

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 洛神葉萃取物及其功能性成份調控肝臟脂質代謝之研 *
* 名稱 : 究 *
* ***** *

執行計畫學生： 吳美鳳
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-035-B
研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月
指導教授： 林慧萱

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 106年03月30日

目錄

摘要.....	1
第一章、研究動機研究問題.....	3
第二章、文獻回顧與探討.....	4
2.1. 脂肪肝(Fatty liver disease).....	4
2.2. 肝臟脂質代謝(Hepatic lipid metabolism).....	5
2.3. 洛神葉(<i>Hibiscus sabdariffa</i> leaf).....	7
第三章、實驗架構.....	9
第四章、研究方法及步驟.....	10
4.1. 洛神葉多酚(Hibiscus leaf polyphenolic extract, HLP)之製備及成份分析.....	10
4.1.1. 多酚萃取物HLP之製備.....	10
4.1.2. 總多酚含量測定(Total phenolic content assay).....	10
4.1.3. 總黃酮含量測定(Total flavonoid content assay).....	10
4.1.4. 總花青素含量測定(Total anthocyanin content assay).....	11
4.1.5. 高效能液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)分.....	12
4.2. 實驗細胞培養(Cell culture).....	13
4.2.1. 細胞培養條件.....	13
4.2.2. 儲存細胞.....	13
4.2.3. 解凍細胞.....	14
4.2.4. 細胞加藥.....	14
4.3. 細胞生長分析(Cell growth assay).....	14
4.4. 油紅O染色(Oil red O staining).....	15
4.5. 尼羅紅染色和定量試驗(Nile red staining and quatitation).....	15
4.6. 細胞西方墨點法(Cellular Western blotting).....	16
4.6.1. 蛋白質萃取與定量.....	16
4.6.2. 西方墨點法.....	17
4.7. 統計分析.....	18
第五章、結果與討論.....	19
5.1. 探討 HLP 之成份功能性成份.....	19
5.2. 探討以不同濃度的 OA 或 ECG 處理 HepG2 細胞存活之影響.....	19
5.3. 探討 ECG 對於 OA 誘導 HepG2 細胞脂質堆積之影響.....	20
5.4. 探討 ECG 對於 OA 誘導 HepG2 細胞膽固醇合成相關調控蛋白表現之影響... 21	
5.5. 探討 ECG 對於 OA 調控 HepG2 細胞內 AMPK 路徑之影響.....	21
5.6. 總結.....	22
第六章、參考文獻.....	23
第七章、附圖.....	26

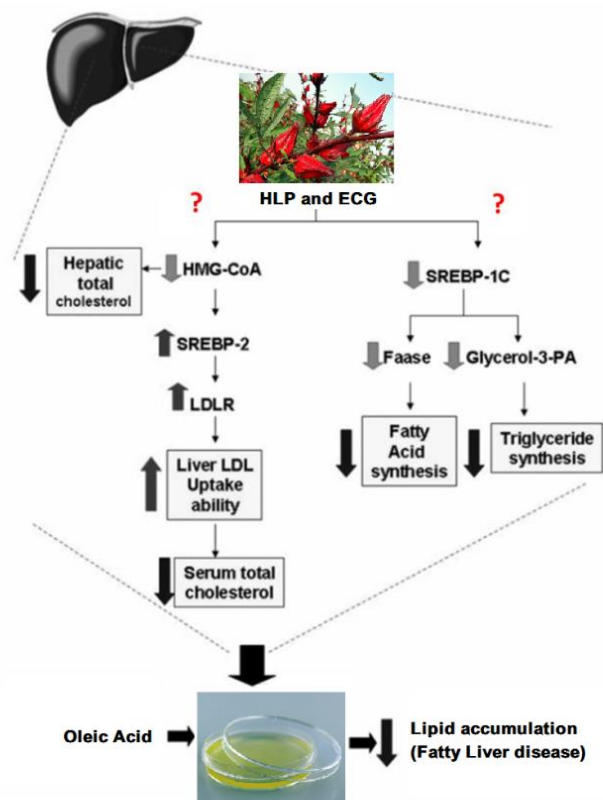
摘要

脂肪肝 (fatty liver disease) 是由於肝臟脂質代謝 (hepatic lipid metabolism) 異常引起肝細胞內脂肪堆積過多的疾病，成為僅次於病毒性肝炎的第二大肝病。近年來，找尋有效降低肝臟脂肪堆積的天然物質來治療脂肪肝已成為當前研究發展的重點。過去已有研究指出，洛神葉 (*Hibiscus sabdariffa* leaf) 具有降血脂、降血糖、抗氧化與誘導腫瘤細胞凋亡的作用。因此，本研究主題欲進一步探討洛神葉多酚萃取物 (*Hibiscus* leaf polyphenolic extract, HLP) 其主要的功能性成分是否具有調控肝臟脂質代謝的功效。首先進行 HLP 之成份分析，確認 HLP 為富含類黃酮 (flavonoid) 之萃取物，其中以表兒茶素沒食子酸酯 (epicatechin gallate, ECG) 含量最多。後續以油酸 (oleic acid, OA) 誘導人類肝臟 HepG2 細胞脂肪堆積作為實驗模式，探討 ECG 是否具有減緩肝細胞脂質堆積的作用及釐清其中分子機制。藉由油紅 O 染色以及尼羅紅染色分析結果顯示 ECG 無細胞毒性之劑量可降低 OA 所誘導 HepG2 細胞脂肪堆積的表現，進一步利用西方點墨法分析證實 ECG 可以抑制肝細胞內脂質生成 (lipogenesis) 反應之相關調控蛋白 (包含：HMGCoA reductase、SREBP1/2 等) 的表現及增加脂質代謝作用，藉此減少肝細胞內脂肪堆積。總結，洛神葉多酚功能性成份之 ECG 具有抑制脂肪肝作用之潛力。

關鍵字：脂肪肝(fatty liver disease)、肝臟脂質代謝(hepatic lipid metabolism)、洛神葉多酚萃取物(*Hibiscus* leaf polyphenolic extract, HLP)、表兒茶素沒食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)、脂質生成(lipogenesis)

第一章、研究動機與研究問題

近年來，臨床調查統計發現全球約有 20% 的人口罹患脂肪肝(fatty liver disease)，隨著世界經濟發展，脂肪肝的病例有逐漸年輕化與比率快速增加的趨勢，且脂肪肝可能演變成慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌而更加危害人體健康。過去研究顯示洛神葉(*Hibiscus sabdariffa* leaf) 具有降血脂、降血糖、抗氧化與促進腫瘤細胞凋亡的作用。因此，本計劃將進一步探討洛神葉萃取物質，包含洛神葉多酚 (*Hibiscus* leaf polyphenolic extract, HLP) 與其主要的功能性成分表兒茶素沒食子酸酯(epicatechin gallate, ECG) 是否具有能夠有效減緩肝臟脂肪堆積的功效，期許對於脂肪肝等相關疾病能有所助益。



第二章、文獻回顧與探討

2.1. 脂肪肝(Fatty liver disease)

2.1.1. 定義

脂肪肝(fatty liver disease)為一臨床之綜合病理表現，由肝臟細胞積聚脂肪而形成[1]。當飲食攝取的脂肪多過人體所能應付時，肝臟便會漸漸積聚脂肪組織。一般定義為肝臟內囤積之脂肪含量高過其總量 5% 以上，此情況便為脂肪肝。一般情況下，依照形成原因可分為酒精性肝病(alcoholic fatty liver disease, AFLD)與非酒精性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)，分類依據在於前者前一天酒精攝取在 20 公克以上，而後者則無。本研究主要探討為 NAFLD 之範疇。

2.1.2. 非酒精性肝病(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)

NAFLD 是一種漸進性的複合肝臟疾病，始於肝臟內脂肪的積聚，而這種脂肪積聚並非過量酒精導致。這一疾病與代謝綜合症（肥胖、胰島素抵抗與血脂異常）密切相關。脂肪肝病通常是緩慢但漸進發展，大多數 NAFLD 患者肝臟內積蓄脂肪，表現出良性的臨床進程。然而，如果不予以治療，NAFLD 會發展為嚴重的疾病，如非酒精性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)，可能惡化為肝纖維化(hepatic fibrosis)、肝硬化(cirrhosis)，某些情形下甚至發展成肝癌[2,

3]。研究發現氧化壓力、脂肪變性和發炎反應是造成 NAFLD 的重要因素[4, 5]，而飲食上的調整如降低脂肪及碳水化合物的攝取或補充抗氧化劑來降低氧化壓力，進而降低發炎或纖維化的發生，則有助於預防或改善 NAFLD，因此經由開發保健食品的研究來發展脂肪肝之預防具有其可行性[6]。

2.2. 肝臟脂質代謝(Hepatic lipid metabolism)

肝臟脂質代謝包含肝臟脂質生成(lipogenesis)與分解(lipolysis)兩種作用，人體肝細胞內脂質含量由此二者相互調節來決定。人體內的脂質(lipids)主要包括膽固醇(cholesterol)、三酸甘油酯(triglyceride, TG)、磷脂質(phospholipid)以及游離脂肪酸(free fatty acid, FFA)。脂質對於人體具有相當重要的生理功能，除了作為熱量來源外，亦提供體內必需脂肪酸、協助脂溶性維生素的吸收、作為合成細胞膜及體內荷爾蒙之重要成份及參與人體內多種代謝作用，其來源可藉由外在的飲食中攝取與內在的肝臟代謝合成作用中產生。人體空腹時，肝臟脂質內生性合成(de novo lipogenesis, DNL)佔肝臟 TG 成分中很少比率，但是在胰島素阻抗及非酒精性肝病患者之情況下則會增加[7]。在 DNL 合成過程中，需要許多酵素參與反應，其中蛋白激酶 AMP-activated protein kinase (AMPK)為合成作用之上游調控蛋白。AMPK 為人體內能量代謝之重要調控分子，藉由調控細胞代謝途徑來

調節全身能量的平衡，一旦察覺體內能量過低時會藉由磷酸化調控蛋白進而打開 ATP-producing pathway，例如：脂肪酸氧化[8]，同時也會關上 ATP-consuming anabolic pathway，例如：脂肪生成作用。在肝臟中，活化的 AMPK 會抑制脂肪及膽固醇的合成並促進分解[9]，藉由調控多種酵素蛋白，例如：HMGCoA reductase (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase)、SREBPs (sterol regulatory element-binding proteins)等使得膽固醇、FA 及 TG 的合成受到抑制。HMGCoA reductase 為一種位於內質網上的膜蛋白，在膽固醇合成過程中扮演重要角色[10]，細胞可藉由 HMGCoA reductase mRNA 的轉錄作用(transcription)、阻礙其轉譯作用(translation)、加速此酵素的降解(degradation)及活性(activity)的調節，以達成負回饋調節來維持細胞內膽固醇的恆定，因此活化的 AMPK 會藉由抑制 HMGCoA reductase 的表現來減少膽固醇的合成。SREBPs 則為調節人體內脂肪酸及膽固醇生成的轉錄因子[11]，而活化的 AMPK 也會經由抑制 SREBPs 的表現來抑制脂肪酸及膽固醇的生成。另外，低密度脂蛋白受器(low density lipoprotein receptor, LDLR)普遍位於人體肝細胞膜的表面。可結合血液循環中的 LDL-C 粒子，並將其帶入肝細胞內，並進一步地代謝分解膽固醇，這是調控血中膽固醇濃度的主要途徑。若 LDLR 基因發生突變，則肝細胞表面將只剩下一半具正常功能的 LDLR；其廓

清血液循環中的低 LDL-C 的能力也下降一半，也將影響肝臟代謝膽固醇之功能[12]。

2.3. 洛神葉(*Hibiscus sabdariffa* leaf)

2.3.1. 洛神葉多酚(*Hibiscus* leaf polyphenolic extract, HLP)

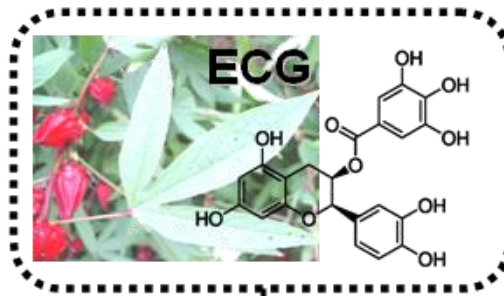
洛神名稱是由英名 Roselle 音譯而來，學名為 *Hibiscus sabdariffa*，又稱「玫瑰茄」、「洛神葵」、「洛神果」、「山茄」、「洛濟葵」，其為錦葵科(Malvaceae)木槿屬一年生草本植物或多年生灌木，生長於熱帶和亞熱帶地區，洛神花萼在東南亞地區常被當作藥用植物使用。傳統中藥藥理上，洛神花具有清熱解渴、降血壓、補血、促進陳代謝、利尿等作用。進一步研究顯示洛神花萃取物中含有類黃酮(flavonoids)、原兒茶酸(protocatechuic acid, PCA)和花青素(proanthocyanidins)等成分，而這些有效成分則具有有抗菌(antibacterial)、抗氧化(antioxidant)、肝腎的保護、抗糖尿病以及降血壓等功能[13]。並在動物模式中發現洛神花多酚萃取物可以抑制高血糖(hyperglycaemia)及高血脂(hyperlipidemia) [14, 15]。但目前的研究大多關注在花萼的部分，相較之下，關於洛神葉的研究便為少數。近年來，我們實驗室研究也發現洛神葉富含類黃酮等多酚(polyphenol)成分，多酚是植物中化學物質的統稱，結構中含有多個酚基團。多酚化合物的共同特點是具有良好的抗氧化活性以及清除自由基(free

radical)的能力。有研究證實洛神葉多酚萃取物(*H. sabdariffa* leaf polyphenolic extract, HLP)可以促進癌細胞走向凋亡[16]、以及具有抗氧化和抑制由氧化型低密度脂蛋白誘發泡沫細胞(foam cell)形成[17]等多種的功能。因此我們擬探討 HLP 對於肝細胞是否具有調控脂質代謝之效果。

2.3.2. 表兒茶素沒食子酸酯(Epicatechin gallate, ECG)

許多茶葉內含有酚類化合物及其衍生物質統稱為茶多酚(tea polyphenols)，茶多酚是以黃烷醇(flavanols)衍生出，約佔茶葉10-30%。茶多酚中對人體最有用的物質為兒茶素類(catechins)，其總量佔了茶多酚總量的70%。兒茶素類經證實與促進人體達到抗氧化、防止老化、防齲齒、抗癌、抗菌、抗病毒、保護心血管等功效有密切的關係[18-20]。兒茶素類可細分以下兩大類：游離型態及酯化沒食子酸，後者包括表兒茶素沒食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)，且含量高於前者。研究報告指出兒茶素的特有化學結構能幫助身體清除自由基，而清除的效率決定於兒茶素的結構中羥基(OH)的數量，羥基愈多效率愈高[21]。

第三章、實驗架構



OA-induced cell model



1. Cytotoxicity analysis
 - Cell counting
2. Cellular lipid accumulation assay
 - Oil red O stain
 - Nile red stain and quantization
3. Signal transduction assay
 - Western blotting
 - Inhibitory assay

第四章、研究方法及步驟

4.1. 洛神葉多酚(*Hibiscus* leaf polyphenolic extract, HLP)之製備及成份分析

4.1.1. 多酚萃取物 HLP 之製備

秤取 100 克乾燥洛神葉，攪拌至粉末狀。以 300 ml 甲醇在 50°C (水浴)中萃取 3 小時過濾，連續三次，收集濾液，於減壓濃縮乾燥後溶解於 50°C 500 ml 二次水。然後以 200 ml 己烷移除色素，分層之水層以 180 ml 乙酸乙酯萃取三次，再於減壓濃縮乾燥後溶解於 300 ml 二次水，最後進行冷凍乾燥為粉末。HLP 之產率約為 2.5%。

4.1.2. 總多酚含量測定(Total phenolic content assay)

測定酚的含量，以 gallic acid (GA) (mg/kg)為標準品(standard)，甲醇溶解後分別取不同的量，以甲醇稀釋補足 1 ml 後，各加 0.5 ml 之 2N Folin-Ciocalteu phenol reagent 後搖勻，再加 3 ml Na_2CO_3 (200 g/L)搖勻，並於室溫靜置 15 分鐘後，加 5 或 10 ml 去離子水後搖勻，以 1250×g 離心 5 分鐘，在波長 725 nm 下測吸光值(甲醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線，並計算回歸方程式。樣品泡好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算酚的含量。

4.1.3. 總黃酮含量測定(Total flavonoid content assay)

測定黃酮的含量，以 rutin (mg/ml) 為標準品。甲醇溶解後分別取不同的體積，以 30% 乙醇稀釋並補足體積至 10 ml 搖勻。接著各加 0.3 ml 之 1M NaNO₃ 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。再加 0.3 ml 之 10% AlNO₃ 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。最後加入 4 ml 之 4% NaOH 溶液混合均勻，補 0.4 ml 去離子水至刻度，放置 15 分鐘。在波長 510 nm 下測吸光值 (乙醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線。並計算回歸方程式。樣品泡好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算黃酮的含量。

4.1.4. 總花青素含量測定(Total anthocyanin content assay)

花青素通常微弱酸性，在酸性環境下可以形成穩定的 flavylium 陽離子構造。本次實驗採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，精確定量待測樣品，得體積 V，並從中吸取 2 ml 試樣，經適當稀釋以濃鹽酸或氫氧化鈉溶液調 pH，使一份 pH 為 1.0，另一份 pH4.5。兩份稀釋液分別以分光光度計測其在 520 nm 的吸光值，得 A₁ (pH 1.0 者) 與 A₂ (pH 4.5 者)，再以下列公式計算每 100 克水果中所含總花青素毫克數。

總花青素含量(mg 花青素/100 mg 萃取物):

$$\frac{(A_1 - A_2) \times F \times MW \times V \times 100}{\epsilon \times \omega}$$

MW: 花青素分子量以 delphinidin-3-diglycoside 之分子量 518.5 計算

V: 總抽出液體積(mL)

F: 稀釋倍數

ϵ : 花青素之莫耳吸光係數(Molecular extinction coefficient)，以 delphinidin-3-diglycoside 在含 0.1% 鹽酸的甲醇溶液之吸光係數 ϵ 值 301.6 計算。

ω : 水果總重(g)

4.1.5. 高效能液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)分析

為使 HPLC 製備固定標準化，實驗利用 HPLC 鑑定其多酚成份。使用 12 個多酚標準品：1. ellagic acid、2. PCA、3. catechin、4. epicatechin、5. caffeic acid、6. EGCG、7. ECG、8. p-coumaric acid、9. naringenin、10. ferulic acid。分析條件為用 C-18 reverse-phase column (5 μm , Hypersil ODS, 200 mm X 2.1 mm)，將 HPLC 過濾(0.45 μm)後，取 20 μl 注入 HPLC，mobile phase 為 A：acetonitrile；B：0.5% glacial acetic acid in water；C：isopropanol；0-5 min 為 100% B；5-15 min 為 5% A、95% B；15-22 min 為 1% A、96% B、3% C；22-24 min 為 5% A、

90% B、5% C；24-30 min 為 100% A，monitored at 290 nm。

4.2. 實驗細胞培養(Cell culture)

4.2.1. 細胞培養條件

本實驗以人類肝細胞株 HepG2 作為實驗對象，並在 MEM (mimimum essential medium eagle) 為基底之培養基中進行培養。MEM 中需另外添加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、0.1 mM non-essential amino acids (NEAA)、2.2 g/L sodium bicarbonate、2 mM L-glutamine 以及 1.0 Mm sodium pyruvate 作為共同培養。等待細胞長滿培養基後，將繼代分盤並將細胞置於 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中，每兩天換一次培養液，並在無菌操作環境下進行操作。

4.2.2. 儲存細胞

待細胞長滿培養基後，以 PBS 潤洗細胞兩次，加入 1x 胰蛋白酶 (trypsin)，之後置於 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中反應 10 分鐘，讓細胞自培養基壁上脫落，再以適量培養液終止胰蛋白酶反應，將細胞液吸入離心管中進行離心 1000 rpm/5 min，倒掉上清液後用已加入 7% DMSO (dimethyl sulfoxide) 之培養液將細胞均勻打散，分裝至冷凍小管中，再將冷凍小管放置 4°C 冰箱 10 分鐘、-20°C 冰箱 30 分鐘及 -80°C 中 overnight，次日將冷凍小管放入液態氮桶中儲存。

4.2.3. 解凍細胞

將 HepG2 細胞之冷凍小管由液態氮桶中取出，快速移至 37°C 水浴槽中解凍，將解凍後之管內細胞移入裝有培養液之離心管中離心 1000 rpm/5 min 後，倒掉上清液，以培養液將細胞均勻打散，之後將打散之細胞放入 75T flask 中，置於 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中培養。

4.2.4. 細胞加藥

將細胞培養於 6-well 中，且每個 well 以細胞計數方式確認所種下之細胞數皆相等，每個 well 中種入 5×10^5 個細胞，待細胞完全貼壁且型態完全後，以 PBS (phosphate-buffered saline) 潤洗細胞，之後加入 starvation medium (即不含有 10% FBS 的培養液)，再放回 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中；放置 24 小時後，再次以 PBS 潤洗細胞，並將培養液換回有添加 10% FBS 的培養液，每個 well 中各加入 0.6 mM 油酸(oleic acid, OA)，且油酸必須先和 BSA (bovine serum albumin) 混合，之後分別加入不同劑量之 ECG (0、0.04、0.2、0.4、2、4 μ M)，於 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中繼續培養 24 小時。

4.3. 細胞生長分析(Cell growth assay)

在無菌操作環境下，將以 ECG 處理過的細胞除去舊培養液後，

加入適量胰蛋白酶，置於 37°C 的溫箱中反應約 10 分鐘，確認將細胞自培養基壁上脫落後，再加入適量培養液終止胰蛋白酶反應，並以 trypan blue 將細胞染色，在光學顯微鏡下使用細胞計數盤進行計數，比較各組細胞生長情形。

4.4. 油紅 O 染色(Oil red O staining)

Oil red O 為一種蘇丹染劑，對於脂肪有強烈親和力，能在中性脂肪中溶解使之呈色，藉由染色後的紅色表現進行分析得知細胞內脂質之含量，因此 Oil red O 為良好脂溶性染劑。將 oil red O 粉末溶於異丙醇配成 5 mg/ml 之原液，再加入二次水將之稀釋 1.5 倍，之後以 0.22 μm 的過濾膜過濾溶劑。將細胞以 PBS 潤洗 2 次，加入 10% paraformaldehyde 在 37°C 的溫箱中固定 30 分鐘，之後加入過濾過之 oil red O 染劑於室溫下反應 15 分鐘使細胞呈色，再以 PBS 洗去多餘染劑，最後以倒立式顯微鏡進行觀察並拍照記錄，觀察結束立即以異丙醇將染劑溶下，並將各組別溶下之染劑分別吸取 1 ml 置入 96 孔盤中，再以 ELISA reader 檢測波長 492 nm 之吸光值，比較脂質染色訊號強弱。

4.5. 尼羅紅染色與定量試驗(Nile red staining and quantitation)

Nile red 為一種親脂性螢光染劑，可以針對脂質進行染色，並在

激發光下顯現出紅色螢光，而螢光強度代表脂質的濃度，藉此得知細胞內脂質含量。將細胞以 PBS 潤洗 2 次，加入 10% paraformaldehyde 在 37°C 的溫箱中固定 30 分鐘，以 PBS 將 Nile red 染劑原液稀釋為 1 $\mu\text{g/ml}$ 並加入使之呈色，室溫下避光反應 5 分鐘，用 PBS 洗去多於染劑，最後以流式細胞儀偵測雷射光 488 nm 所激發之細胞螢光強度並加以分析。

4.6. 西方墨點法(Western blotting)

4.6.1. 蛋白質萃取與定量

將細胞培養於 10 公分 dish 中，待細胞貼壁且型態完全後，以 PBS 潤洗細胞，之後加入 starvation medium，24 小時後，再次以 PBS 潤洗細胞，並將培養液換回有添加 10%FBS 的培養液，加入 0.6 mM 油酸和 BSA 以及不同劑量之 ECG 萃取物培養 24 小時。去除舊的 medium 以 PBS 潤洗後加入適量胰蛋白酶，在 37°C 的溫箱中反應 10 分鐘，將細胞打下並以 1000 rpm/5 min 的轉速離心，除去上清液後加入 1 ml PBS 打散細胞，再以 1000 rpm/5 min 轉速離心後除去上清液，此步驟需重複兩次。之後加入 RIPA buffer (150 mM NaCl、50 mM Tris-base，pH7.5、1% NP-40、0.5% deoxycholic acid 以及 0.1% SDS)後，再加入蛋白酶抑制劑(1 mM sodium orthovanadate、100 μg PMSF 以及 170

µg/ml leupeptin), 以均質機破壞細胞後, 於 4°C 中轉速 1200 rpm/10 min 離心, 保留上清液, 再以 BCA protein assay kit 進行定量分析, 設定 562 nm 檢測吸光值並換算出蛋白濃度, 用以調整蛋白量。

4.6.2. 西方墨點法

以定量出的蛋白濃度來調整蛋白, 將所需的樣品蛋白濃度調整至一致, 並以二次水補至相同體積後加入 loading dye 混合均勻, 將配好的樣品於 100°C 加熱器中加熱 10 分鐘使其變性, 之後在低溫下冷卻 10 分鐘, 離心備用。將樣品注入 SDS 膠體 well 中, 進行 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 電泳分析, 以 60 伏特的電壓電泳約兩小時後, 可將電壓調整至 80 伏特, 依據蛋白中物質分子量不同之特性將其分離。以兩片海綿、兩張濾紙、SDS-PAGE、硝化纖維膜、兩張濾紙、兩片海綿依照順序夾好, 再將夾子放置於轉置槽中, 以電壓 100 伏特轉置 80 分鐘, 使蛋白轉置到硝化纖維膜上。將轉置完成的硝化纖維膜取下, 以麗春紅進行紅染, 剪裁所需檢測蛋白部分, 再以 TBS (tris -buffered saline) 洗去麗春紅, 之後加入 5% blocking buffer (0.5 g 脫脂奶粉溶於 10 ml TBS), 於 4°C 下慢速搖擺 1 小時, 再以 TBS-Tween buffer (含 0.1% Tween-20 的 TBS) wash 三次, 每次 10 分鐘, 之後加入一級抗體於 4°C 下慢速搖擺 overnight。次日回收一級抗體後, 以 TBS-Tween buffer wash 三次每次 10 分鐘, 接著

加入對應之二級抗體於 4°C 下慢速搖擺一小時，再以 TBS-Tween buffer wash 三次每次 10 分鐘。最後將顯影劑 ECL 加在硝化纖維膜上，並以冷光儀顯影進行拍攝，最後利用 Image Quant™ LAS 4000 mini 冷光影像分析系統藉由影像深淺差異來進行蛋白質定量，以比較各組差異。

4.7. 統計分析

以 SigmaPlot 10.0 程式軟體分析數據，而 mean \pm SD 表示各組實驗數據，再利用 t-test -Unpaired 來評估各組別間之統計差異。並以*表示 $P < 0.05$ ，**則表示 $P < 0.01$ ，代表各組之間有顯著差異。

第五章、結果與討論

5.1. 探討 HLP 之成份功能性成份

首先，我們進行洛神葉多酚萃取物(*Hibiscus* leaf polyphenolic extract, HLP) 之成份分析，利用 Folin-Ciocalteu 方法測定 HLP 成份中約佔 35.36% 總多酚含量(Table 1)。另一方面，根據 HPLC 之結果顯示：類黃酮(catechin、ECG 和 quercetin = 24.76%)這類多酚占 HLP 成分比例最高，續利用 Jia 方法分析萃取物之總黃酮含量。Table 1 結果顯示：HLP 約莫測得 65.16% 的黃酮測定值。而花青素之純度測定是採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，由分光光度計分析 HLP 之吸光值再經公式換算。而換算出所萃取出 HLP 的花青素純度約有 1.33%。上述成分鑑定試驗證實 HLP 確為富含多酚之萃取物，其中以類黃酮(flavonoid)--表兒茶素沒食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)的成份比例最高(Table-1)。

5.2. 探討以不同濃度的 OA 或 ECG 處理 HepG2 細胞存活之影響

實驗利用人類肝細胞 HepG2 加入油酸(oleic acid, OA)為誘導劑之細胞模式，探討 ECG 抑制肝臟中脂質堆積作用。油酸為 C18:1 單元不飽和脂肪酸，屬於血液中含最多且最容易與甘油酯化成三酸甘油酯積的脂肪酸。首先以 HepG2 細胞處理不同劑量的 OA (0、0.1、0.2、0.5、0.6、0.8、1.0 mM)反應 24 小時，利用顯微鏡觀察及細胞計

數進行生長分析。透過細胞計數試驗分析細胞數量發現，相較於對照組，在加入高濃度 OA (0.8、1.0 mM)的組別對於 HepG2 細胞之生長有較明顯的抑制效果(Fig. 1A)，因此後續實驗選擇對細胞生長無顯著影響的 OA 劑量 0.6 mM 進行肝細胞脂質堆積之研究。此外，以不同濃度的 ECG (0、0.04、0.2、0.4、2、4 μ M)處理 HepG2 細胞並藉由細胞計數試驗進行細胞生長分析，結果發現在高濃度 ECG (4 μ M)對於 HepG2 細胞有較明顯的抑制生長效果(Fig. 1B)，因此後續實驗選擇對細胞生長無顯著影響的 ECG 劑量(< 4 μ M)進行探討。

5.3. 探討 ECG 對於 OA 誘導 HepG2 細胞脂質堆積之影響

培養 HepG2 細胞後，加入 0.6 mM OA 及不同濃度 ECG (0、0.04、0.2、0.4、2 μ M)共同處理 24 小時，利用油紅 O 染色試驗觀察。在顯微鏡下之結果顯示經過 OA 處理後之 HepG2 細胞紅色油滴明顯表現(Fig.2A)，且收取染劑後之量化結果也明顯上升(Fig. 2B)，而加入不同濃度 ECG (0、0.04、0.2、0.4、2 μ M)處理後，可減低細胞中紅色油滴之含量(Fig. 2A)，且量化結果也明顯下降(Fig. 2B)，因此推論 ECG 能有效降低 HepG2 細胞中脂肪堆積之情形。另外，實驗各組別又以尼羅紅染色(Nil red stain)，再藉由流式細胞儀(flow cytometry)偵測其螢光強度來進行細胞內油滴定量分析，判斷其細胞內脂質堆積之含量。結果顯示經 OA 處理的細胞內脂質含量明顯上升，且量化結果也

呈現明顯上升的趨勢(Fig. 2C)，而加入不同濃度 ECG 反應 24 小時後，細胞內之脂質堆積含量明顯下降，其量化結果與上述 Fig. 2B 相互印證(Fig. 2C)，因此確認 ECG 能有效降低由 OA 所誘發之肝細胞中脂肪堆積。

5.4. 探討 ECG 對於 OA 誘導 HepG2 細胞膽固醇生合成相關調控蛋白表現之影響

以 HepG2 細胞加入 0.6 mM OA 及不同濃度 ECG (0、0.04、0.2、0.4、2 μ M)共同處理 24 小時，利用西方墨點法探討膽固醇生合成相關調控分子，例如 HMGCoA reductase、SREBP-1/2 等蛋白表現量在細胞實驗各組有何影響。由實驗結果得知，只加入單獨加入 OA 的誘導組中 HMGCoA reductase、SREBP -1、SREBP-2 蛋白表現與控制組相比明顯增加，而在有 ECG 合併處理的組別中上述調控蛋白的表現量皆有下降的趨勢(Fig. 3A)，量化結果也再度確認此結果(Fig. 3B)，因此推論 ECG 可能藉由降低膽固醇生合成相關調控蛋白的表現來抑制 OA 所誘導肝細胞內脂質生成(lipogenesis)作用。

5.5. 探討 ECG 對於 OA 調控 HepG2 細胞內 AMPK 路徑之影響

同樣培養 HepG2 細胞後，加入 0.6 mM OA 及不同濃度 ECG (0、0.04、0.2、0.4、2 μ M)共同處理 24 小時，以西方墨點法探討脂質調控的上游路徑 AMPK 路徑的影響。實驗結果發現 OA 誘導組的

p-AMPK 與 AMPK 的比值相較於對照組較為下降，而 ECG 試驗組與誘導組相比之比值則有提升(Fig. 4A)，且量化結果與此相符合(Fig. 4B)，因此推斷 ECG 可能藉由促使 AMPK 蛋白磷酸化表現增加，以影響後續參與在脂質代謝路徑相關分子之表現。進一步，實驗仍持續探討有關於在 OA 誘發 HepG2 細胞脂質堆積模式中，ECG 是否調控三酸甘油脂生成及脂肪酸氧化(fatty acid oxidation)相關調控分子。

5.6. 總結

由上述實驗結果發現，ECG 藉由抑制脂質生成相關調控分子的表現，以達到減少 OA 所誘導肝臟脂質堆積的效果(Fig. 5)，另外，有關於脂質分解(lipolysis)作用則需進一步釐清。根據目前的實驗結果，我們提出 ECG 具有抑制脂肪肝病程發展之潛力。

第六章、參考文獻

1. Farrell GC, Wong VW, Chitturi S. NAFLD in Asia--as common and important as in the West. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 10(5): 307-18, 2013.
2. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 7 (4): 195 -203, 2010.
3. Hashimoto E, Tokushige K, Ludwig J. Diagnosis and classification of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Current concepts and remaining challenges. *Hepatol Res*. 45: 20–28, 2015.
4. Paradies G, Paradies V, Ruggiero F, Petrosillo G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 20(39): 14205 -18, 2014.
5. Tekath M, Klotz T, Montoriol PF, Joubert-Zakeyh J, Garcier JM, Da Ines D. Fat-containing lesions of the liver: a pictorial essay. *Diagnostic and Interventional Imaging*. 96(2):201-11, 2015.
6. Ordonez R, Carbajo-Pescador S, Mauriz JL, Gonzalez-Gallego J. Understanding nutritional interventions and physical exercise in non-alcoholic fatty liver disease. *Curr Mol Med*. 15(1):3-26, 2015.
7. Schwarz JM, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr*. 77(1): 43-50, 2003.
8. Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*. 116(7): 1776-83, 2006.

9. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci.* 117:5479-87, 2004.
10. Cohen E, Aviram M, Khatib S, Rosenblat M, Vaya J. Human carotid atherosclerotic lesion protein components decrease cholesterol biosynthesis rate in macrophages through 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase regulation. *Biofactors.* 41(1):28-34, 2015.
11. Madison B. Srebp2: A Master Regulator of Sterol and Fatty Acid Synthesis. *J Lipid Res.* 2016.
12. Jones PH. Expert perspective: reducing cardiovascular risk in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Am J Cardiol.* 102(12A): 41L-47L, 2008.
13. Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. Hibiscus sabdariffa L. - a phytochemical and pharmacological review. *Food Chem.* 165: 424-43, 2014.
14. Peng CH, Yang YS, Chan KC, Wang CJ, Chen ML, Huang CN. Hibiscus sabdariffa polyphenols alleviate insulin resistance and renal epithelial to mesenchymal transition: a novel action mechanism mediated by type 4 dipeptidyl peptidase. *J Agric Food Chem.* 62: 9736-43, 2014.
15. Peng CH, Chyau CC, Chan KC, Chan TH, Wang CJ, Huang CN. Hibiscus sabdariffa polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. *J Agric Food Chem.* 59: 9901-9, 2011.

16. Chia-Liang Lin. The study of inhibitory effect of Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extracts on human prostate cancer cell growth. 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系碩士論文. 2013.
17. Chen JH, Wang CJ, Sheu JY, Lin HH. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extract inhibits LDL oxidation and foam cell formation involving up-regulation of LXR α /ABCA1 pathway. *Food Chem.* 141: 397-406, 2013.
18. Suzuki-Sugihara N, Kishimoto Y, Saita E, Taguchi C, Kobayashi M, Ichitani M, Ukawa Y, Sagesaka YM, Suzuki E, Kondo K. Green tea catechins prevent low-density lipoprotein oxidation via their accumulation in low-density lipoprotein particles in humans. *Nutr Res.* 36(1): 16-23, 2016.
19. Oliveira MR, Nabavi SF, Daglia M, Rastrelli L, Nabavi SM. Epigallocatechin gallate and mitochondria-A story of life and death. *Pharmacol Res.* 29(104): 70-85, 2015
20. Razali N, Mat Junit S, Ariffin A, Ramli NS, Abdul Aziz A. Polyphenols from the extract and fraction of *T. indica* seeds protected HepG2 cells against oxidative stress. *BMC Complement Altern Med.* 15(1): 438, 2015.
21. Karrie Heneman, Sheri Zidenberg-Cherr. Catechins. UC Davis Department of Nutrition. 95616-8669, 2008.

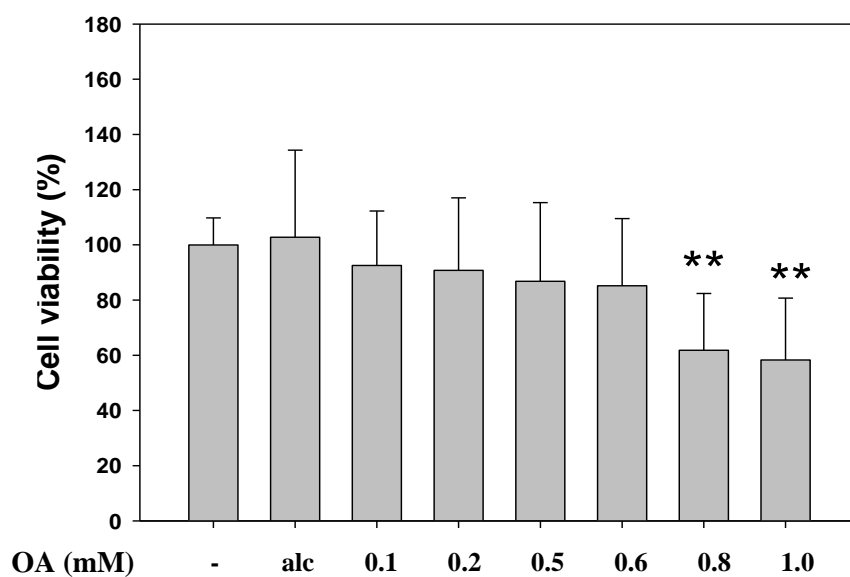
第七章、附圖(表)

Table 1-Composition of HLP

Polyphenolic compound	Peak no.	HLP (%)
Catechin	3	7.40 ± 2.55
ECG	4	16.53 ± 5.58
Ellagic acid	5	10.30 ± 3.40
Ferulic acid	8	0.70 ± 0.29
Quercetin	9	0.83 ± 0.38
Total (HPLC)		35.76
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)		35.36 ± 1.09
Total flavonoid (Jia method)		65.16 ± 9.37
Total anthocyanin (Fuleki and Francis method)		1.33 ± 1.13

Fig. 1

(A)



(B)

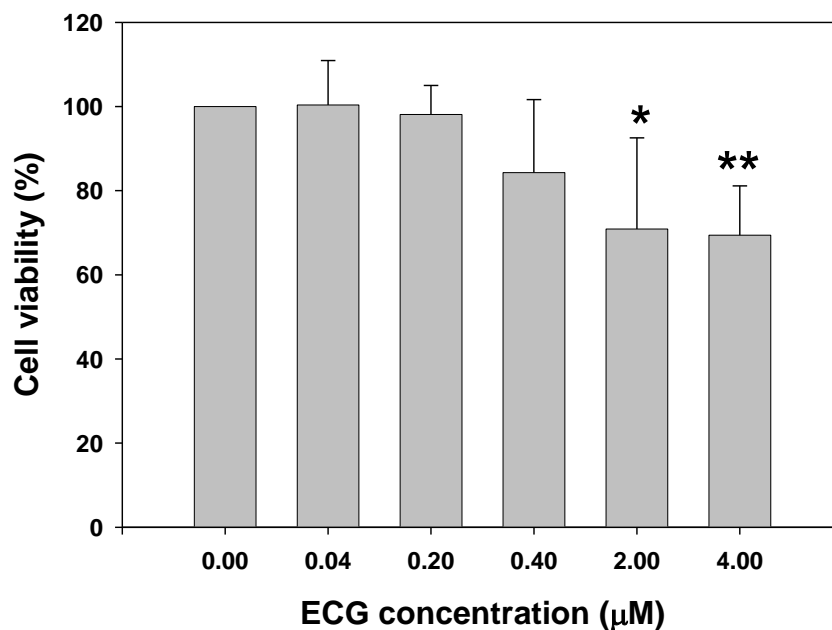
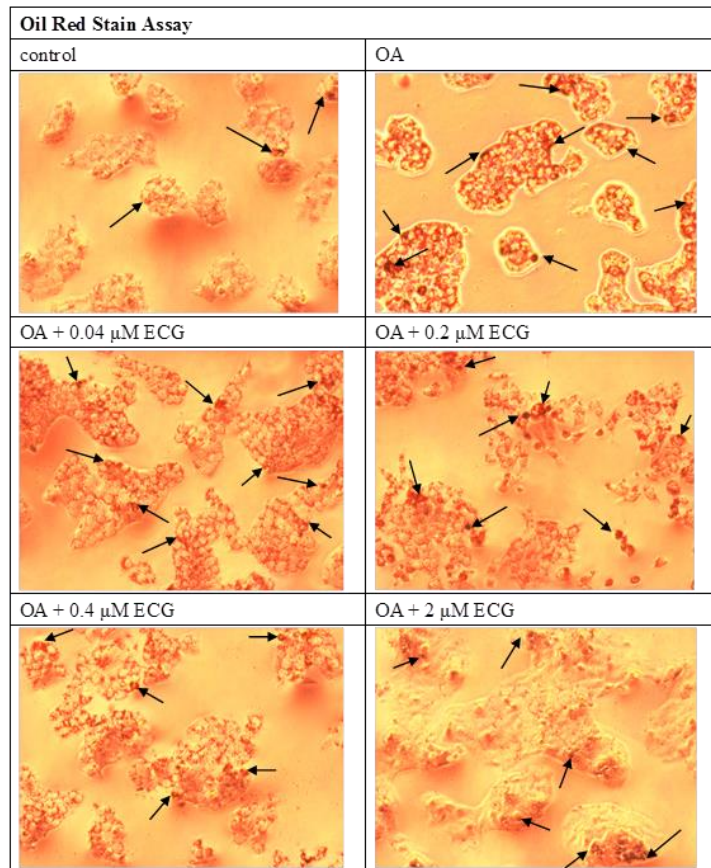


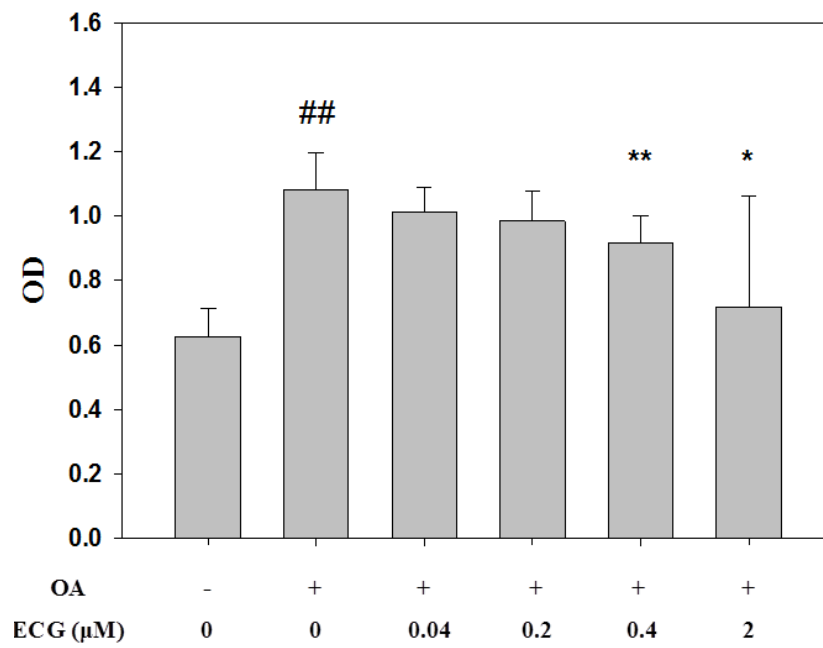
Fig. 1. Effect of ECG or OA on HepG2 cell viability. HepG2 cells were treated with various concentrations of OA (0.1-1.0 mM, A) or ECG (0.04-4 μM, B) for 24 h. Cell viability was analyzed by cell counting assay. The results represent the average of three independent experiments \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

Fig. 2
(A)



(B)

Oil Red Stain



(C)

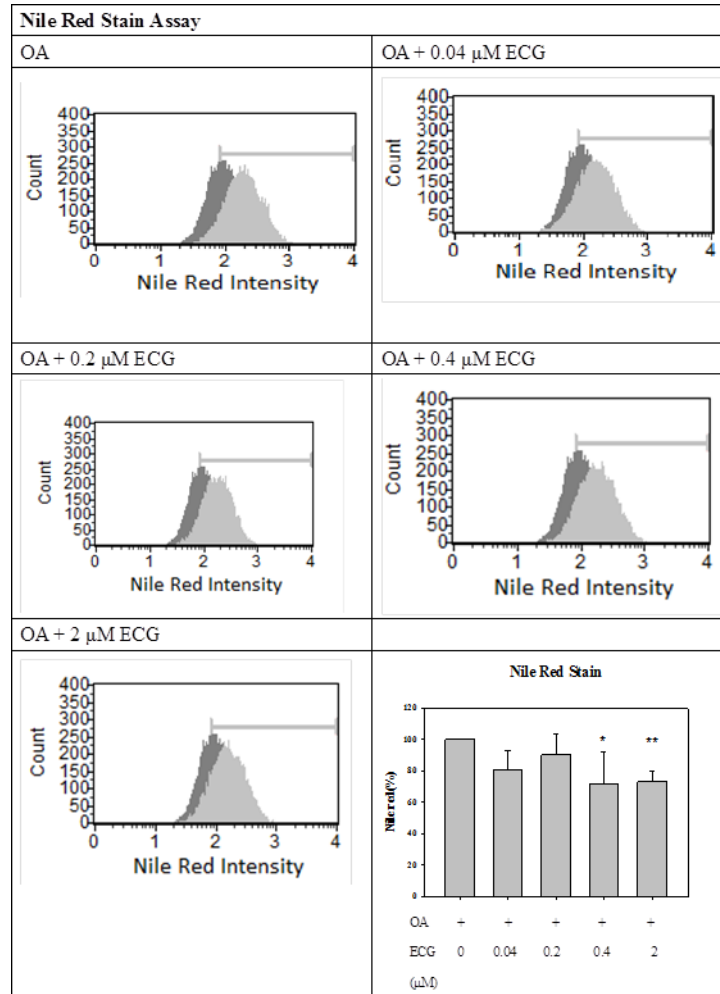


Fig. 2. Inhibitory effect of ECG on the OA-induced lipid accumulation.

(A) HepG2 cells were treated with 0.6 mM of OA in the presence or absence of various concentrations of ECG (0.04-2 μ M) for 24 h. After the incubation, the cells were stained with Oil Red O and then observed under the microscope (200x). The red droplets accumulated in the cells were indicated as the stained lipid. (B) Adding 1 mL of isopropanol to the stained culture dish, the extracted dye was diluted 5x in ddH₂O, and then its absorbance was monitored at 492 nm. (C) Quantification of intracellular fat content with flow cytometric analysis, as assessed by Nile red staining. The quantitative data are presented as means \pm SD of three repeats from three independent experiments. #p < 0.05 compared with the control. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the OA-treated group.

Fig. 3

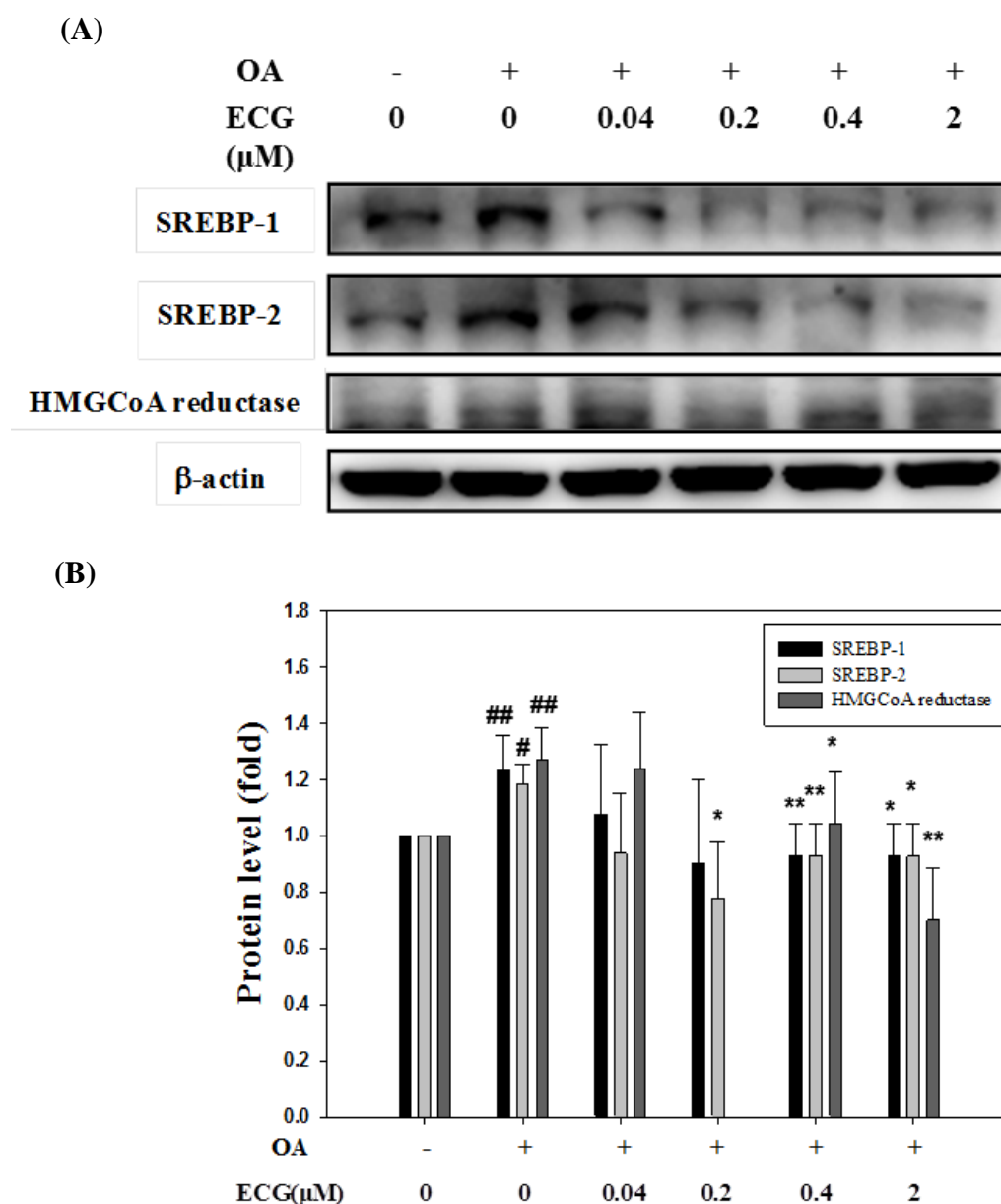
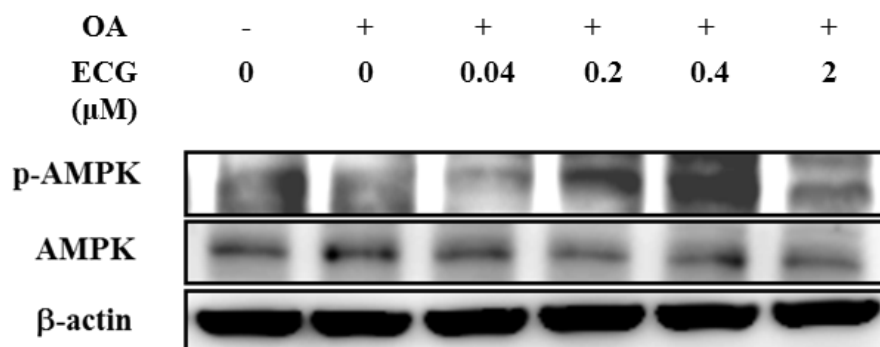


Fig. 3. Effect of ECG on cholesterol biosynthesis-related protein in the OA-treated HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 0.6 mM of OA in the presence or absence of various concentrations of ECG (0.04-2 μM) for 24 h. (A) The protein levels of SREBP-1, SREBP-2, and HMGCoA reductase were determined by Western blotting. β -actin served as an internal control. (B) The quantitative data are presented as means \pm SD of three repeats from three independent experiments. # $p < 0.05$ compared with the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the OA-treated group.

Fig. 4

(A)



(B)

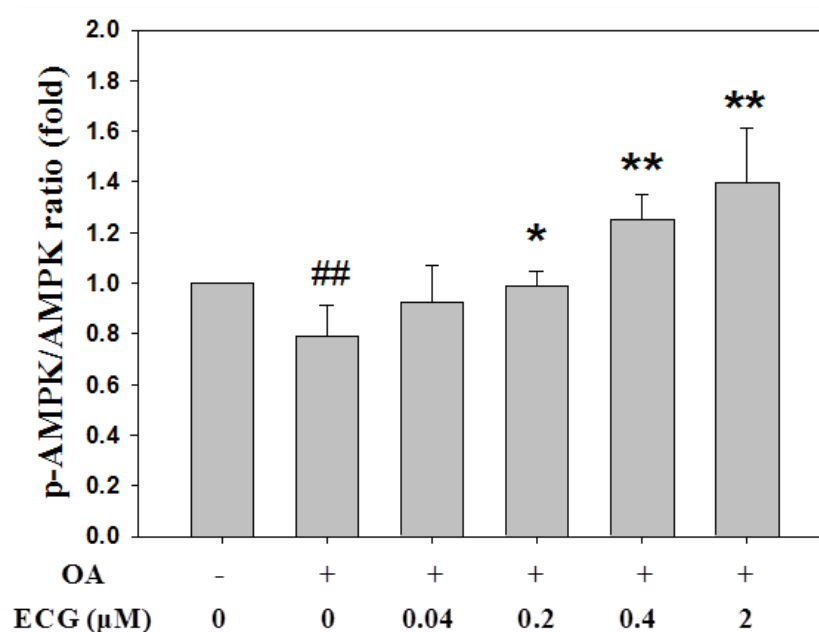


Fig. 4. Effect of ECG on AMPK pathway in the OA-treated HepG2 cells.

HepG2 cells were treated with 0.6 mM of OA in the presence or absence of various concentrations of ECG (0.04-2 μM) for 24 h. (A) The protein levels of p-AMPK and AMPK were determined by Western blotting. β -actin served as an internal control. (B) The quantitative data of p-AMPK/AMPK ratio are presented as means \pm SD of three repeats from three independent experiments. # $p < 0.05$ compared with the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the OA-treated group.

Fig. 5

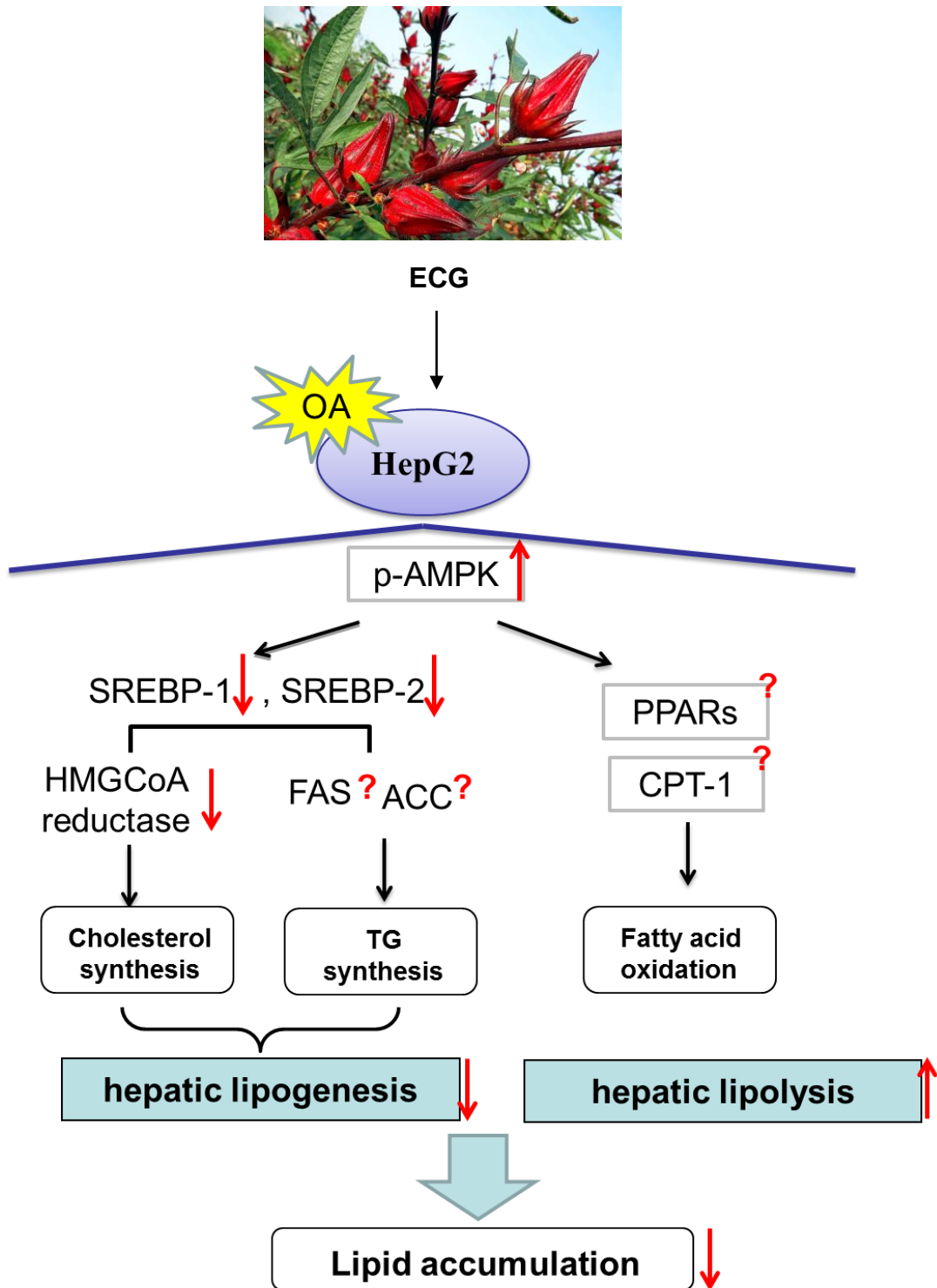


Fig. 5. A proposed model for the inhibitory effect of ECG on hepatic lipid accumulation via downregulation of lipogenesis-regulatory proteins in the OA-treated human hepatocyte HepG2.