

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

疾病化學預防物質開發及作用機轉研究--疾病化學預防物質開發及作用機轉研究(第3年)

計畫類別：整合型
計畫編號：NSC 99-2632-B-040-001-MY3
執行期間：101年08月01日至102年07月31日
執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：周芬碧
共同主持人：徐慶琳、周芬碧、曾博修、曾翠華、陳霽霓
林慧萱、高紹軒、王朝鐘、徐慶琳、曾博修
曾翠華、陳霽霓、林慧萱、高紹軒、王朝鐘
徐慶琳、曾博修、曾翠華、陳霽霓、林慧萱
高紹軒

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

中華民國 102年10月25日

中文摘要：本計劃整合了重要疾病，欲共同開發預防物質並探討其作用機轉。子計畫一探討荷葉萃取物(NLFE)及其成份組合物(NLF)對各種不同乳癌細胞及動物模式探討預防及治療乳癌之作用，並評估 NLF 對於乳癌細胞的轉移與血管新生作用。子計畫二進行黑蒜抗肥胖的研究。子計畫三探討山葵萃取物對癌細胞毒性的作用機轉，並分析山葵萃取物的成份，朝藥物開發的目標。子計畫四利用自發性紅斑性狼瘡小鼠為模式，研究秦膠對於紅斑性狼瘡之效益及相關免疫調節機轉。子計畫五探討蟛蜞菊多酚粗萃物及其多酚主成份對氧化性及發炎性神經細胞傷害是否具有保護作用並探討其作用機制。子計畫六進行穿山龍及欖仁樹葉萃取物對於抑制癌瘤細胞轉移能力的相關研究。子計畫七進行洛神葉抑制動脈粥狀硬化的功能及作用機轉之研究。子計畫八進行紫蘇萃取物對呼吸道發炎與氣喘發展之分子機制研究。

中文關鍵詞：疾病預防、荷葉黃酮、黑蒜、山葵、秦艽、蟛蜞菊、穿山龍、欖仁樹、洛神葉、紫蘇

英文摘要：We hope to prevent or delay the disease occurrence by assimilating the efficient components from the daily food. The aim of our plan is to integrate the important diseases, develop the chemoprevention agent and explain the molecular mechanism. The project 1 wants to (1) test the effect of NLFE and NLF in blocking breast cancer growth, delaying breast cancer development in vitro and vivo, (2) estimate the metastasis and angiogenesis processes of NLFE-treated breast cancer cells. The project 2 is to investigate the development of antiobesity phytochemicals from black garlic and its molecular mechanism. In the project 3 we will look into the molecular mechanism of the cytotoxicity of Wasabia extract (WE) against colon cancer cells to evaluate the potential of Wasabia as a chemoprevention healthy food. To improve the life-quality of SLE patients, we intend to investigate the precise mechanism and functional components of Gentiana macrophylla in the project 4. Whether Wedelia chinese protects neuron cells from oxidative damage and inflammatory damage needs to be investigated in the project 5. In the project 6, we will process the study about the Dioscorea nipponica Makino(DNE) and Terminalia catappa L(TCE) inhibit tje

cnacer cells migration. The aim of the project 7 is to establish the hypolipidemia activity of HLE and its functional component, H. sabdariffa leaf polyphenol-rich extract(HLP). The aims of the project 8 to investigate the beneficial effects of Perilla frutescens extracts on asthma and the cellular targets of Perilla frutescens extracts for the effects.

英文關鍵詞： Disease prevention, Nelumbo nucifera leaves
Flavonoid, Black garlic, Wasabia japonica, Gentiana macrophylla, Wedelia chinesis, Dioscorea nipponica, Terminalia catappa, Hibiscus sabdariffa leaf, Perilla frutescens

「私立大學校院發展研發特色專案計畫」成果報告

期中進度報告

期末報告

疾病化學預防物質開發及作用機轉研究

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2632-B-040-001-MY3

執行期間：99年8月1日至102年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：周芬碧

共同主持人：徐慶琳、王朝鐘、曾博修、曾翠華、陳霽霓、林慧萱、高紹軒

計畫參與人員：

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

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 102 年 10 月 20 日

研究計畫成果報告內容

一、計畫方面：

(一) 計畫目前執行進度及是否達到預定目標

達成預定目標

(二) 計畫執行迄今之成果(請具體明列成果項目，如：論文/專利/重大突破/或其他…)

專利：

1. 荷葉抗乳癌之作用：美國專利(US 7,662,413 B2)
2. 荷葉抗乳癌之作用：台灣專利(I 406667)

論文：

1. Mon-Yuan Yang, Yun-Ching Chang, Kuei-Chuan Chan, Yi-Ju Lee, Chau-Jong Wang. Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves inhibits proliferation of breast cancer in vitro and in vivo. *European Journal of Integrative Medicine*, 2011,3,e153-e163.
2. Jeng-Dong Hsu, Shao-Hsuan Kao, Ting-Tsz Ou, Yu-Jen Chen, Yi-Ju Li, and Chau-Jong Wang. Gallic Acid Induces G2/M Phase Arrest of Breast Cancer Cell MCF-7 through Stabilization of p27Kip1 Attributed to Disruption of p27Kip1/Skp2 Complex. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 1996–2003
3. Hsieh-Hsun Ho, Chi-Sen Chang, Wei-Chi Ho, Sheng-You Liao, Wea-Lung Lin, Chau-Jong Wang. Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF- κ B activity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 266, 2013, 76–85
4. Ho ML, Hsieh YS, Chen JY, Chen KS, Chen JJ, Kuo WH, Lin SJ, Chen PN. Antimetastatic Potentials of *Dioscorea nipponica* on Melanoma In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011:507920.
5. Hui-Hsuan Lin, Kuei-Chuan Chan, Jenn-Yuan Sheu, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang*, Jing-Hsien Chen*. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Food Chemistry.* 132, 880-891, 2012.
6. Jing-Hsien Chen, Chau-Jong Wang, Jenn-Yuan Sheu, Hui-Hsuan Lin*. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extract inhibits LDL oxidation and foam cell formation involving up-regulation of LXR α /ABCA1 pathway. *Food Chemistry.* 141, 397-406, 2013.
7. Jer-Yuh Liu, Yi-Ching Chen, Chun-Hsiang Lin and Shao-Hsuan Kao*. *Perilla frutescens* leaf extract inhibits mite major allergen Der p 2-induced gene expression of pro-allergic and pro-inflammatory cytokines in human bronchial epithelial cell BEAS-2B. *PLOS ONE* Accepted in press, 2013.

研討會發表

1. Chun-Hua Chang, Mon-Yuan Yang, Li-Chu Chen, **Chau-Jong Wang**, 2012. *Nelumbo nucifera* leaf extract (NLE) inhibits angiogenesis in human breast cancer. The 27th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, ROC.
2. Meng-Hsun Yu, Mon-Yuan Yang, Chau-Jong Wang, 2013. *Nelumbo nucifera* leaves extract inhibits adipocytes-induced breast cancer metastasis. The 28th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, ROC.
3. Mon-Yuan Yang, Li-Chu Chen, **Chau-Jong Wang**. Polyphenol-enriched extracts from *Nelumbo Nucifera* leaf suppress the migration and invasion in breast cancer cell. 70th Annual Meeting of

the Japanese Cancer Association, 2011, Nagoya, Japan.

4. Chun-Hua Chang, Mon-Yuan Yang, and **Chau-Jong Wang**. Nuciferine Leaf extract (NLE) inhibits human breast cancer growth by suppressing fatty acid synthase and Akt signaling. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2011, Nagoya, Japan.
 5. 張維棠、曾慶瀛、徐慶琳。黑蒜甲醇萃取物透由 AMPK 與 Sirt1 訊息路徑調控肥胖大鼠之脂質合成與脂解作用。臺灣公定分析化學家協會第六屆第一次會員大會，2012，Taipei, ROC.
 6. 張維棠、曾佩瑜、許孝慈、曾慶瀛、徐慶琳。以細胞試驗模式探討黑蒜頭對脂質生合成之影響及其分子機制。台灣食品科學技術學會第 41 次年會，2011，嘉義，台灣
 7. Hsuan, S.W., **Chou, F.P.** Induction of apoptosis and autophagic cell death by *Wasabia Japonica* extract in human colon cancer Colo 205 cells. (2013) The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama, Japan.
 8. **Chou, F.P.**, Hung, H.Y. Cytotoxic effect of *Wasabia japonica* extract on colon cancer cell Colo 205. (2011) The 8th International Conference on Functional Foods for Chronic Diseases, USA
 9. Shao-Ming Wang^{*}, Tsui-Hwa Tseng[#] Protective Effect of Polyphenolic Extract of *Wedelia chinensis* on tert-Butyl hydroperoxide-induced Cytotoxicity in PC12 Neuroblastoma Cells. 第二十六屆生物醫學聯合會(2011), Taipei, ROC.
 10. Shao-Ming Wang^{*}, Nai-Fang Chen, Yu-Chiuan Huang, Tsui-Hwa Tseng. Protective effect of polyphenolic extracts of *Wedelia chinensis* on beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. International Conference on Food Factors (2011), Taipei, ROC.
 11. Nai-Fang Chen^{*}, Zi-Hui Chen, Fung-Jou Lu, Tsui-Hwa Tseng. Extract of *Wedelia chinensis* Inhibits LPS/IFN- γ -Induced C6 Astrocytoma Cell Activation and Protects Against Inflammation-Mediated Differentiated PC12 Neuronal Cell Injury. 第二十八屆生物醫學聯合會(2013), Taipei, ROC.
 12. Jing-Hsien Chen, Chau-Jong Wang, Chen-Chien Wang, Chia-Liang Lin, and **Hui-Hsuan Lin***, 2012, Hibiscus sabdariffa leaf reduces the development of atherosclerosis via inhibition of LDL oxidation and foam cell formation. The 27th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C.
 13. Jing-Hsien Chen, Yu-Hsuan Chou, Huei-Yin Chen, Chia-Yu Chung, **Hui-Hsuan Lin***, 2013, *Hibiscus sabdariffa* leaf polyphenolic extract inhibits TNF-alpha-induced migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. The 28th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C.
 14. Chi-Ping Wang, Jing-Hsien Chen, Ming-Shih Lee, Ting-Hsuan Wang, **Hui-Hsuan Lin***, 2013, Anti-atherosclerotic effects of *Hibiscus sabdariffa* leaf extracts. The 2013 Annual Meeting of the Taiwan Society of Laboratory Medicine, November 2-3, 2013, Taipei, Taiwan.
 15. Ying-Hua Hsu, Jing-Hsien Chen, Ting-Hsuan Wang, **Hui-Hsuan Lin***, 2013, Anti-atherosclerotic potential of Hibiscus sabdariffa leaf via inhibiting LDL oxidation and foam cell formation. 2013 International Conference of ISNFF, November 5-9, 2013, Taipei, Taiwan.
 16. Chin-Yin Lin, Pei-Ni Chen, Yih-Shou Hsieh. *Dioscorea nipponica* Inhibits Melanoma Metastatic Potential *in Vitro* and *in Vivo*. 2011, 8th International Conference Functional Foods for Chronic Diseases: Science and Practice , USA.
 - 17.
- (三) 請說明計畫執行迄今經費運用狀況(含大型設備之購置狀況)及學校配合款支用情形。

學校並依國科會規定每年提出相對補助款 175 萬，三年共補助 525 萬。其中補助購入重要儀器：細胞行為分析系統、超低溫冷凍櫃、光學顯微鏡、高通量即時螢光定量聚合連鎖反應系統和倒力螢光影像顯微鏡。所補助之配合款已全數核銷。

- (四) 經費使用表：支用金額請統計至 102.10.31 止

年 度	第一年			第二年			第三年		
	國科會補助		學校配合款使用情形	國科會補助		學校配合款使用情形	國科會補助		學校配合款使用情形
	核定金額	使用金額		核定金額	使用金額		核定金額	使用金額	
金 額	7000000	7000000	1750000	7000000	7000000	1750000	7000000	6995965	1750000

說 明：

二、團隊研究能力：總計畫與各子計畫之間的分工架構、整合性及工作協調為何？(請提出具體作法說明)。

本計畫包含 8 個子計畫如下

計畫項目	主持人/ 共同主持人	服務機構/系所	職稱	計 畫 名 稱
總計畫	周芬碧	中山醫學大學/生化暨生物科技研究所	教授	疾病化學預防物質開發及作用機轉研究
子計畫一	王朝鐘	中山醫學大學/生化暨生物科技研究所	教授	開發荷葉類黃酮為抑制乳癌之物質及作用標靶之研究
子計畫二	徐慶琳	中山醫學大學/ 營養系	副教授	黑蒜之抗肥胖植物化學物質開發及其分子機轉研究
子計畫三	周芬碧	中山醫學大學/生化暨生物科技研究所	教授	開發山葵萃取物於抑制大腸癌暨輔助化放療之保健功效與機轉之探討
子計畫四	主持人： 曾博修 共同主持人： 徐再靜	中山醫學大學/生化暨生物科技研究所 中山醫學大學/ 免疫學研究所	教授 教授	秦艽對紅斑性狼瘡病理效益、免疫調節機轉及其作用標靶及有效保健成分開發之研究
子計畫五	曾翠華	中山醫學大學/ 應化系	教授	開發蟛蜞菊多酚成份為預防神經退行性病變之物質及探討其作用機制
子計畫六	主持人： 陳霽霓 共同主持人： 謝易修	中山醫學大學/生化暨生物科技研究所 中山醫學大學/ 生物化學科	副教授 教授	開發穿山龍及欖仁樹葉萃取物作為促進抗癌藥物療效和抑制腫瘤抗藥性物質之研究
子計畫七	林慧萱	中山醫學大學/醫學檢驗暨生物技術學系	副教授	洛神葉萃取物成分抑制血管病變作用及分子機制之研究

子計畫八	高紹軒	中山醫學大學/生化暨生物科技研究所	教授	開發紫蘇萃取物為減緩呼吸道發炎與氣喘之物質及其分子標靶之研究
------	-----	-------------------	----	--------------------------------

1.整合性及協調：

疾病預防已為一世界潮流，因此，尋找一化學預防物質(chemopreventive agent)為一重要工作。例如從茶中萃取 polyphenolic acid extracts、curcuminoid extracts、broccoli compounds 及 soy isoflavonoids 已被廣泛的應用為疾病化學預防物質，希望可以由攝取食物中有效萃取物達到預防或延緩疾病的發生為目的。心血管疾病名列全球第一大死因，世界衛生組織發佈每年約 1700 萬人死於心血管疾病，其中冠心病以及中風約占 76%。根據衛生署發布 97 年國人十大死因，癌症為十大死因之首，心血管疾病 - 心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病分佔國人十大死因第二、三、五名，多數病因起源於肥胖，另外在退化性神經、免疫疾病，對國人影響甚鉅。因此，國內應該極力發展疾病化學預防之研究。本計劃整合了上述重要疾病，欲共同開發預防物質並探討其作用機轉。

整體分工合作架構：



↓

功能性成份分析
 產學合作
 作用機轉或標靶之研究

2. 各子計畫間之相關性與整合：

- a. 各子計畫各執行一項疾病化學預防物質之醫學功能探討，並依衛生署公布之評估方法進行。
- b. 各子計畫用於研究之疾病化學預防物質須分析其中功能性成分，包括多酚、酚酸、類黃酮、花青素或其他有效成份。
- c. 各子計畫將進一步進行作用標靶之研究。
- d. 各子計畫的目標為(1)開發預防或治療疾病物質；(2)增加學術研究；(3)成為中山醫大研發特色。
- e. 子計畫主持人多年來之研究分別在天然物對癌症、心血管疾病、肝臟之研究，多年來均有長期且密切之合作。本次的整合型計畫更加強彼此間對於研究模式及方法技術上的交流，研究資源及儀器互通有無。
- f. 此整合型計畫由本校生化所 (五位)、營養系 (一位)、應化系 (一位)與醫技系 (一位)的八位老師組成中山醫學大學研究團隊來投入此整合型計畫。每一位子計畫的主持人會依據各自的專長，分擔整合型計畫所需之工作內容。而研究工作中所需之研究設備，可由子計畫間共同使用，且在人力配制上會以機動性的方式，協助研究團隊之成員。

三、學校方面：

- (一) 學校提供之具體配套措施(如：配合款；相關行政、空間、設備等之支援及協助；獎勵等)，請提出已配合之措施辦法或具體資料證明。
- (二) 學校對本計畫是否訂有考核機制？如有請列出，及考核結果為何？
- (三) 本計畫執行至今對於學校推展或提升研發環境有何具體成效？

1. 行政配套措施：學校會計財務部門負責所有經費之核銷，經費之使用上進行嚴格把關，並提醒經費執行進度。研發處提供專利申請諮詢、協助專利申請過程、支付專利申請費用，並媒介技轉對象。動物中心及貴儀中心亦配合及支援發展特色專案計畫。

2. 配合款及設備：學校並依國科會規定每年提出相對補助款 175 萬，三年共補助 525 萬。其中補助購入重要儀器：細胞行為分析系統、超低溫冷凍櫃、光學顯微鏡、高通量即時螢光定量聚合連鎖反應系統和倒力螢光影像顯微鏡，除了提供各子計畫主持人使用外，亦依各單位之需求開放使用，對於學校之研發能量助益不少。

3. 獎勵：除了配合款之補助與支付專利申請費用外，校方在補助教師出席國際會議和獎勵 SCI 論文期刊發表皆有相關規定。表現優異者校方亦提報申請國科會補助大專院校獎勵特殊優秀人才措施。

4. 考核機制：總計畫主持人每半年召開研究會議，除了立即檢視各計畫之執行進度外，亦藉由會議召開之機會，增加此團隊之研究成果與經驗之交流，使各個子計畫的研發能力能完全發揮，每年之研究成果在校慶時舉行成果發表會，本校中草藥及保健食品研究中心亦配合及支援發展特色專案計畫。

5. 具體效益：此三年期之計畫整合本校研究團隊之人力與資源，提升本校研究成果之產能。此外，總計畫目標設立在疾病化學預防物質之開發，本研究團隊針對多種天然素材之開發，現階段除了釐清各種素材之疾病化學預防作用外，亦期望未來能朝向『多功能保健素材之開發』，即由各子計畫之研究成果，進行成分之組合與功效評估，最終能尋求有興趣之廠商洽談產學合作與技術轉移之可能，使產、官、學能獲至最大的成果效益，另一效益預期在分子機轉之研究可在學術期刊上如過去幾年之成果在 WOS 排名提升。

(一) 中英文摘要

關鍵詞：疾病預防、荷葉黃酮、黑蒜、山葵、秦艽、蟛蜞菊、穿山龍、欖仁樹、洛神葉、紫蘇

本計劃整合了重要疾病，欲共同開發預防物質並探討其作用機轉。子計畫一探討荷葉萃取物(NLFE)及其成份組合物(NLF)對各種不同乳癌細胞及動物模式探討預防及治療乳癌之作用，並評估NLF對於乳癌細胞的轉移與血管新生作用。子計畫二進行黑蒜抗肥胖的研究。子計畫三探討山葵萃取物對癌細胞毒性的作用機轉，並分析山葵萃取物的成份，朝藥物開發的目標。子計畫四利用自發性紅斑性狼瘡小鼠為模式，研究秦膠對於紅斑性狼瘡之效益及相關免疫調節機轉。子計畫五探討蟛蜞菊多酚粗萃物及其多酚主成份對氧化性及發炎性神經細胞傷害是否具有保護作用並探討其作用機制。子計畫六進行穿山龍及欖仁樹葉萃取物對於抑制癌細胞轉移能力的相關研究。子計畫七進行洛神葉抑制動脈粥狀硬化的功能及作用機轉之研究。子計畫八進行紫蘇萃取物對呼吸道發炎與氣喘發展之分子機制研究。

子計畫一：荷葉是睡蓮科多年生草本植物，其化學成分含有多種荷葉鹼(pronuciferine)、抗氧化物質類黃酮等，本研究以動物實驗模式深入探討台灣荷葉黃酮萃取物(Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves, NLFE)抑制腫瘤生長之功效，並進一步探討其中抑制之機制。以MCF-7細胞為實驗模式，處理不同劑量NLFE下，發現NLFE透過PI3K/Akt路徑，影響脂肪酸合成酶(FAS)之表現進而造成細胞週期停滯在G0/G1期，而MCF-7動物移植性腫瘤試驗證明，NLFE確實能夠抑制腫瘤之生長。其次，NLFE與NLPE能夠降低MMP-2及MMP-9的活性及細胞骨架蛋白RhoA、CDC42、Rac1的表現，並抑制PKC α 的活性，影響下游p38與ERK的磷酸化，進而影響細胞的移行作用。利用雞胚胎實驗及Plug assay，證實NLFE能有效抑制血管新生作用。相關機制分析發現NLFE抑制活化態AKT的表現以及CTGF, Ras/ERK訊息路徑。於NMU(N-methyl-N-nitrosourea)誘導乳癌的模式，處理不同劑量NLFE與臨床藥物Herceptin及Tamoxifen進行比較。結果顯示無論腫瘤發生率、數量及腫瘤大小，在NLFE的處理之下皆顯著下降，NLFE 2%組別效果更優於Tamoxifen之組別。以人類乳癌細胞株BT-474為實驗模式，將細胞注射於裸鼠，並使用不同劑量NLFE與Tamoxifen餵食裸鼠，結果證實NLFE確實可有效降低裸鼠之腫瘤生成，NLFE 2%組別抑制效果更優於Tamoxifen之組別。利用免疫染色分析與西方墨點法分析腫瘤蛋白之表現，結果指出隨著NLFE劑量之提升，FASN及phosph-ER α 的表現量隨著NLFE的劑量增加而逐漸減少，而HER2蛋白並無顯著變化。然而，phosph-HER2，除了NLFE 2.0%組別有受到抑制之外，其他的組別與對照組比較都無明顯改變。總結這些結果也正可以說明NLFE降低乳癌的發生與轉移是透過減少ER α 的活化、誘導乳癌細胞週期停滯、降低腫瘤轉移及抗血管新生作用。因此本研究成果可應用於發展為降低與延緩癌症發生之健康食品。

子計畫二：大蒜(*Allium sativum* L.)精油及其含硫化合物對於高脂飲食所誘導大鼠體重增加具有抑制作用。本研究進行不易形成體脂肪之黑蒜保健食品開發。內容分成二部分：(一)以體外細胞試驗模式，釐清黑蒜萃取物之抗肥胖潛力與作用機轉。結果顯示黑蒜甲醇萃取物(methanol extract of black garlic, MEBG)具有最佳的抑制脂肪細胞數目、胞內三酸甘油酯含量與甘油-3-磷酸去氫酶活性。黑蒜甲醇萃取物能顯著提升AMPK與Sirt1，並抑制脂質合成(PPAR γ 、SREBP-1c、FAS、ACC、aP2、LPL和CD36)與脂肪細胞激素(leptin、PAI-1和resistin)之基因表現，亦會增加脂質氧化(PGC-1 α 和UCP1)與adiponectin之基因表現。(二)以體內動物試驗模式探討黑蒜甲醇萃取物抑制高脂飲食誘導肥胖大鼠之影響與分子機轉。高脂飲食給予MEBG 50 mg/kg、150 mg/kg和300 mg/kg之組別，可顯著降低高脂飲食所誘導之體重增加與脂肪組織堆積、血清中三酸甘油酯與游離脂肪酸含量、肝臟總脂質含量，並增加血清中高密度脂蛋白膽固醇含量。在肝臟與脂肪組織基因表現上，高脂飲食給予MEBG可顯著提升AMPK與Sirt1，並抑制脂肪酸合成(SREBP-1c、PPAR γ 、SCD1、FAS和ACC)之基因表現。此外，亦會提升脂肪酸氧化代謝基因(PPAR α 和UCP1)與降低脂肪細胞激素(leptin和PAI-1)之基因表現。綜合上述結果證實，黑蒜甲醇萃取物具有抑制脂肪細胞脂質堆積與高脂飲食所誘導大鼠肥胖，其可透由活化AMPK與Sirt1之基因表現。

子計畫三：大腸癌是全世界男性與女性因罹患癌症而死亡的主因，且發生率也高居不下，因此針對大腸癌之預防與治療的研究不斷受到重視。山葵(*Wasabia japonica*)俗稱芥末，其地下莖含豐富的維生素C

與A、礦物質、微量元素、以及異硫氰酸鹽(isothiocyanates)等成份。研究顯示山葵主要成分之一6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate (6-MITC)，具有解毒、抗發炎以及誘導癌細胞凋亡的能力。過去有關山葵的研究除了以6-MITC進行化學防癌的研究外，鮮少有文獻以山葵萃取物作為研究對象。本研究探討山葵萃取物對大腸癌細胞的毒性作用機轉，並評估其開發成抗癌保健食品或藥物的潛力。以大腸癌細胞(Colo 205)為細胞模式發現，山葵的確會對Colo 205大腸癌細胞產生毒性並具有濃度與時間依賴性。使用DAPI染色及流式細胞儀分析，發現細胞有DNA濃染的情形，subG1的細胞數增加，顯示山葵萃取物則會使細胞走向Apoptosis，其路徑是透過活化TNF- α 、Fas-L和Caspase 8/3促使細胞產生外源性細胞凋亡，亦可透過調控Bid、Cyt.C和Caspase 9蛋白誘發粒線體所導致的細胞凋亡機制。山葵萃取物亦會引發細胞自噬作用，其路徑主要是促進自噬作用相關蛋白的表現(Beclin-1、Atg5和LC3)。利用自噬作用的促進劑RAD001 (mTOR抑制劑)合併山葵後發現，經由MTT、AVO染色和Western blot分析證實山葵誘發自噬作用主要是促進細胞的死亡。最後，異種移植之動物實驗驗證山葵確實會抑制腫瘤的生長。另外，利用大腸癌誘發動物實驗證實山葵可降低死亡率。綜合以上的結果可以知道山葵可透過促進大腸癌細胞凋亡以及自噬死亡的作用進而達到抑制大腸癌的效果，並增加存活率。這對於抗大腸癌上面的研究有著更進一步的發展，在未來抗癌的保健食品研發上面也有很大的幫助。

子計畫四：隨著藥物安全性的普遍被重視，加上化學合成藥品的傷害及副作用不斷地被發現後，天然成份的藥物因而再度被重視。秦艽除了能減緩包括紅斑性狼瘡等自體免疫病徵外，由於不具毒性，更可作為一般養生之食用。但是到目前為止，秦艽對於減緩狼瘡之詳細分子機轉、自體免疫的調控路徑及其有效成分，卻仍然未知。本研究結果發現，秦艽對於餵食高膽固醇之狼瘡小鼠有明顯的保護效果，特別是在減緩因高膽固醇引發加劇之發炎反應及提升狼瘡小鼠CD4+/CD25+輔助型T細胞族群比例，並提升因高膽固醇所造成狼瘡小鼠肝臟GSH, DPPH及Catalase的活性。實驗結果也顯示秦艽能明顯降低粒線體相關路徑之細胞凋亡訊息。這些結果指出秦艽能有效減緩狼瘡及因膽固醇所加劇狼瘡之肝臟發炎及凋亡。研究中也完成雙向電泳分析及蛋白質點的鑑別，挑選出因狼瘡或膽固醇而有顯著變化的蛋白質點，將進一步分析秦艽對這些蛋白質在狼瘡之病理機轉上所扮演的角色，以找出狼瘡之治療標靶。相信這些研究結果可協助瞭解秦艽減緩狼瘡的機制，提升狼瘡病人生活品質與保健。

子計畫五：蟛蜞菊(*Wedelia chinensis*)是一種菊科植物，為臺灣傳統涼茶的主要材料，由於先前研究顯示：蟛蜞菊乙酸乙酯萃取物中含有大量多酚成分並有捕捉自由基的作用，且HPLC分析中發現其含luteolin及wedelolacton，這兩個天然物在過去文獻中指出具有抗發炎的生物活性，而腦部免疫細胞如astrocyte及glial cell在外傷或老化過程會大量被活化而釋放出cytokines and proinflammatory mediator進而產生大量ROS and RNS造成神經細胞損傷，加速神經退行性病變之發生。因此如能減少astrocyte及glial cell之活化與聚集，將可減少神經細胞之損傷並預防神經退行性病變之發生。第一年研究發現蟛蜞菊粗萃物含多酚成份及類黃酮成份，蟛蜞菊多酚粗萃物對過氧化物tert-butylhydroperoxide所造成PC12神經細胞存活率及細胞毒性等傷害指標皆呈現保護作用，主要是蟛蜞菊多酚粗萃物可增加tert-butylhydroperoxide所造成Bcl-2、Bcl-xL、 γ -GCS下降的表現量，亦可阻斷tert-butylhydroperoxide所活化的MAPKs。第二年動物實驗建立高劑量的半乳糖可誘發小鼠老化之研究模式，發現黃花蟛蜞菊多酚萃取物可減少半乳糖所誘發小鼠老化之現象例如學習能力不全，腦組織p-tau, beta-amyloid的大量產生以及脂質過氧化的大量堆積，又由腦組織切片中也發現半乳糖可大大減少皮質及海馬迴神經細胞的數目。總之蟛蜞菊多酚粗萃物活性研究中我們發現其對氧化性壓力造成神經細胞傷害具保護作用。第三年探討蟛蜞菊萃取物(WEA)對IFN- γ 及LPS誘發星狀細胞活化之作用影響，結果WEA可減少IFN- γ 及LPS誘發星狀細胞株C6細胞釋放TNF α 及iNOS, COX2的表現，並降低IFN- γ 及LPS誘發星狀細胞型態改變與細胞活化指標GFAP的表現，而對這些表現的影響是和抑制IFN- γ 及LPS活化NFB與STAT3訊息路徑有關。最後發現IFN- γ 及LPS處理過星狀細胞株C6細胞的培養液會降低分化PC12腦細胞的存活率，而WEA可提升存活率。蟛蜞菊萃取物主成份wedelolactone (WEL)及luteolin (Lut)也都呈現類似之保護作用，以上結果顯示蟛蜞菊多酚萃取物及其主成份具有抗氧化與抗發炎等活性，進而可預防或延緩神經退行性病變之發生，其保健功能值得開發。

子計畫六：穿山龍屬民間中草藥，為治療筋骨痠痛與損傷的漢方療藥。本研究以極度惡性的老鼠黑色素

癌細胞(B16F10)做研究，於C57BL/6J 老鼠中，以尾靜脈注射黑色素瘤，肺部組織切片有因為餵穿山龍乙酸乙酯萃取物而使黑色素瘤轉移的部分明顯減少。以Wound healing assay及Boyden chamber assay，發現穿山龍乙酸乙酯萃取物抑制細胞移動。細胞處理穿山龍萃取物會抑制MMP-2與u-PA活性，其作用路徑主要透過 PI3K/Akt/ NF-kappa B 路徑抑制核內轉錄因子NF-kappa B的結合能力並同時增加IκB的蛋白表達能力。此外，欖仁樹(*Terminalia catappa* L.)葉具有預防及治療肝炎、抗發炎、清除自由基、抗氧化等活性。在本研究中，以不同濃度欖仁樹葉萃取物(*Terminalia catappa* L. extracts; TCE) 處理急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia; AML)細胞株 HL-60，會造成細胞存活率明顯的降低，主要是透過誘導HL-60細胞走向凋謝死亡。低濃度TCE可以促進臨床上治療急性骨髓性白血病之抗癌藥物(arsenic trioxide)的活性。進一步利用欖仁樹葉的主要成份單寧酸處理HL-60細胞，發現其會造成細胞存活率與細胞數顯著降低，誘導HL-60細胞凋亡。綜合以上結果，欖仁樹葉萃取物與單寧酸可以有效的抑制急性骨髓性白血病細胞HL-60的生長，或許有助於日後對於白血病的治療。此外欖仁樹葉之甲醇萃取物(TLME) 可抑制肺癌細胞株A549之轉移與侵入能力，並抑制TLME對MMP-2、MMP-9與u-PA的分泌量。接著我們再用cell motility/invasion assay來分析TLME對具有轉移能力的肺癌細胞株A549之影響。

子計畫七：洛神葉(*Hibiscus sabdariffa* leaf)具有降血糖及降血脂之功效，其所富含之類黃酮等多酚(polyphenol)成分亦具有抗氧化、抗發炎、防癌及抑制心血管疾病之功能。先前我們研究室已證實洛神葉萃取物(*H. sabdariffa* leaf extract, HLE)能促進癌細胞凋亡(apoptosis)作用。本計畫探討HLE及其多酚萃取物(*H. sabdariffa* leaf polyphenol-rich extract, HLP)抑制動脈粥狀硬化(atherosclerosis)之活性及釐清分子作用機制。第一年的研究結果發現HLE及HLP具有極佳的抗氧化活性並能抑制低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化作用，避免進一步造成氧化型LDL(oxidative LDL, ox-LDL)的堆積，減少巨噬細胞吞噬ox-LDL後形成的泡沫細胞(foam cells)以及有效地減低細胞內脂質的含量。HLP可能透過調控PPAR γ 的表現，進而抑制CD36之表達；或藉由LXR α -ABCA1分子機制，促進膽固醇反向運輸，進而減低細胞內脂質的堆積。第二年之研究利用發炎因子TNF α (tumor necrosis factor- α)誘導血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)過度遷移及增生模式，結果發現HLE及HLP無毒性之劑量可以抑制TNF α 誘導VSMC細胞(A7r5)移動能力，主要是透過降低AP-1轉錄活性進而抑制MMP-9的表現以及細胞移動。另外，TNF α 誘導A7r5細胞增生模式中，HLP可促使細胞內p53蛋白和磷酸化表現，以及活化p21和p27；HLP並且增加Rb/E2F的結合，進而導致E2F和phospho-Rb的表現受到抑制，最後促使細胞週期停滯(cell cycle arrest)在G0/G1期。第三年探討HLE及HLP對於血管內皮細胞(HUVEC)之保護作用，HLE及HLP具有抵抗ox-LDL促進HUVAC細胞生長週期停滯和凋亡之效用，主要是透過活化PI3K classIII/Beclin-1/LC-3以及抑制PI3K classIII/p-Akt/mTOR路徑，共同誘發細胞自噬(autophagy)以保護細胞免於凋亡損傷。此外，利用高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈粥狀硬化病變之動物模式確認HLE抗動脈硬化之效用。並選取試驗動物的主動脈弓部分進行免疫組織染色分析，以anti-PCNA和anti-SM α -actin觀察VSMC之異常增生與遷移現象，以及anti-CD31觀察內皮細胞損傷，驗證各年度在細胞實驗得到的結果。綜合上述，我們提出洛神葉萃取物成份HLE及HLP具有抑制動脈粥狀硬化的作用，而能應用於保健食品的開發。

子計畫八：紫蘇除用於當作裝飾食物，同時也是傳統醫學上的一種藥用植物。過去的研究證實紫蘇的各種萃取物具有抗癌、抗發炎與抗菌等功效，並發現其主要成分之一：迷迭香酸(Rosmarinic acid)具有減緩呼吸道發炎之現象。本研究針對紫蘇對於抑制呼吸道過敏與發炎的分子機轉進行更深入的探討。Der p 2 (DP2)是歐洲室塵蟎(house dust mite)的主要過敏原之一，同時也是台灣地區誘發小兒與成人過敏性氣喘的主因。利用DP2與人類正常支氣管上皮細胞BEAS-2B建構細胞模式的實驗，探討紫蘇抑制呼吸道過敏與發炎的分子機轉。實驗結果顯示，紫蘇葉*Perilla frutescens* leaves的甲醇萃取物 (PFE)，可以有效降低DP2所誘發的前發炎細胞激素 (proinflammatory cytokines)包括IL-6、IL-8與MCP-1，以及前致敏性細胞激素(pro-allergic cytokines)包括IL-4、IL-5、IL-13與MCP-1的mRNA在人類正常支氣管上皮細胞BEAS-2B的表現。並進一步發現PFE對DP2誘發之呼吸道上皮細胞發炎的抑制作用，主要是透過抑制MAPK路徑的活化，包括ERK1/2、JNK與p38 MAPK，以及抑制下游的NF- κ B訊息路徑。此外，亦建構DP2致敏小鼠模式的實驗，證實PFE確實可以降低DP2誘發致敏小鼠中，血清的前發炎細胞激素以及前

致敏性細胞激素的濃度。這些研究證據顯示紫蘇葉 *Perilla frutescens leaves* 的甲醇萃取物PFE，確實具有減緩歐洲室塵蟎主要過敏原DP2造成的呼吸道上皮細胞的發炎與過敏的功效。

Key words: Disease prevention, Nelumbo nucifera leaves Flavonoid, Black garlic, Wasabia japonica, Gentiana macrophylla, Wedelia chinesis, Dioscorea nipponica, Terminalia catappa, *Hibiscus sabdariffa* leaf, *Perilla frutescens*

We hope to prevent or delay the disease occurrence by assimilating the efficient components from the daily food. The aim of our plan is to integrate the important diseases, develop the chemoprevention agent and explain the molecular mechanism. The project 1 wants to (1) test the effect of NLFE and NLF in blocking breast cancer growth, delaying breast cancer development in vitro and vivo, (2) estimate the metastasis and angiogenesis processes of NLFE-treated breast cancer cells. The project 2 is to investigate the development of antiobesity phytochemicals from black garlic and its molecular mechanism. In the project 3 we will look into the molecular mechanism of the cytotoxicity of Wasabia extract (WE) against colon cancer cells to evaluate the potential of Wasabia as a chemoprevention healthy food. To improve the life-quality of SLE patients, we intend to investigate the precise mechanism and functional components of *Gentiana macrophylla* in the project 4. Whether *Wedelia chinese* protects neuron cells from oxidative damage and inflammatory damage needs to be investigated in the project 5. In the project 6, we will process the study about the *Dioscorea nipponica* Makino(DNE) and *Terminalia catappa* L(TCE) inhibit the cancer cells migration. The aim of the project 7 is to establish the hypolipidemia activity of HLE and its functional component, *H. sabdariffa* leaf polyphenol-rich extract(HLP). The aims of the project 8 to investigate the beneficial effects of *Perilla frutescens* extracts on asthma and the cellular targets of *Perilla frutescens* extracts for the effects.

Project 1 : The lotus leaf is the Nymphaeaceae perennial herb, and its chemical composition to contain a variety of pronuciferine and flavonoids. Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves (NLFE) had been demonstrated previously to possess anti-oxidative. This study aimed to define the anti-carcinogenesis and the mechanism of NLFE reduced cancer in cell and animal model. First, NLFE caused the cell cycle arrest in the G0/G1 phase in human breast cancer cell line MCF7. NLFE reduced the phosphorylation of Akt and expression of fatty acid synthase (FAS) in NLFE-treated MCF7 cells. In murine xenograft model confirmed that NLFE inhibited tumor growth rate. Next, NLFE and NLPE inhibited breast tumor cell line cells migration via inhibiting the PKC α -p38 pathway, Rho GTPase family. Additionally, NLFE suppressed the vascular formation in the Matrigel plug assay and chorioallantoic membrane (CAM) in vivo. Immunohistochemical analysis of CD31 show decreased vessel formation in mice treated with NLFE. Analysis of the molecular mechanisms of NLFE inhibited angiogenesis in MDA-MB-231 cells showed reduced activation of AKT and regulation CTGF and Ras /ERK pathway. Finally, NLFE suppressed the chemical induced incidence, multiplicity and tumor volume of mammary tumors in NMU-induced rats. The NLFE 2% group had an effect better than Tamoxifen. Murine BT-474 (breast cancer cell line) xenograft model also confirmed that NLFE inhibited tumor growth. Immunohistochemical and Western blot analysis of FASN (fatty acid synthase) and phosph-ER α show dose dependent decreased protein level, but not HER2. The result revealed that NLFE reduce the incidence and growth of breast cancer is by reducing the activation of ER α . Taken together, our results suggest that NLFE possible as a new auxiliary therapeutic strategy for anti-metastasis and used to develop a new chemopreventive medicament.

Project 2 : Previous study indicated that the garlic oil and its organosulfur compounds can be beneficial for the suppression of body weight gain in a high-fat diet (HFD)-induced obese rats. The aim of this proposal is to investigate the development of black garlic functional food for the prevention of fat accumulation. There are two topics included in this study: (1) Study of black garlic extracts on adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes: methanol extract of black garlic (MEBG) had the highest inhibitions of adipocyte number, intracellular triglyceride, and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity in 3T3-L1 adipocytes. MEBG was significantly increased the gene levels of AMPK and Sirt1, and then decreased the gene levels of lipogenesis (PPAR γ , SREBP-1c, FAS, ACC, aP2, LPL, and CD36), and adipocytokines (leptin, PAI-1, and resistin). It also up-regulated gene levels of fatty acid oxidation (PGC-1 α and UCP1), and adiponectin. (2) Inhibitory effect of on inhibition of obesity induced by a HFD in rats: the body weight, adipose tissue weights of the peritoneal and epididymal, serum parameters of triglyceride and free fatty acid, and hepatic lipid, triglyceride,

and cholesterol were significantly decreased in the MEBG (50-300mg/kg)+HFD groups. Serum HDL-cholesterol level, and fecal lipid, triglyceride, and cholesterol output in the MEBG (50-300mg/kg)+HFD groups were significantly increased as compared to the HFD group. The gene levels of AMPK, Sirt1, UCP1, and adiponectin in MEBG groups were significantly higher than those in the HFD group. The gene levels of lipogenesis (SREPB-1c, PPAR γ , FAS, and ACC), and adipokines (leptin and PAI-1) in adipose tissue were significantly lower than those in the HFD group. Moreover, MEBG significantly increased the gene levels of fatty acid oxidation (AMPK and PPAR α), and decreased the gene levels of FAS, SREBP-1c, and SCD-1 in liver tissue as compared to the HFD group. These results showed that MEBG can suppress intracellular triglyceride accumulation and obesity in rats with HFD-induced obesity through activations of AMPK and Sirt1.

Project 3 : Colon cancer is one of the most common causes of cancer-related deaths worldwide. *Wasabia japonica*, usually called Wasabi, is used as spicy sauce in Japan and Taiwan. The rhizome of Wasabia is rich in vitamin C and A, minerals, trace elements and isothiocyanates. Studies showed that one of the major ingredients of Wasabi, 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MITC), possessed the activities of detoxification, anti-inflammation, and inducing apoptosis of cancer cells. Up to the present, most of the studies of Wasabi were focused on the function of 6-MITC instead of crude extract, and there is no study reporting the cytotoxicity and mechanism of Wasabi against colon cancer. The results of MTT assay and colony formation assay revealed that Wasabi was cytotoxic to Colo 205 cells dose and time-dependently. Increases in chromatin condensation and subG1 population were observed in the cells treated with Wasabi indicating an induction of apoptotic cell death. Wasabi induced extrinsic apoptosis and mitochondrial death machinery by extracellular stimuli pathways through activation of TNF- α , Fas-L, caspase 3/8/9, cleaved-Bid and release of mitochondrial Cyt.C. We also proved the induction of autophagy by Wasabi via promoting LC3-II in Colo 205 cells. Using RAD001, an autophagy agonist, combined with wasabi extract the data suggested that autophagy played a pivotal role for the induction of colon cancer cell death. The xenografts verified that tumor growth was repressed by Wasabi treatment. Taken together, our studies reveal that the anti-cancer function of Wasabi was via the induction of apoptosis and autophagic cell death in colon cancer. The chemical-induced colon cancer mice model showed that mortality was decreased in Wasabi treatment group. These studies support the application of Wasabi as chemopreventive functional food and treatment of colon cancer in the future.

Project 4 : Since medicine security and its side effects are being taken seriously, the natural products are stressed and reconsidered for medication again. A compendium of Chinese (herbal) medicine describes that *Gentiana macrophylla* has the functions of pain-relief, anti-inflammation, anti-histamine, detumescence and anti-rheumatics. However, little is know about the mechanisms and therapeutic components of *Gentiana macrophylla*. In this study, we discovered that *Gentiana macrophylla* has the protective effects on NZB/W F1 mice receiving high-cholesterol diet, especially in alleviating the inflammatory responses. Besides, *Gentiana macrophylla* could significantly increase the population of CD4+/CD25+ helper T cells in NZB/WF 1 mice. It could also reduce the mitochondrial-dependent apoptosis by decreasing the expression of cytochrome c and caspases-3 activity. Moreover, we performed the IEF and identified the protein spots, which have significant expression. In the future, we will analyze the role of these proteins in pathogenesis of SLE and evaluate the possible therapeutic targets.

Project 5 : In the central nervous system (CNS), astrocytes cells play a central role between brain inflammations and infections, because of those cells secrete pro-inflammatory cytokines and chemokine result in progression of CNS diseases including Alzheimer's disease and brain injury. In our preliminary study, it showed ethyl acetate extract of *Wedelia chinensis* (WEA) inhibited xanthine oxidase, an inflammatory enzyme, *in vitro*. Experimentally, it has been indicated LPS and IFN- γ can activate astrocytes cells to secrete inflammatory factors. Herb tea or dietary food which suppresses astrocyte activation may possess neuroprotective potential. Whether *Wedelia chinensis*, a popular summer herb tea material in Taiwan, possesses neuroprotective potential is investigated. **The first year:** it demonstrated that ethyl acetate extract of *Wedelia chinensis* (WEA) could effectively protect PC12 cells against *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced oxidative damages. WEA blocked t-BHP-activated intrinsic apoptosis pathway such as

decreasing t-BHP-activated caspase 9 and caspase 3 as well as the expression of Bcl-2 and Bcl-xL. Meanwhile, WEA increased antioxidant gene expression including heme oxygenase-1 (HO-1) and γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS). **The second year:** the neuronal and behavioral protection effect of WEA was studied in a D-galactose-induced aging mice model. Behavioral assessment showed chronic D-galactose treatment impaired the learning ability of mice in the active avoidance test. In addition, D-galactose caused elevated levels of phospho-Tau, beta-amyloid protein, and malondialdehyde in the cortex and decreased neuronal density in the cortex and hippocampal CA region. All the above behavioral, biochemical, and neuronal changes were inhibited by co-administration of EAW. **The third year:** WEA inhibited LPS/IFN-gamma-induced synapse-like astrocyte cell structure and expression of SSeCKS, a cytoskeleton scaffolding protein, which up-regulated during astrocyte activation in C6 astrocytoma cells. In addition, WEA could suppress LPS/IFN-gamma induced intracellular ROS, iNOS expression and TNF- α secretion in C6 astrocytoma cells. Finally, medium with pretreatment of WEA in C6 astrocytoma cells significantly decreased cytotoxicity in differentiated PC12 cells as compared to medium with LPS/IFN-gamma-activated C6 astrocytoma cells alone. The components of WEA also exhibited neuroprotective effects. These results imply WEA possesses neuroprotective potential.

Project 6 : Recent studies have revealed pleiotropic anticancer and antiproliferative capabilities of *Dioscorea nipponica* Makino. We first demonstrate that ethyl acetate extract (DNE3) was effective in reducing the lung metastases formation by about 99.5% as compared to vehicle treated control animals. When a non-toxic concentration of the extract was treated directly to highly metastatic murin melanoma cells (B16F10) and human melanoma cells (A2058) *in vitro*, it exerted a dose-dependent inhibitory effect on the invasion ($P<0.001$), motility ($P<0.001$), secretion of MMPs ($P<0.001$), and u-PA ($P<0.001$) of both cell lines. Western blot analysis to find that DNE inhibited phosphorylation of Akt and the activation of NF-kappa B and increased the expression of IkappaB. Previous studies showed that the leaves of *Terminalia catappa* L. extracts (TCE) exerted hepatoprotective, antiinflammatory, antioxidative, and radical scavenging activities. We showed that TCE induced apoptotic death in acute myeloid leukemia (AML) HL-60 cells via dose- and time-dependent manner. A low dose of TCE is sufficient to aggravate As₂O₃-induced cytotoxicity in HL-60 cells. The pure compound, tannic acid, was able to induce apoptotic death in HL-60 cells via dose- and time-dependent manner as well as increase of sub-G1 fraction, and chromosome condensation. Moreover, the *Terminalia catappa* L. methanol extracts (TLME) was used to treat a highly metastatic human lung cancer cell line, A549 to investigate their potential for inhibiting cancer cell migration and invasion. TLME can suppress A549 cells migration and invasion, and cells adhesion and spreading. Both of MMP-2 and u-PA activity were also inhibited by TLME.

Project 7 : Previous studies have indicated that *H. sabdariffa* L. leaf possesses hypoglycemic and hypolipid effects. The leaves contain flavonoid that has the following effects, anti-oxidation, anti-inflammation, anti-cancer and inhibition of cardiovascular diseases. In our previous studies, *H. sabdariffa* leaf extract (HLE) has been demonstrated to be able to induce apoptosis in prostate carcinoma cells. In this study, we aimed to investigate the antiatherogenic effects of HLE and its polyphenolic extracts (HLP). **First year:** the inhibitory effects of HLE and HLP on oxidation and lipid peroxidation of low-density lipoprotein (LDL) were defined *in vitro*, while HLP was shown to be more potent. Both extracts showed potential in reducing foam cell formation and intracellular lipid accumulation in oxidized-LDL (ox-LDL)-induced macrophage J774A.1 cells under non-cytotoxic concentrations. Molecular data showed these influences of HLP might be mediated via activation of liver-X receptor α (LXR α)/ ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and inhibition of PPAR γ /scavenger receptor CD36 pathways. **Second year,** we demonstrated that vascular smooth muscle cells (VSMC) A7r5 cells pre-treated with tumor necrosis factor-alpha (TNF α) triggered migration and proliferation, and affected the activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). Non-cytotoxic doses of HLE and HLP abolished the TNF α -induced the secretion of MMP-9 and cell migration via inhibiting the AP-1 pathway. HLP induced phosphorylation of p53, promoted expression of p21 and p27, inhibited phosphorylation of Rb, and thereby blocked the G1 to S transition in the cell cycle in the TNF α -treated A7r5 cells. **Third year,** the results showed that HLE and HLP can protect against the ox-LDL-induced dysfunction in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). HUVEC cells presented DAPI-positive morphology, and had increases in the distribution of hypodiploid and G0/G1 phases after a 24-h treatment with ox-LDL. Both extracts showed

potential in reducing apoptosis and inducing autophagy in ox-LDL-induced HUVEC. The effects of HLE and HLP in the cells might be mediated via PI3K classIII/Beclin-1/LC3 signaling and/or partially via PI3K classI/p-Akt/mTOR pathways. Consumption of HLE reduced the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Histological photomicrographs of aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with a high cholesterol diet (HCD) showed that HLE could inhibit VSMC proliferation (anti-PCNA) and migration (anti-SM α -actin), and endothelial cell injury (anti-CD31). In conclusion, these results suggested that *H. sabdariffa* leaf potentially could be developed as an anti-atherosclerotic agent.

Project 8 : *Perilla frutescens* has been used in traditional medicine for respiratory diseases due to its anti-bacterial and anti-inflammatory activity. This study was aimed to investigate effects of *Perilla frutescens* leaf extract (PFE) on expression of pro-allergic and pro-inflammatory cytokines in airway epithelial cells exposed to mite major allergen Der p 2 (DP2) and the underlying mechanisms. Our results showed that PFE up to 100 μ g/mL had no cytotoxic effect on human bronchial epithelial cell BEAS-2B. Further investigations revealed that PFE dose-dependently diminished mRNA expression of pro-allergic cytokine IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF, as well as pro-inflammatory cytokine IL-6, IL-8 and MCP-1 in BEAS-2B cells treated with DP2. In parallel to mRNA, the DP-2-elevated levels of the tested cytokines were decreased. Further investigation showed that DP2-induced phosphorylation of p38 MAPK (P38) and JNK, but not Erk1/2, was also suppressed by PFE. In addition, PFE elevated cytosolic I κ B α level and decreased nuclear NF- κ B level in DP2-stimulated BEAS-2B cells. Taken together, these findings revealed that PFE significantly diminished both mRNA expression and protein levels of pro-allergic and pro-inflammatory cytokines in response to DP2 through inhibition of P38/JNK and NF- κ B activation. These findings suggest that PFE should be beneficial to alleviate both allergic and inflammatory responses on airway epithelium in response to aeroallergens.

(二)前言及研究目的：

子計畫一：乳癌是全球婦女最常發生的癌症，台灣地區乳癌發生率位居女性好發癌症的第一位。將近70%的乳癌患者，其腫瘤組織中有雌激素受體的表現(ER+)，但這些病人約有2/3以Tamoxifen治療能達到顯著的效果，而ER-的病人則反之。約有30%乳癌經由HER-2基因倍增及其蛋白過度表現引起，復發率極高，因此HER-2可當做乳癌病人復發率的指標(1)。脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FASN)是能量代謝過程中一個重要的酵素複合體，在乳癌病患中若FASN的表現量低的話，其預後與存活率也比較高(2)。於乳癌細胞中利用siRNA降低FASN的表現則可增加抗癌藥物的作用(3)。目前乳癌臨床用藥如：如Tamoxifen可用於治療ER+的乳癌，而trastuzumab(herceptin)屬於單株抗體，可用於治療Her2/neu過度表現的乳癌。因此ER-, PR-, Her2-的三重陰性乳癌就成為乳癌治療的盲點。這種乳癌亞型預後極差，又易早期轉移，對傳統荷爾蒙及化學治療藥物效果較差，這是目前乳癌治療的一個棘手難題(4)。因此探討乳癌的形成原因，以及找出適當、副作用少的治療方式，在對乳癌防制策略上，是相當重要的一環。

荷葉含多種生物鹼、抗氧化物質類黃酮、荷葉苷(nelumboside)、oligomeric procyanidins及其槲皮素、異槲皮甙，以及維生素C、酒石酸、枸橼酸、蘋果酸、草酸、琥珀酸、葡萄糖酸、鞣質。另外，還含抗有絲分裂作用的鹼性成分(5)。本研究室發現荷葉萃取物(NLFE)可抑制殖入裸鼠之乳癌細胞增生，因此本計劃擬詳細研究NLFE在預防及治療乳癌之作用，探討其作用機轉，找出其作用之標靶。

子計畫二：肥胖是全球面臨的健康議題，世界衛生組織(WHO)與食品藥物管理局(FDA)將肥胖列為慢性疾病之一。肥胖和許多疾病之罹病率和死亡率增加息息相關，例如：惡性腫瘤、心血管疾病、糖尿病、慢性肝病、慢性腎臟病和癌症等(Mariela and Itamar, 2011)。改善肥胖問題除了藉由飲食控制外，亦可由調控體內脂肪酸恆定基因、能量代謝基因和脂肪細胞激素相關基因(6-9)，進而達到調控體內脂質的生合成和降低脂質堆積。

大蒜(*Alliums sativum* L.)為百合科鱗莖植物，具有多種營養成分，其中富含之硫化物為大蒜特殊之風味與生理活性之來源。大蒜具有多種生物活性，包括：抑制癌細胞增生、抗發炎、抗氧化、抗血栓、降血脂與降血糖等作用(10)。研究發現大蒜具有抑制高脂飲食所誘導之體重增加，並顯著抑制高脂飲食所誘導之血脂異常(11, 12)。因此認為大蒜和其含硫化合物，對於體重與血脂之控制是具有開發潛力。本研究利用調整溫濕度之生物轉換技術(biotransformation)應用於黑蒜頭(black garlic)之生產開發，黑蒜頭除了改善大蒜原有的特殊風味，亦可提高營養成分(胺基酸、有機硫化合物和多酚化合物)之含量(13)。本研究利用3T3-L1脂肪細胞，利用不同溶劑(水、甲醇和乙醇)進行黑蒜頭之萃取，釐清最具抑制脂質生合成之萃取物，並進一步探討影響脂質生合成之相關分子機轉。接著進一步，以大鼠(Wistar rats)作為實驗對象，在高脂飲食下，誘導大鼠肥胖症模式並同時介入不同劑量之黑蒜甲醇萃取物。評估其是否具有改善肥胖之潛力，並釐清其相關分子作用機轉。

子計畫三：國人的大腸直腸癌居男性與女性癌症死亡之第三位，而發生率則高居第一位，足見大腸直腸癌的防治對於保護國人健康之重要。結腸癌的治療以手術切除為主，直腸癌的治療包括手術切除、術前之同步化放療及術後同步化放療等方法。雖然直腸癌的治療以根除手術為主，但仍有高達百分之30至70的局部復發率。

山葵(*Wasabia japonica*)俗稱芥末，在日本與台灣常被當作食物的辣味調味料。山葵地下莖含豐富的機能性成分，如維生素C與A、礦物質、微量元素、以及異硫氰酸鹽(isothiocyanates)成份。研究顯示山葵主要成分之一6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate(6-MITC)，具有解毒(14)、抗發炎(15)以及誘導癌細胞凋亡(apoptosis)的能力(16)，卻不會造成正常細胞的傷害，為一種有效的化學防癌物質。研究並在in vitro和in vivo模式證實6-MITC具有抑癌的能力，如抑制乳癌及黑色素瘤細胞的生長(17)、抑制黑色素瘤細胞的轉移(18)，以及抑制由4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butnone引發的肺癌(19)和MNNG引起的胃癌(20)。

過去有關山葵的研究除了以6-MITC進行化學防癌的研究外，鮮少文獻以山葵萃取物作為研究對象。本研究室於前置實驗中以山葵萃取物(*Wasabia extract*)為實驗材料，篩選其對不同的癌細胞株的毒性(包括乳癌、肺癌、肝癌與腸癌)，發現山葵萃取物對極惡性腸癌細胞(Colo 205)具有細胞毒性，可引發細胞停滯在G2/M期以及凋亡。本研究探討山葵萃取物對腸癌細胞的毒性作用機轉，評估其開發成抗癌保健食品的潛力。

子計畫四：近年文獻指出，全身性紅斑狼瘡病患中，肝臟異常的盛行率可能高到 55% (21,22)。在一個文獻指出，238 個全身性紅斑狼瘡病患中，其中有 39%肝腫大、6%脾腫大、24%黃疸和 21%肝功能不正常(23)。在另一個肝臟酵素的研究中發現，81 個全身性紅斑狼瘡病患中，就有 55%肝臟酵素不正常(24)。而在狼瘡動物實驗的研究中也發現，高油脂高膽固醇食物確實會加劇狼瘡小鼠的臨床病症，增加細胞的凋亡及多數病灶的惡化，包括加劇肝臟與腦部的發炎反應及細胞凋亡 (25, 26)。秦艽學名為 *Gentiana macrophylla*，據先前流傳下來以及現代醫學報導，這類清熱草本植物中草藥，具有叫 iridoid glycosides 的化學結構，可用來治療狼瘡，聲稱可改善免疫狀況及血液中指標(27)。秦艽除了能減緩包括紅斑性狼瘡等自體免疫病徵外，由於不具毒性，更可作為一般養生之食用。但是到目前為止，秦艽對於減緩狼瘡之詳細分子機轉、自體免疫的調控路徑及其有效成分，仍然未知。本子計畫利用自發性紅斑性狼瘡小鼠為模式，研究秦膠對於紅斑性狼瘡之效益及相關免疫調節機轉。

子計畫五：神經退行性疾病(neurodegenerative disease)是一種原發性神經元變性為基礎的退行性神經系統疾病，該疾病包括：阿茲海默症、帕金森氏症、肌萎縮側索硬化症、舞蹈症等。許多天然物具有保護神經細胞功效，例如 *Hypericum perforatum* L 分離之化合物 Hyperoside 可保護神經細胞受過氧化物的毒殺現象(28); *Rhodiola rosea* L. 分離之化合物 Salidroside 抵抗 beta-amyloid 所誘導的氧化壓力抑制神經細胞凋亡並且透過抗氧化酵素而達到保護效果(29); 天然多酚化合物 Resveratrol 和 Quercetin 抵抗 MPP+ 所誘導氧化壓力抑制神經細胞死亡(30)。以上種種研究皆可證實天然藥物可以保護神經細胞的凋亡，而達到化學預防及治療之能力。

蟛蜞菊學名 *Wedelia chinensis* Merr，具有解熱、化痰和減少咳嗽，並且具有保護肝臟免受毒性威脅，通常是被用來做抗發炎藥物的一種。之前的研究顯示蟛蜞菊化合物具有抑制雄激素的活性及抗癌成份，其中包含四種化合物 indole-3-carboxylaldehyde、wedelolactone、luteolin 和 apigenin。而 wedelolactone 屬於 coumestan 結構而 luteolin 和 apigenin 屬於 flavonoid 結構皆有抗發炎活性之報導，因此蟛蜞菊具有神經保護或減緩神經退行性疾病發之潛力。本研究**第一年**利用過氧化物(*tert-butyl hydroperoxide*, t-BHP) 誘導神經細胞(PC12 Neuroblastoma Cells)凋亡，並利用蟛蜞菊多酚萃取物及分離之化合物來保護神經細胞的凋亡現象，更深入探討內源性抗氧化酵素的表現對抗活性氧所誘導的凋亡能力，而達到神經保護作用。**第二年**利用 d-galactose 誘導老鼠產生老化現象進而評估黃花蟛蜞菊多酚萃取物保護腦神經退化之作用。**第三年**利用 IFN- γ 及 LPS 誘發星狀細胞株活化，觀測蟛蜞菊粗萃物及主成份是否有抑制 IFN- γ 及 LPS 誘發星狀細胞株活化之作用，並探討其作用機制。

子計畫六：許多文獻指出癌細胞與正常細胞差別在於無法進行一般細胞凋亡(apoptosis)且具有異常的增生(proliferation)能力。另外，在癌細胞的侵入(invasion)及轉移(metastasis)亦是癌症導致死亡以及治療複雜度提昇的主要原因；而癌細胞轉移已知與多種細胞生理改變密切相關，其中包含【1】細胞與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)之間結合能力(adhesion)的改變，細胞與細胞間相互作用力的破壞(31, 32)；【2】細胞的侵襲及移動(motility)能力上升；【3】細胞骨架的重整；【4】細胞外基質的分解，接著癌細胞會分泌大量的蛋白酶(proteinase)，如 serine proteinase (33)、metalloproteinase (MMPs)、cathepsins (34, 35)以及 plasminogen activator (PA) 分解 ECM 幫助其穿過細胞外基質(36)；【5】侵入到循環系統中的血管或淋巴管，經由逃避免疫系統的防護，貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官；【6】再經由大量的增生及；【7】血管新生(angiogenesis)作用，癌細胞便藉由奪取正常組織器官的養分而造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡(37, 38)。以上皮細胞為例，細胞癌化至轉移侵入的過程：正常的表皮細胞受到物理性或化學性的刺激後，轉型成癌細胞，轉型後的癌細胞便開始大量的增生，增生後的癌細胞會分泌胞外蛋白水解酵素，分解基底膜以及細胞間基質，最後藉由循環系統以轉移到新的組織器官，然後再開始增生，形成一個新的腫瘤。目前許多研究趨向以天然物成份如多酚類或黃酮類等天然物合併抗癌藥物的使用，期望能加強抗癌藥物的療效，降低抗癌藥物的濃度，以減少化療對人體造成之傷害，達到輔助治療的效果，抑制癌細胞的惡化。

子計畫七：動脈粥狀硬化的發生為一種複雜且為漸進式的致病過程，包括脂質進入血管壁、脂蛋白氧化、泡沫細胞(foam cells)形成與堆積、血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)遷移和增

生，以及內皮細胞損傷(endothelial cells)等(39, 40)。VSMC 異常遷移和增生發生在許多心血管相關疾病的形成過程中。在病程的發展中期，巨噬細胞會與血管內膜中的 T cell 交互作用釋放大量的細胞激素(Th1、Th2 cytokines)而促使一連串的免疫反應的發生(41)，同時周圍的 VSMC 及內皮細胞同樣也會表達生成 IL-1(interleukin-1)、TNF(tumor necrosis factor)等因子，而這些分子的生成會刺激 VSMC 的增生，並轉移至血管內膜或中膜(subendothelial)當中。VSMC 轉移至內膜後，會受 ox-LDL 影響開始表達清除者接受器(scavenger receptor)而吞噬 ox-LDL 形成泡沫細胞。進一步，VSMC 也會開始分泌 MMPs (matrix metalloproteinases)，改變細胞外基質的構成，促使局部區域形成”fibrous cap”，而將粥樣(gruel)覆蓋形成動脈粥狀硬化斑(plaque)(42, 43)。

洛神花(*H. sabdariffa* L.)為錦葵科(Malvaceae)植物，其葉在東南亞一帶為普遍烹煮的蔬菜類食物。洛神葉萃取物(*H. sabdariffa* leaf extract, HLE)具有抗氧化、降血糖、降血脂之功效(44, 45)以及誘導前列腺癌細胞凋亡之作用(46)。過去的研究也指出其成分富含類黃酮(flavonoids)等多酚(polyphenol)成份(47)，此類多酚具有抗氧化、抗發炎、降血脂、防癌之作用及抑制心血管疾病(48, 49)，亦顯示洛神葉具有化學預防的潛力。本研究針對台灣生產之洛神葉進行初步之多酚定性、定量分析，以及抗氧化與抗動脈粥狀硬化活性分析。目的在釐清於複雜且為漸進式的動脈粥狀硬化過程中，洛神葉萃取物所參與影響的範疇及抗動脈粥狀硬化之分子機制。

子計畫八: *Perilla frutescens* leaf in a common garnish and has been widely used as medicinal herb such as “Zisu” in traditional Chinese medicine and “saiboku-to” in Japanese herbal formula for asthma treatment. Previous studies have shown that *Perilla frutescens* leaf extracts possess different biological activities, including inhibition of tumor necrosis factor- α (TNF- α) (50), suppression of IgA nephropathy (51), and anti-inflammatory and anti-allergic activity (52). A series of pro-inflammatory cytokines and chemokines are produced by airway epithelial cells upon stimulation with pathogens and allergens, including IL-6, IL-8, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and monocyte chemotactic protein (MCP)-1 (53, 54).

House dust mite (HDM) is a major causative factor for airway hypersensitiveness and asthma (55). Of mite-sensitive individuals, approximately 90% generates IgE antibody responses to well-identified HDM allergens that are categorized into 24-kd group 1 and the 14-kd group 2 allergens like Der p 2 (DP2, derived from *D. pteronyssinus*) on basis of IgE affinity (56). DP2 is known to trigger both pro-inflammatory and pro-allergic responses on respiratory epithelial cells [8]. In addition to induction of pro-allergic cytokines, it is reported that respiratory cells exposed to DP2 result in up-regulated secretion of pro-inflammatory cytokines and expression of intercellular adhesion molecule-1 (57).

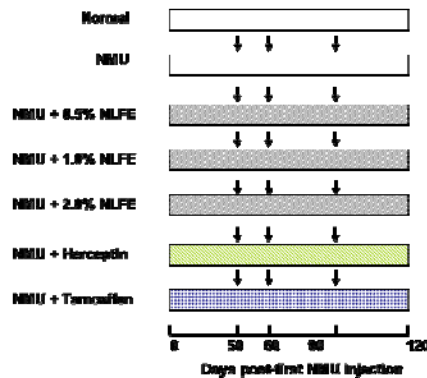
The present study was aimed to investigate whether extract of *Perilla frutescens* leaf alleviates DP2-induced pro-inflammatory and pro-allergic responses with emphasis on mRNA expression and production of cytokine and cellular signaling. Non-tumorigenic human bronchial epithelial cell BEAS-2B was used as cell model. Cytotoxicity of DP2 was determined by MTT assay. mRNA expression was analyzed by both RT-PCR and real-time quantitative PCR (qPCR). Kinase activation, cytosolic level of I κ B α and nuclear-cytosolic distribution of NF- κ B was demonstrated by subcellular fractionation and immunoblotting.

(三)研究方法：

子計畫一：

1. 動物誘發性腫瘤試驗(induction of mammary tumors)

NMU(N-methyl-N-nitrosourea)誘發雌性大鼠乳房組織腫瘤病變動物模式，設計如下圖：



動物以 CO₂ 或麻醉劑麻醉犧牲，收集腫瘤及乳房(腺)組織置入 10%福馬林液中保存，進行病理切片，以 H&E stain 進行細胞型態之染色，進行判讀；並將腫瘤資料數據之整理以(A) the number of animals with tumor (tumor incidence)；(B) latency to tumor appearance 及(C) tumor volume 等方式呈現腫瘤發生率之分析。

2. 荷葉黃酮多酚 (NLFE)抑制腫瘤細胞生長之動物試驗

人類乳癌細胞(BT-474 cell line, 10⁷ cell/0.1 ml) 經皮下注射於裸鼠大腿外側之皮下脂肪層，腫瘤細胞注射後一週，依各組實驗規劃給予不同劑量之 NLFE 餵食，並連續觀察 4 週，每週觀察紀錄腫瘤生成之大小，停止給予 NLFE 之次日(或停止給予受試物後 1-5 天)處死動物，先稱體重，後解剖下皮腫瘤塊，稱重。

子計畫二：

1. 以體外細胞試驗模式，釐清黑蒜萃取物之抗肥胖潛力與作用機轉。

經分化培養完成之 3T3-L1 脂肪細胞，以 0-100 μg/mL 濃度之黑蒜萃取物處理 48 小時。待加藥處理完成，分別測定胞內三酸甘油酯含量、脂肪細胞數目、甘油-3-磷酸去氫酶活性、以及相關基因之表現。

2. 以體內動物試驗模式探討黑蒜甲醇萃取物抑制高脂飲食誘導肥胖大鼠之影響與分子機轉。

隻 8 週齡雄性大鼠 (Wistar rat)，分組(n=8)為(1)正常飲食組(normal diet, ND)、(2)高脂飲食組(high fat-diet, HFD) (油脂來源：大豆油 5.6% 與 20% 豬油)、(3)高脂飲食組給予低劑量(low dose, LD)黑蒜甲醇萃取物[50 mg MEBG/kg rat]、(4)高脂飲食組給予中劑量(medium dose, MD)黑蒜甲醇萃取物[150 mg MEBG/kg rat]和(5)高脂飲食組給予高劑量(high dose, HD)黑蒜甲醇萃取物[300 mg MEBG/kg rat]。動物犧牲後分別測定血清生化參數、肝臟與糞便總脂質、臟與脂肪組織結構切片與油滴累積、以及脂肪與肝臟組織相關基因之表現。

子計畫三：

1. 細胞模式

人類腸癌細胞(Colo 205)經不同劑量之山葵萃取物處理後測定細胞毒性、Colony Formation Assay、細胞週期分析、DAPI 螢光染色法、Acridine Orange Staining，並以 Western blot 分析凋亡及自噬作用和訊息傳遞途徑之相關蛋白質表現。

2. Xenografts 動物實驗

以 nude mice 為 model，在 mice 5~6 週時 s.c. 注射 5x10⁵ 的細胞至右後腿，待腫瘤長至 100 mm³ 時開始進行治療。動物分成 4 組(Control、RAD001、山葵與山葵+RAD001)，每組 6 隻。山葵水萃取物(250 mg/kg) 採管灌每日餵食，RAD001(2.5mg/kg) 採腹腔注射每週三次。實驗過程中定期記錄動物腫瘤的變化。42 天後犧牲 mice 評估療效。並以 Western blot 分析凋亡及自噬作用之相關蛋白質表現。

3. 化學腸癌誘發動物實驗

以公的 CD-1 (ICR) 老鼠為模式，組別包含正常、誘導和誘導+山葵組別，在老鼠 6 週大時開始進行誘發腸癌的實驗，首先以腹腔注射方式注射 1,2-dimethylhydrazine (DMH) (20mg/kg)，一週後再餵食

2% 的 dextran sodium sulfate (DSS)，以溶於飲用水中的方式給予老鼠飲用一週，誘導結束後接著以管灌餵食方式餵食山葵 (低劑量 25mg/kg 或高劑量 100mg/kg)，實驗過程中定期記錄動物的變化。

子計畫四： 本子計畫利用自發性紅斑性狼瘡小鼠為模式，研究秦膠對於紅斑性狼瘡之效益及相關免疫調節機轉。我們將狼瘡小鼠分成三組，分別餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦艽飼料12週後，將小鼠犧牲進行分析。飼養期間測定心跳和平均動脈壓。犧牲後分析肝臟重量、脾臟大小、血清MMP-9活性、血清IL-6濃度、CD4+/CD25+輔助型T細胞族群、肝臟之IL-6、IL-1 β 、IKK- α 及NF- κ B蛋白質表現量、cytochrome-c及caspase-3的活性等。另進行小鼠肝臟之雙向電泳，並分別挑選30個蛋白質點進行蛋白質身分鑑別。

子計畫五：

1. 過氧化物(*tert*-butyl hydroperoxide, t-BHP)誘導神經細胞(PC12 Neuroblastoma Cells)凋亡模式

老鼠神經細胞 PC12 Neuroblastoma Cells 以螞蟥菊萃萃取物處 24 小時後，再加入 3 小時 t-BHP 後測定細胞毒性、LDH assay 毒性、細胞 DAPI 螢光染色、GSH 含量、活性氧含量，並以 Western blot 分析凋亡相關蛋白質表現。

2. d-galactose 誘導老鼠產生老化現象動物模式

將小鼠分成五組 group 1 控制組，group 2 以 d-galactose (50 mg/kg/day;sc) induction toxicity，group 3、4、5 除了施打 d-galactose 外分別皮下注射 10 mg/kg、25mg/kg PEW 及 10 mg/kg 維他命 E 每週三次，共 9 週。活體動物進行主動迴避試驗，動物犧牲後進行 Western blotting 分析相關蛋白質表現及病理組織分析。

3. IFN- γ 及 LPS 誘發星狀細胞株活化模式

以 IFN- γ 及 LPS 誘發星狀細胞株活化，觀測螞蟥菊粗萃物及主成份是否有抑制 IFN- γ 及 LPS 誘發星狀細胞株活化之作用。將 C6 astrocytoma cells 以 1×10^6 cells/ml 並以 1 % fetal bovine serum 的 DMEM 種入 10 cm dishes。待貼壁後加入含有 12 μ g/ml LPS/25 ng/ml IFN- γ 處理 15 min，再額外加入 WEA、Luteolin 或 Wedelolactone 於 24 hr。分別測定下列項目：MTT assay、Nitrite release assay、活性氧物質、Factin stain、DAPI staining、TNF- α release、phosphorylated Stat3 (Tyr705) activity in Nucleus、Western blot 等。

子計畫六：

1. 以極度惡性的老鼠黑色素瘤細胞(B16F10)做研究，於C57BL/6J 老鼠中，以尾靜脈注射黑色素瘤，觀察餵食穿山龍乙酸乙酯萃萃取物是否影響肺部組織黑色素瘤轉移。

2. 以穿山龍乙酸乙酯萃萃取物處理B16F10細胞，進行以Wound healing assay及Boyden chamber assay觀察細胞移動，測定MMP-2與u-PA活性，PI3K、Akt、NF-kappa B蛋白表現。

3. 以不同濃度欖仁樹葉萃萃取物(*Terminalia catappa* L. extracts; TCE)或單寧酸處理急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia; AML)細胞株 HL-60，測定細胞存活率、DAPI染色及sub-G1細胞。

4. 以欖仁樹葉之甲醇萃萃取物(TLME)處理肺癌細胞株A549之轉移與侵入能力，進行以Wound healing assay及Boyden chamber assay觀察細胞移動，測定MMP-2與u-PA活性。

子計畫七：

1. 洛神葉萃萃取物成份 (HLE及HLP) 抑制高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈硬化症之動物模式及抑制泡沫細胞生成作用

洛神葉水萃萃取物 (HLE) 及多酚 (HLP) 製備後進行總多酚含量測定、總黃酮含量測定、總花青素含量測定、高效能液相層析儀(HPLC)分析、抑制體外誘發LDL氧化之作用(TBARS formation、低密度脂蛋白表面電荷改變試驗、ApoB輔蛋白斷裂試驗)、DPPH自由基清除效應、抑制泡沫細胞生成及細胞內脂質堆積之研究(細胞毒性試驗、泡沫細胞生成試驗、細胞內脂質含量分析)，並以Western blot分析相關蛋白質表現。動物模式以高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈硬化症，探討洛神葉萃萃取物成份 (HLE及HLP) 抑制動脈硬化症的效果，實驗過程中定期記錄動物飲食以及體重的變化，並登記動物死亡的數目。飼養25後犧牲，收集血液分析血脂肪，包括總膽固醇、三酸甘油脂、HDL、LDL，另

一部份取肝組織測定其肝內總脂質膽固醇及LDL之濃度。取出實驗動物之主動脈弓(aortic arch)部份，以hematoxylin and eosin 染色觀察病灶。此外，亦觀察胸動脈管腔內壁中脂肪斑之沉積與分布。

2. 洛神葉萃取物成份(HLE及HLP)抑制細胞平滑肌細胞生長週期及移動作用。

以Rat smooth muscle of thoracic aorta-A7r5細胞為模式，處理洛神葉萃取物成份(HLE及HLP)後分析細胞毒性、基質金屬水解蛋白酶活性、傷口癒合試驗和細胞移動性分析、細胞生長曲線、細胞增生試驗、細胞週期分析，以real time-PCR、Western blot和免疫沉澱法分析相關分子的mRNA與蛋白質的表現及作用機制。

3. 洛神葉萃取物成份(HLE及HLP)保護血管內皮細胞損傷作用

以human umbilical vein endothelial cell—HUVEC細胞為模式，處理洛神葉萃取物成份(HLE及HLP)後分析細胞存活測試、細胞毒性測試、細胞增生試驗、細胞凋亡分析、細胞自噬分析，並以Western blot分析相關蛋白質表現。

子計畫八： The transformed human normal bronchial epithelial cells, BEAS-2B, were preincubated with indicated concentration of PFE for 4 h, and then 40 µg/mL rDP2 was added and incubated for 2 h (kinase cascades), 4 h (RT-PCR and qPCR analysis), or 24 h (cell viability assay and cell morphology). The treated cells were subjected for analysis of cell viability, real-time PCR, cytokine production, and Western blotting.

(四)結果：

子計畫一：詳細內容參看附件一

1. 荷葉萃取物(NLFE) 之萃取與定性分析

NLFE 的總多酚含量約有 19.34% (以 GA 當標準品)，總類黃酮含量約有 5.89%，碳水化合物約有 16.63%，蛋白質約佔 4.55% 以及脂肪含量約為 2.43% (見第一一年期中報告 Tab. 1)。以 HPLC 分析，已知其主要成分為 Gallic acid 4.85%、protocatechuic acid 12.74%、catechin 4.59%、gallic acid 6.25%、caffeic acid 2.33%、epicatechin 3.32%、rutin 18.49%、quercetin 19.51% 與 naringenin 3.29% (見第一一年期中報告 Fig. 1, Tab. 2)。

2. NLFE 抑制乳癌細胞之生長

利用 PI 染劑，以流式細胞儀觀察發現在 NLFE 劑量在 3 mg/mL 時，MCF7 細胞之 G0/G1 時期也上升了 20%，並且 sub G1 處也未出現高峰，意味著 NLFE 很有可能是透過細胞週期的停滯來達到抑制腫瘤細胞生長之作用。分析細胞週期相關蛋白之變化，結果顯示隨著 NLFE 劑量的增加，參與 G0/G1 時期的 cyclin D、cyclin E、cdk4 與 cdk2 蛋白表現隨之減少，p21, p27, p16 這些 CDKI 呈現 dose-dependent 增加 (見第一一年期中報告 Fig.4- Fig.9)。其分子機轉後是透過 PI3K/Akt 路徑，影響脂肪酸合成酶(FAS)之表現進而造成細胞週期停滯作用(見第一一年期中報告 Fig.10- Fig.12)。細胞在經過 NLFE 處理之後並不影響 ER α 的蛋白表現，但卻降低 ER α 的磷酸化狀態。細胞內 HER2 的 phosphotyrosine 總量有所下降，其磷酸化位置為 Tyr¹²²¹ 與 Tyr¹²⁴⁸ (見第一一年期中報告 Fig.13- Fig.14)。NLFE 亦可在 in vivo 中有效抑制腫瘤的生長速度，餵食 0.5% NLFE 的組別當中，腫瘤有變小的趨勢，而在 1% NLFE 的餵食下，更可以明顯地看出抑制腫瘤成長的能力(見第一一年期中報告 Fig.16)。

3. NLFE 抑制乳癌細胞之轉移與血管新生作用

利用傷口癒合實驗(wound-healing assay) 及細胞移動分析(Boyden chamber assay)證實 NLFE 與 NLPE 抑制乳癌細胞傷口癒合及移動能力。而 MMP-2 及 MMP-9 的活性也受到抑制。進一步利用西方墨點法分析相關蛋白的表現發現 NLFE 與 NLPE 能夠降低細胞骨架蛋白 RhoA、CDC42、Rac1 的表現，並抑制 PKC α 的活性，影響下游 p38 與 ERK 的磷酸化，進而影響細胞的移行作用。接著透過雞胚胎實驗及 Plug assay，證實 NLFE 能有效抑制血管新生作用。進一步以西方墨點法分析相關機制，結果發現 NLFE 抑制了活化態 AKT 的表現以及 CTGF, Ras/ERK 訊息路徑(見第二一年期中報告)。

4. 動物誘發性腫瘤試驗(induction of mammary tumors)

NMU 成功誘導出大鼠產生腫瘤，誘導的腫瘤發生率約為 60% (Fig. 1)。餵食 1% NLFE 試驗組中，腫瘤發生率僅 10%，而餵食 2% NLFE 之組別中，更完全抑制了腫瘤之發生(Fig. 1)。雖然在餵食 1% NLFE 試驗組中仍有腫瘤之發生，但是也明顯地延遲了腫瘤發生的時間(Fig. 1)，減少腫瘤之數目 (Fig. 2)，並明顯地減緩了腫瘤的成長速度，使得腫瘤的體積比起陽性對照組要小(Fig. 3)。由 Fig. 1- Fig. 3 的結果中可看出 Herceptin 對於 NMU 所誘導的乳癌無法有效地發生作用，然而 Tamoxifen 卻可顯著的降低 NMU 所誘發的乳癌發生率、腫瘤數目與腫瘤體積。NLFE 2%處理的組別治療效果優於 Tamoxifen 處理的組別。利用組織染色(H & E stain) 與免疫組織染色(IHC) 觀察 NMU 所誘導出的腫瘤型態與特徵，腫瘤具有典型乳癌細胞的特徵，且具有高度表現 HER2 與 ER α 的情形(Fig. 4)。NMU 誘導下會提高大鼠血中 E2 的含量，而餵食 NLFE 則會改善其血中 E2 的數值(Fig. 5)。

5. 動物移植性腫瘤試驗

以人類乳癌細胞株BT-474注射在免疫缺乏的裸鼠皮下產生腫瘤，餵食0.5% NLFE的組別當中，腫瘤體積有變小的趨勢，而在2.0% NLFE的餵食下，更可以明顯地看出抑制腫瘤生長的能力，其效果更優於Tamoxifen (Fig. 6)。利用免疫組織染色觀察裸鼠腫瘤的相關蛋白變化，結果發現NLFE 餵食會減少細胞質FASN的量。ER α 的免疫染色結果中，除了NLFE 2.0%的組別有受到抑制之外，其他的組別與對照組都無顯著變化；而在phosph-ER α ^{ser118}的表現方面，單獨注射BT-474細胞株的腫瘤，其細胞核中都有ER α ^{ser118}濃染的情形，餵食NLFE 0.5% 的組別中，有濃染ER α ser118的細胞核數量明顯地減少，而在餵食NLFE 2.0% 的組別，濃染ER α ^{ser118}的細胞已經幾乎不見(Fig. 7)。HER2表現於細胞膜上，其組織染色結果顯示，所有NLFE組別與Tamoxifen跟對照組相比較並無顯著變化；然而，phosph-HER2的免疫染色結果中，除了NLFE 2.0% 組別有受到抑制之外，其他的組別與對照組比較並無明顯改變(Fig.7)。利用

西方墨點法進一步分析在NLFE處理下裸鼠腫瘤蛋白的變化，結果顯示隨著NLFE 劑量之提升，FASN 的表現量隨著NLFE 的劑量增加而逐漸減少。ER α 只在NLFE 2.0% 的組別中有受到抑制,其餘的組別與對照組比較，其蛋白表現都無顯著變化；而phosph-ER α 隨著NLFE 劑量之增加，其表現量則隨之減少，顯示NLFE 確實會造成ER α 的磷酸化表現下降。所有NLFE組別，Tamoxifen組跟對照組相比較下，結果顯示HER2蛋白並無顯著變化；然而，phosph-HER2，除了NLFE 2.0% 組別有受到抑制之外,其他的組別與對照組比較都無明顯改變(Fig.8)。

子計畫二：詳細內容參看附件二

1. 不同溶劑黑蒜萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞之油紅 (oil red O) 染色、胞內三酸甘油酯 (TG) 與甘油-3-磷酸去氫酶 (GPDH) 酵素活性之影響

油紅染色試驗結果顯示(表 1)，黑蒜水萃取物與乙醇萃取物於 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時會降低脂肪細胞數目至 80.18%和 86.43% ($p < 0.05$)。而黑蒜甲醇萃取物在各濃度均可顯著抑制脂肪細胞數目，其中在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度時可降低至 91.15% ($p < 0.05$)。黑蒜甲醇萃取物於 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度以上，可顯著降低脂肪細胞胞內三酸甘油酯之含量(13.6%-25.6%)($p < 0.05$)。由以上結果得知，黑蒜甲醇萃取物具有最佳之抑制 3T3-L1 脂肪細胞胞內三酸甘油酯能力。黑蒜甲醇萃取物在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度以上，具有顯著降低 3T3-L1 脂肪細胞 GPDH 酵素之活性 ($p < 0.05$)。

2. 黑蒜甲醇萃取物對調控脂肪細胞相關訊息分子之影響

由表 2 結果得知，黑蒜甲醇萃取物能顯著提升 AMPK 和 Sirt1 之基因表現，並抑制 PPAR γ 、SREBP-1c、ACC、FAS、aP2、LPL 和 CD36 等脂質合成和運送相關基因表現($p < 0.05$)。黑蒜甲醇萃取物對 PGC-1 α 和 UCP1 皆有顯著的提升作用($p < 0.05$)，對 leptin、resistin 和 MCP-1 之基因表現皆具顯著的抑制作用 ($p < 0.05$)。此外，亦會提升在 adiponectin 之基因表現 ($p < 0.05$)。

3. 黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之體重、食物攝取量與能量攝取之影響

由表 3 結果得知，在給予 50 mg/kg、150 mg/kg 和 300 mg/kg 之黑蒜甲醇萃取物之大鼠，可顯著降低其體重 ($p < 0.05$)。

4. 黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之臟器重量之影響

由表 4 結果得知，在高脂飲食並給予黑蒜甲醇萃取物之組別，在心臟、肝臟、脾臟、肺臟與腎臟重量上，並無統計上之顯著差異 ($p > 0.05$)。高脂飲食給予 50 mg/kg 以上之黑蒜甲醇萃取物，可顯著降低腎周圍與副睪脂肪重量 ($p < 0.05$)。

5. 黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之血清生化參數之影響

由表 5 結果得知，在高脂飲食並給予 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物之組別，可顯著降低血清三酸甘油酯含量、游離脂肪酸含量，並提升血清高密度脂蛋白質膽固醇含量 ($p < 0.05$)。

6. 黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之肝臟與糞便總脂質、三酸甘油酯與膽固醇含量之影響

由表 6 結果顯示，高脂飲食給予 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物之組別，可顯著降低肝臟總脂質、三酸甘油酯與膽固醇含量 ($p < 0.05$)。此外，亦會增加糞便總脂質、三酸甘油酯與膽固醇之排出量 ($p < 0.05$)。

7. 黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之肝臟與脂肪組織切片之影響

由圖 1 肝臟 H&E 組織切片染色結果得知，HFD 組別有較多油滴累積情形、脂肪細胞較正常飲食組為大，在高油脂飼料中添加 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物組別，則可減少肝臟中油滴的堆積及減少脂肪細胞的大小。

8. 黑蒜對高脂飲食誘導肥胖大鼠之肝臟與脂肪組織相關訊息分子之影響

由表 7 結果得知，高脂飲食給予 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物之組別，在脂肪組織中，會顯著增加 AMPK、Sirt1、UCP1 與 adiponectin 之基因表現，並降低 PPAR γ 、SREBP-1c、FAS、ACC 和 CD36 之基因表現 ($p < 0.05$)，亦會顯著降低 leptin 與 PAI-1 之脂肪相關基因表現 ($p < 0.05$)。在肝臟組織中，給予 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物之組別，會顯著提升 AMPK 與 PPAR α 等基因表現，並降低 FAS、SREBP-1c 與 SCD-1 等脂質生合成相關基因表現 ($p < 0.05$)。

子計畫三：詳細內容參看附件三

1. 山葵萃取物對大腸癌 Colo 205 細胞毒性分析及懸浮生長能力的影響

Colo 205 細胞在加入山葵萃取物處理經過 24 小時後，濃度在 1.5 及 2 mg/mL 對細胞有毒殺效果，處理的時間至 48 及 72 小時，2 mg/mL 山葵萃取物之細胞存活率為 47.7% 和 7.1% (Fig. 1)。Colo 205 為半懸浮性生長，以 Colony Formation Assay 觀察長時間山葵萃取物對結腸直腸癌細胞的影響，結果顯示 250µg/ml 濃度即可抑制 Colony 的形成 (Fig. 2)。

2. 山葵萃取物引發大腸癌 Colo 205 細胞之 apoptosis 及其中機制

DAPI stain 及 Flow cytometry assay 分析顯示山葵萃取物會引起 Colo 205 細胞核濃染現象 (Fig. 3)，SubG1 的細胞數值則會上升，G2/M 的數值也有所上升 (Fig. 4)。由此可以推論可能走向的死亡方式為 Apoptosis。利用 western blotting 分析 apoptosis 相關蛋白，外源性路徑所導致的 apoptosis 相關蛋白 Fas-L、TNF- α 及 Caspase 8、Caspase 9 和 Caspase 3 皆隨著山葵萃取物的濃度增加而上升 (Fig. 5A and B)。內源性路徑之 p53 和 Bax 的蛋白表現則隨著山葵萃取物的濃度增加而下降 (Fig. 5C)，抑制 apoptosis 的蛋白 Bcl-xl 表現也隨之下降 (Fig. 5D)。Bid 蛋白表現有明顯減少，活化的 tBid 則有上升，細胞質中的 Cytochrome C (Cyt.C) 蛋白表現亦有隨之上升 (Fig. 5E)。

3. 山葵萃取物引發大腸癌 Colo 205 細胞自噬作用及其中機制與角色

AVO (Acidic vascular organelles) 染色顯示山葵萃取物會導致 Colo 205 細胞的自噬作用 (autophagy) (Fig. 6)。western blotting 分析結果發現，細胞經過不同濃度的山葵處理 48 小時後，抑制 autophagy 的蛋白 Akt 和 mTOR 表現明顯下降 (Fig. 7A)，而促進 autophagy 表現的蛋白 Atg5 和 LC3 則明顯地上升 (Fig. 7B)。利用 autophagy 的促進劑 RAD001 釐清 autophagy 的作用角色，結果顯示細胞在合併處理山葵和 RAD001 後，相較於單獨處理山葵之組別，其細胞毒性有增加 (Fig. 8A)，AVO 紅色螢光亦增加 (Fig. 8B)，LC3 蛋白表現也有明顯增加的現象 (Fig. 8C)。綜合以上結果證實，山葵導致 Colo 205 細胞產生 autophagy 的作用主要是扮演著促進細胞的死亡而非保護細胞的作用角色。

4. 山葵萃取物對大腸癌 Colo 205 細胞 Xenografts 腫瘤生長的影響

利用 BALB/c 裸鼠經由皮下注射 Colo 205 細胞，待腫瘤形成後，隨機分成四組：Control、RAD001 (2.5 mg/kg)、山葵 (250 mg/kg) 和山葵 (250 mg/kg) + RAD001 (2.5 mg/kg)，連續觀察六週。結果顯示，在單獨餵食山葵與 Control 組別老鼠比較其腫瘤生長速率有明顯下降的現象。另外，在合併餵食山葵和 RAD001 的組別可以發現老鼠腫瘤的生長速率明顯比單獨餵食山葵或 RAD001 組別來的低 (Fig. 9)。

5. 山葵萃取物對大腸癌誘發老鼠的影響

利用大腸癌致癌物 DMH (Dimethylhydrazine) 和腸炎誘發物 DSS (Dextran sodium sulfate) 進行老鼠 CD-1 (ICR) 大腸癌誘發的實驗模式。餵食山葵以及誘導組別老鼠體重的增加速率比 Control 組別來的低 (Fig. 10A)。餵食高劑量山葵組別的老鼠肝臟的重量比誘導組別低 (Fig. 10B)。但是老鼠大腸的長度在各組間並無差別 (Fig. 10C)。在餵食高劑量山葵組別的老鼠產生血便和直腸脫垂現象與誘導組別明顯減少 (Table 1 和 2)。誘導組別老鼠的大腸產生 dysplasia 的現象為 100%，而在餵食低劑量與高劑量山葵的組別分別為 75% 和 77.78% (Table 3)。存活率的分析發現誘導 (44.44%) 及餵食低劑量山葵 (55.55%) 組別老鼠的存活率比 Control (100%) 和餵食高劑量山葵 (100%) 組別來的低 (Fig. 10D)。

子計畫四：詳細內容參看附件四

餵食高膽固醇之小鼠從第五週起相較其他 2 組小鼠有顯著上升 [圖一]。在心跳上並無明顯差異 [圖二]。而在平均動脈壓方面，餵食高膽固醇之小鼠相較其他 2 組小鼠，其平均動脈壓從第 9 週起顯著上升 [圖三]。餵食高膽固醇之小鼠其肝臟重量顯著上升，而餵食高膽固醇加上秦芫飼料之小鼠其肝臟重量則顯著下降 [圖四]，而餵食高膽固醇加上秦芫飼料之小鼠其脾臟相較餵食高膽固醇小鼠則顯著變小 [圖五]。此說明餵食高膽固醇之小鼠其脾臟細胞明顯變多，而餵食高膽固醇加上秦芫飼料之小鼠其脾臟相較餵食高膽固醇小鼠則顯著變少 [圖六]。進一步分析發現餵食高膽固醇之小鼠血清 MMP-9 活性明顯增加，而餵食高膽固醇加上秦芫飼料之小鼠其血清 MMP-9 活性則顯著降低 [圖七]。在餵食高膽固醇之小鼠其活化之血清 IL-6 相較對照組小鼠明顯增加，而餵食高膽固醇加上秦芫飼料之小鼠，其血清 IL-6 相較餵食高膽固醇小鼠則顯著減少 [圖八]。此外，我們發現狼瘡小鼠因餵食高膽固醇而引發 CD4⁺/CD25⁺ 輔助型 T 細胞族群比例下降，而在餵食秦芫之後，會顯著提升 CD4⁺/CD25⁺ 輔助型 T 細胞族群比例 [圖九]。

進一步進行秦芫對於餵食高膽固醇狼瘡小鼠肝臟保護的分子機制。發現餵食高膽固醇加秦芫飼料之狼瘡小鼠中，其肝臟之 IL-6、IL-1 β 蛋白質表現量相較於餵食正常飼料及高膽固醇飼料之狼瘡小鼠

皆有顯著的下降[圖十][圖十一]。其下游訊息傳遞分子之 IKK- α 及 NF- κ B 相較於餵食正常飼料及高膽固醇飼料之狼瘡小鼠皆顯著下降[圖十二][圖十三]。至於粒線體相關凋亡的訊息路徑上，由實驗結果發現，cytochrome-c 及 caspase-3 的活性表現，在餵食高膽固醇之小鼠肝臟表現量，相較於餵食正常飼料之狼瘡小鼠有顯著上升。但在餵食高膽固醇加秦艽飼料之狼瘡小鼠中，其肝臟之 cytochrome-c 及 caspase-3 的活性表現相較於餵食正常飼料及高膽固醇飼料之狼瘡小鼠皆顯著的下降[圖十四][圖十五]。除了驗證秦艽對狼瘡小鼠肝臟發炎及凋亡的效益及訊息路徑外[，也完成小鼠肝臟之雙向電泳[圖十六]，並分別挑選30個蛋白質點進行蛋白質身分鑑別[表一]，相信有助更進一步分析這些蛋白質在狼瘡病理機轉中的角色，及找出狼瘡之治療標靶。

子計畫五：詳細內容參看附件五

1. 蟛蜞菊萃取物抑制過氧化物 (*tert*-butyl hydroperoxide, t-BHP) 誘導神經細胞 (PC12 Neuroblastoma Cells) 凋亡與機制

蟛蜞菊之生物活性成份經由總酚測定及類黃酮測定，結果由(Fig. 1)所示乙酸乙酯層所含的酚類及類黃酮類含量為最多。由細胞存活測試及 LDH 釋放之毒性測試，發現蟛蜞菊乙酸乙酯層萃取物 (WEA) 可保護 PC12 神經細胞抵抗過氧化物 (*tert*-butyl hydroperoxide, t-BHP) 所引起的細胞毒性傷害 (Fig. 2)。t-BHP 會誘導 PC12 的細胞凋亡，DAPI 染色及 Flow cytometry PI stain 觀察到萃取物可抑制此現象 (Fig. 3)。萃取物可活化細胞內 Glutathion (GSH) 的產生及降低 t-BHP 所誘導細胞內活性氧 (ROS) (Fig. 4)。以 Western blot 探討內生性粒線體凋亡相關蛋白，發現細胞凋亡所產生的 caspase 3 經由 t-BHP 降低 pro-caspase 3 和 pro-caspase 9 的表現，而預處理過萃取物後 pro-caspase 3 和 pro-caspase 9，另外加入萃取物後會提升 Bcl-2 及 Bcl-xL 表現而使 Bax 的蛋白表現下降 (Fig. 5)。其訊息傳遞機制發現，t-BHP 會活化磷酸化 JNK, p38, Erk1/2 三條訊息路徑，而加入萃取物後可抑制磷酸化的表現 (Fig. 6)。

2. 蟛蜞菊萃取物抑制 d-galactose 誘導老鼠產生老化現象

在主動迴避行為測定中發現 D-半乳糖組的小白鼠學習能力不佳在 30 回測試中 active avoidance 平均在 0.5-3 回而 escape 平均在 20-26 回，給與萃取物並沒有太大的改變 (Table 1)。然而 escape latency 中發現正常組與萃取物組 escape latency 比 D-半乳糖組來的短 (time-by-treatment) (Fig.1)。D-半乳糖會造成腦組織 p-tau、beta-amyloid 的大量產生以及脂質過氧化的大量堆積，而同時處理蟛蜞菊多酚萃取物與維他命 E 皆有意義的降低這些氧化壓力的指標 (Fig.2-4)。腦組織切片中也發現半乳糖可大大減少皮質及海馬迴神經細胞的數目而同時處理蟛蜞菊多酚萃取物與維他命 E 皆有意義的提升皮質及海馬迴神經細胞的數目 (Fig.5-6)。

3. 蟛蜞菊萃取物抑制 IFN- γ 及 LPS 誘發星狀細胞株活化

內毒素及細胞素處理星狀細胞會使形態改變且其中 GFAP 蛋白大量表現，而處理不同濃度蟛蜞菊萃取物 (WEA) 會抑制該活化指標之表現 (Fig.1)。文獻指出 LPS 會透過活化 Src-suppressed C kinase substrate (SScCKS) 促進 iNOS 發炎指標表現，Fig.1 發現 WEA 會抑制 SScCKS 之表現。內毒素及細胞素處理星狀細胞會使其增加 ROS 的製造與 TNF α 的釋放，WEA 可抑制此現象 (Fig.2 and Fig.3)。內毒素及細胞素會增加 COX-2 及 iNOS 表現而處理 WEA 會抑制之 (Fig.4)。內毒素及細胞素處理星狀細胞所造成細胞內 NF κ B 及 STAT 的活化 (phosphorylation)，而加入 WEA 會抑制其活化 (Fig.5)。最後把處理內毒素及細胞素星狀細胞的 medium 加入分化的 PC12 細胞中結果有降低細胞存活率的現象，而經 WEA 與內毒素及細胞素共同處理星狀細胞的 medium 可有意義提升細胞存活率 (Fig.6)。

子計畫六：詳細內容參看附件六

1. 穿山龍乙酸乙酯萃取物抑制黑色素細胞的轉移能力

穿山龍經洗滌、蔭乾後，利用 methanol (DNE1); chloroform (DNE2); ethyl acetate (DNE3); *n*-butanol (DNE4); 與 water (DNE5) 分層萃取 (Fig. 1A)。在以 100 μ g/mL 的分層萃取物處理 B16-F10 黑色素瘤細胞，發現 ethyl acetate (DNE3) 對於細胞的侵襲能力有顯著的抑制效果 (Fig. 1B)。此分層萃取物以高效能液相層析儀 (Waters 600 pump) 進行分析 (Fig. 1C)，及 mass 分析結果如 Fig. 1D。利用 C57BL/6J 老鼠，以尾靜脈注射 B16-F10 細胞，餵食乙酸乙酯萃取物可減少肺部組織黑色素瘤轉移 (Fig. 2A)，及其肺組織的重量 (Fig. 2B)，並抑制癌細胞轉移到肺部的能力 (Fig. 2C)。老鼠的體重並無明顯的差異 (Fig. 2D)。肺部組織

進行hematoxyline和eosine染色顯示餵食DNE3的組別其肺部的tumor有明顯減少(Fig. 3)。以MTT assay發現DNE3對B16-F10(Fig. 4A)與正常皮膚細胞HS68 (Fig. 4B)皆無明顯細胞毒性。傷口癒合實驗證實DNE3可有效抑制B16-F10的移動能力(Fig. 4C&4D)。Boyden chamber assay顯示DNE3可有效抑制B16-F10的侵襲及活動力(Fig. 4E&4F)，另細胞-基質貼附能力實驗證實DNE3可抑制B16-F10與type I collagen的貼附能力(Fig. 4G)。Gelatin zymography與casein zymography分析發現，DNE3可降低細胞MMP-2和u-PA的(Fig. 5A&5B)。其中MMP-2的蛋白表現量也有顯著的減少(Fig. 5C)，而TIMP-2蛋白的表現量，則隨濃度增加而上升(Fig. 5D)。Western blot分析結果發現PI3K的蛋白表現及Akt蛋白的磷酸化會隨著DNE3的濃度提高而減少(Fig.6)。以EMSA方法分析核蛋白，結果顯示NF- κ B與DNA結合的能力隨著處理穿山龍萃取物濃度的增加而逐漸受到抑制(Fig. 7A&7B)，NF- κ B (p65)的蛋白量亦下降(Fig. 7C)，反之cytosol I κ B的蛋白表現量則上升(Fig. 7D)。DNE3亦會抑制人類的黑色素細胞株A2058的細胞活動力、侵襲能力(Fig. 8A&7B)，MMP-9、MMP-2 (Fig. 8C)、u-PA (Fig. 8D)的活性。

2. 欖仁樹葉萃取物對急性骨髓性白血病細胞的毒殺作用

欖仁樹葉50%酒精萃取物(*Terminalia catappa* L. extracts; TCE)以高效能液相層析儀(Waters 600 pump)分析(Fig. 9A)，及mass分析結果如Fig. 9B。欖仁樹葉萃取物可降低HL-60存活率(Fig. 10)及存活的細胞數(Fig. 11)，死亡的細胞數則明顯上升(Fig. 12)。TCE對正常血球細胞不會有毒殺作用(Fig. 13)。TCE處理會增加HL-60sub-G1的細胞數目(Fig. 14)，引起chromatin condensation (Fig. 15)，導致DNA斷裂的情形(Fig. 16)。欖仁樹葉裡面所富含的單寧酸會造成HL-60細胞存活率與細胞數顯著降低(Fig. 17)，但對正常血球細胞不會有毒殺作用(Fig. 17)。單寧酸處理會增加HL-60sub-G1的細胞數目(Fig. 18&19)，引起chromatin condensation (Fig. 20)。顯示TCE與單寧酸具有誘導HL-60細胞凋亡的效果。

3. 欖仁樹葉甲醇萃取物(TLME)抑制肺癌細胞株A549的轉移能力

以不同溶劑萃取之欖仁樹葉來探討對肺癌細胞株A549的蛋白酶 MMP-2 與u-PA (Fig 21 A)及移動(Fig 21 B)的影響，並確定無毒劑量 (Fig 22)。TLME於0,10,30,50 μ g/mL為無毒劑量 (Fig 23)。TLME在不同劑量下可降低A549細胞移動能力(Fig 24)、MMP-9、MMP-2與u-PA的活性(Fig 25)、invasion能力(Fig 26)及motility能力(Fig 27)。Western blot分析發現TCME會抑制EMT相關蛋白p-FAK、p-paxillin與vimentin的表現，並且抑制及p-Akt在細胞內的蛋白表現(Fig 28)。最後我們利用先前所用不同溶劑的穿山龍萃取物(Fig 29)與欖仁樹乙酸乙酯萃取物(Fig 30)利用HPLC分析所得到不同的profile。

子計畫七：詳細內容參看附件七

1. 洛神葉水萃取物 (HLE) 及多酚 (HLP) 成份分析及鑑定

以HPLC分析HLE包含兩個成份catechin (4.25%) 和ellagic acid (28.20%)。HLP則包含五個成份catechin、ECG、ellagic acid、ferulic acid和quercetin，各別含量大約有7.40%、16.53%、10.30%、0.70%和0.83% (Fig. 1 & Table 1)。HLE及HLP各約莫得到5.22%和35.36%總多酚含量及20.98%和65.16%的黃酮測定值(Table 1)。

2. 洛神葉萃取物成份 (HLE/HLP) 抑制體外誘發 LDL 氧化之作用及清除自由基之效力

以銅離子誘導 LDL 氧化的模式進行體外抗氧化試驗結果證實：HLE 及 HPE 具有抑制 LDL 氧化的能力，包括脂質過氧化(Fig. 2)、蛋白表面的電荷改變(Fig. 3)、ApoB 輔蛋白斷裂(Fig. 3)，此外也具有清除 DPPH 自由基的作用(Fig. 4)。

3. 洛神葉萃取物成份 (HLE/HLP) 抑制泡沫細胞之生成

細胞實驗方面，HLE 及 HLP 對於要造成巨噬細胞 J774A.1 之致死毒性所需之劑量相當大(HLE: IC₅₀ > 3.0 mg/ml 以及 HLP: IC₅₀ = 0.75 mg/ml) (Fig. 5)。HLE 及 HLP 的處理可降低由 ox-LDL 誘導巨噬 J774A.1 細胞轉型的泡沫細胞形成(Fig. 6)以及有效地減低細胞內三酸甘油酯和膽固醇的含量(Fig. 7)。以 Western blotting 分析發現 HLP (0.05-0.2 mg/ml) 會抑制 ox-LDL 刺激的 CD36 和 PPAR γ 的蛋白表現(Fig. 8, line 1-3)，反之 HLP 可增加 ox-LDL 所抑制的 LXR α 和 ABCA1 的蛋白表現 (Fig. 8, line 4-5)。

4. 洛神葉萃取物 (HLE) 抑制高膽固醇飲食誘導兔子動脈硬化

高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈粥狀硬化病變之動物模式，體內試驗結果顯示動物血清中總膽固醇、三酸甘油酯及 LDL-C 會因同時餵食 HLE 而降低(Table 2)，胸動脈內層的脂肪斑則降為 48% 和 22.5%，皆有顯著的抑制病程發展之作用(Fig. 9A)。給予 HLE 之組別，其主動脈內層之厚度明顯低於

誘導組，1.0%高劑量之 HLE 組別回復到與正常組相當(Fig. 9B)。

5. 洛神葉萃取物成份 (HLE 及 HLP) 抑制細胞平滑肌細胞生長週期及移動作用

利用發炎因子 TNF α 誘導 VSMC 遷移及增生模式，發現 HLE 及 HLP 能有效抑制 TNF α 促進 VSMC 細胞(A7r5)生長(Fig. 11)、以及 MMP-9 活性(Fig. 12)、基因和蛋白表現(Fig. 13)。利用西方點墨法分析其中參與之作用機轉發現，A7r5 細胞隨著處理 HLE 或 HLP 濃度增加，細胞核內原受到 TNF α 所誘導之 c-Jun 及 c-Fos 表現量隨之減少(Fig. 14A and B)，AP-1 與 DNA 結合能力亦有下降趨勢(Fig. 14C and D)。傷口癒合及 Boyden chamber 分析證實 HLP 抑制 TNF α 誘導 A7r5 細胞移動能力(Fig. 15)。

6. 洛神葉萃取物成份 (HLE/HLP) 抑制血管平滑肌細胞之增生作用

A7r5 細胞預先處理 TNF α 在不同時間點(24 和 48 小時)之下處理 HLP 或 HLE，結果顯示兩者會細胞生長及細胞增生(Fig. 16)，流式細胞儀測定顯示，TNF α 誘導模式中，HLP 可促使 A7r5 細胞週期停滯在 G0/G1 期(Fig. 17)。西方點墨法和 EMSA 等試驗證實 HLP 會增加 p53 蛋白和磷酸化表現以及活化 p21 和 p27；並且 HLP 減少 cdk2/cyclinE 結合以及增加 Rb/E2F 之結合表現(Fig. 18)。

7. 洛神葉萃取物 (HLE) 對於高膽固醇飲食誘導兔子動脈硬化之促增生及遷移蛋白表現之影響

試驗動物的主動脈弓部分進行免疫組織染色分析，在正常組的血管壁中並沒有發現有特異性蛋白的表現，而在誘導組方面，則發現其有明顯的 anti-PCNA (Fig. 19A)及 anti-SM α -actin (Fig. 19B)特異性染色呈現，且動脈內層的厚度也有變厚。

8. 洛神葉萃取物成份 (HLE/HLP) 保護血管內皮細胞免於 ox-LDL 誘導細胞毒性。

利用 MTT 及 LDH assay 分析，HLE/HLP 可降低 ox-LDL 對 HUVEC 細胞所造成的傷害，包括細胞存活率(Fig. 21A)，與細胞毒性 (Fig. 21B)。

9. 洛神葉萃取物成份 (HLE/HLP) 保護血管內皮細胞免於 ox-LDL 誘導細胞死亡

ox-LDL 能誘導 HUVEC 細胞凋亡，而 HLE/HLP 的處理可保護細胞，降凋亡現象(Fig. 22)，並回復細胞週期(Fig. 23A)，及 G0/G1 期進入 S 期重要轉錄因子 E2F 及其調控蛋白 p-Rb(Fig. 23B)。利用 AVO stain 分析及量化細胞自噬作用，結果顯示 HLE 與 HLP 處理會增加 AVO-positive 表現(Fig. 24)。西方點墨法實驗結果顯示細胞自噬相關蛋白(LC3、Beclin-1、PI3K classIII) 表現增加(Fig. 25A)，而另一條抑制細胞自噬路徑 (PI3K classI/Akt/mTOR) 也有活化之情形(Fig. 25B)。

10. 洛神葉萃取物 (HLE) 對於高膽固醇飲食誘導兔子動脈硬化之內皮細胞表現之影響

試驗動物的主動脈弓部分進行免疫組織染色分析，偵測組織當中血管內皮細胞特異性蛋白 CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)的表現。在免疫染色技術中顯示：在正常組的血管壁中並沒有發現有此特異性蛋白的表現。誘導組方面則有明顯的 anti-CD31 特異性染色呈現(Fig. 26)，且動脈內層的厚度也有變厚，以此可推論有血管內皮細胞損傷的現象；萃取物組別則具有抑制作用。

子計畫八：詳細內容參看附件八

1. Effects of PFE and rDP2 on viability of BEAS-2B cells

As shown in Figure 1A PFE (10, 20, 30, 50 and 100 μ g/mL) did not show significant cytotoxicity to human airway epithelial cell BEAS-2B. Neither DP2 alone (20 μ g/mL) nor DP2 combining with PFE treatment (50 μ g/mL) significantly affected cell viability of BEAS-2B cells (Figure 1B).

2. PFE inhibited DP2-induced mRNA expression and protein production of pro-allergic cytokines in BEAS-2B cells

As shown in Figure 2A, significantly induced mRNA expressions of IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF were observed in DP2-stimulated BEAS-2B cells, and the elevated expressions were inhibited by pretreatment of PFE in a dose-dependent manner. The results of quantitative analysis revealed that DP2 significantly increased the mRNA levels of IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF in BEAS-2B cells to 16.3 ± 1.2 , 18.5 ± 0.6 , 44.1 ± 1.8 and 17.6 ± 2.7 -fold of control respectively. The DP2-upregulated mRNA levels of IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF were significantly inhibited by PFE pretreatment (50 μ g/mL) to 7.1 ± 0.9 , 5.7 ± 0.1 , 22.1 ± 1.7 and 7.4 ± 0.8 -fold of control respectively (Figure 2B). DP2 increased protein production of IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF by BEAS-2B cells to 18.5 ± 2.2 , 16.7 ± 1.2 , 27.5 ± 1.6 and 8.8 ± 1.4 pg/mL/10⁴ cells, respectively (Figure 2C). PFE pretreatment dose-dependently reduced the cytokine production up to 7.6 ± 1.1 (IL-4), 6.6 ± 1.2 (IL-5), 12.4 ± 1.4 and 6.1 ± 1.3 (GM-CSF) pg/mL/10⁴ cells, respectively (Figure 2C).

3. PFE inhibited DP2-induced mRNA expression and protein production of pro-inflammatory

cytokines in BEAS-2B cells

As shown in Figure 3A, DP2 significantly induced mRNA expression of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8 and MCP-1 in BEAS-2B cells, which was dose-dependently inhibited by PFE pretreatment. Quantitative qPCR analysis showed that DP2 greatly elevated the mRNA levels of IL-6, IL-8 and MCP-1 in BEAS-2B cells to 35.7 ± 1.6 , 28.7 ± 1.1 , and 11.3 ± 1.2 -fold of control, respectively which were dose-dependently diminished by PFE pretreatment (Figure 3B) to 2.2 ± 0.3 , 1.8 ± 0.2 , and 5.9 ± 1.1 -fold of control (Figure 3B). In parallel to mRNA expression, protein productions of IL-6, IL-8, and MCP-1 in BEAS-2B cells were increased by DP2 to 142.7 ± 12.9 , 102.6 ± 15.6 , and 72.7 ± 8.8 pg/mL/ 10^4 cells, respectively (Figure 3C) which were diminished by PFE pretreatment to 58.9 ± 2.9 (IL-6), 33.7 ± 3.1 (IL-8) and 33.3 ± 2.2 (MCP-1) pg/mL/ 10^4 cells, respectively (Figure 3C).

4. PFE inhibited phosphorylation of MAPKs in DP2-stimulated BEAS-2B cells

As shown in Figure 4, DP2 significantly enhanced phosphorylation of JNK, P38 and Erk1/2 to 2.42, 4.21, and 2.48-fold of GST alone, respectively. The DP2-induced phosphorylation of JNK and P38 were diminished upon PFE pretreatment in a dose-dependent manner but not Erk1/2. With pretreatment of PFE at 50 μ g/mL, levels of p-JNK, p-P38 and p-Erk1/2 were reduced to 1.18, 1.25 and 1.01-fold of GST alone.

5. PFE suppressed degradation of I κ B α and nuclear translocation of NF- κ B in DP2-stimulated BEAS-2B cells

As shown in Figure 5A, exposure of BEAS-2B cells to DP2 led to a significant decrease of cytosolic I κ B α level, the NF- κ B inhibitor, contributing to nuclear translocation of NF- κ B. PFE pretreatment restored the DP2-decreased cytosolic I κ B α level and diminished nuclear NF- κ B level increased by DP2 in a dose-dependent fashion. Further quantitative analysis showed that DP2 treatment increased level of nuclear NF- κ B to 1.54 ± 0.15 -fold of GST alone which was decreased by PFE pretreatment (50 μ g/mL) to 1.21 ± 0.03 -fold of GST control (Figure 5B).

(五)討論

子計畫一:

先前的研究指出NMU大鼠模型誘導疾病相似於乳腺癌，大鼠產生之乳腺腫瘤特性為非侵入性導管癌、ER陽性與分化的上皮細胞組成(58)，這結果與我們IHC的結果相似。有相關文獻指出臨床上目前發現在正常乳腺上皮細胞約有15~25% 會表現ER α ，反之在乳癌中有超過70% 大量表現ER α ，表示ER α 對於促進乳癌的發展扮演一個重要的角色。FASN通過促進激素依賴性乳腺癌和子宮內膜癌細胞的細胞凋亡，抑制細胞增殖和細胞存活率下降，其是透過一個複雜的機制牽涉到MAPK/ER的調控以及E2相關蛋白Her-2/neu (erbB-2) oncogene及cyclin-dependent kinase inhibitors p21WAF1/CIP1 and p27Kip1 (59)。在本研究顯示NLFE可透過(1)抑制ER與HER2的磷酸化，(2)透過PI3K/Akt路徑，影響脂肪酸合成酶(FAS)之表現，誘導乳癌細胞使其細胞週期停滯在G0/G1 phase進而造成細胞週期停滯作用，進而抑制乳癌細胞之生長(下圖1)。荷葉萃取物具有降低腫瘤轉移及抗血管新生作用的潛力(下圖2)。另外發現到NLFE 對於ER α 的磷酸化狀態有所影響，但對HER2蛋白表現卻無顯著差異。雖然有研究指出，HER2過度表達增加了脂肪酸合成酶轉譯，而FASN過度表現也顯著增加了HER2訊息，進而促進了腫瘤的生長(60)。在本次NMU誘導實驗中也可看出，NLFE對HER2並無作用，這結果闡明了NLFE降低乳癌的生長是透過減少ER α 的活化。因此，此次試驗結果證實在in vivo 中，NLFE確實能夠抑制腫瘤的成長，這說明了NLFE具有化學預防與化學保護之功效(chemoprevention and chemoprotection)。

圖 1

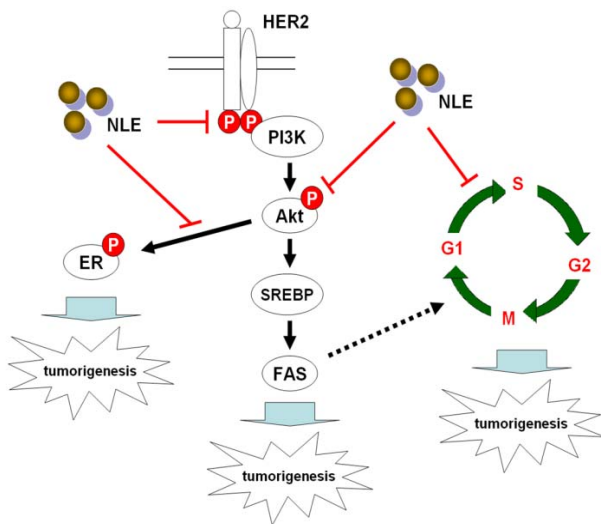
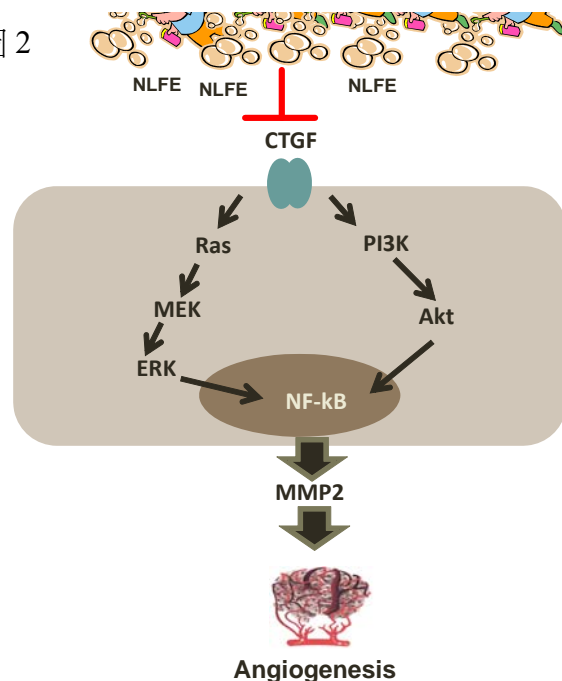


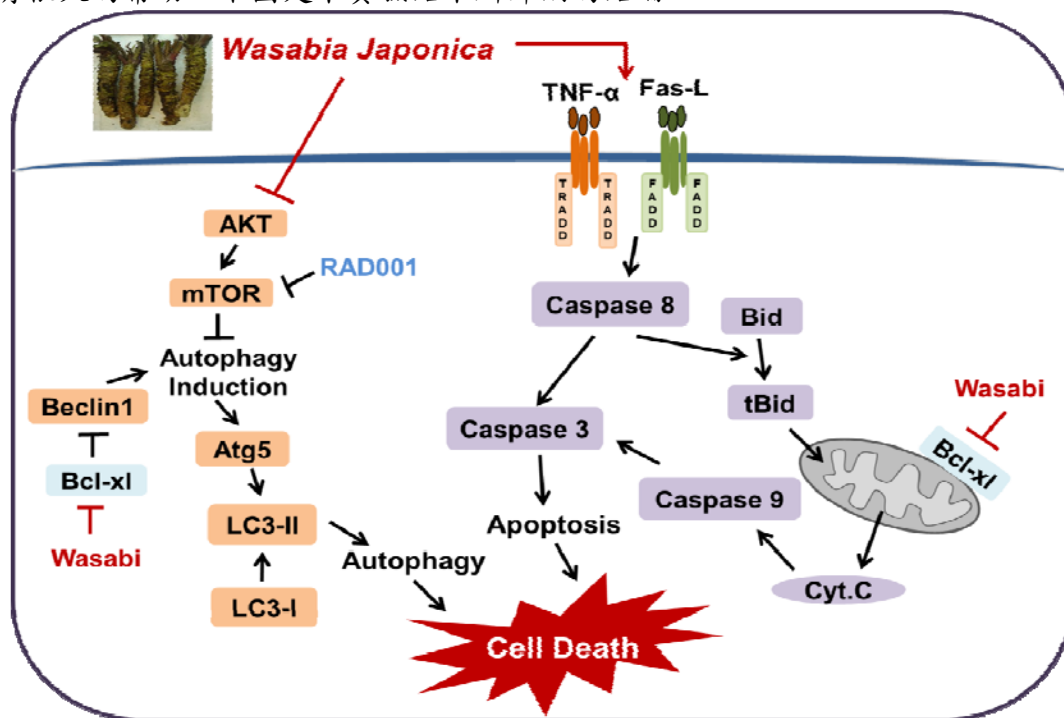
圖 2



子計畫二: 黑蒜頭起源於日本及韓國，相較於一般蒜頭具有較高之多酚與有機硫化物，其亦具有較佳之抗氧化與抗發炎等作用 (61)。大蒜中的有機硫化物 (methyl-sulfonyl-methane) 具有抑制 3T3-L1 細胞脂質生合成和誘導細胞凋亡的能力 (62)。本研究在細胞實驗中，證實黑蒜甲醇萃取物具有抑制脂質合成之基因表現，而降低胞內甘油-3-磷酸去氫酶之酵素活性，並透由提升脂質氧化之基因表現，進而降低胞內三酸甘油酯之堆積。接著進一步以體內動物試驗釐清，結果顯示黑蒜甲醇萃取物具有減低高脂飲食所誘導肥胖大鼠之血脂質異常、體脂肪堆積與體重增加之趨勢，其是透由活化 AMPK 與 Sirt1 而調控脂質生合成與脂肪酸氧化之訊息路徑。Lii 等(63) 研究指出，二烯丙基三硫化物會藉由抑制 ERK 路徑調控脂質生合成相關基因，進而抑制脂肪細胞內油滴的堆積情形。因此，在給予高脂飲食誘導肥胖大鼠之抗肥胖機制，可能是藉由抑制體內三酸甘油酯的形成來達到降低。研究指出，Sirt1 和 AMPK 可透由協同作用提升粒線體功能與脂肪酸氧化作用，進而抑制下游脂質生合成相關路徑 (64, 65)。黑蒜甲醇萃取物會透由 AMPK 與 Sirt1，進而降低脂質生合成 PPAR γ 、SREBP-1c、ACC、FAS 與 SCD-1，並提升氧化代謝 UCP1 與 PPAR α 等相關基因之表現。此外，脂肪細胞亦會分泌脂肪細胞激素，它與許多疾病的發生息息相關。黑蒜甲醇萃取物介入下會顯著提升 adiponectin 並降低 leptin 與 PAI-1 之表現，

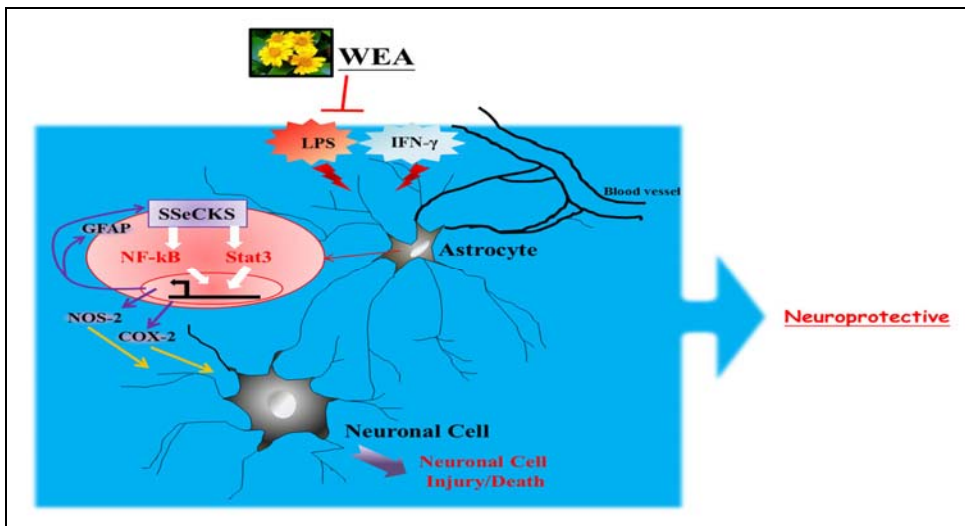
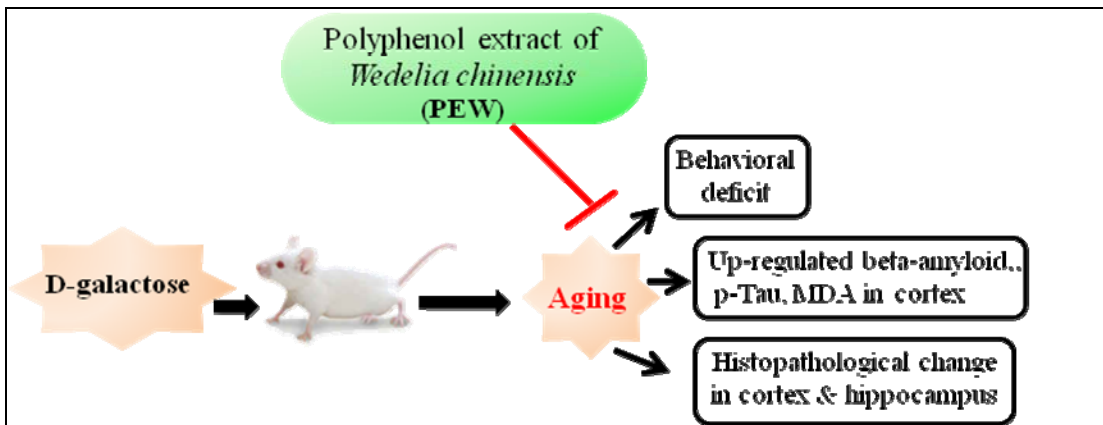
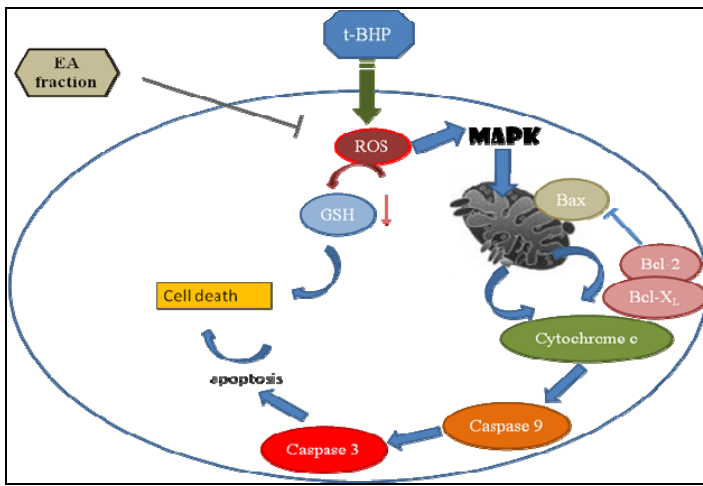
此結果與 Balistreri 等(66)研究結果類似，當提升 adiponectin 含量時可減低脂肪堆積和發炎相關激素之表現。綜合上述結果，黑蒜甲醇萃取物確實具有抑制脂質生成、脂肪細胞激素和提升脂質代謝相關訊息分子之表現，而達到抑制脂質生合成與抗肥胖之作用。

子計畫三: Colo 205 細胞是一株非常惡性的結腸直腸癌細胞，在 Duke's 分期裡為 D 期。研究結果顯示山葵萃取物會使大腸癌 Colo 205 細胞引發 apoptosis。主要是透過外源性(Fas-L/TNF- α)以及外源性誘導粒線體所引發的 apoptosis 路徑。另外，山葵萃取物亦會透過抑制 AKT/mTOR 進而促使 ATG5 和 LC3 表現導致 autophagy 的產生。但是此引發的 autophagy 最終是扮演著保護細胞還是促進細胞死亡的角色？為了證實此作用，我們利用 autophagy 的促進劑 RAD001 來證實。在 MTT 結果發現 RAD001 會促進細胞的死亡，在 AVO 中 RAD001 會誘導 autophagy 的表現增加，LC3 蛋白表現亦會增加。因此我們證實山葵會誘發大腸癌 Colo 205 細胞產生 apoptosis 和 autophagic cell death。最後在動物實驗中驗證了山葵萃取物的確會減緩腸癌腫瘤的生長以及降低死亡率的發生。這對未來在抗癌的保健食品或藥物研發上面將有很大的幫助。下圖是本實驗結果所歸納的結論。



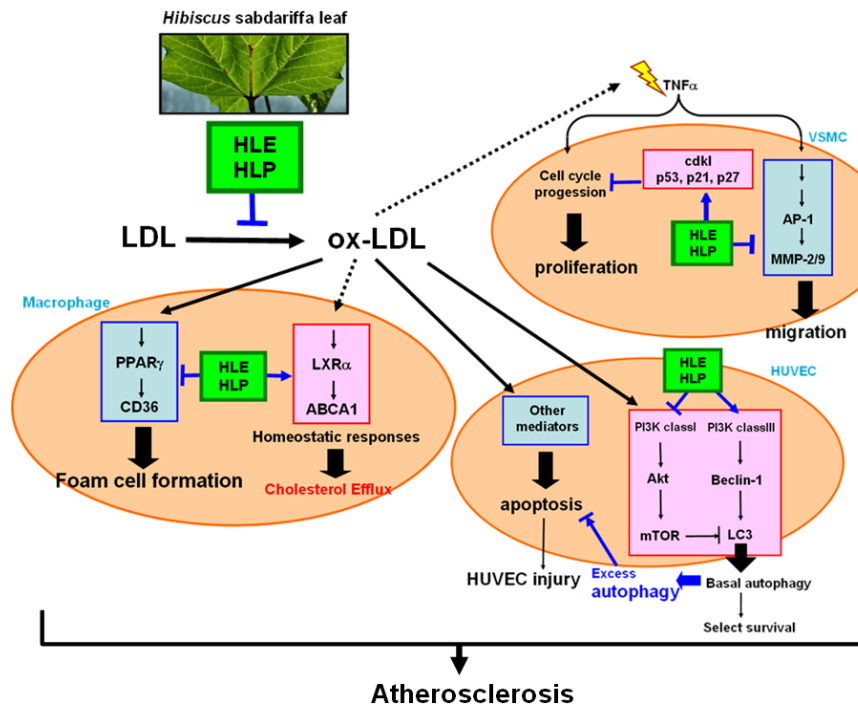
子計畫四: 隨著世界更加開化，許多文明疾病與日俱增。精神壓力或免疫失調所造成的病變，也逐日增加並受到重視。自體免疫缺失就是其中一項很重要的議題。紅斑性狼瘡會侵犯全身各器官或組織，包括心臟與肝臟(67)。增加細胞的凋亡及多數病灶的惡化，包括加劇肝臟與腦部的發炎反應及細胞凋亡(68, 69)。全身性紅斑性狼瘡病人的心血管疾病(CVD)危險因子及發生率，比正常族群高出許多(70)。本研究結果發現，秦艽對於餵食高膽固醇之狼瘡小鼠有明顯的保護效果，特別是在減緩因高膽固醇引發加劇之發炎反應及提升狼瘡小鼠CD4⁺/CD25⁺輔助型T細胞族群比例，並提升因高膽固醇所造成狼瘡小鼠肝臟GSH, DPPH及Catalase的活性。實驗結果也顯示秦艽能明顯降低粒線體相關路徑之細胞凋亡訊息。這些結果指出秦艽能有效減緩狼瘡及因膽固醇所加劇狼瘡之肝臟發炎及凋亡。相信這些研究結果可協助瞭解秦艽減緩狼瘡的機制，提升狼瘡病人生活品質與保健。

子計畫五: 蟛蜞菊具有預防或延緩神經退行性病變發生之活性，其作用機制如下圖



子計畫六：基質金屬蛋白酶(MMPs) 是一系列的家族性酵素，能參與蛋白的合成與分解並在維持細胞外基質(ECM)上扮演重要的角色。在正常的狀態下，MMPs會參與血管之生成、組織重組等。當癌細胞進展時，利用基質金屬蛋白酶 (MMP) 作為武器，將周圍的正常組織破壞，同時進行增生，然後潛入正常組織中。多種證據顯示出基質金屬蛋白酶在腫瘤細胞成長的許多階段中皆扮演關鍵性的角色，基質金屬蛋白酶可以促進腫瘤轉移和血管增生，甚至是腫瘤的發源。我們發現穿山龍乙酸乙酯萃取物抑制黑色素細胞的轉移能力與欖仁樹葉甲醇萃取物抑制肺癌細胞株A549的轉移能力是透過抑制MMPs與u-PA的作用，以達到抗癌的功效，因此穿山龍與欖仁樹葉或許可以應用在預防黑色素癌與肺癌的轉移或輔助其治療，以期對醫療發展有所貢獻。

子計畫七:本研究可以說明洛神葉水萃取物HLE及其功能性成份HLP發揮預防或減緩動脈粥狀硬化之作用(下圖)。由於洛神葉在國內容易栽培，但過去一直被視為無經濟價值的植物部位；而HLE和HLP也容易分離，因此，本研究成果除了可應用於發展新的保健食品，也能推廣洛神植株之葉子為可食用之資源。



子計畫八: It is known that DP2 induces secretion of pro-allergic cytokines and pro-inflammatory cytokines by respiratory epithelial cells which is known to be associated with the activation of MAPKs (71). Transcription factor NF-κB plays a pivotal role in regulation of pro-inflammatory cytokines, and its nuclear translocation is associated with the expression of the pro-inflammatory cytokines. Our findings revealed that PFE significantly diminished both mRNA expression and protein levels of pro-allergic and pro-inflammatory cytokines in response to DP2 through inhibition of P38/JNK and NF-κB activation. These findings suggest that PFE should be beneficial to alleviate both allergic and inflammatory responses on airway epithelium in response to aeroallergens.

(六) 參考文獻

1. Nagai M, Pacheco M, Oshima C, Brentani M. c-erbB-2 DNA amplification and mRNA expression in human primary breast tumors and its relationship to other prognostic factors. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 1993, 8:29-35.
2. Nakamura I, Kimijima I, Zhang G, Onogi H, Endo Y, Suzuki S, Tuchiya A, Takenoshita S, Kusakabe T, Suzuki T. Fatty acid synthase expression in Japanese breast carcinoma patients. *International journal of molecular medicine* 1999, 4:381-388.
3. Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, Basi GS, Tung JS, Earnshaw WC, Leibson PJ, Kaufmann SH. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* 1997, 90:935-943.
4. Bange J, Zwick E, Ullrich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nature medicine* 2001, 7:548.
5. Mukherjee PK, Mukherjee D, Maji AK, Rai S, Heinrich M. The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*)—phytochemical and therapeutic profile. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2009, 61:407-422.
6. Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation*. 2010 (doi:10.1155/2010/802078)
7. Kousteni S. FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. *Bone* 2012, 50:437-443.
8. Schug TT, Li X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. *Annals of Medicine* 2011, 43:198-211.
9. Viollet B, Athes Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Frontiers in Bioscience* 2009, 14:19-44.
10. Pittler MH, Ernst E. Clinical effectiveness of garlic (*Allium sativum*). *Molecular Nutrition and Food Research* 2007, 51:1382-1385
11. Sheen LY, Chen HW, Kung YL, Liu CT, Lii CK. Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high-and low-fat diets. *Nutrition and Cancer* 1999, 35:160-166.
12. Gorinstein S, Leontowicz M, Leontowicz H, Jastrzebski Z, Drzewiecki J, Namiesnik J, Zachwieja Z, Barton H, Tashma Z, Katrich E. Dose-dependent influence of commercial garlic (*Allium sativum*) on rats fed cholesterol-containing diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54:4022-4027.
13. Seo Y, Gweon O, Lee Y, Kang M, Kim J. Effect of garlic and aged black garlic on hyperglycemia and dyslipidemia in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Food Science and Nutrition* 2009, 14:1-7.
14. Kinae N, Masuda H, Shin IS, et al. Functional properties of wasabi and horseradish. *Biofactors* 2000, 13:265-269.
15. Uto T, Fujii M, Hou DX. Effects of 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate on cyclooxygenase-2 expression induced by lipopolysaccharide, interferon-gamma and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Oncol Rep* 2007, 17:233-238.
16. Watanabe M, Ohata M, Hayakawa S, et al. Identification of 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate as an apoptosis-inducing component in wasabi. *Phytochem* 2003, 62:733-739.
17. Nomura T, Shinoda S, Yamori T, et al. Selective sensitivity to wasabi-derived 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate of human breast cancer and melanoma cell lines studied in vitro. *Cancer Detect Prev* 2005, 29:55-60.
18. Fuke Y, Shinoda S, Nagata I, et al. Preventive effect of oral administration of 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate derived from wasabi (*Wasabia japonica* Matsum) against pulmonary metastasis of B16-BL6 mouse melanoma cells. *Cancer Detect Prev* 2006, 30:174-179.
19. Yano T, Yajima S, Virgona N, et al. The effect of 6-methylthiohexyl isothiocyanate isolated from *Wasabia japonica* (wasabi) on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol-induced lung tumorigenesis in mice. *Cancer Lett* 2000, 155:115-120.
20. Tanida N, Kawaura A, Takahashi A, et al. Suppressive effect of wasabi (pungent Japanese spice) on gastric carcinogenesis induced by MNNG in rats. *Nutr Cancer* 1991, 16:53-58.
21. Lu et al. Lupus-related advanced liver involvement as the initial presentation of systemic lupus erythematosus. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2006, 39:471-475.

22. Abraham S, Isenberg D. Hepatic manifestations of autoimmune rheumatic diseases, *Ann. Rheum. Dis.* 2004, 63:123–129.
23. Hsu TC, Chen YC, Tsai CC, Wu JH, Li SL, Tzang BS. Protective effects of taurine against hepatic abnormality in NZB/W F1 mice fed a hypercholesterolemic diet. *Food Chemistry* 2010, 119:62-68.
24. Herlong, HF. Approach to the patient with abnormal liver enzymes, *Hosp. Pract. (Off. Ed.)* 1994, 29:32–38.
25. Huang CY, Hsu TC, Kuo WW, Wu SP, Lin YM, Yen CY, Wu JH, Tzang BS. Beneficial Effects of Taurine on Cardiac Abnormality in NZB/W F1 Mice Fed with a High-Cholesterol Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2009, 57:8635-8642.
26. Hsu TC, Chen YC, Tsai CC, Wu JH, Li SL, Tzang BS. Protective effects of taurine against hepatic abnormality in NZB/W F1 mice fed a hypercholesterolemic diet. *Food Chemistry* 2010, 119:62-68.
27. Ferguson JE, Chalmers RJG, Rowlands DJ. Reversible dilated cardiomyopathy following treatment of atopic eczema with Chinese herbal medicine. *Br J Dermatol.* 1997, 136:592-593.
28. Liu Z, et al., Protective effects of hyperoside (quercetin-3-o-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. *Biomed Pharmacother.* 2005, 59: 481-490.
29. Zhang L, et al., Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 57: 547-555.
30. Bournival J, Quessy P, Martinoli MG. Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP+ -induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 2009, 29: 1169-1180.
31. Gavert N, Ben-Ze'ev A. beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem,* 2007, 102:820-828.
32. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene,* 2008, 27:6920-6929.
33. Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level I evidence studies. *Clin Chem,* 2002, 48:1194-1197.
34. Hashimoto Y, Kondo C, Kojima T, Nagata H, Moriyama A, Hayakawa T, Katunuma N. Significance of 32-kDa cathepsin L secreted from cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm,* 2006, 21:217-224.
35. Mohamed M M, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer,* 2006, 6:764-775.
36. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res,* 2005, 31:599-621.
37. Bhat TA, Singh RP. Tumor angiogenesis--a potential target in cancer chemoprevention. *Food Chem Toxicol,* 2008, 46:1334-1345.
38. Legg JA, Herbert JM, Clissold P, Bicknell R. Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis,* 2008, 11:13-21.
39. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* 2001, 104:503-516.
40. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999, 340:115-126.
41. Hansson GK. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1997, 8:301-311.
42. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* 1993, 69:377-381,.
43. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994, 94:2493-2503.
44. Sachdewa A, Nigam R, Khemani LD. Hypoglycemic effect of Hibiscus rosa sinensis L. leaf extract in glucose and streptozotocin induced hyperglycemic rats. *Indian J Exp Biol.* 2001, 39:284-286.
45. Sachdewa A, Raina D, Srivastava AK, Khemani LD. Effect of Aegle marmelos and Hibiscus rosa sinensis leaf extract on glucose tolerance in glucose induced hyperglycemic rats (Charles foster). *J Environ Biol.* 2001, 22:53-57.
46. Lin HH, Chan KC, Sheu JY, Hsuan SW, Wang CJ*, Chen JH. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Food Chem.* 2012, 132:880-891.
47. Ali BH, Al Wabel N, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus

- sabdariffa L.: a review. *Phytother Res.* 2005, 19:369-375.
48. Rankin SM, De Whalley CV, Hoult RS, Jessup W, Wilkins GM, Collard T, Leake DS. The modification of low density lipoprotein by the flavonoids muricetin and gossypetin. *Biochem Pharmacol.* 1993, 45:67-75.
 49. De Whalley CV, Rankin SM, Hoult JR, Jessup W, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol.* 1990, 39:1743-1750.
 50. Ueda H, Yamazaki M. Inhibition of tumor necrosis factor- α production by orally administering a perilla leaf extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997, 61:1292-1295.
 51. Makino T, Ono T, Muso E, Honda G, Sasayama S. Suppressive effects of *Perilla frutescens* on spontaneous IgA nephropathy in ddY mice. *Nephron* 1999, 83:40-46.
 52. Ueda H, Yamazaki M. Anti-inflammatory and anti-allergic actions by oral administration of a perilla leaf extract in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001, 65:1673-1675.
 53. Bhat RK, Page K, Tan A, Hershenson MB. German cockroach extract increases bronchial epithelial cell interleukin-8 expression. *Clin Exp Allergy* 2003, 33:35-42.
 54. Röschmann KI, Luiten S, Jonker MJ, Breit TM, Fokkens WJ, et al. Timothy grass pollen extract-induced gene expression and signalling pathways in airway epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 2011, 41:830-841.
 55. Scott M, Roberts G, Kurukulaaratchy RJ, Matthews S, Nove A, et al. Multifaceted allergen avoidance during infancy reduces asthma during childhood with the effect persisting until age 18 years. *Thorax* 2012, 67:1046-1051.
 56. Platts-Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1997, 100:S2-24.
 57. Osterlund C, Gronlund H, Polovic N, Sundström S, Gafvelin G, et al. The non-proteolytic house dust mite allergen Der p 2 induce NF- κ B and MAPK dependent activation of bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 2009, 39:1199-1208.
 58. Chan MM, Lu X, Merchant FM, Iglehart JD, Miron PL. Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis* 2005, 26:1343-1353.
 59. Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 1996, 77:474-482.
 60. Jin Q, Yuan LX, Boulbes D, Baek JM, Wang YN, Gomez-Cabello D, Hawke DH, Yeung SC, Lee MH, Hortobagyi GN. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 2010, 12:R96.
 61. Sato E, Kohno M, Hamano H, Niwano Y. Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. *Plant Foods for Human Nutrition* 2006, 61:157-160.
 62. Ambati S, Yang JY, Rayalam S, Park HJ, Della Fera MA, Baile CA. Ajoene exerts potent effects in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting adipogenesis and inducing apoptosis. *Phytotherapy Research* 2009, 23:513-518.
 63. Lii CK, Huang CY, Chen HW, Chow MY, Lin YR, Huang CS, Tsai CW. Diallyl trisulfide suppresses the adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes through ERK activation. *Food and Chemical Toxicology* 2012, 50:478-484.
 64. Schug TT, Li X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. *Annals of Medicine* 2011, 43:198-211.
 65. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metabolism* 2012, 15:675-690.
 66. Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation.* 2010 (doi:10.1155/2010/802078)
 67. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol*, 2003, 56: 481-490.
 68. Hsu, T.C., et al., Treatment with taurine attenuates hepatic apoptosis in NZB/W F1 mice fed with a high-cholesterol diet. *J Agric Food Chem* 2008, 56: 9685-9691.
 69. Huang CY, et al., Beneficial effects of taurine on cardiac abnormality in NZB/W F1 mice fed with a high-cholesterol diet. *J Agric Food Chem* 2009, 57: 8635-8642.
 70. Jara LJ, et al. Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2006, 5:195-201.

71. Park SY, Cho JH, Oh DY, Park JW, Ahn MJ, et al. House dust mite allergen Der f 2-induced phospholipase D1 activation is critical for the production of interleukin-13 through activating transcription factor-2 activation in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 2009, 284:20099-20110.

國科會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

1. Mon-Yuan Yang, Yun-Ching Chang, Kuei-Chuan Chan, Yi-Ju Lee, Chau-Jong Wang. Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves inhibits proliferation of breast cancer in vitro and in vivo. *European Journal of Integrative Medicine*, 2011,3,e153-e163.
2. Jeng-Dong Hsu, Shao-Hsuan Kao, Ting-Tsz Ou, Yu-Jen Chen, Yi-Ju Li, and Chau-Jong Wang. Gallic Acid Induces G2/M Phase Arrest of Breast Cancer Cell MCF-7 through Stabilization of p27Kip1 Attributed to Disruption of p27Kip1/Skp2 Complex. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 1996-2003
3. Hsieh-Hsun Ho, Chi-Sen Chang, Wei-Chi Ho, Sheng-You Liao, Wea-Lung Lin, Chau-Jong Wang. Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF- κ B activity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 266, 2013, 76-85
4. Ho ML, Hsieh YS, Chen JY, Chen KS, Chen JJ, Kuo WH, Lin SJ, Chen PN. Antimetastatic Potentials of *Dioscorea nipponica* on Melanoma In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011:507920.
5. Hui-Hsuan Lin, Kuei-Chuan Chan, Jenn-Yuan Sheu, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang*, Jing-Hsien Chen*. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Food Chemistry*. 132, 880-891, 2012.
6. Jing-Hsien Chen, Chau-Jong Wang, Jenn-Yuan Sheu, Hui-Hsuan Lin*. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extract inhibits LDL oxidation and foam cell formation involving up-regulation of LXR α /ABCA1 pathway. *Food Chemistry*. 141, 397-406, 2013.
7. Jer-Yuh Liu, Yi-Ching Chen, Chun-Hsiang Lin and Shao-Hsuan Kao*. Perilla frutescens leaf extract inhibits mite major allergen Der p 2-induced gene expression of pro-allergic and pro-inflammatory cytokines in human bronchial epithelial cell BEAS-2B. *PLOS ONE* Accepted in press, 2013.

專利： 已獲得 申請中 無

1. 荷葉抗乳癌之作用：美國專利(US 7,662,413 B2)
2. 荷葉抗乳癌之作用：台灣專利(I 406667)

技轉：□已技轉 ■洽談中 □無

其他：(以 100 字為限)

研討會發表

1. Chun-Hua Chang, Mon-Yuan Yang, Li-Chu Chen, **Chau-Jong Wang**, 2012. Nelumbo nucifera leaf extract (NLE) inhibits angiogenesis in human breast cancer. The 27th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, ROC.
2. Meng-Hsun Yu, Mon-Yuan Yang, Chau-Jong Wang, 2013. Nnucilfera leaves extract inhibits adipocytes-induced breast cancer metastasis. The 28th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, ROC.
3. Mon-Yuan Yang, Li-Chu Chen, **Chau-Jong Wang**. Polyphenol-enriched extracts from Nelumbo Nucifera leave suppress the migration and invasion in breast cancer cell. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2011, Nagoya, Japan.
4. Chun-Hua Chang, Mon-Yuan Yang, and **Chau-Jong Wang**. Nuciferine Leaf extract (NLE) inhibits human breast cancer growth by suppressing fatty acid synthase and Akt signaling. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2011, Nagoya, Japan.
5. 張維棠、曾慶瀛、徐慶琳。黑蒜甲醇萃取物透由 AMPK 與 Sirt1 訊息路徑調控肥胖大鼠之脂質生合成與脂解作用。臺灣公定分析化學家協會第六屆第一次會員大會，2012，Taipei, ROC.
6. 張維棠、曾佩瑜、許孝慈、曾慶瀛、徐慶琳。以細胞試驗模式探討黑蒜頭對脂質生合成之影響及其分子機制。台灣食品科學技術學會第 41 次年會，2011，嘉義，台灣
7. Hsuan, S.W., **Chou, F.P.** Induction of apoptosis and autophagic cell death by Wasabia Japonica extract in human colon cancer Colo 205 cells. (2013) The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama, Japan.
8. **Chou, F.P.**, Hung, H.Y. Cytotoxic effect of *Wasabia japonica* extract on colon cancer cell Colo 205. (2011) The 8th International Conference on Functional Foods for Chronic Diseases, USA
9. Shao-Ming Wang*, Tsui-Hwa Tseng# Protective Effect of Polyphenolic Extract of *Wedelia chinesis* on tert-Butyl hydroperoxide-induced Cytotoxicity in PC12 Neuroblastoma Cells. 第二十六屆生物醫學聯合會(2011), Taipei, ROC.
10. Shao-Ming Wang*, Nai-Fang Chen, Yu-Chiuan Huang, Tsui-Hwa Tseng. Protective effect of polyphenolic extracts of *Wedelia chinesis* on beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. International Conference on Food Factors (2011), Taipei, ROC.
11. Nai-Fang Chen*, Zi-Hui Chen, Fung-Jou Lu, Tsui-Hwa Tseng. Extract of *Wedelia chinesis* Inhibits LPS/IFN- γ -Induced C6 Astrocytoma Cell Activation and Protects Against Inflammation-Mediated Differentiated PC12 Neuronal Cell Injury. 第二十八屆生物醫學聯合會(2013), Taipei, ROC.
12. Jing-Hsien Chen, Chau-Jong Wang, Chen-Chien Wang, Chia-Liang Lin, and **Hui-Hsuan Lin***, 2012, Hibiscus sabdariffa leaf reduces the development of atherosclerosis via inhibition of LDL oxidation and foam cell formation. The 27th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C.
13. Jing-Hsien Chen, Yu-Hsuan Chou, Huei-Yin Chen, Chia-Yu Chung, **Hui-Hsuan Lin***, 2013, *Hibiscus sabdariffa* leaf polyphenolic extract inhibits TNF-alpha-induced migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. The 28th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C.
14. Chi-Ping Wang, Jing-Hsien Chen, Ming-Shih Lee, Ting-Hsuan Wang, **Hui-Hsuan Lin***, 2013, Anti-atherosclerotic effects of *Hibiscus sabdariffa* leaf extracts. The 2013 Annual Meeting of the Taiwan Society of Laboratory Medicine, November 2-3, 2013, Taipei, Taiwan.
15. Ying-Hua Hsu, Jing-Hsien Chen, Ting-Hsuan Wang, **Hui-Hsuan Lin***, 2013, Anti-atherosclerotic potential of Hibiscus sabdariffa leaf via inhibiting LDL oxidation and foam cell formation. 2013 International Conference of ISNFF, November 5-9, 2013, Taipei, Taiwan.
16. Chin-Yin Lin, Pei-Ni Chen, Yih-Shou Hsieh. *Dioscorea nipponica* Inhibits Melanoma

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）
- 世界衛生組織發佈每年約 1700 萬人死於心血管疾病，其中冠心病以及中風約占 76%。根據衛生署發布 97 年國人十大死因，癌症為十大死因之首，心血管疾病—心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病分佔國人十大死因第二、三、五名，多數病因起源於肥胖，另外在退行性神經、免疫疾病，對國人影響甚鉅。因此，本計劃整合了上述重要疾病，欲共同開發預防物質並探討其作用機轉。各子計畫各執行一項疾病（包括退化疾病、代謝症候疾病、免疫疾病及惡性腫瘤）化學預防物質之醫學功能探討，並依衛生署公布之評估方法進行。進一步進行作用標靶或作用途徑之研究，目標為(1)開發預防或治療疾病物質；(2)增加學術研究；(3)成為中山醫大研發特色。又本計劃自 2010 年八月執行後在本校成立中草藥及保健食品研究中心，所有子計劃為中心基本成員，成為本校研發特色，多數發表成果於食品及農化科領域，使得在該領域 ESI 論文統計，本校排名第三（私校第一）。執行之具體成果國內及國際學術發表 16 篇，SCI 論文 7 篇及二項專利。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期：__年__月__日

國科會補助計畫	計畫名稱：開發荷葉類黃酮為抑制乳癌之物質及作用標靶之研究 計畫主持人王朝鐘： 計畫編號：NSC 99-2632-B-040-001-MY3 領域：化學防癌		
研發成果名稱	(中文) 荷葉抽出物用為抑制乳癌作用(專利) (英文) Extracts of sacred water Lotus for the treatment of cancer		
成果歸屬機構	中山醫學大學	發明人 (創作人)	王朝鐘 楊孟元
技術說明	(中文) 本發明是關於荷花葉子的萃取和方法。本發明還包括了荷葉萃取的化合物及其用於治療乳癌。 (200-500 字) (英文) The present invention relates provides <i>Nelumbo nucifera</i> leaves extract and a method thereof. The present invention further provides a composition comprising said extract and a method for treating subject suffering from breast cancer with the composition.		
產業別	生物科技、生物醫學		
技術/產品應用範圍	The present invention relates provides <i>Nelumbo nucifera</i> leaves extract and a method thereof. The present invention further provides a composition comprising said extract and a method for treating subject suffering from breast cancer with the composition.		
技術移轉可行性及預期效益	可用於抗乳癌及癌症輔助醫療之臨床試驗，發展為既經濟又成本低之抗癌藥物		

註：本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。

附件一：子計畫一

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ■ 成果報告
□ 期中進度報告

開發荷葉類黃酮為抑制乳癌之物質及作用標靶之研究

計畫類別：□個別型計畫 ■整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2632-B-040-001-MY3

執行期間：2012年8月1日至2013年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學 生化暨生物科技研究所

計畫主持人：王朝鐘

共同主持人：周芬碧

計畫參與人員：楊孟元 張純華

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：■精簡報告 □完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- 赴國外出差或研習心得報告
- 赴大陸地區出差或研習心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

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 年 月 日

(一) 中英文摘要：

乳癌是世界上女性普遍常見的惡性腫瘤，癌症預防已為世界趨勢，因此尋找特殊化學預防物質為現今之重要工作。荷葉是睡蓮科多年生草本植物，其化學成分含有多種荷葉鹼 (pronuciferine)、抗氧化物質類黃酮等，所以本研究擬以細胞與動物實驗模式深入探討台灣荷葉黃酮萃取物(Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves, NLFE)抑制腫瘤生長之功效，並進一步探討其中抑制之機制。我們首先以 MCF-7 細胞為實驗模式，處理不同劑量 NLFE 下，發現 NLFE 透過 PI3K/Akt 路徑，影響脂肪酸合成酶(FAS)之表現進而造成細胞週期停滯在 G0/G1 期，而 MCF-7 動物移植性腫瘤試驗證明，NLFE 確實能夠抑制腫瘤之生長。其次，NLFE 與 NLPE 能夠降低 MMP-2 及 MMP-9 的活性及細胞骨架蛋白 RhoA、CDC42、Rac1 的表現，並抑制 PKC α 的活性，影響下游 p38 與 ERK 的磷酸化，進而影響細胞的移行作用。利用雞胚胎實驗及 Plug assay，證實 NLFE 能有效抑制血管新生作用。進一步以西方墨點法分析相關機制，結果發現 NLFE 抑制活化態 AKT 的表現以及 CTGF, Ras/ERK 訊息路徑。最後，我們利用 NMU(N-methyl-N-nitrosourea)誘導乳癌的產生，並處理不同劑量 NLFE 與臨床藥物 Herceptin 及 Tamoxifen 進行比較。結果顯示無論腫瘤發生率、數量及腫瘤大小，在 NLFE 的處理之下皆顯著下降，NLFE 2%組別效果更優於 Tamoxifen 之組別。此外，我們亦以人類乳癌細胞株 BT-474 為實驗模式，將細胞注射於裸鼠，並使用不同劑量 NLFE 與 Tamoxifen 餵食裸鼠，結果證實 NLFE 確實可有效降低裸鼠之腫瘤生成，NLFE 2%組別抑制效果更優於 Tamoxifen 之組別。最後，我們利用免疫染色分析與西方墨點法分析腫瘤蛋白之表現，結果指出隨著 NLFE 劑量之提升，FASN 及 phosph-ER α 的表現量隨著 NLFE 的劑量增加而逐漸減少，顯示 NLFE 確實會造成 ER α 的磷酸化表現下降。所有 NLFE 組別，Tamoxifen 組跟對照組相比較下，結果顯示 HER2 蛋白並無顯著變化；然而，phosph-HER2，除了 NLFE 2.0% 組別有受到抑制之外，其他的組別與對照組比較都無明顯改變，總結這些結果也正可以說明 NLFE 降低乳癌的發生與轉移是透過減少 ER α 的活化、誘導乳癌細胞週期停滯、降低腫瘤轉移及抗血管新生作用。因此本研究成果可應用於發展為降低與延緩癌症發生之健康食品。

Breast cancer is a common women malignancy tumor in many countries of the world. Over the past decade, advances in understanding carcinogenesis have made possible the identification of the candidates of chemopreventive agents that are being developed to hit the key molecular targets. The lotus leaf is the Nymphaeaceae perennial herb, and its chemical composition to contain a variety of pronuciferine and flavonoids. Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves (NLFE) had been demonstrated previously to possess anti-oxidative In this study aimed to define the anti-carcinogenesis and the mechanism of NLFE reduced cancer in cell and animal model. First, we observed that NLFE caused the cell cycle arrest in the G0/G1 phase in human breast cancer cell line MCF7. The result also revealed that NLFE reduced phosphorylation in Akt and expression of fatty acid synthase (FAS) in NLFE-treated MCF7 cells. In murine xenograft model also confirmed that NLFE inhibited tumor growth rate. Next, our data showed that NLFE and NLPE inhibited breast tumor cell line cells migration We observed that NLFE and NLPE could reduce the PKC α -p38 pathway, Rho GTPase family. Additionally, NLFE suppressed the vascular formation in the Matrigel plug assay and chorioallantoic membrane (CAM) in vivo. Furthermore, Immunohistochemical analysis of CD31 show decreased vessel formation in mice treated with NLFE. Analysis of the molecular mechanisms of NLFE inhibited angiogenesis in MDA-MB-231 cells showed reduced activation of AKT and regulation CTGF and Ras /ERK pathway. Finally, we found that NLFE extracted from Nuciferine Leaf suppressed the chemical induced incidence, multiplicity and tumor volume of mammary tumors in NMU induce rats. The NLFE 2% group inhibit effect of more than Tamoxifen. Additionally, murine xenograft model also confirmed that NLFE inhibited tumor growth. Immunohistochemical and Western blot analysis of FASN (fatty acid synthase) and phosph-ER α show dose dependent decreased protein level. Protein expression has no significant change in HER2;

however, phosph-HER2 in NLFE 2.0% groups have been suppressed, the other group and control group had no significant differences. The result revealed that NLFE reduce the incidence and growth of breast cancer is by reducing the activation of ER α . Taken together, our results suggest that NLFE possible as a new auxiliary therapeutic strategy for anti-metastasis and used to develop a new chemopreventive medicament.

(二) 前言及研究目的：

據統計具有浸潤、轉移現象的乳癌約有 75% 都帶有 ER 或是 PR 的蛋白表現(ER+ 或 PR+)，顯示雌激素在乳房腫瘤的發展與惡化過程中，扮演相當重要的角色，阻斷或干擾雌激素對於乳房腫瘤的影響，對於治療乳癌來說十分地關鍵。對於 HER2 來說，也有將近 20% 的乳癌，是帶有 HER2/neu 蛋白的高度表現，而 50% 以上帶有 HER2/neu 高度表現的乳癌也同時表現 ER+，但是卻僅有 10-15% 的乳癌是完全沒有表現 ER、PR 與 HER2/neu。所以若我們能夠找到 ER 與 HER2/neu 之間的關聯，或是利用調控某蛋白卻具有同時影響 ER 與 HER2/neu 兩條 pathway 之能力，將十分有助於我們了解乳癌的發展過程與並進一步發展具有抑制其潛力之物質。癌症的形成是透過許複雜且多重的過程，其中形成的原因雖然被了解，但治療的效果仍然有限，且對人體造成極大的傷害。目前許多研究趨向以天然物成份或複方來達到抑制癌細胞的增生及惡化，例如 Tea polyphenolic extracts， curcuminoid extracts 及 broccoli extracts (sulforaphane) 已被廣泛的應用為化學防癌物質(chemopreventive agents)。有許多報告證實荷葉具抗氧化活性、降血脂等作用，目前荷葉對於抗癌方面之相關研究甚少。而本實驗室致力於開發天然物中所含的特殊成份，希望可以由攝取食品來達到預防腫瘤發生之目的，因此本計劃將以台灣鄉間常見之大慈蓮萃取物，針對乳癌以 in vitro 與 in vivo 方式進行研究。本研究計劃若能順利達成預定目標，不僅可以有效地充分利用天然的萃取物及其成分可以抑制乳癌發生及相關機轉，而且，可以更深入地瞭解造成乳癌發展的可能原因、過程和機制，對乳癌的預防和控制具有非常重要的貢獻

(三) 文獻探討：

【1】乳癌

乳癌是全球婦女最常發生的癌症，流行病學相關研究指出，誘導乳癌發生的可能因子有：(1)年齡：在西方國家，乳癌發生率隨年齡增加而逐漸增高，每增加 10 歲發生率約增加 2 倍，直到約 45-55 歲，亦即平均停經年齡，增加數目才趨近於平緩；(2)家族史：約 10% 的乳癌病人具有乳癌家族病史；(3)賀爾蒙暴露時間過長或接受賀爾蒙支持性療法者(尤其合併使用雌激素與黃體脂酮者)；(4)脂肪細胞過多，酗酒及更年期後過度肥胖者；(6)基因突變：brca1，brca2，p53，pten 與 stk11/lkb1 等基因的突變已被證實與家族遺傳性乳癌有關[1-4]。

乳癌可區分成五種亞型，不同乳癌亞型的臨床表現及存活率都不同。

1. 管狀 A 型(luminal A)、管狀 B 型(luminal B)乳癌的基因表現像乳管上皮細胞，且為雌激素受體(estrogen Receptors, ER)陽性，約佔 60% 左右，預後較佳。
2. 類正常乳腺型(normal breast like)乳癌之基因表現類似正常乳腺。
3. Her-2/neu 過度表現型，則基因表現為 ER 陰性，但 Her-2/neu 過度表現。
4. 類基底細胞型(basal-like)之基因表現像基底上皮細胞，它的典型表現是 Her-2/neu 陰性，ER 及 PR 亦為陰性，所以又叫三重陰性乳癌(triple-negative breast cancer)，約佔 12 至 20%。三重陰性乳癌與類基底細胞型基因表現的乳癌幾乎相似，此兩種亞型患者的預後極差，易早期轉移，並轉移至臟器[5]。

台灣地區乳癌發生率位居女性好發癌症的第一位，顯示乳癌對於女性健康影響日深。目前乳癌臨床用藥如：如 Tamoxifen 可用於治療 ER+ 的乳癌，而 trastuzumab (herceptin) 屬於單株抗體，可用於治療 Her2/neu 過度表現的乳癌。因此 ER-、PR-、Her2- 的三重陰性乳癌就成為乳癌治

療的盲點。這種乳癌亞型預後極差，又易早期轉移，對傳統荷爾蒙及化學治療藥物效果較差，這是目前乳癌治療的一個棘手難題。因此探討乳癌的形成原因，以及找出適當、副作用少的治療方式，在對乳癌防制策略上，是相當重要的一環。

【2】乳癌相關之蛋白

2-1 神經膠原致癌基因(HER2)

當 HER2 活化時，可經由訊息傳遞而導致腫瘤的發生。在目前人類癌症中，已被證實經由 HER2 過度表現所引起的相關癌症，包括乳癌[6]、卵巢癌[7]等。其中約有 30%乳癌經由 HER-2 基因倍增及其蛋白過度表現引起，復發率極高，因此 HER-2 可當做乳癌病人復發率的指標[8]。

2-2 雌激素受體 (Estrogen Receptors)

雌激素受體(Estrogen receptors/ER)為一受到親脂性配體(lipophilic ligand)化的轉錄因子(ligand-inducible transcriptional factors)，可與雌激素結合，調控男性及女性的生殖發育、脂質代謝、骨骼生長、調節心血管及神經系統...等各種生理機能。此外，雌激素會刺激子宮內膜、乳房及前列腺的增生；因此證明了雌激素受體與子宮內膜及乳房的癌化有關[9]。將近 70%的乳癌患者，其腫瘤組織中有雌激素受體的表現(ER+)，但這些病人約有 2/3 以 Tamoxifen 治療能達到顯著的效果。ER+的乳癌病人，其腫瘤分化較好，生長速率較慢，預後較好，存活率較高，而 ER-的病人則反之。故臨床上以雌激素受體的表現做為預後及賀爾蒙治療的指標。

2-3 脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FASN)

脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FASN) 可將乙醯輔酶 A (acetyl-CoA) 和丙二醯輔酶 A (malonyl-CoA) 轉換為為棕櫚酸 (palmitate)，是能量代謝過程中一個重要的酵素複合體，在肝臟和脂肪組織的脂質合成扮演著重要的角色。科學家 Nakamura 等人曾觀察到，利用免疫組織染色偵測到在乳癌臨床病人的檢體中 FASN 有大量表現的情形，而在乳癌病患中若 FASN 的表現量低的話，其預後與存活率也比較高[10]。另外，Porter 等人利用 tissue microarrays 分析 FASN 在不同時期的乳癌組織中表現差異，結果發現，約有 38.8%的 ductal carcinoma、51.0%的 primary invasion tumors、50.0%的 metastatic-distant 與 lymph node-breast carcinoma 有著 FASN 的過量表現(FASN overexpression)[11]。有趣的是，在有表現 ER 或 HER2/neu 的腫瘤組織當中，FASN 的過量表現更為顯著[12, 13]。有文獻指出，在表現 ER 的乳癌細胞當中，利用基因轉殖方式送入 HER2 大量表現(MCF-7/HER2)或是本身即有 ER 與 HER2 大量表現的乳癌細胞(BT-474)中可以發現到有 FASN 的高度表現，而在上述兩種細胞中利用 siRNA 降低 FASN 的表現則可增加抗癌藥物的作用[14]。

【3】荷葉之背景介紹

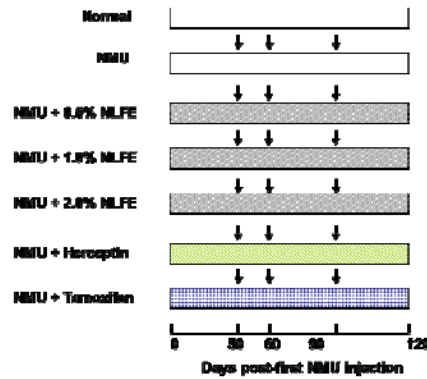
植物蓮學名 Gaertnera。英名 East Indian Lotus，俗稱 Lotus，中文亦稱「荷」、「蓮」，是宿根性多年生水生植物。目前知道荷葉含多種生物鹼、抗氧化物質類黃酮、荷葉苷(nelumboside)、oligomeric procyanidins 及其槲皮素、異槲皮甙，以及維生素 C、酒石酸、枸橼酸、蘋果酸、草酸、琥珀酸、葡萄糖酸、鞣質。另外，還含抗有絲分裂作用的鹼性成分[15]。飲用荷葉茶以減輕體重著名，近代臨床實驗亦多著重於荷葉對肥胖症及高血脂症的效果[16, 17]。本研究室近幾年發現荷葉水萃物可抑制 LDL 氧化，降血脂及抑制血管病變[18, 19]，並進一步發現荷葉水萃物可抑制血管平滑肌細胞增生和位移[18]，我們也發現荷葉水萃物可保護高脂肪食物誘導之脂肪肝病變[20]；最近我們發現荷葉萃取物 (NLFE)可抑制殖入裸鼠之乳癌細胞增生，因此本計劃擬詳細研究 NLFE 在預防及治療乳癌之作用，探討其作用機轉，找出其作用之標靶，預期可發展為預防或治療乳癌之物質。

(四)研究方法：

4-1 動物誘發性腫瘤試驗(induction of mammary tumors)

動物飼養環境依據國家標準之規定。NMU(N-methyl-N-nitrosourea)誘發雌性大鼠乳房組織

腫瘤病變動物模式，係依據 Charles B. Huggins et al.於 1981 年發表於 Proc. Natl. Acad. Sci. USA “N-Nitroso-N-methylurea elicits mammary cancer in resistant and sensitive rat strains” 至今在醫學領域上已有超過百篇以上以此模式為基礎所探討乳癌化學預防之研究報告。設計如下圖：



購入 Sprague-Dawley 大鼠約重 150 公克，共 50 隻，先飼養一週適應環境後隨機分組，每組 10 隻，共分為 A 組，正常組(Normal)；B 組，乳癌誘導組(NMU)；C 組，低劑量試驗組(NMU+ 0.5% NLFE)；D 組，中劑量試驗組(NMU+1% NLFE)；E 組，高劑量試驗組(NMU+2% NLFE)，F 組，臨床藥物:Herceptin (NMU+ Herceptin)； G 組，臨床藥物:Tamoxifen(NMU+ Tamoxifen)每五隻試驗大鼠關置一籠，飼料飲水無限制供應。除 A 組外，其餘六組皆以 NMU 進行腫瘤誘導試驗，以每隻大鼠 50 mg/kg 之 NMU 劑量經由腹腔注射，藉以誘導乳房組織產生腫瘤。在給予 NMU 當天稱為 Day 1。本次試驗將 NMU 分成三個時間點注射，分別是 SD 大鼠出生後第 50 天、第 60 天及第 90 天，並連續觀察到第 120 天後犧牲。試驗開始後，每二週測量試驗動物之體重並紀錄，每天觀察動物飲水及飼料攝取情形，並觀察動物之活動及是否出現毒性反應，NMU 給予後第 20 天開始記錄每組每隻試驗動物腫瘤發生情形，包含大小及個體腫瘤發生數目。本次試驗為期 120 天，期滿，動物以 CO₂ 或麻醉劑麻醉犧牲，收集腫瘤及乳房(腺)組織置入 10%福馬林液中保存，進行病理切片，以 H&E stain 進行細胞型態之染色，進行判讀；並將腫瘤資料數據之整理以(A) the number of animals with tumor (tumor incidence)；(B) latency to tumor appearance 及(C) tumor volume 等方式呈現腫瘤發生率之分析。

4-2 荷葉黃酮多酚 (NLFE)抑制腫瘤細胞生長之動物試驗

由國家實驗動物中心購入 5~6 週之 BALB/cAnN.Cg-Foxn1nu/CrlNarl 雌性裸鼠，共 25 隻，隨機分組，每組 5 隻，分為 A 組，單獨移植腫瘤對照組；B 組，低劑量試驗組 0.5% NLFE；C 組，中劑量試驗組 1% NLFE；D 組，高劑量試驗組 2%；E 組，藥物對照組 1 mg tamoxifen。每 5 隻試驗裸鼠一籠，飲水以高溫高壓滅菌過後的一次水餵之，採無限制供應。選擇人類乳癌細胞(BT-474 cell line)，用細胞計數器計算細胞總數。同時觀察活、死細胞的比例，活細胞比例 ≥ 95%，方為較佳的腫瘤細胞製備。用生理食鹽水稀釋細胞數成 10⁷ cell/0.1 ml，經皮下注射於裸鼠大腿外側之皮下脂肪層，腫瘤細胞注射後一週，依各組實驗規劃給予不同劑量之 NLFE 餵食，並連續觀察 4 週，每週觀察紀錄腫瘤生成之大小，停止給予 NLFE 之次日(或停止給予受試物後 1-5 天)處死動物，先稱體重，後解剖下皮腫瘤塊，稱重。

4-3 組織病理切片及染色

老鼠犧牲後，迅速取部分腫瘤組織，置 10%福馬林中固定，倒去福馬林後以 TBA 脫水，接著浸蠟、包埋，再將組織切片以 fresh xylene 浸泡 2 分鐘，接著以 100% EtOH 浸泡 2 分鐘 1 次，95% EtOH 浸泡 2 分鐘 1 次，以 PBS (0.01 M PBS, pH 7.4)浸泡 2 分鐘 1 次，再用 PBS 配製 3% H₂O₂ (內含 10% MeOH) 於室溫下浸泡 30 分鐘後，以 PBS 清洗 3 次，配製 blocking solution (BSA 20 mg/ml, 0.1% triton, 3%血清)室溫下作用 30 分鐘，以 PBS 清洗 3 次，以 primary antibody 在室溫作用 12~16 小時後，以 PBS 清洗 1 分鐘共 2 次，再加入 secondary antibody 於室溫下作用 30 分鐘後以 PBS 清洗，再加入 ABC buffer (avidin-biotin complex) 於室溫下反應

30 分鐘，以 PBS 清洗 3 次，再用 DAB (DAB 5 mg, 12 μ l H₂O₂, 20 ml Tris) 於室溫下呈色 3-10 分鐘後以 dd H₂O 清洗 1 分鐘共 2 次，再用 hematoxylin 染 10 秒鐘後以 dd H₂O 清洗，最後浸泡於 100% EtOH 2 分鐘共 2 次，再浸於 xylene 2 分鐘共 2 次，於 xylene 未完全揮發前，以 permount 加上蓋玻片(24 x 40 mm) 保存。

4-4 西方點墨法 (western blotting)

將培養皿內培養液吸走，以 PBS 沖洗細胞二次，收集細胞，加入 RIPA buffer，及蛋白質水解酶抑制劑，在 4°C 下震盪 30 分鐘，4°C 高速離心 10,000 \times g，10 分鐘，吸取上清液到新的微量離心管中，儲存在 -70°C。取定量之 whole cell lysate，加水補至固定體積，然後再加入 5 倍追蹤染劑 (loading dye)，混合均勻，以 100 °C 加熱 10 分鐘，再迅速置於冰上，隨後進行 SDS-PAGE，完畢後將膠體取出，轉漬到硝化纖維紙，用 TBS buffer 漂洗，以 5% blocking buffer 於室溫下 1 小時作用，換上一級抗體和二級抗體作用，最後加入 ECL 顯色，並以冷光儀偵測。

(五) 結果與討論：

5-1 荷葉萃取物 (NLFE) 之萃取與定性分析

NLFE 的總多酚含量約有 19.34% (以 GA 當標準品)，總類黃酮含量約有 5.89%，碳水化合物約有 16.63%，蛋白質約佔 4.55% 以及脂肪含量約為 2.43% (見第一一年期中報告 Tab. 1)。以 HPLC 分析，已知其主要成分為 Gallic acid 4.85%、protocatechuic acid 12.74%、catechin 4.59%、gallic acid 6.25%、caffeic acid 2.33%、epicatechin 3.32%、rutin 18.49%、quercetin 19.51% 與 naringenin 3.29% (見第一一年期中報告 Fig. 1, Tab. 2)。

5-2 NLFE 抑制乳癌細胞之生長

我們利用 PI 染劑，以流式細胞儀觀察 NLFE 對於 MCF7 細胞週期之影響。發現在 NLFE 劑量在 3 mg/mL 時，細胞之 G0/G1 時期也上升了 20%，並且 sub G1 處也未出現高峰，意味著 NLFE 很有可能是透過細胞週期的停滯來達到抑制腫瘤細胞生長之作用。我們進一步分析在 NLFE 處理下細胞週期相關蛋白之變化，結果顯示，隨著 NLFE 劑量的增加，負責參與在 G0/G1 時期的 cyclin D、cyclin E、cdk4 與 cdk2 蛋白表現隨之減少，p21, p27, p16 這些 CDKI 呈現 dose-dependent (見第一一年期中報告 Fig.4- Fig.9)。深入探究其分子機轉後，發現是透過 PI3K/Akt 路徑，影響脂肪酸合成酶 (FAS) 之表現進而造成細胞週期停滯作用 (見第一一年期中報告 Fig.10- Fig.12)。而細胞在經過 NLFE 處理之後並不影響 ER α 的蛋白表現，但卻降低 ER α 的磷酸化狀態。觀察 HER2 的變化，其細胞內的 phosphotyrosine 總量有所下降，因此我們進一步分析不同的 HER2 磷酸化位置，結果發現，NLFE 可能是透過降低 HER2 Tyr¹²²¹ 與 HER2 Tyr¹²⁴⁸ 來達到調控細胞的目的 (見第一一年期中報告 Fig. 13- Fig. 14)。我們進一步評估 NLFE 是否能夠在 in vivo 中有效抑制腫瘤的生長速度，由結果可以得知，在陽性對照組中，其腫瘤長得十分巨大，在餵食 0.5% NLE 的組別當中，腫瘤有變小的趨勢，而在 1% NLFE 的餵食下，更可以明顯地看出抑制腫瘤成長的能力，此現象也與將腫瘤摘除下來後之結果一致 (見第一一年期中報告 Fig. 16)。總結這些結果指出，NLFE 可透過 (1) 抑制 ER 與 HER2 的磷酸化 (2) 透過 PI3K/Akt 路徑，影響脂肪酸合成酶 (FAS) 之表現，誘導乳癌細胞使其細胞週期停滯在 G0/G1 phase 進而造成細胞週期停滯作用，進而抑制乳癌細胞之生長 (Fig. 1)。

5-3 NLFE 抑制乳癌細胞之轉移與血管新生作用

我們首先利用傷口癒合實驗 (wound-healing assay) 及細胞移動分析 (Boyden chamber assay) 證實 NLFE 與 NLPE 抑制乳癌細胞傷口癒合及移動能力。而 MMP-2 及 MMP-9 的活性也受到抑制。進一步利用西方墨點法分析相關蛋白的表現發現 NLFE 與 NLPE 能夠降低細胞骨架蛋白 RhoA、CDC42、Rac1 的表現，並抑制 PKC α 的活性，影響下游 p38 與 ERK 的磷酸化，進而影響細胞的移行作用。接著透過雞胚胎實驗及 Plug assay，證實 NLFE 能有效抑制血管新生作用。進一步以西方墨點法分析相關機制，結果發現 NLFE 抑制了活化態 AKT 的表現以及 CTGF，

Ras/ERK 訊息路徑。總括所有的結果可以說明荷葉萃取物具有降低腫瘤轉移及抗血管新生作用的潛力(見第二年期報告及 Fig.2)。

5-4 動物誘發性腫瘤試驗(induction of mammary tumors)

為了評估 NLFE 是否具有抑制癌症發生之能力，因此選用以 NMU 誘導 SD 大鼠自體產生腫瘤的模式探討，本次試驗採用腹腔注射的方式，將 NMU 分成三個時間點注射，分別是 SD 大鼠出生後第 50 天、第 60 天及第 90 天，並連續觀察到第 120 天後犧牲。期間每 20 天記錄每組每隻試驗動物腫瘤發生情形，包含大小及個體腫瘤發生數目及每組腫瘤數目。

由結果中得知，NMU 成功在誘導出大鼠產生腫瘤，經統計結果，本模式所誘導的腫瘤發生率約為 60% (Fig. 3)。對於腫瘤發生率而言，NLFE 達到極佳的抑制效果，餵食 1% NLFE 試驗組中，腫瘤發生率僅 10%，而餵食 2% NLFE 之組別中，更完全抑制了腫瘤之發生(Fig. 3)，說明著 NLFE 似乎具有抑制腫瘤發生之能力。從另一方面來看，雖然在餵食 1% NLFE 試驗組中仍有腫瘤之發生，但是也明顯地延遲了腫瘤發生的時間(Fig. 3)。陸續分析其他方面的結果，發現到餵食低劑量的 NLFE 雖不能達到 100% 的抑制腫瘤發生，但是也是能夠有效地使腫瘤之數目減少(Fig. 4)，並明顯地減緩了腫瘤的成長速度，使得腫瘤的體積比起陽性對照組要小(Fig. 5)，這些結果說明著 NLFE 具有化學預防(chemoprevention) 的效果。我們同時也將臨床藥物 Herceptin(可用於治療 Her2/neu 過度表現的乳癌)，Tamoxifen (可用於治療 ER+的乳癌) 與 NLFE 做比較，由 Fig. 3- Fig. 5 的結果中可看出 Herceptin 對於 NMU 所誘導的乳癌無法有效地發生作用，然而 Tamoxifen 卻可顯著的降低 NMU 所誘發的乳癌發生率，腫瘤數目，與腫瘤體積。NLFE 2%處理的組別治療效果，甚至優於 Tamoxifen 處理的組別。

接著我們利用組織染色(H & E stain) 與免疫組織染色(IHC) 觀察 NMU 所誘導出的腫瘤型態與特徵，由結果中可發現，腫瘤具有典型乳癌細胞的特徵，且具有高度表現 HER2 與 ER α 的情形，顯示 NMU 確實誘導大鼠自發性產生乳癌(Fig. 6)。而我們進一步分析大鼠血中 E2 的含量，發現 NMU 誘導下會提高大鼠血中 E2 的含量，而餵食 NLFE 則會改善其血中 E2 的數值(Fig. 7)，這些結果暗示著 NLFE 降低乳癌的發生率以及乳癌腫瘤的大小可能與 E2 有關。

5-5 動物移植性腫瘤試驗

為了進一步評估 NLFE 是否能夠有效抑制腫瘤的成長速度，於是我們選擇人類乳癌細胞株 BT-474 的注射在免疫缺乏的裸鼠體內強迫其產生腫瘤，待腫瘤生成後，在餵食不同劑量之 NLFE 與 Tamoxifen，觀察 NLFE 對於腫瘤生長之影響。由結果得知，在對照組中，其腫瘤長得十分巨大，而在餵食 0.5% NLFE 的組別當中，腫瘤體積有變小的趨勢，而在 2.0% NLFE 的餵食下，更可以明顯地看出抑制腫瘤生長的能力。餵食 Tamoxifen 的組別雖然腫瘤體積明顯受到抑制，但仍沒有 2.0% NLFE 餵食的組別抑制效果佳，由此，再次印證 NLFE 具有抑制腫瘤生長之能力(Fig. 8)。

接著我們利用免疫組織染色觀察裸鼠腫瘤的相關蛋白變化，結果發現，在有 NLFE 餵食的情況下，表現在細胞質的 FASN 量有減少的趨勢。ER α 的免疫染色結果中，除了 NLFE 2.0% 的組別有受到抑制之外，其他的組別與對照組都無顯著變化；而在 phosph-ER α ^{ser118} 的表現方面，單獨注射 BT-474 細胞株的腫瘤，其細胞核中都有 ER α ^{ser118} 濃染的情形，餵食 NLFE 0.5% 的組別中，有濃染 ER α ^{ser118} 的細胞核數量明顯地減少，而在餵食 NLFE 2.0% 的組別，濃染 ER α ^{ser118} 的細胞已經幾乎不見，顯示 NLFE 確實會造成 ER α 的磷酸化表現下降(Fig. 7)。HER2 表現於細胞膜上，其組織染色結果顯示，所有 NLFE 組別與 Tamoxifen 跟對照組相比較並無顯著變化；然而，phosph-HER2 的免疫染色結果中，除了 NLFE 2.0% 組別有受到抑制之外，其他的組別與對照組比較並無明顯改變(Fig.9)。

我們利用西方墨點法進一步分析在 NLFE 處理下裸鼠腫瘤蛋白的變化。結果顯示出，隨著 NLFE 劑量之提升，FASN 的表現量隨著 NLFE 的劑量增加而逐漸減少。ER α 只在 NLFE 2.0% 的組別中有受到抑制，其餘的組別與對照組比較，其蛋白表現都無顯著變化；而 phosph-ER α 隨

著 NLFE 劑量之增加，其表現量則隨之減少，顯示 NLFE 確實會造成 ER α 的磷酸化表現下降。所有 NLFE 組別，Tamoxifen 組跟對照組相比較下，結果顯示 HER2 蛋白並無顯著變化；然而，phosph-HER2，除了 NLFE 2.0% 組別有受到抑制之外，其他的組別與對照組比較都無明顯改變(Fig.10)，總結這些結果也正可以說明 NLFE 降低乳癌的發生是透過減少 ER α 的活化。

(六) 討論

台灣地區乳癌發生率躍居女性好發癌症的第一位，顯示乳癌對於女性健康影響日深，如何有效預防及延緩乳癌發生是當前研究的重要課題。荷葉是睡蓮科多年生草本植物，自古以來均記載荷葉具有清熱解毒、涼血、止血的作用，其化學成分含有多種荷葉鹼(pronuciferine)、抗氧化物質類黃酮等，許多研究證實荷葉中的物質具有抗氧化之能力[21, 22]。而先前我們實驗室研究也發現荷葉萃取物可有效改善在小鼠體內高脂肪飲食所誘導的脂肪堆積[20]，抑制血管平滑肌細胞增殖和遷移減少動脈粥狀硬化的發生[23]。此外，荷葉萃取物也具改善高脂飲食誘導之肝損傷和氧化壓力之功效[20]。

荷葉自古以來均記載著對於『活血化淤』具有強大的功效，據研究指出荷葉含豐富抗氧化物質，所以具代表性及說服力的功效為抗氧化與降血脂兩大方面，但鮮少有人利用荷葉萃取物做對於抑制腫瘤生成之研究。而我們在以 NMU 誘發 SD 大鼠產生腫瘤的試驗當中，可以得知 NLFE 能夠有效減緩腫瘤的發生，並明顯地抑制腫瘤之生成速率。而再另一項動物試驗的結果當中，我們以裸鼠移植腫瘤細胞的試驗證實，NLFE 確實能夠抑制腫瘤的成長，而免疫化學染色及西方點法的結果也正可以說明 NLFE 降低乳癌的發生是透過減少 ER α 的活化。

先前的研究指出 NMU 大鼠模型誘導疾病相似於乳腺癌，大鼠產生之乳腺腫瘤特性為非侵入性導管癌、ER 陽性與分化的上皮細胞組成[24]，這結果與我們 IHC 的結果相似(Fig. 4)。有相關文獻指出臨床上目前發現在正常乳腺上皮細胞約有 15~25% 會表現 ER α ，反之在乳癌中有超過 70% 大量表現 ER α ，表示 ER α 對於促進乳癌的發展扮演一個重要的角色。FASN 通過促進激素依賴性乳腺癌和子宮內膜癌細胞的細胞凋亡，抑制細胞增殖和細胞存活率下降，其是透過一個複雜的機制牽涉到 MAPK/ER 的調控以及 E2 相關蛋白 Her-2/neu (erbB-2) oncogene 及 cyclin-dependent kinase inhibitors p21WAF1/CIP1 and p27Kip1[25]，而本實驗室第一年的研究結果發現 NLFE 是透過 PI3K/Akt 路徑，影響脂肪酸合成酶之表現進而造成細胞週期停滯作用。在本次的試驗當中，發現到 NLFE 對於 ER α 的磷酸化狀態有所影響，但對 HER2 蛋白表現卻無顯著差異。雖然有研究指出，HER2 過度表達增加了脂肪酸合成酶轉譯，而 FASN 過度表現也顯著增加了 HER2 訊息，進而促進了腫瘤的生長[26]。在本次 NMU 誘導實驗中也可看出，NLFE 對 HER2 並無作用(Fig. 1-3)，這結果闡明了 NLFE 降低乳癌的生長是透過減少 ER α 的活化。因此，此次試驗結果證實在 in vivo 中，NLFE 確實能夠抑制腫瘤的成長，這說明了 NLFE 具有化學預防與化學保護之功效(chemoprevention and chemoprotection)。

(七) 參考文獻

1. McPherson K, Steel C, Dixon J: **ABC of breast diseases: breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics.** *BMJ: British Medical Journal* 2000, **321**(7261):624.
2. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA: **Family history and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis.** *International Journal of Cancer* 1997, **71**(5):800-809.
3. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E: **Epidemiology of breast cancer.** *The lancet oncology* 2001, **2**(3):133-140.
4. Wells CL: **Focus on Breast Cancer.** *ACSM's Health & Fitness Journal* 1999, **3**(1):13-18.
5. Bange J, Zwick E, Ullrich A: **Molecular targets for breast cancer therapy and prevention.** *Nature medicine* 2001, **7**(5):548.

6. Diallo R, Schaefer K-L, Bankfalvi A, Decker T, Ruhnke M, Wülfing P, Jackisch C, Luttes J, Sorensen PH, Singh M: **Secretory carcinoma of the breast: a distinct variant of invasive ductal carcinoma assessed by comparative genomic hybridization and immunohistochemistry.** *Human pathology* 2003, **34**(12):1299-1305.
7. Chuang T-C, Lee Y-J, Liu J-Y, Lin Y-S, Li J-W, Wang V, Law S-L, Kao M-C: **EBNA1 may prolong G₂/M phase and sensitize HER2/neu-overexpressing ovarian cancer cells to both topoisomerase II-targeting and paclitaxel drugs.** *Biochemical and biophysical research communications* 2003, **307**(3):653-659.
8. Nagai M, Pacheco M, Oshima C, Brentani M: **c-erbB-2 DNA amplification and mRNA expression in human primary breast tumors and its relationship to other prognostic factors.** *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 1993, **8**(1):29-35.
9. Evans RM: **The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.** *Science* 1988, **240**(4854):889-895.
10. Nakamura I, Kimijima I, Zhang G, Onogi H, Endo Y, Suzuki S, Tuchiya A, Takenoshita S, Kusakabe T, Suzuki T: **Fatty acid synthase expression in Japanese breast carcinoma patients.** *International journal of molecular medicine* 1999, **4**(4):381-388.
11. Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, Bae YK, Argani P, Marks J, Richardson A, Cooper A, Strausberg R, Riggins GJ: **Molecular Markers in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast1 1 National Cancer Institute Cancer Genome Anatomy Project and Specialized Program in Research Excellence in Breast Cancer at Dana-Farber/Harvard Cancer Center (CA89393) and Johns Hopkins University (CA88843); Department of Defense Breast Cancer Center of Excellence Grants.** *Molecular cancer research* 2003, **1**(5):362-375.
12. Zhang D, Tai LK, Wong LL, Chiu L-L, Sethi SK, Koay ES: **Proteomic Study Reveals That Proteins Involved in Metabolic and Detoxification Pathways Are Highly Expressed in HER-2/neu-positive Breast Cancer*.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2005, **4**(11):1686-1696.
13. Menendez JA, Rubinstein W, Lupu R: **Inhibition of fatty acid synthase (FAS) activity reverses tamoxifen resistance in Her-2/neu-overexpressing breast cancer cells.** In: *AACR Meeting Abstracts: 2005*; 2005: 1198.
14. Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, Basi GS, Tung JS, Earnshaw WC, Leibson PJ, Kaufmann SH: **Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions.** *Blood* 1997, **90**(3):935-943.
15. Mukherjee PK, Mukherjee D, Maji AK, Rai S, Heinrich M: **The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*)–phytochemical and therapeutic profile.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2009, **61**(4):407-422.
16. Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y: **Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats.** *Journal of Ethnopharmacology* 2006, **106**(2):238-244.
17. Ohkoshi E, Miyazaki H, Shindo K, Watanabe H, Yoshida A, Yajima H: **Constituents from the leaves of *Nelumbo nucifera* stimulate lipolysis in the white adipose tissue of mice.** *Planta medica* 2007, **73**(12):1255-1259.
18. Lee HJ, Chen CC, Chou FP, Wu CH, Lai FS, Yang MY, Wang CJ: **Water extracts from *Nelumbo Nucifera* leaf reduced plasma lipids and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits.** *Journal of Food Biochemistry* 2010, **34**(4):779-795.
19. Wu C-H, Yang M-Y, Chan K-C, Chung P-J, Ou T-T, Wang C-J: **Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a *Nelumbo nucifera* leaf flavonoid-rich extract in mice.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2010, **58**(11):7075-7081.
20. Lin M-C, Kao S-H, Chung P-J, Chan K-C, Yang M-Y, Wang C-J: **Improvement for high fat diet-induced hepatic injuries and oxidative stress by flavonoid-enriched extract from *Nelumbo nucifera* leaf.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2009, **57**(13):5925-5932.
21. Huang B, He J, Ban X, Zeng H, Yao X, Wang Y: **Antioxidant activity of bovine and porcine**

- meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf.** *Meat science* 2011, **87**(1):46-53.
22. Lin H-Y, Kuo Y-H, Lin Y-L, Chiang W: **Antioxidative effect and active components from leaves of Lotus (*Nelumbo nucifera*).** *Journal of agricultural and food chemistry* 2009, **57**(15):6623-6629.
 23. Ho H-H, Hsu L-S, Chan K-C, Chen H-M, Wu C-H, Wang C-J: **Extract from the leaf of *nucifera* reduced the development of atherosclerosis via inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration.** *Food and Chemical Toxicology* 2010, **48**(1):159-168.
 24. Chan MM, Lu X, Merchant FM, Iglehart JD, Miron PL: **Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer.** *Carcinogenesis* 2005, **26**(8):1343-1353.
 25. Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U: **Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients.** *Cancer* 1996, **77**(3):474-482.
 26. Jin Q, Yuan LX, Boulbes D, Baek JM, Wang YN, Gomez-Cabello D, Hawke DH, Yeung SC, Lee MH, Hortobagyi GN: **Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells.** *Breast Cancer Research* 2010, **12**(6):R96.

(八) 實驗成果附圖

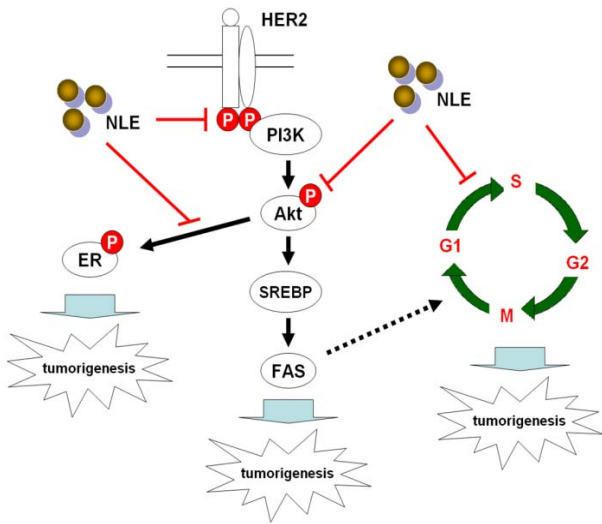


Figure 1. Proposed model for the cancer preventive action of NLFE at multiple steps in MCF-7 breast cancer cells.

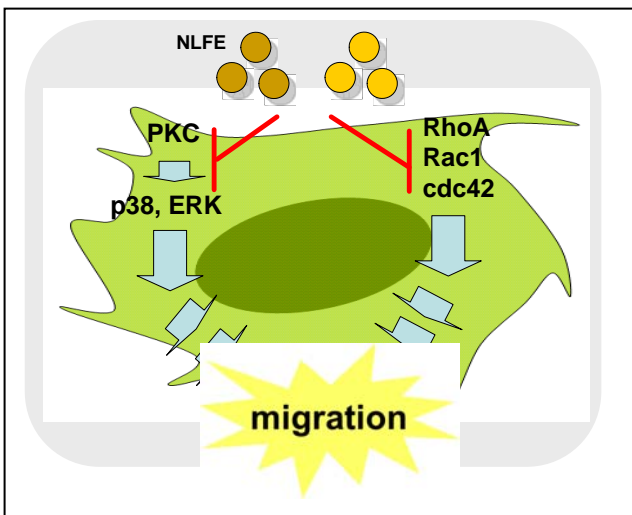
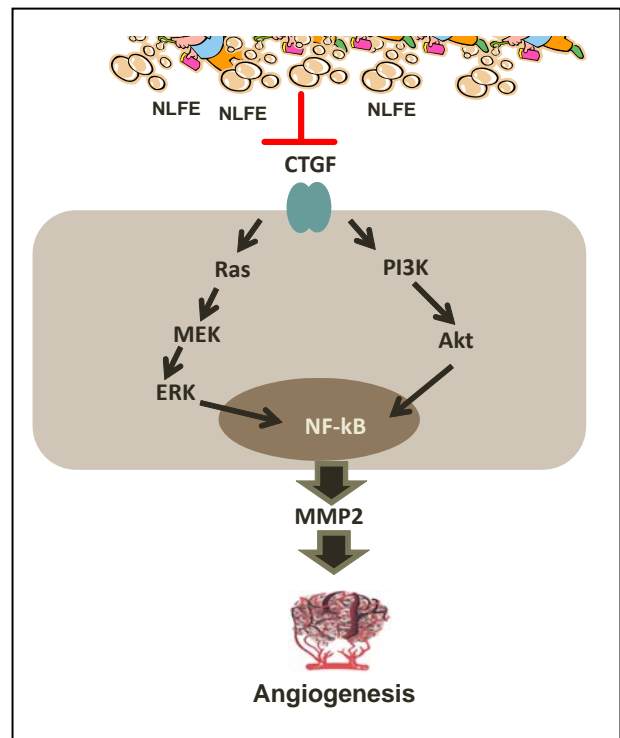


Figure 2. Proposed model for the cancer metastasis of NLFE at multiple steps in MDA-MB-231 breast cancer cells.



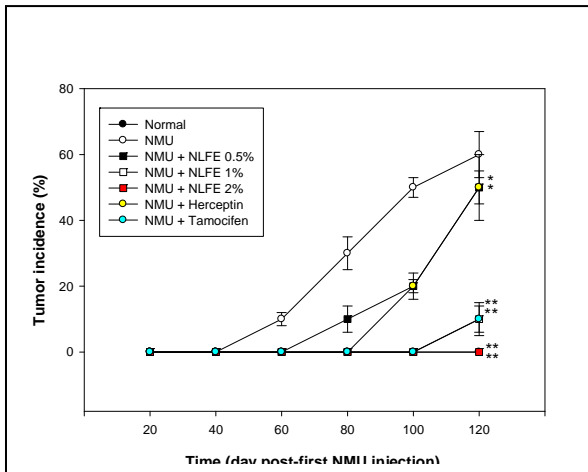


Figure 3. Treatment with NLFE suppresses the NMU-induced incidence of mammary tumors in rats. The induction of mammary tumors induced by three times exposure to 50 mg of NMU/rat is shown. The progressive percentage incidence of cumulative palpable mammary tumors, as a function of time after carcinogen treatment, is shown. Values represent the mean of 10 rats/group. NMU injected group as induced control; NMU + NLFE 0.5%; NMU + NLFE 1%; NMU + NLFE 2% ; NMU+Herceptin (1.2 mg/2 weeks) and NMU+Tamoxifen(Tamoxifen: 1mg/1 kg).

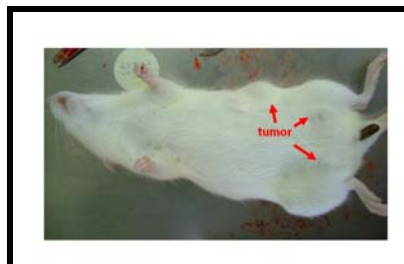
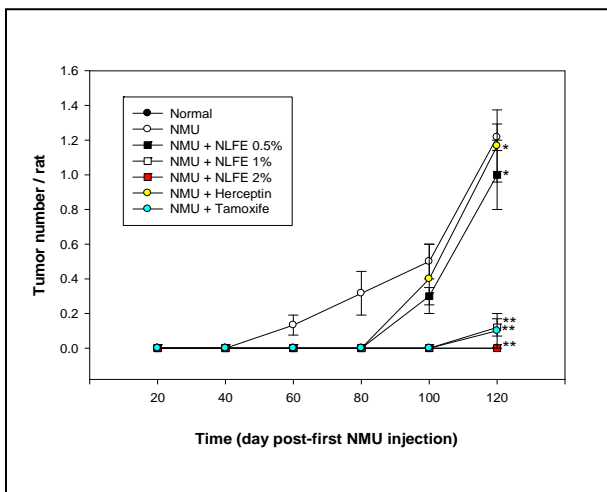


Figure 4. Treatment with NLFE suppresses tumor multiplicity of NMU-induced mammary tumors. Rats of NMU and NMU-NLE groups were ip injected with three doses of NMU (50 mg/kg body weight) at 50, 60, and 90 days of age. All animals were examined by palpation three times a week up to 120 days post-first NMU injection to detect mammary tumors. NMU injected group as induced control; NMU + NLFE 0.5%; NMU + NLFE 1%; NMU + NLFE 2% ; NMU+Herceptin (1.2 mg/2 weeks) and NMU+Tamoxifen(Tamoxifen: 1mg/1 kg).

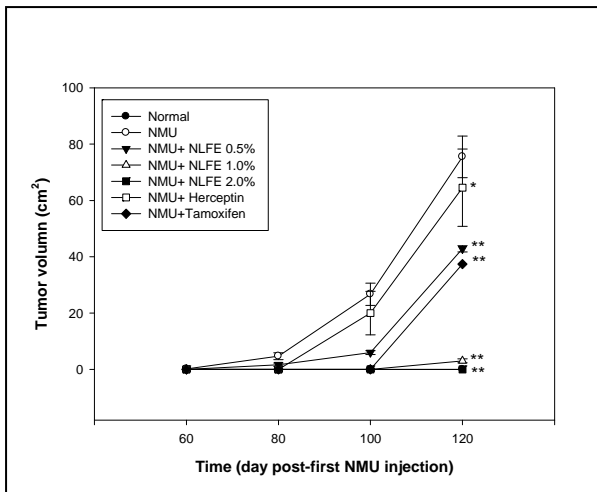


Figure 5. Treatment with NLFE suppresses tumor volume of NMU-induced mammary tumors. Rats of NMU and NMU-NLE groups were ip injected with three doses of NMU (50 mg/kg body weight) at 50, 60, and 90 days of age. All animals were examined by palpation three times a week up to 120 days post-first NMU injection to detect mammary tumors. NMU injected group as induced control; NMU + NLFE 0.5%,; NMU + NLFE 1%,; NMU + NLFE 2% ; NMU+Herceptin (1.2 mg/2 weeks) and NMU+Tamoxifen(Tamoxifen: 1mg/1 kg).

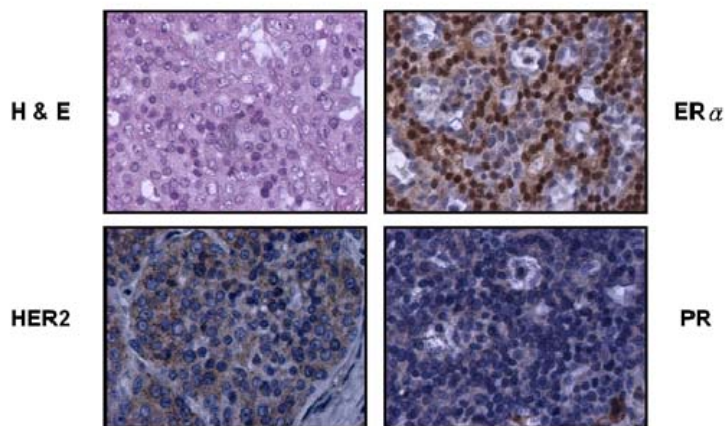


Figure 6. Characterization of NMU-induced rat mammary tumors. Haematoxylin & eosin stained tissue sections showing typical histological appearance of rat mammary tumors. Characterization of NMU-induced tumor cell lineage by immunohistochemistry. Immunohistochemistry of estrogen receptor (ER α). The nuclei of the epithelial cells are intensely stained. Immunohistochemistry of HER2. The cytosol of the epithelial cells are intensely stained. Immunohistochemistry of progesterone receptor (PR). The nuclei of the epithelial cells are very weakly stained. (400 \times)

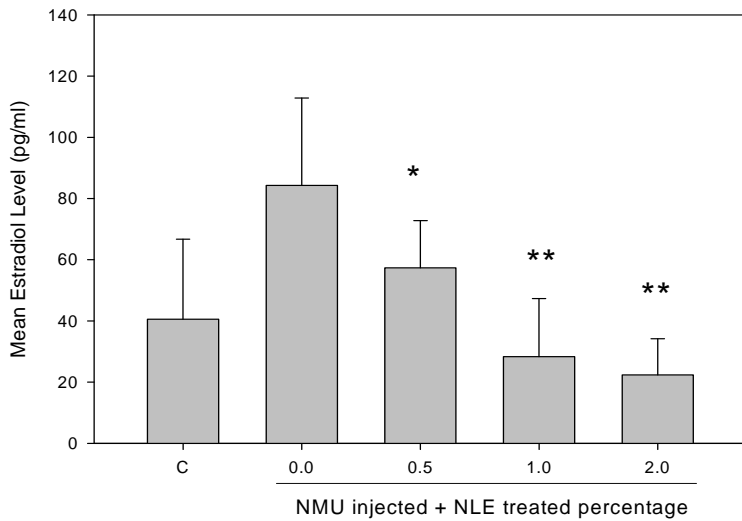


Figure 7. The plasma levels of total estradiol in NMU-injected rat. Rats of NMU and NMU-NLE groups were ip injected with three doses of NMU (50 mg/kg body weight) at 50, 80, and 110 days of age. All animals were examined by palpation three times a week up to 120 days post-first NMU injection to detect mammary tumors. NMU, NMU injected group as induced control; NMU + NLFE 0.5%, low-dose NLFE treated group; NMU + NLFE 1%, middle-dose NLFE treated group; NMU + NLFE 2%, high-dose NLFE treated group.

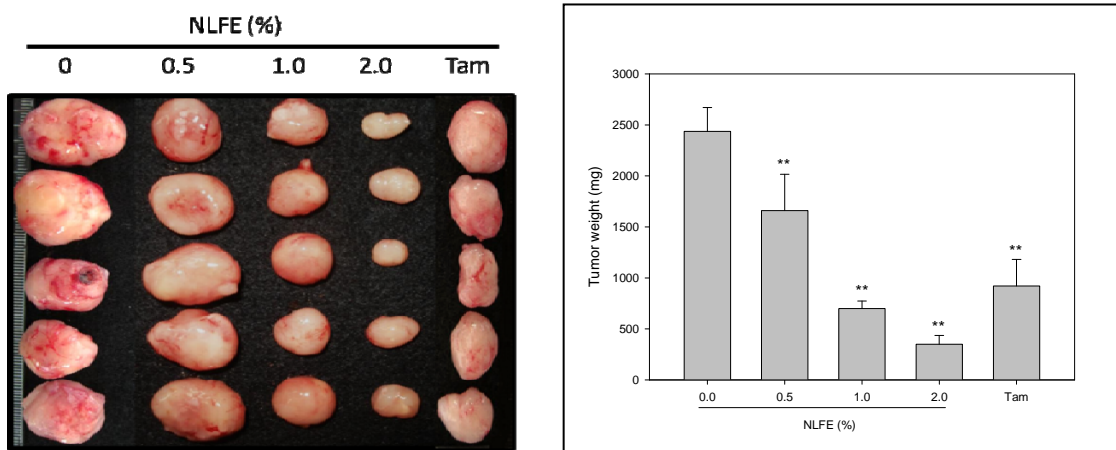


Figure 8. NLFE suppresses tumor growth in nude mice. BT-474 cells were injected subcutaneously into mice. At 28 days after injection, mice were killed by cervical dislocation and tumor were collected for analysis. (A) Representative tumors from each group dissected at day 28. Tam, Tamoxifen. (B) Densitometry analysis of tumor size for each group. Data are shown as the means \pm SD. **, $p < 0.05$.

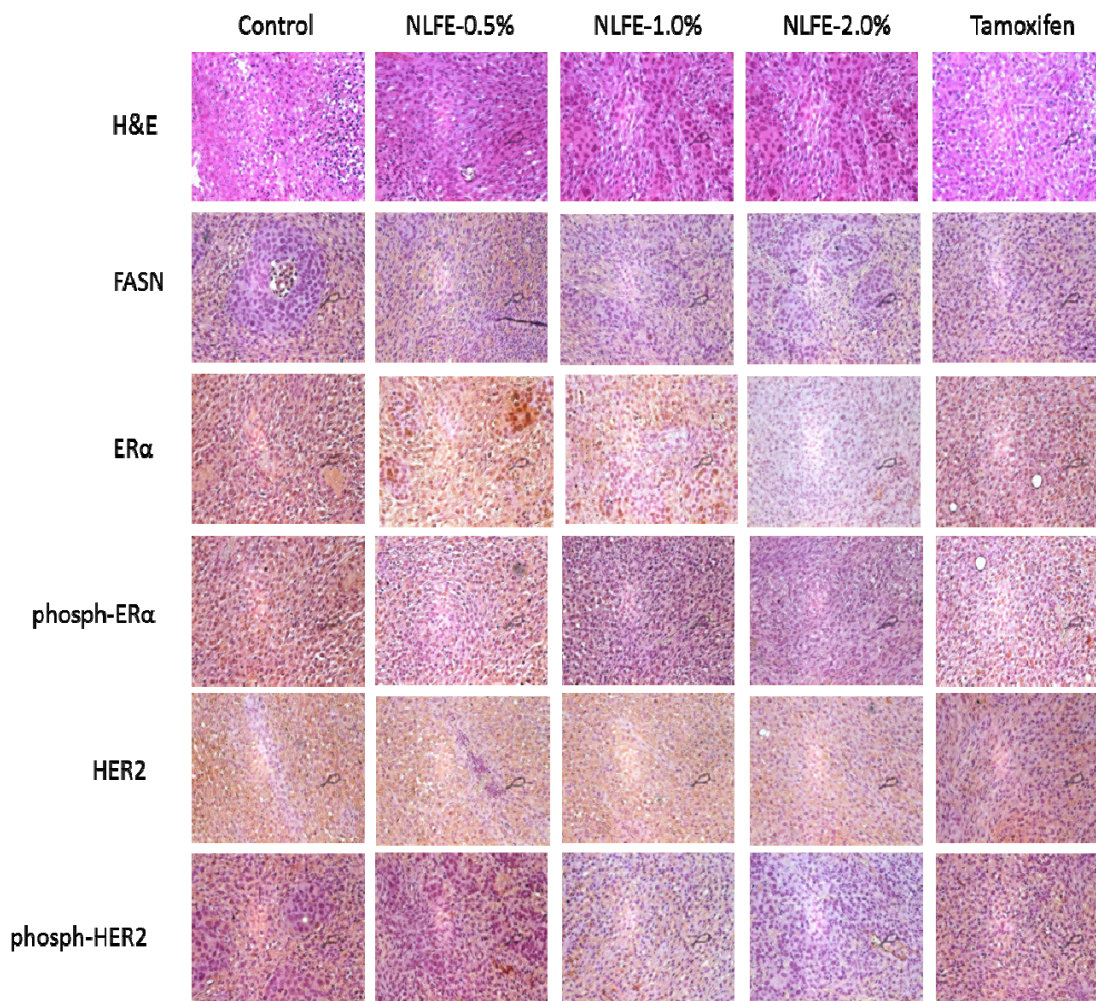
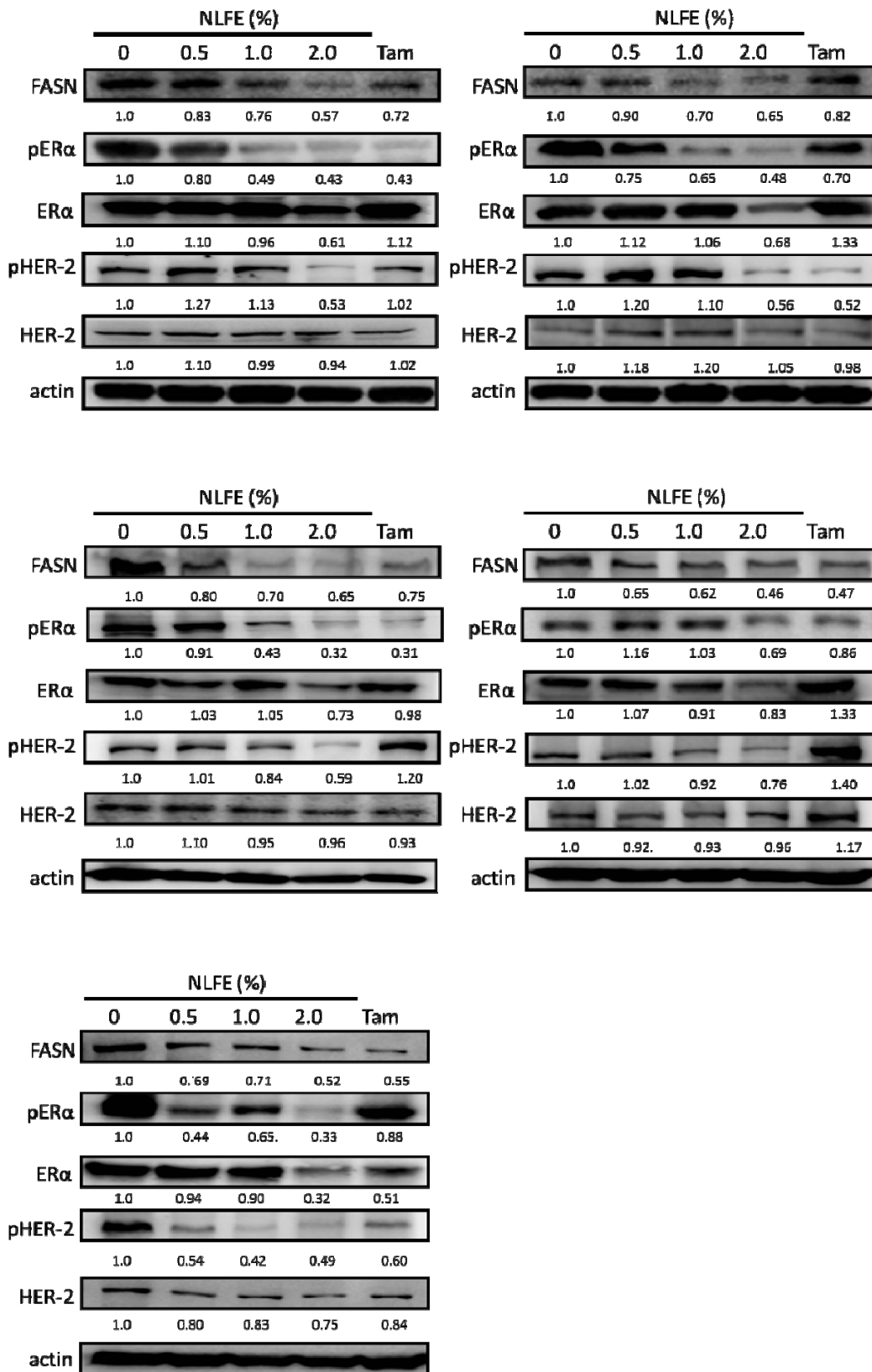


Figure 9. NLFE reduced FAS, ER- α and Her-2 expression in inoculated tumor with BT-474 mammary cancer cell in nude mice. Characterization of BT-474 induced tumor cell lineage by H&E and immunohistochemistry stain. Excised tumors were fixed in formalin and embedded in paraffin prior to preparation for IHC by standard methods. Each target protein was detected with respective antibody. (200 \times)

(A)



(B)

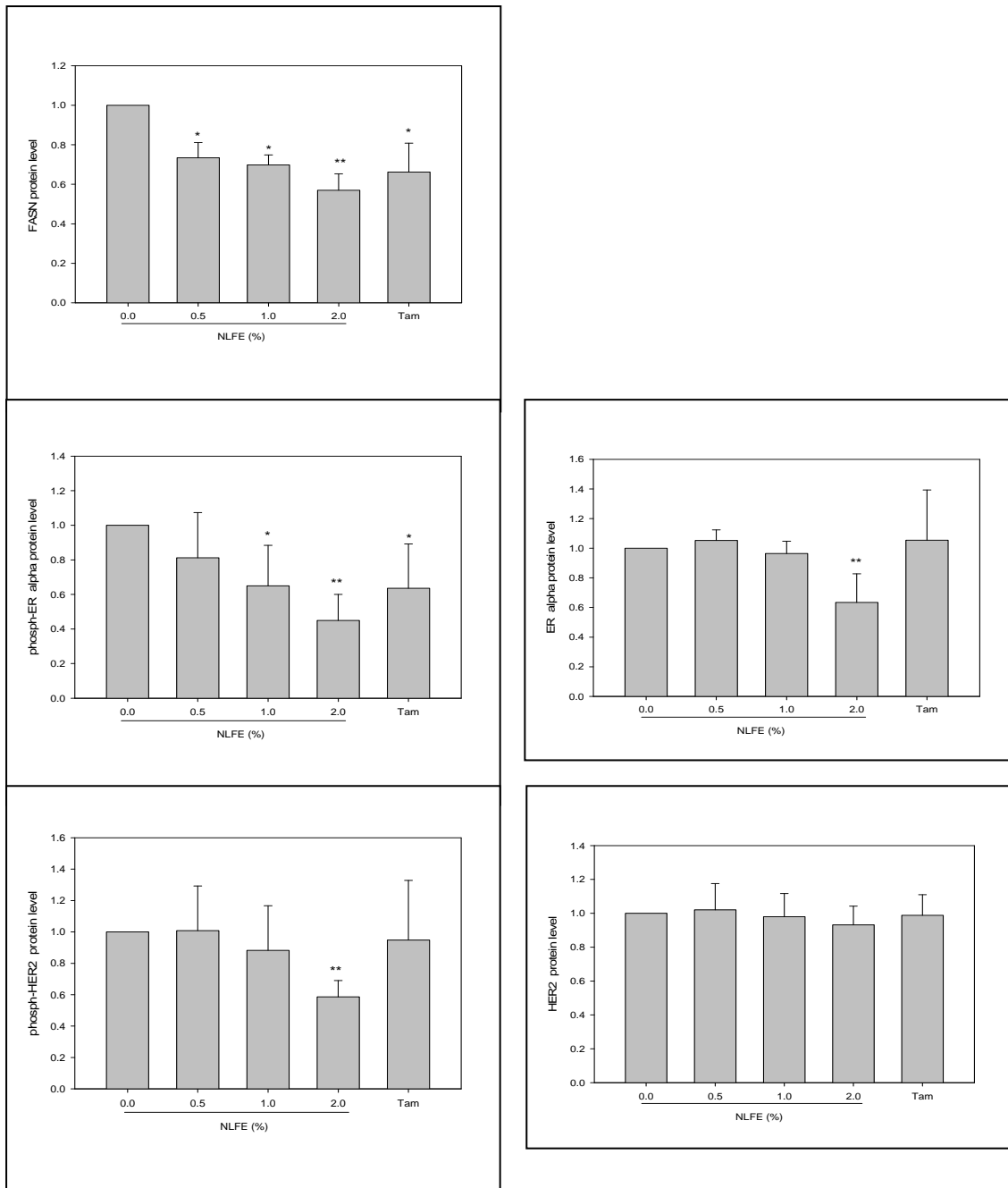


Figure 10. Effect of NLFE on the protein level of FASN, ER- α and Her-2 in BT-474 human breast cancer xenografts nude mice (A) Tumor whole cell extracts (50 μ g/lane) were separated on 8-10% SDS PAGE followed by Western blot analyses. Each target protein band was detected with respective antibody. β -actin was used as an internal control.(B) Quantification of FAS, phosph-ER α / ER α and phosph-HER-2/HER-2. The graph represents mean values of three independent experiments, and error bars represent the means \pm SD of these experiments. *P<0.05 compared with the control. The three independent experiments were significantly different according to a one-way ANOVA. C, control; Tam, Tamoxifen.

附件二：子計畫二

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

疾病化學預防物質開發及機轉研究-子計畫二-黑蒜之抗肥胖植物化學物質開發及其分子機轉研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2632-B-040-001-MY3

執行期間：99年8月1日至102年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學 營養學系

計畫主持人：徐慶琳

共同主持人：

計畫參與人員：張維棠

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

- 移地研究心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

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 102 年 9 月 12 日

摘要

大蒜 (*Allium sativum* L.) 精油及其含硫化合物對於高脂飲食所誘導大鼠體重增加具有抑制作用。然而目前以黑蒜探討抗肥胖之相關研究仍是缺乏，因此本研究將進行不易形成體脂肪之黑蒜保健食品開發。內容分成二部分：(一) 以體外細胞試驗模式，釐清黑蒜萃取物之抗肥胖潛力與作用機轉；(二) 以體內動物試驗模式探討黑蒜甲醇萃取物抑制高脂飲食誘導肥胖大鼠之影響與分子機轉。(一) 在細胞試驗部分，結果顯示三種溶劑萃取物中，以黑蒜甲醇萃取物 (methanol extract of black garlic, MEBG) 具有最佳的抑制脂肪細胞數目、胞內三酸甘油酯含量與甘油-3-磷酸去氫酶活性。在基因表現上，黑蒜甲醇萃取物能顯著提升 AMPK 與 Sirt1，並抑制脂質生合成 (PPAR γ 、SREBP-1c、FAS、ACC、aP2、LPL 和 CD36) 與脂肪細胞激素 (leptin、PAI-1 和 resistin) 之基因表現。此外，黑蒜甲醇萃取物亦會增加脂質氧化 (PGC-1 α 和 UCP1) 與 adiponectin 之基因表現。(二) 在動物試驗部分，高脂飲食給予 MEBG 50 mg/kg、150 mg/kg 和 300 mg/kg 之組別，可顯著降低高脂飲食所誘導之體重增加與脂肪組織堆積，亦可降低血清中三酸甘油酯與游離脂肪酸含量，並增加血清中高密度脂蛋白膽固醇含量。在高脂飲食並給予 MEBG 之組別可顯著降低肝臟總脂質含量，並增加糞便中總脂質排出。在肝臟和脂肪組織切片結果得知，MEBG 可減少油滴堆積。在肝臟與脂肪組織基因表現上，高脂飲食給予 MEBG 可顯著提升 AMPK 與 Sirt1，並抑制脂肪酸合成 (SREBP-1c、PPAR γ 、SCD1、FAS 和 ACC) 之基因表現。此外，亦會提升脂肪酸氧化代謝基因 (PPAR α 和 UCP1) 與降低脂肪細胞激素 (leptin 和 PAI-1) 之基因表現。綜合上述結果證實，黑蒜甲醇萃取物具有抑制脂肪細胞脂質堆積與高脂飲食所誘導大鼠肥胖，其可透由活化 AMPK 與 Sirt1 之基因表現。

關鍵詞：黑蒜甲醇萃取物、高脂飲食、3T3-L1 細胞、大鼠、基因表現

Abstract

Previous study indicated that the garlic oil and its organosulfur compounds can be beneficial for the suppression of body weight gain in a high-fat diet (HFD)-induced obese rats. However, development of black garlic functional food for the prevention of fat accumulation remains scarce. Therefore, the aim of this proposal is to investigate the development of black garlic functional food for the prevention of fat accumulation. There are two topics included in this study: (1) Study of black garlic extracts on adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes; (2) Inhibitory effect of methanol extract of black garlic (MEBG) on inhibition of obesity induced by a HFD in rats. (1) In cell culture model, MEBG had the highest inhibitions of adipocyte number, intracellular triglyceride, and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity in 3T3-L1 adipocytes among the different solvent extracts. In gene expression, MEBG was significantly increased the gene levels of AMPK and Sirt1, and then decreased the gene levels of lipogenesis (PPAR γ , SREBP-1c, FAS, ACC, aP2, LPL, and CD36), and adipocytokines (leptin, PAI-1, and resistin). Moreover, MEBG also up-regulated gene levels of fatty acid oxidation (PGC-1 α and UCP1), and adiponectin. (2) In animal model, the body weight, adipose tissue weights of the peritoneal and epididymal, serum parameters of triglyceride and free fatty acid, and hepatic lipid, triglyceride, and cholesterol were significantly decreased in the MEBG (50-300mg/kg)+HFD groups compared to the HFD group ($p < 0.05$). Serum HDL-cholesterol level, and fecal lipid, triglyceride, and cholesterol output in the MEBG (50-300mg/kg)+HFD groups were significantly increased as compared to the HFD group ($p < 0.05$). The MEBG (50-300mg/kg)+HFD groups showed microvesicular fat accumulation in the liver and adipose tissue. In adipose tissue, the gene levels of AMPK, Sirt1, UCP1, and adiponectin in MEBG groups were significantly higher than those in the HFD group. The gene levels of lipogenesis (SREBP-1c, PPAR γ , FAS, and ACC), and adipokines (leptin and PAI-1) in adipose tissue were significantly lower than those in the HFD group. Moreover, MEBG significantly increased the gene levels of fatty acid oxidation (AMPK and PPAR α), and decreased the gene levels of FAS, SREBP-1c, and SCD-1 in liver tissue as compared to the HFD group ($p < 0.05$). These results showed that MEBG can suppress intracellular triglyceride accumulation and obesity in rats with HFD-induced obesity through activations of AMPK and Sirt1.

Keywords: Methanol extract of black garlic, High fat diet, 3T3-L1 cell, rats, gene expression

一、前言

肥胖是全球面臨的健康議題，世界衛生組織 (WHO) 與食品藥物管理局 (FDA) 將肥胖列為慢性疾

病之一。當體內長期的能量失衡，會導致過多的能量累積在體內，進而以三酸甘油酯的型態儲存於脂肪組織中，當過度的脂肪堆積會對健康造成負面影響。肥胖和許多疾病之罹病率和死亡率增加息息相關，例如：惡性腫瘤、心血管疾病、糖尿病、慢性肝病、慢性腎臟病和癌症等 (Mariela and Itamar, 2011)。脂肪組織是一個儲存能量和釋放能量的器官，亦是一個細胞激素分泌的重要器官。在飲食所誘導的肥胖個體中，脂肪組織會分泌多種發炎因子，進而造成胰島素阻抗性。Wang 和 Jones 在 2004 年回顧性文章中指出，被認可之抗肥胖機制包括：降低能量或食物之攝取、增加能量之消耗、降低前脂肪細胞之分化及增生、減低脂肪生成與促進脂肪分解。因此，改善肥胖問題除了藉由飲食控制外，亦可由調控體內脂肪酸恆定基因 (AMPK、Sirt1、PPAR γ 、FAS、SREBP-1c、LPL 與 aP2)、能量代謝基因 (FOXO1、HSL、ATGL、Perilipin、PGC-1 α 和 UCP1) 和脂肪細胞激素相關基因 (leptin、adiponectin、TNF α 、IL-6、resistin、PAI-1 與 MCP-1)(Viollet et al., 2009; Balistreri et al., 2010; Schuq and Li, 2011; Kousteni, 2012)，進而達到調控體內脂質的生合成和降低脂質堆積。

疾病預防為一重要之世界潮流，如何從飲食生活中藉由食物攝取獲得天然機能性成分，以達到預防或延緩疾病的效果，是目前營養醫學相關研究的目標。大蒜 (*Alliums sativum* L.) 為百合科鱗莖植物，在國內為重要的經濟作物。研究指出，大蒜具有多種營養成分，其中富含之硫化物為大蒜特殊之風味與生理活性之來源。此外，大蒜亦具有多種生物活性，包括：抑制癌細胞增生、抗發炎、抗氧化、抗血栓、降血脂與降血糖等作用 (Pittler and Ernst, 2007)。Sheen 等 (1999) 利用大蒜精油和其含硫化合物，在高脂飲食的模式下探討其對降低體重之影響，發現其具有抑制高脂飲食所誘導之體重增加。Gorinstein 等 (2006) 研究發現，給予 500 mg/day 大蒜粉末的大鼠，具有顯著抑制高脂飲食所誘導之血脂異常。因此認為大蒜和其含硫化合物，對於體重與血脂之控制是具有開發潛力。生物轉換技術可將原料成分進行修飾與轉換，提高具特殊用途和功效之化合物。本研究利用調整溫濕度之生物轉換技術 (biotransformation) 應用於黑蒜頭 (black garlic) 之生產開發，黑蒜頭除了改善大蒜原有的特殊風味，亦可提高營養成分 (胺基酸、有機硫化合物和多酚化合物) 之含量 (Seo et al., 2009)。由於目前黑蒜頭之研究仍是少數，因此本研究期望由生物轉換技術所生產之黑蒜頭，以體外 3T3-L1 脂肪細胞與體內動物試驗模式，探討黑蒜萃取物改善肥胖之潛力及其分子機轉探討。

本研究首先利用 3T3-L1 脂肪細胞，利用不同溶劑 (水、甲醇和乙醇) 進行黑蒜頭之萃取，釐清最具抑制脂質生合成之萃取物，並進一步探討影響脂質生合成之相關分子積轉。接著進一步，利用體內動物模式探討黑蒜甲醇萃取物對減少體脂肪之作用評估。實驗模式以大鼠 (Wistar rats) 作為實驗對象，在高脂飲食下，誘導大鼠肥胖症模式並同時介入不同劑量之黑蒜甲醇萃取物。評估其是否具有改善肥胖之潛力，並釐清其相關分子作用機轉。

二、材料與方法

(一) 樣品

黑蒜頭材料由中州科技大學講座教授兼校長曾慶瀛博士提供，將黑蒜原料進行真空冷凍乾燥後，以粉碎機破碎過篩製成黑蒜粉，利用水、甲醇和乙醇等不同溶劑萃取製得不同溶劑萃取物，供後續之分析使用。各萃取物之名稱為：黑蒜水萃取物 (water extract of black garlic, WEBG)、黑蒜甲醇萃取物 (methanol extract of black garlic, MEBG) 和黑蒜乙醇萃取物 (ethanol extract of black garlic, EEBG)。

(二) 3T3-L1 前脂肪細胞培養與分化

前脂肪細胞株 3T3-L1 (BCRC No.60159) 購自財團法人食品工業發展研究所，生物資源保存及研究中心 (台灣，新竹)。以培養基 [90% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 含有 4 mM L-glutamine 與 4.5 g/L glucose)、1.5 g/L sodium bicarbonate、10% bovine calf serum 與 1% Penicillin-Streptomycin] 和分化藥劑 (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine、1 μ M dexamethasone、1 μ M insulin) 於 37°C、5% CO₂ incubator 進行培養與分化，每兩天更換一次培養液。

(三) 胞內三酸甘油酯 (Intracellular triglyceride) 含量測定

經分化培養完成之 3T3-L1 脂肪細胞，以 0-100 μ g/mL 濃度之黑蒜萃取物處理 48 小時。待加藥處理完成，將細胞培養液移除，並以 PBS 清洗二次，加入 lysis buffer (1% triton X-100 in PBS) 利用超音波破碎機，將細胞完全破碎，此細胞液即利用三酸甘油酯測定套組 (TG assay kit, Teco diagnostics, U.S.A) 胞內三酸甘油酯含量進行測定。

(四) 脂肪細胞數目分析 (油紅染色分析)

Oil red o 染色是參考 Ramirez-Zacarias 等 (1992) 之方法進行測定。將分化之脂肪細胞染色方法，先將培養於培養盤的細胞以 10% neutral buffered formalin (2mL) 固定細胞 20 分鐘以上，倒除固定液後以 100% propylene glycol (1mL) 覆蓋 3 分鐘，再除去 propylene glycol 溶液，並加入 1 mL 之 oil red O 試劑反應 60 分鐘，移除 oil red O 試劑後，加入 60% propylene glycol 溫和攪拌脫色，以 37°C 烘箱乾燥 1 小時，再加入 200 μ L 之 isopropanol 至細胞中，利用攪拌器攪拌萃取細胞之染劑，此萃取液經定量後，即可利用分光光度計於 510 nm 波長作測定。OROSM (oil red o-stained material) 表示每一細胞基準之細胞數量測定，可由控制組之脂肪細胞計算其相對量。

(五) 甘油-3-磷酸去氫酶活性分析

甘油-3-磷酸去氫酶在肥胖上扮演重要角色，其會使得甘油轉換成三酸甘油酯 (Wise and Green, 1979)。甘油-3-磷酸去氫酶活性是使用市售甘油-3-磷酸去氫酶活性分析套組 (B-Bride international, U.S.A) 進行分析。將分化培養完成之 3T3-L1 脂肪細胞，以不同濃度之黑蒜萃取物處理 48 小時。待加藥處理完成，將細胞培養液移除，以 PBS 清洗兩次，加入 enzyme extraction reagent，利用超音波破碎機，將細胞完全破碎，置入離心機 (12000 \times g, 5min, 4°C) 離心。取 96 well plate 分別加入 100 μ L 之細胞均質液和 200 μ L substrate solution (DHAP、NADH 和 lyophilized)，利用 ELISA reader 於 340nm 測定其吸光值。依公式計算 GPDH 活性：GPDH activity (U/mL) = Δ OD at 340 nm/minute \times 0.482

(六) 基因表現分析

1. 細胞 RNA 萃取

脂肪細胞以不同濃度之黑蒜萃取物處理後，使用 TRIzol 試劑抽取細胞之 RNA。萃取方法如下：將培養於 10 cm dish 之細胞先以滅菌 PBS 沖洗兩次，加入 1 mL Trizol 溶液，將細胞刮下，以 pipette 反覆沖打細胞數次後，將溶液置於滅菌之 eppendorf 中，置於室溫 3 分鐘。再加入 0.2 mL 之 choloform 充分搖晃後，置於室溫 3 分鐘，再於 4°C 以 12000 rpm 離心 15 分鐘使其分層。取上層上清液至另一個滅菌之 eppendorf 中，加入等量之 isopropanol 混合均勻，置於室溫 3 分鐘。再以 4°C 以 12000 rpm 離心 10 分鐘後，去除上清液，並以 75% 乙醇 (300 μ L) 清洗，再於 4°C 以 7500 rpm 離心 5 分鐘。倒除液體，置於抽風櫃風乾 (約 5-10 分鐘)，乾燥後之沉澱物加入 50 μ L 之 DEPC-H₂O，充分混合均勻使 RNA 完全溶解。

2. RNA 濃度測定法

RNA 濃度測定，利用分光光度計測定 sample 260 nm 及 280nm 波長之吸光值，於 eppendorf 內加入 DEPC-H₂O 作為 Blank，取 2 μ L total RNA 與 998 μ L DEPC-H₂O 混合均勻後測得吸光值計算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值 (\geq 1.6 品質較佳)，使用下列公式計算 sample 中 total RNA 含量。

Total RNA (μ g) = OD₂₆₀ \times 40 μ g/mL \times 稀釋倍數 (500)/1000

3. 反轉錄反應 (Reverse transcription)

每一樣品取 200 ng 之 RNA 溶液進行逆轉錄反應製備 cDNA。cDNA 之合成藥劑是使用 high-capacity cDNA reverse transcription kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 進行，其反轉錄反應溶液包括：RT buffer、dNTP mix、RT random primers、MultiScribe™ reverse transcriptase 與 Nuclease-free H₂O。反轉錄反應條件為 25°C 反應 10 分鐘，37°C 反應 120 分鐘，85°C 反應 5 分鐘，最後回到 4°C 即可。此 cDNA 再以 Applied Biosystems 公司提供之標準方法，進行 real-time RT-PCR/SYBR Green 操作流程。

4. 即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (Real time RT-PCR)

利用 Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 進行，其實驗流程如下：反應溶液在 25 μ L 之混合液中進行，內含成分為：1 \times Power SYBR Green PCR Master Mix、300 nM forward primer、300 nM reverse primer、RNA template、再以去離子水補足至 25 μ L，分裝到專用的試管內，每個樣品皆做三重複，使用 real-time RT-PCR System 儀器進行分析，在儀器之設定上將樣本的 detector 設定為 SYBR Green，然後進行 RT-PCR 反應。反應條件：95°C 反應 10 分鐘，再以 95°C 反應 15 秒與 60°C 反應 1 分鐘之條件進行 40 cycles 分析。SYBR Green 黏合到增幅產物所得之螢光訊號，以該系統之軟體進行數據之分析。

(七) 動物、飲食與實驗設計

由樂斯科生物科技公司 (台灣，宜蘭) 訂購 40 隻 8 週齡雄性大鼠 (Wistar rat)。將實驗動物預養一週

後隨機分組 (n=8)，其分組說明如下：(1) 正常飲食組 (normal diet, ND)、(2) 高脂飲食組 (high fat-diet, HFD) (油脂來源：大豆油5.6%與20%豬油)、(3) 高脂飲食組給予低劑量 (low dose, LD) 黑蒜甲醇萃取物 [50 mg MEBG/kg rat]、(4) 高脂飲食組給予中劑量 (medium dose, MD) 黑蒜甲醇萃取物 [150 mg MEBG/kg rat] 和 (5) 高脂飲食組給予高劑量 (high dose, HD) 黑蒜甲醇萃取物 [300 mg MEBG/kg rat]。

(八) 血清生化參數測定

血液收集於血清分離管 (BD Vacutainer, Plymouth, UK) 中，以3000 rpm離心10 min取出血清，將其置於ependorf中並貯存於-80°C作為分析使用。血清三酸甘油酯、葡萄糖、酮體、磷脂質、總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇、高密度脂蛋白膽固醇、AST、ALT、尿酸、creatinine、鈉離子、鉀離子與氯離子濃度以市售分析套組 (Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA) 進行測定，酮體 (ketone body) 濃度測定，利用市售生化試劑 (Ranbut, Randox Laboratories Ltd) 分析血液中D-3-hydroxybutyrate濃度。血清游離脂肪酸 (free fatty acid) 測定，是利用生化試劑 (Biovison, K612-100, U.S.A) 進行測試。

(九) 肝臟與糞便總脂質分析

肝臟與糞便脂質萃取參考 Tzang 等 (2009) 之方法。三酸甘油酯分析是利用三酸甘油酯測定套組 (TG assay kit, Teco diagnostics, U.S.A) 進行測定。總膽固醇分析是利用商業套組 (commercial kit)(Cholesterol, Randox Laboratories Ltd., Antrim, UK) 進行測定。

(十) 臟與脂肪組織結構切片與油滴累積之影響

將肝臟與脂肪組織進行石蠟包埋與切片，以H&E染色法進行染色。

(十一) 基因表現分析

脂肪與肝臟組織 RNA 萃取是利用商業套組 (commercial kit) (E.Z.N.A.TM Tissue RNA Kit, omega bio-tek., U.S.A) 進行實驗。並以 high-capacity cDNA reverse transcription kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 進行逆轉錄反應製備 cDNA。此 cDNA 再以 Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 進行 real-time RT-PCR/SYBR Green 操作流程。

(十二) 統計分析

實驗數據使用 SPSS 電腦統計軟體進行分析。變異數分析則以 PROC ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行分析。

三、結果

(一) 不同溶劑黑蒜萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞之油紅 (oil red O) 染色、胞內三酸甘油酯 (TG) 與甘油-3-磷酸去氫酶 (GPDH) 酵素活性之影響

油紅染色試驗結果顯示 (表 1)，黑蒜水萃取物與乙醇萃取物於 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時會降低脂肪細胞數目至 80.18%和 86.43% ($p<0.05$)。而黑蒜甲醇萃取物在各濃度均可顯著抑制脂肪細胞數目，其中在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度時可降低至 91.15% ($p<0.05$)。在胞內三酸甘油酯實驗結果得知，黑蒜甲醇萃取物於 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度以上，可顯著降低脂肪細胞胞內三酸甘油酯之含量 (13.6%-25.6%) ($p<0.05$)，在水萃取物和乙醇萃取物方面，並無統計上之顯著差異 ($p>0.05$)。由以上結果得知，黑蒜甲醇萃取物具有最佳之抑制 3T3-L1 脂肪細胞胞內三酸甘油酯能力，因此後續實驗即選擇此萃取物作完整之研究探討。在 GPDH 酵素活性結果得知，黑蒜甲醇萃取物在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度以上，具有顯著降低 3T3-L1 脂肪細胞 GPDH 酵素之活性 ($p<0.05$)。

(二) 黑蒜甲醇萃取物對調控脂肪細胞相關訊息分子之影響

由表 2 結果得知，黑蒜甲醇萃取物能顯著提升 AMPK 和 Sirt1 之基因表現，並對 PPAR γ 、SREBP-1c、ACC、FAS、aP2、LPL 和 CD36 等脂質合成和運送相關基因表現上，皆具顯著的抑制作用 ($p<0.05$)。在調控脂質氧化代謝相關基因表現上，發現黑蒜甲醇萃取物對 PGC-1 α 和 UCP1 皆有顯著的提升作用 ($p<0.05$)。在脂肪細胞激素相關基因表現上，黑蒜甲醇萃取物對 leptin、resistin 和 MCP-1 之基因表現，皆具顯著的抑制作用 ($p<0.05$)。此外，亦會提升在 adiponectin 之基因表現 ($p<0.05$)。

(三) 黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之體重、食物攝取量與能量攝取之影響

由表 3 結果得知，在給予 50 mg/kg、150 mg/kg 和 300 mg/kg 之黑蒜甲醇萃取物之大鼠，可顯著降低其體重 ($p<0.05$)。高脂飲食給予不同劑量之黑蒜甲醇萃取物，在食物攝取量與能量攝取上並無顯著

差異。

(四) 黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之臟器重量之影響

由表 4 結果得知，在高脂飲食並給予黑蒜甲醇萃取物之組別，在心臟、肝臟、脾臟、肺臟與腎臟重量上，並無統計上之顯著差異 ($p>0.05$)。高脂飲食給予 50 mg/kg 以上之黑蒜甲醇萃取物，可顯著降低腎周圍與副睪脂肪重量 ($p<0.05$)。

(五) 黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之血清生化參數之影響

由表 5 結果得知，在高脂飲食並給予 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物之組別，可顯著降低血清三酸甘油酯含量、游離脂肪酸含量，並提升血清高密度脂蛋白膽固醇含量 ($p<0.05$)，各組大鼠在血清總膽固醇含量並無顯著的差異 ($p>0.05$)。此外，在高脂飲食中，餵食不同劑量之黑蒜甲醇萃取物，並不會造成大鼠肝功能、腎功能與電解質平衡之負面影響。

(六) 黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之肝臟與糞便總脂質、三酸甘油酯與膽固醇含量之影響

由表 6 結果顯示，高脂飲食給予 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物之組別，可顯著降低肝臟總脂質、三酸甘油酯與膽固醇含量 ($p<0.05$)。此外，亦會增加糞便總脂質、三酸甘油酯與膽固醇之排出量 ($p<0.05$)。

(七) 黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之肝臟與脂肪組織切片之影響

由圖 1 肝臟 H&E 組織切片染色結果得知，HFD 組別有較多油滴累積情形，在高油脂飼料中添加 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物組別，則可減少肝臟中油滴的堆積。由圖 1 得知，HFD 組別的脂肪細胞大小明顯較正常飲食組為大，當在高油脂飼料中添加 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物組別，則脂肪細胞大小有明顯的減少。

(八) 黑蒜對高脂飲食誘導肥胖大鼠之肝臟與脂肪組織相關訊息分子之影響

由表 7 結果得知，高脂飲食給予 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物之組別，在脂肪組織中，會顯著增加 AMPK、Sirt1、UCP1 與 adiponectin 之基因表現，並降低 PPAR γ 、SREBP-1c、FAS、ACC 和 CD36 之基因表現 ($p<0.05$)。此外，亦觀察到給予 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物之組別，會顯著降低 leptin 與 PAI-1 之脂肪相關基因表現 ($p<0.05$)。在肝臟組織中，給予 50 mg/kg 以上黑蒜甲醇萃取物之組別，會顯著提升 AMPK 與 PPAR α 等基因表現，並降低 FAS、SREBP-1c 與 SCD-1 等脂質生合成相關基因表現 ($p<0.05$)。然而，在肝臟組織中 Sirt1 和 ACC 之基因作用則無太大影響 ($p>0.05$)。

四、討論

黑蒜頭起源於日本及韓國，其可經由不同生物轉換技術，例如：醋酸菌醱酵、蒜氨酸酶及自然醱酵等方式製成。黑蒜頭相較於一般蒜頭具有較高之多酚與有機硫化合物，其亦具有較佳之抗氧化與抗發炎等作用 (Sato et al., 2006)，故黑蒜頭衍然成為目前具研究潛力的材料。大蒜中的有機硫化合物 (methyl-sulfonyl-methane) 具有抑制 3T3-L1 細胞脂質生合成和誘導細胞凋亡的能力 (Ambati et al., 2009)。因此，本研究利用生物轉換技術生產之黑蒜頭，探討其介入 3T3-L1 脂肪細胞之影響，其中黑蒜甲醇萃取物可較水和乙醇萃取物更具有降低脂肪細胞數目和胞內三酸甘油酯含量。此外，黑蒜甲醇萃取物亦會顯著降低 GPDH 酵素活性 (表 1)。然而，脂肪細胞油滴堆積的減少，是藉由一複雜的分子機制進行調控。基因表現結果顯示，MEBG 具有抑制脂肪生成、脂肪激素和提升脂質代謝相關訊息分子之表現，而達到抑制脂肪細胞數目與脂質生合成之作用 (表 2)。此研究結果類似 Ambati 等 (2009) 的研究，大蒜成分中的有機硫化合物 (methyl-sulfonyl-methane) 具有抑制脂質生合成和誘導細胞凋亡的能力。此研究結果須進一步以體內動物模式證實，因此，本研究以黑蒜甲醇萃取物探討高脂飲食誘導肥胖大鼠之脂質代謝與分子機制。

肥胖會導致脂肪過度堆積在週邊組織，且其與血脂質生化參數 (TG、TC、LDL-C、HDL-C 與 FFA) 有密不可分的關係。動物試驗結果顯示，高脂飲食所誘導之肥胖大鼠中在給予黑蒜甲醇萃取物 50 mg/kg 以上之組別，會顯著減低肥胖大鼠之體重、腎周圍與副睪脂肪重量，以及減低血清三酸甘油酯與游離脂肪酸含量，並提升血清高密度脂蛋白膽固醇含量 (表 3、表 4 和表 5)。此結果與 Seo 等 (2009) 研究相似，給予老鼠 5% 黑蒜頭具有降低血清三酸甘油酯、總膽固醇與提升高密度脂蛋白膽固醇的能力。在肝組織部分，給予黑蒜甲醇萃取物 50 mg/kg 以上之組別，會減低因高脂飲食誘導之肝組織重量增加情形，其減低之情形可由表 6 肝臟脂質含量結果得知，給予黑蒜甲醇萃取物可降低肝臟總脂質、三酸甘油酯與膽固醇含量，由圖 1 組織切片結果得知，其具有改善肝臟和脂肪組織內油滴累積之情形，

並增加糞便總脂質、三酸甘油酯與膽固醇之排出 (表 6)。

Lii 等 (2012) 研究指出，二烯丙基三硫化物會藉由抑制 ERK 路徑調控脂質生合成相關基因，進而抑制脂肪細胞內油滴的堆積情形。因此，在給予高脂飲食誘導肥胖大鼠之抗肥胖機制，可能是藉由抑制體內三酸甘油酯的形成來達到降低。研究指出，Sirt1 和 AMPK 可透由協同作用提升粒線體功能與脂肪酸氧化作用，進而抑制下游脂質生合成相關路徑 (Schuq and Li, 2011; Price et al., 2012)。在表 7 肝臟與脂肪組織基因表現結果顯示，黑蒜甲醇萃取物會透由 AMPK 與 Sirt1，進而降低脂質生合成 PPAR γ 、SREBP-1c、ACC、FAS 與 SCD-1，並提升氧化代謝 UCP1 與 PPAR α 等相關基因之表現。此外，脂肪細胞亦會分泌脂肪細胞激素，它與許多疾病的發生息息相關。黑蒜甲醇萃取物介入下會顯著提升 adiponectin 並降低 leptin 與 PAI-1 之表現，此結果與 Balistreri 等 (2010) 研究結果類似，當提升 adiponectin 含量時可減低脂肪堆積和發炎相關激素之表現。綜合上述結果，黑蒜甲醇萃取物確實具有抑制脂質生成、脂肪細胞激素和提升脂質代謝相關訊息分子之表現，而達到抑制脂質生合成與抗肥胖之作用。

五、結論

在細胞實驗中，證實黑蒜甲醇萃取物具有抑制脂質合成之基因表現，而降低胞內甘油-3-磷酸去氫酶之酵素活性，並透由提升脂質氧化之基因表現，進而降低胞內三酸甘油酯之堆積。接著進一步以體內動物試驗釐清，結果顯示黑蒜甲醇萃取物具有減低高脂飲食所誘導肥胖大鼠之血脂質異常、體脂肪堆積與體重增加之趨勢，其是透由活化 AMPK 與 Sirt1 而調控脂質生合成與脂肪酸氧化之訊息路徑。綜合上述結果顯示，此具有特色與功能之黑蒜，未來確實具有開發成不易形成體脂肪之保健食品素材之潛力。

六、參考文獻

- Ambati, S., Yang, J.Y., Rayalam, S., Park, H.J., Della Fera, M.A., and Baile, C.A. (2009). Ajoene exerts potent effects in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting adipogenesis and inducing apoptosis. *Phytotherapy Research* 23, 513-518.
- Balistreri, C.R., Caruso, C., and Candore, G. (2010). The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation*. (doi:10.1155/2010/802078)
- Gorinstein, S., Leontowicz, M., Leontowicz, H., Jastrzebski, Z., Drzewiecki, J., Namiesnik, J., Zachwieja, Z., Barton, H., Tashma, Z., and Katrich, E. (2006). Dose-dependent influence of commercial garlic (*Allium sativum*) on rats fed cholesterol-containing diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4022-4027.
- Kousteni, S. (2012). FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. *Bone* 50, 437-443.
- Lii, C.K., Huang, C.Y., Chen, H.W., Chow, M.Y., Lin, Y.R., Huang, C.S., Tsai, C.W. (2012). Diallyl trisulfide suppresses the adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes through ERK activation. *Food and Chemical Toxicology* 50, 478-484.
- Mariela, G., and Itamar, R. (2011). Present and Future: Pharmacologic Treatment of Obesity. *Journal of Obesity*. (doi:10.1155/2011/63618)
- Pittler, M.H., and Ernst, E. (2007). Clinical effectiveness of garlic (*Allium sativum*). *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 1382-1385
- Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, A.J., Duarte, F.V., Martin-Montalvo, A., North, B.J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J.S., Hubbard, B.P., Varela, A.T., Davis, J.G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A.P., Coppari, R., Palmeira, C.M., de Cabo, R., Baur, J.A., and Sinclair, D.A. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metabolism* 15, 675-690.
- Ramírez-Zacarias, J.L., Castro-Muñozledo, F., and Kuri-Harcuch, W. (1992). Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 97, 493-497.
- Sato, E., Kohno, M., Hamano, H., and Niwano, Y. (2006). Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. *Plant Foods for Human Nutrition* 61, 157-160,
- Schug, T.T., and Li, X. (2011). Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. *Annals of Medicine* 43, 198-211.
- Seo, Y., Gweon, O., Lee, Y., Kang, M., and Kim, J. (2009). Effect of garlic and aged black garlic on

- hyperglycemia and dyslipidemia in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Food Science and Nutrition* 14, 1-7.
- Sheen, L.Y., Chen, H.W., Kung, Y.L., Liu, C.T., and Lii, C.K. (1999). Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high-and low-fat diets. *Nutrition and Cancer* 35, 160-166.
- Tzang, B.S., Yang, S.F., Fu, S.G., Yang, H.C., Sun, H.L., and Chen, Y.C. (2009). Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. *Food Chemistry* 114, 1450-1455.
- Viollet, B., Ailhaud, Y., Mounier, R., Guigas, B., Zarrinpashneh, E., Horman, S., Lantier, L., Hebrard, S., Devin-Leclerc, J., and Beauloye, C. (2009). AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Frontiers in Bioscience* 14, 19-44.
- Wang, Y.W., and Jones, P.J. (2004). Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 28, 941-955.
- Wise, L. S., and Green, H. (2004). Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 273-275.
- Wu, C.C., Sheen, L.Y., Chen, H.W., Tsai, S.J., and Lii, C.K. (2001). Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food Chemical Toxicology* 39, 563-569.

七、實驗圖表

表 1、不同溶劑黑蒜萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞油紅染色、胞內三酸甘油酯與甘油-3-磷酸去氫酶活性之影響

Table 1. Effects of different solvent extracts of black garlic on OROSM, intracellular TG, and GPDH activity in 3T3-L1 adipocytes

	Different solvent extracts of black garlic ($\mu\text{g/mL}$)					
	0	5	10	25	50	100
OROSM (% of control)						
WEBG	100.0 \pm 4.5 ^a	97.9 \pm 1.7 ^a	93.7 \pm 2.0 ^a	97.3 \pm 2.3 ^a	92.3 \pm 1.8 ^a	80.2 \pm 1.8 ^b
MEBG	100.0 \pm 0.7 ^a	98.1 \pm 0.9 ^a	91.2 \pm 1.1 ^c	91.8 \pm 0.4 ^c	95.0 \pm 0.2 ^b	91.4 \pm 0.5 ^c
EEBG	100.0 \pm 2.5 ^a	99.2 \pm 3.0 ^{ab}	95.4 \pm 1.4 ^{ab}	92.7 \pm 1.2 ^b	96.8 \pm 1.4 ^{ab}	86.4 \pm 1.9 ^c
Intracellular TG (% of control)						
WEBG	100.0 \pm 2.2 ^a	92.7 \pm 2.0 ^a	96.6 \pm 1.5 ^a	98.3 \pm 3.5 ^a	97.7 \pm 2.4 ^a	96.2 \pm 4.2 ^a
MEBG	100.0 \pm 2.0 ^a	93.4 \pm 1.8 ^b	79.3 \pm 1.1 ^d	86.4 \pm 1.2 ^c	80.2 \pm 1.1 ^{cd}	74.4 \pm 3.7 ^d
EEBG	100.0 \pm 2.1 ^a	94.0 \pm 2.8 ^a	98.9 \pm 1.7 ^a	97.6 \pm 1.3 ^a	94.4 \pm 4.1 ^a	99.4 \pm 1.2 ^a
GPDH (% of control)						
MEBG	100.0 \pm 2.2 ^a	30.6 \pm 8.1 ^{bc}	11.9 \pm 1.8 ^c	33.2 \pm 6.7 ^b	20.4 \pm 7.2 ^{bc}	12.7 \pm 5.0 ^c

The reported values are the means \pm SEM ($n=3$). Mean values with different letters were significantly different ($p<0.05$). 3T3-L1 cells were treated with 0-100 $\mu\text{g/mL}$ of WEBG, MEBG, and EEBG for 48 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator.

表2、黑蒜甲醇萃取物對調控脂肪細胞相關訊息分子之影響

Table 2. Effect of MEBG on gene expressions of AMPK, Sirt1, PPAR γ , FAS, ACC, aP2, LPL, CD36, PGC-1 α , UCP1, adiponectin, resistin, MCP-1, and leptin in 3T3-L1 adipocytes

Gene expression* (% of control)	50 μ g/mL MEBG, 0-12 h					
	0 h	1 h	3 h	6 h	9 h	12 h
AMPK	1.00 \pm 0.00	0.12 \pm 0.01*	3.67 \pm 0.39*	7.73 \pm 0.78*	8.85 \pm 0.96*	4.57 \pm 0.48*
Sirt1	1.00 \pm 0.00	0.91 \pm 0.35	4.34 \pm 0.64*	29.5 \pm 8.5*	22.1 \pm 4.9*	8.53 \pm 0.75*
PPAR γ	1.00 \pm 0.00 ^a	0.36 \pm 0.14*	0.18 \pm 0.11*	0.14 \pm 0.14*	0.33 \pm 0.31*	0.36 \pm 0.25*
FAS	1.00 \pm 0.00 ^a	0.67 \pm 0.14*	0.35 \pm 0.20*	0.30 \pm 0.21*	0.38 \pm 0.31*	0.72 \pm 0.34
ACC	1.00 \pm 0.00	0.51 \pm 0.04*	0.27 \pm 0.10*	12.1 \pm 1.9*	21.1 \pm 5.1*	10.6 \pm 1.8*
aP2	1.00 \pm 0.00	0.75 \pm 0.06*	0.80 \pm 0.43	0.68 \pm 0.37	1.03 \pm 0.07	1.02 \pm 0.35
LPL	1.00 \pm 0.00	0.85 \pm 0.26	0.43 \pm 0.29*	0.31 \pm 0.24*	0.63 \pm 0.30	0.65 \pm 0.40
CD36	1.00 \pm 0.00	0.29 \pm 0.02*	0.92 \pm 0.15	8.83 \pm 0.81*	22.0 \pm 3.1*	12.4 \pm 1.7*
PGC-1 α	1.00 \pm 0.00	1.08 \pm 0.71	0.62 \pm 0.21*	26.3 \pm 2.9*	80.8 \pm 5.9*	41.4 \pm 7.7*
UCP1	1.00 \pm 0.00	0.40 \pm 0.37*	0.77 \pm 0.24	4.10 \pm 1.23*	4.62 \pm 1.93*	1.43 \pm 0.73
Adiponectin	1.00 \pm 0.00	2.04 \pm 1.11	1.14 \pm 0.39	9.32 \pm 2.43*	16.0 \pm 9.2*	13.7 \pm 5.9*
resistin	1.00 \pm 0.00	0.22 \pm 0.08*	0.01 \pm 0.01*	0.01 \pm 0.02*	0.06 \pm 0.01*	0.31 \pm 0.34*
MCP-1	1.00 \pm 0.00	0.90 \pm 0.22	0.83 \pm 0.24	0.71 \pm 0.14*	0.86 \pm 0.29	0.86 \pm 0.21
leptin	1.00 \pm 0.00	0.59 \pm 0.21*	0.04 \pm 0.03*	1.06 \pm 0.06	2.20 \pm 0.15*	0.83 \pm 0.50

*The reported values are the means \pm SD (n=3). * p < 0.05 indicates significant differences from the control group. 3T3-L1 adipocytes were treated with 50 μ g/mL of MEBG for 1, 3, 6, 9, and 12h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator.

表 3、黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之體重、食物攝取與能量攝取之影響

Table 3. Effect of MEBG on body weights, food intake, and energy intake of rats with obesity induced by a high-fat diet

Groups *	ND	HFD supplemented with MEBG (mg/kg rat)			
		0	50	150	300
Initial body weight (g)	315.2±3.1 ^a	312.5±1.5 ^a	312.3±1.5 ^a	310.7±1.7 ^a	312.3±1.6 ^a
Final body weight (g)	488.8±6.9 ^b	554.0±11.2 ^a	489.7±9.3 ^b	488.3±15.1 ^b	500.7±17.4 ^b
Food intake (g/rat/day)	22.1±0.3 ^a	19.0±0.3 ^b	18.7±0.3 ^b	18.9±0.3 ^b	19.2±0.3 ^b
Energy intake (kcal/rat/day)	87.6±1.2 ^b	94.6±1.6 ^a	92.8±1.6 ^a	94.7±1.6 ^a	95.4±1.7 ^a

*The reported values are the mean ± SEM ($n=8$). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

表 4、黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之臟器與脂肪組織重量之影響

Table 4. Effect of MEBG on the weights of organs and adipose tissue of rats with obesity induced by a high fat-diet

Tissue weights (mg/g rat) *	ND	HFD supplemented with MEBG (mg/kg rat)			
		0	50	150	300
Heart	2.76±0.04 ^a	2.73±0.07 ^a	2.72±0.06 ^a	2.75±0.06 ^a	2.70±0.07 ^a
Liver	26.8±0.7 ^a	27.6±0.8 ^a	26.4±0.4 ^a	26.5±0.6 ^a	26.0±0.7 ^a
Spleen	1.81±0.06 ^a	1.85±0.06 ^a	1.82±0.05 ^a	1.79±0.07 ^a	1.79±0.09 ^a
Lung	3.88±0.10 ^a	3.73±0.08 ^a	3.80±0.10 ^a	3.84±0.17 ^a	3.73±0.12 ^a
Kidney	6.41±0.36 ^a	6.30±0.13 ^a	6.68±0.16 ^a	6.57±0.10 ^a	6.40±0.21 ^a
Peritoneal fat	26.4±2.0 ^b	44.9±3.7 ^a	31.1±2.1 ^b	28.8±2.2 ^b	28.2±2.2 ^b
Epididymal fat	22.2±2.4 ^b	30.2±1.1 ^a	23.4±1.1 ^b	22.8±1.1 ^b	23.2±2.0 ^b

*The reported values are the mean ± SEM ($n=8$). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

表 5、黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之血清生化參數之影響

Table 5. Effect of MEBG on the serum biochemical parameters of rats with obesity induced by a high fat-diet

Biochemical parameters*	ND	HFD supplemented with MEBG (mg/kg rat)			
		0	50	150	300
Triglyceride (mg/dL)	79.9±6.0 ^b	108.4±13.3 ^a	75.8±5.0 ^b	71.3±4.9 ^b	80.1±4.6 ^b
Total cholesterol (mg/dL)	62.9±1.3 ^a	59.8±3.0 ^a	60.8±3.8 ^a	55.7±3.6 ^a	54.4±2.3 ^a
HDL-cholesterol (mg/dL)	42.2±1.5 ^a	28.9±2.2 ^c	37.1±2.9 ^{ab}	33.9±2.1 ^{bc}	31.8±1.3 ^{bc}
LDL-cholesterol (mg/dL)	11.2±0.5 ^a	13.4±1.5 ^a	12.0±0.7 ^a	11.1±0.9 ^a	10.4±1.0 ^a
AST (U/L)	92.0±4.8 ^a	85.3±1.9 ^a	86.9±4.1 ^a	82.9±4.1 ^a	84.6±4.8 ^a
ALT (U/L)	28.5±1.2 ^a	29.1±1.6 ^a	30.6±2.5 ^a	28.4±1.7 ^a	29.0±2.3 ^a
Uric acid (mg/dL)	5.43±0.54 ^a	5.82±0.37 ^a	5.98±0.43 ^a	5.46±0.53 ^a	5.58±0.48 ^a
Creatinine (mg/dL)	0.73±0.02 ^c	0.83±0.02 ^a	0.76±0.02 ^{bc}	0.74±0.02 ^c	0.80±0.02 ^{ab}
Na ⁺ (mmol/L)	151.9±2.5 ^a	153.1±2.7 ^a	151.5±3.7 ^a	153.6±2.7 ^a	152.5±2.6 ^a
K ⁺ (mmol/L)	7.29±0.42 ^a	7.14±0.24 ^a	7.46±0.45 ^a	7.19±0.57 ^a	7.39±0.42 ^a
Cl ⁻ (mmol/L)	101.1±1.5 ^a	100.8±1.8 ^a	100.3±2.5 ^a	100.4±1.1 ^a	99.5±1.7 ^a
Ketone body (mmol/L)	1.89±0.12 ^{bc}	2.67±0.13 ^a	1.88±0.13 ^{bc}	2.25±0.15 ^b	1.71±0.14 ^c
Free fatty acid (mmol/L)	0.12±0.01 ^b	0.15±0.01 ^a	0.12±0.01 ^b	0.12±0.01 ^b	0.13±0.01 ^b

*The reported values are the mean ± SEM (n=8). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

表 6、黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之肝臟與糞便總脂質、三酸甘油酯與膽固醇含量之影響

Table 6. Effect of MEBG on total lipid, triglyceride, and cholesterol in liver and fecal of rats with obesity induced by a high fat-diet

Contents	ND	HFD supplemented with MEBG (mg/kg rat)			
		0	50	150	300
Liver (mg/g tissue)*					
Hepatic total lipid	48.7±1.9 ^d	83.8±1.3 ^a	70.9±2.4 ^b	66.6±5.0 ^{bc}	60.5±2.8 ^c
Hepatic triglyceride	15.3±1.1 ^b	26.7±1.4 ^a	18.5±1.2 ^b	16.0±1.0 ^b	16.0±0.6 ^b
Hepatic cholesterol	3.52±0.24 ^c	6.86±0.24 ^a	4.57±0.34 ^{bc}	5.36±0.66 ^b	4.98±0.36 ^b
Fecal (mg/g dried fecal)*					
Fecal total lipid	30.6±2.3 ^c	55.6±2.6 ^b	77.7±4.1 ^a	76.9±5.8 ^a	68.1±2.2 ^a
Fecal triglyceride	4.83±0.38 ^c	6.24±0.25 ^b	7.50±0.30 ^a	7.32±0.33 ^a	7.61±0.22 ^a
Fecal cholesterol	3.14±0.10 ^c	4.39±0.28 ^b	6.08±0.16 ^a	5.95±0.14 ^a	5.46±0.10 ^a

*The reported values are the mean ± SEM ($n=8$). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

表 7、黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之脂肪和肝臟組織之脂質生合成、脂肪酸氧化和脂肪相關激素之基因表現影響

Table 7. Effect of MEBG on gene expressions of adipogenesis, fatty acid oxidation, and adipocytokines in adipose tissue and liver tissue of rats with obesity induced by a high-fat diet

Gene expression* (% of control)	ND	HFD supplemented with MEBG (mg/kg rat)			
		0	50	150	300
Adipose tissue					
AMPK	1.00±0.11 ^a	0.33±0.12 ^b	0.99±0.15 ^a	1.37±0.08 ^a	1.09±0.15 ^a
Sirt1	1.00±0.19 ^c	0.21±0.05 ^d	1.79±0.22 ^b	2.22±0.22 ^{ab}	2.54±0.21 ^a
PPAR γ	1.00±0.15 ^b	1.81±0.39 ^a	0.67±0.17 ^b	0.77±0.19 ^b	0.76±0.17 ^b
SREBP-1c	1.00±0.12 ^b	1.55±0.17 ^a	0.90±0.10 ^b	1.01±0.05 ^b	0.93±0.02 ^b
FAS	1.00±0.42 ^b	3.23±0.39 ^a	1.28±0.41 ^b	1.42±0.05 ^b	1.49±0.21 ^b
ACC	1.00±0.18 ^b	2.21±0.60 ^a	0.87±0.33 ^b	1.74±0.32 ^{ab}	1.26±0.15 ^{ab}
CD36	1.00±0.20 ^b	2.21±0.44 ^a	0.66±0.16 ^b	1.23±0.02 ^b	0.97±0.11 ^b
UCP1	1.00±0.30 ^a	0.81±0.28 ^a	3.22±0.77 ^a	2.68±0.97 ^a	3.09±0.89 ^a
Adiponectin	1.00±0.15 ^a	0.31±0.08 ^b	0.88±0.25 ^a	1.09±0.10 ^a	1.20±0.13 ^a
Leptin	1.00±0.27 ^b	3.80±0.26 ^a	1.21±0.20 ^b	3.76±0.09 ^a	3.28±0.18 ^a
PAI-1	1.00±0.08 ^b	3.19±0.63 ^a	1.00±0.22 ^b	0.83±0.16 ^b	1.08±0.05 ^b
Liver tissue					
AMPK	1.00±0.26 ^a	0.16±0.04 ^c	1.11±0.12 ^a	0.51±0.11 ^b	0.64±0.16 ^b
Sirt1	1.00±0.14 ^a	0.03±0.02 ^a	0.67±0.32 ^a	0.05±0.01 ^a	0.73±0.70 ^a

SREBP-1c	1.00±0.03 ^b	3.29±1.01 ^a	0.60±0.29 ^b	1.03±0.20 ^b	0.51±0.34 ^b
FAS	1.00±0.16 ^b	1.65±0.21 ^a	0.87±0.30 ^b	0.71±0.13 ^b	0.62±0.18 ^b
ACC	1.00±0.12 ^a	2.23±1.21 ^a	0.65±0.22 ^a	0.23±0.13 ^a	0.52±0.40 ^a
SCD1	1.00±0.28 ^b	3.74±0.53 ^a	0.98±0.21 ^b	0.89±0.16 ^b	1.14±0.11 ^b
PPAR α	1.00±0.28 ^a	0.06±0.05 ^b	0.52±0.12 ^{ab}	0.28±0.18 ^{ab}	0.56±0.44 ^{ab}

*The reported values are the means \pm SEM (n=3). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

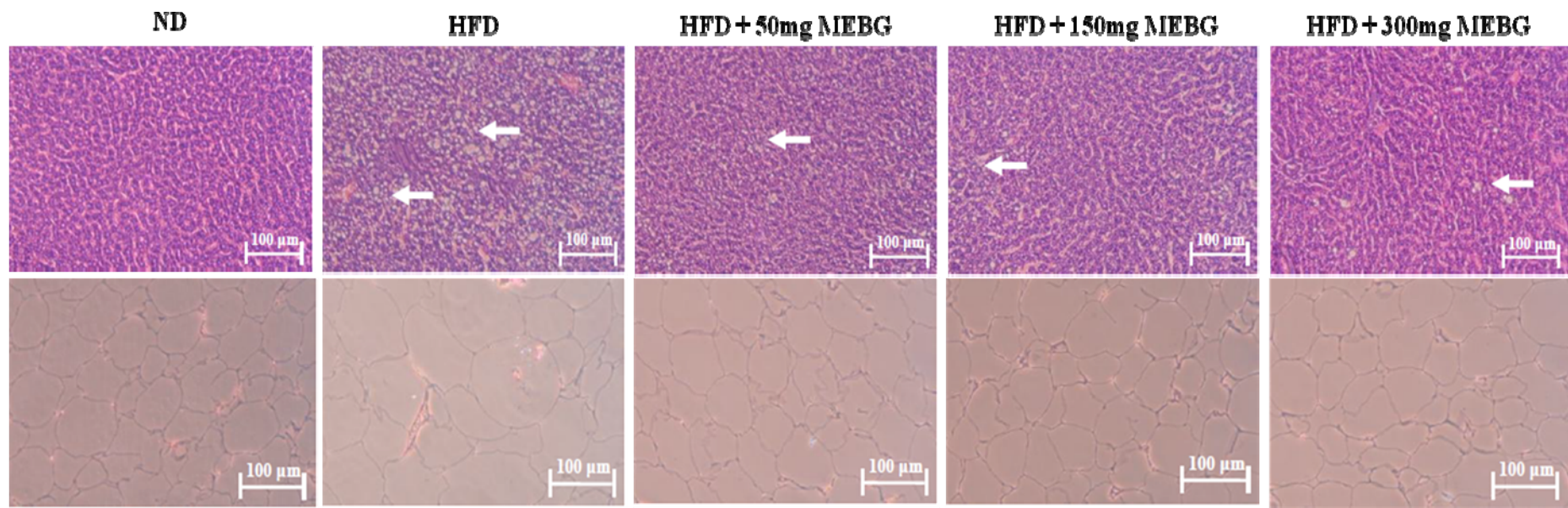


圖 1、黑蒜甲醇萃取物對高脂飲食誘導肥胖大鼠之肝臟和脂肪細胞大小之影響

Figure 1. Effect of MEBG on hepatosteatosis and adipocyte sizes of rats with obesity induced by a high fat diet. Liver were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Original magnification: 200 ×.

國科會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）

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）

本三年期研究計畫釐清黑蒜在體外與體內抗肥胖之作用，確實具有抑制體外脂肪細胞脂質生合成與改善體內高脂飲食誘導肥胖大鼠之作用，並得知黑蒜甲醇萃取物最具抑制作用。綜合上述結果證實，黑蒜甲醇萃取物具有抑制脂肪細胞脂質堆積與高脂飲食所誘導大鼠肥胖，其可透由活化 AMPK 與 Sirt1 之基因表現。預期本研究計畫成果，可於日後應用至健康食品開發，並提供相關產業界產品開發與功效評估之參考依據。

附件三：子計畫三

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

開發山葵萃取物於抑制大腸癌之保健功效與機轉之探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2632-B-040-001-MY3

執行期間：99年8月1日至102年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：周芬碧

共同主持人：

計畫參與人員：

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

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 102 年 09 月 日

中文摘要

大腸癌是全世界男性與女性因罹患癌症而死亡的主因，且發生率也高居不下，因此針對大腸癌之預防與治療的研究不斷受到重視。山葵(*Wasabia japonica*)俗稱芥末，其地下莖含豐富的機能性成分，如維生素 C 與 A、礦物質、微量元素、以及異硫氰酸鹽(isothiocyanates)成份。研究顯示山葵主要成分之一 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate (6-MITC)，具有解毒、抗發炎以及誘導癌細胞凋亡的能力，為一種有效的化學防癌物質。過去有關山葵的研究除了以 6-MITC 進行化學防癌的研究外，鮮少有文獻以山葵萃取物作為研究對象。因此本研究探討山葵萃取物對大腸癌細胞的毒性作用機轉，並評估其開發成抗癌保健食品或藥物的潛力。本研究以大腸癌細胞(Colo 205)為細胞模式。在 MTT 和 colony formation assay 結果發現，山葵的確會對 COLO 205 大腸癌細胞產生毒性並具有濃度與時間依賴性。為了確認細胞死亡的方式，使用 DAPI 染色發現細胞有 DNA 濃染的情形，流式細胞儀分析亦證明 subG1 的細胞數有增加，顯示高劑量的山葵萃取物則會使細胞走向 Apoptosis。接著以 Western blot 分析其路徑，山葵除了可活化 TNF- α 、Fas-L 和 Caspase 8/3 促使細胞產生外源性細胞凋亡，亦可透過調控 Bid、Cyt.C 和 Caspase 9 蛋白誘發粒線體所導致的細胞凋亡機制。另外，由 acridine orange 染色實驗結果顯示，細胞中有 AVOs 的形成，可以得知山葵萃取物亦會引發細胞自噬作用。以 Western blot 分析其路徑，山葵主要促進自噬作用的相關蛋白表現活化(Beclin-1、Atg5 和 LC3)，導致細胞產生自噬作用。為了進一步的證實山葵誘發 COLO 205 大腸癌細胞產生自噬作用所扮演的角色。利用自噬作用的促進劑 RAD001 (mTOR 抑制劑)合併山葵後發現，經由 MTT 和 AVO 染色發現細胞的毒性作用與自噬作用的現象明顯增加。以 Western blot 分析 LC3 的表現也顯著增加，證實山葵誘發自噬作用主要是促進細胞的死亡。最後，利用異種移植之動物實驗進一步的驗證。結果發現山葵確實會抑制腫瘤的生長。另外，利用大腸癌誘發動物實驗證實山葵可降低死亡率。綜合以上的結果我們可以知道山葵可透過促進大腸癌細胞凋亡以及自噬死亡的作用進而達到抑制大腸癌的效果，並增加存活率。這對於抗大腸癌上面的研究有著更進一步的發展，在未來抗癌的保健食品研發上面也有很大的幫助。

關鍵字：山葵、凋亡、自噬作用、腸癌和保健食品

Abstract

Colon cancer is one of the most common causes of cancer-related deaths worldwide. *Wasabia japonica*, usually called Wasabi, is used as spicy sauce in Japan and Taiwan. The rhizome of *Wasabia* is rich in vitamin C and A, minerals, trace elements and isothiocyanates. Studies showed that one of the major ingredients of Wasabi, 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MITC), possessed the activities of detoxification, anti-inflammation, and inducing apoptosis of cancer cells. Up to the present, most of the studies of Wasabi were focused on the function of 6-MITC instead of crude extract, and there is no study reporting the cytotoxicity and mechanism of Wasabi against colon cancer. This study aimed to look into the molecular mechanism of the cytotoxicity of Wasabi in colon cancer cells to evaluate the potential of Wasabi as a functional food for chemotherapy. The results of MTT assay and colony formation assay revealed that Wasabi was cytotoxic to Colo 205 cells dose and time-dependently. Increases in chromatin condensation and subG1 population were observed in the cells treated with Wasabi indicating an induction of apoptotic cell death. Wasabi induced extrinsic apoptosis and mitochondrial death machinery by extracellular stimuli pathways through activation of TNF- α , Fas-L, caspase 3/8/9, cleaved-Bid and release of mitochondrial Cyt.C. We also proved the induction of autophagy by Wasabi via promoting LC3-II in Colo 205 cells. Using RAD001, an autophagy agonist, combined with wasabi extract the data suggested that autophagy played a pivotal role for the induction of colon cancer cell death. The xenografts verified that tumor growth was repressed by Wasabi treatment. Taken together, our studies reveal that the anti-cancer function of Wasabi was via the induction of apoptosis and autophagic cell death in colon cancer.

The chemical-induced colon cancer mice model showed that mortality was decreased in Wasabi treatment group. These studies support the application of Wasabi as chemopreventive functional food and treatment of colon cancer in the future.

Keywords : wasabi, apoptosis, autophagy, colon cancer and functional food

報告內容

一、前言：

根據行政院衛生署101年的統計顯示，國人的大腸直腸癌仍高居男性與女性癌症死亡之第三位，而發生率則高居第一位，足見大腸直腸癌的防治對於保護國人健康之重要。結腸癌的治療以手術切除為主，直腸癌的治療包括手術切除、術前之同步化放療及術後同步化放療等方法。雖然直腸癌的治療以根除手術為主，但仍有高達百分之30至70的局部復發率(1)，因此在1990年美國Institutes of health consensus conference 建議第二及第三期的直腸癌術後須給予放射線治療。近來有越來越多的研究採用術前的放射線治療，不論是否合併化學治療。有數個隨機研究比較了術前化放療與單獨手術兩者，都證實前者增加局部控制率，以及一般存活率(overall survival) (2, 3)。另有一項比較術前化放療與術後化放療的研究指出，前者有較低的局部復發率(4)。術前的放射治療，不論合併化學治療與否，其主要目的是達到使腫瘤縮小而增加手術切除率，並進而減少局部復發率及改善存活率。

影響直腸癌術後復發的因素包括：腫瘤侵犯的深度(T stage)、細胞分化的程度、以及鄰近淋巴結是否有轉移等，T3及T4期別的患者其腫瘤轉移到mesorectal 淋巴結的機會大約百分之36-79，相對於T1及T2期別的患者，其mesorectal 淋巴結轉移的機率只有0-28百分比(5)。由於直腸癌對於化學放射治療的反應差異性頗大，臨床上根據一些指標來評估病患的存活率與局部控制率，這些重要的臨床指標包括臨床分期(採用AJCC TNM staging system)、Dworaktumor regression grade (TRG)、術前化放療前後tumor downstaging (pT)變化、是否施行TME手術以及術前化放療淋巴結的轉移(pN)等。在大腸癌的研究方面，有些研究分析了生物指標(biomarkers)做為大腸癌療效及預後的指標，這些biomarkers與細胞增生(proliferation)、細胞凋亡(apoptosis)、血管新生(neoangiogenesis)、DNA mismatch repair、與5-fluorouracil 代謝有關蛋白表達等生物指標，這些研究結果互異，仍未有定論。

由於大腸直腸癌在國內的癌症發生率高居第三位，威脅國人健康甚巨，國健局將之列為癌症防治重點之一。結腸癌的治療以手術為主，而對於局部晚期的直腸癌僅手術治療仍有很高的復發率，化學治療合併放射治療已成為標準治療共識，因此開發新藥物或加強現有化放療的療效是當務之急。

山葵(Wasabia japonica)俗稱芥末，在日本與台灣常被當作食物的辣味調料。山葵地下莖含豐富的機能性成分，如維生素C與A、礦物質、微量元素、以及異硫氰酸鹽(isothiocyanates)成份。研究顯示山葵主要成分之一6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate (6-MITC)，具有解毒(6, 7)、抗發炎(8-10)以及誘導癌細胞凋亡(apoptosis)的能力(11)，卻不會造成正常細胞的傷害，為一種有效的化學防癌物質。研究並在*in vitro*和*in vivo*模式證實6-MITC具有抑癌的能力，如抑制乳癌及黑色素瘤細胞的生長(12)、抑制黑色素瘤細胞的轉移(13)，以及抑制由4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butnone 引發的肺癌(14)和MNNG引起的胃癌(15)。山葵中的其他成份亦被認為具有抗癌的效果，如monogalactosyl diacylglycerides可以抑制癌細胞的增生(16)。

過去有關山葵的研究除了以6-MITC進行化學防癌的研究外，鮮少文獻以山葵萃取物作為研究對象。本研究室於前置實驗中以山葵萃取物(Wasabia extract)為實驗材料，篩選其對不同的癌細胞株的毒性(包括乳癌、肺癌、肝癌與腸癌)，發現山葵萃取物對極惡性腸癌細胞(Colo 205)具有細胞毒性，可引發細胞停滯在G2/M期以及凋亡。將其合併抗癌藥使用可加強抗癌藥殺死腸癌細胞的作用。這些證據支持山葵具有潛力開發成抗腸癌的保健食品。

二、 研究目的:

大腸直腸癌在國內的癌症發生率高居第三位，威脅國人健康甚巨，國健局將之列為癌症防治重點之一。結腸癌的治療以手術為主，而對於局部晚期的直腸癌僅手術治療仍有很高的復發率，化學治療合併放射治療已成為標準治療共識，因此開發新藥物或加強現有化放療的療效是當務之急。

台灣加入世界組織後，面臨外國進口農產品的競爭，農業轉型朝向精緻農業發展是因應之道。山葵為高單價作物，其種植過去以野生為主，現今則有農民掌握組織培養技術，先培育植株，再以契作方式交由農民於溫室中種植，因此山葵的生產穩定，品質得以保證，並可排除肥料與農藥的使用。山葵的用途現今以食用為主，若能開發其其他功效，尤其是抗癌方面的效用，其經濟價值將可大為提升，配合組織培養技術的開發，應可將山葵推廣為台灣未來的高經濟的精緻農業作物。

至今未有文獻報告有關於山葵萃取物對腸癌細胞的毒性及其作用機制。本研究探討山葵萃取物對腸癌細胞的毒性作用機轉，評估其開發成抗癌保健食品的潛力。

三、 實驗方法:

1. 山葵的萃取

將買來新鮮的山葵磨碎後加入等量的水量，均勻混和後3500 rpm、10分鐘離心，取上清液再用濾紙過濾，過濾後的汁液用100°C溫度加熱10分鐘，放涼後再以3500 rpm、10分鐘離心一次，離心完後的上清液再用濾紙過濾一次，最後所得到的山葵萃取汁液放置放-80°C冰箱結冰後使用冷凍乾燥機收取萃取粉末，存放於-20°C冰箱中待用。

2. 細胞培養

細胞以含有10% Fetal bovine serum、1.5 g/L Sodium bicarbonate、4 mM glutamine、1 mM Penicillin-Streptomycin的RPMI 1640培養液培養於5% CO₂、37°C的恆溫環境。

3. 細胞毒性試驗 (cytotoxicity assay)

於24 well之培養皿中接種 1×10^5 之細胞，當細胞生長至6~8分滿，分別加入不同濃度的萃取物，並分別於24、48或72小時染色觀察及收集細胞進行分析。細胞以PBS輕洗兩次後，換上新鮮的培養液1 ml，加入20 μ l tetrazolium (25 mg/ml)。培養4小時，移除培養液，加入1ml isopropanol，以peppetman來回打散均勻，直接吸1ml以波長563nm測吸光。

4. Colony Formation Assay

首先配製2倍濃度的培養液，在其中所加入的FBS以及其他添加物和藥物都是兩倍的濃度待用。配製1.2%以及0.66%兩種濃度的Agarose，置於55°C水浴中，使其保持液態。將Agarose與培養液以1:1的方式混合倒入dish中，下層膠所要的最終濃度為成份0.6%，放置30分鐘等待凝固後，再倒細胞層，將培養液加入Agarose混合後再放入細胞，細胞數為 1×10^3 cell/ml，注意溫度不可太高，細胞層膠體最終濃度為0.33%。等待細胞層膠凝固後再倒入0.6%的上層膠，將細胞層夾在中間。置放入37°C、5% CO₂培養箱培養14天，直到肉看的見細胞群落後取出計數拍照記錄。

5. 細胞週期分析

細胞經藥物處理24及48小時，以FACScan分析。以PBS洗滌細胞2次，以400 g轉速離心5分鐘，去除上清液後加入250 μ l solution A (trypsin buffer)與細胞混合均勻，在室溫作用10分鐘，再加入solution B (trypsin抑制劑及RNase buffer)，作用10分鐘，後以solution C (propidium iodide)於暗處，0°C環境下，染色10分鐘，以flow cytometry分析。

6. DAPI 螢光染色法

細胞經放射線處理之後，以PBS清洗細胞兩次，加入DAPI螢光染劑，在37°C下避光反應30分鐘。以PBS清洗細胞後，利用倒立螢光顯微鏡觀察細胞核與DNA濃染之現象並拍照。

7. Western blotting

將處理好的細胞蛋白質樣本以10%的SDS-PAGE, 150V電流分離。電泳完畢後將蛋白

轉漬到硝化纖維紙上。轉漬完後將硝化纖維紙取出，用PBS-T buffer 漂洗約5分鐘後，以5% blocking buffer 於室溫下溫和作用1小時。用PBS-T buffer 漂洗後，換上一級抗體(primary Ab) 於室溫下溫和作用一小時，再以PBS-T buffer 漂洗3次。換上二級抗體(secondary Ab) 於室溫下溫和作用1小時。再以PBS-T buffer 漂洗3次後，以ECL冷光系統呈色。

8. Acridine Orange Staining

細胞經不同劑量的萃取物處理後，以PBS清洗三次，至換新的培養液，加入 acridine orange 染劑 (1 µg/ml) 染色 15 分鐘，以 PBS 清洗三次後加入新的培養液，於螢光顯微鏡下觀察細胞螢光之變化，並拍照。

9. Xenografts動物實驗

以nude mice為model，在mice 5~6 週時s.c.注射 5×10^5 的細胞至右後腿，待腫瘤長至100 mm³時開始進行治療。動物將分成4組(Control、RAD001、山葵與山葵+RAD001)，分別進行不同之處理，每組6隻。山葵水萃取物(250 mg/kg)採管灌每日餵食，RAD001(2.5mg/kg)採腹腔注射每週三次。實驗過程中定期記錄動物腫瘤的變化。42天後犧牲mice評估療效。評估項目有腫瘤大小。

10. 腸癌誘發動物實驗

以公的 CD-1 (ICR) 老鼠為模式，組別分別為正常飲食組包含:對照、誘導和誘導+山葵組別，在老鼠 6 週大時開始進行誘發腸癌的實驗，首先以腹腔注射方式注射 1,2-dimethylhydrazine (DMH) (20mg/kg)，一週後再餵食 2% 的 dextran sodium sulfate (DSS)，以溶於飲用水中的方式給予老鼠飲用一週，誘導結束後接著以管灌餵食方式餵食山葵 (低劑量 25mg/kg 或高劑量 100mg/kg)，實驗過程中定期記錄動物的變化。

11. 實驗數據統計分析

所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA)進行student t-test 或one-way analysis of variance或t-test分析。

四、 結果與討論：

1. 山葵萃取物對大腸癌 Colo 205 細胞毒性分析

Colo 205 細胞在加入山葵萃取物處理經過 24 小時後，細胞相對存活率在山葵萃取物濃度 0.1~1 mg/mL 時有增生的趨勢，但是濃度在 1.5 mg/mL 以及 2 mg/mL 對細胞有毒殺效果。將處理的時間拉長至 48 小時以及 72 小時，處理山葵萃取物濃度 0.1~1 mg/mL 的組別中，細胞增生受到了抑制，在山葵萃取物濃度 2 mg/mL，處理 48 以及 72 小時細胞存活率為 47.7% 和 7.1% (Fig. 1)。

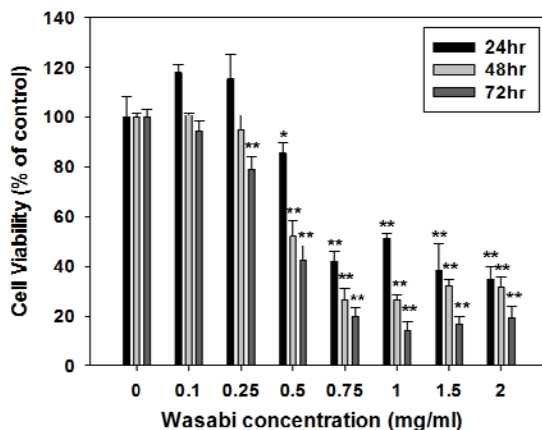


Figure 1 Cytotoxic effects of wasabi extract on Colo 205 cells. Cells were treated with various doses of Wasabi for 24, 48 and 72 hr before subjected to MTT assay for cell viability.

2. 長時間山葵萃取物處理對大腸癌 Colo 205 細胞的影響

Colo 205 為半懸浮性生長，以 Colony Formation Assay 觀察長時間山葵萃取物處理對結腸直腸癌細胞的影響。細胞在含有山葵萃取物的 soft agar 生長兩個星期，在 Fig. 2 的左邊圖片裡可以觀察到在空白對照組(Control)中有明顯的白點，為細胞所長成的 Colonies。其他有加入山葵萃取物的組別中沒有觀察到 Colony 的形成。以倒立顯微鏡觀察，空白對照

組中的 Colonies，細胞明顯的形成團聚狀。而加入山葵萃取物的組別裡，觀察到的細胞都成單顆存在，並沒有觀察到有長成 Colony。

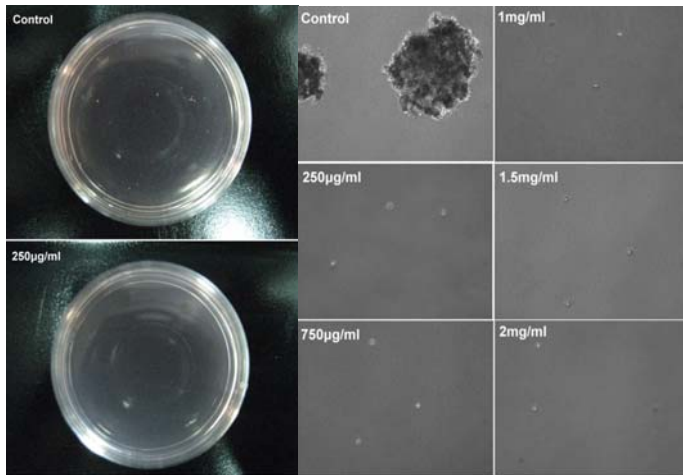


Figure 2 Inhibitory effects of wasabi extract on Colo 205 cell growth. Cells treated with various doses of Wasabi were analyzed by soft agar clonogenic assay for 2 weeks.

3. 山葵萃取物處理大腸癌 Colo 205 細胞之 DAPI 細胞螢光染色

DAPI stain 為染色體 condensation 的指標，染色結果顯示山葵萃取物處理可以看到在 48 小時濃度 1.0 mg/ml 的組別有明顯的核濃染現象(Fig. 3)。由此可以推論 Colo 205 細胞可能走向的死亡方式為 Apoptosis。

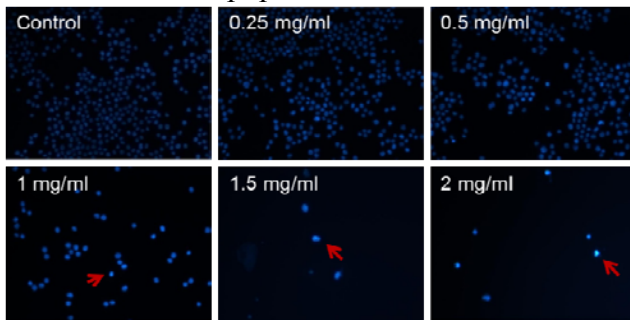


Figure 3 Induction of DNA condensation of Colo 205 cells by wasabi extract. Cells were treated with various doses of Wasabi for 48 hr before subjected to DAPI stain.

4. 山葵萃取物處理大腸癌 Colo 205 細胞之細胞週期分析

Flow cytometry assay 分析細胞週期，結果顯示在 48 小時的分析圖中，隨著山葵萃取物濃度的增加，G0/G1 區域的數值會下降，而 SubG1 的區域數值則會上升，G2/M 的數值也有所上升(Fig. 4)。

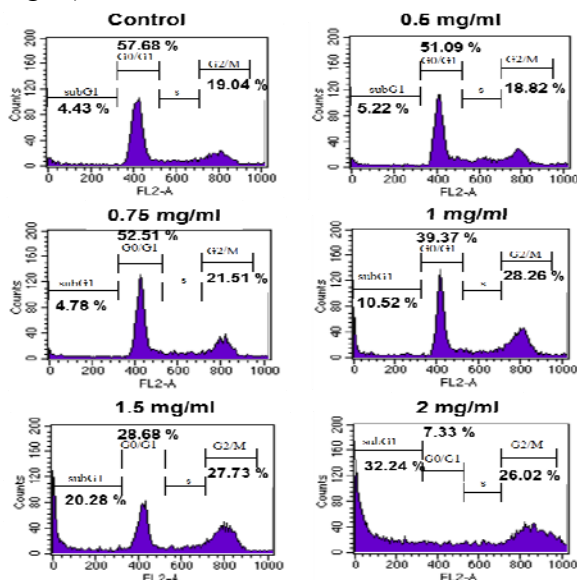


Figure 4 Induction of apoptosis of Colo 205 cells by wasabi extract. Cells were treated with various doses of Wasabi for 48 hr before subjected to flow cytometry analysis.

5. 山葵萃取物對大腸癌 Colo 205 細胞凋亡機制分析

Colo 205細胞在加入山葵萃取物處理經過48小時後，利用 western blotting 分析 apoptosis 相關蛋白。外源性路徑所導致的 apoptosis 相關蛋白 Fas-L、TNF- α 及 Caspase 8、Caspase 9 和 Caspase 3 皆隨著山葵萃取物的濃度增加而上升(Fig. 5A and B)。另外，進一步分析是否山葵亦會透過內源性路徑而導致 apoptosis，實驗結果顯示 p53 和 Bax 的蛋白表現皆隨著山葵萃取物的濃度增加而下降(Fig. 5C)，因此證實山葵導致 Colo 205 細胞凋亡主要是透過外源性的路徑。但是在抑制 apoptosis 的蛋白 Bcl-x1 表現也隨之下降(Fig. 5D)。因此進一步的探討 Caspase 9 的表現是否是透過 Bid 被切割活化的路徑。結果在高濃度(0.75、1 和 1.5 mg/ml)的山葵處理下 Bid 蛋白表現有明顯減少，活化的 tBid 則有上升的現象，而且在細胞質中的 Cytochrome C (Cyt.C)蛋白表現亦有隨之上升的現象 (Fig. 5E)。因此證實山葵會導致細胞產生外源性及誘發粒線體產生 apoptosis。

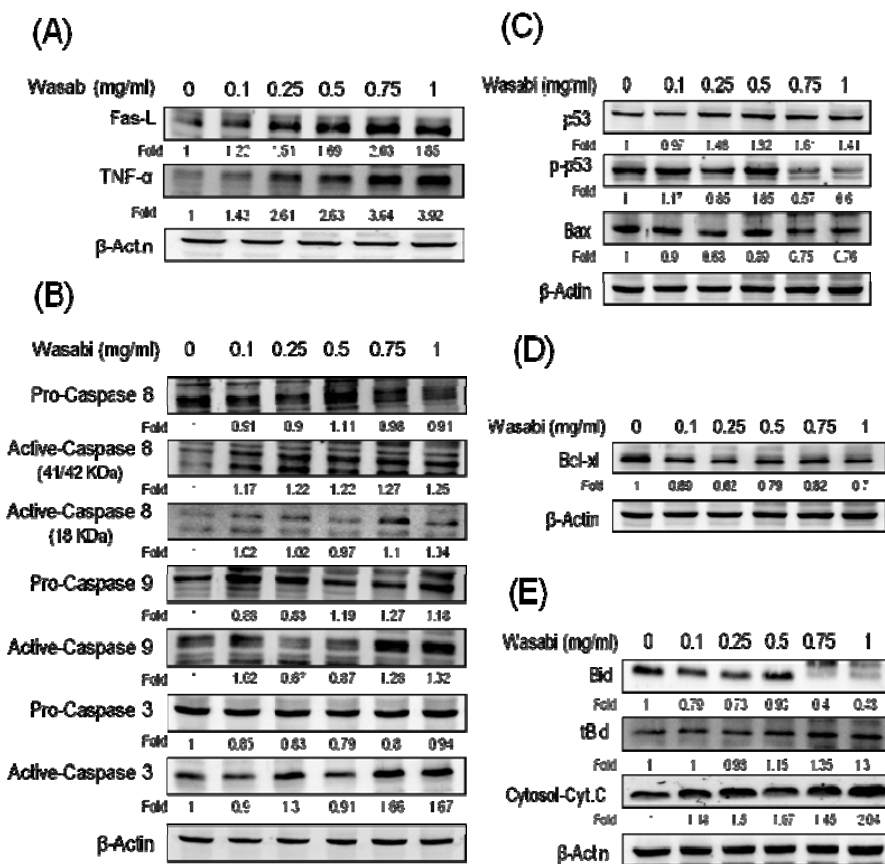


Figure 5 The proteins expression of apoptosis of Colo 205 cells by wasabi extract. Cells were treated with various doses of Wasabi for 48hr before subjected to western blotting. (A) Fas-L and TNF- α , (B) Caspase 8/9/3, (C) P53, p-P53 and Bax, (D) Bcl-x1, (E) Bid, tBid and Cyt.C.

6. 山葵萃取物對大腸癌 Colo 205 細胞自噬作用的影響

AVO (Acidic vascular organelles) stain 為自噬作用 (autophagy) 的指標。Colo 205 細胞在山葵萃取物不同濃度(0、0.25、0.5、0.75、1 和 1.5 mg/ml)處理 48 小時後，在濃度 0.75 mg/ml 可以觀察到細胞有染上 Acridine orange 的紅色螢光(Fig. 6)。

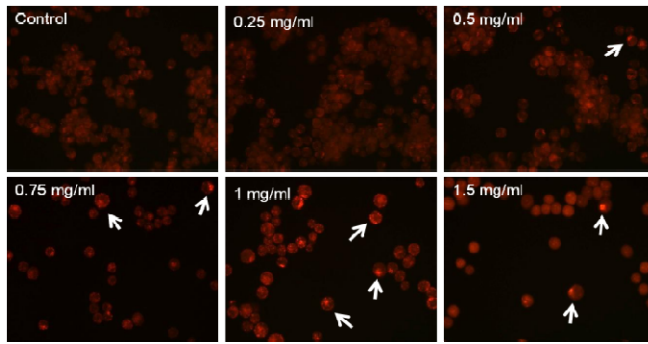


Figure 6 Induction of autophagy of Colo 205 cells by wasabi extract. Cells were treated with various doses of Wasabi for 48hr before subjected to acidic vascular organelles (AVO) stain.

7. 山葵萃取物導致大腸癌 Colo 205 細胞自噬作用之訊息調控分析

利用 western blotting 分析 autophagy 相關蛋白的表現。結果發現，細胞經過不同濃度的山葵處理 48 小時後，抑制 autophagy 表現的蛋白 Akt 和 mTOR 表現明顯下降(Fig. 7A)。另外，促進 autophagy 表現的蛋白 Atg5 和 LC3 則明顯地隨著山葵濃度增加而上升，而 Beclin-1 蛋白表現則無明顯差異(Fig. 7B)。因此證實山葵導致 Colo 205 細胞產生 autophagy 的現象是透過抑制 Akt 和 mTOR 進而活化 LC3 所造成的。

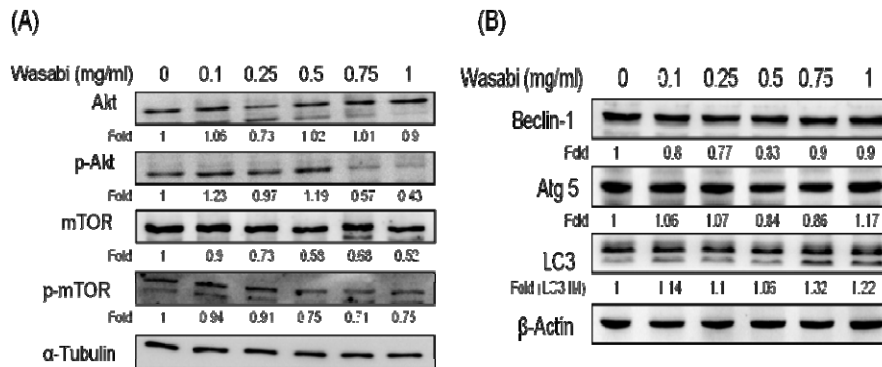


Figure 7 The proteins expression of autophagy of Colo 205 cells by wasabi extract. Cells were treated with various doses of Wasabi for 48hr before subjected to western blotting. (A) Akt, p-Akt, mTOR and p-mTOR, (B) Beclin-1, Atg5 and LC3.

8. 山葵萃取物導致大腸癌 Colo 205 細胞產生自噬作用的角色

為了探討山葵導致 Colo 205 細胞產生 autophagy 的作用角色，因此利用 autophagy 的促進劑 RAD001，亦是 mTOR 的抑制劑，進一步的釐清。在 MTT 細胞毒殺實驗結果顯示，細胞在合併處理山葵和 RAD001 後，相較於單獨處理山葵之組別其細胞毒殺效果有隨著山葵濃度增加而上升的趨勢(Fig. 8A)。另外，在 AVO 染色結果可以發現，細胞經過合併處理山葵和 RAD001 48 小時之後，在濃度 0.25 mg/ml 即可觀察到細胞染上 Acridine orange 的紅色螢光(Fig. 8B)。而在經過合併處理山葵和 RAD001 48 小時之後，LC3 蛋白表現也有明顯增加的現象(Fig. 8C)。綜合以上結果證實，山葵導致 Colo 205 細胞產生 autophagy 的作用主要是扮演著促進細胞的死亡而非保護細胞的作用角色。

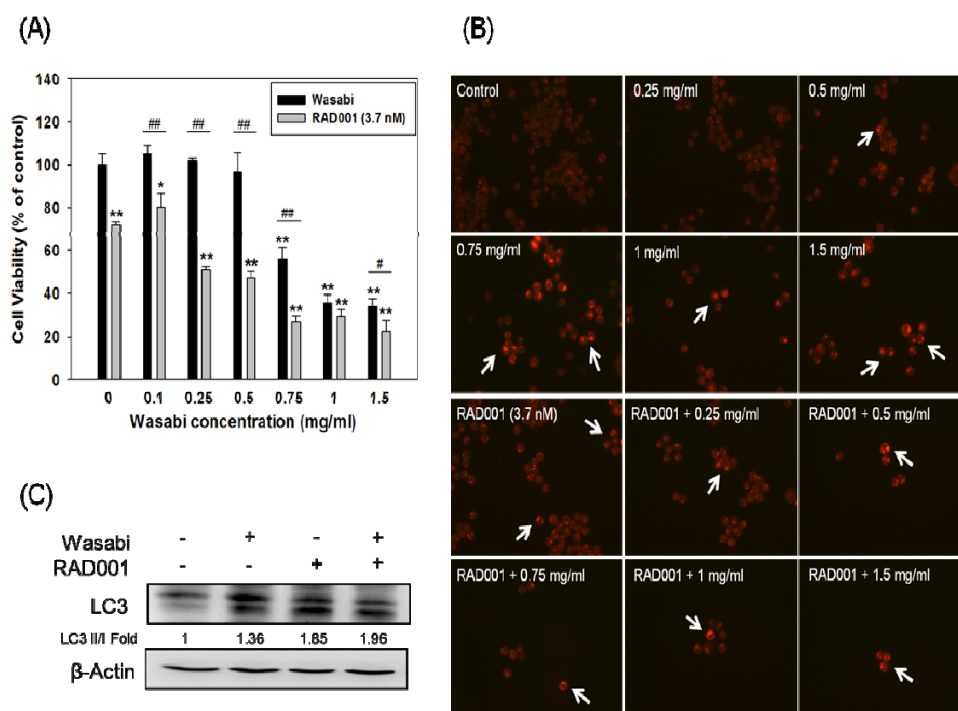


Figure 8 Effects of Wasabi combined with RAD001 in Colo 205 cells. Cells were treated with or without RAD001 (3.7 nM) and indicated concentrations of Wasabi for 48hr. (A) Cell viability was performed by MTT assay. (B) AVO formation was analyzed by acridine orange staining. (C) Cells were treated with or without RAD001 (3.7 nM) and Wasabi (0.25 mg/ml) for 48hr. Western blot showed LC3 expression. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ compared with control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$ compared with cells treated with RAD001.

9. 山葵萃取物對大腸癌 Colo 205 細胞 Xenografts 腫瘤生長的影响

在 *in vitro* 中證實山葵確實對結腸直腸癌 Colo 205 這株細胞有所影响，因此我們接著想進一步的利用動物實驗模式來證實山葵的功效。利用 BALB/c 裸鼠經由皮下注射 Colo 205 細胞，待腫瘤形成後，隨機分成四組: Control、RAD001(2.5 mg/kg)、山葵(250 mg/kg)和山葵(250 mg/kg) + RAD001(2.5 mg/kg)，連續觀察六週。結果顯示，在單獨餵食山葵與 Control 組別老鼠比較其腫瘤生長速率有明顯下降的現象。另外，在合併餵食山葵和 RAD001 的組別可以發現老鼠腫瘤的生長速率明顯比單獨餵食山葵或 RAD001 組別來的低(Fig. 9)。

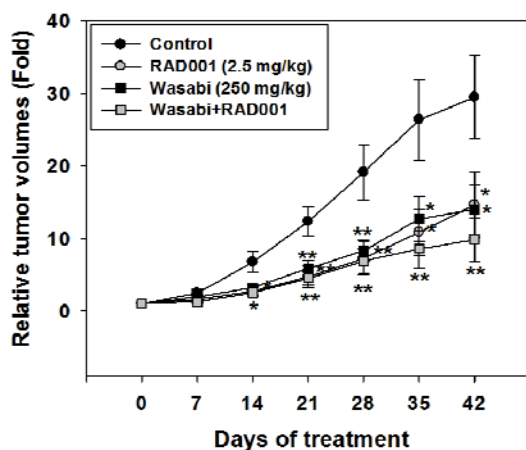


Figure 9 Growth inhibition of tumor treated with Wasabi in nude mice. Colo 205 cells were inoculated subcutaneously into nude mice and treated with Wasabi for 42 days.

10. 山葵萃取物對大腸癌誘發老鼠的影響

利用大腸癌致癌物 DMH (Dimethylhydrazine) 和腸炎誘發物 DSS (Dextran sodium sulfate) 進行老鼠大腸癌誘發的實驗模式。本實驗使用 CD-1(ICR) 小鼠進行大腸癌誘發之動物實驗模式。實驗組別分為: Control、誘導(Induction)、誘導 + 低劑量山葵(25 mg/kg; IWL) 和誘導 + 高劑量山葵(100 mg/kg; IWH) 四組。老鼠經過 DMH 和 DSS 處理之後, 再進行山葵餵食, 觀察 27 週。我們可以觀察到, 在餵食山葵以及誘導組別老鼠體重的增加速率比 Control 組別來的低(Fig. 10A)。另外, 在老鼠肝臟的重量也明顯發現, 餵食高劑量山葵組別的老鼠比誘導組別低(Fig. 10B)。但是在老鼠大腸長度的觀察則發現, 無論是誘導、低劑量或高劑量山葵組別的老鼠其大腸長度明顯比 Control 組的老鼠短(Fig. 10C)。在餵食高劑量山葵組別的老鼠產生血便和直腸脫垂現象與誘導組別明顯減少許多(Table 1 和 2)。但是在誘導組別老鼠的大腸產生 dysplasia 的現象為 100%, 而在餵食低劑量與高劑量山葵的組別分別為 75% 和 77.78% (Table 3)。最後存活率的分析可以發現, 在誘導(44.44%) 及餵食低劑量山葵(55.55%) 組別老鼠的存活率比 Control(100%) 和餵食高劑量山葵(100%) 組別來的低 (Fig. 10D)。

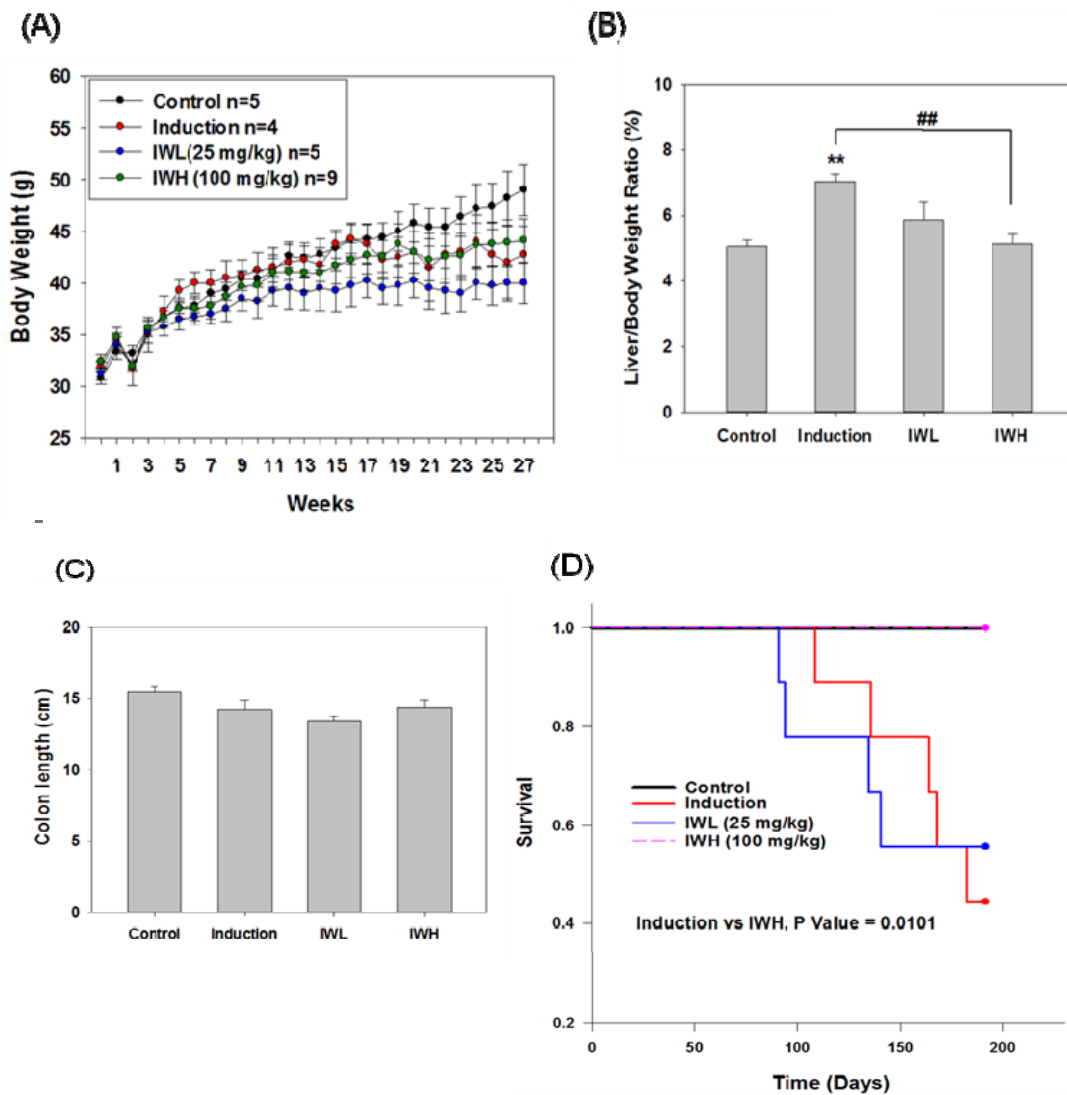


Figure 10 Effects of Wasabi on the body weights in DMH and DSS-treated mice. (A) The body weights were measured once a week. The liver weights (B), and large bowel lengths (D) were analyzed. (E) The survival curves was exhibit. IWL (Induction + 25 mg/kg Wasabi), IWH (Induction + 100 mg/kg Wasabi).

Table 1. Effects of Wasabi on the incidence of bloody stool in each group.

Incidence of Bloody Stool			
Rectal Bleeding	Number	Rate (%)	P Value
Control, n=5	0	0	0.003
Induction, n=9	8	88.89	-
IWL (25 mg/kg), n=9	6	66.67	0.576
IWH (100 mg/kg), n=9	2	22.22	0.015

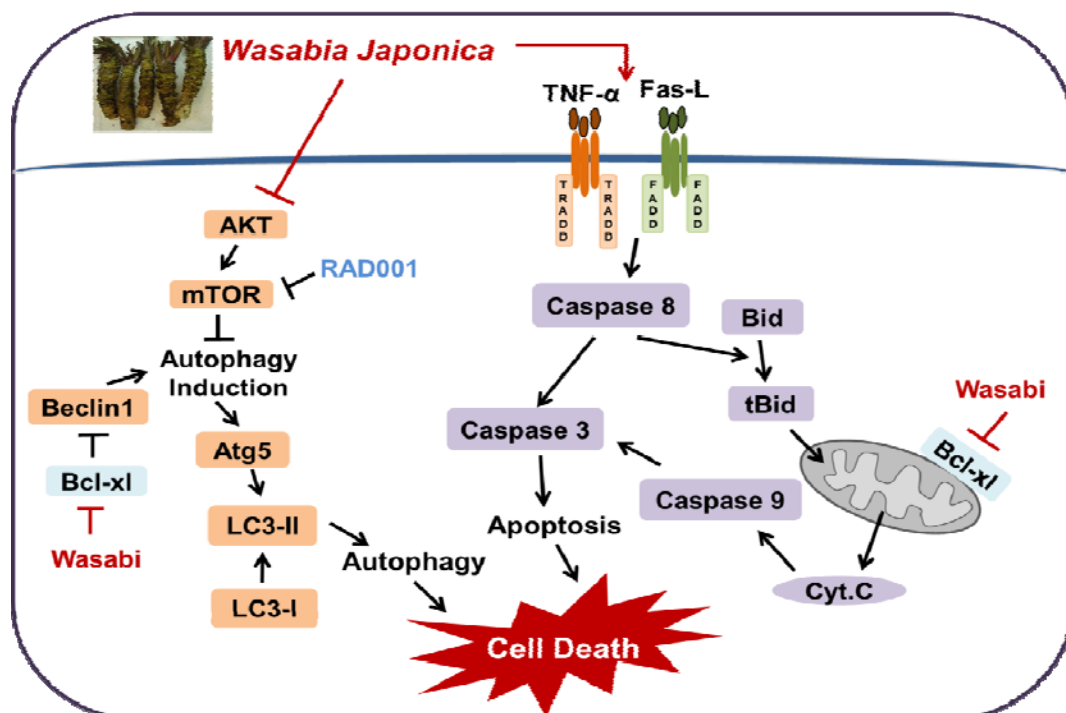
Table 2. Effects of Wasabi on the incidence of rectal prolapse in each group.

Incidence of Rectal Prolapse			
Rectal Prolapse	Number	Rate (%)	P Value
Control, n=5	0	0	0.031
Induction, n=9	6	66.67	-
IWL (25 mg/kg), n=9	6	66.67	1
IWH (100 mg/kg), n=9	1	11.11	0.05

Table 3. Effects of Wasabi on the incidence of colonic dysplasia in each group.

Incidence of colonic dysplasia			
	Number	Rate (%)	P Value
Control, n=5	0	0	0.008
Induction, n=4	4	100	-
IWL (25 mg/kg), n=4	3	75	1
IWH (100 mg/kg), n=9	7	77.78	0.094

Colo 205 細胞是一株非常惡性的結腸直腸癌細胞，在 Duke's 分期裡為 D 期。綜合上述研究結果顯示山葵萃取物會使大腸癌 Colo 205 細胞引發 apoptosis。主要是透過外源性 (Fas-L/TNF- α) 以及外源性誘導粒線體所引發的 apoptosis 路徑。另外，山葵萃取物亦會透過抑制 AKT/mTOR 進而促使 ATG5 和 LC3 表現導致 autophagy 的產生。但是此引發的 autophagy 最終是扮演著保護細胞還是促進細胞死亡的角色？為了證實此作用，我們利用 autophagy 的促進劑 RAD001 來證實。在 MTT 結果發現 RAD001 會促進細胞的死亡，在 AVO 中 RAD001 會誘導 autophagy 的表現增加，並且在 Western blotting 的結果發現 LC3 蛋白表現亦會增加。因此我們證實山葵會誘發大腸癌 Colo 205 細胞產生 apoptosis 和 autophagic cell death。最後在動物實驗中驗證了山葵萃取物的確會減緩腸癌腫瘤的生長以及降低死亡率的發生。這對未來在抗癌的保健食品或藥物研發上面將有很大的幫助。下圖是本實驗結果所歸納的結論。



参考文献

1. Bleday R, Wong WD (1993) Recent advances in surgery for colon and rectal cancer. *Curr Probl Cancer* 17, 1-68.
2. Miller E, Kinsella TJ (1992) Radiosensitization by fluorodeoxyuridine: effects of thymidylate synthase inhibition and cell synchronization. *Cancer Res* 52,1687-1694.
3. Brusco CE, Shewach DS, Lawrence TS (1990) Fluorodeoxyuridine-induced radiosensitization and inhibition of DNA double strand break repair in human colon cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19, 1411-1417.
4. Seifert P, Baker LH, Reed ML, et al. (1975) Comparison of continuously infused 5-fluorouracil with bolus injection in treatment of patients with colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 36, 123-128.
5. Brodsky JT, Richard GK, Cohen AM, Minsky BD (1992) Variables correlated with the risk of lymph node metastasis in early rectal cancer. *Cancer* 69, 322-326.
6. Kinae N, Masuda H, Shin IS, et al. (2000) Functional properties of wasabi and horseradish. *Biofactors* 13, 265-269.
7. Morimitsu Y, Nakagawa Y, Hayashi K, et al. (2002) A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J Biol Chem* 277, 3456-3463.
8. Uto T, Fujii M, Hou DX (2007) Effects of 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate on cyclooxygenase-2 expression induced by lipopolysaccharide, interferon-gamma and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Oncol Rep* 17, 233-238.
9. Uto T, Fujii M, Hou DX (2005) Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 transcription by 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate, a chemopreventive compound from *Wasabia japonica* (Miq.) Matsumura, in mouse macrophages. *Biochem Pharmacol* 70, 1772-1784.
10. Uto T, Fujii M, Hou DX (2005) 6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate suppresses inducible nitric oxide synthase expression through the inhibition of Janus kinase 2-mediated JNK pathway in lipopolysaccharide-activated murine macrophages. *Biochem Pharmacol* 70, 1211-1221.
11. Watanabe M, Ohata M, Hayakawa S, et al. (2003) Identification of 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate as an apoptosis-inducing component in wasabi. *Phytochem* 62, 733-739.
12. Nomura T, Shinoda S, Yamori T, et al. (2005) Selective sensitivity to wasabi-derived 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate of human breast cancer and melanoma cell lines studied in vitro. *Cancer Detect Prev* 29, 55-60.
13. Fuke Y, Shinoda S, Nagata I, et al. (2006) Preventive effect of oral administration of 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate derived from wasabi (*Wasabia japonica* Matsum) against pulmonary metastasis of B16-BL6 mouse melanoma cells. *Cancer Detect Prev* 30, 174-179.
14. Yano T, Yajima S, Virgona N, et al. (2000) The effect of 6-methylthiohexyl isothiocyanate isolated from *Wasabia japonica* (wasabi) on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane-induced lung tumorigenesis in mice. *Cancer Lett* 155, 115-120.
15. Tanida N, Kawaura A, Takahashi A, et al. (1991) Suppressive effect of wasabi (pungent Japanese spice) on gastric carcinogenesis induced by MNNG in rats. *Nutr Cancer* 16, 53-58.
16. Weil MJ, Zhang Y, Nair MG (2005) Tumor cell proliferation and cyclooxygenase inhibitory constituents in horseradish (*Armoracia rusticana*) and Wasabi (*Wasabia japonica*). *J Agric Food Chem* 53, 1440-1444.

國科會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）

1. Hsuan, S.W., **Chou, F.P.** Induction of apoptosis and autophagic cell death by *Wasabia Japonica* extract in human colon cancer Colo 205 cells. (2013) The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama, Japan.
2. **Chou, F.P.**, Hung, H.Y. Cytotoxic effect of *Wasabia japonica* extract on colon cancer cell Colo 205. (2011) The 8th International Conference on Functional Foods for Chronic Diseases.

3. 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）

根據行政院衛生署101年的統計顯示，國人的大腸直腸癌仍高居男性與女性癌症死亡之第三位，而發生率則排名第一，足見大腸直腸癌的防治對於保護國人健康之重要。大腸直腸癌初期症狀不明顯，許多患者發現時已屬晚期，癌症已轉移至其他器官，這類病患的5年存活率低於5%，因此如何預防或延緩大腸癌症的發生為刻不容緩的事。癌細胞對於放射線治療或化學治療產生抗性，是目前癌症治療失敗的主要原因之一。目前許多研究趨向以天然物成份或複方來達到抑制癌細胞的增生及惡化，例如Tea polyphenolic extracts, curcuminoid extracts及broccoli extracts (sulforaphane)已被廣泛的應用為chemopreventive agents。本研究以台灣溫室生產的山葵，製備其萃取物，以細胞和動物實驗探討其抑制人類腸癌細胞的作用，並釐清其抗癌之分子機制。本研究完成之應用及貢獻為(1) 提出山葵萃取物為新chemopreventive agents；(2) 說明其抗癌的機轉；(3) 證實山葵萃取物之抗癌功效及其作用之分子標靶；(4) 提供食物成份在抗癌研究的模式。

附件四：子計畫四

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

秦芄對紅斑性狼瘡病理效益、免疫調節機轉及其作用標靶及有效保
健成分開發之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2632-B-040-001-MY3

執行期間：99年 8月 1日至 102年 7月 31日

計畫主持人：周芬碧

共同主持人：曾博修

計畫參與人員：徐再靜，蔡鈞州，劉思偉，康嘉貞，施雅方，陳俐初，
吳俐誼

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
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

執行單位：中山醫學大學醫學系生化科/所

中 華 民 國 102年 10月 1日

中、英文摘要及關鍵詞(keywords)

隨著藥物安全性的普遍被重視，加上化學合成藥品的傷害及副作用不斷地被發現後，天然成份的藥物因而再度被重視。秦艽除了能減緩包括紅斑性狼瘡等自體免疫病徵外，由於不具毒性，更可作為一般養生之食用。但是到目前為止，秦艽對於減緩狼瘡之詳細分子機轉、自體免疫的調控路徑及其有效成分，卻仍然未知。

在我們的研究結果發現，秦艽對於餵食高膽固醇之狼瘡小鼠有明顯的保護效果，特別是在減緩因高膽固醇引發加劇之發炎反應及提升狼瘡小鼠 CD4+/CD25+輔助型 T 細胞族群比例，並提升因高膽固醇所造成狼瘡小鼠肝臟 GSH, DPPH 及 Catalase 的活性。實驗結果也顯示秦艽能明顯降低粒線體相關路徑之細胞凋亡訊息。這些結果指出秦艽能有效減緩狼瘡及因膽固醇所加劇狼瘡之肝臟發炎及凋亡。

我們最近也完成雙向電泳分析及蛋白質點的鑑別，挑選出因狼瘡或膽固醇而有顯著變化的蛋白質點。我們將進一步分析秦艽對這些蛋白質在狼瘡之病理機轉上所扮演的角色，以找出狼瘡之治療標靶。相信這些研究結果可協助瞭解秦艽減緩狼瘡的機制，提升狼瘡病人生活品質與保健。

關鍵字: 秦艽, 紅斑性狼瘡, 發炎, 凋亡, 訊息傳遞

Abstract

Since medicine security and its side effects are being taken seriously, the natural products are stressed and reconsidered for medication again. A compendium of Chinese (herbal) medicine describes that *Gentiana macrophylla* has the functions of pain-relief, anti-inflammation, anti-histamine, detumescence and anti-rheumatics. However, little is know about the mechanisms and therapeutic components of *Gentiana macrophylla*.

In this study, we discovered that *Gentiana macrophylla* has the protective effects on NZB/W F1 mice receiving high-cholesterol diet, especially in alleviating the inflammatory responses. Besides, *Gentiana macrophylla* could significantly increase the population of CD4+/CD25+ helper T cells in NZB/WF 1 mice. could also reduce the mitochondrial-dependent apoptosis by decreasing the expression of cytochrome c and caspases-3 activity. Moreover, we further performed the IEF and identified the protein spots, which have significant expression. In the future, we will analyze the role of these proteins in pathogenesis of SLE and evaluate the possible therapeutic targets.

Key words: *Gentiana macrophylla* Pall, Systemic lupus erythematosus (SLE), Inflammation, Apoptosis, Signal transudation

報告內容：

近年文獻指出，全身性紅斑狼瘡病患中，肝臟異常的盛行率可能高到 55% [1-3]。在一個文獻指出，238 個全身性紅斑狼瘡病患中，其中有 39% 肝腫大、6% 脾腫大、24% 黃疸和 21% 肝功能不正常[4-5]。在另一個肝臟酵素的研究中發現，81 個全身性紅斑狼瘡病患中，就有 55% 肝臟酵素不正常[6]。而在狼瘡動物實驗的研究中也發現，高油脂高膽固醇食物確實會加劇狼瘡小鼠的臨床病症，增加細胞的凋亡及多數病灶的惡化，包括加劇肝臟與腦部的發炎反應及細胞凋亡 [7-9]。秦艽學名為 *Gentiana macrophylla*，據先前流傳下來以及現代醫學報導，這類清熱草本植物中草藥，具有叫 iridoid glycosides 的化學結構，可用來治療狼瘡，聲稱可改善免疫狀況及血液中指標[10-11]。秦艽除了能減緩包括紅斑性狼瘡等自體免疫病徵外，由於不具毒性，更可作為一般養生之食用。但是到目前為止，秦艽對於減緩狼瘡之詳細分子機轉、自體免疫的調控路徑及其有效成分，仍然未知。

本子計畫利用自發性紅斑性狼瘡小鼠為模式，研究秦膠對於紅斑性狼瘡之效益及相關免疫調節機轉。我們將狼瘡小鼠分成三組，分別餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦艽飼料12週後，將小鼠犧牲進行分析。餵食高膽固醇之小鼠從第五週起相較其他2組小鼠有顯著上升[圖一]。在心跳上並無明顯差異[圖二]。而在平均動脈壓方面，餵食高膽固醇之小鼠相較其他2組小鼠，其平均動脈壓從第9週起顯著上升[圖三]。餵食高膽固醇之小鼠其肝臟重量顯著上升，而餵食高膽固醇加上秦艽飼料之小鼠其肝臟重量則顯著下降[圖

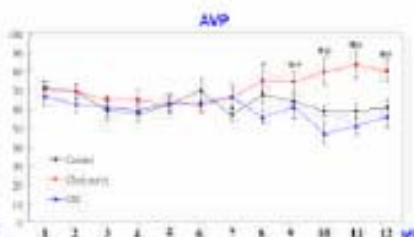
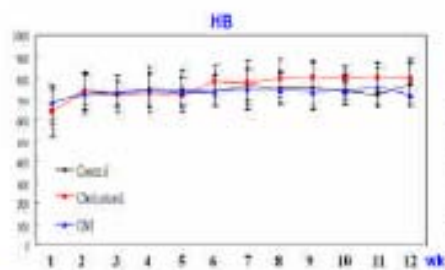
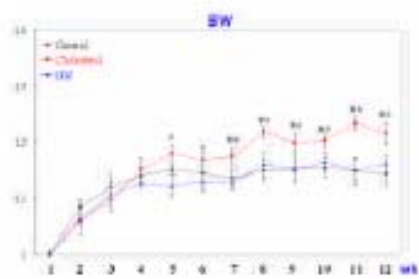
四], 而餵食高膽固醇加上秦艽飼料之小鼠其脾臟相較餵食高膽固醇小鼠則顯著變小[圖五]。此說明餵食高膽固醇之小鼠其脾臟細胞明顯變多, 而餵食高膽固醇加上秦艽飼料之小鼠其脾臟相較餵食高膽固醇小鼠則顯著變少[圖六]。進一步分析發現餵食高膽固醇之小鼠血清MMP-9活性明顯增加, 而餵食高膽固醇加上秦艽飼料之小鼠其血清MMP-9活性則顯著降低[圖七]。在餵食高膽固醇之小鼠其活化之血清IL-6相較對照組小鼠明顯增加, 而餵食高膽固醇加上秦艽飼料之小鼠, 其血清IL-6相較餵食高膽固醇小鼠則顯著減少[圖八]。此外, 我們發現狼瘡小鼠因餵食高膽固醇而引發CD4+/CD25+輔助型T細胞族群比例下降, 而在餵食秦艽之後, 會顯著提升CD4+/CD25+輔助型T細胞族群比例[圖九]。

進一步進行秦艽對於餵食高膽固醇狼瘡小鼠肝臟保護的分子機制。發現餵食高膽固醇加秦艽飼料之狼瘡小鼠中, 其肝臟之IL-6, IL-1 β 蛋白質表現量相較於餵食正常飼料及高膽固醇飼料之狼瘡小鼠皆有顯著的下降[圖十][圖十一]。其下游訊息傳遞分子之IKK- α 及NF- κ B相較於餵食正常飼料及高膽固醇飼料之狼瘡小鼠皆顯著下降[圖十二][圖十三]。至於粒線體相關凋亡的訊息路徑上, 由實驗結果發現, cytochrome-c及caspase-3的活性表現, 在餵食高膽固醇之小鼠肝臟表現量, 相較於餵食正常飼料之狼瘡小鼠有顯著上升。但在餵食高膽固醇加秦艽飼料之狼瘡小鼠中, 其肝臟之cytochrome-c及caspase-3的活性表現相較於餵食正常飼料及高膽固醇飼料之狼瘡小鼠皆顯著的下降[圖十四][圖十五]。除了驗證秦艽對狼瘡小鼠肝臟發炎及凋亡的效益及訊息路徑外[, 也完成小鼠肝臟之雙向電泳[圖十六], 並分別挑選30個蛋白質點進行蛋白質身分鑑別[表一], 相信有助更進一步分析這些蛋白質在狼瘡病理機轉中的角色, 及找出狼瘡之治療標靶。

參考文獻

1. Herlong, 1994 H.F. Herlong, Approach to the patient with abnormal liver enzymes, Hosp. Pract. (Off. Ed.) 29 (1994), pp. 32–38.
2. Lu et al., 2006 M.C. Lu, K.J. Li, S.C. Hsieh, C.H. Wu and C.L. Yu, Lupus-related advanced liver involvement as the initial presentation of systemic lupus erythematosus, J. Microbiol. Immunol. Infect. 39 (2006), pp. 471–475. Abraham et al., 2004 S.
3. Abraham, S. Begum and D. Isenberg, Hepatic manifestations of autoimmune rheumatic diseases, Ann. Rheum. Dis. 63 (2004), pp. 123–129.
4. Tsai-Ching Hsu, Yi-Chen Chen, Chun-Chou Tsai, Jen-Huang Wu, Sin-Lun Li, Bor-Show Tzang*. (2010). Protective effects of taurine against hepatic abnormality in NZB/W F1 mice fed a hypercholesterolemic diet. Food Chemistry 119:62-68.
5. Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O, Amigo MC. Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases , Autoimmunity Reviews, Volume 5, Issue 3, March 2006, Pages 195-201.
6. Herlong, 1994 H.F. Herlong, Approach to the patient with abnormal liver enzymes, Hosp. Pract. (Off. Ed.) 29 (1994), pp. 32–38.
7. Tsai-Ching Hsu, Szu-Yi Chiang, Jen-Huang Wu, Chun-Chou Tsai, Chih-Yang Huang, Yi-Chen Chen, Bor-Show Tzang*. (2008). Treatment with taurine attenuates hepatic apoptosis in NZB/W F1 mice fed with a high-cholesterol diet. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56(20):9685-91.
8. Chih-Yang Huang, Tsai-Ching Hsu, Wei-Wen Kuo, Shih-Ping Wu, Yueh-Min Lin, Chun-Yu Yen, Jen-Huang Wu, Bor-Show Tzang* (2009). Beneficial Effects of Taurine on Cardiac Abnormality in NZB/W F1 Mice Fed with a High-Cholesterol Diet. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57(18):8635-8642.
9. Tsai-Ching Hsu, Yi-Chen Chen, Chun-Chou Tsai, Jen-Huang Wu, Sin-Lun Li, Bor-Show Tzang*. (2010). Protective effects of taurine against hepatic abnormality in NZB/W F1 mice fed a hypercholesterolemic diet. Food Chemistry 119:62-68.
10. Zhong Jiayi, et. al., 25 cases of systemic lupus erythematosus treated by integrated traditional Chinese medicine and Western medicine, Chinese Journal of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine 1999; 19(1): 47-48.
11. Ferguson JE, Chalmers RJG, Rowlands DJ. Reversible dilated cardiomyopathy following treatment of atopic eczema with Chinese herbal medicine. Br J Dermatol. 1997;136:592-593.

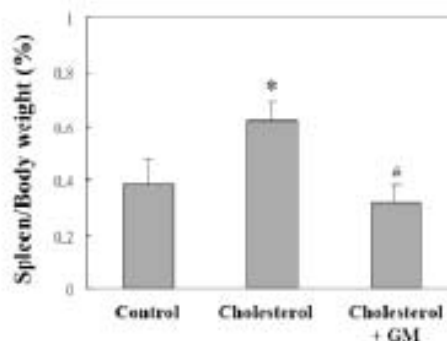
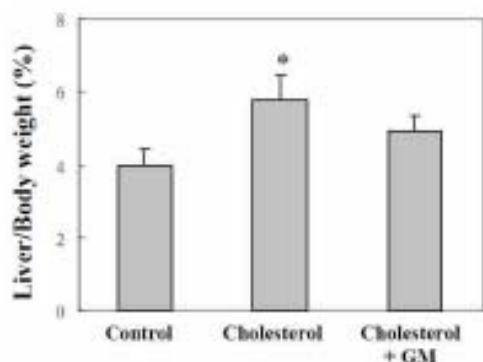
(五) 附表及附圖



圖一，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芎飼料之狼瘡小鼠體重變化。

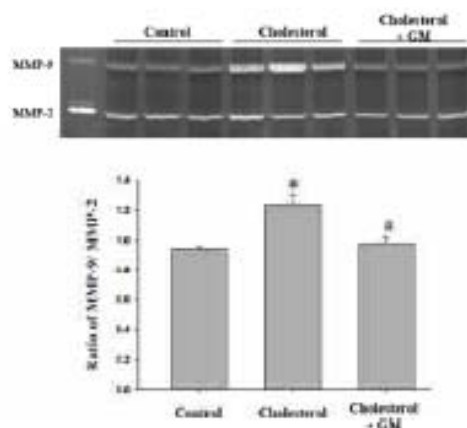
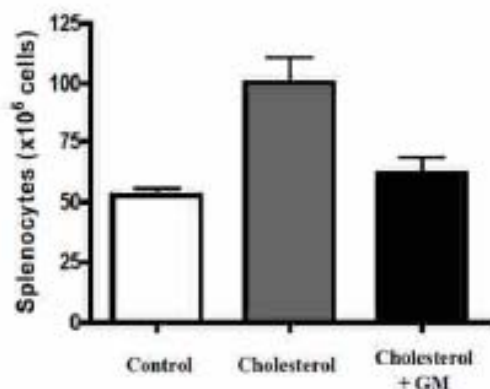
圖二，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芎飼料之狼瘡小鼠心跳變化。

圖三，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芎飼料之狼瘡小鼠血壓變化。



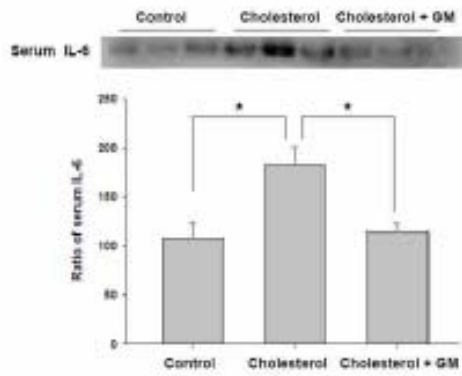
圖四，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芎飼料之狼瘡小鼠肝臟與體重之比例變化。

圖五，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芎飼料之狼瘡小鼠脾臟與體重之比例變化。

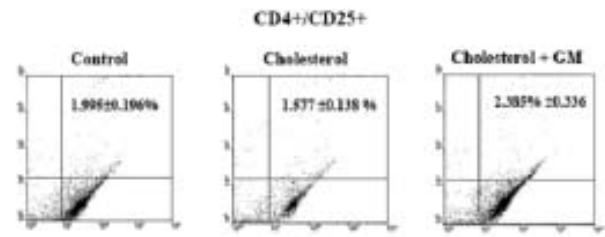


圖六，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芎飼料之狼瘡小鼠脾臟細胞總數之變化。

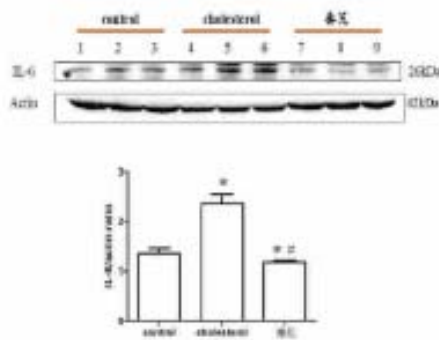
圖七，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芎飼料之狼瘡小鼠血清 MMP 活性之變化。



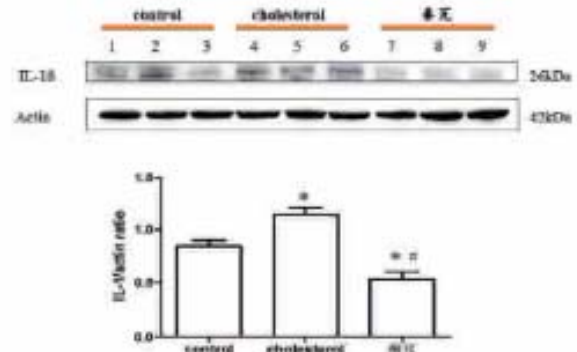
圖八、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芩飼料之狼瘡小鼠血清 IL-6 之變化。



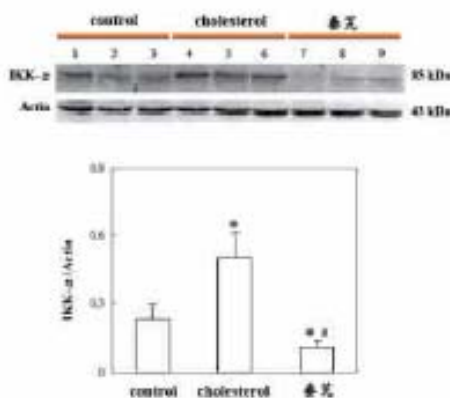
圖九、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芩飼料之狼瘡小鼠脾臟輔助型 T 細胞之變化。



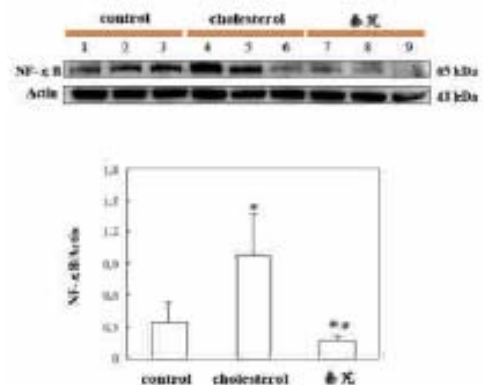
圖十、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芩飼料之狼瘡小鼠肝臟 IL-6 變化。



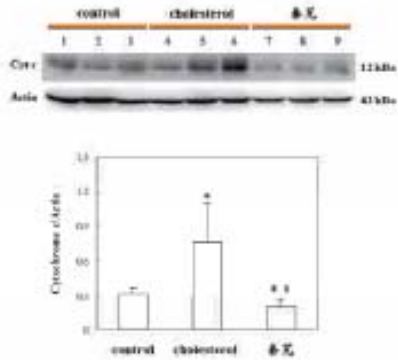
圖十一、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芩飼料之狼瘡小鼠肝臟 IL-1β 變化。



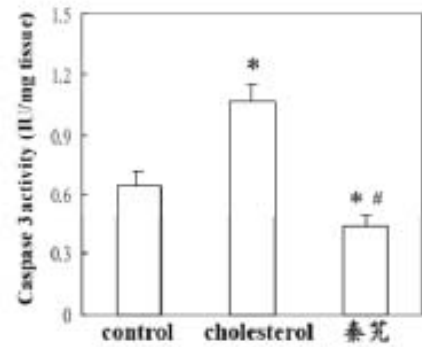
圖十二、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芩飼料之狼瘡小鼠肝臟 IKK-α 變化。



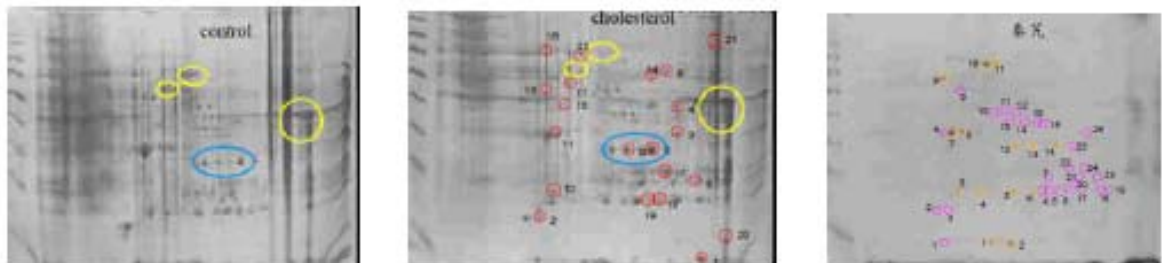
圖十三、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芩飼料之狼瘡小鼠肝臟 NF-κB 變化。



圖十四、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芫飼料之狼瘡鼠 cyt c 變化。



圖十五、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芫飼料之狼瘡小鼠肝臟 caspase 3 變化。



圖十六、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芫飼料之狼瘡小鼠肝臟雙向電泳結果。

表一、蛋白質點鑑定

Group	Control	Cholesterol	GM
1	羧基化乳白蛋白	脂肪酸合酶	-
2	ATPSA1	PCDH10B	-
3	Tu7b	ALEOB	-
4	Pa-1	hMPT2	-
5	A17 合成酶	過氧化酶	-
6	SMP3	脂肪酸轉位酶 acyl-CoA7	-
7	HAAO	脂肪酸轉位酶(T7)	-
8	ETPa	脂肪酸轉位酶(10/17)-同半胱氨酸	-
9	ETPa	ATP5B	SMP7
10	SMP3	CPS1	-
11	SMP3	CPS1	-
12	FNQ1	MST1E	-
13	SMP3	白蛋白	-
14	SMP3	10a-b1	-
15	正卵黃化乳白蛋白	白蛋白	-
16	羧基化乳白蛋白	脂肪酸轉位酶-Chx 的阻遏基因	-
17	PEBP	Zytl1a	-
18	FRDX5	80x33-gt	-
19	巯基化酶 hscCyb3	-	-
20	乙醯輔酶 A 乙醯轉位酶(1) 丙酮酸ACATD	-	-
21	乙醯輔酶 A 乙醯轉位酶(RACATD)	-	-
22	ABG1	-	-
23	PRH9	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30	-	-	hMPT2

餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加秦芫飼料之狼瘡小鼠肝臟雙向電泳蛋白質點之身分鑑別。

(六)計畫成果自評部份，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、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。

本計畫各項試驗進行的相當順利，符合計畫進度及預期達成之目標。從研究結果發現，秦艽確實對於餵食高膽固醇之狼瘡小鼠有明顯的保護效果，特別是在減緩因高膽固醇引發加劇之發炎反應及發炎相關細胞之活化。此外，秦艽會顯著提升狼瘡小鼠 CD4⁺/CD25⁺輔助型 T 細胞族群比例，並有效降低 MDA 生成及提升因高膽固醇所造成狼瘡小鼠肝臟 GSH, DPPH 及 Catalase 的活性。秦艽也可以有效的降低發炎相關路徑，包括 IL-6, IL-1 β 及 IKK- α , NF- κ B 訊息傳遞路徑，並減緩下游之 MMP9 及 iNOS 表現。此外，秦艽亦能減緩 P53/P21 及粒線體相關路徑之細胞凋亡訊息，包括降低 cytochrome-c, apaf-1, 及 caspase-3 的活性。這些結果指出秦艽能有效減緩狼瘡及因膽固醇所加劇狼瘡之肝臟發炎及凋亡。目前我們正統整這些實驗結果，並將進一步撰寫成論文投稿至國際期刊。相信這些研究結果，可以提供減緩狼瘡病症及狼瘡病人日常保健方面之參考。

- 秦艽可應用於減緩狼瘡小鼠全身性發炎及肝臟細胞凋亡。
- 秦艽可提升狼瘡小鼠調節型 T 細胞，改善自體免疫微環境。

附件五：子計畫五

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

疾病化學預防物質開發及機轉研究-疾病化學預防物質開發及
機轉研究

子計畫：開發蟛蜞菊多酚成份為預防神經退行性病變之物質及探討其作用機制

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC99 - 2632 -B -040 -001 -MY3

執行期間：99 年 8 月 1 日至 102 年 7 月 31 日

執行機構及系所：

計畫主持人：周芬碧

共同主持人：曾翠華

計畫參與人員：陳乃鳳

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

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 102 年 07 月 31 日

中文摘要 (關鍵詞:神經膠細胞, 蟛蜞菊, 神經保護)

隨著生活條件的優渥與醫藥的進步, 老年人口的比率在世界各國均有逐年增加的趨勢, 根據流行病學的統計, 好發於老年人的神經退行性疾病如阿茲海默症、帕金森氏症、舞蹈症等已成為人類死亡的重要原因, 隨著人口結構的老化, 神經退行性疾病病患也日益增加, 對家屬、患者和社會大眾而言, 無論是經濟、心裡和生活形態的衝擊、著實是難以估計和承擔。如何預防或減緩神經退行性疾病的發生是一重要課題。蟛蜞菊 (*Wedelia chinensis*) 是一種菊科植物, 為臺灣傳統涼茶的主要材料, 在第一年研究中我們發現蟛蜞菊粗萃物含多酚成份及類黃酮成份, 由 HPLC 分析中發現其類黃酮成份為 luteolin, 另外也發現其含 coumenstan 衍生物 wedelolactone, 在蟛蜞菊多酚粗萃物活性研究中我們發現多酚粗萃物對過氧化物 tert-butylhydroperoxide 所造成 PC12 神經細胞存活率及細胞毒性等傷害指標皆呈現保護作用, 在分子機制中發現蟛蜞菊多酚粗萃物可增加 tert-butylhydroperoxide 所造成 Bcl-2, Bcl-xL, γ -GCS, 下降的表現量, 亦可阻斷 tert-butylhydroperoxide 所活化的 MAPKs。第二年我們進行動物實驗研究, 首先建立高劑量的半乳糖可誘發小鼠老化之研究模式, 我們發現黃花蟛蜞菊多酚萃取物可減少半乳糖所誘發老鼠老化之現象例如學習能力不全, 腦組織 p-tau, beta-amyloid 的大量產生以及脂質過氧化的大量堆積, 又由腦組織切片中也發現半乳糖可大大減少皮質及海馬迴神經細胞的數目。總之蟛蜞菊多酚粗萃物活性研究中我們發現其對氧化性壓力造成神經細胞傷害具保護作用。文獻報導在神經退行性病變腦組織切片中發現 inflammatory mediator, 也看到一些活化的 microglia cells, 活化的 microglia cells 包含 astrocyte 及 glial cell 會活化 NADPH oxidase 也會釋放出 cytokines and proinflammatory mediator 進而產生大量 ROS and RNS 造成神經細胞損傷, 因此第三年我們探討蟛蜞菊萃取物 (WEA) 對 IFN- γ 及 LPS 誘發星狀細胞活化之作用影響, 結果 WEA 可減少 IFN- γ 及 LPS 誘發星狀細胞株 C6 細胞釋放 TNF α 及 iNOS, COX2 的表現, 並降低 IFN- γ 及 LPS 誘發星狀細胞型態改變與細胞活化指標 GFAP 的表現, 而對這些表現的影響是和抑制 IFN- γ 及 LPS 活化 NF κ B 與 STAT3 訊息路徑有關。最後發現 IFN- γ 及 LPS 處理過星狀細胞株 C6 細胞的培養液會降低分化 PC12 腦細胞的存活率, 而 WEA 可提升存活率。而蟛蜞菊萃取物主成份 wedelolactone (WEL) 及 luteolin (Lut) 也都呈現類似之保護作用, 以上結果顯示蟛蜞菊多酚萃取物及其主成份具有抗氧化與抗發炎等活性, 進而可預防或延緩神經退行性病變之發生。其保健功能值得開發。

英文摘要 (Keywords: astocyte, *Wedelia chinensis*, neuroprotective)

There has been a significant increase in neurodegenerative diseases that primarily affects the elderly population, and is a major public health concern. Several lines of evidence suggest that oxidative stress resulting in ROS generation and inflammation play a pivotal role in neurodegenerative disorders. Lots of correlative evidence is consistent with the hypothesis that the accumulation of the macromolecular damage induced by ROS is the central causal factor which promotes the process of neurodegenerative diseases. *Wedelia chinensis* (Compositae), containing polyphenols including flavonoids and wedelolacton, has been used traditionally as oriental medicine and material for herb tea in Taiwan. In this study, **the first year:** we extracted phenolic compounds from *Wedelia chinensis* by ethyl acetate and assessed their neuroprotective efficacies. It demonstrated that ethyl acetate extract of *Wedelia chinensis* (WEA) could effectively protect PC12 cells against tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced oxidative damages. WEA blocked t-BHP-activated intrinsic apoptosis pathway such as decreasing t-BHP-activated caspase 9 and caspase 3 as well as the expression of Bcl-2 and Bcl-xL. Meanwhile, WEA increased antioxidant gene expression including heme oxygenase-1 (HO-1) and γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS). These results suggest that *Wedelia chinensis* possess antioxidant properties and neuroprotective potential. **The second year:** we assessed the neuronal and behavioral protection effect of WEA in a D-galactose-induced aging mice model. Behavioral assessment showed chronic D-galactose treatment impaired the learning ability of mice in the active avoidance test. In addition, D-galactose caused elevated levels of phospho-Tau, beta-amyloid protein, and malondialdehyde in the cortex and decreased neuronal density in the cortex and hippocampal CA region. Interesting, all the above behavioral, biochemical, and neuronal changes were inhibited by co-administration of WEA. These results demonstrated WEA may possess neuronal and behavioral protection potential against the aging process. **The third year:** we founded that WEA inhibited LPS/IFN-gamma-induced synapse-like astrocyte cell structure and expression of SSeCKS, a cytoskeleton

scaffolding protein, which up-regulated during astrocyte activation in C6 astrocytoma cells. In addition, WEA could suppress LPS/IFN- γ induced intracellular ROS, iNOS expression and TNF- α secretion in C6 astrocytoma cells. Finally, medium with pretreatment of WEA in C6 astrocytoma cells significantly decreased cytotoxicity in differentiated PC12 cells as compared to medium with LPS/IFN- γ -activated C6 astrocytoma cells alone. The components of WEA also exhibited neuroprotective effects. These results imply WEA possesses neuroprotective potential.

前言

神經退行性疾病(neurodegenerative disease)是一種原發性神經元變性為基礎的退行性神經系統疾病,該疾病包括:阿茲海默症、帕金森氏症、肌萎縮側索硬化症、舞蹈症等,隨著生活條件的優渥與醫藥的進步,老年人口的比率在世界各國均有逐年增加的趨勢,根據流行病學的統計,好發於老年人的神經退行性疾病已成為人類死亡的重要原因,隨著人口結構的老化,神經退行性疾病病患也日益增加,對家屬、患者和社會大眾而言,無論是經濟、心裡和生活形態的衝擊、著實是難以估計和承擔。如何預防或減緩神經退行性疾病的發生是一重要課題。

文獻指出神經退行性病變與氧化壓力所產生的自由基誘導神經元細胞死亡有相關聯,又在神經退行性病變腦組織切片中發現 inflammatory mediator, 也看到一些活化的 microglia cells,活化的 microglia cells 包含 astrocyte 及 glial cell 會活化 NADPH oxidase 也會釋放出 cytokines and proinflammatory mediator 進而產生大量 ROS and RNS 造成神經細胞損傷,因此如能減少 microglia cell 之活化與聚集將可減少神經細胞之損傷預防神經退行性病變之發生。另外在流行病學調查報告顯示抗氧化與抗發炎天然物或藥物可延緩或預防帕金森氏症候群及老人癡呆症候群的發生。

蟛蜞菊學名: *Wedelia chinensis* Merr, 又稱黃花蜜菜、黃花蟛蜞菊、蟛蜞花,屬於菊科草本植物,外型特徵,黃色的舌狀花瓣,舌片卵狀長圓形,具有解熱、化痰和減少咳嗽,並且具有保護肝臟免受毒性威脅(Lin, Chen et al. 2007)。此植物生長在台灣及中國南部,通常是被用來做抗發炎藥物的一種(Tsai, Lin et al. 2009)。其中,在之前的研究顯示蟛蜞菊化合物具有抑制雄激素的活性及抗癌成份,其中包含四種化合物 indole-3-carboxylaldehyde、wedelolactone、luteolin 和 apigenin (Tsai, Lin et al. 2009)。而 wedelolactone 屬於 coumestan 結構而 luteolin 和 apigenin 屬於 flavonoid 結構皆為多酚結構,蟛蜞菊多酚粗萃物及其主成份之神經保護或減緩神經退行性疾病發生之作用有待了解。

研究目的

由於醫藥科技的進步及生活環境的改善,使得世界人口的平均壽命增加,而走向老化的趨勢,因此探究神經退化疾病現今首要的課題,除了找出預防神經退化藥物外,也必須深入探討誘導神經退化之調控,來達到保護神經細胞的受損。本研究第一年利用過氧化物(*tert*-butyl hydroperoxide, t-BHP)誘導神經細胞(PC12 Neuroblastoma Cells)凋亡,並利用黃花蜜菜多酚萃取物及分離之化合物來保護神經細胞的凋亡現象,更深入探討內源性抗氧化酵素的表現對抗活性氧所誘導的凋亡能力,而達到神經保護作用。第二年利用 d-galactose 誘導老鼠產生老化現象進而評估黃花蟛蜞菊多酚萃取物保護腦神經退化之作用。第三年利用 IFN- γ 及 LPS 誘發星狀細胞株活化,觀測蟛蜞菊粗萃物及主成份是否有抑制 IFN- γ 及 LPS 誘發星狀細胞株活化之作用,並探討其作用機制。

文獻探討

1 天然化學預防對抗疾病作用為現在的趨勢,由於目前醫學藥品皆為化學合成藥物,具有毒性強及副作用大的風險,因此許多研究轉向天然物來延緩或抑制疾病的發生。而目前許多研究對天然藥物抵抗神經退化疾病之功效尚未明瞭,因此近年來許多研究嘗試利用天然物及分離化合物做為對神經退化疾病的預防和醫治。根據文獻上指出,許多天然物具有保護神經細胞功效,例如 *Hypericum perforatum* L 分離之化合物 Hyperoside 可保護神經細胞受過氧化物的毒殺現象(Liu, Tao et al. 2005); *Rhodiola rosea* L. 分離之化合物 Salidroside 抵抗 beta-amyloid 所誘導的氧化壓力抑制神經細胞凋亡並且透過抗氧化酵素而達到保護效果(Zhang, Yu et al. 2010);天然多酚化合物

Resveratrol 和 Quercetin 抵抗 MPP⁺ 所誘導氧化壓力抑制神經細胞死亡(Bournival, Quessy et al. 2009)。

2. 過去較多文獻研究天然物對腦部免疫細胞 micoglia cell 活化所造成的影響作探討, 如多酚黃酮類 luteolin, 文獻發現其抗發炎活性可以減少腦部細胞受到傷害, 而抑制 micoglia cell 活化的作用與其抑制訊息路徑有關 (Ref1)。
3. 近年來有愈來愈多研究發現另一腦部免疫細胞 astrocyte 的重要性, 如天然物 4-O-methylhonokiol 可抑制 LPS 誘發腦細胞組織發炎與傷害, 並發現其與抑制 nuclear factor-kappa B 有關 (Ref2)。另外鈣離子抑制劑(Ref3)被發現也可透過影響訊息路徑降低 astrocyte 活化所造成的腦細胞傷害。這些研究告訴我們抗氧化與抗發炎活性天然物可能具有減少腦部細胞受到傷害, 具有開發預防退行性腦病變如老年痴呆症發生的潛能, 而 astrocyte 是目前受重視的研究重點。

References:

1. Bournival, J., P. Quessy, et al. (2009). "Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP⁺-induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons." Cell Mol Neurobiol **29**(8): 1169-1180.
2. Cho, E. S., K. W. Lee, et al. (2008). "Cocoa procyanidins protect PC12 cells from hydrogen-peroxide-induced apoptosis by inhibiting activation of p38 MAPK and JNK." Mutat Res **640**(1-2): 123-130.
3. Hsiao, Y. C., W. H. Kuo, et al. (2007). "Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via down-regulation of proteinases activities and MAPK pathway." Chem Biol Interact **167**(3): 193-206.
4. Lin, F. M., L. R. Chen, et al. (2007). "Compounds from *Wedelia chinensis* synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells." Carcinogenesis **28**(12): 2521-2529.
5. Liu, Z., X. Tao, et al. (2005). "Protective effects of hyperoside (quercetin-3-o-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide." Biomed Pharmacother **59**(9): 481-490.
6. Ma, W., L. Yuan, et al. (2010). "Genistein as a neuroprotective antioxidant attenuates redox imbalance induced by beta-amyloid peptides 25-35 in PC12 cells." Int J Dev Neurosci **28**(4): 289-295.
7. Pias, E. K., O. Y. Ekshyyan, et al. (2003). "Differential effects of superoxide dismutase isoform expression on hydroperoxide-induced apoptosis in PC-12 cells." J Biol Chem **278**(15): 13294-13301.
8. Kao TK, Ou YC, Lin SY, et al., Luteolin inhibits cytokine expression in endotoxin/cytokine-stimulated micoglia.
9. Lee YJ, Choi DY, Choi IS, et al., Inhibitory effect of 4-O-methylhonokiol on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappa B in vitro and in vivo models. Journal of Neuroinflammation 9:35-53, 2012.
10. Hashioka S, Klegeris A, McGeer PL, Inhibition of human astrocyte and microglia neurotoxicity by calcium channel blockers. Neuropharmacology 63, 685-691, 2012.

研究方法

第一年

中草藥萃取及有效成分萃取 (Extraction and Partition)

利用粉碎機把黃花蜜菜打成碎狀, 取比例 1 克黃花蜜菜粉末分別加入 5 毫升的 95 % 乙醇(1 克: 5 毫升), 置於 37 °C、200 rpm 的培養箱 24 小時進行萃取。隔天將萃取液抽氣過濾, 重複三次, 收集所有濾液並以濃縮機濃縮乾燥, 此為粗萃物。而黃花蜜菜粗萃物中含有多種成分, 因此利用不同極性之有機溶劑進行分配萃取。本研究使用 3 種不同極性的有機溶劑進行萃取, 分別為 Hexane、Diethyl ether、Ethyl acetate, 首先將黃花蜜菜粗萃物加入少量的去離子水, 依極性低到高的有機溶劑分別進行萃取, 收集各層溶劑進行濃縮及活性測試。

總酚測定(Total phenolic contents)及類黃酮測定(Total flavonoid contents)

取0.2 ml 黃花蜜菜萃取物5000 ppm 及gallic acid 分別加入1 ml 之0.5 M Folin reagent 反應4~10 分，再加入1 ml 之sodium carbonate (75 g/L)反應2 小時，測 OD₇₆₀ 之吸光值。繪出gallic acid 標準曲線，並分析黃花蜜菜之總酚濃度。取各個不同濃度之黃花蜜菜萃取物以及Quercetin分別加入甲醇, 10 % Al(NO₃)₃, 1 M CH₃COOK均勻混合，反應40分鐘，測吸光值於415 nm

高壓液相層析分析(High pressure liquid chromatograph analysis)

利用 A Solution(Water 含 2 % Acetate acid)及 B Solution(Acetonitrile)經由 Gradient 方式來分析黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物之化合物，首先由 A:B(90:10, 10min 至 80:20, 10 min 至 70:30, 10 min 至 0:100 跑完梯度)，並利用相同條件分析標準物 Wedelolactone 和 Luteolin 的滯留時間及換算的相對含量。

細胞培養 (Cell culture)

老鼠神經細胞 PC12 Neuroblastoma Cells，培養於 5 % horse serum(HS)、10 % fetal bovine serum (FBS)、1 % L-Glutamine 及 1 % Penicillin-Streptomycin Solution(PS)的 Dulbecco's Modified eagle medium (DMEM) ，培養於 5 % CO₂、37 °C 的培養箱，細胞密度維持 1×10⁶~2×10⁶ ，每周更換培養基 2~3 次。

細胞毒性測試 (Cytotoxicity assay, MTT assay)

利用活細胞粒腺體的去氫酶(dehydrogenase)把 3-{4,5-Dimethylthiazol-2-yl}-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT 試劑)代謝成紫色的結晶體，並利用 OD₅₄₀ 測得吸光值，分析細胞存活量。將細胞培養後，利用 PBS 沖洗再用 trypsin-ETDA 把細胞打下，並且把細胞濃度調整為 5×10⁴ cell/mL，並取 1 mL 的細胞置 24-well plate 裡，培養於 5 % CO₂、37 °C 的培養箱。等待細胞貼壁，且更換含有萃取物之培養基置 24-well plate 培養 24 小時再加入 3 小時 t-BHP 後移除培養基，並加入含有 5 mg/mL MTT 試劑的培養基反應 4 小時，除去培養基，再加入 1 mL DMSO 將紫色結晶體溶解並測 ELISA 波長為 540 nm。

LDH assay 毒性測試

將細胞培養後利用 PBS 沖洗再用 trypsin-ETDA 把細胞打下，並且把細胞濃度調整為 5×10⁴ cell/mL，並取 1 mL 的細胞置 24-well plate 裡培養於 5 % CO₂、37 °C 的培養箱。等待細胞貼壁，且更換含有萃取物之培養基置 24-well plate 培養 24 小時再加入 3 小時的 t-BHP 後收集培養基，離心 400 ×g，5 分鐘。取 100 μL 培養基至 96-well plate 上並加入 100 μL 的 Reaction solution(各 100 μL 的 NAD⁺、Lactic Acid、INT 和 LDH Diaphorase 加入於 9.6 mL 的 Assay buffer)在室溫反應 30 分鐘並輕輕搖晃，最後利用 ELISA 波長 490 nm 測定，使用 LDH Cytotoxicity Assay Kit 測定。

細胞螢光染色 (DAPI assay)

DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)，是一種核酸螢光的染劑，如果細胞凋亡時，就會有DNA斷裂(DNA fragmentation)的情形，斷裂後所露出的AT區域也會變多，所以與DAPI結合的位置也會相對增加。因此可以藉由此特性進而推斷，當在顯微鏡下觀察到的螢光強度越強，則表示DNA斷裂的情形越多，細胞凋亡的現象也相對會越嚴重。將細胞培養後，利用PBS沖洗再用trypsin-ETDA把細胞打下，並且把細胞濃度調整為1×10⁶ cell/mL，並取1 mL置6-well plate裡。等待細胞貼壁，再加入萃取物置6-well plate，培養24小時再加入3小時的t-BHP，利用PBS沖洗並利用3.7%的福馬林固定30分鐘，再用PBS沖洗後加入0.1% Triton-x 100破細胞7分鐘，加入DAPI染劑一小時後利用顯微鏡觀測細胞核的變化，利用100倍顯微鏡拍攝5個視野做量化，200倍為現象圖。

GSH 含量測定 (Quantitative Measurement of Glutathione Content)

Monochlorobimane 是一種 GSH 染劑，可與細胞中的硫基團結合而測得 GSH 之含量。因此本研究方法將細胞培養後，利用 PBS 沖洗再用 trypsin-ETDA 把細胞打下，並且把細胞濃度調整為 1×10⁶ cell/mL，並取 1 mL 置 10-cm dish 裡。等待細胞貼壁後加入不同濃度之萃取物處理 24 小時在加入 t-BHP 3 小時，最後用 PBS 沖洗再用 trypsin-ETDA 把細胞打下，離心後將細胞加入 Monochlorobimane 15 分鐘後加入 1 % NP-40 利用螢光光譜儀測定(Ex/Em:395/450 nm)。

活性氧測定 (ROS assay)

將細胞培養後，利用 PBS 沖洗再用 trypsin-ETDA 把細胞打下，並且把細胞濃度調整為 8×10^5 cell/mL，並取 1 mL 置 10-cm dish 裡。等待細胞貼壁後加入不同濃度之萃取物處理 24 小時在加入 t-BHP 3 小時，並在收細胞前 15 分鐘加入 H₂DCFDA 染色，並收集細胞利用 Flow cytometry 及螢光顯微鏡測試 ROS 的表現。

西方點墨法 (Western blotting)

觀察萃取物置細胞中的分子機制，了解細胞所走的路徑。將細胞培養後，利用 PBS 沖洗再用 trypsin-ETDA 把細胞打下，並且把細胞濃度調整為 2×10^6 cell/mL，並取 1 mL 置 10-cm dish。等待細胞貼壁，再加入萃取物置 10-cm dish，培養 24 小時在加入 3 小時的 t-BHP 後，離心收集細胞並加入 1 mL RIPA buffer 含蛋白酶抑制劑(Na₃VO₄, Leupeptin, PMSF)，在 4 °C 震盪 30 分鐘，之後在 4 °C 下離心 12000 rpm、15 分鐘並取出上清液，保存於 -80 °C。蛋白質定量時利用 Better Bradford Protein Assay Kit 與蛋白質混合，置波長 595 nm 下吸收並去定量蛋白質。將定量完的蛋白質與 Loading dye 混合，在 95 °C 加熱 10 分鐘，並瞬間插入冰上。鑄膠時下層所含的配方是(ddH₂O, 30 % Acrylamide mix, 1.5 M Tris-base (pH 8.8), 10 % SDS, 10 % APS, TEMED)而上層配方為(ddH₂O, 30 % Acrylamide mix, 1.5 M Tris-base (pH 6.8), 10 % SDS, 10 % APS, TEMED) 在上層膠鑄完後放入齒疏，凝固後加入 Marker 及 Sample，並加入 Running buffer (Tris-base, Glycine, SDS)，先用 70 V 跑過上層膠後在用 110 V 跑到底線後停止電壓。之後在將膠上的 Sample 轉漬 NC paper 上，利用夾板夾好後放入轉漬槽後利用 Transfer buffer(Tris-base, Glycine, Methanol) 電壓 100 V，2 小時。之後利用 Washing buffer(10×PBS, Tween-20, ddH₂O)清洗後加入 Blocking buffer (脫脂牛奶)在室溫下反應 1 小時，再用 Washing buffer 清洗，之後在加入一級抗體在 4 °C 下作用 overnight。之後再用 Washing buffer 清洗加入二級抗體作用一小時，再用 Washing buffer 清洗，之後利用冷光螢光分析儀觀察。

分析統計(Statistical analysis)

試驗過程每組皆重複三次以上，mean ± standard deviation，所有數據將以電腦統計軟體 Sigmaplot (Jandel Scientific Software, USA)，採用 one-way analysis of variance(one-way ANOVA) 統計分析，凡 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ，表示為有顯著的差異。

第二年

動物實驗

將小鼠分成五組 group 1 控制組,group 2 以 d-galactose (50 mg/kg/day;sc) induction toxicity, group 3,4,5 除了施打 d-galactose 外分別皮下注射 10 mg/kg, 25mg/kg PEW 及 10 mg/kg, 維他命 E 每週三次,共 9 週。

主動迴避試驗

利用 shuttle cage 在進行研究後第 9 週進行主動迴避試驗, 鋁箱間隔為二個 compartment, 將老鼠放於一邊適應 10 秒後, 給與聲(75db)光(250 lux)刺激進行(CS) 3 秒, 然後給與 10 秒 0.5mA 腳板電擊(UCS), 其逃脫行為以電腦記錄進行 30 回測試, 小白鼠在 CS 下移動至另一 compartment 稱 主動迴避, UCS 下移動至另一 compartment 稱 escape, 無反應稱 failure。

西方點墨法 (Western blotting) (如前)

脂質過氧化測定

The lipid peroxidation in the brain was quantitatively determined by the method described by Wills (Wills, 1966). The amount of malondialdehyde (MDA) was measured by reaction with thiobarbituric acid at 532 nm by spectrophotometer.

病理組織分析

將小老鼠皮質及海馬迴取下以福馬林固定後切片以 hematoxylin-eosin 染色分析。

分析統計(Statistical analysis)

所有數據將以電腦統計軟體 Sigmaplot (Jandel Scientific Software, USA), 採用 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 統計分析, 凡 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 表示為有顯著的差異。

第三年

Cell Culture

將 rat C6 astrocytoma cells (obtained from Bioresource Collection and Research Center, BCRC) 培養於含有 10 % fetal bovine serum, 1 % L-glutamine 與 penicillin/streptomycin 的 DMEM 並放至 5 % CO₂ 培養箱, 7 °C。PC12 Neuronal cells () 培養於含有 10 % horse serum, 5 % fetal bovine serum, 1 % L-glutamine 與 penicillin/streptomycin 的 DMEM 並放至 5 % CO₂ 培養箱, 37 °C。

Preparation of differentiation of PC12 cells

第一天, 將 PC12 Neuronal cells 種到已 coated Poly-L-Lysine (PLL) 的 15 或 10 cm dish 內, 用含有 10 % horse serum, 5 % fetal bovine serum 的 DMEM 培養 24hr。

第二天再將舊培養基吸除掉並換上含有 1% FBS, 1% HS, B27 supplement 與 50 ng/ml NGF 的 neurobasal medium, 培養 48hr。最後再將舊培養基吸除後換上含有 50 ng/ml NGF 的 DMEM 即可進行實驗。

Preparation of conditioned medium of astrocytoma cells & treatment

將 C6 astrocytoma cells 以 1×10^6 cells/ml 並以 1 % fetal bovine serum 的 DMEM 種入 10 cm dishes。待貼壁後加入含有 12 µg/ml LPS/25 ng/ml IFN- γ 處理 15 min, 再額外加入 WEA、Luteolin 或 Wedelolactone 於 24 hr。最後將含有藥物之培養基收集起來並保存於 -20 °C 直到須處理 differentiated PC12 cells。

MTT assay (如前)

Nitrite release assay

Nitrite 為 NO 的穩定氧化代謝產物 ($\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$), 因此常常用 nitrite 累積量來間接代表 NO 產量, 甚至 NOS 活性, 而以 griess reagent (0.1 % sulfanilic acid + 1 % N-(1-naphthyl) ethylenediamide Dihydro-chloride + 2.5 % Phosphoric acid) 測定培養液中 nitrite 累積量評估 NO 產量與 NOS 活性為一簡便的方法 (Green et al., 1982)。藉由比色法 (colorimetric assay) 估算培養液中 nitrite 累積量, 因培養液中 nitrite 累積量的不同, 加入 griess reagent 後, 溶液呈現粉紅色深淺變化, 而在波長 540 nm 時有最大的吸光值。將 C6 cells 以 1×10^6 cell/well 並以 1 % fetal bovine serum 的 DMEM 種入 24 well plate 內, 待貼壁後再加入 12 µg/ml LPS/25 ng/ml IFN- γ 處理 15 min, 再加入 WC-EA、Luteolin 或 Wedelolactone 於 24 hr。最後取出約 800 µl 的 condition medium 放至微量離心管內, 取 100 µl 在 96 well plate 內, 再加入 100 µl 的 griess reagent (1% Sulfanilamide + 0.1% n-(1-naphty) ethylenediamine dihydrochloride), 靜置 15 min 後以 540 nm 偵測。

活性氧物質之測定 (如前)

Factin stain

將 C6 cells 或 differentiated PC12 cells 培養貼壁後, 利用 trypsin-EDTA 將細胞拍打下來, 培養液沖洗後, 再將其細胞混合液離心, 更換新培養液並將細胞濃度調整至 $1-2 \times 10^5$ cell/well, 種到 6-well plate 進行培養。將 cells 處理指定藥物 (The C6 cells : 加入 12 µg/ml LPS/25 ng/ml IFN- γ 處理 15 min, 再加入 WC-EA、Luteolin 或 Wedelolactone, 培養 24 hr; the differentiated PC12 cells : 加入 condition medium, 培養 48 hr。)。將舊培養液吸除, 以 PBS 清洗數次, 加入 3.7% formaldehyde 進行固定, 放置室溫下固定 10 分鐘, 接著再以 0.1% Triton X-100 反應 5 分鐘, 以 3% heat-inactivated BSA 於 37 °C 下 blocking 15 分鐘, 最後利用 TRITC-phalloidin (1:2000) 染色 1 h, 時間到再以 PBS 沖洗數次後, 以 Fluorescence Microscopy 挑選 4-5 個較佳的視野來觀察細胞骨架的變化。

DAPI staining (如前)

Measurement of TNF- α release

將 C6 cells 處理 12 µg/ml LPS/25 ng/ml IFN- γ 處理 15 min, 再加入 Luteolin、Wedelolactone 或 WC-EA 於 24 hr。培養 24hr 之後將 cultured medium 吸取至 endorff tube 內, 最後利用 rat TNF- α ELISA kit (Biosource ELISA; Invitrogen) 進行 TNF- α 釋放於 medium 的測定。

Measurement of phosphorylated Stat3 (Tyr705) activity in Nucleus

將 C6 cells 以 1.5×10^6 cell/ml 並以 1 % fetal bovine serum 的 DMEM 種入 10 cm dish 內，待貼壁後再加入 12 μ g/ml LPS/25 ng/ml IFN- γ 處理 15 min，再加入 Luteolin 或 Wedelolactone 於 24 hr。之後利用 trypsin-EDTA 將細胞拍打下來，經由培養液沖洗幾次後，再將其細胞混合液離心，以 PBS 清洗，離心再移除 PBS 之後進行合蛋白萃取。配制 cytosol extraction buffer (Buffer A : Hepes 10 mM pH 8.0、KCl 10 mM、EDTA 0.1 mM、DTT 1 mM、PMSF 0.5 mM) 與 Nuclear Extraction Buffer (BufferC : Hepes 20 mM pH 8.0、NaCl 0.4 M、EDTA 1 mM、DTT 1 mM、PMSF 1 mM)，將已經用 PBS 清洗乾淨的細胞加入 200 μ l 的 Buffer A 並立即加入 10% NP-40，vortex 15 sec 後放到冰上反應 20 min，之後再 vortex 5 sec 並離心最大轉速 14000 xg，5 min，4 $^{\circ}$ C。移除上清液後將剩餘的 pellet(含有 nuclei)用 PBS 清洗離心 14000 xg，5 min，4 $^{\circ}$ C 一次。吸乾 PBS 後加入 Buffer C 50 μ l，於冰上 1 小時，每 15 min 震盪一次，1 hr 後，離心於 4 $^{\circ}$ C，14000 轉 20 min，取其上清液，即為核蛋白。將核蛋白利用 bio-rad protein assay kit 進行蛋白質定量，最後利用 STAT3 (pY705) ELISA Kit (abcam) 進行 phosphorylated Stat3 (Tyr705) activity 測定。

Western blot (如前)

分析統計(Statistical analysis) (如前)

結果與討論

第一年

1. 黃花蜜菜之生物活性成份及分離之化合物 首先本研究將黃花蜜菜所萃取之萃取物經由總酚測定及類黃酮測定選擇出有效之生物活性萃取層。結果由(Fig. 1)所示，經由不同極性之有機溶劑萃取後發現乙酸乙酯層所含的酚類及類黃酮類含量是最多的，因此在更深入探討了解乙酸乙酯層所含的化合物成分。
2. 黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物保護 PC12 神經細胞抵抗過氧化物(*tert*-butyl hydroperoxide, t-BHP)細胞毒性傷害 本研究利用黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物培養 24 小時觀察細胞毒性(Fig. 2A)，其中利用無毒劑量來保護神經細胞當作藥物劑量，另外也使用處理 3 小時 t-BHP 有毒劑量 100 μ M 的劑量來毒殺 PC12 神經細胞(Fig. 2B)，因此最後將萃取物及過氧化物 t-BHP 兩者結合使用，首先將細胞預處理 24 小時的萃取物後加入過氧化物 t-BHP 3 小時觀察處理萃取物及 t-BHP 細胞存活率是否增加，結果由(Fig. 2C)所示處理不同劑量之萃取物有保護神經細胞死亡的能力；另外利用 LDH 去觀察細胞毒性測試，結果由(Fig. 2D)所示單獨處理 t-BHP 會使 LDH 酵素上升，而預處理不同濃度之萃取物會使 LDH 酵素下降，由上述的結果可以看出黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物可以保護神經細胞的毒性傷害。
3. 黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物預防 t-BHP 所誘導的細胞凋亡 本研究利用 DAPI 染色及 Flow cytometry PI stain 方式去觀察細胞凋亡現象，因此將細胞預處理 24 小時的黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物後在加入 3 小時的 t-BHP 過氧化物，發現預處理過不同濃度之萃取物可以抑制 t-BHP 所誘導的細胞凋亡。
4. 黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物抑制 t-BHP 所誘導細胞內活性氧(ROS)及活化細胞內 Glutathion(GSH)的產生 由於 GSH 在細胞內當作抗氧化酵素的一種，而 t-BHP 所誘導的 ROS 可使 GSH 耗盡，但預處理過黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物後會使 GSH 表現提升並提高抗氧化能力(Fig. 4A)。另外，本研究也利用 Flow cytometry 和螢光顯微鏡去觀察 t-BHP 所誘導的細胞內活性氧的變化，結果由(Fig. 4B)發現，有處理過 t-BHP 後會使細胞產生 ROS，此時 Flow cytometry 所產生的 peak 會向右移動，而加入黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物會降低 ROS 的表現。
5. 黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物抑制 t-BHP 所誘導的 Intrinsic pathway 凋亡路徑 許多文獻上指出，神經保護是透過 anti-apoptosis proteins(Bcl-2, Bcl-X_L)、pro-apoptosis (Bax) proteins 和抗氧化基因(antioxidant genes)有關(Cho, Lee et al. 2008)，因此本研究利用 western blot 去探討內生性粒線體凋亡相關蛋白(Pias, Ekshyyan et al. 2003)，首先在(Fig. 5)發現細胞凋亡所產生的 caspase 3 經由 t-BHP 降低 pro-caspase 3 的表現，而預處理過萃

取物後 pro-caspase 3 慢慢的增加，另外 Intrinsic pathway 所活化的 caspase 9 可以看出處理過 t-BHP 會使 pro-caspase 9 下降，而預處理過萃取物會使 pro-caspase 9 的表現上升，另外加入萃取物後會提升 Bcl-2 及 Bcl-xL 表現而使 Bax 的蛋白表現下降因此可以了解 t-BHP 會使神經細胞經由內生性路徑產生凋亡，而處理過萃取物會保護神經細胞減少凋亡現象。

6. 黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物抑制 t-BHP 所誘導 MAP Kinases 訊息傳遞路徑 MAP Kinases(JNK, p38, Erk1/2)參與細胞內的訊息傳遞，並且調控細胞的增生、凋亡、存活、轉移等，本研究結果由(Fig. 6)所示，細胞處理 t-BHP 後會活化磷酸化 JNK, p38, Erk1/2，但處理過不同濃度的萃取物會抑制磷酸化的表現。因此，t-BHP 可能會經由 JNK, p38, Erk1/2 三條訊息路徑產生細胞凋亡，而加入萃取物後可抑制細胞凋亡訊息路徑的活化。

第二年

1. 氧化壓力被認為與老化過程有密切關係，D-半乳糖是一種還原糖在 D-galactokinase 及 galactose-1-phosphate unidyltransferase 催化下代謝，然而在大量供應 D-半乳糖時在 galactose oxidase 催化下會產生 aldose 及 過氧化物進而導致氧化壓力的產生。在主動迴避行為測定中發現小白鼠學習能力不佳在 30 回測試中 active avoidance 平均在 0.5-3 回而 escape 平均在 20-26 回，給與 PEW 並沒有太大的改變(Table 1),可能須連續讓小白鼠學習數天才有辦法看到變化或差異，然而我們在 escape latency 中發現，30 回測試中 escape latency 有愈來愈短之傾向(time effect)且正常組與 PEW 組 escape latency 比 D-半乳糖組來的短(time-by-treatment)(Fig.1),以上結果顯示 PEW 處理組及 vit.E 處理組可使 D-半乳糖所造成的學習能力不佳恢復。
2. D-半乳糖會造成腦組織 p-tau, beta-amyloid 的大量產生以及脂質過氧化的大量堆積，而同時處理黃花薔薇菊多酚萃取物與維他命 E 皆有意義的降低這些氧化壓力的指標(Fig.2-4)
3. 又由腦組織切片中也發現半乳糖可大大減少皮質及海馬迴神經細胞的數目而同時處理黃花薔薇菊多酚萃取物與維他命 E 皆有意義的提升皮質及海馬迴神經細胞的數目(Fig.5-6),由以上結果顯示黃花薔薇菊多酚萃取物具有預防退行性神經病變發生之潛能。

第三年

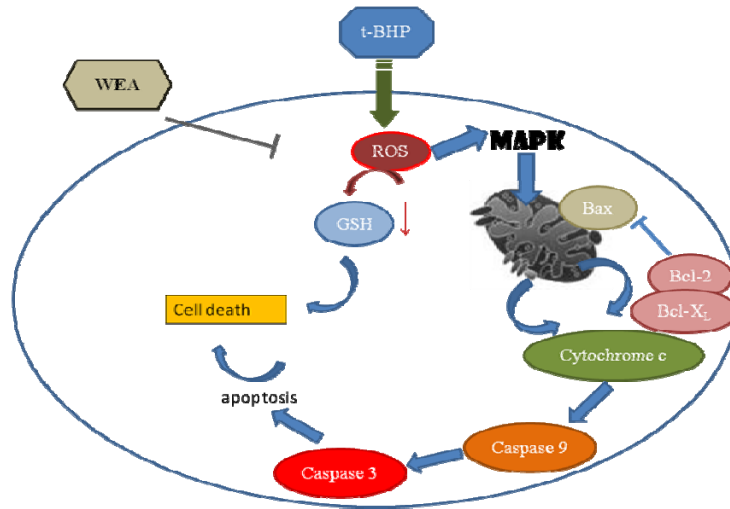
由於外來的傷害或發炎反應會活化的星狀細胞本為保護作用之反應然過度活化時反而會造成腦細胞的傷害，首先我們利用不同濃度的內毒素(LPS)及細胞素(IFN γ) 建立活化但不傷害星狀細胞的濃度與比例(data not shown), 結果選定 12 μ g/ml LPS 加上 25ng/ml IFN γ 進行本研究結果如下：

1. 內毒素及細胞素處理星狀細胞會使形態改變且其中 GFAP 蛋白大量表現，而處理不同濃度薔薇菊萃取物(WEA)會抑制該活化指標之表現(Fig.1)。而文獻指出 LPS 會透過活化 Src-suppressed C kinase substrate (SScCKS)促進 iNOS 發炎指標表現，Fig.1 也發現 WEA 會抑制 SScCKS 之表現。
2. 內毒素及細胞素處理星狀細胞會使其增加 ROS 的製造與 TNF α 的釋放，這些因子是具有攻擊性，會造成週邊細胞傷害，結果我們發現 WEA 會抑制內毒素及細胞素誘發星狀細胞所增加的 ROS 與 TNF α 的釋放(Fig. 2 and Fig. 3)。
3. 內毒素及細胞素處理星狀細胞所造成細胞內 ROS 製造與 COX-2 與 iNOS 表現有密切關係，因此我們偵測內毒素及細胞素處理星狀細胞所造成 COX-2 與 iNOS 表現的影響，結果發現內毒素及細胞素會增加 COX-2 及 iNOS 表現而處理 WEA 會抑制之(Fig. 4)。
4. 發炎的反應常受到訊息路徑 NFkB 及 STAT 的調控，由 time course 實驗中發現內毒素及細胞素處理星狀細胞所造成細胞內 NFkB 及 STAT 的活化(phosphorylation), 而加入 WEA 會抑制 NFkB 及 STAT3 的活化 (Fig. 5)。

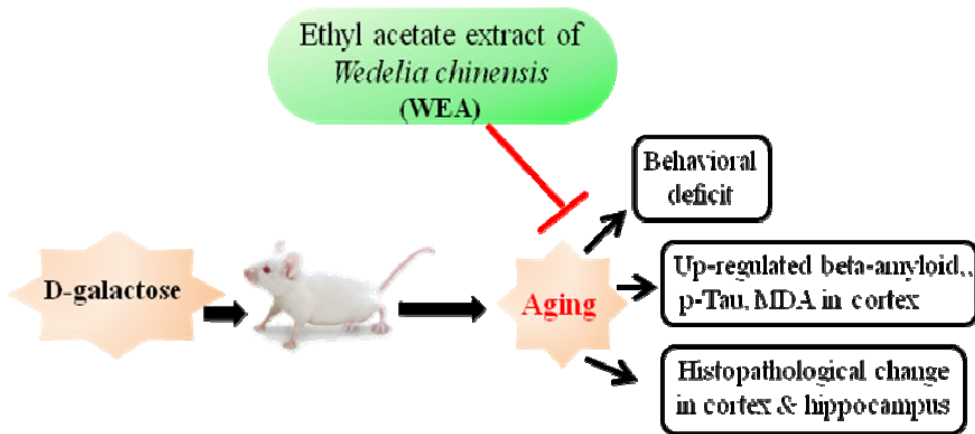
5. 另外我們把處理內毒素及細胞素星狀細胞的 medium 加入分化的 PC12 細胞中結果有降低細胞存活率的現象, 而經 WEA 與內毒素及細胞素共同處理星狀細胞的 medium 可有意義提升細胞存活率 (FIG. 6), 換言之內毒素及細胞素星狀細胞會釋放有害成份如 $TNF\alpha$ 而 WEA 可降低內毒素及細胞素星狀細胞會釋放有害成份, 因此蟛蜞菊具有保護神經細胞之作用.
6. 最後我們將 WEA 進行 HPLC 分析, 發現其主成份為 wedelolacton 及 luteolin (Fig. 7), 因此也進行如上之探討, 結果發現兩者皆有減少內毒素及細胞素誘發星狀細胞所增加的 NO 與 $TNF\alpha$ 的釋放 (Fig. 8 and Fig. 9). 也具有保護神經細胞之作用 (Fig. 10).

結論

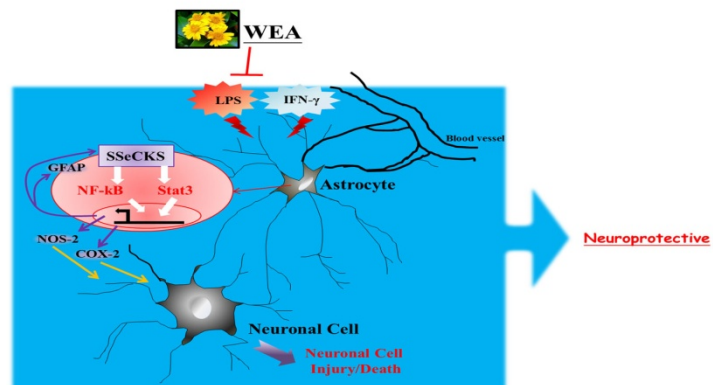
第一年



第二年



第三年



結果圖

第一年

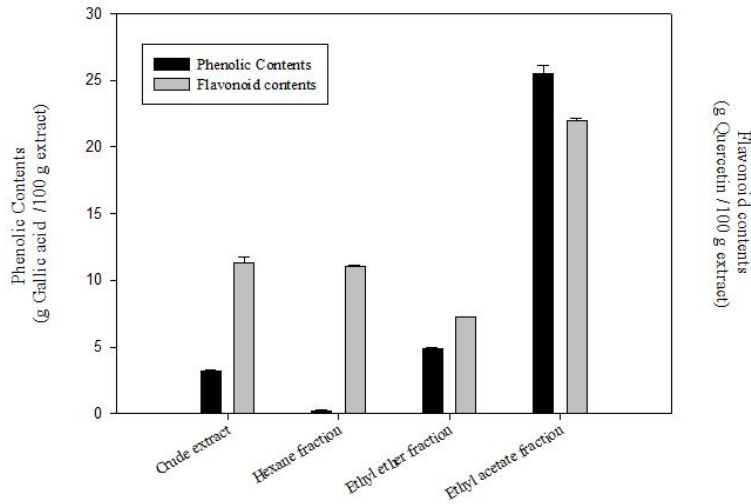


Fig 1. Analysis polyphenolic contain of different extract fraction of *Wedelia chinensis*. Total content analysis of phenols and flavonoids.

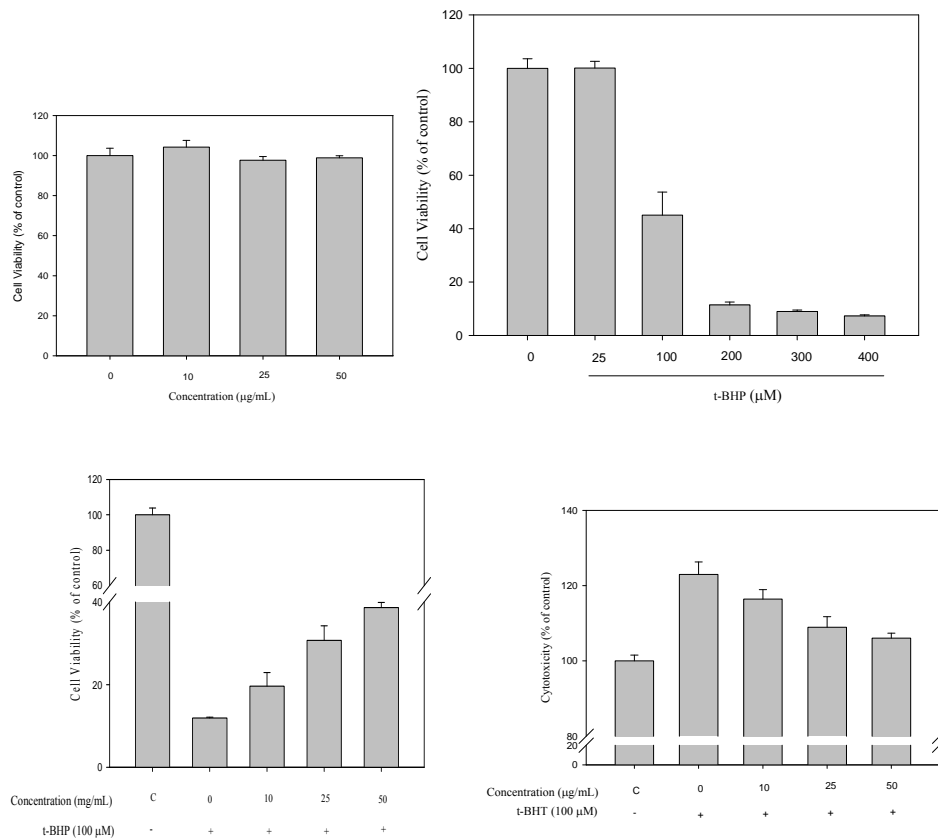


Fig 2. Neuroprotective effect of ethyl acetate fraction of *Wedelia chinensis* on t-BHP-induced cytotoxicity in PC12 cells. (A) PC12 cells were treated with ethyl acetate fraction (10, 25 and 50 µg/mL) for 24 h. (B) PC12 cells were exposed to different concentrations of t-BHP for 3 h. (C) PC12 cells were pretreated with ethyl acetate fraction (10, 25 and 50 µg/mL) for 24 h, and then treated with 100 µM t-BHP for 3 h. (D) Effects of ethyl acetate fraction and t-BHP on extracellular LDH activity in PC12 cells.

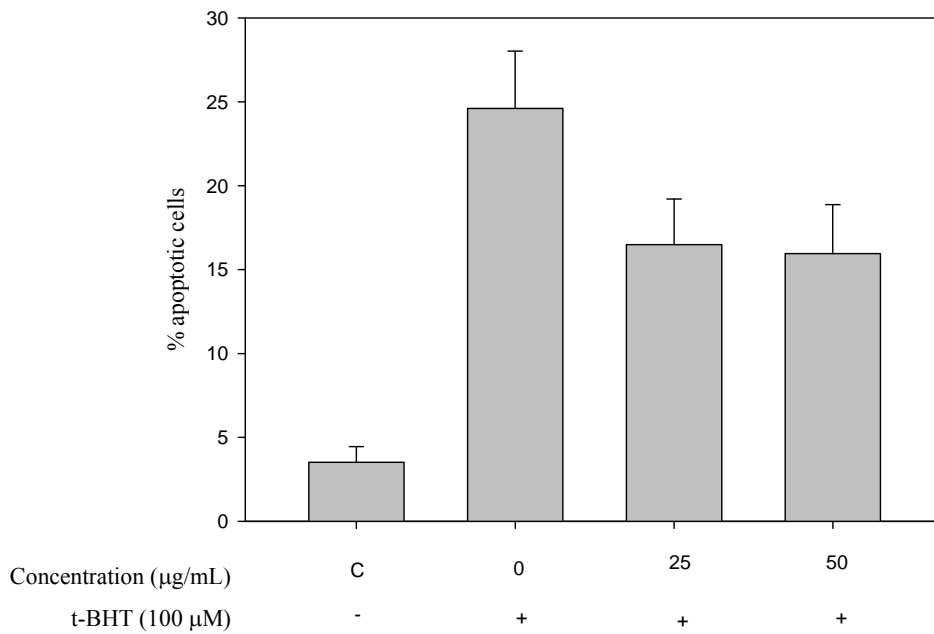


Fig.3 Prevention effect of ethyl acetate extract of *Wedelia chinensis* from t-BHP-induced apoptosis in PC12 cell. Cells were pretreated with ethyl acetate extract (10, 25 and 50 µg/mL) for 24 h, and then treated with 100 µM t-BHP for 3 h. Apoptosis cells were counted under fluorescence microscopy by staining with DPAL..

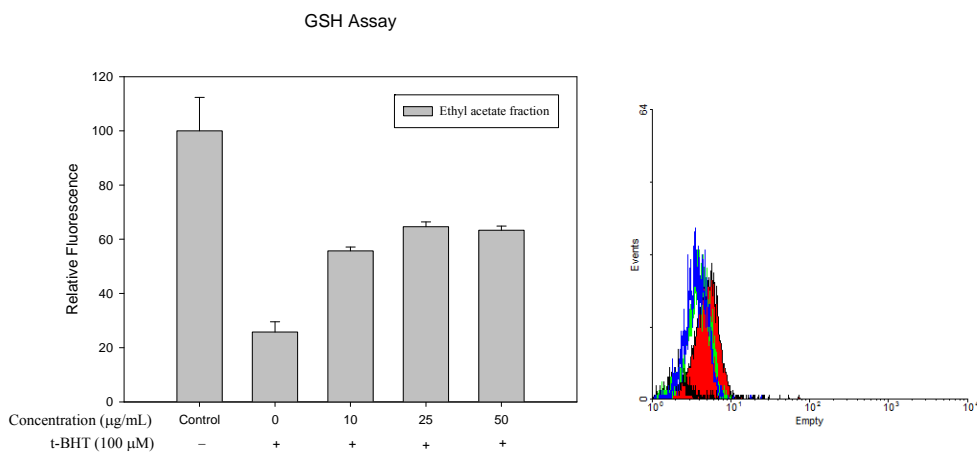


Fig 4. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Wedelia chinensis* on t-BHP-induced intracellular ROS accumulation and GSH depletion. (A) Does dependent effect of ethyl acetate extract on GSH level were determined by monochlorobimane stain. (B) Intracellular ROS levels were determined usi

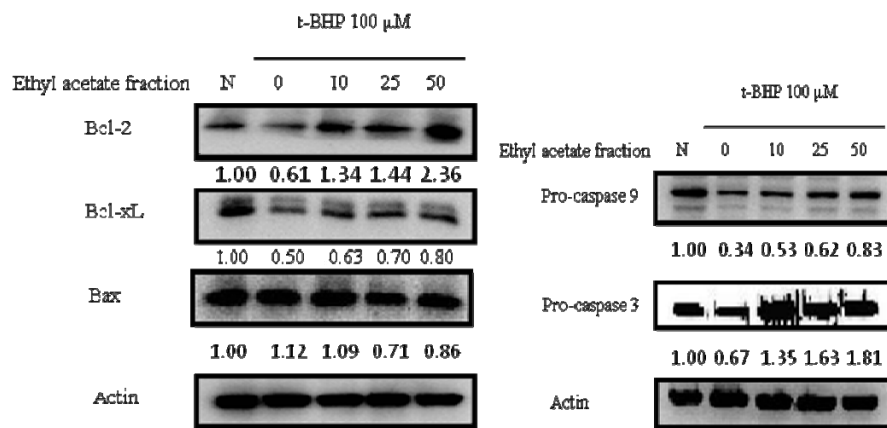


Fig 5. Prevention of t-BHP-induced cell apoptosis by mitochondrial pathway. Effects of ethyl acetate fraction of *Wedelia chinensis* (10, 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$) on the protein expression levels of caspase-3, caspase-9, Bcl-2, Bax

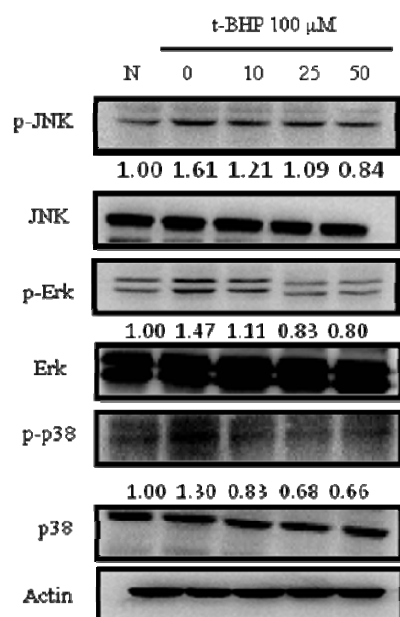


Fig 6. Effects of ethyl acetate extract of *Wedelia chinensis* on t-BHP-induced phosphorylation of JNK, p38 and Erk1/2 MAPK. Cells were pretreated with ethyl acetate extract of *Wedelia chinensis* followed by 100 μM t-BHP challenge for 30 min. After incubation, cells were harvested and MAP kinase protein levels were measured by Western-blot analysis using phospho-specific antibodies for each MAP kinases.

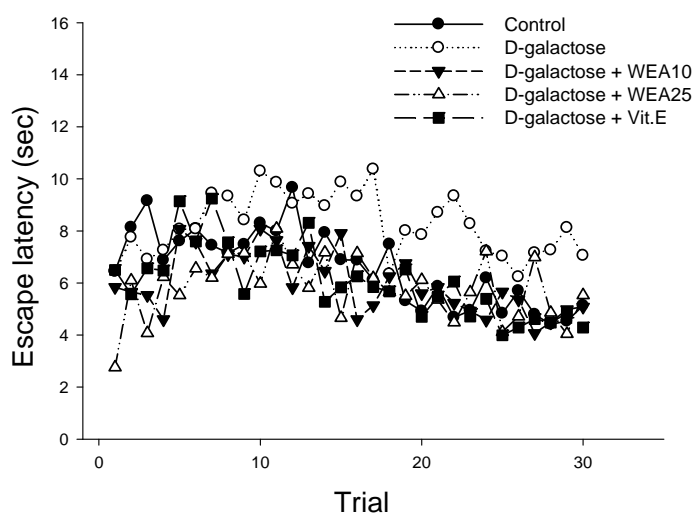


Fig. 1. Effects of WEA and vitamin E (Vit.E) on escape latency of D-galactose-treated mice in the active avoidance test. The test was performed after 9 weeks of D-galactose (50 mg/kg/day, s.c.) treatment. WEA (10 and 25 mg/kg) and vit.E (10 mg/kg) were co-administered intraperitoneally (i.p.) thrice per week for 9 weeks. For clear, the mean values are expressed and the SEMs are abbreviated.

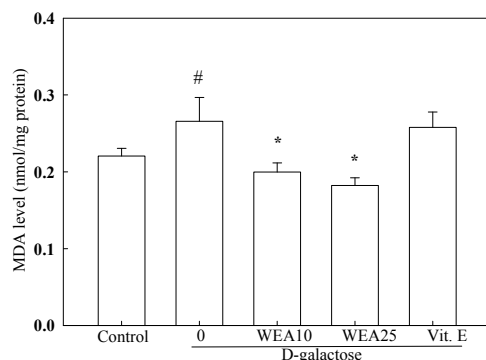


Fig. 2. Effects of WEA on the level of malondialdehyde (MDA) in the cortex of D-galactose-treated mice. The MDA level of each cortex was analyzed as described in the text. Data are expressed as mean±SEM. # $P < 0.05$, compared with the control; * $P < 0.05$, compared with the D-galactose-treated group.

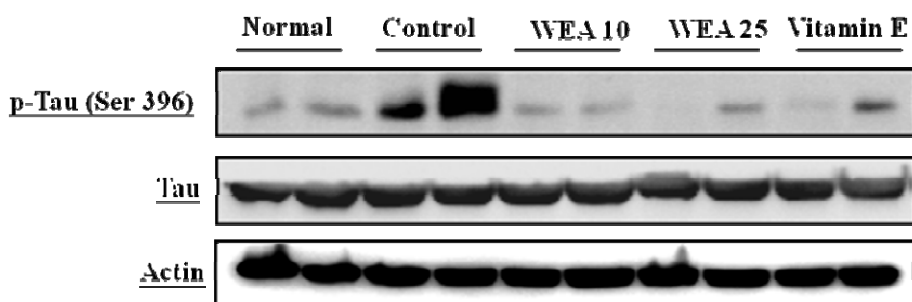


Fig. 3. Effects of WEA on the levels of phosphorylation of Tau protein in the cortex of D-galactose-treated mice. The representative Western blotting shows the levels of Tau protein and phosphorylation Tau (p-Tau).

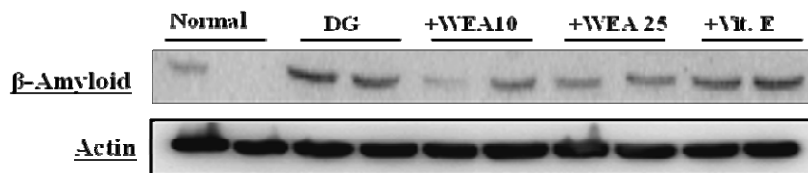


Fig. 4. Effects of WEA on the level of beta-amyloid protein in the cortex of D-galactose-treated mice. The representative Western blotting shows the level of beta-amyloid protein.

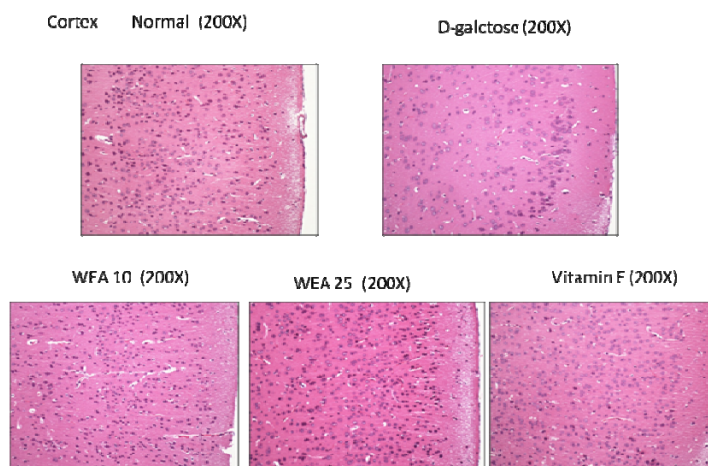


Fig. 5. Effects of WEA on neuronal density in the cortex of D-galactose-treated mice. The representative hematoxylin-eosin staining of the cortex (200 X). Scale bar: 100 μ m.

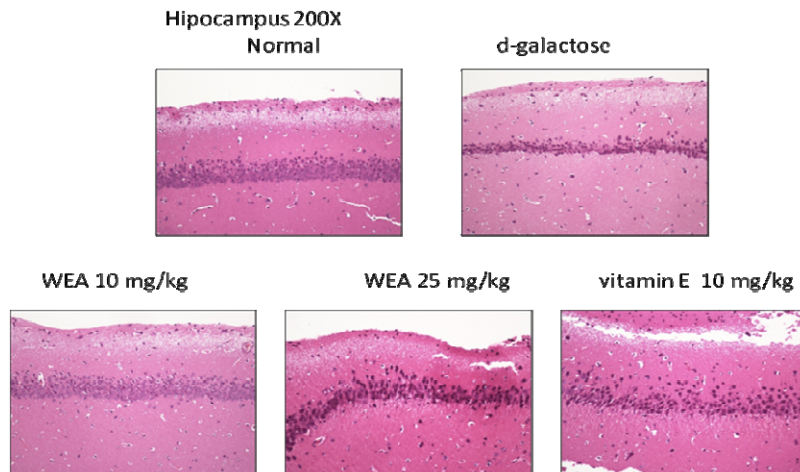
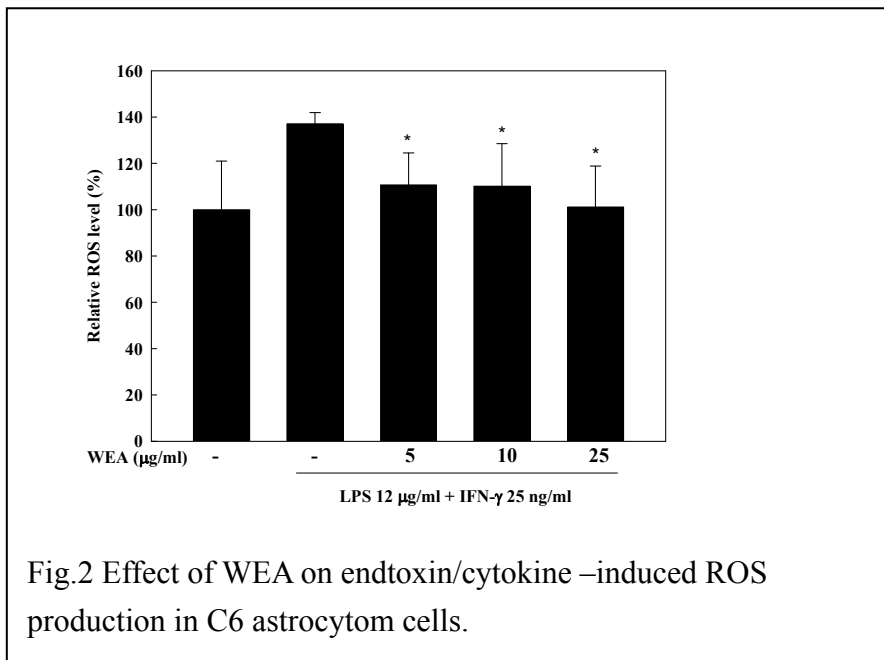
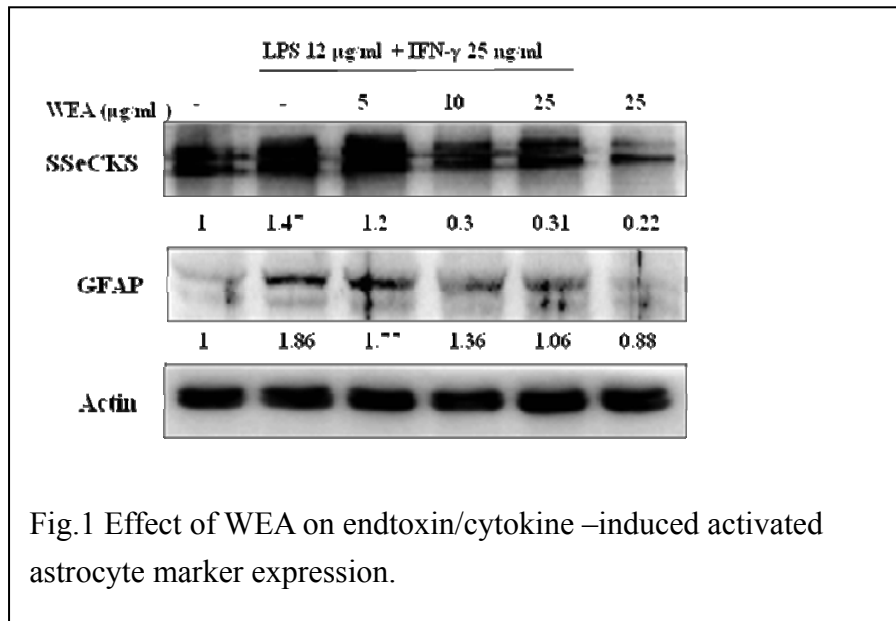
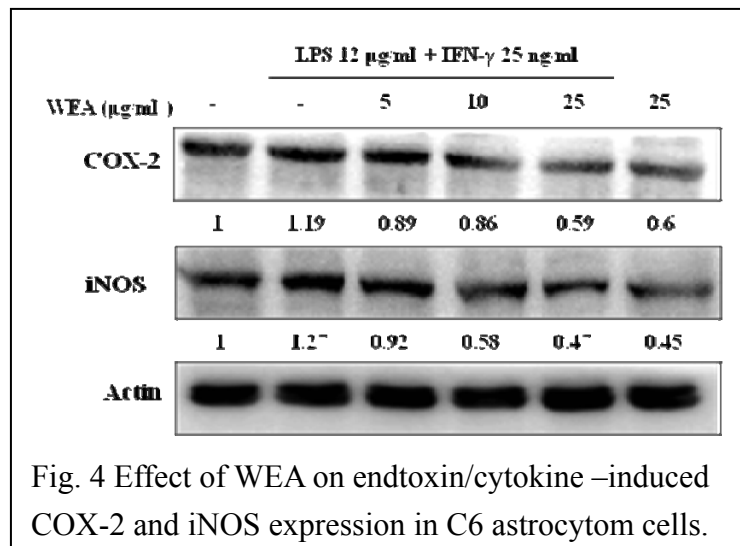
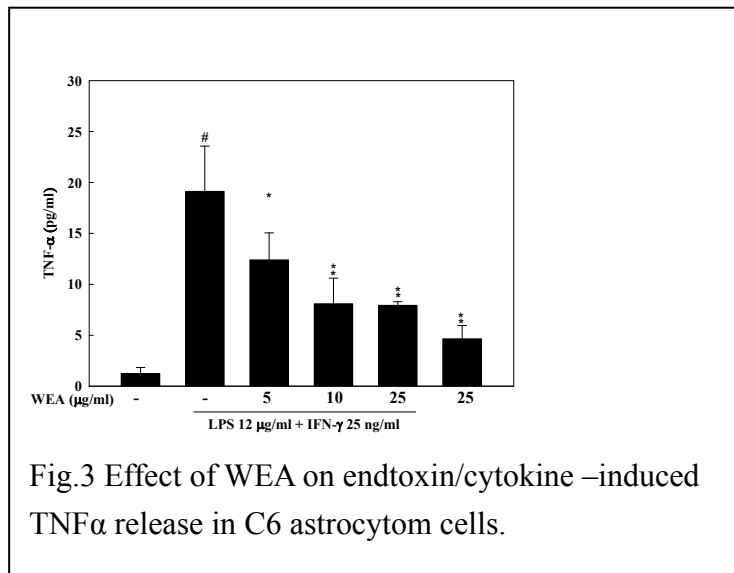
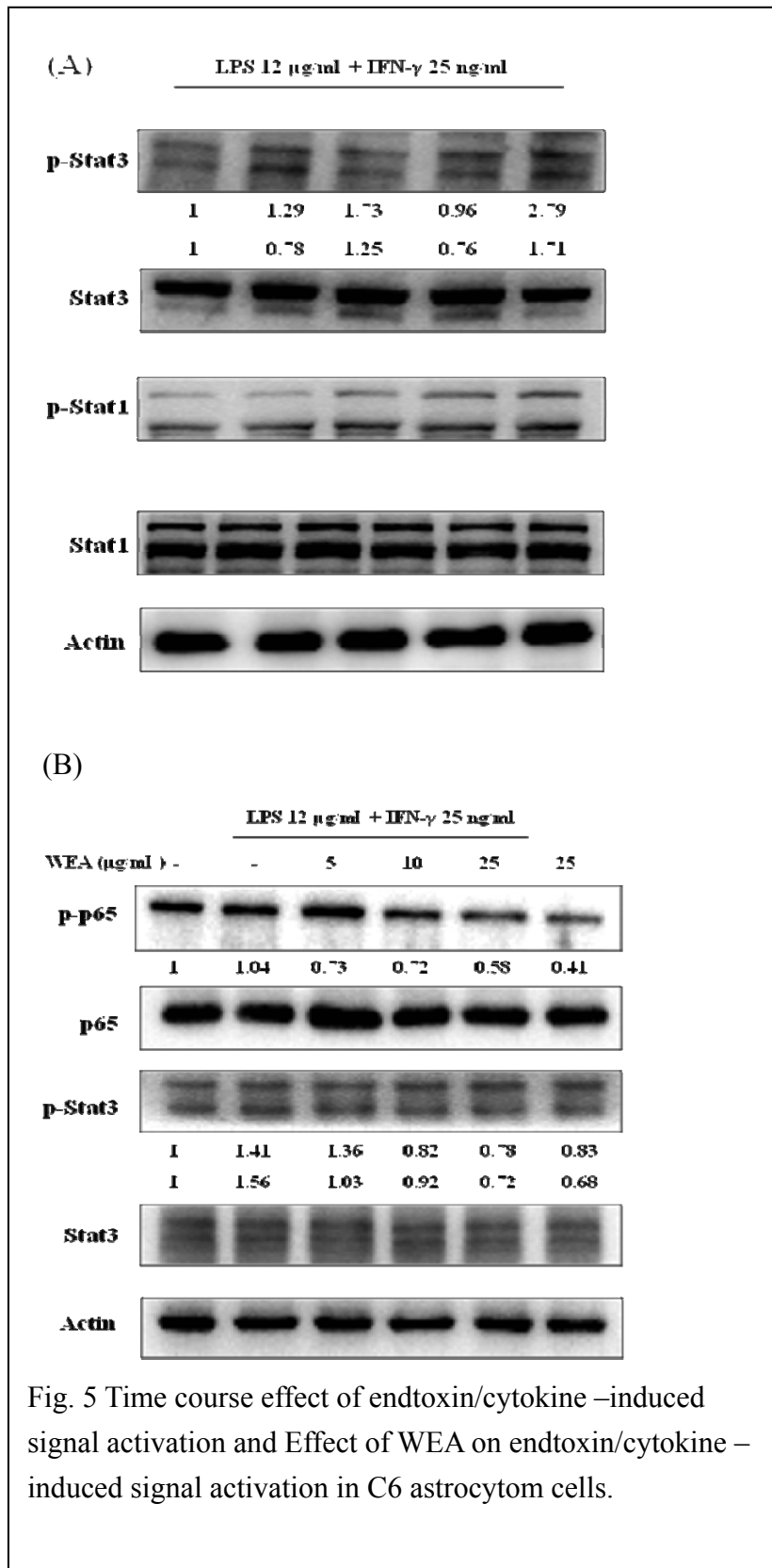
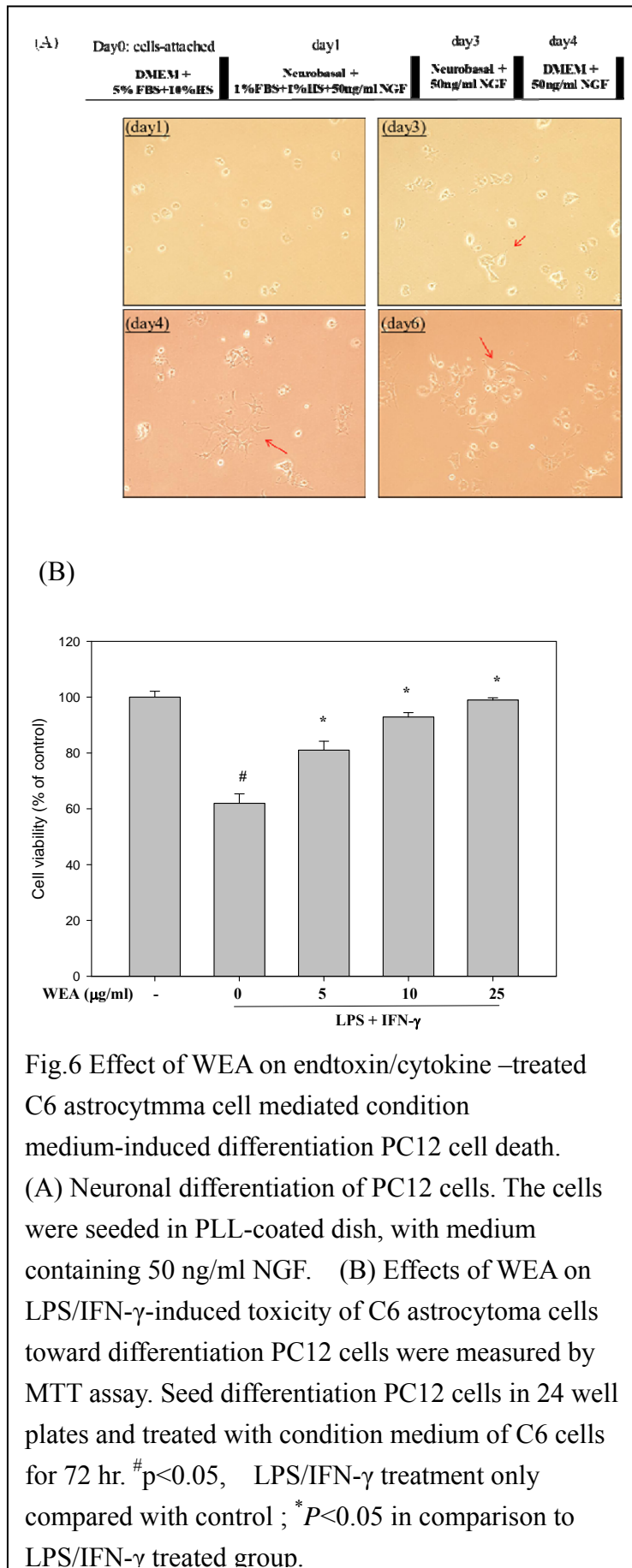


Fig. 6. Effects of WEA on neuronal density in the hippocampus of D-galactose-treated mice. The representative hematoxylin-eosin staining of the hippocampus CA region (200 X).









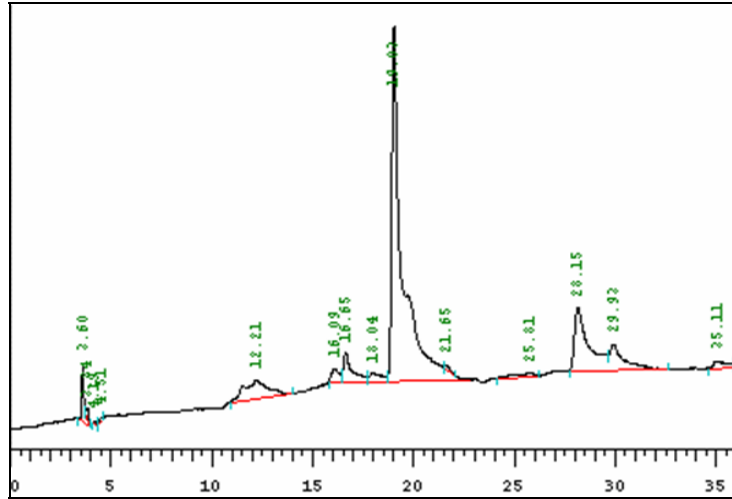


Fig. 7 HPLC analysis of WEA

1. Wedelolactone (RT= 19.93) 2 luteolin (RT=28.15)

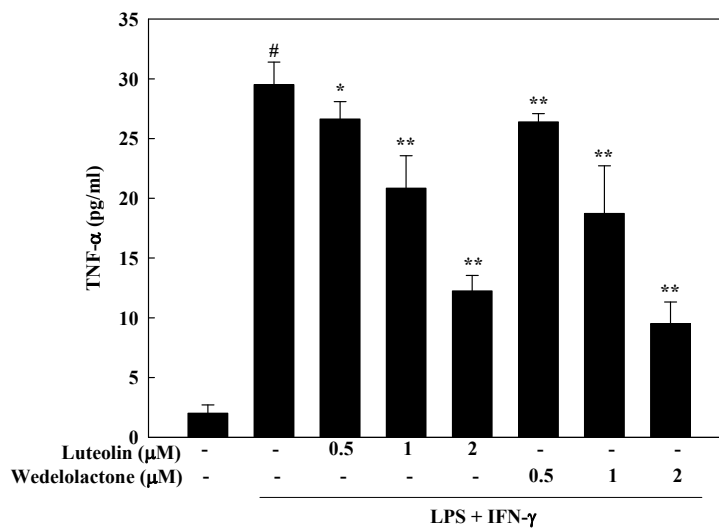
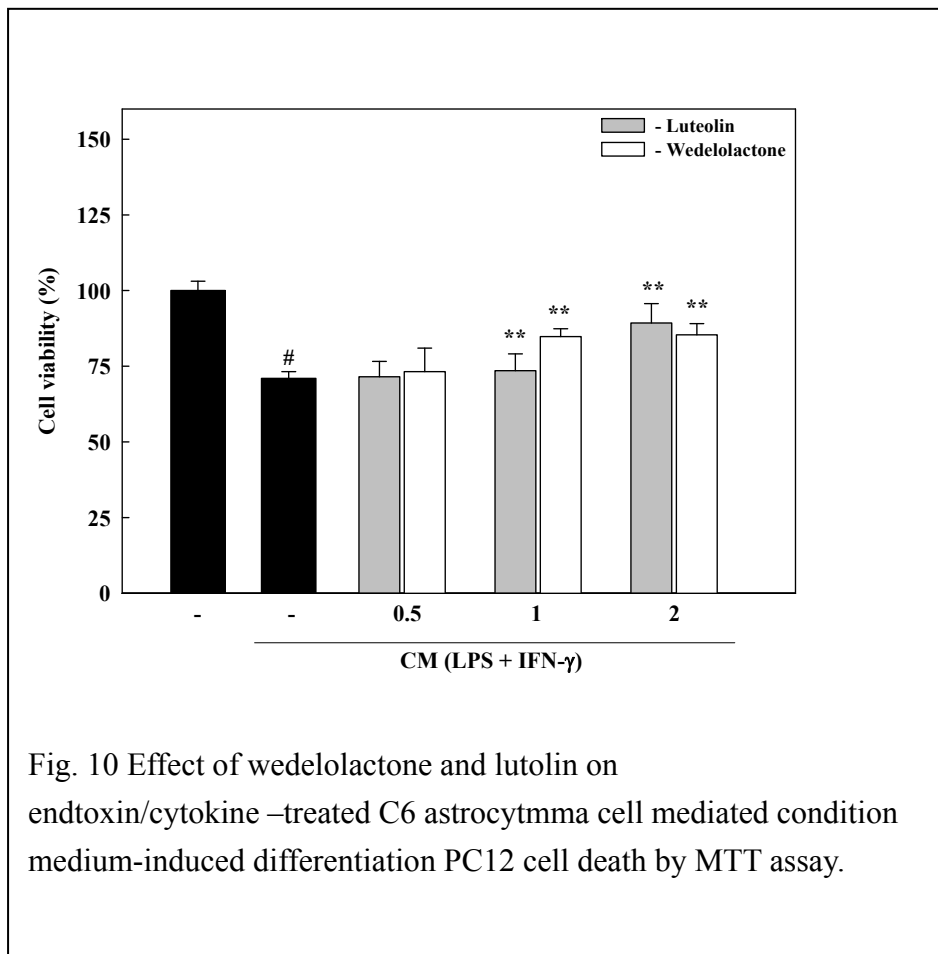
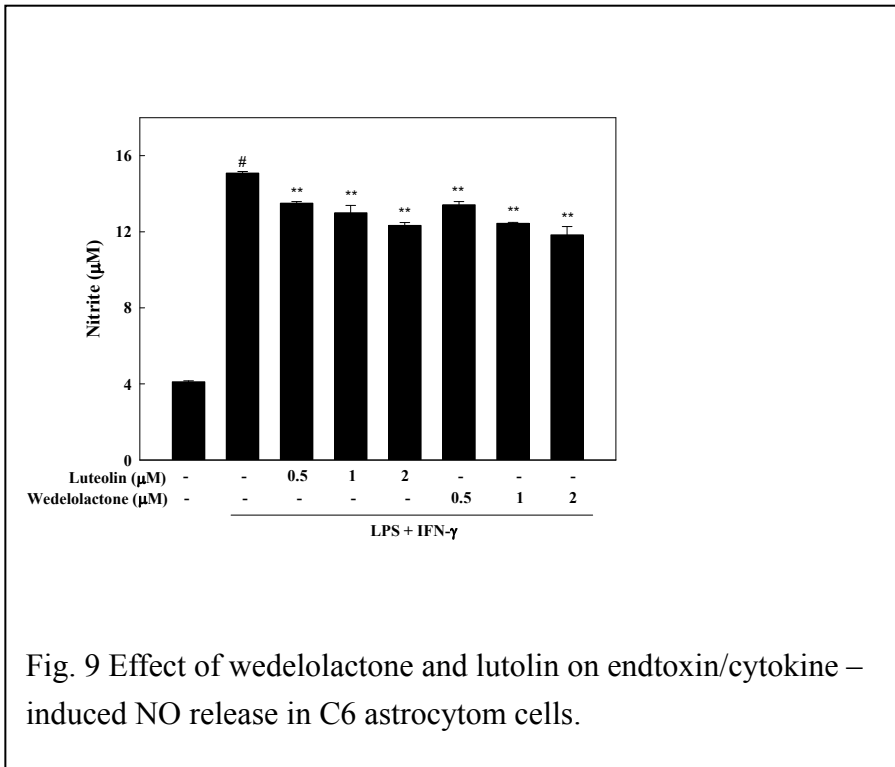


Fig. 8 Effect of wedelolactone and luteolin on endotoxin/cytokine – induced TNF α release in C6 astrocytoma cells.



國科會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 1 件 撰寫中 1 件 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）

成果

1. 參加第二十六屆生物醫學聯合會(2011) 壁報展覽

Title: Protective Effect of Polyphenolic Extract of *Wedelia chinensis* on tert-Butyl hydroperoxide-induced Cytotoxicity in PC12 Neuroblastoma Cells. School of Applied Chemistry, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan.

2 參加 International Conference on Food Factors (2011), 成果受到多位日本學者關注

Title: Protective effect of polyphenolic extracts of *Wedelia chinensis* on beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells

3. 參加第二十八屆生物醫學聯合會(2013) 壁報展覽

Title: Extract of *Wedelia chinensis* Inhibits LPS/IFN- γ -Induced C6 Astrocytoma Cell Activation and Protects Against Inflammation-Mediated Differentiated PC12 Neuronal Cell Injury

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

到目前發現蟛蜞菊含豐富多酚化合物，對腦細胞氧化性傷害所造成的細胞毒性與細胞凋亡具有保護作用，其保護作用與其減少細胞內自由基堆積有關，另外也與其增加抗氧化酵素及提升細胞內 GSH 有關，另外我們也發現其主成份 luteolin 及 wedelolactone 不僅具有補捉自由基之作用也皆具有活化抗氧化酵素之能力。動物實驗也發現蟛蜞菊乙酸乙酯粗萃物可減少 d- galactose 誘發 mice 腦部脂質過氧化產物的產生及皮質腦細胞的減少。另外也發現蟛蜞菊乙酸乙酯粗萃物可抑制星狀細胞的活化與其所造成神經細胞的死亡。而其多酚成份如 luteolin 及 wedelolacton 也都有保護神經細胞的死亡的作用。

由以上結果認為蟛蜞菊除有傳統保肝作用外，本研究認為其可開發為預防老化相關腦退化病變的健康食品，另外本研究亦發現其有活性之成份除了黃酮類 LUTEOLIN 外，另一多酚主成份 Wedelolacton，亦具有抗氧化抗發炎的神經保護活性，而其來源除從天然物萃取外亦已成功被合成，所以其有可能開發為藥物。

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

疾病化學預防物質開發及機轉研究-疾病化學預防物質開發及機轉研究-開發穿山龍及欖仁樹葉萃取物作為促進抗癌藥物療效和抑制腫瘤抗藥性物質之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2632-B-040-001-MY3-(6)

執行期間： 99 年 8 月 1 日至 102 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學 生化所

計畫主持人：周芬碧

共同主持人：陳霽霓

計畫參與人員：賴奕暉

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

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 102 年 09 月 07 日

中英文摘要

癌細胞的轉移往往是惡性腫瘤的重要特徵之一，並且也是在臨床治療上最難以根治的。因此，在很多研究中，大都是以針對癌細胞的轉移過程，開發新藥或是利用天然藥物處理是否會影響癌細胞的轉移。目前已有多種中藥已被確認具有抗發炎，抗過敏及抗癌的活性，且其中具有生物活性的有效成份，部分已被單離並經分析鑑定。中藥對癌症所引起的諸多症狀的治療能有所助益，已是眾所皆知的事實，而中藥的抗癌有效成份之作用機轉，常為有效地促使癌細胞凋亡及抑制癌細胞增生，但對其抑制侵襲及轉移作用和其詳細機制方面的研究還很少。穿山龍屬民間中草藥，被中草藥店拿來做治療筋骨痠痛與損傷的漢方療藥，許多研究發現穿山龍可以降低兔子的血膽固醇酯、治療各種風濕痛、過敏性皮炎、結膜炎、支氣管炎等病，然而，穿山龍萃取物對於抑制癌細胞轉移能力的相關研究則尚未清楚。本實驗以極度惡性的老鼠黑色素癌細胞 (B16F10) 做研究，利用穿山龍以穿山龍之有機成分之分層萃取物分別為 methanol (DNE1); chloroform (DNE2); ethyl acetate (DNE3); *n*-butanol (DNE4); 與 water (DNE5) 來看其侵襲與轉移的能力以及其相關機轉。發現其中乙酸乙酯萃取物(DNE3)對於癌細胞轉移有相當顯著的效果。首先在 C57BL/6J 老鼠中，以尾靜脈注射，同樣隨機分組，肺部組織切片有因為餵藥而使黑色素瘤轉移的部分明顯減少，有餵食乙酸乙酯萃取物的組別具有顯著抑制癌細胞轉移的能力。以 Wound healing assay，發現穿山龍乙酸乙酯萃取物抑制細胞移動效果顯著，在 MTT assay 中不影響細胞存活率。利用 Boyden chamber assay 觀察到在處理穿山龍萃取物之後細胞侵襲及移動能力也顯著被抑制。用 Zymography assay 看 MMP-2 與 u-PA 活性，細胞處理穿山龍萃取物發現 MMP-2 與 u-PA 也有顯著的抑制效果。以 Western blot 看其路徑，主要透過 PI3K/Akt/ NF-kappa B 路徑抑制核內轉錄因子 NF-kappa B 的結合能力並同時增加 IκB 的蛋白表達能力。此外，近年許多研究指出，欖仁樹 (*Terminalia catappa* L.) 葉具有預防及治療肝炎、抗發炎、清除自由基、抗氧化等活性。在本研究中，我們發現急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia; AML)細胞株 HL-60 以不同濃度欖仁樹葉萃取物 (*Terminalia catappa* L. extracts; TCE) 處理，會造成細胞存活率明顯的降低，且下降趨勢具有濃度及時間關係。此外以 TCE 處理 HL-60 細胞，在流式細胞儀的分析中，發現 sub-G1 phase 的細胞群會隨 TCE 的濃度提高而增多，顯示 TCE 具有誘導 HL-60 細胞走向凋謝死亡。進一步以 DAPI stain，證實 TCE 會造成 HL-60 細胞染色質濃染(chromosome condensation)。最後，我們發現低濃度 TCE 可以促進臨床上治療急性骨髓性白血病之抗癌藥物(arsenic trioxide)的活性，並具有相當不錯的輔助效果。進一步利用欖仁樹葉裡面所富函的單寧酸去處理 HL-60 細胞，發現 HL-60 細胞株在單寧酸的處理下，會造成細胞存活率與細胞數顯著降低，並呈現濃度及時間效應。在流式細胞儀的分析實驗中，發現 sub-G1 的細胞群會隨單寧酸的濃度提高而增加，顯示單寧酸具有誘導 HL-60 細胞凋亡的效果。綜合以上結果，欖仁樹葉萃取物與單寧酸可以有效的抑制急性骨髓性白血病細胞 HL-60 的生長，或許有助於日後對於白血病的治療。此外在本實驗中，我們利用欖仁樹葉之甲醇萃取物(TLME) 觀察其抑制肺癌細胞株 A549 轉移之功效。我們先利用 MTT assay 發現在不同濃度 TLME 下對 A549 是無毒劑量的，再利用 gelatin-zymography 與 casein-zymography 的方法分析肺癌細胞株 A549，結果發現 TLME 對 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的分泌量亦有明顯的抑制，並呈現有濃度效應的關係。接著我們再用 cell motility/invasion assay 來分析 TLME 對具有轉移能力的肺癌細胞株 A549 侵入能力之影響。我們發現 TLME 對 A549 的 motility 及 invasion 能力都有顯著的抑制效果，並都呈現濃度效應關係。當 TLME 的濃度在 10μg/mL 時，經 24 hr 處理對 A549 的 migration 及 invasion 能力抑制就有顯著的抑制效果。我們發現 TLME 可能是透過抑制 A549 細胞株 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的分泌進而抑制癌細胞侵襲作用的能力。

關鍵詞： 細胞侵襲； 抗癌； 癌細胞轉移； 基質金屬蛋白酶； 胞漿酶原活化劑； 細胞凋亡

Abstract

The metastasis of cancer is a vital trait in malignance with extreme difficulties in early diagnosis and therapeutic management. Therefore, the development of new remedies or the utilization of natural medicines targeted at metastasis has been interested and studied extensively. Recently, Chinese medicinal herbs have been reported to have various anti-carcinogenesis properties, including inducing cell apoptosis and suppressing cell proliferation. However, the *in vitro* effect and detailed mechanism of *Dioscorea nipponica* Makino on metastasis of cancer cells was still unclear. Recent studies have revealed pleiotropic anticancer and antiproliferative capabilities of *Dioscorea nipponica* Makino, whereas the effect of this plant on metastasis of cancer cells has not been clearly clarified. In the present study, we extracted *Dioscorea nipponica* Makino with methanol (DNE1), chloroform (DNE2), ethyl acetate (DNE3), *n*-butanol (DNE4), and water (DNE5). We first demonstrate that DNE3 was found to be effective in reducing the lung metastases formation by about 99.5% as compared to vehicle

treated control animals. When a non-toxic concentration of the extract was treated directly to highly metastatic murin melanoma cells (B16F10) and human melanoma cells (A2058) *in vitro*, it exerted a dose-dependent inhibitory effect on the invasion ($P<0.001$), motility ($P<0.001$), secretion of MMPs ($P<0.001$), and u-PA ($P<0.001$) of both cell lines. To investigate the possible mechanisms involved in these events, we performed western blot analysis to find that DNE inhibited phosphorylation of Akt. A treatment with DNE3 to B16F10 cells also inhibited the activation of NF-kappa B and increased the expression of IkappaB. Taken together, these findings suggested that DNE3 could reduce the metastasis of melanoma cells, thereby constituting an adjuvant treatment for metastasis control. Moreover, *Terminalia catappa* L. is a Combretaceous plant distributed on tropical and subtropical beaches. Previous studies showed that the leaves of *Terminalia catappa* L. extracts (TCE) exerted hepatoprotective, antiinflammatory, antioxidative, and radical scavenging activities. In this study, we showed TCE-induced apoptotic death in acute myeloid leukemia (AML) HL-60 cells via dose- and time-dependent manner. In addition, TCE also induced cell death by increasing of sub-G1 fraction and chromosome condensation. Notably, a low dose of TCE is sufficient to aggravate As_2O_3 -induced cytotoxicity in HL-60 cells. The pure compound, tannic acid, was further examined. The result showed that TA-induced apoptotic death in HL-60 cells via dose- and time-dependent manner as well as increase of sub-G1 fraction, and chromosome condensation. Altogether, this study suggested the effects of TCE and TA to induce apoptosis in HL-60 and therapeutic potential in acute myeloid leukemia. Moreover, a highly metastatic human lung cancer cell line, A549, was chosen to be treated with *Terminalia catappa* L. methanol extracts (TLME) to investigate their potential for inhibiting cancer cell migration and invasion. For a start, via wound healing assay and Boyden chamber assay, we found that TLME can suppress A549 cells migration and invasion, and TLME did not have toxicity to A549 cells by MTT assay. We also found that TLME can suppress A549 cells adhesion and cell spreading by cell adhesion assay. Based on that tumor metastasis are accompanied with proteolytic degradation of the extracellular matrix and changed cell motility. Both of MMP-2 and u-PA activity were also inhibited by TLME via gelatin zymography and casein zymography assay.

Keywords: Invasion; Anticancer; metastasis; MMPs; u-PA; apoptosis

報告內容

一、前言及研究目的

根據衛生署公佈之台灣十大死亡原因顯示癌症仍為十大死因之首，其中癌細胞的轉移擴散往往是造成癌症病人病灶復發致死的最主要原因，惡性腫瘤可藉由淋巴及血液系統散播到身體其他的組織器官，造成癌症的轉移擴散，所以即使腫瘤經由手術切除或放射線治療後，依舊難以根治，造成病人癒後狀況不佳，如何治療癌症病人，尋找更有效、毒性低的抗癌藥物，是一個迫切的問題。當良性腫瘤變惡性腫瘤，癌細胞則會向四周擴散，並壓迫和毀壞相鄰的正常細胞與轉移的組織與臟器。癌症的形成是透過許多複雜且多重的過程，其中形成的原因雖然被了解，但治療的效果仍然有限，良性腫瘤還可經由外科手術切除，但是惡性腫瘤治療方式多是以放射線療法與化學療法，且化學療法對人體具有相當大之副作用與傷害，在殺死癌細胞的同時也會傷害正常細胞，因此目前許多研究趨向以天然物成份如多酚類或黃酮類等天然物合併抗癌藥物的使用，期望能加強抗癌藥物的療效，降低抗癌藥物的濃度，以減少化療對人體造成之傷害，達到輔助治療的效果，抑制癌細胞的惡化。

一. 癌細胞的侵襲與轉移

目前有許多文獻指出，癌細胞與正常細胞差別在於無法進行一般細胞凋亡(apoptosis)且具有異常的增生(proliferation)能力。另外，在癌細胞的侵入(invasion)及轉移(metastasis)亦是癌症導致死亡以及治療複雜度提昇的主要原因；而癌細胞轉移已知與多種細胞生理改變密切相關，其中包含【1】細胞與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)之間結合能力(adhesion)的改變，細胞與細胞間相互作用力的破壞(Cuiyan et al., 2007; Gavert & Ben-Ze'ev, 2007; Jeanes, Gottardi & Yap, 2008; Nahari et al., 2007; Song, Bai, Yang, Gabrielson, Chan & Zhang, 2007; Sossey-Alaoui et al., 2007; Tommasi et al., 2007; Yamaguchi & Condeelis, 2007; Yanamoto, Kawasaki, Yamada, Yoshitomi, Yoshida & Mizuno, 2008; Yu, Itokawa, Zhu, Syam, Seth & Insogna, 2007)；【2】細胞的侵襲及移動(motility)能力上升；【3】細胞骨架的重整；【4】細胞外基質的分解，接著癌細胞會分泌大量的蛋白酶(proteinase)，如 serine proteinase (Borstnar, Vrhovec, Svetic & Cufur, 2002; Duffy, 2002; Evans & Sloan-Stakleff, 1998; Foekens, Ries, Look, Gippner-Steppert, Klijn & Jochum, 2003; Hildenbrand & Arens, 2004; Kobayashi, Suzuki, Tanaka, Kanayama & Terao, 2003; Robert, Bolon, Gazzeri, Veyrenc, Brambilla & Brambilla, 1999; Suzuki et al., 2003)、metalloproteinase (MMPs)、cathepsins (Bao, Yeh & Lee, 2006; Gopal, Rehman, Chadha, Qiu & Colella, 2006; Hashimoto et al., 2006; Mohamed & Sloane, 2006; Vasiljeva et al., 2006)以及 plasminogen activator (PA) 分解 ECM 幫助其

穿過細胞外基質(Chakrabarti & Patel, 2005a; Chakrabarti & Patel, 2005b; Chakrabarti, Zee & Patel, 2006)；

【5】侵入到循環系統中的血管或淋巴管，經由逃避免疫系統的防護，貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官；【6】再經由大量的增生及；【7】血管新生(angiogenesis)作用，癌細胞便藉由奪取正常組織器官的養分而造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡(Bhat & Singh, 2008; Finney, Vogt, Fukai & Glesne, 2008; Gretschel et al., 2008; Legg, Herbert, Clissold & Bicknell, 2008; Ma et al., 2008; Spanuth, Sood & Coleman, 2008; Vamesu, 2008)。以上皮細胞為例，細胞癌化至轉移侵入的過程：正常的表皮細胞受到物理性或化學性的刺激後，轉型成癌細胞，轉型後的癌細胞便開始大量的增生，增生後的癌細胞會分泌胞外蛋白水解酵素，分解基底膜以及細胞間基質，最後藉由循環系統以轉移到新的組織器官，然後再開始增生，形成一個新的腫瘤。

二、細胞凋亡(apoptosis)

細胞凋亡一詞最早是在1972年由病理學家John Kerr所提出(Kerr, Wyllie & Currie, 1972)，直至1995年後才被廣泛研究。細胞凋亡是指為維持細胞內環境穩定，由基因控制細胞自主性並且有順序式的死亡。細胞凋亡與細胞壞死不同，細胞凋亡不是一件被動的過程，而是主動過程，涉及一系列基因的活化、表達以及調控等作用，它並不是病理條件下自體損傷的一種現象，而是為更好地適應生存環境而主動爭取的一種死亡過程(Radovic, Cucic & Altarac, 2008)。

發生細胞凋亡的細胞，細胞膜發生皺縮 (shrinkage)、凹陷，染色質變得緻密 (condensation)，最後斷裂成碎片；繼而細胞膜將細胞質分割包圍，內含細胞質的斷片，形成了多個膜結構完整的泡狀小體，就稱為凋亡小體 (apoptotic body)。細胞在發生凋亡過程中細胞質濃縮，細胞骨架蛋白被蛋白酶破壞。故具有4個重要外在特徵：(1)細胞質皺縮(2)染色體濃縮 (chromatin condensation) (3)DNA片斷化 (DNA fragmentation) 形成約185 bp的核小體(4)凋亡小體的產生。細胞在發生凋亡過程中它的特性是細胞膜不會破裂，細胞內容物不會流出，因為細胞質濃縮，細胞骨架蛋白被蛋白酶破壞。但粒線體、溶酶體等主要胞器的結構和功能則維持到凋亡的晚期。內質網在早期還有合成蛋白質的功能，後來擴張成泡狀，與細胞膜接觸融合，形成胞質氣泡。細胞膜則始終保持完整，細胞內容物無溢出，因此不會引起發炎反應或危害到周圍組織。胞核染色質的濃集 (chromatin condensation)、細胞核內DNA裂解(DNA fragmentation)形成約185 bp的核小體、細胞皺縮裂解形成凋亡小體 (apoptotic body) 等(Brietzke & Kapczinski, 2008; Radovic et al., 2008)。

二、研究方法

1. cell migration 分析 (1)

利用48 well Boyden chamber的分析方法，lower chamber為含有10% FCS的DMEM，將細胞處理berberine 24小時後，以0.05%的trypsin-EDTA打下所有細胞並用trypan blue計算細胞數，然後注入固定量的細胞 (1.5×10^4 cell/well - 2×10^4 cell/well) 於upper chamber，待細胞移動8小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞10分鐘，風乾5分鐘之後，以Giemsa (1:20) 染色1小時，最後固定住薄膜，擦掉薄膜之上層細胞，在400×顯微鏡底下每個well隨機選取3個視野，數5個well，作移動細胞數之統計。

2. cell invasion 分析(1)

將cellulose nitrate filters 預先coating上 $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Matrigel (0.5 mg/ml)，在laminar flow風乾3~5小時，其後方法同前一項cell migration分析，而培養細胞移動時間則延長為20小時。

3. MTT (Microculture tetrazolium) 分析

本實驗室用來測試細胞是否有活性以及是否存活的方法，將癌細胞以 $3 \sim 5 \times 10^4$ 細胞數分至24 well中，37℃培養16小時後，處理不同濃度berberine處理24小時後，去除加藥的細胞培養液，再加入1 ml以細胞培養液10倍稀釋的MTT reagent(final concentration 0.5 mg/ml)，待此作用4小時之後再以異丙醇將結晶溶出，於O.D. 565 nm下測定溶液吸光，由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。

4. gelatin-zymography (gelatinase 活性測試) (6)

首先製備0.1% gelatin-8% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取16 μl sample(蛋白總量20 μg)，加入4 μl loading buffer，將sample loading到電泳片中，以140V進行電泳分離。大約3小時之後，將膠拆下，加入50 ml的washing buffer，在室溫下洗30分鐘，共兩次。倒掉washing buffer之後，加入50 ml的reaction buffer，於37℃恆溫箱下反應12個小時。將反應完後的gel，以staining buffer染色30 min，之後再以退色液退染觀看結果，並以densitometer (AlphaImage 2000, AlphaImage comp)量化結果。

5. casein-zymography (u-PA 及 t-PA 活性測試) (8)

首先製備 10 % SDS-PAGE 電泳膠片，並且在其下層膠加入 2% 的 casein 及 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 plasminogen，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 16 μl sample (蛋白總量 20 μg)，加入 4 μl loading buffer，將 sample loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離，大約 3 小時之後，將膠拆下，加入 50 ml 的 washing buffer (2.5% Triton X-100 in d H₂O)，在室溫下洗 30 分鐘，共兩次，倒掉 washing buffer 之後，加入 50 ml 的 reaction buffer (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM CaCl₂, 0.01% NaN₃)，於 37°C 恆溫箱下反應 12 個小時，將反應完後的 gel，以 staining buffer 染色 30 min，之後再以退色液退染觀看結果，並以 densitometer (AlphaImage 2000, AlphaImage comp) 量化結果。

6. Western blotting 分析 (10)

首先製備 12.5% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液，取 16 μl sample (蛋白總量 20 μg)，加入 4 μl loading buffer，將 sample denature (95°C, 10 min) 之後再 loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下後進行蛋白轉漬，將膠體置入冰冷之 transfer buffer，將預先浸濕的 NC paper 蓋在膠體上面後裝入 transfer holder，於 4°C 下，以 100V 進行轉漬 1 小時之後，取出 NC paper 加入 blocking buffer，在室溫下搖動一個小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer，在 4°C 下反應 overnight，之後以 washing buffer (TBS+0.05% Tween 20) 清洗三次，每一次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用二個小時後以 washing buffer 清洗三次，每一次 10 分鐘。最後加入 25ml substrate buffer 進行呈色反應(或以 ECL 冷光系統紀錄)，待 NC paper 上有明顯的 band 出現，即以水終止反應並晾乾，並以 densitometer (AlphaImage 2000, AlphaImage comp) 量化結果。

7. 統計分析

所有數據以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 分析。

三、結果與討論

本實驗中所採用的穿山龍經洗滌、蔭乾後，利用 methanol (DNE1); chloroform (DNE2); ethyl acetate (DNE3); *n*-butanol (DNE4); 與 water (DNE5) 來做分層萃取 (Fig. 1A)。在以 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的分層萃取物處理 B16-F10 黑色素瘤細胞，觀察其對細胞侵襲能力的影響，發現 ethyl acetate (DNE3) 對於細胞的棲息能力有顯著的抑制效果 (Fig. 1B)，接下來將此分層萃取物以高效能液相層析儀 (Waters 600 pump) 進行分析 (Fig. 1C)。及 mass 分析結果如 Fig. 1D。利用 C57BL/6J 老鼠，以尾靜脈注射 B16-F10 細胞，同樣隨機分組，肺部組織切片有因為餵藥而使黑色素瘤轉移的部分明顯減少 (Fig. 2A)，有餵食乙酸乙酯萃取物的組別其肺組織的重量與只轉殖癌細胞的組別比起來具有明顯的抑制效果 (Fig. 2B)；並且同時具有顯著抑制癌細胞轉移到肺部的能力 (Fig. 2C)。同時在餵食期間測量老鼠的體重，並無明顯的差異 (Fig. 2D)。將其取下的肺部組織進行以 formalin 固定並以 hematoxyline 和 eosine 進行染色，可以觀察到有餵食 DNE3 的組別其肺部的 tumor 有明顯減少 (Fig. 3)。接下來利用細胞實驗去驗證其轉移的機制，以 MTT assay 觀察 DNE3 對癌細胞 B16-F10 及正常皮膚細胞 HS68 的細胞毒性，發現其對 B16-F10 (Fig. 4A) 與 HS68 (Fig. 4B) 皆無明顯細胞毒性。以傷口癒合實驗觀察其對細胞移動的影響，證實 DNE3 可有效抑制 B16-F10 的移動能力 (Fig. 4C)，並將其量化 (Fig. 4D)。以 modified Boyden chamber coating Matrigel 與 Boyden chamber motility assay 的分析分別進行細胞侵襲能 (invasion) 力與細胞活動力 (motility) 分析，DNE3 可有效抑制 B16-F10 的侵襲及活動力 (Fig. 4E&4F)，以細胞-基質貼附能力實驗證實 DNE3 可抑制 B16-F10 與 type I collagen 的貼附能力 (Fig. 4G)。接著在 serum-starved 的情況下 (以減少血清中蛋白質之干擾)，處理不同濃度的 DNE3 24 小時，收集其 medium，以 gelatin zymography 方法，分析其 MMP-2 的表現，結果發現，處理過 DNE3 的細胞其 MMP-2 的活性確實有降低的現象 (Fig. 5A)。以 casein zymography 來分析 u-PA 的表現，在處理不同濃度的 DNE 24 小時後，細胞 u-PA 的活性會隨著 DNE3 萃取物的濃度增加而降低 (Fig. 5B)。以 Western blot 分析，結果發現 MMP-2 的蛋白表現量也有顯著的減少 (Fig. 5C)，相反的 TIMP-2 蛋白的表現量，則隨著濃度增加而上升 (Fig. 5D)。以 anti-phospho-p38、anti-p38、anti-phospho-ERK1/2、anti-ERK1/2、anti-phospho-Akt 及 anti-Akt 的抗體去進行 Western blot 分析。實驗結果發現 PI3K 的蛋白表現及 Akt 蛋白的磷酸化會隨著 DNE3 的濃度提高而減少，而 p38 及 ERK1/2 蛋白的磷酸化則不受到影響 (Fig. 6)。將 B16-F10 處理不同濃度的 DNE3 萃取物 (0、10、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 24 小時後，萃取其核蛋白，以 EMSA 方法分析 NF- κ B 和 AP-1 分別與 DNA 結合的能力，其結果顯示，只有 NF- κ B 與 DNA 結合的能力隨著處理穿山龍萃取物濃度的增加而逐漸受到抑制 (Fig. 7A&7B)。以 Western blot 分析 NF- κ B (p65) 與

AP-1 的次單元:c-Jun 與 c-Fos,發現 NF- κ B (p65)的蛋白量皆隨著 DNE3 的濃度增加而下降(Fig. 7C)。接著觀察 cytosol 內 I κ B 的蛋白表現量, I κ B 蛋白表現量,會隨著 DNE3 濃度增加而上升(Fig. 7D)。最後以人類的黑色素細胞株 A2058 處理 DNE3,發現 DNE3 對於 A2058 的細胞活動力、侵襲能力(Fig. 8A&7B),MMP-9、MMP-2 (Fig. 8C)、u-PA (Fig. 8D)的活性。此外在欖仁樹葉萃取物(*Terminalia catappa* L. extracts; TCE)方面,以 50%酒精萃取欖仁樹葉萃取物,接下來將此分層萃取物以高效能液相層析儀(Waters 600 pump)進行分析(Fig. 9A)。及 mass 分析結果如 Fig. 9B。我們以欖仁樹葉萃取物處理急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia; AML)細胞株 HL-60,以 MTT assay 分析方法,結果發現 HL-60 存活率明顯的降低,且下降趨勢具有濃度及時間關係(Fig. 10)。以不同濃度 TCE 處理之下,會造成存活的細胞數目有顯著的被抑制(Fig. 11),相對的死亡的細胞數則是明顯得上升(Fig. 12)且具有時間及濃度效應。以 TCE 處理正常周邊血球細胞,證實 TCE 對正常血球細胞不會有毒殺作用(Fig. 13)。以 flow-cytometry 分析 HL-60 細胞週期的變化,隨著 TCE 濃度增加位於 sub-G1 的細胞數目也有顯著增加 (Fig. 14),以 DAPI stain 與 DNA 斷裂分析方法,發現欖仁樹葉萃取物會導致血癌細胞株 HL-60 chromatin condensation (Fig. 15)。利用 DNA 斷裂分析方法,結果證實 TCE 會導致 HL-60 細胞株有 DNA 斷裂的情形產生(Fig. 16)並進一步促使癌細胞走向凋謝死亡。接著利用欖仁樹葉裡面所富函的單寧酸去處理 HL-60 細胞,發現 HL-60 細胞株在單寧酸的處理下,會造成細胞存活率與細胞數顯著降低,並呈現濃度及時間效應 (Fig. 17); 以單寧酸處理正常周邊血球細胞,證實單寧酸對正常血球細胞不會有毒殺作用(Fig. 17)。在流式細胞儀的分析實驗中,發現 sub-G1 的細胞群會隨單寧酸的濃度(Fig. 18)及時間(Fig. 19)提高而增加。以 DAPI stain 分析方法,發現單寧酸會導致血癌細胞株 HL-60 chromatin condensation (Fig. 20),顯示單寧酸具有誘導 HL-60 細胞凋亡的效果。接著於是我們用不同溶劑萃取之欖仁樹葉來探討對肺癌細胞株 A549 的蛋白酶 MMP-2 與 u-PA (Fig 21 A)及移動 (Fig 21 B)的影響,我們分別處理不同溶劑萃取之欖仁樹葉的濃度為 50 μ g/mL,並利用 MTT assay 發現這些濃度對 A549 為無毒劑量 (Fig 22)。於是我們用欖仁樹葉之甲醇萃(TLME)來探討對肺癌細胞株 A549 的轉移及侵襲作用,我們分別處理 TLME 的濃度為 0,10,30,50 μ g/mL,並利用 MTT assay 發現這些濃度對 A549 為無毒劑量 (Fig 23)。我們利用傷口癒合實驗(wound healing assay)分析 TLME 對於 A549 的 migration 能力。我們發現 TLME 在不同劑量下對於 A549 的移動能力(migration)都有明顯的抑制,並且具有濃度效應(Fig 24)。接著我們用 gelatin-zymography 與 casein-zymography 的方法分析 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的活性表現,結果發現 TLME 對於 A549 分泌具有細胞侵襲能力的 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 抑制效果,並呈現濃度效應關係(Fig 25)。再來我們利用不同濃度的 TLME 處理 A549 並分析其 invasion 的能力,我們發現在 24hr 的時候,不同劑量下的 TLME 對於 A549 的 invasion 能力都有抑制的效果並且具有濃度效應(Fig 26)。在細胞 motility assay 中發現 TLME 對於 A549 的 motility 能力也有抑制的效果同時具有濃度效應(Fig 27)。接著我們利用 western blot 希望能了解其內部蛋白變化的情形,了解其抑制癌細胞轉移的路徑,發現 TCME 會抑制 EMT 相關蛋白 p-FAK、p-paxillin 與 vimentin 的表現,並且抑制及 p-Akt 在細胞內的蛋白表現。綜合以上結果,TCME 具有抑制腫瘤細胞 EMT 與侵襲轉移之效果,或許可以應用在預防肺癌的轉移或輔助肺癌的治療上,以期對醫療發展有所貢獻(Fig 28)。因此,我們發現 TLME 是透過抑制 MMP-2 與 u-PA 的作用進而抑制肺癌細胞(A549)轉移和侵襲的能力,以達到抗癌的功效。基質金屬蛋白酶(MMPs)是一系列的家族性酵素,能參與蛋白的合成與分解並在維持細胞外基質(ECM)上扮演重要的角色。在正常的狀態下,MMPs 會參與血管之生成、組織重組等。當癌細胞進展時,利用基質金屬蛋白酶(MMP)作為武器,將周圍的正常組織破壞,同時進行增生,然後潛入正常組織中。多種證據顯示出基質金屬蛋白酶在腫瘤細胞成長的許多階段中皆扮演關鍵性的角色,基質金屬蛋白酶可以促進腫瘤轉移和血管增生,甚至是腫瘤的發源。最後我們利用先前所用不同溶劑的穿山籠萃取物(Fig 29)與欖仁樹乙酸乙酯萃取物(Fig 30)利用 HPLC 分析所得到不同的 profile。

參考文獻

- Bao, B. Y., Yeh, S. D., & Lee, Y. F. (2006). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases. *Carcinogenesis*, 27(1), 32-42.
- Bhat, T. A., & Singh, R. P. (2008). Tumor angiogenesis--a potential target in cancer chemoprevention. *Food Chem Toxicol*, 46(4), 1334-1345.
- Borstnar, S., Vrhovec, I., Svetic, B., & Cufer, T. (2002). Prognostic value of the urokinase-type plasminogen activator, and its inhibitors and receptor in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer*, 3(2), 138-146.

- Brietzke, E., & Kapczinski, F. (2008). TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32(6), 1355-1361.
- Chakrabarti, S., & Patel, K. D. (2005a). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res*, 31(6), 599-621.
- Chakrabarti, S., & Patel, K. D. (2005b). Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 78(1), 279-288.
- Chakrabarti, S., Zee, J. M., & Patel, K. D. (2006). Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J Leukoc Biol*, 79(1), 214-222.
- Cuiyan, Z., Jie, H., Fang, Z., Kezhi, Z., Junting, W., Susheng, S., Xiaoli, F., Ning, L., Xinhua, M., Zhaoli, C., Kang, S., Bin, Q., Baozhong, L., Sheng, C., & Meihua, X. (2007). Overexpression of RhoE in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) is associated with smoking and correlates with DNA copy number changes. *Cancer Biol Ther*, 6(3), 335-342.
- Duffy, M. J. (2002). Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem*, 48(8), 1194-1197.
- Evans, D. M., & Sloan-Stakleff, K. D. (1998). Maximum effect of urokinase plasminogen activator inhibitors in the control of invasion and metastasis of rat mammary cancer. *Invasion Metastasis*, 18(5-6), 252-260.
- Finney, L., Vogt, S., Fukai, T., & Glesne, D. (2008). Copper and Angiogenesis: Unravelling a Relationship Key to Cancer Progression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*.
- Foekens, J. A., Ries, C., Look, M. P., Gippner-Steppert, C., Klijn, J. G., & Jochum, M. (2003). The prognostic value of polymorphonuclear leukocyte elastase in patients with primary breast cancer. *Cancer Res*, 63(2), 337-341.
- Gavert, N., & Ben-Ze'ev, A. (2007). beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem*, 102(4), 820-828.
- Gopal, P., Rehman, R. U., Chadha, K. S., Qiu, M., & Colella, R. (2006). Matrigel influences morphology and cathepsin B distribution of prostate cancer PC3 cells. *Oncol Rep*, 16(2), 313-320.
- Gretschel, S., Astrosini, C., Vieth, M., Jons, T., Tomov, T., Hocker, M., Schlag, P. M., & Kemmner, W. (2008). Markers of tumour angiogenesis and tumour cells in bone marrow in gastric cancer patients. *Eur J Surg Oncol*, 34(6), 642-647.
- Hashimoto, Y., Kondo, C., Kojima, T., Nagata, H., Moriyama, A., Hayakawa, T., & Katunuma, N. (2006). Significance of 32-kDa cathepsin L secreted from cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm*, 21(3), 217-224.
- Hildenbrand, R., & Arens, N. (2004). Protein and mRNA expression of uPAR and PAI-1 in myoepithelial cells of early breast cancer lesions and normal breast tissue. *Br J Cancer*, 91(3), 564-571.
- Jeanes, A., Gottardi, C. J., & Yap, A. S. (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, 27(55), 6920-6929.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kobayashi, H., Suzuki, M., Tanaka, Y., Kanayama, N., & Terao, T. (2003). A Kunitz-type protease inhibitor, bikunin, inhibits ovarian cancer cell invasion by blocking the calcium-dependent transforming growth factor-beta 1 signaling cascade. *J Biol Chem*, 278(10), 7790-7799.
- Legg, J. A., Herbert, J. M., Clissold, P., & Bicknell, R. (2008). Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis*, 11(1), 13-21.
- Ma, J., Sawai, H., Matsuo, Y., Ochi, N., Yasuda, A., Takahashi, H., Wakasugi, T., Funahashi, H., Sato, M., Okada, Y., Takeyama, H., & Manabe, T. (2008). Interleukin-1alpha enhances angiogenesis and is associated with liver metastatic potential in human gastric cancer cell lines. *J Surg Res*, 148(2), 197-204.
- Mohamed, M. M., & Sloane, B. F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(10), 764-775.
- Nahari, D., Satchi-Fainaro, R., Chen, M., Mitchell, I., Task, L. B., Liu, Z., Kihneman, J., Carroll, A. B., Terada, L. S., & Nwariaku, F. E. (2007). Tumor cytotoxicity and endothelial Rac inhibition induced by TNP-470 in anaplastic thyroid cancer. *Mol Cancer Ther*, 6(4), 1329-1337.
- Radovic, N., Cucic, S., & Altarac, S. (2008). [Molecular aspects of apoptosis]. *Acta Med Croatica*, 62(3), 249-256.
- Robert, C., Bolon, I., Gazzeri, S., Veyrenc, S., Brambilla, C., & Brambilla, E. (1999). Expression of plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in lung cancer and their role in tumor progression. *Clin Cancer Res*, 5(8), 2094-2102.
- Song, J., Bai, J., Yang, W., Gabrielson, E. W., Chan, D. W., & Zhang, Z. (2007). Expression and clinicopathological significance of oestrogen-responsive ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 in

breast cancer. *Histopathology*, 51(1), 40-53.

Sossey-Alaoui, K., Safina, A., Li, X., Vaughan, M. M., Hicks, D. G., Bakin, A. V., & Cowell, J. K. (2007). Down-regulation of WAVE3, a metastasis promoter gene, inhibits invasion and metastasis of breast cancer cells. *Am J Pathol*, 170(6), 2112-2121.

Spannuth, W. A., Sood, A. K., & Coleman, R. L. (2008). Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol*, 5(4), 194-204.

Suzuki, M., Kobayashi, H., Tanaka, Y., Hirashima, Y., Kanayama, N., Takei, Y., Saga, Y., Itoh, H., & Terao, T. (2003). Suppression of invasion and peritoneal carcinomatosis of ovarian cancer cell line by overexpression of bikunin. *Int J Cancer*, 104(3), 289-302.

Tommasi, S., Mangia, A., Lacalamita, R., Bellizzi, A., Fedele, V., Chiriatti, A., Thomssen, C., Kendzierski, N., Latorre, A., Lorusso, V., Schittulli, F., Zito, F., Kavallaris, M., & Paradiso, A. (2007). Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: the role of beta-tubulins. *Int J Cancer*, 120(10), 2078-2085.

Vamesu, S. (2008). Angiogenesis and tumor histologic type in primary breast cancer patients: an analysis of 155 needle core biopsies. *Rom J Morphol Embryol*, 49(2), 181-188.

Vasiljeva, O., Papazoglou, A., Kruger, A., Brodoefel, H., Korovin, M., Deussing, J., Augustin, N., Nielsen, B. S., Almholt, K., Bogyo, M., Peters, C., & Reinheckel, T. (2006). Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res*, 66(10), 5242-5250.

Yamaguchi, H., & Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta*, 1773(5), 642-652.

Yanamoto, S., Kawasaki, G., Yamada, S. I., Yoshitomi, I., Yoshida, H., & Mizuno, A. (2008). Ribonucleotide reductase small subunit p53R2 promotes oral cancer invasion via the E-cadherin/beta-catenin pathway. *Oral Oncol*.

Yu, K. P., Itokawa, T., Zhu, M. L., Syam, S., Seth, A., & Insogna, K. (2007). Breast cancer-associated gene 3 (BCA3) is a novel Rac1-interacting protein. *J Bone Miner Res*, 22(4), 628-637.

附表及附圖

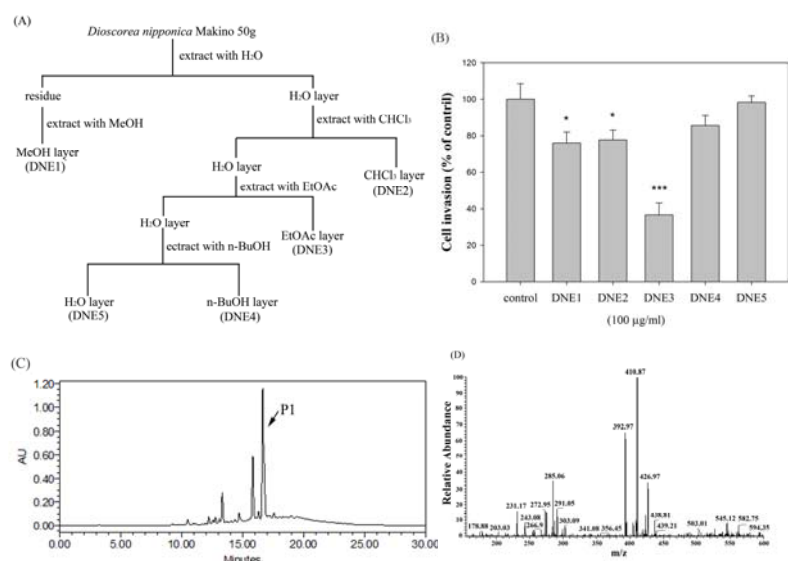


Fig. 1. The chemical profile of *Dioscorea nipponica* extract was analyzed by HPLC-mass spectrometry. (A) Procedure for fractionation of the extracts from *Dioscorea nipponica*. (B) B16F10 cells were treated with these fractions by Transwell invasion assay. (C) Chromatographic patterns from HPLC analysis of DNE3 extracts showed peaks corresponding to the retention times (minutes). Absorbance was monitored at 254 nm. (D) The main product peak (P1) with a retention time of 16.644 min was then subjected to mass spectrometer.

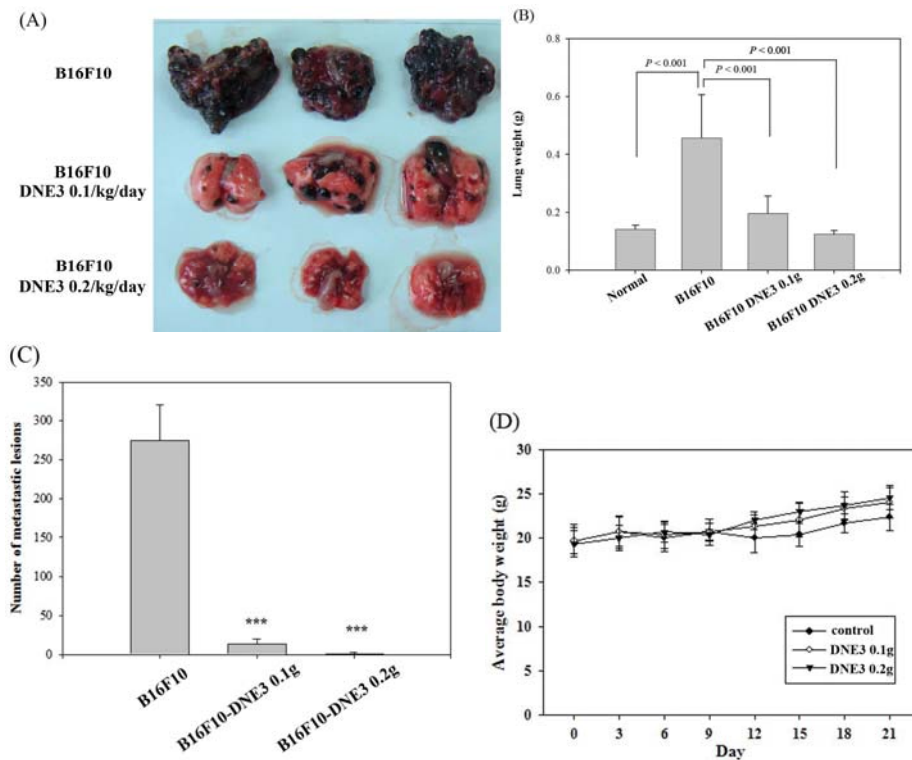


Fig. 2. Suppression of lung metastasis of melanoma cells by DNE3. Melanoma cells were injected into the tail veins of 6-week-old male C57BL/6 mice. After injection of melanoma cells, DNE3 (0.1 g/kg/day and 0.2 g/kg/day) and vehicle (saline) alone were administered oral gavage for 21 days. Mice were sacrificed and then analyzed for representative photographs of lungs (A), the weight of lung (B), the number of lung metastasis (C) and the body weight of mice (D). Results were statistically evaluated by using one-way ANOVA with *post-hock* Dunnett's test. (***, $P < 0.001$).

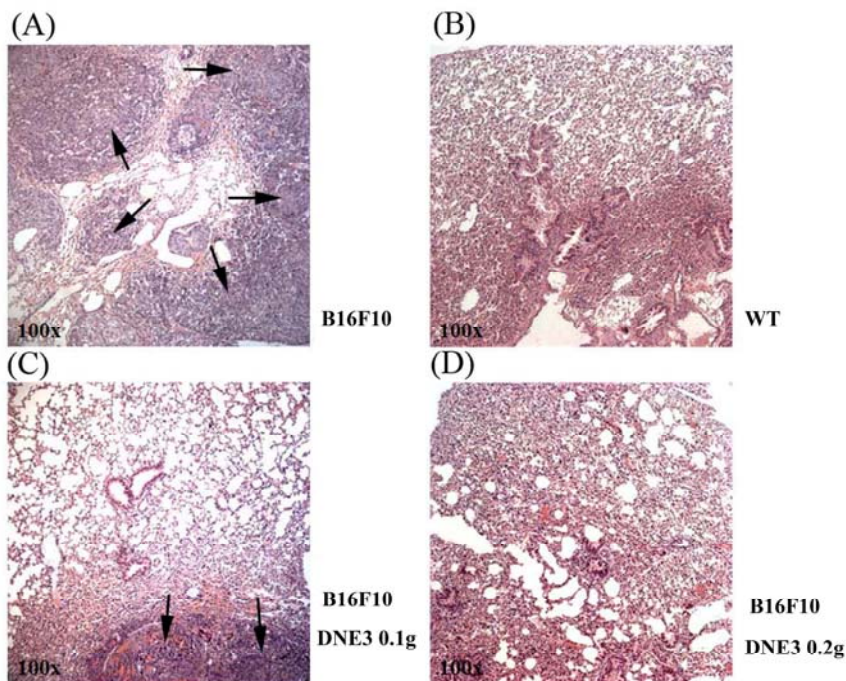


Fig. 3. Histopathology of lung of metastatic tumor bearing animals ($\times 100$). Lungs of the metastasis- induced animals were fixed in neutral buffered formalin, and stained with hematoxyline and eosine. (A) Control (melanoma + saline), (B) normal lung (wild type, WT), (C) melanoma + 0.1g/kg/day DNE3, (D) melanoma + 0.2g/kg/day DNE3. Arrows showed areas of metastatic nodules (tumor).

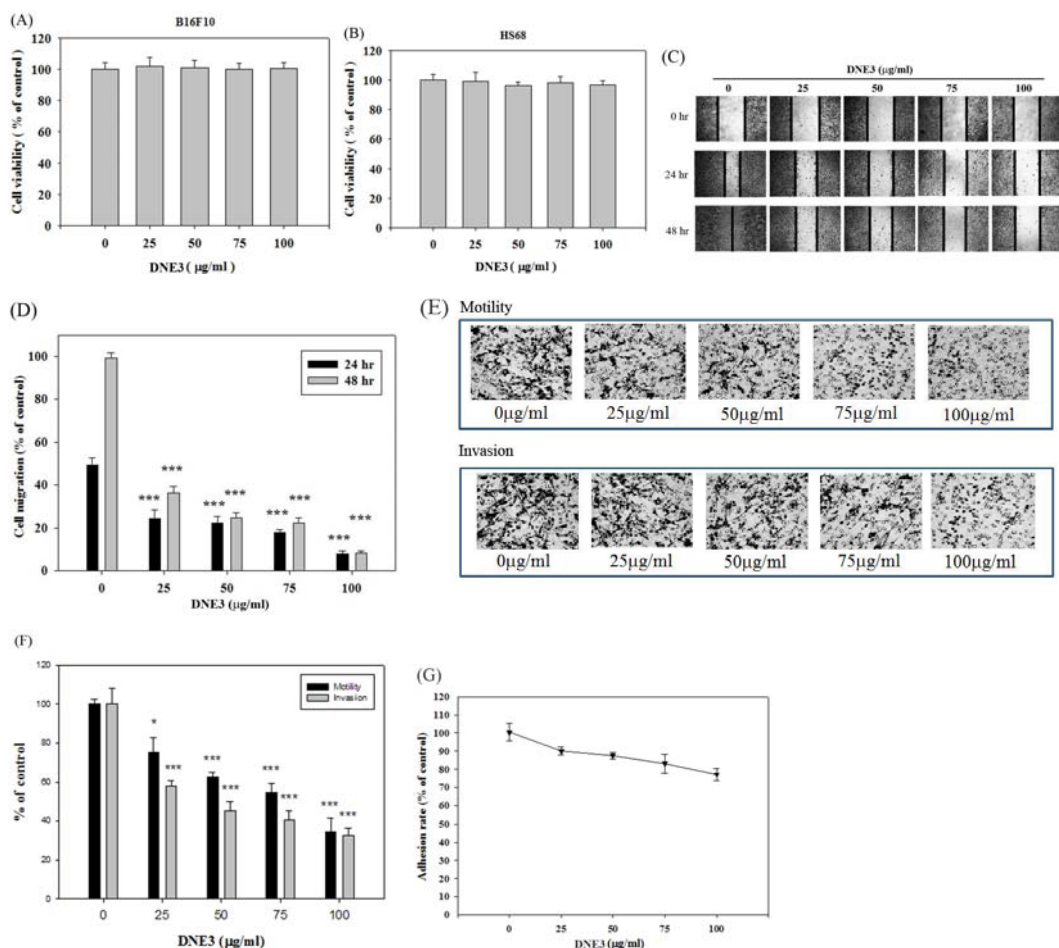


Fig. 4. The effects of DNE3 on cell viability, migration, motility, invasion and adhesion of melanoma cells. (A) B16F10 and (B) HS68 cells were treated with DNE3 for 24 h by MTT assay. (C) B16F10 cells were subjected to analyze for cell migration by wound healing assay. (D) Determined migration ability of B16F10 was subsequently quantified with that of control being 100% (without DNE3 for 48 h). Cells were treated with DNE3 for 24 h, and then subjected to analyze for (E and F) motility, invasion, and (G) adhesion as described in Materials and Methods. Results were statistically evaluated by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (***, $P < 0.001$). Results from 3 repeated and separated experiments were similar.

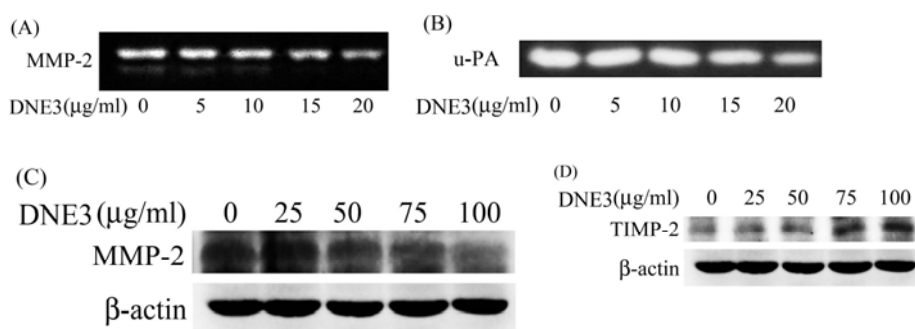


Fig. 5. Effects of DNE3 on the protein levels of proteases and their endogenous inhibitors. Cells were treated with DNE3 for 24 h and then condition media were subjected to gelatin zymography and casein zymography to analyze the activities of MMP-2 (A) and u-PA (B), respectively. Cell lysate were subjected to Western blot to analyze the expression of MMP-2 (C) and TIMP-2 (D).

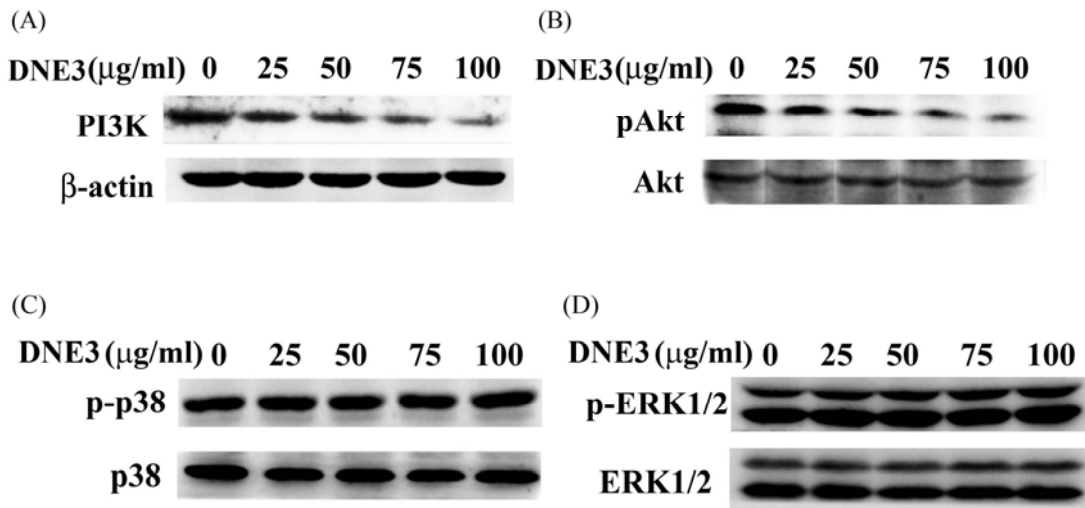


Fig. 6. Inhibitory effect of DEN3 on the phosphorylation of Akt. B16F10 cells were cultured in various concentrations of DNE3 for 24 h, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with anti-PI3K (A), anti-phospho-Akt (B), anti-phospho-p38 (C), and anti-phospho-ERK1/2 (D) antibodies. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system.

Figure 7

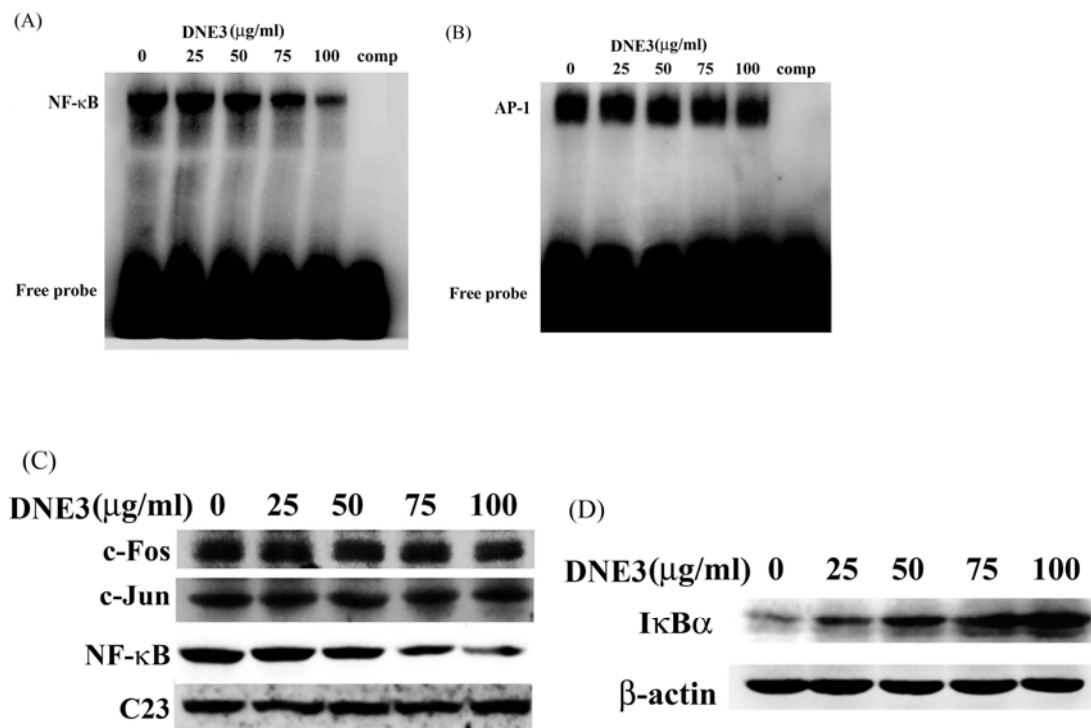


Fig. 7. Effects of DNE3 on the activation of NF- κ B, c-Jun, and c-Fos. Cells were treated with DNE3 and then nuclear extracts were analysed for DNA binding activity of NF- κ B (A) and AP-1 (B) using biotin labeled NF- κ B and AP-1 specific oligonucleotide in EMSA. The last lane represented nuclear extracts incubated with unlabeled oligonucleotide (comp) to confirm the specificity of binding. Nuclear and cytoplasmic extracts were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting with anti-NF- κ B, c-Fos, c-Jun, or C23 antibodies (C) and anti-I κ B α or β -actin antibodies, respectively. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system. The experiments were repeated three times with similar.

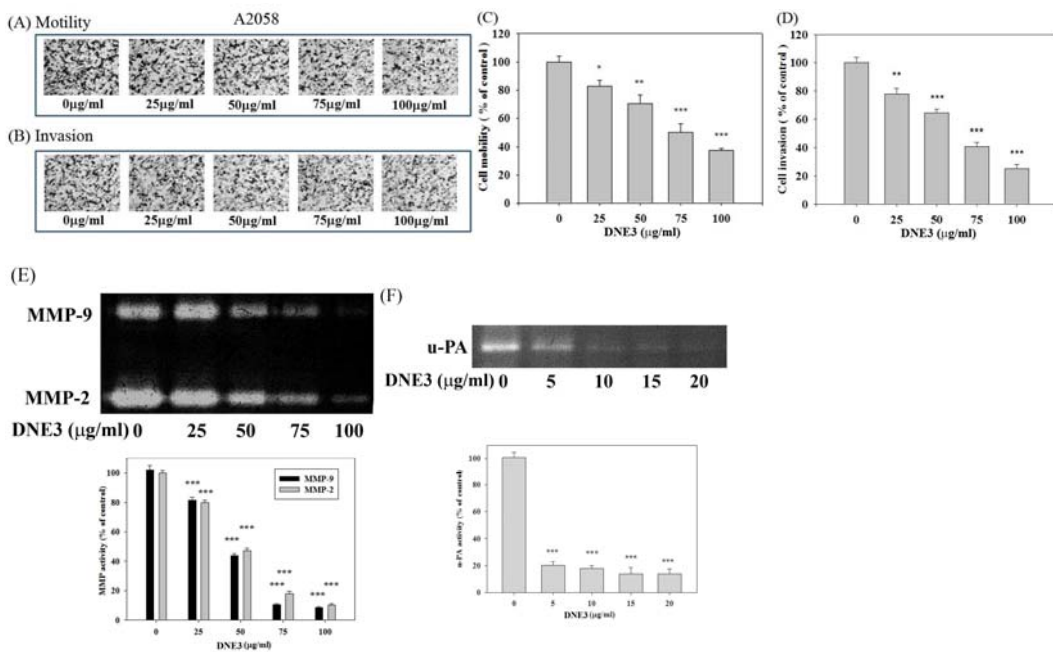


Fig. 8. The effects of DNE3 on cell motility, invasion, the activity of MMPs and uPA of A2058 human melanoma cells. Cells were treated with DNE3 for 24 h, and then subjected to analyze for motility (A and C), invasion (B and D). Condition media were subjected to gelatin zymography and casein zymography to analyze the activities of MMPs (E) and u-PA (F), respectively. Data represented the mean \pm SD of at least 3 independent experiments. Results were statistically evaluated by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

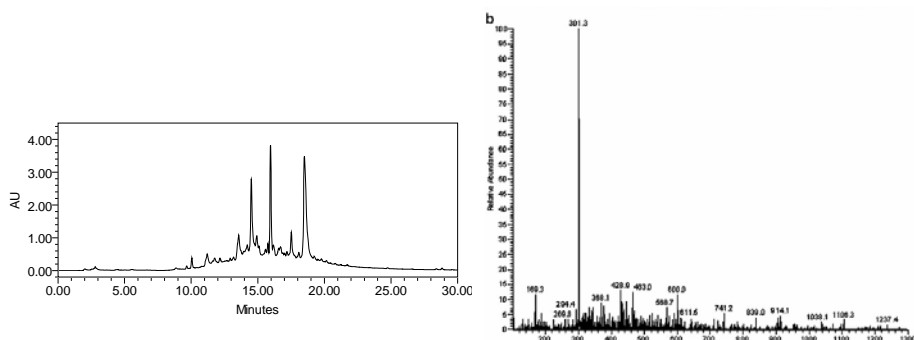


Fig 9. The chemical profile of TCE was analyzed by HPLC-mass spectrometer. (a) Chromatographic patterns from HPLC analysis (254 nm) of TCE extracts showed peaks corresponding to the retention times (min). (b) The main product peak (with a retention time of 11.13 min as shown in (a)) was then subjected to mass spectrometer

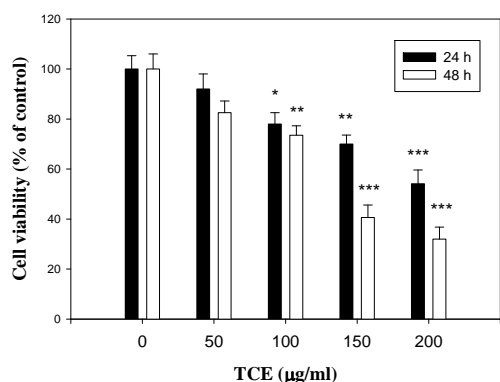


Fig 10. The effect of TCE on the cell viability in HL-60 cells. In concentration- and time-dependent assays, cells were treated with TCE at a concentration of 0, 50, 100, 150, and 200 $\mu\text{g/ml}$ for 24 and 48 h., and then cell viability was detected using MTT test. The data shown were mean \pm SD of three independent experiments (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

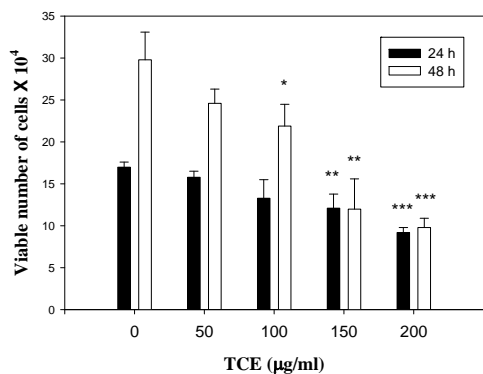


Fig. 11. The inhibitory effect of TCE on cell growth of HL-60 cells. In concentration- and time-dependent assays, cells were treated with TCE at a concentration of 0, 50, 100, 150, and 200 µg/ml for 24 and 48 h., and then viable cells were collected and counted using hemocytometer. The data shown were mean ± SD of three independent experiments (*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001).

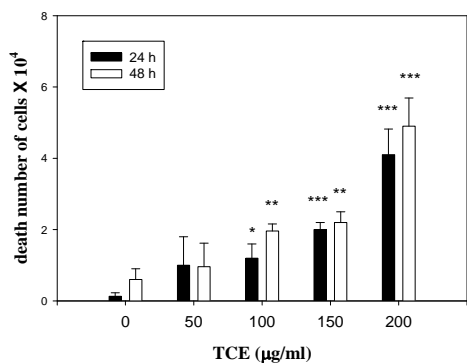


Fig. 12. The apoptotic effect of TCE in HL-60 cells. In concentration- and time-dependent assays, cells were treated with TCE at a concentration of 0, 50, 100, 150, and 200 µg/ml for 24 and 48 h., and then dead cells were collected and counted using hemocytometer. The data shown were mean ± SD of three independent experiments (*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001).

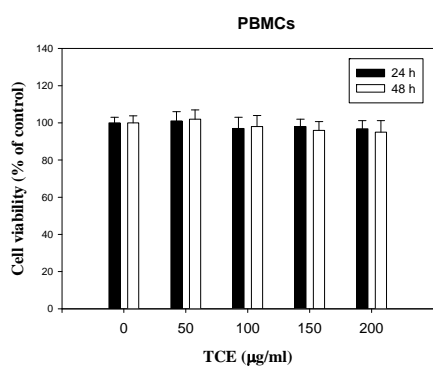
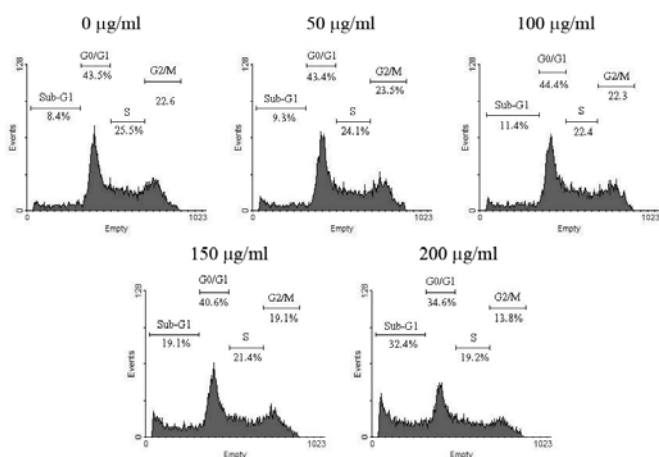


Fig. 13. The effect of TCE on the cell viability in normal peripheral blood mononuclear cells. In concentration- and time-dependent assays, cells (PBMCs) were treated with TCE at a concentration of 0, 50, 100, 150, and 200 µM for 24 and 48 h., and then cell viability was detected using MTT test. The data shown were mean ± SD of three independent experiments (*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001).



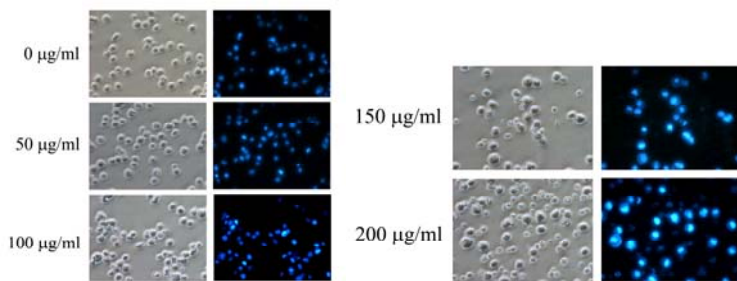


Fig. 15. Apoptotic effect of TCE in HL-60 cells was assessed by DAPI stain. After a 24-hour treatment of HL-60 cells with the indicated concentrations of TCE, the nuclear morphology of the treated cells was observed by fluorescence microscopy using DAPI stain (at a magnification of 40×); *Left*, optical field; *Right*, fluorescent field. A typical photograph from three independent experiments with similar results is shown.

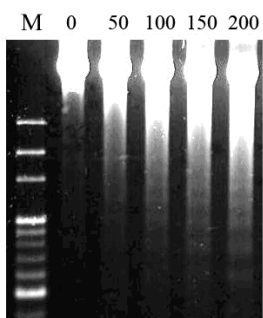


Fig. 16. Apoptotic effect of TCE in HL-60 cells was assessed by DNA fragmentation assay. After a 24-hour treatment of HL-60 cells with the indicated concentrations of TCE, DNA from the treated cells was analyzed for the integrity of DNA by agarose electrophoresis. A typical photograph from three independent experiments with similar results is shown.

Table 1

中文學名	英文學名	縮寫	克數	回收	回收率
欖仁樹的葉	<i>Terminalia catappa L.</i>	TCE	33g	8261mg	25.03%

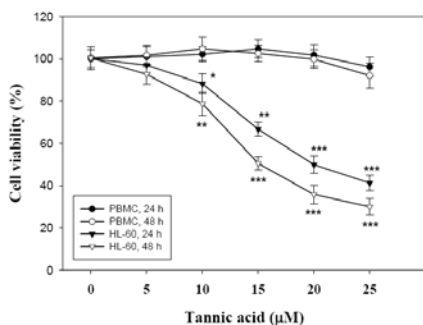


Fig 17. Dose- and time-dependent effects of tannic acid on the viability of leukemia HL-60 cells. HL-60 cells and PBMCs were treated with indicated concentrations of tannic acid for 24 hours and 48 hours. Viability of the treated cells was determined using the MTT assay. The data are expressed in terms of percent of control cells as the mean \pm SD of three replicates. Significant differences versus the control group were analyzed by Student's *t* test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

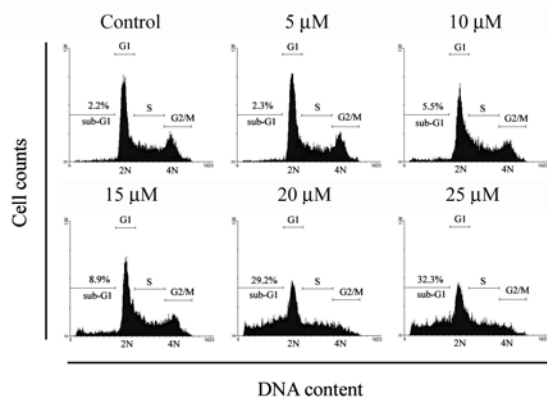


Fig 18. Effect of tannic acid on cell cycle distribution of HL-60 cells. Cells were treated with indicated concentrations of tannic acid in complete medium for 24 hours. After treatment, cell cycle and hypodiploid cells (sub-G1 phase) were analyzed by flow cytometry.

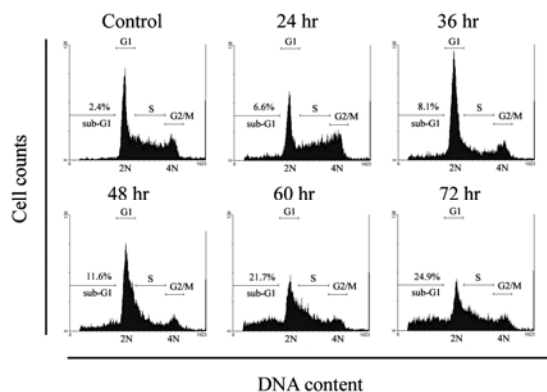


Fig 19. Effect of tannic acid on cell cycle distribution of HL-60 cells. Cells were treated with 10 μM tannic acid in complete medium for 24, 36, 48, 60, 72 hours. After treatment, cell cycle and hypodiploid cells (sub-G1 phase) were analyzed by flow cytometry

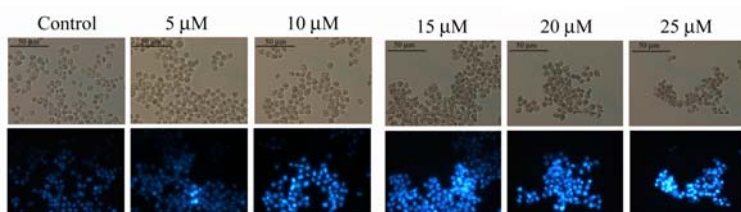
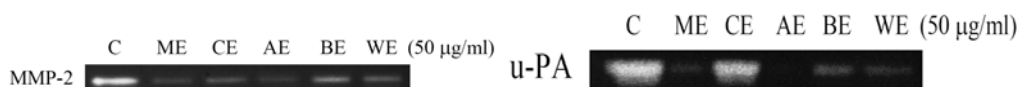


Figure 20. Apoptotic effect of tannic acid in HL-60 cells was assessed by DAPI stain. After a 24-hour treatment of HL-60 cells with the indicated concentrations of tannic acid, the nuclear morphology of the treated cells was observed by fluorescence microscopy using DAPI stain (at a magnification of 40 \times); *top*, optical field; *bottom*, fluorescent field. A typical photograph from three independent experiments with similar results is shown.

(A)



(B)

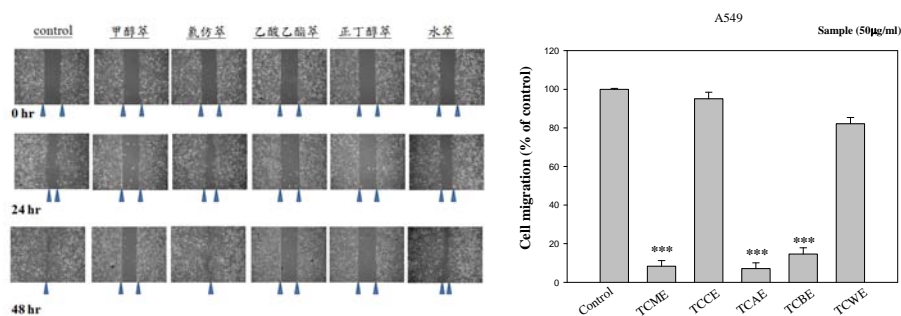


Fig 21. A549 細胞處理欖仁樹葉之不同溶劑萃取物其 MMP-2、u-PA、wound healing(移動能力)之分析。(A) zymography 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉汁萃取物。於培養液 24hr 後 MMP-2 和 u-PA 蛋白活性表現情形。(B) 以 wound healing assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉之萃，其 24hr 後 cell migration 的表現情形。

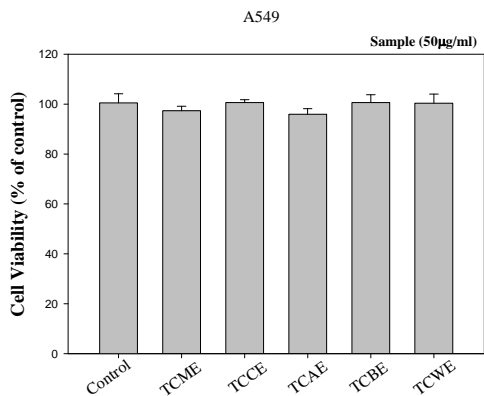


Fig 22. A549 細胞處理欖仁樹葉之萃取物 24hr 其細胞存活率分析。以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉之萃取物，其 24hr 細胞存活率分析，並且量化製成柱狀圖

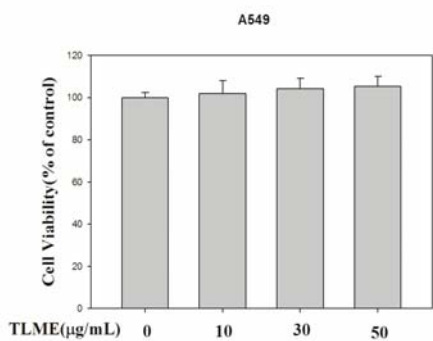


Fig 23. A549 細胞處理欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME) 24hr 其細胞存活率分析。以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉之甲醇萃(TLME)，其 24hr 細胞存活率分析，並且量化製成柱狀圖。

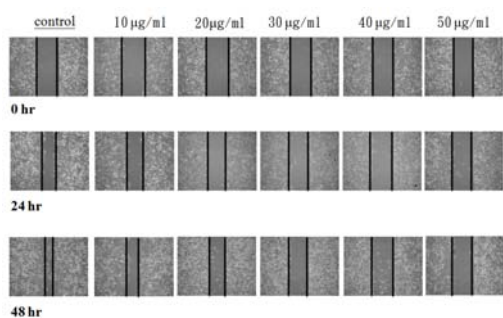


Fig 24. A549 細胞處理欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME) 其 wound healing 移動能力之分析。以 wound healing assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉之甲醇萃(TLME)，其 24hr 後 cell migration 的表現情形。

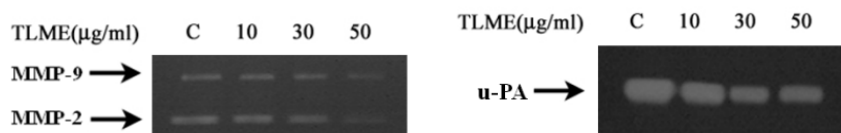


Fig 25. A549 細胞處理不同劑量欖仁樹葉之甲醇萃(TLME)於培養液 24hr 後 MMP-2 MMP-9 和 u-PA 蛋白活性分析。以 zymography 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉之甲醇萃(TLME)於培養液 24hr 後 MMP-2 MMP-9 和 u-PA 蛋白活性表現情形。

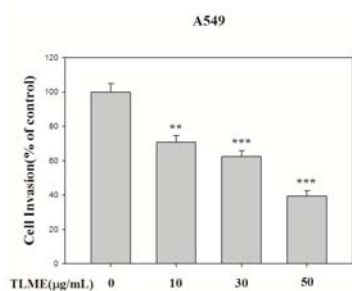


Fig 26. A549 細胞處理欖仁樹的葉之甲醇萃 (TLME) 其 invasion 之能力分析。以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 TLME，24hr 後 cell invasion 能力表現情形，並且量化製成柱狀圖。* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

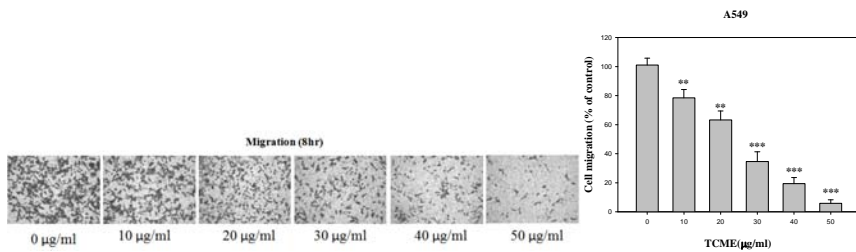


Fig 27. A549 細胞處理不同劑量欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME)其 motility 能力之分析。以 motility assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME)，其 24hr 後 cell motility 能力表現情形，並量化製成柱狀圖。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

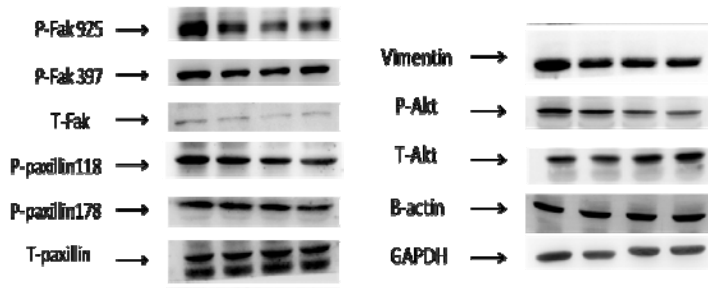
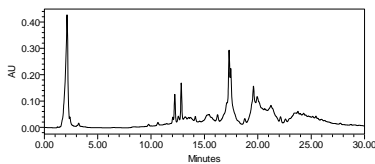
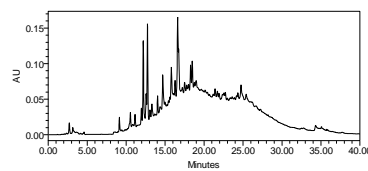


Fig 28. 利用 western blot 觀察 TCME 與 EMT 相關蛋白 p-FAK、p-paxillin 與 vimentin 的表現。

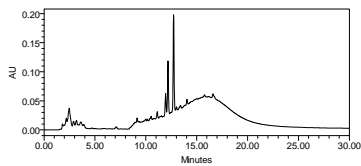
(A) 穿山龍 氯仿萃取物



(B) 穿山龍 甲醇萃取物



(C) 穿山龍 水萃取物



(D) 穿山龍 正丁醇萃取物

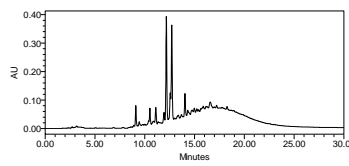
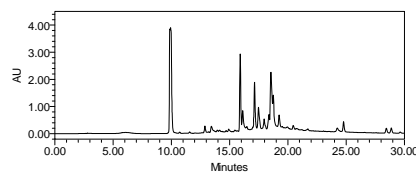


Fig 29. The chemical profile of PU extracts was analyzed by HPLC-mass spectrometer.



(A) 欖仁樹葉 乙酸乙脂萃取物(254nm)

Fig 30. The chemical profile of TC was analyzed by HPLC-mass spectrometer.

國科會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）

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）
上述之實驗結果，葉下珠萃取物抑制黑色素瘤細胞侵襲轉移的成果已在國際期刊 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 發表，如下：Ho ML, Hsieh YS, Chen JY, Chen KS, Chen JJ, Kuo WH, Lin SJ, Chen PN. Antimetastatic Potentials of Dioscorea nipponica on Melanoma In Vitro and In Vivo. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:507920. 其他細胞珠的相關實驗也正在進行及整理中。欖仁樹葉萃取物抑制急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia; AML)細胞株 HL-60 增生及誘導凋亡部分也正在積極進行中，期望日後可以增加臨床診斷之應用性。

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

洛神葉萃取物成分抑制血管病變作用及分子機制之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2632-B-040-001-MY3(4)

執行期間： 99 年 08 月 01 日至 102 年 07 月 31 日

計畫主持人：林慧萱

共同主持人：王朝鐘

計畫參與人員：陳璟賢、鍾佩君、王禎謙、周毓軒、林佳良

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
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

執行單位：中山醫學大學 醫學檢驗暨生物技術學系(所)

中 華 民 國 102 年 09 月 25 日

§ 中英文摘要

洛神葉(*Hibiscus sabdariffa* leaf)為洛神植株之葉子部位，在東南亞一帶為普遍烹煮的蔬菜類食物；在臺灣則經常被丟棄不用。過去的研究顯示洛神葉具有降血糖及降血脂之功效，以及其富含類黃酮等多酚(polyphenol)成分，此類多酚亦具有抗氧化、抗發炎、防癌及抑制心血管疾病之功能。先前我們研究室已證實洛神葉萃取物(*H. sabdariffa* leaf extract, HLE)能促進癌細胞凋亡(apoptosis)作用，顯示洛神葉具有成為化學預防物質(chemoprevention agent)的潛力。本計畫擬探討 HLE 及其多酚萃取物(*H. sabdariffa* leaf polyphenol-rich extract, HLP)抑制動脈粥狀硬化(atherosclerosis)之活性及釐清分子作用機制。第一年的研究結果發現 HLE 及 HLP 具有極佳的抗氧化活性並能抑制低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化作用，避免進一步造成氧化型 LDL(oxidative LDL, ox-LDL)的堆積，減少巨噬細胞吞噬 ox-LDL 後形成的泡沫細胞(foam cells)以及有效地減低細胞內脂質的含量。並提出 HLP 可能透過調控 PPAR γ 的表現，進而抑制 CD36 之表達；也可能藉由 LXR α -ABCA1 分子機制，以促進膽固醇反向運輸，進而減低細胞內脂質的堆積。第二年之研究利用發炎因子 TNF α (tumor necrosis factor- α)誘導血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)過度遷移及增生模式，結果發現 HLE 及 HLP 無毒性之劑量可以抑制 TNF α 誘導 VSMC 細胞(A7r5)移動能力，主要是透過降低 AP-1 轉錄活性進而抑制 MMP-9 的表現以及細胞移動。另外，TNF α 誘導 A7r5 細胞增生模式中，HLP 可促使細胞內 p53 蛋白和磷酸化表現，以及活化 p21 和 p27；HLP 並且增加 Rb/E2F 的結合，進而導致 E2F 和 phospho-Rb 的表現受到抑制，最後促使細胞週期停滯(cell cycle arrest)在 G0/G1 期。第三年探討 HLE 及 HLP 對於血管內皮細胞(HUVEC)之保護作用，HLE 及 HLP 具有抵抗 ox-LDL 促進 HUVEC 細胞生長週期停滯和凋亡之效用，主要的保護機制是透過活化 PI3K classIII/Beclin-1/LC-3 以及抑制 PI3K classIII/p-Akt/mTOR 路徑，共同誘發細胞自噬(autophagy)以保護細胞免於凋亡損傷。此外，利用高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈粥狀硬化病變之動物模式確認 HLE 抗動脈硬化之效用。並選取試驗動物的主動脈弓部分進行免疫組織染色分析，以 anti-PCNA 和 anti-SM α -actin 觀察 VSMC 之異常增生與遷移現象，以及 anti-CD31 觀察內皮細胞損傷，驗證各年度在細胞實驗得到的結果。綜合上述，我們提出洛神葉萃取物成份 HLE 及 HLP 具有抑制動脈粥狀硬化的作用，而能應用於保健食品的開發。

關鍵詞：洛神葉、多酚、抗氧化、細胞凋亡、化學預防物質、動脈粥狀硬化、氧化型低密度脂蛋白、泡沫細胞、發炎因子、血管平滑肌細胞、遷移、增生、細胞週期停滯、內皮細胞、細胞自噬。

Hibiscus sabdariffa leaf, the edible part of *H. sabdariffa* Linne (Malvaceae), is usually ignored and discarded in Taiwan. Previous studies have indicated *H. sabdariffa* L. leaf had been showed to possess hypoglycemic and hypolipid effects. The leaves contain flavonoid, one kind of polyphenol, has the following effects, anti-oxidation, anti-inflammation, anti-cancer and inhibition of cardiovascular diseases. In our previous studies, *H. sabdariffa* leaf extract (HLE) has been demonstrated to be able to induce apoptosis in prostate carcinoma cells. These evidences support that a self role of HLE that may act as a chemopreventive agent. In this study, we aimed to investigate the antiatherogenic effects of HLE and its polyphenolic extracts (HLP), which contained polyphenols including catechin, ECG and ellagic acid. First year, the inhibitory effects of HLE and HLP on oxidation and lipid peroxidation of low-density lipoprotein (LDL) were defined *in vitro*, while HLP was shown to be more potent. Both extracts showed potential in reducing foam cell formation and intracellular lipid accumulation in oxidized-LDL (ox-LDL)-induced macrophage J774A.1 cells under non-cytotoxic concentrations. Molecular data showed these influences of HLP might be mediated via activation of liver-X receptor α (LXR α)/ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and inhibition of PPAR γ /scavenger receptor CD36 pathways. Our data implied that HLP mainly up-regulated the LXR α /ABCA1 pathway, which in turn led to stimulation of cholesterol removal from macrophages and delay atherosclerosis. Second year, we demonstrated that vascular smooth muscle cells (VSMC) A7r5 cells pre-treated with tumor necrosis factor- α (TNF α) triggered migration and proliferation, and affected the activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). Non-cytotoxic doses of HLE and HLP abolished the TNF α -induced the secretion of MMP-9 and cell migration via inhibiting the AP-1 pathway. On the other hand, the results showed that HLP induced phosphorylation of p53, promoted expression of p21 and p27, inhibited phosphorylation of Rb, and thereby blocked the G1 to S transition in the cell cycle in the TNF α -treated A7r5 cells. As a whole, these data showed HLP inhibited TNF α -induced both migration and proliferation of VSMC. Third year, the results showed that HLE and HLP can protect against the ox-LDL-induced dysfunction in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Our data also revealed that the HUVEC cells presented DAPI-positive morphology, and had increases in the distribution of hypodiploid and G0/G1 phases after a 24-h treatment with ox-LDL. Both extracts showed potential in reducing apoptosis and inducing autophagy in ox-LDL-induced HUVEC. The effects of HLE and HLP in the cells might be mediated via PI3K classIII/Beclin-1/LC3 signaling and/or partially via PI3K classI/p-Akt/mTOR pathways. These results suggest that both extracts increase the level of autophagy, which is protective against HUVEC injury. Finally, we have reported that consumption of HLE reduced the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Histological photomicrographs of aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with a high cholesterol diet (HCD) showed that HLE could inhibit VSMC proliferation (anti-PCNA) and migration (anti-SM α -actin), and endothelial cell injury (anti-CD31). In conclusion, these results suggested that *H. sabdariffa* leaf potentially could be developed as an anti-atherosclerotic agent.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* leaf, polyphenol, anti-oxidation, apoptosis, chemopreventive agent, atherosclerosis, oxidized-LDL, foam cell, vascular smooth muscle cells, tumor necrosis factor- α , migration, proliferation, cell cycle arrest, human umbilical vein endothelial cells, autophagy.

(一) 前言

一、動脈粥狀硬化 (atherosclerosis)

根據衛生署統計心血管疾病為國人十大死因之第二名，且為西方國家普遍的疾病之一。而心血管疾病中動脈粥狀硬化更是主要的致死原因(1, 2)。動脈粥狀硬化的發生為一種複雜且為漸進式的致病過程，包括脂質進入血管壁、脂蛋白氧化、泡沫細胞(foam cells)形成與堆積、血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)遷移和增生，以及內皮細胞損傷(endothelial cells)等(3, 4)。目前已知，當血液中脂質成份過高易造成血管內皮細胞的受損，使血管腔(vascular lumen)間隙增加，使得脂蛋白如：“低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)”容易穿過血管腔間隙進入血管內膜(intima)當中堆積，而血管內膜當中的 LDL 又容易受到血管內膜中的一些內生性氧化酶的作用，發生脂質過氧化作用修飾，因而形成“氧化型低密度脂蛋白”(ox-LDL)，而這些修飾後的 ox-LDL 因為立體結構的改變，就變得不容易穿過血管腔間隙離開血管內膜而堆積下來(5, 6)。這些堆積在血管內膜的 ox-LDL 會影響血管內皮細胞的正常功能，諸如維持血管的狀，防止血液的流失，平衡血管的通透性等，而受傷的內皮細胞將變得容易被血液內的物質吸附，更加劇影響其原本之功能(7)。因此，這些受損的血管內皮細胞便會吸引血液中的清道夫--單核球細胞(monocyte)的聚集，而單核球細胞便會由血管內轉移至血管內皮細胞外的內膜，以清除這些影響血管內皮細胞的 ox-LDL。當單核細胞轉移到血管內膜時，會同時分化並活化，形成更具有清除能力的巨噬細胞(macrophage)(8-10)。此時，巨噬細胞對過分堆積的 ox-LDL 進行無限制的吞噬，而這些富含膽固醇的 LDL 將會逐漸累積在巨噬細胞體內，使得巨噬細胞形成另一種病態的細胞型態，稱之為泡沫細胞(11, 12)。這些泡沫細胞的大量堆集在血管內膜會形成所謂的脂肪條紋(fatty streak)，是動脈粥狀硬化過程中最早可以辨識的病灶(13) 所以 LDL 所受到的氧化性修飾及泡沫細胞的形成，在動脈粥狀硬化的早期皆扮演著重要的角色，因此有效的阻止這兩種病灶的發生，將有助於減緩動脈粥狀硬化的發展。此外，在動脈粥狀硬化的病理致病機轉中，也有研究指出動脈粥狀硬化的形成機制是一種脂質與發炎細胞間的聚集，伴隨著 VSMC 增生與細胞外間質液分泌所引起的細胞內膜纖維變性(4)，VSMC 是構成大型血管的主要細胞。目前已知的證據顯示，VSMC 異常遷移和增生在許多心血管相關疾病的形成過程中。在病程的發展中期，巨噬細胞會與血管內膜中的 T cell 交互作用釋放大量的細胞激素(Th1、Th2 cytokines)而促使一連串的免疫反應的發生(14)，同時周圍的 VSMC 及內皮細胞同樣也會表達生成 IL-1(interleukin-1)、TNF(tumor necrosis factor)等因子，而這些分子的生成會刺激 VSMC 的增生，並轉移至血管內膜或中膜(subendothelial)當中。由此可知，VSMC 往血管內層的移動和增生是造成血管內層增厚的主要原因。VSMC 轉移至內膜後，同樣也會受 ox-LDL 影響開始表達清除者接受器(scavenger receptor)而吞噬 ox-LDL 形成泡沫細胞。進一步，VSMC 也會開始分泌 MMPs (matrix metalloproteinases)，改變細胞外基質的構成，促使局部區域形成“fibrous cap”，而將粥樣(gruel)覆蓋形成動脈粥狀硬化斑(plaque)。自此病程由初期單純的脂肪斑形成轉入一個複雜的血管壁管腔損傷的階段(15, 16)。目前在臨床上對於動脈粥狀硬化的治療方式以施行氣球擴張術為主流，但是大部分的患者在半年之後會因為 VSMC 再度的增生與移動而使得血管再度狹窄。因此，如何藉由降低 VSMC 的增生與移動作用也被視為是有效預防動脈粥狀硬化的方法。

二、洛神葉(*Hibiscus sabdariffa* Linne leaf)

洛神花(*H. sabdariffa* L.)為錦葵科(Malvaceae)植物，原產熱帶地區，分部於印度，馬來西亞及東南亞，台灣東部及南部也盛產。其葉在東南亞一帶為普遍烹煮的蔬菜類食物，然而在台灣則被視為廢棄物大量丟棄。綜合國內外之研究顯示洛神葉萃取物(*H. sabdariffa* leaf extract, HLE)具有抗氧化、降血糖、降血脂之功效(17, 18)以及誘導前列腺癌細胞凋亡之作用(19)。過去的研究也指出其成分富含類黃酮(flavonoids)等多酚(polyphenol)成份(20)，此類多酚具有抗氧化、抗發炎、降血脂、防癌之作用及抑制心血管疾病(21, 22)，亦顯示洛神葉具有化學預防的潛力。

(二) 研究目的

心血管疾病名列全球第一大死因，世界衛生組織發佈每年約1700萬人死於心血管疾病，其中冠心病以及中風約占76%。根據衛生署發布100年國人十大死因，心血管疾病—心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病分佔國人十大死因第二、三、五名，心血管疾病死亡人數與癌症相近，對國人影響甚鉅；然而而心血管疾病中動脈粥狀硬化更是主要的致死原因。動脈粥狀硬化的致病過程中，三酸甘油脂、膽固醇之升高，LDL所受到的氧化修飾及血管內膜的變化，諸如泡沫細胞的產生、VSMC的增生與移動、內皮細胞的損傷，皆在動脈粥狀硬化症發展過程當中扮演著相當重要的角色。目前許多研究趨向以探討天然物中所含的成份達到預防疾病的發生為目的。因此本計劃將以台灣本土洛神葉萃取物(HLE)及其多酚萃取物(*H. leaf polyphenol-rich extract*, HLP)進行研究。主要分成幾個部分來探討：(1) HLE及HLP成分分析以及是否具有抗氧化的功能？能否抑制LDL的氧化性修飾作用？(2) HLE及HLP是否具有降三酸甘油脂和膽固醇，以及抑制動脈粥狀硬化之作用？(3) HLE及HLP對於VSMC增生作用之影響？(4) HLE及HLP對於VSMC移動作用之影響？(5) HLE及HLP是否具有抑制內皮細胞損傷之能力？(6) 以上之作用是透過哪些機制所調控？

洛神花茶是台灣區域性常用飲料，過去民間用於解熱、抗高血壓及治療肝病。近年來，國內外之研究針對洛神花化萼各個成份（包含原兒茶酸、花青素、類黃酮以及異黃酮素等等）的生化功效均有多方科學驗證與斬獲。但大部分的洛神花研究都集中在花萼的活性分析，卻甚少植株葉子的科學探討。過去研究僅有針對洛神葉作成分分析，有部分文獻指出洛神葉水萃取物能夠降血糖及降血脂，以及其富含類黃酮成分，顯示洛神葉具有開發為心血管疾病化學預防物質之潛力。因此，本研究將針對台灣生產之洛神葉進行初步之多酚定性、定量分析，以及抗氧化與抗動脈粥狀硬化活性分析。目的在釐清於複雜且為漸進式的動脈粥狀硬化過程中，洛神葉萃取物所參與影響的範疇及抗動脈粥狀硬化之分子機制。天然物抗動脈粥狀硬化之分子機制的研究無論對於多酚萃取物醫藥化評估，亦或針對心血管疾病治療之分子標的，都是重要的參考指標。研究期望能提供國人食用洛神葉時，有一參考依據；為符合新時代講究自然與健康飲食的觀念，提供一無毒性的天然抗氧化劑與保健食品，並且提高洛神花農業作物的經濟效益。

(三) 文獻探討

先前實驗室指出洛神花水萃取物有抑制LDL氧化的作用，其能抑制LDL輔脂蛋白B斷裂(apoB fragmentation) 和LDL-C降解(degeneration)(23, 24)，以及此萃取物也具有抑制血清刺激VSMC過度增生現象(25)。此外，許多研究證實多酚類對心血管病變具有助益。綠茶多酚EGCG可透過訊息蛋白分子p53與NF-κB來抑制VSMC生長與促進其凋亡(26)。來自燕麥的多酚類avenanthiamide則有抑制VSMC生長與增加內皮細胞產生NO的效果(27)。傳統醫療中，黃酮類也作為抗心血管疾病的藥物。黃酮類genistein因抑制酪胺酸激酶，而證明此激酶對VSMC移動的重要性(28, 29)。至於洛神葉在醫學上的報導，國外的研究甚少，只有洛神葉成分分析及降動物血糖試驗等(17, 18)，國內也幾乎無相關之研究。當前疾病預防已為一世界潮流，因此，尋找一化學預防物質(chemopreventive agent)為一重要工作。例如從茶中萃取polyphenolic acid extracts、curcuminoid extracts、broccoli compounds 及 soy isoflavonoids 已被廣泛的應用為疾病化學預防物質(30)，希望可以由攝取食物中有效萃取物達到預防或延緩疾病的發生為目的。根據我們初步的實驗結果顯示：洛神葉萃取物具有抑制低LDL氧化以及對抗脂質過氧化之作用，據此推論洛神葉可能具有抑制動脈粥狀硬化的功能。本次計畫中更將測試分離自洛神葉的成份：洛神葉多酚(HLP)，觀察其是否抑制粥狀硬化，進一步探討其可能的作用路徑。況且HLE是洛神葉直接經由水煮萃取而來，保留天然植物本身最原始之生物活性，一來不會有殘存有機溶劑之虞；二來它不會如人工合成化學物質(pure chemical)對人體衍生氧化性傷害之作用。期盼本計畫所獲得之初步結果，對於日後保健食品及農業之開發與應用上能有所貢獻。

(四) 研究方法

第一年：洛神葉萃取物成份(HLE及HLP)抑制高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈硬化症之動物模式及抑制泡沫細胞生成作用。

一、洛神葉水萃取物(HLE)及多酚(HLP)製備及定量

1.1. 水萃取物HLE之製備

秤取乾燥洛神葉 100 g，加入 6 L distilled water，以 100°C 煮 2 小時，待冷後過濾，將濾液進行冷凍乾燥，得其粉末即為洛神葉粗萃取物。HLE 之產率約為 50%。

1.2. 多酚萃取物HLP之製備

秤取 100 克乾燥洛神葉，攪拌至粉末狀。以 300 ml 甲醇在 50°C(水浴)中萃取 3 小時過濾，連續三次，收集濾液，於減壓濃縮乾燥後溶解於 50°C 500 ml 二次水(deionized distilled water)。然後以 200 ml 己烷移除色素，分層之水層以 180 ml 乙酸乙酯萃取三次，再於減壓濃縮乾燥後溶解於 300 ml 二次水，最後進行冷凍乾燥為粉末。HLP 之產率約為 2.5%。

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

測定酚的含量，以 gallic acid (GA) (mg/kg) 為標準品(standard)，甲醇溶解後分別取不同的量，以甲醇稀釋補足 1 ml 後，各加 0.5 ml 之 2N Folin-Ciocalteu phenol reagent 後搖勻，再加 3 ml Na₂CO₃ (200 g/L) 搖勻，並於室溫靜置 15 分鐘後，加 5 或 10 ml 去離子水後搖勻，以 1250×g 離心 5 分鐘，在波長 725 nm 下測吸光值(甲醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線，並計算回歸方程式。樣品泡好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算酚的含量。

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

測定黃酮的含量，以 rutin (mg/ml) 為標準品。甲醇溶解後分別取不同的體積，以 30% 乙醇稀釋並補足體積至 10 ml 搖勻。接著各加 0.3 ml 之 1M NaNO₃ 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。再加 0.3 ml 之 10% AlNO₃ 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。最後加入 4 ml 之 4% NaOH 溶液混合均勻，補 0.4 ml 去離子水至刻度，放置 15 分鐘。在波長 510 nm 下測吸光值(乙醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線。並計算回歸方程式。樣品泡好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算黃酮的含量。

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

花青素通常微弱酸性，在酸性環境下可以形成穩定的 flavylium 陽離子構造。本次實驗採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，精確定量待測樣品，得體積 V，並從中吸取 2 ml 試樣，經適當稀釋以濃鹽酸或氫氧化鈉溶液調 pH，使一份 pH 為 1.0，另一份 pH4.5。兩份稀釋液分別以分光光度計測其在 520 nm 的吸光值，得 A₁(pH 1.0 者)與 A₂(pH 4.5 者)，再以下列公式計算每 100 克水果中所含總花青素毫克數。

總花青素含量(mg 花青素/100 mg 萃取物):

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

ε × ω

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

V: 總抽出液體積(mL)

F: 稀釋倍數

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

ω: 水果總重(g)

1.6. 高效能液相層析儀(HPLC)分析

為使 HLE 及 HLP 製備固定標準化，實驗利用 HPLC (high performance liquid chromatography) 鑑定其多酚成份。使用 12 個多酚標準品：1. ellagic acid、2. PCA、3. catechin、4. epicatechin、5. caffeic acid、6. EGCG、7. ECG、8. p-coumaric acid、9. naringenin、10. ferulic acid。分析條件為用 C-18 reverse-phase column (5 μm, Hypersil ODS, 200 mm X 2.1 mm)，將 HLE 及 HLP 過濾 (0.45 μm) 後，取 20 μl 注入 HPLC，mobile phase 為 A: acetonitrile; B: 0.5% glacial acetic acid in water; C: isopropanol; 0-5 min 為 100% B; 5-15 min 為 5% A、95% B; 15-22 min 為 1% A、96% B、3% C; 22-24 min 為 5% A、90% B、5% C; 24-30 min 為 100% A, monitored at 290 nm。

二、HLE 及 HLP 抑制體外誘發 LDL 氧化之作用

2.1. DPPH 自由基清除效應

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 在甲醇溶液中呈現藍紫色，為一種穩定的自由基，是一種常被使用作為抗氧化指標的實驗。其結構上可以產生穩定的共振結構，當DPPH 自由基被清除時，呈現顏色會由原先的藍紫色脫色為淡黃色；脫色程度越高，則表示DPPH 自由基被清除的程度越高。且DPPH 甲醇溶液於517 nm 波長下有特定之吸光值。可藉由在517 nm下吸光值的減少來代表DPPH 自由基被清除的程度。取0.1 ml HLE及HLP以甲醇稀釋至4 ml，加入1 ml 新鮮配製0.2 mM DPPH 之甲醇溶液，均勻混合靜置30 分鐘後，以分光光度計於517 nm 波長下測量吸光值變化。利用此原理可測定出特定物質清除自由基之效力。計算公式如下：

$$\text{scavenging effects (\%)} = \left[\frac{1 - (A_{\text{sample at 517nm}} - A_{\text{blank at 517nm}})}{(A_{\text{control at 517nm}} - A_{\text{blank at 517nm}})} \right] \times 100$$

2.2. 低密度脂蛋白的離心萃取(LDL isolation)

取2 ml 的人類之血清，加入0.5 M NaCl 及0.3 mM EDTA (pH 7.4)的混合液0.7 ml，放入 Beckman TL-100 桌上型超高速離心機中，離心90000 rpm，10°C，10 分鐘，取出下層液2 ml，再加入0.5 M NaCl 及0.3 mM EDTA (pH 7.4)的混合液700 μ l，離心90000 rpm，10°C，3.5 小時，取出下層液2 ml，加入166.8 g KBr，使其溶解均勻，再離心90000 rpm，10°C，3.5 小時，收取上層液0.6 ml，即為分離好的低密度脂蛋白。但我們所得到的LDL，需再經過PD-10 column的處理，將LDL中的EDTA去除，我們先以25 ml PBS通過清洗PD-10 column，待其不流動後，再加2.5 ml LDL，也是待其不流動後，再加3.5 ml PBS，去掉前0.5 ml，收取後3 ml 即為去EDTA的LDL，連續步驟直至LDL取完。

2.3. 氧化型低密度脂蛋白的製備(LDL oxidation)

LDL先過PD-10 column後，再加入10 μ M CuSO₄ 於37°C水浴槽中，一起反應24小時，反應後再過一次PD-10 column即可得實驗用之ox-LDL。而ox-LDL經蛋白定量將其蛋白量調整為500 μ g/ml，使依實驗所需之稀釋至最後反應濃度為50 μ g/ml。ox-LDL若要加入細胞反應前，須先以0.22 μ m filter 過濾除菌，以防實驗進行中造成細胞污染。

2.4. 脂質過氧化試驗(TBARS formation assay)

LDL 的結構主要是由脂質、蛋白質及少量的醣類所組成。因此，研究 LDL 的氧化程度則可從研究脂質與蛋白質兩方面著手。根據 Yagi 等(1987)所修飾的方法，其原理是利用 LDL 氧化的過程中，會生成過氧化物MDA (malondialdehyde)，而一分子的MDA 會與兩分子的TBA (thiobarbituric acid)形成具螢光性質的聚合物TBARS (thiobarbituric acid reactive substance)，此物質於激發波長(Ex)為532 nm，發射波長(Em)為600 nm 時，可被偵測到特定的螢光波長。利用TEP (1,1,3,3-tetramethoxypropane)為標準品做標準曲線來定量LDL 被氧化的程度。在 LDL (100 μ g/ml)中加入銅離子(10 μ M)來誘導 LDL 形成 ox-LDL，再添加不同濃度的HLE及HLP，放入37°C水浴槽中反應24小時。再加入等體積25% TCA 溶液 (richloroacetic acid) 將蛋白質變性沉澱下來，並以10,000 rpm 在10°C下離心30分鐘，目的是為了將蛋白質去掉只留下脂質的部分，接著取上清液再加入等體積的TBA溶液反應，在避光的環境下以95°C加熱40分鐘，待其冷卻後，使用Hitachi F-2000 螢光比色計於特定波長Ex/Em532/600下測定MDA產生的量。

2.5. 低密度脂蛋白表面電荷改變試驗(LDL peroxidation-relative electrophoretic mobility assay)

LDL 氧化時，胺基酸序列中的離胺酸 (lysine)、組胺酸 (histidine) 等，帶正電荷的胺基酸會與氧化後的產物MDA、hexanal、4-hydroxynoneal (4-HNE) 結合，使得LDL 蛋白表面正電荷減少，造成負電荷增加的情形。而LDL 蛋白表面電荷改變的情形，可以利用LDL 蛋白在膠體中，往正電場移動的相對距離來觀察。在 LDL (100 μ g/ml) 中加入銅離子(10 μ M)來誘導 LDL 形成 ox-LDL，再添加不同濃度的HLE及HLP，放入37°C水浴槽中反應24小時。利用BACKMAN lipoprotein (LIPO) electrophoresis system，取一片已製備好的膠體，用模板濾紙，將多餘的水分吸掉，將紫色板輕輕對準c點放下，輕壓紫色板，使其附著在gel上，在10個well各注入5 μ l的樣本，靜置5分鐘，用長條濾紙小心的放在紫色板上，吸掉多餘的樣本，將長條濾紙和紫色板一起拿掉，將膠體架在電泳槽上，加入適量的電泳液 (6.07 g/500 ml)，以100伏特的電壓進行電泳30分鐘，然後取出膠體，用專用夾固定好，接著置於固定槽(180 ml 酒精，90 ml 水與30 ml 冰醋酸混合)，固定5分鐘，取出烘乾(需至完全乾)，放入染色槽(染色液：165 ml 酒精與3 ml paragon Lipo stain，再加上135 ml 的水混合)，待其染色均勻分佈後，放入脫色槽(脫色液：450 ml 酒精與550 ml 水混合)，脫色2次後，用去離子水沖洗，再烘乾即可。

2.6. ApoB 輔蛋白斷裂試驗(ApoB fragmentation assay)

當LDL被氧化時，輔蛋白apoB 蛋白(約512 kDa) 會被自由基攻擊而分解為不同大小的蛋白片段，因此利用梯度膠體分析觀察apoB 輔蛋白斷裂情形。在LDL (100 μ g/ml)中加入銅離子(10 μ M)來誘導LDL 形成 ox-LDL，再添加不同濃度的HLE及HLP，放入37°C水浴槽中反應24小時。待LDL 氧化後加入追蹤染劑 (loading dye) 於100°C下反應10分鐘後冷卻之。另一方面，於低溫下配製3~15%的梯度膠體，將以混和追蹤染劑的LDL 樣本小心注入膠體中，然後進行電泳(50 V, 20 mA, 13 小時)。電泳完成後，以染色液(1.25 g coomassie blue, 0.5 g amido black, 227 ml methanol, 46 ml acetic acid, 227 ml ddH₂O)染色1小時，最後以脫色液(40% methanol, 10% acetic acid, 50% ddH₂O)脫色，脫色至無染色液殘留於背景中，封膠後取下保存。

三、HLE 及 HLP 抑制泡沫細胞生成及細胞內脂質堆積之研究

3.1. 細胞毒性試驗(Cytotoxicity assay, MTT assay)

本實驗是用於測試細胞對於HLE及HLP的感受度是如何，以決定後續細胞實驗所選用萃取物之劑量。此法是根據Alley等人所研究的結果所設計之實驗，其原理為在有活性的活細胞會將MTT (thiazolyl blue) 經由粒腺體中dehydrogenase 作用代謝還原為藍紫色結晶，之後再以異丙醇 (isopropanol) 將結晶溶出，並於波長563 nm 下測定溶液吸光值變化，由吸光值的大小可得知存活的細胞數目之多寡，而死細胞是無法進行此作用，因此若溶液的吸光值有降低的話，表示細胞有死亡或無法代謝MTT reagent 的情形。將巨噬細胞 J774A.1 (4 \times 10⁵ cell/well) 培養於24 well culture plate，加入不同濃度的HLE及HLP處理24小時後，移除舊的培養基 (含萃取物)，加入新的培養基和MTT (0.5 mg/ml)反應4 小時，移除培養基，加入異丙醇將結晶溶出，在波長563 nm 下測定吸光值的變化。

3.2. 泡沫細胞生成試驗(Foam cell formation assay)

觀察泡沫細胞的形成，是以油脂染劑—油紅O (oil-Red O) 將細胞內中性脂肪染成紅色再加以觀察。J774A.1細胞(1×10^5 cell/well)在同時處理不同濃度的HLE及HLP，以及事先氧化後之ox-LDL (50 $\mu\text{g/ml}$) 24小時後，將培養液移除，並以PBS清洗二次，再以10% paraformaldehyde 將細胞固定1小時。移除固定液，並以PBS清洗二次，再以50%的異丙醇 (isopropyl alcohol) 浸潤片刻，加入60% oil-Red O染劑覆蓋細胞，15-20分鐘後移除染劑，以PBS 清洗三次(15分鐘/次)。完成上述步驟後，於光學顯微鏡下，觀察細胞內有無被染為深紅色的脂肪油滴，即為泡沫細胞。

3.3. 細胞內脂質含量分析

3.3.1. 細胞內脂質的萃取

觀察HLE及HLP對泡沫細胞內脂質含量之影響。將J774.1細胞(1×10^5 cell/well)在同時處理不同濃度的HLE及HLP，以及事先氧化後之ox-LDL (50 $\mu\text{g/ml}$) 24小時後，將培養液移除，並以PBS清洗二次，再以0.5 ml之hexane:isopropanol (3:2, v/v)萃取細胞內脂質，將脂質萃取物移至玻璃離心管中自然風乾，再以200 μl isopropanol回溶，即可得細胞內脂質萃取液。

3.3.2. 細胞內膽固醇含量之測定

利用市售之測定膽固醇含量之酵素測定法試劑，測定細胞內膽固醇含量之變化。取10 μl 之細胞內脂質萃取液與1 ml之試劑混合，於室溫下反應10分鐘，於波長500 nm下測定吸光值變化，以已知濃度之標準品作對照，計算出細胞內之膽固醇含量，其公式如下：

$$C = 200 \times \Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{STD}} \text{ [mg/dl]}$$

3.3.3. 細胞內三酸甘油酯含量之測定

利用市售之測定三酸甘油酯含量之酵素測定法試劑，測定細胞內三酸甘油酯含量之變化。取10 μl 之細胞內脂質萃取液與1 ml之試劑混合，於室溫下反應10分鐘，於波長500 nm下測定吸光值變化，以已知濃度之標準品作對照，計算出細胞內之三酸甘油酯含量，其公式如下：

$$C = 200 \times \Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{STD}} \text{ [mg/dl]}$$

3.4. 西方點墨法(Western blotting)

首先製備細胞萃取蛋白 (cell lysate)。收集細胞，加入 RIPA buffer 與蛋白酶抑制劑 (sodium orthovanadate、leupeptin 及 PMSF)，在 0 °C 下震盪 30 分鐘，之後於 4 °C 高速離心 (10000 $\times g$) 10 分鐘，所得上清液即為 cell lysate，可儲存於 -70 °C 備用。接下來為所得蛋白定量，將 30 μl cell lysate 加入 1 ml coomassie brilliant blue G-250，在室溫下反應 1 分鐘，利用 Coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595 nm 有一較大之吸光值，以 Spectrophotomete (HITACHI U-3210) 之可見光紫外光比色儀測定，並以 BSA 為蛋白質標準溶液，來換算細胞萃取液之蛋白質濃度。取 50 μg 蛋白與 5X loading dye 以 4: 1 比例混合，以 95 °C 加熱 10 分鐘，再置於冰上冷卻，即可作為電泳樣本。至於 SDS-聚丙醯胺電泳 (SDS-PAGE) 膠片的配鑄，於鑄膠模型架設完成後，下層膠 (separating gel) 依照分子量所需而配製成 6-15 %，上層膠 (stacking gel) 則為 4 %。將配好之整組電泳玻璃膠體裝置移入電泳槽，把 running buffer 加入內槽需至玻璃上緣，再把處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出 well，其中一個 well 注入 color protein markers，然後把 running buffer 加入外槽也需蓋過電導線，連接電泳槽與電源供應器，先以 70 V 壓縮電泳樣本至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電流為 90 V，當 loading dye 跑到底線時才停止電泳。之後進行蛋白轉漬。將膠片截去上層膠之部份後置於兩張濾紙上，膠片上面放上與膠片大小相同之硝化纖維紙 (Nitrocellulose transfer membrane, NC paper)，再置兩張濾紙於其上，其中所有濾紙、NC paper 都必須以 transfer buffer 浸濕過。用玻璃棒趕走氣泡，再以夾板 (內含海綿襯墊) 夾緊，放入轉漬槽中，於冰上以固定電壓 100V 轉漬約 2 個小時。轉漬完成後，取出 NC paper，加入 5 % milk blocking buffer，在室溫下搖晃 1 小時。以 washing buffer (TBS + 0.1 % Tween 20) 清洗三次，每次 10 分鐘，之後加入一級抗體 (分析 NF- κ B、c-Jun 及 c-Fos 等核蛋白)，在 4 °C 下反應，隔天早上以 washing buffer 清洗三次，每次 10 分鐘。接著再加入二級抗體，置於室溫作用 1 小時後，以 washing buffer 清洗三次，每次 10 分鐘。最後將 NC paper 放入盤子 (Tray) 上，用面紙擦去多餘的 washing buffer，再以 Western Lightning (Enhanced chemiluminol Reagent: Oxidizing Reagent= 1: 1; 即 ECL substrate) 覆蓋整個 NC paper，在室溫下約反應一分鐘後，擦去多餘的 ECL substrate，將盤子放入 FUJIFILM LAS-3000 之冷光螢光影像分析系統中，以 ImageReader LAS-3000 Life 儀器控制軟體，在 Chemiluminescence 條件下拍得影像，並以 FUJIFILM-Multi Gauge V2.2 軟體定量蛋白密度。

四、高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈硬化症

4.1. 動物模式

本實驗模式分組概述如下：(a)正常飼料餵食組、(b)高脂肪 (HFD) 餵食組、(c) HFD + 0.5% HLE、(d) HFD + 1.0% HLE、(e) 1.0% HLE (毒性試驗組)，一般組以 normal diet 餵食，2~5 組以 HFD: 89.8% chow, 10% coconut oil 及 0.2% 膽固醇，實驗過程中定期記錄動物飲食以及體重的變化，並登記動物死亡的數目。飼養 25 週後可誘導產生高脂血症，動物禁食一夜後犧牲，犧牲後收集血液分析血脂肪，包括總膽固醇、三酸甘油酯、HDL、LDL，另一部份取肝組織測定其肝內總脂質膽固醇及 LDL 之濃度。犧牲後，取出實驗動物之主動脈弓 (aortic arch) 部份，後浸入 10% 中性福馬林固定 (neutral buffered formalin)，以石蠟包埋，以 hematoxylin and eosin 染色觀察病灶。此外，實驗動物之胸動脈亦由主體小心剝離，並在解剖顯微鏡下將管腔外側之體脂肪小心去除，再以縱切方式將血管剖開，隨後以 oil red O 進行染色，觀察胸動脈管腔內壁中脂肪斑之沉積與分布。

4.2. 組織 oil red O 染色

將 oil red O (300 mg/dl) 的飽和溶液溶於 99% isopropyl alcohol 中，做為保存溶液。將配置好之 oil red 保存溶液與 PBS 以 6:4 的比例混合後，靜置 10 分鐘之後，離心過濾即可使用。取先前以 10% neutral buffered formalin 固定之胸主動脈，用 PBS 洗淨後，以 50% isopropanol 浸泡 5 分鐘，並以 oil red O 浸泡染色 3 分鐘，再以 20% isopropanol 清洗 1 分鐘後，最後用 PBS 將過多的染料洗淨。如果血管內壁有脂肪堆積 (fatty streak) 就會被 oil red O 染成紅色，照相後將照片掃描輸入電腦，以電腦程式 (Image Pro plus) 計算有脂肪堆積之血管面積的百分

比。

4.3. 動物血脂肪及肝臟脂肪測定分析

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

4.3.1. 三酸甘油酯(Serum triacylglycerol, TG)

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

4.3.2. 總膽固醇(Total cholesterol, TC)

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

4.3.3. 高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)

採用酵素作用與比色測定原理，取定量的血清及肝臟均質液中加入適當沉澱劑，將chylomicrons、VLDL、LDL沉澱，作用完全後離心，取定定量上清液加入膽固醇測定試劑，以分光

4.3.4. 低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)

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

五、統計分析(Statistical analysis)

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

第二年：洛神葉萃取物成份(HLE及HLP)抑制細胞平滑肌細胞生長週期及移動作用。

一、細胞培養及VSMC異常遷徙及增生之模式建立

本實驗所使用的細胞自食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心購買之Rat smooth muscle of thoracic aorta—A7r5細胞。此細胞來自老鼠的胸部主動脈，解凍後培養於含有10% Fetal bovine serum、1.5 g/L Sodium bicarbonate、4 mM glutamine、1 mM Penicillin-Streptomycin的Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培養液中。將培養箱設定5% CO₂、37°C的恆溫環境，根據細胞生長速度定期更換培養液。每次實驗前計數適當細胞密度，以0.5%FBS的培養液starvation 24小時之後，加入含有TNF α 10 ng/mL的培養液再反應24小時後，方可進行實驗。

二、洛神葉萃取物成份(HLE及HLP)對於細胞平滑肌細胞移動作用之影響

2.1. 細胞毒性測試(MTT assay)

將A7r5細胞(4×10^5 cell/well)培養於24 well culture plate，以0.5% FBS的培養液starvation 24小時之後，加入含有TNF α 10 ng/mL的培養液，再以不同濃度的HLE或HLP處理24小時後，移除舊的培養基(含萃取物成份)，加入新的培養基和MTT (0.5 mg/ml)反應4小時，移除培養基，加入異丙醇將結晶溶出，在波長563 nm下測定吸光值的變化。

2.2. 基質金屬水解蛋白酶活性分析(Matrix metalloproteinase activity)

利用受質(substrate)與蛋白水解酶(proteinase)結合的原理，將受質加入SDS-PAGE的下層膠中，而電泳後，樣品中所含的蛋白水解酶會根據分子量大小不同而停留在膠體中的特定位置。再利用triton-X 100除去SDS使蛋白水解酶恢復活性後，蛋白水解酶便可以分解膠體中的受質。當受質被分解後，就不會被蛋白質染劑(coomassie blue)染上，因此在藍色背景下，蛋白水解酶所在的位置便會呈現白色區域，再根據白色區域的深淺和大小可判斷此蛋白水解酶的活性大小。將A7r5細胞(1×10^7 cell/100 mm dish)以0.5% FBS的培養液starvation 24小時之後，加入含有TNF α 10 ng/mL的培養液，再以不同濃度的HLE或HLP反應24小時後，以不含胎牛血清的培養液收集細胞分泌的基質金屬水解蛋白酶(MMP)為樣本，以5倍的追蹤染劑與樣本均勻混和後，注入0.1% gelatin-8% SDS-PAGE電泳膠片中，置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，分別以100 V與140 V的電壓進行電泳分離。待電泳分離結束後，以清潔液(2.5% triton-X 100)去除SDS，並在室溫下搖晃30分鐘2次，然後加入反應液(40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃)於37°C恆溫箱中反應12-16小時，反應完的膠片以染色液(coomassie blue)染色30分鐘，再以脫色液(20% methanol, 10% acetic acid)退染，觀看結果。

2.3. 傷口癒合試驗(Wound healing assay)

將A7r5細胞(5×10^5 cell/well)培養於6 well culture plate，當細胞密度約八分滿時以0.5% FBS的培養液starvation 24小時之後，加入含有TNF α 10 ng/mL的培養液，再以不同濃度的HLE或HLP培養於5% CO₂、37°C的恆溫環境中。藉由yellow tip在培養皿中央劃出一道所謂的“傷口”來持續觀察細胞增生及遷移的能力，若傷口一直無法癒合，即表示細胞的遷移受到了抑制。每隔一段時間(0、24、48、72小時)以倒立顯微鏡觀察細胞型態與數目，並且隨機選取5個視野進行細胞數目的計數。

2.4. 細胞移動性分析(Migration assay)

利用48 well Boyden chamber的分析方法，lower chamber為含有20% FBS的培養液；將細胞處理24小時後，以trypsin-EDTA打下所有細胞並用trypan blue計算細胞數，然後注入固定量的細胞(5×10^4)於upper chamber，待細胞移動6小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞10分鐘，風乾5分鐘之後，以Giemsa(1:20)染色1小時，最後固定住薄膜，擦掉薄膜之上層細胞，在400 \times 顯微鏡底下每個well隨機選取3個視野，數5個well作移動細胞數之統計。

2.5. 抑制血管平滑肌細胞遷移分子機制分析

2.5.1. 即時聚合酶連鎖反應(Real time-polymerase chain reaction, real time-PCR)

將純化出之total RNA，利用DEPC H₂O進行不同程度之稀釋，稀釋後之RNA樣本以分光光譜儀讀取核酸定量，計算出各個樣本1 μ g之total RNA的體積，進行反轉錄(reverse transcriptase)。當反轉錄反應完成所得到之cDNA可以進行儲存或直接進行定量PCR反應之用。進行定量PCR實驗步驟：首先需將所要分析基因之primer(包含：reverse與forward)與TaqMan螢光Probe準備完畢。再配製iQ Supermix，用於進行PCR反應之用，Supermix含有PCR反應所需的dNTPs、buffer、鎂離子等，當Supermix與cDNA template混合後

(請勿 vortex, 內有 DNA polymerase), 即可放入 Real-timePCR 機器進行分析。將 Supermix 與 primers、probe 混合好後, 小心地將 20 μ l 的 Supermix 混和液加入 96 well plate 或 8 連排的 PCR 專用試管當中, 最後加入 5 μ l 的 cDNA template, 上機分析結果(Bio-Rad iCycler Real-Time PCR)。

2.5.2. 西方點墨法(Western blotting)

同第一年實驗方法 3.4。

2.5.3. 電泳遷移率分析(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

蛋白質除了能跟蛋白質結合外, 也能跟核酸上特殊的序列結合, 如轉錄因子就是一個很好的例子。而 EMSA 是研究蛋白質與核酸結合最常使用的方法。利用一段含有欲探測序列的寡聚核苷酸探針(oligonucleotide probe), 與含有欲測蛋白質的細胞液共同反應一段時間後, 混合物以不變性的狀態(nondenaturing condition)跑電泳, 未與蛋白質形成複合體的 oligonucleotide 在膠體中移動得較快; 反之, 與蛋白質結合的 oligonucleotide 因為形成一較大分子之複合體故移動得較慢, 由膠體上可以看出兩者的差異。

三、洛神葉萃取物成份 (HLE 及 HLP) 對於細胞平滑肌細胞週期之影響

3.1. 細胞生長曲線試驗(Cell growth curve assay)

用來評估細胞生長情形的實驗方法。將 A7r5 細胞 (5×10^5 cell/well) 培養於 6 well culture plate, 當細胞密度約八分滿時以 0.5% FBS DMEM 培養 24 小時後, 加入含有 TNF α 10 ng/mL 的培養液與不同劑量的 HLE 或 HLP 培養於 5% CO₂、37°C 的恆溫環境中, 每隔一段時間 (0、24、48、72 小時) 以倒立顯微鏡觀察細胞型態與數目, 並且隨機選取 5 個視野進行細胞數目的計數。

3.2. 細胞增生試驗(Cell proliferation assay)

BrdU (bromodeoxyuridine) 是 DNA 鹼基 thymidine 的一個 analogue; 當細胞進行 DNA 合成時會取代 thymidine incorporate 到 DNA 中, 再利用 BrdU monoclonal antibody 去偵測細胞表現 thymidine incorporation 的情形; 因此只有在 DNA 合成旺盛的細胞中會呈現 BrdU 陽性表現結果, 可以用來分析細胞週期的動力學。將 A7r5 細胞 (5×10^3 cell/well) 培養於 96 well culture plate 中, 培養 24 小時後, 將 media 置換成 serum starvation 狀態, 持續 24 小時。分別加入含有 TNF α 10 ng/mL 的培養液與不同劑量的 HLE 或 HLP 混合著 10 μ M BrdU 試劑一起反應, 並以鋁箔包覆 plate 避光反應。再繼續培養 24 小時後, 將細胞培養液去除, 在每個孔洞中加入 200 μ L Fixative Denaturing Buffer 室溫靜置 30 分鐘。將 Fixative Denaturing Buffer 去除後, 在每個孔洞中加入 100 μ L 稀釋後之 Anti-BrdU Antibody Buffer 室溫靜置 1 小時。之後, 將 Anti-BrdU Antibody Buffer 去除, 再以 1 \times Wash Buffer 潤洗三次。去除 Wash Buffer 後, 加入 100 μ L Reconstituted Conjugate Buffer 靜置且避光 15 分鐘。將 Reconstituted Conjugate Buffer 去除, 再以 1 \times Wash Buffer 潤洗三次。去除 Wash Buffer 後, 再以 ddH₂O 潤洗並去除。之後, 每個孔洞中加入 100 μ L Substrate Solution, 室溫靜置且避光 15 分鐘。15 分鐘後, 每個孔洞中加入 100 μ L Stop Solution, 室溫靜置且避光 15 分鐘。接著在 450 及 540 nm 波長下以 ELISA reader 讀取吸光值, 並將波長 450 nm 之吸光值減去 540 nm 之吸光值則為實際數據。

3.3. 細胞週期分析(Flow cytometry analysis)

流式細胞儀則是指細胞於流動狀態下移動時, 能夠觀察及記錄細胞特質的儀器, 除了可以鑑定細胞的標的外, 還可以分析細胞的分裂週期、DNA 含量、細胞凋謝死亡、細胞內鈣離子濃度變化……等等。將 A7r5 細胞 (1×10^7 cell/100 mm dish), 以 0.5% FBS 的培養液 starvation 24 小時之後, 加入含有 TNF α 10 ng/mL 的培養液促進細胞增生, 以不同濃度的 HLP 處理 24 與 48 小時後, 先以 PBS 清洗數次, 再利用 trypsin 將細胞從培養皿上分離下來 (不可用刮的, 以免造成細胞死亡), 離心去除上清液, 重複清洗沉澱物, 離心去除上清液, 最後取沉澱物即細胞。隨即將沉澱物打散後加入 1 毫升 70% 乙醇固定細胞 (保存於 -20 °C, 勿超過一個月)。分析前先將檢體離心去除乙醇, 再以 PBS 清洗, 離心後取沉澱物。將沉澱物輕彈打散, 加入 1 毫升的 PI 染劑 (20 μ g/ml propidium iodide、20 μ g/ml RNase、0.1% triton-X 100), 於室溫下染色 15 分鐘, 需避光, 以流式細胞儀 (BECTON DICKINSON) 分析, 藉此將細胞內不同時期的 DNA 含量以 CELL Quest 軟體作紀錄, 並將處於不同細胞週期的細胞數百分比作區別與統計分析, 藉以觀察 HLP 是否具有抑制 VSNC 增生的能力。

3.4. 抑制血管平滑肌細胞增生機制之探討

3.4.1. 西方點墨法(Western blotting)

同第一年實驗方法 3.4。將經處理之 A7r5 細胞分別於 24 小時後收取其 lysate, 以 Western blotting 分析 p53、p21、p27、p16 和 E2F 蛋白表現及 p53、Rb 磷酸化表現。

3.4.2. 免疫沉澱法(Immunoprecipitation)

以抗體進行免疫沉澱是分離蛋白質複合體或觀察蛋白質之間結合能力最常用到的方法。使用會專一性結合目標蛋白質的抗體, 讓其與溶液中的目標蛋白質結合、並離心沉澱, 來達到與其它溶液中得蛋白質分離的效果。若免疫沉澱法搭配西方點墨法一起進行實驗, 則可偵測到微量蛋白。

四、免疫組織染色(Immunohistochemistry stain, IHC)

免疫組織化學染色法是利用對蛋白質具有特異性的抗體 (例如: anti-PCNA: proliferation marker 及 anti-SM α -actin: SMC marker) 及免疫染色技術來達到偵測組織當中異常蛋白質表現變化為目的。從冰箱中拿出冷凍 slide, 讓其回溫至室溫, 用 SecurelineR pen 標示所有 slide, 並置於 PBS 中, 再利用 2-3 \times PBS 潤溼 slide, 去除冰凍 mounting media (SecurelineR pen 在脫水及清洗 slide 不會掉色), 拭去在樣本周圍過多的 buffer, 加 100 μ l 已經稀釋好濃度的一次抗體至 slide 上, 在室溫下培養一小時 (抗體的量依組織的大小而定), 利用 PBS 潤溼 slide 三次, 每次二分鐘, 擦拭 slide, 接著加入 100 μ l 已稀釋濃度的生物素結合二次抗體 (必須能與 speice 或一次抗體 isotype 相互 match)。在室溫下培養卅分鐘, 利用 PBS 溼潤 slide 三次, 每次二分鐘。擦拭 slide, 接著加入 100 μ l Streptavidin/HRP 到每個 slide, 在室溫下反應卅分鐘, 利用 PBS 溼潤 slide 三次, 每次二分鐘。置備 DAB (DAB 是種 carcinogen, 操作時須小心, 最好戴手套), 小心的滴掉 slide 液體並將 slide 置於平面, 如果使用 SeguenzaR rack, 去除 coverplates, 將 slide 置於平面 (不要讓 slide 乾掉), 每個 slide 加入大約 400 μ l DAB 溶液, 確定所有組織都覆蓋溶液, 在 humid chamber 反應五分鐘左右。小心的拿起每片 slide, 在紙巾上滴掉多餘 DAB, 置於染色架上放入大水盤中。用清水潤溼 slide 三次。

五、統計分析(Statistical analysis)

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

第三年：洛神葉萃取物成份 (HLE 及 HLP) 保護血管內皮細胞損傷作用。

一、細胞培養及HUVEC細胞損傷之模式建立

本實驗所使用的細胞自食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心購買之 human umbilical vein endothelial cell—HUVEC 細胞。此細胞來自人類臍靜脈，解凍後培養於 M199 (內含 20% FBS, 100 Iu/ml Penicillin, 1 mg/ml Streptomycin, 15 mM HEPES, 2 mM L-glutamin, 5 U/ml Heparin, 100 μ g/ml E.C.G.S., pH 值 = 7.2) 培養液中。將培養箱設定 5% CO₂、37°C 的恆溫環境，根據細胞生長速度定期更換培養液。每次實驗前計數適當細胞密度，以 0.5% FBS 的培養液 starvation 24 小時之後，加入含有 ox-LDL 50 μ g/mL 的培養液再反應 24 小時後，方可進行實驗。

二、洛神葉萃取物成份 (HLE 及 HLP) 對於內皮細胞毒性及生長之影響

2.1. 細胞存活測試 (MTT assay)

同第二年實驗方法 2.1。

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

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

2.3. 細胞增生試驗 (BrdU assay)

同第二年實驗方法 3.2。

三、洛神葉萃取物成份 (HLE 及 HLP) 對於內皮細胞死亡之影響

3.1. 細胞凋亡分析

3.1.1. DAPI stain (4',6-diamidino-2-phenylindole stain)

將處理後的 HUVEC 去除上清液，再利用溫的 PBS 進行 wash，以 3% para-formaldehyde 進行 30 分鐘固定。接著去除固定液後，再以 PBS 進行 wash。配置 1 μ g/ml DAPI 之 PBS 進行細胞染色 30 分鐘。隨後去除染劑，再加入 PBS 後，即可利用螢光顯微鏡下進行觀察並拍照。依據結果計數 DAPI-positive 之細胞進行量化。

3.1.2. 細胞週期分析 (Flow cytometry analysis)

同第二年實驗方法 3.3。

3.1.3. 細胞凋亡及細胞週期停滯相關蛋白分析 (Western blotting)

同第一年實驗方法 3.4。將經處理之 HUVEC 細胞分別於 24 小時後收取其 lysate，以 Western blotting 分析 caspase-3、E2F 和 p-Rb 蛋白表現。

3.2. 細胞自噬分析

3.2.1 AVO stain (Acidic vesicular organelles stain)

自體吞噬是一種細胞內利用膜的構造將多餘或要代謝及有問題的蛋白質及胞器加以包裹，最後與溶酶體 (lysosome) 結合形成 autolysosome，予以分解並再加利用的機制，而形成這類的構造也被稱為 AVO。在活體狀態下，AVO 可以吞噬 acidine orange 進行活體染色，因此觀察 HLE 或 HLP 處理之後，細胞 AVOs 的形成。首先細胞經過不同濃度的 HLE 或 HL 處理之後，以 PBS 清洗三次，置換新的培養液，加入 acridine orange 染劑 (1 μ g/ml)，於室溫下避光並染色 15 分鐘，移除培養液並以 PBS 清洗三次後加入新的培養液，於螢光顯微鏡下觀察細胞螢光之變化，並拍照記錄。

3.2.2. 細胞自噬相關蛋白分析 (Western blotting)

同第三年實驗方法 3.1.3。將經處理之 HUVEC 細胞分別於 24 小時後收取其 lysate，以 Western blotting 分析 LC-3、Beclin-1、PI3K classIII (p100)、mTOR、p-Akt、Akt 和 PI3K classI (p85) 等蛋白表現。

四、免疫組織染色 (IHC stain)

同第二年實驗方法項目四。免疫組織化學染色法是利用對蛋白質具有特異性的抗體 (anti-D31: endothelial cell damage marker) 及免疫染色技術來達到偵測組織當中血管內皮細胞特異性蛋白表現變化為目的。

五、統計分析 (Statistical analysis)

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

(五) 結果與討論 (含結論與建議)

第一年：洛神葉萃取物成份 (HLE 及 HLP) 抑制高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈硬化症及泡沫細胞生成作用。

一、洛神葉水萃取物 (HLE) 及多酚 (HLP) 成份分析及鑑定

1.1. 定性分析

以 HPLC 分析 10 個多酚標準品：1. GA、2. protocatechuic acid (PCA)、3. catechin、4. (-)-epicatechin gallate (ECG)、5. ellagic acid、6. rutin、7. p-coumaric acid、8. ferulic acid、9. quercetin、10. naringenin。其滯留時間 (retention time; RT) 分別依序出現 (Fig. 1A)；另外，從 Fig. 1B 以及 Fig. 1C 結果可得知將洛神葉所萃取出 HLE 及 HLP 與標準品 (HLE + standard 以及 HLP + standard) 兩兩混合，其 RT 分別在幾個時間點相吻合。總結 Table 1 顯示：HLE 包含兩個成份 catechin (4.25%) 和 ellagic acid (28.20%)。HLP 則包含五個成份 catechin、ECG、ellagic acid、ferulic acid 和 quercetin，各別含量大約有 7.40%、16.53%、10.30%、0.70% 和 0.83%。

1.2. 定量分析

利用 Folin-Ciocalteu 方法測定 HLE 及 HLP 各約莫得到 5.22% 和 35.36% 總多酚含量 (Table 1)。比較 HLE 經 HPLC 分析結果之多酚加總則為 32.45%，兩種試驗的多酚含量出現明顯的落差。以 HPLC 來論，它屬於定性分析，為使 HLP 製備固定標準化的一種評估方法；測定總多酚含量的 Folin-Ciocalteu 方法 (33) 卻會受制於標準品而有不同的分析結果。另一方面，根據 HPLC 之結果顯示：類黃酮 (catechin、ECG 和 quercetin = 24.76%) 這類多酚占 HLP 成分比例最高，續利用 Jia 方法分析萃取出之總黃酮含量。Table 1 結果顯示：HLE 及 HLP 各約莫得到 20.98% 和 65.16% 的黃酮測定值。而花青素之純度測定是採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，由分光光度計分析 HLE 及 HLP，其吸光值再經公式換算。而換算出所萃取出 HLE 及 HLP 的花青素純度各約有 1.93% 及 1.33%。上述成分鑑定試驗證實 HLP 功能性成份之含量遠高於 HLE，HLP 確為富含多酚之萃取出物，其中以類黃酮的成份比例最高。

二、洛神葉萃取物成份 (HLE/HLP) 抑制體外誘發 LDL 氧化之作用及清除自由基之效力

LDL 的氧化指標於本實驗中分為兩方面來討論，即 LDL 蛋白氧化修飾反應 (oxidative modifications) 與脂質的過氧化作用 (lipid pre-oxidation)。在實驗上，蛋白表面的電荷改變實驗 (LDL peroxidation-relative electrophoretic mobility)，來測定 LDL 蛋白氧化修飾程度，而脂質的過氧化作用的指標則以 TABRS assay 來測定。

2.1. 脂質過氧化試驗 (TBARS formation assay)

LDL 氧化會生成過氧化物 MDA，一分子的 MDA 與二分子的 TBA 會生成具螢光性質的聚合物，以此聚合物的吸光值可換算 MDA 濃度。以脂質過氧化之終產物 MDA 生成濃度當作脂質過氧化的指標，如 Fig. 2 所示，單獨以 10 μ M 銅離子處理之控制組，其中 MDA 濃度急速升高，而在同時添入不同濃度的 HLE 或 HLP 一起反應後，有意義的降低 MDA 的形成，尤其是在添加了 HLE 1.0 mg/ml (Fig. 2A) 或 HLP 0.1 mg/ml (Fig. 2B) 的組別，明顯地降低了九成以上的 MDA 生成量，顯示出 HLE 及 HLP 具有抑制銅離子所誘發之脂質過氧化的作用。

2.2. 蛋白表面的電荷改變實驗 (LDL peroxidation-relative electrophoretic mobility assay)

LDL 氧化時，蛋白序列中的離胺酸 (lysine)、組胺酸 (histidine) 等帶正電荷胺基酸的 e-amino group 與氧化產物的醛類如：MDA、hexanal 與 4-HNE 交聯生成 Schiff base 而使 LDL 表面正電荷減少而負電荷增多。而 LDL 氧化後蛋白表面的電荷改變情形，可以用膠體上色帶往正電場移動的距離來判定，以對照組 (control group) 色帶相對移動的位置 (REM, relative electrophoretic mobility) 為 1。在 *in vitro* 實驗中，以 10 μ M 銅離子誘導 LDL 於 37°C 氧化 24 小時後，其色帶 REM 比對照組多了 2 倍。而在同時添入不同濃度的 HLE 或 HLP 一起反應後，在 HLE 1.0 和 2.5 mg/ml 濃度下其 REM 回復到與對照組相當 (Fig. 3A, left panel)。此外在 HLP 2.0 mg/ml 濃度下，其 REM 為對照組的 0.8 倍 (Fig. 3B, left panel)。由上述實驗結果顯示，有添加 HLE 或 HLP 的組別，其 REM 皆比 positive group (完全不添加萃取出物，但有加入銅離子誘導的組別) 降低，顯示出具有抑制及預防 LDL 氧化的作用。

2.3. ApoB 輔蛋白斷裂試驗 (ApoB protein fragmentation assay)

在 *in vitro* 實驗中以 10 μ M 銅離子誘導下，LDL 於 37°C 氧化 24 小時後，其 LDL 的輔蛋白 apoB 約有 100% 斷裂。而在同時添入不同濃度的 HLE 或 HLP 一起反應後，在 2.5 mg/ml HLE 濃度下 apoB 約有 81% 斷裂 (保留 19%)，而在 5.0 mg/ml 濃度下 apoB 約有 45% 斷裂 (保留 55%) (Fig. 3A, right panel)；而在處理 HLP 的組別，0.5、1.0 和 2.0 mg/ml 濃度下 apoB 各約有 84%、75% 和 22% 斷裂 (保留 16%、25% 和 78%) (Fig. 3B, right panel)。由上述實驗結果顯示，有添加 HLE 或 HLP 的組別，其 apoB 斷裂量比 positive group 降低，證實兩者具有抑制 LDL 氧化之作用。

2.4. DPPH 自由基清除效應

DPPH 為結構穩定的自由基並於 517 nm 波長下有特定之吸光值。當 DPPH 的濃度降低時其吸光值也會隨之降低，利用此原理可測定出特定物質清除自由基之效力。在 *in vitro* 實驗以 1 mM DPPH 為 positive group，而後在相同條件下添入不同濃度的 HLE 或 HLP 測定各濃度下清除 DPPH 的效力。由 Fig. 4 實驗結果顯示，HLE 及 HLP 濃度越高對自由基之捕捉的能力越強，具有濃度依賴性關係。

脂質過氧化及 LDL 氧化被證實是動脈粥狀硬化發生過程的致病因子，由上述實驗結果顯示 HLE 及 HLP 具有抑制 LDL 被氧化的能力，不論在 LDL 的蛋白氧化修飾或脂質過氧化作用，由各實驗結果來看 HLE 在 2.0-5.0 mg/ml 濃度或 HLP 在 0.2-2.0 mg/ml 濃度下可達到抑制 LDL 氧化作用。而由清除自由基的試驗中發現 HLE 及 HLP 具有清除自由基的功能，表示其具有保護 LDL 不受由銅離子促氧化作用生成的自由基攻擊，而可抑制 LDL 氧化。因 HLE 及 HLP 具有抑制 LDL 氧化的效力，將可預期其具有抑制動脈粥狀硬化發生之作用。然而，我們發現在 HLE 濃度 2.0 mg/ml 時，其 DPPH 清除效力約為 50% (Fig. 4A)，而在 HLP 濃度 0.2 mg/ml 時，DPPH 清除效力則僅為 20% (Fig. 4B)。這些結果顯示，HLE 及 HLP 可能並不只是透過清除自由基，抑制 LDL 的氧化作用，進而減緩巨噬細胞轉形為泡沫細胞，減少泡沫細胞的形成。可能尚有其他未知的機制有待釐清。

三、洛神葉萃取物成份 (HLE/HLP) 抑制泡沫細胞之生成

泡沫細胞的形成是早期動脈粥狀硬化發生的特徵，所謂的泡沫細胞是指進入血管內膜的單核性白血球趨化而成的巨噬細胞內堆積了大量的膽固醇，大量的泡沫細胞形成會聚集於血管內膜中而形成脂肪斑。巨噬細胞會受 ox-LDL 的刺激下，大量表達清除者接受器 (scavenger receptors) 而將 ox-LDL 吞噬至細胞內，因此抑制泡沫細胞之生成，可視為降低動脈粥狀硬化發生關鍵指標。

3.1. 細胞毒性試驗

首先觀察 J774A.1 巨噬細胞對於 HLE 及 HLP 之敏感度為何，以決定後續細胞試驗所須之萃取出劑量。由 Fig. 5 中之結果可以得知，HLE 及 HLP 對於要造成巨噬細胞之致死毒性所需之劑量相當大 (HLE: $IC_{50} > 3.0$ mg/ml 以及 HLP: $IC_{50} = 0.75$ mg/ml)，因此後續實驗選用 1.0-2.0 mg/ml 之 HLE 以及 0.1-0.2 mg/ml 之 HLP。

3.2. 泡沫細胞生成試驗

在試管試驗中，我們已然可以得知 HLE 及 HLP 可有效地預防 LDL 的氧化，避免進一步造成 ox-LDL 的堆積，減少巨噬細胞吞噬後形成泡沫細胞的機會。接著我們再以 J774A.1 巨噬細胞處理先氧化好之 ox-LDL，觀察是

否能夠成功誘導泡沫細胞之生成。由Fig. 6中可以明顯觀察到在細胞內部有呈現大量的由oilred O染劑所染上之中性脂肪堆積的現象，相較於正常組中，卻不見任何的紅色顆粒堆積，可知我們成功地誘導泡沫細胞之形成。然而在ox-LDL刺激下，細胞同時處理不同濃度之HLE或HLP後，光學顯微鏡下觀察到巨噬細胞內所堆積的紅色顆粒之銳減(Fig. 6)。由結果推知，在處理HLE 2.0 mg/ml及HLP 0.1-0.2 mg/ml下，有效降低泡沫細胞生成之作用，實驗進一步將驗證HLE及HLP是否透過抗氧化及調控LDL代謝的方式，以減少泡沫細胞生成。後續研究預期HLE及HLP能夠有效抑制泡沫細胞型成，進而減緩動脈粥狀硬化之發生。

3.3. 細胞脂質含量分析

在ox-LDL誘導下會刺激巨噬細胞過量吞噬ox-LDL，使得細胞內大量堆積原先存在於LDL當中的膽固醇與三酸甘油脂，因而形成充滿脂質的泡沫細胞。在給予不同濃度之HLE或HLP後，觀察細胞內脂質含量之變化。由結果得知，在ox-LDL的誘導之下，細胞內的三酸甘油脂含量增加1.3倍，而在有HLE或HLP的保護下，有效地降低了細胞對三酸甘油脂的過量攝取，在HLE 2.0 mg/ml或HLP 0.2 mg/ml作用下，即回復到與正常組差不多的現象(Fig. 7A)。相同的效果也出現在細胞內的膽固醇變化上，ox-LDL誘導J774A.1細胞內的膽固醇增加至將近正常組的1.2倍，而在HLE或HLP的處理下，同樣也抑制了細胞對於膽固醇的過量攝取(Fig. 7B)。同樣說明HLE及HLP能夠有效地抑制細胞過量攝取脂質，進而降低泡沫細胞形成之機會。

3.4. 泡沫細胞生成之機制探討

3.4.1. 巨噬細胞 uptake oxLDL 之作用

巨噬細胞利用清除者接受器 (scavenger receptors, SRs) 辨識 ox-LDL，並經內飲作用將 ox-LDL 吞噬入細胞內。SRs 是一群家族蛋白，為一種嵌入型的膜蛋白，被發現其與修飾型低密度脂蛋白 (如 ox-LDL、乙醯化低密度脂蛋白 ac-LDL) 有很專一的鍵結能力。這些 SRs 中，巨噬細胞主要利用來辨識 ox-LDL 的 SRs 被證實為 type A SR (SR-A) 或 type B SR (SR-B 或稱為 CD36)。CD36 於細胞內的表達機制已被證實是由核內轉錄因子 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) 所調控，PPAR γ 的配位體 (ligands) 如 BRL (rosiglitazone)、TZD (thiazolidinedione) 及 ox-LDL 均會促使 CD36 的表達。因此，以 Western blotting 分析在 ox-LDL 誘導的情況下，同時伴隨有 HLP 處理的 J774.1 細胞中 CD36、SR-A 及 PPAR γ 蛋白表現之情形。結果發現在 ox-LDL 刺激之下，CD36 和 PPAR γ 的蛋白表現增加；SR-A 的表現不受影響。但在同時處理 HLP (0.05-0.2 mg/ml) 的組別中 CD36 和 PPAR γ 的蛋白表現明顯下降許多，說明 HLP 可能透過調控 PPAR γ 的表現，進而影響 CD36 之表達(Fig. 8A, line 1-3)。

3.4.2. 巨噬細胞內膽固醇的代謝作用

VLDL-IDL-LDL之轉型反應可使內生性脂質由肝臟運送至周圍細胞，而細胞內也有另外一套機制，可將周圍細胞內膽固醇移除至肝臟代謝的運輸機制，稱之為「膽固醇反向運輸 (reverse cholesterol transport)」。「膽固醇反向運輸」須以HDL為媒介，由周圍細胞組織中獲取膽固醇後運輸至肝臟代謝，而將周圍細胞內膽固醇由細胞內運輸至細胞外的蛋白即為ABCA1 (ATP-binding cassette protein)。ABCA1是一個運輸蛋白，其功能為將細胞內的膽固醇運輸至細胞外給HDL後由HDL將膽固醇運至肝臟代謝。而由實驗證實動脈硬化中，增加ABCA1的表達可以促使巨噬細胞轉變為泡沫細胞的情形減緩，此試驗更證實ABCA1可由PPAR γ -LXR的分子機制調控其表達。基於此理論若HLP若可介入調控此機制促使ABCA1表達，則可幫助巨噬細胞進行「膽固醇反向運輸」而減少膽固醇於細胞內堆積而形成泡沫細胞。上述結果透過Western blotting証實：ox-LDL似乎抑制LXR α 和ABCA1蛋白表現；然而HLP可以顯著增加兩者蛋白表現之趨勢。說明HLP也可能藉由LXR α -ABCA1分子機制，以促進膽固醇反向運輸(Fig. 8A, line 4-5)。Western blotting量化之結果顯示於Fig. 8B。另外，在HLE (0.5-2 mg/ml) 抑制泡沫細胞生成分子機制探討的部分也得到類似的結果(data not shown)。

四、洛神葉萃取物 (HLE) 對於高膽固醇飲食誘導兔子動脈硬化之影響

4.1. 血脂質測定

我們利用高膽固醇飲食誘導兔子25週後，誘導組之血清三酸甘油酯較正常組上升約1.79倍，但再額外給予HLE之組別，0.5% HLE組與誘導組相較之下，降低約22.5%；1.0% HLE則降低了35%，且都有統計上的意義。在膽固醇方面，正常組為166.33 \pm 48.64 mg/dL，在經由膽固醇飲食誘導下，誘導組較正常組上升8倍，上升至1342.00 \pm 21.21 mg/dL。而分析給予HLE之組別，在0.5% HLE的給予下，兔子血中膽固醇為983.00 \pm 116.58 mg/dL，當劑量提升為1.0%之HLE後，試驗組之膽固醇則為973.66 \pm 450.72 mg/dL，與誘導組相較之下皆有下降的趨勢。0.5% HLE約有抑制血脂上升30.5%；而1.0% HLE抑制力為31.3%。同樣在LDL-C項目，0.5%和1.0% HLE試驗組有類似的抑制作用。但是在針對HDL-C方面，正常組為17.83 \pm 6.15 mg/dL，在經由膽固醇飲食誘導下，上升至120.60 \pm 18.10 mg/dL。而在給予HLE的組別，0.5% HLE的血中HDL-C為102.03 \pm 8.03 mg/dL，而當劑量提升為1.0%之HLE的血中HDL-C為98.93 \pm 43.73 mg/dL。進一步分析危險因子方面，正常組LDL-C/HDL-C的比值為3.03，誘導組LDL-C/HDL-C的比值為10.07，試驗組LDL-C/HDL-C的比值0.5%及1.0% HLE分別為8.45及8.58，與誘導組相較之下也皆有下降的趨勢。另外，在正常飲食之下給予的1.0% HLE作為毒性組，其所有血脂測定數值皆與正常組相似(Table 2)。

4.2. 動脈硬化斑分析

在高膽固醇所誘導的兔子產生動脈硬化症上，我們選取兔子的胸動脈進行動脈硬化斑分析。發現在主動脈內層的表面，正常組及毒性組的動物並沒有發現 atherosclerosis lesion 的產生。而在膽固醇的誘導組則發現有明顯的脂肪斑沉積。以定量分析占據胸動脈內層表面積約 77%。而在飼料中給予 HLE 0.5% 和 1.0% 後，胸動脈內層的脂肪斑則降為 48% 和 22.5%，皆有顯著的抑制病程發展之作用(Fig. 9A)。由此可知，HLE 確實可以減少動脈硬化斑沉積，並可有效的延緩動脈粥狀硬化的發展。

4.3. 病理切片觀察

接著我們選取試驗動物的主動脈弓部分進行病理切片分析，觀察泡沫細胞的分佈、病兆上平滑肌細胞及組織微觀之變化。在病理分析下，正常組的血管壁中，並沒有發現有泡沫細胞的形成，也沒有發現血管平滑肌細胞的位移。在誘導組方面，我們發現其病理切片上有明顯的泡沫細胞堆積，且動脈內層的厚度也有變厚並發現有血管平滑肌細胞位移的現象；而給予 HLE 之組別，其主動脈內層之厚度明顯低於誘導組，1.0% 高劑量之 HLE 組別回復到與正常組相當(Fig. 9B)。

五、第一年總結

第一年首先以銅離子誘導 LDL 氧化的模式進行體外抗氧化試驗結果證實：HLE 及 HPE 具有抑制 LDL 氧化的能力，此外也具有清除 DPPH 自由基的作用。而在細胞實驗方面，HLE 及 HLP 可引發由 ox-LDL 誘導巨噬 J774A.1 細胞轉型的泡沫細胞形成以及有效地減低細胞內三酸甘油酯和膽固醇的含量，並澄清其作用機轉。進一步利用高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈粥狀硬化病變之動物模式，體內試驗結果顯示動物血清中總膽固醇、三酸甘油酯及 LDL-C 會因同時餵食 HLE 而降低，其動脈粥狀硬化的損傷面積也比誘導組兔子減少許多。由以上實驗結果顯示，HLE 及 HLP 具有極佳的抗氧化活性並能抑制 LDL 氧化作用，此外也參與調控巨噬細胞因 LDL 的氧化而產生促進動脈粥狀硬化生成的反應(Fig. 10)。

第二年：洛神葉萃取物成份 (HLE及HLP) 抑制細胞平滑肌細胞生長週期及移動作用。

一、血管平滑肌細胞異常遷移及過度增生之模式建立

目前已知的證據顯示，VSMC 異常遷移和增生參與在許多心血管相關疾病的形成過程中。在病程的發展中期，巨噬細胞會與血管內膜中的 T cell 交互作用釋放大量的細胞激素(Th1、Th2 cytokines)而促使一連串的免疫反應的發生，同時周圍的 VSMC 及內皮細胞同樣也會表達生成 IL-1、TNF 等因子，而這些分子的生成會刺激 VSMC 的增生，並轉移至 intima 或 subendothelial 當中。由此可知，TNF α 具有促進 VSMC 往血管內層的移動和增生之作用。本研究利用 MTT 及 MMP 活性測試 TNF α 有效反應劑量，篩選出 10 ng/mL TNF α 能誘導 A7r5 細胞(VSMC)增生(Fig. 11A)及在無毒劑量之下增加 MMP-9 之活性(Fig. 11B)，後續以此細胞模式模擬 VSMC 異常遷移及過度增生作用。

二、洛神葉萃取物成份 (HLE/HLP) 抑制血管平滑肌細胞之遷移作用

2.1. HLE/HLP 對 TNF α 誘導 A7r5 細胞毒性之影響

經 MTT 分析 HLE/HLP 對 TNF α 誘導 A7r5 細胞之毒性測試(Fig. 11CD)。篩選出 HLE/HLP 對於 TNF α 誘導 A7r5 細胞生長之無顯著影響的濃度與時間，以排除 HLE/HLP 影響細胞生長之因素。往後以 10 ng/mL TNF α 預先處理 A7r5 細胞實驗模式，之後再加入 HLE/HLP 在不同劑量 (HLE: 0.1、0.5、1.0 和 2.0 mg/mL; HLP: 0.01、0.05、0.1 和 0.2 mg/mL) 下，分別培養在 24 小時以後，進行細胞移動相關試驗之分析。

2.2. HLE/HLP 對 TNF α 誘導 A7r5 細胞 MMP-9 表現之影響

動脈粥狀硬化發展過程中，VSMC 會開始分泌 MMPs，改變細胞外基質的構成以適應其遷移性，所以在 TNF α 誘導 A7r5 細胞模式中可偵測到 MMP-9 之活性增加，而且隨著處理 TNF α 劑量增加越趨於明顯；然而對於 MMP-2 的影響並不顯著(Fig. 11B)。Fig. 12A 同樣利用 gelatin-zymography 分析發現：TNF α 對於 A7r5 細胞所分泌的 MMP-9 確實有顯著的促進作用，在濃度 0.1-2.0 mg/mL 處理 HLE 培養 24 小時可以抑制 TNF α 可誘導 MMP-9 的活性表現約 50%(Fig. 12A)。而當 A7r5 細胞暴露在 0.01-0.2 mg/mL HLP 反應 24 小時，則對於 TNF α 誘導 MMP-9 活性之表現也有抑制的效果(Fig. 12B)。

為確認 HLE 及 HLP 對於 MMP-9 之影響，分析 MMP-9 基因和蛋白層次是否會受到 HLE 或 HLP 的作用。Fig. 13A and B 顯示 real-time PCR 之結果，當細胞處理 TNF α 之後可顯著的增加 MMP-9 和 MMP-2 mRNA 的表現；另外，處理 HLE 1.0-2.0 mg/mL 或 HLP 0.1-0.01 mg/mL 皆可明顯抑制 TNF α 所誘導之 MMP-9 mRNA 表現量；而 MMP-2 mRNA 則只受到 HLP 的抑制調控(Fig. 13B)，在 HLE 處理的細胞中則未見影響(Fig. 13A)。類似的結果也被證實在 MMP-9 和 MMP-2 之蛋白表現上，西方點墨法偵測到 TNF α 可以增加 MMP-9 蛋白表現至 5 倍，而較高劑量 HLE 或 HLP 具有抑制作用(Fig. 13C and D)，和 mRNA 之表現調控一致。初步證實：HLE 及 HLP 除了影響 MMP-9 活性之外，也影響了 MMP-9 在基因以及蛋白層次的調控。

2.3. HLE/HLP 對 TNF α 誘導 A7r5 細胞 MMP-9 訊息路徑之影響

在一些細胞中，轉錄因子 NF- κ B 和 AP-1 會調控 MMP-9 基因的轉錄活化，進而影響到 MMP-9 的表現(16, 17)。首先，利用西方點墨法分析細胞核內 NF- κ B 和 AP-1 (c-Jun 及 c-Fos) 蛋白表現。A7r5 細胞隨著處理 HLE 或 HLP 濃度增加，細胞核內原受到 TNF α 所誘導之 c-Jun 及 c-Fos 表現量隨之減少(Fig. 14A and B)。接著，利用 EMSA 分析在細胞核中 AP-1 與 DNA 結合能力。結果發現，TNF α 成功誘導 AP-1 和 DNA 的結合表現增加，當細胞受到 1.0 和 2.0 mg/mL HLE 或 0.01、0.05 和 0.1 mg/mL HLP 處理 24 小時之下，AP-1 與 DNA 結合能力有下降趨勢(Fig. 14C and D)；NF- κ B 與 DNA 結合能力不論在 TNF α 誘導組或同時處理萃取物的組別中皆不受到影響(data not shown)。因此，推論 HLE 及 HLP 兩者抑制 TNF α 誘導 MMP-9 的產生可能是經由阻斷 AP-1 路徑，進而影響細胞移動力。

2.4. HLE/HLP 對 TNF α 誘導 A7r5 細胞移動能力之影響

為進一步分析 HLE 及 HLP 對 TNF α 誘導 A7r5 細胞移動能力之影響，利用傷口癒合(wound-healing assay) 結果發現：在 time-course (0、24 和 48 小時) 的觀察下，與正常生長 control 組相比，A7r5 細胞在 TNF α 培養條件之下約莫 48 小時能完全癒合傷口，當細胞在濃度 0.1、0.5、1.0 和 2.0 mg/mL 之 HLE (Fig. 15A) 或 0.01、0.05 和 0.1 mg/mL 之 HLP (data not shown) 處理 24 小時之下可抑制傷口癒合表現，作用時間至 48 小時之抑制最為明顯，抑制作用呈現時間及濃度依賴性。

Fig. 15B 再利用 Boyden chamber assay 驗證 HLE 及 HLP (data not shown) 確實會影響 TNF α 誘導細胞之移動能力。其結果顯示：同樣 A7r5 細胞暴露在上述濃度之 HLE 或 HLP 在 24 小時後，與 control 組對照可發現，細胞在 1.0-2.0 mg/mL HLE 或 0.05-0.1 mg/mL HLP 處理下可發現細胞穿透 Boyden chamber 的薄膜有明顯抑制 TNF α 作用之表現，並呈現濃度依賴性。這樣的結果也在 Boyden chamber 以 matrigel-coated transwell 之細胞侵襲性試驗中得到證實(data not shown)。綜合上述實驗，HLE 及 HLP 對於 TNF α 誘導 A7r5 細胞移動及侵襲能力具有顯著的抑制效果。

三、洛神葉萃取物成份 (HLE/HLP) 抑制血管平滑肌細胞之增生作用

3.1. HLP 對 TNF α 誘導 A7r5 細胞增生之影響

利用 trypan blue 計數細胞之方法，同樣先確認 TNF α 具有促進 A7r5 細胞增生之作用後，參考 Fig. 12A and B 中 MTT 分析結果，再以不同濃度 HLP (0.1、0.2、0.5 和 1.0 mg/mL) 處理細胞，分別於 0、24、48 和 72 小時後觀察細胞生長情形。當細胞處理 0.2 mg/ml HLP 培養 48 小時開始出現生長受到抑制的現象，延長時間至 72 小時則細胞產生死亡而造成生長曲線下降(Fig. 16A)，HLE (1.0、2.0、3.0 和 5.0 mg/mL) 則也有類似 HLP

抑制細胞生長的效果(data not shown)。往後以 10 ng/mL TNF α 預先處理 A7r5 細胞實驗模式，之後再加入 HLP 在不同劑量(0.2 和 0.5 mg/mL)下，分別培養在 24-48 小時以後，進行細胞增生相關試驗之分析。以 BrdU incorporation assay 再確認 HLP 對 TNF α 誘導 A7r5 細胞增生之影響也得到類似的結果(Fig. 16B)。

3.2. HLP 對 TNF α 誘導 A7r5 細胞週期之影響

Fig. 17 則顯示流式細胞儀分析的結果，TNF α 誘導細胞週期在 24 小時 S 期開始有增多的趨勢增加。在同時處理 0.2 和 0.5 mg/mL HLP 則會減少 S 期以及增加 G0/G1 期的表現；0.5 mg/mL HLP 到 48 小時則細胞出現凋謝死亡的反應。因此，初步推論 HLP 具有抑制 TNF α 誘導 A7r5 細胞增生之作用，並引起細胞週期 G0/G1 期停滯，造成反應 48 小時之細胞走向凋亡。

3.3. HLP 對 TNF α 誘導 A7r5 細胞生長週期蛋白表現之影響

為探討 HLP 何以造成 TNF α 誘導 A7r5 細胞生長週期停滯之機制，利用西方點墨法觀察細胞週期相關蛋白之影響。A7r5 細胞處理 TNF α 後，在有無添加 HLP (0.2 mg/ml)的情況下，分別在 24 和 48 小時時間點收 cell lysat，利用西方點墨法分析：CKI 家族 (phospho-p53、p53、p21、p16、p27) 之蛋白表現。這些蛋白 phospho-p53、p21 和 p27 在 TNF α 誘導 24 小時組別表現皆不顯明；在 HLP 組則呈現增加的表現(Fig. 18A)；此外，許多蛋白複合體參與在細胞週期的調控當中，接著利用免疫沉澱法觀察 HLP 對細胞生長週期 G0/G1 期中主要調控蛋白複合體之影響。Fig. 18B 結果顯示：cdk2/cyclinE complex (line 1) 在 TNF α 刺激下大幅增加，而在 0.2 mg/ml HLP 有抑制作用。另外 Rb 與 E2F 之 association 則在 0.2 mg/ml HLP 反應 48 小時表現增加(Fig. 18B, line 3)。初步結果顯示 HLP 可能藉由誘導 CKI 家族蛋白，減少增加 cdk2 和 cyclinE 結合表現，進一步促進 Rb 與 E2F 之 association，使轉錄因子 E2F 表現受到抑制，最終導致細胞週期 G0/G1 期停滯。

四、洛神葉萃取物 (HLE) 對於高膽固醇飲食誘導兔子動脈硬化之促增生及遷移蛋白表現之影響

第一年研究計劃中我們利用高膽固醇飲食誘導兔子 25 週後，誘導兔子產生動脈硬化症。接著我們選取試驗動物的主動脈弓部分進行免疫組織染色分析，偵測組織當中特異性蛋白的表現(如：anti-PCNA, proliferation marker；anti-SM α -actin, SMC marker)。在免疫染色技術中顯示：在正常組的血管壁中並沒有發現有特異性蛋白的表現。在誘導組方面，我們發現其有明顯的 anti-PCNA (Fig. 19A) 及 anti-SM α -actin (Fig. 19B) 特異性染色呈現，且動脈內層的厚度也有變厚，以此可推論有血管平滑肌細胞增生及位移的現象；萃取物組別則具有抑制現象，此結果可做為第二年細胞實驗之對照。

五、第二年總結

第二年之研究在評估 HLE 及 HLP 調控 VSMC 異常增生與遷移之作用。首先利用發炎因子 TNF α 誘導 VSMC 遷移及增生模式，發現 HLE 及 HLP 能有效抑制 TNF α 促進 VSMC 細胞(A7r5)生長、以及 MMP-9 活性、基因和蛋白表現。為分析其中參與之作用機轉，利用無毒性之劑量觀察 HLE 及 HLP 對於 TNF α 誘導 A7r5 細胞移動能力的影響。傷口癒合及 Boyden chamber 分析的結果都發現明顯抑制的現象。進一步用西方點墨法和 EMSA 等試驗證實兩者透過降低 AP-1 轉錄活性進而降低 MMP-9 的表現，進而抑制 TNF α 誘導 A7r5 細胞移動。另外，A7r5 細胞預先處理 TNF α 在不同時間點(24 和 48 小時)之下，以處理 HLP 當作變因，藉由流式細胞儀測定顯示：TNF α 誘導模式中，HLP 可促使 A7r5 細胞週期停滯在 G0/G1 期。以西方點墨法和免疫沉澱分析其對 TNF α 調控細胞週期蛋白的影響，結果發現 HLP 會增加 p53 蛋白和磷酸化表現以及活化 p21 和 p27；並且 HLP 減少 cdk2/cyclinE 結合以及增加 Rb/E2F 之結合表現，進而導致 E2F 和 phospho-Rb 的表現受到抑制(data not shown)，最後促使細胞週期停滯(Fig. 20)。最後延續第一年高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈粥狀硬化病變之動物模式，選取試驗動物的主動脈弓部分進行免疫組織染色分析(anti-PCNA, anti-SM α -actin)觀察 VSMC 之異常增生與遷移現象，驗證在細胞實驗得到的結果。

第三年：洛神葉萃取物成份 (HLE 及 HLP) 保護血管內皮細胞損傷作用。

一、洛神葉萃取物成份 (HLE/HLP) 保護血管內皮細胞免於 ox-LDL 誘導細胞毒性之影響

首先，利用 MTT 分析 HLE/HLP 對於 ox-LDL 抑制 HUVEC 細胞之存活測試(Fig. 21A)，並觀察 50 μ g/mL ox-LDL 反應 24 小時是否能夠造成 HUVEC 細胞損傷或死亡。根據 Fig. 21A 之結果篩選出 HLE/HLP 對於 ox-LDL 誘導 HUVEC 細胞損傷之具有保護效果的濃度，進一步以 LDH assay 進行細胞毒性測試作為確認(Fig. 21B)。往後以 50 μ g/mL ox-LDL 預先處理 HUVEC 細胞實驗模式，之後再加入 HLE/HLP 在不同劑量 (HLE: 50 和 100 μ g/mL; HLP: 5 和 10 μ g/mL) 之下，分別培養在 24 小時以後，進行細胞存活相關試驗之分析。為釐清 HLE/HLP 保護 HUVEC 細胞免於受到 ox-LDL 損傷之機制，推測 ox-LDL 可能是透過抑制細胞增生或促進細胞死亡兩大作用對 HUVEC 細胞造成損傷。透過 BrdU assay 結果顯示：50 μ g/mL ox-LDL 確實具有抑制 HUVEC 細胞增生作用，其約有 30% 抑制力。處理 HLP 能夠較顯著回復 ox-LDL 抑制細胞增生的效果，且呈現濃度依賴性；而 100 μ g/mL HLE 組別與 ox-LDL 誘導組相比則才有部分促進細胞增生的情形。

二、洛神葉萃取物成份 (HLE/HLP) 保護血管內皮細胞免於 ox-LDL 誘導細胞死亡之影響

2.1. HLE/HLP 對於 ox-LDL 誘導 HUVEC 細胞凋亡之影響

另一方面，探討 ox-LDL 是否能促進 HUVEC 細胞死亡及 HLE/HLP 之保護機制。在 Fig. 22A 顯示 DAPI stain 之結果，ox-LDL 能夠顯著誘導細胞凋亡的表現，在同時加入 HLE 或 HLP 則產生抑制作用，HLP 之抑制效果更為明顯(Fig. 22B)。進一步，利用 Flow cytometry 確認其結果。ox-LDL 單獨處理下，處於 sub G1 期以及 G0/G1 期的細胞增多，代表細胞呈現凋亡及生長停滯之情形；HLE/HLP 皆能夠抑制細胞凋亡，HLP 組別亦呈現 S 期細胞數量回復與 control 相當(Fig. 23A)。在細胞凋亡關鍵蛋白 caspase-3 與 G0/G1 期進入 S 期重要轉錄因子 E2F 及其調控蛋白 p-Rb 的 Western blotting 分析中，證實上述的論點(Fig. 23B)。

2.2. HLE/HLP 對於 ox-LDL 誘導 HUVEC 細胞自噬之影響

Fig. 24A 利用 AVO stain 分析及量化細胞自噬作用，結果觀察到處理 ox-LDL 反應 24 小時後有部分染上 acridine orange 的細胞，同時處理 HLE 之組別細胞呈現此 AVO-positive 表現有隨著濃度的提高而增加，HLP 也有類似的趨勢(Fig. 24B)。並利用西方點墨法分析細胞自噬相關蛋白：LC3、Beclin-1、PI3K classIII (Fig. 25A) 以及另一條抑制細胞自噬路徑 (PI3K classI/Akt/mTOR) (Fig. 25B)。實驗結果顯示：在 ox-LDL 有部分自噬蛋白表現增加，包含 LC3-I/LC3-II、Beclin-1 和 PI3K classIII；然而細胞自噬抑制路徑也有活化之情形，特別在

mTOR 及 p-Akt 的表現明顯提高。而 HLE 或 HLP 處理下，形成 autophagosome 時必要的蛋白 LC3-II 表現確實明顯地上升，其他 PI3K classIII 和 Beclin-1 蛋白一致性增加(Fig. 25A)；PI3K classI 路徑蛋白則呈現下降的趨勢(Fig. 25B)。這些結果顯示 HLE 及 HLP 確實具有保護 HUVEC 細胞免於 ox-LDL 誘導細胞凋亡，可能藉由誘導細胞自噬作用，後續這個部分詳細的分子機轉仍需進一步被釐清。

三、洛神葉萃取物 (HLE) 對於高膽固醇飲食誘導兔子動脈硬化之內皮細胞表現之影響

前兩年研究計劃中我們利用高膽固醇飲食誘導兔子25週後，誘導兔子產生動脈硬化症。接著我們選取試驗動物的主動脈弓部分進行免疫組織染色分析，偵測組織當中血管內皮細胞特異性蛋白 CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)的表現。在免疫染色技術中顯示：在正常組的血管壁中並沒有發現有此特異性蛋白的表現。在誘導組方面，我們發現其有明顯的 anti-CD31 特異性染色呈現(Fig. 26)，且動脈內層的厚度也有變厚，以此可推論有血管內皮細胞損傷的現象；萃取物組別則具有抑制作用，此結果可做為第三年細胞實驗之對照。

四、第三年總結

HLE 及 HLP 對於 HUVEC 具有保護作用，HLE 及 HLP 皆可抵抗 ox-LDL 促進 HUVEC 生長週期停滯和細胞凋亡之效用，且具有濃度依賴性。然而，兩者誘導 HUVEC 自噬現象之強度及分子機制不盡相同。主要的保護機制是透過活化 PI3K classIII/Beclin-1/LC-3 以及抑制 PI3K classIII/p-Akt/mTOR 路徑，共同誘發細胞自噬以保護細胞免於凋亡損傷；另 HLP 調控在細胞週期的部分，具有回復細胞生長的作用，是否與 DNA 修復(DNA repair)或調控其它生長途徑仍有待進一步探討。最後，延續前兩年高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈粥狀硬化病變之動物模式，選取試驗動物的主動脈弓部分進行免疫組織染色分析(anti-CD31)觀察 HUVEC 之損傷現象，驗證在細胞實驗得到的結果。

五、總結論

第一年：(1) 完成洛神葉水草及多酚萃取物成份分析；(2) 證實洛神葉萃取物成份具有抗氧化與抑制 LDL 氧化能力；(3) 證實洛神葉萃取物成份抑制泡沫細胞生成及釐清其中相關之分子機轉；(4) 完成高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈粥狀硬化病變之動物模式；(5) 以動物試驗確認洛神葉萃取物成份具降低血脂及減少動脈粥狀化變灶之效用。

第二年：(1) 建立發炎因子誘發血管平滑肌細胞過度增生及遷移之細胞模式；(2) 證實洛神葉萃取物成份抑制血管平滑肌細胞過度增生及釐清相關分子機轉；(3) 證實洛神葉萃取物成份抑制血管平滑肌細胞遷移作用及釐清相關分子機轉；(4) 以動物試驗分析血管平滑肌層驗證上述在細胞實驗得到的結果。

第三年：(1) 確認 ox-LDL 促進血管內皮細胞損傷、生長週期停滯和細胞凋亡之作用；(2) 證實洛神葉萃取物成份具保護血管內皮細胞之作用及釐清其相關分子機轉；(3) 證實洛神葉萃取物成份誘導血管內皮細胞內之自噬作用及調控機制；(4) 以動物試驗分析血管內皮層驗證上述在細胞實驗得到的結果。

總結，本研究可以說明洛神葉水草萃取物 HLE 及其功能性成份 HLP 發揮預防或減緩動脈粥狀硬化之作用(Fig. 27)。由於洛神葉在國內容易栽培，但過去一直被視為無經濟價值的植物部位；而 HLE 和 HLP 也容易分離，因此，本研究成果除了可應用於發展新的保健食品，也能推廣洛神植株之葉子為可食用之資源。

§ 參考文獻

1. Steinberg, D. and Witztum, J. L. Lipoproteins and atherogenesis. *Current concepts*. *Jama*, 264: 3047-3052, 1990.
2. Navab, M., Berliner, J. A., Watson, A. D., Hama, S. Y., Territo, M. C., Lusis, A. J., Shih, D. M., Van Lenten, B. J., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., and Fogelman, A. M. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16: 831-842, 1996.
3. Glass, C. K. and Witztum, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 104: 503-516, 2001.
4. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115-126, 1999.
5. Heinecke, J. W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis*, 141: 1-15, 1998.
6. Harats, D., Shaish, A., George, J., Mulkins, M., Kurihara, H., Levkovitz, H., and Sigal, E. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 2100-2105, 2000.
7. Hsieh, C. C., Yen, M. H., Yen, C. H., and Lau, Y. T. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 49: 135-145, 2001.
8. Cybulsky, M. I. and Gimbrone, M. A., Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 251: 788-791, 1991.
9. Dong, Z. M., Chapman, S. M., Brown, A. A., Frenette, P. S., Hynes, R. O., and Wagner, D. D. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 102: 145-152, 1998.
10. Qiao, J. H., Tripathi, J., Mishra, N. K., Cai, Y., Tripathi, S., Wang, X. P., Imes, S., Fishbein, M. C., Clinton, S. K., Libby, P., Lusis, A. J., and Rajavashisth, T. B. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol*, 150: 1687-1699, 1997.
11. Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T., and Kodama, T. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 54: 628-640, 1998.
12. Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Kodama, T., and et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386: 292-296, 1997.
13. Colles, S. M., Irwin, K. C., and Chisolm, G. M. Roles of multiple oxidized LDL lipids in cellular injury: dominance of 7 beta-hydroperoxycholesterol. *J Lipid Res*, 37: 2018-2028, 1996.

14. Hansson GK. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 8, 301-11, 1997.
15. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* 69, 377-81, 1993.
16. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 94, 2493-503, 1994.
17. Sachdewa A, Nigam R, Khemani LD. Hypoglycemic effect of Hibiscus rosa sinensis L. leaf extract in glucose and streptozotocin induced hyperglycemic rats. *Indian J Exp Biol.* 39, 284-6, 2001.
18. Sachdewa A, Raina D, Srivastava AK, Khemani LD. Effect of Aegle marmelos and Hibiscus rosa sinensis leaf extract on glucose tolerance in glucose induced hyperglycemic rats (Charles foster). *J Environ Biol.* 22, 53-7, 2001.
19. Lin HH, Chan KC, Sheu JY, Hsuan SW, Wang CJ*, Chen JH. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Food Chem.* 132, 880-891, 2012.
20. Ali BH, Al Wabel N, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: a review. *Phytother Res.* 19, 369-75, 2005.
21. Rankin SM, De Whalley CV, Hoult RS, Jessup W, Wilkins GM, Collard T, Leake DS. The modification of low density lipoprotein by the flavonoids muricetin and gossypetin. *Biochem Pharmacol.* 45, 67-75, 1993.
22. De Whalley CV, Rankin SM, Hoult JR, Jessup W, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol.* 39, 1743-50, 1990.
23. Chen CC, Hsu JD, Wang SF, Chiang HC, Yang MY, Kao ES, Ho YC, Wang CJ. Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Agric Food Chem.* 51, 5472-7, 2003.
24. Lin HH, Chen JH, Wang CJ. Chemopreventive properties and molecular mechanisms of the bioactive compounds in Hibiscus sabdariffa Linne. *Curr Med Chem.* 18, 1245-54, 2011.
25. Lo CW, Huang HP, Lin HM, Chien CT, Wang CJ. Effect of Hibiscus anthocyanins-rich extract induces apoptosis of proliferating smooth muscle cell via activation of P38 MAPK and p53 pathway. *Mol Nutr Food Res.* 51, 1452-60, 2007.
26. Hofmann CS, Sonenshein GE. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate induces apoptosis of proliferating vascular smooth muscle cells via activation of p53. *Faseb J.* 17,702-4, 2003.
27. Nie L, Wise ML, Peterson DM, Meydani M. Avenanthramide, a polyphenol from oats, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and enhances nitric oxide production. *Atherosclerosis* 186, 260-6, 2006.
28. Ward MR, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Jennings G, Bobik A. Inhibition of protein tyrosine kinases attenuates increases in expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors following arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17, 2461-70, 1997.
29. Shimokado K, Yokota T, Umezawa K, Sasaguri T, Ogata J. Protein tyrosine kinase inhibitors inhibit chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 14, 973-81, 1994.
30. Kelloff G.J, Sigman CC, Greenwald P. Cancer prevention: progress and promise. *Eur J Cancer* 35, 2031-8, 1999.

§ 附表及附圖

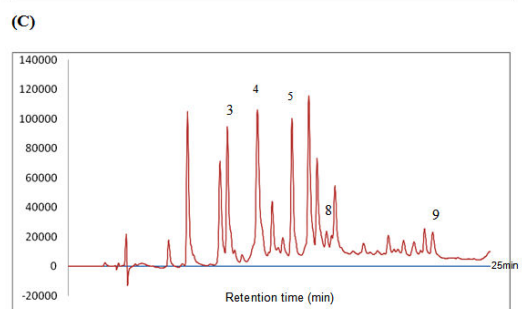
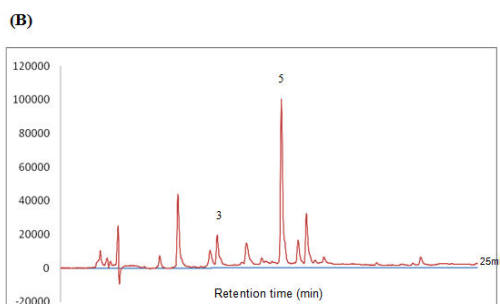
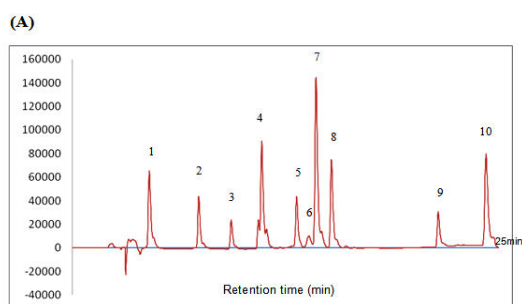


Table 1 – Composition of the HLE and HLP

Polyphenolic compound	Peak no.	HLE (%)	HLP (%)
Catechin	3	4.25 ± 1.43	7.40 ± 2.55
ECG	4		16.53 ± 5.58
Ellagic acid	5	28.20 ± 8.63	10.30 ± 3.40
Ferulic acid	8		0.70 ± 0.29
Quercetin	9		0.83 ± 0.38
Total (HPLC)		32.45	35.76
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)		5.22 ± 0.06	35.36 ± 1.09
Total flavonoid (Jia method)		20.98 ± 1.65	65.16 ± 9.37
Total anthocyanin (Fuleki and Francis method)		1.93 ± 1.24	1.33 ± 1.13

Fig. 1. (A) HPLC chromatogram of 10 kinds of standard polyphenols (10 mg/mL; 10 µl). Peaks: 1, GA; 2, PCA; 3, catechin; 4, ECG; 5, ellagic acid; 6, rutin; 7, *p*-coumaric acid; 8, ferulic acid; 9, quercetin; and 10, naringenin. (B) HPLC chromatograms of free polyphenols from HLE (5 mg/mL; 10 µl). Phenolic compounds correspond to peaks 3 and 5 as in (A). (C) HPLC chromatograms of free polyphenols from HLP (5 mg/mL; 10 µl). Phenolic compounds correspond to peaks 3, 4, 5, 8 and 9 as in (A). Detector was set at 285 and 345 nm.

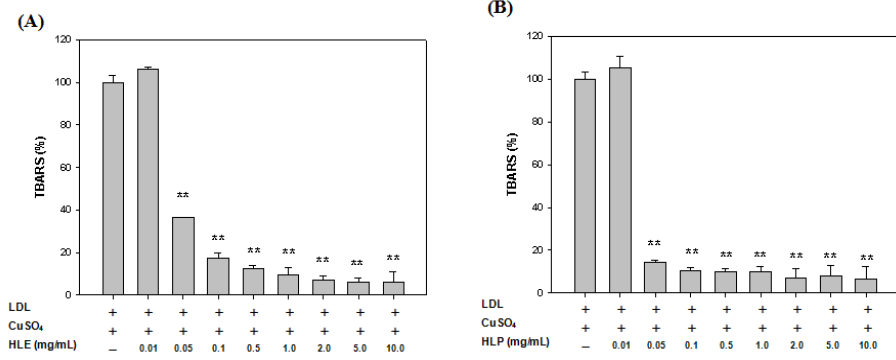


Fig. 2. Inhibitory effects of HLE (A) and HLP (B) on the Cu²⁺-induced the lipid peroxidation of LDL. LDL (100 μg/mL) was incubated with 10 μM CuSO₄ at 37°C for 24 h in the presence or absence of different concentrations of HLE or HLP (0.01-10.0 mg/mL). The quantitative data were presented as means ± SD of three independent experiments. *p < 0.05; **p < 0.01, compared with ox-LDL-treated group.

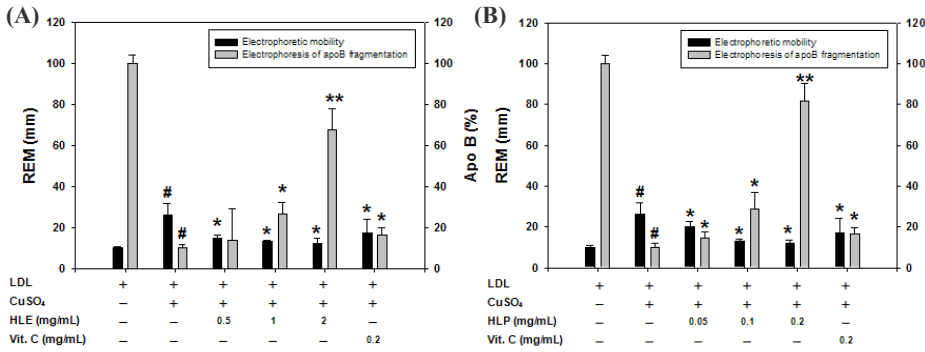


Fig. 3. Effects of HLE (A) and HLP (B) on the Cu²⁺-induced lipid peroxidation and oxidation of LDL. LDL was incubated with 10 μM CuSO₄ at 37°C for 24 h in the presence or absence of different concentrations of HLE or HLP. After the incubation, electrophoretic mobility (*left panel*), and apoB fragmentation (*right panel*) of the LDL were measured. The change in REM (mm) was determined to evaluate the extent of LDL oxidation by agarose gel electrophoresis. The formation of ox-LDL was further confirmed by the apoB fragmentation. Vitamin C (Vit. C, 0.2 mg/mL)-treated group was used as a suitable positive control. The quantitative data are presented as means ± SD of three repeats from one independent study. #p < 0.01 compared with the LDL-treated group. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the ox-LDL-treated group.

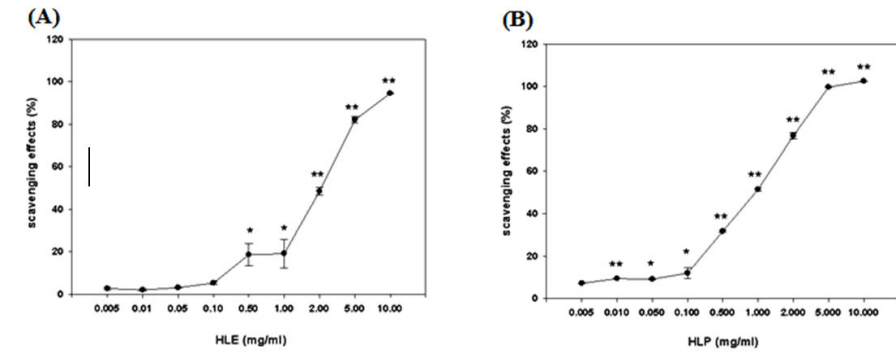


Fig. 4. Effects of HLE (A) and HLP (B) on DPPH scavenging effect (%). DPPH (1 mM) was incubated in the presence or absence of different concentrations of HLE or HLP. The data were means ± SD from three repeats from independent experiment for each group. *p < 0.05; **p < 0.01, compared with untreated group.

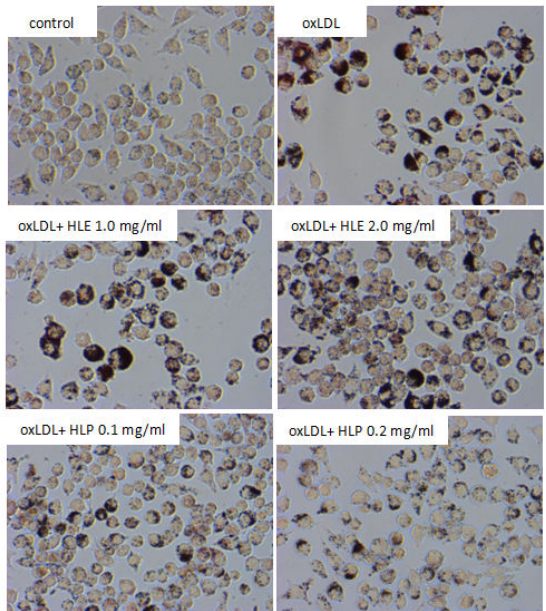


Fig. 6. Inhibitory effects of HLE and HLP on the ox-LDL-induced foam cell formation. J774A.1 cells were cultured in DMEM medium with HLE or HLP and then combined with 50 μg/mL of ox-LDL at 37°C, 5% CO₂ for 24 h. These cells were stained with Oil Red O and then observed under the microscope (200X). The red droplets accumulated in the cells were indicated as the stained lipid.

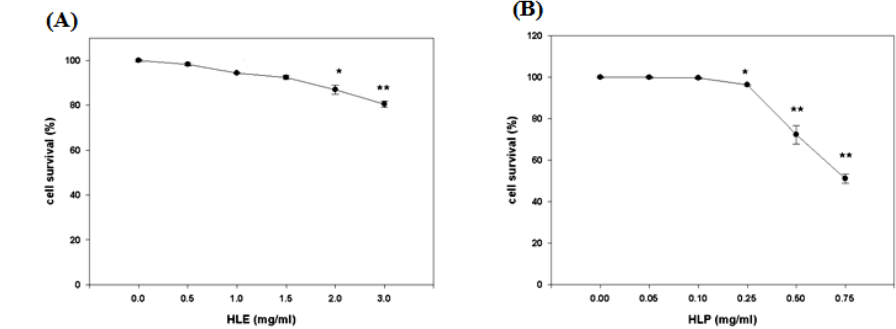
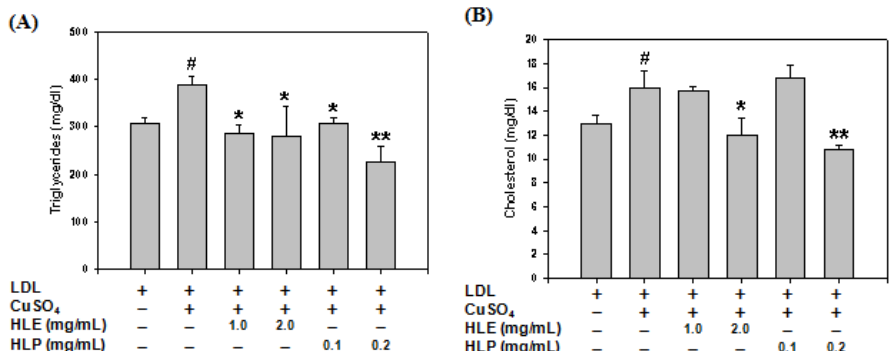


Fig. 5. Effects of HLE (A) and HLP (B) on macrophage cytotoxicity. J774A.1 cell was incubated with different concentrations of HLE or HLP at 37°C for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay. The quantitative data were presented as means ± SD of three independent experiments. *p < 0.05; **p < 0.01, compared with the untreated group.



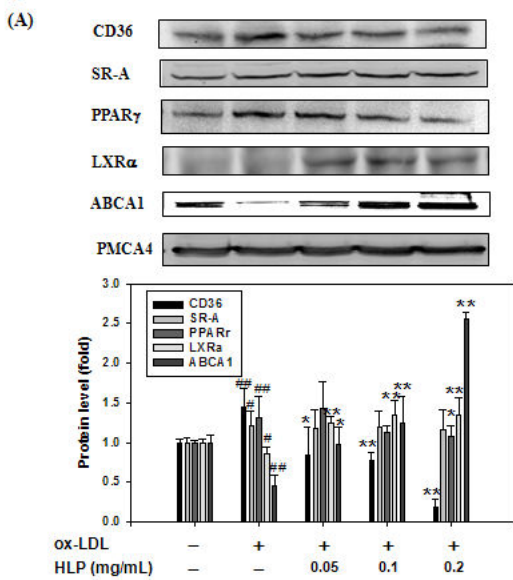


Fig. 7. Inhibitory effects of HLE and HLP on the ox-LDL-induced intracellular lipid accumulation. J774A.1 cells were cultured in DMEM medium with HLE or HLP and then combined with 50 μ g/mL of ox-LDL at 37°C, 5% CO₂ for 24 h. Total intracellular triglyceride (A) and cholesterol (B) were analyzed using enzymatic colorimetric method and expressed as mg/dL. The quantitative data were presented as means \pm SD of three independent experiments. #p < 0.01, compared with LDL-treated group. *p < 0.05; ** p < 0.01, compared with ox-LDL-treated group.

Fig. 8. Effect of HLP on the expressions of macrophage scavenger receptors and LXR α /ABCA1 pathway in ox-LDL-treated J774A.1 cells. (A) Total cell lysates (50 μ g) of J774A.1 cells treated with 50 μ g/mL of ox-LDL in the presence or absence of different concentrations of HLP (0.05, 0.1 and 0.2 mg/mL) for 24 h were analyzed by SDS-PAGE and, subsequently, immunoblotted with antibodies against CD36, SR-A, PPAR γ , LXR α , ABCA1, and PMCA4 that served as an internal control of membrane. (B) The quantitative data are presented as means \pm SD of three repeats from one independent study. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the LDL-treated group. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the ox-LDL-treated group.

Table 2. Effects of oat on the serum biochemical parameters of rabbits induced by a High Cholesterol - Diet*

	Control	HCD	HCD + HLE 0.5%	HCD + HLE 1.0%	Toxicity
GOT (U/L)	11.66 \pm 2.08	86.00 \pm 50.91	31.33 \pm 14.57	14.00 \pm 4.35	44.66 \pm 33.65
GPT (U/L)	31.33 \pm 12.05	102.50 \pm 38.89	84.66 \pm 32.53	42.00 \pm 7.00	79.33 \pm 38.78
LDL-C (mg/dL)	37.33 \pm 50.81	1198.00 \pm 38.59	863.00 \pm 110.01	857.66 \pm 402.38	62.00 \pm 81.43
HDL-C (mg/dL)	17.83 \pm 6.15	120.60 \pm 18.10	102.03 \pm 8.03	98.93 \pm 43.73	21.30 \pm 2.38
LDL-C/HDL-C	3.03 \pm 4.59	10.07 \pm 1.84	8.45 \pm 0.74	8.58 \pm 2.152	2.87 \pm 3.71
Cholesterol (mg/dL)	166.33 \pm 48.64	1342.00 \pm 21.21	983.00 \pm 116.58	973.66 \pm 450.72	93.00 \pm 84.87
Triglycerides (mg/dL)	65.33 \pm 5.13	117.00 \pm 2.82	90.66 \pm 15.14	76.00 \pm 54.61	48.33 \pm 15.37
Free fatty acid (mmol/L)	54.16 \pm 46.43	82.24 \pm 0.42	81.46 \pm 0.13	54.20 \pm 46.56	27.39 \pm 46.68
Glucose (mg/dL)	130.66 \pm 41.93	140.00 \pm 15.55	137.66 \pm 21.12	122.33 \pm 9.07	177.66 \pm 24.00
BUN (mg/dL)	14.10 \pm 1.75	15.55 \pm 0.07	17.33 \pm 5.34	19.60 \pm 2.16	20.60 \pm 1.58
CRE (mg/dL)	1.70 \pm 0.20	1.75 \pm 0.07	1.70 \pm 0.34	2.00 \pm 0.10	1.93 \pm 0.05

* Each value is expressed as the mean \pm SD (n = 6/group). Results were statistically analyzed with Student's t-test.

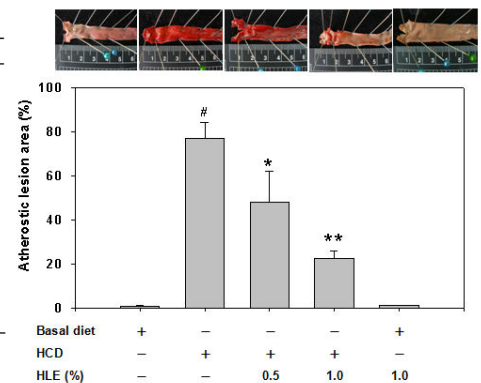


Fig. 9. (A) Extent of the development of atherosclerosis lesions and densitometric analysis of the relative area of atherosclerotic lesion in the thoracic aorta after feeding with the experimental diet in the presence or absence of different concentrations of HLE (0.5 and 1.0 mg/mL). The quantitative data were presented as means \pm SD of three independent experiments. #p < 0.01, compared with basal diet-fed group (control). *p < 0.05; **p < 0.01, compared with HCD-fed group.

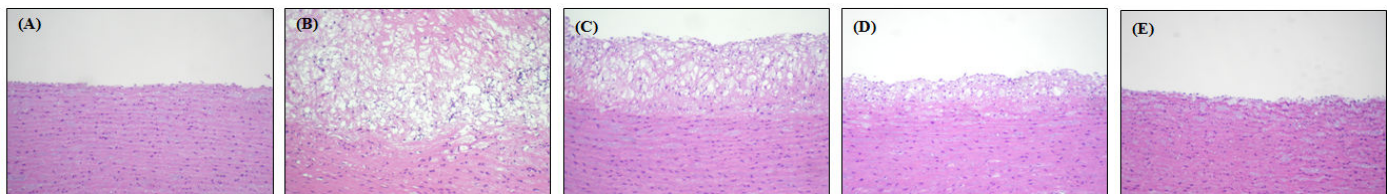


Fig. 9. (B) Histological photomicrographs of aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with HCD. (a) The aortic segment of normal control group which was no lesion on luminal surface of aortic arch (H&E stain). (b) The aortic segment of HCD-fed group which was high subintimal deposits of foam cells and extracellular lipids showing the extension and thickness of the aortic arch. (c) The aortic segment of HCD + 0.5% HLE group which was subintimal deposits of foam cells which have a moderated extension with a medium thickness of thoracic aorta. (d) The aortic segment of HCD + 0.5% HLE group which was development of fatty streak in the intimal of abdominal aortoiliac bifurcation. (e) HLE alone is the toxic group (200 \times).

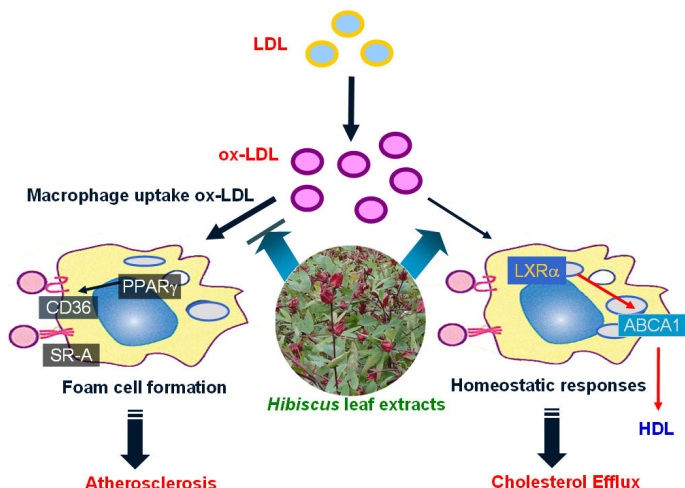


Fig. 10. Schematic representation of the anti-atherosclerotic mechanism of *H. sabdariffa* leaf extracts. The results of the present study revealed the following scheme for the major mechanism of ox-LDL-induced the macrophage uptake of ox-LDL and formation of foam cells, which is attributed by the expressions of CD36 and SR-A, and PPAR γ activation (left pathway). On the other hand, few macrophages also make homeostasis response to ox-LDL (right pathway). Ox-LDL homeostasis regulates the expression of LXR α /ABCA1 signaling pathway, contributing positively to cholesterol efflux in these macrophages. HLE functions against ox-LDL through PPAR α activation and/or PPAR γ /CD36 depression, which in turn led to stimulation of cholesterol removal from macrophages and delay atherosclerosis.

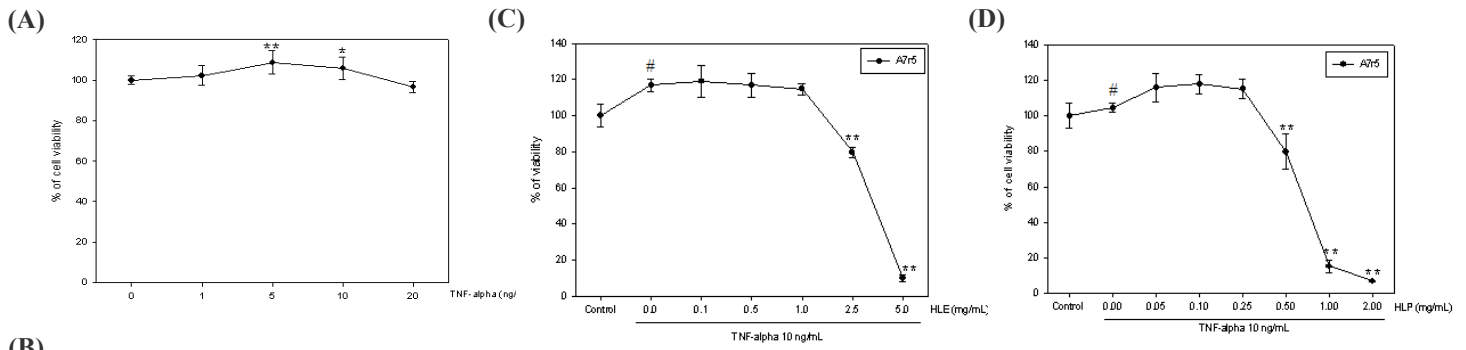


Fig. 11. Model of TNF α -induced VSMC proliferation and migration and the effects of HLE/HLP on TNF α -induced A7r5 cells viability. (A) A7r5 cells were treated with various concentrations (0-20 ng/mL) of TNF α for 24 h. Cell viability was analyzed by MTT assay. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control. (B) A7r5 cells in serum-free medium were treated with various concentrations of TNF α for 24 h. The culture medium of cells after treatment was subjected to gelatin-zymography to analyze the activity of MMPs. Results are representative of at least three independent experiments. Similarly, A7r5 cells were treated with various concentrations of HLE (C) or HLP (D) in the absence or presence TNF α (10 ng/mL) for 24 h. Cell viability was analyzed by MTT assay. The result represents the average of three independent experiments \pm SD. # $P < 0.01$ compared with the control. ** $p < 0.01$ compared with the TNF α group.

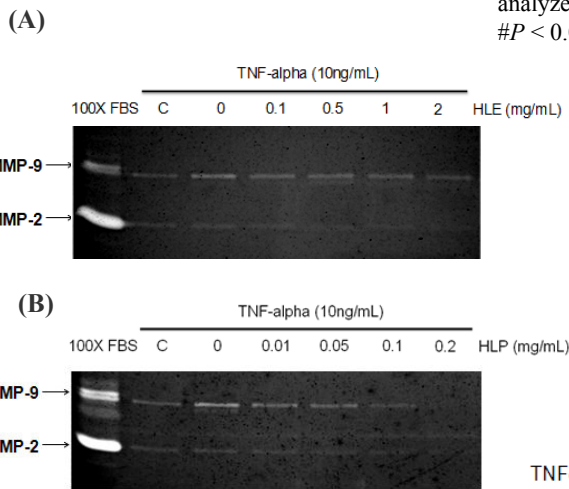


Fig. 12. Effects of HLE (A) and HLP (B) on TNF α -induced the activities of MMPs. A7r5 cells in serum-free medium were treated with various concentrations of HLE or HLP in the absence or presence TNF α (10 ng/mL) for 24 h. The culture medium of cells after treatment was subjected to gelatin-zymography to analyze the activity of MMPs. Results are representative of at least three independent experiments.

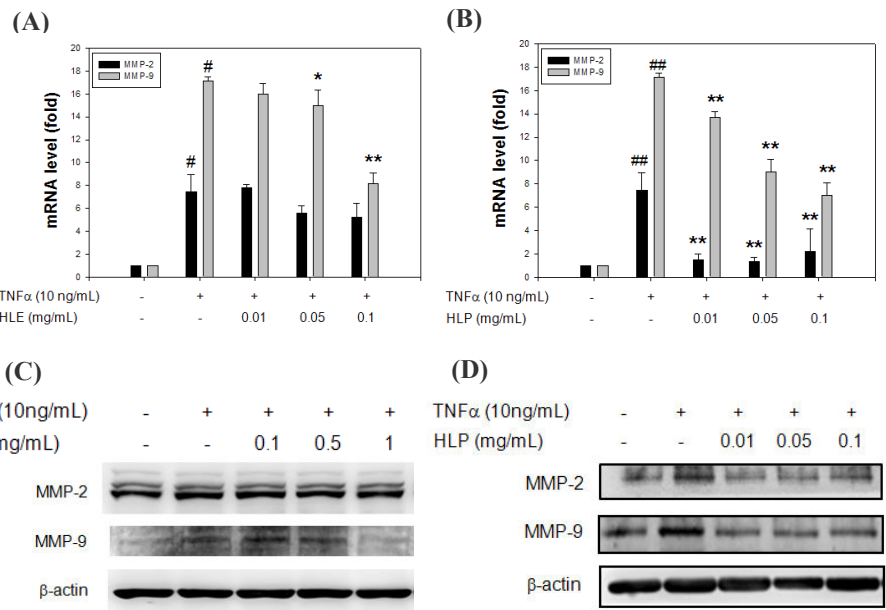


Fig. 13. Effects of HLE (A, C) and HLP (B, D) on TNF α -induced the expression of MMP-9. A7r5 cells in serum-free medium were treated with various concentrations of HLE or HLP in the absence or presence TNF α (10 ng/mL) for 24 h. (A, B) Real-time quantitative RT-PCR and (C, D) Western blot analysis of mRNA and protein levels of MMP-2 and MMP-9 in treated cells and harvested at the indicated times. β -actin was served as an internal control of protein level. The quantitative data were presented as means \pm S.D. of three repeats from one independent study. # $p < 0.01$ compared with the control. * $p < 0.001$ compared with the TNF α group.

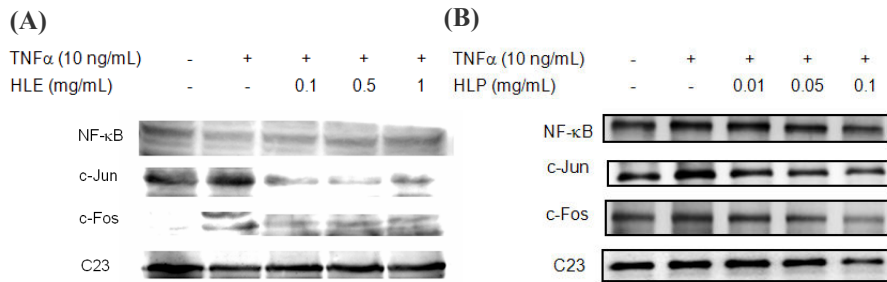


Fig. 14. Effects of HLE (A, C) and HLP (B, D) on TNF α -induced the AP-1 nuclear translocation level. (A, B) A7r5 cells were treated with various concentrations of HLE or HLP in the absence or presence TNF α (10 ng/mL) for 24 h, after which cells were harvested and the nuclear fraction analyzed for the expression of NF- κ B, c-Jun and c-Fos. The nuclear protein levels were determined by Western blotting. C23 was served as a nuclear internal control. (C, D) The nuclear extracts were analyzed for AP-1 DNA binding activity using biotin-labeled AP-1 specific oligonucleotide by EMSA. Lane 1 represented nuclear extracts incubated with unlabeled oligonucleotide (free probe) to confirm the specificity of binding. Results are representative of at least three independent experiments.

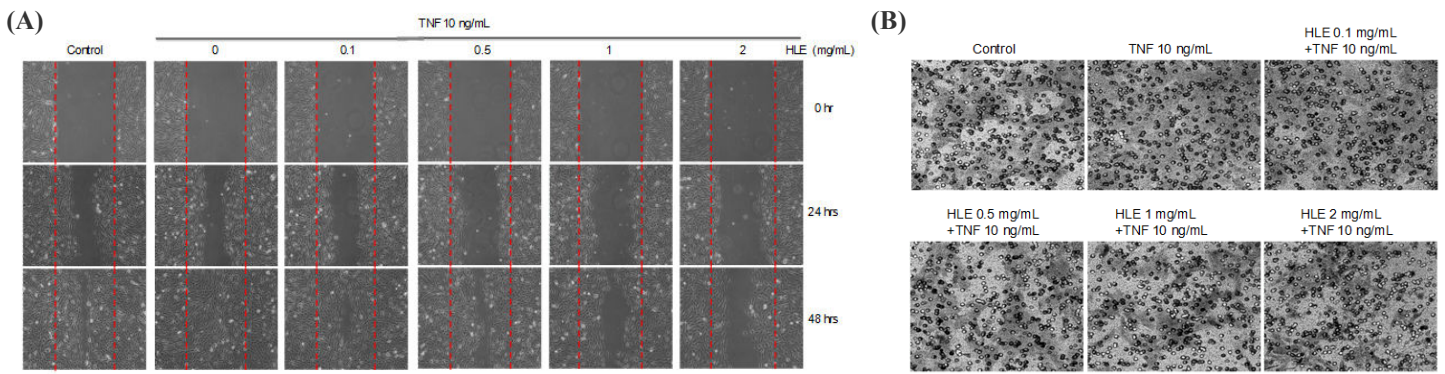


Fig. 15. Effects of HLE on TNF α -treated A7r5 cell motility and invasion *in vitro*. (A) Monolayers of A7r5 cells treated with various concentrations (0-2.0 mg/mL) of HLE in the absence or presence TNF α (10 ng/mL) were scraped and the number of cells in the denuded zone was photographed and quantified after indicated times (0, 24 and 48 h). (B) A7r5 cells were treated with various concentrations of HLE in the absence or presence TNF α for 24 h. Invasion assay was performed using Boyden chamber. Representative photomicrographs of the membrane-associated cells were assayed by Giemsa stain. Results are representative of at least three independent experiments.

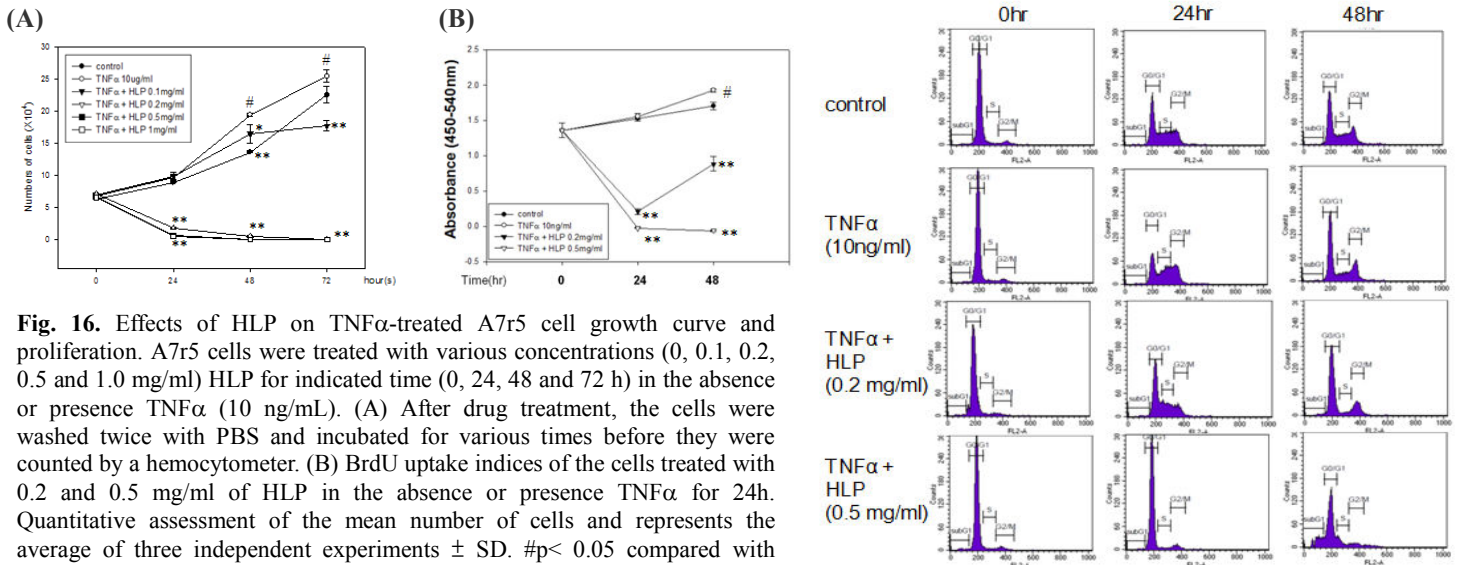


Fig. 16. Effects of HLP on TNF α -treated A7r5 cell growth curve and proliferation. A7r5 cells were treated with various concentrations (0, 0.1, 0.2, 0.5 and 1.0 mg/ml) HLP for indicated time (0, 24, 48 and 72 h) in the absence or presence TNF α (10 ng/mL). (A) After drug treatment, the cells were washed twice with PBS and incubated for various times before they were counted by a hemocytometer. (B) BrdU uptake indices of the cells treated with 0.2 and 0.5 mg/ml of HLP in the absence or presence TNF α for 24h. Quantitative assessment of the mean number of cells and represents the average of three independent experiments \pm SD. # $p < 0.05$ compared with control. ** $p < 0.01$ compared with the TNF α group.

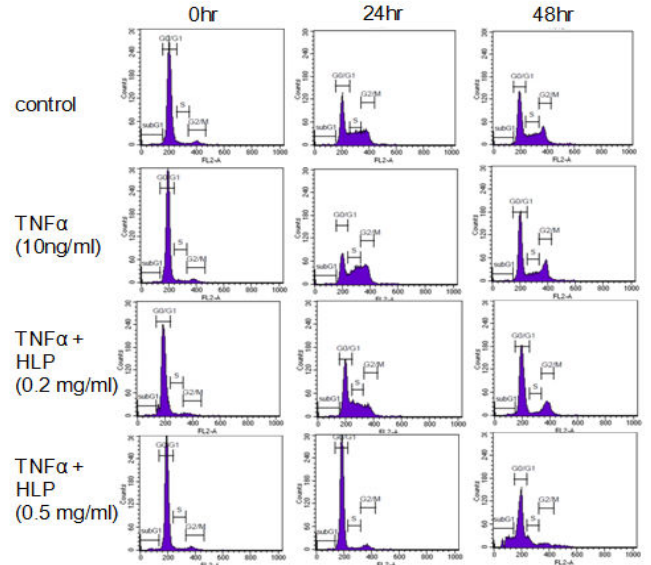


Fig. 17. Effects of HLP on TNF α -treated A7r5 cell cycle progression. A7r5 cells were treated with 0.2 and 0.5 mg/ml of HLP in the absence or presence TNF α (10 ng/mL) for indicated time (0, 24 and 48 h). After treatment, the cells were trypsinized and then subjected to flow cytometry. Quantitative assessment of the percentage of the cells in the cell cycle distribution (subG1, G0/G1, S and G2/M phase), as indicated by PI, and are representative of at least three independent experiments.

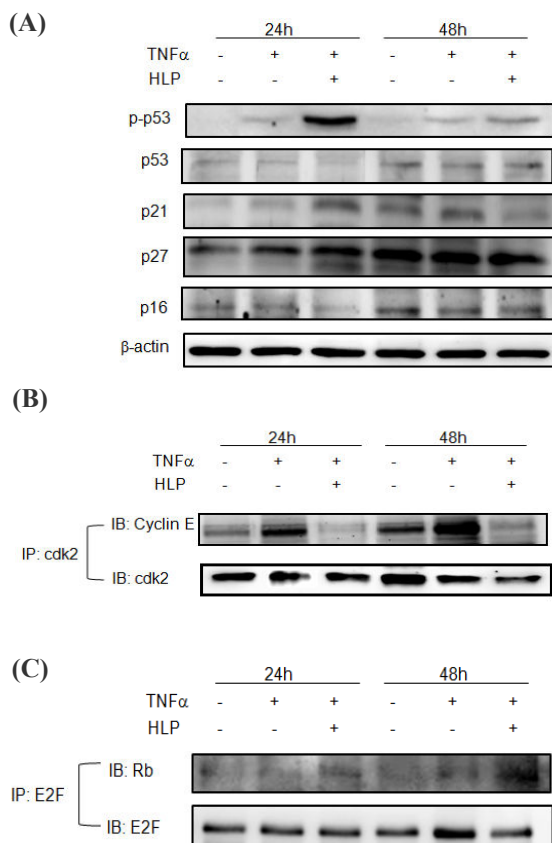


Fig. 18. (A) Immunoblot analysis of the expression of CKI: phospho-p53, p53, p21, p27 and p16 in A7r5 cells treated with HLP in the absence or presence TNF α . Cultured cells were treated with 0.2 and 0.5 mg/ml of HLP in the absence or presence TNF α (10 ng/mL) for 48 h. These proteins were detected by anti-phospho-p53, -p53, -p21, -p16, and -p27 proteins antibodies, and the results were represented by using an ECL system. (B) Analysis of cdk2/cyclinE complex in A7r5 cells following the same treatment. Cell extracts (500 μ g) were immunoprecipitated with cdk2, and Western blot analysis was performed to detect cyclin E. (C) Analysis of Rb/E2F complex in A7r5 cells following the same treatment. Cell extracts (500 μ g) were immunoprecipitated with E2F, and Western blot analysis was performed to detect Rb. Results are representative of at least three independent experiments.

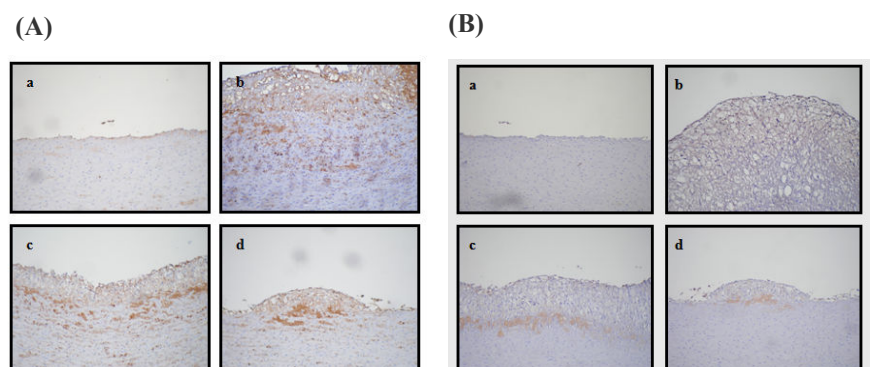


Fig. 19. HLE reduced HCD-induced smooth muscle cells migration and proliferation in the intimal of aortic arch. Immunohistochemistry for SM α -actin (A) and PCNA (B) reveal cell migration and proliferation in the aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with HCD. a, The aortic segment of normal control group which was no lesion on luminal surface of aortic arch. b, The aortic segment of HCD-induced group which was high subintimal deposits of foam cells and extracellular lipids showing the aortic arch. c, The aortic segment of HCD + HLE 0.5% group which was subintimal deposits of foam cells which have a few SM α -actin or PCNA positive cells in thoracic aorta. d, The aortic segment of HCD + HLE 1% group which was subintimal deposits of foam cells which have a few SM α -actin or PCNA positive cells in thoracic aorta. (100 \times)

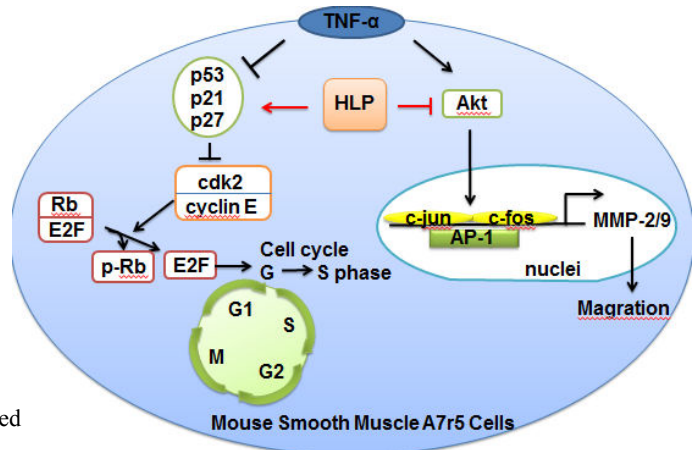


Fig. 20. A proposed model for the HLP-mediated inhibition of TNF α -induced A7r5 cell migration and proliferation.

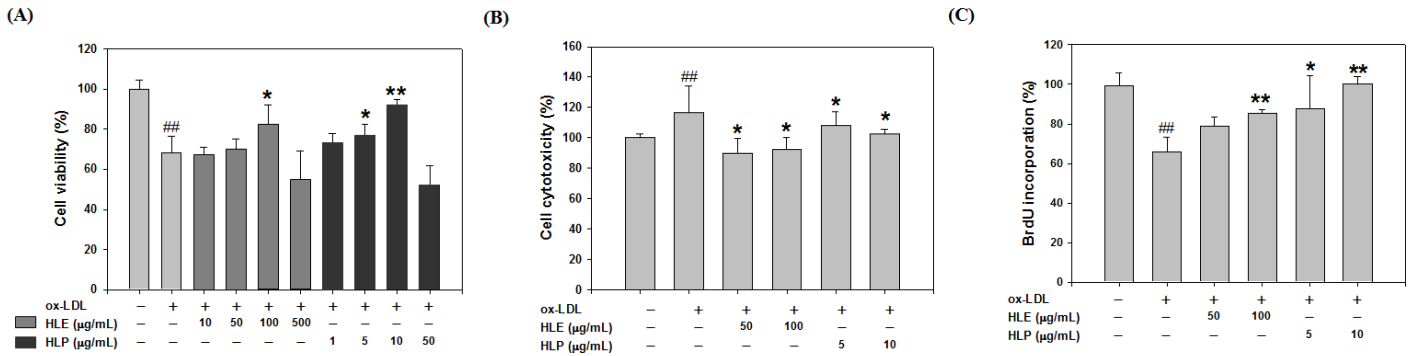


Fig. 21. Effects of HLE and HLP on ox-LDL-induced HUVEC injury. HUVEC were treated with various concentrations of HLE or HLP in the absence or presence ox-LDL (50 μ g/mL) for 24 h. (A) Cell viability was analyzed by MTT assay. (B) Cell cytotoxicity value was analyzed by LDH assay. (C) Cell proliferation value was analyzed by BrdU assay. The result represents the average of three independent experiments \pm SD. ### p < 0.01 compared with the control. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the ox-LDL group.

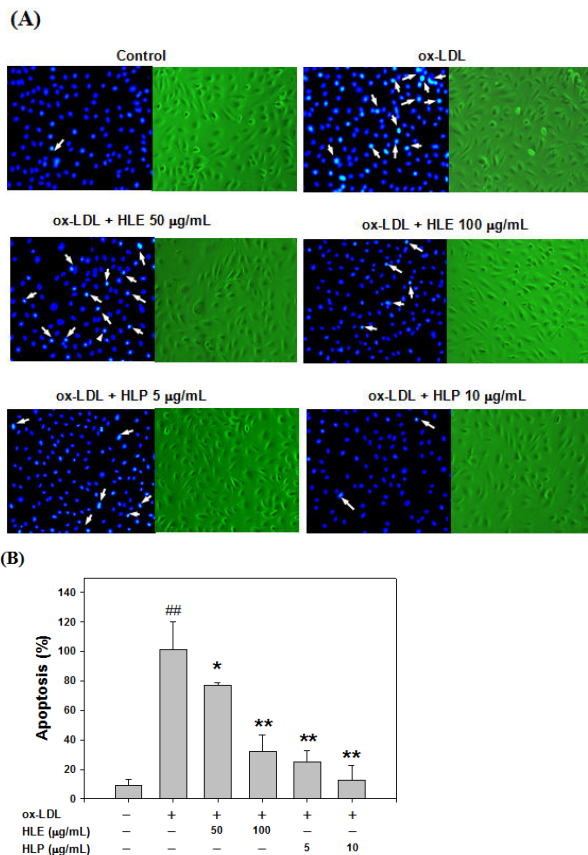


Fig. 22. Effects of HLE and HLP on ox-LDL-induced HUVEC apoptosis. HUVEC were treated with various concentrations of HLE or HLP in the absence or presence ox-LDL (50 μ g/mL) for 24 h. (A) Apoptotic cells were assayed by DAPI stain. The arrow indicated apoptotic cells. (B) Apoptotic values were calculated as the percentage of apoptotic cells relative to the total number of cells in each random field (>100 cells), and represent presented as means \pm S.D. of three repeats from one independent study. ### p < 0.01 compared with the control. * p < 0.001 compared with the ox-LDL group.

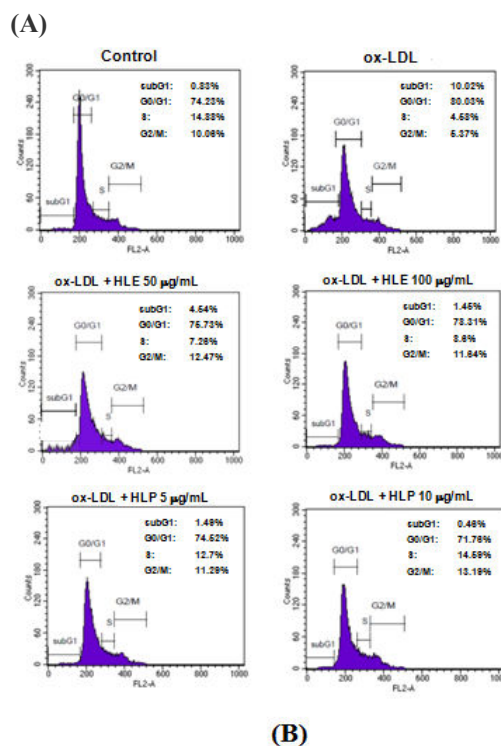
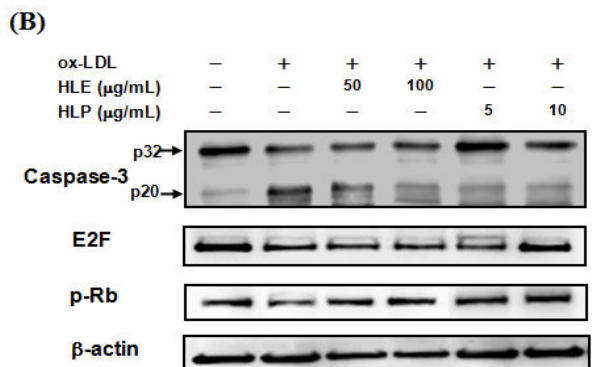


Fig. 23. Effects of HLE and HLP on ox-LDL-induced cell cycle arrest and apoptosis of HUVEC. HUVEC were treated with various concentrations of HLE or HLP in the absence or presence ox-LDL (50 μ g/mL) for 24 h. (A) The DNA content was analyzed using fluorescence flow cytometry. The position of the sub-G1 peak (hypodiploidy), integrated by apoptotic cells, and the G0/G1, S and G2/M peaks are indicated. Quantitative assessment of the cell number percentage in each phase of the cell cycle was calculated and expressed. (B) The expressions of Caspase-3, E2F and p-Rb were detected by Western blotting. β -actin was the loading control. Results are representative of at least three independent experiments.



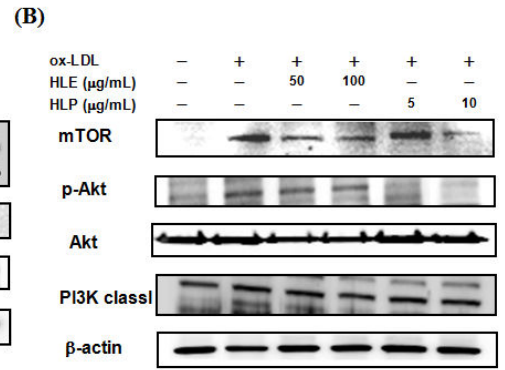
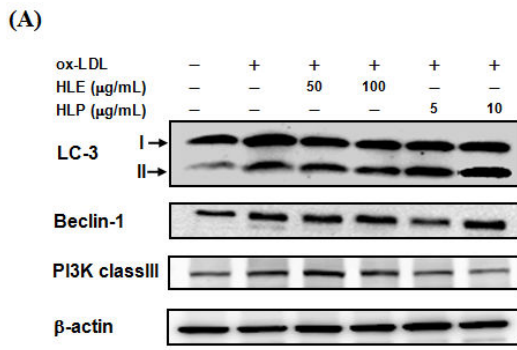
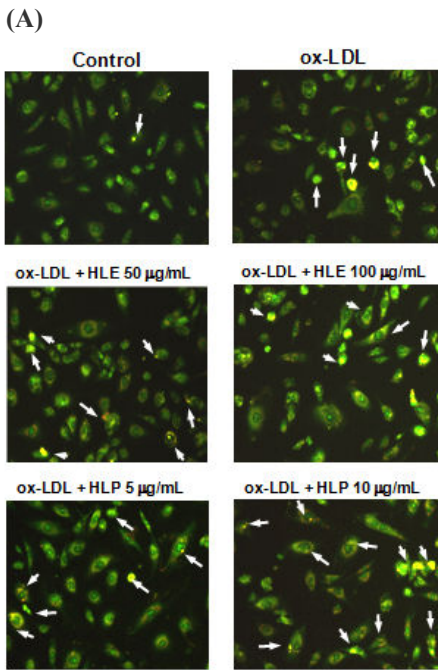


Fig. 24. Effects of HLE and HLP on ox-LDL-induced HUVEC autophagy. HUVEC were treated with various concentrations of HLE or HLP in the absence or presence ox-LDL (50 µg/mL) for 24 h. (A) Autophagic cells were assayed by AVO stain. The arrow indicated autophagic cells. (B) Autophagy values were calculated as the percentage of autophagic cells relative to the total number of cells in each random field (>100 cells), and represent presented as means ± S.D. of three repeats from one independent study. ##p < 0.01 compared with the control. *p < 0.001 compared with the ox-LDL group.

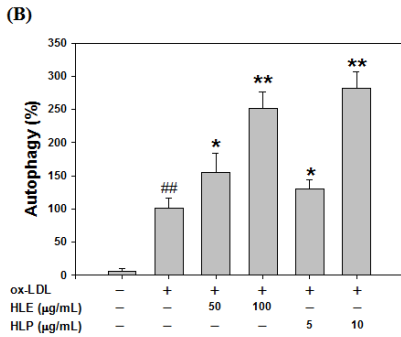


Fig. 25. Effects of HLE and HLP on autophagic pathways in ox-LDL-treated HUVEC. HUVEC were treated with various concentrations of HLE or HLP in the absence or presence ox-LDL (50 µg/mL) for 24 h. The protein levels of LC3, Beclin-1, PI3K classIII (A), and PI3K classI signalings, including mTOR, p-AKT, AKT, and PI3K classI (B) were detected by Western blotting. β-actin was the loading control. Results are representative of at least three independent experiments.

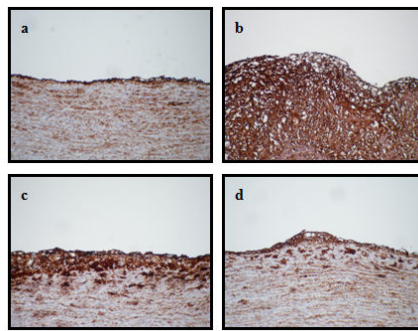


Fig. 26. HLE reduced HCD-induced endothelial cell injury in the intimal of aortic arch. Immunohistochemistry for CD31 reveal cell injury in the aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with HCD. (a) The aortic segment of normal control group which was no lesion on luminal surface of aortic arch. (b) The aortic segment of HCD-induced group which was high subintimal deposits of foam cells and extracellular lipids showing the aortic arch. (c) The aortic segment of HCD + HLE 0.5% group which was subintimal deposits of foam cells which have a few CD31 positive cells in thoracic aorta. (d) The aortic segment of HCD + HLE 1% group which was subintimal deposits of foam cells which have a few CD31 positive cells in thoracic aorta. (100 ×)

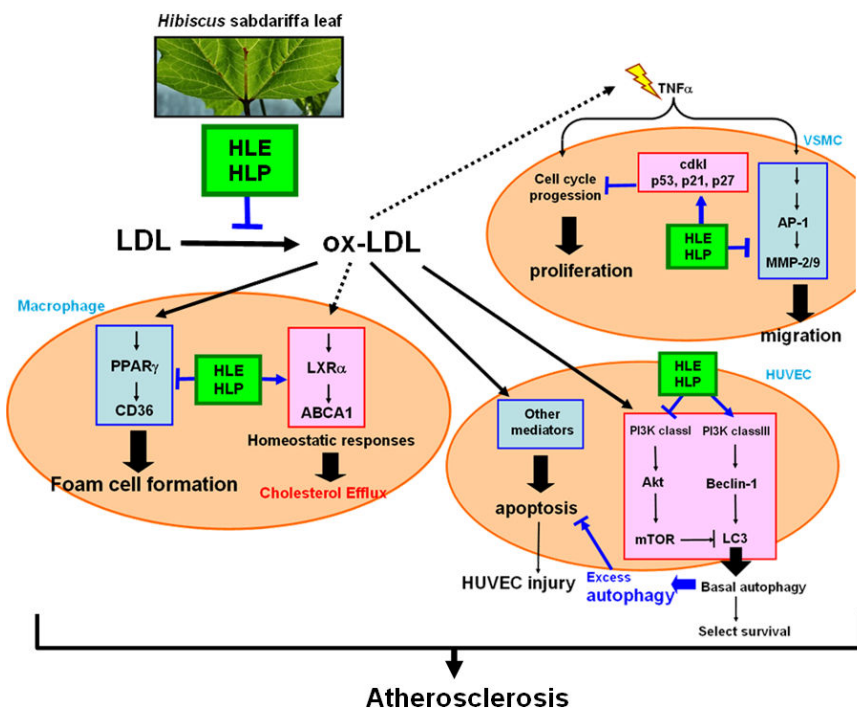


Fig. 27. Overview of protective pathways for HLE and HLP in macrophages, VSMC, and HUVEC. *H. sabdariffa* leaf was shown to be capable of reducing ox-LDL-induced foam cell formation and HUVEC apoptosis, or TNF α -induced VSMC migration and proliferation, which in turn synergistically inhibit atherosclerosis.

國科會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）

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

(1) 本計畫之研究之成果確認洛神葉萃取物成份具有降血脂、抑制LDL氧化、抑制泡沫細胞生成、阻止血管平滑肌細胞之增生與遷移、以及具有保護血管內皮細胞等作用，將提供臨床患者新的治療方向。

(2) 本研究計畫已順利達成預定目標，不僅可以有效地充分利用天然的萃取物及其成分可以抑制心血管病變之作用及相關機轉，而且，可以更深入地瞭解造成人類血管動脈粥狀硬化病變的原因、過程和機制，對心血管疾病的預防和控制具有重要的貢獻。

(3) 本計畫除功能性研究外，同時也可做洛神葉萃取物對於兔子之動物毒理評估。

(4) 本研究也建立ox-LDL經由促進泡沫細胞之生成以及生長因子促進血管平滑肌細胞增生作用，作為探討動脈粥狀硬化之致病成因模式，可應用為將來發展預防心血管疾病保健食品開發之研究，在學術研究上有貢獻。

(5) 本研究在探討ox-LDL及其他刺激物（如：生長因子）對細胞週期進行及細胞凋亡、增生之作用機轉，可為保健食品開發研究之參考。

(6) 研究之成果可推廣台灣本土作物--洛神葉為可食用之資源，提升洛神農業作物的經濟效益，符合現今節能減碳之概念。

附件八：子計畫八

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

疾病化學預防物質開發及作用機轉研究

The study and application of chemopreventive agents for several human diseases

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2632-B-040-001-MY3(8)

執行期間：099 年 08 月 01 日 至 102 年 07 月 31 日

計畫主持人：高紹軒

計畫參與人員：王威鈞、葉期瑋、林君香

執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

中 華 民 國 1 0 2 年 9 月 2 6 日

疾病化學預防物質開發及作用機轉研究

The study and application of chemopreventive agents for several human diseases

子計畫：紫蘇萃取物對減緩呼吸道發炎與氣喘發展之分子機制研究

中文摘要

紫蘇除用於當作裝飾食物(garnish)，同時也是傳統醫學上的一種藥用植物。過去的研究證實紫蘇的各種萃取物具有抗癌、抗發炎與抗菌等功效，並發現紫蘇萃取物的主要成分之一：迷迭香酸(Rosmarinic acid)具有減緩呼吸道發炎之現象。因此，本研究針對紫蘇對於抑制呼吸道過敏與發炎的分子機轉進行更深入的探討。Der p 2 (DP2)是歐洲室塵蟎(house dust mite)的主要過敏原之一，同時也是台灣地區誘發小兒與成人過敏性氣喘的主因。我們利用DP2與人類正常支氣管上皮細胞BEAS-2B建構細胞模式的實驗，探討紫蘇抑制呼吸道過敏與發炎的分子機轉。我們的實驗結果顯示，紫蘇葉*Perilla frutescens leaves*的甲醇萃取物(PFE)，可以有效降低DP2所誘發的前發炎細胞激素(proinflammatory cytokines)包括IL-6、IL-8與MCP-1，以及前致敏性細胞激素(pro-allergic cytokines)包括IL-4、IL-5、IL-13與MCP-1的mRNA在人類正常支氣管上皮細胞BEAS-2B的表現。並進一步發現PFE對DP2誘發之呼吸道上皮細胞發炎的抑制作用，主要是透過抑制MAPK路徑的活化，包括ERK1/2、JNK與p38 MAPK，以及抑制下游的NF- κ B訊息路徑。此外，我們建構DP2致敏小鼠模式的實驗，證實PFE確實可以降低DP2誘發致敏小鼠中，血清的前發炎細胞激素以及前致敏性細胞激素的濃度。這些研究證據顯示紫蘇葉*Perilla frutescens leaves*的甲醇萃取物PFE，確實具有減緩歐洲室塵蟎主要過敏原DP2造成的呼吸道上皮細胞的發炎與過敏的功效。

Abstract

Perilla frutescens has been used in traditional medicine for respiratory diseases due to its anti-bacterial and anti-inflammatory activity. This study was aimed to investigate effects of *Perilla frutescens* leaf extract (PFE) on expression of pro-allergic and pro-inflammatory cytokines in airway epithelial cells exposed to mite major allergen Der p 2 (DP2) and the underlying mechanisms. Our results showed that PFE up to 100 μ g/mL had no cytotoxic effect on human bronchial epithelial cell BEAS-2B. Further investigations revealed that PFE dose-dependently diminished mRNA expression of pro-allergic cytokine IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF, as well as pro-inflammatory cytokine IL-6, IL-8 and MCP-1 in BEAS-2B cells treated with DP2. In parallel to mRNA, the DP-2-elevated levels of the tested cytokines were decreased. Further investigation showed that DP2-induced phosphorylation of p38 MAPK (P38) and JNK, but not Erk1/2, was also suppressed by PFE. In addition, PFE elevated cytosolic I κ B α level and decreased nuclear NF- κ B level in DP2-stimulated BEAS-2B cells. Taken together, these findings revealed that PFE significantly diminished both mRNA expression and protein levels of pro-allergic and pro-inflammatory cytokines in response to DP2 through inhibition of P38/JNK and NK- κ B activation. These findings suggest that PFE should be beneficial to alleviate both allergic and inflammatory responses on airway epithelium in response to aeroallergens.

1. Introduction

Perilla frutescens leaf is a common garnish and has been widely used as medicinal herb such as “Zisu” in traditional Chinese medicine and “saiboku-to” in Japanese herbal formula for asthma treatment. Previous studies have shown that *Perilla frutescens* leaf extracts possess different biological activities, including inhibition of tumor necrosis factor- α (TNF- α) [1], suppression of IgA nephropathy [2], and anti-inflammatory and anti-allergic activity [3, 4]. Airway epithelium has been considered as a major player not only in physical resistance against pathogen invasion and allergens, but also in activation of immune responses [5, 6]. A series of pro-inflammatory cytokines and chemokines are produced by airway epithelial cells upon stimulation with pathogens and allergens, including IL-6, IL-8, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and monocyte chemotactic protein (MCP)-1 [7-9]. Although *Perilla frutescens* has been reported to possess anti-inflammatory activity and traditionally used for respiratory disorders,

its effects on allergen-stimulated airway epithelium and the underlying mechanisms remain sketchy.

House dust mite (HDM) is a major causative factor for airway hypersensitiveness and asthma [10]. Of mite-sensitive individuals, approximately 90% generates IgE antibody responses to well-identified HDM allergens that are categorized into 24-kd group 1 and the 14-kd group 2 allergens like Der p 2 (DP2, derived from *D. pteronyssinus*) on basis of IgE affinity [11, 12]. DP2 is known to trigger both pro-inflammatory and pro-allergic responses on respiratory epithelial cells [8]. In addition to induction of pro-allergic cytokines, it is reported that respiratory cells exposed to DP2 result in up-regulated secretion of pro-inflammatory cytokines and expression of intercellular adhesion molecule-1 [8].

Nuclear factor-kappaB (NF- κ B) is a widely distributed transcription factor which is normally sequestered in the cytoplasm as an inactive multi-unit complex bound by an inhibitory protein (I κ -B) [13]. A number of stimuli can activate the complex through phosphorylation and degradation of I κ -B, leading to translocation of the active dimer into the nucleus. Nuclear NF- κ B binds to the promoter region of genes containing the NF- κ B motif and regulates their expressions. The upregulation of NF- κ B requires the activation of signaling kinases including mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as p42/p44 extracellular signal-regulated kinase (Erk1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK (P38) for nuclear translocation of NF- κ B [14, 15].

The present study was aimed to investigate whether extract of *Perilla frutescens* leaf alleviates DP2-induced pro-inflammatory and pro-allergic responses with emphasis on mRNA expression and production of cytokine and cellular signaling. Non-tumorigenic human bronchial epithelial cell BEAS-2B was used as cell model. Cytotoxicity of DP2 was determined by MTT assay. mRNA expression was analyzed by both RT-PCR and real-time quantitative PCR (qPCR). Kinase activation, cytosolic level of I κ B α and nuclear-cytosolic distribution of NF- κ B was demonstrated by subcellular fractionation and immunoblotting.

2. Materials and Methods

Chemicals and reagents

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Nonidet P-40, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), sodium fluoride, sodium chloride, sodium phosphate, Tris-HCl, Triton X-100 and Tween-20 were purchase from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Preparation of an ethanol extract of *Perilla frutescens* (PFE)

Perilla frutescens plants were collected in Taichung, Taiwan. Approximately 100 g of the *Perilla frutescens* leaf was homogenized into powder and passed through a mesh (0.05 mm). The filtered powder was resuspended into 95% ethanol and sonicated for 24 hours (h). Stock solution (20 mg/mL) of the extract (PFE) was prepared in DMSO, and stored at -20°C until use.

Expression and purification of recombinant Der p 2 (rDP2)

Recombinant DP2 was produced as a recombinant polypeptide with a N-terminal glutathione S-transferase (GST) tag. The *E. coli* BL-21 (Novagen, Madison, WI) strain containing pGES-GST-DP2 plasmid and pGES-GST (A gift from Dr. Jiunn-Liang Ko) was used for expression and purification of rDP2 protein and GST control protein respectively. For checking the expression of rDP2 protein and GST protein, *E. coli* was grown at 37 °C and protein expression was induced with 0.1 mM isopropyl β -d-thiogalactoside (IPTG).

The rDP2 fusion protein and the GST control protein were purified by affinity chromatography using glutathione Sepharose 4B column and by gel filtration using Superdex 75 column (Amersham-Pharmacia Biotech AB, Upsala, Sweden). The purified protein concentration was determined by BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)

Cell culture and treatment

The transformed human normal bronchial epithelial cell line, BEAS-2B, purchased from ATCC, was incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 0.1% sodium bicarbonate, 2 mM glutamine, penicillin G (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 10% fetal bovine serum, and maintained at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO₂. After preincubation of BEAS-2B cells with indicated concentration of PFE for 4 h, 40 µg/mL rDP2 was added and incubated for 2 h (kinase cascades), 4 h (RT-PCR and qPCR analysis), or 24 h (cell viability assay and cell morphology).

Cell viability

Cell viability was determined by mitochondrial-dependent reduction of MTT to formazan. Briefly, 10 µL of MTT solution (5 mg/mL in DMEM) was added to the cell supernatant and incubated for 4 h at 37°C. After removal of medium, 2-propanol was added to lyse cells and to solubilize formazan. The optical density of formazan was measured using a microplate reader (Benchmark, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at 570 nm. The optical density of formazan generated by untreated cells was taken as 100%.

RNA Extraction, RT-PCR and quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Total RNA was isolated from individual samples, according to the manufacturer's instructions, using the RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The purified RNA was used as a template to generate first-strand cDNA synthesis using RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Life Sciences, St. Leon-Rot, Germany). The primer sequences used for RT-PCR and qPCR were listed in Table 1. RT-PCR experiments were performed in triplicates for each sample. qPCR was performed using the ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA). For mRNA quantitation, FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) was used for Taqman PCR. The threshold cycle numbers were calculated using the $\Delta\Delta CT$ relative value method and normalized to GAPDH. qPCR experiments were performed in duplicates for each sample. The correct size of the PCR products was confirmed by agarose gel electrophoresis.

Subcellular fractionation

Cells were washed with PBS and incubated with a lysis buffer (10 mM HEPES, pH7.6; containing 15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.05% v/v Igepal CA-630 and 1 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 10 µg/mL leupeptin, and 10 µg/mL aprotinin) for 10 min. Cell lysates were collected by a centrifugation at 2,500 g for 10 min at 4 °C. The supernatant containing the cytosol was further centrifuged at 20,000 g for 15 min at 4 °C, namely cytosolic fraction. The pellets containing nuclei were washed with PBS, resuspended in nuclear buffer (25 mM HEPES, pH7.6, 0.1% v/v Igepal CA-630, 1 M KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM sodium fluoride, 10 µg/mL leupeptin, and 10 µg/mL aprotinin), and centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 °C. The resulting supernatants were collected, namely nuclear fraction.

Analysis of cytokine production by ELISA

For cytokine production analysis, cells were seeded in 6-well plates at an initial density of 5×10^5 cells/mL, starved in serum-free medium for 16 h, pretreated with serial concentrations of PFE (5, 15, 30 and 50 µg/mL) for 1 h and then treated with DP2 (20 µg/mL) for 24 h. DMSO and purified GST was used as negative control and control protein. The concentration of IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, GM-CSF and MCP-1 was determined in cell free supernatants using DuoSet ELISA kits (R&D Systems, Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm SD of the three independent experiments. Statistical comparisons are made by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Duncan multiple-comparison test. Differences are considered to be significant when the *p* values are <0.05 .

3. Results

3-1. Effects of PFE and rDP2 on viability of BEAS-2B cells

Cytotoxicity of PFE and DP2 to human airway epithelial cell BEAS-2B was first examined by using MTT assay. As shown in Figure 1A, cell viability of BEAS-2B cells cultured with different concentrations of PFE ranged from $103.4 \pm 12.1\%$ to $96.2 \pm 9.2\%$ of control, and each changes of viability between DMSO and different concentrations of PFE (10, 20, 30, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) were statistically insignificant ($P > 0.127$). Based on our previous study [17], 20 $\mu\text{g/mL}$ of DP2 was used to trigger expression of pro-allergic and pro-inflammatory cytokines in BEAS-2B cells, and up to 50 $\mu\text{g/mL}$ of PFE was used for its biological activity investigation. we found that neither DP2 alone (20 $\mu\text{g/mL}$) nor DP2 combining with PFE treatment (50 $\mu\text{g/mL}$) significantly affected cell viability of BEAS-2B cells ($P > 0.251$ as compared to control)(Figure 1B).

3-2. PFE inhibited DP2-induced mRNA expression and protein production of pro-allergic cytokines in BEAS-2B cells

It is known that DP2 induces secretion of pro-allergic cytokines by respiratory epithelial cells [8]. We next investigated the effects of PFE on mRNA expression of pro-allergic cytokine IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF in DP2-stimulated BEAS-2B cells. As shown in Figure 2A, significantly induced mRNA expressions of IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF were observed in DP2-stimulated BEAS-2B cells, and the elevated expressions were inhibited by pretreatment of PFE in a dose-dependent manner. Using qPCR, the results of quantitative analysis revealed that DP2 significantly increased the mRNA levels of IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF in BEAS-2B cells to 16.3 ± 1.2 , 18.5 ± 0.6 , 44.1 ± 1.8 and 17.6 ± 2.7 -fold of control, respectively ($P < 0.05$ as compared to control). GST alone (20 $\mu\text{g/mL}$) appeared to elevate the mRNA expression of the pro-allergic cytokines, ranging from 3.8 ± 0.9 to 5.1 ± 4.7 -fold of control; however, only the increases in IL-4 and IL-5 mRNA expression were significant ($P < 0.05$ as compared to control). The DP2-increased mRNA levels of IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF were reduced by PFE pretreatment in a dose-dependent manner (Figure 2B), and the DP2-upregulated mRNA levels of IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF were significantly inhibited by PFE pretreatment (50 $\mu\text{g/mL}$) and decreased to 7.1 ± 0.9 , 5.7 ± 0.1 , 22.1 ± 1.7 and 7.4 ± 0.8 -fold of control, respectively ($p < 0.005$ as compared to DP2 alone) (Figure 2B).

In addition to mRNA expression, DP2 increased protein production of IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF by BEAS-2B cells to 18.5 ± 2.2 , 16.7 ± 1.2 , 27.5 ± 1.6 and 8.8 ± 1.4 $\text{pg/mL}/104$ cells, respectively ($P < 0.05$ as compared to control)(Figure 2C). PFE pretreatment dose-dependently reduced the protein production of the tested cytokines in BEAS-2B cells, and decreased the cytokine production up to 7.6 ± 1.1 (IL-4), 6.6 ± 1.2 (IL-5), 12.4 ± 1.4 and 6.1 ± 1.3 (GM-CSF) $\text{pg/mL}/104$ cells, respectively ($P < 0.05$ as compared to DP2 alone)(Figure 2C). Although GST alone (20 $\mu\text{g/mL}$) elevated the protein production of the pro-allergic cytokines, the increase of the cytokines was insignificant ($P > 0.172$ as compared to control).

3-3. PFE inhibited DP2-induced mRNA expression and protein production of pro-inflammatory cytokines in BEAS-2B cells

In addition to pro-allergic cytokines, DP2 has been reported to enhance production of pro-inflammatory cytokines by respiratory epithelial cells [8]. We thus investigated whether PFE diminished mRNA expression of pro-inflammatory cytokine IL-6, IL-8 and MCP-1 in BEAS-2B cells in response to DP2. As shown in Figure 3A, DP2 significantly induced mRNA expression of IL-6, IL-8 and MCP-1 in BEAS-2B cells, which was dose-dependently inhibited by PFE pretreatment. Further quantitative qPCR analysis showed that DP2 greatly elevated the mRNA levels of IL-6, IL-8 and MCP-1 in BEAS-2B cells to 35.7 ± 1.6 , 28.7 ± 1.1 , and 11.3 ± 1.2 -fold of control, respectively ($P < 0.05$ as compared to control)(Figure 3B). Similar to the results of pro-allergic cytokine expression, GST (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) slightly enhanced the mRNA expression of the pro-inflammatory cytokines, ranging from 1.2 ± 0.4 to 2.1 ± 0.3 -fold of control (Figure 3B - 3D). The DP2-elevated mRNA levels of IL-6, IL-8 and MCP-1 were dose-dependently diminished by PFE pretreatment (Figure 3B), and the DP2-elevated mRNA levels of IL-6, IL-8 and MCP-1 were significantly reduced by PFE pretreatment (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to 2.2 ± 0.3 , 1.8 ± 0.2 , and 5.9 ± 1.1 -fold of control as comparing to control respectively ($p < 0.005$ as compared to DP2 alone)(Figure 3B).

In parallel to mRNA expression, protein productions of IL-6, IL-8, and MCP-1 in BEAS-2B cells were increased by DP2 to 142.7 ± 12.9 , 102.6 ± 15.6 , and 72.7 ± 8.8 $\text{pg}/\text{mL}/10^4$ cells, respectively ($P < 0.05$ as compared to control)(Figure 3C). PFE pretreatment diminished the protein production of the tested cytokines by BEAS-2B cells in a dose-dependent manner, and decreased the cytokine production up to 58.9 ± 2.9 (IL-6), 33.7 ± 3.1 (IL-8) and 33.3 ± 2.2 (MCP-1) $\text{pg}/\text{mL}/10^4$ cells, respectively ($P < 0.05$ as compared to DP2 alone)(Figure 3C). Additionally, effects of GST alone (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the protein production of the pro-inflammatory cytokines examined were insignificant ($P > 0.121$ as compared to control).

3-4. PFE inhibited phosphorylation of MAPKs in DP2-stimulated BEAS-2B cells

Activation of MAPKs has been known to be associated with DP2-induced production of pro-allergic and pro-inflammatory cytokines [8, 18]. Therefore, effects of PFE on phosphorylation of JNK, P38 and Erk1/2 in BEAS-2B cells in response to DP2 were investigated. As shown in Figure 4, comparing to GST treatment, DP2 significantly enhanced phosphorylation of JNK, P38 and Erk1/2 to 2.42, 4.21, and 2.48-fold of GST alone, respectively. The DP2-induced phosphorylation of JNK and P38 were diminished upon PFE pretreatment in a dose-dependent manner but not Erk1/2. With pretreatment of PFE at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, levels of p-JNK, p-P38 and p-Erk1/2 were reduced to 1.18, 1.25 and 1.01-fold of GST alone. In addition, treated with GST (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) alone insignificantly affected phosphorylation of JNK, P38 and Erk1/2 as compared to negative control (DMSO).

3-5. PFE suppressed degradation of I κ B α and nuclear translocation of NF- κ B in DP2-stimulated BEAS-2B cells

Transcription factor NF- κ B plays a pivotal role in regulation of pro-inflammatory cytokines, and its nuclear translocation is associated with the expression of the pro-inflammatory cytokines. Thus, effects of PFE on degradation of I κ B α and nuclear translocation of NF- κ B in BEAS-2B cells exposed to DP2 were subsequently investigated. As shown in Figure 5A, exposure of BEAS-2B cells to DP2 led to a significant decrease of cytosolic I κ B α level, the NF- κ B inhibitor, contributing to nuclear translocation of NF- κ B. In addition, PFE pretreatment restored the DP2-decreased cytosolic I κ B α level and diminished nuclear NF- κ B level increased by DP2 in a dose-dependent fashion. Further quantitative analysis showed that DP2 treatment increased level of nuclear NF- κ B to 1.54 ± 0.15 -fold of GST alone ($P < 0.05$), and PFE pretreatment (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) following DP2 treatment decreased nuclear NF- κ B level to 1.21 ± 0.03 -fold of GST control (Figure 5B). These findings revealed that PFE inhibited not only degradation of I κ B α but also nuclear translocation of NF- κ B.

4. 圖表說明

Figure 1. Effects of PFE and DP2 treatment on BEAS-2B cell viability. Cells were cultured in a 24-well plate (4×10^4 cells/mL) with serum-free medium for 16 h, then (A) treated with serial concentrations of PFE (10, 20, 30, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, or (B) pretreated with 50 $\mu\text{g/mL}$ PFE for 1 h and following treated with 20 $\mu\text{g/mL}$ DP2 for 24 h. After the treatments, cell viability was determined by MTT assay. The data were presented as means \pm SD of three independent experiments. n.s., not significant as compared to DMSO (A) or control (B).

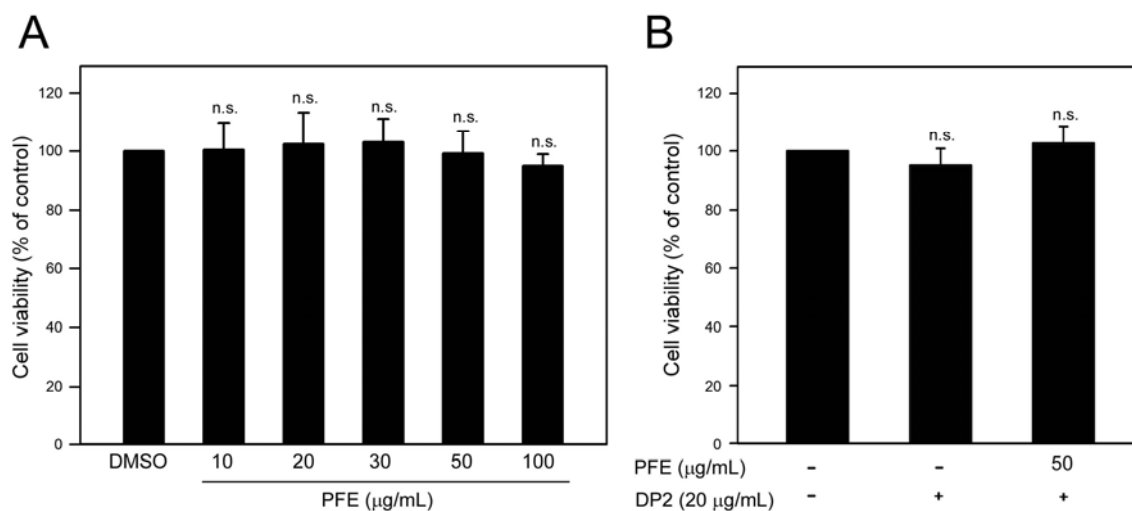


Figure 2. PFE inhibits DP2-induced mRNA expression and protein production of IL-4, IL-5, IL-13 and GM-CSF in BEAS-2B cell. After 16 h-starvation, cells were pretreated with 5, 15, 30 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PFE for 1 h and then stimulated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DP2 for 4 h (mRNA expression) or 24 h (protein production). mRNA expression was determined by RT-PCR (A), or by qPCR (B). Protein production was measured by ELISA (C). Quantitative data was shown as means \pm SD of three independent experiments. #, $P < 0.05$ as compared to GST alone; *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.005$ as compared to DP2 alone.

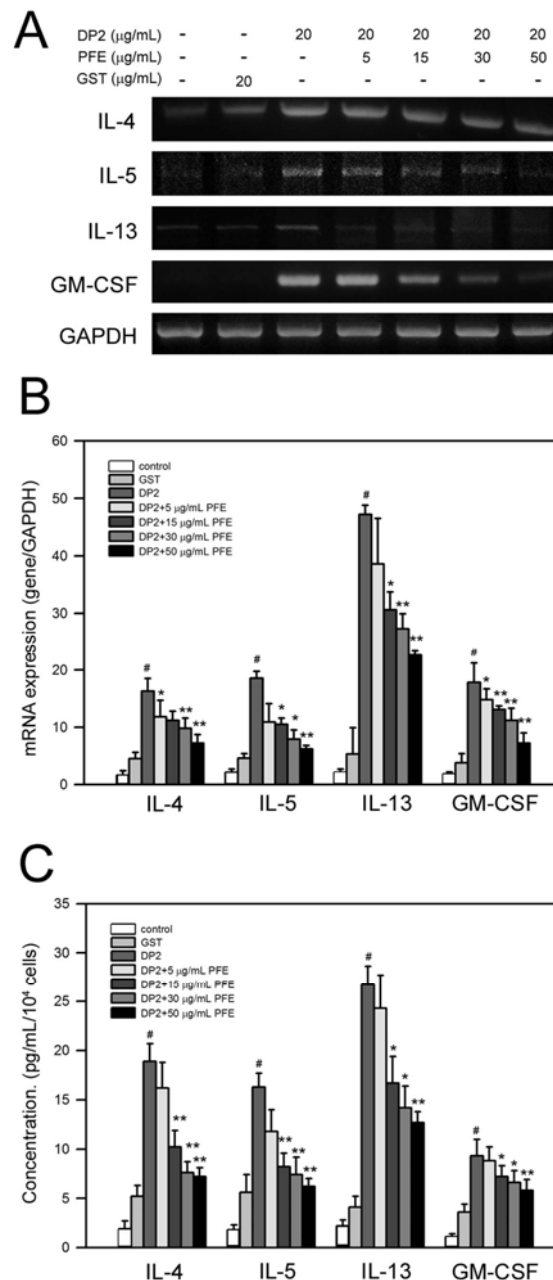


Figure 3. PFE inhibits DP2-induced mRNA expression and protein production of IL-6, IL-8 and MCP-1 in BEAS-2B cell. After 16 h-starvation, cells were pretreated with 5, 15, 30 and 50 $\mu\text{g/mL}$ PFE for 1 h and then stimulated with 20 $\mu\text{g/mL}$ DP2 for 4 h (mRNA expression) or 24 (protein production). mRNA expression was determined by RT-PCR (A), or by qPCR (B). Protein production was measured by ELISA (C). Quantitative data was shown as means \pm SD of three independent experiments. #, $P < 0.05$ as compared to GST alone; *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.005$ as compared to DP2 alone.

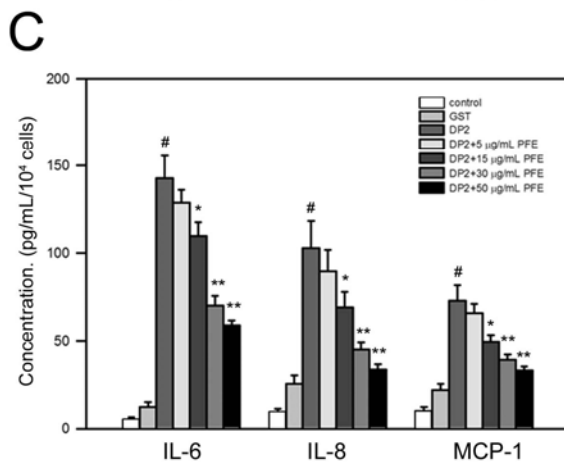
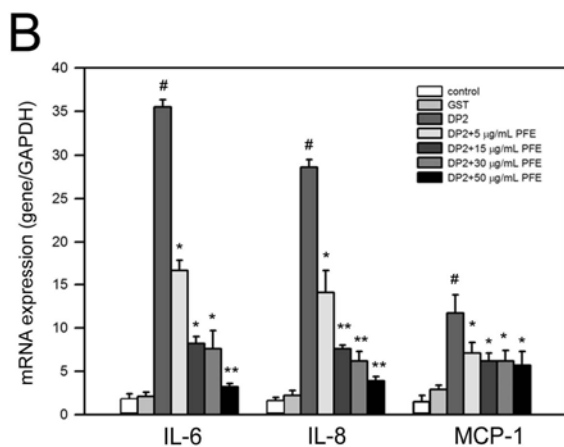
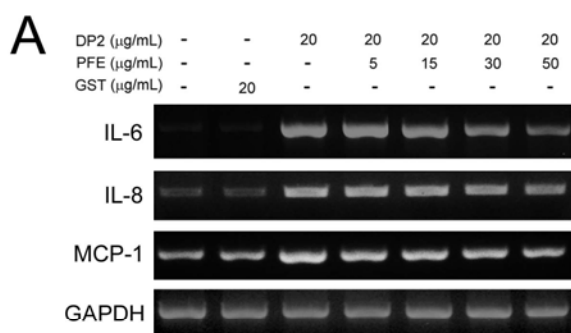


Figure 4. PFE suppressed DP2-induced phosphorylation of MAPKs in BEAS-2B cells. After 16 h-starvation, cells were pretreated with 5, 15, 30 and 50 $\mu\text{g/mL}$ PFE for 1 h and then stimulated with 20 $\mu\text{g/mL}$ DP2 for 30 min. The treated cells were lysed for analysis of phosphorylation by immunoblot using specific antibodies and chemiluminescence development. Quantitative data was performed by densitometric analysis and indicated as [phosphorylated protein/ total protein]. The ratios of GST treatments were used as internal control.

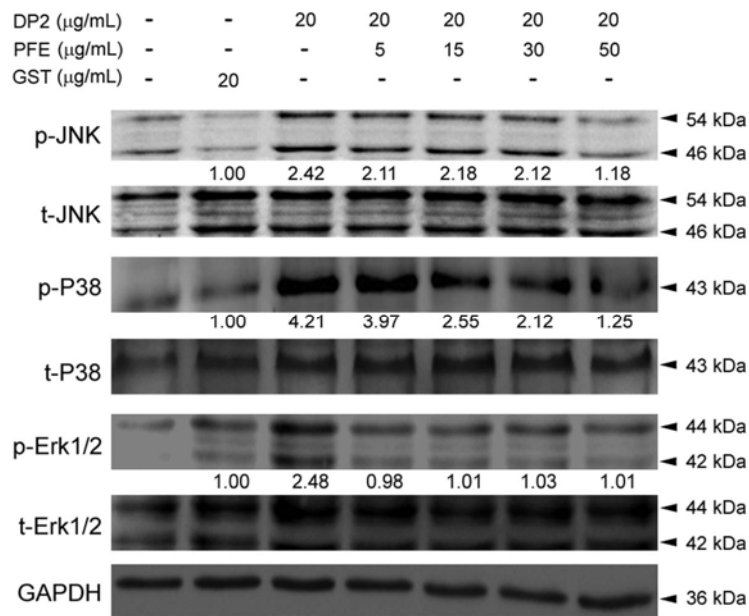
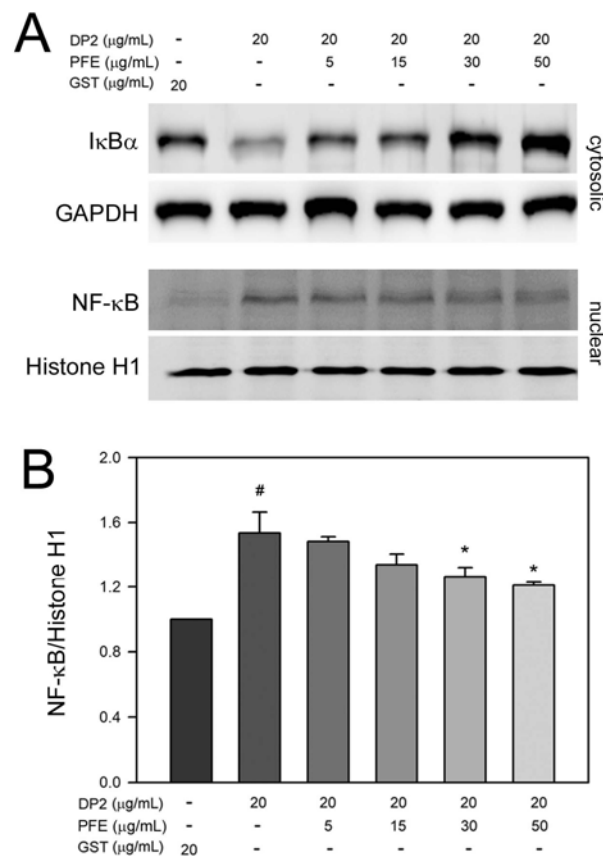


Figure 5. PFE elevated cytosolic I κ B α and diminished nuclear NF- κ B in DP2-stimulated BEAS-2B cells. After 16 h-starvation, cells were pretreated with 5, 15, 30 and 50 μ g/mL PFE for 1 h, and then stimulated with 20 μ g/mL DP2 for 30 min. The treated cells were lysed for (A) determination of cytosolic I κ B α , or (B) distribution of cytosolic and nuclear NF- κ B by immunoblot using specific antibodies and chemiluminescence development. Quantitative data was performed by densitometric analysis and obtained from three independent experiments. Level of GAPDH and histone H1 was used as cytosolic and nuclear control, respectively. #, $p < 0.05$ as compared to GST alone; *, $P < 0.05$ as compared to DP2 alone.



5. 参考文献

1. Ueda H, Yamazaki M. (1997) Inhibition of tumor necrosis factor- α production by orally administering a perilla leaf extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 1292-1295.
2. Makino T, Ono T, Muso E, Honda G, Sasayama S. (1999) Suppressive effects of *Perilla frutescens* on spontaneous IgA nephropathy in ddY mice. *Nephron* 83: 40-46.
3. Ueda H, Yamazaki M. (2001) Anti-inflammatory and anti-allergic actions by oral administration of a perilla leaf extract in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 1673-1675.
4. Shin TY, Kim SH, Kim SH, Kim YK, Park HJ, et al. (2000) Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Perilla frutescens*. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 22: 489-500.

5. Holgate ST. (2008) The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int* 57: 1-10.
6. Martin TR, Frevert CW. (2005) Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2: 403-411.
7. Bhat RK, Page K, Tan A, Hershenson MB. (2003) German cockroach extract increases bronchial epithelial cell interleukin-8 expression. *Clin Exp Allergy* 33: 35-42.
8. Osterlund C, Gronlund H, Polovic N, Sundström S, Gafvelin G, et al. (2009) The non-proteolytic house dust mite allergen Der p 2 induce NF-kappaB and MAPK dependent activation of bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 39: 1199-1208.
9. Röschmann KI, Luiten S, Jonker MJ, Breit TM, Fokkens WJ, et al. (2011) Timothy grass pollen extract-induced gene expression and signalling pathways in airway epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 41: 830-841.
10. Scott M, Roberts G, Kurukulaaratchy RJ, Matthews S, Nove A, et al. (2012) Multifaceted allergen avoidance during infancy reduces asthma during childhood with the effect persisting until age 18 years. *Thorax* 67: 1046-1051.
11. Platts-Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD. (1997) Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol* 100: S2-24.
12. Thomas WR, Smith W. (1998) House-dust-mite allergens. *Allergy* 53: 821-832.
13. Baeuerle PA, Henkel T. (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141-179.
14. Natarajan R, Fisher BJ, Jones DG, Ghosh S, Fowler AA, 3rd. (2002) Reoxygenating microvascular endothelium exhibits temporal dissociation of NF-kappaB and AP-1 activation. *Free Radic Biol Med* 32: 1033-1045.
15. Rahman I, Marwick J, Kirkham P. (2004) Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol.* 68: 1255-1267.
16. Liu YH, Tsai JJ. (2005) Production of salivary immunoglobulin A and suppression of *Dermatophagoides pteronyssinus*-induced airway inflammation by local nasal immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 138: 161-168.
17. Wang WC, Tsai JJ, Kuo CY, Chen HM, Kao SH. (2011) Non-proteolytic house dust mite allergen, Der p 2, upregulated expression of tight junction molecule claudin-2 associated with Akt/GSK-3beta/beta-catenin signaling pathway. *J Cell Biochem* 112: 1544-1551.
18. Park SY, Cho JH, Oh DY, Park JW, Ahn MJ, et al. (2009) House dust mite allergen Der f 2-induced phospholipase D1 activation is critical for the production of interleukin-13 through activating transcription factor-2 activation in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 284: 20099-20110.

國科會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)

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)

子計畫 8: 本研究建立以酒精萃取紫蘇葉高多酚萃取物 PLE 的標準化方法，並證實 PLE 可以抑制脂多糖 LPS 誘發大鼠巨噬細胞 RAW264.7 前發炎細胞激素(pro-inflammatory cytokines)的表現，以及其調控分子機制。接著，進一步直接以塵蟎主要過敏原 DP2 同時誘發人類呼吸道上皮細胞的過敏及發炎，發現 PLE 可以同時抑制過敏反應與發炎反應相關的前致敏細胞激素(pro-allergic cytokines)與前發炎細胞激素的表現。此外，成分分析顯示 PLE 抗過敏與抗發炎主要成分 PF1308 並非先前文獻中所發表的迷迭香酸(rosmarinic acid)，因此已著手進行其分子結構之鑑定與分析。綜合上述研究發現，我們認為 PLE 的確具有抗過敏與抗發炎的生物活性，對於開發為減緩呼吸道過敏與發炎之化學預防物質與保健食品有很大的潛力。未來我們將繼續完成 PF1308 的分子結構分析以及 PF1308 對於 OVA 誘導氣喘動物模式的功效分析，更進一步了解 PF1308 對於氣喘的改善與其分子機轉。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/10/24

國科會補助計畫	計畫名稱: 疾病化學預防物質開發及作用機轉研究
	計畫主持人: 周芬碧
	計畫編號: 99-2632-B-040-001-MY3 學門領域: 食品及農化
無研發成果推廣資料	

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：周芬碧		計畫編號：99-2632-B-040-001-MY3				計畫名稱：疾病化學預防物質開發及作用機轉研究--疾病化學預防物質開發及作用機轉研究	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	11	11	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	1	1	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	11	11	100%	人次	
		博士生	7	7	100%		
		博士後研究員	1	1	100%		
		專任助理	7	7	100%		
國外	論文著作	期刊論文	7	7	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	5	5	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	1	1	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	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	

國科會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）

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）

世界衛生組織發佈每年約 1700 萬人死於心血管疾病，其中冠心病以及中風約占 76%。根據衛生署發布 97 年國人十大死因，癌症為十大死因之首，心血管疾病—心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病分佔國人十大死因第二、三、五名，多數病因起源於肥胖，另外在退行性神經、免疫疾病，對國人影響甚鉅。因此，本計劃整合了上述重要疾病，欲共同開發預防物質並探討其作用機轉。各子計畫各執行一項疾病（包括退化疾病、代謝症候疾病、免疫疾病及惡性腫瘤）化學預防物質之醫學功能探討，並依衛生署公布之評估方法進行。進一步進行作用標靶或作用途徑之研究，目標為(1)開發預防或治療疾病物質；(2)增加學術研究；(3)成為中山醫大研發特色。又本計劃自 2010 年八月執行後在本校成立中草藥及保健食品研究中心，所有子計畫為中心基本成員，成為本校研發特色，多數發表成果於食品及農化科領域，使得在該領域 ESI 論文統計，本校排名第三（私校第一）。執行之具體成果國內及國際學術發表 16 篇，SCI 論文 7 篇及二項專利。