

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

桑椹保健食品之研究開發--桑椹萃取物及功能性成分延緩
糖尿病及肥胖引起眼部病變之研究(1/2)
期中進度報告(精簡版)

計畫類別：整合型
計畫編號：NSC 98-2321-B-040-003-
執行期間：98年08月01日至99年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：李慧禎

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 99年05月24日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

桑椹萃取物及功能性成分緩糖尿病及肥胖引起眼部病變之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC98-2321-B-040-003

執行期間：98年08月01日至100年07月31日

計畫主持人：李慧禎

共同主持人：

計畫參與人員：林雅萍

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學院醫學系生化科

中華民國九十九年五月二十四日

一、計畫內容

【前言】

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

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

世界衛生組織在 2001 年的調查指出，老年性黃斑部病變已經超過白內障，成為歐美國家視力不良的主因。根據美國眼科協會統計，60~70 歲之間的人，有 15 % 的人罹患此病，80 歲以上老年人則有高達 40 % 的盛行率。台灣地區亦統計出 65 歲以上老年人，每 10 人中即有 1 人罹患 AMD，AMD 發生率逐年增高。(1, 2)

老年性黃斑部病變真正的致病原因，至今仍然並不完全清楚，危險因子包括年齡、遺傳、性別 (女多於男)、高血壓、心血管疾病、抽煙、及長時間強光照射，而破壞視網膜底層之 RPE 細胞層，產生了裂縫，之後又形成疤痕。不正常的新生血管經由這些裂縫，長到結疤組織中；可是這些新生血管特別脆弱，管壁容易破裂出血，血液滲漏到黃斑部的下方，會破壞黃斑部精細的組織，妨礙視力。另一方面，視網膜色素上皮細胞可吞噬感光細胞中的錐細胞及桿細胞所釋放出的 outer segment，而感光細胞的 outer segment 含有豐富的多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs)，在高氧化壓力下的環境，多元不飽和脂肪酸容易因自由基而產生脂質過氧化，這些自由基會導致視網膜色素上皮細胞凋亡，當細胞凋亡，就無法供給感光細胞足夠養分，並且會造成脂褐質 (Lipofuscin) 的堆積，這些 lipofuscin 無法被清除而堆積在色素上皮細胞內，而產生所謂的 drusen，最後造成視力受損。在疾病的初期時，通常會沒有任何症狀產生，且只存在直徑 < 63 μm 大小的 drusen 及不正常的視網膜色素上皮細胞，在疾病中期，有一個較大或多個中等大小的 drusen (63 ~ 124 μm)，但並不會擴展到黃斑區，但在疾病的晚期時，通常有較大的 drusen (> 124 μm) 的產生，且會擴展至黃斑區，造成中央視力的受損 (3, 4)。並且，因為視網膜中豐富的不飽和脂肪酸，當陽光中的紫外線或是體內抗氧化能力不足時，體內相對會累積過多的自由基，因此有可能造成視網膜脂質過氧化作用且間接導致 RPE 細胞走向細胞凋亡，RPE 細胞凋亡則最終會導致 AMD 疾病的產生。

目前臨床上的治療方法有下列幾種，其治療目的皆在控制或破壞網膜下新生血管，阻止病情惡化：(1) 光動力療法 (Photodynamic therapy) (2) 雷射光凝固治療 (laser photocoagulation therapy) (3) 經瞳孔熱療法 (transpupillary thermotherapy) (4) 放射線 (5) 手術皆無法根治老年性黃斑部退化。由於視網膜色素上皮細胞易受到光及氧的傷害，在 1994 年 Seddon *et al* 指出，在飲食中給予高含量的類胡蘿蔔素 (carotenoids)，特別是深綠色蔬菜中的葉黃素 (lutein) 及玉米黃素 (zeaxanthin)，能夠降低產生老年性黃斑部退化的危險 [13]。在 2001 年有學者針對中度病程的 AMD 病人，經給予維他命 C、維他命 E 及鋅 (Zinc) 後，其病患的症狀約減輕 28%。所以抗氧化劑的服用能夠預防發生 AMD 的危險 (5, 6)。

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

視網膜有兩個血液供應系統，為脈絡膜微血管 (choriocapillaris) 及內層視網膜血管能提供營養給視網膜色素上皮細胞及光感受器。血液中的LDL可透過脈絡膜微血管通過 Bruch's membrane到達視網膜上層色素細胞 (7)。血液中LDL可藉由細胞表面的LDL接受器 (LDL receptor) 或scavenger receptors如CD36進入細胞中，LDL receptor會辨視Apo B-100蛋白並與之結合，而CD36 receptor 會辨視LDL外鞘的氧化磷脂質。LDL會和clathrin-coated pits結合，coated pits凹陷將LDL包圍，藉由endocytosis的方式進入細胞中，隨後LDL receptor將LDL釋出，可經Lysosome將LDL分解釋放出膽固醇，以供細胞使用 (8)。研究指出，在老年黃斑部退化病人的眼睛及視網膜色素上皮細胞中，有LDL及scavenger receptors的表現 (9, 10)。隨著年紀的增加，布魯赫氏膜 (Bruch's membrane)會聚集脂質及膽固醇，包括脂化及未脂化的膽固醇，尤其聚集在黃斑處。Bruch's membrane位於RPE的表面，是一層很薄的結締組織。在老年性黃斑部退化的疾病，經由組織病理學的切片結果指出，黃斑處的Bruch's membrane有脂質及膽固醇的聚集 (11)；以及LDL的脂蛋白原Apolipoprotein B的聚集。視網膜色素上皮細胞可透過高氧化性壓力的環境而使脂蛋白進行氧化修飾。研究也指出，視網膜色素上皮細胞能夠內噬oxLDL因而造成photoreceptor 轉換及lysosomal功能的改變[28]。Curcio et al.證明此區脂質的聚集相似於動脈內層的情形 (12)。在一些研究也指出，在AMD病人中組織病切的結果相似於動脈粥狀硬化(Atherosclerotic)；此外，造成動脈粥狀硬化的危險因子，如：高血壓、抽菸及年紀，也是造成AMD的危險因子。一些研究也指出，通常有心血管疾病史或心血管疾病症狀的人，發生AMD的機率也比較高 (13)。而當體內有過多的低密度脂蛋白時，容易造成動脈粥狀硬化的發生，低密度脂蛋白在動脈粥狀硬化的病程上扮演一重要的角色 (14)。

叁、糖尿病 (Diabetes)與 oxLDL

在2004年，Ceriello及Motz提出“氧化壓力 (oxidative stress)“在糖尿病患及心血管疾病間之關係 (15)。當血液中血糖及脂肪酸過高，會使acetyl-CoA增加而導致citric acid cycle活性增加並產生過多的mitochondrial NADH及reactive oxygen species (ROS)，過多活性氧所形成的自由基易於使血中的LDL氧化形成氧化型低密度脂蛋白 (oxidized LDL)。oxLDL與眼部的病變已有臨床資料證實，而保健食品經由減低oxLDL產生以降低糖尿病眼部病變的證據則需再進一步釐清。

肆、桑葚

桑椹 (mulberry) 是一種天然植物桑科落葉喬木“桑” (Morus alba L.) 的果實，其科、屬、種名為MORACEAE Morus spp.。桑椹嫩時色清、味酸；成熟時紫黑、多汁。桑椹味甘酸、性涼，具滋陰養血、生津止渴、潤腸通便等作用，自古即被用來防治頭暈、目眩、盜汗、消渴、腸燥、便秘等現象，許多古籍記載了桑椹的藥用價值，但是在科學研究上卻缺乏科學證據來證實。而由桑椹果實顏色為深度的紫紅顏色，顯示出桑椹具有豐富的色素成分，而許多的色素成分被證實是一種很好的抗氧化物質。由Toscano 和Lamonica (1) 鑑定出桑椹的色素成分為花色苷 (awobanin)，而桑椹的花色苷為cyandin 3-glucoside 及 cyandin 3-rutinoside，另外在我們研究是先前研究也發現桑椹亦含有pilargonidin 3-glucoside 及pilargonidin 3-rutinoside (16)。花青素廣泛存在於許多食用的植物果實中，不同的花青素具有不同的顏色，其中包含了：藍色、紫色或紅色等，在植物的果實中通常含有許多不同種類的花青素，並使其具有各種不同的色澤，如：草莓、葡萄及櫻桃等。一些具有醣基的醣化delphinidin 與cyanidin 也發現存在許多的植物中。在營養食品中添加入花青素萃取物，可以有效的使人們攝取到 數個毫克的花青素根據統計，在美國每人每天會攝取180-250毫克的花青素。現今，由天然植物果實中所萃取出具有高度花青素含量產物也廣泛的被接受。對於花青素的應用方面，被認為對於許多的疾病是具有有效的預防作用，如：糖尿病視網膜病變及的微血管循環疾病等，此外也具有抗發炎及化學預防作用的功效。已有許多

報告指出花青素具有抗氧化活性 (17-21) 抗致突變性 (22-24) , 抗癌作用 (25-27) 及降低脂質過氧化作用和DNA 損傷 (28) 。此外桑椹含有豐富的flavonoides (如quercetin , gossypetin , hibiscetin) 及原兒茶酸 (protocatechuic acid) , 這些成份都具有抗氧化、防癌、抑制心血管病變 (29-38) 。

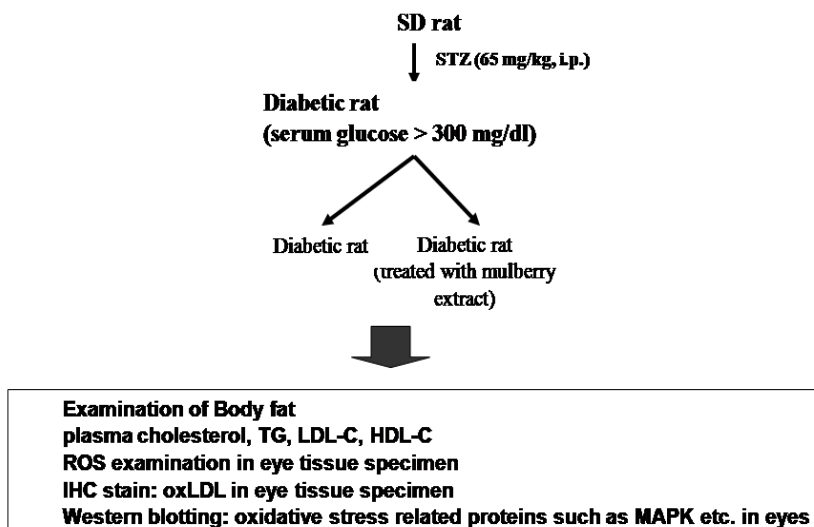
【研究目的】

依據先前的研究發現，腦血管疾病、心臟疾病、糖尿病接與脂質代謝相關，在此類疾病併發症的發生過程中，脂質不當堆積所引起的脂質毒性 (lipotoxicity) 以及衍生出之 oxidized low density lipoprotein (oxLDL) 可能為引起併發症的重要原因。我們發現**糖尿病動物血脂肪甚高且眼部有嚴重白內障及視網膜排列不規則的現象**，因此，降低 lipotoxicity 及 oxLDL 對眼部的影響，應可有效抑制代謝性疾病引起眼病變的併發症。另外，而由食物或天然植物中找尋有效的抑制 lipotoxicity 及 oxLDL 並延緩眼病變併發症的成分更為未來發展的方向。在國外文獻中已有許多相關天然物被研究，如山桑子、藍莓等，但在國內則尚未有完整研究指出本土天然物對眼睛保健之功效。

本研究目的:

1. 桑椹水萃物(MWE)、桑椹多酚萃物(MPE)、桑椹花青素萃物(MAE)對糖尿病造成之脂質代謝異常引起的眼病變有無延緩效果。
2. 上述作用的能分子機轉。
3. 評估發展桑椹萃物成為眼睛保健食品之可能性。

【研究方法】



桑椹萃物及其成分分析

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

糖尿病鼠的誘導及萃物給予

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

視網膜檢體之採取

以斷頸犧牲後取出整顆眼球，先將水晶體中液體以針頭吸出，分離視網膜部分，將檢

體分別置入 (1) -80°C 冷凍；(2) 福馬林；(3) 電顯液中，以進行後續試驗。

西方墨點法分析蛋白

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

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

電子顯微鏡觀察

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

視網膜病變相關之蛋白觀察 (免疫組織染色)

本實驗利用免疫染色方法進行，採用 ABC stain，步驟為先將檢體用 acetone fix 3-5 mins，並架於水平有溼潤的盒中，加 0.1% sodium azide: H₂O₂ = 9:1 之 solution 100 μl 靜置 15 mins 後以 PBS wash 3 times，加 5% goat serum 靜置 10 mins 後以 PBS wash 3 times，加 antibody 於室溫靜置 30 mins 後以 PBS wash 3 times，加 link antibody reagent 1 滴靜置 10 mins 後加 streptavidin reagent 1 滴靜置 15 mins 後以 PBS wash 3 times，加 (9.5 ml Tris + 0.5 ml AEC + 100 μl 3% H₂O₂) 之 solution 100 μl 靜置 10-15 mins 後以 PBS wash 3 times，加 Hemto mayer/s: DDW = 1:1 solution 靜置 1 mins 後以 PBS wash 3 times，加 glyceringelatins 一滴，蓋上蓋玻片，晾乾。

糖尿病造成視網膜病變指標分析

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

抗氧化分子 Glutathione(GSH)的測定：

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

抗氧化酵素觸酶 (catalase) 之測定：

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

【結果與討論】

目前已將 MWE、MPE 及 MAE 製備完成，並已完成 MWE 餵食糖尿病鼠 6 周部份之成果，由結果中發現：

(1) MWE 延緩糖尿病併發的白內障

我們將誘導糖尿病成功後的大白鼠，分成三組，分別餵食 0.5%、1.0% 及 2.0% 的 MWE，計畫在餵食 6 周及 12 周進行犧牲。依目前犧牲的 6 周動物，在犧牲前觀察其眼部的

病變，並諮詢眼科醫師進行診斷及分級，結果發現糖尿病鼠會出現嚴重的白內障，並在水晶體部分出現 nuclear sclerosis (Fig. 1D)。而餵食 1.0%MWE 及 2.0% MWE 的組別則發現白內障現象會減緩成中度或輕微的 cortical opacity (Fig. 1F and Fig 1G)。

(2) MWE 無法降低高血糖現象

在目前犧牲的餵食 6 周 MWE 的糖尿病鼠中，我們並沒有觀察到血糖有降低的現象 (Fig. 2)，並且對於糖尿病鼠體重減輕的現象也未有改善 (Fig. 3)。

(3) MWE 會改善糖尿病所併發的高血脂現象

餵食不同濃度 MWE 的糖尿病鼠中，我們可以發現總膽固醇可以被降低至與正常組幾乎相同。另外在 LDL-C 的降低效果上與總膽固醇的現象較為一致。至於 triglycerol 的降低效果在 0.5% 及 1.0%MWE 較為明顯，當處理了 2.0% MWE 後反而觀察不到降低的現象，我們將在 12 周組犧牲後一併觀察再加以討論。而在 HDL-C 的數據上則可以觀察到整體上，餵食 MWE 的動物的 HDL-C 會比糖尿病鼠減低，但是在濃度越高的 MWE 餵食後，HDL-C 則隨 MWE 濃度增加也趨於增加，這樣的現象我們仍會與 12 周組一起對照觀察再進行討論。

二、重要參考文獻

1. Young, J.S., *Age-related eye diseases: a review of current treatment and recommendations for low-vision aids*. Home Healthc Nurse, 2008. **26**(8): p. 464-71; quiz 472-3.
2. Klein, R., B.E. Klein, and K.L. Linton, *Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study*. Ophthalmology, 1992. **99**(6): p. 933-43.
3. Winkler, B.S., et al., *Oxidative damage and age-related macular degeneration*. Mol Vis, 1999. **5**: p. 32.
4. Shen, J.K., et al., *Oxidative damage in age-related macular degeneration*. Histol Histopathol, 2007. **22**(12): p. 1301-8.
5. Seddon, J.M., et al., *Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group*. JAMA, 1994. **272**(18): p. 1413-20.
6. *A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8*. Arch Ophthalmol, 2001. **119**(10): p. 1417-36.
7. Tserentsoodol, N., et al., *Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process*. Mol Vis, 2006. **12**: p. 1306-18.
8. Jeon, H. and S.C. Blacklow, *Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 535-62.
9. Kamei, M., et al., *Scavenger receptors for oxidized lipoprotein in age-related macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(4): p. 1801-7.
10. Hayes, K.C., et al., *Retinal pigment epithelium possesses both LDL and scavenger receptor activity*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989. **30**(2): p. 225-32.
11. Elnor, V.M., *Retinal pigment epithelial acid lipase activity and lipoprotein receptors: effects of dietary omega-3 fatty acids*. Trans Am Ophthalmol Soc, 2002. **100**: p. 301-38.
12. Hoppe, G., et al., *Oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of processing of photoreceptor outer segments by RPE*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(11): p. 2714-20.
13. Curcio, C.A., et al., *Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(1): p. 265-74.
14. Hyman, L. and R. Neborsky, *Risk factors for age-related macular degeneration: an update*. Curr Opin Ophthalmol, 2002. **13**(3): p. 171-5.
15. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revised. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 816.
16. Liu, L.K., Lee, H.J., Shih Y.W., Chyau K.C., Wang, C.J. Mulberry anthocyanin extracts inhibit

LDL oxidation and macrophage-derived foam cell formation induced by oxidative LDL. *J. Food Biochem* 2008; 73: H113-6.

17. Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994) Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Agric. Fd. Chem.*, 42, 248-251.
18. Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1996) Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem. Pharmacol.*, 52, 1033-1039.
19. Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T. (1998) Dietary cyanidin 3-o- β -D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids*, 33, 583-588.
20. Tsuda, T., Horio, F., Kitoh, J. and Osawa, T. (1999) Protective effects of dietary cyaniding 3-o- β -D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 268, 316-366.
21. Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T. (1999) Absorption and metabolism of cyaniding 3-o- β -D-glucoside in rats. *FEBS Lett*, 449, 179-182.
22. Edenharder, R., Kurz, P., John, K., Burgard, S. and Seeger, K. (1994) In vitro effect of vegetable and fruit juices on the mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline, 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline and 2-amino-3,8-methylimidazo [4,5-f] quinoline. *Fd. Chem. Toxicol.*, 32, 443-459.
23. Edenharder, R., Lepold, C. and Kries, M. (1995) Modifying actions of solvent extracts from fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella tryphimurium* TA98. *Mutat. Res.*, 341, 303-318.
24. Yishimoto, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamakawa, O., Yamaguchi, M. and Yamada, J. (1999) Antimutagenicity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 537-541.
25. Koide, T., Kamei, H., Hashimoto, Y., Kojima, T. and Hasegawa, M. (1996) Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 11, 273-277.
26. Koide, T., Hashimoto, Y., Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M. and Terabe, K. (1997) Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 12, 277-280.
27. Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N. and Shirai, T. (2001) Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-f)pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F334 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.*, 171, 17-25.
28. Ramirez-Tortosa, C., Andersen, O.M., Gardner, P.T., Morrice, P.C., Wood, S.G., Duthie, S.J., Collins, A.R. and Duthie, G.G. (2001) Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 31, 1033-1037.
29. Rankin, S.M., De Whalley, C.V., Hoult, R.S., Jessup, W., Wilkins, G.M., Collard, T. and Leake, D.S. (1993) The modification of low density lipoprotein by the flavonoids muricetin and gossypetin. *Biochem. Pharmacol.*, 45, 67-75.
30. De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R., Jessup, W. and Leake, D.S. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1743-1750.
31. Thanka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Yoshimi, N. and Mori, H. (1993) Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rat. *Cancer Res.*, 53, 2775-2779.
32. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Okamoto, M., Mori, H. and Hara, A. (1994)

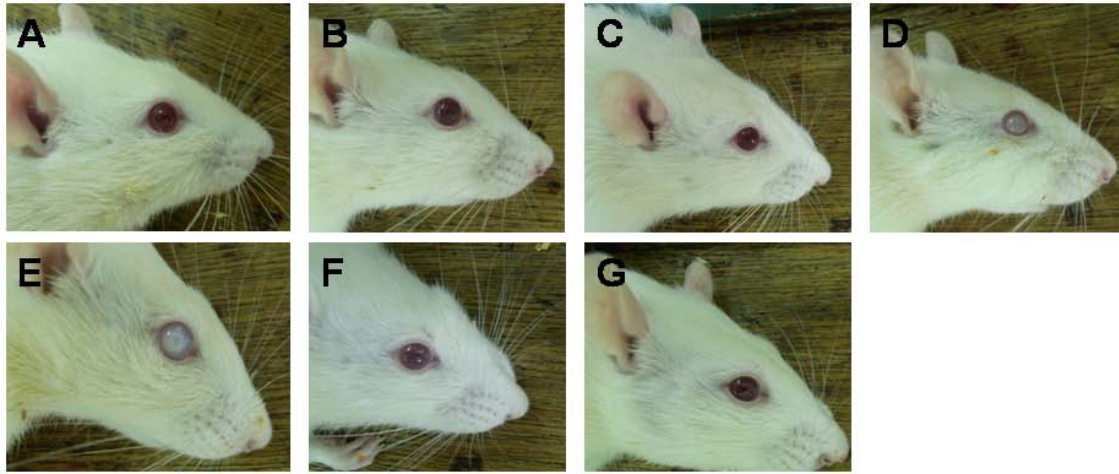
Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and post-initiation phase. *Cancer. Res.*, 54, 1359-2365.

33. Kawamori, T., Thanka, T., Kojima, T., Suzui, M., Ohnishi, M. and Mori, H. (1994) Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn. J. Cancer Res.*, 54, 2359-2365.
34. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M. and Mori, H. (1995) Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer (Suppl.)*, 75, 1433-1439.
35. Hirose, Y., Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita H. and Satoh, K. (1995) Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rat. *Carcinogenesis*, 16, 2337-2342.
36. Tseng, T.H., Wang, C.J., Kao, E.S. and Chu, C.Y. (1996) Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, 101, 137-148.
37. Wang, C.J., Lee, M.J., Chang, M.C. and Lin, J.K. (1995) Inhibition of tumor promotion in benzo(a)pyrene-initiated CD-1 mouse skin by crocetin. *Carcinogenesis*, 16, 187-191.
38. Tseng, T.H., Kao, T.W., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.L. and Wang, C.J. (2000) Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of RB phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem. Pharmacol.*, 60, 307-315.

三、計畫成果自評：(是否達成預定成效，如進度落後請說明原因)

由於在實驗之初，我們耗費許多時間進行桑椹萃取，因此目前進度只算勉強趨近預定進度，尚在進行之實驗則為餵食 12 周的 MWE 動物及細胞實驗。所幸對於桑椹萃物是否能延緩糖尿病眼病變已看到初步成效，並且應與撰寫計畫時所假設的血脂肪有一定程度的相關性，因此在進行機轉探討時，我們仍將著重於觀察脂質與眼病變的相關性進行探討。依目前成果來看，應可進行投稿之準備。

Figure 1. MWE decelerate the diabetic cataract.

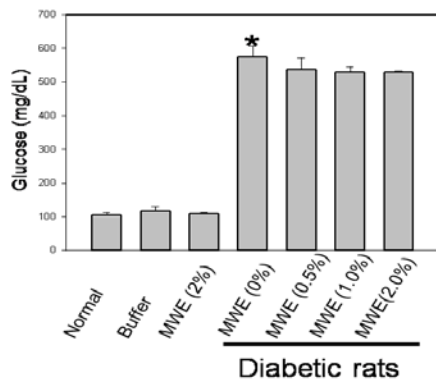


	A	B	C	D	E	F	G
Group	Normal	Buffer	MWE (2%)	MWE (0%)	MWE (0.5%)	MWE (1.0%)	MWE (2.0%)
Degree of cataract	N	N	N	N/S (+++)	N/S (+++)	C/O (++)	C/O (+)

N/S, Nuclear sclerosis in lens; C/O, Cortical opacity in lens.

+++ , severely damaged; ++, moderately damaged; +, mildly damaged.

Figure 2. The effect of MWE in blood glucose.



***, P<0.05, as compared to normal group.**

Figure 3. The effect of MWE in body weight.

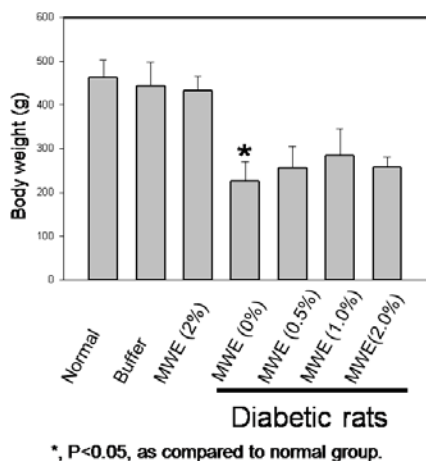


Figure 4. MWE reduce the total cholesterol in plasma of diabetic rats.

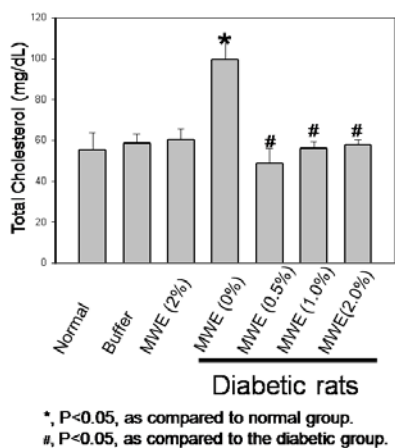


Figure 5. MWE reduce the triglycerol in plasma of diabetic rats.

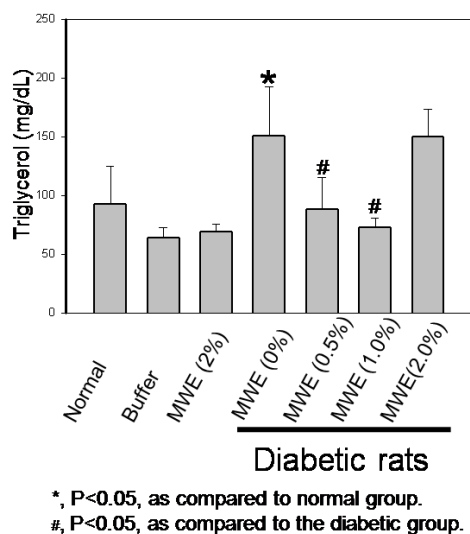


Figure 6. MWE reduce the LDL-cholesterol in plasma of diabetic rats.

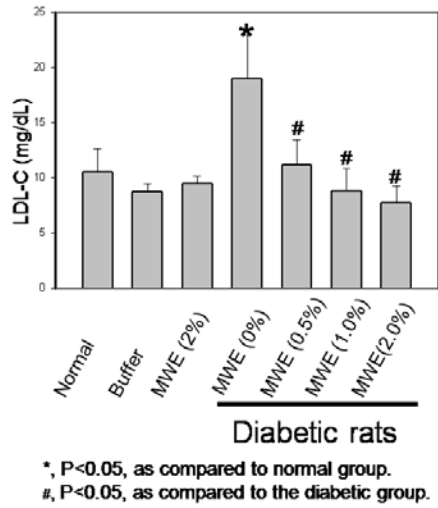


Figure 7. MWE reduce the HDL-cholesterol in plasma of diabetic rats.

