

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

艾草萃取物成份改善代謝症候群及相關調控標靶之研究

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 106-2320-B-040-010-
執行期間：106年08月01日至107年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

計畫主持人：林慧萱

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：吳映璇
大專生-兼任助理：楊薇楨
大專生-兼任助理：吳美鳳

中華民國 107 年 10 月 31 日

中文摘要：代謝症候群(metabolism syndrome)是一種包含肥胖、血壓和血糖偏高以及血脂異常等多項危險因子綜合表現的臨床徵候，伴隨著這些危險因子的增加，罹患心血管疾病、糖尿病和脂肪肝(fatty liver)也相對提升，此些代謝疾病已被證明可用飲食來控制。因此利用健康食品來預防或改善代謝症候群應有其發展的可行性。過去研究顯示艾草萃取物(*Artemisia argyi* extracts, AAE)中含有倍半萜內酯、酚酸以及類黃酮等，研究已證實艾草具有抗氧化、抗癌和護肝等活性。本研究之目的則為評估AAE抗代謝症候群之作用。首先利用高脂飲食(high fat diet, HFD)合併鏈脲佐菌素(streptozotocin, STZ)誘發代謝症候群之動物模式，並以辛伐他汀(simvastatin)作為臨床藥物對照組。結果顯示HFD合併STZ誘導組(HS)之動物血清中總膽固醇、LDL-C、AST、ALT、BUN、CRE及血糖含量升高；上述數值會因同時管餵AAE而降低。AAE組中胰島素阻抗和OGTT表現也比HS組減少許多；並發現AAE可抑制由HS所誘導肝臟脂質堆積及蛋白尿之情形，隨著AAE處理劑量增加其抑制效果越明顯。另以細胞模式探討AAE對於肝細胞內脂質代謝作用之影響，作為改善代謝症候群以避免脂肪肝的發生。實驗結果發現AAE可降低游離脂肪酸(free fatty acid, FFA)-油酸(oleic acid, OA)與棕梠酸(palmitic acid, PA)合併誘導人類肝細胞HepG2脂質堆積之情形，並證實AAE可能是透過AMPK的活化調控下游分子機制，進而抑制肝細胞內脂質生成(lipogenesis)作用之相關調控蛋白表現，以及增加脂肪酸氧化(fatty acid oxidation)相關調控蛋白表現，促進脂質分解(lipolysis)作用，藉此減少肝細胞內脂質堆積。由以上實驗結果顯示，AAE具有降血糖、降血脂，改善胰島素阻抗和肝臟脂質堆積，並能抑制代謝症候群之表徵。

中文關鍵詞：代謝症候群、脂肪肝、艾草、胰島素阻抗、肝臟脂質堆積、人類肝細胞、脂質生成、脂質分解

英文摘要：Metabolic syndrome is characterized by obesity, hypertension, hyperglycemia and dyslipidemia as well as a cluster of risk factors. Along with these risk factors rising, the probability of suffering from cardiovascular disease, diabetes and fatty liver would be increased. *Artemisia argyi*, a perennial herb plant, has been shown to be rich in terpenoids and flavonoids, and to possess antioxidant, anticancer and hepatoprotective activities. *Artemisia argyi* extracts (AAE) has been demonstrated to possess antioxidant, antiradical, antiparasitic, hepatoprotective, and anticancer activities. Here, we investigated the in vitro and in vivo inhibitory effects of AAE on metabolism syndrome. In vivo, the mice were fed high fat diet combined with streptozotocin (HS) supplemented with AAE (100 and 200 mg/kg) or simvastatin for 6 weeks. To analyze metabolic syndrome, fasting serum glucose, insulin, HOMA-IR, and oral glucose tolerance (OGTT) were used as indicators of insulin resistance. Serum total lipids, including total cholesterol (TC), LDL-C, and HDL-C, blood

pressure, and albuminuria were also measured. For exploring the possible mechanism for diet-induced metabolic syndrome, the presence of fat droplets in liver was examined histologically. Feeding AAE to mice significantly reduced these hallmarks of metabolic syndrome induced by HS treatment. AAE improved metabolic syndrome in vivo via possessing hypoglycemic, hypolipidemic, and anti-insulin resistance activities. In vitro, we examined the effect of AAE on reducing lipid accumulation in human hepatic HepG2 cells. The result showed AAE suppressed free fatty acid (FFA), a mixture of oleic acid (OA) and palmitic acid (PA), -induced lipid accumulation. Molecular data showed these influences of AAE might be mediated via AMPK-mediated downregulation of lipogenesis-regulatory proteins and upregulation of lipolysis-regulatory proteins. In conclusion, these data demonstrated that AAE potentially could be developed as an anti-metabolic syndrome agent.

英文關鍵詞： metabolic syndrome, fatty liver, *Artemisia argyi*, insulin resistance, hepatic lipid accumulation, human hepatic HepG2 cells, lipogenesis, lipolysis

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)

艾草萃取物成份改善代謝症候群及相關調控標靶之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 106-2320-B-040-010 -

執行期間：106 年 08 月 01 日至 107 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學 醫學檢驗暨生物技術學系(所)

計畫主持人：林慧萱

計畫參與人員：薛羽庭、吳映璇、楊薇楨、吳美鳳

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現： 否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，____ (請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送)

中 華 民 國 107 年 10 月 30 日

§ 中文摘要

代謝症候群(metabolism syndrome)是一種包含肥胖、血壓和血糖偏高以及血脂異常等多項危險因子綜合表現的臨床徵候，伴隨著這些危險因子的增加，罹患心血管疾病、糖尿病和脂肪肝(fatty liver)也相對提升，此些代謝疾病已被證明可用飲食來控制。因此利用健康食品來預防或改善代謝症候群應有其發展的可行性。過去研究顯示艾草萃取物(*Artemisia argyi* extracts, AAE)中含有倍半萜內酯、酚酸以及類黃酮等，研究已證實艾草具有抗氧化、抗癌和護肝等活性。本研究之目的則為評估 AAE 抗代謝症候群之作用。首先利用高脂飲食(high fat diet, HFD)合併鏈脲佐菌素(streptozotocin, STZ)誘發代謝症候群之動物模式，並以辛伐他汀(simvastatin)作為臨床藥物對照組。結果顯示 HFD 合併 STZ 誘導組(HS)之動物血清中總膽固醇、LDL-C、AST、ALT、BUN、CRE 及血糖含量升高；上述數值會因同時管餵 AAE 而降低。AAE 組中胰島素阻抗和 OGTT 表現也比 HS 組減少許多；並發現 AAE 可抑制由 HS 所誘導肝臟脂質堆積及蛋白尿之情形，隨著 AAE 處理劑量增加其抑制效果越明顯。另以細胞模式探討 AAE 對於肝細胞內脂質代謝作用之影響，作為改善代謝症候群以避免脂肪肝的發生。實驗結果發現 AAE 可降低游離脂肪酸(free fatty acid, FFA)-油酸(oleic acid, OA)與棕梠酸(palmitic acid, PA)合併誘導人類肝細胞 HepG2 脂質堆積之情形，並證實 AAE 可能是透過 AMPK 的活化調控下游分子機制，進而抑制肝細胞內脂質生成(lipogenesis)作用之相關調控蛋白表現，以及增加脂肪酸氧化(fatty acid oxidation)相關調控蛋白表現，促進脂質分解(lipolysis)作用，藉此減少肝細胞內脂質堆積。由以上實驗結果顯示，AAE 具有降血糖、降血脂，改善胰島素阻抗和肝臟脂質堆積，並能抑制代謝症候群之表徵。

關鍵詞：代謝症候群、脂肪肝、艾草、胰島素阻抗、肝臟脂質堆積、人類肝細胞、脂質生成、脂質分解

§ 英文摘要

Metabolic syndrome is characterized by obesity, hypertension, hyperglycemia and dyslipidemia as well as a cluster of risk factors. Along with these risk factors rising, the probability of suffering from cardiovascular disease, diabetes and fatty liver would be increased. *Artemisia argyi*, a perennial herb plant, has been shown to be rich in terpenoids and flavonoids, and to possess antioxidant, anticancer and hepatoprotective activities. *Artemisia argyi* extracts (AAE) has been demonstrated to possess antioxidant, antiradical, antiparasitic, hepatoprotective, and anticancer activities. Here, we investigated the *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of AAE on metabolism syndrome. *In vivo*, the mice were fed high fat diet combined with streptozotocin (HS) supplemented with AAE (100 and 200 mg/kg) or simvastatin for 6 weeks. To analyze metabolic syndrome, fasting serum glucose, insulin, HOMA-IR, and oral glucose tolerance (OGTT) were used as indicators of insulin resistance. Serum total lipids, including total cholesterol (TC), LDL-C, and HDL-C, blood pressure, and albuminuria were also measured. For exploring the possible mechanism for diet-induced metabolic syndrome, the presence of fat droplets in liver was examined histologically. Feeding AAE to mice significantly reduced these hallmarks of metabolic syndrome induced by HS treatment. AAE improved metabolic syndrome *in vivo* via possessing hypoglycemic, hypolipidemic, and anti-insulin resistance activities. *In vitro*, we examined the effect of AAE on reducing lipid accumulation in human hepatic HepG2 cells. The result showed AAE suppressed free fatty acid (FFA), a mixture of oleic acid (OA) and palmitic acid (PA), -induced lipid accumulation. Molecular data showed these influences of AAE might be mediated via AMPK-mediated downregulation of lipogenesis-regulatory proteins and upregulation of lipolysis-regulatory proteins. In conclusion, these data demonstrated that AAE potentially could be developed as an anti-metabolic syndrome agent.

Keywords: metabolic syndrome, fatty liver, *Artemisia argyi*, insulin resistance, hepatic lipid accumulation, human hepatic HepG2 cells, lipogenesis, lipolysis

(一) 前言

一、代謝症候群 (Metabolism syndrome)

代謝症候群是一種包含肥胖、血壓偏高、血糖偏高以及血脂代謝異常等多項危險因子綜合表現的臨床徵候，伴隨著這些危險因子的增加，罹患心血管疾病(cardiovascular disease)、糖尿病(diabetes mellitus)、脂肪肝(fatty liver)也相對提升(1, 2)。於1998年世界衛生組織(WHO)率先提出代謝症候群的定義，認為胰島素阻抗(insulin resistance)是該病症最重要的指標，另外合併以下指標兩項及以上者，即為代謝症候群；這些指標包括肥胖、高血壓、脂質代謝異常、微蛋白尿(3)。國內現行代謝症候群之判定標準(依據2007年衛生署國民健康局公告版)共列腰圍、血壓、空腹血糖濃度、三酸甘油酯及高密度脂蛋白膽固醇等5項危險因子，符合其中3項即認定為代謝症候群患者。據當年度台灣地區高血壓(hypertension)、高血糖(hyperglycemia)、高血脂(hyperlipidemia)之追蹤調查研究顯示：國人代謝症候群盛行率：20歲以上為19.7%(男20.3%，女19.3%)，且隨年齡上升而有增加的趨勢。代謝症候群的危險性來自於它與第2型糖尿病及心血管疾病發生的危險因子具高度關聯性，而胰島素阻抗及第2型糖尿病又會加速粥狀動脈硬化(atherosclerosis)發生，因而目前備受醫學界矚目。研究指出，患有代謝症候群之非糖尿病患者日後罹患第2型糖尿病的機率較正常人增加4倍，罹患心血管疾病的危險性則增加30%(4)。代謝症候群的形成機制雖未完全釐清，但主要因素在於肥胖與胰島素阻抗，而產生葡萄糖及脂肪代謝的異常，進而衍生出上述各種疾病。一般認為胰島素阻抗是所有症狀之間共同連結因子，故目前研究多著重在阻抗的發生與血糖的恆定及心血管疾病發展間的關係。此外，脂質異常(lipid disorder)及發炎(inflammation)現象也被認為是導致代謝症候群的主要機制之一(5, 6)。代謝症候群的成因可能與先天遺傳及人口學等生物因素有關，但最重要的還是不活動或少活動生活型態、肥胖人口增加、生活壓力及其他不良健康行為等因素所造成。在治療代謝症候群相關疾病之藥品方面，如 statin 等具有 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-Coenzyme A (CoA) reductase 抑制作用之藥物常被用於降低患者血清中膽固醇(7)；而可增加高密度脂蛋白膽固醇之 niacin 皆為目前治療及研究之主流(8)。但目前這類上市藥物具有體重增加，肝毒性和心臟衰竭等副作用，因此開發有效且安全以防治代謝症候群的天然食材備受重視。

二、艾草(Artemisia argyi)

艾草屬於菊科(Asteraceae)蒿屬(Artemisia)多年生草本植物，又名灸草、草蓬、祈艾、醫草等。艾草分布於亞洲及歐洲地區，具有獨特香味，在民間使用廣泛(9)。艾草於亞洲地區坊間則作為驅蟲避邪之用，本草綱目將艾草視為藥用植物，具有免疫功能、對慢性病的調節功能。艾葉含有良質的葉綠素與豐富的膳食纖維，以及大量的維他命A、B1、B2、C與礦物質。將艾草入菜食用能夠促進新陳代謝，也具有增血和抗過敏的功用。而艾草中含有的單寧酸及精油成份還具有緩和發炎及收縮黏膜組織等效果(9, 10)。過去研究顯示艾草萃取物(Artemisia argyi extract, AAE)中含有豐富抗氧化劑的倍半萜內酯(sesquiterpene lactones)、木質酚(lignans)、酚酸(phenic acid)以及類黃酮(flavonoids)等(11)。在細胞實驗中已證實AAE具有抗輻射、抗氧化和抗癌的活性(12, 13)；而在動物實驗中則有研究證明AAE抗寄生蟲的作用(14)。最近的研究亦發現AAE具有護肝活性，對於藥物性普拿疼(acetaminophen, APAP)、化學性四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄) (15, 16)，以及細菌性脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)引發之肝損傷具有保護效果(16)。進一步文獻指出AAE主要成份為槲皮素(querctetin)和芹菜素(apigenin) (17)，兩者皆屬於類黃酮且具有很強之疾病化學預防功效。在我們實驗室初步成份分析中顯示AAE中總多酚(polyphenol)及總黃酮類含量各別為26.9%和14.3% (Table 1)，也證實AAE確為富含多酚之萃取物。

(二) 研究目的

隨著物質生活的豐裕，體能活動的減少及壽命的延長，代謝症候群在全世界有急速增加的趨勢。據世界衛生組織統計，全世界每年有 1,700 萬人死於心腦血管疾病，占總死亡人數的 1/4。以台灣地區而言，根據行政院衛生署公布的資料顯示 2016 年國人十大死因中，心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病、肝腎相關疾病以及高血壓性疾病等多項與代謝症候群相關的疾病，其總死亡率遠高於排名第一的惡性腫瘤。代謝症候群儼然已成為我國及世界之新興重要公共衛生議題。代謝症候群引發之相關疾病對個人健康及國家醫療資源都是極大的隱憂，因此各國都急欲尋求防治之道。新的預防和治療代謝症候群策略是大致有如美國國家膽固醇教育計畫成人治療第三版(Adult Treatment Panel III of National Cholesterol Education Program)之建議，必須同時針對肥胖、高血壓、糖尿病及心血管疾病等一起進行整合性的治療。而與代謝症候群具高關連性的三個代謝性疾病--第 2 型糖尿病、脂肪肝和心血管疾病已被證明可用飲食來控制。因此利用健康食品來預防或改善代謝症候群應有其發展的可行性。近年來，且由於自我照護及健康意識之抬頭，傳統醫學及補充替代醫學亦逐漸受到重視，許多具有預防及改善代謝症候群潛力之中草藥及天然物逐漸受到重視。如何藉由增加胰島素敏感性、促進肝臟脂質的代謝、降低三酸甘油脂和膽固醇、修正細胞激素分泌異常的狀況、抑制 LDL 氧化、阻止泡沫細胞的形成、降低血管平滑肌細胞的增生與遷移作用以及保護內皮細胞不受到損害，皆被視為是有效預防或改善代謝症候群的方法。鑑於先前研究指出，艾草具有良好的抗氧化、抗發炎和護肝活性，因此我們推估艾草可作為預防或改善代謝症候群之天然保健食材，本研究計劃若能順利達成預定目標，不僅可以有效地充分利用天然萃取物及其成分，也可以抑制代謝症候群衍生之疾病及相關機轉，更可以深入地瞭解造成人類代謝症候群之成因、致病過程和分子機制，對代謝症候群的預防和控制具有相當重要的貢獻。

艾草為多年生草本植物，且為民間普遍栽種的藥草，全株皆可入藥。本草綱目將苦艾視為藥用植物，具有免疫功能、對慢性病的調節功能。歐洲產之艾草為木質草本植物，具一種苦而稍香的味道，主要用於製造洋艾劑，用於食品、醫藥和洋艾酒的添加劑(9)。也有研究指出將艾草入菜食用能夠促進新陳代謝，也具有增血和抗過敏的功用(10, 11)。其化學成份含有豐富抗氧化劑的倍半萜內酯(sesquiterpene lactone)以及多酚等(12)，國內外之研究針對此些成份的生化功效均有多方科學驗證與斬獲。但大部分的植株研究都集中在根部或葉子的成份分析，卻甚少著重於全株活性功效的科學探討。因此，本研究將針對艾草全株植物進行初步之多酚定性、定量分析，以及抗代謝症候群活性探討。目的在釐清於複雜且為漸進式的代謝症候群病徵中，艾草萃取物所參與影響的範疇及抗代謝症候群之分子機制。天然物抗代謝症候群之分子機制的研究無論對於多酚萃取物醫藥化評估，亦或針對與代謝症候群引發之相關疾病（心血管疾病、糖尿病及脂肪肝）治療之分子標的，都是重要的參考指標。研究期望能提供國人食用艾草時，有一參考依據；為符合新時代講究自然與健康飲食的觀念，提供一無毒性的天然抗氧化劑，冀能研發具預防或輔助治療代謝症候群之艾草保健食品，以裨利國人健康之所需。

(三) 文獻探討

1. 許多研究指出綠茶無論在動物或人體實驗中，皆可發現其具降低血清膽固醇及 TG 的功能(18, 19)，而有效成分為其所含的多酚類。Wu 等人(2004)的研究也已證實綠茶可以改善代謝症候群中多項危險指標(20)。
2. 研究指出飲食中添加大豆分離蛋白、大豆蛋白水解物和大豆異黃酮素皆可顯著地降低代謝症候群大白鼠腹部脂肪堆積、血漿 TC 和 TG 濃度及降低腹腔注射葡萄糖後血漿葡萄糖

和胰島素濃度的上升，並可顯著增加血漿和脂肪組織中adiponectin的濃度及抗氧化酵素活性。主要導因於大豆蛋白中所含的異黃酮素可藉由活化PPAR α 和PPAR γ 促進體內脂質的代謝和胰島素的活化，除了可降低血脂質，同時也改善葡萄糖耐受性(21)。

3. 在細胞實驗中已證實艾草萃取物AAE具有抗輻射、抗氧化和抗癌的活性(12, 13)；而在動物實驗中則有研究證明AAE抗寄生蟲的作用(14)。最近的研究亦發現AAE可以護肝，對於藥物性APAP、化學性CCl₄ (15, 16)、以及細菌性LPS引發之肝損傷具有保護效果(16)。

上一年度計畫【探討芙蓉菊、抹草與苦艾之抗乳癌作用及分子機制(MOST 105-2320-B-040-023 -)】初步成份鑑定AAE富含類黃酮及酚酸(phenic acid)成份(Table 1)，研究亦已發現AAE具有抑制乳癌細胞生長及促進其程序性死亡之作用，以及AAE具有抑制脂激素(leptin)誘導之乳癌細胞惡化生長與雌激素受體(estrogen receptors, ER)過量表現，皆顯示AAE具有抑制肥胖型乳癌之潛力。過去研究亦指出艾草具有抗氧化、抗癌和護肝等活性。基於以上的研究結果，我們推論AAE發展成為抗代謝症候群之天然保健食材的潛力很大。從安全及經濟價值考量，由植物萃取得有機物質作為預防或治療疾病之物質已為各國所重視，例如tea polyphenolic extracts、curcuminoid extracts及broccoli extracts (sulforaphane)已被廣泛的應用為化學預防物質(22, 23)。而本實驗室致力於開發天然物中所含的特殊成份，希望可以由攝取食品來達到預防或延緩疾病之目的。因此，本計畫探討台灣坊間普遍栽種的藥草-艾草，研究其萃取物改善代謝症候群之活性。況且AAE是艾草直接經由水煮萃取而來，保留天然植物本身最原始之生物活性，一來不會有殘存有機溶劑之虞；二來它不會如人工合成化學物質對人體衍生氧化性傷害之作用。期盼本計畫所獲得之初步結果，對於日後保健產品及農業之開發與應用上能有所貢獻。

(四) 研究方法

一、艾草萃取物之製備及定量

1.1. 艾草水萃取物之製備(Preparation of AAE)

秤取100 g乾燥艾草(*Artemisia argyi*, AAE)，加入6 L distilled water，以100°C煮2小時，待冷後過濾，將濾液進行冷凍乾燥得其粉末，即為粗萃取物AAE。

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

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

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

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

二、HFD合併STZ誘導小鼠產生代謝症候群

利用Balb/c小鼠進行實驗，動物實驗模式分組概述如下：(I)正常組、(II)高脂餵(high fat diet,

HFD)食合併靜脈注射40 mg/kg鏈脲佐菌素(streptozotocin, STZ)誘導組(HS)、(III) HS + 100 mg/kg AAE、(IV) HS + 200 mg/kg、(V) HS + 200 mg/kg simvastatin (代謝症候群治療藥物對照組)。正常組以normal diet餵食，第2-5組以HFD：89.8% chow，10% coconut oil及0.2%膽固醇。HFD先行給與7週後，再以STZ誘發實驗待一星期後，採血測量隔夜空腹(17~24小時)血糖值，若達或超過13 mM (230 + 10 mg %)時，則視為有糖尿病。第3-5組再開始分別以胃管給與100和200 mg/kg AAE，以及simvastatin餵食6週(Fig. 1A)。實驗過程中定期記錄動物飲食、飲水、體重、血糖以及血壓的變化，並登記動物死亡的數目，飼養13週後可誘導產生高血脂及高血糖。動物禁食一夜後犧牲，觀察腹部脂肪堆積情形並拍照，犧牲後收集血液分析血脂肪，包括TC、TG、HDL、LDL；另一部份取肝組織測定其肝臟脂肪之濃度。並取出實驗動物之副睪脂肪、肝臟、胰臟和腎臟等部分，浸入10%中性福馬林固定(neutral buffered formalin)，以石蠟包埋，以蘇木精-伊紅染色(hematoxylin and eosin, H&E)染色觀察病灶。

三、代謝症候群症狀評估

3.1. 血糖(blood sugar)測定

血漿中的葡萄糖與葡萄糖氧化酶作用產生葡萄糖醛酸及過氧化氫，後者在過氧化氫酶催化下，與4-aminophenazone及phenol氧化成quinoneimine紫紅色產物。將10 µl的血漿樣品及標準品加入含有phosphate buffer、MOPS buffer、phenol、4-aminophenazone、glucose oxidase和peroxidase溶液中混合均勻，在37°C恆溫箱中反應10分鐘，於波長500 nm吸光值下，以已知濃度之標準品作對照，計算出測定葡萄糖濃度，其公式如下：葡萄糖濃度(mmol/L) = 血液樣品吸光值/標準品吸光值×5.5。

3.2. 血清胰島素(insulin)分析

先將50 µl的conjugate solution置於96 well plate，再將25 µl標準品(系列稀釋)、血液樣本加入分析盤中，室溫反應2小時後，進行wash，移除未與抗體結合的樣品，再加入200 µl peroxidase substrates室溫下反應15分鐘，最後加入酸性溶液終止酵素呈色反應，於波長450 nm下可測其吸光值，換算其胰島素濃度。

3.3. 胰島素胰島素阻抗測試[the homeostasis model assessment-estimated insulin resistance (HOMA-IR) index]

採用 Matthews 等人於 1985 年提出以 HOMA-IR 的方法，利用空腹血糖值、胰島素值導入數學公式，來間接定義量化胰島素阻抗性，數值越大代表胰島素阻抗性越大。

計算：
$$\frac{\text{禁食血糖值(mmol/L)} \times \text{禁食血清胰島素}(\mu\text{U/L})}{22.5}$$

3.4. 葡萄糖耐受測試(oral glucose tolerance test, OGTT)

參考 Andrikopoulos 等人所建立的方法。實驗動物空腹 4~6 小時後，以管灌方式給予 2 g/kg 的葡萄糖，測量在 30、60、90、120 分鐘時的血糖值，以曲線下面積(area under curve, AUC)之變化作為評斷標準。藉由血糖變化了解體內葡萄糖的代謝情形。

3.5. 動物血脂肪及肝臟脂肪測定分析

抽取實驗動物血液樣品以及肝臟組織前，已先將動物空腹12-14小時為原則，採樣後進行下列項目分析：

3.5.1. 總膽固醇(total cholesterol, TC)

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

3.5.2. 三酸甘油酯(triacylglycerol, TG)

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

3.5.3. 低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)

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

3.5.4. 高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)

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

3.6. 其他血液生化值分析

為分析萃取物之毒性，血液生化值包括 glutamic oxaloacetic transaminase (GOP)、glutamic pyruvic transaminase (GPT)、blood urea nitrogen (BUN)、creatinine (CRE) 也一併分析，作為評估肝腎功能是否受 AAE 之影響。

四、組織病理切片及組織染色(H&E stain)

首先，將實驗動物犧牲後，迅速取一小部分動物組織（包含血管、肝臟、脂肪），置於 10% 福馬林中固定，以石蠟包埋製成病理切片。其切片製作過程固定→脫水→澄清→浸潤→包埋→連續切片→染色→封蓋，然後利用 H&E stain 觀察切片型態。

4.1. 油紅染色(Oil red O stain)

油紅是一種可溶於油脂的染劑，可做為中性脂肪與膽固醇酯的定量標記。先配置濃度 0.25% 油紅 stock 於異丙醇中，使用前再以 stock : ddH₂O = 6 : 4 的比例稀釋成 working solution，十分鐘後以濾紙過濾方能使用。組織玻片先以 4% paraformaldehyde 中固定 5 分鐘，接著用 ddH₂O 洗 3 次，風乾 10 分鐘，泡入異丙醇中 2~5 分鐘，接著再泡入油紅中染色 10 分鐘，以 85 % 異丙醇中分色 10 分鐘，用 ddH₂O 潤洗 2 次，再用 hematoxylin 10 秒，用流水沖洗 10 分鐘，以 ddH₂O 潤洗後，風乾至隔夜，最後再以預熱後的 glycerol gelatin 封片，即可用顯微鏡觀察拍照後用 Image J 量化。

4.2. 尼羅紅染色(Nile red stain)

尼羅紅是一種親脂性螢光染料且相當敏感，可做為中性脂肪與膽固醇酯的定量標記，在螢光顯微鏡下呈現黃色至紅色的螢光。先配置濃度 500 µg/ml 的 Nile red stock solution 於 acetone 中，保存於 4°C 中，使用前再以 75% glycerol 配成濃度 2 µg/ml 的 working solution 作使用。取數滴 working solution 於載玻片上，隨後覆上蓋玻片，使組織上均勻沾附染劑染色 5 分鐘，後以波長 470 nm 的雷射光源激發出波長 590 nm 的散射光，以電腦拍攝後用 Image J 量化螢光強度。

4.3. 蘇丹III染色(Sudan III stain)

先配置 0.2% 的 Sudan III 於 70% 乙醇中，以 37°C 水浴 2 小時，用濾紙過濾後即可使用。將組織玻片以 4% paraformaldehyde 固定 1 分鐘，用 ddH₂O 潤洗 2 次後再以 70% 乙醇潤洗 1 次，接著泡入 Sudan III 中染色 10~20 分鐘，再用 70% 乙醇洗去多餘染劑，用 ddH₂O 潤洗一次，再以 hematoxylin 染色 5 分鐘，用流水沖洗 10 分鐘後以 ddH₂O 潤洗 1 次，風乾至隔夜，最後用預熱好的 glycerol gelatin 封片，即可用顯微鏡觀察拍照後用 Image J 量化。

五、西方點墨法(Western blotting)

首先製萃取蛋白(protein extracts)：收集肝臟組織或細胞均質液，加入 RIPA buffer 與蛋白酶抑制劑 (sodium orthovanadate、leupeptin 及 PMSF)，在 0°C 下震盪 30 分鐘，之後於 4 °C 高速離心 (10000 ×g) 10 分鐘，所得上清液即為萃取蛋白，可儲存於 -70°C 備用。接下來為所得蛋白定量，將 30 µl 萃取蛋白加入 1 ml coomassie brilliant blue G-250，在室溫下反應 1 分鐘，利用 Coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595 nm 有一較大之吸光值，以 Spectrophotomete (HITACHI U-3210) 之可見光紫外光比色儀測定，並以 BSA 為蛋

白質標準溶液，換算細胞萃取液之蛋白質濃度。取 50 μ g 蛋白與 5X loading dye 以 4: 1 比例混合，以 95°C 加熱 10 分鐘，再置於冰上冷卻，即可作為電泳樣本。至於 SDS-聚丙醯胺電泳 (SDS-PAGE) 膠片的配鑄，於鑄膠模型架設完成後，下層膠(separating gel)依照分子量所需而配製成 6-15%，上層膠(stackin gel)則為 4%。將配好之整組電泳玻璃膠體裝置移入電泳槽，把 running buffer 加入內槽需至玻璃上緣，再把處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出 well，其中一個 well 注入 color protein markers，然後把 running buffer 加入外槽也需蓋過電導線，連接電泳槽與電源供應器，先以 70 V 壓縮電泳樣本至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電流為 90 V，當 loading dye 跑至底線時才停止電泳。之後進行蛋白轉漬。將膠片截去上層膠之部份後置於兩張濾紙上，膠片上面放上與膠片大小相同之硝化纖維紙 (nitrocellulose transfer membrane, NC paper)，再置兩張濾紙於其上，其中所有濾紙、NC paper 都必須以 transfer buffer 浸濕過。用玻璃棒趕走氣泡，再以內含海綿襯墊的夾板夾緊，放入轉漬槽中，於冰上以固定電壓 100 V 轉漬約 2 個小時。轉漬完成後，取出 NC paper，加入 5% milk blocking buffer，在室溫下搖晃 1 小時。以 washing buffer (TBS + 0.1 % Tween 20) 清洗三次，每次 10 分鐘，之後加入一級抗體(分析肝臟脂質代謝相關蛋白 HMGCoA reductase、SREBPs、FAS、ACC、PPARs、CPT-4、AMPK 等蛋白)，在 4°C 下反應，隔天早上以 washing buffer 清洗三次，每次 10 分鐘。接著再加入二級抗體，置於室溫作用 1 小時後，以 washing buffer 清洗三次，每次 10 分鐘。最後將 NC paper 放入盤子(tray)上，用面紙擦去多餘的 washing buffer，再以 Western Lightning (Enhanced chemiluminol Reagent: Oxidizing Reagent= 1: 1; 即 ECL substrate) 覆蓋整個 NC paper，在室溫下約反應一分鐘後，擦去多餘的 ECL substrate，將盤子放入 FUJIFILM LAS-3000 之冷光螢光影像分析系統中，以 ImageReader LAS-3000 Life 儀器控制軟體，在 Chemiluminescence 條件下拍得影像，並以 FUJIFILM-Multi Gauge V2.2 軟體定量蛋白密度。

六、細胞毒性分析(Cytotoxicity analysis)

6.1. 細胞培養(Cell culture)

人類肝細胞(HepG2 細胞)使用 90% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培養液，並外加 1.5 g/L sodium bicarbonate、2.5 g/L glucose、10 mM HEPES、1.0 mM sodium pyruvate、2 mM L-glutamine、1% penicillin/streptomycin, pH 7.3，再加上 10% FBS 作為增殖培養基。培養在 75 cm² Nunclon™ delta treated flask 中，並放置 37°C、5% CO₂ 環境的恆溫箱裡。每 2~3 天更換一次培養液，5~7 日繼代細胞一次。

6.2. 細胞存活檢測(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay, MTT assay)

此法是根據 Alley 等人所研究的結果所設計之實驗，其原理為在有活性的活細胞會將 MTT 經由粒腺體中 dehydrogenase 作用代謝還原為藍紫色結晶，之後再以異丙醇(isopropanol)將結晶溶出，並於波長 563 nm 下測定溶液吸光值變化，由吸光值的大小可得知存活的細胞數目之多寡，而死細胞是無法進行此作用，因此若溶液的吸光值有降低的話，表示細胞有死亡或無法代謝 MTT 試劑的情形。將細胞培養於 24 well culture plate，加入不同濃度的 AAE 或 AAP 處理 24 小時後，移除舊的培養基，加入新的培養基和 MTT 反應 4 小時，移除培養基，加入異丙醇將結晶溶出，在波長 563 nm 下測定吸光值的變化。

七、細胞內脂質堆積試驗(Cellular lipid accumulation assay)

7.1. 油紅染色(Oil red staining)

Oil red O 為蘇丹染劑之一，對脂肪具有親和力，為脂溶性染料，在脂肪內能高度溶解使中性脂肪著色，因此藉由染色後表現的紅色得知細胞內脂質含量。將細胞培養於 6-well dish 中，待細胞貼壁型態完全後，以 PBS 潤洗細胞後加入 starvation medium，24 小時後，加入 FFA 與分別加入不同劑量的 AAE 分別培養 24 小時。將 oil red 粉末溶解於異丙醇配成 5 mg/ml 原液，

再與水稀釋 1.5 倍，靜置 10 分鐘後以 0.22 μm 的 filter 過濾。細胞以 PBS 潤洗 2 次，加入 10% paraformaldehyde 固定 30 小時，再加入 oil red 染劑於室溫下反應 15 分鐘，用 PBS 洗去多餘染劑，最後以倒立式顯微鏡觀察，觀察完用異丙醇將染劑溶出，取 1 ml 加入 96 孔盤，立即用 ELISA reader 測波長 492 nm 之吸光值。

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

尼羅紅染劑為親脂性螢光染劑，可以針對脂質染色，再激發光下發出紅色螢光，而螢光的強度代表脂質的濃度，因此可以得知細胞內脂質含量。細胞培養於 10 公分 dish 中，待細胞貼壁型態完全後，以 PBS 潤洗細胞後加入 starvation medium，24 小時後，加入 FFA 與分別加入不同劑量的 AAE 或 AAP 分別培養 24 小時。去除舊的 medium 並加入適量的 trypsin，於 37°C 的溫箱中反應 10 分鐘，將細胞打下並離心 1000 rpm/ 5min，移去上清液。細胞以 PBS wash 2 次，加入 10% paraformaldehyde 固定 30 小時，以 1 mg/ml PBS 稀釋染劑，在室溫下避光染色 5 分鐘，用 PBS 洗去多餘染劑，用流式細胞儀偵測雷射光 488 nm 激發細胞螢光強度並進行分析。

7.3. 細胞內三酸甘油酯含量測定(cellular TG analysis)

利用市售之測定三酸甘油酯含量之酵素測定法試劑，測定細胞內三酸甘油酯含量之變化。取 10 μl 之細胞內脂質萃取液與 1 ml 之試劑混合，於室溫下反應 10 分鐘，於波長 500 nm 下測定吸光值變化，以已知濃度之標準品作對照，計算出細胞內之三酸甘油酯含量，其公式如下： $C = 200 \times \Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{STD}}$ [mg/dl]。

八、統計分析(Statistical Analysis)

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

(五) 結果與討論 (含結論與建議)

一、艾草萃取物(AAE)對於 HFD 合併 STZ (HS)誘導小鼠代謝症候群之影響

1.1. 生理數值分析

代謝症候群小鼠試驗中，動物飲食量、飲水量及體重之改變為評估動物健康徵兆的指標之一。將老鼠犧牲後及平時紀錄之生理特徵進行統計，結果顯示控制組和 AAE 毒性組之小鼠體型適中，精神狀態良好、動作自如、毛髮平伏有光澤；而施打 STZ 之組別小鼠體重變輕、精神萎靡、反應和動作遲緩、毛豎無光澤、弓背捲體，且尿量顯著增加。上述結果推論 STZ 的注射會誘發小鼠糖尿病初期症狀。在給予 AAE (100 和 200 mg/kg) 或 simvastatin 的六週試驗期間老鼠飲食和體重皆與 HS 誘導組之老鼠無異 (Fig. 1B and C)。

1.2. 代謝症候群症狀評估

在 HS 誘導小鼠產生代謝症候群徵狀方面，評估指標包括胰島素阻抗、脂質代謝異常、微蛋白尿、高血壓。胰島素阻抗是以血糖、血清胰島素、HOMA-IR 值及 OGTT 血糖變化 (Fig. 2A-D) 作為評估項目，雖然在血清胰島素含量分析上並不如預期，但在 HS 誘導組中仍可以明顯觀察到血清中高血糖數值，以及透過 HOMA-IR 值增加和 OGTT 曲線下有較高於控制組趨勢，顯示胰島素高阻抗性之表徵；並量測血壓之結果中指出誘導組小鼠呈現高血壓狀態 (data not shown)；此外，代謝症候群中微蛋白尿指標則以 SDS-PAGE 進行尿中白蛋白 (albumin) 含量分析，由 Fig. 3 可觀察到誘導組中 albumin 蛋白表現量增加，AAE 可顯著抑制其表現，且具有濃度依賴性。上述分析試驗皆可確認 HS 可成功地誘導小鼠產生代謝症候群，而此些胰島素阻抗指標、血壓數值及微蛋白尿，不論是低劑量或高劑量的 AAE 或 simvastatin 組都能顯示具有降低或減緩之效果。

1.3. 血脂質測定

我們利用 HS 誘導小鼠 13 週後，誘導組之血清 TC 較控制組上升約 1.51 倍，但再 7 週後額

外給予AAE之組別，200 mg/mL AAE組與誘導組相較之下，降低約56.7%；statin組則降低了41.3%，且具有統計上的意義。在TG方面，正常組為 168.34 ± 34.13 mg/dL，在經由HS誘導下，誘導組相較控制組雖無上升之趨勢；而分析給予AAE之組別，在低劑量AAE (100 mg/mL)的給予下，小鼠血中TG為 122.00 ± 15.94 mg/dL，當劑量提升為200 mg/mL AAE後之試驗組TG則為 120.75 ± 4.86 mg/dL，與控制組或誘導組相較之下皆有降低的趨勢。同樣在LDL-C項目，AAEE試驗組有類似TC的抑制作用。進一步分析心血管危險因子方面，低和高劑量AAE試驗組中LDL-C/HDL-C的比值在分別為1.01和0.91，與誘導組相較皆具有統計上之抑制趨勢。另外，在肝腎功能評估方面，高劑量AAE也能夠顯著地抑制由HS所誘導的ALT、BUN和CRE之含量(Table 2)，代表AAE對於代謝症候群導致的肝腎損傷具有一定的保護效應。由此可知，AAE確實可以降血脂、血糖和血壓，以及改善胰島素抗性，進而有效的抑制代謝症候群的發展。

1.4. 胰臟組織病變分析

我們也針對胰臟部分進行病理切片分析，觀察胰臟組織及胰島細胞型態之變化。由 Fig. 4 可觀察到誘導組相對於正常組之胰島組織明顯變小且型態改變，進行量化分析確認其面積縮小約50%；隨著給予的AAE劑量增加，胰島細胞面積可回復到與控制組相當。此結果推論AAE對於代謝症候群引發胰島細胞衰竭具有保護效果，進一步AAE如何增加細胞對胰島素敏感性及促進胰島細胞存活仍需更多研究來驗證，以評估AAE能否改善T2D的發生。

1.5. 肝組織病理切片及染色觀察

接著我們選取試驗動物肝臟部分進行病理切片分析，觀察肝組織型態及脂肪分佈。在病理分析下，正常組的肝組織中並沒有發現有脂肪油滴的形成。在HS誘導組方面，我們發現其病理切片上有明顯的脂肪堆積，組織細胞呈現不規則型態排列之現象；而給予100和200 mg/mL AAE後，肝臟脂肪空泡情形則明顯下降(Fig. 5A)。另外，以三種脂質染色作為脂質堆積確認試驗，顏色愈深愈紅或螢光強度越強，表示脂質堆積的狀況愈嚴重(Fig. 5B-D)。Fig. 5B 為油紅染色在量化結果，可以看到誘導組的脂質堆積顯著增加為控制組的1.33倍，而低和高劑量AAE試驗組分別減少為誘導組的0.89倍與0.79倍。尼羅紅染色在量化後則可以看到誘導組的脂質堆積為控制組的3.3倍，AAE可明顯減少為誘導組的0.59-0.81倍，回復與控制組之染色結果無異(Fig. 5C)。蘇丹三號染色也呈現類似於上述脂質染色的結果(Fig. 5D)。總結 Fig. 5 顯示AAE對HS誘發代謝症候群小鼠可以顯著性減少肝臟脂質堆積情形，由此可推論AAE具有抑制脂肪肝病發展之作用。

1.6. 肝組織脂質代謝蛋白分析

在膽固醇關鍵調控酵素中，SREBP-1和SREBP-2分別負責進行脂肪酸與膽固醇的生合成調控，進而轉錄HMG CoA reductase蛋白表現。各組分析在SREBP-1表現具些微之變化；誘導組SREBP-2蛋白表現與控制組相比上升約4.5倍，在AAE試驗組與誘導組相比則下降0.54倍。另外，在誘導組中HMG CoA reductase蛋白表現與對照組相比上升2.5倍，在AAE試驗組與誘導組相比下降約0.4倍(Fig. 6A)。我們推論AAE可抑制SREBP-2蛋白調控，促使其轉錄之HMG CoA reductase蛋白表現下降，進一步降低膽固醇合成。在參與TG合成之調控蛋白FAS蛋白表現在誘導組與對照組相比，沒有顯著變化。在AAE試驗組中FAS表現與誘導組相比則明顯下降約0.7倍(Fig. 6B)；相反地，AAE能增加p-ACC/ACC比值，我們推論雖然FAS表現受到AAE抑制的作用較不明顯，但在抑制ACC的部分則有明顯的效果，使脂肪酸合成原料(malonyl CoA)減少，造成TG合成減少。在脂肪酸氧化相關調控蛋白(例如PPAR- α 、CPT1等)表現方面，在AAE試驗組與誘導組相比皆有上升之趨勢(Fig. 6C)。上述總結AAE可能一方面藉由抑制肝細胞內脂質生成作用之相關調控蛋白，另一方

面則增加脂肪酸氧化相關調控蛋白表現，促進脂質分解作用，藉此減少肝細胞內脂肪堆積。

二、艾草萃取物(AAE)對於 FFA 誘導肝細胞內脂質堆積之影響

2.1. 細胞存活測試

首先，探討游離脂肪酸(free fatty acids, FFA)：400 μM OA + 200 μM PA、600 μM OA + 300 μM PA、800 μM OA + 400 μM PA 不同組合濃度對人類肝細胞 HepG2 存活的影響。由 MTT 結果可知在 24 小時 FFA 處理下，隨著 FFA 的劑量增加，細胞之存活率明顯減少許多，表示高濃度 FFA 具有抑制細胞生長之作用(Fig. 7A)，後續實驗以不會影響 HepG2 細胞生長的中劑量 FFA (OA 600 μM + PA300 μM)，作為誘導肝細胞脂肪堆積之細胞模式。另外，也利用不同濃度 AAE (0、10、25、50、75、100、200、300、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)處理 HepG2 細胞，觀察 AAE 對細胞存活之影響。由細胞存活結果可知，在 24 小時 AAE 之處理下，隨著 AAE 的劑量增加到 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 會對 HepG2 細胞之生長產生抑制作用(Fig. 7B)，所以篩選 AAE 劑量 < 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作為後續探討其對於肝細胞脂肪堆積之影響。後續 Fig. 7C 則顯示以 FFA 合併 AAE 或 simvastatin 對 HepG2 細胞存活之細胞計數結果，FFA 無論是合併 AAE (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)或 simvastatin (10 μM)對於 HepG2 細胞之存活率皆無明顯之影響，排除合併處理對細胞生長之參數，並以此合併處理的細胞模式探討 AAE 對於 FFA 誘導 HepG2 細胞脂質堆積之影響。

2.2. 細胞內脂質堆積分析

由油紅染色(Fig. 8A, B)及尼羅紅染色(Fig. 8C, D)試驗之結果顯示，在 FFA 處理細胞中紅色油滴清晰可見(箭頭所指紅色部分為油滴)，作為誘導組(Fig. 8A)。Fig. 8B 量化此 FFA 誘導後之 HepG2 細胞中脂肪堆積含量與對照組相比有顯著增加約 1.2 倍，加入不同劑量的 AAE 或 simvastatin 與誘導組比較，各組細胞內脂肪堆積含量皆顯著下降(Fig. 8B)，推論 AAE 或 simvastatin 皆可能降低細胞中脂肪之堆積。接著，將 FFA 處理後的細胞先以尼羅紅染色，再利用流式細胞儀可偵測螢光強度變化原理，螢光強度越強代表細胞內脂質表現越多(Fig. 8C)，並進行統計分析顯示：由 FFA 誘導後 HepG2 細胞脂肪堆積含量與對照組相比有明顯增加趨勢，加入不同劑量的 AAE 或 simvastatin 與誘導組比較，其脂肪堆積含量有下降之趨勢(Fig. 8D)。後續分析細胞中 TG 含量(Fig. 8E)，FFA 誘導組中 TG 含量明顯較控制組高，為控制組的 6.03 倍；處理不同濃度之 AAE 後，不論劑量皆有明顯減少細胞中 TG 含量之趨勢。以上數據顯示 FFA 能成功誘發 HepG2 細胞的脂質堆積，並再給予不同濃度之 AAE 具有減少脂質堆積之作用。

2.3. 細胞內脂質生成與分解相關調控蛋白表現分析

以 HepG2 細胞加入 FFA 及不同濃度 AAE 共同處理 24 小時，利用西方墨點法探討膽固醇生合成相關調控分子，例如 HMGCoA reductase、SREBP-1/2 等蛋白表現量在細胞實驗各組有何影響。由實驗結果得知，只單獨加入 FFA 的誘導組中 HMGCoA reductase、SREBP-1、SREBP-2 蛋白表現與控制組相比明顯增加；而在有 AAE 合併處理的組別之上述調控蛋白的表現量皆有下降的趨勢(Fig. 9A)，因此推論 AAE 可能藉由降低膽固醇生合成相關調控蛋白的表現來抑制 FFA 所誘導肝細胞內脂質生成(lipogenesis)作用。接著探討 TG 合成關鍵蛋白是否受調 AAE 的調控。在誘導組中可以明顯觀察到 p-ACC/ACC 比值為控制組 1.94 倍；而 FAS 蛋白表現和 p-ACC/ACC 比值在 AAE 處理後則有下降趨勢(Fig. 9B)。以上數據顯示，AAE 也可能透過減少 TG 合成來抑制 FFA 誘導 HepG2 細胞之脂質堆積。在脂肪酸氧化相關調控蛋白(例如 PPAR- α 、PPAR- γ 、CPT1-L 等)表現方面，由實驗結果得知，單獨加入 FFA 的誘導組中 PPAR α 和 CPT1-L 蛋白表現與控制組相比明顯下降，而在 ECG 合併處理的組別中兩者表現量則有上升的趨勢(Fig. 9C)，因此推論 AAE 可能藉由提升脂肪酸氧化(fatty acid oxidation)相關調控蛋白的表現，進而促進肝細胞內脂質分解(lipolysis)作用。

2.4. 細胞內能量代謝關鍵調控分子 AMPK 表現分析

同樣處理 HepG2 細胞後，以西方墨點法探討細胞內能量代謝關鍵調控分子 AMPK 蛋白與磷酸化表現之影響。Fig. 9D 實驗結果發現 FFA 誘導組的 p-AMPK 與 AMPK 的比值相較於對照組較為下降；而 AAE 試驗組與誘導組相比之比值則有提升，因此推論 AAE 可能藉由促使 AMPK 磷酸化表現增加，以影響後續參與在脂質代謝路徑相關分子之表現。上述蛋白調控結果與動物實驗分析得到相同之驗證。後續為釐清 AMPK 是否扮演 AAE 調控 FFA 誘導肝細胞脂質代謝調控的上游因子，利用 AMPK 抑制劑 dorsomorphin (3 μ M) 預先處理 HepG2 細胞後，再加入 FFA 及 AAE 共同反應 24 小時，利用油紅染色試驗持續觀察其抑制作用(Fig. 10)。在顯微鏡下之結果顯示 dorsomorphin 預處理後，其細胞中紅色油滴之含量相比於 FFA 合併 AAE 組別顯著提升(Fig. 10A)，且量化結果也明顯上升(Fig. 10B)，因此推論 dorsomorphin 確實具有回復 AAE 抑制 FFA 所誘導 HepG2 細胞中脂肪堆積之情形，也證實 AAE 主要是透過 AMPK 的活化調控下游分子機制。

三、艾草萃取物(AAE)對於 FFA 誘導肝細胞內脂質堆積之影響

3.1. *in vivo*

本實驗利用 HFD 合併 STZ 誘導代謝症候群之疾病動物模式，造成胰島素阻抗、血脂及肝臟脂質代謝異常，以及胰島細胞衰竭等，成功誘導為代謝症候群模式。在本研究中，給予 AAE 六週後可以顯著降低胰島素阻抗、脂質代謝異常、降低肝臟脂質堆積，同時具有改善胰島細胞衰竭之作用，在肝腎損傷程度上也有明顯的保護效果。

3.2. *in vitro*

在肝細胞實驗方面則探討 AAE 抑制肝臟脂質堆積作用，利用肝細胞 HepG2 加入 FFA 為誘導劑之細胞模式。本實驗利用兩種親脂性染劑—油紅染劑以及尼羅紅染劑，雙重試驗分析以評估細胞內脂肪堆積的程度，結果皆顯示 AAE 確實有減少脂質堆積的作用。進一步利用西方點墨法及抑制劑分析證實 AAE 可能是透過 AMPK 的活化調控下游分子機制，進而抑制肝細胞內脂質生成作用之相關調控蛋白表現，以及增加脂肪酸氧化相關調控蛋白表現，促進脂質分解作用，藉此減少肝細胞內脂肪堆積。此 AAE 的抑制作用與動物實驗分析得到相同之結果(Fig. 11)。因此，AAE 具有抑制肝臟脂質堆積以及改善代謝症候群之潛力，期許未來艾草可以開發成健康食品來預防或改善脂肪肝或代謝症候群相關疾病的產生。

§ 參考文獻

1. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res.* 56, 311-7, 2004.
2. Reaven GM, Chen YD. Role of insulin in regulation of lipoprotein metabolism in diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 4, 639-52, 1998.
3. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 15, 539-53, 1998
4. Nabel EG. Cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 349, 60-72, 2003.
5. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes.* 52, 1210-4, 2003.
6. Grundy SM, Brewer HB Jr., Cleeman JI. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, e13-8, 2004.

7. Kumai T, Matsumoto N, Koitabashi Y, Takeba Y, Oonuma S, Sekine S et al. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors: candidate mechanisms for anti-lipid deposition in blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 3, 195-201, 2005.
8. MacKay D, Hathcock J, Guarneri E. Niacin: chemical forms, bioavailability, and health effects. *Nutr Rev*. 70, 357-66, 2012.
9. Juteau F, Jerkovic I, Masotti V, et al. Composition and anti-microbial activity of essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Med*. 69, 158-61, 2003.
10. Saban K, Recep M, Ahmet CAA, Ali Y. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J Agric Food Chem*. 53, 9452-8, 2005.
11. Wichtl M. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, first ed. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 45-8, 1994.
12. Bora KS, Sharma A. Evaluation of antioxidant and free-radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. *Pharm Biol*. 49, 1216-23, 2011.
13. Shafi G, Hasan TN, Syed NA, et al. *Artemisia absinthium* (AA): a novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer. *Mol Biol Rep*. 39, 7373-9, 2012.
14. Caner A, Döşkaya M, Değirmenci A, et al. Comparison of the effects of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia absinthium* growing in western Anatolia against trichinellosis (*Trichinella spiralis*) in rats. *Exp Parasitol*. 119, 173-9, 2008.
15. Gilani AH, Janbaz KH. Preventive and curative effects of *Artemisia absinthium* on acetaminophen and CCl₄-induced hepatotoxicity. *Gen Pharmacol*. 26, 309-15, 1995.
16. Amat N, Upur H, Blazeković B. In vivo hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. *J Ethnopharmacol*. 131, 478-84, 2010.
17. Craciunescu O, Constantin D, Gaspar A, Toma L, Utoiu E, Moldovan L. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chem Cent J*. 6, 97, 2012.
18. Stensvold I, Tverdal A, Solvoll K, Foss OP. Tea consumption. Relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality. *Prev Med*. 21, 546-53, 1992.
19. Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta*. 1127, 141-6, 1992.
20. Wu LY, Juan CC, Hwang LS, Hsu YP, Ho PH, Ho LT. Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. *Europ. J. Nutr*. 43, 116-24, 2004.
21. Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA, Shay N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nut*. 133, 1238-43, 2003.
22. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*. 3, 768-80, 2003.
23. Kotecha R, Takami A, Espinoza JL. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget*. 7, 52517-29, 2016.

§ 附表及附圖

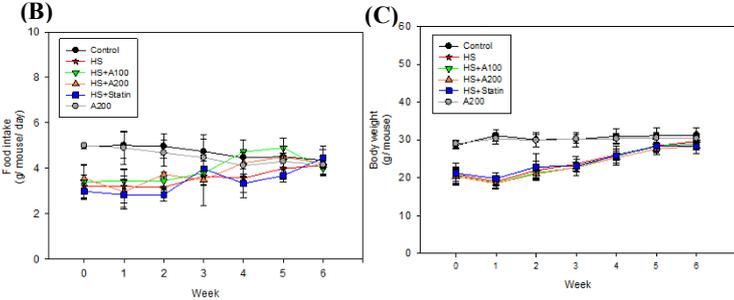
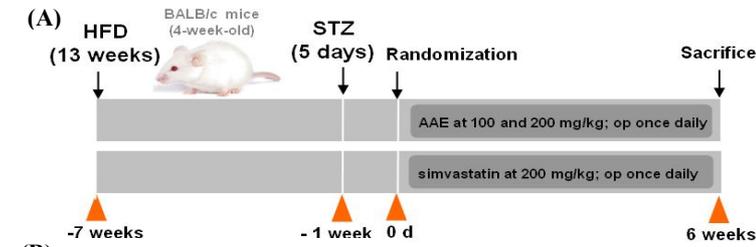


Table 1. Composition of the artemisia argy extracts (AAE)

Composition	AAE
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)	14.3 ± 0.7%
Total flavonoid (Jia method)	26.9 ± 3.2%

Fig. 1. Effect of AAE on food intake and body weight after HFD combined with STZ (HS) treatment in mice. HS treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with AAE (100 and 200 mg/kg) or simvastatin (200 mg/kg) for 6 weeks. (A) Flow chart of AAE attenuated the HS treatment-induced the metabolism syndrome. The Food intake (B), and body weight (C) were recorded weekly. The quantitative data are presented as mean ± SD (n=9).

Fig. 2

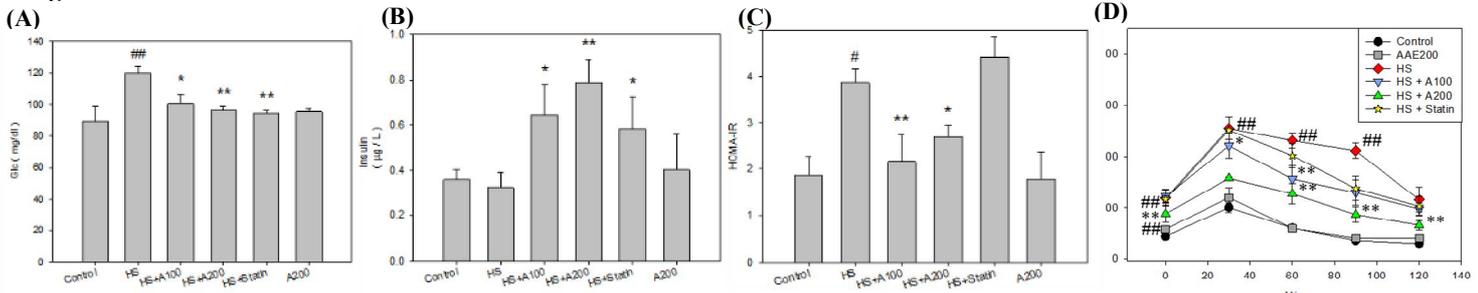


Fig. 2. Effect of AAE on insulin resistance after HS treatment in mice. HS treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with AAE (100 and 200 mg/kg) or simvastatin (200 mg/kg) for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, serum were collected for analysis. Fasting blood sugar (A) and insulin levels (B) were detected. (C) HOMA-IR was calculated by the fasting blood sugar and insulin levels. (D) Oral glucose tolerance (OGTT) was measured in 6th week. The quantitative data are presented as mean ± SD (n=9) from the independent experiments. #p < 0.05, ###p < 0.01 compared with the control group. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the group of HS treatment group.

Table 2. Effects of AAE on the serum biochemical parameters of mice induced by HS treatment in mice.

	Control	HS	HS + A100	HS + A200	HS + statin	A200
TC (mg/dl)	151.08±16.43	227.81±22.14 ^{###}	203.67±7.23	184.28±9.02*	196.10±9.90*	161.71±12.15
TG (mg/dl)	168.34±34.13	150.00±8.19	122.00±15.94*	120.75±4.86**	147.33±22.05	216.33±45.24
HDL-c (mg/dl)	53.14±10.88	67.667±9.56*	83.00±4.30*	85.00±8.29**	84.00±5.48*	59.88±6.90
LDL-c (mg/dl)	65.43±7.74	86.00±1.00 ^{###}	83.50±1.29*	75.00±2.00**	78.00±1.41**	63.50±5.01
LDL-c/HDL-c	1.29±0.34	1.26±0.15	1.01±0.06*	0.91±0.10*	0.89±0.04*	1.08±0.167
AST (U/L)	156.80±26.65	237.00±27.51 ^{###}	190.67±9.29	215.33±2.08	178.67±35.44	156.50±35.52
ALT (U/L)	24.00±4.12	43.50±6.36 ^{###}	20.33±4.0415*	29.25±5.5603*	31.33±2.8868	22.38±5.7056
BUN (mg/dl)	17.23±1.54	21.53±1.92*	14.84±1.07*	15.16±1.44*	14.43±1.59*	15.79±2.78
CRE (mg/dl)	0.31±0.03	0.38±0.04 ^{###}	0.38±0.05	0.32±0.04*	0.33±0.05	0.30±0.00

Each value is expressed as the mean ± SD (n=9). Duration of the experiment = 6 weeks. Results were statistically analyzed with Student's t test. TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; GLU, glucose; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. #p < 0.05, ###p < 0.01 compared with the control group. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the group of HS treatment group.

SDS-PAGE analysis of albumin expression was carried out with urine from them. The quantitative data are presented as mean ± SD (n = 3) from three independent experiments. The quantitative data are presented as mean ± SD (n = 10) from three independent experiments. #p < 0.05, ###p < 0.01 compared with the control group. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the group of HS.

Fig. 3

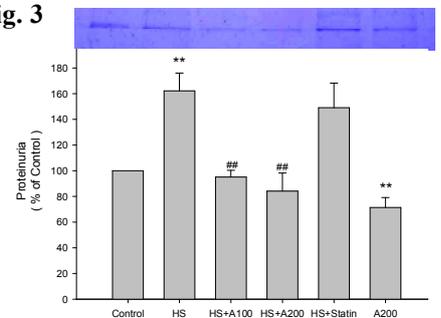


Fig. 3. Effect of AAE on urinary albumin after HS treatment in mice. HS treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with AAE (100 and 200 mg/kg) or simvastatin (200 mg/kg) for 6 weeks. The 6th urine was collected for

Fig. 4

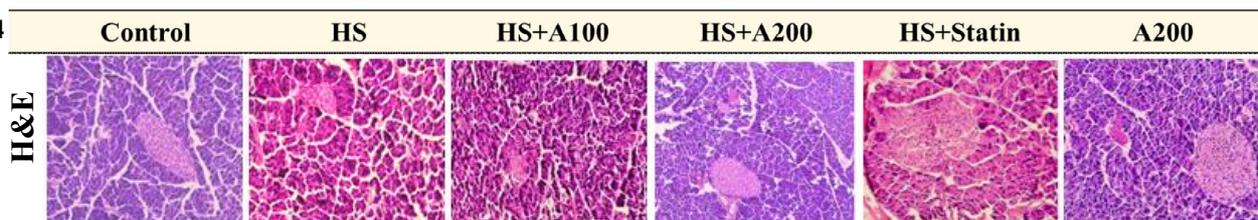


Fig. 4. Effect of AAE on pancreas histopathology after HS treatment in mice. HS treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with AAE (100 and 200 mg/kg) or simvastatin (200 mg/kg) for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and pancreas tissue was collected for analysis. Representative and 200X images of pancreas sections from different dietary treatments (n=9/group) stained with H&E to display the pancreas tissue architecture and the morphology of islets cells.

Fig. 5

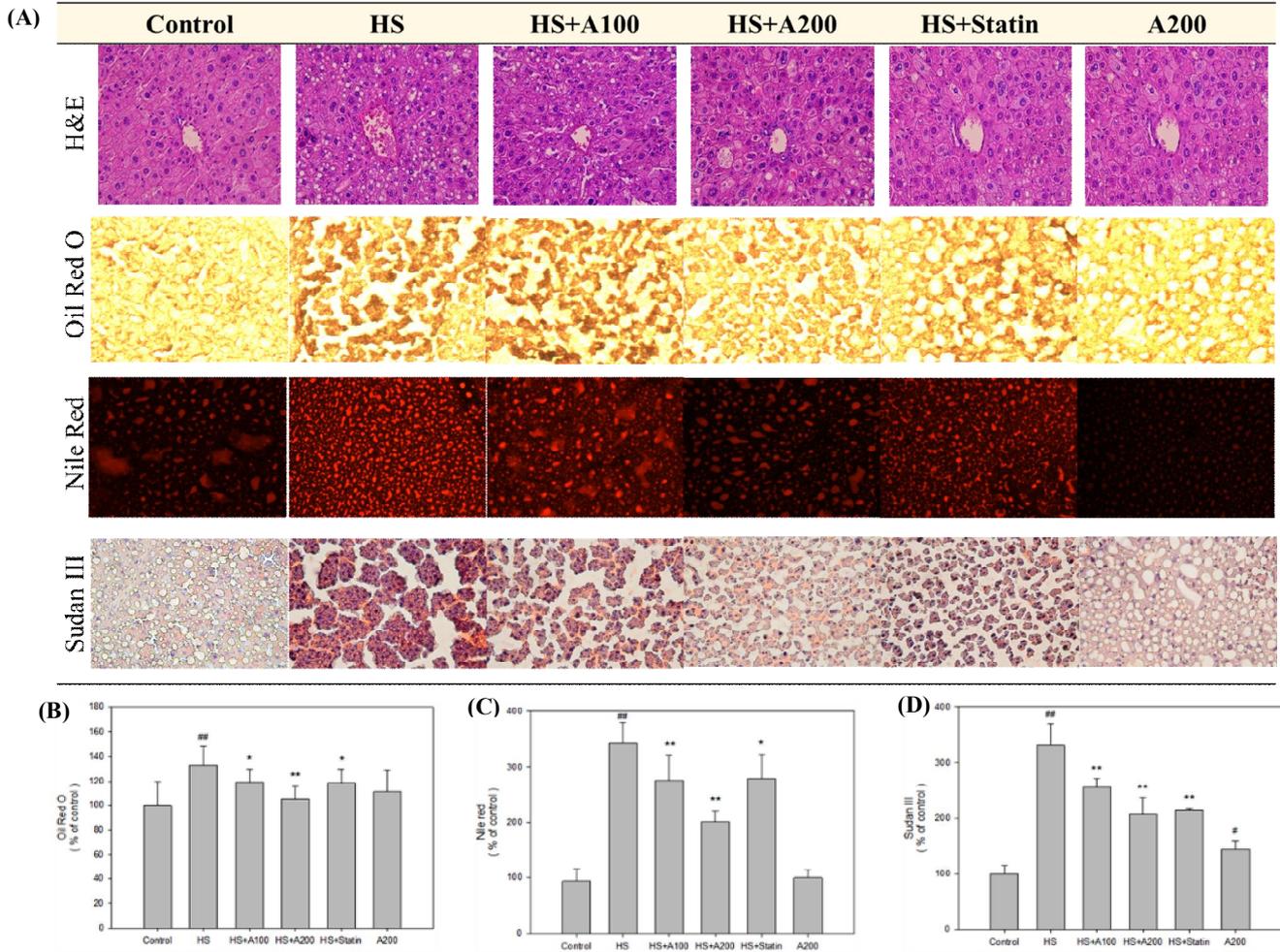


Fig. 5. The effect of AAE on liver histopathology and lipid accumulation after HS treatment in mice. HS treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with AAE (100 and 200 mg/kg) or Simvastatin (200 mg/kg) for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, serum were collected for analysis. (A) The liver was made into paraffin section and frozen section. Paraffin sections were stained with H&E stain and frozen sections were stained with Oil Red O, Nile Red and Sudan III. Statistic analysis of Oil Red O (B), Nile Red (C) and Sudan III (D)-positive area was expressed as % of total area among different groups (n=9/ group). The quantitative data are presented as means \pm SD of three independent study. $###P < 0.01$, compared with control. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with the group of HS treatment group.

Fig. 6

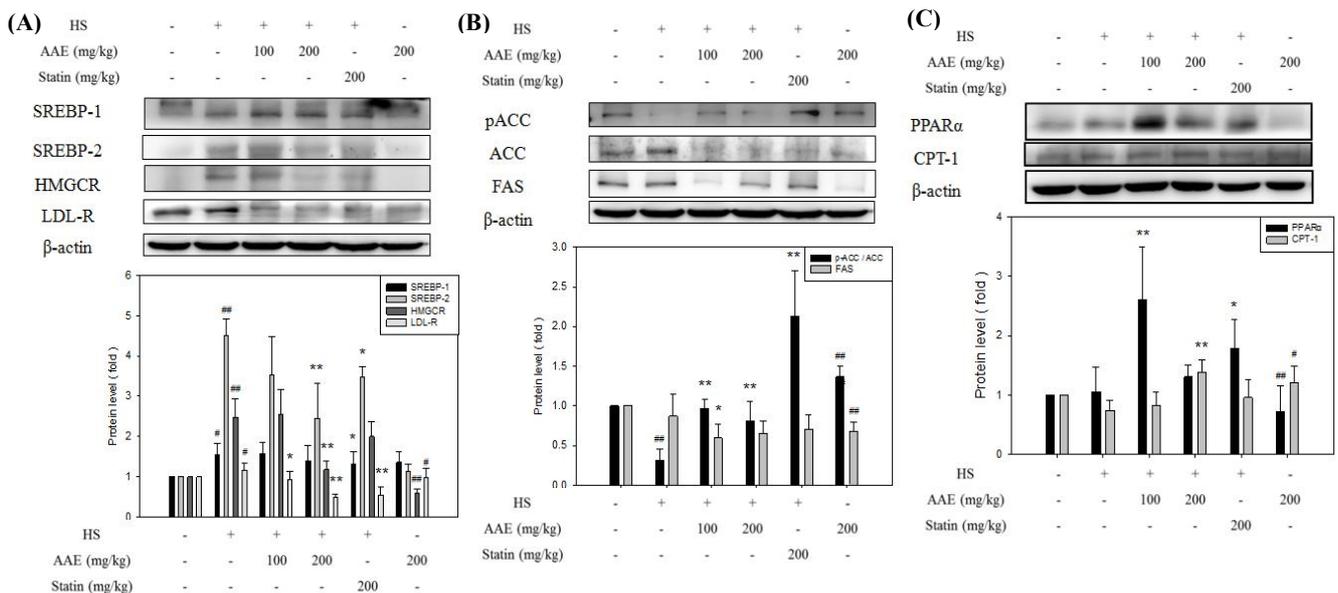


Fig. 6. The in vivo effect of AAE on hepatic lipid metabolism after HS treatment in mice. HS treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with AAE (100 and 200 mg/kg) or simvastatin (200 mg/kg) for 6 weeks, liver tissue were collected for analysis. The protein levels of cholesterol and TG lipogenesis-related factors, including SREBP-1, SREBP-2, HMGCR and LDLR (A), and p-ACC, ACC, and FAS (B) and lipolysis-related factors, including PPAR α and CPT-1 (C) were determined by Western blotting. β -actin was served as an internal control of protein level. The quantitative data are presented as means \pm SD from three independent study. $#P < 0.05$, $##P < 0.01$, compared with control. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with the group of HS.

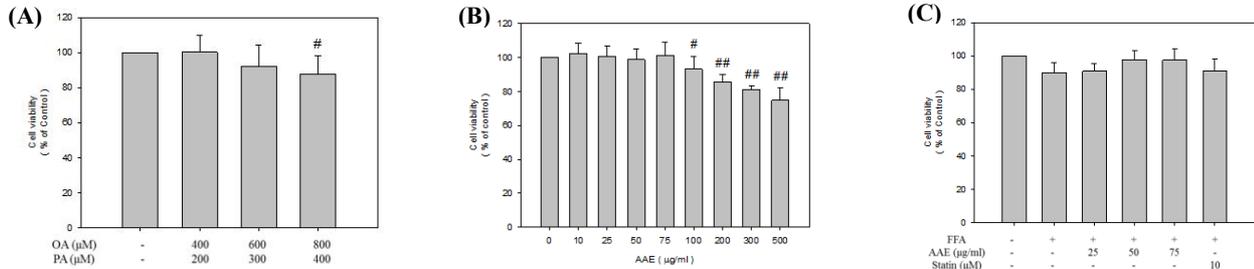
Fig. 7

Fig. 7. The effect of AAE and free fatty acid alone or in combination on HepG2 cell viability. (A-B) HepG2 cell were treated with mixture of OA (400-800 μM) plus PA (200-400 μM, A), or various concentration of AAE (0-500 μg/ml, B) or for 24 h. (C) HepG2 cells were treated with FFA (600 μM of OA and 300 μM of PA) in the presence or absence of indicated concentrations of AAE (25, 50 and 75 μg/ml) or statin (10 μM) for 24 h. The cell viability was analyzed by cell counting assay. The result represent the average of three independent experiments ± SD. #P<0.05, ###P<0.01 compared with of control.

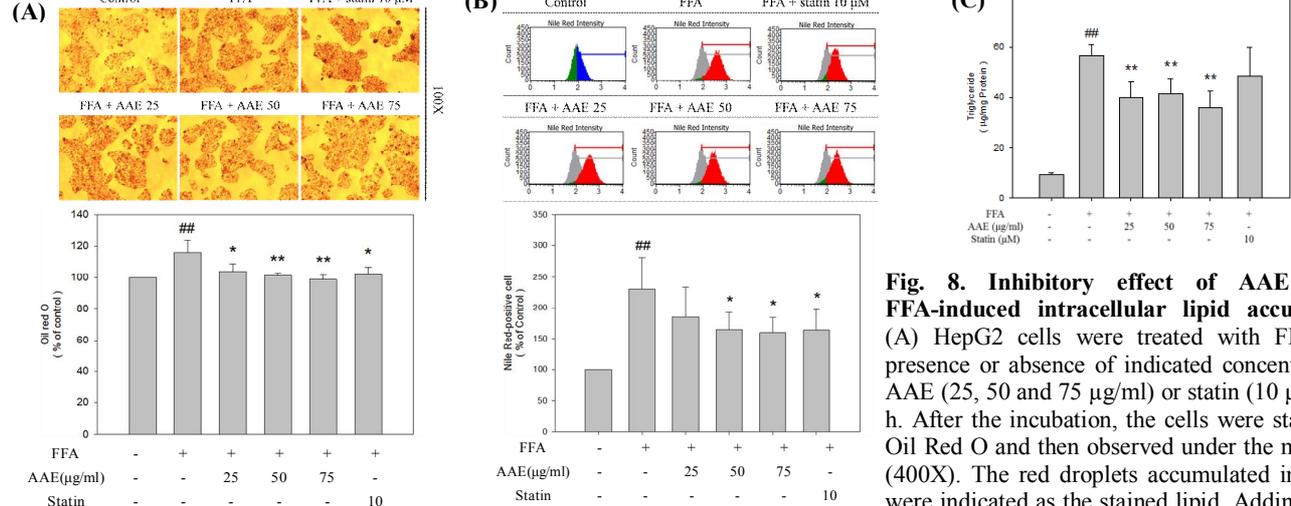
Fig. 8

Fig. 8. Inhibitory effect of AAE on the FFA-induced intracellular lipid accumulation.

(A) HepG2 cells were treated with FFA in the presence or absence of indicated concentrations of AAE (25, 50 and 75 μg/ml) or statin (10 μM) for 24 h. After the incubation, the cells were stained with Oil Red O and then observed under the microscope (400X). The red droplets accumulated in the cells were indicated as the stained lipid. Adding 1 mL of isopropanol to the stained culture dish, and then its absorbance was monitored at 492 nm. (B) Quantification of intracellular fat content with flow cytometric analysis, as assessed by Nile red staining. (C) Total intracellular triglyceride was analyzed using enzymatic colorimetric method and expressed as μg/mg protein. The quantitative data are presented as means ± SD from three independent study. ##p< 0.01 compared with the control. *p< 0.05, **p< 0.01 compared with the FFA-treated group.

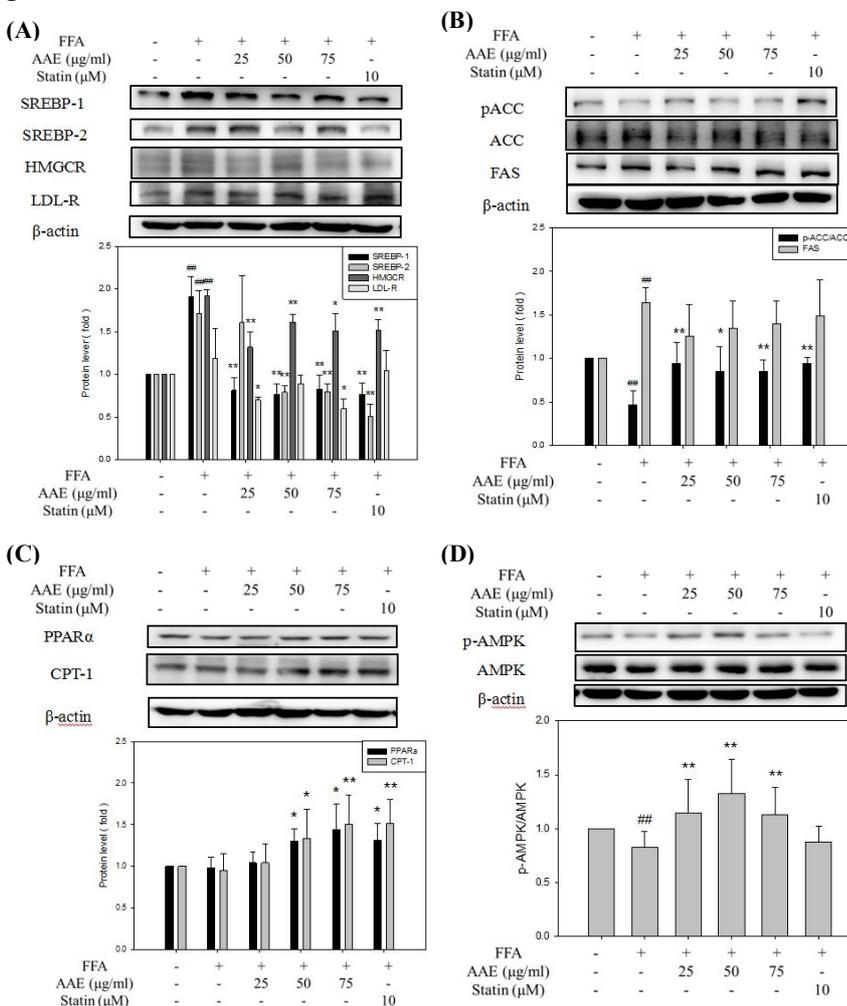
Fig. 9

Fig. 9. The in vitro effect of AAE on hepatic lipid metabolism in the FFA-treated HepG2 cells.

HepG2 cells were treated with FFA in the presence or absence of indicated concentrations of AAE (25, 50 and 75 μg/ml) or statin (10 μM) for 24 h. The protein levels of cholesterol and TG lipogenesis-related factors, including SREBP-1, SREBP-2, HMGCR and LDLR (A), and p-ACC, ACC, and FAS (B), lipolysis-related factors, including PPARα and CPT-1 (C), and p-AMPK, and AMPK were determined by Western blotting. β-actin was served as an internal control of protein level. The quantitative data are presented as means ± SD from three independent study. #P<0.05, ##P<0.01, compared with control. *P<0.05, **P<0.01, compared with FFA-treated group.

Fig. 10

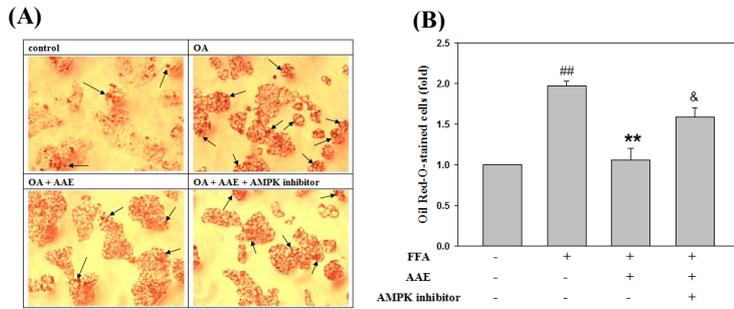


Fig. 10. Effect of AMPK inhibitor dorsomorphin on AAE-inhibited lipid accumulation in the FFA-treated cells. (A) HepG2 cells were pretreated with dorsomorphin (3 μ M) for 15 min, and then treated with FFA in the presence or absence of indicated concentrations of AAE (50 μ g/ml) for 24 h. (A) After the incubation, the cells were stained with Oil Red O and then observed under the microscope (200x). The red droplets accumulated in the cells were indicated as the stained lipid. (B) Adding 1 mL of isopropanol to the stained culture dish, the extracted dye was diluted 5x in ddH₂O, and then its absorbance was monitored at 492 nm. The quantitative data are presented as means \pm SD of three repeats from three independent study. ^{##}p < 0.01 compared with the control. ^{**}p < 0.01 compared with the FFA-treated group. [&]p < 0.05 compared with the FFA combined AAE-treated group.

Fig. 11

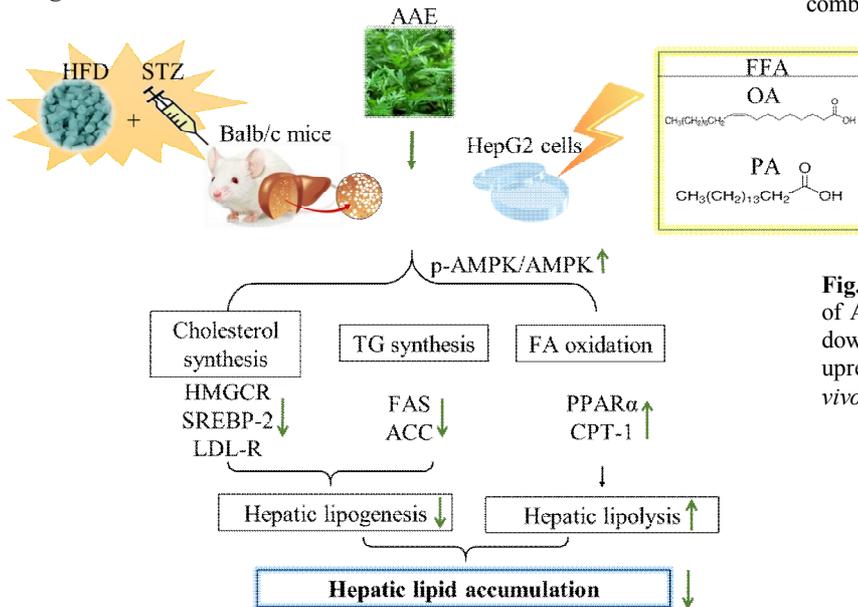


Fig. 11. A proposed model for the anti-metabolism potential of AAE on hepatic lipid accumulation via AMPK-mediated downregulation of lipogenesis-regulatory proteins and upregulation of lipolysis-regulatory proteins *in vitro* and *in vivo*.

106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：林慧萱		計畫編號：106-2320-B-040-010-			
計畫名稱：艾草萃取物成份改善代謝症候群及相關調控標靶之研究					
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	1	Yu-Ting Hsueh, Jing-Hsien Chen, Cheng-Chin Hsu, and Hui-Hsuan Lin*. The study of the inhibitory effect of Artemisia argyi extracts on metabolic syndrome and hepatic lipid accumulation. Food Chemistry. prepared, 2018.	
		研討會論文	2	1. Yu-Ting Hsueh, Hui-Hsuan Lin, Cheng-Chin Hsu, Jing-Hsien Chen*. Study of Artemisia argyi extracts on metabolic syndrome. The 44th Joint Annual Conference of Nutrition Society of Taiwan. New Taipei City, R.O.C. May 26, 2018. 2. Yu-Ting Hsueh, Yue-Ching Wong, Cheng-Chin Hsu, Jing-Hsien Chen*, Hui-Hsuan Lin*. Inhibitory effect of Artemisia argyi extracts on hepatic lipid accumulation in vivo and in vitro. 9th International Conference on Nutrition and Physical Activity (NAPA2018), Taichung City, R.O.C. Dec 17-19, 2018.	
		專書	1	本	Yu-Ting Hsueh, The study of the inhibitory effect of Artemisia argyi extracts on metabolic syndrome and hepatic lipid accumulation, Master Thesis, 2018.
		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
	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		0	篇		
		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		4	人次	兼任研究助理(學士)四名：楊薇楨、吳美鳳、謝毓庭、呂欣怡
			碩士生		2		兼任研究助理(碩士)二名：吳映璇、張艾華
			博士生		0		
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。)			獲獎情形：第四十四屆營養年會暨學術研討會壁報論文競賽基礎營養組優等獎				

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）

（1）本計畫研究之成果確認艾草萃取物成份具有降血壓、降血糖、降血脂、具有保護胰島細胞免於損傷、排除肝臟脂肪堆積、調節肝臟脂肪代謝等作用，將提供臨床代謝症候群或代謝性疾病（脂肪肝）患者新的治療方向。

（2）本研究計畫之成果，不僅可以有效地充分利用天然的萃取物及其成分可以改善代謝症候群、抑制代謝症候群衍生之疾病及相關機轉，更可以深入地瞭解造成人類代謝症候群之成因和分子致病機制，對代謝症候群的預防和控制具有重要貢獻。

（3）本計畫除功能性研究外，同時也完成艾草萃取物之動物毒理評估。

（4）本研究建立HFD合併STZ誘導代謝症候群之實驗動物模式，以及游離脂肪酸誘發肝臟產生脂質堆積之細胞模式，作為探討代謝症候群致病成因之平台，可應用為將來發展改善代謝症候群保健食品開發之研究，在學術研究上有貢獻。

（5）經由本研究開發艾草萃取物為具有多重有效成份，可抑制代謝症候群多項危險因子的單一健康食品，也可以作為預防或輔助治療代謝症候群保健食品開發研究。

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
(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)