

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--桑椹保健食品之研究開發子計畫一:延緩脂肪肝護肝及不易形成體脂肪之研究(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-040-001-
執行期間：99年08月01日至100年07月31日
執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：王朝鐘

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理人員：洪佳鴻
博士班研究生-兼任助理人員：劉力綱

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 24 日

一、摘要：

關鍵詞：桑椹、脂肪肝、肥胖及高血脂

計劃第一年驗證桑椹之水萃取物 (mulberry water extracts ; MWEs) 是否具有降低肝臟脂肪堆積之作用，並探討其作用機制。以六週齡體重約為 90-100 公克之雄性倉鼠 (syrian golden hamster) 進行動物實驗，動物單獨餵食含組成比例 0.2% cholesterol 與 10% coconut oil 之高油脂高膽固醇飲食 (high fat/cholesterol diets ; HFCD) 或於 HFCD 中混入 0.5%、1% 與 2% 的 MWEs 餵食十週，誘導動物產生高血脂症與肝臟脂肪堆積之現象。結果發現添加 MWEs 的組別 (MWEs 組) 與單獨餵食 HFCD 組別 (誘導組) 相較，其動物血清中三酸甘油酯 (TG)、總膽固醇 (TC)、脂肪酸 (FA)、低密度脂蛋白 (LDL) 的濃度均降低 ($p < 0.05$)，罹患心血管疾病的風險值 (risk ratio) 也下降 ($p < 0.05$)；而動物肝臟內之 TG 與 TC 濃度也分別較誘導組減少 ($p < 0.05$)，顯示 MWEs 具有降低由 HFCD 誘導的高血脂作用。

肝臟是動物體中脂質合成代謝主要之器官，接續探討動物肝臟中調控脂質合成代謝之相關蛋白的表現與變化。結果顯示在 MWEs 組中，動物肝臟蛋白中膽固醇、三酸甘油酯與脂肪酸的合成效率限制的關鍵酵素：HMG-CoA reductase、glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) 與 fatty acid synthase (FAS) 的表達均降低 ($p < 0.05$)，顯示肝臟細胞內脂質生合

成作用減少。另外，促進脂肪酸代謝的 β -氧化作用之效率限制關鍵酵素：CPTI (camitine palmitoyltransferase I) 的表現量則增加 ($p<0.05$)，顯示 MWEs 組中肝臟對脂肪酸之代謝作用增加，可避免造成脂質沉積。培養 HepG2 細胞株並加入不同濃度之 MWEs (1.0、3.0、6.0 mg/mL) 於 serum free 的培養液共同培養反應後，萃取細胞蛋白與 mRNA 分別進行蛋白與基因表現分析，結果顯示 HepG2 細胞內 HMG-CoA reductase、GPAT 與 FAS 的蛋白與基因表現均有降低 ($p<0.05$)。此外也發現 MWEs 會增加 HepG2 細胞 LDLR 的表達，與其 uptake LDL 之能力 ($p<0.05$)。另也發現 MWEs 也可調控粒線體 β -氧化作用相關蛋白表現，增加 HepG2 細胞內脂肪酸代謝。

由動物實驗結果顯示 MWEs 具有降血脂與降低肝臟脂肪堆積之作用，而其作用機制輔以細胞實驗驗證，可能是透過調降肝臟細胞內脂質合成代謝相關蛋白表現來減少脂質生合成；另一方面，也增加肝臟 LDLR 表達與 uptake 血中膽固醇能力，並促使脂肪酸進行粒線體 β -氧化作用，藉由減少脂質合成與增加脂質代謝雙方面的作用，達到降血脂與減少肝臟脂質堆積的效果。

第二年我們以油酸堆積肝細胞模式探討桑椹萃取物對於減少肝臟脂肪堆積之作用的功能性成份(桑椹花青素MAEs; 桑椹多酚MPEs)與作用機制，利用油酸誘導HepG2 細胞之脂肪堆積並以nile red染色試驗來觀察細

胞內脂肪堆積的情形，結果證實桑椹萃取物(MWEs)、桑椹花青素(MAEs)及桑椹多酚(MPEs)均可降低細胞脂肪堆積的現象，進一步利用西方墨點法觀察到桑椹萃取物(MWEs、MAEs、MPEs)能降低脂質生成酵素及其轉錄因子之表現，如FAS、ACC、HMGCoR、GPAT、SREBPs等，並使促進脂質代謝酵素及其轉錄因子之表現，如CPTI、PPAR α ，來達到降低肝臟脂質堆積的效果，又這路徑主要是透過AMPK(AMP-activated kinase)之傳訊路徑調控上述這些蛋白質，達到降低肝臟脂肪堆積之效果。研究結果顯示MWEs、MAEs及MPEs對於開發成為預防及治療脂肪肝的保健食品具有相當的潛力。由於MWEs具有抑制脂肪合成及促進脂肪利用，進一步我們探討MWEs在不易形成體脂肪的作用，在高脂肪餵食 10 週之倉鼠，MWEs顯示下降體重 7.1~8.3%，其副睪及腎臟週邊脂肪組織也顯示下降，其他血清及肝臟脂肪及脂肪酸均有意義的降低但其他生理功能指標如BUN、creatinine、K²⁺、Na⁺則無影響，顯示MWEs具有不易形成體脂肪之功能。進一步以桑椹多酚組成物(MPC) 進行動物試驗也顯示具有降低肝臟及體脂肪之功能，證明MWEs之功能性成份為MPEs。

二、計畫緣由與目的

桑椹 (mulberry) 是一種天然植物桑科 (Moraceae) 桑屬 (*Morus*) 樹木的果實。桑樹為落葉喬木或灌木，其種系多而繁雜，較常見的種系有：*Morus alba*，又稱為 white mulberry，多分佈在亞洲東部；*Morus nigra*，又稱為 black mulberry，多分佈在亞洲西南部；*Morus insignis*則分佈在南美洲，其他還有*Morus rubra* (red mulberry)、*Morus mesozygia*、*Morus australis*...等。桑樹葉子為卵形或橢圓形，邊緣有不整齊的粗鋸齒狀，一年有兩次開花結果，花為黃綠色，與葉同時開放，而果實為由數十至數百個微小果粒集合而成，屬長圓形的聚合果，長約2-3公分，即稱為桑椹。未成熟的果實為白色或綠色且果實邊緣帶有淺黃色與粉紅色；果實成熟時，則多呈現是暗紫色、黑色。果實可食用，未成熟時味道酸但成熟時則多汁且帶有甜味。台灣位居熱帶及亞熱帶交界，氣候溫和，非常適合栽種桑樹，台灣種植之桑椹於元月開花，元月下旬或二月中結果，三~四月便可採收。食品加工用途上，可加工製成果汁、果醬、果凍、蜜餞、糖果及發酵飲料等。

桑椹果實的營養成分分析顯示其具有葡萄糖、果糖、多種有機酸、胺基酸、維生素及豐富的鈣、磷、鐵等礦物質和大量的水分與花青素 (Szajdek and Borowska, 2008)。在傳統中草藥醫學的使用上，根據中

藥大辭典記載，桑椹具有明目聰耳、利五臟、治關節病、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（盧宏民,2003）。許多古籍記載了桑椹的藥用價值，如清朝黃元御所著之《玉楸藥解》載：桑椹子養肝，利尿，清虛熱，潤燥，止口渴，小便不暢，虛核，禿髮，黑鬚黑髮。明朝李時珍先生亦在「本草綱目」指出：單食，止消渴·利五臟關節，通氣血。久服不飢，安魂鎮神，令人聰明，變白不老。多收暴乾為末，蜜丸日服。搗汁飲，解中酒毒。釀酒服，利水氣消腫。



1.2. 桑椹果實之生理保健功能

現今之科學研究上，也有相關文獻提供科學證據來證實桑椹果實具有多樣的生理保健功能。Nattapong 與 Omboon 於 2008 年提出，由 *Morus alba* L. 與 *Morus rotundiloba* Koidz 混種的桑椹之萃取物中具有樺木酸 (betulinic acid)，為一種 anti-tyrosinase activity agent，故此桑椹萃取物可作為一 tyrosinase inhibitors，可以抑制 L-tyrosine 轉變為

L-dihydroxyalanine (L-Dopa) 而減少色素沉積現象 (hyperpigmentation) 來達到促使肌膚美白之效果 (Nattapong et al., 2008)。桑椹果實亦具有抗發炎之效用，研究顯示作者餵食桑椹果實之甲醇萃取物可以改善由 carrageenan 誘導生成的老鼠關節炎症狀 (Kim et al., 2006)。另經由餵食桑椹萃取物，藉由誘導增加體內抗氧化防禦系統，可改善老化加速老鼠 (senescence-accelerated mice) 的澱粉樣乙型蛋白 (amyloid beta protein) 生成與學習記憶能力和迴避反應測試，並預防阿茲海默症 (Alzheimer's disease) 的發生 (Shih et al., 2009)。亦有研究證實桑椹萃取物具有抗癌之作用，可抑制黑色素瘤 (melanoma) 細胞內的 Ras/PI3K 訊息傳遞路徑與 metalloproteinase-2 (MMP-2) 與 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 的表達活性來抑制黑色素瘤細胞的惡性轉移 (metastasis) (Huang et al., 2008)。桑椹萃取物也有具有良好的自由基清除效力而能降低密度脂蛋白 (low density lipoprotein; LDL) 的氧化與減少巨噬細胞 (macrophage) 因吞噬囤積大量氧化型低密度脂蛋白 (oxidative-LDL; ox-LDL) 後轉變成泡沫細胞 (foam cell)，而能減少動脈粥狀硬化的發生 (Liu et al., 2008)。另外也能藉由增加肝臟細胞代謝 LDL 與減少體內膽固醇、脂肪酸與三酸甘油酯形成，來降低由高膽固醇飲食餵食老鼠之血脂肪，達預防心血管疾病的作用 (Liu et al., 2009)。

由上述研究文獻顯示，桑椹果實確實具有多樣性的生理保健功能，雖

然如此，但目前對於桑椹的研究仍以針對桑椹的葉子與枝幹和樹皮為多數，相較之下對於桑椹果實的研究與其作用探討，遠不如桑葉（mulberry leaf）、桑椹樹皮（mulberry bark）、根（root），因此對桑椹果實的其他生理保健功能與作用，仍值得研究。

2. 人體脂質代謝（lipid metabolism）

人體內的脂質（lipids）主要包含膽固醇（cholesterol）、三酸甘油酯（TG）、磷脂質（phospholipid）以及游離脂肪酸（free fatty acid；FFA）。脂質具有重要的生理功能，除了作為熱量來源外，亦提供身體必需脂肪酸、協助脂溶性維生素的吸收、作為細胞膜與體內荷爾蒙的重要成份及參與多種代謝作用，其來源可由外在的飲食中攝取與內在肝臟的代謝合成作用產生。人體由飲食中攝取脂肪（fat）經消化系統分解後，在小腸中會形成三酸甘油酯、磷脂質、膽固醇、短鏈脂肪酸以及游離脂肪酸。三酸甘油酯、磷脂質、膽固醇經小腸黏膜吸收後，會與脂蛋白（apolipoprotein, apo-）B、C、E 結合成為乳糜微粒（chylomicron），藉由乳糜管進入淋巴系統與血液循環後，而能送至肝臟、脂肪與肌肉組織代謝利用；短鏈脂肪酸以及少部分的游離脂肪酸則與血清中的白蛋白（albumin）結合，再由淋巴系統以及血液運送至其它的組織（Armand et al., 1996; Zechner et al., 2005）。這些脂質於細胞組織中會經過一連串脂質合成與代謝的作用，再來合成人體必需的脂質產物以維持生命機能，此過程即稱為脂質代謝

(lipid metabolism)。

2.1. 人體內脂質與膽固醇之來源與恆定

體內脂質與膽固醇的來源有二種，一為體內肝臟自行合成的內源性 (endogenous source) 膽固醇，另為由外在食物攝取而得的外源性 (exogenous source) 膽固醇。人體為維持體內脂質與膽固醇量的恆定 (homeostasis)，內源性膽固醇會因外源性膽固醇的多寡來調控其生成，若外源性膽固醇增加則會使內源性膽固醇合成量減少，此調控受轉錄因子：固醇調節元件結合蛋白 (sterol regulatory element-binding proteins; SREBPs) 家族作用，當體內內源性膽固醇缺乏時，SREBPs 會去促使與體內脂質、膽固醇生合成相關的酵素表達，增加內源性膽固醇 (Shimano et al., 1996)。然而，若長時間攝取過量的外源性膽固醇，會使血膽固醇濃度升高而破壞恆定，則會造成與家族性遺傳基因無關的「續發性 (Secondary)」的高血脂症。若是由遺傳基因上的突變，如：低密度脂蛋白受體 (LDL receptor; LDLR) 缺損，造成肝臟無法有效代謝膽固醇而造成的高血脂症，則被稱為「原發性 (Primary)」高血脂症 (VanderLaan et al., 2009)。

2.2. 高血脂症 (hyperlipidemia)

飲食中攝取過多的高油脂、高膽固醇的飲食，會造成人體內血脂蛋白代謝不平衡而罹患高血脂症，且容易併發許多疾病包含脂肪肝、心血管疾

病、引發動脈粥狀硬化造成中風、心肌梗塞而死亡，甚至與糖尿病的神經病變 (diabetic neuropathy) 也有相關 (Vincent et al., 2009)。高血脂症的病理特徵為血清 (serum) 中，有高濃度的三酸甘油酯、總膽固醇與低的「高密度脂蛋白除以總膽固醇」(HDL/TC) 比值 (Tzang et al., 2009)。

脂蛋白 (lipoprotein) 是脂肪在血液中運輸的形式，脂蛋白依密度的不同分成四種：乳糜微粒、極低密度脂蛋白 (very-low density lipoprotein ; VLDL)、低密度脂蛋白 (LDL) 與高密度脂蛋白 (HDL)，不同的脂蛋白上所含的脂肪及脂蛋白元 (apo-lipoprotein) 組成均不相同。LDL 含有大量的膽固醇 (佔血清膽固醇的 60-70%)，並易受氧化酵素、過度金屬離子氧化而形成氧化型低密度脂蛋白 (oxidative LDL ; oxLDL)，且體積小所以容易滲入血管壁內，為形成動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 的重要因子。故血清中 LDL 濃度愈高，會造成高血脂症，罹患心血管疾病與動脈粥狀硬化的危險性就愈高 (Ballantyne, 1998)。HDL 含大量的磷脂類及少量的膽固醇 (佔血清膽固醇的 20-30%)，其功能為自血液和組織中將過多的膽固醇移除並運送至肝臟代謝，而具有減少膽固醇堆積在血管壁內的作用，故血管中 HDL 濃度愈高，表示清除血管壁內膽固醇的能力愈強，因而罹患心血管疾病與動脈粥狀硬化的機率則愈低。

血清中 60-70%的膽固醇是由 LDL 所攜帶，所以當 LDL 的合成過多或代謝太慢時，會導致血清中膽固醇的濃度過高，造成高血脂症及動脈粥

狀硬化。許多臨床與科學研究文獻顯示，降低血清中的 LDL 濃度是一種有效預防心血管疾病與動脈粥狀硬化的方法 (Tannock, 2008)。肝臟細胞上具有 LDL receptor (LDLR)，可以藉由內噬作用 (endocytosis) 將血清中 LDL 吞噬進入肝臟細胞後在溶小體 (lysosome) 被分解代謝。因而增加肝臟細胞 LDLR 的蛋白表達，幫助提高肝臟細胞代謝 LDL 之能力，可以達到降低血中 LDL 濃度及預防高脂血症、心血管疾病之益處。

因此，基於維護體內脂質與膽固醇恆定的觀點，在尋求預防或是治療高脂血症的方法上：增加細胞對外源性脂質的代謝效力、內源性脂質的降解與減少細胞對外源性脂質的吸收、內源性脂質的生合成，都是值得研究的方向。

2.3. 脂肪沉積 (fat accumulation) 與肥胖 (obesity)

人體攝取過多能量時，身體便會以脂肪組織沉積 (fat accumulation) 的形式來囤積過多的能量 (Fruhbeck et al., 2001)。若更進一步因飲食、疾病或是遺傳因子缺陷，造成極端地能量攝入和消耗的不平衡，當能量攝取超過能量消耗時，會使脂肪組織重量增加最後造成肥胖 (obesity)。人體中，過多的能量會藉由增加脂肪細胞的數目以及增大脂肪細胞自身的容積來儲存三酸甘油酯 (Prentice and Jebb, 1995)。在飽食狀態下，胰島素會提高葡萄糖進入脂肪組織的能力，作為增加 glycerol 3-phosphate 來提供脂肪酸酯化成三酸甘油酯所需的能量，並直接提高脂肪酸合成酵素的活

性，促使脂肪組織中三酸甘油酯的儲存 (Tordjman et al., 2003)。故當大量攝食高油脂高膽固醇飲食不但會引起高脂血症，亦容易造成脂肪沉積進而變成肥胖。雖然先天性的遺傳因子會影響到個人是否具有肥胖或體重過重的傾向，但飲食型態相較於遺傳因子，對於個人形成肥胖則有更大的影響力 (Moreno and Rodriguez, 2007)。

體內血脂異常的情況是與其肥胖具有直接的關係，文獻指出肥胖者體內的LDL會大量增加而HDL則會明顯降低 (Miller and Miller, 1975)。若肥胖者體內有胰島素抗性之情況，則會導致的高三酸甘油酯症，造成肝臟和脂肪組織間的游離脂肪酸及由三酸甘油酯大幅增加 (Gavrilova et al., 2000)。故適當減重可作為能有效控制血脂的方法；而降低血液中高膽固醇與高三酸甘油酯之高血脂症狀亦為預防脂質沉積與肥胖的方法 (Bray, 2004)。

3. 高血脂症與肥胖之預防與治療方法

3.1. 增加細胞對外源性脂質、膽固醇的代謝作用

3.1.1. 肝臟 LDL receptor 表達之調控機制

肝臟是主要代謝膽固醇之臟器，在肝臟細胞缺乏膽固醇或脂質的情況下，肝臟會藉由表達 LDL receptor 來 uptake 血液中之膽固醇運送蛋白：LDL 進入細胞內，並將其進行分解代謝，提供細胞生長所需 (Brown and Goldstein, 1986)。肝細胞膜上 LDLR 的數目會被肝細胞中的膽固醇含量回

饋抑制。

LDLR 為與 LDL 的脂蛋白元 apoB-100 專一性結合的細胞表面受體。經由結構上 ligand binding domain 因富含半胱氨酸 (cysteine) 可以形成雙硫鍵以穩定此受體分子，而 ligand binding domain 上另有其他的胺基酸可以形成含有負電荷的支鏈來與 LDL 脂蛋白 B-100 上帶有正電荷的離胺酸 (lysine) 和精胺酸 (arginine) 結合。LDLR 與 LDL 在細胞膜結合後會誘導 endocytosis 作用，細胞膜會內陷形成一吞胞囊泡 (coated vesicle)。之後，吞胞囊泡於細胞質空間經去除 coat 後形成囊泡內體 (endosome)，後因內體 pH 值呈現酸性 (pH 5.0-5.5) 而使 LDLR 上 β -propeller domain 結構產生改變而釋出 LDL，LDLR 則由其囊泡內體上解離，再循環回到細胞表面；接著含有 LDL 的內體會與 lysosome 融合而使 LDL 經 lysosome 酵素作用分解為次單元體，供細胞進行代謝作用。

肝細胞大量 uptake 血液中之 LDL，會促使血液中膽固醇濃度降低，因此若能促使肝細胞大量表達 LDLR，是一種可行的降血脂機制 (Grundy, 1998; Ansell, 1999)。另一方面，statin 是一種臨床上常用之降血脂藥物，其作用機制為抑制肝細胞內 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) 活性而抑制細胞內膽固醇生合成，而可減少膽固醇生成 (Grundy, 1998; H. P. S. C. Group., 2002)。另外，此作用亦會造成肝細胞內膽固醇濃度降低而活化 SCAP-SREBP two-step

transporting activity pathway, 活化後的 SREBP 為一轉錄因子 (transcription factor), 其會促使 LDLR 大量表達而使肝細胞能大量 uptake 血液中 LDL (Smith et al. 1990; Briggs et al., 1993)。

3.2. 增加細胞內源性脂質的降解作用

3.2.1. 脂肪酸 β -氧化作用

β -氧化作用主要在細胞粒線體基質 (matrix) 中發生。長鏈的游離脂肪酸無法直接進入粒線體, 而需於細胞質中經 acyl-CoA synthetase 形成 acyl-CoA, 經粒線體外膜上 carnitine palmitoyltransferase I (CPTI) 作用下, acyl-CoA 會與肉鹼 (carnitine) 結合形成 acyl-carnitine 後進入粒線體基質, 而後 acyl-carnitine 於粒線體基質中經內膜上 carnitine palmitoyltransferase II (CPTII) 作用再分解為 acyl-CoA 與 carnitine, 此時 carnitine 再回到粒線體外膜而 acyl-CoA 於基質中由 COOH 端開始進行 β 氧化作用, 每次移去二個碳原子, 可得到 acetyl-CoA 產物, 而 acetyl-CoA 可以進行 Krebs Cycle, 產生 NADH 跟 FADH_2 進入電子傳遞鍊產生能量 (Pande and Parvin, 1976)。

CPTI 為粒線體內的脂肪酸 β -氧化作用之「反應速率限制酵素」, 存於骨骼肌肌肉和肝臟細胞中。CPTI 位於細胞粒線體的外部膜上, 功能為脂肪酸的載體, CPTI 表達增加時, 將會使更多的脂肪酸可被運送進入可使其被氧化的粒線體內 (Britton et al., 1995)。研究顯示, PPAR α 可以調控 CPTI 表達增加。

3.3. 減少細胞內源性脂質的合成作用：相關蛋白與機制

3.3.1. HMG CoA reductase

膽固醇是構成人體細胞膜的重要成份，也是各種荷爾蒙、維生素D、以及膽汁合成過程中最主要的原料，廣泛存在人體內各種組織細胞(包括腦細胞和神經組織細胞)中。人體需要一定量的膽固醇才能夠維持正常的功能，而人體膽固醇來源約有25~40%來自飲食中攝取，其餘則由人體自行合成。人體中大部分的內生性膽固醇由肝臟合成，約佔總量的50%，其次為小腸，約佔15%。在人體內自行合成的膽固醇量受飲食攝取的膽固醇量調控，若飲食之中攝取較多量的膽固醇時，體內自行合成的膽固醇量便會減少 (Kisseleva et al., 1999)。

HMG CoA reductase 是位於內質網上的膜蛋白，在膽固醇合成過程中扮演著速率決定的角色。膽固醇的生合成由兩分子的acetyl-CoA開始，在thiolase催化下先縮合成acetoacetyl-CoA，經HMG-CoA synthase 作用再與一分子的acetyl-CoA 縮合成HMG-CoA，後再經HMG-CoA reductase 還原形成mevalonate，此步驟亦為生合成反應之速率決定步驟，因此HMG CoA reductase是膽固醇生合成過程中的反應速率限制關鍵酵素。之後mevalonate會再經由後續膽固醇生合成作用，經由各步驟之酵素作用形成各中產物，最終在內質網中環化成lanosterol，經脫去三個甲基、異構化酵素作用及氧化還原等步驟，變成含27個碳的膽固醇。

mevalonate 與其衍生形成之固醇或非固醇類的代謝產物如：膽酸、膽固醇皆對 HMG-CoA reductase 有回饋抑制作用，以達體內膽固醇生合成量的平衡，故抑制 HMG CoA reductase 的活性與作用為許多降膽固醇藥物作用之機制如：statin 類藥物。而細胞本身也可藉由抑制 HMG-CoA reductase mRNA 的轉錄作用（transcription）、阻礙其轉譯作用（translation）、加速此酵素的降解（degradation）及活性的調節（Brown and Goldstein, 1980; Rosser et al., 1989），以達成負回饋調節來維持細胞內膽固醇濃度，之後再經由細胞內膽固醇濃度來調控 SREBPs 蛋白之作用，進行細胞內脂質的合成、分解、運輸與儲存（Goldstein and Brown, 1990）。

3.3.2. 固醇調節結合蛋白（sterol regulatory element-binding proteins）

高等真核生物細胞的脂質代謝為十分複雜的調控，目的在於細胞生長時有時需要全部脂質供應增加，但有時又只需其中某種脂質增加即可，如合成膽酸、類固醇時需較多的膽固醇而不需脂肪酸與磷脂。這些調控主要藉由許多轉錄因子來控制、參予脂質的合成、分解、運輸與儲存，固醇調節結合蛋白（sterol regulatory element-binding proteins；SREBPs）即為其中之一。

SREBPs 是屬於調節脂肪酸與膽固醇生成的轉錄因子，具有 helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-LZ) 的結構(Brown and Goldstein,

1997)，為肝細胞中調節醣類代謝與脂質代謝的一種蛋白。哺乳動物已知有三種的 SREBPs 的異構物，分別為由同一基因經選擇性剪切 RNA 所產生的：SREBP-1a、SREBP-1c 與不同基因編譯產生的 SREBP-2。在調控機制上，SREBP-2 為調控與膽固醇的生成代謝相關蛋白的表達如 HMG-CoA reductase、LDLR。而 SREBP-1a 與 SREBP-1c 則為調控脂肪酸生成代謝。如：Fatty acid synthase (FAS) 與 glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) (Yokoyama et al., 1993; Wang et al., 1994; Shimano, 2001; Horton, 2002)。

SREBPs 活化的機制是經由 SCAP-SREBP two-step transporting activity，其方式如下：SREBP 切割活化蛋白 (SREBP-cleavage activating protein; SCAP)、insig-1(2) 與 SREBP 為一互相結合於內質網 (Endoplasmic Reticulum, ER) 膜上的複合體 (complex)。SCAP 上具有能感受細胞內膽固醇濃度之 domain (sterol-sensing domain)，當細胞內膽固醇濃度增加時會與 insig-1(2) 緊密結合，如同船錨般固定在 ER 上不被併入運輸囊泡 (vesicle) 裡，而不會被運輸到高爾基氏體 (Golgi)。當細胞內膽固醇濃度降低時，insig-1(2) 無法再和 SCAP 結合，會將 SCAP/SREBP 複合體會由 ER 移至 Golgi，藉由 Golgi 上的附膜蛋白酶 1 (S1P) 將 SREBP 切割，使其具 transcription factor domain (bHLH) 由 SREBP 中分開，bHLH 再藉由附膜蛋白酶 2 (S2P) 作用使其離開 Golgi

後進入 nucleus 結合至具有 sterol regulatory element (SRE) 之基因上，促進該基因表達，此過程即為 SCAP-SREBP two-step transporting activity (Brown and Goldstein, 1999; Yang et al., 2000)。

3.3.3. 脂肪酸生成酶 (fatty acid synthase)

脂肪酸在生物體內的功能有：儲存能量、蛋白質的脂化、構成細胞膜以及膜上的訊號傳遞鏈等。而人體內脂肪酸生合成步驟中，其反應速率限制酵素即為脂肪酸生成酶 (fatty acid synthase; FAS)。脂肪酸生成酶主要是由兩個單體組成，每個單體含有七個酵素，主要參予脂肪酸新生作用。FAS 在人體內的所扮演的角色大致上有下列幾種：在肝臟中及脂肪組織中，FAS 將多餘的醣類轉換為脂肪並加以儲存；在乳腺細胞中，FAS 製造出嬰兒較易吸收的脂肪酸。在這些組織中，FAS 的表現都受到飲食及激素的調控 (Wakil et al., 1983)。

3.3.4. 過氧化體增殖活化受體 (PPARs)

過氧化體增殖活化受體 (peroxisome proliferator-activated receptors; PPARs) 為一群核內荷爾蒙接受體(nuclear hormone receptor)，其功能為一轉錄因子，作用在目標基因的啟動子 (promoter) 的專一性序列 (PPAR response element) 上，調控基因的表現，而其活化取決於和其配體(ligands) 的結合與否，來引起對基因表現的壓抑或活化 (repression or activation)。種類上 PPARs 為一 super family proteins 主要分為四種類型 (isotypes)： α 、

β 、 γ 和 δ ，其存在的組織位置與在調控機制所扮演的角色功能各有不同。

PPAR α 多表現於肝臟、棕色脂肪組織、腎臟、心臟及骨骼肌組織中，其功能在於調控細胞組織血脂異化代謝（lipid catabolism）的過程，其 ligands 包括氧化ox LDL、長鏈不飽和脂肪酸（long-chain unsaturated fatty acids）如亞麻油酸（linoleic acid）、支鏈脂肪酸（branched fatty acids）如植烷酸（phytanic acid）、碳廿酸（eicosanoids）、白三烯（leukotriene）、藥物如fibrates 及thiazolidinediones 等（Kersten et al., 2000）。

PPAR α 主要作用於調控與脂質合成代謝相關的基因表現。如 PPAR α 活化可活化活化脂蛋白元A（apolipoprotein A，apoA-I or II）基因表現，促使高密度脂蛋白濃度增加，而可幫助細胞膽固醇代謝運輸（Vu-Dac et al., 1998; Watts et al., 2003）。另外當身體需要能量時，PPAR α 的活性會增加，促進脂肪細胞中的三酸甘油脂分解成脂肪酸，進而輸送到肝臟細胞，轉變成葡萄糖，促進脂肪酸在肝臟細胞中分解，使得肝臟可用以合成三酸甘油脂之脂肪酸減少，而達到降血脂之生理效應（Schoonjans et al., 1995; Leone et al., 1999）。PPAR α 活化也會增加脂肪酸進出粒線體細胞膜運輸之關鍵蛋白carnitine palmitoyltransferase 1（CPT1）的表達，此蛋白為粒線體 β -氧化作用之速率限制關鍵酵素，幫助脂肪酸在粒腺體與過氧化體進行 β -氧化（beta oxidation）產生能量，因此PPAR α 能夠調控消耗脂肪酸，防止脂肪堆積（Schoonjans et al., 1996）。在PPAR α 基因缺乏的小鼠中，若給

予peroxisome proliferators 如：Wy14,643、clofibrate，並不會產生過氧化體增生的效應，也不會誘發PPAR α 下游基因之表現，並在小鼠的肝臟中出現脂肪大量堆積之情形（Lee et al., 1995），顯示PPAR α 在調節脂肪酸 β -oxidation 及維持細胞內脂質代謝恆定有其重要性。

近代因生活型態與飲食文化的改變，國人在日常飲食中常攝取過過多高油脂、高膽固醇的飲食，造成人體內血脂蛋白代謝不平衡，因此罹患高血脂症（hyperlipidemia）。高血脂症容易併發許多疾病包含脂肪肝、心血管病、並引發動脈粥狀硬化造成中風、心肌梗塞而死亡。另高油脂、高膽固醇的飲食會造成極端地能量攝入和消耗的不平衡，而使脂肪沉積造成脂肪組織重量增加，最後導致肥胖（obesity）而引起更多代謝相關疾病如：糖尿病。因此若能發展一無副作用並具降血脂效力之天然食品，應用於日常飲食中，將可預防或減緩高血脂症，減少國人心血管疾病之發生率，亦可降低體脂肪沉積而減少肥胖的發生。

肝臟是主要合成代謝膽固醇之臟器，若抑制肝臟細胞內 HMG-CoA reductase 表達，會減少細胞內膽固醇的生合成，此作用亦會造成肝細胞內膽固醇濃度降低而會促使 LDLR 大量表達，使肝細胞能大量 uptake 血液中 LDL，達到降低血中膽固醇之作用。此外，SREBPs 亦調控許多與體內脂肪酸、三酸甘油酯生合成所需之關鍵酵素的表達。另一方面，加速體脂肪的降解，促進細胞進行 β -氧化作用以消耗脂肪酸，減少脂肪沉積，

亦為一種幫助血脂代謝，降低肥胖發生之方式。

桑椹 (mulberry) 盛產於台灣中南部及東部，易栽培且食用上無副作用，而由桑椹果實顏色為深度的紫紅顏色，顯示出桑椹具有豐富的色素成分：花青素，而花青素已被證實具有許多幫助人類健康之效益之生理活性功能。花青素為水溶性之類黃酮化合物 (flavonoid)，本研究以水萃取之方式，由桑椹果實中製備一萃取物：MWEs，欲探討其是否具有調控動物體內脂質之合成代謝能力，而具有降血脂與預防脂肪沉積的作用，以發展為預防高血脂症與肥胖之保健食品，減少國人罹患心血管與代謝疾病之風險，此外亦可提高桑椹之農產價值，利於發展台灣農業經濟。

本研究以 MWEs 進行動物實驗，於高油脂高膽固醇飲食 (HFCD) 中混入不同比例的 MWEs 及單獨 HFCD (誘導組)，分別來誘導倉鼠 (syrian golden hamster) 產生高血脂症。探討 MWEs 是否具有降低以 HFCD 餵食倉鼠的血清與肝臟中總膽固醇、三酸甘油酯等濃度，並觀察其動物體重與脂肪組織大小變化。之後另以細胞實驗模式來確認 MWEs 及其功能性成份 MAEs 及 MPEs 在降血脂與減緩脂質沉積之作用機制，探討 MWEs 是否可介入調控肝臟細胞對膽固醇、三酸甘油酯及 LDL 的合成代謝與促進脂肪組織降解之相關蛋白表達。期盼能藉由本研究結果，將 MWEs 進一步發展應用於高血脂症、脂肪肝與肥胖的預防保健甚至於臨床上治療。

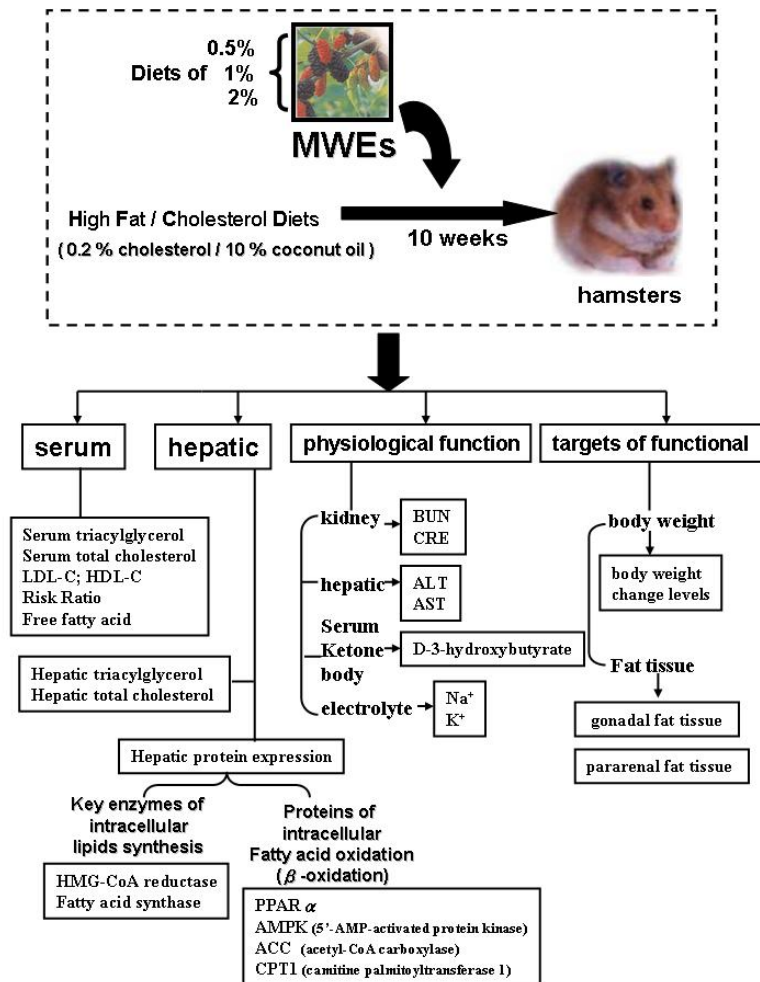
三、材料與方法

1. 肝臟脂肪堆積及不易形成體脂肪之動物實驗模式

本研究使用一天然植物桑椹之水萃取物 (MWEs) 進行動物實驗，於高油脂高膽固醇飲食中混入 MWEs 或單獨餵食高油脂高膽固醇飲食，來誘導倉鼠產生高脂血症與脂肪沉積之現象，驗證 MWEs 是否具有減少肝臟脂肪之作用。

本研究使用倉鼠作為實驗對象。在脂質代謝的研究方面，倉鼠是一種有效的動物實驗模式，倉鼠在餵食0.2% cholesterol與10% coconut oil的高油脂高膽固醇的飲食條件下十週後，可使倉鼠血清總膽固醇濃度大幅增加並造成動脈管壁脂肪斑塊的生成 (Nikkari et al., 1991)。倉鼠可以取代大白鼠成為在脂質代謝研究上的實驗動物，主因大白鼠肝臟合成膽固醇的效率比人類高，且其血漿膽固醇濃度不高，不易判斷由飲食影響LDL濃度及代謝的情形。而倉鼠在脂蛋白分佈以及代謝與人體類似，此外倉鼠的膽固醇及膽酸代謝途徑比大白鼠更接近人體 (Spady et al., 1983)。在試驗中，倉鼠因為脂肪的新陳代謝不正常而肝臟在細胞質發現不正常脂肪小滴 (fat droplets) 的聚集，造成脂肪肝症狀；另倉鼠在誘導血脂異常及動脈粥狀硬化的模式中，其倉鼠體內之脂蛋白 (LDL與VLDL) 中的膽固醇和三酸甘油脂會因為高油脂的飲食而升高 (Spady and Dietschy, 1988)，可以清楚判定誘導是否成功。

故本研究採用六週齡、平均體重為90至100g之雄性倉鼠 (Syrian Golden hamster) 做為動物實驗之對象，餵以0.2% cholesterol與10% coconut oil比例之高油脂高膽固醇飲食，誘導倉鼠產生高脂血症，另於高油脂高膽固醇飲食中混入0.5%、1%與2%的MWEs，驗證MWEs是否具有減少肝臟脂肪之作用。餵食十週後犧牲動物，進行血清生化分析，觀察各組血脂脂肪濃度變化與評估各組動物之生理功能，並擷取動物肝臟組織分析其脂質濃度變化與脂質合成代謝相關蛋白之表現。其架構圖如下：

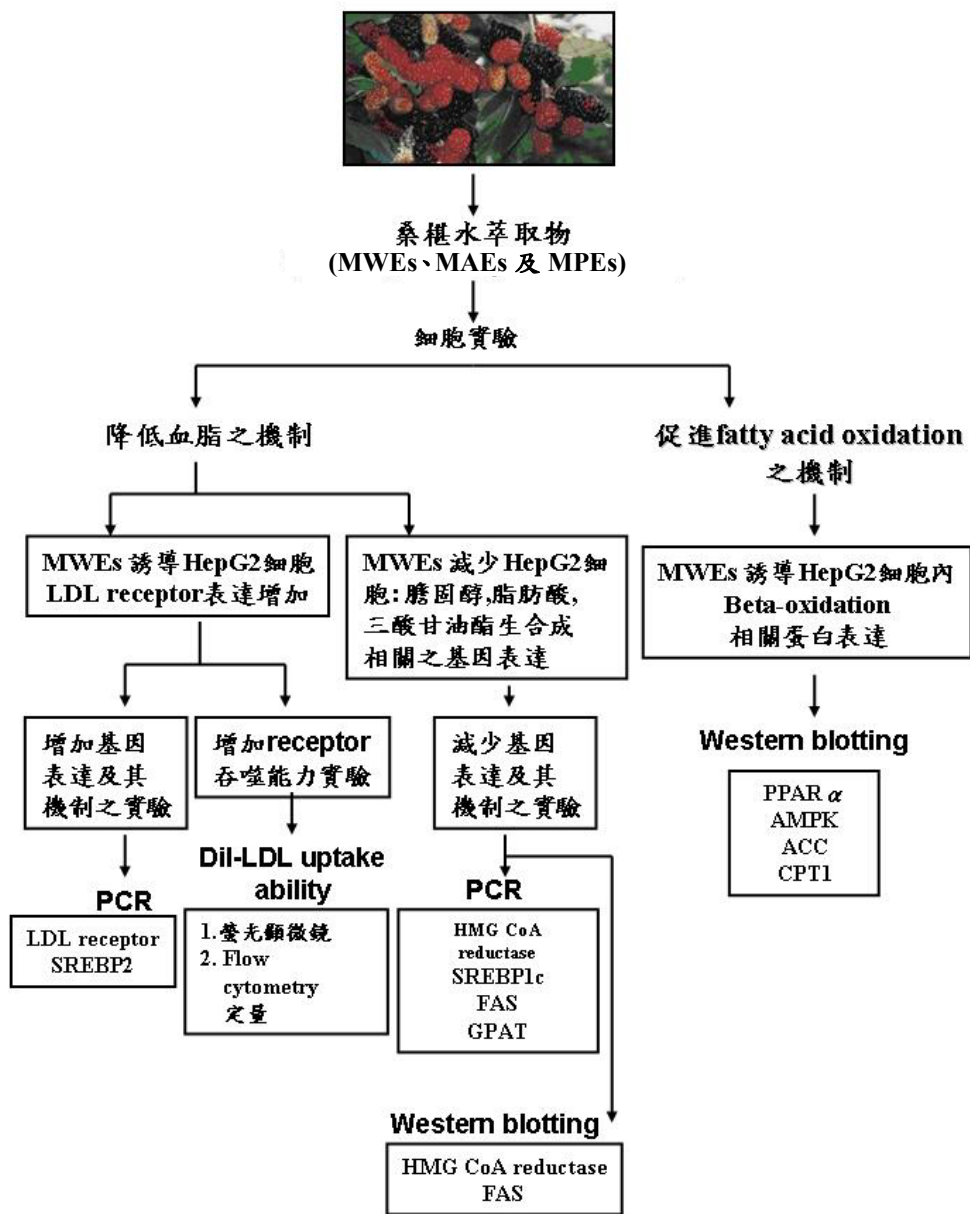


2. 抑制肝細胞脂肪堆積之實驗模式

本實驗模式研究使用 MWEs、MAEs 及 MPEs 進行細胞實驗，驗證三

種萃取物是否具有調控肝臟細胞內與脂質合成代謝相關蛋白之表現，及探討三種桑椹萃取物可能作用於動物模式抑制脂肪堆積之分子機制。

HepG2 細胞株是為研究 B 型肝炎病毒所建立的人類 hepatocarcinoma (Aden et al., 1979)，而後續研究發現，HepG2 細胞能夠正常表現 HMG-CoA reductase 活性，亦可表現 LDL receptor 且能代謝利用 VLDL、LDL，顯示該細胞株在脂質代謝機制上與正常肝細胞有相似的表現 (Dietschy et al., 1993)。此外，HepG2 細胞株具有癌細胞可繼代培養之便利性，故此細胞株被廣泛使用在肝臟脂質代謝研究上 (Javitt, 1990)。本研究採用 HepG2 細胞株，為避免血清內脂質干擾細胞表現，將細胞培養於 serum free 的培養液，並加入不同濃度之 MWEs、MAEs 及 MPEs 共同在 37°C 恆溫培養箱中反應 24 小時後，分別萃取細胞 RNA 進行 RT-PCR 與萃取細胞蛋白進行 western blotting，來分析 MWEs、MAEs 及 MPEs 對 HepG2 細胞內血脂合成代謝相關基因與蛋白表達之作用；另外並進行 Dil-LDL uptake assay，評估三種萃取物是否有影響調控 HepG2 細胞吞噬 LDL 能力，其架構圖如下：



3. 尼羅紅染色和定量試驗 (Nile red staining and quantitation)

螢光染劑可針對脂質染色，並且可以在雷射光激發下，發出紅色螢光，螢光強度表示脂質濃度，藉此反應細胞內中性脂肪的含量。加入 0.5 mM 油酸 (oleic acid, OA) 與 BSA (bovine serum albumin) 依比例混合均勻，作用 24 小時使細胞脂質堆積。處理不同濃度的桑椹水萃取物(MWEs)、桑椹花青素萃取物(MAEs)及桑椹多酚萃取物(MPEs)，

在 37°C 恆溫培養箱中反應 24 小時。之後移除培養液，並以 PBS 潤洗細胞 1-3 次後，加入 4% paraformaldehyde 固定 1 小時，以 PBS 稀釋 Nile red 染劑 (1 µg/ml) 室溫下，避光，染色 5 分鐘，之後，將多餘染劑後洗去，在每盤細胞內以少許 PBS 覆蓋細胞表面，立刻以雷射光 488 nm 激發觀察。定量試驗則以流式細胞儀偵測細胞螢光強度。

4. MPC 配置

以 HPLC 分析桑椹多酚萃取物，多酚成分包含：Rutin, Protocatechuic acid (PCA), Epigallocatechin Gallate (EGCG), Gallic acid (GA), Caffeic acid (CA), Catechin, Naringenin, Quercetin, Epicatechin 將主要成分之純物質依比例均勻混合後，稱之為 Mulberry polyphenolic components (MPC)。

Component	%
GA (Gallic acid)	14.07%
PCA (Protocatechuic acid)	25.25%
CC (catechin)	7.45%
Quercetin	3.73%
CA (Caffeic acid)	10.26%
EC (Epicatechin)	6.52%
Rutin	32.72%

5. 動物飼養

實驗動物為鼠齡 6 週之 C57BL/6 品系公鼠，購自國家實驗動物中心，飼養在不鏽鋼絲網籠，給予 Purina Lab Chow 飼料餵食，蒸餾水不限

制飲用。動物室溫度維持 $22\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，濕度 $65\pm 5\%$ ，光照及黑暗各 12 小時，每週記錄一次飼料攝取量及體重變化。將 C57BL/6 品系小鼠隨機分成 6 組，每組 20 隻，不同組別小鼠飼料成分如下：

	Purina Lab Chow	lard oil	cholesterol	MPC	S
C	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
HFD	78 %	20 %	2 %	0 %	0 %
0.1% MPC	77.9 %	20 %	2 %	0.1 %	0 %
0.3% MPC	77.7 %	20 %	2 %	0.3 %	0 %
0.5% MPC	77.5 %	20 %	2 %	0.5 %	0 %
S	78 %	20 %	2 %	0 %	1 mg/kg

餵食 8 週後犧牲動物，動物犧牲前空腹約 14~16 小時，斷頭採集血液，並取肝臟組織及、性腺週邊脂肪組織及皮下脂肪進行物理測量及日後實驗使用。動物體重變化之計算方式為：以該實驗期間(週)的體重扣除第 0 週時的體重/第 0 週時的體重 $\times 100\%$ ，可計算出體重增加率。

6. 蛋白質萃取及定量

(1) 蛋白質萃取物製備

將加藥處理後的細胞收集好，加入細胞溶解緩衝液 (RIPA buffer：150mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % deoxycholic acid, 0.1 % SDS, pH7.5) 及蛋白質水解酶抑制劑 (sodium orthovanadate(100mM/ml), leupeptin (10 mM/ml) 及 PMSF (100mM/ml)，在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下震盪 4 小時，再以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高速

離心 13200 rpm, 30 分鐘, 吸取上清液到新的微量離心管中, 儲存在 -20°C , 此上清液為細胞全部蛋白之萃取液。

(2) 蛋白質定量

利用 Coomassie brilliant blue G250 會和蛋白質結合成藍色之複合物, 於波長 595nm 下有一較大之吸光值, 以此來定量蛋白質。先以 8 mg/ml 胎牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 來畫標準曲線, 做為蛋白質定量的依據, 以不同濃度 BSA 做標準曲線, 依下表比例加入試劑, 混合均勻。

取各濃度的 BSA 及待測樣品各 30 μl 加入 1 ml Coomassie blue, 室溫下避光反應 10 分鐘, 於波長 595 nm 下測定吸光值變化, 最後將樣本與標準曲線對照後計算出待測物之蛋白質濃度。

7. 西方墨點法 (Western blotting)

(1) 樣品 (sample) 配製

取定量之蛋白液 (50 μl), 以去離子水補至固定體積後加入五倍的 loading dye 混合均勻並以 100°C 加熱 10 分鐘, 待加熱完將樣品置於冰上快速冷卻 5 分鐘隨後以 8000 rpm 離心 5 分鐘即可。

(2) 鑄膠

將電泳玻璃洗淨後擦拭, 組裝置電泳座上固定, 若要分析小分子蛋白則配製 12~15% 的下層 separating gel; 若要分析的是大分子蛋白就

配 8~10 % 的 separating gel。將配下層膠所需溶液混勻後注入玻璃片中至固定高度，加入 30 % 酒精把下膠壓平，待膠凝集後將 30 % 酒精倒掉並吸乾。隨後配製上層 stacking gel 並注入玻璃片中，插入電泳槽齒梳，待上膠凝後以去離子水將殘留在 well 內的上膠清洗乾淨。

(3) SDS-PAGE

首先將電泳液 (running buffer) 倒入電泳槽內槽中，再把處理好之蛋白質樣品小心注入 well 中，其中一個 well 注入 protein standard marker，樣品 loading 完後持續加入新的電泳液於內槽至覆蓋整個玻璃。連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 70 伏特電壓開始進行電泳，直至樣品進行到 stacking gel 與 separating gel 的交界處後再切換成 100 伏特電壓，當色帶進行至底線時才停止電泳。

(4) 蛋白樣本之轉漬 (electrotransfer)

電泳完畢後將膠體取出，截去上層膠的部分，將膠體置於兩張經轉漬液 (transfer buffer) 濕潤過的濾紙上，膠體上面再放上與膠體大小相同的硝化纖維膜，再放上兩張浸濕的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在各層中的氣泡，最後用含有海棉襯墊的夾板夾緊，放入轉漬槽中，以固定 100 伏特轉漬 2 小時。

(5) 免疫墨點法 (immunoblot)

轉漬完將硝化纖維紙取出，以 5 % blocking buffer 於室溫下作用 1

小時。隨後將 blocking buffer 倒掉，再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 分鐘，換上一級抗體，置於 4 °C 下作用 overnight，隔天再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 分鐘，接著換上二級抗體，於室溫下反應 1 小時，再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 分鐘，最後加入 ECL 顯色，並以冷光儀偵測。

8. 血清生化測定分析

動物血液樣品，室溫下離心 3000 rpm，10 分鐘，來分離血清。其測定方法，利用酵素作用與比色測定原理，在定量的血清中加入呈色劑，以分光光度計於適當波長下測定吸光值，使用血液生化自動分析儀器分析。如：血脂質 (TG、TC、LDL-C 及 HDL-C)、血糖 (Glucose)、肝功能 (GOT、GPT)、腎功能 (BUN、CRE)、電解質 (Na、K) 之測定。

9. 血清酮體測定

依照 D-3-Hydroxybutyrate Kit (RANDOX) 說明書指示操作。取出待測樣品，以酵素作用與比色測定原理，加入測定試劑後，放入 37 °C 水浴 60 秒後，在波長 340 nm 下測第一次吸光值 (OD0)，經過 1 分鐘後測第二次吸光值 (OD1)，經過 1 分鐘後測第三次吸光值 (OD2)。根據試劑說明書提供之計算公式求得待測物濃度。

【計算】

$$\text{D-3-Hydroxybutyrate concentration (mmol/l)} = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{standard conc.}$$

10. 肝臟脂質萃取

一般脂質的萃取方法乃依據 Folch 氏的方法為基本方法，秤取 0.1 g 肝臟組織，加入萃取溶劑 2 ml Chloroform/Methanol (2/1, v/v)，均質之後離心，收集有機層，在室溫下使其自然揮發至全乾。測定前加入少許異丙醇 (isopropanol) 回溶，得肝臟脂質萃取液。

11. 肝臟總膽固醇及三酸甘油酯含量分析

取出待測樣品，使用商業測試模組 (commercial kit)，以酵素作用與比色測定原理，加入膽固醇測定試劑或三酸甘油酯測定試劑，以分光光度計在波長 500 nm 下測定吸光值，根據試劑說明書提供之計算公式，換算成三酸甘油酯與總膽固醇之含量。

$$\text{【計算】 } C = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times 200 \text{ (mg/dl)}$$

12. 肝臟組織蛋白萃取及定量

萃取肝臟組織蛋白質，取 0.1 g 組織塊加入適量的 RIPA buffer 及 protease inhibitor 於冰上研磨避免溫度過高，造成蛋白質的分解。研磨後將組織均質液取到 eppendorf 後於 4 °C 冰箱中震盪 30 分鐘，置入高速離心 (1000 rpm, 4 °C, 10 mins)，取上層液定量蛋白質濃度，定量方

法與西方墨點法相同。

13. 肝組織病理切片觀察

將老鼠斷頭後，切小塊肝臟置於 6 % 福馬林中固定，然後做蘇木紫 & 伊紅(Hematoxyline & Eosin) 染色，觀察肝組織有無病變，並以倒立螢光顯微鏡拍照觀察。

14. 統計分析方法

每個實驗至少進行三次，所有數據資料以 Sigma Plot 套裝軟體進行 student t-test 計算 p 值，p 值小於 0.05 者為具統計學上意義。

四、執行進度及成果

1. 桑椹萃取物成份分析

1.1. MWEs 營養成份

MWEs 的營養成份：蛋白質、脂質、醣類等等的分析結果顯示 MWEs 中含有約 1.77%的蛋白質與 4.83%的醣類，脂肪成份則為 4.40%，而類黃酮含量則有約 8.33%（quercetin as standard），酚酸則為 5.07%（gallic acid as standard）（Table 1）。

1.2. MPEs 多酚成份

MPEs 的營養成份：蛋白質、脂質、醣類等等的分析結果顯示 MPEs 中含有約 5.64%的蛋白質與 6.67%的醣類，脂肪成份則為 3.10%，而類黃

酮含量則有約 44.03% (quercetin as standard), 酚酸則為 24.63%(gallic acid as standard) (Table 1)。

1.3. MWEs 花青素成份

利用 HPLC/ESI/MS/MS 分析 MWEs 中花青素成份種類, 結果在 HPLC 的 UV chromatograms 分析圖中, MWEs 花青素有四個主要 peak (figure 1), 與花青素標準品比對及經 LC-ESI/MS/MS 分析結果, 顯示 MWEs 中所含有的花青素種類主要共有四種, 分別是: cyanidine-3-glucoside、cyanidine-3-rutinoside、pelargonidin-3-glucoside 與 pelargonidine-3-rutinoside, 其各自 retention times 分別為 24.6、25.5、26.8 與 27.6 min (Table 2)。

1.4. MWEs 及 MPEs 之 HPLC 分析結果

在 Table 1 的結果裡得知桑椹萃取物中多酚成份居多, 因此, 接下來用 HPLC 分析。將 20 mg/ml 桑椹水萃取物 (MWEs)、10 mg/ml 桑椹多酚萃取物 (MPEs) 與 15 種 1 mg/ml 的多酚標準品做比對, 萃取物單獨分析的結果外, 另外將萃取物與 15 種標準品混合進行分析, 用以確認分析物相對應於標準品的位置, 換算積分的面積得知桑椹水萃取物 (MWEs)、桑椹多酚萃取物 (MPEs) 中所含各種多酚的百分比分別為:

(1) 各種多酚標準品在 HPLC 的 retention time; RT: 1, gallic acid(7.85 min);

2, protocatechuic acid (PCA) (15.17 min) ; 3, catechin (23.49 min) ; 4, epigallocatechin gallate (EGCG) (23.95 min) ; 5, caffeic acid (CA) (26.08 min) ; 6, epicatechin (27.27 min) ; 7, P-coumaric acid (31.57 min) ; 8, rutin (33.44 min) ; 9, Ferulic acid (34.00 min) ; 10, Gossypin (41.72 min) ; 11, Hesperetin (42.85 min) ; 12, Resveratrol (45.17 min) ; 13, quercetin (51.83 min) ; 14, naringenin (56.28 min) ; 15, Hydroxyflavin (57.44 min) , 標示於 Table 3 。

(2) 桑椹水萃取物 (MWEs) :

Gallic acid (GA) 約 0.31%、Protocatechuic acid (PCA) 約 2.92%、Catechin 約 0.54%、Epigallocatechin gallate (EGCG) 約 2.68%、Caffeic acid (CA) 約 1.1%、Epicatechin 約 1.21%、P-coumaric acid 0.35%、Rutin 約 3.22%、Ferulic acid 0.27%、Gossypin 0.26%、Hesperetin 0.34%、Resveratrol 0.35%、Quercetin 約 0.5%、Naringenin 約 0.52%、Hydroxyflavin 0.58%。將所有能與標準品對上的 peaks 加總，共得 15.13% 的多酚，其中以 Rutin 將近佔 3.22% 的比例為最高 (Table 3) 。

(3) 桑椹多酚萃取物 (MPEs) :

Gallic acid (GA) 約 2.67%、Protocatechuic acid (PCA) 約 13.76%、Catechin 約 3.19%、Epigallocatechin gallate (EGCG) 約 6.26%、Caffeic acid (CA) 約 6.15%、Epicatechin 約 4.69%、P-coumaric acid 2.48%、Rutin 約

18.7%、Ferulic acid 0.99%、Gossypin 1.04%、Hysperetin 2.08%、Resveratrol 0.92%、Quercetin 約 5.92%、Naringenin 約 6.71%、Hydroxyflavin 1.43%，其中以 rutin 將近佔 18.7%的比例為最高 (Table 3)。量化結果如表。從 HPLC 的分析裡觀察到 MPEs 以 Protocatechic acid (PCA)、Rutin、Epigallocatechin gallate (EGCG)、Caffeic acid (CA)、Quercetin、Naringenin 的成份居多，個別為 MWEs 的 3~10 倍，其中含量最多的 PCA 以及 Rutin 是 MWEs 的 4~6 倍，這樣的比例與先前的『總多酚酸以及總類黃酮含量分析』的結果接近。從這些結果證實，桑椹的確是富含多酚的果實，而其中多酚的萃取出 (MPEs) 含有高量的 PCA 與 Rutin。

2. 各組動物血清中 TG、TC 與 FFA 濃度之影響變化

以 HFCD 餵食倉鼠之動物試驗中，各試驗組別倉鼠血中脂質濃度示於 Figure 2。單獨以 HFCD 餵食 (誘導組；0% MWEs) 的倉鼠，其血清中三酸甘油酯 (TG)、總膽固醇 (TC) 與游離脂肪酸 (FFA) 濃度有明顯的增加，高於正常組別 (N) ($p < 0.05$, Fig. 2A, B, C)，顯示在 HFCD 餵食模式成功誘導倉鼠呈現高血脂症狀態。

血清中 TG 濃度經 HFCD 餵食模式誘導後明顯上升 (250 mg/dl)，但若同時給予 0.5%、1% 與 2% MWEs 後則發現有隨著劑量上升而下降之趨勢 (210 mg/dl ; 145 mg/dl ; 136 mg/dl) ($p < 0.05$, Fig. 2A)。在血清 TC

濃度，誘導組之 TC 較正常組上升約三倍達 480 mg/dl，但在經餵食 0.5%、1% 與 2% MWEs 後，發現有降低其血中 TC 濃度之作用，較誘導組下降約二倍 ($p < 0.05$, Fig. 2B)。而在游離脂肪酸 (FFA) 濃度，亦有相同之發現，在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之 FFA 濃度，均較誘導組低 ($p < 0.05$, Fig. 2C)，但三組間之濃度經 ANOVA 分析發現無明顯差異。結果顯示在 MWEs 可以降低倉鼠因 HFCD 餵食模式誘導的高血脂症狀。

3. 各組動物血清中 LDL 與 HDL 濃度之影響變化

以 HFCD 餵食倉鼠之動物試驗中，各試驗組別倉鼠血中脂蛋白濃度示於 Figure 3。單獨以 HFCD 餵食（誘導組；0% MWEs）的倉鼠，其血清中 LDL 濃度有明顯的增加，高於正常組別 (N) ($p < 0.05$, Fig. 3A)，而在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之 LDL 濃度，均較誘導組低 ($p < 0.05$, Fig. 3A)。而血中 HDL 濃度則因有加入 0.5%、1% 與 2% MWEs 有增加之現象 ($p < 0.05$, Fig. 3A)，但三組間之濃度經 ANOVA 分析發現無明顯差異。而 0.5%、1% 與 2% MWEs 組別倉鼠之心血管疾病之風險因子 (LDL/HDL ratio)，均較誘導組低，甚至比正常組還少 ($p < 0.05$, Fig. 3B)。

4. 各組動物血漿脂質過氧化程度之影響變化

高脂質飲食不僅會引發高血脂症，同時因血中脂質濃度增加，也會增加脂質過氧化作用的發生，如 LDL 氧化為氧化態的 LDL (oxidative LDL；

oxLDL)，是導致動脈粥狀硬化的主因。之前本人研究已證實，在細胞外實驗中，MWEs 具有抗氧化效力，可預防 LDL 氧化，減少罹患動脈粥狀硬化的風險 (Liu et al., 2008)。因此本研究試驗 MWEs 在 HFCD 誘導血脂異常之動物模式下，是否也能降低動物血漿脂質的過氧化物濃度。各組別血漿脂質過氧化程度示於 Figure 4，結果發現，HCFD 組血中脂質過氧化物濃度較正常組高出許多 ($p < 0.05$)；而在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之血中脂質過氧化物濃度較誘導組 (2.25 mg/ml) 則有下降許多，分別為 0.9 mg/ml、0.73 mg/ml 與 0.73 mg/ml。

5. 各組動物肝臟 TG 與 TC 濃度之影響變化

以 HFCD 餵食倉鼠之動物試驗中，各試驗組別倉鼠肝臟三酸甘油酯與總膽固醇濃度示於 Figure 5。HFCD 誘導組中，其倉鼠肝臟中所含之三酸甘油酯及膽固醇堆積的情形明顯上升，均高於正常組 ($p < 0.05$, Fig. 5A, B)。而在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之肝臟三酸甘油酯濃度較誘導組 (300 mg/dl) 則有下降趨勢，分別為 215 mg/dl、206 mg/dl 與 178 mg/dl。此外，0.5%、1% 與 2% MWEs 組之肝臟膽固醇濃度也較誘導組低 ($p < 0.05$, Fig. 5B)，但三組間之濃度經 ANOVA 分析發現無明顯差異。

6. 各組動物肝臟功能指數：AST、ALT 之影響變化

已有許多動物實驗證實，高血脂症因血中三酸甘油酯含量增高，可能會形成脂肪肝，而導致肝功能病變。故本試驗進一步分析測定各組動物肝功能指標 AST、ALT 之表現變化。結果發現，在經過 HFCD 誘導的組別

中 ALT 的酵素活性情形明顯較正常組上升，而在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之 ALT 的酵素活性較誘導組則有下降趨勢 ($p < 0.05$, Fig. 6A)。然而在誘導的組別中 AST 的酵素活性亦明顯較正常組上升，在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之 AST 的酵素活性較誘導組則有下降且與正常組相同($p < 0.05$, Fig. 6B)，但三組間經 ANOVA 分析則無明顯差異。顯示在 0.5% MWEs 劑量下，即具有降低 HFCD 誘導的 ALT、AST 的酵素活性增加，達減少肝臟功能損傷之作用。

7. 各組動物腎臟功能指數：BUN、CRE 之影響變化

探討 HFCD 所飼食的動物模式下，是否會影響動物腎功能，結果示於 Figure 7。本研究以血清中尿素氮 (BUN) 以及肌酐酸 (CRE) 作為評估腎功能的指標，結果顯示，在 HFCD 餵食下，無論是有無添加 MWEs 的組別，其血清中 BUN 及 CRE 的濃度，均與正常組別無差異 ($p > 0.05$, Fig. 7 A, B)，因此可知在本研究中所採用之餵食模式並不會影響腎臟正常之功能，MWEs 亦不會造成動物腎臟功能損傷。

8. 各組動物肝臟物理型態重量變化

肝臟組織的外觀型態、大小與重量，可作為觀察在 HFCD 餵食模式下，動物肝臟是否有脂質沉積形成脂肪肝之現象。以 HFCD 餵食倉鼠之動物試驗中，各試驗組別倉鼠肝臟型態大小與重量示於 Figure 8。觀察各

組在肝臟組織大小型態上，誘導組的肝臟組織明顯較正常組大，肝臟整體外觀上亦呈現粉白色，為脂肪肝之特徵，顯示在 HFCD 餵食模式下會增加肝臟組織脂肪沉積作用。而在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之肝臟組織，其外觀大小均小於誘導組 (Fig. 8A)，但外觀上與誘導組相同呈現脂肪肝特徵。肝臟組織重量佔動物體重之百分比值示於 Figure 8B，結果顯示在誘導組其肝臟組織的重量明顯高於正常組；而在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之肝臟組織之重量則均小於誘導組 ($p < 0.05$, Fig. 8B)，顯示 MWEs 具有降低 HFCD 誘導的肝臟組織的脂質沉積作用，而降低動物肝臟組織大小與重量。

9. 各組動物肝臟中脂質合成相關蛋白的表達變化

以 HFCD 餵食倉鼠之動物試驗中，各試驗組別倉鼠肝臟中 FAS 與 HMG-CoA reductase 的表達變化，經西方墨點分析方法 (western blot) 及量化後示於 Figure 9。結果顯示在 FAS 蛋白在 1% 與 2% MWEs 組與誘導組相比有明顯的減少，各自分別降低約 36% 與 80% ($p < 0.05$)。而 HMG-CoA reductase 的蛋白表達，在 1% 與 2% MWEs 組與誘導組相比也有明顯的減少，各自分別降低約 41% 與 33% ($p < 0.05$)。

10. 各組動物肝臟中粒線體 β -氧化作用相關蛋白的表達變化

以 HFCD 餵食倉鼠之動物試驗中，各試驗組別倉鼠肝臟中 PPAR α 與

CPTI 蛋白的表達變化，經西方墨點分析方法（western blot）及量化後示於 Figure 10。結果顯示在 PPAR α 蛋白在 1%與 2%MWEs 組與誘導組相比有略為的增加（ $p<0.05$ ）；而 CPTI 蛋白表達，在 0.5%、1%與 2%MWEs 組與誘導組相比也有增加的趨勢（ $p<0.05$ ）。

11. MWEs 對 HepG2 細胞中脂質合成代謝相關基因表達的作用

以 1、3 與 6 mg/ml 濃度的 MWEs 與 HepG2 細胞共同培養反應，來試驗 MWEs 是否有增加 HepG2 細胞中脂質合成代謝相關基因表達的能力，其結果示於 Figure 11。由實驗結果發現，HepG2 細胞經 MWEs 處理後，其 LDLR gene 表達有因 MWEs 濃度增加而增加，而 HMG-CoA reductase gene 表達有明顯因 MWEs 濃度增加而減少（ $p<0.05$, Fig. 11A）；SREBP-2 的基因表達則無明顯變化（ $p>0.05$, Fig. 11A）。另外 SREBP-1c、FAS 與 GPAT gene 的表達則有明顯因 MWEs 濃度增加而減少（ $p<0.05$, Fig. 11B）。

12. MWEs 對 HepG2 細胞中脂質合成相關蛋白表達的作用

由上一實驗確認 MWEs 會調控 HepG2 細胞中與血脂吸收代謝相關的基因表達，接下來進一步以 western blot 來觀察是否此些基因的蛋白表現也受影響。實驗結果發現，HepG2 細胞經 MWEs 處理後，其 FAS 與 HMG-CoA reductase 二基因的蛋白表達，有明顯因 MWEs 濃度增加而減

少 ($p < 0.05$, Fig. 12)。

13. MWEs 對 HepG2 細胞中 β -氧化作用相關蛋白的作用

以 1、3 與 6 mg/ml 濃度的 MWEs 與 HepG2 細胞共同培養反應，來試驗 MWEs 是否有增加 HepG2 細胞中 β -氧化作用相關蛋白表達的能力，其結果示於 Figure 13。由實驗結果發現，HepG2 細胞經 MWEs 處理後，其 PPAR α 表達有在濃度 3 與 6 mg/ml MWEs 組，有增加的趨勢；而 CPTI 也發現到有一樣的現象 ($p < 0.05$, Fig. 13)。

14. MWEs 對 HepG2 細胞中 LDL uptake ability 的作用

以 1、3 與 6 mg/ml 濃度的 MWEs 與 HepG2 細胞共同培養反應，來試驗 MWEs 是否有增加 HepG2 uptake LDL 的能力，其結果示於 Figure 14。實驗結果發現，在螢光顯微鏡下，以相同的視野切換不同光源，可以十分明顯的觀察到細胞中帶有紅色螢光的 Dil-LDL 量，有隨 MWEs 濃度 (1, 3, 6 mg/ml) 增加而增加，顯示當細胞有經 MWEs 處理的組別與正常組的細胞相較 uptake 較多的 Dil-LDL (Figure 18d, f, h)，顯示 MWEs 有增加 HepG2 uptake LDL 的能力。

因 Dil-LDL 會被雷射光源激發出紅色螢光，因此可以流式細胞儀(flow cytometric) 分析，量化所有組別細胞 uptake Dil-LDL 的程度，而此數值亦代表 HepG2 細胞 uptake LDL 的能力。由實驗結果發現，圖中 mean 值

代表細胞內 Dil-LDL 螢光之強度，亦也有隨 MWEs 濃度 (1, 3, 6 mg/ml) 增加而增加之趨勢 (Figure 15A)。而以正常組之 mean 值為 100%作為 HepG2 細胞 uptake LDL 能力之百分比值，換算其他組別後顯示，細胞在加入 MWEs 濃度 (1、3、6 mg/ml) 後，細胞 uptake LDL 能力之百分比值各自增加約 58%、60%與 40% ($p < 0.05$, Fig. 15B)。

15. 桑椹萃取物對 HepG2 細胞株之毒性測試

加入 MWEs、MAEs 及 MPEs 處理 HepG2 細胞株，24 小時後分析細胞存活情形。由 Fig. 16A、B、C 之 MTT assay 結果得知 MWEs、MAEs 及 MPEs 藥物半致死劑量 (IC50) 分別是 6.91 mg/ml、4.22 mg/ml 及 0.86 mg/ml，本實驗設計重點在觀察胞內脂質堆積情形，在不傷害細胞的狀態下，實驗將以 1、2、3 mg/ml MWEs；0.1、0.3、0.5 mg/ml MAEs 及 0.1、0.2、0.3 mg/ml MPEs 作為細胞實驗之處理劑量。

16. 不同濃度油酸對 HepG2 細胞脂質堆積之影響

由 MTT assay 結果，每種桑椹萃取物分別選定三個劑量，分別為低、中及高劑量。確定細胞生長狀態良好，細胞存活率都保持 100% 下，以 0.5 mM 之 oleic acid 與選定桑椹萃取物之劑量處理 HepG2 細胞，並以尼羅紅染色試驗觀察脂肪堆積的情形，利用 Nile red 與 lipid oil droplet 具特異性之結合，在雷射光激發下會散發紅色螢光，可透過螢

光顯微鏡肉眼觀察紅色螢光的強度，得知細胞內脂質含量之變化，並應用流式細胞儀量化並進行統計分析。Fig. 17A，18A，19A 分別為 MWEs、MAEs 及 MPEs 之尼羅紅染色試驗，由圖可觀察在控制組中，紅色螢光較弱，而以 oleic acid 誘導之組別螢光強度明顯增加，並隨各種不同桑椹萃取物之濃度增加會降低紅色螢光之強度。Fig. 17B、18B、19B 則為流式細胞儀的定量結果，Fig. 17B 發現以 0.5 mM 之 oleic acid 誘導後的 HepG2 細胞脂肪含量較對照組增加約 3.5 倍 (* $p < 0.05$)，加入 1、2、3 mg/ml MWEs 的組別，脂肪含量分別降低了 73.7%、69.7% 及 63%。Fig. 18B 發現以 0.5 mM 之 oleic acid 誘導後的 HepG2 細胞脂肪含量較對照組增加約 4.4 倍，具有顯著差異 (# $p < 0.05$)，加入 0.1、0.3、0.5 mg/ml MAEs 的組別，脂肪含量分別降低了 77.9%、65.9% 及 63.8% (* $p < 0.05$)；Fig. 19B 發現以 0.5 mM 之 oleic acid 誘導後的 HepG2 細胞脂肪含量較對照組增加約 3.1 倍，具有顯著差異 (# $p < 0.05$)，加入 0.1，0.2，0.3 mg/ml MPEs 的組別，脂肪含量分別降低了 76.5%、69.8% 及 50.5% (* $p < 0.05$)。由以上三種桑椹萃取物的實驗結果證明皆能降低胞內脂質堆積之效果，以 MPEs 的效果最為顯著，只需使用 0.3 mg/ml 的濃度就能降低將近一半的胞內脂肪含量，其次則是 MAEs，最後是 MWEs。

17. MWEs、MAEs 及 MPEs 降低 HepG2 細胞中脂肪酸合成相關蛋白之表達

由於 Fig. 17 到 Fig. 19 的結果證實 MWEs、MAEs 及 MPEs 對 Oleic acid 誘導細胞脂質堆積有顯著的抑制作用，因此擬進一步研究其詳細的作用機轉。在脂質代謝機制中，幾個跟脂肪酸合成有關的酵素扮演很重要的角色，例如：FAS、ACC、SREBP1 及 AFABP 的表達變化，經西方墨點分析方法（western blot）及量化後顯示於 Figure 20。

17.1. FAS 之表達

FAS 在體內主要參與脂肪酸新生（fatty acid synthesis），當食物中的醣類或脂肪過多時，會刺激 FAS 大量表現以促進脂肪酸的生成。由 Fig. 20A 結果可知，經 oleic acid 誘導後之細胞 FAS 蛋白高 1.05 倍；加入 1、2、3 mg/ml MWEs 處理後，FAS 之蛋白表現量分別為控制組的 1.09、0.85、0.84 倍。由 Fig. 20B 的結果，oleic acid 誘導後之細胞 FAS 表現高 1.1 倍；加入 0.1、0.3、0.5 mg/ml MAEs 處理後表現量分別為控制組的 1.14、1.02、1.04 倍。而 Fig. 20C 結果可見，經 oleic acid 誘導後之細胞 FAS 表現高 1.56 倍。加入 0.1、0.2、0.3 mg/ml MPEs 處理後蛋白表現量分別為控制組的 1.59、1.55、0.91 倍。顯示加入 MWEs 2、3 mg/ml，MAEs 0.3、0.5 mg/ml 及 MPEs 在 0.3 mg/ml 之劑量下能明顯降低 HepG2 細胞以 oleic acid 誘導後

FAS 的表現 (* $p < 0.05$, * $p < 0.001$)，且有 dose-dependent 關係。

17.2. ACC 之表達

ACC 的功能和 FAS 同樣屬於合成脂肪酸之酵素，為 FAS 上游蛋白之重要酵素。由 Fig. 20A 結果可知，經 oleic acid 誘導後之細胞 ACC 表現高 1.31 倍。加入 1、2、3 mg/ml MWEs 處理後 ACC 之蛋白表現量分別為控制組的 1.5、1.31、1.25 倍。Fig. 20B 的結果顯示，oleic acid 誘導後之細胞 ACC 表現高 1.01 倍。加入 0.1、0.3、0.5 mg/ml MAEs 處理後 ACC 表現量分別為控制組的 1.03、1.05、1 倍。Fig. 20C 結果可知，經 oleic acid 誘導後之細胞 ACC 表現高 1.6 倍。加入 0.1、0.2、0.3 mg/ml MPEs 處理後 ACC 蛋白表現量分別為控制組的 1.35、1.12、1.02 倍。顯示 MWEs 及 MAEs 在高劑量下能明顯降低 HepG2 細胞以 oleic acid 誘導後 ACC 的表現 (* $p < 0.05$, * $p < 0.001$)，MPEs 在低劑量下便能抑制 oleic acid 誘導後 ACC 的表現，且有 dose-dependent 關係。

17.3. A-FABP 之表達

Fig. 20A 的結果可知，經 Oleic acid 誘導後之細胞 A-FABP 蛋白表現高 1.7 倍。與控制組相較下，加入 1、2、3 mg/ml MWEs 處理後蛋白表現量分別是 1.47、1.32、0.92 倍。由 Fig. 20B 顯示，經 oleic acid 誘導後之細胞 A-FABP 蛋白表現為 1.50 倍。與控制組相較下，加入

0.1、0.3、0.5 mg/ml MAEs 處理後表現量分別為 1.03、0.92、0.85 倍。而 Fig. 20C 的結果，經 oleic acid 誘導後之細胞 A-FABP 蛋白表現為 1.03 倍。與控制組相較下，加入 0.1、0.2、0.3 mg/ml MPEs 處理後表現量分別是 0.92、0.89、0.75 倍。顯示 MWEs、MAEs 及 MPEs 均能明顯減少 HepG2 細胞由 Oleic acid 誘導後 A-FABP 的表現 (* $p < 0.05$, * $p < 0.001$)，且有 dose-dependent 關係。

17.4. SREBP-1 之表達

SREBP1 負責進行脂肪酸生合成調控，例如轉錄 FAS、ACC 及 GPAT。Fig. 20A 結果顯示，經 oleic acid 誘導後之細胞 SREBP-1 蛋白表現為 1.16 倍。與控制組相較下，加入 1、2、3 mg/ml MWEs 處理後蛋白表現量分別是 1.22、1.10、1.10 倍。Fig. 20B 的結果，經 oleic acid 誘導後之細胞 SREBP-1 蛋白表現為 1.15。與控制組相較下，加入 0.1、0.3、0.5 mg/ml MAEs 處理後表現量分別為 1.17、1.04、0.92 倍。由 Fig. 20C 可知，經 oleic acid 誘導後之細胞 SREBP-1 蛋白表現為 0.94 倍。與控制組相較下，加入 0.1、0.2、0.3 mg/ml MPEs 處理後表現量分別是 0.89、0.89、0.87 倍。顯示 MWEs、MAEs 於中高劑量及 MPEs 從低劑量便能明顯降低 HepG2 細胞由 oleic acid 誘導後 SREBP-1 的表現，且有 dose-dependent 關係。

從 Fig. 20 結果證明，經 Oleic acid 誘導後的細胞其 FAS、ACC、

A-FABP 及 SREBP1 蛋白表現量均有明顯上升，而無論是 MWEs、MAEs 或 MPEs 皆可抑制這些蛋白之表現，推測桑椹萃取物確實具有抑制脂肪酸合成之效用。

18. MWEs、MAEs 及 MPEs 降低 HepG2 細胞中膽固醇合成相關蛋白之表達

18.1. HMGCoR 之表達

HMGCoR 為膽固醇合成之速率決定酵素。Fig. 21A 中，以 oleic acid 誘導後之細胞 HMGCoR 蛋白表現為 1.27 倍。與控制組相較下，加入 1、2、3 mg/ml MWEs 處理後蛋白表現量分別是 1.06、0.94、0.5 倍。Fig. 21B 中，以 oleic acid 誘導後之細胞 HMGCoR 蛋白表現為 1.04 倍。與控制組相較下，加入 0.1、0.3、0.5 mg/ml MAEs 處理後表現量分別為 1.01、0.86、0.80 倍。Fig. 21C 中，以 oleic acid 誘導後之細胞 HMGCoR 蛋白表現為 1.08 倍。與控制組相較下，加入 0.1、0.2、0.3 mg/ml MPEs 處理後表現量分別是 1.08、0.83、0.80 倍。顯示 MWEs、MPEs 分別在中高劑量與 MAEs 在低劑量即明顯減少 (* $p < 0.05$, * $p < 0.001$) HepG2 細胞以 oleic acid 誘導後 HMGCoR 的表現。

18.2. SREBP-2 之表達

SREBP-2 分別負責進行膽固醇的生合成調控，例如轉錄 HMGCoR

等蛋白。Fig. 21A 中，以 oleic acid 誘導後之細胞 SREBP-2 蛋白表現為 1.17 倍。與控制組相較下，加入 1、2、3 mg/ml MWEs 處理後蛋白表現量分別是 1.19、1.07、1.02 倍。Fig. 21B 中，以 oleic acid 誘導後之細胞 SREBP-2 蛋白表現為 1.07 倍。與控制組相較下，加入 0.1、0.3、0.5 mg/ml MAEs 處理後表現量分別為 0.94、0.88、0.84 倍。Fig. 21C 中，以 oleic acid 誘導後之細胞 SREBP-2 蛋白表現高 1.45 倍。與控制組相較下，加入 0.1、0.2、0.3 mg/ml MPEs 處理後表現量分別是 1.3、1.27、1.17 倍。顯示 MWEs 在中高劑量及 MAEs 和 MPEs 自低劑量即能明顯減少 (* $p < 0.05$, * $p < 0.001$) HepG2 細胞以 oleic acid 誘導後 SREBP-2 的表現。

19. MWEs、MAEs 及 MPEs 降低 HepG2 細胞中三酸甘油酯合成相關蛋白之表達

19.1. GPAT 之表達

GPAT 為三酸甘油酯合成之速率決定酵素。Fig. 22A 中，oleic acid 誘導後之細胞 GPAT 蛋白表現高 1.67 倍。與控制組相較下，加入 1、2、3 mg/ml MWEs 處理後蛋白表現量分別是 1.59、1.41、0.87 倍。Fig. 22B 中，oleic acid 誘導後之細胞 GPAT 蛋白表現為 1.32 倍。與控制組相較下，加入 0.1、0.3、0.5 mg/ml MAEs 處理後表現量分別為 1.16、1.09、0.98 倍。Fig. 22C 中，oleic acid 誘導後之細胞 GPAT 蛋白表

現為 1.38 倍。與控制組相較下，加入 0.1、0.2、0.3 mg/ml MPEs 處理後表現量分別是 1.33、1.10、1.07 倍。顯示 MWEs、MPEs 在中高劑量及 MAEs 自低劑量便能明顯減少 (* $p < 0.05$, * $p < 0.001$) HepG2 細胞以 oleic acid 誘導後 GPAT 的表現。

20. MWEs、MAEs 及 MPEs 促進 HepG2 細胞中 β 氧化相關蛋白之表達

20.1. CPTI 之表達

CPTI 為粒線體內的脂肪酸 β -氧化作用之反應速率限制酵素。Fig. 23A 中，oleic acid 誘導後之細胞 CPTI 蛋白表現為 1.19 倍。加入 1、2、3 mg/ml MWEs 處理後蛋白表現量分別為控制組的 1.41、1.55、1.58 倍。Fig. 23B 中，oleic acid 誘導後之細胞 CPTI 蛋白表現為 1.19 倍。加入 0.1、0.3、0.5 mg/ml MAEs 處理後表現量分別為控制組的 1.02、1.04、1.15 倍。Fig. 23C 中，oleic acid 誘導後之細胞 CPTI 蛋白表現為 1.12 倍。加入 0.1、0.2、0.3 mg/ml MPEs 處理後表現量分別為控制組的 1.12、1.26、1.58 倍。顯示 MLEs、MAEs 和 MPEs 均能增加 HepG2 細胞以 oleic acid 誘導後 CPTI 的表現。

20.2. PPAR α 之表達

PPAR α 分別負責進行 β -氧化的生合成調控，例如轉錄 CPTI 等蛋白。Fig. 23A 中，oleic acid 誘導後之細胞 PPAR α 蛋白表現為 1.10 倍。與控制組相較下，加入 1、2、3 mg/ml MWEs 處理後蛋白表現量分別

是 1.53、1.60、1.71 倍。Fig. 23B 中，oleic acid 誘導後之細胞 PPAR α 蛋白表現為 1.00 倍。加入 0.1、0.3、0.5 mg/ml MAEs 處理後表現量分別為控制組的 1.02、1.09、1.14 倍。Fig. 23C 中，oleic acid 誘導後之細胞 PPAR α 蛋白表現之 0.83 倍。與控制組相較下，加入 0.1、0.2、0.3 mg/ml MPEs 處理後表現量分別是 0.94、1.28、1.33 倍。顯示 MLEs、MAEs 和 MPEs 均能增加 HepG2 細胞以 oleic acid 誘導後 PPAR α 的表現。

21. MWEs、MAEs 及 MPEs 促進 HepG2 細胞中 AMPK 蛋白之表達

ACC的功能和FAS同樣屬於合成脂肪酸之酵素，ACC負責催化 acetyl-CoA 轉變成malnoyl-CoA。AMPK可以藉由磷酸化作用抑制 ACC活性以減少脂肪酸合成，然而AMPK 本身也需要藉由上游蛋白質激酶（AMPK kinase）磷酸化後始有活性。除此之外，AMPK在醣類、脂肪代謝機轉中是個很重要的中樞調節者。AMPK 蛋白表現方面，以MWEs處理，所有細胞組別中AMPK蛋白量皆沒有變化；而p-AMPK 蛋白表現方面，與控制組相較下，MWEs處理後蛋白表現量為 1.22、1.24、1.26 倍，相較於誘導組之1.21倍，皆有上升之趨勢。接下來進一步觀察AMPK 和p-AMPK之表現。將p-AMPK/AMPK蛋白變化量計算3次mean \pm SD結果顯示於Fig. 24A。如圖所示，p-AMPK / AMPK ratio在MWEs 處理後與誘導組相比有顯著差異（*p<0.05，

* $p < 0.001$)。以MAEs處理，所有細胞組別中AMPK蛋白量亦無變化；而p-AMPK蛋白表現方面，與控制組相較下，MAEs處理後蛋白表現量為0.9、1.05、1.24 倍，相較於誘導組之0.86倍，皆有上升之趨勢。接下來進一步觀察AMPK 和p-AMPK 之表現。將p-AMPK/AMPK蛋白變化量計算3次mean \pm SD結果顯示於Fig. 24B。

22. MWEs 對餵食高脂之倉鼠體重之影響

倉鼠在飼養期間，每隔兩週測量體重一次，測量時並觀察各組動物外觀狀態與活動力，各組動物毛色不變且無脫毛現象，活動能力敏捷正常，而起始體重(第零週)各組間沒有顯著差異($p > 0.05$, 表四)。各組別「各週體重較第零週體重增加之比列」示於表四，結果顯示，誘導組在飼養期間的最末週，其體重較第零週體重增加約 39.1%，比正常組的增加比例(26.7%)高，顯示在 HFCD 餵食下動物體重有增加之趨勢。在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組飼養期間的最末週，其體重增加率分別為 32.1%、31.7%、30.8%，相較於誘導組之體重增加率有減少趨勢($p < 0.05$, 表四)。

23. 各組動物副睪脂體 (epididymal fat pad) 變化

睪丸周邊脂肪組織(副睪脂體; epididymal fat pad)的大小與重量，可作為不易形成體脂肪之重要功能性指標。以 HFCD 餵食倉鼠之動物試驗中，各試驗組別倉鼠副睪脂體的大小與重量示於 Figure 25。

觀察各組在副睪脂體組織大小型態上，誘導組的副睪脂體明顯較正常組大，顯示在 HFCD 餵食模式下會增加其脂肪沉積作用而使睪丸周邊脂肪組織堆積增大；而在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之副睪脂體，其外觀大小均小於誘導組 (Fig. 25A)。副睪脂體重量與動物體重之比值示於 Figure 25B，結果顯示在誘導組其副睪脂體的重量明顯高於正常組；而在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之副睪脂體重量則均小於誘導組 ($p < 0.05$, Fig. 25B)，顯示 MWEs 具有降低 HFCD 誘導的副睪脂體的脂質沉積作用，而降低動物睪丸周邊脂肪組織大小與重量。

24. 各組動物副腎脂體 (perirenal fat pad) 變化

腎臟周邊脂肪組織 (副腎脂體; perirenal fat pad weight) 的大小與重量，可作為不易形成體脂肪之重要功能性指標。以 HFCD 餵食倉鼠之動物試驗中，各試驗組別倉鼠副腎脂體的大小與重量示於 Figure 10。觀察各組在副腎脂體大小型態上，誘導組的副腎脂體明顯較正常組大，顯示在 HFCD 餵食模式下會增加其脂肪沉積作用而使腎臟周邊脂肪組織堆積增大；而在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之副腎脂體，其外觀大小均小於誘導組 (Fig. 26A)。副腎脂體重量與動物體重之比值示於 Figure 26B，結果顯示在誘導組其副腎脂體的重量明顯高於正常組；而在 0.5%、1% 與 2% MWEs 組之副腎脂體之重量則均小於誘導組 ($p < 0.05$, Fig. 26B)，顯示 MWEs 具有降低 HFCD 誘導的副

腎脂體的脂質沉積作用，而降低動物腎臟周邊脂肪組織大小與重量。

25. MPC 對餵食高脂之小鼠體重之變化

MPC 由 Rutin, PCA, EGCG, GA, CA, Catechin, Naringenin, Quercetin 及 Epicatechin 將主要成分之純物質依比例均勻混合(表五)。

各組別「各週體重較第零週體重增加之比列」示於 Table 6 表示各組動物在飼養期間體重變化的情形，飼養到最末週時，HFD 組體重變化率為 22.68%，加入 Mulberry polyphenolic component (MPC) 處理之組別，0.1% 為 16.84%，0.3% 為 17.8%，0.5% 為 14.1%，Simvastatin 組為 18.7%，由結果顯示，隨著 MPC 劑量之增加，體重增加的幅度有趨緩的情形。

26. 肝臟三酸甘油酯和總膽固醇含量分析

以 HFD 餵食 C57BL/6 之動物試驗中，將各組動物肝臟檢體進行均質，萃取油脂進行含量分析。各試驗組別之肝臟三酸甘油酯與總膽固醇濃度示於 Figure 29。HFD 誘導組中，其肝臟中所含之三酸甘油酯及膽固醇堆積的情形明顯上升，均高於控制組。而在 0.1%、0.3%、0.5% MPC 及 simvastatin 組之肝臟三酸甘油酯濃度較誘導組 (525.47 mg/dl) 則有下降趨勢，分別為 484.81 mg/dl、428.55 mg/dl、377.53 mg/dl 與 356.91 mg/dl ($p < 0.05$)。

27. MPC 對餵食高脂之小鼠血清生化數值之影響

27.1. 總膽固醇 (TCHO)、三酸甘油脂 (TG) 與游離脂肪酸 (FFA)

表七顯示在各組動物血清中，0.1%、0.3%、0.5% MPC 及 simvastatin 之總膽固醇含量分別為 183.33、176.66、122.50 及 120.00，相較於誘導組的 203.33 皆有下降的趨勢。0.1%、0.3%、0.5% MPC 及 simvastatin 之三酸甘油脂含量分別為 156.00、146.67、126.00 及 136.67，相較於誘導組的 180.00 也皆有下降的趨勢，0.5% MPC 劑量下，相較於誘導組有顯著降低 ($p<0.05$; $p<0.01$)。而 0.1%、0.3%、0.5% MPC 及 simvastatin 之游離脂肪酸含量分別為 3.05、3.04、2.99 及 3.06，相較於誘導組的 3.08 也皆有下降的趨勢。此結果顯示，桑椹所含之多酚成分可降低血中三酸甘油脂、膽固醇與游離脂肪酸的堆積。

27.2. 各組動物肝臟功能指數：GOT、GPT 之影響變化

一般脂肪肝患者,其 GOT、GPT 值會有升高之情形，故本試驗進一步分析測定各組動物肝臟功能指標 GOT、GPT 之表現變化。0.1%、0.3%、0.5% MPC 及 simvastatin 之 GPT 數值分別為 68.25、64.60、58.80 及 64.00，相較於誘導組的 94.67 皆有下降的趨勢；0.1%、0.3%、0.5% MPC 及 simvastatin 之 GOT 數值分別為 286.40、271.40、271.00 及 259.25，相較於誘導組的 332.00 皆有下降的趨勢，並顯示在 0.5% MPC 劑量下，即能顯著降低(表七) HFD 所誘導之 GPT、GOT

的酵素活性增加 ($p < 0.05$; $p < 0.01$)，達減少肝臟功能損傷之作用。

27.3. 血漿低密度脂蛋白膽固醇 (LDL)、高密度脂蛋白膽固醇 (HDL)

與 LDL/HDL ratio

膽固醇主要分成兩類，高密度膽固醇 (HDL) 與低密度膽固醇 (LDL)，HDL 被稱為好的膽固醇，因為它在血液中流通性較活潑，把膽固醇由器官細胞輸送到肝臟，再將它代謝或排泄，並且會把累積在血管壁的壞的膽固醇也一併溶解帶走。而 LDL 又稱為壞的膽固醇，較黏稠，流動率慢，而且它由肝臟到器官細胞時，會沿路累積黏在血管壁，是導致動脈硬化的主要原因。0.1%、0.3%、0.5% MPC 及 simvastatin 各組別之 LDL 數值分別為 38.00、34.00、32.00 及 25.00，相較於誘導組的 48.00 皆有下降的趨勢；0.1%、0.3%、0.5% MPC 及 simvastatin 各組別之 HDL 數值分別為 74.50、75.67、74.50 及 70.00，而 LDL/HDL ratio 有下降的情形，但 LDL 及 HDL 分析中，各組並無顯著差異，因此無法就本實驗結果評估桑椹萃取物是否能降低心血管疾病之風險。

27.4. 各組動物腎臟功能指數：BUN、CRE 之影響變化

無法就本實驗結果評估桑葉萃取物是否能降低心血管疾病之風險。血清尿素氮 (BUN) 是臨床上最常用的腎功能指標之一，濃度過高意味著腎臟無法順利將尿素氮排出體外，因此可用來評估腎臟方面

的疾病，例如腎功能不全、急慢性腎絲球腎炎、腎病症候群等。0.1%、0.3%、0.5% MPC 及 simvastatin 各組別之 BUN 數值分別為 27.43、24.98、24.36 及 22.28，相較於誘導組的 31.10 皆有下降的趨勢；Creatinine 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，0.1%、0.3%、0.5% MPC 及 simvastatin 各組別之 CRE 數值分別為 0.62、0.62、0.60 及 0.58，相較於誘導組的 0.68 也皆有下降的趨勢。

28. MPC 調控動物肝臟中脂肪酸合成相關蛋白之作用

Fig. 30. 中，HFD 餵食 C57BL/6 之動物組別，FAS 蛋白表現為正常值之 2.2 倍。與控制組相較下，加入 0.1%、0.3%、0.5% MPC 處理後蛋白表現量分別是 1.96，1.67，1.19 倍，而 simvastatin 組別則為 1.19 倍。ACC 蛋白表現為正常值之 1.87 倍。與控制組相較下，加入 0.1%、0.3%、0.5% MPC 處理後蛋白表現量分別是 1.75，1.51，1.28 倍，而 simvastatin 組別則為 1.39 倍。SREBP-1 蛋白表現為正常值之 1.41 倍。與控制組相較下，加入 0.1%、0.3%、0.5% MPC 處理後蛋白表現量分別是 1.32，1.23，1.21 倍，而 simvastatin 組別則為 1.11 倍。A-FABP 蛋白表現為正常值之 1.13 倍。與控制組相較下，加入 0.1%、0.3%、0.5% MPC 處理後蛋白表現量分別是 1.05，1.03，0.94 倍，而 simvastatin 組別則為 0.9 倍。結果顯示，FAS、ACC、A-FABP 及 SREBP-1

蛋白之表達，相較於誘導組有明顯因 MPC 濃度增加而減少。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

29. MPC 調控動物肝臟中膽固醇合成相關蛋白之作用

Fig. 31. 中，HFD 餵食 C57BL/6 之動物組別，HMGCoR 蛋白表現為正常值之 1.48 倍。與控制組相較下，加入 0.1%，0.3%，0.5% MPC 處理後蛋白表現量分別是 1.47，1.25，0.91 倍，而 simvastatin 組別則為 1 倍。SREBP-2 蛋白表現為正常值之 1.2 倍。與控制組相較下，加入 0.1%，0.3%，0.5% MPC 處理後蛋白表現量分別是 1.06，1.05，0.91 倍，而 simvastatin 組別則為 0.84 倍。結果顯示，HMGCoR 與 SREBP-2 蛋白之表達，相較於誘導組有明顯因 MPC 濃度增加而減少。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

30. MPC 調控動物肝臟中三酸甘油脂合成相關蛋白之作用

Fig. 32. 中，HFD 餵食 C57BL/6 之動物組別，GPAT 蛋白表現為正常值之 1.84 倍。與控制組相較下，加入 0.1%，0.3%，0.5% MPC 處理後蛋白表現量分別是 1.75，1.49，1.21 倍，而 simvastatin 組別則為 1.23 倍。結果顯示，GPAT 蛋白之表達，相較於誘導組有明顯因 MPC 濃度增加而減少。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

31. MPC 調控動物肝臟中 β 氧化相關蛋白之作用

Fig. 33. 中，HFD 餵食 C57BL/6 之動物組別，CPTI 蛋白表現為正常值之 0.73 倍。與控制組相較下，加入 0.1%，0.3%，0.5% MPC 處理後蛋白表現量分別是 0.9，1.08，1.0 倍，而 simvastatin 組別則為 1.03 倍。PPAR α 蛋白表現為正常值之 0.8 倍。與控制組相較下，加入 0.1%，0.3%，0.5% MPC 處理後蛋白表現量分別是 0.87，0.95，0.99 倍，而 simvastatin 組別則為 0.92 倍。結果顯示，CPTI 及 PPAR α 蛋白之表達，相較於誘導組有明顯因 MPC 濃度增加而增加。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

32. MPC 調控動物肝臟中 β 氧化相關蛋白之作用

Fig. 34. 結果觀察 AMPK 活性變化。AMPK 在各組別之表現量並無顯著差異；但 p-AMPK 蛋白的表現量有隨 MPC 濃度增加而明顯增加，經計算 p-AMPK/AMPK ratio 後發現，AMPK 活性表現的確在 0.3%、0.5% MPC 餵食組中明顯上升($p < 0.05$)，推測，以桑椹多酚成分餵食高油脂飲食之 C57BL/6 小鼠可透過活化 AMPK 平衡體內能量代謝，調節脂質生成蛋白的表現。

實驗圖表

Table 1. Nutrient Compositions of MWEs and MPEs.

The components of Mulberry extracts (%)		
	MWEs	MPEs
phenolic acids	5.07 % ± 1.65	24.63 % ± 3.58
Flavonoids	8.33 % ± 1.89	44.03 % ± 4.25
protein	1.77 % ± 0.08	5.64 % ± 0.13
fat	4.40 % ± 0.52	3.10 % ± 0.74
polysaccharide	4.83 % ± 0.24	6.67 % ± 0.12
Total	24.40 %	84.07%

Table 2. Retention Time, UV-vis, and Mass Spectral Characteristics for the Anthocyanic Compositions of MWEs

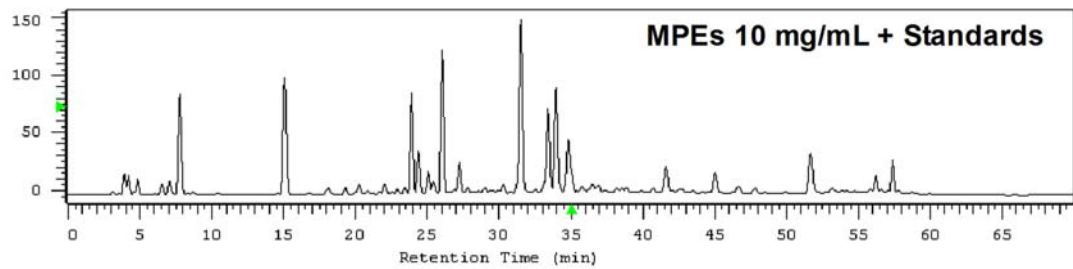
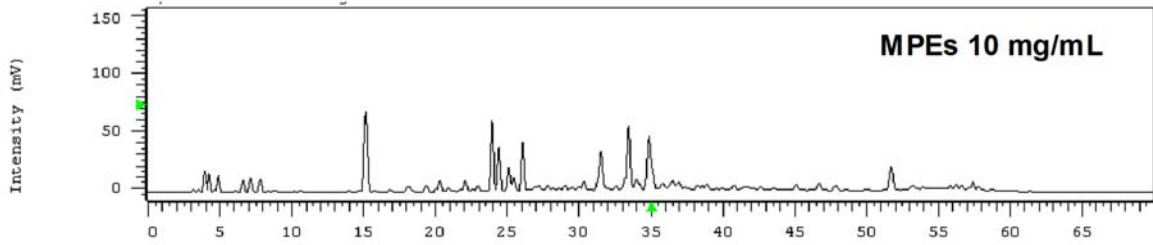
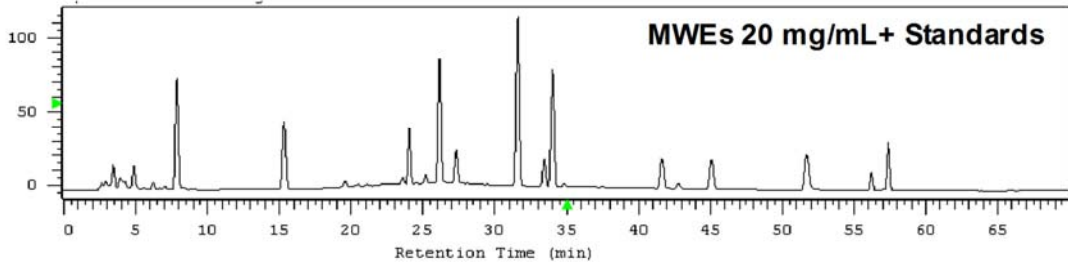
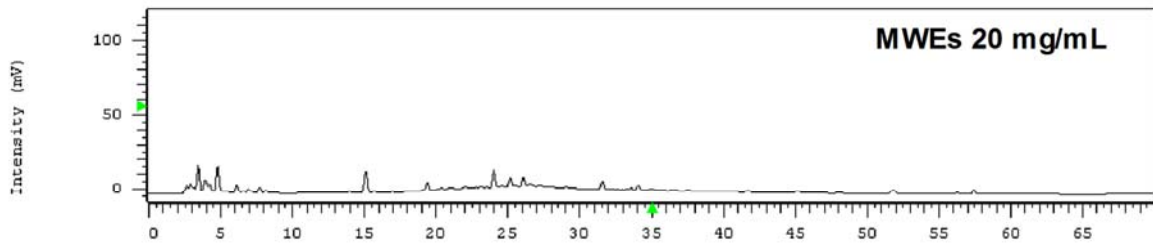
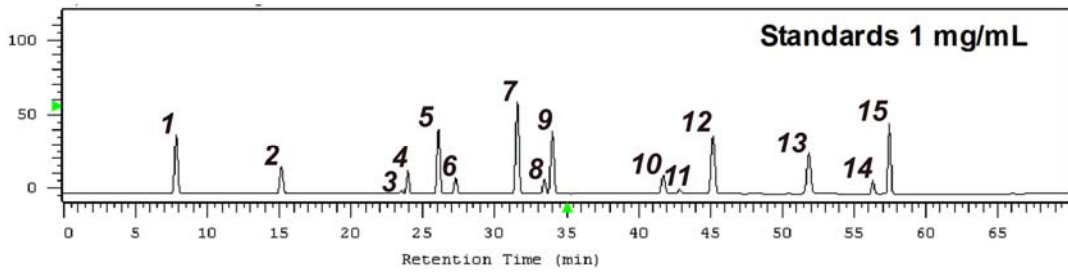
Peak^a	Compound	Rt^b	λ	[M+H]^{+,c}	MS^{2,d}
		(min)	(nm)		
1	cyanidine-3-glucoside	24.6	512, 279, 244, 327	448	287
2	cyanidine-3-rutinoside	25.5	515, 282, 245, 326	595	448, 287
3	pelargonidin-3-glucoside	26.8	496, 270, 432 sh	432	271
4	pelargonidine-3-rutinoside	27.6	502, 279, 433 sh	578	271, 432

^a Peak numbering as in Figure 1.

^b Rt : Retention time.

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

^d Product ion analysis of molecular ion.



HPLC chromatograms assay		MWEs	MPEs
		(%)	(%)
Polyphenolic compound	1.Gallic acid	0.31 ± 0.05	2.67 ± 0.34
	2.Protocatechuic acid	2.92 ± 0.45	13.76 ± 1.65
	3.Catechin	0.54 ± 0.03	3.19 ± 0.38
	4.Epigallocatechin Gallate	2.68 ± 0.20	6.26 ± 0.83
	5.caffeic acid	1.10 ± 0.24	6.15 ± 1.91
	6.Epicatechin	1.21 ± 0.17	4.69 ± 0.87
	7.P-coumaric acid	0.35 ± 0.04	2.48 ± 0.17
	8.Rutin	3.22 ± 1.01	18.17 ± 1.10
	9.Ferulic acid	0.27 ± 0.01	0.99 ± 0.32
	10.Gossypin	0.26 ± 0.02	1.04 ± 0.08
	11.Hesperetin	0.34 ± 0.10	2.08 ± 0.15
	12.Resveratrol	0.35 ± 0.23	0.92 ± 0.19
	13.Quercetin	0.50 ± 0.07	5.97 ± 1.14
	14.Naringenin	0.52 ± 0.17	6.71 ± 1.22
	15.Hydroxyflavin	0.58 ± 0.12	1.43 ± 0.58
	Total	15.13 ± 0.93	76.55 ± 0.70

Table 3. The HPLC chromatogram of MWEs and MPEs. HPLC chromatograms of free polyphenols from MWEs (20 mg/ml) and MPEs (10 mg/ml). HPLC chromatogram of fifteen kinds of standard polyphenols (1 mg/ml). Peaks: 1,gallic acid (7.85 min); 2, protocatechuic acid (PCA) (15.17 min); 3, catechin (23.49 min); 4, epigallocatechin gallate (EGCG) (23.95 min); 5, caffeic acid (CA) (26.08 min); 6, epicatechin (27.27 min); 7, P-coumaric acid (31.57 min); 8, rutin (33.44 min); 9, Ferulic acid (34.00 min); 10, Gossypin (41.72 min); 11, Hesperetin (42.85 min); 12, Resveratrol (45.17 min); 13, quercetin (51.83 min); 14, naringenin (56.28 min); 15, Hydroxyflavin (57.44 min). Detector was set at 280 nm. The arrow indicated the retention time (RT) of merged both extracts and the different standards. HPLC chromatograms of free polyphenols from MWEs (20 mg/ml) and MPEs (10 mg/ml). Quantitative assessment of the percentage of polyphenols in MWEs and MPEs relative to the standards, represent the average of three independent experiments.

Table 4.

Group	Weeks			
	0	4	8	10
Control	95.6±3.96	117.2±5.06 *	122.0±4.10	121.3±6.75
		(22.6%) #	(27.7%)	(26.7%)
HFD	94.1±8.23	124.2±8.23	128.8±5.55	130.9±7.61
		(32.0%)	(37.0%)	(39.1%)
MWEs 0.5%	93.3±11.83	121.3±10.84	124.6±6.83	123.13±4.43
		(30.0%)	(33.5%)	(32%)
MWEs 1.0%	92.4±7.01	116.7±12.61	122.9±16.4	121.6±3.97
		(26.3%)	(33.1%)	(31.7%)
MWEs 2.0%	92.1±9.90	117.09±9.90	121.53±6.58	120.41±3.81
		(27.2%)	(31.9%)	(30.8%)

#()=((week X – week 0) / week 0)×100 %

* means± SD, n=8

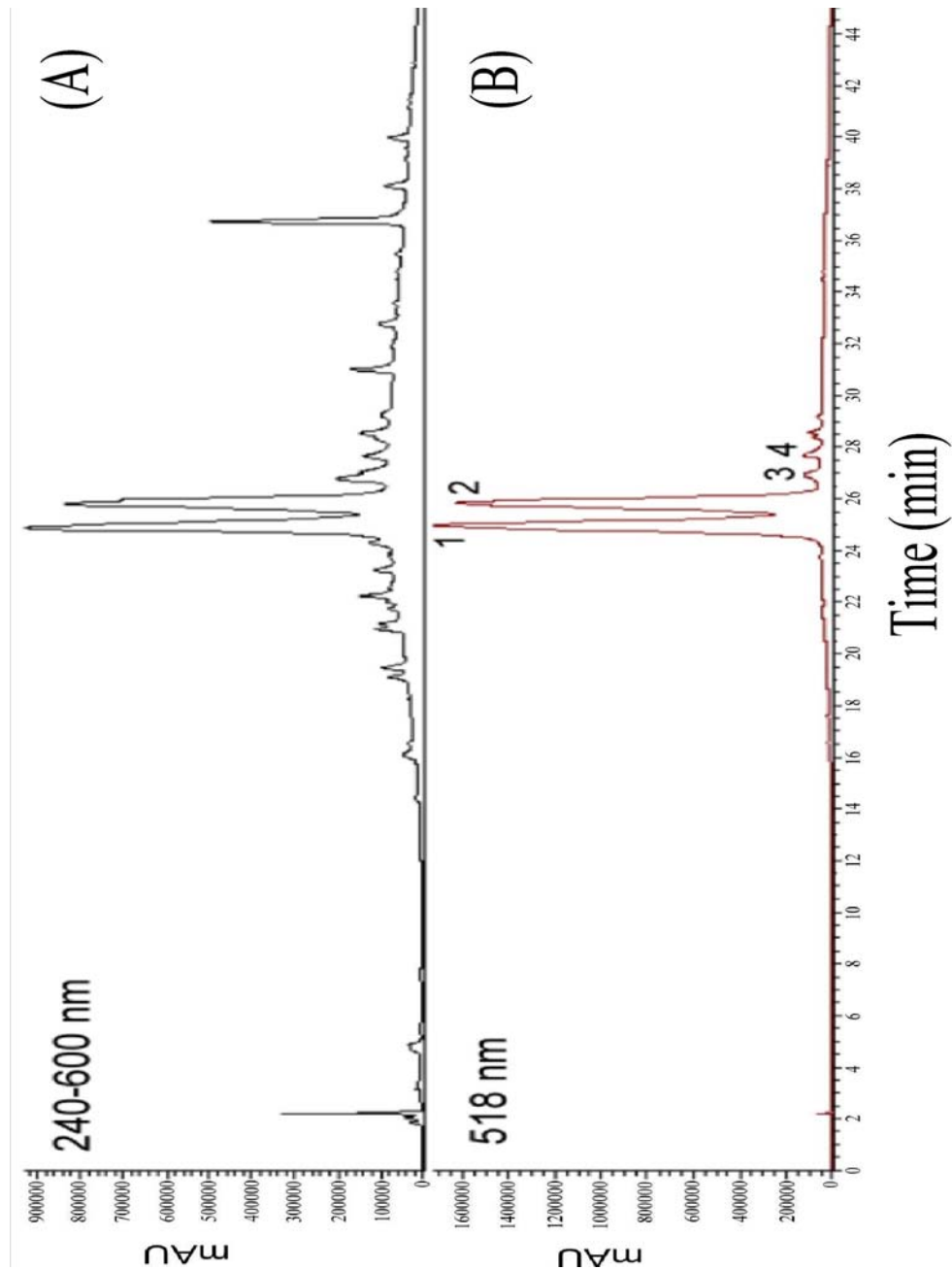


Figure 1. HPLC/UV chromatogram of MWEs. Chromatograms were monitored at scan ranges of 240-600 (A) and 518 nm (B), which correspond to the identified anthocyanic compositions. Anthocyanic compositions corresponding to peaks 1-4 in panels A and B are marked. Peaks: 1, cyanidine-3-glucoside; 2, cyanidine-3-rutinoside; 3, pelargonidin-3-glucoside; and 4, pelargonidine-3-rutinoside.

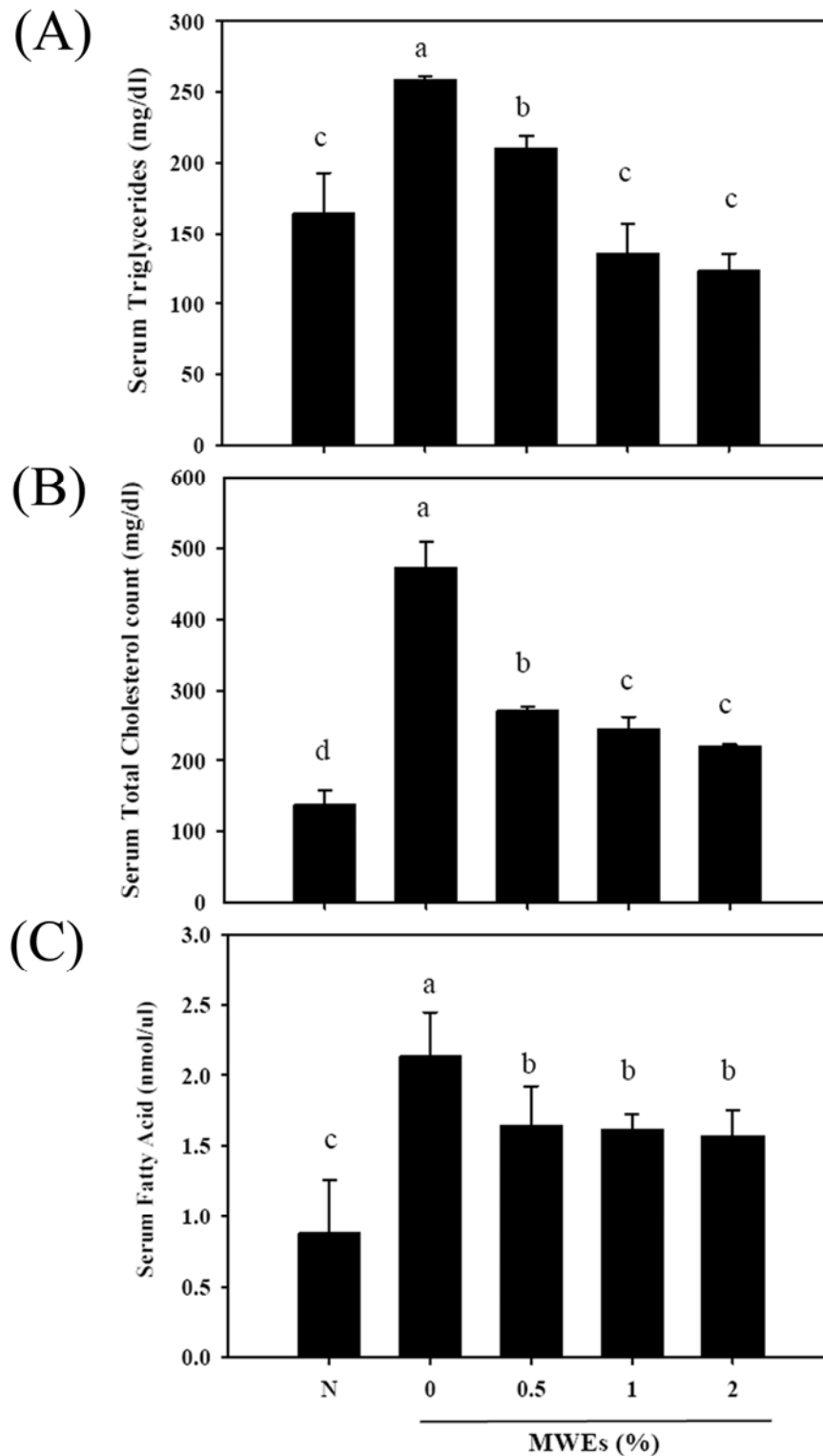


Figure 2. Effect of MWEs on serum triglyceride, cholesterol and fatty acid levels in HFCD-fed hamsters. The data of plasma triglyceride (A), cholesterol (B) and fatty acid (C) are presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$).

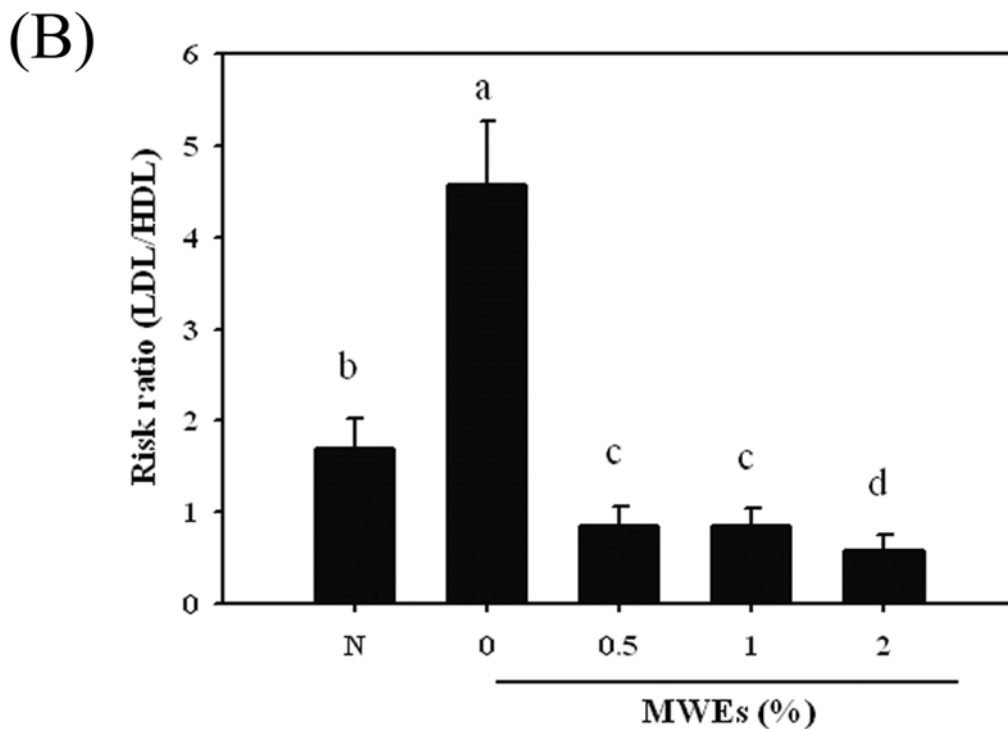
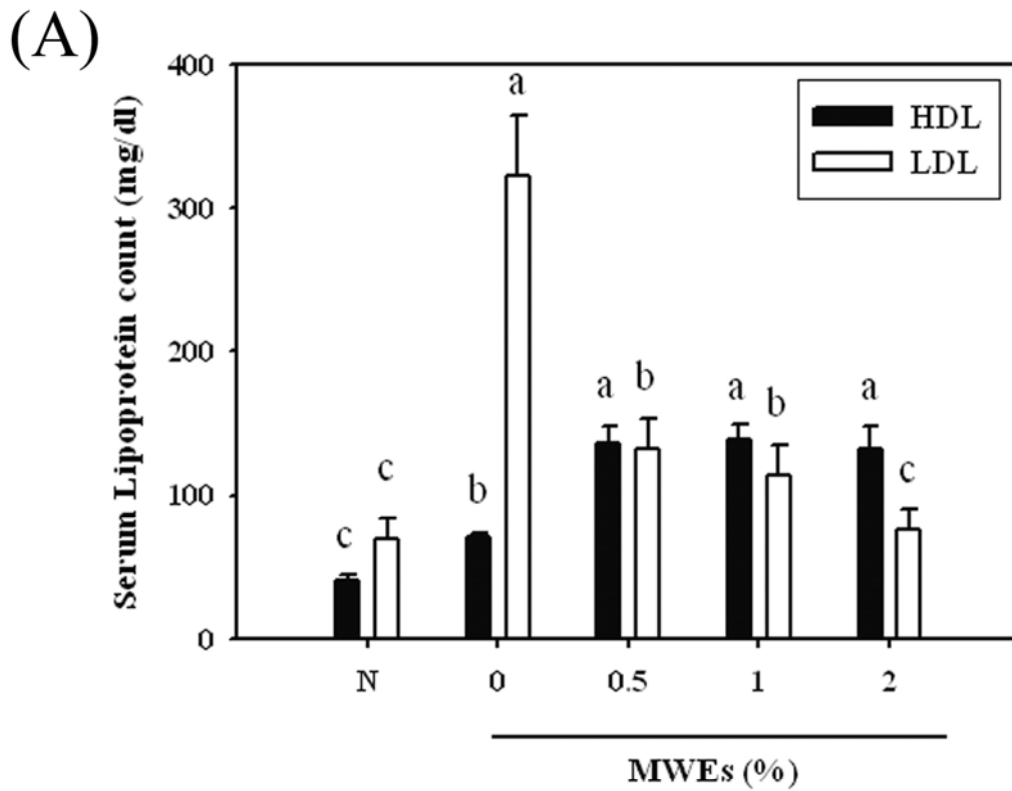


Figure 3. Effect of MWEs on serum HDL and LDL levels in HFCD-fed hamsters. The data of plasma HDL and LDL (A) and risk ratio of LDL/ HDL (B) are presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$).

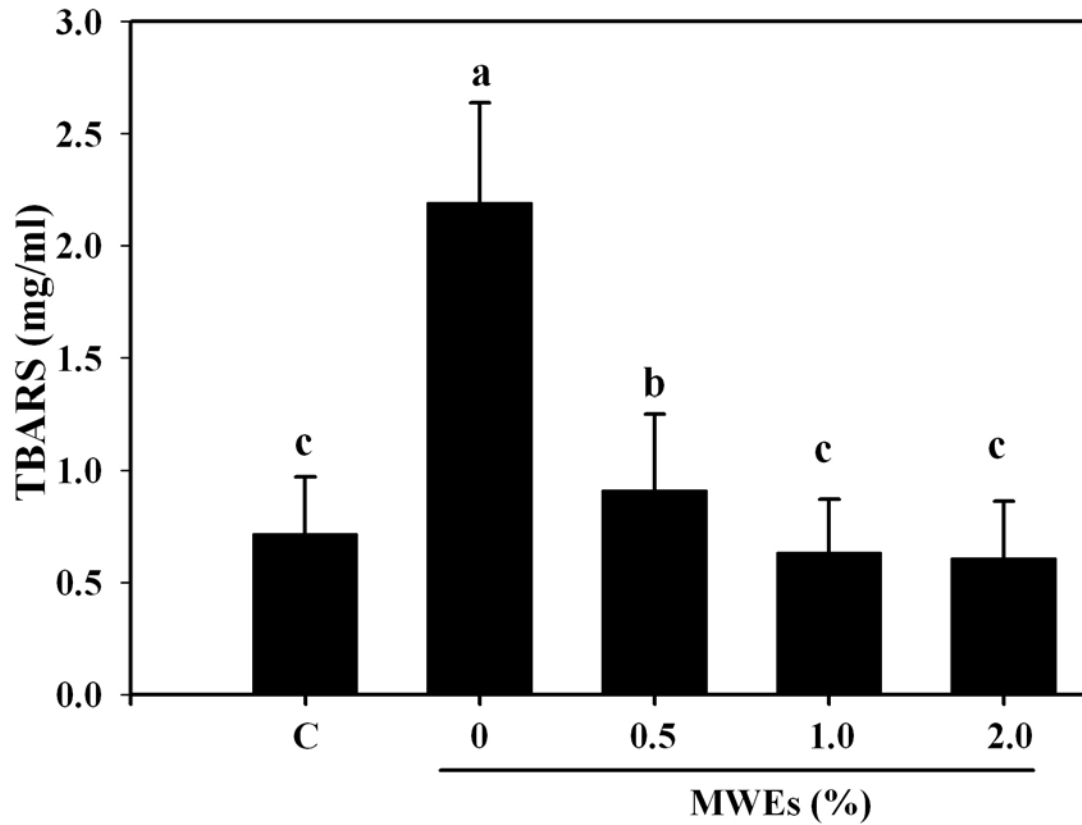
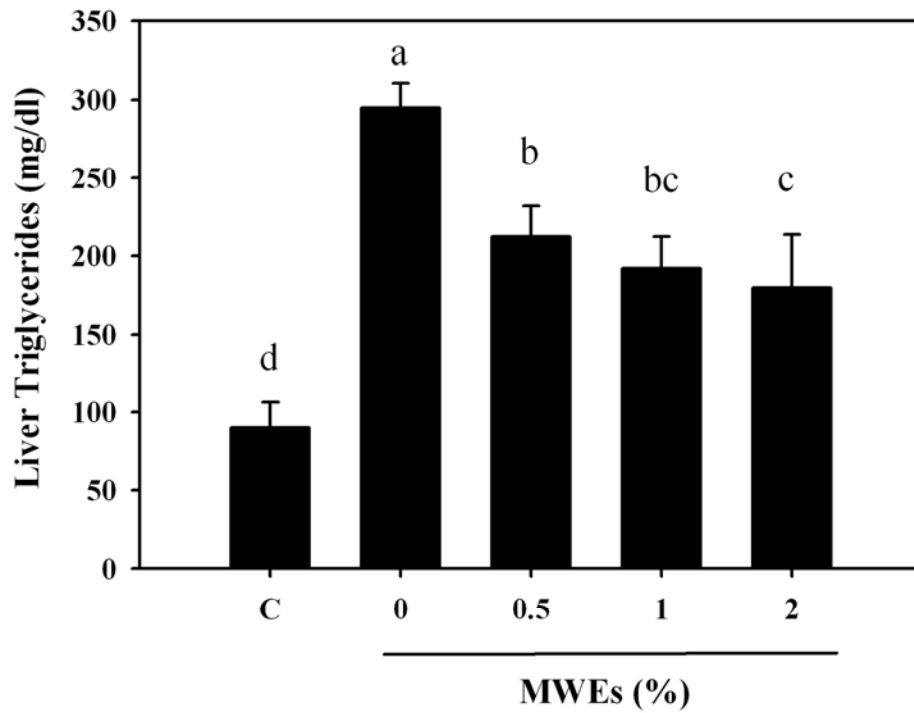


Figure 4. Inhibition of MWEs on serum lipid peroxidation levels in HFCD-fed hamsters. The data is presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$).

(A)



(B)

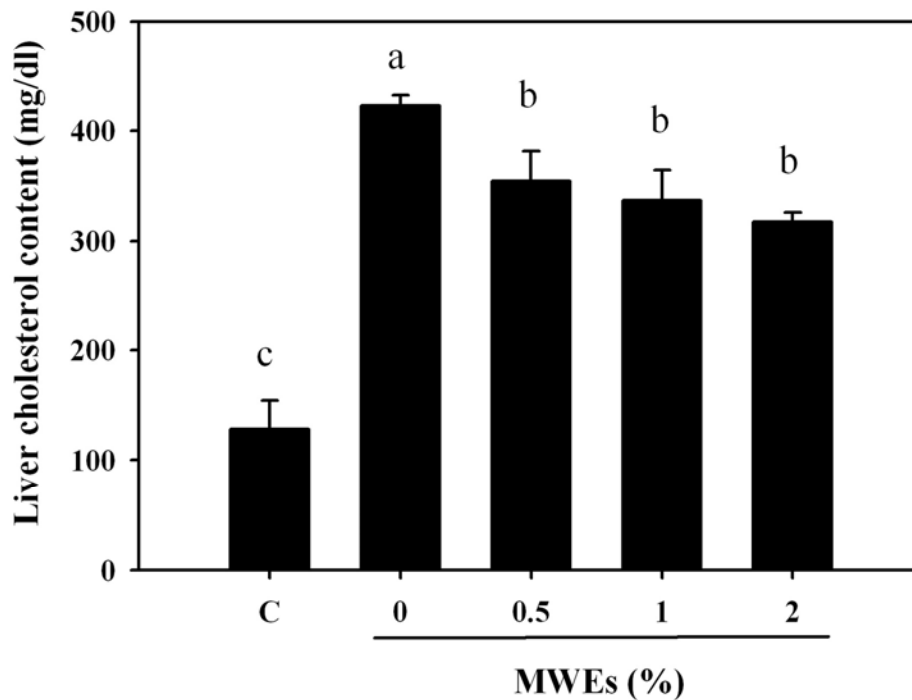
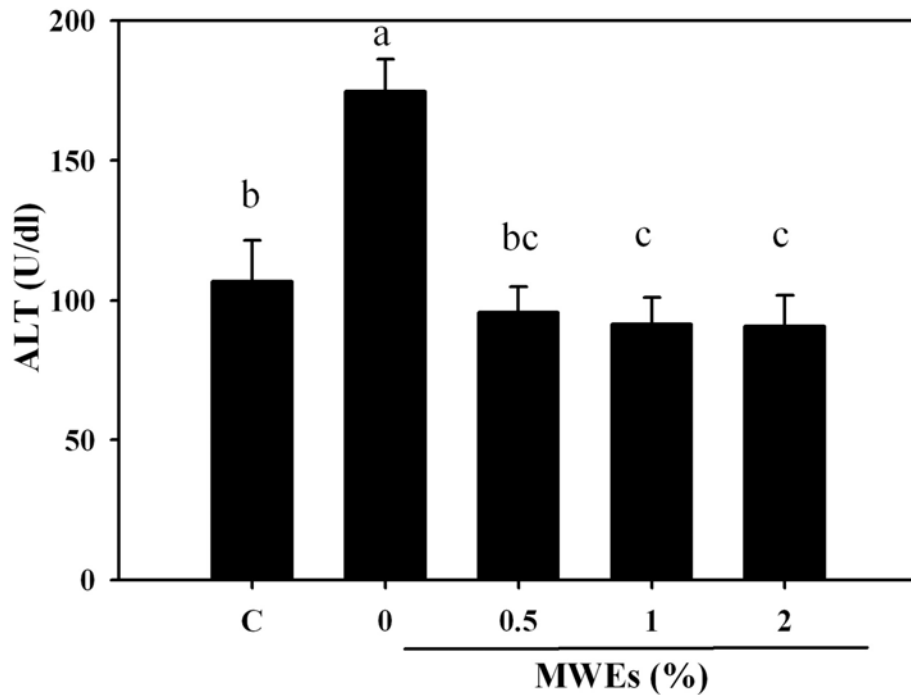


Figure 5. Effect of MWEs on hepatic triglyceride and cholesterol levels in HFCD-fed hamsters. The data of hepatic triglyceride (A) and cholesterol (B) are presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$).

(A)



(B)

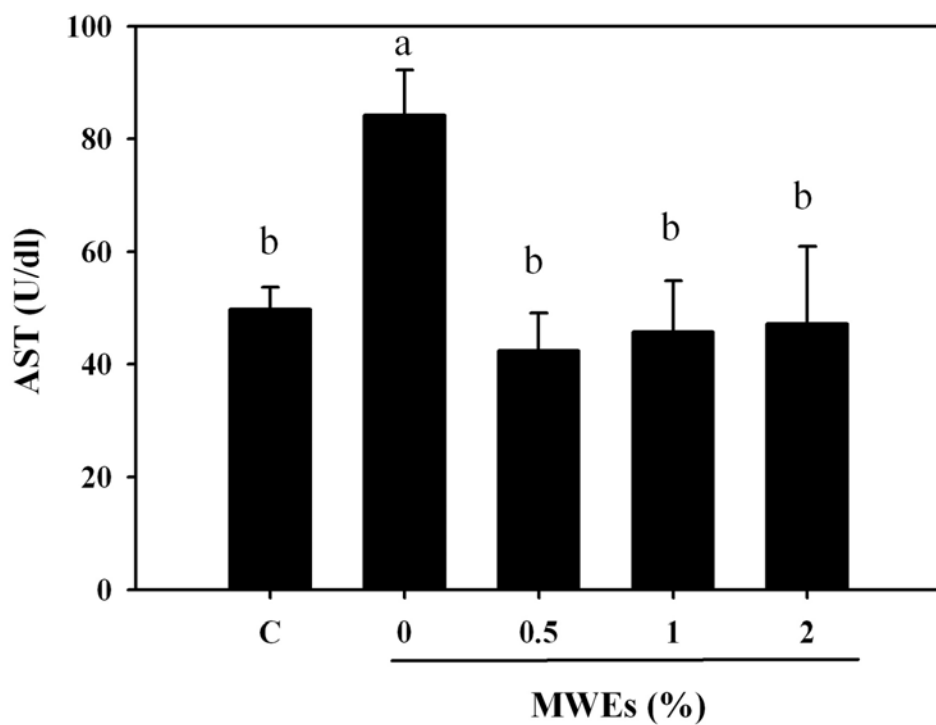


Figure 6. Effect of MWEs on hepatic function in HFCD-fed hamsters. The data of plasma ALT (A) and AST (B) are presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$). ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

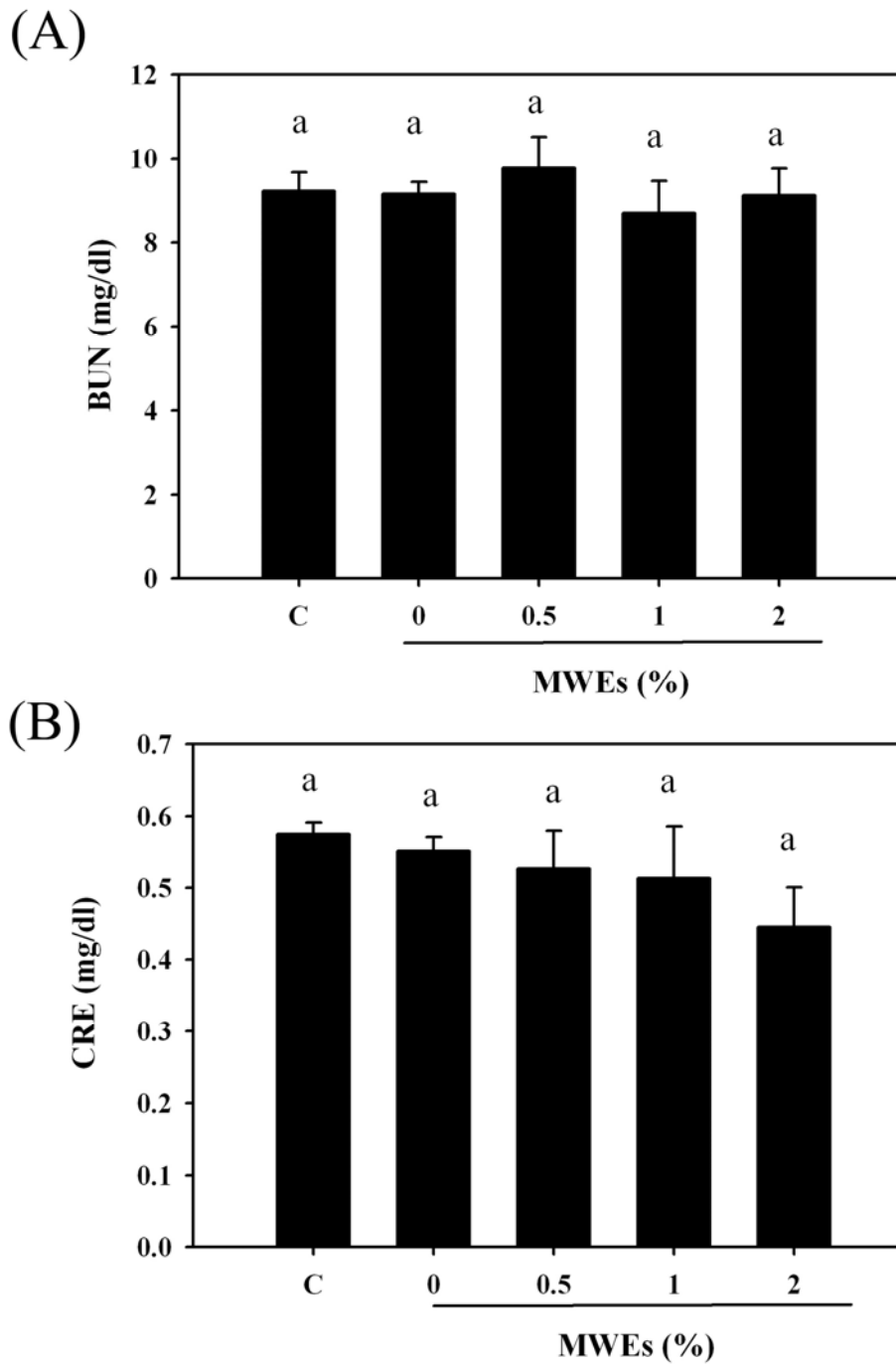


Figure 7. Effect of MWEs on renal function in HFCD-fed hamsters. The data of plasma BUN (A) and CRE (B) are presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$). BUN, blood urea nitroge ; CRE, creatinine.

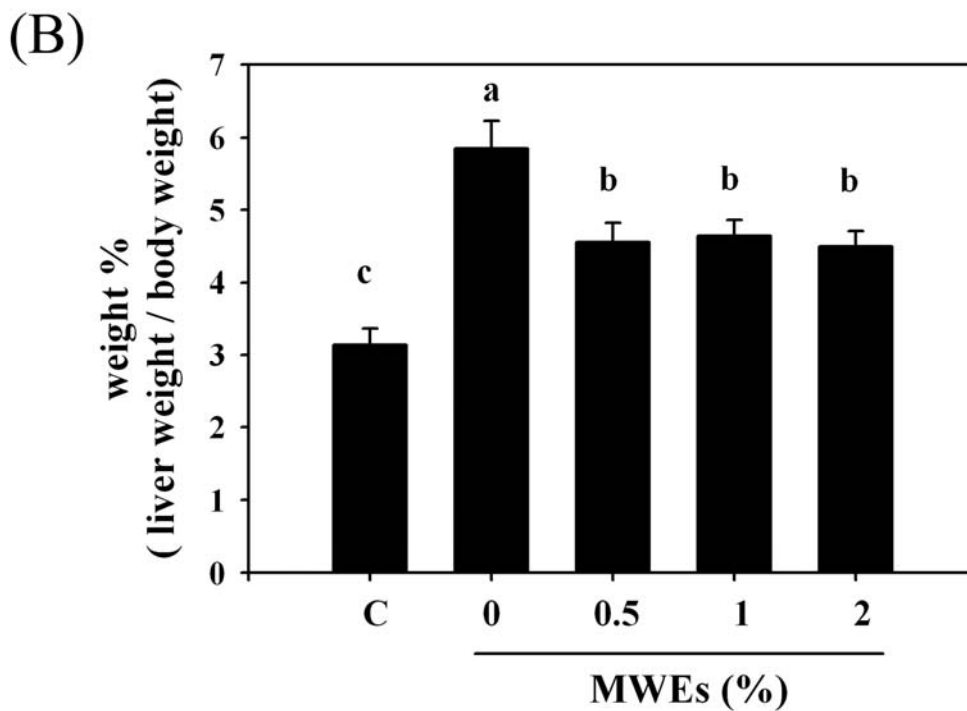
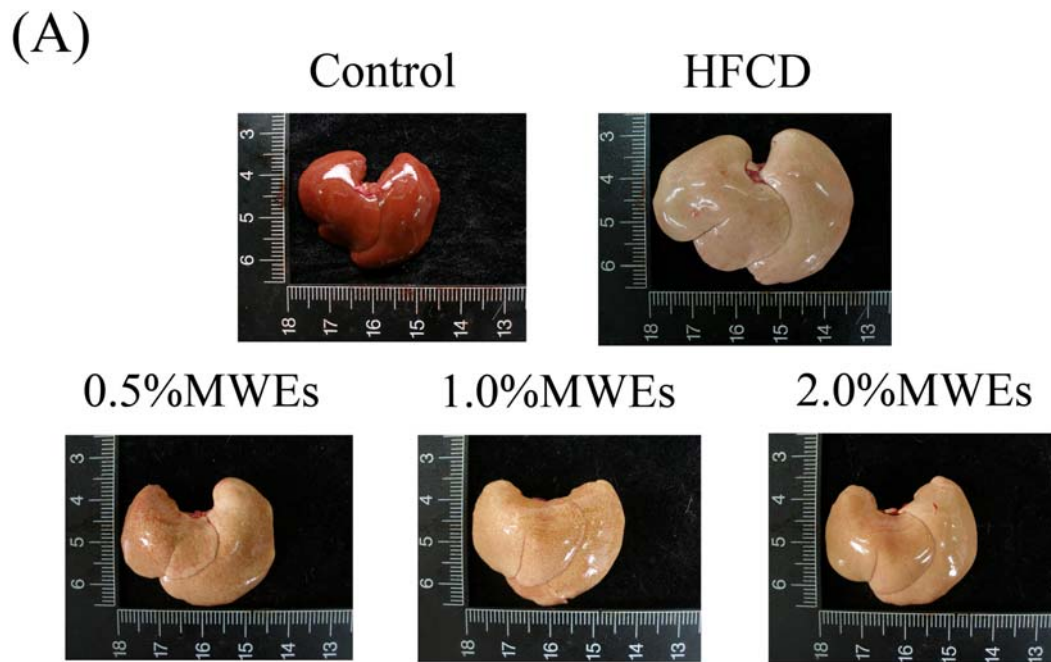
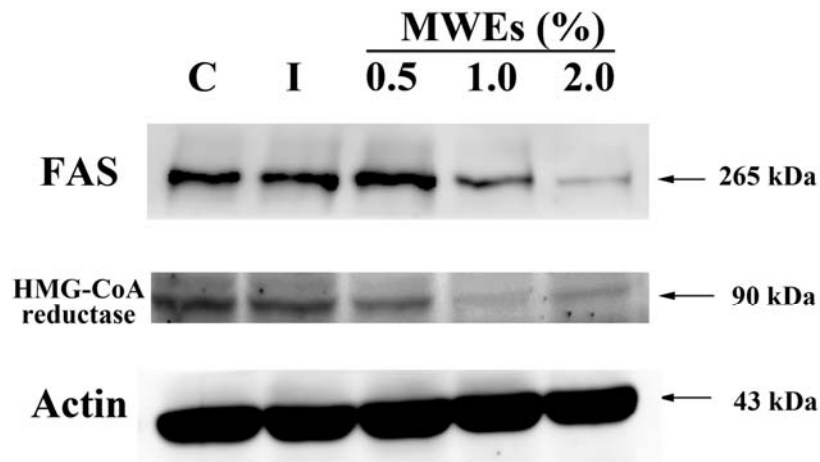


Figure 8. Effect of MWEs on liver weight in HFCD-fed hamsters. The data is presented as mean \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$).

(A)



(B)

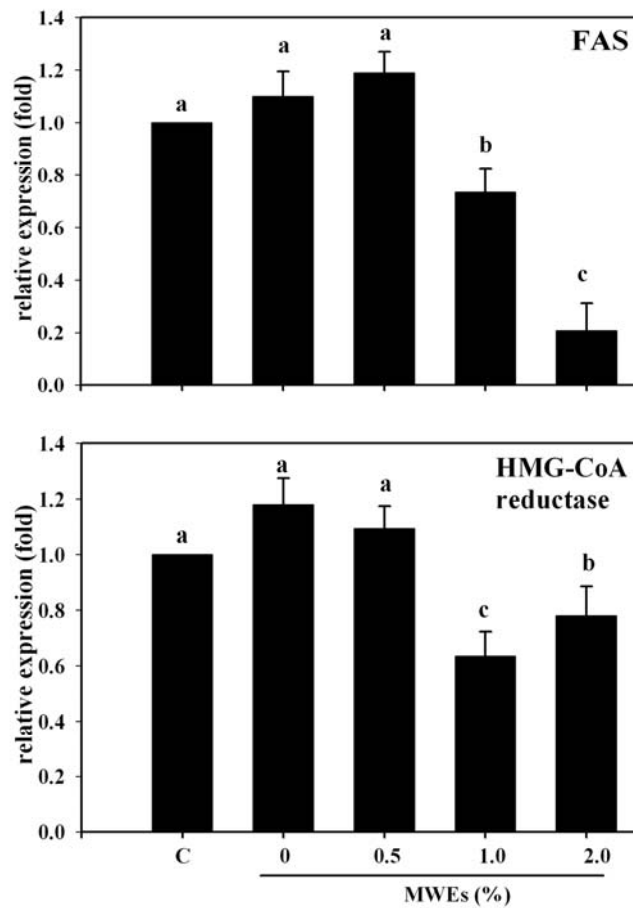
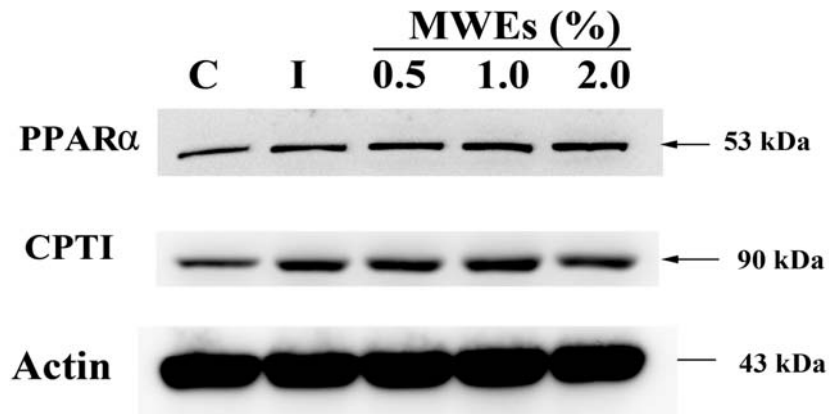


Figure 9. FAS and HMG-CoA reductase protein expressions of hamster as affected by MWEs. The data are given as means \pm SDs ($n = 3$). Mean values in each target gene or protein expressions with different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

(A)



(B)

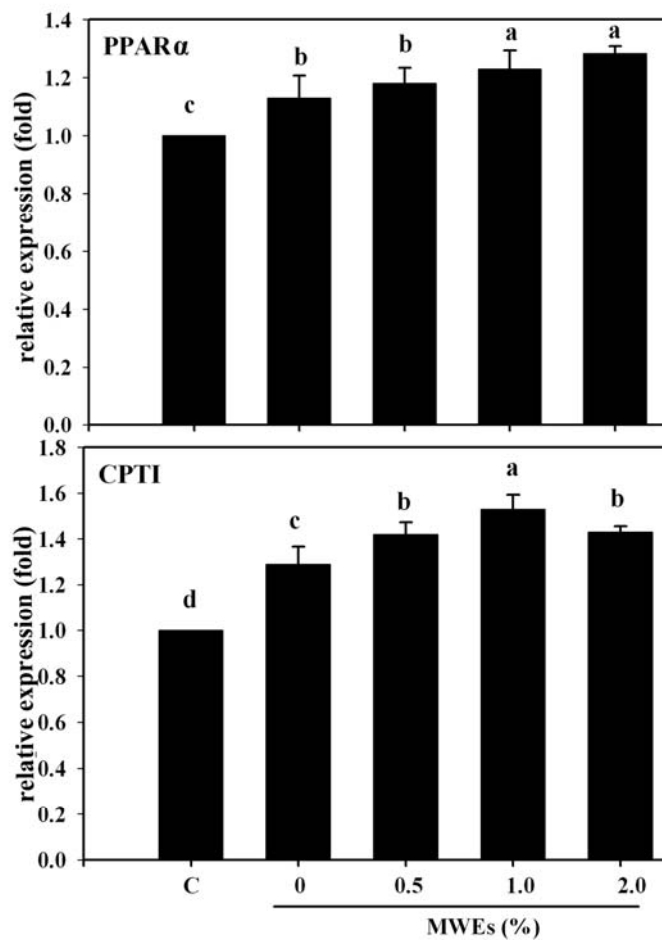


Figure 10. PPAR α and CPTI protein expressions of hamster as affected by MWEs. The data are given as means \pm SDs ($n = 3$). Mean values in each target gene or protein expressions with different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

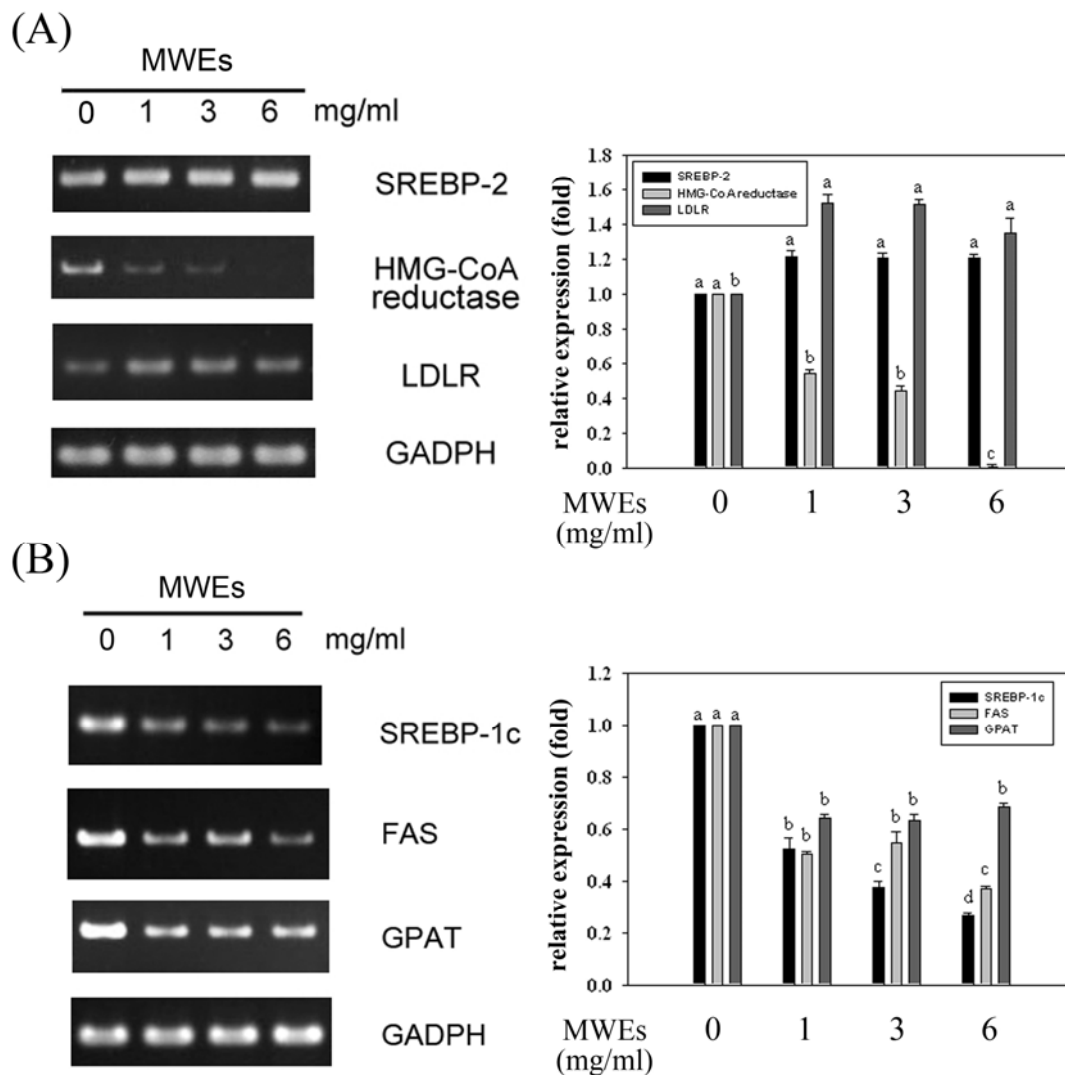


Figure 11. SREBP-2, HMG-CoA reductase, and LDLR mRNA expressions (A); SREBP-1c, FAS, and GPAT mRNA expressions (B) of HepG2 cells as affected by MWEs. The data are given as means \pm SDs (n = 3). Mean values in each target gene or protein expressions with different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

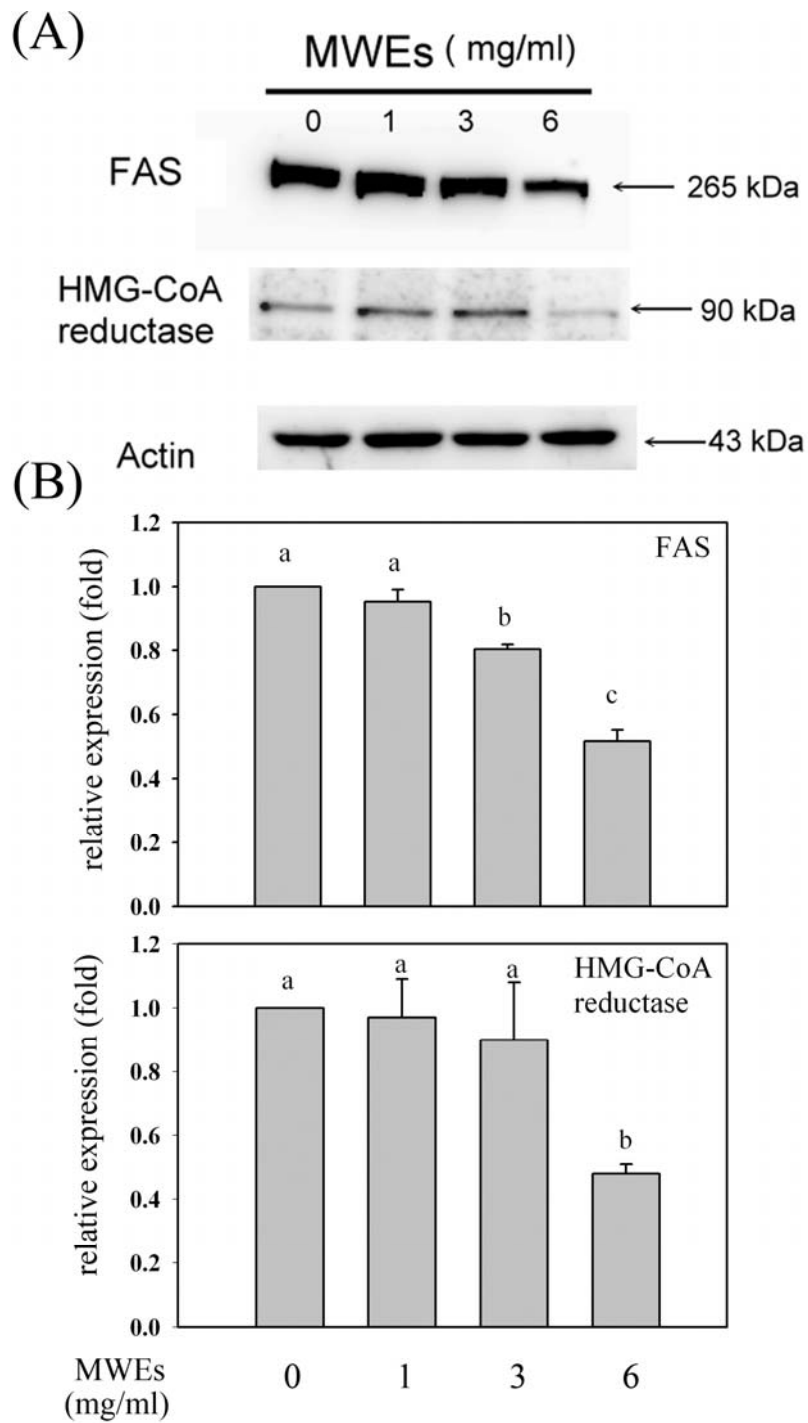


Figure 12. FAS and HMG-CoA reductase protein expressions of HepG2 cells as affected by MWEs. The data are given as means \pm SDs (n = 3). Mean values in each target gene or protein expressions with different letters indicate a significant difference (p < 0.05).

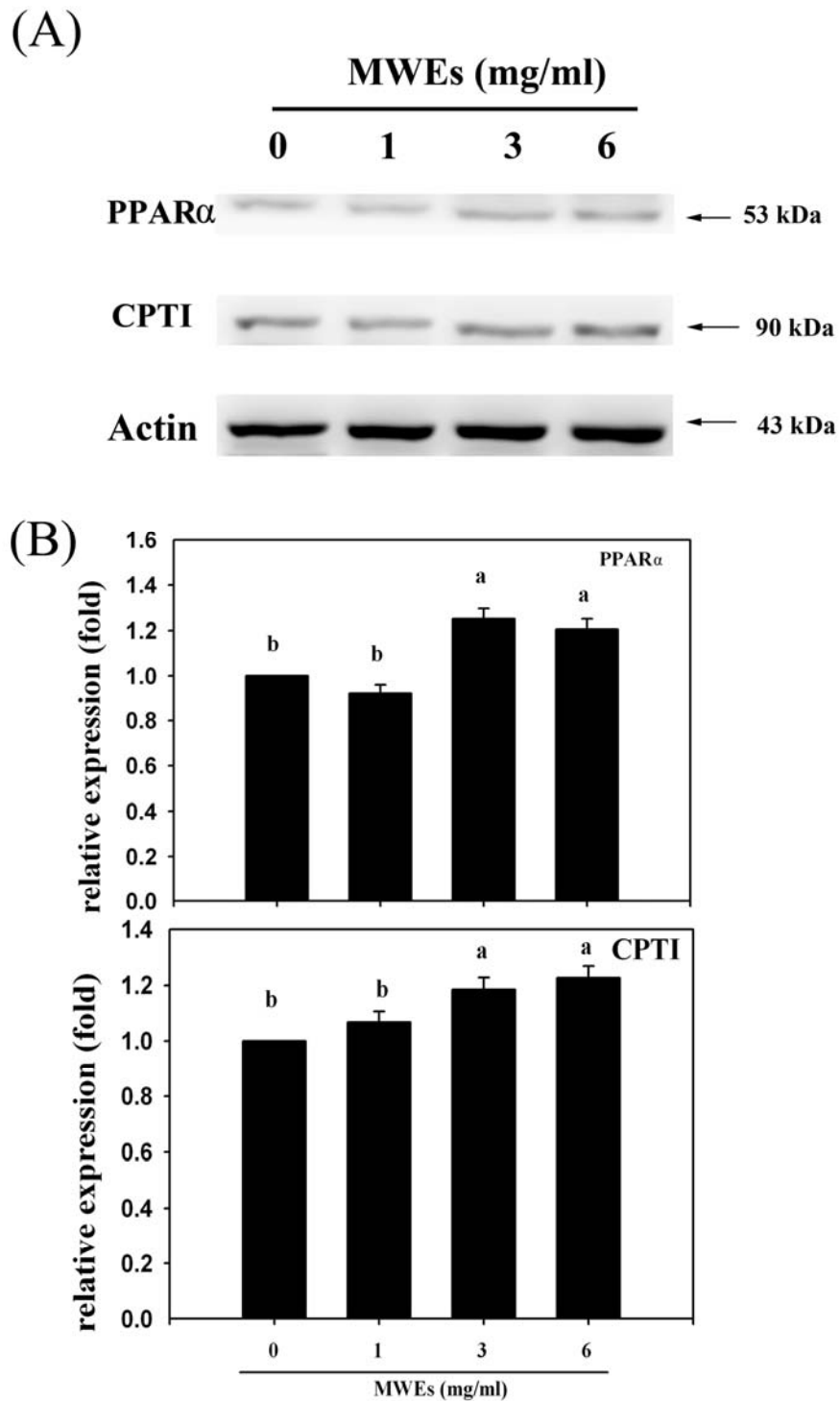


Figure 13. PPAR α and CPTI protein expressions of HepG2 cells as affected by MWEs. The data are given as means \pm SDs (n = 3). Mean values in each target gene or protein expressions with different letters indicate a significant difference (p < 0.05).

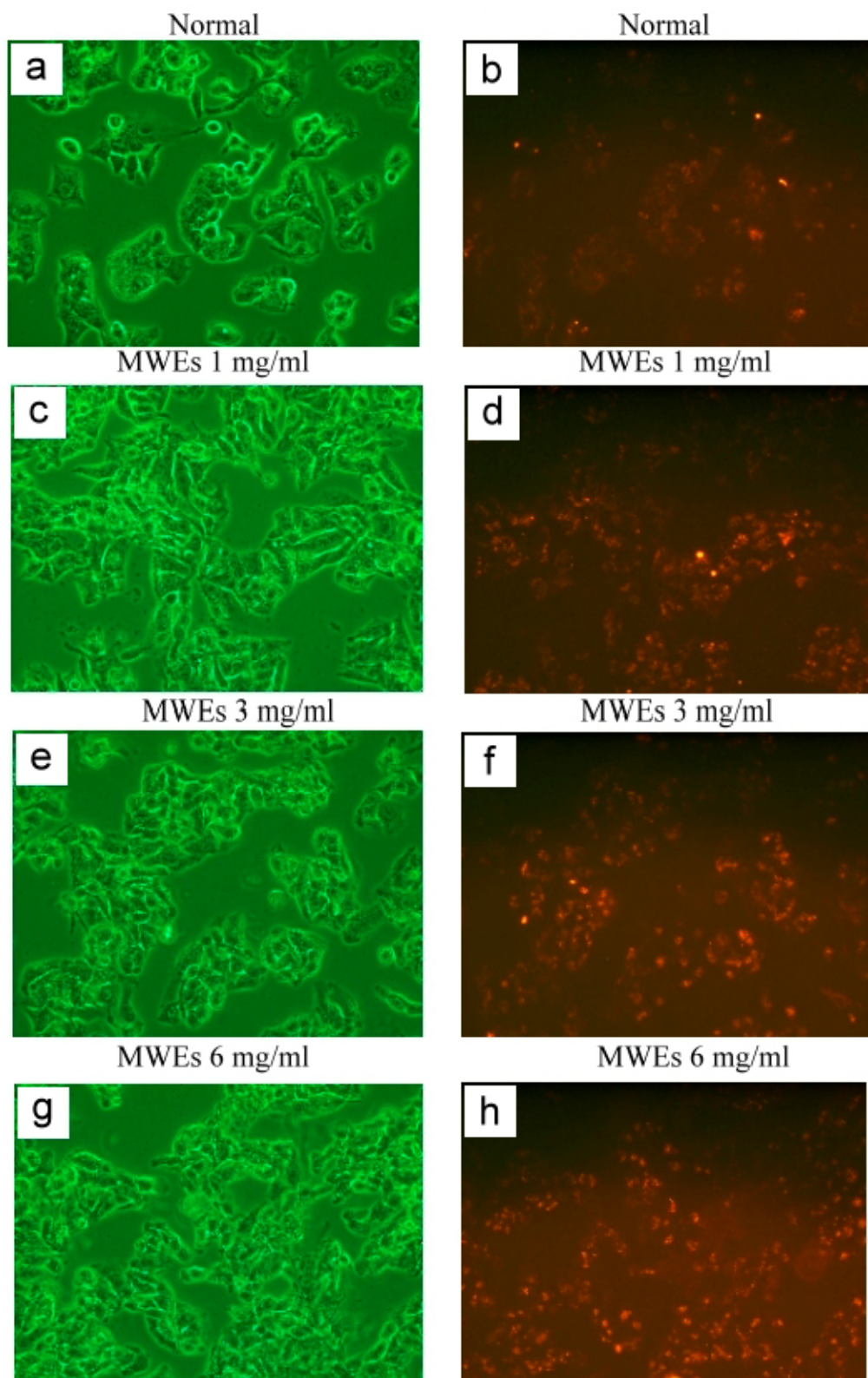


Figure 14. Dil-LDL uptake ability in HepG2 cells treated with MWEs.

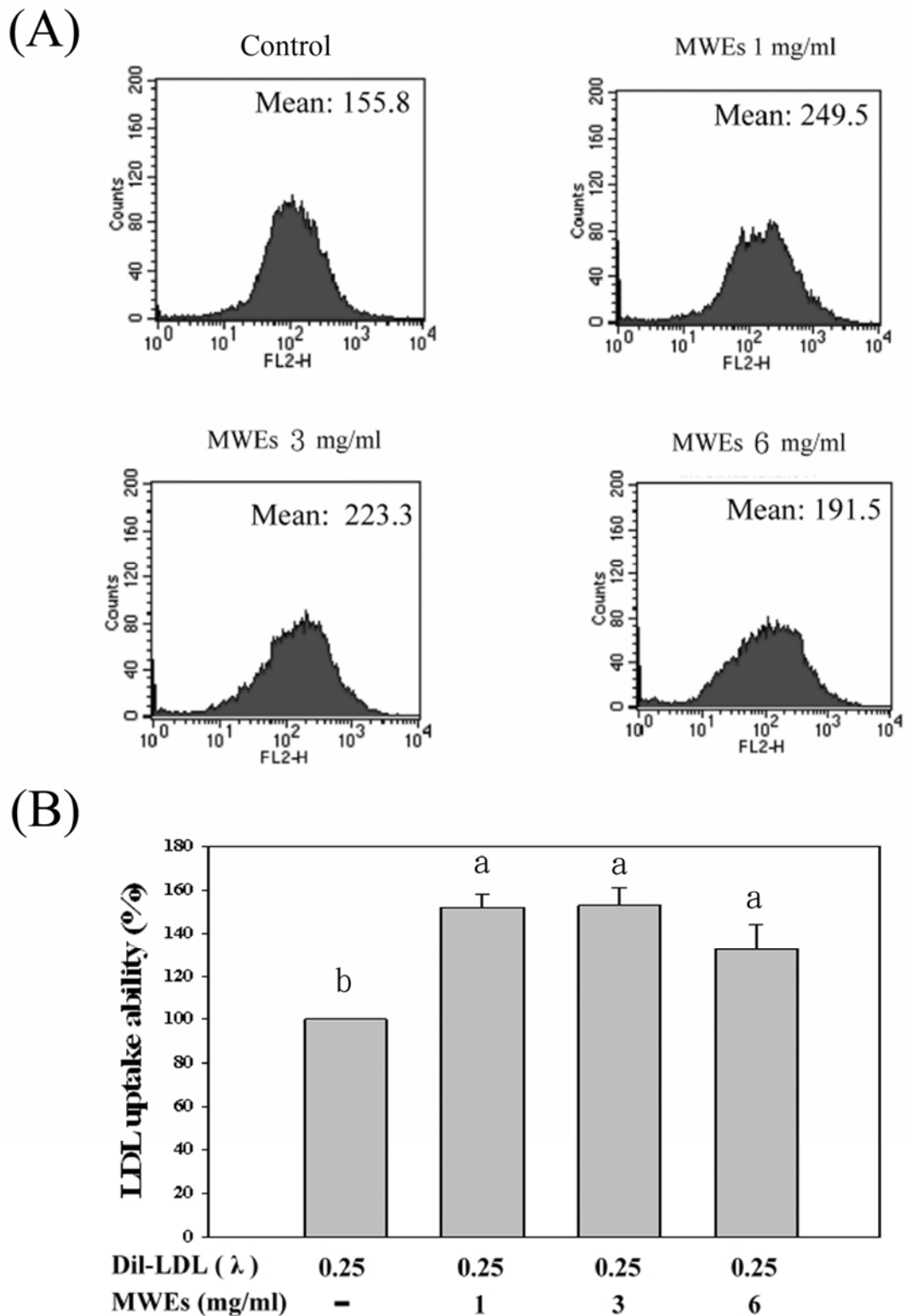
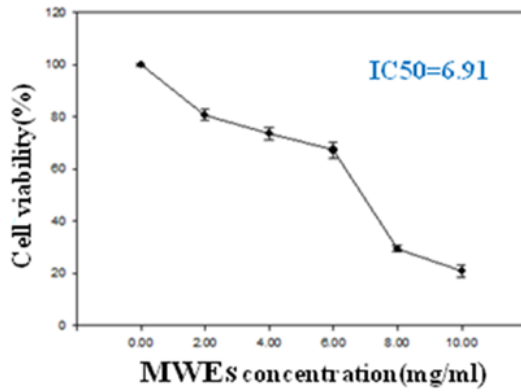
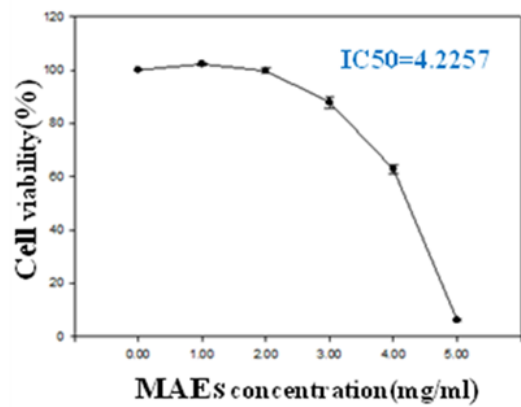


Figure 15. LDL uptake ability in HepG2 cells treated with MWEs. The data are given as means \pm SDs ($n = 3$). Mean values in bars with different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

(A)



(B)



(C)

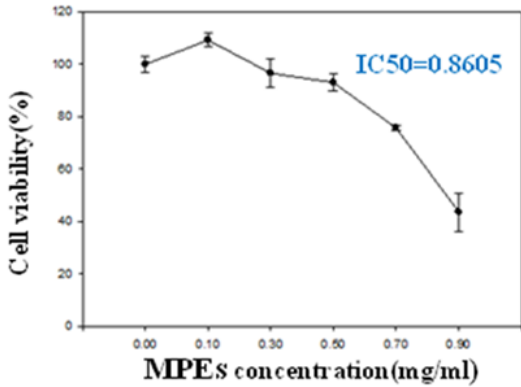


Figure 16. Cytotoxicity of HepG2 cells were treatment with MWEs、MAEs and MPEs. (A-C) Cultured HepG2 cells were treated with various concentrations of MWEs、MAEs and MPEs for 24 hours and analyzed by MTT assay. The data were mean \pm SD from 4 samples for each group.

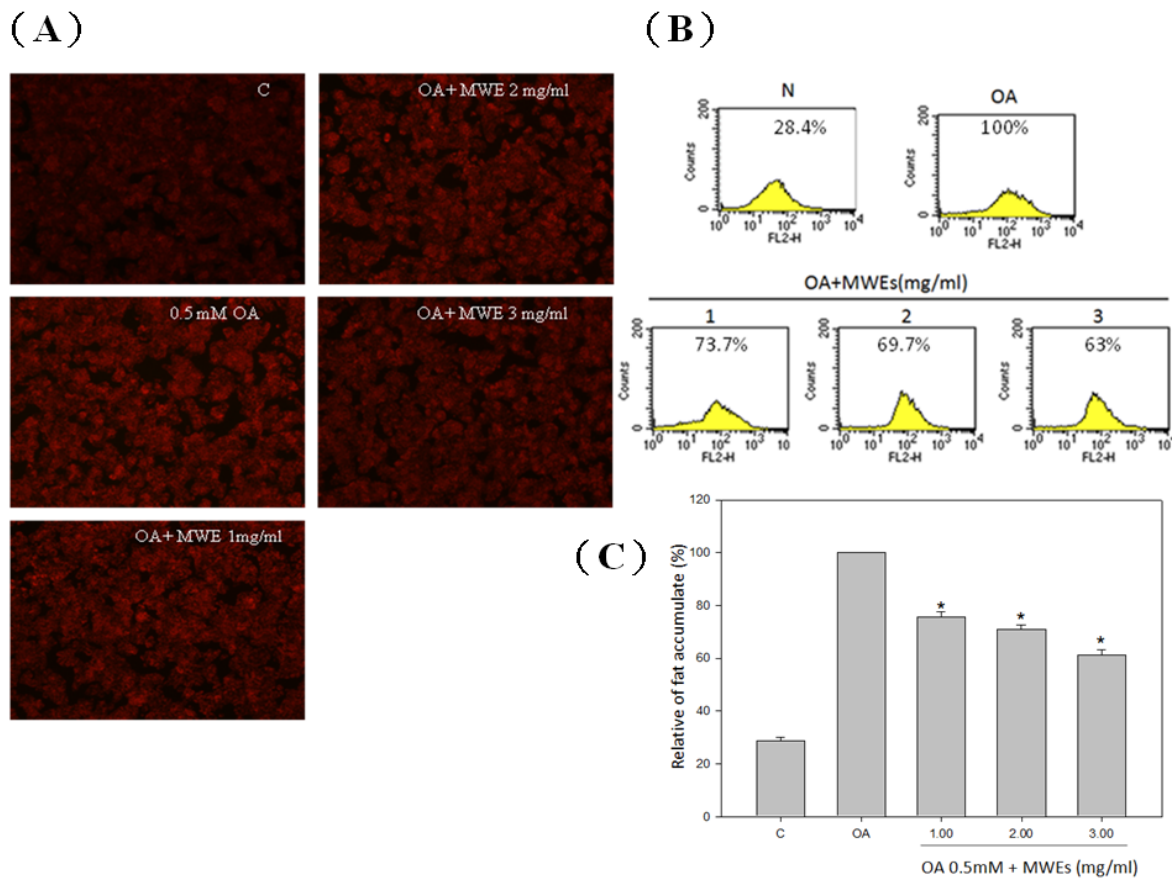


Figure 17. MWEs attenuated oleic acid-induced lipid accumulation in HepG2 cells.

(A) Cultured cells were induced for lipid accumulation by 0.5 mM oleic acid for 24 hours. Cells were co-treated with oleic acid and indicated concentrations of MWEs (1, 2, 3 mg/ml) for 24 hours. Cellular neutral lipids were stained with Nile red. (B) Lipid accumulation was induced by 0.5 mM oleic acid for 24 hours. Cells were co-treated with oleic acid and indicated concentrations of MWEs (1, 2, 3 mg/ml) for 24 hours. Cells were analyzed by flow cytometry. The data represent mean \pm SD from 3 samples for each group. * $p < 0.05$ in relation to the OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

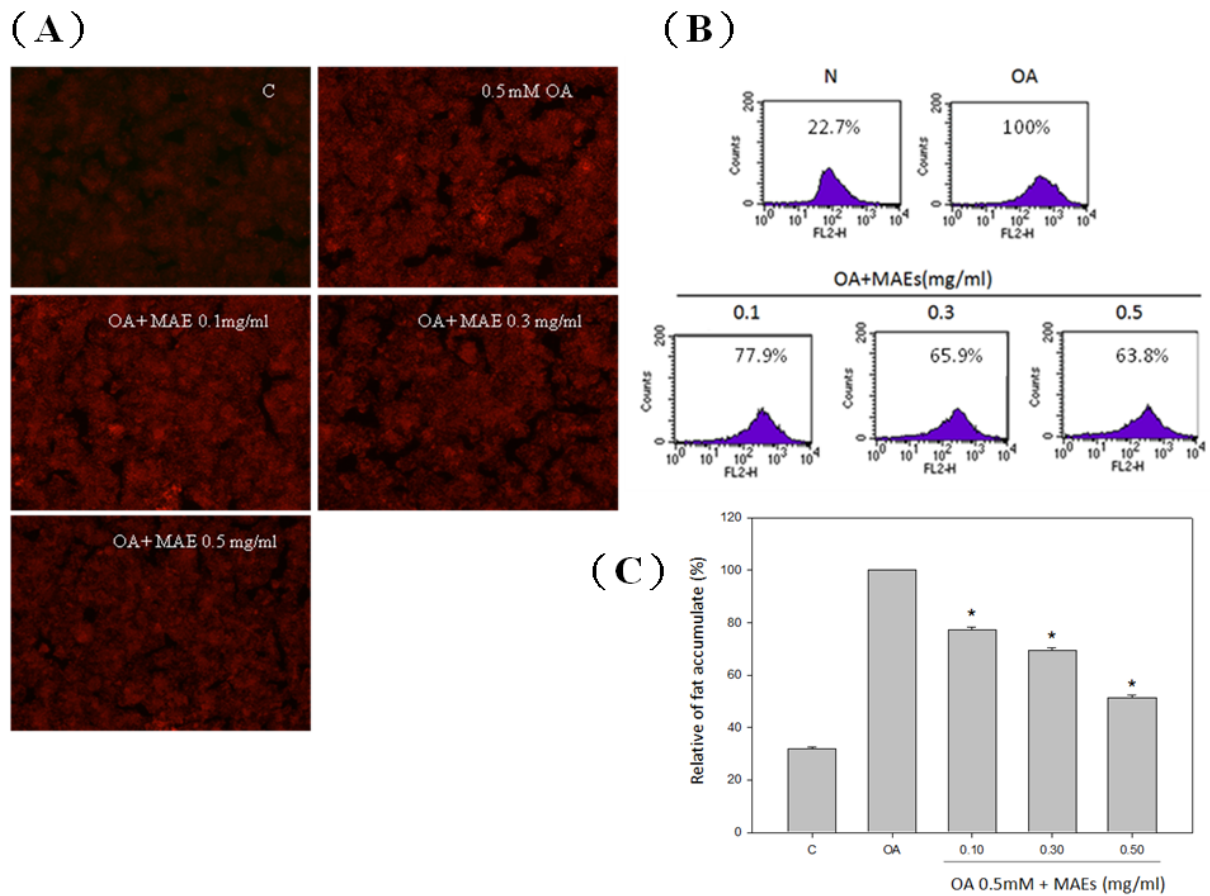


Figure 18. MAEs attenuated oleic acid-induced lipid accumulation in HepG2 cells.

(A) Cultured cells were induced for lipid accumulation by 0.5 mM oleic acid for 24 hours. Cells were co-treated with oleic acid and indicated concentrations of MAEs (0.1, 0.3, 0.5 mg/ml) for 24 hours. Cellular neutral lipids were stained with Nile red. (B) Lipid accumulation was induced by 0.5 mM oleic acid for 24 hours. Cells were co-treated with oleic acid and indicated concentrations of MAEs (0.1, 0.3, 0.5 mg/ml) for 24 hours. Cells were analyzed by flow cytometry. The data represent mean \pm SD from 3 samples for each group. * $p < 0.05$ in relation to the OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

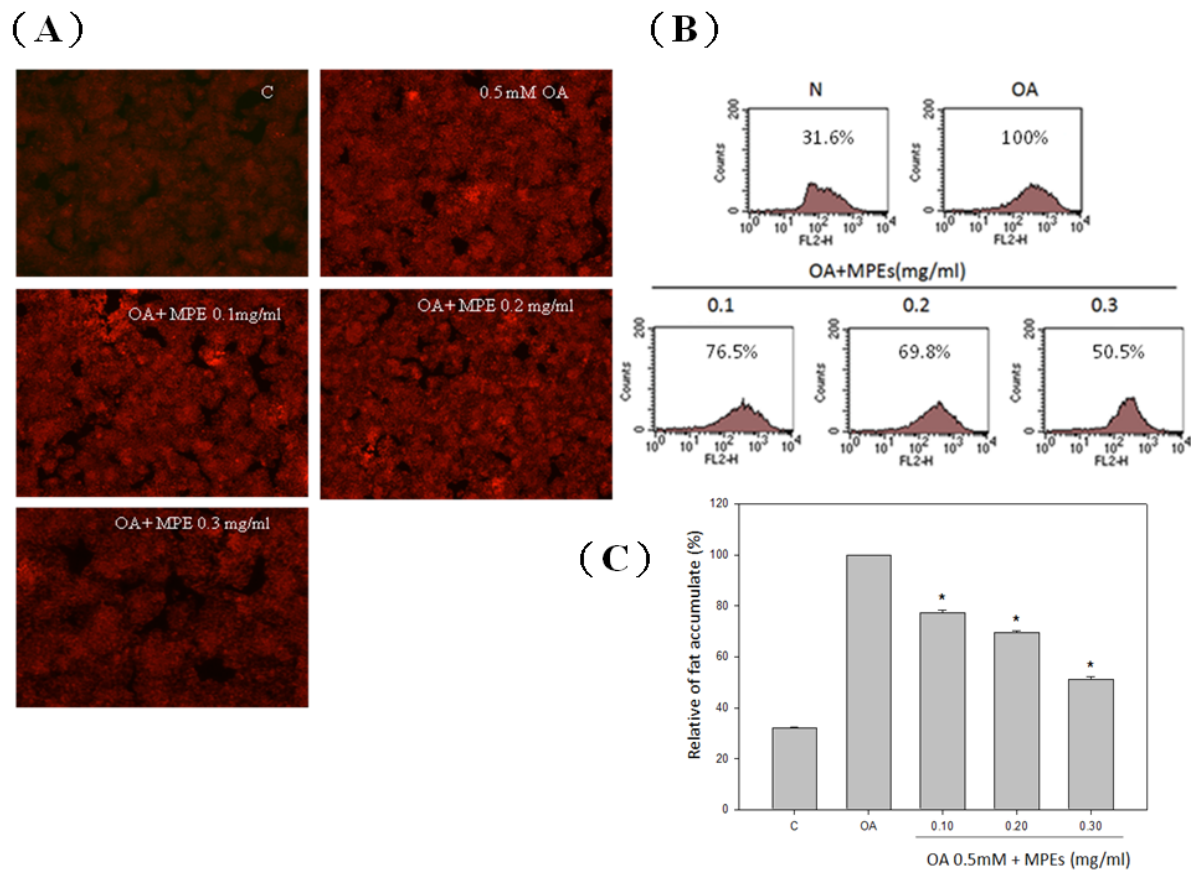


Figure 19. MPEs attenuated oleic acid-induced lipid accumulation in HepG2 cells.

(A) Cultured cells were induced for lipid accumulation by 0.5 mM oleic acid for 24 hours. Cells were co-treated with oleic acid and indicated concentrations of MPEs (0.1, 0.2, 0.3 mg/ml) for 24 hours. Cellular neutral lipids were stained with Nile red. (B) Lipid accumulation was induced by 0.5 mM oleic acid for 24 hours. Cells were co-treated with oleic acid and indicated concentrations of MPEs (0.1, 0.2, 0.3 mg/ml) for 24 hours. Cells were analyzed by flow cytometry. The data were mean \pm SD from 3 samples for each group. * $p < 0.05$ in relation to the OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

(A)

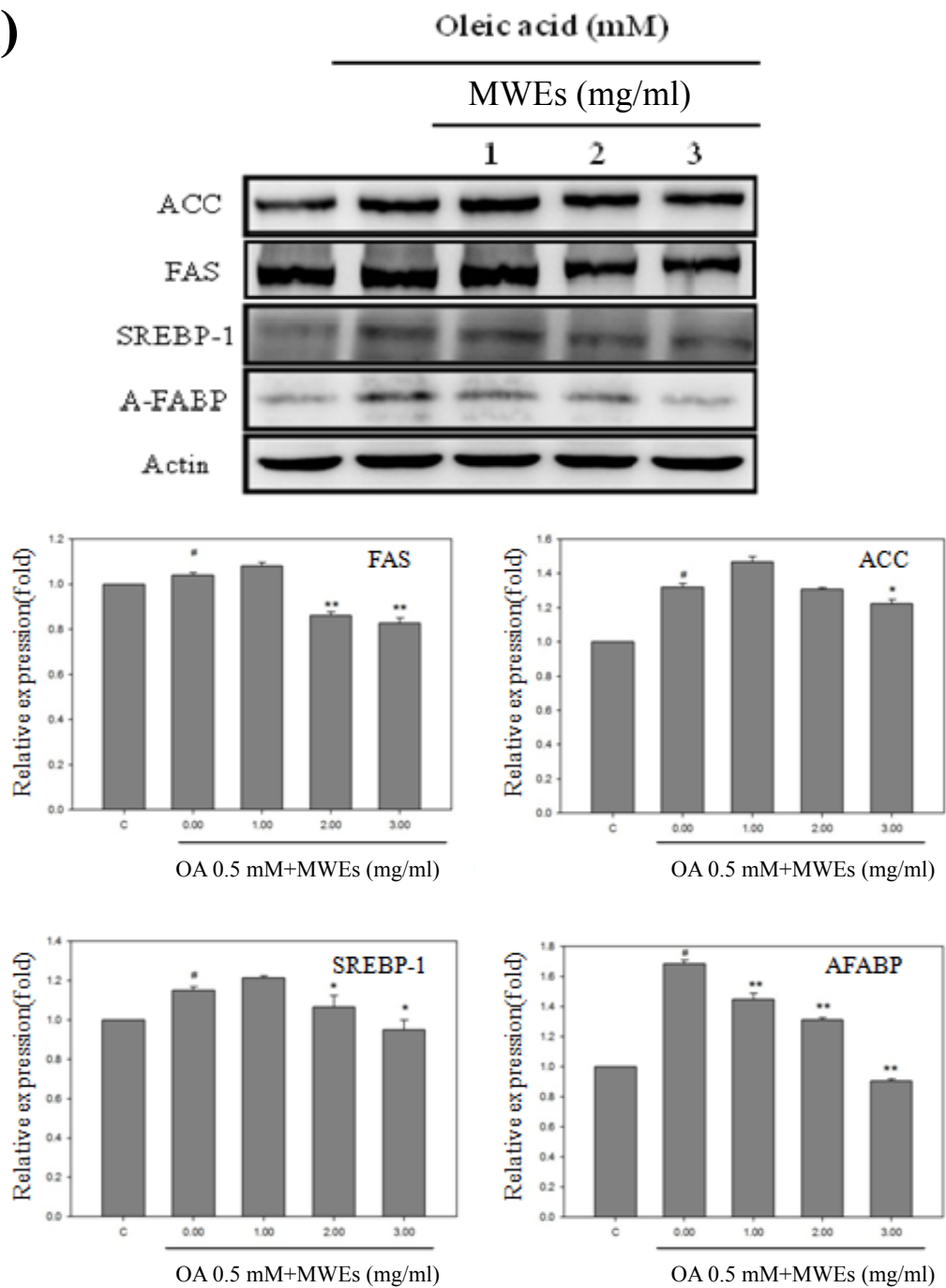


Figure 20A. MWEs inhibit the expression of enzymes in fatty acid synthesis.

Cultured cells were induced lipid accumulation with oleic acid for 24 hours and treated with MWEs (1, 2, 3 mg/ml) for 24 hours. Protein expressions were detected by Western blot analysis. The data were mean \pm SD from 3 samples for each group. # p <0.05 in relation to control group. * p <0.05 in relation to OA-induced group. ** p <0.001 in relation to OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

(B)

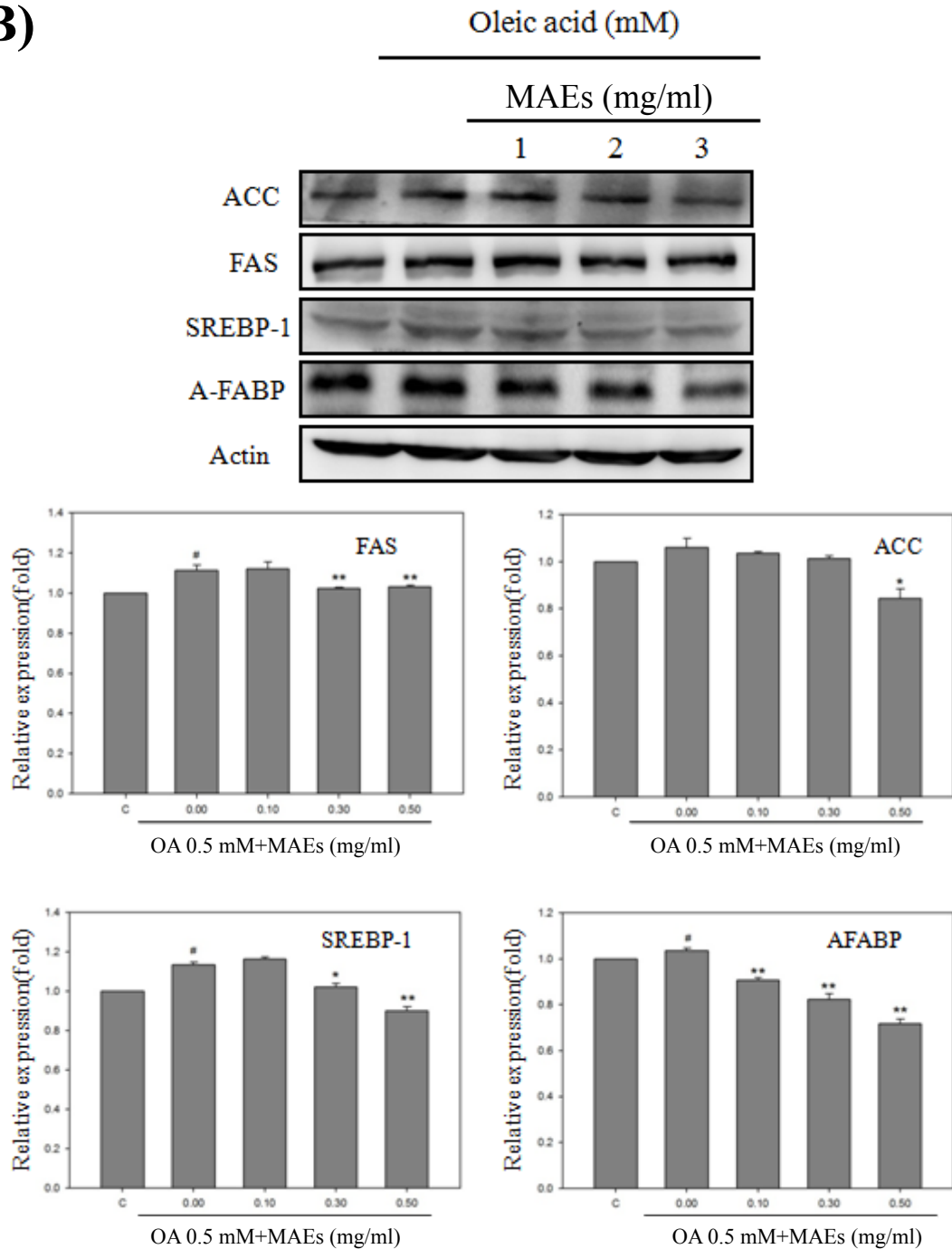


Figure 20B. MAEs inhibit the expression of enzymes in fatty acid synthesis.

Cultured cells were induced lipid accumulation with oleic acid for 24 hours and treated with MAEs (0.1, 0.3, 0.5 mg/ml) for 24 hours. Protein expressions were detected by Western blot analysis. The data were mean \pm SD from 3 samples for each group. # $p < 0.05$ in relation to control group. * $p < 0.05$ in relation to OA-induced group. ** $p < 0.001$ in relation to OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

(C)

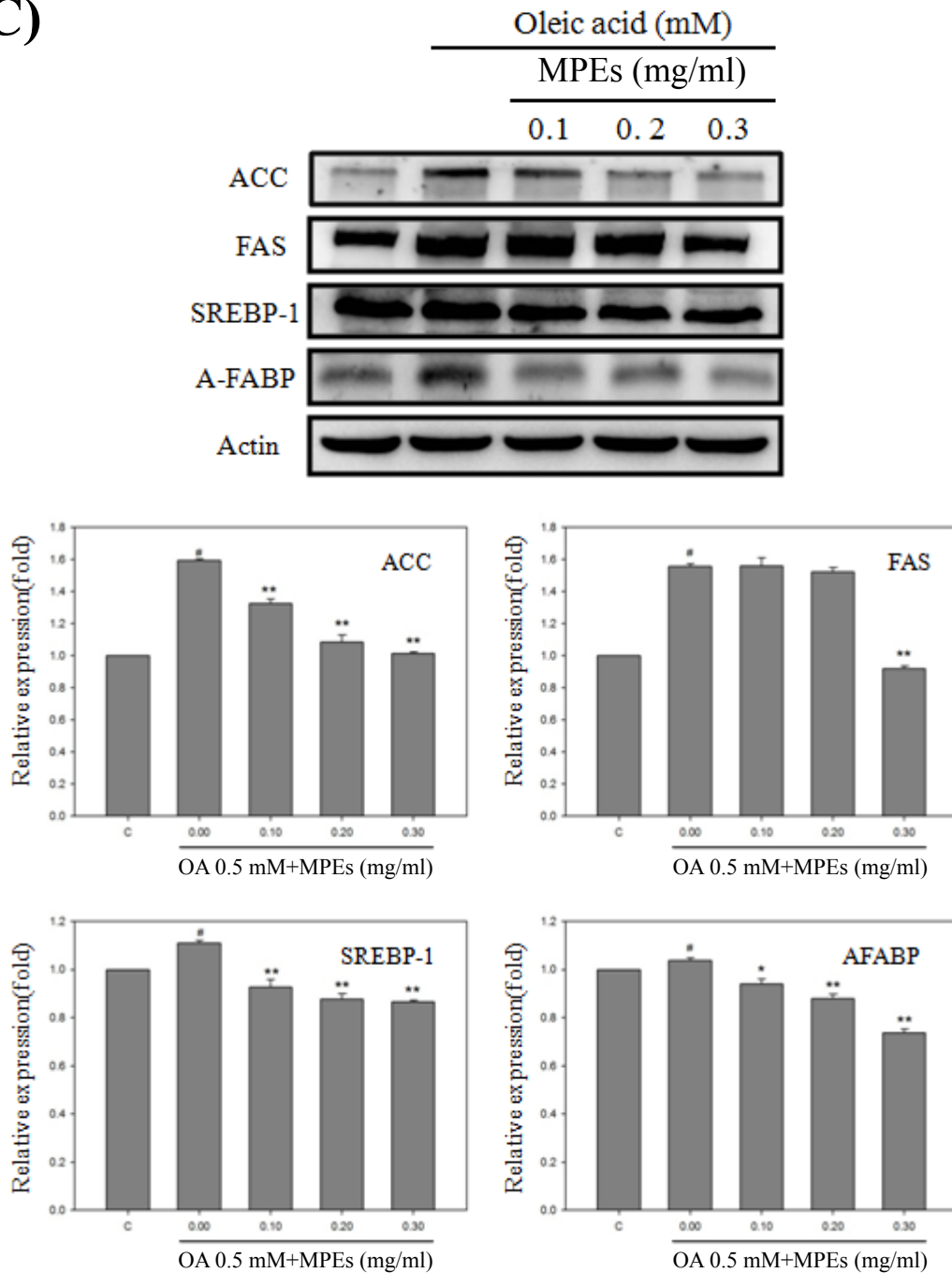


Figure 20C. MPEs inhibit the expression of enzymes in fatty acid synthesis.

Cultured cells were induced lipid accumulation with oleic acid for 24 hours and treated with MPEs (0.1, 0.2, 0.3 mg/ml) for 24 hours. Protein expressions were detected by Western blot analysis. The data were mean \pm SD from 3 samples for each group. # $p < 0.05$ in relation to control group. * $p < 0.05$ in relation to OA-induced group. ** $p < 0.001$ in relation to OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

(A)

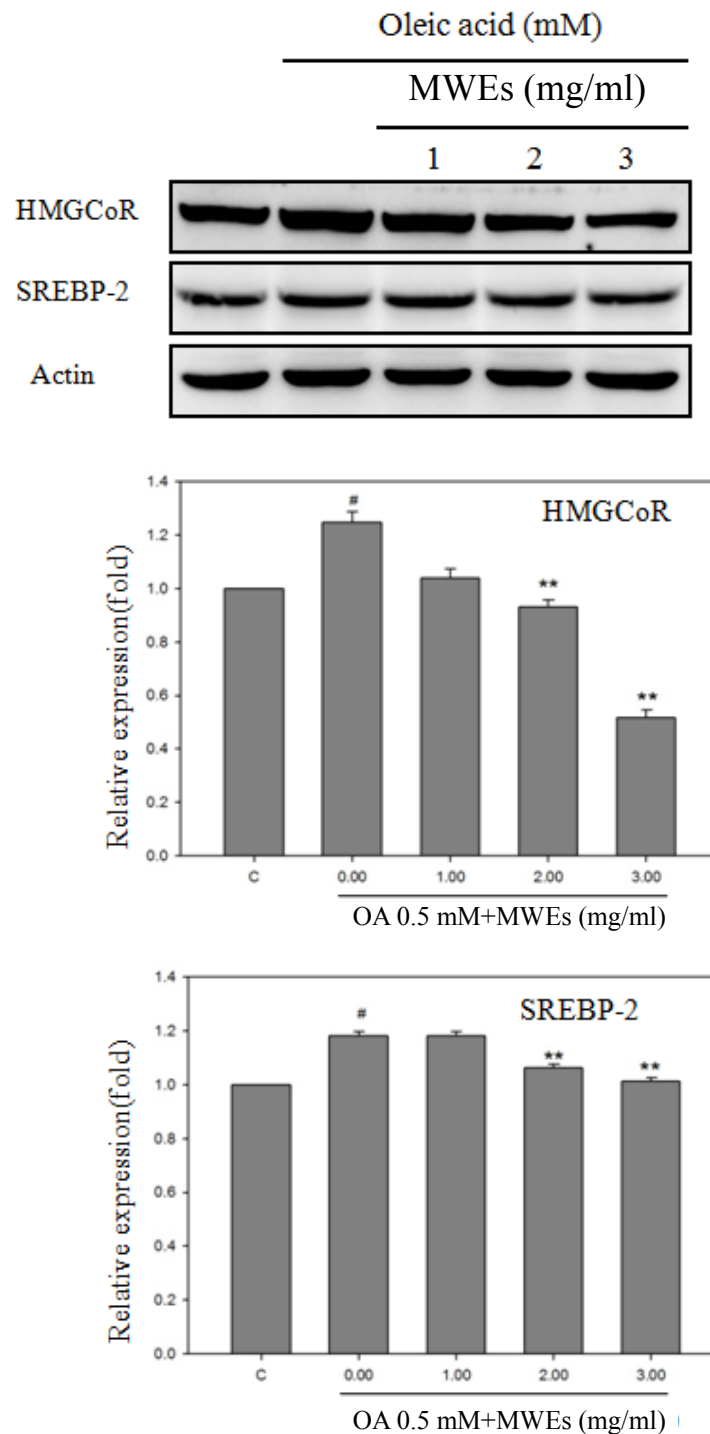


Figure 21A. MWEs inhibit the expression of cholesterol synthesis-related protein.

Cultured cells were induced lipid accumulation with oleic acid for 24 hours and treated with MWEs (1, 2, 3 mg/ml) for 24 hours. Protein expressions were detected by Western blot analysis. The data were mean \pm SD from 3 samples for each group. # $p < 0.05$ in relation to control group. * $p < 0.05$ in relation to OA-induced group. ** $p < 0.001$ in relation to OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

(B)

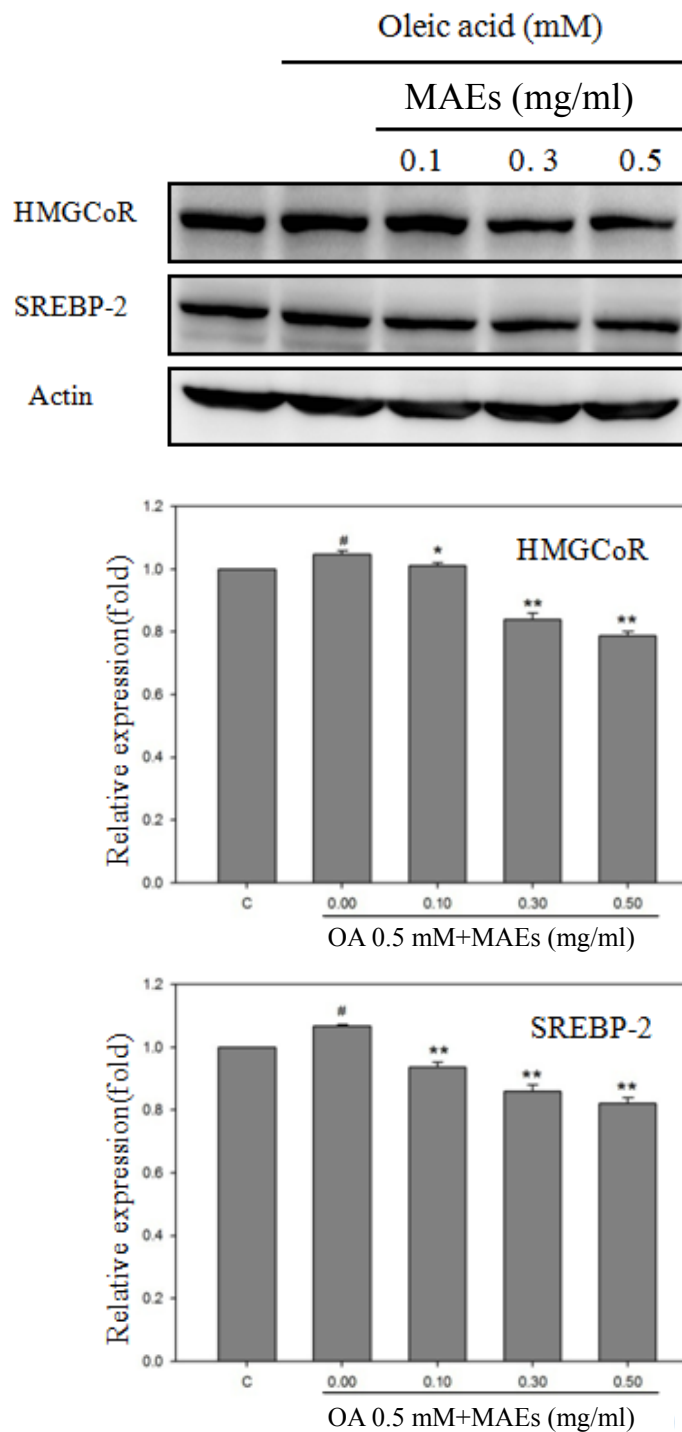


Figure 21B. MAEs inhibit the expression of cholesterol synthesis-related protein.

Cultured cells were induced lipid accumulation with oleic acid for 24 hours and treated with MAEs (0.1, 0.3, 0.5 mg/ml) for 24 hours. Protein expressions were detected by Western blot analysis. The data were mean \pm SD from 3 samples for each group. # $p < 0.05$ in relation to control group. * $p < 0.05$ in relation to OA-induced group. ** $p < 0.001$ in relation to OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

(C)

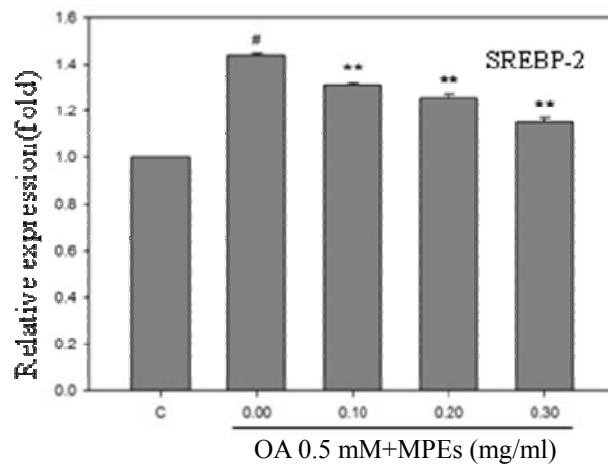
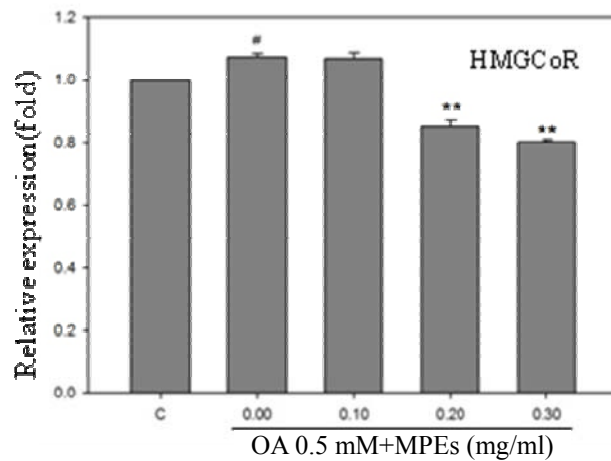
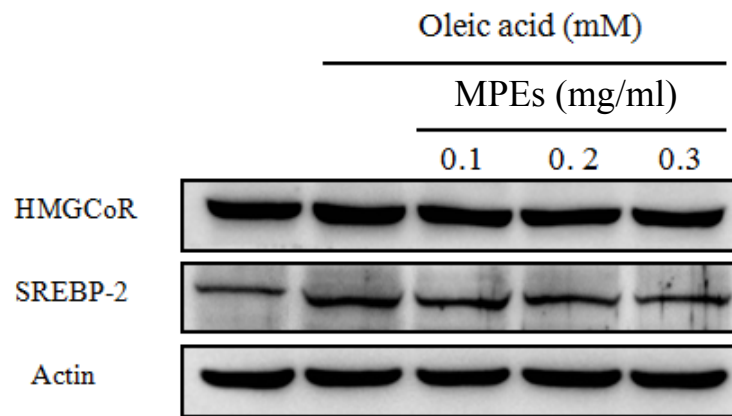
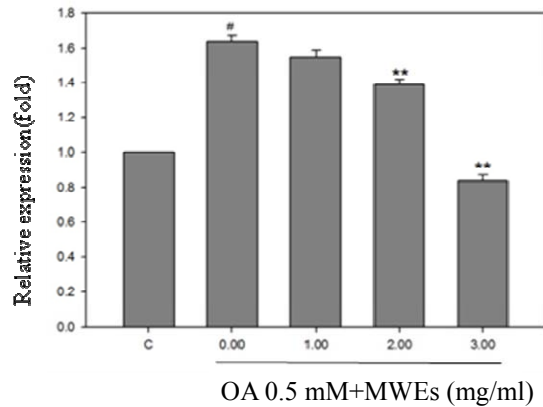
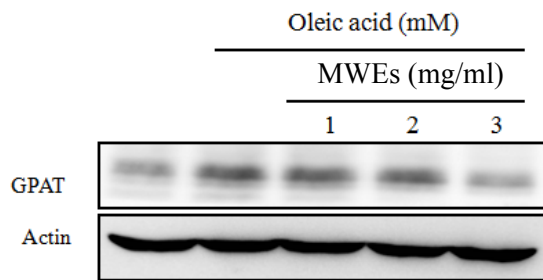


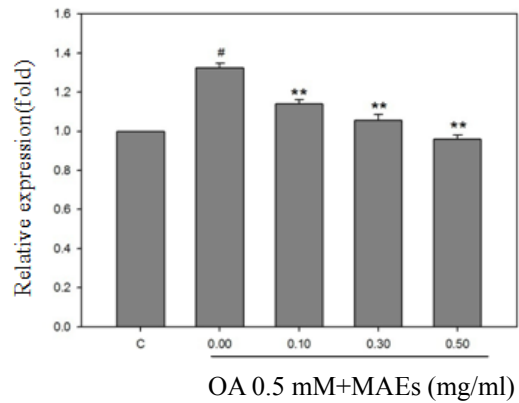
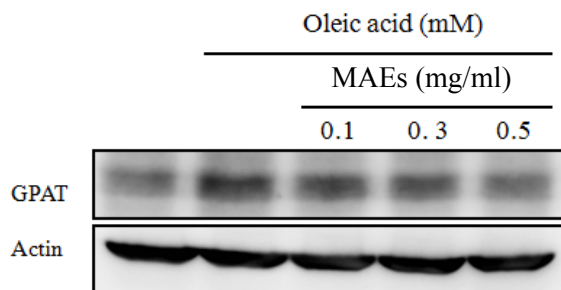
Figure 21C. MPEs inhibit the expression of cholesterol synthesis-related protein.

Cultured cells were induced lipid accumulation with oleic acid for 24 hours and treated with MPEs (0.1, 0.2, 0.3 mg/ml) for 24 hours. Protein expressions were detected by Western blot analysis. The data were mean \pm SD from 3 samples for each group. # $p < 0.05$ in relation to control group. * $p < 0.05$ in relation to OA-induced group. ** $p < 0.001$ in relation to OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

(A)



(B)



(C)

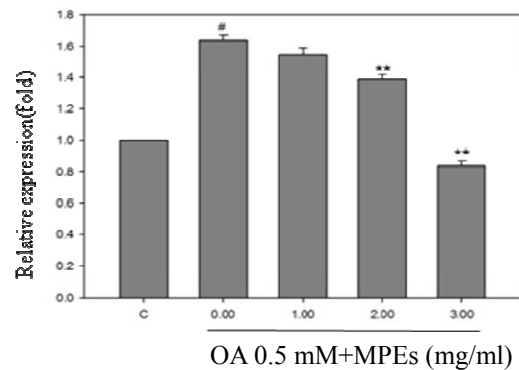
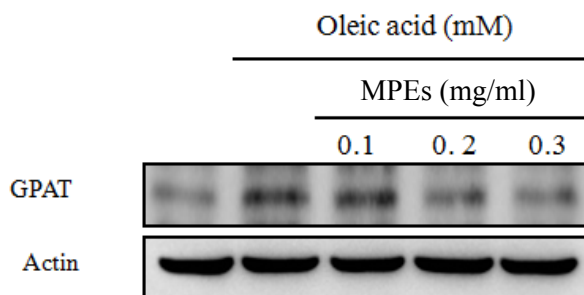


Figure 22. MWEs, MAEs and MPEs inhibit the expression of cholesterol synthesis-related protein. Cultured cells were induced lipid accumulation with oleic acid for 24 hours and treated with MWEs (1, 2, 3 mg/ml) (A), MAEs (0.1, 0.3, 0.5 mg/ml) (B) and MPEs (0.1, 0.2, 0.3 mg/ml) (C) for 24 hours. Protein expressions were detected by Western blot analysis. The data were mean \pm SD from 3 samples for each group. [#] $p < 0.05$ in relation to control group. ^{*} $p < 0.05$ in relation to OA-induced group. ^{**} $p < 0.001$ in relation to OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

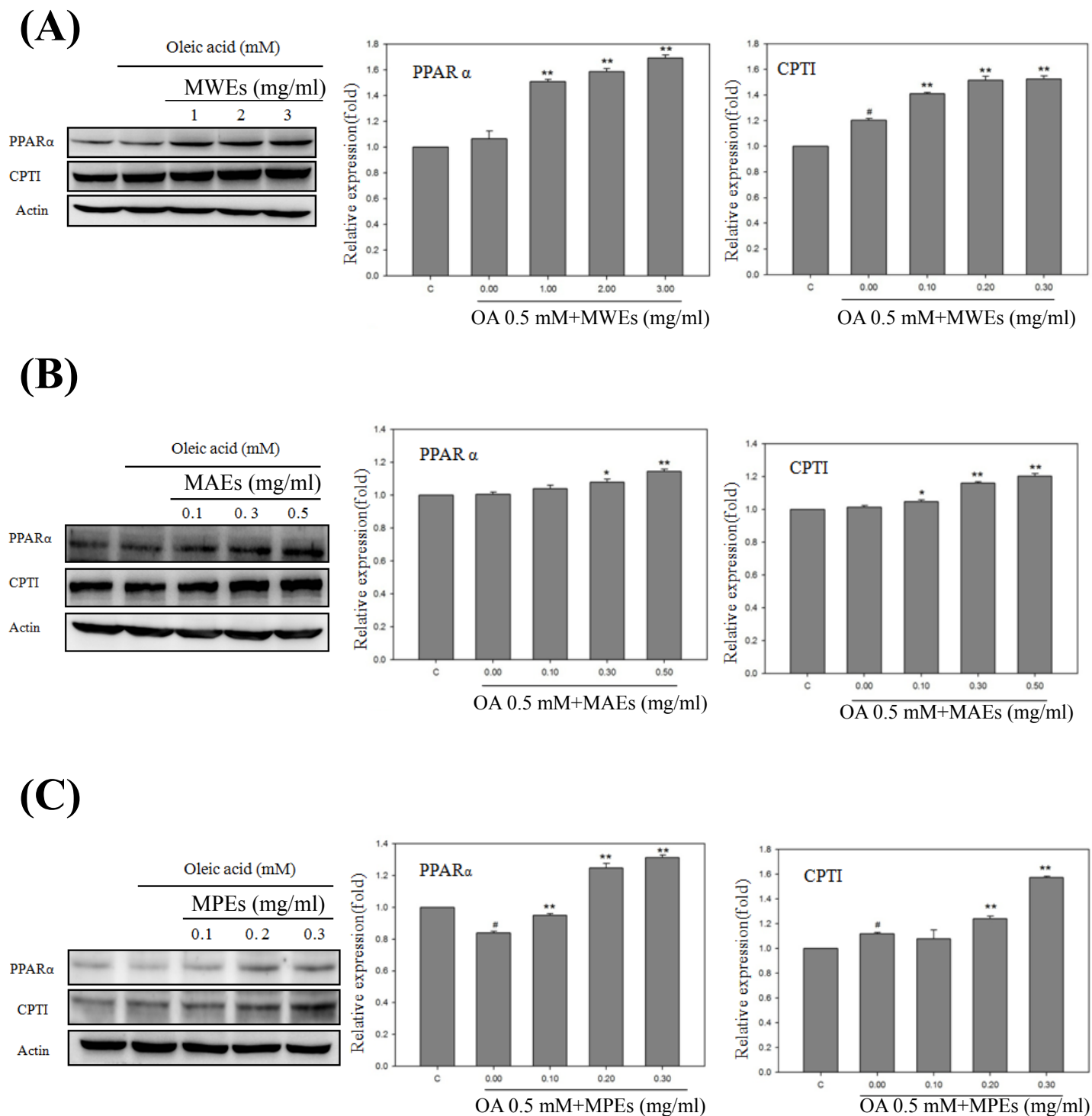


Figure 23. MWEs, MAEs and MPEs inhibit the expression of oxidation-related protein. Cultured cells were induced lipid accumulation with oleic acid for 24 hours and treated with MWEs (1, 2, 3 mg/ml) (A), MAEs (0.1, 0.3, 0.5 mg/ml) (B) and MPEs (0.1, 0.2, 0.3 mg/ml) (C) for 24 hours. Protein expressions were detected by Western blot analysis. The data were mean \pm SD from 3 samples for each group. # $p < 0.05$ in relation to control group. * $p < 0.05$ in relation to OA-induced group. ** $p < 0.001$ in relation to OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

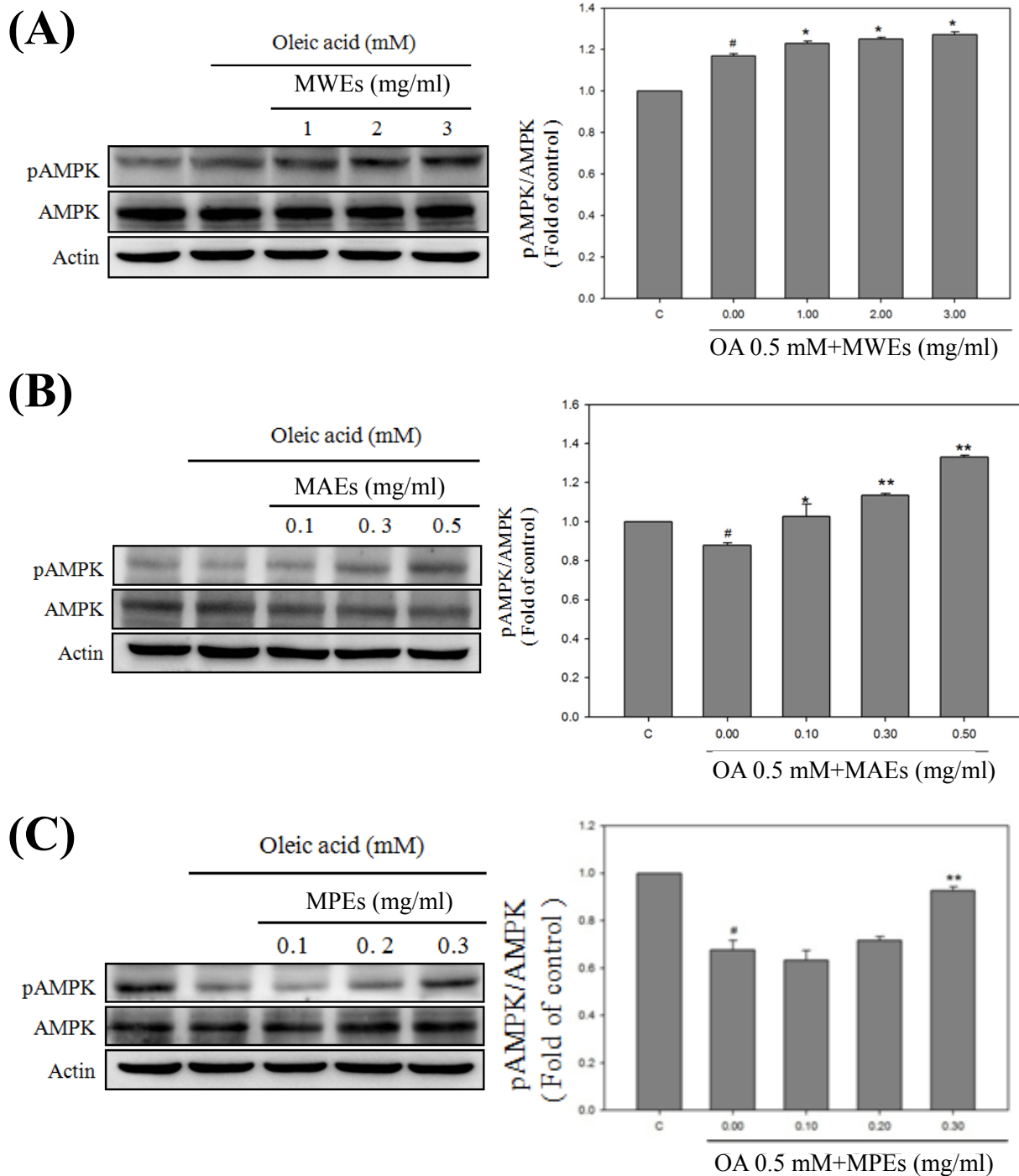
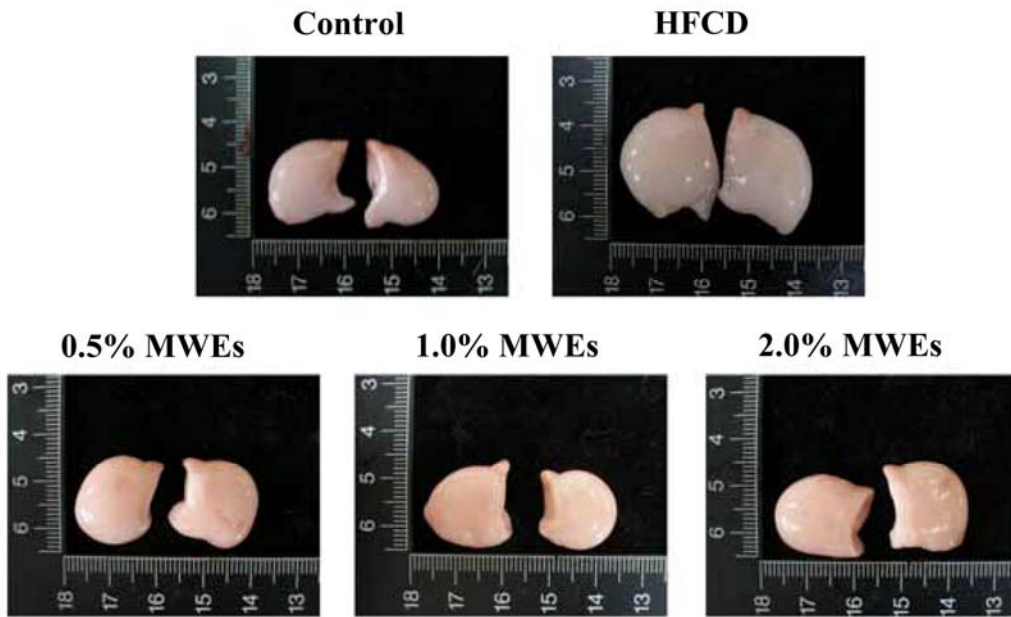


Figure 24. MWEs, MAEs and MPEs stimulated AMPK activity in OA-induced HepG2 cells. Cultured cells were induced lipid accumulation with oleic acid for 24 hours and treated with MWEs (1, 2, 3 mg/ml) (A), MAEs (0.1, 0.3, 0.5 mg/ml) (B) and MPEs (0.1, 0.2, 0.3 mg/ml) (C) for 24 hours. AMPK phosphorylation (pThr172-AMPK) were detected by Western blot analysis. Quantification of p-AMPK/AMPK were depicted means \pm SD from 3 samples for each group. # $p < 0.05$ in relation to control. * $p < 0.05$ in relation to OA-induced group. ** $p < 0.001$ in relation to OA-induced group. C, control; OA, oleic acid.

(A)



(B)

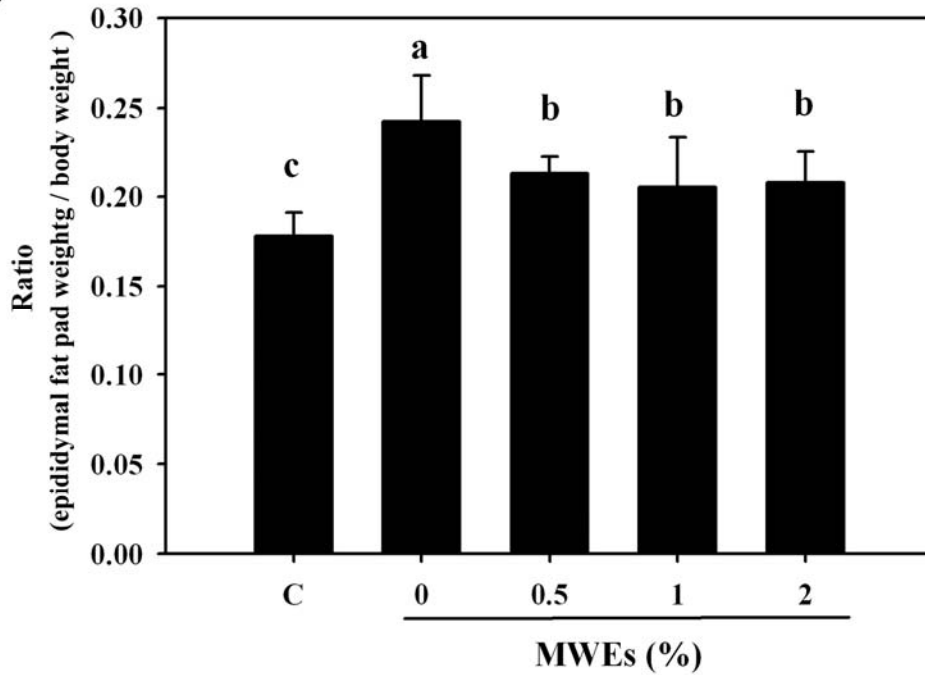


Figure 25. Effect of MWEs on the ratio of epididymal fat pad weight / body weight in HFD-fed hamsters. The data are presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$).

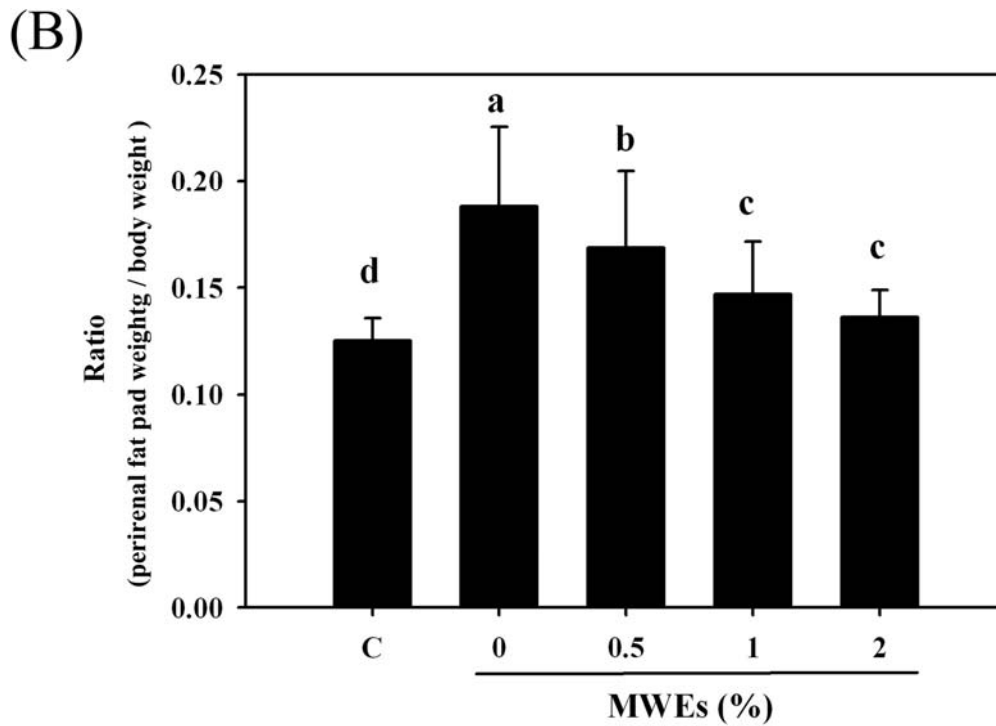
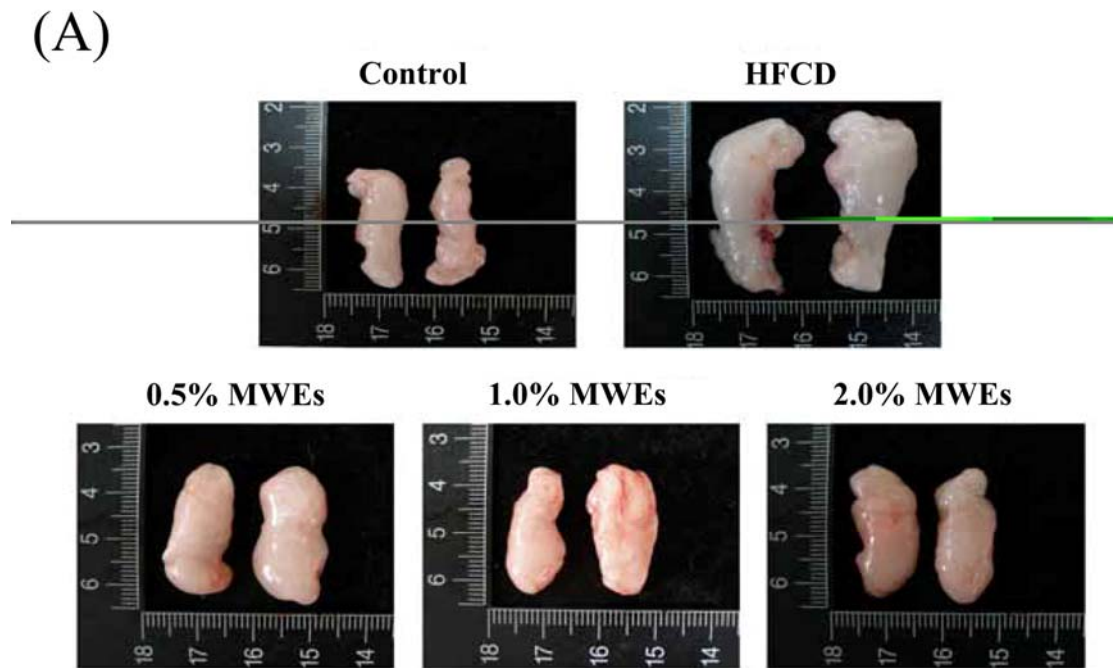


Figure 26. Effect of MWEs on the ratio of perirenal fat pad weight / body weight in HFD-fed hamsters. The data are presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$).

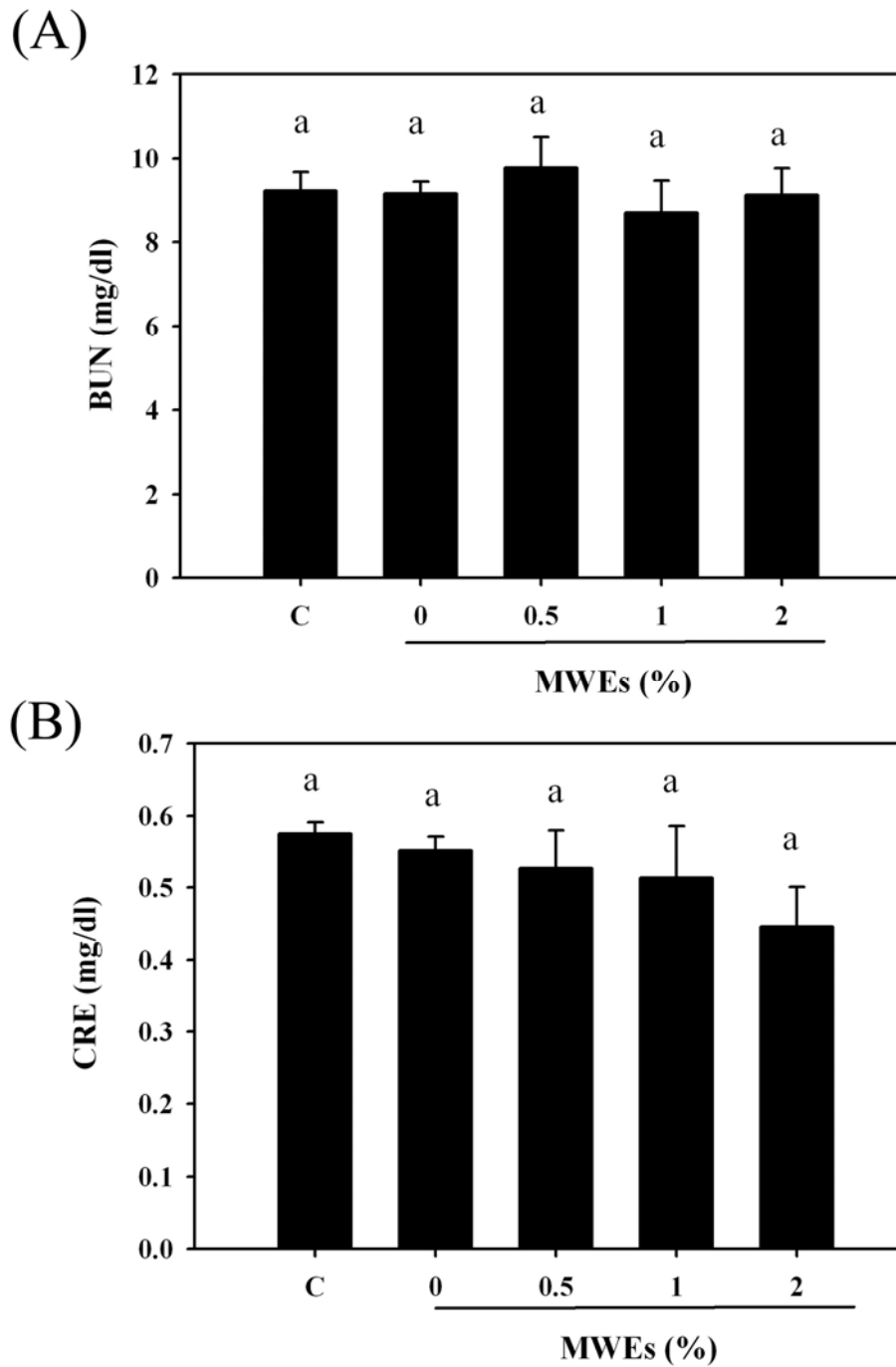


Figure 27. Effect of MWEs on renal function in HFCD-fed hamsters. The data of plasma BUN (A) and CRE (B) are presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$). BUN, blood urea nitroge ; CRE, creatinine.

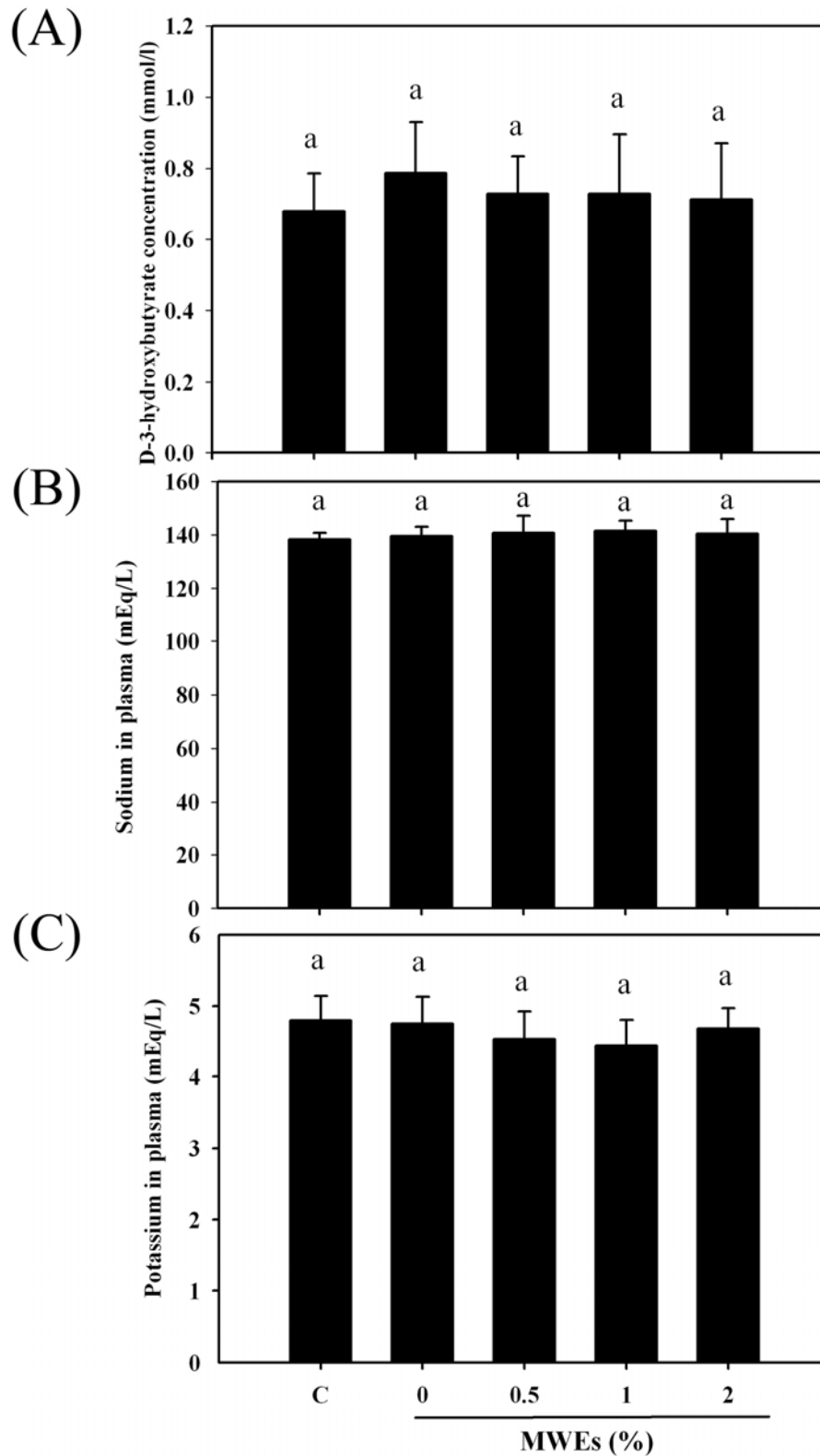


Figure 28. Effect of MWEs on physical function levels in HFCD-fed hamsters. The data of plasma D-3-hydroxybutyrate (A), sodium (B) and f potassium (C) are presented as means \pm SDs from 8 hamsters per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ($p < 0.05$).

MPC component	polyphenol (%)
Gallic acid	2.67±0.34
Protocatechuic acid	13.76±1.65
Catechin	3.19±0.38
Epigallocatechin Gallate	6.26±0.83
Caffeic acid	6.15±1.91
Epiccatechin	4.69±0.87
Rutin	18.17±1.10
Quercetin	5.97±1.14
Naringenin	6.71±1.22

Table 5. The Components of MPC.

	HFD					
	C	MPC (%)				S
		0	0.1	0.3	0.5	
2 week	6.67±0.79	5.83±1.39	3.72±0.77 ^a	4.74±0.67	3.99±0.94	5.46±0.48 ^a
4 week	11.97±0.83	10.04±1.25	7.64±0.42 ^a	7.79±0.55	6.49±1.09	9.03±0.46 ^a
6 week	16.06±0.19	18.57±1.27	14.46±0.24	15.4±0.51	10.7±1.21 ^a	15.89±0.43
8 week	20.93±0.68	22.68±1.92	16.84±0.28 ^a	17.8±0.48 ^a	14.1±1.68 ^a	18.07±0.50

Table 6. Effects of MPC on body weight change levels in C57BL/6 mice. The data of body weight changed (%) every 2 weeks in C57BL/6 mice. All values are presented as means ± SDs from 20 C57BL/6 mice per group. HFD group were maintained on a high-fat diet containing 20 % lard oil and 2 % cholesterol for 8 weeks (n=20). C, normal group; HFD, high fat diet without MPC group; 0.1 % MPC, C57BL/6 mice fed high fat diet with 0.1 % MPC powder; 0.3 % MPC, C57BL/6 mice fed high fat diet with 0.3 % MPC powder; 0.5 % MPC, C57BL/6 mice fed high fat diet with 0.5 % MPC powder. ^ap < 0.05 in relation to HFD group.

Variable	Control	HFD + MPC (%)				HFD + S
		0	0.1	0.3	0.5	
TG (mg/dL)	110.00±61.64	203.33±55.08	183.33±32.15	176.66±20.82	122.50±22.17 ^a	120.00±24.49 ^a
TC (mg/dL)	130.00±26.46	180.00±35.36	156.00±46.15	146.67±15.28	126.00±24.08 ^a	136.67±5.77
GPT (U/L)	58.40±7.83	94.67±27.39	68.25±16.86	64.60±25.24	58.80±12.91 ^a	64.00±9.90
GOT (U/L)	256.00±25.51	332.00±22.93	286.40±79.25	271.40±72.68	271.00±24.75 ^a	259.25±31.40 ^b
HDL (mg/dL)	51.60±20.13	77.80±14.36	74.50±13.22	75.67±12.01	74.50±7.77	70.00±3.61
LDL (mg/dL)	28.00±16.43	48.00±21.68	38.00±21.68	34.00±13.42	32.00±21.68	25.00±17.32
LDL/HDL	0.54	0.61	0.51	0.44	0.42	0.35
BUN (mg/dL)	33.20±1.58	31.10±3.40	27.43±3.08	24.98±1.28 ^b	24.36±1.12 ^b	22.28±1.18 ^b
CRE (mg/dL)	0.62±0.04	0.68±0.04	0.62±0.08	0.62±0.09	0.6±0.08	0.58±0.08 ^a
FFA (nmol)	2.99±0.03	3.08±0.12	3.05±0.05	3.04±0.06	2.99±0.03	3.04±0.06
Ketone body (mmol/L)	0.45±0.25	0.48±0.17	0.52±0.59	0.46±0.20	0.45±0.18	0.47±0.23

Table 7. Effects of MPC are on serum components in C57BL/6J mice. All data are expressed as the mean±SD. C, control ; HFD, high fat diet ; GOT, Glutamic-oxaloacetic transaminase ;GPT, Glutamic-pyruvic transaminase ; BUN, blood urea nitrogen; CRE, serum creatinine ; Na, sodium; K, potassium ; TCHO, total cholesterol ; TG, triglyceride ; HDL, high-density lipoprotein ; LDL, low-density lipoprotein. HFD group were maintained on a high-fat diet containing 20 % lard oil and 2 % cholesterol for 8 weeks (n=20). C, normal group; HFD, high fat diet without MPC group; 0.1 % MPC, C57BL/6 mice fed high fat diet with 0.1% MPC powder; 0.3 % MPC, C57BL/6 mice fed high fat diet with 0.3 % MPC powder; 0.5 % MPC, C57BL/6 mice fed high fat diet with 0.5 % MPC powder. ^ap < 0.05, with respect to high-fat diet-treated group ^b p< 0.01, with respect to high-fat diet-treated group.

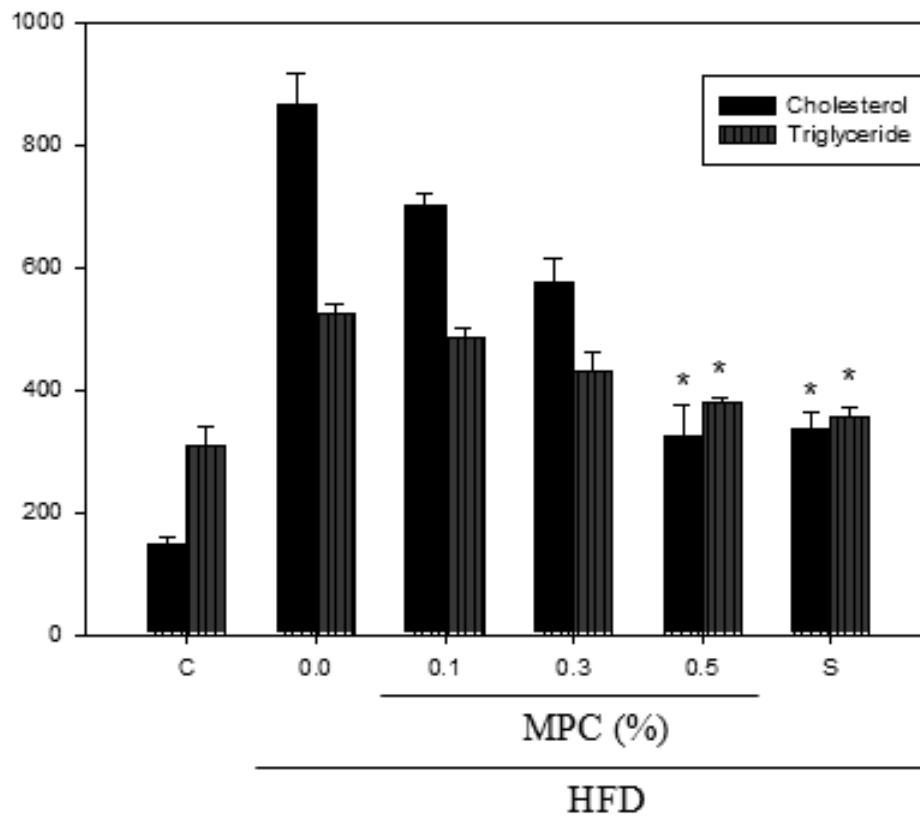


Fig. 29. Quantitative determination revealed that hepatic triglyceride and cholesterol content in C57BL/6 mice. Relative amounts of liver triglyceride and cholesterol contents in C57BL/6 mice (n=20). Lipids were extracted from liver tissue obtained from four group mice and analyzed by spectrometry. * $p < 0.05$ in relation to HFD group. C, control; HFD, high fat diet; MPC, mulberry polyphenolic component .

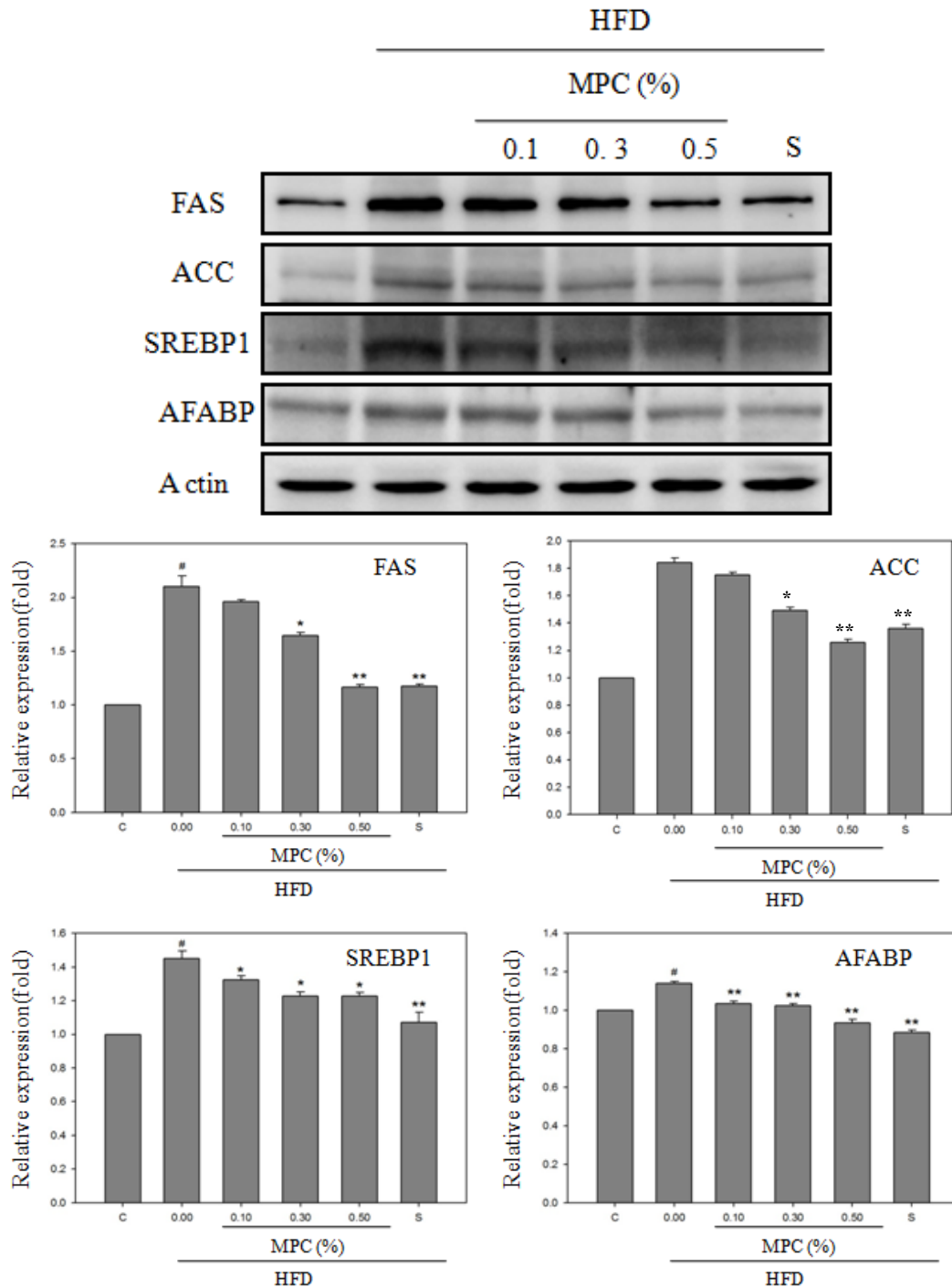


Fig. 30. MPC inhibit the expression of fatty acid synthesis-related protein in C57BL/6 mice. HFD group were maintained on a high-fat diet containing 20 % lard oil and 2 % cholesterol for 8 weeks (n=20). Protein expressions were detected by Western blot analysis. C, normal group; HFD, high fat diet. MPC, mulberry polyphenolic component. #p<0.05 in relation to control group. *p<0.05 ; **p<0.01 in relation to HFD-induced group.

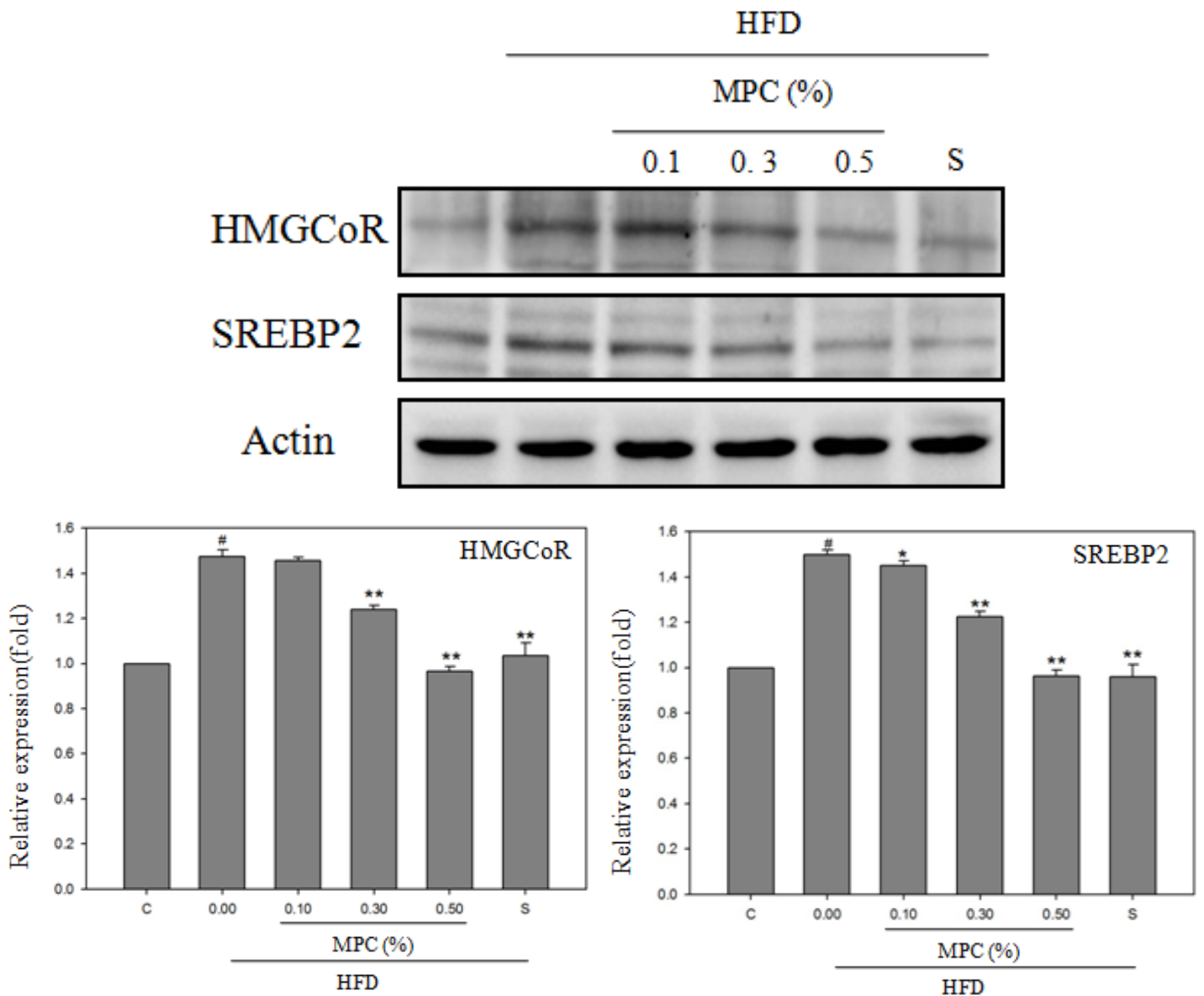


Fig. 31. MPC inhibit the expression of cholesterol synthesis-related protein in C57BL/6 mice. HFD group were maintained on a high-fat diet containing 20 % lard oil and 2 % cholesterol for 8 weeks (n=20). Protein expressions were detected by Western blot analysis. C, normal group; HFD, high fat diet. MPC, mulberry polyphenolic component. #p<0.05 in relation to control group. *p<0.05 ; **p<0.01 in relation to HFD-induced group.

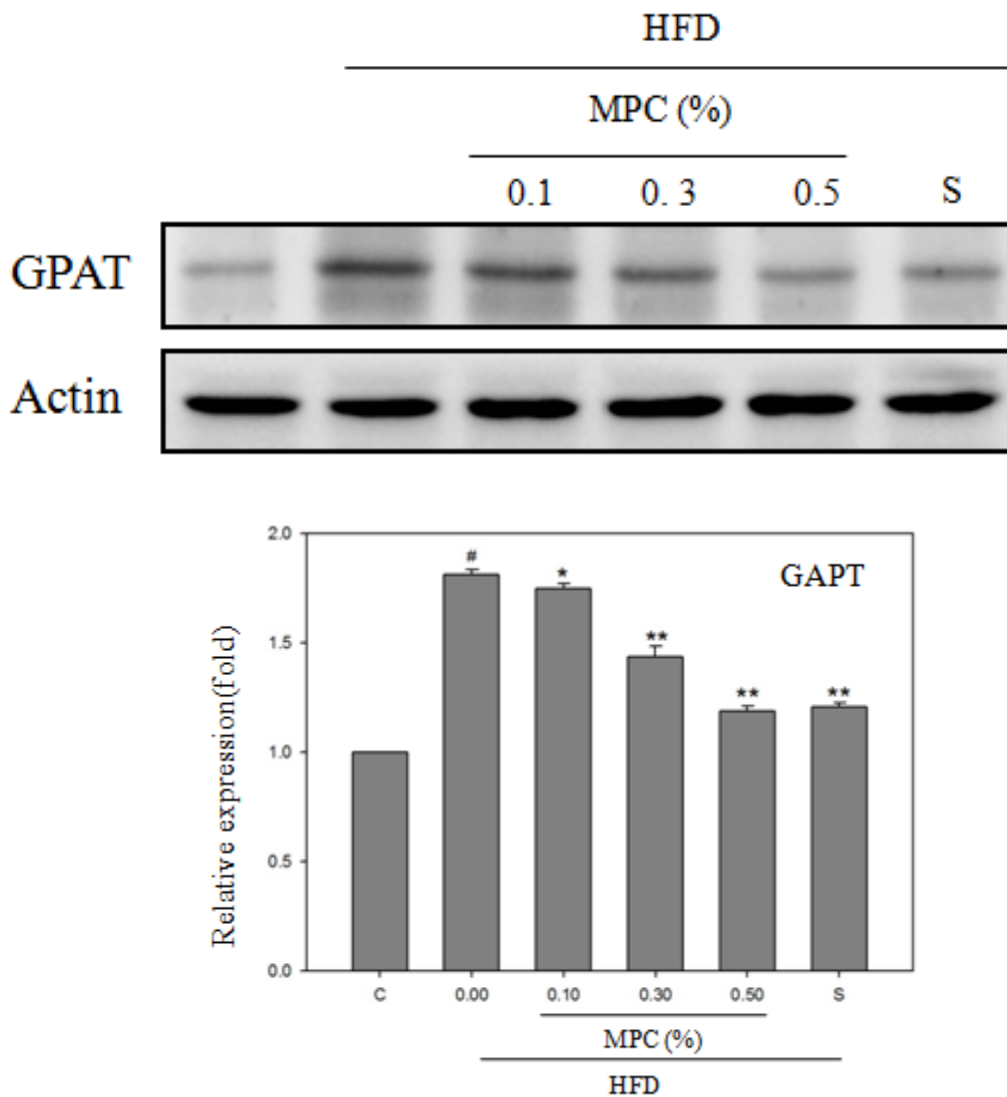


Fig. 32. MPC inhibit the expression of triglycerol synthesis-related protein in C57BL/6 mice. HFD group were maintained on a high-fat diet containing 20 % lard oil and 2 % cholesterol for 8 weeks (n=20). Protein expressions were detected by Western blot analysis. C, normal group; HFD, high fat diet. MPC, mulberry polyphenolic component. #p<0.05 in relation to control group. *p<0.05 ; **p<0.01 in relation to HFD-induced group.

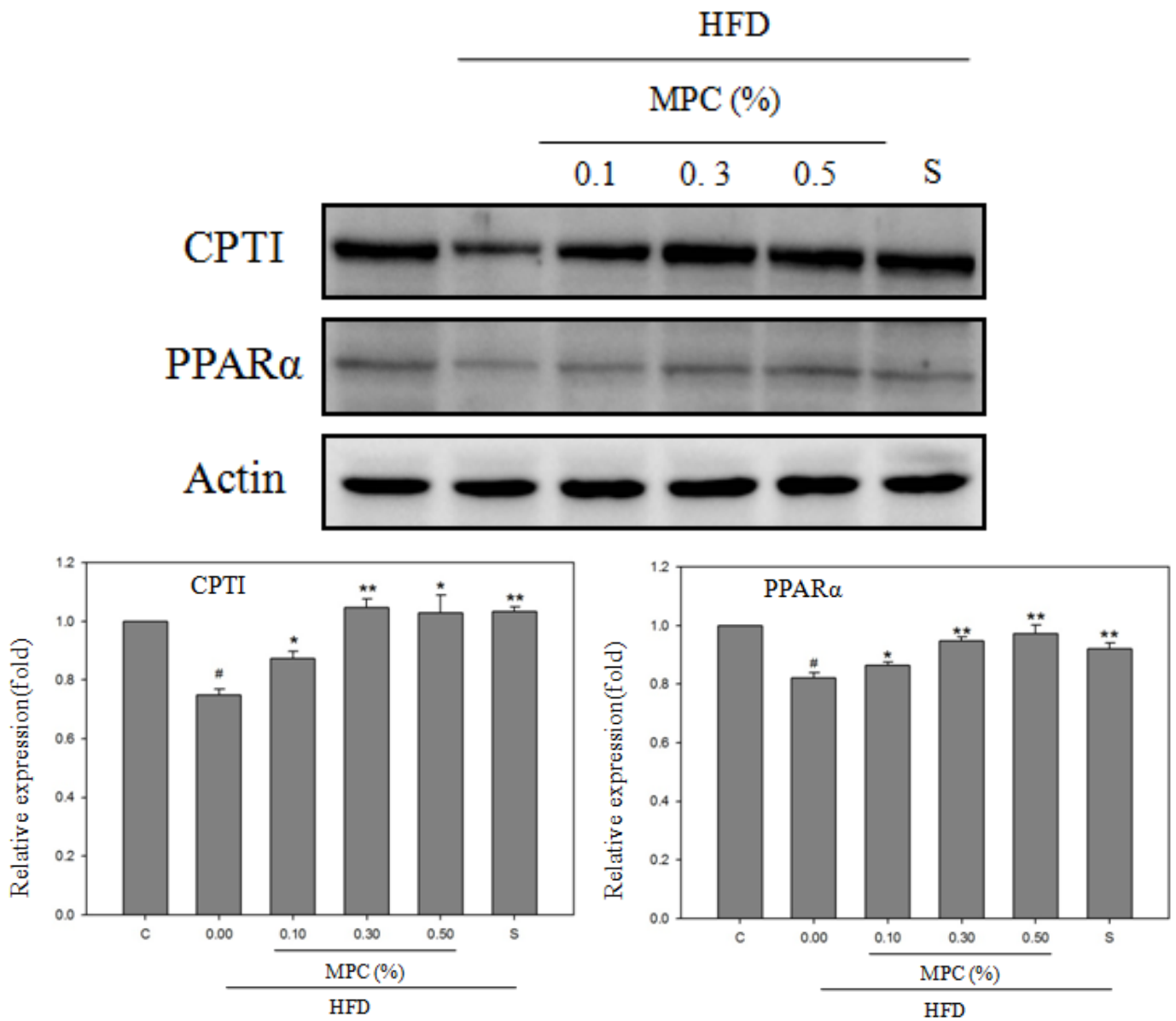


Fig. 33. MPC increase the expression of fatty acid oxidation-related protein in C57BL/6 mice. HFD group were maintained on a high-fat diet containing 20 % lard oil and 2 % cholesterol for 8 weeks (n=20). Protein expressions were detected by Western blot analysis. C, normal group; HFD, high fat diet. MPC, mulberry polyphenolic component. #p<0.05 in relation to control group. *p<0.05; **p<0.01 in relation to HFD-induced group.

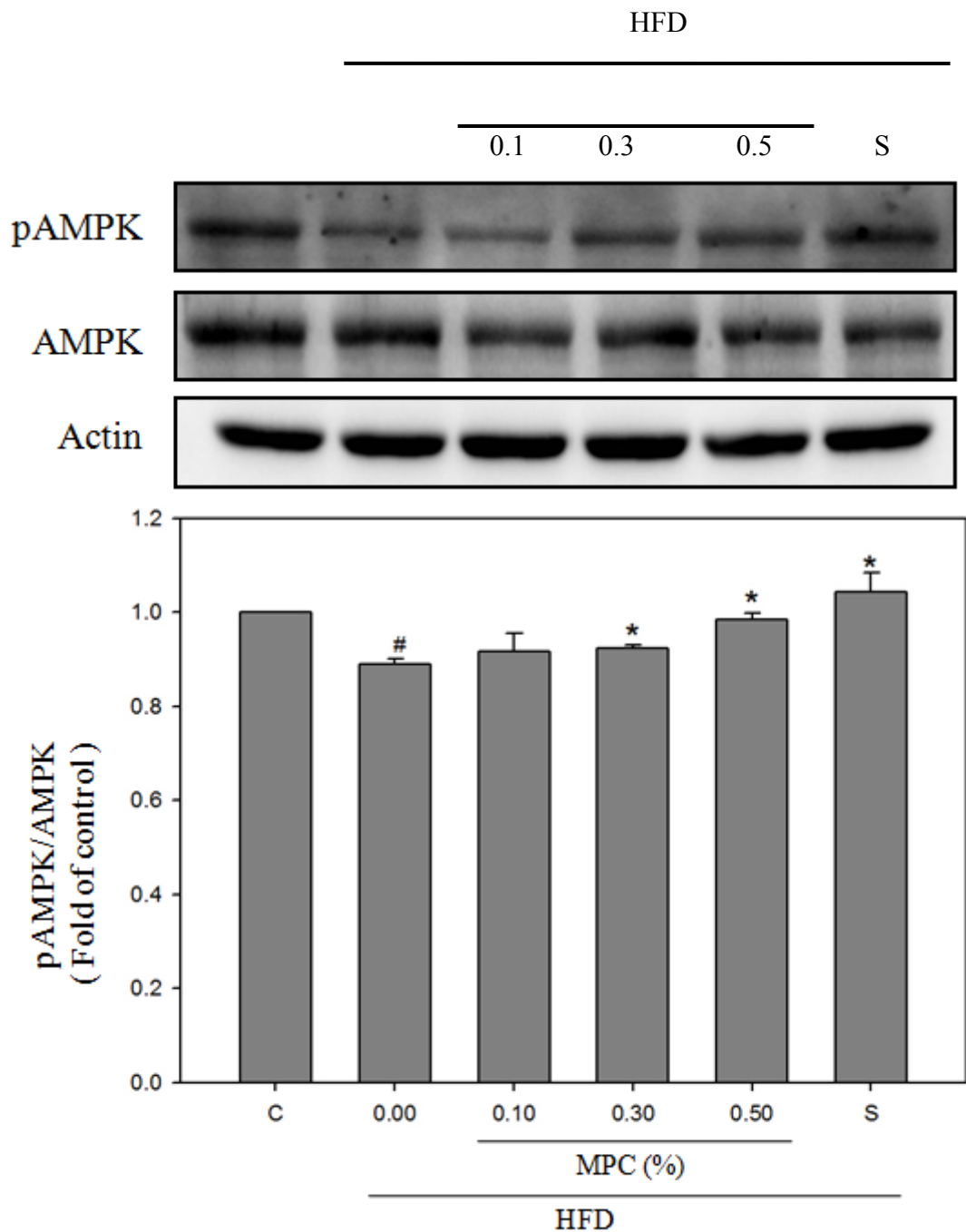
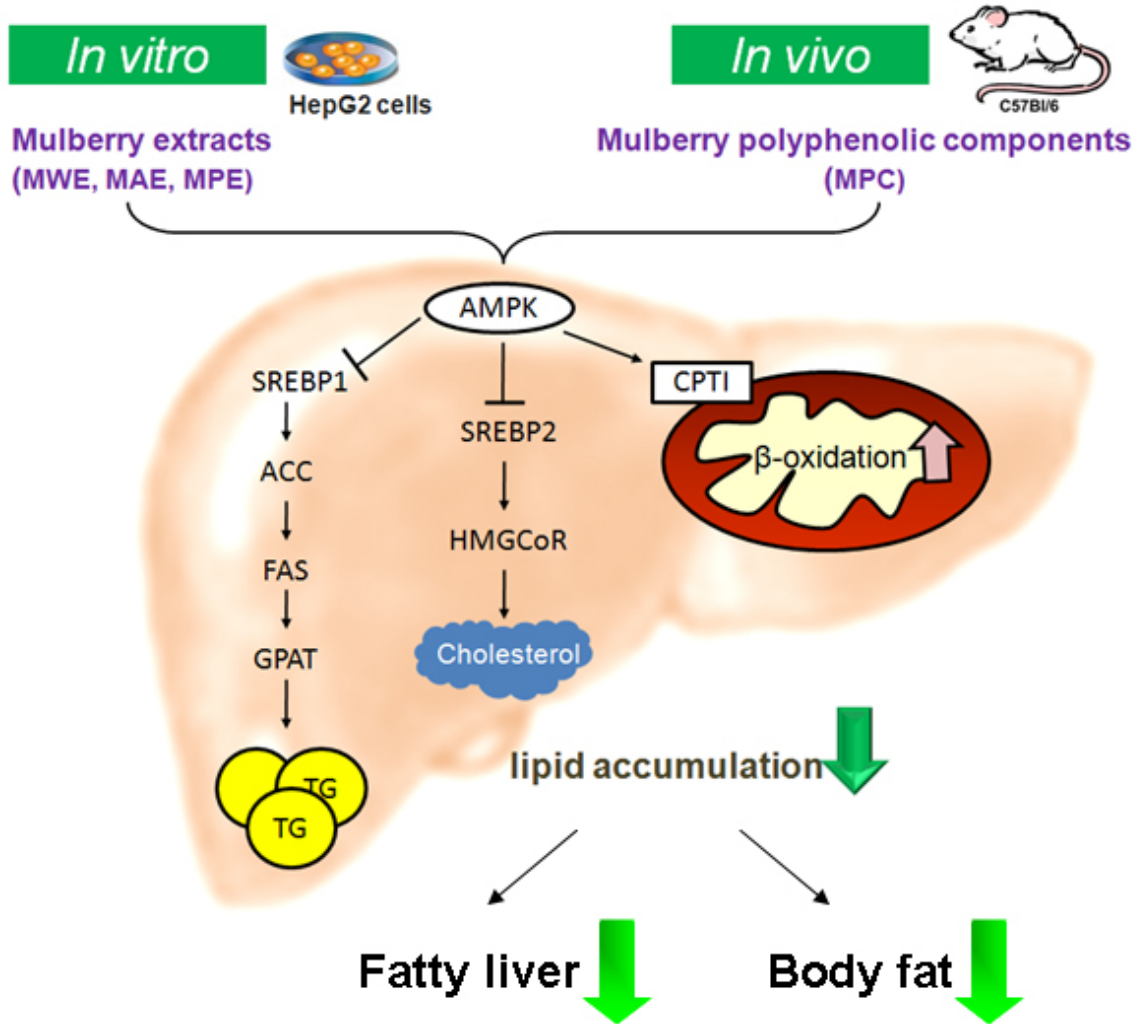


Fig. 34. MPC increase AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation in C57BL/6 mice. HFD group were maintained on a high-fat diet containing 20 % lard oil and 2 % cholesterol for 8 weeks (n=20). (A) AMPK phosphorylation (pThr172-AMPK) were detected by Western blot analysis. (B) All values are expressed as the mean±S.D. *p < 0.05 in relation to high fat diet group. C, control; HFD, high fat diet group.

Summary



參考文獻

盧宏民 (2003) 中藥大辭典。五洲出版社，台北，p.3016~3018。

Aden, D. P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I.; Knowles, B. B.

Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*. **1979**, 282, 615-616.

Ansell, B. J.; Watson, K. E.; Fogelman, A. M., An evidence-based

assessment of the NCEP adult treatment panel II guidelines. National cholesterol education program. *JAMA* **1999**, 282, 2051–2057.

Armand, M.; Borel, P.; Pasquier, B.; Dubois, C.; Senft, M.; Andre, M.;

Peyrot, J.; Salducci, J.; Lairon, D. Physicochemical characteristics of

emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *Am. J.*

Physiol. **1996**, 271, 172-183.

Ballantyne, C. M. Low-density lipoproteins and risk for coronary

artery disease. *Am. J. Cardiol.* **1998**, 82, 3 – 12.

Britton, C. H.; Schultz, R. A.; Zhang, B.; Esser, V.; Foster, D. W.;

McGarry, J. D. Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase

I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial

analysis of the gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 1984-1988.

Brown, M. S.; Goldstein, J. L. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* **1980**, *21*,505-517.

Brown, M. S.; Goldstein, J. L., A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **1986**, *232*, 34–47.

Brown, M. S. ; Goldstein, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **1997**, *89*, 331-340.

Brown, M. S. ; Goldstein, J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11041–11048.

Dietschy, J. M.; Woollett, L. A.; Spady, D. K. The interaction of dietary cholesterol and specific fatty acids in the regulation of LDL receptor activity and plasma LDL-cholesterol concentrations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1993**, *676*, 11–26.

Fruhbeck, G.; Gomez-Ambrosi, J.; Muruzabal, F. J.; Burrell, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and netabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2001**, *280*, 827-847.

- Gavrilova, O.; Marcus-Samuels, B.; Graham, D.; Kim, J. K.; Shulman, G. I.; Castle, A. L.; Vunson, C.; Eckhaus, M.; Retiman, M. L. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 271-278.
- Goldstein, J. L.; Brown, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **1990**, *343*, 425-430.
- Grundy, S. M. Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy. *Circulation* **1998**, *97*, 1436–1439.
- Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **2002**, *360*, 7–22.
- Horton, J. D. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc. Trans*, **2002**, *30*, 1091-1095.
- Huang, H.P.; Shih, Y. W.; Chang, Y. C.; Hung, C. N.; Wang, C. J. Chemoinhibitory effect of mulberry anthocyanins on melanoma metastasis involved in the Ras/PI3K pathway. *J. Agric Food Chem.* **2008**, *56(19)*, 9286-9293.
- Javitt, N. B. HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein,

cholesterol, and bile acids. *FASEB J.* **1990**, 161–168.

Kersten, S.; Desvergne, B.; Wahli, W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **2000**, *40*, 421-424.

Kim, A. J. and Park, S. Mulberry extract supplements ameliorate the inflammation-related hematological parameters in carrageenan-induced arthritic rats. *J. Med Food.* **2006**, *9(3)*, 431-435.

Kisseleva, A. F.; Goryunova, L. E.; Planells, R.; Lafont, H.; Alquier, C. HMG CoA reductase and LDL receptor genes are regulated differently by 15-ketosterols in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *259*, 688-694.

Lee, S. S.; Pineau, T.; Drago, J.; Lee, E. J.; Owens, J. W.; Kroetz, D. L.; Fernandez-Salguero, P. M.; Westphal, H.; Gonzalez, F. J. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell Biol.* **1995**, *15*, 3012-3022.

Leone, T. C.; Weinheimer, C. J.; Kelly, D. P. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in the cellular fasting response: The PPAR alpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1999**, *96*,

7473-7478.

Liu, L. K.; Lee, H. J.; Shih, Y. W.; Chyau, C. C.; Wang, C. J. Mulberry anthocyanin extracts inhibit LDL oxidation and macrophage-derived foam cell formation induced by oxidative LDL. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, 113-121.

Liu, L. K.; Chou, F. P.; Chen, Y. C.; Chyau, C. C.; HO, H. H., Wang, C. J. Effects of mulberry (*Morus alba L.*) extracts on lipid homeostasis *in vitro* and *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7605–7611.

Miller, G. J. ; Miller, N. E. Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet* **1975**, *1*, 16-19.

Moreno, L. A.; Rodriquez, G. Dietary risk factors for development of childhood obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2007**, *10*, 336-341.

Nattapong, S. and Omboon, L. A new source of whitening agent from a Thai Mulberry plant and its betulinic acid quantitation. *Nat Prod Res.* **2008**, *22(9)*, 727-734.

Nikkari, S. T.; Solakivi, T.; Jaakkola, O. The hyperlipidemic hamster as an atherosclerosis model. *Artery* **1991**, *18*, 285-290.

Pande, S.V.; Parvin, R. Characterization of carnitine acylcarnitine translocase system of heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 6683-6691.

Prentice, A. M.; Jebb, S. A. Obesity in Britain: gluttony or sloth? *BMJ* **1995**, *311*, 437-439.

Rosser, D. S.; Ashby, M. N.; Ellis, J. L.; Edwards, P. A. Coordinate regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, and prenyltransferase synthesis but not degradation in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 12653-12656.

Schoonjans, K.; Watanabe, M.; Suzuki, H.; Mahfoudi, A.; Krey, G.; Wahli, W.; Grimaldi, P.; Staels, B.; Yamamoto, T.; Auwerx, J. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19269-19276.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Acta.* **1996**, *1302*, 93-109.

Shih, P.H.; Chan, Y. C.; Liao, J. W.; Wang, M. F.; Yen, G. C. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem. In Press, Corrected Proof, Available*

online 14 May 2009.

- Shimano, H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res.* **2001**, *40*, 439-452.
- Smith, J. R.; Osborne, T. F. G. J. L.; Brown, M. S. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 2306–2310.
- Spady, D. K.; Turley, S. D.; Dietschy, J. M. Dissociation of hepatic cholesterol synthesis from hepatic low-density lipoprotein uptake and biliary cholesterol saturation in female and male hamsters of different ages. *Biochim. Biophys. Acta.* **1983**, *753*, 381-392.
- Spady, D. K.; Dietschy, J. M. Interaction of dietary cholesterol and triglycerides in the regulation of hepatic low density lipoprotein transport in the hamster. *J. Clin. Invest.* **1988**, *81*, 300-309.
- Szajdek, A. and Borowska, E. J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum Nutr.* **2008**, *63*, 147–156.
- Tannock, L. R. Advances in the management of hyperlipidemia induced

atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* **2008**, *6*, 369–383.

Tordjman, J.; Khazen, W.; Antoine, B.; Chauvet, G.; Quette, J.; Fouque, F.; Beale, E. G.; Benelli, C.; Forest, C. Regulation of glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase by fatty acids, retinoic acids and thiazolidinediones: potential relevance to type 2 diabetes. *Biochimie* **2003**, *85*, 1213-1218.

Tzang, B. S.; Yang, S. F.; Fu, S. G.; Yang, H. C.; Sun, H. L.; Chen, Y. C. Effects of flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1450–1455.

VanderLaan, P. A.; Reardon, C. A.; Thisted, R. A.; Getz, G. S. VLDL best predicts aortic root atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*(3), 376-385.

Vincent, A. M.; Hinder, L. M.; Pop-Busui, R.; Feldman, E. L. Hyperlipidemia: a new therapeutic target for diabetic neuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2009**, *14*, 257-267.

Vu-Dac, N.; Chopin-Delannoy, S.; Gervois, P.; Bonnelye, E.; Martin, G.; Fruchart, J. C.; Laudet, V.; Staels, B. The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J.*

Biol. Chem. **1998**, 273, 25713-25720.

Wakil, S. J.; Stoops, J. K.; Joshi, V. C. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, 52, 537-579.

Wang, X.; Sato, R.; Brown, M. S.; Hua, X.; Goldstein, J. L., SREBP-1, a membrane bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* **1994**, 77, 53-62.

Watts, G. F., Barrett, P. H.; Ji, J.; Serone, A. P.; Chan, D. C.; Croft, K. D.;
Loehrer, F.; Johnson, A. G. Differential regulation of lipoprotein kinetics by atorvastatin and fenofibrate in subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes* **2003**, 52, 803–811.

Yang, T.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. Overexpression of membrane domain of SCAP prevents sterols from inhibiting SCAP.SREBP exit from endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 29881–29886.

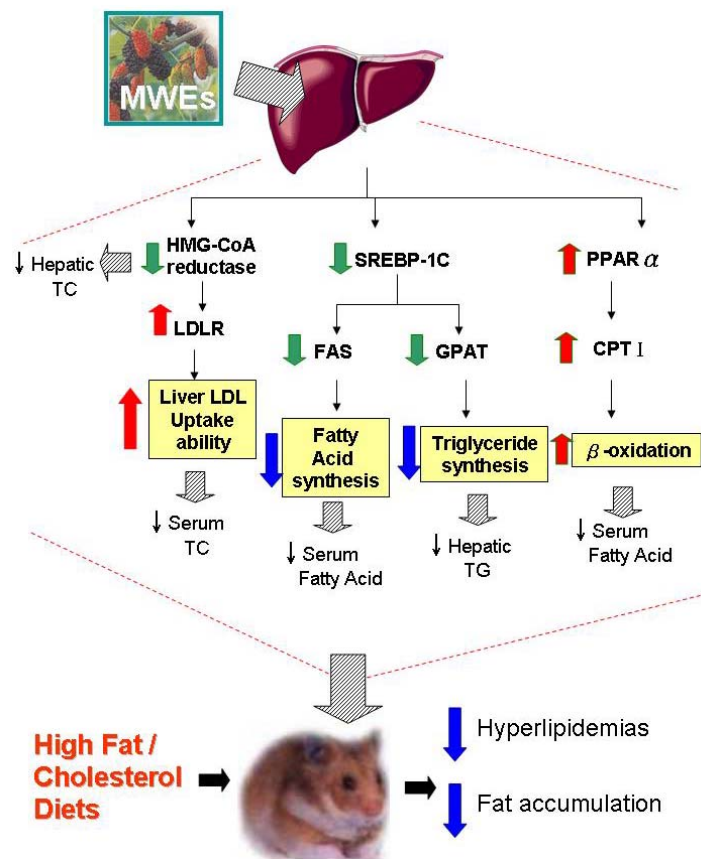
Yokoyama, C.; Wang, X.; Briggs, M. R.; Admon, A.; Wu, J.; Hua, X.; Goldstein, J.L.; Brown, M. S. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* **1993**, 75, 187–197.

Zechner, R.; Strauss, J. G.; Haemmerle, G.; Lass, A.; Zimmermann, R.
Lipolysis: pathway under construction. *Curr. Opin. Lipidol.* **2005**, 16(3),

五、計畫成果自評：(是否達成預定成效，如進度落後請說明原因)

1.本計畫成果證明桑椹水萃取物具有抑制肝臟脂肪堆積、減少脂肪肝之作用，對於高脂肪食物誘導之脂肪肝傷害有護肝之作用。

2.已初步完成其作用之機轉(如下圖)



MWEs 在高油脂高膽固醇飼食倉鼠之降血脂與減少脂質沉積的可能機制。

3.利用油酸在肝細胞之堆積作用，證實功能性成份為桑椹多酚及桑椹花青素，本實驗建立了以油酸(oleic acid, OA)為誘導劑的細胞模式。油酸為C18:1單元不飽和脂肪酸，是血液中含有量最多的脂肪酸，也是所有

最容易與甘油酯化成三酸甘油脂 (triglyceride) 堆積的脂肪酸。

4. AMP-activated protein kinase (AMPK) 之主要功能為一個感應細胞內能量代謝平衡的關鍵調控者。磷酸化活化的 AMPK 可經由許多酵素之磷酸化調控肝中脂質及葡萄糖恆定，如 ACC1，使脂質合成下降，ACC2，使脂質氧化上升，HMGCoR 使膽固醇合成降低，GPAT，使油脂合成下降。本實驗證實桑椹具有抑制並降低肝臟脂肪堆積之功效，經由實驗中 *in vitro* 與 *in vivo* 結果雙雙顯示降低脂質合成及促進脂質代謝這些蛋白上游調控因子為 AMPK。

5. 根據以上結果，桑椹萃取物確實可以透過 AMPK 傳遞路徑調控肝臟脂肪代謝，在未來可能可以做為預防或治療代謝症候群及肝臟脂質堆積之天然物。

6. 進一步的動物試驗也証實桑椹萃取物也降低器官週邊脂肪組織的重量但不影響其生理功能，顯示具有不易形成體脂肪之功能。

7. 本研究成果已完成桑椹功能性成份(多酚)分析，及餵食高脂糧肝堆積之護肝,調節血脂及不易形成體脂肪之作用，將進一步產學合作發展為健康食品

8. 目前發表之成果

Li-Kaung Liu, Fen-Pi Chou, Yi-Chen Chen , Charny-Cherng Chyau, Hsieh-Hsun Ho, and **Chau-Jong Wang**, 2009. Effect of Mulberry extracts on lipid hemeostasis *in vitro* and *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 7605-7611.

Chiung-Huei Peng, Li-Kaung Liu, Chao-Ming Chuang, Charng-Cherng Chyau, Chieng-Ning Huang, **and Chau-Jong Wang**, 2011. Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 2663-2671.

Ting-Tsz Ou, Man-Jung Hsu, Kuei-Chuan Chan, Chieng-Ning Huang, Hsieh- Hsun Ho, **and Chau-Jong Wang** , 2011. Mulberry inhibits oleic acid-induced lipid accumulation via reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance. *J. Sci. Food Agric., In Press.*

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/10/24

<p>國科會補助計畫</p>	<p>計畫名稱：桑椹保健食品之研究開發子計畫一：延緩脂肪肝護肝及不易形成體脂肪之研究(2/2)</p>		
<p>研發成果名稱</p>	<p>(中文) 桑椹保健食品之延緩脂肪肝護肝及不易形成體脂肪 (英文)</p>		
<p>成果歸屬機構</p>	<p>中山醫學大學</p>	<p>發明人 (創作人)</p>	<p>王朝鐘, 劉力綱, 何協勳</p>
<p>技術說明</p>	<p>(中文) 桑椹 (mulberry) 是一種天然植物桑科落葉喬木”桑”(Morus alba L.) 的果實，具有豐富的色素成分，而許多色素的成分已被證實是一種很好的抗氧化物質，如多酚、酚酸及花青素，有開發為保健食品的潛力。過去幾年本實驗室已針對桑椹萃取物 (MWE) 以及多酚萃取物 (MPE) 進行研究，已指出桑椹的粗萃取物具有極佳的抗氧化能力，並可以抑制LDL的氧化；在動物實驗方面已經證實桑椹萃取物能抑制動脈粥狀硬化發生、降低血脂及排除肝脂肪堆積；細胞方面更觀察到可有效抑制平滑肌細胞的增生與移動。因此，我們將研究開發為延緩脂肪肝、護肝及不易形成體脂肪之健康食品。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本研究室已發表桑椹降低血脂，抗氧化，抑制癌細胞轉移，減少脂肪肝，抗肥胖及抑制動脈粥狀硬化之作用 (Food chemistry, 91, 601, 2005 ; Journal of food science, 73, H113, 2008 ; Journal of agricultural and food chemistry, 59, 2663, 2011 ; Journal of agricultural and food chemistry, 57, 7605, 2009 ; Journal of agricultural and food chemistry, 56, 9286, 2008)，並陸續將發表多篇其醫學功能的國際期刊。 2. 目前已確定證實符合衛生署公佈“不易形成體脂肪”功能之評估，包括 減體重；降低肝臟脂肪減少脂肪肝及肝功能指數；減少內臟周邊脂肪；降低血脂肪，游離脂肪酸及血中酮體；不影響生理功能。 3. 可將桑椹萃取物製備為濃縮液或錠片。 4. 申請健康食品項目為：不易形成體脂肪；降低脂肪肝(餵食高脂糧食物之脂肪肝護肝作用, J. Agric. Fd. Chem., 57, 7605, 2009.)；調節血脂。 5. 可與農牧場輔導契作桑椹材料。 <p>(英文) Mulberry, the fruit of Morus alba L, is rich in pigment components. The components, such as polyphenol, phenolic acid and anthocyanin, had been demonstrated to possess antioxidative effects previously. They have the potential to be applied in healthy foods. Our present study was focused on two aspects of the hypolipidemic effects of mulberry water extracts (MWE) and mulberry polyphenol extracts (MPE). First, human hepatocarcinoma HepG2 cells were applied to observe that MWE increased the clearance ability of LDL. Secondly, the anti-atherosclerosis effects, and the attenuation of hypercholesterolemia and lipid accumulation in liver in hamsters by supplementing the mulberry extracts into diets were revealed. We also have observed the proliferation and migration of smooth muscle cells were inhibited effectively after the treatment of the mulberry extracts.</p>		
<p>產業別</p>	<p>農業</p>		
<p>技術/產品應用範圍</p>	<p>申請健康食品項目為：不易形成體脂肪；降低脂肪肝(餵食高脂糧食物之脂肪肝護肝作用, J. Agric. Fd. Chem., 57, 7605, 2009.)；調節血脂。</p>		
<p>技術移轉可行性及預期效益</p>	<p>桑椹為國人所熟知的植物，但目前市場上僅有桑椹飲料、桑椹酒、桑椹醋、桑椹果醬及桑椹美容等產品，卻無富含珍貴完整營養成份且具保健效果的桑椹精華液，具多重功，透過本團隊研究及推廣，相信其迴響跟其他保健食品相比，肯定會熱烈許多，並增進桑椹的加成價值。可將桑椹萃取物製備為濃縮液或錠片</p>		

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。

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：王朝鐘		計畫編號：99-2321-B-040-001-					
計畫名稱：桑椹保健食品之研究開發--桑椹保健食品之研究開發子計劃一：延緩脂肪肝護肝及不易形成體脂肪之研究(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	3	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	2	0	100%	件	
		權利金	10	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (本國籍)	碩士生	2	2	100%	人次	
		博士生	2	2	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	4	6	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (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>1. 97年保健食品學會傑出學術研究暨技術開發獎 2. 100年教育部彈薪獎 3. 98年白蘭氏優秀論文獎 4. 生醫年會優季論文獎</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）

1. 本研究室已發表桑椹降低血脂，抗氧化，抑制癌細胞轉移，減少脂肪肝，抗肥胖及抑制動脈粥狀硬化之作用

(Food chemistry, 91, 601, 2005 ; Journal of food science, 73, H113, 2008 ; Journal of agricultural and food chemistry, 59, 2663, 2011 ; Journal of agricultural and food chemistry, 57, 7605, 2009 ; Journal of agricultural and food chemistry, 56, 9286, 2008), 並陸續將發表多篇其醫學功能的國際期刊。

2. 目前已確定證實符合衛生署公佈“不易形成體脂肪”功能之評估, 包括(1)體重;(2)低肝臟脂肪減少脂肪肝及肝功能指數;(3)少內臟 周邊脂肪;(4)低血脂肪, 游離脂肪酸及血中酮體;(5)影響生理功能。

3. 可將桑椹萃取物製備為濃縮液或錠片。

4. 申請健康食品項目為:(1)易形成體脂肪;(2)低脂肪肝(餵食高脂糧食物之脂肪肝護肝作用, J. Agric. Fd. Chem., 57, 7605, 2009.); (3)節血脂。

5. 可與農牧場輔導契作桑椹材料。