

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

桑椹保健食品之研究開發--桑椹萃取物及功能性成分延緩 糖尿病及肥胖引起眼部病變之研究(2/2) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型
計畫編號：NSC 99-2321-B-040-003-
執行期間：99年08月01日至100年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：李慧禎

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：鍾岱融
碩士班研究生-兼任助理人員：林雅萍

處理方式：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 100 年 10 月 31 日

目錄

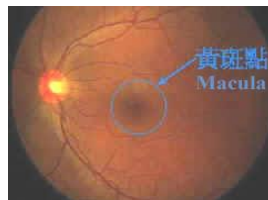
目錄.....	1
報告內容.....	2
前言.....	2
研究目的.....	8
文獻探討.....	9
研究方法.....	10
結果與討論.....	23
參考文獻.....	72
計畫成果自評.....	77

報告內容

一、前言

(一)、眼部退化病變—老年性黃斑部病變 (aged related macular degeneration, AMD)

黃斑部位於眼球正後方，視網膜中心；因為此處含有黃色色素，所以被稱為黃斑(如下圖)。影像會經由光線透過眼角膜及水晶體，聚焦在黃斑部而產生視覺。在黃斑部下方有一單層的六角形細胞—視網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE)在維持黃斑功能正常上扮演著重要的角色，其主要功能為(1)調節視網膜的新陳代謝，提供氧氣和養份並代謝廢物；(2) 吸收感光細胞無法吸收的光線 (尤其是藍光)，防止光線散射及對眼睛的傷害；(3) 提供感光色素所需的成份。因為黃斑部集中大部分的錐狀感光細胞，是視覺最敏銳的部位，負責閱讀或精細工作的視力。所以一旦遭受傷害或破壞，視力會急速減退。



世界衛生組織在 2001 年的調查指出，老年性黃斑部病變已經超過白內障，成為歐美國家視力不良的主因。根據美國眼科協會統計，60~70 歲之間的人，有 15 % 的人罹患此病，80 歲以上老年人則有高達 40 % 的盛行率。台灣地區亦統計出 65 歲以上老年人，每 10 人中即有 1 人罹患 AMD，AMD 發生率逐年增高。

老年性黃斑部病變真正的致病原因，至今仍然並不完全清楚，危險因子包括年齡、遺傳、性別（女多於男）、高血壓、心血管疾病、抽煙、及長時間強光照射，而破壞視網膜底層之 RPE 細胞層，產生了裂縫，之後又形成疤痕。不正常的新生血管經由這些裂縫，長到結疤組織中；可是這些新生血管特別脆弱，管壁容易破裂出血，血液滲漏到黃斑部的下方，會破壞黃斑部精細的組織，妨礙視力。

另一方面，視網膜色素上皮細胞可吞噬感光細胞中的錐細胞及桿細胞所釋放出的 outer segment，而感光細胞的 outer segment 含有豐富的多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs)，在高氧化壓力下的環境，多元不飽和脂肪酸容易因自由基而產生脂質過氧化，這些自由基會導致視網膜色素上皮細胞凋亡，當細胞凋亡，就無法供給感光細胞足夠養分，並且會造成脂褐質(Lipofuscin)的堆積，這些 lipofuscin 無法被清除而堆積在色素上皮細胞內，而產生所謂的 drusen，最後造成視力受損。在疾病的初期時，通常會沒有任何症狀產生，且只存在直徑<63 μm 大小的 drusen 及不正常的視網膜色素上皮細胞，在疾病中期，有一個較大或多個中等大小的 drusen(63 ~ 124 μm)，但並不會擴展到黃斑區，但在疾病的晚期時，通常有較大的 drusen (>124 μm)的產生，且會擴展至黃斑區，造成中央視力的的受損[7, 8]。並且，因為視網膜中豐富的不飽和脂肪酸，當陽光中的紫外線或是體內抗氧化能力不足時，體內相對會累積過多的自由基，因此有可能造成視網膜脂質過氧化作用且間接導致 RPE 細胞走向細胞凋亡，RPE 細胞凋亡則最終會導致 AMD 疾病的產生。(如下圖)

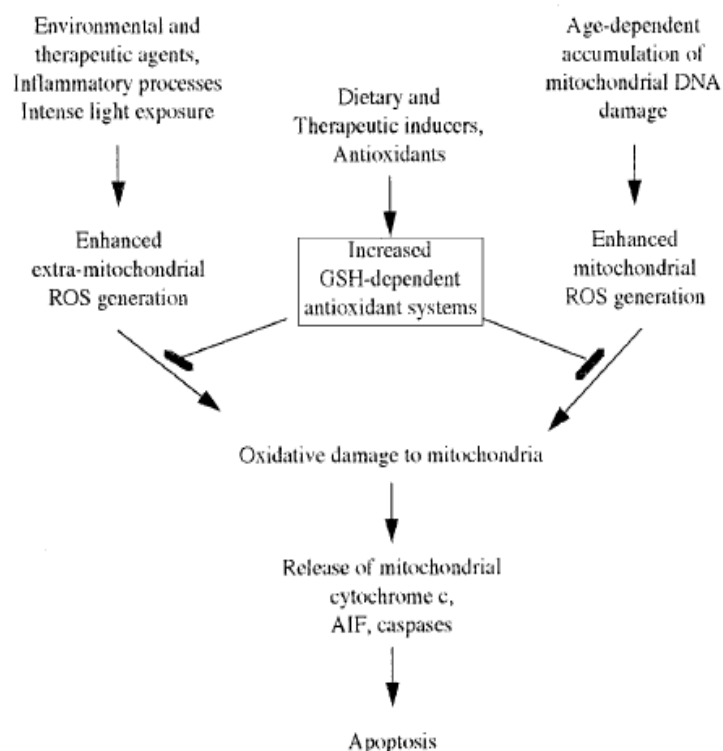


Fig. 9. Schematic model showing oxidative injury and protection of RPE. Different external and internal factors can damage mitochondria, induced ROS generation and lead to cell death. Dietary and therapeutic agents can exert their protect effect by enhancing the GSH antioxidant capacity of RPE.

目前臨床上的治療方法有下列幾種，其治療目的皆在控制或破壞網

膜下新生血管，阻止病情惡化：(1) 光動力療法(Photodynamic therapy) (2)雷射光凝固治療(laser photocoagulation therapy) (3) 經瞳孔熱療法(transpupillary thermotherapy) (4) 放射線 (5) 手術皆無法根治老年性黃斑部退化。由於視網膜色素上皮細胞易受到光及氧的傷害，在1994年Seddon *et al* 指出，在飲食中給予高含量的類胡蘿蔔素(carotenoids)，特別是深綠色蔬菜中的葉黃素(lutein) 及玉米黃素(zeaxanthin)，能夠降低產生老年性黃斑部退化的危險 [13]。在2001年有學者針對中度病程的AMD病人，經給予維他命C、維他命E及鋅(Zinc)後，其病患的症狀約減輕28%。所以抗氧化劑的服用能夠預防發生AMD的危險 [13, 14]。

(二)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein；LDL)與 AMD 之相關性

低密度脂蛋白為一直徑約 19-25 nm 的大球體結構，分子量約為 180-280 kDa，密度介於 1.019–1.063 g/ml，核心具有 170 個三酸甘油酯(Triglyceride，TG) 及 1600 個膽固醇酯(cholesteryl ester，CE)，表面有 700 個磷脂質單層(phospholipid monolayer) 及一個分子量約 500kDa 為 apolipoprotein (apoB-100)。LDL 含有約 600 個非脂化的膽固醇(unesterified cholesterol，UC)，約有三分之一在核心，三分之二分佈在表層。LDL 中含有約 2600 個脂肪酸，有一半是多元不飽和脂肪酸，其中主要的一種為亞麻油酸(linoleic acid)，少量為花生四烯酸(arachidonic acid)及二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid) [15, 16]。LDL 的不飽和脂肪酸可藉由內生性的抗氧化劑以保護及對抗自由基的攻擊及氧化。而每個 LDL 主要含有 6 個分子的 α -tocopherol 抗氧化劑，其餘少量的抗氧化劑為 g-tocopherol、carotenoids、cryptoxanthin、及 ubiquinol-10。血中 60~70% 的膽固醇是由低密度脂蛋白攜帶，其主要功能是将膽固醇由肝臟帶到週邊組織。LDL 的 apo B-100 可經由細胞上的 LDL 接受體(Brown/Goldstein LDL receptor)辨識，進入細胞分解代謝與應用 [17, 18]。

LDL 的氧化是一串複雜的化學性過程包含脂質及 Apo B 的修飾，主要是由於遭到一連串自由基的連鎖反應(chain reaction)。在脂質的修飾是由羥自由基(hydroxyl radical, OH)攻擊 LDL 中 cholesterol esters、phospholipids 及 triglycerides 的不飽和脂肪酸，造成脂質過氧化作用(Lipid peroxidation) 而形成脫氫過氧化物(hydroperoxides)，再斷裂形成醛(aldehydes) 如 malondialdehyde (MDA)、4-hydroxynonenal 及酮(ketones) 分子。在 apo B 的修飾其活性氧物質(Reactive

oxygen species) 會使apo B斷裂成 14 kDa到 500 kDa的片段。此斷裂apo B片段上的離胺酸 (lysine) 及組胺酸 (histidine) 的 ϵ -amino groups 會和氧化產物的醛類如：malondialdehyde (MDA)、4-hydroxynonenal交聯 (cross-linking)而產生Schiff base，使LDL上的正電荷減少而負電荷增加。這種受到氧化的LDL不會被LDL接受體所辨識，而會跟清除接受體(scavenger receptors)有高親和力。

氧化型LDL(Oxidized low-density lipoprotein，oxLDL)的產生主要可經由3種方式，分別為：

(1)在過渡金屬(transition metals)存在下的自動氧化。一些研究指出，在體外可藉由金屬離子如銅(copper)或鐵(iron)離子的存在，可以造成LDL的氧化。

(2) 細胞調節的氧化。在一些研究指出，內皮細胞 (endothelial cells)，巨噬細胞 (macrophage)、血管內膜平滑肌細胞 (arterial smooth muscle cells)、單核細胞 (monocyte)都可以產生自由基而氧化修飾LDL。

(3) 血漿中酵素所調節的氧化。在血管中的一些細胞會產生myeloperoxidase、lipoxygenases (15-Lipoxygenase)、NADPH oxidases及xanthine oxidase，這些酵素能產生ROS，使LDL進行氧化修飾 [19-22]。

視網膜有兩個血液供應系統，為脈絡膜微血管 (choriocapillaris) 及內層視網膜血管能提供營養給視網膜色素上皮細胞及光感受器。血液中的LDL可透過脈絡膜微血管通過Bruch's membrane到達視網膜上層色素細胞 [23]。血液中LDL可藉由細胞表面的LDL接受器 (LDL receptor) 或scavenger receptors如CD36進入細胞中，LDL receptor會辨視Apo B-100蛋白並與之結合，而CD36 receptor 會辨視LDL外鞘的氧化磷脂質。LDL會和clathrin-coated pits結合，coated pits凹陷將LDL包圍，藉由endocytosis的方式進入細胞中，隨後LDL receptor將LDL釋出，可經Lysosome將LDL分解釋放出膽固醇，以供細胞使用[24]。研究指出，在老年黃斑部退化病人的眼睛及視網膜色素上皮細胞中，有LDL及scavenger receptors的表現[25, 26]。隨著年紀的增加，布魯赫氏膜 (Bruch's membrane)會聚集脂質及膽固醇，包括脂化及未脂化的膽固醇，尤其聚集在黃斑處。Bruch's membrane位於RPE的表面，是一層很薄的結締組織。在老年性黃斑部退化的疾病，經由組織病理學的切片結果指出，黃斑處的Bruch's membrane有脂質及膽固醇的聚集[27]；以及LDL的脂蛋白原Apolipoprotein B的聚集。視網膜色素上皮細胞可透過高氧化性壓力的環境而使脂蛋白進行氧化修飾。研究也指出，視網膜色素上皮細胞能

夠內噬oxLDL因而造成photoreceptor 轉換及lysosomal功能的改變[28]。Curcio et al.證明此區脂質的聚集相似於動脈內層的情形[29]。在一些研究也指出，在AMD病人中組織病切的結果相似於動脈粥狀硬化(Atherosclerotic)；此外，造成動脈粥狀硬化的危險因子，如：高血壓、抽菸及年紀，也是造成AMD的危險因子。一些研究也指出，通常有心血管病史或心血管疾病症狀的人，發生AMD的機率也比較高[30]。而當體內有過多的低密度脂蛋白時，容易造成動脈粥狀硬化的發生，低密度脂蛋白在動脈粥狀硬化的病程上扮演一重要的角色[31]。

(三)、糖尿病 (Diabetes)與 oxLDL

根據世界衛生組織估計，全球現有一億四千萬糖尿病患，而十年後也就是西元2020年約增至三億人。而台灣現有糖尿病患約九十萬人，但二十年後糖尿病人數將會倍增至一百八十萬人。其中第二型糖尿病占所有糖尿病患者人口96.5%，而第一型糖尿病占所有糖尿病患者人口3.5%。如此眾多的糖尿病患經常遭遇的問題即為全身性的併發症，包括心血管、腦血管、神經系統、腎病變及眼球微血管病變，其中眼球微血管病變（即視網膜病變）更是成年糖尿病患眼盲之主要原因。

在臨床的治療上發現，糖尿病患者視網膜病變中最為主要者有兩種，其一為視網膜血管通透性增加；其二為進行性視網膜血管阻塞，這些都伴隨視網膜血管新生並易於導致組織缺氧及梗塞。關於其機轉，目前並不清楚，而在臨床治療策略上，為了控制糖尿病所造成的視網膜病變症狀多輔以改善視網膜血液循環藥物如atorvastatin。另一方面，在最近文獻中指出由於高濃度葡萄糖長期存在於視網膜細胞中，將增加nonenzymatic glycation and advanced glycation end products、氧化壓力、PKC活性增加而最終導致視網膜病變之發生，因此，亦有另一類策略為增加抗氧化能力以減低視網膜病變。

在2004年，Ceriello及Motz提出”氧化壓力 (oxidative stress) “在糖尿病患及心血管疾病間之關係 (65)。當血液中血糖及脂肪酸過高，會使acetyl-CoA增加而導致citric acid cycle活性增加並產生過多的mitochondrial NADH及reactive oxygen species (ROS)，過多活性氧所形成的自由基易於使血中的LDL氧化形成氧化型低密度脂蛋白 (oxidized LDL)。oxLDL與眼部的病變已有臨床資料證實，而保健食品經由減低oxLDL產生以降低糖尿病眼部病變的證據則需再進一步釐清。

(四)、肥胖 (Obesity)與 oxLDL

世界衛生組織於 1996 年正式將肥胖列為是一種慢性疾病，2005 年也估算出全球約有 16 億成人是屬體重過重，而屬肥胖者則超過 4 億人。肥胖會造成高脂血症、高血壓、糖尿病和動脈硬化等，增加相關慢性病的罹病率和死亡率。現今研究指出，肥胖普及率會隨著男人及女人的年齡增加而增加，且膽固醇、甘油三酯、極低密度脂蛋白、低密度脂蛋白膽固醇、動脈硬化指數均明顯升高，高密度脂蛋白膽固醇及維生素 E 明顯下降。近年來透過流行病學的調查顯示肥胖者之 oxLDL 明顯增加，由於前述之 oxLDL 與眼部病變的相關性極為密切，因此透過減低 oxLDL 以減緩肥胖引起的眼部病變須進一步被證實。

(伍)、桑葚

桑葚 (mulberry) 是一種天然植物桑科落葉喬木“桑” (Morus alba L.) 的果實，其科、屬、種名為 MORACEAE Morus spp.。桑葚嫩時色清、味酸；成熟時紫黑、多汁。桑葚味甘酸、性涼，具滋陰養血、生津止渴、潤腸通便等作用，自古即被用來防治頭暈、目眩、盜汗、消渴、腸燥、便秘等現象，許多古籍記載了桑葚的藥用價值，但是在科學研究上卻缺乏科學證據來證實。而由桑葚果實顏色為深度的紫紅顏色，顯示出桑葚具有豐富的色素成分，而許多的色素成分被證實是一種很好的抗氧化物質。由 Toscano 和 Lamonica (1) 鑑定出桑葚的色素成分為花色苷 (awobanin)，而桑葚的花色苷為 cyandin 3-glucoside 及 cyandin 3-rutinoside，另外在我們研究是先前研究也發現桑葚亦含有 pilargonidin 3-glucoside 及 pilargonidin 3-rutinoside (如下表)。花青素廣泛存在於許多食用的植物果實中，不同的花青素具有不同的顏色，其中包含了：藍色、紫色或紅色等，在植物的果實中通常含有許多不同種類的花青素，並使其具有各種不同的色澤，如：草莓、葡萄及櫻桃等。一些具有糖基的糖化 delphinidin 與 cyanidin 也發現存在許多的植物中。在營養食品中添加入花青素萃取物，可以有效的使人們攝取到數個毫克的花青素。根據統計，在美國每人每天會攝取 180-250 毫克的花青素。現今，由天然植物果實中所萃取出具有高度花青素含量產物也廣泛的被接受。對於花青素的應用方面，被認為對於許多的疾病是具有有效的預防作用，如：糖尿病視網膜病變及的微血管循環疾病等，此外也具有抗發炎及化學預防作用的功

效。已有許多報告指出花青素具有抗氧化活性 (12-16) 抗致突變性 (17-19) , 抗癌作用 (20-22) 及降低脂質過氧化作用和DNA 損傷 (23) 。此外桑椹含有豐富的flavonoides (如quercetin , gossypetin , hibiscetin) 及原兒茶酸 (protocatechuic acid) , 這些成份都具有抗氧化、防癌、抑制心血管病變(2~11) 。

Table 2-- Retention time, UV-vis, and mass spectral characteristics for the anthocyanic compositions of MWEs and MACs.

Peak ^a	Compound	Rt ^b (min)	λ (nm)	[M+H] ⁺ ^c	MS ^{2,d}
1	cyanidine-3-glucoside	24.9	514, 279, 245, 327	449	287
2	cyanidine-3-rutinoside	25.8	516, 280, 245, 327	595	449, 287
3	pelargonidin-3-glucoside	26.9	497, 270, 430 sh	433	271
4	pelargonidine-3-rutinoside	27.7	505, 279, 432 sh	579	271, 433

^aPeak numbering as in Figure 1.

^bRt = retention time.

^c[M+H]⁺ = positively charged molecular ion.

^dProduct ion analysis of molecular ion.

JOURNAL OF FOOD SCIENCE—Vol. 73, Nr. 6, 2008

二、研究目的

依據先前的研究發現，腦血管疾病、心臟疾病、糖尿病接與脂質代謝相關，在此類疾病併發症的發生過程中，脂質不當堆積所引起的脂質毒性 (lipotoxicity) 以及衍生出之 oxidized low density lipoprotein (oxLDL) 可能為引起併發症的重要原因。我們在動脈粥狀硬化的兔子眼部發現有脂質大量堆積的現象，我們也發現糖尿病動物血脂肪甚高且眼部有嚴重白內障及視網膜排列不規則的現象，因此，降低 lipotoxicity 及 oxLDL 對眼部的影響，應可有效抑制代謝性疾病引起眼病變的併發症。另外。而由食物或天然植物中找尋有效的抑制 lipotoxicity 及 oxLDL 並延緩眼病變併發症的成分更為未來發展的方向。在國外文獻中已有許多相關天然物被研究，如山桑子、藍莓等，但在國內則尚未有完整研究指出本土天然物對眼睛保健之功效。先前研究已分析出桑椹具有花青素等天然抗氧化成分，並在花青素萃物的功效上證實其具有抑制脂質過氧化、oxLDL 及 foam cell 形成的能力。本研究室以桑椹中成分 protocatechuic acid 及 cyanidin 預處理人類視網膜色素上皮細胞 (Adult retinal pigmented epithelium cell, ARPE-19) 後加入 oxLDL，發現桑椹成分可有效降低 oxLDL 引起的 cell toxicity。

本研究目的:

1. 桑椹水萃物(MWE)、桑椹花青素萃物(MAE)對糖尿病或肥胖造成之脂質代謝異常引起的眼病變有無延緩效果。
2. MWE、MAE 延緩脂質代謝異常引起的眼病變與 oxLDL 之相關性及可能機轉。
3. 評估發展桑椹萃物成為眼睛保健食品之可能性。

三、文獻探討

糖尿病是種慢性疾病，且會引起許多的併發症，包括：腦血管病變、心血管病、腎臟病、小血管及神經方面的疾病。在這些併發症中，除卻腦血管病變、心血管病及腎臟病等致死併發症外，尚有易於早期發生卻容易被忽略之眼部病變，特別是視網膜之小血管增生及缺氧等症狀。故對於糖尿病患者飲食及醫療的照顧，絕對不可疏忽，尤其是早期糖尿病患者。已經有研究證實，引起糖尿病併發症的可能原因是：氧化壓力 (oxidative stress)¹、糖化作用(glycation) 及脂質代謝的異常²。但良好的的血糖控制及適時的針對症狀進行改善，可以降低及延緩這三個原因的發展。

糖尿病的視網膜病變是糖尿病的主要併發症之一且往往導致眼盲^{3,4}，許多學者致力於其病因之研究，卻仍無法完全釐清。在臨床上發現，糖尿病視網膜病變在臨床前期即會出現，現象為微血管增生的發展並增加血管通透性，另外會出現capillary basement membrane thickening的現象，這是因為細胞外基質的成分過度推積的結果⁵⁻⁷。在臨床前期之後期內皮細胞及pericyte開始流失而導致細胞死亡進而發展成acellular capillaries^{8,9}。已有研究證實給予適當的細胞外基質如fibronectin、collagen type IV alpha 3 (Col4a3)、laminin beta 1 (lamb 1)等有助改善視網膜病變的現象^{8,9}。這些證據顯示basement membrane thickening在糖尿病視網膜病變應是一個偵測的指標，且改善此現象將對糖尿病視網膜病變的預防應具有相當重要的作用。

近期亦有學者針對糖尿病的特有蛋白AGEs進行與細胞外基質相關的研究，結果發現AGEs確實會使retinal capillary basement membrane thickening增加，當抑制AGEs後則會改善此現象。由於視網膜及腎臟細胞外基質的調節皆顯示與connective tissue growth factor (CTGF)有關，因此最近也有學者針對CTGF的調節進行研究，結果也顯示糖尿病視網膜病變確然與此路徑之調節相關¹⁰⁻²²。

另外，不論細胞實驗或病人的檢體中均發現高濃度葡萄糖會導致細胞凋謝死亡，與凋謝死亡相關的蛋白如 caspase-3、Fas、Bax、BadAktMcl-1cytochrome c apoptosis inducing factor 等皆在糖尿病的視網膜病變中顯示其變化會導致視網膜細胞凋謝死亡²³⁻²⁹。細胞凋謝是一種細胞受環境刺激後，在基因調控之下所產生的自然死亡現象，故亦稱之為程序性細胞死亡 (programmed cell death)，與細胞壞死 (necrosis) 有所區別。細胞壞死一般被認為是細胞在受物理傷害後所造

成的惡性死亡，其特徵包括胞器遭受嚴重破壞以及細胞膜喪失其完整性等，然而這些現象都不是在基因調控之下所產生的。而在發生細胞凋亡的細胞中，可發現胞膜及胞器相對完整，但細胞皺縮、細胞質產生小泡囊、染色質濃縮(chromatin condensation)以及 DNA 斷裂(internucleosomal DNA ladder)等現象³⁰⁻³⁸。

細胞凋亡過程受到目前已被陸續發現的一些基因的調節包括：

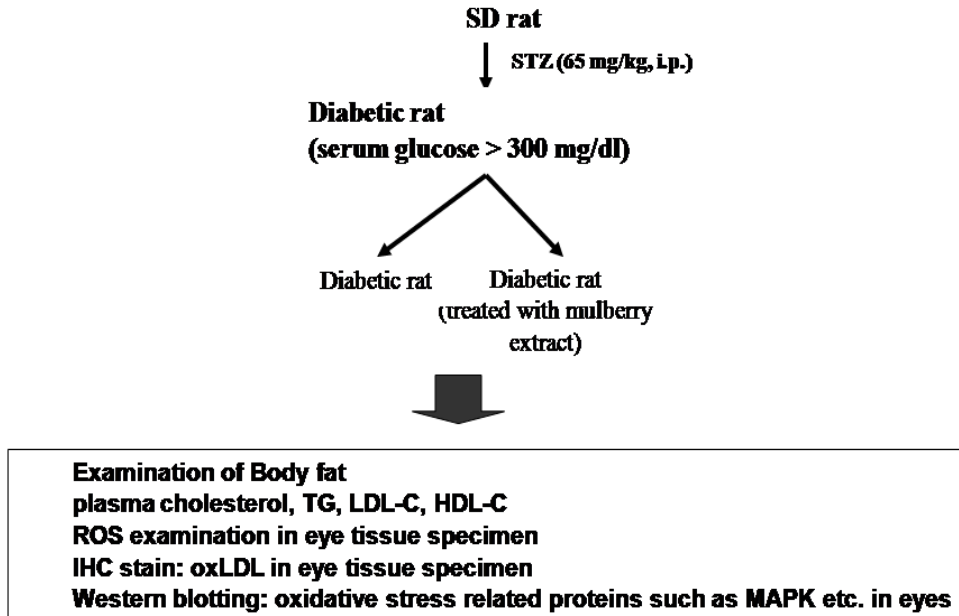
- (1) 其導致細胞凋亡的因子，例如：**p53**，則會使細胞內 DNA 損傷，這也被認為其可抑制癌症的原因。
- (2) 在細胞凋亡過程中，在基因轉錄調控上扮演重要角色，包括 **c-myc**、p53、E2F、c-fos 等。
- (3) **Bcl-2 家族蛋白**在細胞凋亡扮演十分重要的角色，包括抑制細胞凋亡因子及促進細胞凋亡因子。Bcl-2 具有抑制細胞凋亡，促進細胞存活的活性，屬抗凋亡蛋白，此類尚有 Bcl-X_L、Bcl-w 及 Mcl-1 等，均屬於凋亡抑制因子，而 Bad、Bak、Bax、Bid、Bcl-X_S 等則與 Bcl-2 蛋白結合，形成異二聚體而使其失活，故可促進細胞凋亡。細胞是否進入凋亡途徑，取決於 Bcl-2 家族中凋亡因子(Bax、Bad、Bcl-X_S)和抗凋亡因子(Bcl-2、Bcl-X_L)之間的複雜的平衡狀態。

在人體視網膜中有大量不飽和脂肪酸成分，因此很容易受到自由基(如含氧或含氮自由基)的攻擊，因此造成脂質過氧化作用傷害視網膜，進而造成眼睛功能受損。又茶葉中茶多酚類物質(如 EGCG 物質等..)，已被證明具有清除活性氧(ROS)和活性氮(RNS)之自由基及抑制 DHA 不飽和脂肪酸脂質之過氧化，因此可預防視網膜色素上皮(retinal pigment epithelium,RPE)走向細胞凋亡，進而預防視網膜病變(包括年齡相關性黃斑點退化或是青光眼之疾病)；另外因茶多酚類物質具有清除自由基之功能，因此可降低體內抗氧化酵素(如 SOD, GSH 等)之消耗，故間接更能提高對眼睛組織的抗氧化能力。

四、研究方法

第一年: 探討桑葚萃物對糖尿病眼病變的延緩作用

【實驗流程圖】



桑椹萃物及其成分分析

桑椹萃物及其成分分析接由子計畫依同一方式萃取，本子計畫則承接萃物進行以下研究。

糖尿病鼠的誘導及萃取物給予

在試驗上我們根據，Srivastava等人之方法加以修飾進行，利用STZ以65 mg/kg的劑量以i.p.的方式由腹腔給予注射入大白鼠體內，在一週後血糖上升至300 mg/dl以上的認定為糖尿病之狀態，此為定義為day 0，將誘導出的大鼠隨機分組，每組10隻，其中一組為誘導組，另有三組桑椹萃物濃度分別為0.5 %、1.0 %、2.0 % (飼料中所含百分比)，添加於飲水中給予。試驗為期12週。試驗進行時每6周由尾靜脈抽血觀察血糖、總膽固醇、三酸甘油脂的濃度。

視網膜檢體之採取

以斷頸犧牲後取出整顆眼球，先將水晶體中液體以針頭吸出，分離視網膜部分，將檢體分別置入 (1) -80°C 冷凍；(2) 福馬林；(3) 電顯液中，以進行後續試驗。

西方墨點法分析蛋白

在蛋白質的研究中，由生物檢體、細胞或細菌培養液萃取出蛋白質的方法有許多種，共同的步驟是弄碎樣品、再用振盪等方法使其均質化：

將要取的組織置於冰上，以50C.C.離心管，加入適量的RIPA buffer及protease inhibitor，再加入sample開始研磨，為保持低溫，在離心管外可套入一內置碎冰的燒杯，以免研磨溫度過高，造成蛋白的分解。研磨後以ddH₂O清洗研磨鑽後再進行下一sample的研磨。將研磨均勻的sample取到eppendorf，先在4°C冰箱中震盪30分鐘，然後置入高速離心機(10000rpm，4°C，10mins)，之後小心取出sample，避開下層的沉澱物及上層的油脂，將取出的組織液儲存於-80°C冰箱，並加以定量分析。其後進行西方墨點法。

電子顯微鏡觀察

將組織固定於3.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer (pH7.4)中1小時，而後固定於2% osmium tetroxide，經過酒精脫水及epoxy resin包埋後，以1um切片並以toluidine染色以觀察capillary並鑑定糖尿病鼠retinal capillary basement membrane thickness 的現象。

病理組織切片

將組織製成病理切片，以觀察病理現象；其切片製作過程如下：

1. 固定 (fixation)
2. 脫水 (dehydration)
3. 澄清 (clearing)
4. 浸潤 (infiltration)
5. 包埋 (embedding)
6. 連續切片 (serial section)
7. 染色 (stain)
8. 封蓋 (mount)

視網膜病變相關之蛋白觀察 (免疫組織染色)

本實驗利用免疫染色方法進行，採用ABC stain，步驟為先將檢體用acetone fix 3-5 mins，並架於水平有溼潤的盒中，加0.1% sodium azide: H₂O₂= 9:1 之

solution 100 μ l 靜置15 mins 後以PBS wash 3 times，加5% goat serum 靜置 10 mins 後以PBS wash 3 times，加 antibody於室溫靜置30 mins 後以PBS wash 3 times，加link antibody reagent 1 滴靜置10 mins 後加streptavidin reagent 1 滴靜置 15mins 後以PBS wash 3 times，加(9.5 ml Tris+ 0.5 ml AEC + 100 μ l 3% H₂O₂)之solution 100 μ l 靜置10-15 mins 後以PBS wash 3 times，加Hemto mayer/s: DDW = 1:1 solution 靜置1 mins 後以PBS wash 3 times，加glyceringelatins 一滴，蓋上蓋玻片，晾乾。

糖尿病造成視網膜病變指標分析

由於與 oxLDL 及 CD36 在糖尿病病患體中濃度，與導致糖尿病眼病變上有密切的關係，在此我們擬利用免疫組織化學染色觀察，方法如上，使用 oxLDL 及 CD36 為一次抗體，觀察 oxLDL 及 CD36 在視網膜組織上的分布與堆積表現。

抗氧化分子 Glutathione(GSH)的測定：

利用OPT (o-phthalaldehyde)為螢光呈色劑與GSH 反應形成螢光物質後測定。取 500 μ l 的檢體(眼睛組織均質液)，加入 4.5 ml pH 8.0 之 phosphate-EDTA，混合後再取0.1 ml 加入0.9 ml pH 8.0之phosphate-EDTA，與0.1 ml o-phthalaldehyde (1mg/ml in alcohol) 均勻混合避光15分鐘後，於螢光分光光度計Ex/Em 350/420 nm測定。結果以 μ g GSH/mg protein 表示。

抗氧化酵素觸酶 (catalase)之測定：

過氧化氫酶分子量約 240,000Da，以 ferri protoporphyrin (haematin) 為 active component 將 H₂O₂ 分解成水(H₂O) 及氧 (2H₂O₂→2H₂O+O₂)。酵素活性的測定係是以 H₂O₂ 為受質測定 H₂O₂ 減少的速率。取 50 μ l pH 8.0 之 Tris-HCl-EDTA，加上 H₂O₂ (10 mM, 900 μ l) 與 30 μ l ddH₂O 均勻混合，置於 37°C 水浴中 10 分鐘，加入代測檢體(眼睛組織均質液)20 μ l，以分光光度計紀錄在 OD₂₄₀ nm 下 1 分鐘內吸光值下降之情形，每 10 秒為間隔紀錄一次，計算酵素活性，結果以 Int. units /mg protein 表示。

第二年：探討桑葚萃物對肥胖引起眼病變的延緩作用

【實驗流程圖】

In vivo



**High Fat Diet
(10%corn oil, 2%cholesterol)**

Obese Hamster

Control

Treat with MWE

8 weeks

(0.5%, 1%, 2%)

- Body Weight, Liver weight
- Plasma (AST, ALT, HDL ,LDL, triglycerides and total cholesterol)
- Liver cholesterol, triglycerides, HDL, LDL

In vitro



ARPE-19



桑椹花青素萃物(MAE)



觀察ARPE-19 apoptosis

以及型態改變情形

In Vivo study

1. 桑椹水萃取物 (MWEs) 製備

桑椹品種選自於”苗桑一號”。取桑椹 (*Morus alba* L.) 粉末與二次水以 1 (果實) 比 2 (二次水) 比例，以果汁機攪碎成桑椹汁，經離心 (3000 rpm, 15 min) 去除果渣雜質後得澄清果汁，再以減壓濃縮機 (HETO VR-MAXI STA) 濃縮，收集濃縮液約至 500 毫升，濃縮液再經真空冷凍乾燥機乾燥 (LABCONCO) 去除水分，乾燥產物即為 MWEs，儲存於-20°C 備用。MWEs 產率約為 4-5%，取乾燥產物可配製不同濃度之桑椹水萃取物溶液，以進行實驗。

2. 動物來源&肥胖動物誘導

由國家實驗動物中心提供 6-8 週齡(70-100g) 、雄性 Hamster 倉鼠。動物飼養條件為自動光照控制(12 小時白晝、12 小時黑夜) 、室溫控制於 25°C 、相對濕度 55%、動物給與自來水及標準飼料，自由進食和飲水。一週適應期後，在試驗上我們利用飼料中添加 10% corn oil 和 0.2% cholesterol 以誘導動物肥胖，桑椹萃取物則同步給予。動物分組為每組 8 隻，分別為正常組、代糖組、誘導組，另有三組桑椹萃取物濃度分別為 0.5%、1%、2%(飼料中所含重量百分比)，添加於飲水中給予。試驗為期 8 週，犧牲後則進行體脂肪的測定。

3. 視網膜檢體之採取

以斷頸犧牲後取出整顆眼球，先將水晶體中液體以針頭吸出，分離視網膜部分，將檢體分別置入 (1) -80°C 冷凍；(2) 福馬林；(3) 電顯液中，以進行後續試驗。

4. 血液生化值檢測

將血液以 10 分鐘、3000rpm 離心，之後取出血清的部分進行檢測，檢測的項目包含：

(1) AST 的檢測：AST 在催化把 aspartate 得胺基轉移到

α -ketoglutarate 上轉換成 glutamate 和 oxaloacetate。而 oxaloacetate 在 NADH 的存在下受到 malate dehydrogenase 的催化反應還原成 malate，同時也把 NADH 氧化成 NAD 在波長 340nm 下測量由 NADH 氧化成 NAD 所減少的

吸光度和 GOT 的活性成正比。

(2)ALT 的檢測:ALT 在催化反應時，會將 alanine 的胺基轉移到 α -ketoglutarate 上，轉換成 glutamate 和 pyruvate。而 pyruvate 在 NADH 影響下受到 lactate dehydrogenase 的催化還原成 lactate，同時把 NADH 氧化成 NAD，在波長 340nm 下測量由 NADH 氧化成 NAD 所減少的吸光度和 GPT 的活性成正比。

(3)其餘尚有 TCHO(total cholesterol)，TG(triglycerol)，HDL(high-density lipoprotein)，LDL(low-density lipoprotein)

5. 病理組織切片

將組織製成病理切片，以觀察病理現象；其切片製作過程同第一年。

6. 組織均質與蛋白純化

取組織 1g 置於離心管中並加入 RIPA 及 protease inhibitor 混合液(比例 100:1)，將離心管置於冰上以均質機研磨。將研磨後的組織液分裝到 eppendorf 中，於 4°C 冷房震盪 30 分鐘後，置於高速離心機(4°C、10000rpm、10mins)，取出中間清澈的液體，儲存於 -80°C 冰箱中。

7. 肝臟&眼睛 TBARs assay

使用不同濃度 1,1,3,3-Tetramethoxypropane(TEP)作為標準液並畫出標準曲線，進行肝臟脂質過氧化的定量程度。取稀釋 10 倍的肝臟組織液 200 μ l，加入 200 μ l TCA buffer(Trichloroacetic acid)混合後，於 4°C 下離心(10000rpm、30mins)後，取上清液 200 μ l 再加入 200 μ l TBA buffer(Thiobarbituric acid)混合後，於 95°C 下加熱並避光反應 40 分鐘後，以螢光光度計在波長 532nm/600nm 下測定吸光。

8. 總膽固醇測定

將樣品與膽固醇酵素作用(表一)，以分光光度計 500 nm 測定吸光值，依據說明書上提供計算公式，換算其含量。

表一：

Pipette into cuvettes	Reagent blank	Sample or STD
Sample/ STD	----	10 μ l
RGT	1000 μ l	1000 μ l

Mix, incubate 10 min. at 20-25°C or 5 min. at 37°C. Measure the absorbance of the sample /STD against the reagent blank (ΔA) within 60 min.

計算公式：

$$C=200 \times \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{std}}} \text{ (mg/dl) or } C=5.17 \times \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{std}}} \text{ (mmol/l)}$$

9. 三酸甘油酯測定

將樣品與三酸甘油酯酵素作用(表二)，以分光光度計 500 nm 測定吸光值，依據說明書上提供計算公式，換算其含量。

表二：

Pipette into cuvettes	Reagent blank	Sample or STD
Sample/ STD	----	10 μ l
RGT	1000 μ l	1000 μ l
Mix, incubate 10 min. at 20-25°C or 5 min. at 37°C. Measure the absorbance of the sample /STD against the reagent blank (ΔA) within 60 min.		

計算公式：

$$C=200 \times \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{std}}} \text{ (mg/dl) or } C=5.17 \times \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{std}}} \text{ (mmol/l)}$$

10. 低密度脂蛋白測定

將樣品與低密度脂蛋白酵素作用(表三)5分鐘後加入 substrate，反應5分鐘後以分光光度計 555nm 測定。

Pipette into cuvettes	Reagent blank (RB)	CAL/ sample
Water	10 μ l	---
CAL/ sample	---	10 μ l
ENZ	750 μ l	750 μ l
Mix gently and incubate for exactly 5 min at 37°C		
SUB	250 μ l	250 μ l
Mix gently, incubate at 37°C and read the absorbance ΔA of CAL/ samples against RB after 5 min. $\Delta A_{\text{cal/sample}} = A_{\text{cal/sample}} - A_{\text{RB}}$		

計算公式如下：

$$C_{\text{sample}} = C_{\text{CAL}} \times \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{std}}} \quad (\text{mg/dl})$$

Conversion factor : (mg/dl)x0.02586= C(mmol/l)

11. 高密度脂蛋白測定

將樣品與低密度脂蛋白酵素作用(表四)5分鐘後加入 substrate，反應5分鐘後以分光光度計 593nm 測定。

Pipette into cuvettes	Reagent blank (RB)	CAL/ sample
Water	10 μ l	---
CAL/ sample	---	10 μ l
ENZ	750 μ l	750 μ l
Mix gently and incubate for exactly 5 min at 37°C		
SUB	250 μ l	250 μ l
Mix gently, incubate at 37°C and read the absorbance ΔA of CAL/ samples against RB after 5 min. $\Delta A_{\text{cal/sample}} = A_{\text{cal/sample}} - A_{\text{RB}}$		

計算公式如下：

$$C_{\text{sample}} = C_{\text{CAL}} \times \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{std}}} \quad (\text{mg/dl})$$

Conversion factor : (mg/dl)x0.02586= C(mmol/l)

In Vitro study

1. 細胞培養(Cell culture)

本實驗所用的細胞來自 American Type Culture Collection(ATCC)購買的 Adult Retinal Pigment Epithelium-19 cell(ARPE-19)，為人類視網膜色素上皮細胞株。將解凍後的細胞培養在 DMEM/High glucose 培養液中，培養液中加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum)、1% Penicillin、1% Pyruvate 及 2% glutamine，培養於 5% CO₂、37°C 及飽和水蒸氣的培養箱中，每兩天更換一次培養液。

2. 低密度脂蛋白 (LDL)的分離

血清取自於捐血中心健康志願者的新鮮冷凍血漿(Fresh Frozen Plasma)作分離。在每一專用的離心管中取 6mL 的血清加入 2.1mL 的 0.5M NaCl 及 0.3mM EDTA 混合液(Ph 7.4)，以 Bechman 超高速離心機 60000 rpm 在 10°C 下離心 15 分

鐘，將上層乳糜微粒 (Chylomicron) 吸取掉(約取 2.1mL)，之後再加入 2.1ml 的 0.5M NaCl 和 0.3mM EDTA 混合液於專用離心管中，利用相同離心條件離心 3 小時，取下層不透明溶液，每 2mL 溶液加入 0.1668g KBr(potassium bromide)，溶液混合均勻後，再以同樣的離心條件離心 3 小時，離心完後，小心吸取上層黃色薄薄的液體，即是 LDL。

所得的 LDL 經過蛋白定量後，必需通過 PD-10 column(Sephadex G-25; Pharmaci) 以去除 LDL 中的 EDTA，通過 PD-10 column 的 LDL 保存於 4°C，並在一週內使用完畢。

3. MTT assay

將 ARPE-19 cells(1×10^5 /mL) 培養至 24 well plate 中，加入不同濃度桑葚花青素(0.03、0.05、0.1 & 0.3mg)，於培養箱中培養 24 小時後，移除培養液並加入新的培養液與 MTT(0.5mg/mL) 混合液，在培養箱反應 3 小時後，移除培養基加入 1mL isopropanol 將結晶溶出，在波長 563nm 下測定吸光值。

4. DAPI 染色法

細胞發生凋亡(apoptosis)時，染色質(chromatin)會濃縮。所以利用與 DNA 結合的螢光染料染色後，細胞核會呈緻密濃染，或呈碎塊狀緻密濃染。

4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) 是一種常用與 DNA 結合的螢光染劑。DAPI 可以進入細胞核中，插入雙股 DNA 中 minor groove 中 adenine 及 thymine rich 的位置，形成 DNA-DAPI 複合物，可被 UV 光激發而發生藍色螢光，利用螢光顯微鏡觀察細胞核的變化。將細胞培養於 6 well plate 中，其細胞數量為 3×10^5 ，待貼壁 24 小時後更換新的培養基，經過 starvation 24 小時之後，分別加入 100 μ g LDL、10 μ M CuSO₄ 以及 3 種不同濃度的 MAE，反應 12 小時後移除舊的培養基，以 phosphate buffer solution(PBS) 清洗 3 次。在室溫下加入 4% paraformaldehyde 於細胞中 30 分鐘使細胞固定，移除 4% paraformaldehyde 並以 PBS 清洗 3 次，加入 1 μ g/mL DAPI 染色 30 分鐘，需在避光的條件進行染色，再以 PBS 清洗 3 次，利用螢光顯微鏡觀察細胞核是否有濃染的變化，並計數每 100 顆細胞中，死亡細胞的數目，其資料以百分比表示。

5. 細胞週期分析：流式細胞儀(Flow cytometer)

ARPE-19 處理培養於 10 公分培養皿中，其細胞數量為 1×10^6

，待貼壁 24 小時後更換新的培養基，經過 starvation 24 小時之後，分別加入 100 μ g LDL、10 μ M CuSO₄ 以及 3 種不同濃度的桑葚花青素萃取物，反應 24 小時後移除舊的培養基，以 PBS 清洗，再以 trypsin 將細胞打下，離心去除上清液，再重複的清洗及離心，將上清液去除收 pellete，將 pellete 打散加入 1mL 70% 酒精以細胞固定，保存於 -20 $^{\circ}$ C。分析前先將檢體離心去除酒精，再以 PBS 清洗一次，離心後取 pallete。將 pallete 打散加入 500 μ l 的 PI solution (20 ug/ml propidium iodide、20 ug/ml Rnase、0.1% Triton-100) 染色 15 分鐘，此步驟需在避光的環境進行，以 Flow cytometer (FACS) 進行分析。

6. 西方墨點法 (Western blot)

蛋白質抗原之製備

(1) 細胞蛋白質萃取

細胞加入氧化型 LDL 及 桑葚花青素萃取物培養 12 小時之後，將培養皿內的培養基移除，以 PBS 沖洗細胞兩次，加入適當的 Radioimmunoprecipitation (RIPA) Buffer 及蛋白酶抑制劑 (protease inhibitor)，利用細胞刮勺將細胞刮下，在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中震盪 5 小時後，再置入高速離心機，以 4 $^{\circ}$ C、10000rpm 離心 10 分鐘，吸取上清液，儲存於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱，並加以做蛋白定量分析。

(2) 蛋白定量分析

根據 Bradford Method 定量組織均質液中的蛋白量。Coomassie Brilliant Blue (CBG) 在過氯酸溶液中呈紅棕色，但與蛋白質結合後則變成藍色，以 595 nm 波長偵測其吸光，呈色濃淡與蛋白質濃度成正比。以 BSA (bovine serum albumin) 為蛋白質標準溶液，換算成各樣本的蛋白質濃度。取 30 μ l 的樣本，加入 970 μ l 的 Coomassie Blue 溶液，反應 5 分鐘後，於波長 595nm 偵測吸光。

(3) 蛋白樣本前處理

取總蛋白量為 50 μ g 的檢體，加入 5 倍的追蹤染料 (loading dye)，混合均勻，以乾熱器 100 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘使 protein denature，放置於冰上等溫度冷卻即可 load 至 SDS-PAGE 中進行電泳。

SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳 (sodium dodecyl sulfate Poly Acrylamide Gel)

Electrophoresis ; SDS-PAGE)

SDS-PAGE 可將蛋白質依其分子量的不同而分離。將玻璃已去離子水及酒精清洗乾淨擦乾後，裝上膠條並以膠夾將兩片玻璃夾緊。SDS-PAGE 分成兩層膠 stacking gel 及 separating gel，首先先配置 separating gel，決定膠體濃度後，配置適當體積的膠體溶液，將離子水、30%Acrylamide、1.5M Tris pH8.8、10%SDS、10% ammonium persulfate(APS)、N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)，混合均勻後倒入玻璃中約 8 分滿，上層再以去離子水補平，並檢查有無漏膠之情形，待膠凝固後，則可倒掉水層配置 stacking gel；決定膠體濃度後，配置適當體積的膠體溶液，將離子水、30%Acrylamide、1.5M Tris pH6.8、10% SDS、10 % APS、TEMED，混合均勻後倒入玻璃，並插入電泳齒梳，凝固後則可抽出齒梳，再將架膠夾拔除移入電泳槽內。將 running buffer(0.124M Tris、1M glycin、17M msds)倒入電泳槽中，在每個 well 加入 20 μ l 已處理好的檢體及 4 μ l protein marker；protein marker 用以標示蛋白之分子量，將電泳槽接上電源供應器，以 100 伏特電壓進行電泳，直至藍色的追蹤染料落入 running buffer 為止。

蛋白質轉印

在轉印步驟中使用的濾紙、海綿及 Nitrocellulose membrane 皆須以轉印緩衝液(towbin buffer)浸溼。電泳完成後在半乾式轉漬器上，由下往上依序放入 Mylar mask、3 張濾紙、Nitrocellulose membrane、切除 stacking gel 的膠、3 張濾紙，此過程中皆須趕走氣泡，以固定電流 270mA 轉印 1 小時。將已轉印完成的 Nitrocellulose membrane 用 ponceau S 染色，檢測蛋白是否轉印成功，比對 protein marker 後剪下所需的分子量以進行實驗。

Blocking 和抗體抗原反應

剪下的 Nitrocellulose membrane 以 1x TBS 清洗 10 分鐘去除 ponceau S，再以 2.5% blocking buffer (2.5g 脫脂奶粉加 1x TBS 至 50ml)於室溫以 50rpm 搖晃 60 分鐘，阻斷非專一性的結合。60 分鐘後以 1x TBS 清洗 3 次，每次 10 分鐘，加入稀釋後的 primary antibody，置於 4 $^{\circ}$ C 搖晃隔夜。反應後，以 1x TBS 清洗 3 次，每次 10 分鐘，再加入已稀釋接有 HRP(seradish peroxidase)的 secondary antibody，於室溫以 50rpm 搖晃 60 分鐘後，以 1x TBS 清洗 3 次，每次 10 分鐘。

壓片

將 membrane 取出加上 enhanced Chemiluminescent Kit(ECL)進行呈色反

應，以 FUJIFILM LAS-3000 冷光儀分析冷光強度。

7. 數據分析

每個實驗至少三次重複驗證，統計方法使用 Student's t-test 進行數據分析，當 $p < 0.05$ 以下才具有顯著的意義。

五、結果與討論

[第一年]

1、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠眼睛外觀之影響

在正常情況下，水晶體為無色透明狀，當受到傷害時，例如：老化或疾病影響，則會引起白內障，使水晶體呈現白色混濁狀，導致視力衰退。依水晶體混濁位置及硬度關係可分為核性白內障(nuclear sclerosis, NS)、皮質性白內障(Cortical opacity, CO)、後囊性白內障(posterior subcapsular opacity, PSCO) [Heyworth et al.1993 ; Chylack et al.1989]；再依白內障損傷程度分為輕度、中度及重度三級。大白鼠經由 STZ 誘發糖尿病成功後，於第六和第十二週進行犧牲、拍照。在結果觀察到(Fig.1A)，正常組(A)和誘導組(D)相比，誘導組(D)水晶體混濁程度明顯，且核硬化嚴重，並且觀察(Fig.1B)，隨著糖尿病發病時間增加，誘導組(D)水晶體混濁程度及核硬化嚴重。在給予 1%(F)或 2%(G)桑葚水萃物六週(Fig.1A)和十二週(Fig.1B)後，水晶體混濁程度都有顯著的改善，且皮質混濁程度也有所改善。

2、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠眼睛視網膜型態之影響

在正常情況下，視網膜細胞為整齊排列，當眼睛受到傷害時，視網膜細胞便會呈現混亂排列[陳牧君,2004]。為了觀察給予桑葚水萃物後，視網膜型態之變化，因此將經石蠟包埋的組織切片做病理染色(Hematoxylin and Eosin Stain)，以正立光學顯微鏡進行觀察。實驗結果，在(Fig.2A)觀察到，正常組(A)和誘導組(D)相比，經由 STZ 導致糖尿病的誘導組(D)視網膜細胞因被脂肪空泡細胞佔據而發生嚴重的混亂排列現象，並且在(Fig.2B)觀察到，隨著糖尿病發病時間增加，誘導組(D)因大量脂肪空泡細胞佔據視網膜細胞，使視網膜細胞混亂排列現象更加

嚴重。給予 1%(F)或 2%(G)桑葚水萃物六週(Fig.2A)和十二週(Fig.2B)後，脂肪空泡細胞明顯減少，而視網膜細胞排列混亂的程度也有顯著的改善。

3、處理 MWE 對糖尿病大白鼠眼睛角膜型態之影響

我們另行以電子顯微鏡檢查其 cornea 的部位，因為在 6 周及 12 周的動物發現的眼部外觀呈現相似的狀況，因此我們選擇 6 周的動物進行檢查。結果發現糖尿病鼠會在此出現 collagen fiber 界線不清、鬆散及排列不規則的現象，而桑葚水萃物具有改善此一現象的能力。(Fig. 3)

4、處理 MWE 對糖尿病大白鼠尿液總量之影響

糖尿病會有多尿症狀，為了瞭解給予桑葚水萃物對糖尿病大白鼠尿液總量的影響，在第六週及第十二週犧牲前，將大白鼠放置於代謝籠中，收集 24 小時尿液總量。實驗結果，在(Fig.4)觀察到，經由 STZ 誘發糖尿病後，於第六週及第十二週，誘導組尿液總量和正常組相比有明顯增加。在給予桑葚水萃物後六週，糖尿病大白鼠尿液總量並無有效改善，在給予桑葚水萃物十二週後，不論是 0.5%、1%或 2%的桑葚水萃物，都有有效改善尿量的情形。

5、桑葚水萃物對糖尿病大白鼠血糖及體重之影響

為了瞭解桑葚水萃物對糖尿病大白鼠血糖值及體重變化影響，每兩週進行秤重以及尾靜脈採血觀察血糖值變化。血糖值 ≥ 250 (mg/dl)即表示誘發糖尿病成功。從結果觀察到，大白鼠經由 STZ 誘發糖尿病成功之後，給予桑葚水萃物六及十二週(Fig.5)，誘導組血糖和正常組相比有明顯增加，並且給予桑葚水萃物不能有效改善血糖升高的情形。糖尿病症狀有吃多、喝多、尿多以及體重減少，在體重方面，經由實驗結果觀察到，STZ 誘發糖尿病成功後，給予桑葚水萃物六及十二週(Fig.6)，誘導組體重和正常組相比有明顯降低，而給予桑葚水萃物並不能有效改善體重降低的情形。

6、桑葚水萃物對糖尿病大白鼠血清白蛋白(Albumin, ALB)之影響

白蛋白是血液中含量相當高的蛋白質，當腎臟功能正常時，並不會有白蛋白滲漏到尿液中，當腎衰竭時，則會有大量白蛋白滲漏到尿液中。在(Fig.7)可以看

到，大白鼠經由 STZ 誘導糖尿病成功後，在第六週時，給予 0.5%、1% 或 2% 的桑葚水萃物，血清白蛋白分別降低 29.5%、23.2% 及 22.8%。在第十二週時，和誘導組相比，給予桑葚水萃物的組別血清白蛋白並無明顯的變化。

7、桑葚水萃物對糖尿病大白鼠麩丙酮酸轉胺酶(Alanine Aminotransferase, ALT)之影響

ALT 主要存在肝臟細胞，當肝臟受損時，ALT 會釋放到血液中，造成血液中 ALT 值上升，因此 ALT 可用來檢測肝功能。在(Fig.8)可以看到，大白鼠經由 STZ 誘導糖尿病成功後，在第六週時，給予 1% 或 2% 的桑葚水萃物，ALT 分別增加 70% 及 156%。在第十二週時，和誘導組相比，給予 0.5% 桑葚水萃物的組別，ALT 降低 31.28%。

8、桑葚水萃物對糖尿病大白鼠(Aspartate Aminotransferase, AST)之影響

AST 主要存在心臟、腎臟、肝臟、肌肉和腦，當這些器官組織受損時，AST 會釋放於血液中，造成血液中 AST 上升。在(Fig.9)可以看到，大白鼠經由 STZ 誘導糖尿病成功後，在第六週時，給予 0.5%、1% 或 2% 的桑葚水萃物，AST 分別增加 16.48%、134.9% 及 188.6%，並不能有效降低血液中 AST。在第十二週時，和誘導組相比，給予 0.5%、1% 或 2% 的桑葚水萃物的組別，AST 降低 54.96%、22% 及 15.5%，給予十二週的桑葚水萃物能有效的降低血液中的 AST。

9、桑葚水萃物對糖尿病大白鼠血中尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)之影響

尿素氮是經腎臟分泌由尿液排出體外的蛋白質代謝產物，如果血中尿素氮濃度升高，就能反應出腎功能異常。在(Fig.10)可以看到，大白鼠經由 STZ 誘導糖尿病成功後，在第六週時，給予 1% 桑葚水萃物的組別，尿素氮降低 12.6%，給予 0.5% 或 2% 桑葚水萃物的組別，分別增加 33.58% 及 48.55%。在第十二週時，和誘導組相比，給予 0.5%、1% 或 2% 的桑葚水萃物的組別，尿素氮分別降低 29.53%、31.35% 及 46.64%，給予十二週的桑葚水萃物能有效的降低血液中的尿素氮。

10、桑葚水萃物對糖尿病大白鼠肌酸酐(Creatinine, CRE)之影響

肌酸酐是人體肌肉中肌酸的分解產物，屬於代謝廢物的一種，當腎臟受損腎絲球過濾率會下降，導致肌酸酐累積在血液中。在(Fig.11)可以看到，大白鼠經由 STZ 誘導糖尿病成功後，在第六週時，誘導組與餵藥組的肌肝酸無明顯差異。在第十二週時，和誘導組相比，給予 0.5%、1% 或 2% 的桑葚水葦物的組別，肌酸酐分別降低 56.25%、50% 及 55%，給予十二週的桑葚水葦物能有效的降低血液中的肌酸酐。

11、桑葚水葦物對糖尿病大白鼠血液中尿素氮與肌酸酐比值(BUN/ CRE ratio)之影響

血液中尿素氮濃度升高，能反應腎功能異常。但血液中尿素氮濃度並不能反應早期腎臟病，如果缺乏水份、攝取大量蛋白質食物及腎血流不足等因素影響，也會使血液中尿素氮濃度暫時性升高。此外，肌酸酐是非常穩定的腎功能指標，常用於評估腎功能障礙的嚴重程度，及腎臟病的病情控制，但也不適用於早期腎臟病的篩檢。血液中肌酸酐濃度與每個人的肌肉總量或體重有關，與攝取的飲食及水量無關，雖同樣與血液中尿素氮合稱為尿毒，但肌酸酐的濃度，較血液中尿素氮更能精確顯是腎功能的好壞。從(Fig.12)結果得知，當大白鼠誘發糖尿病成功後，在第六週或第十二週的誘導組血液尿素氮和肌酸酐比值和正常組相比都有明顯的增加，而給予桑葚水葦物並不能有效的降低尿素氮與肌酸酐比值。

12、桑葚水葦物對糖尿病大白鼠高密度脂蛋白膽固醇(High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)之影響

HDL-C 可清除血管壁當中過多的膽固醇，減少 LDL-C 在細胞組織中的堆積，讓多餘的膽固醇不會沉積於血管中，因此 HDL-C 可用來評估冠狀動脈疾病的發生機率。從(Fig.13)結果得知，當大白鼠誘發糖尿病成功後，在第六週或第十二週的誘導組 HDL-C 和正常組相比都有明顯的增加，在第六週時，給予 0.5% 桑葚水葦物的組別，HDL-C 降低 37.16%，給予 1% 或 2% 桑葚水葦物的組別，減少 HDL-C 的幅度並不明顯。在第十二週時，和誘導組相比，給予 0.5%、1% 或 2% 的桑葚水葦物的組別，HDL-C 分別降低 22.22%、22.54% 及 20.63%。

13、桑葚水萃物對糖尿病大白鼠低密度脂蛋白膽固醇(Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)之影響

LDL-C 被視為血管阻塞的危險因子。當血液中 LDL 的濃度過高時，便容易在血管壁堆積，而引起血管的硬化，造成心血管疾病。從(Fig.14)結果得知，在第六週時，給予 0.5%、1% 或 2% 的桑葚水萃物的組別，LDL-C 分別降低 7.94%、27.39% 及 36.3%。在第十二週時，和誘導組相比，給予 0.5% 或 1% 桑葚水萃物的組別，LDL-C 分別降低 23.58% 及 4.9%，給予 2% 桑葚水萃物的組別，LDL-C 增加 58.49%。

14、桑葚水萃物對糖尿病大白鼠總膽固醇(Total cholesterol, TCHO)之影響

TCHO 包含 HDL-C 和 LDL-C。從(Fig.15)結果得知，在第六週時，和誘導組相比，給予 0.5%、1% 或 2% 桑葚水萃物的組別，TCHO 分別降低 40.12%、30.8% 及 28.85%。在第十二週時，給予 0.5% 或 1% 的桑葚水萃物組別，TCHO 和誘導組相比差異不大，給予 2% 的桑葚水萃物組別，TCHO 增加 16.41%。

15、桑葚水萃物對糖尿病大白鼠三酸甘油脂(triglyceride, TG)之影響

三酸甘油脂可以用來評估體內脂質代謝狀態，過高的三酸甘油脂代表了高血脂的現象，並造成了血液循環不良的情形。從(Fig.16)的結果得知，當大白鼠誘發糖尿病後，不管是在第六週或第十二週，糖尿病組的三酸甘油脂和正常組相比都有明顯的增加。給予 0.5%、1% 或 2% 的桑葚水萃物，不管在第六週或第十二週，都不能降低三酸甘油脂。

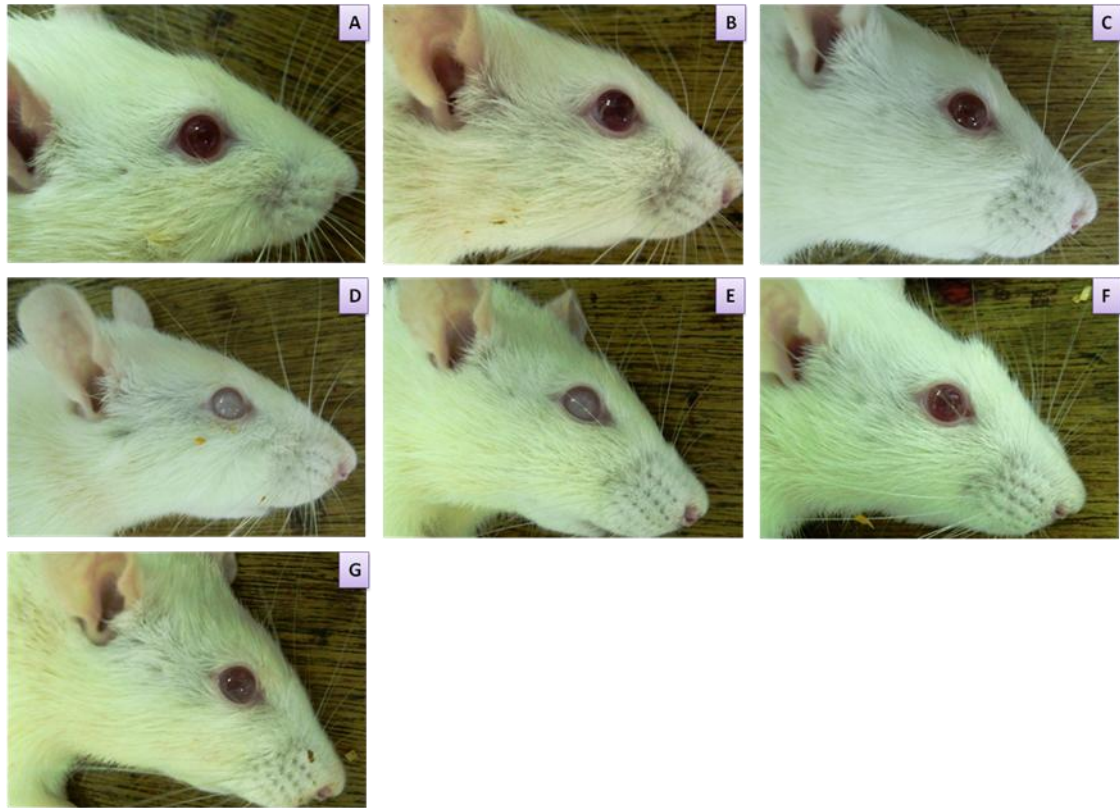
16、桑葚水萃物對糖尿病大白鼠血液生化值的影響

從(Table.1)的結果得知，當大白鼠誘發糖尿病後，誘導組在第六週時，ALT、BUN、HDL-C、TCHO 值都會增加。在第十二週時，當大白鼠誘發糖尿病後，誘導組和正常組相比，ALT、AST、BUN 值也會增加。而當大白鼠誘導糖尿病後，給予 0.5%、1% 或 2% 的桑葚水萃物，不論是在第六週或第十二週，都不能有效改善 STZ 所誘導糖尿病血液生化質的改變。

17、桑葚水萃物對糖尿病大白鼠水晶體 oxLDL 的影響

在之前研究指出，過多的 ROS 會造成氧化壓力(oxidative stress)產生 [Brownlee. 2001；Frank. 2004；Kowluru and Chan. 2007]，而氧化壓力的增加和糖尿病是有相關性的。ROS 會增加脂肪組織產生毒性物質，而視網膜組成成分中占了一大部分的非飽和脂肪酸(Unsaturated fatty acids)，因此 ROS 會導致正常視網膜結構受到破壞。借此想觀察糖尿病大白鼠給予桑葚水萃物之後對於 oxLDL 的影響。將大白鼠眼睛取得的水晶液，使用 Dot blot 分析 oxLDL 的變化量。由實驗結果得知(Fig.17A)，和 Normal 組相比，誘導組眼睛的 oxLDL 表現量約為正常組的 268%，在每日餵食 0.5%、1%及 5%桑葚多酚萃物六週後，oxLDL 的表現量降低至和 Normal 組相當。而從(Fig.17B)觀察到，隨糖尿病發病時間增加，誘導組眼睛的 oxLDL 表現量約為正常組的 347%，在每日餵食 0.5%、1%及 5%桑葚多酚萃物十二週後，oxLDL 的表現量分別降低為 208%、198%及 134%。由結果得知，每日餵時桑葚水萃物能有效降低眼睛中 oxLDL 的表現。

圖一 A、處理桑葚水萃物六週對糖尿病大白鼠眼睛外觀之影響



	A	B	C	D	E	F	G
Group	Normal	Citrate Buffer	MWE(2%)	Diabetes	Diabetes+ MWE(0.5%)	Diabetes+ MWE(1%)	Diabetes+ MWE(2%)
Degree of cataract	N	N	N	N/S(+++)	N/S(+++)	C/O(++)	C/O(+)

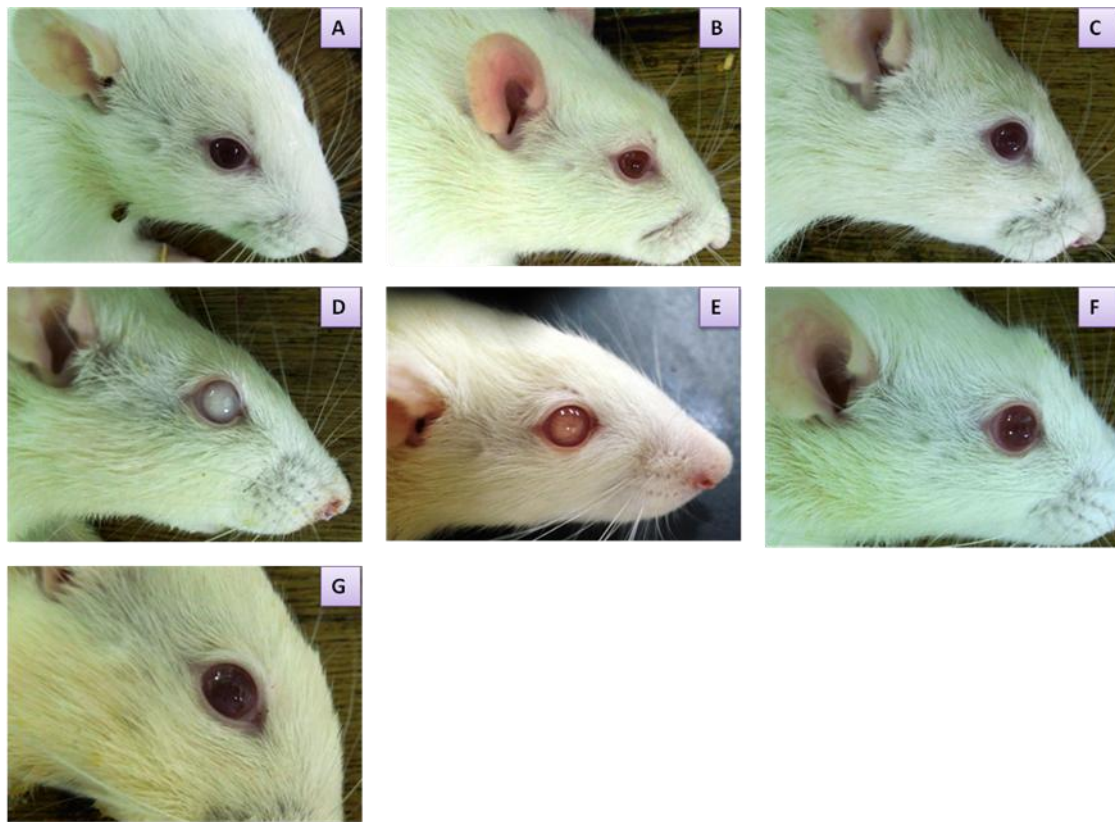
N/S, Nuclear Sclerosis in lens; C/O, Cortical opacity in lens. +++ ,severely damaged;

++ ,moderately damaged; + ,mildly damaged.

Figure 1A 、 Effect of MWE on eye damage in diabetic rats(6 weeks).

(A) normal rat ; (B) citrate rat ; (C) treated with 2% MWE only ; (D) diabetic rat ; (E) diabetic rats treated with 0.5% MWE ; (F) diabetic rats treated with 1% MWE ; (G) diabetic rats treated with 2% MWE.

圖一 B、處理桑葚水萃物十二週對糖尿病大白鼠眼睛外觀之影響



	A	B	C	D	E	F	G
Group	Normal	Citrate Buffer	MWE(2%)	Diabetes	Diabetes+ MWE(0.5%)	Diabetes+ MWE(1%)	Diabetes+ MWE(2%)
Degree of cataract	N	N	N	N/S(+++)	N/S(+++)	C/O(++)	C/O(+)

N/S, Nuclear Sclerosis in lens; C/O, Cortical opacity in lens. +++,severely damaged; ++,moderately damaged; +,mildly damaged.

Figure 1B、Effect of MWE on eye damage in diabetic rats(12 weeks).

(A) normal rat ; (B) citrate rat ; (C) treated with 2% MWE only ; (D) diabetic rat ; (E) diabetic rats treated with 0.5% MWE ; (F) diabetic rats treated with 1% MWE ; (G) diabetic rats treated with 2% MWE.

圖二 A、處理桑葚水萃物六週對糖尿病大白鼠眼睛視網膜型態之影響

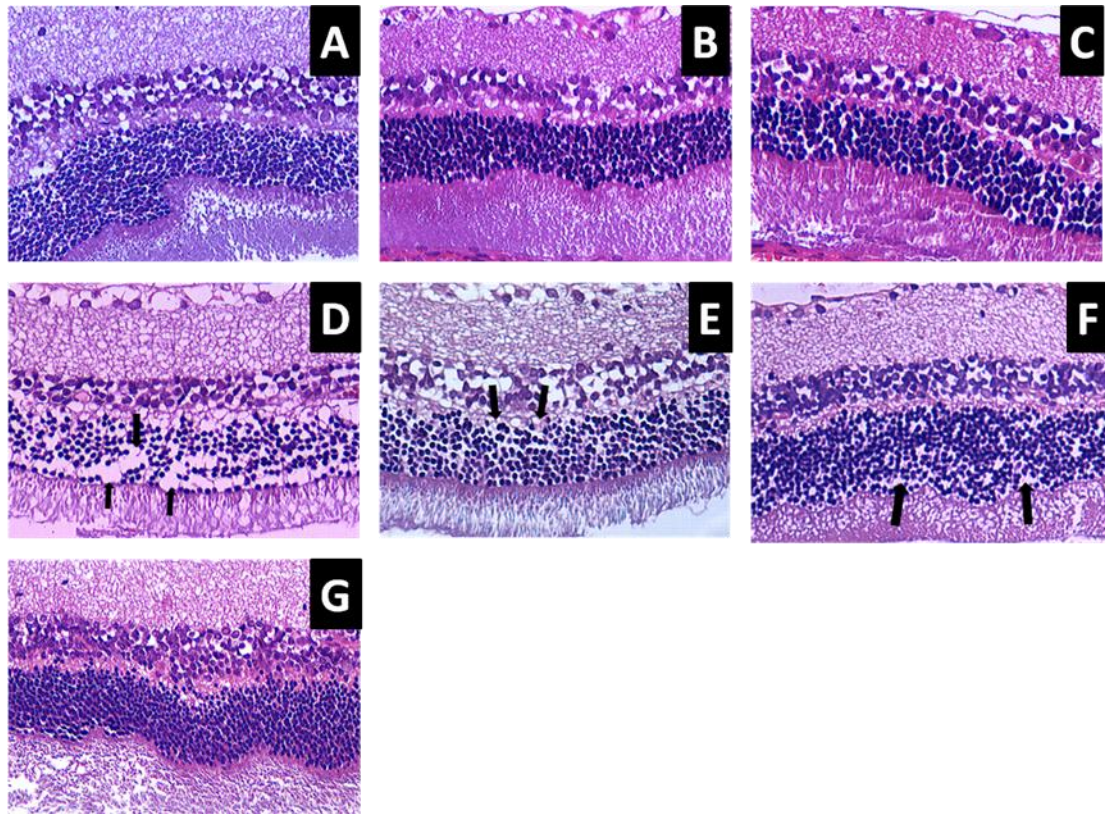


Figure 2A、MWE decreased retina damage in diabetic rats(6 weeks).

(A) normal rat ; (B) citrate rat ; (C) treated with 2% MWE only ; (D) diabetic rat ; (E) diabetic rats treated with 0.5% MWE ; (F) diabetic rats treated with 1% MWE ; (G) diabetic rats treated with 2% MWE. The arrows point the lipocyte in the retina.

圖二 B、處理桑葚水萃物十二週對糖尿病大白鼠眼睛視網膜型態之影響

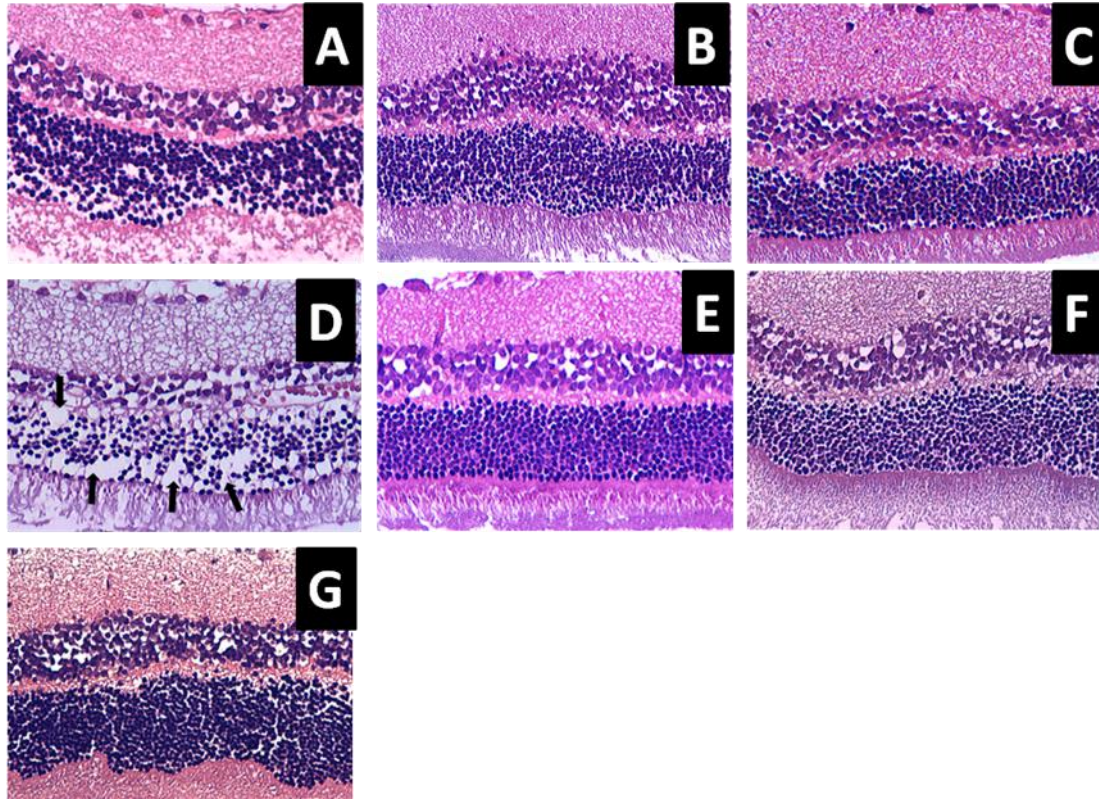
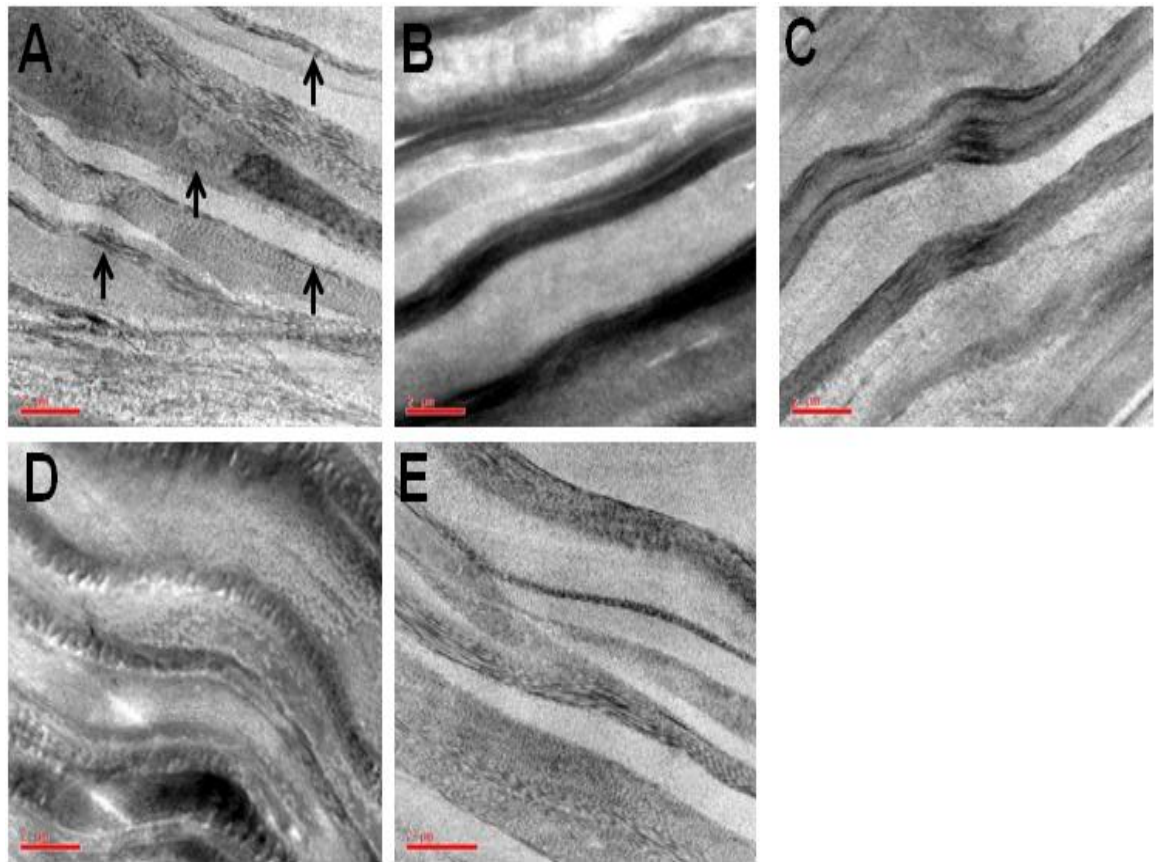


Figure 2B、MWE decreased retina damage in diabetic rats(12 weeks).

(A) normal rat ; (B) citrate rat ; (C) treated with 2% MWE only ; (D) diabetic rat ; (E) diabetic rats treated with 0.5% MWE ; (F) diabetic rats treated with 1% MWE ; (G) diabetic rats treated with 2% MWE. The arrows point the lipocyte in the retina.

圖三、處理桑葚水萃物六周對糖尿病大白鼠眼睛角膜型態之影響



	A	B	C	D	E
Group	Normal	Diabetes	Diabetes+ MWE(0.5%)	Diabetes+ MWE(1%)	Diabetes+ MWE(2%)
Collagen fiber in cornea	Normal	severe	severe	moderate	mild

Figure 3 · MWE Improve the morphology of diabetic cornea under EM (6 weeks)

The arrows pointed are bundles of collagen fiber in cornea. In diabetes, the collagen fiber become loose and irregular. The degree herein is classified to Normal, mild, moderate, and severe.

圖四、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠尿液總量之影響

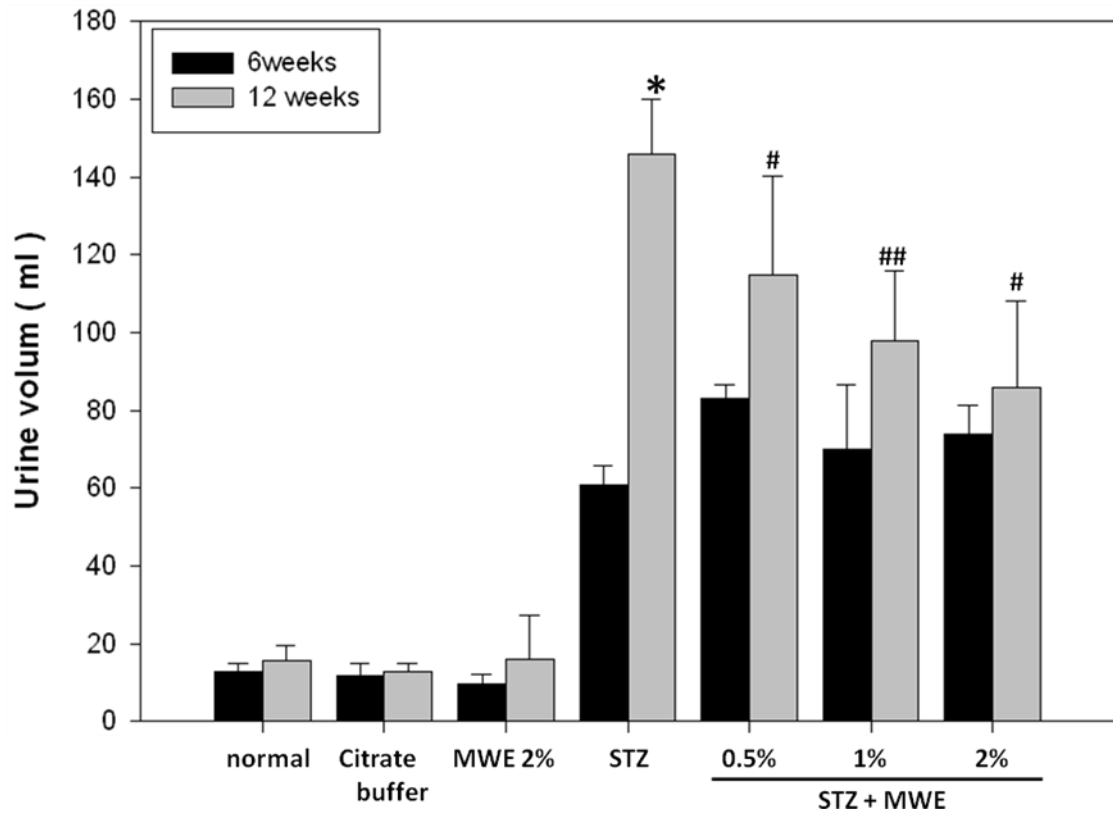


Figure 4、Effect of MWE on Urine volum in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. $*P < 0.000001$ compared with the normal group. $\#P < 0.05$; $\##P < 0.05$ compared with the STZ-induced group.

圖五、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠血糖之影響

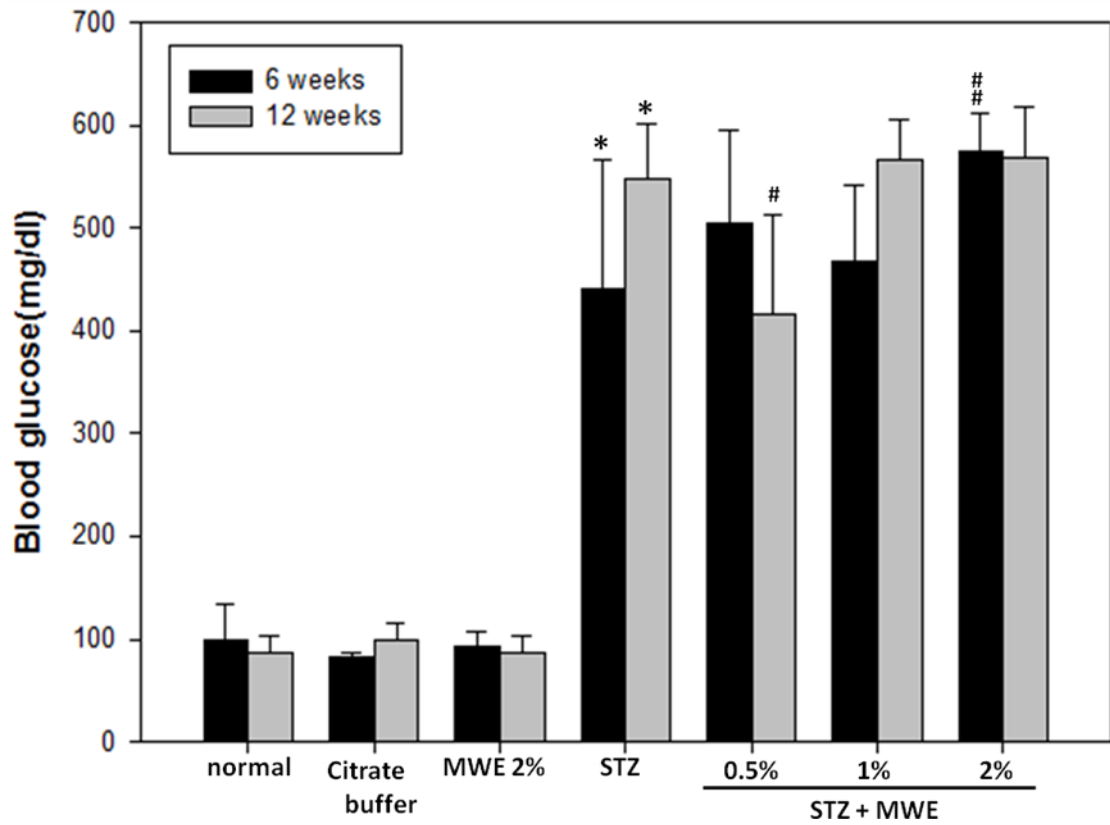


Figure 5 、 Effect of MWE on blood glucose in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. * $P < 0.005$

compared with the normal, # $P < 0.05$; ## $P < 0.0005$ compared with the STZ-induced group.

圖六、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠體重之影響

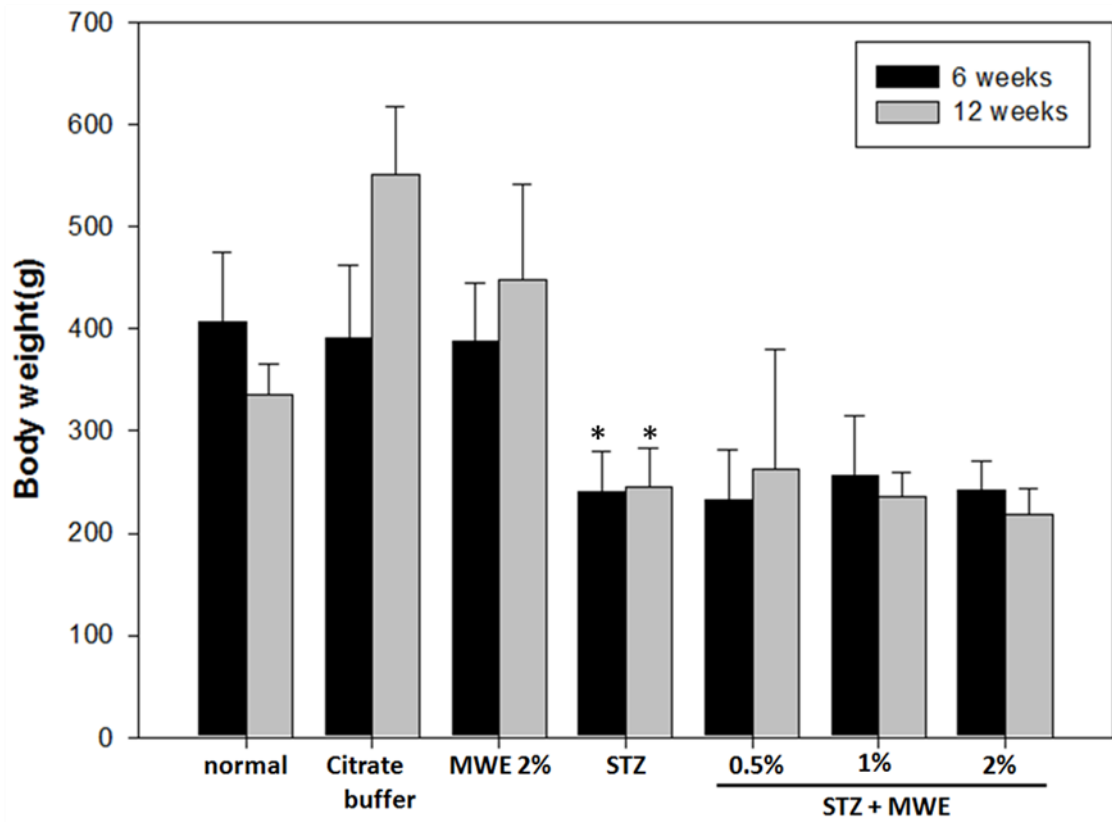


Figure 6、Effect of MWE on weight in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. $*P < 0.001$ compared with the normal.

圖七、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠 Albumin 之影響

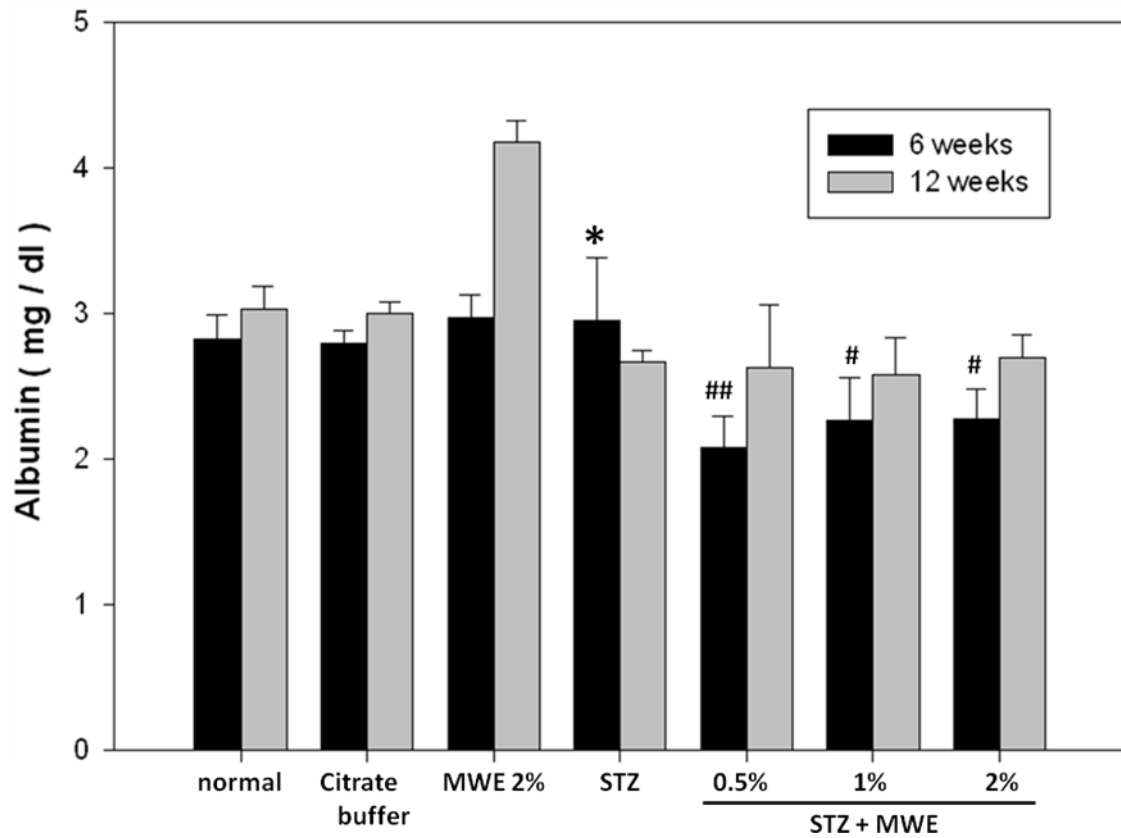


Figure 7、Effect of MWE on Albumin in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. $*P < 0.001$, compared with the normal, $^{\#}P < 0.05$; $^{\#\#}P < 0.005$, compared with the STZ-induced group.

圖八、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠 ALT 之影響

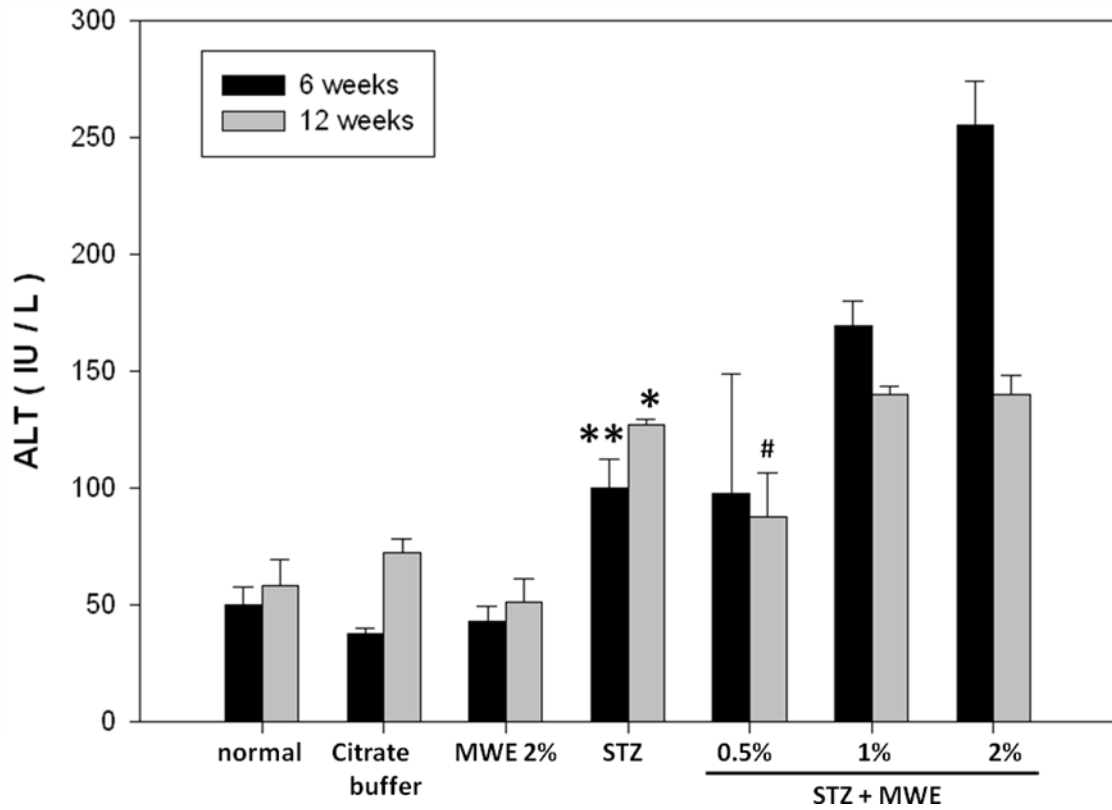


Figure 8、Effect of MWE on ALT in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.0001$ compared with the normal, # $P < 0.05$, compared with the STZ-induced group.

圖九、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠 AST 之影響

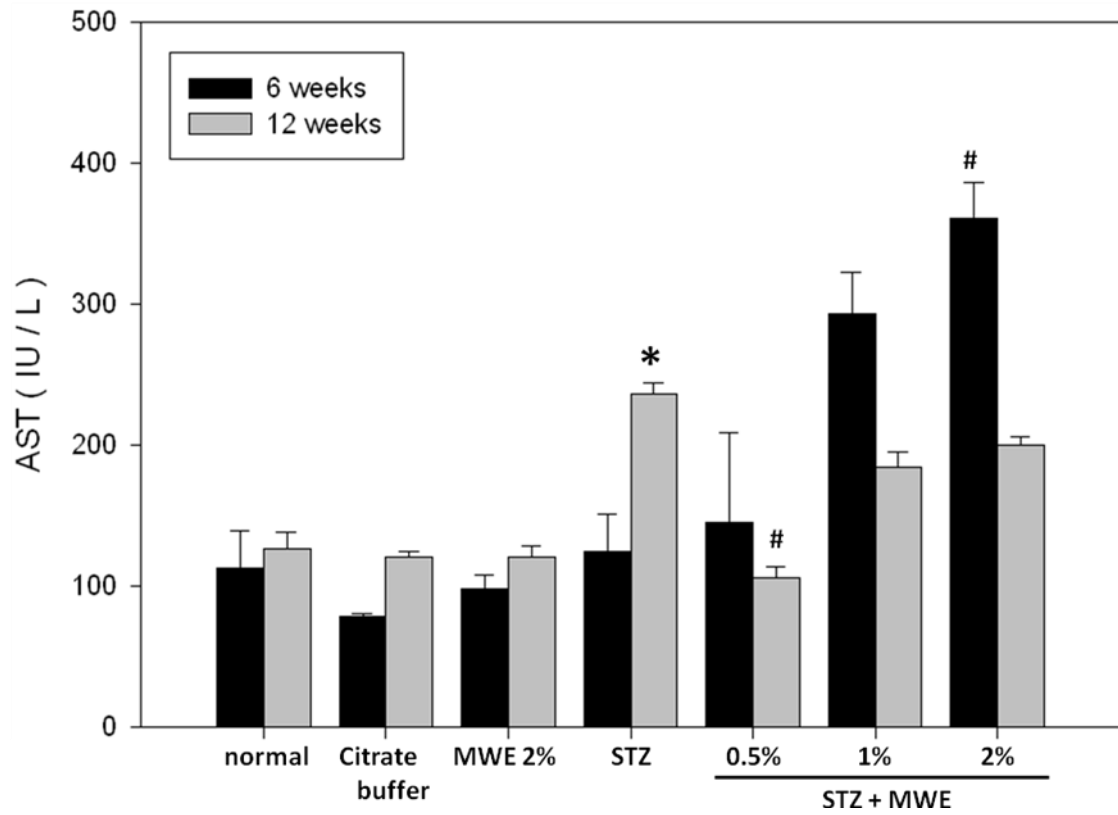


Figure 9、Effect of MWE on AST in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. * $P < 0.05$, compared with the normal, # $P < 0.05$, compared with the STZ-induced group.

圖十、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠 BUN 之影響

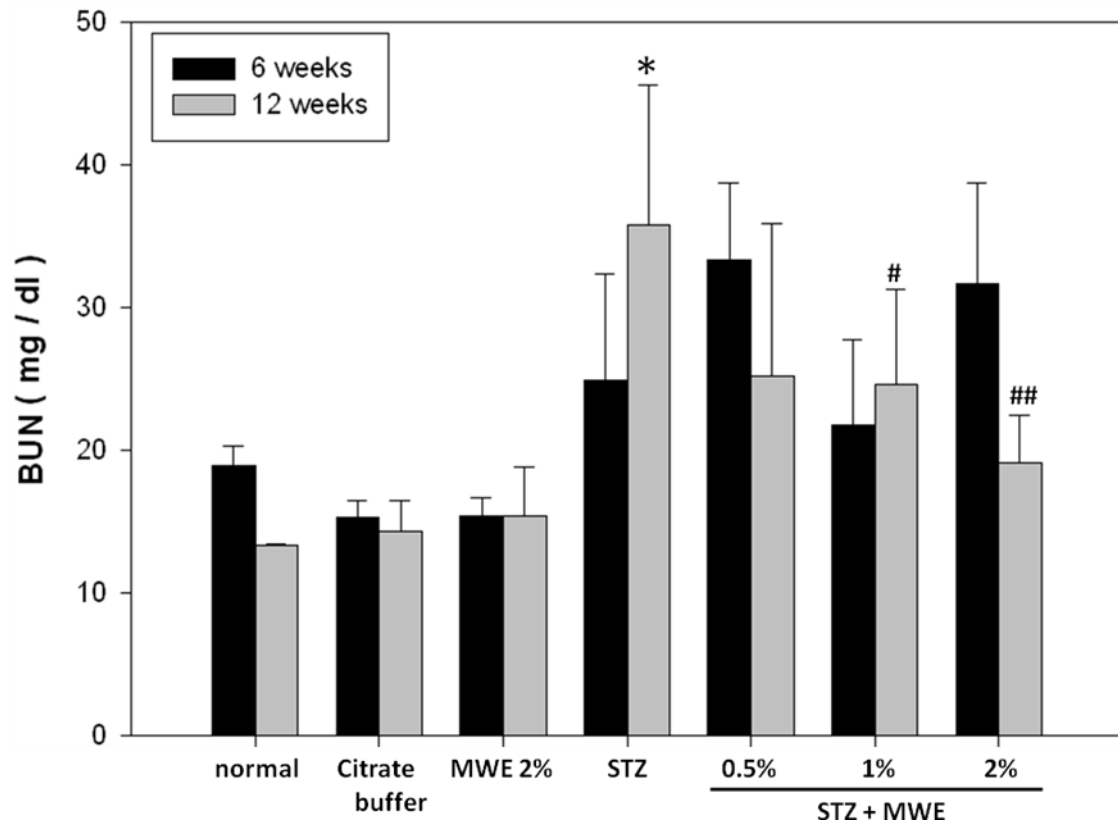


Figure 10、Effect of MWE on BUN in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. * $P < 0.05$, compared with the normal, # $P < 0.05$; ## $P < 0.05$, compared with the STZ-induced group.

圖十一、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠 CRE 之影響

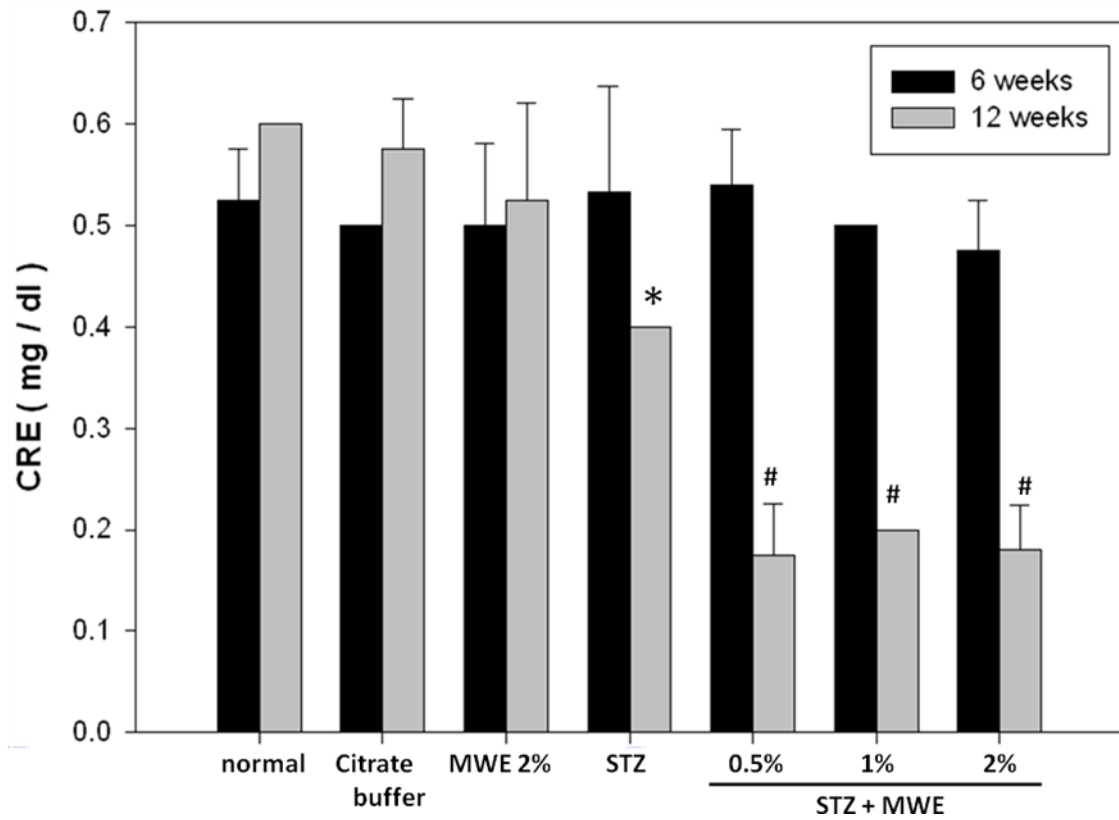


Figure 11、Effect of MWE on CRE in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. * $P < 0.00001$, compared with the normal, # $P < 0.00005$, compared with the STZ-induced group.

圖十二、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠 BUN/CRE ratio 之影響

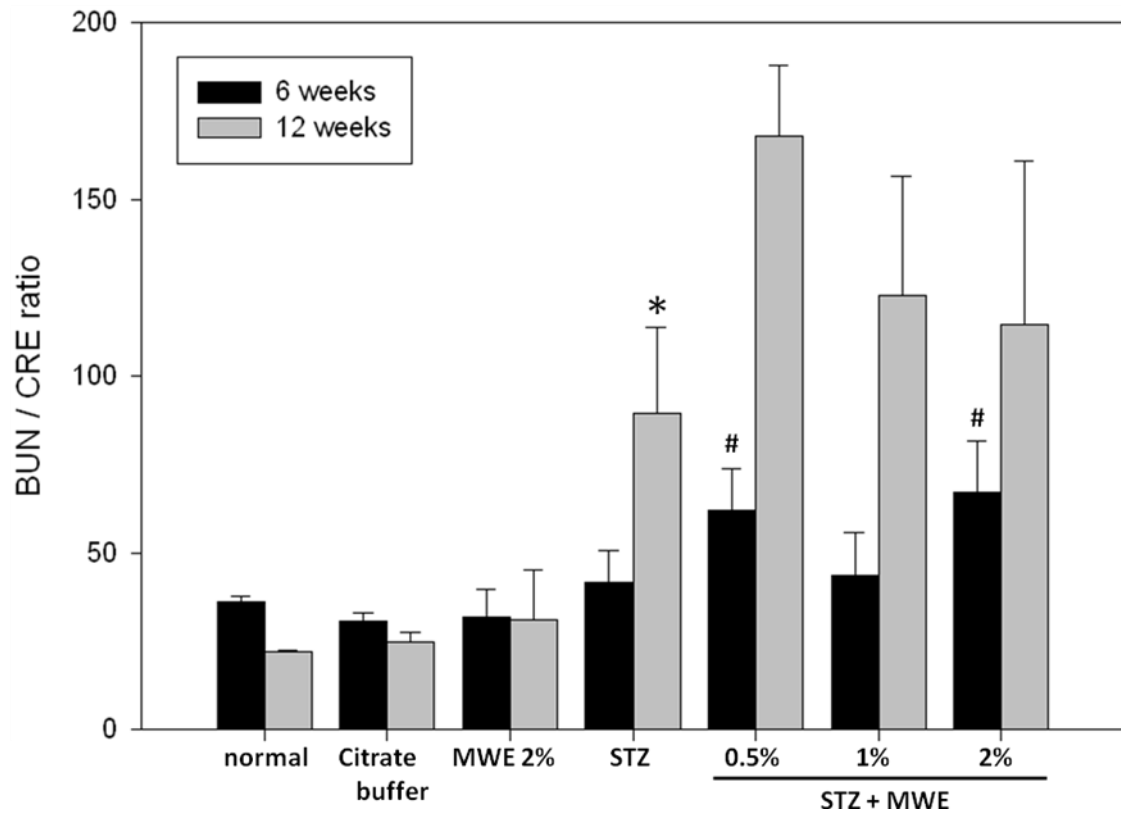


Figure 12、Effect of MWE on BUN/CRE ratio in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. * $P < 0.005$, compared with the normal, # $P < 0.05$, compared with the STZ-induced group.

圖十三、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠 HDL-C 之影響

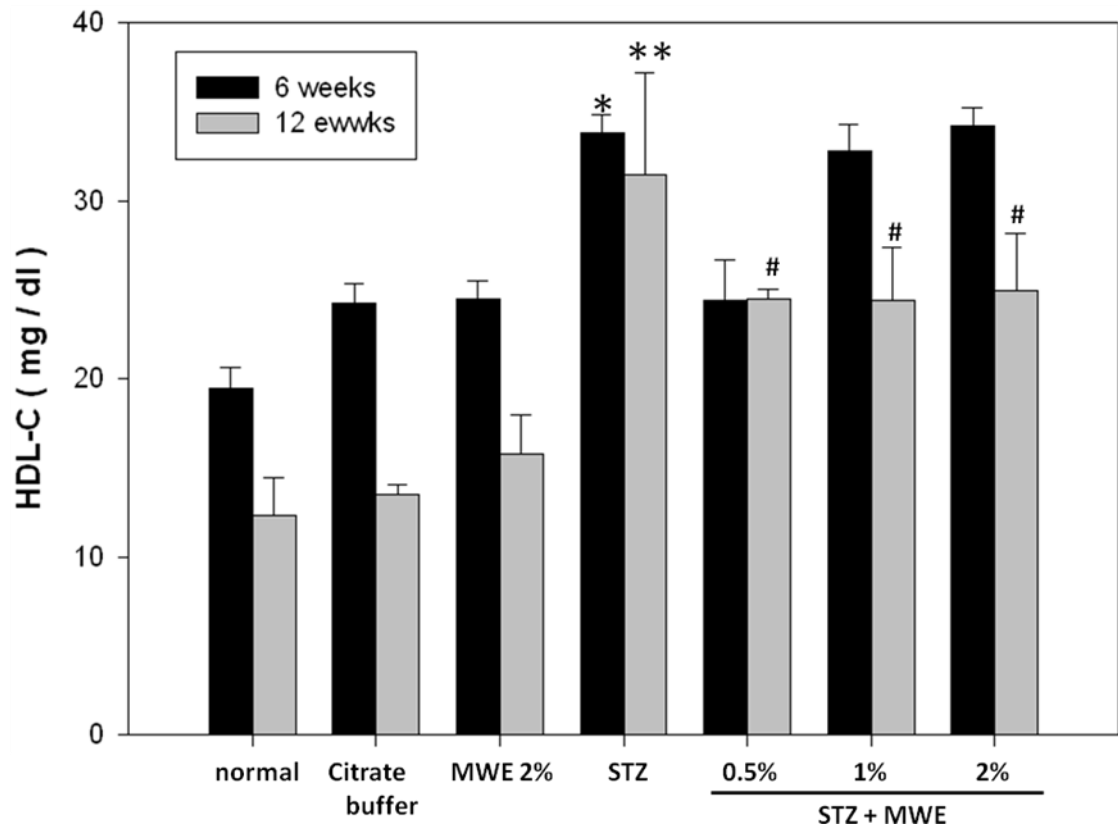


Figure 13、Effect of MWE on HDL-C in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. * $P < 0.01$; ** $P < 0.0005$ compared with the normal, # $P < 0.05$, compared with the STZ-induced group.

圖十四、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠 LDL-C 之影響

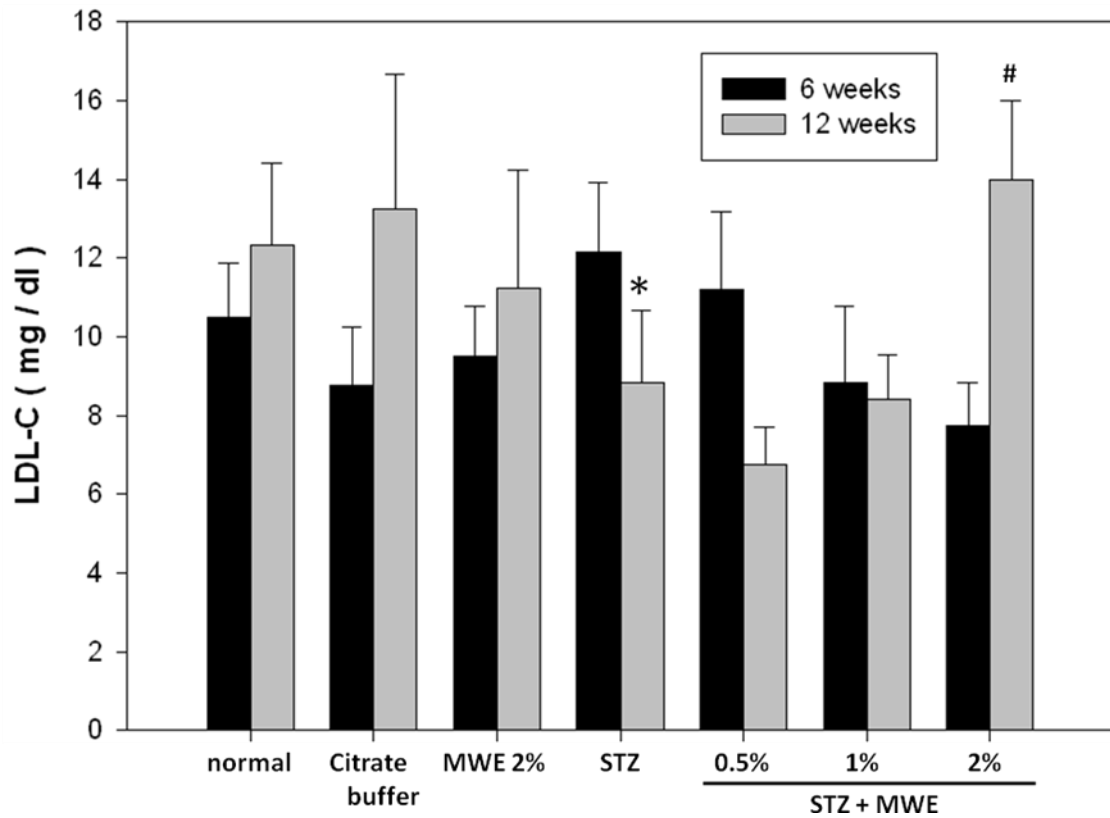


Figure 14、Effect of MWE on LDL-C in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. * $P < 0.05$, compared with the normal, # $P < 0.05$, compared with the STZ-induced group.

圖十五、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠 TCHO 之影響

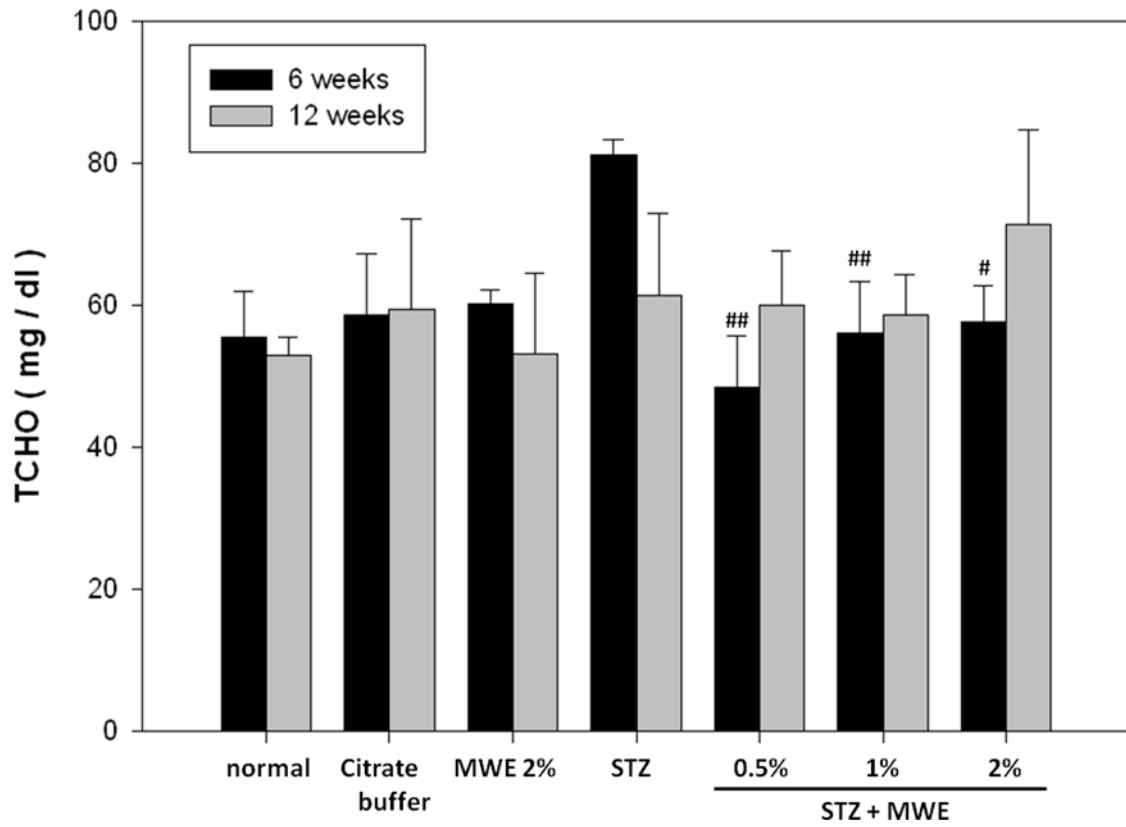


Figure 15、Effect of MWE on TCHO in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ compared with the STZ-induced group.

圖十六、處理桑葚水萃物對糖尿病大白鼠 TG 之影響

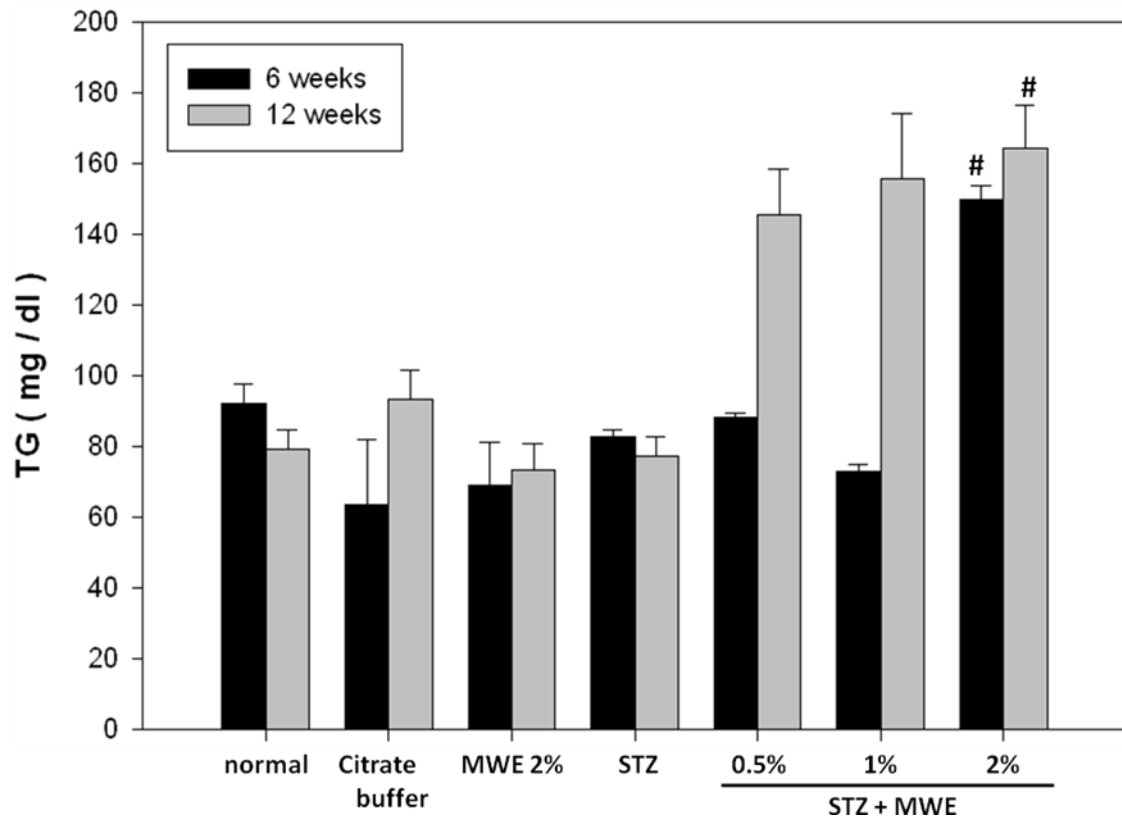


Figure 16、Effect of MWE on TG in diabetic rats.

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. $^{\#}P < 0.01$, compared with the STZ-induced group.

圖十七 A、處理桑葚水萃物六週對糖尿病大白鼠水晶體 oxLDL 之影響

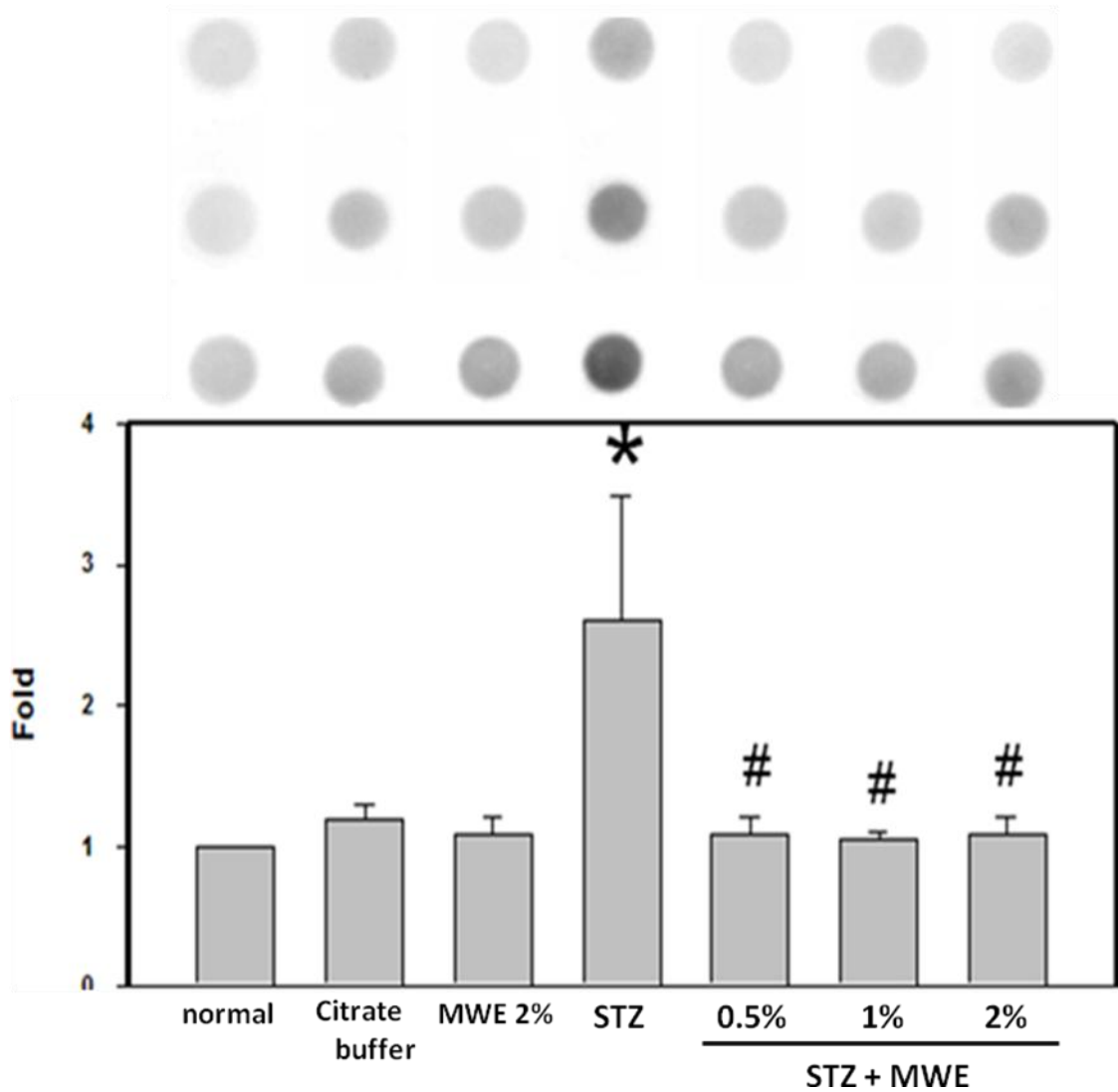


Figure 17A、MWE treated for 6-weeks reduce the ox-LDL in lens of diabetic rats.

(Dot blot)

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. * $P < 0.05$, compared with the normal, # $P < 0.05$, compared with the STZ-induced group.

圖十七 B、處理桑葚水萃物十二週對糖尿病大白鼠水晶體 oxLDL 之影響

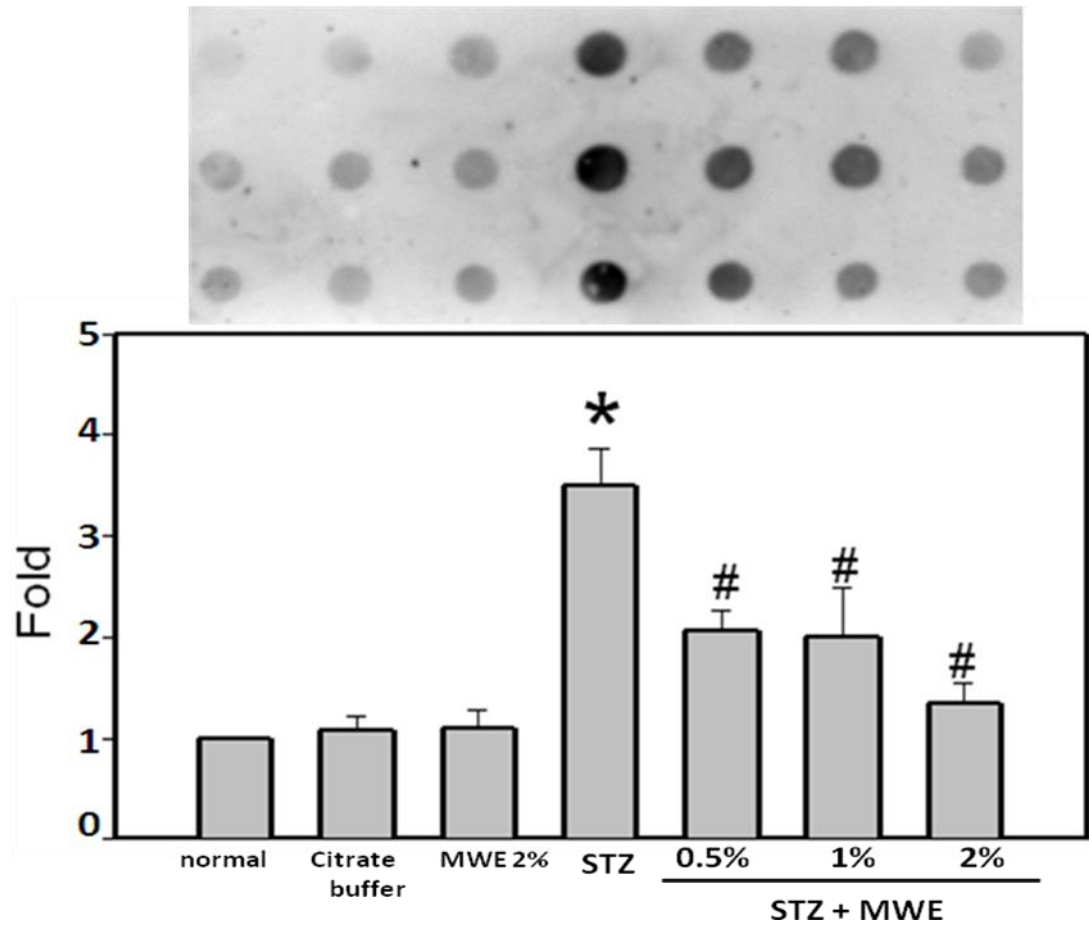


Figure 17B、MWE treated for 12-weeks reduce the ox-LDL in lens of diabetic rats. (Dot blot)

Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. * $P < 0.05$, compared with the normal, # $P < 0.05$, compared with the STZ-induced group.

[第二年]

一. 動物實驗結果

1. 餵食不同濃度桑葚水萃物對於倉鼠體重變化之影響

本實驗倉鼠分組後同時餵食高油脂飲食(動物飼料添加 0.2%膽固醇& 10%玉米油)及添加桑葚水萃物(MWE)之飲水共 8 週，每隔兩週測量其體重並記錄。結果顯示，餵食 HFD 組別第六週體重與正常飲食組相較之下增加 16%，飲食第 8 週則增加 23%。給予 MWE 第八週，0.5%、1%、2%MWE 組別之體重與 HFD 相比分別降低 3%、10%和 8%，不具有顯著意義(Fig.1)。

2. 餵食桑葚水萃物對於倉鼠血清生化值的分析

把倉鼠以高油脂飲食餵食八週後犧牲取其血清，並分析血清中 AST、ALT、HDL、LDL、TG、及 TC，分析結果，餵食 2%MWE 可降低血清中 ALT :17%($p<0.05$)、AST: 8%、HDL: 11%、LDL: 6.9%、TC: 5.6 %、而 TG: 增加 12.9%。除了 ALT 之外，其他數值並沒有統計上的意義(Table 1)。

3. 桑葚水萃物對肝臟變化以及脂質之影響

將倉鼠以高油脂飲食餵食八週後犧牲，取其肝臟秤重並記錄。可觀察到在誘導組的組別中，肝臟呈現粉白色的狀態；分別餵食 0.5%、1%、2%後，肝臟顏色與 HFD 比較起來有恢復的趨勢 (Fig.2)；而秤量各組肝臟，可觀察到餵食桑葚水萃物的組別，其肝臟的重量和 HFD 組別相較之下有減少的趨勢：0.5%減少 3.9%，1%減少 14.5%，2%減少 20.2%，在餵食 2%桑葚水萃物的組別則具有統計上意義($p<0.05$)。

另外在測定肝臟脂質並分析肝臟中脂蛋白表現中，可觀察到 HFD 組別所誘導倉鼠之肝臟脂質，都明顯要比正常組高；而在餵食 0.5%桑葚水萃物組別中，膽固醇下降 0.5%、HDL 下降 4.2%、LDL 下降 3.4%、三酸甘油酯下降 11.4%；在 1%組別中，膽固醇下降 13.4%($p<0.05$)、HDL 下降 12.6%、LDL 下降 13%、三酸甘油酯下降 23.4% ($p<0.05$)；2%組別中，膽固醇下降 25.1%、HDL 下降 17.8% ($p<0.05$)、LDL 下降 24.1% ($p<0.05$)、三酸甘油酯下降 11.4% ($p<0.05$)。(Table. 2)

4. 桑葚水萃物對於倉鼠肝臟和眼睛中過氧化程度的影響

將倉鼠以高油脂飲食餵食八週後犧牲，取其肝臟和眼睛作 TBARS 的分析。肝臟方面，和正常組比較之下，肥胖組 MDA 生成量會明顯多出 35%。餵食桑葚

水草物的組別，會隨著濃度增加，MDA 生成量會明顯被抑制；0.5%下降 44%，1%下降 54%，2%下降 63%。以上肥胖組以及餵食桑葚水草物的組別具有統計上意義($p<0.05$)。

眼睛方面，和正常組比較之下，肥胖組 MDA 生成量會多出 37%。餵食桑葚水草物的組別，會隨著濃度增加，MDA 生成量會被抑制；0.5%下降 44%，1%下降 54%($p<0.05$)，2%下降 63%($p<0.05$)。

5. 桑葚水草物對於倉鼠眼睛視網膜之結構影響

經由高油脂飲食誘導後，取其眼睛作冷凍切片，利用 H&E stain，觀察眼睛之中細胞的變化。染色後結果顯示，未經過 HFD 誘導的組別(Fig. 5A)，其細胞內並無脂肪的堆積；在 HFD 的組別中可明顯看到有脂肪空泡的型成(Fig. 5B)。在餵食桑葚水草物的組別中可觀察到，隨著餵食劑量濃度越高，其脂肪空泡的型成與 HFD 組別比較下有逐漸縮減的趨勢(Fig. 5C.D.E)。0.5%減少 53.7%、1%減少 74.8%、2%減少 93.3%。其量化圖為隨機三個區域作平均，與 HFD 組別比較，餵食桑葚水草物三個組別則具有統計上的意義($p<0.05$)。

另外將眼睛切片做 IHC stain 來觀察 LDL 蛋白的表現。染色後結果顯示，未經過 HFD 誘導的組別(Fig. 6A)，其細胞內並無 LDL 的堆積；在 HFD 的組別中可明顯看到有 LDL 的表現(Fig. 6B)。在餵食桑葚水草物的組別中可觀察到，隨著餵食劑量濃度越高，其 LDL 表現與 HFD 組別比較下有逐漸縮減的趨勢(Fig. 6C.D.E)。0.5%減少 13.7%、1%減少 33.3%、2%減少 56.8%。其量化圖為隨機三個區域作平均，與 HFD 組別比較，餵食桑葚水草物三個組別則具有統計上的意義($p<0.05$)。

二、細胞實驗結果

1. 氧化型 LDL 對於 ARPE-19 視網膜上皮細胞毒性試驗

在許多研究指出，氧化型低密度脂蛋白 (oxLDL) 會影響血管上皮細胞、巨噬細胞。藉由不同濃度的 LDL，經過硫酸銅 (CuSO_4) 右發氧化後，以 Trypan blue 染色計數細胞數目，探討 oxLDL 對 ARPE-19 的影響。本篇實驗使用 10 M 硫酸銅 (CuSO_4) 誘發 LDL 氧化。實驗發現，在加入 50 g/ml LDL 及 10 M 硫酸銅 (CuSO_4) 培養 24 小時後，和正常細胞比較下，ARPE-19 的存活率為 19.7%；加入 100 g/ml LDL 和 10 M 硫酸銅 (CuSO_4) 培養 24 小時後，和正常細胞比較下，ARPE-19 的存活率為 6.8% (Fig.7)。研究發現 APRE-19 與 100 g/ml LDL

和 10 M 硫酸銅 (CuSO₄)培養 24 小時後，對細胞則會造成明顯的凋亡現象，因此接下的實驗，選用 100 g/ml LDL 以及培養時間為 24 小時。

2. 對氧化型 LDL 活性測試(TBARS assay)

LDL 經過氧化後會產生過氧化物質 (MDA)，它會與 2 分子的 thiobarbituric acid (TBA) 生成具螢光性質的聚合物 (TBARS)，因此可經由此聚合物的吸光值換算 MDA 濃度。ARPE-19 和不同濃度的 oxLDL 培養 24 小時後，分別收 medium 以作 TBARS 的分析。當 ARPE-19 和 50 g/ml LDL 和 10 M 硫酸銅 (CuSO₄) 培養 24 小時後，MDA 的生成量約為 24.7 mg/ml protein；而 ARPE-19 和 100 g/ml LDL 和 10 M 硫酸銅 (CuSO₄)培養 24 小時後，MDA 的生成量約為 31.6 mg/ml protein(fig.8)。

3. 氧化型 LDL & 桑葚花青素對於細胞型態的影響

利用光學顯微鏡觀察正常組別、誘導組、加藥組對於細胞型態的變化。在經過 24 小時後，可觀察到加入 100 g/ml LDL 和 10 M 硫酸銅 (CuSO₄)的組別，細胞形態會有明顯改變，包括細胞皺縮、外形不規則、細胞質變少、細胞膜破損、細胞核變明顯這些現象；而在額外加入不同濃度 0.03、0.05、0.1、0.3 mg/ml 的桑葚花青素後，可看到隨著濃度越高，細胞形態恢復的情形就越明顯 (Fig. 9)。

4. 細胞形態& DAPI staining

當細胞進行 apoptosis 時，會有細胞皺縮 (cell shrinkage)、染色質濃染 (chromatin condensation) 及 DNA 裂解片段 (DNA fragmentation)的產生。當細胞 apoptosis 時，則會被 DAPI 染料染上藍色的螢光。在單純使用硫酸銅誘發 LDL 氧化的組別，可發現有大量螢光表現；而在加入了不同濃度的桑葚花青素後，隨著濃度的增加，螢光的表現情形會趨於降低。(Fig.10)

5.不同濃度桑葚萃取物對於 ARPE-19 之毒性試驗

使用 3 種濃度的桑葚花青素：0.05、0.1、0.3mg 至 100 g/ml LDL 和 10 M 誘發傷害的 CuSO₄ 培養 24 小時後，以 MTT assay 測試其存活率。結果顯示，在劑量 0.05mg 組別中，細胞存活率為 25.6%；在劑量 0.1mg 組別中，細胞存活率為 75.6%；在劑量 0.3mg 組別中，細胞存活率為 100%(Fig. 11)。

使用 3 種濃度的桑葚水萃物：0.06、0.08、0.1mg 至 100 g/ml LDL 和 10 M 誘發傷害的 CuSO₄ 培養 24 小時後，以 MTT assay 測試其存活率。結果顯示，在劑量 0.06mg 組別中，細胞存活率為 60.16%；在劑量 0.08mg 組別中，細胞存活

率為 82.29%；在劑量 0.1mg 組別中，細胞存活率為 100%(Fig. 12)。

6. 利用流式細胞儀定量，評估桑葚花青素(MAE)對於 oxLDL 造成

ARPE-19 氧化傷害之影響

以流式細胞儀檢測細胞週期的變化。結果發現，當 ARPE-19 加入 100 g/ml LDL 和 10 M 誘發傷害的 CuSO₄ 培養 24 小時後，sub G1 表現為 76.62%；加入了 0.05mg 桑葚花青素 MAE 後，sub G1 表現為 73.14%；加入了 0.1mg 桑葚花青素 MAE 後，sub G1 表現為 26.76%；加入了 0.3mg 桑葚花青素 MAE 後，sub G1 表現為 1.73%(Fig. 13)

7. 觀察 SREBP-1、CD36 和 oxLDL 之間的表現情形

SREBP-1 和 CD36 皆為 oxLDL receptor，且對 oxLDL 都具有高度親和性。當 ARPE-19 處理 100 g/ml LDL 和 10 M CuSO₄ 和不同濃度桑葚花青素培養 12 小時後，結果顯示在只有處理 100 g/ml LDL 和 10 M CuSO₄ 的組別中，SREBP-1、CD36、oxLDL 表現量明顯比 control 組要來的明顯。而加入了 0.05、0.1、0.3 不同濃度的桑葚花青素處理後，oxLDL receptor 蛋白表現會隨著處理濃度的增加而下降(Fig. 14)。

8. 觀察 pro-apoptotic 和 anti-apoptotic 蛋白之間的表現情形

Bcl-2 和 Bcl-xL 兩者為 Bcl-2 family 之成員，其功能為抑制細胞的凋亡。當 ARPE-19 100 g/ml LDL 和 10 M CuSO₄ 和不同濃度桑葚花青素培養 12 小時後，結果顯示在只有處理 100 g/ml LDL 和 10 M CuSO₄ 的組別中，Bcl-2 和 Bcl-xL 表現量明顯比 control 組要來的少。而加入了 0.05、0.1、0.3 不同濃度的桑葚花青素處理後，anti-apoptotic 蛋白表現會隨著處理濃度的增加而恢復(Fig. 15)。

Caspase-3 是 cysteine preteases 家族成員之一，主要作用在於促進細胞凋亡，而 caspase-3 需經由酵素切割成 active form 的 caspase-3 才會促使細胞凋亡。AIF 的活化也會促使細胞凋亡。當 ARPE-19 100 g/ml LDL 和 10 M CuSO₄ 和不同濃度桑葚花青素培養 12 小時後，結果顯示在只有處理 100 g/ml LDL 和 10 M CuSO₄ 的組別中，active caspase-3 和 AIF 表現量明顯比 control 組要來的多。而加入了 0.05、0.1、0.3 不同濃度的桑葚花青素處理後，pro-apoptotic 蛋白表現會隨著處理濃度的增加而減少(Fig. 16)。

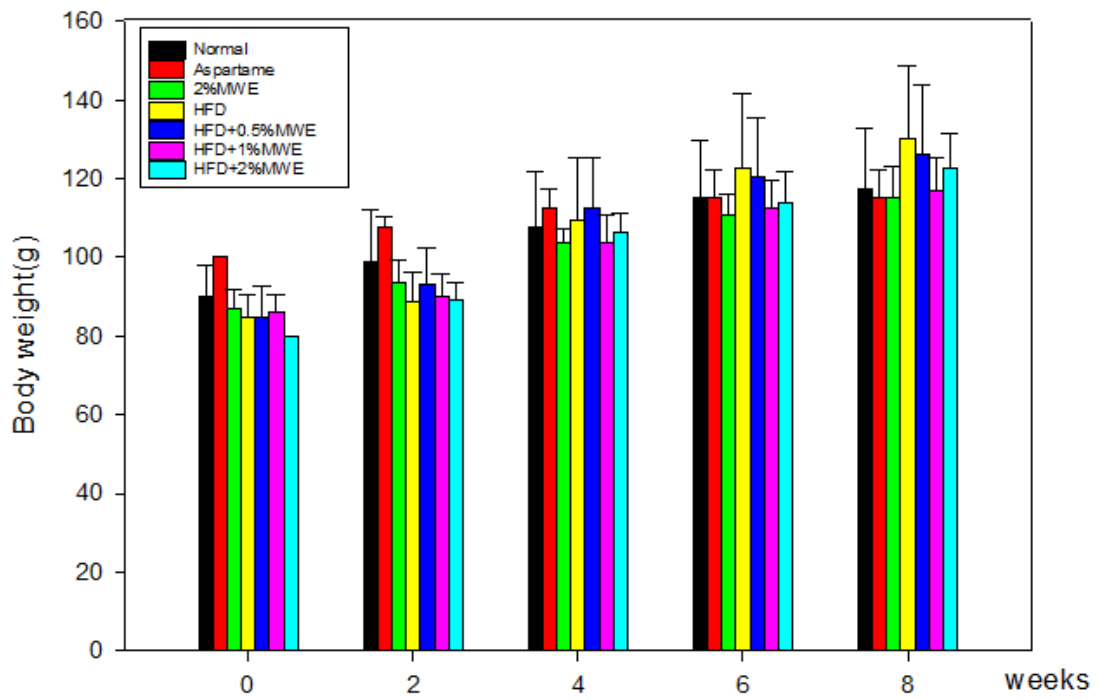


Fig.1 The effect of MWE in high fat diet don't decrease the body weight significant.

Data are shown as means \pm SD.

Table 1 Comparison of serum AST, ALT, HDL-C, LDL-C, triglyceride, and total cholesterol after treatment of MWE.

	Normal	Aspartame	2%MWE	HFD	HFD+0.5%MWE	HFD+1%MWE	HFD+2%MWE
AST (IU/L)	107.5 ±31.3	101.5 ±29.1	113.2 ±32.2	106.1 ±19.5	95.5 ±20.4	91.0 ±26.1	97.6 ±11.3
ALT (IU/L)	80.0 ±8.3	65.5 ±9.3	84.1 ±17.6	83.7 ±12.1	82.1 ±14.3	84.1 ±8.2	69.7 ±9.6*
HDL-C (mg/dl)	73.5 ±3.6	65.7 ±3.8	60.4 ±3.5	103.5 ±18.3#	102.8 ±11.3	100.8 ±9.7	91.6 ±9.2
LDL-C (mg/dl)	13.7 ±1.2	15.5 ±1.0	20.4 ±3.4	64.6 ±22.0#	64.1 ±17.1	75.6 ±25.3	60.2 ±11.2
Triglyceride (mg/dl)	104.0 ±14.0	131.0 ±45.3	219.0 ±52.6	231.5 ±107.4	247.5 ±123.2	235.7 ±64.7	261.5 ±80.9
Total cholesterol (mg/dl)	104.5 ±8.8	95.5 ±3.3	103.7 ±6.0	232.7 ±51.2##	231.7 ±29.7	256.1 ±50.1	219.7 ±17.4

Data shown as means ± SD.

* , P < 0.05, compared with HFD group.

#, P < 0.005, compared with Normal group.

##, P < 0.001, compared with Normal group.

Table 2 Comparison of HDL-C, LDL-C, triglyceride, and total cholesterol after treatment of MWE.

	Control	Aspartame	2%MWE	HFD	HFD+0.5% MWE	HFD+1% MWE	HFD+2% MWE
HDL-C (μ g)	35.06 \pm 5.56	35.37 \pm 4.49	12.90 \pm 11.52	548.74 \pm 143.06 [#]	525.89 \pm 155.10	480.08 \pm 81.72	451.33 \pm 29.85
LDL-C (μ g)	23.13 \pm 4.62	22.23 \pm 6.31	28.82 \pm 12.30	183.29 \pm 36.36 [#]	177.20 \pm 44.12	159.54 \pm 12.95	139.19 \pm 12.14 [*]
Cholesterol (μ g)	40.32 \pm 18.72	49.54 \pm 6.99	50.65 \pm 22.40	853.35 \pm 111.12 [#]	849.66 \pm 176.06	739.24 \pm 85.66 [*]	639.45 \pm 53.06 [*]
Triglycerides (μ g)	18.61 \pm 10.27	55.78 \pm 7.70	64.22 \pm 20.81	520.22 \pm 83.70 [#]	460.95 \pm 56.15	398.49 \pm 56.75 [*]	306.68 \pm 79.01 [*]

Data shown as means \pm SD.

* P < 0.05, compared with HFD group.

#, P < 0.001, compared with Normal group.

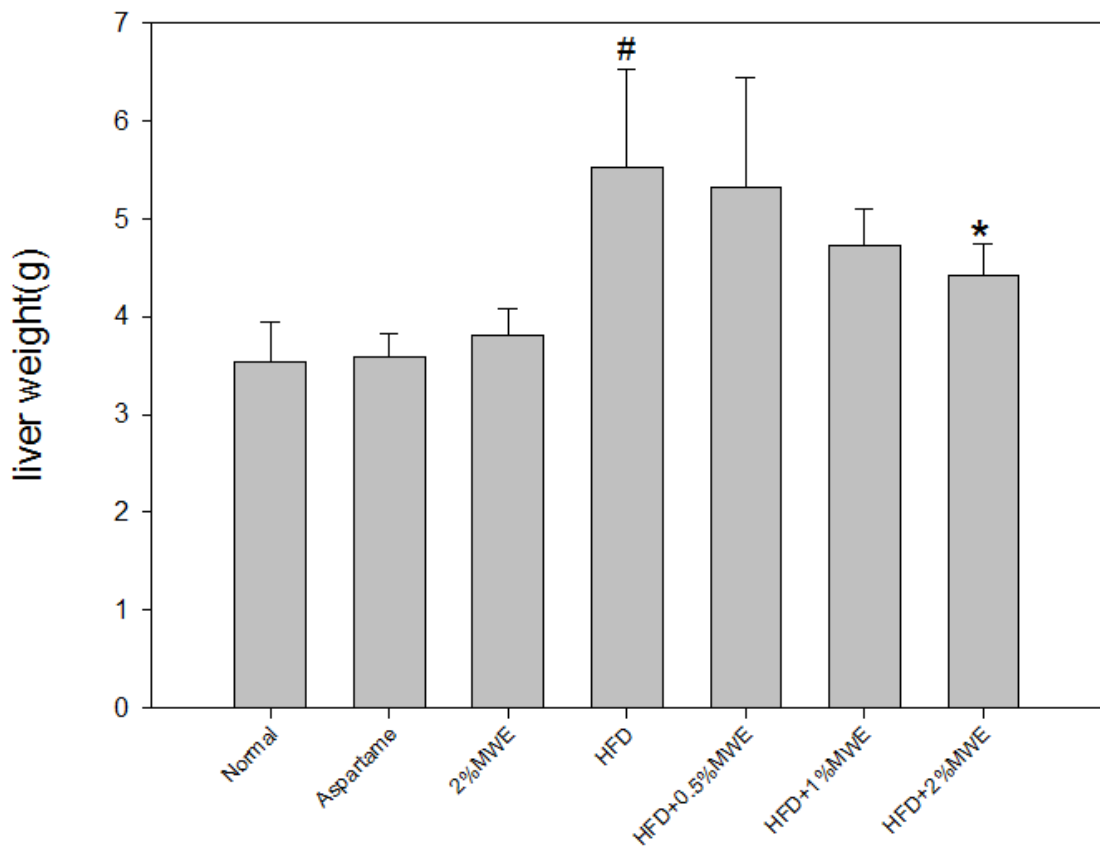
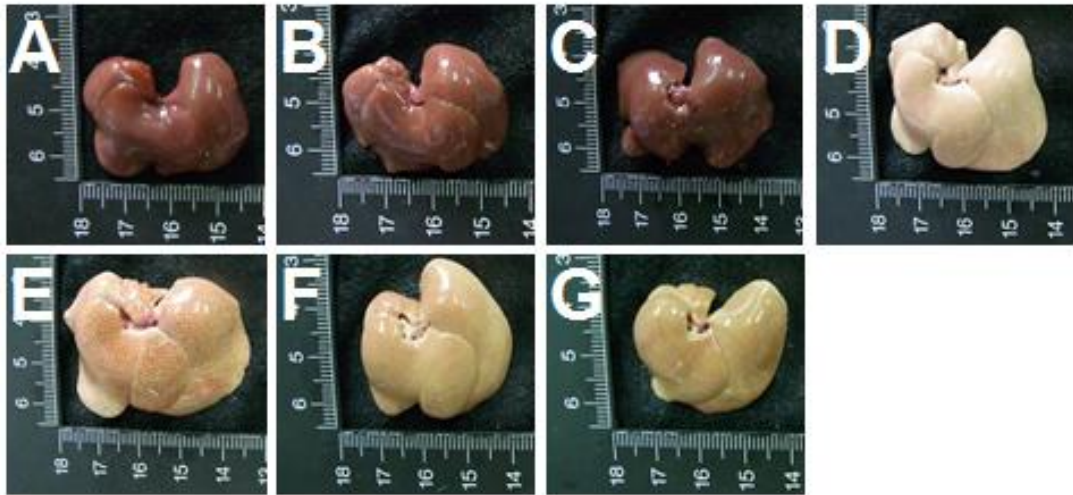


Figure 2. Treatment of MWE can reduce liver weight significantly, and it can improve the phenomenon of fatty liver slightly.

(A)Normal.(B)aspartame.(C)only 2% MWE. (D)high fat diet. (E)high fat diet with 0.5%MWE. (F)high fat diet with 1% MWE. (G)high fat diet with 2% MWE.

*, $P < 0.05$, compared with HFD group.

#, $P < 0.005$, compared with normal group.

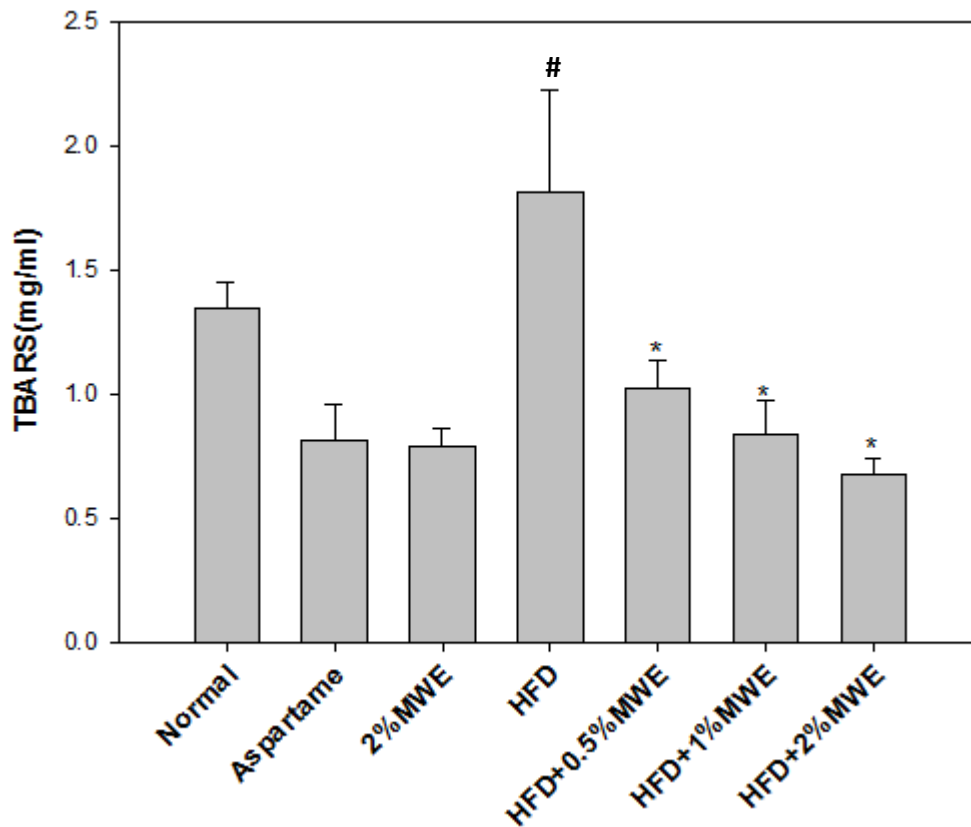


Figure 3. Inhibition of MWEs on liver lipid peroxidation levels in HFD-fed hamsters. The data is presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$).

*, $P < 0.05$, compared with HFD group.

#, $P < 0.05$, compared with normal group.

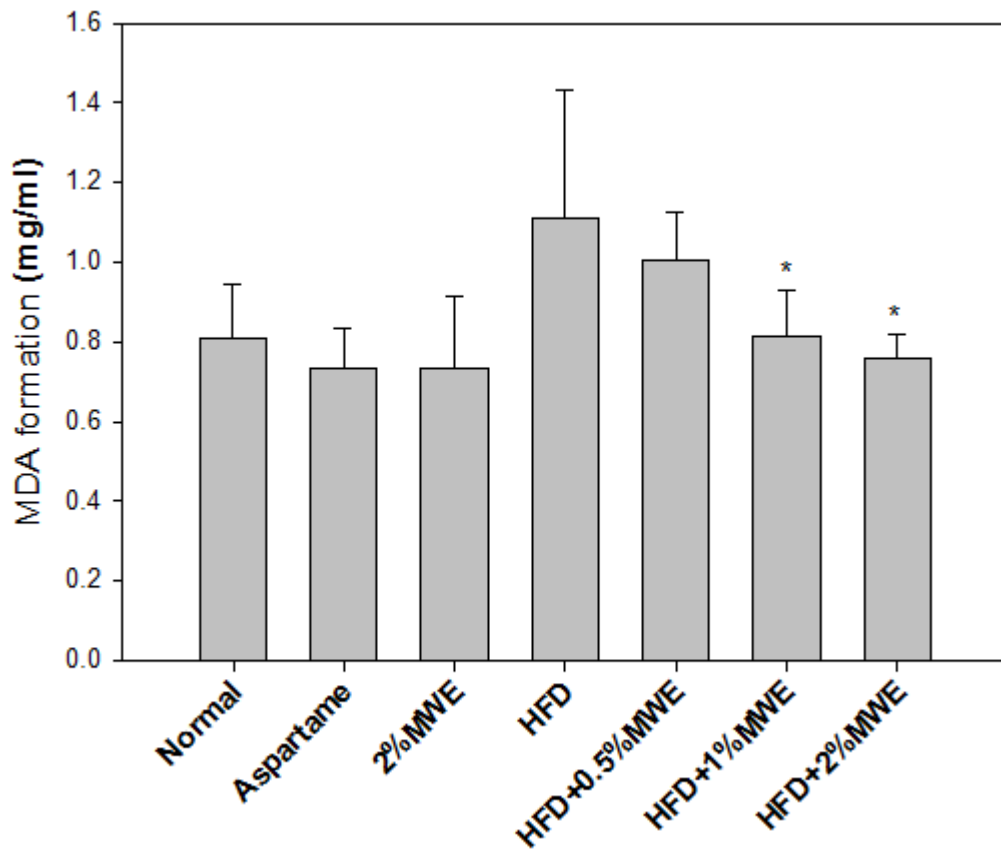


Figure 4. MWEs Inhibit lipid peroxidation levels in eyes in HFD-fed hamsters. The data is presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$).

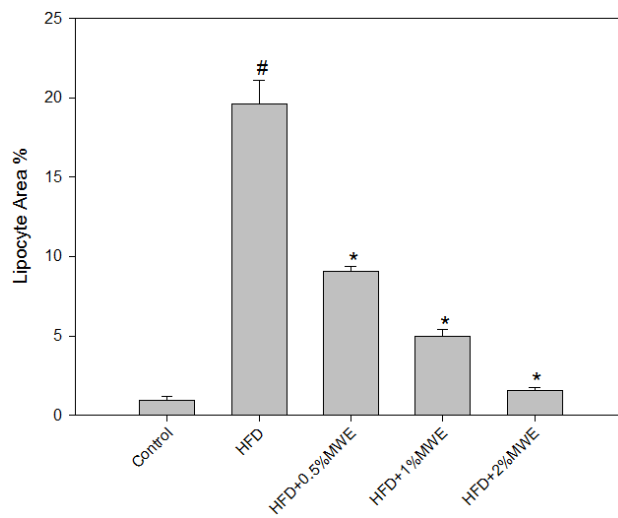
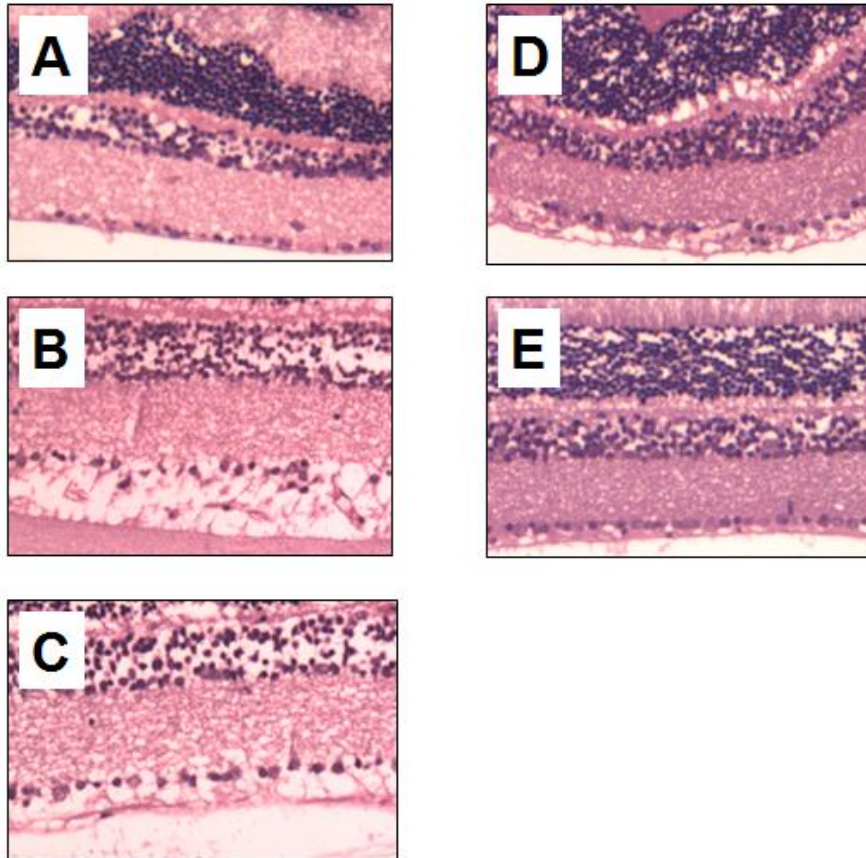


Figure 5. Treatment of MWE can reduce lipocyte area in eyes delaminate significantly. (A)control. (B)high fat diet. (C)high fat diet with 0.5% MWE. (D)high fat diet with 1% MWE. (E)high fat diet with 2%MWE.

*****, $P < 0.05$, compared with HFD group.

#, $P < 0.005$, compared with control group.

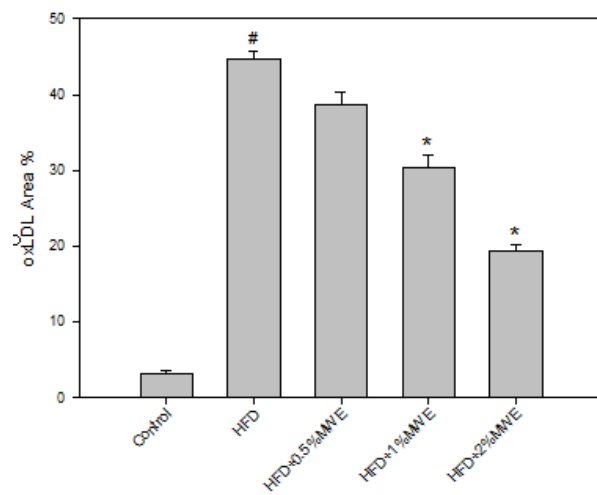
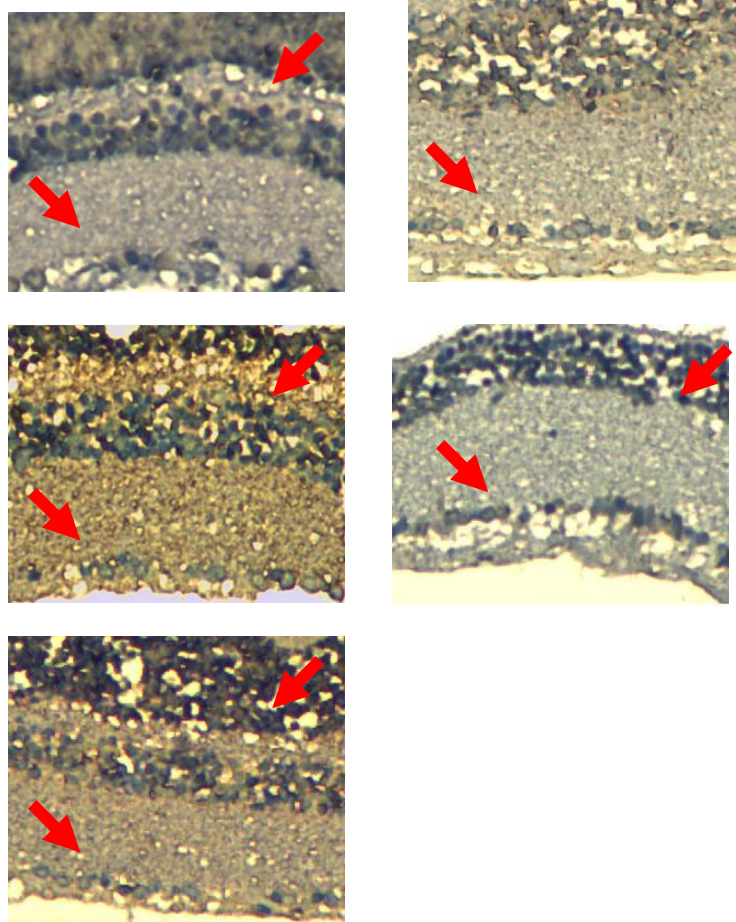


Figure 6. Treatment of MWE can reduce oxLDL area in eyes delaminate significantly. (A)control. (B)high fat diet. (C)high fat diet with 0.5% MWE. (D)high fat diet with 1% MWE. (E)high fat diet with 2%MWE.

*****, $P < 0.05$, compared with HFD group.

#, $P < 0.005$, compared with control group.

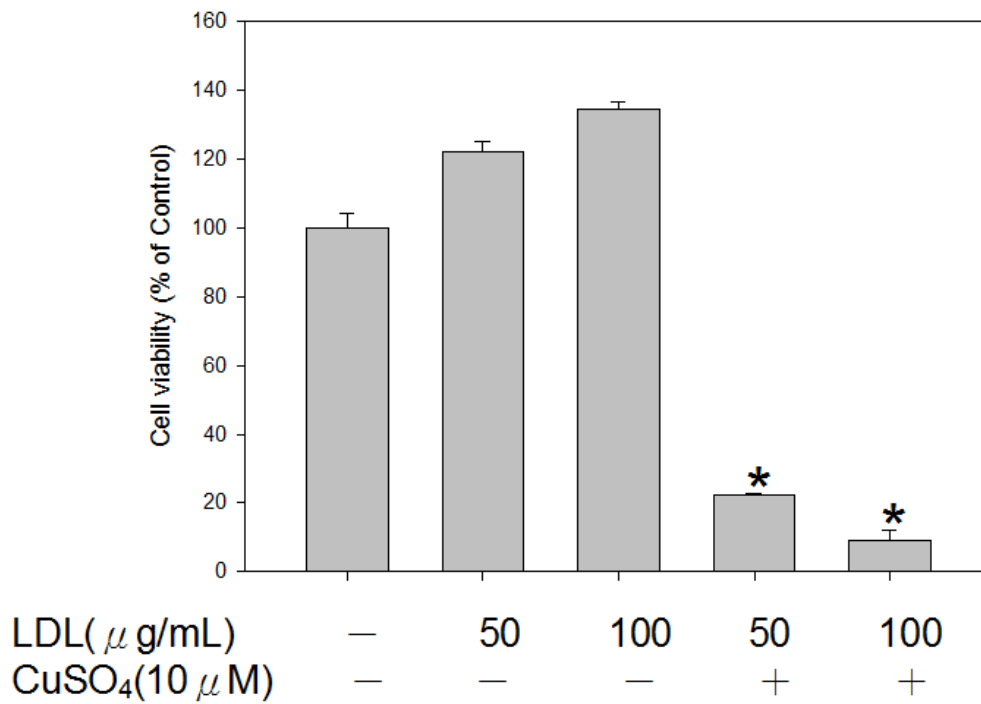
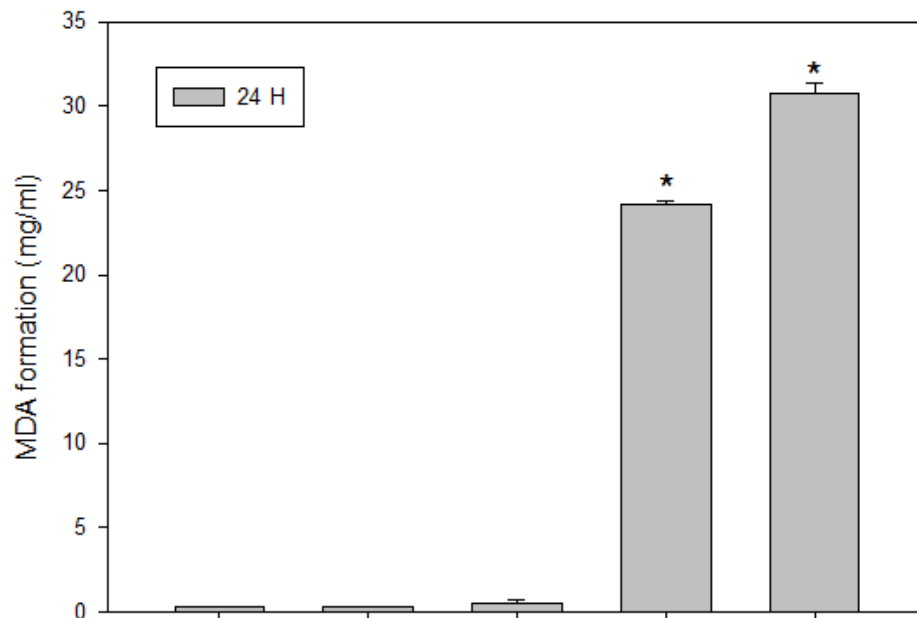


Figure 7. Effect of CuSO₄ induced LDL on cell viability of ARPE-19.

ARPE-19 treated with 50 $\mu\text{g/mL}$ or 100 $\mu\text{g/mL}$ LDL accompanied by 10 μM CuSO₄ for 24 hrs. Cell viability was analyzed by MTT assay. The data were represented as means \pm SD from 3 samples for each group.

* $p < 0.05$ compared with normal group.



LDL(μ g/mL)	—	50	100	50	100
CuSO ₄ (10 μ M)	—	—	—	+	+

Fig 8. CuSO₄ induced lipid peroxidation in LDL.

ARPE-19 treated 50mg/mL and 100mg/mL with 10mM CuSO₄ for 24 hrs. The data were means \pm SD from 3 samples for each group.

* p<0.05 compared with normal group.

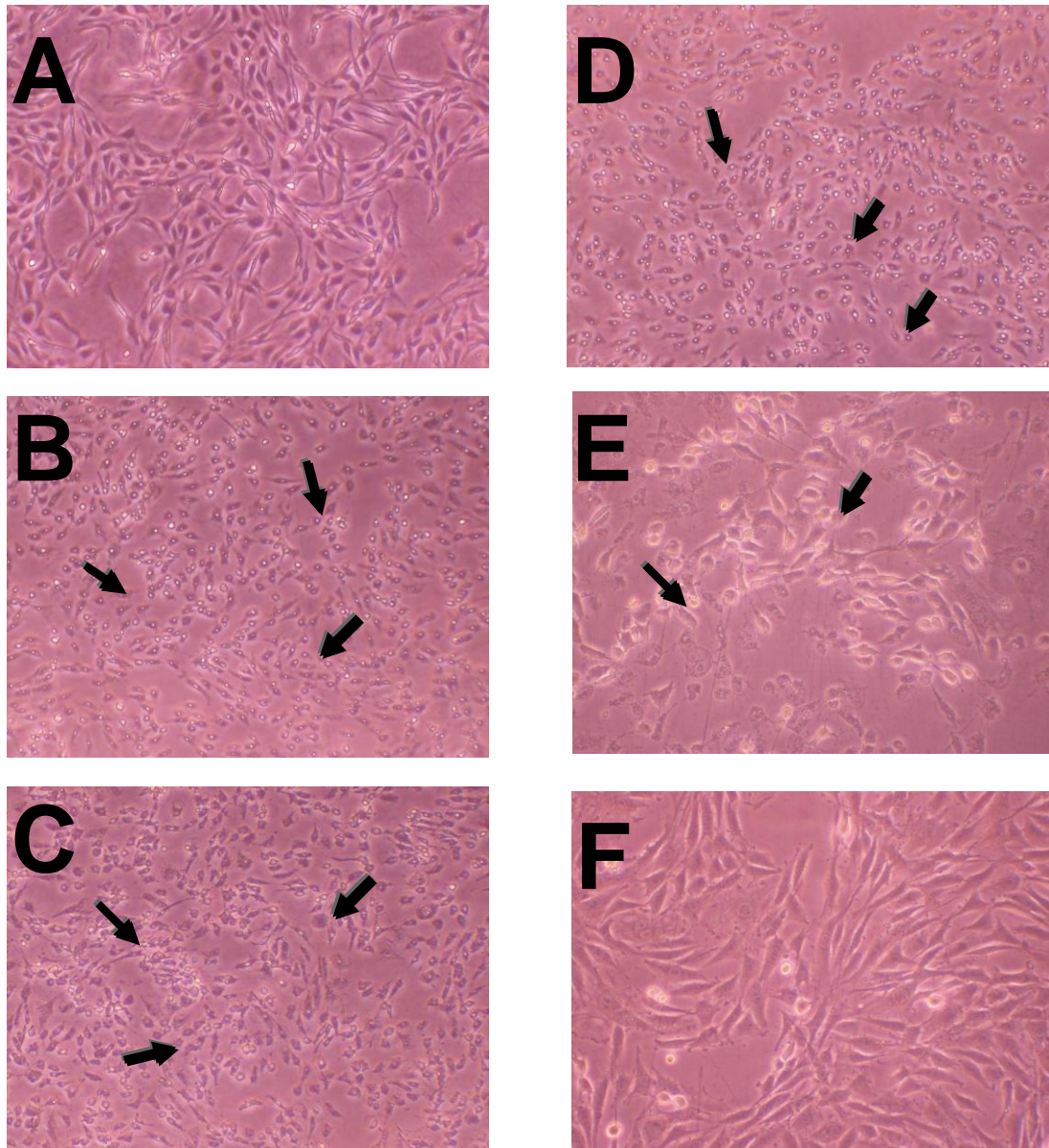


Figure 9. Mulberry anthocyanin extracts rescued oxLDL-induced cell death in ARPE-19 (morphological observation).

(A) ARPE-19 (B) ARPE-19 treated with 100 μ g/mL oxLDL only. ARPE-19 with 100 μ g/mL oxLDL and (C) 0.03 mg MAE; (D) 0.05 mg MAE; (E) 0.1 mg MAE; and (F) 0.3 mg MAE. The arrows pointed out showed shrinkage cells means dead cells.

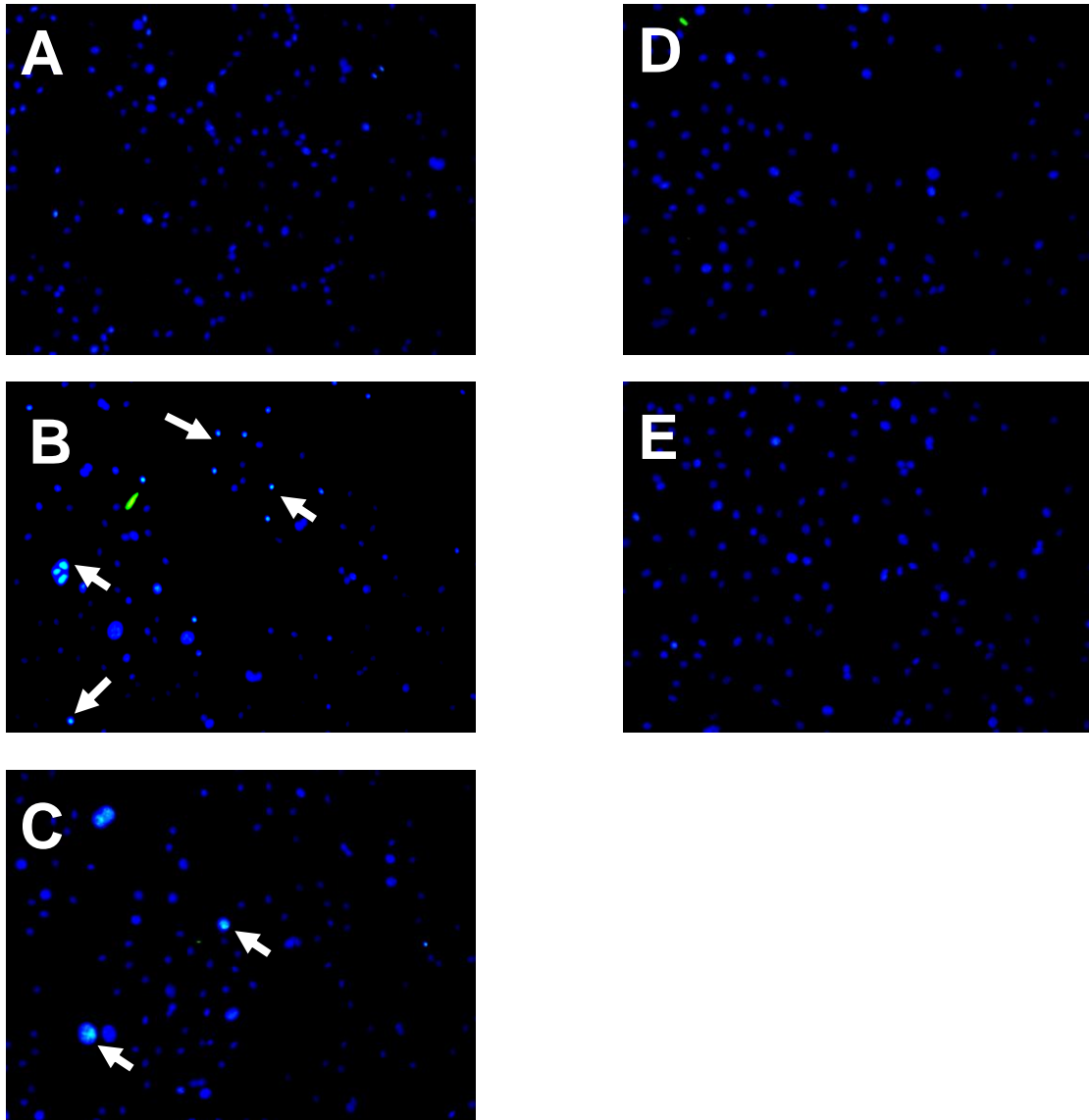
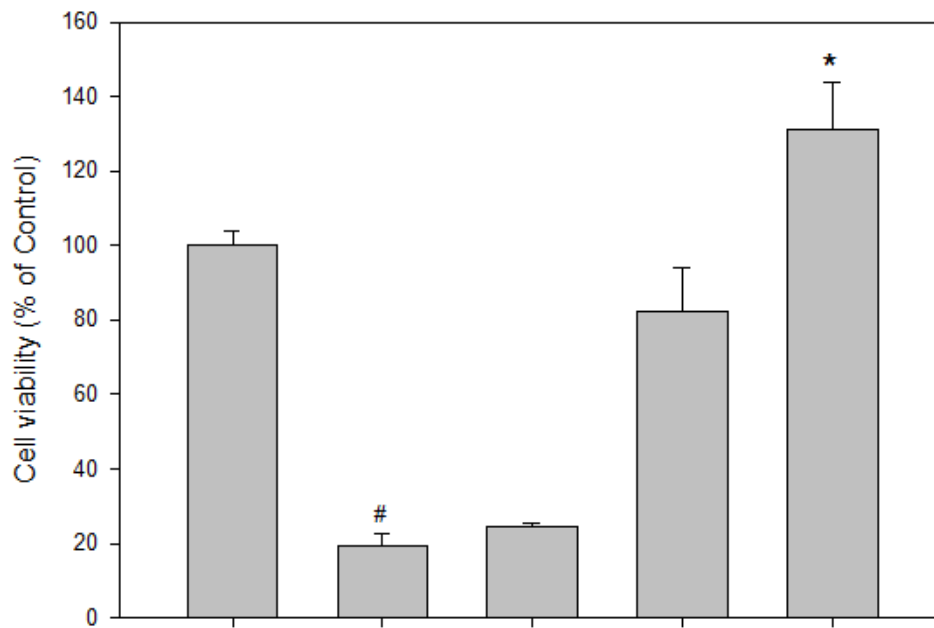


Fig 10. Mulberry anthocyanin extracts rescued oxLDL-induced cell death in ARPE-19 (DAPI).

ARPE-19 treated 100 μ g/mL LDL with 10 μ M CuSO₄ in the MAE for 12 hrs(A)
 ARPE-19 (B) ARPE-19 treated with 100 μ g/mL oxLDL only. ARPE-19 with
 100 μ g/mL oxLDL and; (C) 0.05 mg MAE; (D) 0.1 mg MAE; and (E) 0.3 mg MAE.
 The arrows pointed out showed the dead cell.



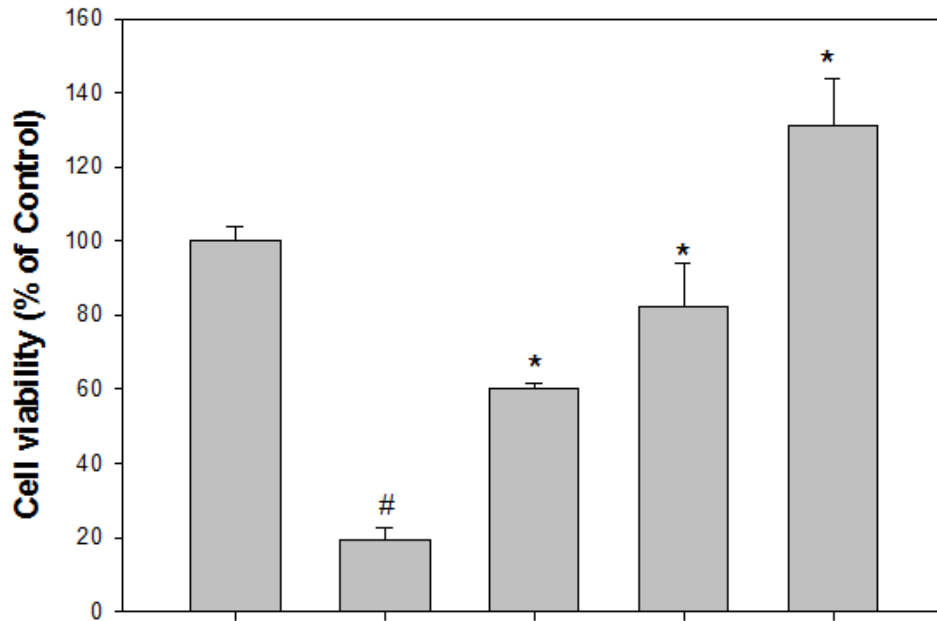
LDL(μ g/mL)	—	100	100	100	100
CuSO ₄ (10 μ M)	—	+	+	+	+
MAE(mg)	—	—	0.05	0.1	0.3

Figure 11. Mulberry anthocyanin extracts rescued oxLDL-induced cell death in ARPE-19.

The data were represented as mean \pm SD from 3 samples for each group.

^{*}, P < 0.05, compared with oxLDL treatment.

[#], P < 0.005, compared with control group.



LDL (μ g/mL)	—	100	100	100	100
CuSO ₄ (10 μ M)	—	+	+	+	+
MWE (mg)	—	—	0.06	0.08	0.1

Figure 12. Mulberry water extracts rescued oxLDL-induced cell death in ARPE-19.

The data were represented as mean \pm SD from 3 samples for each group.

*, P < 0.05, compared with oxLDL treatment.

#, P < 0.005, compared with control group.

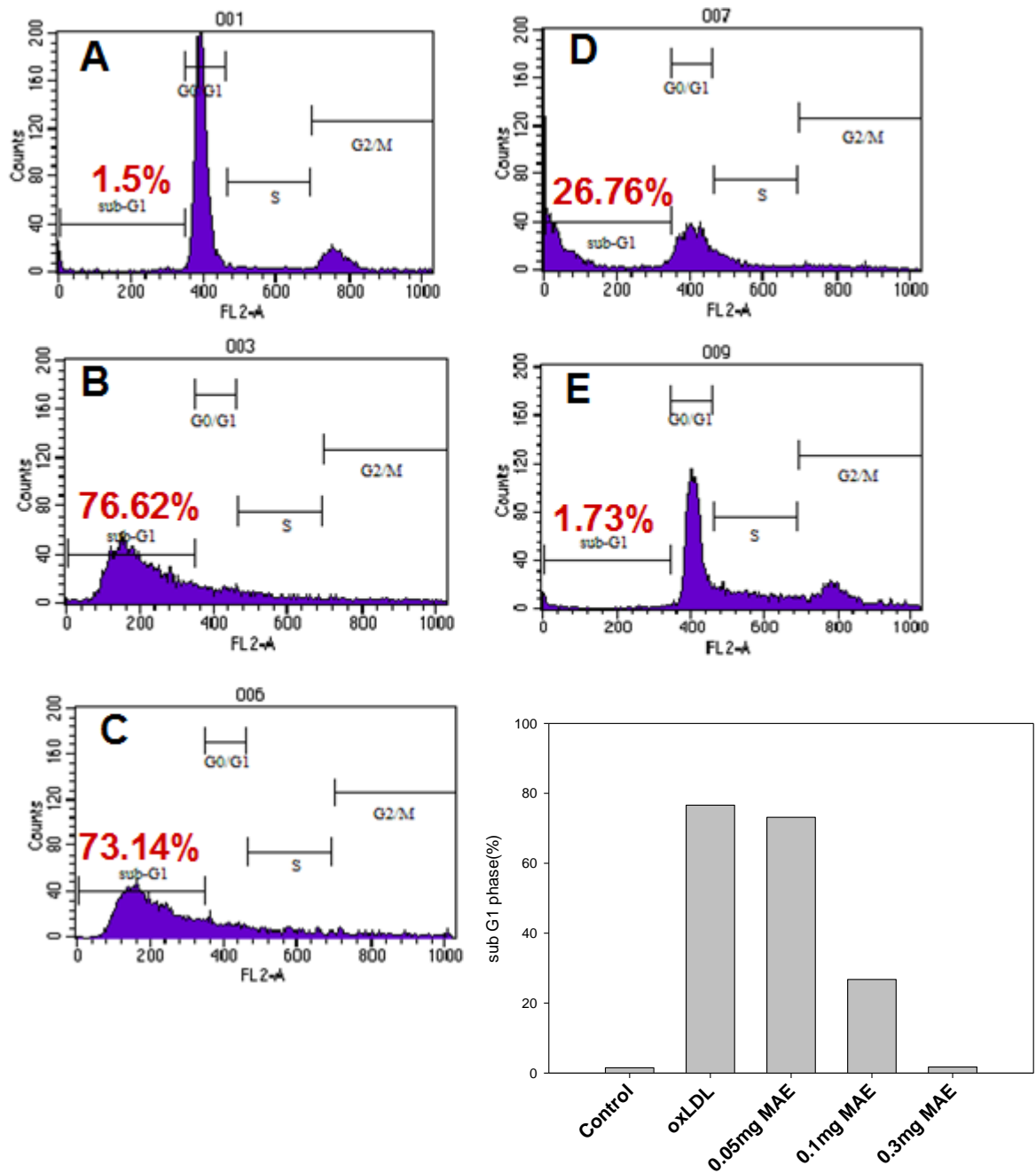


Fig 13. The effect of mulberry anthocyanin extracts inhibits ARPE-19 cell apoptosis and cell cycle progress by flow cytometry.

ARPE-19 treated 100 μ g/mL LDL with 10 μ M CuSO₄ in the MAE for 24 hrs. Cell cycle was analysis by flow cytometry.(A) ARPE-19 (B) ARPE-19 treated with 100 μ g/mL oxLDL only. ARPE-19 with 100 μ g/mL oxLDL and; (C) 0.05 mg MAE; (D) 0.1 mg MAE; and (E) 0.3 mg MAE.

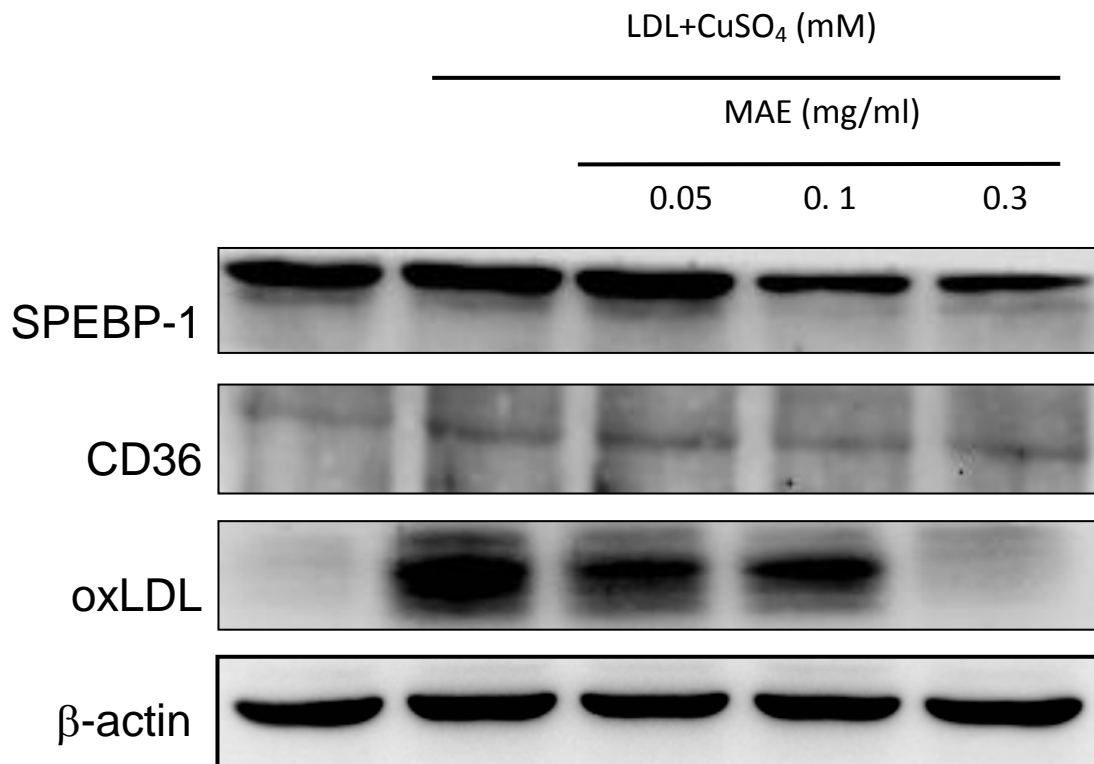


Fig. 14 Immunoblot analysis of the expression of LDL associated receptor in ARPE-19 treated oxLDL.

ARPE-19 treated 100 μ g/mL LDL with 10 μ M CuSO₄ in the MAE for 12 hrs. The cell lysates prepared and subjected to western blot analysis.

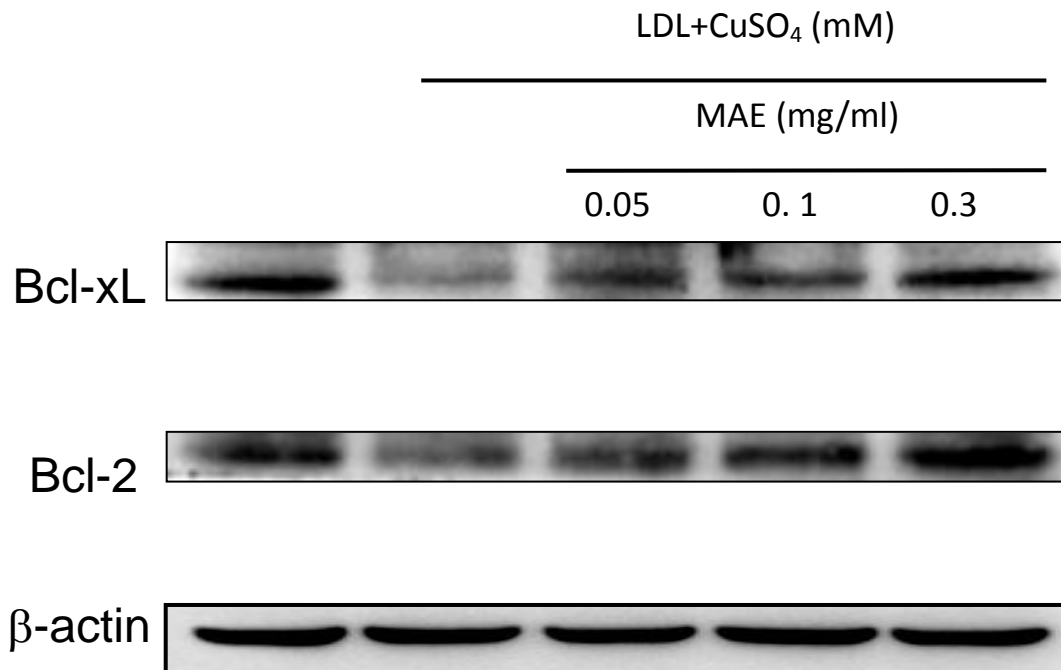


Fig. 15 Immunoblot analysis of the expression of anti-apoptotic protein in ARPE-19 treated oxLDL.

ARPE-19 treated 100 μ g/mL LDL with 10 μ M CuSO₄ in the MAE for 12 hrs. The cell lysates prepared and subjected to western blot analysis.

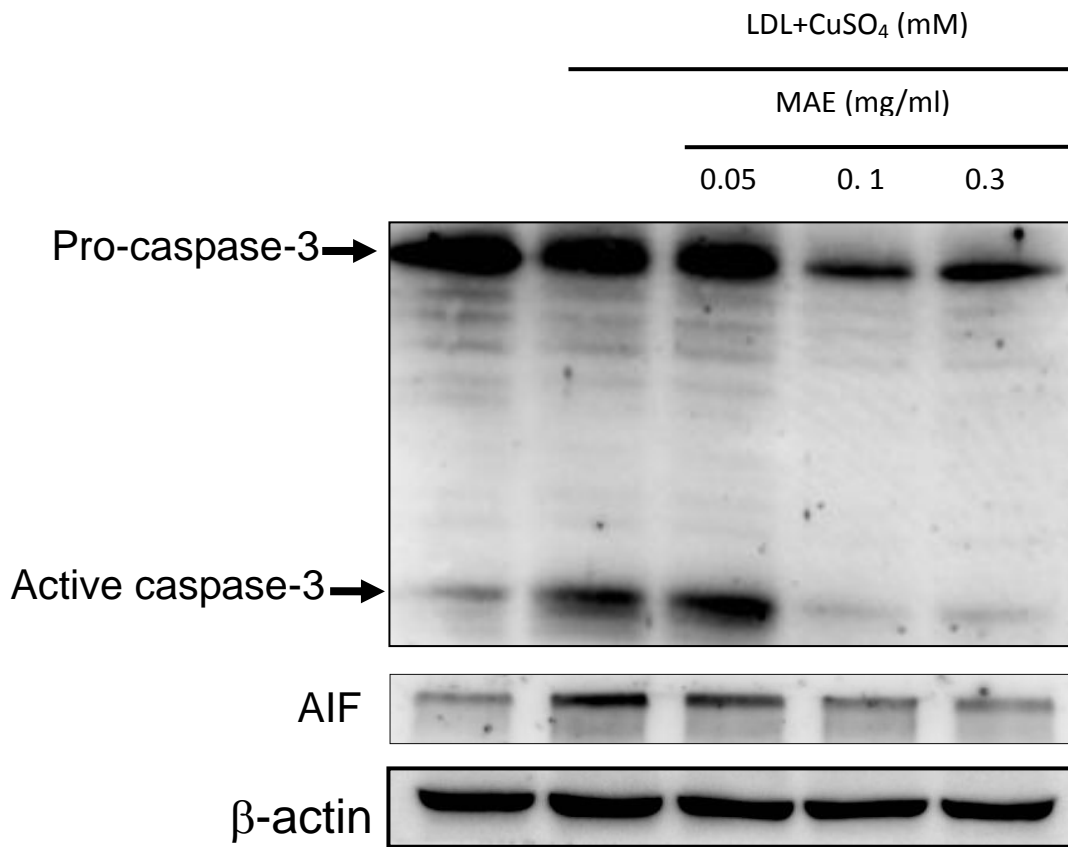


Fig. 16 Immunoblot analysis of the expression of pro-apoptotic protein in ARPE-19 treated oxLDL.

ARPE-19 treated 100 μ g/mL LDL with 10 μ M CuSO₄ in the MAE for 12 hrs. The cell lysates prepared and subjected to western blot analysis.

參考文獻

1. Young, J.S., *Age-related eye diseases: a review of current treatment and recommendations for low-vision aids*. Home Healthc Nurse, 2008. **26**(8): p. 464-71; quiz 472-3.
2. Klein, R., B.E. Klein, and K.L. Linton, *Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study*. Ophthalmology, 1992. **99**(6): p. 933-43.
3. Winkler, B.S., et al., *Oxidative damage and age-related macular degeneration*. Mol Vis, 1999. **5**: p. 32.
4. Shen, J.K., et al., *Oxidative damage in age-related macular degeneration*. Histol Histopathol, 2007. **22**(12): p. 1301-8.
5. Seddon, J.M., et al., *Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group*. JAMA, 1994. **272**(18): p. 1413-20.
6. *A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8*. Arch Ophthalmol, 2001. **119**(10): p. 1417-36.
7. Aviram, M., *Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1993. **98**(1): p. 1-9.
8. Hevonoja, T., et al., *Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL*. Biochimica et Biophysica Acta, 2000. **1488**: p. 189-210.
9. Charlton-Menys, V. and P.N. Durrington, *Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules*. Exp Physiol, 2008. **93**(1): p. 27-42.
10. Moore, K.J. and M.W. Freeman, *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1702-11.
11. Catapano, A.L., F.M. Maggi, and E. Tragni, *Low density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis*. Curr Opin Cardiol, 2000. **15**(5): p. 355-63.
12. Gaut, J.P. and J.W. Heinecke, *Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2001. **11**(3-4): p. 103-12.
13. Esterbauer, H., G. Wag, and H. Puhl, *Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 566-76.
14. Matsuura, E., et al., *Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis*. Prog Lipid Res, 2006. **45**(6): p. 466-86.
15. Tserentsoodol, N., et al., *Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via*

- a low density lipoprotein receptor-mediated process.* Mol Vis, 2006. **12**: p. 1306-18.
16. Jeon, H. and S.C. Blacklow, *Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor.* Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 535-62.
 17. Kamei, M., et al., *Scavenger receptors for oxidized lipoprotein in age-related macular degeneration.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(4): p. 1801-7.
 18. Hayes, K.C., et al., *Retinal pigment epithelium possesses both LDL and scavenger receptor activity.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989. **30**(2): p. 225-32.
 19. Elner, V.M., *Retinal pigment epithelial acid lipase activity and lipoprotein receptors: effects of dietary omega-3 fatty acids.* Trans Am Ophthalmol Soc, 2002. **100**: p. 301-38.
 20. Hoppe, G., et al., *Oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of processing of photoreceptor outer segments by RPE.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(11): p. 2714-20.
 21. Curcio, C.A., et al., *Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(1): p. 265-74.
 22. Hyman, L. and R. Neborsky, *Risk factors for age-related macular degeneration: an update.* Curr Opin Ophthalmol, 2002. **13**(3): p. 171-5.
 23. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revised. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 816.
 24. Liu, L.K., Lee, H.J., Shih Y.W., Chyau K.C., Wang, C.J. Mulberry anthocyanin extracts inhibit LDL oxidation and macrophage-derived foam cell formation induced by oxidative LDL. J. Food Biochem 2008; 73: H113-6.
 25. Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994) Antioxidative pigments isolated from the seeds of phaseolus vulgaris L. J. Agric. Fd. Chem., 42, 248-251.
 26. Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1996) Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from Phaseolus vulgaris L. Biochem. Pharmacol., 52, 1033-1039.
 27. Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T. (1998) Dietary cyanidin 3-o- β -D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. Lipids, 33, 583-588.
 28. Tsuda, T., Horio, F., Kitoh, J. and Osawa, T. (1999) Protective effects of dietary cyaniding 3-o- β -D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. Arch. Biochem. Biophys., 268, 316-366.
 29. Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T. (1999) Absorption and metabolism of cyaniding 3-o- β -D-glucoside in rats. FEBS Lett, 449, 179-182.

30. Edenharder, R., Kurz, P., John, K., Burgard, S. and Seeger, K. (1994) In vitro effect of vegetable and fruit juices on the mutagenicity of 2- amino-3-methylimidazo [4,5- f] quinoline, 2- amino- 3,4- dimethylimidazo [4,5- f] quinoxaline and 2- amino- 3,8- methylimidazo [4,5- f] quinoline. *Fd. Chem. Toxicol.*, 32, 443-459.
31. Eedenharder, R., Lepold, C. and Kries, M. (1995) Modifying actions of solvent extracts from fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella tryphimurium* TA98. *Mutat. Res.*, 341, 303-318.
32. Yishimoto, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamakawa, O., Yamaguchi, M. and Yamada, J. (1999) Antimutagenicity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 537-541.
33. Koide, T., Kamei, H., Hashimoto, Y., Kojima, T. and Hasegawa, M. (1996) Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 11, 273-277.
34. Koide, T., Hashimoto, Y., Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M. and Terabe, K. (1997) Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 12, 277-280.
35. Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N. and Shirai, T. (2001) Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-6)pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F334 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine, *Cancer Lett.*, 171, 17-25.
36. Ramirez-Tortosa, C., Andersen, O.M., Gardner, P.T., Morrice, P.C., Wood, S.G., Duthie, S.J., Collins, A.R. and Duthie, G.G. (2001) Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats, *Free Radic. Biol. Med.*, 31, 1033-1037.
37. Rankin, S.M., De Whalley, C.V., Hoult, R.S., Jessup, W., Wilkins, G.M., Collard, T. and Leake, D.S. (1993) The modification of low density lipoprotein by the flavonoids muricetin and gossypetin. *Biochem. Pharmacol.*, 45, 67-75.
38. De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R., Jessup, W. and Leake, D.S. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1743-1750.
39. Thanka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Yoshimi, N. and Mori, H. (1993) Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rat. *Cancer Res.*, 53, 2775-2779.
40. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Okamoto, M., Mori, H. and Hara, A.

- (1994) Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and post-initiation phase. *Cancer. Res.*, 54, 1359-2365.
41. Kawamori, T., Thanka, T., Kojima, T., Suzui, M., Ohnishi, M. and Mori, H. (1994) Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn. J. Cancer Res.*, 54, 2359-2365.
42. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M. and Mori, H. (1995) Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer (Suppl.)*, 75, 1433-1439.
43. Hirose, Y., Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita H. and Satoh, K. (1995) Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rat. *Carcinogenesis*, 16, 2337-2342.
44. Tseng, T.H., Wang, C.J., Kao, E.S. and Chu, C.Y. (1996) Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, 101, 137-148.
45. Wang, C.J., Lee, M.J., Chang, M.C. and Lin, J.K. (1995) Inhibition of tumor promotion in benzo(a)pyrene-initiated CD-1 mouse skin by crocetin. *Carcinogenesis*, 16, 187-191.
46. Tseng, T.H., Kao, T.W., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.L. and Wang, C.J. (2000) Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of RB phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem. Pharmacol.*, 60, 307-315.
47. Handberg, A., Levis, K., Hojlund, K., Beck-Neilsen, H. Identification of the oxidized Low-density lipoprotein scavenger receptor CD 36 in plasma: a novel marker of insulin resistance. *Circulation* 2006; 114: 1169-1176.
48. Garvey, W.T., Kwon, S., Zheng, D., et al. Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes* 2003; 52: 453-462.
49. Krentz, A.J., Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2003; 5: S19-S27.
50. Krauss, R.M., Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 1496-1504.
51. Beck, J., Ferrucci, L., Sun, K., et al. Circulating oxidized low-density lipoproteins are associated with overweight, obesity, and low serum carotenoids in older community-dwelling women. *Nutrition* 2008; 24: 964-968.
52. Holvoet, P., Mertens, A., Verhamme, P., et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler*

- Thromb Vasc Biol 2001; 21: 844-848.
53. Keaney, J.F., Larson, M.G., Vasani, R.S., et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 434-439.
54. Yamada, Y., Tian, J., Yang, Y., et al. Oxidized low density lipoproteins induce a pathologic response by retinal pigmented epithelial cells. *J Neurochem* 2008 (In publishing)
55. Hanneken, A., Lin, F.F., Johnson, J., Maber, P. Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006; 47: 3164-3177.

計畫成果自評

一、本計劃之研究成果

本研究在第一年使用苗栗農改所之桑葚 (voucher specimen 76C002)，將桑葚水草物(MWE)餵食 STZ 誘導之糖尿病鼠，觀察其延緩糖尿病引起的眼病變的成效，並檢查因糖尿病引起的 oxLDL 與眼病變的相關性。我們發現桑葚水草物可以減緩糖尿病引起的高血脂症狀，並可延緩糖尿病併發的白內障及眼底視網膜病變。另外以肥胖動物為研究模式，探討 oxLDL 在眼組織中的變化及影響。結果發現，當倉鼠餵食高濃度脂質飲食會使眼底組織脂肪含量增加而改變組織的型態，當加入了桑葚水草物後，脂質增加的現象顯著改善，並呈現 dose-dependent 現象。經眼組織進行蛋白分析後，發現眼組織中的 oxLDL 在肥胖倉鼠中會增加，而桑葚水草物可以顯著的降低 oxLDL。在細胞實驗中，桑葚水草物也呈現因降低 oxLDL 的特性而減低 oxLDL 在 ARPE-19 引起的 apoptosis。本研究所建立的兩種動物模式及細胞實驗證實桑葚水草物具有因減低 oxLDL 而延緩眼病變的效用，有發展成為眼睛保健食品之潛能。另外 76C002 桑葚之品種權為台灣所擁有，具在地之獨特性，此項研發成果有助於提升其經濟價值。

二、本研究與醫療保健之相關性

本研究乃依行衛生署 97 年度科技發展計畫重點項目 3-11 保健食品之保健功效項目及其評估方法之研究，加以設計並施行，為發展並建立保健食品之保健功效及其評估方法，以因應產業界對保健食品之保健功效訴求多樣化之需要，並利日後提供衛生署對健康食品之保健功效、評估方法及審查作業之推展。健康食品之開發勢趨成熟，現今在市面上所流通之保健食品亦不計其數。然而，獲得衛生署所認可之健康食品卻僅有四十多種，可見以現有之健康食品功能性規範，並不足以滿足日趨增加的健康食品市場。台灣人民生活日漸富裕，文明病之病患亦是日漸增加，尤其以糖尿病患者日益增加，且屬於隱性的高血糖患者以日益增多，在推行多時的健康食品管理法中已訂定調節血糖之功能性規範，但現今卻沒有針對已患有糖尿病之國人，減緩相關併發症之功能進行規範之訂定。本研究方法之建立，將有助於糖尿病患者減緩視網膜病變之作用。

三、學術貢獻

我們已提出桑葚水草物及其抗氧化活性成分有效延緩脂質代謝異常引起之眼病變的物質，並由結果中得知其可能的相關機轉。本研究之成果已有二篇研討會

論文，目前正在撰寫 SCI 論文，預計產出 2 篇。

四、其他

本研究之進行已產出兩位碩士畢業生及完成一位大學生之研究方法訓練。我們業已提出桑椹萃物及其抗氧化活性成分有效延緩脂質代謝異常引起之眼病變的物質，並由結果中得知其可能的相關機轉。故本研究結果將可配合政府發展保健食品並提供產學合作，並可合乎國家以預防醫學替代治療醫學並降低醫療成本之政策。本研究之主角桑椹已在民間廣被使用甚久，依本研究數據，將可在推廣保健食品時積極強調科學數據及其相關效用。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/10/31

國科會補助計畫	計畫名稱: 桑椹萃取物及功能性成分延緩糖尿病及肥胖引起眼部病變之研究(2/2)
	計畫主持人: 李慧禎
	計畫編號: 99-2321-B-040-003- 學門領域: 保健食品研究開發
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：李慧禎		計畫編號：99-2321-B-040-003-					
計畫名稱：桑椹保健食品之研究開發--桑椹萃取物及功能性成分延緩糖尿病及肥胖引起眼部病變之研究(2/2)							
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	0	0	100%		
		研討會論文	3	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	2	0	100%	人次	
		博士生	0	0	0%		
博士後研究員		0	0	0%			
專任助理		0	0	0%			
國外	論文著作	期刊論文	0	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（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）

一、本計畫之研究成果

本研究在第一年使用苗栗農改所之桑葚（voucher specimen 76C002），將桑椹水萃物(MWE) 餵食 STZ 誘導之糖尿病鼠，觀察其延緩糖尿病引起的眼病變的成效，並檢查因糖尿病引起的 oxLDL 與眼病變的相關性。我們發現桑椹水萃物可以減緩糖尿病引起的高血脂症狀，並可延緩糖尿病併發的白內障及眼底視網膜病變。另外以肥胖動物為研究模式，探討 oxLDL 在眼組織中的變化及影響。結果發現，當倉鼠餵食高濃度脂質飲食會使眼底組織脂肪含量增加而改變組織的型態，當加入了桑椹水萃物後，脂質增加的現象顯著改善，並呈現 dose-dependent 現象。經眼組織進行蛋白分析後，發現眼組織中的 oxLDL 在肥胖倉鼠中會增加，而桑椹萃物可以顯著的降低 oxLDL。在細胞實驗中，桑椹萃物也呈現因降低 oxLDL 的特性而減低 oxLDL 在 ARPE-19 引起的 apoptosis。本研究所建立的兩種動物模式及細胞實驗證實桑葚萃物具有因減低 oxLDL 而延緩眼病變的效用，有發展成為眼睛保健食品之潛能。另外 76C002 桑葚之品種權為台灣所擁有，具在地之獨特性，此項研發成果有助於提升其經濟價值。

二、本研究與醫療保健之相關性

本研究乃依行衛生署 97 年度科技發展計畫重點項目 3-11 保健食品之保健功效項目及其評估方法之研究，加以設計並施行，為發展並建立保健食品之保健功效及其評估方法，以因應產業界對保健食品之保健功效訴求多樣化之需要，並利日後提供衛生署對健康食品之保健功效、評估方法及審查作業之推展。健康食品之開發勢趨成熟，現今在市面上所流通之

保健食品亦不計其數。然而，獲得衛生署所認可之健康食品卻僅有四十多種，可見以現有之健康食品功能性規範，並不足以滿足日趨增加的健康食品市場。台灣人民生活日漸富裕，文明病之病患亦是日漸增加，尤其以糖尿病患者日益增加，且屬於隱性的高血糖患者以日益增多，在推行多時的健康食品管理法中已訂定調節血糖之功能性規範，但現今卻沒有針對已患有糖尿病之國人，減緩相關併發症之功能進行規範之訂定。本研究方法之建立，將有助於糖尿病患者減緩視網膜病變之作用。

三、學術貢獻

我們已提出桑椹萃物及其抗氧化活性成分有效延緩脂質代謝異常引起之眼病變的物質，並由結果中得知其可能的相關機轉。本研究之成果已有二篇研討會論文，目前正在撰寫 SCI 論文，預計產出 2 篇。

四、其他

本研究之進行已產出兩位碩士畢業生及完成一位大學生之研究方法訓練。我們業已提出桑椹萃物及其抗氧化活性成分有效延緩脂質代謝異常引起之眼病變的物質，並由結果中得知其可能的相關機轉。故本研究結果將可配合政府發展保健食品並提供產學合作，並可合乎國家以預防醫學替代治療醫學並降低醫療成本之政策。本研究之主角桑椹已在民間廣被使用甚久，依本研究數據，將可在推廣保健食品時積極強調科學數據及其相關效用。