

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

紅藜及其活性成分對脂肪細胞之影響及抗肝腫瘤之研究(第3年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 105-2320-B-041-001-MY3
執行期間：107年08月01日至108年07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
計畫參與人員：學士級-專任助理：陳潔芸

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 108 年 10 月 21 日

中文摘要：本計畫分三年探討紅藜及其活性成分對脂肪細胞之影響及抗肝腫瘤之研究。第一年研究結果顯示紅藜酒精溶液萃取物(ethanolic extracts of Djulis, EECF)對3T3-L1前脂肪細胞與分化後之脂肪細胞皆不具毒性效應，且會抑制分化後脂肪細胞數目、三酸甘油酯之含量與GPDH活性；再者，EECF可降低PPAR γ ，C/EBP α and SREBP-1c基因表現，顯示EECF對脂肪細胞具有抑制效應。經HPLC-DAD and HPLC-MS/MS之分析，EECF共分離出20種成分，經鑑定後計有10種為已知成分，其中含有甜菜苷(betanin)，芸香苷(rutin)，山柰酚(Kaempferol)及其配醣體。由結果顯示三種成分會抑制分化後脂肪細胞數目與三酸甘油酯之含量，及降低C/EBP α and SREBP-1c基因表現，顯示EECF能有效抑制3T3-L1脂肪細胞之脂質生成，此作用與其所含之生物活性成分有關。

第二年探討in vivo模式對高脂飲食誘導小鼠肥胖與高血脂之影響，結果顯示小鼠餵食高脂飲食共 84 天，10、25、50mg/kgbw之EECF與所含成分包括rutin，quercetin，betanin (5 mg/kg bw)不影響小鼠攝食高脂飲食後的體重變化、食物攝取量以及餵食效率，惟在內臟脂肪重量皆低於高脂飲食組(HF)。此外，EECF低、中、高劑量及rutin，quercetin，betanin組的小鼠血液中 TG、TC、LDL-C含量顯著低於HF組，顯示彼等有改善血液脂質代謝異常的效果。另外，EECF各劑量組及其活性成分組與HF組相比，可顯著降低高脂飲食所誘發的胰島素分泌量且降低瘦體素的分泌，且有較佳口服葡萄糖耐受性與有效降低胰島素阻抗性。綜合上述，EECF無法降低小鼠肥胖，惟可顯著降低血脂，而此效應與其所含之活性成分有關。

第三年計畫乃探討EECF及其活性成分抗腫瘤模式試驗，顯示EECF及其活性成分對人類肝癌細胞HepG2具有毒性。而由細胞流式細胞術，得知HepG2於G0/G1 phase滯流，且由Annexin V分析得知上述凋亡以前期凋亡為主。由於EECF會誘發肝癌細胞之膜電位下降、提昇Bax/Bcl-2比率、促進caspase-3活性與裂解PARP。再者，EECF具有誘發ROS之生成，此可解釋EECF誘發肝癌細胞趨於死亡之可能原因。此外，存在於EECF之活性成分betanin、rutin、kaempferol、quercetin亦具有上述促凋亡現象，惟不具誘發氧化壓力。於in vivo 試驗結果顯示，EECF與其活性成分之quercetin可抑制裸鼠腫瘤之生成體積，顯示EECF與其活性成分之quercetin具有抑制肝癌細胞之功能。

綜合上述三年之研究結果，證實紅藜不僅有降脂效果，亦具有抗肝腫瘤功效。

中文關鍵詞：紅藜、脂肪細胞、甜菜苷，芸香苷，山柰酚、斛皮素、抑制脂肪形成，高脂血症、人類肝癌細胞、凋亡、抗肝腫瘤

英文摘要：The three-year proposal entitled "Study of Djulis (Chenopodium formosanum) and its bioactive compounds on adipogenesis and anti-hepatoma activity, in vitro and in vivo" was investigated. The aim of the first year proposal was to provide new insights into the role of the ethanolic extracts of Djulis (Chenopodium formosanum, EECF) and its bioactive compounds in preventing adipogenesis in 3T3-L1

adipocytes. The results showed EECF significantly inhibited oil red O-stained material (OROSM), triglyceride levels and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity in 3T3-L1 adipocytes. The expression of the critical molecules involved in lipid synthesis such as PPAR γ , C/EBP α and SREBP-1c was attenuated in EECF-treated cells. According to HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis, rutin, kaempferol, betanin and another nine compounds were present in EECF. The suppression of lipid accumulation by rutin, kaempferol and betanin occurred by decreasing the gene expression of PPAR γ , C/EBP α and SREBP-1c. Taken together, these findings suggest the presence of bioactive compounds in EECF may partly account for the anti-adipogenesis of EECF. The second year project is to investigate the effect of Djulis and its bioactive compounds on anti-obesity and hyperlipidemia in high-fat-fed mice. In comparison, total cholesterol (TC), and triacylglycerol (TG) levels were significantly higher in HFD-fed mice than in those fed with EECF at different doses (10, 25, 50 mg/kg bw), rutin (5 mg/kg bw), betanin (5 mg/kg bw) and quercetin (5 mg/kg bw) throughout the 12-week period, indicating alleviation of hyperlipidemia by EECF and bioactive compounds groups. Moreover, plasma insulin was significantly higher in HFD-fed mice than those fed with EECF at different doses, rutin, betanin and quercetin. In addition, results of oral glucose tolerance test (OGTT) revealed improved glucose tolerance and ameliorated insulin response at 60 and 90 min in mice fed with EECF, rutin, betanin and quercetin. Collectively, the findings suggest EECF has beneficial effects on hyperlipidemia of obese mice induced with HFD, which can be attributed in part to the bioactive compounds present in Djulis.

The third year project is to investigate the effect of Djulis and its bioactive compounds on antiproliferation toward hepatoma carcinoma HepG2 cells. The results showed that EECF demonstrated marked antiproliferation and cytotoxic activities toward HepG2 cells. The antiproliferative action is partly attributable to cell cycle arrest in G0/G1 phase and apoptosis induction. The apoptosis induced by EECF was associated with the attenuation of mitochondria membrane potential, increased in Bax/Bcl-2 ratio, induction of caspase-3 activation and cleaved PARP as well as induction of ROS generation. For bioactive compounds present in Djulis, including betanin, rutin, kaempferol and quercetin, showed apoptotic effect in HepG2 cells except for not inducing ROS generation. In vivo test, EECF (100 mg/kg bw) and quercetin (20 and 40 mg/kg bw) inhibited tumor growth

in mice xenograft model.

Overall, EECF shows anti-adipogenesis and inhibition of liver cancer growth, in vitro and in vivo.

英文關鍵詞： Djulis (*Chenopodium formosanum*), betanin, rutin, kaempferol, quercetin, anti-adipogenesis, hyperlipidemia, heptoma carcinoma HepG2 cells, apoptosis, inhibition of liver cancer growth

行政院科技部補助專題研究計畫 成果報告
 期中報告

紅藜及其活性成分對脂肪細胞之影響及抗肝腫瘤之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 105-320-B-041-001-MY3

執行期間：2016 年 8 月 1 日至 2019 年 7 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：陳師瑩

計畫參與人員：褚錦承

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 108 年 7 月 31 日

目錄

壹、中文摘要	1
貳、英文摘要	2
參、前言	3
肆、研究方法	4
伍、結果與討論	15
陸、引用文獻	60
柒、附錄:已發表研發成果	60

壹、中文摘要

本計畫分三年探討紅藜及其活性成分對脂肪細胞之影響及抗肝腫瘤之研究。第一年研究結果顯示紅藜酒精溶液萃取物(ethanolic extracts of Djulis, EECF)對3T3-L1 前脂肪細胞與分化後之脂肪細胞皆不具毒性效應，且會抑制分化後脂肪細胞數目、三酸甘油酯之含量與 GPDH 活性；再者，EECF 可降低 PPAR γ , C/EBP α and SREBP-1c 基因表現，顯示 EECF 對脂肪細胞具有抑制效應。經 HPLC-DAD and HPLC-MS/MS 之分析，EECF 共分離出 20 種成分，經鑑定後計有 10 種為已知成分，其中含有甜菜苷(betanin)、芸香苷(rutin)、山柰酚(kaempferol)及其配醣體。由結果顯示三種成分會抑制分化後脂肪細胞數目與三酸甘油酯之含量，及降低 C/EBP α and SREBP-1c 基因表現，顯示 EECF 能有效抑制 3T3-L1 脂肪細胞之脂質生成，此作用與其所含之生物活性成分有關。

第二年探討紅藜及其活性成分於 *in vivo* 模式對高脂飲食誘導小鼠肥胖與高血脂之影響，結果顯示小鼠餵食高脂飲食共 84 天，10、25、50 mg/kg bw 之 EECF 與所含成分包括 rutin、quercetin、betanin (5 mg/kg bw) 不影響小鼠攝食高脂飲食後的體重變化、食物攝取量以及餵食效率，惟在內臟脂肪重量皆低於高脂飲食組 (HF)。此外，EECF 低、中、高劑量及 rutin、quercetin、betanin 組的小鼠血液中 TG、TC、LDL-C 含量顯著低於 HF 組，顯示彼等有改善血液脂質代謝異常的效果。另外，EECF 各劑量組及其活性成分組與 HF 組相比，可顯著降低高脂飲食所誘發的胰島素分泌量且降低瘦體素的分泌，且有較佳口服葡萄糖耐受性與有效降低胰島素阻抗性。綜合上述，EECF 無法降低小鼠肥胖，惟可顯著降低血脂，而此效應與其所含之活性成分有關。

第三年計畫乃探討 EECF 及其活性成分抗肝腫瘤試驗，結果顯示 EECF 及其活性成分對人類肝癌細胞 HepG2 具有毒性。而由細胞流式細胞術，得知 HepG2 於 G₀/G₁ phase 滯流，且由 Annexin V 分析證實上述凋亡以前期凋亡為主。由於 EECF 會誘發肝癌細胞之膜電位下降、提昇 Bax/Bcl-2 比率、促進 caspase-3 活性與裂解 PARP。再者，EECF 具有誘發 ROS 之生成，此可解釋 EECF 誘發肝癌細胞趨於死亡之可能原因。此外，存在於 EECF 之活性成分 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 亦具有上述促凋亡現象，惟不具誘發氧化壓力。於 *in vivo* 試驗結果顯示，EECF 與其活性成分之 quercetin 可抑制裸鼠腫瘤之生成體積，顯示 EECF 與其活性成分之 quercetin 具有抑制肝癌細胞之功能。

綜合上述本研究結果，證實紅藜不僅有降脂效果，亦具有抗肝腫瘤功效。

關鍵字：紅藜、脂肪細胞、甜菜苷、芸香苷、山柰酚、斛皮素、抑制脂肪形成、高脂血症、人類肝癌細胞、凋亡、抗肝腫瘤

貳、英文摘要

The three-year proposal entitled “Study of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds on adipogenesis and anti-hepatoma activity, *in vitro* and *in vivo*” was investigated. The aim of the first year proposal was to provide new insights into the role of the ethanolic extracts of Djulis (*Chenopodium formosanum*, EECF) and its bioactive compounds in preventing adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. The results showed EECF significantly inhibited oil red O-stained material (OROSM), triglyceride levels and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity in 3T3-L1 adipocytes. The expression of the critical molecules involved in lipid synthesis such as PPAR γ , C/EBP α and SREBP-1c was attenuated in EECF-treated cells. According to HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis, rutin, kaempferol, betanin and another nine compounds were present in EECF. The suppression of lipid accumulation by rutin, kaempferol and betanin occurred by decreasing the gene expression of PPAR γ , C/EBP α and SREBP-1c. Taken together, these findings suggest the presence of bioactive compounds in EECF may partly account for the anti-adipogenesis of EECF.

The second year project is to investigate the effect of Djulis and its bioactive compounds on anti-obesity and hyperlipidemia in high-fat-fed mice. In comparison, total cholesterol (TC), and triacylglycerol (TG) levels were significantly higher in HFD-fed mice than in those fed with EECF at different doses (10, 25, 50 mg/kg bw), rutin (5 mg/kg bw), betanin (5 mg/kg bw) and quercetin (5 mg/kg bw) throughout the 12-week period, indicating alleviation of hyperlipidemia by EECF and bioactive compounds groups. Moreover, plasma insulin was significantly higher in HFD-fed mice than those fed with EECF at different doses, rutin, betanin and quercetin. In addition, results of oral glucose tolerance test (OGTT) revealed improved glucose tolerance and ameliorated insulin response at 60 and 90 min in mice fed with EECF, rutin, betanin and quercetin. Collectively, the findings suggest EECF has beneficial effects on hyperlipidemia of obese mice induced with HFD, which can be attributed in part to the bioactive compounds present in Djulis.

The third year project is to investigate the effect of Djulis and its bioactive compounds on antiproliferation toward hepatoma carcinoma HepG2 cells. The results showed that EECF demonstrated marked antiproliferation and cytotoxic activities toward HepG2 cells. The antiproliferative action is partly attributable to cell cycle arrest in G₀/G₁ phase and apoptosis induction. The apoptosis induced by EECF was associated with the attenuation of mitochondria membrane potential, increased in Bax/Bcl-2 ratio, induction of caspase-3 activation and cleaved PARP as well as induction of ROS generation. For bioactive compounds present in Djulis, including betanin, rutin, kaempferol and quercetin, showed apoptotic effect in HepG2 cells except for not inducing ROS generation. *In vivo* test, EECF (100 mg/kg bw) and quercetin (20 and 40 mg/kg bw) inhibited tumor growth in mice xenograft model.

Overall, EECF shows anti-adipogenesis and inhibition of liver cancer growth,

in vitro and *in vivo*.

Keywords: Djulis (*Chenopodium formosanum*), betanin, rutin, kaempferol, quercetin, anti-adipogenesis, hyperlipidemia, hepatoma carcinoma HepG2 cells, apoptosis, inhibition of liver cancer growth

參、前言

依據世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 2019年統計資料顯示: 5歲以下超重兒4000萬 (占5.9%)，超重的學齡兒童和青少年有3.38億，肥胖成人為6.72億 (WHO, 2019)；以國內而言，依據世界肥胖聯盟 (World Obesity Federation) 於2016年公布各國過重及肥胖盛行率 (BMI \geq 25) 資料顯示，臺灣「2013-2016年國民營養健康狀況變遷調查」成人男性為43.7%，女性為30.8%，而因肥胖而衍生之健康問題不少，包括高血脂、糖尿病、高血壓、心肌梗塞等疾病 (Sowers, 2003)。據此，肥胖已被認為是一種文明病，且WHO已將肥胖列為本世紀最重要之預防醫學及公共衛生問題。

肝臟是人體重要之器官，其負責合成、轉化、解毒、新陳代謝等功能，而慢性肝病、肝硬化、肝癌為肝臟疾病之三部曲，多年來一直是困擾國人健康重要之疾病。依衛福部公佈，國人2014年十大死因，癌症位居首位，肝病居第八位，而肝癌則高居國人癌症死因前二名。由此可見肝病是國內常見之本土病，也是所謂的「國病」。換言之，無論是肥胖或肝癌引起的疾病，長久以來一直是困擾著國人健康。如何有效降低肥胖及減少肝癌之罹患率，進而提昇國人的健康，是相關單位刻不容緩之事。另一方面，產官學研針對上述問題也投入相當多的努力，且積極尋求有效方法，以降低國人在肥胖及肝癌上衍生之疾病，其中藉飲食及發掘天然活性物質以減少肥胖或控制癌細胞之增生與轉移，是近年來的研究重點。

紅藜 (*Chenopodium formosanum*) 為藜屬植物，排灣族稱為Djulis，為台灣原住民特有的傳統糧食作物，彼等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、甲硫胺酸與麩胺酸等，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分析部份成分與抗氧化活性探討 (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。有鑑於此，敝人於102-105年執行科技部三年計畫「紅藜之護肝效應與輔助調節血壓」之研究，其成果已刊登於Journal of Functional Foods (Chyau et al., 2015; Chu et al., 2016; Chen et al., 2019)，顯示紅藜及其活性成分可有效抑制因氧

化壓力所導致細胞凋亡，主要原因在於其不僅含有活性成分包括rutin, betanin, kaempferol及其它20種成分，藉彼等之生物活性而緩和因氧化壓力而導致細胞凋亡現象(Chyau et al., 2015)。其次，在*in vivo*護肝試驗中，紅藜及其活性成分rutin、betanin、kaempferol能減緩大鼠因四氯化碳(CCl₄)導致肝氧化傷害，並抑制脂質氧化、提昇glutathione含量與增加超氧歧化酶活性、減少DNA傷害等抗氧化及調控氧化壓力之特性(Chu et al., 2016)。另外，紅藜及其活性成分亦具有降血壓效應(Chen et al., 2019)。除此之外，有關紅藜是否仍有其他生物活性探討的文獻則付之闕如。基於此，敝人在完成102-105年科技部之計畫：紅藜之護肝效應與輔助調節血壓之研究後，若能賡續執行本計畫：『紅藜及其活性成分對脂肪細胞之影響及抗肝腫瘤活性之研究』，則不僅能一窺紅藜之較完整的生物特性外，所獲成果更能彰顯紅藜之重要性，對於未來應用於醫葯或保健食品產業將更具有參考價值。

本研究之第一年計畫將以*in vitro*模系，探討紅藜及其活性成分對脂肪細胞之影響及其作用機轉；第二年則以*in vivo*模系，深入探討紅藜及其活性成分對高脂飲食誘導大鼠肥胖症之影響；第三年以*in vitro*及*in vivo*方式評估紅藜及其活性成分抗腫瘤效應。本計畫所獲得一系列成果不僅可應用於保健食品及醫藥界之參考，對國人健康維護也極具有意義性。

肆、研究方法

材料與方法

第一年實驗方法

1. 材料與藥品

本計畫所使用的紅藜購自屏東可樂果公司；另所使用之試藥為一級藥品；3T3-L1前脂肪細胞株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

(一) 紅藜酒精溶液萃取物之製備

乙醇(95%)與去離子水以1:1比例混合後備用。將紅藜與備用酒精水溶液以1:10(w/v)比例混合，震盪8hr後靜置隔夜，過濾後，過濾物再以同樣方式萃取，二次之濾液進行減壓濃縮及冷凍乾燥，此為紅藜酒精溶液萃取物。稱重後儲存於4°C。

(二) 細胞培養

由液態氮筒取出3T3-L1前脂肪細胞株，置37°C水浴下快速溶解後，將其細胞液吸放2-3次，隨即加進培養基中，並於37°C、5%CO₂ incubator培養。隔天將其含有冷凍保存液之培養基移除，更換新鮮之培養基，並於37°C、5%CO₂ incubator培養。每兩天更換一次培養液。

(三) 脂肪細胞之分化培養

3T3-L1 前脂肪細胞以 6 well 之培養盤培養至單層 (monolayer)後細胞會形成 confluent，而細胞數不會再增加，以顯微鏡觀察時細胞約長至全滿。約兩天後即可加入分化 A 培養液 (包括 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine、1 μ M dexamethasone、1 μ M insulin、1.5 g/L sodium bicarbonate、10% fetal bovine serum 與 1% antibiotic 溶於 high glucose DMEM)培養 4 天，每隔 2 隔天更換一次培養液，再分別以分化 B 培養液 (1 μ M insulin、11.5 g/L sodium bicarbonate、10% fetal bovine serum 與 1% antibiotic 溶於 high glucose DMEM) 培養，每隔一天更換一次培養液，持續培養，至分化第八天細胞即慢慢分化完成。分化後之細胞於顯微鏡下觀察，細胞會由紡錘狀變為球狀，此時細胞內會堆積許多圓亮的脂肪滴。一般分化後的 8~12 天之細胞視為脂肪細胞，可應用於細胞試驗。

(四) 細胞存活試驗法 (MTT)

測定方法簡述如下，添加有無試驗物與細胞反應適當時間，加入 50 μ l 0.1% 的 MTT 溶液，反應 1 小時後，將所有 medium 移除，加入 120 μ l DMSO，避光待藍紫色結晶溶解後，取 100 μ l 至 96 well plate，以 ELISA reader 讀取 550 nm 之吸光值。計算時以控制組之存活率為 100 % 表示。(Dirsch et al.,1998)。

(五) 3T3-L1 脂肪細胞 oil red o 染色

本試驗參考 Ramirez-Zacarias 等人 (1992)之方法，並作些許修飾，藉 oil red o 染色測定脂肪細胞數目。測定步驟如下：

將細胞以 10% neutral buffered formalin 固定 20 分鐘以上，去除固定液後，以 propylene glycol (100%)覆蓋 3 分鐘，除去 propylene glycol，再加入 1 ml 之 oil red o 試劑充分反應 1 小時後，去除 oil red o 試劑，再加入 60% propylene glycol 溫和攪拌脫色，並以水徹底沖洗，再於 37°C 乾燥 1 h，加入 1 ml 之 isopropanol 萃取細胞之染劑，此萃取液經定量後，測其 510 nm 波長。

(六) 三酸甘油酯含量測定

將樣品加入分化完成之 3T3-L1 脂肪細胞培養 72 小時。將細胞培養液移除，並以 PBS 清洗二次，加入 lysis buffer，置冰浴反應 30min 後，再以 4°C 離心 10000 rpm 10 分鐘，取得細胞均質液並定量蛋白質濃度，以此作為胞內三酸甘油酯含量分析。胞內三酸甘油酯含量之測定乃利用三酸甘油酯測定套組 (TG assay kit, Merck) 進行測定，並於 492 nm 測定其吸光值。此外，以不同濃度之三酸甘油酯所定出之標準曲線，作為脂肪細胞三酸甘油酯含量之計算。

(七) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)活性測定

將分化完成之 3T3-L1 脂肪細胞以待測物處理 72 小時。待處理完成，脂肪細胞以 PBS 清洗二次後，加入 lysis buffer，置冰浴反應 30min 後，再以 4 °C 離心 10000 rpm 10 分鐘，取得細胞均質液並定量蛋白質濃度，取此細胞液測其 GPDH 活性，並於 450 nm 測定其吸光值。GPDH 活性測定乃依 Wise 與 Green (1979)之方法進

行。

(八) 西方點墨法(Western blot assay)

將細胞內之 protein 分離出，以 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，利用專一性之一級抗體與特定蛋白質結合後，再利用接有酵素的二級抗體與一級抗體結合，再加入受質催化二級抗體上之酵素，所得結果即可得知特定蛋白是否存在以及存在表現量之多寡。本研究測定方法參考 Tripathi 等(2009)所述：

1. 蛋白質電泳

running buffer 倒入泳槽中並在第一個孔洞中加入 protein marker，以作為蛋白分子量之對照用，其次依處理方式依序將蛋白充填入每一孔洞中，再通電進行 stacking，而後進行蛋白電泳之分析。

2. 蛋白質轉漬

取一塊和 gel 大小差不多之 nitrocellulose membrane，浸泡於 transfer buffer 中，將 gel 取下來，並放入轉漬夾 (transfer cassette) 中，覆蓋 nitrocellulose membrane，將氣泡逐出，夾上轉漬夾 (transfer cassette)，再將其放於轉漬槽中，倒入 Transfer buffer，通電後進行蛋白質轉漬。

3. 免疫轉染

5% BSA (0.1% PBST) 將轉漬完的 nitrocellulose membrane 於室溫作 blocking 1 小時，再以 0.1% PBST 清洗 10 分鐘 3 次，以待測分析之一級抗體和 nitrocellulose membrane 於 4°C 下反應 overnight，再以 0.1% PBST 洗 10 分鐘 3 次，再以二級抗體在室溫和 nitrocellulose membrane 反應 1hr 後，以 0.1% PBST 清洗 10 分鐘共 3 次。

4. Enhanced chemiluminescence(ECL)偵測

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

(九) 脂肪細胞基因表現分析

本計畫以 Real-time PCR 方法分析脂肪細胞之基因表現。將分化後之脂肪細胞以適當濃度待測物處理適當時間後，以 TRIzol 套組抽取細胞之 RNA。每一樣品取適量之 RNA 溶液進行逆轉錄反應製備 cDNA，而 cDNA 之合成乃使用 high-capacity cDNA reverse transcription kits 進行，其反轉錄反應之條件設為 25°C，反應 10 分鐘，37°C 反應 120 分鐘，85°C 反應 5 秒，最後回到 4°C。此 cDNA 進行 Real-Time PCR/SYBR Green 操作。其反應條件為：95°C，10 分鐘，再以 95 °C，15 秒與 60°C，1 分鐘之條件進行 40 cycles 分析。將 SYBR Green 黏合到增幅產物所得之螢光訊號，並進行數據之分析。

(十) 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 [SecurityGuard C18 (ODS) 4 mm x 3.0 mm ID, Phenomenex Inc., Torrance, CA, U.S.A.]。移動相 A：(water containing 0.1% formic acid) and 移動相 B (acetonitrile containing 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儀分析確認，採用管柱同上述，移動相 A：(water containing 0.1% formic acid) and 移動相 B (acetonitrile containing 0.1% formic acid)。流速為 0.2 ml/min，檢測全波長 210-600 nm。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: 15 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。

第二年實驗方法

一、材料與藥品

所使用的紅藜來源同前所述。另所使用試藥為一級藥品

(一) 紅藜酒精溶液萃取物之製備

製備方法同第一年實驗方法所述。

二、試驗方法

(一) 動物試驗

1. 實驗動物與分組

6 週大 56 隻雄性小鼠 (C57BL/6 mice) 購自國家實驗動物中心，先小鼠 Lab Diet 5001 標準飼料飼養 1 週，適應環境後再分組。分組敘述如下：

分成控制組(CK)、安全劑量組(HC)、負控組(HF)、紅藜低劑量組(LCF)、紅藜中劑量組(MCF)、紅藜高劑量組(HCF)及紅藜其活性成分 rutin 組(R)、betanin 組(B)、quercetin 組(Q)，共 9 組，每組 6 隻；控制組及安全劑量接受控制組動物飼料 (Research Diet D12450J)，負控組及其餘的 6 個組別接受高脂肪高熱量動物飼料 (Research Diet D12492)，餵養 8 週後，實驗各組給予所需的劑量

(紅藜低劑量 10 mg/kg bw、紅藜中劑量 25 mg/kg bw、紅藜高劑量 50 mg/kg bw、rutin 5 mg/kg bw、betanin 5 mg/kg bw、quercetin 5 mg/kg bw)，安全劑量組方面也給予同於紅藜高劑量的樣品，並以管餵方式餵養 4 週。

2. 試驗程序

實驗為期共 84 天。實驗過程中所有 C57BL/6 mice 皆各別飼養於不銹鋼籠子，環境控制在溫度 19-23°C，相對濕度 40-60%，照明 12 小時光或暗，每兩天添加飼料與記錄體重一次，餵養期間自由進食，約 84 天實驗期完成後，使用 CO₂ 窒息 C57BL/6 mice，隨即心臟採血，並擷取附睪表面脂肪組織 (periepididymal fat pad)、肝臟、腎臟及腎臟周圍脂肪，以生理食鹽水清洗乾淨後稱重紀錄，肝臟及附睪脂肪組織進行病理切片分析，血液也進行後續相關生化分析。各組詳細資訊分述如下：

- (1) 控制組 (control diet, CK)：
控制組接受控制組動物飼料 (research diet D12450J) + dd H₂O。
- (2) 安全劑量組
(high dosage of EECF with control diet, HC)：
安全劑量組接受控制組動物飼料 (research diet D12450J) + 紅藜高劑量 (HCF 50 mg/kg bw)。
- (3) 負控組 (high-fat diet, HF)：
接受高脂肪高熱量動物飼料 (research diet D12492) + dd H₂O。
- (4) 紅藜低劑量組
(low dosage of EECF, LCF)：
接受 high-fat diet D12492 + 紅藜低劑量 (LCF 10 mg/kg bw)。
- (5) 紅藜中劑量組
(medium dosage of EECF, MCF)：
接受 high-fat diet D12492 + 紅藜中劑量 (MCF 25 mg/kg bw)。
- (6) 紅藜高劑量組
(high dosage of EECF, HCF)：
接受 high-fat diet D12492 + 紅藜高劑量 (HCF 50 mg/kg bw)。
- (7) Rutin 組 (R)：
接受 high-fat diet D12492 + rutin (5 mg/kg bw)。
- (8) Betanin 組 (B)：
接受 high-fat diet D12492 + betanin (5 mg/kg bw)。
- (9) Quercetin 組 (Q)：
接受 high-fat diet D12492 + quercetin (5 mg/kg bw)。

3. 測定方法

(1) 體脂肪測定指標

A 攝食量與食物利用率

飼養期間精確測量並記錄每日之飼料攝取量，並於試驗末計算食物利用率 (food efficiency)，計算公式如下：

$$\text{食物利用率} = [\text{體重增加量(g)} / \text{總飼料攝取量(g)}] \times 100\%$$

B 體重

體重是反映體脂肪消漲的重要指標，因此試驗期間每週至少要精秤其體重 (固定

於每日動物房燈光轉暗，及給予飼料前) 1 次，並觀察其變化。

體重改變量 (weight change) = 結束體重 - 起始體重

C 體脂肪率

動物犧牲後，取出腹膜腔內之副睪附近、腎臟周圍脂肪，精秤其重量，計算體脂肪率，計算公式如下：

體脂肪率 = [體脂肪量(g) / 體重(g)] x 100%

而，體脂肪量(g) = 副睪附近脂肪(g) + 腎臟周圍脂肪(g)

(2) 血清生化分析項目

A. 血液與血清

(A) 口服葡萄糖耐受性試驗 (OGTT ; Oral glucose tolerance test)

OGTT 是一種檢測糖尿病的篩檢方式之一，實驗鼠於攝食 Research Diet D12492 開始 8 週後，視血糖監測結果，評估誘發狀況，決定是否開始給予樣品。確認誘發後，再給予樣品 2 週及 3 週時再次進行檢測，本計畫定於試驗開始第 56、70 及 84 天，禁食 12 小時後，進行尾巴採血檢測空腹血糖值；必要時改採以口服 (1.5 g/kg) 方式給予實驗動物葡萄糖，然後在給糖後的 30、60、90 分鐘，尾巴採血測定餐後血糖值的變化。

(B) 三酸甘油酯 (triglyceride ; TG)

測定血清中三酸甘油酯濃度，以作為判斷血脂異常之參考依據。使用 Sentinel 之 Triglycerides Liquid 試劑，於波長 548 nm 下，測定吸光值增加量及標準液增加量相比較，計算求得 TG 濃度。

(C) 非脂化游離脂肪酸 (non-esterified fatty acid ; NEFA)

利用 FFA 的 Enzymatic Kits 測定之。抽血後所獲的血漿，取 5 μ l 與 Color reagent A 1ml 於 37°C 反應 10 分鐘後，加入 Color reagent B 2ml，再於 37°C 反應 10 分鐘，利用分光光度計再 550nm 波長下測定其吸光值換算出血漿中的 FFA 含量。

(D) 總膽固醇 (total Cholesterol ; TC)

測定血清中總膽固醇濃度，做為判斷血脂異常之參考依據。使用 Denka Seiken 之 T-CHO 試劑，於波長 604 nm 下，測定吸光值增加量與標準液增加量相比較，計算求得 TC 濃度。

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

測定血清中高密度脂蛋白膽固醇濃度，做為判斷血脂異常之參考依據。採用 Denka Seiken 之 HDL-EX(N) 試劑，先加入沉澱劑使 Chylomicrons、極低密度脂蛋白膽固醇 (VLDL) 及低密度脂蛋白膽固醇 (LDL) 沉澱，再以離心收取上清液，加入測定試劑，於波長 604 nm 下，測定吸光值增加量與標準液

增加量相比，計算求得 HDL-C 濃度。

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

測定血清中低密度脂蛋白膽固醇濃度，做為判斷血脂異常之參考依據。利用酵素作用及比色測定之原理，取定量之血清加入適當的沈澱劑將 LDL 沈澱，作用完全之後將其離心，取定量上清液並加入測定膽固醇之試劑 Denka Seiken 之 LDL-EX(N) 試劑，在波長 500 nm 下測其吸光值，經計算後，再以總膽固醇值扣除上清液膽固醇值，可得 LDL-C 的濃度。

(G) 胰島素 (insulin)

測定血清中胰島素濃度，做為判斷血糖代謝異常之參考依據。採用 Mercodia 的 Mercodia Mouse Insulin ELISA 試劑進行分析。取 10 μ l 樣品混合 100 μ l 的 enzyme conjugate 1 x 溶液，於室溫(18-25 $^{\circ}$ C)在板式震盪器(700-900 rpm)震盪兩個小時。反應液體，再加入 350 μ l 的洗滌液清洗，再以吸水紙吸取多餘液體，此步驟重複五次。加入 200 μ l 的 Substrate TMB 於室溫下(18-25 $^{\circ}$ C)反應 15 分鐘，再加入 50 μ l 的終止溶液震盪五秒鐘確保反應停止。30 分鐘內於波長 450 nm 下，測定吸光值與標準液增加量相比，計算求得 Insulin 濃度。

(H) 瘦體素 (leptin)

使用 ELISA 的方法檢測，使用市售 (Diagnostic Systems Laboratories, Inc, Texas USA) kit，於每 Well 中加入 25 μ L 之血清及標準品，加入 50 μ L 分析緩衝液 (assay buffer)，室溫中放 2 小時，以緩衝液沖洗，再加入 100 μ L antibody-enzyme conjugate solution 於室溫中放 2 小時，然後再以緩衝液沖洗，並加 TMB chromogen solution 100 μ L，室溫中放置 15 分鐘，加入 stop solution 100 μ L 終止反應，於波長 450 nm 的分光光度計中讀出吸光度，並計算濃度。

(I) 麩草醋酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)

測定血清中 AST 活性，做為判斷肝功能及發炎情形之參考依據。採用 Human 之 Aspartate Aminotransferase (EC 2.6.1.1) 試劑，於波長 340 nm 測定吸光值減少速率，求得 AST 活性。

(J) 麩丙酮酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)

測定血清中 ALT 活性，做為判斷肝功能及發炎情形之參考依據。採用 Human 之 Alanine Aminotransferase (EC 2.6.1.2) 試劑，於波長 340 nm 測定吸光值減少速率，求得 ALT 活性。

(3) 組織病理切片

組織病理切片依照文獻為依據，於動物實驗結束後，取得小鼠副睪脂肪組織

及肝臟 (1 x 1cm)，保存於 10% 福馬林液，以石蠟包埋固定，顯微切片製作承單薄切片，以 Hematoxylin-Eosin (H&E) 染色，於螢光顯微鏡下觀察及照相記錄，判讀方式為出現極輕微程度脂肪細胞變小則標註為「1」，輕微程度細胞變小為「2」，並請國立中興大學獸醫學院動物疾病診斷中心協助判讀，以增加切片正確性。

(4) 統計分析

各項數據以統計分析系統(Statistical Analysis System, SAS 1988)統計套裝軟體進行統計的變異數分析(ANOVA)，並以 Duncan's 多變異法(Multiple range test)探討各樣品之間的差異性。

第三年實驗方法

一、材料與藥品

所使用的紅藜來源同前所述。所使用試藥為一級藥品。人類肝癌細胞株 HepG2 cells (BCRC60025)購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心。

(一)紅藜酒精溶液萃取物之製備

製備方法同一年實驗方法所述。

(二)細胞實驗

1. 細胞存活試驗

細胞存活試驗以MTT法測試，將HepG2 cells以 2×10^4 /ml接種於96孔盤，於培養箱中培養24小時後，移除舊的培養基，再加入0.2 ml含不同濃度樣品之培養基，置入培養箱37°C，5% CO₂下反應72 hr，待反應時間終了後，加入50 µl 0.1%之3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)於培養箱中反應1 hr，去除上清液，加入100 µl DMSO，以ELISA reader (Molecular Devices, VMax) 測定550 nm下之吸光值。

2. 細胞滲漏率之測定 (lactic dehydrogenase, LDH)

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 BioVision 之 LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II 來分析。將 HepG2 cells 以 5×10^4 /ml 接種於 24 孔盤，培養 24 小時後，移除舊的培養基，再加入 1 ml 含不同濃度之 EECF (50, 250, 500 µg/ml) 及 betanin、rutin、kaempferol、quercetin (10, 100, 200 µM) 之培養基，置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下反應 72 小時，待反應時間終了，取出 10 µl 胞外細胞培養液(extracellular fluid)至 96 well plate 加入 100 µl 反應試劑於室溫下暗反應 30 分鐘後，以 ELISA reader 讀取 450 nm 的吸光值。最後以 Cytotoxicity(%)表示。計算公式如下：

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(\text{Test Sample}-\text{Low Control})}{(\text{High Control}-\text{Low Control})} \times 100$$

3. 胞內活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 分析

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。測定方法簡述如下，將HepG2 cells以20×10⁴/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EECF (50, 250, 500 µg/ml)及betanin、rutin、kaempferol、quercetin (10,100, 200 µM)之培養基，置入培養箱37°C，5% CO₂下反應24 hr後，再加入50 µM DCFH-DA，置入培養箱37°C，5% CO₂下反應30 min，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，10分鐘離心，去除上層液，加入100 µL PBS緩衝液清洗，以10000 rpm，5分鐘離心去除殘留之培養基，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. DAPI 染色分析

將 HepG2 cells 以 5×10⁴/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 1 mL 含不同濃度之 EECF (50, 250, 500 µg/ml)及 betanin、rutin、kaempferol、quercetin (10,100, 200 µM)之培養基，置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下處理 72 小時，待反應時間終了後，去除培養液，細胞以 PBS 清洗兩次，加入 0.5 ml 4% paraformaldehyde 固定細胞，靜置 30 分鐘後，吸出 paraformaldehyde 再以 PBS 重覆清洗 2 次，加入 0.5 ml 0.1% Triton X-100，室溫下作用 1-2 分鐘使細胞膜通透，加入 0.5 ml 1µg/ml DAPI 染劑避光反應 5 分鐘，去除染劑，加入 0.5 ml PBS 維持細胞型態，螢光顯微鏡 400 倍觀察細胞的型態，將影像轉到電腦上作為結果。

5. 細胞週期分析

將 HepG2 cells 以 100×10⁴/ml 接種於 6 cm dish，於培養箱中培養 24 小時後，移除舊的培養基，再加入 4 ml 含不同濃度之 EECF (50, 250, 500 µg/ml)及 betanin、rutin、kaempferol、quercetin (10,100, 200 µM)之培養基，置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下反應 72 小時，待反應時間終了後，移除培養基，以 PBS 清洗 2 次後，加入 200 µl Trypsin-EDTA 作用 2~3 分鐘切除細胞，加入 800 µl medium 中和 Trypsin-EDTA 反應，再將細胞液體裝至離心管內以 4°C，1000 rpm，5 分鐘離心，去除上層液，加入 500 µL PBS 緩衝液清洗，以 1000 rpm，5 分鐘離心去除殘留之培養基，加入 300 µl PBS 後，並以 700 µl 4°C 之 95% 酒精，以一邊震盪一邊緩慢加入之方式，使細胞均勻混合並且產生孔隙，於-20°C 中放置隔天，以利 PI 染劑進行染色。隔天，以 4°C，1500 rpm 離心 5 分鐘去除酒精，加入 800 µl PBS 並於其中加入 100 µl 之 50 µg/ml RNase A，混合均勻，在 37°C 下反應 2 小時後，加入 100 µl 之 100 µg/ml propidium iodide(PI)，混勻，暗處反應 5~10 分鐘，最後以流

式細胞儀分析。

6. Annexin V 分析

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 EECF (50, 250, 500 μ g/ml) 及 betanin、rutin、kaempferol、quercetin (10, 100, 200 μ M) 之培養基，置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下反應 72 小時，待反應時間終了後，移除培養基，以 PBS 清洗 2 次後，加入 200 μ l Trypsin-EDTA 作用 2~3 分鐘切除細胞，加入 800 μ l medium 中和 Trypsin-EDTA 反應，再將液體裝至離心管內以 4°C，1000 rpm，5 分鐘離心，去除上層液，加入 500 μ L PBS 緩衝液清洗，以 1000 rpm，5 分鐘離心去除殘留之培養基，加入 500 μ l Annexin-V binding buffer 震盪混合均勻，分別加入 5 μ l Annexin-V-FITC 和 PI 的染劑，混勻，暗處反應 5~10 分鐘，最後以流式細胞儀進行分析。

7. 粒腺體膜電位變化之分析

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：粒腺體膜電位是使用 Cayman 之 JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit 進行分析。

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 EECF (50, 250, 500 μ g/ml) 及 betanin、rutin、kaempferol、quercetin (10, 100, 200 μ M) 之培養基，置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下反應 24 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，10 分鐘離心，去除上層液，加入 100 μ L PBS 緩衝液清洗，以 10000 rpm，5 分鐘離心去除殘留之培養基，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)。

8. caspase-3 活性測定

將 HepG2 cells 以 20×10^4 /ml 接種於 6 孔盤，培養 24 小時後，移除舊的培養基，再加入 2 mL 含不同濃度之 EECF (50, 250, 500 μ g/ml) 及 betanin、rutin、kaempferol、quercetin (10, 100, 200 μ M) 之培養基，置入培養箱 37°C，5% CO₂ 下反應 32 hr 後，反應終了，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，10 分鐘離心，去除上層液，加入 100 μ L PBS 緩衝液清洗，以 10000 rpm，5 分鐘離心去除殘留之培養基，使用 BioVision 之 caspase-3/ CPP32

Colorimetric Assay Kit來分析。加入50 μ L lysis buffer，置冰浴反應10 min後，再以4 $^{\circ}$ C，10000 rpm，1分鐘，取得細胞均質液並定量蛋白質濃度，取50 μ L含50-200 μ g蛋白量之細胞液加50 μ L反應液，於37 $^{\circ}$ C反應1-2hr，並於405 nm測定其caspase-3活性吸光值。

9. 西方墨點法

Bax, Bcl-2, PARP 蛋白表現以西方墨點法測定之，所用方法同前所述。

10. 生物活性成分測定

活性成分分析方法同第一年所示。

11. 抑制腫瘤 in vivo 試驗

(1) 動物實驗設計與架構

動物實驗通過台南市奇美醫院動物實驗小組審查通過，合乎人道精神及動物福祉。使用購自樂斯科生物科技公司之4週齡BALB/c (*nu/nu*) 裸鼠，其適應一周後，隨機分組分為8組，每組5隻，以裸鼠後頸處皮下注射方式進行異種腫瘤移植，控制組注射生理食鹽水，另外7組實驗組裸鼠分別注射0.1ml (1×10^7 cell/ml) 的HepG2 腫瘤細胞，各組管餵受試物處理模式，如以下說明：

- A. Control (C)，注射無菌生理食鹽水，管餵無菌生理食鹽水。
 - B. Negative control (NC)，注射腫瘤細胞，管餵無菌生理食鹽水。
 - C. Low dosage of quercetin (LQ)，注射腫瘤細胞，管餵 quercetin (5 mg/kg bw)。
 - D. Medium dosage of quercetin (MQ)，注射腫瘤細胞，管餵 quercetin (20 mg/kg bw)。
 - E. High dosage of quercetin (HQ)，注射腫瘤細胞，管餵 quercetin (40 mg/kg bw)。
 - F. Low dosage of EECF (LCF)，注射腫瘤細胞，管餵 EECF (25mg/kg bw)。
 - G. Medium dosage of EECF (MCF)，注射腫瘤細胞，管餵 EECF (50mg/kg bw)。
 - H. High dosage of EECF (HCF)，注射腫瘤細胞，管餵 EECF(100mg/kg bw)。
- 每2日進行管餵與測量腫瘤大小，並計算其體積，為期21天，犧牲後秤量腫瘤重量及量測體積。

(2) 動物實驗飼養條件與方法

A. 動物飼養條件

使用4週齡BALB/c (*nu/nu*) 裸鼠，飼養於頂蓋濾紙過濾空氣設計的無菌飼養盒，室溫維持22 \pm 2 $^{\circ}$ C，空氣濕度60%，飼料為經高壓滅菌的標準飼料與飲用水，採自由攝食。實驗處理過程與安樂死程序均依照奇美醫學中心動物實驗管理小組規範之辦法操作。

B. 細胞處理與異種腫瘤移植

本實驗使用 HepG2 做為腫瘤接種細胞，先將細胞使用 trypsin-EDTA 處理後，計

數細胞為 1×10^8 ，並懸浮於 1 ml 無血清培養液與 metrigel 藥劑，無血清培養液與 metrigel 藥劑以 1:1 體積混和，細胞處理後保存於冰浴備用；並以皮下注射 0.1ml（細胞數約為 1×10^7 ）於裸鼠後頸皮下，並隔日開始進行受試物管餵。

C. 腫瘤體積測量與生長率計算

以游標尺測量腫瘤的長度與寬度，並帶入以下公式，可得腫瘤體積: Tumor Volume (mm^3) = length (mm) \times width² (mm^2) / 2。得出體積後，帶入以下公式，計算出腫瘤體積生長率 (%) :

$$\text{Tumor volume growth (\%)} = \left(\frac{\text{Test group Tumor Volume}}{\text{Negative Control group Tumor Volume}} \right) \times 100$$

D. 腫瘤採摘與重量量測

將裸鼠使用 CO₂ 昏迷犧牲後，將進行腫瘤摘取；腫瘤取下後，以生理食鹽水清洗，以游標尺測量其體積，並使用微量天平測量其重量。

$$\text{Tumor weight growth (\%)} = \left(\frac{\text{Test group Tumor weight}}{\text{Negative Control group Tumor weight}} \right) \times 100$$

E. 統計分析

本實驗使用 Statistical Analysis System SPSS 12.0，進行統計分析，採用無母數 Median Test 檢定，當 P -value < 0.05 時，表示具有顯著的差異。

伍、結果與討論

第一年結果與討論

圖一為 EECF 對 3T3-L1 前脂肪細胞與分化後之脂肪細胞反應 24 小時對細胞生存性之影響。結果顯示不同濃度 EECF (10-500 $\mu\text{g/ml}$) 對 3T3-L1 前脂肪細胞之存活率皆可達 100% 以上(圖一 A)，顯示不同濃度 EECF 對 3T3-L1 前脂肪細胞生存性不具影響。由於 EECF 對 3T3-L1 前脂肪細胞存性不具影響，爰此可進一步培養而探討 EECF 對分化後脂肪細胞之影響。而不同濃度 EECF (10-500 $\mu\text{g/ml}$) 對分化後脂肪細胞皆不具有細胞毒性之影響，其存活率皆可達 100% 以上(圖一 B)。由圖一顯示 10-500 $\mu\text{g/ml}$ EECF 對前脂肪細胞及分化後之脂肪細胞皆不具細胞毒性，因此，本研究以 10-500 $\mu\text{g/ml}$ 之 EECF 繼續如下之試驗。

圖二為 EECF 對分化後脂肪細胞之脂肪形成之影響。圖二 A 與圖二 B 為反應 72 小時對 OROSM 之影響。結果顯示不同濃度 EECF 對分化後脂肪細胞數量均有抑制性，其抑制效果隨濃度增加有增加效果，顯示 EECF 能抑制分化後脂肪細胞數量。圖二 C 為 EECF 對分化後脂肪細胞反應 72 小時對三酸甘油酯含量之影響。結果顯示不同濃度之 EECF 對分化後脂肪細胞皆具有抑制三酸甘油酯含量之生成效應。其抑制效果隨 EECF 濃度之增加而有增加趨勢。圖二 D 為 EECF

對分化後脂肪細胞反應 72 小時對 GPDH 之影響。結果顯示不同濃度之 EECF 對分化後脂肪細胞皆具有抑制 GPDH 活性之效應，其抑制效果隨 EECF 濃度之增加而有增加趨勢。

圖三為 EECF 對分化後脂肪細胞基因表現之影響。圖三 A 為反應 18 小時對 PPAR γ 之影響。結果顯示不同濃度之 EECF 對分化後脂肪細胞具有抑制 PPAR γ 之作用。PPAR 具有調節脂質代謝之功能，其家族包括 PPAR α 、PPAR β 與 PPAR δ 三類，其中 PPAR γ 參與脂肪之分化、炎症反應、凋亡、肥胖、動脈粥狀硬化與癌症等作用 (Kersten et al., 2000)。由圖三 B 與圖三 C 分別為 EECF 對分化後脂肪細胞反應 12 小時對 C/EBP α 與 SREBP-1c 之影響，結果顯示 500 μ g/ml EECF 有抑制 C/EBP α 與 SREBP-1c 基因之表現。圖三 D 亦可看出 EECF 能抑制 PPAR γ 蛋白之表現。由圖三結果顯示對基因表現之抑制性可解釋何以對脂肪細胞之脂肪形成有抑制功能。

由圖四與表一顯示 EECF 經 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 分析後共純化出 20 種成分，經鑑定後計有 10 種為已知成分，其中有甜菜苷(betainin)、芸香苷(rutin)、山柰酚(kaempferol)及其配糖體，另有紫紅色 amaranthine、flavonol glycoside 的 camellianoside。由於受限於成分取得不易，本試驗以紅藜酒精溶液萃取物及其成分 rutin、kaempferol、betainin 作為測試物質。

圖五為 EECF 之三種活性成分對 3T3-L1 前脂肪細胞與分化後之脂肪細胞反應 72 小時對細胞生存性之影響。三種活性成分(10-100 μ M)對 3T3-L1 前脂肪細胞(圖五 A)與分化後之脂肪細胞(圖五 B)皆不具有細胞毒性。

圖六為三種活性成分對分化後脂肪細胞之脂肪形成之影響。圖六為反應 72 小時對 OROSM 之影響，其中圖六 A 為脂肪細胞經油染後之影像，圖六 B 與對 OROSM 之影響。結果顯示 100 μ M 三種活性成分對分化後脂肪細胞數量減緩效應，其抑制效果隨濃度增加有增加效果，顯示三種活性成分能抑制分化後脂肪細胞數量。其中以 kaempferol 最顯著。圖六 C 為三種活性成分對對分化後脂肪細胞反應 72 小時對三酸甘油酯含量之影響。結果顯示三種活性成分對分化後脂肪細胞皆具有抑制三酸甘油酯含量之生成效應。其抑制效果以 kaempferol 最顯著。圖六 D 為三種活性成分對分化後脂肪細胞反應 72 小時對 GPDH 之影響，顯示三種活性成分對分化後脂肪細胞皆具有抑制 GPDH 活性之效應。

圖七為三種活性成分對分化後脂肪細胞基因表現之影響。圖七 A 為三種活性成分與分化後脂肪細胞反應 6 小時對 PPAR γ 之影響。由結果顯示 kaempferol 具有顯著性抑制效應。由圖七 B 與圖七 C 分別為三種活性成分對分化後脂肪細胞反應 12 小時對 C/EBP α 與 SREBP-1c 之影響，結果顯示 500 μ g/ml 三種活性成分對 C/EBP α 有顯著性抑制效應，而 kaempferol 與 rutin 對 SREBP-1c 基因之表現具有顯著性抑制作用。

結論

由上述結果顯示紅藜對脂肪細胞形成脂肪具有抑制效應，此效應與其所含之活性成分之存在有關聯性。

第二年結果與討論

由第一年紅藜酒精溶液萃取物(EECF)之成分分析顯示，EECF 經 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 分析後共純化出 20 種成分，經鑑定後計有 10 種為已知成分，其中有甜菜苷(betainin)，芸香苷(rutin)，斛皮素(querctin)，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，本試驗以紅藜酒精溶液萃取物及其成分 rutin，querctin，betainin 作為測試物質。

一、體重、食物攝取量及餵食效率

由圖八顯示高脂飲食誘導小鼠之脂肪組織病理學變化，顯示各組間並無顯著性病理變化。由表二顯示餵食高脂飲食小鼠(HF 組) 在最終體重(final body weight) 及每日平均體重增加量 (daily weight gain)皆與對照組(CK 組)及安全劑量組(HC 組) 有顯著差異；餵食高脂飲食小鼠(HF 組)之每日食物攝食量(daily food intake)低於 CK 組與 HC 組；而每日餵食效率(feed efficiency)卻顯著高於 CK 組與 HC 組，此表示因高脂飲食顯著抑制小鼠食慾，而降低攝食量；但因為高脂飲食熱量密度高，反而增加攝食效率，並造成小鼠終體重增加。此外，長期餵食高脂飲食的小鼠飼料中分別添加紅藜低、中、高劑量及其活性成分 rutin、betainin、querctin 顯示不會影響小鼠攝食高脂飲食後的體重變化、食物攝取量以及餵食效率；因此本研究可在不影響體重狀態、攝食量以及餵食效率的前提下，可直接反映紅藜及其活性成分對餵食高脂飲食小鼠所引起的生理生化效應。

二、肝臟、腎臟與內臟脂肪組織相對重量變化

摘取小鼠肝臟、腎臟、腎臟周圍脂肪與副睪脂肪，並以生理食鹽水清洗臟器內殘留的血液，以濾紙瀝乾水分並秤重 紀錄，評估小鼠器官重量變化，可做為器官損傷的間接指標之一，而評估小鼠腎臟周圍脂肪與副睪脂肪重量變化，可間接反映體內脂肪儲存量。結果顯示餵食高脂飲食組(HF 組)的小鼠相對肝重與對照組(CK)及安全劑量(HC)相比較，顯著較輕；而腎臟周圍脂肪與副睪脂肪總和則明顯比 CK 組與 HC 組重。攝取紅藜中劑量與高劑量及其三種活性成分對副睪脂肪相對重量與 HF 組相比有顯著降低，惟攝取紅藜及其三種活性成分對於肝臟相對重量與 HF 組相比無顯著降低，但在內臟脂肪重量皆低於 HF 組，反映各測試樣品能降低體內脂肪儲存量。

三、血液脂質分析

血清總膽固醇 (TC)或低密度脂蛋白 (LDL-C) 過高是導致動脈粥狀硬化疾

病的正相關因子，而三酸甘油酯 (TC)、高密度脂蛋白 (HDL-C) 及未酯化脂肪酸 (NEFA) 可以反映其他脂質代謝性疾病。表三顯示餵食高脂飲食 (HF 組) 小鼠血液中 TG、TC、HDL-C、LDL-C 及 NEFA 都顯著高於對照組 (CK) 及安全劑量 (HC)，顯示高脂飲食已導致小鼠出現高血脂異常症狀。而餵食紅藜低、中、高劑量及其活性成分 rutin、betanin、quercetin 的小鼠血液中 TG、TC、LDL-C 含量顯著低於 HF 組，顯示紅藜及其活性成分都有改善血液脂質代謝異常的效果。

四、血清之肝功能指數及血糖血脂相關代謝指標分析

肝指數 AST、ALT，是肝細胞製造的兩種最多酵素；當肝臟發炎時，肝細胞會壞死，AST、ALT 即進入血液中，造成酵素活性指數升高，醫療方面以此作為肝臟發炎或受損程度的評估。表四顯示餵食高脂飲食組(HF)與對照組(CK)及安全劑量(HC)相比皆無顯著差異，與紅藜各劑量組及其活性成分組相比也無顯著差異，顯示高脂飲食與本測試樣品未造成肝臟負擔或損傷。

胰島素為一種蛋白質激素，由胰臟內的胰島β細胞分泌，胰島素參與調節碳水化合物和脂肪代謝，控制血糖平衡；缺乏胰島素會導致血糖過高造成糖尿病，反之會造成低血糖。由表四結果顯示與 CK 組相比，HF 組有顯著提高胰島素分泌量，然而紅藜各劑量組及其活性成分組與 HF 組相比，可以顯著降低高脂飲食所誘發的高胰島素分泌量；瘦體素 (leptin) 由白色脂肪細胞所製造，釋放作用至下視丘，刺激生熱效應、胰島素敏感性、脂肪酸氧化作用，且降低食慾；因此，體內脂肪高，瘦體素相對增加，並抑制食慾。HF 組與 CK 組及 HC 組相比，顯示高脂飲食明顯會誘導瘦體素的增加，但紅藜各劑量組及其活性成分組相比，能小幅降低瘦體素的分泌，但未達顯著差異(表四)。

五、口服葡萄糖耐受試驗(Oral glucose tolerance test；OGTT)

OGTT 可判定血液中血糖值是否正常，並且可作為是否罹患糖尿病之指標。圖九結果顯示 HF 組在餵食葡萄糖後的第 30 分鐘，血液中血糖值明顯高於 CK 組與 HC 組；在餵食葡萄糖後的第 60 分鐘時，紅藜低、中、高劑量組或 rutin、betanin 及 quercetin 組皆比 HF 組顯著性降低(表五)；計算 9 組實驗小鼠在 0-90 分鐘內血糖面積濃度，HF 組明顯高於 CK 組及 HC 組，而與紅藜各劑量組與其三種活性成分組相比也都有顯著低於 HF 組(圖十)。

六、胰島素阻抗性評估 (Homeostasis model assessment; HOMA)

Homeostasis model assessment (HOMA) 為測量胰島素阻抗性最廣泛使用的指標，此乃利用休息狀態下所檢測空腹血糖值及空腹胰島素濃度，由所計算的 HOMA-IR ($HOMA-IR = \text{空腹血糖值}(\text{mmol/L}) \times \text{胰島素濃度}(\text{mU/L}) / 22.5$)，可以反映出休息且空腹的狀況下的胰島素阻抗性，胰島素阻抗性越高，罹患糖尿病的機會越高。圖十一結果顯示，與 CK 組相比，HF 組明顯有高胰島素阻抗現象；與 HF 組相比，紅藜低、中、高劑量及其活性成分 rutin、betanin 及 quercetin 組的 HOMA-IR，皆顯著低於 HF 組，顯示紅藜各劑量組及其活性成分組都能有效降低胰島素

阻抗性。

結論

由上述結果顯示紅藜及其活性成分在動物模式試驗無法降低肥胖現象，惟能降低內臟脂肪儲存量。此外，能有效降低高血脂現象，並且改善血液脂質代謝異常。再者，可降低高脂飲食所誘發的胰島素分泌量、降低受體素的分泌、口服葡萄糖耐較佳、有效降低胰島素阻抗性。上述彼等效應與紅藜所含之活性成分有關聯性。

第三年結果與討論

本年度研究以紅藜酒精溶液萃取物及其成分 rutin、quercetin、betanin、kaempferol 作為測試物質。

一、對肝癌細胞生長與毒性之影響

圖十二為 EECF 對 HepG2 細胞生存性之影響。結果顯示 50-500 $\mu\text{g/ml}$ 濃度之 EECF 與 HepG2 共培養 72 小時對其生存性有抑制性，且其抑制性有濃度與劑量關係。由此可知，EECF 對肝癌細胞 HepG2 之生存性有顯著之抑制現象。為證明 EECF 對 HepG2 細胞具有毒性，繼續以 LDH 模系測定 EECF 對 HepG2 之毒性作用。圖十三為不同濃度之 EECF 與 HepG2 細胞作用 72 小時之毒性現象。結果顯示 50-500 $\mu\text{g/ml}$ 之 EECF 對 LDH 滲出胞外之比例顯著高於空白組。顯示 EECF 具有毒殺肝癌細胞 HepG2 之能力。

二、與 ROS 生成之影響

已知氧化壓力對細胞生長有影響，因此探討 EECF 是否有誘發氧化壓力，繼而對 HepG2 生存有影響。圖十四為 EECF 與 HepG2 細胞共培養 24 小時對 ROS 生成情形，顯示不同濃度之 EECF 具有誘發 HepG2 細胞內氧化壓力之生成。很顯然，EECF 對 Hep G2 生存性與毒殺性可能與其誘發 ROS 產生有很大關聯性。

三、對細胞凋亡之影響

HepG2 細胞 36hr 後對細胞周期影響。顯示 500 $\mu\text{g/ml}$ EECF 對細胞生長顯著滯留於 G₀/G₁ 期，以致於影響其正常生長期(表六)。

表七為以雙染模式分析不同濃度 EECF 對 HepG2 之凋亡情形，由結果顯示 500 $\mu\text{g/ml}$ EECF 對細胞凋亡以早期凋亡為主。此結果亦証實 EECF 對 HepG2 生存性及毒殺性乃由於凋亡與所致。

圖十五以 DAPI 方法顯示不同劑量 EECF 與 HepG2 細胞作用 72 小時誘發凋亡現象。空白組顯示細胞為完整，惟當細胞與 EECF 作用後則顯得凝縮(condensed)與核碎片(fragmented nuclei)現象，此現象可由圖中箭頭所指之處，顯示細胞遭受凋

亡，且呈現劑量反應關係。

圖十六顯示不同劑量 EECF 誘發 HepG2 胞內膜電位之影響。不同濃度之 EECF 可誘發胞內膜電位下降，其誘發性有濃度與劑量關係，此結果顯示 EECF 能誘發 HepG2 胞內膜電位下降，此可解釋彼等對細胞有趨向於凋亡之現象。

圖十七以西方點墨法偵測細胞內 Bax 與 Bcl-2 之表現，並以 Bax/Bcl-2 之比率做為促凋亡之指標。結果顯示不同濃度 EECF 其 Bax/Bcl-2 之比例有提昇之趨勢，顯示 EECF 能誘發細胞促凋亡現象。

圖十八為不同濃度 EECF 誘發 HepG2 胞內 caspase-3 活性之影響。顯示不同濃度之 EECF 具有誘發胞內 caspase-3 活性現象，進而使其趨向凋亡。

圖十九為不同濃度 EECF 誘發 HepG2 胞內 PARP 裂解程度。顯示不同濃度之 EECF 具有誘發胞內 PARP 裂解，此結果與 EECF 活化 caspase-3 有關聯性，進而裂解 PARP。

由上述結果可知 EECF 具有抑制肝癌細胞，而此活性是否與其所含生物活性成分有關，本研究有必要進行彼等之抗肝癌活性之探討。由第一年研究成果已分離出 20 種成分，惟不同季節、氣候、貯存條件等因素皆會影響其所含成分。有鑑於此，第三年紅藜之樣品乃因已儲存二年之因素，因此有必要再次分析其成分。圖二十與表八顯示 EECF 經 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 分析後共鑑定出 16 種成分，經鑑定後計有 11 種為已知成分，其中有甜菜苷(betainin)、芸香苷(rutin)、槲皮素(querctetin)，山柰酚(kaempferol)及其配醣體，由於受限於成分取得不易，本試驗以紅藜酒精溶液萃取物及其成分 rutin、kaempferol、betainin、querctetin 作為測試物質。

二、EECF 活性成分對肝癌細胞生長與毒性之影響

圖二十一為 betainin、rutin、kaempferol、querctetin 對 HepG2 細胞生存性之影響。結果顯示 50-200 μM 濃度之 betainin、rutin、kaempferol、querctetin 與 HepG2 共培養 72 小時對其生存性有抑制性，且其抑制性有濃度與劑量關係。由此可知，EECF 所含活性成分之 betainin、rutin、kaempferol、querctetin 對肝癌細胞 HepG2 之生存性有顯著之抑制現象。

圖二十二為不同濃度之 betainin、rutin、kaempferol、querctetin 與 HepG2 細胞作用 72 小時之毒性現象。結果顯示 50-200 μM 之 betainin、rutin、kaempferol、querctetin 對 LDH 滲出胞外之比例顯著高於空白組。顯示 EECF 所含活性成分之 betainin、rutin、kaempferol、querctetin 具有毒殺肝癌細胞 HepG2 之能力。

已知氧化壓力對細胞生長有影響，因此探討 betanin, rutin, kaempferol, quercetin 是否有誘發氧化壓力，繼而對 HepG2 生存有影響。圖二十三為 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 與 HepG2 細胞共培養 24 小時有誘發抗氧化情形，且有劑量與反應性之趨勢。很顯然，4 種活性成分對不具誘發氧化壓力，反而有抗氧化功能。此結果無助於 EECF 誘發氧化壓力進而促凋亡之說法。

不同濃度之 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 與 HepG2 細胞作用 36 小時後對細胞周期影響。以 200 μ M kaempferol 與 quercetin 而言，其對細胞生長主要滯留於 G₂/M 期，以致於影響其正常生長期(表九)。

表十為以雙染模式分析不同濃度 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對 HepG2 之凋亡情形。由結果顯示 200 μ M betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對細胞凋亡各為 26.5%, 27.8%, 93.5%, 93.1%。另外，高濃度 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對 HepG2 之壞死不具影響性。此結果證實 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對 HepG2 生存性及毒殺性乃由於凋亡與所致。

圖二十四以 DAPI 方法顯示不同劑量 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 與 HepG2 細胞作用 72 小時誘發凋亡現象。空白組顯示細胞為完整，惟當細胞與 EECF 作用後則顯得凝縮(condensed)與核碎片(fragmented nuclei)現象，此現象可由圖中箭頭所指之處，顯示細胞遭受凋亡，且呈現劑量反應關係。

圖二十五顯示不同劑量 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 誘發 HepG2 胞內膜電位之影響。其中 rutin、kaempferol、quercetin 可誘發胞內膜電位下降，而 betanin 卻無此效應。此結果顯示 rutin, kaempferol, quercetin 能誘發 HepG2 胞內膜電位下降，此可解釋彼等對細胞有趨向於凋亡之現象。

圖二十六以西方點墨法偵測 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 誘發 HepG2 胞內 Bax 與 Bcl-2 之表現，並以 Bax/Bcl-2 之比率做為促凋亡之指標。結果顯示不同濃度 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 可提昇 Bax/Bcl-2 之比例，顯示 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 能誘發細胞促凋亡現象。

圖二十七為不同濃度 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對 HepG2 胞內 caspase-3 活性之影響。顯示不同濃度之 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 可誘發胞內 caspase-3 活性現象，進而使其趨向凋亡。

圖二十八為不同濃度 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 誘發 HepG2 胞內 PARP 裂解程度。顯示不同濃度之 betanin、rutin、kaempferol、quercetin 具有誘發胞內 PARP 裂解，此結果與其活化 caspase-3 有關聯性，進而裂解 PARP。

EECF 與 quercetin 抗腫瘤 *in vivo* 試驗

由上述 *in vitro* 試驗結果顯示 EECF 有促進 HepG2 細胞凋亡現象。基於此，本研究繼續以 *in vivo* 模式探討 EECF 之抗肝腫瘤活性。另外，由上述 *in vitro* 試驗，顯示 quercetin 在細胞週期滯留、細胞凋亡、還原電位下降、Bax/Bcl-2 比率、caspase-3 活性與 PARP 裂解程度之表現皆比 betanin、rutin、kaempferol 顯著，因此，以 quercetin 與 EECF 做為抗腫瘤 *in vivo* 試驗之樣品。

BALB/c (nu/nu) 裸鼠在施打 HepG2 細胞後隔天開始管餵受試物，在第 14~16 天，即可以肉眼觀察到腫瘤成長。異種腫瘤移植第 21 天犧牲，各組 BALB/c (nu/nu) 異種移植裸鼠的體重皆顯著低於控制組(C 組)，反映腫瘤對裸鼠的生理壓力，影響裸鼠的正常成長。然而，異種腫瘤移植的各組體重，並未出現顯著差異，也未觀察到明顯的生理不良反應，或毒性徵候，顯示可排除受試物對異種移植裸鼠並未產生顯著的生理副作用。再者，以第 21 天腫瘤體積生成而言，圖二十九與三十為裸鼠腫瘤生成外觀與實體照片，另由表十一中可看出於第 21 天時，不同濃度 EECF 抑制 nude mice 腫瘤產生，尤其高劑量 EECF 組的腫瘤體積顯著小於 NC 組腫瘤體積；而中劑量與高劑量 quercetin 能顯著抑制腫瘤體積。由此顯示，EECF 與 quercetin 具有抗肝腫瘤活性。

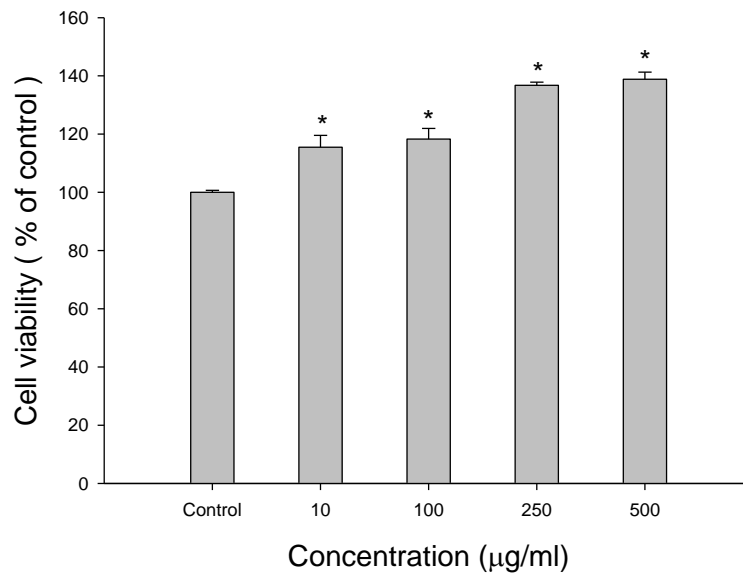
結論

由 *in vitro* 試驗結果顯示 EECF 與其活性成分具有誘發 HepG2 凋亡，進而抑制 HepG2 生存。另由 *in vivo* 試驗結果顯示 EECF 與其活性成分 quercetin 可抑制裸鼠腫瘤生成體積，顯示 EECF 與 quercetin 具有抑制肝癌細胞之功能。

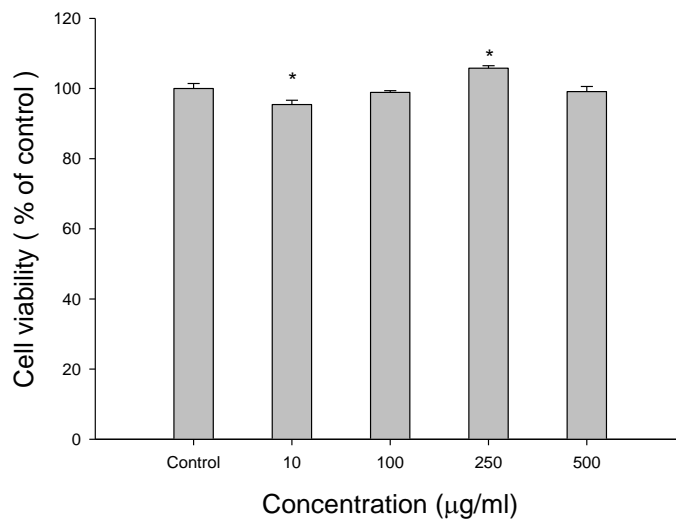
綜合上述三年之 *in vitro* 與 *in vivo* 試驗結果，證實紅藜不僅有降脂效果，亦具有抗肝腫瘤功效。

第一年圖與表

(A)



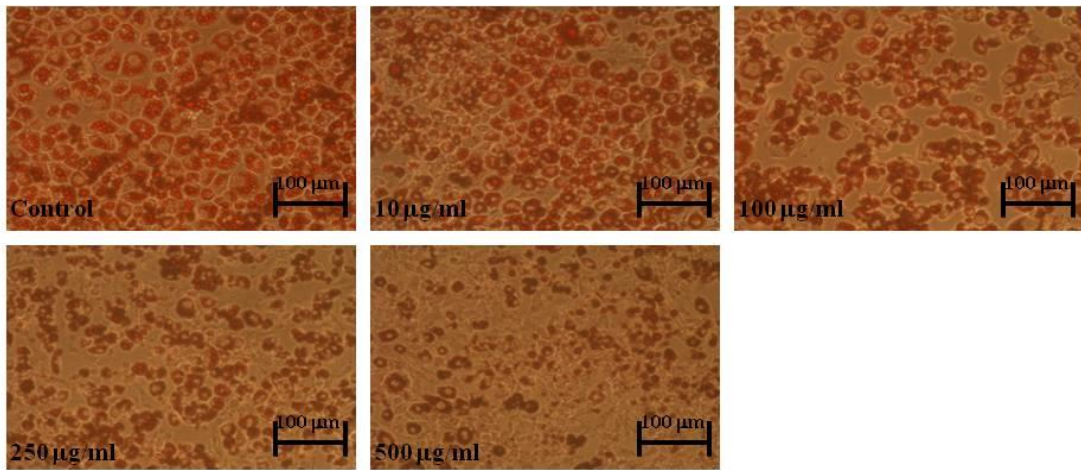
(B)



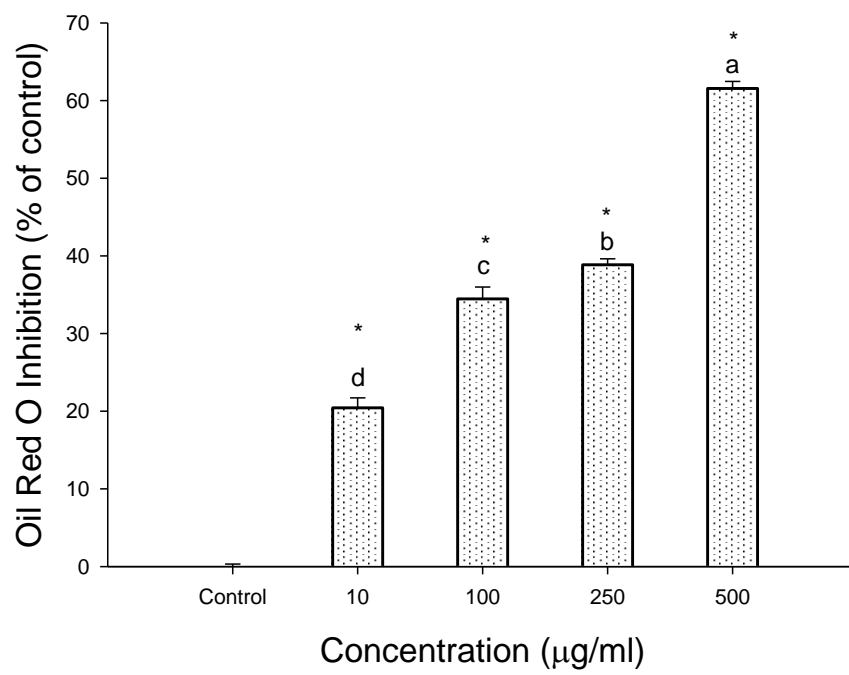
圖一、紅藜酒精溶液萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞與分化後之脂肪細胞生存之影響。紅藜酒精溶液萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞反應 24 小時存活率之影響(A)；紅藜酒精溶液萃取物對分化後脂肪細胞反應 72 小時存活率之影響(B)。

Figure 1. Effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) on cell proliferation in 3T3-L1 pre-adipocytes (A) and 3T3-L1 adipocytes (B). The cells were treated with EECF for 24 and 72 h for pre-adipocytes and 3T3-L1 adipocytes, respectively.

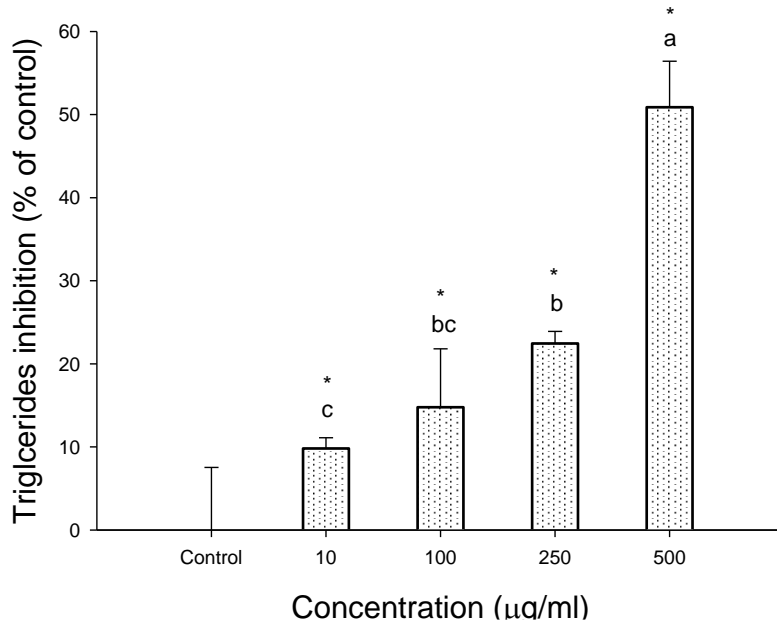
(A)



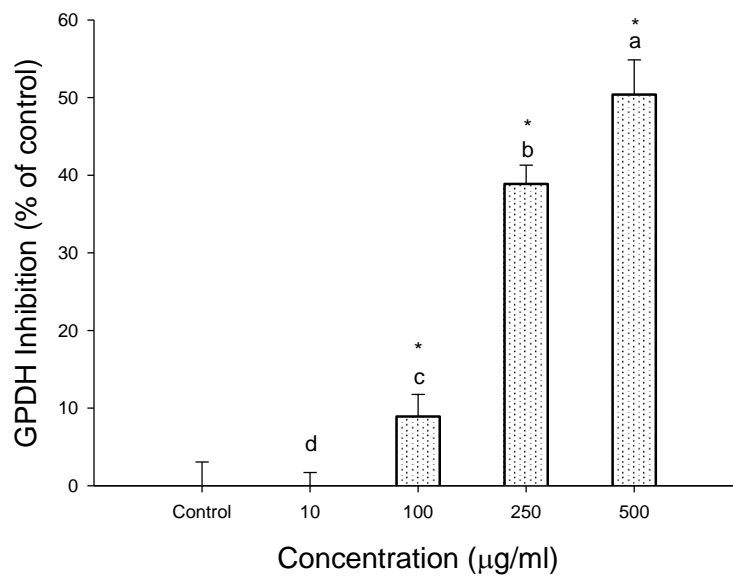
(B)



(C)



(D)

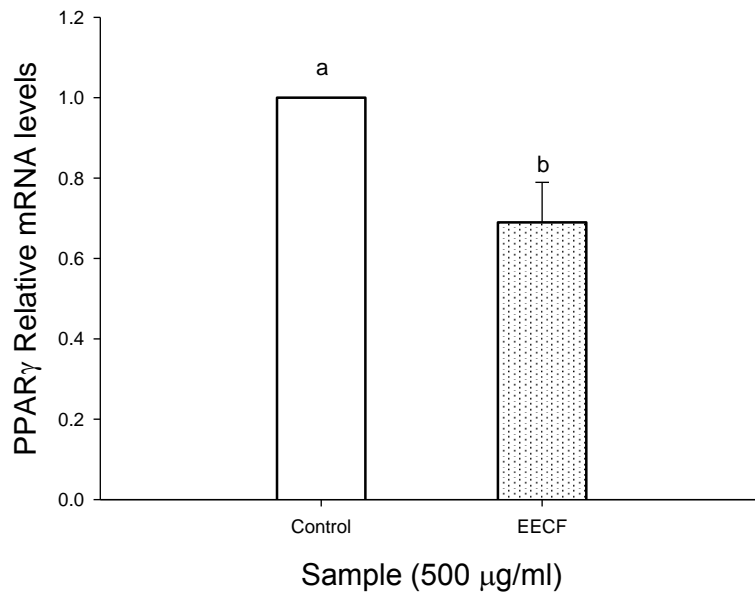


圖二、紅藜酒精溶液萃取物對 3T3-L1 脂肪生成之影響。(A)為紅藜酒精溶液萃取物對 3T3-L1 反應 72 小時之 OROSM 細胞照片。(B)為反應 72 小時對 OROSM 之影響。(C)為 EECF 對分化後脂肪細胞反應 72 小時對三酸甘油酯含量之影響。(D)為 EECF 對分化後脂肪細胞反應 72 小時對 GPDH 之影響。

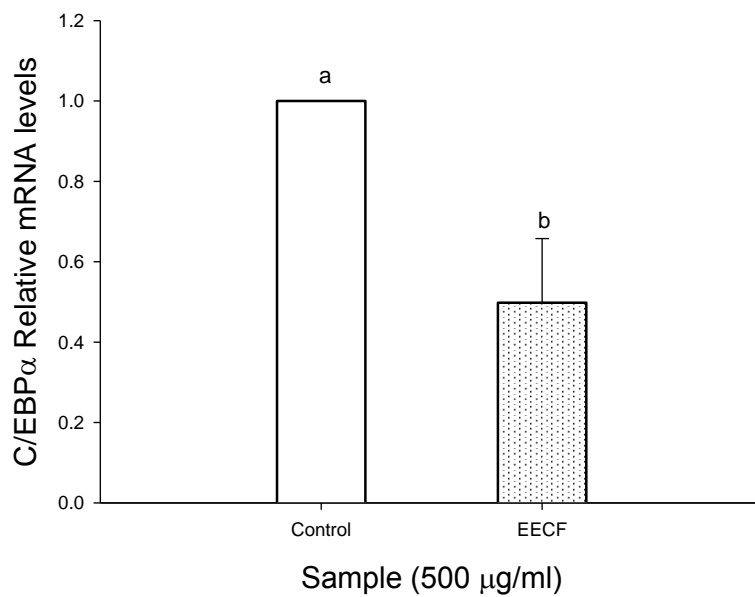
Figure 2. Effect of ethanol extracts of Djulis (EECF) on adipogenesis. (A) The microscopic images of Oil red O-staining of EECF-treated 3T3-L1 cells. (B) Oil red O staining of EECF-treated 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were incubated with 10-500 µg/ml of EECF for 72 h at 37 °C in 5 % CO₂ incubator. (C) EECF-mediated suppression of intracellular triglyceride levels of 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were incubated with 10-

500 μ g/ml of EECF for 72 h at 37 °C in 5 % CO₂ incubator. (D) Effect of EECF on GPDH activity in 3T3-L1 cells. The cells were incubated with 10-500 μ g/ml of EECF for 72 h at 37 °C in 5 % CO₂ incubator. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. *($p < 0.05$), compared to the control. Values in each concentration with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

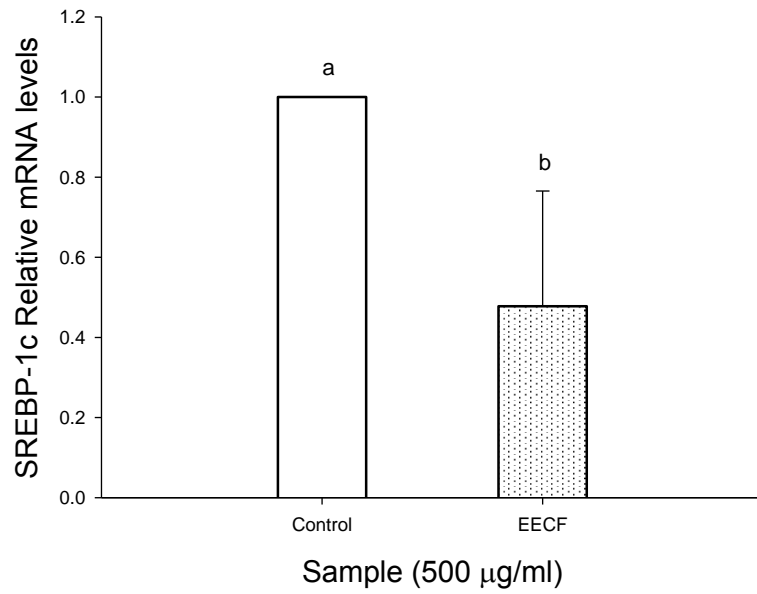
(A)



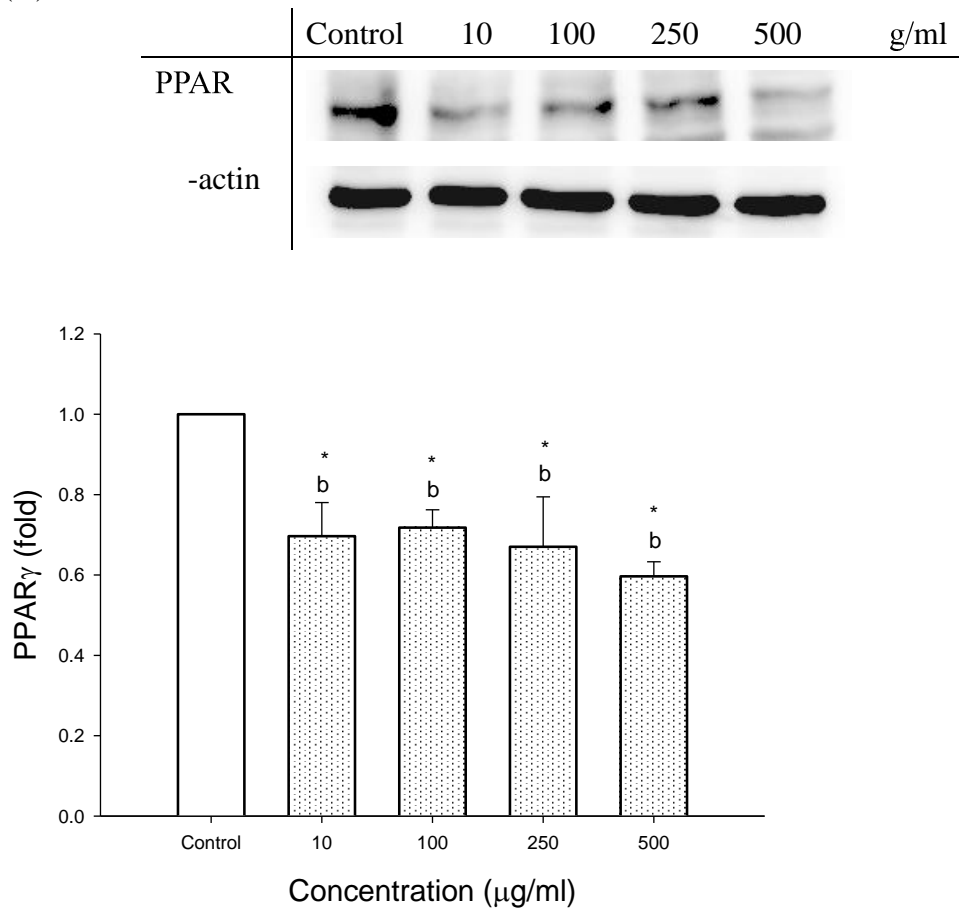
(B)



(C)



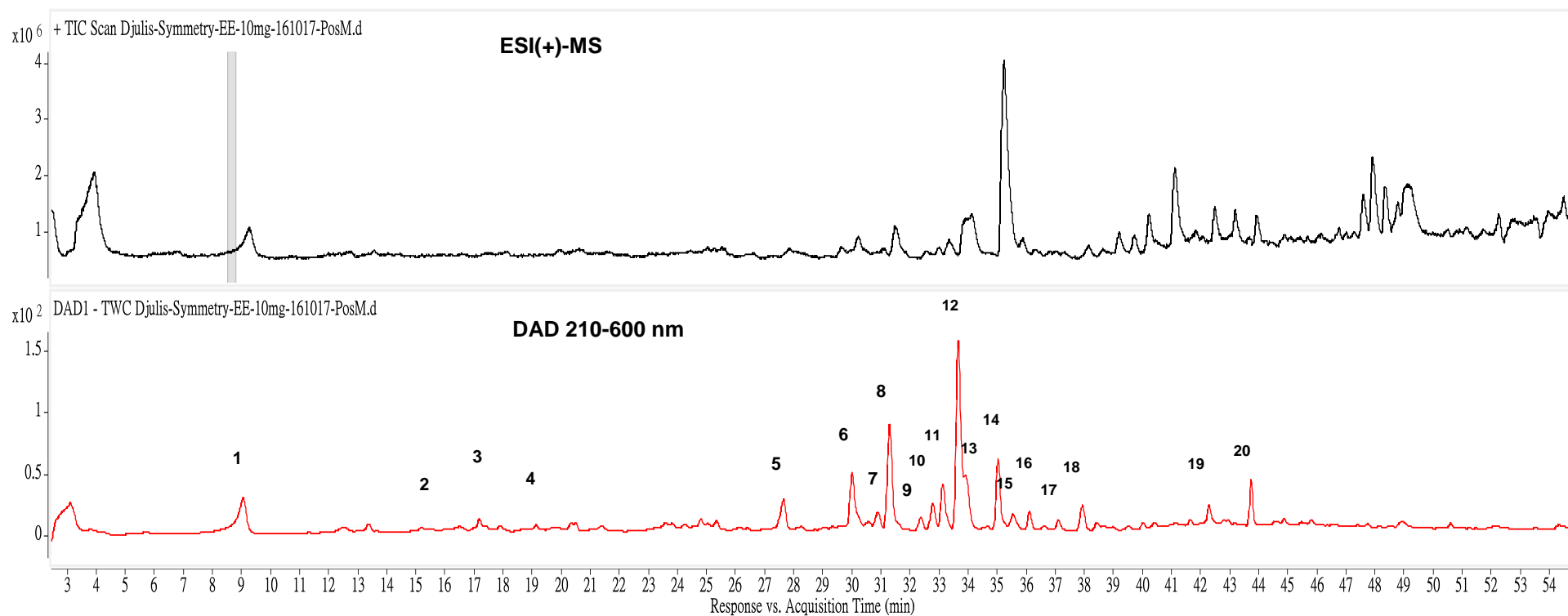
(D)



圖三、紅藜酒精溶液萃取物對分化後脂肪細胞基因表現之影響。(A)為反應 6 小時對 PPAR γ 基因之影響。(B)與(C)分別為紅藜酒精溶液萃取物對分化後脂肪細胞

反應 12 小時對 C/EBP α 與 SREBP-1c 基因之影響。(D)為反應 18 小時對 PPAR γ 活性之影響。

Figure 3. Effect of ethanol extracts of *Djulis* (EECF) on expression of adipogenic genes in 3T3-L1 adipocytes. (A) The effect of EECF on gene levels of PPAR γ in 3T3-L1 cells. The cells were incubated with EECF for 6 h. (B) The effect of EECF on gene levels of C/EBP α in 3T3-L1 cells. The cells were incubated with EECF for 12 h. (C) The effect of EECF on gene levels of SREBP-1c in 3T3-L1 cells. The cells were incubated with EECF for 12 h. (D) The effect of EECF on PPAR γ protein expression in 3T3-L1 cells. The cells were incubated with EECF for 18 h. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. *($p < 0.05$), compared to the control. Values in each concentration with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).



圖四、紅藜酒精溶液萃取物經 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 之分析

Figure 4. Total ion chromatograms of LC/MS analysis in positive electrospray ionization and HPLC-photodiode array detection chromatograms at full scan of 210-600 nm from ethanolic extracts of Djulis (EECF). Peak numbers are referred to Table 1.

表一、紅藜酒精溶液萃取物光譜分析

Table 1. Retention time, UV-Vis and Mass spectral characteristics of the ethanolic extracts of Djulis (*Chenopodium formosanum*)

Peak No.	Compound	t_R (min)	λ_{max} (nm)	$[M + H]^+$	$[M - H]^-$	Amount (mg/g) ^d
1	protocatechuic acid derivatives	9.05	262, 234	285	283	7.328
2	amaranthine ^b	15.05	538	727	-	0.24
3	betanin ^a	17.09	534, 274	551	-	0.74
4	isobetanin ^b	19.28	534, 236	551	-	0.28
5	quercetin derivatives	27.61	254, 354	889	-	4.29
6	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	29.97	254, 354	757	755	7.49
7	quercetin-3- <i>O</i> -deoxy-hexose- <i>O</i> -hexose- <i>O</i> -pentoside	30.85	254, 352	743	-	1.86
8	camellianoside ^b	31.26	268, 350	743	741	13.48
9	kaempferol derivative ^c	32.34	268, 348, 236sh	697	695	1.42
10	kaempferol-3- <i>O</i> -[6'''- <i>p</i> -coumaroyl-glucosyl- β -(1 \rightarrow 4)-rhamnoside] ^b	32.77	268, 349, 246sh	741	739	3.09
11	quercetin- 3- <i>O</i> -2''-(6''- <i>p</i> -coumaroyl) - glucosylrhamnoside	33.09	254, 354	757	-	5.54
12	rutin ^a	33.61	349, 267, 226	611	609	25.89
13	unknown	33.90	220, 268, 352	291	-	6.61
14	20-hydroxyecdysone	34.99	246, 224sh	481	-	8.06
15	unknown	35.50	222, 328	479	-	1.81
16	kaempferol-3,7-di- <i>O</i> -rhamnoside ^c	36.07	350, 266, 234	579	577	1.99
17	kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside ^a	37.30	267, 350, 235sh	595	593	0.90
18	unknown	37.90	222, 252, 340	625	-	3.25
19	unknown	42.91	222, 314	453	-	1.70
20	unknown	43.89	222, 312	677	675	4.04

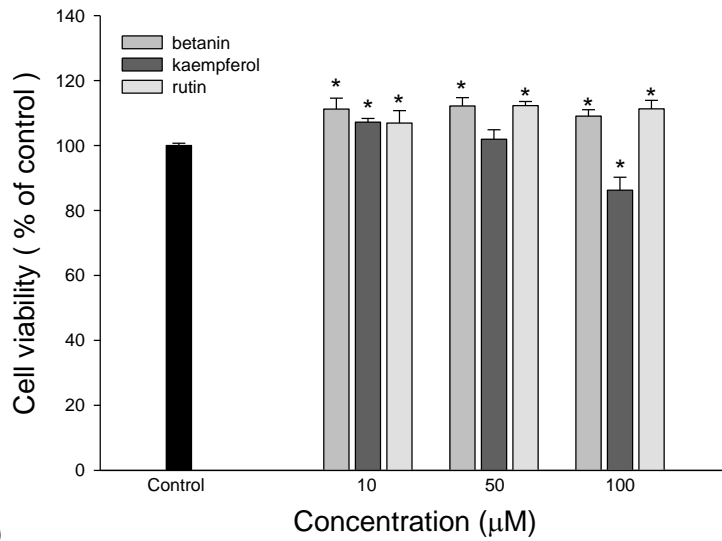
^aThe identification was confirmed further by authentic compound.

^bCompounds were tentatively identified according to mass spectra and the matched data from literatures.

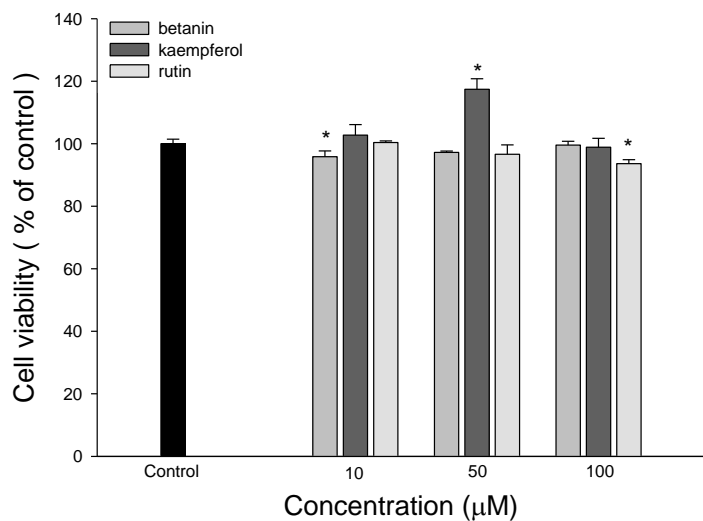
^cCompounds were limitedly identified from mass spectra and UV-visible absorbance spectra.

^dPeaks 2, 3 and 4 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 ethanolic extracts of Djulis (EECF).

(A)



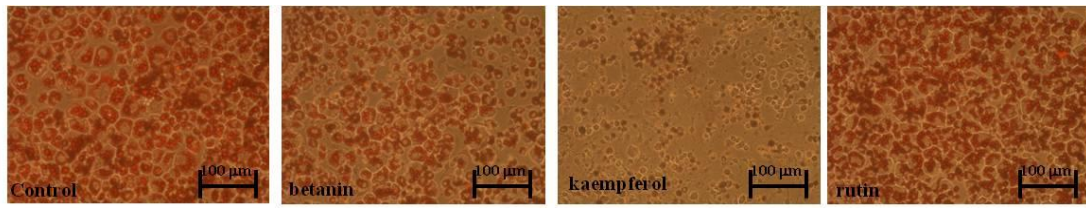
(B)



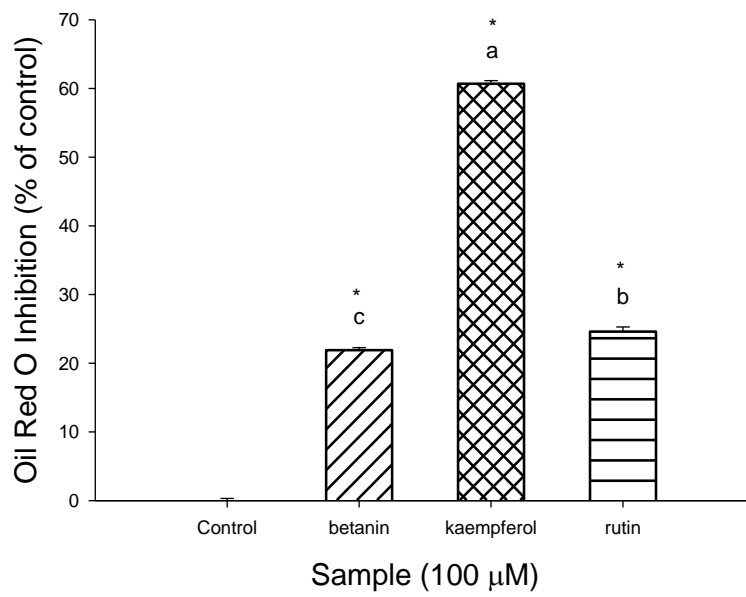
圖五、紅藜酒精溶液萃取物三種活性成分對 3T3-L1 前脂肪細胞與分化後之脂肪細胞存活率之影響。(A)三種活性成分對 3T3-L1 前脂肪細胞反應 24 小時存活率之影響；(B)三種活性成分對分化後脂肪細胞反應 72 小時存活率之影響。

Figure 5. Effect of three bioactive compounds tested from ethanolic extracts of Djulis (EECF) on cell proliferation in 3T3-L1 pre-adipocytes and 3T3-L1 adipocytes. The cells were treated with each bioactive compound tested for 24 and 72 h for pre-adipocytes and 3T3-L1 adipocytes, respectively.

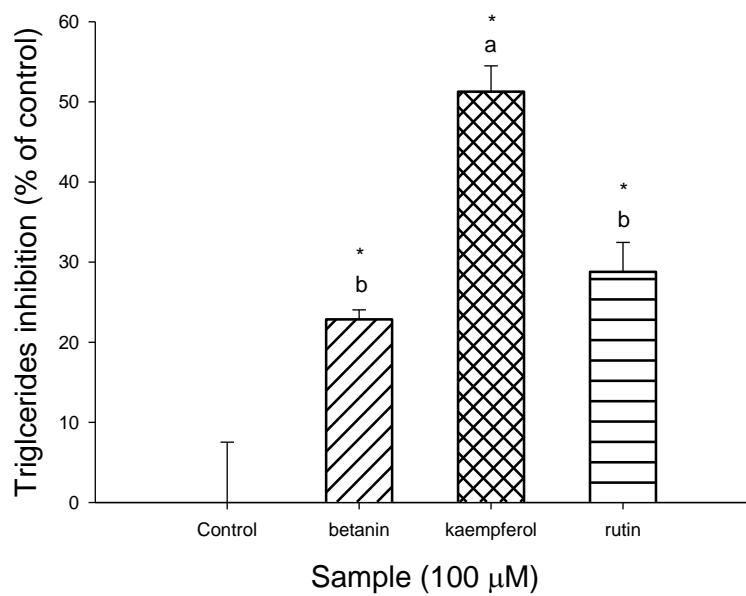
(A)



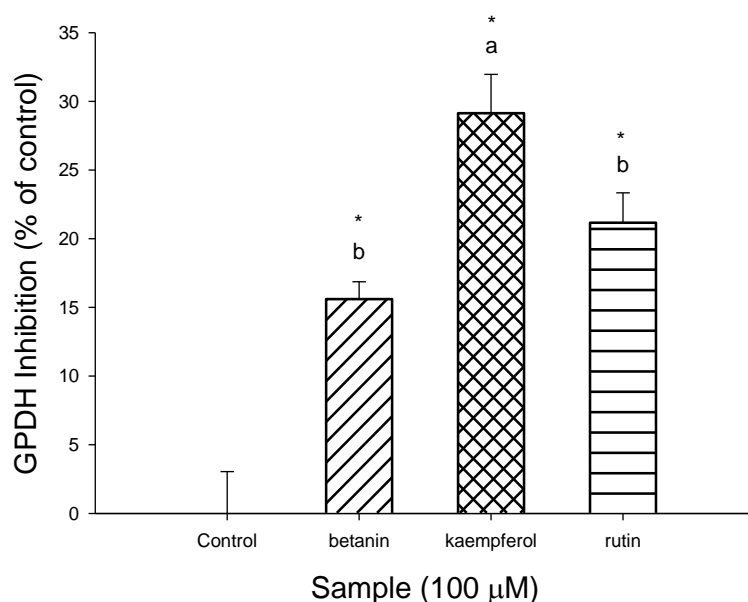
(B)



(C)



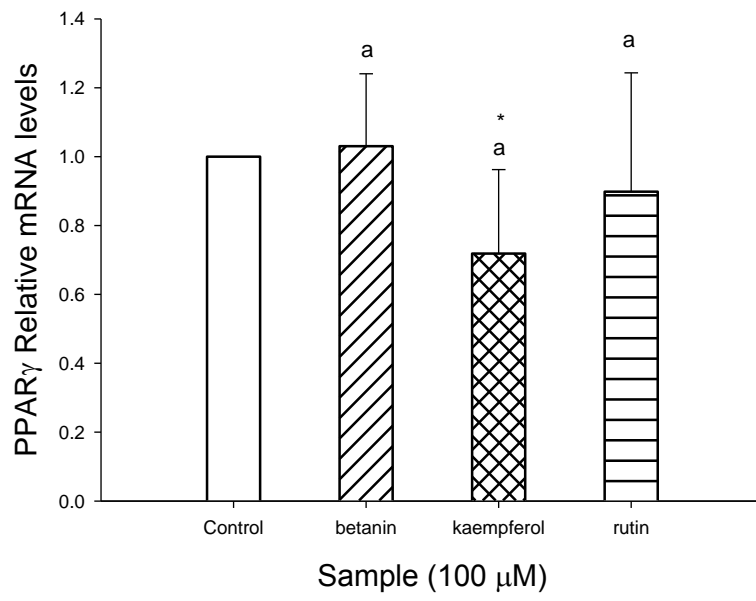
(D)



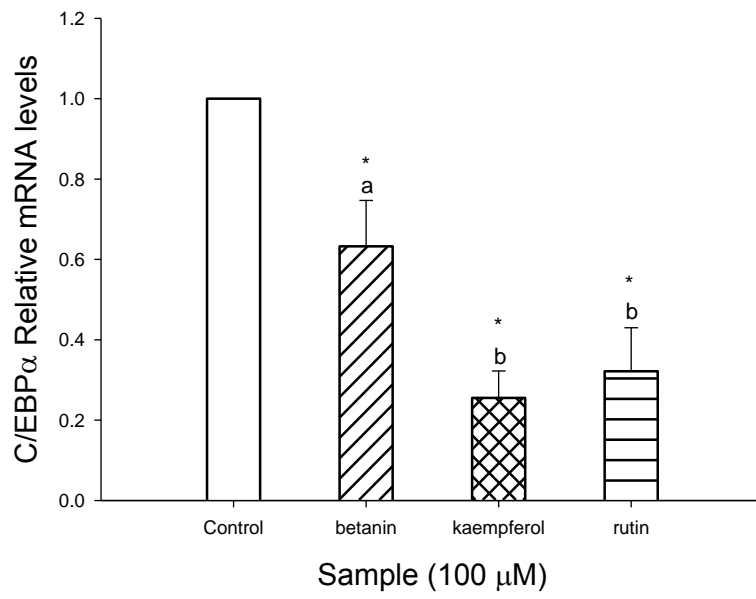
圖六、紅藜酒精溶液萃取出三種活性成分對 3T3-L1 脂肪生成之影響。(A)對 3T3-L1 反應 72 小時之 OROSM 細胞照片。(B)為反應 72 小時對 OROSM 之影響。(C)對分化後脂肪細胞反應 72 小時對三酸甘油酯含量之影響。(D)F 對分化後脂肪細胞反應 72 小時對 GPDH 之影響。

Figure 6. Effects of rutin, kaempferol and betanin on adipogenesis in 3T3-L1 cells. (A) The microscopic images of Oil red O-staining of rutin-, kaempferol- or betanin -treated 3T3-L1 cells. (B) Oil red O staining of rutin-, kaempferol- or betanin-treated 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were incubated with 100μM of rutin, kaempferol or betanin , respectively, for 72 h at 37 °C in 5 % CO₂ incubator. (C) Rutin-, kaempferol- or betanin-mediated suppression of intracellular triglyceride levels of 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were incubated with 100 μM of rutin, kaempferol or betanin , respectively, for 72 h at 37 °C in 5 % CO₂ incubator. (D) Effect of 100 μM of rutin, kaempferol or betanin on GPDH activity in 3T3-L1 cells. The cells were incubated with 10-500μg/ml of rutin, kaempferol or betanin, respectively, for 72 h at 37 °C in 5 % CO₂ incubator. Data are expressed as the mean ± SD of three independent experiments. *(*p* <0.05), compared to the control. Values in each concentration with different superscript letters are significantly different (*p* <0.05).

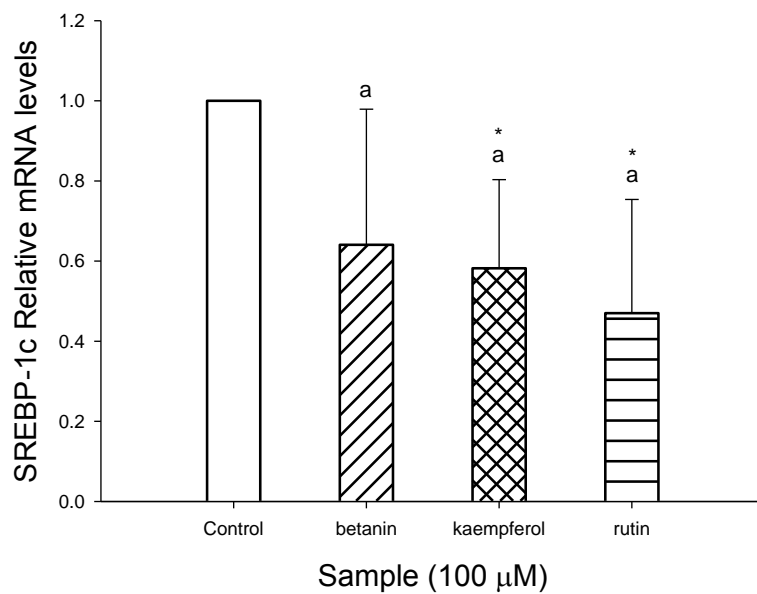
(A)



(B)



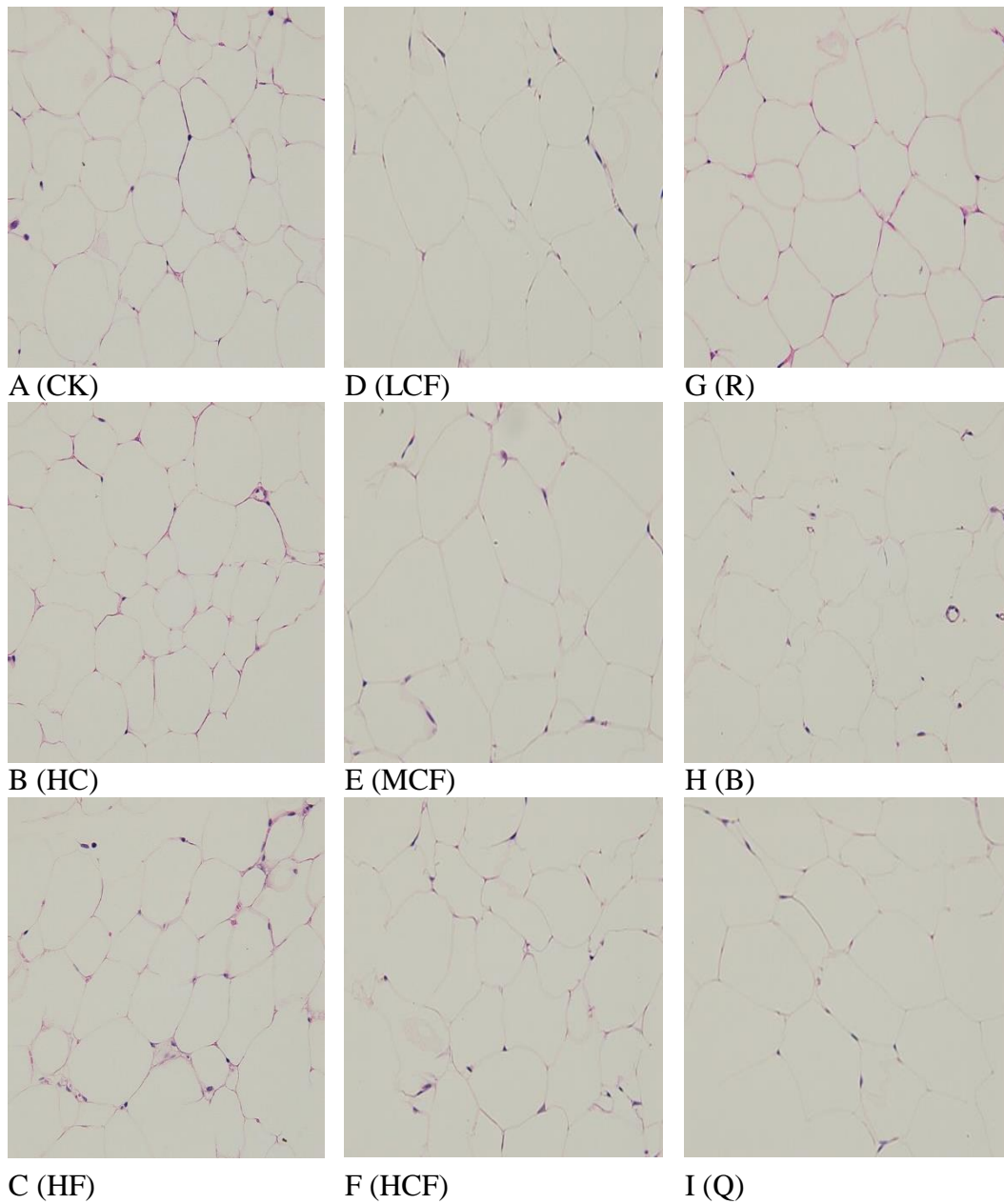
(C)



圖七、紅藜酒精溶液萃取物三種活性成分對分化後脂肪細胞基因表現之影響。(A) 為反應 6 小時對 PPAR γ 基因之影響。(B)與(C)分別為紅藜酒精溶液萃取物對分化後脂肪細胞反應 12 小時對 C/EBP α 與 SREP-1c 基因之影響。

Figure 7. Effects of of rutin, kaempferol and betanin on expression of adipogenic genes. (A) The effect of rutin, kaempferol and betanin on gene levels of PPAR γ in 3T3-L1 cells. (B) The effect of rutin, kaempferol and betanin on gene levels of C/EBP α in 3T3-L1 cells. (C) The effect of rutin, kaempferol and betanin on gene levels of SREBP-1c in 3T3-L1 cells. The cells were incubated with rutin, kaempferol or betanin for PPAR γ , C/EBP α and SREBP-1c was 6 h, 12 h and 12 h, respectively. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. *($p < 0.05$), compared to the control. Values in each concentration with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

第二年圖與表



圖八、高脂飲食誘導小鼠之脂肪組織病理學變化。

Figure 8. Histopathological alterations of the adipose tissue in mice fed with high fat diet. CK: control diet; HC: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium Formosanum* with control diet; HF: high-fat diet; LCF: low dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum* ; MCF: medium dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum* ; HCF: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; R: rutin; B: betanin; Q: quercetin. Values represent the mean \pm SEM (n=6). H&E stain. 400 \times groups.

表二 紅藜酒精溶液萃取物與 rutin, quercetin, betanin 對餵食高脂飲食小鼠各項重量之影響

Table 2. Effects of ethanolic extracts of *Djulis* (EECF) and its bioactive compounds including rutin, quercetin, betanin on body weight, organ or tissue weights of C57BL/6 mice fed with high fat diet

Groups	Initial weight (g)	Final body weight (g)	Daily weight gain (g/day)	Daily food intake (g/day)	Feed efficiency (%)	Relative weights		
						Liver (%)	Kidney (%)	Visceral fat (%)
CK	21.48±0.51	28.00±1.62	0.08±0.01	3.12±0.23	2.55±0.17	4.49±0.10	1.42±0.03	3.28±0.26
HC	21.48±0.22	27.95±1.56	0.08±0.01	3.07±0.05	2.58±0.27	4.23±0.10	1.41±0.02	3.65±0.28
HF	22.66±0.58	33.12±1.73*	0.13±0.03*	2.82±0.02*	4.61±1.03*	3.68±0.14*	1.45±0.04	8.28±0.61 ^{a*}
LCF	22.08±0.27	31.56±0.97	0.11±0.01	2.80±0.02	3.76±0.41	3.76±0.08	1.39±0.05	6.18±0.65 ^{ab}
MCF	22.05±0.15	31.34±1.18	0.10±0.02	2.77±0.02	3.77±0.59	3.70±0.19	1.44±0.01	5.67±0.80 ^b
HCF	22.20±0.57	30.22±1.39	0.09±0.02	2.83±0.02	3.31±0.77	4.03±0.12	1.55±0.06	5.61±0.72 ^b
R	21.84±0.48	28.51±1.55	0.10±0.01	2.73±0.01	3.68±0.31	3.94±0.15	1.55±0.08	5.53±0.84 ^b
B	22.01±0.44	29.60±1.52	0.09±0.02	2.81±0.02	3.17±0.59	3.91±0.16	1.57±0.07	5.56±0.72 ^b
Q	22.17±0.78	28.21±1.93	0.08±0.04	2.82±0.03	2.71±1.24	3.89±0.30	1.55±0.07	5.80±0.72 ^b

CK: control diet; HC: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium Formosanum* with control diet; HF: high-fat diet; LCF: low dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; MCF: medium dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; HCF: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; R: rutin; B: betanin; Q: quercetin. Values represent the mean ± SEM (n=6). Statistical methods for HC, HF vs CK are used by Dunnett's test, the symbol of * means p value <0.05 represented significant difference. Statistical methods for high fat diet groups are used by Duncan's multiple range test, the different superscript letters^(a-b) are significantly different at $p < 0.05$. Feed efficiency (%)= (daily weight gain / daily food intake) × 100. Relative weight (%)= organ or tissue weight (g) / final body weight (g) × 100.

表三 紅藜酒精溶液萃取物與 rutin , quercetin , betanin 對餵食高脂飲食小鼠血脂之影響

Table 3. Effects of ethanolic extracts of Djulis (EECF) and its bioactive compounds including rutin, quercetin, betanin on the plasma lipid levels of C57BL/6 mice fed with high fat diet

Groups	TG (mg/dL)	TC (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	NEFA (mmol/L)
CK	32.40±6.14	136.60±3.26	113.20±2.87	17.00±1.29	1.17±0.11
HC	49.57±6.14	142.60±4.02	115.80±4.16	17.29±1.91	1.42±0.06
HF	139.00±18.77 ^{a*}	209.67±40.93 ^{a*}	141.33±2.33 ^{a*}	30.66±16.92 ^{a*}	2.00±0.32 [*]
LCF	83.75±15.93 ^b	152.80±4.22 ^b	124.00±3.03 ^b	17.20±2.44 ^b	1.56±0.19
MCF	82.40±15.27 ^b	135.60±13.53 ^b	127.50±2.96 ^{ab}	14.83±1.85 ^b	1.61±0.32
HCF	82.75±15.15 ^b	139.20±4.24 ^b	118.33±3.55 ^b	13.00±1.93 ^b	1.51±0.09
R	67.67±3.18 ^b	140.00±25.54 ^b	140.75±2.87 ^a	14.75±3.71 ^b	1.39±0.11
B	51.60±5.57 ^b	145.40±6.87 ^b	121.20±5.60 ^b	19.17±2.70 ^b	1.59±0.09
Q	46.75±12.93 ^b	158.40±8.75 ^b	127.50±5.93 ^{ab}	17.00±2.81 ^b	1.49±0.12

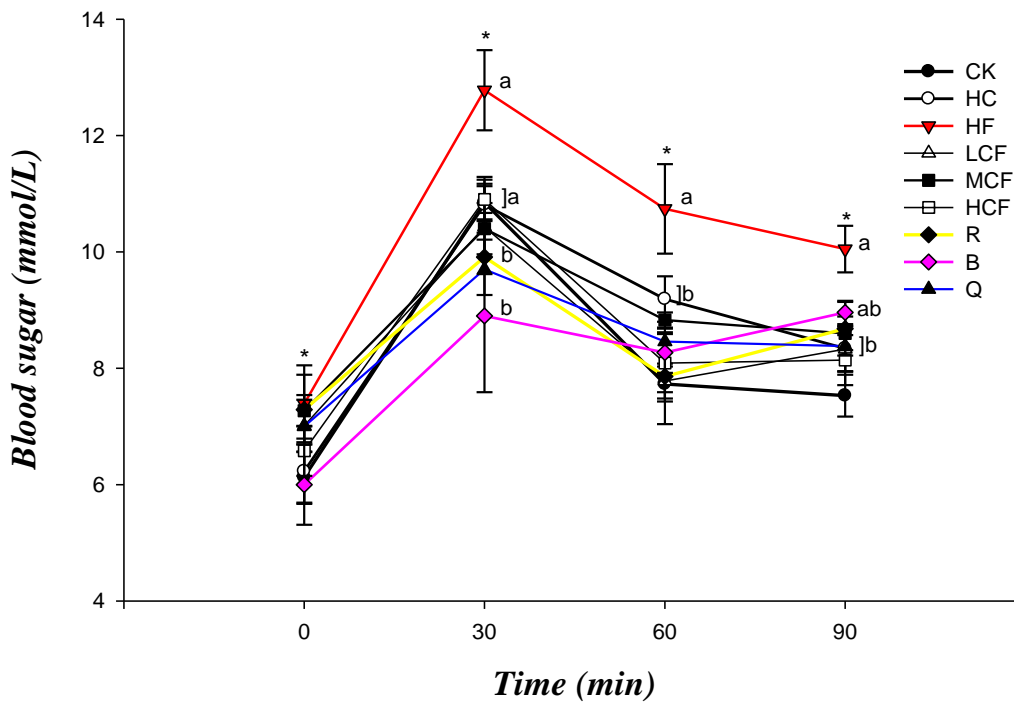
CK: control diet; HC: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium Formosanum* with control diet; HF: high-fat diet; LCF: low dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum* ; MCF: medium dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum* ; HCF: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; R: rutin; B: betanin; Q: quercetin. Values represent the mean ± SEM (n=6). Statistical methods for HC, HF vs CK are used by Dunnett's test, the symbol of * means *p* value <0.05 represented significant difference. Statistical methods for high fat diet groups are used by Duncan's multiple range test, the different superscript letters^(a-b) are significantly different at *p* < 0.05. TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; NEFA, non-esterified fatty acids.

表四 紅藜酒精溶液萃取物與 rutin、quercetin、betanin 對餵食高脂飲食小鼠肝功能與血脂代謝之影響

Table 4. Effects of ethanolic extracts of *Djulis* (EECF) and its bioactive compounds including rutin, quercetin, betanin on biochemical examination for the plasma of C57BL/6 mice fed with high fat diet.

Groups	AST (U/L)	ALT (U/L)	Insulin (μ g/L)	Leptin (ng/L)
CK	204.25 \pm 39.67	37.40 \pm 7.93	0.81 \pm 0.11	12.04 \pm 3.22
HC	215.75 \pm 7.49	43.40 \pm 13.12	0.66 \pm 0.02	15.77 \pm 2.76
HF	208.20 \pm 22.92	47.60 \pm 12.65	2.00 \pm 0.48 ^{b*}	62.80 \pm 8.77 ^{ab*}
LCF	136.00 \pm 50.50	24.25 \pm 5.27	0.79 \pm 0.15 ^a	50.29 \pm 11.28 ^{ab}
MCF	214.25 \pm 35.95	40.40 \pm 8.33	0.91 \pm 0.14 ^a	43.68 \pm 10.02 ^b
HCF	143.50 \pm 20.60	28.60 \pm 6.78	0.87 \pm 0.15 ^a	44.64 \pm 9.53 ^b
R	161.00 \pm 55.52	30.75 \pm 6.05	0.81 \pm 0.02 ^a	92.89 \pm 19.14 ^a
B	176.50 \pm 3.80	44.00 \pm 14.37	1.00 \pm 0.31 ^a	52.06 \pm 21.40 ^{ab}
Q	162.50 \pm 31.42	21.25 \pm 2.02	0.83 \pm 0.05 ^a	50.31 \pm 11.48 ^{ab}

CK: control diet; HC: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium Formosanum* with control diet; HF: high-fat diet; LCF: low dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum* ; MCF: medium dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum* ; HCF: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; R: rutin; B: betanin; Q: quercetin. Values represent the mean \pm SEM (n=6). Statistical methods for HC, HF vs CK are used by Dunnett's test, the symbol of * means p value <0.05 represented significant difference. Statistical methods for high fat diet groups are used by Duncan's multiple range test, the different superscript letters^(a-b) are significantly different at $p < 0.05$. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.



圖九、紅藜酒精溶液萃取物與rutin，quercetin，betanin對餵食高脂飲食小鼠之口服葡萄糖耐受性。

Figure 9. Plasma glucose responses to an oral glucose challenge (1.5 g/kg) after 12 h of food deprivation at day 84. CK: control diet; HC: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium Formosanum* with control diet; HF: high-fat diet; LCF: low dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; MCF: medium dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; HCF: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; R: rutin; B: betanin; Q: quercetin. Values represent the mean \pm SEM (n=6). Statistical methods for HC, HF vs CK are used by Dunnett's test, the symbol of * means p value <0.05 represented significant difference. Statistical methods for high fat diet groups are used by Duncan's multiple range test, the different superscript letters^(a-b) are significantly different at $p < 0.05$.

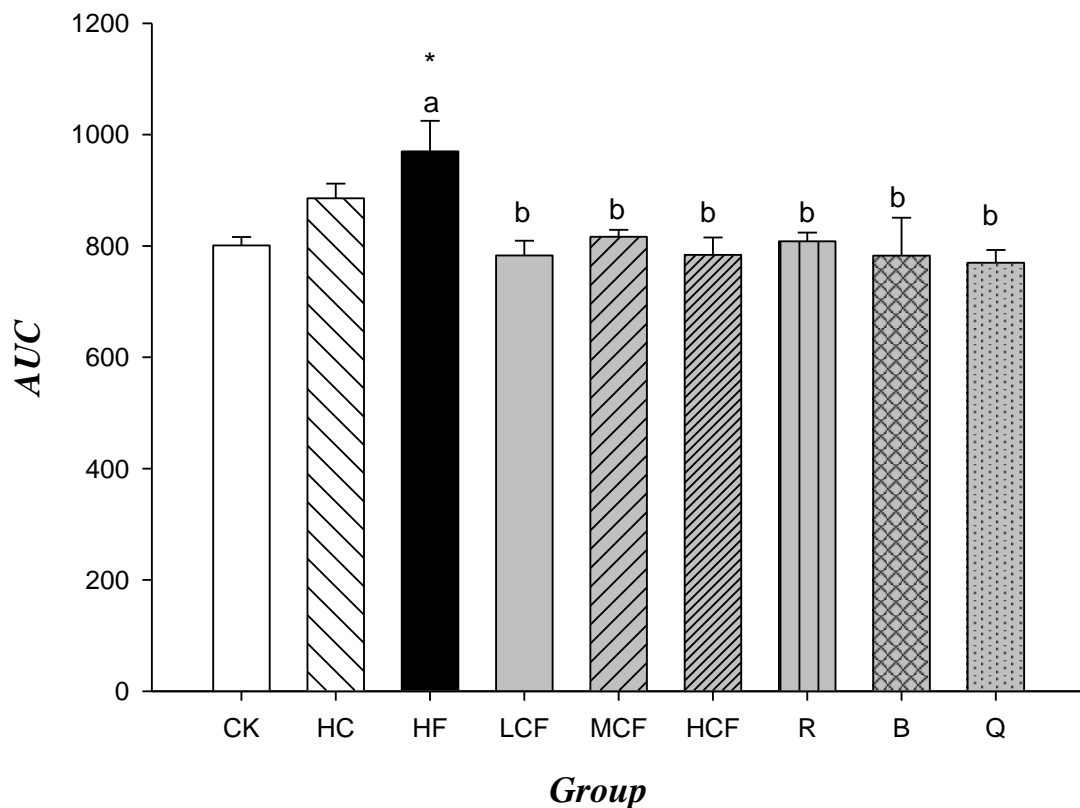
表五 紅藜酒精溶液萃取物與rutin，quercetin，betanin對餵食高脂飲食小鼠之葡

葡萄糖耐受性之影響

Table 5. Effects of ethanolic extracts of Djulis (EECF) and its bioactive compounds including rutin, quercetin, betanin on oral glucose tolerance test (OGTT) of C57BL/6 mice fed with high fat diet at day 80

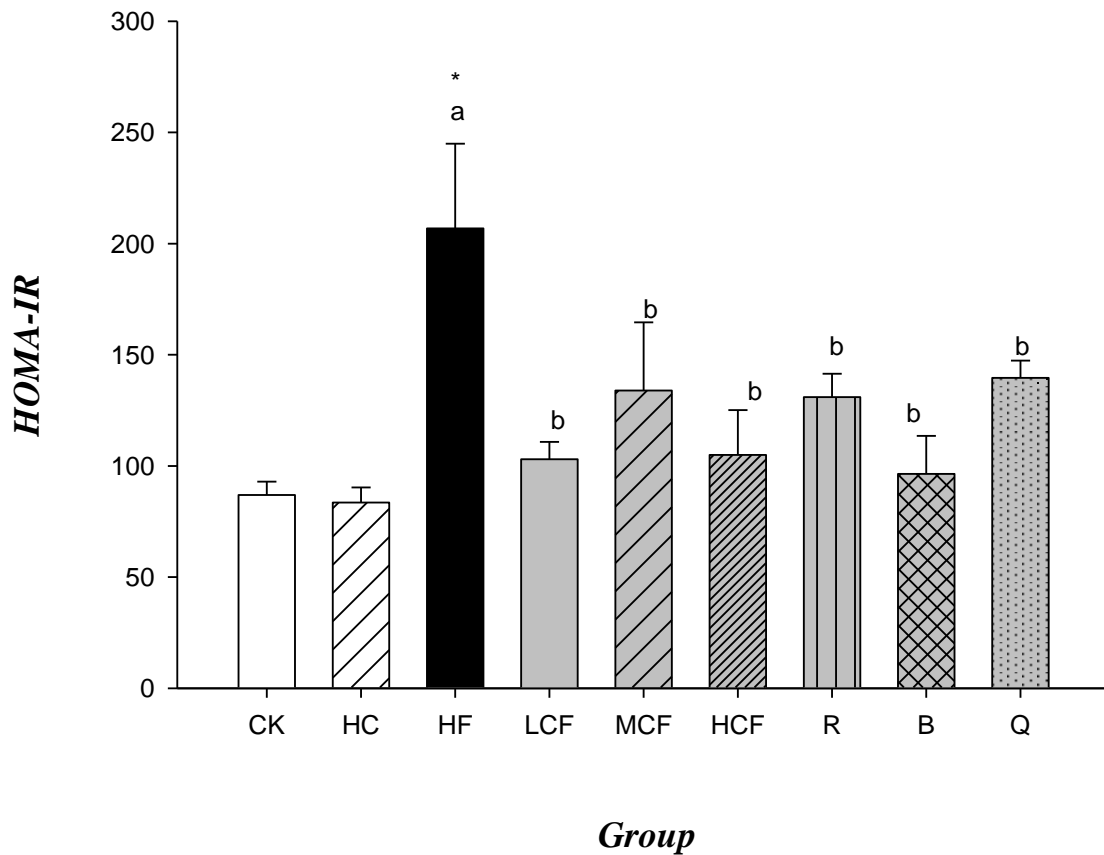
Groups	0 min (mmol/L)	30 min (mmol/L)	60 min (mmol/L)	90 min (mmol/L)
CK	6.13±0.44	10.85±0.32	7.73±0.30	7.53±0.36
HC	6.23±0.56	10.81±0.48	9.18±0.39	8.34±0.39
HF	7.39±0.66*	12.78±0.69 ^{a*}	10.74±0.77 ^{b*}	10.05±0.40 ^{a*}
LCF	7.01±0.45	10.43±0.81 ^{ab}	7.78±0.30 ^a	8.33±0.39 ^b
MCF	7.27±0.27	10.40±0.44 ^{ab}	8.83±0.13 ^a	8.60±0.29 ^b
HCF	6.58±0.43	10.90±0.23 ^{ab}	8.09±0.50 ^a	8.14±0.43 ^b
R	7.29±0.60	9.91±0.65 ^b	7.86±0.82 ^a	8.68±0.46 ^b
B	6.00±0.69	8.90±1.32 ^b	8.27±0.35 ^a	8.96±0.20 ^{ab}
Q	7.00±0.69	9.70±0.25 ^b	8.46±0.43 ^a	8.38±0.29 ^b

CK: control diet; HC: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium Formosanum* with control diet; HF: high-fat diet; LCF: low dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum* ; MCF: medium dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum* ; HCF: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; R: rutin; B: betanin; Q: quercetin. Values represent the mean ± SEM (n=6). Statistical methods for HC, HF vs CK are used by Dunnett's test, the symbol of * means *p* value <0.05 represented significant difference. Statistical methods for high fat diet groups are used by Duncan's multiple range test, the different superscript letters^(a-b) are significantly different at *p* < 0.05. OGTT test: Oral glucose tolerance test.



圖十、紅藜酒精溶液萃取物與rutin，quercetin，betanin對餵食高脂飲食小鼠之血糖面積之影響。

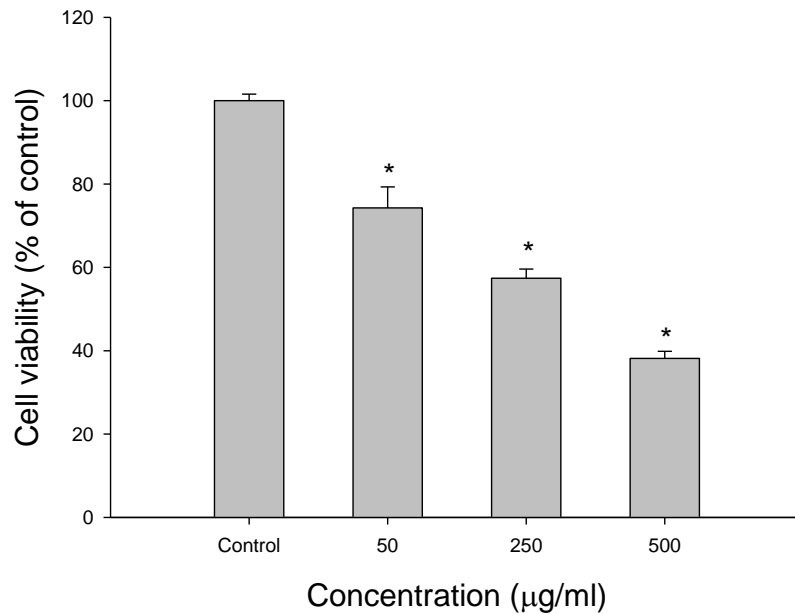
Figure 10. Effects of test samples on AUC of glucose levels from oral glucose tolerance test (OGTT) for C57BL/6 mice fed with high fat diet. CK: control diet; HC: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium Formosanum* with control diet; HF: high-fat diet; LCF: low dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; MCF: medium dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; HCF: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; R: rutin; B: betanin; Q: quercetin. Values represent the mean \pm SEM (n=6). Statistical methods for HC, HF vs CK are used by Dunnett's test, the symbol of * means p value <0.05 represented significant difference. Statistical methods for high fat diet groups are used by Duncan's multiple range test, the different superscript letters^(a-b) are significantly different at $p <0.05$. AUC: The area under the curve (AUC) of glucose levels.



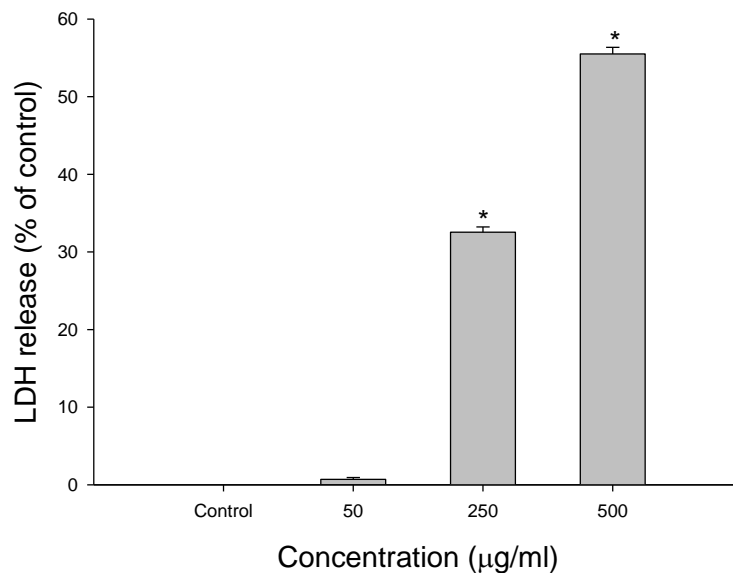
圖十一、紅藜酒精溶液萃取物與 rutin，quercetin，betanin 對餵食高脂飲食小鼠之胰島素阻抗性之影響。

Figure 11. Effects of test samples on homeostasis model assessment (HOMA-IR) of C57BL/6 mice fed with high fat diet. CK: control diet; HC: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium Formosanum* with control diet; HF: high-fat diet; LCF: low dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; MCF: medium dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; HCF: high dosage of ethanolic extracts of *Chenopodium formosanum*; R: rutin; B: betanin; Q: quercetin. Values represent the mean \pm SEM (n=6). Statistical methods for HC, HF vs CK are used by Dunnett's test, the symbol of * means p value < 0.05 represented significant difference. Statistical methods for high fat diet groups are used by Duncan's multiple range test, the different superscript letters^(a-b) are significantly different at $p < 0.05$. HOMA-IR index = insulin (mU/L) \times glucose (mmol/L).

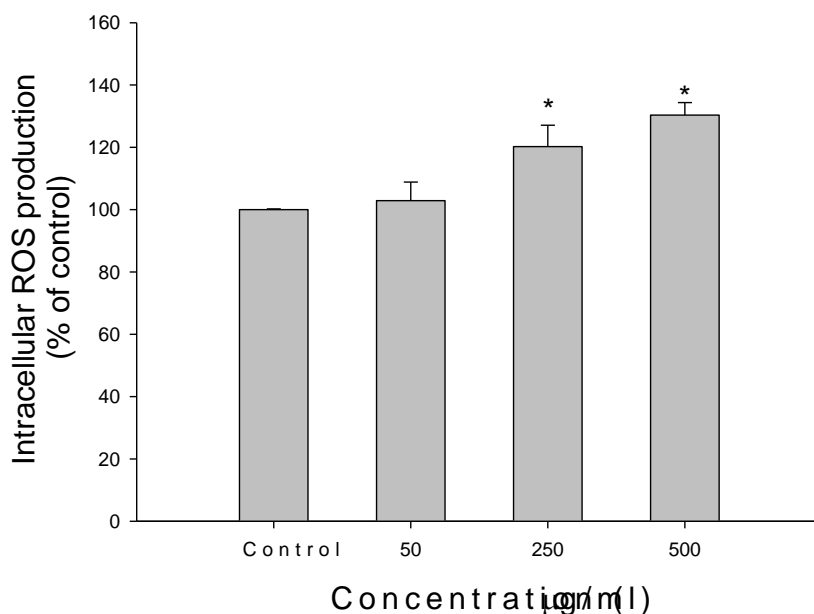
第三年圖與表



圖十二、紅藜酒精溶液萃取物對 HepG2 細胞反應 72 小時細胞生存性之影響。
Figure 12. Effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) on HepG2 cell viability. The cells were treated with EECF for 72 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control group.



圖十三、紅藜酒精溶液萃取物對 HepG2 細胞作用 72 小時對 LDH 釋放之影響。
Figure 13. Effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) on LDH in HepG2 cells. The cells were treated with EECF for 72 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control group.



圖十四、紅藜酒精溶液萃取物對 HepG2 細胞作用 24 小時對 ROS 生成之影響。

Figure 14. Effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) on intercellular ROS production in HepG2 cells. The cells were treated with EECF for 24 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). * (p < 0.05) compared with the control group.

表六 紅藜酒精溶液萃取物對 HepG2 細胞作用 72 hr 後對細胞週期影響

Table 6. Effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) on cell cycle of HepG2 cells

	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	76.8 \pm 2.2	6.6 \pm 1.1	16.4 \pm 1.3
50 µg/ml	78.6 \pm 1.0	9.9 \pm 2.4	11.5 \pm 1.8*
250 µg/ml	77.4 \pm 1.5	10.4 \pm 1.5*	12.1 \pm 1.9*
500 µg/ml	83.1 \pm 2.2*	7.1 \pm 3.2	9.9 \pm 4.1

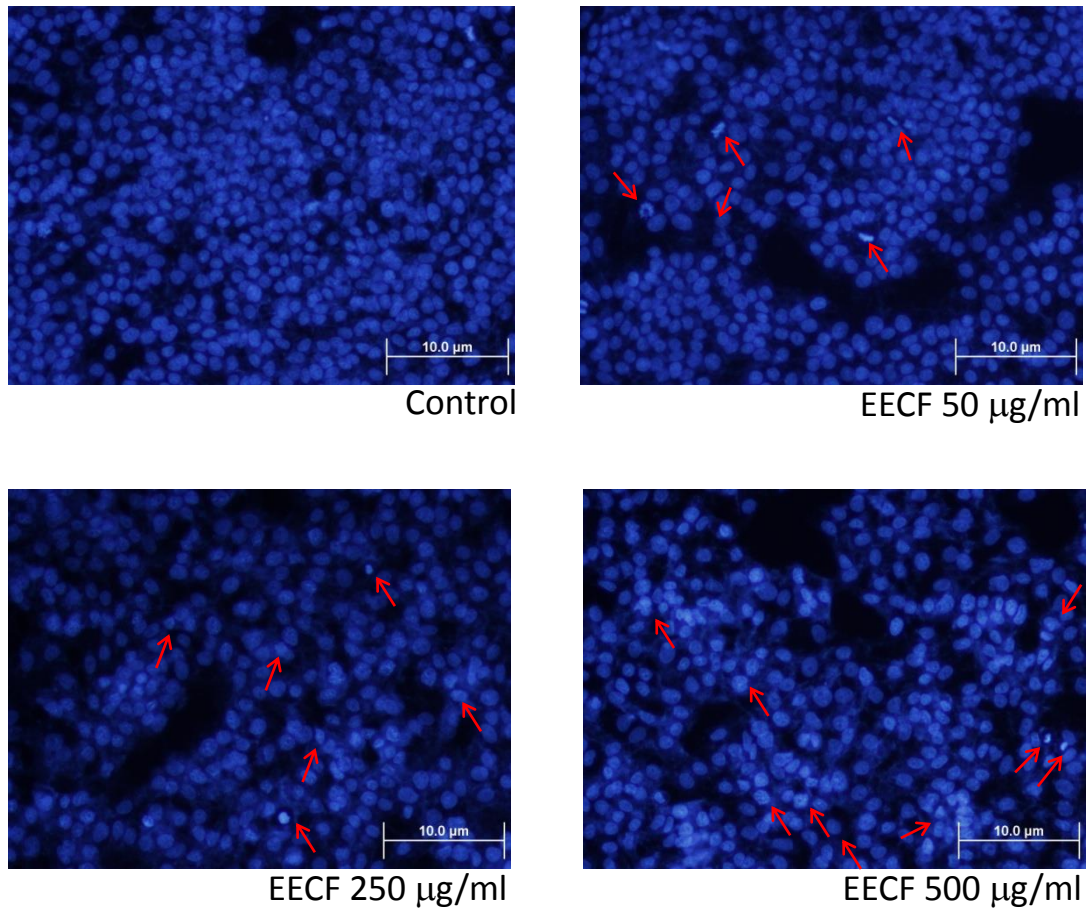
Cell were incubated with EECF (50-500 µg/ml) for 72 h. Data are presented by means \pm SD (n=3).

表七 紅藜酒精水萃物對後對細胞凋亡與壞死之影響

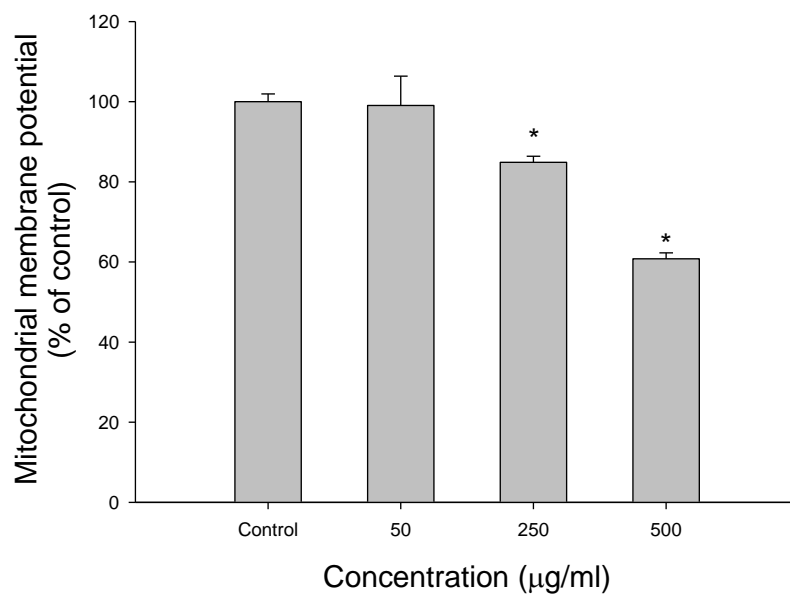
Table 7. Effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) on apoptosis in HepG2 cells

	Necrosis	Late apoptosis	Early apoptosis	Live
Control	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	3.9 \pm 0.3	96.1 \pm 0.4
50 µg/ml	2.2 \pm 0.6*	1.9 \pm 0.4*	5.4 \pm 0.4*	90.5 \pm 0.9*
250 µg/ml	12.9 \pm 0.7*	6.7 \pm 1.0*	2.9 \pm 0.1*	77.5 \pm 1.5*
500 µg/ml	0.2 \pm 0.2	7.2 \pm 2.2*	48.6 \pm 5.9*	43.9 \pm 7.3*

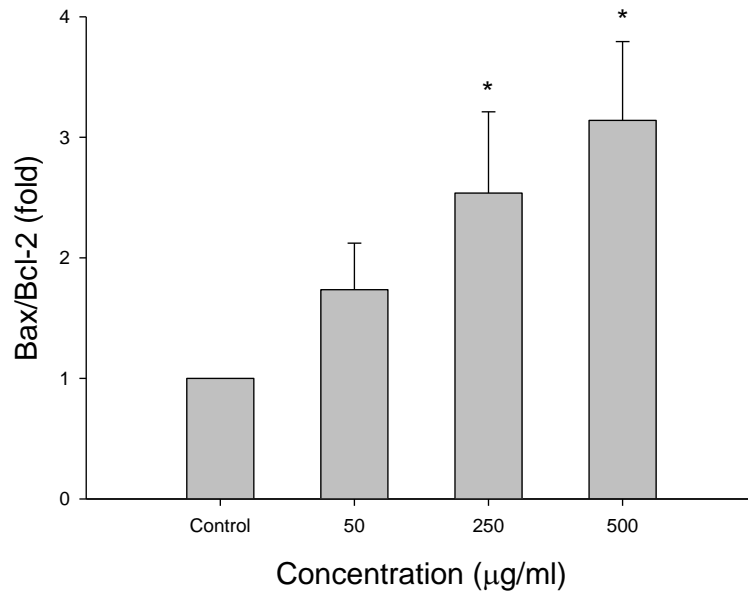
The cells were exposed to EECF (50-500 µg/ml) for 72 hr. The cells were harvested and stained with annexin V-FITC and propidium iodide (PI). Data are presented by means \pm SD (n=3). * (p < 0.05) compared with the control group.



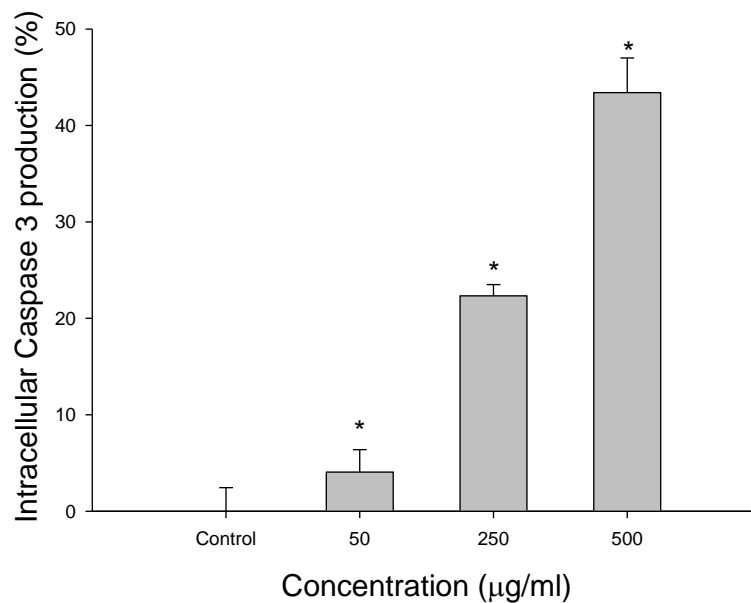
圖十五、紅藜酒精溶液萃取物對 HepG2 細胞作用 72 小時對 apoptosis 影響。
 Figure 15. Induction of apoptosis by effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) in HepG2 cells. The cells were treated with EECF for 72 h. The DAPI-stained cells were evaluated using fluorescense microscopy (400 x). The arrow indicated apoptotic cells.



圖十六、紅藜酒精溶液萃取物對 HepG2 細胞作用 24 小時對粒線體膜電位影響。
 Figure 16. Effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) on mitochondrial membrane potential in HepG2 cells. The cells were treated with EECF for 24 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.

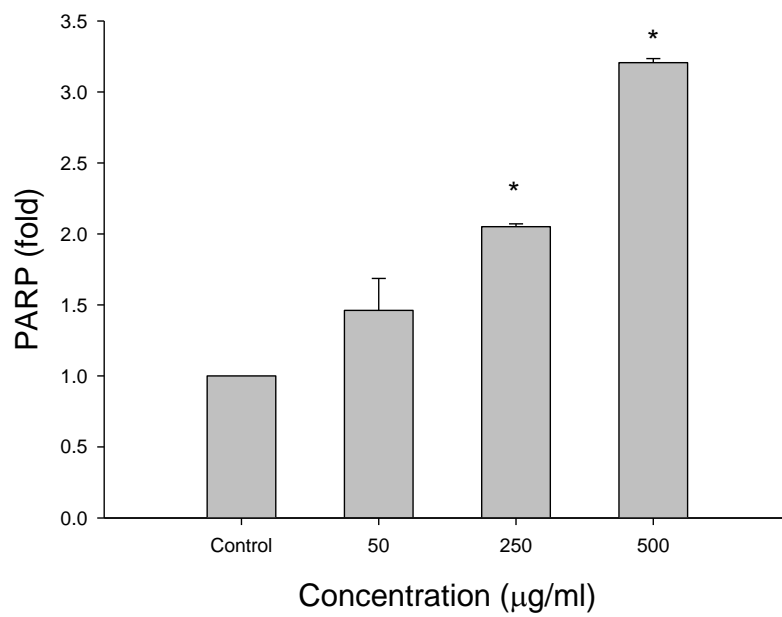


圖十七、紅藜酒精溶液萃取物對 HepG2 細胞作用 3 小時對 Bax/Bcl-2 比率之影響。
 Figure 17. Effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) on the ratios of Bax/Bcl-2 in HepG2 cells. The cells were treated with EECF for 3 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.

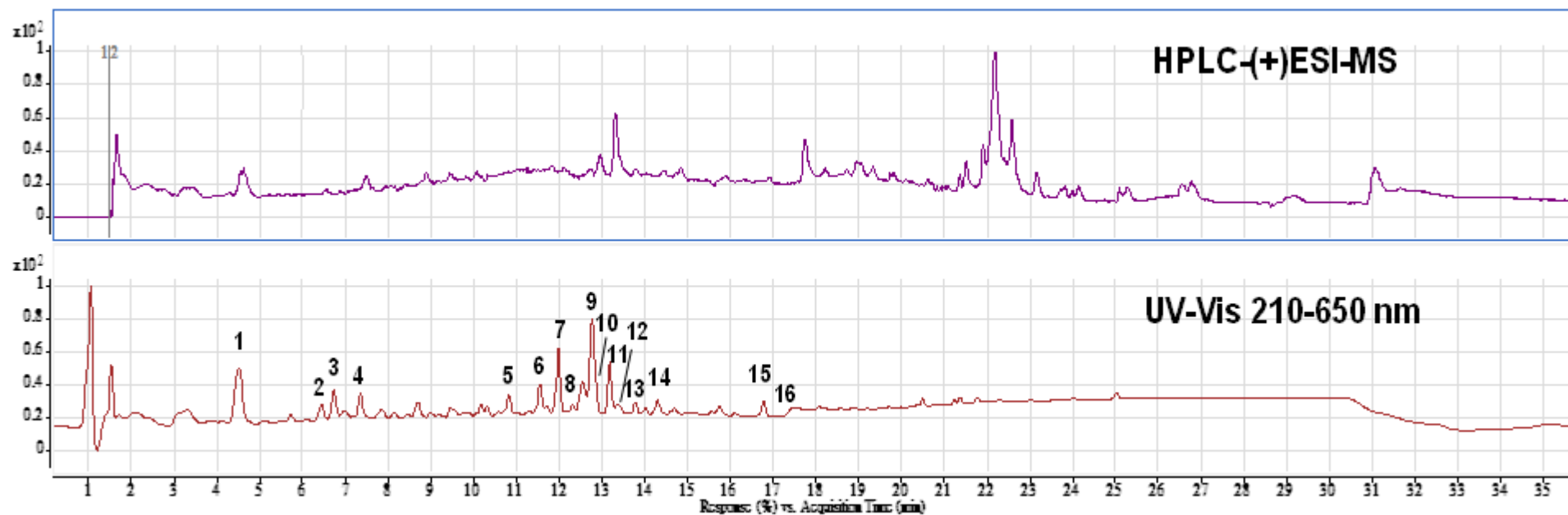


圖十八、紅藜酒精溶液萃取物對 Hep G2 細胞作用 32 小時對 caspase-3 生成影響。
 Figure 18. Effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) on caspase 3 activity in HepG2

cells. The cells were treated with EECF for 32 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.



圖十九、紅藜酒精溶液萃取物對 HepG2 細胞作用 32 小時對 PARP 裂解影響。
Figure 19. Effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) on PARP cleavage in HepG2 cells. The cells were treated with EECF for 32 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.



圖二十、紅藜酒精溶液萃取物經 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 之分析。

Figure 20. Total ion chromatograms of LC/MS analysis in positive electrospray ionization and HPLC-photodiode array detection chromatograms at full scan of 210-600 nm from aqueous ethanol extract of Djulis. Peak numbers are referred to Table 8.

表八 紅藜酒精溶液萃取物光譜分析

Table 8. Retention time, UV-Vis and Mass spectral characteristics of the ethanol extract of Djulis (*Chenopodium formosaneum*)

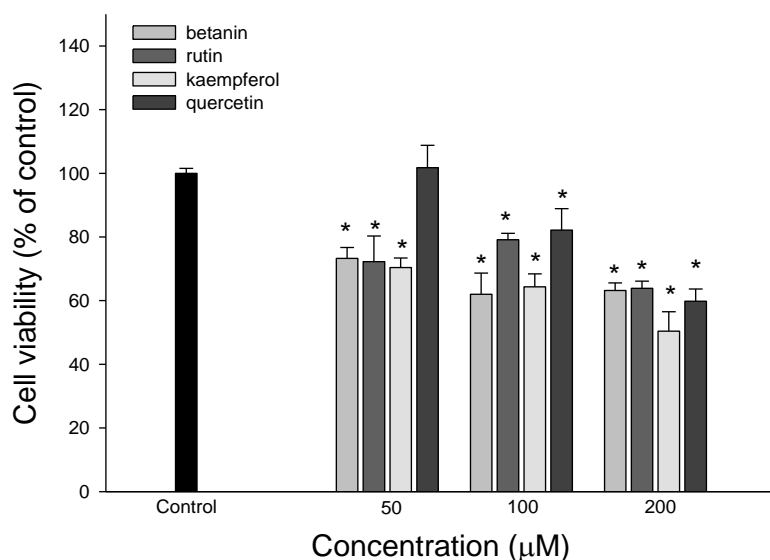
Peak No.	Compound	t_R (min)	λ_{max} (nm)	[M + H] ⁺	Amount (mg/g) ^d
1	protocatechuic acid derivatives	4.67	262, 234	285	33.86
2	unknown	6.61	252,290,532	353[M + Na] ⁺	7.40
3	betanin ^a	6.89	534, 274	551	10.40
4	isobetanin ^b	7.47	534, 236	551	7.75
5	unknown	10.87	315,535	773	6.16
6	quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	11.58	254, 354	757	9.31
7	quercetin-3- <i>O</i> -deoxy-hexose- <i>O</i> -hexose- <i>O</i> -pentoside	12.01	254, 352	743	21.40
8	kaempferol derivative ^c	12.52	268, 348,236sh	697	1.53
9	rutin ^a	12.77	222,256,352	611	26.66
10	unknown	12.85	222,280	245[M + H] ⁻	6.89
11	20-hydroxyecdysone	13.18	246,224sh	481	14.45
12	kaempferol-3,7-di- <i>O</i> -rhamnoside ^c	13.38	350,266,234	579	2.08
13	kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside ^a	13.77	267,350,235sh	595	3.85
14	unknown	14.27	222,256,348	551	5.48
15	unknown	16.70	222,312,412	659	5.36
16	quercetin	17.38	222,370	303	2.41

^aThe identification was confirmed further by authentic compound.

^bCompounds were tentatively identified according to mass spectra and the matched data.

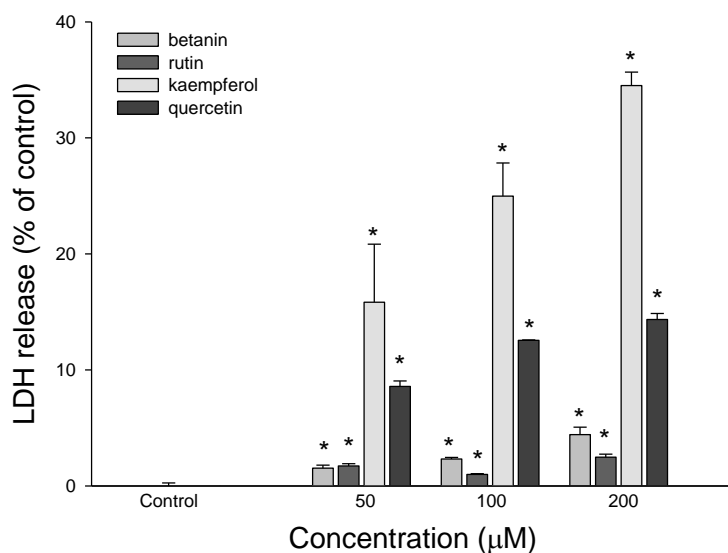
^cCompounds were limitedly identified from mass spectra and UV-visible absorbance spectra.

^dPeak 4 was 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 ethanolic extracts of Djulis (EECF).



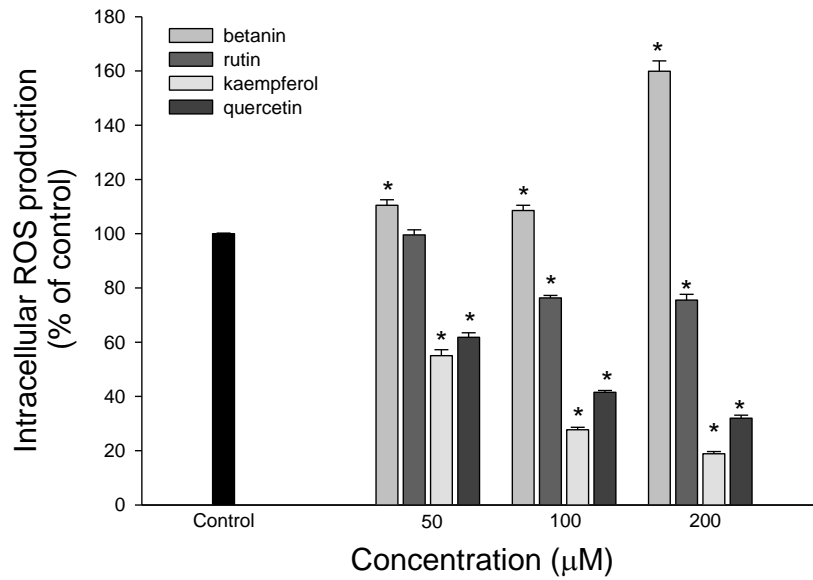
圖二十一、Betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對 HepG2 細胞反應 72 小時之細胞生存性之影響。

Figure 21. The effect of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on HepG2 cell viability. The cells were treated with betanin, rutin, kaempferol, quercetin, respectively, for 72 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control group.



圖二十二、Betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對 Hep G2 細胞作用 72 小時對 LDH 釋放之影響。

Figure 22. The effect of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on LDH in HepG2 cells. The cells were treated with betanin, rutin, kaempferol, quercetin, respectively, for 72 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). *(p < 0.05) compared with the control group.



圖二十三、Betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對 HepG2 細胞作用 24 小時對 ROS 生成之影響。

Figure 23. The effect of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on intercellular ROS production in HepG2 cells. The cells were treated with betanin, rutin, kaempferol, quercetin, respectively, for 24 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.

表九 Betanin, rutin, kaempferol and quercetin 對 HepG2 細胞作用 72 hr 後對細胞週期影響

Table 9. The effect of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on cell cycle of HepG2 cells

		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control		76.8 ± 2.2	6.6 ± 1.1	16.4 ± 1.3
B	50 μM	76.5 ± 1.5	10.9 ± 0.5*	12.6 ± 2.0*
	100 μM	78.4 ± 0.9	11.6 ± 0.7*	9.9 ± 1.5*
	200 μM	78.2 ± 2.4	9.3 ± 0.8*	12.5 ± 2.2
R	50 μM	80.0 ± 1.5	12.4 ± 5.1*	10.5 ± 1.0*
	100 μM	78.9 ± 1.9	10.0 ± 0.6*	11.0 ± 1.4*
	200 μM	80.6 ± 1.4	9.7 ± 1.0*	9.6 ± 0.8*
K	50 μM	81.8 ± 1.0*	8.7 ± 0.9	9.5 ± 0.6*
	100 μM	66.0 ± 3.0*	9.2 ± 0.7*	24.8 ± 3.0*
	200 μM	61.1 ± 5.7*	15.9 ± 3.8*	31.2 ± 3.8*
Q	50 μM	75.8 ± 3.2	9.5 ± 3.1	14.6 ± 3.5
	100 μM	43.8 ± 6.6*	12.7 ± 3.5*	43.3 ± 3.4*
	200 μM	23.3 ± 3.1*	32.5 ± 0.1*	44.3 ± 3.0*

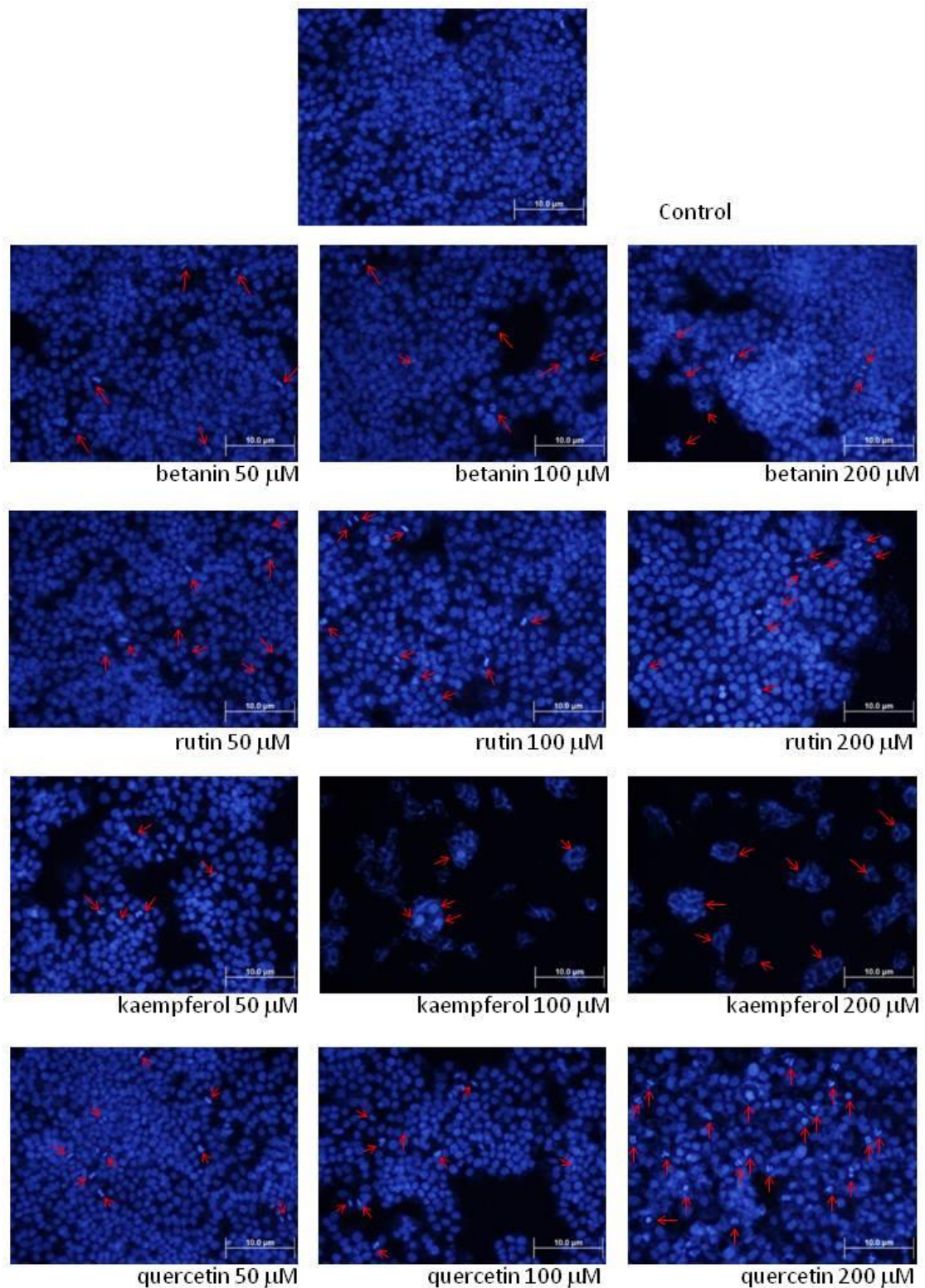
The cells were incubated with betanin (B), rutin (R), kaempferol (K) and quercetin (Q), respectively, for 72 h. Data are presented by means ± SD (n=3). * (p < 0.05) compared with the control group.

表十、Betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對細胞凋亡與壞死之影響

Table 10. Effect of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on apoptosis in HepG2 cells

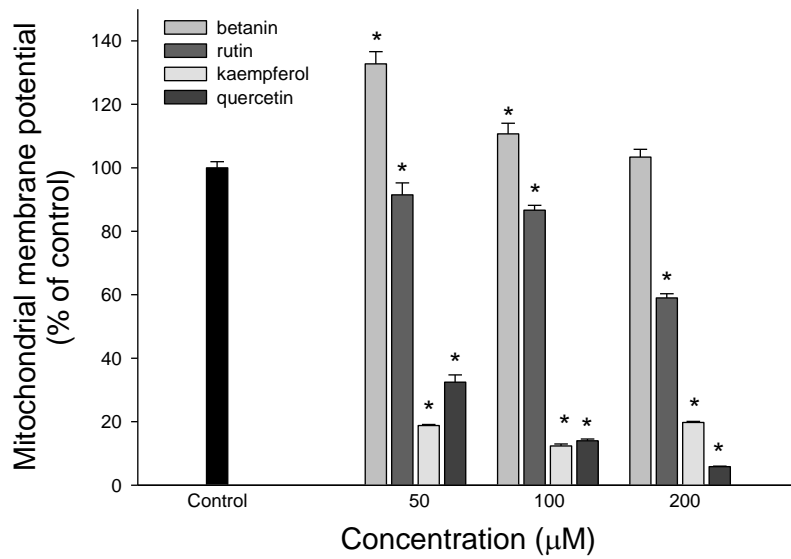
		Necrosis	Late apoptosis	Early apoptosis	Live
Control		0.0 ± 0.0	0.0±0.0	3.9±0.3	96.1±0.4
B	50 μM	0.2±0.1*	0.3±0.4	3.4±0.5	96.4±0.5
	100 μM	0.7±0.3*	0.9±0.2*	11.0±1.7*	87.4±2.0*
	200 μM	0.1±0.1	0.8±0.1*	25.7±2.7*	73.5±2.0*
R	50 μM	0.8±0.3*	0.2±0.1	5.4±0.7*	93.6±0.9*
	100 μM	0.4±0.3*	0.4±0.1*	7.0±0.5*	92.2±0.6*
	200 μM	0.1±0.0	0.7±0.0*	27.1±3.5*	72.2±3.5*
K	50 μM	0.9±0.2*	0.7±0.3*	9.2±0.7*	89.2±0.5*
	100 μM	0.1±0.1	6.3±1.5*	54.5±6.5*	35.4±0.2*
	200 μM	0.1±0.1	39.3±6.9*	54.2±3.7*	6.4±3.2*
Q	50 μM	4.6±1.1*	6.6±1.9*	16.1±1.7*	72.6±3.2*
	100 μM	3.6±1.9*	23.4±5.6*	18.3±3.3*	54.8±5.7*
	200 μM	0.5±0.1*	65.9±4.3*	27.2±2.6*	6.5±1.8*

The cells were exposed to betanin (B), rutin (R), kaempferol (K) and quercetin (Q), receptively, for 72 hr. The cells were harvested and stained with annexin V-FITC and propidium iodide (PI). Data are presented by means ± SD (n=3). * (p < 0.05) compared with the control group.



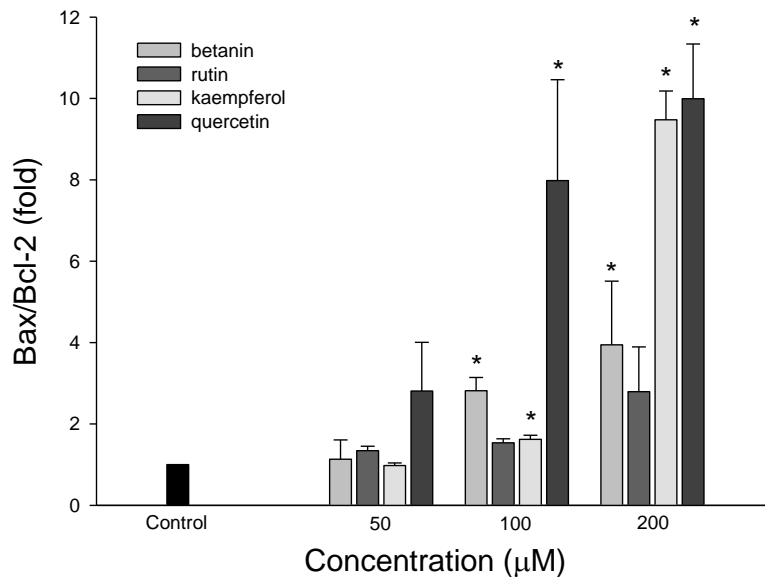
圖二十四、Betanin、rutin、kaempferol、quercetin 與 HepG2 細胞作用 72 小時對 apoptosis 影響。

Figure 24. Induction of apoptosis by betanin, rutin, kaempferol and quercetin in HepG2 cells. The cells were treated with betanin, rutin, kaempferol and quercetin (50-200 μM), respectively, for 72 h. The DAPI-stained cells were evaluated using fluorescence microscopy (400 x). The arrow indicated apoptotic cells.



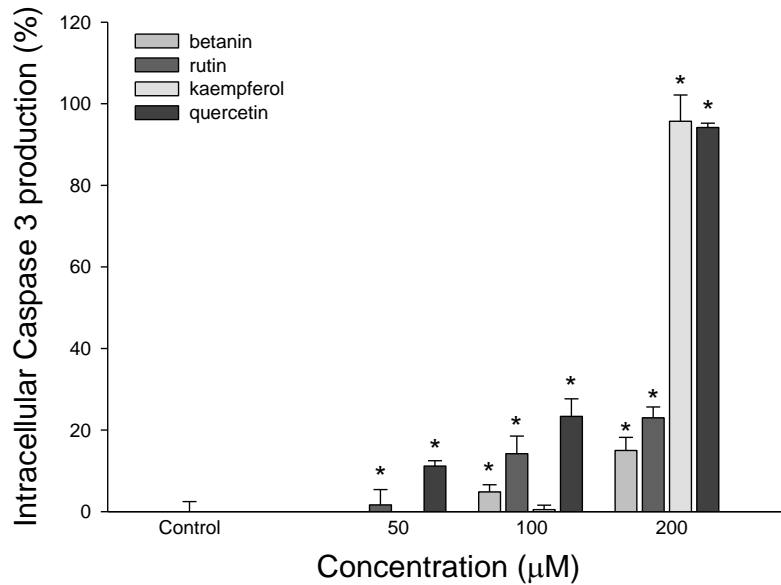
圖二十五、Betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對 HepG2 細胞作用 24 小時對粒線體膜電位影響。

Figure 25. The effect of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on mitochondrial membrane potential in HepG2 cells. The cells were treated with betanin, rutin, kaempferol, quercetin, respectively, for 24 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.



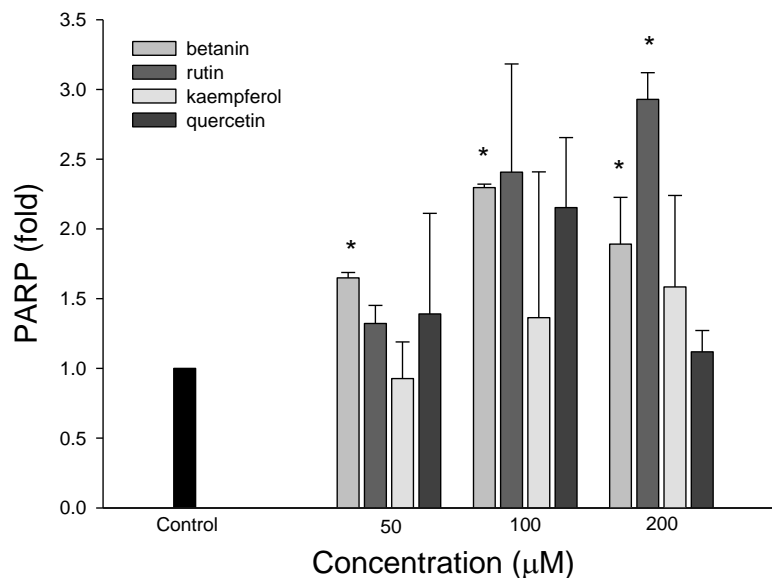
圖二十六、Betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對 HepG2 細胞作用 48 小時對 Bax/Bcl-2 比率之影響。

Figure 26. Effect of Betanin, rutin, kaempferol and quercetin on the ratios of Bax/Bcl-2 in HepG2 cells. The cells were treated with betanin, rutin, kaempferol and quercetin (50-200 μ M), respectively, for 48 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.



圖二十七、Betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對 Hep G2 細胞作用 32 小時對 caspase-3 生成影響。

Figure 27. The effect of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on caspase 3 activity in HepG2 cells. The cells were treated with betanin, rutin, kaempferol, quercetin, respectively, for 32 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.



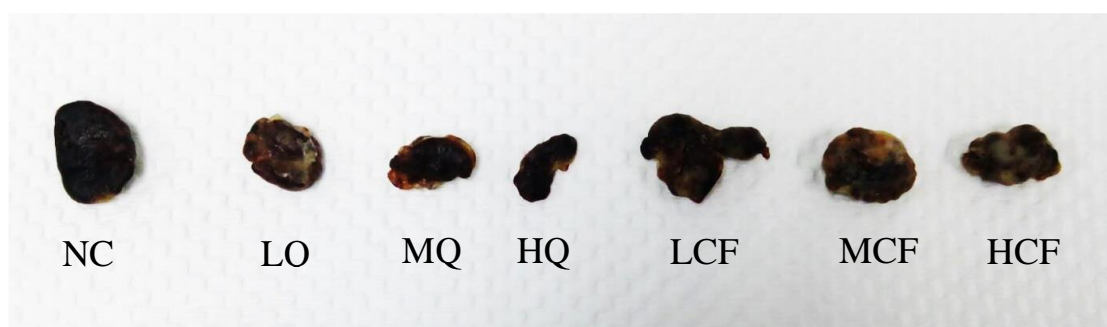
圖二十八、Betanin、rutin、kaempferol、quercetin 對 Hep G2 細胞作用 48 小時對 PARP 裂解影響。

Figure 28. Effect of ethanolic extracts of Betanin, rutin, kaempferol and quercetin on PARP cleavage in HepG2 cells. The cells were treated with betanin, rutin, kaempferol and quercetin (50-200 μ M), respectively, for 48 h. Data are presented by means \pm SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.



圖二十九、紅藜酒精溶液萃取物與 quercetin 抑制肝腫瘤作用。

Figure 29. Effect of ethanolic extracts of Djulis (EECF) and quercetin on the growth of xenografted HepG2 tumour tissue in nude mice: Control (C) and negative control (NC) indicate normal nude mice with normal feed and tumor injected nude mice without test sample treatment, respectively. The different doses of EECF and quercetin were administered orally for 21 consecutive days, starting the day after implantation of tumor cells. Visible tumor sizes on day 21 after injection of indicated HepG2 cells. C: control; NC: negative control; LQ: quercetin (10 mg/kg bw); MQ: quercetin (20 mg/kg bw); HQ: quercetin (40 mg/kg bw); LCF: EECF (25 mg/kg bw); MCF: EECF (50 mg/kg bw); HCF: EECF (100 mg/kg bw).



圖三十、紅藜酒精溶液萃取物與 quercetin 抑制肝腫瘤作用之腫瘤實體照片。

Figure 30. The photographs of a solid tumor. NC: negative control; LQ: quercetin (10 mg/kg bw); MQ: quercetin (20 mg/kg bw); HQ: quercetin (40 mg/kg bw); LCF: EECF (25 mg/kg bw); MCF: EECF (50 mg/kg bw); HCF: EECF (100 mg/kg bw).

表十一 紅藜酒精溶液萃取物及 Quercetin 對 BALB/c (nu/nu)裸鼠異種移植腫瘤生長的抑制作用

Table 11. Inhibitory effect of EECF and Quercetin on growth of tumor xenografts in BALB/c (nu/nu) nude mice

Groups	Body weight (g)	Tumor	
		Volume (mm ³)	Volume (of Negative control %)
Control + Physiological saline	22.22 ± 0.78	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Negative control +HepG2	21.60 ± 0.51	139.77 ± 28.32 [#]	100.00 ± 20.26 [#]
LQ (quercetin 5mg/kg bw) +HepG2	21.65 ± 0.30	112.84 ± 26.18	80.74 ± 18.73
MQ (quercetin 20mg/kg bw) +HepG2	20.61 ± 0.50	77.66 ± 18.40*	55.57 ± 13.16*
HQ (quercetin 40mg/kg bw) +HepG2	21.06 ± 0.82	43.93 ± 4.00*	31.43 ± 2.86*
LCF (EECF 25mg/kg bw) +HepG2	21.25 ± 0.77	139.09 ± 34.81	99.51 ± 24.91
MCF (EECF 50mg/kg bw) +HepG2	20.49 ± 0.93	117.06 ± 33.28	83.75 ± 23.71
HCF(EECF100mg/kg bw) +HepG2	21.34 ± 0.19	84.74 ± 16.44*	60.62 ± 11.77*

Values represent the mean ± SEM (n = 5). Results were statistically analyzed with Dunnett's test. [#](p<0.05), compared to the control, and * (p<0.05), compared to the negative control.

陸、引用文獻

- 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。
- Chen, S.Y., Chu, C. C., Chyau, .C.C., Yang, J.W., Duh, P.D*. 2019. Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds affect vasodilation, angiotensin converting enzyme activity, and hypertension. *Food Bioscience* 32, 100469.
- Chu, C.C., Chen, S.Y., Chyau, C.C., Fu, Z.H., Liu, C.C., Duh, P.D*. 2016. Protective effect of Djulis (*Chenopodium formosaneum*) and its bioactive compounds protect against carbon tetrachloride-induced liver injury, *in vivo*. *J. Functional Foods* 26, 585-597.
- Chyau, C.C., Chu, C.C., Chen, S.Y., Duh, P.D. 2015. Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds protect against oxidative stress in human HepG2 cells. *J. Functional Foods* 18, 159-170.
- Dirsch, V.M., Kiemer, A.K., Wagner, H., Vollmar, A.M. 1998. Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric oxide synthase. *Atherosclerosis* 139, 333-339.
- Ramirez-Zacarias, J. L., Castro-Munozledo, F., Kuri-Harcuch, W. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intercytoplasmic lipids with Oil Red O. *Histochemistry* 97, 493-497.
- Sowers, J. R. 2003. Obesity as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Med.* 115, 37s-41s.
- Tripathi, M.; Singh, B.K.; Kakkar, S.P. 2009. Glycyrrhizic acid modulates t-BHP induced apoptosis in primary rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 47, 339-347.
- Tsai, P.J., Chen, Y.S., Sheu, C.H., Chen, C.Y. 2011. Effect of nanogrinding on the pigment and bioactivity of djulis (*Chenopodium formosanum* Koidz.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1814-1820.
- WHO, 2019; <https://www.who.int/zh/news-room/detail/15-07-2019-world-hunger-is-still-not-going-down-after-three-years-and-obesity-is-still-growing-un-report>.

柒、附錄:已發表研發成果

- Chen, J.Y., Chu, C.-C., Chen, S.-Y., Chu, H.L., Duh, P.D*. 2019. The Inhibitory Effect of Betanin on Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Food and Nutrition Research* 7 (6), 447-451.
- Chen, S.Y., Chu, C. C., Lin, Y. C., Duh, P. D*. 2019. Djulis (*Chenopodium formosanum*) and Its Bioactive Compounds for Management of Hyperlipidemia and Hyperglycemia in High-Fat Diet-Fed Mice. *Journal of Food and Nutrition Research* 7 (6), 452-457.
- Chyau C.C., Chu C.C.,Chen S.Y., Duh P.D*. 2018. The Inhibitory Effects of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and Its Bioactive Compounds on Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecules* 23, 1780; doi:10.3390

已發表研發成果參考文獻

- Chen, S.Y., Chu, C. C., Chyau, .C.C., Yang, J.W., Duh, P.D*. 2019. Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds affect vasodilation, angiotensin converting enzyme activity, and hypertension. *Food Bioscience* 32, 100469.

- Chen, S.Y., Chu, C. C., Jiang, C. L, Duh, P. D*. 2019. The Vasodilating Effect and Angiotensin Converting Enzyme Inhibition Activity of Three Dietary Flavonols: Comparison between Myricetin, Quercetin and Morin, *in vitro*. Journal of Food and Nutrition Research 7 (5), 347-354.
- Chen, S.Y. Chu,C.C., Chyau,C.C., Fu, Z.H., Duh, P.D*. 2018. Effect of water extract of Djulis (*Chenopodium formosaneum*) and its bioactive compounds on alcohol-induced liver damage in rats. International Journal of Food and Nutritional Science 5(1), 55-63.
- Chen, J.Y., Chu, C.C., Chen, S.Y., Duh, P.D*. 2018. Inhibitory effect on lipid accumulation: comparison between two polymethoxyflavones, tangeretin and nobiletin, and one flavonoid, hesperetin, in 3T3-L1 adipocytes. Biomedical Journal of Scientific Technical Research DOI: 10.26717/BJSTR.2018.03.000853.
- Duh, PD , Lin, TP , Huang, SC, Chen, SY*, Chu, CC , Chen,J Y, Chen, C H*. 2018. Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Polygonum Cuspidatum and its Bioactive Compound, Emodin, in Colorectal Carcinoma HT-29 cells. International Journal of Food and Nutritional Science DOI: 10.15436/2377-0619.18.1731.
- Chu, C.C., Chen, S.Y., Chyau, C.C., Fu, Z.H., Duh, P.D*. 2017. Antiproliferative effect of sweet orange peel and its bioactive compounds against human hepatoma cells, *in vitro* and *in vivo*. J. Functional Foods 33, 363-375.
- Chu, C.C., Wu, W.S., Shieh, J.P., Chu, H.L., Lee, C.P., Duh, P.D*. 2017. The anti-inflammatory and vasodilating effects of three selected dietary organic sulfur compounds from allium species. J. Functional Biomaterials. 8(1), 5; doi:10.3390/jfb8010005
- Chu, C.C., Chen, S.Y., Chyau, C.C., Fu, Z.H., Liu, C.C., Duh, P.D*. 2016. Protective effect of Djulis (*Chenopodium formosaneum*) and its bioactive compounds protect against carbon tetrachloride-induced liver injury, *in vivo*. J. Functional Foods 26, 585-597.

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）。

近年來，國人對具有機能性或養生食材之喜好及需求性也更勝以往。據此，具生理功能之機能保健食品於焉蓬勃發展。隨著生活方式的日漸西化，國人肥胖的盛行率逐漸增加，且越來越多的證據指出，肥胖與許多疾病相關。另外，國人罹患肝臟疾病及肝癌之比率仍居高不下，如何降低肥胖與肝癌之罹患率，長久以來一直是產官學研努力的目標。

由本研究成果顯示：紅藜經細胞與動物試驗結果證實藜酒精溶液萃取物能有效抑制 3T3-L1 脂肪細胞之脂質生成，雖然無法降低小鼠肥胖，惟可顯著降低血脂。再者，紅藜酒精溶液萃取物具有抑制肝癌細胞之功能。上述紅藜之生物功能與其所含活性成分有關。綜合上述三年之研究結果，證實紅藜不僅有降脂效果，亦具有抗肝腫瘤功效。

本研究經三年有系統逐一依原進度完成紅藜及其活性成分對脂肪細胞抑制效應與抗肝腫瘤活性，已順利達成預定目標，且參加國際研討會並已刊登三篇論文於國際學術期刊，第四篇正撰寫中。本計畫研發成果將大為提昇紅藜之應用價值，影響所及，將使紅藜之獲益將更極大化。再者，本計畫所獲得一系列成果不僅可廣泛讓消費者周知其保健性，更可提供於保健食品及醫藥界之參考，對國人健康之維護極具有意義。

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_____

(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)

附件四

科技部補助專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：杜平惠				計畫編號：MOST 105 - 320 - B - 041 - 001 - MY3				
計畫名稱：紅藜及其活性成分對脂肪細胞之 影響及抗肝腫瘤之研究								
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			篇	請附期刊資訊。		
		研討會論文						
		專書			本	請附專書資訊。		
		專書論文			章	請附專書論文資訊。		
		技術報告			篇			
		其他			篇			
	智慧財產權及成果	專利	發明專利	申請中		件	請附佐證資料，如申請案號。	
				已獲得			請附佐證資料，如獲證案號。	
			新型/設計專利					
		商標權						
		營業秘密						
		積體電路電路布局權						
		著作權						
		品種權						
	其他							
技術移轉		件數			件			

		收入		千元	<p>1. 依「科技部科學技術研究發展成果歸屬及運用辦法」第 2 條規定，研發成果收入係指執行研究發展之單位因管理及運用研發成果所獲得之授權金、權利金、獎金、股權或其他權益。</p> <p>2. 請註明合約金額。</p>
國外	學術性論文	期刊論文	3	篇	<p>Chen, J.Y., Chu, C.-C., Chen, S.-Y., Chu, H.L., Duh, P.D*. 2019. The Inhibitory Effect of Betanin on Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. <i>Journal of Food and Nutrition Research</i> 7 (6), 447-451.</p> <p>Chen, S.Y., Chu, C. C., Lin, Y. C., Duh, P. D*. 2019. Djulis (<i>Chenopodium formosanum</i>) and Its Bioactive Compounds for Management of Hyperlipidemia and Hyperglycemia in High-Fat Diet-Fed Mice. <i>Journal of Food and Nutrition Research</i> 7 (6), 452-457.</p> <p>Chyau C.C., Chu C.C., Chen S.Y., Duh P.D*. 2018. The Inhibitory Effects of Djulis (<i>Chenopodium formosanum</i>) and Its Bioactive Compounds on Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. <i>Molecules</i> 23, 1780; doi:10.3390</p>

		研討會論文	6	<p>Pin-Der Duh, Shih-Ying Chen, Yi-Chiang Lin, Chin-Chen Chu.. The effect of Djulis (Chenopodium formosanum) and its bioactive compounds on hyperlipidemia in high-fat-fed mice. The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia)-The New Era Redox Research. Japan, Kyoto, 2018.04-07.</p> <p>Shih-Ying Chen, Chin-Chen Chu, Charng-Cherng Chyau, Jing-Wen Yang, Jen-Yin Chen</p> <p>Pin-Der Duh. The antihypertensive effects of Djulis (Chenopodium formosanum) and its bioactive compounds, in vitro and in vivo.2018 Global Conference on Engineering and Applied Science (GCEAS), Japan, Tokyo, 2018.07.10-12.</p> <p>Shih-Ying Chen, Chin-Chen Chu,Charng-Cherng Chyau, Zi-Han Fu, Jen-Yin Chen, Pin-Der Duh,* Effect of Water Extract of Djulis (Chenopodium formosaneum) and its Bioactive Compounds on Alcohol-induced Liver Damage in Rats. The International Society for Nutraceutical and Functional Foods , ISNFF2017 : Platform for Foods , Nutrition and Medical Science. South Korea, Gunsan. 2017, 10. 22-25.</p> <p>Shih-Ying Chen, Chin-Chen Chu, Tsuey-Pin Lin, Chung-</p>
--	--	-------	---	---

					<p>Lin Jiang, Pin-Der Duh. Vasodilative effect and angiotensin converting enzyme inhibitory activity from selected dietary phenolic compounds, 9th International Workshop on Anthocyanins, 2017, 02.22-24. Auckland, New Zealand.</p> <p>Pin-Der Duh, Tsuey-Pin Lin, Chin-Chen Chu, Ja-Ping Shieh, Chin-Hui Chen, Shu-Ching Huang and Shih-Ying Chen, Antiproliferative and apoptosis effects of Polygonum cuspidatum and its bioactive compound, in colorectal carcinoma HT-29 cells, International Symposium on Natural Products for Future 2016 Tokushima, ISNPF 2016), 2016, 09.01-09.04.</p> <p>Chu, C.C., Wu, W.S., Shieh, J.P., Chu, H.L., Lee, C.P., Duh, P.D. Anti-inflammatory and Vasodilating Effects of Three Selected Dietary Organic Sulfur compounds from Allium species 2016 International Forum-Agriculture, Biology, and Life Science (IFABL), Kurume, Japan, 2016, 08.05-08.08.</p>
		專書		本	請附專書資訊。
		專書論文		章	請附專書論文資訊。
		技術報告		篇	
		其他		篇	
智慧財產 權及成果	專利	發明專利	申請中	件	請附佐證資料，如申請案號。
			已獲得		請附佐證資料，如獲證案號。
		新型/設計專利			
		商標權			

		營業秘密			
		積體電路電路布局權			
		著作權			
		品種權			
		其他			
	技術移轉	件數		件	
收入			千元	1. 依「科技部科學技術研究發展成果歸屬及運用辦法」第 2 條規定，研發成果收入係指執行研究發展之單位因管理及運用研發成果所獲得之授權金、權利金、價金、股權或其他權益。 2. 請註明合約金額。	
參與計畫人力	本國籍	大專生		人次	
		碩士生			
		博士生			
		博士後研究員			
		專任助理	1		
	非本國籍	大專生			
		碩士生			
		博士生			
		博士後研究員			
		專任助理			
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。)					

行政院科技部補助國內專家學者出席國際學術會議報告

2017 年 3 月 14 日

報告人姓名	杜平惠	服務機構	嘉南藥理大學 食品科技系	職稱	教授
會議時間 地點	2017/2/22-24 紐西蘭 奧克蘭	本會核定 補助文號	105-2320-B-041 -001 -MY3		
會議名稱	(中文) 第 9 屆國際花青素會議 (英文) 9 th International Workshop on Anthocyanins, 2017				

發表 論文 題目	(中文) 膳食酚類化合物之血管擴張效應與血管緊縮素轉換酶抑制活性 (英文) Vasodilative effect and angiotensin converting enzyme inhibitory activity from selected dietary phenolic compounds
----------------	---

一、參加會議經過

第九屆花青素國際會議(9th International Workshop on Anthocyanins, IWA) 自 2017,2,22~2017,2,24 於紐西蘭之奧克蘭市舉行。本次會議主題為花青素,探討範圍涵蓋:(1)Phytochemistry AND Analysis (2) Biosynthesis And Genetics (3) Application In Food and Industry (4) Horticulture And Floriculture (5) Human Health (6) Ecology, Function And Evolution (7) Others。大會共安排 12 場次計 35 口頭論文演講及 29 篇壁報參展論文。由於集中於花青素的主題,計有大約十幾個國家學者與業界代表參加。來自台灣只有筆者一人,中國大陸三位學者也來參加,其餘來自美、加、德、法、荷、芬蘭、日本及地主國紐西蘭等共將近百位與會,人數雖不多,惟參展之論文品質並不差。值得一提的是,大會場地只有一處,因此不需經常換地方而可專心聽演講。IWA 每二年舉辦一次會議,不重視排場,惟大會舉辦此次會議所付出的有心、用心及細心處處可見。

二、與會心得

筆者從事機能性食品研究多年,對花青素雖有瞭解,惟仍抱著學習、蒐集資料態度參加此次會議。本次討論七大主題中,與筆者研究範圍較相近者於 Food Science and Technology, Biology 與 Human Health 等,故由印象較深刻之壁報參展及口頭論文中摘錄幾篇內容如下:

大會第一場 Keynote speaker 為 Shukitt Hale 主講,其在 anthocyanin 對老人之發炎與認知上之關係上做深入研究,所得結論是花青素在為期 90 天對 60-75 歲之老人而言,具有改善認知上的效果。另一學者 Sigardson, G 提出 Hydroxycinnamic acid 會影響 Cy-derivatives 之顏色表現,而其 aromatic diacylation 與金屬結合會導致顏色變化。美籍學者 Haris, G 提出 blackberries 於儲存狀態與新鮮採收後,blackberries 及其 Cy-3 對 RAW264.7 細胞之抗發炎影響,雖然彼等探討了 NO、PGE₂ 及 COX-2 的影響性,但筆者當場向他提問為何不測 iNOS 表現,他回答是針對 NO 和 PGE₂ 為測定重點,至於 iNOS 則未測定,事後於 break time 時,其主動與筆者交談並道謝我所提問的問題。德籍 Tohge, M. T. 以基因法以及 MS/MS 鑑定 flavonoid 之代謝產物,並提出目前 flavonoid 標準物大致有 300 種之多,而含 flavonoid 之植物有 8000 種以上。日籍中部大學學者 Tsuda, P. T. 探討花青素如何誘導 Glucago-like peptide-1(GLP-1)進而降低血糖,值得一題是, Tsuda 針對分子途徑進行研究,認為 Ca²⁺之 Camk II 涉及其中。挪威籍 Jackola L. 以不同光線、溫度生合成 anthocyanin, 其中發現 bluish anthocyanidins 最具敏感性,而溫度越高,花青素產生量越多,而光線可增加 blue 及 blank nets 之花青素含量。加拿大籍 90 歲 Prof. Nozzolillo 提出有趣主題: Alternative truth about autumn color; 以過去一般傳統思維認為秋天之楓紅或秋色是因 Carotenoid 含量作祟,其實根據 HPLC 之結果,其秋天自然顏色之楓紅一片,不僅是由 Carotenoid 關係,真正原因是其他 flavonoid 含量之變化所致,她很有趣地套上一句近來很紅之美國總統川普所說”不要太相信記者媒體所報導”作為結束。山東農業大學 Hao 於 The apple BTB protein MdBT2 regulates anthocyanin biosynthesis by interacting with MdMYB1 transcription factor in response to nitrate 中提到硝酸鹽於蘋果及其他植物中經由 MdB12-MdMYB1 途徑而 regulate 花青素之含量。日籍學者 Osawa, T 提出 blackcarrant 之萃取物及其 residues 之萃取物以動物試驗證實具有降脂肪、抗發炎,另在人體試驗具護肝效應。筆者也於當場提問認為除了花青素具有上述功能外,其餘有效的 bioactive compounds 也應具有協同作用,另外,也提出詢問在人體試驗中是否針對

phase II 酵素作探討等問題。美籍教授 Monica Ginsti, M. 提出 Antioxidant, UV protection and Anti-photoaging properties of anthocyanin-pigmented lipstick formulations, and their penetration into the skin, 其中在探討 Antioxidants 及 UV-protection 時, 其以 DPPH radical 及 Tyrosinase 抑制性作為探討模式, 筆者則提出, 若以細胞模式代替上述方法將更具有說服性。荷蘭籍學者 Gill, C 提出 The potential anti-cancer effects of novel raspberry phytochemicals 時, 只針對 DNA 之氧化作用討論 raspberry 具抗癌性之過程, 筆者詢問這種抗癌機制是屬於 apoptosis 或 necrosis? 其答說這方面他並未觸及是凋亡或壞使之抗發癌性。最後一場是由 New Zealand Institute for Plant & Food Research Limited 之 Carolyn Lister 提出紐西蘭對於花青素之保健醫療效能之反對宣稱(Claims)作說明, 簡單而言, 有 3 點理由使得目前對花青素不具功能性宣稱, 理由有: 1. 具花青素之食物不具足夠證據顯示具有功能性, 2. 缺少嚴謹足夠科學數據, 3. 不具有利的生理效能。

筆者此次所提的壁報論文題目為 Vasodilative effect and angiotensin converting enzyme inhibitory activity from selected dietary phenolic compounds, 展示期間, 包括日籍學者 Tsuda, 美籍 Haris, 及大陸學者均與筆者討論所展示論文報告內容, 也提供了他們不同的見解供筆者參考。

三天大會期間, 除了聆聽了近 35 場口頭論文報告及多篇壁報論文之外, 也提出問題與講者溝通, 另外於休息及 reception party 時間和與會學者互相認識, 交換名片等。期盼這些場外之交流對筆者在未來教學研究上均能有所幫助。

二、發表論文摘要

The effects of 14 selected dietary phenolic compounds, including three flavones, seven flavonols and four phenolic acids, on vasodilative effect and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity, *in vitro*, was investigated. The results indicated that all the phenolic compounds ranging from 0 to 200 μ M, except gallic acid and caffeic acid, show no cytotoxicity to SVEC cells. Of the selected dietary phenolic compounds, myricetin, quercetin, rutin and chlorogenic acid demonstrated significant induction in the levels of NO, PGI₂, eNOS and COX-2. These four phenolic compounds showed marked inhibitory effect on ROS generation in H₂O₂-induced SVEC cells. In addition, these four phenolic compounds significantly inhibited ACE activity. Enzyme kinetic analysis revealed myricetin and chlorogenic acid are non-competitive inhibitors of ACE. The vasodilative effect and inhibition of ACE of the selected dietary phenolic compounds is associated with the structure of phenolic compounds. The substitution by more hydroxyl groups or the presence of hydroxyl groups in the B-ring of flavonoids and more hydroxyl groups in phenolic acids enhanced vasorelaxation and inhibition of ACE. Taken together, these structure-function relationships facilitate the design of new antihypertensive drugs based on phenolic compounds.

四、攜回資料名稱及內容

此次會議攜回第 5 屆國際花青素會議論文集乙冊可讓有興趣者參閱。

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：2017 年 10 月 30 日

計畫編號	MOST 105-320-B-041-001-MY3		
計畫名稱	紅藜及其活性成分對脂肪細胞之影響及抗肝腫瘤之研究		
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
會議時間	2017 年 10 月 22 日至 2017 年 10 月 25 日	會議地點	南韓 全羅北道 群山
會議名稱	(中文)2017 國際保健及營養食品協會：食品、營養與醫藥學平台 (英文) The International Society for Nutraceutical and Functional Foods, ISNFF2017 : Platform for Foods, Nutrition and Medical Science		
發表題目	(中文) 紅藜水萃取物及其活性成分對酒精誘導大鼠肝傷害之影響 (英文) Effect of Water Extract of Djulis (<i>Chenopodium formosaneum</i>) and its Bioactive Compounds on Alcohol-induced Liver Damage in Rats		

一、參加會議經過

國際保健及營養食品協會(The International Society for Nutraceutical and Functional Foods, ISNFF)於 2017 年 10 月 22-25 日在南韓全羅北道之群山市舉行 2017 年 Platform for Foods, Nutrition and Medical Science。大會主題包羅萬象，主要涵蓋保健食品，營養品，保健食品市場等相關主題。共來自 33 國家，出席人數約 800 多人。口頭論文報告計有 211 篇，而壁報論文有 635 篇，舉凡有關保健食品之專家、學者或各國博碩士生皆踴躍參加。大會場所位於群山市約 30 分車程之國際會議中心舉行，地點雖偏僻，惟大會貼心提供接駁車讓與會者來往方便。

此次大會安排的無論是口頭論文(共 7 個場地)與壁報論文及展示攤位之地點寬敞，動線通暢。另外，主辦單位以 Yong-Joou Surh 教授為主的籌備人員精心的安排，無論是論文集冊，展覽會場，餐飲及各項服務皆很到位，看得出籌備單位之細心與用心。

筆者於大會期間，分別聆聽幾場有關保健方面之口頭論文報告及駐足吸收壁報論文內容，並與報告之學者提出問題討論，印象深刻的是香港中文大學的 Zhen-Yu Chen 在口語論文:Can Dietary Antioxidants Delay the Aging? 報告後，筆者提問及其所回問答內容。簡而言之，Proferssor Chen，提出消費者宜建立“好色”的思維，也就是說要多食用不同顏色的蔬果及穀類等，對吾人健康才有幫助。另外，印尼學者 Sitompu K 在她論文:Association between Quercetin Intake and Malondialdehyde Level of Indonesian Women 報告中認為，年齡介於 19-50 歲 140 女性受試者，發現飲食中(herbs 及 species)之 Quercetin 攝取與其血液中 malondialdehyde 之含量無統計上之相關性。而筆者當場提出看法是：這些受試者所攝食的 herb 及 species 因所含不同種類之成分有干擾 Quercetin 作用所致。其他包括大會所安排演講及我國學者如張素瓊教授等之報告皆為筆者可取經之處，且值得參考。筆者此次所提的壁報論文題目為紅藜水萃取物及其活性成分對酒精誘導大鼠肝傷害之影響(Effect of Water Extract of Djulis (*Chenopodium formosaneum*) and its Bioactive Compounds on Alcohol-induced Liver Damage in Rats)，展示時間為每日上午時間。

二、與會心得

筆者於大會期間除了聆聽口頭論文與駐足觀看展示論文內容外，並提出問題與講者或展示者溝通，另外於休息及 reception 招待晚宴上也與各國專家學者相互介紹認識。這些友誼對筆者有所助益，更深信此次會議期間所獲得心得對筆者在日後研究上應有所幫助。

三、發表論文摘要

The effects of water extract of Djulis (*Chenopodium formosaneum*) (WECF) and its bioactive compounds on alcohol-induced liver damage in rats was investigated. WECF and its bioactive compounds were co-supplemented with drinking water that contained alcohol (30%) at 0.5, 1.0 and 2.5 mg/kg bw, respectively, for 90 days. WECF attenuated oxidative stress by lowering lipid peroxidation, reducing cytochrome P4502E1 (CYP2E1) activity, enhancing catalase activity, and improving histological architecture of rat liver. Rutin, kaempferol and betanin at 1.0 µg/ kg bw significantly inhibited lipid peroxidation in rat liver. Moreover, WECF at 1.0, 2.5 mg/kg bw and rutin and kaemferol at 1.0 µg/ kg bw significantly restored glutathione (GSH) in alcohol-treated rat liver. Rutin at 1.0 µg/kg bw significantly restored superoxide dismutase (SOD) activity. These results suggest that WECF has a beneficial effect in alleviating the adverse effect of alcohol and may be a potential anti-alcoholic agent for treating liver injury.

四、攜回資料名稱及內容

此次會議攜回會議論文集乙冊可讓有興趣者參閱。

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：2019 年 04 月 13 日

計畫編號	MOST 105-320-B-041-001-MY3		
計畫名稱	紅藜及其活性成分對脂肪細胞之影響及抗肝腫瘤之研究		
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
會議時間	2019 年 4 月 4 日至 2019 年 4 月 7 日	會議地點	日本京都
會議名稱	(中文)第 9 屆亞洲自由基研究雙年聯合會-氧化還原研究新時代 (英文) The 9 th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia)-The New Era Redox Research		
發表題目	(中文) 紅藜水萃取物及其活性成分對餵食高脂小鼠高血脂之影響 (英文) The effect of Djulis (<i>Chenopodium formosanum</i>) and its bioactive compounds on hyperlipidemia in high-fat-fed mice		

二、參加會議經過

第 9 屆亞洲自由基研究雙年聯合會-氧化還原研究新時代[The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia)-The New Era Redox Research]會議於 2019 年 4 月 4-7 日在日本京都之國際社區會議廳(Kyoto International Community House)舉行。本次會議主要特色在於生物性氧化還原與自由基研究以及其臨床、生技、藥學應用。舉凡 Nitric Oxide、Cancer & Cell Signaling、Inflammation & Others、Food Factors and Antioxidants、Cancer and Redox Biology、Medicine、Antioxidants、Aging 等領域，分二個會議廳舉行 78 篇口頭式演講，另闢有二處舉辦 68 篇壁報展，而大會於第一天有兩場 plenary lecture 分別為 Takaaki Akaike 之 Cysteine persulfide synthases mediate redox signaling and energy metabolism 以及 Young-Joon Surh 之 Redox regulation of breast cancer stem-like cells。大約有 300 人，來自多國專家學者參加此次會議，而筆者參加代謝方面領域。大會分有口頭與壁報論文，分別於同一棟大樓之 1 樓與 3 樓舉行，而壁報論文則於同一地點不同時段展示。會議於 7 月 4 日辦理辦到，而筆者事先已於網路上報名註冊。

筆者於大會期間，分別聆聽幾場有關 Cancer & Cell Signaling、Inflammat 之口頭論文報告及駐足吸收壁報論文內容，並與報告之學者提出

問題討論。筆者此次所提的壁報論文題目為紅藜水萃取物及其活性成分對餵食高脂小鼠高血脂之影響 The effect of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds on hyperlipidemia in high-fat-fed mice 展示時間為 4 月 6 日 5:30-6:30 時間。

二、與會心得

筆者於大會期間除了聆聽口頭論文與駐足觀看展示論文內容外，並和與會者所提出問題相互溝通，深信此次會議期間所獲心得對筆者在日後研究上應有所幫助。此次大會安排的口頭論文與壁報論地點動線通暢、論文集冊，展覽會場，各項服務尚稱到位，尤其於日本櫻花盛開期間舉辦此次會議，更讓人心曠神怡，留下美好回憶，惟美中不足是相關會議資訊之提供稍嫌薄弱。

三、發表論文摘要

Background: Hyperlipidemia causes to the crucial risk factor for cardiovascular disease. The aim of this study is to investigate the effect of Djulis (*Chenopodium formosaneum*) and its bioactive compounds on hyperlipidemia in high-fat-fed mice.

Methods: Animal experiments, determination of plasma total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), low-density-lipoprotein cholesterol (LDL-C), plasma insulin, leptin, oral glucose tolerance (OGTT).

Results: The mice were fed a high-fat diet for 12 weeks. TC, TG, and LDL-C were significantly lower in EECF at different dose (10, 25, 50 mg/kg bw), Rutin (5 mg/kg bw), betanin (5 mg/kg bw) and Quercetin (5 mg/kg bw) than in high fat (HF) group, indicating hyperlipidemia was alleviated in EECF and bioactive compounds groups. Plasma insulin and leptin of mice in HF group were significantly higher than those of mice in EECF at different dose and Rutin, Betanin and Quercetin groups. In addition, in OGTT, EECF and Rutin, Betanin and Quercetin improved glucose tolerance and ameliorated insulin response at 60 and 90 min in mice.

Conclusion: These results suggest EECF has beneficial effects on hyperlipidemia of mice induced with high-fat-fed diet, which is in part due to the bioactive compounds present in Djulis.

四、攜回資料名稱及內容

此次會議攜回會議論文集乙冊，可讓有興趣者參閱。

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：2019 年 04 月 13 日

計畫編號	MOST 105-320-B-041-001-MY3		
計畫名稱	紅藜及其活性成分對脂肪細胞之影響及抗肝腫瘤之研究		
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
會議時間	2019 年 4 月 4 日至 2019 年 4 月 7 日	會議地點	日本京都
會議名稱	(中文)第 9 屆亞洲自由基研究雙年聯合會-氧化還原研究新時代 (英文) The 9 th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia)-The New Era Redox Research		
發表題目	(中文) 紅藜水萃取物及其活性成分對餵食高脂小鼠高血脂之影響 (英文) The effect of Djulis (<i>Chenopodium formosanum</i>) and its bioactive compounds on hyperlipidemia in high-fat-fed mice		

一、參加會議經過

第 9 屆亞洲自由基研究雙年聯合會-氧化還原研究新時代[The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia)-The New Era Redox Research]會議於 2019 年 4 月 4-7 日在日本京都之國際社區會議廳(Kyoto International Community House)舉行。本次會議主要特色在於生物性氧化還原與自由基研究以及其臨床、生技、藥學應用。舉凡 Nitric Oxide、Cancer & Cell Signaling、Inflammation & Others、Food Factors and Antioxidants、Cancer and Redox Biology、Medicine、Antioxidants、Aging 等領域，分二個會議廳舉行 78 篇口頭式演講，另闢有二處舉辦 68 篇壁報展，而大會於第一天有兩場 plenary lecture 分別為 Takaaki Akaike 之 Cysteine persulfide synthases mediate redox signaling and energy metabolism 以及 Young-Joon Surh 之 Redox regulation of breast cancer stem-like cells。大約有 300 人，來自多國專家學者參加此次會議，而筆者參加代謝方面領域。大會分有口頭與壁報論文，分別於同一棟大樓之 1 樓與 3 樓舉行，而壁報論文則於同一地點不同時段展示。會議於 7 月 4 日辦理辦到，而筆者事先已於網路上報名註冊。

筆者於大會期間，分別聆聽幾場有關 Cancer & Cell Signaling、Inflammat 之口頭論文報告及駐足吸收壁報論文內容，並與報告之學者提出問題討論。筆者此次所提的壁報論文題目為紅藜水萃取物及其活性成分對餵食高脂小鼠高血脂之影響 The effect of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds on hyperlipidemia in high-fat-fed mice 展示時間為 4 月 6 日 5:30-6:30 時間。

二、與會心得

筆者於大會期間除了聆聽口頭論文與駐足觀看展示論文內容外，並和與會者所提出問題相互溝通，深信此次會議期間所獲心得對筆者在日後研究上應有所幫助。此次大會安排的口頭論文與壁報論地點動線通暢、論文集冊，展覽會場，各項服務尚稱到位，尤其於日本櫻花盛開期間舉辦此次會議，更讓人心曠神怡，留下美好回憶，惟美中不足是相關會議資訊之提供稍嫌薄弱。

三、發表論文摘要

Background: Hyperlipidemia causes to the crucial risk factor for cardiovascular disease. The aim of this study is to investigate the effect of Djulis (*Chenopodium formosaneum*) and its bioactive compounds on hyperlipidemia in high-fat-fed mice.

Methods: Animal experiments, determination of plasma total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), low-density-lipoprotein cholesterol (LDL-C), plasma insulin, leptin, oral glucose tolerance (OGTT).

Results: The mice were fed a high-fat diet for 12 weeks. TC, TG, and LDL-C were significantly lower in EECF at different dose (10, 25, 50 mg/kg bw), Rutin (5 mg/kg bw), betanin (5 mg/kg bw) and Quercetin (5 mg/kg bw) than in high fat (HF) group, indicating hyperlipidemia was alleviated in EECF and bioactive compounds groups. Plasma insulin and leptin of mice in HF group were significantly higher than those of mice in EECF at different dose and Rutin, Betanin and Quercetin groups. In addition, in OGTT, EECF and Rutin, Betanin and Quercetin improved glucose tolerance and ameliorated insulin response at 60 and 90 min in mice.

Conclusion: These results suggest EECF has beneficial effects on hyperlipidemia of mice induced with high-fat-fed diet, which is in part due to the bioactive compounds present in Djulis.

四、攜回資料名稱及內容

此次會議攜回會議論文集乙冊，可讓有興趣者參閱。

105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：105-2320-B-041-001-MY3				
計畫名稱：紅藜及其活性成分對脂肪細胞之影響及抗肝腫瘤之研究						
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	3	篇	<p>Chen, J.Y., Chu, C.-C., Chen, S.-Y., Chu, H.L., Duh, P.D*. 2019. The Inhibitory Effect of Betanin on Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. Journal of Food and Nutrition Research 7 (6), 447-451.</p> <p>Chen, S.Y., Chu, C. C., Lin, Y. C., Duh, P. D*. 2019. Djulis (Chenopodium formosanum) and Its Bioactive Compounds for Management of Hyperlipidemia and Hyperglycemia in High-Fat Diet-Fed Mice. Journal of Food and Nutrition Research 7 (6), 452-457.</p> <p>Chyau C.C., Chu C.C., Chen S.Y., Duh P.D*. 2018. The Inhibitory Effects of Djulis (Chenopodium formosanum) and Its Bioactive Compounds on Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. Molecules 23, 1780; doi:10.3390</p>

		<p>研討會論文</p>	<p>6</p>	<p>Pin-Der Duh, Shih-Ying Chen, Yi-Chiang Lin, Chin-Chen Chu.. The effect of Djulis (Chenopodium formosanum) and its bioactive compounds on hyperlipidemia in high-fat-fed mice. The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia)-The New Era Redox Research. Japan, Kyoto, 2018. 04-07.</p> <p>Shih-Ying Chen, Chin-Chen Chu, Charng-Cherng Chyau, Jing-Wen Yang, Jen-Yin Chen</p> <p>Pin-Der Duh. The antihypertensive effects of Djulis (Chenopodium formosanum) and its bioactive compounds, in vitro and in vivo. 2018 Global Conference on Engineering and Applied Science (GCEAS), Japan, Tokyo, 2018. 07. 10-12.</p> <p>Shih-Ying Chen, Chin-Chen Chu, Charng-Cherng Chyau, Zi-Han Fu, Jen-Yin Chen, Pin-Der Duh,* Effect of Water Extract of Djulis (Chenopodium formosaneum) and its Bioactive Compounds on Alcohol-induced Liver Damage in Rats. The International Society for Nutraceutical and Functional Foods · ISNFF2017 : Platform for Foods · Nutrition and Medical Science. South Korea, Gunsan. 2017, 10. 22-25.</p> <p>Shih-Ying Chen, Chin-Chen Chu, Tsuey-Pin Lin, Chung-Lin Jiang, Pin-Der Duh. Vasodilative effect and angiotensin converting enzyme inhibitory activity from selected dietary phenolic compounds, 9th International Workshop on Anthocyanins, 2017, 02. 22-24. Auckland, New Zealand.</p> <p>Pin-Der Duh, Tsuey-Pin Lin, Chin-Chen Chu, Ja-Ping Shieh, Chin-Hui Chen, Shu-Ching Huang and Shih-Ying Chen, Antiproliferative and apoptosis effects of Polygonum cuspidatum and its bioactive compound, in colorectal carcinoma HT-29 cells, International Symposium on Natural Products for</p>
--	--	--------------	----------	--

					Future 2016 Tokushima, ISNPF 2016), 2016, 09.01-09.04. Chu, C.C., Wu, W.S., Shieh, J.P., Chu, H.L., Lee, C.P., Duh, P.D. Anti-inflammatory and Vasodilating Effects of Three Selected Dietary Organic Sulfur compounds from Allium species 2016 International Forum-Agriculture, Biology, and Life Science (IFABL), Kurume, Japan, 2016, 08.05-08.08.
	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	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	參與計畫執行
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	1		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	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。)			2019台灣創新技術博覽會金牌獎 2019嘉南藥理大學核心產品發表暨創新發明競賽金牌 2018台灣創新技術博覽會金牌獎 2017台北國際發明暨技術交易展覽會金牌獎 2017第八屆IIIC國際創新發明競賽金牌獎 2016嘉南藥理大學核心產品發表暨創新發明競賽金牌與銅		

牌獎

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）

近年來，國人對具有機能性或養生食材之喜好及需求性也更勝以往。據此，具生理功能之機能保健食品於焉蓬勃發展。隨著生活方式的日漸西化，國人肥胖的盛行率逐漸增加，且越來越多的證據指出，肥胖與許多疾病相關。另外，國人罹患肝臟疾病及肝癌之比率仍居高不下，如何降低肥胖與肝癌之罹患率，長久以來一直是產官學研努力的目標。

由本研究成果顯示：紅藜經細胞與動物試驗結果證實藜酒精溶液萃取物能有效抑制3T3-L1脂肪細胞之脂質生成，雖然無法降低小鼠肥胖，惟可顯著降低血脂。再者，紅藜酒精溶液萃取物具有抑制肝癌細胞之功能。上述紅藜之生物功能與其所含活性成分有關。綜合上述三年之研究結果，證實紅藜不僅有降脂效果，亦具有抗肝腫瘤功效。

本研究經三年有系統逐一依原進度完成紅藜及其活性成分對脂肪細胞抑制效應與抗肝腫瘤活性，已順利達成預定目標，且參加國際研討會並已刊登三篇論文於國際學術期刊，第四篇正撰寫中。本計畫研發成果將大為提昇紅藜之應用價值，影響所及，將使紅藜之獲益將更極大化。再者，本計畫所獲得一系列成果不僅可廣泛讓消費者周知其保健性，更可提供於保健食品及醫藥界之參考，對國人健康之維護極具有意義。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關科技部, 原住民族委員會, 行政院農業委員會,

(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)