

# 中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科  
佳作

052011

原薯蕷皂昔透過抑制 MAPK 訊號路徑及 ROS 的生成對 LPS 誘導的敗血症具有保護作用

學校名稱：天主教道明學校財團法人高雄市道明高級  
中學

作者：	指導老師：
高二 陳盈丞	葉淑德
高二 張宇捷	
高二 林亮霆	

關鍵詞：原薯蕷皂昔、巨噬細胞、敗血症

# 原薯蕷皂苷透過抑制 MAPK 訊號路徑及 ROS 的生成對 LPS 誘導的敗血症具有保護作用

## 摘要

敗血症是一種由感染引起的全身性發炎反應，常導致多重器官衰竭甚至死亡。天然化合物 Protodioscin（原薯蕷皂苷）主要萃取自薯蕷屬植物，屬於甾體皂苷類，具有多種潛在的生物活性，包括抗炎、抗癌及抗氧化特性，但卻尚未有研究指出對於調控巨噬細胞發炎反應的作用。因此本研究主要探討 Protodioscin 是否可抑制 LPS 誘導的 J774A.1 巨噬細胞發炎反應及 ROS 生成。透過酵素結合免疫吸附分析法檢測 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的產量；藉由西方墨點法分析檢測 Protodioscin 對於 iNOS、COX-2、MAPKs 和 Nrf2 訊號路徑的表現；流式細胞儀分析細胞中活性氧(ROS)的濃度。最後利用免疫螢光染色評估發炎反應程度。實驗結果顯示，Protodioscin 可顯著抑制發炎相關蛋白表現並減少 ROS 產生，顯示其具潛力作為敗血症的輔助治療藥物。

## 壹、前言

### 一、研究動機

根據世界衛生組織（WHO）於 2020 年公布的數據，全球約有 4,890 萬例敗血症（Sepsis）病例，其中約 1,100 萬人因敗血症而死亡，佔全球死亡總數的近 20%。在台灣，根據 2020 年衛福部的統計，每十萬人中約有 3,752 人死於敗血症。敗血症依然是全球發病率和死亡率的主要原因，治療及後續照護的成本對於中低資源國家的經濟帶來了巨大的負擔(Salomao, 2019)。敗血症被定義為由宿主對感染的反應失調導致危及生命及器官功能障礙。其發病機制包括因感染引發的活化連鎖反應，進一步誘導促炎細胞因子的自動放大，即所謂的細胞因子風暴（Cytokine storm）(Chousterman, 2017)。在這個過程中，促炎細胞因子的釋放會誘發新細胞釋放更多細胞因子，導致過度活化的發炎反應（overactive inflammatory response），最終造成細胞和器官的損傷。由入侵病原體引發的免疫反應未能恢復至穩定狀態，導致持續的過度發炎及免疫抑制，這是敗血症的典型

病理綜合特徵(van der Poll, 2017)。本研究希望能透過研究原薯蕷皂苷對 LPS 誘導的敗血症具保護效果，測試原薯蕷皂苷作為敗血症疾病藥物的潛力，並且討論原薯蕷皂苷對發炎相關疾病和減緩敗血症的影響，證實其潛在治療效果。

## 二、研究目的

本研究利用脂多醣 (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激 J774A.1 小鼠巨噬細胞以誘導發炎反應，並進一步評估原薯蕷皂苷對相關發炎途徑的調控作用，藉此探討其作為潛在抗發炎藥物的可能性。主要討論以下幾項：

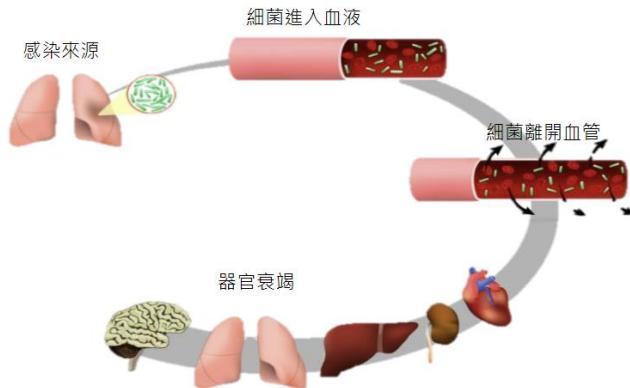
- (一) 探討原薯蕷皂苷是否能有效降低 LPS 在 J774A.1 小鼠巨噬細胞所誘導的發炎反應
- (二) 討論原薯蕷皂苷抑制發炎反應的細胞生理機制
  - 1. 原薯蕷皂苷對發炎相關蛋白活化的影響
  - 2. 原薯蕷皂苷對 MAPK 活化的影響
- (三) 原薯蕷皂苷抗氧化的能力

## 三、文獻回顧

### (一) 敗血症

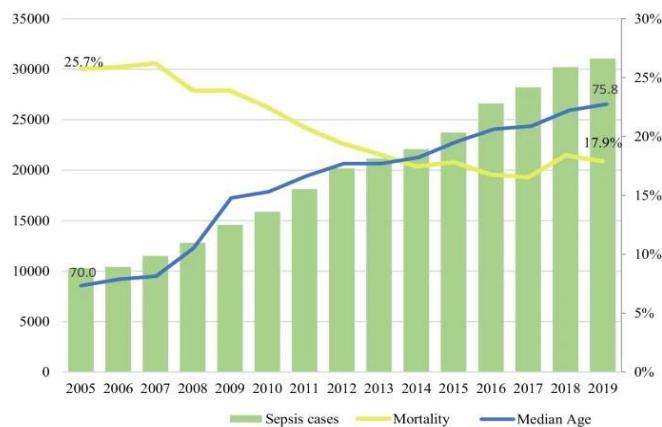
敗血症是微生物(細菌、黴菌、病毒)侵入人體在血液內繁殖並且產生毒素引起的全身性的發炎反應，病人會有發燒、心跳加速、呼吸急促、白血球上升、尿少、發紺、斑駁樣皮膚、意識變化等生命不穩定徵象，病情可能在數小時至數日內快速惡化。嚴重時會引起血壓下降、組織灌流不足，凝血功能的異常甚至全身各種器官衰竭以致死亡，其死亡率約 30-50%。

敗血症是極為複雜的疾病，較常發生於抵抗力不足的病人身上，如老年人、癌症病患、器官功能不全或免疫不全之病患 (Prescott, 2016)。



圖一：敗血症疾病進程。

資料來源： WebMD - Better information. Better health.



圖二：敗血症死亡率與案例數。

資料來源：(Lorencio Cardenas, 2022 )

## (二) 原薯蕷皂昔 (Protodioscin)

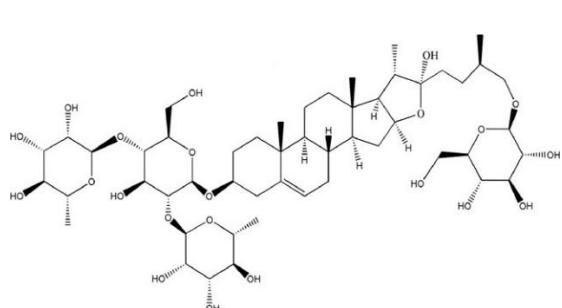
### 1. 簡介

原薯蕷皂昔 (Protodioscin, C<sub>51</sub>H<sub>84</sub>O<sub>22</sub>) 主要存在於薯蕷屬 (Dioscorea) 以及蒺藜 (Tribulus terrestris) 根莖部所萃取的天然物之一，分子量為 1049.20 g/mol，具有多種生物活性，包括抗炎、抗癌、免疫調節和抗氧化活性。

### 2. 應用

過去研究表明，原薯蕷皂昔可能具有抗癌效果，能夠抑制癌細胞和腫瘤的增長 (Chen, 2022)；它可能對免疫系統有影響，潛在的增強或調節免疫反應；此外，

原薯蕷皂苷具抗氧化特性，有助於中和自由基並保護細胞免受氧化壓力影響(Kim, 2023)。並在多種動物中顯示出原薯蕷皂苷透過增加雄激素受體的免疫反應提高了細胞內雄激素受體的濃度，從而使生物體對睪酮和二氫睪酮(DHT)等雄激素的敏感性增強(Gauthaman, 2002)。因此，原薯蕷皂苷具多種生物作用，抗高脂血症、抗癌、抗氧化、性功能和心血管特性。近年來，許多研究聚焦於天然化合物在各類藥物開發中的潛力，而原薯蕷皂苷則是這些潛在藥物中備受關注的一種(Podolak, 2010)。然而，目前尚未有針對原薯蕷皂苷在巨噬細胞中的抗發炎活性及機制被探討，因此本研究主要探討原薯蕷皂苷在治療敗血症的作用及其病理機制。



圖三：原薯蕷皂苷結構。



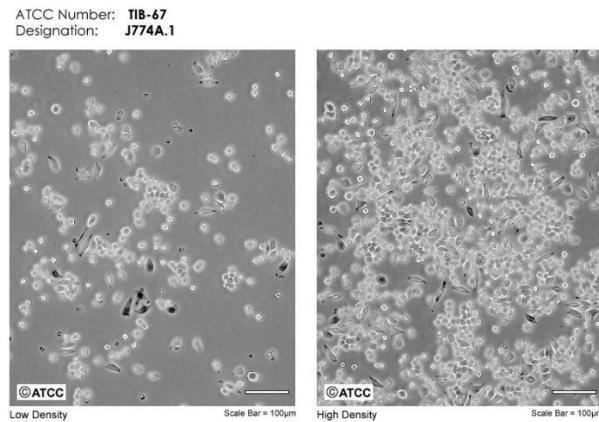
圖四：薯蕷屬。

資料來源：(Shen, 2016) 資料來源：Dioscorea. In: The Plant List (2013).

### (三) 巨噬細胞 (J774A.1)

#### 1. 巨噬細胞株

J774A.1 細胞株是一種小鼠單核巨噬細胞株，最初由 BALB/c 小鼠的單核巨噬細胞在誘導性腫瘤中分離而來。這種細胞具有典型的巨噬細胞特徵，如吞噬作用、抗原呈遞以及分泌細胞因子的能力，因此在免疫學研究中被廣泛應用，截至 2024 年為止已有多達 5,100 篇研究以 J774A.1 細胞株探討免疫反應、發炎機制、細胞吞噬以及細胞與病原體的相互作用。



圖五：J774A.1 細胞株細胞型態。

資料來源：ATCC

## 1. 巨噬細胞之角色

J774A.1 細胞株具有吞噬和殺傷細菌、病毒和其他微生物的能力，同時也可以分泌多種細胞因子和發炎介質，參與免疫反應和發炎反應。J774A.1 細胞為先天免疫系統的核心細胞，負責監測環境，並在異常時提供保護作用。J774A.1 細胞受到刺激後會釋放多種促發炎介質和細胞激素，如一氧化氮、前列腺素 E<sub>2</sub>、白細胞介素 6、腫瘤壞死因子-α (tumor necrosis factor-α ; TNF-α) 和活性氧類，J774A.1 細胞會辨識病原相關分子模式 (PAMP)，如脂多醣 (LPS)，以及損傷相關分子模式 (DAMP)，如壞死細胞釋放的 ATP，並因此而活化，引發發炎反應。如細菌於體內擴散而宿主接觸大量 LPS 時，宿主體內過度的免疫反應可能導致敗血性休克 (Septic shock) 的全身反應，嚴重則會死亡。

## (四) 脂多醣 (Lipopolysaccharide, LPS)

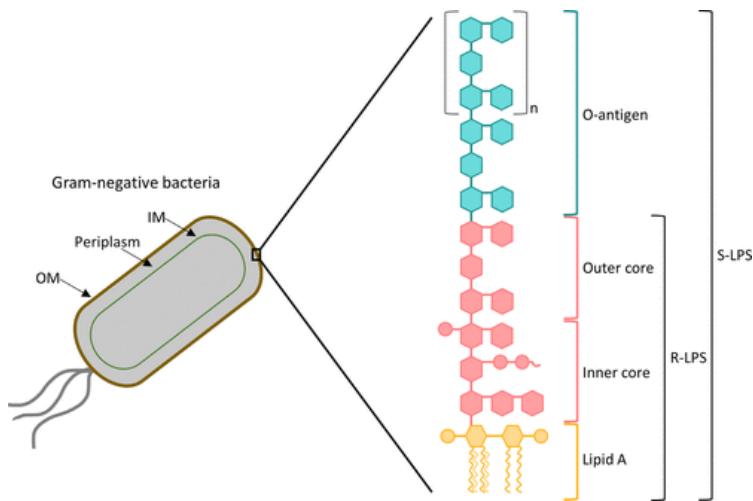
### 1. 簡介

脂多醣 (LPS) 是革蘭氏陰性菌外膜中的主要組成之一，對維持細菌外膜的結構穩定性與完整性具有關鍵作用(Rhee, 2014)。LPS 主要由 脂質 A、O-抗原和外核、內核的多醣組成，其中脂質 A 是其中最具生物活性的部分(Li, 2016)。當細菌受到破壞時，脂質 A 會釋放到宿主的循環系統中，這會引發一系列強烈的免疫反

應，包括急性發炎、發燒和腹瀉。在某些情況下，過度的免疫反應會引發敗血性休克，這是一種由內毒素引起的危及生命的情況(Garcia-Gonzalez, 2020)。

## 2. 應用

脂多醣能透過 Toll 樣受體 (TLR) 活化免疫系統，引發多種發炎反應，並進一步引發細胞因子風暴。並促進細胞因子的釋放，因此常被用於模擬敗血症早期的全身性免疫反應(Kim, 2023)。透過脂多醣的作用，模擬和研究宿主體內過度反應導致的敗血性休克 ( Septic shock ) 的發炎反應和細胞訊號傳導機制。



圖六、脂多醣之結構。

資料來源：(Gonzalez-Fernandez, 2021)

## 貳、 研究設備及器材

### 一、 實驗設備

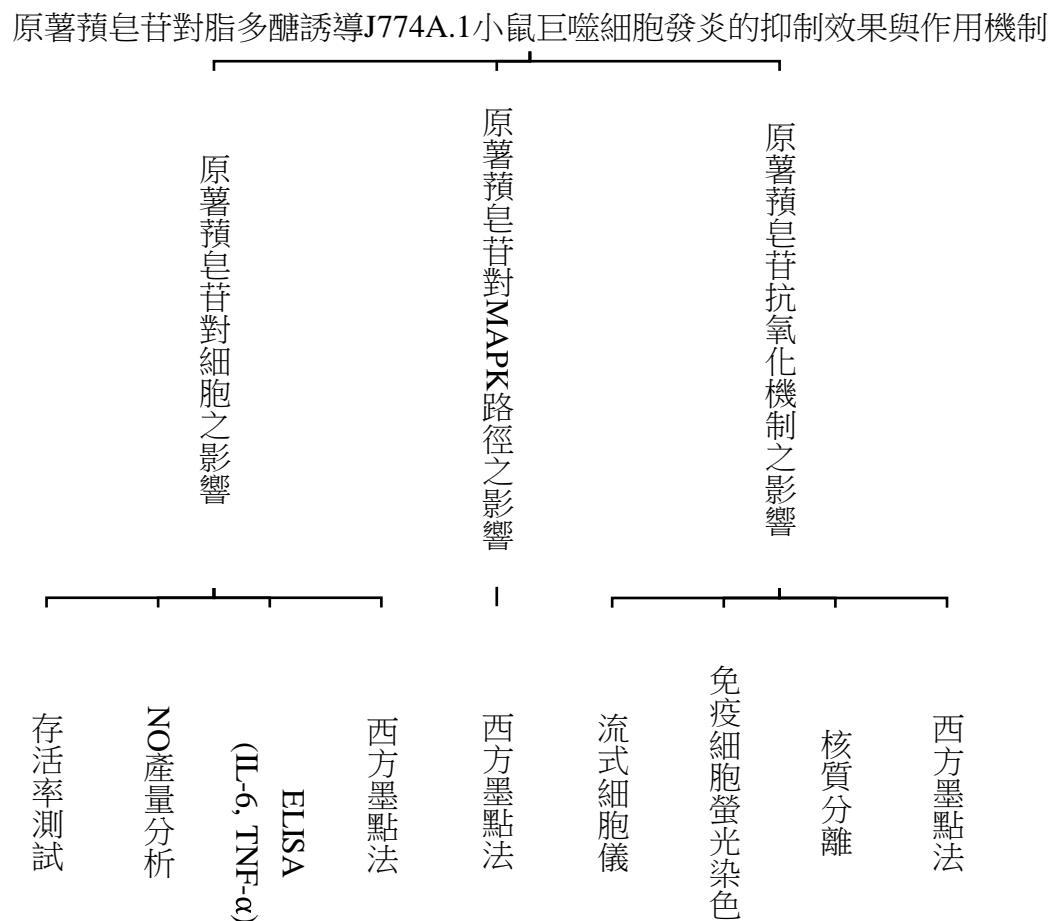
多色流式細胞分析儀 ( BD FACSLyric )、Bio-Rad ChemiDoc XRS<sup>+</sup> System、微板  
讀取器 ( BioTek instruments, 美國佛諾斯基, 維諾斯基, VT, 美國 )

### 二、 實驗器材

培養皿、15 mL 離心管、離心機、細胞培養箱、96 孔盤、12 孔盤、微量盤分析儀、  
微量分注器 ( 1000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L、20  $\mu$ L、10  $\mu$ L )、桌上型平面震  
盪器、試管震盪器、架膠器、PVDF 膜、電泳槽、電泳照膠影像儀、流式細胞儀。

## 參、 研究過程或方法

## 一、研究架構



圖七、研究架構。

資料來源：作者自行繪製

## 二、細胞培養條件

J774A.1 細胞培養於含有 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 及 1% 青黴素/鏈黴素 (Penicillin/Streptomycin) 的杜氏改良伊格爾培養基 (DMEM) 中，並置於 37°C、5% CO<sub>2</sub>的培養箱中進行培養。

## 三、藥品處理方式

先將培養的 J774A.1 細胞以每孔(每 well)  $1 \times 10^5$  個細胞的濃度接種至 96 孔盤(96-well plate) 或 12 孔盤 (12-well plate)。在常規培養條件下培養 24 小時後，進行培養基更換；其中，藥物處理組需於新培養基中加入特定濃度的原薯蕷皂苷，並持續在 37°C、5% CO<sub>2</sub>環境中培養。

#### 四、LPS 誘導發炎處理

以藥物預處理 1 小時後，在藥物處理組與 LPS 對照組的培養基中添加 1  $\mu\text{g/mL}$  的 LPS，並持續培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的環境下。測量不同物質時的培養時間如表一。

表一：測量不同物質時的 J774A.1 細胞培養時間。

測量物質或檢測方法	藥物處理時長（小時）	LPS 處理時長（小時）
Griess assay	1	24
MTT assay	1	24
TNF-α、IL-6	1	24
STAT3	1	24
NOS2、COX2	1	24
MAPK (JNK、ERK、p38)	1	2
Nrf2	1	0.5
HO-1/ KEAPI	1	4

#### 五、細胞存活率分析

以藥物預處理 1 小時，加入 LPS 處理 24 小時後，將培養液總量 1/10 的 MTT 試劑加入到細胞培養的 96 孔盤中。在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 條件下培養 3 小時後，取出培養上清液，加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO 以溶解形成的紫色結晶，再以微量盤分析儀測量吸光值(OD570)。

#### 六、NO 產量測定

以藥物預處理 1 小時後，加入 LPS 處理 24 小時，並收集細胞上清液進行後續分析。

以 200  $\mu\text{M}$  的 NaNO<sub>2</sub> 作為標準品，進行序列稀釋製備七種不同濃度，並以 ddH<sub>2</sub>O

作為空白對照組。Griess reagent A 劑、B 劑以 1:1 比例預先混和，與樣本等量加入孔洞中。反應於避光條件下 15 分鐘後，以微量盤分析儀測定 OD540，根據標準品的濃度與對應 OD540 數值繪製  $\text{NO}^{2-}$  濃度標準曲線，進而計算樣本當中的  $\text{NO}^{2-}$  濃度。

## 七、ELISA 分析法

將細胞經適當處理後，收集上清液作為樣本，檢測 IL-6、TNF- $\alpha$  的濃度。於 96 孔盤中加入以 Coating buffer 稀釋 250X 的 Capture antibody，並置於 4°C 冰箱過夜，使抗體附著於孔壁。隔日，清洗孔盤後，加入預先稀釋的 ELISA diluent 進行 blocking 1 小時，再次清洗後加入樣本與標準品，於 4°C 冰箱中隔夜保存以促進抗原與抗體充分結合。隔日清除孔內液體，加入 Detection antibody 於室溫下反應 1 小時，接著加入 HRP 標記的二級抗體反應 30 分鐘。之後加入 TMB 進行顯色反應 15 分鐘，反應結束後加入 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  終止，並以微量盤分析儀測定 450 nm 波長的吸光值（OD450）以評估目標蛋白濃度。

## 八、以西方墨點法測定蛋白質表現量

將細胞以合適的方式處理後，將上清液抽除，以 PBS 清洗細胞。加入 lysis buffer 將細胞裂解，收集含有細胞中目標蛋白質的 lysis buffer 作為樣本，將樣本以 14,000 rpm 離心 20 分鐘，並捨棄沉澱物。

在 96 孔盤中，以 2 mg/mL 的 BSA 標準品進行序列稀釋，製備出 7 個不同濃度的標準組，並加入 ddH<sub>2</sub>O 作為 0 mg/mL 的對照組，共計 8 組標準品。而每組標準品加入至各自孔位，每孔體積為 10  $\mu\text{L}$ ，作為蛋白質濃度測定的參考基準。也將樣本加入 96 孔盤中，每孔 2  $\mu\text{L}$ 。事先混和蛋白定量試劑的 A、B 劑 (50:1)，並在每孔中加入 200  $\mu\text{L}$  的蛋白定量試劑，避光反應 30 分鐘後以微量盤分析儀測定 OD562，計算出標準曲線，帶入後可計算樣本蛋白質濃度。再以 lysis buffer 將樣本配製為每份含 30 mg 蛋白質的溶液，同時加入濃縮 6 倍 Dye，以此稀釋後的樣本進行後續實驗。根據蛋白質的分子量參考表二選擇適當的聚丙烯醯胺濃度，並依照表三至表五的配方製

備聚丙烯醯胺凝膠。利用 SDS-PAGE 技術分離蛋白質樣本後，將蛋白質轉移至 PVDF 膜上。接著，以 5% 脫脂奶粉配置於 TBST 中，對 PVDF 膜進行封閉處理，然後將膜浸入一級抗體中，並置於 4°C 冰箱中的搖床上過夜孵育。之後，再以二級抗體孵育 1 小時，倒除多餘抗體並加入顯影試劑，最後使用電泳顯影系統觀察並記錄 PVDF 膜上的蛋白質條帶。

表二：蛋白質分子量與適用聚丙烯醯胺凝膠的聚丙烯醯胺濃度。

蛋白質	分子量	聚丙烯醯胺濃度
STAT3	79 kDa	8%
p-STAT3	79 kDa	8%
iNOS	130 kDa	8%
COX-2	72 kDa	8%
JNK 1/2	54 kDa、46 kDa	10%
p-JNK 1/2	54 kDa、46 kDa	10%
p38	40 kDa	10%
p-p38	43 kDa	10%
ERK 1/2	44 kDa、42 kDa	10%
p-ERK 1/2	44 kDa、42 kDa	10%
Nrf2	97-100 kDa	8%
HO-1	28 kDa	15%
KEAPI	60-64 kDa	8%
Lamon A+C	74 kDa	8%
β-actin	42 kDa	10%

## 九、流式細胞儀分析活性氧

將細胞以合適的方式處理後，預留一組控制組不進行染色，而其餘組別加入 DCFDA 及 MitoSOX 染劑，使 DCFDA 及 MitoSOX 染劑最終濃度為  $1 \mu M$ ，再將細胞放回細胞培養箱中，於避光環境下充分染色。20 分鐘後，將 DMEM 培養基抽除，以 PBS 清洗細胞，並收集細胞，以流式細胞儀分析細胞。

表三：4%聚丙烯醯胺的聚丙烯醯胺凝膠配方。

	1 gel	2 gel	3 gel	4 gel
ddH <sub>2</sub> O	1.87 mL	3.56 mL	5.34 mL	7.12 mL
30%聚丙烯醯胺	0.4 mL	0.8 mL	1.2 mL	1.6 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.75 mL	1.5 mL	2.25 mL	3 mL
10% SDS	30 μL	60 μL	90 μL	120 μL
10% APS	30 μL	60 μL	90 μL	120 μL
TEMED	3 μL	6 μL	9 μL	12 μL
Total	3 mL	6 mL	9 mL	12 mL

表四：8%聚丙烯醯胺的聚丙烯醯胺凝膠配方。

	1 gel	2 gel	3 gel	4 gel
ddH <sub>2</sub> O	4.16 mL	8.32 mL	12.48 mL	16.64 mL
30%聚丙烯醯胺	2.4 mL	4.8 mL	7.2 mL	9.6 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.25 mL	4.5 mL	6.75 mL	9 mL
10% SDS	90 μL	180 μL	270 μL	360 μL
10% APS	90 μL	180 μL	270 μL	360 μL
TEMED	10 μL	20 μL	30 μL	40 μL
Total	9 mL	18 mL	27 mL	36 mL

表五：10%聚丙烯醯胺的聚丙烯醯胺凝膠配方。

	1 gel	2 gel	3 gel	4 gel
ddH <sub>2</sub> O	3.56 mL	7.12 mL	10.68 mL	14.24 mL
30%聚丙烯醯胺	3 mL	6 mL	9 mL	12 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.25 mL	4.5 mL	6.75 mL	9 mL
10% SDS	90 μL	180 μL	270 μL	360 μL
10% APS	90 μL	180 μL	270 μL	360 μL
TEMED	10 μL	20 μL	30 μL	40 μL
Total	9 mL	18 mL	27 mL	36 mL

## 十、細胞免疫螢光染色

將細胞以合適的方式處理後，預留一組控制組不染色，在其餘組別的 1 mL 的 DMEM 培養基中加入 10  $\mu$ L 之 100  $\mu$ M 的 DCFDA 及 MitoSOX 染劑，使 DCFDA 及 MitoSOX 染劑最終濃度為 1  $\mu$ M，再將細胞放回細胞培養箱中，使其在避光環境下充分染色。染色 20 分鐘後，去除掉 DMEM 培養基，並以 PBS 清洗細胞，再加入赫斯特染劑(hoechst33342 stain)反應 10 分鐘。使用螢光顯微鏡(Nikon Ti-U, Tokyo, Japan)拍攝細胞影像。

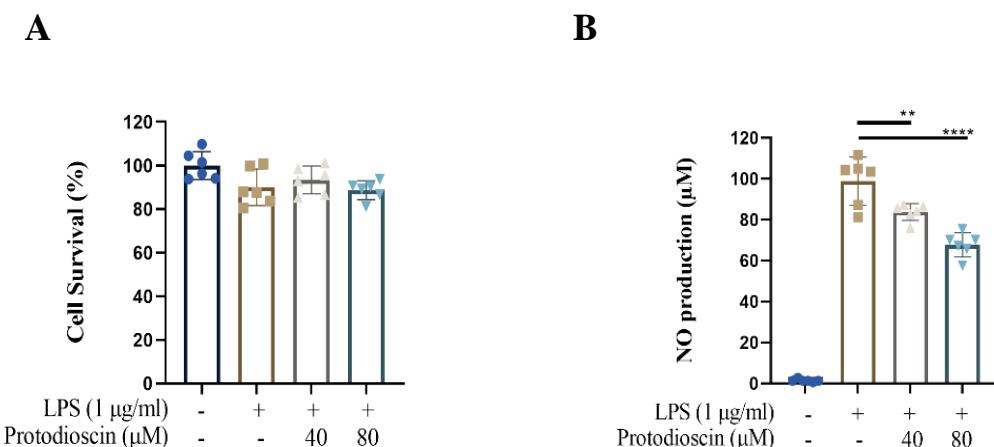
## 十一、統計分析

所有結果使用 Graph Pad Prism 9.0 軟體進行統計分析，均以平均值 $\pm$ 標準偏差 (SD) 呈現。通過單因素方差分析(One-way ANOVA)進行統計分析，然後進行 Tukey's multiple comparisons 多重比較檢驗。 $p$  值小於 0.05 被視為統計學上顯著。(  $p$  value : \* $p$ <0.05 , \*\* $p$ <0.01 , \*\*\* $p$ <0.001 , \*\*\*\* $p$ <0.0001 )。

## 肆、研究結果

### 一、原薯蕷皂苷在對細胞不影響存活率的情況下有效抑制 J774A.1 細胞的發炎反應

以不同濃度的原薯蕷皂苷 (40  $\mu$ M、80  $\mu$ M) 預先處理細胞一小時，再以 LPS 誘導發炎，由圖八 A 結果可知原薯蕷皂苷處理下不會對 J774A.1 細胞產生毒性，使 J774A.1 細胞在經過 LPS 誘導發炎之後仍能維持細胞的生存率，且由圖八 B 可看出原薯蕷皂苷能有效抑制 J774A.1 細胞發炎產生 NO。

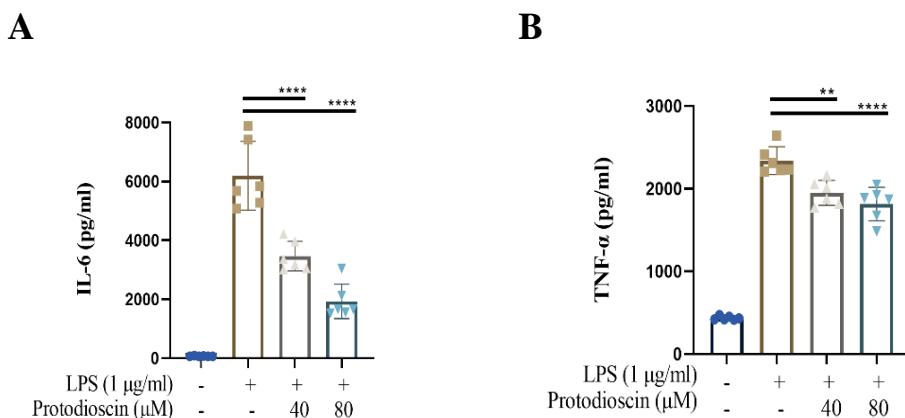


圖八：原薯蕷皂苷對物 J774A.1 細胞活性測試及發炎的抑制能力。

以 MTT assay 檢測細胞存活率，其結果顯示於圖 A；以 Griess assay 檢測 NO 分泌量，其結果顯示於圖 B。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以下方法標示： $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，以 LPS 組為對照。(資料來源：作者自行繪製)

## 二、原薯蕷皂苷抑制 J774A.1 細胞在 LPS 誘導下分泌發炎介質

以不同濃度的原薯蕷皂苷 ( $40 \mu\text{M}$ 、 $80 \mu\text{M}$ ) 預先處理細胞一小時，再透過 LPS 誘導發炎 24 小時，並檢測 LPS 誘導的促發炎介質 TNF- $\alpha$  以及 IL-6 的產生能否透過原薯蕷皂苷的處理而減少。圖九為以 ELISA 檢測細胞所分泌 TNF- $\alpha$  及 IL-6 濃度的結果，結果顯示原薯蕷皂苷能有效抑制 TNF- $\alpha$  以及 IL-6 的分泌。在原薯蕷皂苷濃度高於  $40 \mu\text{M}$  時，能顯著降低。

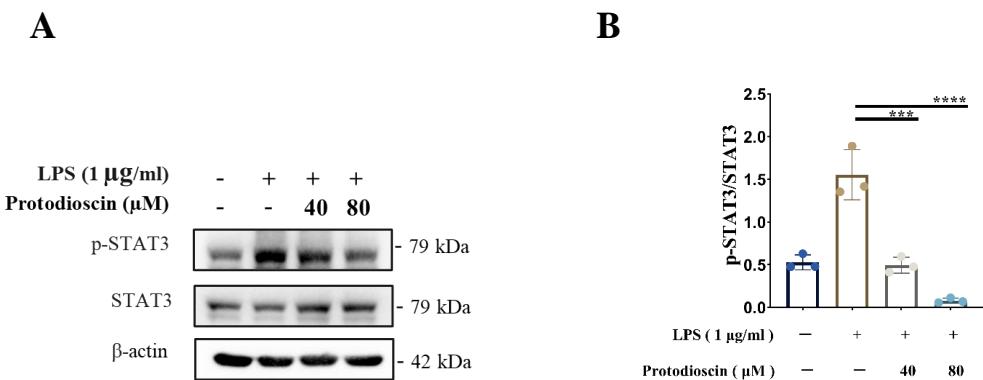


圖九：原薯蕷皂苷對分泌促發炎介質 TNF- $\alpha$  以及 IL-6 的抑制效果。

以 ELISA 分別檢測 TNF- $\alpha$  (圖 A) 以及 IL-6 (圖 B)。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以下方法標示： $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，以 LPS 組為對照。(資料來源：作者自行繪製)

## 三、原薯蕷皂苷降低 J774A.1 細胞在 LPS 誘導下的 STAT3 磷酸化表現量

以不同濃度的原薯蕷皂苷 ( $40 \mu\text{M}$ 、 $80 \mu\text{M}$ ) 預處理細胞一小時後，再以 LPS 誘導 J774A.1 細胞發炎，並收集細胞中的蛋白產物，以西方墨點法分析蛋白質內容物，結果呈現於圖十。結果顯示原薯蕷皂苷能夠有效抑制磷酸化 STAT3 的蛋白質。

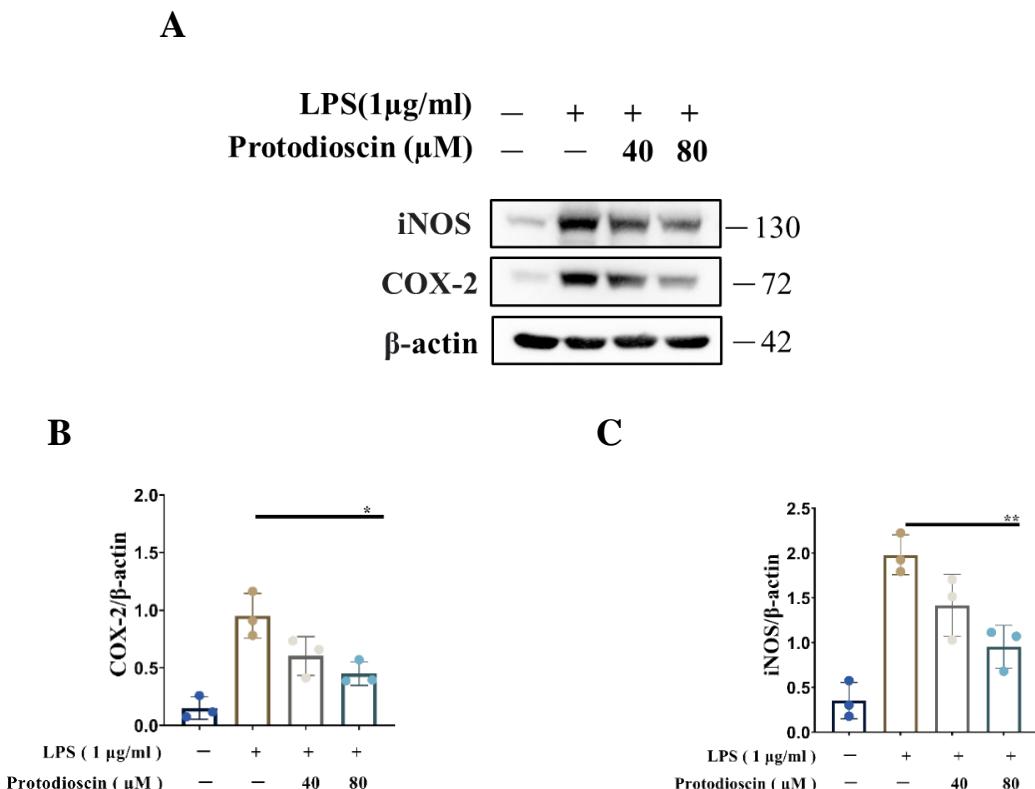


圖十：原薯蕷皂苷減少磷酸化 STAT3 蛋白的表現量。

以西方墨點法檢測 STAT3 及磷酸化 STAT3，以  $\beta$ -actin 為內對照組。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以以下方法標示： $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，以 LPS 組為對照。(資料來源：作者自行繪製)

#### 四、原薯蕷皂苷降低 J774A.1 細胞在 LPS 誘導下的 NOS2 及 COX2 表現量

以不同濃度的原薯蕷皂苷 (40  $\mu\text{M}$ 、80  $\mu\text{M}$ ) 預處理細胞，再以 LPS 誘導 J774A.1 細胞發炎 24 小時，收集細胞中的蛋白產物，並以西方墨點法分析蛋白質內容物，結果呈現於圖十一。結果顯示原薯蕷皂苷能夠有效抑制 NOS2 及 COX2 的蛋白質。

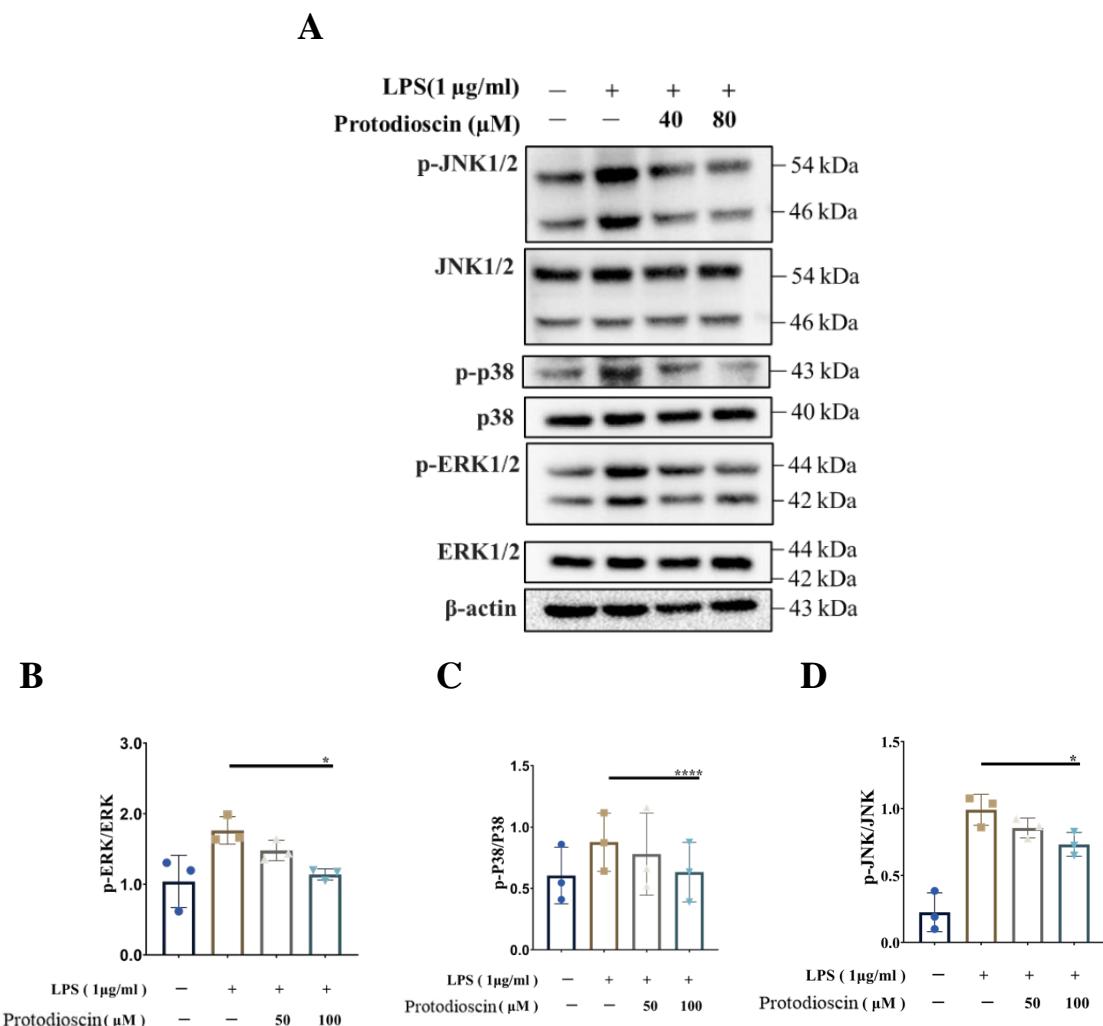


圖十一：原薯蕷皂苷減少 NOS2 及 COX2 蛋白的表現量。

以西方墨點法檢測 NOS2、COX2，以  $\beta$ -actin 為內對照組。數據以平均 $\pm$ 標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以以下方法標示： $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ，以 LPS 組為對照。(資料來源：作者自行繪製)

## 五、原薯蕷皂苷抑制 J774A.1 細胞在 LPS 誘導下的促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 訊息傳遞途徑

以不同濃度的原薯蕷皂苷 ( $40\mu\text{M}$ 、 $80\mu\text{M}$ ) 預處理細胞，再以 LPS 誘導 J774A.1 細胞發炎後，以西方墨點法分析蛋白質內容物中的 MAPK，包含 ERK、JNK、p38 以及磷酸化後的 MAPK，結果呈現於圖十二。結果顯示在以 LPS 誘導發炎後，p-JNK、p-p38、p-ERK 的表現量均上升，而在加入原薯蕷皂苷處理後，p-JNK、p-p38、p-ERK 表現量降低，表示原薯蕷皂苷能有效抑制細胞在 LPS 誘導下的 MAPK 的訊息傳遞途徑。



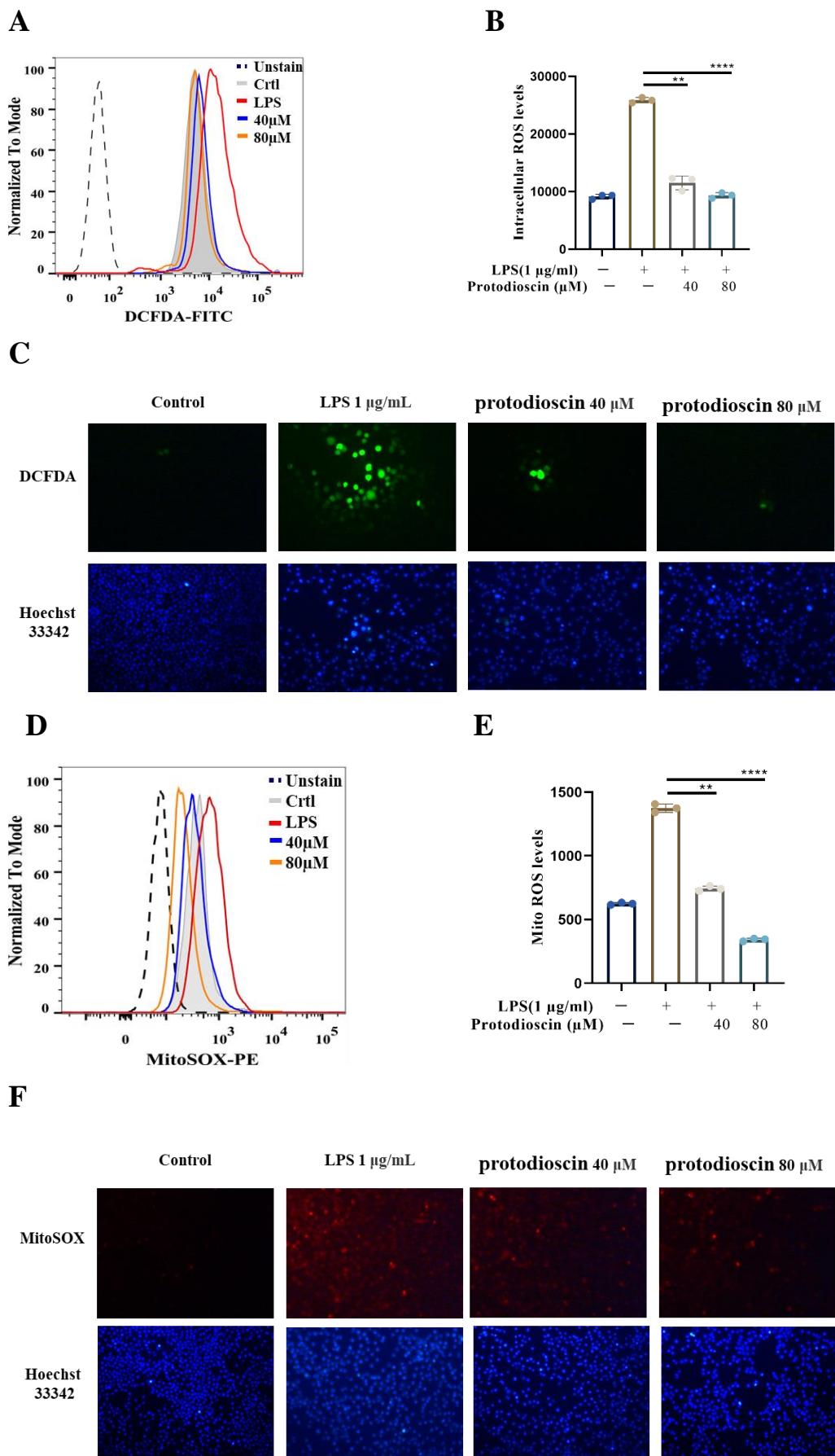
圖十二：原薯蕷皂苷抑制 MAPK 訊息傳遞途徑。

以西方墨點法檢測 p-JNK1/2、JNK1/2、p-p38、p38、p-ERK1/2、ERK1/2，以  $\beta$ -actin 為內對照組。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以以下方法標示： $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，以 LPS 組為對照。(資料來源：作者自行繪製)

## 六、原薯蕷皂苷降低 J774A.1 細胞在 LPS 誘導下產生的 ROS

以不同濃度的原薯蕷皂苷 ( $40 \mu\text{M}$ 、 $80 \mu\text{M}$ ) 將 J774A.1 細胞預先處理一小時後，再加入 LPS 誘導發炎 24 小時，並以 DCFDA 及 MitoSOX 試劑將細胞染螢光 20 分鐘，以流式細胞儀分析 (圖十三 A 及 D) 及細胞於免疫螢光顯微鏡下呈現染色結果 (圖十三 C 及 F)。結果顯示原薯蕷皂苷有效降低 J774A.1 細胞內及粒線體中 ROS 的產生。

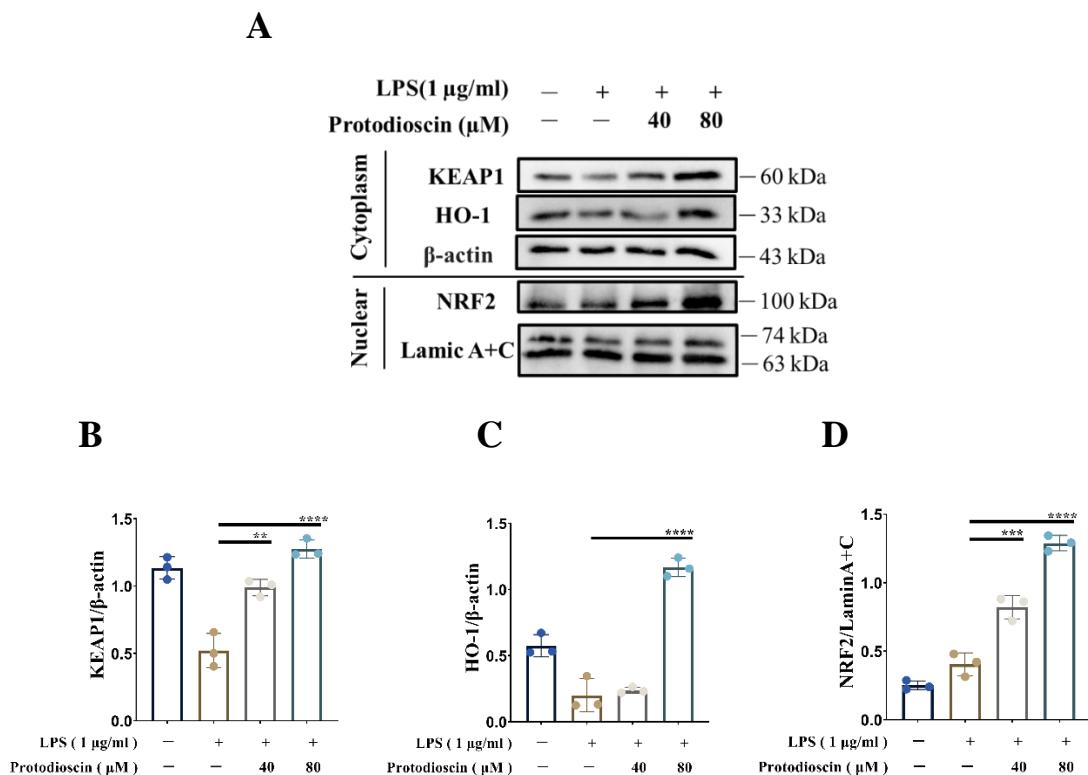
以流式細胞儀分析 ROS 濃度，以 DCFDA 為染劑，分析細胞質中 ROS 產量，結果顯示於圖 A，量化分析 (平均螢光亮度) 顯示於圖 B。以 MitoSOX 為染劑，分析粒線體中 ROS 產量，結果顯示於圖 D，量化分析 (平均螢光亮度) 顯示於圖 E。圖 C、F 分別顯示細胞質與粒線體中 ROS 的免疫螢光染色。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以以下方法標示： $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，以 LPS 組為對照。(資料來源：作者自行繪製)



圖十三：原薯蕷皂苷降低 BV2 細胞的 ROS 產生。

## 七、原薯蕷皂苷增加 LPS 誘導的 J774A.1 細胞中 NRF2/HO-1 路徑活化

以不同濃度的原薯蕷皂苷(40 μM、80 μM)預處理細胞一小時，再以 LPS 誘導 J774A.1 細胞發炎後，針對 NRF2/HO-1 路徑，包含 NRF2、HO-1 及 KEAP1 以西方墨點法分析蛋白質內容物，結果呈現於圖十四。結果顯示 J774A.1 細胞核中的 NRF2 在給予原薯蕷皂苷預先處理的組別中，隨著原薯蕷皂苷的濃度增加而表現量上升。而 J774A.1 細胞質中，KEAP1 及 HO-1 的表現量也是呈現相同的趨勢。



圖十四：原薯蕷皂苷抑制 NRF2/HO-1 訊息傳遞途徑。

以西方墨點法檢測 KEAP1、HO-1、NRF2，以  $\beta$ -actin 及 Lamic A+C 為內對照組。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以以下方法標示：  
 $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，以 LPS 組為對照。(資料來源：作者自行繪製)

## 伍、 討論

原薯蕷皂苷（Protodioscin，分子式  $C_{51}H_{84}O_{22}$ ，分子量 1049.20 g/mol）是一種天然甾體皂苷，主要存在於薯蕷屬（Dioscorea）及蒺藜（Tribulus terrestris）的根莖部，具有多種生物活性，包括抗炎、抗癌、免疫調節及抗氧化等。然而，其在敗血症防治上的潛力尚未被充分探討。

發炎反應是生物體對抗感染性病原體的天然防禦機制，惟若未能有效控制，過度的急性發炎可能導致敗血症與多重器官衰竭。巨噬細胞在發炎反應的啟動與維持中扮演關鍵角色。當 TLR4 受體與脂多醣（LPS）結合後，會活化下游發炎訊號路徑，促使多種促發炎細胞因子與介質釋放。

在本研究中，我們探討原薯蕷皂苷於小鼠巨噬細胞株 J774A.1 中所展現的抗發炎潛力。結果顯示，Protodioscin 可顯著抑制 LPS 誘導的 iNOS 與 COX-2 蛋白表達，並有效降低 NO 的生成。由於 iNOS 與 COX-2 分別催化一氧化氮（NO）及前列腺素（PGE<sub>2</sub>）的合成，兩者在發炎反應及敗血症相關低血壓的形成中扮演重要角色，故此結果突顯 Protodioscin 於調節敗血症發炎反應方面的潛在應用價值。

為深入探討原薯蕷皂苷（Protodioscin）對 TLR4、MAPK 與 NRF2/HO-1 訊息傳遞途徑下游促發炎訊號級聯反應的調控效果，本研究進行了詳細分析。MAPK 訊號通路包含三大類激酶：JNK、ERK 與 p38，這些激酶在調控發炎反應中扮演關鍵角色。而 NRF2/HO-1 則為主要的抗氧化訊息傳導軸，負責啟動細胞的抗氧化防禦機制，以對抗氧化壓力與緩解慢性發炎，進而與多種發炎與代謝性疾病的發展有關。實驗結果顯示，原薯蕷皂苷可顯著抑制 LPS 誘導 J774A.1 巨噬細胞中 MAPK 激酶的磷酸化，並降低促發炎細胞激素 TNF- $\alpha$  與 IL-6 的表現。同時，其亦可活化 NRF2/HO-1 抗氧化訊號通路。

## 陸、 結論

在本研究中，我們的實驗結果證明了原薯蕷皂苷透過降低 NO 的產生、抑制 NOS2、COX2 和 p-STAT3 的表達、減少促發炎因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的分泌、降低 MAPKs 信號路徑的活性，並增加抗氧化 NFR2/HO-1 路徑，從而抑制 LPS 誘導的發炎及氧化反應。這些結果表明原薯蕷皂苷具有降低發炎反應的潛力，可能可以成為治療免疫性疾病的一種天然藥物。

## 柒、 參考文獻資料

1. Salomao, R., et al., *Sepsis: evolving concepts and challenges*. Braz J Med Biol Res, 2019. **52**(4): p. e8595.
2. Chousterman, B.G., F.K. Swirski, and G.F. Weber, *Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis*. Semin Immunopathol, 2017. **39**(5): p. 517-528.
3. van der Poll, T., et al., *The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(7): p. 407-420.
4. Prescott, H.C., et al., *Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study*. BMJ, 2016. **353**: p. i2375.
5. Lorencio Cardenas, C., et al., *Trends in mortality in septic patients according to the different organ failure during 15 years*. Crit Care, 2022. **26**(1): p. 302.
6. Chen, Y.R., et al., *Protodioscin inhibits bladder cancer cell migration and growth, and promotes apoptosis through activating JNK and p38 signaling pathways*. Biomed Pharmacother, 2022. **156**: p. 113929.
7. Kim, S.H., et al., *Protodioscin protects porcine oocytes against H2O2-induced oxidative stress during in vitro maturation*. Anim Biosci, 2023. **36**(5): p. 710-719.
8. Gauthaman, K., P.G. Adaikan, and R.N. Prasad, *Aphrodisiac properties of Tribulus Terrestris extract (Protodioscin) in normal and castrated rats*. Life Sci, 2002. **71**(12): p. 1385-96.
9. Podolak, I., A. Galanty, and D. Sobolewska, *Saponins as cytotoxic agents: a review*. Phytochem Rev, 2010. **9**(3): p. 425-474.
10. Shen, J., et al., *Protodioscin ameliorates fructose-induced renal injury via inhibition of the mitogen activated protein kinase pathway*. Phytomedicine, 2016. **23**(12): p. 1504-1510.
11. Rhee, S.H., *Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut*. Intest Res, 2014. **12**(2): p. 90-5.

12. Li, H., et al., *Lipopolysaccharide Structure and Biosynthesis in Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2016. **21**(6): p. 445-461.
13. Garcia-Gonzalez, N., et al., *Immunomodulation of J774A.1 Murine Macrophages by Lactiplantibacillus plantarum Strains Isolated From the Human Gastrointestinal Tract and Fermented Foods*. *Front Microbiol*, 2020. **11**: p. 557143.
14. Kim, H.J., et al., *Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging*. *Immun Ageing*, 2023. **20**(1): p. 67.
15. Gonzalez-Fernandez, C., et al., *Fighting Against Bacterial Lipopolysaccharide-Caused Infections through Molecular Dynamics Simulations: A Review*. *J Chem Inf Model*, 2021. **61**(10): p. 4839-4851.
16. WebMD - Better information. Better health.
17. The Plant List
18. ATCC

## 【評語】052011

本研究以 J774A.1 小鼠巨噬細胞為實驗模型，分析天然物原薯蕷皂苷（Protodioscin）是否可抑制脂多醣（LPS）誘導下的細胞發炎反應與活性氧（ROS）生成。透過 Griess assay 量測 NO、ELISA 分析促炎因子、Western blot 檢測信號蛋白表現，以及流式細胞儀與免疫螢光評估 ROS 產生。結果顯示原薯蕷皂苷能有效降低促炎反應與 ROS 生成，並調控 MAPK 及 Nrf2/HO-1 訊號路徑，對敗血症有潛在保護效果，呼應全球對敗血症治療需求。

有關本研究的建議如下：

1. Protodioscin 來源於薯蕷屬植物，本身具有多種潛在的生物活性，包括抗炎、抗癌和抗氧化特性，此前尚未有研究明確指出原薯蕷皂苷對於調控巨噬細胞發炎反應的作用，本研究為新藥開發提供了天然來源。
2. 研究主要使用 J774A.1 巨噬細胞系。不同類型的免疫細胞或不同組織來源的細胞對原薯蕷皂苷的反應可能有所不同，這限制了結果的普適性。
3. 做為一種潛在的藥物成分，原薯蕷皂苷在不同劑量下的安全性、潛在副作用或毒性並未討論，這對於其未來的臨床應用和轉化至關重要。

4. 雖假設 Protodiocin 抑制 TLR4/MAPK/Nrf2 等路徑，但缺乏抑制劑/抑制抗體等方式驗證是否為直接機轉。主要集中於 40 與 80  $\mu\text{M}$  濃度，未顯示劑量-反應曲線或更細緻的濃度範圍。

作品海報

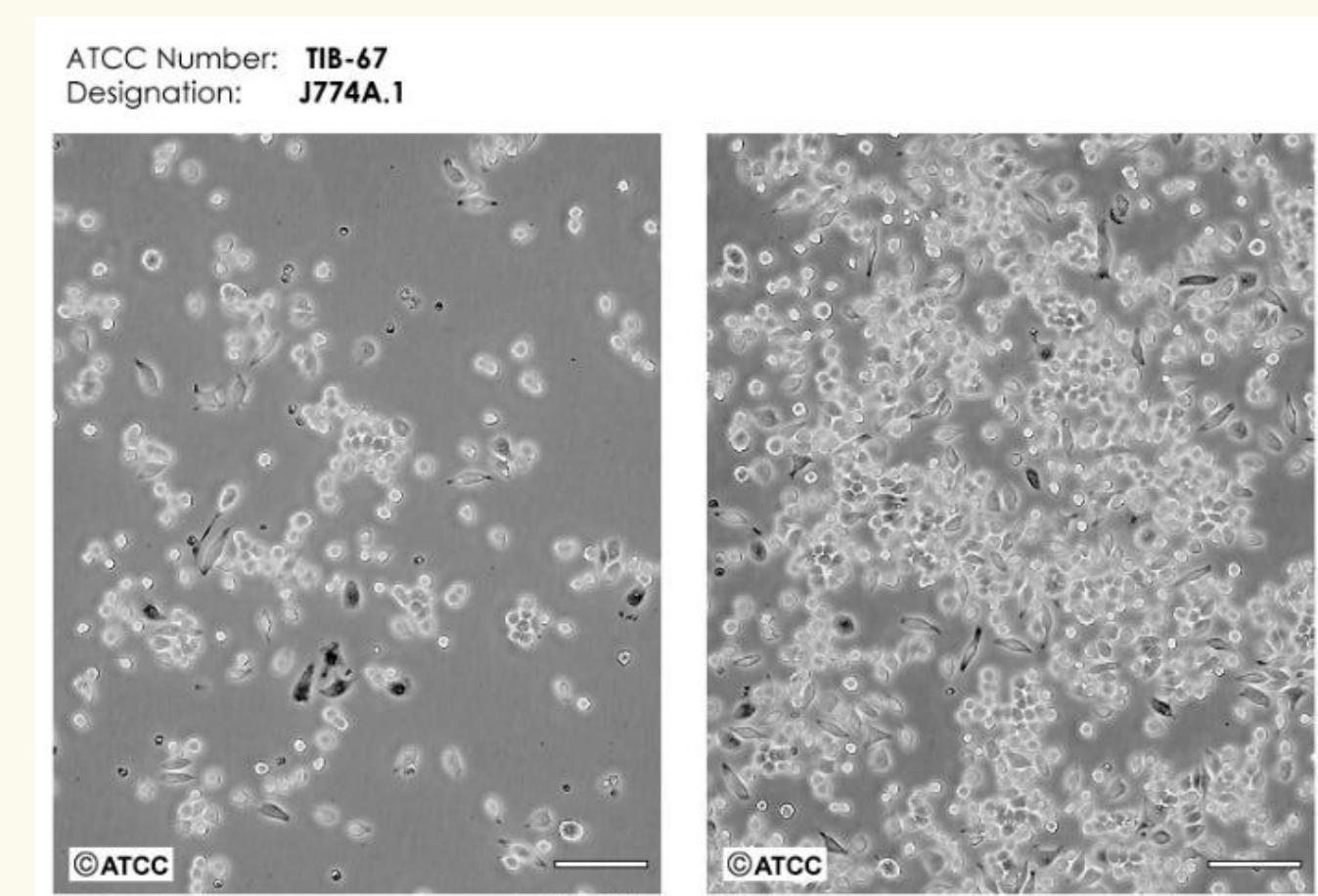
原薯蕷皂苷透過抑制MAPK訊號路徑及ROS  
的生成對LPS誘導的敗血症具有保護作用

## 摘要

敗血症是一種嚴重的全身性發炎反應，通常由感染引起，可能導致多臟器功能衰竭和死亡。其在老年人和免疫系統較弱的患者中有高死亡率及對醫療資源造成重大負擔，若及早發現和適當治療可以顯著改善預後。而天然化合物Protodioscin（原薯蕷皂苷）主要萃取自薯蕷屬（*Dioscorea*）植物，這種天然化合物屬於甾體皂苷類，具有多種潛在的生物活性，包括抗炎、抗癌、免疫調節，此外，protodioscin具抗氧化特性，有助於中和自由基並保護細胞免受氧化壓力。但卻尚未有研究指出Protodioscin對於抑制巨噬細胞發炎反應的作用。因此本研究主要是在探討從Protodioscin對於LPS誘導巨噬細胞的發炎反應是否有抑制作用及其對ROS的生成是否有保護作用。實驗方法包含利用Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)檢測細胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6的產量；藉由西方墨點法分析檢測Protodioscin對於iNOS、COX-2、MAPKs pathway和NFR2/HO-1 signaling pathway的表現；流式細胞儀分析用於檢測細胞中ROS的濃度。最後利用免疫螢光染色評估發炎反應的程度。實驗結果顯示，在LPS誘導的J774A.1巨噬細胞中，Protodioscin可顯著抑制發炎反應、緩解發炎以及減少ROS的產生，未來可望用在敗血症患者治療上。

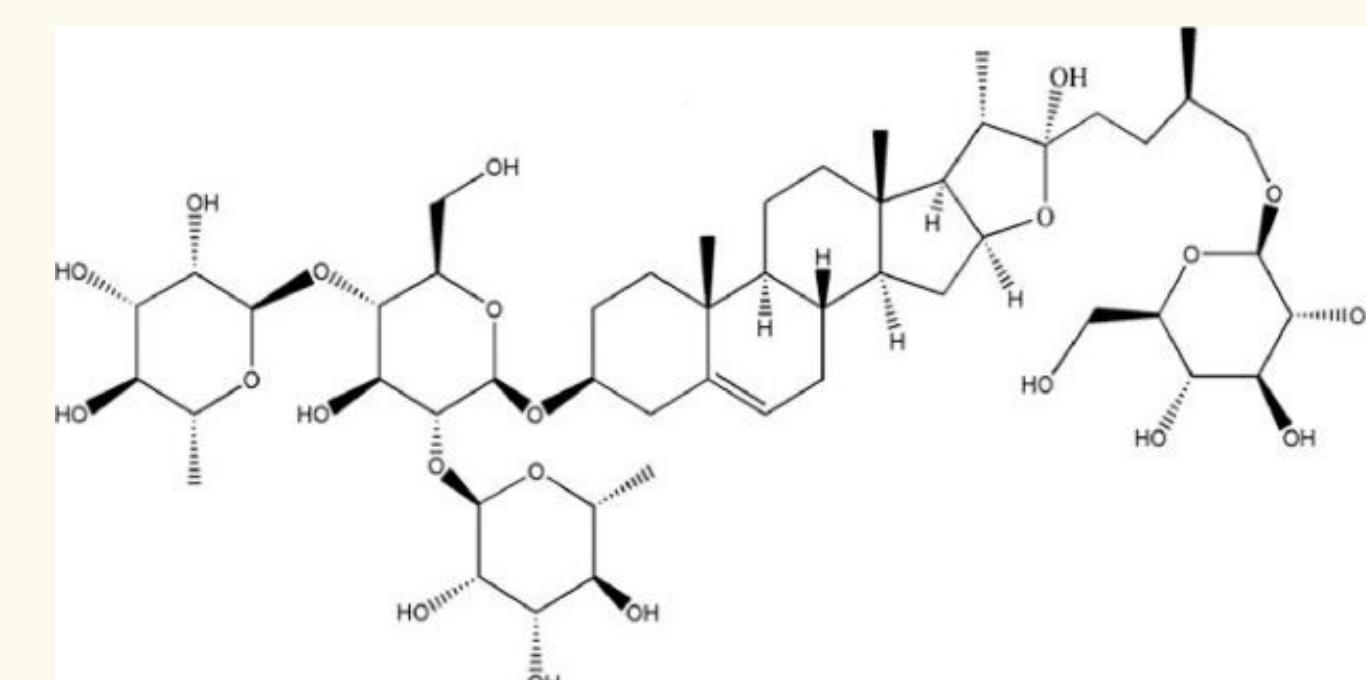
## 細胞及藥物

J774A.1細胞株是一種小鼠單核巨噬細胞株，最初由BALB/c小鼠的單核巨噬細胞在誘導性腫瘤中分離而來。這種細胞具有典型的巨噬細胞特徵，如吞噬作用、抗原呈遞以及分泌細胞因子的能力，因此在免疫學研究中被廣泛應用，截至2024年為止已有多達5,100篇研究以J774A.1細胞株探討免疫反應、發炎機制、細胞吞噬以及細胞與病原體的相互作用。



J774A.1細胞株細胞型態。

資料來源：ATCC



原薯蕷皂苷結構。

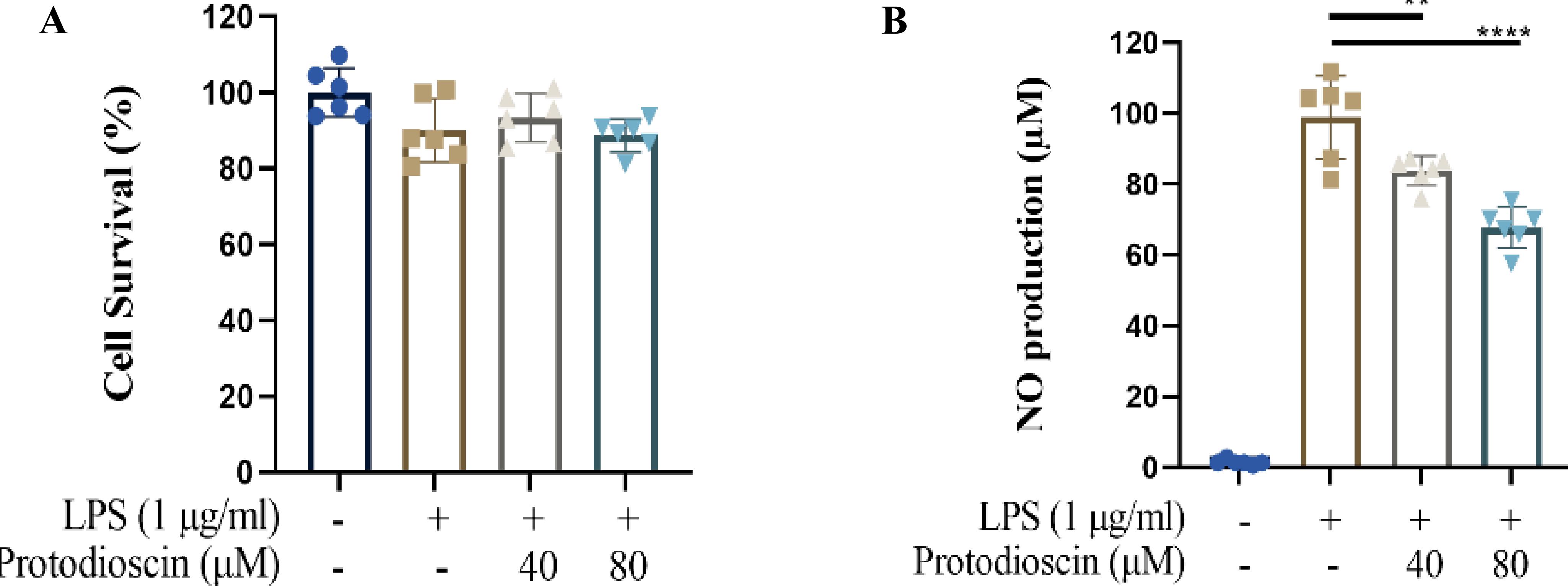
資料來源：(Shen, 2016)



薯蕷屬。

資料來源：Dioscorea. In: The Plant List (2013).

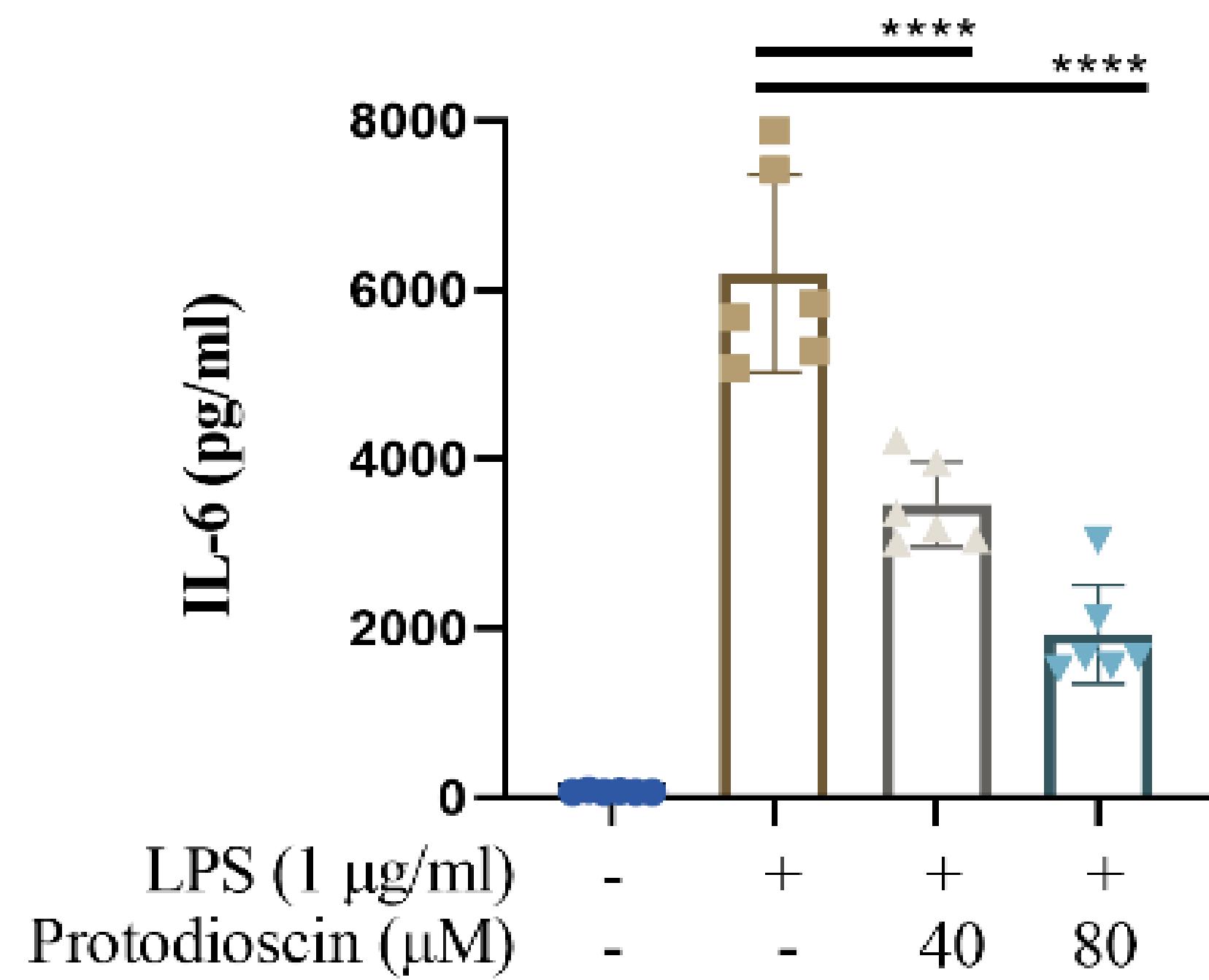
## 結果



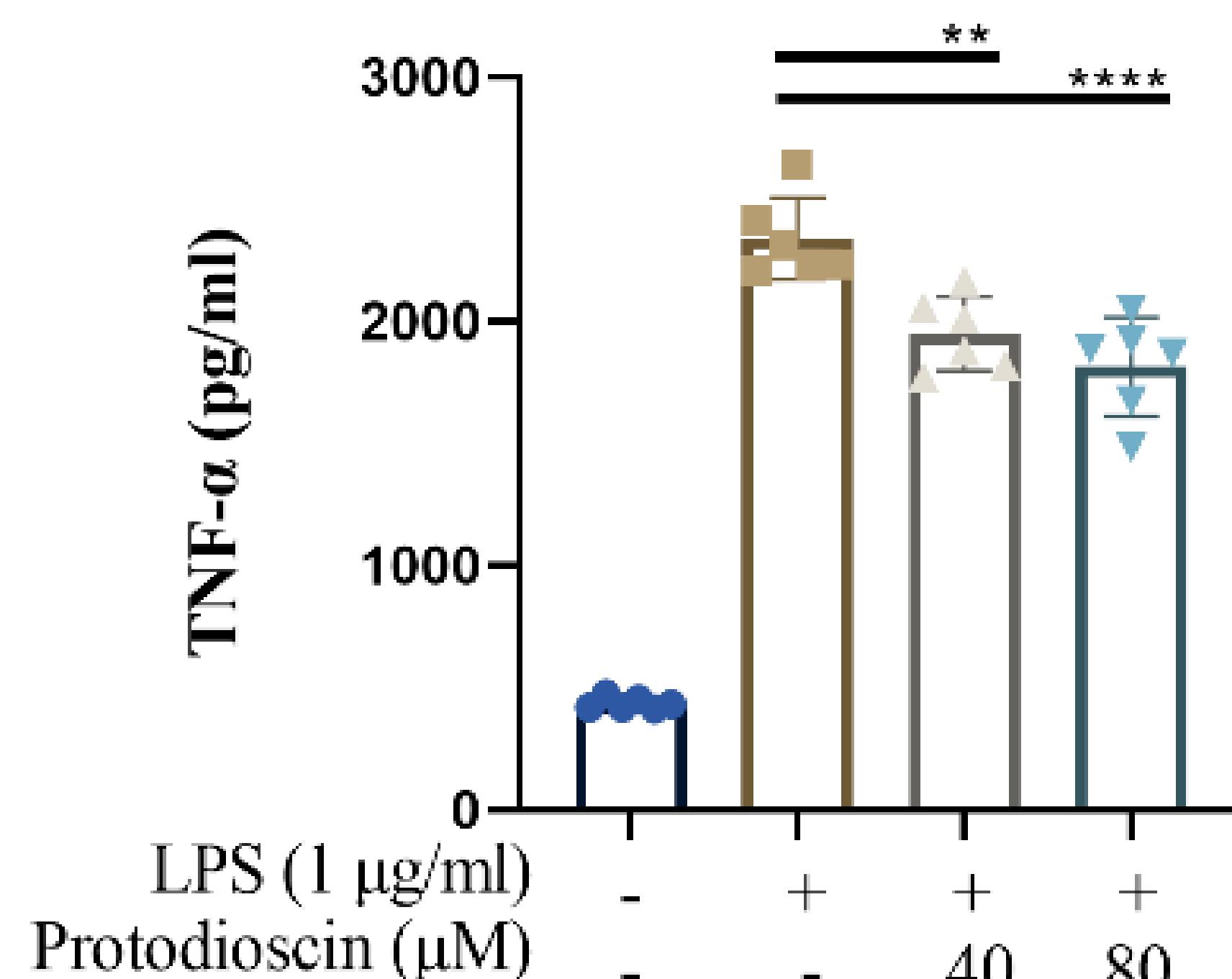
圖一：原薯蕷皂苷對J774A.1細胞活性測試及發炎的抑制能力。(本圖由實驗作者群繪製)以MTT assay檢測細胞存活率(圖A)；以Griess assay檢測NO分泌量，(圖B)。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以下方法標示： $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，以LPS組為對照。

# 結果

A

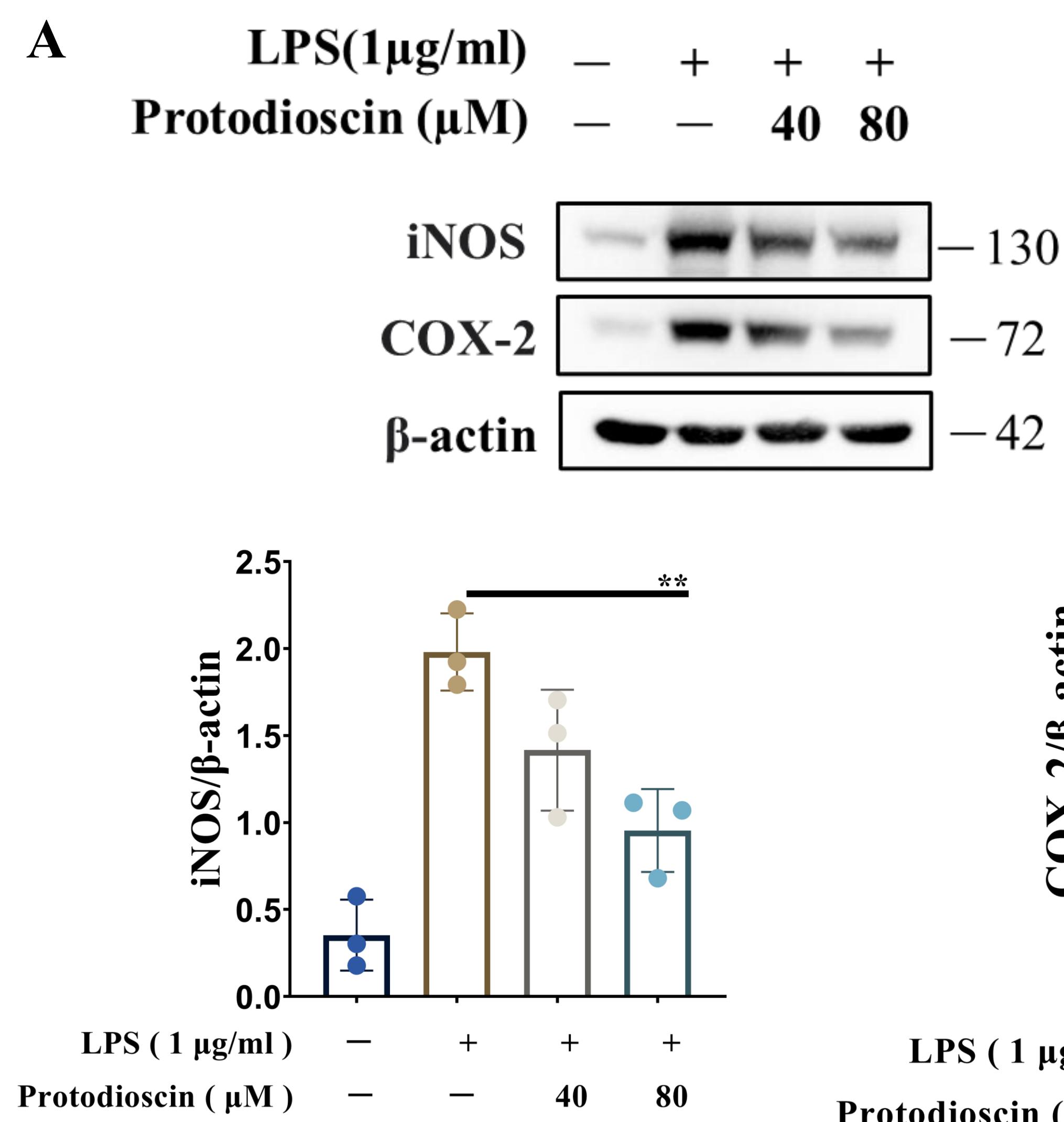


B

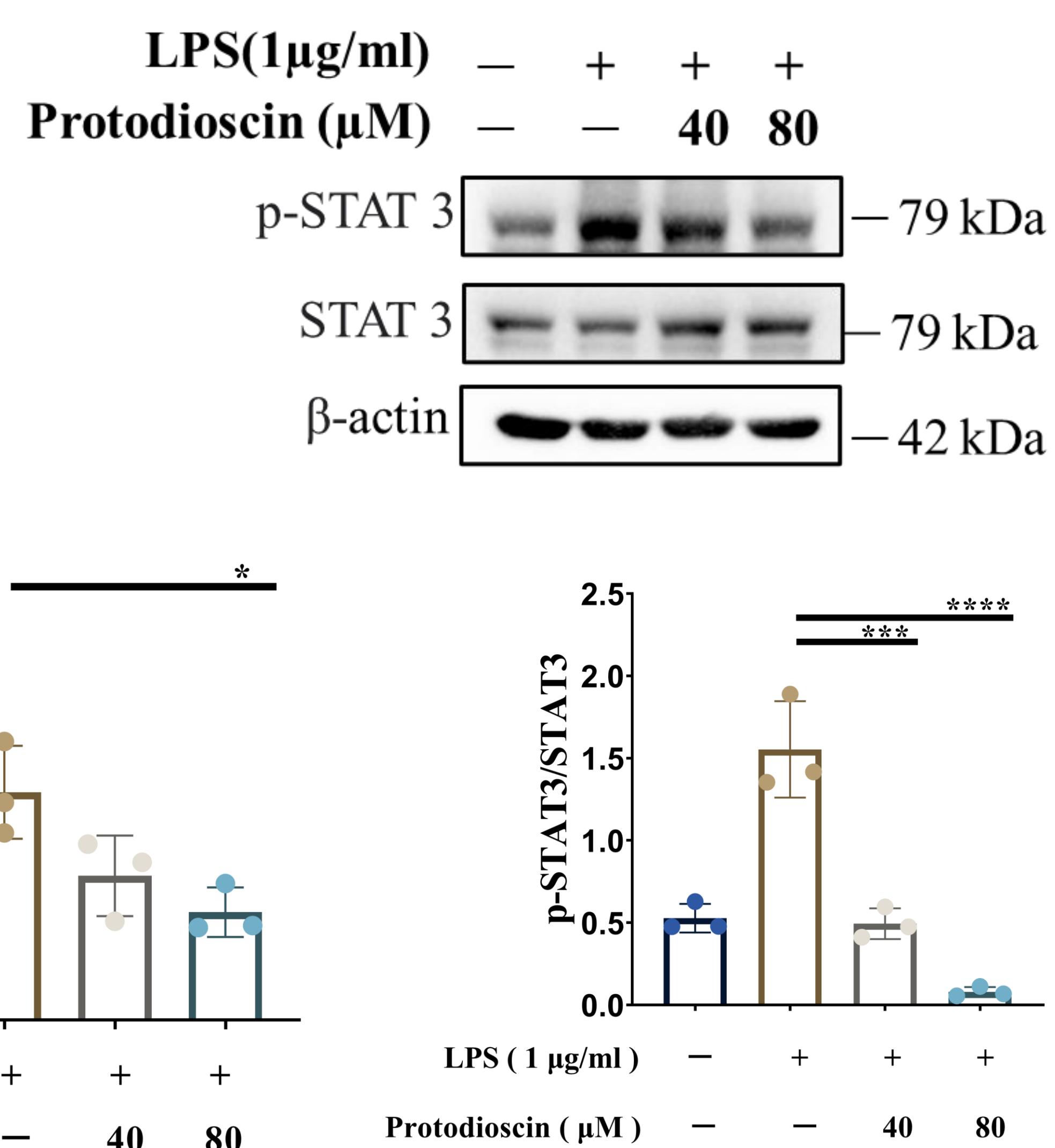


**圖二：原薯蕷皂苷對分泌促發炎介質IL-6以及TNF- $\alpha$ 的抑制效果。(本圖由實驗作者群繪製)**  
以ELISA分別檢測IL-6(圖B)以及TNF- $\alpha$ (圖A)。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以以下方法標示： $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，以LPS組為對照。

A

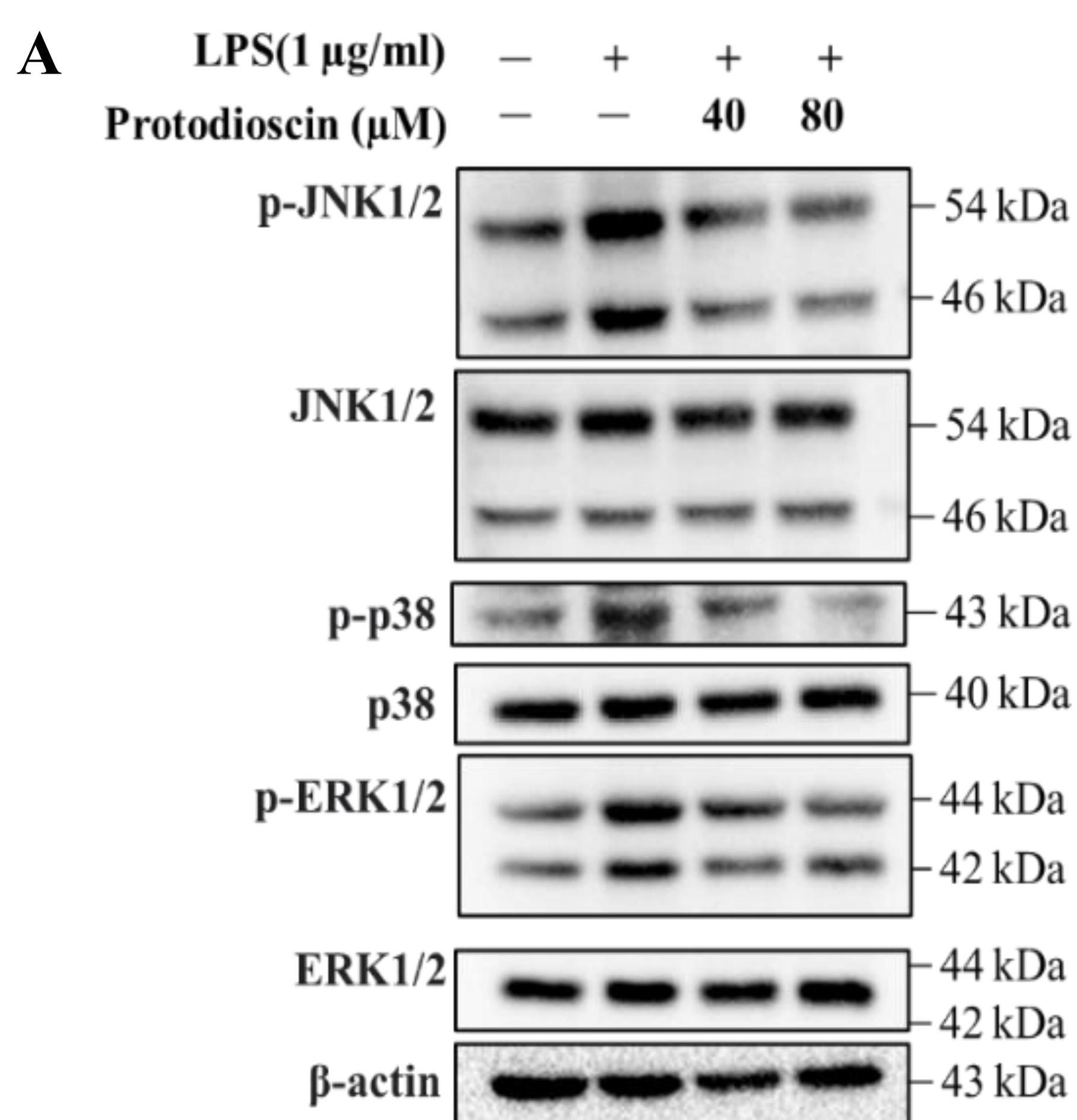


B

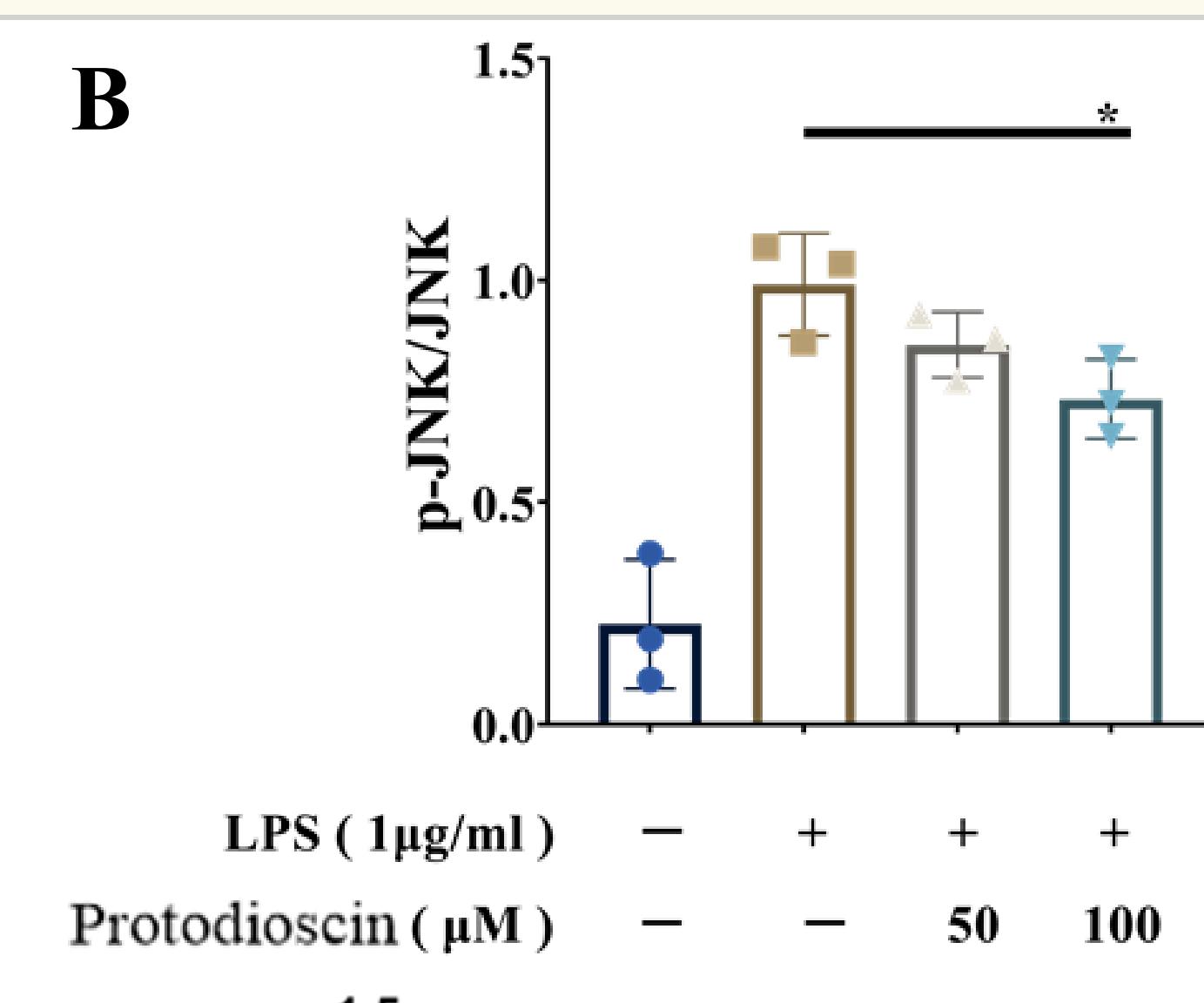


**圖三：原薯蕷皂苷減少NOS2、COX2及STAT3蛋白的表現量。(本圖由實驗作者群繪製)**  
以西方墨點法檢測NOS2、COX2、p-STAT3、STAT3，以 $\beta$ -actin為內對照組。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以以下方法標示： $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，以LPS組為對照。

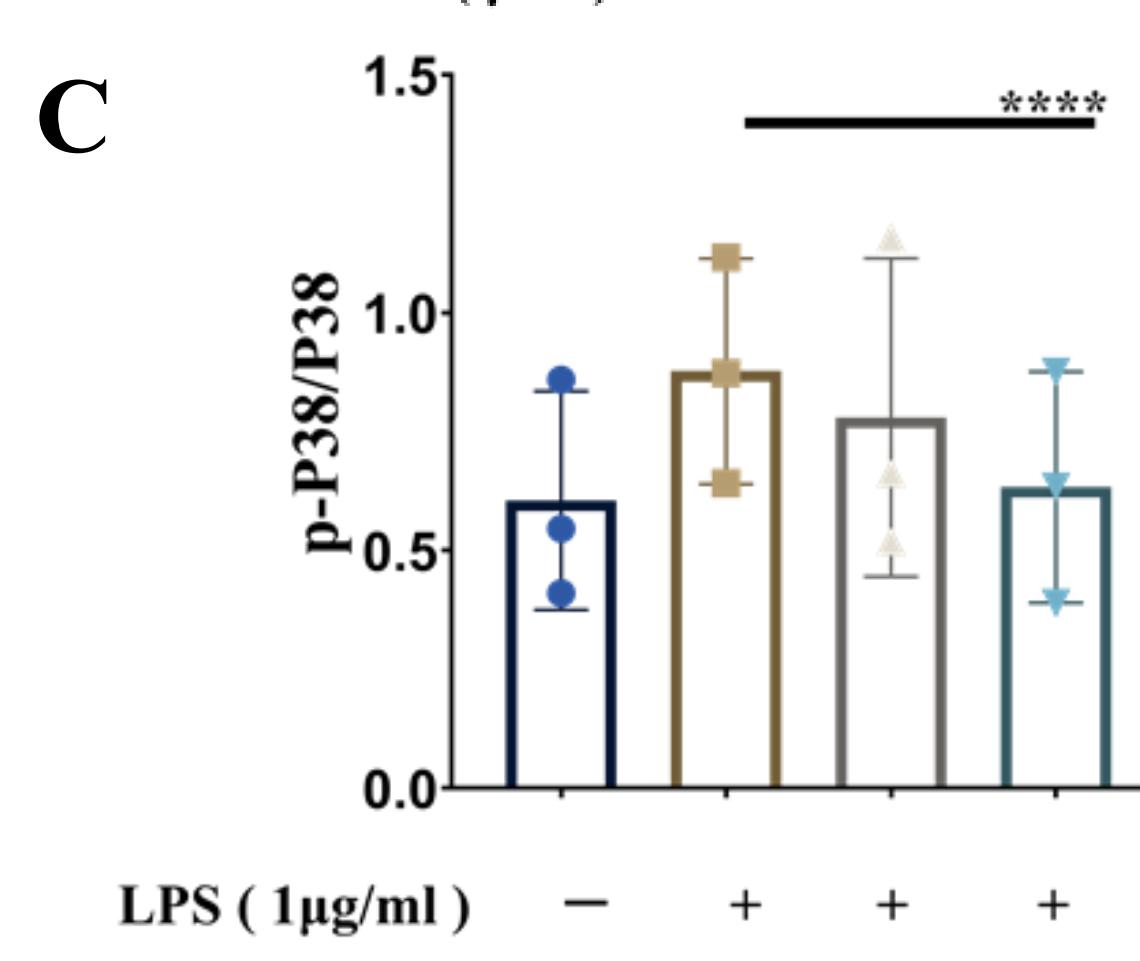
A



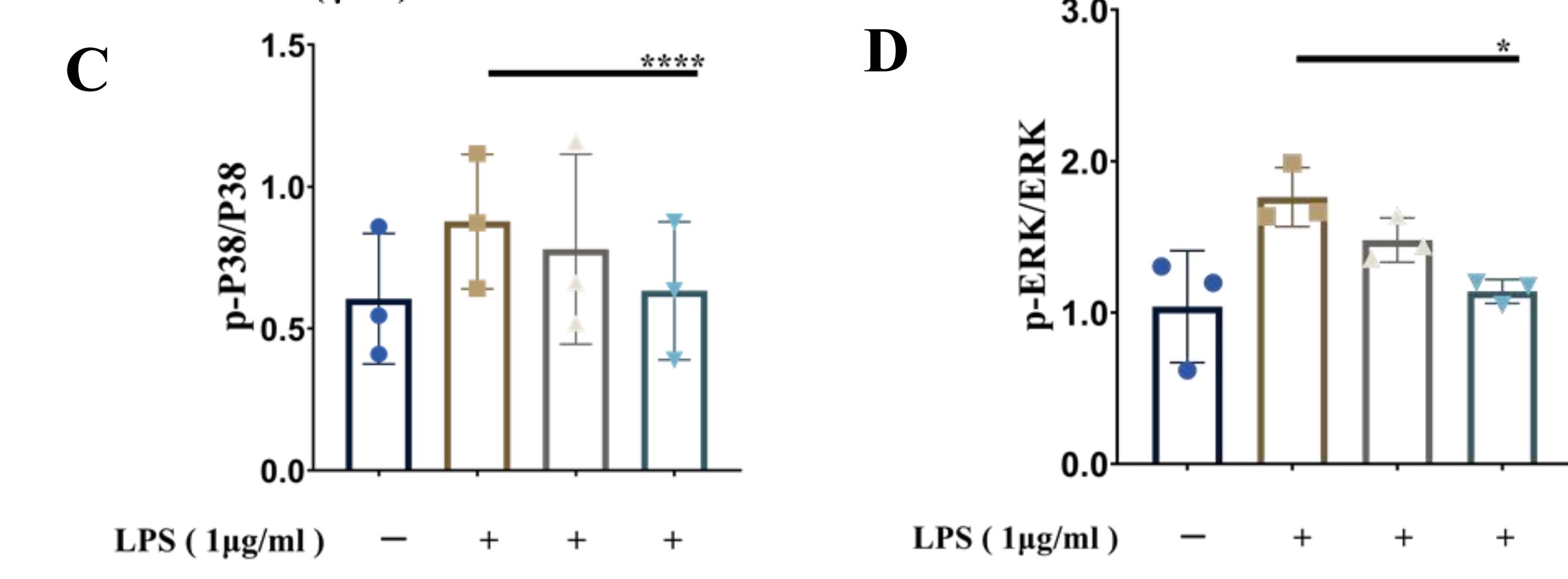
B



C



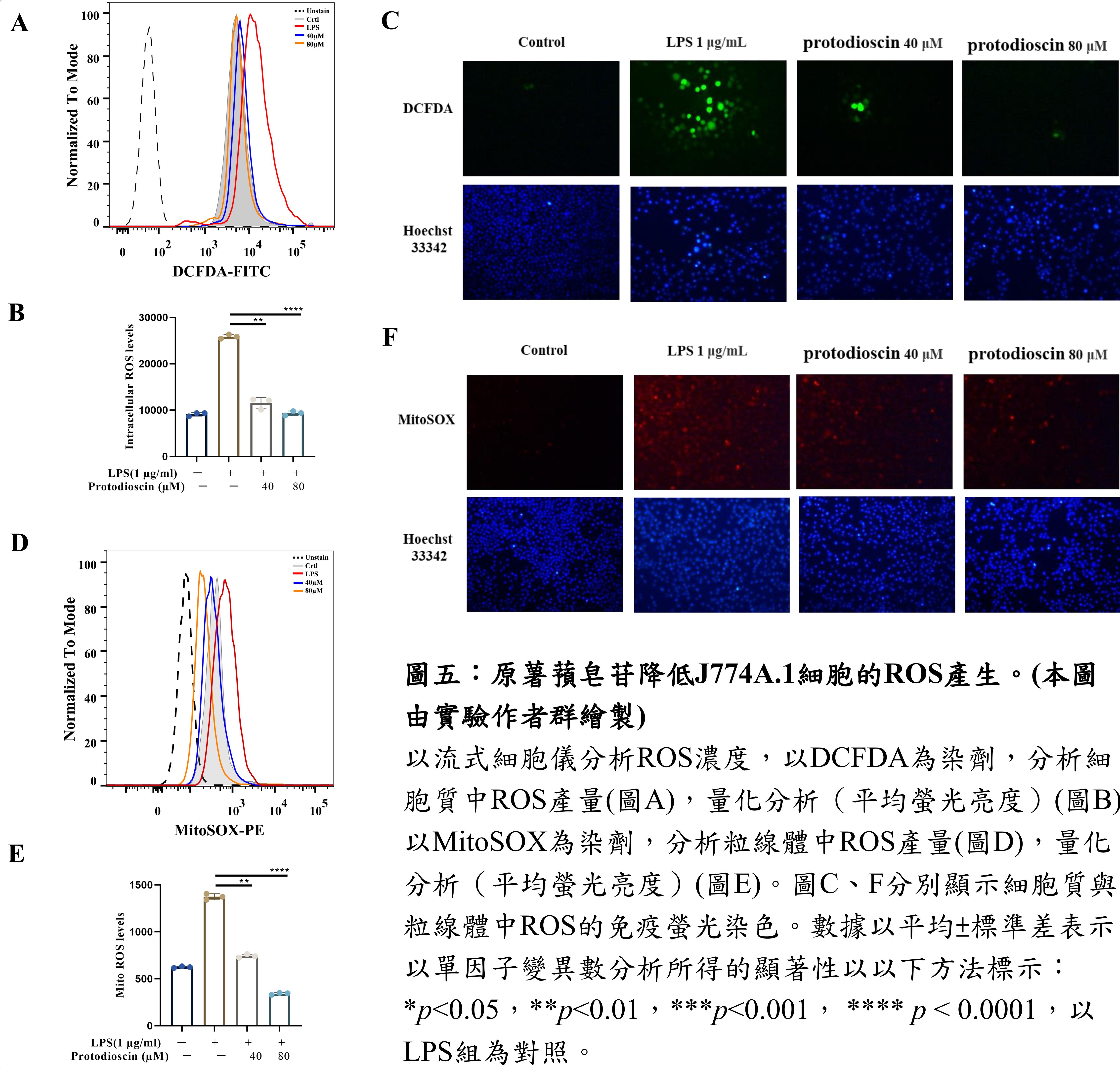
D



**圖四：原薯蕷皂苷抑制MAPK訊息傳遞途徑。(本圖由實驗作者群繪製)**

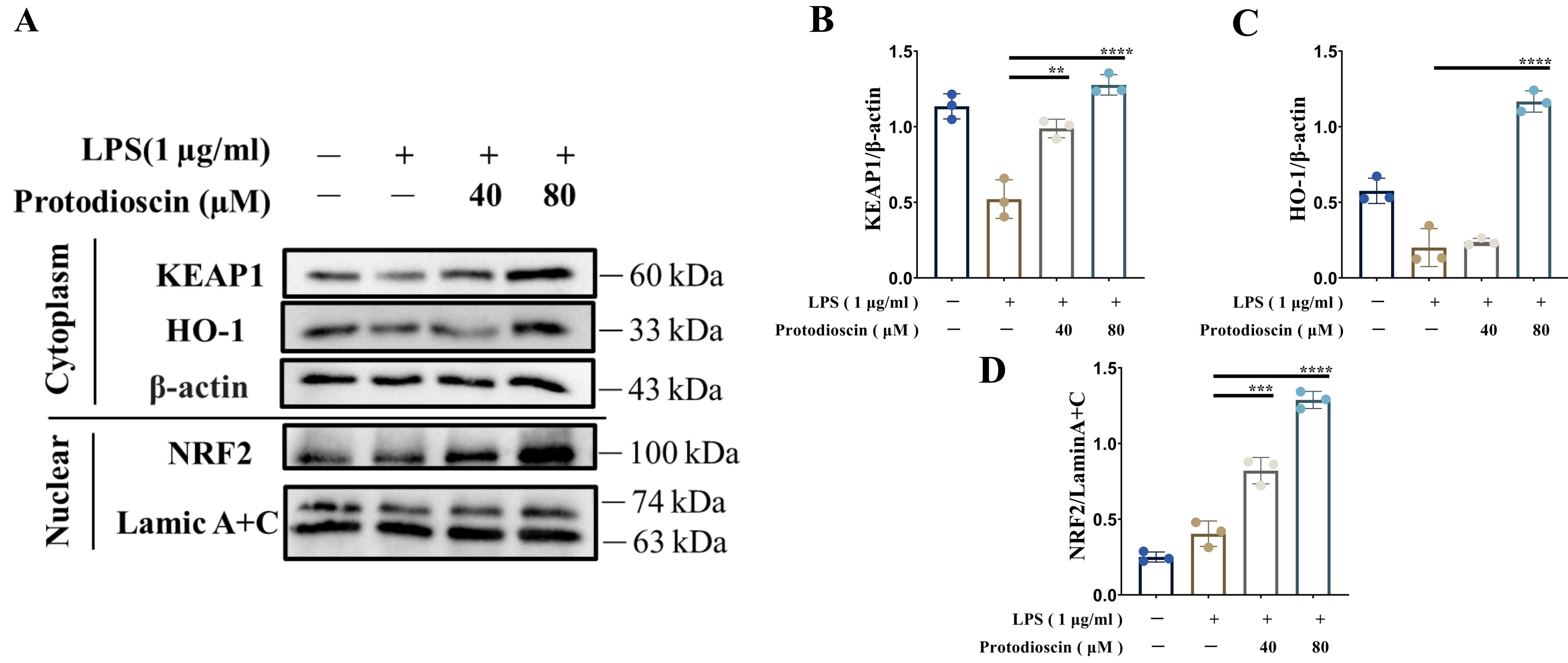
以西方墨點法檢測p-JNK1/2、JNK1/2、p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38、p38，以 $\beta$ -actin為內對照組。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以以下方法標示： $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，以LPS組為對照。

# 結果



圖五：原薯蕷皂苷降低J774A.1細胞的ROS產生。(本圖由實驗作者群繪製)

以流式細胞儀分析ROS濃度，以DCFDA為染劑，分析細胞質中ROS產量(圖A)，量化分析(平均螢光亮度)(圖B)。以MitoSOX為染劑，分析粒線體中ROS產量(圖D)，量化分析(平均螢光亮度)(圖E)。圖C、F分別顯示細胞質與粒線體中ROS的免疫螢光染色。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以以下方法標示：  
 $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ ， $***p < 0.001$ ， $****p < 0.0001$ ，以LPS組為對照。



圖六：原薯蕷皂苷抑制NRF2/HO-1訊息傳遞途徑。(本圖由實驗作者群繪製)

以西方墨點法檢測KEAP1、HO-1、NRF2，以β-actin及Lamic A+C為內對照組。數據以平均±標準差表示，以單因子變異數分析所得的顯著性以以下方法標示： $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ ， $***p < 0.001$ ， $****p < 0.0001$ ，以LPS組為對照。

# 結論

在本研究中，我們的實驗結果證明了原薯蕷皂苷通過降低NO的產生、抑制NOS2和COX2的表達、減少促發炎因子如TNF- $\alpha$ 、IL-6的分泌、降低MAPKs信號路徑的活性，並增加抗氧化NFR2/HO-1路徑，從而抑制LPS誘導的發炎及氧化反應。這些結果表明原薯蕷皂苷具有降低發炎反應的潛力，在未來可能對於治療免疫性疾病具有顯著效益。