

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計畫名稱	： 桑葉功能性成分改善糖尿病性阿茲海默症與神經細胞發炎之機制
------	--------------------------------

報告類別： 成果報告
執行計畫學生： 林子翔
學生計畫編號： MOST 110-2813-C-040-006-B
研究期間： 110年07月01日至111年02月28日止，計8個月
指導教授： 黃惠珮

處理方式： 本計畫可公開查詢
執行單位： 中山醫學大學醫學系生化學科
中華民國 111年03月16日

目錄

壹、摘要.....	2
貳、英文摘要.....	3
參、研究動機與研究問題.....	4
肆、文獻回顧與探討.....	6
伍、研究方法及步驟.....	9
陸、實驗結果.....	11
柒、討論.....	12
捌、結論.....	13
玖、參考文獻.....	13
壹拾、實驗圖表.....	16

壹、摘要

近年來我國老年人口不斷上升，失智症人數也越來越多，而其中阿茲海默症 (Alzheimer's disease, AD) 佔了失智症六成以上。AD 在病變過程中會因為發炎及氧化壓力導致 β -amyloid ($A\beta$) 的累積以及 tau 蛋白的過度磷酸化。另外一個常見的慢性病為糖尿病 (Diabetes mellitus)，根據研究估計 2045 年全球糖尿病患者可能高達 5.5 億人，糖尿病所引起的氧化壓力會導致粒線體失能，使 Reactive oxygen species (ROS) 上升，可能引起神經細胞的死亡，最終導致阿茲海默症的發生，兩者具有相關性。

本實驗室先前發現桑葉水萃物 (Mulberry leaf extract, MLE) 具有抗氧化能力，其主要成分為氯原酸 (Chlorogenic acid, CGA)、新氯原酸 (Neochlorogenic acid, NCGA) 以及 Cryptochlorogenic acid。已有研究指出 CGA、NCGA 具有抗氧化、抗發炎的作用，可能藉由此二路徑，達到保護神經細胞的功能。先前實驗室以 MLE 來餵食糖尿病基因缺陷小鼠 (db/db mice)，發現中腦黑質及紋狀體神經病變相關蛋白 α -synuclein 及 β -amyloid 都有顯著減少，代表 MLE 可能改善糖尿病小鼠的神經系統功能。我們也發現在 MTT 試驗中，CGA 與 NCGA 可以提升糖尿病環境下的 SH-SY5Y 細胞存活率，但是其相關機轉尚不明瞭。

本研究進行 SH-SY5Y 的細胞實驗以確認 CGA 或 NCGA 保護神經細胞的相關機轉，在流式細胞技術分析顯示，經由 Palmitic acid (PA) 加上 glucose (G) 誘導用以模擬糖尿病環境的組別，其 ROS 從控制組的 44.29% 上升到 62.95%，而添加了 CGA、NCGA 的組別，其細胞內的 ROS 含量分別下降至 36.19% 與 33.13%，下降至控制組的水準，證實其具有降低神經細胞內 ROS 的能力，後續我們在西方點墨法的實驗結果也發現 CGA、NCGA 也具有提升 SOD 與 GSH-Px 抗氧化酶的能力。除此之外，我們也發現 CGA、NCGA 能夠降低促發炎蛋白，尤其對 NF κ B 的效果更是顯著，從誘導組的 188.10% 下降至 CGA 的 120.86% 以及 NCGA 的 70.00%，對其他的發炎因子也有相當程度的效果，如 iNOS、TNF α 、IL-6。我們也分析了可幫助神經生長的 BDNF 蛋白，發現其也從誘導組的 90.08% 提升至 CGA 組的 118.50% 以及 NCGA 組的 135.22%。最後我們發現 $A\beta$ 在誘導後大幅提升，但隨著加入 CGA、NCGA 而有所下降。從以上的實驗結果可推斷 CGA 及 NCGA 可能透過降低氧化壓力、減少神經細胞發炎以及提升 BDNF 三種路徑來保護 SH-SY5Y 細胞，具有改善神經退化性疾病的潛力，後續的研究者也許可以利用此兩種物質開發出相關的治療藥物或保健食品，以治療或預防 AD 的發生。

貳、 英文摘要

The elderly population of Taiwan increases in recent years as well as the population of dementia. Alzheimer's disease (AD) accounts for more than 60% of dementia cases. The pathogenesis of AD is connected to excessive oxidative stress and neuroinflammation, which result in deposition of β -amyloid ($A\beta$) and phosphorylation of tau protein. Another common chronic is diabetes mellitus (DM). It is estimated that there will be 550 million people living with DM in 2045 worldwide. The oxidative stress resulted from DM can cause dysfunction of mitochondria, leading to overproduction of reactive oxygen species (ROS) and finally the death of neurons. DM and AD share the same pathological pathways and therefore are connected.

Our team previously found that mulberry leaf extract (MLE) has anti-oxidative effect. Its main components include Chlorogenic acid (CGA), Neochlorogenic acid (NCGA) and Cryptochlorogenic acid. Research has indicated that CGA and NCGA can decrease inflammation and oxidative stress, and therefore protect neuronal cells. Our previous study show that MLE can help reduce α -synuclein and $A\beta$ in substantia nigra and corpus striatum of db/db mice, which indicated MLE may improve the neurological function of db/db mice. We also performed MTT assay and found CGA and NCGA increased the viability of SH-SY5Y cells in diabetic environment, but the further mechanism remains unknown.

This study aimed to explore how CGA and NCGA provide neuroprotective effect on SH-SY5Y cells. The analysis of flow cytometry revealed the ROS of cells treated with palmitic acid (PA) and glucose (G) increased from 44.29% to 62.95%. However, after the addition of CGA and NCGA, the ROS reduced to 36.19% and 33.13% respectively. This result demonstrated that CGA and NCGA can bring down the ROS in SH-SY5Y cells treated with PA+G. The western blot also showed that expressions of some antioxidant enzymes, SOD and GSH-Px, decreased after treated with PA+G. Nevertheless, the addition of CGA and NCGA increased expressions of SOD and GSH-Px. Besides, some pro-inflammatory protein increased in group PA+G, but were reduced by CGA and NCGA, namely NF κ B, iNOS, TNF α and IL-6, presented in an order of group PA+G, PA+G+CGA, PA+G+NCGA. Moreover, the level of BDNF also reduced in group PA+G (90.08%) and was improve in group PA+G+CGA (118.50%) and PA+G+NCGA (135.22%). Finally, the expression of $A\beta$ rose significantly after induced by PA+G and was brought down by CGA and NCGA. From these results, we believed that CGA and NCGA can protect SH-SY5Y cells by reducing oxidative stress, improving neuroinflammation and boosting the level of BDNF and therefore have the potential of improving AD and other neurodegenerative diseases.

參、 研究動機與研究問題

一、研究動機

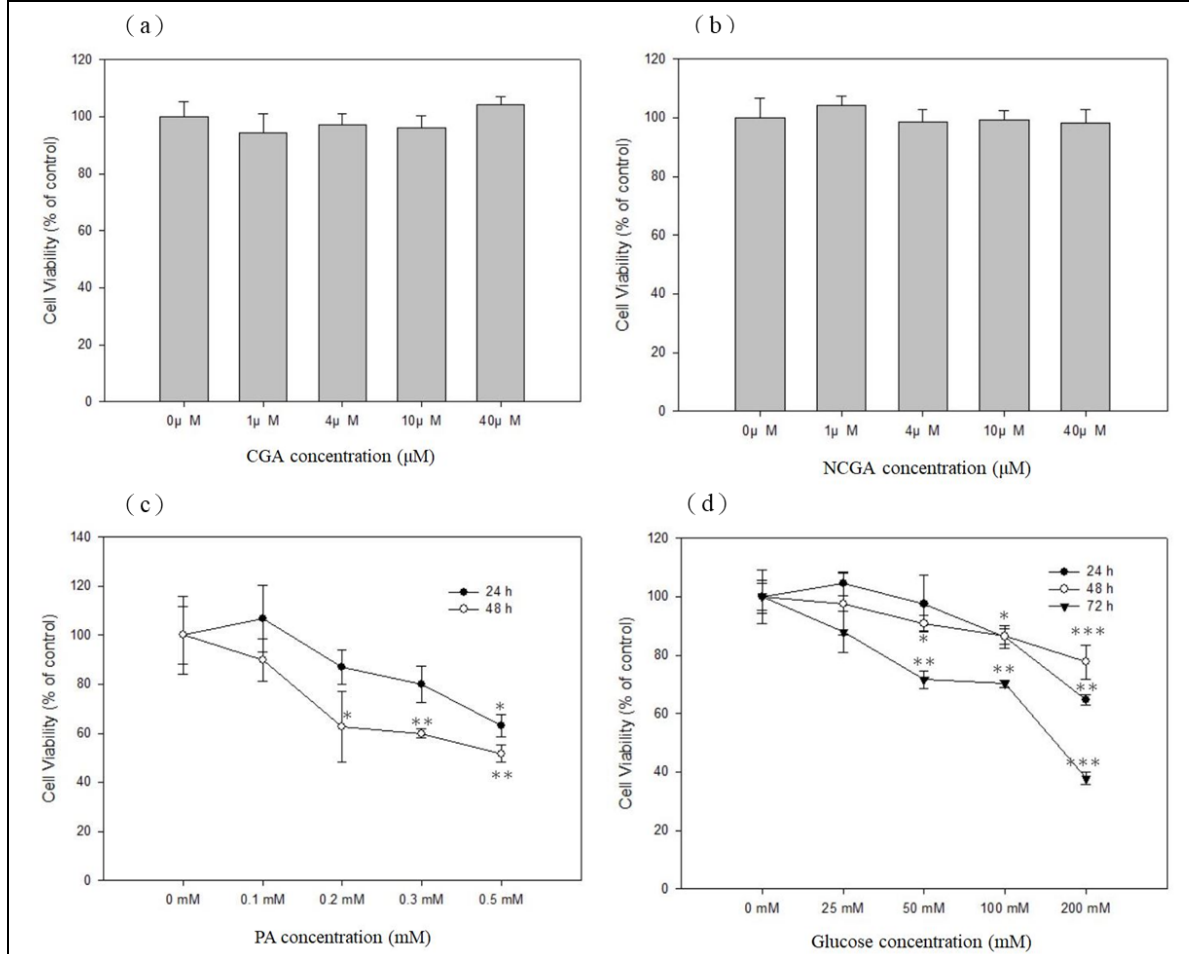
根據世界衛生組織的資料，全世界約有 5000 萬的失智症人口，每年有 1000 萬個新增病患，每年要花費 8180 億美金在失智症的醫療與照護上，而我國在 2019 年已邁入高齡化社會，預估老年人口將會持續增加，根據國家發展委員會的資料顯示，2020 年我國 65 歲以上人口佔總人口數 16%，預估到 2050 年老年人口佔的比例就會達到 36.6%，老年人口數也會從 2020 年的 378 萬人到 2050 年的 745 萬人，而根據台灣失智症協會的資料，年紀越大，失智症的盛行率越高，在 85~89 歲的區間盛行率達到 21.92%，隨著平均年齡的增加，失智症患者人數將會快速成長，預估 2050 年將會達到 83 萬人，伴隨少子化的影響，失智症比例會佔總人口數的 4%，等於每 25 人就有 1 人失智，對社會經濟造成相當大的影響，因此如何預防、改善失智症是相當重要的議題，而 AD 佔了失智症患者六成以上的比例，因此如果能研究出改善 AD 的藥物，就能幫助一半以上的失智症患者。

目前已有研究指出慢性神經發炎反應會導致 AD 的發生，發炎會導致 A β 單體的增加並形成 A β 斑塊；發炎另外會造成 tau 蛋白磷酸化，除此之外發炎也會導致神經退化，這三個路徑都跟發炎有關[1]，由上述可知抗發炎對改善 AD 相當重要。另外由於 ROS 與發炎會交互影響[2]，因此抗氧化對於改善 AD 也是同樣不可忽視的。

之前的研究已證實桑葉萃取物 (MLE) 具有抗發炎的效果[3]，本實驗室利用高效液相色譜法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 測出桑葉中主要成分為氯原酸 (Chlorogenic acid, CGA)、新氯原酸 (Neochlorogenic acid, NCGA) 及 Cryptochlorogenic acid，並且測出 CGA、NCGA 具有較強的抗氧化能力，因此本實驗將會探討 CGA 及 NCGA 是否能利用其抗氧化、抗發炎的特性來保護 SH-SY5Y 人類神經母細胞瘤細胞，改善其發炎的狀態以避免 AD 的指標上升。

本實驗室先前已做了棕櫚酸 (Palmitic acid, PA)、Glucose (G)、CGA、NCGA 對細胞毒性的分析 (MTT assay)，以確定 CGA、NCGA 的非致死劑量，再以 PA+G 作為誘導組模擬糖尿病環境，再分別添加適當劑量的 CGA、NCGA 觀察其對 SH-SY5Y 的細胞存活率的影響，其結果如下：

單獨加藥的 MTT assay 實驗結果



附圖一：單獨加藥 MTT assay 實驗結果

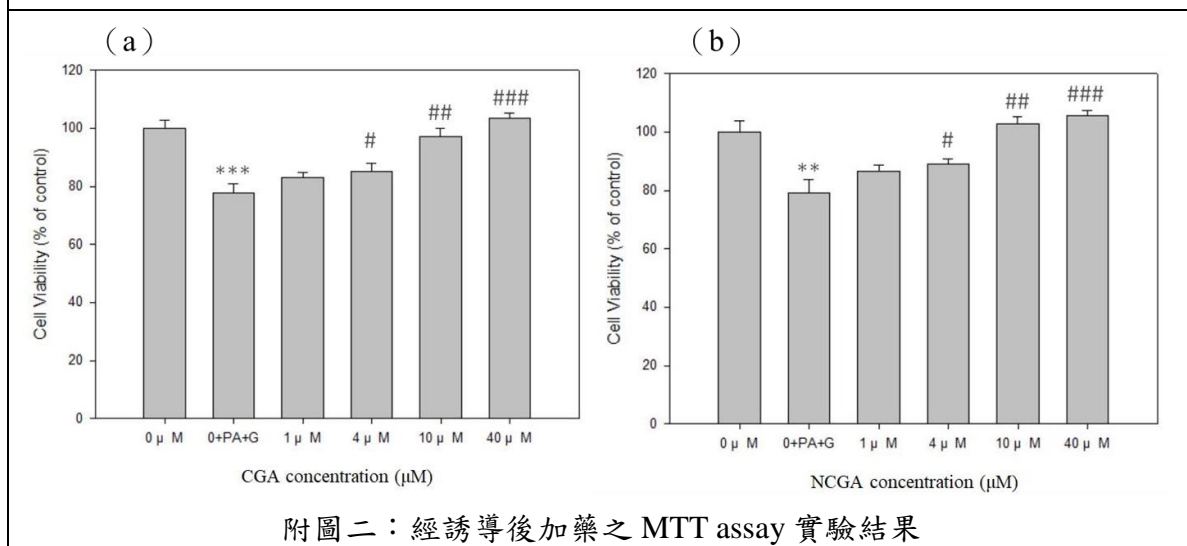
附圖一：CGA、NCGA、PA、glucose 對 SH-SY5Y 細胞毒性測驗結果

(a) CGA (0、1、4、10、40μM) (b) NCGA (0、1、4、10、40μM) 對 SH-SY5Y 細胞毒性測驗結果 (MTT assay)，加至 96-well 盤置於細胞恆溫培養箱經過 24 小時作用。(mean ± SD)

(c) PA (0、0.1、0.2、0.3、0.5 mM) (d) glucose (0、25、50、100、200 mM) 對 SH-SY5Y 細胞毒性測驗結果 (MTT assay)，加至 96-well 盤置於細胞恆溫培養箱經過 24、48、72 小時作用。(mean ± SD，並且以 Student's t-test 統計與對照組是否有統計上的顯著意義，*代表 p<0.05，**代表 p<0.01，***代表 p<0.001)

從 CGA、NCGA 的 MTT assay 中可發現直到 40μM 的濃度細胞的存活率都無下降，說明了 SH-SY5Y 細胞在 40μM 濃度的處理下並不會造成細胞的死亡，而 PA 的濃度越高，細胞的存活率就越低，由於其他研究使用了 0.3mM 的劑量[4]，所以之後的實驗也採用 0.3mM 的 PA 處理 24 小時的方式進行實驗。Glucose 也是在劑量越高的時候，細胞存活率越低，由於其他研究使用了 50mM 的劑量[5]，故接下來的實驗也採用 50mM 濃度的 Glucose 對細胞進行處理 24 小時進行實驗。

經 PA+G 誘導後加藥的 MTT assay 實驗結果



附圖二：經誘導後加藥之 MTT assay 實驗結果

附圖二：經 PA+G 誘導後 CGA 與 NCGA 對 SH-SY5Y 細胞存活率的作用

對 SH-SY5Y 細胞先加入 PA 0.3 mM 與 Glucose 50 mM (0+PA+G) 作為誘導組，再分別加入(a) CGA (0、1、4、10、40 μM) (b) NCGA (0、1、4、10、40 μM)，加至 96-well 盤置於細胞恆溫培養箱經過 24 小時作用以觀察對細胞存活率的影響。(mean ± SD, 並且以 Student's t-test 統計, **代表 p<0.01, ***代表 p<0.001 為跟 0μM 組比較; #代表 p<0.05, ##代表 p<0.01, ###代表 p<0.001 為跟 0+PA+G 組比較)

由此實驗結果可知，CGA、NCGA 具有提升以 PA+G 誘導的 SH-SY5Y 細胞存活率的能力，因此推測其可能具有在糖尿病環境下保護神經細胞的功能，且在 40μM 的濃度下效果最佳，因此將會延續使用 40μM 的濃度作為後續實驗使用的劑量。

從以上實驗結果，我們認為 CGA、NCGA 具有在糖尿病環境下達到神經保護的效果，因此可能具有預防或是改善阿茲海默症的功能，藉由之後的實驗我們將進一步驗證其效果，期望未來能夠造福阿茲海默症的患者，促進社會福祉。

二、研究問題

1. CGA、NCGA 是否能夠減少受棕櫚酸 (Palmitic acid) 及葡萄糖誘導 SH-SY5Y 的發炎蛋白表現量？進一步能夠減少發炎導致的神經傷害？
2. CGA、NCGA 是否能夠降低受棕櫚酸 (Palmitic acid) 及葡萄糖誘導 SH-SY5Y 細胞中的 ROS 含量，並且降低相關酵素 (如 iNOS) 的活性？

肆、文獻回顧與探討

一、阿茲海默症簡介

阿茲海默症病 (Alzheimer's disease, AD) 是一種尚不確定原因和發病機制的神經退化性疾病，主要影響年長者。AD 為失智症最常見的原因。其可能的病理機轉主要包含 β-amyloid (Aβ) 的過度產生或是清除率的減少，累積後會形成具有神經毒性的 β-類澱粉斑塊 (β-amyloid plaque); AD 的病理機轉還涉及到另外一個蛋白：tau 蛋白，tau 蛋白如果過度磷酸化會在神經元細胞質中形成神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles)，在實驗模型中，這種改變後的蛋白質累積在細胞質中也會產生神經毒性。[6]

臨床上，其造成的症狀為記憶力衰退、執行能力及問題解決能力下降、視覺與空間認知出現障礙、神經精神症狀—尤其是在疾病的中晚期，包括排斥社交、情緒不穩等等。[7]

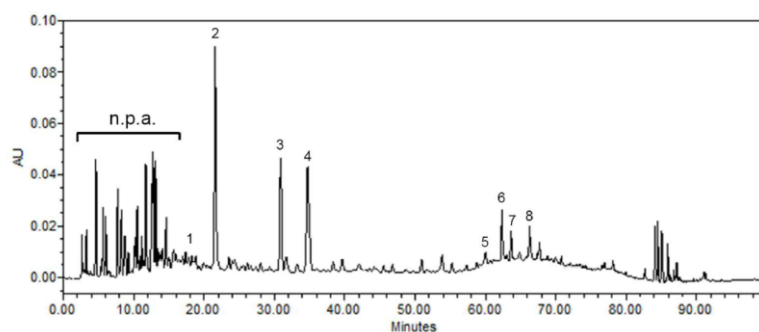
二、 糖尿病

糖尿病的特徵為高血糖，與碳水化合物代謝異常有關，與胰島素的分泌異常或是胰島素阻抗有關，糖尿病又常分為兩型，第一型糖尿病 (Type 1 Diabetes mellitus, T1DM) 的特徵是胰腺 β 細胞因自體免疫被破壞，導致無法產生胰島素，而無法降低血液中的葡萄糖，造成高血糖的現象；第二型糖尿病 (Type 2 Diabetes mellitus, T2DM) 為成人最常見的糖尿病類型 (>90%)，因胰島素阻抗導致胰島素分泌逐漸減少，而形成胰島素相對缺乏導致高血糖。[8]

先前的研究已指出 T2DM 患者有較高的風險得到 AD，T2DM 病人腦部的胰島素阻抗，而大腦中的胰島素受器被認為跟學習與長期記憶有關，同時也調控神經細胞的存活 (Neuronal survival)、能量代謝以及神經可塑性，因此若腦部胰島素無法接上受體，則會影響認知功能並且導致腦部的退化。[9]

三、 桑葉

桑葉為桑科 (Moraceae) 桑屬 (Morus) 的桑科植物乾燥老葉，在亞洲地區廣泛種植，桑葉被當作中藥用來治療高血脂及代謝疾病 [10]，桑葉中含有多種酚醛類物質，以 HPLC 進行測定，包含兒茶酸 (Protocatechuic acid)、新氯原酸 (Neochlorogenic acid, NCGA)、氯原酸 (Chlorogenic acid, CGA)、隱氯原酸 (Cryptochlorogenic acid)、煙花苷 (Nicotiflorin)、蘆丁 (Rutin)、異槲皮素 (Isoquercitrin)、紫雲英苷 (Astragalgin)。其中以 NCGA、CGA 及 Cryptochlorogenic acid 在桑葉成分裡含量最多。[11]



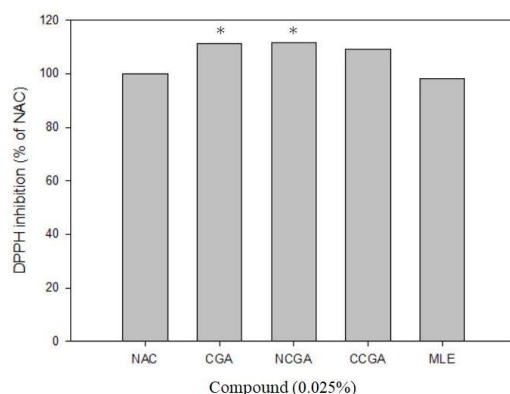
(附圖三：MLE 的 HPLC chromatogram [11])

Peak No.	RT (min)	[M-H] (m/z)	UV band (nm)	Compound Name	Concentration ($\mu\text{g}/10\text{ mg}$)	Intake/day (μg)
1	18.83	153.1	259.7 (max), 294.1	Protocatechuic acid	1.3 ± 0.6	6.3
2	21.58	355.7 [M+H]	241.9, 325.1 (max)	Neochlorogenic acid	35.5 ± 2.7	177.4
3	30.90	355.7 [M+H]	238.4, 326.3 (max)	Chlorogenic acid	23.8 ± 1.5	119.2
4	34.73	355.7 [M+H]	241.9, 326.3 (max)	Cryptochlorogenic acid	31.7 ± 2.4	158.7
5	60.05	595.9 [M+H]	265.6 (max), 177.4346.6	Nicotiflorin	3.5 ± 0.5	17.5
6	62.35	609.2	256.1 (max), 355.0	Rutin	9.2 ± 0.6	45.9
7	63.64	463.5	256.1 (max), 355.0	isoquercitrin	5.6 ± 0.7	28.1
8	66.28	449.7 [M+H]	265.6 (max), 346.6	Astragalgin	5.3 ± 0.5	26.7

RT, retention time.

(附圖四：MLE 的 HPLC chromatogram [11])

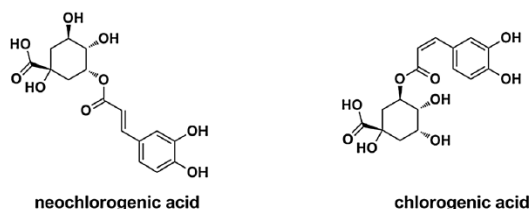
本實驗室先前以 0.00025% CGA、NCGA、Cryptochlorogenic acid 及 MLE，以 0.00025% NAC 作為 positive control，觀察對於 DPPH 的清除能力。DPPH 是一種深紫色粉末的自由基，遇氧化還原後會呈現黃色。使用光譜儀測定後，將數值代入清除率算式中，發現 CGA、NCGA 確實有較強的抗氧化能力。



(附圖五：DPPH inhibition of different compound from MLE)

目前已有研究指出 CGA 可以影響神經系統的功能，具有抗焦慮及抗氧化的作用 [12]、避免大鼠的空間記憶惡化及抑制海馬迴細胞損失 [13]，這些結果表示 CGA 可能具有改善神經退化疾病的潛力，而 NCGA 為 CGA 的同分異構物，為桑葉水萃物中含量最多的物質。由於此兩者具有抗發炎功能 [14] [15]，可能藉由抗發炎、抗氧化的功能降低 ROS 的產生以及降低氧化壓力對細胞的傷害，達到神經細胞的保護功能，以改善阿茲海默症。 [16]

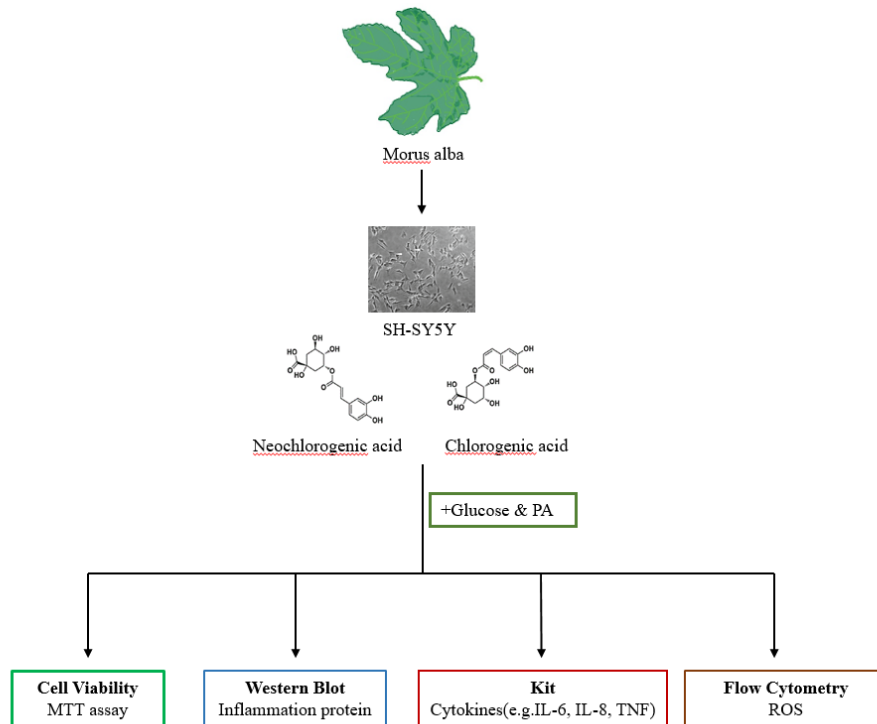
先前實驗室用桑葉水萃物 (MLE) 來餵食糖尿病基因缺陷小鼠 db/db mice，使用免疫螢光染色及西方墨點法發現餵食高脂飲食的小鼠大腦中，紋狀體及中腦黑質部份的神經病變相關蛋白 α -synuclein 及 β -amyloid ($A\beta$) 表現都有增加的情形；而多巴胺相關蛋白 Tyrosine Hydroxylase (TH) 的部份，餵食 MLE 的組別則有明顯的增加，代表 MLE 可能改善糖尿病小鼠的神經系統功能，並且減少阿茲海默症的相關病變蛋白，因此我們想利用 MLE 的主要成分：抗氧化能力較佳的 CGA、NCGA 作為細胞實驗的用藥。



(附圖六：NCGA 及 CGA 的化學結構式)

伍、 研究方法及步驟

一、 研究架構



二、 CGA、NCGA 來源

CGA、NCGA 為向岑信代理商訂購，原廠商為 SIGMA。

三、 細胞試驗

1. 細胞株的種類與來源

本研究採用 SH-SY5Y 人類神經母細胞瘤細胞，感謝中國醫藥大學生技製藥暨食品科學院營養學系的蔡佳文教授實驗室贈與。

2. 細胞培養

細胞培養於 75T flask 中，使用 Dulbecco's modified eagle High glucose (DMEM/H) 作為培養基，並添加 10% Fetal bovine serum (FBS)、5% Antibiotic antimycotic solution、2 mM L-glutamine、0.1 mM Non-Essential Amino Acid (NEAA)、1 mM sodium pyruvate、3.7 g/L sodium bicarbonate，置於 37°C、5% CO₂ 的細胞恆溫培養箱內培養。在繼代培養時先移除原本的培養基，再以 5 ml PBS 清洗，再將 PBS 吸除，然後再用 PBS 清洗一次後加入 1 ml Trypsin，使於細胞恆溫培養箱中作用 3 分鐘，取出後添加 4 ml DMEM 中和 Trypsin 的毒性，吸取至 15 ml 離心管以 1000 rpm 離心 5 分鐘，使細胞沉在離心管底下，去除上清液後用 10 ml DMEM 打散均勻，再吸至 75T flask 培養。每 2~3 天視細胞生長情形進行繼代培養。

3. 細胞存活試驗 (Cell Viability Assay)

數細胞之後將 SH-SY5Y 細胞濃度調整至 2.5×10^4 個/ml，再各取 200 μ l 培養於 96-well-plate，在細胞恆溫培養箱培養 24~48 小時，再分別加入待測藥物 (CGA、NCGA 添加 0、1、4、10、40 μ M 共五組；Glucose 添加 0、25、50、100、200 mM 共五組；Palmitic acid 添加 0、0.1、0.2、0.3、0.5 mM 共五組)，每個濃度做三重複。作用 24~48 小時後，將培養基吸掉，再以 DMEM 將 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 原液稀釋 10 倍作

為 MTT 試劑，在 96-well-plate 每格加入 200 μ l 的 MTT 試劑後，將其靜置於細胞恆溫培養箱 3 小時，此時 MTT 會與仍存活之細胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶作用，產生反應形成紫色的 formazan 結晶，將培養基吸除，再使用 Isopropanol 溶解紫色結晶，最後以 ELISA reader 以波長 563 nm 測得吸光值，可反推細胞經過藥物作用後的存活率。

四、西方墨點法 (Western Blot)

1. 細胞蛋白液收集

事先將細胞培養於在 10 cm 培養皿，培養 48 小時後依組別 (控制組、PA+G、PA+G+CGA、PA+G+NCGA) 加入 Glucose (G) 50 mM、Palmitic acid (PA) 0.3 mM、CGA 40 μ M、NCGA 40 μ M 作用 24 小時後，從細胞恆溫培養箱中取出。

先將 RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer, 放射免疫沉澱法緩衝液) 和蛋白酶抑制劑 (protease inhibitor) 以 99:1 的比例配置細胞裂解液。10 cm 培養皿從細胞恆溫培養箱取出後，將培養基倒掉後用 PBS 潤洗一次，斜放在冰上晾乾。之後加入細胞裂解液，然後用塑膠刮刀將細胞刮下，再用微量吸管吸到 eppendorf 裡。將樣本拿去冷房，在 4°C 環境下設定震幅 6 震盪 1 個小時。震好之後將樣本取回，再放到 4°C 冰箱中離心 10 分鐘，最後拿去 -20°C 冰箱保存。

2. 蛋白定量實驗

以 20 μ l 的二次水加上 980 μ l 的 Bradford reagent 作為蛋白質標準濃液，用來換算細胞樣本之蛋白質濃度，取 2 μ l 的樣本加上 18 μ l 的二次水及 980 μ l 的 Bradford reagent，於室溫下避光 10 分鐘再拿去以分光光度計測量，以波長 595nm 測量吸光值，再利用測出來的數據調配樣本，使各個樣本的蛋白質量皆相同，並放入 -20°C 冰箱保存。

3. 蛋白質電泳 (SDS-PAGE)

依照配方配製膠體並放入 4°C 冰箱保存一夜，隔天拿出來進行電泳，再將其轉移 (Transfer) 至聚偏氟乙烯膜 (polyvinylidene difluoride membrane, PVDF membrane) 上，再以 Blocking buffer 在室溫下搖晃一個小時，並以 TBST (TBS buffer + Tween 20) 清洗三次，每次 10 分鐘，再加入相對應的一級抗體，放入 4°C 冰箱搖晃一夜，隔天回收一級抗體並且以 TBST 清洗三次，每次 10 分鐘，再將對應的二級抗體加入並在室溫下搖晃一個小時，回收二級抗體後再用 TBST 清洗三次後，以塑膠鑷子夾取 PVDF membrane 以擦手紙吸去多餘之 TBST 再將其置於平底鍋上，加入 200 μ l 剛配好的 ECL 冷光呈色劑進行呈色，放入冷光儀 (LAS 4000) 中拍照。

五、流式細胞技術 (Flow cytometry)

流式細胞儀可用來偵測細胞的狀態，如細胞週期的分析、細胞型態、細胞內 pH 值的測定等等，其原理為將樣本中的細胞以流體系統運送，細胞會依序通過雷射光照射的區域，雷射照到細胞後會產生訊號，訊號被放大後會再交由電腦進行分析，因此可以用來偵測細胞內的各種狀態。

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) 是一種螢光物質，可以進入細胞之後，被細胞內的酵素作用後留在細胞內，DCFDA 可與細胞內的自由基物質反應，因此可用來偵測細胞內自由基的變化。

調整細胞的濃度至 1×10^6 個/ml，然後分別培養於 10 公分 dish 中，加入 PA+G 作為誘導組，一小時後再分別加入 CGA、NCGA，反應 24 小時，收細胞後將其移到 eppendorf 中，再以 1000 rpm 離心 5 分鐘，離心後去除上清液，加入 1 ml 的 PBS 至 eppendorf 中，用微量吸管打散細胞，再加入 DCFDA 染色並避光 15 分鐘，再拿去流式細胞儀測。

六、 統計分析與量化

細胞實驗結果每組皆重複三次以上，採用 Student's t-test 進行分析， $p < 0.05$ 則具有統計顯著意義。

陸、 實驗結果

一、 CGA、NCGA 抗氧化效果測試

先前本實驗室已證實 CGA、NCGA 可以提升受 PA+G 誘導之 SH-SY5Y 細胞的生存率，我們認為這是由於 PA+G 會促使細胞產生過多的氧化壓力並傷害細胞，而 CGA、NCGA 具有抗氧化的能力，可以使細胞內的 ROS 下降，降低 ROS 對細胞造成的傷害，進而提升其生存率。為了驗證我們的假設，我們進行了細胞流式技術分析 ROS 在細胞內的含量是否有所變化。從實驗結果可以注意到，經由 PA+G 誘導的組別，其 ROS 從控制組的 44.29% 上升到 62.95%，而添加了 CGA、NCGA 的組別，其細胞內的 ROS 含量分別下降至 36.19% 與 33.13%，下降至控制組的水準。這也代表著 PA+G 確實能夠誘導細胞產生 ROS，而這可能是先前實驗中細胞存活率下降的原因；此結果也支持 CGA、NCGA 可以降低受誘導的細胞內 ROS 的含量，並且進一步提升細胞的生存率，證實了我們的假設。

為了進一步了解細胞 ROS 下降的可能機轉，我們進行了西方墨點法的分析，結果顯示 NCGA、CGA 確實能夠降低部份抗氧化酶的表現量，如 SOD、GSH-Px 皆在誘導後分別下降 16.88% 與 36.56%，足以證實 ROS 的上升可能是來自此二酵素的量減少所致，但是這個負面影響在加入 CGA、NCGA 之後獲得了改善，添加 CGA、NCGA 組別的 SOD 從原本誘導組的 83.12% 分別升至 115.48%、146.23%，而 GSH-Px 的部份則是從誘導組的 63.44% 分別升至 89.05%、114.08%，從結果來看，NCGA 的效果似乎比 CGA 更好，尤其是 SOD 的部份，CGA 與 NCGA 組的差異達到了顯著水準，這可能代表 NCGA 具有更佳的抗氧化效果，另外 catalase 的含量在四個組別都沒差異，可能代表 PA+G 的誘導與 CGA、NCGA 抗氧化的路徑與其較無關。

二、 發炎相關蛋白表現量分析

在西方點墨法的結果也表明 NCGA、CGA 能降低部份促發炎蛋白的表現量，如 NF κ B、iNOS、TNF- α 、IL-6，其中誘導組的 NF κ B 相比控制組上升了 88.10%，但是加了 CGA 與 NCGA 後都大幅下降(分別是 120.86%、70.00%)，NCGA 組別甚至下降到比控制組還要低，效果相當的顯著。其他發炎蛋白也都呈現在 PA+G 組上升，但是在 CGA、NCGA 組下降的趨勢，如 iNOS(131.12%、83.71%、73.15%)、TNF α (158.23%、145.28%、83.45%)、IL-6(132.52%、100.89%、42.47%)，另外抗發炎蛋白 Nrf2 的表現量則從誘導組的 61.53% 分別提升至 CGA 組的 72.34% 以及 NCGA 組的 77.78%，但是效果並沒有像促發炎蛋白來的明顯，顯示此二物質抗發炎的效果應該主要是藉由抑制發炎因子達成而非提升抗發炎蛋白量。

這兩個研究結果證實 CGA、NCGA 確實有抗氧化、抗發炎的效果，但值得注意的是，在 TNF α 、IL-6、Nrf2 這三個蛋白中，都只有 NCGA 組與誘導組的數據有統計上的差異，這可能代表 NCGA 的抗發炎效果在某些路徑比 CGA 表現得更好。

三、 神經相關蛋白測定

從西方墨點法的結果顯示 BDNF 的表現量在 PA+G 組有所下降(90.08%)，但在 CGA、NCGA 組別有顯著提升(118.50%、135.22%)，可能代表它們可以提升神經細胞的生長與分化能力。A β 的表現量在誘導組上升(232.34%)，但隨著加入 CGA、NCGA 而有所下降(211.40%、156.82%)，這代表 CGA、NCGA 可能在 A β 開始增加之前就先

抑制早期的發炎與氧化壓力的病理過程，所以最後的 A β 產生較少，因此對於阿茲海默症可能具有預防的潛力。另外，我們又再一次注意到 NCGA 在降低 A β 這部份表現優於 CGA，我們認為雖然 NCGA 雖然在降低 ROS 方面跟 CGA 不相上下，但是透過了某些其他機轉達到比 CGA 更好的結果。話雖如此，NCGA 並沒有將 A β 降低至原本控制組的程度，這可能代表若未能從源頭控制糖尿病的高油高糖環境，即使有 NCGA 的幫助，神經細胞仍可能累積過多的 A β 造成傷害。

柒、 討論

阿茲海默症目前被認為跟氧化壓力與神經發炎有相當大的關係，先前已有部份研究顯示多酚類物質具有抗氧化、抗發炎的效果，因此有潛力用於阿茲海默症上的治療，本實驗的 CGA、NCGA 也是其中一種多酚，目前已有許多研究證實其具有抗氧化、抗發炎的能力，故也具有治療或預防阿茲海默症的可能性，而實驗結果也顯示此兩種多酚的確可以透過相關機轉降低神 SH-SY5Y 細胞的死亡率。

先前研究已顯示，CGA 具有提升多種被 acrolein 或 H₂O₂ 誘導的神經細胞的生存率以及降低細胞內 ROS 的能力[17-19]，另外也有研究顯示 CGA 可以提升被 A β 誘導的 SH-SY5Y 細胞的生存率[20]，這些研究的結果都與本實驗 MTT 試驗分析的結果一致，皆代表著 CGA 具有保護神經細胞的特性，不過目前阿茲海默症的早期病理過程被認為是氧化壓力引起的[21]，上述實驗所使用的 acrolein 為一種已知有害的物質，可以刺激腦中的粒線體產生更多的 ROS，造成氧化壓力上升[22]，其在日常生活中主要是存在於一些食物如甜甜圈、酒、抽菸、汽機車廢氣等等，此與病人的飲食以及生活型態較相關。而使用 H₂O₂ 誘導則是利用其本身的毒性直接誘導氧化壓力，與正常人體的生理機制可能有所不同。而本研究則是偏向研究糖尿病導致的氧化壓力造成神經細胞的損傷，之前有關於 SH-SY5Y 細胞的研究多單獨以高濃度的 glucose 或是單獨以 PA 誘導[4, 23, 24]，但是糖尿病患者往往因為胰島素阻抗，也容易引起血中三酸甘油酯過多，因此我們認為同時以 glucose 加上油脂的誘導會更貼近糖尿病人的真實情況，先前本實驗室在研究糖尿病性脂肪變性時便是以 glucose + oleic acid/palmitic acid 來誘導 HepG2 細胞產生脂肪變性[25]，所以本研究也採用以 PA+G 進行誘導，較貼近一般糖尿病人的高血糖、高血脂的病理情境，與上述的實驗設計上向上略有不同

上述的另一個實驗則是用 A β 誘導[20]，不過 A β 的過量產生為前期氧化壓力與神經發炎後的結果，所以雖然 A β 本身的確也能產生氧化壓力造成神經細胞損害，但是用 A β 誘導的細胞實驗模型比較偏向利用 CGA 治療已產生 A β 表現量上升的神經細胞，其研究方向是疾病發生後可否以此治療或逆轉神經細胞死亡的情形。而本研究則是偏向如何在疾病前期或是還沒發生之前就先預防氧化壓力與發炎造成的傷害，屬於不同的研究方向。

先前的研究證實 CGA 對 SH-SY5Y 細胞的神經保護作用一部份來自其對自噬作用機轉的效果[26, 27]，但是除了自噬作用外，神經細胞也會受發炎的影響而受損，而目前已有的研究較少著墨在 CGA 是否能夠藉由降低發炎因子才改善 SH-SY5Y 細胞的存活率。本實驗著重於 CGA、NCGA 抗發炎能力的研究，探討此二多酚是否能藉由抗發炎路徑降低神經細胞死亡率，與先前的研究方向不同。目前已有許多研究證實 AD 的發生與發炎因子有相關，包含 TNF α 、NF κ B、iNOS、IL-6，另外也發現 Nrf2 的活化可以達到抗氧化、抗發炎的效果，被認為此路徑的活化可以用以對抗 AD[28]，本實驗對上述相關的發炎因子進行分析，確實發現 CGA、NCGA 能夠藉由調控這些因子達到抗發炎的效果，具有治療或預防 AD 的潛力。

另外 BDNF 與 A β 表現量的分析結果顯示 CGA、NCGA 可以提升 BDNF 的含量，先前已有研究證實認知輕微功能障礙的 AD 病人腦內 BDNF 的表現量就開始會減少

[29], 提升 BDNF 的表現可能是另一條潛在的神經保護路徑, 但是詳細的機轉尚不清楚, 有賴後續的研究者進行實驗分析。

本研究除了研究較常被研究的 CGA 之外, 也對 NCGA 的功能性進行實驗分析, 發現其抗氧化、抗發炎的能力在某些路徑上表現得比 CGA 來得出色, 但是目前對於 NCGA 的研究相對較少, 更幾乎找不到研究 NCGA 對 SH-SY5Y 細胞的療效, 而本研究是少數將 CGA 與 NCGA 放在一起比較其對神經細胞影響的研究, 從本研究的結果來看 NCGA 對於治療氧化壓力與發炎相關的疾病似乎更有潛力, 值得後續的研究者進行更多實驗了解其可能性。

捌、 結論

阿茲海默症是目前失智症最大宗的原因, 且目前只有可以減緩病程的藥品, 並未有可以預防或是治癒此病的藥品出現, 而糖尿病也是常見的慢性病, 引發多種代謝性疾病, 目前也已經被證實與阿茲海默症有所關連。本研究旨在尋找具有潛力的物質來對抗阿茲海默症, 目前已有多个研究證實氧化壓力與發炎發生在阿茲海默症的早期病理過程, 而我們認為 CGA、NCGA 在先前的研究已證實具有抗氧化及抗發炎的效果, 但是尚未有文獻指出是否其對於在糖尿病模擬環境的 SH-SY5Y 細胞有神經保護的功能。

本研究結果證實 CGA、NCGA 的抗氧化、抗發炎能力可以保護受棕櫚酸及高葡萄糖誘導的 SH-SY5Y 細胞, 代表其可能具有預防糖尿病性阿茲海默症的潛力, 其詳細的機轉與路徑尚需更多細胞實驗證實, 並以動物實驗確認最佳的劑量為何以及是否能改善動物的行為模式, 包含認知能力、記憶力等等。

玖、 參考文獻

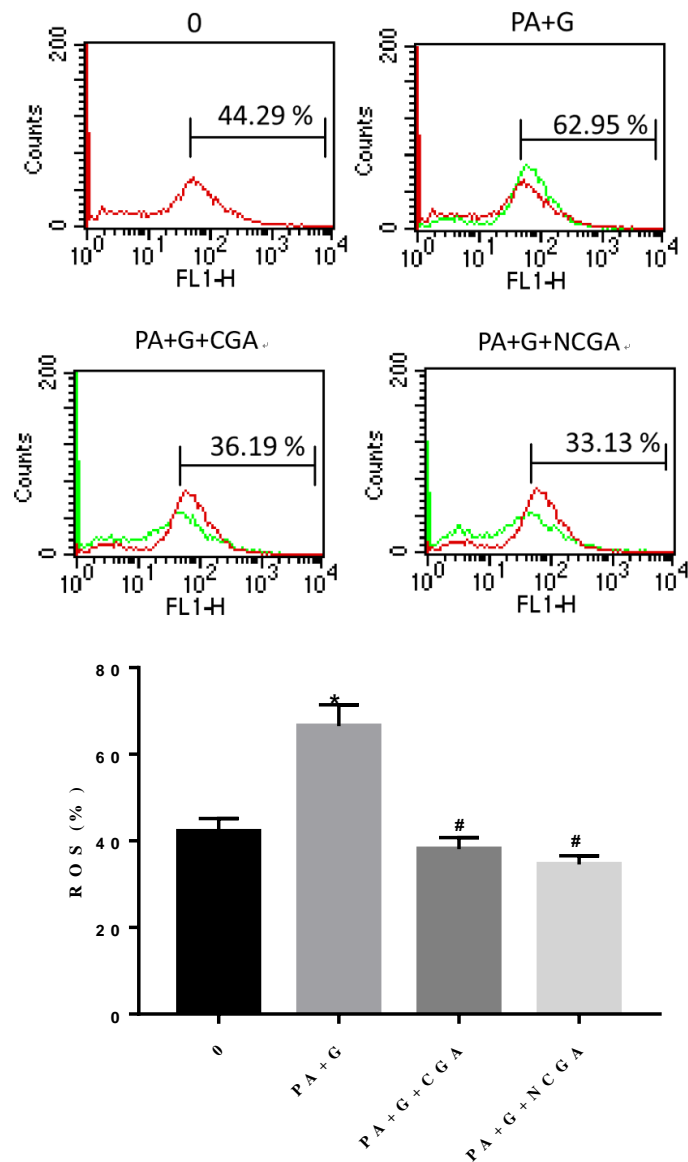
- [1] E. A. Newcombe, J. Camats-Perna, M. L. Silva, N. Valmas, T. J. Huat, and R. Medeiros, "Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease," *Journal of neuroinflammation*, vol. 15, no. 1, pp. 1-26, 2018.
- [2] R. Fischer and O. Maier, "Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF," *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2015, 2015.
- [3] E. Park, S.-M. Lee, J. eun Lee, and J.-H. Kim, "Anti-inflammatory activity of mulberry leaf extract through inhibition of NF- κ B," *Journal of Functional Foods*, vol. 5, no. 1, pp. 178-186, 2013.
- [4] Y.-H. Hsiao, C.-I. Lin, H. Liao, Y.-H. Chen, and S.-H. Lin, "Palmitic acid-induced neuron cell cycle G2/M arrest and endoplasmic reticular stress through protein palmitoylation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells," *International journal of molecular sciences*, vol. 15, no. 11, pp. 20876-20899, 2014.
- [5] A. Khalilnezhad and D. Taskiran, "The investigation of protective effects of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue exenatide against glucose and fructose-induced neurotoxicity," *International Journal of Neuroscience*, vol. 129, no. 5, pp. 481-491, 2019.
- [6] M. C. Dirk Keene, PhDThomas J Montine, MD, PHDLewis H Kuller, MD, DrPH. "Epidemiology, pathology, and pathogenesis of Alzheimer disease-UpToDate." <https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-pathology-and-pathogenesis-of-alzheimer-disease/print> (accessed).
- [7] M. C. D. David A Wolk, MD, "Clinical features and diagnosis of Alzheimer disease-UpToDate," 2020. [Online]. Available: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-and-diagnosis-of-alzheimer-dis>

ease.

- [8] M. L. Silvio E Inzucchi, MD. "Clinical presentation, diagnosis, and initial evaluation of diabetes mellitus in adults-UpToDate." https://www-uptodate-com.sw.lib.csmu.edu.tw/contents/clinical-presentation-diagnosis-and-initial-evaluation-of-diabetes-mellitus-in-adults?search=diabetes&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1#H1 (accessed).
- [9] Z. Kroner, "The Relationship between Alzheimer's Disease and Diabetes: Type 3 Diabetes," *Alternative Medicine Review*, vol. 14, no. 4, 2009.
- [10] C.-H. Peng, H.-T. Lin, D.-J. Chung, C.-N. Huang, and C.-J. Wang, "Mulberry Leaf Extracts prevent obesity-induced NAFLD with regulating adipocytokines, inflammation and oxidative stress," *Journal of food and drug analysis*, vol. 26, no. 2, pp. 778-787, 2018.
- [11] Y.-J. Lee, J.-D. Hsu, W.-L. Lin, S.-H. Kao, and C.-J. Wang, "Upregulation of caveolin-1 by mulberry leaf extract and its major components, chlorogenic acid derivatives, attenuates alcoholic steatohepatitis via inhibition of oxidative stress," *Food & function*, vol. 8, no. 1, pp. 397-405, 2017.
- [12] J. Bouayed, H. Rammal, A. Dicko, C. Younos, and R. Soulimani, "Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects," *Journal of the neurological sciences*, vol. 262, no. 1-2, pp. 77-84, 2007.
- [13] E. Hermawati, N. Arfian, M. Mustofa, and G. Partadiredja, "Chlorogenic acid ameliorates memory loss and hippocampal cell death after transient global ischemia," *European Journal of Neuroscience*, vol. 51, no. 2, pp. 651-669, 2020.
- [14] S. J. Hwang, Y.-W. Kim, Y. Park, H.-J. Lee, and K.-W. Kim, "Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells," *Inflammation Research*, vol. 63, no. 1, pp. 81-90, 2014.
- [15] X.-h. Gao *et al.*, "Anti-inflammatory effects of neochlorogenic acid extract from mulberry leaf (*Morus alba* L.) against LPS-stimulated inflammatory response through mediating the AMPK/Nrf2 signaling pathway in A549 cells," *Molecules*, vol. 25, no. 6, p. 1385, 2020.
- [16] M. Dumont and M. F. Beal, "Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease," *Free radical biology and medicine*, vol. 51, no. 5, pp. 1014-1026, 2011.
- [17] E. S. Cho, Y. J. Jang, M. K. Hwang, N. J. Kang, K. W. Lee, and H. J. Lee, "Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 661, no. 1-2, pp. 18-24, 2009.
- [18] Y. Huang *et al.*, "Protective effects of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester against acrolein-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells," *Neuroscience letters*, vol. 535, pp. 146-151, 2013.
- [19] J. Yao, S. Peng, J. Xu, and J. Fang, "Reversing ROS-mediated neurotoxicity by chlorogenic acid involves its direct antioxidant activity and activation of Nrf2-ARE signaling pathway," *BioFactors*, vol. 45, no. 4, pp. 616-626, 2019.
- [20] J. Han, Y. Miyamae, H. Shigemori, and H. Isoda, "Neuroprotective effect of 3, 5-di-O-caffeoylquinic acid on SH-SY5Y cells and senescence-accelerated-prone mice 8 through the up-regulation of phosphoglycerate kinase-1," *Neuroscience*, vol. 169, no. 3, pp. 1039-1045, 2010.
- [21] C. m. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau, and F. Collin, "Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease," *Redox biology*, vol. 14, pp. 450-464, 2018.
- [22] J. Luo and R. Shi, "Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria," *Neurochemistry international*, vol. 46, no. 3, pp. 243-252, 2005.
- [23] Z.-J. Liu *et al.*, "High glucose enhances bupivacaine-induced neurotoxicity via

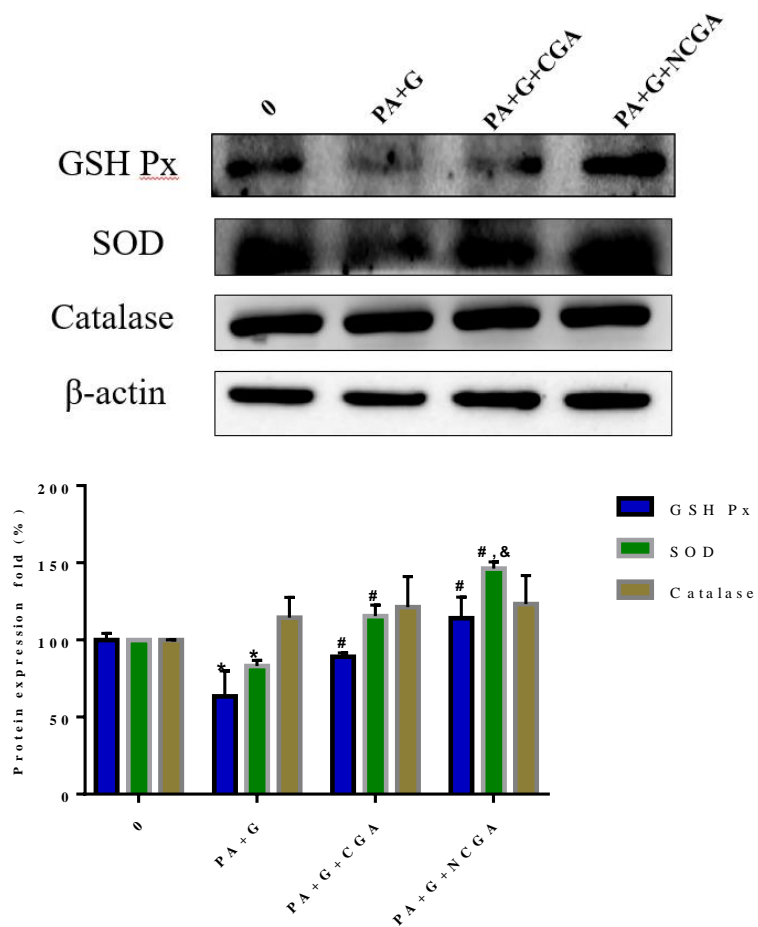
- MCU-mediated oxidative stress in SH-SY5Y cells," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, 2019.
- [24] H. Amine, Y. Benomar, and M. Taouis, "Palmitic acid promotes resistin-induced insulin resistance and inflammation in SH-SY5Y human neuroblastoma," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, pp. 1-12, 2021.
- [25] A.-T. Lee, M.-Y. Yang, Y.-J. Lee, T.-W. Yang, C.-C. Wang, and C.-J. Wang, "Gallic Acid Improves Diabetic Steatosis by Downregulating MicroRNA-34a-5p through Targeting NFE2L2 Expression in High-Fat Diet-Fed db/db Mice," *Antioxidants*, vol. 11, no. 1, p. 92, 2022.
- [26] L. Gao, X. Li, S. Meng, T. Ma, L. Wan, and S. Xu, "Chlorogenic acid alleviates A β 25-35-induced autophagy and cognitive impairment via the mTOR/TFEB signaling pathway," *Drug design, development and therapy*, vol. 14, p. 1705, 2020.
- [27] L.-J. Gao, Y. Dai, X.-Q. Li, S. Meng, Z.-Q. Zhong, and S.-J. Xu, "Chlorogenic acid enhances autophagy by upregulating lysosomal function to protect against SH-SY5Y cell injury induced by H₂O₂," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 21, no. 5, pp. 1-10, 2021.
- [28] G. Bahn and D.-G. Jo, "Therapeutic approaches to Alzheimer's disease through modulation of NRF2," *Neuromolecular medicine*, vol. 21, no. 1, pp. 1-11, 2019.
- [29] H. Tanila, "The role of BDNF in Alzheimer's disease," 2017.

壹拾、 實驗圖表



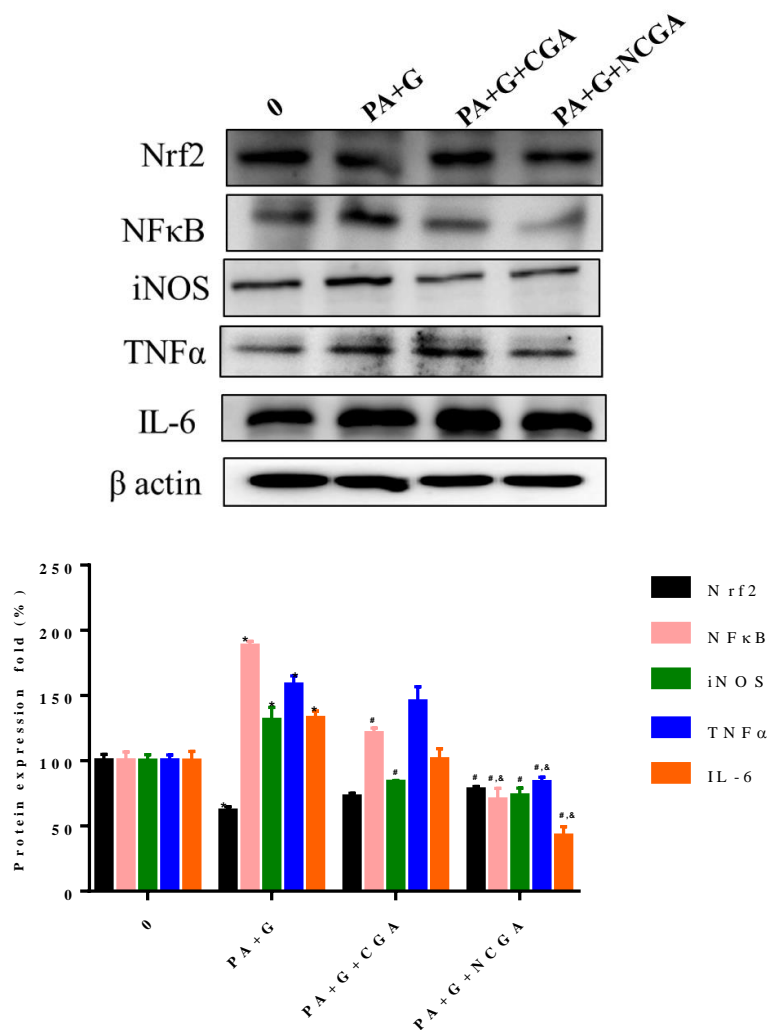
圖一：CGA、NCGA 抗氧化效果測試

0 為控制組；PA+G 為誘導組，以 0.3 mM PA 及 50 mM 葡萄糖誘導；PA+G+CGA 為 PA+G 再加入 40 μ M 的 CGA；PA+G+NCGA 為 PA+G 再加入 40 μ M 的 NCGA。將 SH-SY5Y 培養於 10 公分 dish 後加藥靜置於細胞恆溫培養箱中 24 小時後收集細胞蛋白液，之後運用細胞流式技術進行分析 ROS 的含量 (mean \pm SD，並且以 Student's t-test 統計，*代表 p < 0.05 為跟 0 組比較；#p < 0.05 為跟 PA+G 組比較)



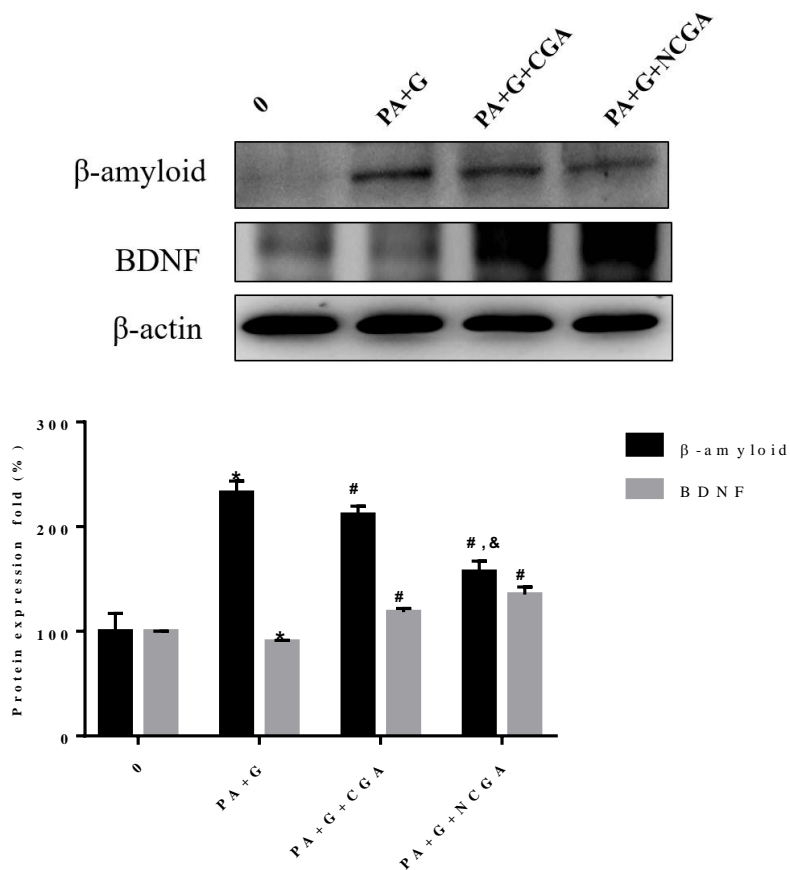
圖二：CGA、NCGA 抗氧化酶測定

0 為控制組；PA+G 為誘導組，以 0.3 mM PA 及 50 mM 葡萄糖誘導；PA+G+CGA 為 PA+G 再加入 40 μ M 的 CGA；PA+G+NCGA 為 PA+G 再加入 40 μ M 的 NCGA。將 SH-SY5Y 培養於 10 公分 dish 後加藥靜置於細胞恆溫培養箱中 24 小時後收集細胞蛋白液，之後進行西方墨點法以觀察抗氧化相關蛋白的表現量 (mean \pm SD，並且以 Student's t-test 統計，*代表 p<0.05 為跟 0 組比較；#代表 p<0.05 為跟 PA+G 組比較；&代表 p<0.05 為 CGA 與 NCGA 組之間的比較)



圖三：CGA、NCGA 抗發炎相關蛋白表現量分析

0 為控制組；PA+G 為誘導組，以 0.3 mM PA 及 50 mM 葡萄糖誘導；PA+G+CGA 為 PA+G 再加入 40 μM 的 CGA；PA+G+NCGA 為 PA+G 再加入 40 μM 的 NCGA。將 SH-SY5Y 培養於 10 公分 dish 後加藥靜置於細胞恆溫培養箱中 24 小時後收集細胞蛋白液，之後進行西方墨點法以觀察發炎相關蛋白的表現量 (mean ± SD, 並且以 Student's t-test 統計, *代表 p<0.05 為跟 0 組比較; #代表 p<0.05 為跟 PA+G 組比較; &代表 p<0.05 為 CGA 與 NCGA 組之間的比較)



圖四：CGA、NCGA 提升神經再生與減少神經傷害效果分析

0 為控制組；PA+G 為誘導組，以 0.3 mM PA 及 50 mM 葡萄糖誘導；PA+G+CGA 為 PA+G 再加入 40 μ M 的 CGA；PA+G+NCGA 為 PA+G 再加入 40 μ M 的 NCGA。將 SH-SY5Y 培養於 10 公分 dish 後加藥靜置於細胞恆溫培養箱中 24 小時後收集細胞蛋白液，之後進行西方墨點法以觀察神經相關蛋白的表現量 (mean \pm SD，並且以 Student's t-test 統計，*代表 $p < 0.05$ 為跟 0 組比較；#代表 $p < 0.05$ 為跟 PA+G 組比較；&代表 $p < 0.05$ 為 CGA 與 NCGA 組之間的比較)