

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

台灣土肉桂葉精油及其主要成分對於內毒素誘發之小腸黏膜損傷之保護作用及模式辨識受體TLR4與NALP3在其中扮演之角色
(第3年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC 101-2313-B-040-008-MY3
執行期間：103年08月01日至104年07月31日
執行單位：中山醫學大學營養學系(所)

計畫主持人：劉承慈
共同主持人：李世傑、賴信志
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：倪曼婷
碩士班研究生-兼任助理人員：許捷盛
碩士班研究生-兼任助理人員：蔡幸芬
碩士班研究生-兼任助理人員：王詩芸
碩士班研究生-兼任助理人員：蔡幸紋

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 104 年 10 月 30 日

中文摘要：目的：利用in vivo模式，觀察台灣土肉桂葉精油(Cinnamomum osmophloeum Kanehira, TC)抗發炎作用、相關機制、及活性成分。方法：於雄性Wistar大鼠灌食不同劑量TC共8次後，以LPS誘發系統性發炎反應症候(SIRS)，觀察嗜中性球趨化活性相關指標，另於雄性C57BL/6J小鼠隔日灌食不同劑量TC、桉羅木醇、或肉桂醛共8次後，以LPS誘發SIRS，觀察小鼠周邊及臟器發炎指標及迴腸組織形態、障壁蛋白和抑菌蛋白含量、盲囊菌相及TLR4與NLRP3訊號路徑活性，驗證桉羅木醇及肉桂醛是否為TC抗發炎作用的主要活性成分及其機制。結果：所有TC及其組成分之試驗劑量均不影響實驗動物生長及注射LPS動物之組織及臟器重/體重百分。TC顯著逆轉LPS誘發之大鼠周邊嗜中性球密度上升及CD11b/CD18表現量，並降低周邊血sL-selectin、sICAM-1及CINC-1、TNF- α 、IL-1 β 及NO濃度及腸黏膜ICAM-1、CINC-1、TNF- α 、IL-1 β 及NO含量，同時改善迴腸嗜中性球浸潤程度及腸黏膜形態學。在小鼠TC顯著降低LPS誘發之周邊血中TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、IFN- γ 、及NO上升並抑制腸繫膜淋巴結與迴腸黏膜之TLR4、MyD88、MD2、NLRP3、ASC、及caspase-1表現量及組織中NF- κ B活化和caspase-1活性，改善迴腸黏膜NO含量及xanthine oxidase活性，並改善迴腸絨毛水腫。進一步觀察確認TC可透過其組成分中肉桂醛和桉羅木醇減緩LPS造成之體重流失及脾臟和腸繫淋巴結腫大，改善脾臟及、肝臟及腸繫淋巴結NO和TNF- α 、IFN- γ 之含量，伴隨抑制脾臟、腸繫淋巴結、及迴腸黏膜中TLR4、MD2、MyD88、NLRP3、ASC、Caspase-1表現量、NF- κ B活化程度及caspase-1活性。TC透過活性成分對於MyD88表現量之抑制作用，亦降低LPS誘發之迴腸黏膜抗微生物肽REG3- β 、REG3- γ 、CRP-ductin及抗發炎荷爾蒙RETNL β 含量，並降低迴腸組織中嗜中性白血球浸潤及逆轉tight junction結構蛋白claudin-5和ZO-1之流失，保護迴腸絨毛形態。盲囊中microbiota豐富度及菌種分布之改變顯示TC及其活性成分可能透過對於腸道微生物生態之影響間接調節免疫反應，提供保護作用。結論：本研究證實TC在系統性發炎之抗發炎及迴腸保護作用，指出肉桂醛及桉羅木醇為其主要活性成分，並提出此作用係透過抑制嗜中性球趨化活性及降低TLR4訊號路徑和NLRP3發炎體活性所致。而TC及其活性成分在LPS誘發迴腸黏膜之保護作用，伴隨tight junction蛋白上升，顯示其可促進腸道障壁功能，具有應用於抗發炎及促進腸道健康之保健產品的潛力。

中文關鍵詞：台灣土肉桂；葉精油；桉羅木醇；肉桂醛；脂多醣；TLR4；NLRP3；caspase-1；NF- κ B；系統性發炎反應症候；迴腸；黏膜；嗜中性球；黏附分子；趨化作用；組織浸潤；抗菌肽；抗發炎荷爾蒙；tight junction蛋白；微生物相

英文摘要：Aim: To investigate the anti-inflammatory effect and the underlying mechanism of leaf essential oil from Cinnamomum osmophloeum kanehira (TC) in vivo and to clarify whether cinnamaldehyde (cin) and linalool (lin) being two major bioactive compositions in TC. Methods: Male Wistar rats or C57BL/6J mice were injected with LPS (ip) after receiving gavaged with various doses of TC, cin, or lin every other day for 8 times followed by the investigation on neutrophil

chemotaxis related index and ileum damage in rats, and on TLR4- and NALP3-signaling pathways, the pro-inflammatory condition in various tissues/organs, levels of antimicrobial peptides and tight junction proteins of ileum, and cecal microbiota in mice. Results: None of the tested substances affect the growth of the experiment animals before the injection of LPS. In mice, TC, cin, and lin all reversed body wt loss and enlarge of lymphoid organs induced by LPS. TC lowered peripheral neutrophil density and peripheral levels of sL-selectin, sICAM-1, CINC-1, TNF- α , IL-1 β , and NO, and ameliorated cellular expression of CD11b/CD18 on neutrophils from rats. LPS-induced neutrophil infiltration and damage of ileum from rats were also reversed by TC concomitantly with lowered intestinal content of ICAM-1, CINC-1, TNF- α , IL-1 β , and NO. In mice, TC significantly lowered the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-18, IFN- γ , and NO in peripheral blood and in various tissues/organs, and inhibited the expression of signaling molecules of TLR4- and NLRP3-pathways and the activation of NF- κ B and caspase-1 in these tissues/organs, concomitantly with ameliorated ileum integrity. These activities of TC can be performed by cin and lin along. Furthermore, these TC components decreased levels of REG3- β , REG3- γ , CRP-ductin, and RETNL β , and increased levels of claudin-5 and ZO-1 in the ileum mucosa and altered cecal microbiota. Conclusion: TC and its active component cin and lin are potent anti-inflammatory substances for prophylactic use.

英文關鍵詞：adhesion molecules; anti-inflammatory hormone; antimicrobial peptides; caspase-1; chemotaxis; cinnamaldehyde; Cinnamomum osmophloeum Kanehira; ileum; leaf essential oil; infiltration; linalool; lipopolysaccharide; microbiota; mucosa; neutrophils; NF- κ B; NLRP3; systemic inflammatory response syndrome; tight junction protein; TLR4

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告
 期末報告

台灣土肉桂葉精油及其主要成分對於內毒素誘發之小腸黏膜損傷之保護作用及模式辨識受體TLR4與NALP3在其中扮演之角色

A Study on the protective effect of leaf essential oil from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum* Kanehira) on endotoxin-induced intestinal damage and the role of two pattern recognition receptors TLR4 and NALP3

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 101-2313-B-040 -008 -MY3

執行期間：一百零一年八月一日至一百零四年七月三十一日

執行機構及系所：中山醫學大學營養系

計畫主持人：劉承慈

共同主持人：李世傑、賴信志

計畫參與人員：王詩芸、倪曼婷、許捷盛、蔡幸芬、蔡幸紋

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 一 百 零 四 年 十 月 三 十 一 日

中文摘要及關鍵詞 (keywords)

目的：利用 *in vivo* 模式，觀察台灣土肉桂葉精油 (*Cinnamomum osmophloeum* Kanehira, TC) 抗發炎作用、相關機制、及活性成分。**方法：**於雄性 Wistar 大鼠灌食不同劑量 TC 共 8 次後，以 LPS 誘發系統性發炎反應症候 (SIRS)，觀察嗜中性球趨化活性相關指標，另於雄性 C57BL/6J 小鼠隔日灌食不同劑量 TC、枷羅木醇、或肉桂醛共 8 次後，以 LPS 誘發 SIRS，觀察小鼠周邊及臟器發炎指標及迴腸組織形態、障壁蛋白和抑菌蛋白含量、盲囊菌相及 TLR4 與 NLRP3 訊號路徑活性，驗證枷羅木醇及肉桂醛是否為 TC 抗發炎作用的主要活性成分及其機制。**結果：**所有 TC 及其組成分之試驗劑量均不影響實驗動物生長及注射 LPS 動物之組織及臟器重/體重百分。TC 顯著逆轉 LPS 誘發之大鼠周邊嗜中性球密度上升及 CD11b/CD18 表現量，並降低周邊血 sL-selectin、sICAM-1 及 CINC-1、TNF- α 、IL-1 β 及 NO 濃度及腸黏膜 ICALM-1、CINC-1、TNF- α 、IL-1 β 及 NO 含量，同時改善迴腸嗜中性球浸潤程度及腸黏膜形態學。在小鼠 TC 顯著降低 LPS 誘發之周邊血中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、IFN- γ 、及 NO 上升並抑制腸繫膜淋巴結與迴腸黏膜之 TLR4、MyD88、MD2、NLRP3、ASC、及 caspase-1 表現量及組織中 NF- κ B 活化和 caspase-1 活性，改善迴腸黏膜 NO 含量及 xanthine oxidase 活性，並改善迴腸絨毛水腫。進一步觀察確認 TC 可透過其組成分中肉桂醛和枷羅木醇減緩 LPS 造成之體重流失及脾臟和腸繫淋巴結腫大，改善脾臟及、肝臟及腸繫淋巴結 NO 和 TNF- α 、IFN- γ 之含量，伴隨抑制脾臟、腸繫淋巴結、及迴腸黏膜中 TLR4、MD2、MyD88、NLRP3、ASC、Caspase-1 表現量、NF- κ B 活化程度及 caspase-1 活性。TC 透過活性成分對於 MyD88 表現量之抑制作用，亦降低 LPS 誘發之迴腸黏膜抗微生物肽 REG3- β 、REG3- γ 、CRP-ductin 及抗發炎荷爾蒙 RETNL β 含量，並降低迴腸組織中嗜中性白血球浸潤及逆轉 tight junction 結構蛋白 claudin-5 和 ZO-1 之流失，保護迴腸絨毛形態。盲囊中 microbiota 豐富度及菌種分布之改變顯示 TC 及其活性成分可能透過對於腸道微生物生態之影響間接調節免疫反應，提供保護作用。**結論：**本研究證實 TC 在系統性發炎之抗發炎及迴腸保護作用，指出肉桂醛及枷羅木醇為其主要活性成分，並提出此作用係透過抑制嗜中性球趨化活性及降低 TLR4 訊號路徑和 NLRP3 發炎體活性所致。而 TC 及其活性成分在 LPS 誘發迴腸黏膜之保護作用，伴隨 tight junction 蛋白上升，顯示其可促進腸道障壁功能，具有應用於抗發炎及促進腸道健康之保健產品的潛力。

關鍵詞

台灣土肉桂；葉精油；枷羅木醇；肉桂醛；脂多醣；TLR4；NLRP3；caspase-1；NF- κ B；系統性發炎反應症候；迴腸；黏膜；嗜中性球；黏附分子；趨化作用；組織浸潤；抗菌肽；抗發炎荷爾蒙；tight junction 蛋白；微生物相

英文摘要及關鍵詞 (keywords)

Aim: To investigate the anti-inflammatory effect and the underlying mechanism of leaf essential oil from *Cinnamomum osmophloeum* kanehira (TC) *in vivo* and to clarify whether cinnamaldehyde (cin) and linalool (lin) being two major bioactive compositions in TC. **Methods:** Male Wistar rats or C57BL/6J mice were injected with LPS (ip) after receiving gavaged with various doses of TC, cin, or lin every other day for 8 times followed by the investigation on neutrophil chemotaxis related index and ileum damage in rats, and on TLR4- and NALP3-signaling pathways, the pro-inflammatory condition in various tissues/organs, levels of antimicrobial peptides and tight junction proteins of ileum, and cecal microbiota in mice. **Results:** None of the tested substances affect the growth of the experiment animals before the injection of LPS. In mice, TC, cin, and lin all reversed body wt loss and enlarge of lymphoid organs induced by LPS. TC lowered peripheral neutrophil density and peripheral levels of sL-selectin, sICAM-1, CINC-1, TNF- α , IL-1 β , and NO, and ameliorated cellular expression of CD11b/CD18 on neutrophils from rats. LPS-induced neutrophil infiltration and damage of ileum from rats were also reversed by TC concomitantly with lowered intestinal content of ICALM-1, CINC-1, TNF- α , IL-1 β , and NO. In mice, TC significantly lowered the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-18, IFN- γ , and NO in peripheral blood and in various tissues/organs, and inhibited the expression of signaling molecules of TLR4- and NLRP3-pathways and the activation of NF- κ B and caspase-1 in these tissues/organs, concomitantly with ameliorated ileum integrity. These activities of TC can be performed by cin and lin along. Furthermore, these TC components decreased levels of REG3- β , REG3- γ , CRP-ductin, and RETNL β , and increased levels of claudin-5 and ZO-1 in the ileum mucosa and altered cecal microbiota. **Conclusion:** TC and its active component cin and lin are potent anti-inflammatory substances for prophylactic use.

Keywords: adhesion molecules; anti-inflammatory hormone; antimicrobial peptides; caspase-1; chemotaxis; cinnamaldehyde; *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira; ileum; leaf essential oil; infiltration; linalool; lipopolysaccharide; microbiota; mucosa; neutrophils; NF- κ B; NLRP3; systemic inflammatory response syndrome; tight junction protein; TLR4

目錄

| | |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| 中文摘要及關鍵詞 | I |
| 英文摘要及關鍵詞 | II |
| 目錄 | III |
| 報告內容 | 1 |
| 一、前言 | 1 |
| 二、研究目的 | 1 |
| 三、文獻探討 | 1 |
| 四、研究方法 | 5 |
| (一) 土肉桂葉精油之製備及成份分析 | 5 |
| (二) 實驗動物處理 | 5 |
| (三) 樣本收集及製備 | 6 |
| (四) 生化分析 | 7 |
| (五) 酵素活性分析 | 7 |
| (六) 西方墨點法分析 | 8 |
| (七) 流式細胞儀分析 | 8 |
| (八) 迴腸組織學分析 | 8 |
| (九) 微生物 DNA 定序技術 | 9 |
| (十) 統計分析 | 9 |
| 五、結果與討論 | 10 |
| 實驗一 | 10 |
| 1-1 土肉桂葉精油影響嗜中性球與血管黏附活性之劑量效應 | 10 |
| (一) 大鼠代謝特徵與臟器、脂肪及骨骼肌重量 | 10 |
| (二) 大鼠周邊血中嗜中性球密度及 CD11/CD18 表現量 | 10 |
| (三) 大鼠周邊血 sL-selectin、sICAM-1、CINC-1 含量 | 10 |
| (四) 大鼠周邊血促發炎激素 TNF- α 、IL-1 β 及 nitrate/nitrite 濃度 | 11 |
| (五) 大鼠小腸黏膜上皮層黏附因子 ICAM-1、趨化因子 CINC-1 含量 | 11 |
| (六) 大鼠小腸黏膜上皮層促發炎激素 TNF- α 、IL-1 β 及 nitrate/nitrite 含量 | 11 |
| (七) 大鼠迴腸黏膜嗜中性球浸潤指標 MPO 活性 | 11 |
| (八) 大鼠迴腸組織完整性 | 11 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1-2 土肉桂葉精油影響系統發炎及腸道損傷之劑量效應 | 12 |
| (一) 小鼠體重變化幅度與誘發系統性發炎後小鼠臟器體重百分比 | 12 |
| (二) 小鼠血漿中促發炎激素 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、IL-18 及 nitrate/nitrite 含量 | 12 |
| (三) 小鼠腸繫膜淋巴結及迴腸黏膜中 TLR4、MD2、MyD88 之表現量及細胞核萃取物 NF- κ B 含量 | 12 |
| (四) 小鼠腸繫膜淋巴結及迴腸黏膜中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量及 caspase-1 活性 | 13 |
| (五) 小鼠迴腸黏膜 nitrate/nitrite 含量及 xanthine oxidase 活性 | 13 |
| (六) 小鼠小腸組織形態學 | 13 |
| 實驗二 | 13 |
| 土肉桂葉精油活性成分肉桂醛及枷羅木醇對於系統發炎相關之淋巴組織活化之影響 | 13 |
| (一) 小鼠生長代謝值和體重、臟器重變化幅度 | 14 |
| (二) 小鼠血漿、肝臟、脾臟、及腸繫膜淋巴結中 nitrate/nitrite 與促發炎細胞激素含量 | 14 |
| (三) 小鼠脾臟及腸繫膜淋巴結中 TLR4、MD ₂ 、MyD88 表現量 | 16 |
| (四) 小鼠脾臟及腸繫膜淋巴結中核萃取物 NF- κ B 含量 | 16 |
| (五) 小鼠脾臟及腸繫膜淋巴結中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量 | 16 |
| (六) 小鼠脾臟及腸繫膜淋巴結中 caspase-1 活 | 17 |
| (七) 小鼠脾臟中 xanthine oxidase 活性 | 17 |
| 實驗三 | 17 |
| 土肉桂葉精油活性成分肉桂醛及枷羅木醇對於系統發炎相關之腸黏膜損傷及腸道 microbiota 調節之影響 | 17 |
| (一) 小鼠迴腸黏膜組織中發炎反應相關指數 | 18 |
| (二) 小鼠迴腸黏膜組織中抗菌蛋白與抗發炎荷爾蒙含量 | 18 |
| (三) 小鼠迴腸黏膜中 TLR4、MD2、MyD88 表現量 | 19 |
| (四) 小鼠迴腸黏膜中核萃取物 NF- κ B 含量 | 19 |
| (五) 小鼠迴腸黏膜中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量 | 20 |
| (六) 小鼠迴腸黏膜中 caspase-1 活性 | 20 |
| (七) 小鼠迴腸黏膜中 xanthine oxidase 活性 | 20 |
| (八) 小鼠腸道外觀及迴腸組織形態學 | 21 |
| (九) 小鼠迴腸組織嗜中性球浸潤 | 21 |
| (十) 小鼠迴腸組織 claudin-5、ZO-1 含量 | 21 |
| (十一) 小鼠盲囊內容物 microbiota 特性 | 22 |
| 六、結論與建議 | 22 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 參考文獻 | 24 |
| 附表與附圖 | 30 |
| 表一、正常控制組及灌食不同劑量土肉桂精油之注射 LPS 各組大鼠臟器重/體重百分比 ... | 31 |
| 表二、正常控制組及灌食不同劑量土肉桂精油之注射 LPS 各組大鼠血清中促發炎激素 TNF- α 、IL-1 β 及 NO 含量的影響 | 32 |
| 表三、正常控制組及灌食不同劑量土肉桂精油之注射 LPS 各組大鼠迴腸黏膜上皮層 ICAM-1、 CINC-1、促發炎激素、NO 含量的影響 | 33 |
| 表四、正常控制組及灌食不同劑量土肉桂精油之注射 LPS 各組小鼠臟器重/體重百分 比 | 34 |
| 表五、正常控制組及灌食不同劑量土肉桂精油之注射 LPS 各組小鼠周邊血中 nitrate/nitrite 及促發炎細胞激素濃度 | 35 |
| 表六、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或枷羅木醇之注射 LPS 各組小鼠生長代謝值 | 36 |
| 表七、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或枷羅木醇之注射 LPS 各組小鼠臟器/體重百 分比之影響 | 37 |
| 表八、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或枷羅木醇之注射 LPS 各組小鼠血漿中促發炎 激素及 Nitrate/nitrite 濃度 | 38 |
| 表九、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或枷羅木醇之注射 LPS 各組小鼠脾臟中促發炎 激素及 Nitrate/nitrite 含量 | 39 |
| 表十、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或枷羅木醇之注射 LPS 各組小鼠肝臟中促發炎 激素及 Nitrate/nitrite 含量 | 40 |
| 表十一、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或枷羅木醇之注射 LPS 各組小鼠腸繫膜淋 巴結中促發炎激素及 Nitrate/nitrite 含量 | 41 |
| 表十二、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或枷羅木醇之注射 LPS 各組小鼠迴腸黏膜 中促發炎激素及 Nitrate/nitrite 含量 | 42 |
| 表十三、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或枷羅木醇之注射 LPS 各組小鼠迴腸黏膜 中抗菌蛋白及抗發炎荷爾蒙含量 | 43 |
| 圖一、灌食土肉桂葉精油對於注射 LPS 之大鼠生長代謝的影響 | 44 |
| 圖二、灌食土肉桂精油對於注射 LPS 之大鼠血液嗜中性球密度的影響 | 45 |
| 圖三、灌食土肉桂葉精油對於注射 LPS 之大鼠嗜中性球表面黏附分子表現量的影 | 46 |
| 圖四、灌食土肉桂葉精油對於注射 LPS 之大鼠血清中可溶性黏附分子和化學激素含量的影響 | 47 |
| 圖五、灌食土肉桂葉精油對於注射 LPS 之大鼠迴腸黏膜 MPO 活性的影響 | 48 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 圖六、灌食土肉桂葉精油對於注射LPS之大鼠迴腸黏膜組織形態學的影響 | 49 |
| 圖七、土肉桂葉精油對於注射 LPS 小鼠迴腸黏膜和腸繫膜淋巴結 TLR4、MD2、MyD88 表現量的影響 | 50 |
| 圖八、土肉桂葉精油對於注射 LPS 小鼠迴腸黏膜和腸繫膜淋巴結細胞核萃取物中 NF- κ B 含量之影響 | 51 |
| 圖九、土肉桂葉精油對於注射 LPS 小鼠迴腸黏膜和腸繫膜淋巴結 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量的影響 | 52 |
| 圖十、土肉桂葉精油對於注射 LPS 小鼠之迴腸黏膜及腸繫膜淋巴結 caspase-1 活性之影響 | 53 |
| 圖十一、土肉桂葉精油對於注射 LPS 小鼠之迴腸黏膜 nitrate/nitrite 含量和 xanthine oxidase 活性之影響 | 54 |
| 圖十二、灌食土肉桂葉精油對於注射 LPS 之小鼠迴腸形態學之影響 | 55 |
| 圖十三、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠淋巴組織 TLR4、MD ₂ 、MyD88 表現量之影響 | 56 |
| 圖十四、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠淋巴組織細胞核萃取物中 NF- κ B 含量之影響 | 57 |
| 圖十五、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠淋巴組織 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量之影響 | 58 |
| 圖十六、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 小鼠淋巴組織中 Caspase-1 活性之影響 | 59 |
| 圖十七、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠臟器中 xanthine oxidase 活性之影響 | 60 |
| 圖十八、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸黏膜中 TLR4、MD ₂ 、MyD88 表現量之影響 | 61 |
| 圖十九、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸黏膜細胞核萃取物中 NF- κ B 含量之影響 | 62 |
| 圖二十、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸黏膜中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量之影響 | 63 |
| 圖二十一、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸黏膜中 caspase-1 活性含量之影響 | 64 |
| 圖二十二、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸組織形態學之影響 | 65 |
| 圖二十三、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸組織嗜中性球 | |

| | |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 浸潤之響 | 66 |
| 圖二十四、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸組織 tight junction 蛋白質含量之影響 | 67 |
| 圖二十五、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠盲囊 microbiota 特性之影響 | 68 |
| 計畫成果自評 | 69 |

報告內容

一、前言

生物體於創傷或感染發生急性免疫反應期間，先天免疫系統透過巨噬細胞、dendritic cells、單核球、嗜中性球、及NK 細胞等免疫細胞，甚或血管內皮及黏膜腔上皮細胞等非典型免疫系統細胞表面或胞內之各種模式辨識受體(pattern recognition receptors; PRRs)，感測病原相關分子模式(pathogen associated molecular patterns; PAMPs)或損傷相關分子模式(damage associated molecular patterns; DAMPs)，感測壓力並啟動各種發炎中介物之產生，調節發炎反應，以幫助修復傷口及清除感染原，為宿主重要的防禦性反應。然而當發炎反應過度向上調節，會導致組織發炎性損傷，是臨床上導致系統性發炎反應症候(systemic inflammatory response syndrome; SIRS)的重要原因，其最終導致嚴重敗血症之多重器官衰竭。雖然過去已有許多研究致力於了解敗血症複雜的致病機制，以引導相關之醫藥研發方向，但敗血症死亡率仍高達18~50%，且為西方國家十大死因及ICU常見死因之一 [Levy et al., 2010; van der Poll and Opal, 2008]，這顯示仍待發展出對於SIRS及敗血症有用之防治方法。在由SIRS發生至發展出嚴重敗血症之多重器官衰竭的急性發炎反應過程中，嗜中性球趨化作用在組織損傷扮演重要角色，其中腸道障壁損傷造成重症病患繼發性感染，並惡化發炎反應，因而目前有越來越多研究針對SIRS之於腸道功能影響的機制加以探討。腸道免疫系統為人體免疫系統重要的一環，上皮完整性提供宿主物理性障壁、而其與免疫細胞透過細胞激素等調節因子之交互作用則形成免疫學障壁。此外，腸道障壁的活性也受到腸腔微環境影響，而此微環境主要牽涉到腸道菌相之變化，故防治由SIRS發生至發展出多重器官衰竭的醫藥方法，最好能協調發炎細胞活性與腸道障壁功能及腸道菌相三者間的交互作用。目前已知格蘭氏陰性菌細胞外壁成分lipopolysaccharide (LPS; 又稱內毒素)為誘發SIRS的重要分子，故過去許多研究以LPS 之PRR--TLR4(toll-like receptor 4) 訊號路徑為介入標的。近年來，許多研究指出，NLRs (Nod-like receptors)也在內毒素所致之多種組織損傷中扮演重要角色，特別是其中NALP3 的訊號路徑。已知台灣土肉桂葉精油據也包括抗發炎及抗氧化之多重生物學活性。本計畫利用LPS誘發之SIRS，觀察台灣土肉桂葉精油對於嗜中性球趨化活性之影響，並觀察其如何透過影響腸道上皮與免疫細胞之TLR4 與NALP3 訊號路徑，在內毒素誘發之SIRS 提供保護性作用。而由於腸道菌相可直接或間接影響腸道上皮及免疫細胞之PRRs 活化，故土肉桂葉精油對於腸道菌相之影響也將是本計畫討論TLR4與NALP3角色的觀察標的。

二、研究目的

我們過去發現枷羅木醇型土肉桂葉精油在糖尿病動物具有抗發炎活性，本計畫觀察其是否可改善LPS誘發之嗜中性球趨化活性，及是否透過調節先天免疫系統中的模式辨識受器TLR4及NLRP3訊號路徑改善系統性發炎反應引起之腸黏膜損傷並改善障壁功能。而由於腸道菌相之變化也會影響腸道黏膜平衡發炎反應之能力，故本研究之另一目的為瞭解土肉桂葉精油在LPS誘發之系統性發炎反應中對於腸道菌相之影響，以利進一步瞭解此腸道菌相變化與LPS誘發之腸道黏膜損傷及免疫組織TLR4及NALP3訊號路徑活化之關聯。此外，本研究除計畫觀察在組成分中含量最高(約40%)的枷羅木醇是否為此精油抗發炎的主要功能性成分外，也計畫觀察精油中肉桂醛(約7%)是否也在此精油的抗發炎活性中扮演一個角色，並同時釐清肉桂醛在LPS誘發之SIRS的抗發炎機制。

三、文獻探討

系統性發炎反應是一種急性全身性發炎反應，往往會進行成敗血症之多重器官衰竭，是為造成重症病患死亡的主因 [Matsuda and Hattori, 2006; Dellinger et al., 2008]。腸黏膜障壁在體內免疫防禦系統中扮演極重要的角色，除了具有gut associated lymphoid tissue 之外，完整排列的腸黏膜單層上皮細胞本身具有物理性障壁功能並表現先天免疫之模式辨識受體(pattern recognition

receptors; PRRs)及相關之訊號路徑，在受到腸道微生物及免疫細胞調節因子作用下，腸道上皮產生具有免疫調節作用的分子[Maldonado-Contreras and McCormick, 2011]。在壓力狀態下，腸道障壁功能受損已知是臨床上造成重症病患伺機感染的主要原因之一[O' Boyle et al., 1998; Zhang et al., 2007]。以非致命劑量之內毒素(LPS)誘發健康人體及實驗動物之系統性發炎時，均顯示破壞腸黏膜障壁功能，在實驗動物進一步發現此舉會導致腸道微生物穿越腸黏膜障壁，並惡化發炎反應或發展出器官組織損傷[O' Dwyer et al., 1988; Deitch et al., 1989]。我們及其他研究者以LPS誘發實驗動物SIRS在腸黏膜損傷的研究均發現，腸黏膜局部氧化壓力增加及透過iNOS大量產生NO會伴隨黏膜細胞壞死與凋亡[Chamulitrat et al., 1996; Chiang et al., 2006]。大量NO也導致系統血壓下降，使得組織出現缺血(ischemia)情況，此可促進腸上皮細胞xanthine oxidase (XO)大量活化並釋出氧自由基，特別是在迴腸[Assimakopoulos et al., 2005]，因而形成持續活化局部發炎反應的惡性循環。近年來對於PRRs的研究指出，壞死及凋亡的細胞可進一步透過釋放damage associated molecule patterns (DAMPs)，活化NLRs訊號路徑，增加促發炎細胞激素及趨化分子釋放[Zheng et al., 2011]，加上缺血後復甦(ischemia-reperfusion)使組織細胞湧入大量促發炎調節物，增加血管通透性及吸引嗜中性球趨化及活化，惡化嗜中性球之浸潤及組織損傷[Balzan et al., 2007]，此亦為造成腸道上皮細胞障壁二次傷害的重要原因。

在系統性發炎反應期間，周邊血中的嗜中性球經由表現於其細胞表面之黏附分子(如 α 2 integrin)及與血管壁之黏附分子(如Intercellular adhesion molecule-1; ICAM-1)交互作用而穿越血管壁，活化的嗜中性球表面黏附分子如L-selectin 及活化之內皮細胞表面黏附分子如ICAM-1 會自細胞剝落，因而可在血清中分別測得游離態L-selectin (sL-selectin) 及游離態ICAM(sICAM-1)當做這些細胞活化之指標[Leeuwenberg et al., 1992; Furie et al., 1995; Shimada et al., 1999; Kuo et al., 2011; Lee et al., 2012]。穿越血管壁之嗜中性球，沿著組織中的 chemoattractants 如人類的IL-8及鼠科的cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) 之濃度梯度遷移到感染或組織受傷的位置[20]，並進行吞嗜、殺菌、及藉由蛋白水解酶破壞微生物或清除受損基質蛋白，但同時也造成組織受傷，此過程也是組織發炎性損傷的病理生理學重要的一環。因而，利用阻斷黏附分子來抑制嗜中性球與血管內皮細胞交互作用也被建議可做為一種抗發炎策略 [Leung and Panaccione, 2008; Stefanelli et al., 2008]。我們及其他學者的研究發現，在注射LPS的動物模式造成血中嗜中性白血球數目增加、嗜中性球表面 α 2 integrin CD11b/CD18 表現量增加、及週邊血中sL-selectin 與sICAM-1濃度上升 [Witko-Sarsat et al., 2000; Wang et al., 2002; Kuo et al., 2011; Lee et al., 2012]，且我們發現注射LPS增加也增加腸黏膜ICAM-1含量，伴隨著局部IL-1 β 、TNF- α 、及CINC-1含量增加，以及代表嗜中性球浸潤之小腸黏膜MPO活性增加及小腸黏膜的破損[Kuo et al., 2011; Lee et al., 2012]，這些發現顯示注射LPS的動物模式適於用來研究SIRS及其併發之腸道問題。

已知LPS是TLR4的一個主要的配體，當革蘭氏陰性菌入侵宿主後其細胞壁的LPS會與血漿蛋白LBP (LPS-binding protein) 結合成為LPS-LBP complex，再與細胞膜上有標記CD14的細胞結合，接著與細胞膜上的TLR4及輔助蛋白MD2交互作用，形成TLR4-MD2-CD14 receptor complex，誘使adaptor蛋白myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88) 活化 (Zanoni and Granucci, 2013)，繼而活化IKKs，讓原本在細胞質中未活化的NF- κ B與I κ B分離，使NF- κ B成活化態後進入細胞核內調控發炎相關基因表現 (Anwar and Choi, 2014)。其中NF- κ B家族是由各種物件組成，有p50 (NF κ B1)、p52 (NF- κ B2)、p65 (RelA)、RelB和c-Rel，從而形成homodimers和heterodimer，而p50和p52分別是p105和p100的前驅物，一但LPS刺激轉錄因子NF- κ B活化，則主要是由p50/p65 heterodimer complex啟動發炎基因轉錄作用 (Fan and Cook, 2004)，其導致前抗發炎細胞激素產生和發炎調節基因的表現 (圖 2-4)，包括iNOS、COX-2、pro-IL-1 β 、pro-IL-18、IL-6、IL-12、和TNF- α (Barnes and Karin, 1997; Yoon et al., 2015; Black et al., 2013)。

在敗血症之實驗動物模式及敗血症病患，TLR4 之表現顯著受到上調 [Armstrong et al., 2004; Tsujimoto et al., 2005]，且在健康志願者以 LPS challenge 也會造成周邊白血球 TLR4 表現量增加 [Wittebole et al., 2005]。反之在 In vivo 研究發現，具有突變形式 TLR4 的小鼠對於 LPS 刺激造成的發炎反應低下 [Hoshino et al., 1999]，並且在 MyD88 分子功能幸喪失的小鼠也有對於 LPS-誘發之休克的抵抗性，並伴隨抑制 MAPK 與 NF- κ B 之活化 [Kawai et al., 1999]，而在敗血症抑制大規模 NF- κ B 活化，亦導致降低發炎反應 [Li et al., 2009]。除了 LPS 刺激外，近年的研究發現，TLR4 訊號路徑也受到內生性釋放之 DAMPs 活化，其中包括由受傷組織釋放的高 mobility group box-1 (HMGB-1；亦稱 HMG-1) [Yu et al., 2006; Klune et al., 2008; Park et al., 2006]。過去認為發炎細胞之 TLR4 受到 LPS 刺激是造成系統性發炎反應的主要原因，而近來有研究數據顯示，黏膜上皮之 TLR4 對於 LPS 之反應與腸道組織受傷之病理生理學變化關係也很密切。已知腸道上皮細胞 (IECs)，包括大鼠 IEC-6 腸細胞、初代 colonocytes、HT-29、及 T84 colonocytes、及小鼠結腸 CMT93 cells 都表現 TLR4，且也表現 MD-2 及 MyD88 [Gribar et al., 2008]。TLR 4 可 constitutively 表現於上皮細胞且可能在宿主的黏膜防禦機制中對抗格蘭氏陰性菌扮演重要角色。

NLRP3 屬於 PRRs 中胞漿可溶性蛋白 NLRs 家族的一個次分類族群，位於胞漿，主要受到特定胞內 PAMPs 如細菌之 pore-forming exotoxins [Kapararakis et al., 2007; Ye et al., 2008] 或 DAMPs 如受損細胞或組織產生之危險訊號如 XO 活化所產生之大量尿酸形成結晶、胞外上升之 ATP 濃度 [Mariathasan et al., 2006; Martinon et al., 2006] 而被活化。LPS 雖然不直接活化 NLRP3，但可透過刺激 TLR 誘發 NLRP3 基因表現，而擴大其訊號路徑引起之反應。此外，LPS 也間接透過活化 NF- κ B 轉錄和 MAPK 調控發炎相關的訊號路徑產生 iNOS，造成生物體內血漿、組織之 NO 含量上升 (Deng et al., 2015)，促使身體血管舒張、血壓下降，導致供氧量減少造成全身氧壓降低 (Forstermann and Sessa, 2012)，活化 XO 進而促使尿酸增加 (Rock et al., 2013) 而刺激 NLRP3 之活化。活化時 NLRP3 透過 pyrin-domain 與 adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein) 結合，接著經 CARD-CARD 的交互作用使 pro-caspase-1 結構的 CARD domain 與 ASC 的 CARD domain 相互接合 (Latz et al., 2013; Lamkanfi and Dixit, 2014)，最終促使 pro-caspase-1 轉變成活化態的 caspase-1 (Jiang et al., 2015)。活化後的 caspase-1 會輔助 TLR4 發炎訊號路徑中轉錄作用產生的不具活性之 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 轉變成具有活性之 IL-1 β 及 IL-18 釋出胞外 (Martinon et al., 2009; Lukens et al., 2012; Madouri et al., 2015)，因而成為發炎反應中不可或缺的角色。近來的研究發現，缺乏 NLRP3 有助於對抗致命性內毒素血症 [Sutterwala et al., 2006]，而缺乏 ASC 的小鼠也對於 LPS 誘發之內毒素休克有抵抗性 [Yamamoto et al., 2004]，因而有學者推論 NALP3 發炎體在敗血症致病機制的重要角色，並且許多學者相繼研究其下游 pathway 與敗血症及內毒素血症的關係。近年來，Ganz et al. [2011] 發現，注射 LPS 的小鼠肝臟損傷與局部 Nalp3、ASC 及 caspase-1 表現量增加有關，並伴隨 IL-1 β 與 IL-18 含量增加。

腸道在個體出生後，立刻被環境中的微生物所移生。腸道中約有 300 - 500 種不同品種微生物構成腸道常存菌，而根據宿主的生長、年齡、飲食及環境因素會影響腸道 flora 定性及定量上的差異性 [Simon et al., 1984; Berg et al., 1997]。腸道完整性及障壁功能之維持，主要依賴腸道上皮、黏膜免疫系統、及 flora 間適當之交互作用。在上消化道，包括胃、十二指腸與空腸，細菌含量都不高且主要菌種為好氧性格蘭氏陽性菌 (格蘭氏陽性 lactobacilli 及 enterococci)。在迴腸，細菌濃度大舉上升，且主要菌種為 coliforms。在迴盲瓣之後，細菌濃度再度增加，最具代表性的菌種為 Bacteroides、Bifidobacteria、Clostridi 與 Lactobacilli [Simon et al., 1984; Berg et al., 1996]。正常下，正常黏膜菌相透過局部產生之有機酸降低 pH、產生天然抗微生物物質、影響腸道中的營養環境、及影響微生物黏附於上皮之位置保護宿主組織免於微生物入侵，且其透過與上皮細胞接觸直接或透過擴散其產物間接與上皮交互作用並調節免疫系統，以平衡宿主防禦機制，抑制外來抗原而與又能常存菌和

平共處[Ohland et al., 2010]。有研究顯示當病原性Salmonella typhimurium進入MAMC (mucosa-associated microbial community)時，常存菌透過上皮MyD88-dependent pathway對宿主發出有病原菌存在的訊號，導致上調抗微生物肽(包括Reg III-gamma 及 -beta、CRP-ductin)，及抗發炎之腸道hormone beta-resistin like molecule (RELM)之表現，並減少S. typhimurium 穿越上皮[Vaishnava et al. 2008]，這可能預預防發炎而改善上皮通透性有關，然而尚不清楚是何種常存菌提供此作用。

在黏膜障壁受損期間，衍生自腸道的微生物發生位移(translocation)，使原本正常下無害的腸道細菌轉而為有害病原。此外，由於腸道上皮細胞暴露於腸道菌及其產物之刺激下，故腸道菌有可能在發炎之病理狀態下加強發炎作用，或因腸腔細菌密度及種類變化，改變腸細胞內PRRs(包括TLR4及NALP3)活化特性，導致惡化腸細胞發炎性損傷[Hausmann et al., 2002; Scharl et al., 2010]。少數近年在重症病患的研究發現，在SIRS患者腸道總絕對厭氧菌(obligate anaerobes)數目的降低及病原性細菌在腸道之增加與敗血症併發症及死亡率有關[Shimizu et al., 2007]、對糞便的分析顯示腸道功能不佳的重症患者比功能良好的患者具有顯著較低數量之總絕對厭氧菌包括Bacteroidaceae及Bifidobacterium，及較高數量之Staphylococcus，並伴隨較低濃度之acetic acid及propionic acid、及較高濃度之succinic acid與乳酸；且前者具有較高菌血症發生率(86%vs 18%)及死亡率(64%vs 20%) [Shimizu et al., 2011a; Shimizu et al., 2011b]。因而，若能逆轉此種腸道菌相，可能有利於對抗LPS誘發之腸道損傷甚至改善系統性發炎反應症候。

已知台灣土肉桂(Cinnamomum osmophloeum kanh.)葉精油具有多種實用價值。Chao et al. [2005]首度報導台灣土肉桂葉精油之抗發炎活性，其發現土肉桂葉精油在LPS 誘發之J774A.1巨噬細胞株有效抑制proIL-1beta 蛋白質表現量，IL-1beta 及IL-6 的產生，但該研究未釐出是精油中的何項成分具此功能。Rao et al. [2007]則發現，土肉桂皮之hexane、ethyl acetate 及甲醇萃取物可劑量依賴性抑制小鼠腹腔巨噬細胞在LPS/IFN-gamma 誘發下產生發炎性調節物--NO、TNF-alpha 與IL-12，並抑制iNOS 蛋白質表現，但該研究亦未釐出主要作用成分為何。Tung et al. [2008]發現土肉桂葉精油中的trans-cinnamaldehyde、caryophyllene oxide、L-borneol、L-bornyl acetate、eugenol、beta-caryophyllene、E-nerolidol、及cinnamyl acetate對於抑制LPS刺激RAW 264.7巨噬細胞株產生NO均有極佳效果。國內外的學者在各種肉桂成份的功能性研究中，均觀察到肉桂醛在發炎之實驗動物模式可抑制NF-kB活化，及NF-kB所促進之iNOS及COX-2基因轉錄[Kim et al., 2007]，並具抗氧化[Kim et al., 2007; Gowder and Devaraj, 2007]，與調節免疫細胞分泌細胞激素的種類之作用[Lin et al., 2011]。在活體外，肉桂醛也抑制LPS刺激之J774A.1巨噬細胞分泌IL-1beta、TNF-alpha及IL-6，及人類THP-1單核球產生IL-1beta及TNF-alpha，並抑制TLR4訊號路徑伴隨降低胞內proIL-1beta的含量[Chao et al., 2008]。肉桂醛已知的其他活性包括抑制高尿酸血小鼠xanthin oxidase活性[89]，及抑制微生物的作用[Wei et al., 2011]。土肉桂精油成分中的桉羅木醇，也被發現在大鼠可抑制carrageenan-誘發之腳掌水腫，且其在活體外實驗發現LPS-誘發之巨噬細胞株J774.A1可透過抑制iNOS活性降低NO產生[Peana et al., 2002; Peana et al., 2006]。因而，本計畫申請人認為非常值得探討土肉桂葉精油、肉桂醛及桉羅木醇之抗發炎作用及相關機制。

四、研究方法

(一) 土肉桂葉精油之製備及成份分析

- (1) 土肉桂葉原料：新鮮土肉桂(*Cinnamomum osmophloeum* Kaneh.)葉收集自國立嘉義大學實驗林場。
- (2) 土肉桂葉精油之製備：精油製備係根據李漢中等人[2003]的方法修改後進行。將土肉桂葉樣品(150 g)，以Clevenger-type 裝置進行水蒸餾2 h 收集揮發性精油，然後測定精油成分。葉精油儲存於氣密容器中及-20°C下，備用於gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)分析及抗發炎活性相關試驗。土肉桂葉精油經GC及GC/MS分析得知其中已知具活性之組成分包括linalool (40.24%)、cinnamaldehyde (6.87%) [Lee et al., 2013]。

土肉桂葉精油組成分

利用GC與GC/MS分析結果顯示精油中含有101種揮發性組成分，包括單萜類(monoterpenoids)、二倍半萜類(sesquiterpenoids)、醇類(alcohols)、酚類(phenols)、醛類(aldehydes)、酮類(ketones)、酯類(esters)、酸(acids)、及其它化合物(Table 1)。而精油中最主要之化合物一組成分百分比高低排序為：linalool (40.24)、trans-cinnamyl acetate (11.71)、camphor (9.38)、cinnamaldehyde (6.87)、3-phenyl-2-propenal (4.06)、caryophyllene (2.65)、coumarin (2.13)、bornyl acetate (1.72)、limonene (1.53)、 α -(+)-pinene (1.38)、estragole (1.31)、及caryophyllene oxide (1.00)。此12種化合物含量均超過組成分1%，且合計佔精油組成分83.99%。四種cinnamaldehyde congeners共佔精油18.96%，百分比高低依序為trans-cinnamyl acetate (11.71)、cinnamaldehyde (6.87)、cis-cinnamic acid (0.23)、及2-hydroxybenzaldehyde (0.14) (Table 1)。根據此分析結果，及學者對於土肉桂化學型之分類依據，顯示本研究所使用之土肉桂之化學型屬於linalool型，其佔組成分40.24%。肉桂醛在此精油中的含量則遠低於linalool。

(二) 實驗動物處理

實驗一、土肉桂葉精油抗系統性發炎反應與腸黏膜損傷之作用及抗嗜中性球趨化作用之劑量反應

在嗜中性白血球浸潤相關研究中，由於需收集嗜中性白血球進行觀察，而小鼠血液樣品量太小，嗜中性球收集不易，故以雄性Wistar大鼠進行實驗。四至六週齡大鼠在適應環境一週後分別以前試驗使用之低、中、高劑量(13、26、或54 mg/kgBW) TC灌食大鼠，並以灌食4 mL/kg載劑(玉米油)當作控制組，每隔一日灌食一次，共八次，然後以溶於生理食鹽水之Salmonella Tryphimurium之LPS (5 mg/mL/kg BW)對動物進行腹腔注射，並在注射後18小時犧牲[Kuo et al., 2011]。控制組則注射等量生理食鹽水。收集下腔靜脈血及迴腸。部分血液樣品用於觀察血中嗜中性球密度並分離嗜中性球，以流式細胞儀分析細胞表面CD11b、CD18表現量；部分血液備用於分析nitrate/nitrite、促發炎細胞激素、黏附因子、及趨化因子濃度。部分腸組織用於製備黏膜樣品，以分析L-selectin、ICAM-1、CINC-1、TNF- α 及IL-1 β 含量及MPO活性；部分腸段置入福馬林中固定，用於組織形態學分析及組織化學染色，觀察嗜中性球浸潤程度。飼育動物期間監測其生長代謝變化，並於犧牲時秤取其重要臟器重量，觀察其變化，動物處理流程如下圖一所示，惟大鼠在注射後18小時犧牲。

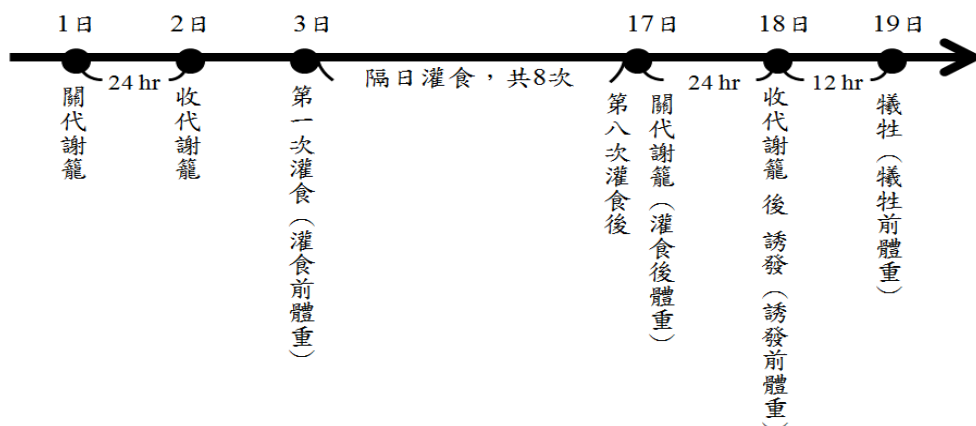
除嗜中性球實驗外，其於實驗皆以小鼠進行。約9週齡雄性小鼠在適應環境一週後分別灌食低、中、高劑量(6.5、13、26 mg/kg BW)之TC，並以灌食4 mL/kg載劑(玉米油)當作控制組，每隔一日灌食一次，共八次，最後一次灌食後隔日，灌食載劑組以腹腔注射生理食鹽水(4 mL/kg BW)或LPS (10 mg/kg BW)，其餘小鼠則注射LPS (10 mg/kg BW)並禁食12小時，然後以二氧化碳窒息法犧牲，收集下腔靜脈血及肝、脾、迴腸、腸繫膜淋巴結等組織樣品進行nitrate/nitrite、促發炎細胞激素含量分析；臟器樣品另備用於分析NF- κ B活化、caspase-1及xanthine oxidase活性、及NALP3、ASC、Caspase-1、TLR4、MD₂、MyD88表現量。部分腸段置入福馬林中固定，用於組織形態學分析。飼育動物期間監測其生長代謝變化，並於犧牲時秤取其重要臟器重量，觀察其變化，動物處理流程如下圖一所示。

實驗二、肉桂醛、伽羅木醇抗系統性發炎反應之作用與土肉桂葉精油之比較

約9週齡雄性 C57BL/6 小鼠在適應環境一週後，分別灌食 13 mg/kg BW 之 TC、伽羅木醇 (Lin, 2.6、5.2 mg/kg BW；分別相當 6.5、13 mg/kg BW TC 中的 Lin 含量)、或肉桂醛 (CA, 0.45、0.9 mg/kg BW；分別相當 6.5、13 mg/kg BW TC 中的 CA 含量)，並以灌食 4 mL/kg 載劑 (玉米油) 當作控制組，每隔一日灌食一次，共八次，最後一次灌食後隔日，灌食載劑組以腹腔注射生理食鹽水 (4 ml/kg BW) 或 LPS (10 mg/kg BW)，其餘小鼠則注射 LPS (10 mg/kg BW) 並禁食 12 小時，然後以二氧化碳窒息法犧牲，收集下腔靜脈血、肝、脾、腸繫膜淋巴結等組織。周邊血及部分肝、脾、腸系膜淋巴結備用於 nitrate/nitrite 及促發炎細胞激素含量分析；部分肝、脾、腸系膜淋巴結備用於 caspase-1 活性及胞核 NF- κ B 含量及 TLR4、MD₂、MyD88、NLRP3、ASC、Caspase-1 表現量分析；肝臟亦備用於分析 xanthine oxidase 活性。飼育動物期間監測其生長代謝變化，並於犧牲時秤取其主要臟器重量，觀察其變化，動物處理流程如下圖一所示。

實驗三、肉桂葉精油、肉桂醛及伽羅木醇對於腸道損傷、障壁功能、以及腸道微生物菌叢之影響

實驗動物處理及犧牲條件如實驗二，惟犧牲後收集迴腸黏膜及盲囊內容物。部分腸段用於分析黏膜組織中 nitrate/nitrite、促發炎細胞激素及抗微生物肽含量、NF- κ B 活化、caspase-1 及 xanthine oxidase 活性、及 NALP3、ASC、Caspase-1、TLR4、MD₂、MyD88 表現量；部分腸段置入福馬林中固定，用於組織形態學分析、並以組織免疫染色法分析嗜中性球浸潤程度及 tight junction 蛋白質表現量。盲囊內容物進行 microbiota 分析。



圖一、實驗動物處理流程

(三) 樣本收集及製備

- (1) **血液樣品收集**：動物以CO₂窒息犧牲，剪開腹部由下腔靜脈抽取血液，將血液製備成血清或血漿備用於定量分析 nitrate/nitrite、HMG-1 或細胞激素。在大鼠實驗中，一部分血液樣品則用於分離嗜中性白血球，以分析其主要黏附分子 CD11b/CD18 在細胞表面之表現量。
- (2) **迴腸組織樣品收集**：取出小腸後，立即以含有蛋白酶抑制劑之冰冷生理食鹽水沖洗並移除腸道內容物、血液及碎屑。由於十二指腸曲以下至迴盲瓣之間約前2/5為空腸，而後3/5為迴腸，故依此取樣迴腸，其中將最靠近迴盲瓣處的2 cm 浸泡於中性福馬林備用於組織學觀察，其餘部分如我們過去所述之方法立即製備成黏膜均質液 (Kuo et al, 2011)，並以液態氮冷凍，備用於化學激素 CINC-1，黏附分子 ICAM-1，細胞激素 IL-1 β 、IL-18、IFN- γ ，HMG-1 含量之分析，NALP3、ASC、caspase-1 與 TLR4、MD-2、MyD88 蛋白質表現量分析，caspase-1、xanthine oxidase、myeloperoxidase (MPO) 活性分析，NF- κ B 活化，及抗微生物肽之分析。另外，在部分實驗中，收集盲囊內容物，備用於腸道微生物 DNA 分析。
- (3) **其他組織樣品收集**：動物犧牲後立即取下肝臟、腎臟、脾臟及腸繫膜淋巴結秤重，其中脾臟及腸繫

膜淋巴結以液態氮冷凍，儲存於-20°C備用於IL-1beta、IL-18、IFN-gamma、HMG-1含量，NALP3蛋白質、ASC、caspase-1與TLR4、MD-2、MyD88、iNOS表現量，及NF-kB、caspase-1活性分析。

(4) **週邊血嗜中性球純化**：取含Sodium heparin全血以4:1(v/v)加入4.5% Dextran/Saline(w/v)混合均勻後，在37°C下沉降45分鐘，取出上層富含白血球之懸浮液於400g、25°C下離心10分鐘，以BSS清洗後於250g、25°C下離心10分鐘，以4ml BSS再懸浮細胞後利用Ficoll-Paque(Pharmacia Biotech)進行密度梯度離心，離心後顆粒型白血球伴隨少許污染之紅血球將位於最下層，以BSS清洗細胞後利用RBC lysis buffer破除污染之紅血球後，收集嗜中性球，再懸浮於RPMI-1640培養基或HBSS再懸浮後備用於Cdb/CD18流式細胞儀分析。此置備流程所獲得之顆粒性白血球經Trypan blue染色及細胞形態學判定，存活率及純度均分別在95%以上。

(5) **脾臟、迴腸黏膜、腸繫膜淋巴結細胞核萃取物製備**：將組織剪成小塊，每克重組織加入3 ml冰冷1 x Hypotonic Buffer，並加入3 μ l 1M DTT及10% Nonidet P-40，均質後以300 x g在4°C離心10分鐘，去除上清液，然後加入500 μ l 1 x Hypotonic Buffer，接著加入50 μ l 10% Nonidet P-40混勻，以14000 x g在4°C離心30秒，並去除上清。加入50 μ l 冰冷1 x Extraction Buffer，vortex後以14000 x g在4°C離心10分鐘，取上清存於-80°C備用於NF- κ B分析。

(6) **Western blotting樣品製備**：迴腸黏膜、腸繫膜淋巴結剪小塊後加入些許液態氮，以鉢磨碎後秤重，加入2~4倍的Ripa bufferr將樣品均質並破細胞，以10300 rpm在4°C下離心20分鐘，並取上清液存於-80°C備用，用以分析NALP3、ASC、Caspase-1、TLR4、MD₂、MyD88表現量。

(四) 生化分析

(1) **ELISA 分析**：血清或組織樣品中黏性分子 sICAM-1、ICAM-1、sL-selectin，促發炎細胞激素 IL-1、IL-18、IFN-gamma、HMG-1，化學激素 CINC-1，腸道抗微生物肽 REG3- β 、REG3- γ 、DMBT1，抗發炎腸道荷爾蒙 RETNL β 含量之定量分析，利用商業分析套組並依廠商說明之步驟進行。

(2) **細胞核NF-kB含量測定**：在哺乳類動物細胞中NFkB共包括五種蛋白質，雖然大部分NFkB都活化轉錄作用，但NFkB的p50/p65 heterodimer 在細胞中含量最大，故本研究利用用NF κ B p65 EZ-TFA Transcription Factor Assay Colorimetric 套組進行分析。將上述組織Nuclear Extraction製備物以Cayman NF- κ B (P-65) Transcription Factor Assay Kit分析。由於僅活化的NF- κ B可進入細胞核調節特定蛋白質轉錄作用，故細胞核萃取物中含有之NF- κ B可做為此轉錄因子活化之指標。

(3) **血漿及組織之nitrate/nitrite分析**：組織加入液態氮，以鉢磨碎後秤重，加入4~8倍PBS將樣品均質，然後以10000 x g在4°C下離心20分鐘，取上清液後進一步以100000 x g在4°C下離心30分鐘，取上清液進行分析。本實驗以Cayman Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit分析上述上清液及血漿。

(4) **蛋白質定量分析**：組織樣品中蛋白質定量分析係利用商業套組Bio-Rad protein assay kits (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)進行。

(五) 酵素活性分析

(1) **Caspase-1活性分析**：以Biovision Caspase-1/ICE Fluorometric Assay Kit分析Caspase-1之活性。將脾臟、腸繫膜淋巴結組織加入液態氮，以鉢磨碎後秤重，加入10 x lysis buffer均質樣品，然後根據廠商說明之步驟進行分析，各組酵素活性以SCO組之酵素活性為100%表示。

(2) **Xanthine Oxidase (XO)活性分析**：以Cayman Xanthine Oxidase Assay Kit分析，將迴腸黏膜組織加入5~10 ml/g XO Sample Buffer，均質後，以10000 x g在4°C離心15分鐘取得上清液，然後根據廠商說明之步驟進行分析，各組酵素活性以SCO組之酵素活性為100%表示。

(3) **Myeloperoxidase (MPO)活性分析**：根據Bradley等人所述，組織間MPO的活性測定可作為嗜中性球含量的enzyme marker，故可視為一種浸潤的指標。此項分析根據我們過去報導中使用的方法進行 [Kuo

et al., 2011], 各組酵素活性以SCO組之酵素活性為100%表示。

(六) 西方墨點法分析

組織樣品於液態氮中磨碎後秤重，加入兩倍的Ripa buffer 後均質樣品，以10300 rpm，4°C，20分鐘進行離心，離心後取上清液進行分析。上清液進行蛋白質定量，將蛋白質濃度定量到200 μ g/16 μ l，加入4 μ l 的5x sample buffer。sample 以乾熱器100°C加熱5分鐘，冰浴後備用。製備好的樣品在Bio-Rad 的系統下以SDS-PAGE(膠濃度依不同蛋白質分子量做適當調整)於Running buffer 中進行電泳(80~120v, 2hours)分離蛋白質。電泳結束後的膠片，於Transfer buffer 中以PVDF 膜進行蛋白質轉漬(80v, 90mins)，PVDF 膜須先泡在methanol 中活化。轉漬完成的PVDF 膜，置於含5% milk 的TBS 中並在室溫下進行blotting (2 h)，blotting 後以TBST 清洗膜(5mins/次，三次)。清洗完成後依分析項目分別加入一次抗體(Mouse anti-ASC; Rabbit anti-Caspase-1; Rabbit anti-NALP3; Rabbit anti-TLR4; Rabbit anti-MD-2抗體) 於4°C下反應過夜。隔天回收一次抗體，以TBST 清洗膜後(5mins/次，三次)，分別加入二次抗體(Goat anti-Mouse IgG，稀釋倍率1:5000 或Goat anti-Rabbit IgG，稀釋倍率1:5000，反應1小時後再以TBST 清洗membrane(5mins/次，三次)。清洗完成後將PVDF 膜以ECL 呈色，以冷光螢光數位影像儀器進行分析。以actin (1:5000)作為internal control。

(七) 流式細胞儀分析

嗜中性球黏附分子CD11b/CD18在細胞表面之含量以流式細胞儀進行分析。細胞以PBS調整密度至 $1 \times 10^6/100 \mu$ l後，以直接免疫螢光染色法分別加入10 μ l Mouse anti-Rat CD11b-FITC(AbD Serotec, MCA275FT) 與10 μ l Mouse anti-Rat CD18-RPE(AbD Serotec, MCA775PE)抗體雙螢光染色，於冰上暗反應30min後於250g、4°C下離心10分鐘，以冰冷PBS清洗兩次，將細胞以1ml冰冷PBS再懸浮，使用直徑35 μ m尼龍網篩(BD Falcon, NO. 352235)過濾至上機專用試管(BD Falcon, NO. 352052)後以流式細胞儀(FACS Calibur, BD)測量單位細胞之螢光強度。以SCO組細胞為negative control，每組分別收取圈選之顆粒球區域內10000顆細胞為代表，數據以軟體WinMDI2.8分析後以Mean fluorescence intensity(MFI)為統計依據。

(八) 迴腸組織學分析

(1) **Hematoxyline and eosin (HE) 染色:**將浸泡於10%經緩衝之中性福馬林之迴腸樣本以石臘包埋。切成厚度5 μ m組織切片並固定於玻片上，以二甲苯進行脫蠟，再以序列酒精(100%，95%，75%及50%)置換二甲苯。以二次水稍微沖洗後以 hematoxyline和eosin進行組織型態染色，染色後依序脫水且進行封片後以光學顯微鏡觀察迴腸絨毛損壞程度。

(2) **Myeloperoxidase (MPO)、claudin-5、及Zonula Occludens Protein-1 (ZO-1) 免疫組織染色:**如上製備之組織切片以PBS清洗，置於含3% H_2O_2 之Methanol，反應10分鐘，再加入trypsin於37°C反應20分鐘。以PBS清洗10分鐘，加入3% BSA後在37°C反應1小時進行blocking。以PBS清洗10分鐘，再分別浸至溶於1% BSA之一級抗體Goat anti-mouse myeloperoxidase polyclone antibody、Goat anti-mouse claudin-5 polyclone antibody、或Goat anti-mouse Zonula Occludens Protein-1 antibody，並在4°C下反應overnight。再以PBS沖洗3次，每次5分鐘，將切片與二級抗體Donkey anti-goat IgG antibody至於避光盒中，並放於37°C烘箱中反應一小時，接者以DAPI mounting medium 封片，以光學顯微鏡觀察其組織呈色反應。

(九) 微生物DNA定序技術:

(1) 盲囊內容物(Cecal stool)收集及DNA純化

犧牲時立即收集新鮮之小鼠盲囊內容物 (至少 0.5g)，並儲存於 -80°C 。利用 QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) 根據廠商說明書製備盲囊內容物之 DNA。

(2) V3-V5 16S rRNA amplification

利用primers F341 (5' - CCTACGGGNGGCWGCAG -3') 及 R805 (5' - GACTACHVGGGTATCTAATCC -3') 放大細菌16S rDNA的V3至V5 domain。每個樣品製備成50 μl PCR mix其中含有 25 ng DNA template, 5X KAPA HiFi 緩衝溶液, 10 mM KAPA dNTP Mix, 1 U/ μl KAPA HiFi DNA Polymerase (KAPA Biosystem, Boston, United States) 及0.3 μM 之各 primer (Tri-I, New Taipei, Taiwan)。PCR反應條件為起始溫度 95°C 下3 min, 之後在 98°C 下20 sec, 45°C 下15 sec, 及 72°C 下15 sec進行15-25 cycles, 然後在 72°C 下1 min 進行final extension。以QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)純化PCR產物, 並利用Qubit® dsDNA HS assay kit (Invitrogen, Grand Island, NY), 以Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Grand Island, NY)進行定量分析。根據Miseq建議的流程在illumina pyrosequencer platform進行PCR產物定序。

(3) 建庫(Library construction)及 Illumina MiSeq 定序

根據廠商建議的方法以Ovation® Ultralow DR Multiplex System 1-96 (NuGen, CA, United States) 建構paired-end library。以Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA) using a DNA 1000 lab chip (Agilent, Palo Alto, CA)分析library的濃度及特性。16S amplicon libraries之2 x 301 + 8 bp (index) 定序是根據廠商說明利用Miseq Reagent kit v3 (600 cycles) on Illumina MiSeq system進行。

利用以下數據分析技術比較不同組小鼠盲囊內容物之 microbiota:

1. 根據Lozupone et al [2006]提出之“Unique fraction metric” (UniFrac)方法分析bacterial diversity clustering
2. 將所得序列間有98%的相似度者, 歸為同一操作型分類單元(OTU)或單型(phylo type), 藉此建立親緣關係樹(phyllum tree);
3. 利用Caporaso et al [2010]所提出之QIIME方法分析DNA序列數據。

(十) 統計分析

各組分析所得數據以平均值加減一個正負標準差(mean \pm SD)表示, 統計利用SPSS 系統分析。本研究將利用Student' s t-test分析控制組與注射內毒素組間的差異, 並利用Duncan' s multiple-comparison test 分析以不同劑量之土肉桂葉精油、linalool、或cinamaldehyde處理並注射內毒素之小鼠組間的差異。P values <0.05代表據統計學上的意義。

五、結果與討論

實驗一

1-1 土肉桂葉精油影響嗜中性球與血管黏附活性之劑量效應 (撰寫投稿論文中)

(一) 大鼠代謝特徵與臟器、脂肪及骨骼肌重量

以 LPS 誘發 SIRS 前，大鼠灌食載劑玉米油 2 ml/kg BW (CO 組)，土肉桂葉精油 13 mg/kg Bw (TC-L 組)、26 mg/kg Bw (TC-M 組)、53 mg/kg Bw (TC-H 組) 或肉桂醛 40 mg/kg Bw (C-40 組) 期間，飼養於代謝籠內，紀錄其體重、攝食量、飲水量、尿液量與糞便量，並觀察生長代謝的情形。結果發現，各組體重隨灌食天數增加呈平穩上升，不同灌食組間體重變化並無顯著差異，且攝食量、飲水量、排尿量與排便量在組間也都無顯著差異，顯示灌食土肉桂葉精油及肉桂醛，在實驗劑量下均不會影響大鼠正常代謝 (圖一)。灌食結束，並注射 LPS 後，犧牲大鼠時收集肝臟、腎臟、脾臟和頸部淋巴結秤重，以犧牲時體重換算臟器體重百分比，結果則發現，灌食玉米油之控制組與 LPS 刺激組相較下，注射 LPS 誘發系統性發炎反應後，肝臟、脾臟和頸部淋巴結的臟器體重百分比顯著較注射 saline 組(SCO 組)高 ($p < 0.05$)；而土肉桂葉精油在各個劑量下及肉桂醛並未顯著影響注射 LPS 大鼠之組織及臟器體重百分比 (表一)。

(二) 大鼠周邊血中嗜中性球密度及 CD11/CD18 表現量

利用大鼠下腔靜脈血分離嗜中性球後，以血液體積校正，分析嗜中性球的密度之結果示於圖二。由結果得知，灌食玉米油的控制組與 LPS 刺激組相較下，LPS 使血液中嗜中性球密度顯著上升 ($p < 0.05$)；此外，比較注射 LPS 各組間血液中嗜中性球的密度可發現，若在誘發前灌食精油或肉桂醛皆可顯著降低周邊血液中嗜中性球密度，且各試驗劑量與未灌食組之差異均具統計學意義 ($p < 0.05$)。TC 在低濃度即可顯著逆轉 LPS 誘發之周邊嗜中性球密度上升之結果，與我們在小鼠試驗報導 TC 在低劑量即具有抗發炎之效果相似 [Lee et al., 2015]。

循環中的嗜中性球對於血管內皮細胞的黏性是使此細胞進入組織的第一步，藉此過程穿越血管壁遷移並累積在皮層病灶或受傷部位，此過程的相關知識已有相當的了解，而嗜中性球對血管內皮具有強黏附性的分子係 beta-2 integrins，其中又以 CD11b/CD18 分子為主，當嗜中性球受到活化時其在細胞膜之表現量會增加，並與內皮細胞表現的 ICAMs 形成穩定黏著，幫助嗜中性球黏著和遷移至發炎位置 [Witko-Sarsat et al., 2000; Wang et al. 2002]。以流式細胞儀分析嗜中性球表面 CD11b 和 CD18 的表現量發現，不論是 CD11b 或 CD18，灌食玉米油的控制組與 LPS 刺激組相較下，LPS 使細胞膜此二種黏性分子含量顯著上升 ($p < 0.05$)；另外，比較注射 LPS 各組間 CD11b/CD18 表現量可發現所有測試劑量之精油皆顯著降低 CD11b 及 CD18 表現量 ($p < 0.05$)，但肉桂醛僅呈現改善此二種黏附分子之作用趨勢而未達統計學意義 (圖三)。亦即土肉桂葉精油可因抑制嗜中性球黏附分子 CD11b/CD18 的表現來調控與此細胞相關的發炎作用，但是肉桂醛的效果則不如土肉桂葉精油。本結果顯示，TC 可透過抑制嗜中性球黏附分子 CD11b/CD18 的表現來調控與此細胞相關的發炎作用。

(三) 大鼠周邊血 sL-selectin、sICAM-1、CINC-1 含量

L-selectin 為表現在活化之嗜中性球表面的分子，為調控嗜中性球在血管壁之滾動、及黏附於血管內皮細胞的重要分子。L-selectin 在嗜中性球活化時與其配體結合然後進行裂解，形成 soluble form (sL-selectin)，因此，在發炎反應下，血清中 sL-selectin 含量可用來觀察嗜中性球活化的情形。ICAM-1 則為表現在血管內皮上讓嗜中性球能穩固黏著於內皮細胞的重要配體，發炎反應下其表現量會增加並成為 soluble form (sICAM-1) 脫落於血液中，因此，測血清中的 sICAM-1 可得知血管內皮細胞表現 ICAM-1 的情形。此外，CINC-1 為齧齒動物中趨化嗜中性球的主要化學激素，在發炎反應下，可趨使嗜中性球由血管遷移到受損組織部位中加重發炎反應 [Shimada et al., 1999; Kuo et al., 2011; Lee et al., 2012; Furie and Randolph, 1995]。

分析有或無注射LPS之小鼠血清中sL-selectin及sICAM-1含量的結果示於圖四。灌食玉米油的控制組與LPS刺激組相較下，LPS顯著刺激周邊血sL-selectin及sICAM-1含量均上升 ($p < 0.05$)；在注射LPS各組組間比較，則發現灌食精油可降低周邊血sL-selectin及sICAM-1含量 ($p < 0.05$)，且其中改善sL-selectin之作用呈劑量依賴性。另一方面，肉桂醛也顯著改善血清中sL-selectin及sICAM-1的含量 ($p < 0.05$)。分析LPS對於血清中化學激素CINC-1含量影響則發現，灌食玉米油的控制組與LPS刺激組相較下，LPS顯著刺激周邊血CINC-1含量上升 ($p < 0.05$)；比較注射LPS各組組間差異可發現，所有精油測試劑量皆可顯著改善血清中CINC-1含量，而肉桂醛也有相同的功效(圖四)。

(四) 大鼠周邊血促發炎激素TNF- α 、IL-1 β 及nitrate/nitrite濃度

分析周邊血中TNF- α 、IL-1 β 及NO的含量在發炎下的變化，結果示於表二。灌食玉米油的控制組與LPS刺激組相較下，不論是TNF- α 、IL-1 β 或NO的含量均會因受到LPS刺激而顯著上升 ($p < 0.05$)；而在注射LPS各組組間比較下可發現，所有測試劑量之精油均顯著改善LPS誘發之周邊nitrate/nitrite上升 ($p < 0.05$)，但精油改善周邊TNF- α 之效果僅低劑量組達統計學意義 ($p < 0.05$)，由於TNF- α 是發炎早期誘發之促發炎激素，本研究於誘發後18小時犧牲動物時採血時測定之，是否錯失測定組間差異性之最佳時機，以至於為觀察到中及高劑量TC的顯著效應有待進一步確認。另外，TC在改善IL-1 β 之效果僅中劑量組(TC-M)達顯著性 ($p < 0.05$)。當測定血中nitrate/nitrite濃度時，則可發現三種試驗劑量TC均顯著改善LPS誘發的此發炎指標(表二)，由於此只標代表誘發發炎期間累積產生之NO的穩定衍生物，故可確認所有試驗劑量之TC均呈抑制SIRS之效果。

(五) 大鼠小腸黏膜上皮層黏附因子 ICAM-1、趨化因子CINC-1含量

腸道組織在發炎狀況下，上皮細胞因受刺激而表現可與嗜中性球交互作用的黏附因子ICAM-1，並會分泌趨化因子CINC-1，促使迴腸組織發生嗜中性球浸潤，進一步破壞障壁功能。本研究觀察LPS誘發SIRS對於迴腸黏膜上皮組織黏附因子ICAM-1、趨化因子CINC-1的含量，結果示於表三。灌食玉米油的控制組與LPS刺激組相較下，不論是ICAM-1或CINC-1的含量均會因受到LPS刺激而顯著上升 ($p < 0.05$)。而在注射LPS各組組間比較下可發現，所有測試劑量之精油均顯著改善LPS誘發之迴腸黏膜ICAM-1及CINC-1含量的效果 ($p < 0.05$)，且其中改善CINC-1之作用具劑量依賴性。肉桂醛C-40組改善ICAM-1與CINC-1含量之作用與精油相似，且具統計學上意義 ($p < 0.05$)。

(六) 大鼠小腸黏膜上皮層促發炎激素TNF- α 、IL-1 β 及nitrate/nitrite含量

腸道組織在發炎狀況下，上皮細胞因受刺激而產生促發炎激素TNF- α 及IL-1 β 來調控發炎反應以及產生NO，其中細胞激素參與發炎時促進腸道上皮通透性及表現黏性分子之作用，而大量NO產生與促進黏膜局部發炎性損傷有關。本研究觀察LPS誘發SIRS對於迴腸黏膜上皮組織促發炎細胞激素TNF- α 、IL-1 β 及NO的含量，結果示於表三。灌食玉米油的控制組與LPS刺激組相較下，不論是TNF- α 、IL-1 β 或nitrate/nitrite的含量均會因受到LPS刺激而顯著上升 ($p < 0.05$)。而在注射LPS各組組間比較下可發現，所有測試劑量之精油均顯著改善LPS誘發之迴腸黏膜TNF- α 及IL-1 β 的含量 ($p < 0.05$)，而在nitrate/nitrite含量方面，雖然所有測試之精油劑量均呈現改善之效果，但僅中、高劑量組具統計學意義 ($p < 0.05$)。灌食肉桂醛改善TNF- α 、IL-1 β 及nitrate/nitrite之效果與精油相似，且皆具統計學上意義 ($p < 0.05$)。

(七) 大鼠迴腸黏膜嗜中性球浸潤指標MPO活性

MPO (myeloperoxidase) 是嗜中性球細胞質顆粒內富含的過氧化酵素，會參與嗜中性球的殺菌機制，因此可用來作為嗜中性球浸潤組織的指標。本研究觀察LPS誘發SIRS對於迴腸黏膜上皮組織MPO活性之影響，結果示圖五。灌食玉米油的控制組與LPS刺激組相較下，注射LPS誘發SIRS造成迴腸黏膜組織MPO活性顯著上升 ($p < 0.05$)。而在注射LPS各組組間比較下可發現，所有測試之精油劑量均顯著改善LPS誘發之迴腸黏膜MPO活性，而灌食肉桂醛可達到與精油相似的效果，但與未灌食的LCO組相較也不

具統計上的差異性。

(八) 大鼠迴腸組織完整性

取迴腸組織進行石蠟包埋切片並以 HE 染色觀察迴腸組織形態，結果顯示於圖六。結果發現正常控制組 (SCO 組) 迴腸組織的絨毛排列緊密且整齊，絨毛高度高，形態完整，相較於 SCO 組，注射 LPS 的 LCO 組小腸絨毛變短、腺窩 (crypt) 變深且絨毛組織不完整，排列也不一致，另外絨毛也出現水腫及融合的發炎特徵。灌食精油組，雖仍呈現稍微絨毛水腫(空泡處)的情形，但絨毛組織形態改善，包括幾無融合現象、絨毛高度增加，腺窩深度變小等形態正常化現象。而灌食肉桂醛組，絨毛組織形態學改按的情況與精油類似。此形態學結果與其它發炎指標的觀察結果相符。

1-2土肉桂葉精油影響系統發炎及腸道損傷之劑量效應 (部分結果已發表於研討會 [許捷盛等人, 2013] 和SCI期刊 [Lee et al., 2015])

(一) 小鼠體重變化幅度與誘發系統性發炎後小鼠臟器體重百分比

小鼠以 TC 預處理隔日灌食共 8 次，然後以 LPS 誘發 SIRS。灌食期間載劑組小鼠體重增加 0.53 ± 0.21 g，此與處以低、中、或高劑量 TC 小鼠體重變化相似 (分別為 0.62 ± 0.97 g、 0.52 ± 0.65 g、及 0.98 ± 0.99 g)；即所測試的 TC 劑量未顯著影響動物生長。誘發 SIRS 後，收集器官秤重並計算器官重量對體重比值結果示於表四。SIRS 會顯著增加脾臟及 MLN 對體重的比值，但投用 TC 未顯著影響器官重對體重比例於 LPS 誘發之 SIRS 小鼠(表四)。

(二) 小鼠血漿中促發炎激素 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、IL-18 及 nitrate/nitrite 含量

SIRS 在周邊血顯著誘發多種促發炎細胞激素上升，包括 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、及 IL-18 (表五)。與載劑組小鼠相較，所有劑量之 TC 組呈顯著較低之 IFN- γ 及 IL-18 ($p < 0.05$) 其中 TC 在劑量 13 及 26 mg/kg 時降低之 IL-1 β 及 TNF- α 濃度據統計學意義 ($p < 0.05$)。此外，TC 之抑制效果為劑量依賴性；在最高劑量下，TC 對 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、及 IL-18 之抑制作用分別達 48.9%、51.8%、35.4%、及 67.7%。周邊 nitrate/nitrite 濃度亦受 LPS 提升，而處以 TC 及使在最低劑量 6.5 mg/kg 已可抑制其濃度上升(表五)。TC 劑量在 6.5、13、及 26 mg/kg 抑制周邊 nitrate/nitrite 的效果分別達 34.9%、39.8%、及 49.4%。

已知周邊上升之 IL-1 β 及 TNF- α 在 SIRS 之進行扮演重要角色，而抑制 IL-1 β 及 TNF- α 之表現已成為治療 SIRS 的標的 [Karin, 1999]。另一方面，多年來已知敗血症病人周邊血 IL-18 濃度高於正常人 [Schulte et al., 2013]。給予致命及非致命劑量 LPS 之實驗動物，其周邊 IL-18 濃度顯著且急遽上升，其中追蹤致命劑量模式血中 IL-18 濃度變化發現其持續上升至動物死亡 [Oberholzer et al., 2001]。反之，LPS 在小鼠誘發之肝臟、心臟、及肺損傷，可在處以抗-IL-18 抗體或 IL-18 結合蛋白而獲致改善 [Oberholzer et al., 2001; Dinarello and Fantuzzi, 2003; Faggioni et al., 2001]。IL-18 的促發炎作用至少是可透過誘發 T-cells 產生另一種促發炎激素 IFN- γ 而造成敗血症期間的組織損傷 [Schroder et al., 2004]。IFN- γ 可回頭增加 MD2 及 TLR4 表現而放大 LPS 之後續促發炎效應 [Zhang et al., 2011]。本研究所發現之 TC 抑制周邊 IL-1 β 及 TNF- α 濃度之作用也與過去其他 *in vitro* 及 *in vivo* 模式之發現一致 [Lee et al., 2013; Chao et al., 2005; Lin et al., 2011]。而本研究首度報導了 TC 在 SIRS 可降低周邊 IL-18 及 IFN- γ 濃度之作用。

(三) 小鼠腸繫膜淋巴結及迴腸黏膜中 TLR4、MD2、MyD88 之表現量及細胞核萃取物 NF- κ B 含量

過去曾有學者提出 gut-lymph 假說 [Mittal and Coopersmith, 2014]，其說明 MLNs 防禦機制受損，是造成腸道內容物侵犯宿主周邊血的主因，且此作用會啟始或惡化系統性損傷。因此，本研究觀察了 MLNs 及迴腸黏膜之 TLR4 及 NLRP3 路徑。本研究結果為首度報導 TLR4 與 NLRP3 訊號路徑主要分子的表現會在迴腸黏膜及 MLNs 受到誘發。在 TLR4 路徑方面，以 LPS 誘發 SIRS 不僅增加淋巴器官腸繫膜淋巴結 (MLNs) 免疫學受器及其訊號路徑蛋白 TLR4、MD2、及 MyD88 之表現，而且也顯著誘發這些分子在迴腸黏膜之表現量 (圖七(A) & (B))。而在處以 TC 之小鼠，不論在 MLNs 或在腸繫膜淋巴結，TLR4、MD2、及 MyD88

表現量均顯著受到抑制，且抑制作用呈 TC 劑量依賴性(圖七)。故本研究接著觀察這些組織細胞核中轉錄因子 NF- κ B 之含量，因為 NF- κ B 自胞漿轉位至細胞核，為此轉錄因子活化之指數。結果發現 SIRS 在腸繫膜淋巴結及迴腸黏膜均誘發 NF- κ B，而此活化作用會因為處以 TC 而改善，且 TC 之作用呈劑量依賴性，且在劑量 13 及 26 mg/kg 時與載劑組相較達統計學意義(圖八)。

(四) 小鼠腸繫膜淋巴結及迴腸黏膜中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量及 caspase-1 活性

在 NLRP3 路徑方面，以 LPS 誘發 SIRS 也促進腸繫膜淋巴結及迴腸黏膜之 NLRP3、ASC、及 caspase-1 表現量(圖九(A) & (B))。在處以 TC 之 SIRS 小鼠，此三種分子的表現量與載劑組相較顯著受到 TC 抑制，且此作用呈 TC 劑量依賴性(圖九)。進一步觀察此二組織中 caspase-1 活性則發現 TC 可顯著抑制 LPS 誘發之 caspase-1 活性，且特別有效的抑制作用是發生於 MLNs；在最小試驗劑量下(6.5 mg/kg) TC 即可顯著抑制 MLNs 中 caspase-1 活性。反之，在迴腸黏膜 TC 之抑制效果在最高劑量(26 mg/kg)才達到統計學意義(圖十)。

雖然過去已有研究報導指出 NLRP3 或 ASC 缺損的實驗動物可分別對抗致命劑量的 LPS 或敗血性休克之誘發 [Sutterwala et al., 2006; Yamamoto et al., 2004]，且 LPS 誘發之肝損傷與肝臟局部之 NLRP3、ASC、及 caspase-1 表現量增加及 IL-1 β 與 IL-18 增加有關 [Ganz et al., 2011]，但本研究首度報導關於 NLRP3 在 LPS 誘發之小腸損傷之角色，之且發現 TC 對於 LPS 誘發之迴腸黏膜及 MLNs 的 NLRP3 訊號路徑抑制作用。雖然過去認為 TLR4 是在內毒素誘發之 SIRS 治療組織損傷的主要標的，但愈來愈多研究者認為 NLRP3 也具重要性 [Ganz et al., 2011]。雖然 LPS 並非直接活化 NLRP3 訊號路徑之配體，一篇近來的研究顯示 LPS 類似物可在齧齒動物巨噬細胞誘發 NLRP3 表現，且呈 NF- κ B 依賴性 [Qiao et al., 2012]。此外，受 NF- κ B 活化而表現之 iNOS 會產生大量 nitric oxide，其所導致的血壓下降及組織缺氧會活化局部組織之 xanthine oxidase [Deitch et al., 1991]。在此狀況下，NLRP3 可能受到 xanthine oxidase 活化之產物尿酸誘發而活化 [Mariathasan et al., 2006; , 40]。我們過去已報導 LPS 誘發之迴腸黏膜損傷中，會伴隨顯著增加之局部 iNOS 活性及 NO 之產生 [Chiang et al., 2006]。因而，本研究接著觀察 LPS 誘發之小鼠迴腸黏膜 nitrate/nitrite 含量及 xanthine oxidase 活性之關聯。

(五) 小鼠迴腸黏膜 nitrate/nitrite 含量及 xanthine oxidase 活性

一如預期，本研究在迴腸黏膜發現 LPS 誘發 nitrate/nitrite 含量上升(圖十一(A))。而處以 TC 則可抑制 LPS 誘發之 nitrate/nitrite 上升，且 TC 之作用呈劑量依賴性，在劑量 6.5、13、及 26 mg/kg 之抑制效果分別達 48.2%、59.6%、及 70.8%(圖十一(A))。我們也發現 LPS 誘發之 SIRS 導至增加迴腸黏膜之 xanthine oxidase 活性(P<0.05)，而處以所有試驗劑量之 TC 均有效抑制此活性 (P<0.05, 圖十一(B))。整根據此結果可推論，TC 抑制 NLRP3 之保護作用除了有部分間接透過抑制 TLR4 路徑或直接抑制 NLRP3 路徑而來之外，也有部分是透過抑制 xanthine oxidase 活性而來。

(六) 小鼠小腸組織形態學

以光學顯微鏡觀察小鼠迴腸黏膜形態學發現，LPS 造成黏膜損傷的特徵包括絨毛變短、頂部變平坦、且發生嚴重水腫(圖十二)。處以 TC 雖然黏膜固有層(lamina propria)仍處於些微水腫之狀態，但可改善 LPS 誘發之黏膜損傷，包括絨毛高度趨近於正常組且絨毛頂部回復較尖銳之形態(Figure 6)。

壓力下腸道障壁功能已知是造成遠端組織損傷的主因，且其在重症病人伺機感染問題扮演重要角色 [Adib-Conquy et al., 2007]。本研究顯示，LPS 誘發迴腸黏膜損傷之特徵，與過去在大鼠之發現一致 [Chiang et al., 2006]。

實驗二

土肉桂葉精油活性成分肉桂醛及伽羅木醇對於系統發炎相關之淋巴組織活化之影響(部分結果於 2014 已發表於研討會 [王詩芸等人, 2014])

(一) 小鼠生長代謝值和體重、臟器重變化幅度

小鼠以LPS誘發SIRS前，先灌食土肉桂葉精油成，且於第一次灌食土肉桂葉精油成分前與灌食第八次後（灌食後第17日）飼育於代謝籠，觀察灌食前和誘發SIRS前體重，並記錄24小時攝食量、飲水量、排尿量和排便量之變化。此外，記錄以LPS誘發SIRS後之體重，並計算各組灌食前後和誘發前後之體重差異。根據表六之結果，小鼠灌食前與誘發前之組間體重並無顯著差異，在攝食量、飲水量、排尿量和排便量方面，無論是灌食前還是灌食後組間同樣皆無顯著差異，顯示實驗使用的精油成分及劑量不影響小鼠代謝。在以LPS誘發後，體重小鼠體重在注射LPS組 (LCO組) 顯著低於注射生理食鹽水之控制組 (SCO組)($P < 0.05$)，但在灌食精油和其活性成分後體重皆有回升的趨勢，其中灌食伽羅木醇之Lin-L組和Lin-H組小鼠，體重與灌食載劑組相較達統計學上的差異 ($p < 0.05$)。在計算灌食載劑與各精油成分前後體重變化幅度後發現，各組間並無顯著差異，但因為注射LPS後禁食12h，故各組小鼠體重均較注射前下降，其中LCO組體重下降幅度顯著大於SCO ($p < 0.05$)，顯示注射LPS造成顯著體重流失。而在注射LPS前若灌食精油(TC組)，與LCO組相較體重顯著回升 ($p < 0.05$)，灌食相當於TC劑量中肉桂醛含量之Cin-L組與LCO組相較體重顯著回升，且效果與TC相似，進一步提高劑量 (Cin-H組)，與LCO組相較體重也有顯著回升 ($p < 0.05$)，但未呈劑量效應。灌食相當於TC劑量中伽羅木醇含量之Lin-L組與LCO組相較體重顯著回升 ($p < 0.05$)，但回升幅度顯著不及TC ($p < 0.05$)，不過進一步提高劑量 (Lin-H組)，則能使體重回升幅度增加，即伽羅木醇之作用呈劑量依賴性。

各組動物於犧牲時收集與秤重並記錄其組織及臟器重，再以誘發前體重換算各組織臟器體重百分比，結果示於表七。經LPS誘發後(LCO組)小鼠脾臟和腸繫淋巴結之重量百分比顯著高於SCO組 ($p < 0.05$)，但並不影響腎臟、肝臟和副睪脂肪之重量。另外，針對脾臟發現，在灌食精油成分之各組脾臟/體重比與LCO組相較皆下降，且其中除了Cin-H組外，脾腫大之改善均達統計學上的意義 ($p < 0.05$)。而在腸繫淋巴結方面也發現，灌食精油成分之各組淋巴結/體重百分比皆下降，且其中除了Cin-L及Lin-H組外，腸繫膜淋巴結腫大之改善均達統計學上的意義 ($p < 0.05$)。此處呈現TC改善LPS誘發之淋巴組織水腫的結果與2015年我們發表的結果不同 [Lee et al., 2015]，這是因為先前我們的報告使用的體重是注射LPS之後的數據，然因為SIRS急性發炎的特性是使體蛋白及體水分流失，故若以注射LPS後的體重計算臟器/體重比，會錯誤估算比值，當改用注射LPS前的體重為基礎時，發現TC可顯著改善LPS誘發之淋巴組織水腫。

由於廣泛應用於食用與外用，伽羅木醇的安全性已經充分的評估；在急性毒性方面小鼠經計算之急性口服LD50是為3500 mg/kg (10%於花生油中)，而在小鼠連續餵食28天的伽羅木醇亞慢性 (subchronic) 毒性研究報告則指出，在雄性小鼠餵食劑量約為116.6 mg/kg/day以下，完全無影響大鼠生長及肝腎等臟器功能及生殖功能 [Ford et al., 2000]。而我們將使用之肉桂醛劑量，也遠小於文獻報導肉桂醛在大鼠之急性毒性LD50=1850 mg/kg bw 之劑量 [Peano et al., 2006]。本研究上述結果，確認本研究使用之精油劑量不影響小鼠生長代謝值，也顯示肉桂醛與伽羅木醇劑量，不影響小鼠生長代謝值，與過去的毒性研究果一致。

本研究在LPS誘發SIRS後，發現小鼠體重顯著下降且處於虛弱狀態，由於LPS透過結合TLR4活化MyD88下游訊號，本研究發現之現象可能以Ruud等人研究之發現解釋：C57BL/6J小鼠在發炎反應下會受到MyD88依賴性訊號傳遞之作用，產生厭食且體重流失之症狀 (Ruud et al., 2013)，而LPS造成脾臟和腸繫淋巴結之腫大之發現，則與Singh等人研究中以LPS刺激小鼠後脾臟腫大之結果相似 (Singh et al., 2014)，為LPS刺激免疫器官作用所致。若在誘發SIRS前處以TC、肉桂醛和伽羅木醇可減緩體重下降幅度，可能與逆轉MyD88依賴性訊號傳遞有關，於以下實驗中觀察。

(二) 小鼠血漿、肝臟、脾臟、及腸繫膜淋巴結中 nitrate/nitrite 與促發炎細胞激素含量

灌食載劑後注射LPS之LCO組小鼠不論在血漿、肝臟、脾臟、或腸繫膜淋巴結中，nitrate/nitrite濃度和促發炎激素 (IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IFN- γ 、HMG-1) 濃度皆顯著高於未注射LPS之SCO組 ($p < 0.05$) (表八、九、十、十一)。而若注射LPS前灌食各種精油成分均可降低LPS誘發之小鼠血漿 nitrate/nitrite 和促發炎激素濃度。在 nitrate/nitrite 濃度方面，注射LPS前灌食精油 (TC組)，與LCO組相較顯著降低 nitrate/nitrite 濃度 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之Cin-L組雖也有改善LPS誘發後 nitrate/nitrite 上升之趨勢，但未達統計學上的意義，不過當提升肉桂醛

劑量 (Cin-H 組) 則可顯著降低 nitrate/nitrite 濃度 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 組下降 nitrate/nitrite 之幅度顯著大於精油之作用，而 Lin-H 與 Lin-L 效果相當。在 IL-1 β 濃度方面，注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低 IL-1 β 濃度 ($p < 0.05$)；分別灌食相當於精油劑量中肉桂醛及桉羅木醇含量之 Cin-L 和 Lin-L 組，雖然均顯著改善 LPS 誘發 IL-1 β 上升之作用 ($p < 0.05$)，但其效果均顯著不如精油，不過肉桂醛及桉羅木醇都在提升劑量後 (分別為 Cin-H 組和 Lin-H 組) 進一步改善 IL-1 β 濃度，即者均呈劑量依賴性改善作用。在 IL-18 濃度方面，注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低 IL-18 濃度 ($p < 0.05$)；灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 組，雖有略微降低 LPS 誘發後 IL-18 濃度之效果，其改善效果不及精油，且與 LCO 組相較未達統計學上的意義，不過當提升肉桂醛劑量 (Cin-H 組) 則顯著降低 IL-18 濃度 ($p < 0.05$)，即肉桂醛具劑量依賴性作用。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 組，則顯著降低 LPS 誘發之 IL-18 上升 ($p < 0.05$)，但效果顯著不如精油 ($p < 0.05$)，然而當提升 Cin 劑量 (Cin-H 組)，則能進一步改善 IL-18 濃度，即桉羅木醇也呈劑量依賴性作用。在 TNF- α 濃度方面，注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低 TNF- α 濃度 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛及桉羅木醇含量之 Cin-L 組和 Lin-L 組，也顯著降低 LPS 誘發之 TNF- α 濃度 ($p < 0.05$)，且效果皆與精油相似，此外提升肉桂醛和桉羅木醇劑量 (Cin-H 組、Lin-H 組)，均可進一步改善 TNF- α 濃度，即肉桂醛和桉羅木醇之作用均具有劑量依賴性。在 IFN- γ 濃度方面，注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低 LPS 誘發後 IFN- γ 濃度 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 組也顯著降低 LPS 誘發之 IFN- γ 濃度 ($p < 0.05$)，且效果與精油相似，再增加灌食肉桂醛之劑量 (Cin-H 組) 與 Cin-L 效果則相似。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 組也顯著性降低 LPS 誘發後 IFN- γ 上升 ($p < 0.05$)，但效果不及精油，不過當提升桉羅木醇劑量 (Cin-H 組) 則可進一步改善 IFN- γ 濃度，即桉羅木醇呈現劑量依賴性作用。在 HMG-1 濃度方面，注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低 LPS 誘發後 HMG-1 濃度 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 組也顯著降低 LPS 誘發之 HMG-1 濃度 ($p < 0.05$)，但效果不及精油，不過增加灌食肉桂醛之劑量 (Cin-H 組)，可進一步改善 HMG-1 上升，即肉桂醛之作用具有劑量依賴性。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 組也顯著降低 LPS 誘發後 HMG-1 上升 ($p < 0.05$)，但效果也不及精油，雖在增加灌食桉羅木醇之劑量 (Lin-H 組) 後並未與 Lin-L 有顯著差異，但仍呈現劑量依賴性改善之趨勢。灌食精油、肉桂醛、及桉羅木醇對於肝臟、脾臟、及腸繫膜淋巴結中 nitrate/nitrite 與 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IFN- γ 、HMG-1 含量的影響與上述在周邊血觀察到的結果相似 (表九、十、十一)。

In vitro 研究已知，以 LPS 刺激 RAW 264.7 巨噬細胞，會增加 iNOS 表現並增加 NO 之生成，若給予濃度 10 $\mu\text{g/mL}$ 之土肉桂枝條精油處理，其精油成分肉桂醛、肉桂酸能有效的抑制 NO 產生 (Tung et al., 2008)；若給予 9.7-15.5 $\mu\text{g/mL}$ 之肉桂醛型土肉桂葉精油發現也能有效抑制 NO 產生，並且具有劑量之依賴性效果 (Tung, 2010)，而肉桂醛 (50 μM) (Liao et al., 2012) 或桉羅木醇 (40 $\mu\text{g/mL}$) (Huo et al., 2013) 也具有降低 NO 生成之作用，本研究 in vivo 的發現與過去 in vitro 研究之結果一致。發炎過程中，生物體啟動免疫反應，藉由增加細胞激素 (IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IFN- γ 和 HMGB-1 等)，以抵禦外來病原菌。根據過去研究，受到 LPS 誘發之小鼠，除了造成 NO 含量增加，同時也會促使免疫調節機制的失衡，使得免疫細胞活化多種調節發炎細胞激素，包括：IL-1ra、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α 等 (Larsen et al., 2013)。從 Xia 等人的細胞實驗中得知 RAW264.7 巨噬細胞以 LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 2 小時後，顯著增加其促發炎激素 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 之產生 (Xia et al., 2012)。而 Jitprasertwong 等人也發現，以 *E. coli* 之 LPS (100 ng/ml) 刺激 THP-1 monocytes，會顯著增加 IL-18 產生 (Jitprasertwong et al., 2014)。另外，哺乳類動物細胞之核內原本未活化的 HMGB-1 受到 LPS 或促發炎激素 (IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ) 刺激免疫細胞而釋出活化之 HMGB-1 蛋白，誘導訊號傳導途徑，導致 NF- κB 活化 (Yang et al., 2015)，進而產生並釋出更多之促發炎激素，如 TNF- α (Yang et al., 2010；Lai et al., 2013)。有文獻指出，LPS 刺激小鼠 J774A-1 巨噬細胞、人血單核細胞和 THP-1 單核球細胞後，給予肉桂醛 (24-80 μM)，可抑制人血單核細胞和 THP-1 monocytes 之 pro-IL-1 β 的產生，且在模式中也發現 TNF- α 的生成減少，顯示具有抗發炎之效果 (Chao et al., 2008；de Cássia da Silveira E Sá et al., 2014)，本研究 in vivo 的發現與過去 in vitro 研究之結果一致，並進一步呈現桉羅木醇抑制促發炎激素之作用。

(三) 小鼠脾臟及腸繫膜淋巴結中 TLR4、MD₂、MyD88 表現量

生物先天免疫系統具有偵測病原微生物入侵的功能，藉由 TLRs 辨認出不同的 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Kawai and Akira, 2010) 和 damaged-associated molecular patterns (DAMPs)，誘導免疫反應作用 (Lotze et al., 2007)。當 TLR4 辨認出 LPS，會促使細胞膜上的 TLR4 與輔助蛋白 MD₂ 交互作用，形成複合體後再透過 MyD88 訊號傳遞至下游而活化 NF- κ B，啟動發炎基因轉錄作用，產生 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18，以增加促發炎細胞激素產生 (Liu et al., 2014)。在 RAW264.7 巨噬細胞之觀察發現，經 LPS (1 μ g/ml) 刺激 12 小時後其 TLR4 之表現顯著上升，同時也促進 NF- κ B 活化 (Xu et al., 2014)。

本 in vivo 研究發現灌食載劑後，注射 LPS 之 LCO 組小鼠脾臟中 TLR4、MD₂、MyD88 表現量皆顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (圖十三)。然而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分可顯著降低 LPS 誘發之小鼠脾臟中 TLR4、MD₂、MyD88 表現量。注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低 TLR4、MD₂、及 MyD88 表現量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛和桉羅木醇含量之 Cin-L 組和 Lin-L 組，可顯著改善 LPS 誘發之 TLR4、MD₂、及 MyD88 表現量 ($p < 0.05$)，其作用皆不及精油組，再增加灌食劑量 (Cin-H 和 Lin-H 組)，雖也顯著降低 LPS 誘發之 TLR4 及 MD₂ 表現量 ($p < 0.05$)，但降低作用與對應組別之低劑量間無顯著差異。LPS 誘發小鼠腸繫淋巴結中 TLR4、MD₂、MyD88 表現量及 TC 成份對於腸繫淋巴結之保護作用，與在脾臟之觀察結果一致 (圖十三)，即 TC、肉桂醛和桉羅木醇均可具有改善 LPS 活化淋巴組織之作用，此可解釋為何這些成分可改善 LPS 誘發之淋巴組織水腫。

(四) 小鼠脾臟及腸繫膜淋巴結中核萃取物 NF- κ B 含量

過去的 in vitro 研究發現，在 LPS (5 mg/ml, 15 000 EU/ml) 刺激之 THP1XBlue 人類單核細胞株和人類週邊血液單核球 (PBMCs) 給予肉桂醛 (1-10 μ g/ml) 可劑量依賴性改善 NF- κ B 活化程度 (Roth-Walter et al., 2014)；同時有文獻指出肉桂醛可抑制 LPS 刺激 RAW 264.7 巨噬細胞時所產生的 NF- κ B 及 TLR4 之表現 (Sá et al., 2014)。另外有文獻指出，桉羅木醇可透過阻斷 MAPK 抑制 NF- κ B 之活化，達到抗發炎之效果 (Aprotosoie et al., 2014)。

本 in vivo 研究發現灌食載劑後，注射 LPS 之 LCO 組小鼠脾臟和腸繫淋巴結細胞核萃取物中 NF- κ B 含量皆顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (圖十四)。而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分均可逆轉 LPS 誘發之小鼠脾臟和腸繫淋巴結中 NF- κ B 含量。注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低脾臟中 NF- κ B 含量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛之 Cin-L 組略微降低 LPS 誘發之 NF- κ B 含量，雖與 LCO 組間未達統計學上的差異，但其 NF- κ B 含量介於灌食精油組 (TC 組) 與 LCO 組之間，且與 TC 組間亦無統計學上的差異，而再增加灌食劑量 (Cin-H 組) 也略為降低 LPS 誘發之 NF- κ B 含量，但改善作用與低劑量間無顯著差異。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇之 Lin-L 略微降低 LPS 誘發之 NF- κ B 含量，雖未達統計學上意義，作用也顯著不及精油，但其 NF- κ B 含量也介於 TC 組與 LCO 組之間，當提高桉羅木醇灌食劑量 (Lin-H 組)，與 Lin-L 組相較，雖呈劑量依賴性改善 NF- κ B 之趨勢，但低劑量與高劑量組間未達統計學意義。注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較精油顯著降低腸繫淋巴結中 NF- κ B 含量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 顯著降低 LPS 誘發之 NF- κ B 含量 ($p < 0.05$)，其作用與精油相似，再增加灌食劑量 (Cin-H 組)，也顯著降低 LPS 誘發之 NF- κ B 含量 ($p < 0.05$)，但改善作用與低劑量間無顯著差異。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 組，可顯著改善 LPS 誘發之 NF- κ B 含量 ($p < 0.05$)，其作用與精油組相當，但再增加灌食劑量 (Lin-H 組)，雖也顯著降低 LPS 誘發之 NF- κ B 含量 ($p < 0.05$)，但改善作用與低劑量間無顯著差異。依此觀察，肉桂醛與桉羅木醇改善腸繫膜淋巴結發炎性活化之效果優於改善脾臟發炎性活化之效果。

(五) 小鼠脾臟及腸繫膜淋巴結中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量

灌食載劑後，注射 LPS 之 LCO 組小鼠脾臟中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量皆顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (圖十五)。然而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分可顯著降低 LPS 誘發之小鼠脾臟中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量。NLRP3 表現量方面，注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低 NLRP3 表現量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛和桉羅木醇含量之 Cin-L 組

和 Lin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 NLRP3 表現量 ($p < 0.05$)，其作用皆不及精油組，再增加灌食劑量 (Cin-H 和 Lin-H 組) 可進一步顯著降低脾臟 NLRP3 表現量 ($p < 0.05$)，即肉桂醛和桉羅木醇之作用各呈劑量依賴性。ASC 及 caspase-1 表現量方面，注射 LPS 前若灌食 TC，與 LCO 組相較顯著降低 ASC 表現量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛和桉羅木醇含量之 Cin-L 組和 Lin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 ASC 及 caspase-1 表現量 ($p < 0.05$)，其作用皆與精油組相當，再增加灌食劑量 (Cin-H 和 Lin-H 組)，雖也顯著降低 LPS 誘發之 ASC 及 caspase-1 表現量 ($p < 0.05$)，但降低作用與對應組別之低劑量間無顯著差異。LPS 誘發小鼠腸繫淋巴結中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量及 TC 成份對於腸繫淋巴結之保護作用，與在脾臟之觀察結果一致 (圖十五)。

NLRs 家族中的 NLRP3 發炎體，可透過受到多種的 PAMPs 或 DAMPs 刺激而活化，促使 NLRP3 與 ASC 結合，而 ASC 會與 procaspase-1 分子結合，促使 procaspase-1 形成活化型式之 caspase-1，而此活化之 caspase-1 將 TLR4 訊號路徑中 NF- κ B 所啟動發炎基因轉錄作用，所產生之 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 轉換成活性型式之 IL-1 β 和 IL-18 (Nadatani et al., 2015; Kayagaki et al., 2013)。過去研究指出，以濃度 100 ng/mL 之 LPS 誘發 THP-1 巨噬細胞，NLRP3 之分子量在 0-12 小時內隨著時間增加表現量也跟著增加，且 Caspase-1 活性、IL-1 β 也有顯著高於控制組 (Chuang et al., 2013)。反之 Zhang 等人發現，透過藥物 Glyburide 阻斷 LPS 刺激心肌纖維母細胞中的 NLRP3 發炎體中 caspase-1 之活化，而減少 IL-1 β 產生 (Zhang et al., 2014)。本研究顯示肉桂醛及桉羅木醇均是 TC 抑制 NLRP3 發炎體活性的重要活性成分，並能解釋這些土肉桂成分在小鼠抑制 IL-1 β 和 IL-18 產生，降低發炎反應之作用。

(六) 小鼠脾臟及腸繫膜淋巴結中 caspase-1 活性

灌食載劑後注射 LPS 之 LCO 組小鼠脾臟和腸繫淋巴結中 caspase-1 活性皆顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (圖十六)。然而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分可顯著逆轉 LPS 誘發之小鼠脾臟和腸繫淋巴結中 caspase-1 活性。注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低脾臟中 caspase-1 活性 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 組，可顯著改善 caspase-1 活性 ($p < 0.05$)，其作用與精油相似，而再增加灌食劑量 (Cin-H 組) 也顯著降低 LPS 誘發之 caspase-1 活性 ($p < 0.05$)，但改善作用與低劑量間無顯著差異。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 組，可顯著改善 caspase-1 活性 ($p < 0.05$)，且其作用顯著優於精油組 ($p < 0.05$)，但再增加灌食劑量 (Lin-H 組)，雖也顯著降低 LPS 誘發之 caspase-1 活性 ($p < 0.05$)，但改善作用與低劑量間無顯著差異。精油及其活性成分皆顯著降低腸繫淋巴結中 caspase-1 活性 ($p < 0.05$)，且肉桂醛及桉羅木醇無論是低還是高劑量效果皆與精油相當。

(七) 小鼠脾臟中 xanthine oxidase 活性

灌食載劑後，注射 LPS 之 LCO 組小鼠脾臟 xanthine oxidase 活性顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (圖十七)。然而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分均可顯著逆轉 LPS 誘發之小鼠脾臟中 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)。注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 顯著降低 LPS 誘發之 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)，且作用與精油相似，再增加灌食劑量 (Cin-H 組)，雖也顯著降低 LPS 誘發之 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)，但改善作用與低劑量間無顯著差異。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 顯著降低 LPS 誘發之 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)，且作用與精油相似，再增加灌食劑量 (Lin-H 組)，同樣顯著降低 LPS 誘發之 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)，但改善作用與低劑量間無顯著差異。

已知大量產生之 NO 可造成生物體內血管鬆弛使組織缺血，導致增加 xanthine oxidase(XO)活性 (Munteanu et al., 2013)，本研究在注射 LPS 之小鼠脾臟和腸黏膜組織確實發現 XO 活性高於未注射 LPS 之控制組，與 NO 增加之結果一致。

實驗三

土肉桂葉精油活性成分肉桂醛及桉羅木醇對於系統發炎相關之腸黏膜損傷及腸道 microbiota 調節之影響 (部分結果於 2015 已發表於研討會海報 [王詩芸等人, 2015])

(一) 小鼠迴腸黏膜組織中發炎反應相關指數

灌食載劑後注射 LPS 之 LCO 組小鼠迴腸黏膜組織中 nitrate/nitrite 含量和促發炎激素(IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IFN- γ 、HMG-1) 含量皆顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (表十二)。然而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分均可逆轉 LPS 誘發之小鼠迴腸黏膜組織 nitrate/nitrite 和促發炎激素含量。nitrate/nitrite 含量方面, 注射 LPS 前若灌食精油, 與 LCO 組相較顯著降低 nitrate/nitrite 含量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 組顯著降低 LPS 誘發之 nitrate/nitrite 上升 ($p < 0.05$), 且下降幅度大於精油, 增加灌食劑量 (Cin-H) 與相對應之低劑量組相較, 進一步改善 nitrate/nitrite 含量, 即肉桂醛之作用呈劑量依賴性。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇之 Lin-L 組顯著降低 LPS 誘發之 nitrate/nitrite 上升 ($p < 0.05$), 且下降幅度大於 TC, 再增加灌食劑量 (Lin-H 組) 後與低劑量組 (Lin-L 組) 相較, 高劑量降低 nitrate/nitrite 之效果不及低劑量組。依此觀察, Cin 和 Lin 對於 TC 降低迴腸黏膜 nitrate/nitrite 含量之作用均有貢獻, 但精油中除了肉桂醛和桉羅木醇外可能存在干擾成分, 降低肉桂醛和桉羅木醇在精油中對於迴腸黏膜組織產生 nitrate/nitrite 之抑制作用。IL-1 β 含量方面, 注射 LPS 前若灌食精油, 與 LCO 組相較顯著降低 IL-1 β 含量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 組顯著降低 LPS 誘發之 IL-1 β 上升 ($p < 0.05$), 其效果與精油相似, 當提高肉桂醛灌食劑量 (Cin-H 組), 與 Cin-L 組相較, 雖呈劑量依賴性改善 IL-1 β 之趨勢, 但低劑量與高劑量組間未達統計學意義。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 組也顯著降低 LPS 誘發之 IL-1 β 含量 ($p < 0.05$), 但效果不及精油, 再增加灌食劑量 (Lin-H 組) 後, 桉羅木醇可進一步改善迴腸黏膜組織 IL-1 β 上升, 即桉羅木醇之作用呈劑量依賴性。IL-18 含量方面, 注射 LPS 前若灌食精油, 與 LCO 組相較顯著性降低 LPS 誘發之 IL-18 含量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 組顯著降低 LPS 誘發之 IL-18 上升 ($p < 0.05$), 其下降幅度不及精油, 再增加灌食劑量 (Cin-H 組) 後, 肉桂醛可進一步改善脾臟 IL-18 含量, 即肉桂醛之作用呈劑量依賴性。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 也顯著降低 LPS 誘發之 IL-18 上升 ($p < 0.05$), 其效果與精油相似, 當提高桉羅木醇灌食劑量 (Lin-H 組), 與 Lin-L 組相較, 雖高劑量降低 IL-18 之效果不及低劑量組, 但低劑量與高劑量組間未達統計學意義。TNF- α 含量方面, 注射 LPS 前若灌食精油, 與 LCO 組相較顯著降低 TNF- α 含量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 組也顯著降低 LPS 誘發之 TNF- α 上升 ($p < 0.05$), 其下降幅度大於精油, 當提高肉桂醛灌食劑量 (Cin-H 組), 與 Cin-L 組相較, 雖高劑量降低 TNF- α 之效果不及低劑量組, 但低劑量與高劑量組間未達統計學意義。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 同樣顯著降低 TNF- α 上升 ($p < 0.05$), 其效果與精油相當, 再增加灌食劑量 (Lin-H 組) 後, 桉羅木醇可進一步改善脾臟 TNF- α , 即桉羅木醇之作用呈劑量依賴性。IFN- γ 含量方面, 注射 LPS 前若灌食精油, 與 LCO 組相較顯著性降低 IFN- γ 上升 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛和桉羅木醇含量之 Cin-L 和 Lin-L 雖也顯著降低 IFN- γ 上升 ($p < 0.05$), 但效果皆不及精油, 再增加灌食劑量 (Cin-H 組和 Lin-H 組) 後, 肉桂醛和桉羅木醇可進一步改善迴腸黏膜組織 IFN- γ 上升, 即肉桂醛和桉羅木醇之作用呈劑量依賴性。HMG-1 含量方面, 注射 LPS 前若灌食精油, 與 LCO 組相較顯著性降低 HMG-1 含量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 組, 雖有略微降低 LPS 誘發後 HMG-1 含量之效果, 其改善效果不及精油, 且與 LCO 組相較未達統計學上的意義, 不過當提升肉桂醛濃度 (Cin-H 組), 與 LCO 組相較則顯著降低 HMG-1 含量 ($p < 0.05$), 即肉桂醛具劑量依賴性作用。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 顯著降低 HMG-1 上升 ($p < 0.05$), 但效果也不及精油, 再增加灌食劑量 (Lin-H 組) 後, 桉羅木醇可進一步改善迴腸黏膜組織 HMG-1 含量, 即桉羅木醇之作用呈劑量依賴性。

上述結果與在周邊及其它臟器觀察到之精油及其成分抗發炎保護作用一致。

(二) 小鼠迴腸黏膜組織中抗菌蛋白與抗發炎荷爾蒙含量

灌食載劑後, 注射 LPS 之 LCO 組小鼠迴腸黏膜組織中抗微生物胜肽 REG3- β 、REG3- γ 和 CRP-ductin 含量皆顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (表十三)。然而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分可顯著降低 LPS 誘發之小鼠迴腸黏膜組織中上述抗微生物胜肽含量。與 LCO 組相較, 注射 LPS 前灌食精油成分之組別, 均呈顯著較低之 REG3- β 、REG3- γ 及 CRP-ductin 含量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛和桉羅木醇含量之 Cin-L 和 Lin-L 組均顯著降低 REG3- β 、REG3- γ 及 CRP-ductin 上升 ($p < 0.05$), 但效果不及精油。當提高肉桂醛和桉羅木醇灌食劑量 (Cin-H 組和 Lin-H 組), 分別與對應之 Cin-L 和 Lin-L 組相較, 改善 REG3- β 之效果無顯著差異。然而肉桂醛和桉羅木醇於改善 LPS 誘發之

REG3- γ 及 CRP-ductin 含量上升方面，則皆呈劑量依賴性效應。

灌食載劑後，注射 LPS 之 LCO 組小鼠迴腸黏膜組織中抗發炎荷爾蒙 RETNL β 含量顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (表十三)。注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低 RETNL β 含量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 雖也顯著降低 RETNL β 上升 ($p < 0.05$)，但效果不及精油，當提高 Cin 灌食劑量(Cin-H 組)，與 Cin-L 組相較，高劑量降低 RETNL β 之效果顯著不及低劑量組 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 顯著降低 RETNL β 上升 ($p < 0.05$)，且效果與精油相似，當提高桉羅木醇灌食劑量(Lin-H 組)，與 Lin-L 組相較，雖呈劑量依賴性改善 RETNL β 之趨勢，但低劑量與高劑量組間未達統計學意義。

人體腸腔內部黏膜組織，是與外來病原菌接觸的主要介面，根據過去腸道發炎疾病之研究，發現當腸腔受到病原菌的刺激，病原菌的信號透過上皮細胞 TLR4 之辨識，並啟動 MyD88-dependent pathway 訊息傳遞 (Pulido et al., 2012)，然而生理調節機制為了維護腸腔不受病原菌的入侵，啟動防禦機制，增加抗微生物肽 (REG3- β 、REG3- γ 、DMBT1) 和抗發炎腸道荷爾蒙 (RETNL- β) 的產生 (Larsson et al., 2012; Goll and Granlund, 2015)。在過去有研究報顯示，利用一般正常之小鼠刪除體內 MyD88 基因之模式，會降低小鼠大腸中抗微生物肽 (REG3- β 和 REG3- γ) 的表現，同時改變腸道菌相之組成 (Larsson et al., 2012)。根據本研究的觀察，LPS 刺激下小鼠之迴腸黏膜 REG3- β 、REG3- γ 、DMBT1 和 RETNL- β 含量皆顯著的高於控制組 (表八)，與過去文獻報導相符，而本研究發現若在注射 LPS 前給予 TC、肉桂醛或桉羅木醇，均降低迴腸黏膜中 REG3- β 、REG3- γ 、DMBT1 和 RETNL- β 含量 (表八)，推測灌食這些土肉桂成分，可能透過上述抗發炎作用抑制 LPS 誘發之抗菌蛋白表現，但也不能排除灌食這些成分改變腸道菌相，降低腸道中致病微生物含量而降低這些 LPS 模式中這些黏膜抗菌蛋白之含量。

(三) 小鼠迴腸黏膜中 TLR4、MD2、MyD88 表現量

灌食載劑後，注射 LPS 之 LCO 組小鼠迴腸黏膜中 TLR4、MD2、MyD88 表現量皆顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (圖十八)。然而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分均可著降低 LPS 誘發之小鼠迴腸黏膜中 TLR4、MD2、MyD88 表現量。TLR4 表現量方面，注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低 TLR4 表現量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛之 Cin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 TLR4 表現量 ($p < 0.05$)，其作用與精油相當，再增加灌食劑量 (Cin-H 組)，亦顯著降低 LPS 誘發之 TLR4 表現量 ($p < 0.05$)，但與 Cin-L 組間無顯著差異。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇之 Lin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 TLR4 表現量 ($p < 0.05$)，其作用與精油組相當，再增加灌食劑量 (Lin-H 組)，雖亦顯著降低 LPS 誘發之 TLR4 表現量 ($p < 0.05$)，但降低作用顯著不及 Lin-L 組 ($p < 0.05$)。MD2 表現量方面，注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低 MD2 表現量 ($p < 0.05$)。灌食相當於 TC 劑量中 Cin 之 Cin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 MD2 表現量 ($p < 0.05$)，其作用與 TC 相當，不過當提升 Cin 濃度 (Cin-H 組) 後降低作用顯著不及低劑量組 ($p < 0.05$)。灌食相當於 TC 劑量中 Lin 之 Lin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 MD2 表現量 ($p < 0.05$)，其作用與 TC 相當，再增加灌食劑量 (Lin-H 組) 同樣顯著降低 LPS 誘發之 MD2 表現量 ($p < 0.05$)，但降低作用與低劑量間無顯著差異。MyD88 表現量方面，注射 LPS 前若灌食 TC，與 LCO 組相較顯著降低 MyD88 表現量 ($p < 0.05$)。灌食相當於 TC 劑量中 Cin 和 Lin 含量之 Cin-L 組和 Lin-L 組，皆可顯著降低 LPS 誘發之 MyD88 表現量 ($p < 0.05$)，其作用皆與 TC 組相當，再增加灌食劑量 (Cin-H 組和 Lin-H 組)，雖同樣顯著降低 LPS 誘發之 MyD88 表現量 ($p < 0.05$)，但與相對應之低劑量組相較，Cin-H 組和 Lin-H 組降低 MyD88 表現量作用顯著不及低劑量組 ($p < 0.05$)。

(四) 小鼠迴腸黏膜中核萃取物 NF- κ B 含量

灌食載劑後，注射 LPS 之 LCO 組小鼠迴腸黏膜組織中 NF- κ B 含量顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (圖十九)。然而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分均可逆轉 LPS 誘發之小鼠迴腸黏膜組織中 NF- κ B 含量。注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較，精油顯著降低迴腸黏膜組織中 NF- κ B 含量 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L，顯著降低 LPS 誘發之 NF- κ B 含量 ($p < 0.05$)，其作用與精油相當，當提高肉桂醛灌食劑量 (Cin-H 組)，與 Cin-L 組相較，無統計學上的差異。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 顯著降低 LPS 誘發之 NF- κ B 含量 ($p < 0.05$)，其作用與精油相當，

但再增加灌食劑量 (Lin-H 組)，雖也顯著降低 LPS 誘發之 NF- κ B 含量 ($p < 0.05$)，但改善作用與低劑量間無顯著差異。

(五) 小鼠迴腸黏膜中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量

灌食載劑後，注射 LPS 之 LCO 組小鼠迴腸黏膜中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量皆顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (圖二十)。然而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分可顯著降低 LPS 誘發之小鼠迴腸黏膜中 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量。NLRP3 表現量方面，注射 LPS 前若灌食 TC，與 LCO 組相較顯著降低 NLRP3 表現量 ($p < 0.05$)。灌食相當於 TC 劑量中 Cin 之 Cin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 NLRP3 表現量 ($p < 0.05$)，但作用不及 TC 組，再增加灌食劑量 (Cin-H 組)，可進一步顯著降低迴腸黏膜中 NLRP3 表現量 ($p < 0.05$)，即 Cin 之作用呈劑量依賴性。灌食相當於 TC 劑量中 Lin 之 Lin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 NLRP3 表現量 ($p < 0.05$)，其作用與 TC 組相當，再增加灌食劑量 (Lin-H 組)，雖同樣顯著降低 LPS 誘發之 NLRP3 表現量 ($p < 0.05$)，但與相對應之低劑量組相較，Lin-H 組降低 NLRP3 表現量作用顯著不及低劑量組 ($p < 0.05$)。依此觀察，Cin 和 Lin 對於 TC 降低迴腸黏膜 NLRP3 表現量之作用均有貢獻。ASC 表現量方面，注射 LPS 前若灌食 TC，與 LCO 組相較顯著降低 ASC 表現量 ($p < 0.05$)。灌食相當於 TC 劑量中 Cin 之 Cin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 ASC 表現量 ($p < 0.05$)，其作用與 TC 組相當，再增加灌食劑量 (Cin-H 組)，雖同樣顯著降低 LPS 誘發之 ASC 表現量 ($p < 0.05$)，但與相對應之低劑量組相較，Cin-H 組降低 ASC 表現量作用顯著不及低劑量組 ($p < 0.05$)。灌食相當於 TC 劑量中 Lin 之 Lin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 ASC 表現量 ($p < 0.05$)，其作用與 TC 組相似，當提高 Lin 灌食劑量 (Lin-H 組)，與 Lin-L 組相較，雖高劑量降低 ASC 表現量之效果不及低劑量組，但低劑量與高劑量組間未達統計學意義。依此觀察，Cin 和 Lin 對於 TC 降低迴腸黏膜 ASC 表現量之作用均有貢獻。在 caspase-1 表現量方面，注射 LPS 前若灌食 TC，與 LCO 組相較顯著降低 caspase-1 表現量 ($p < 0.05$)。灌食相當於 TC 劑量中 Cin 之 Cin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 caspase-1 表現量 ($p < 0.05$)，其作用不及 TC 組，當提高 Cin 灌食劑量 (Cin-H 組)，與 Cin-L 組相較，雖高劑量降低 caspase-1 表現量之效果不及低劑量組，但低劑量與高劑量組間未達統計學意義。灌食相當於 TC 劑量中 Lin 之 Lin-L 組，可顯著降低 LPS 誘發之 caspase-1 表現量 ($p < 0.05$)，其作用與 TC 組相似，再增加灌食劑量 (Lin-H 組)，雖同樣顯著降低 LPS 誘發之 caspase-1 表現量 ($p < 0.05$)，但與相對應之低劑量組相較，Lin-H 組降低 caspase-1 表現量作用顯著不及低劑量組 ($p < 0.05$)。依此觀察，Cin 和 Lin 對於 TC 降低迴腸黏膜 caspase-1 表現量之作用均有貢獻。

(六) 小鼠迴腸黏膜中 caspase-1 活性

灌食載劑後注射 LPS 之 LCO 組小鼠迴腸黏膜組織中 caspase-1 活性顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (圖二十一)。然而觀察到注射 LPS 前若先灌食各種精油成分可顯著逆轉 LPS 誘發之小鼠迴腸黏膜組織中 caspase-1 活性。注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低迴腸黏膜組織中 caspase-1 活性 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛和桉羅木醇含量之 Cin-L 組和 Lin-L 組，也均顯著降低 caspase-1 活性 ($p < 0.05$)，但效果皆顯著不及精油 ($p < 0.05$)，若增加肉桂醛和桉羅木醇之灌食劑量 (分別為 Cin-H 組和 Lin-H 組)，改善 LPS 誘發之 caspase-1 活性的效果皆顯著優於相對應之低劑量組 ($p < 0.05$)，即肉桂醛和桉羅木醇皆呈劑量依賴性作用。

(七) 小鼠迴腸黏膜中 xanthine oxidase 活性

灌食載劑後，注射 LPS 之 LCO 組小鼠迴腸黏膜組織中 xanthine oxidase 活性顯著高於未注射 LPS 之 SCO 組 ($p < 0.05$) (圖十五)。然而觀察到注射 LPS 前若先灌食各種精油成分均可顯著降低 LPS 誘發之小鼠迴腸黏膜組織中 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)。注射 LPS 前若灌食精油，與 LCO 組相較顯著降低迴腸黏膜組織中 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)。灌食相當於精油劑量中肉桂醛含量之 Cin-L 顯著降低 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)，但作用不及精油，再增加灌食劑量 (Cin-H 組)，同樣顯著降低 LPS 誘發之 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)，進一步改善迴腸黏膜中 xanthine oxidase 活性，即肉桂醛之作用呈劑量依賴性。灌食相當於精油劑量中桉羅木醇含量之 Lin-L 顯著降低 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)，且作用與精油相似，再增加灌食劑量 (Lin-H 組)，同樣顯著降低 LPS 誘發之 xanthine oxidase 活性 ($p < 0.05$)，但改善作用與低劑量間無顯著差異。

(八) 小鼠迴腸組織形態學

灌食載劑後，注射 LPS 之 LCO 組小鼠與注射生理食鹽水的 SCO 組相較，迴腸黏膜出現嚴重的水腫，以 H&E 染色觀察迴腸絨毛形態學可發現，其絨毛高度變短與腺窩深度比例下降，絨毛密度降低且呈現融合及水腫的典型發炎形態，而在灌食精油活性成分後則上述絨毛發炎形態均獲得改善(圖二十二)。

(九) 小鼠迴腸組織嗜中性球浸潤

以 Myeloperoxidase (MPO) 免疫染色觀察土肉桂葉精油及其成分對於系統性發炎小鼠迴腸組織嗜中性球浸潤之影響(圖二十三)。組織切片圖中褐色顆粒為嗜中性球，而顏色愈深代表浸潤程度愈嚴重。本研究發現，灌食載劑後注射 LPS 之 LCO 組小鼠其迴腸組織中嗜中性球浸潤情形相較於未注射 LPS 之 SCO 組來的嚴重。而注射 LPS 前先灌食各種精油成分能減少 LPS 誘發之小鼠迴腸組織嗜中性球浸潤之現象。其中可觀察到注射 LPS 前若灌食 TC 能有效降低嗜中性球浸潤，而灌食 Cin-L，則發現降低嗜中性球浸潤現象不及 TC，但在提高劑量(Cin-H)後發現則能進一步抑制嗜中性球浸潤。而灌食 Lin-L 組與其高劑量(Lin-H 組)抑制嗜中性球效果相似，但皆不及 TC。依此觀察，Cin 和 Lin 對於 TC 抑制迴腸組織中嗜中性球浸潤均有貢獻。

(十) 小鼠迴腸組織 claudin-5、ZO-1 含量

以組織免疫染色 claudin-5，觀察土肉桂葉精油及其成分對於系統性發炎小鼠迴腸組織嗜中上皮細胞間 tight junction (圖二十四 (A))。組織切片圖中絨毛上褐色區塊為 claudin-5，而顏色愈深代表腸道單層上皮 tight junction 間連接愈完整。本研究發現，灌食載劑後注射 LPS 之 LCO 組小鼠其迴腸組織中 claudin-5 表現相較於未注射 LPS 之 SCO 組低，顯示 LPS 注射後可能破壞 tight junction 之間的連結。而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分(TC、Cin、Lin)均能逆轉 LPS 誘發之小鼠迴腸組織中 claudin-5 之表現。依此觀察，Cin 和 Lin 對於 TC 改善 LPS 破壞迴腸上皮細胞間 tight junction 均有貢獻。

以組織免疫染色 zonula occludens protein-1 (ZO-1)，觀察土肉桂葉精油及其成分對於系統性發炎小鼠迴腸組織上皮細胞內 tight junction (圖二十四 (B))。組織切片圖中絨毛上褐色區塊為 ZO-1，而顏色愈深代表腸道上皮細胞 tight junction 內結構愈完整。本研究發現，灌食載劑後注射 LPS 之 LCO 組小鼠其迴腸組織中 ZO-1 表現相較於未注射 LPS 之 SCO 組低，顯示 LPS 注射後可能破壞 tight junction 之間的連結。而注射 LPS 前若先灌食各種精油成分(TC、Cin、Lin)均能逆轉 LPS 誘發之小鼠迴腸組織 tight junction 中 ZO-1 之表現。其中注射 LPS 前若灌食 TC 發現能有效改善 ZO-1 之表現，而灌食等同 TC 劑量中 Cin 之 Cin-L 組，發現略微改善 ZO-1 表現，而增加劑量(Cin-H 組)則進一步改善 ZO-1 表現，但 Cin 兩者劑量改善效果皆不及 TC。灌食等同 TC 劑量中 Lin 之 Lin-L 組，發現能有效改善 ZO-1 表現，而增加劑量(Cin-H 組)則更進一步改善 ZO-1 之表現。依此觀察，Cin 和 Lin 對於 TC 改善 LPS 破壞迴腸上皮細胞內 tight junction 均有貢獻。

腸道是生物體中重要免疫組織，免疫功能主要分布在黏膜層上的腸道相關淋巴組織(GALT)，其中腸道上皮細胞障壁由 tight junction 和 adherens junction 組成，為抵禦病原菌的第一道免疫防線。有文獻指出，利用 LPS 注射於健康的狗(1 mg/kg)誘發成敗血症，在注射 LPS 後的 24 小時犧牲，從組織型態學染色觀察到腸道絨毛嚴重水腫、出血，黏膜糜爛不完整(Yang et al., 2014)。另外，注射 LPS 之大鼠，在誘發 24 小時後腸道中發現嗜中性球浸潤之現象(Gao et al., 2015)。本研究之發現與過去文獻相符，而在注射 LPS 前給予 TC、肉桂醛或桉羅木醇均能改善 LPS 誘發之腸黏膜損傷，增加絨毛高度和腺窩深度比例，並且促使絨毛密度密集且逆轉絨毛水腫之狀態(圖十)，且免疫化學染色證實，絨毛損傷之改善是透過減少 LPS 誘發之嗜中性球浸潤(圖十一)，及逆轉迴腸組織 tight junction 中 claudin-5 (圖十二)和 ZO-1 (圖十三)之表現量。根據 Han 等人之研究，以 *Escherichia coli* 之 LPS (2 mg/kg) 誘發小鼠成內毒素血症，觀察到其迴腸中 occludin 和 ZO-1 之表現降低(Han et al., 2004)。另外在 Gu 等人研究發現，以 10 mg/kg 之 LPS 注射於小鼠後 12 小時犧牲，發現與未注射 LPS 之小鼠結腸相較，其注射 LPS 之小鼠結腸 claudin-1、claudin-4、occludin 和 ZO-1 等 tight junctions 結構受到嚴重之破壞(Gu et al., 2011)。根據本研究的觀察，LPS 刺激下小鼠之迴腸 ZO-1 之表現不及控制組(圖十三)，這與 Han 和 Gu 等人之文獻報導相符，其可能原因為本研究之 LPS 誘發小鼠成相當嚴重之發炎反應，LPS

誘發組之腸道上皮已受損嚴重，上皮細胞失去維持 tight junctions 結構之能力，使 ZO-1 之表現下降。而本研究發現若在注射 LPS 前給予 TC、肉桂醛或桉羅木醇，均逆轉 LPS 誘發小鼠之迴腸 claudin-5 (圖十二) 和 ZO-1 (圖十三) 表現，此一結果應為首次關於台灣土肉桂葉精油成分肉桂醛和桉羅木醇改善迴腸道 tight junctions 結構 claudin-5 和 ZO-1 之破壞。推測灌食這些土肉桂成分，可能透過上述臟器/組織結果減少細胞激素產生且抑制 NF- κ B 之活化 (表十)，降低腸道 MLCK 活性、減少 PAMR 收縮，而維持迴腸中 tight junctions 結構 (claudin-5 和 ZO-1) 之完整。然而，目前有文獻指出病原體及其毒素也具有直接或間接調節腸道屏障的能力 (Kalischuk et al., 2009)，如 Yuhan 等人研究，致病性 *Escherichia coli* 會促使 MLCK 磷酸化，而促使 PAMR 收縮，造成 tight junctions (occludin 和 ZO-1) 結構損壞 (Yuhan et al., 1997)。故不能排除灌食土肉桂或其成分 (肉桂醛或桉羅木醇) 而改變腸道菌相，以至於逆轉 LPS 誘發後迴腸中 tight junction 蛋白 (claudin-5 和 ZO-1) 之含量。

(十一) 小鼠盲囊內容物 microbiota 特性

在腸道菌豐富度指數方面，雖然 Shannon 在組間無差異，但不論在 observed species 及 Chao 1 指數，均顯示灌食 TC、肉桂醛及桉羅木醇之組別指數增加均達顯著高於控制組，其中以 TC 增幅最大。由於注射 LPS 也會增加腸道菌相之豐富度指數，故尚不能據此判斷此菌相豐富度之增加利或不於腸道健康；進一步分析腸道菌種之分布 (圖二十五 (B)) 可發現 LPS 增加 Deferribacteres 比例 (此菌在 SCO 組未呈現有意義之分布比率)、增加其它菌種分布之平均比率 (增率達 50%)、但降低 Bacteroidetes 分布比率 (減率達 11.1%)，另外並未明顯影響 Firmicutes 比率；TC 及肉桂醛均增加 Firmicutes 分布比率；與 SCO 組相較，TC、Cin-L、Cin-H 組別之增率分別為 5.6%、6.4%、4.5%)，但桉羅木醇未呈現影響 Firmicutes 分佈比率之作用，此外，TC 逆轉 LPS 誘發增加之 Deferribacteres 比率，至於 Bacteroidetes 則除了 TC 無影響外，所有介入均增加其分佈比例；與 SCO 組相較 Cin-L、Cin-H、Lin-L、Lin-H 組別之增率分別達 4.03%、3.3%、6.4%、6.2%。

由於腸道健康的維護與菌相多樣性有關，正常下菌相豐富度增加，已知對於免疫功能之發展重要，然根據上述結果可知，TC、肉桂醛和或桉羅木醇調節腸道菌相之貢獻各不相同；TC 可能透過較大幅增加腸道菌相豐富度 (與控制組相較，observed species 及 Chao 1 指數均增加 50% 以上) 而肉桂醛和桉羅木醇則透過較微幅增加豐富性可能有助於對抗 LPS 誘發之 SIRS，另外 TC 及肉桂醛亦可能透過增加 Firmicutes 分布比率而提供對抗 LPS 誘發之 SIRS 之效果。至於 TC 逆轉 LPS 增加之 Deferribacteres 分布率，以及桉羅木醇與肉桂醛逆轉 LPS 降低之 Bacteroidetes 分布率是繼發於其抗發炎作用亦或是透過此種菌相變化提供保護作用，需進一步研究釐清

六、結論與建議

綜合本研究結果可知，土肉桂葉精油在不影響實驗動物正常生長情形下，可逆轉 LPS 引起之血液中黏附因子 sL-selectin、sICAM-1 和趨化因子 CINC-1 和 NO 的濃度及嗜中性球表面 CD11b/CD18 的表現量，並且改善腸黏膜組織中 ICAM-1、CINC-1 之含量，伴隨改善腸道嗜中性球浸潤及絨毛受損的情形。本研究首度提出 TLR4 與 NLRP3 訊號路徑與 LPS 誘發之迴腸損傷的關聯；此關聯性反映在迴腸黏膜局部之 TLR4、MD2、MyD88、NLRP3、ASC 表現量、caspase-1 活性及 NF- κ B 活化之增加。此外本研究首度顯示土肉桂葉精油在 SIRS 下保護系統免於發生過度發炎之狀態，及顯著改善迴腸黏膜損傷。本研究證實精油中的肉桂醛和桉羅木醇均是其在此 SIRS 發炎模式中的主要作用分子；肉桂醛及桉羅木醇之抗系統性發炎效應反映在改善之周邊血、肝臟及主要淋巴組織—脾臟與腸繫膜淋巴結中發炎相關細胞激素、化學激素、及 NO 之含量，且與降低淋巴組織中 TLR4 訊號路徑分子 TLR4、MD2、MyD88 和 NLRP3 發炎體相關分子 NLRP3、ASC 和 caspase-1 之表現，抑制 NF- κ B 活化並降低 caspase-1 活性有關。我們過去已指出，LPS 誘發小鼠 SIRS 造成之迴腸黏膜損傷可做為研究臨床重症相關腸道損傷的有用模式。本研究發現在 SIRS 相關之腸黏膜損傷模式中，土肉桂葉精油及其中的肉桂醛和桉羅木醇均可減少迴腸黏膜中 xanthine oxidase 活性、嗜中性球浸潤，改善腸黏膜發炎性損傷。此保護作用，雖伴隨著迴腸黏膜中

抗微生物胜肽表現下降，但也伴隨 tight junction 蛋白含量上升，這些作用均可能是透過抑制迴腸黏膜 TLR4 及 NLRP3 訊號系統所造成，本研究也發現其可能間接透過影響腸道菌相提供保護作用。由於本研究中，實驗動物所灌食的肉桂醛及桉羅木醇依據，是基於其分別在精油中的含量，而因為桉羅木醇占精油的 40.24%、肉桂醛占精油的 6.87%，所以桉羅木醇灌食劑量遠高出肉桂醛很多，因此也可發現在此抗發炎研究的數據中，肉桂醛的效果大多不如桉羅木醇，未來值得進一步比較此二分子在相同劑量下的抗發炎活性。

本研究結果建議，土肉桂葉精油具有應用於抗發炎及促進腸道健康之保健產品的潛力，且其主要成分肉桂醛和桉羅木醇未來可應用於預防臨床重症病患發炎問題。本研究結果亦建議，土肉桂葉精油、肉桂醛及桉羅木醇可能應用於其他發炎問題，如尿酸結晶引起之痛風性發炎，此為無菌發炎形式，主要涉及NLRP3活化，與LPS模式主要起始於TLR4活化不同，為目前執行科技部計畫之研究方向，預期將可開發出此精油更多應用性。

參考文獻

- Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Lett.* 2007; 581: 3723–3733.
- Anwar MA, Choi S. Gram-negative marine bacteria: structural features of lipopolysaccharides and their relevance for economically important diseases. *Mar drugs* 2014; 12: 2485-2514.
- Aprotosoiaie AC, Hâncianu M, Costache II, et al. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour Fragr J.* 2014; 29: 193-219.
- Armstrong L, Medford AR, Hunter KJ, et al. Differential expression of toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin Exp Immunol.* 2014; 136: 312–319.
- Assimakopoulos SF, Scopa CD, Zervoudakis G, et al. Bombesin and Neurotensin Reduce Endotoxemia, Intestinal Oxidative Stress, and Apoptosis in Experimental Obstructive Jaundice. *Ann Surg.* 2005; 241: 159–167.
- Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, et al. Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22: 464–471.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997; 336: 1066-1071.
- Berg R. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 1997; 4: 430–435.
- Black KE, Collins SL, Hagan RS, et al. Hyaluronan fragments induce IFN β via a novel TLR4-TRIF-TBK1-IRF3- dependent pathway. *J Inflamm.* 2013; 10: 1-9.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010; 7: 335-336.
- Chamulitrat W, Skrepnik NV, Spitzer JJ. Endotoxin-induced oxidative stress in the rat small intestine: role of nitric oxide. *Shock* 1996; 5: 217-222.
- Chao LK, Hua KF, Hsu HY, et al. Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 220-231.
- Chao LK, Hua KF, Hsu HY, et al. Study on the Antiinflammatory Activity of Essential Oil from Leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 7274-8.
- Chiang YH, Jen LN, Su HY, et al. Effects of garlic oil and two of its major organosulfur compounds, diallyl disulfide and diallyl trisulfide, on intestinal damage in rats injected with endotoxin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 213: 46-54.
- Chuang SY, Yang CH, Chou CC, Chiang YP, Chuang TH, Hsu LC. TLR-induced PAI-2 expression suppresses IL-1 β processing via increasing autophagy and NLRP3 degradation. *PNAS.* 2013; 110: 16079-16084.
- de Cássia da Silveira E Sá R, Andrade LN, Dos Reis Barreto de Oliveira R, et al. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids Found in Essential Oils. *Molecules,* 2014; 19: 1459-1480.
- Deitch EA, Ma L, Ma WJ, et al. Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice. *J Clin Invest.* 1989; 84: 36-42.
- Deitch EA, Specian RD, Berg RD. Endotoxin-induced bacterial translocation and mucosal permeability: role of xanthine oxidase, complement activation, and macrophage products. *Crit Care Med.* 1991; 19: 785–791.
- Dellinger P, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* 2008; 34: 17–60.
- Deng S, Yu K, Zhang B, et al. Toll-Like Receptor 4 Promotes NO Synthesis by Upregulating GCHI Expression under Oxidative Stress Conditions in Sheep Monocytes/Macrophages. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: ID 359315, 11 pages
- DeSantis TZ Jr, Hugenholtz P, Keller K, et al. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34: W394-W399.
- Dinarelli CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis.* 2003; 187: S370-S384.
- Faggioni R, Cattley RC, Guo J, Flores S, Brown H, et al. IL-18-Binding protein protects against lipopolysaccharide- induced lethality and prevents the development of Fas/Fas ligand-mediated models of liver disease in mice. *J Immunol.* 2001; 167: 5913-5920.

- Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res.* 2004; 10: 71-84.
- Ford RA, Domeyer B, Easterday O, et al. Criteria for development of a database for safety evaluation of fragrance ingredients. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2000; 31: 155-181.
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-1131.
- Furie MB, Randolph GJ. Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol.* 1995; 146: 1287-301.
- Ganz M, Csak T, Nath B, et al. Lipopolysaccharide induces and activates the Nalp3 inflammasome in the liver. *World J Gastroenterol.* 2011; 17: 4772-4778.
- Gao X, Hao S, Yan H, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the intestine damage in endotoxemic rats. *J Surg Res.* 2015; 195: 211 -218.
- Goll R, Granlund AVB. Intestinal barrier homeostasis in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2015; 50: 3-12.
- Gowder SJT, Devaraj H. Effect of the Food Flavour Cinnamaldehyde on the Antioxidant Status of Rat Kidney. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006; 99: 379–382.
- Gribar SC, Anand RJ, Sodhi CP, et al. The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *J Leukocyte Biol.* 2008; 83: 493-498.
- Gu L, Li N, Gong J, et al. Berberine Ameliorates Intestinal Epithelial Tight-Junction Damage and Down-regulates Myosin Light Chain Kinase Pathways in a Mouse Model of Endotoxemia. *J Infect Dis.* 2011; 203: 1602-1612.
- Han X, Fink MP, Yang R, et al. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock* 2004; 21: 261-270.
- Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterol.* 2002; 122: 1987–2000.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999; 162: 3749-3752.
- Huo M, Cui X, Xue J, et al. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *J Surg Res.* 2013; 180: e47-e54.
- Jiang W, Lv H, Wang H, et al. Activation of the NLRP3/caspase-1 inflammasome in human dental pulp tissue and human dental pulp fibroblasts. *Cell Tissue Res.* 2015; 361: 541-555
- Jitprasertwong P, Jaedicke KM, Nile CJ, et al. Leptin enhances the secretion of interleukin (IL)-18, but not IL-1b, from human monocytes via activation of caspase-1. *Cytokine* 2014; 65: 222-230.
- Kalischuk LD, Inglis GD, Buret AG. *Campylobacter jejuni* induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathogens* 2009; 1: 1-10.
- Kaparakis M, Philpott DJ, Ferrero RL. Mammalian NLR proteins; discriminating foe from friend. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85: 495–502.
- Karin M. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999; 18: 6867-6874.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11: 115-122.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11: 373-384.
- Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, et al. Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4. *Science* 2013; 341: 1246 -1249.
- Kim DH, Kim CH, Kim MS. Suppression of age-related inflammatory NF- κ B activation by cinnamaldehyde. *Biogerontol.* 2007; 8: 545–554.
- Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, et al. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med.* 2008; 14: 476–484.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79: 5112-5120.
- Kuo CH, Lee SH, Chen KM, et al. Effect of garlic oil on neutrophil infiltration in small intestine of endotoxin-injected rats and its association with levels of soluble and cellular adhesion molecules. *J Agric Food Chem.* 2011; 59: 7717-7725.
- Lai PF, Cheng CF, Lin H, et al. ATF3 Protects against LPS-Induced Inflammation in Mice via Inhibiting

HMGB1 Expression. *eCAM*. 2013; 716481: 1-14.

Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 2014; 157: 1013-1022.

Larsen MH, Albrechtsen A, Thørner LW, et al. Genome-Wide Association Study of Genetic Variants in LPS-Stimulated IL-6, IL-8, IL-10, IL-1ra and TNF- α Cytokine Response in a Danish Cohort. *PLoS One*. 2013; 8: 1-6.

Larsson E, Tremaroli V, Lee YS, et al. Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut* 2012; 61: 1124-1131.

Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 397-411.

Lee SH, Liu YT, Chen KM, et al. Effect of garlic sulfur compounds on neutrophil infiltration and damage to the intestinal mucosa by endotoxin in rats. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50: 567-574

Lee SC, Hsu JS, Li CC, et al., Protective effect of leaf essential oil from *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira on endotoxin-induced intestinal injury in mice associated with suppressed local expression of molecules in the signaling pathways of TLR4 and NLRP3. *PLoS One*. 2015; 20: e0120700.

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

Leeuwenberg JF, Smeets F, Neefjes JJ, et al. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunol*. 1992; 77: 543–549.

Leung Y, Panaccione R. Anti-adhesion molecule strategies for Crohn disease. *BioDrugs* 2008; 22: 259–264.

Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, et al. The surviving sepsis campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010; 36: 222–231.

Li X, Su J, Cui X, et al. Can we predict the effects of NF- κ B inhibition in sepsis? Studies with parthenolide and ethyl pyruvate. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18: 1047-1060.

Liao JC, Deng JS, Chiu CS, et al. Anti-Inflammatory Activities of *Cinnamomum cassia* Constituents In Vitro and In Vivo. *eCAM*. 2012; 429320: 1-12.

Lin SS, Lu TM, Chao PC, et al. *In vivo* cytokine modulatory effects of cinnamaldehyde, the major constituent of leaf essential oil from *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. *Phytother Res*. 2011; 25: 1511-1518.

Liu L, Gu H, Liu H, et al. Protective Effect of Resveratrol against IL-1 β -Induced Inflammatory Response on Human Osteoarthritic Chondrocytes Partly via the TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling Pathway: An “in Vitro Study”. *Int J Mol Sci*. 2014; 15: 6925-6940.

Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, et al. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev*. 2007; 220: 60-81.

Lozupone C, Hamady M, Knight R. UniFrac—an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 371.

Lukens JR, Gross JM, Kanneganti TD. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Front Immunol*. 2012; 3: 315.

Madouri F, Guillou N, Fauconnier L, et al. Caspase-1 activation by NLRP3 inflammasome dampens IL-33-dependent house dust mite-induced allergic lung inflammation. *J Mol Cell Biol*. 2015; 7 :351-365

Maldonado-Contreras AL, McCormick BA. Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity. *Cell Tissue Res*. 2011; 343: 5-12.

Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; 440: 228–232.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27: 229-265.

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

Matsuda N, Hattori Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci*. 2006; 101: 189–198.

Mittal R, Coopersmith CM. Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends Mol Med*. 2014; 20:

Munteanu M, Sturza A, Schiller A, et al. Endothelial Dysfunction in Diabetes – Classic Sources of Vascular Oxidative Stress (Nadph Oxidases, Enos Uncoupling and Xanthine Oxidase). *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis.* 2013; 20: 149-155.

Nadatani Y, Huo X, Zhang X, et al. In Barrett's Epithelial Cells, Lipopolysaccharide (LPS) Induces TLR4 Signaling With Activation of the NLRP3 Inflammasome, Pro-Inflammatory Cytokine Secretion and Pyroptosis: A Potential Role for the Esophageal Microbiome in Barrett's Carcinogenesis. *Gastroenterol.* 2015; 148: S-100.

Oberholzer A, Steckholzer U, Kurimoto M, et al. Interleukin-18 plasma levels are increased in patients with sepsis compared to severely injured patients. *Shock* 2001; 16: 411-414.

O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, et al. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 1998; 42: 29-35.

O'Dwyer ST, Michie HR, Ziegler TR, et al. A single dose of endotoxin increases intestinal permeability in healthy humans. *Arch Surg.* 1988; 123: 1459-1464.

Ohland CL, MacNaughton WK. 2010. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298: G807-19.

Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 290: C917-C924.

Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, et al. Antiinflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomed.* 2002; 9: 721-726.

Peana AT, Marzocco S, Popolo A, et al. (–)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sci.* 2006; 78: 719-723.

Pulido D, Nogués MV, Boix E, et al. Lipopolysaccharide Neutralization by Antimicrobial Peptides: A Gambit in the Innate Host Defense Strategy. *J Innate Immun.* 2012; 4: 327-336.

Qiao Y, Wang P, Qi J, et al. TLR-induced NF- κ B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages. *FEBS Lett.* 2012; 586: 1022–1026.

Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. *J Ethnopharmacol.* 2007; 114: 78–85.

Rock KL, Kataoka H, Lai JJ. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. *Nat Rev Rheumatol.* 2013; 9: 13-23.

Ruud J, Wilhelms DB, Nilsson A, et al. Inflammation- and tumor-induced anorexia and weight loss require MyD88 in hematopoietic/myeloid cells but not in brain endothelial or neural cells. *FASEB J.* 2013; 27: 51973-1980.

Scharl M, Rogler G. Microbial sensing by the intestinal epithelium in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int J Inflamm.* 2010; 2010: Article ID 671258.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 7537-7541.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004; 75: 163–189.

Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 165974.

Shimada Y, Sato S, Hasegawa M. et al. Elevated serum L-selectin levels and abnormal regulation of L-selectin expression on leukocytes in atopic dermatitis: soluble L-selectin levels indicate disease severity. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104: 163–168.

Shimizu K, Ogura H, Asahara T, et al. Gastrointestinal dysmotility is associated with altered gut flora and septic mortality in patients with severe systemic inflammatory response syndrome: a preliminary study. *Neurogastroenterol Motil.* 2011a; 23: 330-335.

Shimizu K, Ogura H, Goto M, et al. Altered gut flora and environment in patients with severe SIRS. *J Trauma.* 2006; 60: 126 1-33.

Shimizu K, Ogura H, Hamasaki T, et al. Altered gut flora are associated with septic complications and death in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Dig Dis Sci.* 2011b; 56: 1171-1177.

- Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterol.* 1984; 86: 174–193.
- Singh AR, Peirce SK, Joshi S, et al. PTEN and PI-3 kinase inhibitors control LPS signaling and the lymphoproliferative response in the CD19^b B cell compartment. *Exp Cell Res.* 2014; 327: 78-90.
- Stefanelli T, Malesci A, De La Rue SA, et al. Antiadhesion molecule therapies in inflammatory bowel disease: touch and go. *Autoimmun Rev.* 2008; 7: 364–369.
- Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, et al. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 2006; 24: 317-327.
- Tung YT, Chua MT, Wang SY, et al. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresour Technol.* 2008; 99: 3908-3912.
- Tsujimoto H, Ono S, Majima T, et al. Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock* 2005; 23: 39–44.
- Tung YT, Yen PL, Lin CY, et al. Antiinflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves. *Pharm Biol.* 2010; 48: 1130–1136.
- Vaishnava S, Behrendt CL, Ismaila AS, et al. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 20858- 20863.
- van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis.* 200; 8: 32–43.
- Wang Q, Doerschuk CM. The signaling pathways induced by neutrophil_endothelial cell adhesion. *Antioxid. Redox Signal* 2002; 4: 39–47.
- Wang SY, Yang CW, Liao JW, et al. Essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum* acts as a xanthine oxidase inhibitor and reduces the serum uric acid levels in oxonate-induced mice. *Phytomed.* 2008; 15: 940–945.
- Wei QY, Xiong JJ, Jiang H, Zhang C, et al. The antimicrobial activities of the cinnamaldehyde adducts with amino acids. *Int J Food Microbiol.* 2011; 150: 164-170.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000; 80: 617–653.
- Wittebole X, Coyle SM, Kumar A, et al. Expression of tumour necrosis factor receptor and Toll-like receptor 2 and 4 on peripheral blood leucocytes of human volunteers after endotoxin challenge: a comparison of flow cytometric light scatter and immunofluorescence gating. *Clin Exp Immunol.* 2005; 141: 99–106.
- Xia MZ, Liang YL, Wang H, et al. Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *J Pineal Res.* 2012; 53: 325-334.
- Xu X, Yin P, Wan C, et al. Punicalagin Inhibits Inflammation in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages via the Suppression of TLR4-Mediated MAPKs and NF-κB Activation. *Inflammation* 2014; 37: 956-965.
- Yamamoto M, Yaginuma K, Tsutsui H, et al. ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. *Genes Cells* 2004; 9: 1055-1067.
- Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 11942-11947.
- Yang H, Song Z, Jin H, et al. Protective effect of rhBNP on intestinal injury in the canine models of sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2014; 19: 262-266.
- Yang H, Wang H, Ju Z, et al. MD-2 is required for disulfide HMGB1–dependent TLR4 signaling. *J Exp Med.* 2015; 212: 5-14.
- Ye Z, Ting JP-Y. NLR. The nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20: 3–9.
- Yoon YK, Woo HJ, Kim Y. *Orostachys japonicus* Inhibits Expression of the TLR4, NOD2, iNOS, and COX-2 Genes in LPS-Stimulated Human PMA-Differentiated THP-1 Cells by Inhibiting NF-κB and MAPK Activation. *eCAM.* 2015; 682019: 1-9.
- Yu M, Wang H, Ding A, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 2006; 26: 174–179.
- Yuhan R, Koutsouris A, Hecht G. Enteropathogenic *E. coli*-induced phosphorylation of myosin light chain increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterol.* 1997; 113: 1873-1882.
- Zanoni I, Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3: 1-6.
- Zhang W, Xu X, Kao R, et al. Role of cardiac fibroblasts in myocardial dysfunction in mice with sepsis:

effect of NLRP3 inflammasome activation (1096.7). *FASEB J.* 2014; 1096: 1-7.

Zhang XH, Li ML, Wang B, et al. Caspase-1 inhibition alleviates acute renal injury in rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2014; 14: 10457-10463.

Zhang XP, Zhang J, Song QL, et al. Mechanism of acute pancreatitis complicated with injury of intestinal mucosa barrier. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2007; 8: 888-895.

Zheng Y, Gardner SE, Clarke MCH. ATVB in Focus: Cell Death in Cardiovascular Disease: Cell Death, Damage-Associated Molecular Patterns, and Sterile Inflammation in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 2781-2786.

李漢中, 鄭森松, 劉如芸, 張上鎮. 2003. 不同地理品系土肉桂葉部精油之化學多態性. *中華林學季刊.* 36(4), 411-422.

許捷盛 倪曼婷 蔡幸芬 柯千惠 李世傑 劉承慈. 2013. 土肉桂葉精油對於內毒素誘發之系統性發炎作用及發炎訊號路徑分子之影響. 台灣營養學會第三十九屆年會 (台中)

王詩芸 蔡幸芬 蔡幸紋 李世傑 劉承慈. 2014. 台灣土肉桂葉精油主要活性成分枷羅木醇及肉桂醛對於LPS誘發之小鼠系統性發炎反應之影響. 台灣營養學會第四十屆年會 (新北市)

王詩芸, 蔡幸紋, 洪宜葶, 李世傑, 劉承慈. 2015. 台灣土肉桂葉精油活性成分枷羅木醇及肉桂醛改善 LPS 誘發之小鼠迴腸黏膜發炎指數及 TLR4 及 NLRP3 發炎訊號路徑分子表現量. 台灣營養學會第四十一屆年會 (台南)

附表與附圖

表一、正常控制組及灌食不同劑量土肉桂精油之注射LPS各組大鼠臟器重/體重百分比⁸

| 臟器/體重 x 100 (%) | SCO | LCO | TC-L | TC-M | TC-H |
|-----------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|
| 脾 | 0.381 ± 0.01 | 0.425 ± 0.02 [#] | 0.427 ± 0.02 | 0.430 ± 0.01 | 0.410 ± 0.01 |
| 腎 | 1.016 ± 0.02 | 1.091 ± 0.04 [#] | 1.084 ± 0.04 | 1.055 ± 0.03 | 1.090 ± 0.02 |
| 肝 | 3.437 ± 0.38 | 4.492 ± 0.15 [#] | 4.230 ± 0.34 | 3.638 ± 0.36 | 4.263 ± 0.73 |
| 頸部淋巴結 | 0.050 ± 0.01 | 0.065 ± 0.02 [#] | 0.058 ± 0.01 | 0.063 ± 0.01 | 0.061 ± 0.01 |

⁸注射 saline 並灌食載劑的大鼠 (SCO 組) 和注射 LPS 並分別灌食載劑、低、中、高劑量精油之大鼠 (LCO 組、TC-L 組、TC-M 組、TC-H 組)，犧牲後收集臟器並秤重。各組結果以 mean ± SD 表示，[#]表示 SCO 與 LCO 兩組有顯著差異 (p < 0.05)。n=6。

表二、正常控制組及灌食不同劑量土肉桂精油之注射 LPS 各組大鼠血清中促發炎激素 TNF- α 、IL-1 β 及 NO 含量的影響⁸

| (pg/mL) | SCO | LCO | TC-L | TC-M | TC-H |
|--------------------------------|-------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| TNF-α | 252.8 \pm 9.09 | 1470.2 \pm 47.71 ^{#b} | 417.1 \pm 15.75 ^a | 911.5 \pm 29.95 ^{ab} | 731.9 \pm 25.55 ^{ab} |
| IL-1β | 123.5 \pm 67.25 | 358.7 \pm 21.41 ^{#b} | 218.8 \pm 13.87 ^{ab} | 125.5 \pm 61.65 ^a | 239.5 \pm 21.48 ^{ab} |
| NO | 36.13 \pm 1.24 | 138.91 \pm 3.18 ^{#b} | 72.35 \pm 2.46 ^a | 85.46 \pm 2.54 ^a | 70.32 \pm 2.27 ^a |

⁸注射 saline 並灌食載劑的大鼠 (SCO 組) 和注射 LPS 並分別灌食載劑、低、中、高劑量精油之大鼠 (LCO 組、TC-L 組、TC-M 組、TC-H 組)，犧牲後收集下腔靜脈血，製備血清進行分析。各組結果以 mean \pm SD 表示，[#]表示 SCO 與 LCO 兩組有顯著差異 ($p < 0.05$)；ab 符號不相同者表示注射 LPS 各組間有顯著差異 ($p < 0.05$)。n=6。

表三、正常控制組及灌食不同劑量土肉桂精油之注射 LPS 各組大鼠迴腸黏膜上皮層 ICAM-1、CINC-1、促發炎激素、NO 含量的影響[§]

| (pg/mg protein) | SCO | LCO | TC-L | TC-M | TC-H |
|--------------------------------|------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| ICAM-1 | 749.4±46.7 | 2216±892.9 ^{#b} | 1019±475.4 ^a | 1322±131.1 ^a | 1243±708.8 ^a |
| CINC-1 | 424.4±14.5 | 1902±388.7 ^{#c} | 1095±400.7 ^b | 536.3±15.0 ^a | 563.6±35.1 ^a |
| TNF-α | 23.38±1.62 | 93.76±3.96 ^{#b} | 40.45±3.41 ^a | 46.11±3.83 ^a | 34.65±3.52 ^a |
| IL-1β | 75.96±4.32 | 216.8±10.55 ^{#b} | 112.8±68.95 ^a | 89.27±5.87 ^a | 87.50±4.50 ^a |
| NO | 14.56±6.20 | 29.91±8.38 ^{#b} | 22.05±4.31 ^{ab} | 17.24±5.56 ^a | 13.59±5.75 ^a |

[§]注射 saline 並灌食載劑的大鼠 (SCO 組) 和注射 LPS 並分別灌食載劑、低、中、高劑量精油之大鼠 (LCO 組、TC-L 組、TC-M 組、TC-H 組)，犧牲後收集迴腸黏膜組織進行分析。各組結果以 mean \pm SD 表示，[#]表示 SCO 與 LCO 兩組有顯著差異 ($p < 0.05$)；abc 符號不相同者表示注射 LPS 各組間有顯著差異 ($p < 0.05$)。n=6。

表四、正常控制組及灌食不同劑量土肉桂精油之注射 LPS 各組小鼠臟器重/體重百分比⁸

| organ wt/body wt x 100 (%) | SCO | LCO | TC-L | TC-M | TC-H |
|-------------------------------|-------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
| spleen | 0.22 ± 0.02 | 0.33 ± 0.04 [#] | 0.31 ± 0.03 | 0.31 ± 0.02 | 0.32 ± 0.05 |
| kidney | 0.65 ± 0.06 | 0.71 ± 0.07 | 0.68 ± 0.07 | 0.69 ± 0.05 | 0.72 ± 0.06 |
| liver | 4.51 ± 0.61 | 4.80 ± 0.40 | 4.85 ± 0.34 | 4.96 ± 0.30 | 4.29 ± 1.52 |
| mesenteric lymph nodes | 0.07 ± 0.01 | 0.11 ± 0.01 [#] | 0.10 ± 0.02 | 0.10 ± 0.02 | 0.10 ± 0.03 |

⁸Values are the mean ± SD for six mice per group. SCO, control mice treated with vehicle; LCO, endotoxin-injected mice treated with vehicle; TC-L, endotoxin-injected mice treated with 6.5 mg/(kg bw) of TC; TC-M, endotoxin-injected mice treated with 13 mg/(kg bw) of TC; TC-H, endotoxin-injected mice treated with 26 mg/(kg bw) of TC. #Significantly different from the control group (p < 0.05).

表五、正常控制組及灌食不同劑量土肉桂精油之注射 LPS 各組小鼠周邊血中 nitrate/nitrite 及促發炎細胞激素濃度[§]

| | SCO | LCO | TC-L | TC-M | TC-H |
|----------------------------------|-------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| nitrate/nitrite (nmol/mL) | 40.6 ± 21.8 | 624.0 ± 96.9 ^{#a} | 406.3 ± 137.5 ^b | 375.4 ± 148.4 ^b | 315.6 ± 76.6 ^b |
| IL-1β (pg/mL) | 62.6 ± 29.2 | 215.3 ± 44.4 ^{#a} | 181.3 ± 42.8 ^a | 119.6 ± 35.3 ^b | 110.0 ± 37.2 ^b |
| TNF-α (pg/mL) | 37.9 ± 10.5 | 474.5 ± 22.4 ^{#a} | 421.4 ± 61.9 ^a | 278.5 ± 45.4 ^b | 228.6 ± 40.6 ^b |
| IFN-γ (pg/mL) | 1.63 ± 0.51 | 106.34 ± 8.25 ^{#a} | 71.42 ± 6.19 ^b | 70.37 ± 2.39 ^b | 68.67 ± 2.90 ^b |
| IL-18 (pg/mL) | 45.3 ± 11.7 | 283.0 ± 78.60 ^{#a} | 167.4 ± 65.3 ^b | 136.4 ± 47.5 ^{bc} | 91.5 ± 22.7 ^c |

[§]Values are the mean ± SD for six mice per group. SCO, control mice treated with vehicle; LCO, endotoxin-injected mice treated with vehicle; TC-L, endotoxin-injected mice treated with 6.5 mg/(kg bw) of TC; TC-M, endotoxin-injected mice treated with 13 mg/(kg bw) of TC; TC-H, endotoxin-injected mice treated with 26 mg/(kg bw) of TC. #Significantly different from the control group (p < 0.05). a, b, and c indicate the means within a row not sharing the same superscript letter are significantly different (p < 0.05).

表六、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或枷羅木醇之注射LPS各組小鼠生長代謝值⁸

| | SCO | LCO | TC | Cin-L | Cin-H | Lin-L | Lin-H |
|-------------|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 灌食前體重(g) | 23.89±2.34 | 23.50±2.02 | 24.26±1.87 | 23.82±1.52 | 23.84±1.63 | 24.29±1.58 | 24.24±1.49 |
| 誘發前體重(g) | 24.71±2.59 | 24.12±2.49 | 24.61±2.12 | 24.16±1.52 | 24.50±1.99 | 25.37±1.25 | 25.11±1.03 |
| 犧牲前體重(g) | 25.01±0.60 | 23.01±1.5 ^{*a} | 23.78±1.17 ^{ab} | 24.26±0.30 ^{ab} | 24.18±1.46 ^{ab} | 24.60±0.38 ^b | 24.99±0.53 ^b |
| 灌食前後體重差異(g) | 0.89±0.51 | 0.81±0.44 | 0.85±0.51 | 0.93±0.49 | 0.96±0.55 | 0.81±0.50 | 1.06±0.43 |
| 誘發前後體重變化(g) | -1.14±0.3 | -3.16±0.34 ^{*a} | -1.59±0.18 ^d | -1.63±0.24 ^d | -2.38±0.32 ^b | -1.99±0.22 ^c | -1.74±0.24 ^d |
| 攝食量 (g) | | | | | | | |
| Day 0 | 4.04±0.78 | 4.60±0.81 | 4.28±1.61 | 4.47±1.53 | 5.58±1.44 | 4.98±0.74 | 5.03±0.70 |
| Day17 | 5.21±0.60 | 5.27±0.81 | 5.15±0.92 | 5.34±0.75 | 5.34±1.37 | 5.48±0.77 | 5.51±0.67 |
| 飲水量 (ml) | | | | | | | |
| Day 0 | 4.71±2.50 | 4.83±2.23 | 4.57±1.81 | 5.29±1.60 | 5.14±2.04 | 6.14±1.21 | 7.14±2.79 |
| Day17 | 5.57±2.30 | 6.17±1.33 | 4.83±1.72 | 6.33±1.37 | 6.40±1.67 | 6.29±2.14 | 6.67±1.63 |
| 排尿量 (ml) | | | | | | | |
| Day 0 | 0.53±0.51 | 0.54±0.45 | 0.61±0.45 | 0.61±0.63 | 0.35±0.38 | 0.48±0.35 | 1.08±1.16 |
| Day17 | 0.56±0.33 | 0.49±0.46 | 0.25±0.32 | 0.51±0.41 | 0.47±0.26 | 14.75±37.59 | 0.37±0.52 |
| 糞便量 (g) | | | | | | | |
| Day 0 | 1.10±0.35 | 1.16±0.33 | 1.02±0.23 | 1.15±0.27 | 1.21±0.44 | 1.20±0.27 | 1.41±0.40 |
| Day17 | 1.18±0.31 | 1.20±0.13 | 1.15±0.28 | 1.15±0.35 | 1.11±0.37 | 1.33±0.32 | 1.33±0.25 |

⁸Values are the mean ± SD for six mice per group. SCO, control mice treated with vehicle; LCO, endotoxin-injected mice treated with vehicle; TC, endotoxin-injected mice treated with 13 mg/(kg bw) of TC; Cin-L or Cin-H, endotoxin-injected mice treated with 0.45 or 0.9 mg/(kg bw) of cinnamaldehyde, respectively; Lin-L or Lin-H, endotoxin-injected mice treated with 2.6 or 5.2 mg/(kg bw) of linalool, respectively. #Significantly different from the control group (p < 0.05). a, b, and c indicate the means within a row not sharing the same superscript letter are significantly different (p < 0.05).

表七、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或桉羅木醇之注射LPS各組小鼠臟器/體重百分比之影響[§]

| Organ wt/body wt (%) | SCO | LCO | TC | Cin-L | Cin-H | Lin-L | Lin-H |
|----------------------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Kidney [★] | 0.661±0.045 | 0.697±0.035 | 0.672±0.035 | 0.682±0.032 | 0.691±0.033 | 0.674±0.029 | 0.669±0.030 |
| Liver | 4.564±0.375 | 4.723±0.286 | 4.557±0.233 | 4.664±0.188 | 4.718±0.163 | 4.711±0.217 | 4.712±0.170 |
| Spleen | 0.208±0.015 | 0.323±0.014* ^a | 0.303±0.015 ^{bc} | 0.297±0.017 ^c | 0.314±0.025 ^{ab} | 0.300±0.014 ^{bc} | 0.307±0.015 ^{bc} |
| Mesenteric lymph nodes | 0.079±0.007 | 0.129±0.015* ^a | 0.109±0.015 ^{bc} | 0.117±0.015 ^{ab} | 0.101±0.012 ^c | 0.113±0.013 ^{bc} | 0.116±0.012 ^{ab} |
| Epididymal adipose tissue [⊕] | 0.410±0.068 | 0.456±0.112 | 0.454±0.072 | 0.440±0.051 | 0.459±0.046 | 0.457±0.066 | 0.436±0.051 |

[§]Values are the mean ± SD for six mice per group. [★]Mean single kidney weight/body weight (%). [⊕]Mean weight of epididymal adipose tissue/body weight (%). SCO, control mice treated with vehicle; LCO, endotoxin-injected mice treated with vehicle; TC, endotoxin-injected mice treated with 13 mg/(kg bw) of TC; Cin-L or Cin-H, endotoxin-injected mice treated with 0.45 or 0.9 mg/(kg bw) of cinnamaldehyde, respectively; Lin-L or Lin-H, endotoxin-injected mice treated with 2.6 or 5.2 mg/(kg bw) of linalool, respectively. #Significantly different from the control group (p < 0.05). a, b, and c indicate the means within a row not sharing the same superscript letter are significantly different (p < 0.05).

表八、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或桉羅木醇之注射LPS各組小鼠血漿中促發炎激素及Nitrate/nitrite濃度[§]

| | SCO | LCO | TC | Cin-L | Cin-H | Lin-L | Lin-H |
|---------------------------|------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Nitrate/nitrite (nmol/ml) | 129.9±53.4 | 1058.5±71.0 ^{*a} | 903.8±72.7 ^b | 1009.0±74.5 ^a | 907.3±88.3 ^b | 790.6±51.4 ^c | 805.5±45.2 ^c |
| IL-1 β (pg/ml) | 10.63±1.91 | 74.06±3.37 ^{*a} | 24.74±2.69 ^d | 48.24±3.58 ^b | 32.09±4.77 ^c | 50.26±4.55 ^b | 34.23±5.13 ^c |
| IL-18 (pg/ml) | 153.2±52.7 | 1118.1±107.5 ^{*a} | 489.0±52.2 ^{cd} | 1065.6±73.0 ^a | 568.9±42.7 ^c | 705.8±72.3 ^b | 445.7±38.0 ^d |
| TNF- α (pg/ml) | 3.2±2.0 | 202.5±12.7 ^{*a} | 164.2±19.5 ^{bc} | 176.6±11.0 ^b | 132.9±12.0 ^d | 158.7±13.6 ^{bc} | 150.9±12.4 ^{cd} |
| IFN- γ (ng/ml) | 0.34±0.17 | 45.57±3.83 ^{*a} | 11.61±3.84 ^c | 13.47±4.19 ^c | 11.48±5.10 ^c | 22.79±2.08 ^b | 9.45±1.60 ^c |
| HMG-1 (pg/ml) | 24.37±3.47 | 76.86±5.10 ^{*a} | 35.60±3.59 ^d | 48.68±2.76 ^b | 37.48±3.21 ^d | 42.59±3.96 ^c | 38.69±3.25 ^{cd} |

[§]Values are the mean \pm SD for six mice per group. SCO, control mice treated with vehicle; LCO, endotoxin-injected mice treated with vehicle; TC, endotoxin-injected mice treated with 13 mg/(kg bw) of TC; Cin-L or Cin-H, endotoxin-injected mice treated with 0.45 or 0.9 mg/(kg bw) of cinnamaldehyde, respectively; Lin-L or Lin-H, endotoxin-injected mice treated with 2.6 or 5.2 mg/(kg bw) of linalool, respectively. #Significantly different from the control group ($p < 0.05$). a, b, and c indicate the means within a row not sharing the same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

表九、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或桉羅木醇之注射 LPS 各組小鼠脾臟中促發炎激素及 Nitrate/nitrite 含量[§]

| | SCO | LCO | TC | Cin-L | Cin-H | Lin-L | Lin-H |
|--------------------------------|------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Nitrate/nitrite (nmol/mg prot) | 1.15±0.37 | 10.91±3.02* ^a | 3.26±0.69 ^{cd} | 5.10±0.60 ^b | 2.65±0.72 ^d | 4.57±0.89 ^{bc} | 4.06±0.52 ^{bcd} |
| IL-1 β (pg/mg prot) | 148.5±33.7 | 534.0±48.1* ^a | 219.0±31.3 ^{bc} | 265.2±52.7 ^b | 192.7±40.9 ^c | 250.9±34.6 ^{bc} | 272.9±70.0 ^b |
| IL-18 (pg/mg prot) | 124.9±11.8 | 199.3±29.8* ^a | 135.0±25.6 ^b | 155.5±22.3 ^b | 129.5±14.9 ^b | 162.2±28.2 ^b | 141.1±39.9 ^b |
| TNF- α (pg/mg prot) | 2.57±1.00 | 45.53±14.18* ^a | 9.53±3.11 ^c | 14.94±1.67 ^{bc} | 23.17±9.37 ^b | 11.16±9.42 ^c | 17.63±4.27 ^{bc} |
| IFN- γ (pg/mg prot) | 31.6±8.5 | 669.3±30.4* ^a | 354.7±27.3 ^d | 413.6±11.5 ^c | 269.8±44.9 ^e | 452.4±24.7 ^b | 283.6±25.8 ^e |
| HMG-1 (pg/mg prot) | 134.3±12.5 | 595.4±21.6* ^a | 289.9±20.8 ^d | 350.8±33.0 ^c | 251.6±28.4 ^d | 432.1±46.4 ^b | 272.9±30.0 ^d |

[§]Values are the mean \pm SD for six mice per group. SCO, control mice treated with vehicle; LCO, endotoxin-injected mice treated with vehicle; TC, endotoxin-injected mice treated with 13 mg/(kg bw) of TC; Cin-L or Cin-H, endotoxin-injected mice treated with 0.45 or 0.9 mg/(kg bw) of cinnamaldehyde, respectively; Lin-L or Lin-H, endotoxin-injected mice treated with 2.6 or 5.2 mg/(kg bw) of linalool, respectively. #Significantly different from the control group ($p < 0.05$). a, b, and c indicate the means within a row not sharing the same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

表十、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或桉羅木醇之注射 LPS 各組小鼠肝臟中促發炎激素及 Nitrate/nitrite 含量[§]

| | SCO | LCO | TC | Cin-L | Cin-H | Lin-L | Lin-H |
|-----------------------------------|-----------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Nitrate/nitrite (nmol/mg protein) | 1.03±0.26 | 3.63±0.78* ^a | 1.91±0.21 ^c | 2.01±0.67 ^c | 1.93±0.45 ^c | 2.93±0.6 ^b | 1.01±0.80 ^d |
| IL-1 β (pg/mg protein) | 0.77±0.08 | 2.15±0.19* ^a | 1.66±0.18 ^{bcd} | 1.49±0.17 ^d | 1.83±0.18 ^b | 1.75±0.15 ^{bc} | 1.58±0.18 ^{cd} |
| TNF- α (pg/mg protein) | 64.3±27.8 | 828.8±74.5* ^a | 205.2±64.2 ^c | 335.6±63.1 ^b | 261.5±91.4 ^{bc} | 329.4±70.5 ^b | 309.1±25.9 ^b |
| IFN- γ (pg/mg protein) | 45.0±9.3 | 356.7±33.2* ^a | 58.8±5.4 ^e | 99.6±10.9 ^d | 129.5±26.1 ^c | 106.7±15.6 ^d | 154.3±18.2 ^b |
| IL-18 (ng/mg protein) | 1.09±0.15 | 3.64±1.13* ^a | 1.72±0.75 ^b | 1.35±0.26 ^b | 2.06±1.15 ^b | 1.94±0.62 ^b | 1.61±0.65 ^b |
| HMG-1 (ng/mg protein) | 1.26±0.09 | 5.86±0.68* ^a | 4.27±0.95 ^b | 3.52±0.35 ^b | 3.80±0.41 ^b | 4.00±0.24 ^b | 3.94±0.44 ^b |

[§]Values are the mean \pm SD for six mice per group. SCO, control mice treated with vehicle; LCO, endotoxin-injected mice treated with vehicle; TC, endotoxin-injected mice treated with 13 mg/(kg bw) of TC; Cin-L or Cin-H, endotoxin-injected mice treated with 0.45 or 0.9 mg/(kg bw) of cinnamaldehyde, respectively; Lin-L or Lin-H, endotoxin-injected mice treated with 2.6 or 5.2 mg/(kg bw) of linalool, respectively. #Significantly different from the control group ($p < 0.05$). a, b, and c indicate the means within a row not sharing the same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

表十一、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或桉羅木醇之注射 LPS 各組小鼠腸繫膜淋巴結中促發炎激素及 Nitrate/nitrite 含量[§]

| | SCO | LCO | TC | Cin-L | Cin-H | Lin-L | Lin-H |
|-----------------------------------|------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Nitrate/nitrite (nmol/mg protein) | 1.14±0.49 | 6.47±0.69* ^a | 3.46±0.78 ^c | 5.05±0.74 ^b | 3.19±1.27 ^c | 4.80±0.95 ^b | 3.50±0.62 ^c |
| IL-1 β (pg/mg protein) | 24.18±7.83 | 81.86±11.11* ^a | 32.00±6.40 ^c | 61.18±11.81 ^{ab} | 38.90±16.16 ^{bc} | 17.96±9.27 ^c | 28.39±12.17 ^c |
| TNF- α (pg/mg protein) | 1.37±0.81 | 13.02±3.67* ^a | 4.66±1.69 ^{bc} | 6.12±0.48 ^b | 4.52±0.99 ^{bc} | 2.56±0.54 ^c | 3.92±0.82 ^{bc} |
| IFN- γ (pg/mg protein) | 36.7±9.8 | 339.5±35.1* ^a | 169.5±54.9 ^{bc} | 243.9±90.9 ^b | 122.0±71.9 ^c | 126.5±49.8 ^c | 139.2±66.0 ^c |

[§]Values are the mean \pm SD for six mice per group. SCO, control mice treated with vehicle; LCO, endotoxin-injected mice treated with vehicle; TC, endotoxin-injected mice treated with 13 mg/(kg bw) of TC; Cin-L or Cin-H, endotoxin-injected mice treated with 0.45 or 0.9 mg/(kg bw) of cinnamaldehyde, respectively; Lin-L or Lin-H, endotoxin-injected mice treated with 2.6 or 5.2 mg/(kg bw) of linalool, respectively. #Significantly different from the control group ($p < 0.05$). a, b, and c indicate the means within a row not sharing the same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

表十二、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或桉羅木醇之注射 LPS 各組小鼠迴腸黏膜中促發炎激素及 Nitrate/nitrite 含量[§]

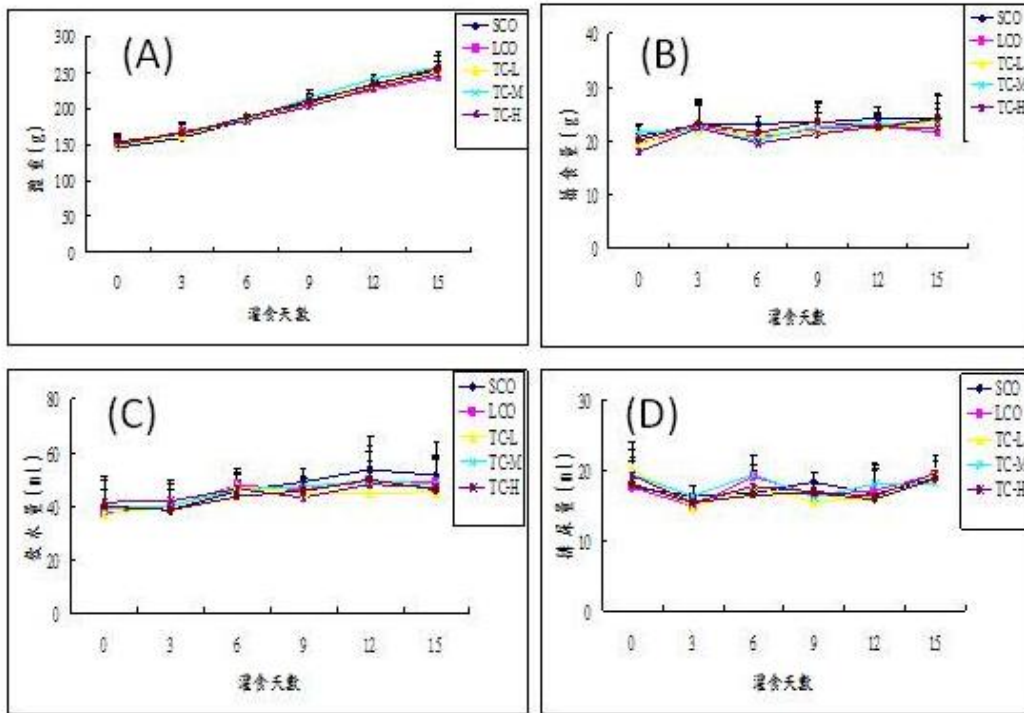
| | SCO | LCO | TC | Cin-L | Cin-H | Lin-L | Lin-H |
|-----------------------------------|------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Nitrate/nitrite (nmol/mg protein) | 6.53±1.84 | 16.11±0.63* ^a | 9.21±0.63 ^b | 7.80±1.39 ^c | 4.29±0.93 ^d | 5.09±1.25 ^d | 6.98±1.25 ^c |
| IL-1 β (pg/mg protein) | 13.85±0.34 | 137.12±5.26* ^a | 61.17±5.11 ^c | 55.79±4.87 ^{cd} | 51.35±4.68 ^d | 79.20±6.67 ^b | 44.37±3.55 ^e |
| IL-18 (pg/mg protein) | 36.0±27.4 | 388.6±60.2* ^a | 191.4±54.6 ^c | 252.2±42.3 ^b | 85.3±12.4 ^d | 142.9±34.8 ^{cd} | 186.9±45.9 ^c |
| TNF- α (pg/mg protein) | 0.25±0.17 | 59.75±5.68* ^a | 39.96±7.99 ^b | 15.33±3.12 ^{cd} | 18.47±8.44 ^c | 45.56±5.38 ^b | 10.47±2.62 ^d |
| IFN- γ (pg/mg protein) | 48.6±4.2 | 342.6±30.7* ^a | 112.2±17.3 ^e | 259.4±24.8 ^c | 175.1±15.6 ^d | 296.2±20.9 ^b | 186.5±13.2 ^d |
| HMG-1 (pg/mg protein) | 16.0±3.4 | 158.4±10.2* ^a | 43.8±3.0 ^c | 154.6±5.5 ^a | 43.2±3.8 ^c | 107.7±10.1 ^b | 41.7±4.9 ^c |

[§]Values are the mean \pm SD for six mice per group. SCO, control mice treated with vehicle; LCO, endotoxin-injected mice treated with vehicle; TC, endotoxin-injected mice treated with 13 mg/(kg bw) of TC; Cin-L or Cin-H, endotoxin-injected mice treated with 0.45 or 0.9 mg/(kg bw) of cinnamaldehyde, respectively; Lin-L or Lin-H, endotoxin-injected mice treated with 2.6 or 5.2 mg/(kg bw) of linalool, respectively. #Significantly different from the control group ($p < 0.05$). a, b, and c indicate the means within a row not sharing the same superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

表十三、正常控制組及灌食土肉桂精油、肉桂醛或桉羅木醇之注射LPS各組小鼠迴腸黏膜中抗菌蛋白及抗發炎荷爾蒙含量[§]

| | SCO | LCO | TC | Cin-L | Cin-H | Lin-L | Lin-H |
|------------------------|------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| REG3-β (pg/mg protein) | 24.0±7.8 | 332.0±50.1 ^{*a} | 47.8±13.2 ^d | 86.4±12.1 ^c | 110.4±4.5 ^c | 152.9±12.8 ^b | 144.9±29.5 ^b |
| REG3-γ (pg/mg protein) | 104.4±20.5 | 562.6±28.1 ^{*a} | 150.2±24.3 ^e | 388.4±43.1 ^b | 221.6±31.5 ^d | 366.1±22.0 ^b | 302.9±23.8 ^c |
| DMBT1 (pg/mg protein) | 99.3±12.6 | 552.9±40.4 ^{*a} | 136.8±24.4 ^d | 312.2±19.7 ^b | 197.9±16.7 ^c | 286.7±37.3 ^b | 227.0±26.4 ^c |
| RETNLβ (ng/mg protein) | 1.50±0.49 | 14.23±2.83 ^{*a} | 4.32±0.84 ^d | 6.92±0.98 ^c | 9.92±1.24 ^b | 5.13±0.79 ^{bcd} | 5.07±1.17 ^{bcd} |

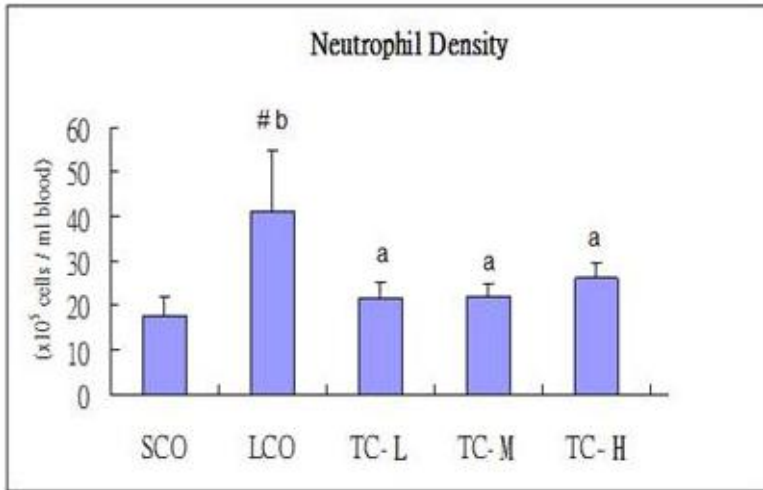
[§]Values are the mean ± SD for six mice per group. SCO, control mice treated with vehicle; LCO, endotoxin-injected mice treated with vehicle; TC, endotoxin-injected mice treated with 13 mg/(kg bw) of TC; Cin-L or Cin-H, endotoxin-injected mice treated with 0.45 or 0.9 mg/(kg bw) of cinnamaldehyde, respectively; Lin-L or Lin-H, endotoxin-injected mice treated with 2.6 or 5.2 mg/(kg bw) of linalool, respectively. #Significantly different from the control group (p < 0.05). a, b, and c indicate the means within a row not sharing the same superscript letter are significantly different (p < 0.05).



圖一、灌食土肉桂葉精油對於注射LPS之大鼠生長代謝的影響

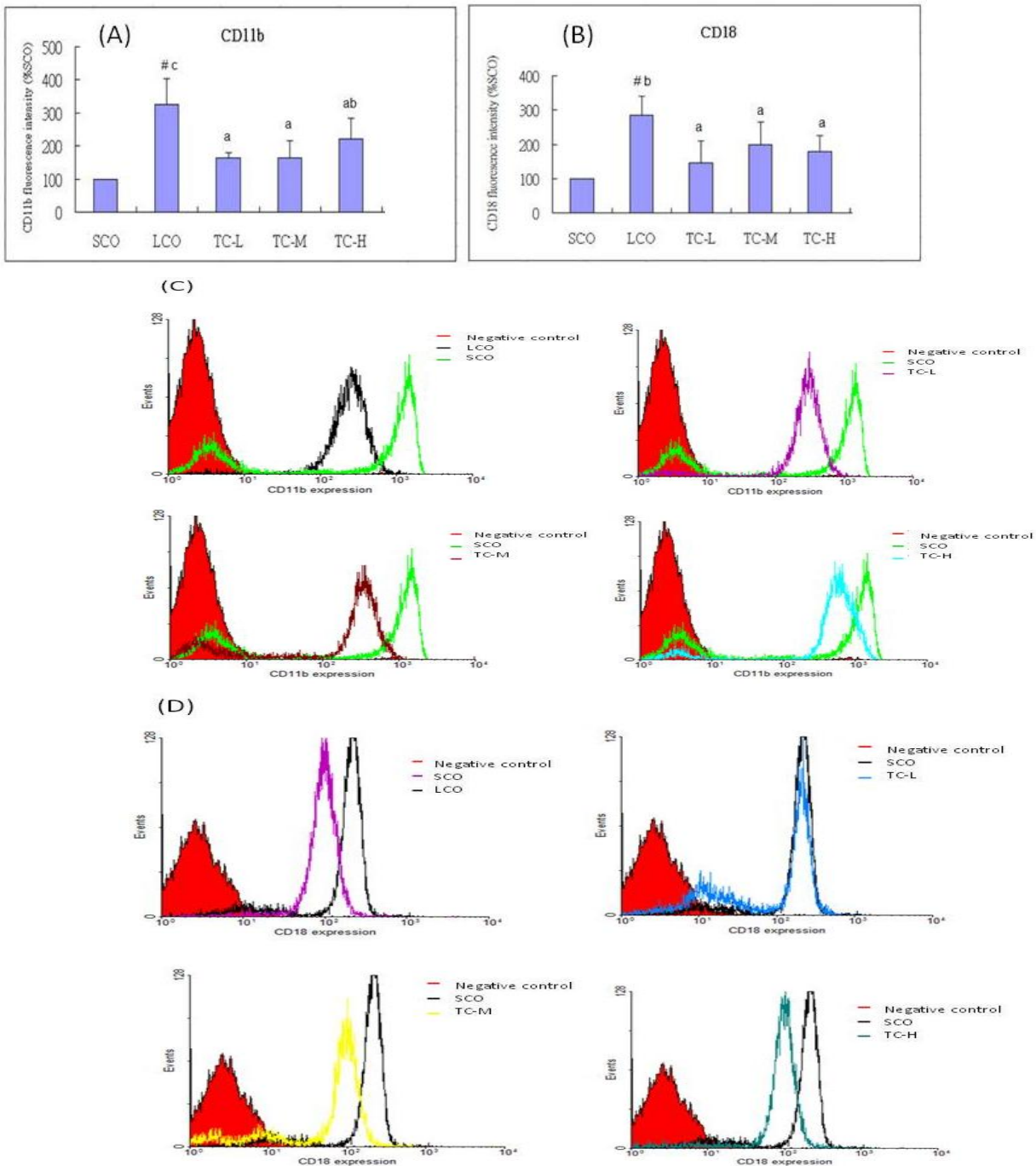
(A) 體重，(B) 攝食量，(C) 飲水量，(D) 排尿量。

注射 saline 並灌食載劑的大鼠 (SCO 組) 和注射 LPS 並分別灌食載劑、低、中、高劑量精油之大鼠 (LCO 組、TC-L 組、TC-M 組、TC-H 組)，灌食期間，大鼠飼育於代謝籠內進行生長及代謝特性之觀察。各組結果以 mean \pm SD 表示。n=6。



圖二、灌食土肉桂精油對於注射LPS之大鼠血液嗜中性球密度的影響

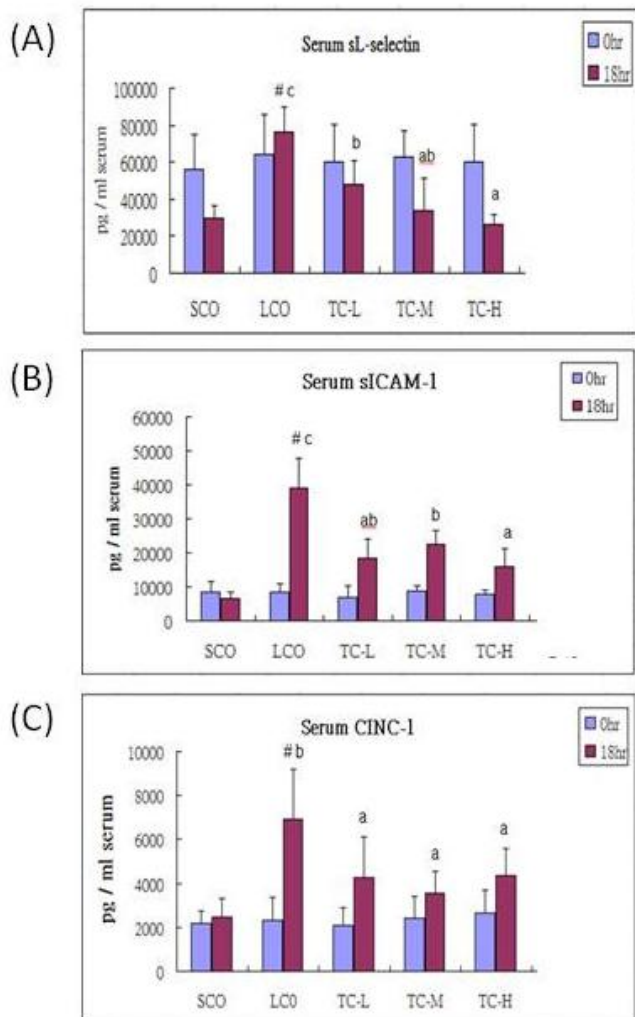
注射 saline 並灌食載劑的大鼠 (SCO 組) 和注射 LPS 並分別灌食載劑、低、中、高劑量精油之大鼠 (LCO 組、TC-L 組、TC-M 組、TC-H 組)，犧牲後收集下腔靜脈血分離嗜中性球，計算單位血液中嗜中性白血球數目。各組結果以 mean \pm SD 表示，# 表示 SCO 與 LCO 兩組有顯著差異 ($p < 0.05$)；ab 符號不相同者表示注射 LPS 各組間有顯著差異 ($p < 0.05$)。n=6。



圖三、灌食土肉桂葉精油對於注射LPS之大鼠嗜中性球表面黏附分子表現量的影響

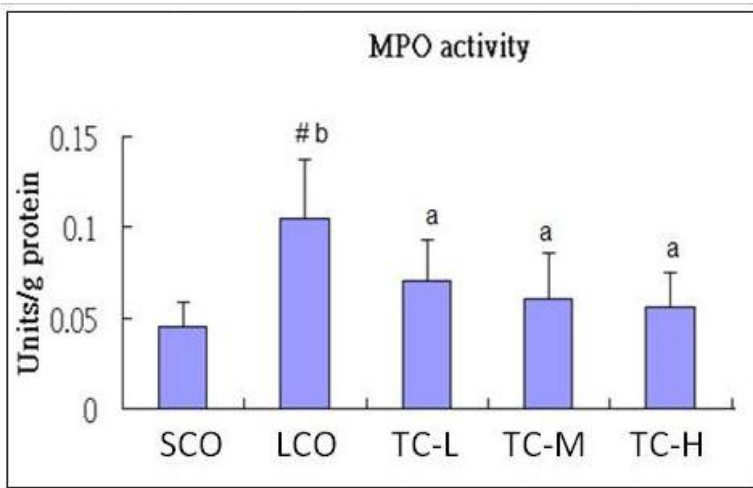
(A) CD11b, (B) CD18

注射 saline 並灌食載劑的大鼠 (SCO 組) 和注射 LPS 並分別灌食載劑、低、中、高劑量精油之大鼠 (LCO 組、TC-L 組、TC-M 組、TC-H 組), 犧牲後取血分離嗜中性球, 以流式細胞儀分析嗜中性球 CD11b 及 CD18 表現量。各組結果以 mean \pm SD 表示, # 表示 SCO 與 LCO 兩組有顯著差異 ($p < 0.05$); abc 符號不相同者表示注射 LPS 各組間有顯著差異 ($p < 0.05$)。n=6。



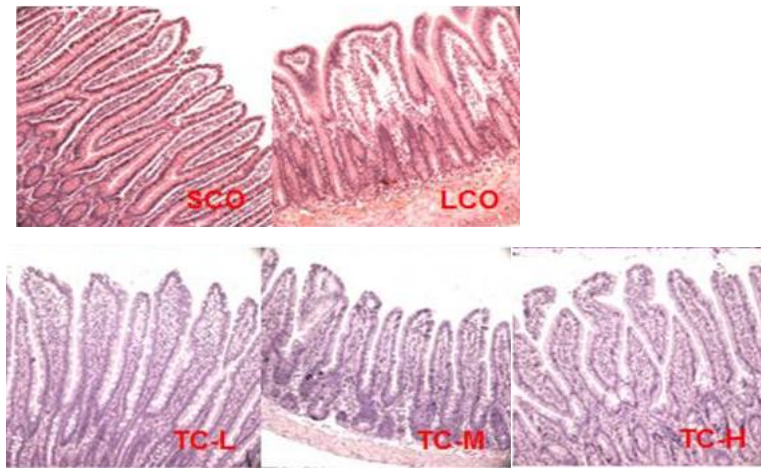
圖四、灌食土肉桂葉精油對於注射LPS之大鼠血清中可溶性黏附分子和化學激素含量的影響
(A)sL-selectin, (B)sICAM-1, (C)CINC-1

注射 saline 並灌食載劑的大鼠 (SCO 組) 和注射 LPS 並分別灌食載劑、低、中、高劑量精油之大鼠 (LCO 組、TC-L 組、TC-M 組、TC-H 組), 誘發前採取尾靜脈血, 且犧牲時收集下腔靜脈血, 分析血清中 (A) sL-selectin, (B) sICAM-1, (C) CINC-1 的濃度。各組結果以 mean \pm SD 表示, # 表示 SCO 與 LCO 兩組有顯著差異 ($p < 0.05$); abc 符號不相同者表示注射 LPS 各組間有顯著差異 ($p < 0.05$)。n=6。



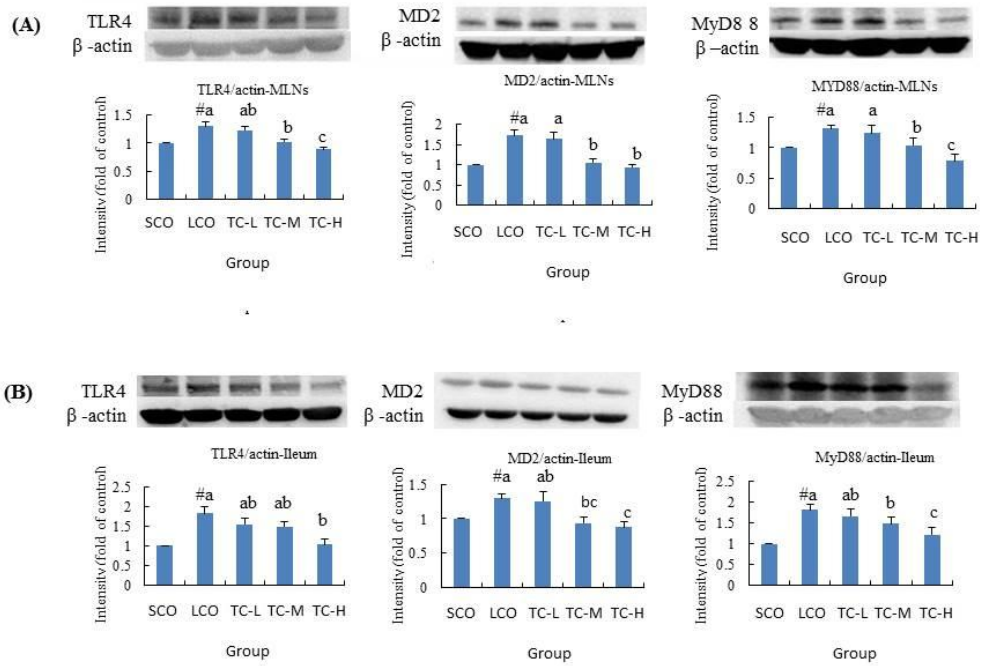
圖五、灌食土肉桂葉精油對於注射LPS之大鼠迴腸黏膜MPO活性的影響

注射 saline 並灌食載劑的大鼠 (SCO 組) 和注射 LPS 並分別灌食載劑、低、中、高劑量精油之大鼠 (LCO 組、TC-L 組、TC-M 組、TC-H 組)，犧牲後收集迴腸，進行 MPO 酵素活性分析。各組量化結果以 mean \pm SD 表示，# 表示 SCO 與 LCO 兩組有顯著差異 ($p < 0.05$)；ab 符號不相同者表示注射 LPS 各組間有顯著差異 ($p < 0.05$)。n=6。



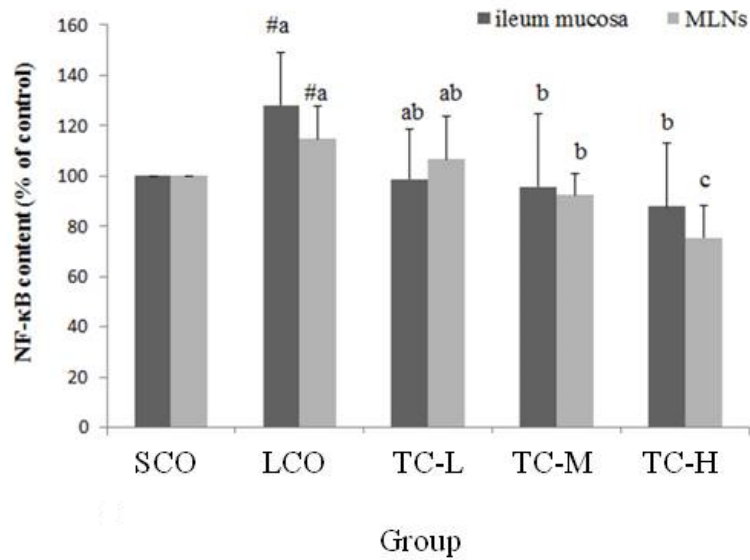
圖六、灌食土肉桂葉精油對於注射LPS之大鼠迴腸黏膜組織形態學的影響

注射 saline 並灌食載劑的大鼠 (SCO 組) 和注射 LPS 並分別灌食載劑、低、中、高劑量精油之大鼠 (LCO 組、TC-L 組、TC-M 組、TC-H 組)，犧牲後收集迴腸以福馬林固定、石蠟包埋、組織切片及進行 HE 染色。切片厚度 $5\mu\text{m}$ ，100 X。



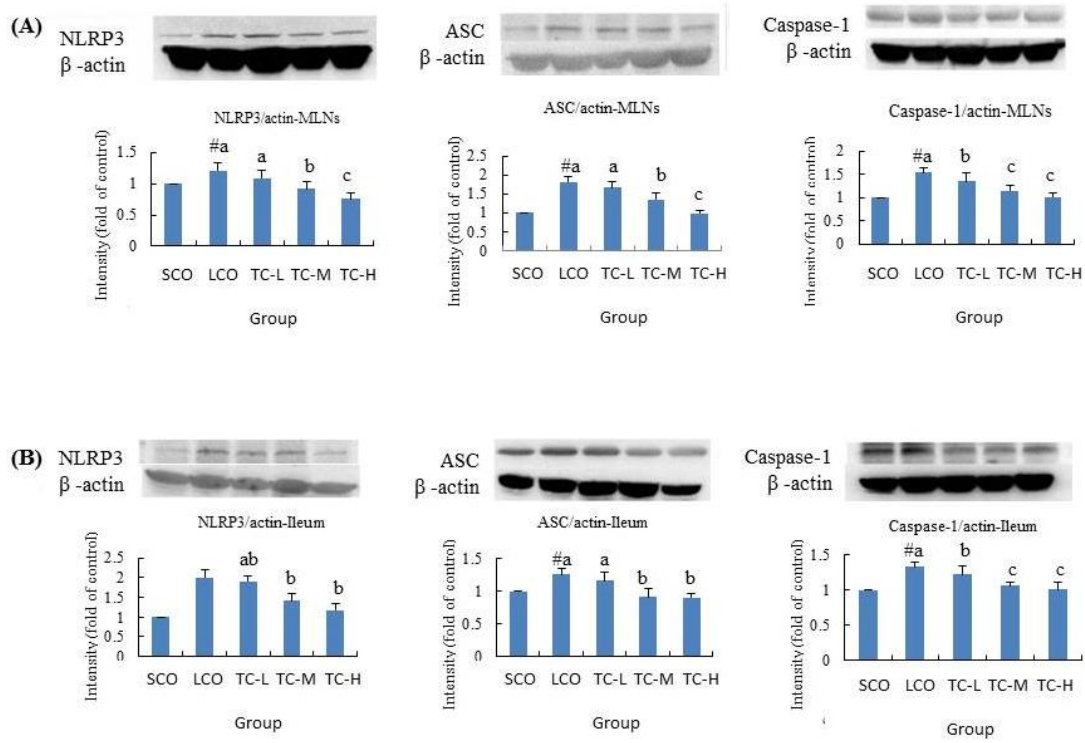
圖七、土肉桂葉精油對於注射 LPS 小鼠迴腸黏膜和腸繫膜淋巴結 TLR4、MD2、MyD88 表現量的影響 (A)迴腸黏膜，(B)腸繫膜淋巴結

Mice received by gavage 6.5 mg/kg TC (TC-L), 13 mg/kg TC (TC-M), 26 mg/kg TC (TC-H), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are means \pm SDs for three mice in each group. #Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, and c not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



圖八、土肉桂葉精油對於注射 LPS 小鼠迴腸黏膜和腸繫膜淋巴結細胞核萃取物中 NF- κ B 含量之影響 (A)迴腸黏膜，(B)腸繫膜淋巴結

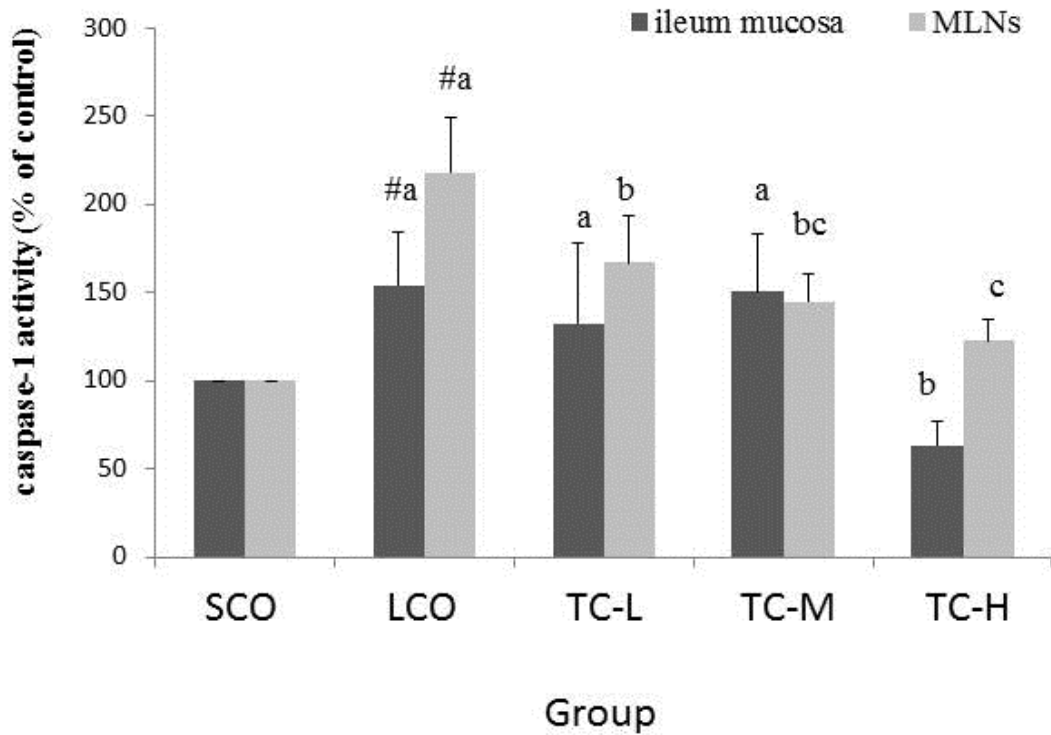
Mice received by gavage 6.5 mg/kg TC (TC-L), 13 mg/kg TC (TC-M), 26 mg/kg TC (TC-H), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are means \pm SDs for six mice in each group. #Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, and c the same tissue not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



圖九、土肉桂葉精油對於注射 LPS 小鼠迴腸黏膜和腸繫膜淋巴結 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量的影響

(A) 迴腸黏膜，(B) 腸繫膜淋巴結

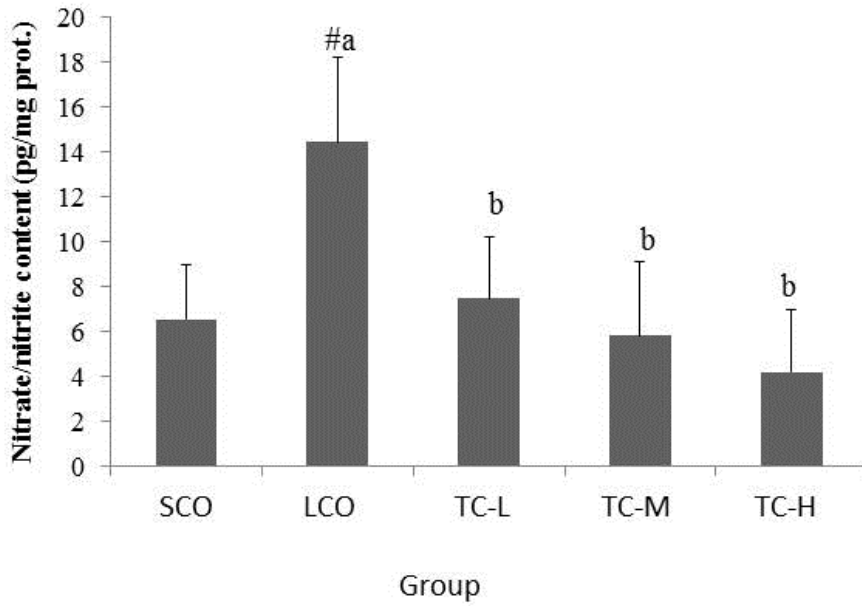
Mice received by gavage 6.5 mg/kg TC (TC-L), 13 mg/kg TC (TC-M), 26 mg/kg TC (TC-H), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are means \pm SDs for three mice in each group. #Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, and c not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



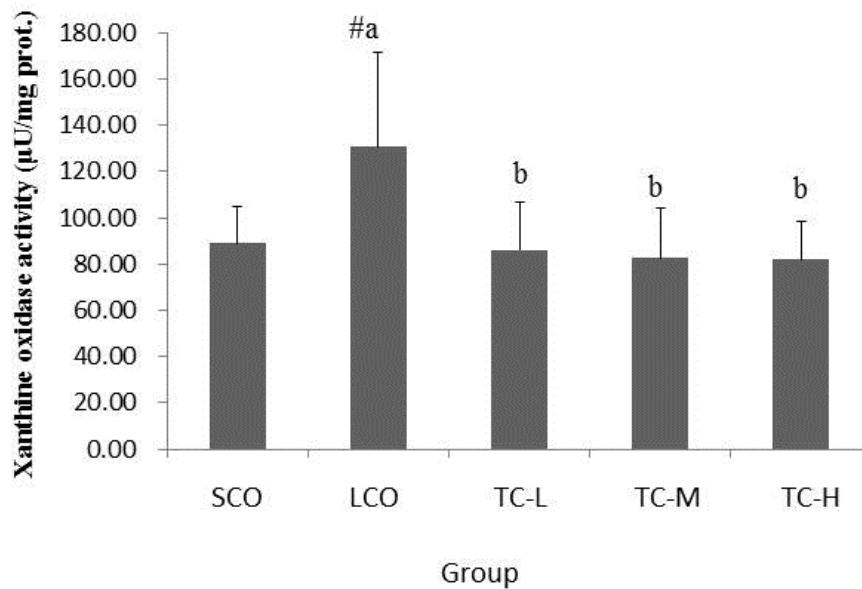
圖十、土肉桂葉精油對於注射 LPS 小鼠之迴腸黏膜及腸繫膜淋巴結 caspase-1 活性之影響

Mice received by gavage 6.5 mg/kg TC (TC-L), 13 mg/kg TC (TC-M), 26 mg/kg TC (TC-H), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are mean \pm SD for six mice in each group. #Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, and c the same tissue not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).

(A)



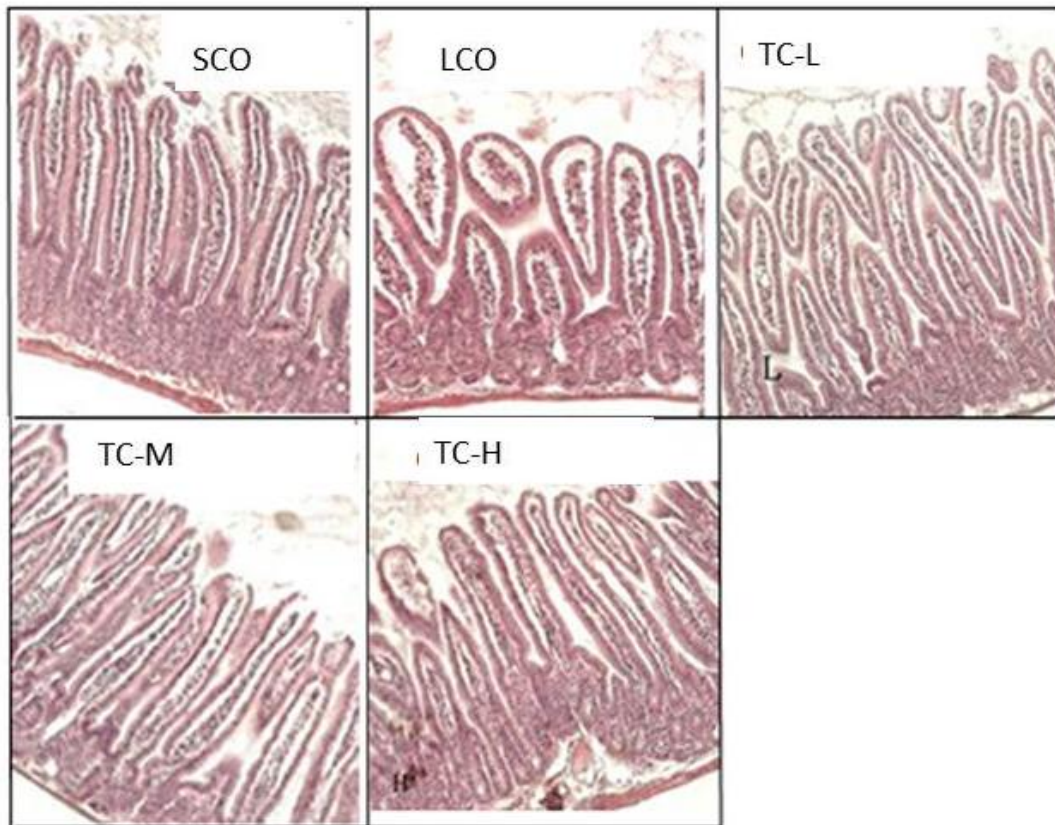
(B)



圖十一、土肉桂葉精油對於注射 LPS 小鼠之迴腸黏膜 nitrate/nitrite 含量和 xanthine oxidase 活性之影響

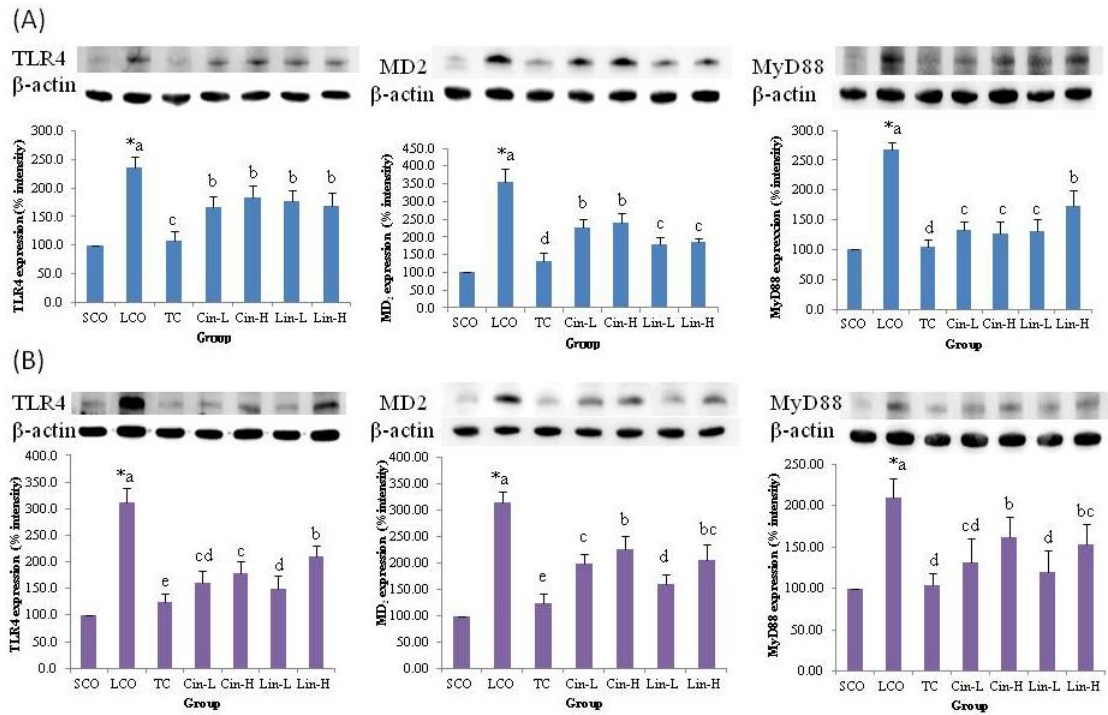
(A)nitrate/nitrite 含量，(B)xanthine oxidase 活性

Mice received by gavage 6.5 mg/kg TC (TC-L), 13 mg/kg TC (TC-M), 26 mg/kg TC (TC-H), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected 12 h after injection. Data are means \pm SDs for six mice in each group. #Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



圖十二、灌食土肉桂葉精油對於注射 LPS 之小鼠迴腸形態學之影響

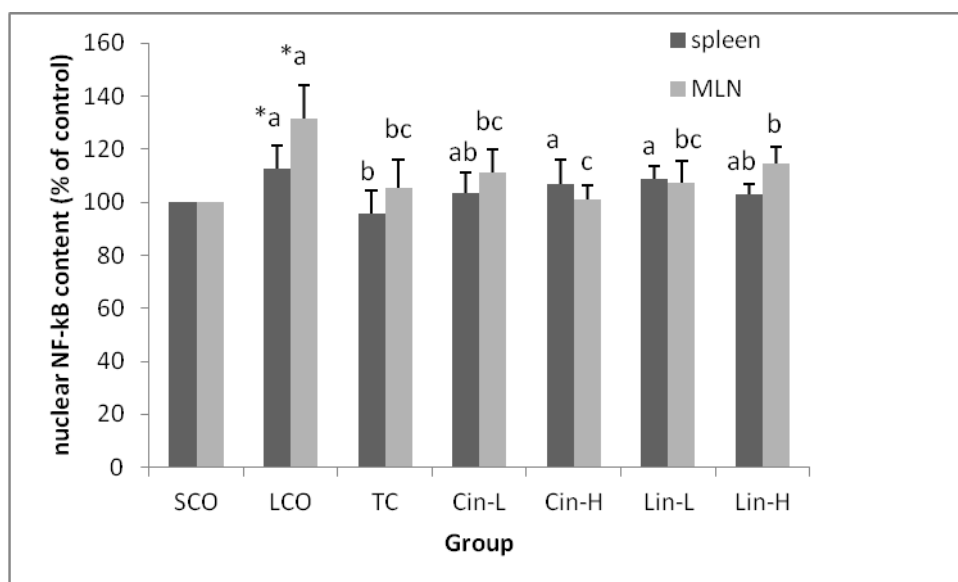
Mice received by gavage 6.5 mg/kg TC (TC-L), 13 mg/kg TC (TC-M), 26 mg/kg TC (TC-H), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with (SCO) saline. Samples were collected at 12 h after injection. Ileum samples were stained with H&E staining. Original magnification x 100.



圖十三、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或伽羅木醇對於注射 LPS 之小鼠淋巴組織 TLR4、MD₂、MyD88 表現量之影響

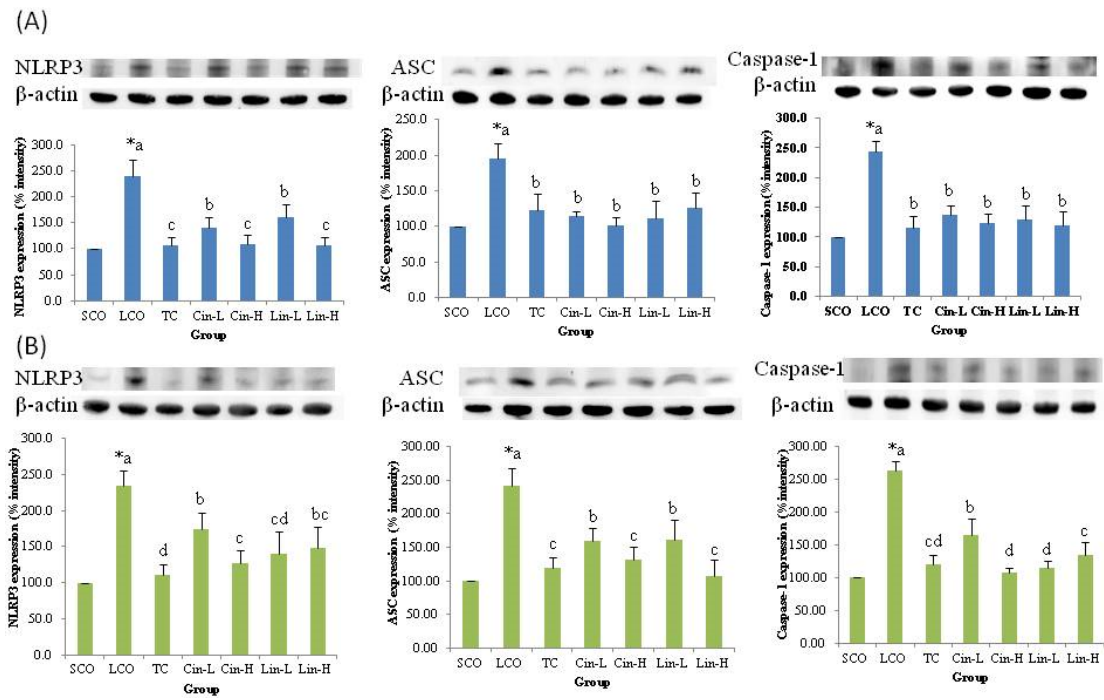
(A) 脾臟，(B) 腸繫淋巴結

Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are mean \pm SD for six mice in each group. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, c, and d the same tissue not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



圖十四、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或伽羅木醇對於注射 LPS 之小鼠淋巴組織細胞核萃取物中 NF-κB 含量之影響

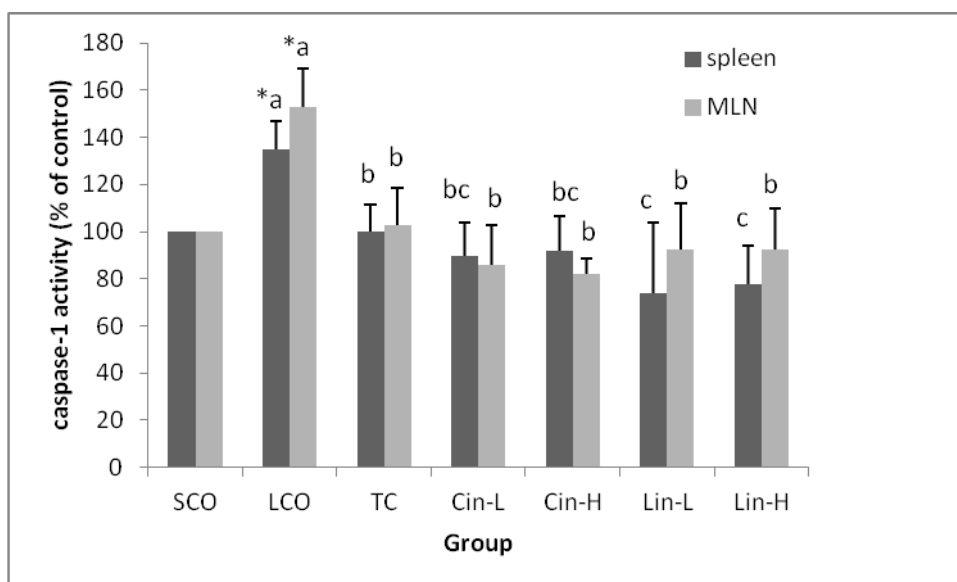
Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are mean \pm SD for six mice in each group. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, and c the same tissue not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



圖十五、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或伽羅木醇對於注射 LPS 之小鼠淋巴組織 NLRP3、ASC、caspase-1 表現量之影響

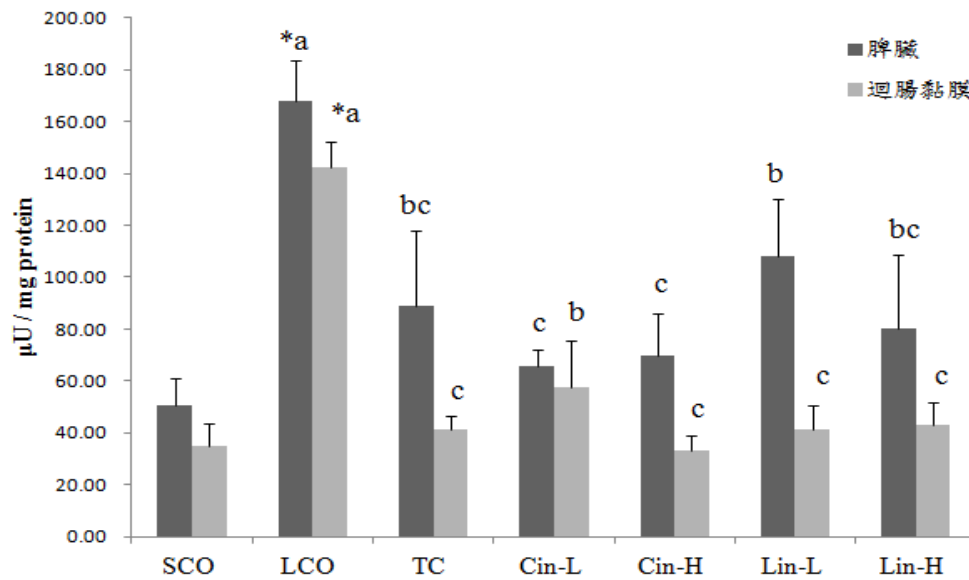
(A)脾臟和(B)腸繫膜淋巴結

Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are mean \pm SD for six mice in each group. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, c, and d the same tissue not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



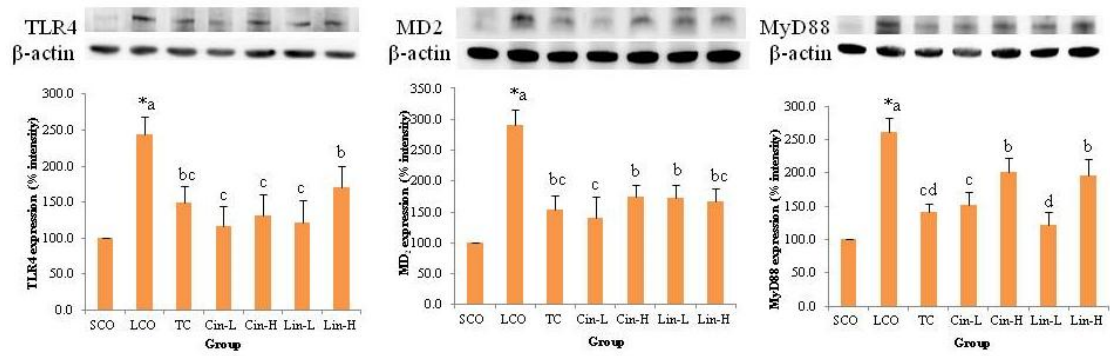
十六、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或伽羅木醇對於注射 LPS 小鼠淋巴組織中 Caspase-1 活性之影響

Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are mean \pm SD for six mice in each group. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, and c the same tissue not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



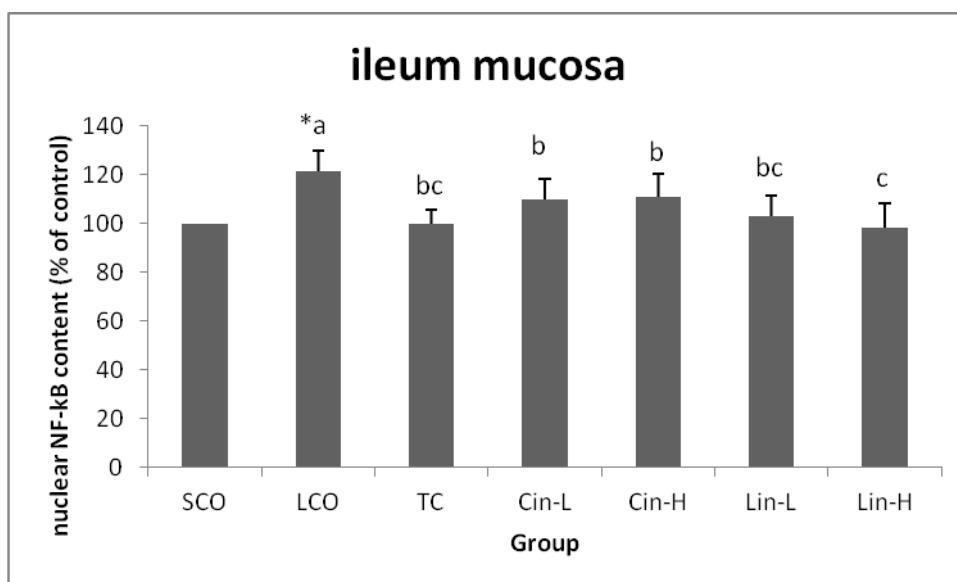
圖十七、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠臟器中 xanthine oxidase 活性之影響

Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are mean \pm SD for six mice in each group. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, and c the same tissue not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



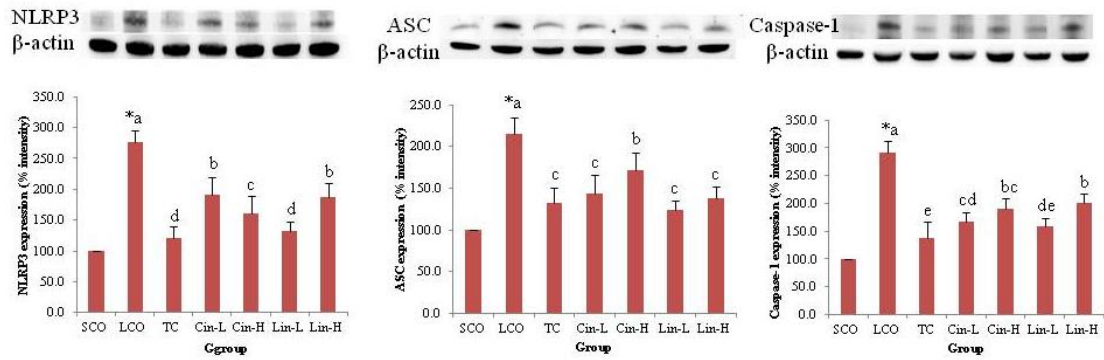
圖十八、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或伽羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸黏膜中 TLR4、MD₂、MyD88 表現量之影響

Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are mean \pm SD for six mice in each group. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, c, and d the same tissue not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



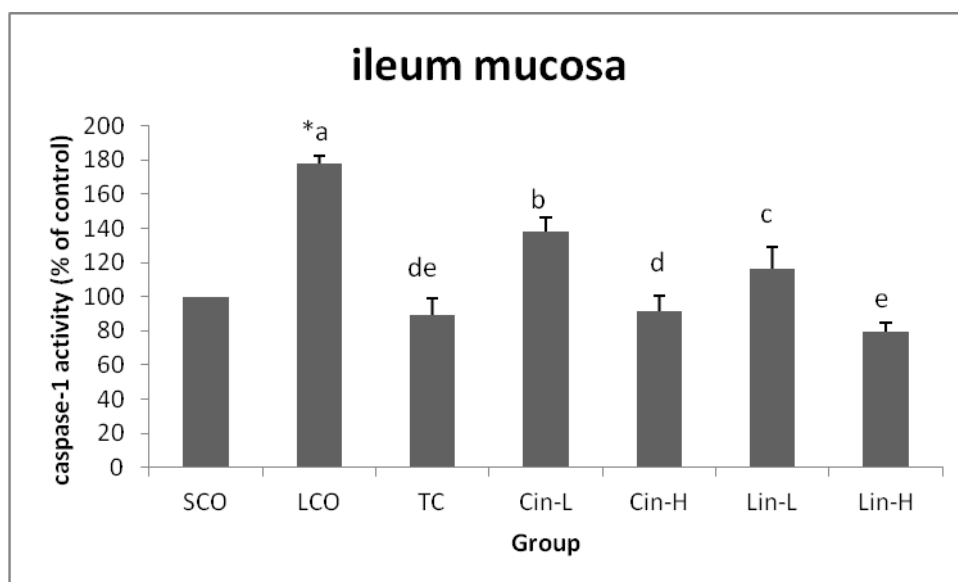
圖十九、灌灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸黏膜細胞核萃取物中 NF-κB 含量之影響

Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are mean \pm SD for six mice in each group. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, and c the same tissue not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



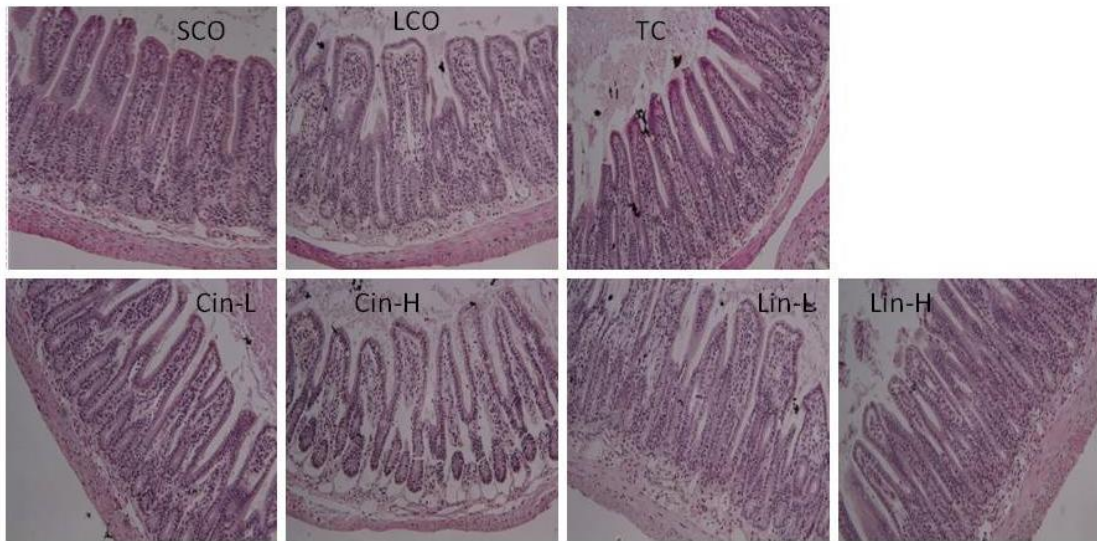
圖二十、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸黏膜中 NLRP3、ASC、Caspase-1 表現量之影響

Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are mean \pm SD for six mice in each group. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, c, d, and e the same tissue not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



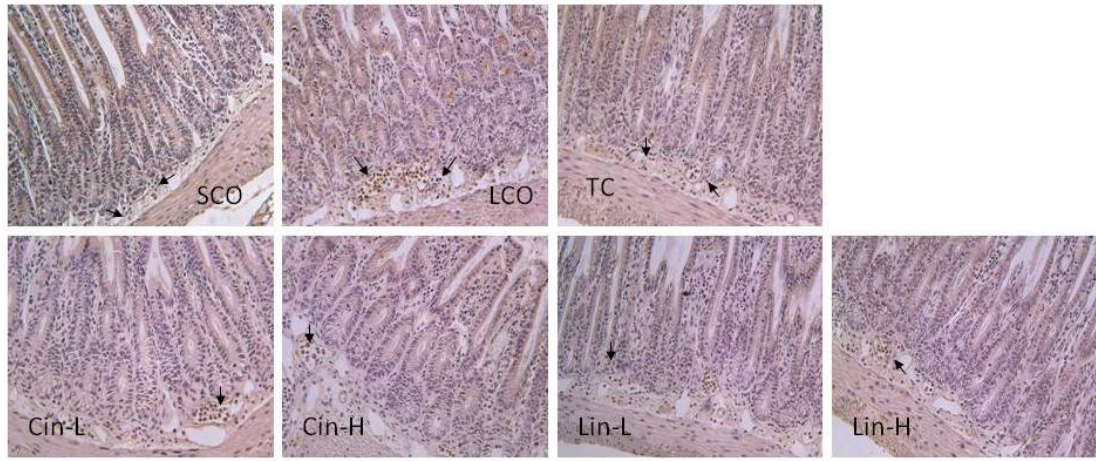
圖二十一、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸黏膜中 Caspase-1 活性含量之影響

Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Data are mean \pm SD for six mice in each group. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). a, b, c, d, and e the same tissue not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$).



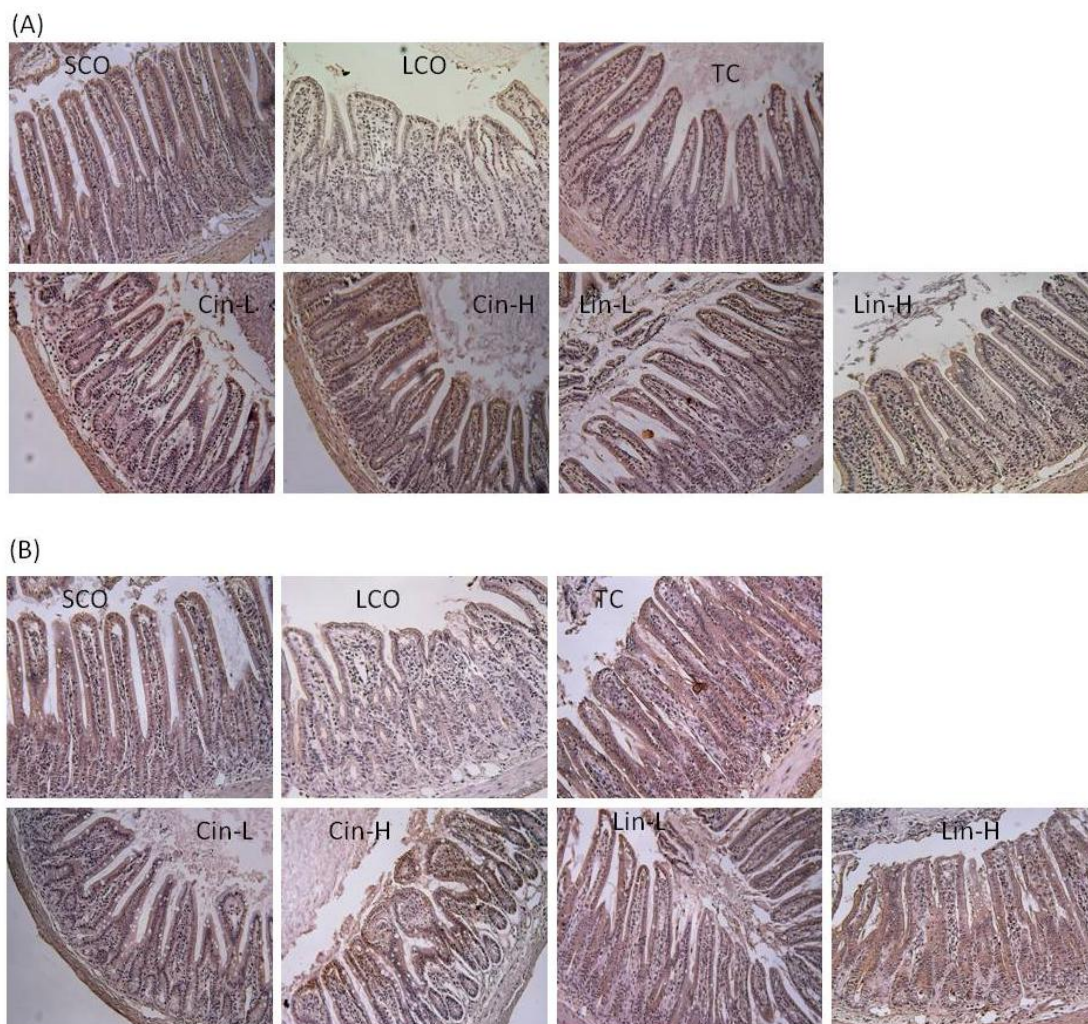
圖二十二、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸組織形態學之影響
(厚度 5 μ m, 200X)

Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Ileum samples were stained with H&E staining.



圖二十三、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸組織嗜中性球浸潤之影響 (厚度 5 μ m, 200X)

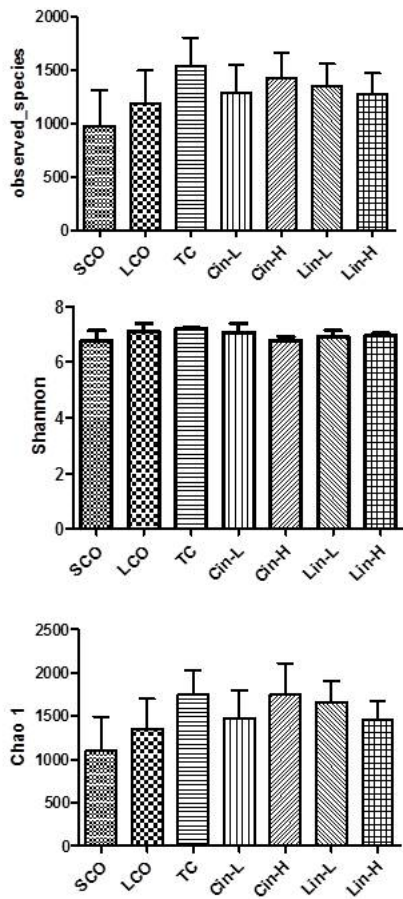
Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Ileum samples were stained with anti-MPO antibody and with Donkey anti-goat IgG antibody conjugated with HRP as the secondary antibody.



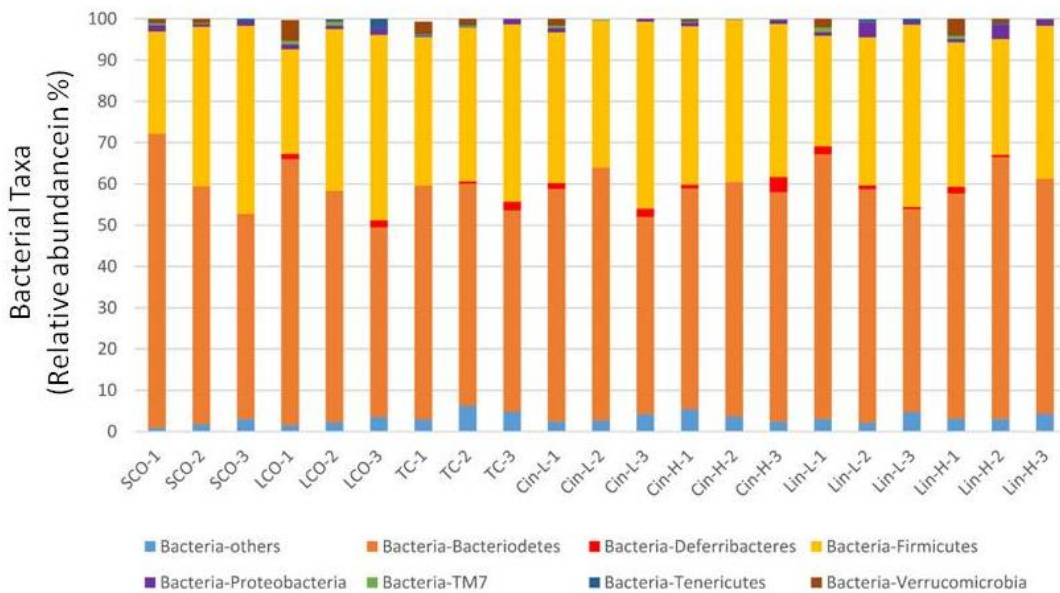
圖二十四、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或桉羅木醇對於注射 LPS 之小鼠迴腸組織 tight junction 蛋白質含量之影響

(A) claudin-5, (B) ZO-1 (厚度 5 μ m, 200X)

Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Ileum samples were stained with anti-claudin-5 antibody or anti-ZO-1 antibody and with Donkey anti-goat IgG antibody conjugated with HRP as the secondary antibody.



(B)



圖二十五、灌食土肉桂葉精油、肉桂醛或伽羅木醇對於注射 LPS 之小鼠盲囊 microbiota 特性之影響 (A)Microbiota 之多樣性指數、(B)各組樣品之菌種分布

Mice received by gavage 13 mg/kg TC (TC), 0.45 or 0.9 mg/kg cinnamaldehyde (Cin-L or Cin-H, respectively), 2.6 or 5.2 mg/kg linalool (Lin-L or Lin-H, respectively), or the vehicle (LCO) every other day 8 times followed by injection with endotoxin from *S. typhimurium* (i.p., 10 mg/kg body weight). Control mice were pretreated with vehicle followed by injection with saline (SCO). Samples were collected at 12 h after injection. Ileum samples were stained with anti-claudin-5 antibody or anti-ZO-1 antibody and with Donkey anti-goat IgG antibody conjugated with HRP as the secondary antibody.

計畫成果自評

本計畫以LPS誘發之SIRS動物模式進行研究，逐步釐清土肉桂葉精油預防系統性發炎及其迴腸黏膜損傷之保護作用及機制，並與其主要活性成分肉桂醛和桉羅木醇對照而得到以下重要成果：(1) 土肉桂葉精油在不影響實驗動物正常生長情形下，可逆轉LPS引起之血液中黏附因子、趨化因子和發炎指標的濃度及嗜中性球表面CD11b/CD18的表現量，並且改善腸黏膜組織中黏附因子之含量，伴隨改善腸道嗜中性球浸潤及絨毛受損的情形，完整呈現精油改善急性發炎病灶形成之生理機轉；(2) 本研究首度提出TLR4與NLRP3訊號路徑與LPS誘發之迴腸損傷的關聯，並首度顯示精油在SIRS下保護系統免於發生過度發炎之狀態及顯著改善迴腸黏膜損傷之分子機轉；(3) 本研究證實精油中的肉桂醛及桉羅木醇均是其在此SIRS發炎模式中的主要作用分子，肉桂醛及桉羅木醇之抗系統性發炎效應反映在改善之周邊血、肝臟及主要淋巴組織—脾臟與腸繫膜淋巴結中發炎相關細胞激素、化學激素、及發炎指標之含量，且與降低淋巴組織中TLR4與NLRP3訊號路徑活性有關；(4) 本研究發現在SIRS相關之腸黏膜損傷模式中，精油及其中的肉桂醛和桉羅木醇均可減少迴腸黏膜中xanthine oxidase活性、嗜中性球浸潤，改善腸黏膜發炎性損傷，且此保護作用伴隨tight junction蛋白含量上升，這除了可能透過其對於迴腸黏膜TLR4及NLRP3訊號系統之抑制作用外，並可能間接透過影響腸道菌相提供保護作用。整體而言，本研究證實台灣土肉桂葉精油具有應用於抗發炎及促進腸道健康之保健產品的潛力，且其主要成分肉桂醛和桉羅木醇未來可應用於預防臨床重症病患發炎問題，研究成果已達預期目標。此外，本計畫部分結果已於2013年、2014年及2015年分別發表於研討會中（許捷盛等人，2013；王詩芸等人，2014；2015），且本研究結果另有一篇論文已發表於SCI期刊(Lee et al., 2015)，目前正以上述發表於研討會之論文為基礎撰寫期刊論文，預計將可於SCI學術期刊再發表三篇論文。

本研究結果已發表之SCI期刊論文：

Lee SC, Hsu JS, Li CC, Chen KM, Liu CT. Protective effect of leaf essential oil from *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira on endotoxin-induced intestinal injury in mice associated with suppressed local expression of molecules in the signaling pathways of TLR4 and NLRP3. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120700. doi: 10.1371/journal.pone.0120700.

本研究結果已發表之研討會論文：

許捷盛，倪曼婷，蔡幸芬，柯千惠，李世傑，劉承慈。2013. 土肉桂葉精油對於內毒素誘發之系統性發炎作用及發炎訊號路徑分子之影響。台灣營養學會第39屆年會。

王詩芸，蔡幸芬，蔡幸紋，李世傑，劉承慈。2014. 台灣土肉桂葉精油主要活性成分桉羅木醇及肉桂醛對於LPS誘發之小鼠系統性發炎反應之影響。台灣營養學會第40屆年會。

王詩芸，蔡幸紋，洪宜葶，李世傑，劉承慈。2015. 台灣土肉桂葉精油活性成分桉羅木醇及肉桂醛改善LPS誘發之小鼠迴腸黏膜發炎指數及TLR4及NLRP3發炎訊號路徑分子表現量。台灣營養學會第41屆年會。

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/10/25

| | |
|-----------|------------------------------------------------------------------|
| 科技部補助計畫 | 計畫名稱: 台灣土肉桂葉精油及其主要成分對於內毒素誘發之小腸黏膜損傷之保護作用及模式辨識受體TLR4與NALP3在其中扮演之角色 |
| | 計畫主持人: 劉承慈 |
| | 計畫編號: 101-2313-B-040-008-MY3 學門領域: 食品及農化 |
| 無研發成果推廣資料 | |

101年度專題研究計畫研究成果彙整表

| 計畫主持人：劉承慈 | | 計畫編號：101-2313-B-040-008-MY3 | | | | |
|-----------------------------------------------------------------|------|-----------------------------|-----------------|------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 計畫名稱：台灣土肉桂葉精油及其主要成分對於內毒素誘發之小腸黏膜損傷之保護作用及模式辨識受體TLR4與NALP3在其中扮演之角色 | | | | | | |
| 成果項目 | | 量化 | | | 單位 | 備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等） |
| | | 實際已達成數（被接受或已發表） | 預期總達成數（含實際已達成數） | 本計畫實際貢獻百分比 | | |
| 國內 | 論文著作 | 期刊論文 | 1 | 1 | 100% | Lee SC, Hsu JS, Li CC, Chen KM, Liu CT. Protective effect of leaf essential oil from <i>Cinnamomum osmophloeum</i> Kanehira on endotoxin-induced intestinal injury in mice associated with suppressed local expression of molecules in the signaling pathways of TLR4 and NLRP3. <i>PLoS One</i> . 2015;10(3):e0120700. doi: 10.1371/journal.pone.0120700. |
| | | 研究報告/技術報告 | 0 | 0 | 100% | |
| | | 研討會論文 | 3 | 3 | 100% | (1)許捷盛, 倪曼婷, 蔡幸芬, 柯千惠, 李世傑, 劉承慈. 2013. 土肉桂葉精油對於內毒素誘發之系統性發炎作用及發炎訊號路徑分子之影響. 台灣營養學 |

| | | | | | | | |
|-----------------|--------|-----------|---|---|------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | | | | | <p>會第39屆年會。 (2)王詩芸, 蔡幸芬, 蔡幸紋, 李世傑, 劉承慈. 2014. 台灣土肉桂葉精油主要活性成分桉羅木醇及肉桂醛對於LPS誘發之小鼠系統性發炎反應之影響. 台灣營養學會第40屆年會。 (3)王詩芸, 蔡幸紋, 洪宜葶, 李世傑, 劉承慈. 2015. 台灣土肉桂葉精油活性成分桉羅木醇及肉桂醛改善LPS誘發之小鼠迴腸黏膜發炎指數及TLR4及NLRP3發炎訊號路徑分子表現量. 台灣營養學會第41屆年會。</p> |
| | | 專書 | 0 | 0 | 100% | 章/本 | |
| 專利 | | 申請中件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 已獲得件數 | 0 | 0 | 100% | | |
| 技術移轉 | | 件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 權利金 | 0 | 0 | 100% | 千元 | |
| 參與計畫人力 (本國籍) | | 碩士生 | 0 | 0 | 100% | 人次 | |
| | | 博士生 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 博士後研究員 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 專任助理 | 0 | 0 | 100% | | |
| 國外 | 論文著作 | 期刊論文 | 0 | 0 | 100% | 篇 | |
| | | 研究報告/技術報告 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 研討會論文 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 專書 | 0 | 0 | 100% | 章/本 | |
| 專利 | | 申請中件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 已獲得件數 | 0 | 0 | 100% | | |
| 技術移轉 | | 件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 權利金 | 0 | 0 | 100% | 千元 | |
| | 參與計畫人力 | 碩士生 | 6 | 6 | 100% | 人次 | 每年依計畫申請 |

| | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------|-----------|---|------------------|----------------|
| | (外國籍) | | | | | 書聘任二名碩士生兼任研究助理 |
| | | 博士生 | 0 | 0 | 100% | |
| | | 博士後研究員 | 0 | 0 | 100% | |
| | | 專任助理 | 0 | 0 | 100% | |
| 其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。) | | 無 | | | | |
| | 成果項目 | | 量化 | | 名稱或內容性質簡述 | |
| 科 教 處 計 畫 加 填 項 目 | 測驗工具(含質性與量性) | | 0 | | | |
| | 課程/模組 | | 0 | | | |
| | 電腦及網路系統或工具 | | 0 | | | |
| | 教材 | | 0 | | | |
| | 舉辦之活動/競賽 | | 0 | | | |
| | 研討會/工作坊 | | 0 | | | |
| | 電子報、網站 | | 0 | | | |
| | 計畫成果推廣之參與(閱聽)人數 | | 0 | | | |

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以100字為限）

已發表：

1. Lee SC, Hsu JS, Li CC, Chen KM, Liu CT. PLoS One.

2015;10(3):e0120700. doi: 10.1371/journal.pone.0120700.

2. 三篇研討會論文分別發表於2013年台灣營養學會第39屆年會、2014年台灣營養學會第40屆年會、2015年台灣營養學會第41屆年會，目前正撰寫成論文，將投稿於SCI期刊。

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

本計畫以LPS誘發之SIRS動物模式進行研究，逐步釐清土肉桂葉精油預防系統性發炎及其迴腸黏膜損傷之保護作用及機制，並與其活性成分肉桂醛和桉羅木醇對照而得到以下重要成果：(1) 土肉桂葉精油在不影響實驗動物正常生長情形下，可逆轉LPS引起之血液中黏附因子、趨化因子和發炎指標的濃度及嗜中性球表面CD11b/CD18的表現量，並且改善腸黏膜組織中黏附因子之含量，伴隨改善腸道嗜中性球浸潤及絨毛受損的情形，完整呈現精油改善急性發生病灶形成之生理機轉；(2) 本研究首度提出TLR4與NLRP3訊號路徑與LPS誘發之迴腸損傷的關聯，並首度顯示精油在SIRS下保護系統免於發生過度發炎之狀態及顯著改善迴腸黏膜損傷之分子機轉；(3) 本研究證實精油中的肉桂醛及桉羅木醇均是其在SIRS發炎模式中的主要作用分子，肉桂醛及桉羅木醇之抗系統性發炎效應反映在改善之周邊血、肝臟及主要淋巴組織—脾臟與腸繫膜淋巴結中發炎相關細胞激素、化學激素、及發炎指標之含量，且與降低淋巴組織中TLR4與NLRP3訊號路徑活性有關；(4) 本研究發現在SIRS相關之腸黏膜損傷模式中，精油及其中的肉桂醛和桉羅木醇均可減少迴腸黏膜中xanthine

oxidase活性、嗜中性球浸潤，改善腸黏膜發炎性損傷，且此保護作用伴隨tight junction蛋白含量上升，這除了可能透過其對於迴腸黏膜TLR4及NLRP3訊號系統之抑制作用外，並可能間接透過影響腸道菌相提供保護作用。整體而言，本研究證實台灣土肉桂葉精油具有應用於抗發炎及促進腸道健康之保健產品的潛力，且其主要成分肉桂醛和桉羅木醇未來可應用於預防臨床重症病患發炎問題，研究成果已達預期目標。此外，本計畫部分結果已於2013年、2014年及2015年分別發表於研討會中（許捷盛等人，2013；王詩芸等人，2014；2015），且本研究結果另有一篇論文已發表於SCI期刊（PLOS ONE, 2014 by Lee et al.），目前正以上述發表於研討會之論文為基礎撰寫期刊論文，預計將可於SCI學術期刊再發表三篇論文。