

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

桑根抑制發炎和氧化壓力所參與訊息路徑之活化及減緩肝癌形成與惡化之研究

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 106-2320-B-040-027-
執行期間：106年08月01日至107年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學應用化學系(含碩士班)

計畫主持人：曾翠華

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：郭建庭
大專生-兼任助理：施懿展
大專生-兼任助理：邱怡瑄

中華民國 107 年 10 月 30 日

中文摘要：肝癌是國人死亡之重大病因，肝癌的形成常經過慢性發炎-肝纖維化-肝硬化過程，其生長失控進而產生轉移特性是其造成致命的主要因素。學者們研究發現減少肝臟慢性發炎及肝纖維化可減少肝癌的發生與惡化。島桑(*Morus australis*)是台灣常見落葉喬木，葉子是蠶的主要食物，果實是果醬或飲料添加物，栽種者7-8年會翻種新株，舊根枝常燃燒做為肥料，本研究以桑根為原料，進行酒精微波萃取得萃取物：MRE，發現其含有豐富多酚等抗氧化成分，成功建立HPLC系統分析其主成份，並分別以老鼠肝纖維細胞株 (HSC-T6)，RAW 264.7 老鼠巨噬細胞探討桑根酒精萃取物抗纖維化與抗發炎潛力，結果發現無毒劑量MRE可降低HSC-T6細胞纖維化形態的改變與移動生長，並減少纖維化蛋白 α SMA及發炎因子 TGF- β 1的表現；另外MRE可降低內毒素誘發RAW 264.7 老鼠巨噬細胞PGE2及 NO的釋放以及 COX2, iNOS的表現，以上證明桑根酒精萃取物抗纖維化與抗發炎作用。另外透過四氯化碳誘導肝損傷，也發現給予老鼠口服MRE可降低四氯化碳所誘導肝損傷，而這些作用與抗氧化與抗發炎有相關性。最後以TGF- β 1誘導良性肝癌細胞HepG2的移動與轉移等惡化特性，發現預處理MRE可降低這些惡化現象，其主要與抑制TGF- β 1誘導表皮-間質轉移 (EMT)特性有關。由以上研究發現桑根具有開發為降低肝纖維化與抗肝發炎以及降低肝癌惡化之保健物質。另由單成分的活性分析推測MRE的保健活性與其含有桑白皮素及氧化白藜蘆醇有關。

中文關鍵詞：桑根、抗纖維、抗發炎、肝癌惡化

英文摘要：Hepatocellular carcinoma (HCC) is a major cause of death in Taiwan, and its prognosis and survival rate are poor. Therefore, the prevention of HCC has received much attention. In recent years, although B-type hepatitis vaccination has been effective in the prevention of liver cancer, other strategies need to be developed. The formation of liver cancer often occurs after chronic inflammation - fibrosis - cirrhosis of the liver, which is growth out of control and then metastatic causing fatal. Taiwan mulberry (*Morus australis*) is a common deciduous tree in Taiwan, of which the leaves are the main food of silkworm, and the fruit is jam or beverage additives. After planted for 7-8 years, *Morus australis* will be replanted and old roots and stem often burn as fertilizer. In the present study, we found that root ethanol extract of *Morus australis* (MRE) showed antioxidant and anti-inflammatory properties. In addition, using activated rat hepatic stellate cells (HSC-T6) as study material, we found that MRE inhibited the active cytoskeleton and growth of HSC-T6 as well as decreased the expression of TGF- β 1 and α -SMA. It implicated that MRE may block the fibrosis of hepatic stellate cells. Then, we used the inflammatory model by LPS initiated RAW 264.7 cells. It showed MRE exhibited antiinflammatory properties such as decrease the release of NO and PGE2 in RAW 264.7 cells. Furthermore, in animal

study, MRE inhibited CCl₄-induced hepatotoxicity in mice, which associated antioxidant and anti-inflammatory properties of MRE. Finally, we evaluated the effects of MRE on the migration and invasion induced by TGF- β 1 in HepG2. It demonstrated that MRE decreased TGF- β 1-induced hepatoma progression involving blocking EMT. Therefore this study demonstrated that MRE may play a role in the prevention of liver cancer progression. From the cell culture analysis of pure components, it showed that oxyresveratrol and morusin may play an important role in the bioactivity of MRE.

英文關鍵詞：Morus root, anti-fibrosis, anti-inflammation, anti-hepatoma progression

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

桑根抑制發炎和氧化壓力所參與訊息路徑之活化及減緩肝 癌形成與惡化之研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 106-2320-B-040-027-

執行期間：106年8月1日至107年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學

計畫主持人：曾翠華

計畫參與人員：郭建庭 邱怡瑄 施懿展 王詩穎

中華民國 107 年 7 月 31 日

中文摘要 (關鍵詞: 桑根、抗纖維、抗發炎、肝癌惡化)

肝癌是國人死亡之重大病因, 肝癌的形成常經過慢性發炎- 肝纖維化- 肝硬化過程, 其生長失控進而產生轉移特性是其造成致命的主要因素。學者們研究發現減少肝臟慢性發炎及肝纖維化可減少肝癌的發生與惡化。島桑(*Morus australis*)是台灣常見落葉喬木, 葉子是蠶的主要食物, 果實是果醬或飲料添加物, 栽種者 7-8 年會翻種新株, 舊根枝常燃燒做為肥料, 本研究以桑根為原料, 進行酒精微波萃取得萃取物: MRE, 發現其含有豐富多酚等抗氧化成分, 成功建立 HPLC 系統分析其主要成份, 並分別以老鼠肝纖維細胞株 (HSC-T6), RAW 264.7 老鼠巨噬細胞探討桑根酒精萃取物抗纖維化與抗發炎潛力, 結果發現無毒劑量 MRE 可降低 HSC-T6 細胞纖維化形態的改變與移動生長, 並減少纖維化蛋白 α SMA 及發炎因子 TGF- β 1 的表現; 另外 MRE 可降低內毒素誘發 RAW 264.7 老鼠巨噬細胞 PGE2 及 NO 的釋放以及 COX2, iNOS 的表現, 以上證明桑根酒精萃取物抗纖維化與抗發炎作用。另外透過四氯化碳誘導肝損傷, 也發現給予老鼠口服 MRE 可降低四氯化碳所誘導肝損傷, 而這些作用與抗氧化與抗發炎有相關性。最後以 TGF- β 1 誘導良性肝癌細胞 HepG2 的移動與轉移等惡化特性, 發現預處理 MRE 可降低這些惡化現象, 其主要與抑制 TGF- β 1 誘導表皮-間質轉移(EMT) 特性有關。由以上研究發現桑根具有開發為降低肝纖維化與抗肝發炎以及降低肝癌惡化之保健物質。另由單成分的活性分析推測 MRE 的保健活性與其含有桑白皮素及氧化白藜蘆醇有關。

英文摘要 (Key words: Morus root, anti-fibrosis, anti-inflammation, anti-hepatoma progression)

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a major cause of death in Taiwan, and its prognosis and survival rate are poor. Therefore, the prevention of HCC has received much attention. In recent years, although B-type hepatitis vaccination has been effective in the prevention of liver cancer, other strategies need to be developed. The formation of liver cancer often occurs after chronic inflammation - fibrosis - cirrhosis of the liver, which is growth out of control and then metastatic causing fatal. Taiwan mulberry (*Morus australis*) is a common deciduous tree in Taiwan, of which the leaves are the main food of silkworm, and the fruit is jam or beverage additives. After planted for 7-8 years, *Morus australis* will be replanted and old roots and stem often burn as fertilizer. In the present study, we found that root ethanol extract of *Morus australis* (MRE) showed antioxidant and anti-inflammatory properties. In addition, using activated rat hepatic stellate cells (HSC-T6) as study material, we found that MRE inhibited the active cytoskeleton and growth of HSC-T6 as well as decreased the expression of TGF- β 1 and α -SMA. It implicated that MRE may block the fibrosis of hepatic stellate cells. Then, we used the inflammatory model by LPS initiated RAW 264.7 cells. It showed MRE exhibited antiinflammatory properties such as decrease the release of NO and PGE2 in RAW 264.7 cells. Furthermore, in animal study, MRE inhibited CCl₄-induced hepatotoxicity in mice, which associated antioxidant and anti-inflammatory properties of MRE. Finally, we evaluated the effects of MRE on the migration and invasion induced by TGF- β 1 in HepG2. It demonstrated that MRE decreased TGF- β 1-induced hepatoma progression involving blocking EMT. Therefore this study demonstrated that MRE may play a role in the prevention of liver cancer progression. From the cell culture analysis of pure components, it showed that oxyresveratrol and morusin may play an important role in the bioactivity of MRE.

前言

肝纖維化是慢性肝病發展到肝硬化甚至是肝癌所必經之階段，由於肝臟具有很強的代償功能，現今多數研究認為肝纖維化尚有逆轉至正常的可能，而肝硬化則否，往往是致命的，又病毒感染宿主後會在病患的肝臟細胞增殖，身體免疫系統對這些感染細胞的反應會造成肝臟的發炎和破壞。過去研究發現造成肝細胞癌和感染肝炎病毒有很大的相關性。又愈來愈多研究證據顯示，身體內在因素如慢性發炎或環境外在因素攝入造成肝臟承受大量 oxidative stress, 傷害肝細胞, 破壞粒線體及內質網膜的完整性, 一些研究發現 ROS 會造成肝細胞凋亡及活化肝細胞巨噬細胞 (kupffer cell) 及星狀細胞 (hepatic stellate cell) 促其產生 PDGFR, TGF- β 1, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) 促進肝纖維化 最後肝硬化進而轉為肝癌，因此減少氧化性肝損傷、肝發炎及降低肝纖維化，或可延緩肝硬化及惡性肝癌的發生，另外發炎因子也被發現有促進癌惡化的角色。

轉化生長因數- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是一個多功能蛋白質，可以影響多種細胞的生長，分化、凋亡及免疫調節等功能。轉化生長因子- β 包括三個亞型，轉化生長因子- β 1，轉化生長因子- β 2 和轉化生長因子- β 3。TGF- β 能使正常的成纖維細胞的表現型態產生轉化，即在表皮生長因子 (EGF) 同時存在的條件下，也能改變成纖維細胞生長特性。轉化生長因子 (TGF- β) 會與細胞表面的受體 (TGFRI 及 RII) 結合並成為二聚體 (heterodimer)，例如由轉化生長因子受體 RI 或 RII 與其各種亞型的轉化生長因子 (TGF- β 1、 β 2 和 β 3) 結合並在各種細胞類型發揮不同的效果。尤其是在肝纖維化的過程中，轉化生長因子會磷酸化細胞內的蛋白 Smad2 和 Smad3 並使下游的細胞內的信號活化。在肝纖維化的過程中，肝細胞與庫氏細胞會分泌 TGF- β 1 而造成星狀細胞活化，藉由 TGF- β 1 的作用顯著地增加星狀細胞間質的產生，因此 TGF- β 1 對於星狀細胞活化扮演著很重要的角色。當肝臟纖維化時，TGF- β 1 也會增加胞外基質的合成、抑制膠原蛋白酵素 (collagenase) 的表現和活化胞外基質分解酵素抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)，促使胞外基質不斷的累積。另外 TGF- β 在肝腫瘤發展過程被認為聚有雙重角色，在肝癌細胞初期發展時 TGF- β 具有抑制生長與促進凋亡的作用，然而過了這階段 TGF- β 卻有促進表皮-間質轉移 進而誘發癌細胞移動與轉移，因此抑制 TGF- β 產生及抑制其活化的訊息路徑的物質則具有保肝之作用。

烏桑學名: *Morus australis* Poir 別名: 桑樹、桑材樹、蠶仔樹、鹽桑仔、蠶仔葉樹，屬於桑科桑屬的植物，主要來自東南亞以及台灣，同屬的植物還有 *Morus alba* (東亞)、*Morus insignis* (南美洲)、*Morus nigra* (西南亞洲)、*Morus rubra* (東北美洲) (附表. 4)，*Morus australis* 外表特徵：落葉性大灌木或小喬木，小枝無毛，但滿布通氣性的黃褐色皮孔；托葉細小，早落性；葉卵形或廣卵形，膜質，銳鋸齒緣，有時分裂，有時不分裂。花雌雄異株，雄花序下垂，葇荑狀，長約 1-2 公分，雄花花被 4 片，雄蕊 4 枚；雌花序橢圓球形、下垂或斜上，花被倒卵形，花柱長而有毛。

過去傳統療效：果食潤腸通便，能治療發燒。樹皮能驅蟲與當瀉藥也能治療牙齦炎。葉子的湯劑被用作治療聲帶的發炎。枝葉煎服可以解熱、消炎、水腫、吐血骨折、毒蛇咬傷、抗菌功能。根則能驅蟲、瀉肺火及利小便。*Morus australis* 主成分包含 Australone A、triterpenoid 3 β -[(m-methoxybenzoyl) oxy] urs-12-en-28-oic acid、morusin、Oxyresveratrol、Kwanon C、betunilic acid、 β -amyrin, quercetin、ursolic acid、Mulbsanggenols N etc. *Morus* 屬的近年來研究：*Morus alba* 能抑制骨質疏鬆、降糖、降血脂、降血壓、抗氧化、抗炎、抗細菌、抗腫瘤、抑制脂肪細胞的增生與分化。*Morus australis* 近年來的研究如下：

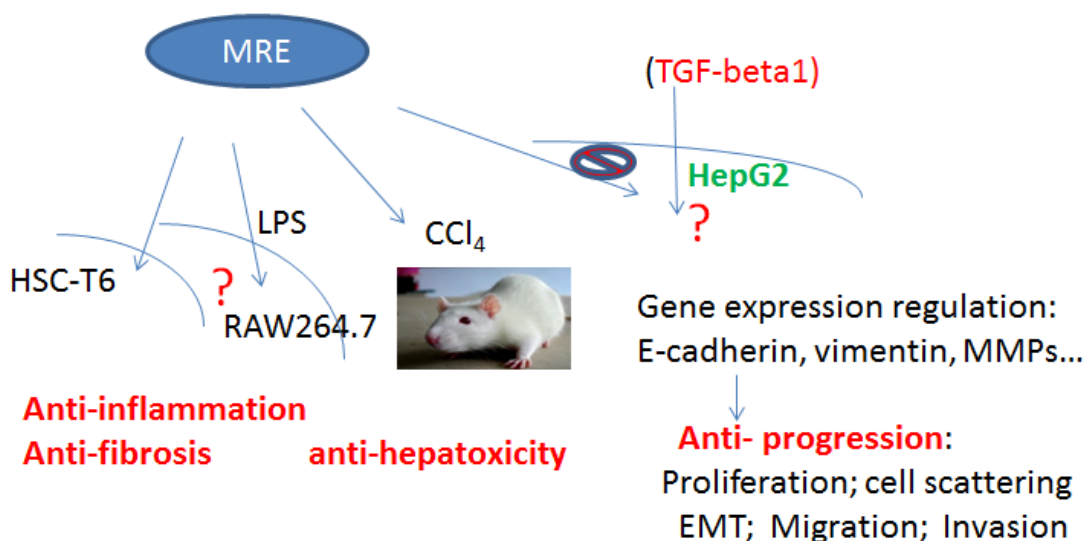
果實：在過去文獻中有以 HPLC 分析發現含有多酚類成分。近年來在大鼠模型中有研究發現具有抗氧化、抗血脂的作用。也有實驗證實能夠抗氧化延緩衰老。葉子：在過去文獻中以 HPLC 及 IT-TOF MS system 分析多酚類。且因含有多酚類證明可促進細胞增生延緩衰老 (Zheng *et al.*, 2014)。

根、枝：在過去文獻中在大鼠糖尿病的模型具有降血糖及脂質過氧化的功用及美白活性外，並沒有保肝及抗癌活性的報導，值得開發。

十多年來在發展生物學上已清楚確認epithelial-mesenchymal transition (EMT)是一種表現型轉化，即將上皮細胞轉變型態成為相類似於纖維母細胞的間質細胞，此改變會失去上皮細胞原有的極性、細胞與細胞間的黏附性和結構上的改變，使得細胞產生轉移能力。因此，EMT透過極為複雜的分子改變導致細胞型態改變，針對腫瘤細胞轉移的特性，EMT是極佳的轉捩點。上皮細胞(epithelium)較常見到的細胞-細胞黏附分子為cadherin axis家族，此類蛋白廣泛分布並且會在細胞邊緣形成帶狀的特殊聚合複合體環繞於上皮細胞中間作為連結。間質細胞 (Mesenchyme) 會形成相對分布的組織網：間質細胞沒有完整的細胞層，通常表面上只存在一些蛋白如cadherin (此蛋白家族相類似於上皮細胞的cadherin axis家族)進而產生黏附作用。促使EMT的發展包含有錯亂的頂端-底端極性 (apicobasal polarity)、基底層的缺陷、細胞-細胞黏附性的結構與功能以及細胞型態的可塑性，通常細胞就會立即產生帶有轉移的能力。另外，EMT會更進一步地涉及到纖維增生(fibroproliferative)，如纖維化，造成慢性發炎，故EMT在各種類型的腫瘤形成中視為極重要的關鍵過程。

研究目的

評估桑根粗萃物是否具有抑制肝纖維化及抑制肝癌惡化之作用，並探討其作用之分子機制。



文獻探討

桑屬植物葉 果實 及 根皮 被認為具有保健及醫療之生物活性,然島桑(*Morus australis*)果實被發現具有降血之預防肥胖的保健作用,葉具有抗肝炎作用, (ref 1-6),而根萃取物除具有美白潛力可做為化妝品機能性成分外 (ref)研究較少。本研究發現島桑根有很強抗氧化作用可減少肝纖維化及抑制發炎因子誘導的肝癌細胞惡化,為台灣本土植物值得開發。

Ref:

1. Eo HJ et al. (2014) Anti-inflammatory and anti-cancer activity of mulberry (*Morus alba* L.) root bark. BMC Complementary & Alternative Medicine 14:200.

- Wei H, Zhu JJ, Liu XQ, Wang ZM, Yan LH (2016) Review of bioactive compounds from root barks of *Morus* plants (Sang-Bai-Pi) and their pharmacological effects. *Cogent chemistry* 2, 1212320.
- Horng CT, Liu ZH, Huang YT, Lee HJ, Wang CJ (2016) Extract from mulberry (*Morus australis*) leaf decelerate acetaminophen induced hepatic inflammation involving downregulation of myeloid differentiation factor 88(MyD88) signals. *Journal of Food and Drug Analysis* 1-10.
- Wu T, Tang Q, Gao Z, Yu Z, Song H, Zheng X, Chen W (2013) Bulberry and Mulberry Juice prevent obesity development in C57BL/6 mice. *PLoS ONE* 8(10): e77585.
- Wu T, Qi X, Liu Y, Guo J, Zhu R, Chen W, Zheng X, Yu T (2013) Dietary supplementation with purified mulberry (*Morus australis* Poir) anthocynins suppresses body weight gain in high-fat diet fed C57BL/6 mice. *Food Chemistry* 141, 482-487.
- Huang HP, Ou TT, Wang CJ (2014) Mulberry (Sang Shen Zi) and its bioactive compounds, the chemoprevention effects and molecular mechanisms *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 3, 7-15.
- Zheng ZP, Tan HY, Wang M (2012) Tyrosinase inhibition constituents from the roots of *Morus australis*. *Fitoterapia* 83, 1008-1013.
- Giannelli G, Koudelkova P, Dituri F, Mikulits W (2016) Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 65, 798-808.
- Wang B, Liu T, Wu JC, Luo SZ, Chen R, Lu LG, Xu MY (2018) STAT3 aggravates TGF- β 1-induced hepatic epithelial-to-mesenchymal transition and migration. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 98, 214-221.
- Lin XL, Liu M, Liu Y, Hu H, Pan Y, Zou W, Fan X, Hu X (2018) Transforming growth factor β 1 promotes migration and invasion in HepG2 cells: Epithelial-to-mesenchymal transition via JAK/STAT3 signaling. *International Journal of Molecular Medicine* 41, 129-136.
- Takaki A, Yamamoto K (2015) Control of oxidative stress in hepatocellular carcinoma: Helpful or harmful? *World Journal of Hepatology* 8, 968-979.
- Yu LX, Ling Y, Wang HY (2018) Role of nonresolving inflammation in hepatocellular carcinoma development and progression. *npj Precision Oncology* 2:6.

研究方法

(1) MRE 之製備與 HPLC 分析

我們先前研究發現微波萃取產率比浸泡萃取產率多約 3 倍,因此本研究以微波萃取進行,方法如下:利用粉碎機將島桑根打成碎狀,均勻混合後,分別取 100 克碎片,使用微波萃取方式以 1:10 比例和 95% 乙醇混合,條件設定 300 w , 20 min, 得到萃取液。收集所有萃取液並以減壓濃縮機濃縮,得到微波粗萃物 (MRE)。

HPLC分析:使用Column: C18 column (250 x 4.6 nm, 5 μ m; Thermo Fisher Scientific Inc.)管住進行檢測。取適量島桑根微波萃取物溶於甲醇。動相溶液使用A solution (acetonitrile), B solution (water) 梯度分析。Injection volume: 10 μ L, Detection: UV 270 nm, Flow rate: 1 ml/min.

(2) cell culture

(A) 採用由雄性大鼠的肝臟中分離出來的 HSC-T6 星狀細胞株。以含有 10% heat - inactivated fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL)、1% Penicillin – Streptomycin (PS: Gibco), pH 7.2 的 Dulbecco's Modified eagle medium (DMEM: Gibco) 培養液培養，並置於 37 °C 含 5% CO₂ 之恆溫培養箱內。在種入 1×10⁵ 個細胞於 10 公分培養盤中，48 小時後細胞長約培養盤八分滿，並進行繼代培養。

(B) 老鼠巨噬細胞株 RAW - 264.7 cell，培養於 10% Fetal bovine serum (FBS) 和 1% Penicillin-Streptomycin solution (PS) 的 RPMI-1640 培養基中，培養於 5% CO₂，37 °C 培養箱，細胞密度維持 2×10⁵-1×10⁶，視情況每 2-3 天更換培養基 1 次。

(C) 人類肝癌細胞株 Hepatomablastoma G2 (Hep-G2) 培養於含有 10% heat - inactivated fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL)、1% Penicillin – Streptomycin (PS: Gibco) 的 Modified eagle medium (MEM: Gibco)，培養箱設定 5% CO₂，37°C 恆溫的環境，細胞密度維持在 2×10⁵ ~ 1×10⁶ cells/ml，每週更換培養基 2.3 次。

(3) Western blotting analysis

將細胞培養後，利用 PBS 沖洗再用 trypsin-ETDA 把細胞打下，並且把細胞濃度調整為 2×10⁶ cell/mL，並取 1 mL 置 10-cm dish。等待細胞貼壁，藥物處理後，離心收集細胞並加入 1 mL RIPA buffer 含蛋白酶抑制劑(Na₃VO₄, Leupeptin, PMSF)，在 4 °C 震盪 30 分鐘，之後在 4 °C 下離心 12000 rpm、15 分鐘並取出上清液，保存於 -80 °C。蛋白質定量時利用 Better Bradford Protein Assay Kit 與蛋白質混合，置波長 595 nm 下吸收並去定量蛋白質。將定量完的蛋白質與 Loading dye 混合，在 95 °C 加熱 10 分鐘，並瞬間插入冰上。鑄膠時下層所含的配方是 (ddH₂O, 30 % Acrylamide mix, 1.5 M Tris-base (pH 8.8), 10 % SDS, 10 % APS, TEMED) 而上層配方為 (ddH₂O, 30 % Acrylamide mix, 1.5 M Tris-base (pH 6.8), 10 % SDS, 10 % APS, TEMED) 在上層膠鑄完後放入齒疏，凝固後加入 Marker 及 Sample，並加入 Running buffer (Tris-base, Glycine, SDS)，先用 70 V 跑過上層膠後在用 110 V 跑到底線後停止電壓。之後在將膠上的 Sample 轉漬 NC paper 上，利用夾板夾好後放入轉漬槽後利用 Transfer buffer (Tris-base, Glycine, Methanol) 電壓 100 V，2 小時。之後利用 Washing buffer (10×PBS, Tween-20, ddH₂O) 清洗後加入 Blocking buffer (脫脂牛奶) 在室溫下反應 1 小時，再用 Washing buffer 清洗，之後在加入一級抗體在 4 °C 下作用 overnight。之後再用 Washing buffer 清洗加入二級抗體作用一小時，再用 Washing buffer 清洗，之後利用冷光螢光分析儀觀察。

(4) 傷口癒合實驗 (Wound healing assay)

細胞培養後，以 PBS 沖洗，用 Tripsin-EDTA 將細胞打下後，將濃度調整成 5×10⁵ cells/ml 取 100ul 細胞液培養於 24-well 中的 cell culture inserts 內 (ibidi, Martinsried, Germany)。等待 24 小時細胞貼壁後，小心拔除 inserts，並以 PBS 沖洗兩次，再更換培養基，同時加入不同濃度的 Morusin，於 48 小時後以顯微鏡觀察拍照 (100x)。細胞之間隔區域面積是以 ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) 軟體進行分析。

(5) 細胞侵入與細胞移動分析 (Invasion and migration assay)

在癌細胞擴散轉移的過程中癌細胞是否可分解並穿透基底膜是一關鍵性的步驟。本實驗室是利用 48-well Boyden chamber 測定。將細胞培養貼壁後，利用 trypsin-EDTA 將細胞拍打下來，經由培養液沖洗幾次後，再將其細胞混合液離心，更換新培養液並將細胞濃度調整至 2×10⁵ cell/well，種到 10-cm dish 後進行培養。細胞貼壁後分別加入不同濃度的 MRE，處理 24 h。在 lower chamber 內注入 33 μl 含有 FBS 的 MEM，之後在 lower chamber 上放置一層 8 μl 孔徑大小的 polycarbonate filter，對角依序鎖上 upper chamber，再將 upper chamber 的每一 well coating 10 μl 的 Matrigel basement membrane matrix (40 μg/cm²)，放置通風口 2 h。之後將已處理不同 morusin

濃度的細胞培養液離心並換至 serum-free MEM，依不同 MRE 的濃度分別注入 upper chamber 的每一 well 內，培養至 5% CO₂、37 °C 的培養箱。最後，將 Chamber 的 membrane 拿出來並且利用甲醇固定 10 分鐘，之後利用 Giemsa 稀釋後染色 1 h，固定 membrane 於載玻片上，在以顯微鏡觀察並隨機取樣 5 個視野範圍做統計。然而，細胞移動分析則不需加入 Matrigel，其餘步驟相同。

(6) Animal study

(A) 本研究以四氯化碳誘導化學性肝病變，過去研究發現 四氯化碳誘導6週會造成鼠肝發炎損傷，四氯化碳誘導10週會產生纖維化。因此本研究待小鼠保定四天適應環境後，開始為期十週之實驗。四氯化碳於保定四天後開始灌食，除第一組外，其餘三組每週灌食20%四氯化碳兩次；而MRE (100 mg/kg; 300 mg/kg)則以腹腔注射方式給藥，每週一、三、五注射藥物。第10週小鼠犧牲後以心臟採血做血液生化值分析(如ALT, AST)。肝臟組織一部分做TBAR-assay及蛋白immunoblotting 分析包括抗氧化相關酵素(GCS,GSH-peroxidase, glutathione reductase, catalase)及纖維化指標蛋白 (collagen,alpha-SAM等),一部分做病理分析包括H & E stain 及 Masson's trichome stain (for fibrosis detection), 一部分做Immunohistochemistry for Tunnel assay, hydroxyl-proline assay.另外腎臟組織也做切片,以追蹤MRE是否有腎毒性。

(B) Pathological histology--Histochemistry and Immunohistochemistry: Histochemistry:將組織置於 10%福馬林中固定，之後再依次將組織脫水，其方法如下：先用 1×PBS於4°C 浸泡 30 分鐘，然後是在室溫中換 50% EtOH浸泡30分鐘，最後是在室溫中換 100% EtOH浸泡30分鐘，2次。待組織完全脫水後，接著將組織在室溫中用 100% xylene浸泡30分鐘，再將組織更換至1：1 xylene：paraffin，於60°C 浸泡45分鐘，然後再將組織浸泡於 paraffin，20分鐘3次，最後一次將組織於石蠟中定位，待石蠟冷卻凝固即可切片。然後做蘇木紫與伊紅 (Hematoxylin & Eosin) 染色，分析觀察皮下腫瘤組織有無 inflammation、細胞核有絲分裂與 necrosis病變及程度，在有給或沒有給 CAPE下觀察其是否有差異性。染色步驟如下：脫蠟後，以蘇木紫染液染 2-15分鐘。以水浸洗。以0.5%溶液分辨染色色度,約1~5秒。浸入氫水中 (1000 ml的水滴入氫水2滴)於流水中清洗，至少須15分鐘。以 0.5%伊紅染液染2分鐘。以 80%、90%、95% 酒精浸洗。依序移入絕對酒精、二甲苯 (1:1) 30秒，二甲苯-木餾油 (4:1), 二甲苯、(I)與二甲苯(II)中各半分鐘。以二甲苯使之透明。封片後以顯微鏡觀察。

(C) Immunohistochemistry:另外將組織切片 (5 μm thick)放入 xylene輕輕搖盪5分鐘，2次。放入 100%、75%、50% 和25% 酒精中，分別輕震5分鐘。放入PBS中輕振5分鐘，2次。以 5% rabbit serum蓋滿組織，30分鐘。洗掉 5% rabbit serum，加入1：100的 primary antibody於室溫下反應1小時。以 PBS沖洗，並在PBS中震盪2次，每次5分鐘。加入 second antibody (biotinylated horse anti-mouse IgG)於室溫下反應1小時。以 PBS沖洗，並在 PBS中震盪2次，每次5分鐘。加入 avidin-biotin peroxidase mixture於室溫下反應半小時。以PBS沖洗，並在PBS中震盪2次，每次5分鐘。加入受質 (3-amino-9-ethylcarbazole) solution，於避光狀態下呈色。以二次水沖洗，並在二次水中震盪2次，每次5分鐘。再以 Hematoxylin & Eosin染色 10分鐘。

(7) 免疫螢光染色 (F-actin immunofluorescence microscopy)

將細胞培養後，以trypsin-EDTA將細胞由培養皿打下，PBS沖洗後，以1000 rpm離心5分鐘，取沉澱細胞，加培養基調整細胞濃度至 2×10^2 /ml，將細胞培養於6-well plate 24小時，再以serum-free的DMEM starvation 24小時，以TGF-beta1及MRE處理後除去培養基，以PBS清洗3次，加入固

定液(3.7% formaldehyde)，於室溫下固定10分鐘，接著以0.1% TritonX-100反應1-3分鐘，以3% heat-inactivated BSA 於37°C下blocking 15分鐘，再以TRITC-phalloidin (500 ng/ml)染色1小時，以PBS沖洗3次後，以Fluorescence Microscopy觀察細胞骨架的變化。

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

結果與討論

1. 我們在 HPLC 分析中發現 oxyresveratrol 和 morusin 二大多酚主成份，二者皆有抗氧化、抗發炎及抑癌惡化的作用，可做為指標成份，其含量多寡會影響 MRE 之活性。另外我們發現桑根含有豐富 oxyresveratrol。(Figure 1)
2. 在活化星狀細胞株中，透過 F-actin 的螢光染色我們發現桑根萃取物(MRE)可影響 HSC-T6 細胞架構，而 TGF- β 1 處理 增強螢光強度 而 MRE 可降低螢光強度，顯示 MRE 可影響星狀細胞的活化。(Figure 2)
3. 在 wound healing assay 中 發現活化星狀細胞快速移動生長而加了 MRE 可抑制生長，有隨劑量增加抑制生長作用也跟著增強(Figure 3)。另外 MRE 也抑制活化星狀細胞 TGF- β 1 及 α -SMA 表現(Figure 4)。
4. 在巨噬細胞株中 MRE 可抑制內毒素 LPS 所誘發細胞 NO 及 PGE2 發炎相關因子的釋放且減少 LPS 所誘發細胞中 COX-2 及 iNOS 的表現(Figure 5; Figure 6)。顯示 MRE 具有抗發炎的作用。
5. 在動物實驗部分，我們以四氯化碳誘導肝損傷，結果發現處理四氯化碳的老鼠肝組織大量表現 COX2 及 iNOS 且有嚴重過氧化及發炎狀況，組織也有壞死狀況，而口服 MRE 則具有保護降低肝組織過氧化及發炎和損傷狀況(Figure 7; Figure 8)。
6. 最後我們以 TGF- β 1 誘發良性肝細胞(HepG2)惡化模式，探討 MRE 是否有保護作用，結果發現 TGF- β 1 可使 HepG2 細胞凝聚生長的特性改變，如 Figure 9 所示 TGF- β 1 處理後的 HepG2 細胞有發散生長的形態變化而預處理 MRE 30 分則抑制了這種改變，另外 TGF- β 1 處理後會促進 HepG2 細胞移動(migration) 及侵入(invasion) 而預處理 MRE 30 分則抑制了這種現象(Figure 10)。因此 MRE 具有抑制癌惡化之作用。
7. 過去文獻指出氧化壓力(oxidative stress)是慢性肝疾病轉為癌化重要因子，尤其是非酒精型肝硬化和 C 型肝炎感染的肝病變；又病毒感染造成肝臟慢性發炎都被認為與肝癌的發生或惡化有密切關係。近年來分子生物方面的探討發現氧化壓力或發炎因子所活化的訊息路徑往往調控細胞增生或形態的改變主導癌症的發生或惡化。因此抗氧化物質與抗發炎物質對某些肝癌的發生或惡化會有影響。
8. 本計劃結果顯示桑根萃取物具有抗氧化、抗發炎等特性 因此可減緩肝癌促進惡化微環境的形成，進而達到保健效果。

(結果圖表)

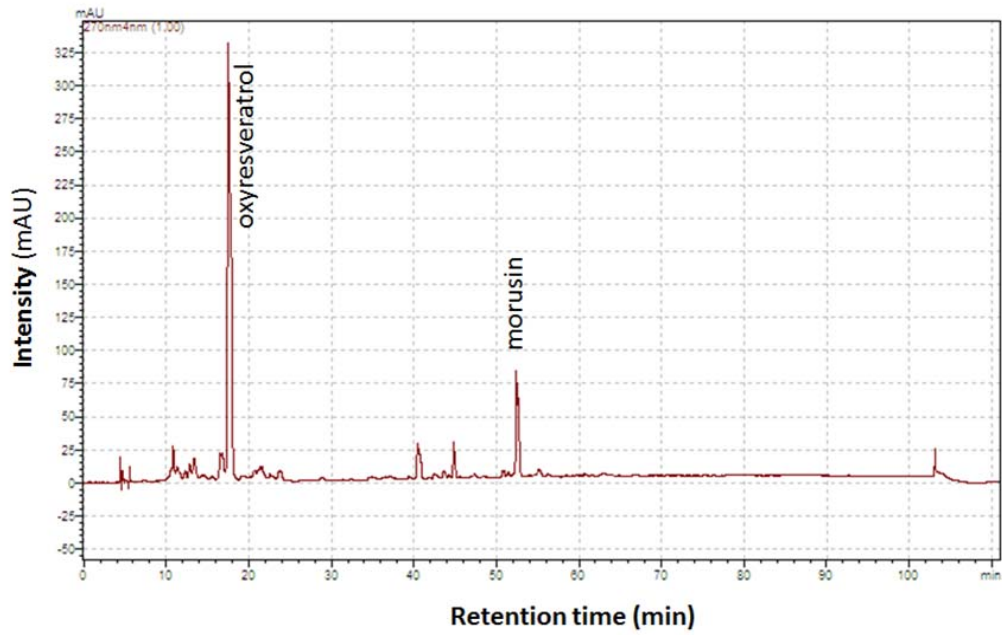


Figure 1. HPLC Chromatogram of *Morus australis Poir* : by 270 nm detection. Retention time : $t_R = 17.5$ min for Oxyresveratrol and $t_R = 52.5$ min for Morusin. The detection was at 270 nm and the gradient solvent system in RP-18 column.

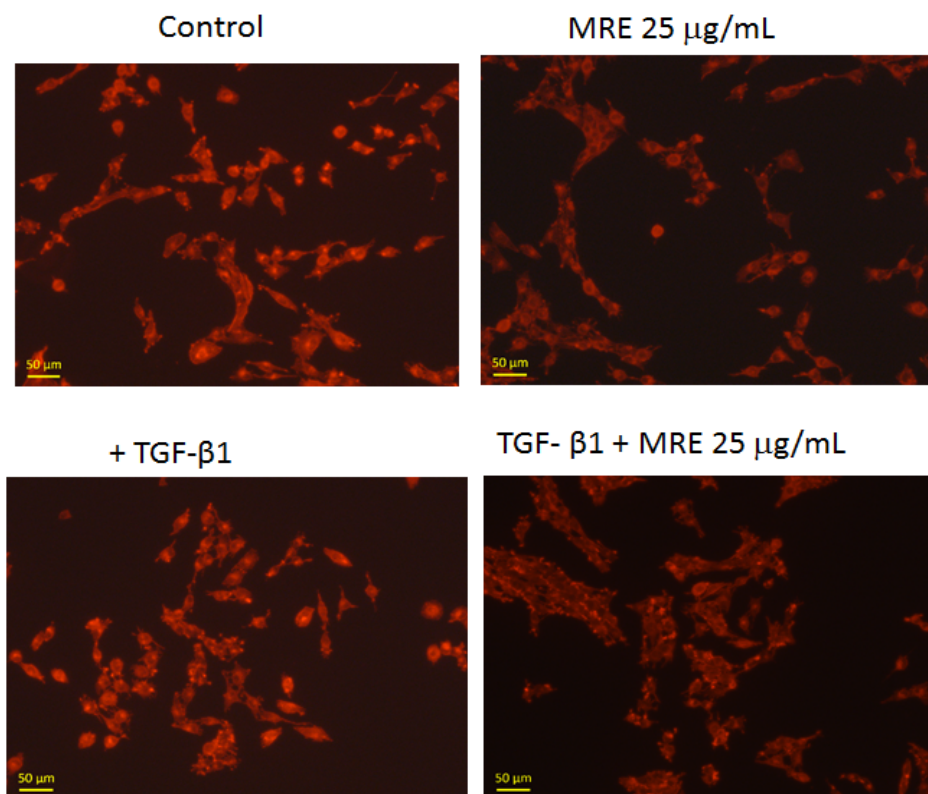


Figure 2 The effect of MRE on the cytoskeleton change of HSC-T6. The *F-actin* was stained with TRICT-phalloidin and was evaluated using a fluorescence microscope by microscopy (x200).

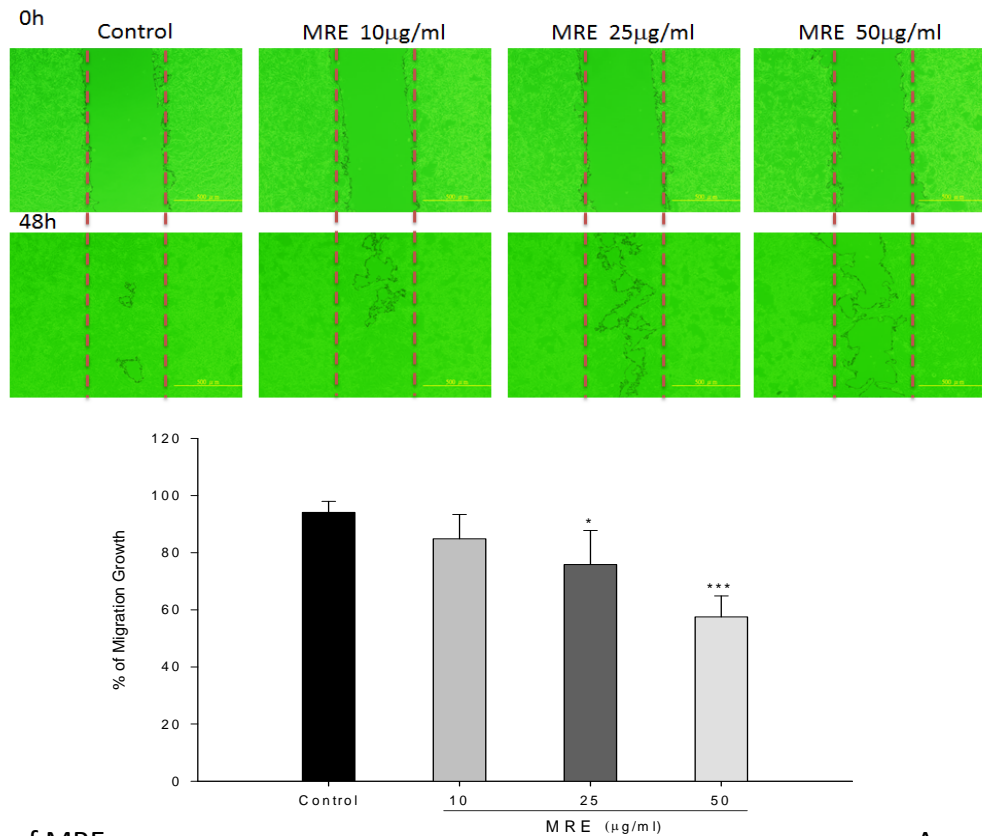


Figure 3. Effect of MRE on the motility and proliferation of HSC-T6 by wound healing Assay

(A) HSC-T6 cells were treated with MRE(10, 25 and 50mM) for 48h. Representative microphotographs showing the wound closure distance 48h post-wounding. Dashed lines indicate initial wounds. (B) Morphometrical analysis was performed to measure the remnant wounding area. The migration rate is shown as % of migration growth. All data are presented as mean \pm SD from three independent experiments. *, P < 0.005 vs. negative controls at the same time point.

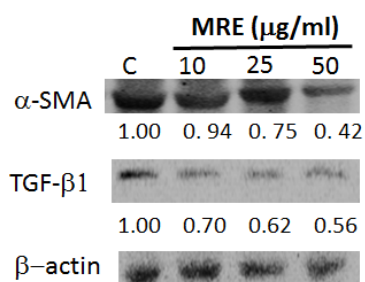


Figure 4. Effect of MRE on the expression of α -SMA and TGF- β 1 in HSC-T6 cells. Cells were treated with indicated concentration of MRE for 48 h. The cells were collected for protein extraction. Approximately 50 μ g of protein extract from each sample was subjected to SDS-PAGE, and immunoblotting was performed using anti- α -SMA and anti-TGF- β 1 antibody, and β -actin as internal control.

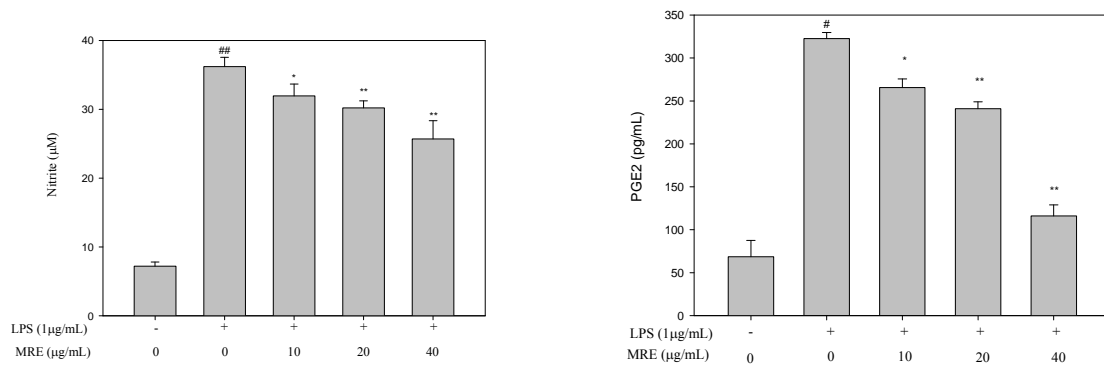


Figure 5 . Effects of MA on LPS – induced NO and PGE2 production in RAW-264.7 cell. Cells were incubated with 0-40 (µg/mL) of MA in the absence or presence of LPS (1 µg/mL) for 24 h. Data presented as mean ± S.D of three independent experiments. [#]*p*<0.05, ^{##}*p*<0.01 compared with control; ^{*}*p*<0.05, ^{**}*p*<0.01 compared with LPS treated alone.

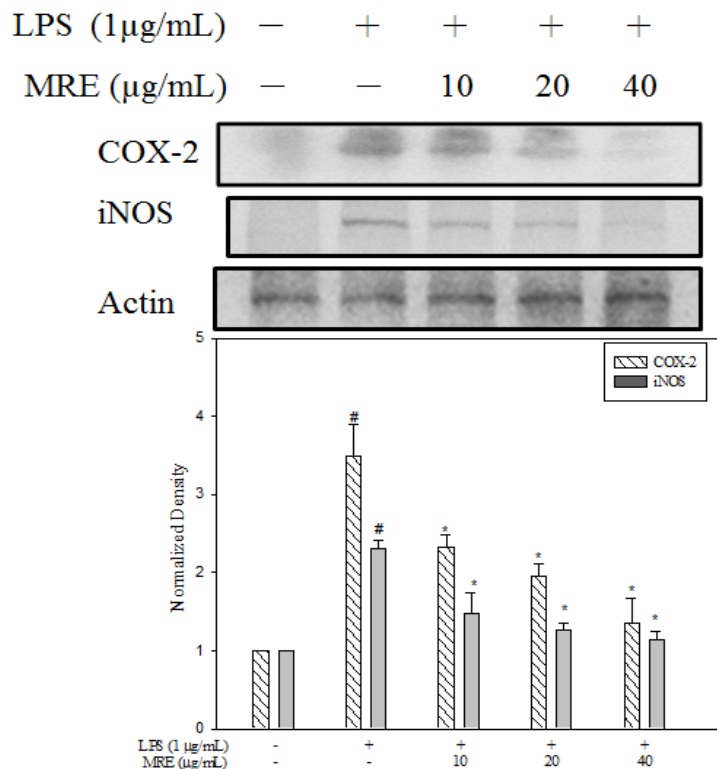


Figure 6. Effect of MRE on CCl₄ induced hepatic expression of COX-2 and iNOS in the mice. The representative immunoblotting was performed against anti-COX-2 and anti-iNOS antibodies, and actin as internal control. The average densitometric values was shown below as means ± SD. [#]*p*<0.05, compared with control (lane 1). ^{*}*p*<0.05, compared with CCl₄ treated alone.

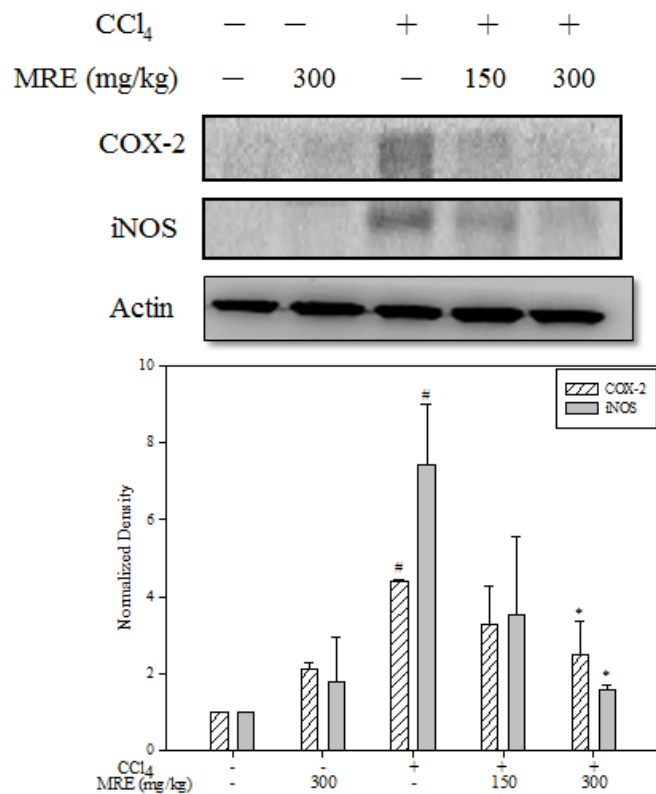


Figure 7. Effect of MRE on CCl₄ induced hepatic expression of COX-2 and iNOS in the mice. The representative immunoblotting was performed against anti-COX-2 and anti-iNOS antibodies, and actin as internal control. The average densitometric values was shown below as means \pm SD. # $p < 0.05$, compared with control (lane 1). * $p < 0.05$, compared with CCl₄ treated alone.

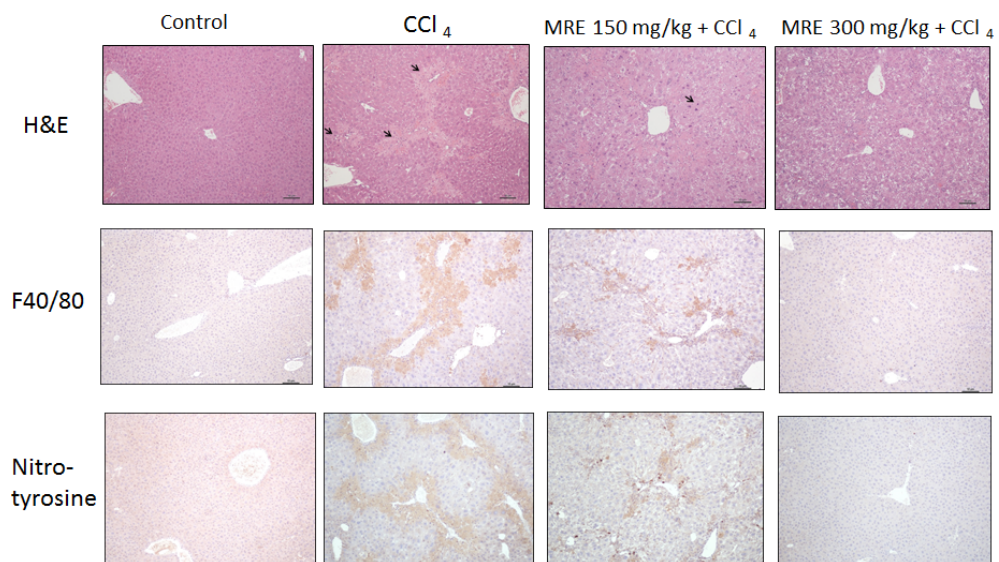


Figure 8. Effect of MRE on histologic changes and liver Inflammation and oxidative stress induced by CCl₄ in mice. The sections of mouse liver were stained with hematoxylin-eosin (original magnification 100x). Macrophage and oxidative stress were revealed as indicated by immunohistochemical staining of anti-F40/80 and anti-nitrotyrosine.

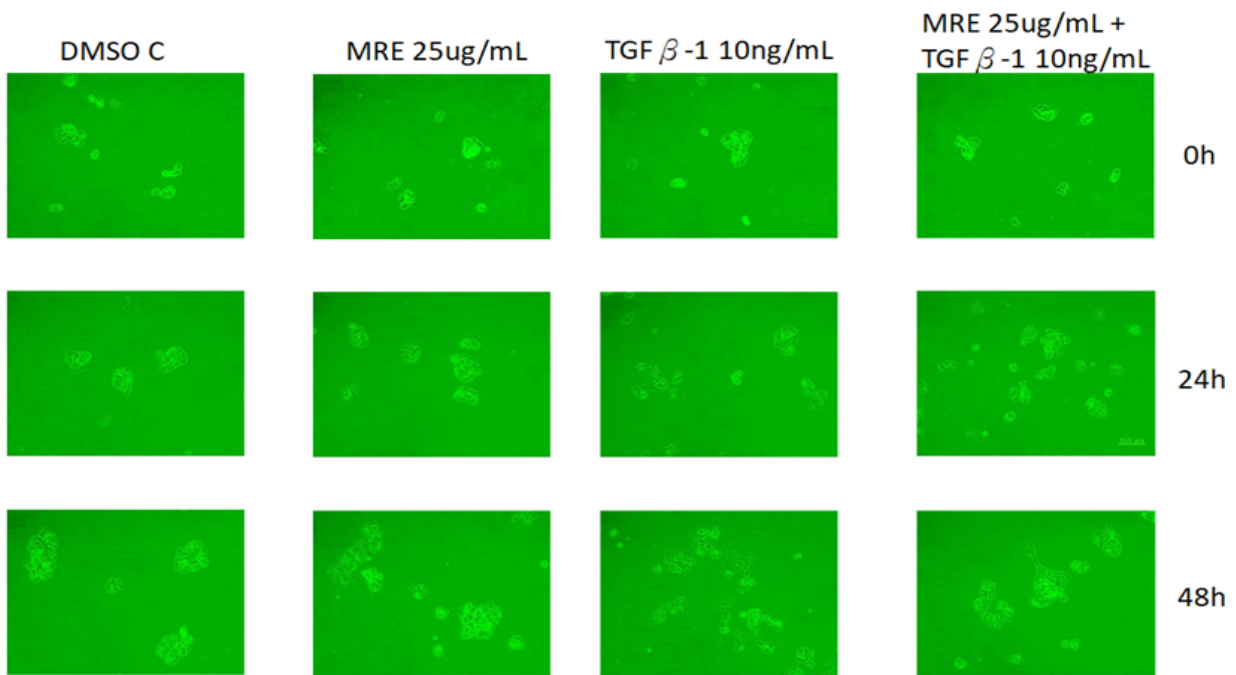


Figure 9. The effect of MRE on TGFβ-1 –induced cell scattering in HepG2 cells.

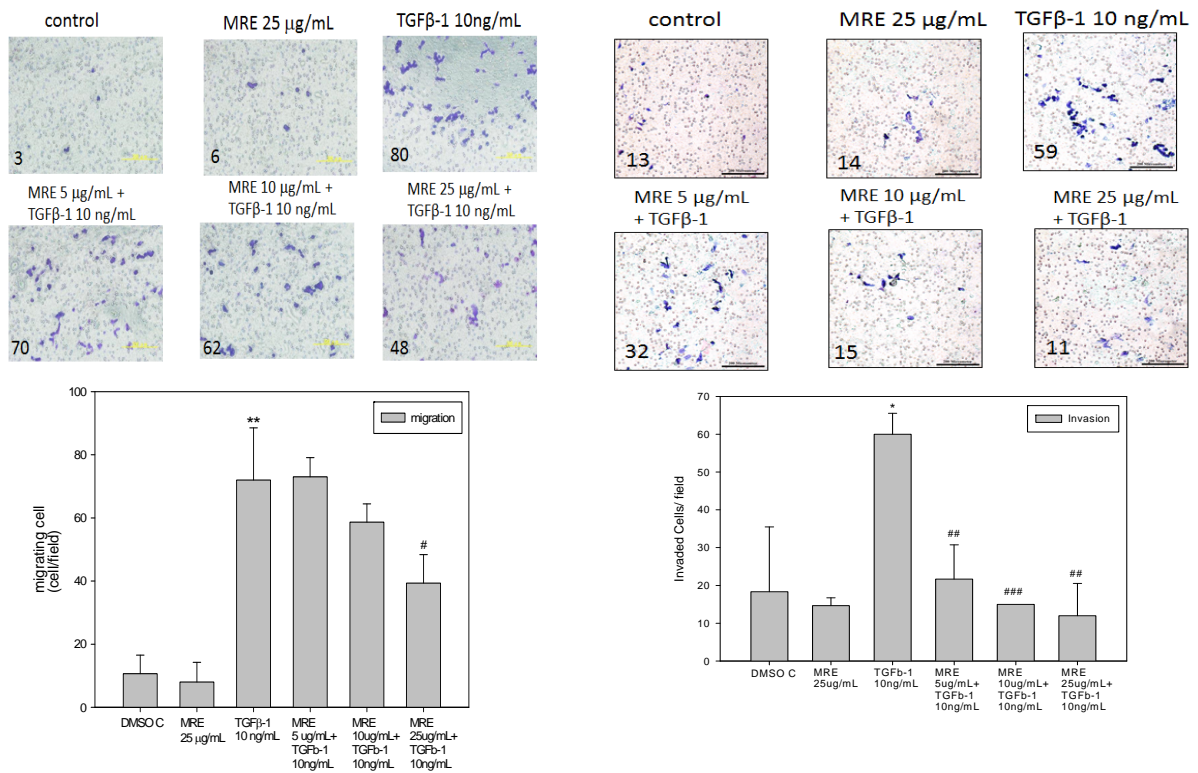


Figure 10. The effect of MRE on TGFβ-1 –induced cell migration and invasion in HepG2 cells.

106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：曾翠華			計畫編號：106-2320-B-040-027-				
計畫名稱：桑根抑制發炎和氧化壓力所參與訊息路徑之活化及減緩肝癌形成與惡化之研究							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇	2018 3/24-25 JACBS POST. Title:HPLC Analysis and Anti-inflammatory Evaluation of Morus Root Extract	
		研討會論文		1			
		專書		0	本		
		專書論文		0	章		
		技術報告		0	篇		
		其他		0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		2	篇	Cellular Physiology and Biochemistry (In press) JAFC 2018, 66, 6708-6716
			研討會論文		0		
			專書		0	本	
專書論文			0	章			
技術報告			0	篇			
其他			0	篇			
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			

		積體電路電路布局權	0			
		著作權	0			
		品種權	0			
		其他	0			
	技術移轉	件數	0		件	
		收入	0		千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	2	人次	大三 生	
		碩士生	1		大四生	
		博士生	0		醫化系碩班生	
		博士後研究員	0			
		專任助理	0			
	非本國籍	大專生	0			
		碩士生	0			
		博士生	0			
		博士後研究員	0			
		專任助理	0			
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)						

科技部補助專題研究計畫成果自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

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）

台灣常有廢棄燃燒桑根枝之現象，本計畫發現微波萃取桑根及枝可得到具有抗氧化及抗發炎之物質，其成份為多酚類如oxyresveratrol 及 morusin，本研究以HPLC建立指標活性成分之分析，可做為廠商開發保健食品時品管建立之參考。另外本計畫首度發現台灣桑根粗萃物具有抗氧化抗發炎及降低肝纖維化與四氯化碳誘導之肝毒性。可開發為保肝保健食品之潛力。另外我們也發現其類黃酮成份如 morusin 及 stilbene 衍生物 oxyresveratrol 都具有抗氧化及抗發炎作用而 morusin 藥效較強。另外我們也建立TGF-beta 1參與肝癌惡化之指標與訊息路徑，並進一步發現桑根粗萃物具有抑制TGF-beta 1誘導的HepG2 移動及轉移等惡化現象。本計畫可提供桑根抗肝纖維及抑制腫瘤微環境促肝癌作用之潛力，有助保肝物質之開發，提供肝癌預防開發參考資訊及提升桑樹栽培之附加價值。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關內政部，
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

說明：(以150字為限)

桑樹經多方研究其葉 果實 枝 根 皆有多種保健功能, 相關輔導農家單位如有辦法結合健康食品生產業者那麼可達物盡其用, 提升價值。