■公開

□密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：010201a127

行政院農業委員會九十七年度科技計畫研究報告

計畫名稱：

利用初代人類軟骨細胞與關節炎鼠模式，開發小葉葡萄應用於關節炎保建之研究 (2/2) (第2年/全程2年)

(英文名稱)

The use of arthritis animal experiments and human osteoarthritic chondrocytes to develop Vitis thunbergii against arthritis

計畫編號：97農科-1.2.1-科-a1(27)

全程計畫期間：96 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

本年計畫期間：97 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

計畫主持人：王靜瓊

執行機關：私立台北醫學大學

971139

一、中文摘要：

小葉葡萄是台灣特有種植物，本研究以人類軟骨細胞與關節炎鼠模式進行其功效評估。結果：以甲醇萃取，並以LPS或IL-1作誘導人類軟骨細胞發炎檢測其抗發炎，以主莖萃取物效果最佳，且分離得vitisin-A, vitisin-B, ampelopsin-C 及 resveratrol等，且以resveratrol抑制PGE2，COX-2及MMP-3活性最強。另以LPS誘導大白兔關節炎模式評估小葉葡萄水萃物，當餵服500mg/kg後，可減緩關節炎發生。再利用Diaion管柱分離時，以100%甲醇沖提之劃分部活性最佳，此結果將可作開發健康食品參考。

二、英文摘要：

Vitis thunbergii (Vt) is a native medicinal plant of Taiwan used in arthritis etc. The study is to develop Vt as a nutritional supplement for arthritis by LPS or IL-1induced production of inflammatory mediators in primary human chondrocytes (PHC) and LPS-induced osteoarthritis model in animal. The MeOH extracts of Vt could inhibit inflammatory mediators in PHC and be obtained four natural products, vitisin A, vitisin B, ampelopsin C and resveratrol. Among them, the anti-inflammatory effects of resveratrol were strongest and could inhibit COX-2 and MMP-3 activity. The other hand, LPS induced osteoarthritis in rabbits and the morbidity rabbits were treated with the water extract of Vitis thunbergii (W-Vt, 500mg/kg). The W-Vt could inhibit osteoarthritis. Compare with chromatography and bioactivity assay, the W-Vt was loading in Diaion column, and 0 to 100%MeOH grading eluted. The results showed, the elution of 100% MeOH was more anti-inflammatory effects. The above results of this study clarified several important informations regarding the role of Vitis thunbergii as a nutritional supplement against arthritis, including the pharmacological effect and methods of quality control for the preparation.

三、計畫目的：

1. 完成體外具活性之樣品關節炎鼠之體內評估，瞭解產品使用方法及劑量。以利用collagenase誘導大白鼠膝關節炎之體內動物模式，餵服膝關節炎鼠具開發潛力之樣品，實驗中並分為預防組(誘導前餵服萃取物)及治療組(誘導後餵服)。大白鼠膝關節注入collagenase後約1個月內膝關節會產生類關節炎，行動不便且關節損壞，屆時將利用動物跑步機觀察動物之活動力，及膝關節病理切片瞭解關節炎傷害或形成之程度，並評估萃取物之功效。 2. 體外人類軟骨細胞之模式繼續評估，活性成分之作用機轉，以作為欲產品之含量指標成分。

四、重要工作項目及實施方法：

關節炎的治療以止痛為主，主要作用是抑制發炎，因此本研究將以LPS或IL-1beta誘導初代人類軟骨細胞發炎模式，模擬體外關節炎現象，評估由子計畫二所提供之萃取物抑制初代人類軟骨細胞發炎之作用如：COX-2及PGE2產生及MMPS生合成路徑。體外試驗有效之樣品，再以膠原蛋白酵素誘導大白鼠膝關節炎之體內動物模式，評估樣品改善關節炎之功效。

1.分離得之天然物將繼續以LPS或IL-1beta誘導初代人類軟骨細胞產生發炎反應及活化MMPs之模式，評估天然物之活性機轉。

2.膠原蛋白酵素誘導大白鼠膝關節炎之體內動物模式評估小葉葡萄之作用。

五、結果與討論：

小葉葡萄為台灣特有種之藥用植物，其民間功能常用來治療筋骨酸痛等，子計畫一所提供主莖中4個純化物 (vitisin A, vitisin B, ampelopsin C及resveratrol)，顯示：resveratrol能藉由降低COX-2酵素之活性來抑制LPS所誘發PHC細胞之PGE2表現，達到抑制發炎反應之功效。此外，resveratrol也能降低MMP-3之活性，避免MMP-3直接損害關節軟骨而造成關節炎之發生。除此之外，我們也利用小葉葡萄之莖部水萃取物進行體內之關節炎預防試驗，利用LPS直接注射於紐西蘭大白兔關節腔來模擬異物侵入性之關節炎，並以正子攝影(PET)來監測其發炎嚴重程度，結果顯示小葉葡萄之主莖部水萃取物，能有效降膝關節之發炎反應，及降低血液中PGE2之含量。推測雖體外實驗中僅以resveratrol具有明顯之活性，但因其他成分如vitisin A, vitisin B皆為resveratrol之多元複合體，所以主莖之萃取物於體內可發揮功效，應與代謝為resveratrol有關。

六、結論

1.以甲醇萃取主莖之萃取物於LPS或IL-1誘導初代人類軟骨細胞發炎試驗中，其抗發炎果最佳，分離得到vitisin A, vitisin B, ampelopsin C 及 resveratrol等四個主成分。

2.四個主成分中，以resveratrol可於LPS誘導人類軟骨細胞發炎前、後或同時，抑制PGE2生成效果最為顯著，且可抑制COX-2及MMP-3之活性。

3.建立LPS誘導大白兔膝關節炎之體內動物模式，檢測小葉葡萄水萃物之功效，結果顯示：可以減緩關節炎之產生。

4.再利用Diaion管柱追蹤其有效之活性劃分部，發現以100%甲醇沖提之劃分部，體外抗發炎效果最佳。

5.綜合結果：小葉葡萄之萃取物具有開發保護或治療關節炎之潛力。

七、參考文獻：

1.行政院衛生署中醫藥委員會編 台灣常見藥用植物圖鑑第二冊 行政院衛生署中醫藥委員會第一版 2002.

2.台灣植物編輯協會。2003。 葡萄科， p.696-710。刊於：台灣植物誌。台灣植物編輯協會。台北。

3.林義恭、劉新裕、賴瑞聲、胡敏夫、高瑞隆、徐原田。2002。台灣原生細本山葡萄的選種與栽培(Ⅰ)細本山葡萄的外表型變異.中華農業研究 51, 24-31.

4.謝文聰、譚思濰、陳介甫、蔡輝彥。1998。山葡萄粗萃取物及其活性成分之鎮痛抗炎作用研究。

5.Yu-Ling Huang, Wei-Jern Tsai, Chien-Chang Shen, Chien-Chih Chen. Resveratrol derivatives from the roots of Vitis thunbergii. Journal of Natural Products, 68, 217-20 (2005).

6.Yue-Hua He, De-Qiang Dou, Kenji Terashima, Yoshiaki Takaya, Masatake Niwa. Two lignan glycosides from Vitis thunbergii. Heerocycles, 63, 871-877 (2004).

7.Yue-Hua He, Kenji Terashima, Yoshiaki Takaya, Masatake Niwa. Structural confirmation of (+)-cis-??-viniferin. Chin. J. Nat. Med., 3, 90-92 (2005).

8.De-qiang Dou, Jie Ren, Maggie Cooper, Yue-Hua He, Yu-Ping Pei, Yoshiaki Takaya, Masatake Niwa, Ying-Jie Chen, Xin-Sheng Yao, Ren-Ping Zhou. Polyphenols from Vitis thunbergii Sieb. et Zucc. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 12, 57-59 (2003).

9.Teguo, P. W., Fauconneau, B., Deffieux, C., Huguet, F., Vercauteren, J., Merillon, J. M. 1998. Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from Vitis vinifera cell cultures. J. Nat. Prod., 61, 655-657.

10.Abramsom L, Vaccarino V. Relationship betweem physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged older US adults. Arch. Intern. Med. 2002, 162, 1286-1292.

11.Garnero P, Rousseau J, Pierre DD. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. Arthritis & Rheumatism 2000, 43, 953-968.

12.Hedbom E, Hauselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. Cell.Mol. Life Sci. 2002, 59, 45-53.

13.Kaboli PJ, Doebbeling BN, Saag KG, Rosenthal GE. Use of complementary and alternative medicine by older people with arthritis: a population-based study. Arthritis Care & Research 2001, 45, 398-403.