

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

荷葉類黃酮多重護肝及抑制肝癌之作用及機轉之研究(第3年)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 101-2313-B-040-004-MY3

執行期間：103年08月01日至104年07月31日

執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：王朝鐘

計畫參與人員：博士後研究：楊孟元

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2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
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 104 年 10 月 22 日

中文摘要：本研究利用 NLE (0.5、1.0 和 2.0%)與 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料合併餵食 C57BL/6J 小鼠六週。研究中證明 NLE 能降低肝功能指數(AST/ALT)及血清和肝臟中三酸甘油酯和膽固醇含量，且抑制三酸甘油酯和膽固醇合成相關蛋白表現，)。此外，顯示 NLE 可經由增加PPAR- α 表現，活化 CPT-1促進脂肪酸運輸，活化MTP促進脂肪酸氧化作用，進而對抗酒精所誘發的脂質生成作用。並能經由活化 GSH、GSH-Px、SOD 和 catalase 等抗氧化性酵素，抑制酒精誘導之氧化效應。NLE 也能抑制酒精所誘發之炎症指標(IL-6, TNF, iNOS, COX-2)。從週邊脂肪組織測量亦證實 NLE 可以抑制體脂肪形成。結果也顯示 NLE 能抑制三酸甘油酯和膽固醇在肝臟中累積、促進脂肪酸運輸、降低小鼠體重、調控脂質在肝臟中累積並降低血清中脂質含量、活化抗氧化酵素避免酒精誘導的氧化效應、透過活化 AMPK 和 PPAR- α 路徑抑制脂肪酸合成、增加脂肪酸運輸和刺激脂肪酸氧化作用。

第二年探討NLE抑制肝纖維化及肝癌之作用。研究首先利用化學致癌物質AAF誘導大鼠產生肝癌的模式，評估NLE抑制AAF所誘導肝臟纖維化，及肝癌發展之作用，並探討其中的相關機轉變化。在AAF動物模式之結果中發現，NLE可以減緩AAF誘導大鼠自發性發生肝癌，NLE是透過增加肝臟之解毒功能，增加GST的活性，及增加肝臟的抗氧化酵素活性，如SOD、GSH-peroxidase及catalase，來達到保護肝臟，抑制肝癌的發生。

第三年證明NLE確實可以抑制人類肝癌細胞株Huh7與Hep3B的生長。進一步分析NLE所造成的細胞死亡形式，透過細胞凋亡雙染分析試驗(Annexin V/PI stain) 與caspase 3的活化證實NLE誘導人類肝癌細胞株走向細胞凋亡(apoptosis)。而從DCFH-DA分析與JC-1染色發現NLE會導致細胞內粒腺體功能異常，造成粒腺體膜電位的改變，進而產生過量的ROS累積，促進肝癌細胞的死亡。從蛋白表現量推測NLE會透過活化p53/Bax/Bak路徑導致肝癌細胞的凋亡。另外發現，NLE可以誘導Hep3B細胞acidic vesicular organelles之產生。而觀察細胞自噬作用相關蛋白(LC3, ATG5, Beclin)也證實NLE確實會誘導Hep3B產生自噬作用，推測NLE也可以透過細胞自噬作用導致肝癌的細胞凋亡。總和以上結果，NLE可以增加肝臟的抗氧化能力與解毒功能而減緩AAF誘導的肝癌生成，並且透過p53/Bax/Bak路徑造成肝癌細胞株粒線體膜電位的改變並調控細胞自噬作用產生，利用這兩種方式導致肝癌細胞的凋亡進而達到抑制肝癌生成之作用，推測NLE可能具有幫助病患減輕肝癌惡化之潛力。

中文關鍵詞：荷葉黃酮、酒精性脂肪肝炎病變、抗氧化、抑制脂肪合成、促進脂肪分解、肝纖維化、解毒酵素、抗肝癌作用、人類肝癌細胞、細胞凋亡、致死性自噬作用、抗肝癌作用

英文摘要：In first year, our results revealed that NLE significantly reduced the lipid accumulation, prevented oxidative stress, facilitated anti-inflammation, suppressed lipid synthesis, increased fatty acid transportation and stimulated fatty acid oxidation by regulating the activation of AMPK, suggesting that NLE could potentially be developed as a natural agent for preventing NAFLD and AFLD (Food Funct.,

2014, 5, 678). In second year, we found that dietary administration of NLE had markerly suppressed AAF-induced liver cancer incidence in wistar rats. NLE increased detoxification and antioxidant enzyme in liver of AAF-induced rat. In this year, we demonstrated that NLE induced cell death in human hepatocellular carcinoma cell, Huh7 and Hep3B, by MTT assay, Annexin V/PI stain and Caspase activation. Reactive oxygen species (ROS) production as side products of the electron transport chain, causing mitochondrial damage. NLE treatment induced cellular ROS accumulate and mitochondrial dysfunction by DCFH-DA and JC-1 analysis in Huh7 and Hep3B. In our study, NLE induced mitochondrial membrane potential loss and apoptosis through activation of p53/Bax/Bak pathway which is similar to ER stress-induced cell death. We presented evidence that NLE also promoted acidic vesicular organelles formation by Acridine orange stain and activated Beclin/ATG5/LC-3 pathway, which is sufficient to induce autophagic cell death in Hep3B cell. These results indicated that the NLE might be a plausible treatment for patients with HCC.

英文關鍵詞： flavonoids-rich extracts of Nelumbo Nucifera leaf, alcoholic liver disease, antioxidation, anti-inflammatory, stimulate lipolysis, inhibit lipogenesis, liver fibrosis, antioxidation, detoxication, anti-hepatocarcinogenesis, human hepatocellular carcinoma cell line, apoptosis, autophagy, anti-hepatocarcinogenesis.

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)

荷葉類黃酮多重護肝及抑制肝癌之作用及機轉之研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 101-2313-B-040-004-MY3

執行期間：101年08月01日至104年07月31日

執行機構及系所：中山醫學大學 生化微生物免疫研究所

計畫主持人：王朝鐘

共同主持人：

計畫參與人員：楊孟元，洪嘉鴻，張純華，游孟勳

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

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 104 年 10 月 21 日

目錄

第一年度研究報告.....	3
壹、中文摘要.....	3
貳、英文摘要.....	4
參、報告內容.....	5
肆、研究材料與方法.....	10
伍、研究成果說明.....	15
陸、研究成果討論.....	25
柒、參考文獻.....	30
捌、研究成果圖與表.....	34
玖、成果發表.....	47
第二年度研究報告.....	48
壹、中文摘要.....	48
貳、英文摘要.....	49
參、報告內容.....	50
肆、研究材料與方法.....	54
伍、研究成果說明.....	61
陸、研究成果討論.....	64
柒、參考文獻.....	66
捌、研究成果圖與表.....	72
第三年度研究報告.....	81
壹、中文摘要.....	81
貳、英文摘要.....	82
參、報告內容.....	83
肆、研究材料與方法.....	89
伍、研究成果說明.....	94
陸、研究成果討論.....	98
柒、參考文獻.....	100
捌、研究成果圖與表.....	106

第一年度研究報告

壹、中文摘要

關鍵字：荷葉黃酮、酒精性脂肪肝炎病變、抗氧化、抑制脂肪合成、促進脂肪分解

荷葉黃酮萃取物(NLE)對於抑制酒精性肝損傷及肥胖之作用，目前尚無發現。本研究利用 NLE (0.5、1.0 和 2.0%)與 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料合併餵食 C57BL/6J 小鼠六週。研究中證明 NLE 能降低肝功能指數(AST/ALT)及血清和肝臟中三酸甘油酯和膽固醇含量，且抑制三酸甘油酯和膽固醇合成相關蛋白表現，如固醇類調節結合蛋白(SREBPs)、glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)、HMG-CoA reductase、脂肪酸合成酶(FAS)和 acetyl-CoA (ACC)。此外，顯示 NLE 可經由增加 peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR- α)表現，活化 palmitoyltransferase-1 (CPT-1)促進脂肪酸運輸，活化 microsomal triglyceride transfer protein (MTP)促進脂肪酸氧化作用，進而對抗酒精所誘發的脂質生成作用。並能經由活化 GSH (glutathione)、GSH-Px (GSH peroxidase)、SOD (superoxide dismutase)和 catalase 等抗氧化性酵素，抑制酒精誘導之氧化效應。從免疫組織染色和 western blot 分析結果，也證明 NLE 也能抑制酒精所誘發之炎症指標 (IL-6, TNF α , iNOS, COX-2)。從週邊脂肪組織測量亦證實 NLE 可以抑制體脂肪形成。結果也顯示 NLE 能抑制三酸甘油酯和膽固醇在肝臟中累積、促進脂肪酸運輸、降低小鼠體重、調控脂質在肝臟中累積並降低血清中脂質含量、活化抗氧化酵素避免酒精誘導的氧化效應、透過活化 AMPK 和 PPAR- α 路徑抑制脂肪酸合成、增加脂肪酸運輸和刺激脂肪酸氧化作用。因此，NLE 具有潛力發展為健康食品，預防酒精引發之肝損傷和肥胖。

貳、英文摘要

The flavonoids-rich extracts of *Nelumbo Nucifera* leaf (NLE) play roles in preventing alcoholic liver disease remain unknown. In this study, we determined whether treatment with NLE would prevent experimental alcoholic liver disease (ALD) and elucidated the underlying mechanism. Six groups of C57BL/6J mice were fed on Lieber-DeCarli regular diet with or without 36% ethanol for 6 weeks. Meanwhile, mice were treated with 0.5, 1.0 and 2.0% NLE respectively. The plasma biomarkers and hepatic content analysis showed that NLE inhibited triglyceride (TG), total cholesterol (TC), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) levels. Furthermore, treatment with NLE lessened the expression of TG and TC synthesis-related proteins by immunoblotting, such as SREBPs, AGPAT1, HMG-CoA reductase, fatty acid synthase (FAS) and acetyl-CoA carboxylase (ACC). In contrast, the peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR- α) and carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) were increased, concurrently, promotion of MTP activity by NLE might serve as a fatty acid transport against lipid accumulation in liver. Beside, NLE prevented oxidant stress by activated antioxidant enzymes, such as GSH, GSH-Px, SOD and catalase. The IHC stain and western blot analysis also exposed the inhibitory effect of NLE on alcohol-induced inflammatory stress. In conclusion, our results revealed that NLE significantly reduced the lipid accumulation, prevented oxidative stress, facilitated anti-inflammation, suppressed lipid synthesis, increased fatty acid transportation and stimulated fatty acid oxidation by regulating the activation of AMPK, suggesting that NLE could potentially be developed as a natural agent for preventing alcohol-induced liver injury and obesity.

Keywords: flavonoids-rich extracts of *Nelumbo Nucifera* leaf, alcoholic liver disease, antioxidation, anti-inflammatory, stimulate lipolysis, inhibit lipogenesis

參、報告內容

3-1. 肝臟疾病

根據衛生署100年的統計慢性肝炎以及肝硬化，在國人十大死亡原因當中佔居第8位，而肝癌更是十大癌症死因的第一位，因而顯示台灣是肝硬化以及肝臟疾病盛行的區域。肝臟病變一般可分為三大階段，即(A)肝損傷(肝炎)(B)肝纖維化和肝硬化(C)肝癌，依發生原因又分為以下：

3-2. 肝損傷

造成肝損傷的原因有諸多因素，包含藥物、病毒感染、飲食習慣不良或酗酒等，引起多發性的營養和機能缺乏，進而產生脂肪浸潤使肝細胞發炎壞死、組織及血管受到破壞，造成肝損傷及肝臟產生纖維化，而將原本正常構造之肝臟，扭曲成許多小節結，使肝臟的功能逐漸走向衰竭之命運，最後導致肝硬化。

肝損傷包括相關肝臟疾病和已造成組織損傷現象。就臨床上判讀，急性肝損傷是指病程少於六個月者，慢性肝損傷則指病程達六個月以上者。肝損傷的發生原因大致分為以下幾種因素：

病毒性肝疾病(Viral liver disease)

病毒性肝病是指因病毒所引起的肝炎、肝硬化及肝癌。主要有六種病毒會產生病毒性肝炎：A、B、C、D、E及G型肝炎病毒，A型及E型肝炎病毒主要經由糞口傳染，而B、C、D、G型等肝炎病毒則是經由血液及體液之接觸來傳染，其中B、C、D及G型肝炎病毒會導致慢性肝炎、肝硬化[2]。

酒精性肝損傷

酒精性肝病是指因長期酗酒所造成的肝疾病。酒精代謝過程中經由CYP2E1(cytochrome P450 2E1)代謝後會產生ROS，造成脂質過氧化、破壞蛋白質及DNA，進而引發細胞毒性[3]。

藥物或毒物性肝損傷

因服用藥物、化學藥品或其餘對肝臟有毒害作用的物質所造成的肝病。例如食物受到黃麴毒素的污染，被認為與日後肝炎和肝癌的發生是有相關聯的[4]；以及因服用過量普拿疼(acetaminophen, 乙醯胺酚)引發急性肝炎[5]。

化學性肝損傷

由化學性肝毒性物質所造成的肝損傷。這些化學物質可通過胃腸道門靜脈或體循環進入肝臟進行轉化，其病變的過程與感染的劑量直接相關，可引起肝臟不同程度的肝細胞壞死、脂肪變形、肝硬化和肝癌。例如四氯化碳(carbon tetrachloride)及脂多糖體(lipopolysaccharide, LPS)，四氯化碳在動物模式上常使用於誘導急性和慢性肝損傷，原理主要是因四氯化碳受肝微粒酶活化成三氯甲烷自由基，然後與蛋白質結合導致蛋白質合成受阻，並引起脂質分解代謝失調，引起肝細胞內三酸甘油酯蓄積，另外三氯甲烷自由基形成過氧化物，導致脂質過氧化而使得肝細胞膜損傷，造成肝中酶素滲出及細胞病變而壞死[6]。LPS又稱為細菌內毒素(endotoxin)一旦進入循環系統，將與蛋白質結合形成LPS-binding protein (LBP)複合體，此複合體與macrophages 或monocytes細胞膜上的Toll-like receptors 結合後，將活化生物體的免疫系統並釋放出大量的細胞激素(cytokines)，引發一連串的全身性發炎反應，而脂多糖誘導肝損傷主要是因為活化引起發炎反應之一些細胞激素和發炎介子大量表現，如TNF- α 、CD14 (LPS receptor)、TGF- β 、IL-1和IL-6等，造成肝細胞發炎和壞死[7]。

3-3. 酒精對人體的影響和致病機制

3-3-1. 酒精性肝病變(alcoholic liver disease, ALD)

ALD是長期大量飲酒所致的肝臟損害性病變，其病理性的發展和發生率包括酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver, 80-90%)、酒精性肝炎(alcoholic hepatitis, 10-35%)、酒精性肝纖維化(liver fibrosis, 20-40%)、酒精性肝硬化(cirrhosis, 8-20%)及肝癌(hepatocellular carcinoma, 3-10%) [8, 9]。然而關於ALD的致病機轉雖然有相當多之研究，但目前尚無統一明確之證據，有文獻提出以氧化效應和脂質過氧化為中心的“two-hit model”假說，其“one-hit”指脂質沉積在肝細胞中而導致脂肪肝，“two-hit”則涉及內毒素、細胞因數參與的氧化效應和脂質過氧化作用[10]。

3-3-2. Stages of ALD

a. 酒精性脂肪肝(alcoholic steatosis, alcoholic fatty liver)

肝細胞內脂肪積累是酒精所誘發肝病變最是和常見的，這種脂肪肝主要是肝內中性脂肪的增加，其細胞內病理性變化包括瀰漫性脂肪液泡的擴張、增殖性內質網擴大和扭曲的線粒體。此一過程的主要病因是增加脂肪酸和三酸甘油酯合成，促進脂肪組織中游離脂肪酸和腸黏膜(intestinal mucosa)的乳迷微粒(chylomicrons)湧入肝臟中，從而增加肝臟脂質生成、抑制脂質分解和損壞細胞中線粒體及微小管(microtubules)，結果導致脂肪在肝臟中積累。研究指出酒精性脂肪肝分子機轉，乃因酒精誘導參與脂質合成酵素(lipogenic enzymes)過度表現，從而抑制下游PPAR α (peroxisome proliferator activated receptor α) 和增加固醇類轉錄因子SREBP (sterol regulatory element-binding protein) 作用[11,12]。酒精也會抑制AMPK (AMP-activated protein kinase)，進而影響細胞內負責脂肪合成和脂肪降解途徑之間平衡的關鍵代謝產物，malonyl coenzyme A和長鏈acyl-coenzyme A[41]；除此之外，長期或是大量攝取酒精會形成脂質過氧化作用而改變NADH/NAD⁺比值增加，經由抑制脂肪酸運輸和氧化作用及促進脂質合成[13]，最終結果造成脂質在肝臟內堆積。

b. 酒精性肝炎(alcoholic steatohepatitis)

這一階段的特點是產生炎症反應，組織學可見透明不規則細胞質結構的嗜酸性酒精小體(Mallory's hyaline)、多型核白血球(polymorphonuclear leukocytes) 和變性或壞死肝細胞。酒精性肝炎一直被視為是酒精性肝硬化的前驅病變。文獻指出酒精代謝的主要產物乙醛(acetaldehyde)，會與蛋白和DNA結合，從而導致功能改變並形成蛋白和DNA之加成物，且此加成物就如同一主動抗原(autoantigens)，會去啟動適應性免疫系統 (adaptive immune system)，活化一些免疫細胞參與反應，造成肝細胞損傷；另外，乙醛所形成之氧化性壓力，也會誘導線粒體損傷及抑制一些抗氧化性酵素活性，造成肝細胞產生apoptosis。

c. 酒精性肝纖維化(fibrosis)

酒精引發之肝纖維化在組織學上可發現圍繞在肝腺泡的任意位置，而早期的肝纖維組織通常可見到中央靜脈和微靜脈，嚴重則可見發達的粗面內質網和高爾基複

合體，還可見微纖維和微小管[15]；如果持續攝取酒精，將會迅速發展較嚴重的階段，包括肝硬化，因此，這種病變可被視為發展成後續的肝硬化指標，其病變是經由乙醛刺激膠原合成(collagen synthesis)，而刺激星狀細胞(stellate cells)產生過度的膠原沉積而形成肌纖維母細胞樣細胞轉化狀態(myofibroblast-like cells)[16, 17]。研究指出酒精及其代謝產物乙醛誘發肝細胞變性、庫氏細胞和多型核白血球活化，會活化星狀細胞轉化，是經由刺激釋放出一些纖維化介子(fibrogenic mediators)，而引發肝臟纖維化；包括生長因子 TGF- β ，血小板生長因子(platelet-derived growth factor)，細胞激素 angiotensin II、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α ，以及 leptin、NO 和 ROS 等[18, 19]。

3-4. 荷葉(Nelumbo Nucifera Leaf)介紹

荷葉為蓮之葉片部份。蓮，學名為 *Nelumbo Nucifera*，是睡蓮科植物蓮 (*Nelumbo Nucifera Gaertn*) 多年生草本挺水植物，又稱蓮花、荷花、芙蓉、水芙蓉、水芝、玉環、水華等，外形大多為半圓形或扇形，展開後類似圓盾形，直徑約 20-90 cm，邊緣成波浪狀，葉面較粗糙呈深綠色或黃綠色，下表面淡灰棕色，較光滑，有粗脈約 21-22 條，自中心向四周射出，中心有突起的葉柄殘基，具有輕微清香氣，味微苦。「本草再新」記載荷葉具有清涼解暑、止渴生津、治瀉痢、去火熱功效。「本草綱目」著述荷葉服之，令人瘦劣，單服可以消陽水浮腫之氣。中醫則常用於清暑利濕、生發清陽功能。

3-4-1. 化學成分

荷葉除了含有普通植物中所共有的碳水化合物、脂質、蛋白質、單寧等化學成分外，目前已知含多種生物鹼:如蓮鹼(roemerine)、荷葉鹼(nunciferine)、O-去甲荷葉鹼(O-nornuciferine)、亞美罌粟鹼(armepavine)、前荷葉鹼(pronuciferine)、N-去甲基荷葉鹼(N-nornuciferine)、D-N-甲基烏藥鹼(D-N-mthylcoc-laurine)、番荔枝鹼(anonaine)、原荷葉鹼(pronuciferine)、鵝掌楸鹼(liriodenine)和脫氫荷葉鹼(dehydroroemerine)[20]等。另外，荷葉亦含抗氧化性物質類黃酮，槲皮素(querctetin)異槲皮甙(Isoquercitrin)、蓮甙(nlumboside)[21,22]，以及維生素 C、酒石酸、檸檬

酸、蘋果酸、葡萄糖酸(gluconic acid)、草酸、琥珀酸、鞣質等。

3-4-2. 生理活性及作用

荷葉萃取物的抗氧化活性可以抑制過氧化氫(H₂O₂)誘導大腸癌細胞株 Caco-2 產生細胞毒性，有效降低自由基對細胞的攻擊，進而保護細胞避免受氧化性損傷[23]。荷葉萃取物所含的生物鹼成分可以對抗有絲分裂作用，抑制細胞週期程進程、降低細胞激素的基因表達和人類外周血液單核球細胞的增殖 [24]。荷葉萃取物富含類黃酮，其抗氧化的能力，能清除 DPPH 自由基、抑制人類低密度脂蛋白(ox-LDL)的氧化作用[25]。在大白鼠的實驗發現，荷葉萃取物可以有效降低大白鼠對脂肪和碳水化合物的吸收，有效達到減重的目的[26]；亦能促進白色脂肪細胞進行脂肪分解燃燒[27]；另外，以高脂飲食誘導的實驗也證明具有減肥和降血脂的作用[28]；荷葉萃取物用於抑制澱粉酶(amylase)、脂肪酶(lipase)的活性，能加速的脂質代謝和上調能源支出增加，而用於治療高脂血症[29]。在使用高脂肪飲食導異的動物模式研究，證實富含黃酮類的荷葉萃取物，會降低血中和肝臟中脂質代謝、避免脂質過氧化、顯著改善 AST 和 ALT、減低 LDL-C 和 HDL-C ratio，並且抑制因高脂肪飲食誘導異常血脂、脂肪肝和肝損傷等作用[30]。以高膽固醇飲食誘導大白兔的研究也發現，荷葉萃取物可以經由抑制 FAK/PI3-kinase/small G protein 路徑，降低 MMP-2/9 的分泌、抑制平滑肌細胞增生和移行，預防動脈粥狀硬化(atherosclerosis)發生[31]。從 *in vitro* 和 C57BL/6J 的小鼠動物模式也證實荷葉萃取物可以經由抑制肝臟中 FAS、acetyl-CoA carboxylase、HMGCoA reductase 表現、增加磷酸化 AMPK 活性、促進脂質調節相關酵素，有效地減輕身體脂肪積累和預防肥胖[32]。

肆、研究材料與方法

4-1. 荷葉黃酮萃取物(NLE)製備

取 200 公克之荷葉粉末，加入 5 L 的二次水攪拌 2 小時以上至完全溶解，浸置於 4°C 冷房隔夜，之後將荷葉汁液先以濾網初步過濾初渣，再以濾膜進行二次過濾，剩餘物再利用 50 ml 離心管離心，以 4000 轉 10 分鐘進行第二次分離荷葉汁液，所得之荷葉萃取液送至冷乾工廠冷凍乾燥去除水分再加以細磨成荷葉粉末，其乾燥粉末產物即為 NLE，將此萃取物儲存於-20 °C 備用，本次實驗 NLE 產率為 14.5%。

4-2. NLE 黃酮分析

以二次水配製 0.05 mg/mL 標準品及 10 mg/mL NLE 後，再以 0.22 µm filter 過濾。HPLC 分析條件如下---使用 Mightysil RP-18 GP 250 管柱，動相條件為[Solution A: Formic acid/water (10:90), Solution B: Formic acid/water/acetonitrile (10:60:30)]，動相梯度為(Time, %B) (0, 20) (55, 85)，流速 1 mL/min，偵測波長 260 nm，注射體積：10 µL，最後以偵測器進行分析。

4-3. 血清中脂質過氧化分析 TBARs assay

本實驗依據 Buege 和 Aust 之方法加以修改(Buege and Aust, 1978)，脂質氧化過程中會產生 Malondialdehyde (MDA)，此時加入 Thiobarbituric acid (TBA)會與 MDA 產生反應物(Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)，可利用吸光值(OD)測定反應物，以判定 MDA 形成量，而得知脂質過氧化的程度。首先將各組別定量其蛋白質含量。接著準備好試管配製不同梯度濃度 1,1,3,3-Tetramethoxypropane (TEP)作為標準液並畫出標準曲線。步驟取稀釋 10 倍的 200 µl 血清，加入 200 µl TCA buffer (Trichloroacetic acid, 25 %)混合後，於 4°C 下離心(1,000 x g; 30 mins)後，取上清液 200 µl 再加入 200 µl TBA buffer 混合後，於 95°C 下加熱並避光反應 40 分鐘後，放入冰上 cold down 15 分鐘並避光，以螢光光度計在波長 532 nm/600 nm 下測定吸光值，再依照標準曲線計算出樣品中所含的 MDA 濃度。

4-4. 動物肝臟脂質萃取與脂質含量之測定

取定量之肝臟組織剪碎，加入萃取溶劑 chloroform/methanol (2:1)，使用均質機均質後，以超高速離心機離心 1,500 x g 取得上清液，再以減壓真空濃縮機去除有機溶劑，得乾燥肝臟脂肪物質。分析時使用異丙醇回溶，所得之肝臟脂質萃取液，利用之商品化試劑組進行各脂質含量測定。

4-5. 動物肝臟蛋白萃取

取 0.1 g 之肝臟組織剪碎後加入蛋白萃取液(iNtRON Biotechnology)，其 sample 與 buffer 比率為 1/100，經均質機研磨得肝臟蛋白組織研磨液。將研磨液震盪反應 1 小時，再以低溫冷凍離心機超高速離心機離心(1,500 xg, 20 分鐘)，經離心後取得上清液，收集上清液即為蛋白，之後再定量配製濃度 60 µg/µl 的 western blotting sample。

4-6. 肝臟氧化和抗氧化功能相關之成分或酵素活性分析

4-6-1. 肝臟均質液之製備

取 0.1 g 肝臟組織，加入 10 倍體積的 Phosphate-EDTA 緩衝液(0.1 M KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, pH 7.0)，以玻璃研磨杵製備均質液。將均質液於 4°C 以 1,500 x g 離心 20 分鐘，取上清液進行蛋白質定量後，儲存於-80°C 備用。

4-6-2. 組織脂質過氧化分析(TBARs assay)

本實驗依據 Buege 和 Aust 之方法加以修改(Buege and Aust, 1978)，脂質氧化過程中會產生 Malondialdehyde (MDA)，此時加入 Thiobarbituric acid (TBA)會與 MDA 產生反應物(Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)，可利用吸光值(OD)測定反應物，以判定 MDA 形成量，而得知脂質過氧化的程度。

4-6-3. 麩胱甘肽(glutathione, GSH)濃度之分析

此測定法是根據 Cohn [33] 等人之螢光測定法。將組織以 normal saline 清洗之後，加入 homogenize buffer (50 mM Tris-0.25 M sucrose, pH7.5)，於冰上以研磨機進行研磨，將研磨液於 4°C 下以 10,000 xg 離心 30 min，取上清液 0.5 ml，

加入 4.5 ml Phosphate-EDTA buffer (0.1 M Na₂HPO₄, 5 mM EDTA, pH8.0)，混合均勻，取 0.1 ml 混合液，加入 0.9 ml phosphate-EDTA buffer，0.1 ml O-phthalaldehyde (OPT)混合均勻後，於室溫下，避光靜置 15 min，將此混合液體倒入石英管中，設定激發波長為 350 nm，放射波長 420 nm 之 Fluorescence spectrophotometer (HITACHI F-2000)測量其螢光強度。分析過程中以 GSH 標準品，作出標準曲線，再進行分析。結果以 nmole/mg protein 表示之。

4-6-4. 麩胱甘肽過氧化酶(GSH Px)活性分析

在麩胱甘肽過氧化酶與麩胱甘肽還原酶(Glutathione reductase, GRd)的偶合反應(Coupling reaction)中，麩胱甘肽過氧化酶會消耗兩分子的還原態麩胱甘肽(GSH)，來清除一分子的過氧化物，同時麩胱甘肽還原酶會消耗一分子的 NADPH，再將氧化態的麩胱甘肽(GSSG)還原成還原態麩胱甘肽。因此還原態麩胱甘肽的消耗速率會等於兩倍 NADPH 的消耗速率，故麩胱甘肽過氧化酶的活性可用 NADPH 在波長 340 nm 下的吸光值變化情形來表示[34]。

4-6-5. 超氧化物歧化酶 (SOD)活性分析

鄰苯三酚(pyrogallol)在 pH 小於 7 的環境中甚為穩定，但在 pH 大於 7 之環境中會發生自身氧化反應，產生超氧陰離子自由基，同時會以一定的速率生成有色中間產物紅桔酚，而超氧化物歧化酶可以將超氧陰離子自由基歧化，而使鄰苯三酚的自身氧化速率受到抑制，根據抑制程度之大小，可換算超氧化物歧化酶之活性[35]。

4-6-6. 過氧化氫酶(catalase)

在波長 240 nm 時，過氧化氫會在觸酶的存在下，逐漸減少其吸光值($\epsilon_{240} = 0.0395 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)，藉由其單位時間內吸光值的改變量，可測得觸酶的活性。一單位觸酶定義為每分鐘過氧化氫所消耗的毫莫耳數[36]。

4-7. 免疫組織染色法

將已經黏在乾淨的載玻片上之石蠟切片，放入 56°C 烘箱中 overnight 後以 Xylene 10 分鐘分隔兩次浸泡，再以 100%酒精 5 分鐘、95%酒精 3 分鐘、80

%酒精 1 分鐘、70%酒精 1 分鐘，之後以二次水浸泡 3 分鐘進行脫蠟。接著再以檸檬酸緩衝溶液(0.01 M, pH 6.0)煮沸 10 分鐘，以二次水浸泡 5 分鐘，擦取出後拭乾，於室溫下，將 Dual Endogenous Enzyme Block 覆蓋在檢體上作用 5 分鐘。以二次水和 PBST 分別沿著玻片沖洗後擦拭去多餘水分。完成後分別加入抗體 iNOS、COX2、IL-2、NFkB、SOD、GSH-Px 及 catalase (1:50-1:100)作用 3 小時，再以 PBST 沿著玻片沖洗，之後加入 Labelled polymer-HRP 在室溫作用 30 分鐘，以 PBST 沖洗後加入呈色劑 DBA (1 ml buffer substrate + 1 drop DBA)反應 5 分鐘，以二次水擦拭去多餘水分，利用 Hematoxylin 做比對 2 分鐘，以自來水沖洗至少 15 分鐘後進行脫水步驟(70% 酒精 2 分鐘、80% 酒精 2 分鐘、95%酒精 2 分鐘、100%酒精 2 分鐘、Xylene 5 分鐘兩次)，待組織玻片晾乾後以 aqueous mounting medium 進行封片。

4-8. 西方墨點法(western blotting)

取定量後之肝組織均質液配置 sample，以蛋白濃度 50-70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 加入等量的 Sample Buffer (2 ml 0.5 M Tris-HCl pH6.8, 1.6 ml Glycerol, 3.2 ml 10% SDS, 0.8 ml 2- β -mercaptoethanol, 0.4 ml 0.5% bromophenol blue)，以 95°C 加熱 10 分鐘，迅速至入冰中冷卻，以離心機將 Sample spin down 後再 loading 至電泳槽膠片上每個 well 中，其上層膠以 80 伏特，下層以 100 伏特進行電泳，待電泳結束後接者進行蛋白質的轉漬至 Nitrocellular paper 上，完成轉漬後以 5%脫脂牛奶於室溫下進行 blocking 1 小時，以 washing buffer (PBS with 0.5% tween-20)沖洗 3 次，將 NC paper 移至於 4°C 冰箱中與初級抗體反應 overnight，再以 washing buffer 沖洗 3 次後，以分別經二級抗體反應 1 小時，以 washing buffer 沖洗 3 次，最後加入 Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus 反應 1 分鐘後，於冷光螢光數位影像分析儀(LAS-4000 plus system)顯影觀察並定量。

4-9. 實驗數據統計分析(statistical analysis)

動物實驗每個實驗至少進行三次，所有數據資料以 SigmaStat 套裝軟體進行，以一元變方分析(One-way analysis of variance, ANOVA)試算過後，各組的差

異再以 Student's t test 統計分析，凡 $p < 0.05$ 以下時表示為有意義的差異。

伍、研究成果說明

5-1. NLE 抑制酒精致肝損傷作用

5-1-1. NLE 對酒精誘導小鼠肝損傷肝臟外觀型態和重量變化之影響

肝臟組織的外觀型態、大小與重量，可作為觀察在酒精餵食的模式下，其動物肝臟是否有產生病變之現象。觀察各試驗組別肝臟型態大小與重量結果顯示於 Fig. 1。經實驗六週後犧牲觀察發現，在各組肝臟組織大小型態上的變化，正常組肝臟色澤紅潤，表面平滑且觸感柔軟，以 ethanol 餵食小鼠之誘導組(EtOH)的肝臟組織明顯較正常組(ND)大，且肝臟整體外觀上呈現色澤明顯偏黃、肝臟表面較粗糙、邊緣較鈍圓等病變特徵，顯示在 ethanol 餵食模式下會誘發肝病變。而在正對照組(silymarin 200 mg/kg)和 NLE (0.5-2%)實驗組之肝臟組織，其肝臟外觀色澤紅潤、表面平滑與正常組幾乎相同、大小特徵小於誘導組(Fig. 1A)。另肝臟組織重量和肝臟組織重量佔動物體重之百分比值表示於 Fig.1B-C，顯示誘導組在其肝臟組織的重量明顯高於正常組($p < 0.01$)，而在正對照組和 NLE (0.5-2 %)實驗組之肝臟組織重量則均小於誘導組($p < 0.01$)，肝臟外觀型態和重量變化結果表明 NLE 能抑制酒精對肝臟組織之損傷($p < 0.05$)。

5-1-2. NLE 對酒精誘導肝臟功能指數 AST, ALT 與 ALP 濃度之影響

血清中天門冬胺酸轉胺酶(AST)、丙胺酸轉胺酶(ALT)和鹼性磷酸酶(ALP)常用於檢測酒精所誘發之肝損傷指標。故本試驗進一步分析測定各組動物肝功能指標 AST、ALT 和 ALP 之表現變化(Table 2)。結果發現誘導組中 AST, ALT 和 ALP 的酵素活性情形明顯較高於正常組表現，而在有處理 silymarin 之正對照組和 NLE (0.5-2%)之實驗組中，其血清中三項肝功能指標，均較於誘導組有下降趨勢，且高劑量 NLE (1-2%)之實驗組其結果趨近於正常組($p < 0.05$)。雖然在 0.5%的 NLE 組別中，ALP 的酵素活性結果呈現不具有統計上之差異，然而 1-2% NLE 之實驗組中，相較於誘導組則有下降。顯示在荷葉萃取物具有降低酒精誘導肝功能指標 ALT、AST 和 ALP 的表現，避免肝臟受到酒精之傷害，而具有護肝的功效。

5-1-3. NLE 對酒精誘導肝臟中三酸甘油脂(TG)和總膽固醇(TC)含量之影響

酒精會直接或經其中間代謝產物乙醛(acetaldehyde)作用導致增加肝臟代謝上之氧化壓力(oxidative stress)，進而促進肝臟之脂質過氧化作用，導致脂質在肝臟中累積，造成脂肪肝和嚴重肝病變。實驗佐以 ethanol 餵食之 C57BL/6J 小鼠動物試驗中，將各組動物肝臟檢體進行均質，萃取脂質進行含量分析。各試驗組別之肝臟三酸甘油脂與總膽固醇濃度顯示於 Fig. 2， $p < 0.01$ 。結果發現誘導組肝臟中所含之三酸甘油脂為 1204.54 mg/dl，總膽固醇為 177.06 mg/dl，與正常組相比(TG: 719.53 mg/dl; TC: 126.71 mg/dl)均明顯上升。而在 NLE (0.5-2%)實驗組及有處理 silymarin 之正對照組中，其肝臟三酸甘油脂和總膽固醇濃度較誘導組則有下降趨勢，分別為 TG: 1014.11 mg/dl、922.60 mg/dl、850.98 mg/dl；silymarin: 897.44 mg/dl。TC: 151.82 mg/dl、10.89 mg/dl、118.02 mg/dl；silymarin: 126.82 mg/dl。如上述數據顯示桑荷葉萃取物具有降低肝臟中三酸甘油脂和總膽固醇含量，能抑制酒精所誘導的脂質合成，並減少脂質在肝臟累積。

5-1-4. 病理切片觀察 NLE 對 ethanol 誘導小鼠肝損傷之影響

取各組別之肝組織切片，以 hematoxylin-eosin (HE)染色，觀察結果顯示於 Fig. 3A；在 ethanol 餵食 C57BL/6J 小鼠的組別中相較於正常組，呈現出瀰漫性大泡型脂肪泡(macrovesicular steatosis)、少數發炎細胞浸潤和肝細胞變性(degeneration)，而在 NLE 實驗組及處理 silymarin 之正對照組中，其肝組織切片 HE 染色結果，則趨近於正常組型態，且均未發現有脂肪累積在肝組織中和肝細胞變性情形。證明荷葉萃取物確實能抑制酒精性脂肪肝和肝病變，具有挽救及保護肝臟免於受酒精之氧化性傷害。

5-1-5. 免疫組織染色觀察 NLE 對酒精誘導小鼠肝組織發炎反應的影響

取 C57BL/6J 小鼠的肝組織切片，以免疫組織染色法觀察引起發炎反應的介質(proinflammatory mediators)chemokines 和 cytokines，包含 iNOS、COX-2、NF- κ B、TNF- α 和 IL-6，結果顯示於 Fig. 3B。觀察結果，其所有誘導組別在六週酒精飼料餵食下，肝細胞呈現變性，且大量表現 proinflammatory mediators 在

肝細胞之細胞質中，而在 0.5 % NLE 實驗組則出現少量抑制，另外，正對照組和 1-2% NLE 實驗組別中，相較於 Lieber-DeCarli Regular Control Diet 飲食之正常組，未有明顯表現量被觀察在這些組別中，證明荷葉萃取物能抑制 iNOS、COX-2、NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 在肝細胞中的表現，調節肝細胞因酒精作用引發之發炎反應和損傷。

5-1-6. Western blotting 分析 NLE 對酒精誘導小鼠肝組織發炎反應的影響

取肝組織均質液以 Western blotting 分析引起發炎反應之介質，iNOS、COX-2、NF- κ B、TNF- α 和 IL-6。觀察結果，其誘導組在流質酒精飼料餵食下，因酒精長時間刺激，相較於正常組增加 3.8、1.3、1.4、1.5 和 2.4 倍表現量，而 NLE (0.5-2 %) 實驗組與誘導組比較，分別呈現劑量之相關抑制現象，且在 1% 和 2 % NLE 實驗組其蛋白表現量皆趨近於正常組，呼應正對照組(silymarin)亦有相同之效果(Fig. 4A-B, $p < 0.05$)。上述數據證明荷葉萃取物能抑制酒精長期刺激下引起之前發炎反應介質表現，降低酒精對肝臟之氧化性損傷和發炎反應。

5-1-7. NLE 對酒精所誘導的氧化壓力(oxidative stress)之影響

5-1-7-1. NLE 調節酒精所誘導的脂質過氧化作用

酒精所造成之氧化壓力會進而促進肝臟脂質過氧化作用，而脂質過氧化的形成主要為自由基過量所導致，因此，利用低密度脂蛋白氧化過後的產物，丙二醛(malondialdehyde)為指標，以 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)方法測得此過氧化物，其數值可判定氧化之程度。本實驗利用荷葉萃取物藉以評估其對 ethanol 所誘導的小鼠血清和肝組織中 MDA 指標是否有影響。分析 C57BL/6J 小鼠血清和肝臟中脂質過氧化的表現量，ethanol 所誘導的組別與正常組相比較，血清明顯高出 2.9 倍和肝臟中明顯高出 1.8 倍(Fig. 5A, $p < 0.01$)，而正對照組和實驗組 NLE (0.5-2%)相較於誘導組其血清和肝組織中 MDA 指標，則分別被抑制在血清中達 49.2、61.1 和 65.3% ($p < 0.01$)，在肝組織中達 26.4%、36.5% 和 40.7% ($p < 0.01$)，且表現量趨近於正常組，結果證明 NLE 能有效的降低酒精代謝產物所製造之自由基，進而抑制脂質過氧化作用。

5-1-7-2. NLE 降低酒精抑制抗氧化酵素之表現

當過量和長期飲用酒精會抑制體內一些抗氧化酵素，進而引發跟代謝性有關之疾病，並發展成嚴重的酒精性肝臟疾病(ALD)[18]。實驗分析 NLE (0.5-2%) 在 ethanol 所誘導的 C57BL/6J 小鼠動物模式中，其抗氧化效用。取肝臟組織分析抗氧化酵素，包含 GSH (glutathione)、GSH-Px (glutathione peroxidase)、catalase、SOD (superoxide dismutase)，結果顯示於 Fig. 5B ($p < 0.05$)。觀察結果其誘導組明顯受酒精影響，因而氧化酵素表現大量受到抑制，與正常組相比 GSH 達 66%、GSH-Px 達 48.2%、catalase 達 58.3% 和 SOD 達 66.4%，但是，在正對照組和含有 NLE 的實驗組中，此些抗氧化酵素分別呈現劑量之相關性，尤其在高劑量 (NLE 2%) 的實驗組，更趨近於正常組表現，其表現量與誘導組相比分別為正對照組 GSH 增加 2.5 倍、GSH-Px 增加 1.8 倍、catalase 增加 2.2 倍和 SOD 增加 2.7 倍；0.5% NLE 實驗組 GSH 增加 1.2 倍、GSH-Px 增加 1.4 倍、catalase 增加 2.0 倍和 SOD 增加 1.3 倍，1% NLE 實驗組 GSH 增加 1.9 倍、GSH-Px 增加 1.6 倍、catalase 增加 2.3 倍和 SOD 增加 2.3 倍，2% NLE 實驗組 GSH 增加 2.6 倍、GSH-Px 增加 1.8 倍、catalase 增加 2.4 倍和 SOD 增加 2.8 倍。證明荷葉萃取物具有很好的抗氧化效果，能降低酒精所因起的氧化作用，挽救酒精所抑制的抗氧化酵素表現。

5-2. NLE 抑制酒精致肥胖作用

5-2-1. NLE 對食物攝取量(food intake)和食物利用率(feed efficiency)之影響

本動物實驗分為六組，分別為 1.正常飼料對照組(ND)。2.酒精飼料餵食誘導組(Lieber-DeCarli ethanol diet; EtOH)。3.EtOH 誘導與餵食 silymarin (200 mg/kg) 之正對照組。4-6.EtOH 誘導與餵食 0.5%、1% 和 2% 之 NLE 實驗組。其熱量控制為 1 Kcal/ml，餵食小鼠六週分別統計數據顯示於 Table 3，結果在 silymarin 和 NLE (0.5-2 %) 實驗組別中其食物攝取量於各組間無明顯差異，然而，體重 (weight gain) 增加較少，且在餵食流質酒精飼料的誘導組中，食物利用率 (0.84 ± 0.09) 明顯高於正常組 (0.78 ± 0.06)，而正對照組和實驗組中，食物利用率則顯著

低於單獨餵食流質酒精飼料的誘導組($p < 0.01$)。實驗證明 NLE 降低攝取食物的利用率導致體重增加較少，達到控制體重增加。

5-2-2. NLE 對酒精誘導小鼠體重變化之影響

本動物實驗統計六週，每週定期測量記錄體重，並統計體重變化率，測量時並觀察各組動物外觀狀態與活動力，其正常組、正對照組和 NLE(0.5-2%)實驗組動物，其外觀毛色不變無脫毛現象，且活動能力敏捷正常，EtOH 誘導組外觀毛色有少許髒亂，並有嗜睡現象。各組體重隨週齡逐漸增加，但彼此之間無明顯差異，結果顯示於 Table 5， $p < 0.05$ 。動物起始體重約為 20 克左右(第 0 週)各組間沒有顯著差異，其體重增加率於第六週之統計，分別增加 39.95% 於正常組、42.44% 於 EtOH 誘導組、30.48% 於正對照、30.09% 於 0.5% NLE、28.04% 於 1% NLE 和 32.55% 於 2% NLE，顯示正對照組和實驗組顯著低於 EtOH 誘導組，且觀察到第五週起，正對照組和實驗組體重有下降之趨勢，證明 NLE 確實具有調節體重達到減肥之功效。

5-2-3. NLE 對酒精誘導小鼠血清中各類脂質之影響

5-2-3-1. 血清中 TG 與 TC 濃度之分析

Table 3 結果顯示在 EtOH 誘導組中，其小鼠血清中三酸甘油酯(120.88 mg/dl)及總膽固醇(104.5 mg/dl)的含量明顯上升，高於正常組(TG: 64 mg/dl, TC: 78.88 mg/dl)達 47.1% 和 24.5%；而在餵食 silymarin 正對照組和 NLE (0.5-2%)實驗組之血清中三酸甘油酯濃度較誘導組則有下降趨勢，分別為 67.75 mg/dl、85 mg/dl、79.75 mg/dl 與 71.63 mg/dl ($p < 0.01$)。此外，正對照組和 NLE 實驗組之血清中總膽固醇濃度也較誘導組低，分別為 81.38 mg/dl、83.25 mg/dl、78.50 mg/dl 與 73.38 mg/dl ($p < 0.01$)。此結果顯示，NLE 可降低小鼠血清中三酸甘油酯與總膽固醇的含量，具有抑制酒精誘導的血中脂質濃度增加，因而能避免體脂肪的形成。

5-2-3-2. 血清中 HDL、LDL 濃度和 LDL/HDL 比値之分析

HDL 被稱為是好的膽固醇，因為它在血液中流通性較佳，會將膽固醇由器

官細胞中輸送到肝臟，再將它代謝或排泄，並且會把累積在血管壁上壞的膽固醇也一併溶解帶走；而 LDL 又稱為壞的膽固醇，較黏稠，流動速率慢，而且它經由肝臟到器官細胞時，會沿路累積黏在血管壁上，同時也因血中脂質濃度增加，而增加脂質過氧化作用的發生，尤其是氧化態的 LDL (oxidative LDL, oxLDL)，是導致動脈硬化和心血管疾病的主要原因。實驗結果顯示於 Table 3，在 EtOH 誘導組中，其小鼠血清中 HDL 與正常組相比，呈現降低 34.8% 表現，而 LDL 則增加 2.9 倍表現，其 ND 和 EtOH 組之 LDL/HDL 比值分別為 0.26/1.17，亦呈現增加趨勢。然而，正對照組和 NLE 實驗組之小鼠血清中 HDL 濃度相較於 EtOH 誘導組，明顯上升，分別為 56.19 mg/dl、43.60 mg/dl、46.25 mg/dl 與 52.99 mg/dl ($p < 0.05$)；另外，在 LDL 濃度則有降低表現，分別為 21.38 mg/dl、25.63 mg/dl、22.63 mg/dl 與 17.88 mg/dl ($p < 0.01$)，其 LDL/HDL 比值分別為 0.38、0.59、0.49 和 0.34。結果證明，NLE 可增加血清中高密度膽固醇含量、具有促進膽固醇運輸的能力、減少低密度膽固醇濃度的效用。

5-2-3-3. NLE 對酒精誘導小鼠周邊脂肪組織重量變化之影響

當人體中能量攝取超過能量消耗時，會藉由增加脂肪細胞的數目以及增大脂肪細胞自身的容積來儲存三酸甘油酯，並會造成過多脂肪沉積，而使脂肪組織重量增加，進而產生肥胖。而酒精會增加能量攝取，促進脂質過氧化作用，誘導體內脂肪組織和體重增加形成酒精性肥胖[37, 38]。因為周邊脂肪組織大小和重量常被作為間接評估肥胖與脂肪堆積位置的重要參考指標，因此，動物犧牲後取副睪脂體(epididymal fat pat)、副腎脂體(perirenal fat pat)和腸間脂體(mesenteric fat pat)等組織，以生理食鹽水清洗後瀝除水分，秤重並記錄重量變化，作為小鼠體內脂肪組織重量多寡的指標，判定 NLE 抑制體脂肪形成之效用。

Fig. 6 數據顯示本研究之誘導模式，在 EtOH 誘導組中小鼠副睪脂體、副腎脂體和腸間脂體，外觀大小明顯較正常組大，而重量顯著增加分別為 2.3、5.4 和 2.3 倍($p < 0.05$)。正對照組和不同劑量的 NLE (0.5-2 %) 實驗組相較於 EtOH 誘導組，副睪脂體分別減少 48.7%、29.1%、40.2% 和 51.3% ($p < 0.01$)；副腎脂體

分別減少 60.1%、47.9%、70.4% 和 77.8% ($p < 0.01$); 腸間脂體分別減少 54.1%、33.1%、43.5% 和 67.7% ($p < 0.01$), 明顯其周邊脂肪組織重量外觀大小較之為小。顯示 NLE 可降低動物睪丸周邊、腎臟周邊和腸間周邊脂肪組織大小與重量, 進而抑制體脂肪形成, 有降低酒精誘導的肥胖作用。

5-2-3-4. NLE 對酒精誘導小鼠腺苷酸活化蛋白激酶的影響

AMPK 是細胞內非常重要的能量調控因子, 協調體內代謝和能量需要, 可以調控許多不同訊息和功能, 參與調節脂肪酸、膽固醇及三酸甘油酯合成, 當活化 AMPK 會增加脂肪酸氧化(fatty acid oxidation)和抑制合成(fatty acid synthesis), 亦可經由磷酸化多種酵素如: FAS (fatty acid synthase), ACC (acetyl-CoA carboxylase), HMGCoR (HMG-CoA reductase) 及 GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) 而使得脂肪酸、膽固醇及三酸甘油酯合成受到抑制。文獻指出酒精的毒性作用會抑制脂肪酸氧化、脂肪酸運輸(fatty acid transport)、及參與訊息之相關蛋白, 並會促進脂質合成相關調控蛋白過度表現, 使得脂質會在肝臟中累積, 因而引發一些與酒精相關的疾病, 包含酒精性脂肪肝(AFLD)和酒精性肥胖等, 而 AMPK 受酒精調節則扮演重要角色。因此, 分析 NLE 是否可調控 AMPK 活性, 在酒精誘導動物肝損傷和肥胖上扮演之作用。實驗取肝臟均質液以 western blot 分析 p-AMPK 和 AMPK 蛋白表現, 並統計 p-AMPK/AMPK 比值為其活性表現, 結果顯示與正常組相比其 EtOH 誘導組中 AMPK 活性, 明顯被抑制達 25% ($p < 0.01$, Fig. 7A), 而在餵食 NLE (0.5-2%) 實驗組中, 發現 NLE 具有劑量之相關性, 能挽救因酒精抑制 AMPK 的活化, 其 AMPK/p-AMPK 比值數據與 EtOH 誘導組相比較分別為增加 2.6-2.9 倍 ($p < 0.05$, Fig. 7A), 並且顯示正對照組和 2.0% NLE 實驗組其比值趨近於正常組。證明 NLE 由活化 p-AMPK 抑制脂肪合成、降低酒精性脂肪肝和酒精性肥胖的風險。

5-2-3-5. NLE 調控酒精誘導小鼠肝臟中三酸甘油酯相關蛋白之作用

轉錄因子 SREBP-1 為 AMPK 下游重要分子, 與脂肪基因有關連並且調節控制三酸甘油酯和脂肪酸生物合成基因表達, 訊息角色在調控轉錄下游脂質生

成酵素(lipogenesis enzymes)基因表現(例如：ACC、FAS 和 GPAT)，促進脂肪酸合成，進一步將游離脂肪酸轉換成為三酸甘油酯形式在肝臟中儲存[106]。文獻指出，在酒精刺激下抑制 AMPK 活化，會進而減低 AMPK 去抑制下游參與三酸甘油酯和脂肪酸合成的蛋白活性，增加三酸甘油酯和脂肪酸合成。實驗取肝組織均質液以 western blot 分析 SREBP-1 及下游調控三酸甘油酯和脂肪酸合成之蛋白 ACC、FAS 和 GPAT，結果顯示於 Fig. 7B， $p < 0.05$ 。在餵食酒精飼料的誘導組中與正常組相比，其 SREBP-1 顯著高出 1.9 倍，ACC 顯著高出 4 倍，FAS 顯著高出 4.5 倍，GPAT 顯著高出 1.7 倍，顯示 EtOH 誘導的模式會促進脂肪酸和三酸甘油酯合成。而正對照組相較於誘導組顯示出抑制效果。但是，0.5% NLE 實驗組在作用於 SREBP-1 和 GPAT 的表現，呈現與誘導組沒有較明顯差異，在 FAS 顯示抑制 19%，在 ACC 顯示抑制 58.2%。另外，1% NLE 實驗組在 SREBP-1 顯示抑制 25.2%，在 ACC 顯示抑制 60%，在 FAS 顯示抑制 60.1%，在 GPAT 顯示出抑制 13.9%。2% NLE 實驗組在 SREBP-1 顯示抑制 49.7%，在 ACC 顯示抑制 71.6%，在 FAS 顯示抑制 68.3%，在 GPAT 顯示出抑制 41.1%。由上述結果證實 NLE 刺激 AMPK 活化，降低下游三酸甘油酯合成相關蛋白表現後，抑制脂肪在體內合成。

5-2-3-6. NLE 調控酒精誘導小鼠肝臟中膽固醇合成相關蛋白之作用

轉錄因子 SREBP-2 為 AMPK 下游重要分子，角色為調控與膽固醇和脂肪酸合成代謝相關的蛋白如 HMGCoR (HMG-CoA reductase)、low density lipoprotein receptor (LDLR)，決定膽固醇合成的速率[108]，而肝細胞大量 uptake 血液中之 LDL，會促使血液中膽固醇濃度降低，因此若能促使肝細胞大量表達 LDLR，是一種可行的降血脂機制。另文獻指出，在酒精刺激下抑制 AMPK 活化，會進而減低 AMPK 去抑制下游參與膽固醇和脂肪酸合成的蛋白活性，增加膽固醇和脂肪酸合成，因此，分析 NLE 對膽固醇合成相關蛋白的調節效用。實驗取肝組織均質液以 western blot 分析 SREBP-2 及下游調控膽固醇和脂肪酸合成之相關蛋白 HMGCoR 和 LDLR，結果顯示於 Fig. 7C， $p < 0.05$ 。在餵食酒精

飼料的誘導組中與正常組相比，其 SREBP-2 顯著高出 1.7 倍，HMGCOR 顯著高出 1.4 倍，LDLR 則減少出 22.2%，而正對照組相較於誘導組呈現 SREBP-2 減少 45.1%，HMGCOR 減少 39.3%，LDLR 則增高 1.3 倍。0.5% NLE 實驗組在 LDLR 和 HMGCOR 呈現與誘導組沒有較明顯差異，SREBP-2 則減少 41.3%。1% NLE 實驗組在 SREBP-2 呈現與誘導組相比減少 45.4%，HMGCOR 則減少 22.2%，LDLR 則增加 22.3%。2% NLE 實驗組在 SREBP-2 呈現與誘導組相比減少 46.2%，HMGCOR 則減少 39.5%，LDLR 則增加 35.3%。由上述結果證實 NLE 會刺激 AMPK 活化，降低下游膽固醇合成相關蛋白 HMGCOR 還原酶表現，抑制脂肪在體內合成，亦具有調控增加 LDLR 清除血液中膽固醇效用。

5-2-3-7. NLE 調控酒精誘導小鼠肝臟中脂肪酸氧化和運輸相關蛋白之作用

過氧化體增殖活化受體(peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR)，為一群核內荷爾蒙接受體(nuclear hormone receptors)，其功能為一轉錄因子，屬固醇類荷爾蒙接受器家族(steroid hormone nuclear receptor superfamily)成員之一，其中 PPAR α 多表現於肝臟、棕色脂肪組織、腎臟、心臟及骨骼肌，會促進脂肪酸氧化作用、參與脂質運輸及生酮作用與葡萄糖新生作用，且能降低血液中三酸甘油酯含量具有降血脂功能。研究亦發現 PPAR α 參與 CPT-I (carnitine palmitoyltransferase I)和 MTP (microsomal triglyceride transfer protein)訊息調控，也能抑制脂質在肝臟中堆積形成脂肪肝及一些和代謝性有關之疾病[14]。另外，文獻亦指出酒精誘導下會抑制 PPAR α 及其對下游訊息調控，而抑制脂肪酸氧化作用並且使得三酸甘油酯、VLDL 由肝臟中輸出受到限制，造成在肝臟中累積[11]。實驗取肝組織均質液以 western blot 分析，探討 NLE 在酒精誘導下如何參與脂肪酸氧化作用和運輸，結果顯示於 Fig. 7D， $p < 0.05$ 。實驗觀察到餵食酒精飼料的誘導組中與正常組相比 PPAR α 顯著被抑制達 23.2%，CPT-I 被抑制達 34.6%，MTP 被抑制達 17.9%，而正對照組與誘導組相比表現增加 PPAR α 1.5 倍、CPT-I 增加 1.6 倍、MTP 增加 1.3 倍。0.5% NLE 實驗組相較於誘導組 PPAR α 和 MTP 表現則無明顯差異，而 CPT-I 則增加 1.3 倍。1% NLE 實驗組 PPAR α

增加 1.3 倍、CPT-I 增加 1.6 倍、MTP 增加 1.2 倍。2% NLE 實驗組 PPAR α 增加 1.6 倍、CPT-I 增加 1.8 倍、MTP 增加 1.3 倍。實驗結果雖然在低劑量 0.5% NLE 呈現與誘導組無明顯差異，但是 1.0%和 2.0% NLE 依然可見其抑制效應。由此結果證實 NLE 具有調控酒精抑制脂肪酸氧化和運輸作用的訊息，會透過增強 PPAR α 活化而促進 CPT-I 對脂肪酸氧化作用，並促進 MTP 對脂肪酸運輸，的確可以降低體脂肪、減少血脂、抑制脂肪肝形成。

陸、研究成果討論

本研究採用 Lieber-DeCarli 飼料，總熱量為 1.0 Kcal/ml，其中正常飼料含 35% 的 fat、47% 的 carbohydrate 和 18% 的 protein；酒精飼料含 36% 的乙醇、35% 的 fat、11% 的 carbohydrate 和 18% 的 protein。誘導組中之 36% 的 carbohydrate 以 95% ethanol 取代，誘導小鼠產生肝損傷和肥胖模式。實驗的飼料配方表一 (Table 1)。這樣的模式目的如同之前文獻指出可使動物發展成肝臟脂肪變性、酒精性肝炎和類似人類酒精性肝病變的組織學特徵[18]。先期實驗在經四週餵食後先以 HE stain 觀察肝組織切片變化，發現只有呈現小型脂肪滴和少數肝細胞變性型態，因此，再將動物繼續餵養至六週後犧牲，從肝臟外觀觀察結果，呈現在餵食酒精之誘導組(EtOH)中，肝臟組織明顯較正常組(ND)大，並且肝臟組織重量和肝臟組織重量佔動物體重之百分比值明顯高於正常組，另外，肝臟整體外觀上呈現色澤明顯偏黃、肝臟表面較粗糙、邊緣較鈍圓等肝病變特徵。而正常組、正對照組和 NLE 實驗組則呈現肝臟色澤紅潤、表面平滑且觸感柔軟如同正常組，其大小特徵亦小於誘導組(Fig. 1)。另以 HE stain 觀察肝組織切片，結果顯示瀰漫性大泡型脂肪泡(macrovesicular steatosis)、肝細胞變性(degeneration)和少數的發炎細胞浸潤現象，而在 NLE 實驗組及處理 silymarin 之正對照組中，其肝組織切片則趨近於正常組型態(Fig. 3A)。因此，以六週的餵食時間建立肝損傷和肥胖模式。結果顯示 NLE 能有效的降低酒精代謝產物所製造之自由基，進而抑制脂質過氧化作用(Fig. 5A)。

另外，在分析抗氧化酵素表現發現，包含 GSH、GSH-Px、catalase 和 SOD 等抗氧化酵素表現量，均呈現劑量之依賴性抑制，且在低百分比濃度 NLE 組別中即可見其抗氧化性酵素表現，1%和 2% NLE 組別中更是趨近於正常組表現 (Fig. 5B)，對照 silymarin 組別具有相同表現。因此，我們認為 NLE 含高抗氧化性物質，是具有能力成為對抗酒精性肝損傷的膳食補充劑或藥物。酒精代謝過程中會大量消耗 NAD⁺，同時產生大量的 NADH，會去干擾肝細胞執行正常的生化代謝功能，增加肝臟代謝上之氧化壓力，因而抑制脂肪酸的氧化作用、促進

肝臟之脂質過氧化作用和增加脂質合成而造成脂質堆積形成脂肪肝，和嚴重肝病變[3]。實驗檢測血清中肝損傷指標 AST、ALT 和 ALP 酵素活性，高劑量 2% NLE 組別中呼應正對組結果，呈現趨近於正常組表現，顯示在 NLE 具有降低酒精之傷害，而具有護肝的功效。在酒精誘導的動物模式中，肝臟組織病理切片呈現嚴重之脂肪肝和肝病變，當餵食 NLE 確實能抑制酒精性脂肪肝和肝病變，保護肝臟免於受酒精之氧化性傷害(Fig. 3A)。而分析血液和肝臟中三酸甘油酯與總膽固醇濃度亦顯示三種濃度的 NLE 都具有很好效果(Fig. 2)。因此，更確定 NLE 可抑制酒精所誘導的脂質合成，減少血液中脂質和脂質在肝臟累積。

酒精及其代謝產物乙醛對肝細胞的毒性作用，主要是促進庫氏細胞和多型核白血球活化，進而活化星狀細胞轉化高度表達 CYP2E1，釋放出一些炎症反應介質，而造成肝細胞毒性，包含 iNOS、NF- κ B、COX2、細胞激素 angiotensin II、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α ，以及 leptin、NO 和 ROS 等，而此類炎症反應介質的測定有助於瞭解肝臟組織炎症活動度、肝臟損害程度及有無肝纖維化傾向[18,19]。以免疫組織染色法(Fig. 3B)以及 Western blotting (Fig. 4)分析，觀察引起發炎反應的介質 iNOS、COX-2、NF- κ B、TNF- α 和 IL-6，證明 NLE 能抑制此類引發炎症反應介質在肝細胞中表現，調節肝細胞因酒精作用引發之發炎反應和損傷。

酒精攝取是否造成體重增加和肥胖，與食物量攝入量和能量平衡有絕對的關係，酒精代謝與能量獲得，根據文獻指出，經由 ADH pathway 每一莫耳酒精能製造出 16 莫耳 ATP。酒精性肥胖根據許多研究指出已確定的危險因素為腹部脂肪的沉積，乃因酒精抑制脂質氧化作用和促進脂肪沉積在腹部的面積。另外在脂肪酸的合成以及三酸甘油酯含量亦是跟肥胖形成有緊密的相關性；酒精所引發之氧化效應和脂質過氧化作用，會抑制粒線體中的脂肪酸氧化脫氫酶，降低 β -氧化作用，且會促進參與脂質合成之相關蛋白表現，進而誘發和代謝相關疾病包含肥胖[11]。實驗分析小鼠的食物攝取量(food intake)和食物利用率(feed efficiency)，統計其食物攝取量於各組間並無明顯差異，然而，三種濃度 NLE 實

驗組與 silymarin 正對照比較結果，食物利用率都具有相似的降低效果。再從統計小鼠體重的變化結果分析，正常組和誘導組之體重隨週齡逐漸增加，尤其在誘導組所增加之比率為最高(第六週, 42.44%)，正對照組和 NLE 實驗組體重增加的比率則顯著低於的誘導組。結果揭露在我們的實驗模式下，動物沒有改變食物攝取量，乃是單純由酒精誘導增加食物利用率而促進小鼠體重增加。另外，觀察到從第五週起，正對照組和實驗組出現體重有下降之趨勢，推論 silymarin 和 NLE 具有調控食物利用率降低酒精誘發肥胖能力。

酒精會增加能量攝取，促進脂質過氧化作用，誘導體內脂肪組織和體重增加形成酒精性肥胖[37, 38]。因為周邊脂肪組織大小重量常被作為間接評估肥胖與脂肪堆積位置的重要參考指標，因此，我們取副睪脂體(epididymal fat pat)、副腎脂體(perirenal fat pat)和腸間脂體(mesenteric fat pat)等組織，評估脂肪組織大小重量做為酒精性肥胖參考指標(Fig. 6)。結果也證實 NLE 具有降低周邊脂肪組織大小與重量，抑制體脂肪形成，可降低酒精誘導的肥胖作用。

AMPK 是細胞內非常重要的能量調控因子，參與協調體內脂質代謝及合成。它調節脂肪酸、膽固醇及三酸甘油酯合成，當活化 AMPK 會增加脂肪酸氧化作用和抑制脂肪酸合成，亦可經由磷酸化多種酵素如：FAS，ACC，HMGCoA reductase 及 GPAT 等而使得脂肪酸、膽固醇及三酸甘油酯合成受到抑制。另外，AMPK 在醣類、脂肪和蛋白質代謝機轉中是個很重要的中樞調節者，亦可以因應細胞狀態決定行脂肪酸氧化作用或合成作用，在脂質代謝路徑中扮演很重要的角色，它可經調控 SREBP-1 及其下游蛋白抑制三酸甘油酯合成，經調控 SREBP-2 及其下游蛋白抑制膽固醇合成，經調控 PPAR- α 促進脂肪酸的氧化作用和運輸，而酒精誘發動物體內脂質累積機轉，則是會經由抑制 AMPK 訊息路徑降低脂肪酸氧化及增加脂肪酸合成[11]。實驗取肝臟均質液以 western blot 分析 AMPK 和 p-AMPK 蛋白表現，並統計 p-AMPK/AMPK 比值為其活性表現，結果顯示荷葉萃取物能挽救因酒精抑制 AMPK 的活化(Fig. 7A)，具有抑制脂質合成及促進脂肪酸氧化作用的能力。進一步以 western blot 分析 SREBP-1 及下游

調控三酸甘油酯和脂肪酸合成之蛋白 ACC、FAS 和 GPAT，並分析 SREBP-2 及下游調控膽固醇和脂肪酸合成之相關蛋白 HMGCo A reductase 和 LDLR。我們證明了荷葉萃取物確實能抑制三酸甘油酯和膽固醇合成等相關蛋白表現(Fig. 7B-C)。同時我們也證明 NLE 會透過增強 PPAR α 活化而促進 CPT-I 對脂肪酸氧化作用以及 MTP 對脂肪酸運輸(Fig. 7D)。綜合上述本研究證明荷葉萃取物能經由活化 AMPK 路徑抑制脂肪合成，增加細胞內源性脂質的降解作用，可降低酒精性脂肪肝和酒精性肥胖風險。

本研究在探討 NLE 調控酒精誘導小鼠肝臟中膽固醇合成相關蛋白之作用，以 western blot 分析 LDLR 表現，乃因當肝細胞大量 uptake 血液中之 LDL，會促使血液中膽固醇濃度降低，因此若能促使肝細胞大量表達 LDLR，被認為是一種可行的降血脂機制，結果也證明 NLE 可增加 LDLR 表現(Fig. 7C)。文獻指出在肝臟中活化的 PPAR α ，會調節脂肪酸轉運蛋白和長鏈 acetyl-CoA synthetase 基因，縮短長鏈不飽和脂肪酸，從而防止脂質積累和毒性，往往會增加高密度脂蛋白和降低甘油三酯含量。我們的研究發現 NLE 有促進 PPAR α 效應(Fig. 7D)，亦能增加血清中高密度脂蛋白和降低血清及肝臟(Fig. 2)中三酸甘油酯含量。實驗中在探討 NLE 調控酒精誘導小鼠肝臟中脂肪酸的運輸作用，我們分析小鼠肝臟中 MTP 的角色和作用，乃因之前研究顯示 MTP 參與脂蛋白和 apoB 的組裝及分泌的關鍵角色，當 MTP 受抑制則富含 TG 的 VLDL 聚合體會無法從 ER lumen 輸出至血液中進行降解，因而導致脂肪肝形成。另指出酒精會抑制 MTP 基因的轉錄，降低脂蛋白在肝臟和小腸的合成和分泌，推測酒精抑制 MTP 結果與酒精性脂肪肝和肥胖有重大之關聯[14]。從實驗分析 MTP 結果證明 NLE 有促進 MTP 蛋白在肝臟中表現增強脂肪酸的運輸作用(Fig. 7D)，其血清(Table 2)及肝臟(Fig. 2)中三酸甘油酯和膽固醇等含量也明顯受到抑制，因此，再一次證明 NLE 具有更安全性的降低血清及肝臟中脂質合成，並有清除肝臟中脂質的能力。

我們之前以 *in vitro* 和 *in vivo* 的模式評估非酒精性脂肪肝研究已經證明 NLE 的功效，可用於抑制因高脂肪飲食引發之異常高血脂、脂肪肝和肝損傷等

作用[30,32]。本次研究是首次證明 NLE 可以抑制酒精性脂肪肝和酒精性肥胖形成。綜合本研究實驗結果(Fig. 8)，我們證明 NLE 抑制酒精誘發脂肪肝、肝臟發炎、脂質合成以及肥胖的機制乃是經由 1.增加抗氧化酵素 GSH、GSH-Px、catalase 和 SOD 的活性抑制脂質過氧化及經由降低發炎反應介質 iNOS、COX-2、NF- κ B、TNF- α 和 IL-6 減低肝臟損傷。2.活化能量調控因子 AMPK 及下游訊息調控脂質代謝及合成，降低肝損傷和體脂肪形成。3.抑制 SREBP-1 及下游訊息蛋白 ACC、FAS 和 GPAT 降低三酸甘油酯合成。4.抑制 SREBP-2 及下游訊息蛋白 HMGCoR 並增加肝臟中 LDLR，降低膽固醇合成。5.活化 PPAR α 及下游訊息蛋白 CPT-I 和 MTP，促進脂肪酸氧化作用及脂肪酸運輸。

柒、參考文獻

1. Shakti Dwivedi PK, Sonam Rajwar and Anup Dwivedi. Pharmacognostic and Pharmacological Aspects of Potent Herbal Hepatoprotective Drugs-A Review. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences 2011, 2, 492-499.
2. Poovorawan Y, Chatchatee P, Chongsrisawat V. Epidemiology and prophylaxis of viral hepatitis: a global perspective. J Gastroenterol Hepatol 2002, 17, S155-66.
3. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? Alcohol Res Health 2006, 29, 245 -54.
4. Wild CP, Montesano R. A model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. Cancer Lett 2009, 286, 22-8.
5. Chun LJ, Tong MJ, Busuttill RW, Hiatt JR. Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. J Clin Gastroenterol 2009, 43, 342-9.
6. Chen ZZ, Wang ZL, Deng CY, et al. (Z)-5-(4-methoxybenzylidene) thiazolidine-2,4-dione protects rats from carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrogenesis. World J Gastroenterol 2012, 18, 654-61.
7. Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002, 283, G256-65.
8. Altamirano J, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011, 8, 491-501.
9. McCullough AJ, O'Connor JF. Alcoholic liver disease: proposed recommendations for the American College of Gastroenterology. Am J Gastroenterol 1998, 93, 2022-36.
10. Schaffert CS, Duryee MJ, Hunter CD. Alcohol metabolites and lipopolysaccharide roles in the development and/or progression of alcoholic liver disease. World J Gastroenterol 2009, 15, 1209-18.
11. Molina PE. Alcohol--intoxicating roadblocks and bottlenecks in hepatic protein and

- lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008, 295, E1-2.
12. Galli A, Pinaire J, Fischer M, Dorris R, Crabb DW. The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver. *J Biol Chem* 2001, 276, 68-75.
 13. You M, Matsumoto M, Pacold CM, Cho WK, Crabb DW. The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. *Gastroenterology* 2004, 127, 1798-808.
 14. Sugimoto T, Yamashita S, Ishigami M. Decreased microsomal triglyceride transfer protein activity contributes to initiation of alcoholic liver steatosis in rats. *J Hepatol* 2002, 36, 157-62.
 15. Yip WW, Burt AD. Alcoholic liver disease. *Semin Diagn Pathol* 2006, 23, 149-60.
 16. Friedman SL. Stellate cell activation in alcoholic fibrosis--an overview. *Alcohol Clin Exp Res* 1999, 23, 904-10.
 17. Wang JH, Batey RG, George J. Role of ethanol in the regulation of hepatic stellate cell function. *World J Gastroenterol* 2006, 12, 6926-32.
 18. Moreno M, Bataller R. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008, 12, 825-52.
 19. Naveau S, Perlemuter G, Chaillet M, et al. Serum leptin in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2006, 30, 1422-8.
 20. Kashiwada Y, Aoshima A, Ikeshiro Y. Anti-HIV benzyloisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorg Med Chem* 2005, 13, 443-8.
 21. Ling ZQ, Xie BJ, Yang EL. Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J Agric Food Chem* 2005, 53, 2441-5.

22. Rai S, Wahile A, Mukherjee K, Saha BP, Mukherjee PK. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *J Ethnopharmacol* 2006, 104, 322-7.
23. Wu MJ, Wang L, Weng CY, Yen JH. Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gertn.). *Am J Chin Med* 2003, 31, 687-98.
24. Liu CP, Tsai WJ, Lin YL, Liao JF, Chen CF, Kuo YC. The extracts from *Nelumbo Nucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci* 2004, 75, 699-716.
25. Lin HY, Kuo YH, Lin YL, Chiang W. Antioxidative effect and active components from leaves of Lotus (*Nelumbo nucifera*). *J Agric Food Chem* 2009, 57, 6623-9.
26. Lim SS, Jung YJ, Hyun SK, Lee YS, Choi JS. Rat lens aldose reductase inhibitory constituents of *Nelumbo nucifera* stamens. *Phytother Res* 2006, 20, 825-30.
27. Ohkoshi E, Miyazaki H, Shindo K, Watanabe H, Yoshida A, Yajima H. Constituents from the leaves of *Nelumbo nucifera* stimulate lipolysis in the white adipose tissue of mice. *Planta Med* 2007, 73, 1255-9.
28. Du H, You JS, Zhao X, Park JY, Kim SH, Chang KJ. Antiobesity and hypolipidemic effects of lotus leaf hot water extract with taurine supplementation in rats fed a high fat diet. *J Biomed Sci* 2010, 17, S42.
29. Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol* 2006, 106, 238-44.
30. Lin MC, Kao SH, Chung PJ, Chan KC, Yang MY, Wang CJ. Improvement for high fat diet-induced hepatic injuries and oxidative stress by flavonoid-enriched extract from *Nelumbo nucifera* leaf. *J Agric Food Chem* 2009, 57, 5925-32.
31. Ho HH, Hsu LS, Chan KC, Chen HM, Wu CH, Wang CJ. Extract from the leaf of *nucifera* reduced the development of atherosclerosis via inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Food Chem Toxicol* 2010, 48, 159-68.

32. Wu CH, Yang MY, Chan KC, Chung PJ, Ou TT, Wang CJ. Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a *Nelumbo nucifera* leaf flavonoid-rich extract in mice. *J Agric Food Chem* 2010, 58, 7075-81.
33. Cohn VH, Lyle J. A fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem* 1966, 14, 434-40.
34. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976, 71, 952-8.
35. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974, 47, 469-74.
36. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984, 105, 121-6.
37. Sayon-Orea C, Martinez-Gonzalez MA, Bes-Rastrollo M. Alcohol consumption and body weight: a systematic review. *Nutr Rev* 2011, 69, 419-31.
38. Yeomans MR. Alcohol, appetite and energy balance: is alcohol intake a risk factor for obesity? *Physiol Behav* 2010, 100, 82-9.

捌、研究成果圖與表

Table 1.Composition of expermental diets

	ND	EtOH	EtOH + 0.5% NLE	EtOH + 1.0% NLE	EtOH + 2.0% NLE	EtOH + Silymarin
Ingredient	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Casein	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4
L-Cystine	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn Oil	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
Olive Oil	28.4	28.4	28.4	28.4	28.4	28.4
Safflower Oil	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
Maltose Dextrin	115.2	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6
Cellulose	10	10	10	10	10	10
Mineral Mix	8.75	8.75	8.75	8.75	8.75	8.75
Vitamin Mix	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Choline Bitartrate	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53
Xanthan Gum	3	3	3	3	3	3
Total	221.78	132.18	132.18	132.18	132.18	132.18
Ethanol(ml/L)	0	67	67	67	67	67
Grand total (kcal/L)	999.8465	1000.2805	1000.2805	1000.2805	1000.2805	1000.2805
<p>This control diet contains 1.0 Kcal/ml, of which 35% are fat derived, 47% are derived from carbohydrate, and 18% are derived from protein.</p> <p>This ethanol diet contains 1.0 Kcal/ml, of which 35% are fat derived, 11% derived from carbohydrate, 18% are derived from protein, and 36% are derived from ethanol.</p>						

Table 2 Characterization of Phenolic Compounds of NLE and NLPE

Peak no.	Assigned identity	NLE (%)	NLPE (%)
1	Gallic acid	20.47 ± 2.97	4.85 ± 0.52
2	Protocatechuic acid (PCA)	1.78 ± 1.00	12.74 ± 1.02
3	Catechin	2.63 ± 1.61	4.59 ± 0.93
4	Gallocatechin gallate (GCG)	1.39 ± 0.80	6.25 ± 0.29
5	Caffeic acid	0.99 ± 0.40	2.33 ± 0.39
6	Epicatechin	1.41 ± 0.22	3.32 ± 1.55
7	Rutin	6.08 ± 3.25	18.49 ± 0.88
8	Quercetin	4.60 ± 2.30	19.51 ± 1.90
9	Naringenin	3.23 ± 0.50	3.39 ± 0.43

Table 3. Effects of MWE on the plasma biochemical parameters and hepatic lipid contents in ethanol fed C57BL/6J mice

Groups	ND	EtOH	EtOH + 0.5% NLE	EtOH + 1.0% NLE	EtOH + 2.0% NLE	EtOH + Silymarin
AST(U/L)	167.75±35.07	261.13±36.78 [#]	254.38±42.53	218.25±39.78 ^{**}	189.38±30.36 ^{**}	180.88±20.68 ^{**}
ALT(U/L)	36.88±3.60	62.25±7.78 [#]	49.25±9.30 ^{**}	47.75±6.11 ^{**}	43.75±4.33 ^{**}	44.25±7.29 ^{**}
ALP(U/L)	74.75±4.36	84.13±3.73 [#]	80.38±14.40	78.88±12.74	72.72±9.90 ^{**}	78.63±9.75 [*]
TG (mg/dl)	64±11.03	120.88±23.56 [#]	85.00±16.21 ^{**}	79.75±25.07 ^{**}	71.63±14.56 ^{**}	67.75±28.48 ^{**}
TC(mg/dl)	78.88±13.12	104.5±6.7 [#]	83.25±9.44 ^{**}	78.5.00±5.93 ^{**}	73.38±7.67 ^{**}	81.38±12.18 ^{**}
LDL-c (mg/dl)	15.5±1.77	45.25±5.87 [#]	25.63±6.12 ^{**}	22.63±5.88 ^{**}	17.88±2.30 ^{**}	21.38±5.37 ^{**}
HDL-c (mg/dl)	59.59±3.76	38.83±7.06 [#]	43.60±4.93 [*]	46.25±5.74 ^{**}	52.99±10.39 ^{**}	56.19±11.32 ^{**}
LDL/HDL	0.26	1.17	0.59	0.49	0.34	0.38
Hepatic TG (mg/dl)	719.53±58.25	1204.54±90.13 [#]	1014.11±34.95 ^{**}	922.60±51.18 ^{**}	850.98±66.24 ^{**}	897.44±37.26 ^{**}
Hepatic TC (mg/dl)	126.71±6.55	177.06±15.59 [#]	151.82±7.57 ^{**}	140.89±12.17 ^{**}	118.02±5.90 ^{**}	126.82±14.50 ^{**}

Mean ± SD (n = 8/group). [#]p < 0.05 compared with the ND group. ^{*}p < 0.05, ^{**}p < 0.01 compared with the EtOH group.

Table 4. Effect of diet supplementation with NLE on body weight gain, food intake and efficiency in ethanol fed C57BL/6J mice

	ND	EtOH	EtOH + 0.5% NLE	EtOH + 1.0% NLE	EtOH + 2.0% NLE	EtOH + Silymarin
Weight gain (g)	8.09±0.60	8.71±0.94 [#]	6.22±0.52 ^{**}	6.10±0.56 ^{**}	5.70±0.67 ^{**}	5.71±0.60 ^{**}
Food intake (kcal/ml/day)	10.35±0.87	10.40±0.90	10.14±0.72	10.12±0.68	10.12±0.6	10.05± 0.75
Feed efficiency	0.78±0.06	0.84±0.09 [#]	0.61±0.05 ^{**}	0.60±0.06 ^{**}	0.56±0.07 ^{**}	0.57±0.06 ^{**}

Mean ± SD (n = 8/group). [#]p < 0.05 compared with the ND group. ^{**}p < 0.01 compared with the EtOH group Feed efficiency = body weight gain ÷ food intake.

Table 5. Effect of NLE on the body weight change in ethanol fed C57BL/6J mice

Groups	Weeks						
	0	1	2	3	4	5	6
ND	20.25=0.23 *	23.23=0.29 (14.72%)	26.48=0.31 (30.77%)	26.68=0.32 (31.75%)	27.16=0.56 (35.24%)	27.76=0.49 (37.09%)	28.34=0.46 (39.95%)
EtOH	20.50=0.19	23.68=0.39 [#] (15.51%)	26.81=0.26 [#] (30.78%)	27.22=0.54 [#] (32.78%)	27.90=0.75 [#] (36.10%)	28.36=0.59 [#] (38.34%)	29.20=0.82 [#] (42.44%)
EtOH + 0.5% NLE	20.41=0.28	23.33=0.22 [*] (15.10%)	26.50=0.26 [*] (29.84%)	26.86=0.32 [*] (31.60%)	27.16=0.59 [*] (33.07%)	26.96=0.62 ^{**} (32.09%)	26.63=0.45 ^{**} (30.48%)
EtOH + 1.0% NLE	20.27=0.20	23.24=0.31 [*] (15.09%)	26.32=0.37 ^{**} (29.83%)	26.65=0.49 [*] (31.48%)	26.89=0.57 ^{**} (32.51%)	26.53=0.67 ^{**} (30.88%)	26.37=0.56 ^{**} (30.09%)
EtOH + 2.0% NLE	20.29= 0.24	23.12=0.20 ^{**} (13.95%)	26.15=0.46 ^{**} (28.88%)	26.57=0.53 [*] (30.95%)	26.77=0.55 ^{**} (31.94%)	26.36=0.60 ^{**} (29.92%)	25.9 =0.59 ^{**} (28.04%)
EtOH + Silymarin	20.06=0.12	23.06=0.16 [*] (14.50%)	26.15=0.46 ^{**} (28.88%)	26.37=0.55 ^{**} (31.46%)	27.15=0.64 [*] (35.34%)	26.96=0.72 ^{**} (34.40%)	26.59=0.65 ^{**} (32.55%)

Mean ± SD (n = 8/group). a, data = [(week X – week 0) / week 0] × 100 %. [#]p < 0.05 compared with the ND group ^{*}p < 0.05, ^{**}p < 0.01 compared with the EtOH group.

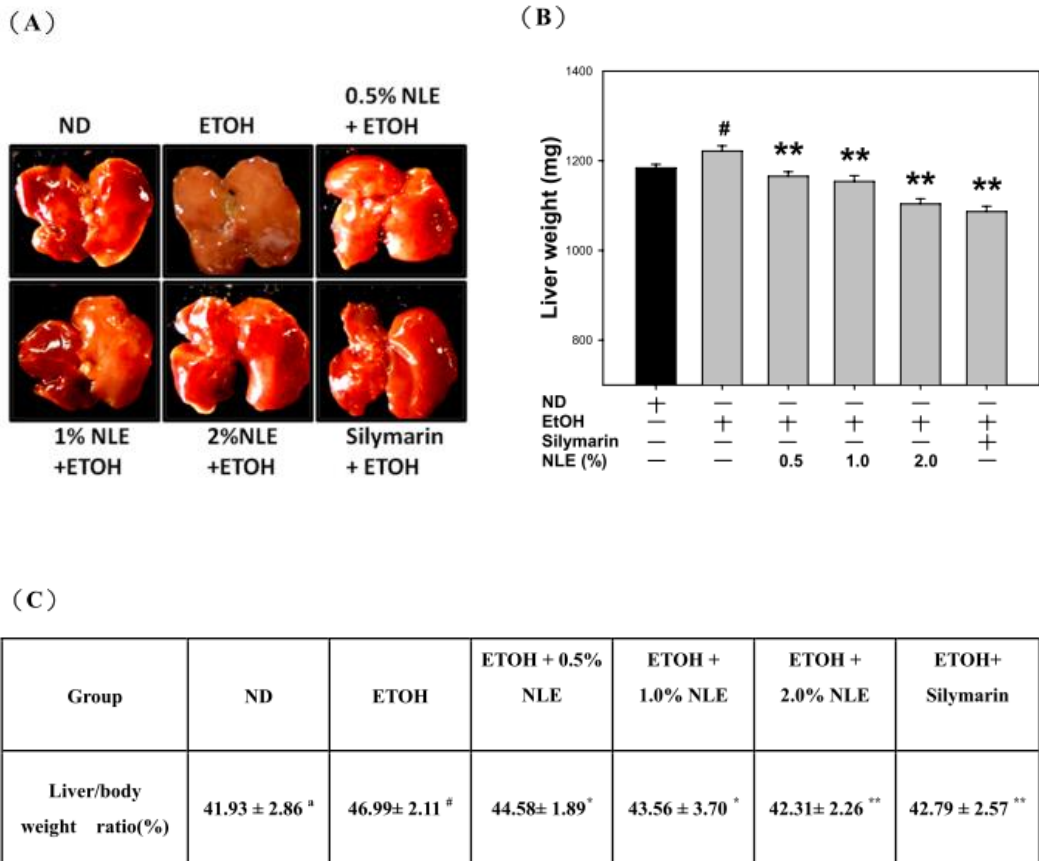


Figure 1. Effect of NLE on liver weight change levels in ethanol diet fed C57BL/6J mice. (A) Livers were obtained from mice. (B) The data of mice liver weight changed levels. (C) and body weight changed percentages are presented as means \pm SD from 8 mice per group. ND , normal control diet fed group; EtOH, mice were fed ethanol diet-induced group; S+ EtOH, mice were fed ethanol diet with 200 mg/kg. Results were statistically analyzed with Student's t-test. #, $p < 0.05$ compared with the ND group. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ compared with the EtOH group.

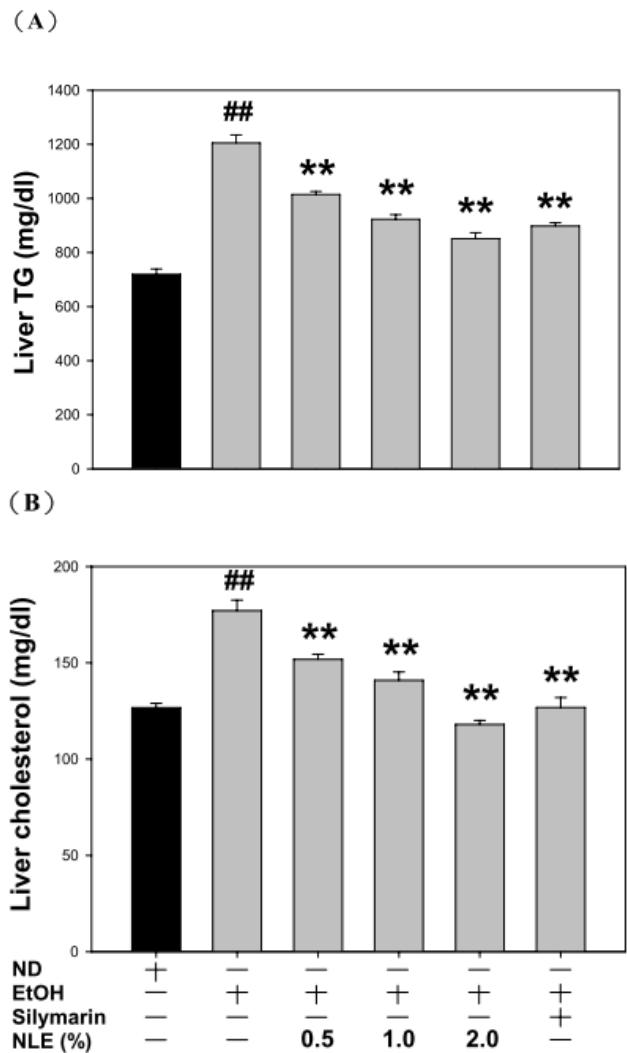
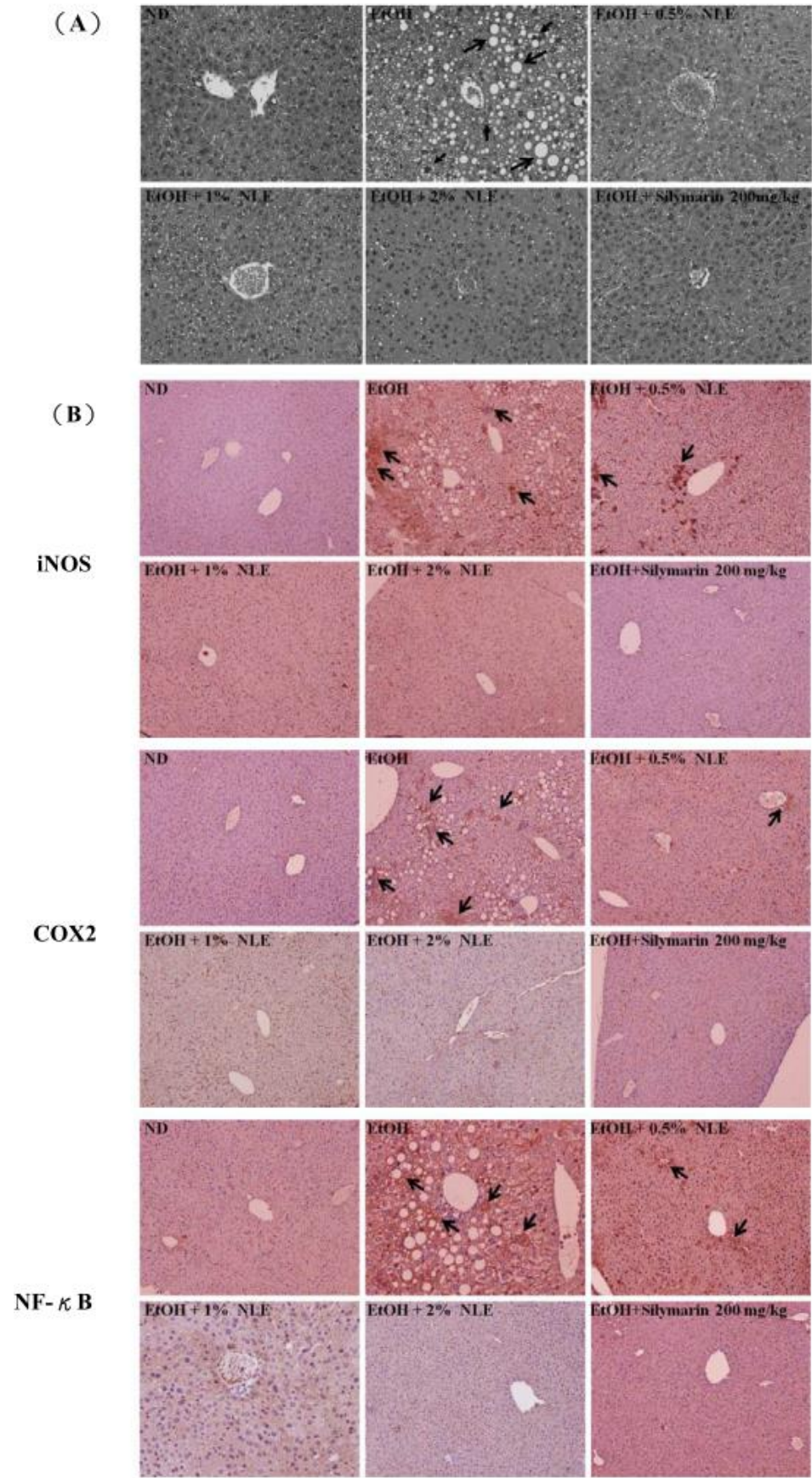


Figure 2. Effect of NLE on hepatic triglyceride and cholesterol content in ethanol fed C57BL/6 mice. Lipids were extracted from each group of liver tissue in C57BL/6 mice, and relative amounts of liver triglyceride (A) and cholesterol (B) contents were analyzed by spectrometry. Data were presented as mean \pm SD (n=8) and analyzed with ANOVA and unpaired t test. ##, p< 0.01 compared with the ND group. **, p< 0.01 compared with the EtOH group.



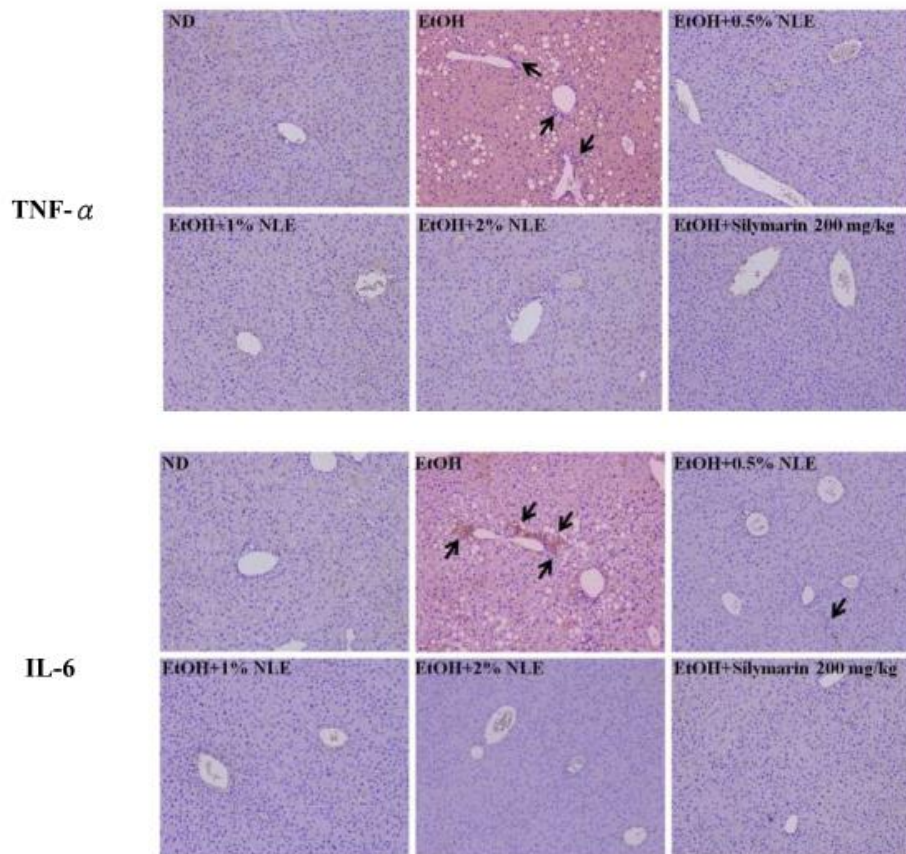
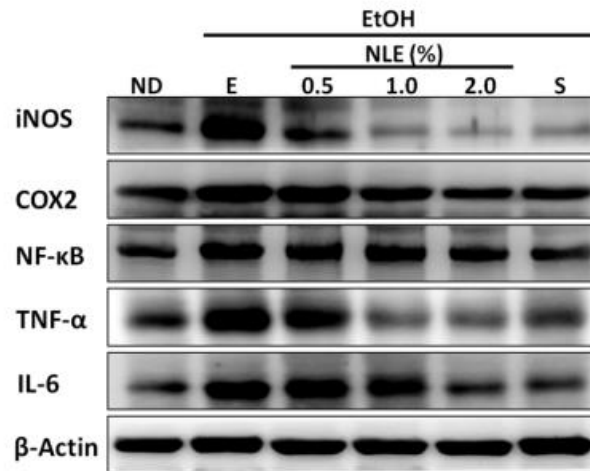


Figure 3. Effect of NLE on liver steatosis, degeneration and inflammation in ethanol fed C57BL/6J mice. Histopathological changes of liver sections of mice under various treatment conditions were assayed after sacrifice. (A) Paraffin-embedded sections of liver were stained with hematoxylin-eosin (HE). The results displayed EtOH induced macrovesicular steatosis (short arrowheads) and some mild degeneration of hepatocytes (longer arrowheads). (B) The expressions of iNOS, COX2, NF- κ B, TNF- α and IL-6 in mice liver were stained by immunohistochemistry. EtOH group showed a significant increase in the immunoreactivity in the cytoplasm of hepatocytes (longer arrowheads). Representative photomicrographs are magnified A: 200 \times and B: 100 \times , respectively.

(A)



(B)

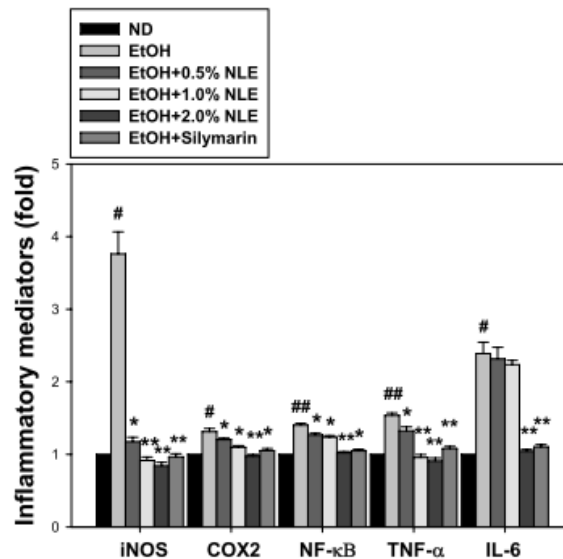


Figure 4. NLE inhibits inflammatory mediators in ethanol fed C57BL/6J mice. Mice were fed with normal diet (control), ethanol supplemented (36%) with silymarin (200 mg/kg), and ethanol supplemented (36%) with MWE (0.5-2%) for 6 weeks. The expressions of inflammatory mediators in liver tissues were determined by western blotting. (A) Data were shown the expression of iNOS, COX2, NF-κB, TNF-α and IL-6. (B) The levels of these proteins were subsequently quantitated by densitometric analysis with that of control being 100%. Data are represented as the mean ± SD for the three experiments. #, p < 0.05, ##, p < 0.01 compared with the ND group. *p < 0.05, **, p < 0.01 compared with the EtOH group.

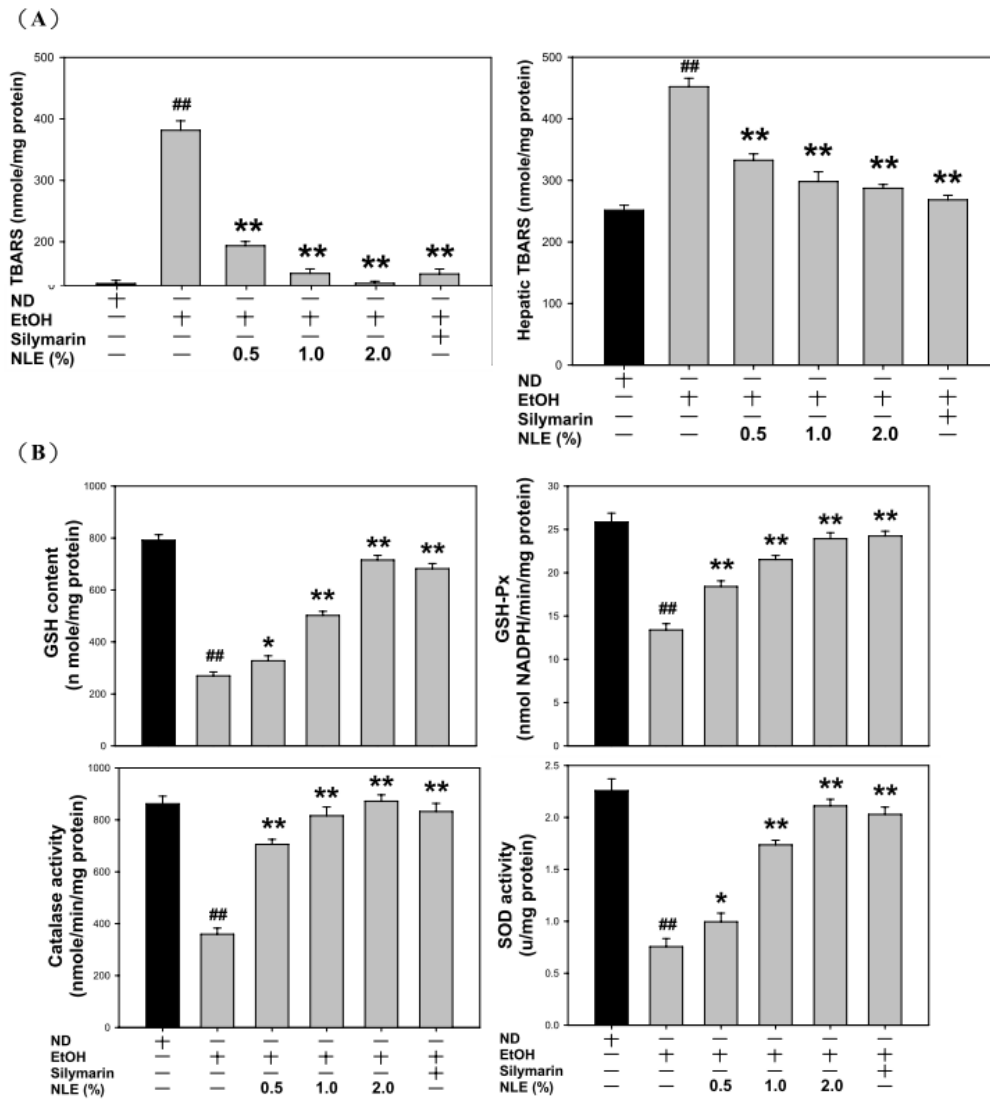
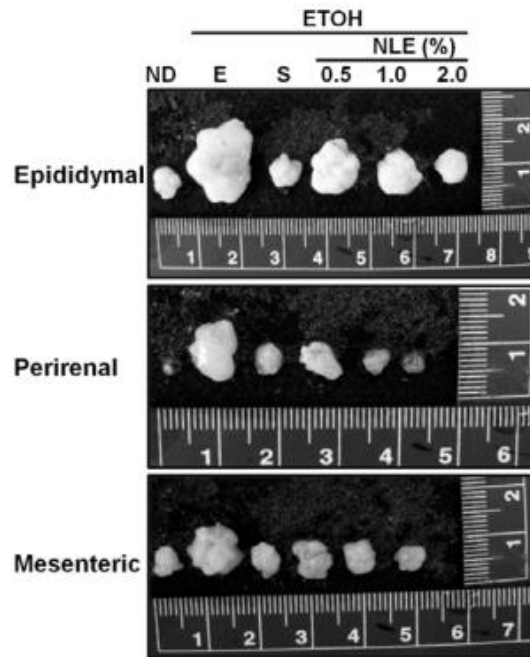


Figure 5. Antioxidative effect of NLE on TBARS and activities of related antioxidant enzymes in ethanol fed C57BL/6J mice. Serum and hepatic levels of TBARS were showed in (A). (B) Hepatic levels of GSH and activities of antioxidant enzyme levels were measured. The data were mean \pm SD from 8 sample for each group and at least three independent experiences. ##, $p < 0.01$ compared with the ND group. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ compared with the EtOH group.

(A)



(B)

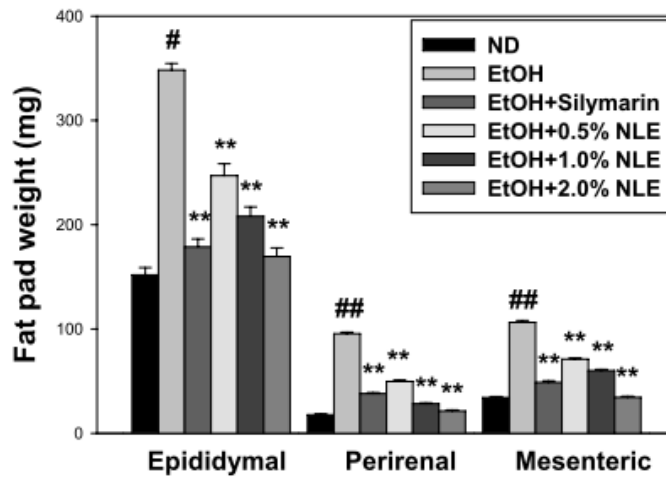
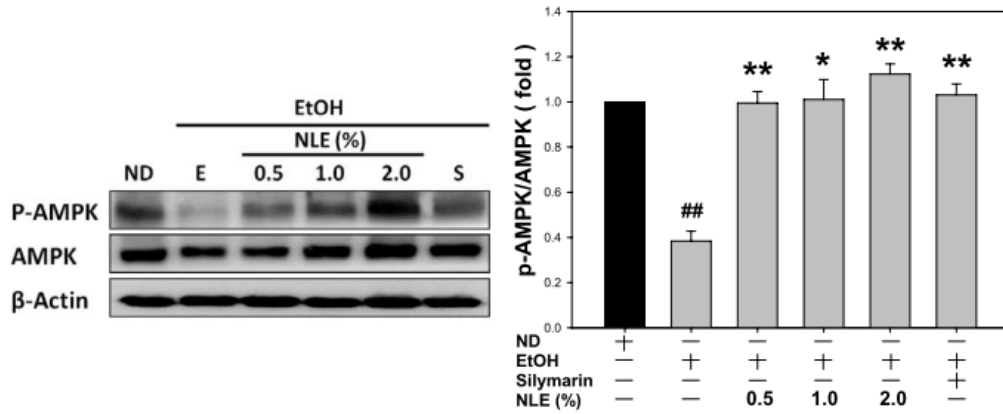
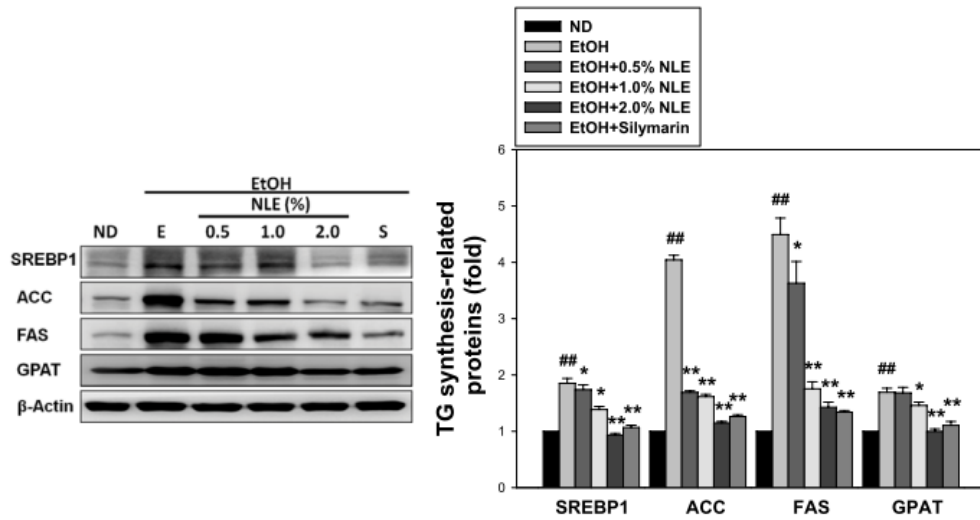


Figure 6. Effect of NLE on the weight of fat pad in ethanol fed C57BL/6J mice. (A) The epididymal, perirenal and mesenteric fat pad were obtained from each group of mice. (B) The quantitative data of mice fat pad weight changed levels are presented as means \pm SD from 8 mice per group. Results were statistically analyzed with Student's t-test. #, $p < 0.05$ compared with the ND group **, $p < 0.01$ compared with the EtOH group.

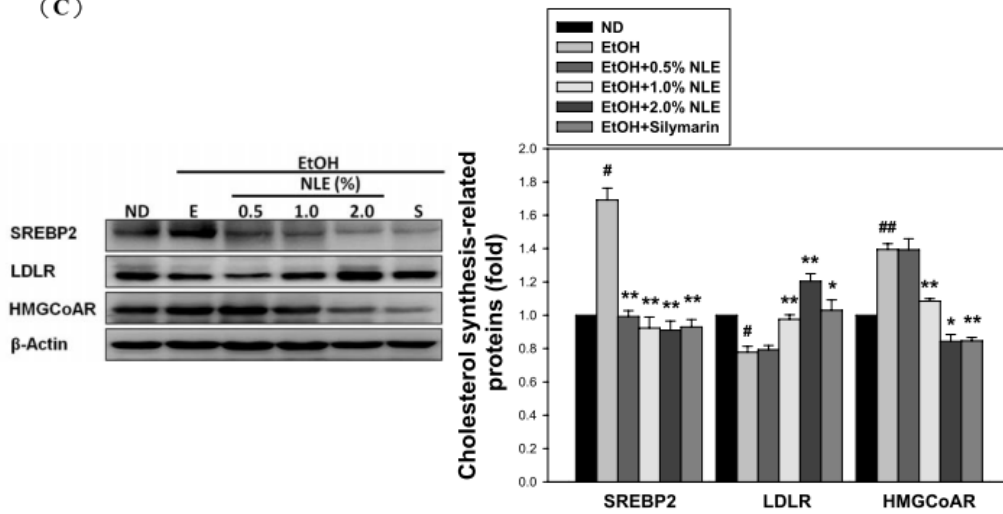
(A)



(B)



(C)



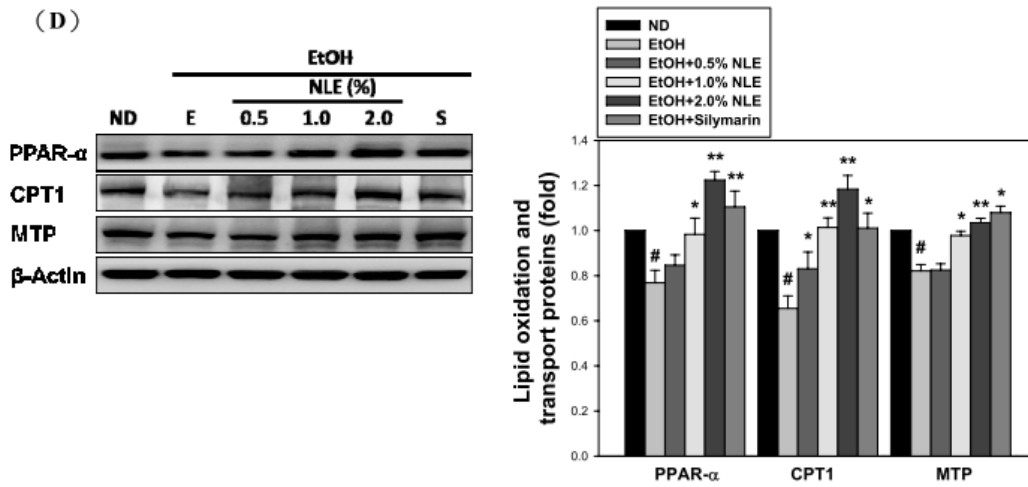


Figure 7. Effect of NLE on the phosphorylation of AMPK, expression of lipogenesis and lipid oxidation related protein in ethanol fed C57BL/6J mice. Livers of the experimental animals were collected and the total proteins were extracted. (A) Thr-172 phosphorylated AMPK, (B) triglyceride synthesis-related proteins, (C) cholesterol synthesis-related proteins, and (D) lipid oxidation and transport related proteins were detected by western blot analysis. The levels of the proteins were subsequently quantitated by densitometric analysis with that of control being 100%. Data are represented as the mean \pm SD for the three experiments. #, $p < 0.05$, ##, $p < 0.01$ compared with the ND group. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ compared with the EtOH group.

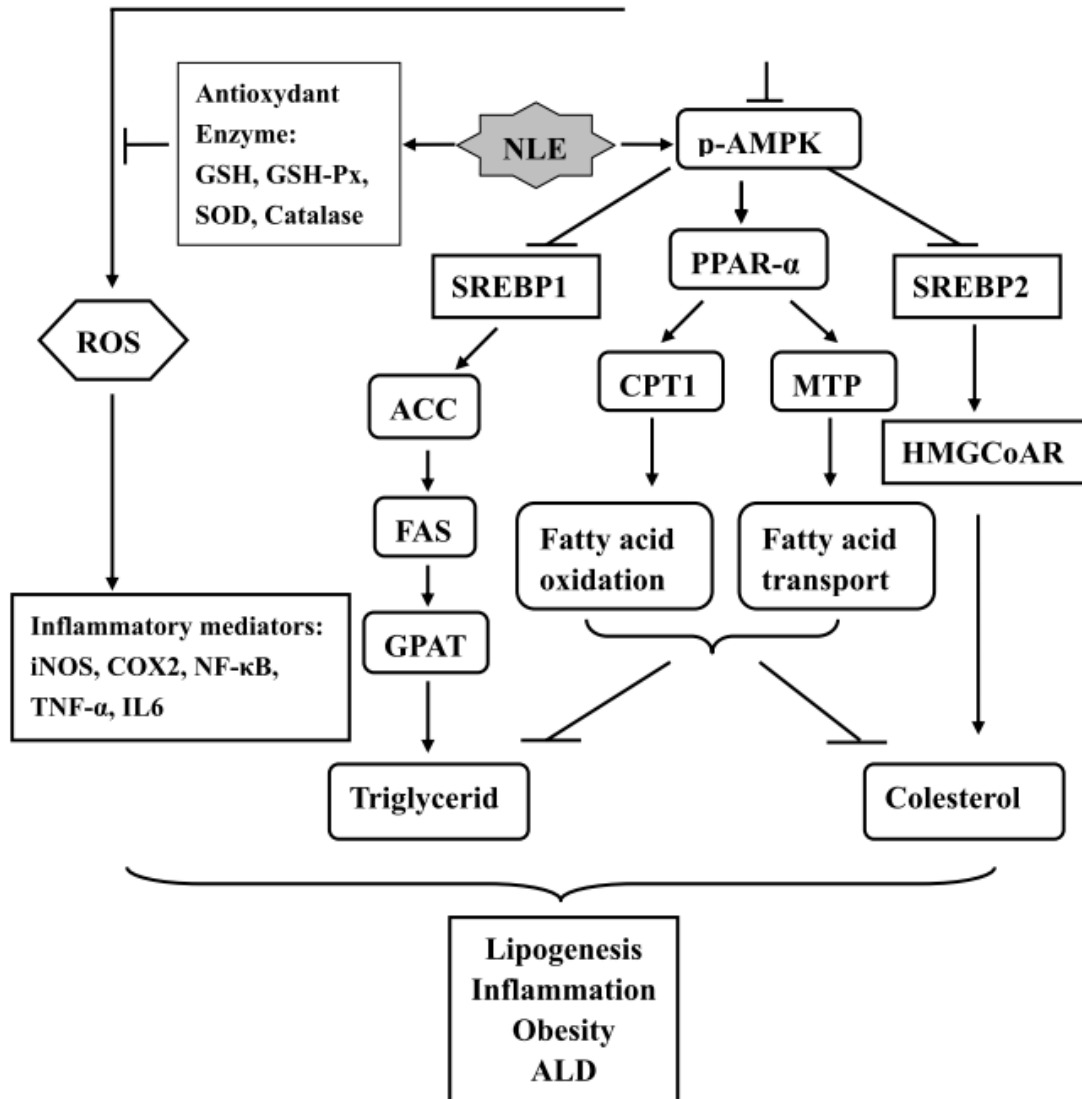


Figure 8. Schematic illustrating proposed mechanism by which NLE prevents alcohol-induced liver injury and obesity. NLE prevents lipid peroxidation and inflammation by increasing antioxidative activity and reducing proinflammatory mediators. NLE inhibit lipogenesis and hepatic lipid accumulation through the activation of the AMPK, which decreasing the TG and cholesterol synthesis. NLE increase the hepatic expression of CPT-1 and MTP for fatty acid oxidation or transport through the activation of the AMPK and PPAR- α signal.

Cite this: *Food Funct.*, 2014, 5, 678

Polyphenol-rich extract of *Nelumbo nucifera* leaves inhibits alcohol-induced steatohepatitis via reducing hepatic lipid accumulation and anti-inflammation in C57BL/6J mice†

Chang-Chieh Tang,^a Wea-Lung Lin,^{bd} Yi-Ju Lee,^{ad} Yu-Chi Tang^a and Chau-Jong Wang^{*ac}

The present study was undertaken to evaluate the hepatoprotective effect mechanisms of *Nelumbo nucifera* leaves extract (NLE) in experimental alcoholic steatohepatitis animal models. We found that the NLE contained polyphenols (phenolic acids and flavonoids), and more than 70% of the main functional components in NLE could potentially provide benefits for alcoholic liver disease. The parameters of histopathology, immunohistochemistry, antioxidant defense, proinflammatory mediator and lipid synthesis-related proteins demonstrated the inhibitory effect of NLE on alcoholic steatohepatitis. Plasma and hepatic content analysis showed that NLE inhibited lipid accumulation by altering the levels of triglycerides (TG) and cholesterol (TC). Treatment with NLE increased the expression of the p-AMPK/AMPK ratio and PPAR- α . Furthermore, fatty acid oxidation and transport via carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) were through the activation of the AMPK and PPAR- α signal. These results revealed that the polyphenol-rich component of NLE prevents alcoholic steatohepatitis by multiple pathways, including reduced lipid synthesis, enhanced fatty acid oxidation and transport responses, inhibited oxidative stress and facilitated anti-inflammation. Suggesting that NLE might be regarded as a beneficial food that has the potential to be developed as a natural agent for preventing alcoholic steatohepatitis.

Received 9th October 2013
Accepted 20th December 2013
DOI: 10.1039/c3fo60478k
www.rsc.org/foodfunction

Introduction

Excessive consumption of alcohol for a long time contributes to the development of alcohol-related liver diseases (ALD). Common pathological conditions including steatosis, steatohepatitis, fibrosis/cirrhosis, and increased risk of hepatocellular carcinoma are observed in alcohol-linked liver disorders.¹ Alcoholic steatosis (AS) is characterized by accumulation of lipid droplets and of triglycerides (TG) and cholesterol (TC) in the liver, which is the earliest sign of liver injury and is present in about 80–90% of people who consume alcohol.¹ However, continued heavy alcohol consumption leads to inflammation of

the liver, referred to as alcoholic steatohepatitis (ASH). Eventually, patients develop liver fibrosis deposition (20–40%) and cirrhosis (8–20%).

Evidence indicates that alcohol induced oxidative stress contributes to alcoholic liver injury via multiple mechanisms involving decreased hepatic antioxidant defense,² secretion of pro-inflammatory mediators,¹ enhanced lipid peroxidation and excess lipid synthesis.³ In addition, oxidative stress, disrupted nitric oxide (NO) signaling, and mitochondrial dysfunction are proposed to be key molecular events that accelerate or worsen steatosis and initiate progression to steatohepatitis and fibrosis.⁴ Chronic alcohol consumption induces oxidative stress and activates the immunity pathway and downstream signaling that results in pro-inflammatory cytokine production.⁵ The activation of pro-inflammatory cytokines, particularly inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase 2 (COX2), transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) plays a critical role in the progression of alcoholic liver injury.

The accumulation of fat in the liver predisposes the liver to more serious damage by several mechanisms. The main pathogenetic factors underlying this process are increased fatty acid and TG synthesis, enhanced hepatic influx of free fatty acids

^aInstitute of Biochemistry and Biotechnology, College of Medicine, Chung Shan Medical University, No. 110, Sec. 1, Jianguo North Road, Taichung 402, Taiwan. E-mail: wcj@csmu.edu.tw; Fax: +886-4-23248167; Tel: +886-4-24730022 extn 11675

^bDepartment of Pathology, Chung Shan Medical University Hospital, Taichung, Taiwan

^cDepartment of Medical Research, Chung Shan Medical University Hospital, Taichung, Taiwan

^dDepartment of Pathology, College of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3fo60478k

第二年度研究報告

壹、中文摘要

關鍵字：荷葉黃酮、肝纖維化、抗氧化、解毒酵素、抗肝癌作用

本研究第一年以 *in vitro* 和 *in vivo* 的非酒精性研究已經證明了 NLE 的諸多功效，可用於抑制因高脂肪飲食引發之異常高血脂、脂肪肝和肝損傷等作用。也證明 NLE 可以抑制酒精性脂肪肝和酒精性肥胖形成的機轉，並發表於 *Food Funct.*, 2014, 5, 678，第二年探討 NLE 抑制肝纖維化及肝癌之作用。研究首先利用化學致癌物質 AAF 誘導大鼠產生肝癌的模式，評估 NLE 抑制 AAF 所誘導肝臟纖維化，及肝癌發展之作用，並探討其中的相關機轉變化。在 AAF 動物模式之結果中發現，NLE 可以減緩 AAF 誘導之肝癌發生與進展，而從其肝臟外觀、重量、切片與血清生化結果顯示，AAF 成功誘導大鼠自發性發生肝癌，NLE 則有效地減緩肝癌的生成作用。NLE 是透過增加肝臟之解毒功能，增加 GST 的活性，及增加肝臟的抗氧化酵素活性，如 SOD、GSH-peroxidase 及 catalase，來達到保護肝臟，抑制肝癌的發生。

貳、英文摘要

In first year , our results revealed that NLE significantly reduced the lipid accumulation, prevented oxidative stress, facilitated anti-inflammation, suppressed lipid synthesis, increased fatty acid transportation and stimulated fatty acid oxidation by regulating the activation of AMPK, suggesting that NLE could potentially be developed as a natural agent for preventing NAFLD and AFLD (Food Funct., 2014, 5, 678). In this year, we found that dietary administration of NLE had markerly suppressed AAF-induced liver cancer incidence in wistar rats. Our results showed that AAF treatment led to a significant ameliorate liver fibrosis, liver weight, histological morphology and serum biomarkers for hepatic injury and hepatocellular carcinogenesis. The serum levels of some important enzymes in liver such as ALT, AST, and γ -GT which were decreased by NLE treatment after AAF-induced HCC. NLE increased detoxification and antioxidant enzyme in liver of AAF-induced rat. These results indicated that the NLE might be a plausible treatment for patients with HCC.

Keywords: flavonoids-rich extracts of *Nelumbo Nucifera* leaf, liver fibrosis, antioxidation, detoxication, anti-hepatocarcinogenesis.

參、報告內容

3-1. 肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)

肝臟是人體最大的器官，位於右上腹腔之橫膈膜下方，其構造可以分成左右肝臟分為左右兩半(右葉占全肝的60%)，由肝動脈及肝門靜脈兩道血流供應所需養份，肝臟所需的氧氣來自心臟運輸送至肝動脈提供肝細胞的吸收，肝門靜脈則攜帶了從消化道吸收的養分及進行外來毒性物質的代謝。肝臟主要負責體內的解毒及新陳代謝作用，掌管醣類、蛋白質、脂質、膽汁等的代謝，許多病原體與毒性物質容易造成肝細胞的損傷，而肝臟具有良好的再生和代償能力，使肝臟能承受一定限度的損傷[7]。

而肝癌的形成是緩慢而且不易被發現的，通常的主因是由慢性肝炎導致肝硬化進而形成肝癌。肝炎是指肝臟發炎以及肝細胞損傷，依形成原因可分為病毒性肝炎、藥物性肝炎、酒精性肝炎、脂肪性肝炎，而當肝臟的發炎反應過於嚴重，此時星狀細胞會被活化促使纖維母細胞的大量表現，分泌大量的膠原蛋白等細胞外基質將受損的肝細胞圍繞，以減少受損區的工作量並且增加修復時間，待修復完畢再以MMP瓦解纖維組織回復正常狀態。然而當肝臟長時間持續受損，MMP分解的速度不及於纖維組織的形成，長久之下會使肝功能下降並破壞血管結構，導致血管變形、變硬而進展到肝硬化，由於硬化的肝無法清除有害物質甚至是致癌物，再加上肝細胞部分基因失去功能時，便會使肝臟癌化，進一步形成肝癌[8]。也因為肝纖維化為肝硬化之的早期階段，因此肝臟纖維化可視為肝癌發展的早期指標。

3-2. 細胞抗氧化系統 (antioxidative system)

當細胞受到ROS 導致的氧化壓力所危害時，通常會利用細胞中的抗氧化機制，採取一些防禦措施，將損害減至最低程度。細胞內的抗氧化機制主要分成兩大部份：初級的抗氧化防禦 (primary antioxidant defenses) 及次級的抗氧化防禦 (secondary antioxidant defenses)。初級的抗氧化防禦是以直接分解或清除 superoxide、 H_2O_2 及OH 為主，多數屬於抗氧化酵素所組成，包括：過氧化氫酶

(catalase)、超氧歧化酶(superoxide dismutase; SOD)、穀胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase; GPx)、穀胱甘肽還原酶(glutathione reductase; GRd) 等；而次級的抗氧化防禦則是以修復受到氧化損害的生物分子為主，包括：維生素C、維生素E、 β -胡蘿蔔素、穀胱甘肽、膽紅素等。

3-2-1.超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)

SOD 廣泛存在於真核或原核生物當中，SOD 能將superoxide 催化成 O_2 或 H_2O_2 ，提供生物體抵抗ROS 所帶來的傷害與破壞。SOD 是含有金屬離子的酵素蛋白，根據其活性位置所結合的金屬輔酶因子的不同，一般可區為：銅鋅型(Cu/ZnSOD)、錳型(MnSOD)、胞外超氧歧化酶(EcSOD)、鐵型(FeSOD)[9]，而這幾種不同類型的SOD 分布於不同的物種與不同的區域。(1) Cu/ZnSOD存在於各種生物體內，在真核細胞中Cu/ZnSOD 主要存在於細胞質及胞器中，其分子量為：32 kDa[10]。Cu/ZnSOD 與superoxide 的反應速度極快，銅離子在歧化反應中扮演了氧化與還原的兩種角色，但鋅離子並沒有參與催化作用其功能主要是在安定整個酵素結構，若以其它金屬離子取代銅離子酵素將失去活性[11]。(2) MnSOD 主要位在於真核細胞與原核細胞的粒線體中，其分子量約 40 kDa[12]。(3) EcSOD：於1982 年被發現，它含有一個銅及一個鐵離子但卻不同於Cu/ZnSOD[13]。EcSOD 僅存在於少數幾種細胞當中，如纖維母細胞及內皮細胞。EcSOD 主要存在於細胞外液與循環的血液中，對於調節血管張力上扮演相當重要的角色。(4) FeSOD 分布於原核細胞基質、藻類及某些高等植物及其葉綠體中，在所有的動物組織中都沒有發現FeSOD 的存在。FeSOD 在核酸與胺基酸序列上與MnSOD 類似，對熱及pH 值的改變較敏感，其分子量約18.5 ~ 22 kDa[14]。

3-2-2.過氧化氫酶 (catalase)

Catalase 是第一個被發現的抗氧化酵素，其分子量約為60 kDa。主要的作用是将過 H_2O_2 催化 O_2 及 H_2O 。Catalase 由四個蛋白質次單元所組成，每次單元都包含了一個血紅素及一個NADPH 分子[15]。Catalase 大部份分佈於細胞內的過氧化體(lysosome)，在肝細胞與紅血球含量豐富，在一般的組織中也有存在。

Catalase 在對於抗氧化系統裡扮演了重要的角色，當細胞內的 H_2O_2 濃度在10 mM 以下時，GPx 會將 H_2O_2 催化 O_2 及 H_2O ；然而當 H_2O_2 濃度在10-20 mM 時，catalase 則會將 H_2O_2 催化 O_2 及 H_2O [16]。一旦 H_2O_2 濃度超過20 mM 時便會開始對細胞產生傷害，超過100 mM 時則容易活化嗜中性白血球產生更多 H_2O_2 並進一步造成細胞的死亡[17]。

3-2-3. 穀胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxide, GPx)

血液中存在的GPx 主要是由腎臟所產生，而GPx 廣泛的存在於身體各組織張中，其中以肝臟及紅血球的含量最高[18]。GPx 必須含有硒(selenium; Se) 當作co-factor，才能完整的發揮作用[19]。GPx 有兩種：不須依賴硒的GPx (selenium dependent glutathione peroxide; Se-GPx)及需要依賴硒的GPx。在細胞內，GPx 存在於細胞質及粒線體；對於 H_2O_2 而言，Se-GSH-Px 是一個最主要的清除者[19]。

3-3. 肝臟的解毒作用

肝臟中解毒作用可分為 phase I 和 phase II，此又可稱為生物轉化途徑，當有害物質 (例如:化學物、致癌物) 進入人體內時，會先由 phase I (cytochrome P450s) 的途徑將有害物質以氧化、還原、水解等代謝方式，改變它的極性直接排出體外，或由 phase I 代謝出的有毒物質進入 phase II，藉由和不同的酵素結合，藉由增加毒物的水溶性，以便排除體外。

3-3-1. 穀胱甘肽硫轉移酶(Glutathione-S-transferase, GST)

穀胱甘肽硫轉移酶(Glutathione-S-transferase, GST)，是phase II 酵素的一種，主要存在細胞質當中，它可中和毒素，協助身體排出致癌物質。而GST有許多種基因型，可分為alpha、mu、pi、theta、sigma、zeta、kappa、omega[20]，其中又以alpha、mu和pi族在體內較多。GST- α 在目前研究發現對抗癌藥物具有抗藥性，有研究指出GST- α 可對抗脂質的過氧化作用[21]，另外有文獻指出在大白鼠中GST- α 是結抗AFB1所造成肝臟毒性的重要角色[22]。GST- μ 也與部分抗癌藥物有抗藥性，最新的研究也發現consuming broccoli (花椰菜) 和GST- μ 的互相影響會改

變攝護腺發炎和癌症形成的路徑[23]。GST- π 在正常肝臟中是不會表現，研究指出GST- π 可做為化學毒性及癌症形成的蛋白標記[24]。在正常的肝細胞當中可發現大量的GST- α ，而GST- μ 含量其次，而GST- π 偵測不到[25]。

3-4. 荷葉黃酮萃取物(flavonoid-rich extract from *Nelumbo Nucifera* Leave, NLE)

荷葉學名*Nelumbo Nucifera*，英文名East Indian Lotus，荷葉為多年水生草本植物蓮的葉片，目前知道荷葉含有多種生物鹼[26]、抗氧化物質類黃酮[27,28]，以及維生素C、酒石酸、枸橼酸、蘋果酸、草酸、琥珀酸、葡萄糖酸、鞣質，另外還含有抗有絲分裂的鹼性成分[29]。

荷葉茶以減輕體重著名，荷葉水萃物可以預防體重增加，抑制脂肪和碳水化合物吸收，加速脂質代謝以及提高能量消耗率[30]。亦有文獻指出，荷葉可以增加胰島素的分泌並調節血糖，具有改善高血脂症及非胰島素依賴型糖尿病的效果[31]，荷葉也能輔助降血壓、預防動脈硬化[32,33]、抗發炎[34]進而達到控制脂肪肝的形成[35]，此外，荷葉也具有保護肝以及抗氧化的活性[36]。

肆、研究材料與方法

4-1. 荷葉黃酮萃取物(NLE)之製備

秤取200克乾燥荷葉粉末，以五公升之二次水攪拌一小時，放置於冷房浸泡至隔夜後，再以濾紙抽氣真空過濾，收集濾液於40 °C下減壓濃縮，再以真空冷凍乾燥去除水份，得乾燥之萃取物，即為荷葉黃酮萃取物(NLE)。實驗時，以乾燥粉末稱重，配取不同濃度NLE。使用於細胞實驗操作之NLE配製的各濃度溶液需先經 0.22 µm filter過濾除菌。

4-2.化學性物質AAF誘導大鼠自發性產生肝癌之模式

實驗動物以雄性wistar 大鼠為實驗動物，購自國家研究院實驗動物中心，飼養於中山醫學大學動物中心，生活週期維持12 小時光照、12 小時黑暗，光照時間為早上6 時至下午6 時，室溫維持 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。進入實驗前充分供應飼料及飲水。

實驗分組

待大鼠適應環境一週後，開始進入本試驗。隨機將實驗動物分成五組，正常對照組(normal control)、AAF 誘導組(2-acetylaminofluorene, AAF induced control)、低劑量 NLE 組(AAF + 0.125 g/kg NLE)、中劑量 NLE 組(AAF + 0.25 g/kg NLE)、高劑量 NLE 組(AAF + 0.5 g/kg NLE)，以每組 10 隻的方式分組。

其詳細分組如下：

Group A：對照組，餵食標準配方飼料。

Group B：AAF 誘導組，餵食標準配方飼料。

Group C：AAF+ NLE LD 試驗組，以 AAF 誘導肝癌發生，期間再配合 0.125 g/Kg NLE 餵食。

Group D：AAF+ NLE MD 試驗組，以 AAF 誘導肝癌發生，期間再配合 0.25 g/Kg NLE 餵食。

Group E：AAF+ NLE HD 試驗組，以 AAF 誘導肝癌發生，期間再配合 0.5 g/Kg NLE 餵食。

誘導模式

誘導肝癌發生之模式是利用餵食化學致癌物質 AAF 的方式誘導大鼠自發性產生肝癌的模式評估 NLE 抑制肝癌發生的功效。將平均 200 公克重之大鼠隨機

分成五組，除 control 組外，其他各組分別以 AAF 誘導 24 週，期間配合不同劑量之荷葉黃酮萃取物(NLE)，並控制相同攝取量之飼料後餵食。每天給予新鮮之飼料並移除舊的飼料，紀錄每日大鼠之攝取情形，並將其飲用水補足，直到實驗期間結束。待實驗期間結束，以給予大鼠過量 CO₂ 之方式，將大鼠犧牲摘取其肝臟與相關組織做生化分析並紀錄各組之間的變化。取其血液做血糖、血清生化(包含肝功能 AST、ALT、 γ -GT、 α -fetoprotein，腎功能 uric acid、creatinine)、並分析肝臟中相關解毒酵素活性(包含 Glutathione-S-transferase、SOD-1、catalase、GPx 等酵素活性)。

4-2-1.肝臟纖維化之評估

在完整誘導大鼠肝癌發生模式之時間為餵食 AAF 長達六個月之久，為觀察 NLE 對於肝癌早期發展過程之影響，將誘導肝癌發生模式之大鼠在經過餵食化學致癌物質 AAF 三個月後，將大鼠犧牲，觀察期肝臟之變化，並作病理切片分析肝臟中纖維化的情形。

4-2-2.動物血脂肪測定分析

動物抽取血液樣品以及肝臟組織前，已先將動物空腹12-14小時為原則，採樣後進行下列項目分析：

4-2-2-1.三酸甘油酯(total triacylglycerol, TG)

三酸甘油酯經由酵素 lipase 水解後，生成 glycerol 和 fatty acids，再透過一連串氧化還原作用產生 H₂O₂，再加入 4-chlorophenol 與 4-aminophenazone 作用，經 peroxidase 氧化後得 quinoneimine，在波長 500 nm 下，即可透過吸光值變化反映三酸甘油酯之濃度。取 10 μ L 血清加入反應溶液(含 0.5 mmol/L 4-aminophenazone、5.5 mmol/L 4-chlorophenol、1 mmol/L ATP、150 U/mL lipase、0.4 U/mL glycerol-kinase、1.5 U/mL glycerol-3-phosphate oxidase、0.5 U/mL peroxidase) 作用，在室溫下反應 10 分鐘，在波長 500 nm 下測定吸光值 A_{sample}。取 10 μ L 的 200 mg/dL 標準品，加入反應溶液作用，在室溫下反應 10 分鐘，在波長 500 nm 下測定吸光值 A_{standard}。欲求得血清中 triglycerides 的濃度，則將 A_{sample} 除以 A_{standard} 在乘以 200 即為血清中 triglycerides 的濃度(mg/dL)[37]。

4-2-2-2.總膽固醇(total cholesterol, TC)

平時生物體內的膽固醇是以乙醯態的膽固醇(cholesterol ester)方式儲存於細胞中，故藉由膽固醇乙醯水解酶(cholesterol esterase)，將乙醯化膽固醇水解為膽固醇和脂肪酸，再經過 cholesterol oxidase 氧化成 cholesterol-3-one 和 H_2O_2 ，再加入 phenol 與 4-aminoantipyrine 作用，經 peroxidase 氧化後得 quinoneimine，在波長 500 nm 下，即可透過吸光值變化反映膽固醇之濃度。取 10 μ L 血清加入反應溶液(含 0.3 mmol/L 4-aminoantipyrine、6 mmol/L phenol、0.5 U/mL peroxidase、0.15 U/mL cholesterol esterase、0.1 U/mL cholesterol oxidase) 作用，在室溫下反應 10 分鐘，在波長 500 nm 下測定吸光值 A_{sample} 。取 10 μ L 的 200 mg/dL 標準品，加入反應溶液作用，在室溫下反應 10 分鐘，在波長 500 nm 下測定吸光值 A_{standard} 。欲求得血清中 cholesterol 的濃度，則將 A_{sample} 除以 A_{standard} 再乘以 200 即為血清中 cholesterol 的濃度(mg/dL)[38]。

4-2-2-3.肝功能之測定

以動物血清中 GOT、GPT 為肝功能測定指標，在含有 α -oxoglutarate 和 L-alanine 的情況下，ALT (alanine aminotransferase) 可將之轉變為 L-glutamate 和 pyruvate，透過 pyruvate 與 NADH 及 H^+ 作用下，會形成 L-lactate 和 NAD^+ ，可在波長 340 nm 下測得吸光值變化。取 100 μ L 血清加入反應溶液(含 0.6 mol/L L-alanine、15 mmol/L α -oxoglutarate、1.2 U/mL LD、0.18 mmol/L NADH) 作用，在波長 340 nm 下測定每分鐘單位時間內吸光值變化，將每分鐘單位時間內吸光值乘以 1746 即為 ALT 之活性(U/L)[39,40]。

在有 AST (aspartate aminotransferase) 存在的情況下， α -oxoglutarate 會與 L-aspartate 反應，經 AST 作用下，會形成 L-glutamate 和 oxaloacetate，再加入 NADH 經由酵素作用下，產生 L-malate 和 NAD^+ ，藉由測定 NADH 的消耗可反映出 AST 的活性。取 100 μ L 血清加入反應溶液(含 240 mmol/L L-aspartate、12 mmol/L α -oxoglutarate、420 U/L MDH、600 U/L LD、0.18 mmol/L NADH) 作用，在波長 340 nm 下測定每分鐘單位時間內吸光值變化，將每分鐘單位時間內吸光值乘以

1746 即為 AST 之活性(U/L)[39,40]。

4-2-3.肝臟脂質過氧化分析(TBARs assay):

本實驗依據 Buege 和 Aust 之方法加以修改[41]，脂質氧化過程中會產生 Malondialdehyde (MDA)，此時加入 Thiobarbituric acid (TBA)會與 MDA 產生反應物(thiobarbituric acid reactive substance, TBARs)，可利用吸光值(OD)測定反應物，以判定 MDA 形成量，而得知脂質過氧化的程度。首先各組分別取 0.2g 肝臟組織，將組織以normal saline清洗之後，加入 1 mL RIPA buffer (pH 7.5)，以均質機製備樣品均質液，並定量其蛋白質含量。接著準備好試管配製不同梯度濃度1,1,3,3-Tetramethoxypropane (TEP)作為標準液並畫出標準曲線。步驟取稀釋10 倍的肝臟組織均質液200 μ L，加入200 μ L TCA buffer (trichloroacetic acid, 25%)混合後，於 4 $^{\circ}$ C 下離心(10,000 rpm; 30 mins)後，取上清液200 μ L 再加入200 μ L TBA buffer (thiobarbituric acid)混合後，於95 $^{\circ}$ C 下加熱並避光反應40 分鐘後，放入冰上cold down 15分鐘並避光，以螢光光度計在波長532 nm/600 nm下測定吸光值，再依照標準曲線計算出樣品中所含的MDA 濃度。

4-2-4.肝臟抗氧化酵素活性分析

4-2-4-1.麩胱甘肽過氧化酶活性分析(glutathione peroxidase, GSH Px)

在麩胱甘肽過氧化酶與麩胱甘肽還原酶 (Glutathione reductase, GRd) 的偶合反應 (Coupling reaction) 中，麩胱甘肽過氧化酶會消耗兩分子的還原態麩胱甘肽 (GSH)，來清除一分子的過氧化物，同時麩胱甘肽還原酶會消耗一分子的NADPH，再將氧化態的麩胱甘肽 (GSSG) 還原成還原態麩胱甘肽。因此還原態麩胱甘肽的消耗速率會等於兩倍 NADPH的消耗速率。故麩胱甘肽過氧化酶的活性可用 NADPH 在波長340 nm 下的吸光值變化情形來表示。此酵素之分析主要是依據 Lawrence 與Burk [42]所報告之方法加以修改。活性測定係以過氧化氫(H₂O₂)為受質。還原態麩胱甘肽(GSH)經由麩胱甘肽過氧化酶(GSH-Px)之催化可將過氧化氫還原，而還原態麩胱甘肽則變成氧化態麩胱甘肽，然後氧化態麩胱甘肽則利用麩胱甘肽還原酶(GSH Rd)與NADPH 將其還原回還原態麩胱甘肽。取肝臟細胞質樣

品5 μL 及95 μL 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)，加入0.8 mL 100 mM 磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.0)之反應混合液(含1 mM EDTA、1 mM NaN_3 、0.2 mM NADPH、1 U/mL GSH Rd 及1 mM GSH)，在室溫下靜置5 分鐘，再加入0.1 mL 2.5 mM 過氧化氫後，以分光光度計在340 nm 下測3分鐘 (25°C)，計算NADPH 減少之速率，間接求出麩胱甘肽過氧化酶的活性，而以去離子水5 μL 當作空白組。比活性 (specific activity)表示法：nmol NADPH/min/mg protein。

4-2-4-2.超氧化物歧化酶活性分析(superoxide dismutase, SOD)

鄰苯三酚 (pyrogallol) 在 pH 小於 7 的環境中甚為穩定，但在 pH大於 7 之環境中會發生自身氧化反應，產生超氧陰離子自由基，同時會以一定的速率生成有色中間產物紅桔酚，而超氧化歧化酶可以將超氧陰離子自由基歧化，而使鄰苯三酚的自身氧化速率受到抑制，根據抑制程度之大小，可換算超氧化歧化酶之活性。實驗參照Marklund 與Marklund [43]所描述之方法進行，將肝組織用冰生理食鹽水(ice-cold saline)洗淨，在漏斗上滴乾生理食鹽水，加入適量緩衝液(0.32 M sucrose、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl, pH 7.4)打碎使成10%之均質漿(homogenate)。高速離心30 分鐘(13,600 x g)，取上清液50 μL ，再加上Tris-cacodylic acid buffer (pH 8.2, 50 mM)100 μL 。溶液再加上超純水，使體積成為980 μL ，再加上鄰苯三酚20 μL (0.2 mM)，劇烈搖盪混均，以分光光度計於420 nm 測量吸光值(A)，每隔20秒測量一次，總共測量5分鐘，計算 $\Delta A / \Delta T$ 。分析單位時間內抑制鄰苯三酚自動氧化速率達50%時之酵素量，定為一單位(U)；肝組織SOD 活性，以每單位蛋白質所含SOD 單位量表示(nmole/min/mg protein)。

4-2-4-3.過氧化氫酶活性分析(catalase)

在波長 240 nm 時，過氧化氫會在觸酶的存在下，逐漸減少其吸光值($\epsilon_{240} = 0.0395 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。藉由其單位時間內吸光值的改變量，可測得觸酶的活性。一單位觸酶定義為每分鐘過氧化氫所消耗的毫莫耳數。實驗依據Aebi 之方法加以修改[44]。將肝組織用生理食鹽水(ice-cold saline)洗淨，在漏斗上滴生理食鹽水，加入適量磷酸鹽緩衝溶液，打碎使成10%之均質液(homogenate)。離心700 x g 10

分鐘，取上層液9份加入1份Triton X-100 (1%)成為stock homogenate (S.H.)。取S.H. 加入適量之磷酸緩衝溶液進行稀釋，調整酸鹼度至pH 7 成為dilute homogenate (D.H.)。取D.H. 2 mL 加入1 mL H₂O₂ (0.03 M)，劇烈搖盪混均，以分光光度計於溫控25°C、波長240 nm 之條件下測量吸光值(A)，每隔20 秒測量一次，總共測量1 分鐘吸光值的變化量，結果以 U/mg protein 表示。

4-2-5.肝臟解毒酵素測定

肝癌主要分為病毒性肝癌與非病毒性肝癌或稱為化學性肝癌兩大類。化學物質的入侵並累積在肝臟中為致癌的主因，若能將化學物質有效的代謝，便可降低癌症的發生率。近年來有許多學者致力於 Glutathione-S-transferase (GST) 與癌症相關性之研究，由於 GST 的代謝方式通常是生物不活化作用，因此毒性物質或致癌物一旦成為 GST 受質被代謝後，並不會被活化成毒性更強的物質，所以 GST 活性的高低被認為在抑制癌症發生的機制中扮演著重要的角色。

將保存在-80°C 的老鼠肝臟取出，加入適量之 homogenization buffer，以組織研磨機進行均質，將均質後組織液於4°C 以 39000 rpm 離心 30 分鐘，吸取上清液即含有肝臟解毒酵素之萃取液，取 1.5 mL GSH substrate buffer 及 1.5 mL CDNB substrate buffer 置入石英管中，再加入 20 µL 之萃取液，迅速混合均勻，在 340 nm 下，反應 3 分鐘，並測定 OD 值變化，以公式換算活性之變化量。

4-2-6.病理切片判讀

試驗結束時，取實驗動物之肝臟最大右葉之肝臟，割取一塊約1 公分立方之組織塊，放入6% 的中性福馬林中固定，接著以不同濃度之乙醇(30, 50, 70, 95, 99.5%) 以及二甲苯(xylene) 進行脫水與透明步驟，爾後以熱石蠟溶液取代二甲苯，最後將組織連同石蠟溶液進行包埋。完成的石蠟標本利用切片機切成5 µm 的連續石蠟切片，將切下來的切片沾黏在乾淨的載玻片上，於37°C 烘乾後用做進一步的病理染色H & E stain。最後請中山醫學大學 附設醫學中心 病理科醫師進行判讀。

4-2-7.大鼠肝臟中之蛋白萃取

取 0.1 g 大鼠肝臟組織切碎後，加入 1 ml 的低張溶液 A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF) 進行均質化，加入 80 μl 的 10% NP-40 混合後，靜置 2 分鐘，離心 14000 g，2 分鐘，取上清液即為細胞質萃取物(cytosolic fraction)。沉澱物再以 500 μl 的溶液 A 加上 40 μl 的 10% NP-40 後，離心 14000 g，2 分鐘後去上清液，沉澱物再加入溶液 B (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 20% glycerol) 混合，靜置 10 分鐘，離心 14800 g，5 分鐘，此時之上清液即包含核蛋白之萃取物，置於-70°C 冰箱保存。

4-2-8. 西方墨點法 (western blotting)

取定量後之肝組織均質液配置 sample，以蛋白濃度 50-70 μg/μL 加入等量的 Sample Buffer (2 mL 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 1.6 mL Glycerol, 3.2 mL 10 % SDS, 0.8 mL 2-β-mercaptoethanol, 0.4 mL 0.5 % bromophenol blue) ，以 95°C 加熱 10 分鐘，迅速至入冰中冷卻，以離心機將 Sample spin down 後再 loading 至電泳槽膠片上每個 well 中，其上層膠以 80 伏特，下層以 100 伏特進行電泳，待電泳結束後接者進行蛋白質的轉漬至 Nitrocellular paper 上，完成轉漬後以 5% 脫脂牛奶於室溫下進行 blocking 1 小時，以 washing buffer (TBS with 0.5 % tween-20) 沖洗 3 次，將 NC paper 移至於 4°C 冰箱中與初級抗體反應 overnight，再以 washing buffer 沖洗 3 次後，以分別經二級抗體反應 1 小時，以 washing buffer 沖洗 3 次，最後加入 Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus 反應 1 分鐘後，於冷光螢光數位影像分析儀 (LAS-4000 plus system) 顯影觀察並定量。

4-2-9. 統計分析

動物實驗以 one way ANOVA 試算過後，各組的差異再以 Student's t test 統計分析，凡 $p < 0.05$ 以下時表示為有意義的差異。

伍、研究成果說明

5-1. NLE 抑制肝癌發生之作用

老鼠體重變化

每周以電子秤測量每隻老鼠之重量，並記錄之，接著以軟體進行統計，分析老鼠在實驗期間體重變化，發現以 AAF 誘導的組別(AAF, induced group)，其體重有明顯的下降，顯示大鼠個體之生長代謝確實有受到 AAF 之誘導而有所改變 (Fig. 1)。

NLE 對於肝臟纖維化之影響

肝癌的形成是緩慢且不易發現的，通常主因是由慢性肝炎導致肝纖維化或肝硬化，進而形成肝癌。然而當肝臟持續受損，造成纖維組織持續存在，長久影響之下，必定會影響肝臟血管結構，降低肝臟正常代謝功能，造成肝功能下降，進而促進肝臟異常增生，進而導致肝臟腫大纖維化，逐漸發展成為肝硬化。由於硬化的肝臟無法回復、清除外來的有毒物質甚至是致癌物，在加上肝臟部分基因失去功能時，便會導致肝臟癌化，形成肝癌。也因為肝纖維化為肝硬化之的早期階段，因此肝臟纖維化可視為肝癌發展的早期指標。

在本實驗中，我們以 AAF 餵食大鼠六個月以自發性產生 HCC 肝癌之模式，為了評估 NLE 對於肝癌早期發展的影響，於是提早在餵食 AAF 三個月後，將部分大鼠犧牲，觀察其肝臟之變化。結果發現，AAF 餵食三個月後造成大鼠肝臟產生大量纖維化的現象，但是在有餵食 NLE 的組別中，隨著 NLE 餵食的劑量增加，則有效地改善大鼠肝臟纖維化產生的區域，顯示 NLE 具有降低 AAF 所誘導肝臟纖維化之作用 (Fig. 2)。

NLE 對肝臟外觀與重量影響

老鼠犧牲後取肝臟並秤其重量紀錄之，將每組中肝臟重量以統計軟體分析，結果發現 AAF 處理組別的肝臟與體重比率(liver weight/bw)明顯高於正常組別 (Fig. 3A)，顯示其中之肝臟確實有因為 AAF 的刺激下而造成相當程度的破壞，進而有不正常肥大的情形，約有 3 倍的增加。由大鼠之肝臟外觀可以發現，在經

過 AAF 的刺激之後，肝臟明顯出現眾多的大小不同之不正常結節，明顯有肝腫瘤之現象(Fig. 3B)，而在同時給予 AAF 和 2% 的 NLE 之組別中，有明顯降低肝臟的比重與肝腫瘤發生之情形，顯示其肝功能有回復的趨勢，也說明了 NLE 具有保護肝臟之能力。

NLE 對血液中肝發炎指標的影響

GOT 主要存在於肝臟、心肌、肌肉，紅血球之內也有，GPT 則主要存在於肝細胞內。當這些細胞因為壞死而破壞之後，細胞內的 GOT，GPT 就會釋出到血液中，所以肝炎、心肌梗塞、肌肉發炎或溶血時，GOT 與 GPT 值都可能上升。而 γ -GT 是一種分解蛋白質的酵素，主要存在於肝和腎組織。有少部份存在於脾臟、攝護腺和心臟。 γ -GT 常用於檢驗肝膽道系統方面的疾病，也是偵測膽汁鬱積性肝疾病的敏感指標。而當肝臟功能受損，其代謝脂肪的能力將會降低，也會導致血液裡的總膽固醇(total cholesterol)與三酸甘油酯(total triglyceride)的數值上升。

由結果顯示，AAF 確實有造成肝臟之受損，使得相關之肝發炎指標 GOT、GPT、 γ -GT、total cholesterol 與 total triglyceride 的上升，但是在餵食隨著 NLE 餵食劑量增加，有效降低血液中 GOT、GPT、 γ -GT、total cholesterol 與 total triglyceride 數值，皆近似於正常組之數值，根據上述結果，再一次說明 NLE 所具有的保護肝臟，避免肝損傷之能力(Fig. 4)。

肝臟外觀變化與病理切片之結果

接著以 H&E stain 觀察肝臟組織的病理變化，從正常組大鼠肝臟組織之肝細胞排列規則整齊，而肝癌細胞會有核仁出現多型現象且大小不一致與核濃染的情形，從結果來看 AAF 處理之組別都有癌化細胞發生，且有明顯地空泡化之現象；而從各組染色結果來看，隨著 NLE 的劑量增加，癌化細胞數量與區域明顯有減少的情形(Fig. 5A)，而觀察大鼠各組肝細胞癌發生比率，隨著 NLE 劑量的增加，肝癌發生比率也有減緩之情形(Fig. 5B)，顯示肝臟確實有逐漸好轉。

5-2. NLE 保護肝臟之作用機制

NLE 對抗氧化酵素表現之影響

過去文獻中證實 AAF 是透過攻擊細胞的 DNA 與增加組織內氧化壓力而導致 HCC 的發生[45,46]，從過去實驗室的研究發現 NLE 可以改善肝損傷與氧化壓力[4]以及 NLE 具有抗氧化之效果[47]，因此我們想要探討 NLE 是否可以抑制 AAF 透過氧化壓力而導致肝癌發生。

從肝臟組織內脂質過氧化程度(TBARs assay)分析結果顯示，在 AAF 誘導下會造成肝臟大量脂質過氧化，而隨著 NLE 餵食劑量增加明顯有改善之情形(Fig. 6)。而從測量 catalase, GPx 與 SOD 抗氧化酵素活性發現，AAF 組別之抗氧化酵素活性較低，隨著 NLE 的劑量增加明顯有改善情形(Fig. 7A-C)，並從 western 結果也得知 NLE 可以增加抗氧化酵素蛋白表現量(Fig. 7D)，顯示 NLE 可回復抗氧化酵素活性，提供肝臟的保護。

NLE 促進肝臟解毒酵素 GST 表現

肝臟是人體重要的解毒器官，而 GST 為重要的解毒酵素，其活化可降低致癌物對細胞的傷害。從肝臟組織內解毒酵素活性分析結果顯示，GST α 、GST μ 與 total GST 在 AAF 誘導組別之酵素活性較低，並且隨著 NLE 的劑量上升有增加解毒酵素活性的趨勢(Fig. 8A-C)，而從 western 結果得之解毒酵素其蛋白也有表現量增加的情形(Fig. 8D)，顯示 NLE 確實可增加肝臟的解毒功能，而達到抗癌化發生的效果。

陸、研究成果討論

在本篇研究中，由化學致癌物質 AAF 所誘導肝癌發生之動物模式中證實，NLE 確實可以抑制肝癌的發生率，減少肝臟腫瘤數目，改善肝臟腫大情形。並透過增加肝臟中解毒酵素 GST α 與 GST μ 的活性，幫助肝臟中抗氧化酵素 catalase，SOD 和 GPx 的作用，達到減緩肝癌發生之機會(Fig. 9)。

過去也有文獻證實，荷葉萃取物可以透過降低肝臟的氧化壓力，改善肝臟 GOT, GPT 的變化，降低肝臟脂肪酸合成關鍵蛋白 Acetyl-CoA carboxylase (ACC) 與 Fatty acid synthase (FASN)的表現影響肝臟的脂肪酸合成；透過影響肝臟 HMG CoA reductase 的表現抑制膽固醇的合成。NLE 透過調節肝臟脂質合成的方式，達到保護肝臟之作用(3,4)，顯示 NLE 對於肝臟機能確實具有相當程度的調節作用，推測 NLE 可藉由促進肝臟機能的表現，進而抑制肝癌細胞的生長，降低肝癌發生的機率。

增強抗氧化酵素 SOD、catalase 與 GPx 的表現，確實可以幫助降低自由基對於細胞的氧化性傷害。而體內大部分之含氧自由基均會被粒線體內的超氧歧化酶 SOD 催化形成 H₂O₂，再經由氧化氫酶 catalase 轉化成水和氧分子。說明著 SOD 為體內重要之抗氧化酵素，專門清除體內活性含氧物 ROS，是生物體對抗氧化性自由基毒性的第一道防線(47,48)。而國外報告也證實，自由基可以在細胞間形成大量的氧化性壓力，造成細胞膜的脂質過氧化，降低細胞膜的通透速率，影響細胞內的訊息傳遞作用，促進正常細胞的突變或是死亡，甚至間接引起組織的不正常增生作用，增加腫瘤生成的機率。

過去文獻指出，AAF 會透過增加體內之氧化壓力，攻擊細胞之 DNA，容易造成基因突變而導致肝癌之發生(45,46)。而根據本研究之結果顯示，荷葉萃取物 (NLE)具有調節肝臟 SOD，catalase 與 GPx 等抗氧化酵素之作用(Fig. 7)，且能夠有效地降低肝臟內脂質的過氧化程度，改善肝臟中的氧化壓力(Fig. 6)。而本實驗室之前針對 NLE 做過分析，發現 NLE 含有大量具有抗氧化的黃酮與多酚成分，顯示 NLE 可以透過本身所富含的抗氧化成分，另一方面提升肝臟的抗氧化酵素

作用，降低體內之氧化傷害，以達到預防肝癌發生之作用。

生物體內化學致癌物的代謝，主要是依賴解毒酵素進行，所以解毒酵素活性的誘發則是生物體代謝致癌物最主要的保護機制。這些解毒酵素大致可分為 phase I 及 phase II 酵素，如 glutathione-S-transferase (GST)，則是經由催化 glutathione 和致癌物去活化，達到解毒之效果，以 aflatoxin B1 為例，即以此種方式進行代謝。GST 是一種具多功能的蛋白質它可以和細胞內的生化分子結合，並進一步攜帶及運送這些分子例如：heme、bilirubin、polycyclic aromatic compounds 及 dexamethasone (49)，並進一步攜帶及運送這些分子。此外在解毒過程中，GST 會催化 glutathione 和多種內生性或外在的活化型化學物結合，進而進入 mercapturic acid 路徑加以代謝，以保護細胞免受傷害(50)。而根據本研究指出，NLE 具有增強 GST 酵素活性之作用，說明著 NLE 可以透過增強或加快 GST 與 AAF 代謝過程中所產生之毒性物質結合，以達到解毒之效果，減少細胞 DNA 受到攻擊的機會，避免肝癌發生的機率。

細胞的增生作用(proliferation)與凋亡(apoptosis)的異常現象與腫瘤的發生發展過程有著密切相關，而肝癌的產生過程也是一樣，取決於肝細胞的增生和死亡相互作用的結果，破壞肝癌細胞的增生與死亡平衡，將有助於降低肝癌的發生率。因此探討 NLE 是否會透過抑制肝細胞的不正常增生現象，減緩 PI3K/Akt/mTOR pathway 的訊息傳遞作用，進而抑制肝癌細胞的生長；或是從另一方面分析，探究 NLE 是否具有促進肝癌細胞的凋亡作用，造成 caspase 的活化，增加粒線體 Bax/Bcl-2 ratio 的比例上升，進而減少肝癌細胞的數量。藉以評估 NLE 抑制肝癌發生的作用與機轉變化，並透過相關的研究，希望對於臨床上罹患肝癌的病人能有所幫助。

柒、參考文獻

1. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR (2008) Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 134: 1752-1763.
2. Ho H-H, Hsu L-S, Chan K-C, Chen H-M, Wu C-H, et al. (2010) Extract from the leaf of *Nucifera* reduced the development of atherosclerosis via inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Food and Chemical Toxicology* 48: 159-168.
3. Wu C-H, Yang M-Y, Chan K-C, Chung P-J, Ou T-T, et al. (2010) Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a *Nelumbo nucifera* leaf flavonoid-rich extract in mice. *Journal of agricultural and food chemistry* 58: 7075-7081.
4. Lin M-C, Kao S-H, Chung P-J, Chan K-C, Yang M-Y, et al. (2009) Improvement for high fat diet-induced hepatic injuries and oxidative stress by flavonoid-enriched extract from *Nelumbo nucifera* leaf. *Journal of agricultural and food chemistry* 57: 5925-5932.
5. Lee HJ, Chen CC, Chou FP, Wu CH, Lai FS, et al. (2010) Water extracts from *Nelumbo Nucifera* leaf reduced plasma lipids and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Food Biochemistry* 34: 779-795.
6. Yang M-Y, Chang Y-C, Chan K-C, Lee Y-J, Wang C-J (2011) Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves inhibits proliferation of breast cancer in vitro and in vivo. *European Journal of Integrative Medicine* 3: e153-e163.
7. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC (2009) *Robbins & Cotran pathologic basis of disease*: Elsevier Health Sciences.
8. Rodriguez-Roisin R, Krowka M, Herve P, Fallon M (2004) Pulmonary–hepatic vascular disorders (PHD). *European Respiratory Journal* 24: 861-880.
9. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) *Aspects of the structure, function, and*

- applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 22: 111-180.
10. Lin C-T, Yeh K-W, Kao M-C, Shaw J-F (1993) Cloning and characterization of a cDNA encoding the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase from sweet potato tuberous root. *Plant molecular biology* 23: 911-913.
 11. Fridovich I (1975) Superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry* 44: 147-159.
 12. Yan T, Oberley LW, Zhong W, Clair DKS (1996) Manganese-containing superoxide dismutase overexpression causes phenotypic reversion in SV40-transformed human lung fibroblasts. *Cancer research* 56: 2864-2871.
 13. Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G (1982) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Research* 42: 1955-1961.
 14. Stallings WC, Patridge KA, Strong RK, Ludwig ML (1984) Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *Journal of Biological Chemistry* 259: 10695-10699.
 15. Kirkman HN, Galiano S, Gaetani G (1987) The function of catalase-bound NADPH. *Journal of Biological Chemistry* 262: 660-666.
 16. Erzurum SC, Lemarchand P, Rosenfeld MA, Yoo J-H, Crystal RG (1993) Protection of human endothelial cells from oxidant injury by adenovirus-mediated transfer of the human catalase cDNA. *Nucleic acids research* 21: 1607-1612.
 17. Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG (1988) Oxidant-induced DNA damage of target cells. *Journal of Clinical Investigation* 82: 1040.
 18. Roxborough HE, Mercer C, McMaster D, Maxwell AP, Young IS (1999) Plasma glutathione peroxidase activity is reduced in haemodialysis patients. *Nephron* 81:

- 278-283.
19. Diplock AT (1991) Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *The American journal of clinical nutrition* 53: 189S-193S.
 20. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 482: 21-26.
 21. Singhal SS, Saxena M, Ahmad H, Awasthi S, Haque AK, et al. (1992) Glutathione S-transferases of human lung: Characterization and evaluation of the protective role of the α -class isozymes against lipid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics* 299: 232-241.
 22. Hayes J, McLeod R, Ellis E, Pulford D, Ireland L, et al. (1995) Regulation of glutathione S-transferases and aldehyde reductase by chemoprotectors: studies of mechanisms responsible for inducible resistance to aflatoxin B1. *IARC scientific publications*: 175-187.
 23. Traka M, Gasper AV, Melchini A, Bacon JR, Needs PW, et al. (2008) Broccoli consumption interacts with GSTM1 to perturb oncogenic signalling pathways in the prostate. *PLoS One* 3: e2568.
 24. Aliya S, Reddanna P, Thyagaraju K (2003) Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer? *Molecular and cellular biochemistry* 253: 319-327.
 25. Ahmad H, Singhal SS, Saxena M, Awasthi YC (1993) Characterization of two novel subunits of the α -class glutathione S-transferases of human liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1161: 333-336.
 26. Kashiwada Y, Aoshima A, Ikeshiro Y, Chen Y-P, Furukawa H, et al. (2005) Anti-HIV benzyloquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure–activity correlations with related alkaloids. *Bioorganic &*

- medicinal chemistry 13: 443-448.
27. Ling Z-Q, Xie B-J, Yang E-L (2005) Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Journal of agricultural and food chemistry* 53: 2441-2445.
 28. Rai S, Wahile A, Mukherjee K, Saha BP, Mukherjee PK (2006) Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *Journal of ethnopharmacology* 104: 322-327.
 29. Liu C-P, Tsai W-J, Lin Y-L, Liao J-F, Chen C-F, et al. (2004) The extracts from *Nelumbo Nucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *Life sciences* 75: 699-716.
 30. Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y (2006) Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 106: 238-244.
 31. Huang CF, Chen YW, Yang CY, Lin HY, Way TD, et al. (2011) Extract of lotus leaf (*Nelumbo nucifera*) and its active constituent catechin with insulin secretagogue activity. *Journal of agricultural and food chemistry* 59: 1087-1094.
 32. Zhangshun G, Jun W, Zelan Y (2003) Effects on water extract of lotus leaf to Improve in Human's Blood Lipids Disorder [J]. *Journal of Chenzhou Medical College* 3: 001.
 33. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol chem* 226: 497-509.
 34. Mukherjee PK, Saha K, Pal M, Saha B (1997) Effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on blood sugar level in rats. *Journal of ethnopharmacology* 58: 207-213.
 35. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95: 351-358.

36. Huang B, Ban X, He J, Tong J, Tian J, et al. (2010) Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extracts of edible lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaves. Food chemistry 120: 873-878.
37. Tietz NW (1995) Clinical guide to laboratory tests: WB Saunders Co.
38. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clinical chemistry 20: 470-475.
39. Keiding R, Hörder M, Denmark WG, Pitkänen E, Tenhunen R, et al. (1974) Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation 33: 291-306.
40. Bergmeyer H, Rich W, Butter H, Schmidt E, Hillman G, et al. (1970) Standardization of methods for estimation of enzyme activity in biological fluids. Z Klin Chem Klin Biochem 8: 658-660.
41. Ernster L, Nordenbrand K (1967) [92a] Microsomal lipid peroxidation. Methods in enzymology 10: 574-580.
42. Lawrence RA, Burk RF (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochemical and biophysical research communications 71: 952-958.
43. Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry 47: 469-474.
44. Aebi H (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymol 105: 121-126.
45. Gupta RC (1984) Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences 81: 6943-6947.
46. Deng L, Lin-Lee Y-C, Claret F-X, Kuo MT (2001) 2-Acetylaminofluorene Up-regulates Rat *mdr1b* Expression through Generating Reactive Oxygen Species That

- Activate NF- κ B Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 276: 413-420.
47. Lin H-Y, Kuo Y-H, Lin Y-L, Chiang W (2009) Antioxidative effect and active components from leaves of Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Journal of agricultural and food chemistry* 57: 6623-6629.
48. IS Young, JV Woodside. (2001) Antioxidants in health and disease. *Journal Clinical pathology* 54, 176-186.
49. Iucker, G. (1995) Influence of glutathione S-transferase B (ligandin) on the intermembrane transfer of bilirubin. Implication for the intracellular transport of nonsubstrate ligands in hepatocytes. *J Clin Invest.*, 96, 1935-1972.
50. Arias, I. M., Fleischner, G., Kirsch, R., Mishkin, S., and Gatmaitan, Z. (1996) In glutathione: Metabolism and function. Raven Press, New York., 20, 175-188.

捌、研究成果圖與表

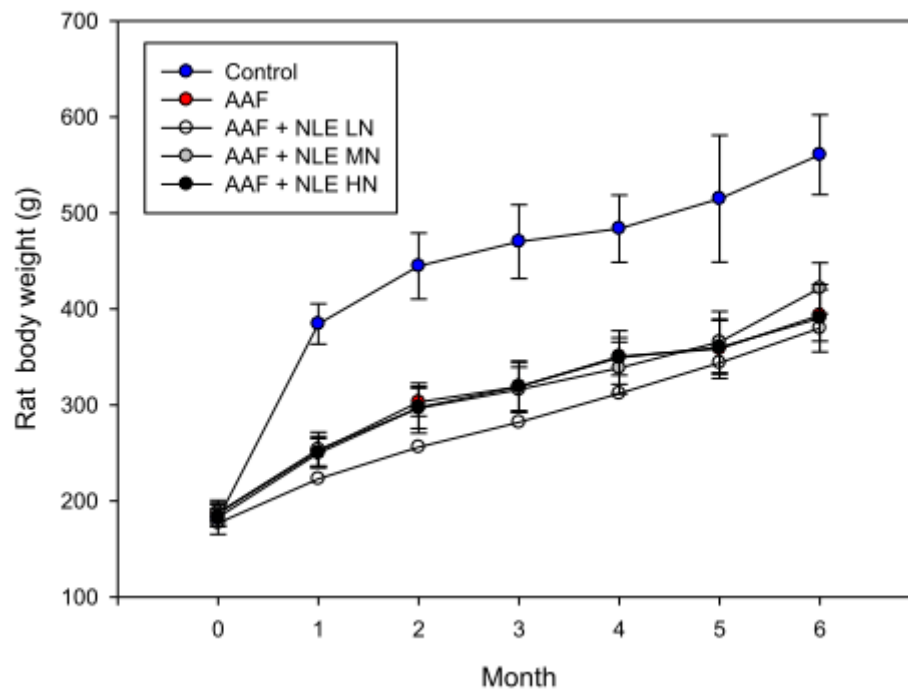


Figure 1. The effect of NLE supplement on body weight in the AAF-induced rats. Wistar rats fed on normal diet (control), normal diet containing AAF (AAF), normal diet containing AAF and NLE 0.125 g/kg (AAF+NLE LN), normal diet containing AAF and NLE 0.25 g/kg (AAF+NLE MN), and normal diet containing AAF and NLE 0.5 g/kg (AAF+NLE HN).

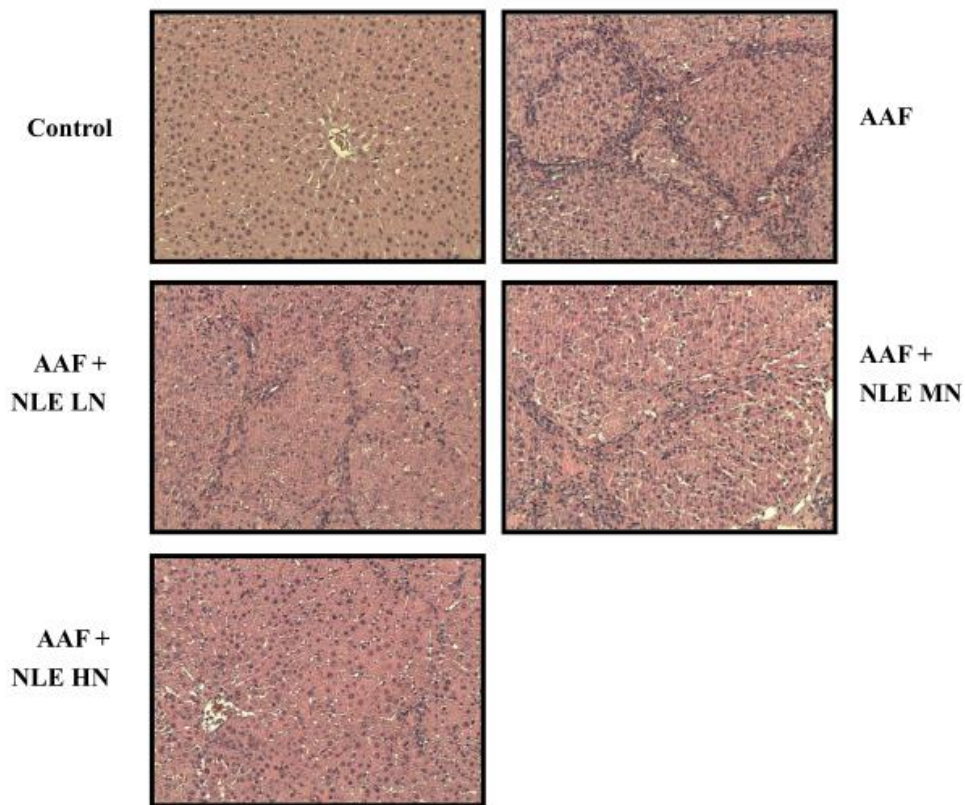
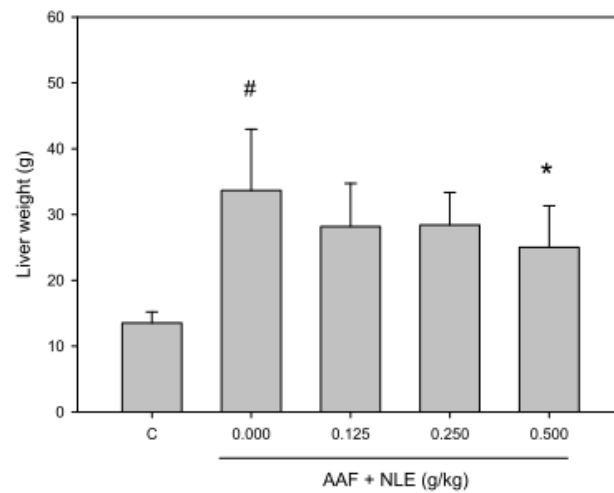


Figure 2. NLE supplement ameliorated the liver fibrosis in AAF-induced HCC. Effects of NLE on AAF-induced liver fibrosis in wistar rats. Rats fed on C, normal diet; AAF; AAF, normal diet containing AAF; AAF + LN, normal diet containing AAF and NLE 0.125 g/kg; AAF + MN, normal diet containing AAF and NLE 0.25 g/kg; and AAF + HN, containing AAF and NLE 0.5 g/kg.

(A)



(B)

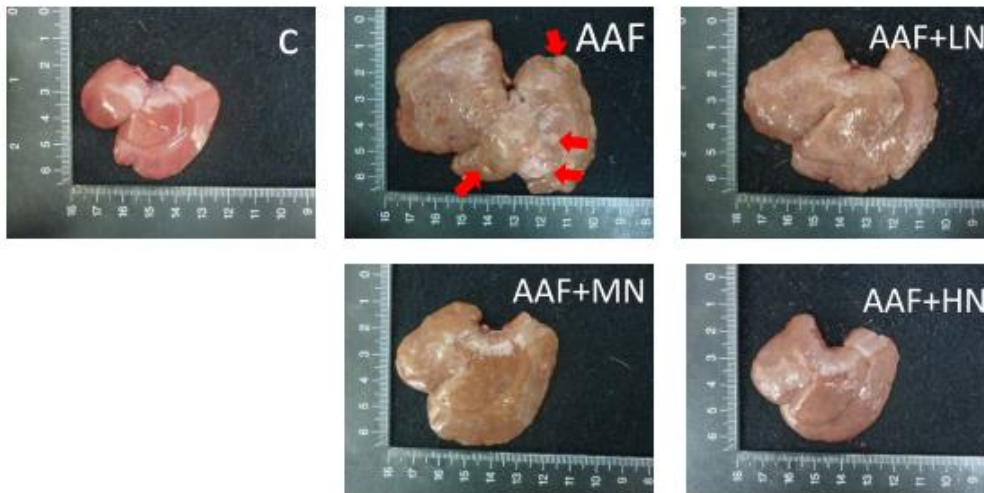


Figure 3. NLE supplement ameliorated the liver appearance in AAF-induced HCC. (A) The liver weight of the AAF-induced rats. Wistar rats fed on C, normal diet; AAF; AAF, normal diet containing AAF; AAF + LN, normal diet containing AAF and NLE 0.125 g/kg; AAF + MN, normal diet containing AAF and NLE 0.25 g/kg; and AAF + HN, containing AAF and NLE 0.5 g/kg. Data are shown as the means \pm SDs; #, $p < 0.05$ as compared with the control group; and *, $p < 0.05$ as compared with the AAF group. (B) Effects of NLE on AAF-induced liver appearance of rats.

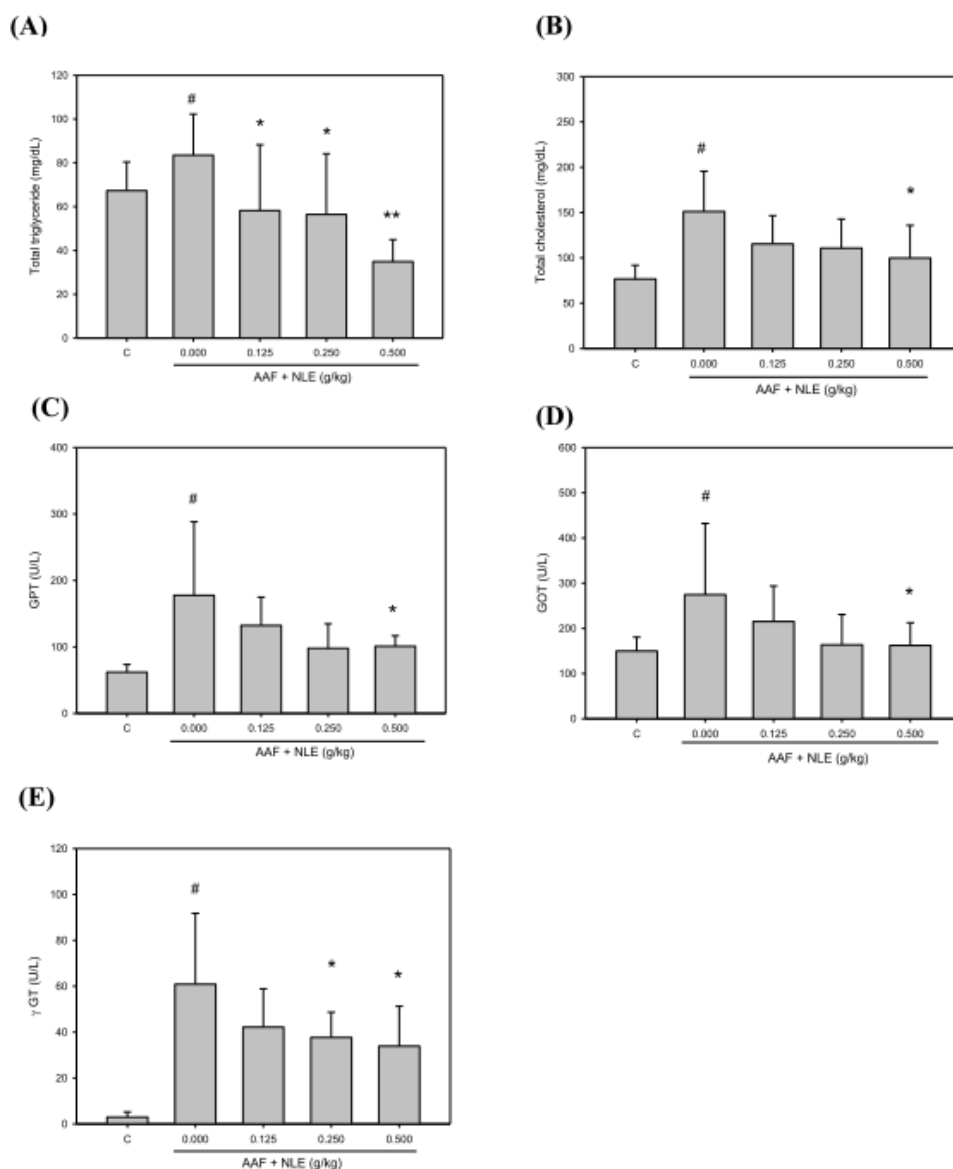


Figure 4. NLE supplement ameliorated the biomarkers expression of hepatic injury and hepatocellular carcinoma. The biomarkers being quantitated were (A) total triglyceride, (B) total cholesterol, (C) GPT activity, (D) GOT activity, and (E) γ -GT level in plasma from AAF-induced rats. C, normal diet; AAF, normal diet containing AAF; 0.125, normal diet containing AAF and NLE 0.125 g/kg; 0.25, normal diet containing AAF and NLE 0.25 g/kg and 0.5, containing AAF and NLE 0.5 g/kg. Data are shown as the means \pm SDs; #, $p < 0.05$ as compared with the control group; *, $p < 0.05$ as compared with the AAF group; and **, $p < 0.01$ as compared with the AAF group.

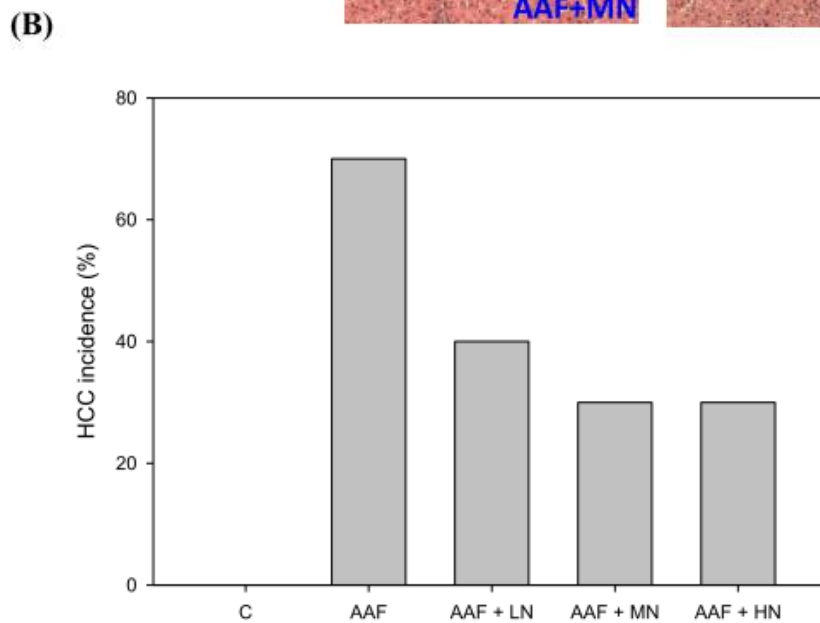
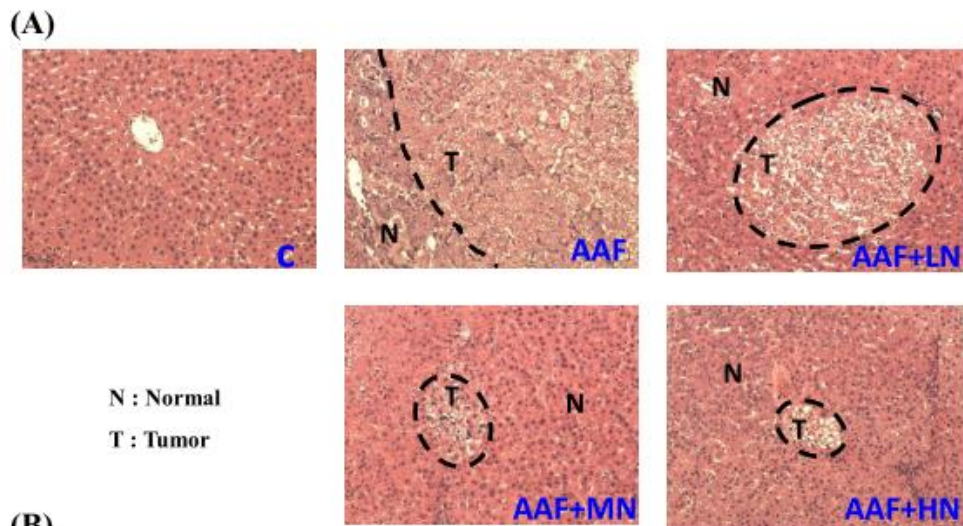


Figure 5. NLE supplement improved the formation of AAF-induced HCC. (A) The sections were stained with H&E and examined by microscope at 100X. N, normal hepatocyte; T, tumor. Livers from Wistar rats fed on C, normal diet; AAF; AAF, normal diet containing AAF; AAF + LN, normal diet containing AAF and NLE 0.125 g/kg; AAF + MN, normal diet containing AAF and NLE 0.25 g/kg; and AAF + HN, containing AAF and NLE 0.5 g/kg were fixed, embedded, and sectioned. (B) The incidence of Hepatocellular carcinoma in AAF-induced Rat.

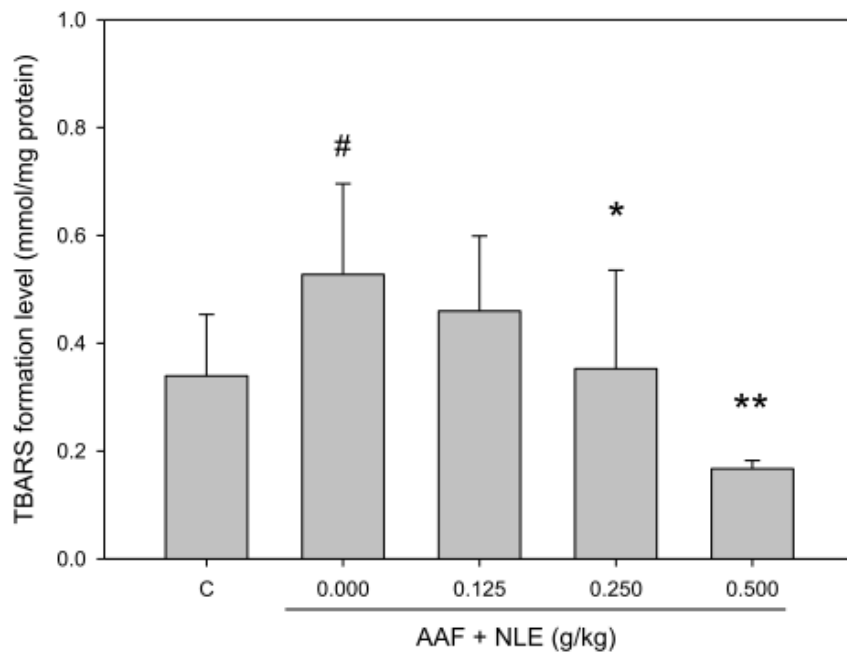


Figure 6. NLE supplement reduced lipid peroxidation in liver in AAF-induced HCC. The levels of TBARS formation in liver was quantitated by spectrophotomic analysis. The crude lipid extracts of liver obtained from Wistar rats fed C, on normal diet; 0.000, normal diet containing AAF; 0.125, normal diet containing AAF + NLE 0.125 g/kg; 0.25, normal diet containing AAF + NLE 0.25 g/kg and 0.5, normal diet containing AAF + NLE 0.5 g/kg were investigated. Data are shown as the means \pm SDs; #, $p < 0.05$ as compared with the normal group; *, $p < 0.05$ as compared with the AAF group, and **, $p < 0.01$ as compared with the AAF group.

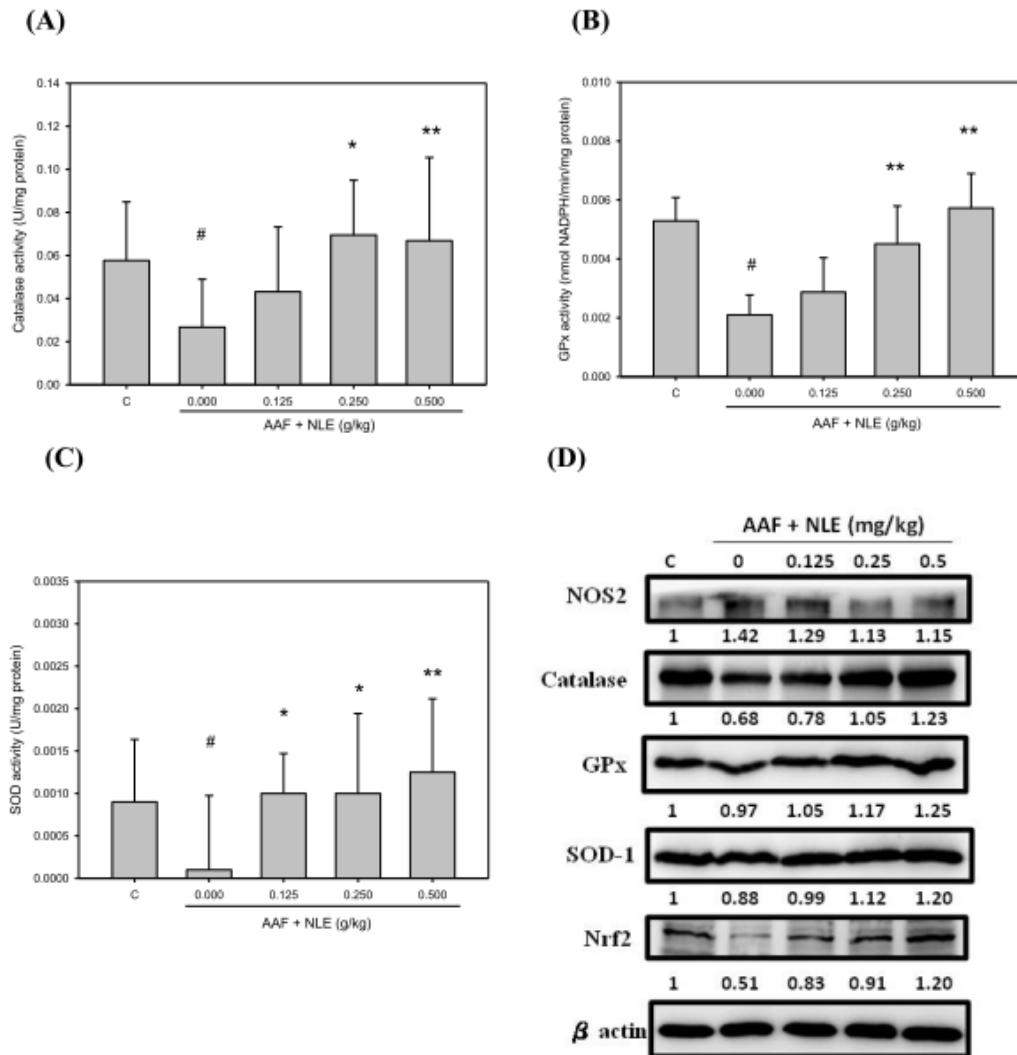


Figure 7. NLE supplement enhanced activation of antioxidant enzymes in liver in AAF-induced HCC. (A) GPx, (B) SOD-1, and (C) catalase enzymatic activity in liver was quantitated by spectrophotometric analysis. The crude extracts of liver obtained from Wistar rats fed C, on normal diet; 0.000, normal diet containing AAF; 0.125, normal diet containing AAF + NLE 0.125 g/kg; 0.25, normal diet containing AAF + NLE 0.25 g/kg; and 0.5, normal diet containing AAF + NLE 0.5 g/kg were investigated. Data are shown as the means \pm SDs; #, $p < 0.05$ as compared with the normal group; *, $p < 0.05$ as compared with the AAF group, and **, $p < 0.01$ as compared with the AAF group. (D) Effects of NLE on antioxidant enzymes expression in rats with hepatic fibrosis. The liver tissue extracts of control group, AAF group, AAF + NLE 0.125 g/kg group, AAF + NLE 0.25 g/kg group, and AAF + NLE 0.5 g/kg group, were subjected to Western blot to analysis NOS2, catalase, GPx, SOD-1, and Nrf2 expression. The levels of these proteins were subsequently quantitated by densitometric analysis with that control being 100%. Data were presented as mean \pm SD from three independent experiments.

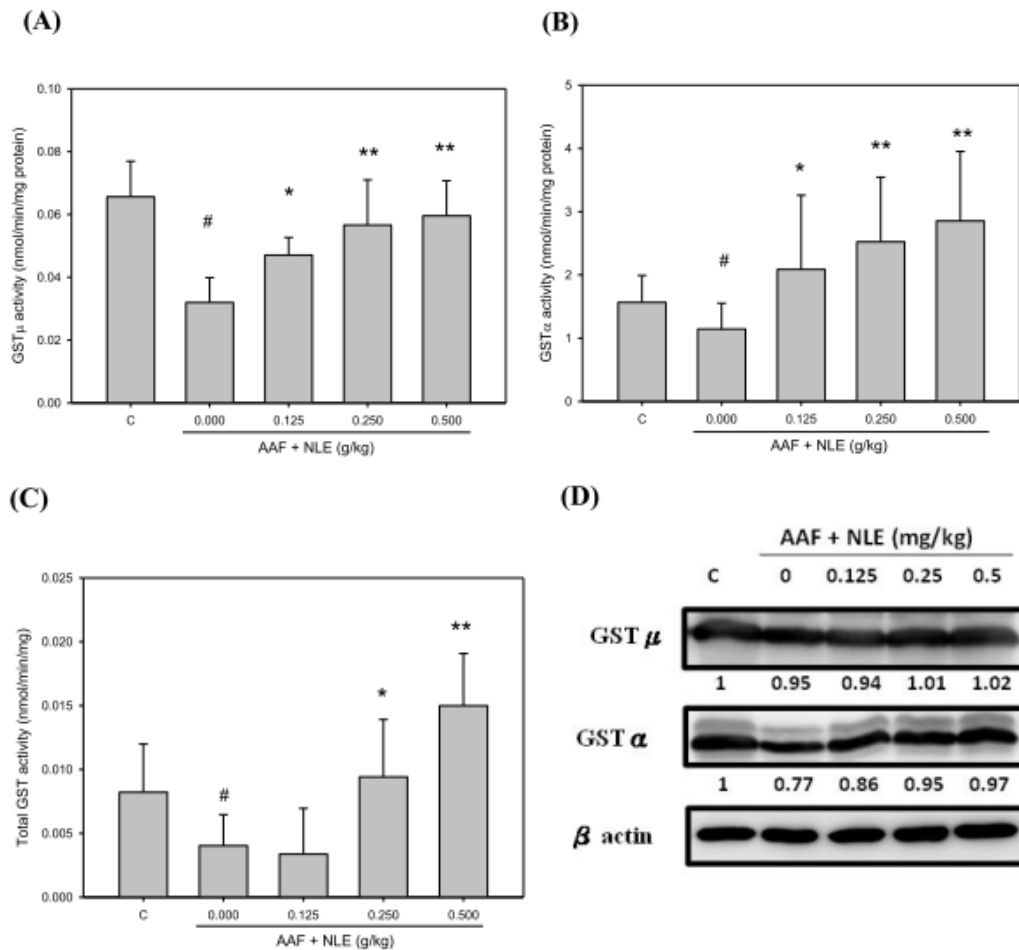


Figure 8. NLE supplement enhanced the activation of GSTs in liver in AAF-induced HCC. The crude extracts of liver obtained from Wistar rats fed on C, on normal diet; 0,000, normal diet containing AAF; 0.125, normal diet containing AAF and NLE 0.125 g/kg; 0.25, normal diet containing AAF and NLE 0.25 g/kg, and 0.5, normal diet containing AAF and NLE 0.5 g/kg were investigated. The levels of (A) GST- μ , (B) GST- α , and (C) GST-total enzymatic activity was quantitated by spectrophotometric analysis. Data are shown as the means \pm SDs; #, $p < 0.05$ as compared with the normal group; *, $p < 0.05$ as compared with the AAF group, and **, $p < 0.01$ as compared with the AAF group. (D) Effects of NLE on detoxifying enzymes expression in rats with hepatic fibrosis. The liver tissue extracts of control group, AAF group, AAF + NLE 0.125 g/kg group, AAF + NLE 0.25 g/kg group, and AAF + NLE 0.5 g/kg group, were subjected to Western blot to analysis GST μ , and GST α expression. The levels of these proteins were subsequently quantitated by densitometric analysis with that control being 100%. Data were presented as mean \pm SD from three independent experiments.

CONCLUSION

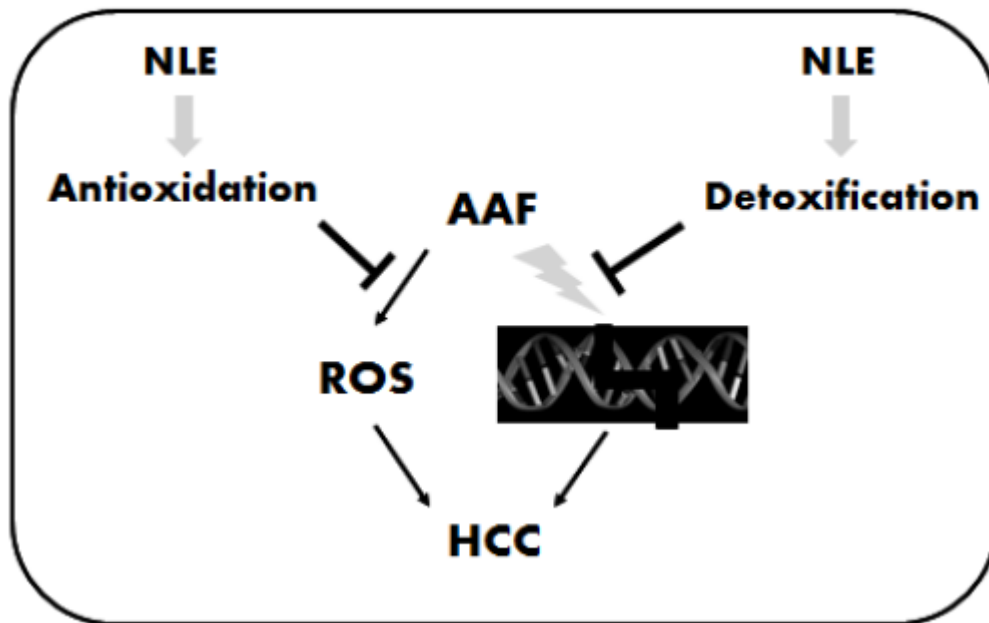


Figure 9. Schematic diagram illustrating the mechanism of NLE inhibits hepatic tumorigenesis *in vivo*.

第三年度研究報告

壹、中文摘要

關鍵字：荷葉黃酮、人類肝癌細胞、細胞凋亡、致死性自噬作用、抗肝癌作用

本研究第一年證明 NLE 可以抑制酒精性脂肪肝和酒精性肥胖形成的機轉，並發表於 *Food Funct.*, 2014, 5, 678；第二年探討 NLE 抑制肝纖維化及肝癌之作用。研究首先利用化學致癌物質 AAF 誘導大鼠產生肝癌的模式，證明 NLE 有效地減緩肝癌的生成作用。NLE 是透過增加肝臟之解毒功能，增加 GST 的活性，及增加肝臟的抗氧化酵素活性，如 SOD、GSH-peroxidase 及 catalase，來達到保護肝臟，抑制肝癌的發生。第三年再利用人類肝癌細胞株驗證 NLE 抑制肝癌生成之作用。從結果證明 NLE 確實可以抑制人類肝癌細胞株 Huh7 與 Hep3B 的生長。進一步分析 NLE 所造成的細胞死亡形式，透過細胞凋亡雙染分析試驗 (Annexin V/PI stain) 與 caspase 3 的活化證實 NLE 誘導人類肝癌細胞株走向細胞凋亡 (apoptosis)。而從 DCFH-DA 分析與 JC-1 染色發現 NLE 會導致細胞內粒腺體功能異常，造成粒腺體膜電位的改變，進而產生過量的 ROS 累積，促進肝癌細胞的死亡。從蛋白表現量觀察到 NLE 造成 Huh7 細胞凋亡的過程中，p53 扮演重要的角色，再透過 Bax/Bak 造成粒線體膜電位的改變，推測 NLE 會透過活化 p53/Bax/Bak 路徑導致肝癌細胞的凋亡。另外，透過顯微鏡觀察發現 NLE 加入後會導致細胞內產生大量液泡，與細胞自噬作用 (autophagy) 的狀態雷同。並由 Acridine orange stain 分析發現，NLE 可以誘導 Hep3B 細胞 acidic vesicular organelles 之產生。而觀察細胞自噬作用相關蛋白 (LC3, ATG5, Beclin) 也證實 NLE 確實會誘導 Hep3B 產生自噬作用，推測 NLE 也可以透過細胞自噬作用導致肝癌的細胞凋亡。總和以上結果，NLE 可以增加肝臟的抗氧化能力與解毒功能而減緩 AAF 誘導的肝癌生成，並且透過 p53/Bax/Bak 路徑造成肝癌細胞株粒線體膜電位的改變並調控細胞自噬作用產生，利用這兩種方式導致肝癌細胞的凋亡進而達到抑制肝癌生成之作用，推測 NLE 可能具有幫助病患減輕肝癌惡化之潛力。

貳、英文摘要

In first year, our results revealed that NLE significantly reduced the lipid accumulation, prevented oxidative stress, facilitated anti-inflammation, suppressed lipid synthesis, increased fatty acid transportation and stimulated fatty acid oxidation by regulating the activation of AMPK, suggesting that NLE could potentially be developed as a natural agent for preventing NAFLD and AFLD (Food Funct., 2014, 5, 678). In second year, we found that dietary administration of NLE had markedly suppressed AAF-induced liver cancer incidence in wistar rats. NLE increased detoxification and antioxidant enzyme in liver of AAF-induced rat. In this year, we demonstrated that NLE induced cell death in human hepatocellular carcinoma cell, Huh7 and Hep3B, by MTT assay, Annexin V/PI stain and Caspase activation. Reactive oxygen species (ROS) production as side products of the electron transport chain, causing mitochondrial damage. NLE treatment induced cellular ROS accumulate and mitochondrial dysfunction by DCFH-DA and JC-1 analysis in Huh7 and Hep3B. In our study, NLE induced mitochondrial membrane potential loss and apoptosis through activation of p53/Bax/Bak pathway which is similar to ER stress-induced cell death. We presented evidence that NLE also promoted acidic vesicular organelles formation by Acridine orange stain and activated Beclin/ATG5/LC-3 pathway, which is sufficient to induce autophagic cell death in Hep3B cell. These results indicated that the NLE might be a plausible treatment for patients with HCC.

Keywords: flavonoids-rich extracts of *Nelumbo Nucifera* leaf, human hepatocellular carcinoma cell line, apoptosis, autophagy, anti-hepatocarcinogenesis.

參、報告內容

3-1. 肝癌

肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma, 簡稱肝癌)在醫學界被認為是最具挑戰性的惡性疾病,世界衛生組織(WHO)的最新統計,肝癌是全球第六大常見的癌症,也是癌症死亡的第三位原因,每年死亡人數超過60 萬人,其中八成出現在亞洲與非洲國家。根據中華民國衛生署國民健康局的2011年資料顯示,惡性腫瘤患者死亡中排名第二。台灣每年約有8 千個新增肝癌病例,每年約有7 千人死於肝癌[5]。誘導肝癌發生可能的主要因素有: 1. B型肝炎病毒: 在亞洲和非洲流行地區, B型肝炎感染的傳播主要是經由母親垂直傳染給新生兒, 高達90%的感染者會演變成慢性感染, B型肝炎會頻繁地嵌入到宿主的DNA中。台灣是B型肝炎的盛行區, B型肝炎帶原者約占15~20%。B型肝炎感染者易產生肝癌的風險包括: 男性或年齡超過50歲[6]、已經感染很長一段時間、有肝癌家族史、有接觸過黃麴毒素、喝酒、抽菸、合併感染C型肝炎或合併感染D型肝炎病毒(hepatitis delta virus)、高B型肝炎病毒量及B型肝炎基因型C (genotype C)等[7-8]。 2. C型肝炎病毒: 根據流行病學相關研究指出, C型肝炎帶原者罹患肝癌的機率是非C型肝炎帶原者肝癌的機率15至20倍[9]。C型肝炎感染者易造成肝癌的風險包括: 感染時的年齡大、男性、與人類免疫缺陷病毒(HIV)或B型肝炎合併感染、患有糖尿病或肥胖的人有關[10-11]。 3. 酗酒(定義為每天攝入60克以上酒精): 長期大量飲酒者罹患肝癌比未酗酒者高出1.5至2.0倍風險[12]。 4. 肝硬化: 肝硬化可能是肝癌的先兆, 也可能是造成肝癌之原因。最近有研究指出門脈壓力肝硬化程度和肝癌發生率有線性關係[13-14]。 5. 肝毒性物質: 能使肝臟受損之毒性物質, 其中最具代表性是由黴菌所產生的黃麴毒素B1。 6. 肥胖/糖尿病/非酒精性脂肪化肝炎(NASH): 肝臟細胞的氧化作用, 而造成肝細胞膜本身脂質發生過氧化作用, 並誘發炎性細胞激素以及氧自由基的釋放, 導致肝臟進一步發生壞死性炎症以及潛在性的肝硬化, 易造成肝癌的產生[15-17]。 7. 其他因素: 遺傳性血鐵沉澱(hemochromatosis)、 α 1-抗胰島蛋白酶缺乏症、自體免疫性肝炎、紫質症和威爾森式症等亦有相關報告與肝癌有

關。目前對於初期小型肝癌最佳治療方式為外科治療，但肝癌早期症狀不明顯，如未持續追蹤檢查，常不易及早發現，以至於肝癌確診通常已經無法接受外科手術治療[18]。而對於無法接受外科手術的病人化學治療仍有其可行性，但化學藥物所引發的副作用及肝癌細胞的抗藥性，使得治療效果不如預期。

3-2. 細胞凋亡 (cell apoptosis)

多細胞生物體內細胞的增生與死亡就像天秤的兩端，仰賴兩者間的動態平衡來維持著細胞數量上的衡定。細胞死亡的方式有好幾種，但是以細胞壞死 (necrosis) 和細胞凋亡 (apoptosis) 這兩種最為主要與常見，前者屬被動式死亡，通常是由嚴重的物理化學傷害所造成，例如：pH 值極端改變、高溫或缺氧等，造成細胞膜通透性發生改變而使細胞急速地膨脹或破裂而死亡[19]，是一種非專一性的死亡方式。而細胞凋亡發生於細胞在正常的生理成長階段或受到外力刺激時，皆可透過基因或蛋白的調控來主動且耗能地讓細胞有計畫性的邁入死亡，這樣的過程是漸進有程序性的，所以並不會造成身體或組織的太大負擔，也並不會引發過量不必要的免疫反應，因此又稱程序性的細胞死亡 (programmed cell death)[20]。在正常的生理狀況，例如在胚胎的型態發育 (morphogenesis) 和免疫系統的發育過程中，生物體可透過適度的細胞凋亡將多餘的細胞或會辨認自身抗原的免疫細胞移除，來維持器官組織的正常以及避免自體免疫疾病 (autoimmune disease) 的產生[21]。但若細胞凋亡過度時，大量的細胞死亡會破壞細胞的衡定進而產生疾病[22]，例如神經退化疾病、阿茲海默症 (Alzheimer's disease)、帕金森氏症 (Parkinson's disease) 以及後天免疫不全症後群 (AIDS) 等，相反的，若細胞中凋亡反應受到不當的抑制時，往往是癌症的前兆，因此現今針對治療腫瘤的藥物研究方向，多是朝向誘導腫瘤細胞內的細胞凋亡路徑來達到殺死癌細胞的目的。

在細胞凋亡的發生過程中，細胞型態上的改變是淺而易見的。初期的特徵為 Phosphatidylserine (PS) 由細胞膜內翻至膜外的表層，此時可利用 Annexin VI/PI 雙染技術來區分正常、凋亡或壞死細胞。而進入凋亡後期時，細胞內的核酸內切

酶(endonuclease)會將 DNA 裂解成不同倍數的 180 – 200 bp 左右的片段 (DNA fragmentation)，造成細胞核內的染色質濃染 (chromatin condensation)、細胞皺縮 (cell shrinkage)、細胞質中胞器聚集以及細胞膜產生泡狀邊緣 (membrane blebbing)，最後細胞膜會將各種胞器及 DNA 片段包覆形成凋亡小體 (apoptotic bodies)[23]，隨後被鄰近的巨噬細胞吞噬清除以避免細胞發炎反應產生。

細胞凋亡的訊息傳遞路徑

細胞凋亡的過程是受到嚴密地調控，而其中所涉及的蛋白質非常繁雜，因此也造成細胞凋亡之訊息傳導路徑的多樣性。簡單而言，細胞凋亡的機制可分為兩種；死亡受體活化之訊息路徑又稱外在路徑 (death receptor pathway；the extrinsic pathway) 以及粒線體調控路徑又稱內在路徑 (mitochondria associated pathway；the intrinsic pathway)，此兩種途徑皆會活化 caspase，而活化的 caspase 可切割細胞受質導致細胞生化及型態學的改變而凋亡[24]。

死亡接受體活化之訊息路徑(death receptor pathway)

死亡接受體是一群鑲嵌在膜上的蛋白，屬於 TNFR (tumor necrosis factor receptor) 家族基因，包括 Fas (Apo-1/CD95)、DR4 (TRAIL-R1)、TNFR1 以及 TNFR2，此家族的蛋白皆含有相似 domain 及大量的胱氨酸 (cystine)，除此之外，在細胞質的內側部分皆含有 death domain [25]，可連接細胞內連結蛋白 (intracellular adaptor protein)，來傳達一連串的死亡訊息。以 Fas/FasL (CD95/CD95L) 路徑為例，當 Fas 與 FasL 結合會活化 Fas receptor 進行 trimerization，並吸引 FADD (as associating protein death domain) 結合至細胞質的內側之 death domain 上，隨後 FADD 則會吸引多分子的 procaspase-8 與其形成一複合體 DISC (death-inducing signaling complex)，透過改變 procaspase-8 的構形來促使其活化，最後具有活性的 caspase-8 便會活化下游的 caspase-3、caspase-7 和 caspase-6 [26]，此外 caspase-8 的活化也會促使 Bcl-2 家族的 Bid 裂解成 t-Bid，進而影響粒線體的膜電位，導致 cytochrome c 的釋放而活化了 caspase-3 及 caspase-9 [27]，最後的結果都會造成細胞凋亡。

粒線體調控路徑 (mitochondria associated pathway)

當細胞受刺激而造成DNA受損、鈣離子濃度失衡、ROS (reactive oxygen species) 大量產生或是接收到死亡接受體活化的下游訊息時，會改變粒線體膜的通透性 (mitochondria membrane permeabilization) 導致粒線體膜電位差 (mitochondria transmembrane potential) 的瓦解，而使得粒線體內的促凋亡蛋白大量釋放到細胞質中，例如cytochrome c [28]、Smac/Diablo [29]、AIF (apoptosis inducing factor) [30] 以及EndoG (endonuclease G)[31] 等，其中cytochrome c 與Smac/Diablo 可促使凋亡小體 (apoptosome, Apaf-1/cytochrome c/caspase-8 complex) 的產生，進一步活化下游 caspase-3 而導致細胞凋亡，此種屬caspase-dependent cell death。而另一種不須經由 caspase (caspase-independent cell death) [32]的粒線體死亡訊息是透過 AIF 和 EndoG 從粒線體釋放到細胞質，再由細胞質移動至細胞核內將 DNA 片段化[33]，導致細胞凋亡。由上述可知經粒線體引起的細胞凋亡主要是因為粒線體膜的通透性及電位差改變而造成。過去研究發現，細胞內有一群分佈在細胞質粒線體外膜、內質網膜以及細胞核膜上的蛋白家族；稱Bcl-2 家族，其主要功能即是調控粒線體膜的完整性[34]。Bcl-2 家族因其功能以及含有的BH domain 不同而分為三類成員：(a) 抑制細胞凋亡蛋白群：Bcl-2、Bcl-X_L 和Mcl-1，(b) 多區塊促細胞凋亡蛋白群：Bax、Bak，(c) 單區塊促細胞凋亡蛋白群：Bad、Bid 和 Bim。細胞內藉由此三類蛋白間的交互作用來調控粒線體膜的變化，在正常情況下，促凋亡蛋白和抑制凋亡蛋白的表現量會維持平衡狀態，但若此平衡遭破壞則會影響細胞正常的生長及死亡。例如當Bcl-2 表現量大於Bax 時，Bcl-2 便可藉由與Bax 形成異二聚體 (heterodimer)來抑制細胞凋亡，但若細胞受死亡訊號刺激而使Bax 的蛋白表現增加時，Bax 便可自行形成同二聚體(homodimer) 且結合到粒線體膜上形成孔洞，改變粒線體通透性及膜電位進而促進細胞凋亡。另外，死亡接受體活化後亦可透過caspase-8 切割 Bid，使其形成活化態t-Bid 後進一步結合上粒線體進而改變其通透性，促使細胞凋亡。

細胞凋亡執行者- caspase 家族

Caspase 全名為 cysteine dependent aspartate specific protease，為胱氨酸蛋白酶家族，目前已發現有 14 種 caspase，其中大多參與細胞凋亡過程[35]。在細胞內 caspase 以非活化態 proenzyme 的形式存在，當細胞接受到死亡信號後就會切割成為活化態進而促進凋亡。而 caspase 因角色不同可主要分為兩類，分別為啟動者(initiator caspase, caspase-8、caspase-9) 和執行者 (effector caspase, caspase-3、caspase-6 和 caspase-7)，啟動者功能為接受死亡信號並促進並活化下游的執行者，而活化後的執行者則會直接裂解細胞內某些蛋白，如負責 DNA 修補功能的 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 使得 PARP 功能喪失，或是活化 DNA 水解酶 (如 caspase-activated DNase) 造成 DNA 不正常斷裂最後導致細胞凋亡。

3-3. 自體吞噬(autophagy)

當細胞遭受壓力，例如飢餓、紫外光照射、缺氧、自由基和藥物刺激等，都會引發自體吞噬(autophagy)，當細胞走向自體吞噬時，細胞膜或內直往的膜會形成雙層膜接上許多蛋白質和脂類的物質，之後藉由這雙層膜將胞內蛋白質或胞器包裹住而形成自噬小體(autophagosome)，隨後自噬小體再與溶酶體(lysosome)融合形成自噬溶酶體(autolysosome)，藉由溶酶體內的酵素將包裹住的蛋白質或胞器消化分解達到回收再利用的目的，且可與細胞凋亡一同調控細胞的生長與死亡 [36]。

3-4. 荷葉黃酮萃取物(NLE)

荷葉學名 *Nelumbo Nucifera*，英文名 East Indian Lotus，荷葉為多年水生草本植物蓮的葉片，目前知道荷葉含有多種生物鹼[37]、抗氧化物質類黃酮[38, 39]，以及維生素C、酒石酸、枸橼酸、蘋果酸、草酸、琥珀酸、葡萄糖酸、鞣質，另外還含有抗有絲分裂的鹼性成分[40]。

荷葉茶以減輕體重著名，荷葉水萃物可以預防體重增加，抑制脂肪和碳水化合物吸收，加速脂質代謝以及提高能量消耗率[41]。亦有文獻指出，荷葉可以增加胰島素的分泌並調節血糖，具有改善高血脂症及非胰島素依賴型糖尿病的效果

[42]，荷葉也能輔助降血壓[43]、預防動脈硬化[43,44]、抗發炎[45]進而達到控制脂肪肝的形成[46]，此外，荷葉也具有保護肝以及抗氧化的活性[47]。

肆、研究材料與方法

4-1. 荷葉黃酮萃取物(NLE)之製備

秤取 200 克乾燥荷葉粉末，以五公升之二次水攪拌一小時，放置於冷房浸泡至隔夜後，再以濾紙抽氣真空過濾，收集濾液於 40°C 下減壓濃縮，再以真空冷凍乾燥去除水份，得乾燥之萃取物，即為荷葉黃酮萃取物(NLE)。實驗時，以乾燥粉末稱重，配取不同濃度 NLE。使用於細胞實驗操作之 NLE 配製的各濃度溶液需先經 0.22 μm filter 過濾除菌。

4-2. NLE 促進肝癌細胞死亡之試驗

4-2-1. 細胞培養 (cell culture)

本實驗所使用的細胞株來自食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心購買之人類肝癌細胞株 Hep3B 與 Huh7。Hep3B 培養於 minimum essential medium (MEM) 培養液中，培養液中含 10% fetal bovine serum (FBS)、1.5 g/L sodium bicarbonate、2 mM L-glutamine 與 1 mM penicillin/streptomycin。而 Huh7 培養於 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培養液中，其中含 10% fetal bovine serum (FBS)、2 mM L-glutamine 與 1 mM penicillin/streptomycin。所有細胞均培養在維持 5% CO₂、37°C 的恆溫環境。依細胞生長速度而定，更換培養液的時間及次數，原則上每 2-3 天更換一次。

4-2-2. 細胞毒性試驗 (MTT assay)

本實驗是用於測試細胞對於 NLE 的感受度是如何，以決定後續細胞實驗所選用 NLE 之劑量。此法是根據 Alley 等人所研究的結果所設計之實驗，其原理為在有活性的活細胞會將 MTT (thiazolyl blue) 經由粒腺體中 dehydrogenase 作用代謝還原為藍紫色結晶，之後再以異丙醇將結晶溶出，並於波長 563 nm 下測定溶液吸光值變化，由吸光值的大小可得知存活的細胞數目之多寡，而死細胞是無法進行此作用，因此若溶液的吸光值有降低的話，表示細胞有死亡或無法代謝 MTT reagent 的情形[48]。將人類肝癌細胞株 Hep3B 或 Huh7 細胞 (5×10^4 cell/well) 養於 24 well 培養皿中，再以不同濃度的 NLE (0.5, 1, 2, 3 與 4 mg/mL) 處

理 24 小時後，移除舊的培養基(含萃取物)，加入新的培養基和 MTT 試劑(0.5 mg/mL) 混合反應 4 小時，移除培養基，加入異丙醇將結晶溶出，在 OD 563 nm 下測吸光值的變化。

4-2-3. 細胞週期分析 (cell cycle analysis)

Propidium iodide (PI) 能與核酸(包含 DNA 與 RNA) 結合，在以雷射光 488 nm 波長的激發下可放出橘紅色波長的螢光。而流式細胞儀則利用壓力將待測細胞在鞘液的包圍之下呈單行排列，依次通過雷射照射區，由雷射光源激發出 488 nm 波長的光波打在細胞上，會依細胞的不同特性而產生不同的螢光強度與光散射，在雷射光束垂直的 90 度位置收集紅色螢光訊號 (617 nm)，可偵測細胞中染上 PI 的 DNA 含量。將人類肝癌細胞株 Hep3B (1×10^7 cell/100 mm dish) 加入不同濃度的 NLE 後 24 小時，先以 PBS 清洗數次，再利用 0.5% trypsin-EDTA 與細胞作用，使細胞與培養皿脫離，離心去除上清液，沉澱物即細胞。隨即將細胞打散後加入 1 mL 事先保存於 -20°C 的 70% 乙醇固定細胞，最少 12~16 小時。分析前先將檢體離心去除乙醇，再以 PBS 清洗，離心後取沉澱物。將細胞輕彈打散，加入 1 mL 的 PI 染劑(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A, 0.1% triton-X 100)，於室溫下避光染色 15 分鐘，以流式細胞儀分析，藉以觀察 NLE 是否具有影響 Hep3B 之細胞週期的能力。

4-2-4. 細胞凋亡雙染分析試驗 (Annexin V-PI stain)

磷脂絲胺酸(Phosphatidylserine, PS) 正常位於細胞膜的內側，但在細胞凋亡的早期，PS 會從細胞膜的內側翻轉到細胞膜外，暴露在細胞膜外的環境當中。而 Annexin V 是一種 Ca^{2+} 依賴性磷脂質結合蛋白，能與 PS 具有特異性的結合。將 Annexin V 進行螢光素(FITC) 或 biotin 標記後，以標記過的 Annexin V 作為螢光探針，利用流式細胞儀或螢光顯微鏡可檢測細胞凋亡的發生。碘化丙啶(propidium iodide, PI) 則是一種核酸染劑，它不能通過細胞膜，但在凋亡中晚期的細胞(late apoptosis) 和壞死細胞(necrosis)，PI 則能夠透過不完整細胞膜而使細胞內的 DNA 染色。因此將 Annexin-V 與 PI 配合，就可以評估細胞死亡的形式

[49,50]。將人類肝癌細胞株 Hep3B 或 Huh7 細胞 (1×10^7 cell/100 mm dish) 加入不同濃度的 NLE 後 24 小時，先以 PBS 清洗 2 次，加入 100 μ L Binding Buffer 和 5 μ L 的 Annexin V-FITC 染劑，再加入 5 μ L 的 PI (100 μ g/mL) 避光反應 15 分鐘後，加入 400 μ L Binding Buffer，立即用流式細胞儀分析，同時以不加 Annexin V-FITC 及 PI 的細胞作為陰性對照。

4-2-5. 粒線體膜電位變化 (JC-1 stain)

粒線體膜電位改變 (mitochondria permeability transition) 具有釋放數種蛋白並左右細胞凋亡的能力。當粒線體的 Ca^{2+} 濃度過高、氧化壓力 (oxidative stress) 增加、或粒線體膜電位降低時，會增加粒線體膜的通透性，使得膜內蛋白會被釋放到細胞質，包括 cytochrome c，Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein)，AIF (apoptosis inducing factor)，和 endonuclease G，並誘發下游 caspases 等一連串反應，而使細胞走向細胞凋亡 (apoptosis)。利用親脂性、些微帶正電、極低毒性的螢光染劑 JC-1 來偵測粒線體的去極化。在健康的細胞裡，帶正電 JC-1 分子會進到帶負電的粒線體內，且聚集成多體 (J-aggregates)，此時 JC-1 發紅色螢光。當膜電位下降，也就是細胞進行細胞凋亡的早期，JC-1 會變成單體 (monomer)，且螢光變成綠色。因此，可以很輕易地藉由紅色 (沒有進行細胞凋亡) 與綠色 (細胞凋亡) 來判斷細胞是否進行細胞凋亡。將人類肝癌細胞株 Huh7 或 Hep3B 細胞 (1×10^7 cell/75T flask) 加入不同濃度的 NLE 後 24 小時，先以 trypsin 將細胞拆下並以 PBS 清洗 2 次，再加入含有 10 μ g/mL JC-1 染劑的細胞培養液，在培養箱中反應 30 分鐘，以 PBS 清洗 2 次後，立即用流式細胞儀分析，同時以不加 JC-1 染劑的細胞作為陰性對照。

4-2-6. 細胞內氧化壓力的變化 (DCFH-DA stain)

活性氧化物 (ROS) 為具有高度氧化力的分子。它的生成可能來自於細胞內或細胞外的物質所誘發。研究指出 ROS 在訊息傳遞過程中扮演著很重要的角色，目前所知 MAPK 的家族如 ERK、JNK 以及 p38 等皆可受到 ROS 所調控。磷

脂氫穀胱甘肽過氧化物酶(PHGPx)是目前已知能直接保護細胞膜免受過氧化損傷的唯一酶類，它具有極強的抗氧化作用而且可能參與調節細胞的訊息傳遞。

DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)是目前用來測量細胞內 ROS 的含量之常用的化學螢光物質，DCFH-DA 能夠自由通透細胞膜，當 DCFH-DA 進入細胞後，會被細胞內的酯解酶(esterase)作用變成 DCFH，此時 DCFH 因無法自由通透細胞膜而留在細胞內。DCFH 會被細胞內的 ROS 氧化成 DCF，若以 450~490 nm 波長的光束激發，則可放射出 515~550 nm 波長的螢光，因此可利用流式細胞儀來測量細胞內螢光的含量，並推算細胞內 ROS 的多寡。將人類肝癌細胞株 Huh7 或 Hep3B 細胞 (1×10^7 cell/75T flask) 加入不同濃度的 NLE 後 24 小時，先以 trypsin 將細胞拆下並以 PBS 清洗 2 次，再加入含有 $1 \mu\text{M}$ DCFH-DA 之細胞培養液於 37°C 下作用 30 分鐘，之後用 PBS 洗兩次以去除細胞外多餘的 DCFH-DA，以流式細胞儀分析螢光反應變化。

4-2-7. 酸性囊狀胞器產生 (AVO stain)

當溶酶體與自噬泡融合之後，可以藉由溶酶體內的酵素消化自噬泡所包裹的胞器或蛋白質，此時酸性囊泡內的 pH 質呈酸性，這個構造也被稱為為 AVO (acidic vesicular organelles)。在活體狀態下，AVO 可吞嚥 acridine orange (AO) 染劑，利用螢光顯微鏡可觀察到橘紅色螢光的小顆粒，可作為判定細胞自噬作用發生的指標之一。將人類肝癌細胞株 Hep3B 細胞經不同濃度的 NLE 處理 24 小時後，以 trypsin 將細胞拆下並以 PBS 清洗 2 次，再加入含有 $5 \mu\text{g/mL}$ acridine orange 染劑的細胞培養液，在培養箱中反應 30 分鐘，以 PBS 清洗 2 次後，立即用流式細胞儀分析。

4-2-8. 西方墨點法 (western blotting)

將加藥處理後的細胞收集，加入細胞溶解緩衝液(RIPA buffer)及蛋白質水解酶抑制劑(proteinase inhibitors)，在 4°C 下進行均質化，再以 4°C 高速離心 10000 rpm 20 分鐘，並利用不同濃度的胎牛血清蛋白(bovine serum albumin,BSA)畫出之標準曲線，定量各組蛋白並以濃度 $50\text{-}70 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 加入去離子水補充樣品體積後加

入五倍的 loading dye 混合均勻並以以 95°C 加熱 10 分鐘，迅速至入冰中冷卻，以離心機將 Sample spin down 後再 loading 至電泳槽膠片上每個 well 中，其上層膠以 80 伏特，下層以 100 伏特進行電泳，待電泳結束後接者進行蛋白質的轉漬至 nitrocellular paper 上，完成轉漬後以 5% 脫脂牛奶於室溫下進行 blocking 1 小時，以 washing buffer (TBS with 0.5 % tween-20) 沖洗 3 次，將 NC paper 移至於 4°C 冰箱中與初級抗體反應 overnight，再以 washing buffer 沖洗 3 次後，以分別經二級抗體反應 1 小時，以 washing buffer 沖洗 3 次，最後加入 Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus 反應 1 分鐘後，於冷光螢光數位影像分析儀 (LAS-4000 plus system) 顯影觀察並定量。

4-2-9. 統計分析

細胞實驗過程每組皆三重複以上，採用採用 student's t-test 比較不同方式處理下組別間的差異，以 mean \pm SD 表示，當 $p < 0.05$ 以下時表示為統計學上有意義的差異。

伍、研究成果說明

NLE 抑制肝癌發生之機制

NLE 對人類肝癌細胞株 Huh7 之毒性測試

首先觀察 NLE 是否會造成人類肝癌細胞株 Huh7 的死亡。因此以不同劑量的 NLE (0, 0.25, 0.5, 1 及 2 mg/mL)處理人類肝癌細胞株 Huh7，經過 24 小時後，移除含有 NLE 的培養基，加入含有 MTT 藥物的培養基，進行細胞毒殺試驗分析，觀察 NLE 是否對於肝癌細胞具有毒殺作用，結果發現 NLE 對 Huh7 半致死劑量為 2.89 mg/mL (Fig. 1)。

NLE 誘導肝癌細胞株 Huh7 細胞凋亡

利用細胞凋亡時會造成 PS 外翻的特性，藉由 AnnexinV/PI 雙重染色法確認 NLE 對於 Huh7 的致死作用，利用流式細胞儀定量 NLE 所造成肝癌細胞凋亡死亡的程度。從 AnnexinV/PI 雙染分析的結果顯示，NLE 確實可以造成 Huh7 細胞凋亡，並且隨著 NLE 劑量增加，凋亡細胞比例有增加的情形，NLE 2-4 mg/mL 劑量分別造成 29.7%, 43.99% 與 52.35%的細胞凋亡(Fig. 2, $p < 0.05$)。而從凋亡相關蛋白 Bcl₂ family 與 caspase 活化與蛋白表現量觀察，結果顯示 caspase 3 與 FasL 的蛋白表現皆隨著 NLE 處理劑量的增加而上升(Fig. 3)，另一方面，Bcl₂ family 中之 Bcl₂ 與 BCL_{xL} 的蛋白表現量雖然沒有太大的變化，但是 Bax, Bim, AIF 與 EndoG 致死相關蛋白表現量卻有顯著地增加(Fig. 3)。而肝癌細胞隨著 NLE 處理劑量的增加，細胞凋亡相關蛋白的表現量也有明顯上升的趨勢(Fig. 3)，因此再一次證實 NLE 確實可以造成人類肝癌細胞株 Huh7 細胞凋亡，進而促進肝癌細胞的死亡。

NLE 透過增加肝癌細胞株 Huh7 內氧化壓力而促進細胞凋亡之作用

我們試著探討 NLE 是透過什麼機制導致 Huh7 發生細胞凋亡，從過去文獻中說明細胞體內 ROS 的增加，會促進細胞凋亡作用的發生[49]。於是我們假設 NLE 會造成 Huh7 細胞內的 ROS 含量上升，進而導致細胞凋亡。因此以 ROS 的染劑 DCFH-DA 分析，Huh7 細胞再經過 NLE 加入後，細胞內 ROS 含量的變化。

從流式細胞儀的分析結果顯示，NLE 加入後確實會導致細胞內 ROS 產量的上升，正常對照組的細胞內 ROS 含量為 9.4，而細胞在經過 NLE 處理之後，細胞內 ROS 量上升到 32.70-46.44，且隨著 NLE 處理的劑量增加而有所上升，呈現劑量效應 (Fig. 4)，而我們也使用已知的抗氧化藥物 NAC 作為驗證，觀察是否可以降低 NLE 所誘發的 ROS 含量。由結果得知，Huh7 細胞在同時處理 NLE 與抗氧化物質 NAC 時，NAC 確實能夠有效降低 NLE 所誘發的 ROS 上升現象 (Fig. 4)。而 H_2O_2 作為 positive control 展現細胞內 ROS 含量增加的變化 (Fig. 4)。

而從時間點的測量變化來看，結果顯示 NLE 所誘發 ROS 含量上升，在肝癌細胞 (ROS 含量為 9.24) 經過 NLE 刺激後，約 6 小時即有上升的趨勢 (ROS 含量上升至 10.46)，在刺激 12 小時後開始顯著地增加 (ROS 含量增加到 21.18)，而隨著 NLE 刺激的時間增加，肝癌細胞內 ROS 的含量也明顯地增加到 30.11 (Fig. 5)，顯示 NLE 確實會刺激人類肝癌細胞株 Huh7 產生過多的 ROS 含量，進而導致肝癌細胞的凋亡，並且有劑量與時間依賴性的趨勢。

NLE 透過粒線體導致 ROS 釋放進而肝癌細胞株 Huh7 細胞凋亡

接著評估 NLE 所誘發肝癌細胞內過量的 ROS 是從何而來。從過去文獻中發現粒線體功能異常會導致粒線體膜電位改變，促進 ROS 大量釋放到細胞質 [50]。於是我們利用 JC-1 染劑去測量肝癌細胞內粒線體的去極化，當 JC-1 進入健康細胞的粒線體會呈現紅色螢光，而在粒線體膜電位改變時 JC-1 會變為綠色螢光，因此可以從螢光的變化得知粒線體膜電位的變化，從流式細胞儀分析的結果顯示 NLE 加入後粒線體膜電位有明顯改變的情形，正常情況下肝癌細胞的粒線體膜電位為 0.08，而肝癌細胞在經過 NLE 刺激之後，粒線體膜電位增加至 71.63-74.01 ($p < 0.05$, Fig. 6)，顯示肝癌細胞在 NLE 刺激下確實會造成粒線體膜電位的改變，而 H_2O_2 作為 positive control 展現細胞內粒線體膜電位改變的情形 (Fig. 6)。而從時間點的測量變化來看，正常情況下肝癌細胞的粒線體膜電位為 0.64，肝癌細胞在經過 NLE 處理 30 分鐘下，即可觀察到明顯地粒線體膜電位的上升至 72.75 ($p < 0.05$, Fig. 7)，顯示在 NLE 加入後 30 分鐘細胞內即可攻擊粒線體，造成粒線

體膜電位的改變(Fig. 7)。而 H₂O₂ 作為 positive control 展現細胞內粒線體膜電位改變的情形(Fig. 7)。結果證實 NLE 是透過導致細胞內粒線體膜電位改變促使過量的 ROS 釋放而造成細胞凋亡。對於粒線體與細胞凋亡相關蛋白 Bcl-2 family 之 Bax, Bim 的蛋白表現量也確實有明顯增加的情形(Fig. 3)，同時間我們也發現到 cytochrome c 會從粒線體釋放到細胞質(Fig. 8)，更加證實 NLE 確實會透過調控粒線體導致細胞的凋亡作用。

NLE 對人類肝癌細胞株 Hep3B 之毒性測試

接著探討 NLE 是否會造成另外一株人類肝癌細胞株 Hep3B 死亡，因此以不同劑量的 NLE(0, 0.25, 0.5, 1 及 2 mg/mL)處理人類肝癌細胞株 Hep3B，經過 24 小時後，移除含有 NLE 的培養基，加入含有 MTT 藥物的培養基，進行細胞毒殺試驗分析，觀察 NLE 是否對於肝癌細胞具有毒殺作用，進行 MTT 試驗，結果發現 NLE 對 Hep3B 半致死劑量為 2.65 mg/mL (Fig. 9)。

NLE 誘導肝癌細胞株 Hep3B 細胞凋亡

利用細胞凋亡時會造成 PS 外翻的特性，藉由 AnnexinV/PI 雙重染色法確認 NLE 對於 Huh7 的致死作用，利用流式細胞儀定量 NLE 所造成肝癌細胞凋亡死亡的程度。從 AnnexinV/PI 雙染分析的結果顯示，NLE 確實可以造成 Huh7 細胞凋亡，並且隨著 NLE 劑量增加，凋亡細胞比例有增加的情形，NLE 2-4 mg/mL 劑量分別造成 43.42%, 39.13% 與 28.99% 的細胞凋亡(Fig. 10, p<0.05)。而從 Western blot 分析凋亡相關蛋白 Bcl₂ family 與 caspase 活化與蛋白表現量情形，

Bcl₂ family 中 BCL_xL 的蛋白表現量隨著 NLE 的加入而有所下降(Fig.11)，而 Bax, Bim, AIF 與 EndoG 致死相關蛋白表現量卻有更為顯著地增加(Fig. 11)。而肝癌細胞隨著 NLE 處理劑量的增加，Bcl₂ family 中細胞凋亡相關蛋白 Bak, Bax 與 EndoG 的表現量也有明顯上升的趨勢(Fig.11)，因此 NLE 確實可以造成人類肝癌細胞株 Hep3B 產生細胞凋亡作用，進而促進癌細胞的死亡。

NLE 誘導肝癌細胞株 Hep3B 細胞自噬作用

而我們從顯微鏡的觀察發現，Hep3B 在加入 NLE 之後有不同於 Huh7 加藥

處理的現象，即是 Hep3B 出現大量液泡的情形(Fig. 12)，於是我們推測 NLE 是否也可以造成 Hep3B 細胞自噬作用現象的發生。而細胞自噬作用發生時會有酸性囊狀胞器(acidic vesicular organelles, AVO)的形成，於是利用 acridine orange 染劑可以染上 AVO 並呈橘紅色的螢光，可以利用螢光顯微鏡的觀察(Fig. 13)與流式細胞儀的定量分析(Fig. 14)，結果顯示在加入 NLE 之後確實可以使酸性囊狀胞器的大量產生。並且以 western blot 觀察細胞自噬作用特殊蛋白(LC-3, ATG5 與 Beclin1)表現量觀察顯示，NLE 確實可以造成 Hep3B 細胞自噬作用的發生(Fig. 15)。另外，從過去文獻中證實，細胞自噬作用可以造成細胞的死亡[51, 52]，而細胞自噬作用死亡的細胞形式會出現在流式細胞儀分析 AnnexinV/PI 雙染圖中的第二象限細胞群內，由結果顯示 NLE 確實造成 Hep3B 增加因細胞自噬作用而死亡的細胞數(Fig. 16)。綜合以上結果，NLE 可以透過誘導 Hep3B 細胞凋亡與細胞自噬作用的發生，而促進肝癌細胞的死亡作用。

陸、研究成果討論

Bax 與 Bak 隸屬於 Bcl-2 家族成員，已知皆與細胞凋亡作用有著密切相關，主要功能是促進細胞凋亡作用的發生。各種 Bcl-2 蛋白家族成員之間，成員間會互相形成活化的同源二聚體(homologous dimer)或異源二聚體(heterodimer)，以調控細胞的死亡(apoptosis)及存活作用(survival)，並因此來決定細胞的存亡。在 Bcl-2 蛋白家族調節細胞凋亡過程中，粒線體扮演一個相當重要的角色。其中主要抑制細胞凋亡的成員包括有 Bcl-2 及 Bcl-xL，在粒線體外膜上發揮作用，以維持粒線體外膜的完整性。然而，其他促進細胞凋亡的成員 Bax 及 Bak，則可通過形成 dimer 破壞粒線體外膜的完整性，進而達到抑制粒線體正常作用的目的；此外，研究亦發現 BH3-only 蛋白的影響可以促進細胞凋亡作用的發生，細胞凋亡刺激存在時，BH3-only 表現量會增加或經過轉錄後修飾(post-translational modification)改變，此時 BH3-only 蛋白會與 Bcl-2 或 Bcl-xL 結合，降低主要抑制細胞凋亡的成員數量，而使其對抗 Bax 及 Bak 的作用減弱，從而促使細胞凋亡的發生。

在細胞凋亡的途徑中，粒線體本身的內膜及外膜的完整性，亦會產生某些結構上的變化，其中包括有內膜跨外膜所造成的膜電位喪失，以及某些特異性細胞凋亡相關蛋白質被釋放到細胞質當中，其中最重要的是粒線體膜間隙的 cytochrome c，由粒線體釋放到細胞質的 cytochrome c 會觸發的一連串的細胞凋亡蛋白連鎖反應，也因此 cytochrome c 是細胞凋亡訊息傳遞過程中的重要關鍵因子，所以觀察細胞質中有無 cytochrome c 的存在也是評估細胞凋亡的一項重要指標。此外，粒線體外膜上的 Bcl-2 蛋白家族(Bcl-2 或 Bcl-xL)也能夠參與調控細胞凋亡作用，並透過與同家族的 Bax 或 Bak 結合，降低 Bax 或 Bak 在粒線體膜上形成的通道，進一步阻斷 cytochrome c 從粒線體中被釋放出來。而被釋放出的 cytochrome c，在 ATP/dATP 的協助下，會進一步與 pro-caspase-9 及 apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1)結合，形成 cytochrome c-Apaf-1-procaspase-9 多聚體(polymer)，稱之為的凋亡體 (apoptosome)，並啟動生成 caspase-9，再由 caspase-9 誘導其他的 caspase 協助下導致細胞凋亡的產生。

從過去文獻中證實 p53 可以調控細胞週期與細胞凋亡[53]，而我們在 Huh7 的 western blot 結果發現 p53 有明顯活化，而 p53 調控關鍵蛋白 p21 卻是下降的 (Fig. 17)，顯示了 NLE 沒有透過 p53 造成細胞週期停滯，而 Bak 與 Bax 的表現量增加暗示了 NLE 可能透過這條路徑而導致細胞的凋亡 (Fig. 3)，於是我們之後可能會探討 p53 調控細胞凋亡的關鍵蛋白 PUMA 與 NOXA 的表現而確定這條路徑的重要性。而從先前文獻證實，內質網壓力可以透過 p53 與下游路徑 Bak 與 Bax 導致細胞凋亡的發生[54]，因此我們未來想要探討 NLE 是否是透過內質網壓力活化下游路徑進而促進細胞凋亡。

然而內質網壓力除了可以促進細胞凋亡也可以造成細胞自噬作用的現象發生[55]，這跟我們在 Hep3B 給予 NLE 之誘導後都有細胞凋亡與自噬作用的現象相符合，因此未來將朝向觀察內質網壓力的特殊蛋白表現，去進一步證實 NLE 是否是透過內質網壓力導致肝癌細胞的死亡而達到抑制肝癌的作用。

而在肝癌發展包含了起始、促進與擴展，我們在 AAF 誘導大鼠的結果中證明了 NLE 可以抑制肝癌形成起始與促進作用，而之後可以透過裸鼠 inoculation 的模式觀察 NLE 是否針對已形成腫瘤的癌細胞具有相同的抑制效果。

柒、參考文獻

1. El-Serag B. Hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 12, 1118–1127, 2011.
2. Bruix J, Llovet JM. Major achievements in hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 373, 614–616, 2009.
3. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International*, 5, 1-13, 2005.
4. Guanyu Wang, Jiawei Zhang, Luying Liu, Sherven Sharma, Qinghua Dong. Quercetin Potentiates Doxorubicin Mediated Antitumor Effects against Liver Cancer through p53/Bcl-xl. *PLOS one* 7, e51764-75, 2012.
5. Liu CH, Tsai CC, Chen HH. The Diagnosis and Treatment Strategy of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Internal Medicine of Taiwan*, 24, 85-94, 2013.
6. Yu MW, Chang HC, Liaw YF. Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst* 92, 1159-64, 2000.
7. Chen CJ, Yang HI, Iloeje UH. Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B. *Hepatology* 49, S72-84, 2009.
8. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; 100, 1134-43, 2008.
9. Donato F, Tagger A, Gelatti U. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*, 155, 323-31, 2002.
10. Davis GL, Alter MJ, El-Serag H, Poynard T, Jennings LW. Aging of hepatitis C virus (HCV)-infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression. *Gastroenterology*, 138, 513-21, 2010.
11. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and

- mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *N Engl J Med*, 348, 1625-38, 2003.
12. Donato F, Tagger A, Gelatti U. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*, 155, 323-31, 2002.
 13. Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, et al. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology*, 49, 1954-61, 2009.
 14. Jung KS, Kim SU, Ahn SH. Risk assessment of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma development using liver stiffness measurement (FibroScan). *Hepatology*, 53, 885-94, 2011.
 15. Vanni E, Bugianesi E. Obesity and liver cancer. *Clin Liver Dis*, 18, 191-203, 2014.
 16. Dhar D, Seki E, Karin M. NCOA5, IL-6, Type 2 Diabetes, and HCC: The Deadly Quartet. *Cell Metab*, 19, 6-7, 2014.
 17. Singh D, Das CJ, Baruah MP. Imaging of non alcoholic fatty liver disease: A road less travelled. *Indian J Endocrinol Metab*, 17, 990-5, 2013.
 18. Nowak AK, Chow PK, Findlay M. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: a review. *Eur J Cancer*, 40, 1474-84, 2004.
 19. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*, 1, 3-11, 1997.
 20. Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol* 68, 29-43, 1998.
 21. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57, 1972.
 22. Williams GT. Apoptosis in the immune system. *J Pathol* 173, 1-4, 1994.

23. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-62, 1995.
24. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45, 528-37, 2000.
25. Fumarola C, Guidotti GG. Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis* 9, 77-82, 2004.
26. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-62, 1994.
27. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen, GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 256, 27-33, 2000.
28. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-90, 1999.
29. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-57, 1996.
30. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42, 2000.
31. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-6, 1999.
32. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-9, 2001.
33. Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 1644, 133-47, 2004.

34. Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476, 118-23, 2000.
35. Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 7, 1182-91, 2000.
36. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544, 2012.
37. Kashiwada Y, Aoshima A, Ikeshiro Y, Chen Y-P, Furukawa H, et al. Anti-HIV benzyloquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure–activity correlations with related alkaloids. *Bioorganic & medicinal chemistry* 13, 443-448, 2005.
38. Ling Z-Q, Xie B-J, Yang E-L. Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 2441-2445, 2005.
39. Rai S, Wahile A, Mukherjee K, Saha BP, Mukherjee PK. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *Journal of ethnopharmacology* 104, 322-327, 2006.
40. Liu CP, Tsai WJ, Lin YL, Liao JF, Chen CF, et al. The extracts from *Nelumbo Nucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *Life sciences* 75, 699-716, 2004.
41. Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 238-244, 2004.
42. Huang CF, Chen YW, Yang CY, Lin HY, Way TD, et al. Extract of lotus leaf

- (*Nelumbo nucifera*) and its active constituent catechin with insulin secretagogue activity. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 1087-1094, 2011.
43. Zhangshun G, Jun W, Zelan Y. Effects on water extract of lotus leaf to Improve in Human's Blood Lipids Disorder [J]. *Journal of Chenzhou Medical College* 3, 001, 2003.
 44. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol chem* 226, 497-509, 1957.
 45. Mukherjee PK, Saha K, Pal M, Saha B. Effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on blood sugar level in rats. *Journal of ethnopharmacology* 58, 207-213, 1997.
 46. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95, 351-358, 1979.
 47. Huang B, Ban X, He J, Tong J, Tian J, et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extracts of edible lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaves. *Food chemistry* 120, 873-878, 2010.
 48. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research* 48, 589-601, 1988
 49. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 48, 749-762, 2010.
 50. Betts D, Madan P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. *Molecular human reproduction* 14, 445-453, 2008.
 51. Jung KH, Noh JH, Kim JK, Eun JW, Bae HJ, et al. Histone deacetylase 6 functions as a tumor suppressor by activating c-Jun NH2-terminal kinase-mediated beclin 1-dependent autophagic cell death in liver cancer. *Hepatology* 56, 644-657, 2012.
 52. Tai W, Shiau C, Chen H, Liu C, Lin C, et al. Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular

- carcinoma cells. *Cell death & disease* 4, e485, 2013.
53. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, et al. p53-and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302, 1036-1038, 2003.
54. Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (puma) and noxa by p53. *Journal of Biological Chemistry* 281, 7260-7270, 2006.
55. Benbrook D, Long A. Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp Oncol* 34, 286-297, 2002

捌、研究成果圖與表

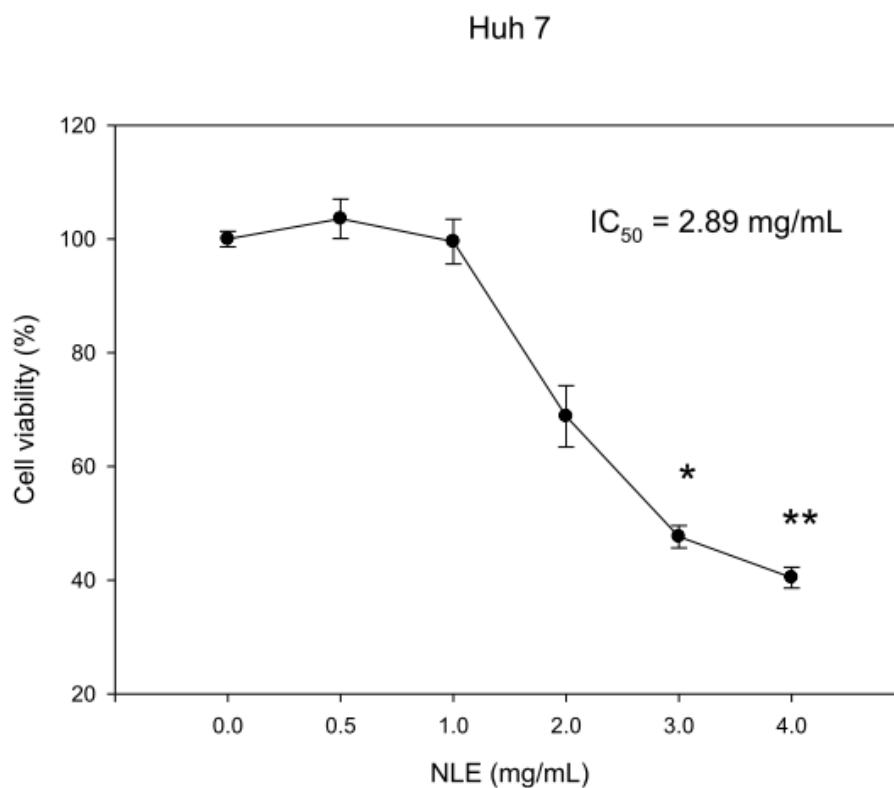


Figure 1. NLE induced the cytotoxicity effects of NLE on Huh7 cell. Human hepatocellular carcinoma cell line, Huh7 cells, were incubated with different concentration NLE (0.5~4 mg/mL) in 37°C for 24 hrs. The data were means \pm SD for three replicates per treatment.

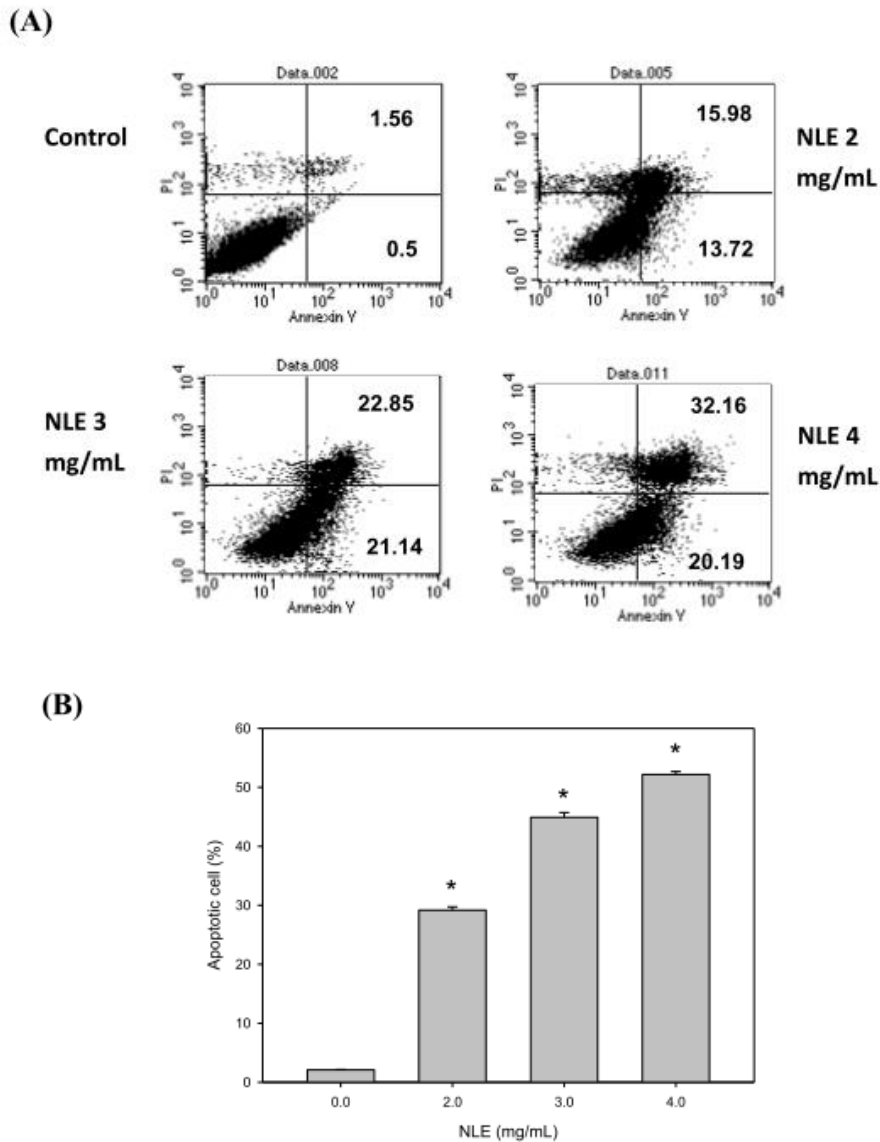


Figure 2. NLE induced cell death in Huh7 cell. Apoptotic cell was evaluated after treating Huh7 cells with indicated concentration of NLE. (A) Cell was stained with Annexin-V and PI. Flow cytometry profile represents Annexin-V-FITC staining in x axis and PI in y axis. (B) Quantitative assessment of the percentage of apoptosis cell. The data were means \pm SD for three replicates per treatment. *, $p < 0.05$ compared with control.

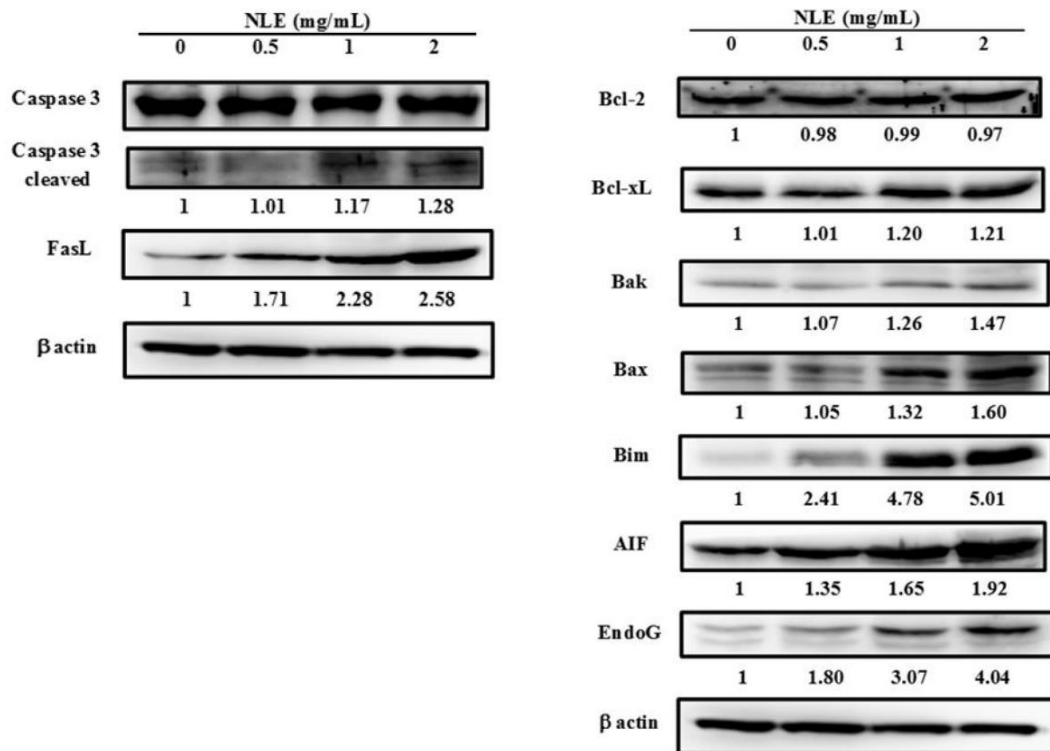


Figure 3. NLE induced cell apoptotic markers in Huh7 cell. Immunoblot analysis of the Caspase 3, FasL, Bcl₂ family, AIF, and EndoG protein expression of apoptosis in Huh7. Culture cells were treated with 0, 0.5, 1, and 2 mg/mL of NLE for 12 hrs and whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel (protein concentration is 50 μ g/ μ L). Western hybridization was performed with antibodies against Caspase 3, FasL, Bcl₂ family, AIF, and EndoG. Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

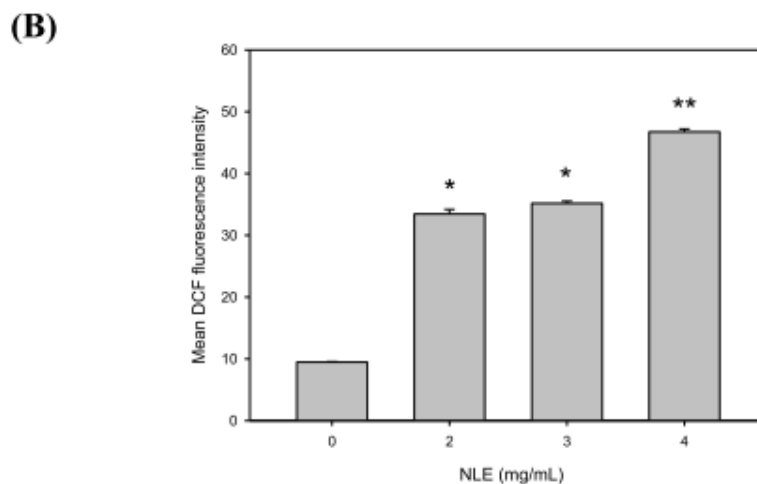
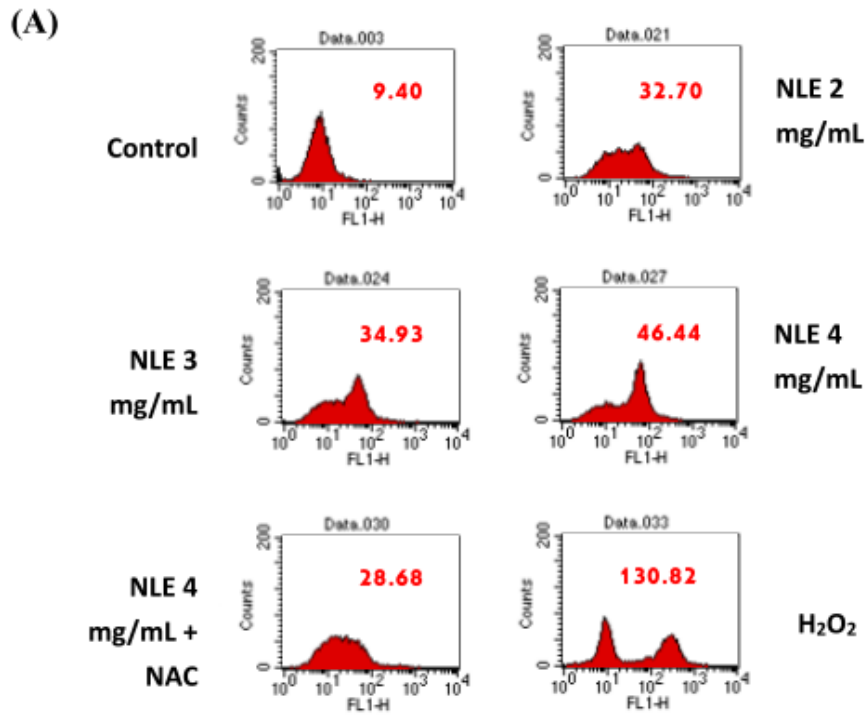


Figure 4. NLE induced cellular ROS accumulation in a dose-dependent manner in Huh7 cell. (A) Huh7 cell were treated with NLE 2, 3, and 4 mg/mL or not. H₂O₂ as a positive control. NAC was an inhibitor for ROS. Measurement of intracellular ROS detected by oxidized 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) fluorescence. Data were analysis for flow cytometry. Quantitative assessment of the mean of DCF fluorescence cell (B). Significant differences versus control cells are represented by *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$

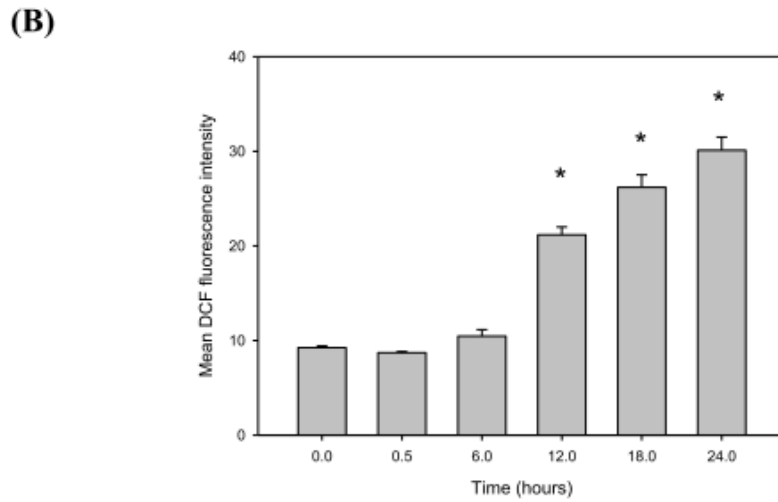
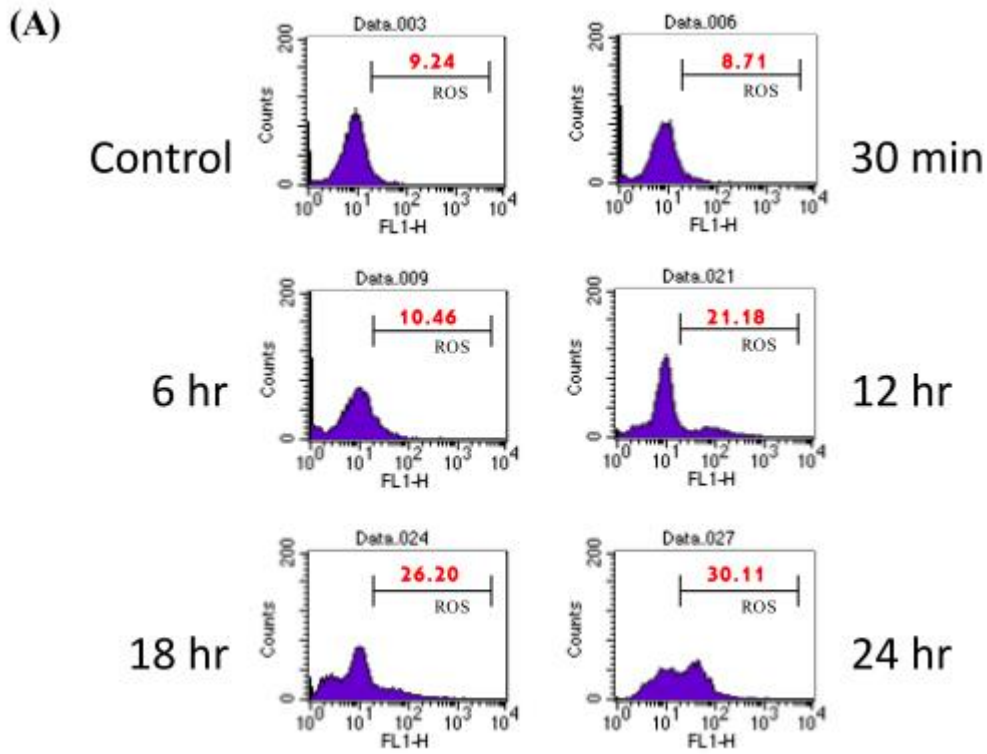


Figure 5. NLE induced cellular ROS accumulation in a time-dependent manner in Huh7 cell. (A) Huh7 cells were treated with NLE 2 mg/mL for different time periods (0.5, 6, 12, 18, and 24 h) or not. Measurement of intracellular ROS detected by oxidized 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) fluorescence. Data were analysis for flow cytometry. Quantitative assessment of the mean of DCF fluorescence cell (B).

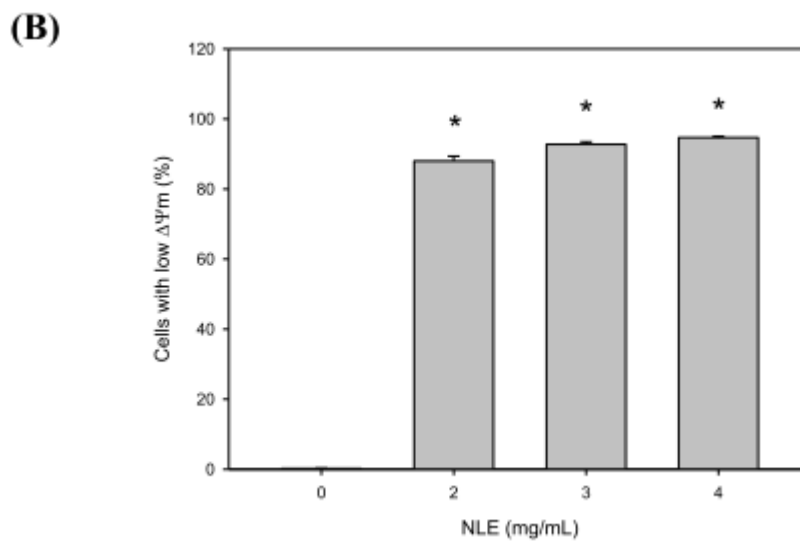
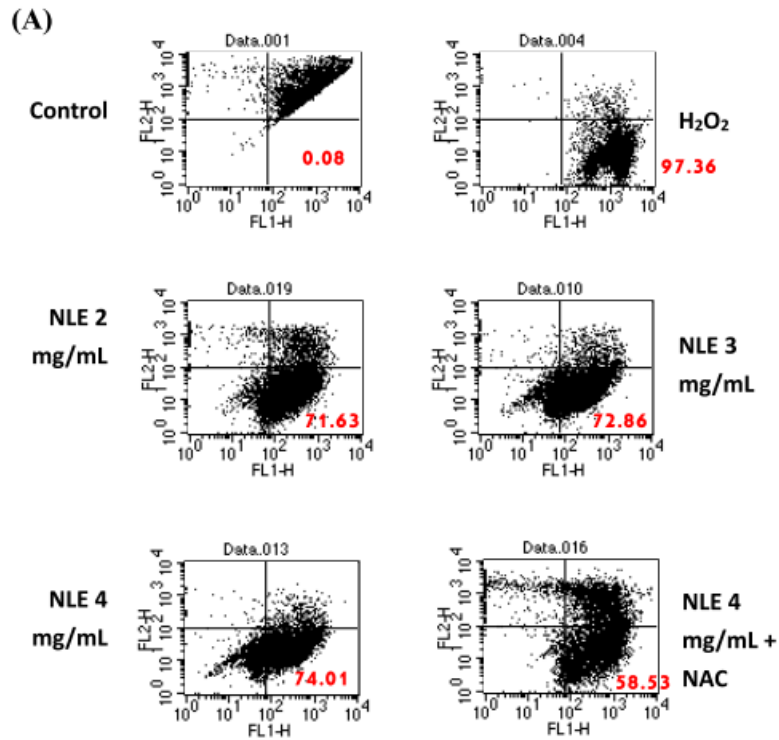


Figure 6. NLE induced mitochondrial dysfunction in a dose-dependent manner in Huh7 cell. FACS analysis of $\Delta\psi_m$ in human hepatocellular carcinoma cell. (A) Huh7 cell were treated with NLE 2, 3, and 4 mg/mL or not. H_2O_2 was used as a positive control. NAC was an inhibitor for ROS. Cells were stained with JC-1 and analyzed by flow cytometry. Quantitative assessment of the mean of Huh7 cells with low red and high green fluorescence which with mitochondrial depolarization (B).

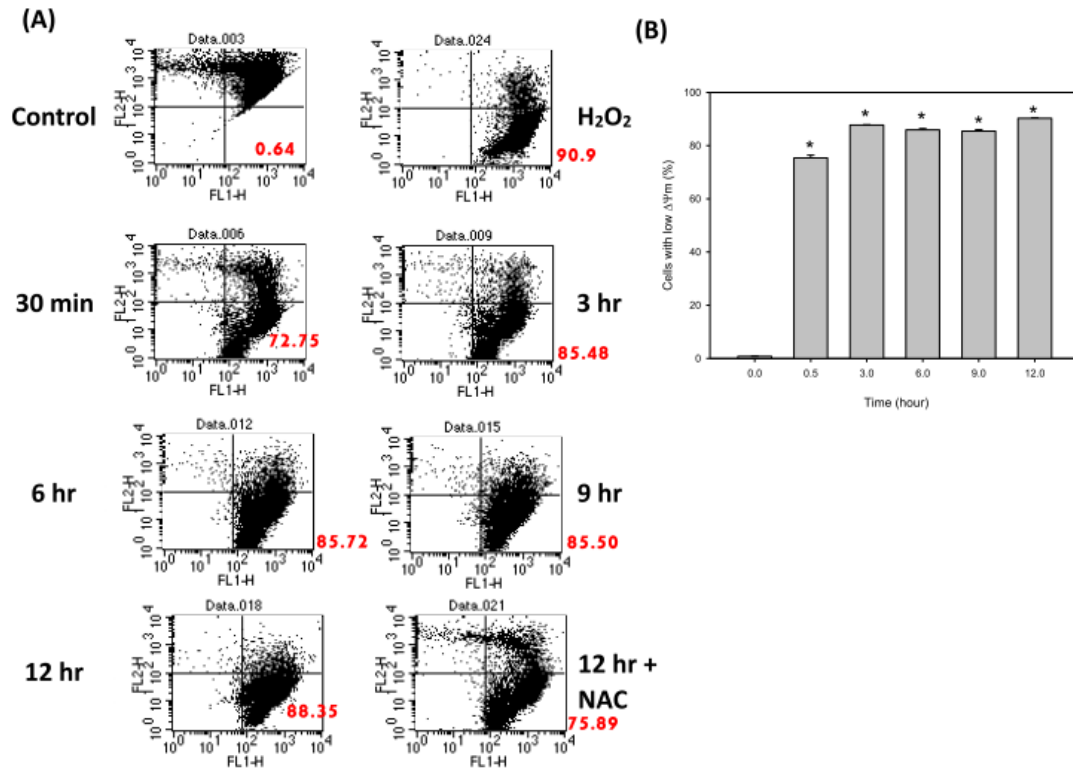


Figure 7. NLE induced mitochondrial dysfunction in a time-dependent manner in Huh7 cell. FACS analysis of $\Delta\psi_m$ in human hepatocellular carcinoma cell. (A) Huh7 cell were treated with NLE 2 mg/mL for different time periods (0.5, 3, 9, and 12 hrs) or not. H₂O₂ was used as a positive control. NAC was an inhibitor for ROS. Cells were stained with JC-1 and analyzed by flow cytometry. Photomultiplier settings were adjusted to detect JC-1 monomer fluorescence signals on the FL1 detector (green fluorescence) and JC-1 aggregate fluorescence signals on the FL2 detector (red fluorescence). Quantitative assessment of the mean of Huh7 cells with low red and high green fluorescence which with mitochondrial depolarization (B).

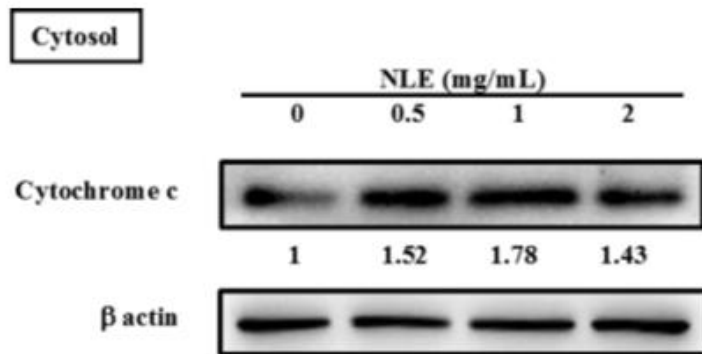


Figure 8. NLE induced cytochrome *c* release from mitochondria. Immunoblot analysis of the cytochrome *c* in cytosolic subcellular fractions. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel (protein concentration is 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Western hybridization was performed with antibodies against cytochrome *c*. Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

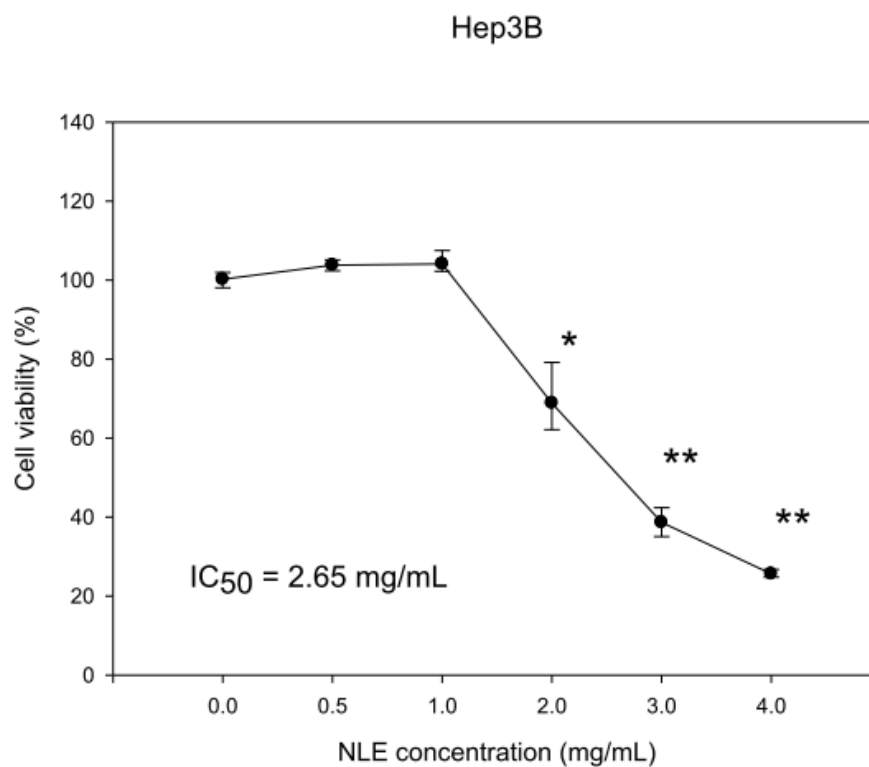


Figure 9. NLE induced the cytotoxicity effects of NLE on Hep3B cell. Human hepatocellular carcinoma cell line, Hep3B cells, were incubated with different concentration NLE (0.5~4 mg/mL) in 37°C for 24 hrs. The data were means \pm SD for three replicates per treatment.

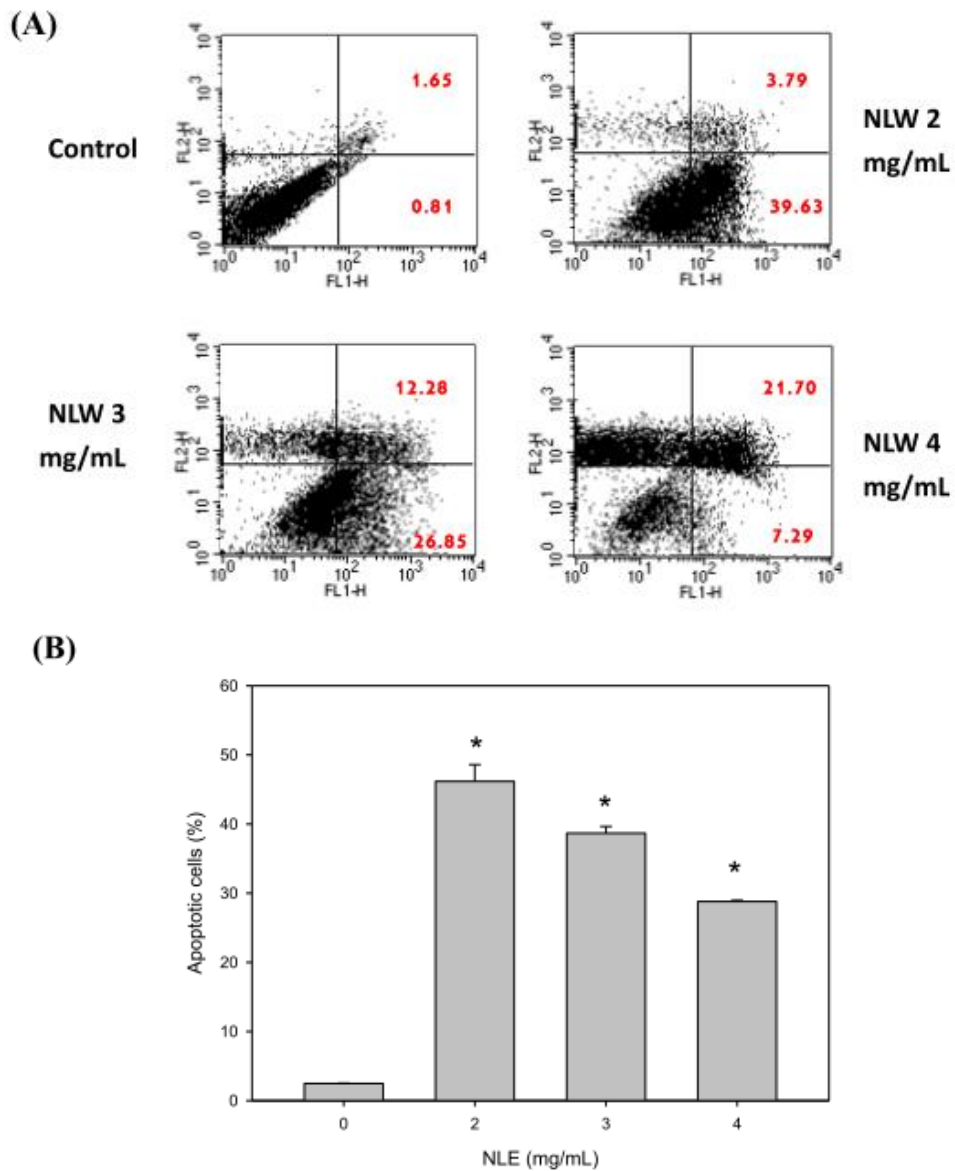


Figure 10. NLE induced cell death in Hep3B cell. Apoptotic cell was evaluated after treating Hep3B cells with indicated concentration of NLE. (A) Cell was stained with Annexin-V and PI. Flow cytometry profile represents Annexin-V-FITC staining in x axis and PI in y axis. (B) Quantitative assessment of the percentage of apoptosis cell. The data were means \pm SD for three replicates per treatment. *, $p < 0.05$ compared with control.

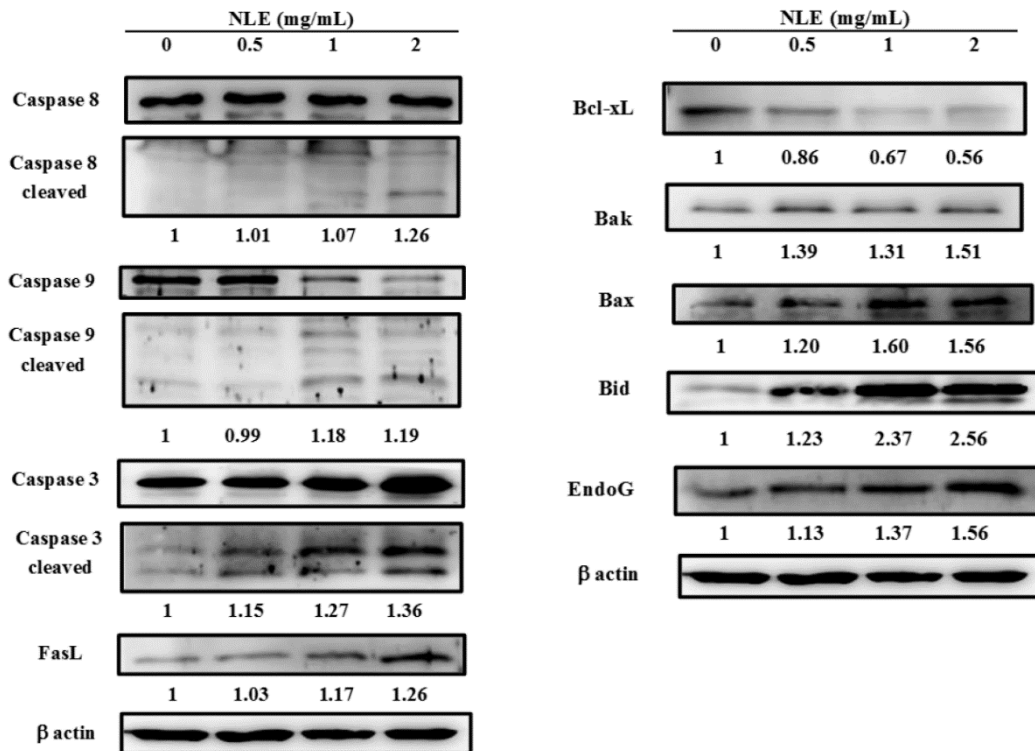


Figure 11. NLE induced cell apoptotic markers in Hep3B cell. Immunoblot analysis of the Caspase family, FasL, Bcl₂ family, and EndoG protein expression of apoptosis in Hep3B. Culture cells were treated with 0, 0.5, 1, and 2 mg/mL of NLE for 12 hrs and whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel (protein concentration is 50 μg/μL). Western hybridization was performed with antibodies against Caspase family, FasL, Bcl₂ family, and EndoG. Western blot analysis of β-actin was used as an internal control. The data were means ± SD for three replicates per treatment.

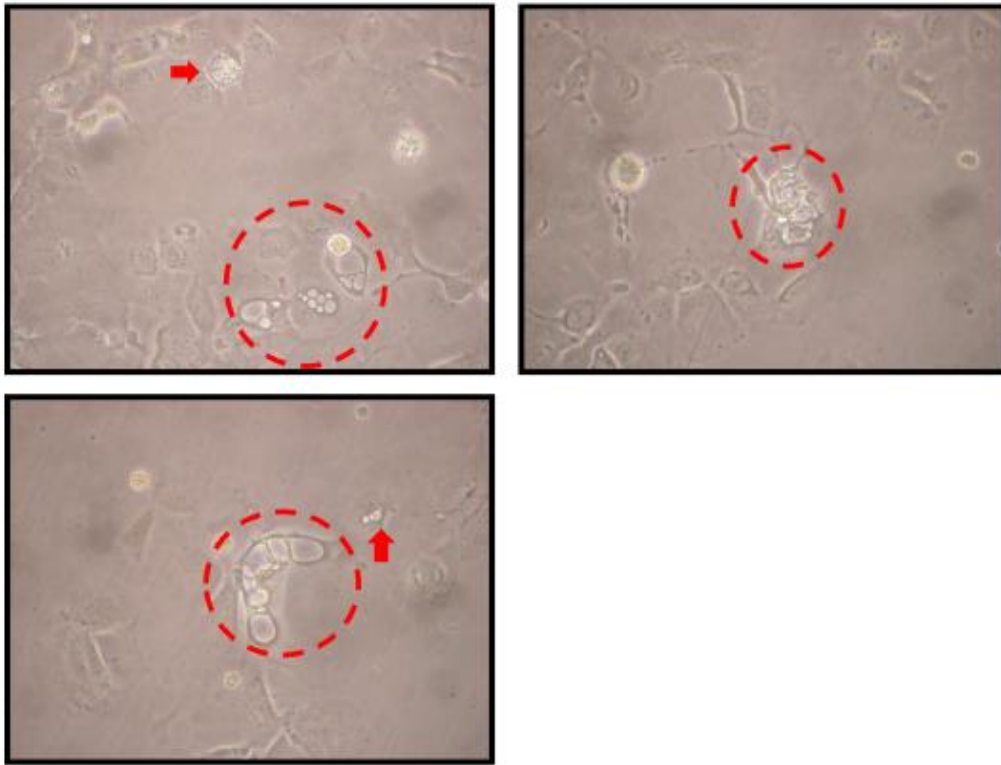


Figure 12. NLE induced autophagy in human hepatocellular carcinoma cell line. Vesicular-like organelles (arrows and circle) from NLE treated Hep3B cells which morphologies were observed and photographed by a reverse-phase microscope.

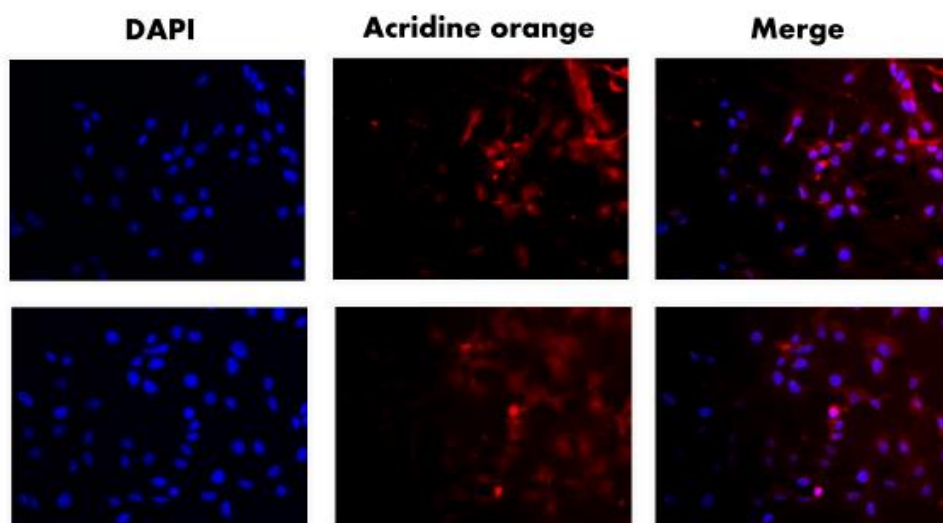


Figure 13. NLE induced acidic vesicular organelles (AVO) in human hepatocellular carcinoma cell line. Microscopic image of NLE treated Hep3B cells stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (left panel), acridine orange (middle panel) and merge (right panel).

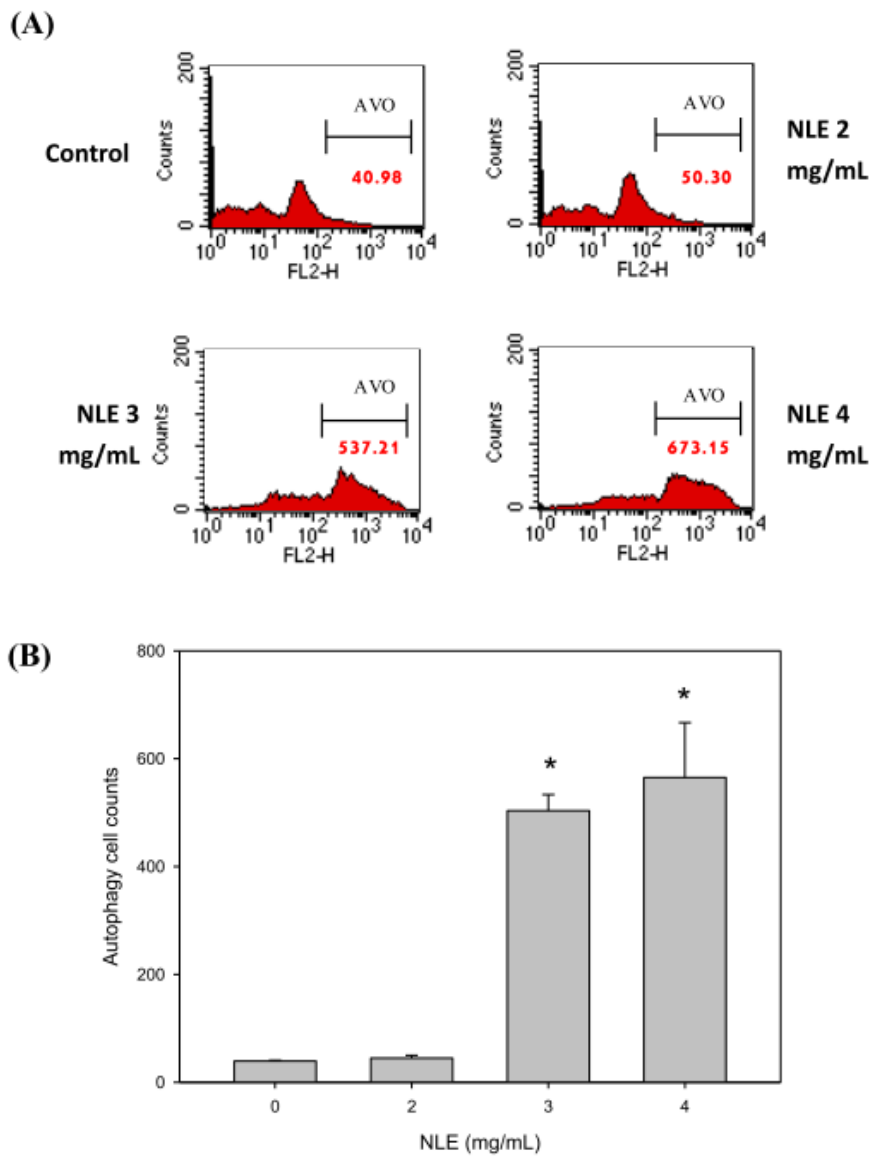


Figure 14. NLE induced acidic vesicular organelles (AVO) formation in human hepatocellular carcinoma cell. (A) Huh7 cell were treated with NLE 2, 3, and 4 mg/mL or not. Measurement of AVO detected by acridine orange (AO) fluorescence. Data were analysis for flow cytometry. Quantitative assessment of the mean of DCF fluorescence cell (B). Significant differences versus control cells are represented by *, $p < 0.05$. The data were means \pm SD for three replicates per treatment.

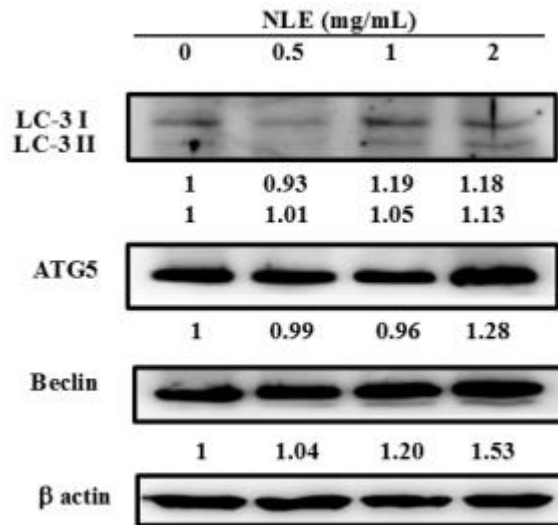


Figure 15. NLE induced the relative protein expression of autophagy in Hep3B. Culture cells were treated with 0, 0.5, 1, and 2 mg/mL of NLE for 12 hrs and whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel (Protein concentration is 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Western hybridization was performed with antibodies against LC-3 I/II, ATG5, and Beclin1. Western blot analysis of β -actin was used as an internal control

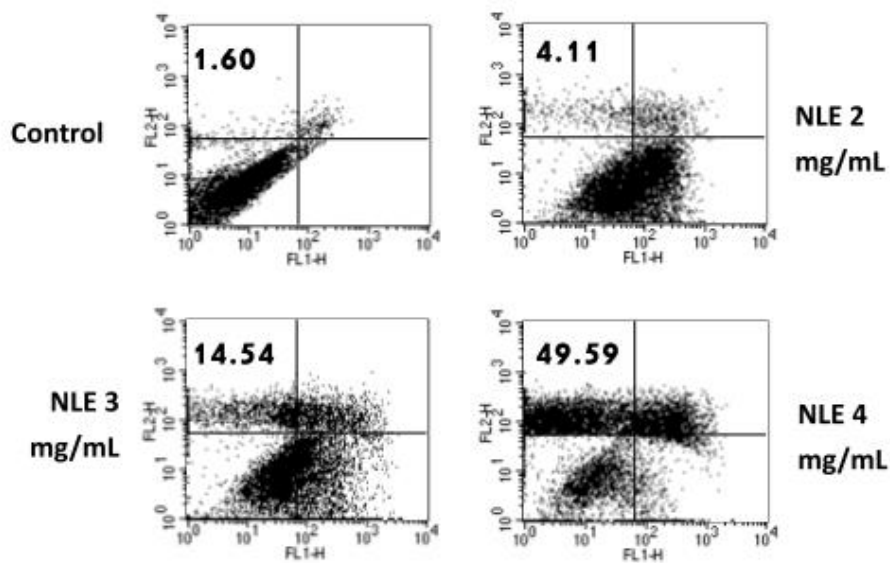


Figure 16. NLE induced autophagic cell death in human hepatocellular carcinoma cell line. Autophagic death cell was evaluated after treating Hep3B cells with indicated concentration of NLE. The percentage of autophagic death cells is calculated as the percentage of PI positive and Annexin-V negative cells. Cell was stained with Annexin-V and PI. Flow cytometry profile represents Annexin-V-FITC staining in x axis and PI in y axis. The data were means \pm SD for three replicates per treatment.

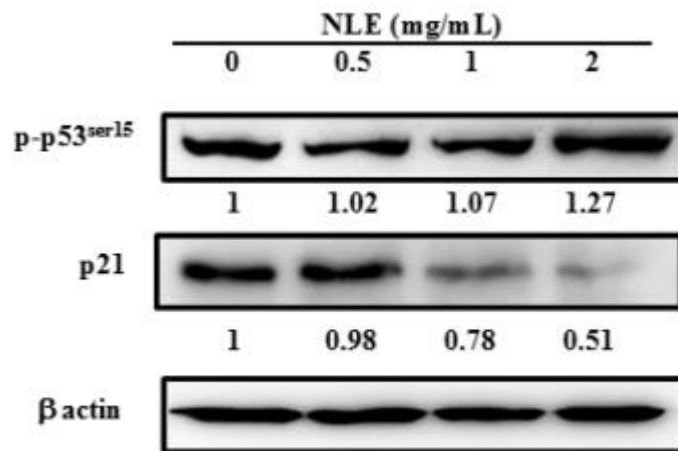


Figure 17. NLE induced the activation of the p53 and p21 protein expression in Huh7. Culture cells were treated with 0, 0.5, 1, and 2 mg/mL of NLE for 12 hrs and whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel (protein concentration is 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Western hybridization was performed with antibodies against phosphorylation of p53^{ser15} and p21. Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

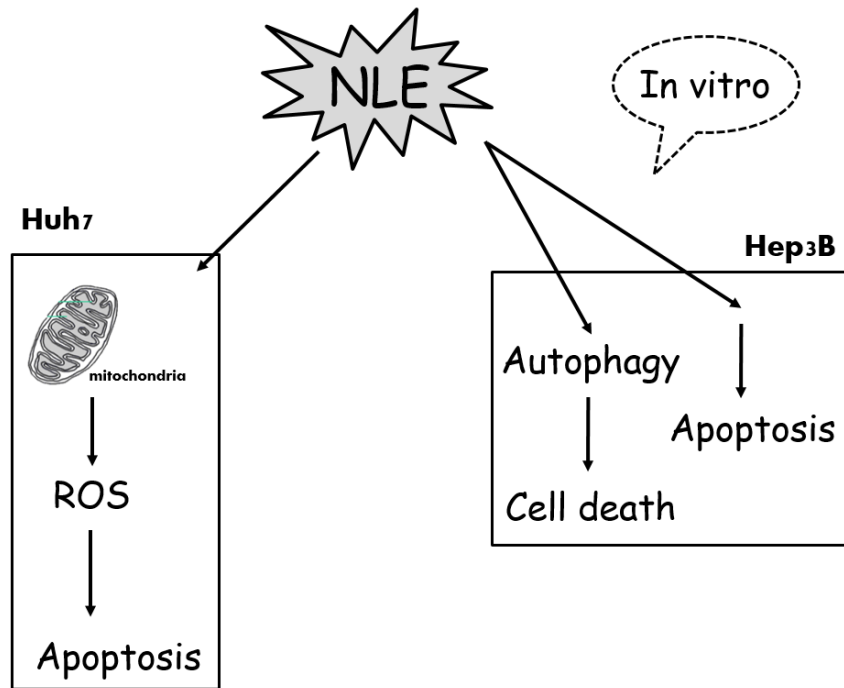


Figure 18. Schematic diagram illustrating the mechanism of NLE inhibits hepatic tumorigenesis *in vitro*.

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/07/10

科技部補助計畫	計畫名稱: 荷葉類黃酮多重護肝及抑制肝癌之作用及機轉之研究
	計畫主持人: 王朝鐘
	計畫編號: 101-2313-B-040-004-MY3 學門領域: 食品及農化
無研發成果推廣資料	

101年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：王朝鐘		計畫編號：101-2313-B-040-004-MY3				計畫名稱：荷葉類黃酮多重護肝及抑制肝癌之作用及機轉之研究	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明： 如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	1	1	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	1	1	100%	人次	
		博士生	1	1	100%		
		博士後研究員	1	1	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	2	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	1	1	100%	件	
		已獲得件數	1	1	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
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。）		<p>1. 在為期多年的研究成果中發現，CONQUER荷葉膠囊的活性成分具有標靶藥物特性，主要生理活性功效說明如下：1. 促進癌細胞死亡；2. 抑制癌細胞增殖；3. 抑制新生血管形成；4. 不易形成體脂肪；5. 抗發炎作用等，有鑑於此，本研究團隊希望能藉由CONQUER荷葉膠囊之毒性遠小於目前市面上其他抗癌藥之特性，加上其本身生理活性功效，來進行乳癌與肝癌標靶藥物的開發，未來更將市場推展到全世界，進行全球化的行銷，使產品收益能達到極大化。</p> <p>2. CONQUER荷葉膠囊抗癌不僅有較佳治癒率及較少副作用，且藥價也較目前標靶藥物低廉，加上專利尚有約二十年之久，堪稱是目前投資獲利最好之標的藥物，相信未來CONQUER荷葉膠囊抗乳癌藥上市後，其安全性高、治癒率高、癌症復</p>					

發率低及治療方式過程不需停藥之特點，勢必將具有接近百分之百佔有新發生之乳癌病患選擇使用之優勢，且該藥目標市場亦為癌症病患中之最大市場，未來將在癌症市場大放光芒並廣泛應用，銷售業績亦將遠超過任何現存之藥物。
3. 本產品另可申請不易形成體脂肪，化學性、酒精性及非酒精性之護肝作用的健康食品認證。

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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100字為限）

荷葉多酚用於抑制肝癌之用途已申請美國專利中，其內容撰寫投稿

J. Agric. Food Chem. 及 J. Fun. Foods中，合併抗乳癌專利申請國家新創獎

Title of Invention:

METHOD FOR INDUCING DEATH OF A CANCER CELL

First Named Inventor/Applicant Name: Wang, Chau-Jong

Date Filed: 03/13/2015

Serial Number: ___14/656,874

Attorney Docket No. : 2433-WCJ-US

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）

1. 在為期多年的研究成果中發現，CONQUER荷葉膠囊的活性成分具有標靶藥物特性，主要生理活性功效說明如下：1. 促進癌細胞死亡；2. 抑制癌細胞增殖；3. 抑制新生血管形成；4. 不易形成體脂肪；5. 抗發炎作用等，有鑑於此，本研究團隊希望能藉由CONQUER荷葉膠囊之毒性遠小於目前市面上其他抗癌藥之特性，加上其本身生理活性功效，來進行乳癌與肝癌標靶藥物的開發，未來更將市場推展到全世界，進行全球化的行銷，使產品收益能達到極大化。

2. CONQUER荷葉膠囊抗癌不僅有較佳治癒率及較少副作用，且藥價也較目前標靶藥物低廉，加上專利尚有約二十年之久，堪稱是目前投資獲利最好之標的藥物，相信未來CONQUER荷葉膠囊抗乳癌藥上市後，其安全性高、治癒率高、癌症復發率低及治療方式過程不需停藥之特點，勢必將具有接近百分之百佔有新發生之乳癌病患選擇使用之優勢，且該藥目標市場亦為癌症病患中之最大市場，未來將在癌症市場大放光芒並廣泛應用，銷售業績亦將遠超過任何現存之藥

物。

3. 本產品另可申請不易形成體脂肪，化學性、酒精性及非酒精性之護肝作用的健康食品認證。