

## 【結案報告】

### 嘉南藥理大學 104 年度教師研究計畫-重點研究計畫

民生學院-台灣產蔬菜植物特定保健功效研究暨保健產品開發

子計畫一：白鳳菜萃取物之腸炎保護功效評估

主持人：黃惠玲

繳交日期：2016/2/28

#### (一) 摘要

環境因素會影響發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的病程進展，飲食因子也包含在內，白鳳菜 (*Gynura formosana*) 是本土蔬菜，富含多酚類化合物，具有抗氧化能力，因此我們選用 DSS (Dextran Sulfate Sodium) 誘發結腸炎小鼠當做人類潰瘍性結腸炎之實驗動物模式。本實驗室研究顯示：膳食炸油會顯著惡化 DSS (Dextran sulfate sodium) 誘導小鼠急性結腸炎病程，然而食用炸油造成此種亞健康狀態是否可被逆轉，乃本研究欲探討的重點，並評估本土食材-白鳳菜的介入是否具有緩和或降低病程的效應。實驗以 5 週齡 C57BL/6 品系雌鼠，隨機分成 15%新鮮油組與 15%炸油組，飼養四周後，15%新鮮油組分成正常組 (N)、控制組 (C)；炸油組分成四組：炸油組 (15%炸油，O)、對照組(15% 新鮮油，OC)、白鳳菜低劑量組(15%新鮮油+200 mg/kg 白鳳菜水草物，OGL)、白鳳菜高劑量組 (15%新鮮油+600 mg/kg 白鳳菜水草物，OGH)，飼料均以 AIN-93G 修正為 15% 高油飼料，令其自由攝取。飼養兩週後，除了 N 組以外，其餘組別均於飲用水中添加 2% (w/v) DSS 誘發急性結腸炎，每天計算疾病活動指數 (Disease activity index, DAI)，連續 5 天後換成蒸餾水 2 天後，隔夜禁食犧牲，採集血液與大腸，分析發炎相關細胞激素、酵素活性與大腸黏膜完整性相關基因 mRNA 表現。結果得知飼料改成新鮮油可顯著降低疾病活動指數，緩和急性結腸炎病程進展，降低小鼠死亡率，補充低劑量白鳳菜水草物，可顯著降低血清全身性發炎指標 Haptoglobin (Hp) 的濃度，具有抗發炎效應，可能具有逆轉炸油造成小鼠亞健康狀態的保健潛力。

**關鍵詞：**炸油、白鳳菜、DSS (Dextran sulfate sodium)、結腸炎

#### (二) 研究動機與研究問題

**研究動機：**發展本土蔬菜的附加醫用價值，選用含多酚類化合物、具有抗氧化能力的白鳳菜為研究食材。

**研究問題：**探討白鳳菜是否有緩和病症進展的功效，並試圖找出白鳳菜的有效食用劑量。



### (三) 文獻回顧與探討

潰瘍性結腸炎 (ulcerative colitis, UC) 與克隆氏症 (Crohn's disease, CD) 是人類常見兩種主要的慢性發炎性腸道疾病 (chronic inflammatory bowel disease, IBD)，慢性潰瘍性結腸炎患者是大腸癌之高危險群者之一，因此降低 UC 的病程將有助於減少將來罹患大腸癌的機率。結腸炎的發生原因不明，遺傳基因、環境與飲食因子交互作用均會影響病程的進展，其致病機制推測與局部黏膜免疫反應有關，包括免疫細胞的活化、上皮黏膜損傷，伴隨產生許多非特異性的發炎介質，例如細胞激素 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、生長因子、花生四烯酸代謝產物 (PGE<sub>2</sub> ...)、活性氧物質 (ROS) 與活性氮物質 (RNS，如 NO)，這些分子助長了慢性發炎過程，也與組織損傷有關；另外改變腸道黏膜組成與轉錄因子間的平衡也是可能影響腸炎病程進展的原因 (Khor et al., 2006; Langmann et al., 2006; Schmitz and Langmann, 2006)。

誘發 IBD 的動物模式有許多種方法，包括飲水添加化學藥劑 DSS (dextran sulfate sodium) 刺激或特殊調整性細胞激素基因剔除小鼠，如 IL-2、IL-10。學者利用飲水添加 DSS 誘發小鼠產生急性與慢性腸炎，其症狀很類似人類 UC 的表現，包括在急性期小鼠出現結腸黏膜發炎、潰瘍、血便、體重下降、結腸縮短，以及巨觀之結腸發炎分數與組織切片之隱窩發炎分數均顯著提高 (Melgar et al., 2005)。流行病學調查顯示罹病危險性與蔗糖、油脂 (單元不飽和與多元不飽和)、維生素 B6 攝取量成正相關，與果糖、鎂、維生素 C、水果攝取量呈負相關，不當的膳食因子或過度營養負荷會影響腸道的黏膜恆定與防禦能力 (Geerling et al., 2000; Reif et al., 1997)。

因此本研究本實驗採用 DSS (dextran sulfate sodium) 誘發小鼠腸道發炎模式，目的在於發展本土蔬菜的附加醫用價值，選用含多酚類化合物、具有抗氧化能力的白鳳菜為研究食材，探討白鳳菜是否有緩和病症進展的功效，並試著找出白鳳菜的有效食用劑量。

### (四) 研究方法與步驟

52隻5週齡之C57BL/6品系雌鼠分成兩組：15% 新鮮油組與15% 炸油組，經四週飼養後，15% 新鮮油組分成：正常組 (N)、控制組 (C)；炸油組分成：炸油組炸油組 (15% 炸油, O)、對照組(15% 新鮮油, OC)、白鳳菜低劑量組(15% 新鮮油+200 mg/kg 白鳳菜萃取物, OGL)、白鳳菜高劑量組(15% 新鮮油 + 600 mg/kg白鳳菜萃取物, OGH)，飼養兩週後，於飲水中添加 2% DSS<sup>[註]</sup> 誘發小鼠結腸炎，連續5天後換成2天蒸餾水，此期間每日紀錄體重、攝食量、糞便及活動力，並計算疾病活動指數 (disease activity index, DAI)，觀察補充白鳳菜萃取物及飼料中油脂的改變對小鼠結腸炎病程的影響，於第八天犧牲，收集血清、肝臟、結腸進行相關分析。

組織方面，取大腸測量總長度與秤重，分析抗氧化與發炎相關分子。結果均以平



均值 ± 標準偏差 (mean ± S.D.) 表示，先確認數據為常態分佈後，以 Two-way ANOVA 檢定雙因子的獨立效應及其交互作用，當雙因子之交互作用存在時，則以 Duncan's Multiple Range test 檢定各組獨立樣本之組間差異，將顯著性水準設定為  $p < 0.05$ ，各項統計分析係用商用統計軟體執行之。

1. 疾病活動指數 (Disease activity index, DAI) 分別有三個評分標準：

$$\text{DAI} = (\text{Fecal blood score} + \text{Diarrhea score} + \text{Weight lose score}) \div 3$$

Visible Fecal Blood Score：糞便流血程度，採用市售試劑組 (BASO fecal OB-II)，餵食 2% DSS 開始集每日糞便檢體於固定時段，收集後將其放入夾鏈中放置冰上，以保護 pseudoperoxidase 活性，利用試劑組內所附的檢查片，將糞便檢體使用木棒攪拌後，均勻塗抹於兩片檢驗片 (1.1cm × 1.8cm)，使用 Developer A (pyramidon 與 acetic acid) 滴在檢驗片上，等待試劑完全滲入檢驗片後再滴入 Developer B (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)，立即開始計時，判斷指示劑呈色的時間。

Diarrhea Score：腹瀉指數以糞便形狀與硬度來評斷。

0, normal pellets；1, Slightly loose feces；2, loose feces；3, watery diarrhea

Weight Lose Score：體重流失量。

0, normal；1, 1~5%；2, 6~10%；3, 11~15%；4, 16~20%；5, 21~25%；6, 26~30%；7, 31%以上

2. 血清指標：取得全血放置室溫 (25°C~30°C) 靜待 30 分鐘等其凝固，以 3500 rpm (HETTICH, UNIVERSAL 32 R) 於 4°C 下離心 30 分鐘，分離血清，少量分裝後，凍於 -80°C 冰箱，供日後分析。分析血清 Haptoglobin (Hp)：全身性發炎指標，採用市售試劑組 (mouse haptoglobin ELISA kit, ICL-E90HPT) 分析之。

[註] DSS: Dextran Sulfate Sodium Salt Reagent Grade (MP Biomedicals.LLC, CAT NO. 160110)，以二次水配置成 2% DSS，每天新鮮配置，每日更換。

## (五) 實驗結果與討論

1. 疾病活動指數

如圖 1-4 所示，DAI 指數方面，於急性腸炎誘發第 7 天，OC、OGL 與 OGH 組皆顯著低於 O 組，其中又以 OGH 較低，表示白鳳菜水草物與新鮮油的搭配能夠緩和炸油惡化結腸炎病程。

2. 免疫與發炎系統

如圖 5 所示，全身性發炎指標 Haptoglobin (Hp) 的血清濃度，除 N 組外，OGL 組顯著低於 O 組，表示炸油能加劇全身發炎狀況，補充白鳳菜水草物能明顯緩和其效應，高劑量白鳳菜水草物可顯著降低疾病活動指數，緩和腸炎病程進展。低劑量白鳳菜水草物可顯著降低血清中 Hp 濃度，降低發炎反應。



## (六) 結論

飼料改成新鮮油可顯著降低疾病活動指數，緩和急性結腸炎病程進展，降低小鼠死亡率，補充低劑量白鳳菜水草物，可顯著降低血清全身性發炎指標 Haptoglobin (Hp) 的濃度，具有抗發炎效應，可能具有逆轉炸油造成小鼠亞健康狀態的保健潛力。

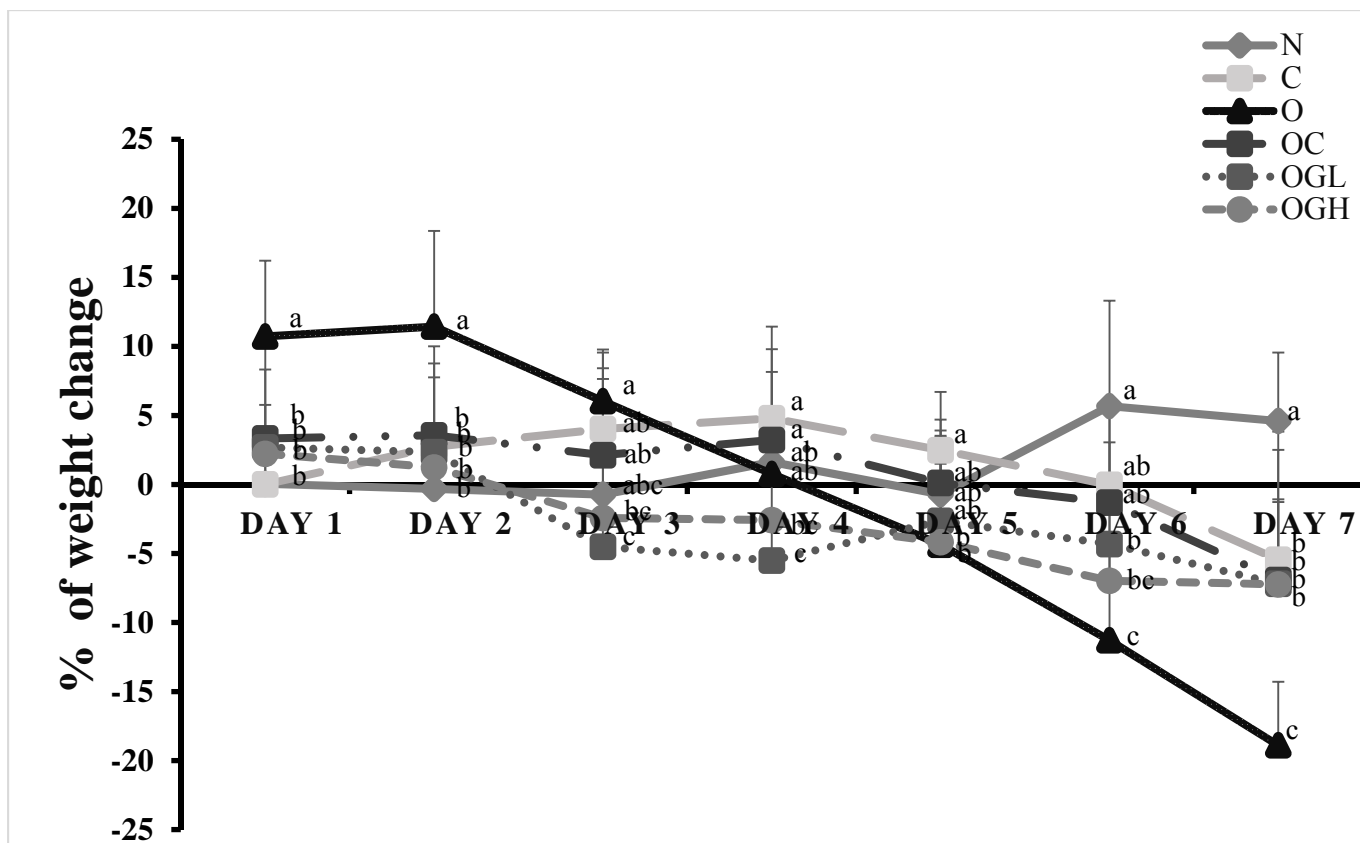


圖 1. 炸油與給予白鳳菜水草物對 DSS 誘導小鼠結腸炎之臨床分析 — 體重流失



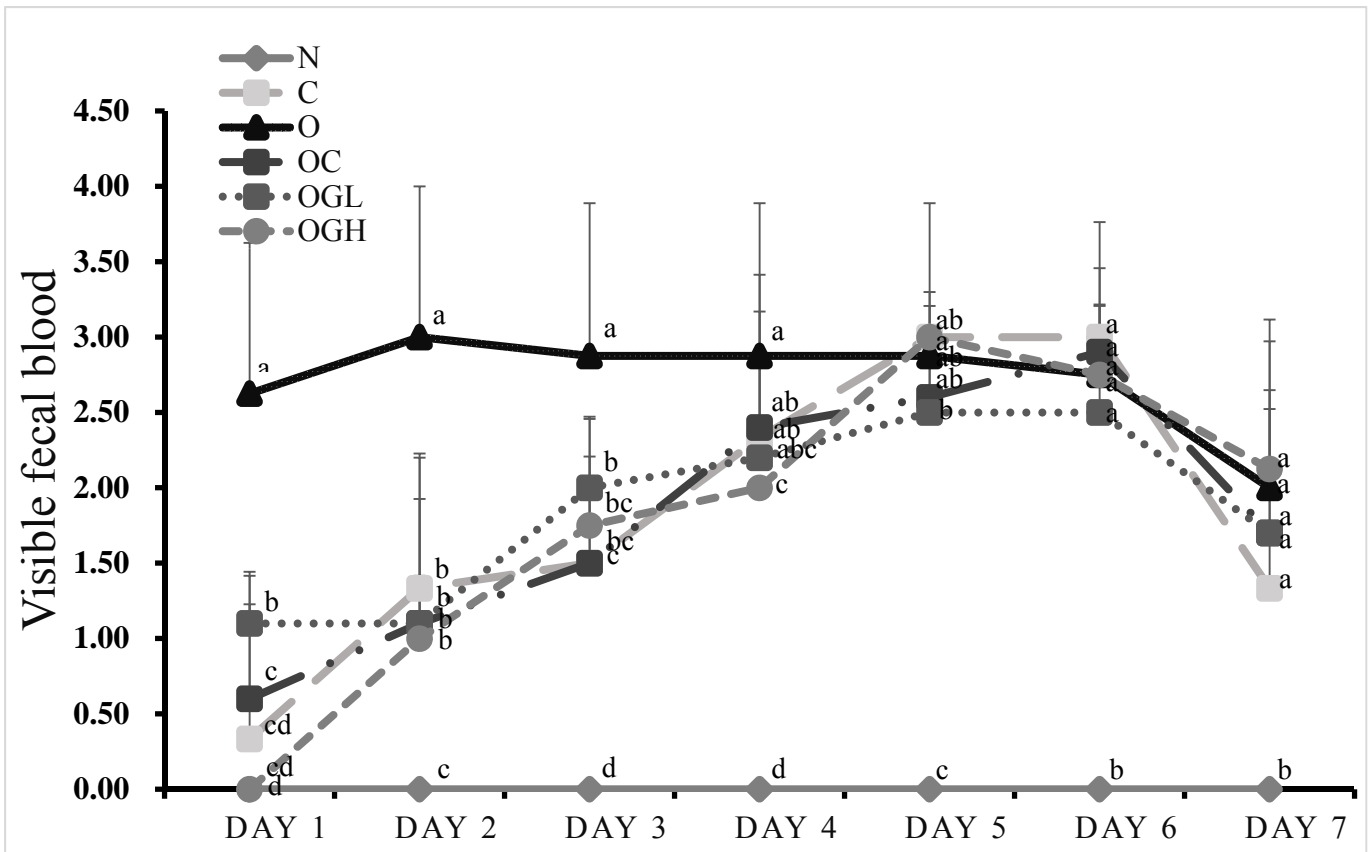


圖 2. 炸油與給予白鳳菜水萃物對 DSS 誘導小鼠結腸炎之臨床分析 — 血便程度

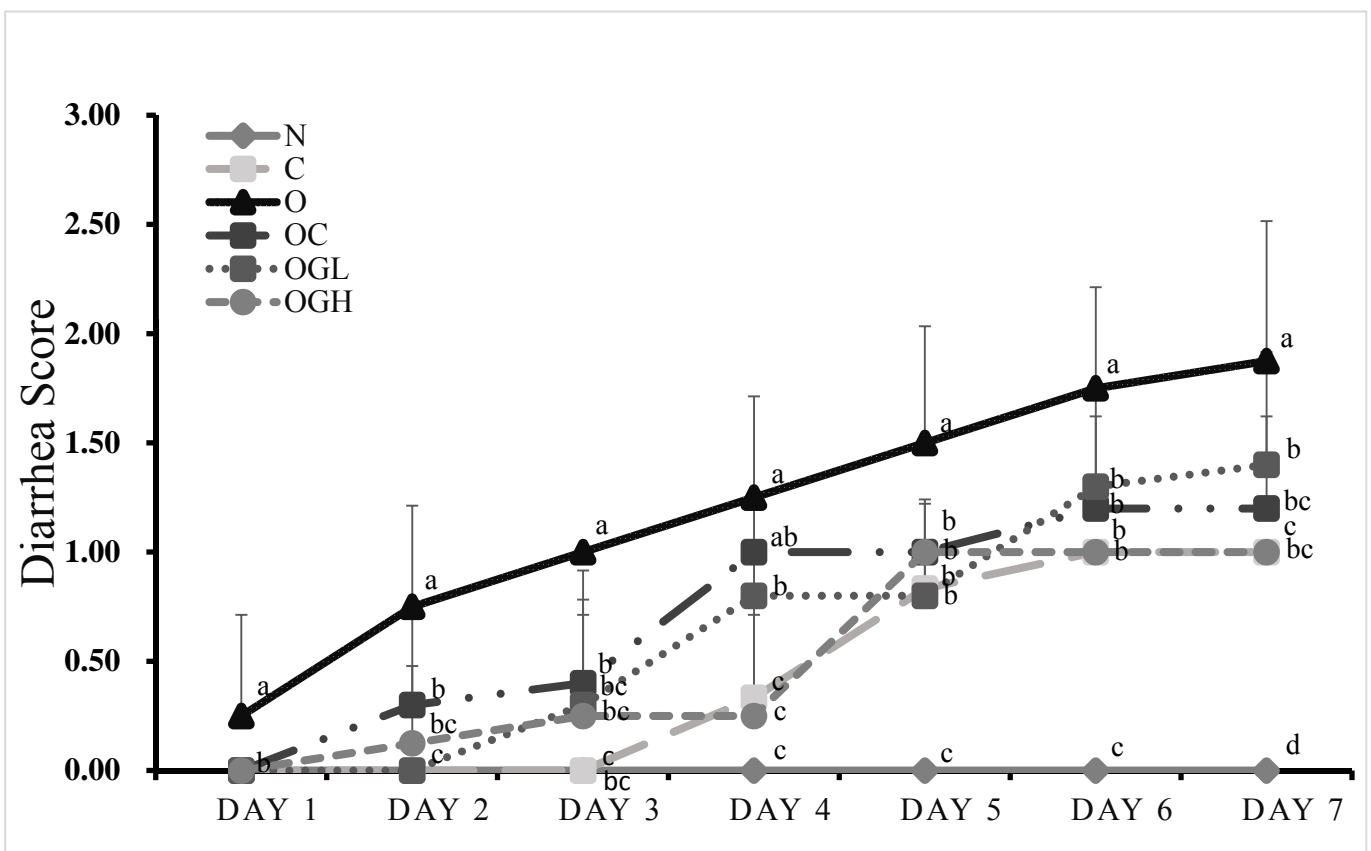


圖 3. 炸油與給予白鳳菜水萃物對 DSS 誘導小鼠結腸炎之臨床分析 — 腹瀉程度



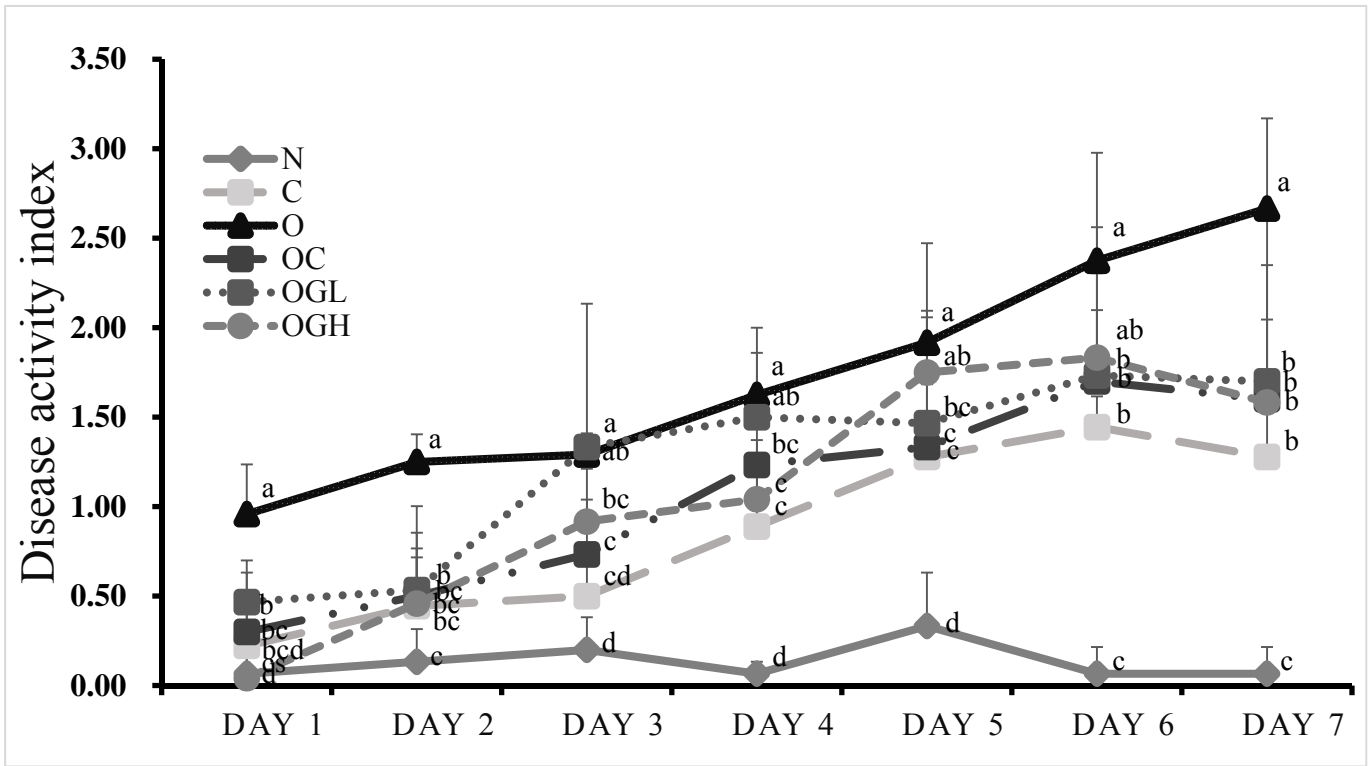


圖 4. 炸油與給予白鳳菜水萃物對 DSS 誘導小鼠結腸炎之臨床分析 — DAI 指數

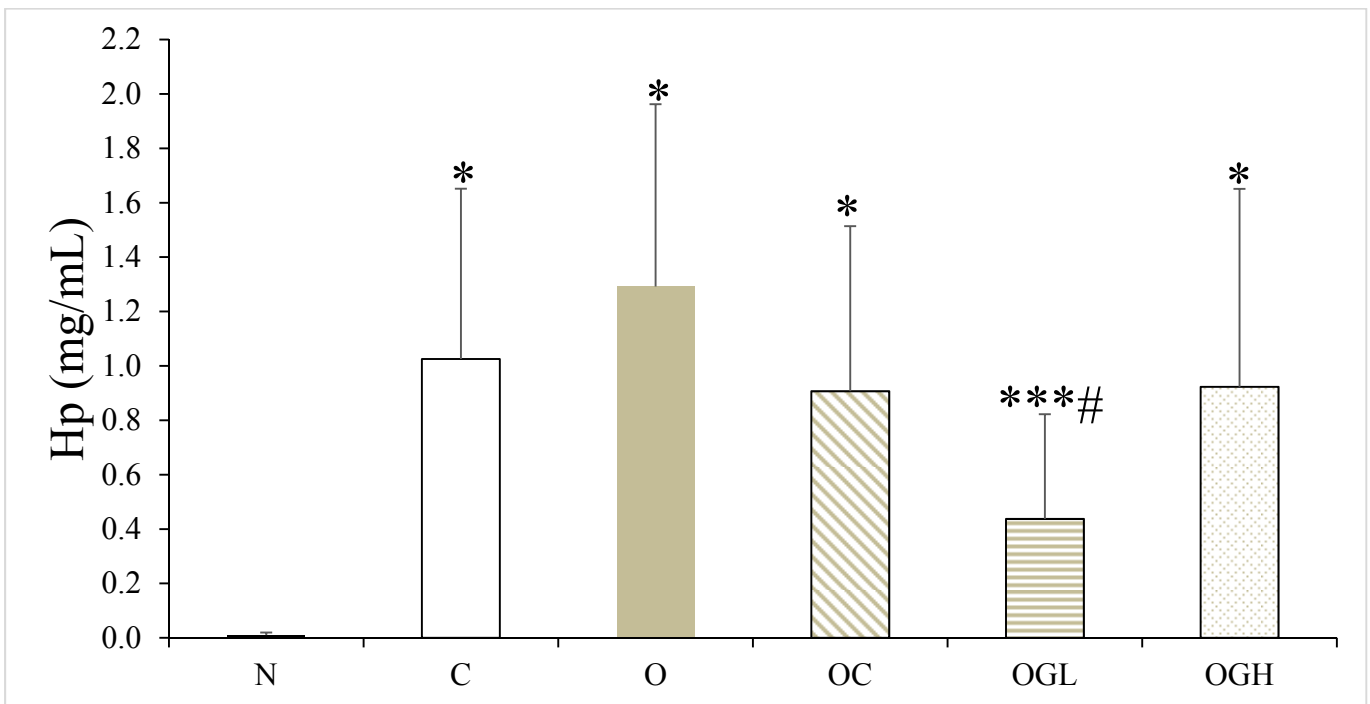


圖 5. 血清 Haptoglobin (Hp) 濃度。\*  $p < 0.05$  N group compared with the C group, O group, OC group, OGL group and OGH group. \*\*  $p < 0.05$  C group compared with the OGL group. #  $p < 0.05$  O group compared with the OGL group.



## (六)參考文獻

- Geerling, B.J., Dagnelie, P.C., Badart-Smook, A., Russel, M.G., Stockbrugger, R.W., and Brummer, R.J. (2000). Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 1008-1013.
- Hoebler, C., Gaudier, E., De Coppet, P., Rival, M., and Cherbut, C. (2006). MUC genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. *Dig. Dis. Sci.* 51, 381-389.
- Khor, T.O., Huang, M.T., Kwon, K.H., Chan, J.Y., Reddy, B.S., and Kong, A.N. (2006). Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer Res.* 66, 11580-11584.
- Li, W., Khor, T.O., Xu, C., Shen, G., Jeong, W.S., Yu, S., and Kong, A.N. (2008). Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF-kappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 76, 1485-1489.
- Liu, J. F. and Huang, C. J. (1995) Tissue alpha-tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil. *J Nutr.* 125 : 3071-80.
- Longman, R. J., Poulson, R., Corfield, A. P., Warren, B. F., Wright, N. A., Thomas, M. G. (2006). Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem.* 54, 1335-1348.
- Melgar, S., Karlsson, A., and Michaelsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G1328-G1338.
- Morante, M., Sandoval, J., Gomez-Cabrera, M.C., Rodriguez, J.L., Pallardo, F.V., Vina, J.R., Torres, L., and Barber, T. (2005). Vitamin E deficiency induces liver nuclear factor-kappaB DNA-binding activity and changes in related genes. *Free Radic. Res.* 39, 1127-1138.
- Reif, S., Klein, I., Lubin, F., Farbstein, M., Hallak, A., and Gilat, T. (1997). Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 40, 754-760.
- Schmitz, G., and Langmann, T. (2006). Metabolic learning in the intestine: adaptation to nutrition and luminal factors. *Horm. Metab. Res.* 38, 452-454.
- Wahli, W. (2008). A gut feeling of the PXR, PPAR and NF-kappaB connection. *J. Intern. Med.* 263,613-619.

