

國立臺灣海洋大學食品科學系碩士班  
專題討論書面報告

探討半葉馬尾藻萃取物抗發炎與改善  
硫酸鈉聚葡萄糖 (DSS)  
誘導潰瘍性結腸炎之功效

授課老師：柯源悌老師

張君如老師

指導教授：吳彰哲老師

學 號：10732061

學 生：廖浩宇 (5136)

報告日期：2020 年 05 月 06 日

|     |      |      |     |      |
|-----|------|------|-----|------|
| 內容  | 時間掌控 | 表達能力 | 投影片 | 書面資料 |
| 40% | 10%  | 30%  | 10% | 10%  |
|     |      |      |     |      |

指導教授：\_\_\_\_\_老師

1 探討半葉馬尾藻萃取物抗發炎與改善硫酸鈉聚葡萄糖 (DSS)

2 誘導潰瘍性結腸炎之功效

3 碩二 10732061 廖浩宇 (5136)

4 2020/05/06

5 大綱

6 一、前言

7 二、實驗設計流程

8 三、實驗材料與方法

9 四、結果

10 五、結論

11 摘要

12 潰瘍性結腸炎 (ulcerative colitis) 是一種炎症性腸病，其特徵在於結腸黏膜  
13 的反覆發炎，並且會造成罹患結腸癌的機率增加。儘管亞洲地區發生率不及歐美  
14 地區，但隨飲食西化影響，盛行率正逐年上升。在生活水平提高及健康意識抬頭  
15 下，天然保健食品逐漸受人們所重視。臺灣周邊海域蘊含豐富藻類資源。研究指  
16 出褐藻萃取之海藻多醣具有抗氧化、抗發炎等重要生理活性。本研究探討半葉馬  
17 尾藻水萃物 (*Sargassum hemiphyllum* water extracts, SHw) 對於潰瘍性結腸炎之影  
18 響。半葉馬尾藻水萃物主要由分子量 708 kDa 之多醣及分子量 180 Da 之單醣  
19 所組成。抗氧化實驗部分包含 DPPH 自由基清除試驗、螯合亞鐵及超氧陰離子  
20 清除試驗，結果顯示 1 mg/mL SHw 之 DPPH 清除率為  $75.86 \pm 0.70\%$ ；超氧陰  
21 離子清除率為  $83.60 \pm 1.80\%$ ，5mg/mL SHw 之螯合亞鐵能力為  $40.66 \pm 1.89\%$ 。  
22 細胞實驗結果顯示 SHw 對於人類結腸腺瘤細胞株 Caco-2 不具毒殺特性。動物  
23 實驗使用 Dextran sodium sulfate (DSS) 誘導潰瘍性結腸炎之動物模式並給予受  
24 試小鼠攝取 1.5 g/kg SHw。結果顯示相較於 DSS 誘導組，受試組體重減輕、疾  
25 病活動指數、腸道結構受損現象及促發炎因子 IL-6、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  表現量皆  
26 有改善的趨勢，這些結果證明 SHw 具有改善潰瘍性結腸炎症狀之效果。

27

|    |                                                         |               |
|----|---------------------------------------------------------|---------------|
| 1  | 第一章、前言 .....                                            | 6 錯誤! 尚未定義書籤。 |
| 2  | 一、發炎性腸道疾病 .....                                         | 6             |
| 3  | 二、潰瘍性結腸炎 (Ulcerative colitis) .....                     | 6             |
| 4  | 1. 潰瘍性結腸炎簡介 .....                                       | 6             |
| 5  | 1-1 Ulcerative proctitis .....                          | 6             |
| 6  | 1-2 Proctosigmoiditis .....                             | 6             |
| 7  | 1-3 Left-sided colitis .....                            | 6             |
| 8  | 1-4 Pancolitis.....                                     | 6             |
| 9  | 1-5 Acute severe ulcerative colitis .....               | 7             |
| 10 | 2. 潰瘍性結腸炎流行病學 .....                                     | 7             |
| 11 | 3. 腸道黏膜屏障與潰瘍性結腸炎 .....                                  | 7             |
| 12 | 4. 潰瘍性結腸炎免疫反應 .....                                     | 7             |
| 13 | 5. 潰瘍性結腸炎之治療 .....                                      | 7             |
| 14 | 6. DSS 誘導潰瘍性結腸炎模型 .....                                 | 8             |
| 15 | 二、海藻 (Seaweed) .....                                    | 8             |
| 16 | 1. 海藻 (Seaweed) 簡介 .....                                | 8             |
| 17 | 2. 褐藻 (Brown seaweed) .....                             | 8             |
| 18 | 3. 半葉馬尾藻 ( <i>Sargassum hemiphyllum</i> ) .....         | 9             |
| 19 | 3-1 褐藻醣膠 (Fucoidan) .....                               | 9             |
| 20 | 第二章、實驗設計流程 .....                                        | 10            |
| 21 | 一、半葉馬尾藻特性分析 .....                                       | 10            |
| 22 | 二、細胞實驗 .....                                            | 10            |
| 23 | 三、動物實驗 .....                                            | 11            |
| 24 | 第三章、實驗材料與方法 .....                                       | 12            |
| 25 | 一、實驗材料 .....                                            | 12            |
| 26 | 1. 樣品原料及萃取用有機溶劑 .....                                   | 12            |
| 27 | 2. 誘導結腸炎化學品 .....                                       | 12            |
| 28 | 4. 抗氧化試驗 .....                                          | 12            |
| 29 | 5. 細胞株.....                                             | 12            |
| 30 | 6. 細胞培養之培養基 .....                                       | 12            |
| 31 | 7. 細胞存活率試劑 .....                                        | 13            |
| 32 | 8. 一氧化氮生成試驗 .....                                       | 13            |
| 33 | 9. Transepithelial Electrical Resistance 試驗 (TEER)..... | 13            |
| 34 | 10. 實驗動物.....                                           | 13            |
| 35 | 11. 組織切片 .....                                          | 14            |

|    |                                                                                   |    |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1  | 12. RNA 萃取套組 .....                                                                | 14 |
| 2  | 13. 反轉錄反應試劑 .....                                                                 | 14 |
| 3  | 14. 即時定量聚合酶鏈鎖反應試劑 (Real-time PCR).....                                            | 14 |
| 4  | 15. 細胞因子分析 .....                                                                  | 15 |
| 5  | 二、儀器設備 .....                                                                      | 15 |
| 6  | 三、實驗方法 .....                                                                      | 15 |
| 7  | 1. 實驗樣品製備 .....                                                                   | 15 |
| 8  | 1-1 半葉馬尾藻熱水萃取物 .....                                                              | 16 |
| 9  | 2. 樣品特性分析 .....                                                                   | 16 |
| 10 | 2-1 凝膠滲透層析儀 (Gel Permeation Chromatography, GPC).....                             | 16 |
| 11 | 2-2 總糖含量測定 (Total sugar content).....                                             | 16 |
| 12 | 2-3 硫酸根含量測定 .....                                                                 | 16 |
| 13 | 2-4 抗氧化能力試驗 .....                                                                 | 17 |
| 14 | 2-4-1 清除 DPPH ( $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) 自由基能力測定...17 |    |
| 15 | 2-4-2 清除超氧陰離子能力測定 .....                                                           | 17 |
| 16 | 2-4-3 螯合亞鐵離子能力測定 .....                                                            | 18 |
| 17 | 3. 細胞實驗 ( <i>In vitro</i> ) .....                                                 | 18 |
| 18 | 3-1 細胞株活化 .....                                                                   | 18 |
| 19 | 3-2 細胞培養 (Cell culture).....                                                      | 18 |
| 20 | 3-3 細胞保存.....                                                                     | 18 |
| 21 | 3-4 細胞毒性測試 (Cytotoxicity test).....                                               | 19 |
| 22 | 3-5 細胞內一氧化氮 (Nitrate oxide, NO) 含量測定 .....                                        | 19 |
| 23 | 3-6 Transepithelial electrical resistance (TEER).....                             | 19 |
| 24 | 4. 動物實驗 ( <i>In vivo</i> ) .....                                                  | 20 |
| 25 | 4-1 潰瘍性結腸炎小鼠之動物模式建立 .....                                                         | 20 |
| 26 | 4-2 疾病活動指數 (DAI) .....                                                            | 20 |
| 27 | 4-2 ELISA .....                                                                   | 20 |
| 28 | 4-4 分析組織中細胞因子之 mRNA 表現量 .....                                                     | 21 |
| 29 | 4-4-1 抽取組織 total RNA .....                                                        | 21 |
| 30 | 4-4-2 反轉錄反應 (Reverse transcription, RT).....                                      | 21 |
| 31 | 4-4-3 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction)....                         | 21 |
| 32 | 4-5 組織病理切片 .....                                                                  | 22 |
| 33 | 4-5-1 石蠟切片 .....                                                                  | 22 |
| 34 | 4-5-2 蘇木素-伊紅染色 (Hematoxylin and eosin stain, H&E stain) ....                      | 22 |
| 35 | 5. 統計分析.....                                                                      | 22 |
| 36 | 第四章、結果 .....                                                                      | 23 |
| 37 | 一、半葉馬尾藻水萃物化學性分析 .....                                                             | 23 |

|    |                                        |    |
|----|----------------------------------------|----|
| 1  | 1. 半葉馬尾藻水草物產率與成分分析 .....               | 23 |
| 2  | 2. 半葉馬尾藻水草物之總糖、硫酸根含量及抗氧化能力 .....       | 23 |
| 3  | 二、半葉馬尾藻水草物抗發炎之體外試驗 .....               | 23 |
| 4  | 1. 水草物對於人類結腸腺瘤細胞株 (Caco-2) 之細胞毒性 ..... | 23 |
| 5  | 三、半葉馬尾藻水草物對潰瘍性結腸炎動物模式之探討 .....         | 23 |
| 6  | 1. 半葉馬尾藻水草物對於潰瘍性結腸炎小鼠的體重變化、健康指數之影響 .   |    |
| 7  | .....                                  | 23 |
| 8  | 2. 半葉馬尾藻水草物對潰瘍性結腸炎小鼠模型腸道之生理影響 .....    | 24 |
| 9  | 2-1 臟器重量及長度變化 .....                    | 24 |
| 10 | 2-2 結腸組織切片分析 .....                     | 24 |
| 11 | 2-3 促發炎細胞激素表現量變化 .....                 | 24 |
| 12 | 第五章、結論 .....                           | 26 |
| 13 | 參考文獻 .....                             | 27 |
| 14 |                                        |    |

# 1 第一章、前言

## 2 一、發炎性腸道疾病

3 發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一種慢性反覆性腸道  
4 發炎的疾病，主要可分為克羅恩病 (Crohn's Disease, CD) 及潰瘍性結腸炎  
5 (ulcerative colitis, UC) (Xavier & Podolsky, 2007)。目前 IBD 的發病機制尚未明瞭，  
6 通常被認為與遺傳、腸黏膜的免疫調節異常、腸內菌種改變或環境壓力有關。研  
7 究指出，壓力會造成腸道中發炎細胞及腸道滲透性增加，加重腸道發炎反應  
8 (Matsumoto *et al.*, 2004)。研究指出，IBD 的患者有演變為大腸結腸癌的風險  
9 (Francescone *et al.*, 2015)。

10

## 11 二、潰瘍性結腸炎 (Ulcerative colitis)

### 12 1. 潰瘍性結腸炎簡介

13 UC 是一種由於環境因素及遺傳相互作用所引發的終身腸道疾病，其病灶為  
14 侷限在直腸或結腸黏膜層的連續部位的慢性發炎，並且特徵是復發及緩解過程反  
15 覆發生 (臺灣發炎性腸道疾病學會，2018)。其徵狀包含腹瀉、血便、腹絞痛、噁  
16 心嘔吐、食慾減低及血中白蛋白偏低等，並且根據發炎的位置可將 UC 分為五型：  
17 ulcerative proctitis、proctosigmoiditis、left-sided colitis、pancolitis 及 acute  
18 severe ulcerative colitis。

19

#### 20 1-1 Ulcerative proctitis

21 發炎部位局限於接近肛門的區域(直腸)，直腸出血是唯一徵兆。此種形式的 UC  
22 症狀最為溫和。

23

#### 24 1-2 Proctosigmoiditis

25 發炎部位涉及直腸和乙狀結腸。症徵包括腹瀉、腹部痙攣、直腸出血和疼痛。

26

#### 27 1-3 Left-sided colitis

28 發炎部位從直腸延伸到乙狀結腸和降結腸。症徵包括腹瀉，腹部痙攣、直腸  
29 出血、左腹疼痛及體重減輕。

30

#### 31 1-4 Pancolitis

32 發炎部位包含整個結腸，病徵為嚴重的腹部痙攣和疼痛、疲勞和體重顯著減  
33 輕。

## 1-5 Acute severe ulcerative colitis

此種結腸炎較為罕見，影響部位為整個結腸，病徵為嚴重疼痛、大量腹瀉、直腸出血、發燒和無法進食。

## 2. 潰瘍性結腸炎流行病學

UC 屬於 IBD 的其中一種，在全球各地以歐洲及北美洲罹患比率最高。然而，近年來亞洲地區 UC 的發生率及盛行率正在逐年上升中。UC 在臺灣的盛行率為每十萬人中有 12 名患者，每年新確診之個案約為 350 人，並且臺灣 UC 患者中以男性居多，男女比例約為 1.4~1.6 (臺灣發炎性腸道疾病學會，2018)。在亞太城市化較高的地區，UC 的發生率相對較高，因此推測 UC 發生率的上升之部分原因與生活習慣的西化有關 (Wei *et al.*, 2017; Chiba & Komastu, 2019)。

## 3. 腸道黏膜屏障與潰瘍性結腸炎

腸道每日會接收大量外部刺激，其中由腸道上皮細胞緊密連接形成的黏膜屏障系統為最前線之屏障，當上皮屏障受到破壞將導致腸道通透性增加，此時各種病原體、抗原和內毒素容易穿透腸道的上皮引起腸道炎症和慢性發炎 (Duchmann & Zeitz, 1999; Xavier & Podolsky, 2007)。

## 4. 潰瘍性結腸炎免疫反應

UC 的特徵為免疫反應及細胞激素釋放失調 (Arita *et al.*, 2005)，因此促發炎細胞激素在發炎反應機制相當關鍵。先前研究表明，在小鼠急性結腸炎模型中 Interleukin-6 (IL-6) 會大量表現 (Rogler & Andus, 1998)，並且 IL-6 基因被破壞的小鼠對於 DSS 誘導之潰瘍性結腸炎具有較高敏感性 (Suzuki *et al.*, 2001)。在腸道發炎患者體內。此外，在腸道發炎疾病患者體內也可檢測到 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 及 IL-6 的增加 (Jeon *et al.*, 2016)。

## 5. 潰瘍性結腸炎之治療

目前藥物和外科手術是 IBD 的兩種主要治療方法 (Lean *et al.*, 2015)。依疾病病情而定，需服用 5-aminosalicylic acid (5-ASA)、皮質類固醇、局部灌腸劑或免疫抑制劑，並且當急性症狀時甚至需禁食。當藥物治療無效或確定癌化病灶、大量出血和穿孔時須進行全直腸結腸切除或迴腸造瘻手術。

## 6. DSS 誘導潰瘍性結腸炎模型

硫酸鈉聚葡萄糖 (Dextran sulfate sodium, DSS) 結腸炎模型是目前應用最為廣泛的腸炎模型之一。DSS 對腸道上皮細胞具毒性，會影響黏膜屏障的完整性 (Okayasu *et al.*, 1990)，導致血便、潰瘍、上皮損傷和發炎細胞浸潤 (Cooper *et al.*, 1993)。在組織學上，DSS 會引起小鼠腸壁隱窩的腫脹和上皮細胞增生，這與人類急性和慢性 UC 症狀相似。因此，DSS 誘導的結腸炎模型特別適合研究炎性結腸炎的機制。

## 二、海藻 (Seaweed)

### 1. 海藻 (Seaweed) 簡介

臺灣四面環海，因此具有相當充沛的海洋資源，其中包含藻類。海藻依據體型可區分為兩大類，分別為大型藻及微細藻。大多數微細藻行為浮游性，微細藻多為單細胞藻類，通常不具游泳能力，但少數具有鞭毛者可在水中游動。大型藻是構造較為複雜的多細胞藻類，具有假根可行固著生長，一般著生於潮間帶及亞潮帶的礁岩上，大型海藻依內部所含色素可分為四類，分別為藍綠藻 (Cyanophyta)、綠藻 (Chlorophyta)、褐藻 (Phaeophyta) 及紅藻 (Rhodophyta) (Wilkie, 1968)。藍綠藻約有 2000 種，生活於海洋中的比例為 8%，並含有葉綠素 a；綠藻約有 14720 種，生活於海洋中的比例為 13%，含有葉綠素 a 與葉綠素 b；褐藻約有 1500 種，生活於海洋中的比例為 99%，含有葉綠素 a 及葉綠素 c；紅藻約有 4000 種，生活於海洋中的比例為 98%，含有葉綠素 a 與葉綠素 d。海藻因無維管束組織所以不歸為植物界，改為橫跨原核生物界及原生生物界兩界，其中藍藻為原核生物界，綠藻、紅藻及褐藻則改為原生生物界 (Sangha *et al.*, 2014)。

海藻分布範圍很廣，由寒帶至熱帶皆有其蹤跡，通常溫帶的海藻較其他地區種類多且豐富，藻體亦較大型。目前臺灣海藻種類約為 600 種以上，由於臺灣近岸海藻屬於一年生，且受環境變化的影響，因此呈現季節性變化，主要以冬季與春季生長最為旺盛，而夏季與秋季則大多存活於潮下帶，且海藻的種類與數量皆會顯著減少。臺灣海藻分布於本島北海岸、東北角、恆春半島與東部等處，另外，澎湖、綠島、蘭嶼及小琉球等離島地區也有豐富的海藻資源。依種類分布而言，北部與東北部因受到冷水團的影響，有較多亞熱帶種，如石花菜、紫菜與小海帶等，蘇澳以南的東部海域及恆春半島因受到黑潮暖水團的影響，則以熱帶藻種居多，如仙人掌藻、小傘藻等。臺灣海藻體型上大都屬於嬌小的型態，僅有馬尾藻可生長至數公尺長為臺灣近岸海域最大的海藻種類 (陳, 2005)。

### 2. 褐藻 (Brown seaweed)

1 褐藻為多細胞生物，屬於真核細胞生物，其顏色從暗褐色到橄欖綠都有，主  
2 要取決於褐藻素與葉綠素之比例。主要分布於較低溫水域，由於臺灣周邊海域較  
3 溫暖，因此並無大型海帶生長，其中馬尾藻為臺灣最大型褐藻，最常可達 2-3 公  
4 尺，每逢三、四月盛產時會形成小型「馬尾藻海」(Hwang *et al.*, 2010)。與其他藻  
5 類群的區別在於色素方面，除了葉綠素 a、c、胡蘿蔔素及葉黃素之外，褐藻普遍  
6 含有大量黃橙色的褐藻素 (fucoxanthin)，故多呈褐色。光合產物為褐藻澱粉  
7 (laminari) 及甘露醇 (mannitol) (Amsler & Fairhead, 2005)。細胞壁分兩層，內層由  
8 纖維素組成，外層由褐藻膠組成，因此具有膠狀或濃稠之特性，常被用於各種食  
9 品之添加，或紡織工業、橡膠工業及其他工業用途。褐藻可以被食用，常見有海  
10 帶、裙帶菜等，因含有大量的維生素及無機鹽類，常被視為補充營養的副食品，  
11 醫藥上的利用更有上千年歷史，古籍《本草綱目》及《本草經疏上》早有記載海  
12 帶類具治療甲狀腺腫、癭瘤結氣、水腫、利尿、去等功用，現代醫學研究，也已證  
13 明有些褐藻有降血壓和抗癌作用 (Cock *et al.*, 2010)。而臺灣的海產褐藻，目前已  
14 知共有 10 科，25 屬，86 種 (陳，2005)。

15

### 16 3. 半葉馬尾藻 (*Sargassum hemiphyllum*)

17 在臺灣大型褐藻中以馬尾藻 (*Sargassum* spp.) 產量為最多。半葉馬尾藻為褐  
18 藻綱 (Phaeophyceae) 墨角藻目 (Fucales) 馬尾藻科 (Sargassaceae) 馬尾藻屬  
19 (*Sargassum*)，藻體成黃褐色至黑褐色，可分為柄、葉及附著器三大部分，其以附著  
20 器固著於礁石上，葉與其分枝均為圓柱形略扁，葉片則呈左右不對稱，一側向外  
21 呈弧形彎曲形似半葉，且葉薄邊緣呈粗鋸齒或楔形，氣囊為圓形，且生殖托位於  
22 葉液下，雌雄異體，生長於潮間帶中部至潮下帶，可作為食用、飼料、藥用、肥料  
23 及工業用 (Huynh *et al.*, 2011)。

24

#### 25 3-1 褐藻醣膠 (Fucoidan)

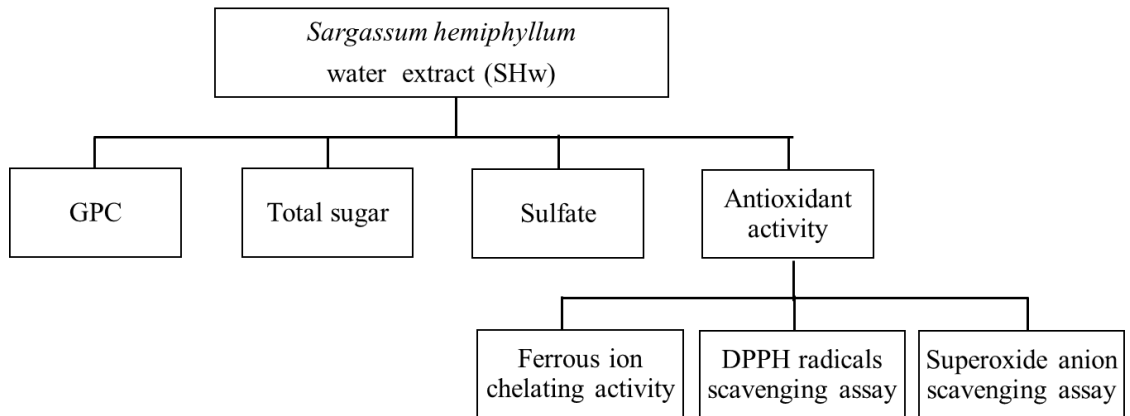
26 褐藻醣膠於 1913 年首次由 Kylin 自褐藻中分離獲得，又稱岩藻多醣或岩藻  
27 聚醣硫酸酯 (Chizhov *et al.*, 1999)，為水溶性膳食纖維，富含 L-岩藻醣 (L-fucose)  
28 及硫酸酯基團 (Sulfate ester group)，主要存在於褐藻和一些海洋無脊椎動物 (如海  
29 膽和海參) 中 (Li *et al.*, 2008)。褐藻醣膠在許多研究中已被證實具有多重生理功效，  
30 如抗氧化、抗發炎、抗病毒、抗癌、抗凝血、預防血栓形成、神經保護作用、活化  
31 造骨細胞與免疫調節作用及抑制肺癌細胞遷移等功效 (Berteau & Mulloy, 2003;  
32 Cui *et al.*, 2008; Dore *et al.*, 2013)。研究表明在慢性結腸炎小鼠模型中，*Cladosiphon*  
33 *okamuranus* 之褐藻醣膠具有降低促炎細胞因子 IL-6 的水平之功效 (Matsumoto *et*  
34 *al.*, 2004)。此外，在急性結腸炎大鼠模型中，含有褐藻醣膠之營養補充品可降低大  
35 鼠體內單核球數量並抑制其發炎症狀 (Koetzner *et al.*, 2010)。

36

## 1 第二章、實驗設計流程

### 2 一、半葉馬尾藻特性分析

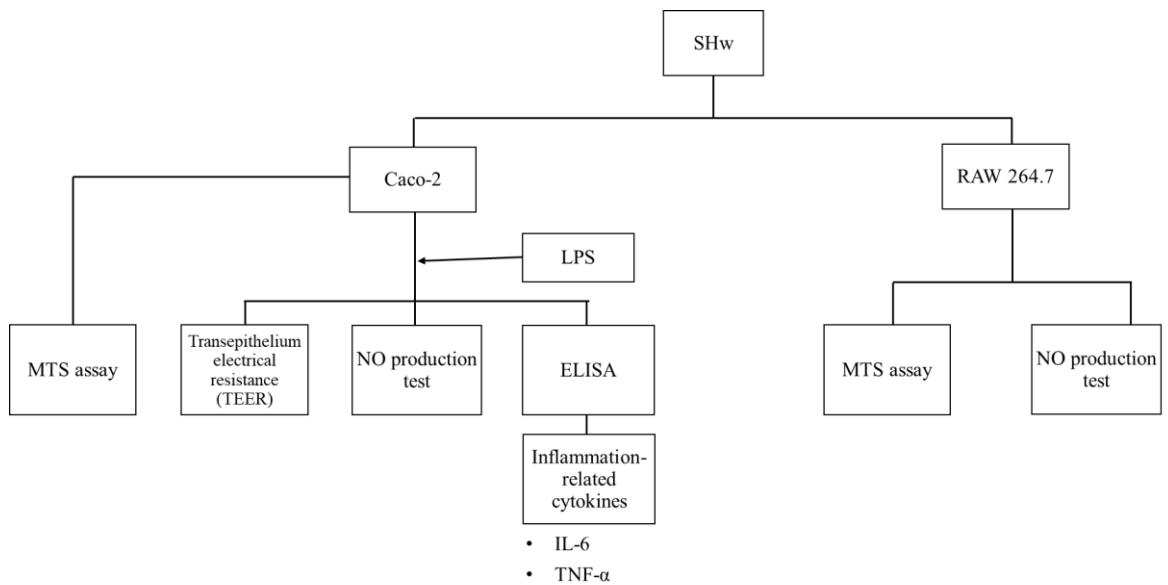
3



4

5

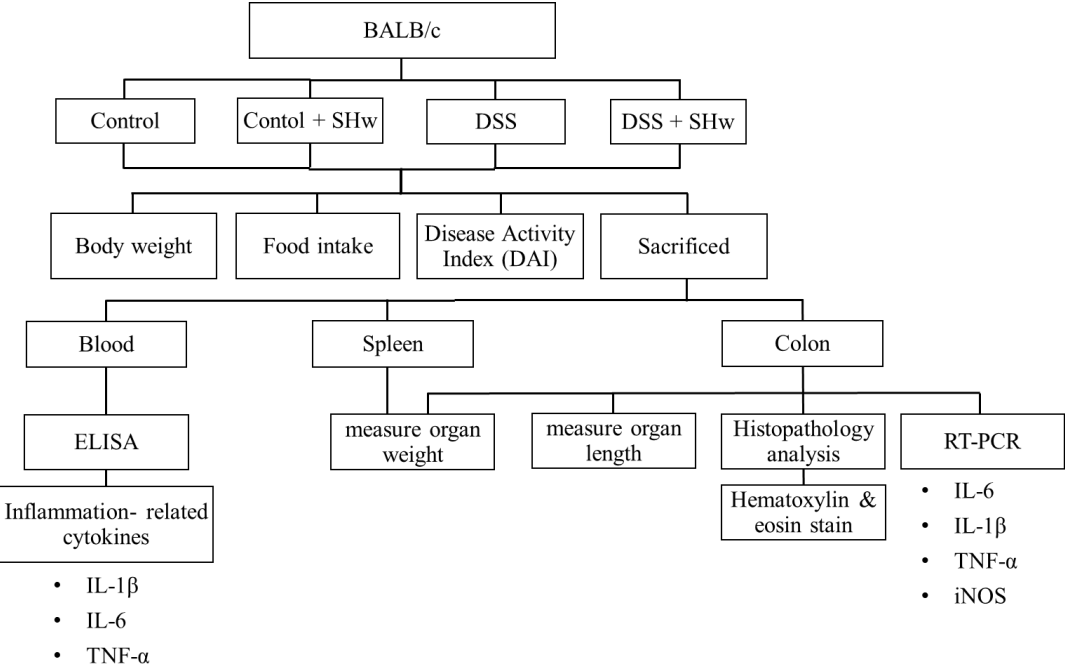
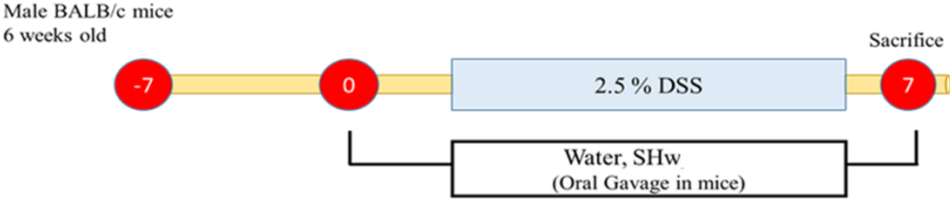
### 6 二、細胞實驗



7

1 三、動物實驗

2  
3  
4  
5



6  
7

# 1 第三章、實驗材料與方法

## 2 一、實驗材料

### 3 1. 樣品原料及萃取用有機溶劑

4 半葉馬尾藻 (*Sargassum hemiphyllum*)，採自臺灣基隆市和平島 (5-6 月)。

### 6 2. 誘導結腸炎化學品

7 Dextran Sulfate Sodium (DSS; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)

### 9 3. 標準品

10 Pullulan (Shodex, Japan)

11 Fucoidan from *Fucus vesiculosus* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)

12 D-glucose (Sigma-Aldrich, USA)

13

### 14 4. 抗氧化試驗

15  $\alpha,\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH; Sigma-Aldrich, USA)

16 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; USB Corporation, Cleveland, OH, USA)

17 Iron (II) chloride ( $\text{FeCl}_2$ ; Sigma-Aldrich, USA)

18 Ferrozine (Sigma-Aldrich, USA)

19 Gallic acid (Sigma-Aldrich, USA)

20 L-Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, USA)

21 Nitro blue tetrazolium (NBT; Sigma-Aldrich, USA)

22 Nicotine amide adinine dinuclited reduced form (NADH; Sigma-Aldrich, USA)

23 Phenazine methouslphate (PMS; Sigma-Aldrich, USA)

24 Potassium persulfate ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ; Sigma-Aldrich, USA)

25

### 26 5. 細胞株

27 Caco-2 (Human colorectal adenocarcinoma cell, ATCC HTB-37)

28 RAW 264.7 (Mouse monocyte/macrophage cells, ATCC TIB-71<sup>TM</sup>)

### 29 6. 細胞培養之培養基

1 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Gibco, Gaithersburg, MD, USA)  
2 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS; Gibco, USA)  
3 Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, USA)  
4 Minimum Essential Medium Alpha Medium (MEM- $\alpha$ ; Gibco, USA)  
5 Sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>; Sigma-Aldrich, USA)  
6 Trypan blue (Sigma-Aldrich, USA)  
7 0.05 % Trypsin-EDTA (Gibco, USA)  
8 Fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)  
9 Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Solution (Biological Industries, Beit  
10 Haemek, Israel)

## 11 7. 細胞存活率試劑

12 Cell Titer 96® Aqueous MTS reagent powder (Promega, Madison, WA, USA)  
13 Phenazine methosulfate, PMS (Sigma-Aldrich, USA)  
14 MF-Millipore™ Membrane Filter, 0.22  $\mu$ m pore size (Merck Millipore, Burlington,  
15 MA, USA)  
16

## 17 8. 一氧化氮生成試驗

18 Lipopolysaccharides (LPS; Sigma-Aldrich, USA)  
19 Sodium nitrite (Sigma-Aldrich, USA)  
20 Sulfanilamide (Sigma-Aldrich, USA)  
21 N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, USA)  
22  
23

## 24 9. Transepithelial Electrical Resistance 試驗 (TEER)

25 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Gibco, USA)  
26 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco, USA)  
27  
28

## 29 10.實驗動物

30 購自財團法人國家實驗動物中心之 BALB/c 品系小鼠，於國立臺灣海洋大學  
31 生命科學院實驗動物中心以標準飼料及飲水飼養、繁殖，具有 12 小時制燈光調  
32 節，所有實驗用動物均通過本校生科院實驗動物委員會審議許可。  
33

## 1 11.組織切片

- 2 Ethanol, EtOH (Orhiyo, Taiwan)
- 3 Xylene (百上, Taiwan)
- 4 Paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)
- 5 Paraplast tissue embedding medium (Leica, Germany)
- 6 Eosin (Merck, Germany)
- 7 Hematoxylin (Thermo Fisher Scientific Inc, USA)

8  
9

## 10 12.RNA 萃取套組

- 11 RNeasy mini kit (QIAGEN, Germany)
- 12 RNase free water (QIAGEN, Germany)
- 13 High pure RNA isolation kit (Roche, USA)

14

## 15 13.反轉錄反應試劑

- 16 5X RT buffer : 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>,
- 17 50 mM 10 M oligo (dT) 15 primer (Promega, USA)
- 18 10 mM dNTP mix (Promega, USA)
- 19 DTT (Promega, Madison, USA)
- 20 M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA)
- 21 RNA ribonucleus inhibitor (Invitrogen, USA)

22  
23

## 24 14.即時定量聚合酶鏈鎖反應試劑 (Real-time PCR)

- 25 2x qPCRBIO SyGreen Blue Mix Lo-ROX (PCR Biosystems Inc, USA)
- 26 10 μM primer (Beacon Designer 5.0)

| Gene          | Forward Primer                        | Reverse Primer                    |
|---------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| GAPDH         | 5'-GCG ACT TCA ACA GCA ACT C-3'       | 5'-GGT CCA GGG TTT CTT ACT CC -3' |
| iNOS          | 5'-TCT CCC TTT CCT CCC TTC TTC TC -3' | 5'-ATG GTG CCT CCT GGT GGT C-3'   |
| TNF- $\alpha$ | 5'-GGT GTT CAT CCA TTC TCT CTA C-3'   | 5'-CCC AGC ATC TTG TGT TTC-3'     |

|              |                                   |                                     |
|--------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| IL-6         | 5'-TCC ATC CAG TTG CCT TCT TG-3'  | 5'-TTT CTC ATT TCC ACG ATT TCC C-3' |
| IL-1 $\beta$ | 5'-ACC TGT CCT GTG TAA TGA AAG-3' | 5'-GCT TGT GCT CTG CTT GTG -3'      |

1 即時定量聚合酶連鎖反應之引子：

## 2 15.細胞因子分析

3 Mouse IL-1 $\beta$  Quantikine ELISA Kit (Research And Diagnostic Systems Inc,  
4 Minneapolis, Minn, USA)

5 Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit (R&D systems, USA)

6 Mouse TNF- $\alpha$  Quantikine ELISA Kit (R&D systems, USA)

7

## 8 二、儀器設備

9 正立螢光顯微鏡 BX51 (Olympus, Japan)

10 石蠟切片機 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA)

11 真空抽氣過濾器 (Labber, USA)

12 真空凍結乾燥機 (Model DW3, Heto-Holter, USA)

13 高效能液相層析儀 (ASI Model 500/501 Pump, USA)

14 高低溫管柱恆溫器 (Colbox, USA)

15 高效能液相層析偵測器 (Jasco, Japan)

16 倒立顯微鏡 ECLIPSE TS100 (Nikon, Japan)

17 數字型水浴鍋 SB-1200 (Eyela, Japan)

18 Biometra T3000 thermocycler (Biometra, Germany)

19 Exigo 血球分析儀 (Medonic, Sweden)

20 ELISA reader ( $\mu$ Quat, Biotek, USA)

21 iCycler iQ multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad, USA)

22 pH 測定器 (pH Meter F-71, Horiba, Taiwan)

23 UVP transilluminator GDS-7900 system (UVP, Upland, USA)

24 Z233M-2 微量型離心機 (Hettich, Germany)

25 Z383K 高速冷凍型離心機 (Hettich, Germany)

26 Millicell-ERS resistance system (Merck Millipore, USA)

## 27 三、實驗方法

### 28 1. 實驗樣品製備

將半葉馬尾藻以自來水清洗除去附著的雜質後，於 50 °C 熱風乾燥 48 小時，經充分乾燥後，以電動粉碎機研磨至粉末狀處理後，即為半葉馬尾藻藻粉，放置於防潮箱保存。

## 1-1 半葉馬尾藻熱水萃取物

將半葉馬尾藻藻粉 (g) 與 ddH<sub>2</sub>O (mL) 以 1:20 比例混合，加熱至 100 °C，萃取 1 小時，靜置冷卻後加入蛋白酶與纖維素酶於 50 °C 震盪培養箱反應 3 小時後，以 100 °C 中止酵素反應後靜置冷卻，利用濾網去除較大的雜質，再以 5000 rpm 離心 15 分鐘後，收集上清液進行冷凍真空乾燥所得物質即為半葉馬尾藻熱水萃取物 (*Sargassum hemiphyllum* water extract, SHw)，保存於防潮箱備用 (邱，2012)。

## 2. 樣品特性分析

### 2-1 凝膠滲透層析儀 (Gel Permeation Chromatography, GPC)

樣品分子量分析採用 Ohpak SB-804 HQ 管柱 (8.0 mm ID x 300 mm)，分析之樣品溶液需經過 0.45 μm 濾膜過濾。注入 20 μL 樣品及標準品，以去離子水為移動相，以 55 °C 下流速 0.8 mL/min 進行分離，再以示差折射率檢測器 (Refractive index, RI) 檢測。

### 2-2 總糖含量測定 (Total sugar content)

以 D-glucose 作為標準品，分別配置不同濃度以繪製標準曲線，將樣品進行十倍稀釋後，取 200 μL 至微量離心管，加入 5 μL 之 80 % 苯酚，再加入 500 μL 之 18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，待冷卻後於波長 490 nm 下測定吸光值，並將其吸光值以內插法推算總糖含量。

### 2-3 硫酸根含量測定

BaCl<sub>2</sub> buffer：取 0.05 M 氯化鋇 (BaCl<sub>2</sub>) 1 mL，2 M 醋酸 5 mL，0.02 M 碳酸氫鈉 4 mL，以絕對酒精定量至 50 mL。Na-rhodizonate solution：取 2.5 mg Na<sub>2</sub>C<sub>6</sub>O<sub>6</sub> 及 50 mg ascorbic acid 溶於 10 mL 的去離子水後，以絕對酒精定量至 50 mL 後靜置於暗處。取 0.1 mL 的樣品加入 1 N 鹽酸 (HCl) 0.1 mL，置於 100 °C 下水解 1 小時後，放入 60-65 °C 烘箱中使鹽酸蒸發，乾燥後加入 0.1 mL 的去離子水，加入 0.4 mL 絕對酒精與 0.2 mL BaCl<sub>2</sub> buffer 和 0.3 mL Na-rhodizonate

solution 混合均勻後，置於暗室反應 20 分鐘，於 520 nm 下測定吸光值。並由 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 所得之標準曲線換算成硫酸根含量，單位為 μg / mL(Dodgson, 1961)。

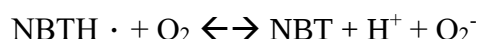
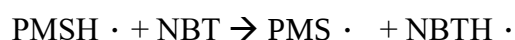
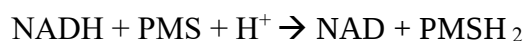
## 2-4 抗氧化能力試驗

### 2-4-1 清除 DPPH ( $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) 自由基能力測定

常見的抗氧化物質是藉由提供氧 (Hydrogen donor) 來清除脂質過氧化物自由基來達到抑制氧化連鎖反應進行；由於 DPPH (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) 是一種含有基數個安定性佳的自由基，在 517 nm 有很強的吸光值，因此當 DPPH 被含有抗氧化能力的物質還原，或與另一個自由基結合時，吸光值就會下降，因此吸光值越低表示該物質對 DPPH 自由基的清除力越強，反應式為  $\text{DPPH}\cdot + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH:H} + \text{A}\cdot$ ，故可利用此特性偵測樣品提供氫離子去除自由基之效果。分析方法為將樣品配製成 1 mg / mL，並連續對半稀釋成八個濃度；正控制組 ascorbic acid 配製成 500 μM，並對半稀釋成 250、125、62.5、31.25、15.625 與 7.8125 μM 之濃度。取 100 μL 樣品，加入 100 μL 濃度為 0.1 mM 的 DPPH 甲醇溶液，避光靜置 30 分鐘後於 517 nm 測定吸光值後，將吸光值代入公式計算 DPPH 自由基清除率 (Shimada *et al.*, 1992)。

### 2-4-2 清除超氧陰離子能力測定

利用非酵素系統來產生超氧陰離子 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)，再利用 NBT (Nitro blue tetrazolium) 來測定樣品清除超氧陰離子的能力。PMS (Phenazine methosulphate) 與 NADH 作用會產生超氧陰離子，NBT 將其還原成 deformation，此化合物在 560 nm 具有最大吸收波峰，因此 560 nm 吸光數值與清除超氧陰離子的能力成反比。以 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 配製成 120 μM 的 PMS、936 μM 的 NADH 及 300 μM 的 NBT。將沒食子酸 (Gallic acid) 與樣品以 PBS 溶解，配製成 1 mg / mL，並連續對半稀釋成八個濃度。取 50 μL 不同濃度的待測物依序與 50 μL PMS、50 μL NADH 及 50 μL NBT 混合後反應 5 分鐘，於 560 nm 下測定其吸光值。將吸光值代入公式計算超氧陰離子清除率 (Robak & Gryglewski, 1988)。反應式如下：



1           2NBTH · → NBT + NBTH<sub>2</sub> (Deformation)  
2           超氧陰離子清除率 (%) = [1-(樣品 560 nm /空白組 560 nm (即未含有任何抗  
3           氧化劑之吸光值)))] × 100 %  
4

## 5   2-4-3 螯合亞鐵離子能力測定

6           在多種離子當中亞鐵離子 (Fe<sup>2+</sup>) 為最有影響力的促氧化劑，其會促進進脂質  
7           過氧化作用的進行。利用 Fe<sup>2+</sup> 與 Ferrozine 的複合物在吸光值 562 nm 會有呈色  
8           反應，可得知樣品對 Fe<sup>2+</sup> 的螯合能力與吸光值成反比。將 EDTA 及樣品以 PBS  
9           溶解，並連續對半稀釋成八個濃度。取 100 μL 不同濃度的樣品依序加入 50 μM  
10          Ferrozine 之醋酸銨溶液 (pH 7) 及 10 μM 硫酸鐵 (亞鐵離子來源)，混合後反應  
11          2 小時，於 562 nm 下測定其吸光值，將吸光值代入公式計算螯合亞鐵離子能力  
12          (Danis *et al.*, 1994)。

13          亞鐵離子螯合率(%) = [1-(樣品 562 nm /空白組 562 nm (即未含有任何抗氧  
14          化劑之吸光值)))] × 100 %  
15

## 16   3. 細胞實驗 (*In vitro* study)

### 17   3-1 細胞株活化

### 18   3-2 細胞培養 (Cell culture)

19          Caco-2 細胞培養於 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 的環境下，每隔兩天更換 MEM-α 培養  
20          液 (含 20 % FBS)。當細胞貼覆在於 10 - cm 培養盤之面積約 80 % 時，將培養  
21          容器中的培養液移除，接著利用 10 mL 磷酸緩衝液 (Phosphate buffered saline,  
22          PBS, pH=7.4) 沖洗兩次，加入 1 mL Trypsin-EDTA (0.05 % trypsin, 0.53 mM EDTA-  
23          4Na) 放入 37 °C 培養箱 5 分鐘，當細胞脫離壁面懸浮時，加入 0.5 mL FBS 終  
24          止 Trypsin-EDTA 反應，之後加入 10 mL 培養液沖下細胞並收集於離心管中，以  
25          180 x g、4 °C 離心 5 分鐘，去除上清液，以 1 mL 培養液回溶並沖散細胞。於新  
26          的 10 - cm 培養盤添加 8 mL 培養液、2 mL FBS 及 0.25 mL 細胞懸浮液，繼續  
27          以 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 培養條件培養至培養盤之面積約 80 %。  
28

### 29   3-3 細胞保存

30          每支凍管中細胞量為 2 × 10<sup>6</sup> cells / mL。以細胞培養步驟做至計數後，計算出  
31          每支凍管所需要加入細胞液數量，與含有 5 % DMSO (抗凍劑)及 10% FBS 的培

1 養液進行混合使總體積為 1 mL，將混和好之液體加入凍管後，將凍管放入漸凍盒  
2 置於 -80°C 凍存至隔週，之後轉存置於液態氮桶保存。

3

### 4 3-4 細胞毒性測試 (Cytotoxicity test)

5 本實驗採用 MTS assay，MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-  
6 carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt)，為一種  
7 Tetrazolium salt 的黃色物質。由於活細胞之粒線體會產生 NADPH 使 Tetrazolium  
8 salt 還原成褐色的 Formazan，細胞存活數與 Formazan 的產生量成正比。將  $10^4$   
9 cells/well 的 Caco-2 cells 種於 96 孔盤中，置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養  
10 24 小時後，分別加入不同濃度樣品培養 48 小時，接著添加 20  $\mu$ L/well MTS  
11 reagent 後於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱培養 1 小時，以 ELISA reader 測定 490 nm  
12 吸光值(許，2013)。

13

### 14 3-5 細胞內一氧化氮 (Nitrate oxide, NO) 含量測定

15 將  $2.5 \times 10^6$  cells/well 的 Caco-2 細胞以種於 24 孔盤中，每 2 天更換細胞培  
16 養基，直至細胞完全分化 (14-21 天)。接著將不同濃度之樣品及 1  $\mu$ g/mL LPS 與  
17 細胞培養 24 小時，最終將 100  $\mu$ L 培養液轉移到 96 孔盤中，並 50  $\mu$ L N-1-  
18 naphthylethylenediamine dihydrochloride 溶液與 50  $\mu$ L sulfanilamide 溶液避光 10  
19 分鐘後以 550 nm 測定吸光值並計算出亞硝酸根離子 (Nitrite) 含量 (Yang *et al.*,  
20 2019)。

21

### 22 3-6 Transepithelial electrical resistance (TEER)

23 當細胞生長狀態良好時將細胞接種於 24 孔 transwell plates 上，在 apical  
24 side(AP 側) 加入濃度為  $5 \times 10^4$  cells/mL 之細胞懸浮液 0.3 mL，basolateral side  
25 (BL 側)加入細胞培養液 0.7 mL。每 48 h 進行換液，7 天後每 24 h 換液，細胞  
26 培養 15 - 21 天直至細胞分化為單層膜。TEER 使用 Millicell-ERS resistance  
27 system (Merck Millipore) 進行測定。

28 以 PBS 潤洗細胞後，接著於 transwell 上下層皆加入 Hanks' Balanced Salt  
29 Solution (HBSS)。將樣品加入 AP 側培養 6 小時，隨後將 LPS (1  $\mu$ g/mL) 加入  
30 BL 側中 24 小時。在 0 小時 (T<sub>0</sub>) 和處理結束 (T<sub>24</sub>) 分別測量 TEER 值。

31 TEER 計算方式:

32 
$$\text{TEER } \Omega\text{cm}^2 = (T_{24} - T_{\text{control}}) / (T_0 - T_{\text{control}}) (\Omega) \times A (\text{cm}^2)$$
。T<sub>control</sub> 為不  
33 含細胞培養基之 TEER 值；A 為有效膜面積 (0.33 cm<sup>2</sup>)。

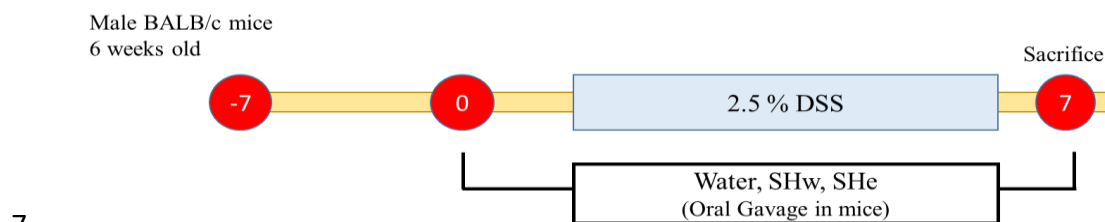
34

35

## 4. 動物實驗 (*In vivo* study)

### 4-1 潰瘍性結腸炎小鼠之動物模式建立

本實驗將 6 週齡雄性 BALB / c 小鼠馴養一週後，給予小鼠飲用 2.5% (w / v) DSS 7 天后進行犧牲。在實驗之前將小鼠秤重分組，組別分為 control、DSS、DSS + SHw 及 DSS + SHe。



### 4-2 疾病活動指數 (DAI)

疾病活動指數 (DAI) 以糞便帶血、糞便稠度和體重損失百分比進行計算 (Jeon *et al.*, 2016)。

| DAI 指數評分 |                                                                                             |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 體重減輕     | 0 = 小於 1 %<br>1 = 小於 5 %，大於 1 %<br>2 = 小於 10 %，大於 5 %<br>3 = 小於 10 %，大於 15 %<br>4 = 大於 15 % |
| 糞便黏稠度    | 0 = 不存在<br>2 = 軟而黏<br>4 = 腹瀉                                                                |
| 直腸出血     | 0 = 正常<br>2 = 輕微出血<br>4 = 嚴重出血                                                              |

12

### 4-2 ELISA

小鼠犧牲後心臟採血，將血液離心  $3500 \times g$ , 30 分鐘後，吸取上清液進行 cytokine 測定，先將 capture antibody coating 在 Corning™ Costar™ 9018 ELISA plate 4°C overnight，使用 wash buffer 清洗 3 次 (每次 250-300  $\mu$ L)，再加入 blocking buffer 放置室溫 1 小時，用 wash buffer 清洗 5 次後，加入標準品連續

1 稀釋製作標準曲線及 100  $\mu$ L sample 室溫放置 2 小時，再用 wash buffer 清洗 5  
2 次，加入 100  $\mu$ L 鍵結酵素之抗體，置放室溫 1 小時，最後用 wash buffer 清洗 6  
3 次後，加入 100  $\mu$ L substrate 30 分鐘後，加入 50  $\mu$ L stop solution 等待 15 分鐘，  
4 結果使用 ELISA reader 在 OD<sub>450</sub> 進行判讀。

5

## 6 4-4 分析組織中細胞因子之 mRNA 表現量

### 7 4-4-1 抽取組織 total RNA

8 取組織 25-30 mg 以 RNeasy mini kit 萃取 total RNA，加入 600  $\mu$ L Buffer RLT  
9 (Lysis buffer) 將組織均勻磨碎後，以 25 G 的針頭抽吸 5 次均質後，再加入與  
10 sample 等體積的 70 % 酒精混和均勻後，將液體取入 spin column 中置於 2 mL  
11 collection tube 中，離心 ( $8000 \times g$ , 15 sec, RT)，使 RNA 結合至 column membrane  
12 上。在 spin column 中加入 700  $\mu$ L Buffer RW1 (含 EtOH)，離心 ( $8000 \times g$ , 15 sec,  
13 RT)，洗去 membrane 上雜質，再加入 500  $\mu$ L Buffer RPE，離心 ( $8000 \times g$ , 15 sec,  
14 RT)，重複加入 500  $\mu$ L Buffer RPE，離心 ( $8000 \times g$ , 15 sec, RT)，將 spin column  
15 換至新的 collection tube 中，以同樣條件在室溫下離心 1 分鐘，去除殘餘酒精。  
16 將 spin column 換到新的 1.5 mL microtube 中，加入 20  $\mu$ L 的 RNase-free water  
17 並靜置 5 分鐘後離心 ( $8000 \times g$ , 5 mins, RT)，重複上述步驟後，沖下 membrane 上  
18 RNA。取 2  $\mu$ L RNA 與 DEPC-H<sub>2</sub>O 稀釋 10 倍，測其在 260 nm 與 280 nm 波  
19 長下吸光值並換算成 RNA 濃度及純度 (王，2012)。

20

### 21 4-4-2 反轉錄反應 (Reverse transcription, RT)

22 取 100 ng 定量好之 RNA 置於 PCR tube 中，以 DEPC-H<sub>2</sub>O 將體積補充至  
23 12.5  $\mu$ L，加入 1  $\mu$ L Oligo (dT) 15 primer，加熱 72 °C 反應 3 分鐘後立即置於冰  
24 上，依序加入 4 mL 5x RT buffer、1  $\mu$ L 10 mM dNTP mix、0.5  $\mu$ L RNase inhibitor、  
25 1  $\mu$ L M-MLV reverse transcriptase，均勻混合之後 42 °C 反應 1 小時，接著加熱 95  
26 °C 反應 5 分鐘，即得到 cDNA，並保存於 -20 °C 備用 (董，2010)。

27

### 28 4-4-3 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction)

29 利用連續稀釋的方式測試先前合成的 cDNA 找出最適合的即時聚合酶連鎖  
30 反應之濃度，其稀釋倍數以 100 倍為最適濃度。接著將經過稀釋 100 倍之 cDNA  
31 取 5  $\mu$ L 作為模板與 iQTM SYBR ® Green Supermix 12.5  $\mu$ L，10  $\mu$ M 雙向引子各  
32 0.5  $\mu$ L，最後添加無菌的 Q-H<sub>2</sub>O 使反應總體積為 25  $\mu$ L。將反應物試管放置於  
33 PCR 反應器中 (iCycler IQ ® Multicolor Real-Time PCR Detection System，BIO-

RAD) 利用各引子最適黏合溫度進行聚合酶連鎖反應，並且設定引子黏合之步驟收光，利用即時定量聚合酶連鎖反應所得之 Ct 值進而計算各種細胞激素之表現情形 (董，2010)。

計算方式如下：

$$\text{Target gene (Ct)} - \text{internal control (Ct)} = \Delta\text{Ct}$$

$$\text{Test gene}\Delta\text{Ct} - \text{control}\Delta\text{Ct} = \Delta\Delta\text{Ct}$$

$$\text{Gene expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

## 4-5 組織病理切片

### 4-5-1 石蠟切片

將實驗小鼠以 CO<sub>2</sub> 窒息法進行犧牲後，取要進行切片觀察之組織浸泡在 10 % 福馬林溶液中一天，將組織進行修剪後放入包埋盒中，以 70 %、90 %、100 % 酒精及二甲苯進行脫水、石蠟包埋，使用石蠟切片機以 4 μm 進行組織切片，將切片置於 42 °C 之水槽，待切片展開展開後以載玻片將切片平整撈起，最終將玻片置於 42 °C 烘箱中烘片，而後於 4 °C 下保存或進行組織色 (邱，2012)。

### 4-5-2 蘇木素-伊紅染色 (Hematoxylin and eosin stain, H&E stain)

染色前先將包覆組織的石蠟以二甲苯脫蠟覆水，之後將玻片浸泡 Hematoxylin 染色 40 秒，接著以流水沖洗，之後浸泡 Eosin 染色 10 秒，以流水沖洗，待玻片乾後，依序迅速浸泡 70 %、90 % 及 100 % 酒精，最後浸泡二甲苯 5 分鐘，待玻片乾後即可封片保存 (邱，2012)。

## 5. 統計分析

實驗數據結果以平均值標準差 (mean ± SD) 表示，以 student's t-test 進行統計分析，當 p < 0.05 表示在統計上具有顯著差異，以 \* 代表。

## 第四章、結果

### 一、半葉馬尾藻水萃物化學性分析

#### 1. 半葉馬尾藻水萃物產率與成分分析

半葉馬尾藻水萃物以熱水萃取法進行萃取，凍乾後半葉馬尾藻水萃物 (*Sargassum hemiphyllum* water extract, SHw)，產率為 24.6 % (Table 1)，再以 GPC 進行成分分子量分析，以 Pullulan (Shodex, Japan) 及 D-glucose (Sigma, USA) 作為標準品，結果顯示半葉馬尾藻水萃物主要由分子量約 708 kDa 之多醣及分子量 180 Da 之葡萄糖組成 (Figure 1)。

#### 2. 半葉馬尾藻水萃物之總醣、硫酸根含量及抗氧化能力

以酚硫酸法 (Phenol-sulfuric acid assay) 測定 SHw 中總可溶性醣類，結果顯示每克 SHw 中含有  $328.00 \pm 13.53$  mg 之醣類及  $61.39 \pm 0.11$  mg 之硫酸根 (Table 1)。SHw 的抗氧化活性實驗結果顯示，SHw 在 1 mg/mL 濃度下 DPPH 自由基清除能力為  $75.88\% \pm 0.70\%$  (Figure 2)，在清除超氧陰離子能力為  $83.59 \pm 1.80\%$  (Figure 3)，而在 5 mg/mL 濃度下螯合亞鐵能力為  $40.66 \pm 1.89\%$  (Figure 4)。

### 二、半葉馬尾藻水萃物抗發炎之體外試驗

#### 1. 水萃物對於人類結腸腺瘤細胞株 (Caco-2) 之細胞毒性

首先分析 SHw 對於 Caco-2 之細胞毒性，配製 1 mg/mL 的 SHw 作為最高濃度並以培養液連續稀釋至 0.125 mg/mL 後，分別與 Caco-2 細胞培養 48 小時後加入 MTS 試劑測試其細胞存活率。

結果顯示，在 SHw 濃度為 1mg/mL 及其餘更低濃度下，Caco-2 細胞株之存活率皆高於 80 %，顯示 SHw 對於 Caco-2 細胞株不具有毒殺效果 (Figure 5)。

### 三、半葉馬尾藻水萃物對潰瘍性結腸炎動物模式之探討

#### 1. 半葉馬尾藻水萃物對於潰瘍性結腸炎小鼠的體重變化、健康指數之影響

本研究以 6 周齡雄性 BALB/c 小鼠作為實驗動物，使用 2.5 % DSS 誘導小鼠腸道受損模擬結腸炎為動物模式。動物飼養期間紀錄體重、攝食量和疾病活動指數。第 0 天即給予小鼠飲用含有 2.5 % DSS 之過濾水，持續至犧牲前誘使小鼠體重減輕和腹瀉血便造成小鼠慢性發炎。組別分為控制組、控制組 + 餵食樣品組 (1.5g/kg SHw)、DSS 組及 DSS + 餵食樣品組 (1.5g/kg SHw)。結果顯示，體重流失變化方面，DSS 誘導導致小鼠體重增加現象緩慢，並於第 6 日時體重開始迅速流失，犧牲前與 control 組相比，DSS 組體重流失現象顯著增加 ( $p<0.001$ )。SHw 的攝入促使小鼠體重增加現象較 DSS 組明顯，並且體重流失現象受到改善 ( $p<0.05$ ) (Figure 6)。小鼠健康狀況方面，採用小鼠疾病活動指數 (Disease activity index scores, DAI) 評估結腸炎之嚴重性。評估標準包含體重流失、糞便黏稠度及直腸出血。自 DSS 誘導開始，DAI 指數隨實驗天數增加逐漸升高表明結腸發炎程度逐漸趨於嚴重。相較而言，SHw 的攝入減緩 DAI 指數提升速度 (Figure 7)。以上結果證實 SHw 具有提升結腸炎小鼠健康狀態之效果。

## 2. 半葉馬尾藻水萃物對潰瘍性結腸炎小鼠模型腸道之生理影響

### 2-1 臟器重量及長度變化

小鼠於第 7 日進行犧牲，各組小鼠脾臟重量並無顯著差異，顯示腸道發炎並未造成脾臟腫大現象 (Figure 8)。腸道發炎特徵為結腸變形縮減，經 DSS 誘導後小鼠平均結腸長度顯著短於 control 組小鼠，而 SHw 的攝入對於結腸長度縮減現象並無顯著改善效果 (Figure 9)。

### 2-2 結腸組織切片分析

腸道發炎會導致腸道黏膜層受損，導致腸道腫脹潰爛並造成結構受損。根據 H&E 染色，結果顯示 DSS 誘導造成腸壁增厚現象 (Figure 10)。DSS 誘導腸道發炎亦會導致腸道柱狀結構鬆散、腸道隱窩的消失及組織異常增生，SHw 的攝入改善柱狀結構受損現象及隱窩破壞現象 (Figure 11-12)。結腸中會有大量杯狀細胞存在，其可分泌黏蛋白幫助排便。DSS 的誘導將導致大量杯狀細胞的消失及出現免疫細胞浸潤的現象，SHw 可改善杯狀細胞消失的現象 (Figure 13)。

### 2-3 促發炎細胞激素表現量變化

研究指出，iNOS 會藉由催化 L-arginine 產生關鍵發炎物質一氧化氮。因

1 此，在慢性發炎疾病中 iNOS 的表現量皆有上升的現象 (Wu *et al.*, 2017)。此  
2 外，在 IBD 患者體內的 IL-6、 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  皆會有大量表達的現象  
3 (Raddatz *et al.*, 2005; Bradley, 2008; Waldner & Neurath, 2014)，因此以 q-PCR  
4 分析上述 4 種發炎相關因子在結腸中的表現。結果顯示，DSS 誘導的結腸發  
5 炎現象，使 iNOS ( $p < 0.05$ )、 IL-6 ( $p < 0.01$ )、 IL-1 $\beta$  ( $p < 0.001$ )及 TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$ )  
6 基因表現量顯著上升，SHw 則顯著降低 iNOS ( $p < 0.05$ )、 IL-6 ( $p < 0.05$ )、 IL-  
7 1 $\beta$  ( $p < 0.001$ )及 TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) 基因表現量 (Figure 14-17)。  
8

## 第五章、結論

1. 半葉馬尾藻之水草物可改善小鼠體重減輕及疾病活動指數，進而達到減輕小鼠潰瘍性結腸炎症狀的效果。
2. 動物實驗中，半葉馬尾藻之水草物具有改善結腸炎小鼠結腸結構損傷效果，並可有效抑制 DSS 誘導造成結腸中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 iNOS 基因表現上升現象進而抑制腸道發炎症狀。

## 參考文獻

- 王含羽。2012。牛樟芝-中草藥發酵產物對第二型登革病毒感染之保護效果評估。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。臺灣。
- 古瓊寧、吳白玫、陳瑋芸、沈盈如、黃子芸、蔡沁玟、陳惠芳。2015。以高效液相層析儀及高效陰離子交換儀同步分析食品中葡萄糖、果糖、蔗糖、麥芽糖、乳糖及半乳糖檢驗方法之探討。食品藥物研究年報, 6, 22-35。
- 臺灣發炎性腸道疾病學會。2018。潰瘍性結腸炎臨床治療指引。取自 [http://www.tsibd.org.tw/editor\\_images/File/TSIBD-UC-2018.pdf](http://www.tsibd.org.tw/editor_images/File/TSIBD-UC-2018.pdf)
- 江玲慧。2018。海木耳萃取物協同化學療法(5-fluorouracil) 抗直腸癌細胞轉移之效果。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。臺灣。
- 卓筱錚。2017。探討半葉馬尾藻萃取物對第二型登革病毒感染之保護效果評估。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。臺灣。
- 房彥君。2016。利用肺癌小鼠模式探討當歸補血湯藉由免疫調節及抗氧化機制達到抗癌之功效。國立臺灣海洋大學食品科學系博士學位論文。基隆。臺灣。
- 林恩如。2019。利用大腸癌小鼠探討半葉馬尾藻水草物改善發炎微環境以達到保護功效。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。臺灣。
- 邱雅鳳。2012。探討藻類多醣抗病毒與其免疫調節之作用機制。國立臺灣海洋大學食品科學系博士學位論文。基隆。臺灣。
- 國立臺灣博物館(2004) 何謂海藻 [http://formosa.ntm.gov.tw/seaweeds/a/a1\\_01.asp](http://formosa.ntm.gov.tw/seaweeds/a/a1_01.asp)
- 國立臺灣博物館。紅藻植物門。取自 [http://formosa.ntm.gov.tw/seaweeds/b/b3\\_03.asp](http://formosa.ntm.gov.tw/seaweeds/b/b3_03.asp)
- 許文邁。2013。牛樟芝減緩小鼠由順鉑誘導肝毒性及增加抗腫瘤反應。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。臺灣。
- 陳正平、陳鴻鳴、李澤民、何平合、何林泰。2005。臺灣沿海，綠島及蘭嶼海洋生物多樣性之調查研究。國立臺灣中山大學海洋植物研究所博士學位論文。
- 曾紫婷。2015。探討半葉馬尾藻萃取物對於 A 型流感病毒感染之保護效果評估。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。臺灣。
- 董祐伶。2010。小球藻萃取物對於第二型登革病毒感染之保護效果評估。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文。基隆。臺灣。
- Aisa, Y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, K., Ikeda, Y., & Kizaki, M. (2005). Fucoindan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *American Journal of Hematology*, 78(1), 7-14.
- Amsler, C. D., & Fairhead, V. A. (2005). Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Advances in Botanical Research*, 43, 1-91.
- Andresen, L., Jørgensen, V., Perner, A., Hansen, A., Eugen-Olsen, J., & Rask-Madsen,

1 J. (2005). Activation of nuclear factor  $\kappa$ B in colonic mucosa from patients with  
2 collagenous and ulcerative colitis. *Gut*, 54(4), 503-509.

3 Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J. N., Petasis, N. A.,  
4 Blumberg, R. S., & Serhan, C. N. (2005). Resolvin E1, an endogenous lipid  
5 mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2, 4, 6-  
6 trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proceedings of the National*  
7 *Academy of Sciences*, 102(21), 7671-7676.

8 Aviello, G., Amu, S., Saunders, S. P., & Fallon, P. G. (2014). A mineral extract from  
9 red algae ameliorates chronic spontaneous colitis in IL-10 deficient mice in a  
10 mouse strain dependent manner. *Phytotherapy Research*, 28(2), 300-304.

11 Balboa, E. M., Millán, R., Domínguez, H., & Taboada, C. (2019). *Sargassum muticum*  
12 hydrothermal extract: effects on serum parameters and antioxidant activity in  
13 rats. *Applied Sciences*, 9(12), 2570.

14 Berteau, O., & Mulloy, B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures,  
15 functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of  
16 enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, 13(6), 29R-  
17 40R.

18 Bitencourt, M. A., Silva, H., Abílio, G. M., Miranda, G. E., Moura, A., Araújo-Júnior,  
19 J. X. d., Silveira, E. J.D., Santos, B. V. O., & Souto, J. T. (2015). Anti-  
20 inflammatory effects of methanolic extract of green algae *Caulerpa mexicana* in  
21 a murine model of ulcerative colitis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*,  
22 25(6), 677-682.

23 Bradley, J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology:*  
24 *A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 214(2), 149-  
25 160.

26 Brito, T. V., Neto, J. P., Prudêncio, R. S., Batista, J. A., Júnior, J. S., Silva, R. O.,  
27 Franco, A. X., Aragão, K. S., Soares, P. M. G., Souza, M. H., Chaves, L. S.,  
28 Freitas, A. L. P., Medeiros, J. V. R., & Barbosa, A. L. R. (2014). Sulfated-  
29 polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates  
30 acid-induced colitis in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(8),  
31 1161-1170.

32 Chen, C.-Y., Lee, K.-T., Tzu-Chi, L. C., Lai, W.-T., & Huang, Y.-B. (2013).  
33 Epidemiology and disease burden of ulcerative colitis in Taiwan: a nationwide  
34 population-based study. *Value in Health Regional Issues*, 2(1), 127-134.

35 Chiba, M., Nakane, K., & Komatsu, M. (2019). Westernized diet is the most ubiquitous  
36 environmental factor in inflammatory bowel disease. *The Permanente Journal*,  
37 23.

- 1 Chizhov, A. O., Dell, A., Morris, H. R., Haslam, S. M., McDowell, R. A., Shashkov, A.  
2 S., Nifant'ev, N. E., Khatuntseva, E. A., & Usov, A. I. (1999). A study of  
3 fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydrate Research*,  
4 320(1-2), 108-119.
- 5 Choi, J.-i., Raghavendran, H. R. B., Sung, N.-Y., Kim, J.-H., Chun, B. S., Ahn, D. H.,  
6 Choi, H. S., Kang, K. W., & Lee, J.-W. (2010). Effect of fucoidan on aspirin-  
7 induced stomach ulceration in rats. *Chemico-biological Interactions*, 183(1),  
8 249-254.
- 9 Cock, J. M., Sterck, L., Rouzé, P., Scornet, D., Allen, A. E., Amoutzias, G., Anthouard,  
10 V., Artiguenave, F., Aury, J. M., Badger, J. H., Beszteri, B., Billiau, K., Bonnet,  
11 E., Bothwell, J. H., Bowler, C., Boyen, C., Brownlee, C., Carrano, C. J.,  
12 Charrier, B., Cho, G. Y., Coelho, S. M., Collén, J., Corre, E., Silva, C. D.,  
13 Delage, L., Delaroque, N., Dittami, S. M., Doulbeau, S., Elias, M., Farnham, G.,  
14 Gachon, C. M. M., Gschloessl, B., Heesch, S., Jabbari, K., Jubin, C., Kawai, H.,  
15 Kimura, K., Kloareg, B., Küpper, F. C., Lang, D., Bail, A. L., Leblanc, C.,  
16 Lerouge, P., Lohr, M., Lopez, P. J., Martens, C., Maumus, F., Michel, G.,  
17 Saavedra, D. M., Morales, J., Moreau, H., Motomura, T., Nagasato, C., Napoli,  
18 C. A., Nelson, D. R., Collén, P. N., Peters, A. F., Pommier, C., Potin, P.,  
19 Poulain, J., Quesneville, H., Read, B., Rensing, S. A., Ritter, A., Rousvoal, S.,  
20 Samanta, M., Samson, G., Schroeder, D. C., Ségurens, B., Strittmatter, M.,  
21 Tonon, T., Tregear, J. W., Valentin, K., Dassow, P. v., Yamagishi, T., Peer, Y.  
22 V. d., & Wincker, P. (2010). The Ectocarpus genome and the independent  
23 evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*, 465(7298), 617.
- 24 Cooper, H. S., Murthy, S., Shah, R., & Sedergran, D. (1993). Clinicopathologic study  
25 of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory*  
26 *Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 69(2), 238-249.
- 27 Cui, Y., Luo, D., & Wang, X. (2008). Fucoidan: Advances in the study of its anti-  
28 inflammatory and anti-oxidative effects. *Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica*  
29 *Sinica*, 43(12), 1186-1189.
- 30 Danis, T., Madeira, V., & Almeida, M. (1994). Action of phenolic derivates  
31 (acetoaminophen, salicylate and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane  
32 lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry*  
33 *and Biophysics*, 315, 161-169.
- 34 Dodgson, K. (1961). Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and  
35 non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochemical*  
36 *Journal*, 78(2), 312.
- 37 Dore, C. M. P. G., Alves, M. G. d. C. F., Will, L. S. E. P., Costa, T. G., Sabry, D. A., de

1 Souza Rêgo, L. A. R., Accardob, C. M., Rochaa, H. A. O., Filgueira, L. G. A.,  
2 & Leite, E. L. (2013). A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown  
3 algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and  
4 anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 467-475.

5 Duchmann, R., & Zeitz, M. (1999). Crohn's disease. *Mucosal immunology*, 1055-1080.

6 Fiocchi, C. (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis.  
7 *Gastroenterology*, 115(1), 182-205.

8 Francescone, R., Hou, V., & Grivennikov, S. I. (2015). Cytokines, IBD, and colitis-  
9 associated cancer. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(2), 409-418.

10 Herath, K. H. I. N. M., Cho, J., Kim, A., Kim, H.-S., Han, E. J., Kim, H. J., Kim, M. S.,  
11 Ahn, G., Jeon, Y. J., & Jee, Y. (2019). Differential modulation of immune  
12 response and cytokine profiles of *Sargassum horneri* ethanol extract in murine  
13 spleen with or without Concanavalin A stimulation. *Biomedicine and*  
14 *Pharmacotherapy*, 110, 930-942.

15 Hidayati, J. R., Yudiati, E., Pringgenies, D., Arifin, Z., & Oktaviyanti, D. T. (2019).  
16 Antioxidant Activities, Total Phenolic Compound And Pigment Contents of  
17 Tropical *Sargassum* sp. Extract, Macerated In Different Solvents Polarity.  
18 *Jurnal Kelautan Tropis*, 22(1), 73-80.

19 Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food  
20 applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543-597.

21 Huynh, T.-G., Yeh, S.-T., Lin, Y.-C., Shyu, J.-F., Chen, L.-L., & Chen, J.-C. (2011).  
22 White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing  
23 *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased  
24 immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome  
25 virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(2), 286-293.

26 Hwang, P.-A., Wu, C.-H., Gau, S.-Y., Chien, S.-Y., & Hwang, D.-F. (2010).  
27 Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from  
28 seaweed *Sargassum hemiphyllum*. *Journal of Marine Science and Technology*,  
29 18(1), 41-46.

30 Iraha, A., Chinen, H., Hokama, A., Yonashiro, T., Kinjo, T., Kishimoto, K., Nakamoto,  
31 M., Hirata, T., Kinjo, N., Higa, F., Tateyama, M., Kinjo, F., & Fujita, J. (2013).  
32 Fucoidan enhances intestinal barrier function by upregulating the expression of  
33 claudin-1. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(33), 5500.

34 Jeon, Y.-D., Kang, S.-H., Bang, K.-S., Chang, Y.-N., Lee, J.-H., & Jin, J.-S. (2016).  
35 Glycyrrhetic acid ameliorates dextran sulfate sodium-induced Ulcerative colitis  
36 in vivo. *Molecules*, 21(4), 523.

37 Kan, J., Cheng, J., Xu, L., Hood, M., Zhong, D., Cheng, M., Liu, Y., Cheng, L., & Du,

1 J. (2019). The combination of wheat peptides and fucoidan protects against  
2 chronic superficial gastritis and alters gut microbiota: a double-blinded,  
3 placebo-controlled study. *European Journal of Nutrition*, 1-12.

4 Kim, K.-N., Heo, S.-J., Yoon, W.-J., Kang, S.-M., Ahn, G., Yi, T.-H., & Jeon, Y.-J.  
5 (2010). Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the  
6 activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7  
7 macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 649(1-3), 369-375.

8 Kim, M., Kim, K., Park, S., Choi, J., & Ahn, D. (2017). Inhibitory activity of  
9 *Sargassum hemiphyllum* ethanol extract on inflammatory response in LPS-  
10 induced RAW 264.7 cells and mouse model. *Korean Society for Biotechnology  
11 and Bioengineering Journal*. 319-327

12 Kimura, H., Hokari, R., Miura, S., Shigematsu, T., Hirokawa, M., Akiba, Y., Kurose, I.,  
13 Higuchi, H., Fujimori, H., Tsuzuki, Y., Serizawa, H., & Ishii, H. (1998).  
14 Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the  
15 formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative  
16 colitis. *Gut*, 42(2), 180-187.

17 Kimura, H., Miura, S., Shigematsu, T., Ohkubo, N., Tsuzuki, Y., Kurose, I., Higuchi,  
18 H., Akiba, Y., Hokari, R., Hirokawa, M., Serizawa, H., & Ishii, H. (1997).  
19 Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in  
20 colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease.  
21 *Digestive Diseases and Sciences*, 42(5), 1047-1054.

22 Koetzner, L., Grover, G., Boulet, J., & Jacoby, H. I. (2010). Plant-derived  
23 polysaccharide supplements inhibit dextran sulfate sodium-induced colitis in the  
24 rat. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(5), 1278-1285.

25 Kotake-Nara, E., Kushiro, M., Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K., & Nagao, A.  
26 (2001). Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *The  
27 Journal of Nutrition*, 131(12), 3303-3306.

28 Lean, Q. Y., Eri, R. D., Fitton, J. H., Patel, R. P., & Gueven, N. (2015). Fucoidan  
29 extracts ameliorate acute colitis. *PLoS One*, 10(6), e0128453.

30 Lee, K. H., & Yoon, W. H. (2011). Preventive effects of co-treatment with fucoidan  
31 and lutein on the development of Inflammatory Bowel Disease in DSS mouse  
32 model. *Natural Product Sciences*, 17(3), 234-238.

33 Lee, M.-C., & Huang, Y.-C. (2019). Soluble eggshell membrane protein-loaded  
34 chitosan/fucoidan nanoparticles for treatment of defective intestinal epithelial  
35 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 949-958.

36 Li, B., Lu, F., Wei, X., & Zhao, R. (2008). Fucoidan: structure and bioactivity.  
37 *Molecules*, 13(8), 1671-1695.

- 1 Lucena, A., Souza, C., Jales, J., Guedes, P., de Miranda, G., de Moura, A., Araújo-  
2 Júnior, J. X., Nascimento, G. J., Scortecchi, K. C., Santos, B. V. O., & Souto, J.  
3 T. (2018). The bisindole alkaloid caulerpin, from seaweeds of the *Genus*  
4 *caulerpa*, attenuated colon damage in murine colitis model. *Marine drugs*,  
5 16(9), 318.
- 6 Mandal, P., Mateu, C. G., Chattopadhyay, K., Pujol, C. A., Damonte, E. B., & Ray, B.  
7 (2007). Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the  
8 brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*,  
9 18(3), 153-162.
- 10 Matsumoto, S., Nagaoka, M., Hara, T., Kimura-Takagi, I., Mistuyama, K., & Ueyama,  
11 S. (2004). Fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus* Tokida ameliorates  
12 murine chronic colitis through the down-regulation of interleukin-6 production  
13 on colonic epithelial cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 136(3), 432-  
14 439.
- 15 Mizuno, M., Nishitani, Y., Hashimoto, T., & Kanazawa, K. (2009). Different  
16 suppressive effects of fucoidan and lentinan on IL-8 mRNA expression in in  
17 vitro gut inflammation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(10),  
18 2324-2325.
- 19 Ohkusa, T., Okayasu, I., Ogihara, T., Morita, K., Ogawa, M., & Sato, N. (2003).  
20 Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated  
21 from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut*, 52(1), 79-83.
- 22 Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R.  
23 (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and  
24 chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694-702.
- 25 O'Shea, C., Sweeney, T., Callanan, S., Doyle, D., Walsh, A., Ryan, M., & O'Doherty, J.  
26 (2013). P-199 The brown algae-derived polysaccharides laminarin and fucoidan  
27 alleviate histopathology and inflammation in a porcine model of ulcerative  
28 colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(suppl\_1), S104-S105.
- 29 Peng, J., Yuan, J.-P., Wu, C.-F., & Wang, J.-H. (2011). Fucoxanthin, a marine  
30 carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and  
31 bioactivities relevant to human health. *Marine Drugs*, 9(10), 1806-1828.
- 32 Podolsky, D. K. (2002). Medical progress. *The New England Journal of Medicine*,  
33 347(6).
- 34 Raddatz, D., Bockemühl, M., & Ramadori, G. (2005). Quantitative measurement of  
35 cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and  
36 endoscopic activity and outcome. *European Journal of Gastroenterology &*  
37 *Hepatology*, 17(5), 547-557.

- 1 Robak, J., & Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions.  
2 *Biochemical Pharmacology*, 37(5), 837-841.
- 3 Rogler, G., & Andus, T. (1998). Cytokines in inflammatory bowel disease. *World*  
4 *Journal of Surgery*, 22(4), 382-389.
- 5 Rutgeerts, P., Sandborn, W. J., Feagan, B. G., Reinisch, W., Olson, A., Johanns, J.,  
6 Travers, S., Rachmilewitz, D., Hanauer, S. B., Lichtenstein, G. R., de Villiers,  
7 W. J., Present, D., Sands, B. E., & Colombel, J. F. (2005). Infliximab for  
8 induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *New England Journal*  
9 *of Medicine*, 353(23), 2462-2476.
- 10 Sangha, J. S., Kelloway, S., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2014). Seaweeds  
11 (macroalgae) and their extracts as contributors of plant productivity and quality:  
12 the current status of our understanding. In *Advances in Botanical Research*  
13 (Vol. 71, pp. 189-219): Elsevier.
- 14 Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Nagaoka, M., Hashimoto, S., Aiyama, R., Iha, M.,  
15 Ueyama, S., & Yokokura, T. (2000). Properties of fucoidan from *Cladosiphon*  
16 *okamuranus* tokida in gastric mucosal protection. *Biofactors*, 11(4), 235-245.
- 17 Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative  
18 properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in *Cyclodextrin*  
19 *emulsion*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 945-948.
- 20 Sudirman, S., Hsu, Y. H., He, J. L., & Kong, Z. L. (2018). Dietary polysaccharide-rich  
21 extract from *Eucheuma cottonii* modulates the inflammatory response and  
22 suppresses colonic injury on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice.  
23 *PloS one*, 13(10).
- 24 Sutherland, L. R., Martin, F., Greer, S., Robinson, M., Greenberger, N., Saibil, F.,  
25 Martin, T., Sparr, J., Prokipchuk, E., & Borgen, L. (1987). 5-Aminosalicylic  
26 acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis, and  
27 proctitis. *Gastroenterology*, 92(6), 1894-1898.
- 28 Suzuki, A., Hanada, T., Mitsuyama, K., Yoshida, T., Kamizono, S., Hoshino, T., Kubo,  
29 M., Yamashita, A., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., Matsumoto, S., Toyonaga,  
30 A., Sata, M., & Yoshimura, A. (2001). CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative  
31 regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *Journal of*  
32 *Experimental Medicine*, 193(4), 471-482.
- 33 Taniguchi, M., Kuda, T., Shibayama, J., Sasaki, T., Michihata, T., Takahashi, H., &  
34 Kimura, B. (2019). In vitro antioxidant, anti-glycation and immunomodulation  
35 activities of fermented blue-green algae *Aphanizomenon flosaquae*. *Molecular*  
36 *Biology Reports*, 46(2), 1775-1786.
- 37 Tanoue, T., Nishitani, Y., Kanazawa, K., Hashimoto, T., & Mizuno, M. (2008). In vitro

1 model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264. 7  
2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(3), 565-  
3 569.

4 Triantafyllidis, J. K., Merikas, E., & Georgopoulos, F. (2011). Current and emerging  
5 drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Design,*  
6 *Development and Therapy*, 5, 185.

7 Watt, J., & Marcus, R. (1969). Ulcerative colitis in the guinea-pig caused by seaweed  
8 extract. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 21(S1), 187S-188S.

9 Waldner, M. J., & Neurath, M. F. (2014). Master regulator of intestinal disease: IL-6 in  
10 chronic inflammation and cancer development. *In Seminars in Immunology*  
11 (Vol. 1, No. 26, pp. 75-79).

12 Wei, S. C., Chang, T. A., Chao, T. H., Chen, J. S., Chou, J. W., Chou, Y. H., Chuang,  
13 C. H., Hsu, W. H., Huang, T. Y., Hsu, T. C., Lin, C. C., Lin, H. H., Lin, J. K.,  
14 Lin, W. C., Ni, Y. H., Shieh, M. J., Shih, I. L., Shun, C. T., Tsang, Y. M.,  
15 Wang, C. Y., Wang, H. Y., Weng, M. T., Wu, D. C., Wu, W. C., Yen, H. H.,  
16 Wong, J. M. (2017). Management of ulcerative colitis in Taiwan: consensus  
17 guideline of the Taiwan Society of Inflammatory Bowel Disease. *Intestinal*  
18 *Research*, 15(3), 266.

19 Wen, Z.S., Xiang, X.W., Jin, H.X., Guo, X.Y., Liu, L.J., Huang, Y.N., OuYang, X. K.,  
20 & Qu, Y. L. (2016). Composition and anti-inflammatory effect of  
21 polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264. 7 macrophages.  
22 *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 403-413.

23 Wilkie, K. (1968). Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. In:  
24 JSTOR.

25 Wu, G. J., Shiu, S. M., Hsieh, M. C., & Tsai, G. J. (2016). Anti-inflammatory activity  
26 of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaeifolium*.  
27 *Food Hydrocolloids*, 53, 16-23.

28 Wu, X., Song, M., Gao, Z., Sun, Y., Wang, M., Li, F., Zheng, J. & Xiao, H. (2017).  
29 Nobiletin and its colonic metabolites suppress colitis-associated colon  
30 carcinogenesis by down-regulating iNOS, inducing antioxidative enzymes and  
31 arresting cell cycle progression. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 42,  
32 17-25.

33 Xavier, R., & Podolsky, D. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory  
34 bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427.

35 Yan, X., Chuda, Y., Suzuki, M., & Nagata, T. (1999). Fucoxanthin as the major  
36 antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Bioscience,*  
37 *Biotechnology, and Biochemistry*, 63(3), 605-607.

1 Yang, H.-S., Haj, F. G., Lee, M., Kang, I., Zhang, G., & Lee, Y. (2019). Laminaria  
2 japonica Extract Enhances Intestinal Barrier Function by Altering Inflammatory  
3 Response and Tight Junction-Related Protein in Lipopolysaccharide-Stimulated  
4 Caco-2 Cells. *Nutrients*, 11(5), 1001.

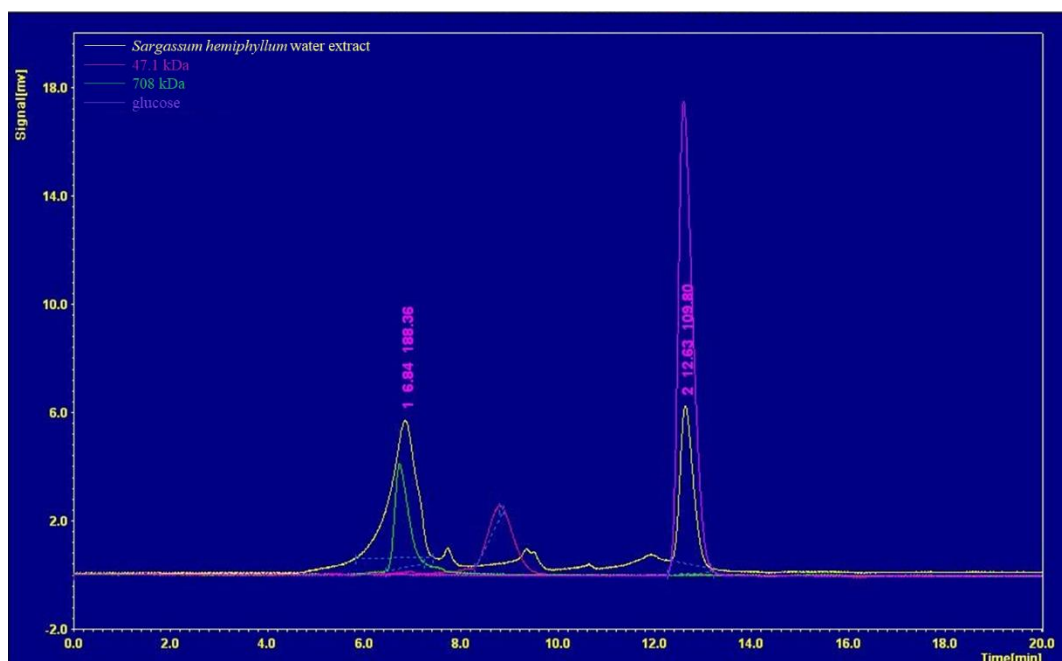
5 Yang, X. (1994). An experimental study on immunoregulatory effect of fucoidan.  
6 *Chinese Journal of Marine Drugs*(03).

7 Zhang, X., Liu, Q., & Thorlacius, H. (2001). Inhibition of selectin function and  
8 leukocyte rolling protects against dextran sodium sulfate-induced murine colitis.  
9 *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 36(3), 270-275.

10 Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid  
11 contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food*  
12 *Chemistry*, 64(4), 555-559.

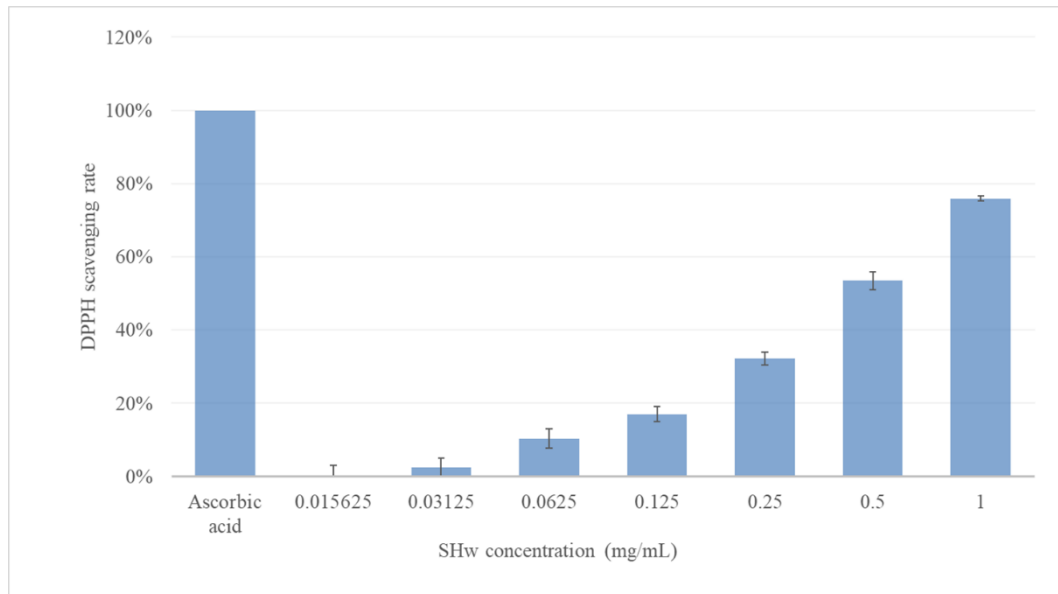
13 Zhu, C., Zhang, S., Song, C., Zhang, Y., Ling, Q., Hoffmann, P. R., Li, J., Chen, T.,  
14 Zheng, W., & Huang, Z. (2017). Selenium nanoparticles decorated with Ulva  
15 lactuca polysaccharide potentially attenuate colitis by inhibiting NF- $\kappa$ B  
16 mediated hyper inflammation. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 20.

17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26



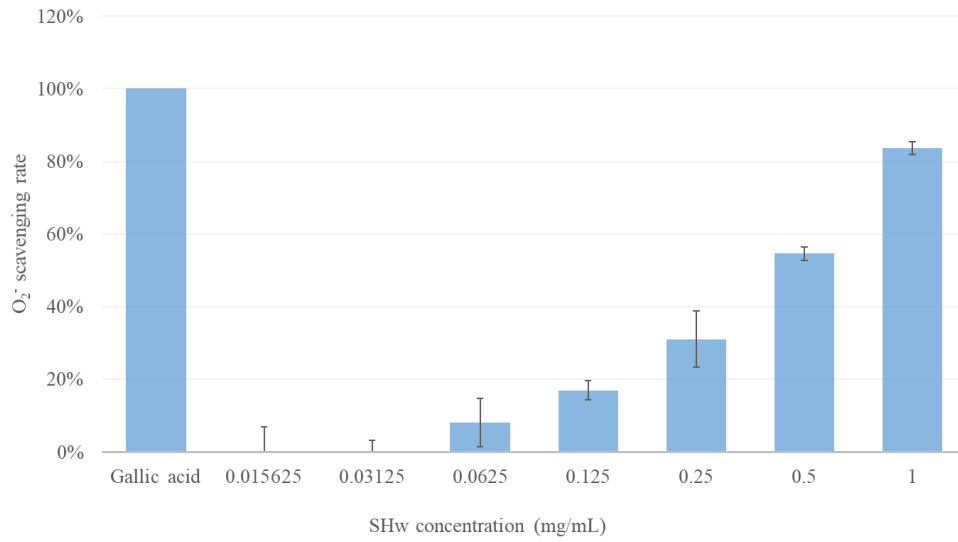
圖一、半葉馬尾藻水萃物凝膠滲透層析

Figure 1. GPC chromatogram of *Sargassum hemiphyllum* water extract. Column: Ohpak SB-804 HQ, size exclusion column: 8.0 mm ID x 300 mm ; column temperature: 55°C ; Injection volume: 20  $\mu$ L ; Flow rate: 0.8 mL/min ; Mobile phase: H<sub>2</sub>O ; Detector: RI.



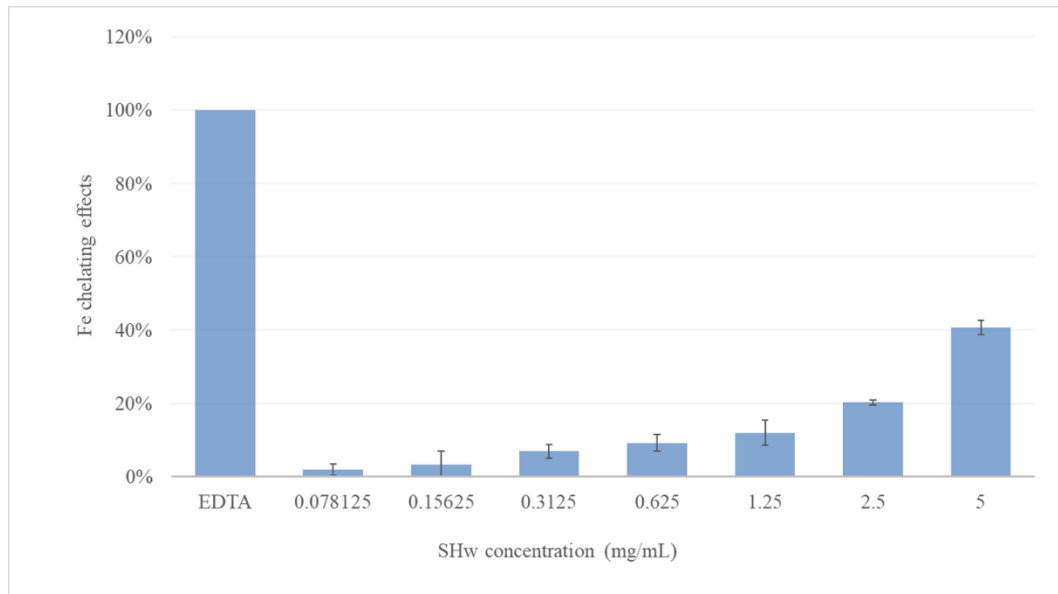
圖二、半葉馬尾藻水萃物之 DPPH 自由基清除能力

Figure 2. DPPH ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) radical scavenging activity of the *Sargassum hemiphyllum* water extract. Ascorbic acid was used as a standard. Values were calculated as mean  $\pm$  SD in each group (n = 3).



圖三、半葉馬尾藻水萃物之超氧陰離子自由基清除能力

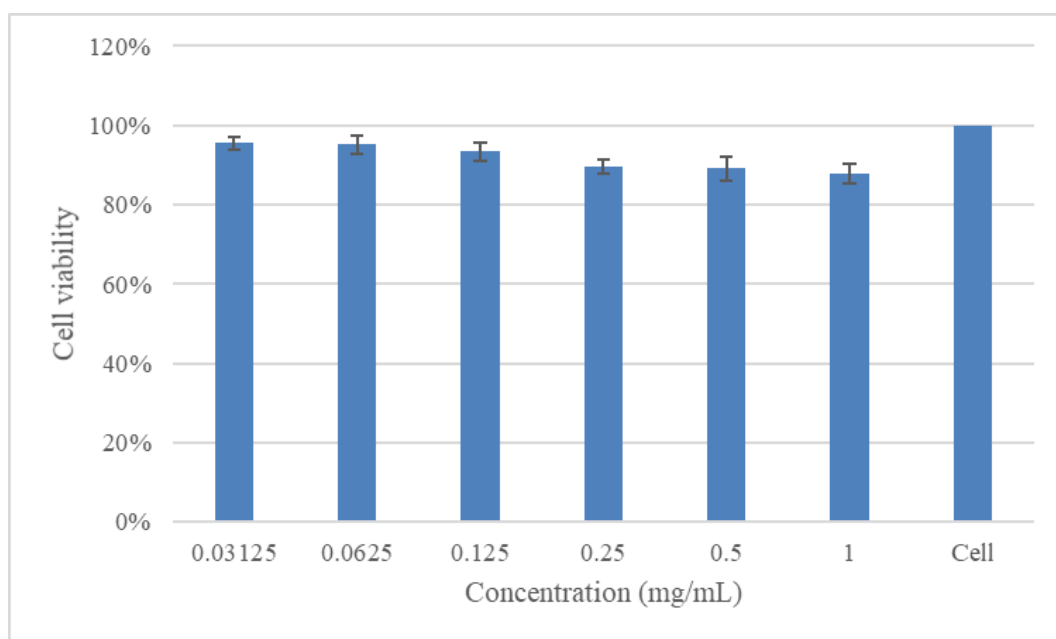
Figure 3. The superoxide anion scavenging activity of the *Sargassum hemiphyllum* water extract. Gallic acid was used as a standard. Values were calculated as mean  $\pm$  SD in each group (n = 3).



圖四、半葉馬尾藻水萃物之螯合亞鐵能力

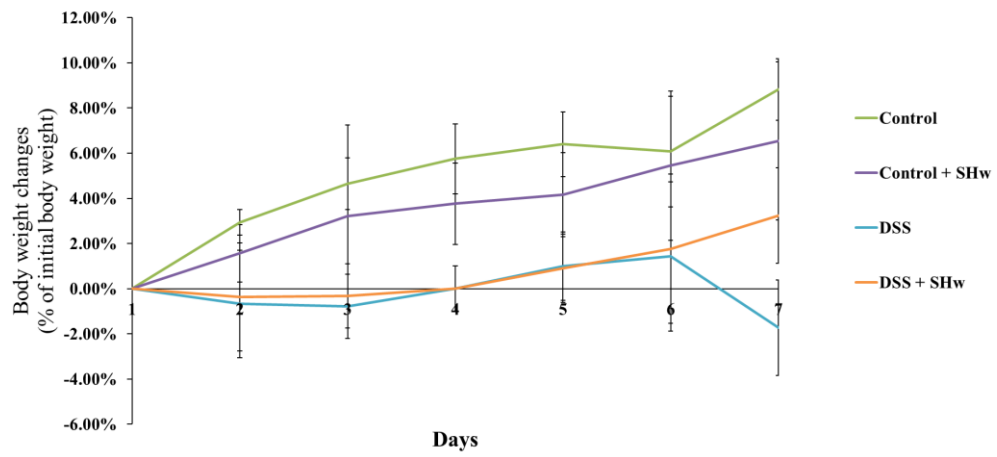
Figure 4. The Ferrous ions chelating effects of the *Sargassum hemiphyllum* water extract. EDTA was used as a standard. Values were calculated as mean  $\pm$  SD in each group (n =

3).



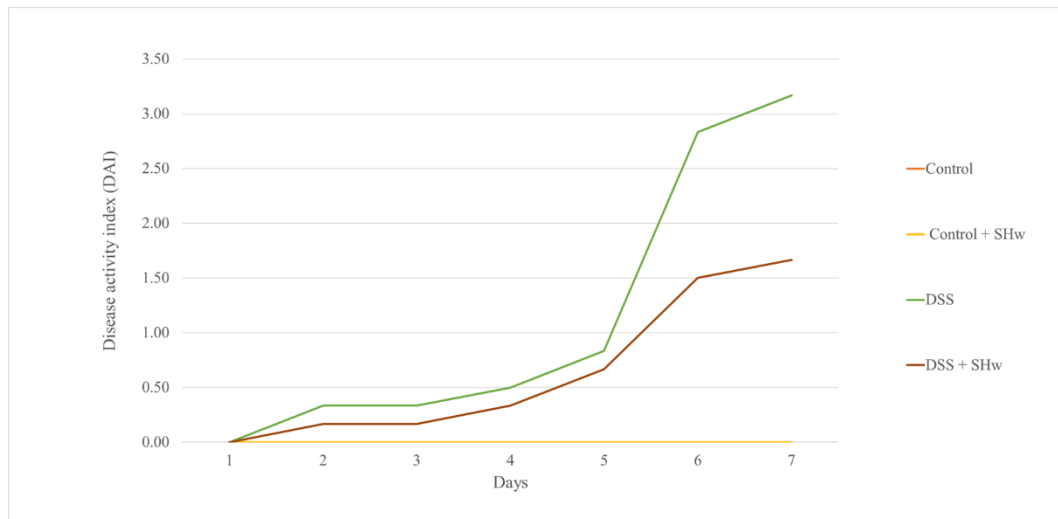
圖五、半葉馬尾藻水萃物之細胞存活率

Figure 5. Effects of the *Sargassum hemiphyllum* water extract on the growth of Caco-2. Cells were incubated in culture medium containing various concentrations of the *Sargassum hemiphyllum* water extract for 48 h. Cell cytotoxicity was determined by MTS assay. Values were calculated as mean  $\pm$  SD in each group (n = 3).



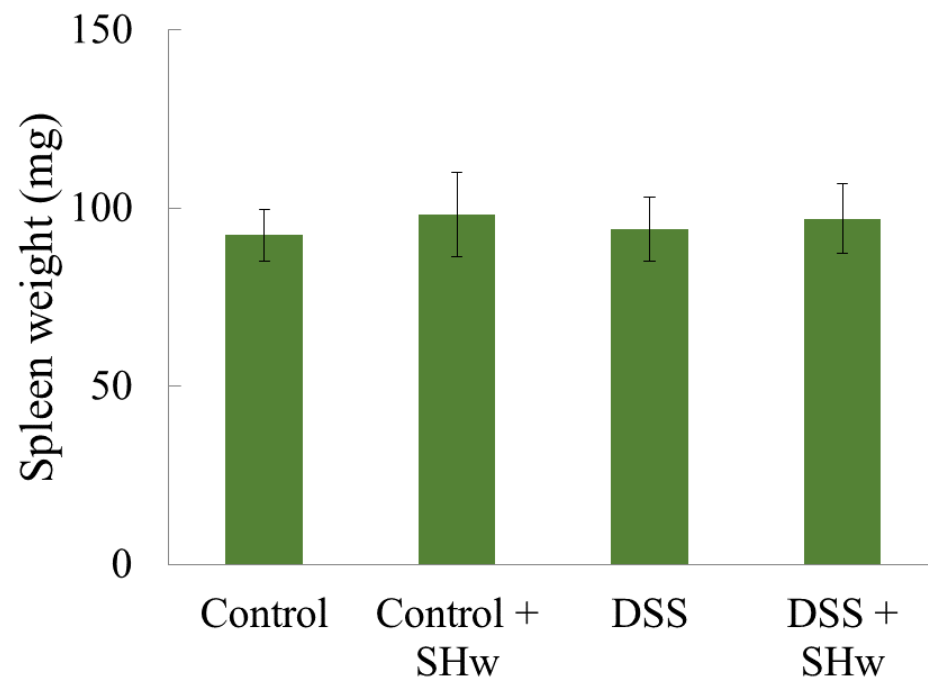
圖六、實驗期間小鼠體重流失變化

Figure 6. Effect of the *Sargassum hemiphyllum* water extract on weight loss in DSS-treated mice during 7 days of treatment. Values were calculated as mean  $\pm$  SD in each group (n = 6).



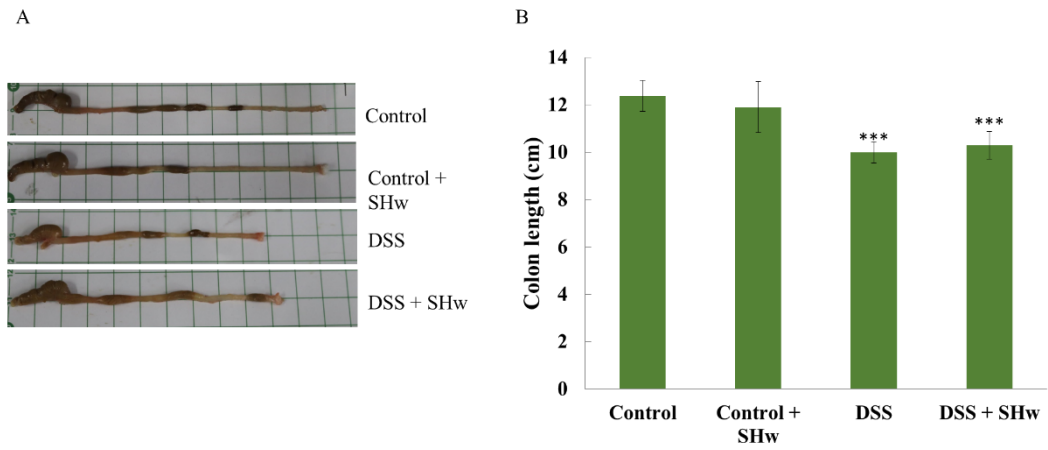
圖七、實驗期間小鼠疾病活動指數圖

Figure 7. Effect of the *Sargassum hemiphyllum* water extract on disease activity index (DAI) in DSS-treated mice during 7 days of treatment (n = 6).



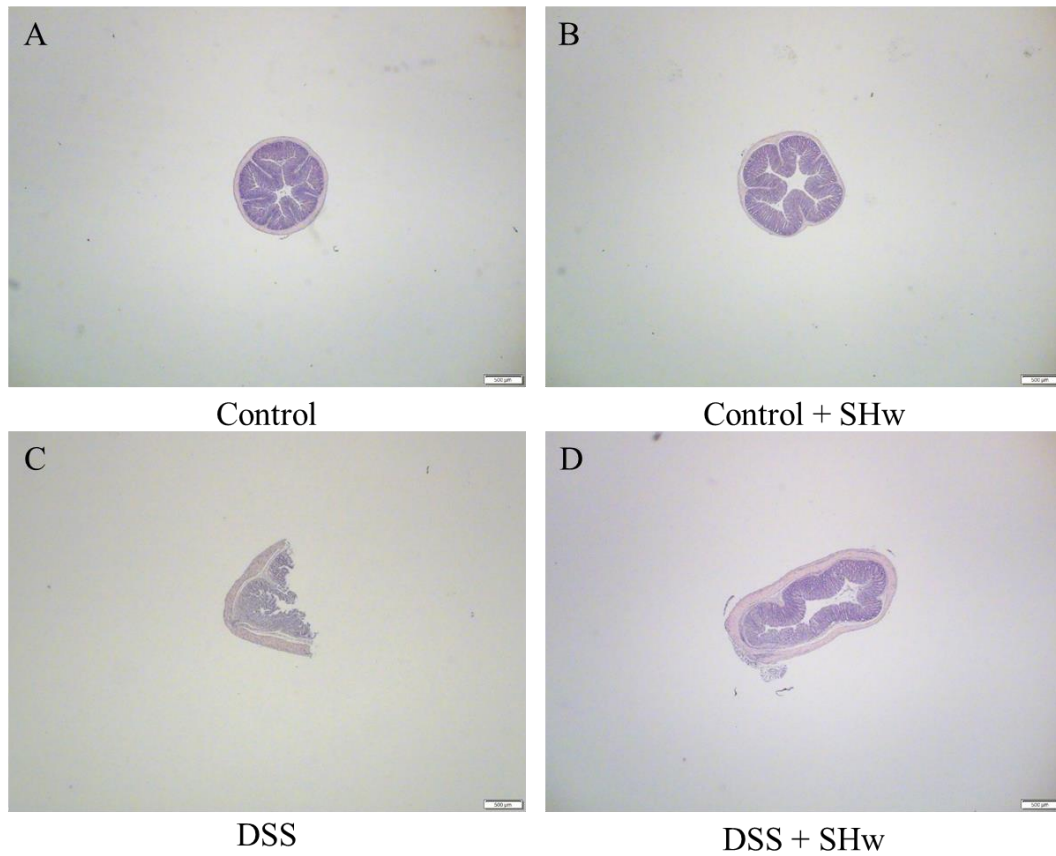
圖八、小鼠脾臟重量變化

Figure 8. Effect of the *Sargassum hemiphyllum* water extract on the spleen weight in DSS-treated mice during 7 days of treatment (n = 6).



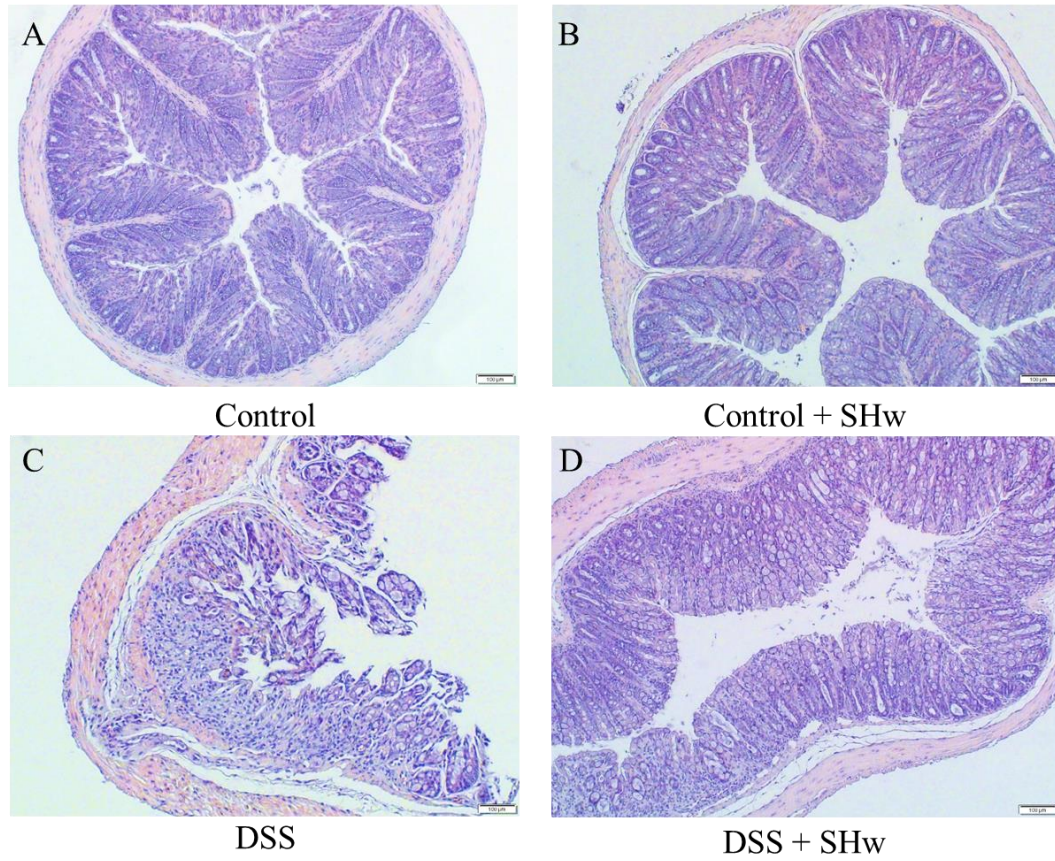
圖九、小鼠結腸示意圖及長度量化結果

Figure 9. Effect of the *Sargassum hemiphyllum* water extract on colon health after 7 days of treatment: (A) representative colons for each group, (b) colon length (n = 6).



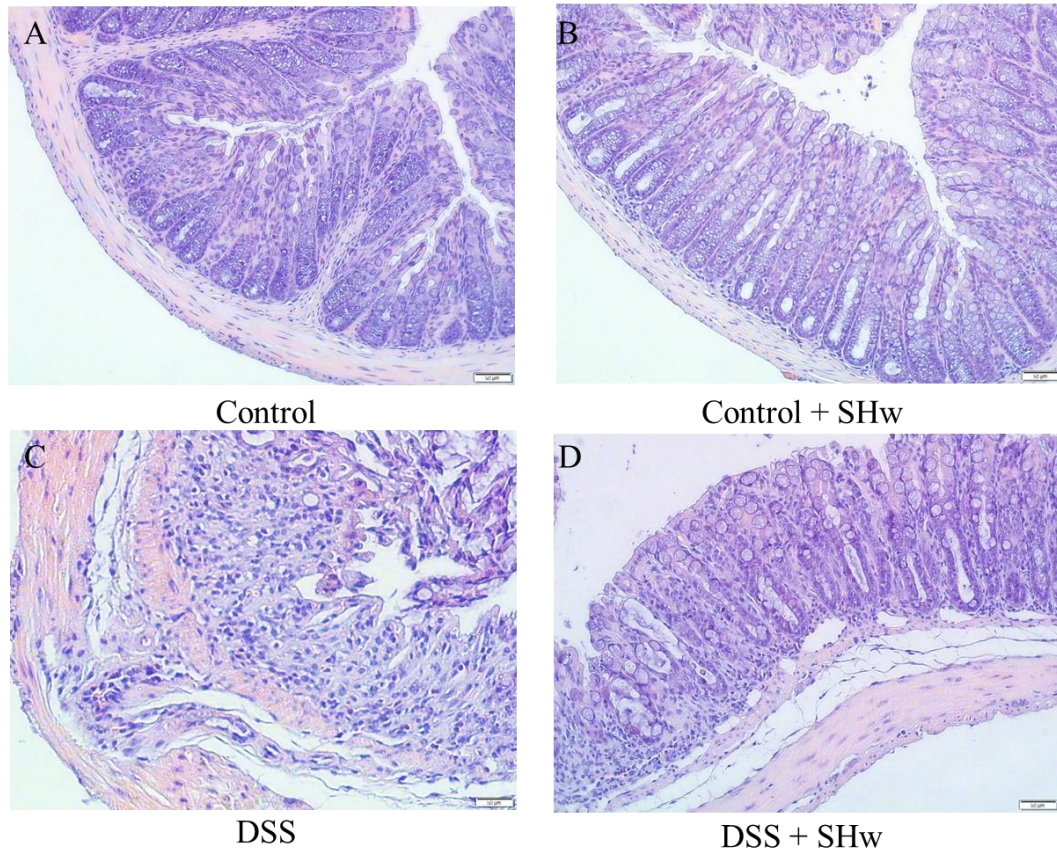
圖十、結腸組織 H&E 染色結果

Figure 10. Effect of the *Sargassum hemiphyllum* water extract on DSS-treated mice after 7 days of treatment. H&E-stained sections of colon (scale bar 500 μm).



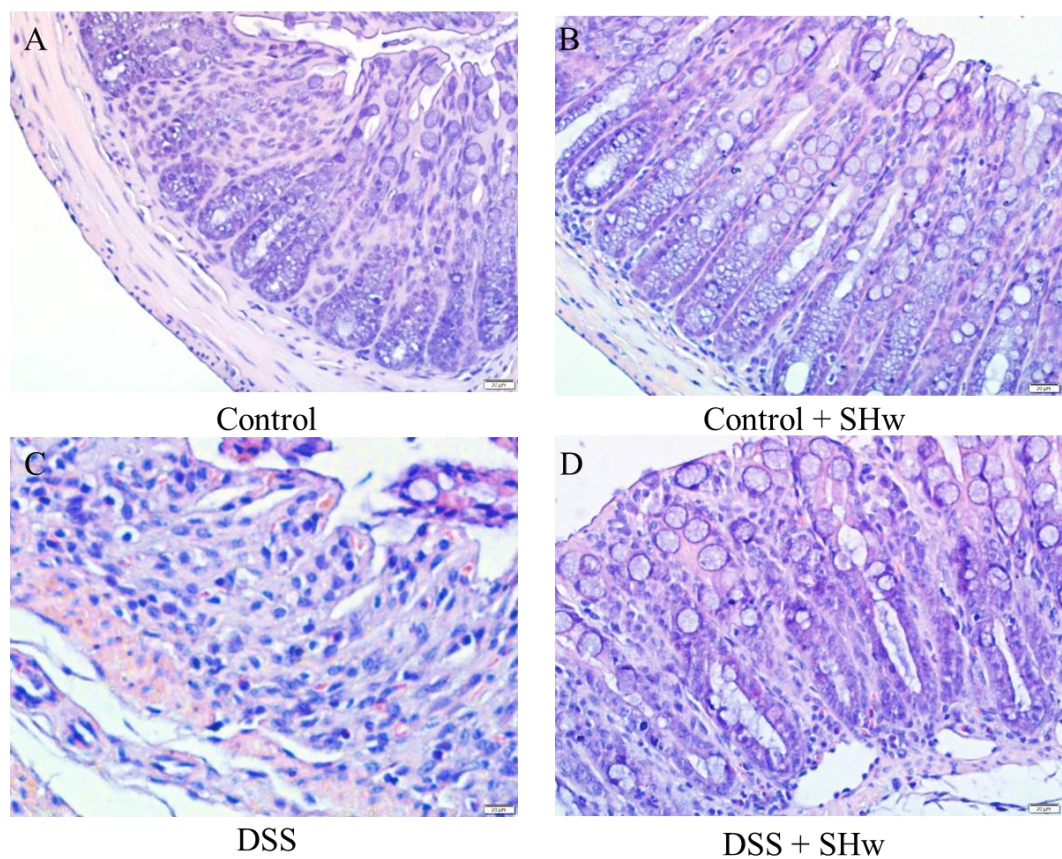
圖十一、結腸組織 H&E 染色結果

Figure 11. Effect of the *Sargassum hemiphyllum* water extract on DSS-treated mice after 7 days of treatment. H&E-stained sections of colon (scale bar 100 µm).



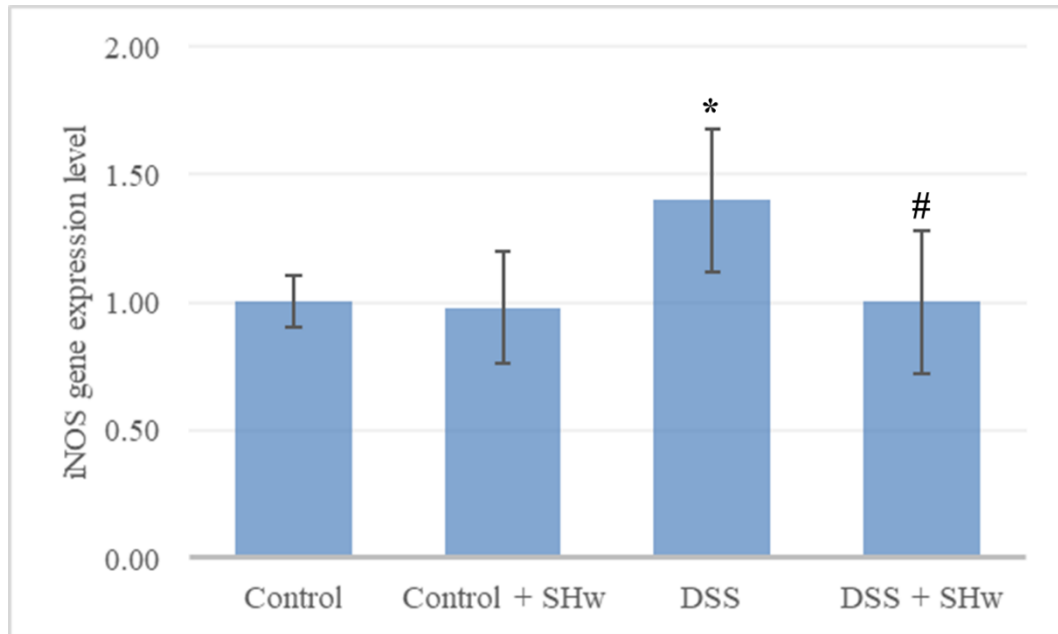
圖十二、結腸組織 H&E 染色結果

Figure 12. Effect of the *Sargassum hemiphyllum* water extract on DSS-treated mice after 7 days of treatment. H&E-stained sections of colon (scale bar 50  $\mu$ m).



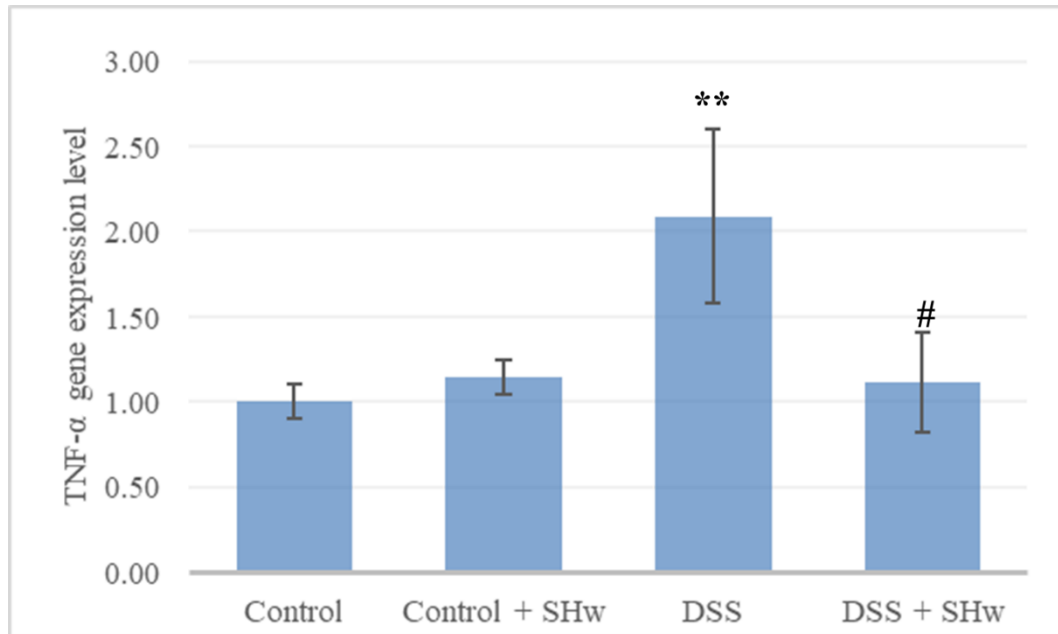
圖十三、結腸組織 H&E 染色結果

Figure 13. Effect of the *Sargassum hemiphyllum* water extract in DSS-treated mice after 7 days of treatment. H&E-stained sections of colon (scale bar 20  $\mu$ m).



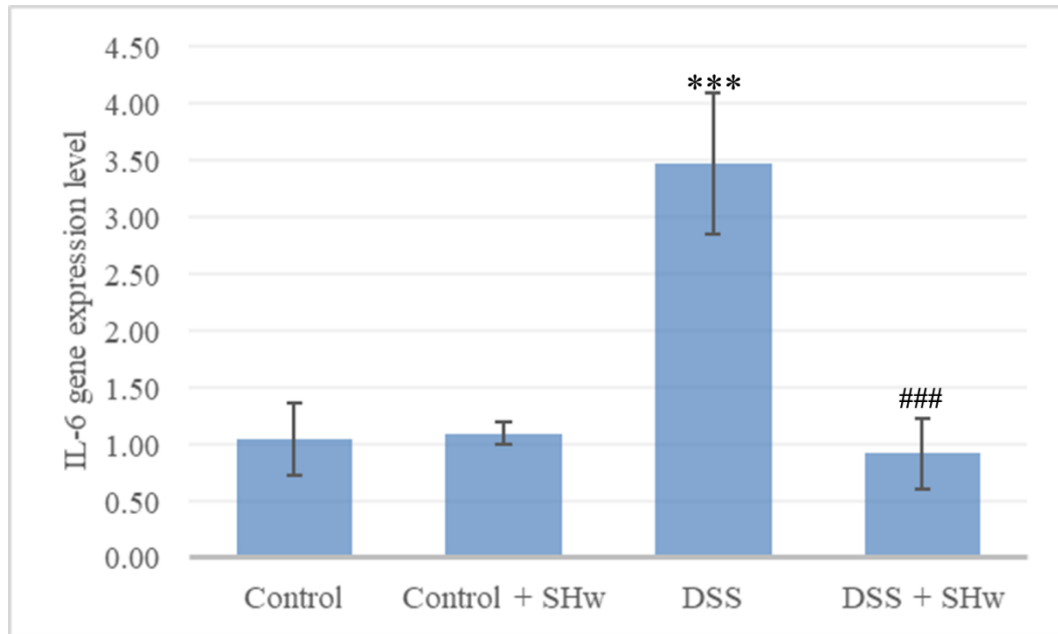
圖十四、誘導型一氧化氮合成酶即時聚合酶鏈鎖反應

Figure 14. Relative mRNA expression of iNOS in mice treated with *Sargassum hemiphyllum* water extract and/or 2.5% DSS. Gene expression level of iNOS in colon analyzed by real-time PCR. GAPDH was used as loading control. Values were calculated as mean  $\pm$  SD in each group (n = 6). Results were statistically analyzed with student's t-test. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 when compared with control group. # $p$  < 0.05, ## $p$  < 0.01 and ### $p$  < 0.001 when compared with DSS group.



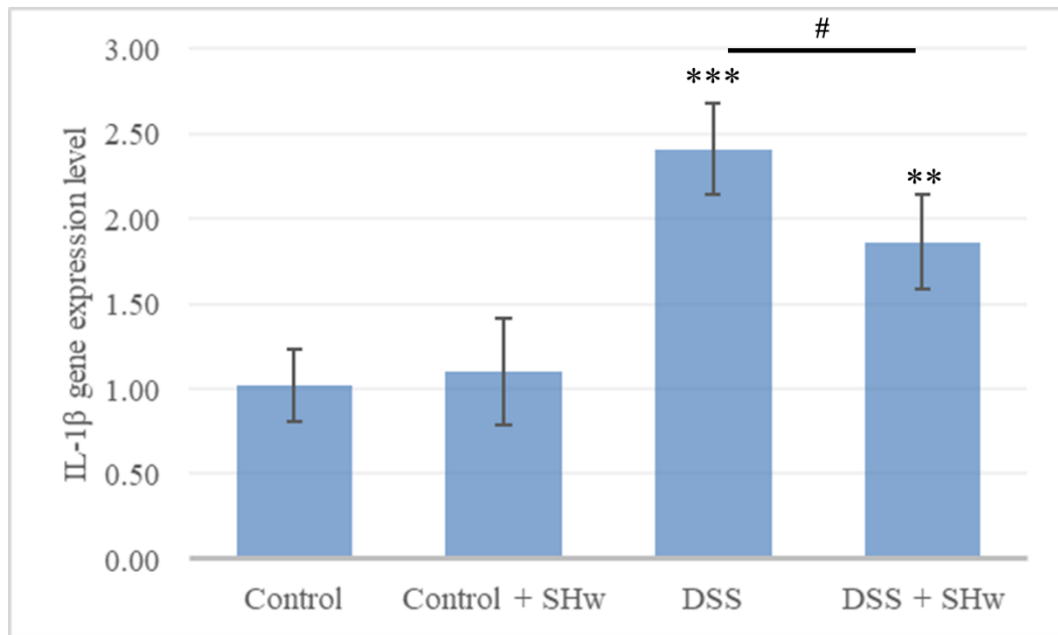
圖十五、腫瘤壞死因子- $\alpha$ 即時聚合酶鏈鎖反應

Figure 15. Relative mRNA expression of TNF- $\alpha$  in mice treated with *Sargassum hemiphyllum* water extract and/or 2.5% DSS. Gene expression level of TNF- $\alpha$  in colon analyzed by real-time PCR. GAPDH was used as loading control. Values were calculated as mean  $\pm$  SD in each group (n = 6). Results were statistically analyzed with student's t-test. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 when compared with control group. # $p$  < 0.05, ## $p$  < 0.01 and ### $p$  < 0.001 when compared with DSS group.



**圖十六、Interleukin-6 即時聚合酶鏈鎖反應**

Figure 16. Relative mRNA expression of IL-6 in mice treated with *Sargassum hemiphyllum* water extract and/or 2.5% DSS. Gene expression level of IL-6 in colon analyzed by real-time PCR. GAPDH was used as loading control. Values were calculated as mean  $\pm$  SD in each group (n = 6). Results were statistically analyzed with student's t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  when compared with control group. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  when compared with DSS group.



**圖十七、Interleukin-1 $\beta$  即時聚合酶鏈鎖反應**

Figure 17. Relative mRNA expression of IL-1 $\beta$  in mice treated with *Sargassum hemiphyllum* water extract and/or 2.5% DSS. Gene expression level of IL-1 $\beta$  in colon analyzed by real-time PCR. GAPDH was used as loading control. Values were calculated as mean  $\pm$  SD in each group (n = 6). Results were statistically analyzed with student's t-test. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 when compared with control group. # $p$  < 0.05, ## $p$  < 0.01 and ### $p$  < 0.001 when compared with DSS group.

表一、半葉馬尾藻水萃物萃取率、總糖及硫酸根含量表

Table 1. The yield, total sugar and sulfate group content of the *Sargassum hemiphyllum* water extract.

|                            | SHw            |
|----------------------------|----------------|
| Yield (%)                  | 24.6%          |
| Total sugar content (mg/g) | 328.00 ± 13.53 |
| Sulfate group (mg/g)       | 61.39 ± 0.11   |

Values were calculated as mean ± SD in each group (n = 3).