■公開

□密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：010201a121

行政院農業委員會九十六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** (第1年/全程1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：96農科-1.2.1-科-a1(21)

全程計畫期間：96 年 1 月 1 日至 96 年 12 月 31 日

本年計畫期間：96 年 1 月 1 日至 96 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

960421

一、中文摘要：

關節炎是目前老人疾病中，常用中草藥輔助治療的疾病之一。而小葉葡萄是台灣特有種之藥用植物，被廣用於許多老年疾病，如：筋骨酸痛，肝炎，胃痛，眼疾，跌打損傷，及關節炎等。因此本研究為開發臺灣原生種小葉葡萄應用於預防保健食品研究之子計畫三：利用初代人類軟骨細胞模式，開發小葉葡萄應用於關節炎保建之研究。研究結果顯示：主幹莖及枝幹對 LPS刺激初代人類軟骨細胞釋放PGE2抑制50%之濃度49.28 ?慊/ml及59.26 ?慊/ml。而利用主莖分離得到之Ampelopsin C, (+)-cis- ε -Viniferin及Resveratrol可抑制LPS誘導之 PGE2產生，抑制50%之濃度分別為59.0, 70.49及8.51 ?慊/ml。而(+)-cis- ε -Viniferin 及Resveratrol 對 IL-1?玲冗玳GE2之產生有抑制作用，其抑制50%之濃度分別為68.51及18.9 ?慊/ml。主莖萃取物及Ampelopsin C, (+)-cis- ε -Viniferin及Resveratrol抑制軟骨細胞發炎反應之機轉，推測應是透過抑制COX-2, iNOS及MMP-3 蛋白表現。

二、英文摘要：

Arthritis is a complicated infirmity of joint which is characterized by joint stiffness, inflammation and pain. Clinicians as well as patients are still waiting for efficacious remedies. Besides, Arthritic patients frequently used alternative and complementary medicine to alleviate their joint discomfort or to maintain the health of their joints. Vitis thunbergii is a native medicinal plant of Taiwan used in many age-related illnesses such as arthralgia, hepatitis, gastritis, eye disorder, sprain and strain, etc. However, there is no clear mechanistic exploration of V. thunbergii to explain why this plant is useful in rheumatism. The purpose of this study is to investigate the effects of V. thunbergii on cartilage and its anti-arthritic mechanisms. Different parts (stem, branch, leaf and root) of V. thunbergii were extracted with methanol and the extracts were employed in the following experiments. Primary human chondrocytes (PHCs) stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and interleukin-1 beta (IL-1β) would enhance the release of cartilage degrading enzymes, i.e. prostaglandin E2 (PGE2) and metalloproteinase (MMP-3, -13), and this model was used in the experiment. Indomethacin, a documented NSAIDs served as positive control in the study. PHCs were treated with V. thunbergii extracts or indomethacin with or without LPS or IL-1β. Because stem and branch parts of V. thunbergii had no cytotoxicities on the PHC at 100 micro-g/ml, we used these two parts to do the following PGE2 inhibitory experiments.
The results expressed indomethacin inhibited PGE2 production in LPS-stimulated PHCs, while the stem part of V. thunbergii showed the more significant and dose-dependent inhibitory effects (25 micro-g/ml to 100 micro-g/ml, about 60% inhibition rate at 100 micro-g/ml) on PGE2 expression than the branch part. However, in the IL-1β stimulation, only the high dose of stem part displayed the inhibitory effects (about 20% inhibition rate at 100 micro-g/ml)on PGE2 expression. Therefore, the active components were isolated from the stem part of V. thunbergii and oligomers of resveratrol were obtained, (+)-vitisin A, ampelopsin, (+)- ε -viniferin and resveratrol. Resveratrol showed the strongest inhibitory effects in PGE2 productions and MMP-3, -13 expressions after the LPS or IL-1β treatment. This result implies V. thunbergii had well chondroprotective effects on inflammatory arthritis.

三、計畫目的：

世界衛生組織已將2000-2010宣布為骨骼與關節年，正是為了喚起大眾，包括研究人員，對關節疾病的重視；的確，在高齡化國家，罹患退化性關節炎的患者越來越多，同時退化性關節炎對離患者所造成的痛苦，生活上的不便，以及醫療費用的成長不容忽視。可是目前常用的藥物並沒有能效阻止退化性關節炎的進行，甚至還會有各種的副作用，有的還可能造成更進一步的破壞。古籍中，治療關節炎症狀的中草藥品種繁多，並有多種的治法，但是中草藥於臨床的運用，往往受限於較緩慢的療效，而使得忽視其開發的潛力。但目前台灣仍有許多罹患退化性關節炎的患者會尋求替代醫療包括中草藥來解除其疼痛，小葉葡萄即為流傳使用的一種。而如何用現代的生物科技技術，探討小葉葡萄於退化性關節炎之應用價值實有其必要性。因而本計畫之目的，則是期望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之保建，其研究成果可提供未來保健食品之應用，讓眾多退化性關節炎患者能得到安全又有效的輔助治療外，亦可提升小葉葡萄之經濟價值，促進農業與生物科技產業之共生。

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-1誘導初代人類軟骨細胞發炎模式，模擬體外關節炎現象，評估由子計畫一所提供之萃取物及天然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。方法如下：

1. 建立人類軟骨細胞初代培養系統。
2. 以LPS或IL-1誘導軟骨細胞產生發炎及活化MMPs，再利用EIA組及西方點墨法，檢測樣品之作用。

五、結果與討論：

1.目前已建立初代人類軟骨細胞之培養方法，從分解組織至細胞成熟約需14天，繼待培養3次後，細胞數到達一定量時，即可進行藥物篩選（圖一）。

2.主莖對LPS刺激初代人類軟骨細胞釋放PGE2抑制比其他不為顯著（圖二），且抑制50%之濃度49.28ug/ml及59.26ug/ml。

3.由子計畫1提供由主莖分離得到之(+)-Vitisin A （1）, Ampelopsin C（2）, (+)-cis- ε -Viniferin（3）, Resveratrol（4）4個主成分中，Ampelopsin C, (+)-cis- ε -Viniferin及Resveratrol可抑制LPS誘導之PGE2產生，抑制50%之濃度分別為59.0,70.49 及8.51ug/ml（圖三）。而(+)-cis- ε -Viniferin 及Resveratrol 對 IL-1誘導PGE2之產生有抑制作用，其抑制50%之濃度分別為68.51及18.9 ug/ml。Ampelopsin C, (+)-cis- ε -Viniferin及Resveratrol抑制軟骨細胞發炎反應之機轉，推測應是透過抑制COX-2,iNOS及MMP-3 蛋白表現。

3.四個主成分中，僅有2先加入細胞後，再以LPS 及IL-1誘導，可以顯著抑制 PGE2產生，其餘皆無此現象。推測2為結構較大之聚合物，可能是透過阻斷LPS 及IL-1之受器，以至抑制PGE2產生。

六、結論

綜合實驗結果發現小葉葡萄之主幹莖及枝幹確實可以抑制軟骨細胞發炎反應，且其主要活性指標成分應為(+)-cis- ε -Viniferin及Resveratrol，且其抗發炎之作用機轉，推測應是透過抑制COX-2, iNOS及MMP-3 蛋白表現。此結果顯示：小謝葡萄之主莖卻實具有開發為保護關節炎之健康食品，且可利用(+)-cis- ε -Viniferin及Resveratrol作為控制品質之指標成分。

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. 林煥哲。 1997。小本山葡萄及羅氏鹽膚木蟲癭成份之研究. 台北醫學院藥學研究所碩士論文。

4. 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(2):24-31.

5. 蔡佳宏、王子慶、吳明昌。 2001。細葉山葡萄及香茹草抗至突變性之研究。科學農業 49(7,8):186-191。

6. 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。

7. 郭賢伸。2005。利用細本山葡萄(Vitis thunbergii Sieb. et Zucc.)細胞培養生產白黎蘆醇(resveratrol)之研究。大同大學生物工程研究所碩士論文。

8. 曾淵如 21世紀之老年醫學的展望—老年人之長壽活躍及幸福的期望 台灣醫界 2002;45(9): 29-32

9. Mei-Chun Lu. Micropropagation of vitis thunbergii Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shot tip culture. Scientia Horticulturae ,107, 64-69 (2005).

10. Nien-Yung Chiu, Kuang-Hsiung Chang. The illustrated medicinal plants of Taiwan Vol.4. SMC PUBLISHING INC. Taiwan, R.O.C., p.147 (1995).

11. Nien-Yung Chiu, Kuang-Hsiung Chang. The illustrated medicinal plants of Taiwan Vol.5. SMC PUBLISHING INC. Taiwan, R.O.C., p.140 (1998).

12. 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).

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

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

15. 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).

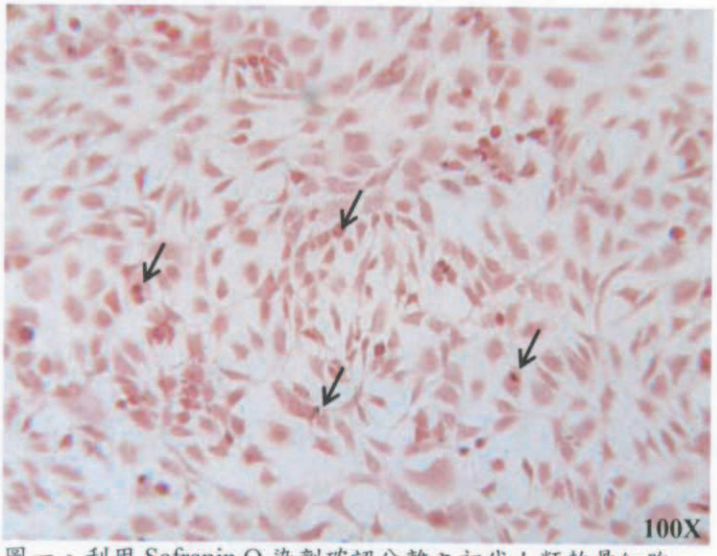
16. Lu, M. C. 2005. Micropropagation of vitis thunbergii Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shot tip culture. Scientia Horticulturae ,107, 64-69.

17. 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.

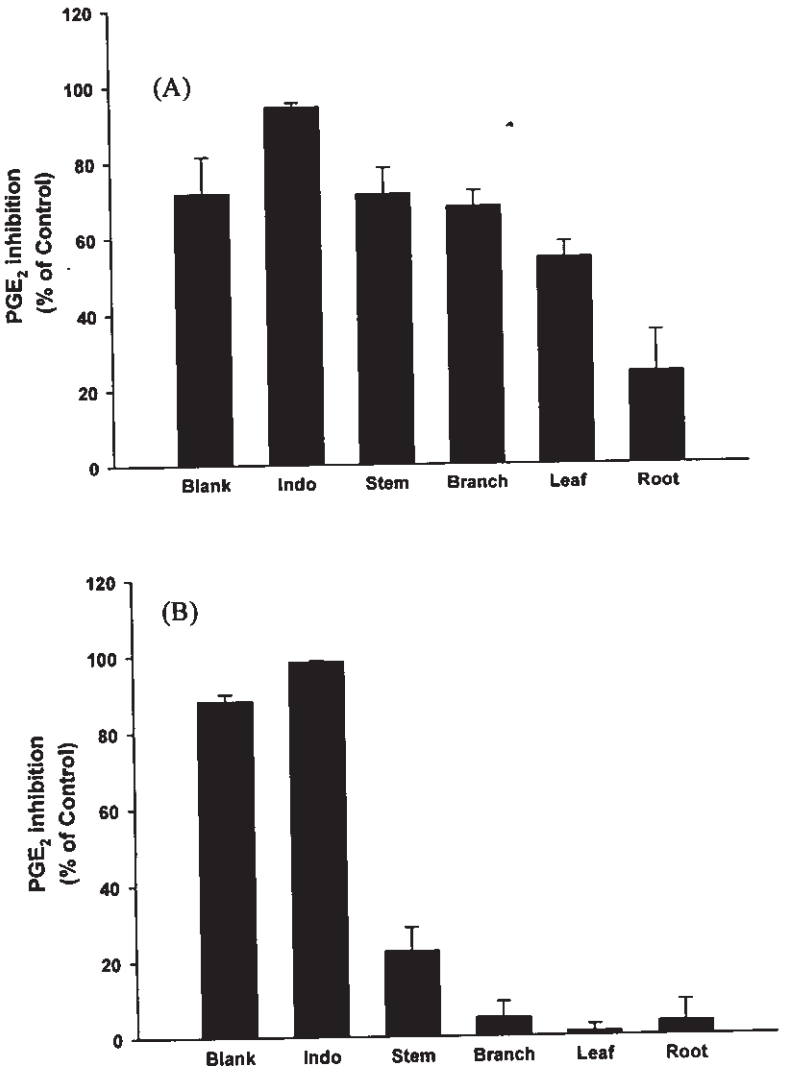
18. Abramsom L, Vaccarino V. Relationship betweem physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged older US adults. Arch. Intern. Med. 2002; 162: 1286-1292.

19. 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(5): 953-968

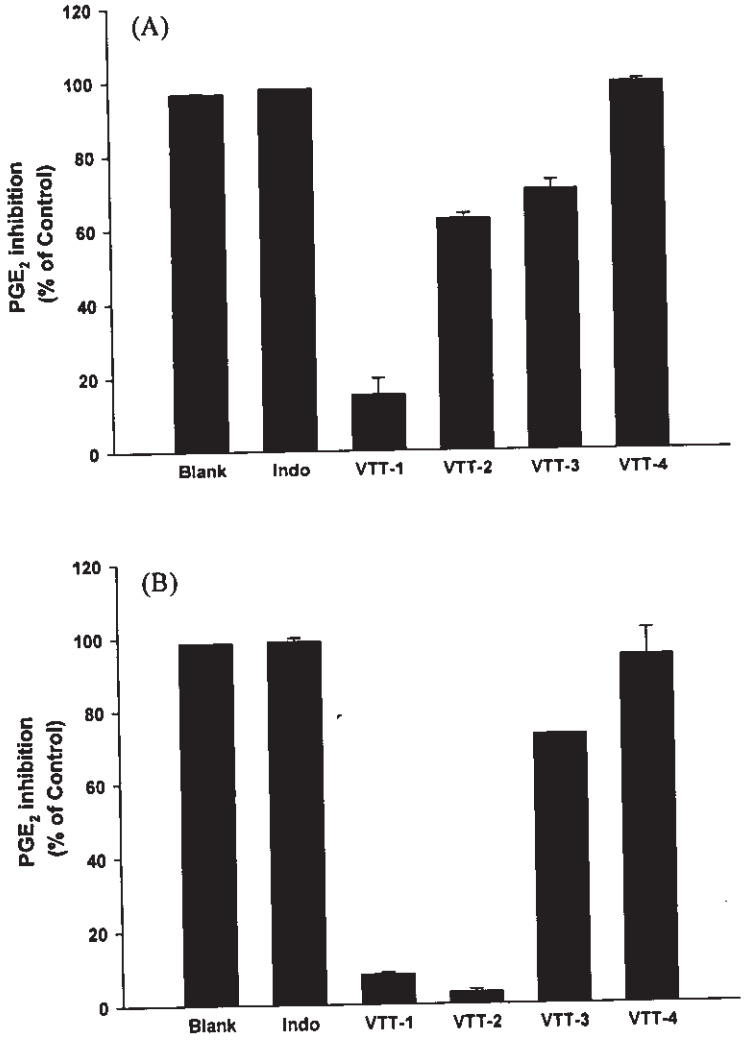
20. Hedbom E, Hauselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. Cell.Mol. Life Sci2002; 59: 45-53.
21. Kaboli PJ, Doebbeling BN, Saag KG, Rosenthal GE. Use of complementary and alternative medicine by older people with arthritis: a population-based study Arthritis Care & Research 2001; 45: 398-403.
22. Leng S, Chaves P, Koenig K, Walston J. Serum interleukin-6 and hemoglobin as physiological correlates in the geriatric syndrome of frailty: a pilot study J Am Geriatr Soc 2002; 50: 1268-1271
23. Park KC, Park EJ, Kim ER, Kim Y, Chung SH, Cho BW, Kim S, Jin M. Therapeutic effects of PG201, an ethanol extract from herbs, through cartilage protection on collagenase-induced arthritis in rabbits. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jun 17;331(4):1469-77.
24. Payne N, Gledhill N, katzmarzyk PT, Jamnik V, Ferguson S. Health implications of musculoskeletal fitness. Can.J. Appl. Physiol. 2000; 25(2):114-126.
25. Rashad S, Heminway A, Rainsford Kim, Revell P, Low F, Walker F. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the course of osteoarthritis. Lancet 1989.
26. Spector TD, Hart DJ, Nandra D, Doyle DV, Mackillop N, Gallimore JR, Pepys MB. Low level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease. Arthritis & Rheumatism 1997; 40(4): 723-727.



圖一、利用 Safranin O 染劑確認分離之初代人類軟骨細胞。
箭頭所指之地方為正在進行細胞增生之軟骨細胞。



圖二、小葉葡萄對 LPS 及 IL-1β 兩種誘導劑刺激初代人類軟骨細胞釋放 PGE_2 之抑制率。(A) 1 痢/ml LPS 誘導，(B) 5 ng/ml IL-1β 誘導。Blank: 不含誘導劑之空白組。 Indo: 10 然 indomethacin。萃取物劑量均為 100 痢/ml。Stem: 主幹莖，Branch: 側枝，Leaf: 葉，Root: 主根。



圖三、於小葉葡萄中分離得到之四種純化物對 LPS 及 IL-1β 兩種誘導劑刺激初代人類軟骨細胞釋放 PGE_2 之抑制率。(A) 1 痢/ml LPS 誘導，(B) 5 ng/ml IL-1β 誘導。Blank: 不含誘導劑之空白組。 Indo: 10 然 indomethacin。純化物劑量均為 100 然 。VTT-1: (+)-Vitisin A, VTT-2: Ampelopsin C, VTT-3: (+)-*cis*-ε-Viniferin, VTT-4: Resveratrol