

南華大學  
自然醫學研究所  
碩士論文

鴨兒芹萃取物對高血脂小鼠降血脂及肝細胞脂質  
代謝之影響

**Effects of *Cryptotaenia japonica* Hassk extracts on lipid  
homeostasis *in vivo* and *in vitro***

指導教授：陳秋媛博士

研究生：陳政圻

中華民國一百年六月

南 華 大 學  
自然醫學研究所  
碩 士 學 位 論 文

鴨兒芹萃取物對高血脂小鼠降血脂及肝細胞  
脂質代謝之影響

研究生：陳政圻

經考試合格特此證明

口試委員：徐正周  
林群智

連秋媛

指導教授：連秋媛

系主任(所長)：連秋媛

口試日期：中華民國 一 百 年 六 月 十 五 日

## 誌謝

謹以此拙著獻給我的指導教授 陳秋媛老師，感謝您這些日子以來的耐心指導，您研究學習的精神及為人處事的態度是我們仿效的典範，對於家庭、生活及事業的平衡亦值得我們學習。感謝 徐士蘭教授、林群智老師及羅俊智老師對於論文口試的意見、指導及鼓勵，令我獲益良多，也使論文更趨完整。另外也感謝自醫所的所有老師們，承蒙老師們辛勤授課，讓我們瞭解自然醫學及獲得基本的研究理論。感謝宜蓉及玉芬在課程及實驗上的大小事的協助。感謝鄭奕帝主任對學術研究的支持。感謝曾提供協助的的長官及師長們。

志峯、育昱、麗珠、志明及我的摯友們，你們給予的實質幫助及精神支持，點滴在心，有些話不用說，相信你們一定懂。最後我親愛的家人們，還有所有愛我及我愛的人，這些日子以來你們的包容、支持及關心是我一路走來、完成論文的動力，感謝你們！

## 縮寫表

ACAT ( acyl-CoA: cholesterol acyltransferase ) : 醯基輔酶 A : 膽固醇醯基轉移酶

ALT ( alanine aminotransferase ) : 麩氨酸丙酸轉氨酶

AMPK ( adenosine monophosphate kinase ) : 腺苷酸單磷酸激酶

AST ( aspartate aminotransferase ) : 天門冬胺酸轉胺酶

CE ( cholesteryl ester ) : 膽固醇酯

CM ( chylomicron ) : 乳糜微粒

ECJ ( extracts of *Cryptotaenia japonica* Hassk ) : 鴨兒芹醇萃物

FC ( free cholesterol ) : 游離膽固醇

FFA ( free fatty acid ) : 游離脂肪酸

HFCD ( high fat/ cholesterol diets ) : 高脂肪/高膽固醇飲食

HDL ( high density lipoprotein ) : 高密度脂蛋白

HDL- C ( high density lipoprotein cholesterol ) : 高密度脂蛋白膽固醇

HMG- CoA ( 3- hydroxy- 3- methylglutaryl CoA ) : 3-羥基- 3- 甲基戊二酸醯輔酶 A

LDL ( low density lipoprotein ) : 低密度脂蛋白

LDL- C ( low density lipoprotein cholesterol ) : 低密度脂蛋白膽固醇

LPL ( lipoprotein lipase ) : 脂蛋白脂解酶

PL ( phospholipid ) : 磷脂質

TC ( total cholesterol ) : 總膽固醇

TG ( triglyceride ) : 三酸甘油酯

VLDL ( very low density lipoprotein ) : 極低密度脂蛋白

VLDL- C ( very low density lipoprotein cholesterol ) : 極低密度脂蛋白  
膽固醇

## 摘要

鴨兒芹 (*Cryptotaenia japonica* Hassk) 是一種廣泛分佈於台灣中部山區的植物，可作為食用性蔬菜。本研究目的為探討鴨兒芹之乙醇萃取物 (ECJ) 在以高脂肪/高膽固醇飼料誘導之小鼠肥胖疾病動物模式下的降血脂作用。ICR 小鼠隨機分成以下五組：(1) 餵食基礎飼料的正常飲食組；(2) 餵食高脂肪/高膽固醇飲食組；(3) 餵食高脂肪/高膽固醇飲食及 20 mg/kg 的 ECJ 組；(4) 餵食高脂肪/高膽固醇飲食及 100 mg/kg 的 ECJ 組；(5) 餵食高脂肪/高膽固醇飲食及 simvastatin 西藥治療組。實驗動物於 8 週後犧牲進行生化及組織病理檢驗。高脂肪/高膽固醇飲食合併餵食高或低劑量 ECJ 之小鼠的血清總膽固醇及三酸甘油酯分別比只餵食高脂肪/高膽固醇飲食組明顯地降低 27.28% 及 50.81%；肝臟之總膽固醇及三酸甘油酯含量測試也得到類似的趨勢。毒理檢查結果顯示在實驗劑量下並未發現餵食 ECJ 對實驗小鼠有任何肝腎毒性。此外，細胞學實驗結果發現 ECJ 在 HepG2 細胞中會抑制油酸 (oleic acid) 誘導的肝細胞內脂肪堆積。ECJ 可減少 HepG2 細胞中參與三酸甘油酯和膽固醇合成相關分子的基因表現，並可增加腺苷酸單磷酸激酶 (adenosine monophosphate kinase, AMPK) 的磷酸化，顯示 ECJ 可能是透過 AMPK 的活化調控下游與脂質代謝相關分子的表現，進而減少肝細胞內的脂肪堆積。結論：本研究結果

顯示鴨兒芹具有降血脂及抑制肝脂肪堆積之效用，可作為預防及減輕高血脂症的天然食材，建議民眾可於日常飲食中多加攝取。

**關鍵詞：**鴨兒芹、高脂肪/高膽固醇飲食、高血脂症、脂肪肝、腺苷酸單磷酸激酶

## Abstract

*Cryptotaenia japonica* Hassk (mountain celery) is a common vegetable which is widely distributed in midland of Taiwan. The objective of this study was to investigate the hypolipidemic effects of *Cryptotaenia japonica* Hassk in a mouse obesity model induced by high fat/cholesterol diets (HFCD). ICR mice were fed with either HFCD or HFCD supplemented with 20 and 100 mg/kg *Cryptotaenia japonica* Hassk extract (ECJ, 95% ethanol extract) daily for 8 weeks and simvastatin as a therapeutic control. Plasma total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) levels of mice combined fed with HFCD and ECJ were significantly reduced by about 27.28% and 50.81%, respectively, as compared to HFCD fed mice. Similar tendencies were observed in hepatic TC and TG. There were also no side effects observed on the functions of kidney and liver when feeding with various ECJ supplements. In cellular level, ECJ significantly reduced hepatic lipid accumulation in human HepG2 cells when stimulated with oleic acid. ECJ also downregulated the gene expressions of enzymes which involved in the cholesterol and triglyceride biosynthesis. We also found that ECJ increased the phosphorylation of AMPK in a dose-dependent manner.



These results suggest that *Cryptotaenia japonica* Hassk prevented and mitigated high fat/cholesterol diet-induced hyperlipidemia as well as reduced hepatic lipid accumulation through AMPK activation pathway. Therefore, *Cryptotaenia japonica* Hassk could be used as a natural material against hyperlipidemia and hepatic steatosis.

**Key Words:** *Cryptotaenia japonica* Hassk, high fat/cholesterol diets, hyperlipidemia, HepG2, hepatic steatosis, AMPK

# 目次

縮寫表.....	i
摘要.....	iii
Abstract.....	v
目次.....	vii
表次.....	xii
圖次.....	xiv
第一章 緒論.....	1
1.1 研究動機.....	1
1.2 研究架構.....	3
1.2.1 動物實驗.....	3
1.2.2 細胞實驗.....	4
第二章 文獻回顧.....	5
2.1 高血脂與代謝性疾病.....	5
2.1.1 血漿脂質.....	5
2.1.2 脂蛋白.....	7
2.1.3 代謝症候群.....	9

2.2 脂肪肝疾病.....	13
2.2.1 非酒精性脂肪性肝疾病定義.....	14
2.2.2 非酒精性脂肪性肝炎與血脂之相關性.....	15
2.3 AMPK 路徑.....	19
2.4 鴨兒芹文獻回顧.....	21
第三章 材料與方法.....	23
3.1 儀器設備.....	23
3.2 鴨兒芹萃取及成分檢測.....	23
3.2.1 萃取流程.....	23
3.2.2 HPLC 分析條件.....	26
3.2.3 DPPH 清除自由基實驗.....	26
3.3 動物實驗 (I)-降血脂療效評估.....	28
3.3.1 實驗動物飼養與分組.....	28
3.3.2 溶液配製與投予途徑.....	30
3.3.3 攝食量與體重記錄.....	30
3.3.4 動物犧牲、採血及臟器摘取.....	30
3.3.5 功能性指標評估.....	31
3.3.6 病理組織學切片與 Haematoxylin & Eosin 染色.....	31

3.3.7	肝臟中總脂質濃度測定 .....	33
3.3.8	糞便脂質含量測定 .....	35
3.3.9	安全性指標評估 .....	36
3.4	動物實驗 (II)-急毒性測試 .....	36
3.4.1	實驗動物飼養與分組 .....	36
3.4.2	溶液配製與投予途徑 .....	37
3.4.3	動物犧牲、採血及臟器摘取 .....	38
3.4.4	血液學檢測 .....	38
3.4.5	血清生化檢測 .....	38
3.4.6	臟器病理檢測 .....	39
3.5	細胞實驗 .....	39
3.5.1	細胞株來源及培養條件 .....	39
3.5.2	細胞毒性測試 .....	39
3.5.3	脂肪油滴以 Nile Red 螢光染色定量 .....	40
3.5.4	細胞內蛋白質之定性與定量分析 .....	40
3.5.5	反轉錄聚合酶鏈反應 .....	42
3.6	統計分析 .....	45
第四章	結果 .....	46

4.1 鴨兒芹萃取物成份分析.....	46
4.1.1 HPLC 分析結果.....	46
4.1.2 DPPH 清除自由基實驗.....	49
4.2 動物實驗 (I)-降血脂療效評估.....	55
4.2.1 功能性指標評估.....	55
4.2.2 安全性指標評估.....	68
4.3 動物實驗 (II)-急毒性測試.....	72
4.3.1 臨床症狀及死亡率觀察.....	72
4.3.2 血液學評估.....	75
4.3.3 血清肝及腎臟功能指數評估.....	77
4.3.4 臟器變化評估.....	79
4.4 細胞學實驗.....	84
4.4.1 細胞毒性測試.....	84
4.4.2 ECJ 對 HepG2 細胞內脂肪堆積之影響.....	85
4.4.3 ECJ 抑制 HepG2 細胞內脂肪合成基因之表現.....	88
4.4.4 ECJ 促進 HepG2 細胞內 AMPK 之磷酸化.....	90
第五章 討論.....	92
5.1 動物實驗.....	92

5.2 細胞學實驗.....	97
第六章 結論.....	100
參考文獻.....	101
附圖.....	116
附錄.....	120

## 表次

Table 3.1 The sequence of primer .....	44
Table 4.1 Major components of ECJ .....	48
Table 4.2 The body weight, weight gain and daily feed intake of experimental mice.....	57
Table 4.3 Effects of ECJ on experimental mice performance serum lipidic parameters.....	63
Table 4.4 Effects of ECJ on experimental mice performance hepatic lipidic parameters .....	65
Table 4.5 Effects of ECJ on experimental mice performance fecal lipidic parameters.....	67
Table 4.6 Effects of ECJ on experimental mice performance plasma AST and ALT levels .....	69
Table 4.7 Effects of ECJ on experimental mice performance plasma BUN and creatinine levels .....	71
Table 4.8 Clinical signs and time course of death of mice after treated with ECJ in acute oral toxicity test.....	73
Table 4.9 Changes of body weight and weight gain of mice after treated	

with ECJ at 0, 7, and 14 days in acute oral toxicity test.....74

Table 4.10 Hematological parameters of mice after treated with ECJ in acute oral toxicity test.....76

Table 4.11 Serum biochemistry changes in liver and renal function in mice treated with ECJ in acute oral toxicity test .....78

Table 4.12 Organ weight changes of mice treated with ECJ in acute oral toxicity test .....80



## 圖次

Figure 3.1 鴨兒芹萃取流程 .....	25
Figure 4.1 HPLC/UV chromatogram of ECJ. ....	47
Figure 4.2 DPPH free-radical scavenging ability of ECJ.....	49
Figure 4.3 DPPH free-radical scavenging ability of gallic acid.....	51
Figure 4.4 DPPH free-radical scavenging ability of chlorogenic acid.....	52
Figure 4.5 DPPH free-radical scavenging ability of luteolin .....	53
Figure 4.6 DPPH free-radical scavenging ability of apigenin.....	54
Figure 4.7 Liver outward appearances of experimental mice .....	59
Figure 4.8 Liver weight of experimental mice .....	60
Figure 4.9 Histopathological examination.....	61
Figure 4.10 Organe outward appearances of experimental mice in acute oral toxicity test .....	81
Figure 4.11 Histopathological findings in acute oral toxicity test.....	82
Figure 4.12 Histopathological findings in acute oral toxicity test.....	83
Figure 4.13 Cell viability .....	84
Figure 4.14 Effects of ECJ on hepatic lipid accumulation .....	86
Figure 4.15 Qualitative analysis of lipid accumulation in HepG2 cells	

.....87

Figure 4.16 Effects of ECJ on lipogenic related gene expression in  
HepG2 cells .....89

Figure 4.17 Effects of ECJ on AMPK Phosphorylation in HepG2 Cells  
.....91

# 第一章 緒論

## 1.1 研究動機

血管病變相關疾病佔國人主要的死亡原因之前幾名，而高血脂症是導致心血管疾病的一個重要因子，也是脂肪肝疾病的相關重要因子 (Anderson & Hanna, 1999)。根據中華民國行政院衛生署網站公布之 98 年死因統計結果分析的資料顯示心臟疾病、腦血管疾病及慢性肝病（含肝硬化）分占排名第 2、第 3 及第 8 名 (衛生署，2010)。

近年來因生活型態及飲食習慣的改變，國人飲食西方及精緻化，生活壓力大卻普遍缺乏規律運動，造成血脂異常發生 (丁予安、何橈通、宋育民等，2003)。研究指出平日多攝取蔬果及高纖維食物，可以大幅降低 LDL-C，提高糞便中膽酸及短鍊脂肪酸的排除，可以降低代謝性疾病的發生率 (Jenkins et al., 2001)。鴨兒芹為台灣三百公尺以上冷涼低濕山地常見之作物 (楊毓貞，2001)。國內有學者研究發現芹菜種子萃取之精油部份在疾病小鼠模式有降血脂之功效 (Cheng, Lin, Yu, & Peng, 2008; 鄭明清，2004)；西洋芹及芹菜類植物曾被報導在大鼠疾病動物模式下有明顯降低血脂及肝臟三酸甘油酯的作用 (Tsi, Das, & Tan, 1995)。國外研究也認為芹菜成份中的芹菜素 (apigenin) 可藉由阻斷鈣離子通道以放鬆血管進而有降血壓之功

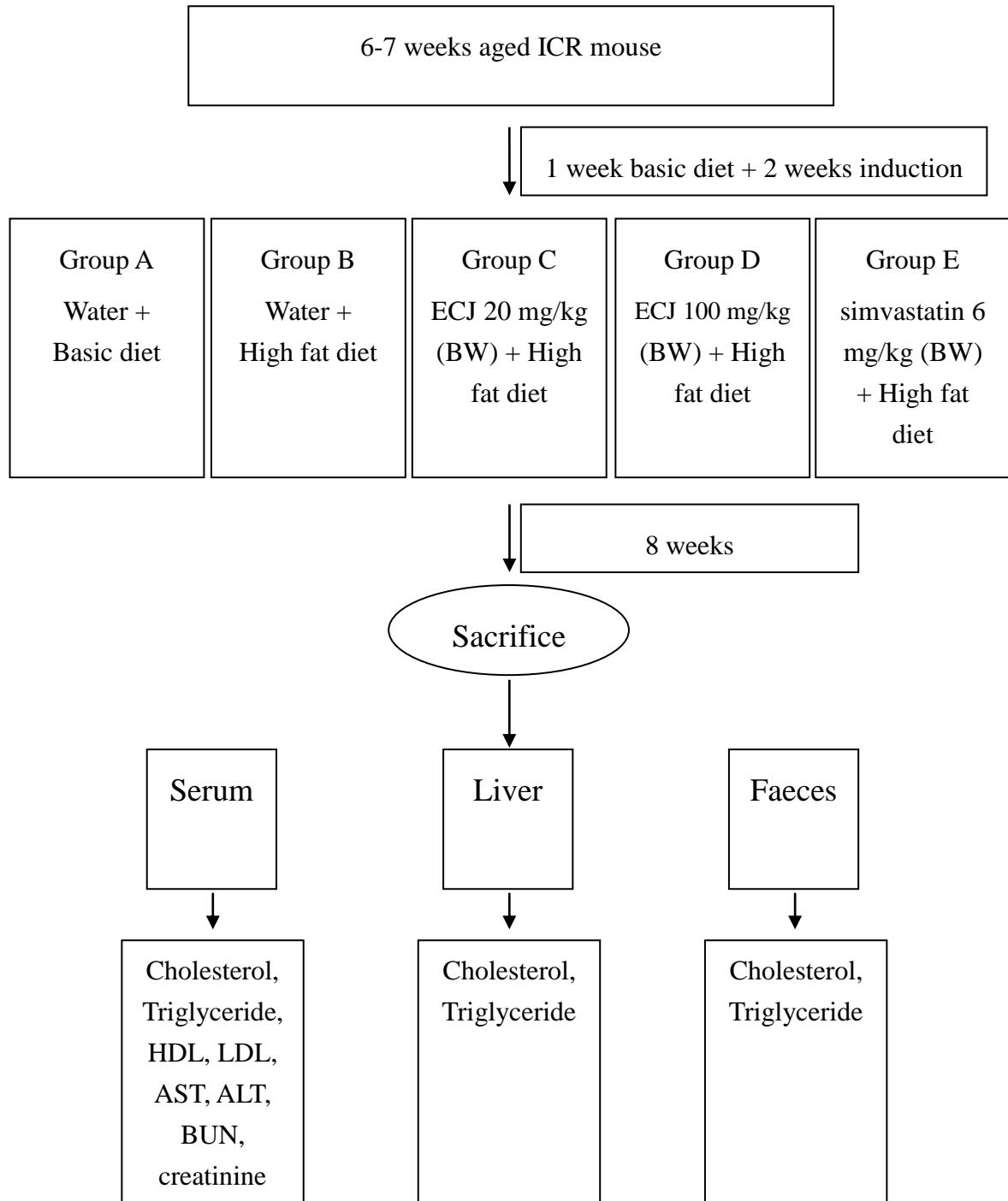
效 (Ko, Huang, & Teng, 1991) 。在處理 paracetamol 誘發肝損傷的動物模式實驗中發現芹菜有肝臟保護作用 (Singh & Handa, 1995) 。但對於鴨兒芹全株之降血脂作用及活性成分探討尚未有研究發表。因此，本研究將透過動物實驗的療效評估及細胞學實驗的機轉探討驗證鴨兒芹降血脂及預防脂肪肝之功效，其結果不僅可供一般民眾作為保健食用時的參考依據，亦可促進農民栽種之意願並增加其收益。

本研究之目的：

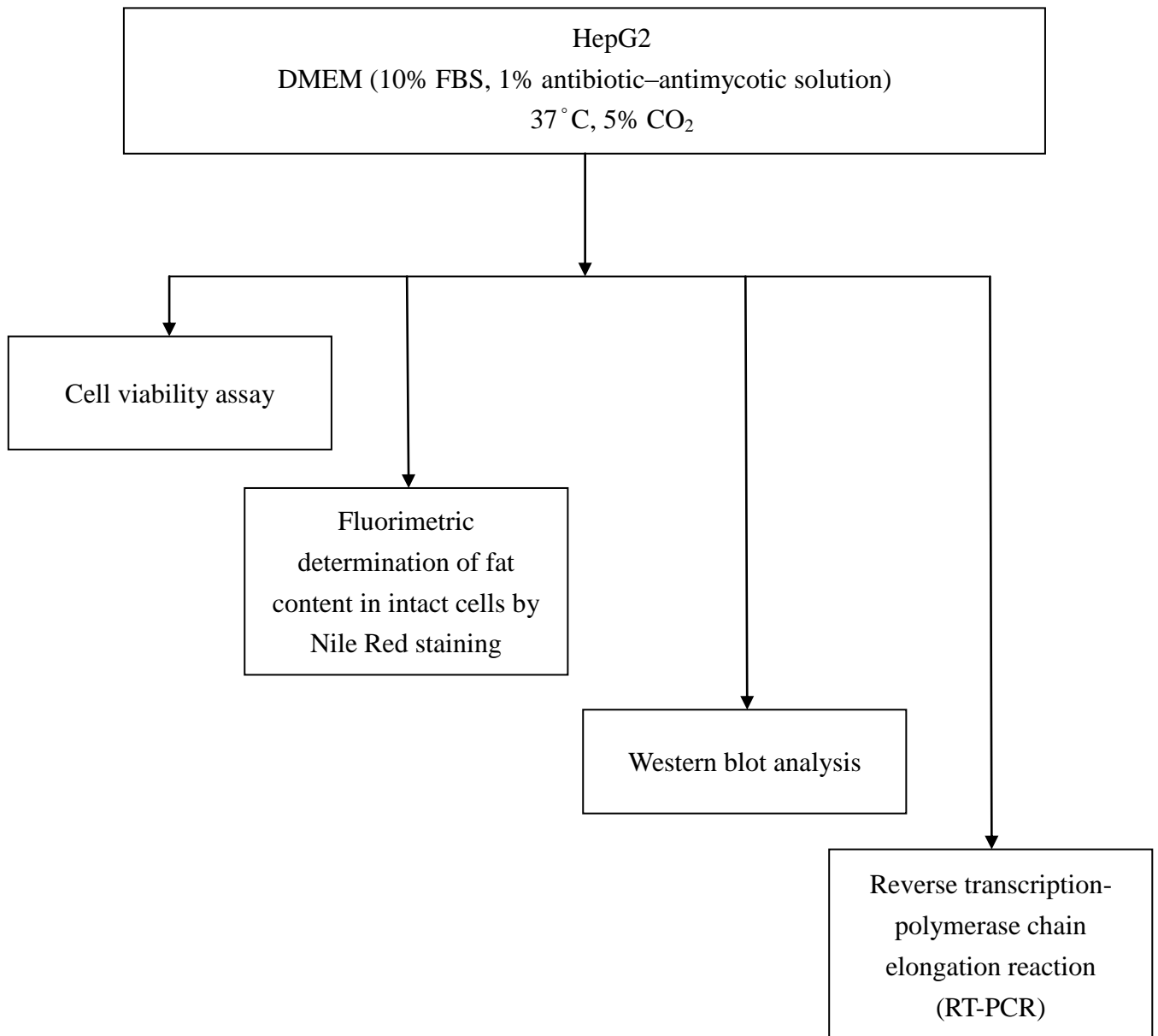
1. 建立鴨兒芹萃取流程。
2. 鴨兒芹萃取物之 HPLC 活性成分分析。
3. 建立小鼠高血脂症疾病動物模式及鴨兒芹萃取物降血脂療效之評估。
4. 鴨兒芹萃取物對小鼠之安全性評估。
5. 以細胞學模式探討鴨兒芹萃取物對肝脂質代謝之調控機轉。

## 1.2 研究架構

### 1.2.1 動物實驗



## 1.2.2 細胞實驗



## 第二章 文獻回顧

### 2.1 高血脂與代謝性疾病

血漿脂質 (plasma lipids, 簡稱為血脂) 是血漿或血清中脂類的總稱, 主要有膽固醇 (cholesterol)、三酸甘油酯 (triglyceride, TG)、磷脂質 (phospholipids)、游離脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 等, 血中的脂類含量超過正常濃度稱為高血脂症。膽固醇是細胞膜結構的主要成分, 也是合成膽酸及固醇類荷爾蒙的必需前驅物。因為膽固醇及三酸甘油酯為脂溶性物質, 不能溶解於水性血漿, 故須與血液中的脂蛋白元 (apolipoprotein) 結合成非共價鍵形式的親水性脂蛋白 (lipoprotein) 方能溶於血漿 (Rensen & van Berkel, 1996), 並隨血液循環而灌流身體各器官組織, 故又稱為高脂蛋白血症。過高的血中膽固醇濃度, 是造成動脈粥狀硬化的重要條件, 並與心血管疾病死亡率密切相關 (Verschuren et al., 1995)。

#### 2.1.1 血漿脂質

血漿脂質主要包括膽固醇、三酸甘油酯、磷脂質和游離脂肪酸等, 膽固醇約有 70-75% 的比例以膽固醇酯 (cholesteryl ester) 的型態存在血液中 (Franz, 1986)。

## <1> 膽固醇

人體內膽固醇除了一部份攝取自食物外，大部份由肝臟中的肝細胞合成。血漿中膽固醇濃度不會立即受到當日食物中膽固醇多寡的影響。

## <2> 三酸甘油酯

三酸甘油酯是人體脂肪的主要成分，也是熱量的高濃縮型態，約佔飲食脂肪的 95%。三酸甘油酯的結構是由甘油 (glycerol) 的三個 OH 基與三分子脂肪酸 (fatty acid) 的 COOH 以酯鍵 (ester bond) 結合而成；不同的三個脂肪酸組成混合型三酸甘油酯。三酸甘油酯為非水溶性物質，無法在血液中運行，故需藉由蛋白質和磷脂質等兩性乳化劑包圍在外側，形成親水性的脂蛋白顆粒，才可隨血液循環運送至身體各器官組織中 (Franz, 1986)，三酸甘油酯在血漿中主要以乳糜微粒及極低密度脂蛋白的型態存在。在代謝過程中，三酸甘油酯須先由脂解酶 (lipase) 水解成甘油及脂肪酸，才能進一步氧化產生能量。當攝取過量脂肪、醣類和酒精，都有可能使血液中的三酸甘油酯濃度升高。

在肝細胞內，三酸甘油酯以血漿中送回的游離脂肪酸為主要來源，配合醣類新陳代謝的中間物提供了甘油部分而組成，做為生理能源的儲蓄資源。肝細胞為防止三酸甘油酯過多蓄積於肝臟內，乃藉著合成



極低密度脂蛋白，將過剩的三酸甘油酯排出肝臟。食物很容易影響血漿三酸甘油酯濃度，例如飲酒、攝取含大量脂肪或醣類食物，可於短期內提高血漿三酸甘油酯濃度，運動則可經由消耗熱量而降低血漿三酸甘油酯的濃度。持續高濃度的血漿三酸甘油酯，常會導致三酸甘油酯蓄積於肝細胞內，伴生脂肪肝 (fatty liver) 病變 (Tessari, Coracina, Cosma, & Tiengo, 2009) 。

### 2.1.2 脂蛋白

除了游離脂肪酸之外，所有的脂質都是以脂蛋白的複合物於血漿中運送。脂蛋白元、磷脂質與游離膽固醇 (free cholesterol, FC) 形成此複合物的極性外套，而其中心則包含非極性的三酸甘油酯與膽固醇。不同比例的脂質與脂蛋白元組合成數種主要的脂蛋白。

血漿依其密度大小，可分成乳糜微粒 (chylomicrons, CM)、極低密度脂蛋白 (very low-density lipoprotein, VLDL)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL)、脂蛋白 a (lipoprotein a) 等 (Thompson, 1989) 。

#### <1> 乳糜微粒

乳糜微粒密度小於 0.95 g/mL，其中 98-99% 為總脂質，主要含三酸甘油酯，約佔總脂質的 88%，為分子量最大的脂蛋白 (Murray,

2009)。

## <2> 高密度脂蛋白

高密度脂蛋白含大量的磷脂質及少量的膽固醇（約佔血漿膽固醇的 20-30 %），其主要功能為將週邊組織的膽固醇輸送回肝臟代謝，推測亦包括自血管壁帶走滲入的膽固醇，因而具有清潔血管壁的作用，血漿中的高密度脂蛋白膽固醇（HDL-C）濃度愈高，表示逆向輸送血漿膽固醇回肝臟代謝的能力愈佳，因而罹患動脈粥狀硬化疾病的之機率越低（Whayne et al., 1981）。

## <3> 低密度脂蛋白

低密度脂蛋白含有大量的膽固醇，約佔血漿總膽固醇的 60-70% ，若清除代謝效率差，導致血漿中濃度過高，則容易滲入血管壁內，形成動脈粥狀硬化（atherosclerosis），故血漿中低密度脂蛋白膽固醇（LDL-C）濃度越高，罹患動脈粥狀硬化疾病的危險性就越高（Zang et al., 2006）。

過氧化的低密度脂蛋白會與巨噬細胞上的接受器結合，巨噬細胞吞噬 LDL 後形成泡沫細胞沈積於血管內皮下層，為動脈粥狀硬化形成的主要原因（Ross, 1993），血清中 LDL 濃度的增加，與動脈粥狀硬化及冠狀心臟疾病的發生率呈現正相關（Whayne, et al., 1981）。

#### <4> 極低密度脂蛋白

極低密度脂蛋白含大量的三酸甘油酯，其膽固醇含量約僅為血漿膽固醇的 10% (Murray, 2009) 。

#### 2.1.3 代謝症候群

高三酸甘油酯和高密度脂蛋白偏低、高血壓、高血糖、腰圍過大並列為代謝症候群 (metabolic syndrome) 的表徵。代謝症候群是一個與肥胖或胰島素抗性 (insulin resistance, IR) 相關的心臟危險因子的聚集現象，1988 年 Reaven 提出「X 症候群 (Syndrome X)」的概念，並認為與胰島素阻抗 (insulin resistance) 有密切相關，通常病人的特徵是聚集了高血壓、胰島素抗性或高胰島素濃度、血糖不耐、極低密度脂蛋白偏高、尿酸偏高、高密度脂蛋白膽固醇偏低等特質於一身 (Kylin, 1923; Reaven, 1988) ，其中有關於血脂代謝異常的指標有三項：

1. 血漿三酸甘油酯濃度偏高；
2. 高密度脂蛋白膽固醇濃度偏低；
3. 出現顆粒較小而高密度的低密度脂蛋白膽固醇 (small, dense-LDL cholesterol) ，它比較小，重量超過典型的低密度脂蛋白膽固醇 (Lemieux et al., 2000) ，此三項血脂代謝異常均可能促進動脈粥狀硬化。糖尿病亦屬代謝疾病，會加速並惡化動脈粥狀硬化所導致的心血管疾病，第 2 型糖尿病患者於臨床病徵明顯之前，常會出現胰島素阻

抗性，且出現不同程度的 X 症候群。

### <1> 代謝症候群定義

代謝症候群現今有兩種主要的定義，其一是在 1998 提出的“Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation”，定義自從糖尿病的面向出發。其定義標準為，在糖尿病或空腹血糖偏高或葡萄糖耐受不良或胰島素抗性的狀態，合併有以下情況二者及以上者，即為代謝症候群：

1. 肥胖（男性腰圍除以臀圍比率大於 0.9、女性大於 0.85），或身體質量指數在 30 以上者。
2. 脂質代謝異常：三酸甘油脂大於等於 150 mg/dL 或高密度脂蛋白膽固醇過低（男性低於 35 mg/dL、女性低於 45 mg/dL）。
3. 血壓大於 140/90 毫米汞柱。
4. 微白蛋白尿（microalbuminuria），指白蛋白的尿液排除率（excretion rate）大於 20  $\mu\text{g}/\text{min}$ 。

其二是 NCEP-ATP III 建議的方法，主要是使用經常評估之心臟血管危險因子來定義代謝症候群。滿足下列症狀標準（含）三項以上者，即為代謝症候群：

1. 男性腰圍大於 102 公分、女性大於 88 公分。
2. 三酸甘油脂大於 150 mg/dL。

3. 男性高密度脂蛋白膽固醇低於 40 mg/dL 、女性低於 50 mg/dL 。
4. 血壓大於等於 130/85 毫米汞柱。
5. 空腹血糖大於等於 110 mg/dL 。

代謝症候群在不同人種及性別比較時，可能其各組成的組合型態也不見得相同。根據行政院衛生署國民健康局出版之「高血脂防治手冊-國人血脂異常診療及預防指引」比較台灣營養健康調查與美國國家健康及營養檢查調查 III 發現使用 NCEP-ATP III 定義台灣男性最多的組合是血壓、三酸甘油酯偏高及高密度脂蛋白膽固醇偏低的聚集，而美國白人男性則是各種組合都相當平均。台灣女性最主要的組合是高密度脂蛋白膽固醇偏低、血壓和腰圍偏高，美國白人女性是高密度脂蛋白膽固醇偏低、三酸甘油酯和腰圍偏高的組合 ("Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report," 2002; 丁予安、何橈通、宋育民， 2003) 。

## <2> 動脈粥狀硬化與自由基及血脂之相關性

世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 為動脈粥狀硬化所下的定義：「因脂質及膽固醇、脂蛋白、血液產物及鈣質等沉積於動脈內膜 (intima) 而造成其上斑塊 (plaque) 或結節狀 (nodular)

增厚之疾病」。

動脈粥狀硬化的危險因子包括內生性因子如遺傳性疾病（如非胰島素依賴型糖尿病、血脂代謝異常、家族性心臟病等），先天的性別差異（男性高於女性）及後天的因飲食習慣所起的肥胖（obesity）、高血壓、血漿三酸甘油酯與總膽固醇濃度過高等，此外尚包括外界環境因素，如抽煙、壓力、缺乏運動等，皆為引發動脈粥狀硬化的危險因子（Glass & Witztum, 2001），其中血脂異常可說是導致動脈粥狀硬化最直接的危險因素。國外研究指出，動脈粥狀硬化形成的主要成因是血中膽固醇濃度過高，特別是 LDL-C（Olsson & Nilsson, 2009）。

**動脈粥狀硬化致病機轉：**

### **(1) 損傷反應假說 (Response to injury hypothesis)**

Ross 所提出之假說，主要是強調內皮細胞功能失調，致使細胞做出急性與慢性的發炎反應以作為保護。而造成內皮細胞損傷的原因可能有：物理性傷害（如血管分支處的擾流）、化學性傷害（如自由基攻擊）、與暴露於致毒性物質（如氧化的 LDL, OxLDL），受到損傷的內皮細胞會誘使一連串的發炎反應發生（Ross, 1993），而與動脈粥狀硬化發生有關的反應如下：

1. 局部動脈內膜移位與增生，且巨噬細胞、T- 淋巴球與平滑肌細胞在此聚集（accumulation）。

2. 結締組織生成，如 elastin fiber protein、collagen 與 proteoglycans 。
3. 巨噬細胞與平滑肌細胞內大量脂質堆積而形成泡沫細胞 (foam cells) 。

## (2) 氧化假說 (Oxidation hypothesis)

有研究顯示，在紐西蘭大白兔的動脈硬化斑上發現有氧化的 LDL (OxLDL) 存在 (Carew, Schwenke, & Steinberg, 1987) ，因此認為 LDL 的氧化與動脈硬化的發生有密切的關係。OxLDL 因結構上的氧化修飾作用而無法被 native-LDL receptor 所辨識及進行負向調控 (down regulation) 因此便藉由巨噬細胞表面所含的清除接受體 (scavenger receptors) 途徑，而大量累積於巨噬細胞內，導致巨噬細胞形成泡沫細胞。這些泡沫細胞堆積在血管壁上便形成脂肪紋 (fatty streak) 或脂肪斑 (fatty plaque) ，導致初期動脈粥狀硬化的發生。

## 2.2 脂肪肝疾病

在不同階段之脂肪肝 (fatty liver) 疾病，肝脂質蓄積 (尤其是三酸甘油酯) 已成為一重要的公衛議題，因為它可能會導致進一步的肝炎和肝硬化 (H. Yuan, Shyy, & Martins-Green, 2009; H. D. Yuan, Yuan, Chung, Jin, & Piao, 2010) 。此外，脂肪肝和肝內之三酸甘油酯蓄積在包括肥胖，高血脂，糖尿病等代謝症候群的發展，扮演著重要角色

(Choi & Diehl, 2008; Nozaki et al., 2009)。

在肝臟細胞中脂肪顆粒所佔據的面積，決定著脂肪肝的嚴重性。脂肪肝定義為肝臟重量中脂肪所佔比例大於 5% 或是在肝組織切片中超過 10% 以上的肝細胞呈現脂肪空泡變性的現象時便可診斷為「脂肪肝」。診斷上以肝臟切片的組織學診斷為黃金標準，但在一般民眾不同意接受肝臟穿刺 (liver biopsy) 檢查的情況下，肝臟超音波檢查已成為診斷脂肪肝最重要的方式，根據研究顯示，超音波診斷脂肪肝之準確度高達 97% (Yang et al., 1988)。1986 年由 Schaffner 首先提出脂肪性肝疾病 (fatty liver disease, FLD) 的疾病觀念，此後 FLD 才成為一個獨立的疾病 (Schaffner & Thaler, 1986)。脂肪肝是一種病理現象，而其成因卻是多樣的，病因大致粗分為酒精性與非酒精性，兩者的區別在於前者之酒精攝取一天在 20 克之上，而後者則無。非酒精性脂肪性肝疾病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的病因也有許多，包括某些藥物及毒物、先天性代謝疾病、及後天代謝性疾病，其中最常見病因的就是肥胖症、糖尿病及高血脂症 (Elizabeth, 2001)。

### 2.2.1 非酒精性脂肪性肝疾病定義

NAFLD 是目前肝臟醫學界對非酒精性脂肪肝病最廣為接受的一種命名，它所含蓋的肝臟疾病很廣泛，包括脂肪變性 (fatty



metamorphosis or steatosis)、單純脂肪肝、脂肪性肝炎 (steatohepatitis) 、脂肪纖維化以及肝硬化都包含在內 (Angulo, 2002) 。而非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 是指當肝臟脂肪堆積情形持續惡化，伴隨肝臟細胞受損及肝臟發炎症狀時就稱為非酒精性脂肪性肝炎，此為美國 Ludwig 醫師在女性糖尿病及高血脂患者身上發現伴隨 NAFLD 及肝發炎症狀，而提出「非酒精性脂肪性肝炎」之病理診斷名詞，必須有肝臟切片且符合某些條件才可使用 (Ludwig, Viggiano, McGill, & Oh, 1980) 。在 1986 年 Schaffner 強調 NASH 在肝臟衍生纖維化的機制中扮演著重要的角色 (Schaffner & Thaler, 1986) ；英國 Day 及 James 發現 NASH 的患者中有 15-50% 發生不同程度的纖維化 (Day & James, 1998) 。NASH 是 NAFLD 病程發展的一個階段，但由於脂肪肝炎進而產生纖維化，最後甚至演變成肝硬化，因為 NASH 的嚴重性，世人已不再視 NAFLD 為一種良性肝症狀。

### 2.2.2 非酒精性脂肪性肝炎與血脂之相關性

肝臟是脂肪代謝的重要器官，其在脂肪類食物上的消化、吸收、分解、合成以及運輸的過程中扮演著極為重要的角色。從動力學的角度來看，當脂肪酸的吸收及重新合成時，過度的氧化及再吸收產生不平衡，脂肪肝就因此形成。造成脂肪肝的脂肪酸的來源可能包括如下

(Attached Figure 1) (Donnelly et al., 2005) :

1. 儲存在脂肪組織的周邊脂肪經由血漿游離脂肪酸庫的途徑運送到肝臟 (pathway 1)。胰島素阻抗和在空腹狀態下源自脂肪組織的脂肪酸變動的調節異常有關，有力的證據證明，就是在 NAFLD 患者中胰島素不能抑制脂肪組織的脂肪分解。血漿游離脂肪酸庫於空腹狀態下促使大部分脂肪酸流往肝臟，從而藉由 VLDL 顆粒提供了大量的脂肪酸自肝中分泌。但是，其他來源的脂肪酸能促進肝三酸甘油酯積累脂肪肝；
2. 肝內通過重新脂質生合成新製造之脂肪酸 (pathway 2)；
3. 膳食脂肪酸可以經由血漿游離脂肪酸庫流出 (pathway 3)，還有經由腸原性乳糜微粒的吸收 (pathway 4) 進入到肝臟。

肝臟由血液中所攝取的游離脂肪酸，最終會在肝臟中合成三酸甘油酯並儲存起來，或以 VLDL 的形式將三酸甘油酯轉運出肝臟進入血液循環中。因此肝臟受到損傷後，均可導致脂質（尤其是三酸甘油酯）在肝細胞內異常的代謝及堆積（Attached Figure 2）。各種致肝傷害因素可以通過下述一種或多種機制來導致脂肪肝（包括 NAFLD 中的脂肪變性）的發生：

1. 因個體攝取過多的高脂類飲食並導致高血脂症，相對會使血清 FFA 異常增加；
2. 肝細胞合成 FFA 或由碳水化合物轉化成三酸甘油酯增加；
3. FFA 在肝細胞線粒體內氧化及利用率降低，而轉變為三酸甘油酯；
4. 由於 VLDL 本身合成的減少，致使三酸甘油酯轉運發生阻礙，導致脂肪組織與肝細胞間的脂肪代謝動態失衡，以及肝細胞中的三酸甘油酯合成及排泄間的平衡發生障礙，三酸甘油酯在肝細胞內過度囤積，最終發生脂肪變性。

NAFLD 病程中的脂肪變性及其所衍生成 NASH 的真正致病機轉目前尚不很明確，但由近年來由大量的臨床及動物實驗研究所得之結果，得知 NAFLD 的形成是多因性的。英國 Day 及 James 提出以胰島素抗性、氧化壓力（oxidative stress）以及脂質過氧化作用（lipid peroxidation）的雙衝擊理論（two-hit theory）（Day & James, 1998），這

些致肝傷害機制直接對肝細胞進行兩次攻擊，並導致肝臟發生瀰漫性脂肪浸潤、炎症反應、壞死、凋亡、再生損害以及肝星狀細胞活化等一系列病理連鎖性免疫攻擊反應。「第一次衝擊」是脂肪酸及三酸甘油酯異常在肝細胞內囤積，而衍生肝細胞脂肪變性病變，第一個衝擊後出現脂肪肝；而在此基礎上，接著引起慢性氧化壓力及脂質過氧化作用，導致肝細胞粒線體損傷及細胞因子與肝星狀細胞的活化，由此導致肝細胞持續的傷害，而進一步衍生肝臟本身發生炎症、壞死、細胞凋亡以及纖維化等併發症，此即為第「二次衝擊」，第二個衝擊後則出現脂肪肝炎 (fatty hepatitis)。第一個衝擊肇因於肝內脂肪的過度堆積，其原因有肥胖症、高血脂症、糖尿病、及胰島素抗性等原因；而第二重衝擊則起因於氧化壓力，會造成肝細胞膜上脂質過氧化 (peroxidation) (Sanyal et al., 2001)，並藉由釋放前發炎細胞激素和活化星狀細胞進一步造成纖維化。

## 2.3 AMPK 路徑

AMPK 是一個感應細胞內能量代謝的關鍵調控者，藉由調控細胞代謝途徑之運作來調節全身能量的平衡 (Lin, Huang, & Lin, 2007)。

AMPK 曾被稱其功能如同一監控細胞能量狀態以反應營養環境變化之燃料計量器及能量感應器 (Ben Sahra et al., 2008)，近來有研究指出 AMPK 可以為代謝症候群疾病進程導致之代謝缺陷提供一連結。

AMPK 是一 heterotrimeric enzyme 複合物，包含一個催化用的 subunit  $\alpha$  及 2 個調節用的 subunit  $\beta$  及  $\gamma$ 。AMPK 的活化是經由 AMP 濃度上升及 ATP 濃度下降而產生，當細胞內的 ATP 濃度減少時，AMP 的濃度會隨之升高，使得 AMP/ATP 的比值升高，這樣的結果將導致整個 AMPK 蛋白在結構上的改變並增加  $\alpha$ -subunit thr-172 位置的磷酸化 (Hardie, 2004)。目前發現，當 AMP 與 AMPK 結合後造成的結構性改變將產生異位調控活化 AMPK 的效果。此外，AMPK 結構性的改變也會增加 AMPK 上游活化因子 AMPK kinase (或又稱為 LKB1) 對  $\alpha$ -subunit thr-172 位置的磷酸化，而更提高 AMPK 的活化。

AMPK 系統為一能量平衡的調節者，一旦被低能量狀態所活化，就會分別經由調控蛋白磷酸化的短期作用以及基因表現的長期作用進而打開 ATP-producing pathway (例如 fatty acid 氧化及醣酵解)；

並且關上 ATP- consuming anabolic pathway (例如脂肪生成)。此系統不但會作用於單一細胞的層級，而且也會於整個身體的層級調整食物的吸收及能量的消耗，尤其是經由胰島素敏化 adipokines leptin 及 adiponectin。當骨骼肌收縮及心肌缺氧時，AMPK 被大量的活化，並在葡萄糖傳遞及脂肪酸氧化時發揮作用 (Attached Figure 3)。在肝臟中，AMPK 的活化會促進脂肪酸氧化並漸少葡萄糖的合成；活化的 AMPK (pAMPK) 會抑制脂肪合成途徑和促進脂肪分解途徑 (Hardie, 2004; Horton, Goldstein, & Brown, 2002; Yin et al., 2007)，活化的 AMPK 也可以增加其下游受質 acetyl CoA carboxylase (ACC) 的磷酸化。ACC 為脂肪酸生合成關鍵酵素，具兩種重要調節脂肪酸代謝之功能，除了促進脂肪酸合成外，產物 malonyl-CoA 為脂肪酸氧化之抑制劑。AMPK 在骨骼肌、肝臟及脂肪組織中活化會減少血糖濃度、血漿中脂質濃度及異常的脂肪累積，並增加胰島素敏感性，因此 AMPK 可作為預防與治療第二型糖尿病及其他代謝性疾病的標靶分子。

## 2.4 鴨兒芹文獻回顧

鴨兒芹的學名 *Cryptotaenia japonica* Hassk ，與西洋芹 (*Apium graveolens* L.) 是同屬繖形科 (Apiaceae) 不同種的多年生草本植物，葉柄長而淡綠，先端具心形小葉三片，葉緣有缺刻且形似鴨掌，因此又稱為鴨兒芹。其外觀特徵為：植株高 40-70 公分，無毛，全株有香氣。根狀莖很短；根細長密生。莖直立，具叉狀分枝。葉互生，三出複葉，葉柄基部稍擴大成膜質，窄葉鞘而抱莖，小葉無柄；中間小葉菱狀倒卵形，長 3-10 公分，寬 2-6 公分，邊緣有不整齊重鋸齒，基部下延，側生小葉歪卵形，有時淺裂。花序為不規則之繖形花序，小花超過 100 朵，夏季開白色小花，有時帶紫紅色，為頂生及腋生的複傘形花序，傘梗數條，有不等長的圓錐狀分枝，小傘梗 2-4 條，使花序呈疏鬆圓錐狀。萼齒退化；花瓣先端長而內彎；雄蕊之花藥縱裂；雌蕊之子房下位為 2 室，每室 1 胚珠。雙懸果，長橢圓形，分果長圓而不扁，有 5 稜，主稜發達，次稜不明顯，每稜間有油管 3 個，結合面 3-4 個。文獻記載之中文異稱為三葉、三石、當田、赴魚、野蜀葵、三葉芹、水白芷、大鴨腳板、鴨腳板草、野芹菜、紅鴨腳板、水芹菜、山芹菜 (台灣) (林宗旦、林宗平、林景彬, 1992)。英文別稱為 *mitsuba*, *Japanese wild parsley*, *honeywort*, *san ip* 及 *san ye qin* (Hardway, T. M. et al., 2004)。在台灣則將其歸為芹菜類之一，原為本省野生的植物，

生於低山林邊、溝邊、田邊濕地或溝谷草叢中。台灣中部及南部皆有野生，陽明山、溪頭、阿里山、太平山及八通關古道均相當常見（黃涵、洪利，1988）。全台灣大部份地區都有栽培當蔬菜吃，南投鹿谷為主要產地。中藥性味歸為辛、苦、平，功能主治為消炎、解毒、活血、消腫、治肺炎、肺膿腫、淋病、疝氣、風火牙痛、癰疽疔腫、帶狀皰疹、皮膚搔癢（林宗旦、林宗平、林景彬，1992），台灣民間傳統上常用於降低血壓、降膽固醇及減肥之用。有研究顯示發現鴨兒芹特殊香氣是因為含特殊精油成分，且各部位不同。鴨兒芹各部位精油皆不含任何的 Phthalide 類化合物，而 Phthalide 類化合物為西洋芹降血脂之有效成份，雖然如此，也有研究發現鴨兒芹種子甲醇萃取物具有一定的抗氧化能力並且在動物實驗中發現有調節血脂質的能力，顯示鴨兒芹與其近源植物的降血脂成分可能有所不同（Cheng, Lin, Yu, & Peng, 2008; 鄭明清，2004）。



## 第三章 材料與方法

### 3.1 儀器設備

石蠟組織切片機 (Leica, RM 2145, Nussloch, Germany)

全自動生化分析儀 Roche automated clinical chemistry analyzers  
(Roche, MODULAR analyzers, U.S.A.)

恆溫水浴槽 (YIH DERN, BH-130D, Taipei, Taiwan)

超音波細胞破碎機 (Qsonica, MICROSON XL2000, Connecticut,  
U.S.A.)

高速離心機 (Evernew, YCF-401, Taiwan)

ELISA Reader (Biotek, FLx800, U.S.A.)

減壓濃縮機 (Savant, speed Vac. SC 110, N.Y., U.S.A.)

Mini VE blotter (Hofer, U.S.A.)

Power supply (Hofer, U.S.A.)

### 3.2 鴨兒芹萃取及成分檢測

#### 3.2.1 萃取流程

新鮮鴨兒芹於三至四月間購於南投縣竹山鎮栽培鴨兒芹的農場，採收前需為一星期以上持續之晴天。鮮重為 20 kg，洗淨後剪切成小段於 40°C 烘箱中連續乾燥約 48 小時，乾燥後之乾重 (1733.8 g) 約為鮮重 8.55%，換算其含水率約為 91.45%，乾燥後之鴨兒芹室溫下已

3 倍體積之 95% 乙醇浸泡 24 小時後，過濾收集濾液，並將殘留物再以室溫 95% 乙醇浸泡 24 小時後過濾收集濾液，此步驟共操作三次，收集並混合三次所有濾液，於 45°C 減壓濃縮至浸膏，再以真空冷凍乾燥法獲得鴨兒芹醇萃冷凍乾燥粉劑 (ethanol extracts of *Cryptotaenia japonica* Hassk, 簡稱 ECJ) (155.6 g) ，流程如 Figure 3.1 所示，萃取率約為原植物乾重之 8.98%，換算 1 g 鴨兒芹萃取物等於 130.34 g 的新鮮鴨兒芹，然後儲存於密封罐置於 -70°C 冰箱冷凍。

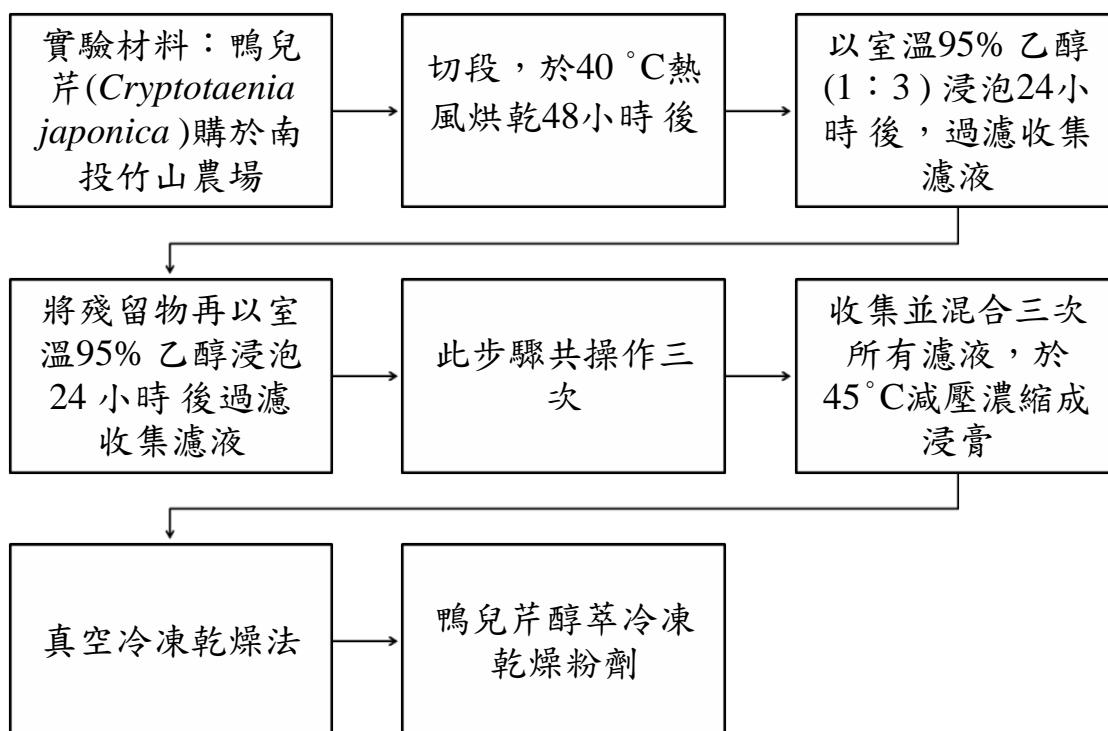


Figure 3.1 鴨兒芹萃取流程

### 3.2.2 HPLC 分析條件

層析時使用 Inertsil ODS-2 (5  $\mu\text{m}$  , 4.6  $\times$  250 mm ) , GL Science Inc. (Japan) 層析管柱，以甲醇(A)及緩衝水溶液(B) (0.2% phosphoric acid) 為移動相，以梯度沖提分別如下，0-45 min: 85% - 40% B ; 45-50 min: 40% B ; 50-75 min: 40- 85% B ; 75-80 min: 85% B 等梯度。檢品注入量為 10  $\mu\text{L}$  ，流速設定為 1.0 mL/min ，層析 80 分鐘，利用 254 nm 檢測 gallic acid 及 340 nm 分別檢測 apigenin, chlorogenic acid 及 luteolin。由檢測所得層析峰之積分面積值來計算含量。

### 3.2.3 DPPH 清除自由基實驗

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl,  $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ ) 自由基清除能力是常用於評估食品抗氧化活性的方法之一，常用於測定各類物質抗氧化能力，如大豆油 (Shimada, Fujikawa, Yahara, & Nakamura, 1992) 、梅納反應產物 (Kirigaya, et al., 1971) 等，其原理為實驗上所採用的 DPPH 甲醇溶液為紫羅蘭色，在 517 nm 下有強的吸光值，但是 DPPH 若與試樣結合被抗氧化劑還原時，將會降低吸光值，由此藉以判斷試樣清除 DPPH 自由基的能力，其吸光值愈低，表示試樣清除 DPPH 自由基的能力愈強，即表示抗氧化能力愈高 (Michael, 2001) 。

## <1> ECJ 清除自由基實驗

參考 Shimada 等人 (1992) 方法加以修飾。取 10  $\mu\text{L}$  鴨兒芹醇萃液 (1 mg/dL, 2.5 mg/dL, 5 mg/dL, 10 mg/dL, 25 mg/dL, 50 mg/dL) 加入 750  $\mu\text{L}$  新鮮配置的 DPPH 溶液+ 240  $\mu\text{L}$  乙醇均勻混合作為實驗組 (test)。此外，取 10  $\mu\text{L}$  萃取液加入 990  $\mu\text{L}$  不含 DPPH 的乙醇均勻混合作為樣品空白吸光組 (sample)；再取 250  $\mu\text{L}$  乙醇加入 750  $\mu\text{L}$  新鮮配置的 DPPH 溶液均勻混合作為未加 ECJ 之 DPPH 溶液吸光值組 (blank)。三組均於室溫下避光靜置 30 分鐘後，使用分光光度計測定 517 nm 吸光值。依下列公式計算清除率，當清除率愈高，則清除 DPPH 自由基之能力愈強，即供氧能力愈強。以上實驗均進行三重複。以濃度為 x 軸、清除率為 y 軸製圖並計算 50% 清除率濃度 ( $\text{SC}_{50}$ )。

$$\text{SC\% (DPPH scavenging activity)} = [\text{A}_{\text{blank}} - (\text{A}_{\text{test}} - \text{A}_{\text{sample}})] / \text{A}_{\text{blank}} \times 100\%$$

(A：吸光值)

## <2> ECJ 之主要成份清除自由基實驗

分別配製 6.25  $\mu\text{M}$ , 12.5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  體積莫耳濃度的 gallic acid, chlorogenic acid, luteolin 及 apigenin 溶液，測定方法如 ECJ 清除自由基實驗，以上實驗均進行三重複。以濃度為

x 軸、清除率為 y 軸分別繪製 gallic acid, chlorogenic acid, luteolin 及 apigenin 之圖並計算  $SC_{50}$ 。

### 3.3 動物實驗 (I) -降血脂療效評估

#### 3.3.1 實驗動物飼養與分組

本實驗所使用之動物為購買自樂斯科生技股份有限公司 (BioLASCO Taiwan Co. Ltd, Taiwan) 的 ICR 小鼠 (ICR mice)。ICR 小鼠皆為 6 至 7 週齡，體重約為 32 g。以不鏽鋼鐵籠飼養於動物中心，以自動定時器控制光照週期，給予一日 12 小時照明 (AM 07: 00 - PM 06: 00) 及 12 小時黑暗 (PM 06: 00 - AM 07: 00) 環境循環，環境溫度約維持於  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，濕度約維持於  $55 \pm 5\%$ 。本研究實驗動物之使用操作均依照長庚醫院動物中心規範、中華實驗動物學會之「實驗動物管理與使用指南」及 Guidelines of Care and Use of Laboratory Animals 進行。以鼠專用粒狀飼料 (LabDiet® 5001 Rodent diet, Purina Mills LLC, St. Louis, MO, USA) 及逆滲透水採自由進食供應，經 1 週適應期後，全部實驗動物隨機分成 2 組：正常組 (A 組, n=6) 繼續餵食鼠專用粒狀飼料，疾病動物組 (n= 24) 餵食含有高脂肪/高膽固醇專用粒狀飼料 (Research Diets® D12492, Research Diets, Inc., U.S.A.)，成份組成如 Attached Figure 4 所示 (Nakayama et al., 2007)。

於 2 週後確認以此種方式誘導正常 ICR 小鼠最後形成高膽固醇血症的肥胖動物模式成功後，再將疾病動物組小鼠隨機分成 4 組，全部實驗小鼠共 5 組，每組 6 隻，每天飼料及飲水自由飲食，不予控制。實驗動物分組處理如下：

1. 正常飲食組 (A 組)：水 + 鼠專用粒狀飼料 (Group A, n=6)
2. 高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組)：水 + 高脂肪/高膽固醇專用粒狀飼料 (Group B, n=6)
3. ECJ 低劑量組 (C 組)：ECJ 20 mg/kg/day + 高脂肪/高膽固醇專用粒狀飼料 (Group C, n=6)
4. ECJ 高劑量組 (D 組)：ECJ 100 mg/kg/day + 高脂肪/高膽固醇專用粒狀飼料 (Group D, n=6)
5. simvastatin 治療組 (E 組)：simvastatin 6 mg/kg/day + 高脂肪/高膽固醇專用粒狀飼料 (Group E, n=6)

### 3.3.2 溶液配製與投予途徑

每日以 1 mL 滅菌塑膠針筒套上不鏽鋼餵食管餵食各組所需之劑量。不鏽鋼餵食管平時浸泡在 75% 酒精溶液中，使用前再以二次水潤濕。鴨兒芹冷凍乾燥粉劑以二次水配製成不同濃度；simvastatin 以二次水配製成所需濃度，再以不鏽鋼餵食管依體重經口餵食，每隻灌食劑量與體積量比例之上限為 50 mL/kg/day。各組老鼠每天經口管餵一次，時間總計 8 週。

### 3.3.3 攝食量與體重記錄

實驗期間每日觀察飲食及活動狀況，收取糞便，記錄每週攝食量及每週體重變化至實驗動物犧牲前。

### 3.3.4 動物犧牲、採血及臟器摘取

小鼠於抽血前需禁食約 6-8 小時。利用毛細管由小鼠眼窩採血，取血後靜置約 1 小時，於 4°C 低溫離心機內離心，以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取出上清液即為血清，分裝入 eppendorff tube，於 -20°C 冷凍儲存，待日後分析。

採血後，以 2% 異氟烷 (isoflurane) 麻醉後經心臟採血後犧牲進行解剖。摘取肝組織照相，秤重並紀錄外觀變化，剪下肝臟的左側葉，放入液態氮中迅速冷凍，最後再置於夾鍊袋中保存於 -70°C 冰箱中



待測。其餘肝葉浸泡於 10% 福馬林緩衝溶液中固定，以利切片及 Haematoxylin & Eosin 染色進行檢查組織病理變化。

### 3.3.5 功能性指標評估

#### <1> 血清脂值測定

將樣本委託嘉義長庚醫院檢驗醫學科，進行 TC, TG, HDL-C 和 LDL-C 參數的檢驗分析測定。

### 3.3.6 病理組織學切片與 Haematoxylin & Eosin 染色

#### <1> 原理

石臘包埋 (paraffin embedding) 所使用包埋介質為非親水性，因此必須將已完成福馬林固定後的組織，依次經由脫水、脫酒精、浸潤等步驟方能包埋成石臘塊，並進行切片 (paraffin block section) 。Haematoxylin 為鹼性染劑會將嗜鹼性物質如細胞核及核仁染成藍色，而 Eosin 則對酸性物質具有親和性，會將細胞內嗜酸性物質如蛋白質等染成紅色或粉紅色，因此利用此兩種染劑可區分出細胞結構、大小、型態、組織排列與病變表現。

#### <2> 方法

石臘包埋 (脫水、透明化與石臘浸潤) 之簡易操作流程：

10% 中性福馬林液 → 固定組織 1 星期

自來水 → 沖洗 1 小時 (為了以後正常染色，必須去除固定液)

70% alcohol → 脫水 (dehydration) 1 小時

80% alcohol → 脫水 1 小時

95% alcohol → 脫水 1 小時

95% alcohol → 脫水 1 小時

100% absolute alcohol → 脫水 1 小時

100% absolute alcohol → 脫水 1 小時

100% absolute alcohol → 脫水 1 小時

100% absolute alcohol + 二甲苯 (Xylene) → 透明化 1 小時

Xylene → 透明化 0.5-1 小時 (去組織中的酒精)

Xylene → 透明化 0.5-1 小時

浸潤於 (二甲苯:石蠟 = 1:1) 溶液中 1 小時 → 石蠟中 30 分 共

3 次 → 包埋 (embedding) → 連續切片 (serial section)

Haematoxylin & Eosin 染色之步驟：

自來水沖洗 → 二次水潤濕 → Haematoxylin (1 g/L ) 染色 15  
分鐘 (藉此將細胞核染成藍紫色) → 自來水沖洗 15-30 分鐘 → 二次  
水潤濕 → Eosin 3-5 分鐘 (將細胞質染成淡粉紅色) → 80%酒精 5 秒  
→ 90%酒精 5 秒 → 95%酒精 5 秒 → absolute alcohol 5 秒 →  
absolute alcohol 5 秒 (脫水，使結構變為清晰容易區分) → 二甲苯

30 秒 (脫醇) → 二甲苯 30 秒 → 封片 (Mounting) 。

### 3.3.7 肝臟中總脂質濃度測定

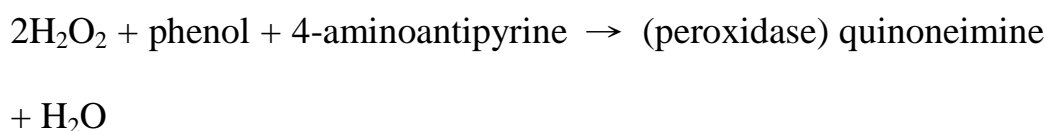
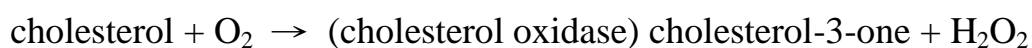
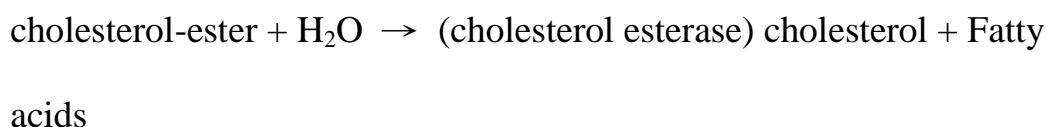
#### <1> 肝臟中脂質萃取

參考 Folch 等人稍加修飾後之方法 (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957) ，取肝臟固定量，加入 20 倍重量之 chloroform-methanol 混合溶液 (2:1, v/v) ，以超音波均質機均質磨碎後，置 15 mL 離心管中，以 2,000 xg 離心 10 分鐘，取澄清液再以 chloroform-methanol 混合溶液 (2:1, v/v) 定量到 5 mL ，並置於 4°C 待執行脂質分析。為避免 chloroform 之揮發，宜盡快完成分析。

#### <2> 肝臟中膽固醇濃度之測定

參考 Allain 等人及 Richmond 稍加修飾後之方法 (Allain, Poon, Chan, Richmond, & Fu, 1974; Richmond, 1973) 。本實驗肝臟膽固醇的測定是以市售試劑組 (REF 10028, HUMAN) ，以 Enzymatic CHOD-PAP 法測得，其原理是以 cholesterol esterase 水解成膽固醇，再利用 cholesterol oxidase 氧化膽固醇以產生過氧化氫 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，在過氧化酵素 (peroxidase) 催化下與 4-amionantipyrine 及 salicylic alcohol 作用，產生 quinoneimine 之淡紅色物質於 500 nm 波長測其吸光值。實驗進行時，取 10 μL 肝臟萃取液或膽固醇標準品置於 1.5 mL 的

ependorff tube 中，加入 1000  $\mu$ L 膽固醇 Enzymatic Kits 充分混勻後，置於室溫反應 15 分鐘，立即以分光光度計於波長 500 nm 測定吸光值，經標準品比對，計算可得 cholesterol 的濃度，其單位以 mg/dL 表示。

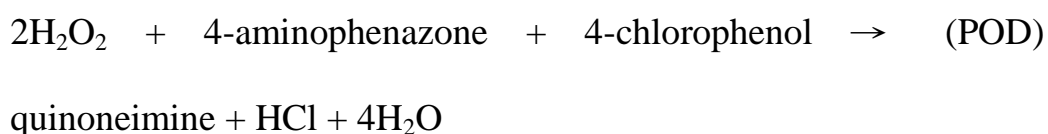
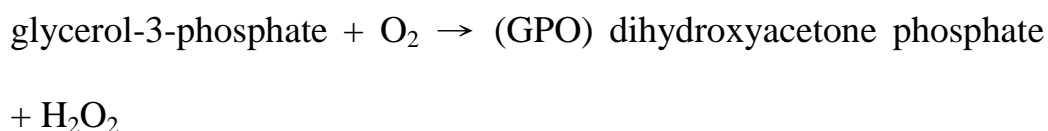
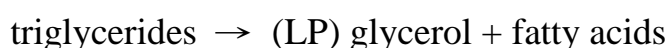


$$[(\text{Sample OD}-\text{Blank OD}) / \text{Standard OD}] \times 200 = \text{mg/dL}$$

### <3> 肝臟中三酸甘油酯濃度之測定

本實驗肝臟三酸甘油酯之測定採用市售酵素 GDP-PAP 三酸甘油酯試劑組 (REF 10724, HUMAN)，其原理為利用 lipoprotein lipase (LP) 水解甘油酯鍵，接著再依序與 glycerol kinase (GK)、glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) 以及 peroxidase (POD) 反應，最終產生 4- (o-benzo-quinone, monoimido) -phenazone 的淡紅色產物。該物質於波長 500 nm 下有最大的吸光值，其濃度和血漿中之 triglyceride 及 free glycerol 量成正比。

方法為取 10  $\mu$ L 肝脂質萃取液或三酸甘油酯標準品置於 1.5 mL 的 eppendorff tube 中，加入 1000  $\mu$ L TG Kit Reagent 充分混勻後，置於室溫反應 15 分鐘，立即以分光光度計測定波長 500 nm 處的吸光值，經標準品比對計算可得 triglyceride 的濃度，其單位以 mg/dL 表示。



$$[(\text{Sample OD}-\text{Blank OD}) / \text{Standard OD}] \times 200 = \text{mg/dL}$$

### 3.3.8 糞便脂質含量測定

#### <1> 糞便脂質萃取

取乾燥糞便粉末 0.5 g 於 15 mL 離心管中，加入 10 mL 萃取液 (chloroform: methanol = 2:1)，加蓋浸泡 24 小時 (每 2-3 小時混勻一次)，之後以 90 mm 濾紙過濾至 15 mL 離心管中，再以萃取液定量至 5 mL，置於 4°C 待測，為避免 chloroform 之揮發，宜盡快完成分析。

## **<2> 糞便膽固醇及三酸甘油酯含量測定**

糞便脂質含量測定如肝臟膽固醇及三酸甘油酯之含量測定。

### **3.3.9 安全性指標評估**

#### **<1> 肝功能指數**

將血清樣本委託嘉義長庚醫院檢驗醫學科，進行 AST, ALT 參數的檢驗分析測定。

#### **<2> 腎功能指數**

將血清樣本委託嘉義長庚醫院檢驗醫學科，進行 BUN, creatine 參數的檢驗分析測定。

## **3.4 動物實驗 (II) - 急毒性測試**

### **3.4.1 實驗動物飼養與分組**

本實驗所使用之動物為購買自樂斯科生技股份有限公司 (BioLASCO Taiwan Co. Ltd, Taiwan) 的 ICR 小鼠 (ICR mice)。ICR 小鼠皆為 5 至 6 週齡，以不鏽鋼鐵籠飼養於動物中心，以自動定時器控制光照週期，給予一日 12 小時照明 (AM 07: 00 - PM 06: 00) 及 12 小時黑暗 (PM 06: 00 - AM 07: 00) 環境循環，環境溫度約維持於  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，濕度約維持於  $55 \pm 5\%$ 。本研究實驗動物之使用操作均依

照長庚醫院動物中心規範、中華實驗動物學會之「實驗動物管理與使用指南」及 Guidelines of Care and Use of Laboratory Animals 進行。以鼠專用粒狀飼料 (LabDiet® 5001 Rodent diet, Purina Mills LLC, St. Louis, MO, USA) 及逆滲透水採自由進食供應，經 1 週適應期後，全部實驗動物隨機分成 2 組 (雌雄各半)：正常組 (N 組, n= 20)，給藥組 (T 組, n= 20)。實驗依據衛生署口服急毒性試驗、美國環保署 (USEPA) 試驗規範進行口服急毒性試驗 (衛生署，1999; USEPA, 2002)。實驗動物分組處理如下：

1. 正常組 (N 組)：水 (Group N, n=20)
2. 給藥組 (T 組)：ECJ 15 g/kg body weight (BW) (Group T, n=20)

### 3.4.2 溶液配製與投予途徑

每日以 1 mL 滅菌塑膠針筒套上不鏽鋼餵食管餵食各組所需之劑量。不鏽鋼餵食管平時浸泡在 75% 酒精溶液中，使用前再以二次水潤濕。鴨兒芹冷凍乾燥粉劑以二次水配製成 0.75 g/mL 濃度，再以不鏽鋼餵食管依體重經口餵食，每隻灌食劑量與體積量比例之上限為 50 mL/kg/day。各組老鼠每天經口管間隔 4 小時餵食 2 次，最終劑量為 15 g/kg body weight (BW)，處理後每日觀察並每週秤體重 1 次，時間總計 2 週。

### 3.4.3 動物犧牲、採血及臟器摘取

試驗結束後，小鼠以 2% 異氟烷 (isoflurane) 麻醉後，經心臟採血後犧牲進行解剖。

### 3.4.4 血液學檢測

將採集之全血放入含 EDTA 抗凝血劑試管 (K3 EDTA syringes, Vacutainer, NJ, USA) 後，委託嘉義長庚醫院檢驗醫學科，進行血液學的檢驗分析測定 (complete blood count, CBC)，包括白血球數 (white blood cell count, WBC)、紅血球數 (red blood cell count, RBC)、血紅素 (hemoglobin, HGB)、血球容積比 (hematocrit, HCT)、平均紅血球體積 (mean corpuscular, MCV)、平均血紅素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均血紅素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) 及血小板 (platelet, PLT) 等項目。

### 3.4.5 血清生化檢測

取全血後靜置約 1 小時，於 4°C 低溫離心機內離心，以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取出上清液即為血清，將血清樣本委託嘉義長庚醫院檢驗醫學科，進行 AST, ALT, BUN 和 creatine 的檢驗分析測定。



### 3.4.6 臟器病理檢測

小鼠犧牲後摘取各臟器組織照相，秤腦、心、肝、腎、脾、睪丸等臟器重量(g)，並以最後一週之最終體重(g)，作為體內臟器重量比率(%)之計算。並紀錄觀察肉眼外觀病理變化，最後再浸泡於 10% 福馬林緩衝溶液中固定，以利切片及 Haematoxylin & Eosin 染色進行檢查組織病理變化。

## 3.5 細胞學實驗

### 3.5.1 細胞株來源及培養條件

HepG2 細胞培養於含 10% FBS、1% antibiotic-antimycotic solution 之 DMEM，分別以每孔  $1 \times 10^6$  cells 接種於 10 cm 培養盤，培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱。細胞每兩天以含 0.25% Trypsin-EDTA solution 繼代。

### 3.5.2 細胞毒性測試

HepG2 細胞以每孔  $2 \times 10^4$  cells 培養於 24 孔培養盤中培養 24 小時，分別加入藥物處理，24 小時後，倒掉上清液加入 MTT solution 50  $\mu$ L/well (2 mg/mL in PBS)，放置於 37°C 培養箱 4 小時後倒掉 MTT solution，每孔加入 250  $\mu$ L DMSO 放入培養箱 30 分鐘。利用 ELX800 Universal Microplate Reader 測定 540 nm 吸光值。

### 3.5.3 脂肪油滴以 Nile Red 螢光染色定量

HepG2 細胞以每孔  $5 \times 10^4$  cells 培養於 12 孔培養盤中，分別加入含鴨兒芹萃取物 (100-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 1.0 mM oleic acid (OA) 培養。利用 Nile Red 以強度螢光顯示測定 HepG2 細胞脂肪含量，Nile Red 為一脂溶性螢光染劑，用於測定堆積在細胞質的脂肪含量。方法為先將細胞以 PBS 洗滌兩次，加入 Nile Red solution 濃度為 50 ng/mL in PBS 放置 37°C 培養箱中 15 分鐘。細胞以 PBS 洗滌，利用顯微螢光測定儀 (excitation 488 nm 和 emission 550 nm) 測定螢光強度以代表 HepG2 細胞脂肪含量 (Greenspan & Fowler, 1985; McMillian et al., 2001)。

### 3.5.4 細胞內蛋白質之定性與定量分析

#### <1> 細胞內蛋白質之萃取 (Protein Extraction)

不同時間點收集經藥物處理或未經處理之細胞，在 4°C 以 1000 rpm 離心 5 分鐘，用冰的 PBS 將細胞清洗一次後，於 4°C 下再離心 5 分鐘，倒掉上清液並用棉棒將多餘的水吸乾，加入適量的 RIPA buffer 【50 mM Tris (pH=7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% Na Deoxycholate, EDTA (pH=8.0), 1 mM EGTA (pH=8.0), 1mM DTT, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Leupeptin, 0.2 mM PMSF, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Aprotinin, 1 mM Na Vanadate, 1 mM NaF】，將細胞 pellet 均勻打散，置於冰上作用 30 分鐘，4°C 下將細胞液以 55000 rpm 超高速離心 30 分鐘，收集上清液，

以一系列已知濃度的 BSA 做成之 standard curve 換算蛋白質濃度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )。將蛋白質分裝並用 RIPA buffer 調整成相同體積，接著再加入 1/3 量的 4 倍 protein loading dye (8% SDS, 0.04% serva blue R-250, 40% glycerol, 200 mM Tris pH 6.8, 10% 2-mercaptoethanol)，以  $90^{\circ}\text{C}$  乾浴加熱變性 10 分鐘後，即可置於  $-20^{\circ}\text{C}$  中保存。

### <2> 聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE Assay)

利用 SDS-PAGE 將蛋白質依分子量大小予以分離。首先配製 1.5 mm 厚的 discontinuous acrylamide gel，下層 separating gel 其 acrylamide 的百分比，視分析蛋白質分子量而定，上層的 stacking gel 則含有 4% acrylamide。配置完成的膠體放至電泳槽內，加入電泳緩衝液 (running buffer : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)。接著將萃取出來的蛋白質 sample 及標示標準分子量的 Multimarker 依序注入膠體的孔槽中，通以電壓 80 伏特，待樣品通過 stacking gel 後電壓調整為 100 伏特，視其分子量大小斟酌電泳時間。

### <3> 西方墨點法 (Western blot)

將 PVDF membrane 浸於 methanol 數秒後以 Milli-Q water 浸濕，接著將裁好的濾紙與 PVDF membrane 先浸泡在 transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine) 中。取出電泳膠以濕式轉漬器轉漬至 PVDF

membrane，於 4°C 通以 400 mA 達 90 分鐘。將 membrane 取出，浸泡於 5% non-fat milk/TBST 或 2% BSA/TBST 中，於室溫下搖晃一至三小時。以 TBST buffer (24.22g Tris, 87.75g NaCl, 10 mL Tween 20，加水調到 1L) 清洗 membrane 10 分鐘 3 次，加入一級抗體於 4°C 下作用隔夜。隔日先以 TBST buffer 清洗 membrane 10 分鐘 3 次，加入二級抗體，使其在室溫下搖晃作用一小時之後，再用 TBST buffer 清洗 10 分鐘 3 次，接著在暗房中將 membrane 與 ECL (Enhance chemi-luminescence) 反應後，裝於透明塑膠袋內並置於壓片夾中，以 X-ray film 感光顯影，再以自動沖片機沖片。

### 3.5.5 反轉錄聚合酶鏈反應

#### <1> RNA 萃取

收集細胞 lysates，室溫下加入 RNABee (約 1 mL/dish) 作用之後，加入 0.2 mL chloroform 室溫下作用 15 分鐘，之後在 4°C 下以 12000 rpm 離心 15 分鐘，取約 0.5 至 0.6 mL 的上層液加入含 0.5 mL isopropanol 的 eppendorff 中，沉澱 10 分鐘後，在 4°C 下以 12000 rpm 離心 10 分鐘，離心後吸去上層液體，以 75% ethanol 清洗，最後在 4°C 下以 12000 rpm 離心 5 分鐘，吸去上層液體後風乾，待 pellet 呈透明狀後加入 30-50  $\mu$ L 的 DEPC-H<sub>2</sub>O，置於 -80°C 冰箱儲存。

## <2> 反轉錄反應 (Reverse transcription)

RNA 從波長 260 nm 的吸收值換算成 RNA 濃度，每一處理取 1  $\mu\text{g}$  RNA、20  $\mu\text{M}$  Random hexamer primer 0.5  $\mu\text{L}$  和 20  $\mu\text{M}$  Oligo (dT) primer 0.5  $\mu\text{L}$ ，以 ddH<sub>2</sub>O 調整體積至 13.5  $\mu\text{L}$  後，於 70°C 下 denature 10 分鐘，之後再加入 4  $\mu\text{L}$  的 5 倍 Reaction buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3、375 mM KCl、15 mM MgCl<sub>2</sub>)、1  $\mu\text{L}$  的 10 mM dNTP mix、0.5  $\mu\text{L}$  Recombinant RNase inhibitor (40 units/ $\mu\text{L}$ )、1  $\mu\text{L}$  的 MMLV Reverse transcriptase (200 units/ $\mu\text{L}$ ) 於 42°C 下 extension 1 小時，94°C 下作用 5 分鐘，再將 cDNA 置於 -20°C 儲存。

## <3> 聚合酶鏈反應 (Polymerase chain elongation reaction)

取 2  $\mu\text{L}$  cDNA、20  $\mu\text{M}$  primer (forward & reverse primer 各 1  $\mu\text{L}$ ) (如 Table 3.1 所示)，12.5  $\mu\text{L}$  2X Taq Master Mix (150mM Tris-HCl pH 8.5, 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 or 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2% Tween 20, 0.4 mM dNTPs, 0.05 units Ampliqon Taq polymerase, Stabilizer) 最後以 ddH<sub>2</sub>O 調整體積至 25  $\mu\text{L}$  後，以 Bio-Rad PCR machine 進行聚合酶鏈反應。

## <4> DNA 電泳膠實驗

利用微波爐加熱含有 2% agarose 的 TBE buffer，待稍微冷卻後，加入 5  $\mu\text{l}$ /100 mL 比例的 ethidium bromide (10 mg/mL)，混合均勻後倒入水平電泳凝膠模型中，盡量避免氣泡的產生，凝固後，置於 4°C

冰箱冷藏一下或放置隔夜，倒入 0.5 倍的 TBE buffer 於電泳槽中，並使 buffer 面稍為高於膠面。將 PCR 產物與 6 倍 DNA gel-loading dye 混和均勻之後，注入 agarose gel 的凹槽中。利用 50 伏特的電壓進行 DNA 電泳，分離後，再以 EverGene 數位影像擷取系統(gel analysis system) 分析。實驗試劑：5 倍 TBE buffer: Tris 54 g , Boric acid 27.5 g , 0.5 M EDTA /pH 8.0 20 mL ，以 ddH<sub>2</sub>O 調整體積至 1L。6 倍 DNA gel-loading dye: 0.125 g Bromophenol Blue, 0.125 g Xylene Cyanol FF, 15 mL Glycerol, ddH<sub>2</sub>O 加至 35 mL 。

**Table 3.1 The sequence of primer**

Primer	Sequence (5'→3')
FAS	Forward: AGCTGCCAGAGTCGGAGAAC Reverse: CAAGA AACTGCACGGAGGTGT
HMG-CoA	Forward: GATGACTCGTGGCCCAGTTG Reverse: GGGCGTTGTAGCCTCCTATG
GAPDH	Forward: GCCGC TTCTG TTTCT ACCAG Reverse: ACACC GGTTT CTGAC TTTGG

### 3.6 統計分析

試驗期間各組之實驗值變化，以 Statistical Package for Social Science (SPSS for windows 12.0) 統計分析套裝軟體進行 Student's t-test，或以單向變方分析法 (One-way ANOVA) 之 LSD test 進行組間比較分析，若  $p < 0.05$  則視為其組間有顯著差異水準。試驗結束後，若處理組動物死亡數超過處理動物數半數 (50%)，則統計方式求取劑量與死亡率之迴歸方程式，計算動物半致死劑量 ( $LD_{50}$ ) 及其 95% 可信賴區間 (confidence limit)。

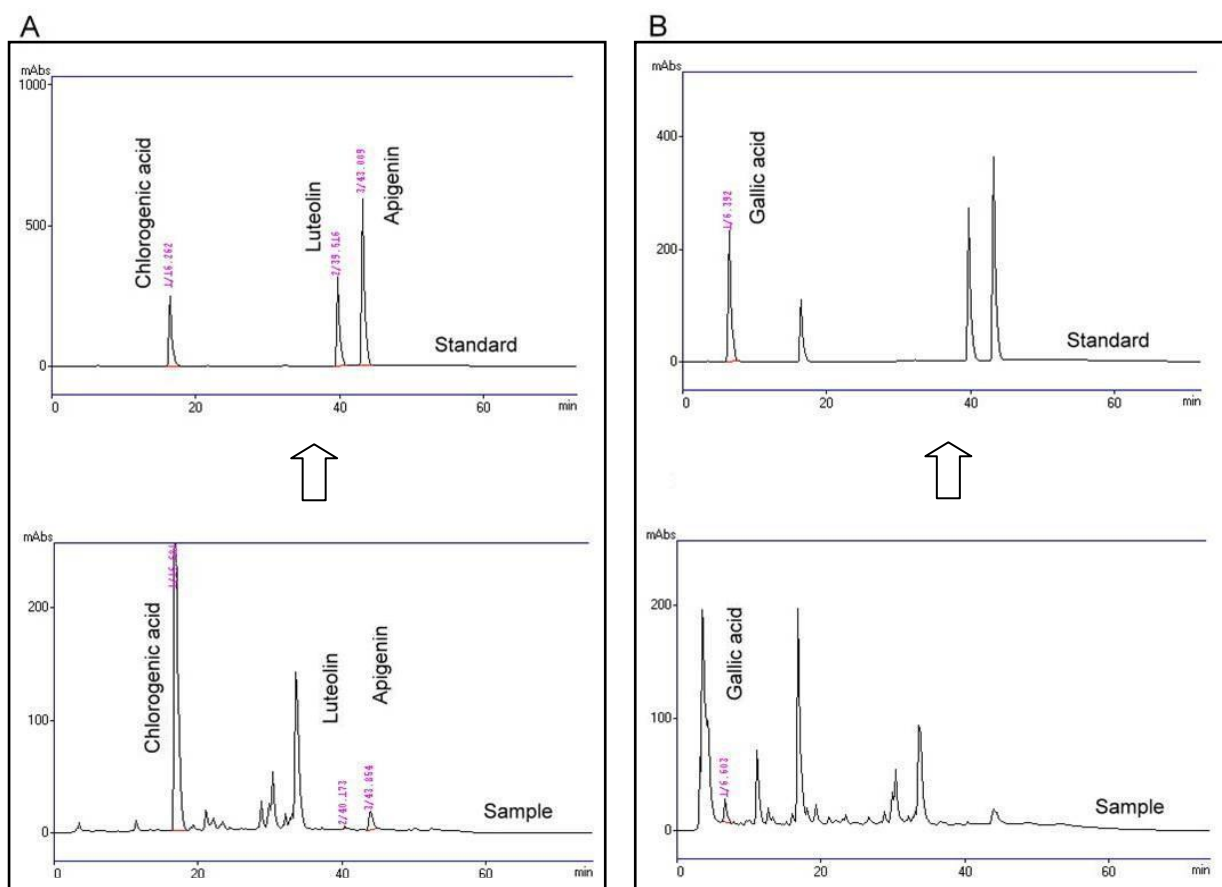
## 第四章 結果

### 4.1 鴨兒芹萃取物成份分析

#### 4.1.1 HPLC 分析結果

分析結果如 Figure 4.1 及 Table 4.1 所示。以 HPLC 分析 ECJ 後發現其內含主要成分為：gallic acid (含量為 0.82 mg/g)，chlorogenic acid (含量為 15.32 mg/g)，apigenin (含量為 0.41 mg/g) 及 luteolin (含量為 0.12 mg/g)。





**Figure 4.1 HPLC/UV chromatogram of ECJ.**

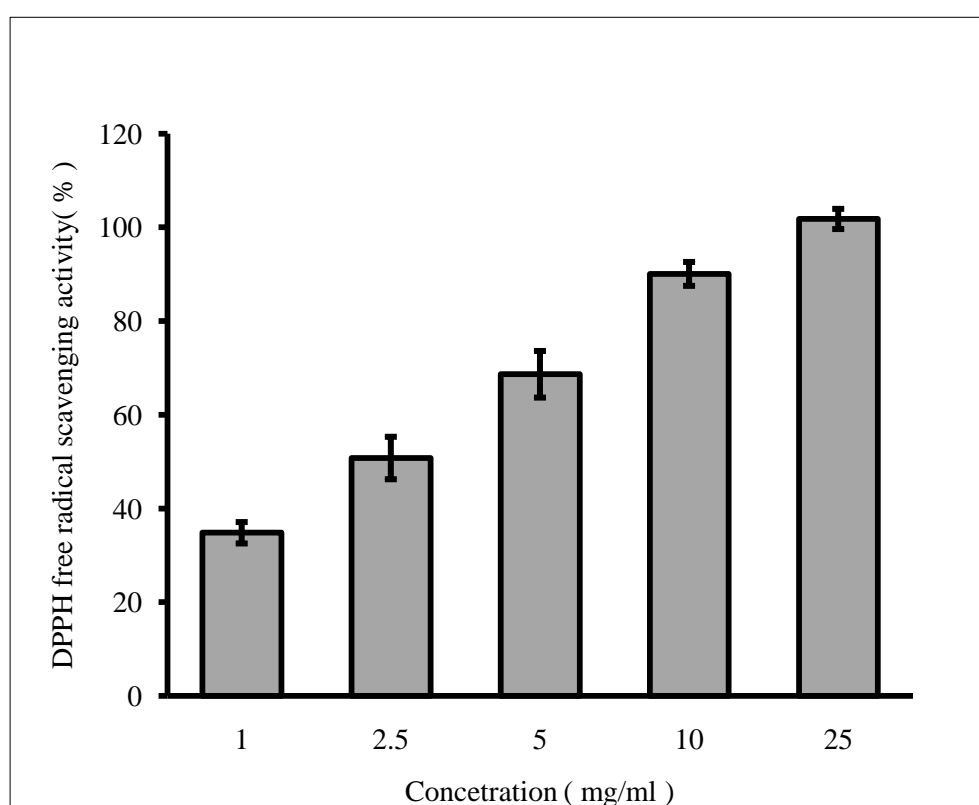
**Table 4.1 Major components of ECJ**

成分名稱	滯留時間 (min)	含量 (mg/g)
gallic acid	6.6	0.82
chlorogenic acid	16.7	15.32
luteolin	40.3	0.12
apigenin	44.0	0.41

## 4.1.2 DPPH 清除自由基實驗

### <1> ECJ 清除自由基實驗

由 Figure 4.2 可知，ECJ 對 DPPH 清除自由基的清除率會隨著濃度增加而增加，ECJ 之  $SC_{50}$  約為 2.5 mg/mL，而在濃度 25 mg/mL 時的清除自由基能力可達 100%。



**Figure 4.2 DPPH free-radical scavenging ability of ECJ**

$$SC\% \text{ (DPPH scavenging activity)} = [A_{\text{blank}} - (A_{\text{test}} - A_{\text{sample}})]/A_{\text{blank}} \times 100\%$$

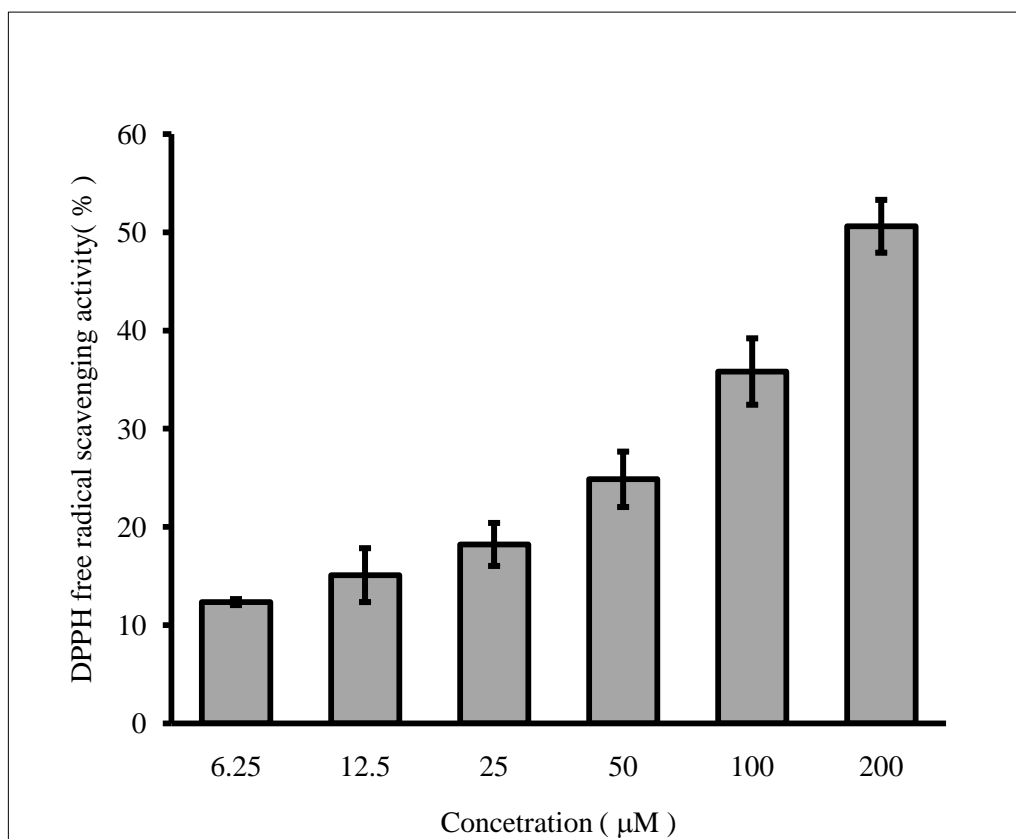
A: absorbance (optical density, OD)

The scavenging abilities of ECJ against DPPH radical were concentration-dependent.

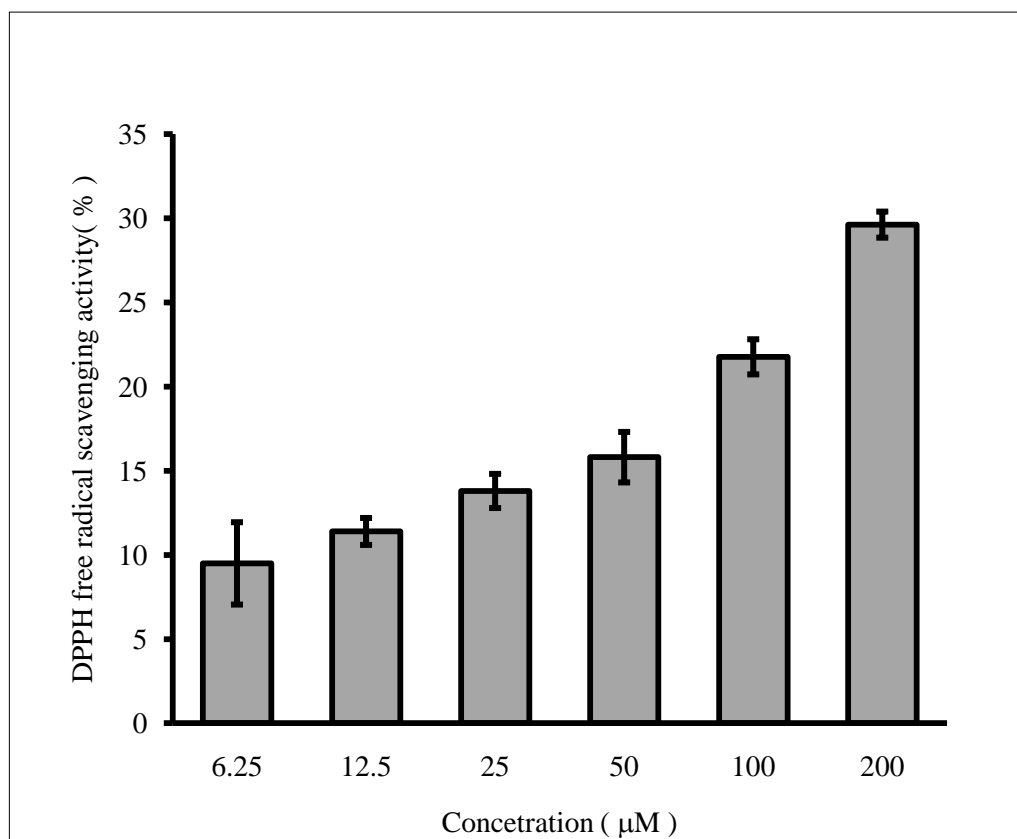
## <2> ECJ 之主要成份清除自由基實驗

根據各成份不同濃度測得之清除率，以濃度為 x 軸、清除率為 y 軸分別繪製 gallic acid, chlorogenic acid, luteolin 及 apigenin 之檢量線求得回歸方程式並計算清除率 50% 之濃度，結果顯示 gallic acid 之  $SC_{50}$  濃度為  $187.64 \mu\text{M}$  ( $y = 0.1954x + 13.335$ ,  $R^2 = 0.981$ ，如 Figure 4.3 所示)；chlorogenic acid 之  $SC_{50}$  濃度為  $395.5 \mu\text{M}$  ( $y = 0.1001x + 10.41$ ,  $R^2 = 0.9792$ ，如 Figure 4.4 所示)；luteolin 之  $SC_{50}$  為  $195.81 \mu\text{M}$  ( $y = 0.1839x + 13.99$ ,  $R^2 = 0.9209$ ，如 Figure 4.5 所示)；apigenin 之  $SC_{50}$  為  $995.05 \mu\text{M}$  ( $y = 0.039x + 11.193$ ,  $R^2 = 0.9382$ ，如 Figure 4.6 所示)。

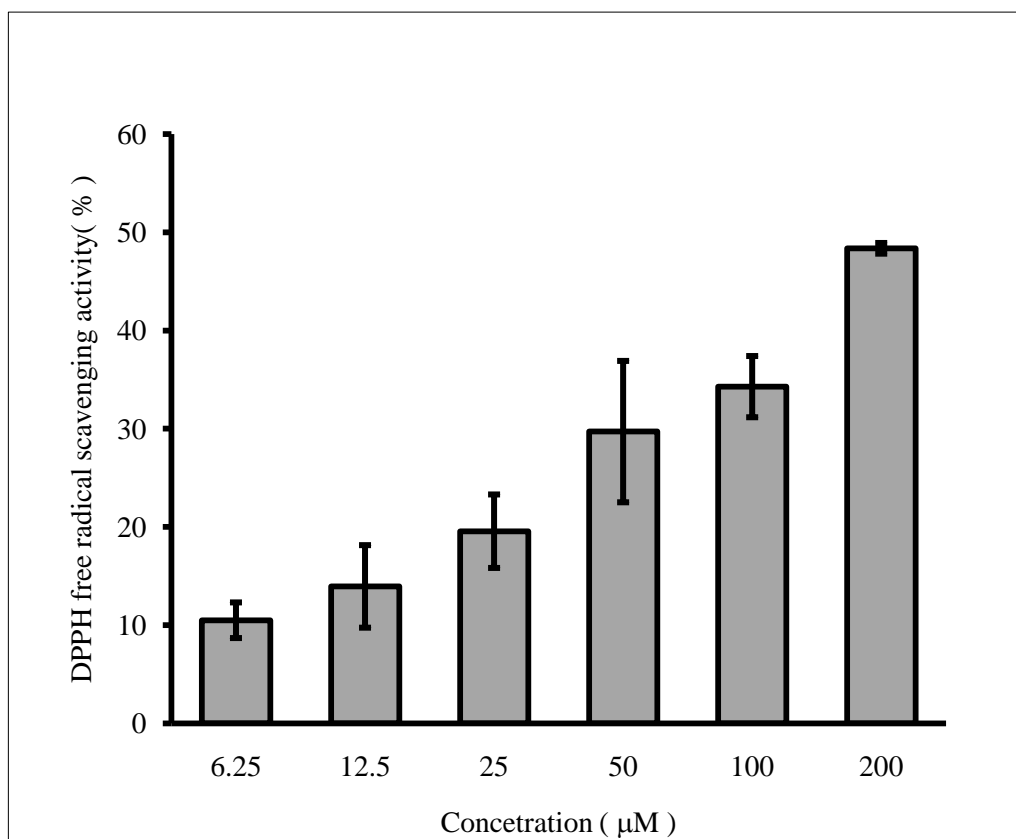
實驗結果顯示在清除自由基能力方面，gallic acid > luteolin > chlorogenic acid > apigenin。



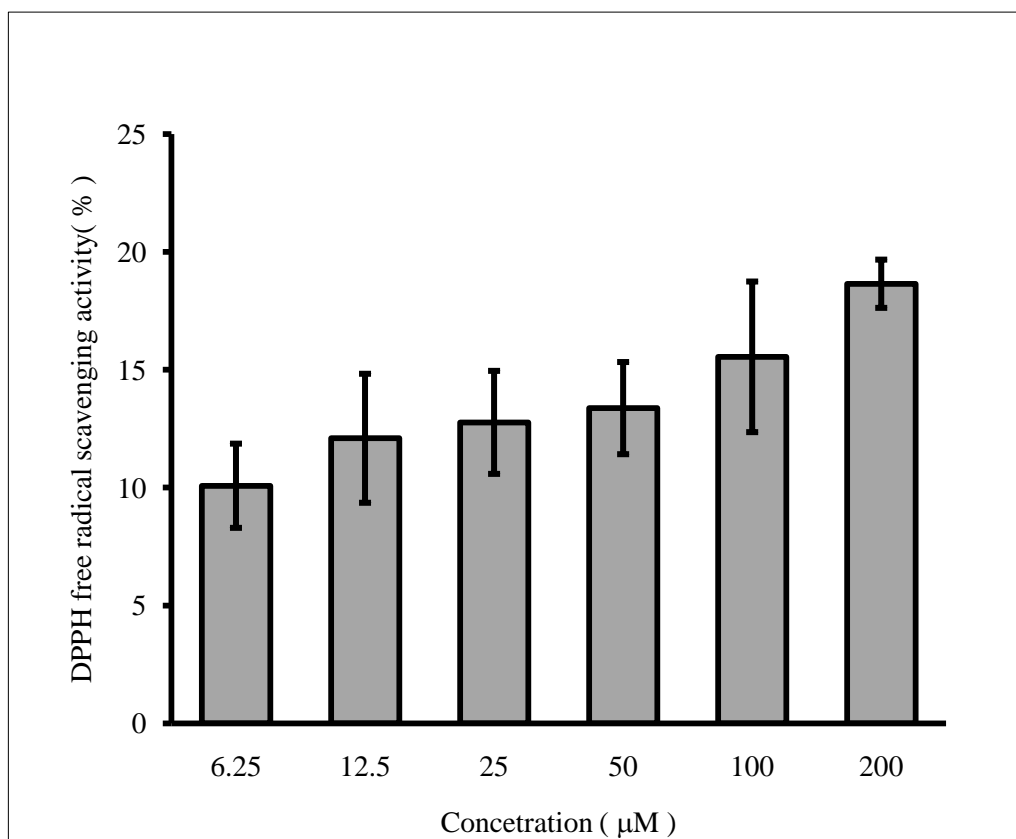
**Figure 4.3 DPPH free-radical scavenging ability of gallic acid**



**Figure 4.4 DPPH free-radical scavenging ability of chlorogenic acid**



**Figure 4.5 DPPH free-radical scavenging ability of luteolin**



**Figure 4.6 DPPH free-radical scavenging ability of apigenin**



## 4.2 動物實驗 (I) -降血脂療效評估

### 4.2.1 功能性指標評估

#### <1> 處理不同濃度 ECJ 八週後，對於高脂肪/高膽固醇飲食之小鼠體重增加與攝食量的影響

正常飲食與高脂肪/高膽固醇飲食之雄性 ICR 小鼠於八週飼養期間，每週測量一次體重，紀錄各組實驗小鼠之平均體重變化情形。各組初始體重無顯著性差異，8周後，其各組體重變化如 Table 4.2 所示，高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 之平均體重，比正常飲食組 (A 組) 平均體重大出 12.48%，具有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。ECJ 低劑量組 (C 組) 比正常飲食組 (A 組) 平均體重減少 15.11% ；比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 平均體重減少 25.70% ，皆有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。ECJ 高劑量組 (D 組) 比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 平均體重減少 16.85% ，有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。所有處理 ECJ 的實驗動物於實驗結束時其體重增加量 (weight gain) 皆少於其他組別，具有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ ) ，其中 ECJ 低劑量組 (C 組) 之體重增加量明顯比正常飲食組 (A 組) 少 53.33% ；比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 少 66.54% ，皆有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )；ECJ 高劑量組 (D 組) 之體重增加量明顯比正常飲食組 (A 組) 少

39.62% ，但沒有統計顯著性差異；比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 少 56.73% ，有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ ) 。ECJ 低劑量組 (C 組) 之體重增加比率和正常飲食組 (A 組) 及高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 皆有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ ) 。ECJ 高劑量組 (D 組) 之體重增加比率和高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ ) 。simvastatin 治療組 (E 組) 與高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 在最終體重、體重增加及體重增加比率方面皆無明顯差異。所有組別之攝食量皆無明顯差異。

**Table 4.2 The body weight, weight gain and daily feed intake of experimental mice**

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Weight gain (g)	Weight gain/ Initial body weight (%)	Daily feed intake (g day <sup>-1</sup> )
A	32.50 ± 2.50	45.80 ± 6.74 <sup>*</sup>	13.30 ± 5.85 <sup>*</sup>	40.89 ± 18.14	3.77 ± 0.85
B	33.76 ± 3.08	52.33 ± 8.99 <sup>#</sup>	18.56 ± 7.40 <sup>#</sup>	54.86 ± 20.20	3.42 ± 0.64
C	32.66 ± 2.47	38.88 ± 2.64 <sup>#*</sup>	6.21 ± 1.64 <sup>#*</sup>	19.17 ± 5.29 <sup>#*</sup>	3.48 ± 0.84
D	35.48 ± 4.58	43.51 ± 3.49 <sup>*</sup>	8.03 ± 3.22 <sup>#*</sup>	23.56 ± 10.90 <sup>*</sup>	3.18 ± 0.74
E	32.85 ± 1.75	50.68 ± 5.59	17.83 ± 7.03	55.27 ± 24.76	3.36 ± 0.79

<sup>#</sup> Indicates a p-value < 0.05 (*versus* group A). <sup>\*</sup> Indicates a p-value < 0.05 (*versus* group B).

A: normal diet group; B: high fat diet group; C: high fat diet + ECJ 20 mg/kg (low dose) ; D: high fat diet + ECJ 100 mg/kg (high dose) ; E: high fat diet + simvastatin (6 mg/kg) .

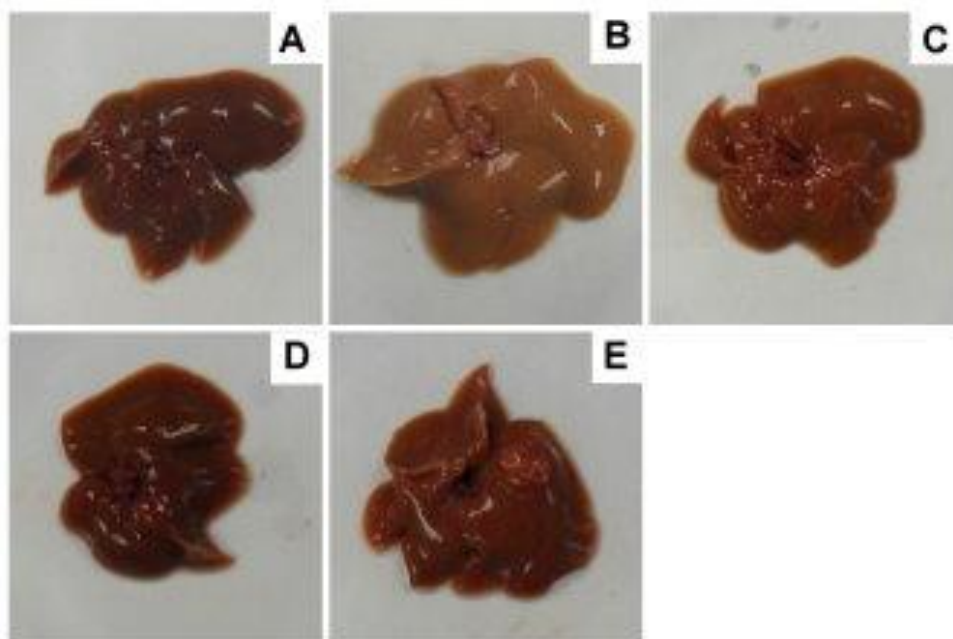
Data represent as the mean ± SD (n=6).

## <2> 處理不同濃度 ECJ 八週後，對於高脂肪/高膽固醇飲食之小鼠 肝臟外觀、重量及病理切片觀察

各組實驗小鼠於8周後犧牲取的的肝臟之外觀如 Figure 4.7 所示，可以發現高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 肝臟體積大於正常飲食組 (A 組)，而且顏色較正常組的肝臟淺並呈現出略黃的色澤，且較易破裂。所有處理 ECJ 的組別之肝臟體積明顯較高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 較小，體積大小與外觀顏色也與正常飲食組 (A 組) 肝臟較為接近。simvastatin 治療組 (E 組) 其肝臟體積大小、顏色則介於正常飲食組 (A 組) 與高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 之間。

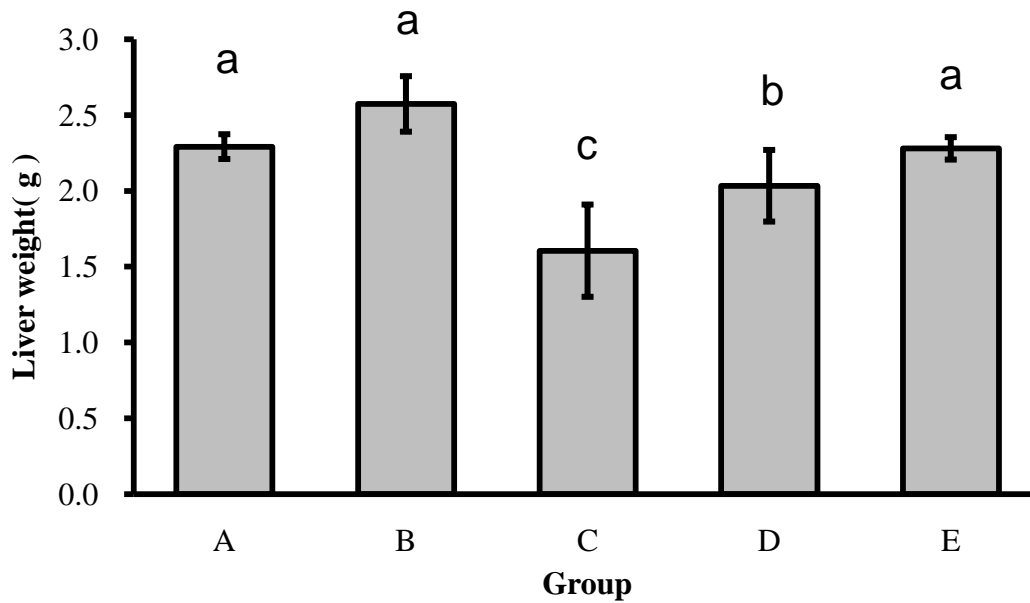
由 Figure 4.8 可知，小鼠經餵食不同劑量的 ECJ 8 週後，在肝臟重方面，所有處理 ECJ 的實驗動物均比其他組別低，且有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。

小鼠之肝臟病理切片染色圖如 Figure 4.9 所示。高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 其肝細胞細胞質可見脂肪小滴 (fat droplets) 蓄積，觀察其肝臟切片，明顯的發現肝細胞質被脂肪顆粒所佔據，但所有處理 ECJ 的組別與正常組肝組織之脂肪小滴較不明顯。而 simvastatin 治療組 (E 組) 也有類似情形，但肝細胞質被脂肪顆粒佔據之情形沒有高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 嚴重。



**Figure 4.7 Liver outward appearances of experimental mice**

A: normal diet group; B: high fat diet group; C: high fat diet + ECJ 20 mg/kg (low dose) ; D: high fat diet + ECJ 100 mg/kg (high dose) ; E: high fat diet + simvastatin (6 mg/kg) .

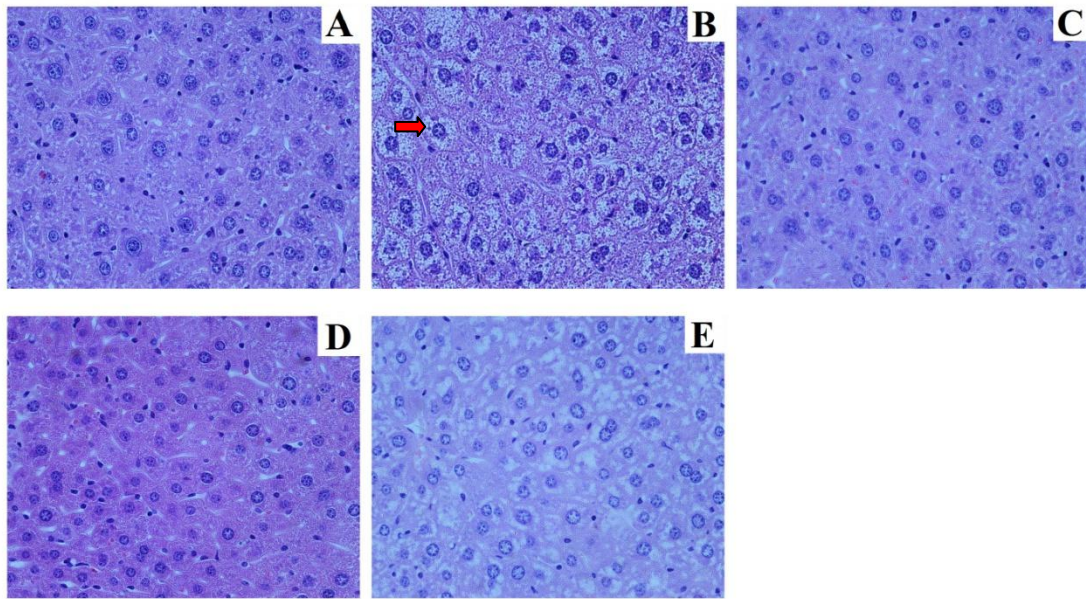


**Figure 4.8 Liver weight of experimental mice**

Experimental mice were fed with high fat diet after eight weeks of treatments with different concentrations ECJ.

Data represent as the mean  $\pm$  SD (n=6). Mean values within each bar with different superscripts are significantly different (p-value < 0.05).

A: normal diet group; B: high fat diet group; C: high fat diet + ECJ 20 mg/kg (low dose) ; D: high fat diet + ECJ 100 mg/kg (high dose) ; E: high fat diet + simvastatin (6 mg/kg) .



#### **Figure 4.9 Histopathological examination**

Representative H&E-stained liver sections are shown (original magnification 400×).

A: normal diet group; B: high fat diet group; C: high fat diet + ECJ 20 mg/kg (low dose) ; D: high fat diet + ECJ 100 mg/kg (high dose) ; E: high fat diet + simvastatin (6 mg/kg) .

### <3> 處理不同濃度 ECJ 八週後，對於高脂肪/高膽固醇飲食之小鼠血清脂質的影響

由 Table 4.3 可知，高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 在血清 TC 及 TG 方面，分別比正常飲食組 (A 組) 明顯高出 22.93% 及 38.74%。顯示本實驗之高脂肪/高膽固醇疾病動物模式誘導成功。ECJ 低劑量組 (C 組) 在血清 TC 及 TG 方面，分別比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 明顯減少 27.28% 及 50.81%，皆有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )，並較正常飲食組 (A 組) 少。ECJ 高劑量組 (D 組) 在血清 TC 方面，比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 明顯減少 9.80%，但無統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )；在血清 TG 方面，比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 明顯減少 53.75%，有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。simvastatin 治療組 (E 組) 在血清 TC 及 TG 方面，分別比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 明顯減少 33.76% 及 53.85%，皆有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )，並較正常飲食組 (A 組) 少。

TC/HDL-C 是一個動脈粥狀硬化的危險因子，而且與心血管疾病呈現正相關 (Tohidi et al., 2010; Zhang et al., 2009)。本實驗所有藥物處理之實驗動物的 TC/HDL-C 比值皆比 A 組少，有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。



**Table 4.3 Effects of ECJ on experimental mice performance serum lipidic parameters**

Group	Cholesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	Triglyceride (mg dL <sup>-1</sup> )	HDL-C (mg dL <sup>-1</sup> )	LDL-C (mg dL <sup>-1</sup> )	TC/ HDL-C	LDL-C / HDL-C
A	180.80 ± 29.80*	120.80 ± 36.59*	123.60 ± 18.89*	17.40 ± 4.97*	1.44 ± 0.05	0.14 ± 0.03
B	234.60 ± 51.77 <sup>#</sup>	197.20 ± 45.33 <sup>#</sup>	167.70 ± 24.89 <sup>#</sup>	33.20 ± 20.02 <sup>#</sup>	1.38 ± 0.10	0.18 ± 0.08
C	170.60 ± 33.91*	97.00 ± 16.07*	134.78 ± 25.32*	21.80 ± 6.05	1.26 ± 0.05 <sup>#*</sup>	0.15 ± 0.01
D	211.60 ± 28.60	91.20 ± 26.09*	163.38 ± 21.04 <sup>#</sup>	30.60 ± 6.65	1.30 ± 0.00 <sup>#</sup>	0.18 ± 0.03
E	155.40 ± 44.36*	91.00 ± 13.69*	120.82 ± 28.91*	17.40 ± 11.50*	1.24 ± 0.05 <sup>#*</sup>	0.13 ± 0.05

<sup>#</sup> Indicates a p-value < 0.05 (*versus* group A). \* Indicates a p-value < 0.05 (*versus* group B).

A: normal diet group; B: high fat diet group; C: high fat diet + ECJ 20 mg/kg (low dose) ; D: high fat diet + ECJ 100 mg/kg (high dose) ; E: high fat diet + simvastatin (6 mg/kg) .

Data are presented as mean ± SD. (n=6)

#### <4> 處理不同濃度 ECJ 八週後，對於高脂肪/高膽固醇飲食之小鼠 肝臟脂質的影響

由 Table 4.4 可知，高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 在肝臟 TC 及 TG 方面，分別比正常飲食組 (A 組) 明顯增加 4.52% 及 30.53%。ECJ 低劑量 (C 組) 在肝臟 TC 及 TG 方面，分別比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 明顯減少 21.06% 及 27.97%，皆有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )；而與正常飲食組 (A 組) 相比，亦分別減少 17.49% 及 5.97%。ECJ 高劑量 (D 組) 在肝臟 TC 及 TG 方面，分別比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 明顯減少 27.17% 及 8.82%；而與正常飲食組 (A 組) 相比，只有 TC 減少 23.88%，有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。simvastatin 治療組 (E 組) 與正常飲食組 (A 組) 相比，只有 TC 減少 2.61%，但有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ )，而 TC 及 TG 皆較高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 低。

**Table 4.4 Effects of ECJ on experimental mice performance hepatic lipidic parameters**

Group	Hepatic Cholesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	Hepatic Triglyceride (mg dL <sup>-1</sup> )
A	135.09 ± 33.21 <sup>*</sup>	175.82 ± 24.92 <sup>*</sup>
B	141.20 ± 11.98 <sup>#</sup>	229.50 ± 22.70 <sup>#</sup>
C	111.46 ± 15.84 <sup>#*</sup>	165.32 ± 89.32 <sup>#*</sup>
D	102.83 ± 15.83 <sup>#*</sup>	209.26 ± 15.28 <sup>#*</sup>
E	131.66 ± 49.11 <sup>#</sup>	197.51 ± 44.94

<sup>#</sup> Indicates a p-value < 0.05 (*versus* group A). <sup>\*</sup> Indicates a p-value < 0.05 (*versus* group B).

A: normal diet group; B: high fat diet group; C: high fat diet + ECJ 20 mg/kg (low dose) ; D: high fat diet + ECJ 100 mg/kg (high dose) ; E: high fat diet + simvastatin (6 mg/kg) .

Data are presented as mean ± SD. (n=6)

## <5> 處理不同濃度 ECJ 八週後，對於高脂肪/高膽固醇飲食之小鼠 糞便脂質的影響

糞便中之固醇類可能來自於未吸收之膳食及隨膽汁排出的膽固醇。如 Table 4.5 所示，高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 糞便膽固醇為  $18.94 \pm 0.75$  mg/dl 明顯高於正常飲食組 (A 組)  $12.48 \pm 1.48$  mg/dl，兩者間具顯著差異 ( $P < 0.05$ )。如 Table 4.5 所示，ECJ 各組及 simvastatin 治療組 (E 組) 之糞便脂肪排出量皆比正常飲食組 (A 組) 與高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 顯著高 ( $p < 0.05$ )，各組間皆有統計上的顯著差異。

**Table 4.5 Effects of ECJ on experimental mice performance fecal lipidic parameters**

Group	Fecal Cholesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	Fecal Triglyceride (mg dL <sup>-1</sup> )
A	12.48 ± 1.48*	15.70 ± 1.75*
B	18.94 ± 0.75 <sup>#</sup>	22.29 ± 0.85 <sup>#</sup>
C	22.50 ± 1.13 <sup>#*</sup>	25.12 ± 1.25 <sup>#*</sup>
D	23.46 ± 1.18 <sup>#*</sup>	25.53 ± 1.56 <sup>#*</sup>
E	25.80 ± 1.37 <sup>#*</sup>	28.30 ± 1.44 <sup>#*</sup>

<sup>#</sup> Indicates a p-value < 0.05 (*versus* group A). \* Indicates a p-value < 0.05 (*versus* group B).

A: normal diet group; B: high fat diet group; C: high fat diet + ECJ 20 mg/kg (low dose) ; D: high fat diet + ECJ 100 mg/kg (high dose) ; E: high fat diet + simvastatin (6 mg/kg) .

Data are presented as mean ± SD. (n=6)

#### 4.2.2 安全性指標評估

<1> 處理不同濃度 ECJ 八週後，對於高脂肪/高膽固醇飲食之小鼠血清肝功能指數的影響

如 Table 4.6 所示，AST 在各組間並無統計上的差異，但是發現所有處理 ECJ 的實驗動物在 ALT 方面明顯比正常飲食組 (A 組) 及高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 還低，具統計顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

**Table 4.6 Effects of ECJ on experimental mice performance plasma  
AST and ALT levels**

Group	AST (U dL <sup>-1</sup> )	ALT (U dL <sup>-1</sup> )
A	80.80 ± 21.15	38.40 ± 5.89
B	90.00 ± 25.79	57.80 ± 22.37
C	94.00 ± 12.58	25.20 ± 6.90 <sup>#*</sup>
D	98.20 ± 73.88	23.00 ± 1.22 <sup>#*</sup>
E	145.80 ± 126.39	53.60 ± 36.55

<sup>#</sup> Indicates a p-value < 0.05 (*versus* group A). <sup>\*</sup> Indicates a p-value < 0.05 (*versus* group B).

A: normal diet group; B: high fat diet group; C: high fat diet + ECJ 20 mg/kg (low dose) ; D: high fat diet + ECJ 100 mg/kg (high dose) ; E: high fat diet + simvastatin (6 mg/kg) .

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase.

Data are presented as mean ± SD. (n=6)

<2> 處理不同濃度 ECJ 八週後，對於高脂肪/高膽固醇飲食之小鼠  
血清腎功能指數的影響

如 Table 4.7 所示，所有處理高脂肪/高膽固醇飲食之實驗動物的 BUN 皆高於正常飲食組 (A 組)。但是各組間之 creatinine 值皆無統計顯著性差異。





**Table 4.7 Effects of ECJ on experimental mice performance plasma BUN and creatinine levels**

Group	BUN (mg dL <sup>-1</sup> )	creatinine (mg dL <sup>-1</sup> )
A	15.82 ± 0.67	0.16 ± 0.01
B	24.78 ± 7.67 <sup>#</sup>	0.12 ± 0.06
C	26.58 ± 1.96 <sup>#</sup>	0.15 ± 0.04
D	23.90 ± 2.37 <sup>#</sup>	0.13 ± 0.03
E	32.16 ± 3.06 <sup>#</sup>	0.14 ± 0.02

<sup>#</sup> Indicates a *p* value < 0.05 (*versus* group A). \* Indicates a *p*-value < 0.05 (*versus* group B).

A: normal diet group; B: high fat diet group; C: high fat diet + ECJ 20 mg/kg (low dose); D: high fat diet + ECJ 100 mg/kg (high dose); E: high fat diet + simvastatin (6 mg/kg ).

BUN: blood urea nitrogen.

Data are presented as mean ± SD. (n=6)

## 4.3 動物實驗 (II) - 急毒性測試

### 4.3.1 臨床症狀及死亡率觀察

本實驗之小鼠口服急毒性試驗是以 15 g/kg body weight 作為最高毒性測試劑量濃度，投予後連續觀察 14 天。結果顯示，灌食 15 g/kg 之給藥組雌雄鼠第 0 至 1 天出現焦躁情形，其中有一隻雄鼠的肛門及尾部可見淡褐色黏稠下痢便，第 2 天後全部恢復正常，試驗期間全部試驗鼠隻均無死亡（如 Table 4.8 所示），顯示對小鼠之口服急毒性的半致死劑量 ( $LD_{50}$ ) 大於 15 g/kg BW。另外如 Table 4.9 所示，給藥組在第 7 天體重及體重增加量皆比正常組低，但無統計學顯著性差異；在第 14 天時給藥組雌鼠體重及體重增加量比正常組高，給藥組雄鼠體重及體重增加量比正常組高，但皆無統計學顯著性差異。

**Table 4.8 Clinical signs and time course of death of mice after treated with ECJ in acute oral toxicity test**

Sex/Group	Animal No.	Clinical sign	Day after treatment								Mortality (%)	
			1	2	3	4	5	6	7	14		
Male												
N	10	Normal	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0
T	10	Diarrhea <sup>1</sup>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0
		Normal	9	10	10	10	10	10	10	10	10	0
Female												
N	10	Normal	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0
T	10	Diarrhea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
		Normal	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0

<sup>1</sup> Mice showed slight diarrhea after treated with ECJ and then recovered gradually post 1 day treatment.

Mortality (%) = (Dead No./Treated No.) × 100

N: normal group; T: 15 g/kg (BW) ECJ group

**Table 4.9 Changes of body weight and weight gain of mice after treated with ECJ at 0, 7, and 14 days in acute oral toxicity test**

Sex/Group	Animal	Body weight (g) /gain (g)		
	No.	0day (initial)	7day	14day
Male				
N	10	34.6 ± 2.1	40.8 ± 2.8/6.2 ± 2.2	44.0 ± 3.5/9.4 ± 2.4
T	10	34.5 ± 2.5	39.7 ± 2.1/5.2 ± 1.8	42.3 ± 2.2/7.8 ± 2.2
Female				
N	10	27.0 ± 1.6	28.7 ± 1.2/1.7 ± 0.8	29.4 ± 1.5/2.4 ± 1.1.
T	10	26.6 ± 1.1	27.6 ± 1.3/1.0 ± 0.6	30.3 ± 1.8/3.7 ± 1.9

N: normal group; T: 15 g/kg (BW) ECJ group

# Significant difference between the control and treated groups at  $p < 0.05$

Data are presented as mean ± SD. (n=10)

### 4.3.2 血液學評估

檢測實驗小鼠之血液，結果顯示白血紅素 (WBC)、紅血球數 (RBC)、血紅素 (HGB)、血球容積比 (HCT)、平均紅血球體積 (MCV)、平均血紅素 (MCH)、平均血紅素濃度 (MCHC) 及血小板 (PLT) 等檢測項目均介於正常值範圍內，相較於對照組之數值亦無統計學顯著性差異 (如 Table 4.10 所示)，表示在本實驗週期內血液學上不會造成顯著的變化。

**Table 4.10 Hematological parameters of mice after treated with ECJ in acute oral toxicity test**

Sex/ Group	WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg/cell)	MCHC (g/dL)	PLT (10 <sup>3</sup> /μL)
Male								
N	4.4 ± 1.1	8.96 ± 1.7	14.7 ± 2.0	48.2 ± 5.7	53.5 ± 1.8	16.4 ± 1.1	30.9 ± 2.1	699.9 ± 203.3
T	5 ± 1.4	8.75 ± 1.5	14.9 ± 1.9	47.9 ± 4.8	54.2 ± 1.9	16.5 ± 1.3	31.1 ± 2.4	750.6 ± 260.1
Female								
N	2.2 ± 1.0	8.63 ± 1.3	14.2 ± 1.2	45.6 ± 6.1	52.8 ± 1.2	16.7 ± 1.6	30.3 ± 2.9	735.0 ± 201.7
T	3.1 ± 1.3	8.66 ± 1.2	14.4 ± 1.1	46.0 ± 4.9	52.5 ± 1.4	16.2 ± 1.8	30.5 ± 3.0	672.7 ± 100.3

N: normal group; T: 15 g/kg (BW) ECJ group

WBC: white blood count; RBC: red blood cell; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT: platelets.

# Significant difference between the control and treated groups at p < 0.05

Data are presented as mean ± SD. (n=10)

### 4.3.3 血清肝及腎臟功能指數評估

檢查血清肝腎參數值結果顯示，AST, ALT, BUN 及 creatinine 等項目均無差異 ( $p > 0.05$ ) (如 Table 4.11 所示)，表示不會影響肝腎代謝物，而給藥組 BUN 值皆比對照組相對高，但無統計學顯著性差異，且本試驗 BUN 值皆在小鼠正常生理值範圍內。

**Table 4.11 Serum biochemistry changes in liver and renal function in mice treated with ECJ in acute oral toxicity test**

Sex/Group	AST (U dL <sup>-1</sup> )	ALT (U dL <sup>-1</sup> )	BUN (mg dL <sup>-1</sup> )	creatinine (mg dL <sup>-1</sup> )
Male				
N	98.2 ± 23.9	37.4 ± 5.8	17.8 ± 1.7	0.16 ± 0.1
T	95.8 ± 26.4	35.8 ± 2.4	18.58 ± 1.9	0.16 ± 0.0
Female				
N	80.8 ± 21.2	28.00 ± 1.2	16.8 ± 3.7	0.15 ± 0.0
T	88.0 ± 25.8	27.60 ± 3.6	18.9 ± 2.6	0.14 ± 0.0

N: normal group; T: 15 g/kg (BW) ECJ group

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BUN: blood urea nitrogen.

# Significant difference between the control and treated groups at  $p < 0.05$

Data are presented as mean ± SD. (n=10)



#### 4.3.4 臟器變化評估

量測實驗小鼠臟器重量發現對照組與給藥組之腦、心、肝、腎、脾和睪丸等臟器重量均與對照組無明顯差異（如所 Table 4.12 示）。所有實驗小鼠經解剖檢查臟器病變，結果顯示對照組與處理組之腦、心、肝、腎、脾和睪丸等重要臟器均無明顯肉眼病理變化（如 Figure 4.10 所示），對照組與處理組之腦、心、肝、腎、脾、睪丸和卵巢等重要臟器切片結果亦無發現明顯病理組織變化（如 Figure 4.11 及 Figure 4.12 所示），顯示 ECJ 對於體內重要器官在此實驗週期中並無造成毒性反應或病變。

**Table 4.12 Organ weight changes of mice treated with ECJ in acute oral toxicity test**

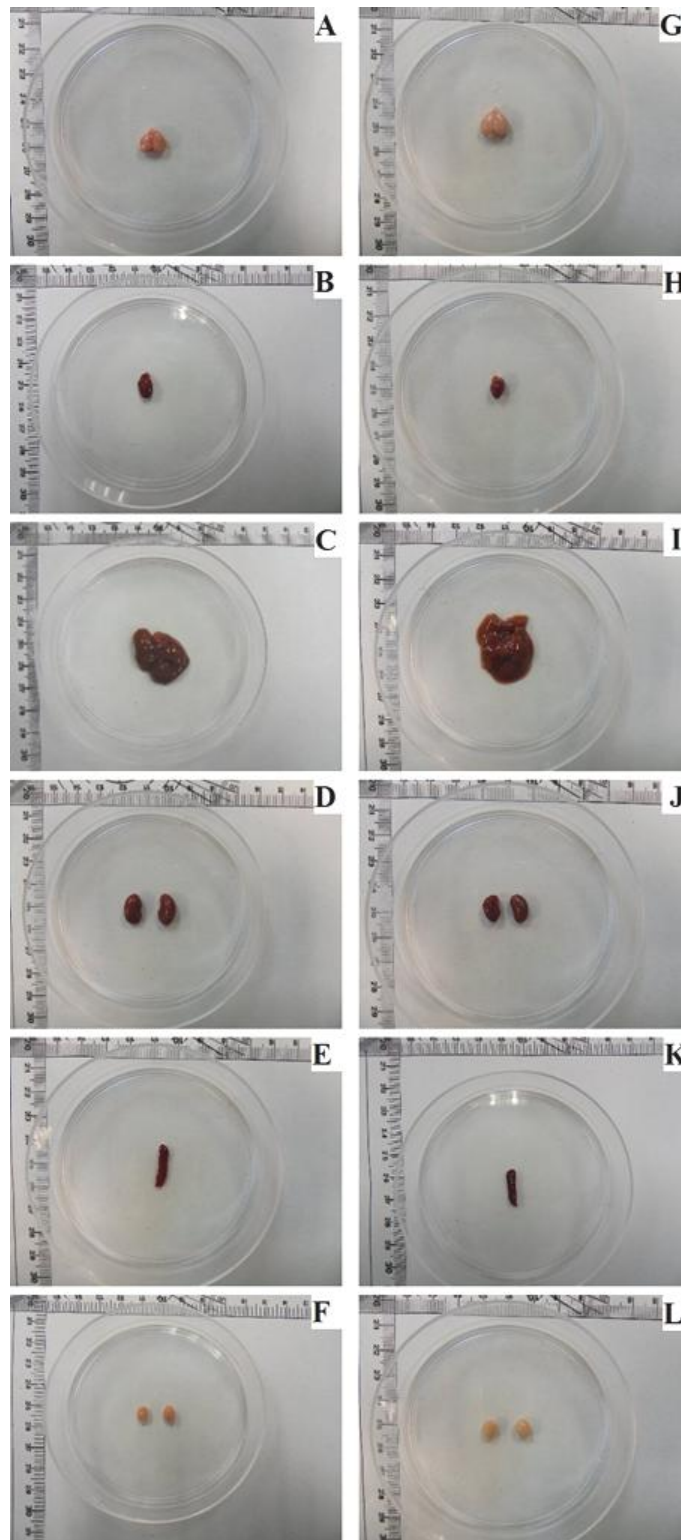
Sex/Group	Brain (%)	Heart (%)	Liver (%)	Kidney (%)	Spleen (%)	Testis (%)
Male						
N	0.86 ± 0.05	0.48 ± 0.04	4.93 ± 0.38	1.45 ± 0.07	0.26 ± 0.07	0.51 ± 0.04
T	0.83 ± 0.03	0.44 ± 0.03	4.43 ± 0.43	1.32 ± 0.07	0.28 ± 0.10	0.63 ± 0.02
Female						
N	1.21 ± 1.04	0.63 ± 0.07	5.34 ± 0.52	1.38 ± 0.08	0.34 ± 0.08	-
T	1.30 ± 1.10	0.51 ± 0.04	5.74 ± 0.58	1.25 ± 0.05	0.35 ± 0.09	-

Organ weight (%) = [organ weight (g) / final body weight (g)] × 100.

N: normal group; T: 15 g/kg (BW) ECJ group

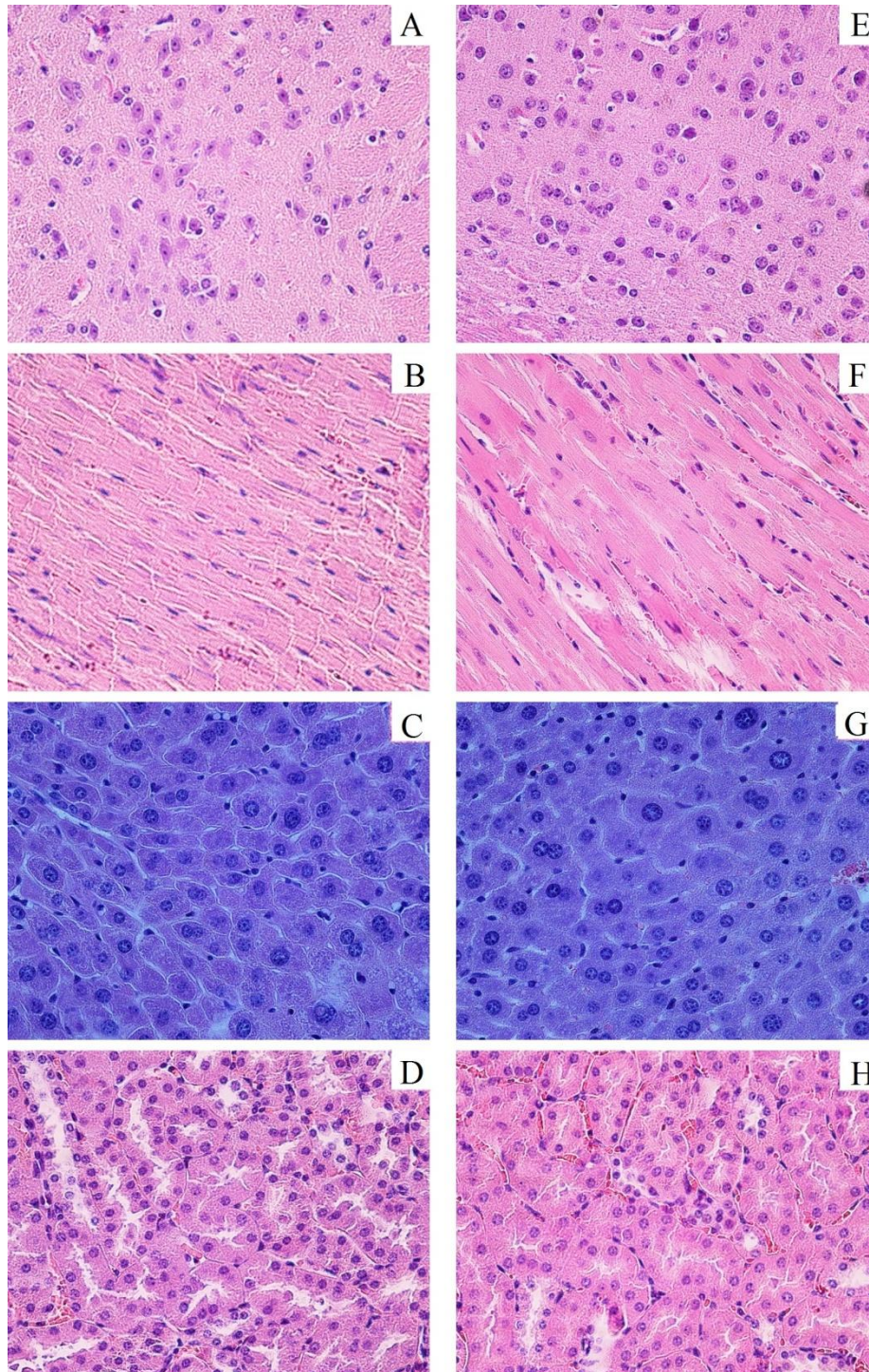
# Significant difference between the control and treated groups at  $p < 0.05$

Data are presented as mean ± SD. (n=10)



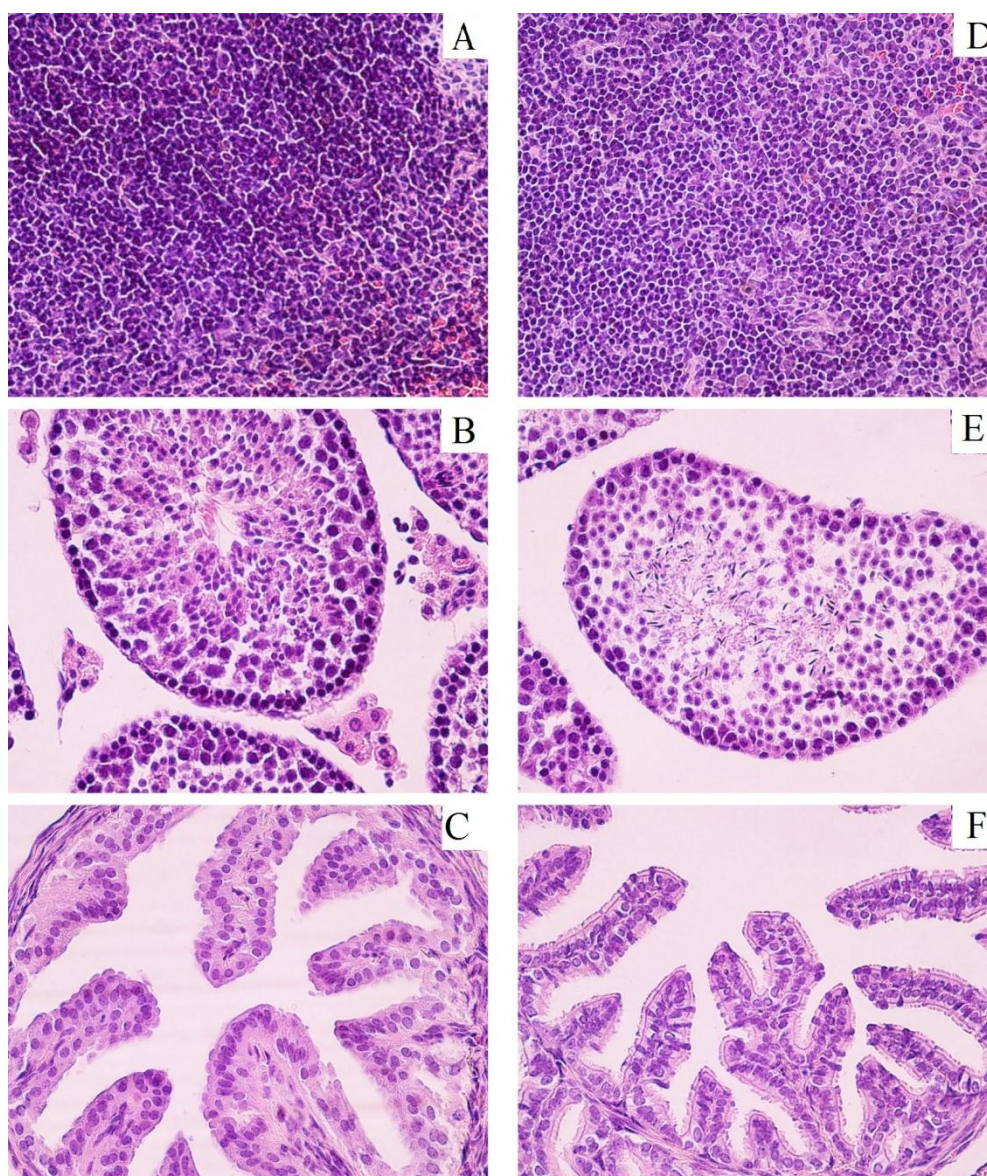
**Figure 4.10 Organe outward appearances of experimental mice in acute oral toxicity test**

No significant lesions of brain, heart, liver, kidney, spleen and testis were found in the normal (A, B, C, D, E, F) and treated (G, H, I, G, K, L) groups.



**Figure 4.11 Histopathological findings in acute oral toxicity test**

No significant lesions of various tissue were found in the treated mice (A: brain, B: heart, C: liver, D: kidney) compare with control mice (E: brain, F: heart, G: liver, H: kidney) (H&E stain, original magnification 400×).



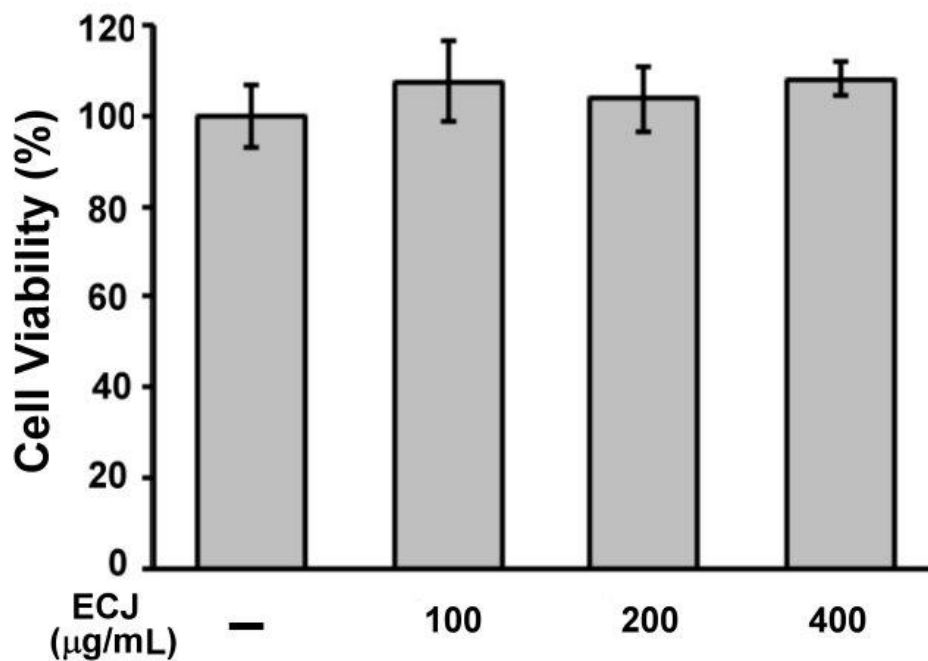
**Figure 4.12 Histopathological findings in acute oral toxicity test**

No significant lesions of various tissue were found in the treated mice (A: spleen, B: testis, C: ovarin) compare with control mice (D: spleen, E: testis, F: ovarin) (H&E stain, original magnification 400×).

## 4.4 細胞學實驗

### 4.4.1 細胞毒性測試

分別以不同濃度之 ECJ (0-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ) 來處理 HepG2 細胞 24h 以測試 ECJ 之細胞毒性。MTT 實驗結果如 Figure 4.13 所示，實驗使用劑量範圍 (100-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ) 並不會產生細胞毒性。



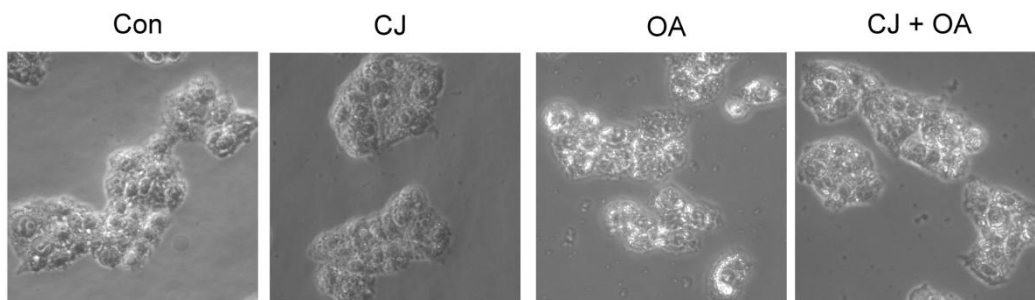
**Figure 4.13 Cell viability**

HepG2 cells were treated with various concentrations (0, 100, 200 and 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ) of ECJ for 24 h Cell proliferation was measured by MTT assay.

#### 4.4.2 ECJ 對 HepG2 細胞內脂肪堆積之影響

不管在正常個體或是非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 的患者體內，棕櫚油酸 (palmitic acid, C16 : 0) 和油酸 (oleic acid, C18 : 1) 皆是肝臟內的三酸甘油酯中含量最豐富的游離脂肪酸。因此，以棕櫚酸或油酸誘導人類肝細胞和 HepG2 細胞以形成脂肪超載 (Ricchi et al., 2009) 可作為研究肝臟脂質代謝的細胞學實驗模式。研究指出屬於單元不飽和類的油酸比棕櫚酸對細胞的毒性較小，而且可在體外建立之脂肪肝模式中防止或減輕棕櫚酸所導致的毒性 (Kohjima et al., 2009)。

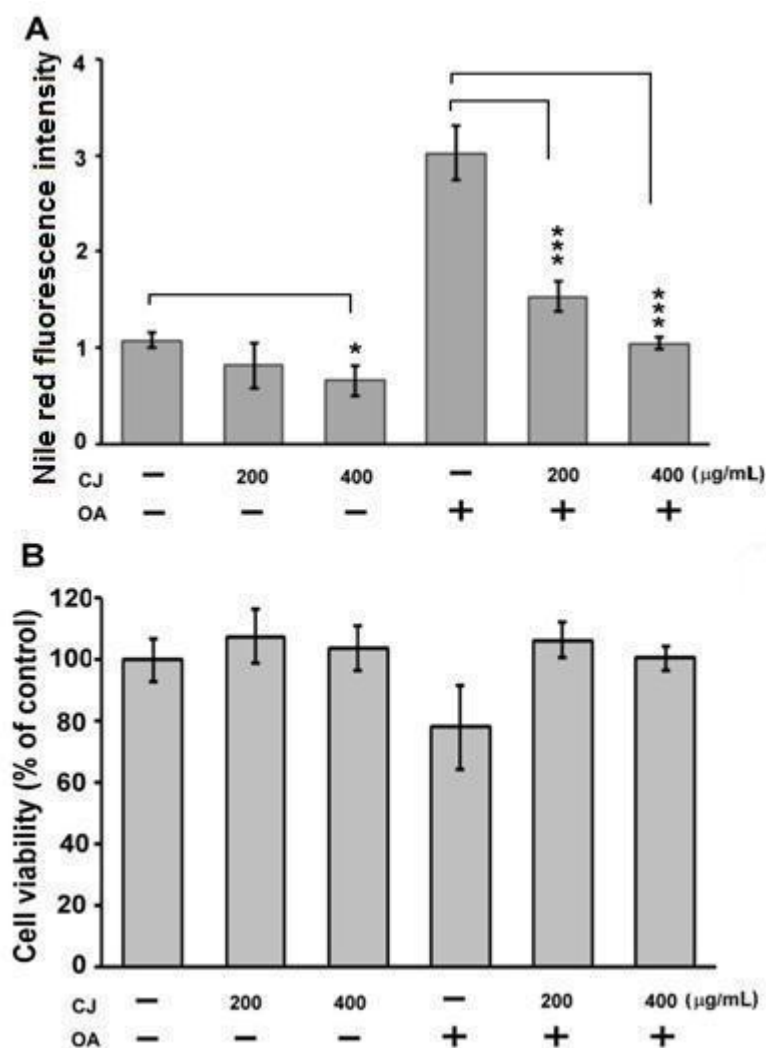
為觀察 ECJ 對肝細胞脂質堆積的影響，以不同濃度 (0, 100, 200 & 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 ECJ 和 1 mM 的油酸處理 HepG2 細胞 24 小時。如 Figure 4.14 所示，ECJ 明顯抑制由 oleic acid 誘發的脂質蓄積。脂肪油滴經 Nile red 染色定量結果顯示 (如 Figure 4.15 所示)，細胞內脂肪含量於合併處理 ECJ 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時較單獨處理 oleic acid 減少 49.33% ( $p < 0.001$ )；合併處理 ECJ 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時較單獨處理 oleic acid 減少 49.33% 減少 65.53% ( $p < 0.001$ )，MTT 結果顯示單獨處理 oleic acid 會造成細胞傷害，ECJ 的處理反而可以保護細胞免於 oleic acid 的傷害。



**Figure 4.14 Effects of ECJ on hepatic lipid accumulation**

HepG2 cells were cultured in a 12-well microplate at  $5 \times 10^4$  cells/well and treated with 1.0 mM oleic acid (OA) in presence or absence of ECJ (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h. Cells were examined under an inverted microscope (Leica DMIL) and photographs were taken with a Canon Power Shot S 70 digital camera.





### Figure 4.15 Qualitative analysis of lipid accumulation in HepG2 cells

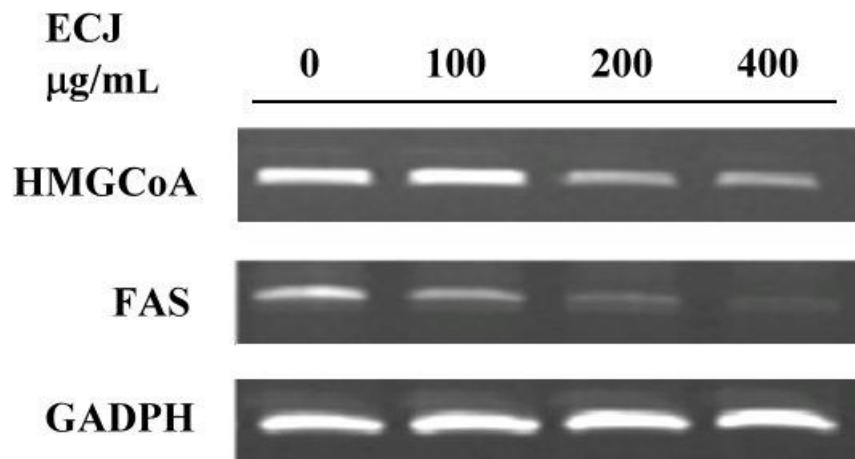
HepG2 cells were cultured in a 12-well microplate at  $5 \times 10^4$  cells/well and treated with 1.0 mM oleic acid (OA) in presence or absence of ECJ (200 and 400  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h.

(A) Quantitative measurement of intracellular lipids as assessed by Nile red labeling followed by Fluorescent Imaging Plate Reader (FLIPR) measurement. (B)

Determination of viable cell number by colorimetric MTT assay. Data are represented as the mean  $\pm$  S.E. for triplicate experiments. \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.4.3 ECJ 抑制 HepG2 細胞內脂肪合成基因之表現

根據前述之結果顯示鴨兒芹萃取物可明顯地抑制肝細胞的脂肪堆積。本研究接著以 RT-PCR 實驗以探討 ECJ 是否會影響脂肪代謝相關基因的表現。如 Figure 4.16 所示，ECJ 以劑量依賴性地抑制 FAS 及 HMG-CoA 的基因表現。這些數據顯示 ECJ 抑制脂質的蓄積乃是通過調控包含脂肪合成及膽固醇合成基因的表現。



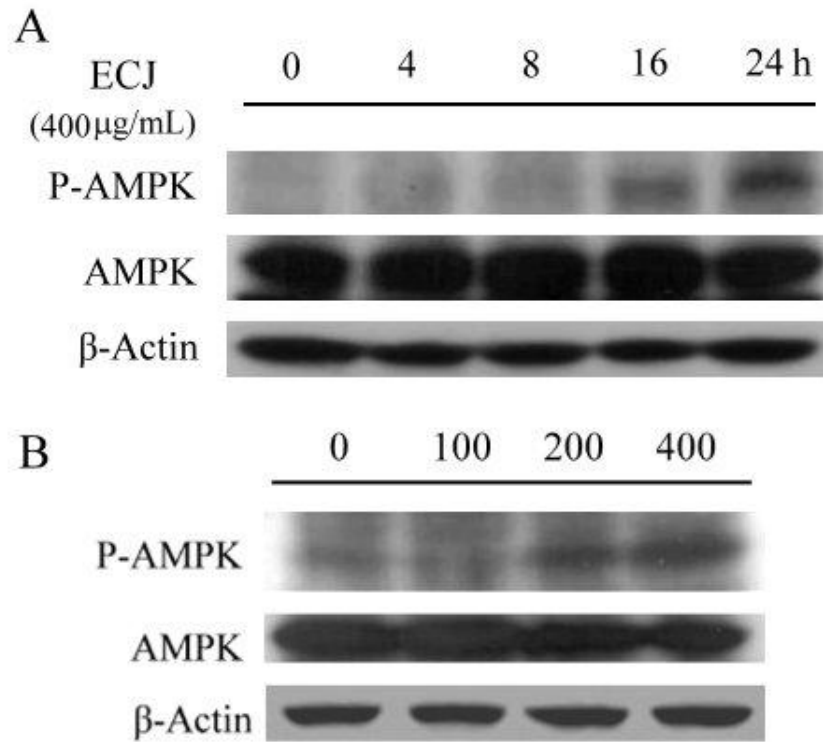
**Figure 4.16 Effects of ECJ on lipogenic related gene expression in HepG2 cells**

Cells were treated with 0-400 μg/mL ECJ for 24h. Total RNA was subjected to RT-PCR as described in “Materials and Methods”.

#### 4.4.4 ECJ 促進 HepG2 細胞內 AMPK 之磷酸化

有研究指出 AMPK 的活化會促進脂肪酸氧化及同時也會抑制脂肪及膽固醇的合成以維持細胞能量的恒定 (Liu, Huang, & Huang, 1995; Viollet et al., 2009)。接著我們將探討 ECJ 促進脂質代謝是否與 AMPK 的活性有關。於不同時間以同一劑量 (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 之 ECJ 或在固定時間以不同濃度之 ECJ (100-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 處理 HepG2 細胞，在每一時間點收集細胞及抽取蛋白進行西方墨點法分析。如 Figure 4.17 所示，ECJ 明顯地將 AMPK 磷酸化，並呈現時間及劑量效應。





**Figure 4.17 Effects of ECJ on AMPK Phosphorylation in HepG2 Cells**

Cells were treated with 400 μg/mL ECJ for the indicated times (A). Cells were treated with various concentrations of ECJ for 24h (B). Protein extracts were prepared and subjected to western blot analysis using phosphor-AMPK (pAMPK), AMPK, and β-actin antibodies. β-actin protein was used as an internal loading control.

## 第五章 討論

### 5.1 動物實驗

各組初始體重無顯著性差異，8周後，高脂肪/高膽固醇飲食組 (B組) 之平均體重，比正常飲食組 (A組) 平均體重大出 12.48% ，具有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ ) ，顯示本實驗之肥胖疾病動物模式誘導成功。在攝食量未減少情形下，ECJ 低劑量 (C組) 比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B組) 平均體重輕，亦比正常飲食組 (A組) 平均體重輕，加上所有處理 ECJ 的實驗動物於實驗結束時其體重增加量及體重增加比率皆少於其他組別，具有統計顯著性差異 ( $p < 0.05$ ) ，故推論 ECJ 成分中存在調控體內能量運用及代謝之作用，而不是因為降低食慾，減少攝食量產生之作用。

小鼠經實驗 8 週後，發現高脂肪/高膽固醇飲食組 (B組) 肝臟體積大於正常飲食組。在肝臟重方面，高脂肪/高膽固醇飲食組 (B組) 肝臟皆比其他組別為重，在病理切片部份也顯示其肝臟組織之脂肪蓄積嚴重。所有處理 ECJ 的組別之肝臟重量明顯較高脂肪/高膽固醇飲食組 (B組) 低，甚至也較正常飲食組 (A組) 低，體積與外觀顏色也與正常組肝臟較為接近，顯示 ECJ 對正常飲食也有降低肝脂肪堆積作用。有研究指出飲食中添加膽固醇會造成血漿及肝臟等組織膽固醇

堆積 (Fungwe, Cagen, Wilcox, & Heimberg, 1992; Fungwe, Cagen, Cook, Wilcox, & Heimberg, 1993) 。亦有研究指出，飲食中添加膽固醇會增加肝臟中膽固醇的濃度且肝臟膽固醇的增加會促進醃基輔酶 A：膽固醇醃基轉移酶 (acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, ACAT) 活性而使膽固醇堆積於肝臟 (Liu, et al., 1995) 。Fungwe 等人指出膽固醇的攝取會抑制肝臟中 HMG-CoA reductase 的活性，使得大量三酸甘油酯堆積在肝臟 (Fungwe, et al., 1992) 。在本研究中肝臟三酸甘油酯及總膽固醇含量部份，高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 比正常飲食組 (A 組) 高，故可確認添加高膽固醇飲食會造成小鼠肝臟三酸甘油酯與膽固醇之堆積。本實驗所添加高脂肪/高膽固醇亦會造成脂質及膽固醇於肝臟中累積，導致脂肪肝，因此推論此為高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 肝臟重量及大小明顯增加之原因。觀察病理切片油滴分布之情形顯示，所有處理 ECJ 之組別的肝組織之脂肪小滴較不明顯。而 simvastatin 治療組 (E 組) 也有類似脂肪蓄積情形，但肝細胞質被脂肪顆粒佔據之情形沒有高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 嚴重。綜合以上各點，故推論 ECJ 成分中存有調控肝內脂肪代謝之作用。而處理不同劑量 ECJ 組別之降肝臟 TC 效果皆相當顯著，甚至比 simvastatin 治療組 (E 組) 還顯著，在肝臟 TG 部份，ECJ 低劑量 (C 組) 不只比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 低，亦比正常飲食組 (A

組) 含量低，但是 ECJ 高劑量 (D 組) 效果不顯著，顯示在低劑量的 ECJ 有一定調控肝臟 TC 及 TG 之作用，並無劑量效應。

有研究指出攝取高脂肪飲食會使脂肪分解產生大量游離脂肪酸進入肝臟合成三酸甘油酯，使肝臟中三酸甘油酯含量增加，並增加血漿中三酸甘油酯含量 (Cheung, 1996)，如此可以解釋高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 之血漿三酸甘油酯含量比正常飲食組 (A 組) 高。而處理 ECJ 之各組別及 simvastatin 治療組 (E 組) 之血漿三酸甘油酯含量皆比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 低，甚至比正常飲食組 (A 組) 低，三組效果相當。飲食中膽固醇的攝取會反應在血漿中的膽固醇含量，如此可以解釋高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 之血漿總膽固醇含量比正常飲食組 (A 組) 高。而 ECJ 低劑量 (C 組) 及 simvastatin 治療組 (E 組) 之血漿總膽固醇含量皆比高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 低，兩組效果相當。有研究指出高脂肪/高膽固醇飲食會使肝臟細胞內之膽固醇含量上升，並且可能會使肝臟細胞 LDL-receptors 數目減少 (Roberts, Liang, Barnard, Kim, & Vaziri, 2004)，最後使血漿 LDL-C 濃度上升。而處理高脂肪/高膽固醇飲食之各組別之 LDL-C 濃度皆較正常飲食組 (A 組) 高，只有 simvastatin 治療組 (E 組) 和正常飲食組 (A 組) 含量較接近。而肝臟脂肪酸以 C 18:1 為主，是因為膽固醇的攝取會增加  $\Delta^9$  - desaturase 活性 (Leikin et al., 1987)，使



stearic acid (C 18:0) 易轉變成 oleic acid (C 18:1) ，造成 stearic acid 含量減少，oleic acid 增加，成為肝臟中主要脂肪酸 (Dictenberg, Pronczuk, & Hayes, 1995) 。在本研究中發現 ECJ 對於血漿及肝臟脂質作用並無劑量效應，推測為粗萃物中各成份 (包含降低及提高 TG 或 TC 合成) 有效作用劑量不同所導致。

ECJ 各組別及 simvastatin 治療組 (E 組) 之糞便脂肪排出量皆比正常飲食組 (A 組) 與高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 顯著高，顯示實驗使用之藥物皆有促進脂肪排除之作用。而高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 糞便膽固醇為  $18.94 \pm 0.75$  mg/dL 明顯高於正常飲食組 (A 組)  $12.48 \pm 1.48$  mg/dL ，兩者間具顯著差異 ( $P < 0.05$ ) 。但是高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組) 餵食高達 60% 脂肪飼料，因此推論給予小鼠高脂肪/高膽固醇飲食，可能因體內機制使多餘膽固醇儲存於肝臟，故降低糞便中膽固醇含量 (Liu, et al., 1995) 。

肝細胞中存在天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST) 與麩氨酸丙酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT) ，當肝細胞壞死時，血液中 AST 與 ALT 濃度增加代表的是肝細胞受損的程度，可以藉此了解肝臟遭破壞的情況。在臨床上，AST 為肝細胞損害與壞死、肝功能疾病 (例：肝硬化、肝炎、肝癌等) 及心肌梗塞等心血管疾病之判定指標，不過，AST 除存肝臟中，也存於骨骼肌、心肌、腎

臟、腦部、肺、胰臟、紅血球等器官或細胞；因此，AST 的值偏高，表示這些部位可能發生問題。ALT 亦為肝功能疾病之指標，ALT 主要存在肝細胞中，當肝臟受到傷害時，ALT 就會釋放到血液中，專一性較佳，其指數上升相對提高罹病之危險。高脂肪/高膽固醇飲食組 (B 組)，其 AST 與 ALT 值明顯高於正常飲食組 (A 組)，探究其可能原因為高膽固醇飲食引起肝臟代謝負擔，使血清 AST 與 ALT 濃度提高。所有處理高脂肪/高膽固醇飲食之組別的 AST 皆高於正常飲食組 (A 組)，但是數值皆為小鼠可容許之正常值 (Gass & Denicola, 1993)。而其中以 simvastatin 治療組 (E 組) 之值最高，研究指出 statin 類藥物會影響肝指數 (Chalasan, 2005)，故推論可能是因為 simvastatin 的作用導致。所有處理 ECJ 組別之 ALT 下降，為明確之肝臟保護作用證據。故推論 ECJ 可有效減輕高膽固醇飲食所引起脂肪堆積於肝臟而誘發之肝臟傷害。

本實驗中以 simvastatin 為西藥對照組 (Xu, Xu, & Ryan, 2009)，simvastatin 的功用為減少肝臟製造膽固醇，以及加速肝臟清除血液中的膽固醇。依臨床研究顯示 simvastatin 可有效降低其總血漿膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇，三酸甘油酯及極低密度脂蛋白膽固醇，並升高高密度脂蛋白膽固醇濃度。simvastatin 之活性型為 HMG-CoA 還原酶之專一性抑制劑；此 HMG-CoA 還原酶負責催化 HMG-CoA 轉換成

mevalonate，HMG-CoA 轉換成 mevalonate 為膽固醇生合成途徑之早期步驟。此外，HMG-CoA 也容易反向代謝成乙醯輔酶 A (acetyl-CoA)，其可參與體內許多生合成途徑。在動物研究中，simvastatin 於口服後，對肝臟具高度選擇性，為主作用部位，在此其濃度遠比非標的組織為高，在肝臟經廣泛之首渡 (first pass) 效應代謝後，隨後即排泄於膽汁中。

國內學者鄭明清等的研究顯示鴨兒芹種子精油萃取物有降血脂及提升 HDL-C 之作用，但攝食鴨兒芹種子精油會減少實驗動物食慾 (鄭明清，2004)。本研究結果顯示鴨兒芹全草醇萃物之降血脂作用明顯，尤其是在血液 TG 部分較種子精油萃取物佳，且 ECJ 不會影響實驗動物食慾。本研究使用全草萃取，相較於種子精油，其產率較高，更能充分利用材料以降低成本。

綜合口服急毒性安全評估實驗結果，ECJ 對小鼠口服急毒性之半致死劑量 (LD<sub>50</sub>) 為每公斤 > 15 g，是健康食品安全評估方法內單一劑量急毒性試驗測試最大劑量 (5 公克試驗動物/公斤動物體重) 的 3 倍，故 ECJ 在安全評估分類標準應是屬於低毒害甚或是無毒害物質。

## 5.2 細胞學實驗

有許多的文獻以 HepG2 細胞作為探討肝脂肪代謝作用機轉及藥

物篩選的模式 (Karthikesan, Pari, & Menon, 2010; Lin, et al., 2007; H. D. Yuan, et al., 2010) ，本研究首次以 HepG2 細胞探討鴨兒芹萃取物對肝脂肪代謝之調控，結果發現鴨兒芹萃取物確實會促進磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK) 的活化導致下游 FAS 和 HMGCoA 表現減少。AMPK 的活化會導致 phosphorylation 並調控下游參與脂肪代謝的標靶基因以維持能量狀態。AMPK 會因為細胞內之 AMP: ATP ratio 升高而活化 (Hardie, Scott, Pan, & Hudson, 2003) ，研究顯示，AMPK 對調控脂肪代謝有重要地位 (Li, Ge, Zheng, & Zhang, 2008) ，AMPK 的活化會導致 phosphorylation 並調控下游參與脂肪代謝的標靶基因以維持能量狀態，因此 AMPK 未來可為治療脂肪肝的標靶。在眾多的 AMPK 下游調控基因中，以 HMG-CoA reductase 及 ACC 被充分研究鑒定 (Ha, Daniel, Broyles, & Kim, 1994; Henin, Vincent, Gruber, & Van den Berghe, 1995) ，研究發現 AMPK 活化會抑制 ACC 及 HMG-CoA 的作用，並且發現是通過 sterol regulatory element binding protein 1s (SREBP1s) 來間接抑制 ACC 及 HMG-CoA 的表現 (Kohjima, et al., 2008; Park, et al., 2008) 。SREBPs (sterol regulatory element binding proteins) 為轉錄因子家族，包括 SREBP1a, SREBP1c 和 SREBP2 (Yuan, Shyy, & Martins-Green, 2009) 。SREBP1c 在肝中是一個關鍵的轉錄因子，會促進數種參與脂肪酸合成的脂肪合成酶其中包括 FAS,

ACC, 及 SCD1 (Awazawa et al., 2009; Tessari, Coracina, Cosma, & Tiengo, 2009) ; SREBP2 則是相對於調控特定參與膽固醇的合成及吸收的基因, 包括 LDLR 和 HMG-CoA。FAS 是一個脂肪生成的關鍵酶, 這使得它成為抗肥胖治療的一個重要標靶。AMPK 在脂質代謝中之角色也被近來的研究強調顯示它介導脂肪酸合成 (Kemp et al., 2003) 。有研究指出 FAS 的表現減少與 sterol response element binding protein-1 (SREBP-1) 的核轉移被抑制有關 (Weng, Ho, Ho, & Lin, 2007) 。此外, C/EBP $\alpha$  與 PPAR $\gamma$  這兩種蛋白質可以促進脂肪細胞的生長及脂肪新生; PPAR $\alpha$  則和脂肪的分解有關。而鴨兒芹萃取物是否是因為增加 AMP/ATP 比例而引發 AMPK 訊息路徑的活化; 以及鴨兒芹萃取物是否會調控 SREBPs, C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  和 PPAR $\alpha$  的表現, 將是未來研究的目標。

DPPH 清除率的實驗結果證明, ECJ 含有多種抗氧化物質, 包括 gallic acid, chlorogenic acid, luteolin 及 apigenin 等, 這些已知的抗氧化成份可能在 ECJ 對抗脂質自由基造成肝細胞損傷時扮演重要保護角色。從 HPLC 分析結果顯示 ECJ 中含有高量的綠原酸 (chlorogenic acid)。過去文獻指出綠原酸對於 STZ 誘導第二型糖尿病大鼠有降血脂作用 (Karthikesan, et al., 2010) , 鴨兒芹的功效是否與綠原酸有關將是日後研究的重點之一。

## 第六章 結論

過去有多文獻指出來自植物的某些成份具有降血脂及抑制脂肪肝形成之作用，顯示平日多攝取這些天然食材可作為預防高血脂及相關疾病最簡便的方法之一。本研究之動物實驗結果證明了鴨兒芹確實具有降血脂之功效；細胞學實驗也探討了其抑制肝脂肪堆積的作用機轉確實和 AMPK 活化有關，這些結果可作為日後開發天然保健食品之參考依據，也希望能提高農民栽種意願並增加其收入。

## 參考文獻

### 中文參考文獻

丁予安、何橈通、宋育民（2003）。*高血脂防治手冊國人血脂異常診療及預防指引*。台北市：行政院衛生署國民健康局。

林宗旦、林宗平、林景彬（1992）。*新編中藥大辭典*，台北新文豐出版社，2593- 2594。

黃涵、洪利（1988）。*台灣蔬菜彩色圖說*。台北市：國立台灣大學園藝系編印，82-87。

楊毓貞（2001）。山芹菜栽培之經濟分析。*農業世界*，214，84-87。

鄭明清（2004）。*數種芹菜精油成份分析及其降血脂之研究*。未出版碩士論文，彰化縣：大葉大學生物產業科技學系碩士班。

衛生署（1999）。*健康食品安全及功效評估方法*。台北市：作者。

衛生署（2010）。*98年死因統計結果分析*。2010年3月1日，取自：

<http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DisplayStatisticFile.aspx?d=75923&s=1>

## 英文參考文獻

- Anderson, J. W., & Hanna, T. J. (1999). Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *Journal of Nutrition*, 129(7 Suppl), 1457S-1466S.
- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W., & Fu, P. C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, 20(4), 470-475.
- Awazawa, M., Ueki, K., Inabe, K., Yamauchi, T., Kaneko, K., Okazaki, Y., et al. (2009). Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(1), 51-56.
- Ben Sahra, I., Laurent, K., Loubat, A., Giorgetti-Peraldi, S., Colosetti, P., Auberger, P., et al. (2008). The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral Effects in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene*, 27(25), 3576-3586.
- Carew, T. E., Schwenke, D. C., & Steinberg, D. (1987). Antiatherogenic Effects of probucol unrelated to its hypocholesterolemic Effects: evidence that antioxidants *in vivo* can selectively inhibit low density



- lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7725-7729.
- Chalasani, N. (2005). Statins and hepatotoxicity: focus on patients with fatty liver. *Hepatology*, 41(4), 690-695.
- Cheng, M. C., Lin, L. Y., Yu, T. H., & Peng, R. Y. (2008). Hypolipidemic and antioxidant activity of mountain celery (*Cryptotaenia japonica* Hassk) seed essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 3997-4003.
- Cheung, P. C. K. (1996). The hypocholesterolemic Effects of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research*, 16(10), 1721-1725.
- Choi, S. S., & Diehl, A. M. (2008). Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Lipidology*, 19(3), 295-300.
- Day, C. P., & James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 114(4), 842-845.

- Dictenberg, J. B., Pronczuk, A., & Hayes, K. C. (1995). Hyperlipidemic Effects of trans fatty acids are accentuated by dietary cholesterol in gerbils. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 6(7), 353-361.
- Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1343-1351.
- Elizabeth, K. E. (2001). A novel growth assessment chart for adolescents. *Indian pediatrics*, 38(9), 1061-1064.
- Environmental Protection Agency (USEPA)(1998). *OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 870.1100, Acute Oral Toxicity*. Washington, DC: Author.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Franz, M. (1986). Is it safe to consume aspartame during pregnancy? A review. Nutrition update. *Diabetes Education*, 12(2), 145-147.
- Fungwe, T. V., Cagen, L., Wilcox, H. G., & Heimberg, M. (1992). Regulation of hepatic secretion of very low density lipoprotein by

- dietary cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 33(2), 179-191.
- Fungwe, T. V., Cagen, L. M., Cook, G. A., Wilcox, H. G., & Heimberg, M. (1993). Dietary cholesterol stimulates hepatic biosynthesis of triglyceride and reduces oxidation of fatty acids in the rat. *Journal of Lipid Research*, 34(6), 933-941.
- Gass, T., & Denicola, D. (1993). *Veterinary Reference Guide*. New York: Eastman Kodak Company.
- Glass, C. K., & Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 104(4), 503-516.
- Greenspan, P., & Fowler, S. D. (1985). Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of Lipid Research*, 26(7), 781-789.
- Ha, J., Daniel, S., Broyles, S. S., & Kim, K. H. (1994). Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 269(35), 22162-22168.
- Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A., & Hudson, E. R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Letters*, 546(1), 113-120.
- Hardie, D. G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*, 117(Pt

23), 5479-5487.

Hardway, T. M. et al. (2004). Circumscription of Apiaceae tribe

Oenantheae. *South African Journal of Botany*, 70, 393-406.

Henin, N., Vincent, M. F., Gruber, H. E., & Van den Berghe, G. (1995).

Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(7), 541-546.

Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs:

activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1125-1131.

Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., Popovich, D. G., Vidgen, E.,

Mehling, C. C., Vuksan, V., et al. (2001). Effects of a very-high-fiber vegetable, fruit, and nut diet on serum lipids and colonic function. *Metabolism*, 50(4), 494-503.

Karthikesan, K., Pari, L., & Menon, V. P. (2010). Antihyperlipidemic

Effects of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. *Chemico-Biological Interactions*, 188(3), 643-650.

- Kemp, B. E., Stapleton, D., Campbell, D. J., Chen, Z. P., Murthy, S., Walter, M., et al. (2003). AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 1), 162-168.
- Ko, F. N., Huang, T. F., & Teng, C. M. (1991). Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta. *Biochimica et Biophysica Acta* 1115(1), 69-74.
- Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Nakashima, M., et al. (2009). The Effectss of unsaturated fatty acids on lipid metabolism in HepG2 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 45(1-2), 6-9.
- Kylin, E. (1923). Studien ueber das hypertonie-hyperglykmie-hyperurikmiesyndrome. *Zentralblatt Fuer Innere Medizin*, 44, 105-127.
- Lemieux, I., Pascot, A., Couillard, C., Lamarche, B., Tchernof, A., Almeras, N., et al. (2000). Hypertriglyceridemic waist: A marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small, dense LDL) in men? *Circulation*, 102(2), 179-184.

- Li, H. B., Ge, Y. K., Zheng, X. X., & Zhang, L. (2008). Salidroside stimulated glucose uptake in skeletal muscle cells by activating AMP-activated protein kinase. *European Journal of Pharmacology*, 588(2-3), 165-169.
- Lin, C. L., Huang, H. C., & Lin, J. K. (2007). Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells. *Journal of Lipid Research*, 48(11), 2334-2343.
- Liu, C. H., Huang, M. T., & Huang, P. C. (1995). Sources of triacylglycerol accumulation in livers of rats fed a cholesterol-supplemented diet. *Lipids*, 30(6), 527-531.
- Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B., & Oh, B. J. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings*, 55(7), 434-438.
- McMillian, M. K., Grant, E. R., Zhong, Z., Parker, J. B., Li, L., Zivin, R. A., et al. (2001). Nile Red binding to HepG2 cells: an improved assay for *in vitro* studies of hepatosteatosis. *In Vitro & Molecular Toxicology*, 14(3), 177-190.
- Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W. (2009). *Harper's Illustrated Biochemistry*. New York:

McGraw-Hill.

Musso, G., Gambino, R., & Cassader, M. (2009). Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in Lipid Research*, 48(1), 1-26.

Nakayama, T., Suzuki, S., Kudo, H., Sassa, S., Nomura, M., & Sakamoto, S. (2007). Effects of three Chinese herbal medicines on plasma and liver lipids in mice fed a high-fat diet. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2), 236-240.

Nozaki, Y., Fujita, K., Yoneda, M., Wada, K., Shinohara, Y., Takahashi, H., et al. (2009). Long-term combination therapy of ezetimibe and acarbose for non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 51(3), 548-556.

Olsson, A. G., & Nilsson, P. M. (2009). ["The lower LDL cholesterol levels, the better" still valid. Negative/neutral conclusions of three studies on statins do not change the clinical practice]. *Lakartidningen*, 106(12), 854-857.

Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595-1607.

Rensen, P. C., & van Berkel, T. J. (1996). Apolipoprotein E Effectively

inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 14791-14799.

Ricchi, M., Odoardi, M. R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., et al. (2009). Differential Effects of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(5), 830-840.

Richmond, W. (1973). Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clinical Chemistry*, 19(12), 1350-1356.

Roberts, C. K., Liang, K., Barnard, R. J., Kim, C. H., & Vaziri, N. D. (2004). HMG-CoA reductase, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, LDL receptor, SR-B1, and ACAT in diet-induced syndrome X. *Kidney International*, 66(4), 1503-1511.

Ross, R. (1993). Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplantation Proceedings*, 25(2), 2041-2043.

Sanyal, A. J., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W. B., Contos, M. J., Sterling, R. K., et al. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis:



association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities.

*Gastroenterology*, 120(5), 1183-1192.

Schaffner, F., & Thaler, H. (1986). Nonalcoholic fatty liver disease.

*Progress in Liver Diseases*, 8, 283-298.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992).

Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean

oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food*

*Chemistry*, 40(6), 945-948.

Singh, A., & Handa, S. S. (1995). Hepatoprotective activity of *Apium*

*graveolens* and *Hygrophila auriculata* against paracetamol and

thioacetamide intoxication in rats. *Journal of Ethnopharmacology*,

49(3), 119-126.

Tessari, P., Coracina, A., Cosma, A., & Tiengo, A. (2009). Hepatic lipid

metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition,*

*Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 19(4), 291-302.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP)

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High

Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report.

(2002). *Circulation*, 106(25), 3143-3421.

Thompson, G. R. (1989). *Handbook of Hyperlipidemia*. London: Current Science Ltd.

Tohidi, M., Hatami, M., Hadaegh, F., Safarkhani, M., Harati, H., & Azizi, F. (2010). Lipid measures for prediction of incident cardiovascular disease in diabetic and non-diabetic adults: results of the 8.6 years follow-up of a population based cohort study. *Lipids in Health and Disease*, 9, 6.

Tsi, D., Das, N. P., & Tan, B. K. (1995). Effectss of aqueous celery (*Apium graveolens*) extract on lipid parameters of rats fed a high fat diet. *Planta Medica*, 61(1), 18-21.

Verschuren, W. M., Jacobs, D. R., Bloemberg, B. P., Kromhout, D., Menotti, A., Aravanis, C., et al. (1995). Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures. Twenty-five-year follow-up of the seven countries study. *Journal of the American Medical Association*, 274(2), 131-136.

Viollet, B., Guigas, B., Leclerc, J., Hebrard, S., Lantier, L., Mounier, R., et al. (2009). AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 196(1), 81-98.

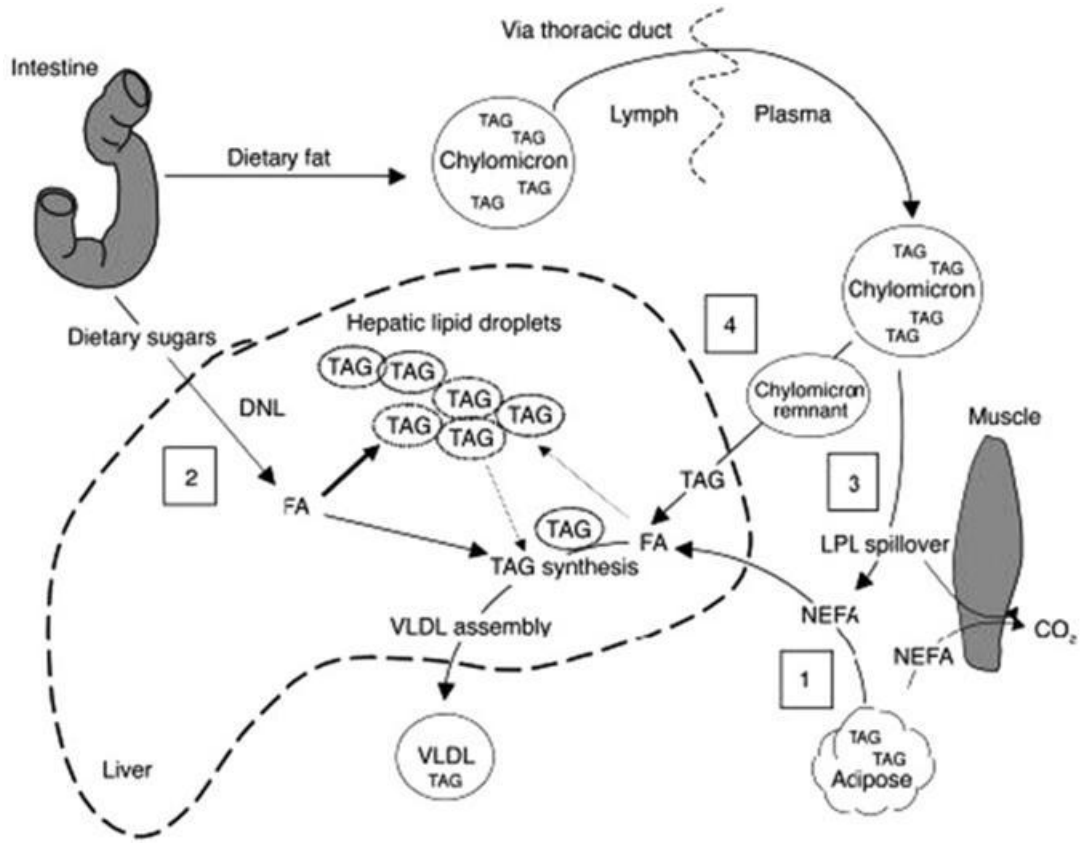
- Viollet, B., Mounier, R., Leclerc, J., Yazigi, A., Foretz, M., & Andreelli, F. (2007). Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders. *Diabetes & Metabolism*, 33(6), 395-402.
- Weng, M. S., Ho, C. T., Ho, Y. S., & Lin, J. K. (2007). Theanaphthoquinone inhibits fatty acid synthase expression in EGF-stimulated human breast cancer cells via the regulation of EGFR/ErbB-2 signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218(2), 107-118.
- Wayne, T. F., Alaupovic, P., Curry, M. D., Lee, E. T., Anderson, P. S., & Schechter, E. (1981). Plasma apolipoprotein B and VLDL-, LDL-, and HDL-cholesterol as risk factors in the development of coronary artery disease in male patients examined by angiography. *Atherosclerosis*, 39(3), 411-424.
- Xu, H., Xu, H. E., & Ryan, D. (2009). A study of the comparative effects of hawthorn fruit compound and simvastatin on lowering blood lipid levels. *The American Journal of Chinese Medicine (AJCM)*, 37(5), 903-908.
- Yang, P. M., Huang, G. T., Lin, J. T., Sheu, J. C., Lai, M. Y., Su, I. J., et

- al. (1988). Ultrasonography in the diagnosis of benign diffuse parenchymal liver diseases: a prospective study. *Taiwan yi xue hui za zhi. Journal of the Formosan Medical Association*, 87(10), 966-977.
- Yin, H. Q., Kim, M., Kim, J. H., Kong, G., Kang, K. S., Kim, H. L., et al. (2007). Differential gene expression and lipid metabolism in fatty liver induced by acute ethanol treatment in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 223(3), 225-233.
- Yuan, H., Shyy, J. Y., & Martins-Green, M. (2009). Second-hand smoke stimulates lipid accumulation in the liver by modulating AMPK and SREBP-1. *Journal of Hepatology*, 51(3), 535-547.
- Yuan, H. D., Yuan, H. Y., Chung, S. H., Jin, G. Z., & Piao, G. C. (2010). An active part of *Artemisia sacrorum* Ledeb. attenuates hepatic lipid accumulation through activating AMP-activated protein kinase in human HepG2 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(2), 322-328.
- Zang, M., Xu, S., Maitland-Toolan, K. A., Zuccollo, A., Hou, X., Jiang, B., et al. (2006). Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in

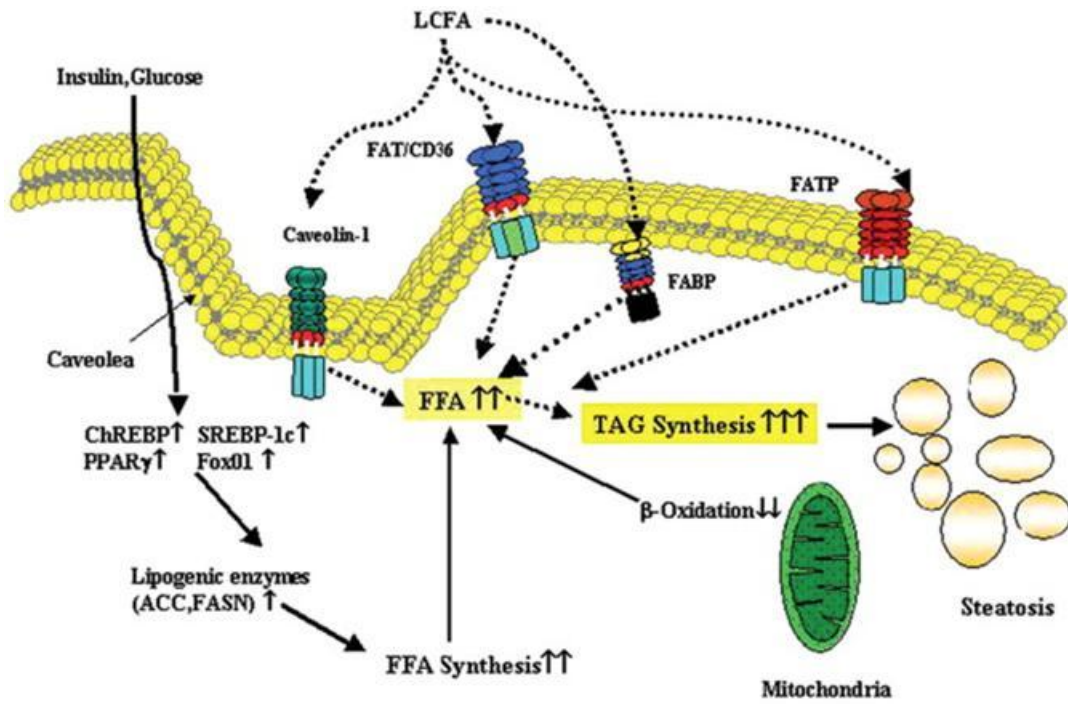
diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*, 55(8), 2180-2191.

Zhang, L., Qiao, Q., Tuomilehto, J., Hammar, N., Ruotolo, G., Stehouwer, C. D., et al. (2009). The impact of dyslipidaemia on cardiovascular mortality in individuals without a prior history of diabetes in the DECODE Study. *Atherosclerosis*, 206(1), 298-302.

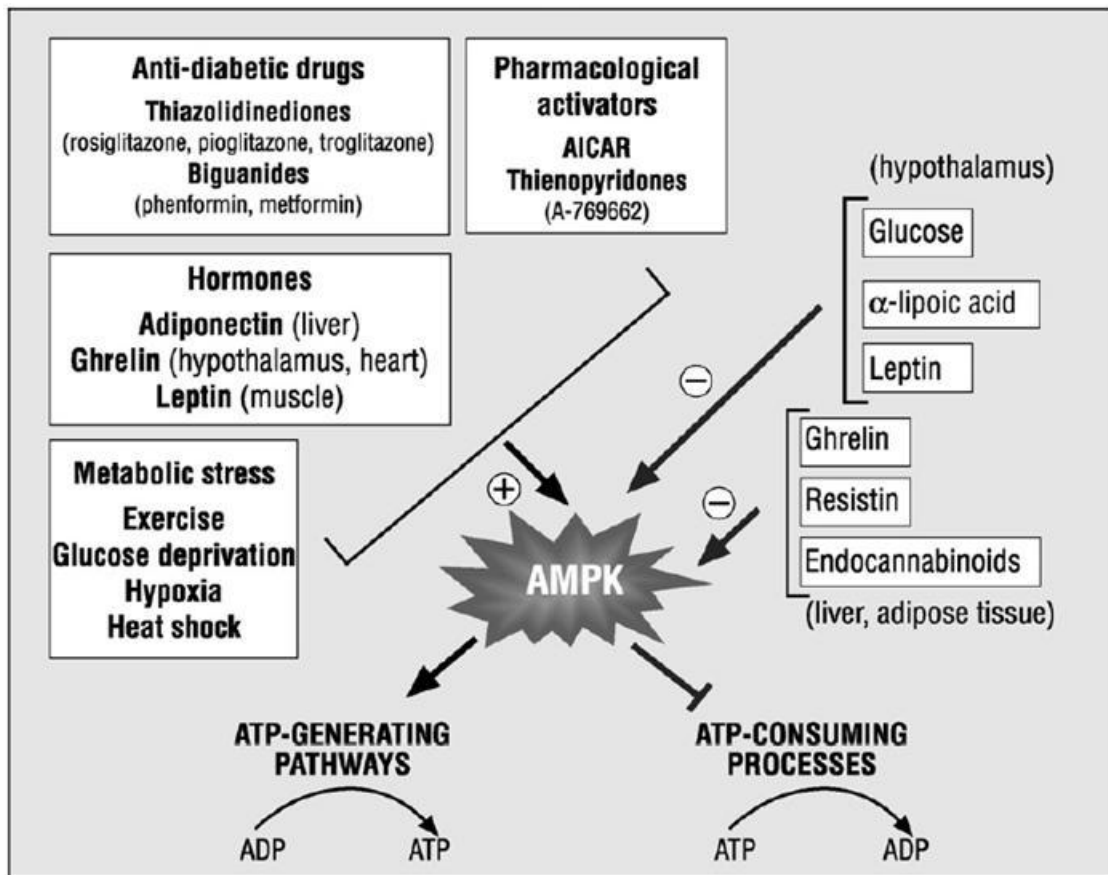
附圖



Attached Figure 1 Pathways contributing to hepatic triglyceride accumulation (Donnelly et al., 2005)



Attached Figure 2 Hepatic lipid metabolism and hepatic steatosis  
(Musso, Gambino, & Cassader, 2009)



Attached Figure 3 AMPK as a target of drugs, nutrients and hormones ( Viollet et al., 2007 )



## Formula

<b>Product #</b>	<b>D12492</b>	
	<b>gm%</b>	<b>kcal%</b>
Protein	26.2	20
Carbohydrate	26.3	20
Fat	34.9	60
	<b>Total kcal/gm</b>	100
	5.24	
<b>Ingredient</b>	<b>gm</b>	<b>kcal</b>
Casein, 80 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	0	0
Maltodextrin 10	125	500
Sucrose	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	245	2205
Mineral Mix, S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H <sub>2</sub> O	16.5	0
Vitamin Mix, V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Blue Dye #1	0.05	0
<b>Total</b>	<b>773.85</b>	<b>4057</b>

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

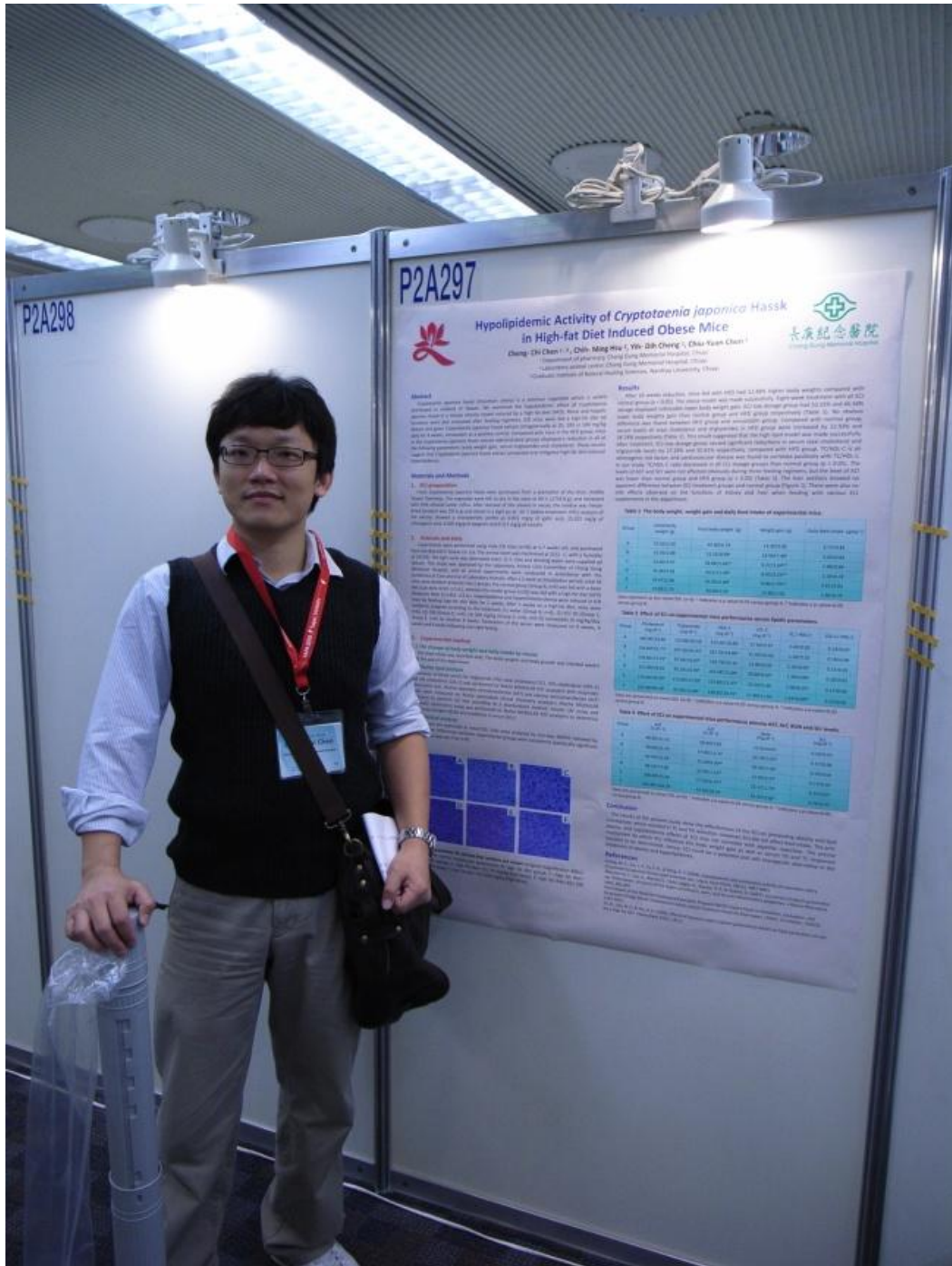
\*Typical analysis of cholesterol in lard = 0.95 mg/gram.

Cholesterol (mg)/4057 kcal = 232.8

Cholesterol (mg)/kg = 300.8

### Attached Figure 4 High fat diet formula (D12492)

# 附錄



本研究以壁報論文發表於 2010 年第 23 屆亞洲藥學會

(2010 年 11 月 7 日，臺北國際會議中心(TICC))