

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

## 蓮蓬萃取物成份抗代謝症候群及其分子機制之研究(第3年)

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：NSC 102-2320-B-040-003-MY3  
執行期間：104年08月01日至105年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

計畫主持人：林慧萱  
共同主持人：陳璟賢  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：徐英華  
碩士班研究生-兼任助理人員：王廷軒  
碩士班研究生-兼任助理人員：黃登琪

中華民國 105 年 10 月 27 日

中文摘要：代謝症候群(metabolism syndrome)引發之相關疾病包含心血管疾病、脂肪肝和第二型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2D)，這三個代謝性疾病已被證明可用飲食來控制。因此利用健康食品來預防或改善代謝症候群應有其發展的可行性。蓮蓬(lotus seedpod)自古即被用來行氣除脹、益補脾胃、止血化瘀、降肝火及止血功效。本研究之目的則為評估蓮蓬萃取物(lotus seedpod extract, LSE)抗代謝症候群之作用。計畫第一年研究成果指出：利用高脂飲食(high fat diet, HFD)合併鏈脲佐菌素(streptozotocin, STZ)誘發代謝症候群之動物模式中，LSE可以顯著降低胰島素阻抗、脂質代謝異常、脂質過氧化程度，並提升體內抗氧化防禦系統，以降低肝腎發炎反應及損傷程度，同時具有改善胰島組織萎縮的現象。第二年則探討LSE是否具有保護 $\beta$ 細胞免於損傷之作用，進而作為改善代謝症候群以避免T2D發生為研究之重點。首先，在過氧化物(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)處理 $\beta$ 細胞(RIN-5F)模擬氧化損傷之細胞模式中，LSE及其主要類黃酮成份epigallocatechin (EGC)皆能有效保護 $\beta$ 細胞存活、以及具有維持 $\beta$ 細胞分泌胰島素之功能。LSE及EGC也能抗細胞凋亡(apoptosis)並減少氧化傷害，且能增加細胞自噬(autophagy)作用。進一步發現LSE及EGC能夠抑制促凋亡蛋白caspase 3、PARP-1和Bax表現量；以及誘導抗凋亡蛋白Bcl-2和phospho-Bad、促增生蛋白Akt、class I PI3K之表現，而細胞自噬蛋白LC3-II和Beclin-1的表現量則有上升之趨勢。第三年進一步以研究LSE及EGC促進肝細胞內脂肪代謝作用，以及抗發炎活性評估，作為改善代謝症候群以避免脂肪肝的發生。實驗結果發現LSE及EGC皆可降低油酸(oleic acid, OA)所誘導人類肝細胞(HepG2)內脂質堆積，並抑制發炎反應相關蛋白NF- $\kappa$ B和COX-2之表現、膽固醇生成關鍵酵素HMG CoA reductase及其調控蛋白SREBP-2、以及增加肝糖合成相關調控蛋白Akt與GSK3 $\beta$ 磷酸化表現。在代謝症候群之動物實驗中進一步分析胰臟和肝臟組織蛋白之結果與細胞實驗得到相同之驗證。總結，LSE能夠透過細胞自噬機制，有效的保護胰臟組織及細胞免於氧化壓力所造成的傷害。LSE也可以抑制肝臟發炎和脂質生成酵素的表現，以及促進肝糖合成，藉此達到減少肝臟脂質堆積及發炎作用。本研究可以說明蓮蓬萃取物LSE及其功能性成份EGC發揮改善代謝症候群之功效。

中文關鍵詞：代謝症候群、脂肪肝、第二型糖尿病、蓮蓬、胰島素阻抗、抗氧化、胰島細胞、類黃酮、細胞凋亡、細胞自噬、抗發炎、脂質堆積

英文摘要：Metabolic syndrome is characterized by obesity, hypertension, hyperglycemia and dyslipidemia as well as a cluster of risk factors. Along with these risk factors rising, the probability of suffering from cardiovascular disease, fatty liver and type 2 diabetes mellitus (T2D) would be increased. In the present study, we aimed to investigate the anti-metabolic syndrome effect of lotus seedpod extract (LSE). First, LSE was demonstrated to be rich in flavonoid, including catechin and epigallocatechin (EGC). In first year, the mice were fed high fat diet (HFD) combined streptozotocin (STZ) supplemented with LSE (1% and 2%) for 6 weeks. Feeding LSE to mice significantly reduced

these hallmarks of metabolic syndrome induced by HFD combined STZ treatment. LSE improved metabolic syndrome in vivo via possessing hypoglycemic, hypolipidemic, antioxidant and anti-inflammatory activities. In second year, we examined the protective effect of LSE on pancreatic  $\beta$ -cells. Firstly, LSE or its main compound flavonoid, EGC, dose-dependently improved the survival of RIN-5F rat pancreatic  $\beta$ -cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced viability loss. LSE or EGC showed potential in reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced occurrence of apoptosis. In addition, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced formation of acidic vesicular organelles and the up-regulation of LC3-II were increased by LSE or EGC. Our data imply that LSE up-regulates the autophagic pathway, which in turn led to reduced oxidative stress-induced  $\beta$ -cell injury and apoptosis. In third year, the result showed LSE or EGC suppressed oleic acid (OA)-induced lipid accumulation in human hepatic HepG2 cells. Molecular data showed that LSE or EGC inhibits the OA-induced hepatic lipogenesis- and inflammation-related regulatory proteins in vitro. In conclusion, these data demonstrated that LSE potentially could be developed as an anti-metabolic syndrome agent.

英文關鍵詞： metabolic syndrome, fatty liver, type 2 diabetes mellitus, lotus seedpod, flavonoid, insulin resistance, antioxidant, anti-inflammatory, pancreatic  $\beta$ -cells, apoptosis, autophagy, lipid accumulation.

# 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)

## 蓮蓬萃取物成份抗代謝症候群及其分子機制之研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 102-2320-B-040-003-MY3

執行期間：102年08月01日至105年07月31日

執行機構及系所：中山醫學大學 醫學檢驗暨生物技術學系(所)

計畫主持人：林慧萱

共同主持人：陳璟賢

計畫參與人員：徐英華、王廷軒、黃登琪

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 105 年 10 月 27 日

## § 中文摘要

代謝症候群(metabolism syndrome)引發之相關疾病包含心血管疾病、脂肪肝和第二型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2D)，這三個代謝性疾病已被證明可用飲食來控制。因此利用健康食品來預防或改善代謝症候群應有其發展的可行性。蓮蓬(lotus seedpod)自古即被用來行氣除脹、益補脾胃、止血化瘀、降肝火及止血功效。本研究之目的則為評估蓮蓬萃取物(lotus seedpod extract, LSE)抗代謝症候群之作用。計畫第一年研究成果指出：利用高脂飲食(high fat diet, HFD)合併鏈脲佐菌素(streptozotocin, STZ)誘發代謝症候群之動物模式中，LSE 可以顯著降低胰島素阻抗、脂質代謝異常、脂質過氧化程度，並提升體內抗氧化防禦系統，以降低肝腎發炎反應及損傷程度，同時具有改善胰島組織萎縮的現象。第二年則探討 LSE 是否具有保護  $\beta$  細胞免於損傷之作用，進而作為改善代謝症候群以避免 T2D 發生為研究之重點。首先，在過氧化物( $H_2O_2$ )處理  $\beta$  細胞(RIN-5F)模擬氧化損傷之細胞模式中，LSE 及其主要類黃酮成份 epigallocatechin (EGC)皆能有效保護  $\beta$  細胞存活、以及具有維持  $\beta$  細胞分泌胰島素之功能。LSE 及 EGC 也能抗細胞凋亡(apoptosis)並減少氧化傷害，且能增加細胞自噬(autophagy)作用。進一步發現 LSE 及 EGC 能夠抑制促凋亡蛋白 caspase 3、PARP-1 和 Bax 表現量；以及誘導抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 phospho-Bad、促增生蛋白 Akt、class I PI3K 之表現，而細胞自噬蛋白 LC3-II 和 Beclin-1 的表現量則有上升之趨勢。第三年進一步以研究 LSE 及 EGC 促進肝細胞內脂肪代謝作用，以及抗發炎活性評估，作為改善代謝症候群以避免脂肪肝的發生。實驗結果發現 LSE 及 EGC 皆可降低油酸(oleic acid, OA)所誘導人類肝細胞(HepG2)內脂質堆積，並抑制發炎反應相關蛋白 NF- $\kappa$ B 和 COX-2 之表現、膽固醇生成關鍵酵素 HMG CoA reductase 及其調控蛋白 SREBP-2、以及增加肝醣合成相關調控蛋白 Akt 與 GSK3 $\beta$  磷酸化表現。在代謝症候群之動物實驗中進一步分析胰臟和肝臟組織蛋白之結果與細胞實驗得到相同之驗證。總結，LSE 能夠透過細胞自噬機制，有效的保護胰臟組織及  $\beta$  細胞免於氧化壓力所造成的傷害。LSE 也可以抑制肝臟發炎和脂質生成酵素的表現，以及促進肝醣合成，藉此達到減少肝臟脂質堆積及發炎作用。本研究可以說明蓮蓬萃取物 LSE 及其功能性成份 EGC 發揮改善代謝症候群之功效。

關鍵詞：代謝症候群、脂肪肝、第二型糖尿病、蓮蓬、胰島素阻抗、抗氧化、胰島細胞、類黃酮、細胞凋亡、細胞自噬、抗發炎、脂質堆積

## § 英文摘要

Metabolic syndrome is characterized by obesity, hypertension, hyperglycemia and dyslipidemia as well as a cluster of risk factors. Along with these risk factors rising, the probability of suffering from cardiovascular disease, fatty liver and type 2 diabetes mellitus (T2D) would be increased. In the present study, we aimed to investigate the anti-metabolic syndrome effect of lotus seedpod extract (LSE). First, LSE was demonstrated to be rich in flavonoid, including catechin and epigallocatechin (EGC). In **first year**, the mice were fed high fat diet (HFD) combined streptozotocin (STZ) supplemented with LSE (1% and 2%) for 6 weeks. To analyze metabolic syndrome, body weight and epididymal fat accumulation were used as indicators of obesity. Fasting serum glucose, insulin, HOMA-IR, and oral glucose tolerance (OGTT) were used as indicators of insulin resistance. Serum total lipids, including cholesterol, triglyceride, LDL-C, and HDL-C, and blood pressure were also measured. For exploring the possible mechanism for diet-induced metabolic syndrome, adipocytokines (leptin and adiponectin) and proinflammatory factors (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6) were measured in serum, as well as the presence of fat droplets and peri-portal fibrosis in liver was examined histologically. Feeding LSE to mice significantly reduced these hallmarks of metabolic syndrome induced by HFD combined STZ treatment. LSE improved metabolic syndrome *in vivo* via possessing hypoglycemic, hypolipidemic, antioxidant and anti-inflammatory activities. In **second year**, we examined the protective effect of LSE on pancreatic  $\beta$ -cells. Firstly, LSE or its main compound flavonoid, EGC, dose-dependently improved the survival of RIN-5F rat pancreatic  $\beta$ -cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced viability loss. LSE or EGC showed potential in reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced occurrence of apoptosis confirmed by morphological and biochemical features, including an increase in the distribution of hypodiploid phase, apoptotic bodies formation and caspase-3 activation. In addition, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced formation of acidic vesicular organelles and the up-regulation of microtubule associated protein 1 light chain 3-II (LC3-II), a marker of autophagy, were increased by LSE or EGC. Molecular data showed that autophagic effect of LSE or EGC might be mediated via class III PI3K/Beclin-1 and class I PI3K/Akt/p-Bad cascade pathway. Our data imply that LSE up-regulates the autophagic pathway, which in turn led to reduced oxidative stress-induced  $\beta$ -cell injury and apoptosis. In **third year**, we examined the effect of LSE and EGC on reducing lipid accumulation in human hepatic HepG2 cells. The result showed LSE or EGC suppressed oleic acid (OA)-induced lipid accumulation. Molecular data showed these influences of LSE or EGC might be mediated via SREBP-2/HMG CoA reductase, Akt/GSK3 $\beta$  and NF- $\kappa$ B/COX-2 cascade pathway. These results demonstrate that LSE or EGC inhibits the OA-induced hepatic lipogenesis- and inflammation-related regulatory proteins *in vitro*. In conclusion, these data demonstrated that LSE potentially could be developed as an anti-metabolic syndrome agent.

Keywords: metabolic syndrome, fatty liver, type 2 diabetes mellitus, lotus seedpod, flavonoid, insulin resistance, antioxidant, anti-inflammatory, pancreatic  $\beta$ -cells, apoptosis, autophagy, lipid accumulation.

## (一) 前言

### 一、代謝症候群 (Metabolism syndrome)

代謝症候群是一種包含肥胖、血壓偏高、血糖偏高以及血脂代謝異常等多項危險因子綜合表現的臨床徵候，伴隨著這些危險因子的增加，罹患心血管疾病 (cardiovascular disease)、糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 和脂肪肝 (fatty liver) 也相對提升 (1, 2)。於 1998 年世界衛生組織 (WHO) 率先提出代謝症候群的定義，認為胰島素阻抗 (insulin resistance) 是該病症最重要的指標，另外合併以下指標兩項及以上者，即為代謝症候群；這些指標包括肥胖、高血壓、脂質代謝異常、微蛋白尿(3)。國內現行代謝症候群之判定標準 (依據 2007 年衛生署國民健康局公告版) 共列腰圍、血壓、空腹血糖濃度、三酸甘油酯及高密度脂蛋白膽固醇等 5 項危險因子，符合其中 3 項即認定為代謝症候群患者。據當年度台灣地區高血壓 (hypertension)、高血糖 (hyperglycemia)、高血脂 (hyperlipidemia) 之追蹤調查研究顯示：國人代謝症候群盛行率：20 歲以上為 19.7% (男 20.3%，女 19.3%)，且隨年齡上升而有增加的趨勢。代謝症候群的危險性來自於它與第 2 型糖尿病及心血管疾病發生的危險因子具高度關聯性，而胰島素阻抗及第 2 型糖尿病又會加速粥狀動脈硬化 (atherosclerosis) 發生，因而目前備受醫學界矚目。研究指出，患有代謝症候群之非糖尿病患者日後罹患第 2 型糖尿病的機率較正常人增加 4 倍，罹患心血管疾病的危險性則增加 30% (4)。代謝症候群的形成機制雖未完全釐清，但主要因素在於肥胖與胰島素阻抗，而產生葡萄糖及脂肪代謝的異常，進而衍生出上述各種疾病。一般認為胰島素阻抗是所有症狀之間共同連結因子，故目前研究多著重在阻抗的發生與血糖的恆定及心血管疾病發展間的關係。此外，脂質異常 (lipid disorder) 及發炎 (inflammation) 現象也被認為是導致代謝症候群的主要機制之一(5, 6)。代謝症候群的成因可能與先天遺傳及人口學等生物因素有關，但最重要的還是不活動或少活動生活型態、肥胖人口增加、生活壓力及其他不良健康行為等因素所造成。在治療代謝症候群相關疾病之藥品方面，如 statin 等具有 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-Coenzyme A (CoA) reductase 抑制作用之藥物常被用於降低患者血清中膽固醇(7)；而可增加高密度脂蛋白膽固醇之 niacin 皆為目前治療及研究之主流(8)。但目前這類上市藥物具有體重增加，肝毒性和心臟衰竭等副作用，因此開發有效且安全以防治代謝症候群的天然食材備受重視。

### 二、蓮蓬 (Lotus seedpod)

植物蓮學名 *Nelumbo nucifera* Gaertner。英名 East Indian Lotus，俗稱 Lotus，中文亦稱「荷」、「蓮」，是宿根性多年生水生植物。蓮在印度、中國及日本菲律賓等國皆有產，但主產地在印度，近百年內才由日本傳入臺灣，並開始大量種植，主要分佈在白河鎮、嘉義及台南市郊一帶，蓮的經濟作物以生產蓮子、蓮藕及藕粉等加工品為主。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之分析、生物活性之探討(9-13)，然而對於蓮蓬部位則極少有科學文獻報導。蓮蓬為蓮的花心，別稱蓮房。蓮蓬為傳統中藥材，味苦性溫，本草綱目記載蓮蓬可用來行氣除脹、益補脾胃、止血化瘀、清熱、降肝火及止血，但目前蓮蓬被視為廢棄物大量丟棄。近年來已有文獻證實蓮蓬中富含原花青素 (proanthocyanidins) (14-16)，此成份屬於類黃酮 (flavonoid)。研究已顯示蓮蓬原花青素 (procyanidins of lotus seedpod, LSPCs) 具有抗氧化(15, 16)、抗老化、增強記憶力(15-20)、免疫調節(21)以及抗癌(22)之活性，所以推論蓮蓬萃取物具有疾病化學預防的活性。

## (二) 研究目的

隨著物質生活的豐裕，體能活動的減少及壽命的延長，代謝症候群在全世界有急速增加的趨勢。據世界衛生組織統計，全世界每年有 1,700 萬人死於心腦血管疾病，占總死亡

人數的 1/4。以台灣地區而言，根據行政院衛生署公布的資料顯示 2014 年國人十大死因中，心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病、肝腎相關疾病以及高血壓性疾病等多項與代謝症候群相關的疾病，其總死亡率遠高於排名第一的惡性腫瘤。代謝症候群儼然已成為我國及世界之新興重要公共衛生議題。代謝症候群引發之相關疾病對個人健康及國家醫療資源都是極大的隱憂，因此各國都急欲尋求防治之道。新的預防和治療代謝症候群策略是大致有如美國國家膽固醇教育計畫成人治療第三版 (Adult Treatment Panel III of National Cholesterol Education Program) 之建議，必須同時針對肥胖、高血壓、糖尿病及心血管疾病等一起進行整合性的治療。而與代謝症候群具高關連性的三個代謝性疾病--第 2 型糖尿病、脂肪肝和心血管疾病已被證明可用飲食來控制。因此利用健康食品來預防或改善代謝症候群應有其發展的可行性。近年來，且由於自我照護及健康意識之抬頭，傳統醫學及補充替代醫學亦逐漸受到重視。許多具有預防及改善代謝症候群潛力之中草藥及天然物逐漸受到重視。如何藉由增加胰島素敏感性、促進肝臟脂質的代謝、降低三酸甘油酯和膽固醇、修正細胞激素分泌異常的狀況、抑制 LDL 氧化、阻止泡沫細胞的形成、降低血管平滑肌細胞的增生與遷移作用以及保護內皮細胞不受到損害，皆被視為是有效預防或改善代謝症候群的方法。鑑於先前研究指出，蓮蓬具有良好的抗氧化活性、免疫調節、抑制 LDL 氧化、減緩動脈硬化等功效，因此，我們推估蓮蓬可作為預防或改善代謝症候群之天然保健食材，本研究計劃若能順利達成預定目標，不僅可以有效地充分利用天然萃取物及其成份，也可以抑制代謝症候群衍生之疾病及相關機轉，更可以深入地瞭解造成人類代謝症候群之成因、致病過程和分子機制，對代謝症候群的預防和控制具有相當重要的貢獻。

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之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，但目前蓮蓬被視為廢棄物大量丟棄。過去的研究顯示蓮蓬成分富含類黃酮，並報導其具有較強的清除自由基和抗氧化能力，顯示蓮蓬具有開發為預防及改善代謝症候群之物質的潛力。因此，本研究將針對台灣生產之蓮蓬進行初步之多酚定性、定量分析，以及抗代謝症候群活性分析。目的在釐清於複雜且為漸進式的代謝症候群病症中，蓮蓬萃取物所參與影響的範疇及抗代謝症候群之分子機制。天然物抗代謝症候群之分子機制的研究無論對於類黃酮萃取物醫藥化評估，亦或針對與代謝症候群引發之相關疾病（糖尿病、脂肪肝及心血管疾病）治療之分子標的，都是重要的參考指標。研究期望能提供國人食用蓮蓬時，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，冀能研發具預防或輔助治療代謝症候群之蓮蓬保健食品，以裨利國人健康之所需。

### (三) 文獻探討

1. 許多研究指出綠茶無論在動物或人體實驗中，皆可發現其具降低血清膽固醇及TG的功能(23, 24)，而有效成分為其所含的多酚類。而Wu等人(2004)的研究中也已證實綠茶可以改善代謝症候群的多項危險指標(25)。
2. 研究指出飲食中添加大豆分離蛋白、大豆蛋白水解物和大豆異黃酮素皆可顯著地降低代謝症候群大白鼠腹部脂肪堆積、血漿TC和TG濃度及降低腹腔注射葡萄糖後血漿葡萄糖和胰島素濃度的上升，並可顯著增加血漿和脂肪組織中adiponectin的濃度及抗氧化酵素活性。主要導因於大豆蛋白中所含的異黃酮素可藉由活化PPAR $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 促進體內脂質的代謝和胰島素的活化，除了可降低血脂質，同時也改善葡萄糖耐受性(26)。
3. 過去研究證實荷葉水草物可抑制LDL氧化，降血脂及抑制血管病變(12)，並進一步發現荷葉水草物可抑制血管平滑肌細胞增生和位移(13)。



對於蓮蓬在醫學上的報導，國外的研究甚少，只有蓮蓬原花青素抗氧化、抗老化及抑制小鼠黑色素細胞瘤試驗等(14-22)，國內也幾乎無相關之研究。至於蓮心及荷葉之抗氧化、抗癌、抗肥胖及抗心血管疾病等研究則較多(9-13)。從安全及經濟價值考量，由植物萃取有機物質作為預防或治療疾病之物質已為各國所重視，例如 tea polyphenolic extracts, curcuminoid extracts 及 broccoli extracts (sulforaphane) 已被廣泛的應用為化學預防物質。而本實驗室致力於開發天然物中所含的特殊成份，希望可以由攝取食品來達到預防或延緩疾病之目的，因此本計劃將以台灣鄉間常見大慈蓮之蓮蓬部位，萃取其中所富含之功能性成份(LSE) 針對動脈硬化以 in vitro 與 in vivo 方式進行研究。根據我們成份定量實驗結果顯示：蓮蓬萃取物之類黃酮含量 85.7% (Table 1)高於荷葉萃取物 (56%) (11)，更具有成為化學預防物質之潛力。況且 LSE 是蓮蓬直接經由水煮萃取而來，保留天然植物本身最原始之生物活性，一來不會有殘存有機溶劑之虞；二來它不會如人工合成化學物質對人體衍生氧化性傷害之作用。期盼本計畫所獲得之初步結果，對於日後保健產品及農業之開發與應用上能有所貢獻。

#### (四) 研究方法

##### 一、蓮蓬萃取物 (LSE) 之製備及成份分析

###### 1.1. LSE 水萃取物之製備

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。

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

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

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

測定黃酮的含量，以 rutin (mg/ml) 為標準品。甲醇溶解後分別取不同的體積，以 30% 乙醇稀釋並補足體積至 10 ml 搖勻。接著各加 0.3 ml 之 1M NaNO<sub>3</sub> 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。再加 0.3 ml 之 10% AlNO<sub>3</sub> 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。最後加入 4 ml 之 4% NaOH 溶液混合均勻，補 0.4 ml 去離子水至刻度，放置 15 分鐘。在波長 510 nm 下測吸光值 (乙醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線。並計算回歸方程式。樣品泡好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算黃酮的含量。

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

花青素通常微弱酸性，在酸性環境下可以形成穩定的 flavylium 陽離子構造。本次實驗採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，精確定量待測樣品，得體積 V，並從中吸取 2 ml 試樣，經適當稀釋以濃鹽酸或氫氧化鈉溶液調 pH，使一份 pH 為 1.0，另一份 pH4.5。兩份稀釋液分別以分光光度計測其在 520 nm 的吸光值，得 A<sub>1</sub> (pH 1.0 者) 與 A<sub>2</sub> (pH 4.5 者)，再以下列公式計算每 100 克水果中所含總花青素毫克數。

總花青素含量(mg 花青素/100 mg 萃取物):

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

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

V: 總抽出液體積(mL)

F: 稀釋倍數

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

$\omega$ : 水果總重(g)

### 1.5. 高效能液相層析儀 (HPLC) 分析

為使 LSE 製備固定標準化, 實驗利用 HPLC 鑑定其多酚成份。使用 17 個多酚標準品: 1. gallic acid (GA)、2. protocatechuic acid (PCA)、3. catechin、4. procyanidin B2、5. epicatechin、6. caffeic acid、7. epigallocatechin gallate (EGCG)、8. ellagic acid (EA)、9. rutin、10.  $\rho$ -Coumaric acid、11. epigallocatechin (EGC)、12. ferulic acid (FA)、13. epicatechin gallate (ECG)、14. gossypin、15. gossypetin、16. quercetin、17. naringenin。分析條件為用 C-18 reverse-phase column (5  $\mu$ m, Hypersil ODS, 200 mm X 2.1 mm), 將 LSE 過濾 (0.45  $\mu$ m) 後, 取 20  $\mu$ l 注入 HPLC, mobile phase 為 A: 0.1% Formic acid; B: acetonitrile wit 0.1% formic acid; 0-5 min 為 90% A、10% B; 5-14 min 為 70% A、30% B; 14-19 min 為 60% A、40% B; 19-23 min 為 40% A、60% B; 23-24 min 為 10% A、90% B; 24-33 min 為 100% B, monitored at 285 and 345 nm。

## 二、HFD 合併 STZ 誘導小鼠產生代謝症候群

利用 Balb/c 小鼠進行實驗, 動物實驗模式分組概述如下: (I) 正常飼料餵食組、(II) 高脂肪餵食合併靜脈注射 40 mg/kg STZ 組 (HFD+ STZ)、(III) HFD+ STZ+ 1% LSE、(IV) HFD+ STZ+ 2% LSE、(V) HFD+ STZ+ 30 mg/kg statin (代謝症候群治療藥物對照組)。一般組以 normal diet 餵食, 第 2-5 組以 HFD: 89.8% chow, 10% coconut oil 及 0.2% 膽固醇。實驗過程 (Fig. 2A) 中定期記錄動物飲食、飲水、體重、血糖以及血壓的變化, 並登記動物死亡的數目, 飼養 11 週後可誘導產生高血脂及高血糖。動物禁食一夜後犧牲, 觀察腹部脂肪堆積情形並拍照, 犧牲後收集血液分析血脂肪, 包括 TC、TG、HDL、LDL; 另一部份取肝組織測定其肝臟脂肪之濃度。並取出實驗動物之副睪脂肪、肝臟、胰臟和腎臟等部分, 浸入 10% 中性福馬林固定 (neutral buffered formalin), 以石蠟包埋, 以蘇木精-伊紅染色 (hematoxylin and eosin, H&E) 染色觀察病灶。

## 三、代謝症候群症狀評估

### 3.1. 血糖 (blood sugar) 測定

血漿中的葡萄糖與葡萄糖氧化酶作用產生葡萄糖醛酸及過氧化氫, 後者在過氧化氫酶催化下, 與 4-aminophenazone 及 phenol 氧化成 quinoneimine 紫紅色產物。將 10  $\mu$ l 的血漿樣品及標準品加入含有 phosphate buffer、MOPS buffer、phenol、4-aminophenazone、glucose oxidase 和 peroxidase 溶液中混合均勻, 在 37°C 恆溫箱中反應 10 分鐘, 於波長 500 nm 吸光值下, 以已知濃度之標準品作對照, 計算出測定葡萄糖濃度, 其公式如下: 葡萄糖濃度 (mmol/L) = 血液樣品吸光值/標準品吸光值  $\times$  5.5。

### 3.2. 血清胰島素 (insulin) 分析

先將 50  $\mu$ l 的 conjugate solution 置於 96 well plate, 再將 25  $\mu$ l 標準品 (系列稀釋)、血液樣本加入分析盤中, 室溫反應 2 小時後, 進行 wash, 移除未與抗體結合的樣品, 再加入 200  $\mu$ l peroxidase substrates 室溫下反應 15 分鐘, 最後加入酸性溶液終止酵素呈色反應, 於波長 450 nm 下可測其吸光值, 換算其胰島素濃度。

### 3.3. 葡萄糖耐受測試 (oral glucose tolerance test, OGTT)

參考 Andrikopoulos 等人所建立的方法。實驗動物空腹 4~6 小時後, 以管灌方式給予 2

g/kg 的葡萄糖，測量在 30、60、90、120 分鐘時的血糖值，以曲線下面積（area under curve；AUC）之變化作為評斷標準。藉由血糖變化了解體內葡萄糖的代謝情形。

### 3.4. 胰島素胰島素阻抗測試（the homeostasis model assessment-estimated insulin resistance (HOMA-IR) index）

採用 Matthews 等人於 1985 年提出以 HOMA-IR 的方法，利用空腹血糖值、胰島素值導入數學公式，來間接定義量化胰島素阻抗性，數值越大代表胰島素阻抗性越大。

計算：
$$\frac{\text{禁食血糖值}(\text{mmol/L}) \times \text{禁食血清胰島素}(\mu\text{U/L})}{22.5}$$

### 3.5. 動物血脂肪及肝臟脂肪測定分析

抽取實驗動物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：

#### 3.5.1. 總膽固醇（total cholesterol, TC）

採用 enzymatic colorimetric method，定量的血清及肝臟均質液中加入呈色劑，經37°C水浴，作用之後可生成紅色化合物，以分光光度計500 nm波長下測定吸光值，而換算TC濃度。

#### 3.5.2. 三酸甘油酯（serum triacylglycerol, TG）

利用酵素法，在定量的血清及肝臟均質液中加入呈色劑，經22-25°C下水浴，以分光光度計於500 nm下測定吸光值，計算TG濃度。

#### 3.5.3. 低密度脂蛋白膽固醇（LDL-C）

採用酵素作用與比色測定原理，取定量的血清及肝臟均質液中加入適當沉澱劑，將 chylomicrons、VLDL、LDL 沉澱，作用完全後離心，取定定量上清液加入膽固醇測定試劑，以分光光度計在適當波長（500 nm）下測定吸光值，經計算後，再以總膽固醇值扣除上清液膽固醇值，可得LDL-C濃度。

#### 3.5.4. 高密度脂蛋白膽固醇（HDL-C）

採用酵素作用與比色測定原理，取定量的血清及肝臟均質液中加入適當沉澱劑，將 chylomicrons、VLDL、LDL 沉澱，作用完全後離心，取定定量上清液加入膽固醇測定試劑，以分光光度計在適當波長（500 nm）下測定吸光值，而換算HDL-C濃度。

## 四、其他血液生化值分析

為分析萃取物之毒性，血液生化值包括 glutamic oxaloacetic transaminase (GOP)、glutamic pyruvic transaminase (GPT)、blood urea nitrogen (BUN)、creatinine (CRE)也一併分析，作為評估肝腎功能是否受LSE之影響。

## 五、細胞激素含量測定

### 5.1. 脂肪細胞激素 adiponectin 和 leptin 含量分析

adiponectin 和 leptin 的含量將以商業套組進行分析。分析方法係利用 ELISA 的原理，用專一性抗體結合待測物，再加入受質 TMB(3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine)，經 peroxidase 催化，使之呈色，最後再加入 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應。步驟如下：將 25 μl 的血漿樣品加入含有 leptin 和 adiponectin 抗體的孔盤中，再加入 50 μl 的 conjugate solution，再室溫下使用 shaker 反應 2 小時，之後使用 wash buffer 清洗六次，再加入 peroxidase 的受質 TMB 200 μl，反應 15 分鐘，最後加入 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應，以 ELISA reader 於波長 OD 450 nm 測得吸光值，計算濃度。

### 5.2. 細胞發炎激素 TNFα、IL-1β和 IL-6 含量分析

使用商業套組進行分析，血清中 TNFα、IL-1β和 IL-6 會接上已 coating 具特異性的多株抗體，再加入抗 TNFα、IL-1β和 IL-6 的過氧化酶與其受質 TMB (tetramethylbenzidine) 作為呈色劑，測吸光值後代入標準曲線換算出濃度。步驟如下：在 96 孔盤中加入 25 μl 的血清、標準品與每孔 50 μl 的 Enzyme conjugate solution 反應 2 小時之後，以 wash buffer 清

洗 6 次，再加入 200  $\mu$ l 的 TMB 反應 15 分鐘後，加入 50  $\mu$ l stop solution，即可在 450 nm 下測得吸光值。最後將吸光值代入方程式可求得 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 濃度，單位以 pg/mL 表示。

## 六、組織病理切片及組織染色 (H&E stain)

首先，將實驗動物犧牲後，迅速取一小部分動物組織（包含血管、肝臟、脂肪），置於 10% 福馬林中固定，以石蠟包埋製成病理切片。其切片製作過程固定→脫水→澄清→浸潤→包埋→連續切片→染色→封蓋，然後利用 H&E stain 觀察切片型態。

## 七、膠原纖維特殊染色 (Masson's trichrome stain)

切片先經二甲苯的脫臘和酒精復水後，將處理過的切片放在 Bouin 氏溶液中固定 7 分鐘，然後水洗至切片上黃色消失，約洗 10 分鐘時間，再將切片以 Weigert's iron hematoxylin 溶液染色 10 分鐘，用溫的流水洗 10 分鐘，再用蒸餾水稍沖洗切片；之後用 Biebrich scarlet-acid fuchsin solution 染 7 分鐘，用蒸餾水稍沖洗切片，用 phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution 染 5 分鐘，後用蒸餾水稍沖洗，再用 aniline blue solution 染 5 分鐘，以作對比染色，用蒸餾水再稍沖洗之，置於 1% acetic acid solution 染 3 分鐘，後用蒸餾水稍沖洗切片，完成染色過程後進行脫水流程，依序放置於 50% 酒精中 30 秒、70% 酒精中 30 秒、95% 酒精中 20 秒、100% 酒精中 20 秒、100% 酒精中 30 秒，再用二甲苯澄清 2 次，最後以封片膠封片。

## 八、抗氧化酵素分析

### 8.1. 脂質過氧化測定 (Lipid peroxidation assay, TBARS)

根據 Yagi 等 (1987) 所修飾的方法，其原理是利用脂質氧化的過程中，會生成過氧化物 MDA (malondialdehyde)，而一分子的 MDA 會與兩分子的 TBA (thiobarbituric acid) 形成具螢光性質的聚合物 TBARS (thiobarbituric acid reactive substance)，此物質於激發波長 (Ex) 為 532 nm，發射波長 (Em) 為 600 nm 時，可被偵測到特定的螢光波長。利用 TEP (1,1,3,3-tetramethoxypropane) 為標準品做標準曲線來定量脂質被氧化的程度。步驟如下：取樣品 (血清、濃度 100  $\mu$ g/ml 肝臟均質液)，再加入等體積 25% TCA 溶液 (trichloroacetic acid) 將蛋白質變性沉澱下來，並以 10,000 rpm 在 10 $^{\circ}$ C 下離心 30 分鐘，目的是為了將蛋白質去掉只留下脂質的部分，接著取上清液再加入等體積的 TBA 溶液反應，在避光的環境下以 95 $^{\circ}$ C 加熱 40 分鐘，待其冷卻後，使用螢光比色計於特定波長 Ex/Em 532 / 600 下測定 MDA 產生的量。

### 8.2. GPx (Glutathione peroxidase) 酵素活性測定

使用 Lawrence 等人所建立的方法，以過氧化氫 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 為受質，在麩胱甘肽過氧化酶 (GPx) 的催化下可還原成 H<sub>2</sub>O，而還原態麩胱甘肽 (GSH) 則變成氧化態麩胱甘肽 (GSSG)，GSSG 在 NADPH 的存在下可利用麩胱甘肽還原酶 (GRd) 作用還原回 GSH，於波長 340 nm 下測得 NADPH 遞減的情形，間接求得 GPx 的活性。步驟如下：取 624  $\mu$ l 的 reagent buffer (10mM EDTA 和 10mM NaN<sub>3</sub> 溶於 100mM PPB)，加入 10 mM GSH 80  $\mu$ l、1 EU/ml GRd 16  $\mu$ l，再加入 20 mM PPB 與樣品 (血清 10  $\mu$ l、濃度 100  $\mu$ g/ml 肝臟均質液 2  $\mu$ l)、2 mM NADPH 80  $\mu$ l 混合均勻後靜置 5 分鐘，加入 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ l 後測定在波長 340 nm 條件下 3 分鐘內吸光值的變化情形。濃度計算：GPx 活性 = (樣品 - blank 的吸光值) / 6.22  $\times$  106 / 樣品  $\mu$ l 數  $\times$  蛋白濃度 (mg/dl) 單位：nmole/min/mg pt

### 8.3. SOD (Superoxide dismutase) 酵素活性測定

以市售 SOD assay kit (cayman) 測定。樣品 (血清 10  $\mu$ l、濃度 100  $\mu$ g/ml 肝臟均質液 2  $\mu$ l) 以 sample buffer (含 50 mM Tris-HCl pH 8.0) 等倍稀釋後，取 10  $\mu$ l 稀釋後之待測液加入於 96 well plate 後再加入 200  $\mu$ l Radical Detector (含 tetrazolium salt) 與 20  $\mu$ l Xanthine Oxidase，反

應20分鐘，測其450 nm吸光值。以SOD standard (cayman) 做一標準曲線，利用內插法推算其濃度。

## 九、細胞生長分析(Cell growth assay)

### 9.1. 細胞培養(Cell culture)

大鼠胰臟胰島β細胞(RIN-m5F細胞)以90% RPMI 1640培養液為主，人類肝細胞(HepG2細胞)則是使用90% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培養液，並外加1.5 g/L sodium bicarbonate、2.5 g/L glucose、10 mM HEPES、1.0 mM sodium pyruvate、2 mM L-glutamine、1% penicillin/streptomycin，pH 7.2~7.3，再加上10% fetal bovine serum (FBS)作為增殖培養基。培養在75 cm<sup>2</sup> Nunclon™ delta treated flask 中，並放置37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境的恆溫箱裡。每2至3天更換一次培養液，5~7日繼代細胞一次。

### 9.2. 細胞計數分析(Cell counting assay)

將細胞培養於75T flask 數代。經細胞計數後，於6-well 的培養皿中種植細胞，等待細胞貼附、生長後，將培養液換成starvation medium (不含有10% FBS的培養液)以進行飢餓處理，放回5% CO<sub>2</sub> 之37°C 無菌恆溫培養箱中生長。24小時後，換回正常的培養液，並將細胞處理200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以模擬氧化壓力之環境，再分別加入不同劑量的萃取物LSE (0.5和1 µg/ml)或EGC (0.2和0.4 µM)反應於5% CO<sub>2</sub> 之37°C無菌恆溫培養箱中。24小時後，去除上清液，並加入適量的胰蛋白酶(trypsin)，於恆溫箱中反應10分鐘，使細胞脫落，後以trypan blue 染色，再以計數盤計數分析。

### 9.3. 細胞毒性測試(Lactate dehydrogenase assay, LDH assay)

LDH是一種位於細胞質中的酵素，一旦細胞受損，LDH即被釋放到細胞外。測量培養基中該酵素的活性，判定細胞是否受到毒殺。LDH測試方法使用In vitro toxicology assay kit 試劑組來定量LDH。其原理為細胞在培養基內所釋出的LDH乃藉由酵素反應，最後將tetrazolium 鹽轉換成紅色formazan 產物以分光光度計492 nm來讀取。方法為取出處理後的細胞培養液，抽取50 µl的培養液到96孔的培養皿中等待測試。將LDH試劑組中的LDH Assay Substrate Solution、LDH Assay Cofactor Preparation、LDH Assay Dye Solution，各取相當量於試管槽中均勻混合，以pipette吸取70 µl的LDH試劑加入到96孔的培養皿中反應，放置室溫或在37°C 培養箱中，避光反應30分鐘。加入20 µl 1N的鹽酸中止反應。以酵素免疫分析儀ELISA reader 讀取波長490 nm吸光值。

### 9.4. 細胞內ROS含量測定(ROS assay)

細胞飢餓處理24小時後，將舊的medium 移除，以PBS清洗細胞後再加入正常的medium，接著先將細胞以50 µM dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)處理，再放回5% CO<sub>2</sub> 之37°C無菌恆溫培養箱中使其生長。1小時後，將含有DCFDA的medium 移除，以PBS清洗細胞後再加入正常的medium，並將細胞以200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合併不同劑量的萃取物LSE (0.5和1 µg/ml)或EGC (0.2和0.4 µM)處理，再放回5% CO<sub>2</sub> 之37°C無菌恆溫培養箱中使其生長。於24小時後，加入適量的trypsin，於恆溫箱中反應10分鐘，使細胞脫落，隨後加入5~10 ml的medium以終止trypsin的反應並沖刷細胞，再將其吸到15 ml離心管中，接著以1000 rpm離心5分鐘後將上清液去除，再以PBS清洗細胞後上機測定DCF 螢光表現，即代表細胞內ROS的含量。

## 十、細胞凋亡分析(Apoptosis analysis)

### 10.1. 細胞凋亡染色分析(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI stain)

將細胞培養於75T flask 數代。經細胞計數後，於6-well 中種入細胞，並等待細胞貼附、生長後，將培養液換成starvation medium以進行飢餓處理，並放置5% CO<sub>2</sub> 之37°C無菌恆溫培養箱中生長。24小時後，將舊的medium 移除，以PBS清洗細胞後再加入正常的

medium，並將細胞以 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合併不同劑量的萃取物 LSE (0.5 和 1 µg/ml) 或 EGC (0.2 和 0.4 µM) 處理，再放回 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中使其生長。於 24 小時後，以 PBS 清洗細胞 1~3 次，並加入 3ml 的 4% para-formaldehyde，於室溫下固定 30 分鐘。固定完成後，再以 PBS 清洗細胞 1~3 次，並加入 3ml 的 DAPI (以 PBS 將濃度為 10 mg/ml 的原始試劑稀釋為濃度 100 µg/ml 後才可使用) 染色 30 分鐘。最後，再以 PBS 清洗細胞 3 次，於 340/380 nm 下的螢光顯微鏡中觀察結果。

### 10.2. 流式細胞儀分析(Flow cytometric analysis)

將細胞培養於 75T flask 數代。經細胞計數後，於 6-well 中種入細胞，並等待細胞貼附、生長後，將培養液換成 starvation medium 以進行飢餓處理，並放置 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中生長。24 小時後，將舊的 medium 移除，以 phosphate buffer saline (PBS) 清洗細胞後再加入正常的 medium，並將細胞以 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合併不同劑量的萃取物 LSE (0.5 和 1 µg/ml) 或 EGC (0.2 和 0.4 µM) 處理，再放回 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中使其生長。於 24 小時後，加入適量的 trypsin，於恆溫箱中反應 10 分鐘，使細胞脫落，隨後加入 5~10 ml 的 medium 以終止 trypsin 的反應並沖刷細胞，再將其吸到 15 ml 離心管中，接著以 1000 rpm 離心 5 分鐘後將上清液去除，再以 PBS buffer 清洗細胞並將細胞沖散後以 1000 rpm 再離心 5 分鐘並去除上清液。隨後利用離心管內所殘餘的上清液將細胞打散，並加入 1 ml 70% 的酒精(可避免細胞發生凝集現象)並輕輕的將其混合均勻，使細胞固定，再將處理完的細胞液放置 -20°C 冰箱中反應 overnight (12 小時)。固定完成後，將細胞液以 100 rpm 離心 5 分鐘並去除上清液，再以殘留在管內的液體將細胞打散。隨後加入 1 ml 的 PBS buffer 並均勻混合後離心，再去掉上清液，重複數次，以清洗細胞。最後再加入 1 ml 的 PI/Triton X-100 溶液 (終濃度 PI= 20 µg/ml, Triton-X 100=0.1%, RNase A=0.2 mg/ml)，並將細胞均勻打散，且應避光染色至少 30 分鐘後，再以流式細胞儀分析其細胞週期的變化。

### 10.3. 西方點墨法(Western blotting)

首先製備細胞萃取蛋白(cell lysate)。收集細胞，加入 RIPA buffer 與蛋白酵素抑制劑 (sodium orthovanadate、leupeptin 及 PMSF)，在 0 °C 下震盪 30 分鐘，之後於 4 °C 高速離心 (10000 ×g) 10 分鐘，所得上清液即為 cell lysate，可儲存於 -70 °C 備用。接下來為所得蛋白定量，將 30 µl cell lysate 加入 1 ml coomassie brilliant blue G-250，在室溫下反應 1 分鐘，利用 Coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595 nm 有一較大之吸光值，以 Spectrophotomete (HITACHI U-3210) 之可見光紫外光比色儀測定，並以 BSA 為蛋白質標準溶液，來換算細胞萃取液之蛋白質濃度。取 50 µg 蛋白與 5X loading dye 以 4:1 比例混合，以 95 °C 加熱 10 分鐘，再置於冰上冷卻，即可作為電泳樣本。至於 SDS-聚丙醯胺電泳 (SDS-PAGE) 膠片的配鑄，於鑄膠模型架設完成後，下層膠 (separating gel) 依照分子量所需而配製成 6-15 %，上層膠 (stacking gel) 則為 4 %。將配好之整組電泳玻璃膠體裝置移入電泳槽，把 running buffer 加入內槽需至玻璃上緣，再把處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出 well，其中一個 well 注入 color protein markers，然後把 running buffer 加入外槽也需蓋過電導線，連接電泳槽與電源供應器，先以 70 V 壓縮電泳樣本至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電流為 90 V，當 loading dye 跑至底線時才停止電泳。之後進行蛋白轉漬。將膠片截去上層膠之部份後置於兩張濾紙上，膠片上面放上與膠片大小相同之硝化纖維紙 (Nitrocellulose transfer membrane, NC paper)，再置兩張濾紙於其上，其中所有濾紙、NC paper 都必須以 transfer buffer 浸濕過。用玻璃棒趕走氣泡，再以夾板 (內含海綿襯墊) 夾緊，放入轉漬槽中，於冰上以固定電壓 100V 轉漬約 2 個小時。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（分析細胞凋亡相關蛋白 caspase-3、PARP-1、Bcl-2、Bax、p-Bad、Bad 等蛋白），在 4 °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，用面紙擦去多餘的 washing buffer，再以 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，擦去多餘的 ECL substrate，將盤子放入 FUJIFILM LAS-3000 之冷光螢光影像分析系統中，以 ImageReader LAS-3000 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。

## 十一、細胞自噬分析(Autophagy analysis)

### 11.1. 細胞自噬染色分析(Acidic vesicular organelles, AVO stain)

將細胞培養於 75T flask 數代。經細胞計數後，於 6-well 中種入細胞，並等待細胞貼附、生長後，將培養液換成 starvation medium 以進行飢餓處理，並放置 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中生長。24 小時後，將舊的 medium 移除，以 PBS 清洗細胞後再加入正常的 medium，並將細胞以 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合併不同劑量的萃取物 LSE (0.5 和 1 μg/ml) 或 EGC (0.2 和 0.4 μM) 處理，再放回 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中使其生長。於 24 小時後，將上清液去除，並以 PBS 清洗細胞 2 次後，再加入 1 ml 的 AVO 染劑(於 999 μl 的 medium 中加入 1 μl 的 AVO 原始試劑)作用 15 秒後，將 AVO 染劑去除，並以 PBS 清洗細胞，最後再加入 1 ml 的 PBS 於 well 後，於螢光顯微鏡下觀察結果。

### 11.2. 細胞自噬相關蛋白分析(Western blotting)

同上述實驗方法 3.1.3。將經處理之細胞分別於 24 小時後收取其 lysate，以 Western blotting 分析 LC-3、Atg-5/12、Beclin-1、class III PI3K、class I PI3K、p-Akt 和 Akt 等蛋白表現。

## 十二、細胞內脂質堆積試驗(Cellular lipid accumulation assay)

### 12.1. 油紅染色(Oil red staining)

Oil red O 為蘇丹染劑之一，對脂肪具有親和力，為脂溶性染料，在脂肪內能高度溶解使中性脂肪著色，因此藉由染色後表現的紅色得知細胞內脂質含量。將細胞培養於 6-well dish 中，待細胞貼壁型態完全後，以 PBS 潤洗細胞後加入 starvation medium，24 小時後，加入 0.6 mM OA 與分別加入不同劑量的 LSE、EGC 或 simvastatin 分別培養 24 小時。將 oil red 粉末溶解於異丙醇配成 5 mg/ml 原液，再與水稀釋 1.5 倍，靜置 10 分鐘後以 0.22 μm 的 filter 過濾。細胞以 PBS 潤洗 2 次，加入 10% paraformaldehyde 固定 30 小時，再加入 oil red 染劑於室溫下反應 15 分鐘，用 PBS 洗去多餘染劑，最後以倒立式顯微鏡觀察，觀察完用異丙醇將染劑溶出，取 1 ml 加入 96 孔盤，立即用 ELISA reader 測波長 492 nm 之吸光值。

### 12.2. 尼羅紅染色和定量試驗(Nile red staining and quantization)

尼羅紅染劑為親脂性螢光染劑，可以針對脂質染色，再激發光下發出紅色螢光，而螢光的強度代表脂質的濃度，因此可以得知細胞內脂質含量。細胞培養於 10 公分 dish 中，待細胞貼壁型態完全後，以 PBS 潤洗細胞後加入 starvation medium，24 小時後，加入 0.6 mM 油酸與分別加入不同劑量的 LSE、EGC 或 simvastatin 分別培養 24 小時。去除舊的 medium 並加入適量的 trypsin，於 37°C 的溫箱中反應 10 分鐘，將細胞打下並離心 1000 rpm/5min，移去上清液。細胞以 PBS wash 2 次，加入 10% paraformaldehyde 固定 30 小時，以 1 mg/ml PBS 稀釋染劑，在室溫下避光染色 5 分鐘，用 PBS 洗去多餘染劑，用流式細胞儀偵測雷射光 488 nm 激發細胞螢光強度並進行分析。

### 12.3. 細胞代謝及發炎相關蛋白分析(Western blotting)

同上述實驗方法 3.1.3。將經處理之細胞分別於 24 小時後收取其 lysate，以 Western

blotting 分析 HMG CoA reductase、SREBP-1、SREBP-2、p-Akt、Akt、GSK3 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B 和 COX-2 等蛋白表現。

### 十三、統計分析 (Statistical analysis)

數據以 means  $\pm$  SD 表示。以 Student t-test-Unpaired 來評估統計差異。P < 0.05 表示具有顯著性。

## (五) 結果與討論 (含結論與建議)

### 一、蓮蓬萃取物 (LSE) 成份分析及鑑定

#### 1.1. 定性分析

以 HPLC 分析 17 個多酚標準品：1. GA、2. PCA、3. catechin、4. procyanidin B2、5. epicatechin、6. caffeic acid、7. EGCG、8. EA、9. rutin、10.  $\rho$ -Coumaric acid、11. EGC、12. FA、13. ECG、14. gossypin、15. gossypetin、16. quercetin、17. naringenin。其滯留時間 (retention time, RT) 分別依序出現(Fig. 1A)；另外，將蓮蓬水萃取物 LSE 與標準品 (LSE + standard) 兩兩混合，其 RT 分別在幾個時間點相吻合，從 Fig. 1B 結果可得。總結 Table 1 顯示 LSE 包含四個成份 catechin、procyanidin B2、 $\rho$ -Coumaric acid、和 EGC，各別含量大約有 4.6%、3.4%、2.8%和 12.5%。

#### 1.2. 定量分析

利用 Folin-Ciocalteu 方法測定 LSE 約莫得到 29.6%總多酚含量(Table 1)。比較 LSE 經 HPLC 分析結果之多酚加總則為 23.3 %，兩種試驗的多酚含量出現些許的落差。以 HPLC 來論，它屬於定性分析，為使 LSE 製備固定標準化的一種評估方法；測定總多酚含量的 Folin-Ciocalteu 方法卻會受制於標準品而有不同的分析結果。另一方面，根據 HPLC 之結果顯示：類黃酮 (catechin + procyanidin B2 + quercetin = 20.5%) 這類多酚占 LSE 成分比例最高，續利用 Jia 方法分析萃取物之總黃酮含量。Table 1 結果顯示：LSE 約莫得到 85.7%黃酮測定值。而花青素之純度測定是採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，由分光光度計分析 LSE，其吸光值再經公式換算，而換算出所萃取出 LSE 的花青素純度約有 6.3%。上述成份鑑定試驗證實 LSE 確為富含類黃酮之萃取物，其中以 EGC 的比例最高。

### 二、蓮蓬萃取物 (LSE) 對於 HFD 合併 STZ 誘導小鼠代謝症候群之影響

#### 2.1. 生理數值分析

*In vivo* 試驗中，動物飲食量、飲水量及體重之改變為評估動物健康徵兆的指標之一。將老鼠犧牲後及平時紀錄之生理特徵進行統計。結果顯示在給予 LSE (1%和2%)或 statin 的六週試驗期間老鼠飲食和飲水皆與誘導組或正常組之老鼠無異(Fig. 2B and C)。根據體重統計結果顯示：誘導組之老鼠體重隨週數逐漸增加，然而不具統計上之意義；其他組別體重則與正常組相當(Fig. 2D)。

#### 2.2. 代謝症候群症狀評估

在 HFD 合併 STZ 所誘導的小鼠產生代謝症候群徵狀方面，評估指標包括肥胖、胰島素阻抗、高血壓、脂質代謝異常、微蛋白尿。除了體重項目之外，我們觀察犧牲前老鼠體型及犧牲後腹腔內臟器脂肪分佈之情形(Fig. 3A)，以評估肥胖表現。在誘導組小鼠腹腔臟器 (肝、腸、腎臟) 以肉眼觀察有明顯體積增大情形。各臟器經秤重後，進行體重與臟器比計算分析。從 Table 2 除可發現誘導組與正常組相比之小鼠胰臟重量明顯較小之外；而肝、腎臟重量和體積卻比正常組來的大很多，是否 HFD 合併 STZ 誘導下會導致肝腎發炎腫大仍有待進一步證實；反觀試驗組的部分，只有 2% LSE 能夠成功的回復胰臟衰竭之病理現象。另外，副睪脂肪含量也可作為肥胖指標之一。Fig. 3B 顯示 HFD 合併 STZ 確實明顯增加副睪脂肪含量，2% LSE 具有減低其脂肪含量之表現；而代謝症候群指標中胰島素阻抗則



以血糖、血清胰島素(Table 3)、HOMA-IR 值(Fig. 3C)及 OGTT 血糖變化(Fig. 3D)作為評估項目，雖然在血清胰島素含量分析上並不如預期，但在 HFD 合併 STZ 誘導組中仍可以明顯觀察到高血糖、以及透過 HOMA-IR 值增加和 OGTT 曲線下有較高趨勢，顯示胰島素高阻抗性之表徵；並量測血壓指標，Fig. 3E 結果中指出誘導組小鼠呈現高血壓狀態，上述試驗皆可確認 HFD 合併 STZ 可成功地誘導小鼠產生代謝症候群。而此些胰島素阻抗指標及血壓數值，不論是低劑量或高劑量的 LSE 或 statin 組都能顯示具有降低或減緩之作用。

### 2.3. 血脂質測定

我們利用 HFD 合併 STZ 誘導小鼠 11 週後，誘導組之血清 TC 較正常組上升約 1.35 倍，但再 5 週後額外給予 LSE 之組別，2% LSE 組與誘導組相較之下，降低約 70.5%；statin 組則降低了 58.0%，且具有統計上的意義。在 TG 方面，正常組為  $152.67 \pm 18.88$  mg/dL，在經由高脂合併 STZ 誘導下，誘導組較正常組雖無上升之趨勢；而分析給予 LSE 之組別，在 1% LSE 的給予下，小鼠血中 TG 為  $106.50 \pm 19.36$  mg/dL，當劑量提升為 2% LSE 後之試驗組 TG 則為  $93.50 \pm 21.46$  mg/dL，與正常組或誘導組相較之下皆有下降的趨勢。同樣在 LDL-C 項目，2% LSE 試驗組有類似 TC 的抑制作用。但是在針對 HDL-C 方面，給予 LSE 之試驗組別與誘導組相比並無統計上的意義。進一步分析危險因子方面，正常組 LDL-C/HDL-C 的比值為 0.41，誘導組 LDL-C/HDL-C 的比值增加為 0.53，試驗組 LDL-C/HDL-C 的比值在 2% LSE 中為 0.42，與誘導組相較具有統計上之降低趨勢。另外，在肝腎功能評估方面，2% LSE 也能夠顯著地抑制由 HFD 合併 STZ 所誘導的 GPT 和 BUN 之含量(Table 3)，代表 LSE 對於代謝症候群導致的肝腎損傷具有一定的保護效應。由此可知，LSE 確實可以降血脂、血糖和血壓，以及改善胰島素抗性，進而有效的抑制代謝症候群的發展。

### 2.4. 血清中細胞激素含量測定

先前研究指出發炎細胞激素(例如:IL (interleukin)-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF (tumor necrosis factor)  $\alpha$ ) 會刺激肝臟、肌肉及脂肪組織，阻斷胰島素活化胰島素訊息傳遞路徑的能力，引發細胞失去對胰島素的敏感性，促使胰島素抗性的產生。另外，因肥胖引起的氧化壓力與發炎反應，導致脂肪細胞激素(包含 adiponectin、TNF- $\alpha$  及 leptin 等)分泌異常，也是造成胰島素阻抗的關鍵病理過程(27)。進一步，為釐清代謝症候群小鼠血清中細胞激素表現量是否有所改變，首先以 TBARS 分析血清中脂質過氧化物 MDA，以及測量 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、leptin 和 adiponectin 等細胞激素含量。由 Fig. 4 結果所示：HFD 合併 STZ 可以增加血清中 TBARS 值(Fig. 4A)、TNF $\alpha$ (Fig. 4B)、IL-1 $\beta$ (Fig. 4C) 及 leptin 和 adiponectin 之比值(leptin/adiponectin ratio) (Fig. 4E)；雖然 LSE 減低血清中 TBARS 值表現較不明顯，TNF $\alpha$  含量也只有在 2% LSE 組別才顯示出抑制作用，但 LSE 能夠有效降低由 HFD 合併 STZ 所誘導增加的 IL-1 $\beta$  含量及 leptin 和 adiponectin 之比值，此抑制效果相較 statin 組別更為顯著。各組血清中 IL-6 含量則無明顯差異(Fig. 4D)。綜合上述結果可呼應過去研究之報導(28)，修正細胞激素分泌異常的狀況可改善胰島素阻抗作用，亦可作為預防代謝症候群發生的可行的飲食保健策略。

## 三、蓮蓬萃取物 (LSE) 對於代謝症候群引發肝腎損傷及胰島衰竭之影響

### 3.1. 肝組織病理切片及染色觀察

接著我們選取試驗動物肝臟部分進行病理切片分析，觀察肝組織型態及脂肪分佈。在病理分析下，正常組的肝組織中並沒有發現有脂肪油滴的形成。在誘導組方面，我們發現其病理切片上有明顯的脂肪堆積，組織細胞呈現不規則型態排列之現象，且可觀察到肝臟巨噬細胞(Kuffer cell)；而在飼料中給予 LSE 1% 和 2% 後，肝臟脂肪堆積情形則明顯下降(Fig. 5A)。另外，以 Masson's trichrome 染色觀察肝臟纖維化程度，主要用於區別膠原纖維與其他組織。在誘導組可見肝纖維化之表徵；在給予低劑量 1% LSE 和 statin 組別有部分減緩之趨勢；2% LSE 組別則回復與正常組之染色結果無異(Fig. 5B)，由此可推論 LSE 具有抑制脂

肪肝病程發展之作用。

### 3.2. 肝組織抗氧化酵素分析

在分析肝臟抗氧化酵素方面，包含測定 TBARS、GSH、GPx 和 SOD 等酵素活性。結果發現在 HFD 合併 STZ 誘導之下，肝臟 TBARS 和 GSH 活性表現增加(Fig. 6A and B)、GPx 活性不受影響(Fig. 6C)、SOD 活性則顯著受到抑制(Fig. 6D)；而 LSE 試驗組可減低肝臟脂質過氧化表現，亦可顯著增加 GPx 和 SOD 兩者抗氧化酵素之活性，在 statin 組也呈現類似作用結果。綜合 Figs. 5-6 可證實 LSE 和 statin 具有具有抗氧化及抗發炎等功效，可進而改善代謝症候群以避免脂肪肝的發生。

### 3.3. 腎臟組織病變分析

關於腎臟部分病理切片部分，目的為觀察腎病變之表徵。在 HFD 合併 STZ 誘導下之腎組織發現有發炎細胞侵潤的現象，組織細胞型態也呈現不規則排列且組織結構鬆散；LSE 給予下明顯回復此些病變表現(Fig. 7A)。此外，代謝症候群中微蛋白尿指標則以 SDS-PAGE 進行尿中白蛋白(albumin)含量分析，由 Fig. 7B 可觀察到誘導組中 albumin 蛋白表現量增加，2% LSE 和 statin 可抑制其表現，類似的結果出現在各組腎臟 TBARS 數值的調控上(Fig. 7C)。綜合 Fig. 7 之實驗結果推知 LSE 可能藉由抗氧化作用以改善腎炎或腎病變，對於減緩蛋白尿病徵也能有所裨益。

### 3.4. 胰臟組織病變分析

我們也針對胰臟部分進行病理切片分析，觀察胰臟組織及胰島細胞型態之變化。由 Fig. 8A 可觀察到誘導組相對於正常組之胰島組織明顯變小且型態改變，進行量化分析確認其面積縮小約 50% (Fig. 8B)；隨著給予的 LSE 劑量增加，胰島細胞面積可回復到與正常組相當。在分析胰臟脂質過氧化方面也發現到 LSE 可以抑制 HFD 合併 STZ 所誘導之 TBARS 數值(Fig. 8C)。如此顯見 LSE 對於代謝症候群引發胰島細胞衰竭具有保護效果，進一步 LSE 如何增加細胞對胰島素敏感性及促進胰島細胞存活仍需更多研究來驗證，以評估 LSE 能否改善 T2D 的發生。

## 四、蓮蓬萃取物成份 (LSE/EGC) 保護胰島β細胞免於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導細胞毒性之影響

### 4.1. 細胞生長分析

RIN-m5F 細胞處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後存活率明顯降低，而合併處理 LSE 或 EGC 的組別則能有效保護細胞，維持細胞存活率(Fig. 9A)；分析受損細胞分泌到培養液中的 LDH 含量則沒有明顯變化(Fig. 9B)；進一步分析脂質過氧化情況，TBARS 結果顯示處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的組別其脂質過氧化明顯增加，合併處理 LSE 或 EGC 則能有效減緩脂質過氧化表現(Fig. 9C)；分析細胞中 ROS 含量變化，實驗結果發現處理處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後細胞中 ROS 含量明顯增加，合併處理 LSE 或 EGC 的組別則能降低細胞中 ROS 含量(Fig. 9D)。

### 4.2. 細胞凋亡分析

分析細胞週期變化發現，處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後細胞 subG1 期比例明顯上升。合併處理 LSE 或 EGC 後則有下降的趨勢(Fig. 10A)；分析細胞凋亡表現之實驗結果發現：處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後細胞中 DAPI 螢光表現量明顯增加，顯示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可誘導細胞凋亡表現，而合併 LSE 或 EGC 後細胞凋亡比例則明顯降低(Fig. 10B&C)；分析細胞凋亡相關蛋白質變化則發現：處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的組別，其細胞中促凋亡蛋白如 Caspase3、PARP-1、Bax、Bad 表現量增加，而合併 LSE 或 EGC 的組別其促凋亡蛋白表現量降低、抗凋亡蛋白如 Bcl-2、p-Bad 表現上升(Fig. 10D&E)。

### 4.3. 細胞自噬分析

過去研究顯示，細胞自噬作用能透過分解細胞內胞器來維持細胞存活。因此，我們分析細胞自噬變化，實驗結果發現處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後酸性小囊數量些許上升，而合併處理 LSE 及 EGC 後則酸性小囊數量顯著增加(Fig. 11A&B)；分析細胞中細胞自噬及細胞增生蛋白表現

量變化發現，處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後細胞自噬蛋白如 Beclin-1、Class III PI3K、LC3 及 Atg 5/12 complex 表現量增加，合併處理 LSE 及 EGC 則明顯增加(Fig. 11C&D)；細胞增生蛋白如 Class I PI3K 及 p-Akt 處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後有下降的趨勢，而合併處理 LSE 及 EGC 也明顯增加兩者之表現(Fig. 11E)。

#### 五、蓮蓬萃取物 (LSE) 對於代謝症候群小鼠的胰臟組織中細胞增生與自噬蛋白的影響

為確認在代謝症候群動物實驗中胰臟組織蛋白表現之結果是否與細胞實驗得到相同之驗證，分別以細胞自噬蛋白 LC3 及細胞增生蛋白 PCNA 對胰臟組織進行免疫組織染色，實驗結果發現，誘導組其 LC3 蛋白表現量些許上升，而 PCNA 蛋白表現量則下降。在處理 1%、2% LSE 及 statin 的組別，其 LC3 蛋白與 PCNA 蛋白則表現量皆有明顯增加之趨勢(Fig. 12A&B)。進一步分析胰臟組織蛋白發現：誘導組其促凋亡蛋白如 Caspase3 及 Bax 表現量增加，而處理 1%、2% LSE 及 statin 的組別其促凋亡蛋白表現量降低，且抗凋亡蛋白如 Bcl-2 則明顯增加(Fig. 13A)；細胞自噬蛋白如 LC3、Atg5 及 Beclin-1 在誘導組中表現量些微上升，而處理 1%、2% LSE 及 statin 的組別，表現量則顯著增加(Fig. 13B)。

#### 六、蓮蓬萃取物成份 (LSE/EGC) 抑制 OA 誘導肝細胞內脂質堆積之影響

##### 6.1. 細胞存活分析

首先探討用不同濃度的 OA 對 HepG2 細胞存活的影響，利用不同濃度 OA (0.1、0.2、0.5、0.6、0.8、1 mM) 處理 HepG2 細胞。由細胞計數結果可知在 24 小時 OA 處理下，隨著 OA 的劑量增加，細胞之存活率明顯減少許多，表示高濃度 OA (0.8 和 1 mM) 具有抑制細胞生長之作用(Fig. 15A)，後續實驗以不會影響 HepG2 細胞生長的 OA 劑量 0.6 mM，作為誘導肝細胞脂肪堆積之細胞模式。另外，也利用不同濃度 LSE (0.1、0.5、1、5、10、50、100 µg/ml) 處理 HepG2 細胞，觀察 LSE 對細胞存活之影響。由細胞計數結果可知，在 24 小時 LSE 之處理下，隨著 LSE 的劑量增加到 50-100 µg/ml 會對 HepG2 細胞之生長產生抑制作用(Fig. 15B)，所以篩選 LSE 劑量 < 50 µg/ml 作為後續探討其對於肝細胞脂肪堆積之影響。進一步，依據 LSE 中 EGC 含量比列之濃度處理 HepG2 細胞，觀察 EGC 對細胞存活之影響。由細胞計數結果可知，以 24 小時 EGC 濃度在 0.4 和 2 µM 處理 HepG2 細胞之存活率並無顯著變化(data not shown)。後續 Fig. 15C 則顯示以 OA 合併 LSE、EGC 或 simvastatin 對 HepG2 細胞存活之細胞計數結果，OA 無論是合併 LSE (0.5、1、5、10 µg/ml)、EGC (0.4 和 2 µM) 或 simvastatin (5 和 10 µM) 對於 HepG2 細胞之存活率皆無明顯之影響，排除合併處理對細胞生長之參數，並以此合併處理的細胞模式探討 LSE 或 EGC 對於 OA 誘導 HepG2 細胞脂質堆積之影響。

##### 6.2. 細胞內脂質堆積分析

由油紅染色(Fig. 16A, B)及尼羅紅染色(Fig. 16C, D)試驗之結果顯示，在 OA 處理細胞中紅色油滴清晰可見(箭頭所指紅色部分為油滴)，作為誘導組(Fig. 16A)。Fig. 9B 量化此 OA 誘導後之 HepG2 細胞中脂肪堆積含量與對照組相比有顯著增加約 2 倍，加入不同劑量的 LSE、EGC 或 simvastatin 與誘導組比較，各組細胞內脂肪堆積含量顯著下降約 1.2 倍(Fig. 16B)，推論 LSE、EGC 或 simvastatin 皆可能降低細胞中脂肪之堆積。接著，將 OA 處理後的細胞先以尼羅紅染色，再利用流式細胞儀可偵測螢光強度變化原理，螢光強度越強代表細胞內脂質表現越多(Fig. 16C)，並進行統計分析顯示：由 OA 誘導後 HepG2 細胞脂肪堆積含量與對照組相比有明顯增加趨勢，加入不同劑量的 LSE、EGC 或 simvastatin 與誘導組比較，其脂肪堆積含量有下降之趨勢(Fig. 16D)。

##### 6.3. 細胞內脂質生成與發炎反應相關調控蛋白表現分析

Fig. 17A 結果顯示：脂質生成相關調控蛋白 SREBP-2 和 HMG CoA reductase 兩者表現在誘導組與正常組相比之下，皆表現明顯增加；而加入 LSE 或 EGC 可以降低 SREBP2 和

HMGCoA reductase 之蛋白表現，推論 LSE 或 EGC 可能具有抑制 OA 誘導細胞內膽固醇合成之作用。在發炎反應相關蛋白 NF- $\kappa$ B 和 COX-2 的表現方面，兩者也在誘導組與對照組相比有明顯上升趨勢，在 LSE 試驗組與誘導組相比則有下降表現情形(Fig. 17B)，推論 LSE 可能降低 OA 誘導之細胞發炎反應。

## 七、蓮蓬萃取物 (LSE) 對於代謝症候群小鼠的肝臟組織中脂質生成與發炎反應相關調控蛋白的影響

在膽固醇關鍵調控酵素中，SREBP-1 和 SREBP-2 分別負責進行脂肪酸與膽固醇的生合成調控，進而轉錄 HMG CoA reductase 蛋白表現。各組分析在 SREBP-1 之表現無太大變化；誘導組 SREBP-2 蛋白表現與對照組相比上升約 1.3 倍，在 LSE 試驗組與誘導組相比則下降 1.6 倍。另外，在誘導組中 HMG CoA reductase 蛋白表現與對照組相比上升 1.6 倍，在 LSE 試驗組與誘導組相比下降約 1.7 倍(Fig. 18A)。我們推論 LSE 可抑制 SREBP-2 蛋白調控，促使其轉錄之 HMG CoA reductase 蛋白表現下降，進一步降低膽固醇合成。在參與肝糖代謝之調控蛋白 Akt、GSK3 $\beta$  磷酸化表現在誘導組與對照組相比，沒有顯著變化。在 LSE 試驗組與誘導組相比則明顯上升約 1.2 倍(Fig. 18B)，我們推論 LSE 可藉由調控 Akt/GSK3 $\beta$  路徑促使肝糖合成，平衡血液中葡萄糖濃度。在發炎反應相關蛋白 NF- $\kappa$ B 和 COX-2 的表現分析方面，在誘導組與對照組相比顯著上升約 1.2 倍，在 LSE 試驗組與誘導組相比有下降約 1 倍(Fig. 18C)，進而推論 LSE 藉由抑制 NF- $\kappa$ B 和 COX-2 蛋白表現可以降低發炎反應。上述蛋白調控結果與細胞實驗分析(Fig. 17)得到相同之驗證。

## 八、總結

### 8.1. 第一年

本實驗利用 HFD 合併 STZ 誘導代謝症候群之疾病動物模式，造成肥胖、胰島素阻抗、血脂及肝臟脂質代謝異常，以及血清中發炎細胞激素(TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )和脂肪細胞激素(leptin)含量增加，促進肝腎發炎反應、及胰島細胞衰竭等，成功誘導為代謝症候群模式。在本研究中，給予 LSE 六週後可以顯著降低胰島素阻抗、脂質代謝異常、脂質過氧化程度，並提升體內抗氧化防禦系統，以降低肝臟內的發炎反應，同時具有改善胰島細胞衰竭之作用，在肝腎損傷程度上也有明顯的保護效果。綜合以上結論，LSE 可以有效改善高脂合併 STZ 所誘發之代謝症候群，後續將進一步針對抗代謝症候群之分子機制進行探討。

### 8.2. 第二年

透過胰島 $\beta$ 細胞實驗發現處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 會增加細胞氧化壓力、透過 Bax、Caspase3 等凋亡蛋白路徑促使細胞進入凋亡，造成 $\beta$ 細胞受損死亡。而同時 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 也會使細胞自噬蛋白 LC3、Beclin-1、Class III PI3K 等蛋白些微上升來保護胰島 $\beta$ 細胞。在合併處理 LSE 或 EGC 後能透過增加 Class I PI3K、Akt 等促增生蛋白及抗凋亡蛋白 p-Bad、Bcl-2 的表現量來達到抗細胞凋亡的目的。此外，也能進一步增加細胞自噬蛋白表現來保護細胞。在動物實驗中發現，以高脂合併 STZ 誘導代謝症候群小鼠之組別的胰島面積較小且脂質過氧化增加。組織中促增生蛋白表量降低、促凋亡蛋白表現量明顯增加。在餵食 LSE 的組別其效果與餵食降血脂藥物 statin 相同，具有能保護胰島 $\beta$ 細胞之作用、降低脂質過氧化、減少胰臟組織所受的氧化壓力。分析其蛋白質表現結果也與細胞實驗相符，證明 LSE 確實具有保護 $\beta$ 細胞的效果(Fig. 14)。因此，蓮蓬具有的抗氧化能力確實能保護 $\beta$ 細胞免於氧化性傷害，並透過蓮蓬對於 $\beta$ 細胞的保護作用進一步達到抗代謝症候群的目標。

### 8.3. 第三年

在肝細胞實驗方面則探討 LSE 及 EGC 抑制肝臟脂質堆積作用，利用肝細胞 HepG2 加入 OA 為誘導劑之細胞模式。OA 為 C18:1 單元不飽和脂肪酸，屬於血液中含有量最多的脂肪酸，也是所有最容易與甘油酯化成三酸甘油酯的脂肪酸。本實驗利用兩種親脂性染劑

一油紅染劑以及尼羅紅染劑，雙重試驗分析以評估細胞內脂肪堆積的程度。在油紅染色方面，LSE 或 EGC 有減少脂質堆積的情形，另以尼羅紅染色量化評估細胞內脂質堆積程度，結果顯示 LSE 或 EGC 確實有減少脂質堆積的作用。最後進行西方墨點法分析細胞內相關分子調控蛋白，LSE 或 EGC 能夠抑制膽固醇生成關鍵酵素 HMGCoA reductase 及其調控蛋白 SREBP-2，以及發炎反應相關蛋白 NF- $\kappa$ B 和 COX-2 之表現，此 LSE 的抑制作用與動物實驗分析得到相同之結果(Fig. 18)。因此，LSE 及其功能性成份 EGC 具有抑制肝臟脂質堆積以及改善代謝症候群之潛力，期許未來蓮蓬可以開發成健康食品來預防或改善脂肪肝、T2D 或代謝症候群相關疾病的產生。

## § 參考文獻

1. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res.* 56, 311-7, 2004.
2. Reaven GM, Chen YD. Role of insulin in regulation of lipoprotein metabolism in diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 4, 639-52, 1998.
3. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 15, 539-53, 1998
4. Nabel EG. Cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 349, 60-72, 2003.
5. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes.* 52, 1210-4, 2003.
6. Grundy SM, Brewer HB Jr., Cleeman JI. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, e13-8, 2004.
7. Kumai T, Matsumoto N, Koitabashi Y, Takeba Y, Oonuma S, Sekine S et al. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors: candidate mechanisms for anti-lipid deposition in blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 3, 195-201, 2005.
8. MacKay D, Hathcock J, Guarneri E. Niacin: chemical forms, bioavailability, and health effects. *Nutr Rev.* 70, 357-66, 2012.
9. Rai S, Wahile A, Mukherjee K, Saha BP, Mukherjee PK. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *J Ethnopharmacol.* 104, 322-7, 2006.
10. Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 106, 238-244, 2006.
11. 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.* 57, 5925-32, 2009.
12. Lee HJ, Chen CC, Chou FP, Wu CH, Lai FS, Yang MY et al. Water extracts from *Nelumbo nucifera* leaf reduced plasma lipids and atherosclerosis in cholesterol fed rabbits. *J Food Biochem.* 34, 779-95, 2010.
13. 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.* 48, 159-68, 2010.

14. 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.* 53, 2441-5, 2005.
15. Gong Y, Liu L, Xie B, Liao Y, Yang E, Sun Z. Ameliorative effects of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive deficits and oxidative damage in senescence-accelerated mice. *Behav Brain Res.* 194, 100-7, 2008.
16. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Zhang L, Wu H et al. Procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorate scopolamine-induced memory impairment in mice. *Phytother Res.* 23, 1742-7, 2009.
17. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Zhang L, Wu H et al. Rejuvenation of antioxidant and cholinergic systems contributes to the effect of procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorating memory impairment in cognitively impaired aged rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 19, 851-60, 2009.
18. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Zhang L, Wu H et al. Procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorate age-related antioxidant deficit in aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 65, 236-41, 2010.
19. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Deng Q, Wu H et al. Memory impairment in cognitively impaired aged rats associated with decreased hippocampal CREB phosphorylation: reversal by procyanidins extracted from the lotus seedpod. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 65, 933-40, 2010.
20. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Deng Q, Bao W et al. Changes in the nitric oxide system contribute to effect of procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorating memory impairment in cognitively impaired aged rats. *Rejuvenation Res.* 14, 33-43, 2011.
21. Duan Y, Zhang H, Xie B, Yan Y, Li J, Xu F 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.
22. Duan Y, Zhang H, Xu F, Xie B, Yang X, Wang Y et al. Inhibition effect of procyanidins from lotus seedpod on mouse B16 melanoma in vivo and in vitro. *Food Chem.* 122, 84-91, 2010.
23. Stensvold I, Tverdal A, Solvoll K, Foss OP. Tea consumption. Relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality. *Prev Med.* 21, 546-53, 1992.
24. Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1127, 141-6, 1992.
25. Wu LY, Juan CC, Hwang LS, Hsu YP, Ho PH, Ho LT. Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. *Europ. J. Nutr.* 43, 116-24, 2004.
26. Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA, Shay N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nut.* 133, 1238-43, 2003.
27. Matsuzawa Y. White adipose tissue and cardiovascular disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 19, 637-47, 2005.
28. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Skoumas Y, Stefanadis C. The implications of anthropometric, inflammatory and glycaemic control indices in the epidemiology of the metabolic syndrome given by different definitions: a classification analysis. *Diabetes Obes Metab.* 9, 660-8, 2007.

§ 附表及附圖

Fig. 1

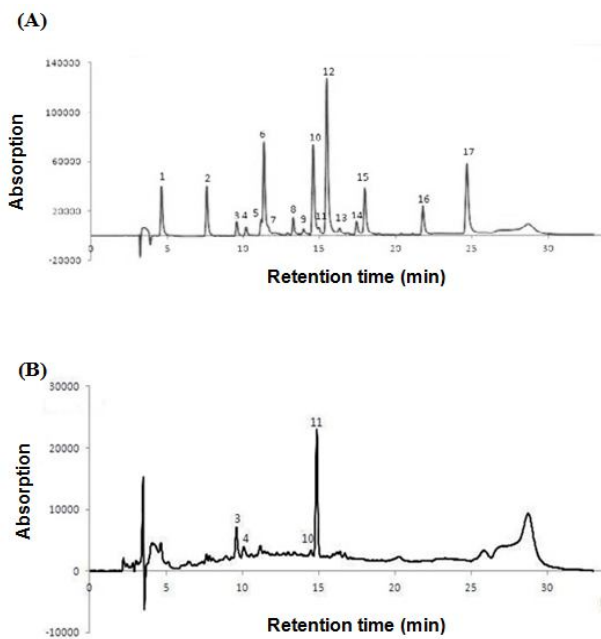


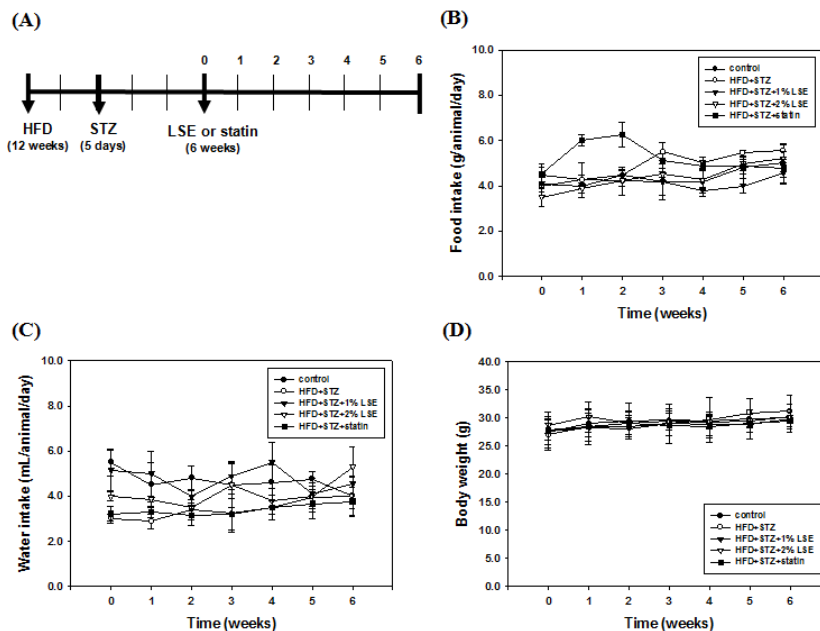
Table 1 – Composition of the LSE

Polyphenolic compound	Peak no. <sup>a</sup>	LSE (%)
Catechin	3	4.6 ± 1.8
Procyanidin B2	4	3.4 ± 0.7
ρ-coumaric acid	10	2.8 ± 0.5
EGC	11	12.5 ± 1.2
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)		29.6 ± 9.0
Total flavonoid (Jia method)		85.7 ± 3.2
Total anthocyanin (Fuleki and Francis method)		6.3 ± 2.8

<sup>a</sup> Phenolic compounds correspond to peaks as in HPLC chromatogram of 12 kinds of standard polyphenols.

**Fig. 1.** The chromatogram of the identification of the active compounds in LSE after 33 min using HPLC technique, X axis represents retention time (min), Y axis represents absorption. **(A)** HPLC chromatogram of 17 kinds of standard polyphenols (10 mg/mL; 10 μL). Peaks: 1. GA, 2. PCA, 3. catechin, 4. procyanidin B2, 5. epicatechin, 6. caffeic acid, 7. EGCG, 8. EA, 9. rutin, 10. ρ-Coumaric acid, 11. EGC, 12. FA, 13. ECG, 14. gossypin, 15. gossypetin, 16. quercetin, and 17. naringenin. **(B)** HPLC chromatograms of free polyphenols from LSE (5 mg/mL; 10 μL). Phenolic compounds correspond to peaks 3, 4, 10 and 11 as in (A). Detector was set at 285 and 345 nm.

Fig. 2



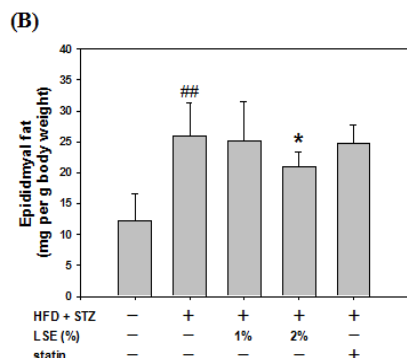
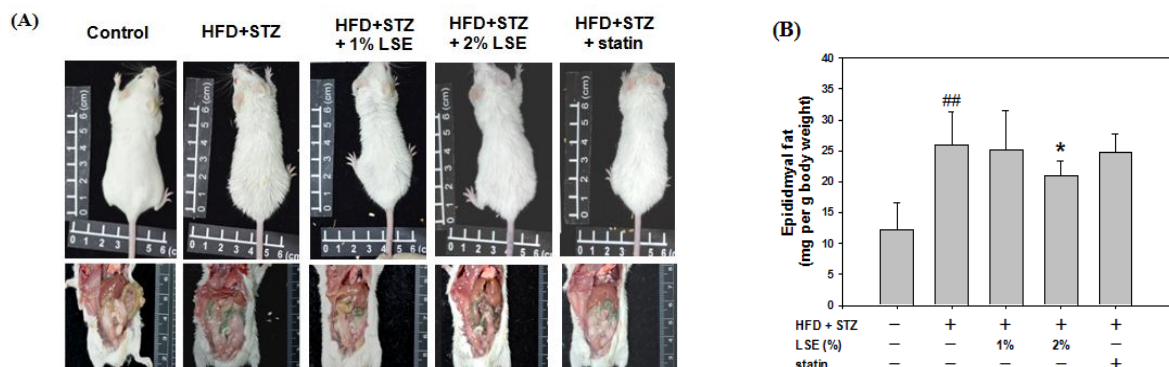
**Fig. 2.** Effect of LSE on food intake, water intake, and body weight after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with LSE (1% and 2%) or statin (30 mg/kg) for 6 weeks. **(A)** Flow chart of LSE attenuated the HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome. **(B-D)** The food intake (B), water intake (C), and body weight (D) through all experiment were recorded once weekly for 6 weeks. The quantitative data are presented as mean ± SD (n = 10) from three independent experiments.

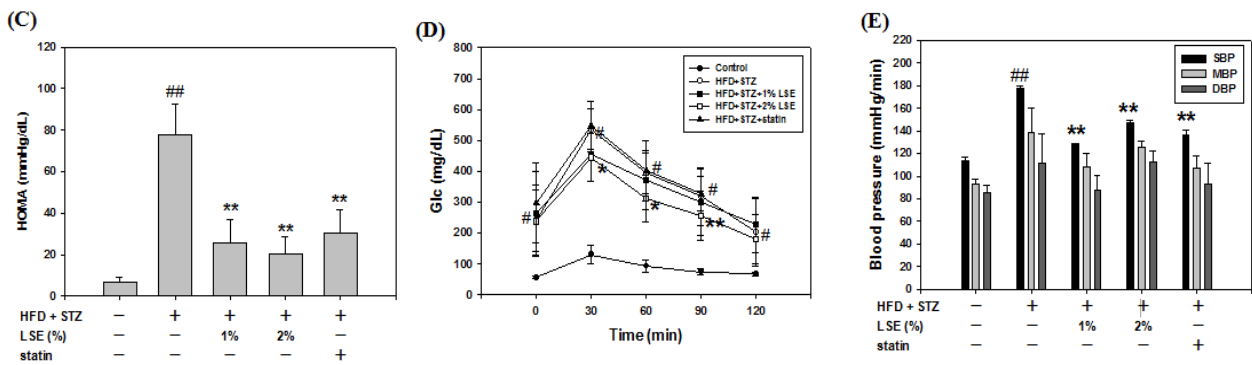
TABLE 2. Effects of LSE on the organ weight/ body weight ratio of mice induced by a HFD combined STZ treatment<sup>a</sup>

Organ weight (mg)/ Body weight (g) ratio	Control group	HFD + STZ group	HFD + STZ + 1% LSE group	HFD + STZ + 2% LSE group	HFD + STZ + statin group
Pancreas	3.39 ± 1.15	1.39 ± 0.27 <sup>b</sup>	1.93 ± 0.56	2.54 ± 1.20 <sup>c</sup>	2.56 ± 1.58
Liver	46.32 ± 2.98	65.06 ± 7.71 <sup>b</sup>	63.81 ± 5.31	66.08 ± 6.10	66.00 ± 7.29
Kidney	18.77 ± 1.25	27.91 ± 1.67 <sup>b</sup>	27.88 ± 1.06	27.43 ± 1.16	30.15 ± 2.24 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Each value is expressed as the mean ± SD (n = 10/group). Duration of the experiment = 6 weeks. Results were statistically analyzed with Student's t test. <sup>b</sup>p < 0.01 compared with the control group. <sup>c</sup>p < 0.05 compared with the HFD+STZ group.

Fig. 3





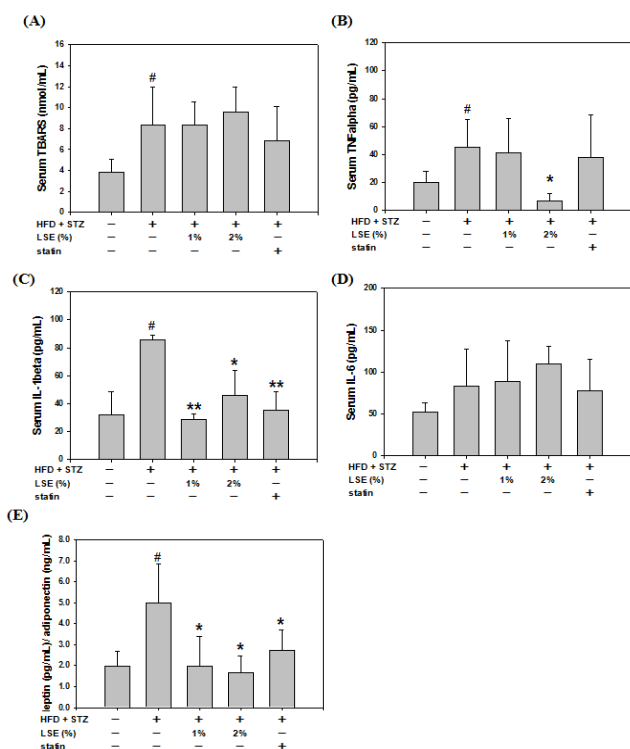
**Fig. 3.** Effect of LSE on metabolism syndromes after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with LSE (1% and 2%) or statin for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and epididymal fat tissue and serum were collected for analysis. (A) Body shape (*upper panel*) and a ventral view (*down panel*) of different groups were photographed at week 6. (B) The weight of epididymal fat was expressed as mg per g total body weight area among different groups. (C) On week 6, HOMA-IR was calculated by the fasting plasma glucose and insulin levels. (D-E) Serum OGTT (D) and blood pressure (E) were detected. The quantitative data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10) from three independent experiments. <sup>##</sup>p < 0.05, <sup>###</sup>p < 0.01 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the group of HFD plus STZ.

**Table 3. Effects of LSE on the serum biochemical parameters of rabbits induced by a HFD plus STZ<sup>a</sup>**

variable <sup>b</sup>	Control group	HFD + STZ group	HFD + STZ + 1% LSE group	HFD + STZ + 2% LSE group	HFD + STZ + statin group
Cholesterol (mg/dL)	165.60 $\pm$ 17.44	223.75 $\pm$ 21.42 <sup>c</sup>	227.33 $\pm$ 8.14	182.75 $\pm$ 17.06 <sup>e</sup>	189.67 $\pm$ 5.13 <sup>e</sup>
Triglycerides (mg/dL)	152.67 $\pm$ 18.88	141.67 $\pm$ 20.98	106.50 $\pm$ 19.36 <sup>e</sup>	93.50 $\pm$ 21.46 <sup>f</sup>	102.75 $\pm$ 27.29
LDL-c (mg/dL)	35.50 $\pm$ 6.35	67.25 $\pm$ 8.81 <sup>c</sup>	66.67 $\pm$ 12.06	59.75 $\pm$ 5.91	62.75 $\pm$ 8.54
HDL-c (mg/dL)	89.20 $\pm$ 5.45	125.00 $\pm$ 17.36 <sup>c</sup>	142.50 $\pm$ 8.06	118.00 $\pm$ 14.18	114.40 $\pm$ 12.18
GOT (U/L)	226.00 $\pm$ 56.20	250.00 $\pm$ 101.08	228.33 $\pm$ 43.02	213.50 $\pm$ 33.26	202.20 $\pm$ 33.26
GPT (U/L)	76.00 $\pm$ 9.90	99.50 $\pm$ 9.88 <sup>d</sup>	119.00 $\pm$ 36.77	82.00 $\pm$ 32.49	65.25 $\pm$ 17.99 <sup>e</sup>
BUN (mg/dL)	21.20 $\pm$ 2.52	34.04 $\pm$ 6.86 <sup>c</sup>	14.67 $\pm$ 1.39 <sup>f</sup>	16.80 $\pm$ 2.81 <sup>f</sup>	15.87 $\pm$ 2.47 <sup>f</sup>
CRE (mg/dL)	0.38 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	0.50 $\pm$ 0.08	0.46 $\pm$ 0.11	0.44 $\pm$ 0.05
Glc (mg/dL)	50.10 $\pm$ 7.14	342.83 $\pm$ 37.30 <sup>c</sup>	225.00 $\pm$ 99.82 <sup>e</sup>	182.00 $\pm$ 81.43 <sup>f</sup>	194.14 $\pm$ 79.92 <sup>f</sup>
Insulin (mg/dL)	1.74 $\pm$ 0.46	1.91 $\pm$ 0.36	1.70 $\pm$ 0.33	1.77 $\pm$ 0.34	2.05 $\pm$ 0.56

<sup>a</sup>Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD (n = 10/group). Duration of the experiment = 6 weeks. Results were statistically analyzed with Student's t test. <sup>b</sup> LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; BUN, blood urea nitro gen; CRE, creatinine. <sup>c</sup>p < 0.01 compared with the control group. <sup>d</sup>p < 0.05 compared with the control group. <sup>e</sup>p < 0.05 compared with the HFD+STZ group. <sup>f</sup>p < 0.01 compared with the HFD+STZ group.

**Fig. 4**



**Fig. 4.** Effect of LSE on serum cytokines level after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with LSE (1% and 2%) or statin for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and serum was collected for analysis. (A) The lipid peroxidation of serum was assessed by measuring the TBARS. TBARS activity was expressed using concentration (nmole/mg protein) of MDA, as lipid peroxidation indicator. (B-E) Serum TNF $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C), IL-6 (D) levels, and leptin and adiponectin ratio (E) were detected by ELISA assays. The quantitative data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10) from three independent experiments. <sup>#</sup>p < 0.05 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the group of HFD plus STZ.

**Fig. 5.** Effect of LSE on liver histopathology and lipid peroxidation after HFD combined STZ treatment in mice. (A) Representative 100X (*upper panel*) and 200X (*down panel*) images of liver sections from different dietary treatments (n=10/group) stained with H&E to display the hepatic tissue architecture and presence of macro- and micro-vesicular steatosis (white parts), representing accumulation of lipid droplets in hepatocytes and the distribution of steatosis, and kuffer cells (arrows). (B) Liver sections also stained with Masson's trichrome to show presence of fibrotic tissue (stained blue, arrows) (100X, *upper panel*; 200X, *down panel*).



Fig. 5

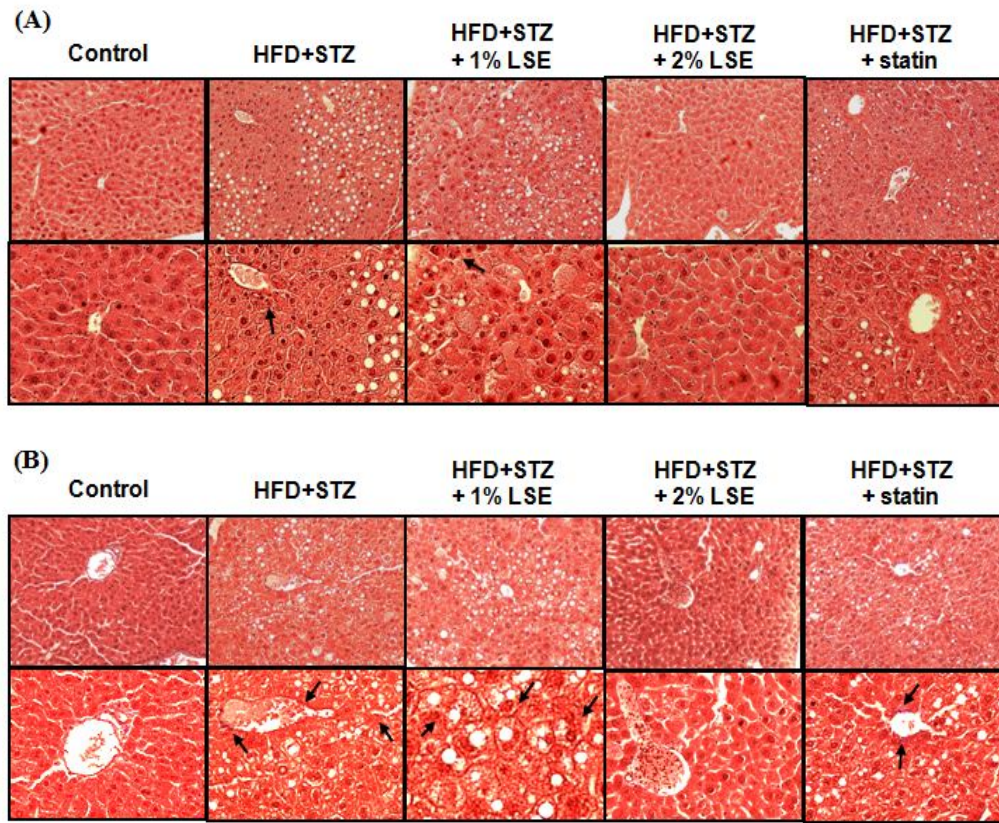
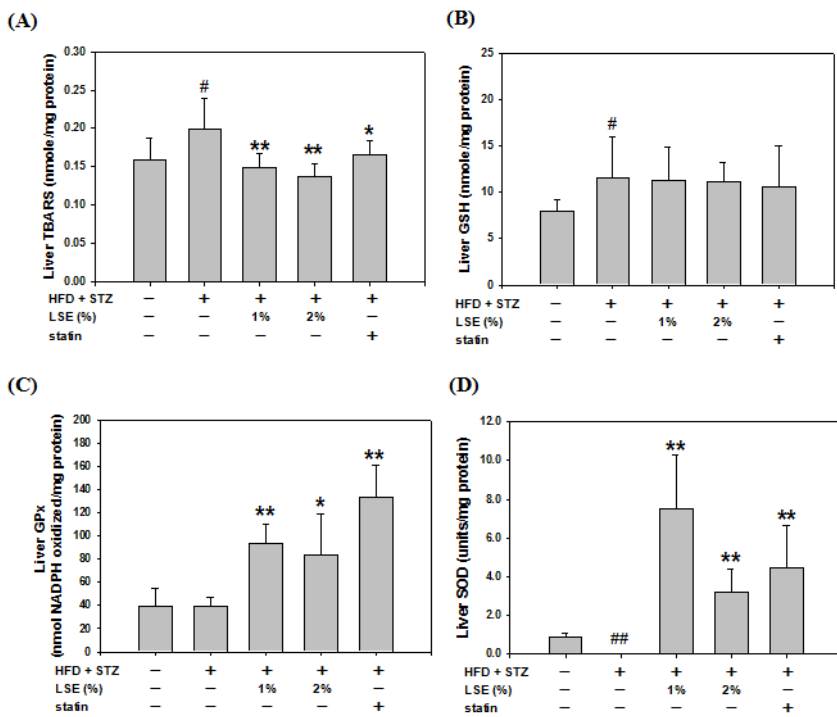
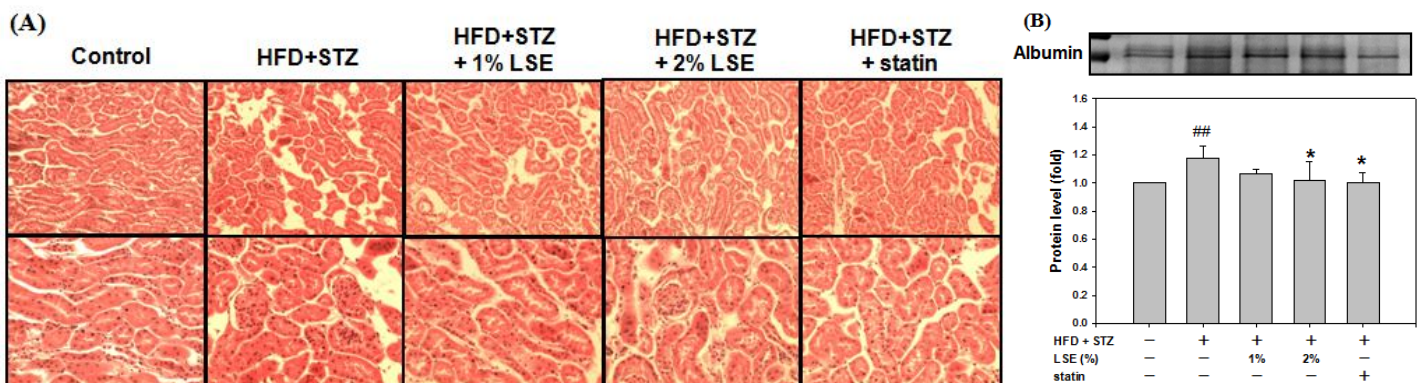


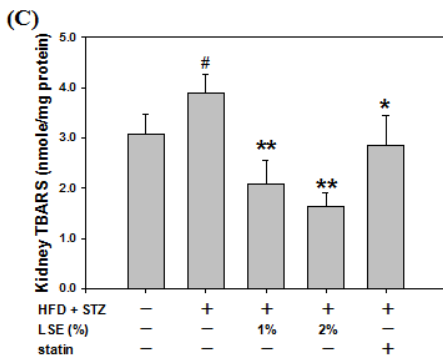
Fig. 6



**Fig. 6.** Effect of LSE on liver lipid peroxidation and antioxidant enzymes after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with LSE (1% and 2%) or statin for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and liver tissue was collected for analysis. **(A)** The lipid peroxidation of liver was assessed by measuring the TBARS. TBARS activity was expressed using concentration (nmole/mg protein) of MDA, as lipid peroxidation indicator. **(B-D)** Liver GSH (B), GPx (C), and SOD (D) activities were detected by ELISA assays. The quantitative data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10) from three independent experiments. <sup>##</sup>p < 0.01 compared with the control group. <sup>\*</sup>p < 0.05, <sup>\*\*</sup>p < 0.01 compared with the group of HFD plus STZ.

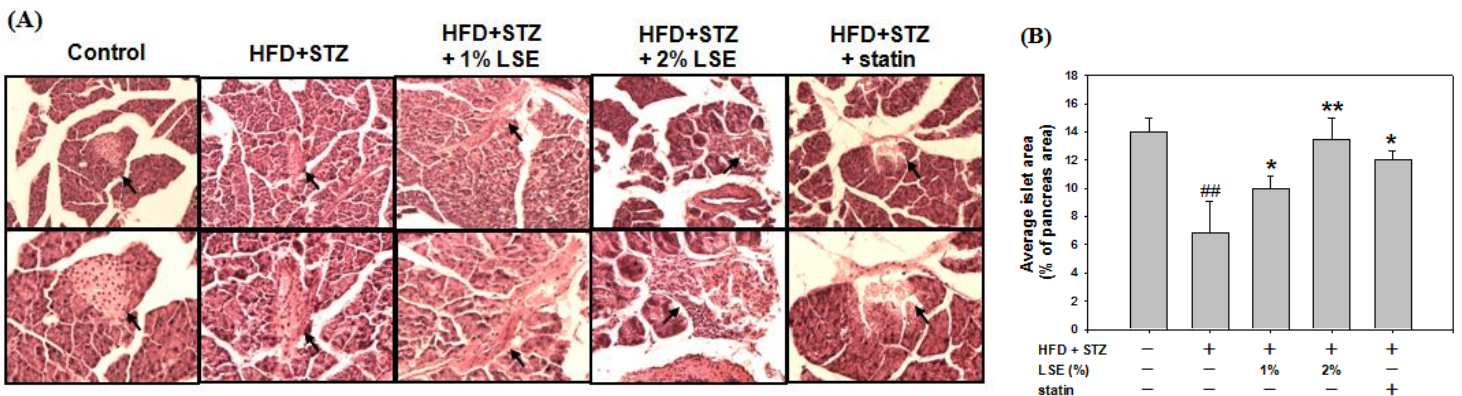
Fig. 7





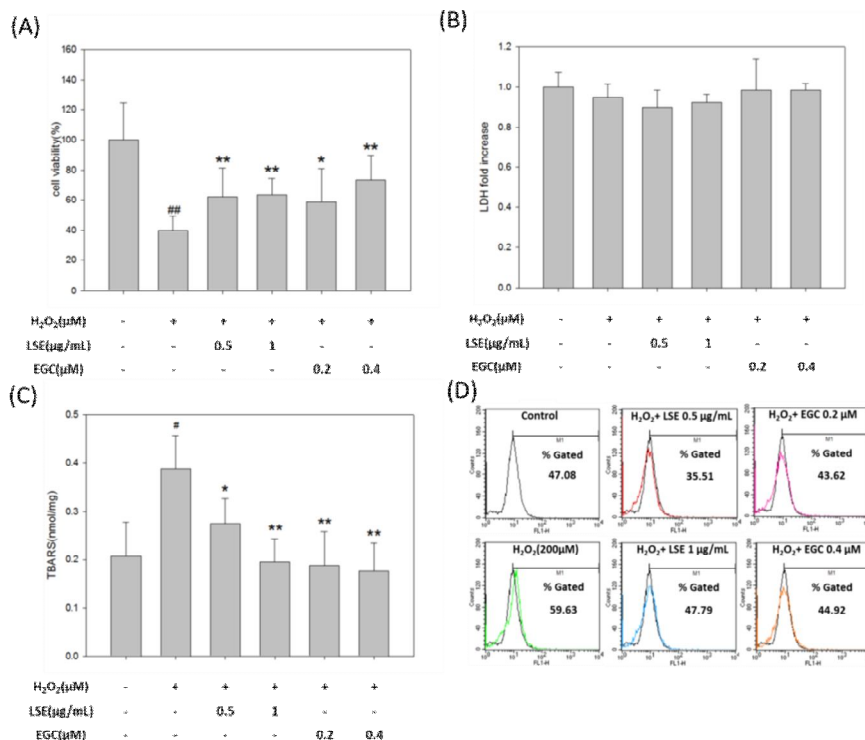
**Fig. 7.** Effect of LSE on kidney histopathology and lipid peroxidation after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with LSE (1% and 2%) or statin for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and kidney tissue was collected for analysis. **(A)** Representative 100X (*upper panel*) and 200X (*down panel*) images of kidney sections from different dietary treatments (n=10/group) stained with H&E to display the pancreas tissue architecture and inflammatory cells (black parts). **(B)** SDS-PAGE analysis of albumin expression was carried out with urine from them. The quantitative data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3) from three independent experiments. **(C)** The lipid peroxidation of kidney was assessed by measuring the TBARS. TBARS activity was expressed using concentration (nmole/mg protein) of the

**Fig. 8**



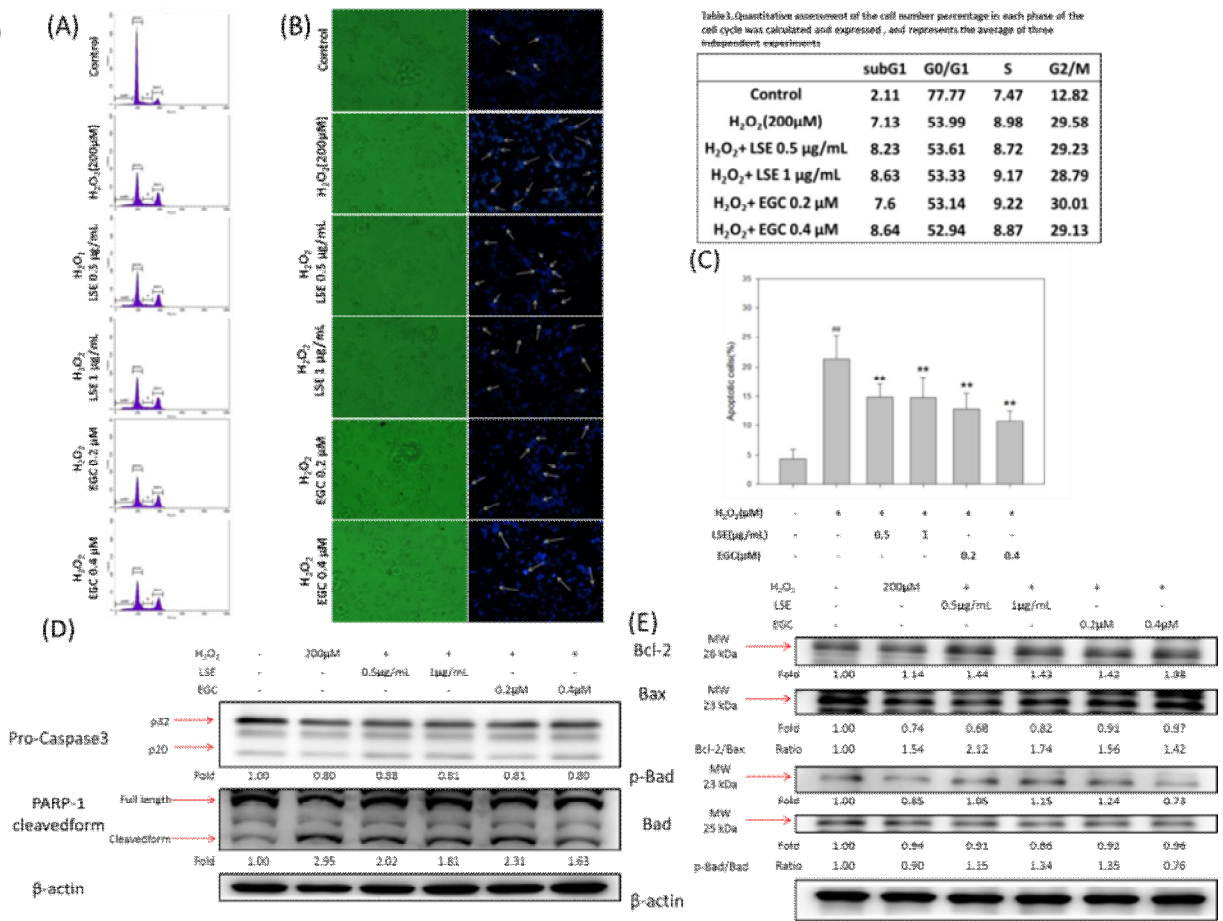
**Fig. 8.** Effect of LSE on pancreas histopathology and lipid peroxidation after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with LSE (1% and 2%) or statin for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and pancreas tissue was collected for analysis. **(A)** Representative 100X (*upper panel*) and 200X (*down panel*) images of pancreas sections from different dietary treatments (n=10/group) stained with H&E to display the pancreas tissue architecture and the morphology of islets cells (arrows). **(B)** Statistic analysis of average area of per islets area was expressed as % of total pancreas area among different groups (n=10/group). **(C)** The lipid peroxidation of pancreas was assessed by measuring the TBARS. TBARS activity was expressed using concentration (nmole/mg protein) of MDA. The quantitative data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 10) from three independent experiments. <sup>##</sup>p < 0.01 compared with the control group. <sup>\*</sup>p < 0.05, <sup>\*\*</sup>p < 0.01 compared with the group of HFD plus STZ.

**Fig. 9**



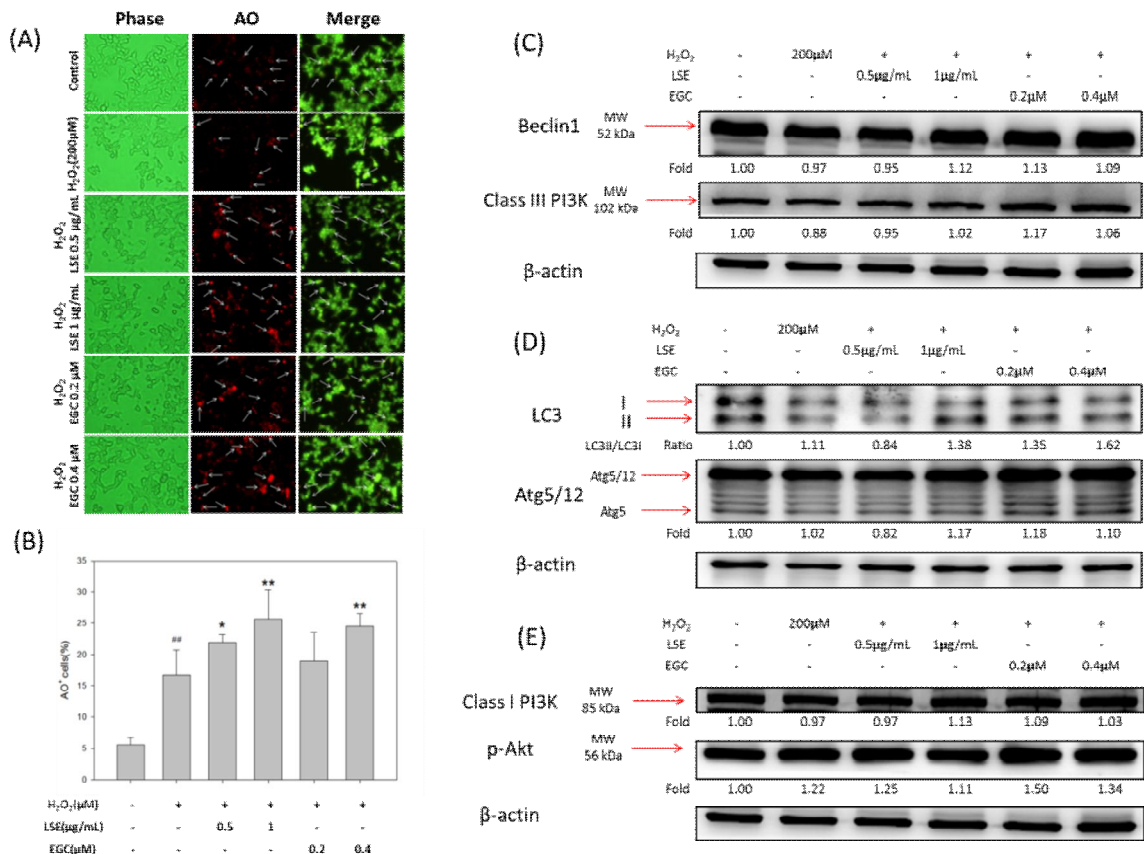
**Fig. 9.** Effects of LSE and EGC in combination with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on  $\beta$ -cell viability and oxidative injury. **(A)**  $\beta$ -cells were treated with or without various concentrations of LSE (0.5 and 1  $\mu$ g/mL) or EGC (0.2 and 0.4  $\mu$ M) in the presence or absence of 200  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. Cell viability was analyzed by cell counting assay. **(B)** LDH release assay of media from  $\beta$ -cells treated with or without various concentrations of LSE or EGC in the presence or absence of 200  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. **(C-D)** Under the same treatment conditions, the lipid peroxidation **(C)** and intracellular ROS level **(D)** were assessed by measuring the TBARS and H<sub>2</sub>DCF-DA assay, respectively. The results represent the mean  $\pm$  SD (n = 3) from three independent experiments. <sup>#</sup>p < 0.05, <sup>##</sup>p < 0.01 compared with control. <sup>\*</sup>p < 0.05, <sup>\*\*</sup>p < 0.01, compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group.

**Fig. 10**



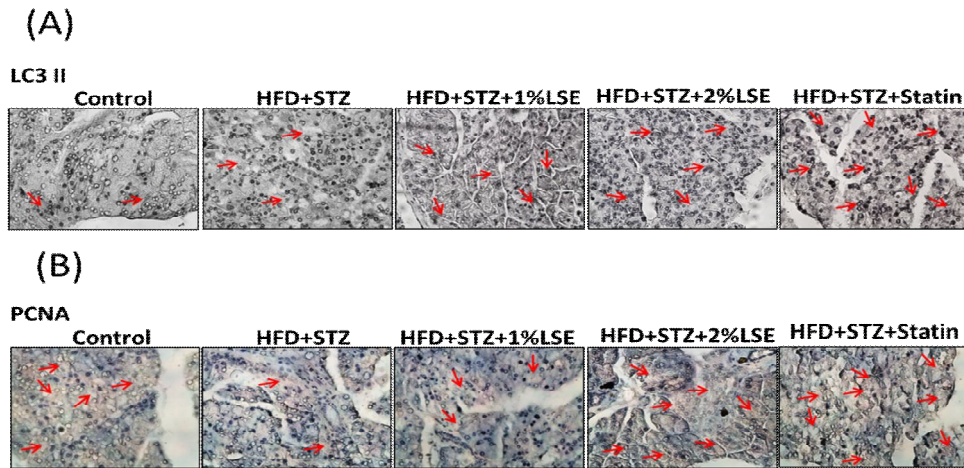
**Fig. 10. Effects of LSE and EGC on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced β-cell apoptosis.** β-cells were treated with the indicated concentrations of LSE (0.5 and 1 µg/mL) or EGC (0.2 and 0.4 µM) in the presence or absence of 200 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. (A) The DNA content was analyzed using fluorescence flow cytometry. The position of the subG1 peak (hypodiploidy), integrated by apoptotic cells, and the G0/G1, S and G2/M peaks are indicated. (B) The cells were assayed by DAPI staining. Arrows indicate apoptotic cells. Panels show (from left to right) phase-contrast microscopy and DAPI staining. (C) Apoptotic values were calculated as the percentage of apoptotic cells relative to the total number of cells in each random field (>100 cells) and represent as mean ± SD (n = 3) of three independent experiments ± SD. #p < 0.01 compared with control. \*\*p < 0.01 compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group. (D-E) The protein levels of caspase-3, PARP-1 (D), Bcl-2, Bax, and p-Bad (E) were determined by Western blotting. The protein levels (fold) above the figures represent relative density of the bands normalized to β-actin. Results are representative of at least three independent experiments.

**Fig. 11**



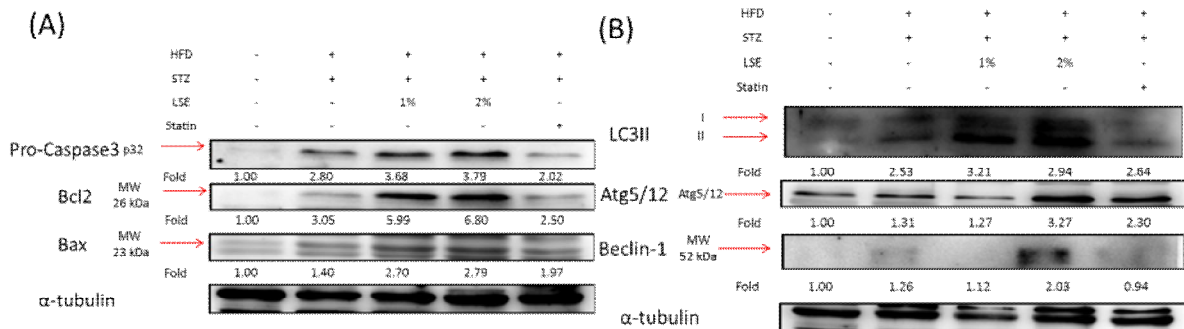
**Fig. 11. Effects of LSE and EGC on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced  $\beta$ -cell autophagy.**  $\beta$ -cells were treated with the indicated concentrations of LSE (0.5 and 1  $\mu$ g/mL) or EGC (0.2 and 0.4  $\mu$ M) in the presence or absence of 200  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. (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 percentage of AO+ cells relative to the total number of cells in each random field (>100 cells) and represent the average of three independent experiments  $\pm$  SD. ##*p* < 0.01 compared with control. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group. (C-E) The protein levels of LC3, ATG5/12 (B), Beclin-1, class III PI3K (C), class I PI3K and p-Akt (D) were determined by Western blotting. The protein levels (fold) above the figures represent relative density of the bands normalized to  $\beta$ -actin. Results are representative of at least three independent experiments.

**Fig. 12**



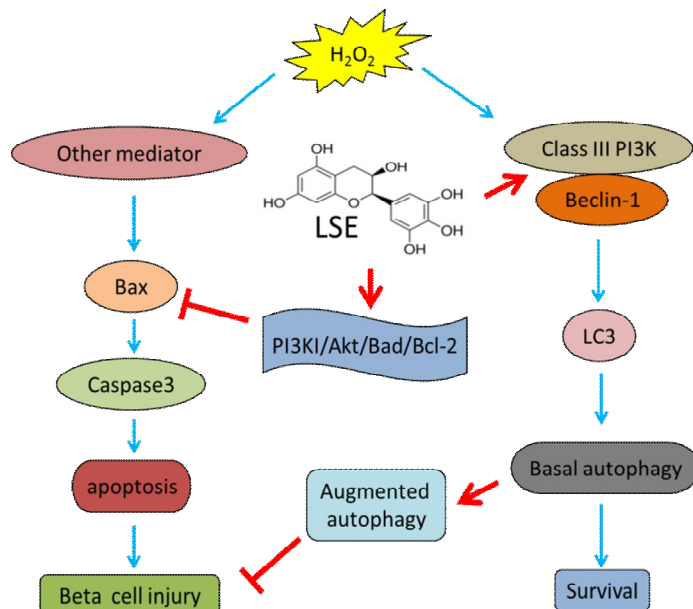
**Fig. 12. Effect of LSE on pancreas cell autophagy and proliferation in HFD combined STZ treatment in mice.** HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with LSE (1% and 2%) or semistatin (30 mg/kg) for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and pancreas tissue was collected for analysis. Immunohistochemical staining of LC3 II (A) and PCNA (B), indicated by arrows, was carried out with the tissue extracts from them. Results are representative of at least three independent experiments.

**Fig. 13**



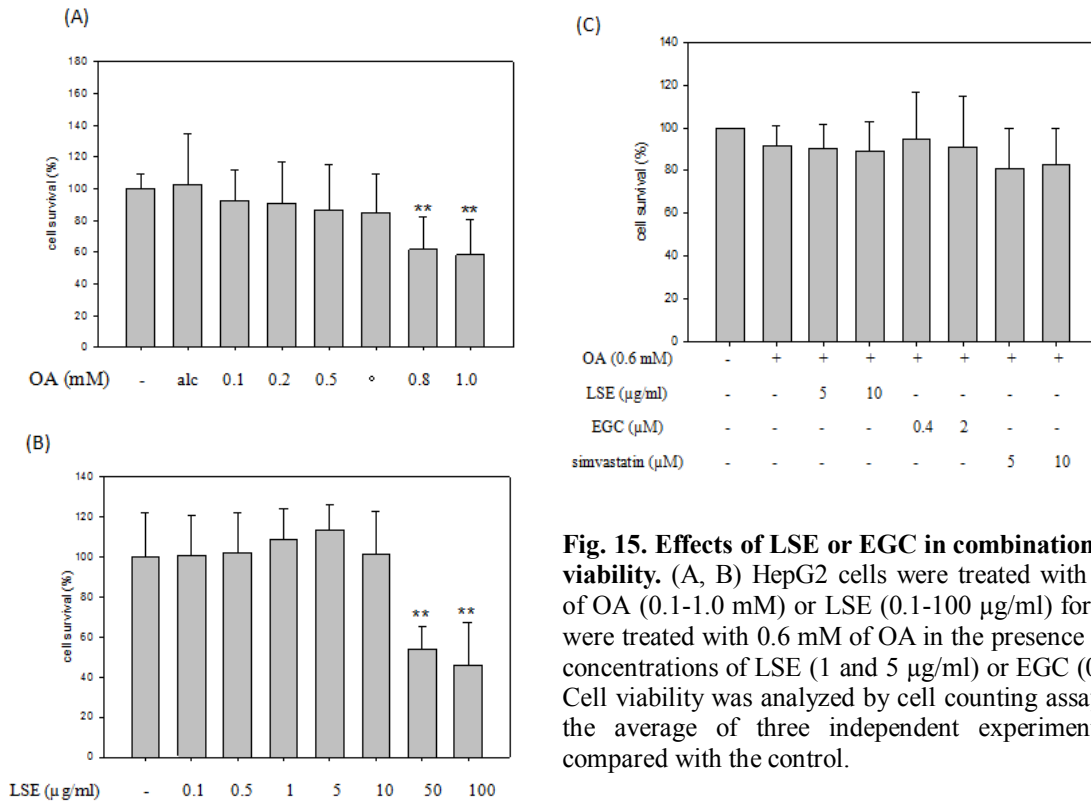
**Fig. 13. Effect of LSE on autophagy-related proteins in HFD combined STZ treatment in mice.** HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with LSE (1% and 2%) or semistatin (30 mg/kg) for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and pancreas tissue was collected for analysis. Western blot analysis of caspase 3, Bax, Bcl-2 (A), LC3, Atg5, and Beclin-1 (B) was carried out with the tissue extracts from them. The protein levels (fold) below the blots represent the relative density of the bands normalized to  $\beta$ -actin. Results are representative of at least three independent experiments.

**Fig. 14**



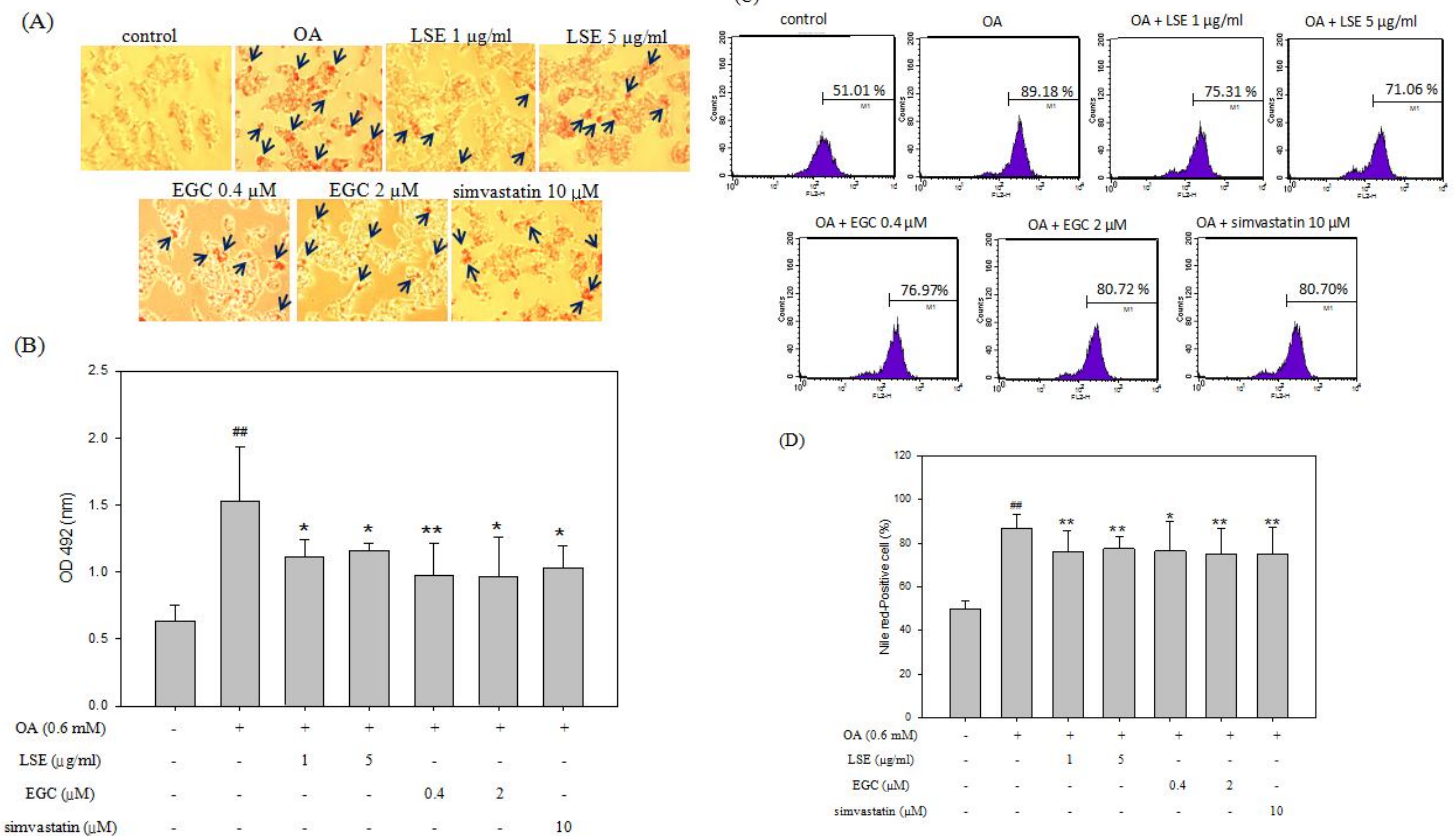
**Fig. 14. Schematic representation of the protective effects of LSE against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates both apoptosis and autophagy in  $\beta$ -cells. While apoptosis definitely leads to cellular injury, autophagy is activated as a prosurvival mechanism. LSE functions against the effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via the activation of class I PI3K/Akt/Bad/Bcl-2 and inhibition of Bax/caspase 3 cascade pathways. In addition, LSE promotes class III PI3K/Beclin-1/LC3 signaling that subsequently induces the augmentation of autophagy. This mechanism provides sustained cellular survival under conditions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated  $\beta$ -cells injury.

**Fig. 15**



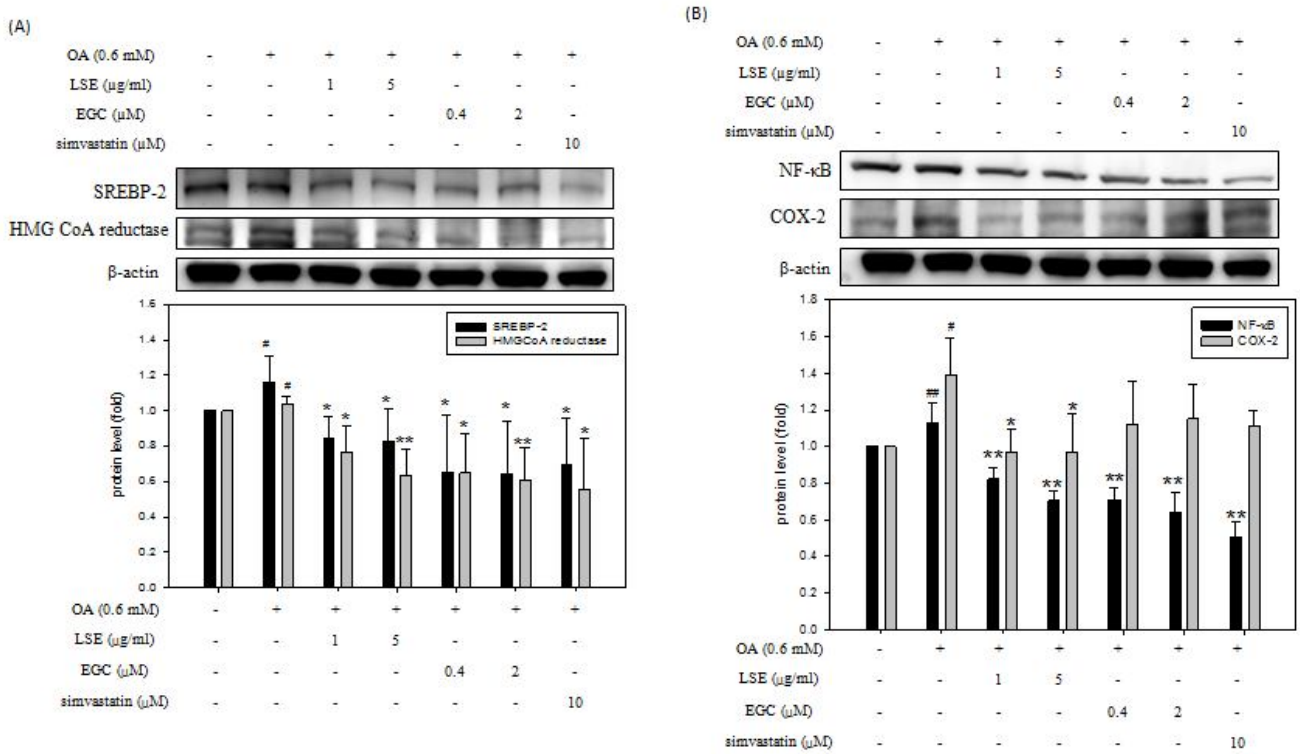
**Fig. 15. Effects of LSE or EGC in combination of OA on HepG2 cell viability.** (A, B) HepG2 cells were treated with various concentrations of OA (0.1-1.0 mM) or LSE (0.1-100 µg/ml) for 24 h. (C) HepG2 cells were treated with 0.6 mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (1 and 5 µg/ml) or EGC (0.4 and 2 µM) for 24 h. Cell viability was analyzed by cell counting assay. The results represent the average of three independent experiments ± SD. \*\*p< 0.01 compared with the control.

**Fig. 16**



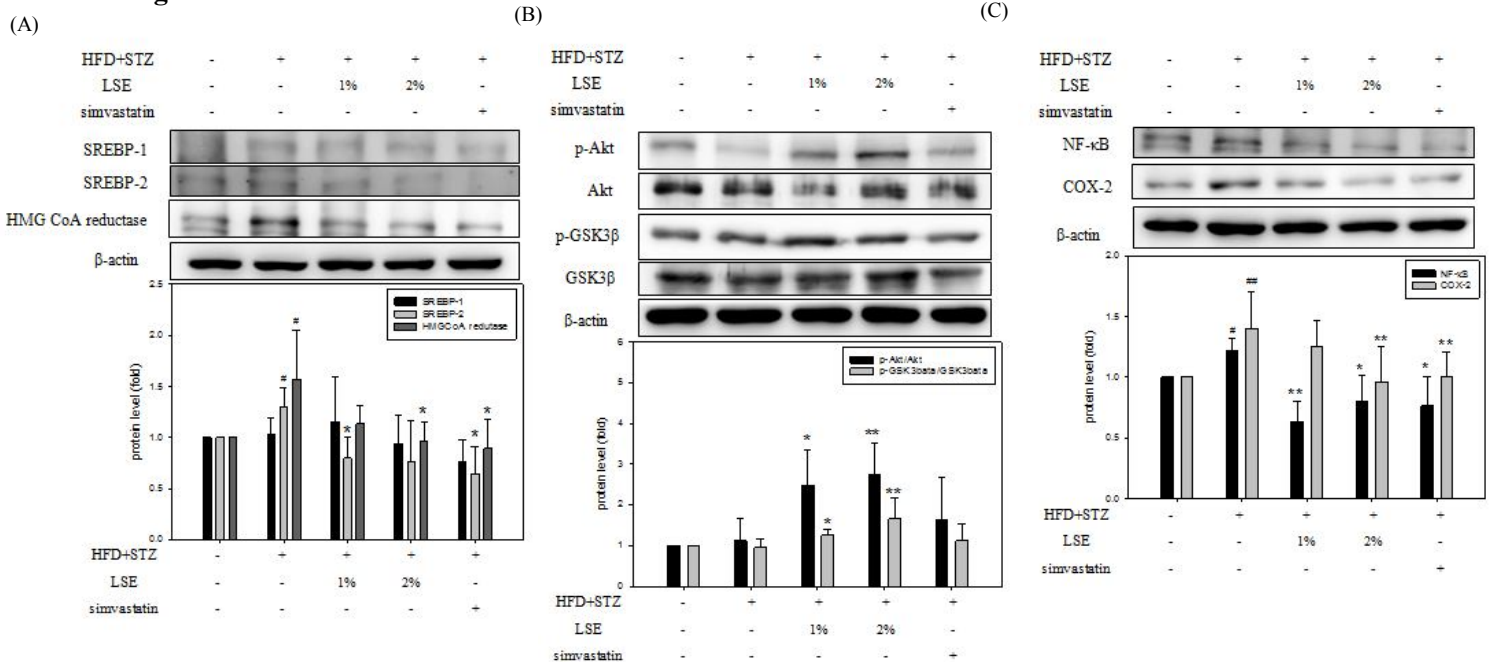
**Fig. 16. Inhibitory effect of LSE or EGC on the OA-induced intracellular lipid accumulation.** (A) HepG2 cells were B treated with 0.6 mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (1 and 5 µg/ml) or EGC (0.4 and 2 µM) for 24 h. After the incubation, the cells were stained with Oil Red O and then observed under the microscope (100×). The red droplets accumulated in the cells were indicated as the stained lipid. (B) Adding 1 mL of isopropanol to the stained culture dish, the extracted dye was diluted 5× in ddH<sub>2</sub>O, and then its absorbance was monitored at 492 nm. (C) Quantification of intracellular fat content with flow cytometric analysis, as assessed by Nile red staining. (D) The quantitative data are presented as means ± SD of three repeats from three independent study. ###p< 0.01 compared with the control. \*p< 0.05, \*\*p< 0.01 compared with the OA-treated group.

**Fig. 17**



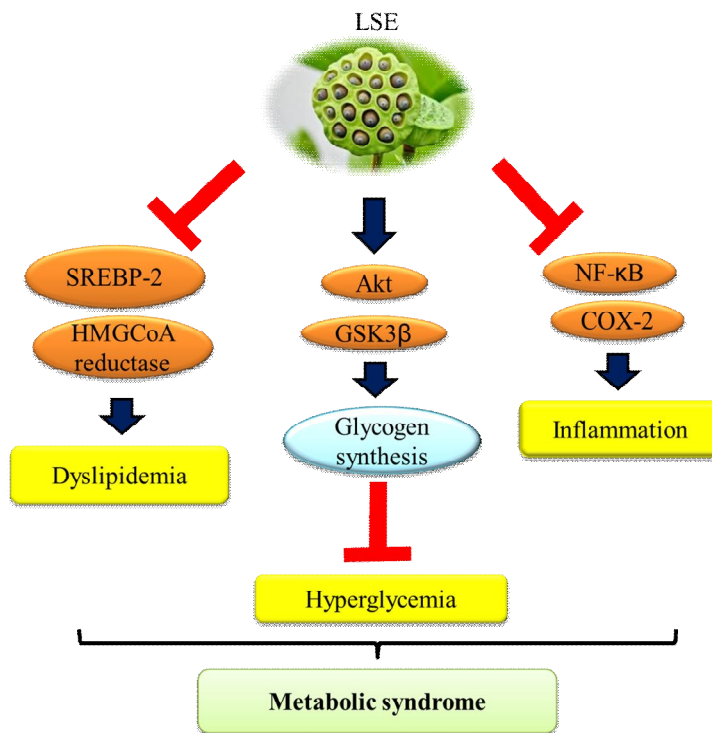
**Fig. 17. Effect of LSE or EGC on OA-induced lipogenesis- and inflammation-related regulatory proteins.** HepG2 cells were treated with 0.6 mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (1 and 5 μg/ml) or EGC (0.4 and 2 μM) for 24 h. The protein levels of SREBP-2, HMG CoA reductase (A), NF-κB and COX-2 (B) were determined by Western blotting. β-actin served as an internal control. The quantitative data are presented as mean ± SD from three independent experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the OA-treated group.

**Fig. 18**



**Fig. 18. Effect of LSE on dyslipidemia-, hyperglycemia- and inflammation-related proteins after HFD combined STZ treatment in mice.** HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with LSE (1% and 2%) or statin (30 mg/kg) for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and liver tissue was collected for analysis. (A-C) The protein levels of SREBP-1, SREBP-2, HMGCoA reductase (A), p-Akt, Akt, p-GSK3β, GSK3β (B), NF-κB and COX-2 (C) were determined by Western blotting. β-actin served as an internal control. The quantitative data are presented as mean ± SD (n=10) from three independent experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control group. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the group of HFD plus STZ.

**Fig. 19**



**Fig. 19.** A proposed model for the inhibitory effect of LSE on hepatic lipid accumulation via downregulations of lipogenesis regulatory proteins in OA-induced human hepatocyte HepG2 *in vitro* and in HFD combined STZ-induced the metabolism syndrome of mice *in vivo*.

# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/10/27

科技部補助計畫	計畫名稱: 蓮蓬萃取物成份抗代謝症候群及其分子機制之研究
	計畫主持人: 林慧瑩
	計畫編號: 102-2320-B-040-003-MY3      學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	



102年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：林慧萱			計畫編號：102-2320-B-040-003-MY3			
計畫名稱：蓮蓬萃取物成份抗代謝症候群及其分子機制之研究						
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	學術性論文	期刊論文	0			
		研討會論文	3	篇	1. Deng-Chi Huang, Jing-Hsien Chen, Ting Hsuan Wang, Ting Yu Su, Hui-Hsuan Lin* (2015, March 21-22) The effect of lotus seedpod on metabolic syndrome. The 30th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C., 2015 2. Ting-Hsuan Wang, Jing-Hsien Chen, Wei-Yu Chang, Hui-Hsuan Lin* (2015, March 21-22) Beta-cell protective effects of lotus seedpod in vitro and in vivo. The 30th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C., 2015 3. Ting-Yu Su, Wei-Yu Chang, Deng-Chi Huang, Yu-Lun Hung, Jing-Hsien Chen*, Hui-Hsuan Lin* (2016, March 26-27) Lotus seedpod extracts improved metabolic syndrome and reduced lipid accumulation in hepatocytes. The 31th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C., 2016.	
		專書	2	本	1. 黃登琪、林慧萱。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。中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系碩士論文，104年七月。 2. 王廷軒、林慧萱。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。中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系碩士論文，104年七月。	
		專書論文	0	章		
		技術報告	0	篇		
	其他	0	篇			
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
				新型/設計專利	0	

		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
國外	學術性論文	期刊論文		1	篇	Ming-Shih Lee, Jing-Hsien Chen, Ting-Hsuan Wang, Hui-Hsuan Lin* Ivivo and in vitro beta-cell protective effects of lotus seedpod extracts against oxidative injury. Food Chem, in revision, 2016	
		研討會論文		1		Jing-Hsien Chen, Ming-Shih Lee, Ting-Hsuan Wang, Yu-Chen Liu, Hui-Hsuan Lin* (2016, April 16-17) 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 2016, Taichung, R.O.C., 2016.	
		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	本國籍	大專生		6	人次		
		碩士生		3			
		博士生		0			
		博士後研究員		0			

力		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。)		獲獎情形： 1. 黃登琪、林慧萱。蓮蓬水萃取物對於高脂飲食合併STZ誘發代謝症候群小鼠之研究，2015第九屆Zespri論文獎。 2. 王廷軒、林慧萱。蓮蓬萃取物成分對胰島細胞之保護作用，2015第九屆Zespri論文獎。		

## 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）

研討會論文共四篇

獲獎情形：2015第九屆Zespri論文獎兩篇

### 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) 本計劃研究之成果若確認蓮蓬萃取物成份具有降血糖和血脂、抗氧化、抗發炎、抑制胰島素阻抗、保護胰島細胞損傷、以及排除肝臟脂肪堆積等作用，將提供臨床代謝症候群或代謝疾病（糖尿病、脂肪肝）患者新的治療方向。

(2) 本計劃除功能性研究外，同時也可做為蓮蓬萃取物之動物毒理評估。

(3) 本研究建立高脂肪合併鏈脈佐菌素誘導代謝症候群之實驗動物模式，以及過氧化物促進胰島素阻抗、以及油酸誘導肝臟脂肪堆積之細胞模式，作為探討代謝症候群致病成因之平台，可應用為將來發展預防及改善代謝症候群保健食品開發之研究，在學術研究上有貢獻。

(4) 經由本研究開發蓮蓬萃取物為具有多重有效成份，可抑制代謝症候群多項危險因子的單一健康食品，也可以作為預防或輔助治療代謝症候群保健食品開發研究之參考。

(5) 代謝症候群在全世界有急速增加的趨勢，代謝症候群會導致糖尿病、心腦血管疾病、肝腎相關疾病等盛行率攀升，除減低危險因子外，若能將蓮蓬開發為具預防或改善代謝症候群之健康食品，對於減低國家醫療負擔、提昇農業價值、發展食品生技產業等都具有相當貢獻。

### 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)