

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

台灣土肉桂葉精油及其主要成分於高尿酸血症相關之急、慢性  
病症之抗發炎作用及相關機制之探討(第3年)

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 104-2320-B-040-022-MY3  
執行期間：106年08月01日至107年07月31日  
執行單位：中山醫學大學營養學系(所)

計畫主持人：劉承慈  
共同主持人：李世傑、李健群  
計畫參與人員：碩士級-專任助理：王詩芸  
碩士班研究生-兼任助理：余家瑩  
碩士班研究生-兼任助理：麥庭瑜  
碩士班研究生-兼任助理：張芸瑄  
碩士班研究生-兼任助理：張雅娟  
碩士班研究生-兼任助理：曹悅哲

中華民國 107 年 10 月 31 日

中文摘要：目的：利用尿酸鈉結晶(MSU)誘發之痛風性發炎反應及高尿酸飲食誘發血中sUA上升之動物模式觀察枷羅木醇型台灣土肉桂葉精油(TC)及其主要活性成分枷羅木醇(Lin)和肉桂醛(Cin)預防急性痛風發作及慢性高血尿酸共病症之效果及其抗發炎作用在其中所扮演的角色，以利開發土肉桂於防治高尿酸血症相關之急、慢性病症的用途。方法：以雄性C57BL/6小鼠利用腹腔內注射MSU誘發痛風性發炎模式或餵食含有2% (w/w) potassium oxonate及3% (w/w) uric acid之高尿酸飲食為模式，其中在注射MSU前或餵食高尿酸飲食期間，各組小鼠每隔一日接受口胃管灌食載劑玉米油 (2 ml/kg)、TC (13 mg/kg)、Lin與Cin (5.2 mg/kg Lin + 0.9 mg/kgCin)、Lin (2.6或5.2 mg/kg)、Cin (0.45或0.9 mg/kg)、allopurinol (5 mg/kg)、colchicine (1.5 mg/kg)，共灌食八次。結果：在不影響小鼠基本代謝參數的劑量下，TC個別或組合其活性成分枷Lin和Cin顯著抑制MSU誘發局部浸潤之嗜中性球數目、腹膜MPO活性及抑制NETs形成，改善血中的痛風性發炎指標MPO活性和TGF- $\beta$ 1濃度，且抑制注射MSU造成之腎臟和脾臟nitrate/nitrite，IL-1 $\beta$ 及/或TNF- $\alpha$ 上升。其抗痛風性發炎的效果與抑制MSU誘發巨噬細胞釋放IL-1 $\beta$ 及降低sICAM-1、CXCL-1和CD14之產生有關。分子層次的觀察顯示其抗發炎作用與抑制胞內發炎訊號分子TLR2、MyD88、NLRP3、ASC及caspase-1之表現量，以及抑制NLRP3發炎體活化有關。此外，在高尿酸飲食餵食的小鼠介入TC及其活性成分可透過抑制肝臟xanthine oxidase活性及在腎臟抑制URAT1且促進OAT1和OAT3表現量幫助降低血尿酸值。透過在胰島素標的組織降低IL-1 $\beta$ 或TNF- $\alpha$ ，TC及/或其活性成分能改善胰島素阻抗，此反映於改善之空腹及OGTT期間血中c-peptide含量，並能抑制腎臟中的IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量及改善腎臟超過濾問題。這些成分在脂肪組織及腎臟之抗發炎作用也與抑制胞內發炎訊號分子TLR2，MyD88，ASC，和caspase-1 p20表現量有關。此外，其在血液中可逆轉高尿酸誘發之nitrate/nitrite濃度下降也或是改善高尿酸飲食造成腎臟超過濾的機制。整體而言，本研究之發現建議枷羅木醇型台灣土肉桂葉精油在防治高血尿酸相關急、慢性共病症發展之保健功效及臨床應用價值且也驗證枷羅木醇和肉桂醛為其活性成分。

中文關鍵詞：土肉桂；葉精油；枷羅木醇；肉桂醛；尿酸鈉結晶；細胞激素；化學激素；黏性分子；巨噬細胞；嗜中性球；腹膜灌洗液；痛風；發炎；小鼠；腎臟；脾臟；血漿；高血尿酸症；胰島素阻抗；allopurinol；caspase-1；colchicine；c-peptide；potassium oxonate；ASC；MyD88；MPO；NETs；NLRP3；OAT3；sCD14；TLR2；URAT1

英文摘要：Aim: To investigate the preventive effect of leaf essential oil from *Cinnamomum osmophloeum*. Kaneh (TC) and two of its active compositions, linalool (Lin) and cinnamylaldehyde (Cin), on hyperuricemia-associated comorbidities in mice. The role of anti-inflammatory activity of these cinnamon compositions was also clarified. Methods: Male C57BL/6 mice were either injected intraperitoneally with monosodium urate crystals (MSU) or fed with hyperuricemic diet containing 2% (w/w) potassium oxonate and 3% (w/w) uric

acid, in which mice were gavaged corn oil (2 ml/kg), TC (13 mg/kg), Lin plus Cin (5.2 mg/kg Lin + 0.9 mg/kg Cin), Lin (2.6 or 5.2 mg/kg), Cin (0.45 or 0.9 mg/kg), allopurinol (5 mg/kg) or colchicine (1.5 mg/kg) every other day for eight times before the injection of MSU or during hyperuricemic diet-treatment period. Results: None of these compositions affect metabolic parameters of the mice. TC and Lin and Cin alone and/or in combination significantly inhibited MSU-induced neutrophil infiltration, the elevation of intraperitoneal MPO activity and the formation of NETs along with ameliorated indicator of gouty inflammation, namely MPO activity and TGF- $\beta$ 1 concentration in plasma. These compositions also inhibited MSU-injection induced elevation of nitrate/nitrite, IL-1 $\beta$ , and/or TNF- $\alpha$  in kidney and spleen. These anti-gouty inflammation effects were associated with reduced IL-1 $\beta$  secretion from MSU-stimulated macrophages and lowered production of sICAM-1, CXCL-1, and CD14. Molecular level investigation suggested that the anti-gouty inflammation effects of these compositions can be attributed to suppressed expression of TLR2, MyD88, NLRP3, ASC, and caspase-1, and suppressed activity of NLRP3 inflammasome. On the other hand, TC and Lin and Cin alone and/or in combination tend to reduce blood uric acid concentration via inhibition of hepatic xanthine oxidase activity and renal expression of URAT1 while promote renal expression of OAT1 and OAT3. The compositions also ameliorated insulin-resistance by reducing levels of IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  in insulin target tissues reflected by significantly lowered fasting plasma c-peptide concentration and that accumulated during OGTT period. In addition, these compositions also ameliorated glomerular hyperfiltration along with suppressed renal contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . The ameliorated insulin sensitivity and glomerular hyperfiltration was also associated with inhibited expression of TLR2, MyD88, ASC and aspase-1 p20 in adipose tissue, an insulin target tissue, and in kidney. Furthermore, the ameliorated renal function by these compositions may also be attributed to reversed plasma level of nitrate/nitrite. In summary, the finding of the present study suggested the usefulness of TC on prevention of hyperuricemia-associated comorbidities and provided evidences that linalool and cinnamaldehyde are active compositions of TC for such use.

英文關鍵詞：adhesion molecules; allopurinol; caspase-1; chemokine; cinnamaldehyde; Cinnamomum osmophloeum Kanehira; colchicines; c-peptide; cytokines; leaf essential oil; gout; hyperuricemia; inflammation; insulin resistance;

kidney; linalool; macrophages; mice; monosodium urate  
crystal; neutrophils; peritoneal lavage; plasma; potassium  
oxonate; spleen; ASC; MyD88; MPO; NETs; NLRP3; OAT3; sCD14;  
TLR2; URAT1

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

## 台灣土肉桂葉精油及其主要成分於高尿酸血症相關之急、慢性病症之抗發炎作用及相關機制之探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2320-B-040 -022 -MY3

執行期間：104年08月07日至107年07月31日

執行機構及系所：中山醫學大學營養系

計畫主持人：劉承慈

共同主持人：李世傑、李健群

計畫參與人員：碩士級-專任助理：王詩芸

碩士班研究生：余家瑩

碩士班研究生：麥庭瑜

碩士班研究生：張芸瑄

碩士班研究生：張雅娟

碩士班研究生：曹悅哲

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，\_\_\_\_\_（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

中華民國 107 年 10 月 31 日

## 中文摘要及關鍵詞

**目的:** 利用尿酸鈉結晶(MSU)誘發之痛風性發炎反應及高尿酸飲食誘發血中 sUA 上升之動物模式觀察枷羅木醇型台灣土肉桂葉精油(TC)及其主要活性成分枷羅木醇(Lin)和肉桂醛(Cin)預防急性痛風發作及慢性高血尿酸共病症之效果及其抗發炎作用在其中所扮演的角色,以利開發土肉桂於防治高尿酸血症相關之急、慢性病症的用途。**方法:** 以雄性 C57BL/6 小鼠利用腹腔內注射 MSU 誘發痛風性發炎模式或餵食含有 2% (w/w) potassium oxonate 及 3% (w/w) uric acid 之高尿酸飲食為模式,其中在注射 MSU 前或餵食高尿酸飲食期間,各組小鼠每隔一日接受口胃管灌食載劑玉米油 (2 ml/kg)、TC (13 mg/kg)、Lin 與 Cin (5.2 mg/kg Lin + 0.9 mg/kg Cin)、Lin (2.6 或 5.2 mg/kg)、Cin (0.45 或 0.9 mg/kg)、allopurinol (5 mg/kg)、colchicine (1.5 mg/kg),共灌食八次。**結果:** 在不影響小鼠基本代謝參數的劑量下,TC 個別或組合其活性成分枷 Lin 和 Cin 顯著抑制 MSU 誘發局部浸潤之嗜中性球數目、腹膜 MPO 活性及抑制 NETs 形成,改善血中的痛風性發炎指標 MPO 活性和 TGF- $\beta$ 1 濃度,且抑制注射 MSU 造成之腎臟和脾臟 nitrate/nitrite, IL-1 $\beta$  及/或 TNF- $\alpha$  上升。其抗痛風性發炎的效果與抑制 MSU 誘發巨噬細胞釋放 IL-1 $\beta$  及降低 sICAM-1、CXCL-1 和 CD14 之產生有關。分子層次的觀察顯示其抗發炎作用與抑制胞內發炎訊號分子 TLR2、MyD88、NLRP3、ASC 及 caspase-1 之表現量,以及抑制 NLRP3 發炎體活化有關。此外,在高尿酸飲食餵食的小鼠介入 TC 及其活性成分可透過抑制肝臟 xanthine oxidase 活性及在腎臟抑制 URAT1 且促進 OAT1 和 OAT3 表現量幫助降低血尿酸值。透過在胰島素標的組織降低 IL-1 $\beta$  或 TNF- $\alpha$ , TC 及/或其活性成分能改善胰島素阻抗,此反映於改善之空腹及 OGTT 期間血中 c-peptide 含量,並能抑制腎臟中的 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量及改善腎臟超過濾問題。這些成分在脂肪組織及腎臟之抗發炎作用也與抑制胞內發炎訊號分子 TLR2, MyD88, ASC, 和 caspase-1 p20 表現量有關。此外,其在血液中可逆轉高尿酸誘發之 nitrate/nitrite 濃度下降也能是改善高尿酸飲食造成腎臟超過濾的機制。**結論:** 本研究之發現建議枷羅木醇型台灣土肉桂葉精油在防治高血尿酸相關急、慢性共病症發展之保健功效及臨床應用價值且也驗證枷羅木醇和肉桂醛為其活性成分。

## 關鍵詞

土肉桂;葉精油;枷羅木醇;肉桂醛;尿酸鈉結晶;細胞激素;化學激素;黏性分子;巨噬細胞;嗜中性球;腹膜灌洗液;痛風;發炎;小鼠;腎臟;脾臟;血漿;高血尿酸症;胰島素阻抗;allopurinol; caspase-1;colchicine;c-peptide; potassium oxonate; ASC;MyD88;MPO;NETs;NLRP3; OAT3;sCD14;TLR2;URAT1

## 英文摘要及關鍵詞

**Aim:** To investigate the preventive effect of leaf essential oil from *Cinnamomum osmophloeum*. Kaneh (TC) and two of its active compositions, linalool (Lin) and cinnamylaldehyde (Cin), on hyperuricemia-associated comorbidities in mice. The role of anti-inflammatory activity of these cinnamon compositions was also clarified. **Methods:** Male C57BL/6 mice were either injected intraperitoneally with monosodium urate crystals (MSU) or fed with hyperuricemic diet containing 2% (w/w) potassium oxonate and 3% (w/w) uric acid, in which mice were gavaged corn oil (2 ml/kg), TC (13 mg/kg), Lin plus Cin (5.2 mg/kg Lin + 0.9 mg/kg Cin), Lin (2.6 or 5.2 mg/kg), Cin (0.45 or 0.9 mg/kg), allopurinol (5 mg/kg) or colchicine (1.5 mg/kg) every other day for eight times before the injection of MSU or during hyperuricemic diet-treatment period. **Results:** None of these compositions affect metabolic parameters of the mice. TC and Lin and Cin alone and/or in combination significantly inhibited MSU-induced neutrophil infiltration, the elevation of intraperitoneal MPO activity and the formation of NETs along with ameliorated indicator of gouty inflammation, namely MPO activity and TGF- $\beta$ 1 concentration in plasma. These compositions also inhibited MSU-injection induced elevation of nitrate/nitrite, IL-1 $\beta$ , and/or TNF- $\alpha$  in kidney and spleen. These anti-gouty inflammation effects were associated with reduced IL-1 $\beta$  secretion from MSU-stimulated macrophages and lowered production of sICAM-1, CXCL-1, and CD14. Molecular level investigation suggested that the anti-gouty inflammation effects of these compositions can be attributed to suppressed expression of TLR2, MyD88, NLRP3, ASC, and caspase-1, and suppressed activity of NLRP3 inflammasome. On the other hand, TC and Lin and Cin alone and/or in combination tend to reduce blood uric acid concentration via inhibition of hepatic xanthine oxidase activity and renal expression of URAT1 while promote renal expression of OAT1 and OAT3. The compositions also ameliorated insulin-resistance by reducing levels of IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  in insulin target tissues reflected by significantly lowered fasting plasma c-peptide concentration and that accumulated during OGTT period. In addition, these compositions also ameliorated glomerular hyperfiltration along with suppressed renal contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . The ameliorated insulin sensitivity and glomerular hyperfiltration was also associated with inhibited expression of TLR2, MyD88, ASC and caspase-1 p20 in adipose tissue, an insulin target tissue, and in kidney. Furthermore, the ameliorated renal function by these compositions may also be attributed to reversed plasma level of nitrate/nitrite. **Conclusion:** The finding of the present study suggested the usefulness of TC on prevention of hyperuricemia-associated comorbidities and provided evidences that linalool and cinnamylaldehyde are active compositions of TC for such use.

### Keywords:

adhesion molecules; allopurinol; caspase-1; chemokine; cinnamaldehyde; *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira; colchicines; c-peptide; cytokines; leaf essential oil; gout; hyperuricemia; inflammation; insulin resistance; kidney; linalool; macrophages; mice; monosodium urate crystal; neutrophils; peritoneal lavage; plasma; potassium oxonate; spleen; ASC; MyD88; MPO; NETs; NLRP3; OAT3; sCD14; TLR2; URAT1

目錄	頁碼
中文摘要及關鍵詞	I
英文摘要及關鍵詞	II
目錄	III
報告內容	VII
一、前言	1
二、研究目的	1
三、文獻探討	1
(一)、體內尿酸測定	1
(二)、高尿酸血症和痛風的流行病學	2
(三)、MSU 誘發之急性痛風性發炎反應和作用機制	2
(四)、可溶性尿酸(sUA)誘發之發炎反應及其對於胰島素阻抗和糖尿病發展的影響	4
(五)、台灣土肉桂葉精油目前已知之生物活性及其在高尿酸血症相關病症之可能應用	4
四、研究方法	5
(一)、實驗動物及其處置	5
(二)、無菌尿酸鈉 (MSU) 結晶及土肉桂葉精油製備	6
(三)、高尿酸飼料製備	6
(四)、動物樣品收集及製備	6
(五)、生化分析	7
(六)、流式細胞儀分析	7
(七)、NETs 免疫組織染色	7
(八)、西方墨點法分析	8
(九)、Real-time-PCR	8
(十)、統計分析	9
五、結果與討論	9
實驗一、土肉桂精油及其活性成分於小鼠抗 MSU 誘發急性痛風性發炎之作用及機制	9
(一)、小鼠體重和臟器重特徵	9
(二)、腹膜灌洗液中嗜中性球和單核球/巨噬細胞數	9
(三)、腹膜灌洗液 MPO 活性	9
(四)、血漿、腹膜灌洗液、臟器nitrate/nitrite、IL-1 $\beta$ 和TGF- $\beta$ 1濃度/含量	10
(五)、脾臟和腎臟中 TLR2/4 和 NLRP3 訊號路徑分子表現量及 caspase-1 活性	11



(六)、血漿及腹膜灌洗液中 sCD14、CXCL1 及/或 sICAM 濃度	11
(七)、腹膜灌洗液嗜中性球表面 CD11a/CD11b/CD18 表現量	12
(八)、腹膜灌洗液細胞中 caspase-1 活性和 NF- $\kappa$ B 活性	12
(九)、腹膜灌洗液細胞 NETs-associated elastase 免疫組織染色	12
實驗二、土肉桂精油及其活性成分於 MSU 刺激之小鼠腹腔巨噬細胞抗發炎作用及機制	13
(一)、MSU 結晶刺激之巨噬細胞形態	13
(二)、MSU 刺激巨噬細胞之 nitrate/nitrite、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及 IL-10 釋放量	13
(三)、MSU 刺激之巨噬細胞 NLRP3 和 caspase-1 蛋白質表現量	14
(四)、MSU 刺激之巨噬細胞 TLR4 和 MyD88 蛋白質表現量	14
實驗三、介入土肉桂成分對於高尿酸飲食小鼠血糖代謝及相關共病症之影響及其機制	15
(一)、小鼠代謝值、體重及臟器體重百分比	15
(二)、血清尿酸濃度、尿液尿酸排出量	15
(三)、腎臟尿酸轉運蛋白表現量	15
(四)、肝臟 xanthine oxidase 活性	16
(五)、血中葡萄糖、fructosamine 及 c-peptide 濃度	16
(六)、胰島素標的組織中 nitrate/nitrite 及 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 含量	16
(七)、脂肪組織中 TLR2、MyD88、NLRP3 及 caspase-1 p20 蛋白質表現量	17
(八)、腎功能指標	17
(九)、腎臟中 nitrate/nitrite 及 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 含量	18
(十)、腎臟中 TLR2、MyD88、ASC 及 caspase-1 p20 蛋白質表現量	18
(十一)、血液中 nitrate/nitrite 濃度	18
六、結論與建議	18
參考文獻	20
附表與附圖	25
表一、正常控制組及灌食土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛後注射 MSU 之各組小鼠灌食前、後和誘發後(犧牲前)體重和臟器組織重/體重百分比	26
表二、正常控制組及灌食土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛後注射 MSU 各組小鼠腹膜灌洗液中嗜中性白血球及巨噬細胞/單核球 profile	27
表三、正常控制組及灌食土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛後注射 MSU 各組小鼠血漿、腹膜灌洗液及臟器組織中 nitrate 和 nitrite、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1 濃度或含量	28
表四、正常控制組及灌食土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛後注射 MSU 各組小鼠血漿和腹膜	

灌洗液中sCD14、趨化分子CXCL1及/或黏附分子sICAM濃度 .....	29
表五、有或無添加土肉桂葉精油、枷羅木醇或肉桂醛於預培養液之巨噬細胞在 MSU 刺激下 之 nitrate/nitrite、IL-1 $\beta$ 及 TNF- $\alpha$ 釋放量.....	30
表六、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小鼠 代謝值.....	31
表七、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小鼠 體重及臟器體重百分比.....	32
表八、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小鼠 血尿酸值及尿液尿酸排出量.....	33
表九、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小鼠 血漿中葡萄糖、fructosamine 及 C-peptide 濃度.....	34
表十、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小鼠 各組織/器官中促發炎細胞激素含量 .....	35
表十一、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小 鼠 BUN、血清/尿液 creatinine 濃度及 GFR.....	37
圖一、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腹膜灌洗液中 MPO 活性.....	38
圖二、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠脾臟中 (A) TLR2、(B) TLR4、(C) MyD88 和 (D) MD2 表現量.....	39
圖三、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腎臟中 (A) TLR2、(B) TLR4、(C) MyD88 和 (D) MD2 表現量 .....	40
圖四、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠脾臟中 (A) NLRP3、(B) ASC、(C) Caspase-1 表現量和 (D) caspase-1 活性.....	41
圖五、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腎臟中(A)NLRP3、 (B) ASC、 (C) caspase-1 表現量和(D)caspase-1 活性.....	42
圖六、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腹腔嗜中性球表面 CD11a (A)、CD11b (B) 和 CD18 (C)表現量.....	43
圖七、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腹膜灌洗液細胞核中 NF- $\kappa$ B p65 含量.....	44
圖八、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腹膜灌洗液細胞中 caspase-1 活性.....	45
圖九、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腹膜灌洗液細胞中 NETs-免疫螢光染色.....	46
圖十、MSU結晶刺激小鼠初代腹腔巨噬細胞之細胞形態學.....	47

圖十一、MSU 刺激之小鼠腹腔巨噬細胞 NLRP3 和 caspase-1 蛋白質表現量.....	48
圖十二、MSU 刺激之小鼠腹腔巨噬細胞 TLR4、MD2、MyD88 蛋白質表現量.....	49
圖十三、高尿酸飲食小鼠血漿中尿酸濃度 (A)及 24 小時尿液中總尿酸排除量(B)之變化百分比.....	50
圖十四、高尿酸飲食小鼠腎臟中 URAT1 (A)、OAT1 (B)、OAT3 (C) mRNA 表現量.....	51
圖十五、高尿酸飲食小鼠腎臟中 URAT1 (A)、OAT1 (B)、OAT3 (C)蛋白質表現量.....	52
圖十六、高尿酸飲食小鼠肝臟中 xanthine oxidase 活性.....	53
圖十七、高尿酸飲食小鼠副睪脂肪中 TLR2、MD2 及 MyD88 蛋白質表現量.....	54
圖十八、高尿酸飲食小鼠腎臟中 TLR2、MYD88、ASC、Caspase-1 p20 蛋白質表現量.....	55
圖十九、高尿酸飲食之小鼠血漿中 nitrate/nitrite 濃度.....	56
計畫成果自評 .....	57

## 報告内容

## 一、前言

尿酸是人體分解代謝嘌呤的終產物，當過多嘌呤降解造成尿酸產生增加，加上腎臟廓清尿酸功能不足時，造成尿酸生成及排出間失去動態平衡，即引發血尿酸值升高。高血尿酸若未引發急性關節炎等痛風發作症狀，一般並無表徵，只有當血尿酸濃度過高而形成不溶解尿酸鈉結晶(MSU)造成發炎性損傷方是過去臨床上主要關注的問題。目前已有相當多關於此種非感染性發炎反應的科學研究，利用各種動物模式呈現其主要的病理生理學及細胞機制，並以調控這些機制作為防治痛風之研發策略。然而，臨床上也發現，僅約5-12%高尿酸血症患者最終發展成痛風，雖然過去對於無症狀的高血尿酸者並無積極控制血尿酸值的作為，但近年來流行病學研究結果提出，可溶性尿酸(sUA)是許多高血尿酸常見共病症的致病原因—包括高血壓、胰島素阻抗、代謝症候群、第2型糖尿病、心血管疾病、腎臟疾病等慢性疾病，因而使得sUA在高血尿酸之健康議題近年越來越受到關注。根據歷年國民營養調查，我國高尿酸血症及痛風盛行率偏高且65歲以上的長者之盛行率最高。因此，隨著國人平均壽命增加，高尿酸血症及痛風的防治將成為維護國人健康愈來愈重要的課題。目前醫療上對於不曾發作痛風的高尿酸血症者，主要著重於給予飲食衛教，而對於已發生痛風者，則除了在發作時予以抗發炎治療外，也會建議長期使用某些抗發炎藥物例如秋水仙素及非固醇類抗發炎藥(NSAIDs)做為預防痛風復發之療法，並會處以長期降血尿酸藥物之處方，但許多病人往往因為這類藥物副作用而導致治療中斷或發展其它臨床問題。台灣土肉桂葉是一項便宜且可大量取得的原料，過去已有研究觀察肉桂醛型台灣土肉桂之葉精油降血尿酸及抗發炎作用。本研究PI實驗室過去則發現低劑量枷羅木醇型土肉桂葉精油及其活性成分枷羅木醇和肉桂醛之抗糖尿病作用，且其在以內毒素誘發實驗動物系統性發炎反應中除了改善發炎反應外，也能抑制xanthine oxidase活性，此抗發炎效果可歸因於抑制TLR4、MyD88與NLRP3訊號路徑相關分子表現量及活性。因此，枷羅木醇型土肉桂葉精油及其活性成分具有應用於預防及改善MSU所引起之發炎及改善sUA常見共病症之潛力，本計畫即針對此議題進行研究。

## 二、研究目的

本研究第一、二年期的目的，為利用腹腔注射尿酸鈉(MSU)結晶誘發急性痛風性發炎之小鼠模式，探討灌食不同劑量枷羅木醇型土肉桂葉精油(TC)、枷羅木醇(Lin)及/或肉桂醛(Cin)對於腹腔嗜中性球數量、免疫細胞活化之調節作用，及血液及腹腔灌液中發炎指標濃度，以及與免疫組織/發炎細胞之TLR2、4及NLRP3路徑之訊號分子表現及活化之關係。第三年的目的則是以餵食含potassium oxonate及尿酸之高尿酸飲食之小鼠為模式，探討介入不同劑量TC、Lin/或Cin對於其血糖代謝及腎功能之影響，並觀察血液、胰島素標的組織及腎臟發炎指數及對這些組織/器官中TLR2、4及NLRP3路徑之訊號分子表現及活化之影響。另外，若受測精油及其成分在高尿酸血中能降低血尿酸濃度，則也可間接改善其誘發之血糖異常問題，所以也將觀察其在此模式中對於與腎臟廓清尿酸有關的主要轉運蛋白URAT1、OAT1、及OAT3表現量。

## 三、文獻探討

### (一)、體內尿酸測定

在哺乳類動物，尿酸由普林分解代謝而來，雖然大部分哺乳類動物可經uricase將尿酸降解為allantoin，但人類組織不具uricase，所以尿酸是人類分解代謝普林的終產物。人體普林來源包括內源性和外源性，前者來自胺基酸經核酸合成代謝之產物及胞內核苷酸及其衍生物，而後者來自飲食核苷酸；在代謝及腎功能正常之個體，內源性普林來源約貢獻3.0 mg/dL之血液尿酸值 (Coe et al., 1976; Griebisch and Zollner, 1974)，而常見導致尿酸合成快速增加的主因是當人體出現細胞turnover rate增加而加速RNA及DNA代謝的狀況，例如惡性腫瘤、血液學疾病、發炎性疾病、其它因素造成之組織損傷(Reginato and Olsen, 2007)。於外源性普林對血尿酸影響之研究顯示，積極控制飲食普林攝取約能降低血尿酸值1 mg/dL (Burns and Wortmann, 2012)。由於尿酸在水中或生物學流體中的溶解度相當低(正常下，哺

乳類動物血中尿酸濃度在4-6 mg/mL可維持溶解狀態)，當血尿酸濃度升高達超過飽和濃度時會形成尿酸鹽結晶(主要為尿酸鈉結晶monosodium urate, MSU)，是臨床上造成痛風性發炎的原因。排除體內尿酸的主要途徑為腎臟；人體有大於70%尿酸由腎臟排出，其餘約30%則由腸上皮細胞轉運至腸腔後由糞便排出(Prasad Sah and Qing, 2015)。正常下，自腎絲球濾出至腎小管的血尿酸可由腎近端小管大量再吸收到血液中，當由腎小管濾出的尿酸愈多則腎小管再吸收率也愈高，所以例如當血尿酸值接近常人平均值兩倍時，腎臟尿酸再吸收率也是常人的兩倍(Lipkowitz, 2012)，這使得高尿酸合成時，極易造成尿酸排除量無法滿足維持正常血尿酸值需求的情況。已知一些腎臟的有機陰離子轉運器(organic anion transporters; OAT)如URAT1 (urate transporter 1)、OAT1、及OAT3，都涉及腎臟尿酸廓清作用；URAT1主要作用為自腎小管再吸收尿酸回周邊血So and Thorens, 2010; Mandal and Mount, 2015)。目前具有促進尿酸廓清作用的藥物如probenecid、benzbromarone均是以抑制URAT1活性為機制(Li, et al., 2016)。OAT1和OAT3之主要作用則是將血清尿酸濾出至腎小管；研究顯示，剔除OAT1之小鼠腎臟尿酸分泌降低(Nigam et al., 2007)，且在誘發高尿酸血症的大鼠，也發現其下調腎臟OAT1和OAT3基因表現(Habu et al., 2003; Habu et al., 2005)，因此促進OAT1及OAT3之作用，也能作為促進尿酸廓清之標的(Hu et al., 2009)。

## (二)、高尿酸血症和痛風的流行病學

當體內尿酸合成與排出之衡定失調，造成血尿酸值上升，會形成臨床上之高尿酸血症，而雖然透過xanthine oxidase (XO)的尿酸合成作用是提升血中尿酸含量的必要因素，但臨床上痛風發作個案中，肇因於尿酸合成增加者僅占約10%，其餘90%都是因腎臟尿酸排除不足所致(Mandal and Mount, 2015)。流行病學上高尿酸血症的定義，是指血尿酸濃度高於正常人的尿酸濃度之平均值加上二個標準差(陳得源等人, 2016)，而生化上的定義，則是指血液中的尿酸濃度達到飽和而會形成不可溶的鹽類之程度，但在人體是否某一特定濃度之血尿酸會形成不溶的鹽類而造成急性痛風發作，則尚與其他生理、生化因子有關；根據英國與德國的回溯性分析報告顯示，以血尿酸濃度 $<6.0$  mg/dL 做基準，當血尿酸濃度為 $6.0-7.0$  mg/dL、 $7.0-8.0$  mg/dL、 $8.0-9.0$  mg/dL 及 $\geq 9.0$  mg/dL 則痛風發作的勝算比(odds ratio, OR) 分別是1.33、1.49、1.71及2.15 (Khanna et al., 2012; Annemans et al., 2008)。根據台灣痛風與高尿酸血症2016診治指引顯示，當以sUA濃度 $>6.0$  mg/dL為閾值時，我國高血尿酸盛行率高達70.2% (陳得源等人, 2016)。此外，根據台灣在2005-2008年進行之「國民營養狀況變遷調查」結果，19歲以上痛風盛行率男、女性分別為8.4%、3.0%；而若針對65歲以上年齡層更可發現，痛風盛行率男、女性分別提高為12.8%、8.0%，顯示我國痛風盛行率遠高於全球(Chuang et al., 2011)，且顯示隨著國人平均壽命增加，高尿酸血症及痛風是臨床上愈來愈重要的議題。過去在臨床上對於血尿酸值偏高之健康危害，主要是以MSU造成的急慢性發炎病灶(例如痛風和腎臟疾病)惡化加以解釋，Smith et al的報告指出，痛風全球盛行率約0.08%，每日新增病例自1990年76,000例成長至2010年114,000例，該報告也指出因為痛風是一種最常見的發炎性關節疾病，在2010年已名列造成全球負擔疾病(Global Burden of Disease, GBD)研究項目之一(Smith et al., 2014)。而近年愈來愈多流行病學研究顯示，血尿酸值偏高的個體，即使尚未及於痛風發作的階段，也和多種與慢性發炎有關之非傳染性疾病呈顯著相關性，包括高血壓、心血管疾病、代謝症候群和第2型糖尿病等(Kuwabara, 2016; Soltani et al., 2013; Dehghan et al., 2008)。

## (三)、MSU誘發之急性痛風性發炎反應和作用機制

MSU誘發之急性發炎反應屬於一種非外來病原誘發之無菌發炎反應(sterile inflammation), Shi et al首先指出MSU結晶可以類似微生物病原之作用方式活化先天免疫系統，並可視為一種「danger signal」，也就是一種danger-associated molecular pattern (DAMP) (Shi et al., 2003)。其後的研究發現MSU是高尿酸血症病人關節滑液中誘發痛風性發炎的必要分子(Crişan et al., 2016)，而MSU蓄積也可能在關節以外的組織/器官誘發發炎反應，例如尿酸腎病中，MSU慢性沉積於腎臟間質是為引起腎小管間質慢性發炎性損傷的主要導因(Singh, 2016)。目前已知之急性痛風性發炎反應的免疫學機轉說明

如下。

## 1. 嗜中性球的角色

嗜中性球在人類是含量最高的白血球，正常下不存在於組織內，但在急性發炎反應中，可在發炎部位測得大量活化的嗜中性球浸潤。嗜中性球堆積在結晶沉積部位是發現於人類急性痛風發作及各種MSU誘發痛風性發炎作用動物模式的免疫反應早期特徵(Shaw et al., 2014; Jhang et al., 2016)。在鼠科以MSU誘發滑膜炎(synovitis)顯示，嗜中性球化學激素受體CXCR-2(相當於人類IL-8受體)與痛風性發炎有關(Terkeltaub et al., 1998; Amaral et al., 2012);而在痛風情況下活化CXCR-2的主要配體則是CXCL1(Tavares et al., 2012)。此外，以MSU誘發嗜中性球recruitment也與嗜中性球表面integrins, 和血管內皮表現之黏附分子如ICAM-1和VCAM-1交互作用有關(Mitroulis et al., 2013)。在痛風的急性發炎期間，浸潤組織的嗜中性球會釋放酵素myeloperoxidase (MPO)造成痛風相關組織受損(Mitroulis et al., 2013; Meotti et al., 2011; Kato, 2016)。此外，近來也發現MSU結晶會導致其形成neutrophil extracellular traps (NETs)，而進一步放大發炎過程；NETs是由活化之嗜中性球分泌物在細胞外圍形成之網狀結構，其組成分包括細胞DNA、histones、顆粒中的酵素、及一些抗微生物蛋白質(Brinkmann et al., 2004)，過去已知NETs主要作用為捕捉及殺害胞外病原，但其中所含的elastase可分解基質蛋白造成組織損傷(Kaplan and Radic, 2012)，且嗜中性球形成之NETs包覆MSU結晶使急性發作後期NETs會形成聚集體(aggNET)，此過程雖可降低其它發細胞暴露於MSU結晶之刺激減緩痛風急性發作，但隨著時間的延長aggNET便會形成痛風石(tophus)(Schauer et al., 2014; Maueröder et al., 2015)，長期累積在關節之痛風石會引起關節的僵硬、破壞、變形、甚至引發感染，嚴重時喪失活動能力(蔡嘉哲等人, 2013; Rada, 2017)。

## 2. 巨噬細胞及其 TLR 訊號路徑和 NLRP 發炎體的角色

已知MSU誘發嗜中性球趨的主要調節因子是resident巨噬細胞產生之IL-1 $\beta$ ；在以MSU誘發之小鼠peritonitis不論抗IL-1 $\beta$ 特異性抗體或利用IL-1訊號抑制劑，都可在腹腔注射MSU之小鼠改善嗜中性球浸潤(Mitroulis et al., 2013; Martinon et al., 2006; Torres et al., 2009; Martin et al., 2009a)，且在缺乏IL-1R之小鼠也顯著降低結晶誘發之發炎作用(Martinon et al., 2006)，而若在以MSU誘發動物前減少小鼠腹腔resident巨噬細胞數，則會降低MSU結晶誘發之腹腔IL-1 $\beta$ 含量上升[Martin et al., 2009b]。NLRP3屬胞漿可溶性蛋白NLRs家族的一個次分類族群，與TLRs同屬先天免疫細胞之pattern recognition receptors (PRRs)的一種，其關鍵訊號分子包括caspase-1、ASC、及NLRP3；當NLRP3蛋白質活化時會與ASC分子及caspase-1分子聚合成複合體，即所謂NLRP3發炎體(inflammasome)，其繼而可造成pro-caspase-1裂解，產生含p20次單元且具酵素活性之caspase-1，使不具活性之proIL-1 $\beta$ 及proIL-18分解產生具活性之IL-1 $\beta$ 及IL-18並分泌至胞外，調節發炎作用(Martinon et al., 2002)。Martinon et al首先提出NLRP3發炎體是先天免疫系統中主要的結晶物質(包括MSU)感測器，並與活化下游先天免疫反應有關。*In vitro*，在缺乏NLRP3、ASC或caspase-1的小鼠巨噬細胞，結晶無法誘發其IL-1 $\beta$ 之分泌，且*in vivo*注射結晶至此小鼠腹腔中也無法趨化嗜中性球，顯見NLRP3發炎體在結晶誘發急性發炎作用之關鍵角色(Martinon et al., 2006)。此外，以CD14為co-receptor之穿膜蛋白TLRs家族中TLR2及TLR4(Bäckhed et al., 2002; Scott et al., 2006)，也可透過活化下游訊號分子MyD88而磷酸化I $\kappa$ B及活化ERK 1/2、MAPK和JNK而活化轉錄因子NF $\kappa$ B及AP-1，促進包括iNOS、proIL-1 $\beta$ 及proIL-18及其他促發炎細胞激素之基因表現(Kawai T, Akira, 2010)，參與MSU誘發之發炎反應。利用培養小鼠骨髓衍生之巨噬細胞發現，若細胞來自TLR-2 $^{-/-}$ 、TLR-4 $^{-/-}$ 、或MyD88 $^{-/-}$ 之小鼠，則對於MSU結晶誘發產生IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 之功能受損；在小鼠注射MSU結晶至皮下氣囊(air pouches)之痛風發性炎模式中，在TLR-2 $^{-/-}$ 、TLR-4 $^{-/-}$ 及MyD88 $^{-/-}$ 小鼠嗜中性球浸潤均受抑制(Liu-Bryan et al., 2005a; Liu-Bryan et al., 2005b)。活體外研究發現，MSU結晶可直接與sCD14結合；而剔除小鼠CD14基因，可大幅降低其骨髓衍生之巨噬細胞在MSU結晶誘發之pro-IL-1 $\beta$ 表現量、caspase-1活性及IL-1 $\beta$ 釋放量(Scott et al., 2006)，並大幅降低嗜中性白血球浸潤至注射MSU部

位。

#### (四)、可溶性尿酸(sUA)誘發之發炎反應及其對於胰島素阻抗和糖尿病發展的影響

##### 1. sUA 誘發發炎反應的證據及可能機制

除了 MSU 外，sUA 也是一種體內的 DAMP (Gasse et al., 2009)，可因宿主細胞或組織損傷而大量產生，其透過啟動宿主先天免疫反應幫助組織修復，但同時活化體內發炎反應而會直接造成發炎狀態，並參與包括慢性高尿酸血症相關之代謝症候群等高尿酸血症共病症的致病過程(Soltani et al., 2013)。臨床觀察發現，高血尿酸值和人體呈現低程度(low-grade)慢性發炎現象有關，其證據包括，相較於血尿酸值正常者，高尿酸血症之病人血中發炎指標 IL-1ra、IL-6、sIL-6r、IL-18、TNF- $\alpha$ 、C-reactive protein 均顯著提高(Ruggiero et al., 2006)。於肥胖 6-9 歲兒童，sUA 值也是預測血中發炎指標 sICAM-1、CRP、和 IL-6 的獨立因子(Valle et al., 2015)。In vitro，將正常人 PBMCs 先以 sUA 刺激再加入 TLR2 或 TLR4 配體，會比未先行以 sUA 刺激之正常細胞產生較高量促發炎激素 (Crişan et al., 2016)。動物實驗也發現，以高果糖飲食誘發大鼠血尿酸上升，會造成其腎臟巨噬細胞浸潤及 IL-1 $\beta$  表現量增加，反之在處以 xanthine oxidase 抑制藥物 allopurinol 降低 sUA 且不影響血糖的情況下，可改善此模式下巨噬細胞浸潤及腎臟損傷，並降低腎臟 IL-1 $\beta$  含量 (Kim et al., 2015)。In vitro 以 sUA 誘發人類單核球細胞株 THP-1 分化之巨噬細胞也顯示，可透過刺激細胞 NLRP3 發炎體活化而分泌 IL-1 $\beta$  (Kim et al., 2015)，最近其他以 sUA 誘發小鼠初代巨噬細胞之研究也顯示，分泌 IL-1 $\beta$  作用與 NLRP3 發炎體活化有關(Braga et al., 2017)。

##### 2. sUA 誘發胰島素阻抗的證據及影響胰島素標的組織的可能機制

目前已有實驗室證據顯示，相較於正常小鼠，利用 uricase 抑制劑—potassium oxonate 所誘發之高尿酸血小鼠，於 OGTT 及 ITT 中呈現葡萄糖耐受不良與胰島素阻抗之情形，且與肝臟，肌肉和脂肪組織中胰島素刺激之 Akt(Ser473)磷酸化減少及 IRS-1 之錯誤磷酸化(phosphor-IRS-1 (Ser307))增加有關 (Zhu et al., 2014; Jia et al., 2013)。而以含有 2% potassium oxonate 及 3%uric acid 之高尿酸飼料提升小鼠血尿酸濃度，也發現會增加肝臟中 caspase-1 p45、caspase-1 p20、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白質表現量，且伴隨肝臟中胰島素促進之 Akt 磷酸化活化減少(Wan et al., 2016)。其它以細胞株的進行的 in vitro 研究顯示，添加 sUA 於 3T3-L1 脂肪細胞、C2C12 肌肉細胞、HepG2 及 L02 肝細胞之培養液，都會抑制胰島素在這些細胞所促進之 Akt 磷酸化及葡萄糖攝取量，顯示胰島素訊號傳遞受到 sUA 阻礙(Wan et al., 2016; Yuan et al., 2017; Baldwin et al., 2011)。反之，在肝細胞 HepG2，利用 siRNA 剔除細胞 NLRP3，可逆轉 sUA 導致之胰島素下游訊號 Akt 磷酸化減少的現象，顯示 sUA 在此細胞造成之胰島素阻抗至少有部分是透過 NLRP3 發炎體活化所致(Wan et al., 2016)。

#### (五)、台灣土肉桂葉精油目前已知之生物活性及其在高尿酸血症相關病症之可能應用

台灣本土的肉桂類包括有土肉桂(Cinnamomum osmophloeum kanehira)、山肉桂(C. insulari-montanum)、日本香桂(C. japonicum)和胡氏肉桂(C. macrostemon)，但其中以土肉桂具商業價值(張上鎮, 2002; 謝瑞中, 2006)，故有較大規模之栽種。台大森林系教授張上鎮研究團隊比較分離自十六種源及不同地理位置之土肉桂葉精油之化學組成後，將其類分為六種化學型：(1) 肉桂醛(cinnamaldehyde)型，(2) 肉桂醛-桂皮乙酸酯型，(3) 桂皮乙酸酯型，(4) 伽羅木醇(linalool)型，(5) 樟腦型及(6)混合型 (Cheng et al., 2006)。這些不同化學型的土肉桂之葉精油根據各自所特有的組成分，可提供不同實用價值。土肉桂之開發價值可貴處之一在於，許多肉桂類植物精油之活性成份主要含於樹皮(桂皮)，在提煉其成分時會傷害樹木，而研究發現富含大量具生物學活性成分之土肉桂葉，其精油產量比樹皮還高出5倍，故生產時不僅可大量採收原料，且不對樹木造成傷害，開發其應用性符合永續發展的理念(楊政川等人, 2010)。因為肉桂醛(cinnamaldehyde; Cin)，又稱沉香醇或芳樟醇，已知具有許多生物學活性，故目前關於土肉桂葉精油(TC)醫藥方面應用之研究，多以



Cin含量最高之肉桂醛型植株進行。根據本計畫共同主持人李世傑老師的分析，台灣中部也栽種了大面積枷羅木醇(linalool; Lin)型土肉桂，然而至目前為止，在TC中，關於Lin型之TC生物學功能之科學研究報導尚屬有限。此TC的主要成分Lin，是一種單萜類化合物，由於其提供之獨特香味，在全球具傳統上的廣泛用途。傳統上，Lin以單一化合物或富含Lin的天然物（如胡荽精油）之形式做為香料，添加於包括化妝品、香水、洗髮精、衛浴肥皂及其他衛浴及非化妝品產品，如家用清潔劑及清潔用品 (Ford et al., 2000)。此外，枷羅木醇在歐洲及美國也是合法食品添加物，用於增加食品風味 (Letizia et al., 2003)。我們過去已報導Lin型TC在在STZ-DM大鼠具有降血尿酸值、抗氧化、抗發炎、及保護腎功能作用 (Lee et al., 2013; 蔡幸芬, 2014)，在內毒素誘發之系統性發炎小鼠具有抑制小腸黏膜 xanthine oxidase 活性及抑制TLR4與NLRP3訊號路徑相關分子表現及活性之作用，且能改善LPS在大鼠引起之腸黏膜嗜中性球浸潤及損傷 (劉育廷, 2010; Lee et al., 2015)。且我們也發現除了Cin之外，Lin也具有上述生物學活性的分子 (倪曼婷, 2013; Lee et al., 2018)。故以本研究驗證Lin型TC及其活性成分Lin和Cin改善MSU及sUA所引起之發炎及sUA相關之血糖代謝異常及共病症之作用及探討其機制。

#### 四、研究方法

##### (一)、實驗動物及其處置

###### 實驗一、土肉桂精油及其活性成分於小鼠抗MSU誘發急性痛風性發炎之作用及機制

十週齡 (體重約25 g)之雄性C57BL/6小鼠進行，開始試驗前至少一週將動物飼育在經控制之環境中，曝露於日光照及黑暗各12小時的循環中，並供應標準rodent chow及飲水讓其任意取食。TC或其成分Lin或Cin之灌食採口胃管灌食(bolus)方式。開始灌食前，將小鼠隨機分為九組：載劑 (2 ml/kg BW之玉米油)、TC (13 mg/kg之TC;TC組)、高劑量Lin+高劑量Cin((5.2 mg/kg之Lin+0.9 mg/kg之Cin; Lin+Cin組)、低劑量Lin (2.6 mg/kg之Lin;Lin-L組)、高劑量Lin (5.2 mg/kg之Lin;Lin-H組)、低劑量Cin (0.45 mg/kg之Cin;Cin-L組)、高劑量Cin (0.9 mg/kg之Cin;Cin-H組)、Allo (5 mg/kg之allopurinol)、Col (1.5 mg/kg之colchicine)，每隔一日依組別灌食一次，共灌食八次，最後一次灌食隔日由腹腔注射無菌MSU結晶懸浮液 (3 mg/0.5 mL PBS/mice) 同時移去飼料，禁食12 h後以二氧化碳犧牲，收集腹膜灌洗液及心臟血液。先前灌食載劑並注射MSU之小鼠為MSU組，先前灌食載劑後注射無菌PBS之小鼠為控制組(con組)。本研究採用之土肉桂來源為嘉義大學實驗林場之葉精油，精油製備如我們過去所述(Lee, et al., 2013) 其中約含40%枷羅木醇及7%肉桂醛。介入劑量是根據我們過去發現可在小鼠改善LPS誘發之發炎反應的有效劑量(Lee et al., 2014b)。

###### 實驗二、土肉桂精油及其活性成分於MSU刺激之小鼠腹腔巨噬細胞之抗發炎作用及機制

十週齡雄性C57BL/6小鼠，入室後如上述適應環境一週，然後進行腹腔注射2 ml Brewer thioglycollate medium (4%)，四天後禁食12小時然後以二氧化碳犧牲，接著以含3% FBS之無菌PBS充分清洗腹腔以收集細胞。

###### 實驗三、土肉桂精油及其活性成分對於採高尿酸飲食小鼠血糖代謝及相關共病症之影響及機制

十週齡雄性C57BL/6小鼠，入室後如上述適應環境一週，然後隨機分為九組，其中一組給予一般飲食，其餘八組給予含有2% potassium oxonate及3% uric acid之高尿酸飲食，於小鼠開始接受實驗飲食後第四十二天起，八組高尿酸飲食小鼠分別隔日灌食載劑 (2 ml/kg BW之玉米油;HUA組)、TC (13 mg/kg之TC;TC組)、高劑量Lin+高劑量Cin((5.2 mg/kg之Lin+0.9 mg/kg之Cin; Lin+Cin組)、低劑量Lin (2.6 mg/kg之Lin;Lin-L組)、高劑量Lin (5.2 mg/kg之Lin;Lin-H組)、低劑量Cin (0.45 mg/kg之Cin;Cin-L組)、高劑量Cin (0.9 mg/kg之Cin;Cin-H組)、Allo (5 mg/kg之allopurinol)，共灌食8次，一般飲食

組則灌食載劑玉米油 (con組)，共灌食八次。於第六次灌食後執行口服葡萄糖耐受試驗(OGTT)，在實驗開始後第五十六天，即第八次灌食當天，於灌食前的早上眼窩採血，備用於血尿酸濃度分析，並於灌食後禁食十五小時再以二氧化碳犧牲，收集血液及組織，備用於生化分析、西方墨點分析及/或組織學觀察。TC及其活性成分Lin及Cin之灌食劑量設計依據如實驗一所述。

## (二)、無菌尿酸鈉 (MSU) 結晶及土肉桂葉精油製備 (實驗一和二)

無菌MSU結晶之製備是根據Steiger and Harper (2013)所述方法，將250 mg uric acid加入45 ml之30 mM NaOH/DDH<sub>2</sub>O煮沸至完全溶解，在無菌操作台內經0.22  $\mu$ m針頭過濾器進行無菌過濾，置於室溫下風乾7~10天，使其析出結晶。顯微鏡觀察形成之針狀結晶長度需約為5-20  $\mu$ m，並且利用*Limulus* amoebocyte cell lysate assay之E-toxata分析套組 (SI-ET0100-1KT) 確認尿酸結晶無LPS污染後備用。

## (三)、高尿酸飼料製備 (實驗三)

於粉狀之Lab Diet 5001混合2% potassium oxonate及3% uric acid，依據粉體重量加入0.72 ml/g之蒸餾水，混合均勻並揉成每顆重量為8.6±0.2 g之小團狀，而一般飼料則以同樣之水份比例製備，存於-20°C備用。給予動物前須先回溫至室溫，每日給予每隻小鼠一顆，動物均自由進食飼料及蒸餾水。

## (四)、動物樣品收集及製備

1. **血液樣品收集:**實驗一及實驗三誘發之動物犧牲後，立即自心臟收集血液，製備成血漿，其中實驗一的血液樣品備用於定量分析nitrate/nitrite、TGF- $\beta$ 1、IL-1 $\beta$ 、sCD14、sICAM和CXCL-1濃度及MPO活性。實驗三的血液樣品備用於定量分析尿酸、fructosamine、IL-1 $\beta$ 、CXCL1、ICAM、C-peptide、nitrate/nitrite、creatinine及BUN濃度分析。

2. **尿液樣品收集:**實驗三之小鼠於犧牲前三天飼育於代謝籠二十四小時，並記錄體重及二十四小時內的攝食量、飲水量、排便量及排尿量，收集的尿液備用於尿酸及creatinine分析

3. **器官/組織樣品收集:**實驗一之小鼠犧牲後立即取下肝臟、腎臟、副睪脂肪、骨骼肌及胰臟秤重，其中腎臟、脾臟、胰臟、肝臟、脂肪、骨骼肌(gastroc)備用於nitrate/nitrite、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1分析；且腎臟、肝臟和脾臟備用於TLR4和NLRP3訊號路徑分子表現量之西方墨點分析及NF- $\kappa$ B活化與caspase-1活性分析；肝臟亦備用於xanthineoxidase活性分析。實驗三之動物犧牲後立即取下肝臟、腎臟、副睪脂肪、骨骼肌及胰臟秤重，並備用於nitrate/nitrite、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 含量分析和TLR4和NLRP3訊號路徑分子表現量之西方墨點分析。

4. **腹膜灌洗液收集及差異性細胞計數:**實驗一之小鼠腹腔注射MSU後參考Getting et al (1997)及Liu et al (2017)之方法，以3 ml含3 mM EDTA 及25 U/ml heparin之PBS沖洗腹腔，將一部分灌洗液(lavage fluids)加入Turk's solution (0.01%crystal violet in 3% acetic acid)，並利用血球計數盤及光學顯微鏡進行差別細胞計數，計數單核球/巨噬細胞與PMN之含量比例。部分灌洗液離心後，上清液備用於定量分析nitrate/nitrite、細胞激素TGF- $\beta$ 1、IL-1 $\beta$ 、sCD14和CXCL-1含量及MPO活性分離出的細胞供分析caspase-1活性、NF- $\kappa$ B活化、流式細胞儀分析CD11a/CD11b/CD18、及NET-associated elastase螢光染色。

5. **腹腔初代巨噬細胞收集及培養:**實驗二之小鼠腹腔注射Brewer thioglycollate medium四天犧牲後，以含3% FBS之無菌PBS清洗腹腔，在以25°C以400xg離心細胞懸浮液後，移除上清液，經以RBC lysis buffer破紅血球處理，再以含5% FBS之DMEM重新懸浮細胞。經Trypan blue染色法確認本製備之細胞存活率平均>95%以上。培養細胞時，將細胞密度3  $\times$  10<sup>6</sup>/ml種入96-well或24-well中，在5% CO<sub>2</sub>、37°C培養箱中預先培養貼盤2小時後，移除上清液，並以PBS清洗3次，接著以DMSO (0.1%) 做為載劑在各well

別添加TC (5、25、75  $\mu\text{g/ml}$ )、Lin (2.0、10.1、30.2  $\mu\text{g/ml}$ ) 及 Cin (0.3、1.7、5.2  $\mu\text{g/ml}$ ) 預處理半小時，然後移除上清液，再以MSU結晶 (0、300  $\mu\text{g/ml}$ ) 刺激同時依各well原先的預處理條件添加不同濃度精油成分，培養24小時後收集上清培養液及細胞。細胞培養上清液用於分析 nitrate/nitrite、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-10濃度；細胞以PBS清洗後用於以西方墨點法分析TLR4和NLRP3 訊號路徑分子表現量。前試驗在培養液中添加終濃度為0至125  $\mu\text{g/ml}$ 之TC培養24小時，以MTT測定細胞存活率，結果顯示TC濃度在 $\leq 75$   $\mu\text{g/ml}$ 時不影響細胞存活率，因此以添加0至75  $\mu\text{g/ml}$ 之TC及相當於其中所含之Lin和Cin濃度至培養液進行細胞實驗。

## (五)、生化分析

1. **ELISA分析:** 樣品中TGF- $\beta$ 1、IL-1 $\beta$ 、sCD14、sICAM、CXCL-1、C-peptide濃度，利用相應之商業ELISA kits，參照廠商之說明書分析步驟進行分析。

2. **NF- $\kappa$ B活化測定:** 萃取組織/細胞之細胞核fraction後利用商業分析套組NF- $\kappa$ B (p65) transcription factor assay kit 測定細胞核NF- $\kappa$ B含量作為評估此轉錄因子活化之依據，分析步驟參照廠商之說明書並利用micro-plate reader進行。

3. **nitrate/nitrite測定:** 利用以nitrate reductase 將NO<sub>3</sub><sup>-</sup>還原成NO<sub>2</sub><sup>-</sup>，然後再以Greiss reagent 進行呈色反應之原理，可於波長550 nm下讀取吸光值並對照標準品而測得nitrate/nitrite含量。

### 4. 酵素分析:

(1) Xanthine oxiase assay: 肝臟xanthine oxiase活性分析將採用商業分析套組(xanthine oxidase Assay Kit)，分析步驟參照廠商之說明書並利用micro-plate reader進行。

(2) Myeloperoxidase (MPO) assay: 腹膜灌洗液及血漿中MPO活性分別為嗜中性球浸潤及活化的marker，本實驗利用MPO商業分析套組，分析步驟參照廠商之說明書並利用micro-plate reader進行。

(3) Caspase-1 assay: caspase-1活性分析採用分光光度計商業分析套組(Caspase 1 Colorimetric Assay Kit)，分析步驟參照廠商之說明書並利用micro-plate reader進行。

5. **蛋白質定量分析:** 利用Lowry原理，利用Cu<sup>2+</sup>在鹼性環境中與蛋白質結合形成之銅蛋白質複合物，與Folin試劑中phosphomolybdic-phosphotungstate還原生成藍色物質，後以分光光度計測定其吸光值，對照白蛋白標準品之standard curve計算樣本中蛋白質含量。

6. **其它生化分析:** 樣品中creatinine、BUN及Uric acid 濃度測定均是利用商業分析套組，依照廠商說明書之步驟進行。

## (六)、流式細胞儀分析

本計畫以流式細胞儀分析浸潤腹腔之嗜中性球表面黏附分子表現量，方法步驟採用我們實驗室建立的分析條件進行 (Kuo et al., 2011); 利用抗小鼠CD18、CD11a、及CD11b單株抗體，並以偶合螢光物質 isothiocyanate 之二抗(goat anti-mouse IgG)之分析套組測定。

## (七)、NETs 免疫組織染色法

本實驗採用 Immunohistochemical staining 法分析，其利用抗原和抗體間專一性的結合反應，檢測細胞中目標抗原的存在，將neutrophil elastase (NE) 標記為綠色螢光，所利用之NET assay kit 商業分析套組 (Cayman, Ann Arbor, MI) 依廠商說明書流程進行，可將非NET-related elastase (主要來自於嗜中性球 azurophilic granules) 洗去，故可特異性測得來自NET的elastase。細胞核染色是以DAPI標記為藍色螢光。

## (八)、西方墨點法分析

1. 細胞/組織樣品TLR2、4及NLRP3訊號路徑蛋白質分子表現量分析:根據我們實驗室建立的實驗條件進行(Lee et al., 2018);以液態氮磨碎後秤重,加入兩倍的Ripa buffer後均質樣品,以10300rpm, 4 °C, 20分鐘進行離心,離心後取上清液進行分析。上清液進行蛋白質定量,將蛋白質濃度定量到200  $\mu\text{g}/16\mu\text{l}$ ,加入4  $\mu\text{l}$ 的5x sample buffer。sample以乾熱器100°C加熱5分鐘,冰浴後備用。製備好的樣品在Bio-Rad 的系統下以SDS-PAGE(膠濃度依不同蛋白質分子量做適當調整)於Running buffer中進行電泳(80~120v, 2hours)分離蛋白質。電泳結束後的膠片,於Transfer buffer 中以PVDF膜進行蛋白質轉漬(80v, 90mins),PVDF膜須先泡在methanol中活化。轉漬完成的PVDF膜,置於含5% milk的TBS中並在室溫下進行blotting (2 h),blotting後以TBST清洗膜(5mins/次,三次)。清洗完成後依分析項目分別加入一次抗體(mouse anti-ASC、rabbit anti-caspase-1或anti-caspase-1 p20、rabbit anti-NLRP3、rabbit anti-TLR2、rabbit anti-TLR4、rabbit anti-MyD88抗體)於4°C下反應過夜。隔天回收一次抗體,以TBST清洗膜後(5mins/次,三次),分別加入二次抗體(goat anti-mouse IgG或goat anti-rabbit IgG,反應1小時後再以TBST清洗membrane(5mins/次,三次)。清洗完成後將PVDF 膜以ECL呈色,以冷光螢光數位影像儀器進行分析。以actin (1:5000)作為internal control。

2. 腎臟尿酸轉運相關蛋白表現量分析:根據Hu et al. (2009)的方法修改後進行;如上述均質樣品後在3,000 g離心15 min。將上清液於12,000 g離心20 min。然後將沉澱物溶於Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 及1% PMSF。跑12% SDS-PAGE電泳 (Bio-Rad, Hercules, CA),轉印後如上述以二抗標誌、呈色及判讀以mGAPDH為內標。一抗包括rabbit anti-URAT1, rabbit anti-OAT1, rabbit anti-OAT3, rabbit anti-GAPDH, arginase-2);二次抗體為goat anti-rabbit IgG。

## (九)、Real-time-PCR

根據Hu et al. (2009)所述方法進行URAT1、OAT1、及OAT3之RT-PCR分析,利用TRIzol reagent (Invitrogen)萃取腎臟total RNA,將均質液與200  $\mu\text{l}$  chloroform混合,然後以14,000 g離心15 min。上層水相(約0.5 ml)加入等體積isopropanol然後以14,000 g離心20 min沉澱。除去上清液後將total RNA pellet再懸浮於70  $\mu\text{l}$  RNase free的無菌水,儲存於4°C保存,並供後續RNA分析。定量RNA時取出保存於RNase free滅菌水中的RNA,置於乾浴槽中以45°C加熱5分鐘,待RNA完全溶解後,取出3  $\mu\text{l}$  RNA溶液,以超微量分光光譜儀(NanoPhotometer)測定RNA濃度。本實驗Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction使用High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits 進行分析,依照廠商說明書之步驟進行,cDNA產物儲存於-20°C保存備用。由生工有限公司購買各目標基因的forward primers及reverse primers:

PCR forward and reverse primer sequences

Primer	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
URAT1	ACATCCAGAAACAGTCAGT	TCTTCCTCCTCCTCTTATTG
OAT1	TGGAGTGGATGCCTATTC	GAAGAACCAAGAGTAGATGAAG
OAT3	TCTGAGCACCATTATCTTGAAT	TACCCACCAGGACAACAA
$\beta$ -Actin	CCTTCCTTCTTGGGTATGG	ACTGTGTTGGCATAGAGG

先將forward和reverse primers的離心管spin down,再緩緩打開管蓋加入RNase free無菌水並將primers濃度配置成100  $\mu\text{M}$ ,儲存於-20°C中備用。將100  $\mu\text{M}$ 的forward primer及reverse primer各取10  $\mu\text{l}$ 加入480  $\mu\text{l}$  RNase free無菌水,配置成濃度各為2  $\mu\text{M}$ 之primers,儲存於-20°C備用。先將cDNA以RNase free無菌水稀釋5倍,再配置PCR mixture,如表2-5。取2  $\mu\text{l}$  1/5 cDNA逐一加入至八連排並置入8  $\mu\text{l}$  PCR mixture,混合均勻後以StepOne™ Real-Time PCR System進行real-time PCR反應,設定條件為:stage-1 95°C反應10分鐘,作用一循環;stage-2 95°C反應15秒、60°C反應1小時,共作用四十個循環;melting curve-95°C反應15秒、60°C反應1分鐘,95°C反應15秒,最終反應結果經

StepOneSoftware v2.1 軟體分析得到各基因之Ct (Threshold cycle)，將內標基因  $\beta$ -actin的Ct值減去目標基因的Ct值，即得到 $\Delta$ Ct，各實驗組mRNA之 $\Delta$ Ct減去控制組mRNA之 $\Delta$ Ct可得到 $\Delta\Delta$ Ct，帶入公式 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 即得到目標基因之相對表現量。

## (十)、統計分析

各組分析所得數據以平均值加減一個正負標準差(mean $\pm$ SD)表示，統計利用SPSS 系統分析。實驗一利用Student' s t-test分析正常控制組(con組)與無灌食試劑且注射尿酸鈉結晶之MSU組間的差異，並利用Duncan' s multiple-comparison test分析注射MSU結晶各組間之差異。實驗二利用Student' s t-test分析正常控制組(con組)與無添加試劑於培養液且以尿酸鈉結晶刺激之MSU組間的差異，並利用Duncan' s multiple-comparison test分析以MSU刺激之各組間的差異。實驗三則是利用Student' s t-test分析正常控制組(con組)與攝取高尿酸飲食且無介入試劑之HUA間的差異，並利用Duncan' s multiple-comparison test分析高尿酸飲食各組間之差異。P values <0.05代表據統計學上的意義。

## 五、結果與討論

### 實驗一、土肉桂精油及其活性成分於小鼠抗 MSU 誘發急性痛風性發炎之作用及機制

#### (一)、小鼠體重和臟器重特徵

小鼠於灌食前後及誘發後犧牲前，紀錄其體重，結果發現，各組間體重均無顯著差異，顯示灌食實驗劑量之 TC、Lin、Cin、allopurinol (Allo)或 colchicine(Col)均不會影響小鼠生長(表一)。此外，灌食載劑之小鼠在結束八次灌食之後隨機分為兩組後，一組在最後一次灌食的次日腹腔注射 saline，作為控制組(Con 組)，而另一組則注射 MSU (MSU 組)。灌食其他成分的組別也於最後一次灌食隔日，於腹腔注射 MSU。犧牲動物時收集之腎臟、脾臟、胰臟、肝臟、副睪脂肪和骨骼肌(腓腸肌)秤重，並換算臟器重/體重百分比，結果示於表一。由結果可知，與正常控制組相較下，腹腔注射 MSU 並未顯著影響小鼠組織及臟器/體重百分，亦即 MSU 引起的急性發炎與痛風時 MSU 在關節引起的發炎反應同為局部性，不似腹腔注射 LPS 引起的腹膜炎會出現免疫器官腫大及體重及肌肉流失等系統性發炎的特徵 (Lee et al., 2018)。注射 MSU 前，不論預先灌食 TC、Lin、Cin、Allo 或 Col，與灌食載劑相較，也均未顯著影響小鼠各組織及臟器/體重百分。

#### (二)、腹膜灌洗液中嗜中性球和單核球/巨噬細胞數

小鼠經由腹腔注射 MSU 後不影響其腹膜灌洗液細胞之存活率；以 trypan blue 染色法鏡檢結果顯示，所有組別的細胞存活率均>98%。在細胞 profile 方面，MSU 誘發前後腹腔巨噬細胞總數的變化不大，且不受灌食土肉桂葉精油的影響，但嗜中性球數目在 MSU 誘發後為注射 PBS 的對照組之 334.2% (表二)。已知急性痛風確診依據，主要是在滑液中發現嗜中性球及其所吞噬之 MSU 結晶，此時在浸潤關節滑液的細胞中，嗜中性球含量比例可達>80% (Mitroulis et al., 2013)。本研究發現，MSU 誘發後，嗜中性白血球在腹膜灌洗液細胞中的比例達 67.8%，未達 MSU 在關節滑液所造成的 80%以上的分布量，推論是由於本研究是以腹腔 MSU 取代痛風性關節炎滑液囊的位置，二者微環境有所差異所致，且可能與暴露於 MSU 的時間長短及在不同位置的清除率有關。本研究發現，在誘發前灌食 TC 及其活性成分 Lin 和 Cin 後，可減少 MSU 誘發的嗜中性球浸潤程度 (表二)。其中，在誘發前灌食 TC 及相當於 TC 劑量之 Lin+Cin、Lin-H、Cin-H 後均顯著降低嗜中性球總數，其抑制之幅度略優於 Allo 和 Col (表二)。

#### (三)、腹膜灌洗液 MPO 活性

在 MSU 誘發的滑液囊痛風性發炎中，MPO 酵素活性可用來評估 neutrophils 的浸潤程度 (Hoffmeister et al., 2014)。因此本研究以腹膜灌洗液中的 MPO 活性做為確認嗜中性浸潤的指標。結果顯示，MSU

誘發小鼠腹膜灌洗液中 MPO 活性上升，而 TC 可降低此酵素活性，且其效果優於單獨使用相當於其中含量的 Lin-H 或 Cin-H 組（圖一）。不意外地，治療痛風藥物 Col 極顯著降低小鼠腹膜灌洗液中 MPO 活性而抑制 xanthine oxidase 之藥物 Allo 抑制 MPO 活性之效果較低。將表二中嗜中性球細胞數受 MSU 和 TC 及其活性成分之影響程度與腹膜灌洗液中 MPO 活性變化程度作比較，發現 MSU 誘發 MPO 上升幅度達控制組約 314.5%，與嗜中性球上升幅度大致相符，但灌食 TC 及其活性成分對於 MPO 的抑制幅度不如對於細胞數的抑制作用，反之，Col 抑制 MPO 活性的程度 (>50%) 則遠超過其抑制細胞浸潤數目的程度 (<25%)。Col 抗痛風性發炎的機制已知是防止細胞骨架微小管組裝而破壞 (1) 發炎體活化，(2) 以微小管為基礎的發炎細胞驅化、白三烯素及細胞激素產生以及吞噬作用 (Dalbeth et al., 2014)。因此，Col 抑制腹膜灌洗液中 MPO 活性遠大於抑制浸潤的細胞數，可能肇因於其抑制細胞骨架運動所致之嗜中性球顆粒分泌作用所致。反之，這是否意味著土肉桂葉成分會因促進了浸潤的嗜中性球 MPO 分泌而造成與細胞數變化不吻合的情形，有待進一步釐清。由於在痛風性發炎病灶，浸潤組織之嗜中性球的作用主要為幫助吞噬(清除)MSU 結晶，故 TC 和 Col 抗發炎的差異性作用，指出其具有 alternative 之預防效果。

#### (四)、血漿、腹膜灌洗液、臟器 nitrate/nitrite、IL-1 $\beta$ 和 TGF- $\beta$ 1 濃度/含量

在本研究觀察的動物樣品中，發炎指標 nitrate/nitrite、IL-1 $\beta$  和 TGF- $\beta$ 1 在胰臟、肝臟、脂肪和肌肉之含量均未受注射 MSU 也未受及灌食試劑之影響，故表三呈現之結果及其討論均僅針對受影響之樣本——血漿、腹水、腎臟、脾臟。

Nitrate/nitrite 為 NO 穩定衍生物，因而其含量代表體內 NO 合成的活性。經由 MSU 誘發可發現，NO 含量除了在免疫器官脾臟有些微上升之外，在其餘樣品中包括血漿、腹膜灌洗液及腎臟均不變或降低，推測這可能是由於免疫器官中有較多發炎細胞可經誘發 iNOS 活性產生 NO 所致。較特別的是，我們在注射 MSU 之小鼠發現血漿中 nitrate/nitrite 濃度與 Con 組相較降低近 48% 並統計學上的意義。我們推論，雖然 MSU 是直接注射於小鼠腹腔，但不能排除注射後至犧牲動物的 12 h 期間部分溶解之 MSU 成為 sUA 並被腹膜微血管吸收；我們事後在注射小鼠之 MSU 懸浮液中測得 8 mg/dL 之 sUA 濃度。過去其它文獻指出，血液中尿酸濃度上升會抑制 eNOS 活性，其繼而造成內皮細胞功能異常及痛風相關之心血疾病 (Schwartz et al., 2011)。而本研究意外發現，若誘發前灌食 TC 及其活性成分可顯著回升血漿 NO 濃度，且 Allo 和 Col 也有類似效果。另一方面，在免疫器官脾臟中 NO 含量因注射 MSU 而顯著增加，若誘發前灌食 TC 及其活性成分後反而能降低 NO 含量，其效果也與 Allo 或 Col 相似(表三)，脾臟中此 NO 的變化是否與 iNOS 受到的調節有關，在實驗二的巨噬細胞實驗有進一步釐清。

在文獻探討中已說明 MSU 結晶刺激下，組織中 IL-1 $\beta$  的主要來源是 resident 巨噬細胞。本研究未發現 MSU 增加腹膜灌洗液中的單核球/巨噬細胞數量(表二)，故在腹膜灌洗液發現注射 MSU 增加 IL-1 $\beta$  濃度(表三)，顯然是因 resident 巨噬細胞受到 MSU 活化所致。而在誘發前若灌食 TC 及其活性成分，則在不影響單核球/巨噬細胞數量(表二)的情況下，顯著降低腹膜灌洗液中 IL-1 $\beta$  濃度，且效果略優於 allo 或 Col (表三)，顯示這些成分的抗發炎活性。這些土肉桂成分抑制腹腔中 IL-1 $\beta$  濃度之作用可用來解釋為何灌食 TC 及其成分可降低 MSU 誘發之嗜中性球浸潤 (表二)。若根據 IL-1 $\beta$  做為發炎程度的指標，可發現腹腔注射 MSU 也在腎臟和脾臟引起發炎現象，但因未在血漿中測得其濃度，且其它臟器，包括胰臟、肝臟、肌肉、脂肪組織的含量均不受注射 MSU 影響，因而可確認此模式應屬於腹腔局部而非系統性發炎狀態的特性，即類似痛風之局部發炎特徵。由於痛風發作與高尿酸血症病人發展腎衰竭關係密切，且 Zhou et al (2012) 顯示尿酸可透過活化腎小管 NF- $\kappa$ B 訊號路徑誘發腎臟發炎，因而未來應著重探討痛風病人發作期間對於腎臟發炎的影響。此外，本研究發現已 MSU 誘發前灌食 TC 及其活性成分，可改善腎臟 IL-1 $\beta$  含量，雖然效果與 Allo 相當，但抗發炎程度略遜於 Col。

在痛風性急性發炎終期，病灶中 TGF- $\beta$ 1 上升，其主要由發炎部位之巨噬細胞及嗜中性球產生，因而此生長因子被視為痛風性發炎程度的良好指標 (Fadok et al., 1998; Steiger and Harper, 2013)，

此與本研究發現腹腔注射 MSU 造成灌洗液中 TGF- $\beta$ 1 濃度上升相符 (表三)。然而本研究亦發現,經由 MSU 的誘發,不但腹膜灌洗液中 TGF- $\beta$ 1 濃度倍增,且血漿、腎臟和脾臟也誘發顯著且大量上升之 TGF- $\beta$ 1 含量,此結果與 IL-1 $\beta$  吻合。近來的研究顯示,尿酸會誘發人類纖維母細胞表現 TGF- $\beta$ 1,並可能與冠狀動脈疾病有關 (Chen et al., 2014),本研究發現腹腔注射 MSU 可誘發血漿 TGF- $\beta$ 1 濃度上升,特別是採集自心臟的血漿,這可能說明高尿酸血症與痛風和心血管疾病間之關聯。而本研究也發現,若在誘發前灌食 TC 及其活性成分可逆轉 MSU 誘發之 TGF- $\beta$ 1 含量上升(表三)。這是否意味著 TC 及其成分也可能適用於預防心血管疾病,有待未來進一步以適當的研究模式驗證。

#### (五)、脾臟和腎臟中 TLR2/4 和 NLRP3 訊號路徑分子表現量及 caspase-1 活性

雖然過去其它研究,以MSU結晶至皮下氣囊 (air pouches)至TLR-2-/-、TLR-4-/-及MyD88-/-小鼠的模式,指出TLR-2、TLR-4、及MyD88在MSU活化巨噬細胞及引起痛風發作之必要角色 (Liu-Bryan et al., 2005a; b),然而,本研究結果建議,不論在脾臟(圖二)還是腎臟(圖三),TLR4在本研究模式中誘發發炎的角色都不如TLR2明顯,一方面是基於TLR4不若TLR2在MSU誘發後表現量之大幅上升,另一方面是MD2在MSU誘發後增幅亦僅發生微幅變化(圖);TLR4活化需以MD2複合體存,但TLR2活化時則無需MD2與其形成複合物(Yu et al., 2010)。因而此部分結果的討論重點應在於MSU誘發之TLR2及MyD88表現量變化。在脾臟,注射MSU造成TLR2表現量急遽增加,而TC顯著降低其表現量,效果優於Lin+Cin或相當於其劑量之單獨預灌食與TC相當劑量之Lin或Cin組,及Allo組,但預灌食Col不如TC抑制TLR2表現的效果。注射MSU也在脾臟誘發MyD88表現量顯著上升,而TC可使其表現量降回至接近正常,效果微幅優於Lin+Cin或單獨預灌食與TC相當劑量之Lin或Cin組,或Allo和Col組。在腎臟,MSU造成TLR2表現量顯著上升,而預灌食TC顯著降低腎臟TLR2表現量,其效果優於Lin+Cin或單獨Lin或Cin。MSU也誘發腎臟MyD88表現量顯著上升,預灌食TC使MyD88表現量降低至接近正常,其效果優於Lin+Cin或單獨Lin或Cin,且與Allo和Col的效果相似。

腹腔注射 MSU 顯著增加小鼠脾臟(圖四)和腎臟(圖五)中 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 表現量,同時增加腎臟 caspase-1 活性,顯示 MSU 可促使 pro-IL-1 $\beta$  轉化為 IL-1 $\beta$ ,與表三中所呈現 MSU 增加 IL-1 $\beta$  含量的結果相符。若在 MSU 誘發前灌食精油及其活性成分,則不論在脾臟或腎臟,均可降低 NLRP3、ASC 和 caspase-1 表現量及降低腎臟 caspase-1 活性,此結果與表三中呈現 TC 及其活性成分改善 IL-1 $\beta$  含量的趨勢大致相符,雖然 IL-1 $\beta$  降低的程度不如這些訊號分子表現量降低的程度。推測可能是因尿酸對於 TLR 訊號分子表現量的調節程度及精油成分對這些分子表現量調節的幅度均較發炎體相關分子受調節的程度小,以致於 pro-IL-1 $\beta$  表現量增減幅度都較小所致。此外,本結果顯示,精油及其活性成分之上述作用,效果與 Allo 和 Col 相似(圖四和五)。

#### (六)、血漿及腹膜灌洗液中 sCD14、CXCL1 及/或 sICAM 濃度

已知 MSU 病灶會透過活化血管內皮黏附分子及增加化學激素來造成周邊嗜中性球趨化至病灶部位,故在此模式的循環血中 sICAM-1 及 CXCL-1 濃度均顯著上升符合預期 (表四)。注射 MSU 前灌食 TC 或其活性成分均顯著降低 MSU 所誘發之血漿中 sICAM-1 及 CXCL-1 濃度上升,其效果趨近於 Allo 和 Col 之作用。本研究發現,TC 及其活性成分也具有大幅抑制 MSU 誘發之 sICAM-1 及 CXCL-1 濃度上升,有利於減緩循環血中嗜中性球趨化作用,且已知本研究的 Cin 和 Lin 劑量符合 WHO 專家學者所訂定的 ADIs 範圍,具有食用安全性 (Lee et al., 2018)。本研究也觀察到 TC、Lin 和 Cin 均能顯著降低 MSU 誘發之腹膜灌洗液中 CXCL1 濃度,其中 TC 及相當於 TC 劑量之 Lin+Cin 作用效果與 Allo 和 Col 相似(表四),且可用以解釋腹腔中所觀察到嗜中性球數目變化之趨勢 (表二)。另外,已知 CD14 是活化 TLR2 和 4 之配體的 adaptor,而 MSU 結晶可直接與 sCD14 結合以活化 TLR2 和 4 (Scott et al., 2006);血清中存在游離態 CD14(sCD14),雖然尚不清楚 sCD14 濃度在痛風病人血中濃度變化,但活體外研究發現,MSU 結晶可直接與 sCD14 結合;在剔除小鼠 CD14 基因會大幅降低其骨髓衍生之巨噬細胞在 MSU 結晶誘發之 pro-IL-1 $\beta$  表現量、caspase-1 活性及 IL-1 $\beta$  釋放量 (Scott et al., 2006)。且在剔除 CD14 基因小鼠活體注射 MSU 結晶至皮下氣囊之痛風模式中,可降低嗜中性白血球浸潤幅度達 75%以上,顯示 CD14

在 TLR2 和 4 相關之痛風機制之必要角色 (Scott et al., 2006)。本研究發現，血漿中 sCD14 濃度會受腹腔注射 MSU 結晶而顯著上升，TC 及其活性成分略微抑制此分子濃度但其效果不如 Allo 及 Col，且與 MSU 組相較未達顯著差異。在腹膜灌洗液發現，MSU 也顯著促進此分子濃度而以 TC、Lin+Cin、Lin-H 處理的組別，均顯著降低此分子濃度，且抑制幅度與 Col (表四)。因此，論 TC 及其成分可透過抑制 MSU 誘發之 sCD14 濃度上升而緩解 TLR 配體誘發之 signal 1 活化。

#### (七)、腹膜灌洗液嗜中性球表面 CD11a/CD11b/CD18 表現量

已知 MSU 結晶活化之嗜中性球浸潤可透過 CD11b receptors 中介；若以抗體抑制嗜中性球上的 CD11b 會抑制嗜中性球對 MSU 結晶刺激的反應 (Barabe et al., 1998)，但 CD11a 及 CD18 表現量在 MSU 結晶誘發之嗜中性球浸潤的角色則尚不清楚。本研究以流式細胞儀觀察到，腹膜灌洗液中嗜中性球表面 CD11a、CD11b 和 CD18 表現量均會受到 MSU 的誘發(圖六)。而預先灌食 TC 顯示些微降低 CD11a (圖六(A))及 CD18 (圖六(C))，但不影響 CD11b (圖六(B))。相當於 TC 劑量中 Lin 含量的 Lin-H 組不影響 CD11a (圖六(A))，但些微減少 CD11b (圖六(B))和 CD18 (圖六(C))表現量，而相當於 TC 劑量中 Cin 含量的 Cin-H 組則對於 CD11a (圖六(A))、CD11b (圖六(B))和 CD18 (圖六(C))表現量均造成些微降低，Allo 及 Col 則僅些微減少 CD18 (圖六(C))。由於本研究並非觀察周邊血嗜中性球，而是觀察已浸潤至發炎部位的細胞，所以理論上這些細胞必須表現一定程度的黏附因子方能進行浸潤組織的作用，也就是說，腹膜灌洗液中的血球可能不是研究 TC 調節細胞黏附分子的適當樣本，但即便如此，仍可由這些分子表現的變化趨勢得知 TC 及其活性成分可能之抑制作用。本研究未進行周邊血嗜中性球的此項分析，主要受制於小鼠血量不足，且其中嗜中性球比例遠遠低於人類周邊血，故除非將樣品 pool 否則不易獲得足供分析的細胞數。

#### (八)、腹膜灌洗液細胞中 caspase-1 活性和 NF- $\kappa$ B 活性

目前已知發炎時細胞分泌 IL-1 $\beta$  是一種 2 步驟過程；首先細胞必須透過活化 signal 1 產生 proIL-1 $\beta$ ，因 proIL-1 $\beta$  的基礎表現量偏低，受轉錄因子 NF- $\kappa$ B 調控可大大提升其表現量 (Ozkurede et al., 2012)。第二步驟是活化 signal 2 發炎體；可在無菌環境被受到非微生物性的刺激發炎體主要是 NLRP3，MSU 結晶是誘發其活化之誘發劑之一。活化的 NLRP3 發炎體導致酵素 caspase-1 之活化，並將 proIL-1 $\beta$  分解為 IL-1 $\beta$  釋出胞外。本研究針對腹腔細胞觀察此二步驟，由於細胞數量有限，故無法針對訊號分子表現量變化偵測，而是直接觀察 NF- $\kappa$ B 活化及 caspase-1 受到 MSU 之影響，以及預先灌食土肉桂葉精油成分之效果。結果發現，受到腹腔注射之 MSU 刺激 12 h，單位體積之腹膜灌洗液中發炎細胞核中 NF- $\kappa$ B 含量僅些微上升但與控制組相較達顯著差異，其幅度不若 caspase-1 被活化的程度 (圖八)，這可能是因為 NF- $\kappa$ B 為 MSU 誘發較早期階段之 signal 1 反應，而 caspase-1 為第二階段% signal 2 反應，而上述觀察是在誘發後的後期進行，以至於僅 caspase-1 活性與控制組相較呈顯著上升 (P<0.05，圖八)。而在不影響腹膜灌洗細胞存活率下，預先灌食小鼠 TC 和相當於 TC 劑量之 Lin+Cin、Cin-H 與 MSU 組相較可顯著降低 caspase-1 活性 (P<0.05)，且效果與和 Col 相似，而 Allo 顯示最大幅度抑制 caspase-1 的效果(圖八)。

#### (九)、腹膜灌洗液細胞 NETs 免疫組織染色

已知 MSU 誘發的發炎病灶中會隨發炎活性增加而增加嗜中性球形成 NETs 之活性，在急性痛風性關節炎的病人已觀察到由滑液及周邊嗜中性球形成之 NETs，活體外以 MSU 結晶刺激嗜中性球或取自痛風病人血清及滑液之嗜中性球均發現形成 NETs (Kaplan and Radic, 2012; Schorn et al., 2012)。NETs 由鬆散的染色質和顆粒蛋白組成如：嗜中性球彈性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)瓜氨酸化組蛋白 H3 (citrullinated histone H3, citH3)等形成細胞外纖維，其中所含的 elastase 可分解基質蛋白造成組織損傷 (Kaplan and Radic, 2012)。且在急性期 NETs 之形成與痛風性發炎損傷及後續形成痛風石有關 (Schauer et al., 2014; Maueröder et al., 2015)。本研究收集腹膜灌洗液後，利用



Immunohistochemical staining 法進行浸潤細胞之 neutrophil elastase 螢光染色，並以正立螢光顯微鏡 400X 進行拍照。結果顯示，MSU 在浸潤的嗜中性球誘發顯著量之 NET 陽性細胞，且可因預先灌食 TC 及其活性成分而降低陽性細胞的比例，效果與 Col 相似，但 Allo 未改善腹腔中浸潤之嗜中性球 NET 陽性細胞的比例（圖九）。

## 實驗二、土肉桂精油及其活性成分於 MSU 刺激之小鼠腹腔巨噬細胞之抗發炎作用及機制

### (一)、MSU 結晶刺激之巨噬細胞形態

以倒立式顯微鏡觀察培養液中無或有添加終濃度為 300  $\mu\text{g/ml}$  之 MSU 懸浮液，培養 24 小時後對於巨噬細胞形態學的影響，其結果示於圖十。顯微鏡檢顯示本研究所製備之 MSU 針狀結晶長度約介於 5-20  $\mu\text{m}$ （圖二(A)），與文獻相符（Steiger and Harper, 2013）。巨噬細胞形態顯示，無刺激下，細胞雖然以偽足貼盤，但大致上仍傾向維持對稱的原圓形或略呈橢圓形（圖十(B)），但在 MSU 刺激下，細胞形態呈現不規則的偽足伸展狀態，朝向 MSU 結晶處聚集，並吞噬結晶，細胞體積增加，且細胞質中明顯有較多的顆粒（圖十(C)）。此外，部分細胞在 MSU 刺激下似乎可進一步融合為 giant cell，其體積數倍於一般巨噬細胞，且其中含有被吞噬之較大 size 的結晶（圖十(C)）。這些形態學變化確認了 MSU 為活化巨噬細胞的刺激因子，故進一步觀察 MSU 刺激作用對於促發炎指標分泌的影響。

### (二)、MSU 刺激巨噬細胞之 nitrate/nitrite、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及 IL-10 釋放量

在促發炎指標方面發現，以 MSU 刺激巨噬細胞 24 小時並未影響培養基中 nitrate/nitrite 的含量，亦即 MSU 不誘發巨噬細胞分泌 NO（表五），而雖些微促進細胞產生 TNF- $\alpha$ ，但也不具統計學上的意義（表一）。然而，可觀察到以 MSU 刺激之 VCO 組與未受刺激之 VCO 組相較，顯著促進細胞分泌 IL-1  $\beta$  ( $p < 0.05$ , 表五)，但並未誘發巨噬細胞產生抗發炎細胞激素 IL-10。已知巨噬細胞的角色是痛風性發炎的發動者，且 MSU 在體內主要是透過促進巨噬細胞分泌 IL-1  $\beta$  導致誘發嗜中性白血球浸潤組織，（Martinon et al., 2006; Torres et al., 2009; Martin et al., 2009a; Amaral et al., 2012）。過去的體外研究多先以 LPS 預處理細胞以提升胞內 proIL-1  $\beta$  含量，然後方給予 MSU 刺激細胞，此類研究發現 MSU 可刺激細胞分泌 IL-1  $\beta$ （Sil et al., 2017），與本研究僅以 MSU 刺激的發現一致，推測巨噬細胞中原本就存在一定基礎 level 之 proIL-1  $\beta$  表現量，這可由後續觀察到未受刺激細胞之細胞核仍有基礎量之 NF- $\kappa$ B 得證，而當 MSU 刺激時間較長時（本研究刺激 24 小時，其他以 LPS 誘發之研究則約刺激 6 小時），培養基中即會累積顯著量 IL-1  $\beta$ 。本研究發現 TC 及其活性成分均能夠降低因 MSU 刺激而增加分泌的 IL-1  $\beta$ ，其中給予 Lin-H 及 Cin-H 之組別在 MSU 刺激之模式中，分別能降低 71% 和 82% 之 IL-1  $\beta$  分泌量，顯示此二種 TC 成分適用於開發防治痛風性發炎的保健用途。

在 TNF- $\alpha$  方面有學者於小鼠腹腔注射 MSU 結晶後 72 小時收集腹腔細胞再給予 200  $\mu\text{g/ml}$  之 MSU 結晶刺激 16 小時，發現培養液中 IL-1  $\beta$  濃度顯著高於未再予 MSU 刺激組，但 MSU 並未顯著促進細胞產生 TNF- $\alpha$ （Martin et al., 2011; Martin et al., 2009a, Martin et al., 2009b），此也與本研究直接以 MSU 刺激初代巨噬細胞發現其不影響細胞產生 TNF- $\alpha$  之結果一致（表五）。由於 resting 狀態下活化態 NF- $\kappa$ B 亦可增進 TNF- $\alpha$  之表現，但此細胞激素似乎並不會累積在培養基中，這與過去學者所報導 TNF- $\alpha$  半衰期很短，約僅 18.2 min 可能有關（Oliver et al., 1993）。

以不同濃度 TC（5、25 或 75  $\mu\text{g/ml}$ ）添加於 MSU 刺激之巨噬細胞培養液中，發現對於培養基中 nitrate/nitrite 濃度之影響相當有限；在 MSU 刺激下，即使添加不同濃度 TC 的各組與 VCO 組間 nitrate/nitrite 濃度成顯著差異，但差異幅度均在 10% 以內。然而，可觀察到，TC 濃度依賴性抑制 MSU 刺激 IL-1  $\beta$  分泌，且在中及高濃度時達統計學上的意義 ( $p < 0.05$ , 表五)。雖然 MSU 對於細胞分泌 TNF- $\alpha$  的刺激作用並不顯著，但仍可觀察到 TC 呈濃度依賴性抑制細胞分泌此促發炎激素，且高濃度 TC 甚至可抑制此濃度達正常控制組的 35.4%，由於 TNF- $\alpha$  之表現除受到 NF- $\kappa$ B 調節外，尚會受到其他轉錄因子之調節，如 AP-1（Fu et al., 2002），故是否 TC 對於其他相關轉錄因子亦具有調節作用，以及是否在 resting

狀態TC抑制細胞產生TNF- $\alpha$ 具有生理學意義，有待進一步釐清。此外，MSU存在下，TC不刺激細胞分泌IL-10（表五）。

當以相當於各測試TC濃度中Lin含量之Lin-L、-M、-H或Cin含量之Cin-L、-M、-H添加於MSU刺激之巨噬細胞培養液中，發現Lin和Cin如同TC般對於細胞培養基中nitrate/nitrite濃度之影響有限，但顯著且大幅逆轉MSU促進IL-1 $\beta$ 產生的作用，其效果均優於相對應之TC濃度，但未呈現濃度依賴效應。Lin抑制細胞產生TNF- $\alpha$ 的效果，相似於其所相對應之TC濃度，且呈現濃度依賴效應，Cin亦抑制細胞產生TNF- $\alpha$ ，未呈現濃度依賴效應（表五）。

有研究報導指出關節處受到MSU刺激而增加關節液中IL-1 $\beta$ 之濃度，可歸因於NLRP3發炎體的活化（Pétrilli and Martinon, 2007），因此進一步觀察TC對於MSU誘發之NLRP3/ASC/caspase-1發炎體蛋白活化路徑表現之影響。此外，因為IL-1 $\beta$ 的前驅物pro-IL-1 $\beta$ 之表現，與TLR4/MD2/MyD88路徑有關，故進一步觀察MSU刺激巨噬細胞對其TLR4和NLRP3路徑相關蛋白質表現之影響和TC及其活性成分之作用。

### （三）、MSU刺激之巨噬細胞NLRP3和caspase-1蛋白質表現量

Western blotting之結果顯示，以MSU刺激小鼠腹腔巨噬細胞24小時，顯著誘發NLRP3及caspase-1蛋白質表現量使其高於VCO組（ $p < 0.05$ ）（圖十一）。近來其他研究報導顯示，在大鼠腳掌注射MSU造成踝關節組織中NLRP3及caspase-1 mRNA表現量顯著高於未注射MSU組（Dhanasekar and Rasool, 2016），與本研究在*in vitro*觀察初代巨噬細胞NLRP3及caspase-1蛋白質表現量的結果一致。且Martinon et al. (2006)以1  $\mu\text{g/ml}$ 之LPS預培養小鼠初代腹腔巨噬細胞1小時以累積細胞內pro-IL-1 $\beta$ 含量，接著以50  $\mu\text{g/ml}$ 之MSU刺激16小時，亦誘發培養液中caspase-1及IL-1 $\beta$ 蛋白質含量上升，此與本研究僅以MSU刺激初代巨噬細胞24小時的結果一致。

灌食TC顯著抑制MSU誘發之NLRP3表現量（ $p < 0.05$ ），但未逆轉MSU誘發之caspase-1表現量（圖十一）。以MSU刺激之Lin及Cin各組與VCO組相較，Lin-M及-H和Cin所有濃度均顯著抑制NLRP3表現，但在caspase-1表現量方面，僅Cin達顯著抑制的效果，且呈濃度依賴性效應（ $P < 0.05$ ，圖三）。以上結果指出，TC及其活性成分抑制MSU誘發巨噬細胞產生IL-1 $\beta$ 之作用（表五）可歸因於其抑制MSU誘發巨噬細胞NLRP3分子表現量，且Cin可另透過抑制caspase-1表現量達到抑制效果。

### （四）、MSU刺激之巨噬細胞TLR4和MyD88蛋白質表現量

Western blotting 之結果顯示，以MSU刺激小鼠腹腔巨噬細胞24小時，其MyD88蛋白質表現量顯著高於VCO組（ $p < 0.05$ ）（圖十二）。目前有關MSU對於巨噬細胞中TLR4訊號路徑之研究尚不多見，而且由於許多學者在觀察MSU對於巨噬細胞之影響時，會先以ATP或LPS預處理巨噬細胞，使其TLR4路徑活化累積細胞中pro-IL-1 $\beta$ 之含量，產生NLRP3路徑之啟動訊號，但臨床痛風患者體內是否會有LPS滲漏之現象尚不清楚。本研究首度發現單純以MSU刺激巨噬細胞24小時僅顯MyD88蛋白質表現量會受到MSU刺激而上升，TLR4則否。Chen等人（2006）發現缺乏MyD88基因之小鼠在腹腔注射MSU後6小時之腹膜灌洗液中IL-1 $\beta$ 之濃度較正常小鼠低，也顯示MyD88在MSU活化巨噬細胞發炎反應中扮演關鍵性角色。

在MSU刺激下添加TC、Lin 或Cin於培養液，均未顯著影響MSU刺激小鼠腹腔巨噬細胞TLR4和MyD88 蛋白質表現量（圖十二）。因此推測，TC及其活性成分對於抗MSU刺激之非感染性發炎，主要是透過抑制NLRP3訊號路徑之分子表現而非TLR4。

## 實驗三、介入土肉桂成分對於高尿酸飲食小鼠血糖代謝及相關共病症之影響及其機制

### (一)、小鼠代謝值、體重及臟器體重百分比

自小鼠開始給予高尿酸飲食誘發血尿酸值上升的第一天算起，於第42日開始介入土肉桂葉精油 (TC)、枷羅木醇 (Lin) 或肉桂醛 (Cin)、allopurinol 和 colchicine，於第五次灌食後 (第50日) 飼育於代謝籠，並記錄24小時攝食量、飲水量、排便量及排尿量之變化，結果僅排尿量呈現組間顯著差異，HUA組相較於Con組有顯著增加排尿量達約控制組的兩倍 ( $p < 0.05$ )，而相較於HUA組，介入TC及Cin-H顯著降低小鼠排尿量 ( $p < 0.05$ )，且Lin+Cin、Lin-H及Cin-L組也都呈降低排尿量的趨勢 (表六)。文獻指出，因高尿酸飲食中含有較高含氮物質—尿酸，故促進排尿量；正常下，隨血尿酸濃度增加，尿中排除總尿酸量也會以等比例的量增加 (Lipkowitz, 2012)，故據以推論介入土肉桂成分可能透過降低血尿酸值而降低尿液尿酸造成之滲透壓而改善排尿量。在體重方面，小鼠在給予高尿酸飲食前、後，及介入土肉桂成分後均測量其體重，並於犧牲後立即收集及測定臟器重量，並計算臟器/體重百分比，結果發現高尿酸飲食或土肉桂成分之介入並不影響這些數值 (表七)，也就是介入未對小鼠成長造成影響，符合我們過去關於TC、Lin和Cin安全劑量之報導 (Lee et al., 2018)。

### (二)、血清尿酸濃度、尿液尿酸排出量

由於本研究增加血尿酸的方式為透過飲食成分提供外源性尿酸及尿酸酶抑制劑以抑制尿酸降解，故在前試驗中發現當收集隔夜空腹下之血液測定尿酸濃度時，未發現Con組與HUA組間血尿酸值存在差異，且介入不同TC成分也未顯著影響組間空腹血尿酸濃度，僅Allo組顯著降低空腹血尿酸值 (data not shown)。當本研究以飽食狀態下採集之眼窩血液樣本分析血清中尿酸濃度。結果顯示於表八，且計算血尿酸值對照Con之變化百分比示於圖十三(A)。與Con組相較，HUA組之血尿酸濃度顯著提高，且約達Con之28%，與其他文獻顯示此模式可誘發C57BL/6小鼠血清中尿酸值由2.5 mg/dL顯著提升至3.8 mg/dL之血尿酸上升幅度相較略低 (Wan et al., 2016)，過去有學者報導此模式測得知血尿酸值與動物攝食速度及採樣時間有關 (Newburger et al., 1979)。根據國內痛風與高尿酸血症2016診治指引指出，流行病學上高尿酸血症的定義是指血尿酸濃度高於正常人的尿酸濃度之平均值加上二個標準差 (陳得源等人, 2016)，若以此為定義參考，本研究模式以誘發超過控制組超過兩倍標準差之血尿酸值，故應該有其意義。另一方面，我們發現介入TC可顯著降低飽食狀態下血尿酸濃度，且降低至Con組之-3.63%。雖然單獨或合併給予Lin及/或Cin降低血尿酸值之作用未達統計學意義，但也能發現Lin和Cin降低血尿酸值的劑量依賴性趨勢及其合併使用之潛在效果 (圖1(a))。如上所述，已知尿液尿酸排除量會隨血尿酸濃度增加而增加 (Lipkowitz, 2012)，我們進一步觀察24h尿液尿酸排除量可發現，不論介入TC、或單獨/結合Lin和Cin，都能逆轉高尿酸飲食所造成之尿中尿酸排除量，且其中主要作用來自於Cin非Lin (表八、圖十三(B))。本研究未發現介入5 mg/kg BW之Allo可顯著降低血尿酸值，這可能是因為部分尿酸是來自於飲食直接提供，故血尿酸值不全然受到xanthine oxidase抑制劑Allo下降，且本研究收集眼窩血時距離前次灌藥時間已超過二十四小時，也就是已超過其作用時間；臨床藥理學上，Allo之半衰期約為兩小時，而在大鼠的time course實驗觀察到，給予Allo十小時後血尿酸值也回到介入前水準 (Fukunari et al., 2004)。當我們觀察24h尿液總尿酸排除量仍能發現Allo大大降低排除量，反映出此藥物在24h期間整體降低血尿酸濃度之活性。

### (三)、腎臟尿酸轉運蛋白表現量

為了解降低之尿酸排除是否與這些成分影響腎臟尿酸轉運蛋白表現量有關，本研究進一步以RT-PCR及西方墨點法分析了腎臟中URAT1、OAT1和OAT3表現量，結果分別示於圖十四和圖十五。在URAT1 mRNA表現量方面，相較於HUA組，介入Lin-L、Lin-H、Cin-L、Cin-H及Lin+Cin，均顯著抑制再吸收尿酸之轉運蛋白URAT1表現量 ( $p < 0.05$ )，但TC對於URAT1 mRNA表現量之抑制作用不顯著。在OAT1 mRNA表現量方面，所有土肉桂成分之介入均逆轉高尿酸飲食所抑制之此幫助運出血尿酸之分子的mRNA表相

量且除了 TC 外，其餘組別均達顯著效果。在 OAT3 mRNA 表現量方面，所有土肉桂成分之介入均促進此運出血尿酸之分子的 mRNA 表相量，且除了 TC 及 Lin-L 外，其餘組別均達顯著效果。至於這些轉運蛋白之蛋白質表現量結果不全然與 mRNA 相同。高尿酸飲食未顯著影響這些分子之蛋白質表現量，而介入土肉桂成分後，發現 OAT1 蛋白質表現量不受任何介入影響，URAT1 蛋白表現量則顯著受到低和高劑量 Lin 和 Cin 改善；而介入 TC、Lin+Cin、Lin-L、Lin-H、Cin-L 與 Cin-H 組，相較於 HUA 組，也都有上升 OAT3 蛋白表現量之趨勢，且其中 Lin-L 與 Cin-H 組呈顯著效果 ( $p < 0.05$ )。雖然抑制 URAT1 表現及促進 OAT3 表現有助於促進尿酸排除，但圖十三(B)顯示除了 Lin-L 組以外的介入均減少 24 尿液尿酸排除量，推測這可能是因為這些成分抑制 xanthine oxidase 活性而減少血尿酸值所致，因為腎臟尿酸廓清會隨體內尿酸合成減少而下降。因此，本研究進一步測定肝臟中合成尿酸之酵素 xanthine oxidase 活性。

#### (四)、肝臟 xanthine oxidase 活性

餵食高尿酸飲食之小鼠，於介入 HUA 組發現其肝臟中 xanthine oxidase 活性顯著高於一般飲食之 Con 組 ( $p < 0.05$ ) (圖十六)。本實驗模式雖未發現肝臟中 xanthine oxidase 活性顯著受 Lin 或 Cin 降低，但確實呈現 Lin+Cin 顯著抑制 xanthine oxidase 之效果 ( $p < 0.05$ )。過去 *in vitro* 文獻指出，土肉桂葉精油可在活體外直接抑制 xanthine oxidase 活性，且此作者之 *in vivo* 研究以腹腔注射 potassium oxonate 誘發小鼠急性血尿酸升高，並餵食 150 mg/kg BW 之 Cin 發現也可藉由抑制 xanthine oxidase 來降低血中尿酸濃度，且其效果相當於餵食 10 mg/kg BW Allo (Wang et al., 2008)。由於本研究介入之 Cin 及量為 0.45 或 0.9 mg/kg BW，故可能由於劑量不足而僅能呈現作用的趨勢但未能達統計學意義，Lin 之作用也有待提高劑量釐清。此外，給予與 Lin 和 Cin 實驗劑量相當含量之 TC 能呈現顯著抑制 xanthine oxidase 活性及降血尿酸效果，也不能排除 TC 中可能還有其他活性成分。此外，本研究犧牲動物並收集肝臟的時間式在禁食 15 h 後；如上述，此時間點已遠超過 Allo 之半衰期，所以 allo 之作用無法反應於此試驗之結果，反之，我們顯示 TC 及 Lin+Cin 抑制 xanthine oxidase 之效果，顯示建議其有較 Allo 長時間的作用半衰期，值得未來進一步釐清。

#### (五)、血中葡萄糖、fructosamine 及 c-peptide 濃度

動物採高尿酸飲食五十二天後，進行口服葡萄糖耐受試驗，並在犧牲時測定血糖、fructosamine 及 c-peptide 濃度，結果顯示於表九。本研究發現，各組間 OGTT 之血糖值曲線下面積(AUC)無統計學上的差異，且犧牲後空腹血糖值及 fructosamine 濃度也不受高尿酸飲食或土肉桂成分介入之影響。然而，空腹血中 C-peptide 濃度在 HUA 組現顯著高於 Con 組，顯示有較高內生性葡萄糖分泌之作用，也就是呈現胰島素阻抗之狀態。在不影響血糖的情況下，TC、Lin+Cin、Lin-L、Cin-H 組與 HUA 組相較均能顯著降低血中 C-peptide 濃度。根據文獻，在人類正常血尿酸值濃度範圍 4~7 mg/dL 每上升 1 mg/dL 即能顯著增加 T2DM 風險，且已知血尿酸值上升與胰島素阻抗增加有關 (Avula and Shenoy, 2016)，此與我們發現高尿酸飲食增加胰島素阻抗的結果一致，而我們也顯示介入土肉桂成分可改善許尿酸及其相關之胰島素阻抗問題。已知尿酸引發的發炎反應是在胰島素標的組織造成阻抗的主要原因，故本研究接著定量分析胰島素標的組織中的發炎指標。

#### (六)、胰島素標的組織中 nitrate/nitrite 及 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 含量

流行病學研究已指出血尿酸值上升是引發 T2DM 發展之重要風險因子，且可能致病機制已被提出，包括 sUA 可造成 TNF- $\alpha$  上升，此細胞激素已知造成胰島素阻抗，反之已有臨床試驗證實，以 allopurinol 抑制血尿酸值即可改善胰島素阻抗 (Takir et al., 2015)。在本研究測定的三種發炎指標中，高尿酸飲食僅在脂肪誘發顯著增加之 IL-1 $\beta$  含量，而在肌肉和肝臟則僅增加 nitrate/nitrite 含量。然而，也可發現高尿酸飲食傾向增加肌肉和肝臟中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量。而介入土肉桂成分可發現其顯著降低肌肉和肝臟中的 TNF- $\alpha$  含量 ( $p < 0.05$ )，且在各組織傾向降低 IL-1 $\beta$  含量但僅 Cin-H 對於脂肪組

織中 IL-1 $\beta$  含量之抑制作用達統計學的意義。本研究正對照組也指出降血尿酸藥物 allopurinol 能顯著改善肌肉 TNF- $\alpha$  含量和肝臟 nitrate/nitrite 及 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量 (表十)。分子機制證實 sUA 誘發發炎相關訊號 signal 2, 即涉及 NLRP3 發炎體活化 (Kim et al., 2015; Xiao et al., 2015; Braga et al., 2017)。已知發炎反應阻礙了胰島素標的組織(脂肪、肌肉)之細胞中胰島素訊息傳遞路徑, 這對於胰島素抵抗與 T2DM 的發生扮演重要的角色。目前已知在肥胖相關之胰島素抵抗, 其機制是包括 NLRP3 發炎小體及 MyD88 依賴路徑之活化 (Hosoi et al., 2010; McArdle et al., 2013; Stienstra et al., 2011; Vandanmagsar et al., 2011), 飲食誘發肥胖之小鼠產生胰島素抵抗, 發現其脂肪組織中 TLR2 及 caspase-1 p20 蛋白質表現量且 TLR2 與 MyD88 之結合顯著增加, 且脂肪組織中有免疫細胞浸潤的現象, 同時也發現 IRS-1 絲胺酸殘基的磷酸化顯著增加, 並伴隨胰島素促進之 Akt 磷酸化活化顯著減少, 而以抑制劑抑制 TLR2 或基因剔除 ASC 或 caspase-1 則可逆轉上述現象 (Caricilli et al., 2008; Stienstra et al., 2011; Vandanmagsar et al., 2011); 此外, 研究發現高尿酸飼料, 可能透過增加 NLRP3 訊號, 增加肝臟中 caspase-1 p20、IL-1 $\beta$  蛋白質表現量造成胰島素抵抗 (Wan et al., 2016), 但高血尿酸是否對於肌肉及脂肪組織有一樣的影響, 進而可能損害胰島素促進之葡萄糖攝入的效率, 目前則不清楚。由於本計畫前試驗發現本研究所使用的動物模式不影響肌肉中上述發炎訊號分子表現量, 故僅進一步針對脂肪組織這些發炎訊號路徑分子表現量進行觀察。

### (七)、脂肪組織中 TLR2、MyD88、NLRP3 及 caspase-1 p20 蛋白質表現量

以 western blotting 分析高尿酸飲食造成之副睪脂肪 TLR2、MyD88、NLRP3 及 caspase-1 p20 蛋白質表現量發現其顯著受高尿酸飲食促進 (圖十七)。與 HUA 組相較, 介入 TC 或合併給予 Lin 及 Cin 均有降低 TLR2 蛋白質表現量之趨勢, 而單獨介入 Lin-H 或 Cin-H 降低 TLR2 蛋白質表現量之作用呈現劑量依賴性, 且在高劑量下達顯著抑制效果 ( $P < 0.05$ )。MyD88 蛋白質表現量方面, 與 HUA 組相較, TC、Lin+Cin、Lin-L、Lin-H、Cin-H 組均顯著降低 MyD88 蛋白質表現量, Cin-L 也有降低 MyD88 蛋白質表現量之趨勢, 但未達無統計學上的差異, 而單獨給予低或高劑量之 Lin 或 Cin 其降低 MyD88 蛋白質表現量之趨勢呈現劑量依賴性, 但不管是單獨或合併給予 Cin 或 Lin 之效果均不及給予 TC。但降血尿酸藥 Allopurinol 則未抑制 TLR2 及 MyD88 蛋白質表現量。本研究未發現高尿酸飲食或介入土肉桂成分會影響副睪脂肪中 NLRP3 蛋白質表現量, 但其顯著增加 ASC 及 caspase-1 p20 蛋白質表現量 (圖十七)。與 HUA 組相較, Lin+Cin 組顯著降低 ASC 蛋白質表現量, TC 雖有降低 ASC 蛋白質表現量之趨勢, 但未達無統計學上的差異, 但不管是單獨或合併給予 Cin 或 Lin 之效果均不及給予 TC 或 Lin+Cin 之抑制效果。此外, 雖然介入 TC、單獨或合併給予 Lin 及 Cin 均有降低 caspase-1 p20 蛋白質表現量, 但僅 TC 組達到統計學上的差異。Allopurinol 不論在抑制 ASC 或 caspase-1 p20 蛋白質表現量方面都無顯著作用。由以上可知, 在本研究模式下土肉桂成分調節脂肪發炎訊號的作用至少有部分是獨立於調控血尿酸濃度, 而與過去我們發現的抗發炎活性直接相關 (Lee et al., 2018)。

### (八)、腎功能指標

本研究分析小鼠血液尿素氮 (BUN) 及根據血中和尿中 creatinine 含量計算腎絲球過濾率 (GFR), 結果示於表十一。血清中 BUN 濃度方面, 餵食高尿酸飲食之 HUA 組雖顯著高於一般飲食之 Con 組 ( $p < 0.05$ ), 但仍維持在小鼠正常生理範圍 (BUN: 8-33 mg/dL)。介入 TC 及其活性成分之各組, 除 Cin-H 組之血清中 BUN 濃度顯著低於 HUA 組外 ( $p < 0.05$ ), 其餘組別之 BUN 濃度與 HUA 組間均無顯著差異。在 GFR 方面, HUA 組的 GFR 值不論以體重或腎重為基礎, 其數值均顯著高於 Con 組 ( $p < 0.05$ ), 呈現超過率狀態。近來的研究報告指出, 大量實驗室證據證實尿酸會刺激活化腎臟局部 renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), 且 RAAS 已知是透過失衡的動脈血管收縮導致腎絲球超過率的因素, 其最終導致腎絲球硬化 (Hisatome and Kuwabara, 2016), 此與本研究發現相符合, 然而本研究發現介入土肉桂成分之各組中, 僅 Lin+Cin 組可顯著逆轉高尿酸飲食 HUA 組所導致之 GFR 值上升現象 ( $p < 0.05$ )。且本研究也未發現 Allo 改善 GFR 值。

## (九)、腎臟中 nitrate/nitrite 及 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 含量

於餵食高尿酸飲食之 HUA 組，腎臟中 nitrate/nitrite 含量顯著高於一般飲食之 Con 組 ( $p < 0.05$ )，相較於 HUA 組，介入 TC 組腎臟中 nitrate/nitrite 含量顯著下降 ( $p < 0.05$ )，介入 TC 活性成分之各組，與 HUA 組相比較，皆顯著降低腎臟中 nitrate/nitrite 含量，且效果與 TC 組相似 (表十)。而 Allo 組相較於 HUA 組也顯著降低腎臟中 nitrate/nitrite 含量 ( $p < 0.05$ )。在促發炎激素 IL-1 $\beta$  與 TNF- $\alpha$  方面，HUA 組相較於 Con 組，呈現微增加腎臟產生 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  之趨勢，但不具統計學上之意義。在介入土肉桂成分各組，相較於 HUA 組，皆呈現顯著降低腎臟中 IL-1 $\beta$  含量 ( $p < 0.05$ )。此外，介入土肉桂成分，相較於 HUA 組均呈現降低腎臟 TNF- $\alpha$  含量之趨勢，其中 Lin+Cin、Lin-L 和 Cin-L 的作用達統計學上之意義 ( $p < 0.05$ )，且其效果與 Allo 相當 (表十)。

## (十)、腎臟中 TLR2、MyD88、ASC 及 caspase-1 p20 蛋白質表現量

本研究以西方墨點法觀察腎臟中 TLR2、MYD88、NLRP3、ASC 及 caspase-1 p20 蛋白質表現量，以確認其在腎臟的抗發炎作用，結果顯示於圖十八。雖然這些發炎訊號蛋白質的表現量均不受高尿酸飲食的影響，與腎臟未發現增加之 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量相符 (表十)，但介入 Lin-L、Lin-H 與 Cin-H 均能顯著降低 TLR2 蛋白質之表現量 ( $p < 0.05$ )。介入土肉桂成分之各組均顯著降低腎臟 MYD88 蛋白質表現量 ( $p < 0.05$ )，顯示 signal 1 的活性可受到這些土肉桂成分之顯著抑制，此與其能降低腎臟 TNF- $\alpha$  含量相符合 (表十)。在 NLRP3 發炎體相關訊號蛋白質表現量方面，介入 TC 及其活性成分之各組，除 TC 組外，其餘組別相較於 HUA 組，皆顯著降低 ASC 表現量 ( $p < 0.05$ )，但只有 Cin-H 組可顯著降低 caspase-1 p20 蛋白質表現量 ( $p < 0.05$ )。整體而言，此 western blotting 結果顯示腎臟中的 signal 2 活性可因相關分子表現量受土肉桂成分抑制而降低，此與其能降低腎臟 IL-1 $\beta$  含量相符合 (表十)。正對照組 Allo 組也呈顯著降低之腎臟中 TLR2、MyD88、ASC 及 caspase-1 p20 蛋白質表現量，此發現進一步確認 TC 及其成分降低腎臟中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量之機制，但所有介入中僅 Lin+Cin 顯著改善腎臟超過率，此與這些成分在腎臟的抗發炎作用似乎較無關，為了解是否與改善尿酸上升引發之血壓調節改變進而改善腎臟血流有關，故接著觀察血液中 nitrate/nitrite 濃度。

## (十一)、血液中 nitrate/nitrite 濃度

已知尿酸能降低血管內皮產生 NO 及降低 NO 生物利用率，進而影響血壓調節；在人類臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 之研究顯示，可溶性尿酸能透過降低內皮一氧化氮合成酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 與其活化劑鈣調蛋白 (calmodulin) 之結合而降低此酵素之活性，導致減少 NO 釋放 (Kang et al., 2005; Park et al., 2013)。另外有研究指出，尿酸可直接與 NO 反應形成 6-aminouracil 造成 NO 耗竭 (Gersch et al., 2008)。Khosla 等人利用 oxonic acid 誘發大鼠血中尿酸濃度提高，並測量血中 nitrate/nitrite 濃度，發現血中尿酸濃度與 nitrate/nitrite 濃度呈現負相關 (Khosla et al., 2005)。近來則有學者指出，血管 NOS 系統受損已知與糖尿病腎病之 hyperfiltration 有關 (Dellamea et al., 2014)。根據本研究發現，高尿酸飲食導致小屬血中 nitrate/nitrite 濃度顯著下降 (圖十九)，這可能部分解釋其造成小屬腎臟超過率的現象。而無論是介入 TC、合併或單獨給予 Lin 及 Cin 均顯著提升周邊血中 nitrate/nitrite 濃度，且已 Lin+Cin 改善幅度最大，推測其可透過改善高血尿酸所導致之腎局部血壓異常而改善腎絲球過濾率。本研究未發現 Allo 顯著改善血中 nitrate/nitrite 濃度，此與推論 Allo 因而無法改善腎絲球超過率之現象吻合。關於土肉桂葉精油對於腎臟 RAAS 調控之影響值得未來進一步探討。

## 六、結論與建議

總結本研究的主要發現：在安全劑量範圍下灌食伽羅木醇型台灣土肉桂葉精油 (TC) 及個別或組合其活性成分伽羅木醇 (Lin) 和肉桂醛 (Cin) 於小鼠可預防尿酸鈉結晶 (MSU) 誘發之痛風性發炎反應，其證據包括：(1)

抑制痛風性發炎誘發局部浸潤之嗜中性球數目及破壞組織之 MPO 活性和 NETs 形成，以抑制及發炎指標濃度 (2) 抑制痛風性發炎在血中誘發之痛風性發炎指標 MPO 和 TGF- $\beta$ 1 濃度 (3) 抑制痛風性發炎下造成之腎臟和脾臟發炎指標含量 (4) TC 及其活性成分抑制嗜中性球浸潤的作用與抑制 MSU 誘發巨噬細胞釋放 IL-beta 及抑制黏附分子 sICAM-1 及趨化因子 CXCL-1 之產生有關 (5) TC 及其活性成分的保護機制是透過抑制胞內與發炎作用有關之 signal 1 分子 TLR2 和 MyD88 表現量及 signal 2 分子 NLRP3、ASC 和 caspase-1 表現量及 NLRP3 發炎體活化有關也與抑制 TLR 之 adaptor CD14 之產生有關。此外，本研究也發現在以含有 potassium oxonate 和尿酸之高尿酸飲食餵食的小鼠介入 TC 及其活性成分可預防血尿酸值上升所引起的血糖代謝、血壓調節及腎功能異常問題，且與其降血尿酸和抗發炎作用有關其證據包括：(1) 透過抑制 xanthine oxidase 活性及調節腎臟幫助廓清尿酸之轉運蛋白表現而降低血尿酸值及 24 h 尿液排出之總尿酸量 (2) 透過在胰島素標的組織之抗發炎作用改善胰島素阻抗 (3) 在脂肪組織之抗發炎作用與抑制與發炎作用有關之 signal 1 分子 TLR2 和 MyD88 表現量及 signal 2 分子 ASC 和 caspase-1 p20 表現量有關 (4) 在腎臟抑制發炎指標含量並改善腎臟超過濾問題 (5) 對於腎臟的保護作用也與抑制與發炎作用有關之 signal 1 分子 TLR2 和 MyD88 表現量及 signal 2 分子 ASC 和 caspase-1 p20 表現量有關 (6) 在血液中可逆轉高尿酸誘發之 nitrate/nitrite 濃度下降，推論可因而改善血管內皮產生 NO 產生不足造成之血壓異常。由於我們過去已在報告中指出相當於本研究所介入枷羅木醇型台灣土肉桂成分 Lin 和 Cin 的劑量換算為人體劑量符合美國 FDA 及 WHO 對於此二化合物建議之 acceptable daily intake (ADIs) 劑量 (Lee et al., 2018)，因此本研究之發現建議此二成分以及以此二成分為主要組成之枷羅木醇型台灣土肉桂葉精油在未來值得進一步進行人體試驗，確認其在防治高血尿酸相關急、慢性共病症發展之保健功效及臨床應用價值。

## 參考文獻

- Amaral FA, Costa VV, Tavares LD et al (2012) NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B4 in a murine model of gout. *Arthritis Rheum* 64:474–484.
- Annemans L, Spaepen E, Gaskin M et al (2008). Gout in the UK and Germany: prevalence, comorbidities and management in general practice 2000–2005. *Ann Rheum Dis* 67:960-966.
- Avula NR, Shenoy D (2016) Evaluation of Association of Hyperuricaemia with Metabolic Syndrome and Insulin Resistance. *J Clin Diagn Res* 10:OC32-OC34.
- Bäckhed F, Meijer L, Normark S et al (2002) TLR4-dependent recognition of lipopolysaccharide by epithelial cells requires sCD14. *Cell Microbiol* 4:493-501.
- Baldwin W, McRae S, Marek G et al (2011) Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome. *Diabetes* 60:1258-1269.
- Barabe F, Gilbert C, Liao N et al (1998) Crystal-induced neutrophil activation VI. Involvement of FcγRIIIB (CD16) and CD11b in response to inflammatory microcrystals. *FASEB J* 12:209–220.
- Braga TT, Forni MF, Correa-Costa M et al (2017) Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome. *Sci Rep* 7:39884.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C et al (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-1535.
- Burns CM, Wortmann RL (2012) Latest evidence on gout management: what the clinician needs to know. *Ther Adv Chronic Dis* 3:271-286.
- Caricilli AM, Nascimento PH, Pauli JR et al (2008) Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *J Endocrinol* 199:399-406.
- Chen CJ, Shi Y, Hearn A et al (2006) MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest* 116:2262-2271.
- Chen C, Lei W, Chen W et al (2014) Serum TGF-β1 and SMAD3 levels are closely associated with coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord* 14:18.
- Cheng SS, Liu JY, Hsui YR et al (2006) Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresour Technol* 97:306-312.
- Chuang SY, Lee SC, Hsieh YT et al (2011) Trends in hyperuricemia and gout prevalence: Nutrition and Health Survey in Taiwan from 1993-1996 to 2005-2008. *Asia Pac J Clin Nutr* 20:301-308.
- Coe FL, Moran E, Kavalich AG (1976) The contribution of dietary purine over-consumption to hyperpuricosuria in calcium oxalate stone formers. *J Chronic Dis* 29:793-800.
- Crişan TO, Cleophas MC, Oosting M et al (2016) Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. *Ann Rheum Dis* 75:755-762.
- Dalbeth N, Lauterio TJ, Wolfe HR (2014) Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. *Clin Ther* 36:1465-1479.
- Dehghan A, van Hoek M, Sijbrands EJ et al (2008) High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 31:361–362.
- Dellamea BS, Leitão CB, Friedman R et al (2014) Nitric oxide system and diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr* 6:17.
- Dhanasekar C, Rasool M (2016) Morin, a dietary bioflavonol suppresses monosodium urate crystal-induced inflammation in an animal model of acute gouty arthritis with reference to NLRP3 inflammasome, hypo-xanthine phospho-ribosyl transferase, and inflammatory mediators. *Eur J Pharmacol* 786:116-127.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A et al (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101:890-898.
- Ford RA, Domeyer B, Easterday O (2000) Criteria for development of a database for safety evaluation of fragrance ingredients. *Regul Toxicol Pharmacol* 31:155-181.
- Gasse P, Riteau N, Charron S et al (2009) Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome



in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179:903-913.

Gersch C, Pali SP, Kim KM et al (2008) Inactivation of nitric oxide by uric acid. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 27:967-978.

Griebisch A, Zollner N (1974) Effect of ribomononucleotides given orally on uric acid production in man. *Adv Exp Med Biol* 41:443-449.

Getting SJ, Flower RJ, Parente L et al (1997) Molecular Determinants of Monosodium Urate Crystal-Induced Murine Peritonitis: A Role for Endogenous Mast Cells and a Distinct Requirement for Endothelial-Derived Selectins1. *JPET* 283:123–130.

Habu Y, Yano I, Takeuchi A et al (2003) Decreased activity of basolateral organic ion transports in hyperuricemic rat kidney: roles of organic ion transporters, rOAT1 rOAT3 and rOCT2. *Biochem Pharmacol* 66:1107-1114.

Habu Y, Yano I, Okuda M et al (2005) Restored expression and activity of organic ion transporters rOAT1, rOAT3 and rOCT2 after hyperuricemia in the rat kidney. *Biochem Pharmacol* 69:993-999.

Hisatome I and Kuwabara M (2016) Hyperuricemia plays pivotal role in progression of kidney disease. *Circ J* 80: 1710-1711.

Hoffmeister C, Silva MA, Rossato MF et al (2014) Participation of the TRPV1 receptor in the development of acute gout attacks. *Rheumatol (Oxford)* 53:240-249.

Hosoi T, Yokoyama S, Matsuo S et al (2010) Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-deficiency increases risk of diabetes in mice. *PLoS One* 5:e12537.

Hu QH, Wang CA, Li JM et al (2009) Allopurinol, rutin, and quercetin attenuate hyperuricemia and renal dysfunction in rats induced by fructose intake: renal organic ion transporter involvement. *Am J Physiol-Renal* 297:F1080-F1091.

Jhang JJ, Lu CC, Yen GC. (2016) Epigallocatechin gallate inhibits urate crystals-induced peritoneal inflammation in C57BL/6 mice. *Mol Nutr Food Res* 60:2297–2303.

Jia L, Xing J, Ding Y et al (2013) Hyperuricemia causes pancreatic beta-cell death and dysfunction through NF-kappaB signaling pathway. *PLoS One* 8:e78284.

Kang DH, Park SK, Lee IK et al (2005) Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *J Am Soc Nephrol* 16:3553-3562.

Kaplan MJ, Radic M (2012) Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 189:2689–2695.

Kato Y (2016) Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific 641 markers and reactive compounds during inflammation. *J Clin Biochem Nutr* 58: 99–104.

Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunol* 11:373–384.

Khanna D, FitzGerald JD, Khanna PP et al (2012) 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64:1431-1446.

Khosla UM, Zharikov S, Finch JL et al (2005) Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Intern* 67:1739-1742.

Kim SM, Lee SH, Kim YG et al (2015) Hyperuricemia-induced NLRP3 activation of macrophages contributes to the progression of diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 308:F993-F1003.

Kuwabara M (2016) Hyperuricemia, Cardiovascular Disease, and Hypertension. *Pulse (Basel)* 3:242-252.

Kuo CH, Lee SH, Chen KM, et al (2011) Effect of garlic oil on neutrophil infiltration in small intestine of endotoxin-injected rats and its association with levels of soluble and cellular adhesion molecules. *J Agric Food Chem* 59:7717-7725.

Lee SC, Xu WX, Lin LY et al (2013) Chemical Composition and Hypoglycemic and Pancreas-Protective Effect of Leaf Essential Oil from Indigenous Cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum* Kanehira). *J Agric Food Chem* 61:4905–4913.

Lee SC, Hsu JS, Li CC et al (2015) Protective Effect of Leaf Essential Oil from *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira on Endotoxin-Induced Intestinal Injury in Mice Associated With Suppressed Local Expression of Molecules in the Signaling Pathways of TLR4 and NLRP3. *PLoS One* 10:e0120700

Lee SC, Wang SY, Li CC, Liu CT (2018) Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde and linalool from

the leaf essential oil of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira in endotoxin-induced mice. *J Food Durg Anal* 26:211-220.

Letizia CS, Cocchiara J, Lalko J et al (2003) Fragrance material review on linalool. *Food Chem Toxicol* 41:943-64.

Li S, Yang H, Guo Y et al (2016) Comparative efficacy and safety of urate-lowering therapy for the treatment of hyperuricemia: a systematic review and network meta-analysis. *Sci Rep* 6:33082.

Lipkowitz MS (2012) Regulation of uric acid excretion by the kidney. *Curr Rheumatol Rep* 14:179-188.

Liu HJ, Pan XX, Liu BQ et al (2017) Grape seed-derived procyanidins alleviate gout pain via NLRP3 inflammasome suppression. *J Neuroinflammation* 14:74.

Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A et al (2005a) Innate Immunity Conferred by Toll-like Receptors 2 and 4 and Myeloid Differentiation Factor 88 Expression Is Pivotal to Monosodium Urate Monohydrate Crystal-Induced Inflammation. *Arthritis Rheum* 52:2936–2946.

Liu-Bryan R, Pritzker K, Firestein GS et al (2005b) TLR2 Signaling in Chondrocytes Drives Calcium Pyrophosphate Dihydrate and Monosodium Urate Crystal-Induced Nitric Oxide Generation. *J Immunol* 174:5016–5023.

Mandal AK, Mount DB (2015) The molecular physiology of uric acid homeostasis. *Annu Rev Physiol* 77:323-345.

Martin WJ, Herst PM, Chia EW et al (2009a) Sesquiterpene dialdehydes inhibit MSU crystal-induced superoxide production by infiltrating neutrophils in an in vivo model of gouty inflammation. *Free Radic Bio Med* 47:616–621.

Martin WJ, Walton M, Harper J (2009b) Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout. *Arthritis Rheum* 60:281–289.

Martinon F, Pétrilli V, Mayor A et al (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237-241.

Martinon F, Burns K, Tschopp, J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 $\beta$ . *Mol. Cell* 10:417–426.

Maueröder C, Kienhöfer D, Hahn J et al (2015) How neutrophil extracellular traps orchestrate the local immune response in gout. *J Mol Med* 93:727-734.

McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM et al (2013) Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol* 4:52.

Meotti FC, Jameson GN, Turner R et al (2011) Urate as a physiological substrate for myeloperoxidase: implications for 639 hyperuricemia and inflammation. *J Biol Chem* 286: 12901–12911.

Mitroulis I, Kambas K, Semin KR (2013) Neutrophils, IL-1 $\beta$ , and gout: is there a link? *Immunopathol* 35:501–512.

Nigam SK, Bush KT, Bhatnagar V (2007) Drug and toxicant handling by the OAT organic anion transporters in the kidney and other tissues. *Nat Clin Pract Nephrol* 3:443-448.

Oliver JC, Bland LA, Oettinger CW et al (1993) Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge. *Lymphokine Cytokine Res* 12:115-120.

Ozkurede VU, Franchi L (2012) Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: role of inflammasomes in autoinflammatory syndromes. *Clin Exp Immunol* 167:382-390.

Park JH, Jin YM, Hwang S et al (2013) Uric acid attenuates nitric oxide production by decreasing the interaction between endothelial nitric oxide synthase and calmodulin in human umbilical vein endothelial cells: a mechanism for uric acid-induced cardiovascular disease development. *Nitric Oxide* 32:36-42.

Pétrilli, V. and Martinon, F. (2007) The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout. *Joint Bone Spine* 74:571-576.

Prasad Sah OS, Qing YX (2015) Associations between hyperuricemia and chronic kidney disease: a review. *Nephrourol Mon* 7(3):e27233.

Rada B (2017) Neutrophil extracellular traps and microcrystals. *J Immunol Res* 2017:2896380.

Reginato AM, Olsen BR (2007) Genetics and experimental models of crystal-induced arthritis. Lessons learned from mice and men: is it crystal clear? *Curr Opin Rheumatol* 19:134–145.

Ruggiero C, Cherubini A, Ble A et al (2006) Uric acid and inflammatory markers. *Eur Heart J*

27:1174-1181.

Schauer C, Janko C, Munoz LE et al (2014) Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med* 20:511.

Schwartz IF, Grupper A, Chernichovski T et al (2011). Hyperuricemia attenuates aortic nitric oxide generation, through inhibition of arginine transport, in rats. *J Vas Res* 48:252-260.

Scott P, Ma H, Viriyakosol S et al (2006) Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. *J Immunol* 177:6370–6378.

Shaw OM, Steiger S, Liu X et al (2014) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor drives monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammatory macrophage differentiation and NLRP3 inflammasome up-regulation in an in vivo mouse model. *Arthritis Rheumatol* 66: 614 2423–2428.

Shi Y, Evans JE, Rock KL (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425:516–521.

Sil P, Wicklum H, Surell C et al (2017) Macrophage-derived IL-1 $\beta$  enhances monosodium urate crystal-triggered NET formation. *Inflamm Res* 66:227-237.

Singh JA (2016) Gout: will the “King of Diseases” be the first rheumatic disease to be cured? *BMC Med* 14:180.

Smith E, Hoy D, Cross M et al (2014) The global burden of gout: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* 73:1470-1476.

So A, Thorens B (2010) Uric acid transport and disease. *J Clin Invest* 120:1791–1799.

Soltani Z, Rasheed K, Kapusta DR et al (2013) Potential role of uric acid in metabolic syndrome, hypertension, kidney injury, and cardiovascular diseases: is it time for reappraisal? *Curr Hypertens Rep* 15:175-181.

Steiger S, Harper JL (2013) Neutrophil cannibalism triggers transforming growth factor $\beta$ 1 production and self regulation of neutrophil inflammatory function in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in mice. *Arthritis Rheum* 65:815–823.

Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ et al (2011) Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:15324-15329.

Takir M, Kostek O, Ozkok A et al (2015) Lowering Uric Acid With Allopurinol Improves Insulin Resistance and Systemic Inflammation in Asymptomatic Hyperuricemia. *J Invest Med* 63:924-929.

Terkeltaub R, Baird S, Sears P et al (1998) The murine homolog of the interleukin-8 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of neutrophilic inflammation in the air pouch model of acute urate crystal-induced gouty synovitis. *Arthritis Rheum* 41:900–909.

Torres R, Macdonald L, Croll SD et al (2009) Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. *Ann Rheum Dis* 68:1602–1608.

Valle M, Martos R, Cañete MD et al (2015) Association of serum uric acid levels to inflammation biomarkers and endothelial dysfunction in obese prepubertal children. *Pediatr Diabetes*. 16:441-447.

Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A et al (2011) The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 17:179-188.

Wan X, Xu C, Lin Y et al (2016) Uric acid regulates hepatic steatosis and insulin resistance through the NLRP3 inflammasome-dependent mechanism. *J Hepatol* 64:925-932.

Wang SY, Yang CW, Liao JW et al (2008) Essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum* acts as a xanthine oxidase inhibitor and reduces the serum uric acid levels in oxonate-induced mice. *Phytomed* 15:940–945.

Xiao J, Fu C, Zhang X et al (2015) Soluble monosodium urate, but not its crystal, induces toll like receptor 4-dependent immune activation in renal mesangial cells. *Mol Immunol* 66:310-318.

Yu L, Wang L, Chen S (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med* 14:2592-2603.

Yuan H, Hu Y, Zhu Y et al (2017) Metformin ameliorates high uric acid-induced insulin resistance in skeletal muscle cells. *Mol Cell Endocrinol* 443:138-145.

Zhou Y, Fang L, Jiang L et al (2012). Uric acid induces renal inflammation via activating tubular NF- $\kappa$ B signaling pathway. *PLoS One* 7:e39738.

Zhu Y, Hu Y, Huang T et al (2014) High uric acid directly inhibits insulin signaling and induces insulin

resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 447:707-714.

蔡嘉哲、余光輝、林孝義等人 (2013) 台灣痛風與高尿酸血症 2013 診治指引. *Formosan J Rheumatol* 27:1-26

陳得源、李奕德、林世昌等人 (2016) 台灣痛風與高尿酸血症 2016 診治指引. *Formosan J Rheumatol* 30:1-32.

張上鎮 (2002) 土肉桂葉子精油的生物活性與應用. *台灣林業* 28(6):31-35.

謝瑞中 (2006) 肉桂天然香料的成分與應用. *林業研究專訊* 13(4):14-16.

楊政川、李世傑、何坤益、林敏宜 (2010) 台灣森林特產物--土肉桂. *科學發展* 446:28-33.

劉育廷. 2010. 土肉桂葉精油對於LPS誘發大鼠腸黏膜嗜中性球浸潤及發炎作用之影響. 中山醫學大學營養學系碩士論文.

蔡幸芬. 土肉桂葉精油於第2型糖尿病小鼠模式胰島素增敏及腎臟保護作用之探討. 2014. 中山醫學大學營養學系碩士論文.

倪曼婷. 2013. 槲羅木醇於streptozotocin誘發糖尿病大鼠之抗糖尿病作用. 中山醫學大學營養學系碩士論文.

## 附表與附圖

表一、正常控制組及灌食土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛後注射 MSU 之各組小鼠灌食前、後和誘發後(犧牲前)體重和臟器組織重/體重百分比

	Con	MSU	TC	Lin+Cin	Lin-L	Lin-H	Cin-L	Cin-H	Allo	Col
<b>Body wt.</b>										
灌食前	26.75±1.25	25.86±1.79	24.86±1.29	26.01±2.00	25.78±0.94	24.24±1.31	25.05±2.61	24.55±1.97	26.20±1.44	25.94±1.13
MSU 誘發前	27.14±1.61	26.24±2.37	25.90±1.28	27.31±1.02	26.56±1.25	25.78±0.94	24.89±2.87	25.46±2.18	26.58±1.84	26.54±1.36
MSU 誘發後	24.83±1.18	24.93±1.51	23.86±0.62	25.83±1.44	25.65±0.82	24.31±1.60	23.15±2.89	23.64±2.25	23.81±1.87	23.80±0.99
<b>臟器/體重比 x100 (%)</b>										
腎臟	0.66±0.03	0.67±0.02	0.67±0.04	0.71±0.10	0.68±0.02	0.67±0.02	0.66±0.04	0.68±0.01	0.70±0.03	0.67±0.05
脾臟	0.22±0.01	0.23±0.02 <sup>ab</sup>	0.23±0.01 <sup>ab</sup>	0.25±0.04 <sup>ab</sup>	0.25±0.03 <sup>a</sup>	0.21±0.01 <sup>b</sup>	0.24±0.04 <sup>ab</sup>	0.22±0.02 <sup>ab</sup>	0.23±0.00 <sup>ab</sup>	0.22±0.01 <sup>ab</sup>
胰臟	0.73±0.06	0.74±0.17	0.76±0.04	0.74±0.09	0.69±0.11	0.74±0.09	0.71±0.06	0.69±0.09	0.79±0.13	0.67±0.12
肝臟	4.82±0.55	4.67±0.40 <sup>ab</sup>	4.66±0.42 <sup>ab</sup>	4.58±0.45 <sup>ab</sup>	4.86±0.42 <sup>a</sup>	4.60±0.38 <sup>ab</sup>	3.48±1.99 <sup>b</sup>	4.67±0.34 <sup>ab</sup>	4.61±0.37 <sup>ab</sup>	4.79±0.17 <sup>a</sup>
副睪脂肪	0.44±0.11	0.49±0.08 <sup>ab</sup>	0.49±0.04 <sup>ab</sup>	0.49±0.04 <sup>ab</sup>	0.47±0.04 <sup>ab</sup>	0.51±0.03 <sup>ab</sup>	0.43±0.13 <sup>ab</sup>	0.55±0.12 <sup>a</sup>	0.46±0.02 <sup>ab</sup>	0.42±0.09 <sup>b</sup>
腓腸肌	0.60±0.03	0.57±0.03 <sup>abc</sup>	0.58±0.05 <sup>abc</sup>	0.56±0.07 <sup>bc</sup>	0.52±0.06 <sup>c</sup>	0.58±0.04 <sup>abc</sup>	0.58±0.04 <sup>abc</sup>	0.63±0.06 <sup>a</sup>	0.61±0.02 <sup>ab</sup>	0.55±0.03 <sup>bc</sup>

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine. Data presented as mean ± SD. \*significant difference between Con group and MSU group (p < 0.05). a, and b, and c indicate the means of MSU-injected groups not sharing the same superscript letter are significantly different (P < 0.05).

表二、正常控制組及灌食土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛後注射 MSU 各組小鼠腹膜灌洗液中嗜中性白血球及巨噬細胞/單核球 profile

	Con	MSU	TC	Lin+Cin	Lin-L	Lin-H	Cin-L	Cin-H	Allo	Col
總細胞數 ( $\times 10^6$ /mice)	3.02 $\pm$ 0.90	5.62 $\pm$ 1.13 <sup>*a</sup>	3.20 $\pm$ 1.14 <sup>c</sup>	4.13 $\pm$ 1.36 <sup>bc</sup>	4.91 $\pm$ 1.56 <sup>ab</sup>	3.62 $\pm$ 1.24 <sup>c</sup>	4.24 $\pm$ 1.23 <sup>bc</sup>	4.06 $\pm$ 1.31 <sup>bc</sup>	3.94 $\pm$ 1.26 <sup>bc</sup>	4.10 $\pm$ 0.50 <sup>bc</sup>
viability%	98.5 $\pm$ 1.2	98.8 $\pm$ 0.5	99.1 $\pm$ 1.1	98.8 $\pm$ 0.8	98.0 $\pm$ 1.9	99.6 $\pm$ 0.9	99.0 $\pm$ 1.0	99.4 $\pm$ 1.2	99.0 $\pm$ 1.2	99.2 $\pm$ 0.9
Neutrophils number ( $\times 10^6$ /mice)	1.14 $\pm$ 0.34	3.81 $\pm$ 0.77 <sup>*a</sup>	1.47 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	2.13 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	2.82 $\pm$ 0.90 <sup>ab</sup>	1.85 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>	2.32 $\pm$ 0.67 <sup>ab</sup>	2.01 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	2.30 $\pm$ 0.74 <sup>ab</sup>	2.18 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>
Monocyte/ Macrophages number ( $\times 10^6$ /mice)	1.88 $\pm$ 0.56	1.81 $\pm$ 0.36	1.74 $\pm$ 0.62	2.00 $\pm$ 0.66	2.09 $\pm$ 0.66	1.77 $\pm$ 0.61	1.92 $\pm$ 0.56	2.04 $\pm$ 0.66	1.64 $\pm$ 0.52	1.92 $\pm$ 0.23

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and MSU group ( $p < 0.05$ ). a, and b, and c indicate the means of MSU-injected groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

表三、正常控制組及灌食土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛後注射 MSU 各組小鼠血漿、腹膜灌洗液及臟器組織中 nitrate 和 nitrite、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  1 濃度或含量

	Con	MSU	TC	Lin+Cin	Lin-L	Lin-H	Cin-L	Cin-H	Allo	Col
<b>血漿</b>										
nitrate/nitrite ( $\mu$ M/ml)	178.6 $\pm$ 46.7	85.1 $\pm$ 24.9 <sup>*cb</sup>	106.8 $\pm$ 13.5 <sup>ab</sup>	103.6 $\pm$ 27.4 <sup>ab</sup>	110.5 $\pm$ 6.3 <sup>ab</sup>	50.9 $\pm$ 11.2 <sup>c</sup>	88.7 $\pm$ 21.0 <sup>bc</sup>	78.5 $\pm$ 24.4 <sup>bc</sup>	115.9 $\pm$ 32.8 <sup>ab</sup>	136.3 $\pm$ 59.6 <sup>a</sup>
IL-1 $\beta$ ( $\mu$ M/ml)	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
TGF- $\beta$ 1 (pg/ml)	43.5 $\pm$ 8.8	102.1 $\pm$ 19.7 <sup>*a</sup>	48.4 $\pm$ 9.9 <sup>c</sup>	63.6 $\pm$ 8.7 <sup>bc</sup>	82.7 $\pm$ 21.9 <sup>ab</sup>	50.3 $\pm$ 9.3 <sup>c</sup>	86.4 $\pm$ 10.2 <sup>a</sup>	59.3 $\pm$ 13.9 <sup>c</sup>	50.4 $\pm$ 10.3 <sup>c</sup>	42.7 $\pm$ 10.5 <sup>c</sup>
<b>腹膜灌洗液</b>										
nitrate/nitrite ( $\mu$ M/ml)	31.1 $\pm$ 8.6	17.6 $\pm$ 3.3 <sup>*a</sup>	13.1 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>	21.4 $\pm$ 5.7 <sup>ab</sup>	25.1 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>	21.9 $\pm$ 7.3 <sup>ab</sup>	26.0 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>	20.7 $\pm$ 3.9 <sup>ab</sup>	23.8 $\pm$ 8.0 <sup>a</sup>	25.8 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	8.14 $\pm$ 2.91	16.72 $\pm$ 2.39 <sup>*a</sup>	9.72 $\pm$ 4.17 <sup>b</sup>	10.90 $\pm$ 4.59 <sup>ab</sup>	14.50 $\pm$ 2.02 <sup>ab</sup>	8.91 $\pm$ 3.49 <sup>b</sup>	11.56 $\pm$ 5.75 <sup>ab</sup>	8.32 $\pm$ 3.79 <sup>b</sup>	12.26 $\pm$ 3.73 <sup>ab</sup>	13.17 $\pm$ 6.49 <sup>ab</sup>
TGF- $\beta$ 1 (pg/ml)	49.3 $\pm$ 16.2	104.2 $\pm$ 10.5 <sup>*a</sup>	56.3 $\pm$ 19.5 <sup>c</sup>	69.9 $\pm$ 9.5 <sup>bc</sup>	97.5 $\pm$ 11.6 <sup>a</sup>	61.6 $\pm$ 10.5 <sup>bc</sup>	79.1 $\pm$ 11.3 <sup>b</sup>	65.1 $\pm$ 10.2 <sup>bc</sup>	62.6 $\pm$ 6.2 <sup>bc</sup>	71.6 $\pm$ 17.4 <sup>bc</sup>
<b>腎臟</b>										
nitrate/nitrite ( $\mu$ M/mg prot)	0.20 $\pm$ 0.07	0.19 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.15 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.17 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.21 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.21 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.21 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/mg prot)	418.9 $\pm$ 43.1	546.1 $\pm$ 64.9 <sup>*a</sup>	426.9 $\pm$ 63.6 <sup>abc</sup>	483.3 $\pm$ 86.3 <sup>ab</sup>	538.6 $\pm$ 56.1 <sup>a</sup>	387.7 $\pm$ 92.5 <sup>bc</sup>	467.5 $\pm$ 86.1 <sup>abc</sup>	377.4 $\pm$ 75.5 <sup>bc</sup>	440.6 $\pm$ 89.5 <sup>abc</sup>	354.5 $\pm$ 89.6 <sup>c</sup>
TGF- $\beta$ 1 (ng/mg prot)	2.49 $\pm$ 0.44	5.45 $\pm$ 1.13 <sup>*a</sup>	2.23 $\pm$ 1.32 <sup>c</sup>	2.57 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>	4.33 $\pm$ 0.90 <sup>ab</sup>	2.33 $\pm$ 0.77 <sup>c</sup>	5.44 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	3.38 $\pm$ 0.77 <sup>bc</sup>	2.39 $\pm$ 0.82 <sup>c</sup>	2.55 $\pm$ 0.76 <sup>c</sup>
<b>脾臟</b>										
nitrate/nitrite ( $\mu$ M/mg prot)	0.24 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.09 <sup>*a</sup>	0.27 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.25 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.30 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.30 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.31 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.23 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.22 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/mg prot)	8.46 $\pm$ 2.72	12.93 $\pm$ 1.51 <sup>*</sup>	9.03 $\pm$ 2.82	9.96 $\pm$ 2.53	10.51 $\pm$ 3.51	13.21 $\pm$ 5.28	12.78 $\pm$ 7.19	13.85 $\pm$ 5.06	11.72 $\pm$ 1.44	13.39 $\pm$ 6.61
TGF- $\beta$ 1 (pg/mg prot)	50.8 $\pm$ 12.0	115.7 $\pm$ 17.8 <sup>*a</sup>	63.7 $\pm$ 19.3 <sup>bc</sup>	76.8 $\pm$ 25.5 <sup>bc</sup>	83.0 $\pm$ 16.6 <sup>ab</sup>	65.3 $\pm$ 21.5 <sup>bc</sup>	92.9 $\pm$ 28.0 <sup>ab</sup>	70.7 $\pm$ 20.8 <sup>bc</sup>	72.8 $\pm$ 17.4 <sup>bc</sup>	43.7 $\pm$ 19.8 <sup>c</sup>

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and MSU group ( $p < 0.05$ ). a, and b, and c indicate the means of MSU-injected groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



表四、正常控制組及灌食土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛後注射 MSU 各組小鼠血漿和腹膜灌洗液中 sCD14、趨化分子 CXCL1 及/或黏附分子 sICAM 濃度

	Con	MSU	TC	Lin+Cin	Lin-L	Lin-H	Cin-L	Cin-H	Allo	Col
<b>血漿</b>										
sCD14 (pg/ml)	33.7±3.2	62.5±19.9 <sup>*a</sup>	46.7±8.9 <sup>ab</sup>	43.9±12.3 <sup>ab</sup>	47.2±12.8 <sup>ab</sup>	49.3±19.1 <sup>ab</sup>	46.3±14.5 <sup>ab</sup>	46.7±13.5 <sup>ab</sup>	39.6±16.4 <sup>b</sup>	29.4±14.4 <sup>b</sup>
sICAM (ng/ml)	3.47±1.43	5.88±1.70 <sup>*a</sup>	3.09±0.75 <sup>bc</sup>	3.24±1.20 <sup>bc</sup>	4.09±1.55 <sup>b</sup>	3.58±0.98 <sup>bc</sup>	2.42±1.24 <sup>cd</sup>	3.20±0.79 <sup>bc</sup>	2.29±0.88 <sup>cd</sup>	1.32±0.69 <sup>d</sup>
CXCL1 (pg/ml)	73.0±23.3	293.2±56.8 <sup>*a</sup>	79.6±27.8 <sup>c</sup>	116.3±35.1 <sup>bc</sup>	106.2±45.0 <sup>bc</sup>	92.3±32.2 <sup>bc</sup>	142.6±64.1 <sup>b</sup>	138.4±26.8 <sup>b</sup>	81.3±54.1 <sup>c</sup>	76.2±32.6 <sup>c</sup>
<b>腹膜灌洗液</b>										
sCD14 (pg/mL)	4.3±1.3	10.2±2.0 <sup>*a</sup>	6.7±2.1 <sup>cd</sup>	6.5±2.2 <sup>d</sup>	9.1±1.3 <sup>abc</sup>	7.8±1.6 <sup>bcd</sup>	10.0±1.1 <sup>ab</sup>	10.1±2.0 <sup>ab</sup>	11.4±2.6 <sup>a</sup>	6.9±2.2 <sup>cd</sup>
CXCL1 (pg/mL)	56.7±6.9	116.5±28.5 <sup>*a</sup>	57.9±12.2 <sup>cd</sup>	61.9±15.2 <sup>cd</sup>	74.2±10.1 <sup>bc</sup>	77.1±12.2 <sup>bc</sup>	95.0±17.6 <sup>b</sup>	90.9±18.9 <sup>b</sup>	50.7±22.2 <sup>d</sup>	51.8±13.7 <sup>d</sup>

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine. Data presented as mean ± SD. \*significant difference between Con group and MSU group (p < 0.05). a, b, c, and d indicate the means of MSU-injected groups not sharing the same superscript letter are significantly different (P < 0.05).

表五、有或無添加土肉桂葉精油、枷羅木醇或肉桂醛於預培養液之巨噬細胞在 MSU 刺激下之 nitrate/nitrite、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  釋放量

	+ MSU										
	VCO	VCO	TC-L	TC-M	TC-H	Lin-L	Lin-M	Lin-H	Cin-L	Cin-M	Cin-H
Nitrate/nitrite ( $\mu$ M)	9.96 $\pm$ 0.38	9.67 $\pm$ 0.45 <sup>c</sup>	10.5 $\pm$ 0.47 <sup>abc</sup>	10.59 $\pm$ 0.72 <sup>ab</sup>	10.31 $\pm$ 0.06 <sup>abc</sup>	10.53 $\pm$ 0.54 <sup>ab</sup>	10.44 $\pm$ 0.52 <sup>abc</sup>	11.12 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	10.21 $\pm$ 0.58 <sup>bc</sup>	10.4 $\pm$ 0.6 <sup>abc</sup>	10.28 $\pm$ 0.27 <sup>bc</sup>
促發炎細胞激素 (pg/ml)											
IL-1 $\beta$	29.1 $\pm$ 6.4	57.1 $\pm$ 10.6 <sup>*a</sup>	52.8 $\pm$ 6.6 <sup>a</sup>	37.5 $\pm$ 3.8 <sup>b</sup>	35.4 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>	15.9 $\pm$ 2.7 <sup>cd</sup>	19.5 $\pm$ 7.6 <sup>c</sup>	16.6 $\pm$ 8.0 <sup>cd</sup>	7.5 $\pm$ 4.4 <sup>cd</sup>	6.3 $\pm$ 4.6 <sup>d</sup>	9.2 $\pm$ 6.1 <sup>cd</sup>
TNF- $\alpha$	183 $\pm$ 33	223.8 $\pm$ 35.4 <sup>a</sup>	144.3 $\pm$ 33.1 <sup>b</sup>	136.5 $\pm$ 35.8 <sup>b</sup>	64.8 $\pm$ 22.3 <sup>d</sup>	129.1 $\pm$ 35.6 <sup>b</sup>	122.9 $\pm$ 47.1 <sup>bc</sup>	67.5 $\pm$ 43.9 <sup>d</sup>	72 $\pm$ 15.5 <sup>cd</sup>	62.7 $\pm$ 18.3 <sup>d</sup>	97.1 $\pm$ 24.7 <sup>c</sup>
抗發炎細胞激素 (pg/ml)											
IL-10	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

VCO, vehicle-control; TC-L, 5 $\mu$ g/ml of TC; TC-M, 25 $\mu$ g/ml of TC; TC-H, 75  $\mu$ g/ml of TC; Lin-L, 2.0  $\mu$ g/ml of Lin; Lin-M, 10.1  $\mu$ g/ml of Lin; Lin-H, 30.2  $\mu$ g/ml of Lin; Cin-L, 0.3  $\mu$ g/ml of Cin; Cin-M, 1.7 $\mu$ g/ml of Cin; Cin-H, 5.2  $\mu$ g/ml of Cin) \*significant difference between VCO groups with and without MSU stimulation ( $p < 0.05$ ). a, b, c, and d indicate the means within MSU-stimulated groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

表六、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小鼠代謝值

	Con	HUA	TC	Lin+Cin	Lin-L	Lin-H	Cin-L	Cin-H	Allo
進食量 (g/day)	6.79±1.00	7.43±0.69	7.96±1.00	8.02±1.22	7.31±1.48	7.56±1.04	7.30±0.85	8.07±0.45	7.68±0.87
飲水量 (ml/day)	7.83±0.98	8.75±1.17	8.17±0.75	7.25±1.25	8.00±1.26	8.25±0.88	8.67±0.52	8.67±1.37	7.33±1.21
排尿量 (ml/day)	1.25±0.51	2.52±0.87 <sup>*ab</sup>	1.53±0.39 <sup>cd</sup>	1.68±0.84 <sup>bcd</sup>	2.80±0.70 <sup>a</sup>	2.22±0.61 <sup>abcd</sup>	1.80±0.35 <sup>bcd</sup>	1.48±0.84 <sup>d</sup>	2.47±0.84 <sup>abc</sup>
排便量 (g/day)	1.92±0.44	2.07±0.46	2.37±0.29	2.07±0.53	2.24±0.21	2.09±0.17	2.38±0.34	2.35±0.31	2.23±0.33

Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean ± SD. \*significant difference between Con group and HUA group (p < 0.05). a, b, c and d indicate the means of hyperuricemic diet-treated groups not sharing the same superscript letter are significantly different (P < 0.05).

表七、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小鼠體重及臟器體重百分比

	Con	HUA	TC	Lin+Cin	Lin-L	Lin-H	Cin-L	Cin-H	Allo
誘發前體重	26.4±0.86	26.14±1.36	25.82±1.16	25.57±0.75	25.14±1.35	25.96±1.51	25.99±0.80	25.28±0.47	25.42±1.02
灌食前體重	27.73±1.24	27.23±4.42	27.63±4.86	26.96±3.26	27.83±4.65	27.73±6.74	27.38±3.98	27.59±1.75	27.28±4.61
禁食前體重	27.53±1.76	27.2±1.88	27.07±2.34	26.31±0.88	26.23±1.58	26.45±2.23	26.58±1.17	26.78±1.23	26.19±2.42
犧牲前體重	25.26±1.35	24.66±1.44	24.78±1.99	23.95±0.69	23.94±1.54	24.19±2.11	24.31±1.28	24.32±0.94	24.2±1.96
臟器/體重 X100 (%)									
副睪脂肪	0.54±0.27	0.52±0.27	0.53±0.28	0.51±0.27	0.53±0.27	0.53±0.27	0.55±0.29	0.54±0.28	0.5±0.26
腓腸肌	0.57±0.02	0.56±0.02	0.57±0.02	0.57±0.02	0.57±0.02	0.57±0.01	0.55±0.02	0.55±0.02	0.55±0.04
肝臟	4.11±0.08	4.01±0.13	3.98±0.13	3.98±0.12	3.98±0.15	3.95±0.16	4.00±0.05	3.97±0.12	3.93±0.09
胰臟	0.74±0.2	0.74±0.12	0.75±0.11	0.76±0.11	0.74±0.14	0.75±0.17	0.73±0.07	0.73±0.09	0.75±0.06
腎臟	0.64±0.04	0.66±0.02	0.65±0.02	0.65±0.01	0.65±0.02	0.65±0.02	0.65±0.02	0.65±0.02	0.65±0.02

Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean ± SD.

表八、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、伽羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小鼠血尿酸值及尿液尿酸排出量

	Con	HUA	TC	Lin+Cin	Lin-L	Lin-H	Cin-L	Cin-H	Allo
Fed plasma uric acid (mg/dL)	1.93±0.19	2.47±0.13 <sup>*a</sup>	1.86±0.34 <sup>b</sup>	2.07±0.4 <sup>ab</sup>	2.31±0.34 <sup>ab</sup>	2.12±0.34 <sup>ab</sup>	2.42±0.29 <sup>a</sup>	2.2±0.43 <sup>ab</sup>	2.41±0.31 <sup>a</sup>
Urinary uric acid (mg/dl)	2.67±0.35	2.18±0.54 <sup>a</sup>	2.10±0.58 <sup>a</sup>	1.99±0.81 <sup>a</sup>	2.22±0.85 <sup>a</sup>	2.06±1.16 <sup>a</sup>	2.09±0.91 <sup>a</sup>	2.07±0.69 <sup>a</sup>	1.09±0.33 <sup>b</sup>
Total urinary uric acid excretion (μg)	34.7±19.3	53.3±24.37	32.8±18.7	34.2±20.7	58.8±23.1	43.7±18.2	36.6±24.2	30.8±22.2	26.8±20.1

Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean ± SD. \*significant difference between Con group and HUA group (p < 0.05). a and b indicate the means of hyperuricemic diet-treated groups not sharing the same superscript letter are significantly different (P < 0.05).

表九、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、伽羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小鼠血漿中葡萄糖、fructosamine 及 C-peptide 濃度

	Con	HUA	TC	Lin+Cin	Lin-L	Lin-H	Cin-L	Cin-H	Allo
Fructosamine (mmol/L)	1.95±0.08	1.88±0.1	1.77±0.1	1.9±0.24	1.81±0.09	1.86±0.23	1.68±0.32	1.72±0.35	1.73±0.16
Fasting C-peptide (ng/ml)	81.7±13.5	116.2±24.9 <sup>*ab</sup>	77.5±30.5 <sup>c</sup>	91±20.7 <sup>bc</sup>	95.7±11.6 <sup>bc</sup>	99.5±11.4 <sup>abc</sup>	102.6±16 <sup>abc</sup>	92.1±24.7 <sup>bc</sup>	96.7±15.5 <sup>abc</sup>
OGTT AUC (g×min/dL)	24.58±0.77	23.59±3.18 <sup>ab</sup>	23.93±1.97 <sup>ab</sup>	23.68±2.12 <sup>ab</sup>	23.84±1.54 <sup>ab</sup>	22.58±1.41 <sup>a</sup>	23.68±1.44 <sup>a</sup>	23.82±1.75 <sup>ab</sup>	23.61±1.02 <sup>ab</sup>
Glucose challenged C-peptide (ng/ml) <sup>§</sup>	100.8±40	170.8±44.4 <sup>ab</sup>	118.2±17.8 <sup>ab</sup>	181.4±71.9 <sup>a</sup>	179.2±42 <sup>ab</sup>	208.6±27.7 <sup>b</sup>	165.4±55.5 <sup>ab</sup>	124.3±43 <sup>a</sup>	170.3±19.5 <sup>ab</sup>

Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean ± SD. \*significant difference between Con group and HUA group (p < 0.05). a, b, and c indicate the means of hyperuricemic diet-treated groups not sharing the same superscript letter are significantly different (P < 0.05).

表十、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小鼠各組織/器官中促發炎細胞激素含量

	CO	HUA	TC	Lin+Cin	Lin-L	Lin-H	Cin-L	Cin-H	Allo
<b>副睪脂肪</b>									
nitrate/nitrite (nmol/mg prot)	5.3±1.5	4.86±0.8 <sup>a</sup>	5.98±0.6 <sup>b</sup>	5.39±0.9 <sup>ab</sup>	4.77±0.6 <sup>a</sup>	4.92±0.6 <sup>a</sup>	4.56±0.6 <sup>a</sup>	5.12±1.1 <sup>ab</sup>	4.6±0.5 <sup>a</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/mg prot)	1721±257	2181±457 <sup>*a</sup>	1997±385 <sup>a</sup>	1952±578 <sup>ab</sup>	1753±453 <sup>ab</sup>	2083±476 <sup>a</sup>	2059±624 <sup>a</sup>	1445±219 <sup>b</sup>	1835±334 <sup>ab</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/mg prot)	22.5±4.4	20.1±5.3	22.3±7.4	22.3±7.4	21.8±7.4	25.0±10.3	23.2±7.2	19.9±5.5	22.0±5.5
<b>腓腸肌</b>									
nitrate/nitrite (nmol/mg prot)	2.76±0.5	1.9±0.2 <sup>*a</sup>	2.37±0.5 <sup>ab</sup>	2.56±1.2 <sup>ab</sup>	2.55±0.3 <sup>ab</sup>	2.79±0.5 <sup>b</sup>	2.01±0.7 <sup>ab</sup>	2.07±0.3 <sup>ab</sup>	1.93±0.7 <sup>a</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/mg prot)	153.9±29.2	191.9±61.9 <sup>ab</sup>	207.9±60.5 <sup>a</sup>	150.8±98.5 <sup>abc</sup>	175.1±42.7 <sup>abc</sup>	123.3±32.3 <sup>bc</sup>	157.1±44.6 <sup>abc</sup>	148.2±24 <sup>abc</sup>	213.4±42.5 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/mg prot)	5.86±0.6	6.25±0.5 <sup>a</sup>	4.59±0.7 <sup>b</sup>	4.8±1.8 <sup>b</sup>	4.87±1.3 <sup>b</sup>	4.27±0.6 <sup>b</sup>	5.1±0.4 <sup>b</sup>	4.6±0.9 <sup>b</sup>	4.26±0.4 <sup>b</sup>
<b>肝臟</b>									
nitrate/nitrite (nmol/mg prot)	1.67±0.30	2.40±0.33 <sup>*a</sup>	1.90±0.41 <sup>bc</sup>	2.19±0.75 <sup>ab</sup>	2.08±0.18 <sup>abc</sup>	2.05±0.4 <sup>abc</sup>	1.62±0.14 <sup>cd</sup>	1.86±0.17 <sup>bc</sup>	1.15±0.20 <sup>e</sup>
IL-1 $\beta$ (ng/mg prot)	4.68±1.03	5.06±1.34 <sup>a</sup>	4.29±0.41 <sup>ab</sup>	3.69±0.78 <sup>bc</sup>	3.35±0.57 <sup>bc</sup>	3.21±0.59 <sup>c</sup>	3.56±1.06 <sup>bc</sup>	3.52±0.24 <sup>bc</sup>	3.76±0.51 <sup>bc</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/mg prot)	23.9±2.5	28.5±6.7 <sup>a</sup>	13.1±1.4 <sup>b</sup>	13.1±1.9 <sup>b</sup>	12.3±1.6 <sup>b</sup>	12.1±1.6 <sup>b</sup>	12.7±1.0 <sup>b</sup>	12.0±2.0 <sup>b</sup>	11.4±0.7 <sup>b</sup>
<b>胰臟</b>									
nitrate/nitrite (nmol/mg prot)	26.7±4.9	23.0±3.8 <sup>ab</sup>	24.0±3.0 <sup>ab</sup>	25.5±3.3 <sup>ab</sup>	21.7±2.7 <sup>a</sup>	24.9±2.7 <sup>ab</sup>	28.1±5.2 <sup>b</sup>	27.3±4.2 <sup>b</sup>	27.2±5.4 <sup>b</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/mg prot)	372.2±89.4	465.7±50.7 <sup>ab</sup>	418.5±90.3 <sup>b</sup>	485.7±45.7 <sup>ab</sup>	450.2±49.9 <sup>ab</sup>	503.1±67.3 <sup>a</sup>	438.8±42.8 <sup>ab</sup>	344.2±63.6 <sup>c</sup>	479.1±31.8 <sup>ab</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/mg prot)	1.55±0.4	1.64±0.2 <sup>a</sup>	1.19±0.4 <sup>b</sup>	1.07±0.4 <sup>b</sup>	1.36±0.3 <sup>ab</sup>	1.15±0.2 <sup>b</sup>	1.12±0.1 <sup>b</sup>	1.36±0.5 <sup>ab</sup>	1.39±0.3 <sup>ab</sup>
<b>腎臟</b>									
nitrate/nitrite (nmol/mg prot)	1.30±0.09	3.93±0.66 <sup>*a</sup>	2.68±0.74 <sup>bc</sup>	2.74±0.67 <sup>bc</sup>	2.70±0.68 <sup>bc</sup>	2.87±0.88 <sup>c</sup>	2.29±0.73 <sup>bc</sup>	1.99±0.27 <sup>b</sup>	2.31±0.26 <sup>bc</sup>
IL-1 $\beta$ (ng/mg prot)	5.42±1.18	6.90±1.89 <sup>a</sup>	1.90±0.65 <sup>bc</sup>	3.09±0.99 <sup>cd</sup>	5.22±1.54 <sup>e</sup>	4.22±0.53 <sup>de</sup>	3.46±0.74 <sup>d</sup>	3.42±1.18 <sup>d</sup>	1.66±0.46 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/mg prot)	90.1±20.1	108.6±35.3 <sup>a</sup>	91.0±14.7 <sup>ab</sup>	64.7±23.7 <sup>b</sup>	80.7±20. <sup>b</sup>	90.4±17.7 <sup>ab</sup>	70.7±8.2 <sup>b</sup>	87.2±25.5 <sup>ab</sup>	72.7±19.4 <sup>b</sup>

Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and HUA group ( $p < 0.05$ ). a, b, c, and d indicate the means of hyperuricemic diet-treated groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

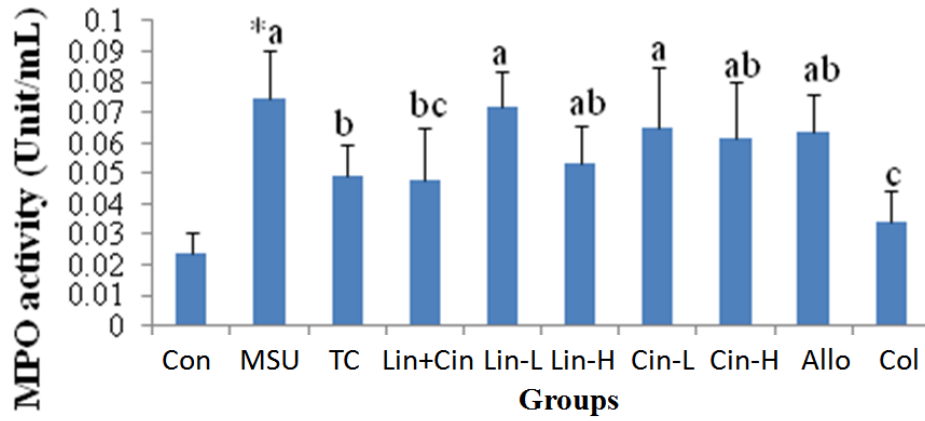


表十一、正常控制組及有或無介入土肉桂精油、枷羅木醇、肉桂醛下餵食高尿酸飲食之小鼠 BUN、血清/尿液 creatinine 濃度及 GFR

	Con	HUA	TC	Lin+Cin	Lin-L	Lin-H	Cin-L	Cin-H	Allo
BUN (mg/dl) serum	22.87±1.86	28.03±2.26 <sup>*ab</sup>	28.37±1.02 <sup>a</sup>	28.48±4.00 <sup>a</sup>	27.11±2.06 <sup>abc</sup>	25.50±1.60 <sup>abcd</sup>	24.83±1.36 <sup>bcd</sup>	23.56±2.55 <sup>d</sup>	25.45±4.09 <sup>abcd</sup>
creatinine (mg/dl)	0.75±0.01	0.75±0.01	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.01	0.75±0.00	0.75±0.01	0.75±0.01
Urinary creatinine (mg/dl)	0.824±0.006	0.831±0.012 <sup>a</sup>	0.824±0.005 <sup>ab</sup>	0.823±0.006 <sup>ab</sup>	0.82±0.003 <sup>b</sup>	0.822±0.005 <sup>b</sup>	0.824±0.006 <sup>ab</sup>	0.824±0.006 <sup>ab</sup>	0.826±0.005 <sup>ab</sup>
GFR (CCR/BW) x100 <sup>Ⓢ</sup>	0.027±0.008	0.059±0.021 <sup>*a</sup>	0.045±0.011 <sup>ab</sup>	0.027±0.008 <sup>b</sup>	0.055±0.007 <sup>a</sup>	0.050±0.013 <sup>a</sup>	0.043±0.015 <sup>ab</sup>	0.060±0.016 <sup>a</sup>	0.059±0.027 <sup>a</sup>

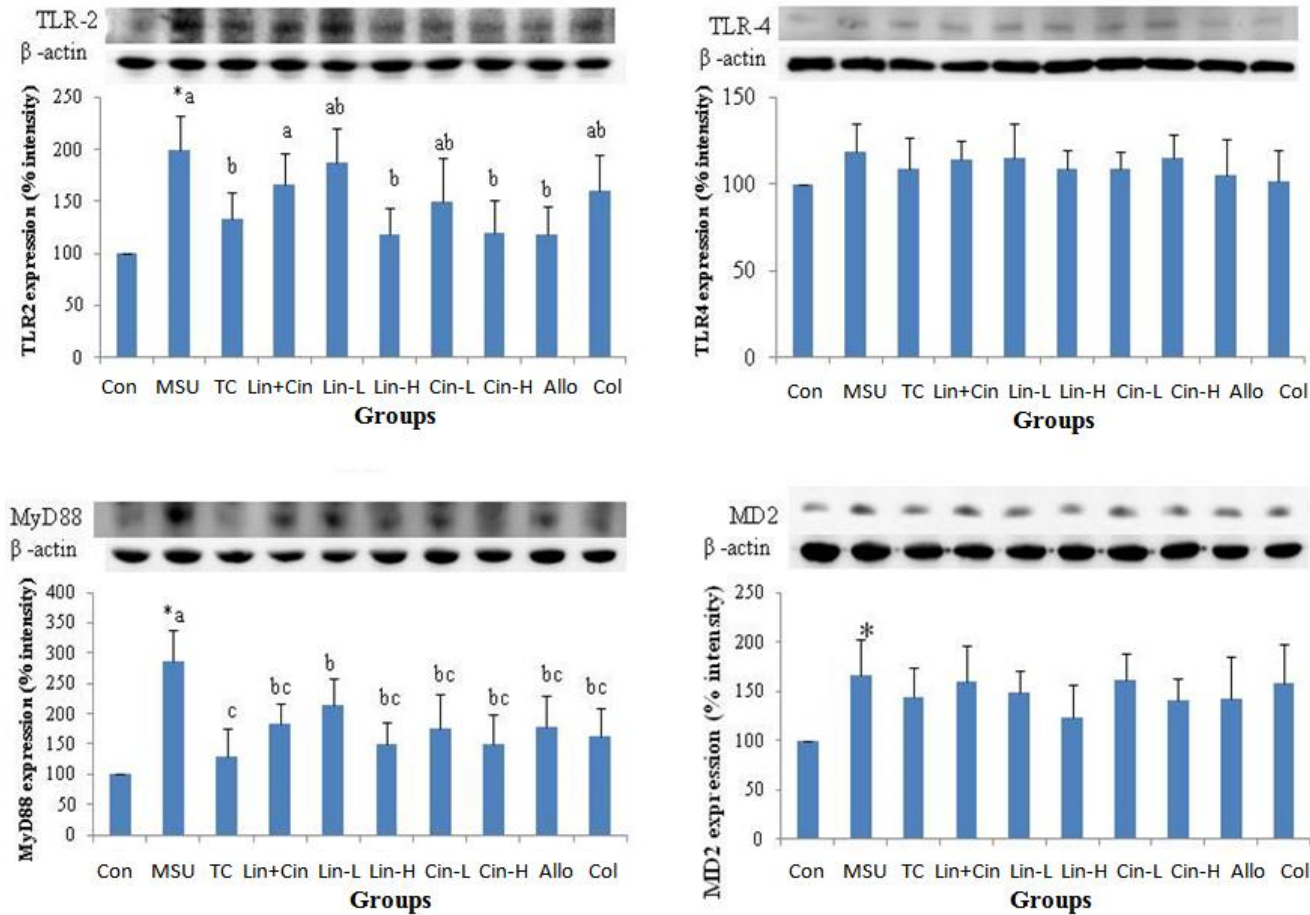
Ⓢ 【(urinary creatinin (mg/dL) × 24 h urine volume (ml)) / (1440 (min) × serum creatinine (mg/dL))】 /body wt (kg) x100

Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean ± SD. \*significant difference between Con group and HUA group (p < 0.05). a, b, c, and d indicate the means of hyperuricemic diet-treated groups not sharing the same superscript letter are significantly different (P < 0.05).



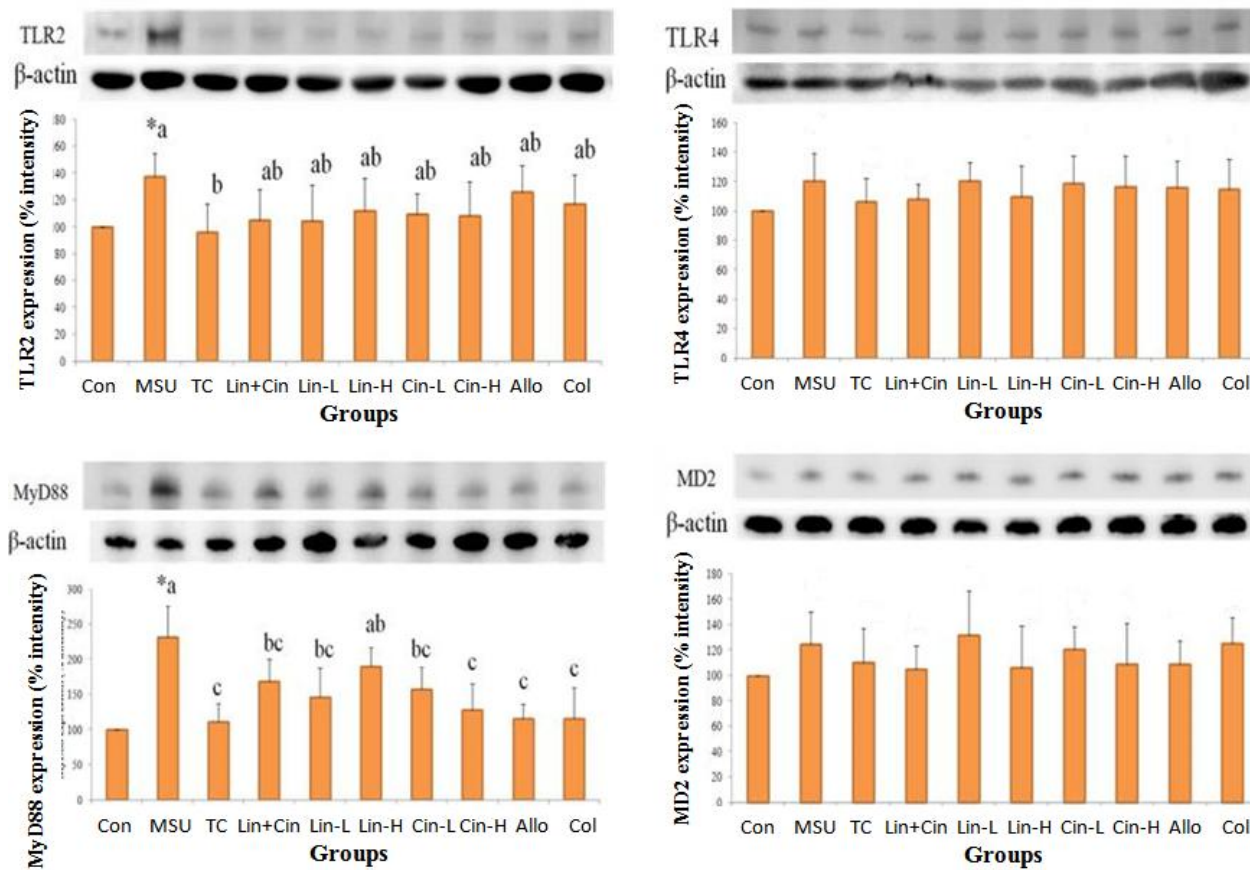
圖一、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腹膜灌洗液中 MPO 活性

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and MSU group ( $p < 0.05$ ). a, b, and c indicate the means of MSU-injected groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



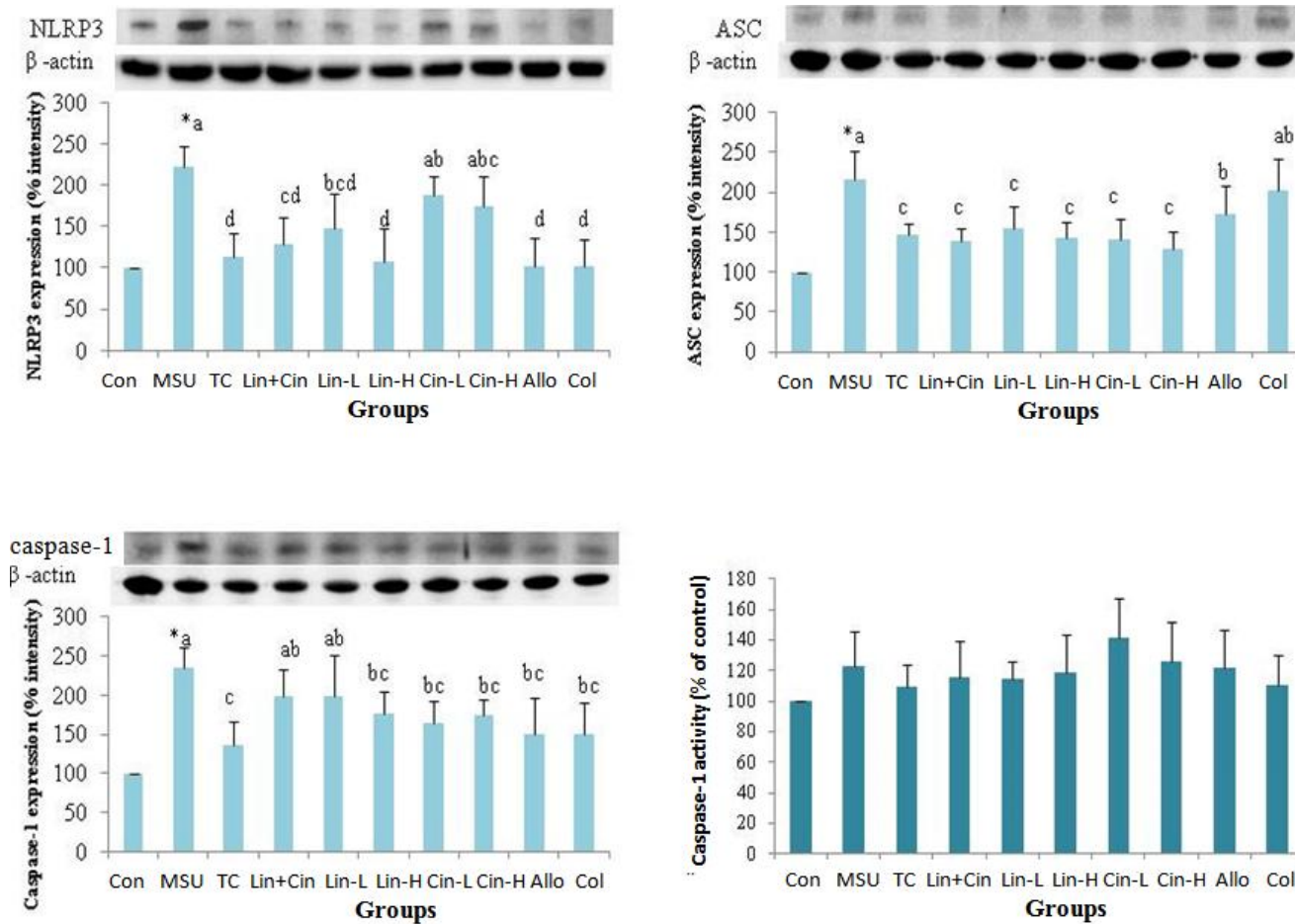
圖二、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠脾臟中 (A) TLR2、(B) TLR4、(C) MyD88 和 (D) MD2 表現量

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and MSU group ( $p < 0.05$ ). a, b, and c indicate the means of MSU-injected groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



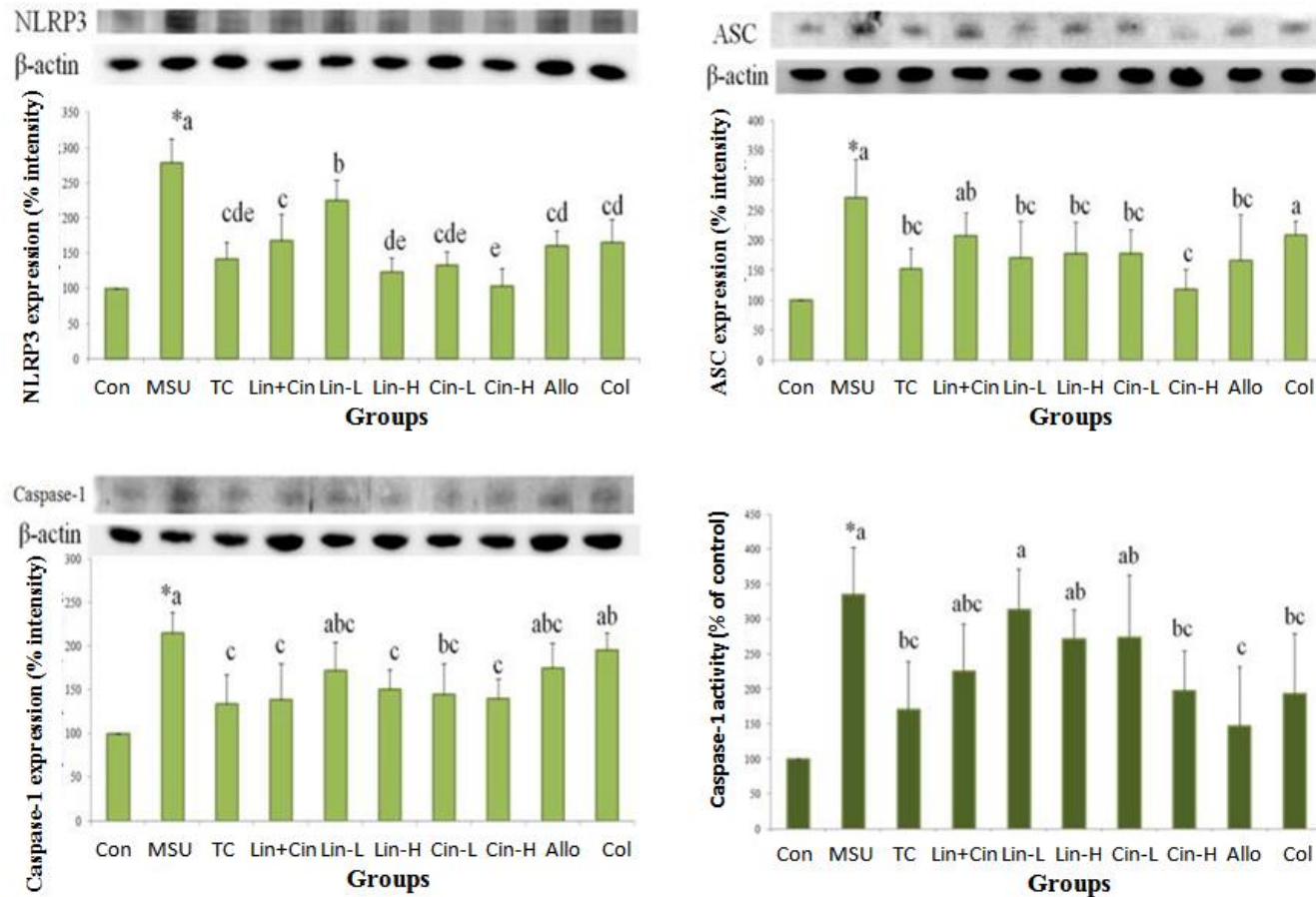
圖三、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腎臟中 (A) TLR2、(B) TLR4、(C) MyD88 和 (D) MD2 表現量

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and MSU group ( $p < 0.05$ ). a, b, and c indicate the means of MSU-injected groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



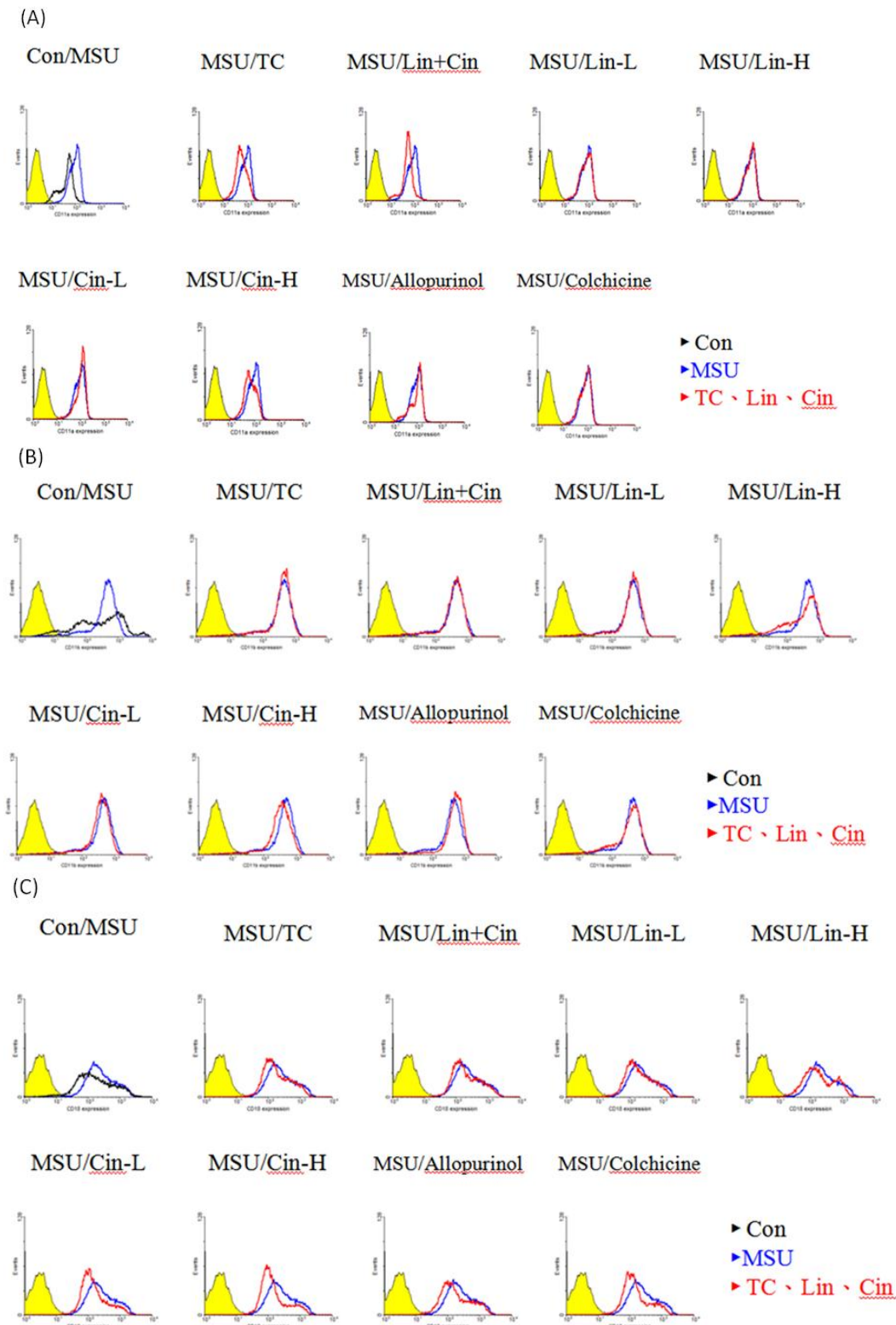
圖四、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠脾臟中 (A) NLRP3、(B) ASC、(C) Caspase-1 表現量和 (D) caspase-1 活性

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and MSU group ( $p < 0.05$ ). a, b, c, and d indicate the means of MSU-injected groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



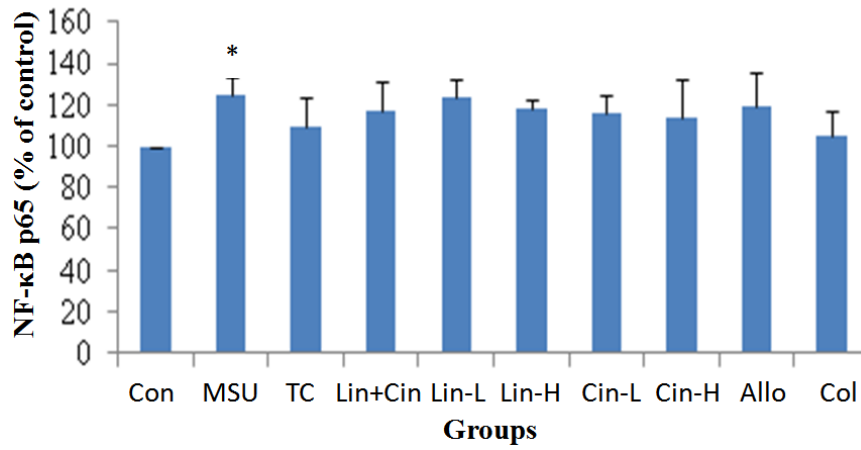
圖五、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腎臟中(A)NLRP3、(B)ASC、(C)caspase-1表現量和(D)caspase-1活性

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and MSU group ( $p < 0.05$ ). a, b, c, and d indicate the means of MSU-injected groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



圖六、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腹腔嗜中性球表面 CD11a (A)、CD11b (B)和 CD18 (C)表現量

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine.

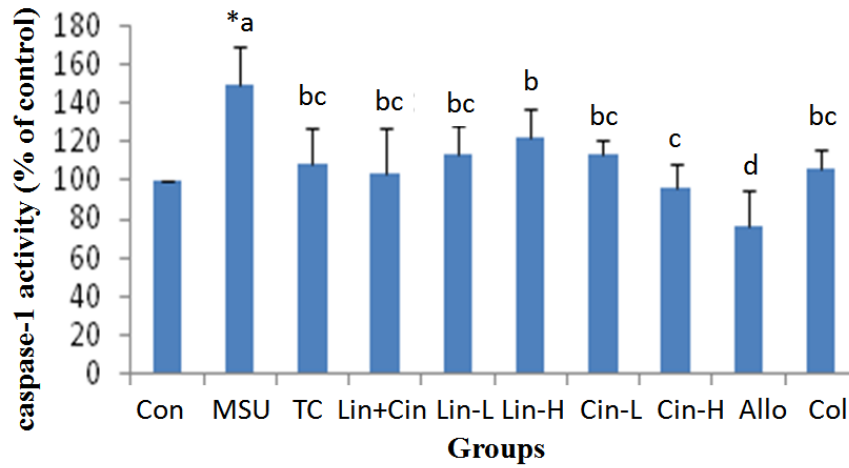


圖七、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腹膜灌洗液細胞核中 NF-κB p65 含量

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine. Data presented as mean  $\pm$  SD.

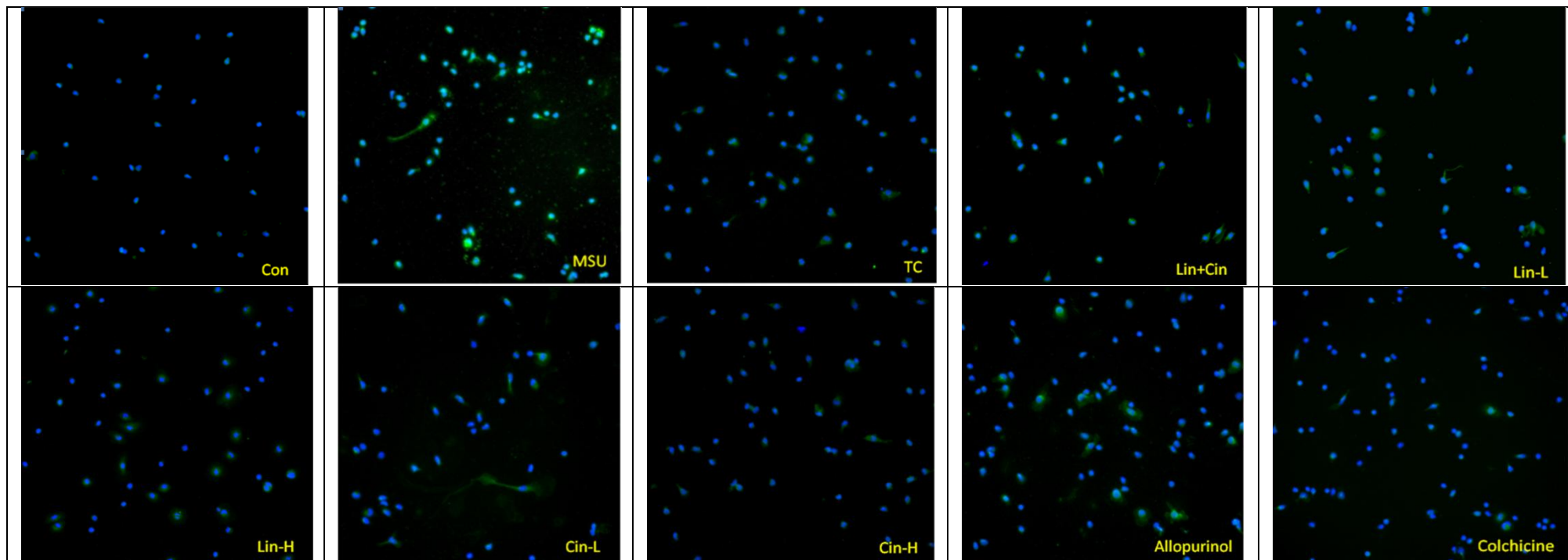
\*significant difference between Con group and MSU group ( $p < 0.05$ ).





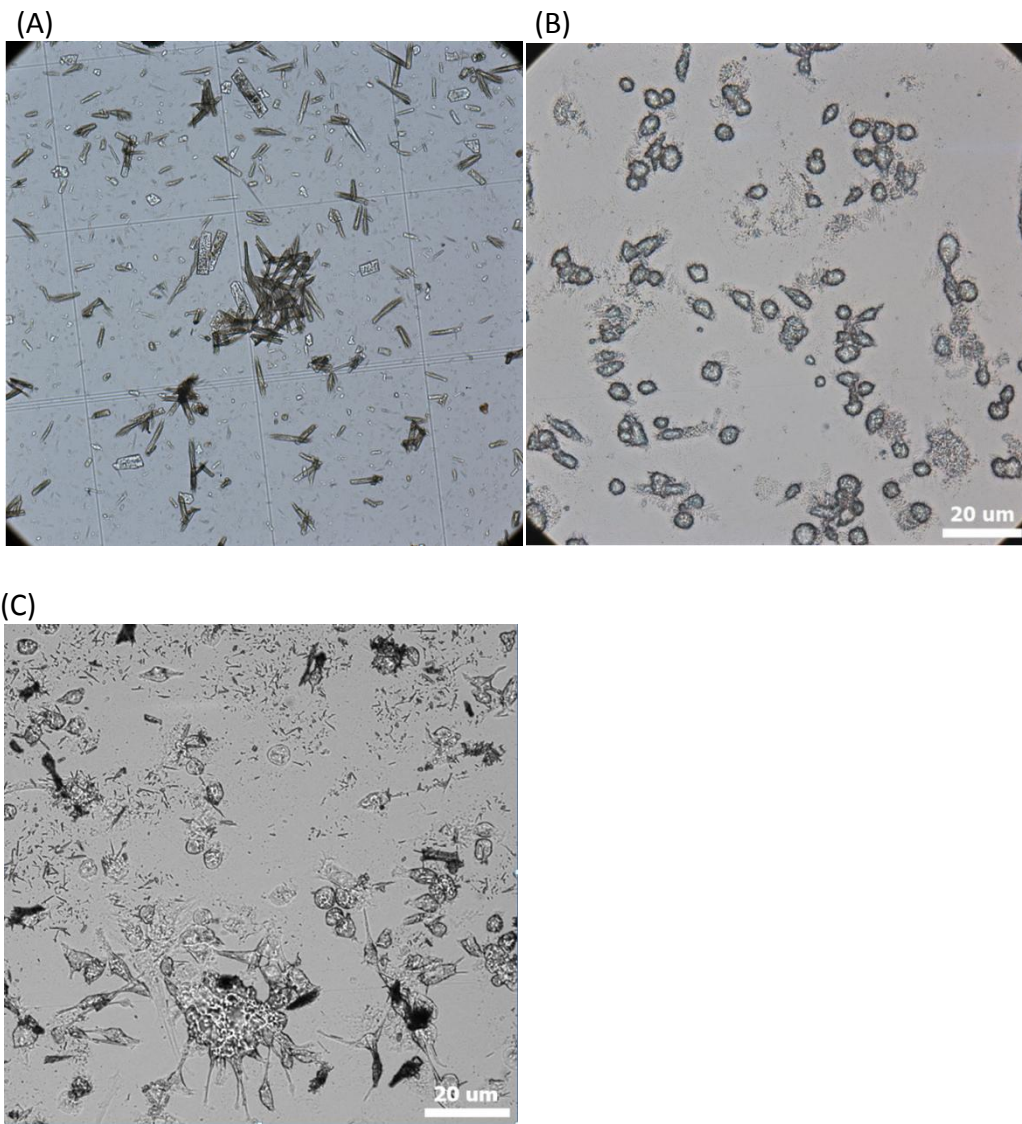
圖八、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腹膜灌洗液細胞中 caspase-1 活性

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and MSU group ( $p < 0.05$ ). a, b, c, and d indicate the means of MSU-injected groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

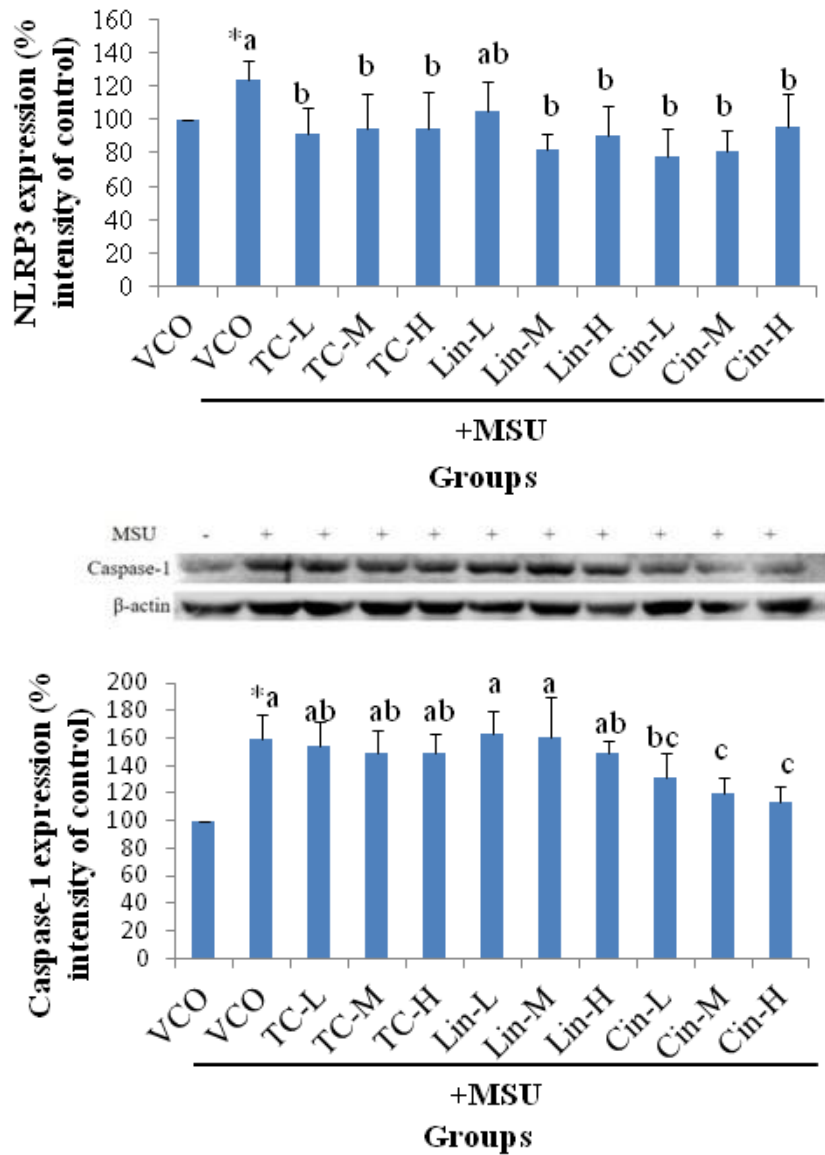


圖九、尿酸鈉結晶(MSU)誘發痛風性發炎小鼠腹膜灌洗液細胞中 NETs 之免疫螢光染色

Con, pretreated with corn oil and injected with PBS; groups other than the Con were injected with MSU and pretreated with the agents as the followings: MSU, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol; Col, 1.5 mg/kg of colchicine.

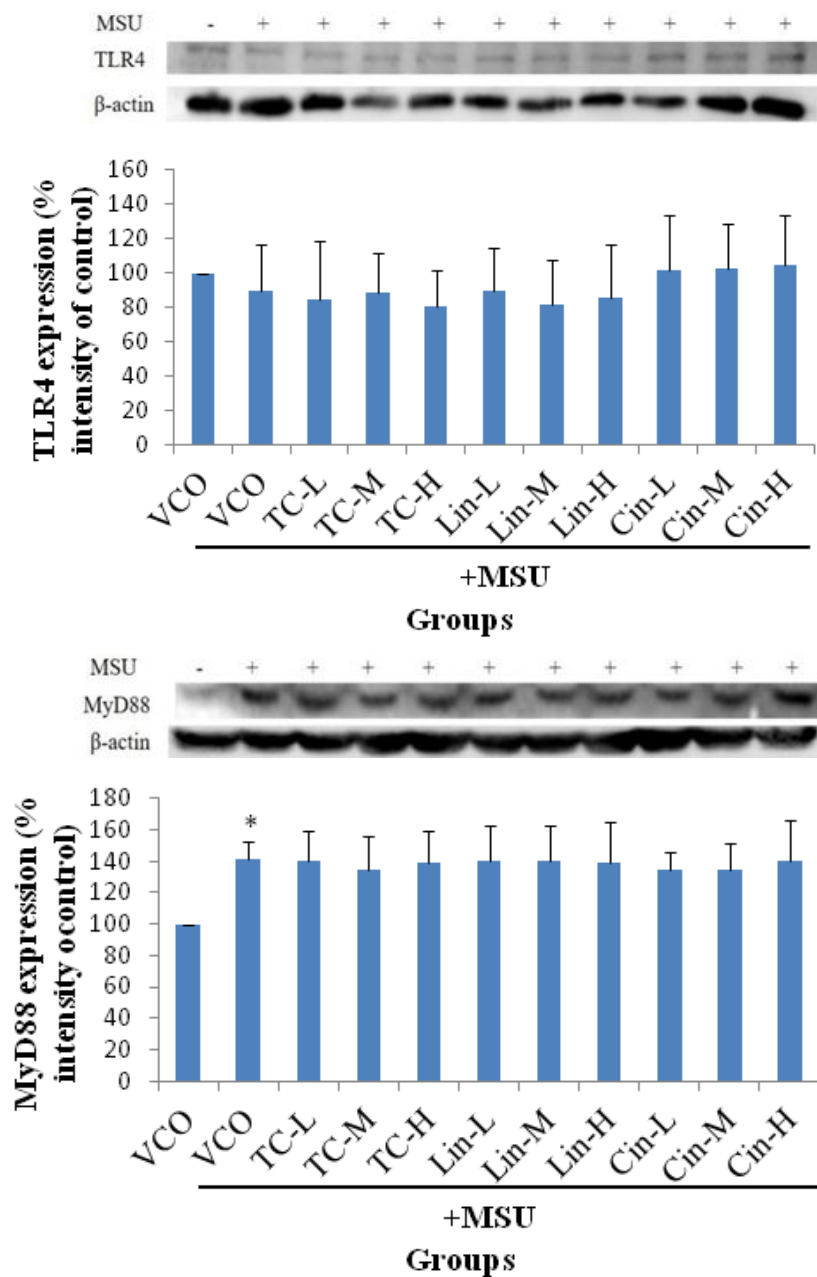


圖十、MSU 結晶刺激小鼠初代腹腔巨噬細胞之細胞形態學。(A) MSU 結晶，(B) 未以 MSU 活化之 resting 巨噬細胞，(C) 以 MSU 刺激 24 小時之巨噬細胞。



圖十一、MSU 刺激之小鼠腹腔巨噬細胞 NLRP3 和 caspase-1 蛋白質表現量

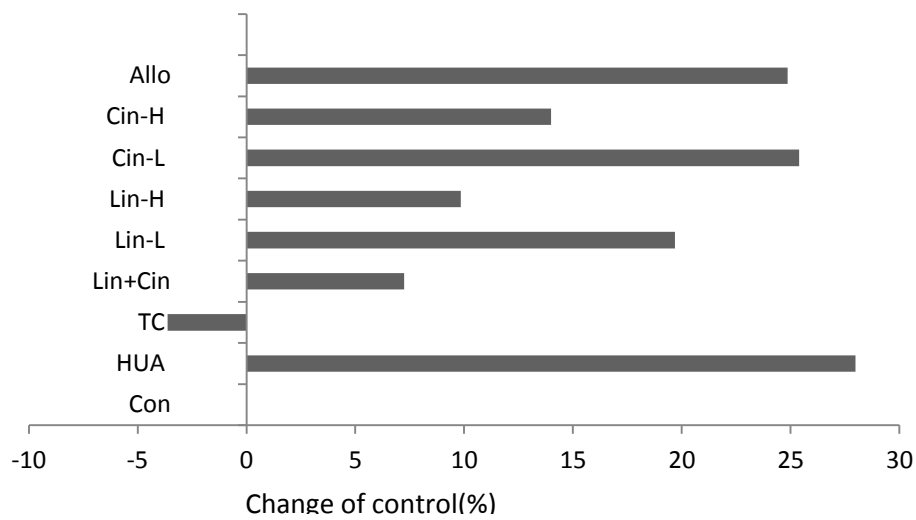
VCO, vehicle-control; TC-L, 5µg/ml of TC; TC-M; 25µg/ml of TC; TC-H,75 µg/ml of TC; Lin-L, 2.0 µg/ml of Lin; Lin-M, 10.1 µg/ml of Lin, Lin-H, 30.2 µg/ml of Lin; Cin-L, 0.3 µg/ml of Cin; Cin-M, 1.7µg/ml of Cin; Cin-H, 5.2 µg/ml of Cin. Data presented as mean ± SD. \*significant difference between VCO groups with and without MSU stimulation ( $p < 0.05$ ). a, b, and c indicate the means within MSU-stimulated groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



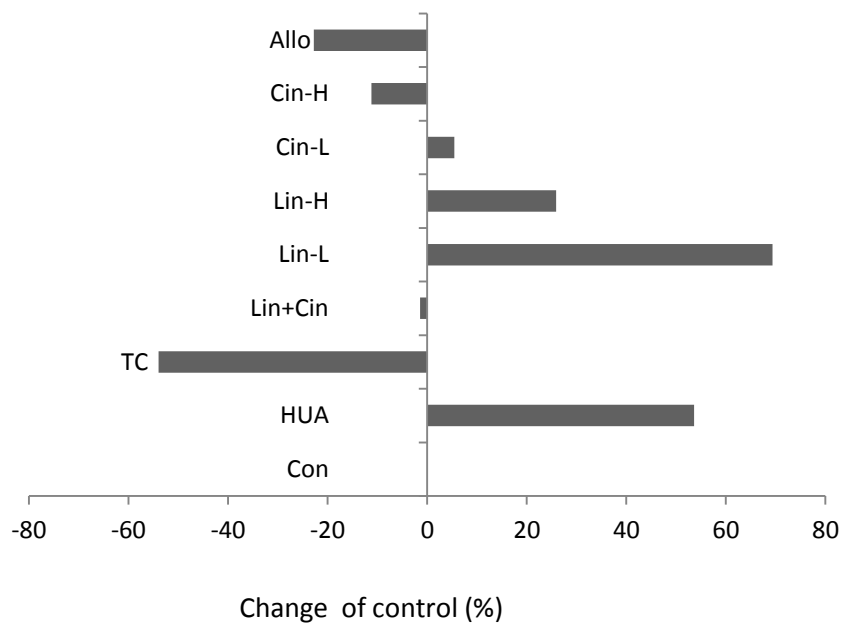
圖十二、MSU 刺激之小鼠腹腔巨噬細胞 TLR4、MD2、MyD88 蛋白質表現量

VCO, vehicle-control; TC-L, 5µg/ml of TC; TC-M; 25µg/ml of TC; TC-H,75 µg/ml of TC; Lin-L, 2.0 µg/ml of Lin; Lin-M, 10.1 µg/ml of Lin, Lin-H, 30.2 µg/ml of Lin; Cin-L, 0.3 µg/ml of Cin; Cin-M, 1.7µg/ml of Cin; Cin-H, 5.2 µg/ml of Cin. Data presented as mean ± SD. \*significant difference between VCO groups with and without MSU stimulation (p < 0.05).

(A) Fed plasma uric acid level change



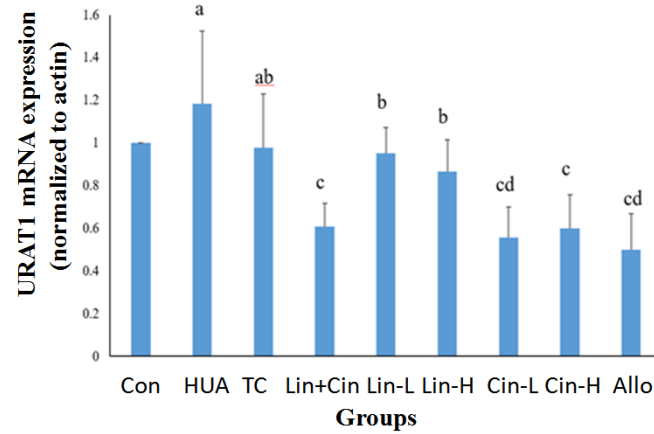
(B) Total urinary uric acid excretion change



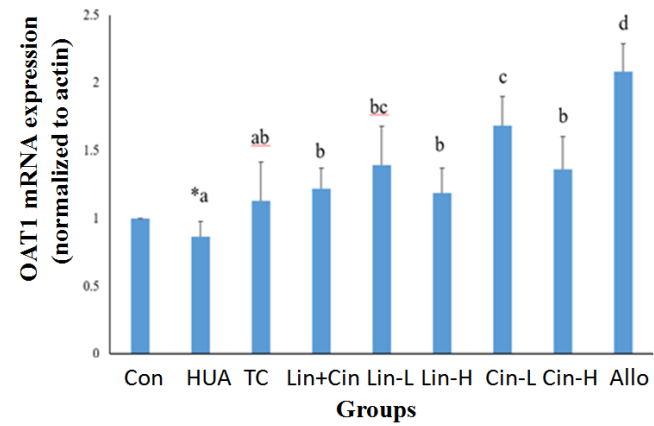
圖十三、高尿酸飲食小鼠血漿中尿酸濃度 (A)及 24 小時尿液中總尿酸排除量(B)之變化百分比

Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol.

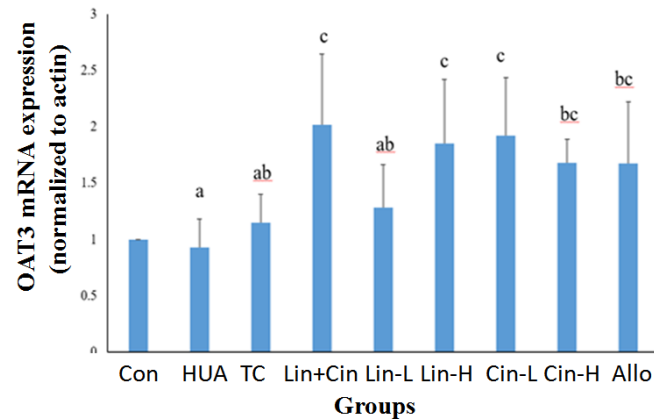
(A) URAT1



(B) OAT1

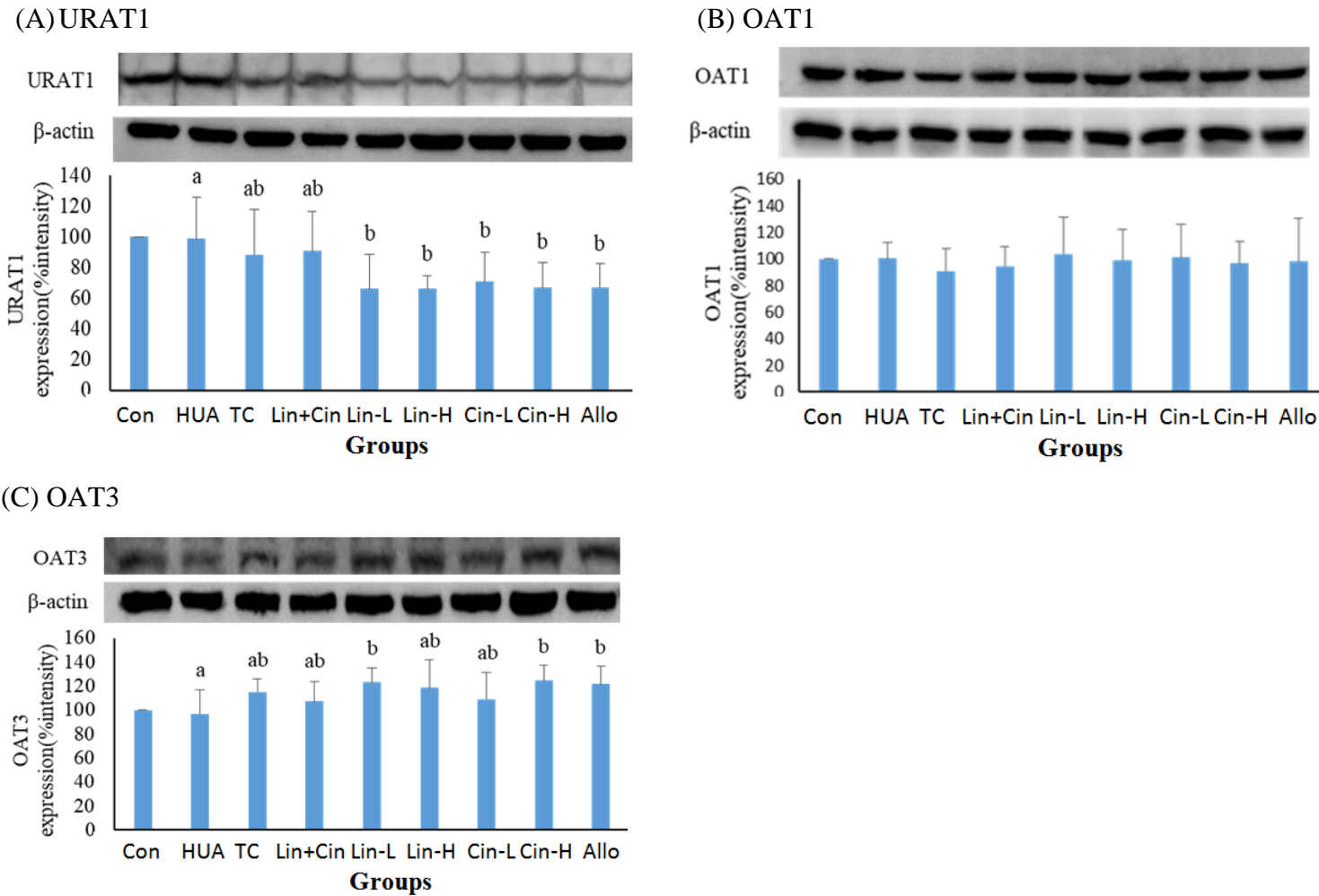


(C) OAT3



圖十四、高尿酸飲食小鼠腎臟中 URAT1 (A)、OAT1 (B)、OAT3 (C) mRNA 表現量

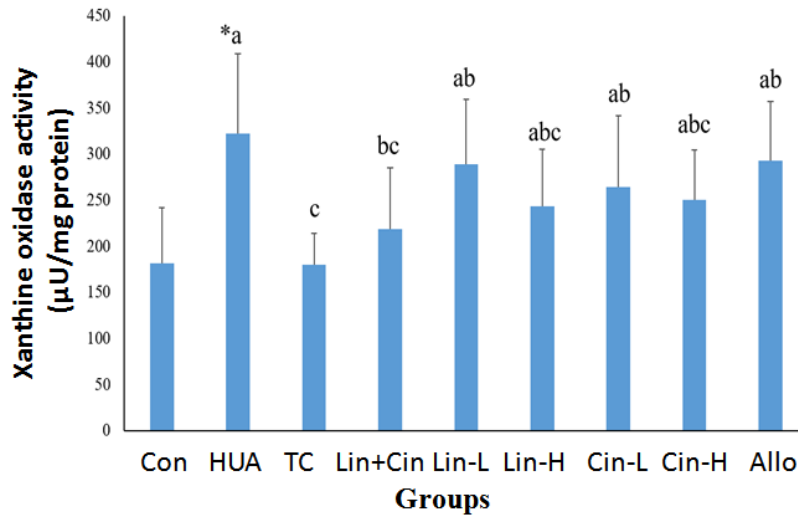
Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and HUA group ( $p < 0.05$ ). a, b, c, and d indicate the means of hyperuricemic diet-treated groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



圖十五、高尿酸飲食小鼠腎臟中 URAT1 (A)、OAT1 (B)、OAT3 (C)蛋白質表現量

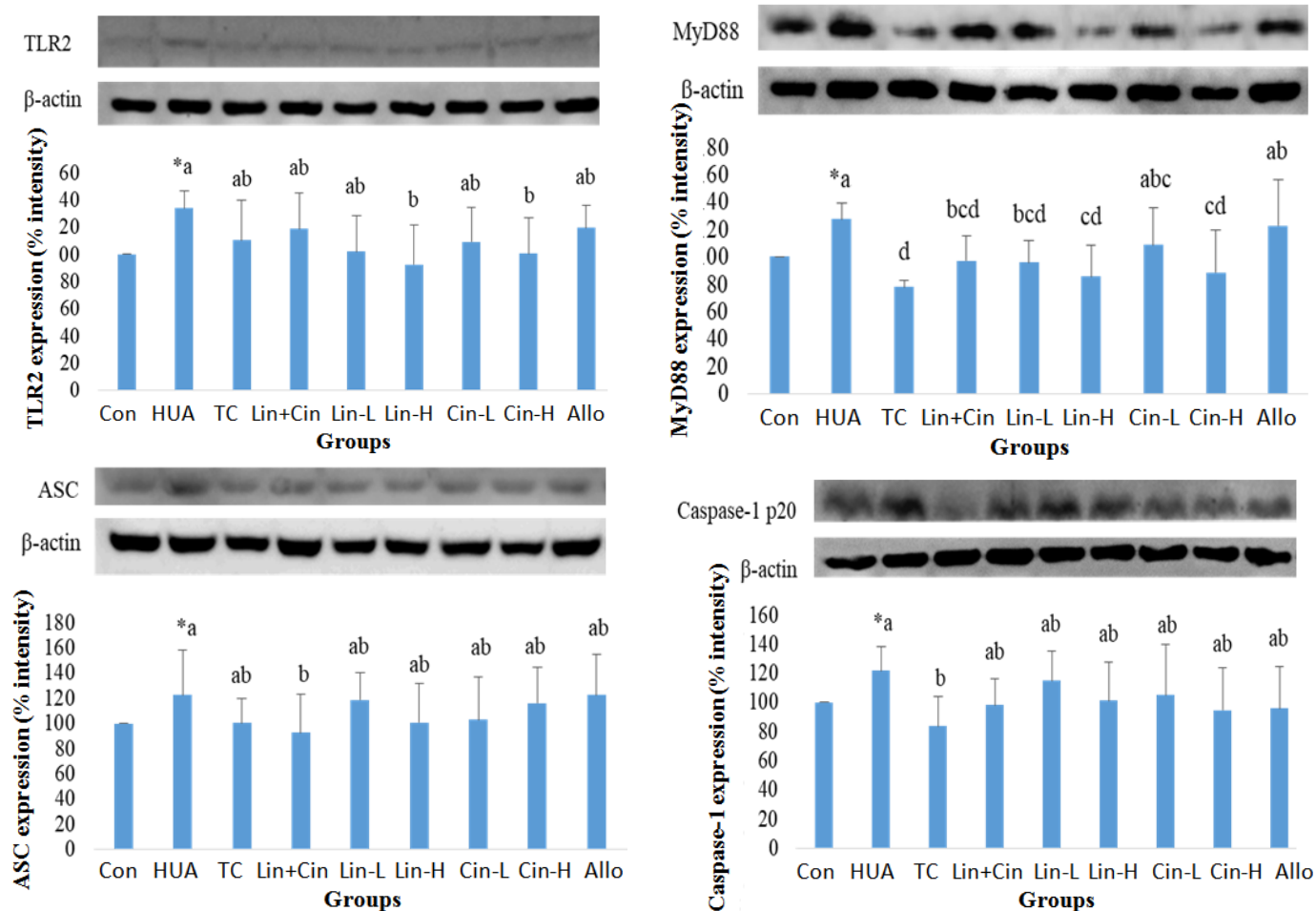
Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and HUA group ( $p < 0.05$ ). a and b indicate the means of hyperuricemic diet-treated groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).





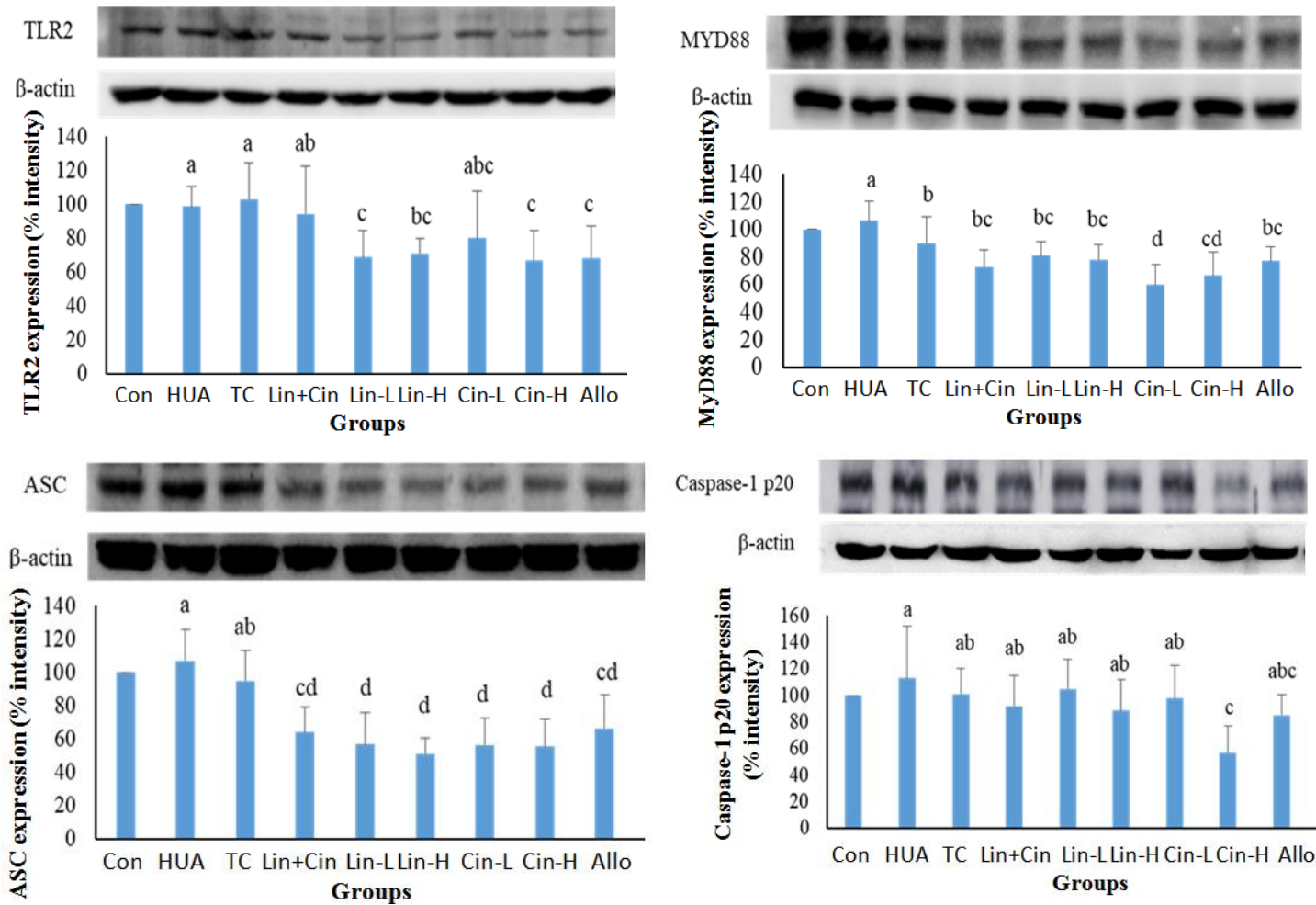
圖十六、高尿酸飲食小鼠肝臟中 xanthine oxidase 活性

Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and HUA group ( $p < 0.05$ ). a, b, and c indicate the means of hyperuricemic diet-treated groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



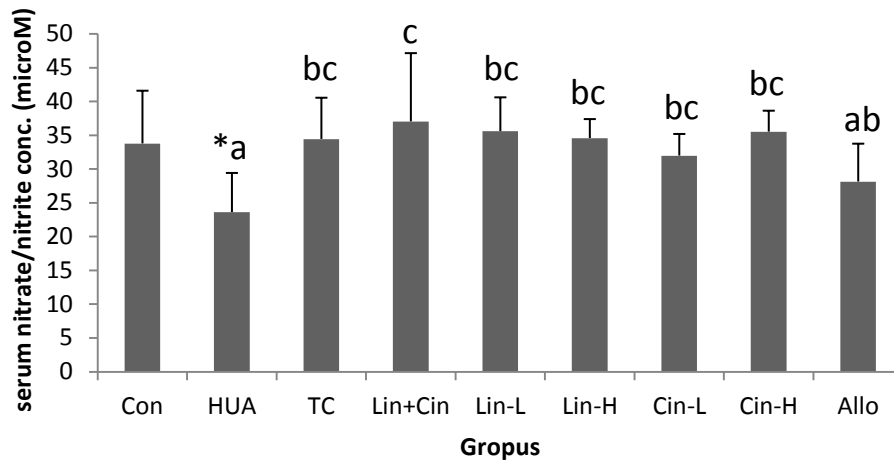
圖十七、高尿酸飲食小鼠副睪脂肪中 TLR2、MD2 及 MyD88 蛋白質表現量

Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and HUA group ( $p < 0.05$ ). a, b, c, and d indicate the means of hyperuricemic diet-treated groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



圖十八、高尿酸飲食小鼠腎臟中 TLR2、MYD88、ASC、Caspase-1 p20 蛋白質表現量

Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and HUA group ( $p < 0.05$ ). a, b, c, and d indicate the means of hyperuricemic diet-treated groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



圖十九、高尿酸飲食之小鼠血漿中 nitrate/nitrite 濃度

Con, mice received normal chow diet and supplemented with corn oil (2 ml/kg BW); groups other than the Con were mice received hyperuricemic diet containing 2% potassium oxonate and 3% uric acid and supplemented with the agents as the followings: HUA, corn oil; TC, 13 mg/kg of TC; Lin+Cin, 5.2 mg/kg of Lin plus 0.9 mg/kg of Cin; Lin-L, 2.6 mg/kg of Lin; Lin-H, 5.2 mg/kg of Lin; Cin-L, 0.45 mg/kg of Cin; Cin-H, 0.9 mg/kg of Cin; Allo, 5 mg/kg of allopurinol. Data presented as mean  $\pm$  SD. \*significant difference between Con group and HUA group ( $p < 0.05$ ). a, b, and c indicate the means of hyperuricemic diet-treated groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 計畫成果自評

本計畫因通過經費不足以完成原先規畫之100%內容，但已盡量調整經費之使用，包括將計畫主持費挪用於耗材購買，盡可能完成所有研究內容，總結本計畫成果，達成率為95%以上。本研究之學術及應用價值方面：已知關於高尿酸血症及痛風之醫療，雖然目前臨床上已有例如以colchicine及非固醇類抗發炎藥做為預防痛風復發之療法或利用allopurinol或其它xanthine oxidase抑制劑抑制尿酸生成之藥物，例如目前已在臨床試驗階段最新用藥即包括IL-1 $\beta$ 抑制劑及尿酸廓清劑。本研究證實在合乎枷羅木醇 (Lin) 及肉桂醛 (Cin) 之 acceptable daily intake (ADIs) 劑量範圍內灌食枷羅木醇型台灣土肉桂葉精油 (TC) 及個別或組合其活性成分Lin和Cin，於小鼠可有用防尿酸鈉結晶 (MSU) 誘發之痛風性發炎反應及高尿酸飲食誘發之胰島素阻抗和腎絲球超過濾，且與抑制XO活性、調節腎臟尿酸轉運蛋白表現量及抑制胞內signal-1及-2發炎訊號分子表現量有關。本研究結果提出枷羅木型台灣土肉桂葉精油可能在人類防治高尿酸血症相關急、慢性共病症的alternative therapy，且也在學術上提出其活性成分及作用機制。若未來這些作用能在人體試驗獲得進一步證實，將能應用於改善過人與高尿酸血症有關的健康問題。本計畫部分重要結果已在106年發表於第43屆台灣營養學會年會暨學術研討會，共計三篇。因執行計畫期間PI參與多項學術服務工作，因而無充裕時間完成這些果之期刊論文撰寫，目前正致力於完成投稿論文之潤飾，預期能將這些成果發表於SCI期刊。

本研究結果已發表之研討會論文詳細資料如下：

王詩芸 洪宜葶 麥庭瑜 余家瑩 張芸瑄 李世傑 劉承慈 (2016) 台灣土肉桂葉精油與其活性成分枷羅木醇及肉桂醛對於尿酸鈉結晶誘發小鼠痛風性發炎反應中腹腔嗜中性球活化之影響. 第43屆台灣營養學會年會暨學術研討會 (台中).

麥庭瑜 余家瑩 王詩芸 張芸瑄 洪宜葶 李世傑 劉承慈 (2016) 台灣土肉桂葉精油與其活性成分linalool及cinamaldehyde對於餵食potassium oxonate和uric acid誘發高尿酸血症小鼠模式腎臟保護機制之探討. 第43屆台灣營養學會年會暨學術研討會(台中).

余家瑩 麥庭瑜 王詩芸 洪宜葶 張芸瑄 李世傑 劉承慈 (2016) 以餵食Potassium oxonate和Uric acid誘發高尿酸血症之小鼠模式探討台灣土肉桂葉精油與其活性成分枷羅木醇及肉桂醛對於血糖調控機制之影響. 第43屆台灣營養學會年會暨學術研討會 (台中)

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：劉承慈		計畫編號：104-2320-B-040-022-MY3	
計畫名稱：台灣土肉桂葉精油及其主要成分於高尿酸血症相關之急、慢性病症之抗發炎作用及相關機制之探討			
成果項目		量化	單位
			質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)
國內	期刊論文	0	
	學術性論文 研討會論文	3	<p>王詩芸 洪宜葶 麥庭瑜 余家瑩 張芸瑄 李世傑 劉承慈 (2016) 台灣土肉桂葉精油與其活性成分桉羅木醇及肉桂醛對於尿酸鈉結晶誘發小鼠痛風性發炎反應中腹腔嗜中性球活化之影響. 第43屆台灣營養學會年會暨學術研討會 (台中).</p> <p>論文摘要： 我們過去發現台灣土肉桂葉精油 (TC) 及其成分桉羅木醇 (Lin) 和肉桂醛 (Cin) 可減少尿酸鈉 (MSU) 結晶誘發小鼠腹腔灌洗液中嗜中性球/總細胞數比例，本實驗進一步探討上述成分對 MSU 誘發嗜中性球活化之影響。將雄性 C57BL/6 小鼠分組，並預先隔日灌食載劑；TC (13 mg/kg BW)；Lin (2.6、5.2 mg/kgBW)；Cin (0.4、0.9 mg/kg BW)；Lin (5.2 mg/kgBW) +Cin (0.9 mg/kg BW)；allopurinol (5 mg/kgBW) 或 colchicine (1.5 mg/kgBW) 共八次。最後一次灌食後隔日，灌食載劑的小鼠注射 (i. p.) PBS (0.5 ml/mice；con 組) 或 MSU (3 mg/0.5ml PBS/mice；MSU 組)，其餘小鼠則均注射 (i. p.) 同上劑量之 MSU，禁食 12 小時後犧牲。結果顯示，TC、Lin 和 Cin 在不影響細胞存活率下，可降低 MSU 誘發之腹腔灌洗液細胞 caspase-1 和 NET (neutrophil extracellular traps)- neutrophil elastase 活性，及 CD11a 表現。在血漿中，系統性發炎反應指標 IL-1<math>\beta</math> 濃度並未受到腹腔注射 MSU 或灌食試劑之誘發，而 TC 及 Lin+Cin 可降低 sCD14 濃度且 TC、Lin 及 Cin 均顯著降低 sICAM、CXCL1 及 TGF-<math>\beta</math>1 濃度。在腹腔灌洗液中，TC 顯著降低 NO 濃度；Cin-H 顯著降低 TGF-<math>\beta</math>1 濃度，且 TC、Lin 和 Cin 均能降低腹腔灌洗液中 sICAM 和 CXCL1 濃度。由上述結果可知，TC 及其活性成份 Cin、Lin 透過抑制嗜中性球與血管內皮趨化作用相關因子降低 MSU 引發之痛風性發炎部位的嗜中性</p>

球數目，且可降低因MSU而趨化至痛風性發炎部位的嗜中性球生理活性，改善發炎作用。

麥庭瑜 余家瑩 王詩芸 張芸瑄 洪宜葶  
李世傑 劉承慈 (2016) 台灣土肉桂葉精油與其活性成分linalool及cinnamaldehyde對於餵食potassium oxonate和uric acid誘發高尿酸血症小鼠模式腎臟保護機制之探討. 第43屆台灣營養學會年會暨學術研討會(台中).

論文摘要:

血尿酸值升高為慢行腎臟病的獨立風險因子，本研究目的為探討灌食台灣土肉桂葉精油(TC)及其活性成分linalool (Lin)和cinnamaldehyde (Cin)對於高血尿酸模式小鼠肝腎功能、發炎狀態及腎臟尿酸轉運蛋白表現之影響。使用十週齡雄性C57BL/6小鼠餵食含3% uric acid和2% potassium oxonate的飼料56天，並於第42天起隔日灌食載劑corn oil (2ml/kg BW)、TC (13mg/kg BW)、Cin (0.45或0.9 mg /kg BW)、Lin (2.6或5.2 mg /kg BW)、allopurinol(5 mg/kg BW)、colchicine (1.5mg/kg BW)。結果顯示，此模式除增加小鼠排尿量外，並不影響小鼠其他代謝值、血清AST活性和creatinine含量；雖然顯著降低血清ALT活性並顯著增加BUN值，但變化均在正常生理範圍內；此外，介入土肉桂成分造成上述肝腎功能指標變化均在正常生理範圍內。腎臟發炎指數方面，此模式顯著增加NO含量，略微增加IL-1beta含量，但不影響caspase-1活性。TC及相當於其劑量之Cin與Lin均顯著降低IL-1beta含量且高劑量Cin及allopurinol顯著降低NO含量和caspase-1活性；腎臟TNF-alpha含量則不受此模式或飲食介入影響。RT-PCR結果顯示，此模式雖未影響URAT1、OAT1及OAT3表現，但飲食介入Cin抑制URAT1且促進OAT1表現，且Lin可促進OAT3表現。整體而言，此高血尿酸模式不影響小鼠肝腎功能，且本研究介入之土肉桂成分劑量具安全性並可能改善腎臟發炎程度；Cin和Lin可藉由抑制腎小管再吸收尿酸及促進尿酸自周圍血管轉運至腎小管保護腎臟並改善高尿酸問題。

余家瑩 麥庭瑜 王詩芸 洪宜葶 張芸瑄  
李世傑 劉承慈 (2016) 以餵食

					<p>Potassium oxonate和Uric acid誘發高尿酸血症之小鼠模式探討台灣土肉桂葉精油與其活性成分枷羅木醇及肉桂醛對於血糖調控機制之影響. 第43屆台灣營養學會年會暨學術研討會 (台中)</p> <p>論文摘要:  高尿酸與第2型糖尿病發展有關, 但長期使用降尿酸藥物之副作用限縮了其臨床使用, 故需積極尋找替代療法。已知台灣土肉桂葉精油 (TC) 及其活性成分 linalool (Lin) 及 cinnamaldehyde (Cin) 能抑制xanthine oxidase活性, 且有抗發炎效果。以十週齡雄性C57BL/6小鼠, 餵食含2% potassium oxonate及3% uric acid之飼料56天誘發高尿酸血症, 並於第42天起隔日灌食載劑corn oil (2 ml/kg BW)、TC (13 mg/kg BW)、Lin合併Cin (Lin: 5.2 mg/kg BW、Cin: 0.9 mg/kg BW)、Lin (2.6或5.2 mg/kg BW)、Cin (0.45或0.9 mg/kg BW)、allopurinol (5 mg/kg BW)。與控制組相較, 此模式增加進食狀態下血尿酸濃度, 雖未影響口服葡萄糖耐受性及周邊fructosamine濃度, 但顯著增加c-peptide濃度, 顯示需較多胰島素維持正常血糖。另外, 在未誘發IL-1<math>\beta</math>下造成血中及骨骼肌NO含量下降, 顯示高尿酸抑制eNOS活性。介入TC顯著降低血尿酸濃度, 且顯著提升周邊NO濃度及降低骨骼肌中TNF-<math>\alpha</math>含量。單獨給予Cin或Lin改善血尿酸的作用不如TC, 但低劑量Cin或Lin在不影響血糖下, 可顯著改善血中c-peptide含量, 且顯著提升周邊NO濃度。高劑量Lin也顯著提升骨骼肌中NO含量及降低IL-1<math>\beta</math>和TNF-<math>\alpha</math>含量; 高劑量Cin雖未顯著影響骨骼肌NO及IL-1<math>\beta</math>含量, 但顯著降低骨骼肌TNF-<math>\alpha</math>含量。根據上述結果推論, TC及其活性成分可能改善高尿酸血症相關之胰島素阻抗及血壓異常。</p>
		專書		0	本
		專書論文		0	章
		技術報告		0	篇
		其他		0	篇
智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
			已獲得	0	
		新型/設計專利	0		



		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
		其他		0		
	技術移轉	件數		0	件	
		收入		0	千元	
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇
			研討會論文		0	
專書			0	本		
專書論文			0	章		
技術報告			0	篇		
其他			0	篇		
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
	營業秘密		0			
	積體電路電路布局權		0			
	著作權		0			
	品種權		0			
	其他		0			
技術移轉	件數		0	件		
	收入		0	千元		
參與計畫人力	本國籍	大專生		0	人次	
		碩士生		0		
		博士生		0		
		博士後研究員		0		
		專任助理		0		
	非本國籍	大專生		0		
		碩士生		0		
		博士生		0		
		博士後研究員		0		
		專任助理		0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體						

效益事項等，請以文字敘述填列。）

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以200字為限）

本計畫部分重要結果已在106年發表於第43屆台灣營養學會年會暨學術研討會，共計三篇。因為執行本計畫期間PI參與多項學術服務，因而無充裕時間完成這些結果之期刊論文撰寫，目前正致力於完成投稿論文，預期能將這些成果發表於SCI期刊。

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

關於高尿酸血症及痛風之醫療，雖然目前臨床上已有例如以colchicin及非固醇類抗發炎藥做為預防痛風復發之療法，或利用allopurinol或其它xanthine oxidase抑制劑抑制尿酸生成之藥物，但往往因這些藥物的各種副作用導致治療中斷或發展其它臨床問題，因此仍有必要發展其他方法，例如目前已在臨床試驗階段最新用藥即包括IL-1 $\beta$ 抑制劑及尿酸廓清劑。本研究證實在合乎枷羅木醇(Lin)及肉桂醛(Cin)之acceptable daily intake (ADIs)劑量範圍內灌食枷羅木醇型台灣土肉桂葉精油(TC)及個別或組合其活性成分Lin和Cin，於小鼠可有效預防尿酸鈉結晶(MSU)誘發之痛風性發炎反應及高尿酸飲食誘發之胰島素阻抗和腎絲球超過濾，且與抑制XO活性、調節腎臟尿酸轉運蛋白表現量及抑制胞內signal-1及-2發炎訊號分子表現量有關。本研究結果提出枷羅木醇型土肉桂為可能在人類防治高尿酸血症相關急、慢性共病症的alternative therapy，且也在學術上提出其活性成分的作用機制。若未來這些作用能在人體試驗獲得進一步證實，將能應用於改善國人有關高尿酸共病症的健康問題。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關  
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

說明：(以150字為限)