

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

## 蓮蓬萃取物成份多重護肝及分子機制之研究(第3年)

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 103-2313-B-040-004-MY3  
執行期間：105年08月01日至106年07月31日  
執行單位：中山醫學大學營養學系(所)

計畫主持人：陳璟賢  
共同主持人：林慧萱、徐成金  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：黃筱尹  
碩士班研究生-兼任助理：陳姿潔  
碩士班研究生-兼任助理：余亭萱  
碩士班研究生-兼任助理：蔡珮旻  
碩士班研究生-兼任助理：梁力予  
碩士班研究生-兼任助理：曾正雄  
碩士班研究生-兼任助理：賴彥勳  
碩士班研究生-兼任助理：張子喬  
碩士班研究生-兼任助理：邱珮瑜  
碩士班研究生-兼任助理：薛羽庭

中華民國 106 年 10 月 12 日

中文摘要：蓮蓬(lotus seedpod)味苦性溫，自古即被用來行氣除脹、益補脾胃、止血化瘀、清熱及降肝火功效。過去研究顯示蓮蓬原花青素(procyanidins of lotus seedpod, LSPCs)具有抗氧化以及免疫調節之活性，本計畫擬探討蓮蓬萃取物(lotus seedpod extracts, LSE)多重護肝之功效。第一年計劃建立多重肝損傷之動物模式，探討LSE是否具有保肝之功效，並另行安全毒性評估。工作項目包括28天餵食毒性試驗；分析LSE對於化學性(N-acetyl-p-aminophenol, APAP)、細菌性(lipopolysaccharides, LPS)、酒精性(alcohol)及脂肪性(high fat diet, HFD)致肝病變之保肝作用。本年度研究發現28天餵食毒性試驗結果證明LSE不具有毒性，而且可以降低肝指數GOT和GPT、以及血脂TCHO和TG的含量，尤其以小鼠最為顯著。至於四種誘導肝損傷模式皆為成功誘發；LSE對抗肝損傷結果發現，除酒精性肝損傷無法達到護肝效果外，其餘化學性、細菌性及脂肪性肝損傷模式中，LSE皆可達到護肝之作用。第二年利用乙醯胺基苯酚(acetaminophen, APAP)及細菌內毒素(lipopolysaccharide, LPS)分別誘導人類肝細胞株HepG2化學性及細菌性損傷，探討LSE護肝的詳細分子機制。首先，在APAP誘導肝細胞損傷方面，LSE及其主要所含的化合物表沒食子兒茶素(epigallocatechin, EGC)皆可降低APAP對於HepG2細胞的傷害並提高存活率。LSE或EGC也可抑制由APAP所誘導HepG2細胞凋亡(apoptosis)的發生，其主要是經由抑制凋亡內在(intrinsic)與外在(extrinsic)及其上游分子ASK1/JNK訊息傳遞路徑進而達到抗細胞凋亡之作用。另外，在LPS誘發肝細胞損傷方面，LSE或EGC能降低LPS誘發HepG2細胞內發炎激素IL-6的表現量，分子機制分析發現LSE透過抑制TLR4 (Toll-like receptor 4)路徑以降低 $I\kappa B\alpha$ 之磷酸化，進而抑制下游分子NF- $\kappa B$ 的轉錄活性，導致發炎相關因子的表現量下降。第三年利用油酸(oleic acid, OA)誘導人類肝細胞株HepG2細胞損傷，而蓮蓬萃取物(lotus seedpod extracts, LSE)與其主要功效成分表沒食子兒茶素(epigallocatechin, EGC)可以增加HepG2細胞存活率並減少細胞中脂肪堆積；此外oleic acid誘導氧化壓力與細胞凋亡的增加，在LSE或EGC的給予下，皆能降低氧化壓力與抑制細胞凋亡來減少肝細胞損傷，分子數據顯示LSE的抗凋亡作用可能通過線粒體途徑介導。綜合以上研究結果，未來蓮蓬萃取物可能具有潛力應用於保肝產品的開發

中文關鍵詞：蓮蓬、護肝、肝損傷、脂肪肝、乙醯胺基苯酚、細菌內毒素、細胞凋亡、油酸

英文摘要：Lotus seedpod is usually discarded, except when sometimes used as a traditional medicine with hemostasis function and for eliminating bruise. In first year, we aimed to investigate the hepatoprotective effects of lotus seedpod extract(LSE). The study was designed to investigate the in vivo effect of LSE on 28-day feeding toxicity study, and multiple liver injury models, including N-acetyl-p-aminophenol(APAP)-, lipopolysaccharides(LPS)-, alcohol-, and high fat diet(HFD)-induced liver injury. 28-day feeding toxicity study results showed that serum levels of

glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, triglycerides and total cholesterol in LSE-treated male mice were decreased as compared with control group. In vivo studies, LSE improved APAP-, LPS-, and HFD-induced liver injury. In second year, we want to clarify the molecular mechanisms of LSE protection against APAP- and LPS-induced liver injury. LSE dose-dependently improved the survival of human liver HepG2 cells from APAP-induced loss of viability. LSE showed potential in reducing APAP-induced occurrence of apoptosis via ASK1/JNK pathway were confirmed by morphological and biochemical features. Furthermore, LSE was demonstrated to reduce LPS-induced an increase in level of IL-6 in HepG2 cells. Molecular data also showed that antiinflammatory effects of LSE might be mediated via the downregulation of Toll-like receptor 4/NF- $\kappa$ B signaling. In third year, we examined the hepatoprotective effect of LSE in vitro. Oleic acid(OA) is used to induce the phenotype of non-alcoholic fatty liver disease in HepG2 cells. LSE improved the OA-induced loss of viability and lipid accumulation of HepG2 cells. Furthermore, LSE showed potential in reducing OA-induced oxidative stress, apoptotic bodies formation and caspase-3 activation. These results demonstrated that LSE will be useful for clinical implications in the prevention of liver injury and apply as healthy foods.

英文關鍵詞：lotus seedpod, hepatoprotective, liver injury, fatty liver, N-acetyl-p-aminophenol, lipopolysaccharides, oleic acid

## 中、英文摘要及關鍵詞 (keywords)

蓮蓬(lotus seedpod)味苦性澀溫，自古即被用來行氣除脹、益補脾胃、止血化瘀、清熱及降肝火功效。過去研究顯示蓮蓬原花青素(procyanidins of lotus seedpod, LSPCs)具有抗氧化以及免疫調節之活性，本計畫擬探討蓮蓬萃取物(lotus seedpod extracts, LSE)多重護肝之功效。第一年計劃建立多重肝損傷之動物模式，探討 LSE 是否具有保肝之功效，並另行安全毒性評估。工作項目包括 28 天餵食毒性試驗；分析 LSE 對於化學性(N-acetyl-p-aminophenol, APAP)、細菌性(lipopolysaccharides, LPS)、酒精性(alcohol)及脂肪性(high fat diet, HFD)致肝病變之保肝作用。本年度研究發現 28 天餵食毒性試驗結果證明 LSE 不具有毒性，而且可以降低肝指數 GOT 和 GPT、以及血脂 TCHO 和 TG 的含量，尤其以小鼠最為顯著。至於四種誘導肝損傷模式皆為成功誘發；LSE 對抗肝損傷結果發現，除酒精性肝損傷無法達到護肝效果外，其餘化學性、細菌性及脂肪性肝損傷模式中，LSE 皆可達到護肝之作用。第二年利用乙醯胺基苯酚(acetaminophen, APAP)及細菌內毒素(lipopolysaccharide, LPS)分別誘導人類肝細胞株 HepG2 化學性及細菌性損傷，探討 LSE 護肝的詳細分子機制。首先，在 APAP 誘導肝細胞損傷方面，LSE 及其主要所含的化合物表沒食子兒茶素(epigallocatechin, EGC)皆可降低 APAP 對於 HepG2 細胞的傷害並提高存活率。LSE 或 EGC 也可抑制由 APAP 所誘導 HepG2 細胞凋亡(apoptosis)的發生，其主要是經由抑制凋亡內在(intrinsic)與外在(extrinsic)及其上游分子 ASK1/JNK 訊息傳遞路徑進而達到抗細胞凋亡之作用。另外，在 LPS 誘發肝細胞損傷方面，LSE 或 EGC 能降低 LPS 誘發 HepG2 細胞內發炎激素 IL-6 的表現量，分子機制分析發現 LSE 透過抑制 TLR4 (Toll-like receptor 4)路徑以降低  $I\kappa B\alpha$  之磷酸化，進而抑制下游分子 NF- $\kappa B$  的轉錄活性，導致發炎相關因子的表現量下降。第三年利用油酸(oleic acid, OA)誘導人類肝細胞株 HepG2 細胞損傷，而蓮蓬萃取物(lotus seedpod extracts, LSE)與其主要功效成分表沒食子兒茶素(epigallocatechin, EGC)可以增加 HepG2 細胞存活率並減少細胞中脂肪堆積；此外 oleic acid 誘導氧化壓力與細胞凋亡的增加，在 LSE 或 EGC 的給予下，皆能降低氧化壓力與抑制細胞凋亡來減少肝細胞損傷，分子數據顯示 LSE 的抗凋亡作用可能通過線粒體途徑介導。綜合以上研究結果，未來蓮蓬萃取物可能具有潛力應用於保肝產品的開發。

關鍵詞：蓮蓬、護肝、肝損傷、脂肪肝、乙醯胺基苯酚、細菌內毒素、細胞凋亡、油酸

Lotus seedpod is usually discarded, except when sometimes used as a traditional medicine with hemostasis function and for eliminating bruise. In first year, we aimed to investigate the hepatoprotective effects of lotus seedpod extract(LSE). The study was designed to investigate the in vivo effect of LSE on 28-day feeding toxicity study, and multiple liver injury models, including N-acetyl-p-aminophenol(APAP)-, lipopolysaccharides(LPS)-, alcohol-, and high fat diet(HFD)-induced liver injury. 28-day feeding toxicity study results showed that serum levels of glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, triglycerides and total cholesterol in LSE-treated male mice were decreased as compared with control group. In vivo studies, LSE improved APAP-, LPS-, and HFD-induced liver injury. In second year, we want to clarify the molecular mechanisms of LSE protection against APAP- and LPS-induced liver injury. LSE dose-dependently improved the survival of human liver HepG2 cells from APAP-induced loss of viability. LSE showed potential in reducing APAP-induced occurrence of apoptosis via ASK1/JNK pathway were confirmed by morphological and biochemical features. Furthermore, LSE was demonstrated to reduce LPS-induced an increase in level of IL-6 in HepG2 cells. Molecular data also showed that antiinflammatory effects of LSE might be mediated via the downregulation of Toll-like receptor 4/NF- $\kappa B$  signaling. In third year, we examined the hepatoprotective effect of LSE in vitro. Oleic acid(OA) is used to induce the phenotype of non-alcoholic fatty liver disease in HepG2 cells. LSE improved the OA-induced loss of viability and lipid accumulation of HepG2 cells. Furthermore, LSE showed potential in reducing OA-induced oxidative stress,

apoptotic bodies formation and caspase-3 activation. These results demonstrated that LSE will be useful for clinical implications in the prevention of liver injury and apply as healthy foods.

Key words: lotus seedpod, hepatoprotective, liver injury, fatty liver, N-acetyl-p-aminophenol, lipopolysaccharides, oleic acid

## 目錄

一、前言	1~3 頁
二、研究目的	3 頁
三、文獻探討	3~4 頁
四、研究方法	4~7 頁
五、結果與討論（含結論與建議）	7~11 頁
六、參考文獻	12~14 頁
七、附表及附圖	15~22 頁

## 一、前言

人體的肝臟是身體內最大的器官，其執行許多主要功能以維持身體的平衡及健康，包括產生血清蛋白質及荷爾蒙、將外來物質進行解毒作用、負責葡萄糖及脂質之代謝等。當物質進入體內吸收，血液可從小腸表面直接流至肝臟之門靜脈，並經由肝臟作代謝而後排除，因此肝臟相較於其他器官容易造成毒性傷害。導致肝損傷約有 50% 是由藥物所引起的，其他原因包括病毒或感染、酒精、飲食、自體免疫、肝膽腫瘤、遺傳等。一般而言，肝臟具有強大再生和代償能力，對輕度或局限性損傷往往能順利修復，但是當酒精或藥品毒物突然暴增或逐漸累積，肝臟代謝出現障礙，主要可分成四個類型肝病：脂肪肝(fatty liver)、肝炎(hepatitis)、肝硬化(cirrhosis)及肝癌(liver cancer)(1)，嚴重將危及生命。肝病盛行率由行政院衛生署公告 101 年國人十大死因統計資料得知，惡性腫瘤(malignant neoplasms)高居第一位，其中肝癌佔惡性腫瘤名列第二；而慢性肝病與肝硬化(chronic liver disease and cirrhosis)則位居十大死因第九名(行政院衛生署，2013)，因此護肝與預防肝病是日常生活中急切需要關注的保健議題。以下將以多重肝損傷(multiple liver injury)類型及致病機轉分別討論。

### 1.1. 化學性肝損傷 (Chemical-induced liver injury)

根據美國 1998-2007 年統計發現乙醯胺基苯酚(N-acetyl-p-aminophenol, acetaminophen, APAP)使用過量是急性肝衰竭病患最主要病因(2)，並有研究指出過量使用 APAP 會造成肝損傷(3)。APAP 為常用止痛劑「普拿疼」的主要成份，經研究調查結果發現，國內約有 1.5% 的青少年平均每一個月至少服用 15 天以上的止痛藥，更有 0.35% 已經藥物成癮，其中又以 APAP 類的藥物為主(4)。

### 1.2. 細菌性肝損傷 (LPS-induced liver injury)

革蘭氏陰性菌細胞壁主要成分為脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)，LPS 屬於內毒素(endotoxin)的一種。LPS 可以在動物體內引發發炎作用，並產生氧化壓力，進而造成肝臟等多重的器官損傷。LPS 所誘導發炎反應，目前已知經由 Toll-like receptor 4 (TLR4) 活化 TNF- $\alpha$ 、interleukin-1(IL-1)、interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )與抗發炎細胞激素 IL-4、IL-6、IL-10 與 IL-11 的表現，進而損傷肝臟(5)。

### 1.3. 高脂肪飲食與肝損傷 (High fat diet-induced liver injury)

高脂肪飲食(high fat diet, HCD)與許多疾病有關，包括肥胖、心血管疾病以及第二型糖尿病，也與肝臟脂肪性病變有關(6)。過去研究發現以高脂肪食物餵食大鼠會造成大鼠體內脂質過氧化，而導致肝臟細胞 DNA 的損傷(7)。高脂肪食物會形成膽結石與黃膽症狀的動物實驗也已被證實(8)。

### 1.4. 保肝機制 (Mechanisms of liver protection)

#### 1.4.1. 抑制細胞凋亡 (Inhibition of cell apoptosis)

細胞凋亡又稱為程序性細胞死亡(programmed cell death, PCD)，是一種生理上的死亡過程。在胚胎發育過程與器官成熟的生理發展中扮演著很重要角色。在 1972 年，Kerr 等人就提出程序性死亡的觀念，認為細胞凋亡最主要的機制在維持細胞恆定(9)。因此，當肝細胞面對各種外來刺激時，將引發肝臟細胞的凋亡，因此本研究將利用蓮蓬萃取物抑制肝細胞受化學性、細菌性、酒精性、脂肪性等外來刺激所導致的細胞凋亡。

1.4.1.1. 外在傳導路徑：指由受體所傳導的凋亡路徑。主要是經由 TNF 家族所傳遞之一連串死亡訊號，包括 Fas(Apo-1/CD95)、TRAIL-R (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-Receptor/DR4)、TNFR1 以及 TNFR2。例如，當 Fas ligand (FasL)與細胞膜表面接受器 Fas 結合後，促使下游的受體傳導蛋白質 FADD (Fas associating protein death domain)及 procaspase-8 結合形成一複合體 death-inducing signaling complex (DISC)，進而活化 procaspase-8，活化型的 caspase-8 便活化其下游的 caspase-3、caspase-7 及 caspase-6，最後導致細胞凋亡。

1.4.1.2. 內在傳導路徑：指由粒線體(mitochondria)所傳導的凋亡路徑。在外在的刺激下(如：ROS、放射線、藥物等)，細胞質的粒腺體膜電位降低，此時，粒腺體會釋放出 cytochrome c 等蛋白質，當 Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1)、cytochrome c、dATP 及 procaspase-9 結合形成凋亡複合體 (apoptosome)後，procaspase-9 便形成活化態的 caspase-9，同樣活化下游的 caspase-3 等而使細胞凋亡。



1.4.1.3. Caspase (Cysteine dependent aspartate specific protease) 家族：為胱胺酸蛋白酵素家族，此種酵素在細胞體內是以 proenzyme 的形式存在，經由蛋白水解的切割作用，變成 heterodimers 而具有活性，在啟動與執行細胞凋亡反應上扮演重要的角色。哺乳類細胞中，目前已發現 14 個成員，依據其結構與功能分為兩大群：一群為起始酵素(initiator caspase)，如 caspase-8 與 caspase-9，含有一段較長且具有功能的重要 prodomain (在活化時會被切掉)，屬於上游調節者。另一群為影響酵素(effector caspase)，如 caspase-3、caspase-6 與 caspase-7，其特色是具有一段較短的 prodomain，在凋亡反應中扮演下游調節者(10)。起始酵素的作用，主要是促進並活化影響酵素，傳遞細胞凋亡的訊號，而影響酵素的作用則是直接裂解某些蛋白，如負責 DNA 修補功能的 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)，PARP 被切斷後，其分子量由 110 KDa 變成 85 KDa 進而成為促使細胞凋亡的蛋白，以及許多維持細胞結構之蛋白質(如 lamin A 等)，或活化其他分解的酵素，如 Caspase-activated DNase (CAD)、DNA degradation enzyme，來執行細胞的死亡過程(11)。

1.4.1.4. Bcl-2 家族：Bcl-2 分子量 26 KDa，為一種 integral membrane protein，主要分佈於細胞質中的粒腺體外膜、內質網以及細胞核膜上，Bcl-2 亦屬於一種能調節 caspases 活性的蛋白質。Bcl-2 基因是第一個被發現與細胞凋謝死亡有關的基因，但是 Bcl-2 基因是維持細胞的存活。Bcl-2 會大量表現於一般胚胎生長的過程，以及一些必需長期存活的細胞。Bcl-2 並非單獨存在的分子，而是一個包含不同相似基因的族群。而每個 Bcl-2 家族成員皆在細胞的凋謝死亡中扮演重要角色。目前已知 Bcl-2 家族有 18 個成員，依其功能可分為抑制細胞凋亡(如：Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1)以及促進細胞凋亡(如：Bad、Bak、Bax、Bid)兩類。在正常情況下，這兩類的蛋白質會維持平衡以調節細胞狀態，當 Bcl-2 表現量高於 Bax 時，便阻止細胞凋亡，反之，若當 Bax 表現量高於 Bcl-2 時，便走向細胞凋亡。當細胞接受到凋亡的訊號時，pro-apoptotic effect 的蛋白，如 Bad 或 Bax 等，會和 Bcl-2 結合，形成二聚體(heterodimer)。此時，二聚體會在粒腺體膜形成孔洞，使粒腺體上的膜電位改變、通透性增加，造成 cytochrome c 從粒腺體內釋放到細胞質中。接著，cytochrome c 會與細胞質中的 Apaf-1 結合，進而活化 caspase-9 及其他相關的蛋白，造成細胞凋亡(12)。

1.4.2. 細胞激素及發炎相關蛋白(Cytokines and inflammation-related regulatory proteins)：

1.4.2.1. 腫瘤壞死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha; TNF- $\alpha$ )：TNF 細胞激素的產生，在人體中是用來對抗宿主感染的防禦系統，它參與許多發炎和免疫反應。TNF- $\alpha$  主要是由巨噬細胞內皮細胞和一些腫瘤細胞所分泌的物質，會趨使嗜中性白血球往感染處移動並產生發炎反應，進而對抗惡性腫瘤生長及毒殺細胞(13)。肝臟受到 LPS 的刺激後，會活化庫氏細胞並清除 LPS，而 LPS 可使庫氏細胞產生大量促發炎介質，像是 TNF- $\alpha$  及 IL-1，進而導致肝損傷(14)。

1.4.2.2. 白介素-1 $\beta$  (Interlukin-1 $\beta$ ; IL-1 $\beta$ )：IL-1 是一種多肽的細胞激素，由單核球、巨噬細胞、和纖維母細胞等所分泌，在人體中白介素 1 $\alpha$ 、白介素 1 $\beta$  及白介素接受器結抗子(interlukin-1 receptor antagonist; IL-1Ra)的形式存在(15)。IL-1 $\beta$  在發炎及免疫反應中扮演很重要的角色，當體內受到 LPS 的刺激後，會促使 IL-1 $\beta$  的分泌，引起發炎反應，像是誘導肝細胞中急性反應蛋白的合成、活化 B 細胞及 T 細胞、促進一氧化氮分泌等(16)。

1.4.2.3. 白介素-6 (Interlukin-6; IL-6)：IL-6 主要由巨噬細胞、嗜中性白血球及 T 細胞等分泌，在受傷的組織中或受到感染，它的活化會使身體中的免疫反應啟動，例如急性期蛋白的增加、B 細胞產生抗原及 T 細胞的活化等。另外，IL-6 也能啟動發炎、免疫及細胞存活等相關路徑，如 JAK/STAT 及 Ras/MAPK 等路徑，這些因子和癌化過程、腫瘤入侵及血管新生都密切相關(17)。

1.4.2.4. 核轉錄因子(Nuclear factor kappa B; NF- $\kappa$ B)：在哺乳類動物體中，NF- $\kappa$ B 分別由 5 種蛋白組成：NF- $\kappa$ B1 (p105 and p50)、NF- $\kappa$ B2 (p100 and p52)、c-Rel、RelB 及 RelA (p65)，這五種次單元會形成 Rel homology domain，且它對不同的標靶基因具有不同的親和力，是存在於細胞質的轉錄因子。而 NF- $\kappa$ B 上游關鍵調控激酶 I $\kappa$ B kinase (IKK)是由 IKK $\alpha$  及 IKK $\beta$  所組成，它可以使 I $\kappa$ B 磷酸化並抑制 I $\kappa$ B 的作用。IKK/NF- $\kappa$ B 訊號路徑在體內多種生理和病理過程中是一個關鍵的作用。在細胞未受到刺激的情況下，細胞質的 NF- $\kappa$ B 會與 I $\kappa$ B 結合，形成不活化的 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 複合物。當受到 LPS



或發炎激素刺激後，會啟動 IKK  $\alpha/\beta$  將 I $\kappa$ B 磷酸化，使 I $\kappa$ B 降解，而使 NF- $\kappa$ B 被釋放出來並進入細胞核中調節下游基因，其所調控的基因大多與發炎及細胞存活相關(18)。

## 二、研究目的

現今由於社會環境與結構的變遷、醫藥生物科技的日新月異，使得保健、養生的觀念日益受到重視。許多研究學者亦致力於相關的研究，例如：癌症、心血管疾病、細胞老化與死亡、營養與保健等等。近年來，國內食品安全陸續亮紅燈，國人飲食面對許多外來有害物質的傷害，這些急性或慢性的毒物傷害，可能直接或間接與國人癌症高發生率有關，根據衛生署統計，民國 100 年國人 10 大死因仍以癌症居首，而肝癌更是排名十大癌症死亡順位第二名。因此由天然物中萃取功效成份來對抗肝損傷，除可大幅降低國人健保資源的消耗，也能帶來相當可觀的經濟效應。化學預防是近年來在癌症的臨床或基礎研究中重要且快速進展的科研領域。我們研究室近年來致力於由台灣常見藥草中鑑定具化學預防活性潛能的天然植物萃取物與天然物。其主要的目的是希望發展出一套系統性之體外（細胞培養系統）及體內（動物模式）之研究平台與提供重要之科學性數據，來評估、驗證並有效應用目標藥用植物於將來做為人類抗（防）癌之健康食品或另類保健產品之可能性。

植物蓮在台灣用途多在庭園造景欣賞及供人食用，故為著名食用、藥用兼觀賞植物，經濟價值極高。近年有關於植物蓮的研究多著重於蓮心及荷葉等功能性成份分析與生物活性之探討，然而對於蓮蓬則極少有科學文獻報導。蓮蓬為傳統中藥材，但目前蓮蓬於蓮子採收後被視為廢棄物而丟棄。過去的研究顯示蓮蓬成分富含原花青素，並報導其具有較強的清除自由基和抗氧化能力，顯示蓮蓬也可以扮演化學預防與保健的角色。因此，本研究將針對台灣生產之蓮蓬進行初步之多酚類定性、定量分析，以及多重護肝功能之體內外研究。目的在釐清於多重肝臟病變的過程中，蓮蓬萃取物所參與影響的範疇及其分子機制。研究期望能提供國人使用蓮蓬及農業推廣時，有一參考依據；為符合新時代講究自然與健康飲食的觀念，提供一無毒性的天然抗氧化劑與多重護肝保健產品，並提高植物蓮農業作物的經濟效益。

## 三、文獻探討

1. 乙醯胺基苯酚 APAP 為常見解熱止痛藥物「普拿疼」成分，過量使用會造成肝臟損傷(3)。食藥署研究「全國學童用藥知能與行為調查」報告指出，高達 5 成 3 學生不知道含 APAP 的止痛藥，成人每天不可以超過 4000 毫克。而也有研究指出，國內約有 1.5% 的青少年平均每一個月至少服用 15 天以上的止痛藥，更有 0.35% 已經藥物成癮，其中又以 APAP 類的藥物為主(4)。
2. LPS 是革蘭式陰性菌細胞壁主成分，屬於內毒素的一種。LPS 可以在動物體內引發發炎作用，並產生氧化壓力，進而造成肝臟等多重的器官損傷。LPS 誘導發炎反應，經由 TLR4 活化 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IFN $\gamma$  與抗發炎細胞激素 IL-4、IL-6、IL-10 與 IL-11 的表現，進而損傷肝臟(5)。最近有研究指出，前花青素衍生物(procyanidin dimer B2)經由活化 IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-M protein 來抑制 LPS 所誘發的 TLR4 路徑，進而抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-12p70 的表現(19)。因此富含 catechin 及 EGC（兩者為原花青素之裂解產物）的 LSE 應具有保護肝細胞免於 LPS 損傷的功效。
3. 最近亦有研究指出，高脂肪食物餵食小鼠會損害小鼠肝臟再生能力。而其分子機轉研究則發現高脂肪飲食會增加肝臟細胞 I $\kappa$ B 表現而抑制 NF- $\kappa$ B 的轉錄活性，進而抑制下游因子 Cyclin D1 與 Bcl-xL 的表現，使肝臟細胞更容易走向細胞凋亡的途徑，減低受高脂肪損傷之肝臟細胞的再生能力(20)。最近更有研究指出，高脂餵食小鼠之後會損害肝細胞自噬作用(21)。另有研究證實 EGCG 可以經由活化 TGF/SMAD、PI3 K/Akt/FoxO1 與 NF- $\kappa$ B 路徑來降低高脂飲食引發老鼠肝纖維化、氧化壓力及發炎狀況，其中也發現 EGCG 可改善高脂老鼠 ALT/AST 比例由 0.5 降低至 0.3(22)。
4. 根據過去 HPLC 分析發現蓮蓬多酚類化合物含量以表沒食子兒茶素(Epigallocatechin; EGC)為最多，具有 11.27% (23)，其次為兒茶素(catechin)。近年來有文獻指出，綠茶中的 EGC 能夠降低因 E.Coli 引起的尿道感染而達到抗菌的效果(24)。Kushima 等人提出 EGC 能抑制 ErbB2 及 ErbB3 蛋白的磷酸化，進而抑制乳癌細胞的轉移作用(25)。另外，Vergote 學者等人提出，EGC 可以透過增加 Bax 蛋白的表現

量，降低 Bcl-2 的生成，使乳癌細胞(MCF-7 及 MDA-MB-231)進行細胞凋亡，進而抑制乳癌細胞的生長(26)。然而，EGC 對於保肝之功效仍有待進一步研究。

5. 目前全世界已發表蓮蓬研究約十餘篇，其中研究發現蓮蓬內含之原花青素(procyanidins of lotus seedpod, LSPCs)具有抗氧化(27)、抗老化、增強記憶力(28)、免疫調節(29)、抑制黑色素合成(30)、減緩醱化終產物的傷害(31)及降低低頻電磁波的氧化傷害(32)。因此本研究利用蓮蓬萃取物對抗化學性、細菌性、酒精性及脂肪性肝臟損傷具有發展潛力，且經由完成體內外動物與細胞實驗，將可提升蓮蓬之農業經濟價值，開發蓮蓬護肝之保健產品。

#### 四、研究方法

4.1. 蓮蓬萃取物 (LSE) 之製備：秤取乾燥蓮蓬 100 g，加入 6 L distilled water，以 100°C 煮 2 小時，待冷後過濾，將濾液進行冷凍乾燥，得其粉末即為蓮蓬粗萃取物，最後進行冷凍乾燥為粉末。

4.2. 28 天餵食毒性試驗(28-day feeding toxicity study)：28 天餵食毒性試驗之目的是測試試驗物質經重覆給予 28 天後對哺乳類動物可能產生之毒性影響，了解毒性變化之產生，同時測定無毒性顯示之劑量。本實驗模式分組概述如下：正常組、1%蓮蓬萃取物、2%蓮蓬萃取物、5%蓮蓬萃取物。以 ICR 進行每組公母鼠各 10 隻，共 80 隻，萃取物拌於飼料中，每天固定時間給予試驗物質，連續 28 天。分析體重與食物消耗量(定期測量動物的體重及食物消耗量)。血清生化檢驗(Clinical Chemistry)：包含 alkaline phosphatase、alanine aminotransferase、aspartate aminotransferase、gamma-glutamyl transferase、albumin、bilirubin (total)、creatinine、urea nitrogen、glucose、protein (total)。組織病理檢驗：1.測量主要臟器重量，包含肝、腎、心、脾臟。2. 肝、腎、心、脾臟的組織病理切片檢驗。

4.3. LSE 對抗化學性(乙醯胺基苯酚, APAP)致肝臟損傷動物實驗：以 BALB/c 小鼠(20-25 克)進行，每組 10 隻，共 50 隻。本實驗模式分組概述如下：(A) 正常控制組：腹腔(intraperitoneally, I.P.)注射生理食鹽水+經口(peroral, per os, P.O.)管餵去離子水；(B) 負對照組(肝臟損傷組)：400 mg APAP/kg bw (I.P.) + 去離子水(P.O.)；(C) 正對照組(N-acetylcysteine, NAC 治療對照組)：400 mg APAP/kg bw (I.P.) + 600 mg NAC/kg bw (P.O.)；(D) 400 mg APAP/kg bw (I.P.) + 1%蓮蓬萃取物(P.O.)；(E) 400 mg APAP/kg bw (I.P.) + 2%蓮蓬萃取物(P.O.)。A 組腹腔注射生理食鹽水(0.6 ml/30 g bw for mice)，B-E 組腹腔注射 400 mg APAP/kg bw (0.6 ml/30 g bw for mice)，每週 2 次(相隔 3-4 天)於樣品管餵前 1 小時進行肝臟炎誘導，以減少藥物及樣品互相影響；並在 A、B 組每日管餵去離子水，在 C 組管餵 NAC (600 mg/kg bw for mice)，在 D、E 組則於乙醯胺基苯酚誘導肝臟損傷前 1 星期開始給予試驗樣品(共為期 9 週)。所有實驗動物每週投予試驗樣品(相對於去離子水或 NAC)後 4 小時，以眼窩採血方式檢測肝臟的生化功能。最後於 APAP 誘導肝臟損傷第 8 週結束時全部犧牲，抽血後剖腹取肝臟標本。

4.4. LSE 對抗細菌性(LPS)致肝臟損傷動物實驗：以 ICR 小鼠(20-25 克)進行，每組 15 隻，共 60 隻。本實驗模式分組概述如下：(A) 正常控制組：腹腔(intraperitoneally, I.P.)注射生理食鹽水+經口(peroral, per os, P.O.)管餵去離子水；(B) 負對照組(肝臟損傷組)：10 mg LPS/kg bw (I.P.) + 去離子水(P.O.)；(C) 10 mg LPS/kg bw (I.P.) + 1%蓮蓬萃取物(P.O.)；(D) 10 mg LPS/kg bw (I.P.) + 2%蓮蓬萃取物(P.O.)。將 A-D 組小鼠隨機分組後，依照組別給予正常飲食或餵食蓮蓬萃取物，經飼養四週後，犧牲前 16 小時給予以下處理：A 組腹腔注射生理食鹽水(0.2ml/30 g bw for mice)，B-D 組腹腔注射 10 mg LPS/kg bw (I.P.) (0.2 ml/30 g bw for mice)。犧牲後採取血液及肝臟臟器進行檢測。

4.5. LSE 對抗酒精性(Alcohol)致肝臟損傷動物實驗：實驗動物宜採用雄性 8-10 週齡之 C57BL/6J (B6)小鼠，體重約 20 克，每組實驗動物隻數 10 隻。將研究組別分為 A.正常控制組：正常飲食組；B.負對照組：Lieber-DeCarli 流質飼料餵食組；C 組：Lieber-DeCarli 流質飼料+1%蓮蓬萃取物(P.O.) 實驗組；D 組：Lieber-DeCarli 流質飼料+2%蓮蓬萃取物(P.O.)實驗組。以 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料誘發 C57BL/6J (B6)小鼠酒精性脂肪肝損傷實驗模式，本方法中之 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料選擇市售流質酒精飼料。實驗前將性成熟 C57BL/6J (B6)小鼠以亂數法分為至少 4 組，每組 10 隻：(A) 為正常控制組：Lieber-DeCarli 流質正常飼料任食 + 經口(peroral, per os, P.O.)管餵去離子水；(B) 組為負對照組(肝臟損傷組)：Lieber-DeCarli 流質酒精飼料任食 + 去離子水(P.O.) (3) C、D 組為實驗組：Lieber-DeCarli

流質酒精飼料任食 + 兩種劑量之試驗樣品 (P.O.)。A 組 (正常控制組) 管餵去離子水(P.O.)，B-D 組 Lieber-DeCarli 流質酒精飼料任食，每天一次在 A、B 組以管餵去離子水，在 C、D 組則管餵試驗樣品，共為期 4 週，試驗前 1 週需逐步增加酒精飼料中酒精含量讓實驗動物適應含酒精之液態飼料。試驗開始後，所有實驗動物分別於每天投予試驗樣品與去離子水，最後於第 4 週結束時秤重後全部犧牲，採血檢驗肝臟生化功能，並剖腹取肝臟標本，秤重後比較其肝重體重比，並以 H&E 染色來進行組織病理學觀察。

4.6. *LSE* 對抗脂肪性(HFD)致肝臟損傷動物實驗：以高脂飼料誘發 C57BL/6J (B6)小鼠非酒精性脂肪肝損傷實驗模式，每組實驗動物隻數 15 隻。本方法中之高脂飼料選擇市售高脂飼料(脂肪含量 60%)。實驗前將 C57BL/6J (B6)小鼠以亂數法分為四組，每組至少 15 隻：(A)組為正常控制組：正常飼料任食(脂肪含量 10%) + 經口(peroral, per os, P.O.)管餵去離子水；(B)組為負對照組 (肝損傷組)：高脂飼料任食(脂肪含量 60%) + 去離子水(P.O.)(C)組：高脂飼料任食(脂肪含量 60%) + 1% 蓮蓬萃取物(P.O.) 實驗組；(D)組：高脂飼料任食(脂肪含量 60%) + 2% 蓮蓬萃取物(P.O.) 實驗組。共為期 17 週。試驗開始後，所有實驗動物分別於每天投予試驗樣品 (或去離子水)。最後於高脂飼料誘導肝損傷成功結束時，秤重後全部犧牲。採血檢驗肝臟生化功能，並剖腹取肝臟標本，秤重後比較其肝重體重比，並以 H&E 染色來進行組織病理學觀察。

4.7. 肝損傷動物實驗測定項目：上述四種致肝臟損傷動物實驗，進行以下項目測定：

4.7.1. 血清：測定與肝臟傷害相關之成分或酵素活性 (1) AST (GOT)；(2) ALT (GPT)；(3) triglyceride (TG)；(4) cholesterol；(5) 肝重/體重(%)；(6) BUN；(7) creatinine。

4.7.2. 肝臟：測定各種與抗氧化功能相關之成分或酵素活性 (1) Gglutathione (GSH)；(2) Glutathione reductase (GSH Rd)；(3) Glutathione peroxidase (GSH Px)；(4) Glutathione S-transferase (GST)；(5) Superoxide dismutase (SOD)；(6) Catalase。

4.7.3. 抗氧化酵素活性分析：脂質過氧化測定 (Lipid peroxidation assay, TBARS)、GSH (glutathione) 濃度之分析、GPx (Glutathione peroxidase) 酵素活性測定、GSH Rd (glutathione reductase)活性分析、GST (glutathione S-transferase)活性分析、SOD (Superoxide dismutase) 酵素活性測定、CAT (catalase) 活性分析

4.7.4. 細胞激素含量測定：細胞激素 adiponectin 和 leptin 含量分析、細胞發炎激素 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量分析。

4.7.5. 組織病理切片觀察：在實驗結束時，所有小鼠均予以犧牲，採血後割取肝及腎臟，在最大右葉的同一位置割取 2 塊 1 cm x 1 cm 之 Blocks，固定於 10% 的中性福馬林 (formalin) 液中，以石蠟包埋、切片後，做進一步的病理染色，其餘肝及腎臟則置於 -80 $^{\circ}$ C 的冷凍櫃中冷凍，以便檢測抗氧化酵素的活性。為了觀察慢性肝損傷時，肝細胞的受損、脂肪變性、壞死、纖維化等變化，因此除了將肝及腎臟組織做 H&E stain 之外，還做膠原蛋白的特殊染色 (Masson's trichrome stain) 或其他適當染色方法，以便評估肝纖維化程度。

4.8. 細胞培養與處理：將人類肝臟上皮細胞 HepG2 cell 株細胞培養於 DMEM medium 中，放置於 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中生長。

4.9. 細胞毒性測試 (Cytotoxicity assay, MTT assay)：本實驗是應用於測試 HepG2 細胞在面對不同致病原刺激下之細胞存活率的方法。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 tetrazolium bromide) 經由粒腺體中去氫酶 (dehydrogenase) 作用代謝還原為藍紫色結晶，之後再以異丙醇 (isopropanol) 將結晶溶出，並於 OD563 nm 下測定溶液吸光，由吸光度的大小可得知有活性的細胞數目多寡，而死細胞是無法進行此作用的，因此若溶液的吸光值有降低的話，表示細胞有死亡的現象發生，故也可以藉此方法來判定細胞存活與死亡的情形。調整 HepG2 細胞濃度約為 105 cell/ml，以 1 ml 之細胞沖至 24 well microtiter plate 培養，加入不同濃度的 APAP、LPS，反應 24 小時，移除 medium (含藥)，加入新的 medium (不含藥) 和 MTT (0.5 mg/ml) 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 反應 4 小時，移除 medium (含 MTT) 以 PBS washing，加入 isopropanol 將結晶溶出，



在 OD563 nm 下測定溶液吸光。

4.10. 細胞生長曲線分析 (Cell growth assay): 調整 HepG2 細胞濃度約為 105 cell/ml, 以 1 ml 之細胞沖至 24 well microtiter plate 培養, 加入不同濃度的 APAP、LPS, 於 0-48 小時分別收取細胞計數。待反應時間到, 將細胞以 PBS 清洗 2 次, 吸去上清液, 加入 trypsin-EDTA 將細胞打下, 接著以 1500 rpm 離心 5 分鐘, 將收取下來的細胞與 trypan blue 1:1 混合均勻, 以細胞計數盤 (counting chamber) 計算細胞數。

4.11. 細胞凋亡分析 (apoptosis analysis)

4.11.1. 流式細胞儀分析 (Annexin V-PI stain): 將細胞種於 6-well 培養皿中培養, 待細胞長滿後, 分別給予不同時間、濃度之 LSE 處理, 以及加入不同濃度的 APAP、LPS 一起培養 24 小時後, 將培養液收集至離心管, 以 PBS 清洗培養皿中之細胞, 並加入 trypsin 將細胞切下, 將含有細胞的懸浮液一併收集至離心管中離心, 吸去上清液, 以 Annexin-V binding buffer (BioVision) 懸浮 pellet, 並分別加入 Annexin-V-FITC 和 PI 的 kit (BioVision), 混勻, 室溫下避光靜置 5-10 分鐘, 最後將混勻的細胞懸浮液移至康式管中, 利用流式細胞儀 (Flow cytometry, Becton Dickinson FACS Calibur) 偵測螢光強度, 和控制組比較來換算細胞凋亡和壞死的百分比。

4.12. 西方點墨法 (Western blotting): 首先製備細胞萃取蛋白 (cell lysate) 後, 取 50  $\mu$ g 蛋白與 5X loading dye 以 4:1 比例混合, 以 95  $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘, 再置於冰上冷卻, 即可作為電泳樣本。將樣本以 SDS-聚丙醯胺電泳 (SDS-PAGE) 方法進行。之後進行蛋白轉漬, 以固定電壓 100V 轉漬約 2 小時。轉漬完成後, 取出 NC paper, 加入 5% milk blocking buffer, 在室溫下搖晃 1 小時。以 washing buffer (TBS + 0.1% Tween 20) 清洗三次, 每次 10 分鐘, 之後加入一級抗體 (分析 COX-2, TLR4, NF- $\kappa$ B, Bad, Bcl-2, Bax, IAP, caspase-9, caspase-8, caspase-3 等蛋白), 在 4 $^{\circ}$ C 下反應, 隔天早上以 washing buffer 清洗三次, 每次 10 分鐘。接著再加入二級抗體, 置於室溫作用 1 小時後, 以 washing buffer 清洗三次, 每次 10 分鐘。最後將 NC paper 放入盤子 (Tray) 上, 用 Western Lightning (Enhanced chemiluminol Reagent: Oxidizing Reagent= 1:1; 即 ECL substrate) 覆蓋整個 NC paper, 在室溫下約反應一分鐘後, 將盤子放入 FUJIFILM LAS-4000 之冷光螢光影像分析系統中, 以 ImageReader LAS-4000 Life 儀器控制軟體, 在 Chemiluminescence 條件下拍得影像, 並以 FUJIFILM-Multi Gauge V2.2 軟體定量蛋白密度。

4.13. 免疫沉澱法 (Immunoprecipitation, IP): 本實驗利用 Bio-Rad 「SureBeads Magnetic Beads」進行免疫沉澱分析。其可將特定蛋白質 (如: FasL) 沉澱下來並利用抗體 (Fas) 與它進行特異性結合, 以探討蛋白質間的交互作用。實驗步驟 (以 FasL 為例): 將磁珠與其液體均勻混合後抽 50  $\mu$ l 至 eppendorf, 以 1 ml PBS + 0.1% Tween 20 wash 3 次 (若是以 vortex 震盪 wash 則需離心數秒), 接著加入抗體 (FasL) (約 25  $\mu$ l 抗體 + 175  $\mu$ l TBS-Tween), 放於室溫輕輕 shaking 10 分鐘後 (其目的是使磁珠與抗體結合), 固定於磁座並將懸浮液吸除再以 1 ml PBS-Tween wash 3 次, 接著加入 150  $\mu$ l 蛋白質萃取液 (約 10 dish 細胞量), 於室溫輕輕 shaking 1 小時後, 固定於磁座並將懸浮液吸除再以 1 ml PBS-Tween wash 3 次, 但是第三次 wash 需移到新的 eppendorf, 再離心數秒將剩餘 buffer 吸除。接著為 Elution, 即意指將磁珠上的 sample 洗滌下來, 先加入 40  $\mu$ l loading dye 再置於 70 $^{\circ}$ C 乾浴槽作用 10 分鐘, 最後固定於磁座並將懸浮液吸到新的 eppendorf 即可。已萃取完之懸浮液 (sample) 需先定蛋白, 其蛋白濃度較高因此須稀釋 20-25 倍再定量蛋白較適合, 最後貯存於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱備用。其後續跑膠與 Western blotting 相同, 但每 well 蛋白濃度需取 P=250 mg/ml, 不需分析  $\beta$ -actin, 而內標即為純化的蛋白 (FasL), 因此一片膜分析純化下來的蛋白 (FasL), 另一片膜則分析和它結合的蛋白 (Fas)。

4.14 粒線體膜電位分析 (Mitochondrial membrane potential assay, JC-1 staining): JC-1 為帶正電的染劑, 於正常細胞, 其可被粒線體膜上的負電荷吸引並聚集形成二聚體, 於螢光顯微鏡下可發出橘紅色光, 倘若細胞凋亡、粒線體膜電位消失, 則 JC-1 染劑無法被膜上的電場吸引因此散佈於細胞質中, 於螢光顯微鏡下則呈綠色螢光, 因此透過螢光顏色的變化可觀察粒線體膜電位改變之情形。實驗步驟: 於 6-well, 每 well 接種 5 X 10<sup>5</sup> 個細胞, 待細胞加藥處理 24 小時後將廢液吸除並以冰的 PBS wash 細胞 2 次, 備濃度為 0.25  $\mu$ l/ml 的 JC-1 染劑 (稀釋液為 medium), 再每 well 加入 1 ml JC-1 染劑, 染 15 分鐘後, 將細

胞收下並以 1 ml PBS 回溶即可上機，從備染劑後的操作過程皆需避光。

4.15 粒線體分離(Mitochondria isolation)：本實驗使用 Thermo 「Mitochondria isolation kit (Prod #89874)」商業套組進行粒線體分離。以  $2 \times 10^7$  cells/管為例，細胞收下後以 PBS wash 乾淨再離心第二次，將上清液倒除，加入 800  $\mu$ l regent A 以中速 vortex 5 秒鐘後靜置於冰上 2 分鐘，再加入 10  $\mu$ l regent B，在冰上靜置 5 分鐘但每 30 秒則劇烈震盪 5 秒再放回冰上，再置於冰箱劇烈 vortex 1 小時(此為萃取粒線體關鍵步驟)，待時間到後加入 800  $\mu$ l regent C 上下搖勻數次即可再加入蛋白酶抑制劑，以 700g、4°C 離心 10 分鐘，所得 pellet 為細胞核(再經均質即可得細胞核萃取液，均質前需加蛋白酶抑制劑，後續步驟與細胞蛋白質萃取過程相同)，而上清液再以更高轉速 12000 g、4°C 離心 15 分鐘。二次離心後所得之上清液為細胞質，而沉澱物則為粒線體，加 100  $\mu$ l RIPA 與各 1  $\mu$ l 的蛋白酶抑制劑再均質，以 12000 g、4°C 離心 5 分鐘，所得上清液即為粒線體萃取液，其亦需定蛋白再貯存於-80°C 冰箱，跑 Western blotting 時，每 well 蛋白濃度以 30 mg/ml 為佳。

4.16 活性氧物質生成分析(DCFH-DA staining)：於 6-well，每 well 接種  $5 \times 10^5$  個細胞，待細胞貼附六分滿即可進行加藥，加藥前先加染劑(最終染色濃度: 50  $\mu$ M，以 medium 稀釋)，每格加 1 ml、染色 1 小時，再將染劑吸除並以 PBS wash 2 次，接著即可加藥，待 24 小時後將細胞收下，以 1 ml PBS 回溶並上機(Flow cytometry)，配、加染劑與收細胞過程皆須全程避光。

4.17 油紅(oil red o)染色：Oil red o 是一種中性脂肪染劑，能使細胞中的脂肪被染色，並藉此比較不同組細胞中的脂質含量。實驗步驟是將適量細胞培養於 6-well 中，輕搖使其均勻分散後放入恆溫培養箱培養 24 小時，24 小時後將舊的培養基移除後 wash 兩次再各加入 2ml 的培養基，再依各組實驗條件加入 LSE (2.5-10  $\mu$ g/ml)、EGC (4  $\mu$ M)和 OA (0.6 mM)，培養 48 小時。48 小時後，先進行染劑配製，將 Oil red o 粉末用 isopropanol 溶解並配成 5mg/ml 的 stock，stock 再與二次水以 6：4 的比例稀釋，並以 0.22  $\mu$ m 的 filter 過濾後備用。培養完的細胞以 PBS wash 兩次後每個 well 加入 4% paraformaldehyde 1 ml 固定 30 分鐘，然後用 PBS wash 三次後每個 well 加入配好的 Oil red o 1 ml 染色 15 分鐘，用 PBS 再 wash 兩次後每個 well 加入 1 ml PBS 以倒立顯微鏡觀察並拍照。觀察完用 isopropanol 將染劑溶出並各取 200  $\mu$ l 加入 96 孔盤以 ELISA reader 測量波長 492 nm 的吸光值。

4.18 尼羅紅(Nile red)染色：Nile red 也是一種脂肪染劑，其在正常狀態下不會發出螢光，但在富含脂質的環境中其可以發出黃色螢光(隨細胞內儲存中的中性脂質多寡增加螢光強度)。實驗步驟是將適量細胞培養於 6-well 中，輕搖使其均勻分散後放入恆溫培養箱培養 24 小時，24 小時後將舊的培養基移除後 wash 兩次再各加入 2ml 的培養基，再依各組實驗條件加入 LSE (2.5-10  $\mu$ g/ml)、EGC (4  $\mu$ M)和 Oleic acid (0.6 mM)，培養 48 小時。48 小時後，先進行染劑配製，將 Nile red 粉末用 isopropanol 溶解並配成 1mg/ml 的 stock，stock 再與二次水以 1：1000 的比例稀釋備用。培養完的細胞以 PBS wash 三次後用 Trypsin 將細胞打下收集並倒掉上清液，每管加入 4% paraformaldehyde 1 ml 固定 30 分鐘後離心去除上清液，每管加入配好的 Nile red 1 ml 染色 5 分鐘，離心去除上清液後用 PBS 洗滌一次，加入適當量的 PBS 回溶並以 Muse Flow cytometry 偵測 488nm 螢光強度並進行分析。

4.19. 實驗數據統計分析：比較試驗前、後上述各指標值之變化或其結果與正、負對照組比較是否具有統計上之顯著改善 ( $p < 0.05$ )。但當試驗樣品組包括有不同劑量組或有正、負對照組時，必須進行組間的統計比較，例如先以 ANOVA (analysis of variance) 比較，有明顯差異時，再以 Duncan's multiple range test 進行比較，以評估該試驗樣品的最適劑量，以及該試驗樣品與正、負對照樣品功效的比較。然後加以綜合判斷該試驗樣品是否具有保護肝及腎臟或可降低其中某項危險因子之功能。

## 五、結果與討論 (含結論與建議)

### 5.1. 28 天餵食毒性試驗(28-day feeding toxicity study)結果

經由餵食 1%、2%、5% 蓮蓬萃取物 28 天期間，每週記錄公母鼠體重、飲食量、飲水量，結果均無明顯變化(Fig. 1)；28 天後犧牲分析公母鼠肝、腎臟重量也無顯著差異(Fig. 2)；再將公母鼠犧牲時取其血清進行生化檢驗，結果發現，公鼠的 GOT、GPT、TCHO(總膽固醇)、TG(三酸甘油酯)皆有下降趨勢

(Table 1)，母鼠 GOT、GPT、TCHO(總膽固醇)、TG(三酸甘油酯)的下降趨勢沒有公鼠顯著(Table 2)。再將肝、腎、心、脾臟進行組織病理切片檢驗，H&E 染色結果也均無發現異常病兆(Fig. 3)。

## 5.2. LSE 對抗化學性(乙醯胺基苯酚，APAP)致肝臟損傷動物實驗結果

在 28 天餵食毒性試驗發現，餵食蓮蓬萃取物對於公鼠有明顯降低血清中 GOT、GPT、TCHO、TG 的數值，我們以 APAP 誘發公鼠化學性肝臟損傷，餵食 N-acetylcysteine (NAC)為治療對照組，觀察餵食 1%及 2%蓮蓬萃取物對於 APAP 誘發公鼠化學性肝臟損傷的影響。8 週後犧牲觀察肝、腎臟重量也無顯著差異(Fig. 4)。由血清生化分析值發現，APAP 誘導組可使 GOT 及 TG 顯著增加，而餵食蓮蓬組則可有意義降低 GOT 及 TG (Table 3)。分析抗氧化酵素發現，餵食蓮蓬可增加 GSH、GRd、catalase 酵素活性，TBARs 分析結果顯示餵食蓮蓬可有效降低 APAP 引發的脂質過氧化現象(Fig. 5)。餵食蓮蓬可降低細胞發炎激素 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量(Fig. 6)。最後經由病理切片顯示，H&E 染色結果發現 APAP 組可損傷肝細胞，再由 Masson' s trichrome 染色法確認 APAP 組造成的肝纖維化增加，餵食蓮蓬組別可有效減少肝臟纖維化(Fig. 7)。

## 5.3. LSE 對抗細菌性(LPS)致肝臟損傷動物實驗結果

我們以細菌性(LPS)致肝臟損傷，觀察餵食 1%及 2%蓮蓬萃取物對於 LPS 誘發公鼠細菌性肝臟損傷的影響。分別於第 4 與第 8 週後犧牲觀察肝、腎臟重量也無顯著差異(Fig. 8)。由血清生化分析值發現，8 週後，LPS 誘導組可使 GOT、GPT 及 TG 顯著增加，而餵食蓮蓬組則可有意義降低 GOT、GPT 及 TG (Table 5)。分析抗氧化酵素發現，餵食蓮蓬可增加 GPx、catalase 酵素活性，TBARs 分析結果顯示餵食蓮蓬可有效降低 LPS 引發的脂質過氧化現象(Fig. 9)。餵食蓮蓬可降低 LPS 誘發血清與肝臟中細胞發炎激素 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量(Fig. 10)。最後經由病理切片顯示，H&E 染色與 Masson' s trichrome 染色法結果發現 LPS 組與餵食蓮蓬組並無明顯損傷肝細胞，也無造成的肝纖維化 (Fig. 11)。

## 5.4. LSE 對抗酒精性(Alcohol)致肝臟損傷動物實驗

我們以酒精性(Alcohol)致肝臟損傷，觀察餵食 1%及 2%蓮蓬萃取物對於 30%酒精誘發公鼠肝臟損傷的影響。於 4 週後犧牲觀察肝、腎臟重量也無顯著差異(Fig. 12)。由血清生化分析值發現，4 週後，酒精誘導組可使 GOT、GPT 顯著增加，而餵食蓮蓬組則無明顯影響 (Table 6)。分析抗氧化酵素、脂質過氧化 TBARs 分析、細胞發炎激素 IL-6 分析均發現，餵食蓮蓬均無顯著影響 (Fig. 13)。最後經由病理切片顯示，H&E 染色結果發現酒精餵食組可損傷肝細胞，但餵食蓮蓬並無法改善。Masson' s trichrome 染色法結果發現酒精組與餵食蓮蓬組無造成的肝纖維化 (Fig. 14)。

## 5.5. LSE 對抗脂肪性(HFD)致肝臟損傷動物實驗

我們以 60%高脂飲食(HFD)致肝臟損傷，觀察餵食 1%及 2%蓮蓬萃取物對於 60%高脂飲食誘發公鼠肝臟損傷的影響。於 16 週後觀察體重明顯發現，餵食 2%蓮蓬萃取物組體重明顯降低( $P < 0.01$ )，而犧牲觀察肝臟重量發現餵食 2%蓮蓬萃取物可有效降低高脂飲食所誘發肝臟重量增加情形( $P < 0.01$ )，而高脂飲食使腎臟重量降低也因為食 2%蓮蓬萃取物而有效回升( $P < 0.01$ ) (Fig. 15)。由血清生化分析值發現，16 週後，高脂誘導組可使 GOT、GPT、TG、TCHO(膽固醇)、LDL 顯著增加，而餵食 2%蓮蓬萃取物組則明顯降低這些數值 (Table 6)。抗氧化酵素 GPx 與 catalase 餵食蓮蓬可有效提升。脂質過氧化 TBARs 分析，餵食蓮蓬可有效降低脂質過氧化 (Fig. 16)。細胞發炎激素 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量分析均發現，餵食蓮蓬可顯著降低這些發炎因子 (Fig. 17)。最後經由病理切片顯示，H&E 染色結果發現高脂餵食組可導致脂肪肝情形，而餵食 2%蓮蓬萃取物組可明顯改善脂肪肝。Masson' s trichrome 染色法結果發現高脂組與餵食蓮蓬組無造成的肝纖維化 (Fig. 18)。

總結第一年度研究成果，28 天餵食毒性試驗結果發現蓮蓬萃取物並無毒性，而且可以降低 GOT、GPT、TCHO、TG，尤其以公鼠最為顯著。致於四種誘導肝損傷模式皆為成功誘發，蓮蓬對抗肝損傷結果發現，除酒精性肝損傷無法達到護肝效果外，其餘化學性、細菌性及脂肪性肝損傷，蓮蓬皆有護肝功效，因此第一年度證實蓮蓬萃取物可預防化學性、細菌性及脂肪性肝損傷而達到護肝功效。

## 5.6. LSE 對抗化學性(乙醯胺基苯酚，APAP)致肝臟損傷細胞實驗結果與討論

APAP 在正常使用劑量下，大多經由尿液或膽汁排出；然而，若服用高劑量 APAP 則會增加肝臟 CYP2E1 酵素之氧化作用，進而代謝出大量 NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone imine)，過多 NAPQI 會與粒線體中的蛋白質結合致使粒腺體膜電位改變，造成粒線體功能喪失、活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)增加最後使肝細胞急性損傷甚至壞死(33)。細胞凋亡(apoptosis)為生物體主動而有序的死亡過程，此過程受到基因、蛋白質與細胞凋亡因子的相互調控。於細胞實驗中，由 DAPI 染色可看出誘導組具有細胞凋亡特徵，包含：細胞型態改變、皺縮、核濃染等，而在 LSE 治療組，其凋亡特徵減少且細胞型態較為完整(Fig.20A)；由 Annexin V/PI staining 可看出誘導組約有 34%細胞被誘發凋亡，但在 LSE 與 EGC 治療的組別其可減少約 20%的細胞凋亡(Fig.21)，由此結果可知，LSE 與 EGC 具有減緩肝細胞凋亡之可能。Apoptosis 為一複雜的過程，當死亡受體(death receptor)與配體(ligand)結合，會直接或間接活化凋亡蛋白酶(caspase)，進而促使細胞走向凋亡。過去文獻指出，APAP 會誘發內、外在或 ASK 1/JNK 細胞凋亡路徑，使肝細胞造成不可逆的細胞凋亡(33)，由本實驗可看到，APAP 會顯著誘發 apoptosis 外在路徑蛋白 caspase-3,-8,-9 與其上游 Fas/FasL 之蛋白表現，促使細胞走向凋亡途徑，而在 LSE 高劑量(10 $\mu$ g/ml)與 EGC(4 $\mu$ M)治療組，其 caspase 系列蛋白表現顯著下降(Fig.22)。過去研究指出，APAP 會誘發 ASK 1 蛋白並促使其下游 JNK 之活化，進而誘導凋亡蛋白如 Bax 和 Bak 在粒線體外膜聚合，而導致粒線體膜電位改變、膜通透性變大，此時 cytochrome c 從內膜釋出至細胞質而活化 caspase，此路徑也可釋放 AIF(Apoptosis-inducing factor)與(Endonuclease G, 核酸內切酶 G)，此兩種蛋白可直接進入細胞核使 DNA 裂解成碎片而引起細胞凋亡(34, 35)；從本實驗結果可看到，LSE 可降低 APAP 所誘發之 ASK 1 與 JNK 表現(Fig. 26)，進而降低 Bcl-2 family 的促凋亡蛋白(bax,bid)表現(Fig. 23)，也減少粒腺體 cytochrome c、Endo G 釋出至細胞質(Fig. 24)。綜合上述結果可證實我們的實驗結果與先前研究結果一致，而 LSE 於細胞實驗中具有潛力可降低因 APAP 所誘導的肝細胞凋亡(Fig. 29)。

### 5.7. LSE 對抗細菌性(LPS)致肝臟損傷細胞實驗結果與討論

利用人類肝細胞 HepG2 進行不同濃度的 LSE (0-100  $\mu$ g/ml)處理 24 小時，觀察 LSE 對於 HepG2 細胞的存活率是否有影響，藉此判斷 LSE 對細胞是否有毒性。由 Fig. 30A 細胞計數結果可知 LSE (0-25  $\mu$ g/ml)皆不會影響 HepG2 細胞的存活率。我們使用 LPS 合併處理 LSE 或 EGC 共同培養 24 小時後觀察細胞存活之情形。在實驗結果 Fig. 30B 中發現，細胞單獨處理 LPS 或細胞使用 LPS 並合併 LSE 或 EGC，皆對細胞存活率無影響。而在發炎因子 IL-6 的測定中發現，以 LPS 處理 HepG2 細胞後，其細胞內的 IL-6 含量和控制組相比下會上升 1.41 倍且達顯著差異(# $p$ < 0.05)，而細胞處理 LPS 且合併 LSE 5  $\mu$ g/ml 或 EGC 2  $\mu$ M 的組別皆明顯減少細胞內 IL-6 的含量，分別降低 0.65 倍及 0.68 倍(\*\* $p$ < 0.01) (Fig. 31B)。另外，實驗也分析細胞中發炎因子的 mRNA 的表現量，在實驗結果 Fig. 13D 中顯示，以 LPS 處理 HepG2 細胞後，其細胞內 IL-6 的表現量和控制組相比下，上升了 1.49 倍且達到統計上的差異(# $p$ <0.05)。在 Fig. 32A 實驗結果中發現，細胞給予 LPS 後，和控制組相比下，誘導組細胞內的 COX-2 與 iNOS 蛋白表現量明顯增加，而給予 LPS 合併 LSE 的組別，和誘導組相比下，其細胞內 COX-2 與 iNOS 蛋白的表現量會明顯降低。在 Fig. 32B 實驗結果中發現，細胞給予 LPS 後，其 COX-2 及 iNOS mRNA 的表現量和控制組相比下會上升 (### $p$ < 0.01)，而細胞給予 LPS + LSE 5  $\mu$ g/ml 的組別和 LPS 組相比下，能明顯降低 COX-2 及 iNOS mRNA 的表現量。在 Fig. 33 實驗結果可以得知，細胞經 LPS 刺激後會活化 IKK 的表現，和控制組比較下，誘導組明顯上升，而在 LPS + 5  $\mu$ g/ml LSE 的組別和誘導組相比下，其減少 IKK 的表現量。在 IKK 活化後，會使 I $\kappa$ B 被磷酸化並釋出 NF- $\kappa$ B，因此接著分析 p-I $\kappa$ B/I $\kappa$ B 比值的表現量。在細胞給予 LPS 後，誘導組和控制組相比下其 p-I $\kappa$ B/I $\kappa$ B 的表現會明顯增加，而細胞合併 LPS + LSE (2.5、5  $\mu$ g/ml)的組別和誘導組相比下，能使細胞中 p-I $\kappa$ B/I $\kappa$ B 的表現量降低。另外，給予細胞 LPS 後，被釋出的 NF- $\kappa$ B 在細胞質中的表現量，誘導組和控制組相比下，明顯增加，而給予 LPS + LSE 5  $\mu$ g/ml 及 LPS + EGC 2  $\mu$ M 的組別，皆可使細胞中的 NF- $\kappa$ B 降低。在 Fig. 34 實驗結果中得知，細胞經過 LPS 刺激後，誘導組和控制組相比下，其細胞核中轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的表現量會明顯增加；而合併處理 LPS + LSE (2.5、5  $\mu$ g/ml)的組別，和誘導組相比下，可以降低細胞內轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的表現量。在研究結果 Fig. 35 中可知，細胞經由 LPS 刺激後，誘導組和控制組相比下，p-p38/p38



的表現量比值會增加，在 LPS + LSE 5  $\mu\text{g/ml}$  及 LPS + EGC 2  $\mu\text{M}$  的組別和誘導組相比下，其細胞內 p-p38/p38 的表現量比值會減少。而 JNK 及 ERK 此兩大路徑，其細胞中的表現量在統計上皆無達到統計上的差異。由上述結果得知，LSE 可能是藉由透過抑制 p38 來抑制發炎表現，但進一步的分子機制仍有待釐清。接著實驗分析 TLR4 及下游蛋白 MyD88 的表現量，在 Fig. 36 研究結果中顯示，HepG2 細胞給予 LPS 後，誘導組和控制組相比下，TLR4 及 MyD88 蛋白表現量會明顯增加，給予 LPS + LSE (2.5、5  $\mu\text{g/ml}$ ) 和誘導組相比會下降，而 LPS + EGC 2  $\mu\text{M}$  的組別和誘導組相比下亦會下降。由此可得，LSE 可以降低 LPS 和 TLR4 的結合及降低 TLR4 與 MyD88 的結合。綜合上述結果將可能分子機制整理於 Fig. 37。

### 5.8. LSE 對抗脂肪性(oleic acid, OA)致肝臟損傷細胞實驗結果與討論

細胞實驗首先對 LSE 是否能使 HepG2 細胞存活率上升進行確認，由 Fig. 38 可以得知隨著 LSE 劑量的增加存活率有明顯的上升(12%-26%的回升)，因此 LSE 可能具有減緩 OA 所誘導的肝損傷的能力。因為脂肪堆積此誘導模式會產生的結果之一也是 NAFLD 病程必然發生的現象之一，所以接下來確認 LSE 對於 HepG2 細胞脂肪堆積的影響，由 Fig. 39 的兩種脂肪染色實驗我們能夠發現 LSE 給予後細胞中的脂肪堆積情況確實有明顯的降低，如 Nile red 中 2.5、5、10  $\mu\text{g/ml}$  LSE 組與 EGC 組比 OA 組分別低了 43%、44%、54%、41%。由結果我們可以推論 LSE 的給予是能夠使細胞中 OA 所誘導的脂肪堆積減少的，而降低了脂肪堆積可以減少其所引發的後續傷害，這很可能是 LSE 減少肝細胞損傷的原因之一。

由之前的文獻我們可以知道氧化壓力是 NAFLD 惡化成 NASH 的關鍵因素之一 (36-39)。在此誘導模式中應該也會有氧化壓力的產生，所以接下來針對 ROS 的產生進行 DCF 染色實驗，由 Fig. 40 的結果可以看到誘導組比起控制組有更多(約多 25%)的細胞有更強的訊號，代表誘導組中細胞具有更大的氧化壓力，而處理組除了 2.5 LSE 組也都有所下降，可以推論 OA 誘導確實增加了氧化壓力而中高劑量的 LSE 也確實發揮了其抗氧化能力減少了氧化壓力，減少 ROS 應該也是 LSE 減少肝細胞損傷的原因之一。

在細胞中 ROS 的增加可以促使自噬的增加，自噬通過吞噬和降解氧化物來減少氧化損傷，保護細胞(40-42)，另外自噬也有消除細胞中脂滴的功能(43, 44)。所以我們使用 AVO stain 觀察細胞自噬的變化，由 Fig. 41 (D)的結果可以觀察到雖然誘導組的自噬作用確實有上升但上升幅度並不大，而中高劑量的 LSE 處理組則與控制組接近，且兩組間比較皆無顯著差異。為了確定 OA 與 LSE 對自噬的影響所以對自噬相關的蛋白進行了分析，由 Fig. 42 的結果可以知道 PI3K/akt/mTOR pathway 中誘導組只有 p-akt/akt (1.19 倍)比起控制組有較明顯的上升，而處理組部分低劑量 LSE 組與誘導組相似，中高劑量 LSE 組與 EGC 組則在 class I PI3K、p-akt/akt 表現量上則有稍微的上升，但 mTOR 則普遍降低。就結果來說誘導組應該沒有對此抑制自噬路徑造成明顯影響，而中高劑量 LSE 組與 EGC 組的 mTOR 與 class I PI3K、p-akt/akt 趨勢的不一致可能是因為這些蛋白不只參與一條路徑所致，但是否是如此或為哪條路徑需要進一步的研究。

在關於自噬相關蛋白的分析，Fig. 43 的蛋白表現量誘導組比起控制組普遍只有稍微升高，而處理組中也只有高劑量 LSE 組與 EGC 組有觀察到較明顯的表現量下降。就結果來說誘導組對於自噬的活化是不明顯的，這與先前的一些研究結果是不同的(40, 45)，由其中同樣使用 OA 誘導的細胞實驗研究(45, 46)的條件分析，其 OA 誘導時間分別為 4 小時、6 小時與 24 小時，而本實驗採用的誘導時間是 48 小時而 OA 劑量也比其略高，另外也有研究指出隨著 NAFLD 病程的惡化自噬可能會被抑制(44, 47)，所以原因可能是自噬是脂肪堆積早期會引發的一種保護反應，而當自噬被抑制可能將無法拮抗凋亡，導致凋亡反應的發生。而本實驗使用的 LSE 在此時間點可能並不具有刺激自噬上升保護細胞的作用，但真相可能需要進一步研究來確認。

ROS 除了誘導自噬外也會誘導凋亡的產生(48, 49)，而之前的脂肪堆積誘導實驗也指出會誘導凋亡的產生(50, 51)。所以首先使用了 DAPI 染色與 Annexin V/7-AAD 染色來觀察是否誘導凋亡，由 Fig. 44 的結果可以看到可以看到 DAPI 與 Annexin V/7-AAD 結果的趨勢相似，在 Annexin V/7-AAD 結果上，OA 組明顯高於控制組為控制組的 1.56 倍，代表本實驗模式確實如先前研究般誘導了凋亡的產生。而

在 LSE 處理組中也觀察到劑量依賴性的降低凋亡效果，所以由這兩個實驗可以推論 LSE 與 EGC 都具有抑制細胞凋亡的能力。

在凋亡機制中，粒線體膜電位改變是內在路徑凋亡的重要關鍵之一，因為先前研究顯示 ROS 的攻擊會造成粒線體功能障礙誘發膜電位改變從而啟動內在路徑凋亡(52, 53)，所以接下來利用 JC-1 stain 來觀察此誘導模式的粒線體膜電位改變。由 Fig. 45 結果可以觀察到 OA 組粒線體膜電位改變明顯高於控制組為控制組的 5.16 倍，而 LSE 的給予也明顯降低了粒線體膜電位改變。本實驗模式確實如先前研究般誘導了粒線體膜電位改變。而在 LSE 處理組中也觀察到了降低凋亡效果，所以由這個實驗可以推論 LSE 與 EGC 都具有抑制細胞粒線體膜電位改變從而減緩凋亡的能力，但關於不同劑量 LSE 呈現的趨勢與其他實驗不一致可能需要進一步的研究探討。粒線體膜電位改變主要由外粒線體膜上 bcl-2 family 的抗凋亡蛋白與促凋亡蛋白間比例決定，所以接下對 bcl-2 family 其中的重要蛋白進行分析，由 Fig. 46 結果可以觀察到 OA 組抗凋亡的 bcl-2 明顯減少與促凋亡的 bax 明顯增加，此結果是與粒線體膜電位結果相符合的。而處理組也普遍降低 bax 表現量並隨劑量增加 bcl-2 表現量，由此可以推論 LSE 改變了 bcl-2 與 bax 間的比例從而減少粒線體膜電位改變。而 bid 的表現量除了 5 LSE 組有稍微上升外各組沒有太大的差異，bid 是 bax 上游路徑的誘導蛋白，bid 在死亡受體凋亡信號傳導過程中會被 caspase 8 等蛋白酶切割並活化 bax，但有研究指出在無 bid 活化路徑時 bax 也能被活化(54)，所以此處 bax 活化可能並非經由 bid。

粒線體膜電位改變誘導凋亡的路徑中，cytochrome c 由粒線體釋出是其中重要的促凋亡因素之一，其會與 caspase 9 結合並活化下游執行凋亡的凋亡蛋白酶(caspase)從而引發細胞凋亡。所以接下來對粒線體與細胞質中的 cytochrome c 進行分析，由 Fig. 47 的結果可以觀察到誘導組的 cytochrome c 比起控制組確實更多的釋出到細胞質中，而處理組的 cytochrome c 的釋出比起誘導組有明顯的減少，由此結果可以更加強化誘導組對內在凋亡路徑的影響。

因為已經確定 OA 誘導能夠促進凋亡，接下來對實際執行凋亡作用的凋亡蛋白酶與凋亡作用產物進行分析，由 Fig 48 (B)可以觀察到 caspase 3、caspase 8、caspase 9 在誘導組表現量都明顯比控制組高分別為 1.28、1.10、1.16 倍，而處理組在 caspase 8、caspase 9 上皆有明顯的減少，在 caspase 3 部分則是高劑量 LSE 組與 EGC 組有明顯的減少。由結果可以看到較高劑量的 LSE 能夠有效減少與凋亡相關的 caspase 3、caspase 8、caspase 9 蛋白表現量來減緩凋亡作用。凋亡作用產物能夠做為最終的凋亡作用強度的比較，由 Fig 48 (D)可以觀察到被 caspase 3 切割後產生的 c-PARP-1 在誘導組表現量都明顯比控制組高為控制組的 2.11 倍，而處理組的 c-PARP-1 表現量則都有明顯降低，可以發現在 OA 誘導的凋亡(尤其是內在路徑凋亡)上 LSE 具有抑制效果。

ROS 的攻擊是 DNA 損傷的主因之一，而 PARP-1 會參與 DNA 修復途徑，升高或持續的 DNA 損傷會刺激 PARP-1 表現量的上升，關於 PARP-1 的作用路徑是非常複雜的，其中有研究顯示 PARP-1 的升高會促進粒線體膜電位的改變，促進內在路徑凋亡，另外也有研究指出 PARP-1 的升高會抑制 caspase 8 的活化，從而抑制外在路徑凋亡(55, 56)。而由 Fig 48 (D)可以觀察到 PARP-1 蛋白的表現量上在誘導組比控制組略高為控制組的 1.13 倍，而 LSE 處理組在 PARP-1 的表現量比起 OA 組有明顯的下降，由結果可以推論此誘導模式或許也造成了 DNA 損傷導致 PARP-1 表現量的上升促進內在路徑凋亡，而 LSE 對於 DNA 損傷或許有保護作用，但需要進一步研究證實。在外在路徑凋亡部分，雖然 caspase 8 表現量有上升但比起內在路徑凋亡路徑的 caspase 3、caspase 9 上升的幅度較小，推測外在路徑凋亡在此誘導模式可能是較為次要的路徑，所以本實驗並無進行進一步的研究，關於在此誘導模式中 LSE 在外在路徑凋亡上的詳細作用可能需要進一步的研究釐清。

綜合上述結果將可能分子機制整理於 Fig. 49，LSE 組與 EGC 組能夠減少脂肪堆積、降低氧化壓力與降低與粒線體相關的內在路徑凋亡來減少肝損傷，因此 LSE 具有開發成減緩 NAFLD 病程惡化的天然萃取物的潛能。

## 六、参考文献

1. Sun, B. and Karin, M. NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene* 27: 6228-6244, 2008.
2. Fontana, R.J. Acute liver failure including acetaminophen overdose. *Med. Clin. North. Am.* 92: 761-794, 2008
3. Williams CD, Farhood A, Jaeschke H. Role of caspase-1 and interleukin-1beta in acetaminophen-induced hepatic inflammation and liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 247:169-78, 2010.
4. Chen SP, Fuh JL, Lu SR, Wang SJ. Exertional headache--a survey of 1963 adolescents. *Cephalalgia.* 29:401-7, 2009.
5. Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *Journal of Endotoxin Research.* 11: 5-11, 2005.
6. Herrine SK. Schiff's Diseases of the Liver. *Gastroenterology.* 116, 1501-2, 1999.
7. Djuric Z, Lu MH, Lewis SM et al. Oxidative DNA damage levels in rats fed low-fat, high-fat, or calorie-restricted diets. *Toxicol Appl Pharmacol.* 115, 156-60, 1992.
8. Muriel P. High fat diet and liver damage induced by biliary obstruction in the rat. *J Appl Toxicol.* 15, 125-8, 1995.
9. 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.
10. Chinnaiyan AM, Dixit VM. The cell-death machine. *Curr Biol.* 6, 555-62, 1996.
11. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood.* 98, 2603-14, 2001.
12. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoint for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 39, 615-47, 2003.
13. Qidwai T, Khan F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol.* 2011,74: 522-47.
14. Yao HW, Li J, Chen JQ, Xu SY. A 771726, the active metabolite of leflunomide, inhibits TNF-alpha and IL-1 from Kupffer cells. *Inflammation.* 2004, 28: 97-103.
15. Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol.* 2011, 41: 1203-17.
16. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011, 117: 3720-32.
17. Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011, 22: 83-9.
18. Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* 2005, 115: 2625-32.
19. Sung NY, Yang MS, Song DS et al. Procyanidin dimer B2-mediated IRAK-M induction negatively regulates TLR4 signaling in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 438:122-8, 2013.
20. DeAngelis RA, Markiewski MM, Taub R, Lambris JD. A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology.* 42, 1148-57, 2005.
21. Czaja MJ. Autophagy in health and disease: 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C973-C978, 2010.
22. Xiao J, Ho CT, Liong EC et al. Epigallocatechin gallate attenuates fibrosis, oxidative stress, and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease rat model through TGF/SMAD, PI3 K/Akt/FoxO1, and

- NF-kappa B pathways. *Eur J Nutr.* 2013. DOI 10.1007/s00394-013-0516-8.
23. 林韋帆, 使用高效能液相層析法分析洛神葉、蓮蓬及石蓮花中多酚類化合物。中華醫事科技大學, 台南市, 2012。
  24. Reygaert W, Jusufi I. Green tea as an effective antimicrobial for urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2013, 4: 162.
  25. Kushima Y, Iida K, Nagaoka Y, Kawaratani Y, Shirahama T, Sakaguchi M, Baba K, Hara Y, Uesato S. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin and (-)-epigallocatechin gallate against heregulin beta1-induced migration/invasion of the MCF-7 breast carcinoma cell line. *Biol Pharm Bull.* 2009, 32: 899-904.
  26. Vergote D, Cren-Olivé C, Chopin V, Toillon RA, Rolando C, Hondermarck H, Le Bourhis X. (-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts. *Breast Cancer Res Treat.* 2002, 76: 195-201.
  27. Gong Y, Liu L, Xie B et al. Ameliorative effects of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive deficits and oxidative damage in senescence-accelerated mice. *Behav Brain Res.* 194, 100-7, 2008.
  28. Xu J, Rong S, Xie B et al. Procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorate scopolamine-induced memory impairment in mice. *Phytother Res.* 23, 1742-7, 2009.
  29. Duan Y, Zhang H, Xie B et al. Whole body radioprotective activity of an acetone-water extract from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. seedpod. *Food Chem Toxicol.* 48, 3374-84, 2010.
  30. Duan Y, Zhang H, Xu F et al. Inhibition effect of procyanidins from lotus seedpod on mouse B16 melanoma in vivo and in vitro. *Food Chem.* 122, 84-91, 2010.
  31. Wu Q, Chen H, Lv Z et al. Oligomeric procyanidins of lotus seedpod inhibits the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Chem.* 138:1493-502, 2013.
  32. Duan Y, Wang Z, Zhang H et al. The preventive effect of lotus seedpod procyanidins on cognitive impairment and oxidative damage induced by extremely low frequency electromagnetic field exposure. *Food Funct.* 4:1252-62, 2013.
  33. Xie Y, Ramachandran A, Breckenridge DG, Liles JT, Lebofsky M, Farhood A, Jaeschke H. Inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase 1 protects against acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 286(1):1-9; 2015 Jul 1.
  34. Du K, McGill MR, Xie Y, Bajt ML, Jaeschke H. Resveratrol prevents protein nitration and release of endonucleases from mitochondria during acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chemical Toxicology.* 81:62-70; 2015 Jul.
  35. Park G, Kim KM, Choi S, Oh DS. *Aconitum carmichaelii* protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity via B-cell lymphoma-2 protein-mediated inhibition of mitochondrial dysfunction. *Environ Toxicol Pharmacol.* 42:218-25; 2016.
  36. Basaranoglu, M., G. Basaranoglu, and H. Sentürk, From fatty liver to fibrosis: A tale of “second hit”. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 2013. 19(8): p. 1158-1165.
  37. Robertson, G., I. Leclercq, and G.C. Farrell, Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 281(5): p. G1135-9.
  38. Caldwell, S.H., R.H. Swerdlow, E.M. Khan, J.C. Iezzoni, E.E. Hespeneide, et al., Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 1999. 31(3): p. 430-434.
  39. Nassir, F. and J.A. Ibdah, Role of Mitochondria in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014. 15(5): p. 8713-8742.
  40. Sun, K., X. Xie, Y. Liu, Z. Han, X. Zhao, et al., Autophagy lessens ischemic liver injury by reducing oxidative damage. *Cell & Bioscience*, 2013. 3: p. 26-26.
  41. Cursio, R., P. Colosetti, and J. Gugenheim, Autophagy and Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *BioMed Research International*, 2015. 2015: p. 417590.



42. Li, L., J. Tan, Y. Miao, P. Lei, and Q. Zhang, ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell Mol Neurobiol*, 2015. 35(5): p. 615-21.
43. Bechmann, L.P., R.A. Hannivoort, G. Gerken, G.S. Hotamisligil, M. Trauner, et al., The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 2012. 56(4): p. 952-964.
44. Kwanten, W.J., W. Martinet, P.P. Michielsen, and S.M. Francque, Role of autophagy in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: A controversial issue. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 2014. 20(23): p. 7325-7338.
45. Niso-Santano, M., S.A. Malik, F. Pietrocola, J.M. Bravo-San Pedro, G. Mariño, et al., Unsaturated fatty acids induce non-canonical autophagy. *The EMBO Journal*, 2015. 34(8): p. 1025-1041.
46. Park, E.-J., A.Y. Lee, S.-H. Chang, K.-N. Yu, J.-H. Kim, et al., Role of p53 in the cellular response following oleic acid accumulation in Chang liver cells. *Toxicology Letters*, 2014. 224(1): p. 114-120.
47. Lavallard, V.J. and P. Gual, Autophagy and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *BioMed Research International*, 2014. 2014: p. 120179.
48. Ma, Y., J. Zhang, Q. Zhang, P. Chen, J. Song, et al., Adenosine induces apoptosis in human liver cancer cells through ROS production and mitochondrial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 448(1): p. 8-14.
49. Siddiqui, M.A., J. Ahmad, N.N. Farshori, Q. Saquib, S. Jahan, et al., Rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in human liver HepG2 cells. *Mol Cell Biochem*, 2013. 384(1-2): p. 59-69.
50. Gomez-Lechon, M.J., M.T. Donato, A. Martinez-Romero, N. Jimenez, J.V. Castell, et al., A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact*, 2007. 165(2): p. 106-16.
51. Chen, D.F. and C.H. Wang, [The relationship between the opening of mitochondrial permeability transition pores of cultured hepatocytes with their apoptoses in a non-alcoholic fatty liver disease model]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2007. 15(11): p. 837-9.
52. Ma, Y., J. Zhang, Q. Zhang, P. Chen, J. Song, et al., Adenosine induces apoptosis in human liver cancer cells through ROS production and mitochondrial dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014. 448(1): p. 8-14.
53. Chistiakov, D.A., I.A. Sobenin, V.V. Revin, A.N. Orekhov, and Y.V. Bobryshev, Mitochondrial Aging and Age-Related Dysfunction of Mitochondria. *BioMed Research International*, 2014. 2014: p. 238463.
54. Zhang, J., K. Huang, K.L. O'Neill, X. Pang, and X. Luo, Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53. *Cell Death & Disease*, 2016. 7(6): p. e2266.
55. Ba, X. and N.J. Garg, Signaling Mechanism of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in Inflammatory Diseases. *The American Journal of Pathology*, 2011. 178(3): p. 946-955.
56. Zhang, F., S.S. Lau, and T.J. Monks, A Dual Role for Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 During Caspase-Dependent Apoptosis. *Toxicological Sciences*, 2012. 128(1): p. 103-114.

## 七、附表及附圖

Fig. 1

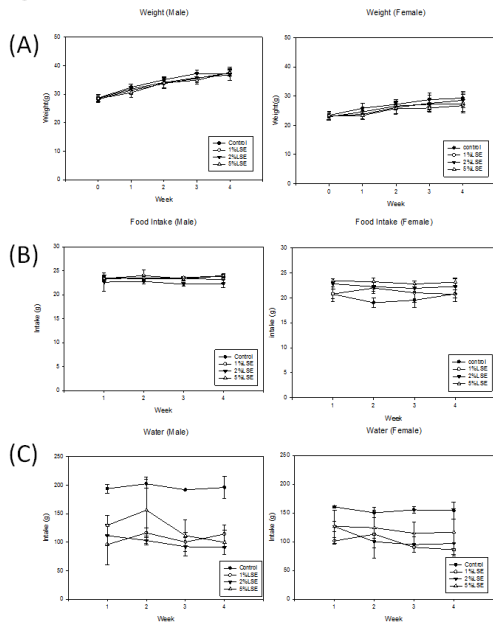


Fig. 1 Body weight(A), food intake(B) and water intake(C) of male and female mice (n=10/group) during 28-day feeding of LSE(Lotus seedpod extract).

Fig. 2

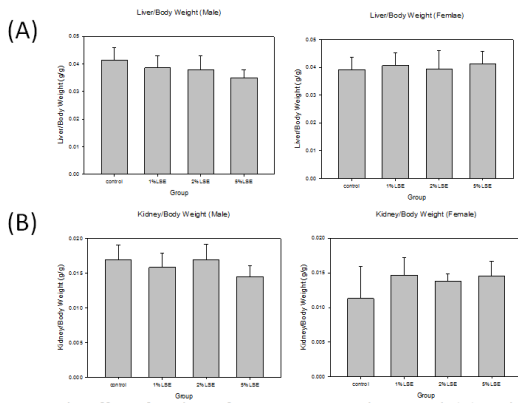


Fig. 2 The effect of 28 days of LSE treatment on liver weight(A), and kidney weight(B) of male and female ICR mice (n=10/group).

Table 1. The biochemical parameters in male mice (n=10/group) serum after 28-day feeding of LSE.

	Control	1% LSE	2% LSE	5% LSE
GOT (U/L)	233.25±92.11	211.00±67.20	179.63±47.53	183.50±34.67
GPT (U/L)	54.00±13.90	41.38±7.80*	39.63±6.61*	37.63±4.98**
Total Protein (g/ml)	5.34±0.20	5.20±0.15	5.19±0.22	5.23±0.18
Albumin (g/dl)	2.43±0.23	2.44±0.25	2.48±0.21	2.44±0.18
BUN (mg/dl)	27.56±7.19	25.15±7.85	23.51±2.69	22.84±3.54
CRE (mg/dl)	0.40±0.00	0.44±0.17	0.43±0.07	0.39±0.04
TCHO (mg/dl)	158.63±17.21	123.75±14.02**	150.63±31.50	144.25±17.69
TG (mg/dl)	153.38±26.89	122.38±30.98	125.25±24.82	126.00±17.19
ALK (U/L)	99.13±32.59	94.00±21.02	113.75±24.34	101.88±10.44
γ-GT (U/L)	0.63±0.92	1.38±1.19	0.88±0.64	0.63±0.52
T-bilirubin (mg/dl)	0.33±0.15	0.29±0.08	0.33±0.07	0.29±0.06
HDL (mg/dl)	85.75±15.84	66.75±12.41*	86.38±18.67	79.88±14.16
LDL (mg/dl)	42.13±12.79	32.38±6.16	39.13±10.34	39.25±13.98

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 compared with control group

Table 2. The biochemical parameters in female mice (n=10/group) serum after 28-day feeding of LSE.

	Control	1% LSE	2% LSE	5% LSE
GOT (U/L)	352.50±94.14	239.00±106.61*	246.38±74.23*	335.50±97.69
GPT (U/L)	58.00±8.86	52.29±17.74	49.13±6.27*	79.13±46.76
Total Protein (g/ml)	5.53±0.29	5.37±0.19	5.36±0.09	5.16±0.16**
Albumin (g/dl)	2.91±0.12	2.97±0.08	2.93±0.12	2.93±0.09
BUN (mg/dl)	19.55±2.54	21.57±4.41	25.70±4.83**	20.44±7.96
CRE (mg/dl)	0.39±0.10	0.37±0.05	0.38±0.05	0.36±0.16
TCHO (mg/dl)	108.75±20.03	105.29±23.37	96.13±19.14	95.25±21.55
TG (mg/dl)	121.75±15.77	117.57±23.22	137.38±52.53	107.63±22.82
ALK (U/L)	178.50±67.23	177.43±18.27	157.88±35.99	165.88±22.05
γ-GT (U/L)	1.50±1.41	2.29±0.49	1.50±0.53	1.88±1.81
T-bilirubin (mg/dl)	0.23±0.07	0.23±0.05	0.20±0.05	0.20±0.05
HDL (mg/dl)	61.00±12.05	58.00±12.44	50.25±10.50	52.50±12.02
LDL (mg/dl)	23.38±8.57	24.14±11.94	18.63±6.86	21.13±6.81

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 compared with control group

Fig.3

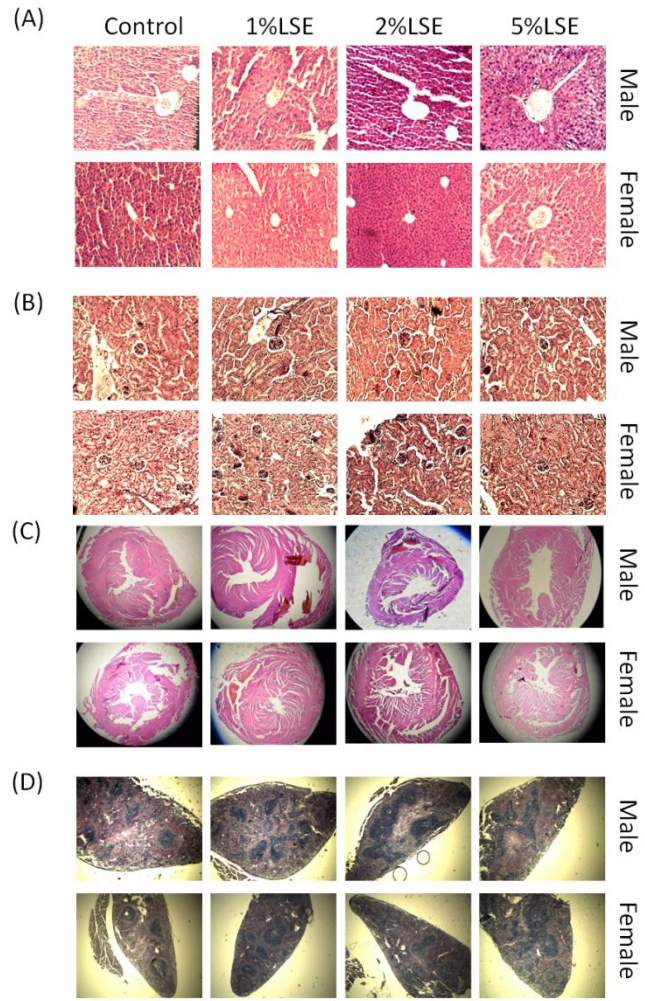


Fig. 3 Liver(A), kidney(B) heart(C) and spleen(D) histopathology of male and female mice after 28-day feeding of LSE. Representative 100X images of tissue sections from different dietary treatments (n=10/group) stained with H&E.

Fig. 4

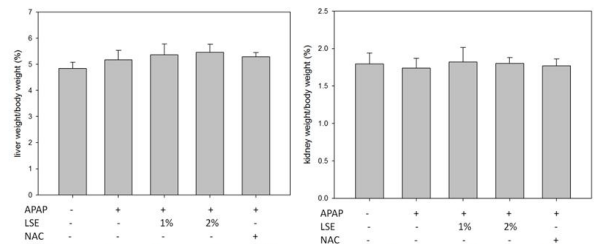


Fig. 4 The effect of 8 weeks of LSE treatment on liver weight(A), and kidney weight(B) of BALB/c mice (n=10/group) induced by APAP injection.

Table 3. The effect of 8 weeks of LSE treatment on serum biochemical parameters of BALB/c mice (n=10/group) induced by APAP injection.

	Control	APAP	APAP+1% LSE	APAP+ 2%LSE	APAP+ NAC
GOT (U/L)	174.2±38.2	266.3±81.4*	174.0±20.1*	158.0±18.5*	208.7±42.6
GPT (U/L)	61.2±7.5	69.7±31.6	64.3±15.6	54.2±12.2	48.7±15.8
TG (mg/dl)	218.2±48.4	265.5±38.2*	195.0±49.7*	205.7±42.2*	204.6±65.1*
TCHO (mg/dl)	164.0±11.4	158.5±13.3	135.3±12.2*	133.2±8.1**	149.2±18.2
BUN (mg/dl)	26.2±5.6	30.9±5.4	37.5±5.7	33.8±3.7	33.7±5.7
Creatinine (mg/dl)	0.42±0.045	0.31±0.113	0.46±0.055*	0.43±0.052*	0.37±0.166

\*p < 0.05 compared with control group; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 compared with APAP group

Fig. 5

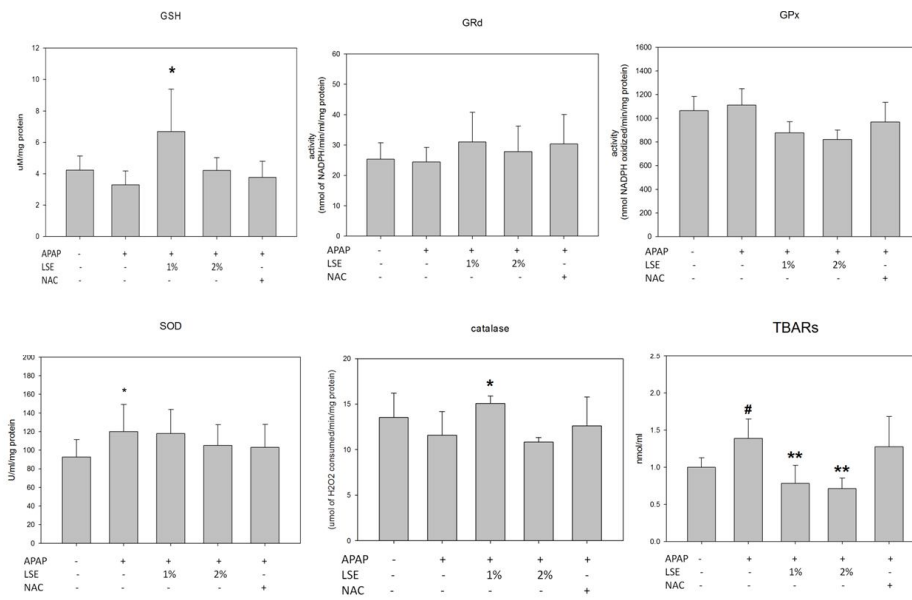


Fig. 5 The effect of LSE on liver antioxidant enzymes in BALB/c mice induced by APAP injection. The BALB/c mice were treated with or without LSE (1% and 2%) during the 8-week treatment period in the presence or absence of 400 mg APAP/kg bw (I.P.), twice per week. Liver GPx, GSH, GRd, SOD, catalase and lipid peroxidation (TBARs) activities were detected by ELISA assays. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 10). #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the APAP group.

Fig. 6

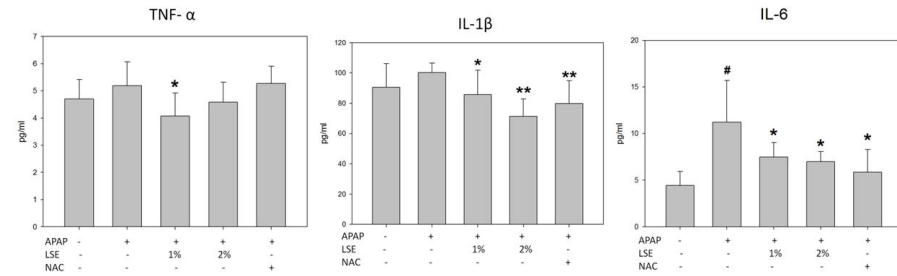


Fig. 6 The effect of LSE on serum levels of inflammatory cytokines in BALB/c mice induced by APAP injection. The BALB/c mice were treated with or without LSE (1% and 2%) during the 8-week treatment period in the presence or absence of 400 mg APAP/kg bw (I.P.), twice per week. The serum levels of TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) and IL-1 $\beta$  (C) were detected by ELISA assays. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 10). #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control group. \*p < 0.05 compared with the APAP group.

Fig. 7

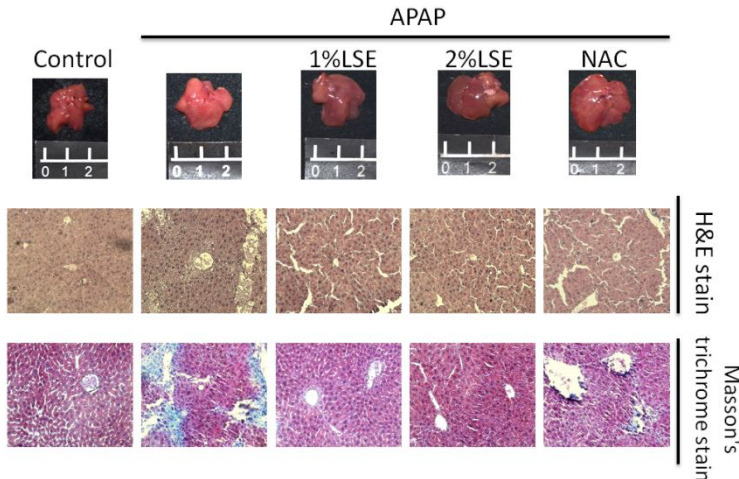


Fig. 7 The effect of 8 weeks of LSE treatment on BALB/c mice (n=10/group) induced by APAP injection. The BALB/c mice were treated with or without LSE (1% and 2%) during the 8-week treatment period in the presence or absence of 400 mg APAP/kg bw (I.P.), twice per week. The mice were sacrificed after 8 weeks, and liver tissue was collected for analysis. Representative 100X images of liver sections from different dietary treatments (n=10/group) stained with H&E.

Table 6 The effect of 4 weeks of LSE treatment on serum biochemical parameters of C57BL/6J (B6) mice (n=10/group) induced by 30% ethanol liquid diet.

variable	control	EtOH	EtOH+1%LSE	EtOH+2%LSE
GOT(U/L)	131.2 $\pm$ 50.4	238.3 $\pm$ 43.0 <sup>#</sup>	243 $\pm$ 39.0	216 $\pm$ 78.1
GPT(U/L)	24.2 $\pm$ 4.9	56.3 $\pm$ 7.6 <sup>#</sup>	79 $\pm$ 17.3	67 $\pm$ 40.7
TG(mg/dl)	152.7 $\pm$ 18.9	131.5 $\pm$ 21.2	99 $\pm$ 12.8	105.3 $\pm$ 14
TCHO(mg/dl)	103.7 $\pm$ 5.2	102.3 $\pm$ 9.8	99.7 $\pm$ 7.4	101.6 $\pm$ 5.5
BUN(mg/dl)	26.3 $\pm$ 1.0	14.4 $\pm$ 0.4 <sup>#</sup>	12.5 $\pm$ 0.7 <sup>**</sup>	17.7 $\pm$ 8.2
CREA(mg/dl)	0.47 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0	0.45 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0

#p < 0.05 compared with control group; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 compared with EtOH group

Fig.8

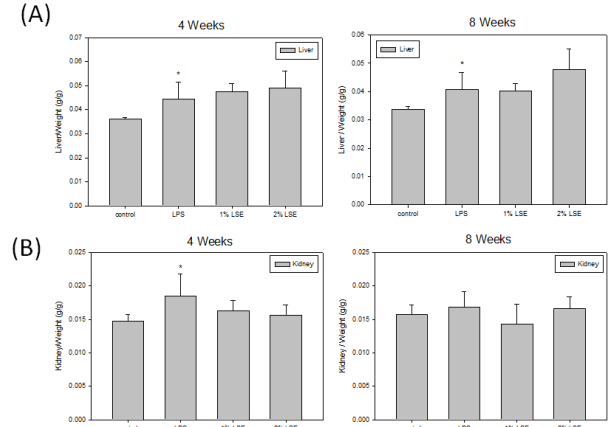


Fig. 8 The effect of LSE on liver weight(A) and kidney weight(B) in ICR mice induced by LPS injection. The ICR mice were treated with or without LSE (1% and 2%) during the 4-week or 8-week treatment period in the presence or absence of LPS (20 mg/kg/w) for 16 h. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 10). #p < 0.01 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the LPS group.

Table 4 The effect of 4 weeks of LSE treatment on serum biochemical parameters of ICR mice induced by LPS injection<sup>a</sup>.

variable <sup>b</sup>	Control	LPS	1% LSE	2% LSE
GOT (U/L)	169.3 $\pm$ 34.5	252.3 $\pm$	318.3 $\pm$ 56.1	291.2 $\pm$ 54.0
GPT (U/L)	46.8 $\pm$ 6.2	91.8 $\pm$ 30.3 <sup>c</sup>	96.8 $\pm$ 15.0	99.5 $\pm$ 13.4
TG (mg/dl)	158.0 $\pm$ 12.4	421.6 $\pm$ 94.1 <sup>d</sup>	406.3 $\pm$ 85.4	358.6 $\pm$ 78.7
TCHO (mg/dl)	150.6 $\pm$ 12.4	141.2 $\pm$ 13.7	168.2 $\pm$ 21.0 <sup>e</sup>	169.2 $\pm$ 24.4
Albumin (g/dl)	2.5 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	2.2 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.0
BUN (mg/dl)	25.0 $\pm$ 2.8	93.2 $\pm$ 13.8 <sup>d</sup>	94.3 $\pm$ 15.1	78.6 $\pm$ 17.0
CRE (mg/dl)	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>e</sup>
HDL (mg/dl)	79.6 $\pm$ 8.8	71.0 $\pm$ 9.8	87.2 $\pm$ 13.3 <sup>e</sup>	89.0 $\pm$ 14.4 <sup>e</sup>
LDL (mg/dl)	39.4 $\pm$ 10.6	12.4 $\pm$ 2.7 <sup>d</sup>	23.0 $\pm$ 14.8	18.5 $\pm$ 4.1 <sup>e</sup>
Glucose (mg/dl)	86.4 $\pm$ 10.5	46.0 $\pm$ 4.1 <sup>d</sup>	57.0 $\pm$ 11.3	42.0 $\pm$ 8.9

<sup>a</sup>Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD (n=10/group). Duration of the experiment = 4 weeks. Results were statistically analyzed with Student's t test. <sup>b</sup>GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein. <sup>c</sup>p < 0.05 compared with the control group. <sup>d</sup>p < 0.01 compared with the control group. <sup>e</sup>p < 0.05 compared with the LPS group.

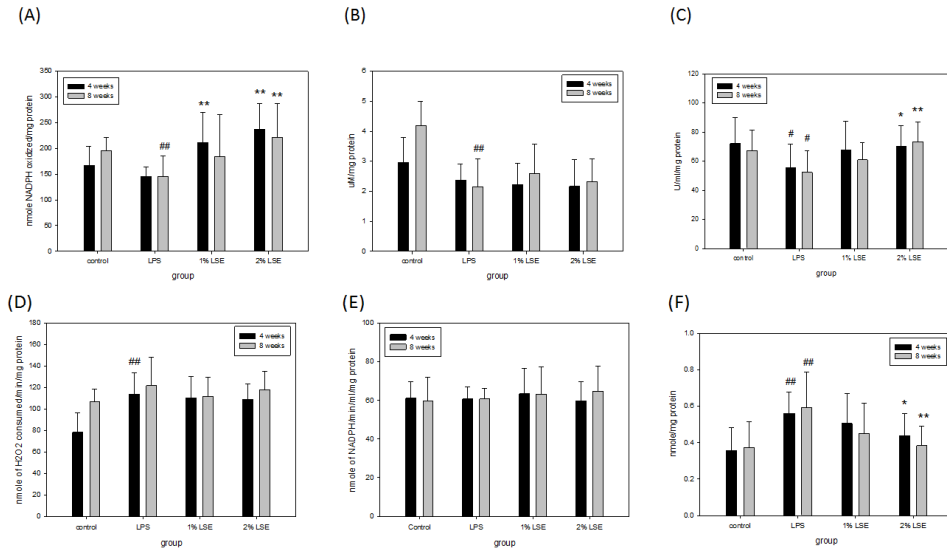
Table 5 The effect of 8 weeks of LSE treatment on serum biochemical parameters of ICR mice induced by LPS injection<sup>a</sup>.

variable <sup>b</sup>	Control	LPS	1% LSE	2% LSE
GOT (U/L)	173.8 $\pm$ 19.8	332.3 $\pm$ 44.0 <sup>c</sup>	277.8 $\pm$ 92.2	297.2 $\pm$ 44.8
GPT (U/L)	50.0 $\pm$ 5.0	143.3 $\pm$ 18.6 <sup>c</sup>	102.0 $\pm$ 19.6 <sup>d</sup>	110.6 $\pm$ 10.2 <sup>d</sup>
TG (mg/dl)	164.6 $\pm$ 29.0	389.3 $\pm$ 88.2 <sup>c</sup>	177.5 $\pm$ 47.0 <sup>e</sup>	246.0 $\pm$ 18.3 <sup>d</sup>
TCHO (mg/dl)	143.3 $\pm$ 12.7	132.3 $\pm$ 10.4	132.3 $\pm$ 6.7	141.8 $\pm$ 10.8
Albumin (g/dl)	2.6 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	2.1 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.1
BUN (mg/dl)	23.3 $\pm$ 3.0	78.8 $\pm$ 4.1 <sup>c</sup>	65.8 $\pm$ 6.8 <sup>d</sup>	57.2 $\pm$ 12.8 <sup>d</sup>
CRE (mg/dl)	0.9 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>
HDL (mg/dl)	73.8 $\pm$ 10.3	67.0 $\pm$ 5.7	73.8 $\pm$ 14.2	70.2 $\pm$ 2.5
LDL (mg/dl)	35.8 $\pm$ 9.3	11.0 $\pm$ 3.4 <sup>c</sup>	28.0 $\pm$ 8.6 <sup>e</sup>	17.4 $\pm$ 3.1 <sup>d</sup>
Glucose (mg/dl)	105.6 $\pm$ 19.0	47.0 $\pm$ 6.0 <sup>c</sup>	63.8 $\pm$ 11.6 <sup>d</sup>	56.2 $\pm$ 6.9 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD (n=10/group). Duration of the experiment = 8 weeks. Results were statistically analyzed with Student's t test. <sup>b</sup>GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein. <sup>c</sup>p < 0.01 compared with the control group. <sup>d</sup>p < 0.05 compared with the LPS group. <sup>e</sup>p < 0.01 compared with the LPS group.

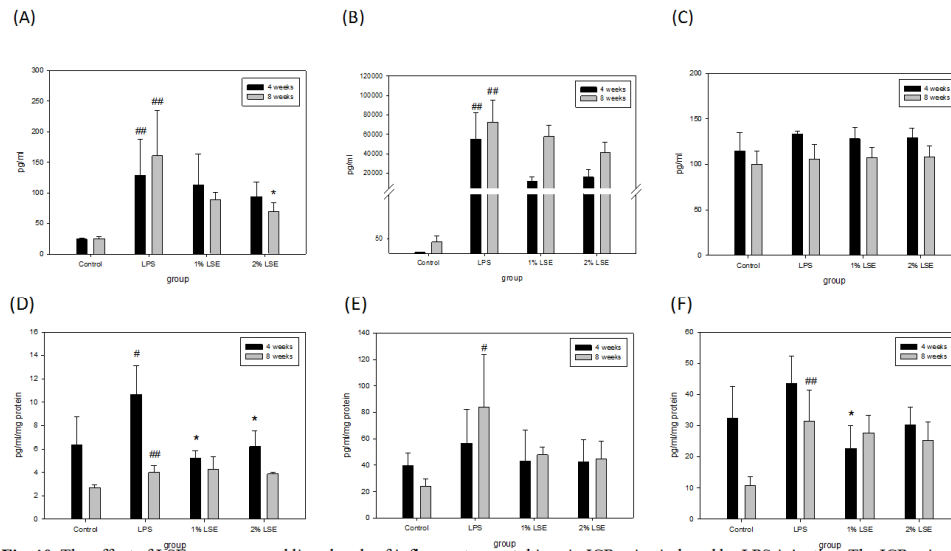


Fig.9



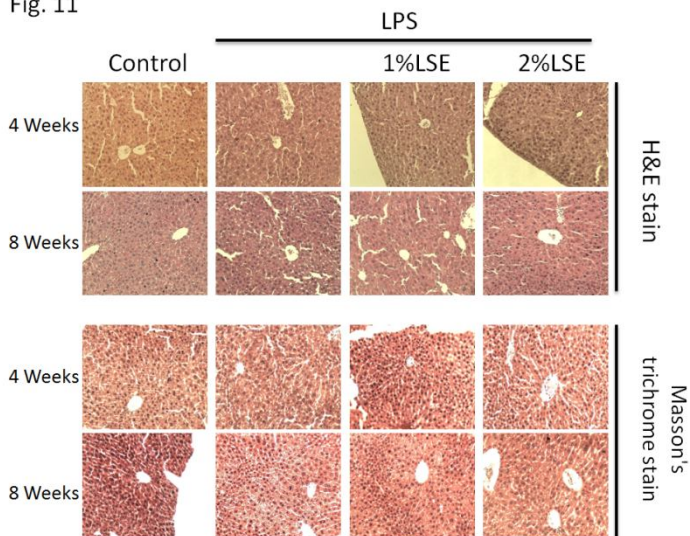
**Fig. 9** The effect of LSE on liver antioxidant enzymes and lipid peroxidation in ICR mice induced by LPS injection. The ICR mice were treated with or without LSE (1% and 2%) during the 4-week or 8-week treatment period in the presence or absence of LPS (20 mg/kgw) for 16 h. Liver GPx (A), GSH (B), SOD (C), catalase (D) and GSH Rd (E) activities were detected by ELISA assays. The lipid peroxidation of liver was assessed by measuring the TBARS assay(F). The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 10). #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the LPS group.

Fig.10



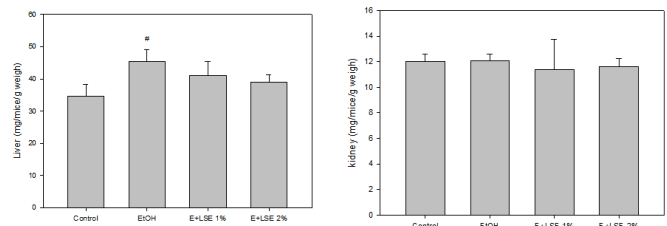
**Fig. 10** The effect of LSE on serum and liver levels of inflammatory cytokines in ICR mice induced by LPS injection. The ICR mice were treated with or without LSE (1% and 2%) during the 4-week or 8-week treatment period in the presence or absence of LPS (20 mg/kgw) for 16 h. The serum and liver levels of TNF- $\alpha$  (A · D), IL-6 (B · E) and IL-1 $\beta$  (C · F) were detected by ELISA assays. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 10). ##p < 0.01 compared with the control group. \*p < 0.05 compared with the LPS group.

Fig. 11



**Fig. 11** The effect of LSE on liver histopathology in ICR mice induced by LPS injection. The ICR mice were treated with or without LSE (1% and 2%) during the 4-week or 8-week treatment period in the presence or absence of LPS (20 mg/kgw) for 16 h. The mice were sacrificed after 4-week or 8-week, and liver tissue was collected for analysis. Representative 100X images of liver sections from different dietary treatments (n=10/group) with H&E and Masson's trichrome stain.

Fig.12

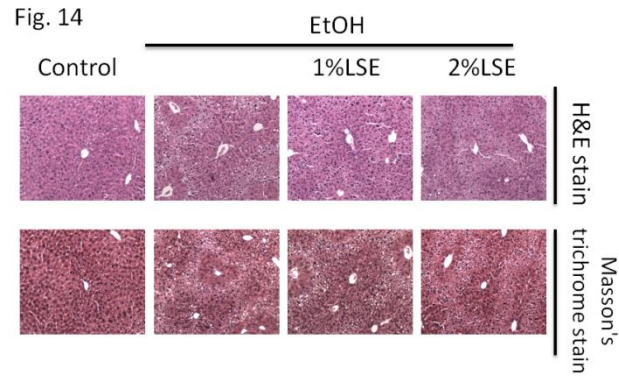
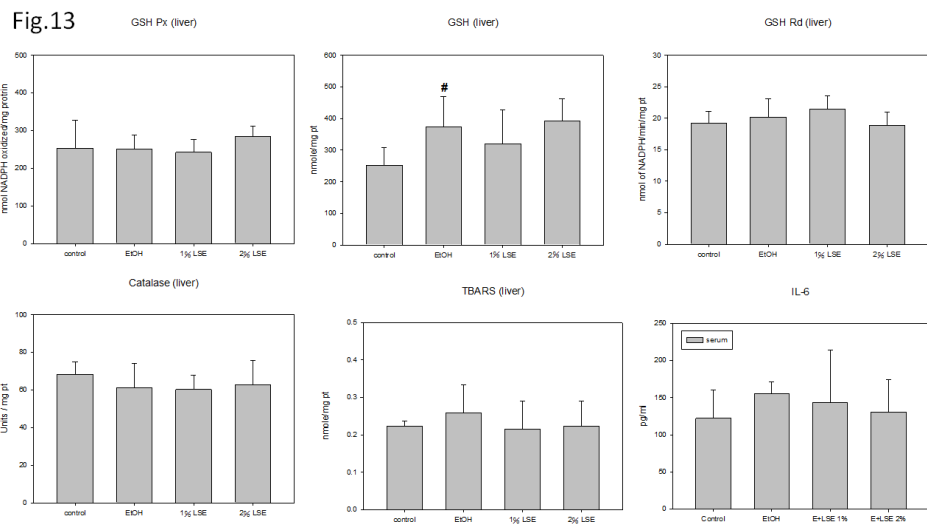


**Fig. 12** The effect of 4 weeks of LSE treatment on liver weight and kidney weight of C57BL/6J (B6) mice (n=10/group) induced by 30% ethanol(EtOH) Lieber-DeCarli liquid diet.

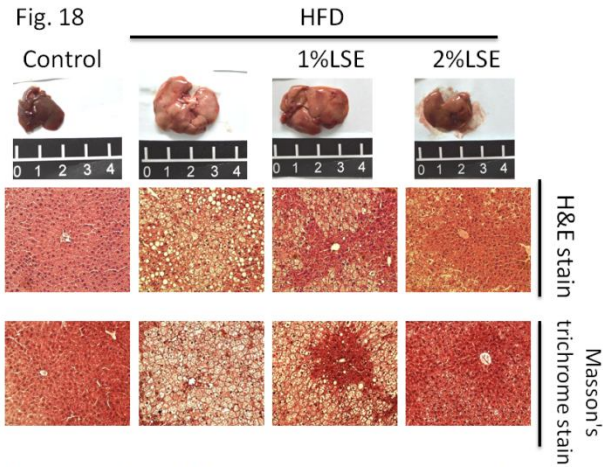
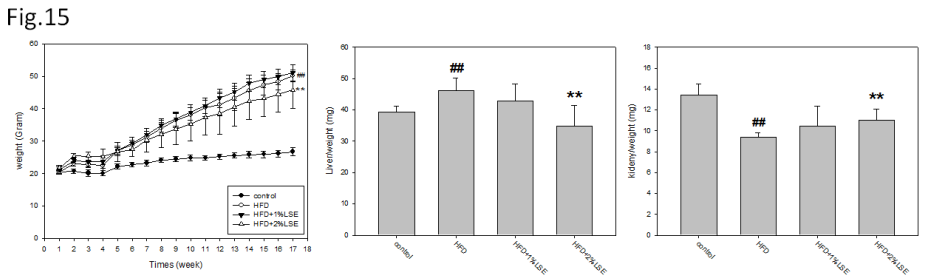
**Table 7** The effect of 16 weeks of LSE treatment on serum biochemical parameters of C57BL/6J (B6) mice (n=10/group) induced by 60% high fat diet(HFD).

variable	control	HFD	HFD+1%LSE	HFD+2%LSE
GOT (U/L)	133.75 $\pm$ 8.1	276.5 $\pm$ 80.2#	210.3 $\pm$ 36.6	147.8 $\pm$ 10.6*
GPT (U/L)	46.2 $\pm$ 7.0	209.0 $\pm$ 52.1#	173.3 $\pm$ 22.6	89.5 $\pm$ 34.5**
TG (mg/dL)	65.8 $\pm$ 6.9	84.5 $\pm$ 4.5##	72.8 $\pm$ 8.5*	75.7 $\pm$ 2.1*
BUN(mg/dL)	26.6 $\pm$ 3.6	16.7 $\pm$ 1.1##	16.6 $\pm$ 1.6	15.4 $\pm$ 1.2
CRE (mg/dL)	0.4 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
TCHO (mg/dL)	78.6 $\pm$ 4.0	229.5 $\pm$ 23.5##	199.3 $\pm$ 8.8*	186.5 $\pm$ 9.3*
HDL-c (mg/dL)	41.2 $\pm$ 4.3	147.2 $\pm$ 35.0##	131.8 $\pm$ 17.9	131.6 $\pm$ 30.7
LDL-c (mg/dL)	23.0 $\pm$ 8.5	59.0 $\pm$ 16.0##	51.6 $\pm$ 14.4	28.7 $\pm$ 13.0*

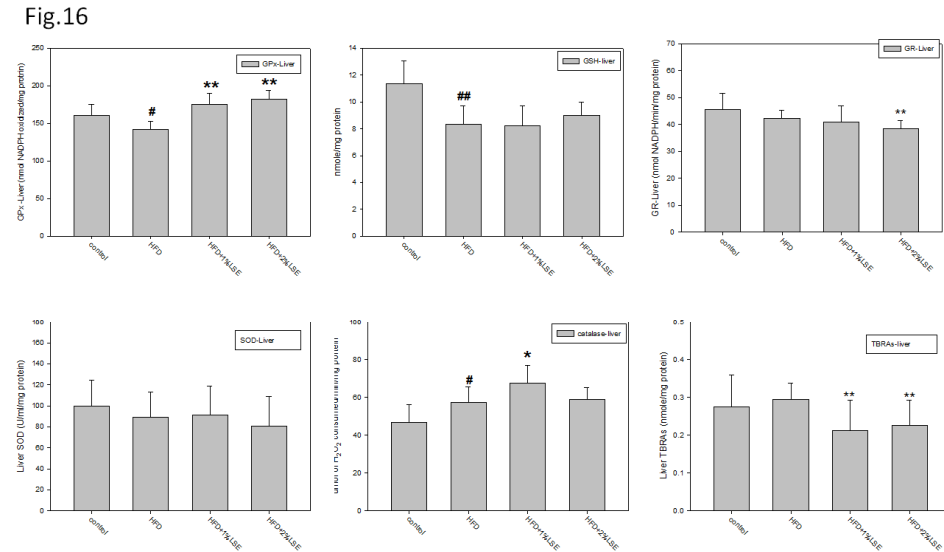
#p < 0.05, ##p < 0.01 compared with control group; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 compared with HFD group



**Fig. 13** The effect of LSE on liver antioxidant enzymes in C57BL/6J (B6) mice induced by 30% ethanol liquid diet. The C57BL/6J (B6) mice were treated with or without LSE (1% and 2%) during the 4-week treatment period in the presence of 30% ethanol liquid diet. Liver GPx, GSH, GRd, catalase activities, lipid peroxidation (TBARS) and IL-6 were detected by ELISA assays. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 10). #p < 0.05 compared with the control group.

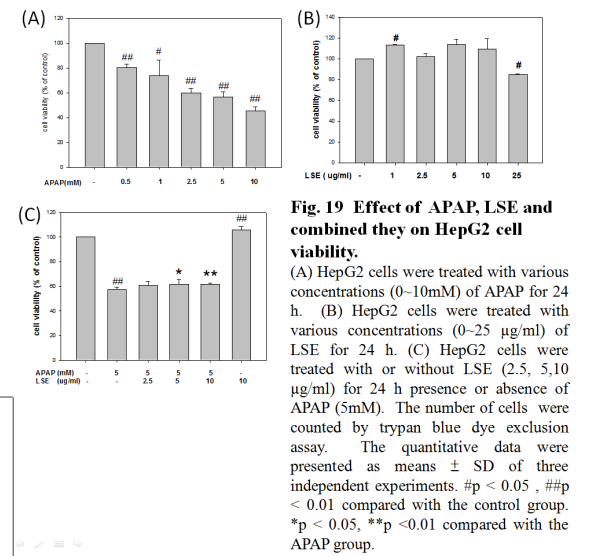
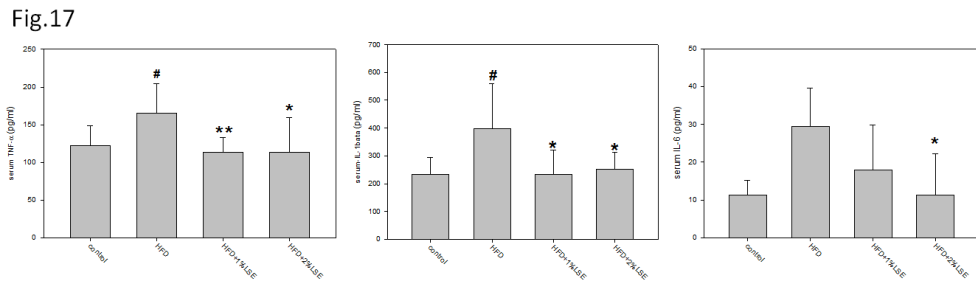


**Fig. 15** The effect of 16 weeks of LSE treatment on body weight, liver weight and kidney weight of C57BL/6J (B6) mice (n=10/group) induced by 60% high fat diet(HFD).

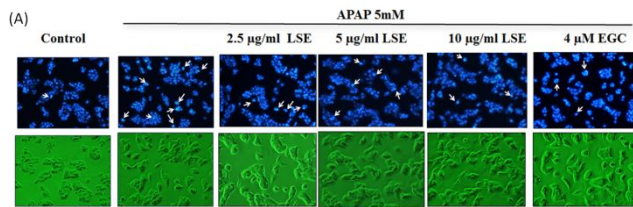


**Fig. 18** The effect of LSE on liver histopathology in C57BL/6J (B6) mice induced by 60% high fat diet. The C57BL/6J (B6) mice were treated with or without LSE (1% and 2%) during the 16-week treatment period in the presence of 60% high fat diet. The mice were sacrificed after 16-week, and liver tissue was collected for analysis. Representative 100X images of liver sections from different dietary treatments (n=10/group) with H&E and Masson's trichrome stain.

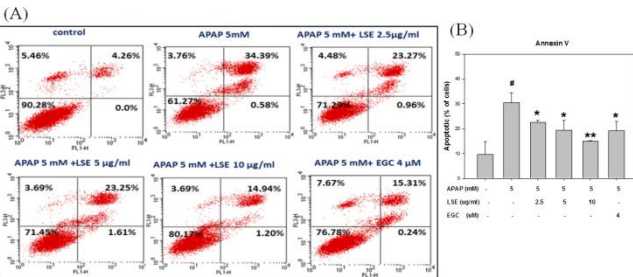
**Fig. 16** The effect of LSE on liver antioxidant enzymes in C57BL/6J (B6) mice induced by 60% high fat diet(HFD). The C57BL/6J (B6) mice were treated with or without LSE (1% and 2%) during the 16-week treatment period in the presence of 60% high fat diet. Liver GPx, GSH, GRd, SOD, catalase and lipid peroxidation (TBARS) activities were detected by ELISA assays. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 10). #p < 0.05 compared with the control group.



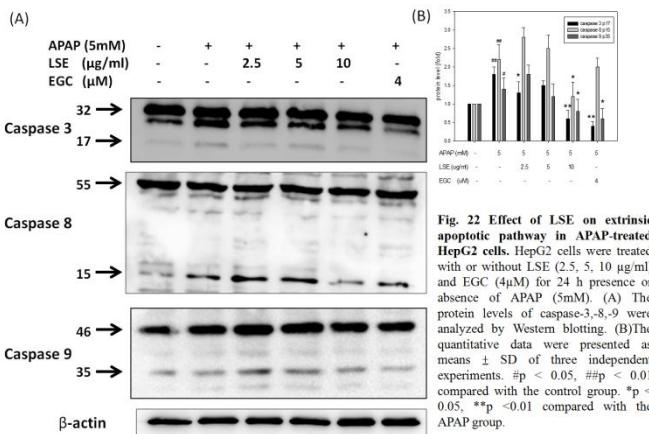




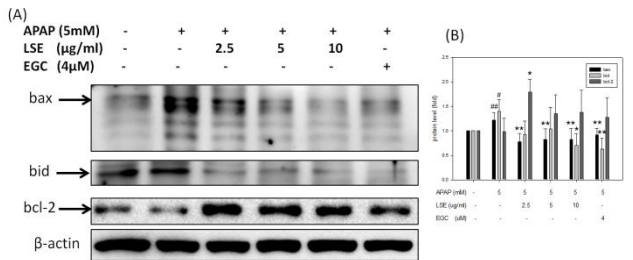
**Fig. 20 Effect of LSE on APAP-induced HepG2 cell apoptosis.** HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5, 10 µg/ml) and EGC (4µM) for 24 h presence or absence of APAP (5mM). The apoptotic cells were assayed by DAPI assay. (A) Arrows indicate that the apoptotic cells. (B) Apoptotic values were presented as percentage of apoptotic cells divided by the total number of cells. The quantitative data were presented as means ± SD. #p < 0.05 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the APAP group.



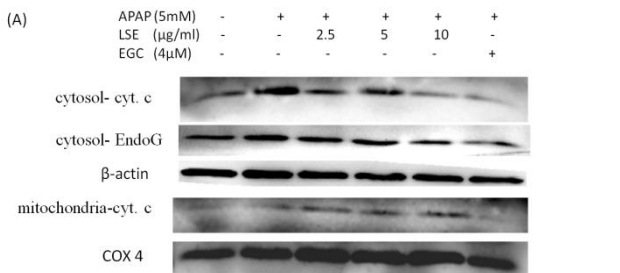
**Fig. 21 Effect of LSE on APAP-induced HepG2 cell apoptosis.** (A) For annexin V/PI staining, HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5, 10 µg/ml) and EGC (4µM) for 24 h presence or absence of APAP (5mM) before subjected to flow cytometry analysis. (B) The quantitative data were presented as means ± SD of three independent experiments. #p < 0.05 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the APAP group.



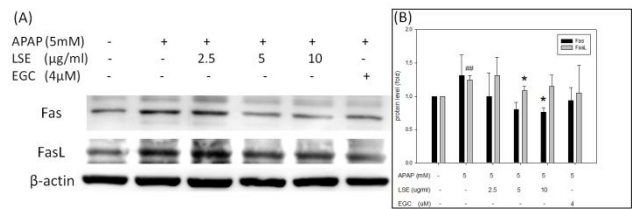
**Fig. 22 Effect of LSE on extrinsic apoptotic pathway in APAP-treated HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5, 10 µg/ml) and EGC (4µM) for 24 h presence or absence of APAP (5mM). (A) The protein levels of caspase-3,-8,-9 were analyzed by Western blotting. (B) The quantitative data were presented as means ± SD of three independent experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the APAP group.



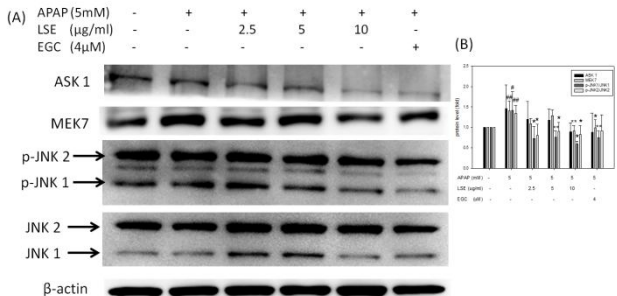
**Fig. 23 Effect of LSE on intrinsic apoptotic pathways in APAP-treated HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5, 10 µg/ml) and EGC (4µM) for 24 h presence or absence of APAP (5mM). The protein levels of Bcl-2 family (bax, bid, bcl-2) were analyzed by Western blotting. (B) The quantitative data were presented as means ± SD of three independent experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the APAP group.



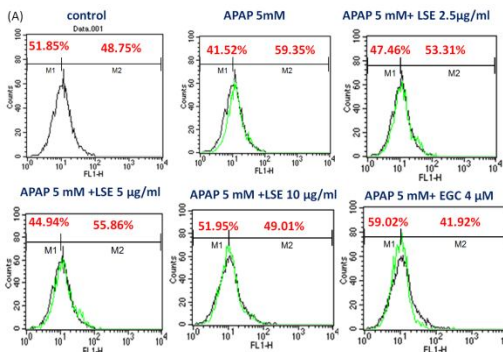
**Fig. 24 Effect of LSE on cytosol and mitochondria cytochrome c and EndoG in APAP-treated HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5, 10 µg/ml) and EGC (4µM) for 24 h presence or absence of APAP (5mM). The protein levels of cytochrome c and EndoG were analyzed by Western blotting. (B) The quantitative data were presented as means ± SD of three independent experiments. #p < 0.05 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the APAP group.



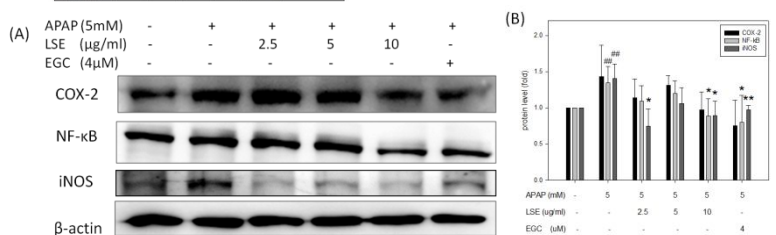
**Fig. 25 Effect of LSE on extrinsic apoptotic pathways in APAP-induced HepG2 cell.** HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5, 10 µg/ml) and EGC (4µM) for 24 h presence or absence of APAP (5mM). (A) The protein levels of Fas and FasL, were analyzed by Western blotting. (B) The quantitative data were presented as means ± SD of three independent experiments. #p < 0.01 compared with the control group. \*p < 0.05 compared with the APAP group.



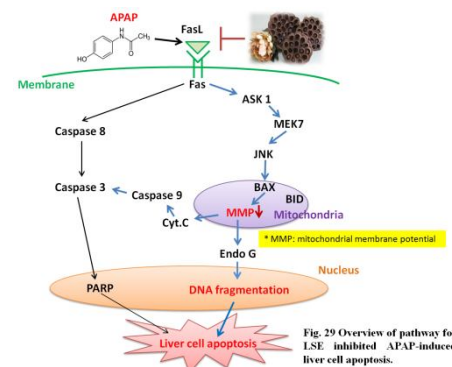
**Fig. 26 Effect of LSE on ASK1/MEK7/JNK in APAP-treated HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5, 10 µg/ml) and EGC (4µM) for 24 h presence or absence of APAP (5mM). The protein levels of ASK1/MEK7/JNK were analyzed by Western blotting. (B) The quantitative data were presented as means ± SD of three independent experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the APAP group.



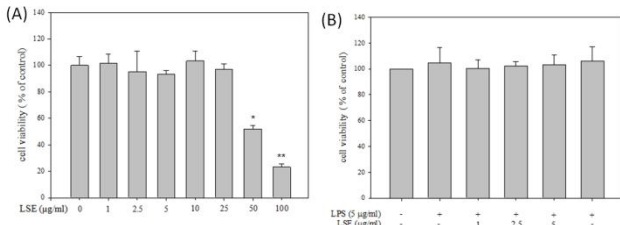
**Fig. 27 Effect of LSE on APAP-induced HepG2 cell involve formation of reactive oxygen species (ROS).** HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5, 10 µg/ml) and EGC (4µM) for 24 h presence or absence of APAP (5mM). (A) The ROS were assayed by DCFH-DA staining with flow cytometry. (B) ROS levels were presented as percentage of autophagy cells divided by the total number of cells. The quantitative data were presented as means ± SD of three independent experiments. #p < 0.05 compared with the control group. \*p < 0.05 compared with the APAP group.



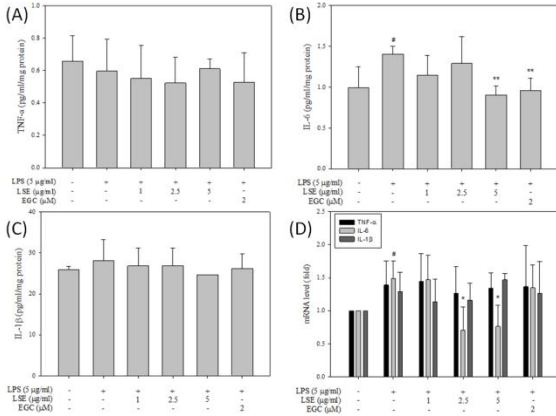
**Fig. 28 Effect of LSE on the expression of inflammation-related proteins in APAP-induced HepG2 cell.** HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5, 10 µg/ml) and EGC (4µM) for 24 h presence or absence of APAP (5mM). (A) The protein levels of COX-2, NF-κB and iNOS were analyzed by Western blotting. (B) The quantitative data were presented as means ± SD of three independent experiments. #p < 0.05 compared with the control group. \*p < 0.05 compared with the APAP group.



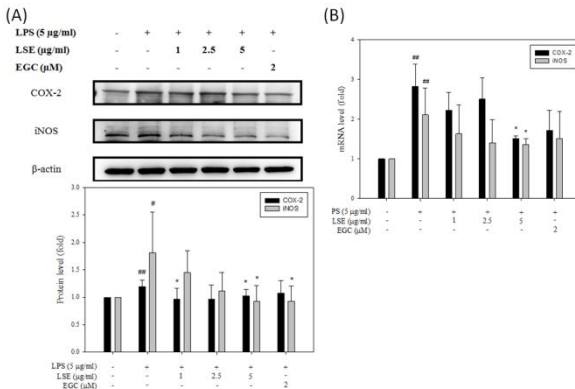
**Fig. 29 Overview of pathway for LSE inhibited APAP-induced liver cell apoptosis.**



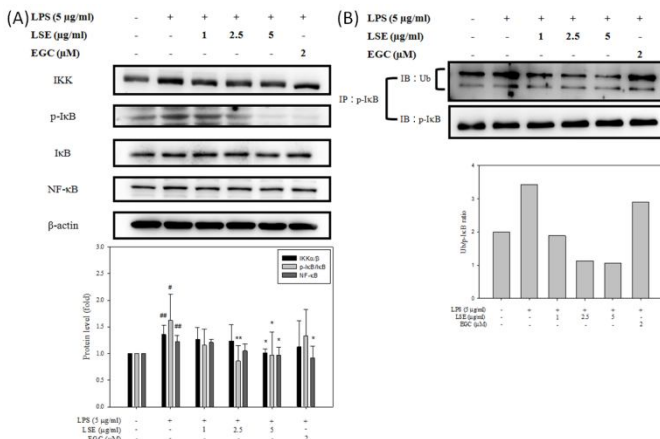
**Fig. 30 The effect of LSE or LPS with/without LSE on HepG2 cell viability.** HepG2 cells were treated with various concentrations of (A) LSE (0-100 µg/ml) for 24 hr. (B) HepG2 cells were stimulated with LPS (5 µg/ml) and treated with various concentration of LSE (1, 2.5 and 5 µg/ml) or EGC 2 µM for 24 hr. The number of cells was counted by trypan blue dye exclusion assay. The results were represented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments and the significant different was established at  $p < 0.05$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the control group.



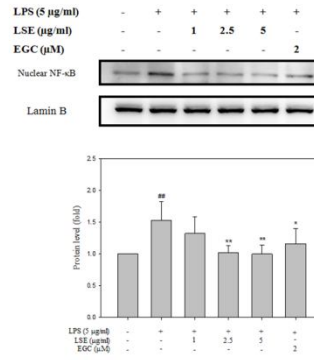
**Fig. 31 The effect of LSE on cellular levels of inflammatory cytokines in LPS-induced HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with or without LSE (1, 2.5 and 5 µg/ml) or EGC 2 µM in the presence or absence of LPS (5 µg/ml) for 24 hr. The cellular levels of TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) and IL-1 $\beta$  (C) were detected by ELISA assays. Total cellular mRNA (D) was analyzed by real-time PCR for TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ . The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 3). # $p < 0.05$  compared with the control group. \*\* $p < 0.01$  compared with the LPS group.



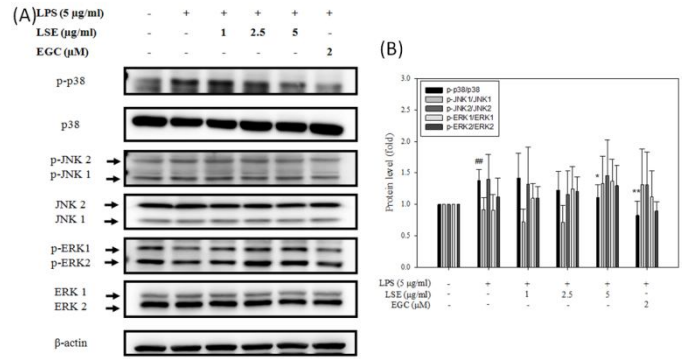
**Fig. 32 The effect of LSE on the expressions of inflammation-related proteins in LPS-induced HepG2 cells.** HepG2 cells were stimulated with LPS (5 µg/ml) and treated with various concentration of LSE (1, 2.5 and 5 µg/ml) or EGC 2 µM for 24 hr. (A) The inflammation-related proteins were analyzed by western blotting.  $\beta$ -actin, served as an internal control of cell cytosol. (B) Total cellular mRNA was analyzed by real-time PCR for COX-2 and iNOS. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 3). ## $p < 0.01$  compared with the control group. \* $p < 0.05$  compared with the LPS group.



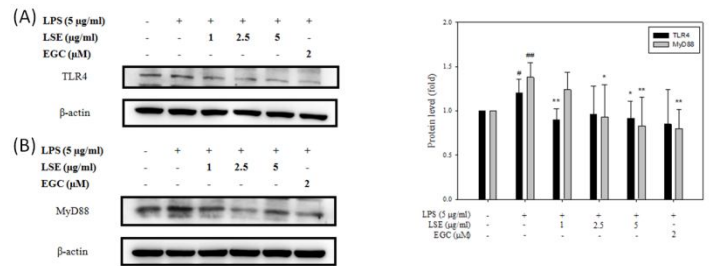
**Fig. 33 The effect of LSE on LPS-induced IKK/NF- $\kappa$ B pathway in HepG2 cells.** HepG2 cells were stimulated with LPS (5 µg/ml) and treated with various concentration of LSE (1, 2.5 and 5 µg/ml) or EGC 2 µM for 24 hr. (A) The IKK/NF- $\kappa$ B pathway related proteins in cytosolic fractions were analyzed by western blotting.  $\beta$ -actin, served as an internal control of cell cytosol. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n=3). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  compared with the control group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the LPS group. (B) Cell extracts prepared from the same treatment condition were immunoprecipitated with p-IkB. The precipitated complexes were analyzed by immunoblotting by using antibody ubiquitin.



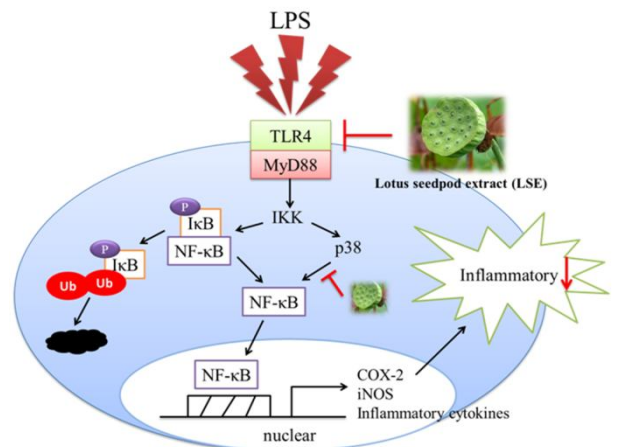
**Fig. 34 The effect of LSE on LPS-induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in HepG2 cells.** HepG2 cells were stimulated with LPS (5 µg/ml) and treated with various concentration of LSE (1, 2.5 and 5 µg/ml) or EGC 2 µM for 24 hr. The nuclear NF- $\kappa$ B proteins were analyzed by western blotting. Lamin B, served as an internal control of cell nuclear. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n=3). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  compared with the control group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the LPS group.



**Fig. 35 The effect of LSE on LPS-induced MAP kinase pathway in HepG2 cells.** HepG2 cells were stimulated with LPS (5 µg/ml) and treated with various concentration of LSE (1, 2.5 and 5 µg/ml) or EGC 2 µM for 24 hr. The MAP kinase pathway related proteins were analyzed by western blotting.  $\beta$ -actin, served as an internal control of cell cytosol. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 3). ## $p < 0.01$  compared with the control group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the LPS group.

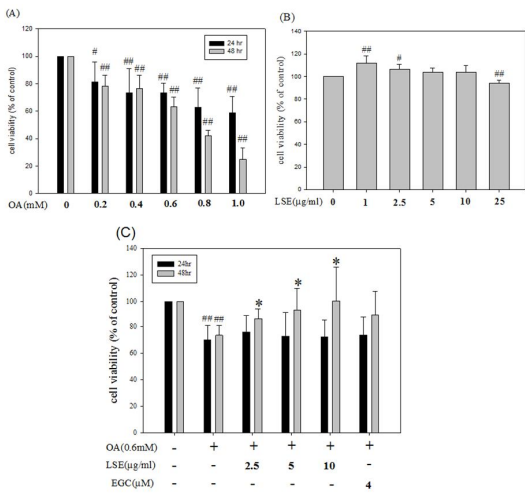


**Fig. 36 The effect of LSE on LPS-induced TLR4 (membrane) and MyD88 (cytosol) protein expression in HepG2 cells.** HepG2 cells were stimulated with LPS (5 µg/ml) and treated with various concentration of LSE (1, 2.5 and 5 µg/ml) or EGC 2 µM for 24 hr. The TLR4 proteins (A) and MyD88 (B) were analyzed by western blotting.  $\beta$ -actin, served as an internal control of cell membrane and cell cytosol. The results were represented as mean  $\pm$  SD (n = 3). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  compared with the control group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the LPS group.

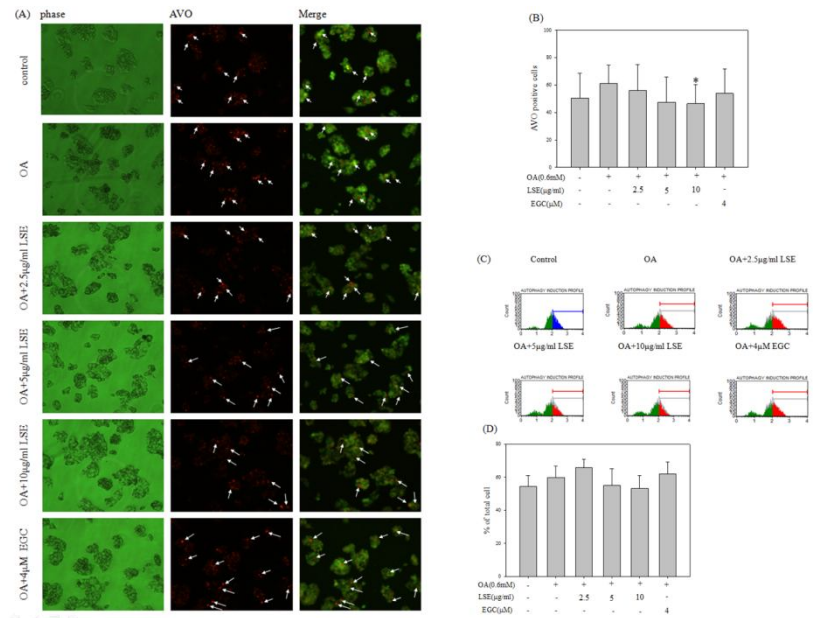


**Fig. 37 Overview of pathway for LSE inhibited LPS-induced liver inflammation in vivo and in vitro.**

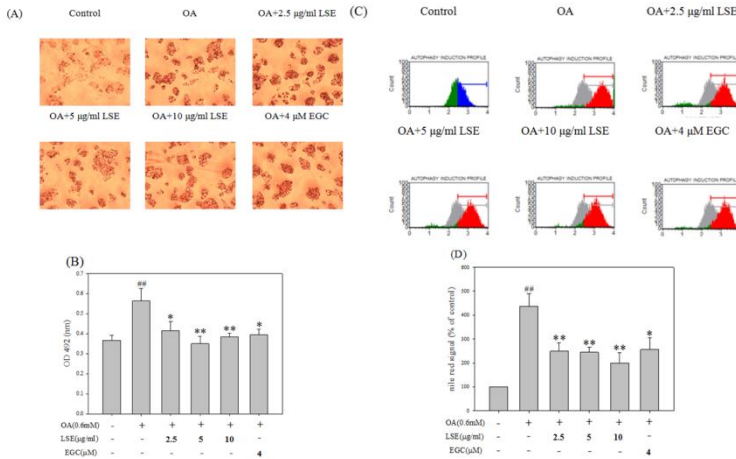




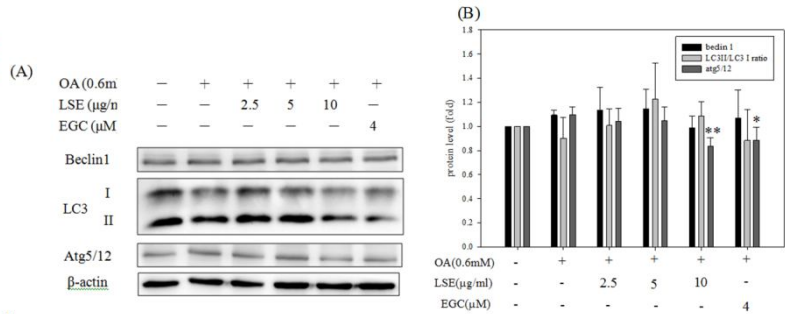
**Fig. 38 Effects of OA, LSE, EGC in combination on HepG2 cell viability.** (A) HepG2 cells were treated with various concentration (0-1.0 mM) of OA for 24, 48 hr. (B) HepG2 cells were treated with various concentration (0-25 µg/ml) of LSE for 48 hr. (C) HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5 and 10 µg/ml) for 24hr and 48hr in the presence or absence of OA (0.6 mM). The quantitative data were presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  compared with the control group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the OA treated group.



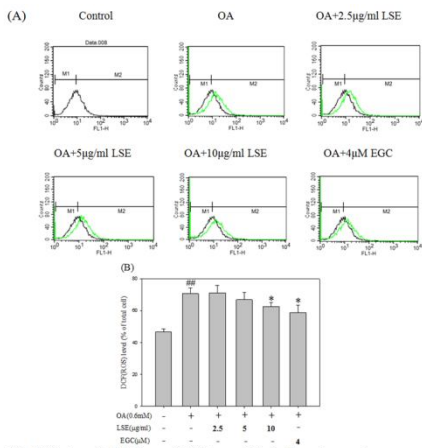
**Fig. 41 Effects of LSE or EGC on OA-induced HepG2 cell autophagy.** HepG2 cells were treated with 0.6mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (2.5, 5 and 10 µg/ml) or EGC (4µM) for 48hr. (A) Autophagic cells were assayed by AO staining. Arrows indicate autophagic cells. Panels show (from left to right) phase-contrast microscopy (left), AO staining (middle), and merge image (right). (B) Autophagic values were calculated as the AO<sup>+</sup> cells in each random field (>100 cells) and represent as mean  $\pm$  SD (n=3) of three independent experiments  $\pm$  SD. (C) Autophagic cells were assayed by AO staining. The AO fluorescence was analyzed using flow cytometry. Observed cell AO fluorescence enhancement (right shift) or weakened (left shift). (D) The Flow results of AVO are quantified. Autophagic values were calculated as the percentage of AO<sup>+</sup> cells relative to the total number and represent as mean  $\pm$  SD (n=3) of three independent experiments  $\pm$  SD. ##  $p < 0.01$  compared with the control group. \*  $p < 0.05$  compared with the OA treated group. \*\*  $p < 0.01$  compared with the OA treated group.



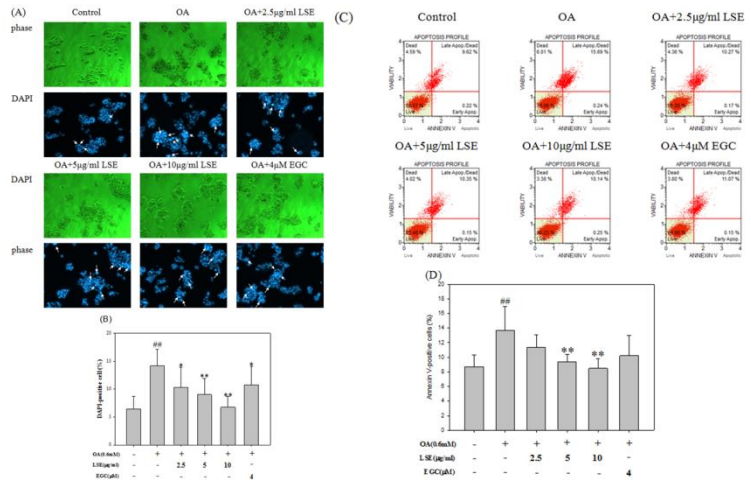
**Fig. 39 Effects of LSE or EGC on the OA-induced intracellular lipid accumulation.** HepG2 cells were treated with 0.6mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (2.5, 5 and 10 µg/ml) or EGC (4µM) for 48hr. (A) After the incubation, the cells were stained with Oil Red O and then observed under the microscope (100X). The red droplets accumulated in the cells were indicated as the stained lipid. (B) adding 1 ml of isopropanol to the stained culture dish to extract oil red O, and then monitor its absorbance at 492nm. (C) Quantification of intracellular fat content with flow cytometry analysis, as assessed by Nile red staining. (D) The quantitative data are presented as means  $\pm$  SD of two independent experiments. #  $p < 0.05$  compared with the control group.



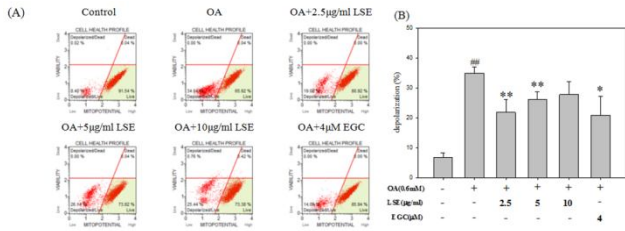
**Fig. 43 Effect of LSE or EGC on expression of autophagy-related proteins in OA-treated HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with 0.6mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (2.5, 5 and 10 µg/ml) or EGC (4µM) for 48hr. (A) The protein levels of beclin 1, LC3 II/LC3 I, atg5/12 were analyzed by western blotting.  $\beta$ -actin served as an internal control of cell cytosol. (B) The quantitative data were presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiment. #  $p < 0.05$  compared with the control group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the OA treated group.



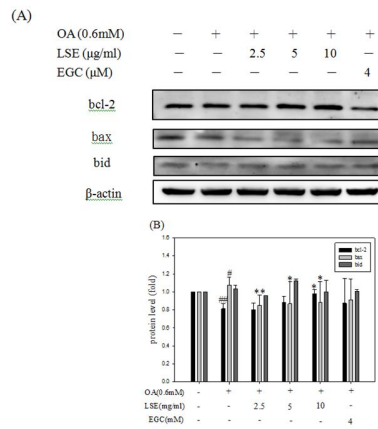
**Fig. 40 Effects of LSE or EGC on OA-induced an increase in ROS content in HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with 0.6mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (2.5, 5 and 10 µg/ml) or EGC (4µM) for 48hr. (A) The ROS were assayed by DCFH-DA staining with flow cytometry. (B) ROS levels were presented as percentage of DCF-positive cells divided by the total number of cells. The quantitative data were presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiment. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  compared with the control group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the OA treated group.



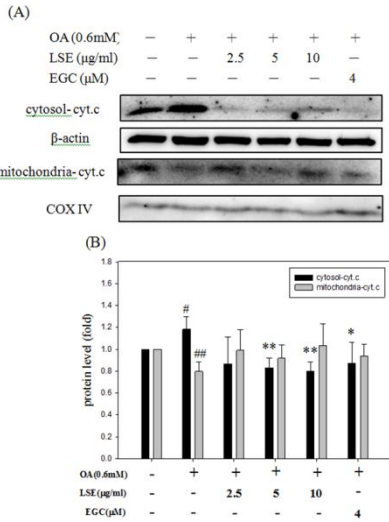
**Fig. 44 Effects of LSE or EGC on OA-induced HepG2 cell apoptosis.** HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5 and 10 µg/ml) or EGC (4µM) for 48hr in the presence or absence of OA (0.6mM). (A) The apoptotic cells were assayed by DAPI assay. Arrows indicate apoptotic cells. (B) Apoptotic values were presented as percentage of apoptotic cells divided by the total number of cells. (C) For annexin V/7-AAD staining, HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5 and 10 µg/ml) or EGC (4µM) before subjected to flow cytometry analysis. (D) The quantitative data were presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments. ##  $p < 0.01$  compared with the control group. \*\*  $p < 0.01$  compared with the OA treated group.



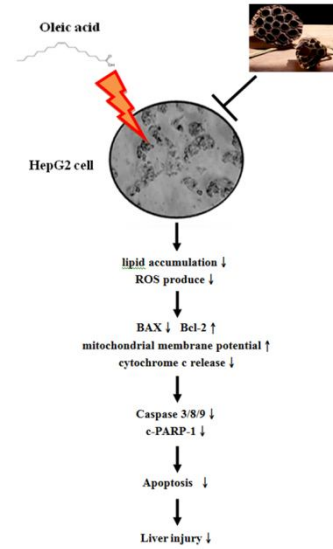
**Fig. 45 Effects of LSE or EGC on OA-induced mitochondrial membrane depolarization in HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with or without LSE (2.5, 5 and 10 μg/ml) or EGC (4μM) for 48hr in the presence or absence of OA (0.6mM). (A) The mitochondrial membrane depolarization were assayed by JC-1 staining with flow cytometry. (B) Depolarization levels were presented as percentage of depolarization cells divided by the total number of cells. The quantitative data were presented as means ± SD of three independent experiments. # p<0.05, ## p<0.01 compared with the control group. \* p<0.05, \*\* p<0.01 compared with the OA treated group.



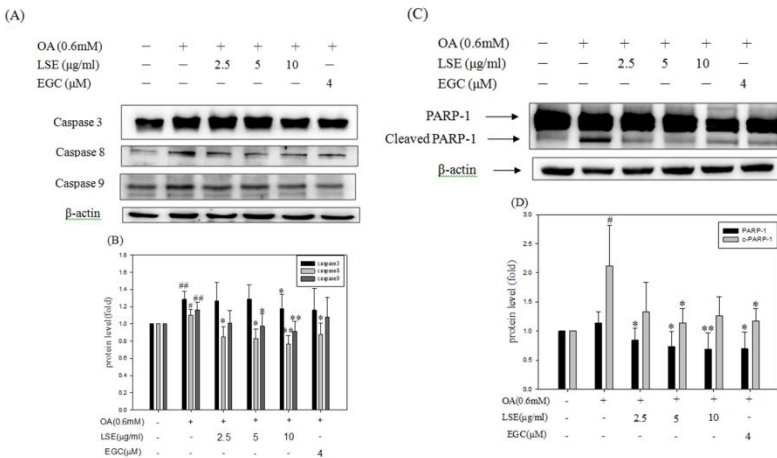
**Fig. 46 Effects of LSE or EGC on expression of bcl-2 family proteins in OA-treated HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with 0.6mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (2.5,5 and 10 μg/ml) or EGC(4μM) for 48hr. (A) The protein levels of bax, bcl-2 and bid were analyzed by western blotting. β-actin served as an loading control. (B) The quantitative data were presented as mean ± SD of three independent experiments. # p<0.05, ## p<0.01 compared with the control group. \* p<0.05, \*\* p<0.01 compared with the OA treated group.



**Fig. 47 Effects of LSE or EGC on expression of cytochrome c proteins in OA-treated HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with 0.6mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (2.5,5 and 10 μg/ml) or EGC(4μM) for 48hr. (A) The protein levels of cytosol and mitochondria cytochrome c were analyzed by western blotting. β-actin and COX IV served as an internal control of cell cytosol and mitochondria. (B) The quantitative data were presented as mean ± SD of three independent experiments. # p<0.05, ## p<0.01 compared with the control group. \* p<0.05, \*\* p<0.01 compared with the OA treated group.



**Fig. 49 Overview of pathways for LSE inhibited OA-induced liver injury**



**Fig. 48 Effects of LSE or EGC on expression of PARP-1 protein in OA-treated HepG2 cells.** HepG2 cells were treated with 0.6mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (2.5, 5 and 10 μg/ml) or EGC (4μM) for 48hr. (A) The protein levels of caspase 3,8,9 were analyzed by western blotting. β-actin served as a loading control. (B) The quantitative data were presented as mean ± SD of three independent experiments. (C) The protein levels of PARP-1 and cleaved PARP-1(c-PARP-1) were analyzed by western blotting. β-actin served as a loading control. (D) The quantitative data were presented as mean ± SD of three independent experiment. # p<0.05, ## p<0.01 compared with the control group. \* p<0.05, \*\* p<0.01 compared with the OA treated group.

103年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：陳璟賢		計畫編號：103-2313-B-040-004-MY3	
計畫名稱：蓮蓬萃取物成份多重護肝及分子機制之研究			
成果項目		量化	單位 質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)
國內	期刊論文	0	
	學術性論文 研討會論文	10	<p>1. The effect of lotus seedpod extract on lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. The 30th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C. March 21-22. P405.</p> <p>2. The effect of lotus seedpod on metabolic syndrome. The 30th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C. March 21-22. P423.</p> <p>3. Hepatoprotective effect of lotus seedpod extract on lipopolysaccharide-induced liver inflammation in vivo. 2016 Annual Meeting and International Conference on Health Care of Aging, Taipei, R.O.C. March 5, 2016. P51.</p> <p>4. Hepatoprotective effect of lotus seedpod extract against acetaminophen-induced liver injury in vivo and in vitro. The 31th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C. March 26-27, 2016.</p> <p>5. Lotus seedpod extracts improved metabolic syndrome and reduced lipid accumulation in hepatocytes. The 31th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C. March 26-27, 2016.</p> <p>6. In vivo hepatoprotective effect of lotus seedpod extract against acetaminophen-induced liver injury. 8th Asia-Pacific City Forum of Biomedical Laboratory Science 2016, April 16-17, Taichung, R.O.C.</p> <p>7. Beta-cell protective effects of lotus seedpod extracts against oxidative injury in vitro and in vivo. 8th Asia-Pacific City Forum of Biomedical Laboratory Science</p>



					<p>2016, April 16-17, Taichung, R.O.C.</p> <p>8. Effect of Lotus Seedpod Extract against Acetaminophen-Induced Liver Injury. The 42th Joint Annual Conference of Nutrition Society of Taiwan. Taipei, R.O.C. May 21. 2016. PA-05.</p> <p>9. Inhibitory effect of Lotus seedpod extracts on metabolic syndrome in mice and lipid accumulation in hepatocytes. 9th Asia-Pacific City Forum of Biomedical Laboratory Science 2017, April 15-16, Taoyuan, R.O.C.</p> <p>10. In Vitro Protective Effect of Lotus Seedpod Extracts against Oleic Acid-Induced Liver Injury. The 43th Joint Annual Conference of Nutrition Society of Taiwan. Taichung City, R.O.C. May 20, 2017. SA-08.</p>
	專書		0	本	
	專書論文		5	章	<p>1. 中山醫學大學碩士論文 體內和體外研究蓮蓬萃取物成份對於胰島beta細胞免於氧化性損傷之保護作用 2015</p> <p>2. 中山醫學大學碩士論文 蓮蓬萃取物對於細菌內毒素誘發肝損傷之影響 2015</p> <p>3. 中山醫學大學碩士論文 蓮蓬水萃取物改善代謝症候群及減少肝細胞脂肪堆積之研究 2015</p> <p>4. 中山醫學大學碩士論文 體外和體內研究蓮蓬萃取物抵抗乙醯胺基苯酚誘導肝損傷之保護作用 2016</p> <p>5. 中山醫學大學碩士論文 蓮蓬萃取物應用於保肝護腎之研究 2017</p>
	技術報告		0	篇	
	其他		0	篇	
智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
			已獲得	2	
		新型/設計專利	0		
	商標權		0		
	營業秘密		0		
	積體電路電路布局權		0		
	著作權		0		
	品種權		0		
	其他		0		
技術移轉	件數		0	件	

		收入		0	千元		
國外	學術性論文	期刊論文		0	篇		
		研討會論文		0			
		專書		0	本		
		專書論文		0	章		
		技術報告		0	篇		
		其他		0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利	0			
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
參與計畫人力	本國籍	大專生		5	人次	聘任大專生擔任臨時工共5人	
		碩士生		10		聘任碩士生擔任兼任助理10人	
		博士生		0			
		博士後研究員		0			
		專任助理		0			
	非本國籍	大專生		0			
		碩士生		0			
		博士生		0			
		博士後研究員		0			
		專任助理		0			
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)							

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

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

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以200字為限）

已發表學術研討會論文10篇，完成碩士專書論文6本

已獲得專利證號 I531372、I568442

與中美兄弟製藥股份有限公司於2017年1月洽談合作

與九福來科技集團已於2017年3月簽署合作意向書

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. 本計劃成果確認蓮蓬萃取物(LSE)具有多重護肝作用，目前正積極洽談技術轉移，實質將成果轉入產業界，提升植物蓮產業附加經濟價值，結合本土保健生技產業，提昇本土農業產值，符合環保節能減碳，更可共創產、官、學互利共享局面。
  2. 本研究計劃順利達成預定目標，可有效充分利用天然的萃取物達到多重護肝之作用，更深入地瞭解化學性、細菌性、脂肪性物質造成人類肝病變的原因、過程和機制，對肝癌預防具有重要的貢獻。
  3. 本計畫完成護肝保健食品申請相關所需實驗，包含28天餵食毒性試驗等，結果發現攝取高劑量LSE對於公母鼠並沒有毒性，有利於未來與廠商媒合，共同申請蓮蓬多重護肝保健食品。
  4. LSE能降低LPS誘發HepG2細胞發炎相關因子的表現量下降。綜合研究結果，未來LSE可能有潛力應用於預防細菌性肝炎。
  5. LSE可降低Acetaminophen(APAP)對於HepG2人類肝細胞的凋亡傷害並提高存活率。未來可應用於治療藥物性肝損傷之潛力。
  6. LSE可以降低油酸(OA)誘導HepG2人類肝細胞損傷並減少細胞中脂肪堆積、氧化壓力與細胞凋亡的增加，未來可應用於治療脂肪性肝損傷之潛力。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關  
（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）  
本研究具影響公共利益之重大發現：否 是  
說明：（以150字為限）