

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

紅藜及其活性成分之護肝效應與輔助調節血壓之研究(第3年)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：MOST 102-2313-B-041-001-MY3

執行期間：104年08月01日至105年10月31日

執行單位：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學食品科技系

計畫主持人：杜平惠

共同主持人：陳師瑩、褚錦承

計畫參與人員：學士級-專任助理人員：陳潔芸

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中 華 民 國 106 年 01 月 12 日

中文摘要：本三年期研究計畫為探討紅藜及其活性成分之護肝效應與輔助調節血壓之研究。結果顯示，10 - 250g/ml之紅藜水萃取物（WECF）具有抑制0.2 mM t-BHP誘發HepG2細胞毒性之能力，其作用機轉與其有效降低TBARS與ROS生成以及提升GSH含量有密切關連性。再者，WECF顯著性地調控IB-及PARP之降解，並抑制t-BHP誘發Caspase-3活性、膜電位下降，提升Bcl-2/Bax比率，再者，由DAPI染色檢示中，顯示WECF具有抗細胞凋亡作用。由HPLC-DAD與HPLC-MS/MS分析中，得知共有甜菜苷(Betanin)，芸香苷(Rutin)，山柰酚(Kaempferol)及其它20種化合物存在於紅藜水萃取物中。經活性分析，顯示彼等成分對紅藜水萃取物在降低肝細胞氧化壓力有所助益，進而有助於減少細胞之凋亡。

在護肝效應之四氯化碳誘發肝氧化動物試驗模系，大鼠預先餵食WECF及個別之1.0 g/kg bw Betanin、Kaempferol及Rutin連續28天，並於第28天腹腔注射四氯化碳(CC14, CC14/olive oil; 1/1: v/v, 2ml/kg bw)。隔天犧牲，並進行血清與生化值檢測與病理切片檢驗。結果顯示WECF(2.5 mg/kg bw)能顯著降低AST與ALT值，病理切片也顯示WECF在肝組織損傷有趨緩現象。另外，WECF及三種活性成分皆可抑制TBARS含量並減緩因CC14作用而使GSH含量下降，而Betanin及WECF亦可提升SOD活性。另彼等亦可降低CC14對淋巴球DNA氧化破壞性。在酒精誘發肝損傷動物試驗模系，大鼠以酒精(30%)連續90天誘發肝損傷，並分別餵0.5, 1.0, 2.5 mg/kg bw WECF及1.0 g/kg bw之Betanin、Kaempferol與Rutin。結果顯示，酒精誘發肝細胞之TBARS與CYP2E1，惟不同濃度之WECF與三種活性成分皆能抑制TBARS生成量，另外1.0 g/kg bw Rutin、Kaempferol與2.5 mg/kg bw WECF能提升GSH含量，且三種不同濃度之WECF能提升觸酶活性，而1.0 g/kg bw之Betanin與2.5 mg/kg bw之WECF可抑制酒精誘發CYP2E1之活性。再者，由病理切片也顯示WECF及三種活性成分有顯著緩和酒精誘發肝細胞之傷害現象。由此顯示WECF可藉由抑制油脂氧化、提升GSH含量，增加抗氧化酵素及抑制CYP2E1活性而得以有效保護因酒精誘發肝損傷作用。綜合上述，此兩種動物試驗模式，顯示WECF具有抑制氧化作用，進而產生護肝效應。

於輔助調節血壓模式試驗，結果顯示100-500 g/ml之WECF與三種活性成分(10與25 M)可促進SVEC4-10細胞之eNOS與COX-2基因表現，進而能增加NO與PGI2生成量。此外WECF及三種活性成分能抑制SVEC4-10細胞內Ca²⁺與ROS生成及peroxynitrite之生成量，並可降低血管緊縮素轉移酶活性。另於in vivo試驗中，WECF(100 mg/kg bw)於試驗第4天即具有顯著降收縮壓與舒張壓，而50 mg/kg bw之Rutin也具有顯著降低收縮壓之功效。很顯然WECF具有調降大鼠高血壓之效果。

綜合上述，紅藜水萃取物由於含有活性成分，使其不僅具有護肝也具有降高血壓之特性。

中文關鍵詞：紅藜，甜菜苷(Betanin)，芸香苷(Rutin)，山柰酚(Kaempferol)，人類肝癌細胞株，氧化壓力，凋亡，四氯化碳，酒精，麩胱甘肽，超氧歧化酶，細胞色素P450 2E1，護肝效應，小鼠淋巴結血管上皮樣細胞(SVEC4-10細胞)，自發性高血壓大鼠，調節血壓，血管緊縮素轉移酶，收縮壓，舒張壓

英文摘要：The three-year proposal entitled “Study of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and their bioactive compounds on hepatoprotective effect and supplementary regulation of blood pressure was investigated. Water extracts of Djulis (WECF) demonstrated a cytoprotection in 0.2 mM t-BHP-induced HepG2 cells. The oxidative damage was accompanied by depletion of GSH, TBARS and ROS which were reduced by WECF. There was a down-regulation degradation of IB- and PARP by WECF in t-BHP-induced cells. The increase in the Bcl-2/Bax ratio, mitochondrial membrane potential and a decrease in caspase-3 activity by WECF in t-BHP-induced cells parallel the effect on cell viability. According to HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis, Betanin, Kaempferol, Rutin and another twenty compounds were present in WECF, which may partially be responsible for their protective effect against oxidative damage. WECF demonstrated significantly lowered AST and ALT, and attenuated histopathological changes in CCl₄-treated rats. WECF also attenuated oxidative stress by lowering TBARS, restored GSH, enhanced CAT activity, and inhibited CYP2E1 activity in alcohol-treated rat liver. These two in vivo results obtained show that WECF demonstrated hepatoprotective effect against CCl₄ or alcohol-induced liver injury due mainly to attenuating oxidative stress. WECF, Rutin, Kaempferol and Betanin induced eNOS and COX-2 activities and thereby inducing NO and PGI₂ production. In addition, WECF and three bioactive compounds displayed marked inhibition on peroxynitrite, Ca²⁺ production and ROS in SVEC4-10 cells. ACE activity was inhibited. The antihypertensive effect of WECF was also investigated in spontaneously hypertensive rats (SHRs). The SBP and DBP of the WECF (100 mg/kg bw) were significantly lower than negative control. In conclusion, Djulis show hepatoprotective and antihypertensive effects. The presence of bioactive compounds in Djulis may in part be responsible for hepatoprotection and antihypertension of Djulis.

英文關鍵詞：Djulis (*Chenopodium formosanum*), Betanin, Rutin, Kaempferol, human liver cancer cell line (HepG2 cell), oxidative stress, apoptosis, carbon tetrachloride, ethanol, glutathione, superoxide dismutase, Cytochrome P450 2E1, hepatoprotection, SVEC4-10 cell, spontaneously hypertensive rat, regulating blood pressure, angiotensin I-converting enzyme, systolic blood pressure and diastolic blood pressure

行政院科技部補助專題研究計畫 ☒ 成果報告
☐ 期中報告

紅藜及其活性成份之護肝效應與輔助調節血壓之研究

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 102-2313-B-041-001-MY3

執行期間：2012 年 8 月 1 日至 2016 年 10 月 31 日

執行機構及系所：嘉南藥理大學食品科技系

計畫主持人：杜平惠

共同主持人：褚錦承

共同主持人：陳師瑩

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☐ 精簡報告 ☒ 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

☐ 赴國外出差或研習心得報告

☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告

☒ 出席國際學術會議心得報告

☐ 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☒ 一年 ☐ 二年後可公開查詢

中 華 民 國 105 年 12 月 26 日

目錄

壹、中文摘要	II
貳、英文摘要	III
參、前言	1
肆、研究方法	2
伍、結果與討論	15
陸、引用文獻	73
柒、附錄:已發表研發成果	74

壹、中文摘要

本三年期研究計畫為探討紅藜及其活性成分之護肝效應與輔助調節血壓之研究。結果顯示，10–250 $\mu\text{g/ml}$ 之紅藜水萃取物 (WECF) 具有抑制 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 細胞毒性之能力，其作用機轉與其有效降低 TBARS 與 ROS 生成以及提升 GSH 含量有密切關連性。再者，WECF 顯著性地調控 I κ B- α 及 PARP 之降解，並抑制 *t*-BHP 誘發 Caspase-3 活性、膜電位下降，提升 Bcl-2/Bax 比率，再者，由 DAPI 染色檢示中，顯示 WECF 具有抗細胞凋亡作用。由 HPLC-DAD 與 HPLC-MS/MS 分析中，得知共有甜菜苷 (Betanin)，芸香苷 (Rutin)，山柰酚 (Kaempferol) 及其它 20 種化合物存在於紅藜水萃取物中。經活性分析，顯示彼等成分對紅藜水萃取物在降低肝細胞氧化壓力有所助益，進而有助於減少細胞之凋亡。

在護肝效應之四氯化碳誘發肝氧化動物試驗模系，大鼠預先餵食 WECF 及個別之 1.0 $\mu\text{g/kg bw}$ Betanin、Kaempferol 及 Rutin 連續 28 天，並於第 28 天腹腔注射四氯化碳 (CCl_4 , $\text{CCl}_4/\text{olive oil}$; 1/1 : v/v, 2ml/kg bw)。隔天犧牲，並進行血清與生化值檢測與病理切片檢驗。結果顯示 WECF (2.5 mg/kg bw) 能顯著降低 AST 與 ALT 值，病理切片也顯示 WECF 在肝組織損傷有趨緩現象。另外，WECF 及三種活性成分皆可抑制 TBARS 含量並減緩因 CCl_4 作用而使 GSH 含量下降，而 Betanin 及 WECF 亦可提升 SOD 活性。另彼等亦可降低 CCl_4 對淋巴球 DNA 氧化破壞性。在酒精誘發肝損傷動物試驗模系，大鼠以酒精 (30 %) 連續 90 天誘發肝損傷，並分別餵 0.5, 1.0, 2.5 mg/kg bw WECF 及 1.0 $\mu\text{g/kg bw}$ 之 Betanin、Kaempferol 與 Rutin。結果顯示，酒精誘發肝細胞之 TBARS 與 CYP2E1，惟不同濃度之 WECF 與三種活性成分皆能抑制 TBARS 生成量，另外 1.0 $\mu\text{g/kg bw}$ Rutin、Kaempferol 與 2.5 mg/kg bw WECF 能提升 GSH 含量，且三種不同濃度之 WECF 能提升觸酶活性，而 1.0 $\mu\text{g/kg bw}$ 之 Betanin 與 2.5 mg/kg bw 之 WECF 可抑制酒精誘發 CYP2E1 之活性。再者，由病理切片也顯示 WECF 及三種活性成分有顯著緩和酒精誘發肝細胞之傷害現象。由此顯示 WECF 可藉由抑制油脂氧化、提升 GSH 含量，增加抗氧化酵素及抑制 CYP2E1 活性而得以有效保護因酒精誘發肝損傷作用。綜合上述，此兩種動物試驗模式，顯示 WECF 具有抑制氧化作用，進而產生護肝效應。

於輔助調節血壓模式試驗，結果顯示 100-500 $\mu\text{g/ml}$ 之 WECF 與三種活性成分 (10 與 25 μM) 可促進 SVEC4-10 細胞之 eNOS 與 COX-2 基因表現，進而能增加 NO 與 PGI_2 生成量。此外 WECF 及三種活性成分能抑制 SVEC4-10 細胞內 Ca^{2+} 與 ROS 生成及 peroxynitrite 之生成量，並可降低血管緊縮素轉移酶活性。另於 *in vivo* 試驗中，WECF (100 mg/kg bw) 於試驗第 4 天即具有顯著降低收縮壓與舒張壓，而 50 mg/kg bw 之 Rutin 也具有顯著降低收縮壓之功效。很顯然 WECF 具有調降大鼠高血壓之效果。

綜合上述，紅藜水萃取物由於含有活性成分，使其不僅具有護肝也具有降高血壓之特性。

關鍵詞：紅藜，甜菜苷 (Betanin)，芸香苷 (Rutin)，山柰酚 (Kaempferol)，人類肝癌細胞株，氧化壓力，凋亡，四氯化碳，酒精，麩胱甘肽，超氧歧化酶，細胞色素 P450 2E1，護肝效應，小鼠淋巴結血管上皮樣細胞 (SVEC4-10 細胞)，自發性高血壓大鼠，調節血壓，血管緊縮素轉移酶，收縮壓，舒張壓

貳、英文摘要

The three-year proposal entitled “Study of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and their bioactive compounds on hepatoprotective effect and supplementary regulation of blood pressure was investigated. Water extracts of Djulis (WECF) demonstrated a cytoprotection in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The oxidative damage was accompanied by depletion of GSH, TBARS and ROS which were reduced by WECF. There was a down-regulation degradation of I κ B- α and PARP by WECF in *t*-BHP-induced cells. The increase in the Bcl-2/Bax ratio, mitochondrial membrane potential and a decrease in caspase-3 activity by WECF in *t*-BHP-induced cells parallel the effect on cell viability. According to HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis, Betanin, Kaempferol, Rutin and another twenty compounds were present in WECF, which may partially be responsible for their protective effect against oxidative damage.

WECF demonstrated significantly lowered AST and ALT, and attenuated histopathological changes in CCl₄-treated rats. WECF also attenuated oxidative stress by lowering TBARS, restored GSH, enhanced CAT activity, and inhibited CYP2E1 activity in alcohol-treated rat liver. These two *in vivo* results obtained show that WECF demonstrated hepatoprotective effect against CCl₄ or alcohol-induced liver injury due mainly to attenuating oxidative stress.

WECF, Rutin, Kaempferol and Betanin induced eNOS and COX-2 activities and thereby inducing NO and PGI₂ production. In addition, WECF and three bioactive compounds displayed marked inhibition on peroxynitrite, Ca²⁺ production and ROS in SVEC4-10 cells. ACE activity was inhibited. The antihypertensive effect of WECF was also investigated in spontaneously hypertensive rats (SHRs). The SBP and DBP of the WECF (100 mg/kg bw) were significantly lower than negative control.

In conclusion, Djulis show hepatoprotective and antihypertensive effects. The presence of bioactive compounds in Djulis may in part be responsible for hepatoprotection and antihypertension of Djulis.

Keywords: Djulis (*Chenopodium formosanum*), Betanin, Rutin, Kaempferol, human liver cancer cell line (HepG2 cell), oxidative stress, apoptosis, carbon tetrachloride, ethanol, glutathione, superoxide dismutase, Cytochrome P450 2E1, hepatoprotection, SVEC4-10 cell, spontaneously hypertensive rat, regulating blood pressure, angiotensin I-converting enzyme, systolic blood pressure and diastolic blood pressure

參、前言

長久以來，肝病為國人健康的惡夢，且夙有國病之稱。而慢性肝炎、肝硬化、肝癌為肝臟疾病的三部曲。在肝病病因分級上，有藥物性、病毒性與酒精性肝損傷。依衛生署 2011 年最新國人十大死因統計資料顯示，惡性腫瘤仍是頭號殺手，而肝癌則是十大癌症死因第二名，其中男性肝癌占癌症死因之首位，由此可見肝病對國人健康威脅之鉅。另外，據統計，年齡超過 40 歲以上國人約 20% 罹患高血壓，如果不正視此問題，將引發嚴重的心、腦血管疾病，而心、腦血管疾病多年來占國人十大死因前二、三名。換言之，無論是肝病或血壓引起的疾病一直是困擾著國人健康。如何降低國人在肝病及血壓上的罹患率，提昇國人的健康，是相關單位刻不容緩之事。爰此，產官學研多方努力，積極尋求有效方法，以降低國人在肝病及血壓上衍生的疾病，其中藉飲食及天然生物活性成分以調控生物體之氧化壓力，以及有效調節血壓，是近年來研究重點之一。再者，以輔助醫學角度而言，以天然生物活性成分輔助藥物之功效，是極為有意義的策略之一。

紅藜(*Chenopodium formosanum*)為藜屬植物，排灣族稱為 Djulis，為台灣原住民特有的重要傳統糧食作物，因具有綠色或紫紅色條紋而有「紅藜」、「赤藜」、「紫藜」、「彩虹米」等別稱。紅藜含有 50% 澱粉，12-18% 蛋白質，其蛋白質含量與小麥相近，也含豐富的鈣、磷、鐵、鈉、及鉀等。尤其是紅藜含有豐富的離胺酸、甲硫胺酸與胺基酸等，這些胺基酸大多是其他穀類所缺乏(蔡，2006)。由於它的營養價值高，美國國家航空暨太空總署(NASA)視其為有潛力的新作物(蔡，2006)。有關紅藜的機能特性，蔡等(2006，2009)與劉等(2008)曾有一系列探討，包括以 HPLC 部份成分分析與抗氧化活性探討(蔡等，2006)。再者，紅藜經奈米研磨後，其 betalain 與酚類含量相對提高，惟其抗氧力趨於不穩定(Tsai et al., 2011)。由前人上述研究，紅藜雖具有生物活性成分，且具有捕捉 DPPH 自由基之抗氧化性，惟 DPPH 是一種很穩定的自由基，以此模式平台測定抗氧化力，實無法反映真正複雜的反應情形，更遑論應用於細胞及動物模式系統的解釋。此外，除了上述前人的紅藜研究外，迄今有關其它生物活性的文獻則付之闕如。爰此，本計畫首先將以 HPLC 及 LC/MS 分離並鑑定活性成分，再擇取主要活性成分以及紅藜水粗萃物為試驗樣品進行三年期的研究。第一年計畫將以細胞模系為平台，探討紅藜水粗萃物及其活性成分對肝細胞遭受 t-BHP 誘發氧化傷害及凋亡之保護效應；第二年則以動物模式系統，探討紅藜水粗萃物與活性成分對化學性與酒精性肝炎之保護效應；第三年探討紅藜水粗萃取物與活性成分對血壓輔助調節作用。

肆、材料與方法

第一年實驗方法

(一) 材料與藥品

本計畫所使用的紅藜購自可樂穀農場；另所使用試藥為一級藥品；HepG2 細胞株則購自食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心。

(二) 試驗方法

1. 紅藜不同溶劑萃取物之製備

紅藜以 1:10 加水煮沸 40 分鐘，過濾後，濾液再以 1:10 水煮沸 40 分鐘，二次之濾液進行減壓濃縮乾燥，此為紅藜水萃取物(water extracts of Djulis, WECF)。另取適量紅藜以乙酸乙酯，正丁醇分別以 1:10 依序進行萃取，步驟同前，再進行減壓濃縮乾燥，所得萃取物分別稱為乙酸乙酯萃取物 (ethyl acetate extracts of Djulis, EECF)與正丁醇萃取物(butanol extracts of Djulis, BECF)，稱重後儲存於 4°C 下以備用。

2. 生物活性成分測定

活性成分分析

A. 以 HPLC 及 LC/MS 測定萃取物所含活性成分

HPLC 分析採用管柱 Symmetry C18 analysis column (2.1 × 150 mm; 3.5 μm particle size, Waters) 與 precolumn [ScurityGuard C18 (ODS) 4 mm × 3.0 mm ID, Phenomenex Inc., Torrance, CA, U.S.A.]。移動相 A: acetonitrile (含 0.1 % formic acid), B: Deionized distilled (dd) water (含 0.1 % formic acid), 流速為 0.2 mL/min, 檢測全波長 210 - 600 nm。

B. LC-MS 分析

為避免 HPLC 分析時同一滯留時間而誤判化合物，進一步以高效能液相層析質譜儀分析確認，採用管柱同上述，移動相 A: 乙腈 (含 0.1 % 甲酸), B: 水 (含 0.1 % 甲酸), 流速為 0.2 mL/min, 使用光偶極排列檢測器 (photodiode array detector, PDA) 檢測全波長 210 - 600 nm, 並聯接至三重四極桿質譜儀[Agilent 6420 Triple Quadrupole Mass Spectrometer equipped with Mass Hunter software (version: B.01.04) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)]., 並以正或負電之電灑離子化 (electrospray ionization, ESI) 模式分析, 儀器條件: 氮氣 (乾燥氣體), 流速: 9 L/min; nebulising gas: 35 psi. The drying gas temperature: 300 °C; potential: 3500 V. The fragmentor voltage: 90 V, collision voltage: 25 V. Quadrupole 1 filtered the calculated m/z of each compound of interest; quadrupole 2 scanned for ions produced by nitrogen collision of these ionized compounds in the range 100 – 800 m/z at a scan time of 200 ms/cycle.。

3. 胞內氧化保護作用

(1) 對細胞毒性之影響

A. 細胞培養

HepG2 以含有 10 %胎牛血清(FBS)之 MEM (minimal essential medium)為完全培養基，培養於 5 % CO₂、37°C 之恆溫培養箱中，每 2~3 天更換新鮮的培養基。待細胞培養至約九分滿時，將培養基移除，以 PBS 緩衝液(14 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄)清洗培養皿中附著狀態之細胞共二次，以 1 ml trypsin-EDTA(TE)分離培養皿中細胞，作用 3 - 4 min, 再以 2 ml 含 FBS 之 MEM medium 中和 TE 之反應，經 1500 rpm 離心 5 分鐘後收集細胞，將細胞

均勻沖散後，以 1:3 的比例進行培養。

B. 細胞存活試驗法 (MTT)

本試驗基於活細胞呼吸時，其粒線體所含之去氫酵素能還原 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 生成紫色產物 (formazan)，若紫色愈深表示活存細胞愈多，藉此可作為細胞存活之指標。測定方法：將 HepG2 cells 以 10×10^4 /ml 接種於 24 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 0.5 mL 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 μ g/ml) 及 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (1,10,100 μ M) 之培養基，再加入 t-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37°C，5 % CO₂ 反應 24 小時，待反應時間終了後，加入 50 μ l 0.1% 之 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 於培養箱中反應 1hr，反應終了，移除培養基，加入 120 μ l DMSO 將紫色結晶物溶出，並取 100 μ l 至 96 孔盤中，以 ELISA reader (Molecular Devices, VMax) 測定 550 nm 下之吸光值。計算時以控制組之存活率為 100% 表示。

C. 細胞滲漏率之測定

LDH 細胞滲漏率為評估細胞毒性之指標，為針對死亡細胞進行測定之方法，細胞毒性(%) 使用 Promega 之 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 來分析。將 HepG2 cells 以 10×10^4 /ml 接種於 96 well plate，培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 0.2 ml 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 μ g/ml) 之培養基，再加入 t-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37°C，5 % CO₂ 下反應 16 小時，待反應時間終了後，取出 50 μ l 胞外細胞培養液 (extracellular fluid) 至 96 well plate 加入 50 μ l 反應試劑於室溫下暗反應 30 分鐘後，加入 50 μ l 終止試劑，以 ELISA reader 讀取 490 nm 的吸光值。最後以 Cytotoxicity(%) 表示。

計算公式：Cytotoxicity(%) = 實驗組/對照組 $\times$ 100

(2) 對細胞氧化性之影響

A. 細胞內活性氧之生成測定

其原理為 DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) 能自由地通過細胞膜，受到酯解酶 (esterase) 作用成 DCFH，而 DCFH 進一步受到胞內 H₂O₂ 氧化成 DCF (dichlorofluorescein)，以螢光儀在 450 - 490 nm 激發，在 515 - 550 nm 下會發射出螢光，藉此推算胞內 H₂O₂ 之含量。測定方法：將 HepG2 cells 以 20×10^4 /ml 接種於 6 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 1 ml 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 μ g/ml) 及 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (1,10,100 μ M) 之培養基，再加入 50 μ M 之 DCFH-DA 反應 15 分鐘，加入 t-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37°C，5 % CO₂ 下反應 3 小時，待反應時間終了，移除培養基，以 PBS 緩衝液清洗細胞 2 次後，加入 100 μ l Trypsin-EDTA 作用 2 - 3 分鐘，加入 500 μ l 培養基中和 Trypsin-EDTA 反應，將細胞液移至微量離心管內以 10000 rpm，離心 10 分鐘，去除上層液，加入 100 μ l PBS 緩衝液清洗，以 10000 rpm，離心 5 分鐘去除殘留之培養基，再加入 100 μ l PBS 緩衝液將細胞打散後，移至 96 孔黑盤中，以螢光冷光儀 (BioTek FLx-800) 進行螢光強度分析 (Ex wavelength: 485 nm, Em wavelength: 528 nm)。

B. 胞內脂質過氧化物之測定

脂質氧化產物(thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)為脂質過氧化所產生的二級產物，當胞內脂質成分受到氧化劑氧化時，會造成脂質氧化生成 TBARS。此時測定 TBARS 生成量可反映出胞內氧化程度。測定方法：將 HepG2 cells 以 20×10^4 /ml 接種於 6 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 1 ml 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 之培養基，再加入 *t*-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37°C，5% CO_2 下反應 2 小時，待反應時間終了後，移除培養基以 PBS 清洗細胞除去未貼附之細胞，加入 0.5 ml Homogene buffer (1.5 % KCl, 1 mM EDTA, 10 mM KH_2PO_4 , pH7.4)，將細胞刮下後收集，此細胞懸浮液經超音波破碎機進行均質，再以 10000 rpm 離心 10 分鐘，上清液即為細胞均質液。取 200 μL 細胞均質液加入 200 μL 10 % TCA，以 3500 rpm 離心 10 分鐘，取上清液 200 μL 再加入 200 μL 0.4 % TBA (溶於 0.2 N HCl)，水浴 50°C，加熱 1 小時，加入 400 μL Isobutanol 混勻後，以 3500 rpm 離心 10 分鐘，取 200 μL 上層反應物至 96 孔黑盤，以螢光冷光儀 (BioTek FLx-800) 進行螢光強度分析 (Ex wavelength : 485 nm, Em wavelength : 528 nm)。

(3) 對胞內抗氧化物質與抗氧化酵素活性之影響

胞內 glutathione (GSH)含量之影響

將 HepG2 cells 以 20×10^4 /ml 接種於 6 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 1 ml 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 之培養基，再加入 *t*-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37°C，5% CO_2 下反應 3 小時，待反應時間終了後，移除培養基，加入 0.5ml PBS (含有 CMF-DA 5 μM)，置入培養箱 37°C，5 % CO_2 下反應 30 分鐘後，將含有 CMF-DA 之 PBS 緩衝液移除，以 PBS 緩衝液清洗細胞 1 次後，加入 100 μL Trypsin-EDTA 作用 2 - 3 分鐘，加入 500 μL 培養基中和 Trypsin-EDTA 反應，將細胞液移至微量離心管內以 10000 rpm，離心 10 分鐘，去除上層液，加入 100 μL PBS 緩衝液清洗，以 10000 rpm，離心 5 分鐘去除殘留之培養基，再加入 100 μL PBS 緩衝液將細胞打散後，移至 96 孔黑盤中，以螢光冷光儀 (BioTek FLx-800) 進行螢光強度分析 (Ex wavelength : 485 nm, Em wavelength : 528 nm)。

(4) 對細胞凋亡之影響

A. 流式細胞儀分析細胞凋亡：Annexin V-FITC 雙分析

本分析原理乃利用細胞早期凋亡之細胞膜仍呈現完整，可將 PI 染劑排斥而不被染色，惟膜上之 phosphatidyl serine (PS)發生外露，可與 Annexin V-FITC 親合性結合，利用此特性可將細胞區分出正常、凋亡或壞死狀況。分析方法：將 HepG2 cells 以 20×10^4 /ml 接種於 6 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，再加入 1 ml 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 之培養基，再加入 *t*-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37°C，5% CO_2 下反應 24 小時，待反應時間終了後，移除培養基，以 PBS 清洗 2 次後，加入 100 μL Trypsin-EDTA 作用 2 - 3 分鐘，加入 500 μL 培養基中和 Trypsin-EDTA 反應，將細胞液移至微量離心管內以 10000 rpm，離心 10 分鐘，去除上層液，加入 100 μL PBS 緩衝液清洗，以 10000 rpm，離心 5 分鐘去除殘留之培養基，加入 500 μL Annexin-V binding buffer 震盪混合均勻，分別加入 5 μL Annexin-V-FITC 和 PI 的染劑，混勻，暗處反應 5~10 分鐘，利用流式細胞儀(Flow cytometer)偵測螢光強度，所得結果和控制組比較，藉此換算 necrosis 和 apoptosis 的百分比。

B. DAPI staining

將 HepG2 cells 以 50×10^4 /ml 接種於 6 孔盤於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，再加入 1 ml 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 μ g/ml) 或 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (1,10,100 μ M) 之培養基，再加入 *t*-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下反應 24 小時，待反應時間終了後，移除培養基，以 PBS 清洗 2 次，後用 0.5 ml 的 PBS 將細胞回溶。蓋玻片以 poly-L-lysine 處理 1 分鐘，再去除 poly-L-lysine，使蓋玻片表面帶正電，將細胞液均勻佈滿蓋玻片上，使細胞貼附於蓋玻片上，靜置 10 分鐘後，細胞即貼附於蓋玻片上，再緩慢加入 1 ml 4% paraformaldehyde，反應作用 30 分鐘以固定細胞，吸出 paraformaldehyde 後，再以 PBS 清洗掉多餘未附著的細胞，接著以 0.5 % Triton X-100 作用 10 分鐘，打破細胞膜，再以 PBS 清洗後，加入 1% BSA，在室溫中反應 30 分鐘進行 blocking 後以 PBS 清洗，最後加入 5 μ l 濃度為 5 μ g/ml 的 DAPI 進行封片，以螢光顯微鏡進行觀察。

(5) 對細胞凋亡蛋白之影響

A. Caspase cascade 活性測定

將 HepG2 cells 以 10×10^4 /ml 接種於 96 孔盤，培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 0.1 ml 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 μ g/ml) 及 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (1,10,100 μ M) 之培養基，再加入 *t*-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下反應 24 小時，反應終了，加入 50 μ l Caspase-Glo[®] 3/7 kit，混合均勻後，置入培養箱 37 °C，5 % CO₂ 下反應 1 小時後，取 100 μ l 至 96 孔白盤，以螢光冷光儀 (BioTek FLx-800) 偵測冷光強度，以換算 Caspase-3 的活性。

B. 對 Bcl-2 家族之影響

a. 西方點墨法(Western blot)

西方點墨法是分析蛋白變性程度最常用之分析法。首先將細胞內之 protein 細胞內分離出，利用 SDS-PAGE 將分子量不同之蛋白質分開，經轉移至醋酸纖維膜上後，利用具有專一性之一級抗體(primary antibody)與特定蛋白質結合後，再利用接有酵素的二級抗體(secondary antibody)與一級抗體結合，再加入受質催化二級抗體上之酵素，藉反應結果得知特定蛋白是否存在與分子量及存在表現量多寡。

蛋白質製備：

將 HepG2 cells 以 200×10^4 /ml 接種於 10 cm dish，培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 5 ml 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 μ g/ml) 或 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (1,10,100 μ M) 之培養基，再加入 *t*-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37 °C，5 % CO₂ 下反應 2 小時，反應終了，去除培養基後以 PBS 清洗 2 次，加 1 mL PBS 將細胞刮下，以 10000 rpm，離心 10 分鐘，去除上層液後，加入 100 μ l lysis buffer (RIPA buffer)混合均勻於冰上反應 30 分鐘，再以 4°C 10000 rpm 離心 10 分鐘，取得細胞均質液並定量蛋白質濃度。接著將細胞均質液加入 4X loading buffer 以 95 °C 反應 15 分鐘後，冰浴 5 分鐘，以 4°C 10000 rpm，離心 10 分鐘，冰浴備用。

(i) 蛋白質電泳

利用 SDS-PAGE 將蛋白質依分子量的不同分離。配製 discontinuous acrylamide gel，gel 分為上下兩層，下層為 separating gel，其 acrylamide 的百分比視所分析的蛋白質分子而定，上層則為 stacking gel，含 4 % acrylamide。將凝膠完成的膠片置於電泳槽中，加入電泳緩衝液(Running buffer：25 mM Tris，192 mM glycine，0.1 % SDS)。將標準分子量的 marker 以及各樣品依序注入膠體的孔槽中，以電壓 80 voltage，待樣品通過 stacking gel 後將電壓調整為 100 voltage，視需要調整電泳時間。

(ii) 蛋白質轉漬

取一塊和 gel 差不多大小之 nitrocellulose membrane 浸泡於 transfer buffer r (48 mM Tris-base，39 mM glycine，20 % methanol) 中，接著將 gel 取下來，並放入轉漬夾 (transfer cassette) 中，覆蓋 Nitrocellulose membrane，並將氣泡趕出，夾上轉漬夾 (transfer cassette)，並將其放於轉漬槽中，倒入 Transfer buffer，以 400 mA 電流進行 1 小時蛋白質轉漬。

(iii) 免疫轉染

將轉漬完的 nitrocellulose membrane 先以 5% BSA (溶於 PBST (PBS 中含有 0.1 % Tween-20) 中)，置於 4°C 下反應 1 小時，以 PBST 震盪清洗 30 分鐘(每 10 分鐘更換一次)，便可加入一級抗體(5% BSA / PBST 稀釋配置)，於 4°C 震盪反應 16 - 18 hr，接著以 PBST 震盪清洗 30 分鐘(每 10 分鐘更換一次)，接著加入二級抗體(溶於 PBST 中)，於室溫下震盪反應 1 小時後，再以 PBST 震盪清洗 30 分鐘(每 10 分鐘更換一次)。

(iv) Enhanced chemiluminescence (ECL) 偵測

以 ECL 來偵測二級抗體，利用軟體 TOPBIO Capture 拍攝，再以 ImageJ 進行分析量化。

(6) 粒線體膜電位之測定

粒線體外膜上有許多分子相互結合以形成通道提供流質之出入。正常狀況下粒線體本身會產生大量之能量而與細胞質維持一定的電位差，若粒線體通透性增加時，則會有小分子迅速進入粒線體內，導致電位差改變，而且一些離子及大量水分也會進入粒線體內，造成整個粒線體基質膨脹，導致外膜破裂。故測定通透性之變化，可得知細胞凋亡與否。測定方法如下：粒線體膜電位是使用 Cayman 之 JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit 進行分析。

將 HepG2 cells 以 10×10^4 / ml 接種於 12 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，再加入 1 ml 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 μ g/ml) 之培養基，再加入 t-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下反應 2 小時，待反應時間終了後，加入 10 μ l JC-1 kit 混合均勻後，置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下反應 30 分鐘後，將培養基移除，以 PBS 緩衝液清洗細胞 2 次後，加入 100 μ l Trypsin-EDTA 作用 2 - 3 分鐘，加入 500 μ l 培養基中和 Trypsin-EDTA 反應，將細胞液移至微量離心管內以 10000 rpm，離心 10 分鐘，去除上層液，加入 100 μ l PBS 緩衝液清洗，以 10000 rpm，離心 5 分鐘去除殘留之培養基，接著加入 100 μ l 之 PBS 緩衝液將細胞打散後，移至 96 孔黑盤中，以螢光冷光儀 (BioTek FLx-800) 進行螢光強度分析 (Ex wavelength : 530 nm，Em wavelength : 590 nm)。

(7) I κ B- α 活性表現之測定

蛋白質製備：

將 HepG2 cells 以 200×10^4 /ml 接種於 10cm dish，培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 5 ml 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 μ g/ml) 之培養基，再加入 *t*-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下反應 2 小時，反應終了，去除培養基後以 PBS 清洗 2 次，加 1 ml PBS 將細胞刮下，以 10000 rpm，10 分鐘離心，去除上層液後，加入 100 μ l lysis buffer (RIPA buffer) 混合均勻於冰上反應 30 分鐘，再以 4°C，10000 rpm 離心 10 分鐘，取得細胞均質液並定量蛋白質濃度。接著將細胞均質液加入 4X loading buffer 以 95°C 反應 15 分鐘後，冰浴 5 分鐘，以 4°C 10000 rpm，離心 10 分鐘，冰浴備用。

(i) 蛋白質電泳

方法同前所述

(ii) 蛋白質轉漬

方法同前所述

(iii) 免疫轉染

方法同前所述

(iv) Enhanced chemiluminescence(ECL)偵測

方法同前所述

(8) 對 PARP 之影響

蛋白質製備：

將 HepG2 cells 以 200×10^4 /ml 接種於 10cm dish，培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 5 ml 含不同濃度之 WECF (10, 100, 250 μ g/ml) 之培養基，再加入 *t*-BHP 0.2 mM 置入培養箱 37 °C，5% CO₂ 下反應 24 小時，反應終了，去除培養基後以 PBS 清洗 2 次，加 1 ml PBS 將細胞刮下，以 10000 rpm，離心 10 分鐘，去除上層液後，加入 100 μ l lysis buffer (RIPA buffer) 混合均勻於冰上反應 30 分鐘，再以 4°C，10000 rpm 離心 10 分鐘，取得細胞均質液並定量蛋白質濃度。接著將細胞均質液加入 4X loading buffer 以 95°C 反應 15 分鐘後，冰浴 5 分鐘，以 4°C，10000 rpm，離心 10 分鐘，冰浴備用。

(i) 蛋白質電泳

方法同前所述

(ii) 蛋白質轉漬

方法同前所述

(iii) 免疫轉染

方法同前所述

(iv) Enhanced chemiluminescence(ECL)偵測

方法同前所述

第二年實驗方法

一、材料與藥品

所使用的紅藜與製備方法同前所述。另所使用試藥為一級藥品

二、實驗設計

(一)化學性護肝效應：參考衛福部公報(2010)與余(2010)所述方法誘發化學性肝炎

1. 實驗方法：四氯化碳誘發大鼠慢性肝損傷實驗模式

(1)動物來源：由樂斯科生物科技公司購買 6 週齡 Wistar 雄性大鼠(180-200 克)為試驗對象，以四氯化碳誘發試驗，每組 6 隻 Wistar 大鼠。每隻大鼠個別飼養於不鏽鋼籠中，動物房溫度維持在 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，濕度為 50-65%，光照及黑暗時間各 12 個小時。其飼料 (Lab Diet 5001 標準飼料) 與 RO 水均以自由給食方式，每天記錄飼料攝取量與動物體重。大鼠實驗處理過程與安樂死程序均依照嘉南藥理大學實驗動物照護及使用小組規範操作。

(2)為探討紅藜及其活性成分「預防」化學性肝炎，將試驗動物分成下列組別：

正常對照組 (Control)：RO 水 (P.O.)+ RO 水 (I.P.)

負對照組 (CCl_4)：RO 水 (P.O.)+ CCl_4 (I.P.)

正對照組：Silymarin (100 mg/ kg bw) + CCl_4 (I.P.)

R 實驗組：1.0 μg Rutin / kg b.w (P.O.)+ CCl_4 (I.P.)

B 實驗組：1.0 μg Betanin / kg bw (P.O.) + CCl_4 (I.P.)

K 實驗組：1.0 μg Kaempferol / kg bw (P.O.)+ CCl_4 (I.P.)

低劑量組：0.5 mg WECF / kg bw (P.O.) + CCl_4 (I.P.)

中劑量組：1.0 mg WECF / kg bw (P.O.) + CCl_4 (I.P.)

高劑量組：2.5 mg WECF / kg bw (P.O.) + CCl_4 (I.P.)

安全劑量組：2.5 mg WECF / kg bw (P.O.)

2. 試驗程序如下：

大鼠經一週適應環境後，隨機分成 10 組如上述。每日管餵樣品 (P.O.)，經連續 22 天管餵後，最後一天以腹腔注射 (intra-peritoneal, I.P.) 0.2ml/100 g b.w. 之 50% CCl_4 ，而正常對照組與最高濃度試驗樣品組以 RO 水代替。隨後禁食 24 小時後，以二氧化碳處理令其窒息並進行犧牲。以腹腔靜脈採血檢驗生化功能，並剖腹取肝臟標本，秤重後將最大右葉肝割取一塊 1cm $\times$ 1cm Block 固定於 10% 的中性馬福林 (formaline) 溶液中，石蠟包封切片後作 Hematoxylin & Eosin stain 來進行病理學觀察；另擷取最大右葉肝部分組織進行脂質過氧化與抗氧化酵素活性分析。

(二)酒精性護肝效應：參考 Sarphe 等(1997)方法誘發酒精性肝炎

1. 實驗方法：酒精誘發大鼠慢性肝損傷實驗模式

(1)動物來源：由樂斯科生物科技公司購買 6 週齡 Wistar 雄性大鼠(180-200 克)為試驗對象，以慢性酒精誘發試驗。每隻大鼠個別飼養於不鏽鋼籠中，動物房溫度

維持在 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，溫度為 50-65%，光照及黑暗時間各 12 個小時。

大鼠試驗之前先給予 7 天之適應期，其飼料 (Lab Diet 5001 標準飼料) 與 RO 或酒精水均以自由給食方式，每天記錄飼料攝取量，每週記錄一次動物體重。大鼠實驗處理過程與安樂死程序均依照嘉南藥理大學實驗動物照護及使用小組規範操作。

(2)為探討紅藜及其活性成分「預防」酒精性肝炎，將大鼠分成 10 組，實驗分組如下：

正常對照組 (Control)：RO 水 (P.O.)+飲用 RO 水

負對照組 (EtOH)：RO 水 (P.O.)+飲用酒精水

正對照組：Silymarin (100 mg/ kg bw) +飲用酒精水

R 實驗組：1.0 μg Rutin / kg b.w (P.O.)+ 飲用酒精水

B 實驗組：1.0 μg Betanin / kg bw (P.O.) +飲用酒精水

K 實驗組：1.0 μg Kaempferol / kg bw (P.O.)+飲用酒精水

低劑量組：0.5 mg WECF / kg bw (P.O.) +飲用酒精水

中劑量組：1.0 mg WECF / kg bw (P.O.) +飲用酒精水

高劑量組：2.5 mg WECF / kg bw (P.O.) +飲用酒精水

安全劑量組：2.5 mg WECF / kg bw (P.O.) +飲用 RO 水

2.試驗程序如下：

大鼠經一週適應環境後，正式開始實驗開始，負控制組、正控制組及實驗組在第 1~14 天飲用水皆換為 20% 酒精，待大鼠適應 20% 酒精水後，第 15~90 天則開始調高濃度至為 30% 酒精，第 91 天隨後禁食 24 小時後，以二氧化碳處理令其窒息並進行犧牲。以腹腔靜脈採血檢驗生化功能，並剖腹取肝臟標本，秤重後將最大右葉肝割取一塊 1cm $\times$ 1cm Block 固定於 10% 的中性馬福林 (formaline) 溶液中，石蠟包封切片後作 Hematoxylin & Eosin stain 來進行病理學觀察；另擷取最大右葉肝部分組織進行脂質過氧化與抗氧化酵素活性分析。

三、測定方法

上述化學性與酒精性護肝之試驗大鼠分別測其血清生化分析及病理切片

血清生化分析項目

將動物之血液樣品在室溫下放置一小時使其凝結，再以冷凍離心機於 4°C 每分鐘 12000 rpm 離心五分鐘，所得血清以自動生化分析儀檢測血糖、三酸甘油酯、膽固醇、ALT、AST、BUN 及 creatinin 的含量。

2.肝臟中抗氧化酵素與 GSH 之分析

肝臟中抗氧化酵素包括 SOD，CAT 與 GPx 的酵素活性以及 GSH，將以相關的 Kit 配合 ELISA 進行分析。

3.肝組織脂質過氧化的測定

本試驗測定肝組織之 TBARS 之含量，藉以反應肝細胞內氧化反應程度。反應液以 TCA 沉澱蛋白質後，再與 TBA 反應，再將此混合液於沸水中反應 10 分鐘，再測 532 之吸光值。

4.Cytochrome P450 2E1(CYP2E1)活性的測定

酒精的代謝會由 alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase 作用外，亦可藉由 microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS)代謝，而 MEOS 中的主要酵素 CYP2E1 會被酒精誘發，使 CYP2E1 活性增加，因此本試驗將以自動生化分析儀偵測肝臟組織中 CYP2E1 的活性。

5. 彗星試驗 (Comet Assay)

彗星試驗 (Comet Assay) 又稱單細胞凝膠電泳 (SCGE)，廣泛應用於評估 DNA 損傷的檢測。利用膠體電泳分離不同大小片段的 DNA，偵測 DNA 單股斷裂，斷裂之 DNA 會移動至細胞核外，經由核酸染色後，會形成拖尾的現象；若細胞 DNA 未損害則移動慢，且會留在核質體內。藉由分析 DNA 分布情況，判斷血液淋巴球細胞 DNA 受損的嚴重度。

6. 病理切片觀察

將動物犧牲後，經動脈取血後，取肝臟並在最大右葉的同一位置割取 1 公分見方的肝組織放入 10% 的中性福馬林中，以 Paraffin 包埋，切成厚度為 4mm 的厚片，作進一步的觀察染色。為了觀察肝損傷時，肝細胞的受損、脂肪變性、壞死、纖維化等變化，除了將肝組織做 Hematoxylin & Eosin stain 外，還做網狀纖維及膠原纖維的特殊染色，以便評估肝臟纖維化程度。

第三年實驗方法

一、材料與藥品

1. 本計畫所使用的紅藜與製備方法同前所述。所用試藥為一級藥品，而 SVEC4-10 細胞株則購自食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心。

二、試驗方法

細胞培養

SVEC4-10 以含有 10 % 胎牛血清(FBS)之 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)為完全培養基，培養於 5 % CO₂、37°C 之恆溫培養箱中，每 2 - 3 天更換新鮮的培養基。待細胞培養至約九分滿時，將培養基移除，以 PBS 緩衝液(14 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄)清洗培養皿中附著狀態之細胞共 2 次，以 1 ml Trypsin-EDTA 分離培養皿中細胞，作用 3 - 4 min，再以 2 ml 含 FBS 之 DMEM medium 中和 Trypsin-EDTA 之反應，經 1500 rpm 離心 5 分鐘後收集細胞，將細胞均勻沖散後，以 1:6 - 1:8 的比例進行培養。

(一)細胞存活率之試驗 (MTT)

SVEC4-10 以 15×10^4 /ml 接種於 24 孔盤，培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 0.5 ml 含不同濃度之 WECF (100, 250, 500 µg/ml)及 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (10, 25 µM)之培養基，反應 16 小時後，加入 50 µl 0.1 % 的 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)溶液，反應 1 小時，移除培養基，加入 120 µl DMSO 將紫色結晶物溶出後，取 100 µl 至 96 孔盤中，以 ELISA reader 讀取 550 nm 的吸光值。計算時以控制組之存活率為 100%表示。

(二)ACE 活性抑制測定

將不同濃度的 0.006 ml 樣品，加入 0.015 ml 的 5 mM HHL、0.009 ml 含有 0.3 M

NaCl 的 pH 8.2 K-PO₄ 緩衝溶液及 0.03 ml 的 20 mM ACE 混合均勻，於水浴鍋中培養 37°C，60 分鐘。再加入 0.05 ml 的 1M HCl 終止其反應。終止反應後，加入 0.1 mL 的 pyridine，接著加入 0.05 ml 的 BSC，以震盪器震盪均勻，於冰上冰浴 1 分鐘。取 0.2 ml 至 96 孔盤，以 ELISA reader 讀取 405 nm 的吸光值。

(三)細胞內一氧化氮之測定 (NO)

將 SVEC4-10 以 15×10^4 /mL 接種於 24 孔盤，培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 0.5 ml 含不同濃度之 WECF (100, 250, 500 µg/ml) 及 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (10, 25 µM) 之培養基，反應 16 小時，取出 200 µl 胞外細胞培養液至 96 孔盤加入 20 µl Griess A 試劑和 20 µl Griess B 試劑室溫下反應 10 分鐘後，以 ELISA reader 讀取 550 nm 的吸光值。

(四)PGI₂ 含量測定

PGI₂ 含量之測定乃依 Cayman enzyme immunoassay #515211 kit 測定 PGI₂ metabolite 6-ketoprostaglandin F1- α 生成量。將 SVEC4-10 cells 以 15×10^4 /ml 接種於 24 孔盤，培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 0.5 ml 含不同濃度之 WECF (100, 250, 500 µg/ml) 及 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (10, 25 µM) 之培養基，反應 4 小時，取稀釋 200 X 之細胞培養液 50 µl 至事先 coating 二級抗體之 96 well plate，加入 50 µl PGI₂ tracer 和 50 µl PGI₂ antibody。將反應盤以塑膠膜封好，置於 4°C 下反應 18 hr。反應完後，將盤中的反應液倒掉，以 wash buffer 清洗 5 次，接著於每個 well 中加入 200 µl Ellman's reagent，室溫下暗反應 90 - 120 min，以 ELISA reader 讀取 405 nm 的吸光值。利用 PGI₂ 標準品所得之標準曲線求出培養液中之 PGI₂ 濃度(pg/ml)。

(五)捕捉 ONOO⁻測定

將 SVEC4-10 cells 以 30×10^4 /ml 接種於 6 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 1 ml 含不同濃度之 WECF (100, 250, 500 µg/ml) 及 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (10, 25 µM) 之培養基，置入培養箱 37°C，5 % CO₂ 下反應 16 小時，待反應時間終了，移除培養基，加入 0.5ml PBS (含有 DHR123 10µM)，置入培養箱 37°C，5 % CO₂ 下反應 30 分鐘後，以 PBS 緩衝液清洗細胞 2 次後，加入 100 µl Trypsin-EDTA 作用 2 - 3 分鐘，加入 500 µl 培養基中和 Trypsin-EDTA 反應，將細胞液移至微量離心管內以 10000 rpm，離心 10 分鐘，去除上層液，加入 100 µl PBS 緩衝液清洗，以 10000 rpm，離心 5 分鐘去除殘留之培養基，再加入 100 µl PBS 緩衝液將細胞打散後，移至 96 孔黑盤中，以螢光冷光儀 (BioTek FLx-800) 進行螢光強度分析 (Ex wavelength : 485 nm, Em wavelength : 528 nm)。

(六)細胞內活性氧之生成測定

將 SVEC4-10 cells 以 30×10^4 /ml 接種於 6 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 1 ml 含不同濃度之 WECF (100, 250, 500 µg/ml) 及 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (10, 25 µM) 之培養基，再加入 50 µM 之 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 反應 15 分鐘，加入 H₂O₂ 1 mM 置入培養箱 37°C，5 % CO₂ 下反應 2 小時，待反應時間終了，移除培養基，以 PBS 緩衝液清洗細胞 2 次後，加入 100 µl Trypsin-EDTA 作用 2 - 3 分鐘，加入 500 µl 培養基中和 Trypsin-EDTA 反應，將細胞液移至微量離心管內以 10000 rpm，離心

10 分鐘，去除上層液，加入 100 μ l PBS 緩衝液清洗，以 10000 rpm，離心 5 分鐘去除殘留之培養基，再加入 100 μ l PBS 緩衝液將細胞打散後，移至 96 孔黑盤中，以螢光冷光儀 (BioTek FLx-800) 進行螢光強度分析 (Ex wavelength : 485 nm , Em wavelength : 528 nm) 。

(七)細胞內鈣離子濃度測定

將 SVEC4-10 cells 以 30×10^4 /ml 接種於 6 孔盤，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 1 ml 含不同濃度之 WECF (100, 250, 500 μ g/ml) 及 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (10, 25 μ M) 之培養基，置入培養箱 37°C，5 % CO₂ 下反應 20 小時，待反應時間終了，移除培養基，加入 0.5ml PBS (含有 Fluo-3 2.5 μ M)，置入培養箱 37°C，5 % CO₂ 下反應 30 分鐘後，以 PBS 緩衝液清洗細胞 2 次後，加入 100 μ l Trypsin-EDTA 作用 2 - 3 分鐘，加入 500 μ l 培養基中和 Trypsin-EDTA 反應，將細胞液移至微量離心管內以 10000 rpm，離心 10 分鐘，去除上層液，加入 100 μ l PBS 緩衝液清洗，以 10000 rpm，離心 5 分鐘去除殘留之培養基，再加入 100 μ l PBS 緩衝液將細胞打散後，移至 96 孔黑盤中，以螢光冷光儀 (BioTek FLx-800) 進行螢光強度分析 (Ex wavelength : 485 nm , Em wavelength : 528 nm) 。

(八)西方墨點法(Western blot)

eNOS 與 COX 活性依西方墨點法測定，其方法同前所述。

蛋白質製備：

將 SVEC4-10 cells 以 100×10^4 /ml 接種於 10cm dish，培養 24 小時後，移除舊的培養基，加入 5 ml 含不同濃度之 WECF (100, 250, 500 μ g/ml) 及 Betanin、Kaempferol 及 Rutin (25 μ M) 之培養基，置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下分別反應 2 小時及 14 小時，反應終了，去除培養基後以 PBS 清洗 2 次，加 1 ml PBS 將細胞刮下，以 10000 rpm，離心 10 分鐘，去除上層液後，加入 100 μ l lysis buffer (RIPA buffer) 混合均勻於冰上反應 30 分鐘，再以 4°C 10000 rpm 離心 10 分鐘，取得細胞均質液並定量蛋白質濃度。接著將細胞均質液加入 4X loading buffer 以 95°C 反應 15 分鐘後，冰浴 5 分鐘，以 4°C，10000 rpm，離心 10 分鐘，冰浴備用。

(i) 蛋白質電泳

方法同前所述

(ii) 蛋白質轉漬

方法同前所述

(iii) 免疫轉染

方法同前所述

(iv) Enhanced chemiluminescence(ECL)偵測

方法同前所述

(九)輔助調節血壓動物試驗

(九)輔助調節血壓動物試驗

本試驗參考衛福部公佈之輔助調節血壓功能評估方法 (衛生署，2006) 。其原理

為以受試物給予原發性高血壓動物 (如 SHR 等)，觀察受試物對高血壓動物模型的收縮壓與舒張壓指標的影響，評價受試物的調節血壓作用。

1. 實驗方法

自國家實驗動物中心購買 9 週齡原發性高血壓大鼠 (SHR)和正常血壓大鼠 (WKY)。每隻大鼠個別飼養於不鏽鋼籠中，動物房溫度維持在 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度為 50-65%，控制每天光照及黑暗時間各 12 個小時。(光照期為 8:00-20:00，黑暗期為 20:00 至隔日 8:00)。飼料 (Lab Diet 5001 標準飼料) 與水均以自由給食方式，每兩天記錄動物體重。大鼠適應一週後隨機分成下列 7 組：

- a. 控制組 (CK)：WKY 大鼠管餵 RO 水
- b. 對照組 (CA)：SHR 大鼠管餵 Silymarin (100 mg/ kg bw)
- c. 實驗組 (R)：SHR 大鼠管餵 50 rutin mg/kg bw
- d. 實驗組 (B)：SHR 大鼠管餵 50 betanin mg/kg bw
- e. 低劑量組 (L)：SHR 大鼠管餵 10 mg WECF / kg bw
- f. 中劑量組 (M)：SHR 大鼠管餵 50 mg WECF / kg bw
- g. 高劑量組 (H)：SHR 大鼠管餵 100 mg WECF / kg bw

每組 7 隻大鼠，大鼠實驗處理過程與安樂死程序均依照嘉南藥理大學實驗動物照護及使用小組規範操作。實驗共為期 21 天，每 0、2、4、6、9、13、17、21 測量大鼠血壓。

2. SHR 血壓之測定

以間接測定法測定 WKY、SHR 之收縮壓與舒張壓，測定方法使用非侵入式老鼠多功能血壓測量儀尾套法 (MBRP-RMC1) 測量。實驗前對受試動物進行血壓測量(第 0 天)。依據測壓儀器的要求進行動物清醒、安靜狀態下的血壓的測定。實驗開始後每 2、4、6、9、13、17、21 天測量大鼠之血壓，測量時間為早上 8:00~12:00。實驗為期 21 天。測量前先將大鼠置於 32°C 的血壓機中，並以大鼠保定器將大鼠固定，只露出尾巴部分。將感應器套至大鼠尾巴基部，由儀器自動感應血壓而打氣加壓，所偵測數值包括心跳 (heart rate)、收縮壓 (systolic blood pressure)、舒張壓 (diastolic blood pressure) 及平均血壓 (average blood pressure)，每隻大鼠測量 3-5 次並加以平均。利用血壓機測量出來的收縮壓、舒張壓、平均血壓來計算最終收縮壓、最終舒張壓、最終平均血壓，計算公式如下：

- a. 最終收縮壓：收縮壓/心跳 $\times$ 平均心跳
- b. 最終舒張壓：舒張壓/心跳 $\times$ 平均心跳
- c. 最終平均血壓：平均血壓/心跳 $\times$ 平均心跳

3. 血漿生化分析項目

將動物之血液樣品放入含肝素的採血管，於室溫下靜置 1 小時以離心機分離血漿，以 3000 rpm 離心 10 分鐘，所得血漿以相關的 Kit 配合 ELISA 進行分析血管收縮轉移酶 (ACE) 與腎素 (renin)。

4. 統計分析

各項數據以 SPSS 17.0 統計軟體分析，利用 Paired t-test 檢定每一組大鼠的收縮壓、舒張壓、平均血壓、心跳、調整收縮壓、調整舒張壓、調整平均血壓，與自己起始點 (第 0 天) 之間的差異；再以變異數分析 (ANOVA)，以及 Duncan's

multiple range test 事後檢定第 9 與 21 天各組間的收縮壓、舒張壓、平均血壓、心跳、調整收縮壓、調整舒張壓、調整平均血壓的差異，統計顯著性設定在 $p < 0.05$ 。

伍、結果與討論

第一年

一、不同溶劑對回收率之影響

本研究以三種溶劑作區分，分別是以水作初步萃取，所得萃取物稱為 WECF，其次依序以乙酸乙酯及正丁醇等溶劑萃取，所得萃取物，分別稱 EECF 與 BECF。其回收率分別為 16.65%、3.8%及 8.0%，顯示 WECF 之回收率最高，其次為 BECF 及 EECF。圖一為各區分物對 HepG2 細胞之生存性之影響，顯示 WECF 在不同濃度對 HepG2 之生存性無影響，而其他兩種區分物皆顯示具有毒性。基於此，以下試驗乃以 WECF 為試驗對象。

二、對細胞生長之影響

圖二為 WECF 在不同濃度下對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 氧化傷害之存活率影響。結果顯示不同濃度之 WECF 可有效抑制 *t*-BHP 對細胞之氧化傷害性。

圖三為 WECF 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 之毒性反應之影響，結果顯示不同濃度之 WECF 能顯著抑制 *t*-BHP 誘發 HepG2 細胞之毒性反應。

三、對氧化壓力之影響

圖四為 WECF 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發細胞 ROS 產生之影響。結果顯示 0.2 mM *t*-BHP 單獨處理 3 小時可使細胞內 ROS 產生至少為控制組之 16.32 倍，若以 10、100 與 250 µg/ml WECF 處理，很明顯與單獨處理 *t*-BHP 之傷害組比較，皆具有清除胞內 ROS 之能力。

圖五為 WECF 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發胞內 GSH 含量之影響。結果顯示 0.2 mM *t*-BHP 單獨作用 3 小時，HepG2 胞內之 GSH 含量減少 57.29 %，若同時處理不同濃度之 WECF，於高濃度 250 µg/ml 的 WECF 可顯著增加 GSH 含量。

圖六為 WECF 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發胞內 TBARS 含量之影響。結果顯示 0.2 mM *t*-BHP 單獨作用 3 小時，HepG2 胞內之 TBARS 含量顯著增加，若同時處理不同濃度之 WECF，可顯著降低 TBARS 之含量。

四、對細胞凋亡之影響

圖七為 WECF 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 胞內 caspase-3 活性之影響。0.2 mM *t*-BHP 可使胞內之 caspase-3 活性增為控制組之 2.07 倍。若以 10、100 與 250 µg/ml WECF 處理，則 caspase-3 活性將減少至控制組之 1.71、1.34 及 1.36 倍，顯示上述待測物對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 caspase-3 活性有減緩作用。

圖八為 WECF 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 胞內 IκB-α 分解之影響。0.2 mM *t*-BHP 單獨作用 2 小時，可使胞內 IκB-α 分解至少 50 % 左右，若以 10-250 µg/ml WECF 處理，則 IκB-α 分解率將顯著性減少。換言之 WECF 可視為 NFκB 活性之抑制劑。

圖九以西方點墨法分析 WECF 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發細胞內 Bcl-2/Bax 比率之影響性。結果顯示 0.2 mM *t*-BHP 單獨作用 2 hr，其 Bcl-2/Bax 之比率明顯下降，而

不同濃度之 WECF 處理，很明顯提升 Bcl-2/Bax 之比率，顯示 WECF 能減緩 *t*-BHP 所誘發細胞之凋亡現象。

圖十顯示不同濃度 WECF 對 *t*-BHP 誘發胞內膜電位之影響。0.2 mM *t*-BHP 誘發細胞 2 hr，其膜電位顯著下降，惟不同濃度 WECF 處理能顯著性增加膜電位，此結果顯示 WECF 能有效防止 *t*-BHP 誘發細胞膜電位下降現象。

圖十一顯示不同濃度之 WECF 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 PARP 之影響。0.2 mM *t*-BHP 誘發細胞 24 hr 後，其 PARP 基因表現顯著性下降，而 100 與 250 µg/ml 之 WECF 則能顯著性緩減胞內 PARP 降解。由圖七結果顯示，當 *t*-BHP 誘發胞內 caspase-3 活性表現後，導致 PARP 之分解(圖十一)。相反地，當 WECF 抑制 caspase-3 活性之表現後，相對地也保護 PARP 之分解性。

圖十二以 DAPI staining 確認 WECF 對 0.2 mM *t*-BHP 誘發細胞之抗凋亡性。由圖中可知 *t*-BHP 誘發細胞凋亡，惟以 10 - 250 µg/ml WECF 處理之細胞，其凋亡之現象很明顯減少。

五、成分分析

WECF 經 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 之分析，由圖十三與表一，顯示 WECF 共被純化出 23 種成分，經鑑定後計有 15 種為已知成分，其中有類黃酮的甜菜苷(Betanin)，芸香苷(Rutin)，山柰酚(Kaempferol)及其配醣體，另有紫紅色 amaranthine，flavonol glycoside 的 camellianoside。由於受限於成分取得不易，本試驗以紅藜水萃取物及其成分 Rutin，Kaempferol，Betanin 作為測試物質。

十一、紅藜成分對氧化性凋亡之影響

圖十四顯示有效成分對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 生存性，活性氧及對 Caspase-3 活性之影響。由圖十五之 A 中可看出 1-100 µM 之 Rutin，Kaempferol 及 Betanin 可減緩 *t*-BHP 誘發細胞生長受損現象，而圖十四之 B 則可顯示三種成分可減少 *t*-BHP 誘發活性氧壓力。另外，Rutin，Kaempferol，Betanin 亦可降低 *t*-BHP 誘發 caspase-3 活性之作用(圖十四 C)。

第二年結果與討論

結果與討論

一、化學性模系護肝效應

(一) WECF 與活性成分對 CCl₄ 誘發大鼠體重與肝、腎臟器重量之影響

表二為預先餵食 WECF (0.5-2.5 mg/kg bw)與活性成分 Rutin，Kaempferol，Betanin (1 µg/kg bw)予大鼠連續 28 天，並於第 28 天腹腔注射 CCl₄，其誘發大鼠體重與肝、腎器官重量之影響。由結果顯示各組樣品餵食 28 天後，其大鼠體重皆無顯著性差異($p > 0.05$)。

(二) WECF 與活性成分對 CCl₄ 誘發大鼠肝損傷之血清生化值的影響

表三為 WECF 與活性成分對預先餵食大鼠 28 天後，於第 28 天腹腔注射 CCl₄ 誘發大鼠肝損傷之血清生化值的影響。大鼠在第 28 天注射 CCl₄，會明顯增加血清中肝損傷指標的 AST 與 ALT ($p < 0.05$)，而 Silymarin 與 2.5 mg/kg bw 的 WECF

可降低血清中之 AST($p < 0.05$)，且後者亦能顯著降低 ALT 值。

(三) WECF 與活性成分對 CCl₄ 誘發大鼠抗氧化酶與 GSH 之影響

表四結果顯示腹腔注射 CCl₄ 會降低 SOD 與 GSH 含量，WECF 與 Betanin 能增加 SOD 活性；各組對 GPX 與 CAT 則不具影響性，但會顯著增加 GSH 含量。

(四) WECF 與活性成分對 CCl₄ 誘發大鼠 CYP2E1 活性之影響

由圖十五顯示 1.0 與 2.5 mg/kg bw 的 WECF 可誘發 CYP2E1 活性而三種 WECF 之活性成分與單獨注射 CCl₄ 組作比較則不具影響性。

(五) WECF 與活性成分對 CCl₄ 誘發大鼠血液淋巴球細胞之影響

由圖十六顯示注射 CCl₄ 會明顯增加大鼠淋巴球細胞 DNA 之顯著損傷，而各組樣品之添加很明顯抑制 DNA 之損傷，顯示 WECF 與其活性成分具有抑制 CCl₄ 誘發大鼠血液淋巴球細胞 DNA 氧化破壞性。

(六) WECF 與活性成分對 CCl₄ 誘發大鼠損傷之病理切片

由圖十七病理切片之顯微鏡相片中顯示 WECF 與活性成分具有不等程度護肝現象，其中 Rutin、Betanin 及 1.0 與 2.5mg/kg bw 的 WECF 最為顯明。

二、酒精性模系護肝效應

(一) WECF 與活性成分 對 CCl₄ 誘發大鼠體重與肝、腎臟器重量之影響

表五中顯示餵食酒精 (30%)，其體重顯著性低於控制組，而肝重則顯著高於控制組，惟餵食 WECF (0.5、1.0 與 2.5 mg/kg bw) 及三種活性成分，飼育 90 天，其體重及肝、腎重量與對照組無顯著性差異。

(二) WECF 與活性成分對酒精水溶液誘發大鼠之血清與生化值之影響。

由表六可看出大鼠以酒精處理後除三酸甘油酯有顯著性增加外，其餘之 AST、ALT、BUN、CRE 與 CHOL 皆與對照組無顯著性增加，而 WECF 與三種活性成分處理之各組別，除 2.5 mg/kg bw 之 WECF 在 TG 與酒精水溶液組有差異外，其餘與酒精組或與對照組皆無顯著性差異。

(三) WECF 與活性成分對酒精發大鼠抗氧化酶與 GSH 之影響。

表七顯示酒精會顯著降低大鼠 SOD 與 CAT 活性，而 1.0 $\mu\text{g/kg bw}$ Rutin 可顯著提升 SOD 活性。另不同濃度 WECF 可顯著增加 CAT 活性。對 GSH 而言，酒精可增加 GSH 含量，而 WECF、Rutin 與 Kaempferol 則顯著低於酒精組。

(四) WECF 與活性成分對氧化壓力之影響

圖十八顯示酒精顯著性增加 TBARS 形成量，而 WECF 與三種成分之處裡則顯著性地降低 TBARS 之形成量。另由圖十九則顯示酒精增加大鼠淋巴球細胞 DNA 之損傷，而各組 WECF 與三種活性成分樣品之處理則很明顯抑制 DNA 之損傷，顯示 WECF 與其活性成分具有抑制酒精發大鼠淋巴球細胞 DNA 氧化現象。

(五) WECF 與活性成分對酒精水溶液誘發 CYP2E1 活性之影響

由圖二十中可看出酒精可誘發大鼠之 CYP2E1 活性，而 0.1 $\mu\text{g/kg bw}$ Betanin 與

2.5 mg/kg bwWECF 則具有顯著性之抑制作用。

(六) WECF 與活性成分對酒精水溶液誘發肝細胞損傷之病理切片

由圖二十一中顯示 WECF 與活性成分對酒精水溶液誘發大鼠肝細胞損傷情形不如酒精組之嚴重，顯示 WECF 與活性成分對肝細胞具有保護作用。

第三年結果與討論

結果與討論

一、對內皮細胞(SVEC4-10)生長之影響

本試驗以小鼠淋巴內皮細胞 SVEC4-10 為細胞株進行 *in vitro* 試驗。

圖二十二為 WECF 對 SVEC4-10 細胞生存性之影響。由圖得知 100–500 $\mu\text{g/ml}$ 的 WECF 對 SVEC4-10 細胞生存性皆大於 85 % 以上，顯示 100–500 $\mu\text{g/ml}$ 的 WECF 對 SVEC4-10 生存不具影響。

二、對內皮細胞 NO 產生及對 eNOS 基因表現之影響

圖二十三為 WECF 對 SVEC4-10 細胞反應 16 小時後對 NO 產生之影響，結果顯示 WECF 隨著濃度增加有增加 SVEC4-10 細胞內 NO 之產出量。換言之，WECF 對內皮細胞具有促進 NO 產生作用。為進一步瞭解 WECF 對促進 NO 產生之機轉，本研究分析 WECF 對 eNOS 基因表現之影響。由圖二十四中可看出 100–500 $\mu\text{g/ml}$ 之 WECF 對 eNOS 具有濃度與基因表現之促進相關性。由圖二十四可看出 WECF 因對 eNOS 之基因表現有誘發性，進而增加內皮細胞之 NO 產出量(圖二十三)。

三、對 PGI₂ 產出及對 COX-2 基因表現之影響

圖二十五為 WECF 對 PGI₂ 產出量之影響。結果顯示不同濃度之 WECF 對 PGI₂ 產出量具有顯著性促進作用。另圖二十六則顯示不同濃度 WECF 對 COX-2 基因表現之影響，顯示不同濃度之 WECF 對 COX-2 基因表現有正向促進關係。

四、對 Ca²⁺ 生成之抑制性

圖二十七為探討 WECF 對 Ca²⁺ 之抑制情形。顯示 WECF 可抑制內皮細胞之 Ca²⁺ 量。前人文獻顯示，eNOS 能夠催化 arginine 而形成氣體訊號分子的 NO。一旦 NO 形成，將滲入血管平滑肌細胞(VSMC)而活化 guanylate cyclase (GC)，此 GC 可將 GTP 轉化成 cGMP。另一方面，COX 可將花生四烯酸作用成 prostacyclin (PGI₂)，並進入 VSMC，再與 G-protein-coupled receptor (Gs) 結合，繼而活化 adenylyate cyclase (AC)，此酶能將 ATP 轉化成 cAMP 的。上述 cGMP 與 cAMP 則分別促進 GMP-dependent protein kinase (DKG) 與 cAMP-dependent protein kinase (PKA) 的活性。此二種激酶可磷酸化鉀離子通道蛋白，導致 VSMC 膜的高度電極化，以致於進一步抑制進入平滑肌細胞之 Ca²⁺，一旦 Ca²⁺ 流入量降低，將增加血管擴張性，減少血壓驟升現象。由圖二十七顯示 WECF 具有抑制內皮細胞之 Ca²⁺ 量，此有助於 WECF 調降血壓之說。

五、對 peroxynitrite 生成性之影響

圖二十八為 WECF 對 peroxynitrite (ONOO⁻) 作用之影響，由圖中可看出

WECF 對 ONOO^- 之生成有顯著性抑制。前人研究報告顯示內皮細胞之 O_2^- 會與 NO 反應而產生 peroxynitrite，其會進一步氧化 eNOS 之輔因子 tetrahydrobiopterin (BHx)，另外，peroxynitrite 會降低 prostacyclin synthetase 活性，導致 PGI_2 生成量下降，進而升高血壓。換言之，WECF 抑制 peroxynitrite 之活性，有助於其調降血壓。

六、對 ROS 氧化作用之影響

圖二十九為 WECF 對 H_2O_2 誘發內皮細胞 ROS 產生量之影響。由圖中可看出 WECF 對 ROS 之生成有顯著性抑制。

七、對 ACE 活性之抑制性

表八顯示 WECF 對 ACE 具有顯著抑制性，且隨濃度增加其抑制性有增加趨勢，再者，500 $\mu\text{g/ml}$ 對 ACE 之抑制性與對照組 1 μM 之 captopril 無顯著性差異。基於此，WECF 對 ACE 之抑制作用可說明其對血壓有調降之功能性。

八、WECF 活性成分 Rutin，Kaempferol 與 Betanin 對內皮細胞生化指標之影響

圖三十顯示 WECF 之三種成分在 10 與 25 μM 濃度之生存性皆有大於 90%，顯示在此濃度對 SVEC4-10 生存性不具影響。圖三十一顯示三種成分在 25 μM 濃度下對 NO 之產生量具有影響，其中以 Kaempferol 影響最鉅。另由圖三十二中可看出三種成分對 eNOS 基因表現也具有促進作用。再者，三種成分對 PGI_2 (圖三十三) 與 COX-2 基因表現 (圖三十四) 也具有正向性之影響。另外，三種成分對 Ca^{2+} 量之生成具有顯著性之抑制性 (圖三十五)，而對 peroxynitrite 生成而言，三種成分亦具有抑制性 (圖三十六) 且對 H_2O_2 誘發內皮細胞 ROS 產生量亦具抑制性 (圖三十七)。由圖三十五至圖三十七可解析三種成分對 SVEC4-10 細胞有關降血壓因子之正向性影響，而彼等結果有助於解釋 WECF 具有調降血壓之說。再者由表九亦可看出三種成分對 ACE 具有顯著性抑制作用。

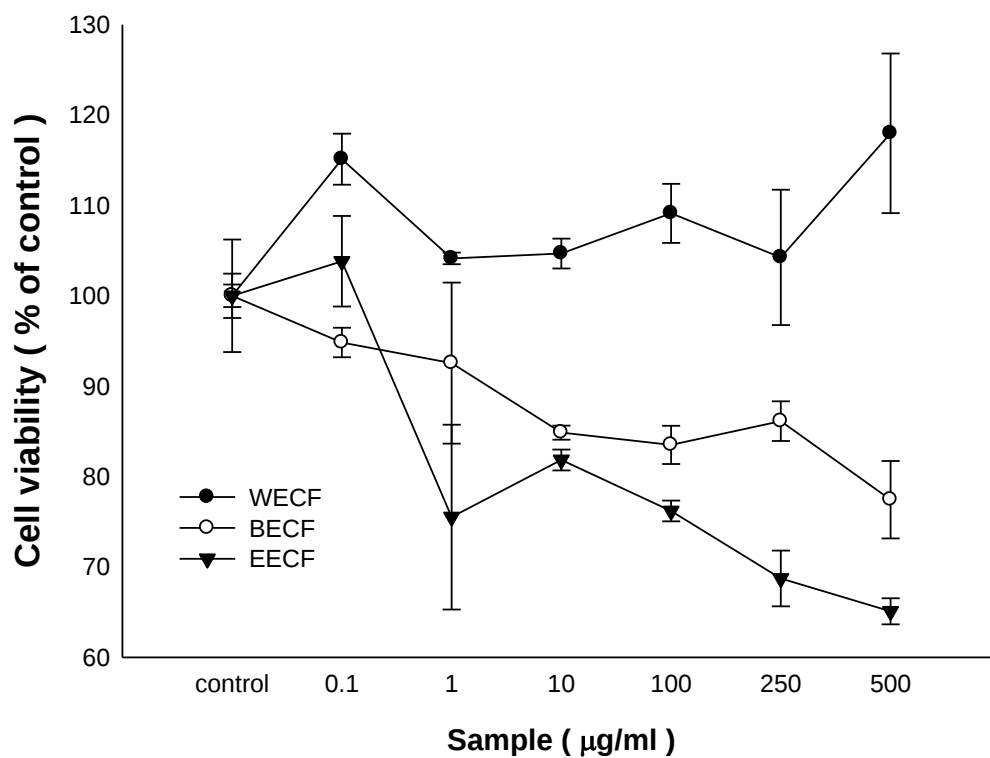
九、WECF 及其活性成分降血壓之 *in vivo* 試驗

由於 *in vitro* 試驗中 50 μM 之 Kaempferol 對 SVEC4-10 具有毒害性，考量其在 *in vivo* 試驗可能具有毒性，故在 *in vivo* 試驗中只以 Rutin 與 Betanin 測試。表十為以不同濃度之 WECF 及 Rutin，Betanin 對 SHR 大鼠體重與腎臟無影響，惟各樣品組之肝種顯著大於控制組。表十一為以不同濃度之 WECF 及 Rutin，Betanin 對 SHR 大鼠收縮壓之血壓影響。由此可看出試驗期間於第 21 天，100 mg/kg bw 之 WECF 及 50 mg/kg bw 之 Rutin 與第 0 天比較具有顯著調降收縮血壓作用，分別減少 21.2 與 39.5 mmHg。而第四天後，100 mg/kg bw 之 WECF 已具有調降之效。另由表十二亦可看出第 21 天 100 mg/kg bw 之 WECF 與 50 mg/kg bw 之 Rutin 與第 0 天比較，具有顯著降低舒張壓之效，分別減少 15.3 與 22.2 mmHg。

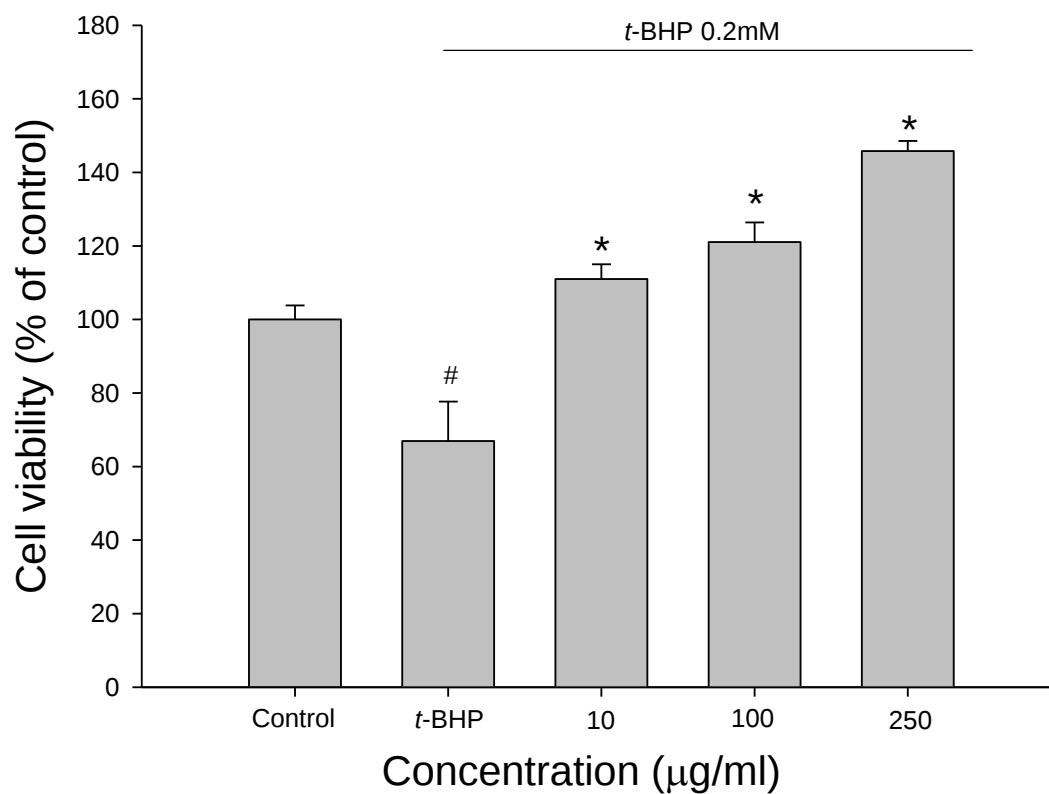
由上述研發成果可確認紅藜水草物可降低 *t*-BHP 產生之氧化壓力，進而保護 *t*-BHP 因誘發細胞氧化壓力而細胞受損現象。其中 WECF 降低 *t*-BHP 誘發 ROS、TBARS 含量、Caspase-3 活性及減少 I κ B- α 之分解，提升 GSH、Bcl-2/Bax 比率及膜電位。再者，由於 WECF 含有效成分，故具有上述降低氧化壓力之效。在

in vivo 模式中，因 WECF 具有抑制氧化作用，因此在以 CCl₄ 或以酒精誘發肝細胞傷害之 *in vivo* 試驗中，WECF 皆能顯著保護肝細胞免於被氧化作用，而其所含之活性成分由於具有不等程度之生物活性，故有助於 WECF 之護肝效應。在調降血壓研發成果中，可進一步看出 WECF 因促進 eNOS 與 COX-2 活性而增加 NO 與 PGI₂ 產生量，同時 WECF 抑制 ACE 活性、Ca²⁺、ONOO⁻ 含量。另外，WECF 對 SHR 大鼠之收縮壓與舒張壓有調降功能，而彼等功能與其所含有效成分之存在有關。綜合上述，紅藜及其活性成分具有護肝與輔助調節血壓之效應。

第一年圖與表

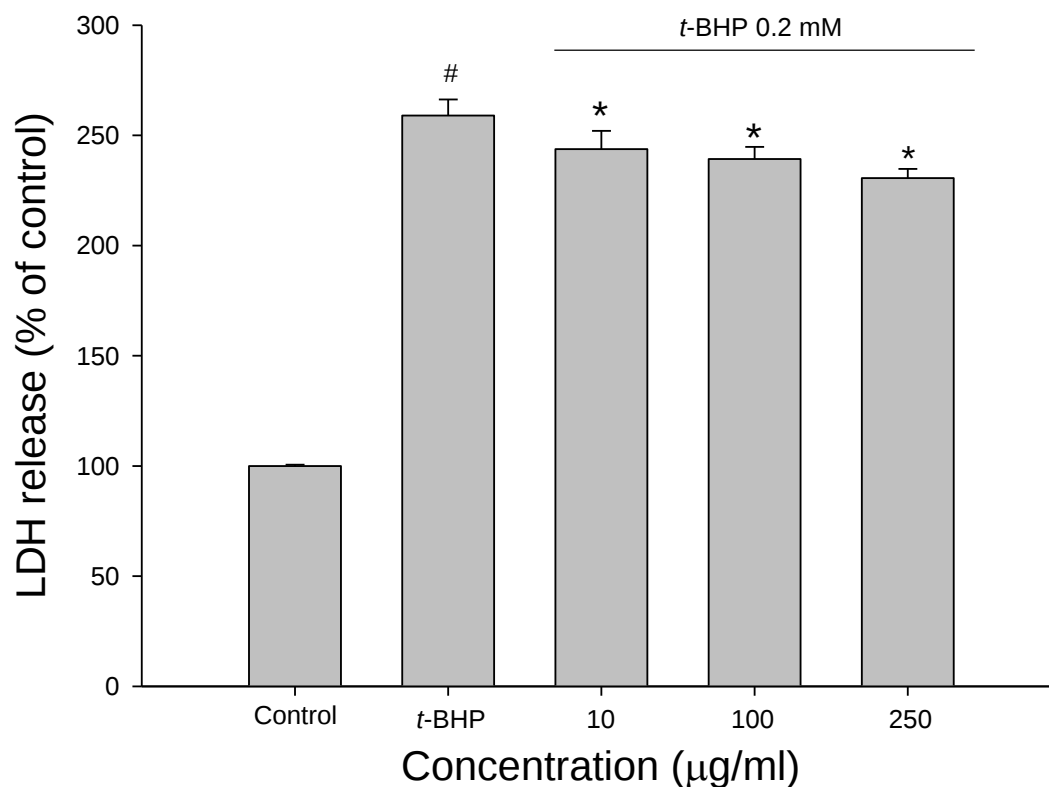


圖一 不同溶劑紅藜萃取物對 HepG2 細胞反應 24 小時之細胞生存性之影響
 Figure 1. Effects o Djulis extracted with different solverts on HepG2 cell viability. The cells were treated with water extracts of of Djulis (WECF), ethyl acetate extracts of Djulis (EECF) and butanol extracts of of Djulis (BECF), respectively, for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3).



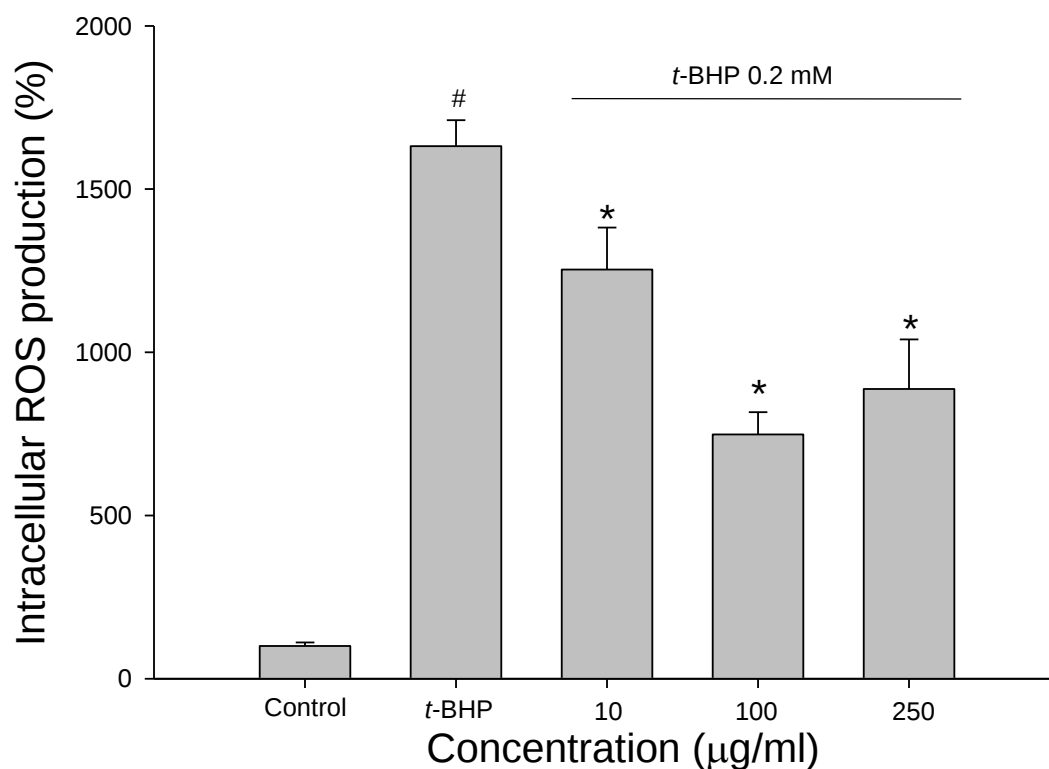
圖二 紅藜水萃取物對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 反應 24 小時後對細胞生存性之影響

Figure 2. Effects of water extracts of Djulis (WECF) on HepG2 cell viability in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The cells were treated with different concentrations of WECF and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$) compared with the control group. *($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



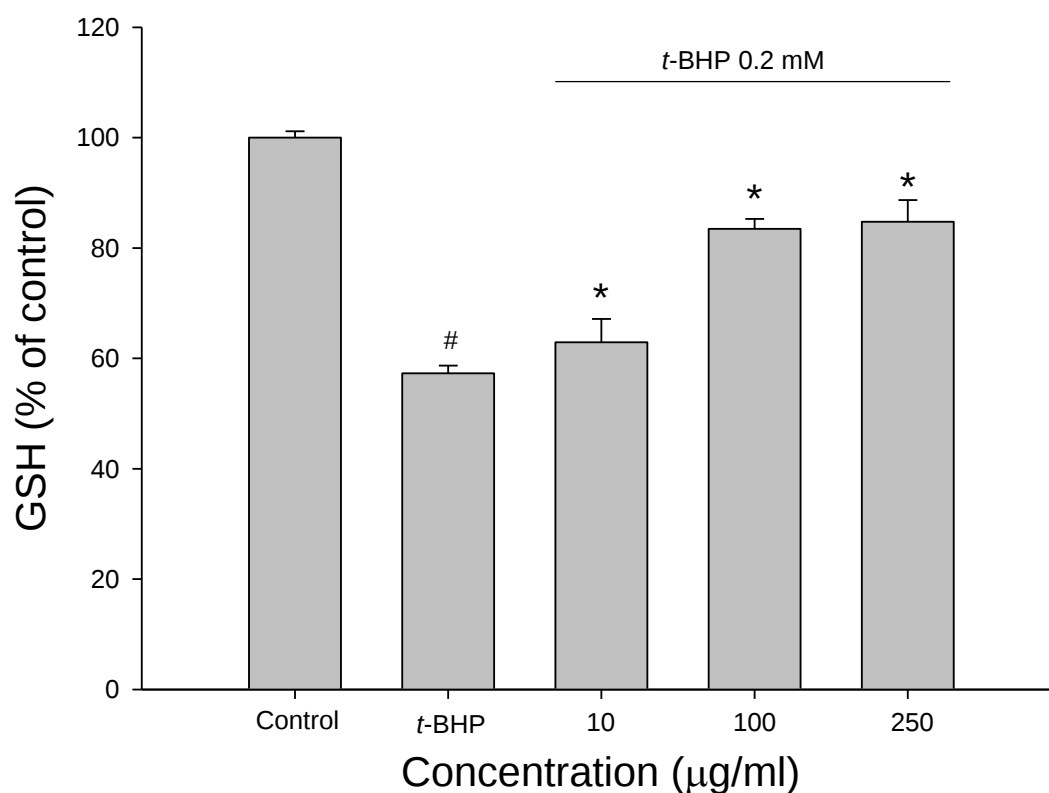
圖三 紅藜水萃取物對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 細胞作用 16 小時後對 LDH 釋放之影響

Figure 3. Effects of water extracts of Djulis (WECF) on LDH leakage in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The cells were treated with different concentrations of WECF and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 16 h . Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$) compared with the control group. *($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



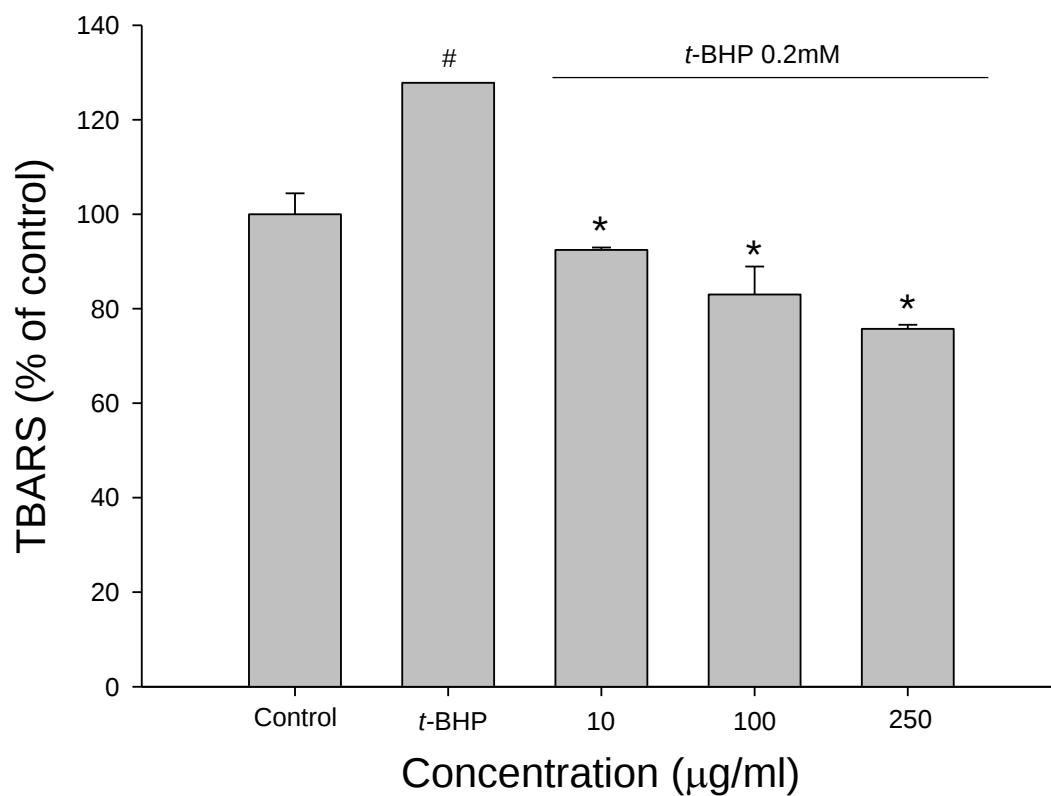
圖四 紅藜水萃取物對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 之細胞作用 3 小時後對 ROS 生成影響

Figure 4. Effects of water extracts of Djulis (WECEF) on ROS production in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The cells were treated with different concentrations of WECEF and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 3 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$) compared with the control group. *($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



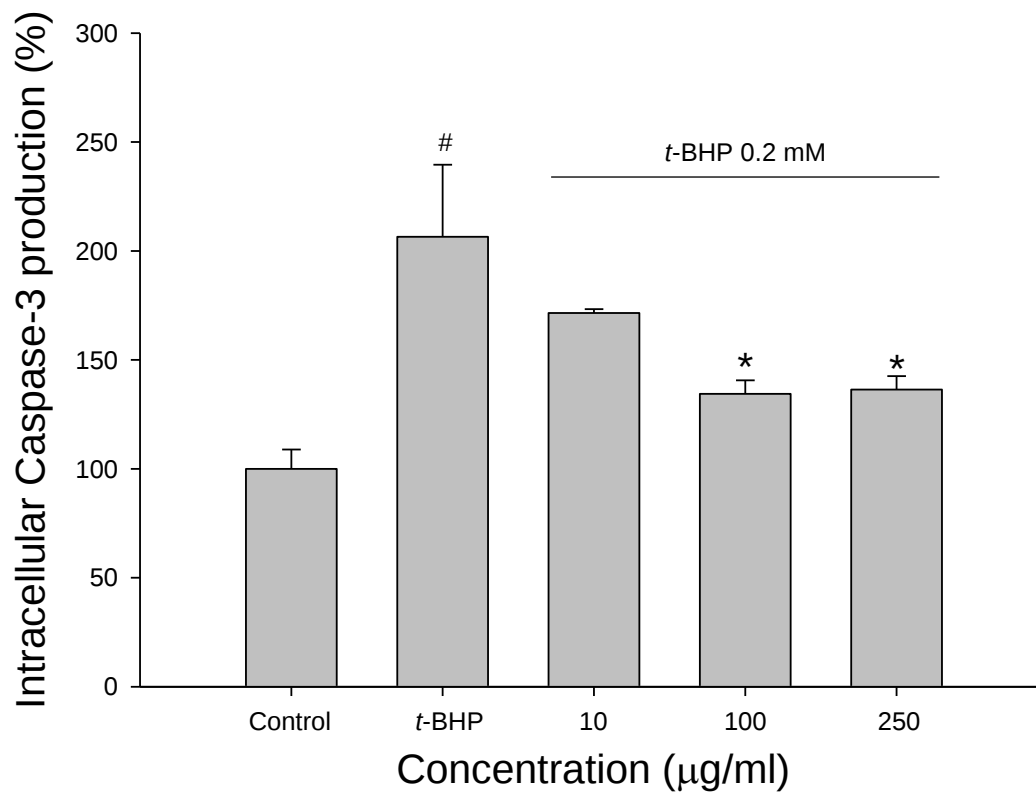
圖五 紅藜水萃取物對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 之細胞作用 3 小時後對 GSH 生成之影響

Figure 5. Effects of water extracts of Djulis (WECF) on GSH in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The cells were treated with different concentrations of WECF and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 3 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$) compared with the control group. *($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



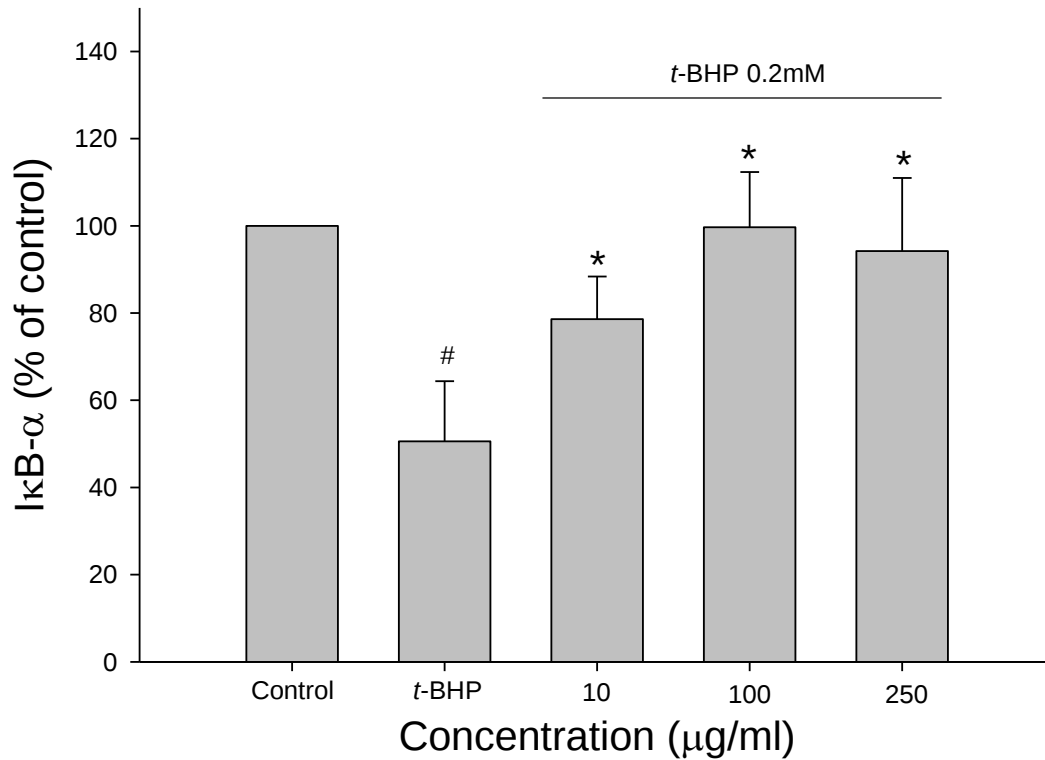
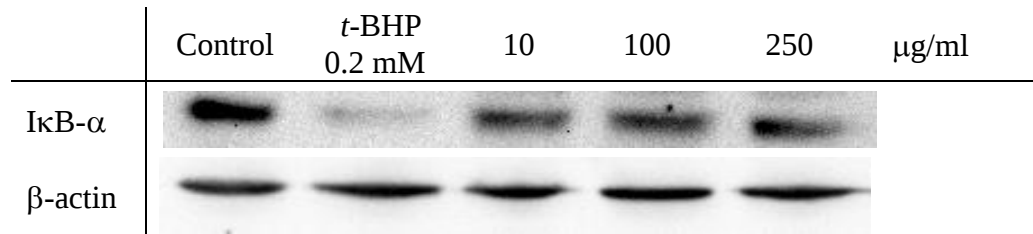
圖六 紅藜水萃取物對 0.2 mM *t*-BHP 誘發 HepG2 之細胞作用 2 小時後對 TBARS 生成之影響

Figure 6. Effects of water extracts of of Djulis (WECF) on TBARS levels in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The cells were treated with different concentrations of WECF and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # (p < 0.05) compared with the control group. * (p < 0.05) compared with 0.2 mM *t*-BHP- induced cells alone.



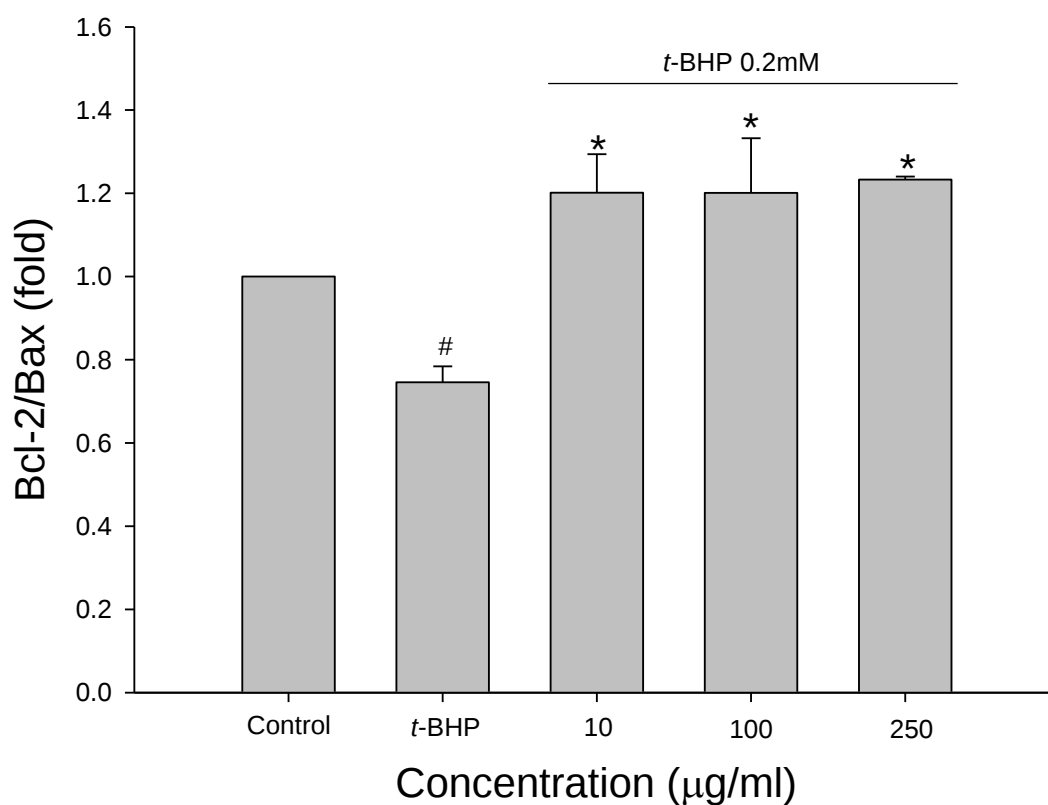
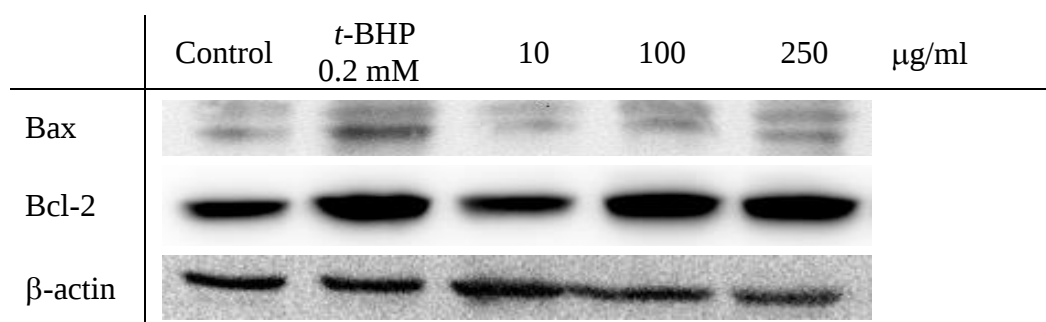
圖七 紅藜水萃取物對 HepG2 細胞作用 24 小時後對 caspase-3 生成影響

Figure 7. Effects of water extracts of Djulis (WECF) on caspase-3 activity in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The cells were treated with different concentrations of WECF and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$) compared with the control group. *($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



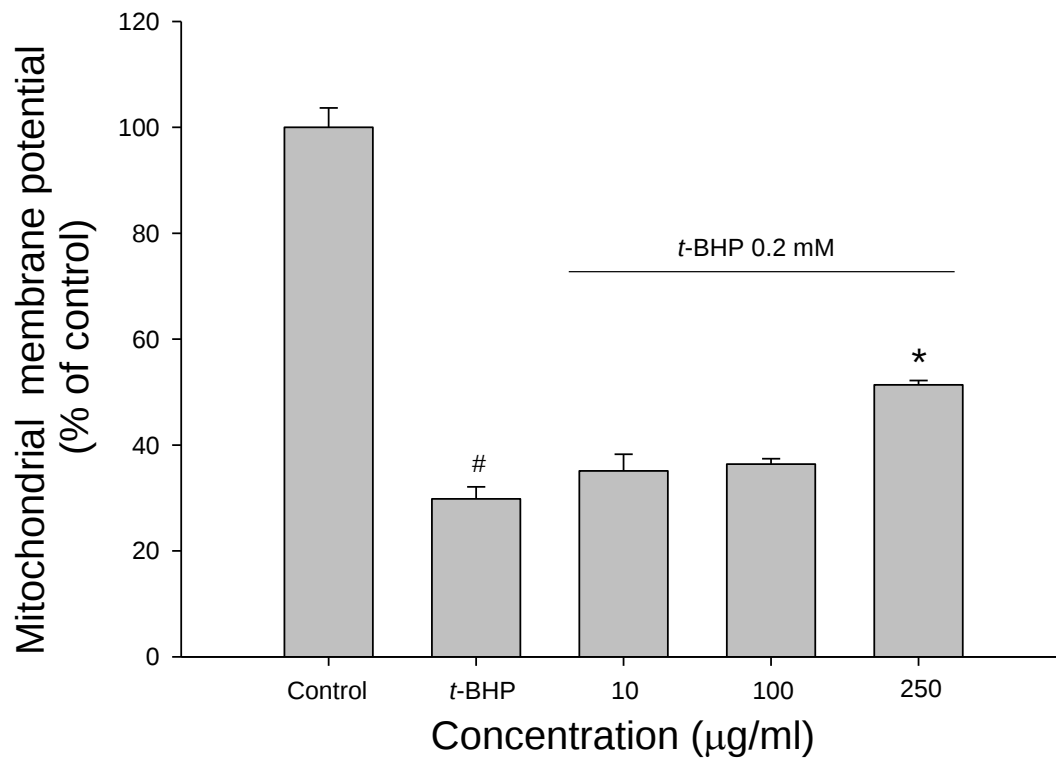
圖八 紅藜水萃取物對 HepG2 細胞作用 2 小時後對 IκB-α 之影響

Figure 8. Effects of water extracts of of *Djulis* (WECEF) on IκB-α in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The cells were treated with different concentrations of WECEF and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 2 h. Data are presented by means ± SD (n=3). # (p < 0.05) compared with the control group. * (p < 0.05) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



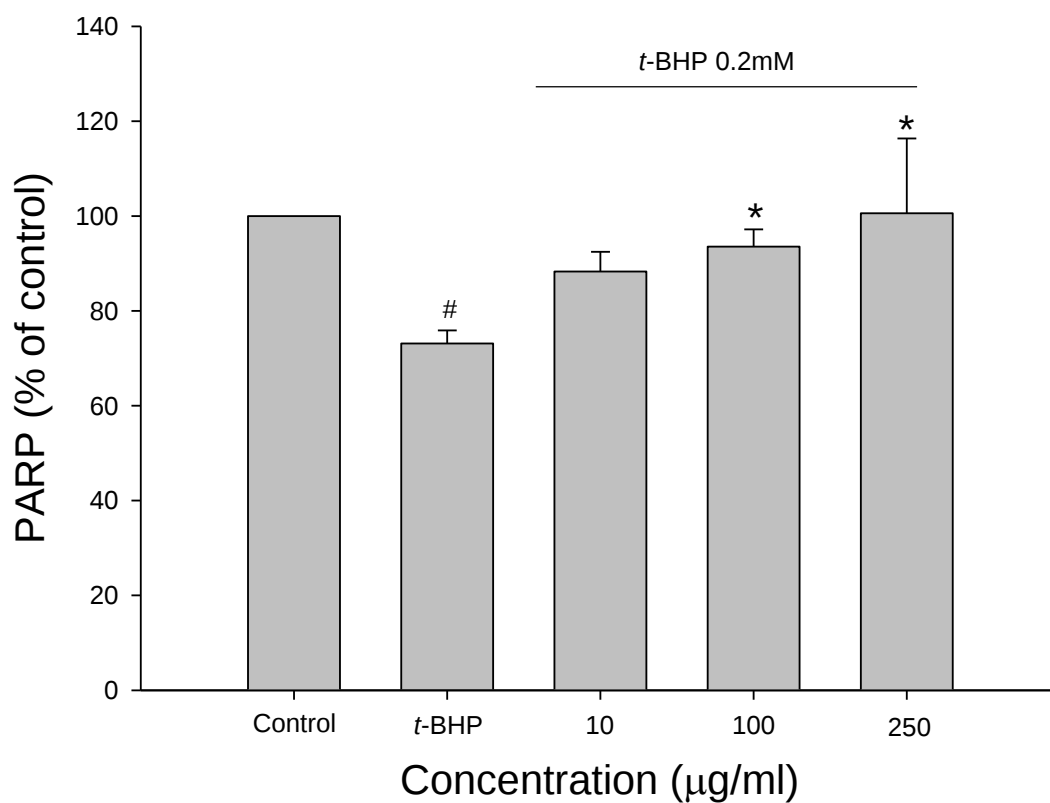
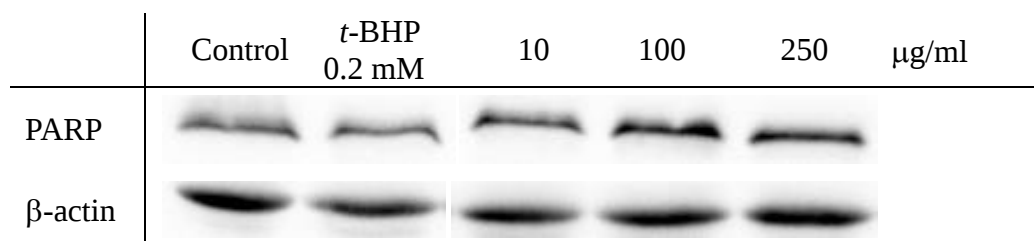
圖九 紅藜水萃取物對 HepG2 細胞作用 2 小時後對 Bcl-2/Bax 之影響

Figure 9. Effects of water extracts of of Djulis (WECF) on Bcl-2/Bax in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The cells were treated with different concentrations of WECF and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$) compared with the control group. *($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



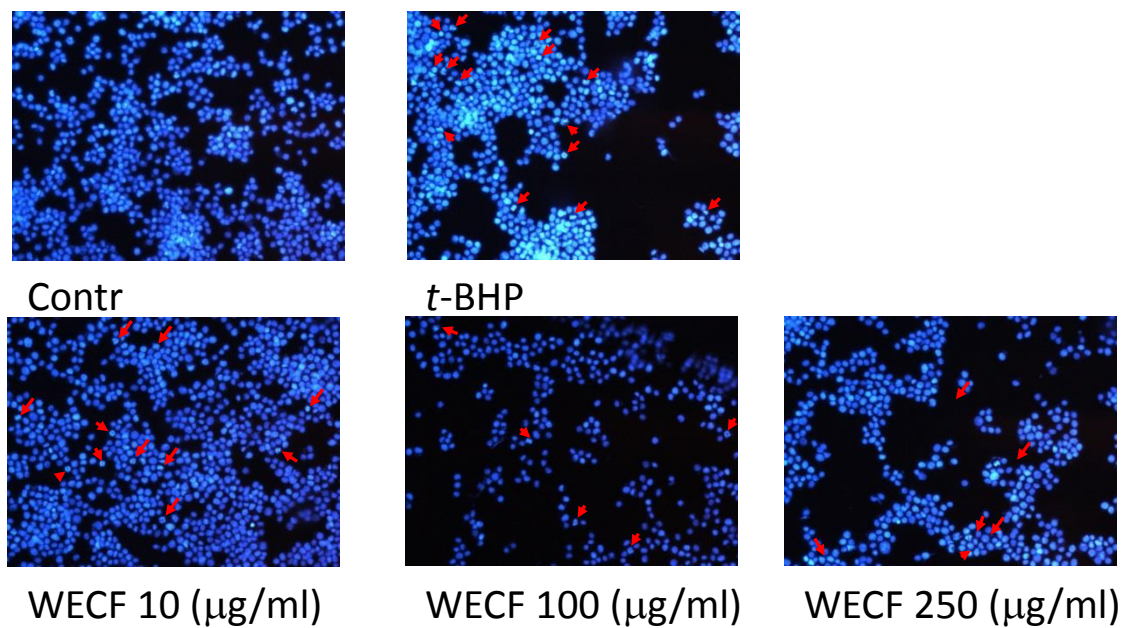
圖十 紅藜水萃取物對 HepG2 細胞作用 2 小時後對膜電位之影響

Figure 10. Effects of water extract of of Djulis (WECEF) on mitochondrial membrane potential in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The cells were treated with different concentrations of WECEF and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$) compared with the control group. *($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP- induced cells alone.



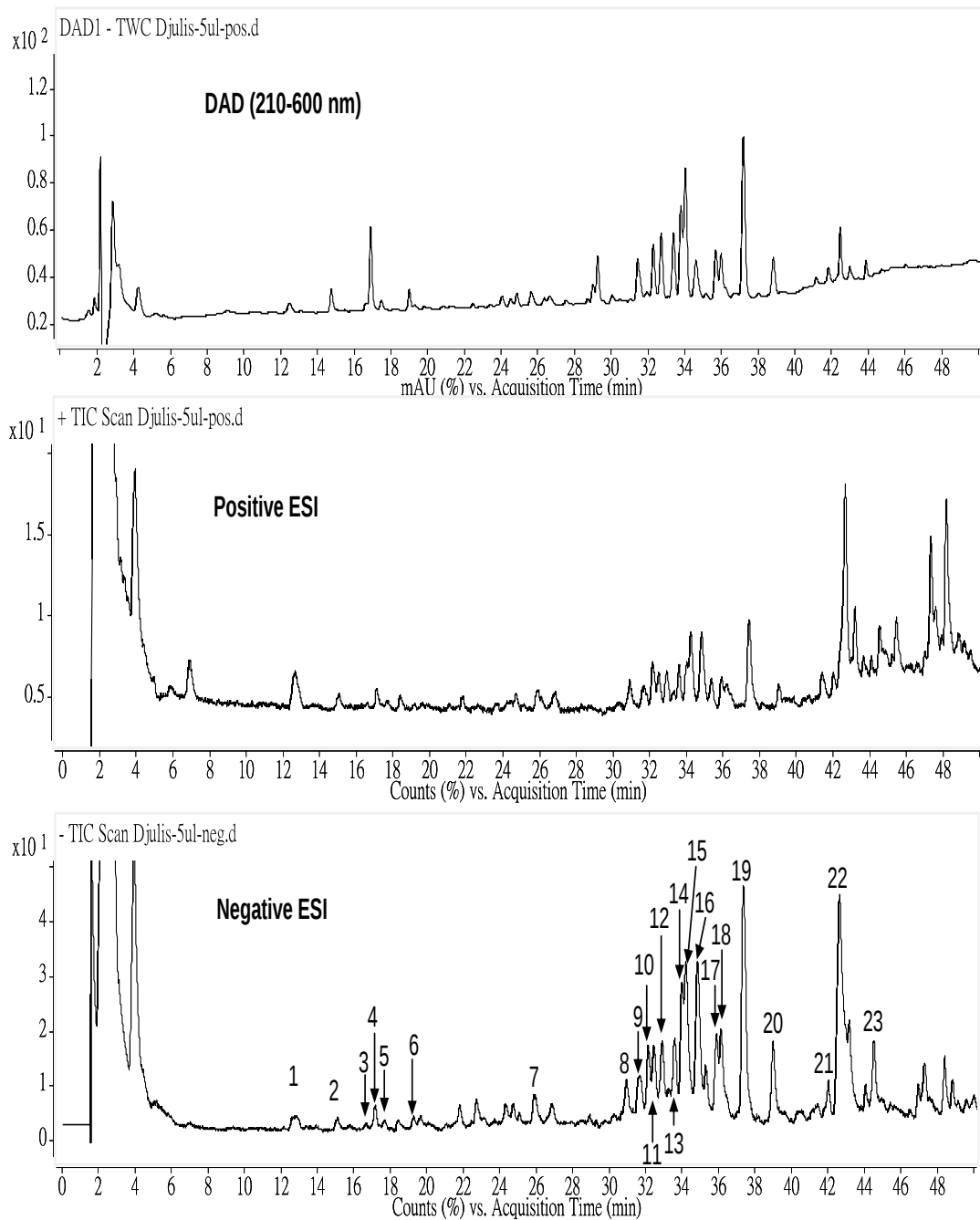
圖十一 紅藜水萃取物對 HepG2 細胞作用 24 小時後對 PARP 之影響

Figure 11. Effects of water extract of of Djulis (WECF) on PARP in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The cells were treated with different concentrations of WECF and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$) compared with the control group. *($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.

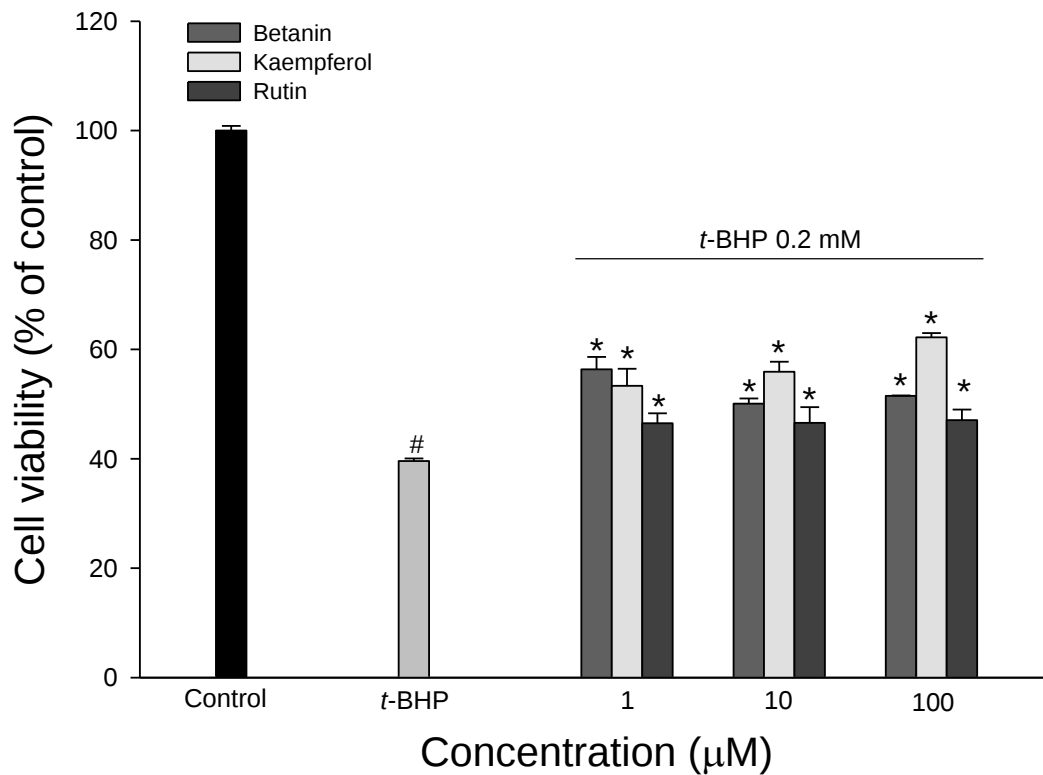


圖十二 紅藜水萃取物對 HepG2 細胞作用 24 小時後對細胞形態之影響

Figure 12. Effects of water extract of of Djulis (WECEF) on morphology in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. The cells were treated with different concentrations of WECEF and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 24 h.

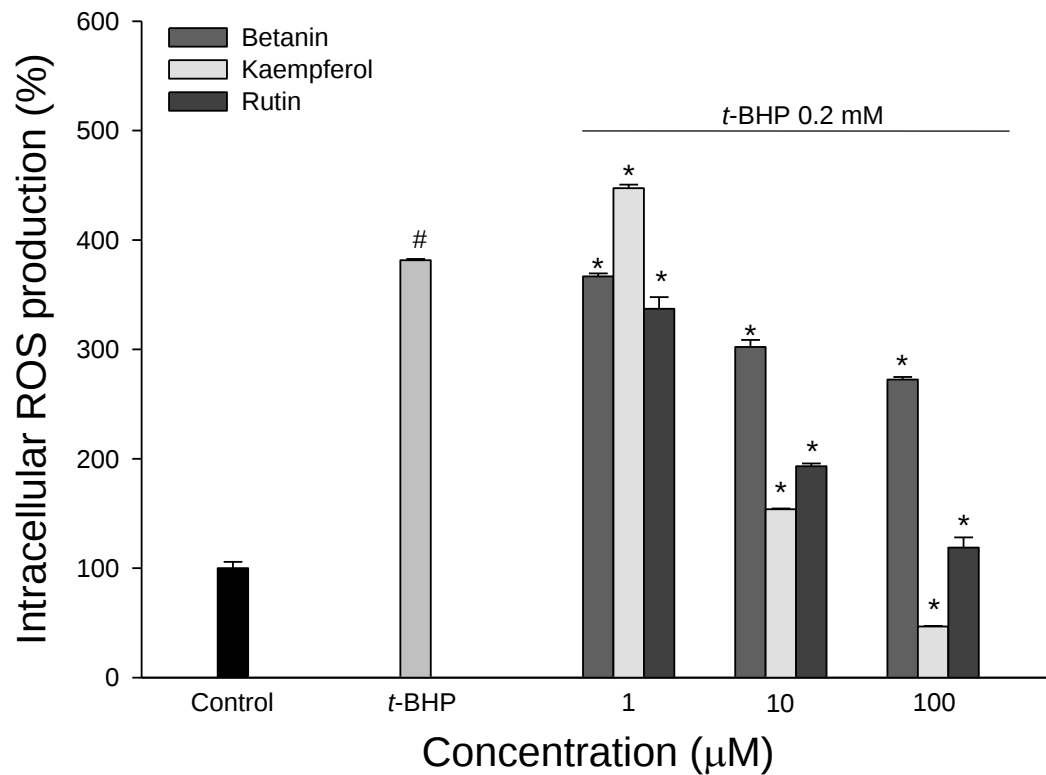


圖十三 紅藜水萃取物經 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 之分析
 Figure 13. Total ion chromatograms of m/z 100-800 in electrospray positive (upper panel) and negative ionization (middle panel), and HPLC-photodiode array detection chromatograms (lower panel) at full scan of 210-600 nm from methanol soluble compounds in aqueous extract of Djulis. Peak numbers refer to Table 1.



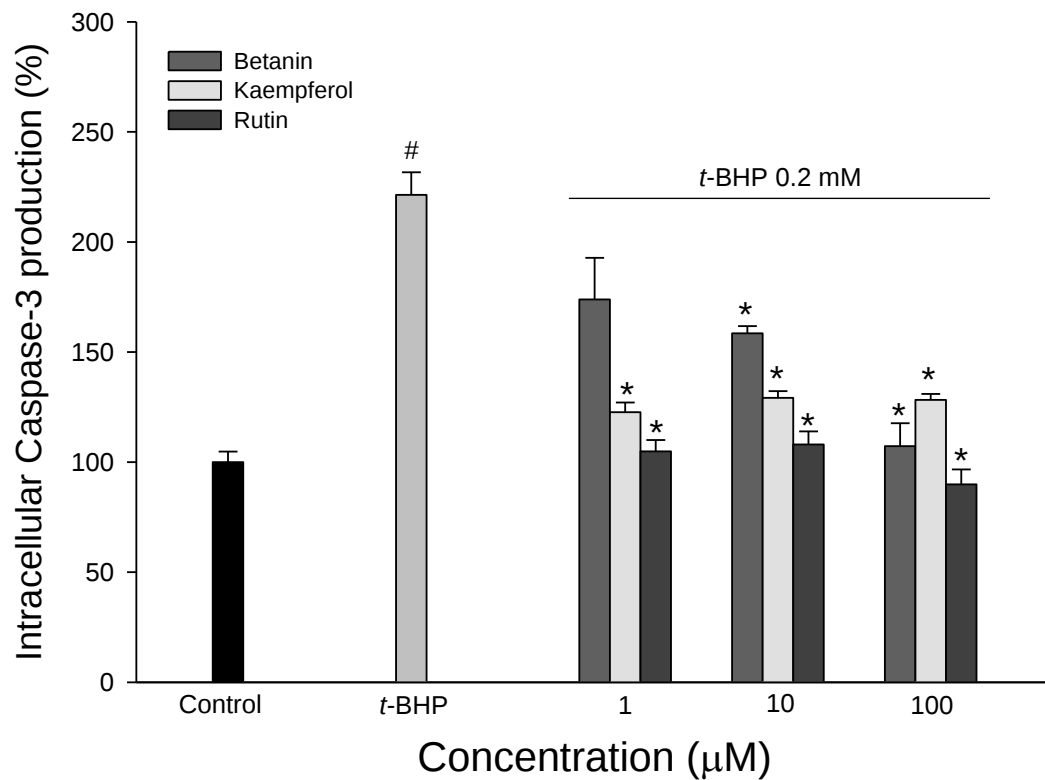
圖十四 A Betanin, Kaempferol and Rutin 對 *t*-BHP 誘發 HepG2 細胞反應 24 小時之細胞生存性之影響

Figure 14A. Effects of Betanin, Kaempferol and Rutin on HepG2 cells survival in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. Cells were treated with different concentrations of Betanin, Kaempferol and Rutin and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#]($p < 0.05$) compared with the control group. ^{*}($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



圖十四 B Betanin, Kaempferol and Rutin 對 *t*-BHP 誘發 HepG2 細胞反應 3 小時之 ROS 之影響

Figure 14B. Effects of Betanin, Kaempferol and Rutin on ROS production in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. Cells were treated with different concentrations of Betanin, Kaempferol and Rutin and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 3 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#](p < 0.05) compared with the control group. ^{*}(p < 0.05) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.



圖十四 C Betanin, Kaempferol and Rutin 對 *t*-BHP 誘發 HepG2 細胞反應 24 小時之 caspase-3 之影響

Figure 14C. Effects of Betanin, Kaempferol and Rutin on caspase-3 activity in 0.2 mM *t*-BHP-induced HepG2 cells. Cells were treated with different concentrations of Betanin, Kaempferol and Rutin and exposed to 0.2 mM *t*-BHP for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#]($p < 0.05$) compared with the control group. ^{*}($p < 0.05$) compared with 0.2 mM *t*-BHP-induced cells alone.

表一紅藜水萃取物之光譜分析

Table1. Retention time, UV-vis and Mass spectral characteristics of the water extracts of Djulis (WECF)

Peak	Compound	t_R (min)	λ_{max} (nm)	$[M + H]^+$	fragment ions	$[M - H]^-$	MS^2	Amount (mg/g) ^d	References
1	Unknown	12.68	274	220	188, 205, 156	218	--	10.08	
2	Amaranthine ^b	15.05	538	727	355, 377, 404, 220	--	--	20.02	Tsai et al. (2012)
3	Isoamaranthine ^b	16.78	534, 237	727	147, 379, 300, 715	--	--	2.83	Tsai et al. (2012)
4	Betanin ^a	17.09	534, 274	551	539, 505, 187, 355	--	--	68.33	
5	Betanidin ^c	17.65	474, 260	391	327, 355, 129, 212	389	--	4.46	Kobayashi et al. (2001)
6	IsoBetanin ^b	19.28	534, 236	551	539, 327, 356, 505	--	--	15.40	Tsai et al. (2012)
7	Unknown	25.81	275, 234	713	409, 147, 513, 340	711	--	12.29	
8	Unknown	30.90	235, 277	274	206, 252, 120, 234	272	--	57.85	
9	Camellianoside ^b	31.60	268, 350	743	611, 303, 497, 595	741	300, 179	10.22	Onodera et al. (2006)
10	Unknown	32.07	257, 356, 230sh	473	207, 457, 249, 177	471	--	35.56	
11	Kaempferol derivative ^c	32.40	268, 348, 236sh	697	565, 433	695	549, 284, 430	8.89	
12	Kaempferol 3-O-[6'''-p-coumaroyl-glucosyl- β -(1 $\rightarrow$ 4)-rhamnoside] ^b	32.82	268, 349, 246sh	741	565, 361, 299	739	593, 285, 431	60.37	Luo et al. (2013)
13	Kaempferol-3-O-[xylopyranosyl(1,3)-rhamnopyranosyl(1,6)]-galactoside ^b	33.54	267, 354, 233sh	727	595, 287, 383, 449	725	284, 255, 575	56.90	Semmar et al. (2002)
14	Rutin ^a	33.91	349, 267, 226	611	303, 465	609	300, 301, 271	95.69	
15	Kaempferol-3-O-[2-O-xylopyranosyl-6-O-rhamnopyranosyl]-glucoside ^b	34.18	266, 351, 230sh	727	595, 287, 449	725	284, 593, 255	117.02	Park et al. (2006)
16	Unknown	34.77	270, 234, 350	581	291, 313, 245, 273	579	245, 203	22.44	
17	Kaempferol-3-O-robinobioside ^b	35.80	267, 342, 235	595	287, 449, 567	593	284	28.53	Liu et al. (2010)
18	Kaempferol-3,7-di-O-rhamnoside ^c	36.07	350, 266, 234	579	433, 375	577	--	52.34	Page et al. (2012)
19	Kaempferol-3-O-Rutinoside ^a	37.30	267, 350, 235sh	595	287, 449	593	285, 284, 255	160.03	
20	Kaempferol-3,4'-dipentoside ^c	38.81	268, 351, 235sh	551	287, 419	549	--	42.73	
21	Kaempferol-3-O-rhamnoside ^c	41.96	266, 235, 346	433	287, 321	431	--	14.10	Kerhoas et al. (2006)
22	Unknown	42.56	236, 312, 420	679	295, 340	677	489, 279, 444	32.82	
23	Unknown	44.01	245, 318, 412	677	659, 330, 538	675	--	7.42	
	Total							936.32	

^aThe identification was confirmed further by authentic compound. ^bCompounds were tentatively identified according to mass spectra and the matched data from literatures. ^cCompounds were limitedly identified from mass spectra and UV-visible absorbance spectra. ^dPeaks 2, 3, 4 and 6 were quantified as equivalent to Betanin and all the others were quantified as quercetin (three replicates for all compounds) based on the amount of mg/g extract.

第二年圖與表

表二 紅藜水萃取物及其三種活性成分對 CCl₄ 誘發大鼠體重及相對臟器重量之影響

Table 2 Effects of water extracts of Djulis (WECF) and three bioactive compounds on body weight and relative organ weights in male Wistar rats

Groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Relative organ weights (%)	
			Liver	Kidney
Control	300.03±8.16	329.07±21.06	43.1±9.72	10.0±1.27
50% CCl ₄ / Olive oil	305.47±5.10	372.64±18.38	45.1±2.86	9.1±0.49
Rutin (1µg/kg bw)+CCl ₄	272.58±22.13	339.08±18.65	44.2±5.26	9.8±0.43
Betanin (1 µg/kg bw)+CCl ₄	291.51±17.98	349.90±11.38	42.2±3.64	9.2±0.47
Kaempferol (1 µg/kg bw)+CCl ₄	295.38±15.25	335.78±22.15	43.7±3.67	9.2±0.82
Silymarin (100 mg/kg bw)+CCl ₄	296.67±14.35	344.73±17.46	39.4±1.74	9.0±0.58
WECFL (0.5 mg/kg bw)+CCl ₄	285.60±10.16	333.77±23.60	40.1±4.78	9.5±0.61
WECFM (1 mg/kg bw)+CCl ₄	300.03±8.16	344.42±10.57	43.2±4.22	9.6±0.61
WECFH (2.5 mg/kg bw)+CCl ₄	289.59±14.89	338.7±19.60	39.6±4.06	10.4±0.32
WECFH (2.5 mg/kg bw)	288.97±5.37	346.50±27.68	38.3±1.41	10.0±1.27

Values are means ± SD for six rats per group. Results were all statistically analyzed with LSD test. [#]significant difference from the control group ($p < 0.05$). ^{*}significant difference from the CCl₄ group ($p < 0.05$). Relative organ weight= organ weight (g) / final body weight (g) × 100%.

表三 紅藜水萃取物及其三種活性成分對 CCl₄ 誘發大鼠血清生化值之影響

Table 3 Effects of water extracts of Djulis (WECF) and three bioactive compounds on serum biochemical values in male Wistar rats treated with CCl₄

Groups	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)	CHOL (mg/dL)	TG (mg/dL)
Control	116±10	35±1.5	15±2	0.64±0.06	73.3±20.8	77.00±2.0
50% CCl ₄ / Olive oil	1409±821 [#]	391±199 [#]	18±3	0.62±0.06	40.2±6.2 [#]	44.00±11.1 [#]
Rutin (1 µg/kg bw)+ CCl ₄	868±654	257±193	21±3	0.65±0.04	51.2±7.5	37.20±15.1
Betanin (1 µg/kg bw)+ CCl ₄	948±619	217±155	21±4	0.67±0.07	45.3±3.6	38.00±11.0
Kaempferol (1 µg/kg bw)+ CCl ₄	1205±633	496±3001	19±3	0.64±0.04	43.7±8.9	47.50±20.3
Silymarin (100 mg/ kg bw)+ CCl ₄	622±681 [*]	203±254	20±3	0.67±0.05	38.2±6.7	34.67±14.9
WECF (0.5 mg/ kg bw)+CCl ₄	1320±1001	522±448	21±2	0.67±0.04	44.2±11.2	40.17±10.0
WECF (1 mg/ kg bw)+CCl ₄	747±383	214±130	20±3	0.63±0.04	36.2±11.6	32.20±8.2
WECF (2.5 mg/ kg bw)+CCl ₄	315±161 [*]	94±43 [*]	21±4	0.64±0.06	47.3±20.7	37.00±9.7
WECF (2.5 mg/ kg bw)	119±39 [#]	36±10 [#]	16±0	0.62±0.02	32.3±3.2 [#]	68.67±18.0 [#]

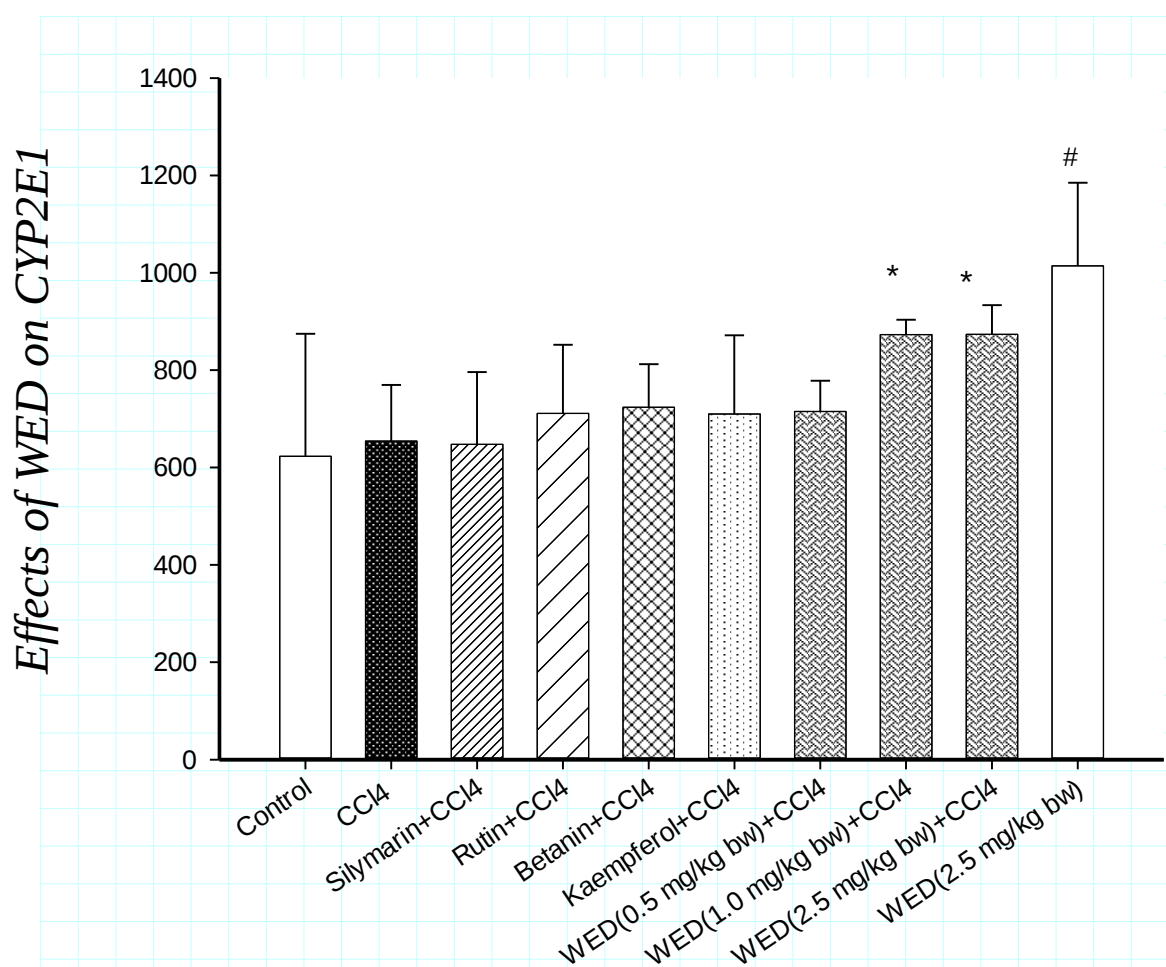
Values are means ± SD for six rats per group. Results were all statistically analyzed with LSD test. [#]significant difference from the control group ($p < 0.05$). ^{*}significant difference from the CCl₄ group ($p < 0.05$). AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; CHOL, cholesterol; TG, triglyceride.

表四 紅藜水萃取物及其三種活性成分對 CCl₄ 誘發大鼠抗氧化酵素及穀胱甘肽之影響

Table 4 Effects of water extracts of Djulis (WECF) and three bioactive compounds on antioxidant enzymes activities and glutathione content in male Wistar rats treated with CCl₄

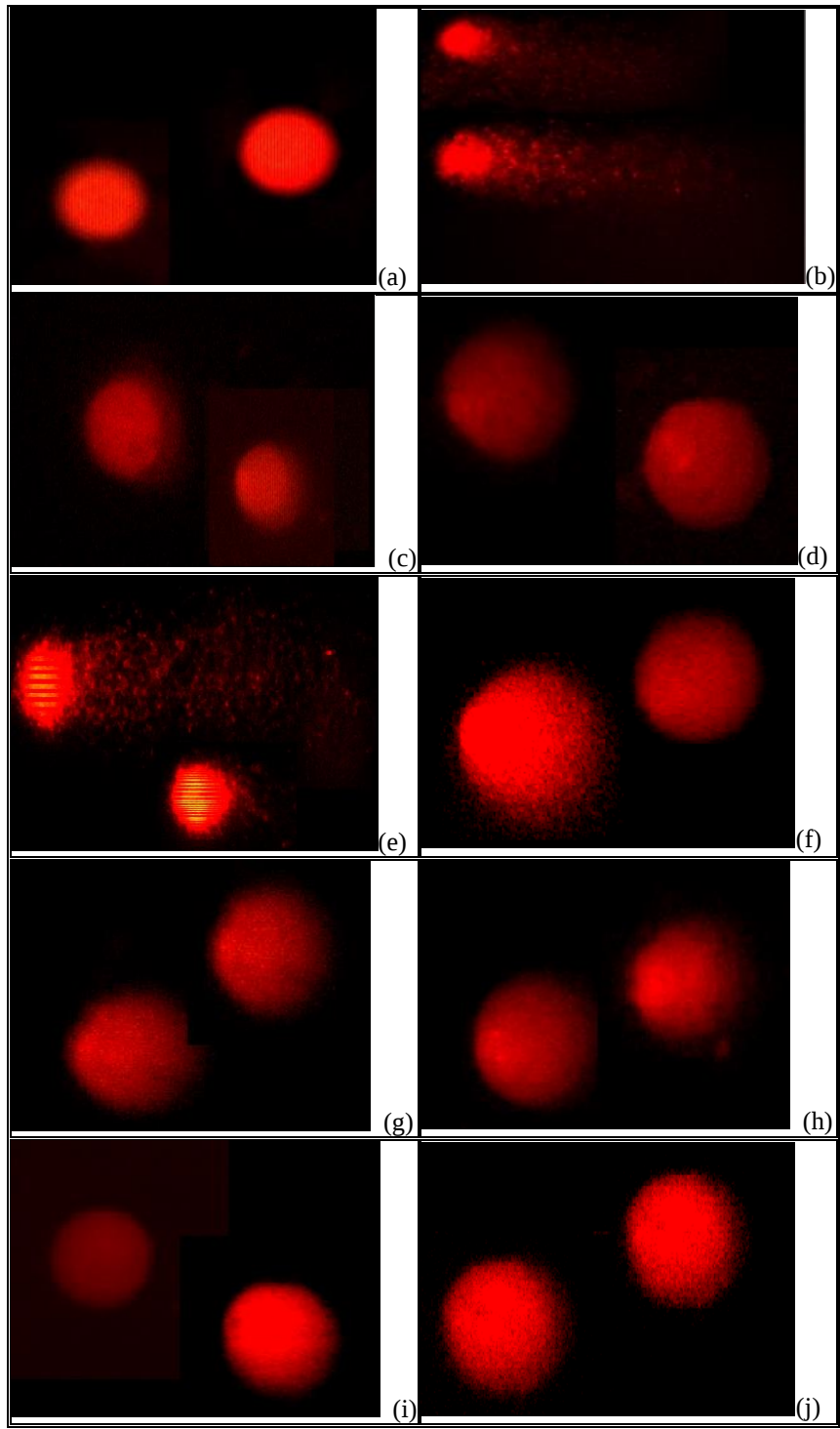
Groups	SOD (U / g Liver)	GPx (U / g Liver)	CAT (ng /g Liver)	GSH (μg /g Liver)
Control	3480±1355	157±66	458±30	1558±14
50% CCl ₄ / Olive oil	2335±461 [#]	104±13	455±42	1384±259
Rutin (1μg/kg bw)+ CCl ₄	2595±636	148±45	552±66	2289±337 [*]
Betanin (1μg/kg bw)+ CCl ₄	4573±886 [*]	140±24	533±58	2081±422 [*]
Kaempferol (1μg/kg bw)+ CCl ₄	2848±647	108±37	554±98	1967±226 [*]
Silymarin (100 mg/ kg bw)+ CCl ₄	3415±516	133±12	468±55	1996±160 [*]
WECF (0.5 mg/ kg bw)+CCl ₄	4534±1823 [*]	112±18	493±58	1999±236 [*]
WECF (1 mg/ kg bw)+CCl ₄	4446±1033 [*]	156±20	483±62	1948±292 [*]
WECF (2.5 mg/ kg bw)+CCl ₄	4647±496 [*]	145±40	456±59	2428±430 [*]
WECF (2.5 mg/ kg bw)	2548±311	149±38	390±76	1969±49 [#]

Values are means ± SD for six rats per group. Results were all statistically analyzed with LSD test. [#]significant difference from the control group ($p < 0.05$). ^{*}significant difference from the CCl₄ group ($p < 0.05$). SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; CAT, catalase; GSH, glutathione.

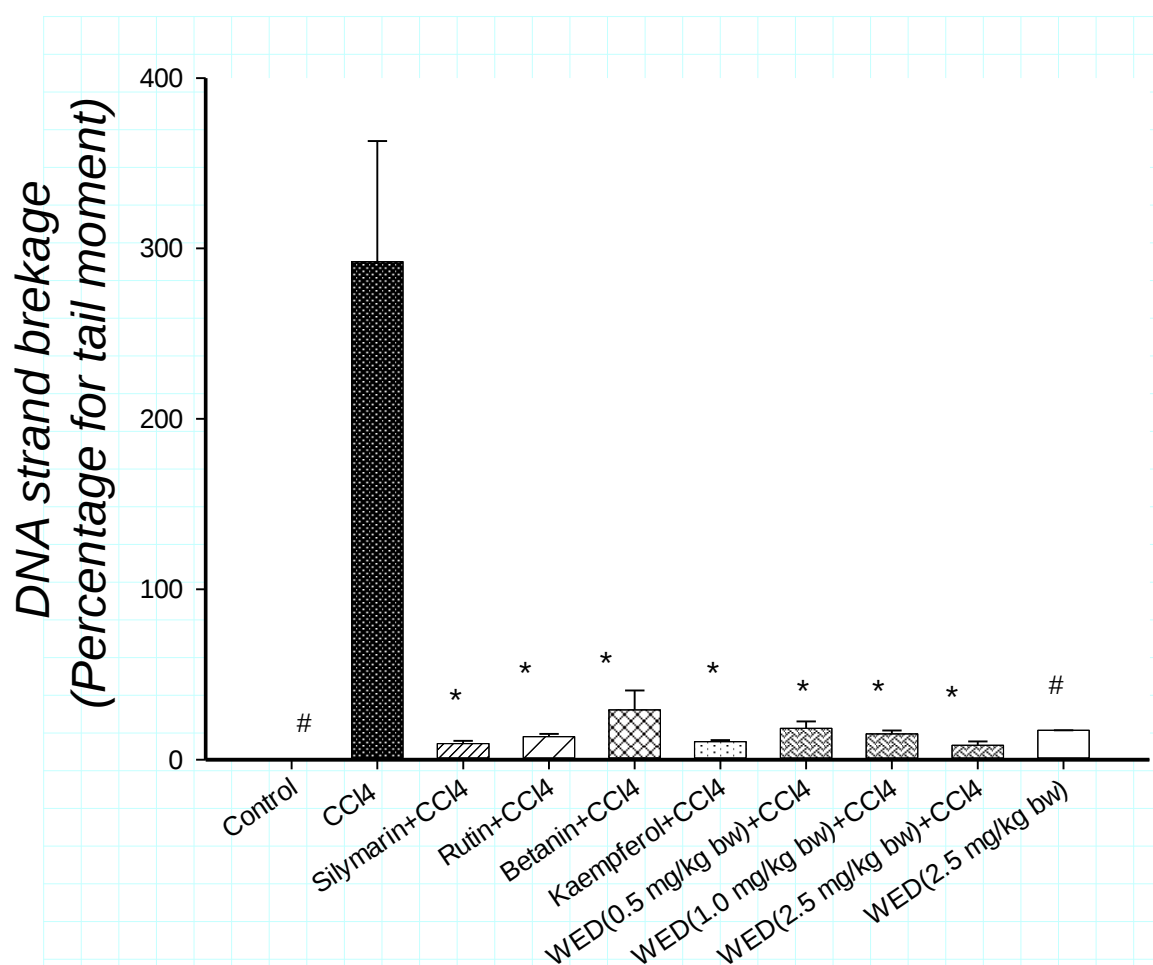


圖十五 紅藜水萃取物及其三種活性成分對 CCl_4 誘發大鼠解毒酵素之 CYP2E1 的影響
 Figure 15. Effects of water extracts of Djulis (WECF) and three bioactive compounds on CYP2E1 in male Wistar rats treated with CCl_4 . Values are means $\pm$ SD for six rats per group. Results were all statistically analyzed with LSD test. #significant difference from the control group ($p < 0.05$). *significant difference from the CCl_4 group ($p < 0.05$). CYP2E1, Cytochrome P450. The concentration of Rutin, Betanin, and Kaempferol is $1\mu\text{g/kg bw}$, respectively.

(A)

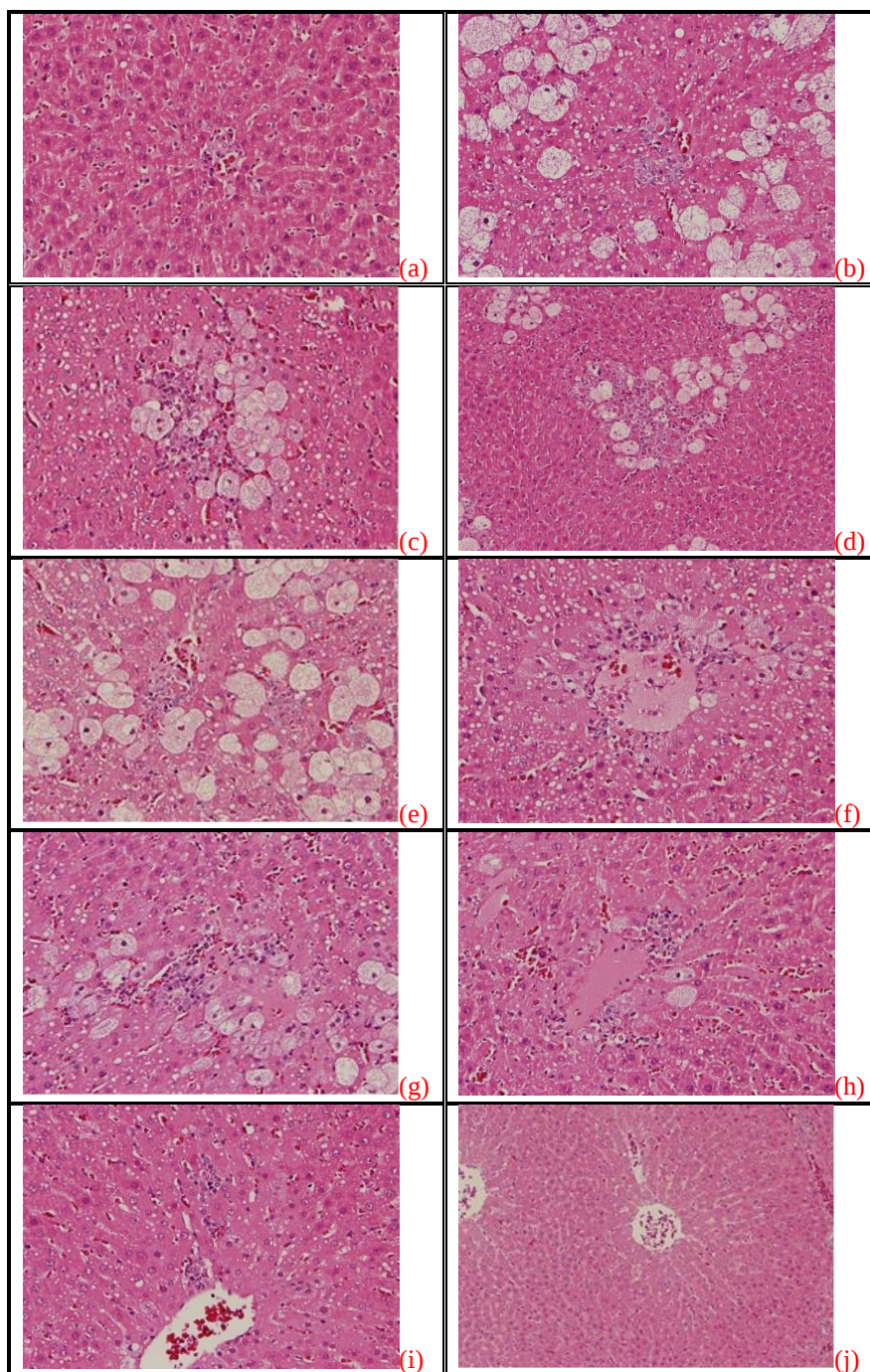


(B)



圖十六 紅藜水萃取物及其三種活性成分對CCl₄誘發大鼠DNA鍊斷裂之彗星試驗

Figure 16. Effects of water extracts of Djulis (WECF) and three bioactive compounds on DNA strand breakage. Photomicrographs of comets (A) in lymphocyte stained with propidium iodide in different groups: (a) Control group; (b) 50% CCl₄; (c) Rutin (1 µg/kg bw)+CCl₄; (d) Betanin (1 µg/kg bw)+CCl₄ group; (e) Kaempferol (1 µg/kg bw)+CCl₄; (f) Silymarin (100 mg/ kg bw)+CCl₄ group; (g) WECF (0.5 mg/ kg bw)+CCl₄ groups; (h) WECF (1mg/ kg bw)+CCl₄ groups; (i) WECF (2.5 mg/ kg bw)+CCl₄ groups ; (j) WECF (2.5 mg/ kg bw) and genotoxicity of WECF on DNA strand breakage (B) in blood lymphocytes from rats treated with CCl₄. Tail moment = percent of DNA in the tail×tail length (Tm). Data were presented as mean ± SEM. Results were all statistically analyzed with LSD test. #significant difference from the control group ($p < 0.05$). * Significant difference from the CCl₄ group ($p < 0.05$).



圖十七 紅藜水萃取物及其三種活性成分對 CCl₄ 誘發 Wistar 大鼠之肝臟病理組織變化
 Figure 17. Effects of water extracts of Djulis (WECF) and three bioactive compounds on liver in rats induced by CCl₄ treatment : (a) Control group; (b) 50% CCl₄; (c) Rutin (1 µg/kg bw)+ CCl₄; (d) Betanin (1 µg/kg bw)+ CCl₄ group; (e) Kaempferol (1 µg/kg bw)+ CCl₄; (f) Silymarin (100 mg/kg bw)+CCl₄ group; (g) WECF (0.5 mg/kg bw)+CCl₄ groups; (h) WECF (1 mg/kg bw)+CCl₄ groups; (i) WECF (2.5 mg/ kg bw)+CCl₄ groups ; (j) WECF (2.5 mg/kg bw).

表五 紅藜水萃取物及其三種活性成分對酒精誘發大鼠體重及相對臟器重量之影響

Table 5. Effects of water extracts of Djulis (WECF) and their bioactive compounds on body weight and relative organ weights in rats treated with ethanol (EtOH)

Groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Relative organ weights (%)	
			Liver	Kidney
Control	257.17±4.26	489.13±29.14	3.02±0.37	0.77±0.08
EtOH	269.83±9.95	416.20±23.25 [#]	3.63±0.27 [#]	0.80±0.07
Silymarin (100 mg/kg bw)+ EtOH	270.96±9.35	447.49±65.49	3.49±0.36	0.77±0.05
Rutin (1.0 µg/kg bw)+ EtOH	277.34±9.51	427.90±39.39	3.62±0.20	0.80±0.06
Betanin (1.0 µg/kg bw)+ EtOH	274.55±11.46	446.33±31.34	3.60±0.29	0.80±0.07
Kaempferol (1.0 µg/kg bw)+ EtOH	265.56±3.21	446.84±28.68	3.45±0.15	0.83±0.07
WECF (0.5 mg/kg bw)+ EtOH	276.30±8.73	429.60±34.25	3.67±0.13	0.82±0.03
WECF (1.0 mg/kg bw)+ EtOH	274.76±12.19	427.50±36.00	3.80±0.41	0.85±0.09
WECF (2.5 mg/kg bw)+ EtOH	269.53±4.70	445.64±49.95	3.50±0.28	0.79±0.09
WECF (2.5 mg/kg bw)	275.43±4.74	503.33±36.31	3.13±0.05	0.78±0.05

Values are means ± SD for six rats per group. Results were all statistically analyzed with LSD test. [#]Significant difference from the control group ($p < 0.05$). ^{*}Significant difference from the EtOH group ($p < 0.05$). Relative organ weight (%) = organ weight (g) / final body weight (g) × 100.

表六 紅藜水萃取物及其三種活性成分對酒精誘發大鼠血清生化值之影響

Table 6. Effects of water extracts of Djulis (WECF) and their bioactive compounds on serum biochemical values in rats treated with ethanol (EtOH)

Groups	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)	CHOL (mg/dL)	TG (mg/dL)
Control	105±15	47±11	20±2	0.75±0.06	63.7±1.2	82.3±24.0
EtOH	110±12	52±10	22±4	0.72±0.02	71.5±15.6	153.0±17.3 [#]
Silymarin (100 mg/kg bw)+ EtOH	102±14	47±10	21±3	0.72±0.05	75.1±11.5	153.2±39.1
Rutin (1.0 µg/kg bw)+ EtOH	109±3	48±4	18±1	0.68±0.06	80.2±20.4	128.8±27.9
Betanin (1.0 µg/kg bw)+ EtOH	103±13	50±13	23±3	0.73±0.04	71.0±10.9	139.8±39.6
Kaempferol (1.0 µg/kg bw)+ EtOH	100±12	42±7	19±1	0.67±0.01	66.1±8.2	121.5±29.9
WECF (0.5 mg/kg bw)+ EtOH	100±4	42±9	20±1	0.68±0.04	62.7±8.7	145.7±5.7
WECF (1.0 mg/kg bw)+ EtOH	102±10	52±12	22±4	0.68±0.01	70.9±8.7	130.2±23.8
WECF (2.5 mg/kg bw)+ EtOH	100±28	45±12	20±2	0.70±0.06	69.0±10.1	110.2±14.6 [*]
WECF (2.5 mg/kg bw)	88±5	45±12	21±2	0.74±0.12	69.5±2.1	119.0±31.1

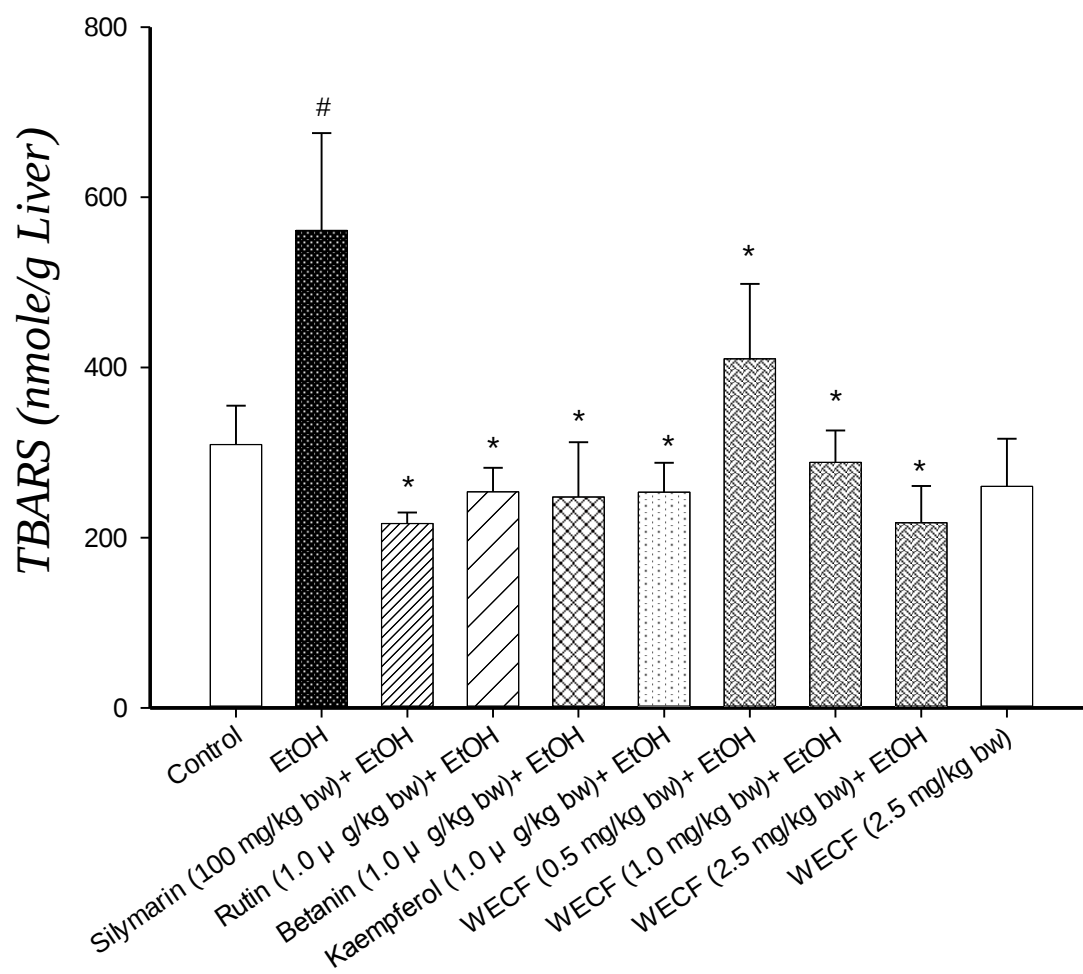
Values are means ± SD for six rats per group. Results were all statistically analyzed with LSD test. [#]Significant difference from the control group ($p < 0.05$). ^{*}Significant difference from the EtOH group ($p < 0.05$). AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; CHOL, cholesterol; TG, triglycerol.

表七 紅藜水萃取物及其三種活性成分對酒精誘發大鼠抗氧化酵素及穀胱甘肽之影響

Table 7. Effects of water extracts of Djulis (WECF) and their bioactive compounds on glutathione (GSH) and antioxidant enzymes activities in rats treated with ethanol (EtOH)

Groups	GSH (nmole /g Liver)	SOD (U / g Liver)	GPx (U / g Liver)	CAT (nU /g Liver)
Control	260±57	1464±367	118±16	624±37
EtOH	700±63 [#]	918±173 [#]	115±16	461±14 [#]
Silymarin (100 mg/kg bw)+ EtOH	493±123 [*]	701±106	130±31	734±119 [*]
Rutin (1.0 µg/kg bw)+ EtOH	522±124 [*]	1210±176 [*]	117±17	467±33
Betanin (1.0 µg/kg bw)+ EtOH	527±125	860±86	113±9	660±146
Kaempferol (1.0 µg/kg bw)+ EtOH	461±119 [*]	985±267	101±8	504±117
WECF (0.5 mg/kg bw)+ EtOH	645±67	775±142	120±14	783±57 [*]
WECF (1.0 mg/kg bw)+ EtOH	500±134 [*]	607±88	107±15	811±26 [*]
WECF (2.5 mg/kg bw)+ EtOH	461±58 [*]	703±171	97±12	804±91 [*]
WECF (2.5 mg/kg bw)	733±70	1129±216	124±19	835±60 [#]

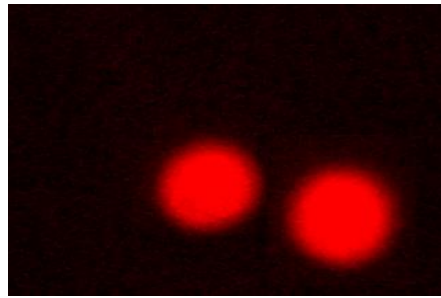
Values are means ± SD for six rats per group. Results were all statistically analyzed with LSD test. [#]Significant difference from the control group ($p < 0.05$). ^{*}Significant difference from the EtOH group ($p < 0.05$). GSH, glutathione, SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; CAT, catalase.



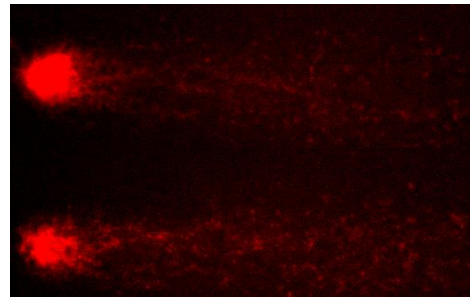
圖十八 紅藜水萃取物及其三種活性成分對酒精誘發 HepG2 之細胞作用 2 小時後對 TBARS 生成之影響

Figure 18. Effects of water extracts of Djulis (WECF) and their bioactive compounds on thiobarbituric acid reaction substances (TBARS) formation in the liver of rats treated with ethanol (EtOH). Values are means $\pm$ SD for six rats per group. # significant difference from the control group ($p < 0.05$). * Significant difference from the EtOH group ($p < 0.05$).

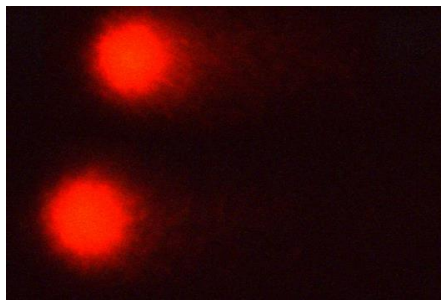
(A)



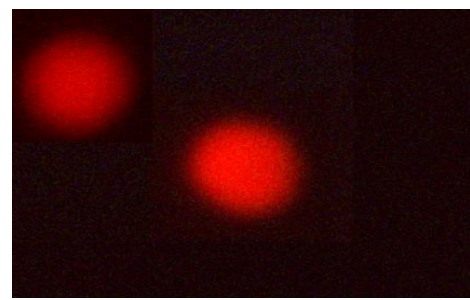
(a)



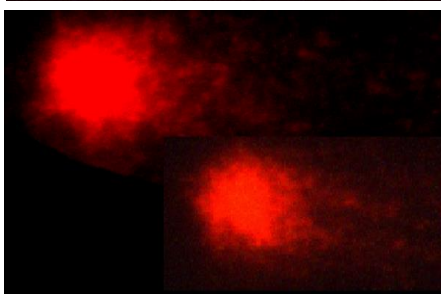
(b)



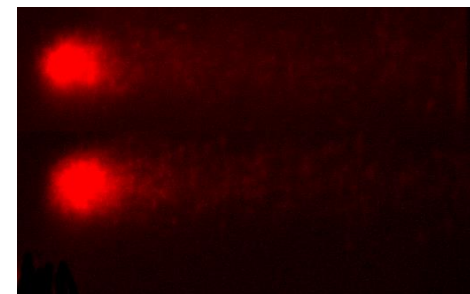
(c)



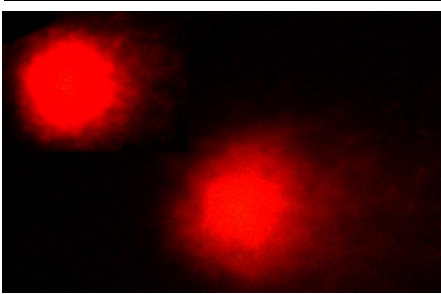
(d)



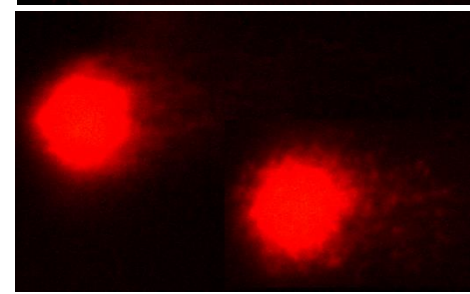
(e)



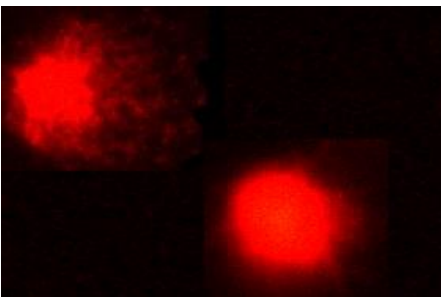
(f)



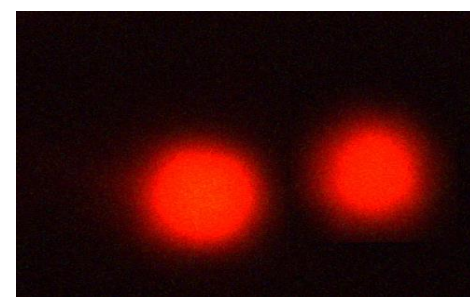
(g)



(h)

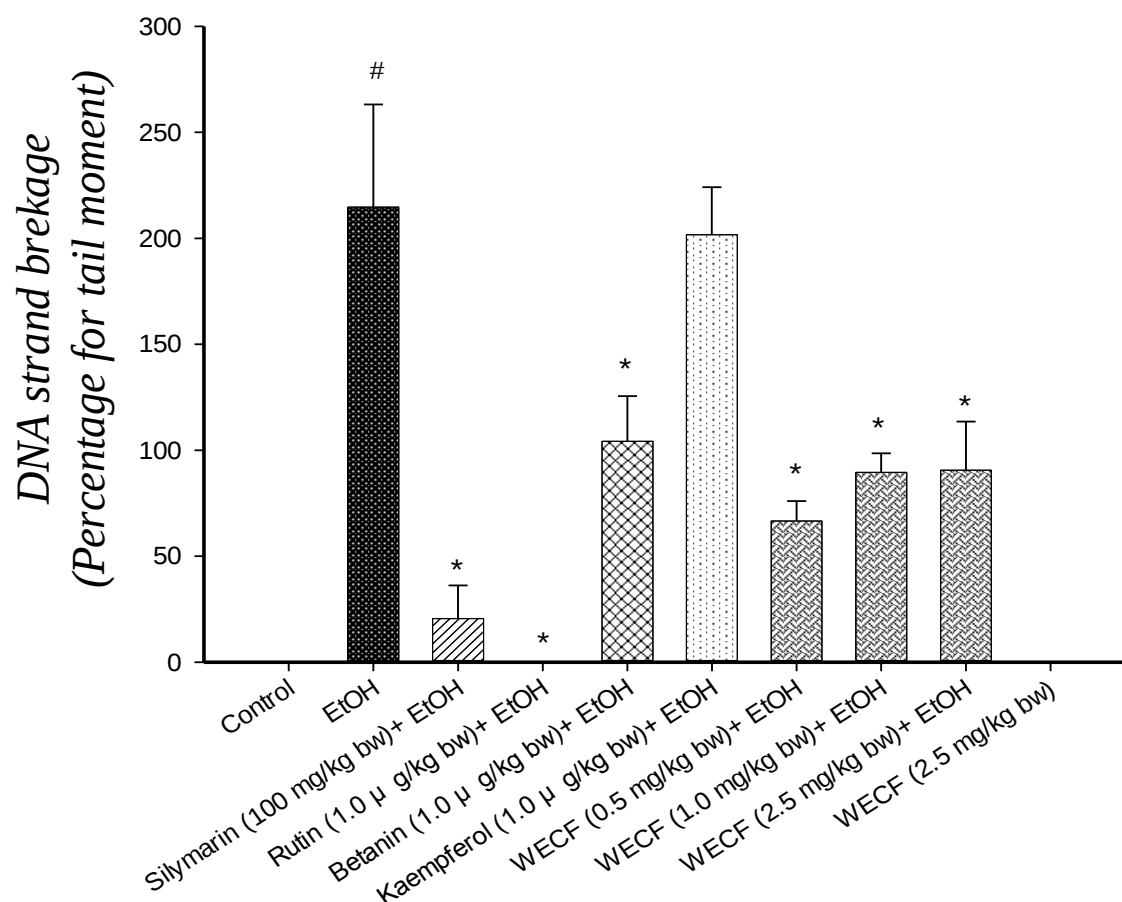


(i)



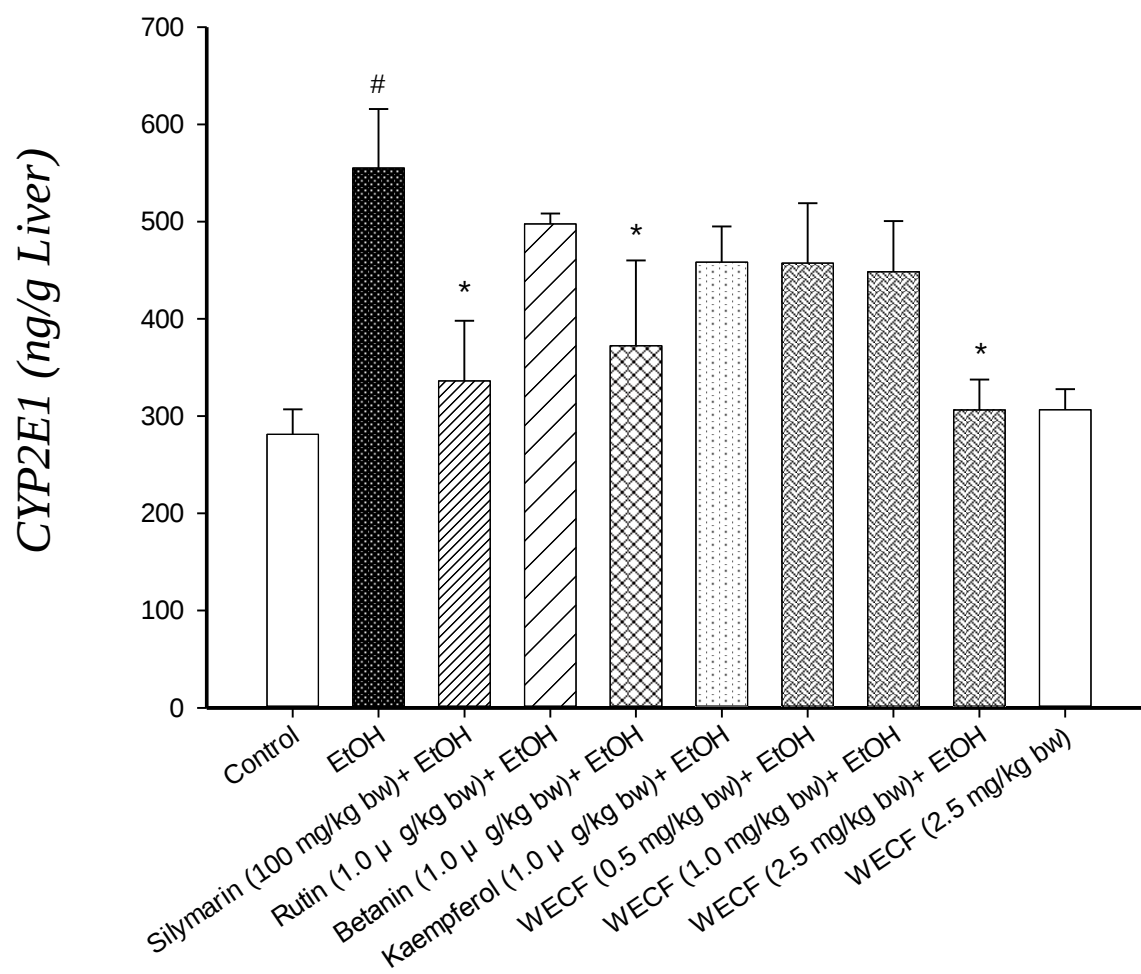
(j)

(B)



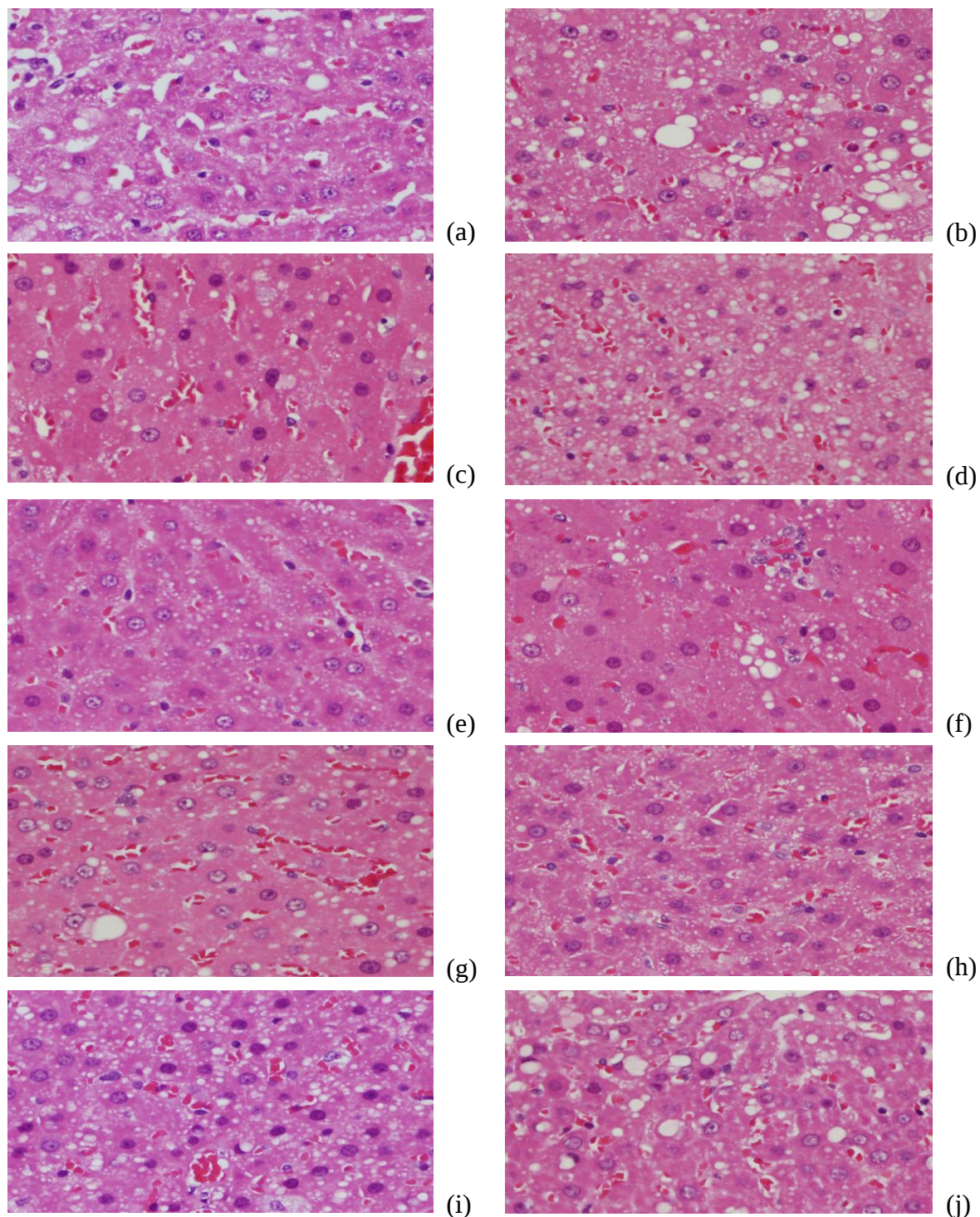
圖十九 紅藜水萃取物及其三種活性成分對酒精誘發大鼠DNA鍊斷裂之彗星試驗

Figure 19. Effects of water extracts of Djulis (WECF) and their bioactive compounds on DNA strand breakage. Photomicrographs of comets (A) in lymphocyte stained with propidium iodide in different groups: (a) Control group; (b) ethanol (EtOH); (c) Rutin (1.0 µg/kg bw)+ EtOH; (d) Betanin (1.0 µg/kg bw)+ EtOH; (e) Kaempferol (1.0 µg/kg bw) + EtOH; (f) Silymarin (100 mg/kg bw)+ EtOH; (g) WECF (0.5 mg/kg bw)+ EtOH; (h) WECF (1.0 mg/kg bw)+ EtOH; (i) WECF (2.5 mg/kg bw)+ EtOH ; (j) WECF (2.5 mg/kg bw) and genotoxicity of WECF on DNA strand breakage (B) in blood lymphocytes from rats treated with EtOH. Tail moment = percent of DNA in the tail × tail length (Tm). Data were presented as mean ± SEM. Results were all statistically analyzed with LSD test. [#] Significant difference from the control group ($p < 0.05$). ^{*} Significant difference from the EtOH group ($p < 0.05$).

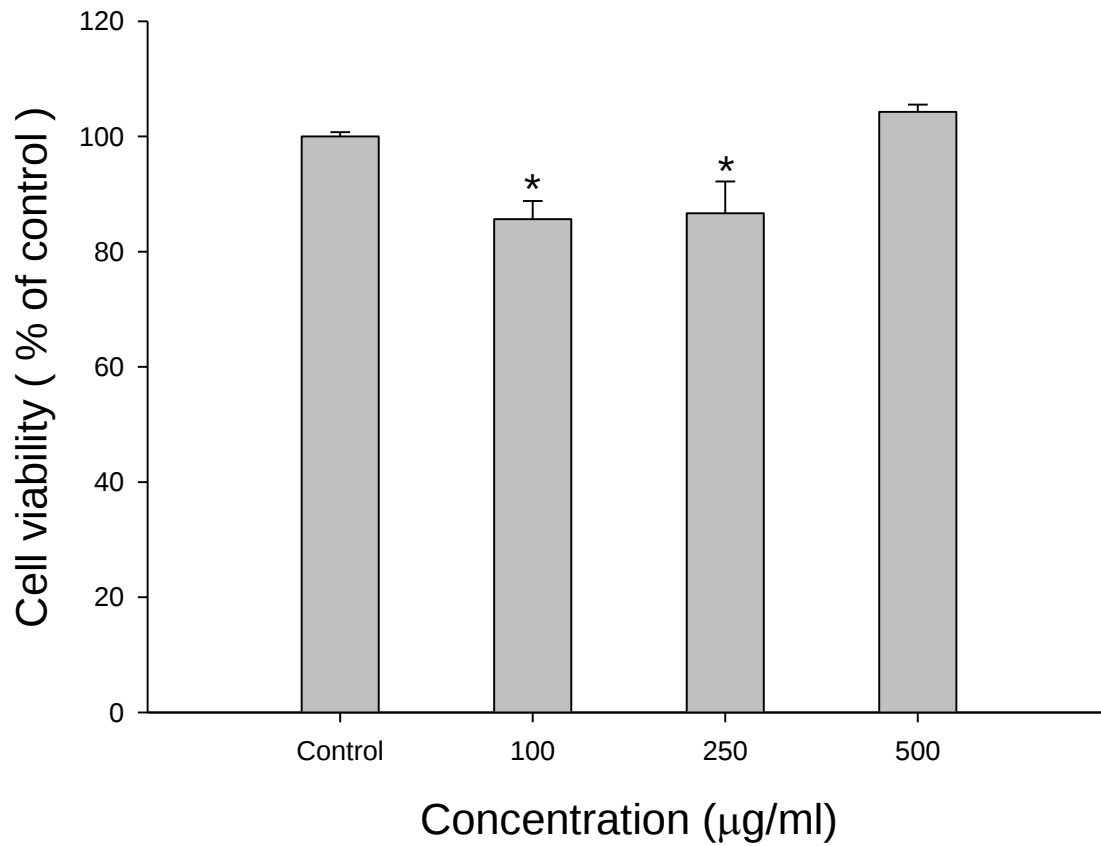


圖二十 紅藜水萃取物及其三種活性成分對酒精誘發大鼠解毒酵素之 CYP2E1 的影響

Figure 20. Effects of water extracts of Djulis (WECF) and their bioactive compounds on CYP2E1 activity in the liver microsomes of rats treated with ethanol (EtOH). Values are means $\pm$ SD for six rats per group. # Significant difference from the control group ($p < 0.05$). * Significant difference from the EtOH group ($p < 0.05$).

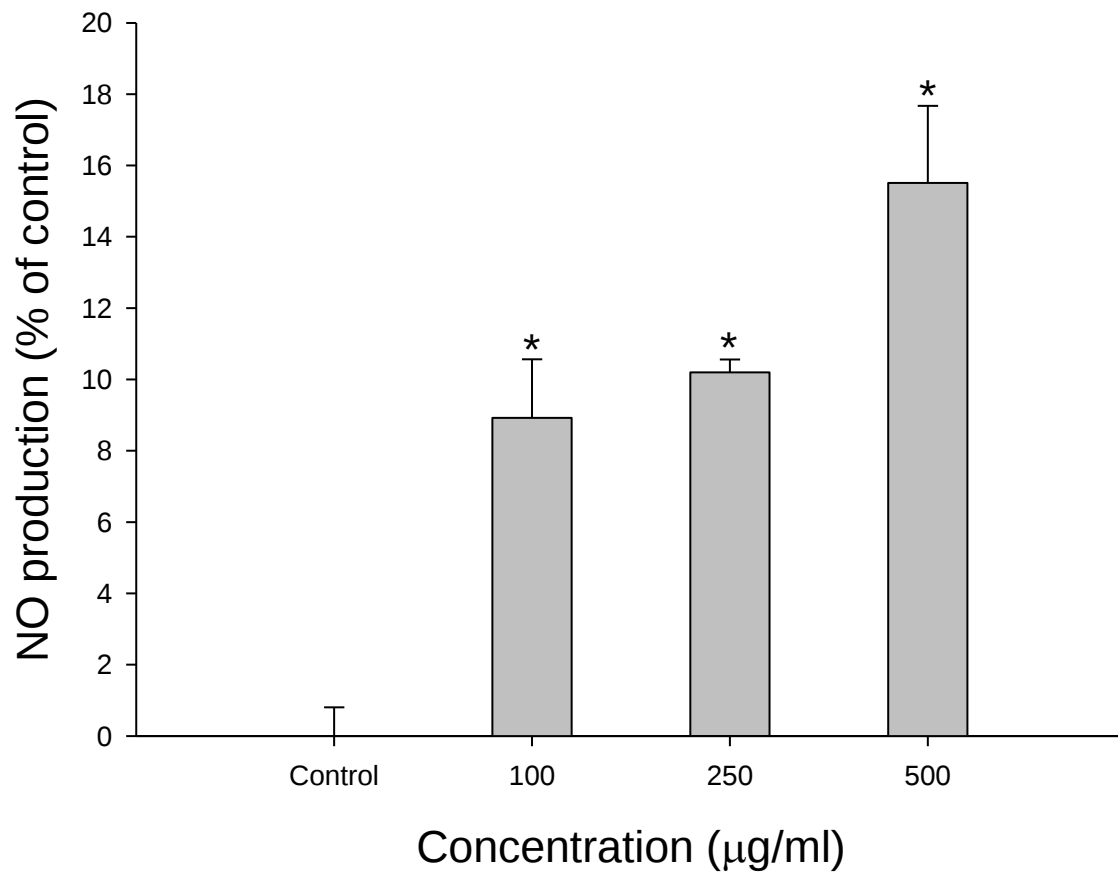


圖二十一 紅藜水萃取物及其三種活性成分對酒精誘發 Wistar 大鼠之肝臟病理組織變化
 Figure 21. Effects of water extracts of Djulis (WECF) and their bioactive compounds on the liver histological damage after ethanol (EtOH) treatment in rats. (a) Control group; fatty infiltration, slight (b) EtOH group; fatty infiltration, diffuse, severe (c) Silymarin (100 mg/kg) + EtOH group; fatty infiltration, slight (d) Rutin (0.001 mg/kg) + EtOH group; fatty infiltration, diffuse, moderate (e) Betanin (0.001 mg/kg) + EtOH group; fatty infiltration, slight (f) Kaempferol (0.001 mg/kg) + EtOH group; fatty infiltration, moderate (g) WECF (0.5 mg/kg) + EtOH group; fatty infiltration, diffuse, moderate (h) WECF (1mg/kg) + EtOH group; fatty infiltration, diffuse, slight to moderate (i) WECF (2.5 mg/kg) + EtOH group; fatty infiltration, slight (j) WECF (2.5 mg/kg); fatty infiltration, slight. Magnification 400x.



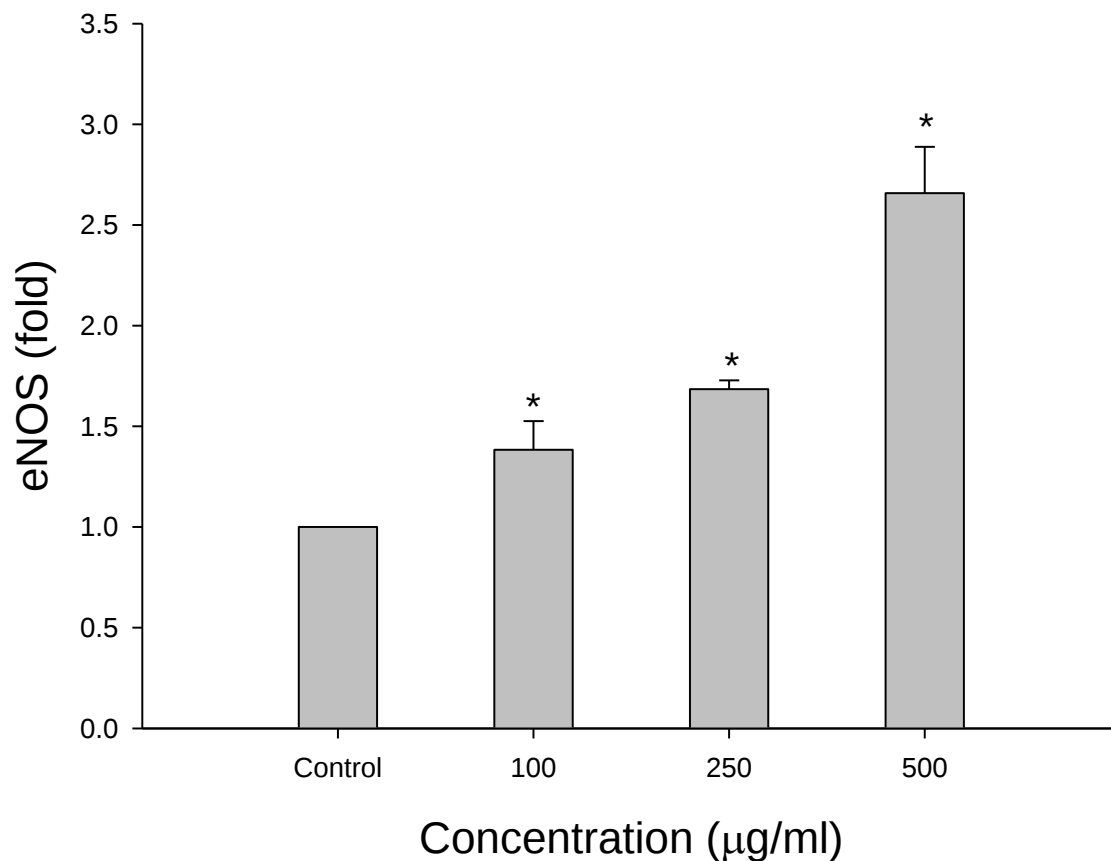
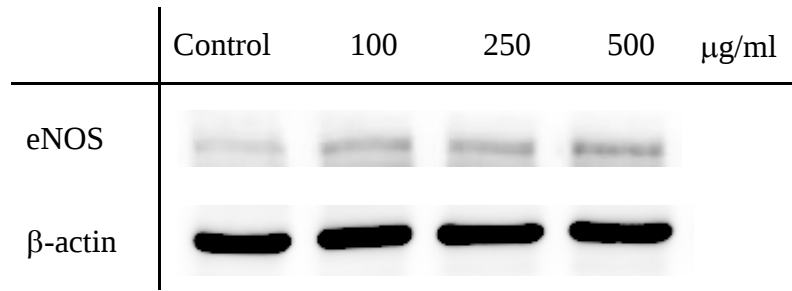
圖二十二 紅藜萃取物對 SVEC4-10 細胞反應 16 小時之細胞生存性之影響

Figure 22. Effects of water extracts of Djulis (WECF) on SVEC4-10 cell viability. The cells were treated with WECF for 16 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control group.



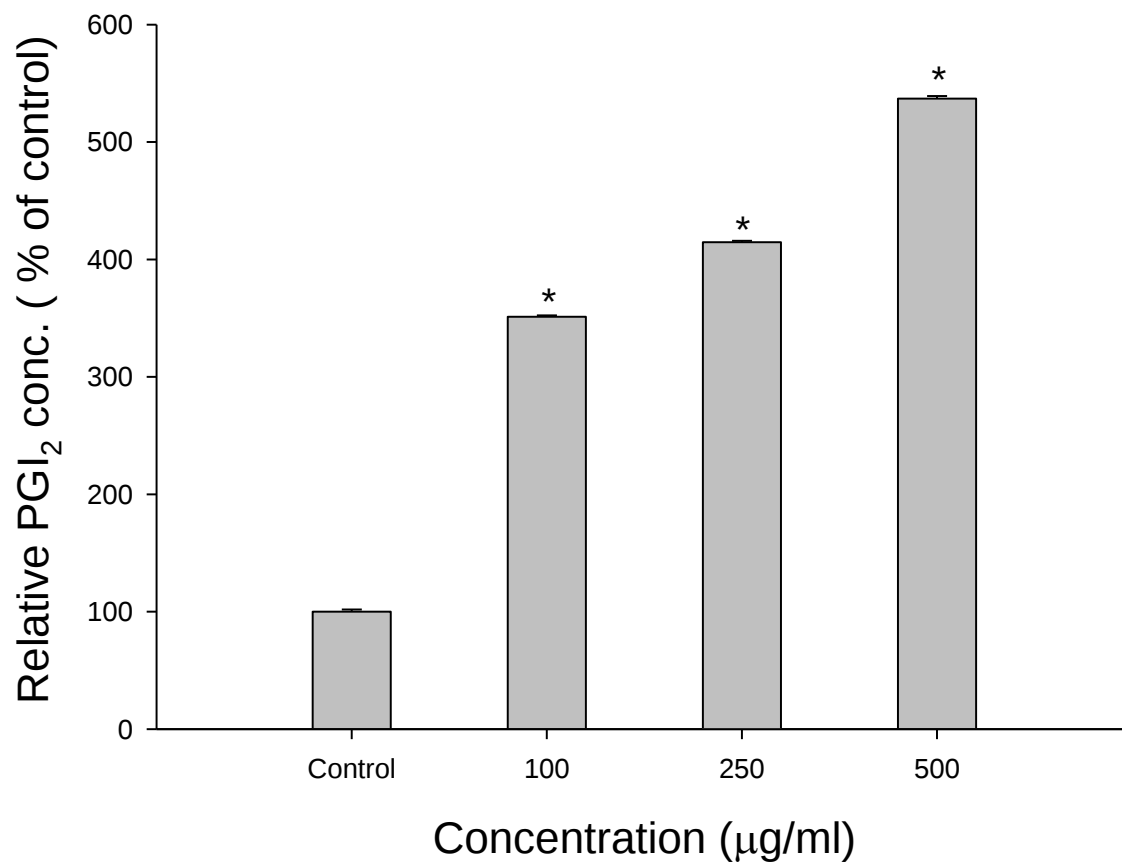
圖二十三 紅藜萃取物對 SVEC4-10 細胞反應 16 小時對 NO 生成之影響。

Figure 23. Effects of water extracts of Djulis (WECEF) on NO production in SVEC4-10 cells. The cells were treated with WECEF for 16 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control.



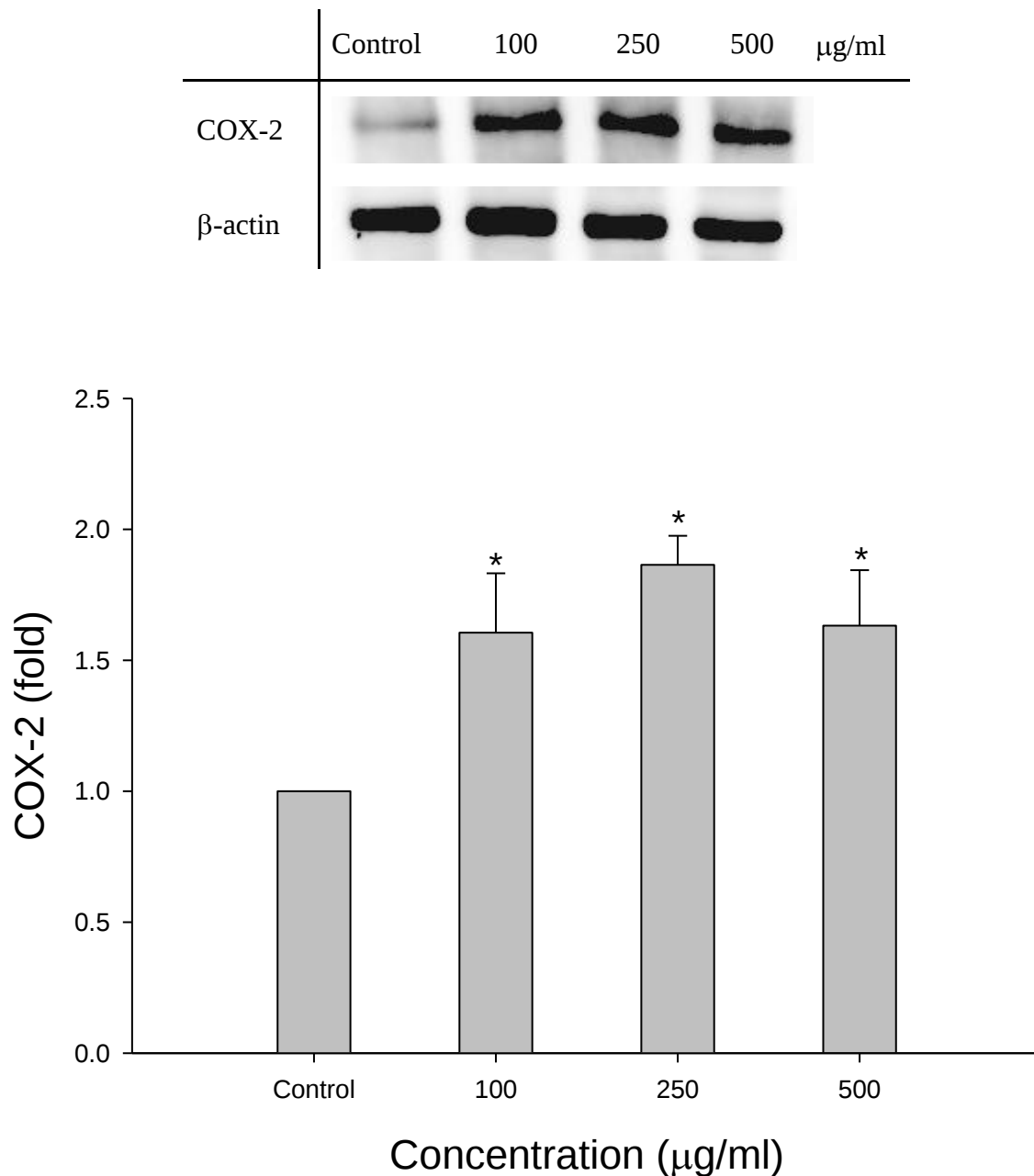
圖二十四 紅藜萃取物對 SVEC4-10 細胞反應 14 小時對 eNOS 基因表現之影響

Figure 24. Effects of water extracts of Djulis (WECEF) on eNOS expression in SVEC4-10 cells. The cells were treated with WECEF for 14 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control.

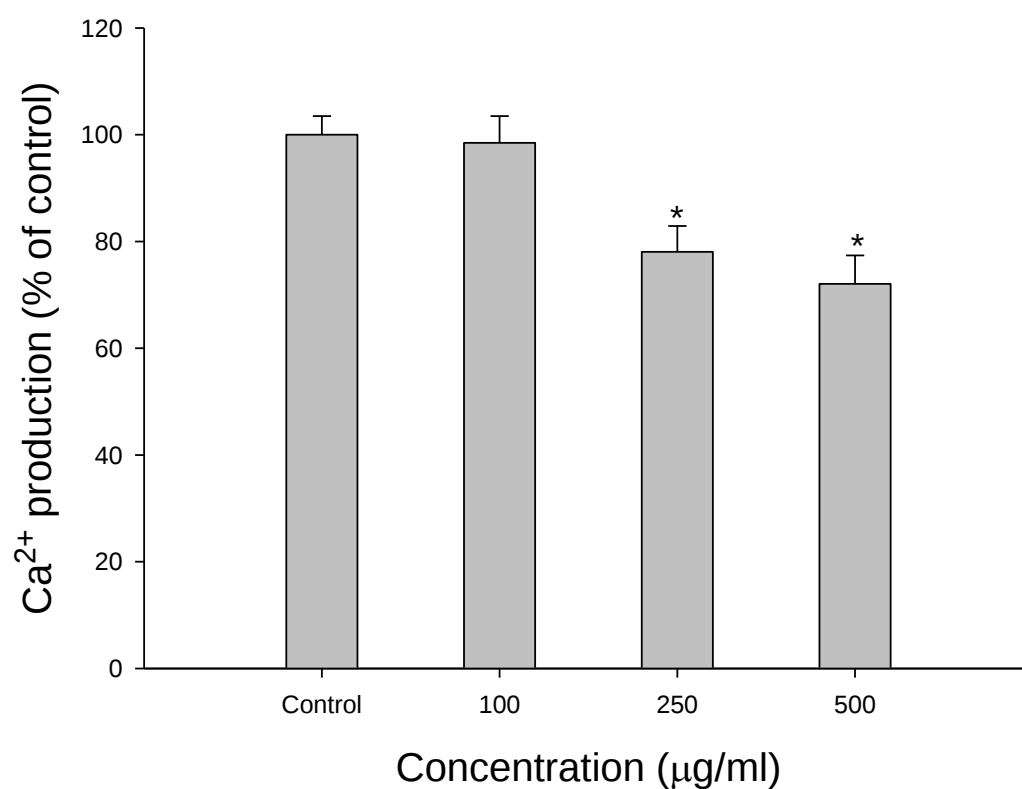


圖二十五 紅藜萃取物對 SVEC4-10 細胞反應 4 小時對 PGI₂ 生成之影響。

Figure 25. Effects of water extracts of Djulis (WECF) on PGI₂ production in SVEC4-10 cells. The cells were treated with WECF for 4 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control.

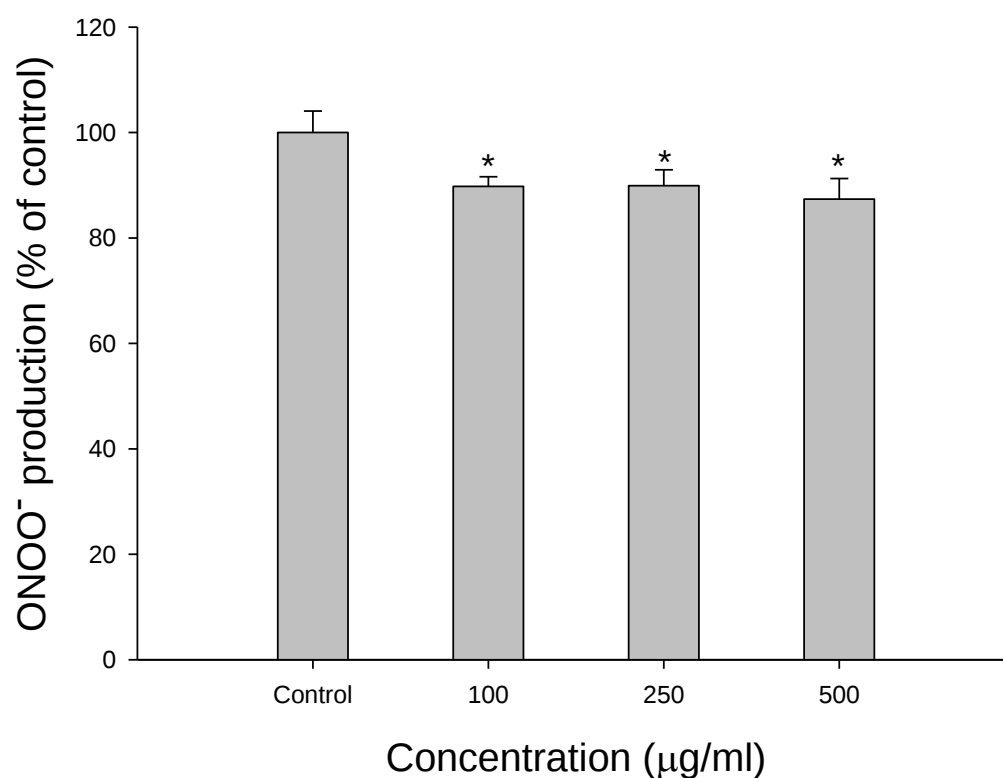


圖二十六 紅藜萃取物對 SVEC4-10 細胞反應 2 小時對 COX-2 基因表現之影響
 Figure 26. Effects of water extracts of Djulis (WECF) on COX-2 expression in SVEC4-10 cells. The cells were treated with WECF for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control.

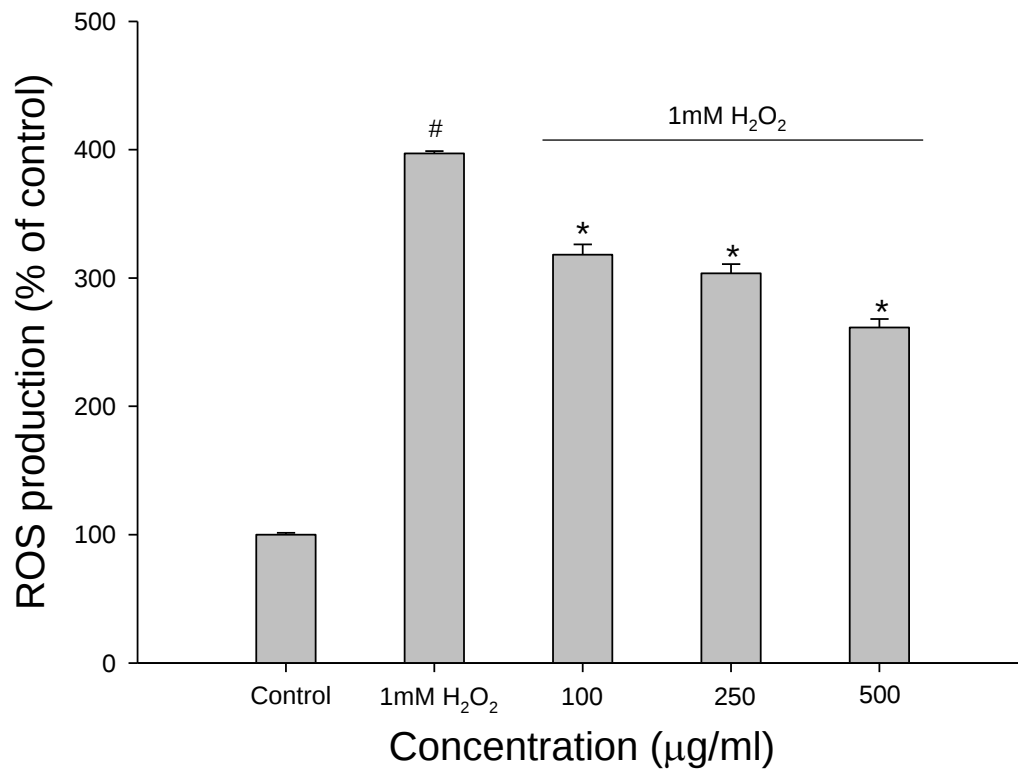


圖二十七 紅藜萃取物對 SVEC4-10 細胞反應 20 小時對 Ca^{2+} 之影響

Figure 27. Effects of water extracts of Djulis (WECF) on Ca^{2+} in SVEC4-10 cells. The cells were treated with WECF for 20 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control.

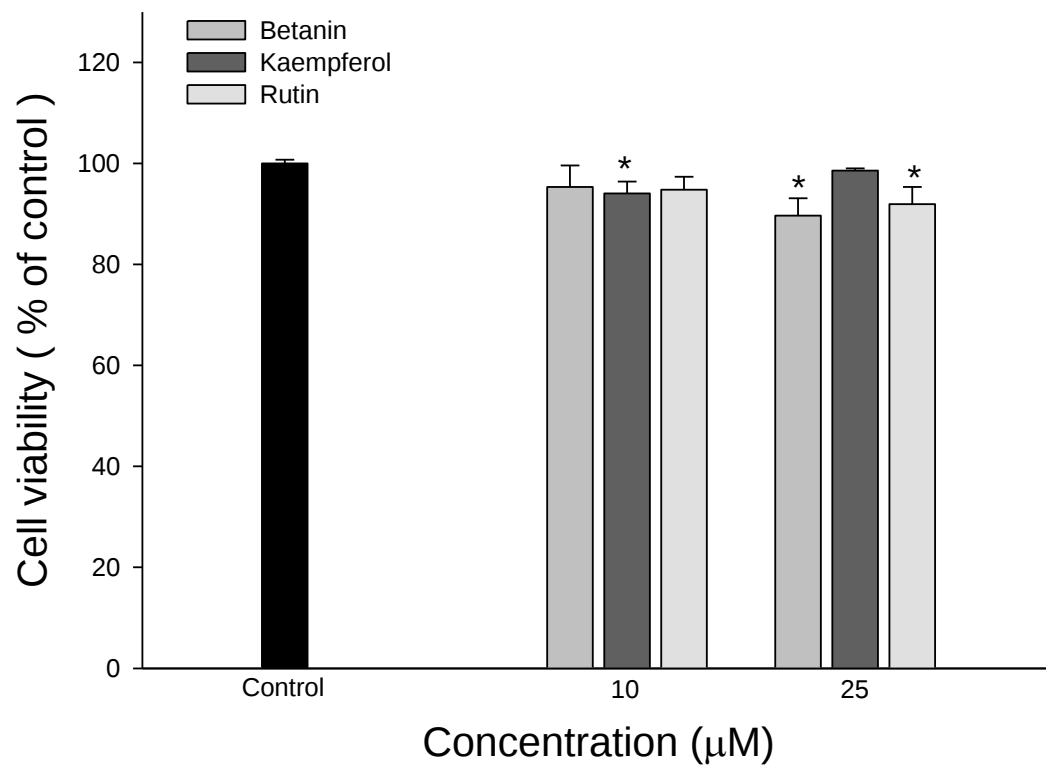


圖二十八 紅藜萃取物對 SVEC4-10 細胞反應 16 小時對 peroxynitrite 之影響
Figure 28. Effects of water extracts of Djulis (WECF) on peroxynitrite in SVEC4-10 cells. The cells were treated with WECF for 16 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control.



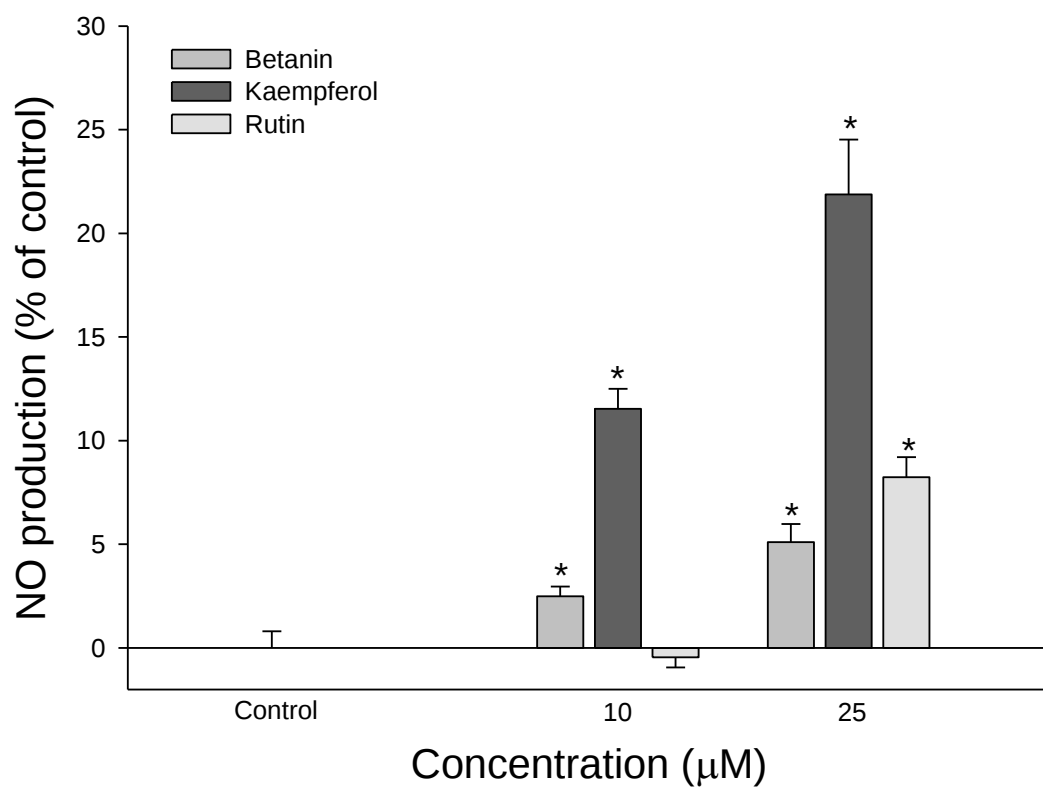
圖二十九 紅藜萃取物對 H₂O₂ 誘發 SVEC4-10 細胞反應 2 小時之 ROS 之影響。

Figure 29. Effects of water extracts of Djulis (WECF) on ROS production in 1 mM H₂O₂-induced SVEC4-10 cells. The cells were treated with WECF and exposed to 1 mM H₂O₂ for 2h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # (p < 0.05) compared with the control group. * (p < 0.05) compared with 1 mM H₂O₂- induced cells alone.



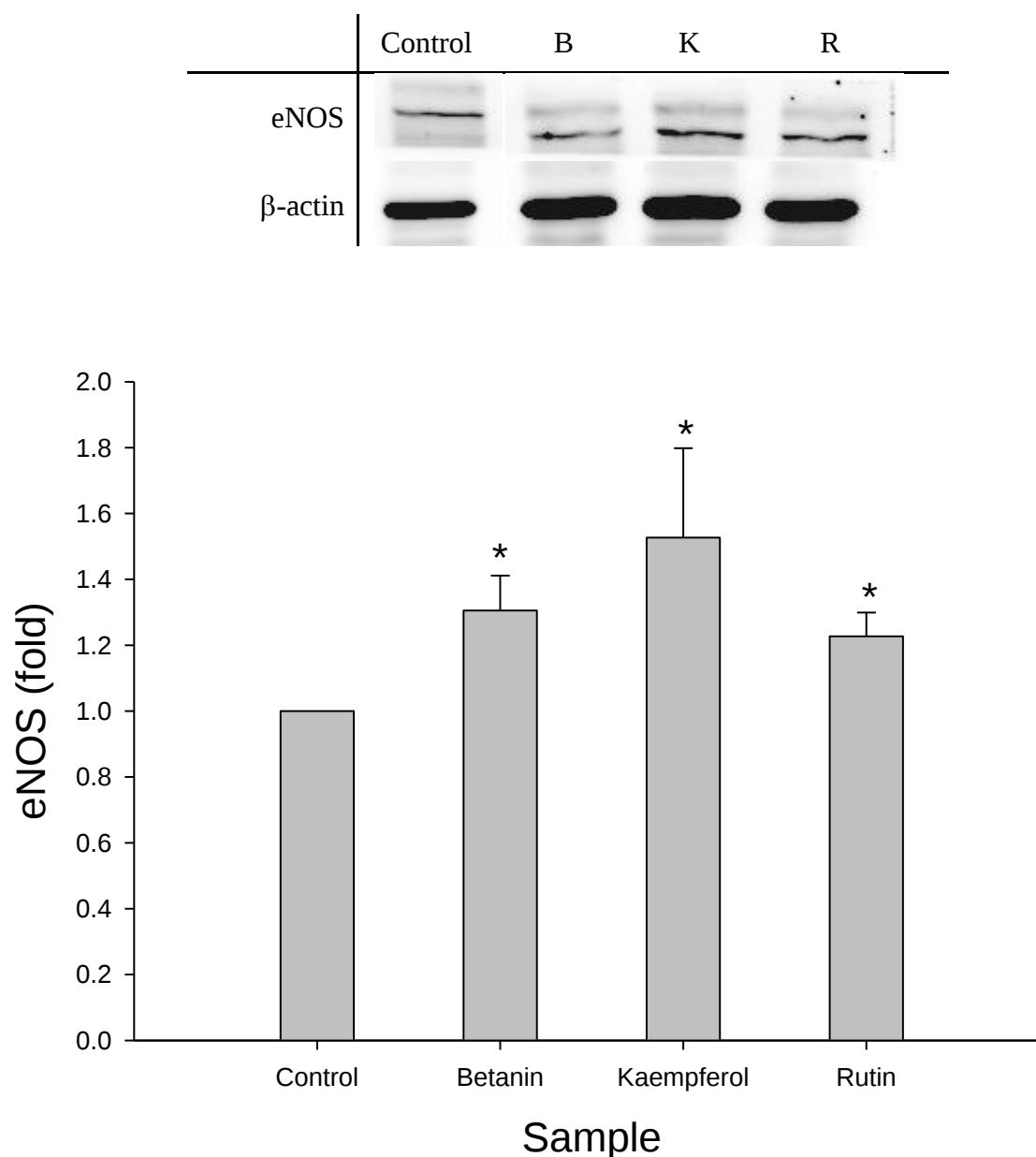
圖三十 Betanin, Kaempferol and Rutin 對 SVEC4-10 細胞反應 16 小時之細胞生存性之影響

Figure 30. Effects of Betanin, Kaempferol and Rutin on SVCE4-10 cell viability. The cells were treated with different concentrations of Betanin, Kaempferol and Rutin for 16 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *($p < 0.05$) compared with the control group.



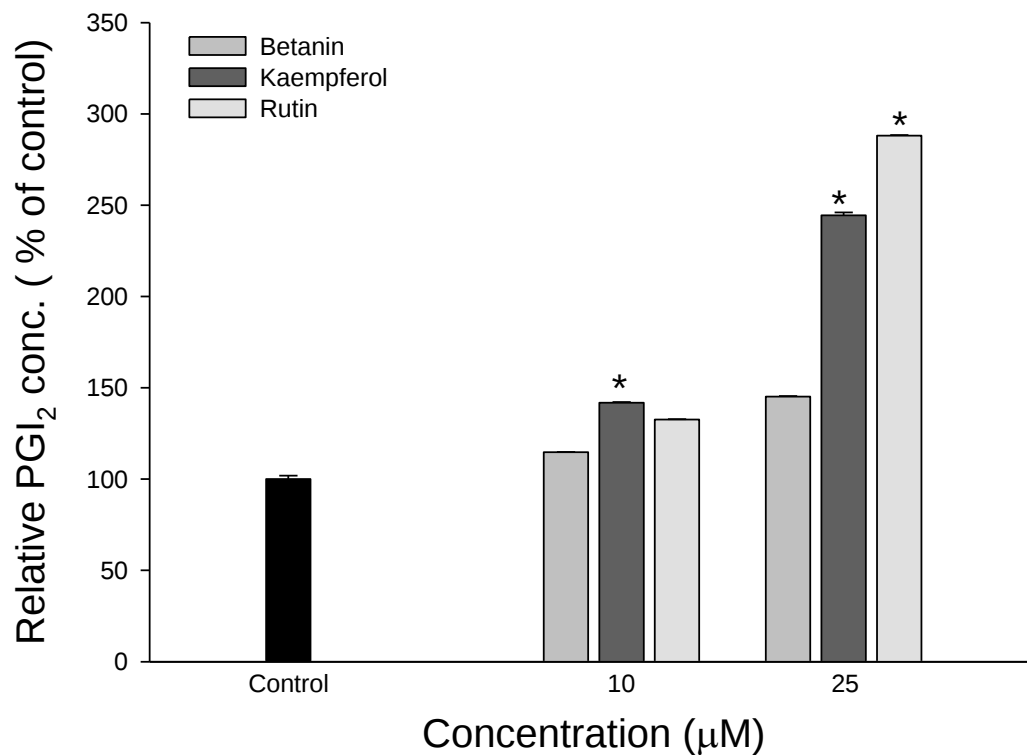
圖三十一 Betanin, Kaempferol and Rutin 對 SVEC4-10 細胞反應 16 小時對 NO 生成之影響。

Figure 31. Effects of Betanin, Kaempferol and Rutin on NO production in SVEC4-10 cells. The cells were treated with different concentrations of Betanin, Kaempferol and Rutin for 16 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *($p < 0.05$) compared with the control



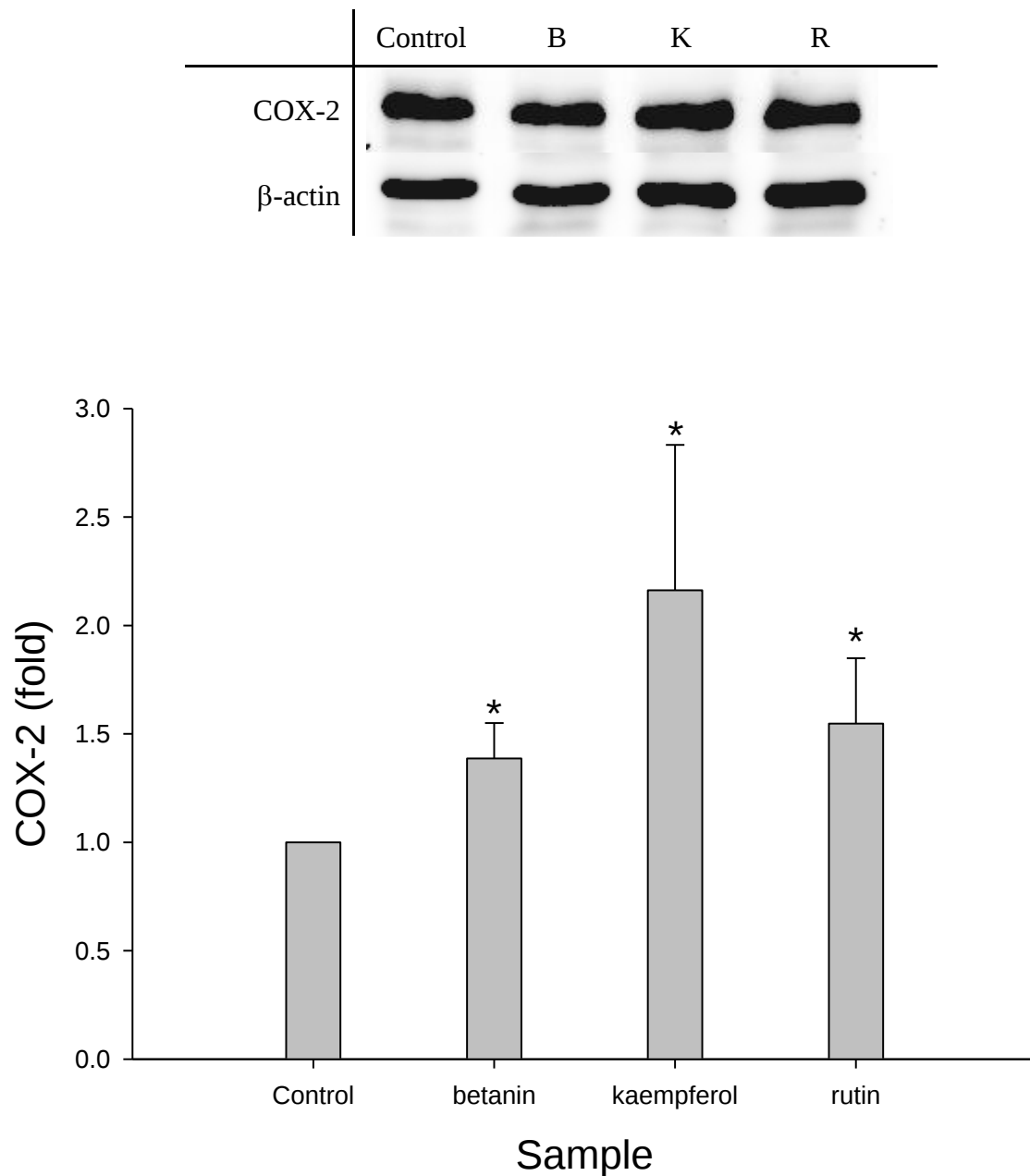
圖三十二 Betanin, Kaempferol and Rutin 對 SVEC4-10 細胞反應 14 小時對 eNOS 基因表現之影響

Figure 32. Effects of Betanin, Kaempferol and Rutin at 25 μ M on eNOS expression in SVEC4-10 cells. The cells were treated with Betanin, Kaempferol and Rutin for 14 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *($p < 0.05$) compared with the control



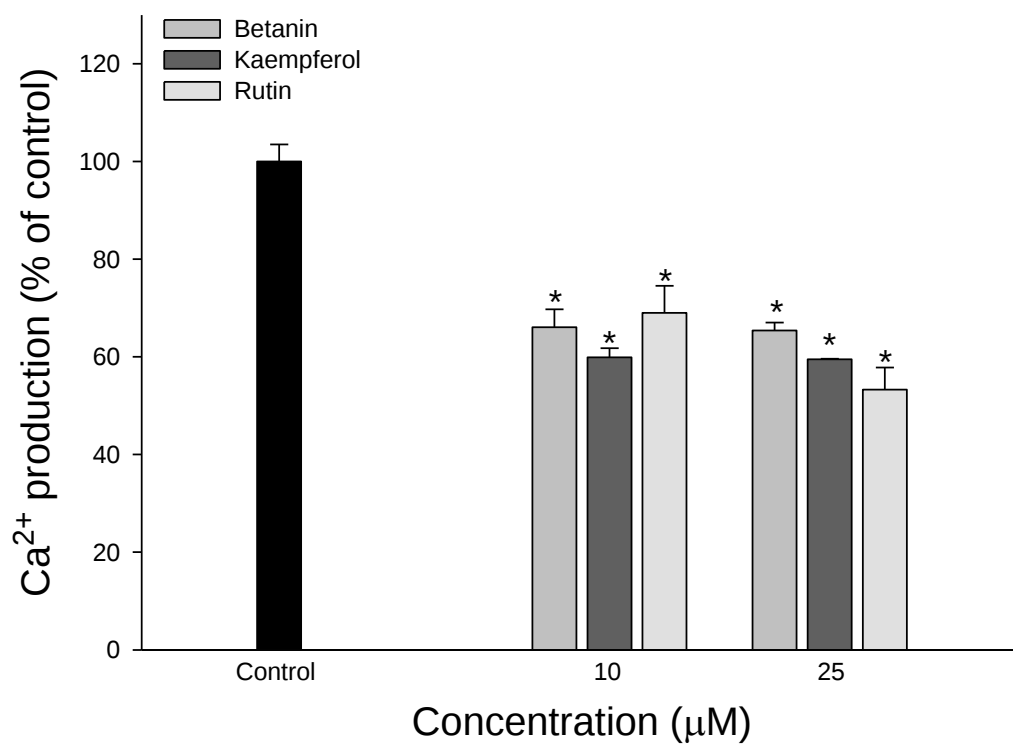
圖三十三 Betanin, Kaempferol and Rutin 對 SVEC4-10 細胞反應 4 小時對 PGI₂ 生成之影響。

Figure 34. Effects of water extracts of Betanin, Kaempferol and Rutin on PGI₂ production in SVEC4-10 cells. The cells were treated with different concentrations of Betanin, Kaempferol and Rutin for 4 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *($p < 0.05$) compared with the control

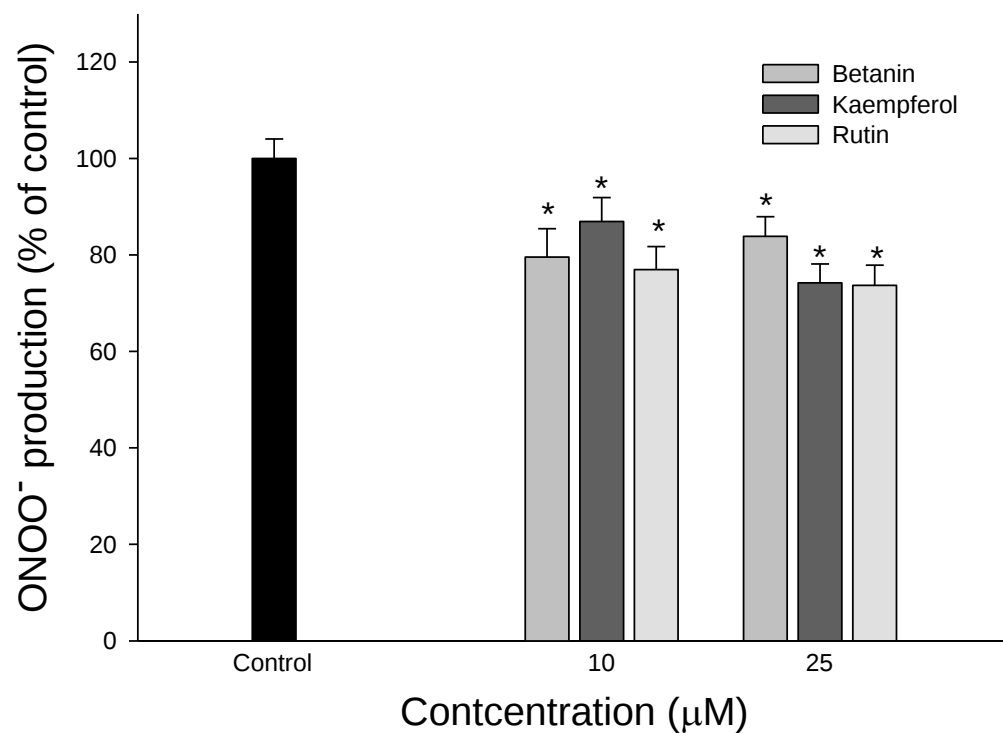


圖三十四 Betanin, Kaempferol and Rutin 對 SVEC4-10 細胞反應 2 小時對 COX-2 基因表現之影響

Figure 34. Effects of Betanin, Kaempferol and Rutin at 25 μ M on COX-2 expression in SVEC4-10 cells. The cells were treated with Betanin, Kaempferol and Rutin for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *($p < 0.05$) compared with the control

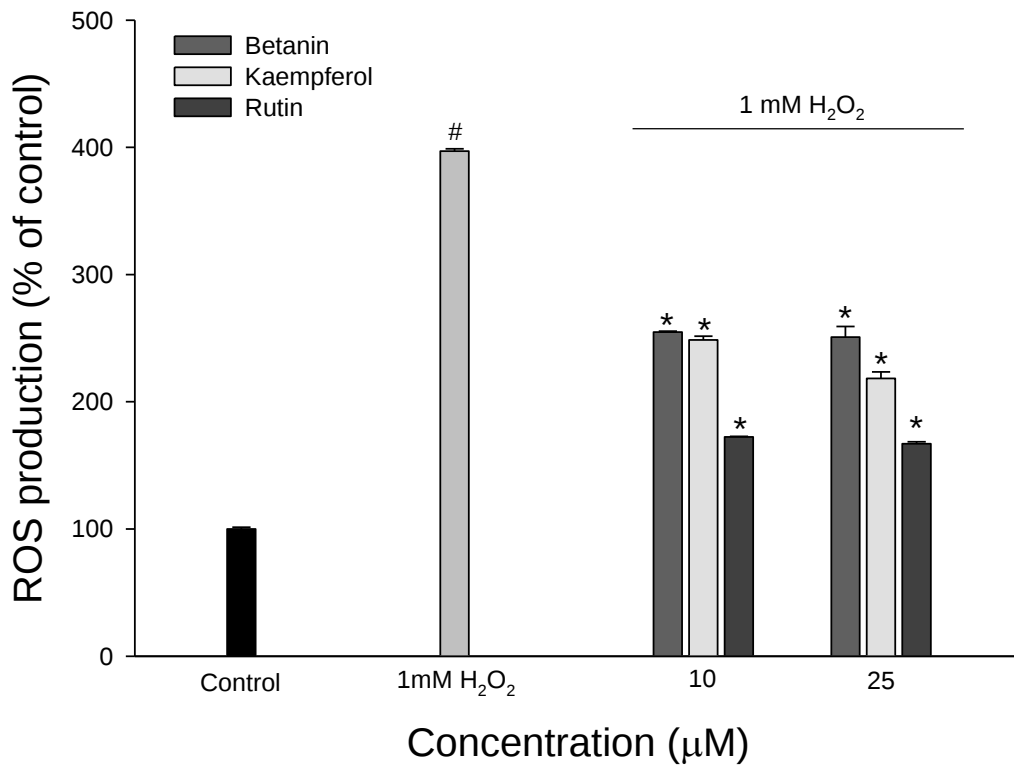


圖三十五 Betanin, Kaempferol and Rutin 對 SVEC4-10 細胞反應 20 小時對 Ca^{2+} 之影響
 Figure 35. Effects of Betanin, Kaempferol and Rutin on Ca^{2+} in SVEC4-10 cells. The cells were treated with different concentrations of Betanin, Kaempferol and Rutin for 20 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *($p < 0.05$) compared with the control.



圖三十六 Betanin, Kaempferol and Rutin 對 SVEC4-10 細胞反應 16 小時對 peroxynitrite 之影響

Figure 36. Effects of Betanin, Kaempferol and Rutin on peroxynitrite in SVEC4-10 cells. The cells were treated with different concentrations of Betanin, Kaempferol and Rutin for 16 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *($p < 0.05$) compared with the control.



圖三十七 Betanin, Kaempferol and Rutin 對 H₂O₂ 誘發 SVEC4-10 細胞反應 2 小時之 ROS 之影響。

Figure 37. Effects of Betanin, Kaempferol and Rutin on ROS production in 1 mM H₂O₂-induced SVEC4-104-10 cells. The cells were treated with different concentrations of Betanin, Kaempferol and Rutin and exposed to 1 mM H₂O₂ for 2h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#](p < 0.05) compared with the control group. ^{*}(p < 0.05) compared with 1 mM H₂O₂- induced cells alone.

表八 紅藜萃取物對血管緊縮素轉移酶之抑制率

Table 8. The inhibitory effect of water extracts of Djulis (*Chenopodium formosaneum*) (WECF) on angiotensin converting enzyme

Concentration (μg/ml)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (μg/ml)
100	24.07 ± 0.03 ^c	261.31 ± 0.94
250	48.15 ± 0.11 ^{bc}	
500	74.07 ± 0.05 ^{ab}	
Captopril (1μM)	81.48 ± 0.06 ^a	

Experiments were done in triplicates. Values are expressed as the means ± SD. Mean with different lower case subscripts in the same column is significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's test.

表九 Betanin, Kaempferol and Rutin 對血管緊縮素轉移酶之抑制率

Table 9. The inhibitory effect of Betanin, Kaempferol and Rutin on angiotensin converting enzyme

Concentration (μM)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (μM)
Betanin		
10	14.81 ± 0.05 ^b	—
50	16.67 ± 0.08 ^b	
100	25.00 ± 0.07 ^a	
Kaempferol		
10	7.41 ± 0.05 ^c	—
50	20.99 ± 0.11 ^b	
100	38.89 ± 0.08 ^b	
Rutin		
10	14.81 ± 0.05 ^b	65.81 ± 0.05
50	37.04 ± 0.06 ^b	
100	79.63 ± 0.08 ^a	
Captopril (1μM)	81.48 ± 0.06 ^a	

Experiments were done in triplicates. Values are expressed as the means ± SD. Mean with different lower case subscripts in the same column is significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's test.

表十 紅藜水萃取物及其活性成分對 SHR 大鼠體重及相對臟器重量之影響

Table 10. Effects of water extracts of Djulis (WECF) and its bioactive compounds on body weight and relative organ weights in spontaneously hypertensive rats

Groups	Initial body weight (g)	9th day body weight (g)	21st day body weight (g)	Relative organ weights (%)	
				Liver	Kidney
C	260.52±2.28	266.84±3.77	284.30±4.71	1.81±0.04 ^a	0.60±0.01
CA	271.65±2.48	276.60±5.02	287.40±4.53	2.20±0.03 ^b	0.61±0.01
H	260.78±3.31	266.31±2.17	282.23±2.53	2.12±0.05 ^b	0.58±0.01
M	263.80±3.31	266.72±2.65	283.85±3.33	2.12±0.04 ^b	0.61±0.01
L	272.13±4.36	278.23±3.37	290.25±4.26	2.18±0.07 ^b	0.59±0.01
R	264.06±2.95	264.36±5.20	280.56±2.50	2.13±0.08 ^b	0.60±0.02
B	271.35±5.33	274.53±4.37	288.27±3.02	2.07±0.04 ^b	0.58±0.01

Data were shown as mean±SEM (n=7). C: Control; CA: Captopril at 50 mg/kg bw; H: WECF at 100 mg/kg bw ; M: WECF at 50 mg/kg bw; L: WECF at 10 mg/kg bw; R: Rutin at 50 mg/kg bw; B: Betanin at 50 mg/kg bw. Values in the same column with different superscript letter are significantly different at $p < 0.05$ analyzed by Duncan test.

表十一 紅藜萃取物及其活性成分對對 SHR 大鼠收縮壓之影響

Table 11. Effect of water extracts of Djulis (WECF) and its bioactive compounds on systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats

Groups \ Days	0	2	4	6	9	13	17	21
C	175.8±3.7	180.2±5.9	173.6±2.6	178.5±4.4	176.3±6.7 ^b	174.3±9.8	176.6±8.6	175.5±7.0 ^b
CA	206.0±6.3	172.9±4.5*	158.0±6.1*	150.7±5.7*	155.7±4.0 ^a	149.1±8.2*	154.9±7.4*	151.1±7.2 ^a
H	199.9±5.2	187.7±8.4	177.9±9.6*	176.7±4.7*	178.0±4.3 ^b	179.2±3.4*	181.0±3.7*	178.7±2.5 ^b
M	202.3±9.6	200.0±7.4	186.3±5.6	187.2±6.1	185.2±7.1 ^{bc}	180.7±5.2	187.2±8.5	200.3±5.6 ^c
L	215.6±11.7	199.3±7.1	197.8±10.2	196.5±5.4	203.1±6.2 ^c	197.9±5.0	203.4±3.6	205.8±8.4 ^c
R	214.8±9.0	190.1±6.2	198.4±6.6	188.3±5.9	184.5±7.8 ^{bc}	190.9±8.0	172.7±5.0*	175.3±5.0 ^b
B	200.3±6.9	190.5±8.0	194.8±9.7	188.5±8.2	193.5±4.2 ^{bc}	196.0±8.8	187.7±8.6	187.6±5.2 ^{bc}

Data were shown as mean±SEM (n=7). C: Control; CA: Captopril at 50 mg/kg bw; H: WECF at 100 mg/kg bw ; M: WECF at 50 mg/kg bw; L: WECF at 10 mg/kg bw ;R: Rutin at 50 mg/kg bw ;B: Betanin at 50 mg/kg bw. * represent significantly different from the day 0 at $p < 0.05$ analyzed by paired-*t* test. Values in the same column with different superscript letter ^(a-d) are significantly different at $p < 0.05$ analyzed by Duncan test. Systolic blood pressure=SBP / HR x AveHR, HR: heartbeat rate, AveHR: average heartbeat rate.

表十二 紅藜萃取物及其活性成分對對 SHR 大鼠舒張壓之影響

Table 12. Effect of water extracts of Djulis (WECF) and its bioactive compounds on diastolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats

Groups \ Days								
	0	2	4	6	9	13	17	21
C	98.7±3.5	105.1±3.6	91.2±6.0	99.3±4.2	101.8±6.3 ^b	105.6±6.8	96.3±8.9	92.6±6.4 ^{ab}
CA	132.3±6.1	102.3±6.4*	93.5±4.9*	90.5±5.1*	83.8±5.6 ^{*a}	88.2±6.1*	95.0±5.8*	84.5±7.5 ^{*a}
H	126.0±5.2	117.7±5.4	104.2±8.5*	104.8±4.1*	108.4±5.3 ^b	109.9±3.4*	110.2±3.4*	110.7±5.2 ^{*bc}
M	124.3±4.5	121.1±8.9	112.8±5.9	118.3±7.5	119.1±4.5 ^b	118.3±3.8	107.9±6.3	120.1±5.0 ^c
L	131.8±9.2	126.5±6.8	111.8±7.8	107.0±5.3	113.8±6.3 ^b	113.8±5.4	121.1±5.6	122.0±5.8 ^c
R	127.7±9.9	122.1±7.3	124.8±6.6	116.2±4.1	111.1±3.9 ^b	123.2±5.8	99.5±5.2*	105.5±4.7 ^{*bc}
B	122.3±9.3	112.1±8.3	115.0±5.9	108.2±6.4	113.6±6.5 ^b	120.2±8.7	120.3±10.1	114.4±6.3 ^c

Data were shown as mean±SEM (n=7). C: Control; CA: Captopril at 50 mg/kg bw; H: WECF at 100 mg/kg bw ; M: WECF at 50 mg/kg bw; L: WECF at 10 mg/kg bw ;R: Rutin at 50 mg/kg bw ;B: Betanin at 50 mg/kg bw. * represent significantly different from the day 0 at $p < 0.05$ analyzed by paired- t test. Values in the same column with different superscript letter are significantly different at $p < 0.05$ analyzed by Duncan test. Diastolic blood pressure=DBP / HR x AveHR, HR: heartbeat rate, AveHR: average heartbeat rate.

陸、參考文獻

- 蔡碧仁 民族植物紅藜的永續利用研究-民族植物紅藜之營養及機能性成分之永續利用(1)，行政院農業委員會 95 年度科技計畫研究報告 2006。
- 蔡碧仁 民族植物台灣藜(*Chenopodium formosanum* Koidz)應用與開發之研究(2)，行政院農業委員會 98 年度科技計畫研究報告 2009。
- 劉崇煌 民族植物紅藜的永續利用研究-紅藜抗氧化物含量及抗氧化酵素活性分析，行政院農業委員會 97 年度科技計畫研究報告 2008。
- 衛生署食字第 0991301352 號公告護肝效應功能評估方法，016 卷，142 期，2010
- 余佩螢 不同品系甘蔗葉之抗氧化與抗腫瘤活性，嘉南藥理科技大學生物科技系碩士班碩士論文 2010,7.23。
- Chen, X.; Shao, J.; Xiang, L.; Liu, X. Involvement of apoptosis in malathion-induced cytotoxicity in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line. *Comparat. Biochem. Physiol., Part C.* 2006, 142, 36-45.
- Chen, Z. Y.; Peng, C.; Jiao, R.; Wong, Y.M.; Yang, N.; Huang, Y. Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 4485-4499.
- Chirico, S., Smith, C., Marchant, C., Mitchinson, M., Halliwell, B. Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free Radic. Res. Comms.* 1993, 19, 51-57.
- Dirsch, V.M.; Kiemer, A.K.; Wagner, H.; Vollmar, A.M. Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric oxide synthase. *Atherosclerosis* 1998, 139, 333-339.
- Gebhardt, R.; Fausel, M. Antioxidant and hepatoprotective effects of artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicology in vitro* 1997, 11, 669-672.
- Hu, M.L.; Dillard, C.J.; Tappel, A.L. Aurothioglucose effect on sulfhydryls and glutathione-metabolizing enzymes: in vivo inhibition of selenium-dependent glutathione peroxidase. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1988, 59, 147-160.
- Nath, J.; Powledge, A. Modulation of human neutrophil inflammatory responses by nitric oxide: studies in unprimed and LPS-primed cells. *J. Leukoc. Biol.* 1997, 62, 805-816.
- Sarphie, N.B.; D'souza, D.M.; Van Thiel, D.H.; McClain, C.J.; Deaciuc, I.V.; Dose- and time-dependent effects of ethanol on functional and structural aspects of the liver sinusoid in the mouse. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 1997, 21, 1128-1136.
- Shin, S.G.; Kim, J.Y.; Chung, H.Y.; Jeong, J.C. Eingerone as an antioxidant against peroxynitrite. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7617-7622。
- Tripathi, M.; Singh, B.K.; Kakkar, S.P. Glycyrrhizic acid modulates t-BHP induced apoptosis in primary rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47, 339-347.
- Tsai, J.S.; Chen, J.L.; Pan, B.S. ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*). *Process Biochem.* 2008, 43, 743-747.
- Tsai, P.J.; Chen, Y.S.; Sheu, C.H.; Chen, C.Y. Effect of nanogrinding on the pigment and bioactivity and Djulis (*Chenopodium Formosanum* Koidz.) *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 1814-1820.
- Wu, M.J.; Huang, C.J.; Lian, T.; Kou, M.C.; Wang, L. Antioxidant activity of *Glossogyne tenuifolia*. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53 (16), 6305-6312.

柒、附錄：已發表研發成果

- Chu, C.C., Chen, S.Y., Chyau, C.C., Fu, Z.H., Liu, C.C., Duh, P.D*. Protective effect of Djulis (*Chenopodium formosaneum*) and its bioactive compounds protect against carbon tetrachloride-induced liver injury, *in vivo*. *J. Functional Foods* 2016,26, 585-597.
- Chyau, CC, Chu, CC, Chen, SY, Duh, PD*. Djulis (*Chenopodium formosaneum*) and its bioactive compounds protect against oxidative stress in human HepG2 cells. *J. Functional Foods* 2015; 18, 159-170.

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：2016 年 3 月 4 日

計畫編號	MOST—102—2313—B041—001—MY3		
計畫名稱	紅藜及其活性成分之護肝效應與輔助調節血壓之研究		
出國人員姓名	杜平惠	服務機構及職稱	嘉南藥理大學食品科技系教授
會議時間	2016 年 2 月 20 日至 2016 年 2 月 24 日	會議地點	日本 東京
會議名稱	(中文)第 25 屆亞洲肝臟研究協會(Asian Pacific Association for the Study of the Liver, APASL): (英文) 25 th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver		
發表題目	(中文) 紅藜及其活性成分對四氯化碳引發肝損傷之護肝效應 (英文)The protective effect of Djulis and its bioactive compounds against CCl ₄ -induced liver injury		

一、 參加會議經過

亞洲肝臟研究協會(Asian Pacific Association for the Study of the Liver, APASL)每年舉辦一次年會，今年為第 25 屆年會於東京新高輪國際會議中心舉行。筆者曾於多年前參加過在曼谷舉辦之 APASL 之年會，對於當年參加人數及參與者提出之論文品質印象深刻。

本次年會於 2 月 20 日註冊，並舉辦一日課程之 post graduate course，隔日舉行開幕式。日本親王 Tomohito of Mikasa 女兒特地來致歡迎詞，除了歡迎與會者參加外，並特別感謝專家、學者對肝病之研究做出貢獻，期許再接再厲，解決人類共有疾病。另外，日籍榮譽主席 Masau Omato 亦致詞表示 APASL 今年年會主要有三目的，分別是將過去每二年舉辦的年會改為每年舉行，其次，每年另於不同國家舉辦 2 至 4 次之單一主題研討會，再者是發行每年 6 次的 Hepatology International 的期刊，以利學術教育推廣發展目的。本次年會主席日籍 Osma Yokosuka 亦於大會中報告今年共有來自 60 個以上國家共約 4000 人參加，並提出約 1500 篇之論文發表，顯示 APASL 是一個組織極為可觀的協會。

今年探討之主題為 Modern Hepatology，重點包含 21 日之 HCV day，22 日之 HBV，23 日之 HCC/NASH day，24 日之 WHO/Civil day。換言之，將肝病之發展型態及其相對應屬性之論文於當日發表。在大會開幕歡迎儀式後，緊接著大會安排一些演講，分別是美籍之 Martin 講述近幾十年來 nucleotide drugs 對 HCV 之最新治療方式，其中 tenofovirDF(TDF)結合 nucleotide 在 HCV 治療上已有很好的表現，另外有些藥物雖被允許使用，但在其他國家則仍被禁止。日籍 Masao Omata 在其 Barriers of HCV treatment in Asia Pacific 報告中指出肝病患者有 70-80%罹患 C 型肝炎，在其 350 病患治療處理 6 個月過程中，HCV 患者人數大為降低，並講述其治療方式。大陸學者 Lai Wei 則在其 Barrier of HCV treatment in China 報告，指出在中國大陸大約有 1 千萬人罹患 HCV，而真正接受治療大約只有 1.6%，另對 HCV 不了解亦是造成 HCV 患者增加之主因，再者據其估計對 HCV 之不了解及教育推廣不足，所衍生之健康醫療支出將更為嚴峻。我國高醫教授莊萬隆以其多年研究及臨床醫療過程中發表 Treatment of HCV，從最初使用 Interferon 至後來最新藥物結合方式治療 HCV 等作解釋。埃及學者 Alaaeldin Lbrahin 演講 Gentype 4 題目，讓人吸睛是其將 HCV 病毒與恐怖分子作等號譬喻，並以金恩博士名言“I have a dream”作結束，其期待在埃及有朝一日能將 HCV 消滅，作為他的夢想，此說法贏得聽眾熱烈鼓掌鼓勵。日籍 Shin Maeda 教授在其 Hepatocarcinogenesis in mouse model 中指出其以 diethylnitrosamines 作為誘導致癌，並以 5 mg/kg 劑量注射入 mouse，8 個月後犧牲，利用此 model 探討對 HCC 之發展及發想性，以及以氧化壓力之訊息途徑進一步瞭解肝細胞死亡及 myeloid 之關聯性。土耳其籍之 Necati Ormecl 報告 Biomarker and imaging of NASH，其整理 NASH 不同生化 marker 與不同 imaging 處理之指標，並很完整敘述各種指標用途。南韓籍之 Dong Joon Kim 則在 Alcohol liver disease as systemic disease 主題報告中，敘述酒精對腸胃道包括對菌叢等影響。日籍 Keisuke Hino 在 oxidative stress and NASH 中提出 ROS 對粒線體的影響，其次鐵離子之螯合可抑制 ROS 生成外，另可抑制疾病及肝癌進一步發展。印尼籍 Rino Alvani Gnni 在其報告中分別提出 Guideline of NASH in Asia 及 Europe 之處理原則，整體而言，NASH/NAFLD 在亞洲所發生問題較歐洲多，但處理治療頻率卻較歐洲少。日籍 Toshiji Saihara 在其 Treatment of NASH based on metabolic syndrome 中很詳細報告指出肥胖、糖尿病等與 HCC 皆有關連性，而運動、合理飲食控制對 NASH 治療有其關連性。另外，大會也安排專家、學者利用中午用餐時間做精闢之演講，其中印象深刻是，23 日中午之 Confirming the real-world value of HCV therapy。共有四個國家(包含美國、中華民國、日本、南韓)不同專家提出其個人在 HCV 之治療及政府之因應措施，其中我國高醫余明隆教授也提出精闢見解，印象較深刻是他提出，由於民眾對 C 肝認識不清及台灣健保用藥關係，使得我國在 C 肝治療上尚有努力提升之空間。除了參加上述口頭論文報告外，每位壁報論文發表者必須口頭陳述三分鐘，另二分鐘接受提問，算來也是短時間之口頭報告。筆者所提出之論文題目為 The protective effect of Djulis and its bioactive compounds against CCl4-induced liver injury，除了口頭報告外，Chiba 大學之研究學者亦當場對筆者提出有關 Djulis 生長、應用上之問題。

二、與會心得

綜合這次研討會，筆者提出下列幾項心得：

1. 本次研討會聚焦在 HCV 探討，主要原因在於由先前以 Interferone 治療因有其不良副作用，目前已有結合型藥物可殺死 C 肝病毒，因此研究者眾。

2. 結合型藥物取代過去單一藥物療法仍是未來治療 C 肝主要方向。
3. 認知與教育推廣是治療 C 肝第一道防線。
4. 肥胖或糖尿病等代謝症狀對 HCV 或 HCC 有絕對影響性。
5. 營養不均衡或缺乏運動與 NASH 等症狀有關。
6. 本次成果報告以臨床醫療報告居多，對機轉之了解反而不多。
7. 藥物治療方式對 HCV、NASH、NAFLD 等較受青睞。相對而言，以食物療法在臨床醫療上並不受重視。
8. 有藥廠提供之藥物配合醫師之臨床醫療無論在實務上或應用上皆有方便性。
9. 動物實驗有其重要性，惟應用在臨床醫療上仍有段距離
10. 筆者研究領域在天然食材之機轉探討，雖在 *in vitro* 與 *in vivo* model 皆運用在試驗設計上，且也與醫學中心合作提出研究主題，惟未來仍需進一步尋求與醫學中心合作針對 NASH 或 NAFLD 等主題作深入探討。

三、發表論文全文或摘要

The protective effect of Djulis and its bioactive compounds against CCl₄-induced liver injury

Shih-Ying Chen^a, Charng-Cherng Chyau^b, Chin-Chen Chu^{c,d}, Pin-Der Duh^{e,*}

^aDepartment of Health and Nutrition, Chia Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan, R.O.C. ^bResearch Institute of Biotechnology, Hungkuang University, Taichung, Taiwan, R.O.C. ^cDepartment of Anesthesiology, Chi-Mei Medical Center, Tainan, Taiwan, R.O.C. ^dDepartment of Recreation and Health-Care Management, Chia Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan, R.O.C. ^eDepartment of Food Science and Technology, Chia Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan, R.O.C.

The protective effect of water extracts of Djulis (*Chemopodium formosaneum*, WECF) and its bioactive compounds, rutin, kaempferol and betanin, against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats was investigated. Rutin, kaempferol, betanin and another three compounds were identified and present in WECF using HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis. Oral administration of WECF to rats at 2.5 mg/kgbw for 28 consecutive days before a single dose of CCl₄ demonstrated a significantly lowered serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels, and attenuated histopathological changes in CCl₄-treated rats. Although WECF induced CYP2E1 activity, WECF inhibited lipid peroxidation, restored hepatic glutathione (GSH), enhanced superoxide dismutase (SOD), and reduced DNA damage in CCl₄-treated rats, which explained the antioxidant action and suppressed oxidative stress. Rutin, kaempferol and betanin at 1.0 µg/kgbw significantly restored GSH levels and reduced DNA damage in CCl₄-treated rats. In addition, betanin at 1.0 µg/kgbw increased SOD activity. Taken together, this study is the first time to demonstrate that WECF protects rat liver from CCl₄-treated liver injury due mainly to attenuating oxidative stress. The presence of bioactive compounds in WECF may partly be responsible for the hepatoprotection of WECF.

四、建議：無

五、攜回資料名稱及內容: 會議議程與摘要光碟

六、其他

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2017/01/12

科技部補助計畫	計畫名稱：紅藜及其活性成分之護肝效應與輔助調節血壓之研究		
	計畫主持人：杜平惠		
	計畫編號：102-2313-B-041-001-MY3		學門領域：食品及農化
研發成果名稱	(中文) 紅藜及其活性成分之護肝效應與輔助調節血壓之研究		
	(英文) Study of Djulis (Chenopodium formosanum) and their bioactive compounds on hepatoprotective effect and supplementary regulation of blood pressure		
成果歸屬機構	嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學	發明人 (創作人)	杜平惠, 褚錦承, 陳師瑩
技術說明	(中文) 12310 - 250 g/ml之紅藜水萃取物 (WESP) 具有抑制0.2 mM t-BHP誘發HepG2細胞毒性之能力，其作用機轉與其降低TBARS與ROS生成及提升GSH含量有密切關連性。再者，WESP顯著性地調控抗細胞凋亡作用。由HPLC-DAD與HPLC-MS/MS分析，共有甜菜苷(Betanin)，芸香苷(Rutin)，山柰酚(Kaempferol)及其它20種化合物存在於紅藜水萃取物中，經活性分性，顯示彼等成分對紅藜水萃取物在降低肝細胞氧化壓力有所助益，進而有助於減少細胞之凋亡。 在護肝效應之四氯化碳誘發肝氧化動物試驗模系，結果顯示WESP(2.5 mg/kg bw)能顯著降低AST與ALT值，在肝組織上損傷有趨緩現象。另外，WESP及三種活性成分皆可抑制TBARS含量並減緩因CC14作用而使GSH含量下降，而Betanin及WECF亦可提升SOD活性。此外，大鼠以酒精 (30 %) 連續90天誘發肝損傷，試驗結果顯示，WESP可藉由抑制油脂氧化，提升GSH含量，增加抗氧化酵素及抑制CYP2E1活性而得以有效保護因酒精誘發肝損傷作用。 於輔助調節血壓試驗，結果顯示100-500 g/ml之WECF與三種活性成分 (10與25 M) 可促進SVEC4-10細胞之eNOS與COX-2基因表現，進而增加NO與PGI2生成量。此外，可降低血管緊縮素轉移酶活性。於in vivo試驗中，紅藜水萃取物具有調降SHR大鼠高血壓之功效。綜合上述，紅藜水萃取物不僅具有護肝也具有降高血壓之特性。		
	(英文) Water extracts of Djulis (WECF) demonstrated a cytoprotection in t-BHP-induced HepG2 cells. According to HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis, Betanin, Kaempferol, Rutin and another twenty compounds were present in WECF. WECF consisting of bioactive compounds can prevent oxidative stress by enhancing the antioxidant indices and reducing apoptosis of cells. WECF demonstrated significantly lowered AST and ALT, and attenuated histopathological changes in CCl4-treated rats. WECF also attenuated oxidative stress by lowering TBARS level, restored GSH, enhanced CAT activity, and inhibited CYP2E1 activity in alcohol-treated rat liver. In vitro, WECF, Rutin, Kaempferol and Betanin demonstrated significant inductive on eNOS and COX-2 activities and thereby inducing NO and PGI2 production. ACE was also inhibited. In vivo, SBP and DBP of the WECF were significantly lower than those of the negative control. The results provide evidence that Djulis show hepatoprotective and antihypertensive effects.		
產業別	農業, 食品、飲料及菸類製造		
技術/產品應用範圍	生技、發酵、食品製造、萃取技術、細胞與動物試驗等相關技術/保健食品、農產加工，生技醫藥		
技術移轉可行性及預期效益	本研發成果可技術移轉予保健生技或農產加工，生技醫藥業。其效益為提升紅藜作物附加價值，促進護肝效應與輔助調節血壓食品之商品化，配合業界有效行銷，其利潤將大為可期。		

註：本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。

102年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：杜平惠				計畫編號：102-2313-B-041-001-MY3				
計畫名稱：紅藜及其活性成分之護肝效應與輔助調節血壓之研究								
成果項目				量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇			
		研討會論文		0				
		專書		0	本			
		專書論文		0	章			
		技術報告		0	篇			
		其他		0	篇			
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件		
				已獲得	0			
			新型/設計專利		0			
		商標權		0				
		營業秘密		0				
		積體電路電路布局權		0				
		著作權		0				
		品種權		0				
		其他		0				
		技術移轉	件數		0		件	
	收入		0	千元				
國外	學術性論文	期刊論文		2	篇	Chu, C.C., Chen, S.Y., Chyau, C.C., Fu, Z.H., Liu, C.C., Duh, P.D*. Protective effect of Djulis (Chenopodium formosaneum) and its bioactive compounds protect against carbon tetrachloride-induced liver injury, in vivo. J. Functional Foods 2016, 26, 585-597. Chyau, CC, Chu, CC, Chen, SY, Duh, PD*. Djulis (Chenopodium formosaneum) and its bioactive compounds protect against oxidative stress in human HepG2 cells. J. Functional Foods 2015; 18, 159-170.		
		研討會論文		3		Chen, S.Y., Chyau, C.C., Chu, C.C, Duh, P.D. The protective effect of Djulis and its bioactive compounds against CCl4-induced liver injury. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study		

						of the Liver, Tokyo, Japan, 2016. 02.20-2016.02.24. Chu, CC, Chen, SY, Chyau, CC, Duh,PD. The inhibitory effects of sweet orange (Citrus sinensis) peel on human hepatomacellular carcinoma HepG2 cells, in vitro and in vivo. 12th Asian Congress of Nutrition (12th ACN2015), Yokohama, Japan, 2015.05.14-2015.05.18. Duh, P.D., Lin, T.P., Chen, C.H., Lin, Y.C., Chen, S.Y. Antihyperlipidemic effects of ethanolic extract of Noni (Morinda citrifolia L.) leaves and its bioactive compound, Rutin, in mice fed with a high-fat diet. International Congress on Natural Sciences and Engineering. Kyoto, Japan, 2014. 05/6-05/09.	
		專書			0	本	
		專書論文			0	章	
		技術報告			0	篇	
		其他			0	篇	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權			0		
		營業秘密			0		
		積體電路電路布局權			0		
		著作權			0		
		品種權			0		
		其他			0		
		技術移轉	件數				0
	收入			0	千元		
參與計畫人力	本國籍	大專生			0	人次	
		碩士生			0		
		博士生			0		
		博士後研究員			0		
		專任助理			1		
	非本國籍	大專生			0		
		碩士生			0		
		博士生			0		

		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 （無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。）					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

☒ 達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以100字為限）

☐ 實驗失敗

☐ 因故實驗中斷

☐ 其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文：☒ 已發表 ☐ 未發表之文稿 ☐ 撰寫中 ☐ 無

專利：☐ 已獲得 ☐ 申請中 ☒ 無

技轉：☐ 已技轉 ☐ 洽談中 ☒ 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

紅藜為台灣原著民特有之糧作，其雖已被證實具有抗氧化功效，但實際應用於特定功能性的評估仍未見相關文獻。藉此，透過本計畫之執行，已充分解明紅藜在氧化壓力之抑制性、對肝炎之保護及降高血壓特性，其貢獻如下：

1. 本計畫之研究成果，已確認紅藜具有保護肝臟免於被氧化傷害，包括降低氧化壓力、調控防禦系統、抑制肝細胞凋亡等作用時，將有助於機能食品之應用。

2. 本計畫研發成果已確認紅藜具有保護化學性與酒精性肝效應，此一模式可做為將來開發護肝機能性食品之參考，對業界將有一定程度之貢獻。

3. 本計畫完成降血壓的研究，且解明其作用機制，將可提供食品、醫藥界在開發藥物與治療新方向之應用與參考。

4. 本計畫解析上述功能之作用機制，此可作為學術在教學與研究之參考。

5. 本計畫順利達成預期目標，將使紅藜利用價值大為提昇，對其附加收益將有加分效果。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：☐ 否 ☒ 是，建議提供機關 農委會、衛福部、科技部、經濟部

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現：☒否 ☐是

說明：（以150字為限）

本計畫已充分解明紅藜具有抑制氧化壓力，且有護肝及降高血壓特性，此功能性可提供食品、醫藥界在開發藥物與治療新方向之應用與參考，並可提升紅藜之應用附加價值，並不具影響公共利益。