

# 亞洲大學

保健營養生技學系

碩士論文

黃花蜜菜萃取物對小鼠肝細胞與巨噬細胞之抗  
發炎活性探討

Anti-inflammatory effect of the *Wedelia chinensis*  
(Osbeck) Merr. extracts on mouse liver cells and  
macrophages

研究生：劉欣芮

指導教授：趙哲毅 博士

中華民國 一百零二年 七月

## 謝誌

首先誠摯的感謝指導教授趙哲毅博士，老師悉心的教導且不時的討論並指點我正確的方向，同時分享寶貴的自身經驗與專業知識，使我在這些年中獲益匪淺，老師對學問的嚴謹更是我學習的典範。

感謝 趙哲毅老師、林佳育老師、黃冠中老師等口試委員於百忙中抽空指導論文初稿內容修改且參與畢業口試，提供許多寶貴意見，使得論文更加完善，在這線上最大的敬意與謝意，感謝您們！

感謝 鄧正賢老師、蒙美津老師教導我統計軟體的使用方法和論文格式，感謝從大學到研究所所有教導過我的老師，因為有您們在專業學術上的指導使我受益良多。

兩年裡的日子，實驗室裡共同的生活點滴，學術上的討論、言不及義的閒扯、讓人又愛又怕的宵夜、趕作業的革命情感、因為睡太晚而遮遮掩掩閃進實驗室……，感謝眾位學長姐、同學、學弟妹的共同砥礪，你/妳們的陪伴讓兩年的研生活變得絢麗多彩。感謝佩瑩學姐、祐嘉、巧迪學長在我剛進實驗時，細心的指導我不論實驗或處事上我皆學習到實驗中應有的態度且感謝碩宇、祐嘉學長在細胞實驗方面給予我許多相關知識的協助，感謝佩瑩學姐，旺慶學長協助我進行核轉錄因子、HPLC 的分析，謝謝黃家的仲億學長在我困惑時，為我解答，十分感謝上述的學長姐們不厭其煩的指出我研究中的缺失，且總能在我迷惘時為我解惑，也感謝鈺淇、若竹、怡諄、子群、麗惠等各位同學的幫忙，總是針對學術上的問題互相討論。實驗室的竣誠學弟、佩君、彥廷、雅甄學妹…等趙家前後任的學弟妹們當然也不能忘記，你/妳們的幫忙及搞笑我銘感在心。

最後，謹以此文獻給我摯愛的雙親，因為沒有你們的支持我就無法完成研究所的學業。

劉欣芮 謹誌於

亞洲大學保健營養生技學系 碩士班

中華民國 102 年 7 月

## 中文摘要

黃花蜜菜目前廣泛被使用在市售的青草茶中，黃花蜜菜為菊科多年生草本植物，具有消炎解熱、止咳化痰、保護肝臟、解讀等作用。本研究將黃花蜜菜分別以正己烷、乙酸乙酯、乙醇、正丁醇及熱水進行萃取，進行抗氧化試驗包括清除 DPPH 自由基能力、亞鐵螯合能力、還原能力及總酚含量試驗。抗發炎試驗則以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞株發炎模式與 APAP 誘發 FL83B 小鼠肝細胞損傷模式，分別進行細胞存活率、NO 生成及 Western blot 等實驗。實驗結果發現黃花蜜菜乙醇萃取物有最佳清除 DPPH 自由基能力，乙酸乙酯萃取物有顯著抑制亞鐵離子螯合之效果，黃花蜜菜乙醇萃取物與熱水萃取物其還原能力較佳，黃花蜜菜熱水萃取物總酚含量顯著高於其他萃取物。正己烷、乙醇萃取物透過抑制 iNOS 表達抑制 LPS 誘導 RAW264.7 巨噬細胞的發炎反應並抑制 NO 生成，黃花蜜菜正己烷、乙酸乙酯萃取物會活化 PPAR $\gamma$  但沒有抑制 NF- $\kappa$ B 之表現且可以有效抑制 iNOS、COX-2、IL-6 等發炎相關蛋白質之表現，進而抑制發炎介質如 NO 之生成。黃花蜜菜萃取物由實驗結果可得知樣品能增加細胞抗氧化酵素之生成，進而達到抑制乙醯胺基苯酚對肝細胞所造成之傷害。

關鍵字：黃花蜜菜、抗氧化、抗發炎、脂多醣、乙醯胺基苯酚

## Abstract

*Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. is widely used in the commercial available Taiwan herbal teas. This Asteraceae plant is a perennial herb with bright yellow flowers and a light, camphor-like odor and is used to relieve fever and to reduce cough and phlegm. It has also been studied for protection of the liver from toxicity. In this study, the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. were extracted by *n*-hexane, ethyl acetate, ethanol, *n*-butanol and hot water respectively. This study was intended to investigate the inflammatory responses in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine macrophage RAW264.7 cells. This study was also investigate the hepatoprotective effect of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts on acetaminophen-induced injury in mouse liver FL83B cells. The results showed that the *n*-hexane extract of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. could suppress the immune response of LPS-induced inflammatory reactions in mouse RAW264.7 macrophage cells through the inhibition of iNOS expression and suppress the production of nitric oxide (NO). *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts significantly reduced synthesis of nitric oxide and interleukin-6 (IL-6) production, and the inhibitory effect might attribute to the inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and type II cyclooxygenase (COX-2) expression. This study demonstrated that *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts was not control NF- $\kappa$ B activation. That *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts was raised PPAR $\gamma$  activation of cellular by LPS-stimulated RAW264.7. The *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. ethanol extracts at concentration of 200  $\mu$ g/mL were significantly decreased the cytotoxicity induced by acetaminophen.

Keywords: *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr., antioxidation, anti-inflammation, lipopolysaccharide, acetaminophen

## 總目錄

中文摘要.....	i
Abstract .....	ii
表目錄.....	vi
圖目錄.....	vii
第一章 前言 .....	1
第二章 文獻探討.....	2
第一節 黃花蜜菜文獻回顧.....	2
(一) 黃花蜜菜簡介.....	2
(二) 黃花蜜菜古籍記載.....	2
(三) 黃花蜜菜之成份.....	3
(四) 黃花蜜菜相關研究.....	4
第二節 抗氧化作用.....	4
(一) 自由基與活性氧分子.....	4
第三節 發炎反應.....	5
(一) 定義.....	5
(二) 脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS).....	6
(三) 一氧化氮合成酶 (Nitric oxide synthase, NOS).....	6
(四) 環氧化酶 (COX-2).....	7
(五) 第一型血基質氧化酶 (HO-1).....	8
(六) 細胞激素 (IL-6、IL-10).....	9
(七) 腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ ).....	11
(八) 核轉錄因子 (NF- $\kappa$ B).....	12
第四節 肝損傷模式.....	14
(一) Acetaminophen 作用機轉與治療.....	14
第三章 研究架構.....	18
第四章 材料與方法.....	20

第一節 實驗樣品來源與製備	20
第二節 一般成分分析	21
第三節 抗氧化能力測定	23
(一) DPPH 自由基清除能力測定	23
(二) 螯合亞鐵離子能力測定	24
(三) 還原力測定	25
(四) 抗氧化活性成分總酚含量測定	26
第四節 細胞培養	27
第五節 抗發炎試驗	29
第六節 蛋白質萃取與定量	31
第七節 西方墨點法 (Western blot)	33
第八節 短暫轉染	38
第九節 細胞激素分析	39
(一) TNF- $\alpha$	39
(二) IL-10	41
第十節 抗氧化酵素分析	42
(一) Catalase Assay	42
(二) Glutathione Assay	44
(三) Glutathione Peroxidase Assay	45
第十一節 高效液相層析儀分析 (HPLC)	46
第十二節 統計分析	49
第五章 結果	50
Part I 黃花蜜菜萃取物抗發炎作用機制探討	50
一、黃花蜜菜萃取之產率	50
二、黃花蜜菜之成分分析	50
三、黃花蜜菜之 HPLC 分析	50
四、黃花蜜菜抗氧化能力	50

五、黃花蜜菜萃取物對 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞之影響與抑制 NO 生成試驗 -----	51
六、黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW264.7 小鼠巨噬細胞內蛋白質表現之影響-	51
七、黃花蜜菜萃取物之 PPAR $\alpha$ 和 PPAR $\gamma$ 活化倍數分析 -----	54
Part II 黃花蜜菜萃取物護肝作用機制探討 .....	54
一、黃花蜜菜萃取物以 APAP 誘發 FL83B 小鼠肝細胞細胞存活率之影響與抗氧化酶素分析 -----	54
第六章 討論 .....	82
第七章 結論 .....	86
參考文獻 .....	87



## 表目錄

表一、Acetaminophen 藥物中毒的治療建議表 .....	17
表二、不同溶劑黃花蜜菜萃取產率 .....	57
表三、黃花蜜菜萃取物成份分析 .....	57
表四、黃花蜜菜萃取物清除 DPPH 自由基能力 .....	58
表五、黃花蜜菜萃取物亞鐵螯合能力試驗 .....	58
表六、黃花蜜菜萃取物還原能力試驗 .....	59
表七、黃花蜜菜萃取物總酚含量試驗 .....	59
表八、黃花蜜菜萃取物 Catalase 含量試驗 .....	76
表九、黃花蜜菜萃取物 GSH 含量試驗 .....	77
表十、黃花蜜菜萃取物 GPX 含量試驗 .....	78
表十一、黃花蜜菜萃取物中木犀草素含量 .....	81

## 圖目錄

圖一、黃花蜜菜照片 .....	2
圖二、黃花蜜菜萃取物 HPLC 純化圖譜 .....	3
圖三、NO 生成之路徑 .....	7
圖四、前列腺素合成路徑 .....	8
圖五、活化 HO-1 表現機制 .....	9
圖六、細胞激素訊息傳遞路徑 .....	11
圖七、藉由 TNF- $\alpha$ 結合其受體 TNFR，使得 TRADD 和 RIP 結合，進而 IKK 活化來影響 NF- $\kappa$ B 的活性 .....	13
圖八、藉由 TNF- $\alpha$ 刺激誘發 NF- $\kappa$ B，導致基因產生轉錄活化作用而抑制細 胞凋亡 .....	14
圖九、Acetaminophen 代謝過程 .....	15
圖十、實驗架構圖 .....	18
圖十一、不同濃度下黃花蜜菜萃取物對 RAW264.7 細胞之存活率試驗 .....	60
圖十二、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞生成 NO <sub>2</sub> 之影響 .....	61
圖十三、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 (a) iNOS、(b) COX-2 蛋白質表現之影響 .....	62
圖十四、黃花蜜菜正己烷萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 iNOS 蛋白質 表現之影響 .....	63
圖十五、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 IL-6 蛋白質表現之 影響 .....	64
圖十六、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 PPAR $\gamma$ 蛋白質表現 之影響 .....	65

圖十七、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 HO-1 蛋白質表現之影響.....	66
圖十八、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 (a) NF- $\kappa$ B (Nuclear)、(b) NF- $\kappa$ B (Cytosol) 蛋白質表現之影響.....	67
圖十九、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 (a) TNF- $\alpha$ 、(b) IL-10 細胞激素含量之影響.....	68
圖二十、黃花蜜菜萃取物 CHO-K1 細胞存活率試驗.....	69
圖二十一、黃花蜜菜萃取物對 (a) GAL4-rPPAR $\alpha$ 、(b) GAL4-rPPAR $\gamma$ 之活化能力分析.....	70
圖二十二、乙醯胺基苯酚對 FL83B 細胞之存活率試驗.....	71
圖二十三、黃花蜜菜萃取物對 FL83B 細胞存活率試驗.....	72
圖二十四、黃花蜜菜萃取物和 (a) 15 mM、(b) 60 mM、(c) 90 mM APAP 共同處理 FL83B 24 hr 細胞存活率試驗 (模式 A).....	73
圖二十五、預處理黃花蜜菜萃取物 24 hr 再處理 (a) 15 mM、(b) 60 mM、(c) 90 mM APAP 24 hr FL83B 細胞存活率試驗 (模式 B).....	74
圖二十六、預處理 (a) 15 mM、(b) 60 mM、(c) 90 mM APAP 24 hr 再處理黃花蜜菜萃取物 24 hr FL83B 細胞存活率試驗 (模式 C).....	75
圖二十七、(a) Luteolin 標準品、(b) 黃花蜜菜乙酸乙酯萃取物、(c) 黃花蜜菜乙醇萃取物層析圖.....	79
圖二十八、(a) Luteolin 標準品、(b) 黃花蜜菜正丁醇萃取物、(c) 黃花蜜菜熱水萃取物層析圖.....	80
圖二十九、Luteolin 標準品檢量線.....	81
圖三十、黃花蜜菜抗發炎之可能作用機制.....	86

## 第一章 前言

肝臟為人體重要代謝器官會受飲食、藥物或其他生理反應影響，在六大營養素、藥物等代謝占有重要位置且為化學物質的代謝主要場所，肝臟因通過的神經組織較少，所以剛開始發生病變時往往不易察覺，故有無聲的器官稱號，肝臟是不容易受損的器官，因為它是人身體中可以自行恢復的組織之一且只要肝臟有五分之一是正常其功能就可以正常運作且肝臟含有大量的血液經過有豐富的微血管，可用於物質的交換，但是當它功能受損時，代表我們的身體缺乏代謝、解毒的重要器官。

中醫學認為肝的主要功能藏血、主魂、主目、主筋脈和主疏泄，與脾胃的升降密切相關，與膽互為表裡。肝氣鬱結則出現脅肋脹滿、精神抑鬱、納食不化、脘痞腹脹，甚則黃疸等症候。(健康食品之護肝功能評估方法， 920829 衛署食字第 0920401629 號公告修正) 近年來，肝癌、慢性肝病及肝硬化死亡人數逐年上升，由 90 年肝癌死亡人數 6,415 人，死亡率 28.7 到 96 年死亡人數 7,809 人，死亡率 34.1%，慢性肝病及肝硬化死亡人數 90 年 5,239 人，死亡率 23.5 到 96 年 5,160 人，死亡率 22.5%，(行政院衛生署人口統計資料) 慢性肝病及肝硬化為十大死亡原因之第六位。

造成肝臟疾病之主要因素有病毒性、酒精性與化學性三大類，由於造成病毒性、酒精性肝損傷之動物模式不易建立，所以本實驗以化學性肝損傷進行護肝功能之評估。在全球暖化，天氣日漸炎熱，消暑變為極為重要的一件事，台灣民眾傳統最常使用的消暑飲料為青草茶，青草茶因地方、廠商的不同而配方稍微有變化，黃花蜜菜為青草茶常使用的中草藥之一，黃花蜜菜目前廣泛被使用在市面上販售的青草茶中，其扮演的角色需要進一步研究，本研究探討黃花蜜菜抗發炎、護肝之作用機制。黃花蜜菜同一屬植物南美蟛蜞菊具有很好的抗氧化能力(林芷儀，2005)，但其相關的研究較少，Acetaminophen (APAP) 是經氧化傷害造成肝臟受損，故使用同一屬的植物黃花蜜菜，又名蟛蜞菊進行研究。

## 第二章 文獻探討

### 第一節 黃花蜜菜文獻回顧

#### (一) 黃花蜜菜簡介

黃花蜜菜為菊科蟛蜞菊屬植物，學名 *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr.，別名蟛蜞菊、黃花田路草、蛇舌黃、海砂菊、黃花龍舌草、黃花曲草、鹿舌草、黃花墨菜、龍舌草，植物型態為莖匍匐狀，分枝斜升。葉紙質，線形至披針形，全緣或為疏生齒緣，疏被粗毛。頭花單一、腋生，總梗長 6-12 cm；頭花直徑約 2 cm。分佈於低海拔之溼地及田畦，亦見於海濱附近。(楊遠波等人，2000)



圖一、黃花蜜菜照片 (楊遠波等人，2000)

Figure 1. The photo of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr.

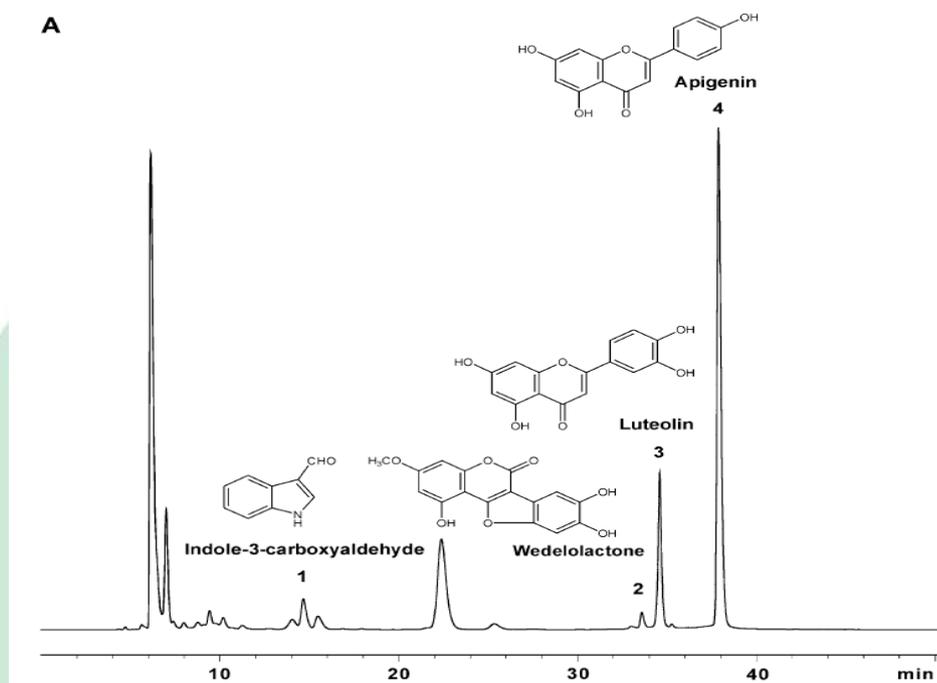
#### (二) 黃花蜜菜古籍記載

黃花蜜菜是常用於青草茶的中草藥之一，青草茶也叫百草茶是利用多種藥草一起煎煮而成，在民間療法上主要用於「生津止渴、降火消暑」，後來又發展出可以「調整體質、排除體內毒素、強身保健」等作用。(張豐榮，2006)

黃花蜜菜味辛、性平、無毒，有降火、解毒、健胃和利尿之功用。可以治腫毒、諸瘡寒熱、絞腸沙痛、打傷出血、水腫利尿、纏蛇丹毒、也是野外求生食物之一。全草可入藥，全年可採收，拔取洗淨曬乾後即可使用，用量在四錢到三兩之間，鮮草可用到十兩到一斤。(李幸祥，2003)

### (三) 黃花蜜菜之成份

黃花蜜菜經 HPLC 和核磁共振分析後純化出四種有效化合物：吲哚-3-甲醛 (Indole-3-carboxyaldehyde)、蟛蜞菊內酯 (Wedelolactone)、木犀草素 (Luteolin)、芹菜素 (Apigenin)。(Lin *et al.*, 2007)



圖二、黃花蜜菜萃取物 HPLC 純化圖譜 (Lin *et al.*, 2007)

Figure 2. The HPLC purification map of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr.

蟛蜞菊內酯 (Wedelolactone) 經 Kobor 等人 (2004) 發現可以抑制 I $\kappa$ B kinase complexes (IKK) 而阻斷前發炎物質 NF- $\kappa$ B 之生成有關 (Kobori *et al.*, 2004)。木犀草素 (Luteolin) 為黃酮類化合物具有極佳的抗氧化能力，可以透過增加 Heme oxygenase 1 (HO-1) 表達而減緩過氧化氫傷害心肌細胞並阻止細胞凋亡作用 (Sun *et al.*, 2012)。當木犀草素與菊苣素 (Lectucin) 共同處理 LPS 誘發 RAW264.7 小鼠巨噬細胞發炎反應可以具有抑制所產生的 NF- $\kappa$ B 和 Activator Protein 1 (AP-1) 活性，其中木犀草素在代謝路徑中為主要的作用，菊苣素可以加大木犀草素的作用 (Park *et al.*, 2011)。木犀草素可以有效降低鹿角菜膠 ( $\lambda$ -Carrageenan) 誘發小鼠炎症的作用，木犀草素與芹菜素不能抑制 TNF- $\alpha$  誘導的 I $\kappa$ B 蛋白降解，但可以顯著抑制 NF- $\kappa$ B 活化 (Megumi *et al.*, 2011)。

#### (四) 黃花蜜菜相關研究

##### 1. 抗氧化作用

三裂葉螞蟥菊，學名 *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc.，菊科螞蟥菊屬，別名南美螞蟥菊，與台灣原生之螞蟥菊 (*W. chinensis*) 同一屬，三裂葉螞蟥菊 95% 乙醇萃取物總酚含量有 25.49 mg/g，對清除 DPPH 自由基能力有較佳的效果 ( $EC_{50} = 628 \mu\text{g/mL}$ )，在 UV 光譜顯示 299 nm、328 nm 有特性吸收，具有防曬特性。(林芷儀，2005)

##### 2. 抗癌作用

Indole-3-carboxyaldehyde 抑制 PC-3 前列腺癌細胞的生長因子及 NF- $\kappa$ B 及 IKK  $\alpha$  的活化，在 Indole-3-carboxyaldehyde 50-100  $\mu\text{M}$ 下可以使 LNCaP 前列腺癌細胞週期阻滯，抑制 p53 基因的激活。Wedelolactone 為 IKK 抑制劑。木犀草素 (Luteolin) 透過抑制誘導血管生成磷酸肌醇3激酶/Akt 的訊息傳遞達到抑制血管內皮生長因子，減少腫瘤細胞的轉移。芹菜素 (Apigenin) 抑制腫瘤血管生長及抑制 IKK 激酶活性，Indole-3-carboxyaldehyde、Wedelolactone、木犀草素 (Luteolin) 和芹菜素 (Apigenin) 皆能抑制前列腺癌細胞產生。(Tsai *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007) 木犀草素 (Luteolin) 可以有效保護經脂多糖誘發產生急性肺部損傷小鼠肺部，減少經 LPS 誘發產生的 TNF- $\alpha$  和 MAPK 與 NF- $\kappa$ B 路徑，降低過氧化氫對肺部細胞的傷害，木犀草素可以有效降低 LPS 對肺部產生的氧化壓力。

#### 第二節 抗氧化作用

##### (一) 自由基與活性氧分子

自由基是帶有一個單獨未配對電子的原子、分子、或離子，因其極具活性及不穩定性，會和體內的細胞組織產生氧化反應，導致組織細胞失去正常功能，甚至破壞DNA，造成損害或突變進而引發癌症。(黎孝韻等人，2007)

活性氧為一含氧之自由基，自由基種類很多，對人體會造成傷害的活性氧為，

氫氧自由基 (hydroxyl radical, OH•) 活性很強，對細胞的傷害性很大，經金屬離子的調控，主要是由過氧化氫經亞鐵離子 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 催化所產生，超氧陰離子 (superoxide anion radical,  $\text{O}_2^-$ ) 產生於粒線體電子傳遞鏈處，當細胞進行呼吸作用產生 ATP 時，大約 1-3% 的電子於一連串的傳遞過程中漏出，並與氧相結合而產生超氧化物，過氧化氫 (hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 屬於活性較小的自由基，主要於細胞內的過氧化氫體 (peroxisomes) 產生，進行細胞內的一些必要氧化反應，單重態氧 (singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ ) 和脂質過氧化物 (lipid hydroperoxide, LOOH)。自由基攻擊自由基後會衍生一些副產品，這些副產品會使遺傳發生錯誤而有致癌的可能。人體若長期遭受這一連串的傷害，所造成的結果就是各種慢性疾病發生和老化。(黎孝韻等人，2007；Bonorden *et al.*, 1994；Gutteridge, 1993；Halliwell *et al.*, 1992)

### 第三節 發炎反應

#### (一) 定義

發炎反應是身體免疫系統啟動所產生的反應，不管如何啟動身體免疫系統，它會在組織內產生慢性發炎，發炎介質的釋放，自體免疫抗體產生，形成免疫複合物和活化 T 細胞，自然殺手細胞、巨噬細胞、多型核白血球細胞。自身抗原特異性抗體誘導組織損傷，導致細胞裂解、加速分解抗敏感性細胞、活化補體、啟動抗體依賴的細胞毒性或結合細胞表面受體干擾組織本身正常運作。發炎反應是身體內抵抗外來物侵入、組織受傷及受到紫外線照射所誘發一連串非特異性的生理保護，特別是病毒或細菌之感染時，所誘發的防禦反應。當體內受到感染時，巨噬細胞會分泌一些媒介物質來防止外來物擴散，同時引起紅、腫、熱、痛等症狀。(Parham *et al.*, 2004) 發炎可分為急性發炎和慢性發炎兩種，急性發炎通常發生的相當快速，且伴隨著全身性反應。(楊志元等，2002; Goldsby *et al.*, 2002) 而當體內免疫力功能降低，無法抵抗外來物入侵，使得發炎反應持續進行時，即造成慢性發炎，目前慢性發炎被視為退化性疾病的主要病因，如癌症、動脈粥狀

硬化、氣喘及風濕性關節炎等。

過度的發炎反應可能對身體造成嚴重的傷害，如：癌症和慢性發炎有很大相關性，因為慢性發炎造成體內細胞激素、前列腺素、一氧化氮生成等，使發炎反應不斷進行，而增加了致癌的機會 (Goodwin and Ceuppens, 1983)。

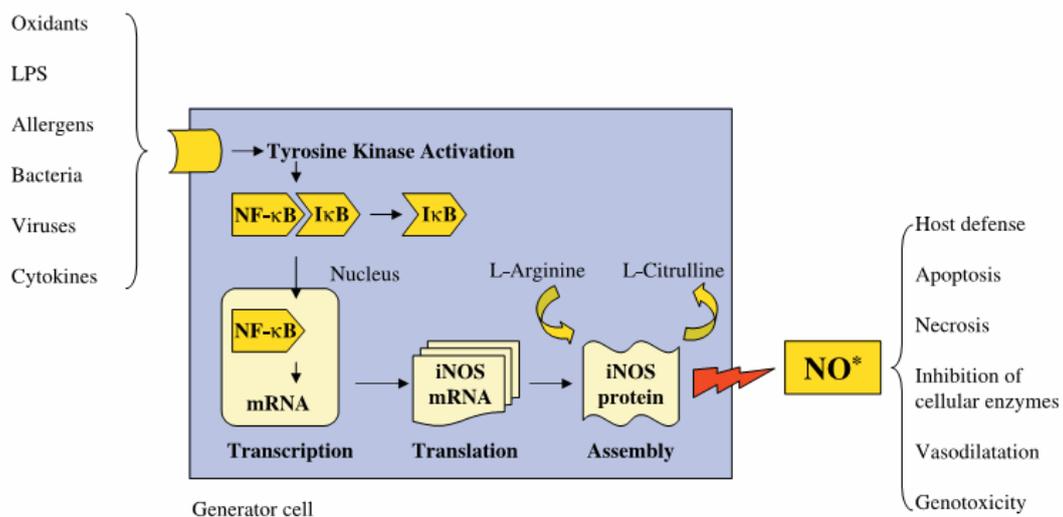
## (二) 脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS)

LPS 是一種內毒素 (endotoxin)，為革蘭氏陰性菌 (Gram-negative bacteria) 細胞壁的成分，嵌在雙層之脂質外膜上，保護細菌結構的完整性，主要結構由 O antigen polysaccharide、核心及 lipid A 所構成，其中 lipid A 是毒性的主要來源 (Halstead *et al.*, 2002)，LPS 會與血漿中 LPS-binding protein (LBP) 形成複合體，可被巨噬細胞膜上的受體蛋白 CD14 結合形成 CD14-LPS complex 後，藉由細訊息傳遞下去 (Yang *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2008)。活化的主要訊息傳導路徑包括有 (IKK)-NF- $\kappa$ B 以及 MAPK 路徑 (ERK、JNK 及 p38) 等，而直接或間接的促進許多轉錄因子如：NF- $\kappa$ B、AP-1、Elk-1、c-Jun、c-Fos、ATF-1、SRF 及 CREB 等的活化 (Guha and Mackman, 2001)。

## (三) 一氧化氮合成酶 (Nitric oxide synthase, NOS)

一氧化氮已知參與各種生理反應，包含血管舒張、神經傳遞、抗血小板凝集和低密度脂蛋白膽固醇氧化等 (Park *et al.*, 2011)，一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 是一個半衰期很短不穩定自由基氣體。因此，很快的被氧化成硝酸鹽 (nitrate, NO<sub>3</sub>) 及亞硝酸鹽 (nitrite, NO<sub>2</sub>)。由於分子小且未帶電性 (uncharged)，所以能藉著旁分泌 (paracrine) 或自分泌 (autocrine) 的方式快速的通過細胞膜進入細胞中。一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 是合成 NO 的關鍵酵素，藉由 NOS 及 NADPH 的催化作用，將 L-arginine 氧化形成 L-citrulline 後釋出 NO。NOS 主要有三種 (Nathan *et al.*, 1992)，依合成 NO 位置與功能不同，可分為：neuronal NOS (Nnos, NOS I) 存在於神經元細胞。endothelial NOS (eNOS, NOS III) 存在於血管內皮細胞。inducible NOS (iNOS, NOS II) 存在於巨噬細胞、單核球、

內皮細胞及平滑肌細胞中。nNOS、eNOS 一般在細胞中持續表現，其活性受到  $\text{Ca}^{2+}$  濃度的調控，生理作用為血管擴張、抑制血小板凝集、神經傳導等。當巨噬細胞被 LPS 或細胞激素  $\text{INF-}\gamma$  活化後，會使巨噬細胞表現出誘發性的一氧化氮合成酶 (inducible NOS, iNOS)，緩慢而持續的釋放大量 NO，進而毒殺病毒、外來入侵物等 (Nathan, 1992)。如圖一所示，由於 NO 的生成主要是在於 iNOS 的蛋白質表現量，目前已知 LPS 和  $\text{INF-}\gamma$  可藉由活化巨噬細胞中 iNOS 的轉錄因子  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ，增加其與 iNOS DNA 序列結合而促進 iNOS mRNA 轉錄作用 (Bogdan, 2001)。然而，少量的 NO 可以維持正常生理功能外；過多的 NO 也會導致一些慢性發炎疾病產生，已證實有類風濕性關節炎、糖尿病、敗血性休克、中風、高血壓以及癌症等疾病的發生 (Achike *et al.*, 2003)。

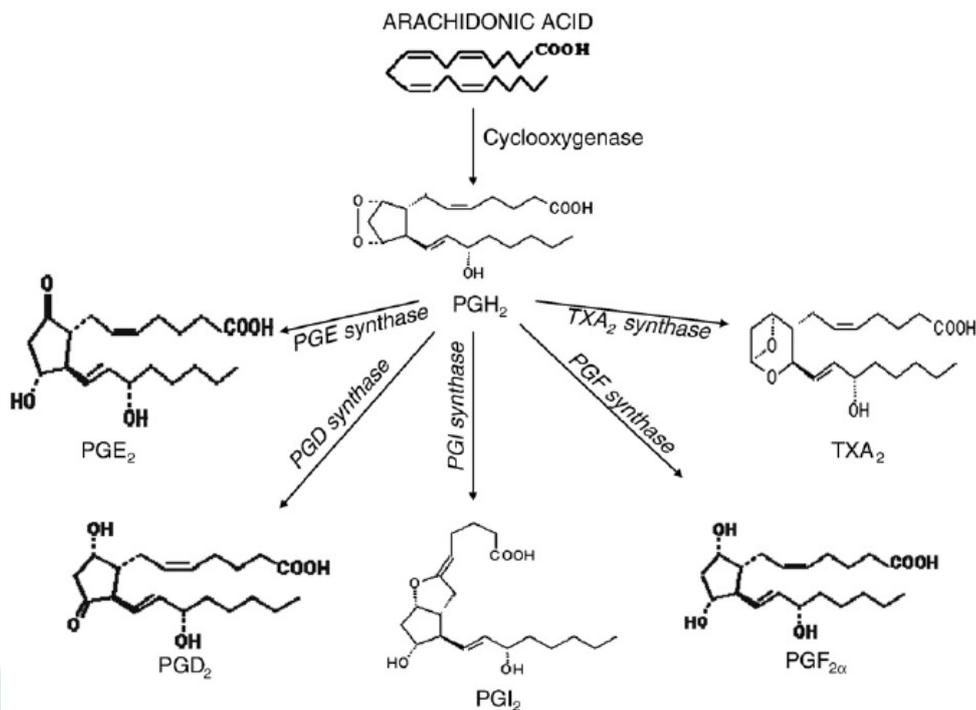


圖三、NO 生成之路徑

Figure 3. The NO formation pathway. (Maqsood *et al.*, 2007)

#### (四) 環氧化酶

花生四稀酸 (AA) 經環氧化酶 (COX) 作用後生成前列腺素  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ )，經不同的前列腺素合成酶，將  $\text{PGH}_2$  轉化成一系列具有生物活性的前列腺素，如： $\text{PGE}_2$ 、 $\text{PGD}_2$ 、 $\text{PGI}_2$ 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Cipollone *et al.*, 2008)。



圖四、前列腺素合成路徑 (Cipollone *et al.*, 2008)

Figure 4. Biosynthetic pathway of prostanoids

COX 具有兩種 isoforms，COX-1 在大部分的組織中都有表達，是一種恆定表現的酵素，COX-1 有文獻認為對調節生理反應，如：維持腸胃道黏膜的完整性、調節腎臟血流和前體血栓素的合成等有相關性。COX-2 是誘導型的酵素，通常狀況下不存在組織中，但受到生長因子、促癌物和脂多糖等刺激時，COX-2 會大量表現，參與發炎反應 (Shin *et al.*, 2010)。

#### (五) 第一型血基質氧化酶 (HO-1)

血紅素降解的第一個速度限制酵素血基質氧化酶 (Heme oxygenase, HO)，反應後產生鐵離子、一氧化碳、膽綠素，膽綠素經膽綠素還元沒還原成膽紅素，鐵離子會使鐵蛋白生成且被鐵蛋白收集儲存，血基質氧化酶有分為 HO-1 和 HO-2 兩種，HO-2 為非誘導型，主要存在腦和睪丸中，調控中央神經系統、消化系統的神經傳導功能，HO-1 為誘導型，一般在細胞與組織間表現量極低，當受到氧化物刺激時會大量產生，一般狀態下 HO-1 不活化，但受到壓力刺激和血紅素、ROS 上升等影響，Keap 1 會釋放 Nuclear Respiratory Factor-2 (NrF2) 進入核內取代 Bach 1 使 HO-1 表達，如圖五 (Paine *et al.*, 2010)。近幾年發現

HO-1 與免疫調節和抗發炎都具有相關性，可減少炎症的反應，一氧化碳過去被認為是一種有毒氣體，但文獻證明 HO-1 衍生的一氧化氮可以參與調節炎症與細胞凋亡等作用，一氧化碳具有抑制內皮細胞區相凋亡功能，可減少發炎蛋白質 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等發炎蛋白質表現並促進 IL-10 生成。膽綠素具有清除自由基、抑制 NADPH 及 PKC 的活性，減少氧化壓力。二價鐵，會誘發 ferritin 產生，與細胞內鐵離子結合以維持細胞內鐵離子濃度的恆定。目前已有細胞及活體實驗證據顯示 ferritin 參與 HO-1 的細胞保護作用。有研究使用 HO-1 基因缺乏的小鼠和比較缺乏 HO-1 基因的人類的發炎狀況皆較嚴重，HO-1 可以減少 LPS 誘發巨噬細胞發炎所產生的 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS 表現量且可以抑制內皮細胞產生黏附因子的表達 (Cho *et al.*, 2010; An *et al.*, 2012)。

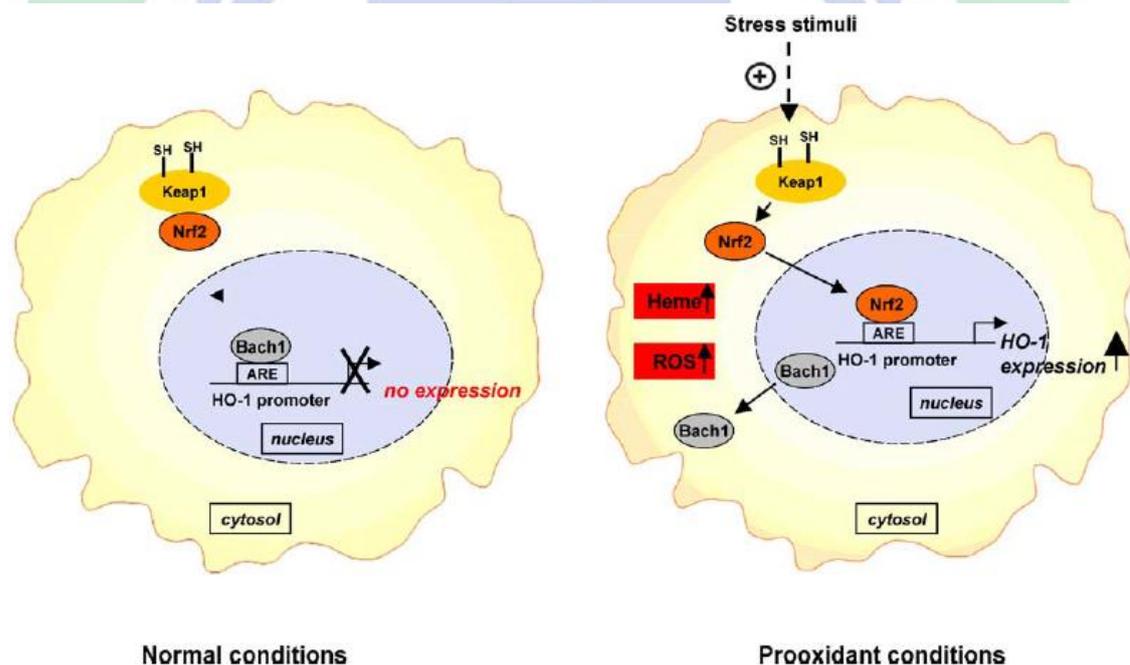


圖 五、活化 HO-1 表現機制 (Paine *et al.*, 2010)

Figure 5. The mechanism of activating HO-1 expression

(六) 細胞激素 (IL-6、IL-10)

單核球和吞噬細胞所分泌的細胞激素稱單核激素，由淋巴細胞所產生稱淋巴

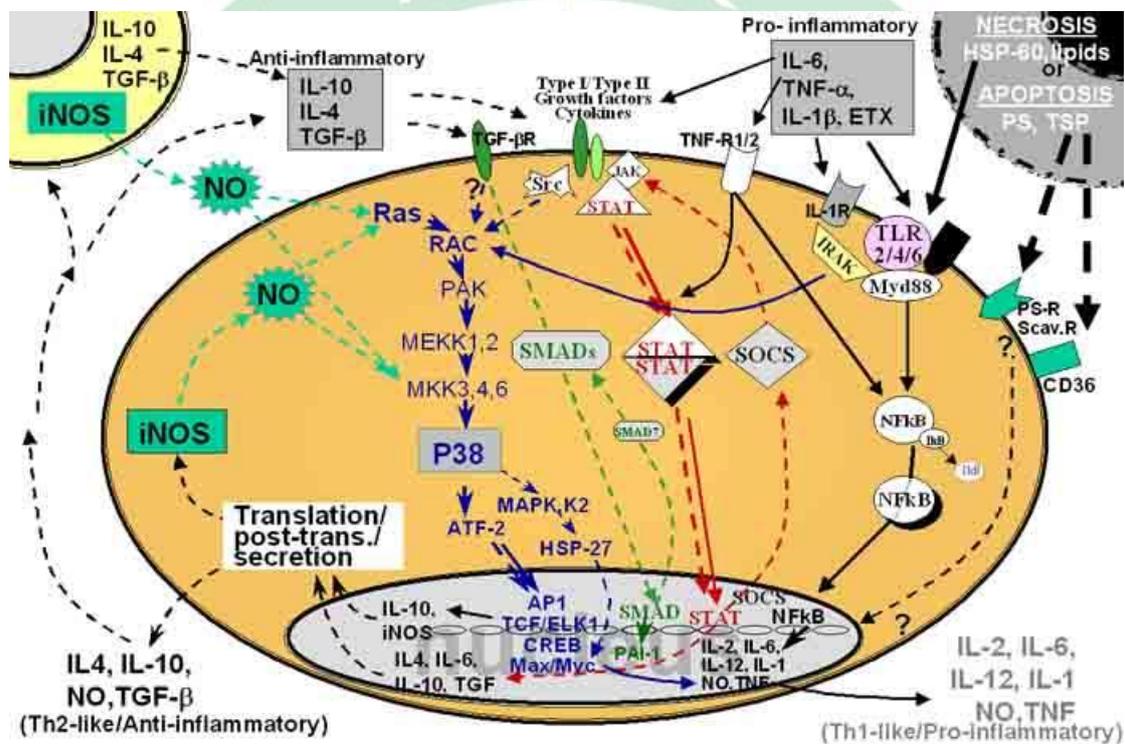
激素，但隨研究發展發現其他種類的細胞也會合成相同的蛋白質，可以在內皮細胞、上皮細胞等組織細胞中分泌，因此將此類細胞所分泌的蛋白質稱為細胞激素，有些細胞激素由白血球（如：巨噬細胞）或 T 細胞所製造作用在其他的白血球上，此類細胞激素稱介白質 (interleukin)。(謝文欽等人，2004；方世華等人，2007)

細胞激素是一種多肽在細胞與細胞之間扮演著聯絡者的角色，是一種小分子量蛋白質。當細胞受到微生物和其他抗原反應刺激時分泌細胞激素，以影響自己或其他細胞的特性，如活化、增生或分化。細胞激素的特性有：短暫分泌、之間可以互相影響、作用範圍可能是局部或全身、不同激素具有相同作用等特性。細胞激素依結構可分為血球生成素 (Hematopoietins)，如： IL-3、IL-6 等，干擾素 (Interferon, IFN)，如： IFN- $\gamma$ 、化學激素 (Chemokine)，如： CXCL、腫瘤壞死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF)，如： TNF- $\alpha$  等四種。細胞激素的接受器可分為 Ig 超級家族 (Ig superfamily)、第一型細胞激素接受器、第二型細胞激素接受器、腫瘤壞死因子接受器、化學激素接受器。(謝文欽等人，2004；方世華等人，2007)

CD4<sup>+</sup> 輔助型 T 細胞 (T<sub>H</sub> 細胞) 可依分泌的細胞激素不同而區分為： T<sub>H1</sub> 和 T<sub>H2</sub> 細胞， T<sub>H1</sub> 細胞在微生物感染狀態下會產生 IFN- $\gamma$ ， IFN- $\gamma$  會活化巨噬細胞並增強其殺菌能力， IL-12 可活化 NK 細胞且誘導 T<sub>H</sub> 細胞分化形成 T<sub>H1</sub> 細胞， TNF- $\beta$  和 TNF- $\gamma$  與 T<sub>H1</sub> 細胞誘發的發炎反應有關，如延遲性過敏反應，所以 T<sub>H1</sub> 細胞與病毒及胞內細菌感染所引發的免疫反應較有相關性， T<sub>H2</sub> 細胞由 T 細胞產生的 IL-4 所誘導生成， T<sub>H2</sub> 細胞激素與過敏疾病的形成相關。如圖六 (Perl *et al.*, 2006)

當細胞受到 LPS 或 TNF- $\alpha$  誘導時會產生 IL-1， IL-1 可由巨噬細胞、嗜中性白血球、上皮細胞等所分泌， IL-1 分為 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ ，兩者之間有 30% 左右得相似度，如：結合相同的接受器且有相同的生物作用，當 IL-1 分泌量較少時為局部發炎反應因子，分泌量較多時會進入血液中使 TNF- $\alpha$  所引起

的發燒、誘導急性其反應蛋白生成加劇作用。當單核球吞噬細胞、血管內皮細胞和其他細胞受到微生物或細胞激素 (如：IL-1 和 TNF- $\alpha$ ) 刺激時會產生 IL-6，IL-6 具有刺激急性期反應蛋白生成、促使漿細胞分泌抗體等作用。IL-10 可由 T 細胞和活化態巨噬細胞所分泌，屬於  $T_H2$  細胞分泌，可抑制促炎因子活化，如：活化的巨噬細胞作用，IL-10 是一種負迴饋調節因子，當外來感染源被消除時，IL-10 可以使巨噬細胞停止作用，減少發炎對細胞產生的傷害。(謝文欽等人，2004；方世華等人，2007)



圖六、細胞激素訊息傳遞路徑 (Perl *et al.*, 2006)

Figure 6. Diagrammatic representation of the various activation signal pathways

### (七) 腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ )

細胞受 LPS 感染時會產生 TNF- $\alpha$ ，IFN- $\gamma$  可增加此作用產生更多的 TNF- $\alpha$ ，TNF 接受器家族包含許多細胞激素和細胞膜蛋白質，TNF 接受器家族有 p55 接受器 (TNF-R I)、p75 接受器 (TNF-R II)、CD40、OX-40 鍵結體、淋巴毒素  $\beta$  接受器 (LT- $\beta$ R)、RANK 及其他成員，此接受器家族成員皆參與免疫和發炎反應，TNF 家族成員分別結合至其他接受器而起不同的反應，如：轉

錄因子 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 活化為原發炎反應。(謝文欽等人, 2004; 方世華等人, 2007)

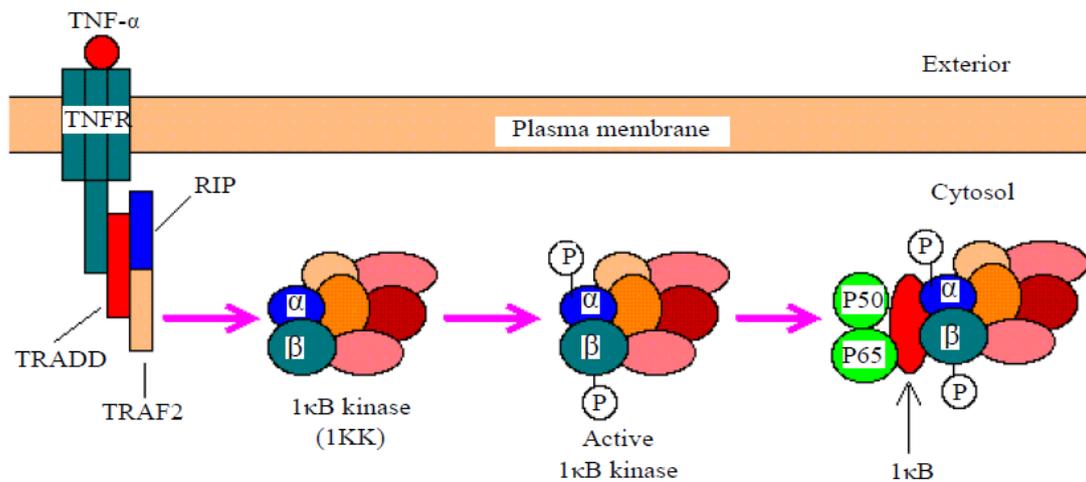
當 TNF- $\alpha$  分泌量較少時為局部發炎反應因子會使血管內皮細胞受黏附分子, 如: 白血球使大量白血球到感染部位等作用, 分泌量較多時會進入血液中引起全身性反應, 如: 發燒, 肝臟的血漿蛋白質、IL-1、IL-6 產生發炎反應生成急性期反應蛋白質, 抑制心肌與平滑肌張力, TNF- $\alpha$  會影響內皮細胞的血栓調制素的表現, 導致血栓形成, 當嗜中性白血球作用時此反應會更嚴重, 敗血性休克是因 LPS 誘發 TNF- $\alpha$  和細胞激素產生作用而導致, 細胞激素包括: IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-1。(謝文欽等人, 2004; 方世華等人, 2007)

#### (八) 核轉錄因子 (NF- $\kappa$ B)

當DNA上的促進子和基礎轉錄複合體結合時無法有效的進行轉錄作用, 此時就需要轉錄因子提供幫助, 使作用繼續下去。NF- $\kappa$ B 是一種二聚體 (homodimers), 家族成員被分為五種不同的相關結構蛋白質: p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), RelB 以及 c-Rel, NF- $\kappa$ B/Rel 家族會表現在大多數細胞中, 這五種蛋白質立體結構組成有45% 以上的相似度。(Scheidereit, 2006)

一般狀態下 NF- $\kappa$ B 為不活化狀態, 當細胞接受外來的訊息刺激, 目前已知可以活化 NF- $\kappa$ B 活性之因子包括: 細胞激素及生長因子: 例如: IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等, 細菌產物: 例如: LPS 等, I $\kappa$ B 激酶 (I $\kappa$ B kinase, IKK) 會磷酸化 I $\kappa$ B 內的絲胺酸, 使 I $\kappa$ B 經被降解失去作用, NF- $\kappa$ B 便進入細胞核。進入核內後, 會與特定 DNA 序列的啟動子 (promoter) 結合進而活化該基因的表現 (Scheidereit, 2006)。發炎反應之關係外, NF- $\kappa$ B 的活化作用與癌症生成過程亦有關 (Baldwin, 2001) 如圖八 NF- $\kappa$ B 活化 TRAF-1、TRAF-2、cIAP-1、cIAP-2 抑制 caspase 8 活化。細胞激素 (cytokines)、黏附分子 (adhesion molecules)、趨化激素 (chemokines) 的表現受 NF- $\kappa$ B 調控, 如: 細胞膜上 TNF- $\alpha$  與 TNF receptor 結合後會誘導接受器互動蛋白 (receptor-interacting protein; RIP)、腫瘤

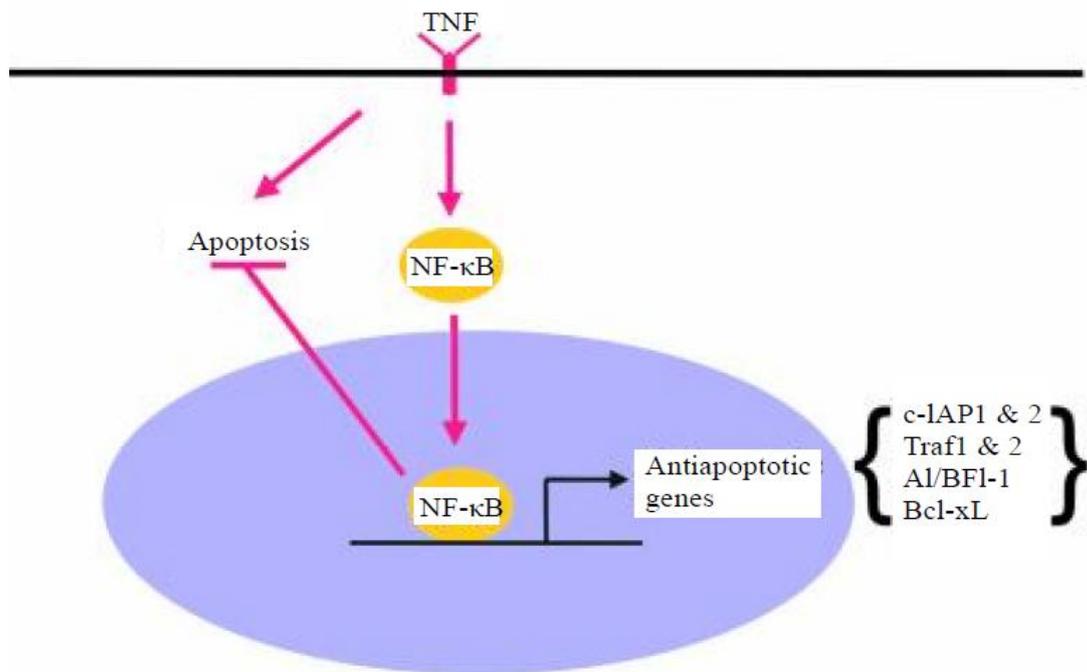
壞死因子接受器相關因子 2 (TNF receptor-associated factor 2; TRAF 2) 以及腫瘤壞死因子接受器連結死亡蛋白 (TNF receptor-associated death domain protein; TRADD) 等的活化。RIP 和 TRAF 2 與活化 IKK (I $\kappa$ B kinase) 相關，活化型的 IKK 藉由抑制 I $\kappa$ B 之功能而使 NF- $\kappa$ B 被釋放。NF- $\kappa$ B 被釋放後即可進入細胞核中成為轉錄因子或是抑制細胞凋亡作用 (圖七、圖八) (Scheidereit, 2006; Baldwin, 2001; 鄧富元等人, 2006)。



圖七、藉由 TNF- $\alpha$  結合其受體 TNFR，使得 TRADD 和 RIP 結合，進而 IKK 活化來影響 NF- $\kappa$ B 的活性

Figure 7. The pathway of NF- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$ .

(<http://www.cashmere.com.tw/new28.htm>.) (TRADD, tumor necrosis factor receptor-associated death domain; TRAF, tumor necrosis factor receptor-associated factor; RIP, regulated intramembranous proteolysis)



圖八、藉由 TNF 刺激誘發 NF- $\kappa$ B，導致基因產生轉錄活化作用而抑制細胞凋亡 (Baldwin, 2001)

Figure 8. Apoptosis inhibited by the activity of NF- $\kappa$ B induced by TNF.

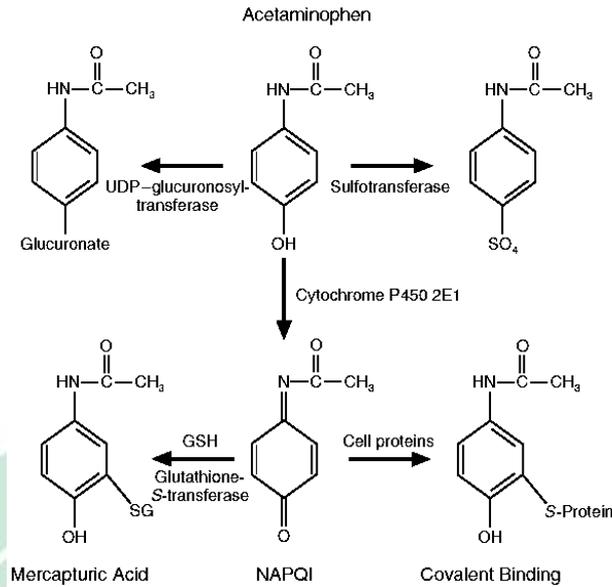
#### 第四節 肝損傷模式

##### (一) Acetaminophen 作用機轉與治療

(張菁文，2001；盧冠宇、賴建名，2007)

Acetaminophen 又稱為 paracetamol 或 N-acetyl-para-aminophenol，簡稱 APAP，在治療劑量下 acetaminophen 副作用少且安全，為市面上使用最普遍的解熱鎮痛藥物，西方國家使用過量 acetaminophen 是猛暴性肝衰竭及藥物引起肝臟傷害主要原因，以自殺及慢性酗酒者是常見族群，尤其是英國的比例最高 (Tibbs *et al*, 1995)。

Acetaminophen 90% 經由 glucuronide 及 sulphate 結合形成無毒性的代謝產物 (圖三) (Lee, 1995)，少部分 (約 5%) 經由 CYP2E1 及 CYP3A4 代謝成 NAPQI 活性代謝物，NAPQI 經由 glutathione 結合排到尿液。



圖九、Acetaminophen 代謝過程 (Lee, 1995)

Figure 9. Metabolic processes of acetaminophen

Acetaminophen 代謝轉由 CYP2E1 代謝成 NAPQI，NAPQI 是活性很強的親電子物質，在正常情況下，NAPQI 會立即和細胞內的 glutathione 反應形成無毒的硫醇化合物。當 APAP 使用過量時，使得細胞內 glutathione 的消耗速率大於合成速率，當細胞內 glutathione 的含量低於正常的 30% 時，NAPQI 便會和細胞內含有 cysteine 的大分子或核苷酸結合，導致肝細胞損傷。(Roberts *et al.*, 1991) 從細胞組織染色可以證明在肝細胞壞死前，NAPQI 會和 cysteine 的硫醇基在肝小葉中心區域形成共價鍵結 (Dai *et al.*, 1995)。造成肝臟區域性壞死；一般正常人單次服用 10-15 g acetaminophen 會發生急性肝臟傷害 (Rabinovitz *et al.*, 1992)，但是慢性酗酒者誘導 CYP2E1 及使 glutathione 排空 (Nelson, 1990)，使得慢性酗酒者在治療劑量下就會引起肝臟傷害，Acetaminophen 中毒臨床分期：在攝入 0.5-24 小時，會出現厭食、噁心、嘔吐、身體不適、臉色蒼白，盜汗；在 24-48 小時後，初期的症狀會減緩，但會有右上腹疼痛、寡尿和生化數值上升 (ALT、AST、INR 等)；在 72-96 小時肝功能異常達到尖峰狀態會有厭食、噁心、嘔吐、身體不適等症狀會再次出現且嚴重者會有猛爆性肝炎、代謝性酸中毒等併發症；在 4-14 天可能會引起寡尿性腎衰竭。因為 acetaminophen 引起肝

臟傷害屬於延遲發作，所以病患預後無法從臨床表徵中預測，因此血中濃度的測定是最有效評估方法 (Prescott, 1983)，病患若在藥物服用過量後四小時測得血中濃度大於 200 mg/L 及 15 小時後大於 30 mg/L，則病患有較高明顯肝臟傷害的危險性；慢性酗酒者對 acetaminophen 敏感性較高，因此四小時後血中濃度大於 100 mg/L 及 15 小時後大於 15 mg/L 有較高危險性引起肝臟傷害。

APAP藥物中毒的治療建議如表一，NAC 解毒的主要機轉是 NAC 在體內先轉換成 cysteine，再和 glutamate 及 glycine 於肝細胞內合成 glutathione。其他次要機轉包括：NAC 可直接和 NAPQI 結合且作為硫的提供者，直接和 APAP 結合形成無毒的代謝產物。

Silymarin 廣泛用於保護肝臟上，其具有抗發炎、抗氧化作用有研究發現口服 Silymarin 在大鼠中可以保護給予四氯化碳造成的肝纖維化，有可能是經由降低肝臟結締組織生長因子 (CTGF) 達到改善肝臟纖維化作用。(Tzeng *et al.* 2012)

表一、Acetaminophen 藥物中毒的治療建議表 (盧冠宇、賴建名，2007)

Table 1. Poisoning treatment recommendations form acetaminophen

---

急性藥物過量

---

1. Activated charcoal, 1 g/kg 於 4 小時之內給予
2. N-Acetylcysteine

劑量

Load: 140 mg/kg PO once

Maintenance: 70 mg/kg PO every 4 hours for 17 doses

其他注意事項

第一次劑量應在 8 小時內給予

N-Acetylcysteine 可給予口服或 IV

孕婦可以使用

---

長期使用引起的肝毒性

---

如果 acetaminophen 血中濃度或肝指數偏高時，以 N-acetylcysteine 同上述劑量治療 24~36 小時，之後在評估 acetaminophen 的血中濃度和肝毒性的進展再決定是否繼續治療

---

### 第三章 研究架構

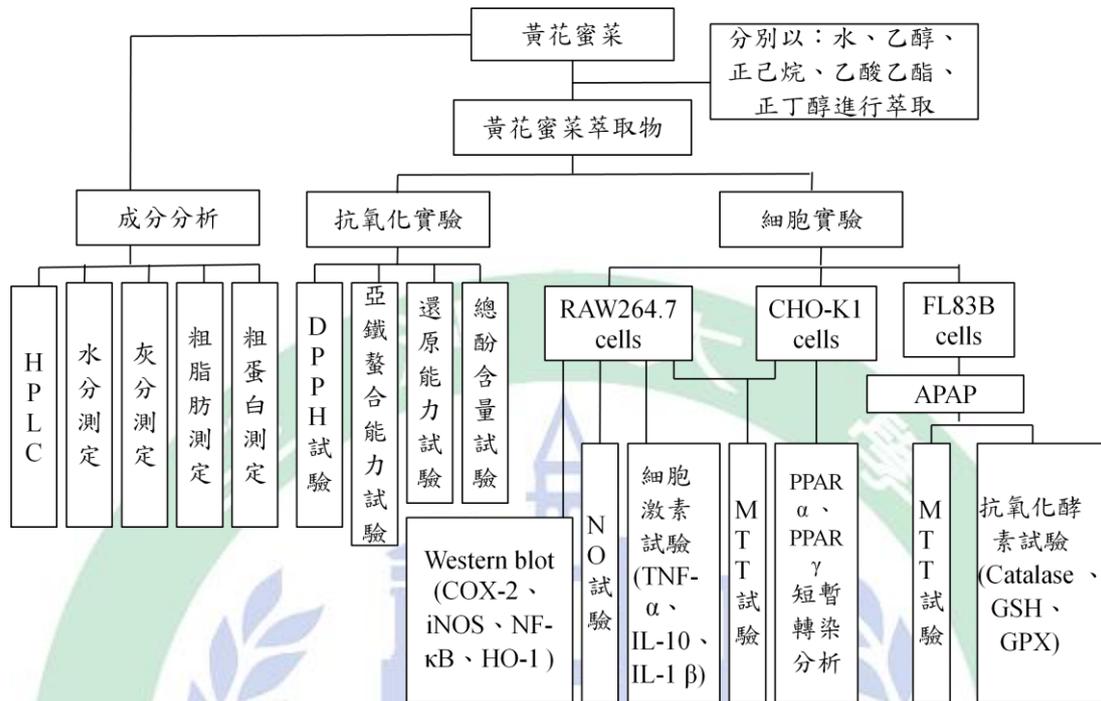


圖 十、實驗架構圖

Figure 10. The experimental design of this study.

本研究黃花蜜菜以研磨機製成粉末，並以不同溶劑進行萃取，分別為水 (Water)、正丁醇 (*n*-Butanol)、乙醇 (Ethanol)、乙酸乙酯 (Ethyl Acetate)、正己烷 (*n*-Hexane)。探討其抗氧化能力包括分析 DPPH 自由基清除能力、亞鐵離子螯合能力、還原能力、總酚含量測定。抗發炎試驗則以 LPS 誘發小鼠巨噬細胞株 RAW 264.7 產生發炎反應觀察其是否具有抗發炎之保健功效。肝損傷試驗，則以 APAP 誘發 FL83B 小鼠正常肝細胞受損，處理不同黃花蜜菜萃取物，觀察抗氧化酵素活性變化與減少抗發炎相關蛋白質之表現量。

進行一般成份分析了解黃花蜜菜之基本組成份，進行 HPLC 分析各萃取物中黃花蜜菜之活性成分木犀草素 (Luteolin) 的含量多寡。

進行細胞存活率試驗 (MTT assay)，測試樣品與誘發藥品對於細胞存活率的影響，選擇不影響細胞存活率的濃度進行後續實驗，避免因細胞死亡造成結果的誤判。NO 生成試驗是初步判定樣品是否具有抗發炎能力的指標，因在發炎狀態

下會產生大量的 NO，若有抑制 NO 的生成即代表其具有抗發炎的功效。進行 Western blot 觀察 iNOS、COX-2、NF- $\kappa$ B、IL-6、HO-1 等蛋白質之表現量。

以 LPS 誘發 RAW264.7 小鼠巨噬細胞，觀察樣品是否具有抑制發炎的作用。用 APAP 誘發 FL83B 小鼠肝細胞，確認樣品是否具有護肝及抗發炎的功效。以 APAP 誘發 FL83B 小鼠肝細胞受損，分為三種模式進行實驗：模式 A：APAP (15 mM、60 mM、90 mM) 和 200  $\mu$ g/mL 黃花蜜菜萃取物共同處理 24 小時，模式 B：預處理 100  $\mu$ g/mL 黃花蜜菜萃取物 24 小時後再處理 APAP (15 mM、60 mM、90 mM) 24 hr，模式 C：預處理 APAP (15 mM、60 mM、90 mM) 24 小時後再處理 200  $\mu$ g/mL 黃花蜜菜萃取物。



## 第四章 材料與方法

### 第一節 實驗樣品來源與製備

#### 1. 黃花蜜菜來源

大順青草藥店，台中市霧峰區中正路 1117 號，來源：台灣。

#### 2. 黃花蜜菜萃取

購買黃花蜜菜以研磨機製成粉末，並以不同溶劑進行萃取，分別為水 (Water)、正丁醇 (*n*-Butanol)、乙醇 (Ethanol)、乙酸乙酯 (Ethyl Acetate)、正己烷 (*n*-Hexane)。水萃取之方法為將黃花蜜菜粉末以水煮沸 30 分鐘後進行過濾，並以冷凍乾燥機去除水分而得。有機溶劑萃取之方法為黃花蜜菜粉末以上述不同極性之有機溶劑浸泡三天，經抽氣過濾後以減壓濃縮機去除有機溶劑，秤重後並加以氮氣吹乾可能殘留之有機溶劑。所得之有機溶劑萃取物以 Dimethyl sulfoxide (DMSO)、而水萃物則以 PBS 回溶成 stock 待後續實驗使用。

樣品簡稱：

黃花蜜菜水萃物 (WW)、黃花蜜菜乙醇萃取物 (WE)、黃花蜜菜乙酸乙酯萃取物 (WEA)、黃花蜜菜正己烷萃取物 (WH)、黃花蜜菜正丁醇萃取物 (WB)。

#### 3. 實驗試藥

Dimethyl Sulfoxide (DMSO, 0231, Amresco)

95% Ethanol (EtOH, 景明化工)

95% Ethyl Acetate (EA, 景明化工)

95% Hexanes (*n*-Hexane, 景明化工)

95% *n*-Butanol (*n*-Butanol, 景明化工)

Phosphate Buffered Saline (PBS, 0708, Amresco)

#### 4. 實驗儀器

Hotplate stirrer (LMS-1003, Lab Tech)

Ultrasonic Steri-Cleaner (DC 400, Delta)

Refrigerated Air Dryer Series (FD-12-IS-6P, Kingmech, Taiwan)

Vacuum Evaporator (R-2000V, Panchum)

乾式真空幫浦 (VP-60D, Panchum)

冷卻循環機 (CC-2000, Panchum)

自動真空控制器 (VC-7600, Panchum)

## 第二節 一般成分分析

### 1. 實驗試劑

超純水 (Milli-Q<sup>®</sup>) : Millipore

氫氧化鈉 (聯工化學試藥)

乙醚 (聯工化學試藥)

硫酸 (SHOWA)

鹽酸 (SHOWA)

硫酸鉀 (聯工化學試藥)

硼酸 (聯工化學試藥)

Bromocresol green (Koch-Lightltd, BR-240759)

Methyl red (Katayama chemical, M-0635)

### 2. 實驗器材

熱風循環烘箱 (BALANCE, CDV-60)

灰化爐 (BALANCE, CMF-40)

凱氏氮蒸餾裝置 (BUCHI, Distillation Unit K-355)

紅外線加熱式分解裝置 (BUCHI, Distillation Unit K-435)

脂肪快速萃取器 (CHERNG HUEI, WDG-21-645)

低溫循環水槽 (YIH DER, BL-710D)

秤量瓶 (伸球公司)

坩鍋 (伸球公司)

圓底燒瓶 (伸球公司)

圓筒濾紙 (ADVANTEC, GRADE84 (30 × 100 mm))

脫脂棉 (伸球公司)

### 3. 實驗方法

#### 【水分測定】

秤取新鮮樣品 2 g ( $W_1$ ) 放入已秤重量且經 105°C 烘箱烘乾 24 小時達恆重的坩鍋 (W)，將含有樣品的坩鍋置於 105°C 烘箱中反覆乾燥、冷卻，秤重至恆重 ( $W_2$ )，由重量損失量除以原樣品重而得到樣品含水量，水分含量 (%) 計算公式：

$$\{ [W_1 - (W_2 - W) / W_1] \} \times 100$$

#### 【灰分測定】

秤取乾燥樣品 2 g ( $W_1$ ) 放入已秤重量且經 105°C 烘箱烘乾 24 小時達恆重的坩鍋 (W)，置於 550°C 灰化爐中加熱 24 小時後放入乾燥箱降至室溫後秤重 ( $W_2$ )。樣品灰分含量 (%) 計算公式： $\{ [W_1 - (W_2 - W) / W_1] \} \times 100$

#### 【粗脂肪測定】

秤取乾燥樣品 2 g (W) 放入圓筒濾紙中，上面以脫脂棉覆蓋，接著取經 105°C 烘箱烘乾 24 小時達恆重的圓底燒瓶秤重 ( $W_1$ )，圓筒濾紙放入 Soxhlet 萃取裝置之萃取管中段，將圓底燒瓶裝入 150 mL 的乙醚接於其下，置於 55°C 恆溫水域連續萃取 18 小時。萃取完後，拿下冷凝管取出圓筒濾紙，乙醚回收，圓底燒瓶放入抽氣櫃中使殘留的乙醚揮發，接著放入 105°C 烘箱中 24 小時，最後放入乾燥箱降至室溫後秤重 ( $W_2$ )。樣品脂質含量 (%)： $\{ [(W_2 - W_1) / W] \} \times 100$

#### 【粗蛋白測定】

秤取乾燥樣品 2 g (W) 放入分解瓶中，加入 25 mL 的濃硫酸和硫酸鉀 (蛋白質催化劑)，加熱分解至溶液澄清為止，然後裝入凱氏氮蒸餾裝置內進行蒸餾並加入鹼液 (40% 氫氧化鈉) 蒸餾 6 分鐘，出口用混和指示劑 (bromocresol green +

methyl red) 硼酸溶液 (4%, 25 mL) 接收，最後用 0.1 N 鹽酸標準溶液滴定製桃紅色出現為止，期間紀錄消耗的鹽酸毫升數 ( $V_1$ )，並做空白組紀錄消耗的鹽酸毫升數 ( $V_2$ )。樣品蛋白質含量 (%) 計算公式： $[(V_1 - V_2) \times F \times 0.014 \times N/W] \times 100$

### 第三節 抗氧化能力測定

#### (一) DPPH 自由基清除能力測定

##### 1. 實驗試藥

95% Ethanol (EtOH, 景明化工)

Gallic acid (41086, Acros)

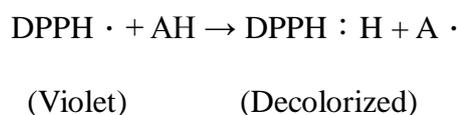
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, 44150, Alfa Aesar)

##### 2. 實驗儀器

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

##### 3. 實驗原理:

自由基具有不成對電子且為人體正常生理代謝產物之一，一般生物體之抗氧化系統與自由基間會維持平衡，但當身體受到外來因素、內在環境的刺激或某些代謝物的影響，使得體內抗氧化劑的濃度和抗氧化力降低，活性氧、自由基就會攻擊細胞內脂質、蛋白質和核酸等，造成細胞組織的損傷，導致多種疾病之發生。DPPH ( $\alpha, \alpha$ -diphenyl-b-picrylhydrazyl,  $C_{18}H_{12}N_6O_5$ ) 是一種具連鎖反應之自由基，且因其為一穩定之自由基，所以 DPPH 常用於評估樣品是否具有提供氫電子並終止 DPPH 自由基的連鎖反應能力。(Shimada *et al.*, 1992)



#### 4. 實驗流程

參考 Shimada 等人 (1992) 的方法稍做變化以符合本實驗室之需求。將實驗樣品以乙醇溶液稀釋濃度至 0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL 且以相同濃度之 Gallic acid 做為正對照組，1 mM DPPH 溶液；不同濃度的樣品和 Gallic acid 以 1：4 比例混合，避光反應 30 分鐘，用 ELISA Reader 觀察其於 517 nm 下之吸光值變化。DPPH 的乙醇溶液在 517 nm 下有較強之吸光值，當其被抗氧化劑還原時吸光值會降低，代表吸光值越低，樣品抗氧化能力供氫能力越強。

DPPH 自由基清除力 (scavenging effects) =  $\left[ \frac{\text{控制組 } A_{517} - \text{實驗組 } A_{517}}{\text{控制組 } A_{517}} \right] \times 100$ 。

#### (二) 螯合亞鐵離子能力測定

##### 1. 實驗試藥

95% Ethanol (EtOH, 景明化工)

98% Ferrozine iron reagent (41057, Acros)

Ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA, AC0970, Scharlau)

Ferrouschloride, tetrahydrate ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0909, SHOWA)

##### 2. 實驗儀器

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

##### 3. 實驗原理 (Dinis *et al.*, 1994; Decker *et al.*, 1990)

金屬離子的催化作用是造成脂質過氧化及促進自由基生成加速氧化的重要因素，此實驗目的為試驗樣品是否具有經由供給其一未共用之電子對與過渡金屬離子形成穩定之結構的能力。在多種過渡金屬離子中， $\text{Fe}^{2+}$  最具促氧化劑之一。於本實驗中利用  $\text{Fe}^{2+}$  對於 ferrozine 具有特異性之結合能力，而其結合所形成

之複合物於 562 nm 下有吸光值變化，藉由觀察呈色變化即可得實驗樣品對於  $\text{Fe}^{2+}$  的螯合能力。



#### 4. 實驗流程

參考 Decker and Welch (1990) 方法稍做變化以符合本實驗室之需求。將實驗樣品以乙醇溶液稀釋濃度至 0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL，且用相同濃度之 EDTA 做為正對照組，取不同濃度的樣品和 EDTA 各 100 $\mu$ L，加入 370  $\mu$ L 乙醇溶液，再加入 10  $\mu$ L  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2 mM) 後，避光反應 30 秒，最後加 Ferrozine (5 mM) 避光反應 10 分鐘後，於 562 nm 下觀測吸光值變化。若  $\text{Fe}^{2+}$  與樣品結合，減少 ferrozine- $\text{Fe}^{2+}$  的生成，則會降低吸光值。

螯合亞鐵能力 (chelating effects) =  $\left[ \frac{(\text{控制組於 } 562 \text{ nm 之吸光值} - \text{實驗組於 } 562 \text{ nm 之吸光值})}{\text{控制組於 } 562 \text{ nm 之吸光值}} \right] \times 100$ 。

#### (三) 還原力測定

##### 1. 實驗試藥

Ascorbic acid (Vitamin C, A0278, Sigma)

Ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ , 0909-3250, SHOWA)

Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1982-0150, SHOWA)

Sodium dihydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 1932-8250, SHOWA)

Potassium Ferricyanide ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 1634-4250, SHOWA)

Trichloroacetic acid (TCA, 152135, Acros)

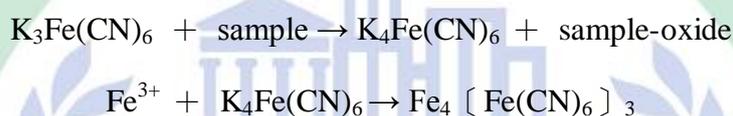
##### 2. 實驗儀器

Ultrasonic Steri-Cleaner (DC 400, Delta)

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

### 3. 實驗原理

還原劑在氧化還原反應中，擔任電子提供者的角色，也就是在反應中它本身被氧化，同時還原另一個反應物。還原劑之主要作用方式移轉氫原子與捕捉氧原子，提供一個還原狀態的環境，還原已經氧化的過氧化物，減緩氧化作用進行的能力，並藉由還原作用減少活性氧的生成，以達到抑制氧化反應的目的。本研究中是以普魯士藍 ( $\text{Fe}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ) 之生成量做為指標，其主要反應原理為將赤血鹽 [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] 還原成黃血鹽 [ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ]，並以  $\text{Fe}^{3+}$  形成普魯士藍，於 700 nm 下觀察其吸光值之變化檢測其還原能力之效果，吸光值越高代表樣品還原能力越佳。(Oyaizu, 1986)



### 4. 實驗流程

參考 Oyaizu (1986) 方法稍做變化以符合本實驗室之需求。將實驗樣品以乙醇溶液稀釋濃度至 0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL 和相同濃度之 Ascorbic acid 做為正對照組，取不同濃度之樣品和 Ascorbic acid 各 125  $\mu\text{L}$ ，加 125  $\mu\text{L}$  Sodium Phosphate buffer (pH 6.6) 和 1% 赤血鹽 (Potassium ferricyanide) 125  $\mu\text{L}$ ，在 50°C 水浴 20 分鐘，冰浴 3 分鐘快速冷卻，加 125  $\mu\text{L}$  10% Trichloroacetic acid (TCA) 溶液，取樣品上清液 250  $\mu\text{L}$ ，加 250  $\mu\text{L}$  二次水和 50  $\mu\text{L}$  0.1%  $\text{FeCl}_3$ ，混勻後靜置反應 10 分鐘，測波長 700 nm。普魯士藍生成量越多，吸光值也越高，當吸光值越高，代表樣品之還原能力越強。

還原力 = 樣品反應後 700 nm 之吸光值 - 對照組反應後 700 nm 之吸光值。

#### (四) 抗氧化活性成分總酚含量測定

##### 1. 實驗試藥

Gallic acid (41086-0050, Acros)

Sodium carbonate, anhydrous ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 島久藥品)

Folin – Ciocalteu's phenol reagent, 2 N (F9252, Sigma)

## 2. 實驗儀器

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

## 3. 實驗原理

Folin-Ciocalteu's Phenol reagent 試劑在鹼性環境會與酚類化合物 (phenol) 產生反應，因磷鉬酸會被苯酚還原，使試劑由金黃色變為藍色，利用此特性即可用來定量樣品中酚類化合物之含量。反應在波長 750 nm 下會有最大之吸光值，試劑和樣品中之酚類化合物結合後其吸光值越高，代表樣品之酚類化合物含量越高。

## 4. 實驗方法

樣品用乙醇溶液稀釋成 2 mg/mL。取稀釋後的樣品 50  $\mu\text{L}$ ，加 50  $\mu\text{L}$  Folin – Ciocalteu's phenol reagent, 2 N 混和均勻並加入 700  $\mu\text{L}$  二次水，均勻混和靜置 3 分鐘，加 200  $\mu\text{L}$  20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液，立即水浴 100°C 反應 1 分鐘，避光待樣品冷卻後，測波長 700 nm 吸光值的變化，依同樣方法以不同濃度 Gallic acid 做為樣品，將吸光值變化求出標準曲線之回歸方程式，樣品之吸光值代入即可算出每克樣品萃取物中含有多少 Gallic acid 之相對量 (Gallic acid equivalent, GAE)。

## 第四節 細胞培養

### 1. 實驗試藥

Dimethyl Sulfoxide (DMSO, 0231, Amresco)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SH30003.01, Thermo)

Fetal bovine serum (FBS, 10437, Gibco)

L-Glutamine (25030, Gibco)

Non-Essential Amino acids solution (NEAA,01-340-1B, Biological Industries)

Penicillin Streptomycin (PS, 15140, Gibco)

Phosphate Buffered Saline (PBS, 0780, Amresco)

Sodium Bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>, SB0482, Bio Basic Inc.)

Sodium pyruvate (S8636, Sigma)

Trypsin 0.25% (Trypsin-EDTA, SH30042.01, Thermo)

Ham's F12 (Biological)

MEM-EAGLE Earle's Salts Base (11-025-1K, Biological)

## 2. 實驗儀器

CO<sub>2</sub> incubator (Elite-2, Revco)

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

Ultrasonic Steri-Cleaner (DC 400, Delta)

## 3. 實驗方法

### 【解凍細胞活化】

將含有 10% FBS、1% PS (Penicillin and Streptomycin) 的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Ham's F12 (F-12) 培養液回溫 37°C 後取 9 mL 加至 75 cm<sup>2</sup> Flask 培養瓶或 10 cm<sup>2</sup> dish 中 (RAW 264.7 細胞培養液成分為 DMEM, CHO-K1 細胞培養液成分為 F-12, FL83B 細胞培養液成分為 F-12), 由液態氮中取出細胞株的冷凍管在 37°C 回溫, 1 分鐘後加入 75 cm<sup>2</sup> Flask 培養瓶或 10 cm<sup>2</sup> dish 中, 完成後以顯微鏡觀察無異狀即放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中。隔夜過後觀察細胞生長情況, 此時大部分細胞應貼附於 75 cm<sup>2</sup> Flask 培養瓶或 10 cm<sup>2</sup> dish 底部, 更換 15 mL 新的培養液, 待細胞完整貼覆並呈現正常型態時即可進行細胞繼代。

### 【細胞繼代】

待培養於 75 cm<sup>2</sup> Flask 或 10 cm<sup>2</sup> dish 之細胞長滿後, 移除原培養基, 以 10 mL 1X PBS 重複清洗兩次, 並加入 1 mL 的 0.05% Trypsin-EDTA 後均勻搖晃, 使 0.05% Trypsin-EDTA 洗潤過 75 cm<sup>2</sup> Flask 或 10 cm<sup>2</sup> dish 中所有細胞後, 放入

37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中，三分鐘使細胞去貼附。取出輕拍打 75 cm<sup>2</sup> Flask 或 10 cm<sup>2</sup> dish 底部後加入 9 mL 新鮮培養基，以細胞刮刀將 75 cm<sup>2</sup> Flask 或 10 cm<sup>2</sup> dish 培養瓶中之細胞確實刮下（此步驟只有 RAW 264.7 細胞需要），將其均勻混合後，以 1:10 之稀釋比例移至新的 75 cm<sup>2</sup> Flask 或 10 cm<sup>2</sup> dish 培養瓶繼續培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中，約 2~3 天需再繼代一次。

#### 【種細胞】

取 10 μL 的細胞液（繼代時所剩）加入 30 μL Trypan blue solution 混合均勻，取 10 μL 加入細胞計數器中，於倒立式顯微鏡下計算細胞數目，以培養液稀釋細胞液，種入不同的培養盤中。

#### 【冷凍細胞】

配置含細胞抗凍液成分 DMSO 的培養液備用，細胞繼代後所剩下的細胞液置於離心管中，離心 1000 rpm 5 分鐘後去除培養液，加入抗凍液 (1 mL/管) 於離心管中並混合均勻，將抗凍液置入冷凍管中並纏上膠布，放入冷凍盒中直接放入 -80°C，以每分鐘降 1°C 後，即可移至液態氮桶中長期保存。

#### 第五節 抗發炎試驗

##### 實驗試藥

Dexamethasone, 98% (Dex, A17590, Alfa Aesar)

Dimethyl Sulfoxide (DMSO, 0231, Amresco)

Lipopolysaccharide (LPS, L2654, Sigma)

Phosphate Buffered Saline (PBS, 0780, Amresco)

Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT, 0793, Amresco)

CM-H2DCFDA (C6827S, Invitrogen)

Griess reagent :

由 N1 和 N2 solution (1 : 1; v/v) 混合而成，保存於 4°C。

藥品	濃度	製備	備註
Sodium nitrite (NaNO <sub>2</sub> )	1 mM	3.45 mg/50mL	分子量 69.00，製備於 ddH <sub>2</sub> O
N1 solution : sulfanilamide	1 %	500 mg/50mL	每 50 mL 須包含 3 mL H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ，製備於 ddH <sub>2</sub> O
N2 solution : naphthylethylenediamide dihydrochloride	0.1 %	50 mg/50mL	每 50 mL 須包含 3 mL H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ，製備於 ddH <sub>2</sub> O

實驗儀器

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

Ultrasonic Steri-Cleaner (DC 400, Delta)

### 3. 實驗方法

#### 【細胞存活率試驗】

活細胞線粒體中的呼吸鏈，在琥珀酸脫氫酶 (SDH) 和細胞色素 C 的作用下 tetrazolium 環開裂，生成藍色的 formazan 結晶，formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比 (死細胞中琥珀酸脫氫酶消失，不能將 MTT 還原)。

將長滿之細胞 trypsinize 下來，以培養基稀釋成  $4 \times 10^5$  cells/mL，種於 96 孔盤，每孔加入 100  $\mu$ L 細胞液，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 18 至 24 小時移除原培養基，並加入 55  $\mu$ L/well 之 MTT (0.5 mg/mL) 試劑，置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 3 小時後，再加入 100  $\mu$ L/well 0.04 N 鹽酸和異丙醇混合液輕輕震盪使活細胞與 MTT 試劑混合產生之 formazan 溶出。最後以酵素免疫分析儀

(ELISA reader) 檢測 540 nm 下之吸光值。

### 【NO<sub>2</sub> 生成量試驗】

一氧化氮的半衰期短，而亞硝酸鹽 (Nitrite, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 為其穩定的氧化代謝產物，因此藉由測定 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量可間接得之 NO 生成量。

將長滿之細胞 trypsinize 下來，以培養基稀釋成  $4 \times 10^5$  cells/mL，種於 96 孔盤，每孔加入 100  $\mu$ L 細胞液，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 18 至 24 小時。隔日移除原培養基，並添加測試樣品與 LPS (100 ng/mL) 總體積 100  $\mu$ L/well 共同處理，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 18 小時，每孔取 100  $\mu$ L 上清液到另一個 96 孔盤中，並加入混合的 Griess reagent 100  $\mu$ L/well，避光反應 10 分鐘，並以 ELISA reader 檢測 540 nm 下之吸光值，對照標準曲線即可計算出 NO<sub>2</sub> 之含量。

## 第六節 蛋白質萃取與定量

### 1. 實驗試藥

Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER<sup>®</sup>, 78501, Pierce)

Phosphate Buffered Saline (PBS, 0780, Amresco)

超純水 (Milli-Q<sup>®</sup>) (Minipore)

Bradford reagent (BIO BASIC INC., SK3031)

### 2. 實驗儀器

免疫酵素分析儀(BIO-RAD, Model 680)

高速冷凍離心機(HERMLE, Z233-MK-2)

細胞刮刀 (cell scrapers) (BIOFIL)

### 3. 實驗方法

#### 【蛋白質萃取】

將細胞液稀釋成  $4 \times 10^5$  cells/mL，種於 6 cm<sup>2</sup> dish 中 (5 mL/dish)，至於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 18 至 24 小時，去除培養液，分別加入含有 LPS

和樣品的培養基，置於培養箱中繼續培養 18 至 24 小時，後加入 1 mL 的 PBS 清洗，在冰上用細胞刮勺收集細胞，在 4°C、4500 rpm、5 分鐘，去除上清液，加入 200  $\mu$ L 細胞裂解試劑 (M-PER) 並以針筒吸放多次，於 4°C、10000 rpm、15 分鐘，離心後的上清液即細胞蛋白質原液，置於 -20°C 保存。

#### 【細胞核蛋白質萃取】

(所有試劑、epd.、plate 使用時皆須放置在冰上操作，不用時存放在 -20°C)

加 128  $\mu$ L DDW 到 DTT tube 中，配成 1 M DTT 溶液，1 M DTT 與 CIR-1 以 1:1000 比例配置，如：1  $\mu$ L DTT 加到 1 mL CIR-1，8 個 well 每個 400  $\mu$ L 所以需要配 3200  $\mu$ L， $3200/1000=3.2$ ，加 3.2  $\mu$ L DTT。將上清液去除以 PBS 清洗細胞加 Cytoplasmic Isolation Reagent (含 DTT) 10 cm<sup>2</sup> dish 每個 500  $\mu$ L/dish (6 well 每個 200  $\mu$ L/well) 在冰上反應 5 分鐘，用刮勺將細胞刮下，放入 1.5 mL epd. 中，離心 2500 rpm、3min、4°C，上清液為細胞質蛋白質，沉澱物先留著，加 CIR-1 (不含 DTT) 10 cm<sup>2</sup> dish 的每個 epd. 500  $\mu$ L/epd. (6 well 的每個 epd. 200  $\mu$ L/epd.) 輕柔吸放均勻，再以 2500 rpm、3 min、4°C 離心，去除上清液加 NIR-1 10 cm dish 的每個 epd. 60  $\mu$ L/epd. (6 well 的每個 epd. 20  $\mu$ L/epd.) 用 Vortex 1 min 強度調 5，靜置冰上 10 min，再次 Vortex 1 min 強度調 5，離心轉速調最高不要小於 10,000 g，10 min、4°C，所得之上清液即為核內蛋白質。

#### 【蛋白質定量】

以胎牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin) 定出標準曲線後，取出需定量之細胞蛋白質原液，避免細胞蛋白質濃度超過標準曲線範圍，先以 ddH<sub>2</sub>O 將蛋白質稀釋，在從中取出 10  $\mu$ L 至 96 well 中與 protein assay kit (Bradford method) 試劑做混合，並置於室溫中反應 2-3 分鐘測定波長 595 nm 吸光值，並帶入以胎牛血清所建立的標準曲線中，即可得知細胞蛋白質濃度，將所有蛋白質原液稀釋成同一濃度，定量完成的蛋白質存放於 -20°C。

## 第七節 西方墨點法 (Western blot)

### 1. 實驗試藥

Ammonium persulfate 98% (APS, A7460, Sigma)

Sodium Dodecyl Sulfate 20% solution (SDS, 0837, Amresco)

10 X TG Buffer (0307, Amresco)

1.5 M Tris Buffer pH 8.8 (JB31, Amresco)

0.5 M Tris Buffer pH 8.8 (JB32, Amresco)

Acryl/Bis<sup>TM</sup>29 : 1,40% (W/V) solution (Amresco)

TEMED (0761, Amresco)

Tween 20 (0777, Amresco)

99% Methanol (景明化工)

脫脂奶粉 (安佳)

Western Lighting<sup>®</sup> Plus-ECL (203-100201, PerkinElmer)

### 2. 實驗抗體

Cyclooxygenase-2 (Millipore)

Inducible nitric oxide (Novus)

### 3. 實驗儀器

冷光影像分析系統儀 (Image Quant LAS 4000 mini, 0622193, GE Healthcare)

水平震盪器 (Bio-Rad)

Electrophoresis chamber (Bio-Rad)

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

Ultrasonic Steri-Cleaner (DC 400, Delta)

pH meter (Suntex, Taiwan)

Semi-Dry Transfer cell (170-3940, Bio-Rad)

#### 4. 實驗方法

##### 【Loading Sample 製備】

將 4 X Loading Dye 與樣品以 1 : 3 之比例混和，加入定量好的細胞蛋白質萃取液，均勻混和後置於 95°C 之乾浴槽中加熱 5 分鐘，使其能夠打斷蛋白質之立體結構，加熱完畢立即放置於冰上 3 分鐘，以防止蛋白質結構除新回復，完成後存放於 -20°C 中備用。

##### 【SDS-Polyacrylamide Gel 製備】

先置備 10% 下層膠 (resolving gels)，加入製膠器中並以異丙醇 (isoprpanol) 壓膠面使膠片高低一致，下層膠膠凝固後將異丙醇到出，加入 5% 上層膠 (stacking gels)，插上齒梳 (comb) 且須避免產生氣泡。

	Stacking gel	Separating gel : acrylamide concentration			
		5%	10%	12%	15%
MW Range (kD)	Any	60-200	16-70	14-60	14-45
Total volumes	4 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
40% Acyl/Bis	0.5 mL	1.25 mL	2.5 mL	3 mL	3.75 mL
H <sub>2</sub> O	2.4 mL	6.05 mL	4.8 mL	4.3 mL	3.55 mL
1.5M Tris pH 8.8	-	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
0.5M Tris pH 8.8	1.0 mL	-	-	-	-
10% SDS	40 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
10% APS	40 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	4 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

### 【Buffer 製備】

---

#### Electrophoresis buffer (10 X)

---

Tris (249.3 mM)	29 g
Glycine (1.92 M)	144 g
1% SDS (20% SDS)	10 g (50 mL)
ddH <sub>2</sub> O	定量至 1 L

---

---

#### Western blot transfer buffer (10 X) (濕式)

---

Tris (249.3 mM)	30.3 g
Glycine (1.92 M)	144 g
ddH <sub>2</sub> O	定量至 1 L

---

---

#### Western blot transfer buffer (1 X) (濕式)

---

Western blot transfer buffer (10 X)	100 mL
95% Methanol	200 mL
ddH <sub>2</sub> O	定量至 1 L

---

---

#### TBS (20 X) pH 7.4

---

Tris (249.3 mM)	60.57 g
NaCl	175.32 g
ddH <sub>2</sub> O	定量至 1 L

---

---

TBS (1 X) pH 7.4

---

TBS (20 X)                      50 mL

ddH<sub>2</sub>O                              定量至 1 L

---

---

TBST (1 X) pH 7.4

---

TBS (1 X)                              1000 mL

Tween 20                              1 mL

---

### 【電泳 (Electrophoresis)】

將製好的膠片放置於電泳槽中，內槽先倒入電泳緩衝溶液 (TG-SDS)，確認內槽之電泳緩衝溶液不會洩漏到外槽後，電泳外槽也到入適量之電泳緩衝溶液，再將置備好之樣品 loading 到膠片內，並連接上電源。先以 60 V 之電壓進行電泳 20 分鐘，確認各 loading 之樣品無異狀後，接著以 90-120 V 的電壓進行電泳，直至 Sample buffer dye 降至 resolving gels 之底部為止。

### 【半乾式轉漬 (Semi-Dry Transfer)】

利用半乾式轉漬儀將膠片上已被分離之蛋白質轉漬至可與蛋白質結合之轉漬模 (PVDF) 上。先將半乾式轉漬儀電及上蓋取起，取 3 片泡過 20% Methanol/1 X TG-SDS buffer 濾紙互相疊合併排除氣泡，並依序放上 PVDF、需轉漬之膠片，最後在同樣蓋上 3 片泡過 20% Methanol/1 X TG-SDS buffer 之濾紙，由於氣泡會影響轉漬造成不均勻之狀況，所以同樣需確認將氣泡完全移除，最後將多餘之液體移除後按照電源之方向蓋上半乾式轉漬儀電極蓋，並以 250 mA、15 V 之電壓進行轉漬 50 分鐘。

### 【濕式轉漬 (West Transfer)】

利用濕式轉漬儀將膠片上已被分離之蛋白質轉漬至可與蛋白質結合之轉漬模 (PVDF) 上。先將濕式轉漬儀電極上蓋取起，將海綿與濾紙浸泡在 1X transfer buff 中，取 1 片海綿與濾紙互相疊合併排除氣泡 (由黑色面開始放起)，並依序

放上需轉漬之膠片、PVDF，最後在同樣蓋上 1 片濾紙和海棉，由於氣泡會影響轉漬造成不均勻之狀況，所以同樣需確認將氣泡完全移除，最後將黑色的一面面向黑色放置後按照電源之方向蓋上濕式轉漬儀電極蓋，並以 400 mA、60 V 之電壓進行轉漬 50 分鐘。

#### 【Wash】

轉漬後將轉漬膜取下，並確認是否轉漬成功後先以 1X PBST 清洗 3 次，85 rpm，每次清洗 5 分鐘。

#### 【Blocking】

由於此時轉漬膜上有許多未被蛋白質填補之孔洞，所以 Blocking 之動作是為了使我們的抗體僅僅只能跟特異的蛋白質結合而不是和膜結合。將清洗過後之轉漬膜浸泡於 5% 脫脂奶中，85 rpm，一小時。

#### 【Wash】

Blocking 後之轉漬膜進行清洗之動作，用 1X TBST 清洗 3 次，90 rpm，每次清洗 5 分鐘。

#### 【加入一級抗體 ( $\beta$ -actin; iNOS; COX-2; IL-6; HO-1)】

Blocking 後之轉漬膜泡於以 1 X TBS 稀釋後之一級抗體中，以 90 rpm，於 4 °C 下浸泡至隔夜。

#### 【Wash】

浸泡過一級抗體的轉漬膜用 1X TBST 清洗 4 次，90 rpm，每次清洗 8 分鐘。

#### 【加入二級抗體 (HRP)】

依照一級抗體取得來源不同使用不同的二級抗體，並於 90 rpm 下，浸泡一小時。

#### 【Wash】

浸泡過二級抗體的轉漬膜用 1X PBST 清洗 4 次，90 rpm，每次清洗 5 分鐘。

## 【冷光呈色】

將轉漬膜由 1X TBST 中取出並將其稍微瀝乾後，浸泡於 Western Lighting Plus-ECL 試劑中後再以冷光影像分析系統進行分析並拍照，並以影像分析軟體 (AlphaFaseFC) 及統計軟體分析 (SPSS 18.0) 定量蛋白質。

## 第八節 短暫轉染

### 1. 實驗試藥

pBKCMV GAL4-rPPAR $\alpha$

pBKCMV GAL4-rPPAR $\gamma$

pBKCMV (USA)<sub>4</sub>-alkaline phosphatase

Lipofectamine 200 Reagent (Invitrogen, 11668-019)

OPTI-MEM<sup>®</sup> (Reduced Serum medium) (Gibco, 31985-070)

TCM<sup>TM</sup> (Serum Replacement) (Protide, 1002)

Tropix<sup>®</sup> CDP Str<sup>®</sup> (Applied Biosystems, T2216)

Rosiglitazone (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S) (Cayman, 71740)

Wy14643 (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S) (Cayman, 70730)

### 2. 實驗儀器

多功能微量盤複合偵測儀 (BioTek<sup>®</sup>, Synergy-Mx-Gen5)

96 孔微量分析盤 (白底) (NUNC)

### 3. 實驗方法

細胞長滿後計算細胞數，將 CHO-K1 細胞液稀釋成  $4 \times 10^5$  cells/mL 種於 96 well (100  $\mu$ L/well) 中，置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 18-24 小時，稀釋 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  質體 DNA 0.1  $\mu$ g (100 ng) 分別溶於 5  $\mu$ L OPTI-MEM，溫和混勻，稀釋 AP 質體 DNA 溶於 5  $\mu$ L OPTI-MEM，溫和混勻，稀釋 LF 2000 微脂粒 0.4  $\mu$ L 溶於 5  $\mu$ L OPTI-MEM，溫和混勻，室溫靜置 5 分鐘。將稀釋過的 PPAR $\alpha$

和 PPAR $\gamma$  質體 DNA 分別與稀釋的 AP 質體 DNA 均勻混合後再與 稀釋的 LF2000 微脂粒混合 (總體積 20  $\mu$ L)，混合均勻 20 分鐘使其形成 DNA-LF2000 complex 後直接加入 96 孔盤中 (20  $\mu$ L/孔)，置於 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  培養箱反應 5 小時。接著每孔在加 80  $\mu$ L 的 10% FBS/F12，終止反應且置於培養箱繼續培養隔夜。吸除培養基，以無血清之 Ham's F12 培養液洗滌 (100  $\mu$ L/well) 兩次後，加入用 10% TCM/F12 配置的空白組、實驗組、正對照組樣品 (100  $\mu$ L/well) 處理 48 小時後，收集上清液，同時間進行細胞存活率試驗。取 10  $\mu$ L 上清液加至 96 well 白盤中，每孔加入 50  $\mu$ L Tropix 受質於 37 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘，接著進行冷光 (luminescence) 分析。

## 第九節 細胞激素分析

### (一) TNF- $\alpha$

#### 1. 實驗試劑

Wash buffer (1X) 取 25 mL Wash buffer (20X) 加滅菌水 475 mL DDW 稀釋，冰 4 $^{\circ}$ C 可保存 1 個月。

Assay buffer 取 2.5 mL Wash buffer (20X) 加滅菌水 47.5 mL DDW 稀釋，冰 4 $^{\circ}$ C 可保存 1 個月。

Blue-Dye 每瓶含有 0.4 mL，可直接使用。

Green-Dye 每瓶含有 0.4 mL，可直接使用。

Red-Dye 每瓶含有 0.4 mL，可直接使用。

Biotin-Conjugate 取 3 mL Assay buffer (1X) 加 30  $\mu$ L Green-Dye 加 30  $\mu$ L

Biotin-Conjugate，可維持 1 小時。

Streptavidin-HRP 3 mL Assay buffer 加 12  $\mu$ L Red-Dye 加 15  $\mu$ L

Streptavidin-HRP，可維持 1 小時。

#### 2. 實驗儀器

市售 TNF- $\alpha$  Assay Kit : eBioscience BMS607/2TWO

內附 Microwell plate coated with polyclonal antibody to mouse TNF- $\alpha$  96 well plate

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

### 3. 實驗原理

腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ )，也被稱為惡病質，由單核球細胞和巨噬細胞產生的細胞因子，在組織損傷或受病毒感染時，TNF- $\alpha$  可以活化嗜中性粒細胞、血管內皮因子、誘導局部血液凝血等作用，抑制脂蛋白、脂肪酶的活性，導致惡病質。當單核球細胞產生 TNF- $\alpha$  四小時會刺激細胞產生 IL-2，TNF- $\alpha$  表達量高時會長期刺激 T 細胞 CD2 和 CD28，增強  $\gamma$ -干擾素的表現。

將 TNF- $\alpha$  抗體 (小鼠來源) coating 在 96 well 中，標準品或樣品與抗體結合，利用 Biotin-Conjugate 標記 TNF- $\alpha$  抗體，再利用 Streptavidin-HRP 結合 Biotin-Conjugate 的抗體，在 washing 的步驟中洗去未結合的 Biotin-Conjugate 與 Streptavidin-HRP，使用可與 Streptavidin-HRP 反應的呈色試劑，當呈現深藍色時，加入酸終止反應，於 450 nm 下測其結果，對照標準曲線，得知樣品中 TNF- $\alpha$  的含量。

### 4. 實驗方法

先確定所需測試樣品、blank 組和 standard 的數量，而每個樣品、blank、standard 和 control sample 組接需 2 重複。用 400  $\mu$ L 的 wash buffer 洗 well，1 次洗 10~15 秒共洗 5 次，最後一次洗完要吸出多的 wash buffer，不要超過 15 min。稀釋 standard 在 epd. 中：加 225  $\mu$ L sample diluent (sample diluents 2 mL + 8  $\mu$ L Blue-Dye) 在每個 epd.，再吸 225  $\mu$ L standard 與其混合均勻，再吸 225  $\mu$ L standard 與 sample diluent 混合均勻的液體到下個濃度，重複吸放均勻，再吸 225  $\mu$ L 起來到下個濃度，小心避免劃到內表面。，這個步驟再做 6 次，就會有稀釋後的 standard 濃度為 1000.0~15.6 pg/mL，將剛剛序列稀釋好的 standard，取 100  $\mu$ L 依序加入，最後一孔要加入不含 standard 的 sample diluents (含 Blue-Dye) 100  $\mu$ L。加 100  $\mu$ L

sample diluent 至 blank well，加 50  $\mu$ L sample diluent 和 50  $\mu$ L sample 至 sample well，蓋上封膜放在 18~25 $^{\circ}$ C 室溫中 2 hr。準備 Biotin-Conjugate，將封膜拿起，用 400  $\mu$ L 的 wash buffer 洗 well，1 次洗 10~15 秒 共洗 4 次，加 100  $\mu$ L Biotin-Conjugate，再封膜放室溫 18~25 $^{\circ}$ C 室溫中 1 hr，準備 Streptavidin-HRP，膠膜拿起，wash 4 次立刻做下一步，加 100  $\mu$ L Streptavidin-HRP。(包含 blank well)，再封膜放室溫 18~25 $^{\circ}$ C 中 1 hr，膠膜拿起，wash 4 次立刻做下一步，加入 100  $\mu$ L TMB Substrate Solution 至全部的 well，放在室溫 18~25 $^{\circ}$ C 10 min(避免直接暴露在強光)(當高濃度 standard 變深藍色，建議加 stop solution，另外也可用 620 nm 來監測其顏色。停止反應須快速加入 100  $\mu$ L stop solution，快速混勻才能完全終止反應。結果的判讀需在添加 stop solution 之後判讀或將 microwell 儲存在 2~8 $^{\circ}$ C 避光 1 hr 內測完。) 利用分光光度計測 450 nm。

## (二) IL-10

### 1. 實驗試劑

Wash buffer (1X) 取 25 mL Wash buffer (20X) 加滅菌水 475 mL DDW 稀釋，冰 4 $^{\circ}$ C 可保存 1 個月。

Assay buffer 取 2.5 mL Wash buffer (20X) 加滅菌水 47.5 mL DDW 稀釋，冰 4 $^{\circ}$ C 可保存 1 個月。

Blue-Dye 每瓶含有 0.4 mL，可直接使用。

Green-Dye 每瓶含有 0.4 mL，可直接使用。

Red-Dye 每瓶含有 0.4 mL，可直接使用。

Biotin-Conjugate 取 3 mL Assay buffer (1X) 加 30  $\mu$ L Green-Dye 加 30  $\mu$ L

Biotin-Conjugate，可維持 1 小時。

Streptavidin-HRP 3 mL Assay buffer 加 12  $\mu$ L Red-Dye 加 15  $\mu$ L

Streptavidin-HRP，可維持 1 小時。

### 2. 實驗儀器

市售 IL-10 Assay Kit : eBioscience BMS614/2TWO

內附 Microwell plate coated with polyclonal antibody to mouse IL-10 96 well plate

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

### 3. 實驗原理

介白素 (IL-10) 是一種多功效的細胞激素，在淋巴細胞和骨髓細胞中扮演重要的角色，IL-10 可以阻斷細胞激素的合成與巨噬細胞部分功能，參與 B 細胞、肥大細胞和胸腺細胞增殖和分化的調節。

將 IL-10 抗體 (小鼠來源) coating 在 96 well 中，標準品或樣品與抗體結合，利用 Biotin-Conjugate 標記 IL-10 抗體，再利用 Streptavidin-HRP 結合 Biotin-Conjugate 的抗體，在 washing 的步驟中洗去未結合的 Biotin-Conjugate 與 Streptavidin-HRP，使用可與 Streptavidin-HRP 反應的呈色試劑，當呈現深藍色時，加入酸中止反應，於 450 nm 下測其結果，對照標準曲線，得知樣品中 IL-10 的含量。

### 4. 實驗方法

同 TNF- $\alpha$  實驗方法。

## 第十節 抗氧化酵素分析

### (一) Catalase Assay

#### 1. 實驗試劑

Catalase Assay Buffer (10X) 取 2 mL Catalase Assay Buffer 和 18 mL DDW 稀釋，冰 4°C 可保存 2 個月。

Catalase Sample Buffer (10X) 取 5 mL 的 Catalase Sample Buffer 和 45 mL DDW 稀釋。Formaldehyde standards、Catalase (Control)、樣品皆要用此當稀釋液。冰 4°C 可保存 2 個月。

Catalase Formaldehyde Standard 每瓶含 4.25 M formaldehyde。可直接使用。

Catalase (Control) 需先加 2 mL 稀釋的 Sample Buffer 回溶當做原液。再從中取 100  $\mu$ L 和 1.9 mL sample buffer 稀釋，稀釋完後取 20  $\mu$ L 至 Positive Control 的 well。

Catalase Potassium Hydroxide 加入 4 mL 冰 DDW 震勻(皆放冰上)。冰 4°C 可保存 3 個月。

Catalase Hydrogen Peroxide 取 40  $\mu$ L 的 Catalase Hydrogen Peroxide 和 9.96 mL DDW 混合均勻，可維持 2 小時。

Catalase Purpald (Chromagen) 每瓶含有 4 mL，可直接使用。

Catalase Potassium Periodate 每瓶含有 1.5 mL，可直接使用。

## 2. 實驗儀器

市售 Catalase Assay Kit：Cayman Item NO.707002。

內附 Goat anti-mouse coated 96 well plate

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

## 3. 實驗原理

Catalase 為普遍存在生物體中的抗氧化酵素且存在含氧的細胞內，主要功能包括清除細胞內之過氧化氫 ( $H_2O_2$ )、活性氧物質 (ROS) 和一些有毒物質。在甲醇的過氧化反應，可被當作電子的提供者。此試劑利用 Catalase 過氧化功能來測定其活性。加入甲醇與酵素產生過氧化反應，形成甲醛 (Formaldehyde)，而 Formaldehyde 會與特殊呈色劑 Purpald (4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole) 形成含有 Aldehydes 之雙環結構，並隨著氧化反應而從無色液體轉變成紫色測試液，顏色越深代表 catalase，在波長 540 nm 測吸光值，即可計算出 Cell lysates 中 Catalase 之活性。(王郁菁，2008；陳智傑，2007)

## 4. 實驗方法

Formaldehyde standards Wells 加 100  $\mu$ L 稀釋 Assay Buffer、30  $\mu$ L methanol 和

20  $\mu\text{L}$  配好的 standard, Positive Control Wells 每孔各加入 100  $\mu\text{L}$  稀釋 Asaay Buffer、30  $\mu\text{L}$  methonl 和 20  $\mu\text{L}$  配好的 Catalase (Control)。Sample Wells 加入 100  $\mu\text{L}$  稀釋 Asaay Buffer、30  $\mu\text{L}$  methonl 和 20  $\mu\text{L}$  配好的樣品 CAT 活性需介 2~35 nmol/min/mL, 若沒有則需要用 sample buffer 稀釋。啟動反應每孔則需快速加入 20  $\mu\text{L}$  稀釋 Hydrogen Peroxide, 室溫震盪 20 分鐘, 每孔再加入 30  $\mu\text{L}$  稀釋 Potassium Hyeroxide 以及 30  $\mu\text{L}$  Catalase Purpald 終止反應, 室溫震盪 10 分鐘後每孔加入 10  $\mu\text{L}$  Catalase Potassium Periodate, 室溫震盪 5 分鐘, 測 OD.540 nm。

## (二) Glutathione Assay

### 1. 實驗試劑

GSH MES Buffer (2X) 原本液體就有 60 mL, 需再加 60 mL DDW 稀釋才可使用。

GSSG Standard 每瓶含有 2 mL 的 25  $\mu\text{M}$  GSSG 可直接使用。4°C 可保存 1 年。

GSH Co-Factor Mixture 和 0.5 mL 的 DDW 混合均勻即可使用。混完的液體夠做 96 well, 4°C 可保存 2 週。

GSH Enzyme Mixture 要小心的打開避免裡面的液體濺出, 加入 2 mL 稀釋 MES Buffer 混勻好即夠做 96 well, 4°C 可保存 2 週。

GSH DTNB 加入 0.5 mL 的 DDW 混勻。必須在 10 分鐘內用完。

### 2. 實驗儀器

市售 Glutathione Assay Kit : Cayman Item NO.703002。

內附 Goat anti-mouse coated 96 well plate

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

### 3. 實驗原理

試劑利用 Glutathione reductase 來測定 GSH 的含量。GSH 結構上之硫氫基會與 DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, Ellman's reagent) 反應產生黃色的 TNB (5-thio-2-nitrobenzoic acid) 及二氧化硫混合物 (GSTNB), GSTNB 是介於 GSH 和 TNB 之間的共存產物, GSTNB 會再與 Glutathione reductase 作用, 減

少 GSTNB 產量且重新合成 GSH 並形成更多的 TNB。TNB 產生的速率與 GSH 之濃度成比例關係，所以可以藉由直接測量組織中的 TNB 重新合成的產量，就可以換算組織中有多少濃度的 GSH 被重新合成，波長 405 nm 測定吸光值，即可計算得知細胞培養液與 Cell lysates 中 GSH 之含量。(王郁菁，2008；陳智傑，2007)

#### 4. 實驗方法

加 50  $\mu$ L 配好的 standard 至指定的 well，再加入 50  $\mu$ L 配好的樣品蓋上提供的 plate cover，準備 Assay Cocktail，混合均勻至 20 mL 的離心管 MES Buffer (11.25 mL) + reconstituted cofactor Mixture (0.45 mL) + reconstituted Enzyme (2.1 mL) + DDW (2.3 mL) + DTNB (0.45 mL)。Assay Cocktail 現配現用，每個時間點皆需跑 Standar curve，10 分鐘內準備好。掀開 plate cover 用八爪加入 150  $\mu$ L 現配的 Assay Cocktail 至 standard 和樣品的 well 中後，避光 shaker。測吸光值 405~414 nm。5 分鐘測一次測 6 個點總共 30 分鐘。在波長 405 nm 時，最低標準 0.15~0.25 AU；最高標準 0.6~0.8 AU。

#### (三) Glutathione Peroxidase Assay

##### 1. 實驗試劑

GPx Assay Buffer (10X) vial 中含有 3 mL 的 Assay Buffer，再加入 27 mL DDW。冰 4°C 可儲存半年。

GPx Sample Buffer (10X) 2 mL 的加 18 mL DDW 稀釋。此稀釋液用於稀釋 GPx control、sample。冰 4°C 可儲存 1 個月。

Glutathione Peroxidase (Control) 應避免反覆解凍需分裝置 -20°C，取 10  $\mu$ L Glutathione Peroxidase 和 490  $\mu$ L 稀釋過的 sample Buffer(在冰上)，做實驗時再取 20  $\mu$ L 至 well，在操作過程中吸光值每分鐘大約會降低 0.051 unit。

GPx Co-Substrate Mixture 買的是 480 well，有 5 瓶 GPx Co-Substrate Mixture，每個 vial 各加 6 mL DDW 震勻，需再 25°C 下做實驗。冰 4°C 可儲存 2 天。

GPx Cumene Hydroperoxide 480 well kit 有 12 mL 的 Cumene Hydroperoxide，可直接使用，需冰在  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

## 2. 實驗儀器

市售 Glutathione Assay Kit : Cayman Item NO.703102。

內附 Goat anti-mouse coated 96 well plate

ELISA Reader (Synergy Mx, Biotek)

## 3. 實驗原理

利用 Glutathione reductase 之作用間接測量 GPx 之活性。當氫過氧化物 (Hydroperoxide) 經由 GPx 之作用會促使 GSH 轉變為 GSSG，再透過 NADPH 與 Glutathione reductase 將 GSSG 回復成 GSH，而反應過程中，NADPH 會氧化成  $\text{NADP}^+$ ，測 OD. 340 nm，其吸光值會隨時間增加而遞減，其吸光值減少之速率與 GPx 之活性成比例關係。(王郁菁，2008；陳智傑，2007)

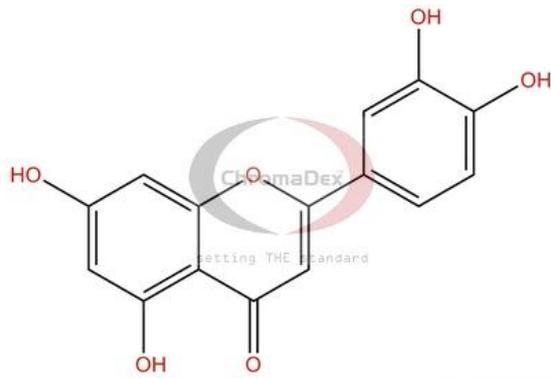
## 4. 實驗方法

Sample wells 每孔加 100  $\mu\text{L}$  稀釋 Assay Buffer、50  $\mu\text{L}$  co-Substrate mixture 和 20  $\mu\text{L}$  稀釋樣品。啟動反應每孔快速加入 20  $\mu\text{L}$  Cumene Hydroperoxide，輕搖數秒使其混合均勻，每分鐘讀取一次波長 340 nm 總共讀取 5 次。初始樣品吸光值不能高於 1.2 或低於 0.5。

## 第十一節 高效液相層析儀分析 (HPLC)

### 1. 實驗試劑

標準品 木樨草素 (Luteolin) (ASB-00012461-010, ChromaDex<sup>TM</sup>, MW 286.24, 友和股份有限公司)



甲醇 (Methanol) HPLC 級 (99.9%) 供儀器分析用 (景明化工股份有限公司)  
乙腈 (Acetonitrile) HPLC 級 (99.99%) 供儀器分析用 (景明化工股份有限公司)  
甲酸 (Formic acid) ACS 級 (88%) 供儀器分析用 (景明化工股份有限公司)  
Reverses Osmosis, RO 及超純水, (Millipore, DQ5/Ultrapur and Pure water, Elix/Pure water)

流動相：移動相組成採用兩種溶劑，A 液為 2.5% (v/v) 甲酸水溶液；B 液為甲醇，以 A:B (v/v) 為 40:60 比例做為分析時之移動相，此後並維持比例 30 min，流速皆設定為 1.0 mL/min，注射量為 10  $\mu$ L，搭配 Ultraviolet/Visible 偵測器作全波長掃描 (Photo Diode Array Detector, PDA)，並以其波長為 350 nm 為 HPLC 層析圖擷取條件。

## 2. 實驗儀器

濾紙 (Filter paper) (Whatman No. 1, 直徑 110 mm, 購自全雅科技有限公司)  
針頭式過濾器 (Filter) (Millipore 13 mm Millex Filter, 0.45  $\mu$ m PVDF non-sterile, 購自弘屹科技有限公司)  
分析樣本瓶 (12 mm $\times$ 32 mm, 2 mL) (Waters 公司之產品, 購自瑞森科技有限公司)

本研究用以分析指標成份之高效液相層析儀溶劑輸送系統為 HITACHI HPLC L-5000 system, 附自動注射器, 連接 HITACHI 5430 UV/VIS Detector 搭配光電二極體陣列偵測器 (Photodiode Array Detector, PDA) 檢測, 分析管柱為 TOSOH TSK-GEL ODS-80TM (250  $\times$  4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m, Japan), 購自三津科技股份有限

公司

### 3. 實驗原理

高效液相層析儀分析是利用流動相通過固定相時，混合物中的各成份在固定相和流動相之間的分布係數不相同（即親和力不同），使其在管柱中的滯留時間不相同而分離的方法，可將液體混合物中的成份分離、成分定性及定量分析。適於分析高沸點不易揮發、分子量大、不同極性的有機化合物。例如：可檢測分析食品中的三聚氰胺的含量。若化合物與固定相親和力較強，滯留時間長，而化合物與動相的親和力較強，滯留時間短，依此原理將樣品中的標的待測物與干擾物分離。在逆相層析法中，通常以高極性作為流動相，固定相為非極性，極性大的化合物會先被沖提出來，極性小的較慢沖提出來，因而達到分離效果。

### 4. 實驗方法

移動相組成採用兩種溶劑，A 液為 2.5% (v/v) 甲酸水溶液；B 液為甲醇，以 A:B (v/v) 為 40:60 比例做為分析時之移動相，此後並維持比例 30 min，流速皆設定為 1.0 mL/min，注射量為 10  $\mu$ L，搭配 Ultraviolet/Visible 偵測器作全波長掃描 (Photo Diode Array Detector, PDA)，並以其波長為 350 nm 為 HPLC 層析圖擷取條件。標準曲線製作：Luteolin 標準品為 ChromaDex<sup>TM</sup> 公司之產品。精秤 1.0 mg 之標準品以甲醇溶解，再依序以甲醇稀釋成 6 種濃度 (5、20、50、100、200  $\mu$ g/mL) 之標準溶液。樣本前處理：分別取樣品萃取物 WH 52.0 mg、WEA 54.0 mg、WE 60.2 mg、WB 56.1 mg、WW 50.0 mg，並以 HPLC 級甲醇回溶定量至 5 mL，經 0.45  $\mu$ m 濾膜過濾後，隨即以 HPLC 進行分析。Luteolin 定量分析，依據本節所述之 HPLC 層析條件，針對不同樣品內 Luteolin 加以定量，並以每 1 g 萃取物/1 mL 中所含之 Luteolin ( $\mu$ g) 表示。

## 第十二節 統計分析

實驗結果皆以平均值  $\pm$  標準偏差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。數據之統計先確認為常態分布後，以 one way ANOVA、Duncan's Multiple Range Test 來檢定各組獨立樣本組間之差液， $P < 0.05$  則代表具統計上顯著差異統計分析以 SPSS 18.0 軟體統計分析。



## 第五章 結果

### Part I 黃花蜜菜萃取物抗發炎作用機制探討

#### 一、黃花蜜菜萃取之產率

取乾燥黃花蜜菜經磨碎成粉，各取 30 g 分別以正己烷、乙酸乙酯、乙醇、正丁醇、熱水進行萃取，得到產率分別為 3.2%、3.04%、9.27%、3.1%、8.4%，結果如表二所示。

#### 二、黃花蜜菜之成分分析

本實驗以中草藥店乾燥黃花蜜菜測定水分含量、粗脂肪、粗蛋白及灰份含量，再以 100% 扣除水分含量、粗脂肪、粗蛋白及灰份含量得碳水化合物之含量。各項目皆以百分比 (%) 表式，結果如表三所示，水份 (Moisture) 12.74%、灰份 (Ash) 13.64%、粗脂肪 (Crude fat) 1.07%、粗蛋白 (Crude protein) 14.54%、碳水化合物 (Carbohydrate) 58.01%。

#### 三、黃花蜜菜之 HPLC 分析

依據本論文第三章節所述分析技術進行對照標準品 Luteolin 分析，如圖二十七、二十八 所示，於滯留時間 9.69 min 出現 Luteolin 之波峰 (peak)，且 Luteolin 在濃度 5-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，得線性迴歸方程式 ( $Y=mX+b$ ) 及相關係數 ( $R^2$ ) 為： $y = 0.5397x - 2.6872$ ,  $R^2: 0.9974$ ，顯示良好線性關係，如圖二十九所示，黃花蜜菜萃取物層析圖如圖二十七、二十八所示，萃取物定量結果如表十一所示，含量由多到少依序為乙醇、乙酸乙酯、正丁醇、熱水，然而正己烷萃取物無標準品之含量。圖表 Y 軸數字起始值不同，故須對照其起始值比較。

#### 四、黃花蜜菜抗氧化能力

結果如表四所示，清除 DPPH 自由基能力在 0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL 濃度下黃花蜜菜乙醇萃取物與正對照組 Gallic acid 在統計上沒有差異且顯著高於其他萃取物，乙醇萃取物在 0.5 mg/mL、1 mg/mL 和 2 mg/mL 濃度下時顯

著高於 0.25 mg/mL，正丁醇萃取物於 2 mg/mL 下顯著高於其他濃度，黃花蜜菜乙醇萃取物在 2 mg/mL 下達正對照組 (Gallic acid) 的 80%。亞鐵螯合能力試驗在 1 mg/mL 下黃花蜜菜正己烷、熱水萃顯著高於其他萃取物，在 2 mg/mL 濃度下熱水萃取物達正對照組 (EDTA) 的 44.14%，如表五所示。還原能力試驗於 2 mg/mL 下黃花蜜菜乙醇、熱水萃取物顯著高於其他萃取物，乙醇、熱水萃取物在 2 mg/mL 濃度顯著高於同一萃取物其它濃度，結果如表六所示。總酚含量試驗中黃花蜜菜熱水萃取物顯著高於其他萃取物，如表七所示。

### 五、黃花蜜菜萃取物對 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞之影響與抑制 NO 生成試驗

空白組為不含 LPS 組別，負對照組為以 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞無處理樣品，結果如圖十一所示，黃花蜜菜萃取物在 RAW264.7 巨噬細胞中，在 50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$  濃度下皆不影響細胞存活率，但在 200  $\mu\text{g/mL}$  濃度下，正己烷萃取物會影響細胞存活率，故後續實驗使用 100  $\mu\text{g/mL}$  濃度。以 100 ng/mL LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞株發炎模式，並以黃花蜜菜不同有機溶劑萃取物對發炎介質 NO 生成量的影響，在不影響細胞存活率下抑制發炎介質 NO 生成，結果如圖十二所示，黃花蜜菜正己烷 (WH)、乙醇 (WE)、正丁醇 (WB) 萃取物抑制 NO 生成顯著高於其他萃取物，正己烷、乙醇、正丁醇萃取物在 100  $\mu\text{g/mL}$  下抑制 NO 生成分別為 75.65%、57.11%、54.95%。

### 六、黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW264.7 小鼠巨噬細胞內蛋白質表現之影響

(一) 黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞 iNOS 蛋白質表現量之影響

結果如圖十三所示，可以得知正己烷、乙酸乙酯、乙醇萃取物能顯著減少 iNOS 蛋白質的表現量且抑制效果與空白組、正對照組 (Dexamethasone) 相當無統計上之沒有顯著差異，正丁醇萃取物之抑制效果沒有前三者那麼顯著，熱水萃取物反而顯著增加 iNOS 的生成，正己烷萃取物顯著減少 iNOS 的表現量且抑

制效果與負對照組有顯著差異達負對照組的 64% 且與正對照組效果相當，黃花蜜菜萃取物中以正己烷、乙酸乙酯、乙醇萃取物減少 iNOS 生成效果最佳，熱水萃取物效果最差。

(二) 黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞 COX-2 蛋白質表現量之影響

由圖十三可得知正己烷、乙酸乙酯、乙醇、正丁醇萃取物在統計上沒有差異，但相對於負對照組、正對照組 (Dexamethasone) 有顯著差異，熱水萃取物相較於負對照組會顯著增加 COX-2 的生成，正己烷萃取物顯著減少 COX-2 的表現量且抑制效果與負對照組有顯著差異達負對照組的 12% 且與正對照組效果相當，此結果與 iNOS 之結果趨勢相同。

(三) 黃花蜜菜正己烷萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞 iNOS 蛋白質表現量之影響

由黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞 iNOS 蛋白質表現量實驗結果顯示，結果如圖十四所示，正己烷萃取物抑制 iNOS 生成效果最顯著，所以使用正己烷不同濃度進行實驗，由實驗結果得知，正己烷在 50  $\mu\text{g/mL}$ 、75  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$  下與正對照組 (Dexamethasone) 抑制 iNOS 表現之能力相當無統計上之顯著差異。

(四) 黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞 IL-6 蛋白質表現量之影響

由結果可以得知乙醇萃取物顯著減少 IL-6 的表現量且抑制效果與空白組、有顯著差異，正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、熱水萃取物沒有顯著差異且相較空白組、負對照組沒有顯著差異，黃花蜜菜萃取物中以乙醇萃取物減少 IL-6 生成效果最佳，結果如圖十五所示。

(五) 黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞 HO-1 蛋白質表現量之影響

由結果可以得知正己烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取物顯著增加 HO-1 的表現量且增強效果與空白組、負對照組、正對照組 (Dexamethasone) 有顯著差異，熱水萃取物相較於空白組、負對照組沒有顯著差異，正己烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取物顯著增加 HO-1 的生成，黃花蜜菜萃取物中以正己烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取物增加 HO-1 生成效果最佳，乙醇與熱水萃取物效果最差，結果如圖十七所示。

(七) 黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞 PPAR $\gamma$  蛋白質表現量之影響

結果如圖十六所示，得知正己烷、乙酸乙酯、乙醇、正丁醇、熱水萃取物皆能顯著增加 PPAR $\gamma$  的表現量且增強效果與空白組、負對照組有顯著差異，乙醇、正丁醇、熱水萃取物顯著增加 PPAR $\gamma$  的表現量且與正對照組 (Dexamethasone) 沒有顯著差異，黃花蜜菜萃取物中以正己烷、乙酸乙酯萃取物增加 PPAR $\gamma$  表現量最為顯著。

(八) 黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞 NF- $\kappa$ B (Nuclear) 蛋白質表現量之影響

黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞，抽取核蛋白質 (Nuclear)，以  $\alpha$ -tubulin 為 internal control，結果如圖十八所示，空白組與負對照組有顯著差異，實驗組、正對照組與空白組、負對照組沒有顯著差異。

(九) 黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞 NF- $\kappa$ B (Cytosol) 蛋白質表現量之影響

黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞，抽取質蛋白質 (Cytosol)，結果如圖十八所示，空白組與負對照組有顯著差異。

(十) 黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞 TNF- $\alpha$  蛋白質表現量

結果如圖十九所示，空白組、負對照組及正對照組間有顯著差異且乙酸乙酯

萃取物與負對照組有顯著差異，可以減少 TNF- $\alpha$  蛋白質表現量。

(十一) 黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞 IL-10 蛋白質表現量

結果如圖十九所示，空白組、負對照組、正對照組間皆有顯著差異，熱水萃取物相對負對照組有顯著差異可增加 IL-10 表現量。

## 七、黃花蜜菜萃取物之 PPAR $\alpha$ 和 PPAR $\gamma$ 活化倍數分析

(一) 黃花蜜菜萃取物對 CHO-K1 細胞存活率之影響

黃花蜜菜萃取物處理 CHO-K1 中國倉鼠卵巢細胞 48 hr，結果如圖二十所示，在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下皆不影響細胞存活率，但在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下正己烷、乙酸乙酯萃取物會影響細胞存活率，因 LF 2000 會影響細胞存活率，故後續實驗使用 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度。

(二) 黃花蜜菜萃取物活化 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  表現之情形

實驗使用 LF2000 將 GAL4-rPPAR $\alpha$  質體或 GAL4-rPPAR $\gamma$  質體轉殖進入 CHO-K1 細胞，再處理 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度的黃花蜜菜萃取物 48 hr。結果如圖二十一所示，熱水萃取物可以顯著活化 PPAR $\alpha$  之表現，其活化效果為空白組之 1.52 倍 ( $P < 0.05$ )，且活化 PPAR $\gamma$ ，活化倍數為 Vehicle 之 1.33 倍 ( $P < 0.05$ )。PPAR $\alpha$  之正對照 Wy14643 在 10  $\mu\text{M}$  濃度下，可以顯著活化 PPAR $\alpha$ ，其活化倍數為 Vehicle 之 3.33 倍 ( $P < 0.05$ )，而 PPAR $\gamma$  之正對照 Rosiglitazone 在 10  $\mu\text{M}$  濃度下，活化倍數為 Vehicle 組之 2.94 倍 ( $P < 0.05$ )。

## Part II 黃花蜜菜萃取物護肝作用機制探討

一、黃花蜜菜萃取物以 APAP 誘發 FL83B 小鼠肝細胞細胞存活率之影響與抗氧化酵素分析

(一) Acetaminophen、黃花蜜菜萃取物對 FL83B 小鼠肝細胞細胞存活率

APAP 處理 FL83B 小鼠肝細胞 24 hr，結果如圖二十二所示，在 45 mM 以

下得劑量皆不影響細胞存活率，在 45 mM 以上的劑量皆不影響細胞存活率，故後續實驗使用 15、60、90 mM。黃花蜜菜萃取物處理 FL83B 小鼠肝細胞 24 hr，結果如圖二十三所示，在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下皆不影響細胞存活率，但在 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下正己烷、乙酸乙酯萃取物會影響細胞存活率，故後續實驗使用 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度。

(二) 黃花蜜菜萃取物和 15、60、90 mM APAP 共同處理 FL83B 24 hr 細胞存活率試驗 (模式 A)

黃花蜜菜萃取物和 15、60、90 mM APAP 共同處理 FL83B 小鼠肝細胞 24 hr，結果如圖二十四所示，乙酸乙酯萃取物在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下，與負對照組有顯著差異，正己烷、乙醇、正丁醇、熱水萃取物與空白組、負對照組、正對照組沒有顯著差異。

(三) 預處理黃花蜜菜萃取物 24 hr 再處理 15、60、90 mM APAP 24 hr FL83B 細胞存活率試驗 (模式 B)

預處理黃花蜜菜萃取物 24 hr 再處理 15、60、90 mM APAP 24 hr，結果如圖二十六所示，乙酸乙酯萃取物在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下，與空白組、負對照組有顯著差異，正己烷、乙醇、正丁醇、熱水萃取物與空白組、負對照組、正對照組沒有顯著差異，故後續實驗使用 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度。

(四) 預處理 15、60、90 mM APAP 24 hr 再處理黃花蜜菜萃取物 24 hr FL83B 細胞存活率試驗 (模式 C)

預處理 15、60、90 mM APAP 24 hr 再處理黃花蜜菜萃取物 24 hr，結果如圖二十五所示，正己烷、乙酸乙酯、乙醇、正丁醇、熱水萃取物與空白組、負對照組、正對照組沒有顯著差異。

(五) 黃花蜜菜萃取物以 APAP 誘發 FL83B 小鼠肝細胞對 Catalase 之影響  
模式 A：15 mM、90 mM APAP 和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  黃花蜜菜萃取物共同處理 24 小時

模式 B：預處理 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  黃花蜜菜萃取物 24 小時後再處理 15 mM、90 mM APAP 24 hr

模式 C：預處理 15 mM、90 mM APAP 24 小時後再處理 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  黃花蜜菜萃取物

結果如表八所示，空白組與負對照組皆有顯著差異，90 mM APAP 劑量在模式 A 下乙酸乙酯萃取物相較負對照組可有效增加 Catalase 的含量，15 mM APAP 劑量在模式 B 下正己烷、乙酸乙酯、乙醇、正丁醇、熱水萃取物相較負對照組可有效增加 Catalase 的含量，90 mM APAP 劑量在 B 模式下正丁醇、熱水萃取物相較負對照組可有效增加 Catalase 的含量，15 mM APAP 劑量在模式 C 下乙醇萃取物相較負對照組可有效增加 Catalase 的含量。

#### (六) 黃花蜜菜萃取物以 APAP 誘發 FL83B 小鼠肝細胞對 GSH 之影響

結果如表九所示，在預處理 APAP 24 hr 後再處理 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  黃花蜜菜萃取物 (模式 B) 下 空白組與復到組有顯著差異且在預處理 15 APAP 時，黃花蜜菜萃取物可以增加 GSH 的含量，但在高劑量 APAP 誘導模式下是沒有顯著差異且在其他兩種模式下無顯著差異。

#### (七) 黃花蜜菜萃取物以 APAP 誘發 FL83B 小鼠肝細胞對 GPX 之影響

結果如表十所示，空白組、負對照組、實驗組皆無顯著差異。

表二、不同溶劑黃花蜜菜萃取產率

Table 2. The yield of different solvent extract of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr..

	正己烷 (WH)	乙酸乙酯 (WEA)	乙醇 (WE)	正丁醇 (WB)	熱水 (WW)
產率 Yield (%) <sup>1</sup>	3.2	3.04	9.27	3.1	8.4

1. Yield (%) = (extract weight/ dry material weight) × 100

表三、黃花蜜菜萃取物成份分析

Table 3. The ingredient analysis of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr..

項目	含量 (%)
水分 (Moisture)	12.74 ± 0.14
灰份 (Ash)	13.64 ± 0.12
粗脂肪 (Crude fat)	1.07 ± 0.72
粗蛋白 (Crude protein)	14.54 ± 0.03
碳水化合物 (Carbohydrate)	58.01 ± 0.00

Values are means ± SD ( n = 5) and analyzed using one-way ANOVA test.

表四、黃花蜜菜萃取物清除 DPPH 自由基能力

Table 4. The DPPH scavenging activity of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr.

extracts

	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
WH	<sup>z</sup> 11.04 ± 5.94 <sup>a</sup>	<sup>zy</sup> 15.75 ± 5.46 <sup>ab</sup>	<sup>zy</sup> 22.05 ± 8.92 <sup>ab</sup>	<sup>y</sup> 34.11 ± 3.43 <sup>a</sup>
WEA	<sup>z</sup> 9.19 ± 1.93 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 11.18 ± 1.44 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 11.94 ± 3.13 <sup>a</sup>	<sup>y</sup> 19.87 ± 2.66 <sup>a</sup>
WE	<sup>z</sup> 73.30 ± 5.33 <sup>b</sup>	<sup>y</sup> 85.89 ± 0.64 <sup>cd</sup>	<sup>y</sup> 85.19 ± 1.22 <sup>c</sup>	<sup>y</sup> 81.22 ± 1.80 <sup>bc</sup>
WB	<sup>z</sup> 19.90 ± 2.64 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 23.75 ± 3.04 <sup>b</sup>	<sup>y</sup> 34.14 ± 3.76 <sup>b</sup>	<sup>x</sup> 59.87 ± 1.61 <sup>b</sup>
WW	<sup>z</sup> 77.18 ± 1.91 <sup>b</sup>	<sup>z</sup> 78.80 ± 2.34 <sup>c</sup>	<sup>z</sup> 77.40 ± 4.44 <sup>c</sup>	<sup>z</sup> 62.48 ± 17.40 <sup>b</sup>
Gallic acid	<sup>z</sup> 91.01 ± 0.48 <sup>c</sup>	<sup>z</sup> 91.11 ± 0.32 <sup>d</sup>	<sup>z</sup> 90.84 ± 0.41 <sup>c</sup>	<sup>z</sup> 90.80 ± 0.24 <sup>c</sup>

Values are the mean ± SD of three independent experiments. Values not sharing a letter are significantly different ( $p < 0.05$ ). a, b, c, d The same sample extract and different concentration. x, y, z The same sample concentration and different extract.

表五、黃花蜜菜萃取物亞鐵螯合能力試驗

Table 5. Ferrous chelating ability of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts

	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
WH	<sup>z</sup> 9.02 ± 0.54 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 10.14 ± 2.30 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 29.44 ± 7.12 <sup>bc</sup>	<sup>z</sup> 31.34 ± 4.77 <sup>c</sup>
WEA	<sup>z</sup> 13.46 ± 14.58 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 7.48 ± 10.04 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 8.04 ± 5.41 <sup>ab</sup>	<sup>z</sup> 32.61 ± 4.32 <sup>c</sup>
WE	<sup>z</sup> 4.51 ± 8.04 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 6.06 ± 15.05 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 2.80 ± 0.75 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 7.96 ± 5.51 <sup>a</sup>
WB	<sup>z</sup> 0.43 ± 8.52 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 1.42 ± 5.61 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 3.42 ± 0.34 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 16.90 ± 2.08 <sup>ab</sup>
WW	<sup>z</sup> 25.88 ± 1.94 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 36.25 ± 12.76 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 39.42 ± 13.53 <sup>c</sup>	<sup>z</sup> 27.23 ± 1.54 <sup>bc</sup>
EDTA	<sup>z</sup> 90.80 ± 0.14 <sup>b</sup>	<sup>z</sup> 87.22 ± 4.17 <sup>b</sup>	<sup>y</sup> 89.31 ± 1.85 <sup>d</sup>	<sup>y</sup> 88.59 ± 3.09 <sup>d</sup>

Values are the mean ± SD of three independent experiments. Values not sharing a letter are significantly different ( $p < 0.05$ ). a, b, c, d The same sample extract and different concentration. x, y, z The same sample concentration and different extract.

表六、黃花蜜菜萃取物還原能力試驗

Table 6. The reducing power of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts

	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
WH	<sup>z</sup> 0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	<sup>y</sup> 0.08 ± 0.00 <sup>a</sup>	<sup>x</sup> 0.15 ± 0.01 <sup>ab</sup>	<sup>w</sup> 0.30 ± 0.00 <sup>ab</sup>
WEA	<sup>z</sup> 0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 0.02 ± 0.02 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 0.04 ± 0.01 <sup>a</sup>
WE	<sup>z</sup> 0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 0.20 ± 0.00 <sup>a</sup>	<sup>y</sup> 0.34 ± 0.01 <sup>ab</sup>	<sup>x</sup> 0.61 ± 0.06 <sup>bc</sup>
WB	<sup>z</sup> 0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 0.06 ± 0.00 <sup>a</sup>	<sup>zy</sup> 0.12 ± 0.00 <sup>ab</sup>	<sup>y</sup> 0.30 ± 0.09 <sup>ab</sup>
WW	<sup>z</sup> 0.21 ± 0.00 <sup>a</sup>	<sup>y</sup> 0.34 ± 0.00 <sup>a</sup>	<sup>x</sup> 0.54 ± 0.02 <sup>b</sup>	<sup>w</sup> 0.88 ± 0.02 <sup>c</sup>
Vitamin C	<sup>z</sup> 1.70 ± 0.42 <sup>b</sup>	<sup>z</sup> 1.89 ± 0.37 <sup>b</sup>	<sup>x</sup> 1.94 ± 0.45 <sup>c</sup>	<sup>z</sup> 1.96 ± 0.27 <sup>d</sup>

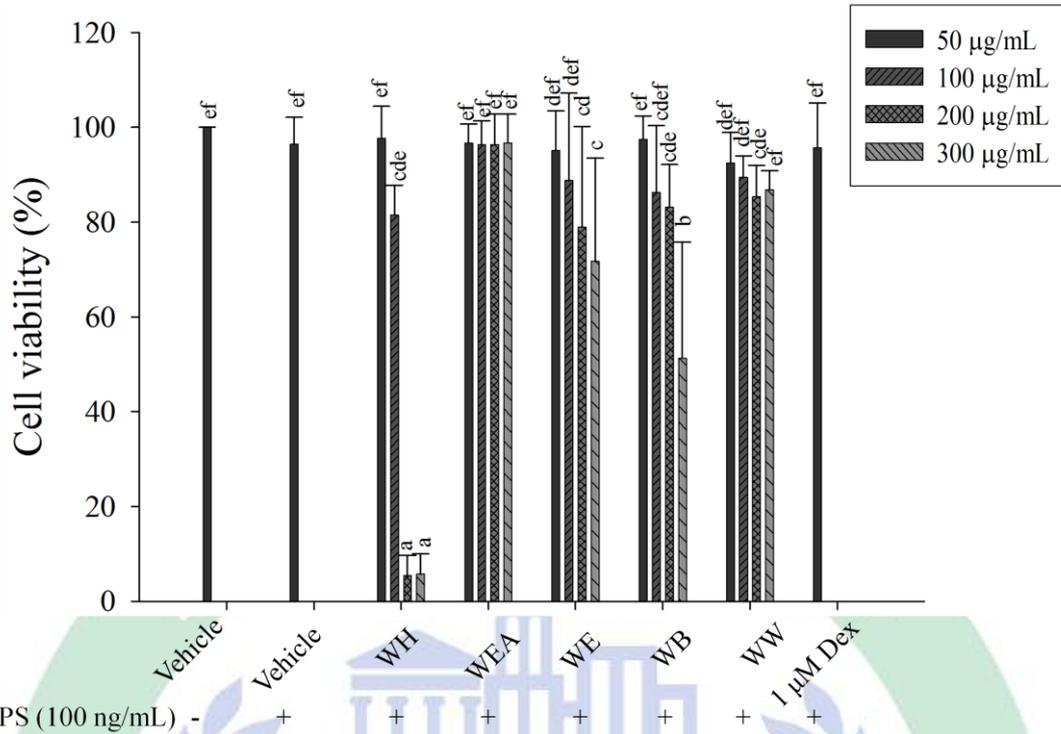
Values are the mean ± SD of three independent experiments. Values not sharing a letter are significantly different ( $p < 0.05$ ). a, b, c, d The same sample extract and different concentration. x, y, z The same sample concentration and different extract.

表七、黃花蜜菜萃取物總酚含量試驗

Table 7. The total phenol contents of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts

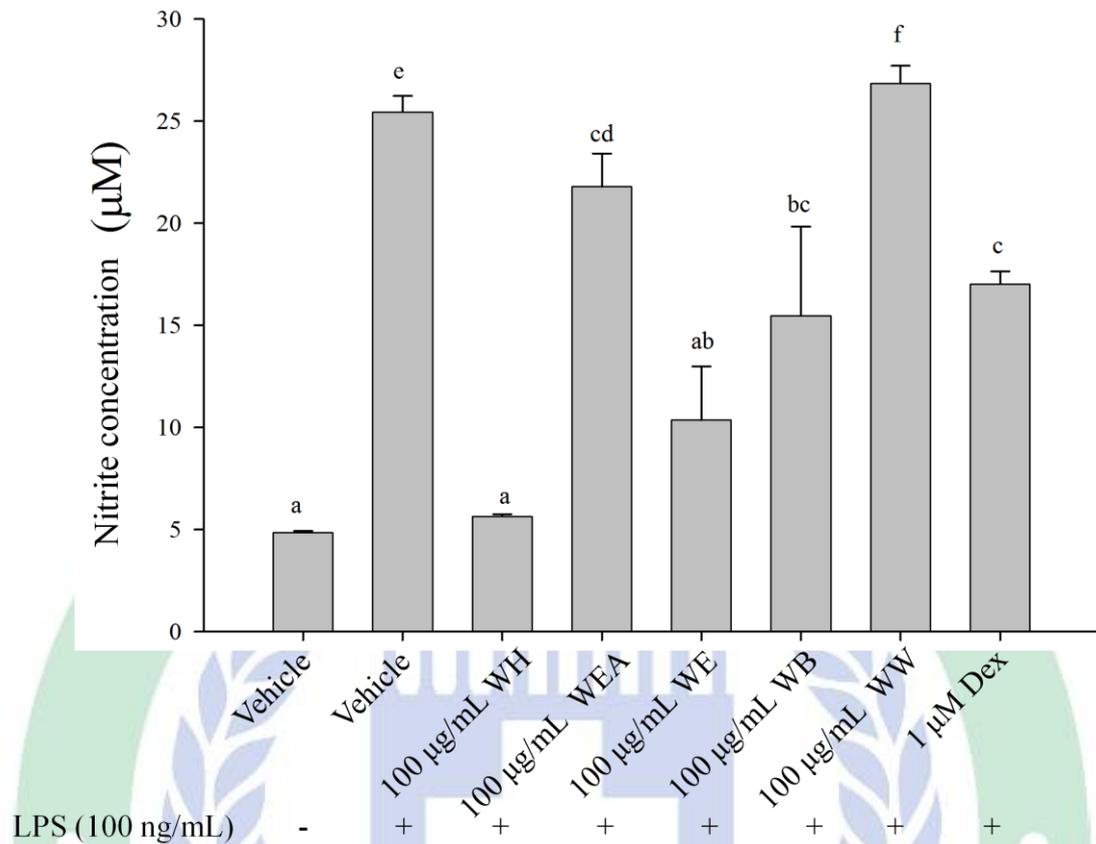
	mg GAE/g <sup>1</sup>
WH	14.21 ± 0.56 <sup>a</sup>
WEA	8.58 ± 0.29 <sup>a</sup>
WE	58.52 ± 6.72 <sup>b</sup>
WB	16.59 ± 1.16 <sup>a</sup>
WW	77.90 ± 4.13 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> GAE : gallic acid equivalent. Values are the mean ± SD of three independent experiments. Values not sharing a letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

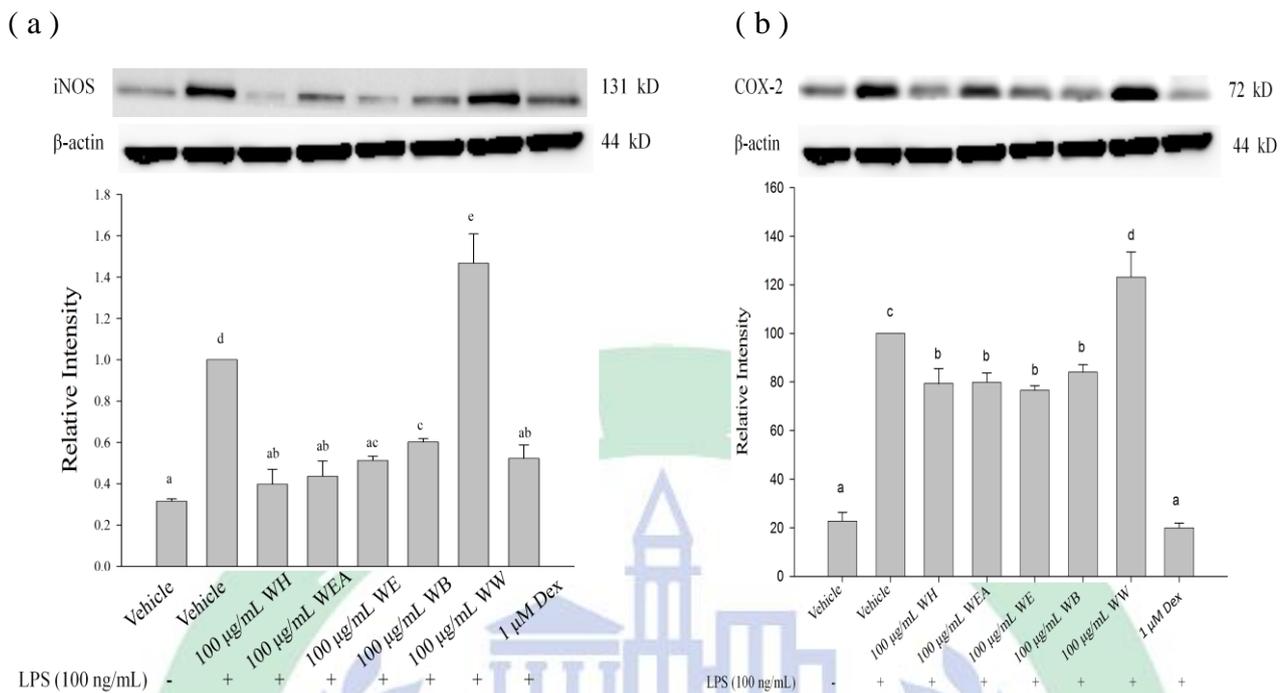


圖十一、不同濃度下黃花蜜菜萃取物對 RAW264.7 細胞之存活率試驗

Figure 11. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts on MTT assay in RAW264.7 cell. Values are means  $\pm$  SD (n = 4) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other. Dexamethasone (Dex.) at the concentration of 1  $\mu$ M is as the positive control.

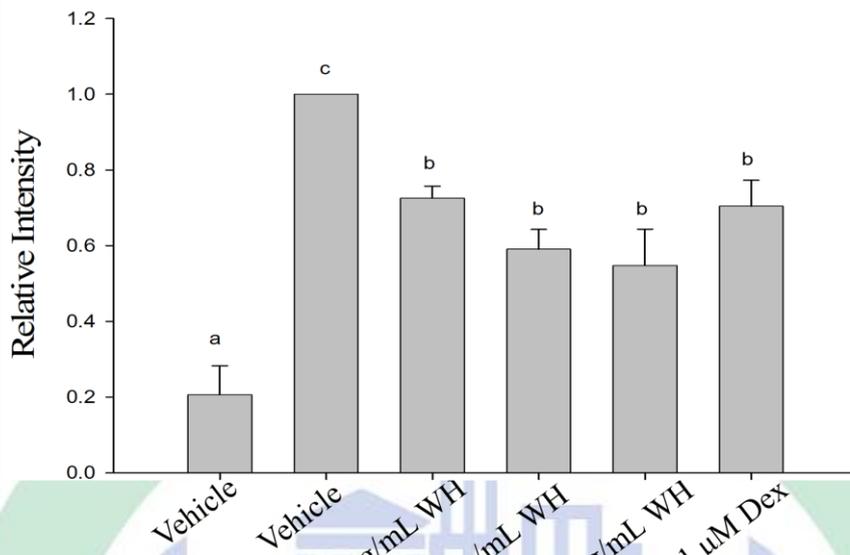
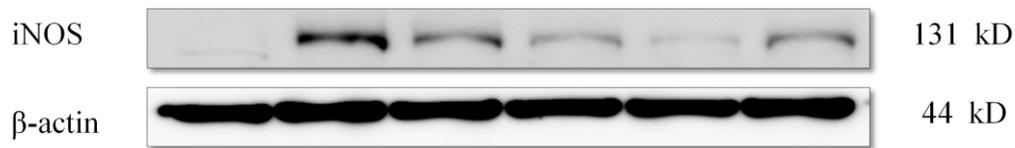


圖十二、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞生成 NO<sub>2</sub> 之影響  
 Figure 12. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts on NO<sub>2</sub> produce in RAW264.7 cells. Values are means ± SD (n = 5) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other. Dexamethasone (Dex.) at the concentration of 1 µM is as the positive control.



圖十三、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 (a) iNOS、(b) COX-2 蛋白質表現之影響

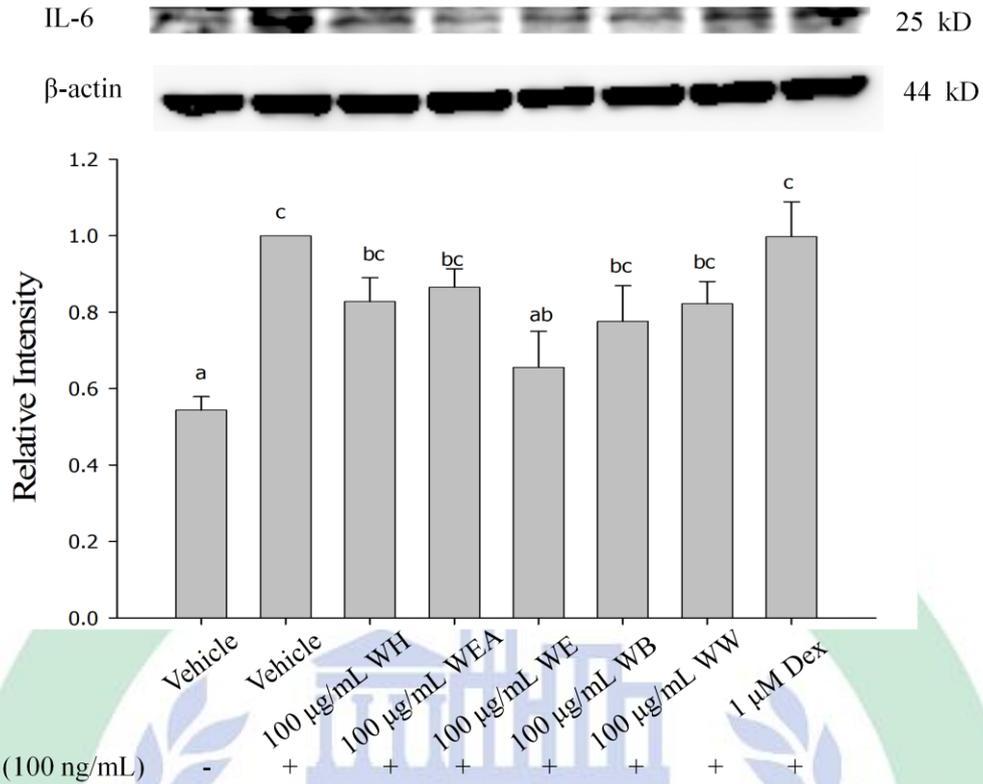
Figure 13. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts on iNOS (a), COX-2 (b) level in LPS-stimulated RAW264.7 cell. Sample were successively eluted with solvent mixtures of increasing polarity as indicated above the graph. Total cellular protein (50 µg/lane) was separated on a 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and stained with antibodies specific for iNOS. Values are means  $\pm$  SD (n = 3) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other. Dexamethasone (Dex.) at the concentration of 1 µM is as the positive control.



LPS (100 ng/mL)

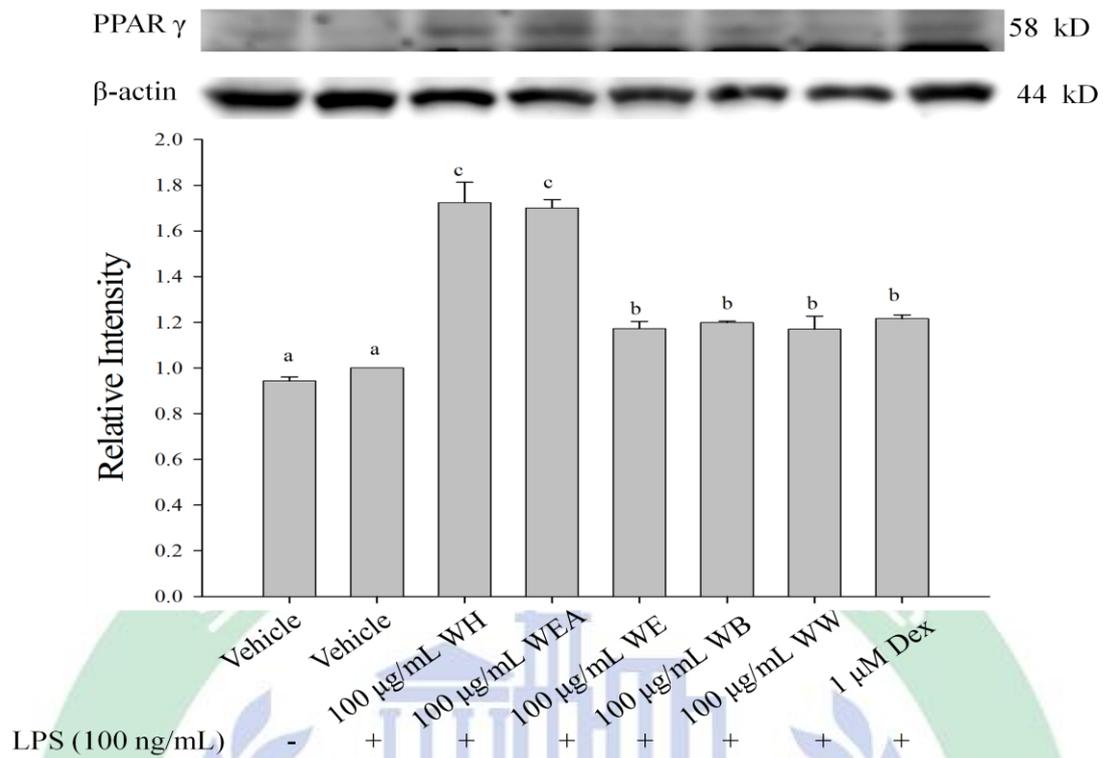
圖十四、黃花蜜菜正己烷萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 iNOS 蛋白質表現之影響

Figure 14. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. *n*-Hexane extracts on iNOS level in LPS-stimulated RAW264.7 cell. Sample were successively eluted with solvent mixtures of increasing polarity as indicated above the graph. Total cellular protein (50 µg/lane) was separated on a 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and stained with antibodies specific for iNOS. Values are means  $\pm$  SD (n = 3) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other. Dexamethasone (Dex.) at the concentration of 1 µM is as the positive control.



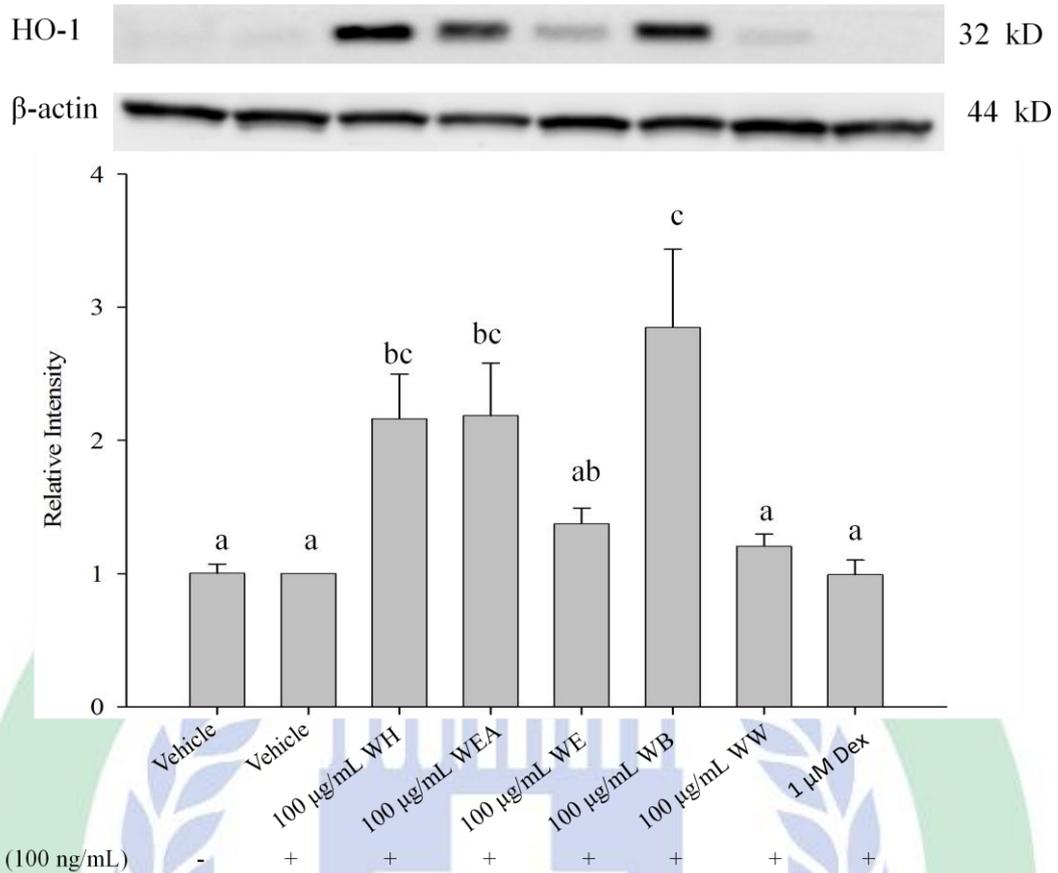
圖十五、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 IL-6 蛋白質表現之影響

Figure 15. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts on IL-6 level in LPS-stimulated RAW264.7 cell. Sample were successively eluted with solvent mixtures of increasing polarity as indicated above the graph. Total cellular protein (100 μg/lane) was separated on a 15% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and stained with antibodies specific for IL-6. Values are means ± SD (n = 3) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other. Dexamethasone (Dex.) at the concentration of 1 μM is as the positive control.



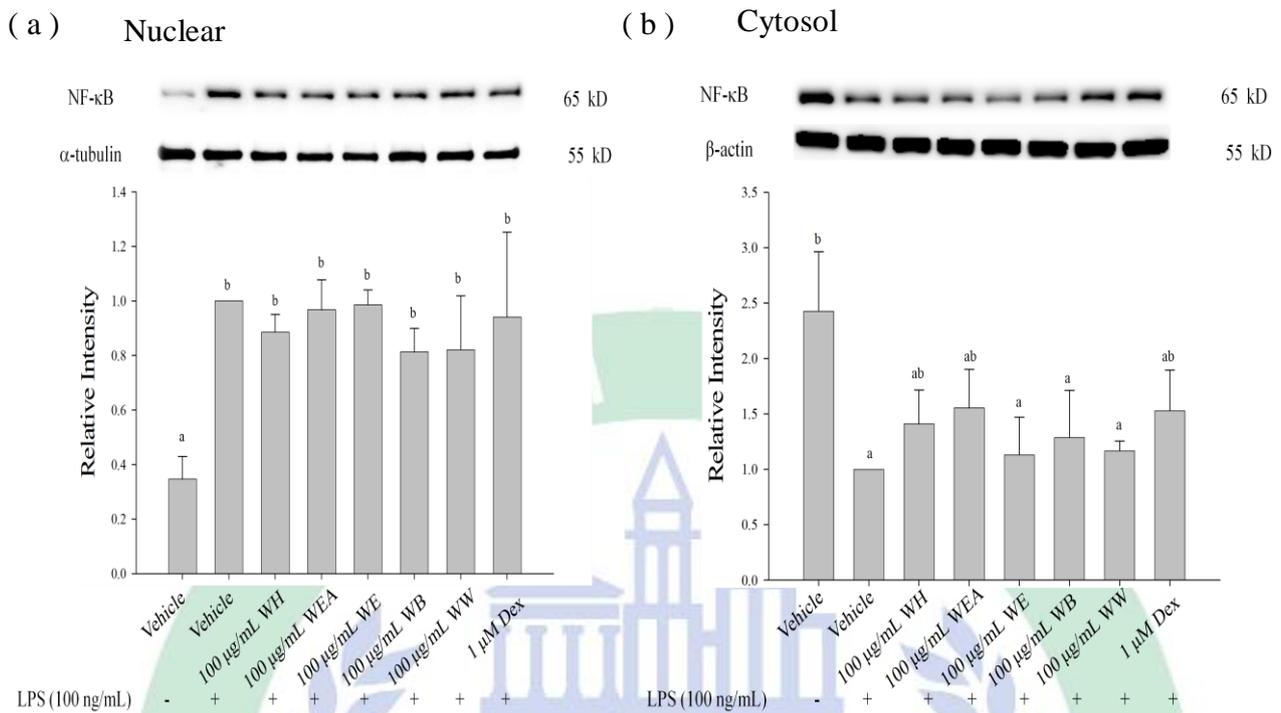
圖十六、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 PPAR $\gamma$  蛋白質表現之影響

Figure 16. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts on PPAR $\gamma$  level in LPS-stimulated RAW264.7 cell. Sample were successively eluted with solvent mixtures of increasing polarity as indicated above the graph. Total cellular protein (100  $\mu$ g/lane) was separated on a 15% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and stained with antibodies specific for IL-6. Values are means  $\pm$  SD (n = 3) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other. Dexamethasone (Dex.) at the concentration of 1  $\mu$ M is as the positive control.



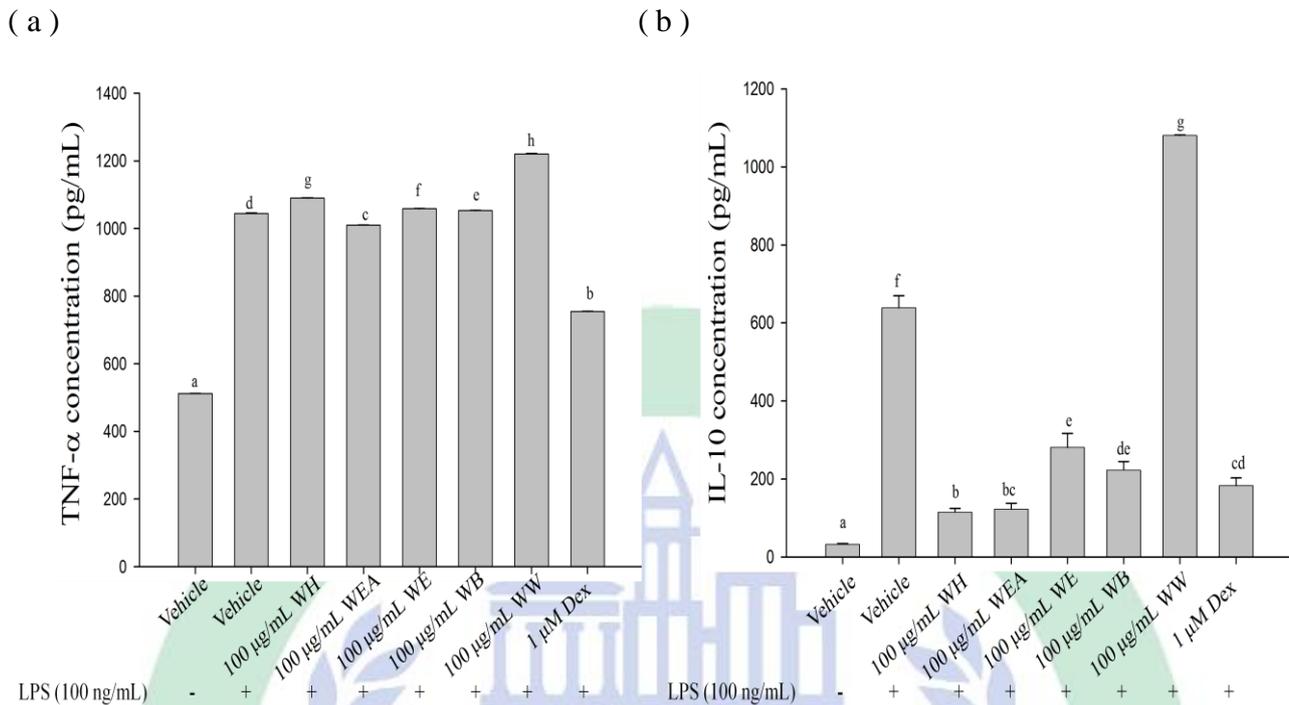
圖十七、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 HO-1 蛋白質表現之影響

Figure 17. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts on HO-1 level in LPS-stimulated RAW264.7 cell. Sample were successively eluted with solvent mixtures of increasing polarity as indicated above the graph. Total cellular protein (100 µg/lane) was separated on a 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and stained with antibodies specific for HO-1. Values are means  $\pm$  SD (n = 3) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other. Dexamethasone (Dex.) at the concentration of 1 µM is as the positive control.



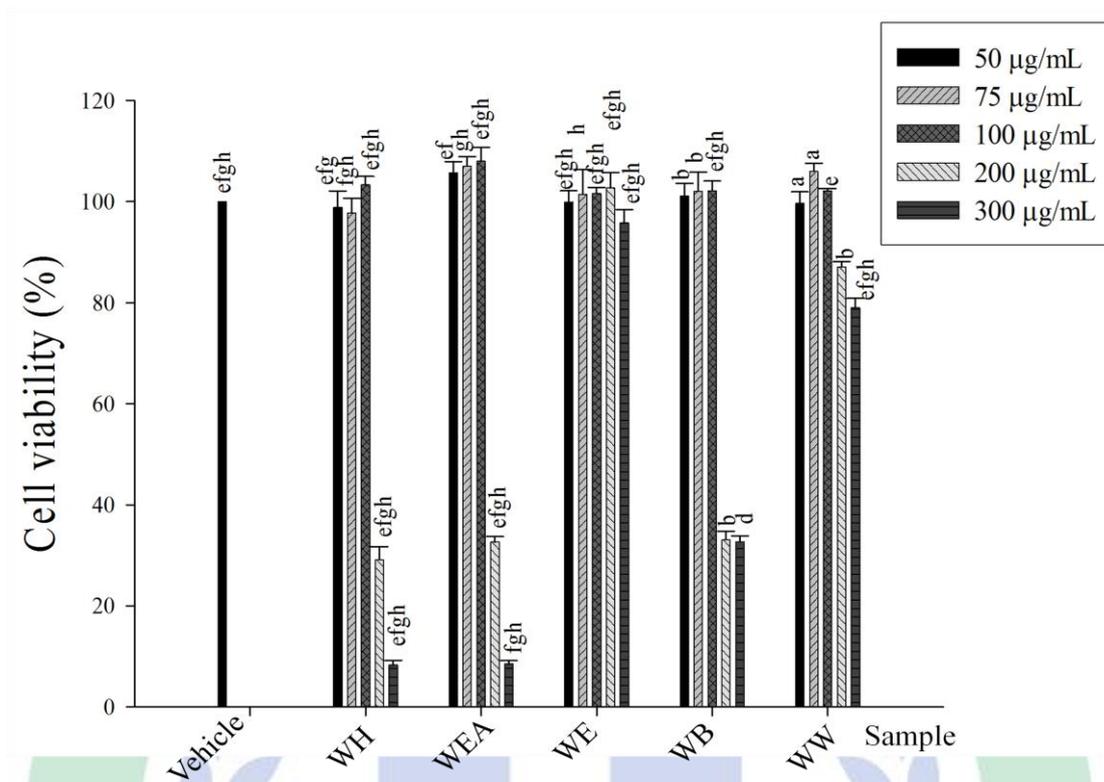
圖十八、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 ( a ) NF-κB (Nuclear) 、 ( b ) NF-κB (Cytosol) 蛋白質表現之影響

Figure 18. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts on NF-κB (Nuclear) ( a ) , NF-κB (Cytosol) ( b ) level in LPS-stimulated RAW264.7 cell. Sample were successively eluted with solvent mixtures of increasing polarity as indicated above the graph. Total cellular protein (100 μg/lane) was separated on a 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and stained with antibodies specific for NF-κB. Values are means ± SD ( n = 3) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other. Dexamethasone (Dex.) at the concentration of 1 μM is as the positive control. α-tubulin is as the internal control.



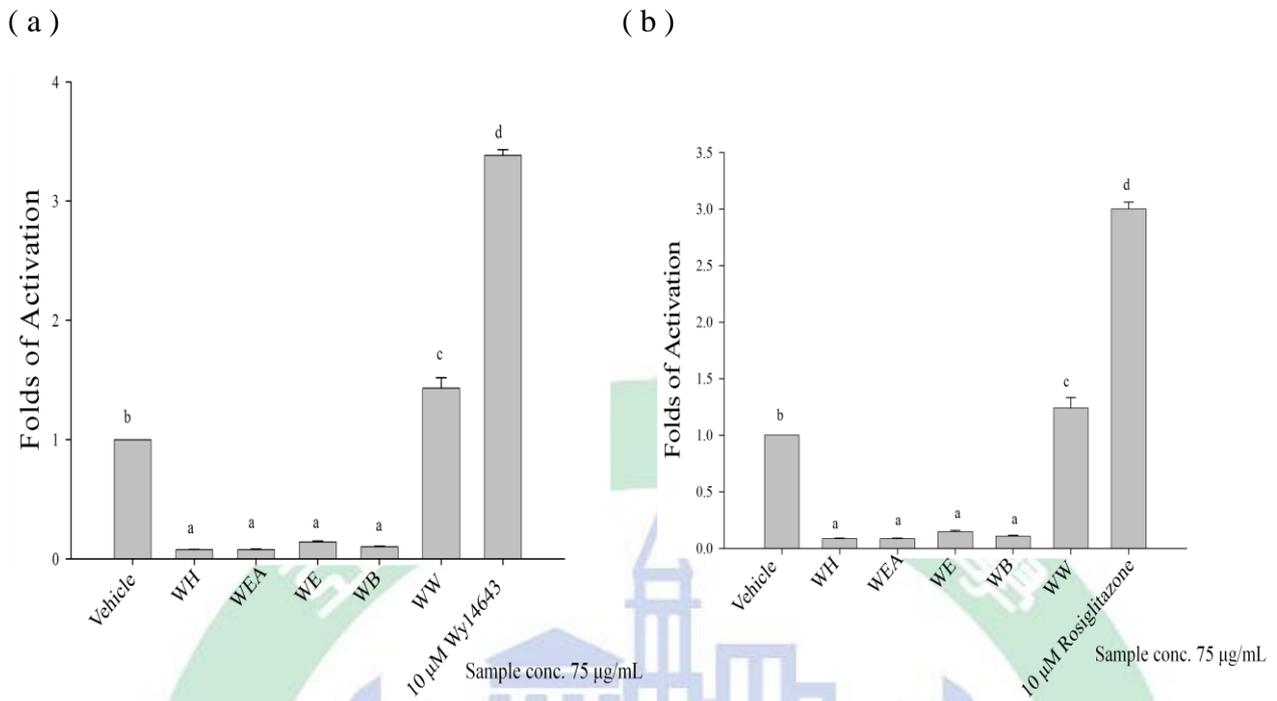
圖十九、黃花蜜菜萃取物經 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞 (a) TNF- $\alpha$ 、(b) IL-10 細胞激素分泌量之影響

Figure 19. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts on TNF- $\alpha$  (a), IL-10 (b) cytokine secretion in LPS-stimulated RAW264.7 cell. Values are means  $\pm$  SD (n = 3) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other. Dexamethasone (Dex.) at the concentration of 1  $\mu$ M is as the positive control.



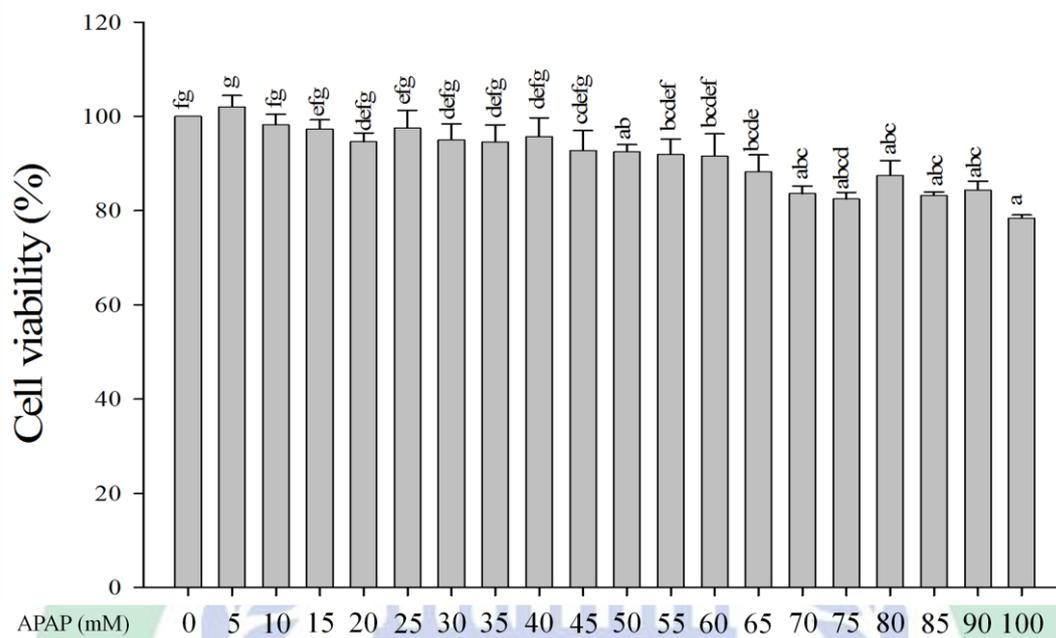
圖二十、黃花蜜菜萃取物 CHO-K1 細胞存活率試驗

Figure 20. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts on MTT assay in CHO-K1 cell. Values are means  $\pm$  SD (n = 4) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other.



圖二十一、黃花蜜菜萃取物對 (a) GAL4-rPPAR $\alpha$ 、(b) GAL4-rPPAR $\gamma$  之活化能力分析

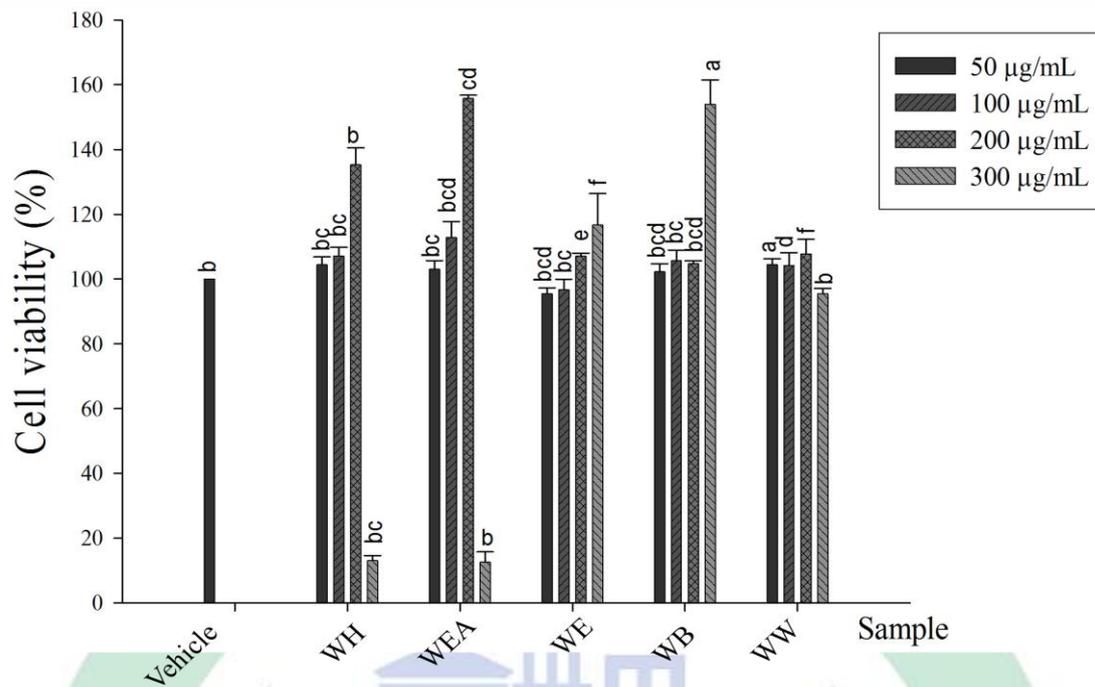
Figure 21. Transactivation assay of GAL4-rPPAR $\alpha$  (a), GAL4-rPPAR $\gamma$  (b) by *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts. Values are means  $\pm$  SD (n = 4) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different (P < 0.05) from each other.



圖二十二、乙醯胺基苯酚對 FL83B 細胞之存活率試驗

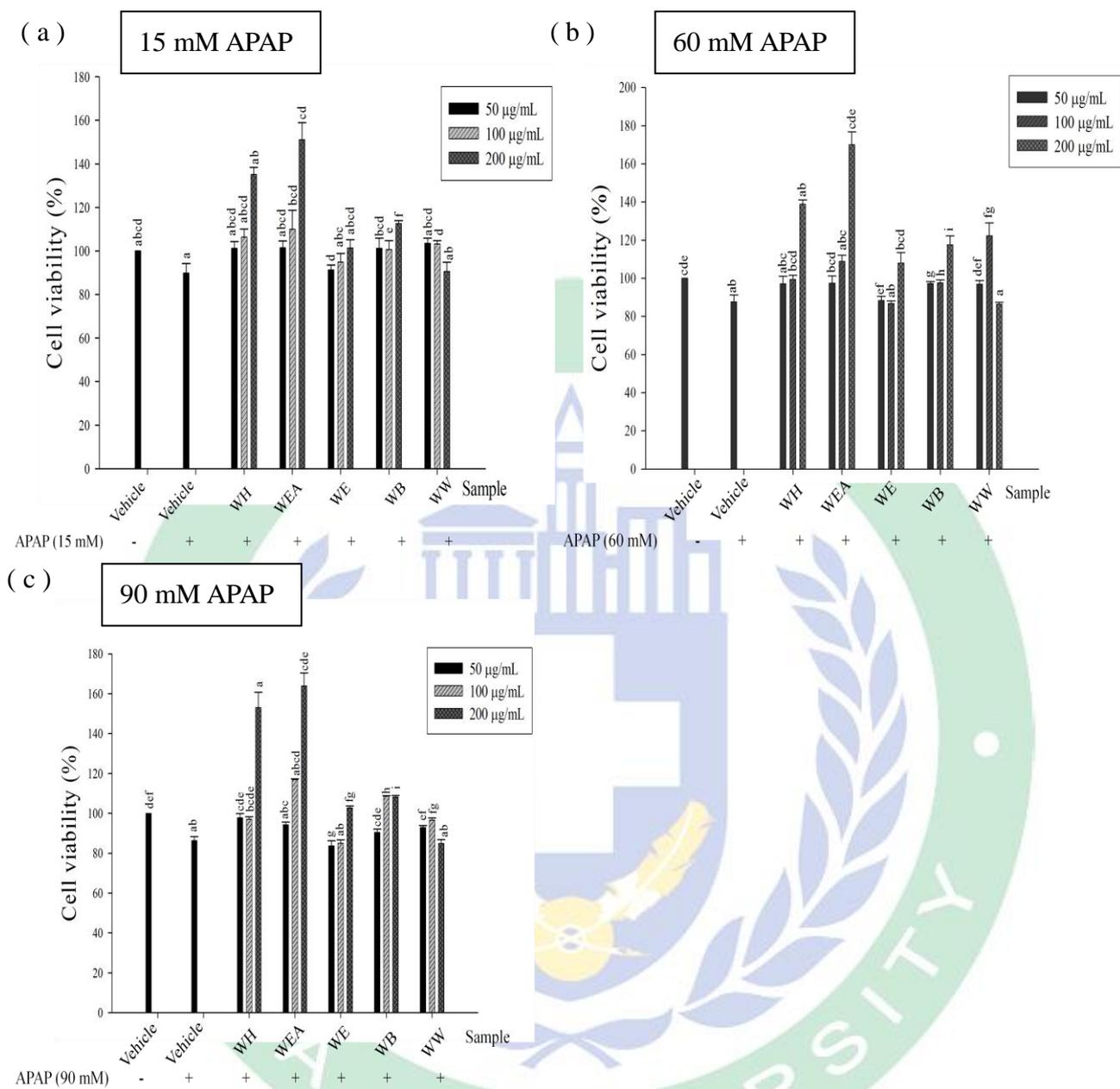
Figure 22. Effects of different concentration of APAP on MTT assay in FL83B cell.

Values are means  $\pm$  SD ( n = 4) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other.



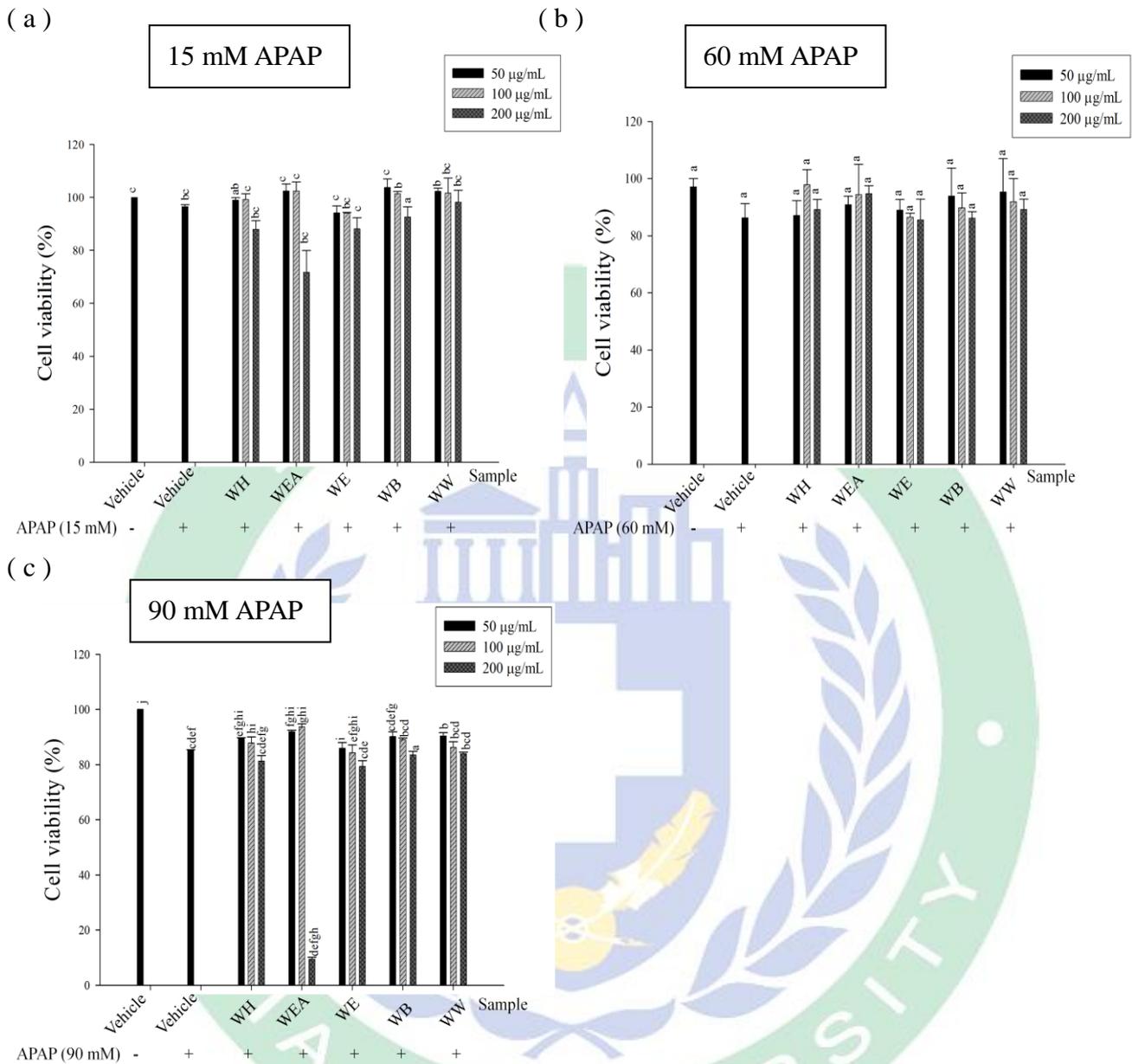
圖二十三、黃花蜜菜萃取物對 FL83B 細胞存活率試驗

Figure 23. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts on MTT assay in FL83B cell. Values are means  $\pm$  SD (n = 4) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other.



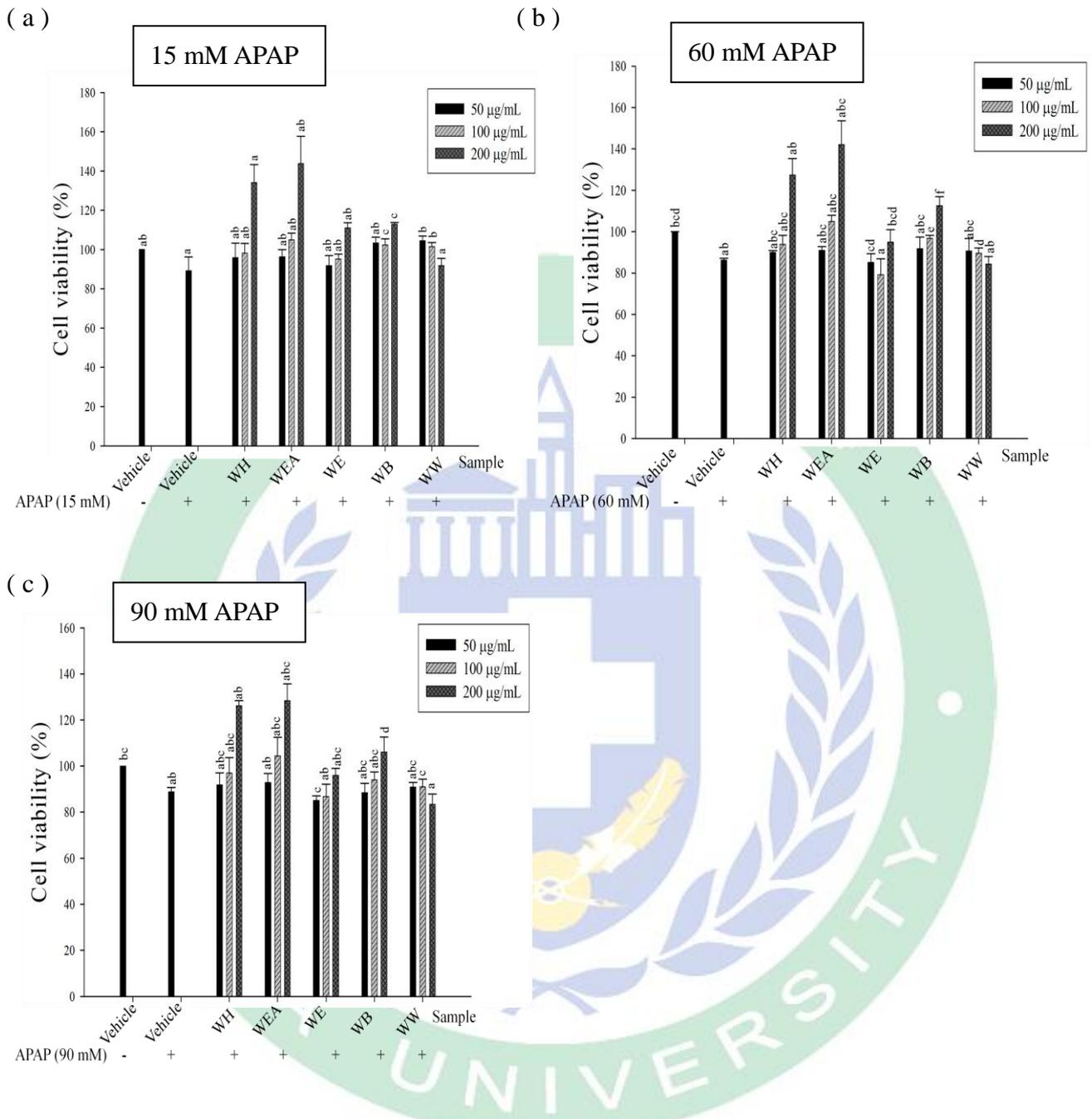
圖二十四、黃花蜜菜萃取物和 (a) 15 mM、(b) 60 mM、(c) 90 mM APAP 共同處理 FL83B 24 hr 細胞存活率試驗 (模式 A)

Figure 24. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts and 15 mM ( a ), 60 mM ( b ), 90 mM ( c ) APAP-stimulated co-treatment on MTT assay of FL83B cell. (model A) Values are means  $\pm$  SD ( n = 4) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different (  $P < 0.05$  ) from each other.



圖二十五、預處理黃花蜜菜萃取物 24 hr 再處理 (a) 15 mM、(b) 60 mM、(c) 90 mM APAP 24 hr FL83B 細胞存活率試驗 (模式 B)

Figure 25. Effects of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts pre-treatment on MTT assay in 15 mM ( a ), 60 mM ( b ), 90 mM ( c ) APAP-stimulated FL83B cell. (model B) Values are means  $\pm$  SD ( n = 4) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Bar not sharing a common letter are significantly different ( P < 0.05) from each other.



圖二十六、預處理 (a) 15 mM、(b) 60 mM、(c) 90 mM APAP 24 hr 再處理黃花蜜菜萃取物 24 hr FL83B 細胞存活率試驗 (模式 C)

Figure 26. Effects of 15 mM ( a ), 60 mM ( b ), 90 mM ( c ) APAP -stimulated pre-treatment on MTT assay in the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts FL83B cell. (model C) Values are means  $\pm$  SD ( n = 4) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test.

Bar not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other.

表八、黃花蜜菜萃取物 Catalase 含量試驗

Table 8. The catalase contents of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts

nmol/min/mL	model	APAP (mM)	Vehicle (- APAP)	Vehicle (+ APAP)	WH	WEA	WE	WB	WW
Catalase	A	15	77.62 ± 0.05 <sup>f</sup>	57.22 ± 0.27 <sup>e</sup>	27.33 ± 0.17 <sup>b</sup>	27.58 ± 0.19 <sup>b</sup>	36.40 ± 0.08 <sup>c</sup>	24.49 ± 0.14 <sup>a</sup>	46.56 ± 0.04 <sup>d</sup>
	A	90	34.07 ± 0.24 <sup>g</sup>	21.58 ± 0.08 <sup>d</sup>	16.94 ± 0.08 <sup>a</sup>	22.71 ± 0.02 <sup>e</sup>	20.83 ± 0.07 <sup>c</sup>	18.02 ± 0.09 <sup>b</sup>	27.15 ± 0.25 <sup>f</sup>
	B	15	66.25 ± 0.11 <sup>f</sup>	43.41 ± 0.05 <sup>b</sup>	48.67 ± 0.03 <sup>c</sup>	84.75 ± 0.13 <sup>g</sup>	41.43 ± 0.07 <sup>a</sup>	58.08 ± 0.07 <sup>e</sup>	52.73 ± 0.19 <sup>d</sup>
	B	90	46.65 ± 0.32 <sup>f</sup>	34.27 ± 0.15 <sup>c</sup>	26.88 ± 0.02 <sup>b</sup>	25.10 ± 0.10 <sup>a</sup>	24.94 ± 0.06 <sup>a</sup>	37.14 ± 0.02 <sup>d</sup>	45.04 ± 0.05 <sup>e</sup>
	C	15	77.62 ± 0.05 <sup>g</sup>	60.11 ± 0.34 <sup>e</sup>	37.09 ± 0.07 <sup>a</sup>	43.40 ± 0.11 <sup>b</sup>	61.21 ± 0.06 <sup>f</sup>	48.37 ± 0.08 <sup>c</sup>	56.67 ± 0.42 <sup>d</sup>
	C	90	68.36 ± 0.04 <sup>f</sup>	60.75 ± 0.03 <sup>e</sup>	30.28 ± 0.10 <sup>d</sup>	16.02 ± 0.04 <sup>a</sup>	19.76 ± 0.27 <sup>b</sup>	26.42 ± 0.91 <sup>c</sup>	20.56 ± 2.33 <sup>b</sup>

Values are means ± SD ( n = 3) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Vehicle (- APAP) , control; Vehicle (+ APAP), negative control; APAP, Acetaminophen. The original cell density was  $4 \times 10^5$  cells/mL. a, b, c, d The same sample extract and different concentration.

表九、黃花蜜菜萃取物 GSH 含量試驗

Table 9. The GSH contents of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts

$\mu\text{M}$	model	APAP (mM)	Vehicle (- APAP)	Vehicle (+ APAP)	WH	WEA	WE	WB	WW
GSH	A	15	17.78 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	15.25 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	14.99 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	14.76 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	15.38 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	15.10 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	17.57 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>
	A	90	13.31 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	13.07 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	14.24 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	14.42 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	13.38 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	14.35 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	14.66 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
	B	15	16.37 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	15.23 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	15.62 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	22.56 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	16.37 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	15.80 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	15.67 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
	B	90	16.19 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	15.88 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	14.55 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	15.77 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	16.42 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	14.94 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	13.72 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
	C	15	15.80 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	14.11 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	15.75 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	16.74 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	15.15 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	16.87 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>	15.46 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>
	C	90	15.33 $\pm$ 0.16 <sup>f</sup>	14.55 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	14.50 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	13.62 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	13.38 $\pm$ 0.29 <sup>bc</sup>	12.79 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	12.14 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>

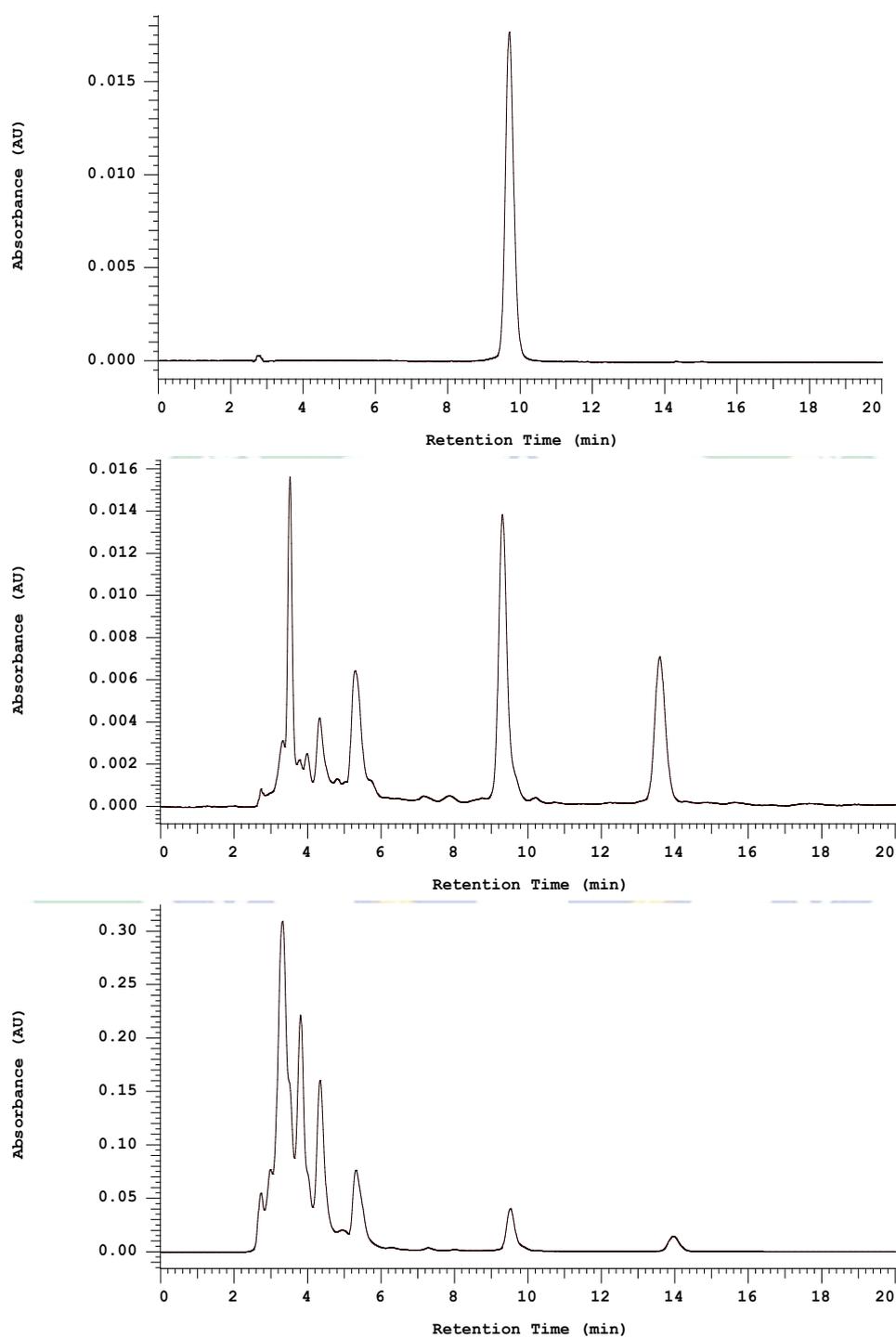
Values are means  $\pm$  SD ( n = 3) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Vehicle (- APAP) , control; Vehicle (+ APAP), negative control; APAP, Acetaminophen. The original cell density was  $4 \times 10^5$  cells/mL. a, b, c, d The same sample extract and different concentration.

表十、黃花蜜菜萃取物 GPX 含量試驗

Table 10. The GPX contents of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts

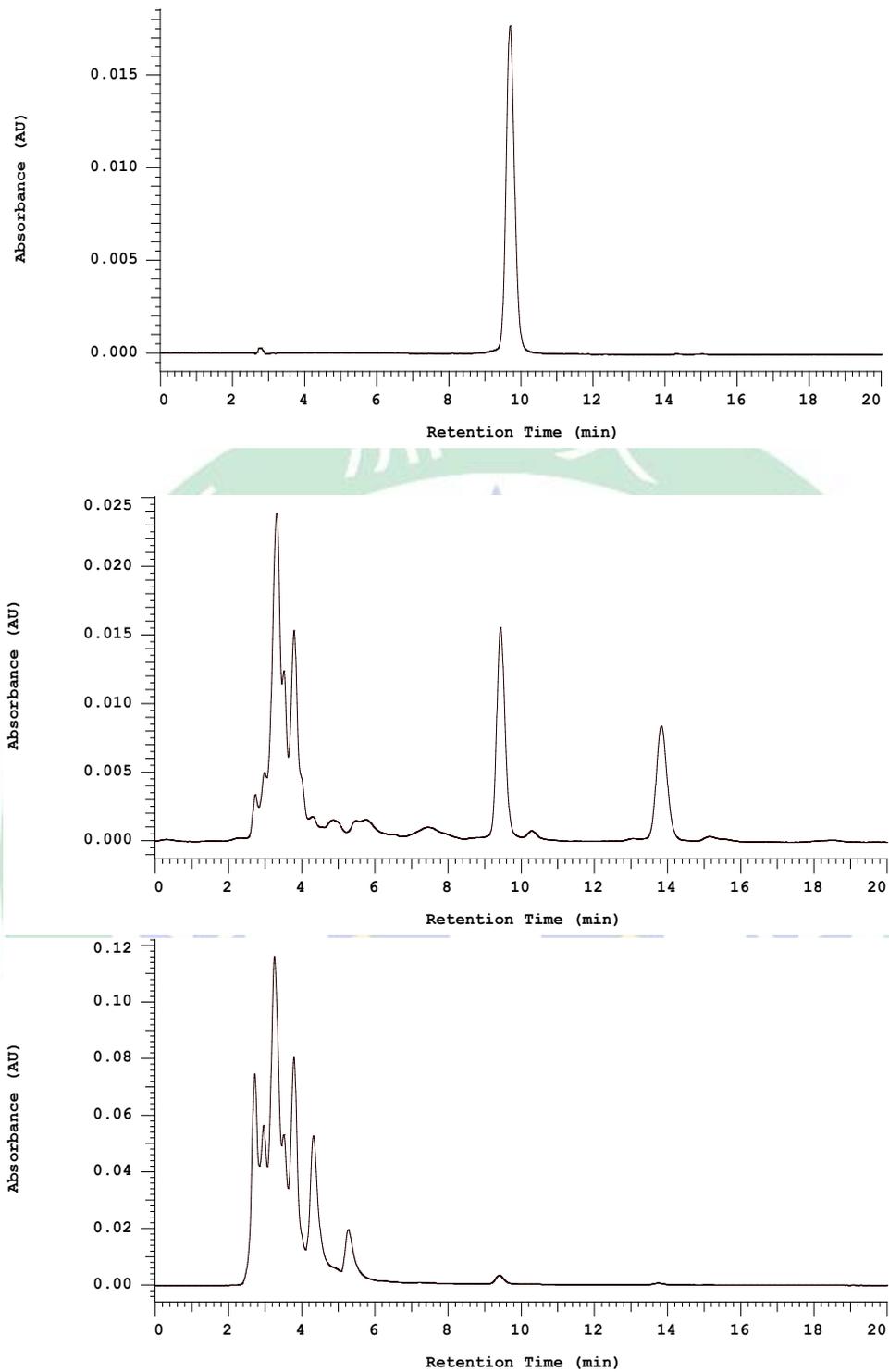
nmol/min/mL	model	APAP (mM)	Vehicle (- APAP)	Vehicle (+ APAP)	WH	WEA	WE	WB	WW
GPX	A	15	329.42 ± 23.94 <sup>a</sup>	336.55 ± 22.41 <sup>a</sup>	320.00 ± 43.05 <sup>a</sup>	340.12 ± 23.95 <sup>a</sup>	338.85 ± 24.20 <sup>a</sup>	330.44 ± 24.96 <sup>a</sup>	342.15 ± 23.43 <sup>a</sup>
	A	90	330.95 ± 26.99 <sup>a</sup>	337.83 ± 25.22 <sup>a</sup>	342.41 ± 23.18 <sup>a</sup>	351.07 ± 21.65 <sup>a</sup>	348.27 ± 23.44 <sup>a</sup>	339.10 ± 23.94 <sup>a</sup>	347.51 ± 24.20 <sup>a</sup>
	B	15	346.23 ± 22.92 <sup>a</sup>	341.89 ± 26.24 <sup>a</sup>	338.59 ± 25.98 <sup>a</sup>	338.59 ± 22.93 <sup>a</sup>	353.62 ± 26.24 <sup>a</sup>	359.22 ± 24.71 <sup>a</sup>	344.70 ± 24.45 <sup>a</sup>
	B	90	191.63 ± 82.27 <sup>a</sup>	192.40 ± 85.57 <sup>a</sup>	166.67 ± 92.65 <sup>a</sup>	191.63 ± 6.34 <sup>a</sup>	225.25 ± 94.49 <sup>a</sup>	184.50 ± 86.34 <sup>a</sup>	263.71 ± 94.94 <sup>a</sup>
	C	15	182.21 ± 86.59 <sup>a</sup>	197.23 ± 85.83 <sup>a</sup>	261.42 ± 67.49 <sup>a</sup>	316.69 ± 46.36 <sup>a</sup>	201.57 ± 85.58 <sup>a</sup>	193.93 ± 86.60 <sup>a</sup>	188.07 ± 89.40 <sup>a</sup>
	C	90	318.98 ± 39.99 <sup>a</sup>	342.41 ± 31.84 <sup>a</sup>	356.17 ± 32.35 <sup>a</sup>	316.43 ± 21.65 <sup>a</sup>	236.71 ± 42.79 <sup>a</sup>	232.13 ± 46.36 <sup>a</sup>	244.61 ± 65.97 <sup>a</sup>

Values are means ± SD ( n = 3) and analyzed using one-way ANOVA, followed by Duncan's new multiple range test. Vehicle (- APAP) , control; Vehicle (+ APAP), negative control; APAP, Acetaminophen. The original cell density was  $4 \times 10^5$  cells/mL. a, b, c, d The same sample extract and different concentration.



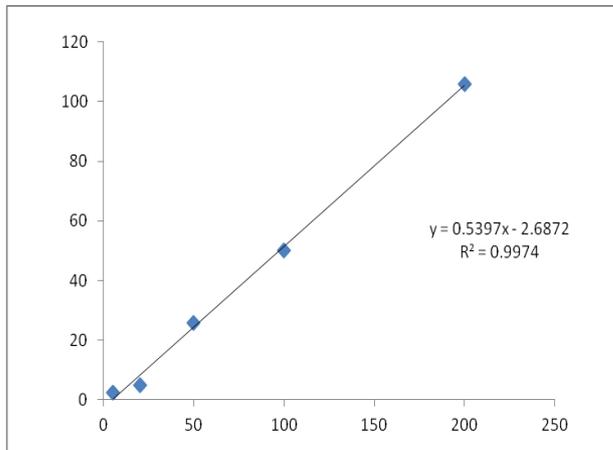
圖二十七、(a) Luteolin 標準品、(b) 黃花蜜菜乙酸乙酯萃取物、(c) 黃花蜜菜乙醇萃取物層析圖

Figure 27. Luteolin standard ( a ), the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. ethyl acetate extract ( b ), the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. ethanol extract ( c ) chromatogram.



圖二十八、(a) Luteolin 標準品、(b) 黃花蜜菜正丁醇萃取物、(c) 黃花蜜菜熱水萃取物層析圖

Figure 28. Luteolin standard ( a ), the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. butanol extract ( b ), the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. hot water extract ( c ) chromatogram



圖二十九、Luteolin 標準品檢量線  
Figure 29. Luteolin standard calibration curve

表十一、黃花蜜菜萃取物中木犀草素含量  
Table 11. The quantity analysis of the luteolin content in *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts.

萃取物	µg / g extract
WEA	660.67
WE	957.59
WB	652.94
WW	543.91

## 第六章 討論

經過去研究得知，黃花蜜菜是常用於青草茶的中草藥之一（張豐榮，2006），有文獻指出黃花蜜菜中之活性成分 Indole-3-carboxyaldehyde 能抑制 PC-3 前列腺癌細胞的生長因子及 NF- $\kappa$ B 及 IKK $\alpha$  的活化，木犀草素 (Luteolin) 可以有效保護經脂多糖誘發產生急性肺部損傷小鼠肺部，減少經 LPS 誘發所產生的 TNF- $\alpha$  和 MAPK 與 NF- $\kappa$ B 路徑，降低過氧化氫對肺部細胞的傷害，木犀草素可以有效降低 LPS 對肺部產生的氧化壓力 (Lin *et al.*, 2007)。另有研究指出黃花蜜菜乙酸乙酯層萃取物會經由 PI3K/AKT 的路徑而活化 Nrf2、HO-1 和  $\gamma$  glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) 抗氧化酵素路徑，分離出的化合物 Wedelolactone 和 Luteolin 發現可降低神經細胞受 Tert-butylhydroperoxide (t-BHP) 的毒性傷害，並且活化 HO-1 和  $\gamma$ -GCS 的抗氧化酵素的表現，推測可能是由 Wedelolactone 和 Luteolin 產生抗氧化作用 (王紹銘，2011)。以上實驗證實黃花蜜菜及其成份具有抗發炎及抗氧化之作用，本實驗想進一步探討其抗發炎作用機制及減少乙醯胺基苯酚對肝細胞所產生的氧化傷害。

本實驗選用的黃花蜜菜是乾燥過後的樣品經成分分析結果顯示，樣品經乾燥測量其水分含量 12.74%，可能是因為經烘乾所以水分含量較低，其灰份 (Ash) 13.64%、粗脂肪 (Crude fat) 1.07%、粗蛋白 (Crude protein) 14.54%、碳水化合物 (Carbohydrate) 58.01%。

由先前研究得知黃花蜜菜同一屬植物三裂葉蟛蜞菊 95% 乙醇萃取物對清除 DPPH 有較佳的效果且總酚含量高有 25.49 mg/g (林芷儀，2005)，黃花蜜菜經體外抗氧化實驗，得知乙醇萃取物清除 DPPH 自由基能力最佳，其抗氧化效果與三裂葉蟛蜞菊相同。Lin 學者 (2007) 分析黃花蜜菜後純化出四種有效化合物：Indole-3-carboxyaldehyde、Wedelolactone、Luteolin、Apigenin，本實驗經 HPLC 證實黃花蜜菜萃取物中含有 Luteolin，經 Kobor 等人 (2004) 發現 Wedelolactone 可以抑制 I $\kappa$ B kinase complexes (IKK) 而阻斷前發炎物質 NF- $\kappa$ B

之生成有關，經 Park 學者在 (2011) 指出當木犀草素與菊苣素共同處理 LPS 誘發 RAW264.7 小鼠巨噬細胞發炎反應可以具有抑制所產生的 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 活性，本實驗證實黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞之 PPAR  $\gamma$  蛋白質表現量顯著增加。Ricote 學者 (1998) 表示活化 PPAR $\gamma$  會抑制巨噬細胞中核轉錄因子 NF- $\kappa$ B 表現，黃花蜜菜萃取物以 LPS 誘發 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞模式下細胞核內之 NF- $\kappa$ B 蛋白質表現量沒有顯著之差異，可能因為樣品為粗萃取物其有效成份及效果沒有純物質佳，故沒有呈現顯著差異，但其有效成分證實存在於粗萃取物中，也有可能因為萃取物是透過抑制 I $\kappa$ B kinase 達到抑制 NF- $\kappa$ B 路徑作用。黃花蜜菜萃取物可以有效抑制 IL-6、iNOS 之表現量，iNOS 為 NO 生成調控蛋白質，實驗發現正己烷、乙醇萃取物顯著減少 iNOS 的表現量且抑制效果與正對照組 (Dexamethasone) 為抗發炎藥物相當，NO 生成量與其結果相同。Cho 學者 (2010) 和 An 學者 (2012) 指出 HO-1 大量表現可以減少 LPS 誘發巨噬細胞發炎所產生的 TNF- $\alpha$ 、IL-6、iNOS 表現量且可以抑制內皮細胞產生黏附因子的表達，經實驗結果顯示正己烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取物可以有效活化 HO-1，達到抑制 iNOS、IL-6、TNF- $\alpha$  之效果，進而抑制 NO 之生成，熱水萃取物顯著增加 IL-10 的表現量，因在嚴重發炎狀態下，細胞會產生平衡機制，產生 IL-10 抑制細胞自身的發炎作用，故熱水萃取物顯著增加 IL-10 的表現量。正己烷、乙酸乙酯、乙醇、正丁醇萃取物會抑制 COX-2 之表現，熱水萃取物相較於負對照組顯著增加 COX-2 的生成。Jeon 學者 (2011) 研究指出增加 HO-1 之表現會抑制 COX-2，本實驗結果顯示正己烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取物可以有效活化 HO-1 且顯著抑制 COX-2 的生成，與文獻研究結果相符。經上述實驗證實黃花蜜菜具有抑制發炎反應之作用，除了透過活化 PPAR $\gamma$  之表現外並抑制促發炎蛋白質及產物生成外，推測可能與 NF- $\kappa$ B 路徑有關。

研究指出乙醯胺基苯酚在高劑量下會導致肝細胞受損死亡，在過去文獻多使

用初代肝細胞進行實驗，但初代肝細胞取得不易且不能持續生長繼代，對後續研究有所影響，故本實驗採用 FL83B 小鼠肝細胞進行實驗，分為三種模式：A 模式：黃花蜜菜萃取物和 APAP (15、60、90 mM) 共同處理 FL83B 24 hr、B 模式：預處理黃花蜜菜萃取物 24 hr 在處理 APAP (15、60、90 mM) 24 hr、C 模式：預處理 APAP (15、60、90 mM) 24 hr 在處理黃花蜜菜萃取物 24 hr，在黃花蜜菜萃取物和 APAP 共同處理和預處理之實驗發現乙酸乙酯萃取物在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下可以有效保護、預防肝細胞不受乙醯胺基苯酚 (APAP) 的傷害且有促進肝細胞生長之作用。預處理黃花蜜菜萃取物 24 hr 再處理 APAP 24 hr 之實驗結果顯示萃取物在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下會影響細胞存活率，可能是因為萃取物為粗萃取物所導致，粗萃取物中可能含有其他雜質，加上乙醯胺基苯酚的傷害使細胞不能負荷進而導致細胞死亡，或者是因為萃取物中有其他的有效成份造成此結果，其他有效成份使細胞走向其他路徑，如：細胞凋亡路徑，造成萃取物在高濃度處理後再受到傷害時，細胞會走向凋亡。A、C 兩種模式下，處理黃花蜜菜萃取物皆可以有效的保護、治療受損的肝細胞。

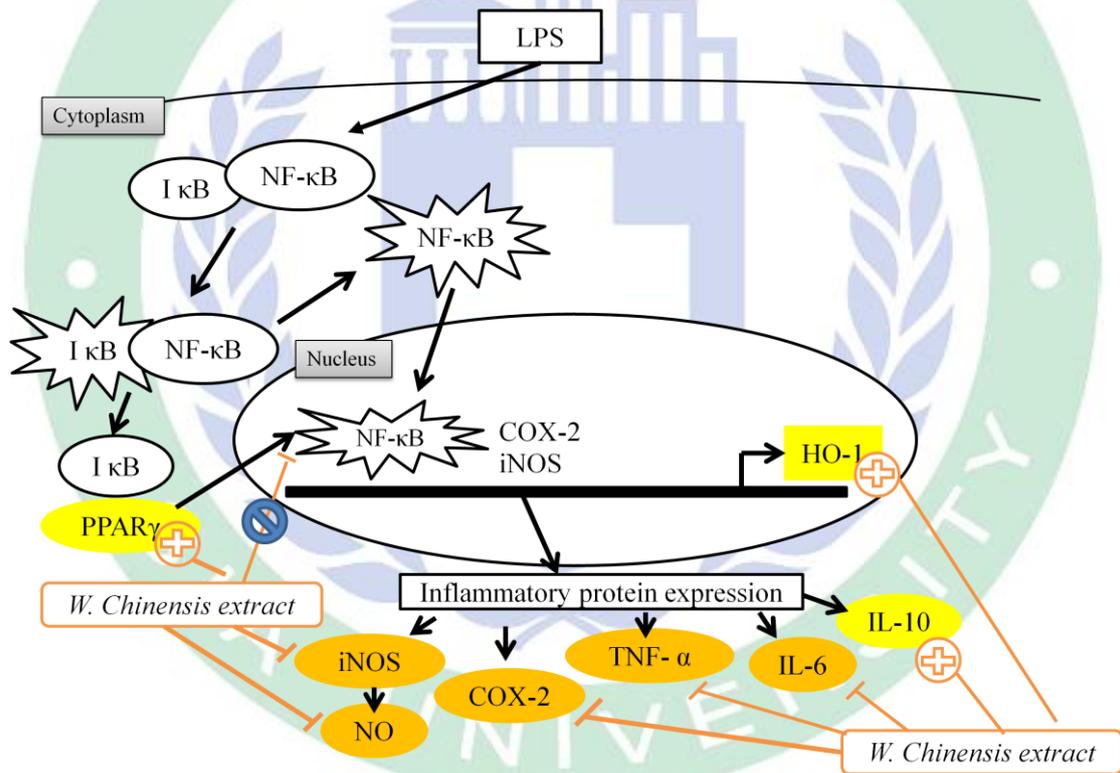
Catalase 含量在 90 mM APAP 劑量在 A 模式下乙酸乙酯與熱水萃取物相較負對照組可有效增加 Catalase 的含量，15 mM APAP 劑量在 B 模式下正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、熱水萃取物相較負對照組可有效增加 Catalase 的含量，90 mM APAP 劑量在 B 模式下正丁醇、熱水萃取物相較負對照組可有效增加 Catalase 的含量，15 mM APAP 劑量在 C 模式下乙醇萃取物相較負對照組可有效增加 Catalase 的含量，代表樣品具有增加 Catalase 表現量的作用。GSH 在預處理 APAP 24 hr 後再處理 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  黃花蜜菜萃取物 (C 模式) 下空白組與負對照組有顯著差異且在預處理 15 mM APAP 時，黃花蜜菜萃取物可以增加 GSH 的含量，但在高劑量 APAP 誘導模式下和其他兩種模式下無顯著增加 GSH 的含量，GSH 的含量在高劑量下沒有顯著增加，可能因為誘發劑量太高導致萃取物沒有促進 GSH 生成，或因萃取物中含有其他有效成份造成細胞凋亡所導致。

黃花蜜菜萃取物沒有顯著增加 GPX 表現量，可能是因為黃花蜜菜萃取物參與抗氧化酵素路徑但卻不能使 GPX 催化 GSH 產生作用，黃花蜜菜萃取物可促進 Catalase 和 GSH 生成，加速代謝過氧化氫減少自由基的傷害。模式 B 具有增加 Catalase 和 GSH 生成作用，故以模式 B 作為未來實驗發展方向。

Sun 學者 (2012) 研究顯示木犀草素 (Luteolin) 為黃酮類化合物具有極佳的抗氧化能力，可以透過增加 HO-1 表達而減緩過氧化氫傷害心肌細胞並阻止細胞凋亡作用，本論文以 HPLC 分析萃取物中含有標準品 Luteolin 含量，含量由多到少依序為乙醇、乙酸乙酯、正丁醇、熱水，與抗氧化結果相呼應，乙醇萃取物抗氧化效果最佳，乙酸乙酯萃取物可顯著增加 HO-1 之表現。以 HPLC 分析萃取物中含有標準品 Luteolin 含量，實驗發現正己烷萃取物並無檢測出 Luteolin 含量，但該萃取物確有部分不錯之保健功效，因此推測可能為其他的活性成分所致，至於是什麼成分則有待進一步之純化分離與探討！

## 第七章 結論

由體外抗氧化試驗得知黃花蜜菜熱水萃取物有較佳的抗氧化能力，其次為乙醇萃取物。黃花蜜菜正己烷、乙醇萃取物可以有效抑制 iNOS、COX-2、IL-6 之蛋白質表現，進而抑制發炎介質如：NO 之生成。依據上述實驗結果，黃花蜜菜正己烷、乙酸乙酯、乙醇萃取物有顯著的抗發炎作用，但因目前萃取物為粗萃取物，故未來可以利用管柱層析進一步分離出具有抗發炎活性之有效成分，並探討體內及體外的抗發炎作用機制。另外，本實驗發現黃花蜜菜萃取物具有增加細胞抗氧化酵素之生成，進而達到抑制乙醯胺基苯酚對肝細胞所造成之傷害。



圖三十、黃花蜜菜抗發炎之可能作用機制

Figure 30. Anti-inflammatory effect of the *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. extracts mechanism

## 參考文獻

- 方世華、王政光、李英中、李慶孝、洪小芳、陳佳禧、張芸潔、楊舒如、蕭欣杰、賴麗娟、賴志河，2007，免疫學(第二版)，新文京開發出版股份有限公司，185-196。
- 王郁菁，2008，高糖誘發之氧化傷害對 Hep G2 細胞之影響，靜宜大學食品營養學系碩士論文。
- 李幸祥，2003，台灣草藥事典(六)，旺文設股份有限公司出版，台北市。
- 林巧迪，2012，薏仁不同部位萃取物對於抗光老化及抗發炎之研究，亞洲大學保健營養生技學系碩士論文。
- 林芷儀，2005，三裂葉蟛蜞菊的抗氧化活性成份研究，靜宜大學應用化學系應用化學所碩士論文。
- 張菁文，2001，藥物引起肝臟傷害，國立成功大學臨床藥學研究所碩士論文。
- 張豐榮，2006，台灣民間常用青草藥，冠倫文化事業股份有限公司，台北市。
- 梁祐嘉，2012，山苦瓜萃取物之抗發炎研究：透過轉錄因子 PPAR 之活化及調節一氧化氮之生成，亞洲大學保健營養生技學系碩士論文。
- 陳智傑，2007，甲基安非他命影響大鼠肝臟抗氧化酶的活性之機制探討，台北市立體育學院運動科學研究所碩士論文。
- 楊志元、林智暉、劉定萍、王聖予、汪蕙蘭，2002，免疫生物學，藝軒圖書出版社，台北市。
- 楊遠波、劉和義、彭鏡毅、施炳霖、呂勝由，2000，台灣維管束植物誌第四版，行政院台灣農委會出版。
- 鄧富元、龔素芳、夏毅然、高文斌、謝耀東，2006，NF- $\kappa$ B 在發炎反應、細胞凋亡與癌症生成過程中的調控，*Chin Dent Journal* 25:12-24。
- 黎孝韻、曾國慶，2007，自由基及抗氧化物功能的探討，藥學期刊，24:95。
- 盧冠宇、賴建名，2007，Acetaminophen 中毒的機轉與藥物治療，藥學雜誌，

96:109-113。

蕭懷宇，2003，剪力調控內皮細胞轉錄因子 Nrf2 與 HO-1 之探討—PI3K 與 Akt 之角色，國立台灣大學化學工程學研究所碩士論文。

謝文欽、鄭巧怡，2004，細胞與分子免疫學，合記圖書出版社，243-274。

Acharya S.K., Dasarathy S., Kumer T.L., (1996) Fulminant hepatitis in a tropical population: clinical course, cause, and early predictors of outcome. *Hepatology* 23, 1448-1455.

Achike F.I., Kwan C.Y., (2003) Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signalling pathway. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 30, 605-615.

An L., Liu C.T., Yu M.J., Chen Z.H., Guo X.G., Wang P., Wang J.F., Fang X.Q., Gao Y.H., Yu S.Y., (2012) Heme oxygenase-1 system, inflammation and ventilator-induced lung injury, *European Journal of Pharmacology* 29, 771-774.

Baldwin A.S., (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- $\kappa$ B, *The Journal of Clinical Investigation*, 107, 241-246.

Bonorden W. R., Pariza, M.W., (1994) Antioxidant nutrients and protection from freeradicals. *Nutritional Toxicology* Raven Press, New York 19-48.

Cho H.Y., Kleeberger S.R., (2010) Nrf2 protects against airway disorders, *Toxicology and Applied Pharmacology* 244, 43-56.

Dai Y., Cederbaum A.I., (1995) Cytotoxicity of acetaminophen in human cytochrome P450E1-transfected HepG2 cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 273, 1497-1505.

Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., (2000) Kuby Immunology, 4th Freeman, New York.

Goodwin J.S., Ceuppens J., (1983) Regulation of immune response by prostaglandins. *Journal of Clinical Immunol* 3, 295-314.

- Guha M., Mackman, N., (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling* 13, 85-94.
- Gutteridge J.M.C., (1993) Free radicals in disease process: A complication of cause and consequence. *Free Radical Research* 19, 141-158.
- Hailman E., Lichenstein H.S., Wurfel M.M., Miller D.S., Johnson D.A., Kelley M., Busse L.A., Zukowski M.M., Wright S.D., (1994) Lipopolysaccharide (LPS) - binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *Journal of Experimental Medicine* 179, 269-277.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Cross C. E., (1992) Free radicals, Antioxidants, and human disease: Where are we now? *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 119, 598-620.
- Kathryn E., (2005) Inflammation, stress, and diabetes, *Journal of Clinical Investigation* 115, 1111-1119.
- Kobori M., Yang Z., Gong D., Heissmeyer V., Zhu H., Jung Y.K., Rao A., Sekine T., Ikegami F., Yuan C., Yuan J., (2004) Wedelolactone suppresses LPS-induced caspase-11 expression by directly inhibiting the IKK complex, *Cell Death and Differentiation*. 11, 123-130.
- Lee W.M., (1995) Drug-induced hepatotoxicity. *New-England Journal of Medicine* 333, 1118-1127.
- Lin F.M., Chen L.R., Lin E.H., Ke F.C., Chen H.Y., Tsai M.J., Hsiao P.W., (2007) Compounds from *Wedelia chinensis* synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells, *Carcinogenesis* 28, 2521-2529.
- Maqsood M.E., Khalid M.N., Bashir M.M., (2007) The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease. *The FEBS Journal* 274, 906-923.

- Megumi F.T., Kei N., Tago K., Mashino T., Kasahara T., (2011) Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin, *International Immunopharmacology* 11, 1150-1159.
- Nelson S.D., (1990) Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Seminars in Liver Disease* 10, 267-78.
- Paine A., Britta E.V., Blasczyk R., Immenschuh S., (2010) Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential, *Biochemical Pharmacology* 80, 1895-1903.
- Parham A., (2004) *The Immune System*. 2nd Garland Science, New York.
- Park C.M., Jin K.S., Lee Y.W., Song Y.S., (2011) Luteolin and chicoric acid synergistically inhibited inflammatory responses via inactivation of PI3K-Akt pathway and impairment of NF- $\kappa$ B translocation in LPS stimulated RAW 264.7 cells, *European Journal of Pharmacology* 660, 454-459.
- Perl M., Chung C.S., Garber M., Huang X., Ayala A., (2006) Contribution of anti-inflammatory/immune suppressive processes to the pathology of sepsis, *Frontiers in Bioscience* 11, 272-299.
- Prescott L.F., (1983) Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. *Drugs* 25, 290-314.
- Rabinovitz M., Van Thiel D.H., (1992) Hepatotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *American journal of gastroenterology* 87, 1696-704.
- Roberts D.W., Bucci T.J., Benson R.W., (1991) Immunohistochemical localization and quantification of the 3- (cystein-Syl) -acetaminophen protein adduct in acetaminophen toxicity. *American Journal of Pathology* 138, 359-571.
- Scheidereit C., (2006) I $\kappa$ B kinase complexes: gateways to NF- $\kappa$ B activation and transcription. *Oncogene* 25, 6685-6705.
- Shin J.S., Park Y. M., Choi J.H., Park H.J., Shin M.C., Lee Y. S., Lee K.T., (2010)

Sulfuretin isolated from heartwood of *Rhus verniciflua* inhibits LPS-induced inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and pro-inflammatory cytokines expression via the down-regulation of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 murine macrophage cells, *International Immunopharmacology* 10, 943-950.

Sun G.B., Sun X., Wang M., Ye J., Si J.Y., Xu H., Meng X., Qin M., Sun J., Wang H.W., Sun X., (2012) Oxidative stress suppression by luteolin-induced heme oxygenase-1 expression, *Toxicology and Applied Pharmacology* 265, 229-240.

Tibbs C., Williams R., (1995) Viral causes and management of acute liver failure. *Journal of Hepatology* 22, 68-73.

Tsai C.H., Lin F.M., Yang Y.C., (2009) , Herbal extract of *Wedelia chinensis* attenuates androgen receptor activity and orthotopic growth of prostate cancer in nude mice , *Clinical Cancer Research* 18, 1158-1078.

Tzeng J.I., Chen M.F., Chung H.H., Cheng J.T., (2012) Silymarin decreases connective tissue growth factor to improve liver fibrosis in rat treated with carbon tetrachloride, *Phytotherapy Research* 27, 1023-1028.