

科技部補助專題研究計畫報告

紅藜及其活性成分對PM2.5誘發肺部傷害之保護效應

報告類別：成果報告
計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 108-2320-B-041-001-
執行期間：108年08月01日至109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

本研究具有政策應用參考價值：☐否 ☒是，建議提供機關經濟部, 衛生福利部, 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

中 華 民 國 109 年 10 月 28 日

中文摘要：根據衛福部資料顯示，2019年國人十大死因，肺炎連續二年高居第三位，肺癌更居十大癌症之首。呼吸系統疾病已知與空氣汙染等因素有關。以空汙而言，其會加劇慢性呼吸疾病、肺癌、心臟或中風等疾病。因此，保護肺部是當今重要的議題。其中，藉由天然物以降低疾病的發生是近年來研究的重點。紅藜為台灣原住民特有的糧作，其具有顯著生物活性，惟對保護肺部之作用與機轉目前仍甚為闕如。準此，本研究乃探討紅藜與其活性成分對PM_{2.5}誘發人類肺腺癌細胞株A549細胞氧化傷害之保護作用。

由研究結果顯示，50-300 $\mu\text{g/ml}$ 之紅藜水萃取物（WECF）對A549細胞生存性不具影響性，而400 $\mu\text{g/ml}$ PM_{2.5}與A549細胞反應24小時，A549細胞存活性為68.48%，顯示400 $\mu\text{g/ml}$ PM_{2.5}抑制A549細胞生存性，惟加入WECF，A549細胞生存性提升至85%。很顯然，WECF有抑制PM_{2.5}誘發A549細胞生存下降能力，而其作用機轉與其有效降低PM_{2.5}誘發胞內ROS與TBARS生成、降低caspase-3促凋亡、提升SOD活性與GSH含量有密切關連性。再者，WECF顯著性地正向調控Nrf2及HO-1蛋白表現，且藉由JNK與ERK路徑而活化Nrf2與HO-1蛋白，進而對PM_{2.5}誘發A549細胞氧化破壞產生保護作用。

由HPLC-DAD與HPLC-MS/MS分析得知WECF含有rutin、quercetin配醣體及其它成分等共14種化合物，經活性分析，顯示rutin與quercetin可抑制PM_{2.5}誘發A549細胞生長下降現象。另外，rutin與quercetin亦可抑制PM_{2.5}誘發ROS與脂質氧化物之生成，且抑制PM_{2.5}誘發caspase-3活性之效應。再者，rutin與quercetin也具抑制PM_{2.5}誘發A549胞內降低GSH含量與SOD活性。另一方面，rutin有正向調控Nrf2蛋白表現，惟quercetin不具顯著影響性。綜合上述，紅藜水萃取物由於含有生物活性成分，使其對PM_{2.5}誘發肺部細胞A549之傷害具有保護效應。

中文關鍵詞：紅藜、芸香苷、斛皮素、人類肺癌細胞A549、氧化破壞、懸浮微粒、訊息路徑

英文摘要：According to Ministry of Health and Welfare report, among top ten causes of death in Taiwan in 2019, pneumonia is not only the third leading cause for the second consecutive years, but also its mortality increases year after year. Moreover, lung cancer is the first leading cause of cancer-related cause in Taiwan. The causes of pneumonia and lung cancer are associated with exposure of air pollution, smoking and passive smoking. Therefore, the issue of protecting lung injury or decrease in pneumonia and lung cancer is very important. Among the issues, there have many studies on the protective effects of natural products and their derived compounds against human diseases.

Djulius (*Chenopodium formosanum*) is a particular grain crop. Djulis showed significantly biological effects, in vitro and in vivo. However, the mechanism action of djulis against PM_{2.5}-induced oxidative stress in A549, a human lung adenocarcinoma cell line, remains unclear. To reveal these uncertainties, the aim of this project is to

investigate the djulis and its bioactive compounds inhibit PM2.5-induced oxidative stress in human epithelial A549 cells and the mechanism action.

The results show that WECF in the range from 50–300 µg/ml does not affect A549 cell viability and is not cytotoxicity to A549 cells. PM2.5 at 400 µg/ml significantly decreased cell viability, while treatment of A549 cells with different concentrations of WECF, the cell viability was up to 85%, compared to the cells treated with PM2.5 alone (68.48%), indicating that WECF protected cells against PM2.5-induced cytotoxicity. WECF-inhibited cytotoxicity by PM2.5 was associated with decrease in PM2.5-induced ROS generation, TBARS formation and activity of caspase-3, and increase in SOD activity and GSH contents. Western blot analysis showed that PM2.5 negatively regraded the protein expression of Nrf2 and HO-1, however, WECF significantly raised the protein expression of Nrf2 and HO-1, as compared with cells treated with PM2.5. In addition, WECF protects A549 cells from PM2.5-induced oxidative stress injury by upregulating Nrf2 and HO-1 protein expression via activation of the JNK and the ERK signaling pathways.

According to the HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis, rutin, quercetin and another twelve compounds were present in WECF. Rutin and quercetin at 1 and 5 µM significantly protected cells against PM2.5-induced cytotoxicity. Rutin and quercetin inhibited ROS generation, TBARS levels, activity of caspase-3 induced by PM2.5. In addition, rutin and quercetin significantly improved SOD activity and GSH levels in PM2.5-induced A549 cells, compared to the cells treated with PM2.5 alone. Moreover, rutin positively regulated the protein expression of Nrf2 and HO-1 as compared with cells treated with PM2.5, however, quercetin did not affect the protein expression of Nrf2 and HO-1. Taken together, WECF showed a significantly cytoprotective effect against PM2.5-induced oxidative damage of A549 cells, which may be most likely because of the bioactive compounds in WECF.

英文關鍵詞： Djulis (*Chenopodium formosanum*), rutin, quercetin, A549, a human lung adenocarcinoma cell line, oxidative damage, particulate matter, signaling pathway.

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 PM_{2.5} 誘發肺部傷害之保護效應

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：MOST 108-2320-B-041-001

執行期間：2019 年 8 月 1 日至 2020 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 109 年 9 月 22 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	7
陸、引用文獻	10
柒、附錄:已發表研發成果	36

壹、中文摘要

根據衛福部資料顯示，2019 年國人十大死因，肺炎連續二年高居第三位，肺癌更居十大癌症之首。呼吸系統疾病已知與空氣汙染等因素有關。以空汙而言，其會加劇慢性呼吸疾病、肺癌、心臟或中風等疾病。因此，保護肺部是當今重要的議題。其中，藉由天然物以降低疾病的發生是近年來研究的重點。紅藜為台灣原住民特有的糧作，其具有顯著生物活性，惟對保護肺部之作用與機轉目前仍甚為闕如。準此，本研究乃探討紅藜與其活性成分對 PM2.5 誘發人類肺腺癌細胞株 A549 細胞氧化傷害之保護作用。

由研究結果顯示，50-300 $\mu\text{g/ml}$ 之紅藜水萃取物 (WECF) 對 A549 細胞生存性不具影響性，而 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 與 A549 細胞反應 24 小時，A549 細胞存活性為 68.48%，顯示 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 抑制 A549 細胞生存性，惟加入 WECF，A549 細胞生存性提升至 85%。很顯然，WECF 有抑制 PM2.5 誘發 A549 細胞生存下降能力，而其作用機轉與其有效降低 PM2.5 誘發胞內 ROS 與 TBARS 生成、降低 caspase-3 促凋亡、提升 SOD 活性與 GSH 含量有密切關連性。再者，WECF 顯著性地正向調控 Nrf2 及 HO-1 蛋白表現，且藉由 JNK 與 ERK 路徑而活化 Nrf2 與 HO-1 蛋白，進而對 PM2.5 誘發 A549 細胞氧化破壞產生保護作用。

由 HPLC-DAD 與 HPLC-MS/MS 分析得知 WECF 含有 rutin、quercetin 配醣體及其它成分等共 14 種化合物，經活性分析，顯示 rutin 與 quercetin 可抑制 PM2.5 誘發 A549 細胞生長下降現象。另外，rutin 與 quercetin 亦可抑制 PM2.5 誘發 ROS 與脂質氧化物之生成，且抑制 PM2.5 誘發 caspase-3 活性之效應。再者，rutin 與 quercetin 也具抑制 PM2.5 誘發 A549 胞內降低 GSH 含量與 SOD 活性。另一方面，rutin 有正向調控 Nrf2 蛋白表現，惟 quercetin 不具顯著影響性。綜合上述，紅藜水萃取物由於含有生物活性成分，使其對 PM2.5 誘發肺部細胞 A549 之傷害具有保護效應。

關鍵字：紅藜、芸香苷、斛皮素、人類肺癌細胞 A549、氧化破壞、懸浮微粒、訊息路徑

貳、英文摘要

According to Ministry of Health and Welfare report, among top ten causes of death in Taiwan in 2019, pneumonia is not only the third leading cause for the second consecutive years, but also its mortality increases year after year. Moreover, lung cancer is the first leading cause of cancer-related cause in Taiwan. The causes of pneumonia and lung cancer are associated with exposure of air pollution, smoking and passive smoking. Therefore, the issue of protecting lung injury or decrease in pneumonia and lung cancer is very important. Among the issues, there have many studies on the protective effects of natural products and their derived compounds against human diseases.

Djulius (*Chenopodium formosanum*) is a particular grain crop. Djulis showed significantly biological effects, *in vitro* and *in vivo*. However, the mechanism action of djulis against PM2.5-induced oxidative stress in A549, a human lung adenocarcinoma cell line, remains unclear. To reveal these uncertainties, the aim of this project is to investigate the djulis and its bioactive compounds inhibit PM2.5-induced oxidative stress in human epithelial A549 cells and the mechanism action.

The results show that WECF in the range from 50-300 µg/ml does not affect A549 cell viability and is not cytotoxicity to A549 cells. PM2.5 at 400 µg/ml significantly decreased cell viability, while treatment of A549 cells with different concentrations of WECF, the cell viability was up to 85%, compared to the cells treated with PM2.5 alone (68.48%), indicating that WECF protected cells against PM2.5-induced cytotoxicity. WECF-inhibited cytotoxicity by PM2.5 was associated with decrease in PM2.5-induced ROS generation, TBARS formation and activity of caspase-3, and increase in SOD activity and GSH contents. Western blot analysis showed that PM2.5 negatively regulated the protein expression of Nrf2 and HO-1, however, WECF significantly raised the protein expression of Nrf2 and HO-1, as compared with cells treated with PM2.5. In addition, WECF protects A549 cells from PM2.5-induced oxidative stress injury by upregulating Nrf2 and HO-1 protein expression via activation of the JNK and the ERK signaling pathways.

According to the HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis, rutin, quercetin and another twelve compounds were present in WECF. Rutin and quercetin at 1 and 5 µM significantly protected cells against PM2.5-induced cytotoxicity. Rutin and quercetin inhibited ROS generation, TBARS levels, activity of caspase-3 induced by PM2.5. In addition, rutin and quercetin significantly improved SOD activity and GSH levels in PM2.5-induced A549 cells, compared to the cells treated with PM2.5 alone. Moreover, rutin positively regulated the protein expression of Nrf2 and HO-1 as compared with cells treated with PM2.5, however, quercetin did not affect the protein expression of Nrf2 and HO-1. Taken together, WECF showed a significantly cytoprotective effect against PM2.5-induced oxidative damage of A549 cells, which may be most likely because of the bioactive compounds in WECF.

Keywords: Djulis (*Chenopodium formosanum*), rutin, quercetin, A549, a human lung adenocarcinoma cell line, oxidative damage, particulate matter, signaling pathway.

叁、前言

空氣污染物含蓋範圍很廣，而飄浮在空氣中類似灰塵的粒狀物稱為懸浮微粒，而 PM2.5 指的是懸浮微粒小於或等於 2.5 微米之粒子。諸多的文獻證實，PM2.5 不僅會穿透肺泡，通過呼吸障壁，進入循環系統，最終分散至全身 (Feng et al., 2016)。值得一提的是，PM2.5 有較多之特殊表面，其有助於和毒性化合物結合，這些物質包括毒性金屬、揮發性有機物、多環芳香碳氫化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)、polychlorinated dibenzo-p-dioxin and furan、polychlorinated biphenyls 等 (Kouassi et al., 2010)，這些微粒子已證實對人體健康具有破壞性。因此，WHO 於 2006 年即建議將 PM2.5 列為空氣污染之指標物。諸多研究證實 PM2.5 對人體健康有負面影響，包括誘發氧化壓力、基因毒性、致突變性及發炎反應，且 PM2.5 對彼等的作用機轉也屢有所見 (Feng et al., 2016)。目前已知自由基會造成生物分子之脂質過氧化與蛋白質及核酸氧化破壞；以 PM2.5 對生物系統氧化壓力而言，其會誘發自由基一連串反應，並產生氧化壓力 (oxidative stress) 導致體內萌生毒性。

PM2.5 導致人體或動物細胞毒性的理由如下：1. PM2.5 附著自由基；2. 有機物結合在 PM2.5 上，誘發或增加體內 ROS 之生成；3. 附於 PM2.5 的重金屬，譬如 Fe、Cu、Vn 及 Mn 等可誘發或促進 Fenton reaction，進而改變相關酵素的功能性。再者，由 PM2.5 所調控發炎反應細胞所形成的氧化壓力亦可產生 ROS 及 RNS。另外，PM2.5 可影響體內抗氧化防禦系統包括降低抗氧化酵素的表現及抗氧化成分之含量及功能。以 nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) 之角色而言，其為一種對氧化還原反應敏感之轉錄因子，活化的 Nrf2 透過與氧化反應元件 (antioxidant response element, ARE) 相互作用，可活化許多代謝解讀酵素與抗氧化蛋白，亦是體內抑制癌化與對抗氧化壓力的主要防禦機制之一員 (Na and Surh, 2014)。換言之，PM2.5 會誘發並改變抗氧化酵素，譬如改變超氧因離子歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 等酵素基因之表現，最終降低此等酵素活性。其次，前人研究亦指出 Nrf2 表現被抑制或 Nrf2 基因被敲除 (knockout) 者皆會增加 PM2.5 誘發 ROS 生成現象 (Lee et al., 2004)。由此顯示 Nrf2 基因調控影響 PM2.5 誘發體內防禦系統甚鉅。另外，細胞一旦曝露於 PM2.5，其系統之氧化酵素譬如 plasma paradox myeloperoxidase 及 heme oxygenase (HO) 等活性將表現異常。以血紅素加氧酶 (HO-1) 而言，其在數種細胞內是擔任保護細胞效應之一種誘發性抗氧化酵素。而 HO-1 的數量乃受抗氧化反應元件 (ARE) 調控，而此 ARE 調控系統則與 Nrf2 之活化作用有相關聯。正常狀態下，Nrf2 被 kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap 1) 調節，而 Nrf2 被 Keap 1 限制在細胞質內，當細胞受到氧化劑譬如 PM2.5 等所誘發時，Nrf2 將脫離 Keap 1，並轉入細胞核，此時活化狀態的 Nrf2 在細胞核內將和其他同源的 Jun、Maf bzip 等轉錄因子結合為異源二聚體 (heterodimer)，並啟動 HO-1 基因之轉錄 (Yang et al., 2015)。HO-1 具有抗氧化和抗發炎效應，前人研究顯示有些植化素能透過 Nrf2 之活化促進 HO-1 基因或蛋白之表現，而 Nrf2 基因敲除之動物則無法表現此種作用 (Lee et al., 2004)。當活化之 Nrf2 進入細胞核內，與 ARE 結合後可啟動 HO-1 基因表現，進而可與 ROS 反應，達到降低氧化傷害 (Na and Surh, 2014)。換言之，若能由天然物尋求有效的植化素或有效生物活性成分藉由正向調節 Nrf2 機制，進而提升解毒或抗氧化酶之基因表現，達到提高細胞之防禦能力，此有助於吾人對於毒性氧化劑對生物體破壞之保護作用。

過去探討氧化壓力模式大抵以氧化傷害劑或毒性物誘導細胞氧化。以空汙對肺細胞之影響而言，由於空汙可能含有 PAHs、含氮物、硫化物等物質，

故前人研究大多以 benz(a)pyrene 等作為誘導劑，藉以模擬空汙對細胞氧化作用，惟此種模式過於簡單，實無法反映空汙對細胞氧化之全貌。因此，前人研究以美國國家標準暨技術研究院(National Institute of Standard & Technology, NIST)製備，且經過驗證由柴油機排氣(diesel exhaust particulate mixture)所形成的懸浮微粒(SRM1650b)視為 PM2.5 (Yang et al., 2015)，藉此作為細胞氧化傷害劑或毒性物以利誘導細胞氧化，其研發成果較具有實際性與參考價值。

紅藜為台灣特有植物，為台灣原住民特有之傳統糧作，除作為糧食混含米、麥之用，亦可作為釀酒用。尤其近年來，消費者養生觀念意識之提高，且紅藜之營養價值也漸為熟知後，紅藜的價值亦水漲船高。前人研究已證實紅藜清除自由基能力與分類含量呈正向關係(Tsai et al., 2006)。另外，敝人分別於 102-104 與 105-108 兩期共六年的科技部計畫也證實紅藜及其活性成分(rutin, kaempferol, betanin)具有抑制細胞氧化壓力(Chyau et al., 2015)、護肝效應(Chu et al., 2016; Chen et al., 2018)、減緩脂肪細胞形成(Chyau et al., 2018)、降血壓(Chen et al., 2019)與抗肝癌(Chu et al., 2020)功能。顯示紅藜具有顯著的生物活性功能，而紅藜之活性成分雖在前次科技部計畫中已分離與純化及鑑定過，惟不同收穫期、天候狀況、萃取方式等因素而影響紅藜內部變化，導致成分有所改變，這些問題在執行計畫前皆必須列入考量之重點。再者，美國國家標準暨技術研究院(National Institute of Standard & Technology, NIST)將市區塵埃(urban dust)製備成懸浮微粒(particulate matter)，其代號為 Standard Reference Material 1649b (SRM1649b)；依 SRM1649b 之組成而言，其成分含有機化合物與非有機化合物兩大類；前者有多環芳香碳氫化合物(polycyclic aromatic compounds, PAHs)、含氮多環芳香碳氫化合物(nitro-PAHs)、多氯聯苯(polychlorinated biphenyl, PCB)、含氯農藥(chlorinated pesticides)、十溴二苯醚(decabromodiphenyl ether)、戴奧辛(dioxine)類化合物等；而後者則有鎘(cadmium)、汞(mercury)、鉛(lead)等金屬。考量 PM2.5 採樣與收集不易，以及 SRM1649b 為空氣汙染性微粒物，且為認證之標準品。基於此，本計畫以 SRM1649b 作為空氣汙染源，深信此 SRM1649b 不僅可代表市區塵埃 PM2.5 懸浮微粒，更可降低實驗結果之差異性。有鑑於此，本研究以紅藜為測試樣品，先分離、純化並鑑定其活性成分，再以彼等萃取物及其代表性之活性成分探討對 PM2.5 誘發肺腺癌 A549 細胞氧化傷害之影響，並解析其作用機轉。

肆、研究方法

材料與方法

(二) 材料與藥品

1. 材料與藥品

本計畫所使用紅藜購自屏東可樂果公司；所使用試藥為一級藥品。人類肺腺癌細胞株 A549 細胞則購自食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心。城市空氣懸浮顆粒購自位於馬里蘭州蓋瑟斯堡之美國國家標準暨技術研究院 (National Institute of standard, and Technology, NIST)) 所製備且經驗證為市區塵埃懸浮微粒之 SRM1649b (standard reference material 1649b)，以下稱為 PM2.5。

2. 樣品與 PM2.5 製備

(1) 紅藜水萃取物之製備

紅藜分別以 1：10 加水煮沸 20 分鐘，過濾後，濾渣再以 1：10 水煮沸 20 分鐘，二次之濾液進行減壓濃縮乾燥，此為紅藜水萃取物(water extract of djulis WECF)。

(2) PM2.5 製備

取 50 毫克的 PM2.5 加入 1 毫升的 DMSO (dimethyl sulfoxide) 以超音波震盪器於常溫避光下震盪 2 小時, 經過 13000 g 離心 30 分鐘後無菌過濾, 收集上清液即為 PM2.5 懸浮液, 貯存於-20°C 待用。

3.HPLC/ESI-MS-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 × 100 mm; 1.8 μm particle size, Waters) 與 precolumn [ScurityGuard C18 (ODS) 2.1 mm x 2.0 mm, sub-2 μm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, U.S.A.]。移動相 A: water (含 0.1 % formic acid), B: acetonitrile (含 0.1 % formic acid), 流速為 0.3 mL/min, 溫度設為35 °C。The binary gradient elution為 0-3 min (2-5% B), 3-15 min (5-30% B), 15-20 min (30-95% B), 20-28 min (95% B)與28-30 min (95-2% B)。使用PDA 偵測器檢測全波長 210-600 nm, 各別以254, 280, 325, 375 nm 檢視。

使用光偶極排列檢測器 (phtodiode 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), 流速等設定如下: 10 L/min; nebulising gas: 30 psi. 乾燥氣體溫度為 325 °C; potential: 3500 V. 碎裂電壓(fragmentor voltage): 115 V, 碰撞電壓(collision voltage): 15 V。利用ESI-MS 與 ESI-MS/MS比較以標準品質譜以鑑定分離化合物。每一成分含量以 7-methoxyflavanone當作內標準品以定量(Chu et al., 2016)。

4. 對細胞生存性之影響

(1) 細胞培養

由液態氮筒取出 A549 細胞株迅速放置 37°C 水浴中回溫, 將細胞種入 100-mm petri dishes 培養皿中, 加入適量的培養基(90% Ham's F12K medium with 2 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate + 10% fetal bovine serum), 並於 37°C, 5% CO₂ incubator 培養, 每兩天更換一次培養液。

(2) 細胞存活試驗法 (MTT)

本試驗基於活細胞呼吸時, 其粒線體所含之去氫酵素能還原 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-3-diphenyltetrazolium bromide (MTT)生成紫色產物(formazan), 若紫色愈深, 表示細胞存活愈多, 藉此作為細胞存活之指標。測定方法簡述如下, 添加有無試驗物與細胞反應適當時間, 於 96 well plates 中加入 20 μl 的 0.1% MTT 溶液, 反應 2hr 後, 移除上層液, 再加入 100 μl DMSO 使結晶紫溶出, 以 microplate reader 測定 540 nm 下之吸光值(Dirsch et al.,1998)。

(3) 細胞滲漏率之測定

本試驗乃基於細胞一旦受損, 則所含之 lactose dehydrogenase(LDH)將滲漏至細胞外, 若測得胞外 LDH 量增加, 表示細胞死亡現象增加。測定方法依 Gebhardt 等 (1994) 所述, 依實驗設計進行試驗樣品與細胞共培養反應 30 分鐘後, 加入 PM2.5 反應適當時間後, 以市售 LDH kit 進胞外 LDH 之活性測定。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：

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

5. 對細胞氧化性之影響

(1) 細胞內活性氧之生成測定

其原理為 DCFH-DA(2', 7'-dichlorofluorescein 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，試驗樣品與細胞共培養反應 30 分鐘後，加入 PM2.5 反應適當時間後，移除 medium，加入 0.5 ml PBS(含有 DCFH-DA 50 μM) 反應 30 分鐘後，再以螢光儀測定胞內活性氧的相對量(Wu et al., 2005)。

(2) 胞內脂質過氧化物之測定

丙二醛(malondialdehyde, MDA)為脂質過氧化所產生的二級產物，當胞內脂質成分受到氧化劑氧化時，會造成脂質氧化生成 MDA。此時測定 MDA 生成量可反映出胞內氧化程度。測定方法簡述如下，試驗樣品與細胞共培養反應 30 分鐘後，加入 PM2.5 反應適當時間後，加入 BHA(最終濃度為 1 mM)，取出上述反應液，並與 TCA 和 TBA 混合，於沸水中反應 10 min，以螢光儀檢測 MDA 含量 (Ex: 530 nm, Em: 560 nm) (Chirico et al., 1993)。

6. 對胞內抗氧化物質與抗氧化酵素活性之影響

(1) 胞內 glutathione (GSH)含量之影響

測定方法簡述如下，試驗樣品與細胞共培養反應 30 分鐘後，加入 PM2.5 反應適當時間後，移除 medium，加入 0.5ml PBS (含有 CMF-DA 5μM) 反應 30 分鐘後，再以螢光儀測定胞內 GSH 含量 (Ex: 485 nm, Em: 528 nm) (Wu et al., 2005)。

(2) 對胞內 superoxide dismutase (SOD)活性之測定

使用市售 SOD assay kit 測定 SOD 活性，測定方法簡述如下，試驗樣品與細胞共培養反應 30 分鐘後，加入 PM2.5 反應適當時間後，待細胞全部刮下後，將細胞破碎，再於 10000 rpm 離心 10 分，取上清液 10 μl，加入 SOD 反應液，以分光光度計測在 0-10 分鐘內波長 405 nm 吸光值之變化。

7. 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℃ 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 ImageJ 進行分析量化。

8.統計分析

本實驗使用 Statistical Analysis System SPSS version 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

一、對細胞生長之影響

圖一為 PM2.5 與 A549 細胞反應 24 小時對細胞生存性之影響。100，200，300，與 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 對 A549 細胞作用後之存活率分別為 71.6、68.1、65.0 和 56.6%，其中 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 對 A549 細胞生存性較具影響性，基於此，本研究以 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 作為誘發 A549 細胞氧化破壞之濃度。

圖二為 WECF 與 A549 細胞反應 24 小時對細胞生存性之影響。結果顯示不同濃度 WECF (10-300 $\mu\text{g/ml}$) 對 A549 細胞之存活率皆可達 100% 以上，顯示不同濃度 WECF 對 A549 細胞生存性不具影響。由於 300 $\mu\text{g/ml}$ 濃度以下之 WECF 對 A549 細胞生存性不具影響，爰此，以 50、150 與 300 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度探討 WECF 對 PM2.5 誘發 A549 氧化傷害之影響。

由圖三顯示 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 與 A549 細胞反應 24 小時，其細胞存活性為 68.48%，顯示 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 對 A549 細胞生存性具有負面影響，惟加入 50、150 與 300 $\mu\text{g/ml}$ WECF，A549 細胞生存性提升至約 85%。很顯然，WECF 抑制 PM2.5 誘發 A549 細胞生存下降性。

圖四為 WECF 對 PM2.5 誘發 A549 細胞之毒性反應之影響，結果顯示 PM2.5 與 A549 細胞作用後，LDH 有滲漏現象，顯示 PM2.5 的確對 A549 細胞具有毒性。而不同濃度 WECF 之添加能顯著地抑制 PM2.5 誘發 A549 細胞之毒性反應。

二、對氧化壓力之影響

圖五為 WECF 對 PM2.5 誘發 A549 細胞產生 ROS 之影響。顯示 PM2.5 單獨處理 2 小時可使細胞內 ROS 產生之量為控制組之 8.68 倍，若以 50、150 與 300 $\mu\text{g/ml}$ WECF 共培養，則 ROS 產生為控制組之 7.50，6.23，5.02 倍。很明顯，不同濃

度 WECF 與單獨處理 PM2.5 之傷害組相比較，前者具有抑制 PM2.5 誘發 A549 胞內 ROS 生成之能力。

圖六為 WECF 對 PM2.5 誘發胞內 TBARS 含量之影響。結果顯示 PM2.5 單獨作用 2 小時，A549 胞內之 TBARS 含量與空白組相較顯著增加 2.38 倍，顯示 PM2.5 誘發 A549 胞內脂質氧化產物之產生。若同時處理 50、150 與 300 $\mu\text{g/ml}$ 之 WECF，則胞內之 TBARS 含量為 1.25，1.02，0.91 倍，表示 WECF 具有降低 PM2.5 誘發胞內脂質氧化產物之含量。

三、對細胞凋亡之影響

圖七為 WECF 對 PM2.5 誘發 A549 胞內 caspase-3 活性之影響。PM2.5 可使胞內之 caspase-3 活性增加，顯示 PM2.5 對 A549 細胞有促凋亡現象。若以 50、150 與 300 $\mu\text{g/ml}$ 之 WECF 處理，則 caspase-3 活性將減少至 PM2.5 組之 0.82、0.57 及 0.42 倍，顯示 WECF 有抑制 PM2.5 誘發 caspase-3 活性之效應。換言之，WECF 可抑制 PM2.5 誘發 A549 細胞凋亡特性。

四、對細胞抗氧化系統之影響與機制探討

圖八為 WECF 對 PM2.5 誘發 A549 胞內超氧歧化酶(SOD)活性之影響。PM2.5 可使胞內之 SOD 活性顯著性地降低。若以 50、150 與 300 $\mu\text{g/ml}$ 之 WECF 共培養，則 SOD 活性將隨劑量增加而顯著性增加。顯示 WECF 有抑制 PM2.5 誘發 SOD 活性下降之效應。

圖九為 WECF 對 PM2.5 誘發 A549 胞內 GSH 含量之影響。顯示 PM2.5 單獨作用 20 小時，A549 胞內之 GSH 含量與空白組相較，減少至 74.89 %，若同時處理 50、150 與 300 $\mu\text{g/ml}$ 之 WECF，胞內之 GSH 含量與空白組相較，分別為 97.14，103.65，110.90%，此結果顯示 WECF 抑制 PM2.5 誘發 A549 胞內 GSH 含量下降趨勢。

綜合上述，WECF 不僅具有抑制 PM2.5 誘發 A549 胞內氧化產物之生成，也有減緩 PM2.5 誘發 A549 胞內降低 GSH 含量與 SOD 活性功能。而 WECF 抑制 PM2.5 誘發胞內氧化破壞功能是否與啟動胞內 phase 2 酵素有關，值得進一步探討。Nrf2 為一種對氧化還原反應敏感之轉錄因子，當 Nrf2 受到氧化劑(oxidants)或植物保護化合物(chemoprotective compounds)作用，Nrf2 會脫離與 Keap1 結合，而活化的 Nrf2 會轉入細胞核，透過與氧化反應元件(antioxidant response element, ARE)相互作用，進而活化 ARE，導致許多代謝解毒酵素與抗氧化蛋白酵素，譬如 HO-1、NQO-1、 γ -GCL1 等產量增加，連帶產生抗氧化作用與解毒功能，在抑制氧化傷害等細胞防禦保護中發揮重要的作用(Yang et al., 2015)。基於此，本研究繼續進行 WECF 對 Nrf2 與 HO-1 之影響。

圖十為 WECF 對 PM2.5 誘發 A549 胞內 Nrf2 之影響。由西方點墨法分析中可看出，胞內 Nrf2 含量受 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 作用下顯著性下降，惟以 50、150 與 300 $\mu\text{g/ml}$ 之 WECF 與 A549 細胞共培養，則 Nrf2 含量將隨 WECF 劑量增加而顯著性增加。顯示被 PM2.5 誘發的 A549 細胞在 WECF 存在下有提升胞內 Nrf2 含量效應。

圖十一為 WECF 對 PM2.5 誘發 A549 胞內 HO-1 之影響。由西方點墨法分析中可看出，胞內 HO-1 蛋白表現受 PM2.5 作用下顯著性下降，惟以 150 與 300 $\mu\text{g/ml}$ 之 WECF 與 A549 細胞共培養，則 HO-1 蛋白表現將隨 WECF 劑量增加而顯著增加。HO-1 是細胞處在各種壓力下誘導產生的蛋白，由圖十一可知，A549 細胞之 HO-1 受 PM2.5 誘發而抑制其蛋白表現。而由圖十與十一結果，顯示 WECF 具有調控 Nrf2 能力，且提升 HO-1 蛋白表現，進而保護細胞免於氧化破壞。此結果可解釋前述 WECF 有抑制 PM2.5 誘發 A549 氧化破壞之效應。

為進一步瞭解 WECF 以何種路徑活化 Nrf2 與 HO-1 蛋白表現，本研究以 p38 抑制劑(SB203580, SB)、JNK 抑制劑(SP600125, SP)與 ERK 抑制劑(U-0126, U)與 WECF 存在下探討對 PM2.5 誘發 A549 細胞 Nrf2 與 HO-1 蛋白表現之影響。由圖十二結果顯示，SP+WECF+PM2.5 組與 U+WECF+PM2.5 組之 Nrf2 蛋白表現與 WECF+PM2.5 組比較有顯著下降，而 SB+WECF+PM2.5 與 WECF+PM2.5 組比較則不具顯著性差異，表示 WECF 是透過 JNK 與 ERK 路徑而活化 Nrf2。而由圖十三結果可看出，SP+WECF+PM2.5 組與 U+WECF+PM2.5 組之 HO-1 蛋白表現與 WECF+PM2.5 組比較皆有顯著下降，而 SB+WECF+PM2.5 與 WECF+PM2.5 組比較則不具顯著性差異，表示 WECF 是透過 JNK 與 ERK 路徑而活化 HO-1。圖十三與圖十二結果一致，很顯然，Nrf2 轉入細胞核，透過與氧化反應元件(antioxidant response element, ARE)相互作用，進而活化 ARE，導致抗氧化蛋白酵素譬如 HO-1 酶等產量增加，連帶產生抗氧化作用 (Na and Surh, 2014)。經此結果顯示，A549 細胞在 PM2.5 誘發氧化破壞情況下，WECF 藉由 JNK 與 ERK 路徑正向調整 Nrf2，繼而活化 HO-1 酶，最終對 PM2.5 誘發 A549 細胞氧化破壞產生保護作用。

五、成分分析

WECF 經 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 之分析，由圖十四與表一，顯示 WECF 共被純化出 14 種成分，經鑑定後計有 13 種為已知成分，其中有類黃酮的甜菜苷(betanin)，芸香苷(rutin)，quercetin(槲皮素)、山柰酚(kaempferol)及其配醣體，另有 amaranthine、phenylacetic acid derivative、20-hydroxyecdysone 等成分。由於類黃酮為熟知具生物活性成分，而 betanin 為賦予紅藜紅色之成分之一，故本研究 rutin、quercetin、kaempferol 與 betanin 作為測試物質廣續如下試驗。

六、活性成分對 PM2.5 抑制 A549 細胞生存性影響

圖十五為紅藜活性成分 rutin、kaempferol、betanin 與 quercetin 對 PM2.5 抑制 A549 細胞生存性之影響。結果顯示，由 1 與 5 μM 之 rutin 與 quercetin 有顯著性抑制 PM2.5 降低 A549 細胞生長現象，而 kaempferol 及 betanin 卻無此效應。基於此，以下試驗以 rutin 與 quercetin 為試驗成分。

七、活性成分對 PM2.5 誘發 A549 細胞氧化與凋亡之影響

圖十六為 1 與 5 μM rutin 與 quercetin 對 PM2.5 誘發 A549 細胞產生 ROS 之影響。結果顯示 rutin 與 quercetin、PM2.5 與細胞共培養 2 小時，很明顯，rutin 與 quercetin 與單獨處理 PM2.5 之傷害組相比較，rutin 與 quercetin 可減少 PM2.5 誘發 A549 活性氧之生成量。另外，PM2.5 單獨作用 2 小時，A549 胞內之 TBARS 含量與空白組相較顯著增加 2.04 倍，顯示 PM2.5 誘發 A549 胞內脂質氧化產物之產生(圖十七)。若同時處理 1 與 5 μM rutin 與 quercetin，則胞內之 TBARS 含量為 1.04，

0.93 倍，表示 rutin 與 quercetin 具有抑制 PM2.5 誘發 A549 胞內脂質氧化產物之產生。圖十八為 rutin 與 quercetin 對 PM2.5 誘發 A549 胞內 caspase-3 活性之影響，顯示 rutin 與 quercetin 有抑制 PM2.5 誘發 A549 胞內 caspase-3 活性之效應，且呈現劑量與反應性之關係。再者，rutin 與 quercetin 也有抑制 PM2.5 誘發 A549 胞內降低 SOD 活性 (圖十九)與 GSH 含量(圖二十)功能。

八、活性成分對 PM2.5 誘發 A549 細胞 Nrf2 與 HO-1 之影響

圖二十一為紅藜活性成分 rutin 與 quercetin 對 PM2.5 抑制 A549 細胞 Nrf2 之影響。由結果顯示，1 與 5 μ M 之 rutin 有增加 Nrf2 含量，顯示 A549 細胞被 PM2.5 誘發影響下，其 Nrf2 有下降現象，而以 rutin 處理則有提升效應。惟不同濃度 quercetin 對 PM2.5 誘發 A549 細胞 Nrf2 含量則不具顯著影響性。圖二十二為 rutin 與 quercetin 對 PM2.5 抑制 A549 細胞 HO-1 蛋白表現之影響。1 與 5 μ g/ml 之 rutin 有增加 Nrf2 含量之趨勢，惟不具顯著差異。再者，quercetin 對 PM2.5 誘發 A549 細胞 HO-1 含量不具顯著影響性。

由上述圖十五至圖二十一結果，顯示 rutin 與 quercetin 有抑制 PM2.5 誘發 A549 細胞氧化破壞與促凋亡效應，雖然 quercetin 對 PM2.5 誘發細胞 Nrf2 與 HO-1 蛋白表現不具影響性，惟由圖十四與表一顯示，紅藜仍含有其他生物活性成分，推測彼等可能以直接或間接相乘作用而抑制 PM2.5 誘發 A549 細胞氧化破壞。由此可解釋 WECF 抑制 PM2.5 誘發 A549 氧化破壞可能與其所含活性成分之存在有關聯性。

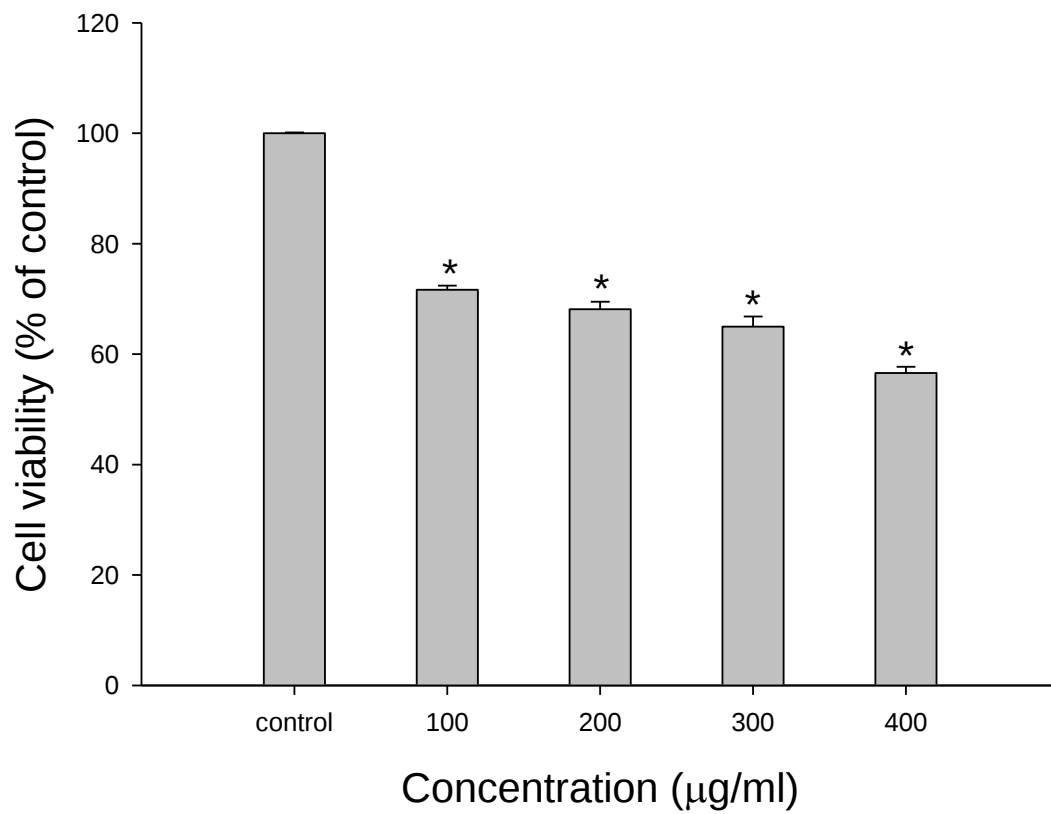
結論

綜合上述結果，紅藜在 PM2.5 誘發細胞氧化試驗中表現出保護細胞效應，而紅藜含有生物活性成分，尤其是 rutin 與 quercetin 在抑制 PM2.5 誘發氧化作用上扮演部份抑制氧化角色，惟 quercetin 對 Nrf-2 與 HO-1 蛋白表現不具顯著正調控性，顯示 WECF 具有保護細胞免於受 PM2.5 氧化傷害之效應並不完全歸因於單獨活性成分之存在，而是由紅藜所含生物活性成分以個別或彼此相乘作用所致。由本研究結果可知，紅藜及其活性成分對 PM2.5 誘發肺部細胞之傷害具有保護效應。

陸、引用文獻

- Chirico, S., Smith, C., Marchant, C., Mitchinson, M., Halliwell, B. (1993). Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free Radical Research. Communications*, 19, 51-57.
- Chu, C.C., Chen, S.Y., Chyau, C.C., Fu, Z.H., Liu, C.C., Duh, P.D. (2016). Protective effect of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds protect against carbon tetrachloride-induced liver injury, in vivo. *Journal of Functional Foods*, 26, 585-597.
- Chu, C.C., Chen, S.Y., Chyau, C.C., Wu, Y.C., Chu, H.L., Duh, P.D. Anticancer activity and mediation of apoptosis in hepatoma carcinoma cells. *Journal of Functional Foods* 75 (2020) 104225.
- Chen, S.Y., Chu, C.C., Chyau, C.C., Fu, Z.H., Duh, P.D. (2018). Effect of water extract of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds on alcohol-induced liver damage in rats. *International Journal of Food and Nutritional Science*, 5(1), 55-63.
- Chen, S.Y., Chu, C.C., Chyau, C.C., Yang, J.W., Duh, P.D. (2019). The effects of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds on vasodilation, angiotensin converting enzyme activity, and antihypertension, in vitro and in vivo.

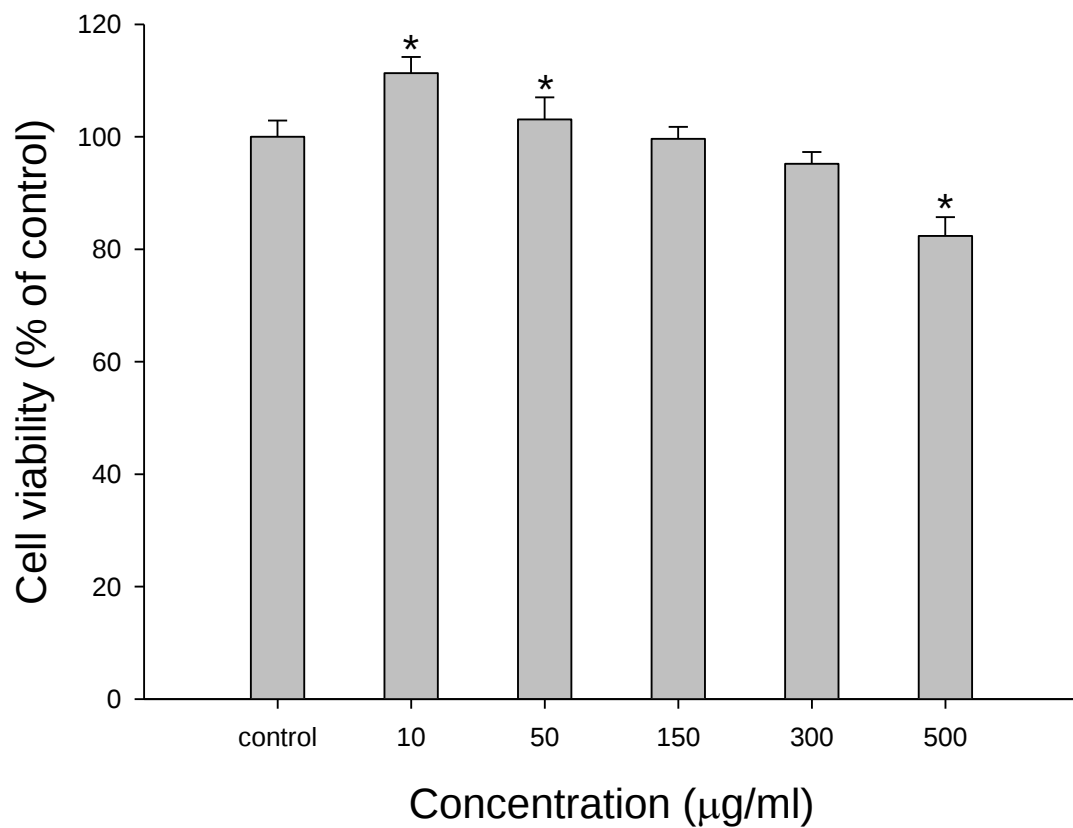
- Food Bioscience, 32, 100469. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100469>
- Chyau, C.C., Chu, C.C., Chen, S.Y., Duh, P.D. (2015). Djulis (*Chenopodium formosaneum*) and its bioactive compounds protect against oxidative stress in human HepG2 cells. *Journal of Functional Foods*, 18, 159-170.
- Chyau, 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.
- 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.
- Feng, S., Gao, D., Liao, F., Zhou, F., Wang, X. (2016). The health effects of ambient PM2.5 and potential mechanisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 67-74.
- Kouassi, K.S., Billet, S., Garçon, G., Erdin, A., Diouf, A., Cazier, F., Djaman, J., Courcot, D., Shirali, P. (2010). Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM2.5) collected in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Toxicology*, 30, 310-320.
- Lee, J.M., Johnson, J.A. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 37, 139-143.
- Na, N.H., Surh, Y.J. (2014). Oncongenic potential of Nrf2 and its principal target protein heme oxygenase-1. *Free Radic. Biol. Med.*, 243, 353-365.
- Tripathi, M.; Singh, B.K.; Kakkar, S.P.(2009). Glycyrrhizic acid modulates t-BHP induced apoptosis in primary rat hepatocytes. *Food Chemistry and Toxicology*, 2009,47,339-347.
- Tsai, P.J., Chen, Y.S., Sheu, C.H., Chen, C.Y. (2011). Effect of nanogrinding on the pigment and bioactivity and Djulis (*Chenopodium formosanum* koidz.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1814-1820.
- Wu, M.J., Huang, C.J., Lian, T., Kou, M.C., Wang, L. (2005). Antioxidant Activity of *Glossogyne tenuifolia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6305-6312.
- Yang, G.Z., Wang, Z.J., Bai, F., Qin, X.J., Cao, J., Lv, J.Y., Zhang, M.S. (2015). Epigallocatechin-3-Gallate Protects HUVECs from PM2.5-Induced Oxidative Stress Injury by Activating Critical Antioxidant Pathways. *Molecules*, 20 (4), 6626-6639.



圖一、PM2.5 對 A549 細胞生長之影響

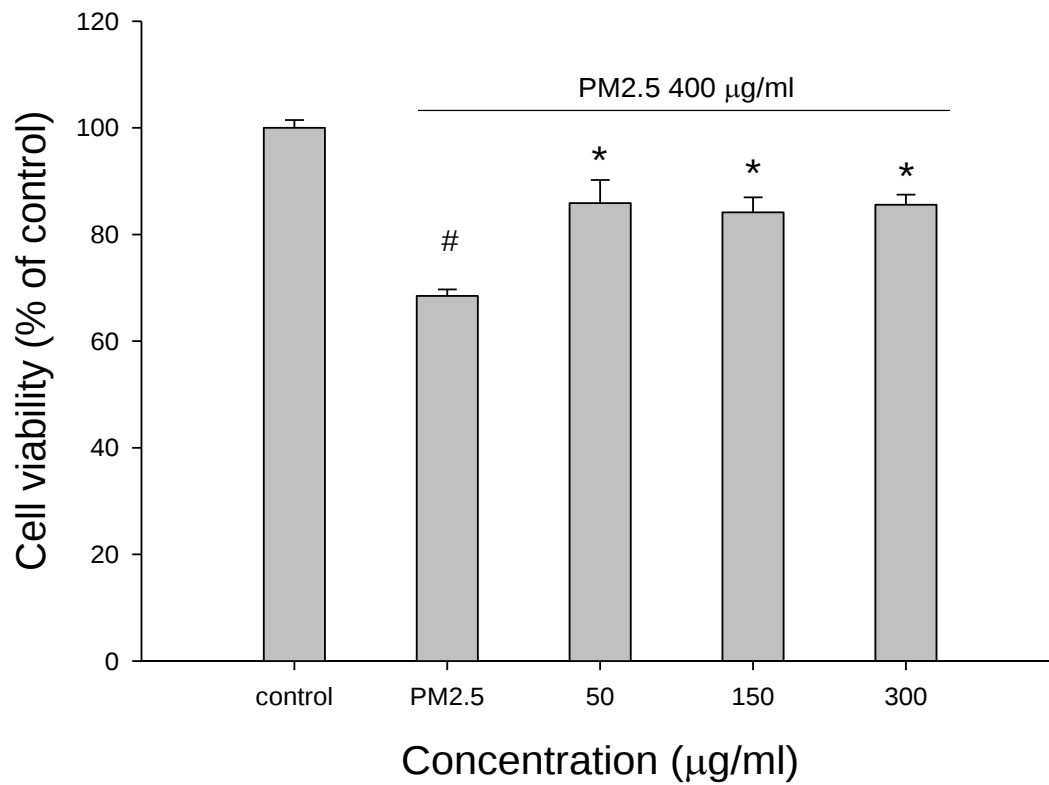
Figure 1. Effects of different concentrations of PM2.5 on A549 cell viability. The cells were treated with PM2.5 for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3).

* ($p < 0.05$) compared with the control group.



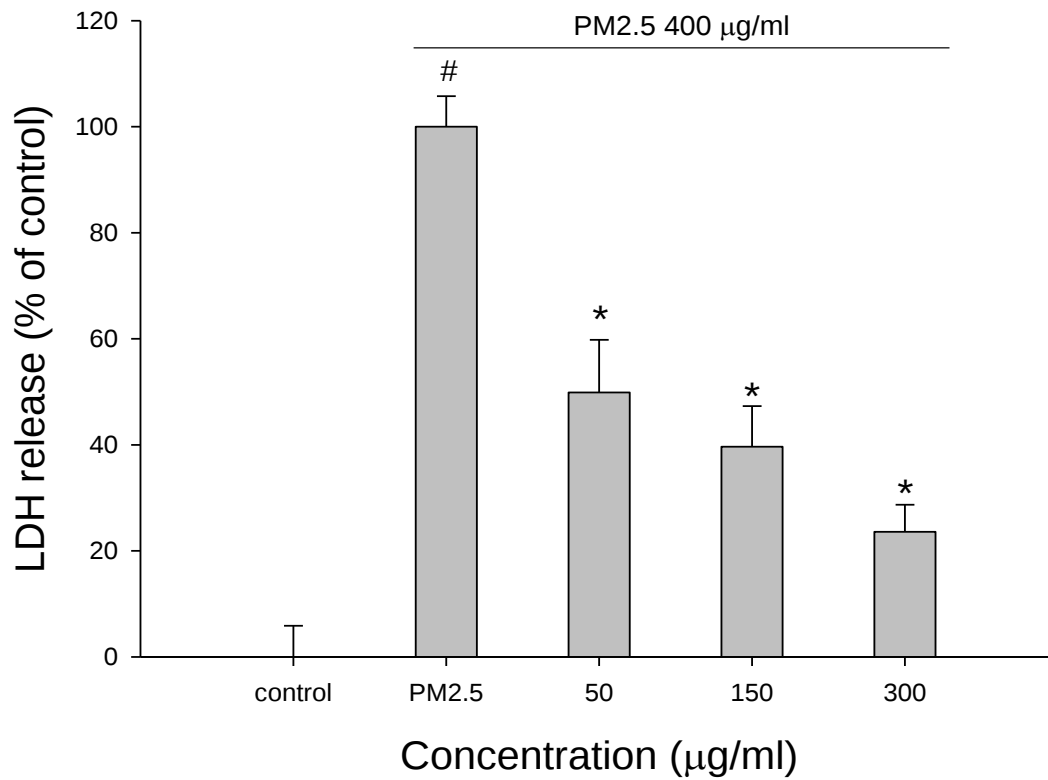
圖二、不同濃度紅藜水萃取物對 A549 細胞生長之影響

Figure 2. Effects of different concentrations of water extract of djulis (WECF) on A549 cell viability. The cells were treated with WECF for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). * ($p < 0.05$) compared with the control group.



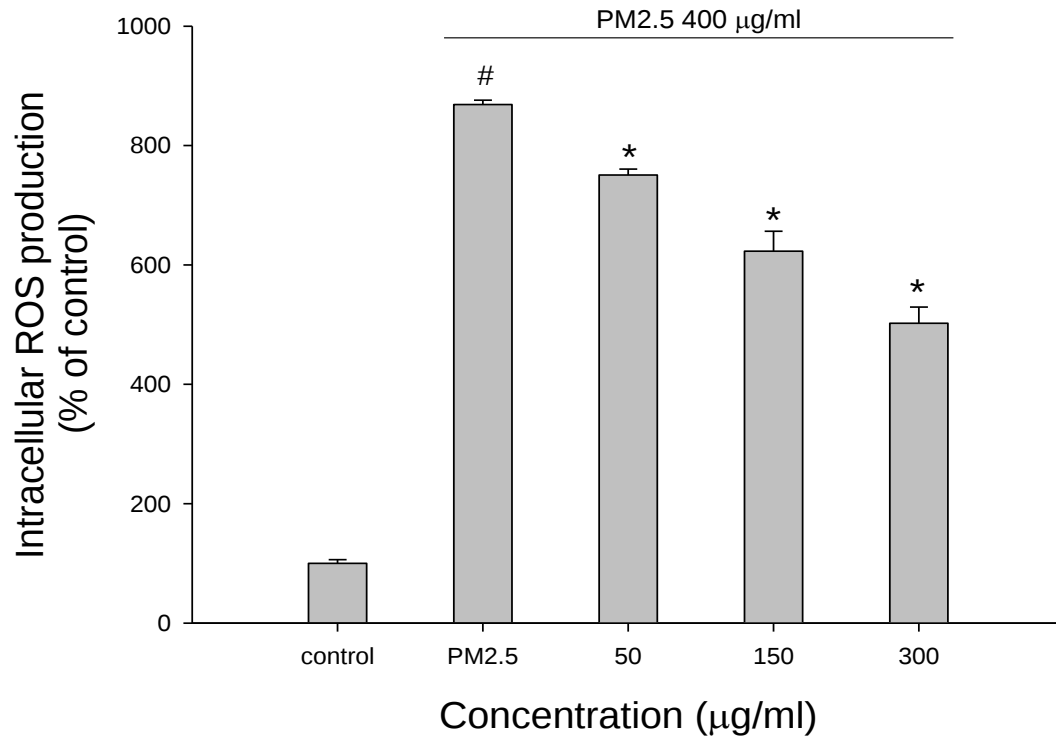
圖三、紅藜水萃取物對 PM2.5 誘發 A549 細胞生長之影響

Figure 3. Effects of water extract of djulis (WECF) on PM2.5-induced A549 cell viability. The cells were treated with WECF and exposure to 400 μg/ml PM2.5 for 24 h. Data are presented by means ± SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group, and * ($p < 0.05$) compared with 400 μg/ml PM2.5-induced cells alone.



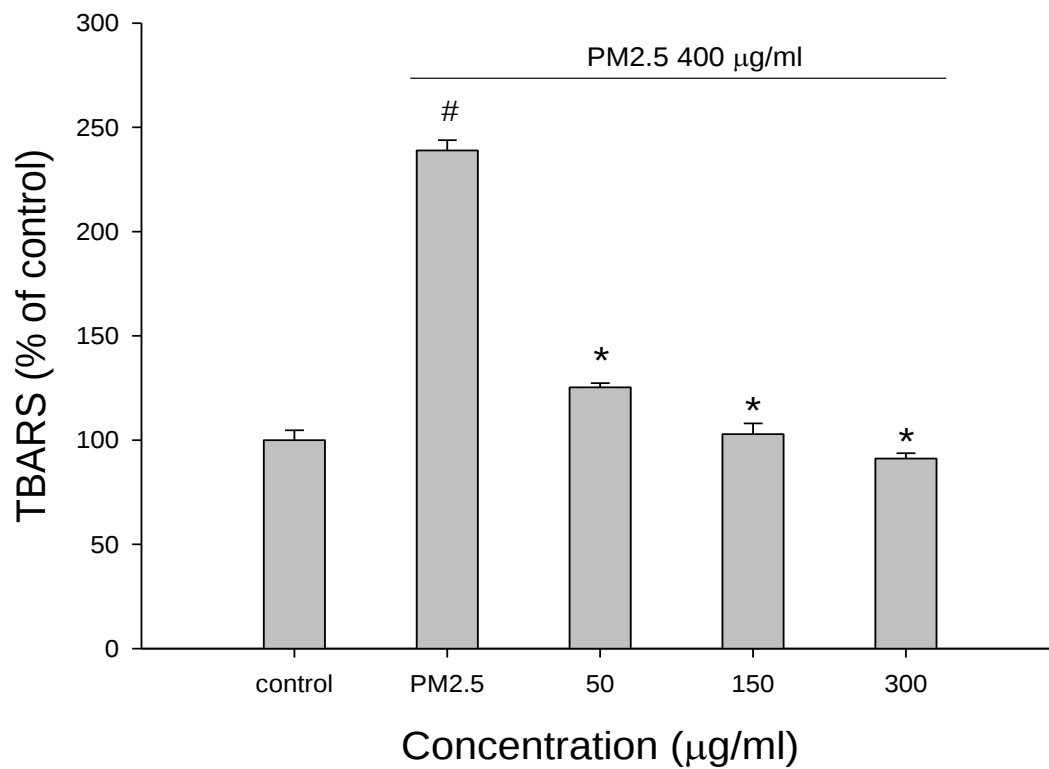
圖四、紅藜水萃取物對 PM2.5 誘發 A549 細胞 LDH 滲漏之影響

Figure 4. Effects of water extracts of djulis (WECF) on LDH leakage in 400 µg/ml PM2.5-induced A549 cells. The cells were treated with WECF and exposure to 400 µg/ml PM2.5 for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group, and * ($p < 0.05$) compared with 400 µg/ml PM2.5-induced cells alone.



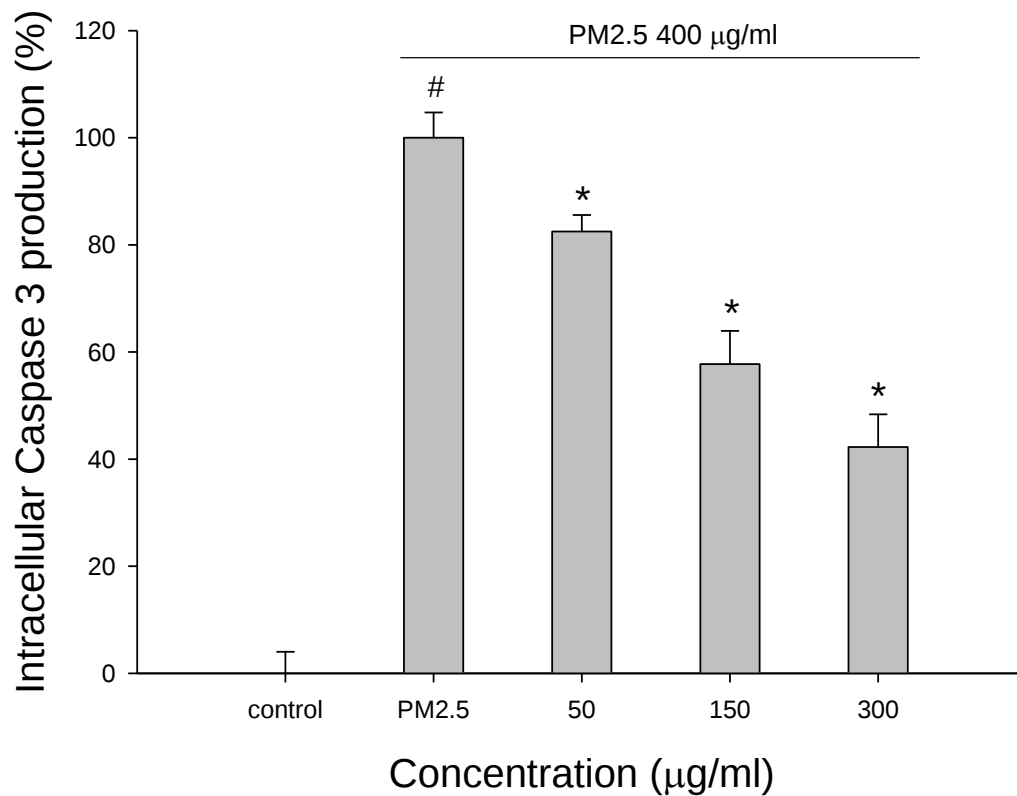
圖五、紅藜水萃取物對 PM2.5 誘發 A549 細胞產生 ROS 之影響

Figure 5. Effects of water extracts of djulis (WECEF) on PM2.5-induced intercellular ROS generation in A549 cells. The cells were treated with WECEF and exposure to 400 μg/ml PM2.5 for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 400 μg/ml PM2.5-induced cells alone.



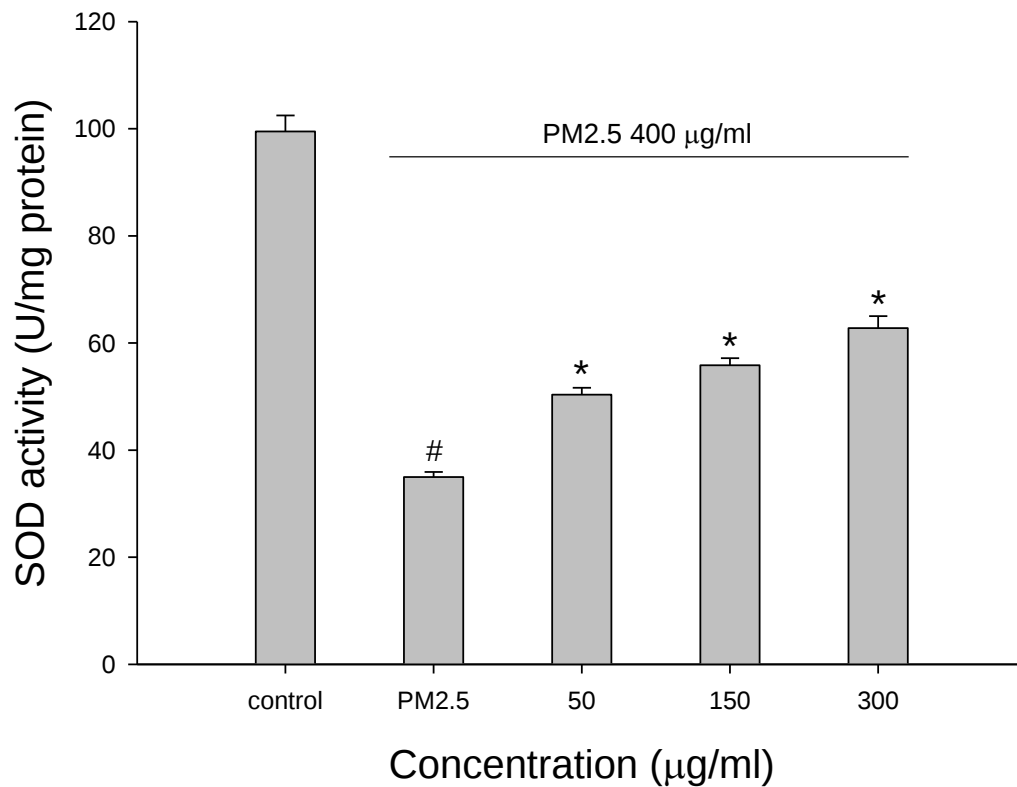
圖六、紅藜水萃取物對 PM2.5 誘發 A549 細胞產生脂質氧化物之影響

Figure 6. Effects of water extracts of djulis (WECF) on PM2.5-induced intercellular TBARS formation in A549 cells. The cells were treated with WECF and exposure to 400 μg/ml PM2.5 for 2 h. Data are presented by means ± SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 400 μg/ml PM2.5-induced cells alone.



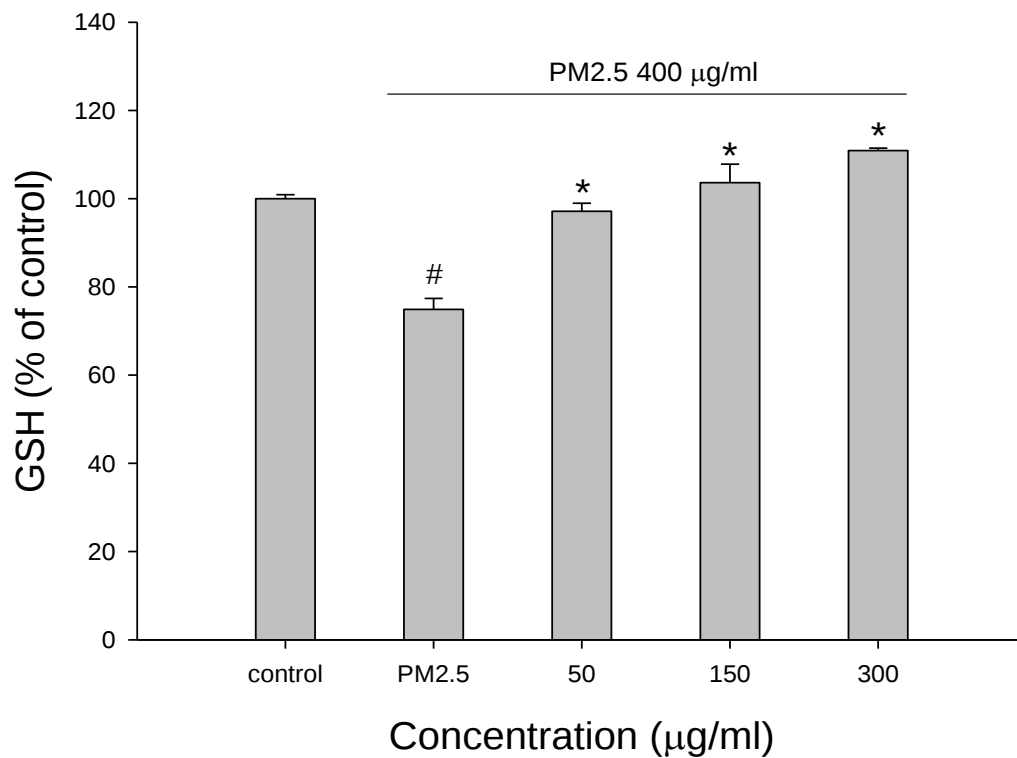
圖七、紅藜水萃取物對 PM2.5 誘發 A549 細胞 caspase-3 活性之影響

Figure 7. Effects of water extracts of djulis (WECF) on PM2.5-induced caspase 3 activity in A549 cells. The cells were treated with WECF and exposure to 400 µg/ml PM2.5 for 20 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 400 µg/ml PM2.5-induced cells alone.



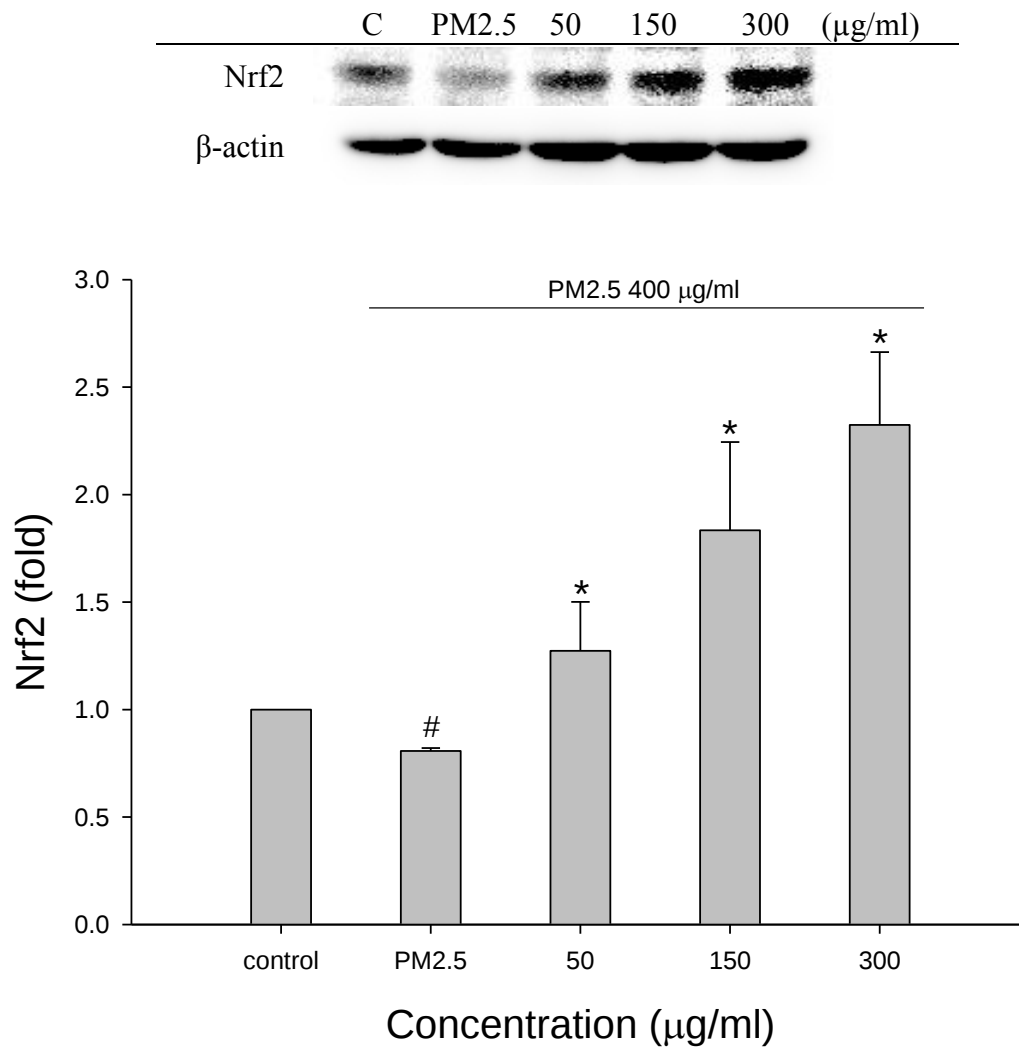
圖八 紅藜水萃取物對 PM2.5 誘發 A549 細胞 SOD 活性之影響

Figure 8. Effects of water extracts of djulis (WECF) on PM2.5-induced SOD activity in A549 cells. The cells were treated with WECF and exposure to 400 µg/ml PM2.5 for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 400 µg/ml PM2.5-induced cells alone.



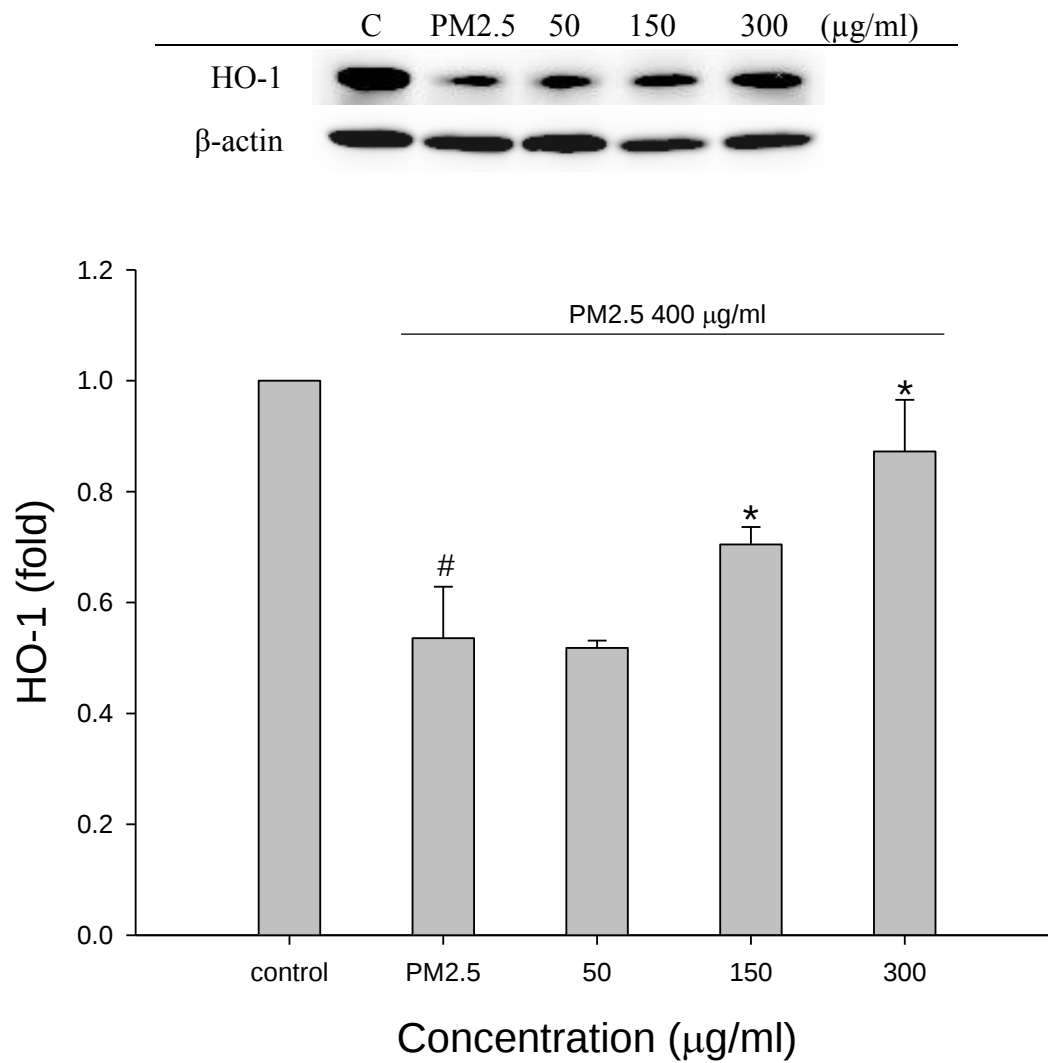
圖九、紅藜水萃取物對 PM2.5 誘發 A549 細胞 GSH 含量之影響

Figure 9. Effects of water extracts of djulis (WECF) on PM2.5-induced GSH contents in A549 cells. The cells were treated with WECF and exposure to 400 µg/ml PM2.5 for 20 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 400 µg/ml PM2.5-induced cells alone.



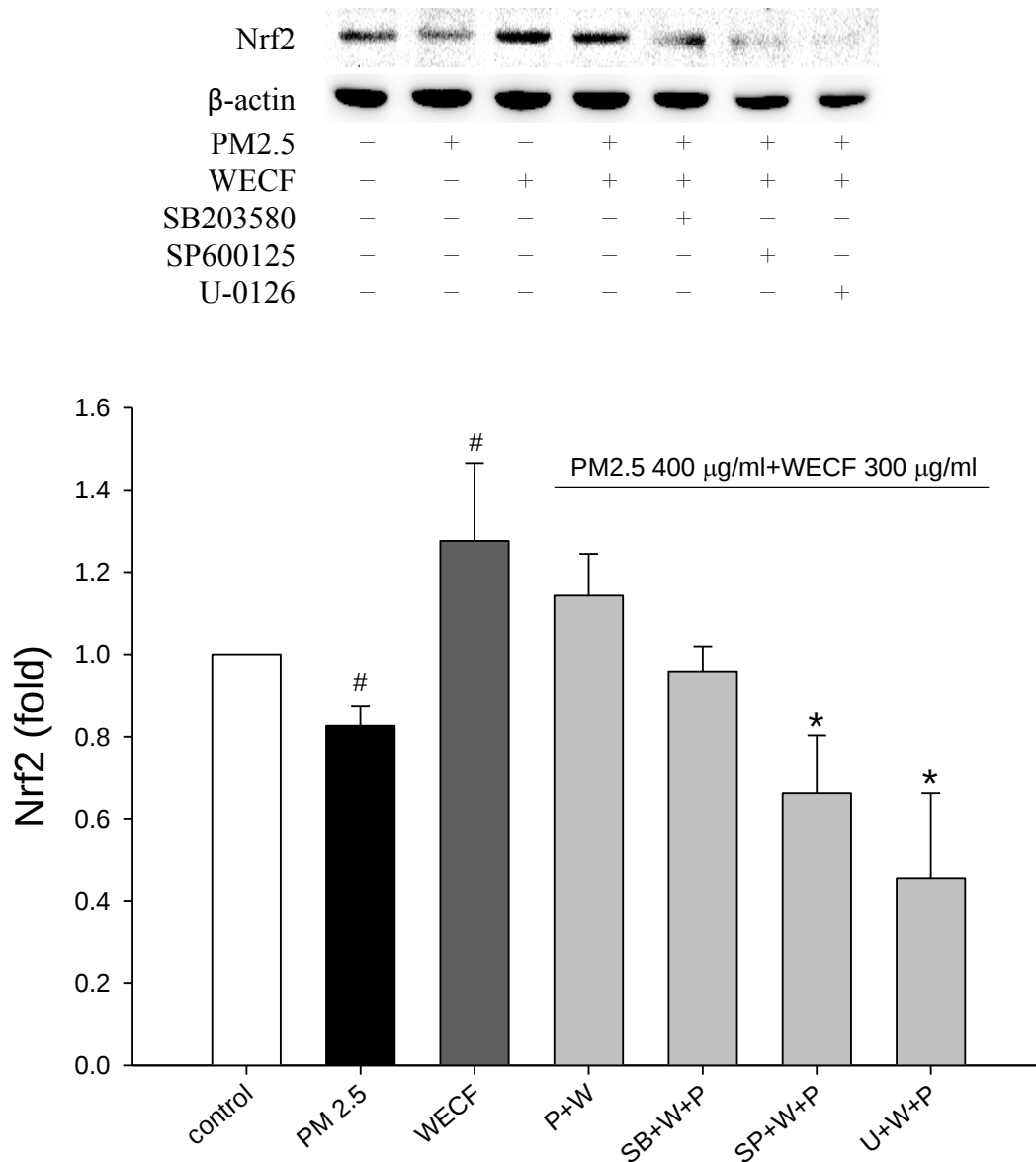
圖十、紅藜水萃取物對 PM2.5 誘發 A549 細胞 Nrf2 蛋白表現之影響

Figure 10. Effects of water extracts of djulis (WECF) on PM2.5-induced expression of Nrf2 in A549 cells. The cells were treated with WECF and exposure to 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 for 12 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5-induced cells alone.



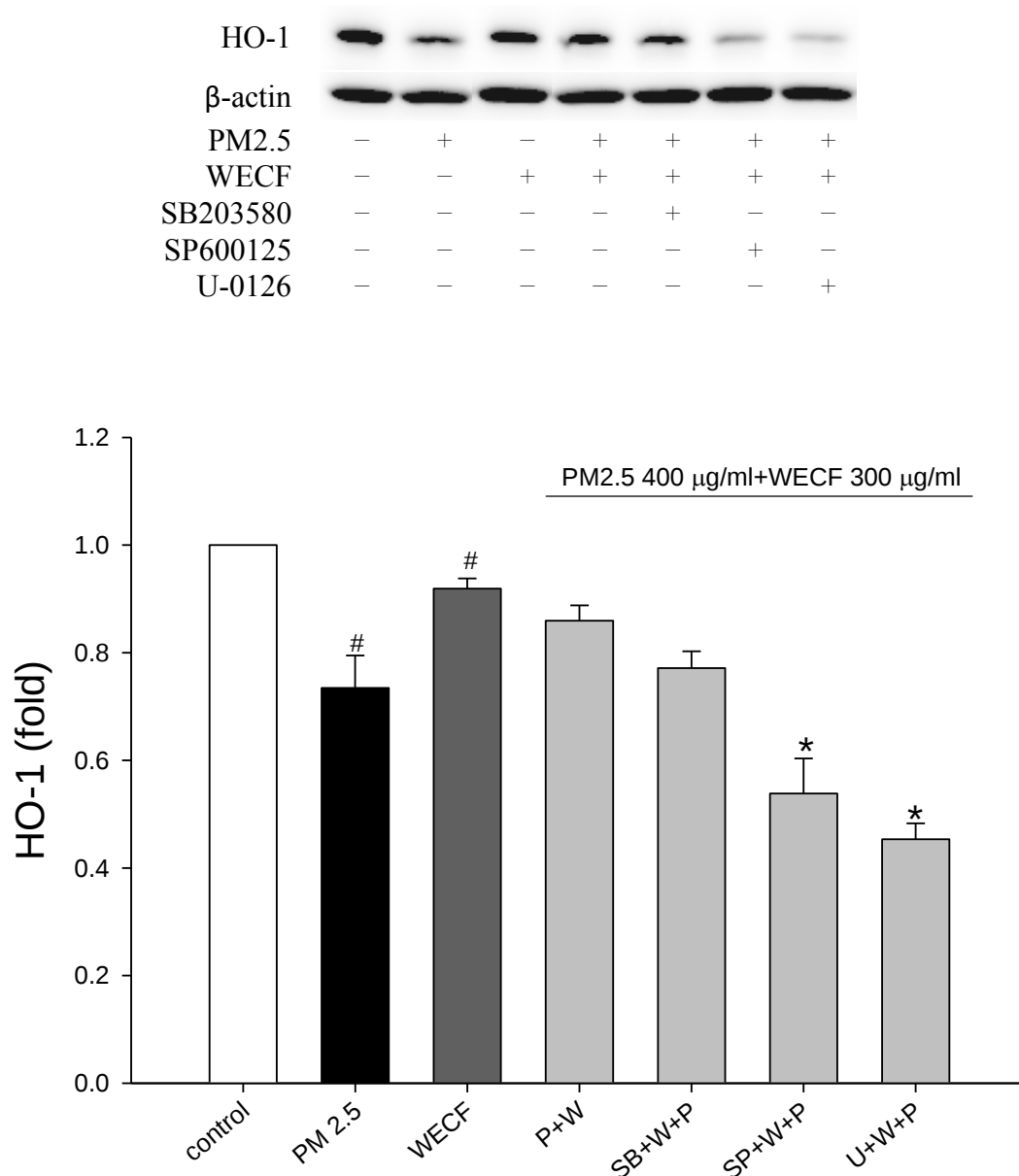
圖十一、紅藜水萃取物對 PM2.5 誘發 A549 細胞 HO-1 活性之影響

Figure 11. Effects of water extracts of djulis (WECF) on PM2.5-induced HO-1 activity in A549 cells. The cells were treated with WECF and exposure to 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 for 15 h. Data are presented by means $\pm$ SD ($n=3$). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5-induced cells alone.



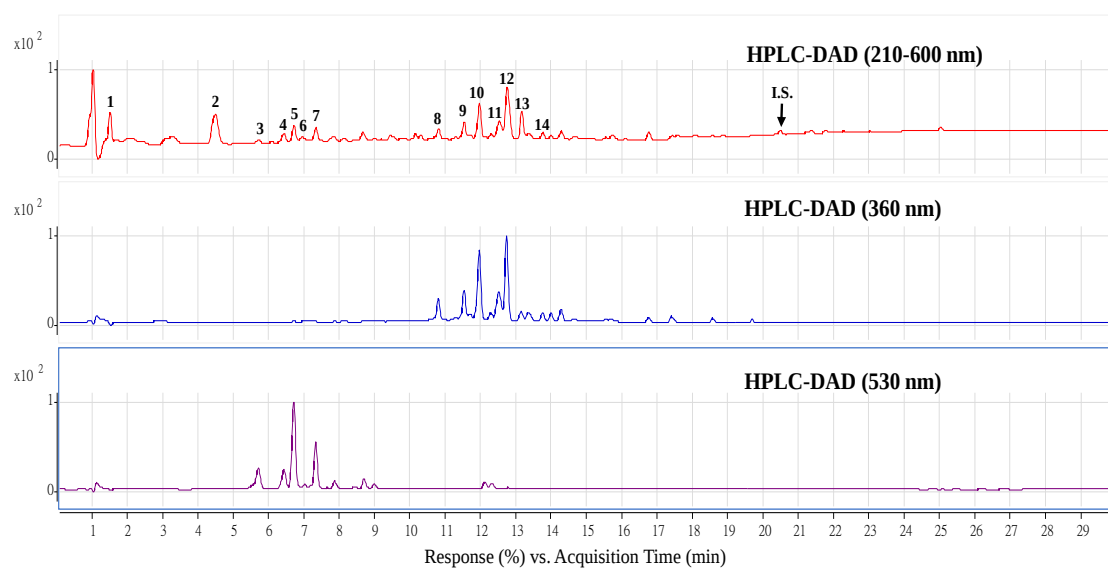
圖十二、紅藜水萃取物與 p38 抑制劑(SB203580, AB)、JNK 抑制劑(SP600125, SP)與 ERK 抑制劑(U-0126, U)存在下對 PM2.5 誘發 A549 細胞 Nrf2 蛋白表現之影響

Figure 12. Effects of p38 inhibitor (SB203580, SB), JNK inhibitor (SP600125, SP) and ERK inhibitor (U-0126, U) on water extracts of djulis (WECF)-induced Nrf2 protein expression in PM2.5-treated A549 cells. Control, cultured with medium alone for 12 h; PM2.5, incubated with PM2.5 400 μ g/ml for 12 h; P+W, incubated with WECF and PM2.5 for 12 h (WECF was added 30 min before PM2.5); SB+W+P, SP+W+P and U+W+P, treated as described for P+W except that the p38 MAPK inhibitor SB203580, the JNK inhibitor SP600125 or the ERK inhibitor U-0126, respectively, was added to the medium before WECF. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with WECF+ 400 μ g/ml PM2.5-induced cells.



圖十三、紅藜水萃取物與 p38 抑制劑(SB203580, SB)、JNK 抑制劑(SP600125, SP)與 ERK 抑制劑(U-0126, U)存在下對 PM2.5 誘發 A549 細胞 HO-1 蛋白表現之影響

Figure 13. Effects of p38 inhibitor (SB203580, SB), JNK inhibitor (SP600125, SP) and ERK inhibitor (U-0126, U) on water extracts of djulis (WECF)-induced HO-1 protein expression in PM2.5-treated A549 cells. Control, cultured with medium alone for 15 h; PM2.5, incubated with PM2.5 400 μg/ml for 15 h; P+W, incubated with WECF and PM2.5 for 15 h (WECF was added 30 min before PM2.5); SB+W+P, SP+W+P and U+W+P, treated as described for P+W except that the p38 MAPK inhibitor SB203580, the JNK inhibitor SP600125 or the ERK inhibitor U-0126, respectively, was added to the medium before WECF. Data are presented by means ± SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with WECF+ 400 μg/ml PM2.5-induced cells.



圖十四、紅藜水萃取物 HPLC-MS total ion 與 HPLC-DAD chromatograms 之分析
 Figure 14. High performance liquid chromatograms detected at a full UV-Vis spectrum of 210-600 nm (top) and UV 530 nm (middle), and the total ion chromatogram of negative ionization mass spectrometry (bottom) from water extracts of djulis (WECF).

表一 紅藜水草萃取物成分之光譜分析

Table 1. HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis on the chromatographic and spectroscopic characteristics and content of water extract of djulis

Peak No.	RT (min)	Compound name	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[M+H]^+ / [M-H]^-$, m/z	MS/MS ^c m/z	Content ($\mu\text{g/g}$)
1	1.51	Unknown	266	136^b /134	-	778.8 $\pm$ 83.9
2	4.43	Phenylacetic acid derivative*	234, 262	285/ 283	151	1961.1 $\pm$ 126.6
3	5.73	Amaranthin	268, 536	727 /	389	189.9 $\pm$ 82.9
4	6.42	Isoamaranthin	264, 530	727 /	389	411.1 $\pm$ 61.8
5	6.70	Betanin ^a	260, 290sh, 538	551 /	389	589.4 $\pm$ 76.9
6	6.99	Isodopaxanthin	260, 472	391 /389	255, 150, 345, 347	178.6 $\pm$ 48.9
7	7.34	Isobetanin	268, 290sh, 532	551 /	389	417.0 $\pm$ 38.8
8	10.82	Quercetin derivative*	256, 352	889/ 887	741, 446, 300	305.6 $\pm$ 49.4
9	11.54	Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	254, 352	757/ 755	609, 447, 301	473.2 $\pm$ 53.6
10	11.94	Quercetin-3- <i>O</i> -trisaccharide	228, 254, 322	743 /741	303	1260.0 $\pm$ 133.8
11	12.53	Quercetin 3- <i>O</i> -(2, 6-di- <i>O</i> -rhamnosyl-glucoside)	256, 352	757/ 755	300, 301, 151	609.4 $\pm$ 170.5

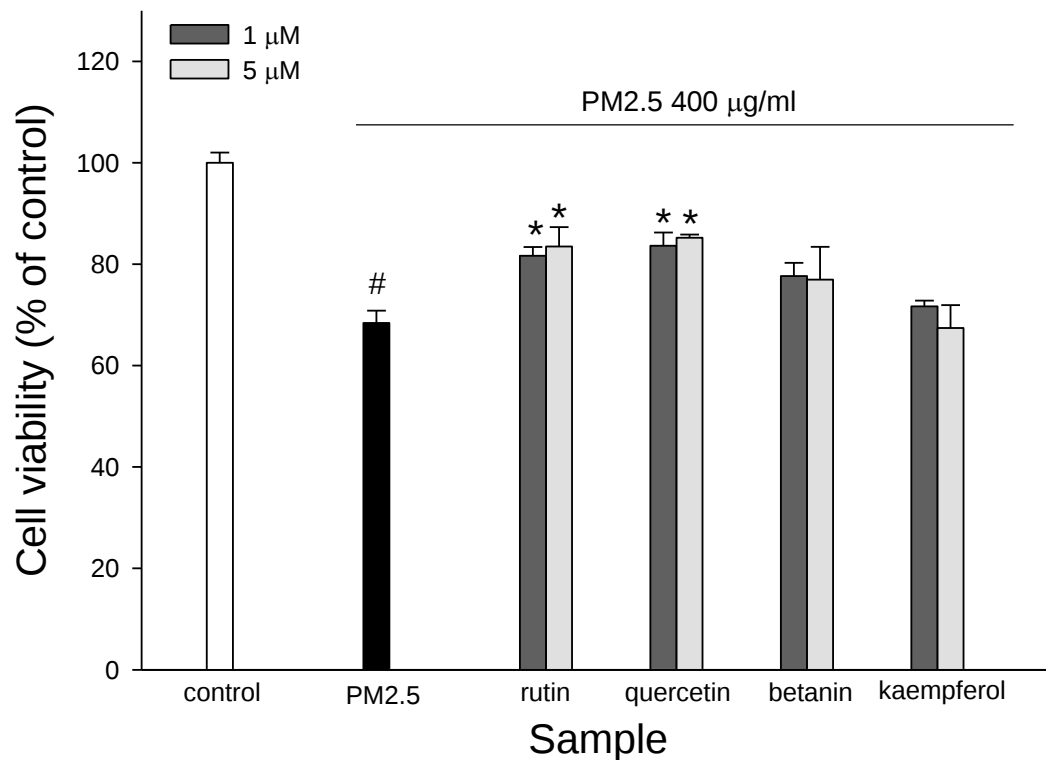
12	12.77	Rutin ^a	254, 352	611/ 609	301	2219.7 ± 342.4
13	13.15	20-Hydroxyecdysone	246, 316, 422	481	165, 371, 301, 173	839.7 ± 96.8
14	13.75	Kaempferol 3-O-β-rutinoside	228, 266, 316	595 /593	287	212.5 ± 22.9
15	20.49	Internal standard ^a	220, 272, 312	255 /	151, 131, 103, 209	100

^a Compound identification by comparison with authentic standards.

^b Values in bold indicates the molecular ion for MS/MS fragmentation.

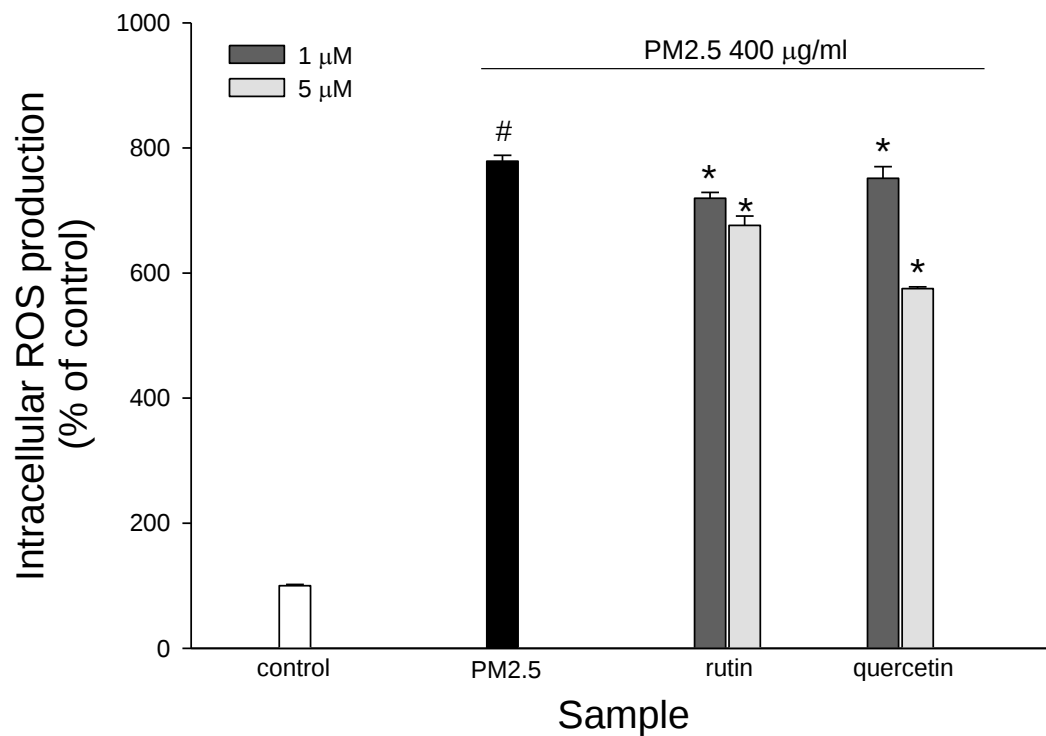
^c MS/MS fragment ions are shown with decreasing order according to their signal intensity.

*tentatively identified. Internal standard: 7-methoxyflavanone.



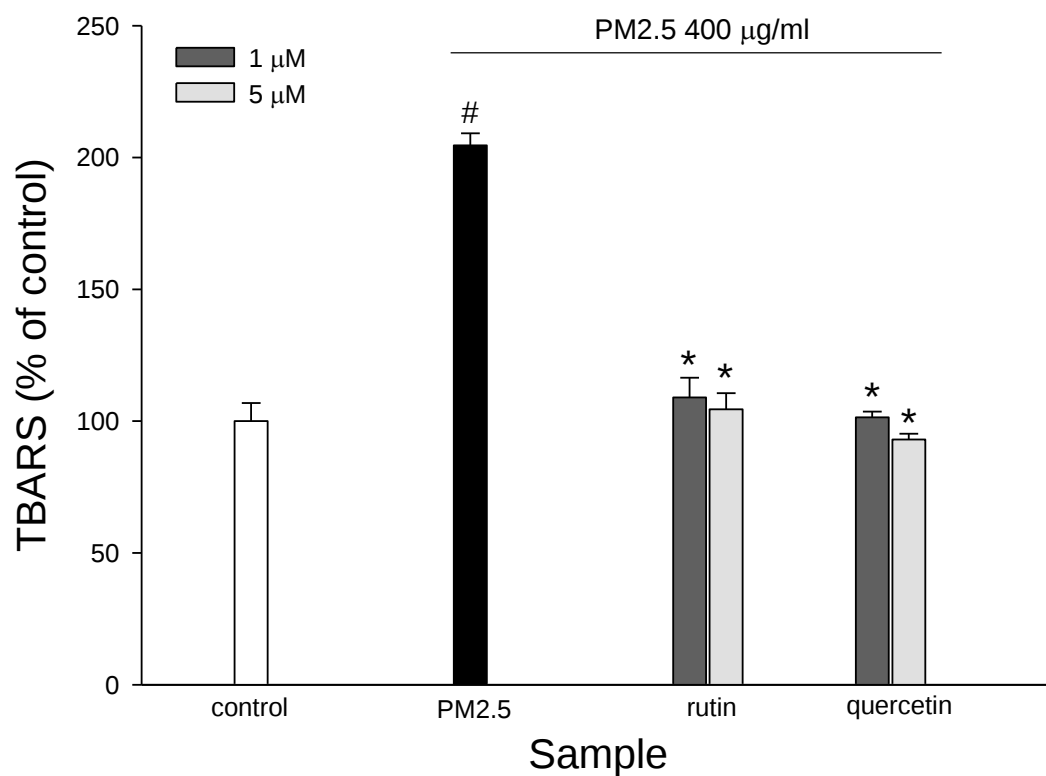
圖十五、紅藜水萃取物之四種活性成分對 PM2.5 誘發 A549 細胞生長之影響

Figure 15. Effects of rutin, quercetin, kaempferol and betanin on PM2.5-induced A549 cell viability. The cells were treated with rutin, quercetin, kaempferol or betanin and exposure to 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD ($n=3$). # ($p < 0.05$) compared with the control group, and * ($p < 0.05$) compared with 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5-induced cells alone.

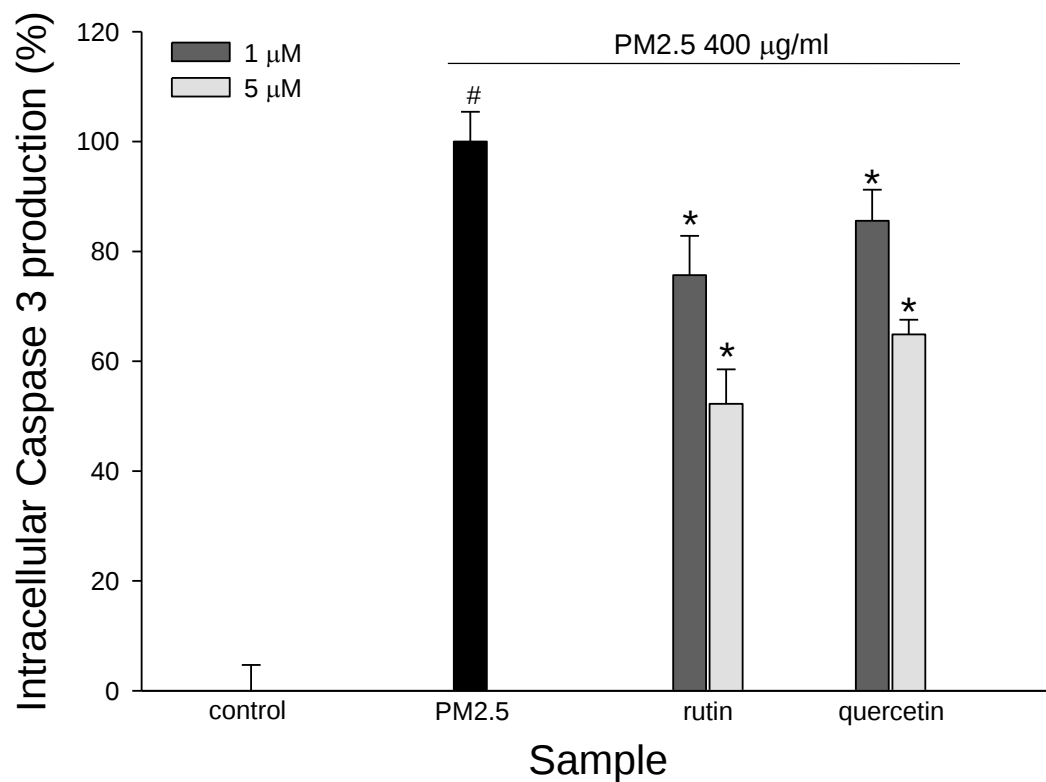


圖十六、Rutin 與 quercetin 對 PM2.5 誘發 A549 細胞產生 ROS 之影響

Figure 16. Effects of rutin and quercetin on PM2.5-induced intercellular ROS production in A549 cells. The cells were treated with rutin and quercetin and exposure to 400 μg/ml PM2.5 for 2 h. Data are presented by means ± SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group, and * ($p < 0.05$) compared with 400 μg/ml PM2.5-induced cells alone.

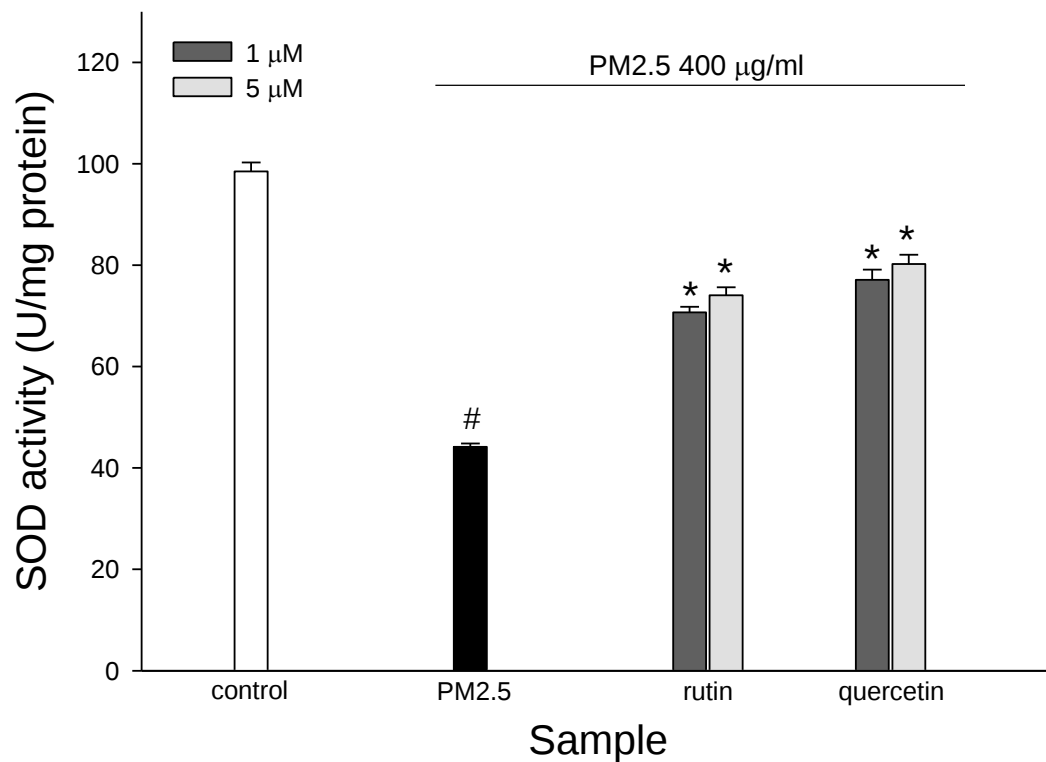


圖十七、Rutin 與 quercetin 對 PM2.5 誘發 A549 細胞產生脂質氧化物之影響
 Figure 17. Effects of rutin and quercetin on PM2.5-induced intercellular TBARS formation in A549 cells. The cells were treated with rutin and quercetin and exposure to 400 μ g/ml PM2.5 for 2 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group, and * ($p < 0.05$) compared with 400 μ g/ml PM2.5-induced cells alone.



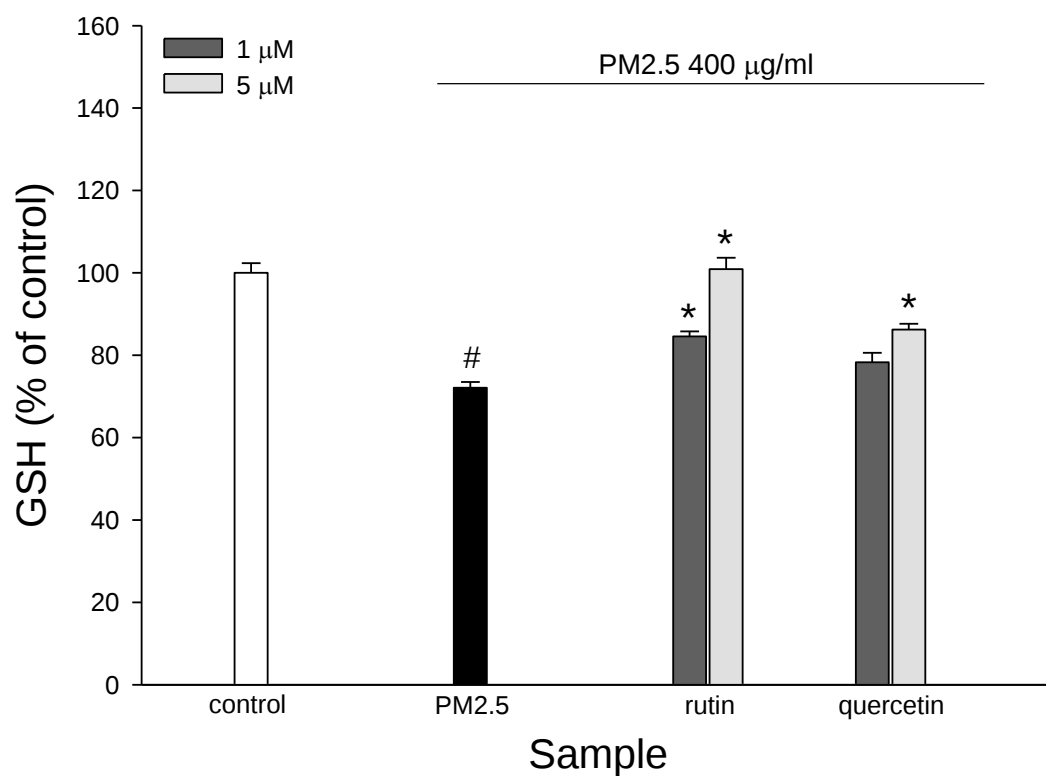
圖十八、Rutin 與 quercetin 對 PM2.5 誘發 A549 細胞 caspase-3 之影響

Figure 18. Effects of rutin and quercetin on PM2.5-induced caspase-3 activity in A549 cells. The cells were treated with rutin and quercetin and exposure to 400 μg/ml PM2.5 for 20 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group, and * ($p < 0.05$) compared with 400 μg/ml PM2.5-induced cells alone.



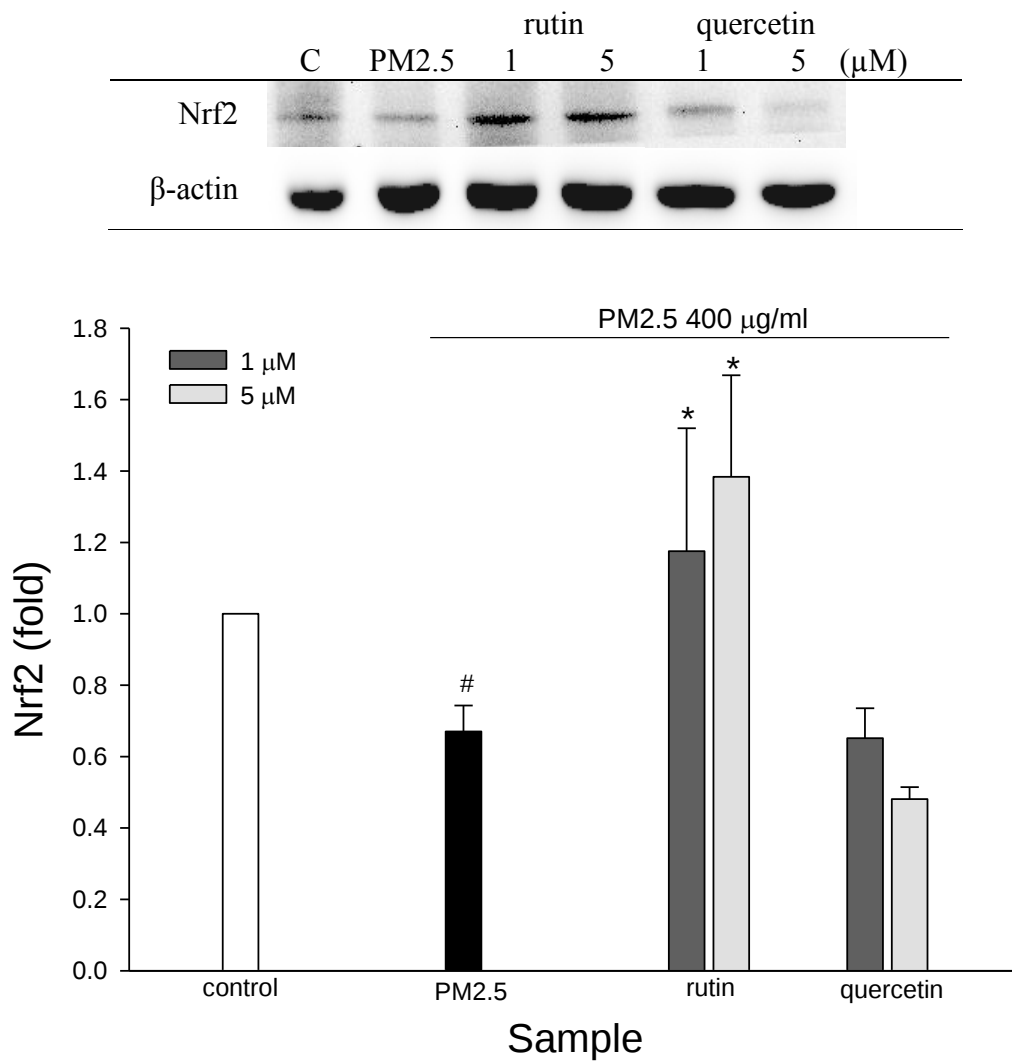
圖十九、Rutin 與 quercetin 對 PM2.5 誘發 A549 細胞 SOD 活性之影響

Figure 19. Effects of rutin and quercetin on PM2.5-induced SOD activity in A549 cells. The cells were treated with rutin and quercetin and exposure to 400 µg/ml PM2.5 for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group, and * ($p < 0.05$) compared with 400 µg/ml PM2.5-induced cells alone.

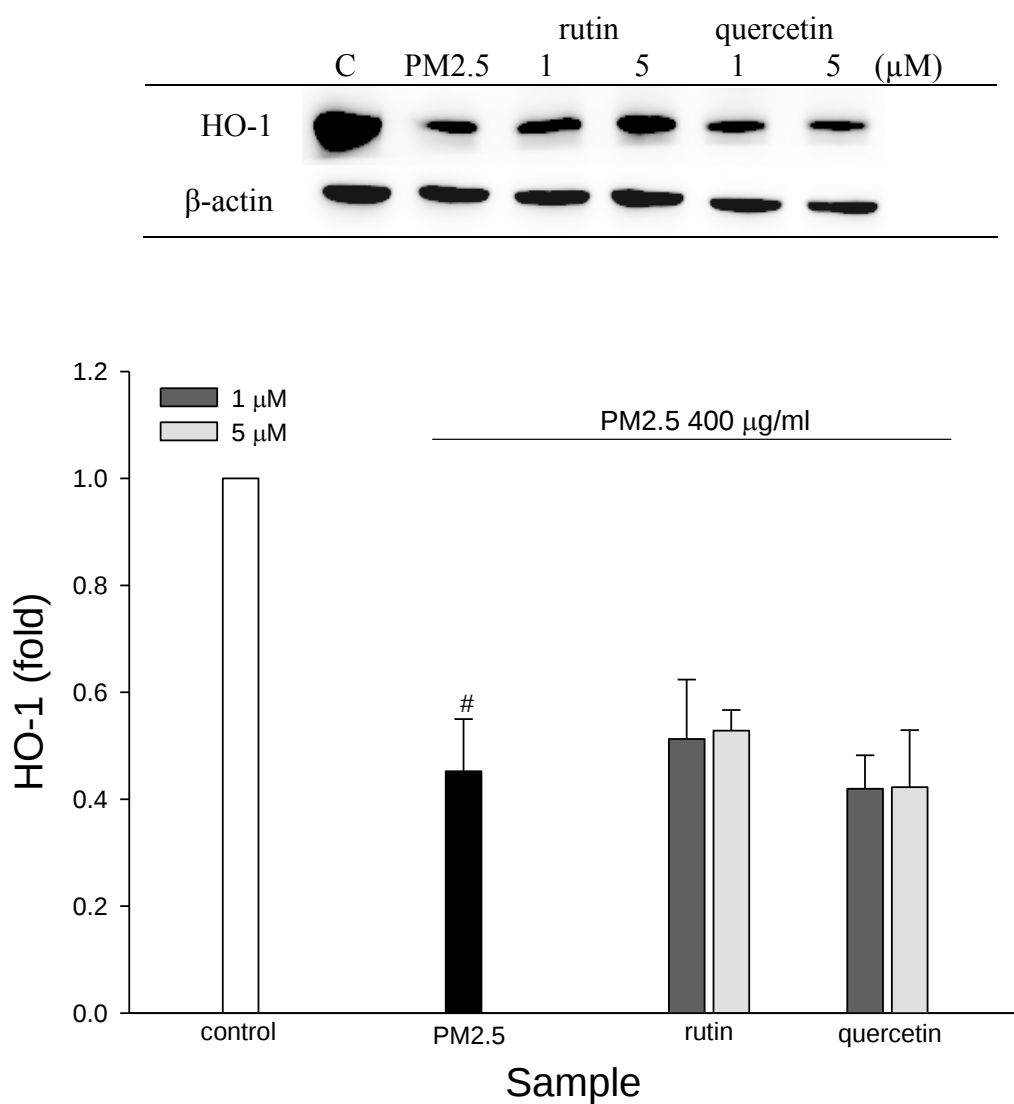


圖二十、Rutin 與 quercetin 對 PM2.5 誘發 A549 細胞 GSH 含量之影響

Figure 20. Effects of rutin and quercetin on PM2.5-induced GSH contents in A549 cells. The cells were treated with rutin and quercetin and exposure to 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5 for 20 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group, and * ($p < 0.05$) compared with 400 $\mu\text{g/ml}$ PM2.5-induced cells alone.



圖二十一、Rutin 與 quercetin 對 PM2.5 誘發 A549 細胞 Nrf2 蛋白表現之影響
 Figure 21. Effects of rutin and quercetin on PM2.5-induced expression of Nrf2 in A549 cells. The cells were treated with rutin and quercetin and exposure to 400 μ g/ml PM2.5 for 12 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group and * ($p < 0.05$) compared with 400 μ g/ml PM2.5-induced cells alone.



圖二十二、Rutin 與 quercetin 對 PM2.5 誘發 A549 細胞 HO-1 活性之影響

Figure 22. Effects of rutin and quercetin on PM2.5-induced HO-1 activity in A549 cells. The cells were treated with rutin and quercetin and exposure to 400 μ g/ml PM2.5 for 15 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). # ($p < 0.05$) compared with the control group.

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）。

PM2.5 不僅會穿透肺泡，通過呼吸障壁，進入循環系統，最終分散至全身，這些微粒子已證實對人體健康具有破壞性。若能由天然物尋求有效的植化素或有效生物活性成分藉由正向調節生理機能，進而提升解毒或抗氧化酶之基因表現，達到提高細胞之防禦能力，此有助於吾人對於 PM2.5 毒性氧化劑對生物體破壞之保護作用。紅藜為台灣原住民特有的糧作，本研究乃探討紅藜與其活性成分對 PM2.5 誘發肺部 A549 細胞氧化傷害之保護作用。

研究結果顯示，紅藜在 PM2.5 誘發細胞氧化試驗中表現出保護細胞效應，而紅藜含有生物活性成分，尤其是 rutin 與 quercetin 在抑制 PM2.5 誘發氧化作用上扮演部份抗氧化角色，顯示紅藜保護細胞免於受 PM2.5 氧化傷害之效應乃因其所含生物活性成分以個別與彼此相乘作用所致。由此可知，紅藜及其活性成分對 PM2.5 誘發肺部細胞之傷害具有保護效應。

本研究有系統依原進度進行探討，且已順利達成預定目標，目前正著手撰寫研發成果，預計投稿國外期刊。本計畫研發成果可提供於保健食品及醫藥界之參考，不僅對食品工業有助益，對國人健康之維護極具有意義。此外亦可提升紅藜之應用價值，影響所及，將使紅藜之經濟效益將更極大化。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： ☐ 否 ☒ 是，建議提供機關 農委會、衛福部、經濟部
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現： ☒ 否 ☐ 是

說明：(以 150 字為限)

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 108-2320-B-041-001			
計畫名稱：紅藜及其活性成分對 PM2.5 誘發肺部傷害之保護效應							
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				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。		
	國外	學術性論文	期刊論文			篇	
			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	專利權	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。)				計畫執行期間獲得 2019 台灣創新技術博覽會金牌獎 2019 核心產品發表暨創新發明競賽金牌		

108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：108-2320-B-041-001-		
計畫名稱：紅藜及其活性成分對PM2.5誘發肺部傷害之保護效應					
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	
國外	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	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
	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	1		協助計畫執行，實驗操作等工作。
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。)			計畫執行期間獲得 2019台灣創新技術博覽會金牌獎 2019核心產品發表暨創新發明競賽金牌		