



中國醫藥大學

生物科技系碩士班

碩士學位論文

學位論文編號：BST99-12(0012)

乳酸菌對於梔子萃取物治療小鼠感染幽門螺旋桿  
菌的影響

**Effects of *Lactobacillus* spp. on improving the  
efficiency of gardenia extract in treating  
*Helicobacter pylori* infection in mice**

指導教授：徐媛曼 副教授

研究生：賴彥汝

中華民國 101 年 07 月

中國醫藥大學 生物科技系碩士班

碩士候選人學位考試

論文題目

中文：乳酸菌對於梔子萃取物治療小鼠感染幽門螺旋桿菌的影響

英文：Effects of *Lactobacillus* spp. on improving the efficiency of gardenia extract in treating *Helicobacter pylori* infection in mice

本論文係賴彥汝於中國醫藥大學生物科技系碩士班完成之碩士論文，經考試委員審查及口試合格，特此證明。


考試委員

徐曉琴

鄧景浩

吳奎濱

系主任：



中華民國 101 年 07 月 19 日

## 中文摘要

在世界上約有 50 % 人口感染幽門螺桿菌，而幽門螺桿菌與慢性胃炎、胃潰瘍和胃癌有關聯。70 % 至 95 % 的消化性潰瘍患者都受其感染。梔子在中醫上，被用來治療肝、膽囊疾病以及炎症和發燒。研究上也證實，梔子對抗氧化損傷，以及細胞毒性和抗發炎活性的作用。梔子苷是梔子果實中的主要環烯醚萜苷，可在腸道中經細菌酶轉化成梔子素。本研究發現，梔子素毒殺幽門螺桿菌的能力較梔子苷高 20 倍以上，並且梔子素可有效降低幽門螺桿菌毒力因子 *vacA* 基因的表現，改變幽門螺桿菌型態，降低侵入胃上皮細胞的能力，對幽門螺桿菌感染引發的發炎反應與氧化壓力亦可有效抑制。因此，微生物酵素對藥物活性具重要影響。我們由 68 株乳酸菌中篩選出擁有最強  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的分離株 *Lactobacillus rhamnosu* JB3。利用 JB3 轉換梔子萃取物之轉換液與梔子素具相同生物活性。並在小鼠感染實驗中證實，同時服用 JB3 與梔子萃取物較單純口服梔子萃取物，更能抑制感染胃組織中 *vacA* 基因之表現量，並降低幽門螺旋桿菌特異抗體 IgA、IgG 與 IgM 在血清中的表現量，及抑制血清中因感染引發的 IFN- $\gamma$  的表現量。藉此研究，可降低抗藥菌株的產生，並減輕治療副作用的發生，提供了治療幽門螺旋桿菌感染的新興治療方式。

關鍵字：幽門螺桿菌；梔子；乳酸菌

## 英文摘要

*Helicobacter pylori* infection is associated with chronic gastritis, peptic ulcers, and gastric cancer. About 50% of the population in the world is infected by *H. pylori*. Furthermore, 70% to 95% of *H. pylori*-infected patients are suffering from peptic ulcer. Gardenia has been used as an herbal medicine to treat liver and gall bladder disorders such as hepatitis and acute jaundice, as well as inflammation and fever in Chinese medicine for many years. The effective pharmacological actions, such as protective activity against oxidative damage, as well as cytotoxic, and anti-inflammatory activities, have been demonstrated. Geniposide is one of the major iridoid glycosides in gardenia fruit and is transformed into genipin by bacterial enzymes in the intestine and then absorbed. In our study, it has showed that the anti-*H. pylori* activity of genipin was at least 20-fold higher than that of geniposide. And genipin could also decrease the mRNA expression of *vacA* gene and the invasion ability of *H. pylori*, and change the morphology of bacteria. Infection-induced inflammation and oxidative stress were suppressed by it. Therefore, the biotransformation by bacterial enzymes is important for the bioactivity of herbal compounds. We screened 68 field-isolates, *Lactobacillus rhamnosu* JB3 showed the best  $\beta$ -glucosidase. Thus, JB3 was used to convert gardenia extract (GE) into genipin. The converted GE showed similar bioactivities to genipin. In mouse-infection model, the treatment combined JB3 and GE could significantly decrease *H. pylori* infection and *H. pylori*-specific IgA, IgG, and IgM levels, and also

infection-induced IFN- $\gamma$  expression in serum. This design could not only provide a new treatment of *H. pylori* infection and also overcome the problem that antibiotic treatment caused by disturbing the proper function of the intestinal flora.

Key words: *Helicobacter pylori*; gardenia; *Lactobacillus* spp.



## 誌謝

感謝恩師 徐媛曼老師對於學生在學期間的細心指導、生活上的照顧與做人處世的教誨。論文初稿完成後，感謝 吳金濱老師及 鄧景浩老師撥冗審閱，並於口試時給予學生指正教導及提供寶貴的建議，使學生論文更加完備。

感謝藥學系 侯鈺琪老師及侯老師實驗室的學長姐，生態所周院士實驗室的王博學長，在實驗給予協助，使實驗能順利進行。

感謝千香學姐、秋瑩學姐、貞儀與華襄在實驗及生活上各項的幫助，以及實驗試的學弟妹們，郁恆、炫、郁欣、品靜、怡伶、珮禎、宜馨和閔瀚，感謝大家平常在實驗室的陪伴，感謝你們在這兩年的研究生歲月中對我的關心及帶給我的歡樂回憶。

感謝中國醫藥大學生物科技系碩士班同學，雅婷、季娟、麗怡、奕臻、育雯、雅玲、侑珍、浥塵、士豪、冠泓、宗佑、致豪、浩諭、彭勃、堯智和士鋒，陪我分享碩士班生涯，除了給予我課頁少的幫助之外，也給了我美好的回憶。

最後我要感謝我的家人這兩年來的默默的支持，我的父親、母親、弟妹與二伯一家人，使我能順利的完成這兩年的碩士學業。

# 目錄

中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
誌謝.....	v
目錄.....	vi
圖目錄.....	viii
表目錄.....	ix
壹、研究緣起.....	1
貳、文獻回顧.....	5
第一節、幽門螺旋桿菌.....	5
第二節、乳酸菌.....	15
第三節、生物轉換.....	17
第四節、梔子.....	18
參、材料與方法.....	22
第一節、梔子萃取物分析.....	22
第二節、幽門螺旋桿菌的培養.....	25
第三節、乳酸菌株分離與培養.....	25
第四節、最低殺菌濃度測試.....	27
第五節、掃描式電子顯微鏡檢測.....	28
第六節、細胞培養.....	29
第七節、細胞存活率測試.....	31
第八節、菌種的鑑定與β-葡萄糖苷酶活性測試.....	33
第九節、轉換液的製備與成分分析.....	37
第十節、幽門螺旋桿菌之黏附與侵入測試.....	39

第十一節、介白素-8 表現量分析.....	40
第十二節、一氧化氮表現量分析.....	41
第十三節、幽門螺旋桿菌感染小鼠之實驗模式.....	42
第十四節、RNA 表現量測試.....	43
第十五節、抗體測試.....	45
第十六節、干擾素- $\gamma$ 表現量測試.....	46
第十七節、統計學分析.....	47
肆、結果.....	48
第一節、梔子對幽門螺旋桿菌的殺菌能力的評估.....	48
第二節、梔子素對幽門螺旋桿菌形態與 <i>vacA</i> 基因表現的影響.....	49
第三節、梔子苷與梔子素對於胃上皮細胞的影響.....	50
第四節、梔子萃取物之定量分析.....	52
第五節、菌種鑑定與篩選.....	53
第六節、梔子對乳酸菌的殺菌能力的評估.....	57
第七節、轉換速率檢測.....	58
第八節、轉換液對胃上皮細胞與細菌的影響.....	60
第九節、轉換液對幽門螺旋桿菌黏附與侵入胃上皮細胞的影響.....	62
第十節、轉換液對幽門螺旋桿菌引起感染細胞介白素-8 表現量的影響.....	64
第十一節、轉換液對幽門螺旋桿菌引起感染細胞一氧化氮表現量的影響.....	65
第十二節、GE 轉換對幽門螺旋桿菌感染小鼠能力的影響.....	66
第十三節、GE 轉換對感染小鼠之幽門螺旋桿菌特異抗體表現量的影響.....	67
第十四節、GE 轉換對感染小鼠之干擾素- $\gamma$ 表現量的影響.....	69
伍、討論.....	71
陸、參考文獻.....	75



## 圖目錄

圖一：VacA 六元體的聚合物 .....	9
圖二：梔子苷與梔子素之結構.....	19
圖三：一級胺對梔子素進行親核攻擊 .....	21
圖四： $\beta$ -葡萄糖苷酶活性測試原理.....	36
圖五：小鼠感染模型 .....	42
圖六： <i>H. pylori</i> 受 genipin 刺激前後形態之改變 .....	49
圖七：Genipin 對 <i>H. pylori</i> 之 <i>vagA</i> 基因 RNA 表現量之影響 .....	50
圖八：Genipin、geniposide 與 GE 對於 AGS cells 存活率之影響.....	51
圖九：GE 中 10,000 倍稀釋後 geniposide 與 100 倍稀釋後 genipin 之層析圖 .....	52
圖十：利用 JB3 轉換 GE 生成 genipin 之速率分析 .....	60
圖十一：轉換液對 AGS cells 細胞存活率之影響 .....	62
圖十二：轉換液對 <i>H. pylori</i> 侵入能力之影響.....	63
圖十三：轉換液對 <i>H. pylori</i> 黏附能力之影響.....	63
圖十四：轉換液對 <i>H. pylori</i> 感染 AGS cells 表現 IL-8 量之影響 .....	64
圖十五：轉換液對 <i>H. pylori</i> 感染 RAW 264.7 cells 產生一氧化氮表現之影響 .....	65
圖十六：Genipin、GE、JB3 與轉換液對 <i>H. pylori</i> 感染小鼠能力的影響.....	67
圖十七：Genipin、GE、JB3 與轉換液對 <i>H. pylori</i> 感染小鼠之 IgA 表現量的影響 .....	68
圖十八：Genipin、GE、JB3 與轉換液對 <i>H. pylori</i> 感染小鼠之 IgG 表現量的影響 .....	68
圖十九：Genipin、GE、JB3 與轉換液對 <i>H. pylori</i> 感染小鼠之 IgM 表現量的影響.....	69
圖二十：Genipin、GE、JB3 與轉換液對 <i>H. pylori</i> 感染小鼠之 IFN- $\gamma$ 表現量的影響 ..	70

## 表目錄

表一：體外實驗之轉換液之組別 .....	37
表二：轉換液分析之組別 .....	38
表三：小鼠投藥組別 .....	43
表四：GE、geniposide 與 genipin 對 <i>H. pylori</i> 之最低殺菌濃度分析 .....	48
表五：菌種鑑定與酵素能力 .....	54
表六：GE、geniposide 與 genipin 對 <i>H. pylori</i> 與 JB3 之最低殺菌濃度分析 .....	58
表七：轉換液中 genipin 濃度 .....	61



## 壹、研究緣起

幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 是一種存在胃裡的細菌，全世界約有 50 % 以上的人口感染 [1]。過去的研究中發現，*H. pylori* 的存在與慢性胃炎 (chronic gastritis)、胃潰瘍 (gastric ulcer)、十二指腸潰瘍 (duodenal ulcer)、黏膜相關淋巴組織淋巴瘤 (mucosa associated lymphoid tissue lymphoma) 與胃癌 (gastric cancer) 有密切的關係 [2-3]。而世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 與美國國立衛生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 也將 *H. pylori* 列為胃癌的因素之一 [4-5]。

對於 *H. pylori* 的治療，目前普遍使用三合一治療，雖然治癒率達 85 - 90 % [6-7]，但使用抗生素治療，衍生出菌株發生抗藥性的擔憂。在國內的調查中指出，*H. pylori* 對於 amoxicillin 的抗藥性高達 36 % [8]，而在其他國家的調查中發現，*H. pylori* 在歐洲對於 clarithromycin 的抗藥性提升了 18 % [9]，在中國的 *H. pylori* 對 metronidazole 的抗藥性也提升了 50 % [10]，隨著抗藥性的升高，三合一治療的失敗率在全球也逐漸上升中，許多地區三合一治療的失敗率高達 20 % 以上 [11]。再

加上治療期間，病患常會出現頭暈、口苦、味覺遲鈍、噁心、腹脹、腹瀉等症狀，導致病人的配合度低 [12]。所以尋找一些安全且有效的治療方式，成為治療 *H. pylori* 的新研究方向。

除了以抗生素治療 *H. pylori* 的感染外，也有許多以中草藥用於 *H. pylori* 治療的研究，如黃芩、黃連、黃柏、桂枝、地丁、玫瑰花、土苓、高良薑、烏梅、山楂等，在體外實驗中證實具有抑制抗幽門螺旋桿菌生長的功能 [6,13-14]。但在體內的研究上較少見。但至今還未有利用梔子治療 *H. pylori* 感染的論文發表。

梔子是一種相當常見的中藥材，具有利膽、護肝、消炎以及清熱的功能 [15-16]。梔子的果實中可以提取出梔子苷 (geniposide)，而 geniposide 經由  $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase) 的作用會產生梔子素 (genipin) [17]。Geniposide 具有保護肝臟、增加膽汁分泌、減少胃液分泌、促進胰液分泌、治療氣喘、抗癌的功能 [16,18-21]。Genipin 會與蛋白質上所游離的自由胺基形成穩固的交聯 (crosslinking)，在生醫材料上常被拿來做為交聯劑使用 [22]，genipin 也有抗細胞凋亡 [23]，抗發炎的等作用 [24]。據文獻指出，genipin 對於化學性刺激所引發的

胃炎具有良好的療效 [25]。但未有研究針對 geniposide 與 genipin 對 *H. pylori* 所引起的胃炎具治療效果的報導。而在我們的預試驗中發現，genipin 的最低殺菌濃度為 0.5 mM，而 geniposide 的最低殺菌濃度在 10 mM 以上，所以對於 *H. pylori* 的殺菌力，genipin 比 geniposide 有高達 20 倍以上的殺菌力。但 genipin 對於人類胃上皮癌細胞 (human gastric cancer epithelial cells, AGS cells) 的細胞毒性較強，所以為了降低 genipin 對細胞造成的傷害，而又能達到治療 *H. pylori* 的效果，口服毒性較低的 geniposide 並使其在體內轉換為具療效的 genipin 為我們研究的方向。

利用微生物產生的酵素，進行催化與降解的過程稱為生物轉換 [26]。β-glucosidase 是微生物用來分解纖維素的一種水解酶，廣泛地存在於不同種類的生物體內 [27-30]。乳酸菌是我們所知道的腸道中能產生 β-glucosidase 的一類益生菌。在臨床研究上，乳酸菌對於治療過敏 (allergies)、腹瀉 (diarrhea)、潰瘍性結腸炎 (ulcerative colitis) 與 *H. pylori* 感染等都有相當的效果 [31-32]。目前相關的研究指出，乳酸菌會吸附於人體胃腸道中，與 *H. pylori* 競爭吸附，而且有助於

調節免疫，對 *H. pylori* 的感染有其療效 [32-33] 。

目前研究的中草藥，對於 *H. pylori* 的治療都還是無法達到良好的效果。因此，藉由酵素的轉換，將梔子萃取物中殺菌能力弱的 geniposide 在胃中轉換為殺菌能力強的 genipin，對於治療 *H. pylori* 的感染是一個新研究的方向。我們希望了解，乳酸菌是否能經由轉換的能力提高梔子萃取物對於 *H. pylori* 治療的效果，並了解其細部機轉。



## 貳、文獻回顧

### 第一節、幽門螺旋桿菌

#### 一、發現與命名

*H. pylori* 是在 1982 年由 Dr. Barry J. Marshall 與 Dr. Robin J. Warren 由病人胃黏膜分離出來的革蘭氏陰性菌 [34]。他們提出胃潰瘍與胃炎等疾病是因為 *H. pylori* 體內增生導致，並非過去所認為的因辛辣食物與壓力所造成。在當時許多的醫生不相信這個理論，而為了證明這個致病機轉，Dr. Barry J. Marshall 喝下 *H. pylori*，結果造成嚴重的胃潰瘍，後來又以抗生素治療成功。因此，於 2005 年 Dr. Barry J. Marshall 和 Dr. Robin J. Warren 獲得了諾貝爾生理學或醫學獎。這個理論對於當時的醫學認知有很大的衝擊，它改變了傳統腸胃學有關胃潰瘍的致病機轉，也為胃癌的防治提供一個新的方向。

*H. pylori* 最初命名為幽門彎曲菌 (*Campylobacter pyloridis*)，後來因為語法修正變更為 *Campylobacter pylori*。一直至 1989 年，經由基因序列的鑑定與研究，發現其不屬於彎曲菌屬 (*Campylobacte*)，才被歸類為螺旋菌屬 (*Helicobacter*) 而定名為 *Helicobacter pylori* [35]。

## 二、流行病學與感染症狀

*H. pylori* 是世界上普遍存在的致病菌之一，調查指出世界上約有一半以上的人口感染，而感染範圍遍及全球 [36]，大多數的人在兒童時期就被感染，社會經濟狀況與遺傳因子都會影響其感染率。在發展中國家患病率高達 90 % 的人口，其中約 30 % 的人會出現感染症狀 [37]。

輕微感染 *H. pylori* 會引起非潰瘍性消化不良症 (non-ulcer dyspepsia)、胃及食道回流疾病 (stomach and esophageal reflux) 與慢性胃炎等症狀，有 10 - 15 % 的患者會經由慢性胃炎轉換為胃潰瘍或十二指腸潰瘍，當慢性胃炎轉變的更嚴重時，會形成萎縮性慢性胃炎 (atrophic chronic gastritis)，最後演變為胃癌以及胃黏膜相關組織淋巴瘤 [38-39]。

## 三、型態與基因體

*H. pylori* 是一種革蘭氏陰性微需氧 (micro-aerophilic) 的桿菌，長約 2.5 - 5.0  $\mu\text{m}$ ，寬約 0.5 - 1.0  $\mu\text{m}$ ，一端具有 4 - 6 條的鞭毛，整體形態看來像一個螺旋型。但如果在培養時間延長、營養狀況不好、高含氧的環境或著抗生素刺激下，*H. pylori* 會由桿狀出現 U 型的摺疊，



最後型成球狀。球狀的幽門桿菌是死亡或存活的狀態，在傳染途徑中是否為重要的角色,至今仍有爭議 [40-43]。球狀與桿狀的 *H. pylori* 同樣具有完整的細胞膜及鞭毛 [40]，且不影響感染 BALB/c 小鼠的能力，故有一方認為，*H. pylori* 藉由球狀形式躲避不適當的生存條件 [40-41]。目前在體外的實驗中，無法將球狀的 *H. pylori* 回復成桿狀，並有研究指出，當培養液中的桿狀菌低於總量的 30% 以下時就無法在培養出下一代的 *H. pylori* [41]。而在豬隻感染的實驗中，球狀 *H. pylori* 也不具感染能力 [42]。因此推測球狀的 *H. pylori* 代表細胞的退化，為無生存能力的形式。

目前已有三株 *H. pylori* 序列完成解碼，分別 26695、J99 與 HAG1 [44-45]，由此得知 *H. pylori* 的染色體大約有 1.6 - 1.7 megabase (Mb)，平均 CG 含量為 39%，基因具有高度變異性，且重組率相當高，這對於 *H. pylori* 適應宿主環境有很大的幫助。

#### 四、對宿主的影響

*H. pylori* 對宿主的影響主要來自於尿素酶 (urease)、鞭毛 (flagella)、附著因子 (adherence factors)、vacuolating cytotoxin A

(VacA) 與 *cag* pathogenic island (*cag*-PAI)。

尿素酶會將胃中的尿素轉換成為氨，中和菌體周圍的胃酸，這使 *H. pylori* 在胃中免於胃酸的傷害。而在細菌表面的尿素酶亦會與胃上皮細胞表面的 class II major histocompatibility complex (MHC) 結合導致細胞凋亡 [46]。至於鞭毛則可提供運動性，使得 *H. pylori* 能鑽入胃黏膜，減低胃酸對於細菌的傷害 [47-48]。

附著因子是細菌初期感染的關鍵，廣義的定義能有助於菌體附著於宿主的因子稱為附著因子 [49]，目前研究發現的附著因子包含：neutrophil-activating protein (NAP)、adherence-associated protein A/B (AlpAB)、HopZ、heat shock protein (Hsp)、blood group antigen-binding adhesion (BabA) 與 sialic acid-binding adhesion (SadA) [51-57] 等，*H. pylori* 藉由這些附著因子黏附於胃上皮細胞以抵抗蠕動與胃排空，才能進一步在胃中的生長。

VacA 蛋白是由 *vacA* 基因轉錄轉譯，再經由切割形成的蛋白，會嵌在宿主細胞的細胞膜上，形成一個六元體的聚合物，其結構如圖一，具有陰離子通道的特性，使細胞中重碳酸鹽與有機陰離子釋放至細胞外，

而釋放出的重碳酸鹽與有機陰離子可做為細菌生長的養分來源 [58-59]。而 VacA 蛋白會藉由細胞吞噬 (endocytosis) 進入細胞內，因為陰離子通道的特性，使細胞質中氯離子進入空泡中，引起氫離子、氫與水進入空泡中，使空泡持續增大，最後使細胞形成空泡狀 [60]，VacA 蛋白也會與粒線體結合，釋放出 cytochrome c，導致細胞凋亡 [61]。



圖一：VacA 六元體的聚合物 [58]

*cag*-PAI 為 *H. pylori* 的基因片段 [44]，其中部分基因為第 IV 型的分泌系統的結構蛋白 [62]，經由第 IV 型的分泌系統可以將 *H. pylori* 的毒素相關蛋白送入細胞中如 cytotoxin-associated gene A (CagA)。CagA 進入細胞後，會使細胞產生蜂鳥的型態 (hummingbird phenotype)，增加細胞的運動性與刺激周圍細胞增生。不正常的細胞增生與運動性是細胞轉型的特徵，而這也是造成癌症的原因 [63-66]。

當胃組織受到 *H. pylori* 感染時，CagA 會刺激胃上皮細胞產生

nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 並釋放 interleukin-8 (IL-8)。IL-8 會使血液中的中性粒細胞 (neutrophil) 與單核細胞 (monocyte) 進入細胞黏膜層，在黏膜層的中性粒細胞或單核細胞產生活性氧中間質 (reactive oxygen intermediate, ROI)，引起發炎反應 [67-70]。而 VacA 進入細胞後，會刺激粒線體，經由 cytochrome c 與 caspase 3 使細胞凋亡。此外 *H. pylori* 的感染，也會引起巨噬細胞分泌 interleukin-12 (IL-12)，刺激 T cells 引起發炎，或產生 interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) 與 tumor necrosis factor  $-\alpha$  (TNF-  $\alpha$ )，直接引起發炎 [71-72]。而巨噬細胞會利用 L-arginine 產生 nitric oxide (NO)，抑制 *H. pylori* 的感染 [73]。*H. pylori* 感染，也會刺激漿細胞產生特異性抗體 (immunoglobulin, Ig) 如 IgA、IgG 與 IgM，辨識 *H. pylori* [74]。

## 五、診斷與治療

對於 *H. pylori* 感染的診斷分為侵入性檢查與非侵入性檢查兩種。侵入性檢查包含有快速尿素酶檢測、病理組織學切片檢測、細菌培養、刷拭細胞檢查、聚合酶鏈鎖反應；非侵入性檢查包含有碳-13尿素呼吸法、碳-14尿素呼吸法、血清檢查、酵素結合免疫吸收法 (enzyme-linked

immunosorbent assay, ELISA) 、糞便抗原檢查、乳液凝集 (latex agglutination) 、免疫色層分析 (immunochromatography) 、尿液抗體檢查 [77] 。

快速尿素酶檢測是利用 *H. pylori* 會產生尿素酶的特性，在尿素溶液中加入酚紅指示劑，當組織中帶有 *H. pylori* 時，尿素酶會將尿素水解為氨，使環境中pH 值升高，進而使酚紅由原來的黃色轉為粉紅色，顏色變化的速度與細菌的密度成正比；而在24小時內酚紅沒有變色，就可視為組織無感染，方法簡單且快速，但也容易受抗生素的影響形成偽陽性 [78-79] 。

病理組織學切片檢測是於胃竇部取出組織進行染色，直接以染色觀察是否有 *H. pylori* 的存在。通常會以 Hematoxylin-Eosin (HE) 染色搭配特殊染色如 Warthin-Starry stain 、 Giemsa stain 、 Genta stain 等。此方法也可以觀察組織的發炎情形 [80] 。做內視鏡檢查時也可在胃竇部分做刷拭抹片，利用特殊染色如 Giemsa stain 等觀察有無細菌 [81] 。

細菌培養是檢測 *H. pylori* 最標準的方式，特異性可高達 100 %，

也可以針對菌株的抗藥性來選擇投藥，但分離、運送與培養條件都會影響細菌的生長，而且培養菌株需較長的時間，是此檢驗的缺點 [82-83] 。

聚合酶鏈鎖反應可利用 DNA 放大的方式檢驗出極少的菌量，且能在數小時內得知是否感染 *H. pylori* 。

尿素呼吸法 (urea breath test, UBT) ，碳-13尿素呼吸法 (C13 urea breath test) 與碳-14尿素呼吸法 (C14 urea breath test) 都是利用碳的同位素與碳-12的比例來分析判斷是否感染 *H. pylori* [84 - 76]。將碳- 13 或碳- 14 標定於尿素分子上，讓病人喝下， *H. pylori* 的尿素酶會將標定的尿素分子水解為氨與二氧化碳，二氧化碳進入呼吸循環，吐出有碳- 13 或碳- 14 的二氧化碳，分析同位素與碳- 12 比例 [85-86] 。兩者間比較，碳- 14 為放射性的同位素，所以使用受到限制，目前大多以碳- 13 來檢測，但其檢測儀器 (scintillation counter) 較為昂貴。

血清檢查試測是用於測定血液中對 *H. pylori* 的抗體 (IgG, IgA 或 IgM) ，使用 ELISA 測試，適合檢測體內是否感染過 *H. pylori* ，但因抗體會在體內存留所以不適合治療後的追蹤 [87] 。

糞便抗原檢查，利用 *Helicobacter pylori* stool antigen (HpSA) 以 ELISA 的方式測試糞便中 *H. pylori* 的抗原，HpSA 是由兩種抗 *H. pylori* 外膜的抗體製成。此方法能直接檢測抗原，不受抗生素干擾，是一種簡單且快速的方法 [88-92]。

治療 *H. pylori* 感染的藥物，由最早期的單一療法，二合一療法，三合一療法，到四合一療法。單一治療是僅以一種抗生素進行治療，但單一療法治癒率不顯著，如 amoxicillin 的治癒率僅 24 - 30 % [77]。二合一療法是以鉍製劑 (bismuth compound) 或質子幫浦抑制劑 (proton pump inhibitors, PPI) 加上一種抗生素進行治療。鉍製劑是一種含有鉍鹽的胃黏膜保護劑，可覆蓋在潰瘍表面上形成凝膠保護層，抑制 *H. pylori* 的生長。質子幫浦抑制劑會抑制細胞中  $H^+$ ,  $K^+$ -ATP ase 的幫浦阻止氫離子進入胃，使胃中 pH 值上升，而加強抗生素之殺菌效果 [93-99]。目前普遍使用三合一治療，治癒率有 85 - 90 % [6-7]，在國內是以氫氣接受器阻斷劑 (histamine  $H_2$ -receptor antagonists, H2RA)、質子幫浦抑制劑或鉍製劑合併兩種抗生素使用。氫氣接受器阻斷劑是抑制使  $H^+$ ,  $K^+$ -ATP ase 活化的氫離子受器，藉由此降低胃酸分泌，氫離子受體拮抗

劑會競爭結合壁細胞膜上的氫離子受體，進而使胃酸分泌減少。常用的抗生素包括 amoxicillin、clarithromycin、metronidazole、tetracycline 等。但使用抗生素治療，衍生出菌株發生抗藥性的擔憂。在國內的調查中指出，*H. pylori* 對於 amoxicillin 的抗藥性高達 36 % [8]，而在其他國家的調查中發現，*H. pylori* 在歐洲對於 clarithromycin 抗藥性提升了 18 % [9]，在中國的 *H. pylori* 對 etronidazole 的抗藥性也提升了 50 % [10]，隨著抗藥性的提升，三合一治療的失敗率在全球也逐漸的在上升中，在許多的地區三合一治療的失敗率高達 20 % 以上 [11]。加上治療期間，病患常會出現頭暈、口苦、味覺遲鈍、噁心、腹脹、腹瀉等症狀，導致病人的配合度低 [12]。

除了以抗生素治療 *H. pylori* 的感染外，也有許多以中草藥用於 *H. pylori* 治療的研究，如黃芩、黃連、黃柏、桂枝、地丁、玫瑰花、土芩、高良薑、烏梅、山楂等，在體外實驗中證實具有抑制抗 *H. pylori* 生長的功能 [6,13-14]，但在體內的研究上較少見。

益生菌具有預防與治療胃腸道疾病的特性，而對於治療 *H. pylori* 的感染也有相當的效果 [32]。目前相關的研究指出，乳酸菌會吸附



於人體胃腸道中，與 *H. pylori* 競爭吸附，而且有助於調節免疫，對 *H. pylori* 的感染有其療效 [32-33]。

## 第二節、乳酸菌

乳酸菌 (lactic acid bacteria) 泛指能將大分子的醣轉換為乳酸的細菌，目前對於乳酸菌還無清楚的定義，但通常擁有幾項共通特色：革蘭氏陽性菌，不形成內生性孢子，不具運動性。通常為球狀或桿狀，對氧氣的需求可分為厭氧、微好氧、耐氧厭氧性或兼性厭氧性 [100-101]。乳酸菌依其發酵產物的種類又可分為兩種，同型發酵 (homofermentation)，只會產生乳酸；異型發酵 (heterfermentation)，除了生成乳酸之外還產生醋酸、乙醇及二氧化碳等多種產物 [32]。而在坊間，乳酸菌一詞普遍與益生菌劃為等號。

「Probiotics」一詞曾被譯為原生物素、生菌劑、益生菌或原生保健性菌種等，近年來此名詞被用於，給予人類或動物可促進其健康之微生物，進一步定義為「凡應用於人類或動物，可藉以改善內生性微生物相平衡而有益於宿主之單一或複數種微生物稱之」[102]。目前，

對人體有益的益生菌主要包含三屬：乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*)、雙  
叉桿菌屬 (*Bifidobacterium*) 與鏈球菌屬 (*Streptococcus*) [32]。

益生菌可藉由降低環境 pH，與病原菌競爭養分，減少有害菌增  
殖場所，產生抗菌物質等，來達到維持正常腸道菌相的功能，如 *L.*  
*acidophilus* 會妨礙病原菌與細胞結合並產酸殺死病原菌，文獻指出其  
能有效抑制 *Salmonella* Typhimurium、*Escherichia coli*、*Yersina*  
*pseudotuberculosis* 與 *Listeria monocytogenes* 附著侵入大腸癌細胞株  
(Caco-2) 細胞 [103]。*L. lactis* 會產生乳酸鏈球菌素 (nisin)，nisin  
是一種天然的多肽，具有抑菌的功能。在 1969 年聯合國糧食及農業  
組織/世界衛生組織將 nisin 定為一種生物型防腐劑，可應用於食品工  
業，而美國食品藥物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 在  
1988 正式核准，可運用產生 nisin 的菌株製成的乾酪粉抑制肉毒桿菌  
的生長 [104]。將益生菌運用於嬰兒型腹瀉 [105]、抗生素伴生性腹  
瀉 (antibiotic-associated diarrhea) [106]、旅行者腹瀉 (traveler's  
diarrhea) [107] 也有良好的效果。此外，益生菌還有調節免疫功能與促  
進代謝的功能 [32]。

乳酸桿菌屬中，常被討論的菌株為 *L. rhamnosus* GG (LGG) ，它能降低酒精引起的內毒素與脂肪肝，進而改善肝功能 [108] 。縮短減緩輪狀病毒型腹瀉與解除大腸急躁症 [109-110] 。也可以增加腸黏膜 IgA 與刺激細胞釋放 IFN- $\gamma$  ，有助於腸道免疫 [111] 。

### 第三節、生物轉換

利用微生物產生的酵素，進行催化與降解的過程稱為生物轉換 [26] 。  $\beta$ -glucosidase 是一種糖苷水解酵素 (glycosidase) ，可以打斷糖苷鍵結 [112] 。廣泛存在於自然界之中，微生物、植物、昆蟲以及哺乳動物都能產生  $\beta$ -glucosidase 。許多微生物可以製造  $\beta$ -glucosidase 分解大分子的多醣類 [113] ，如將纖維素分解形成葡萄糖以做為能量來源。在植物之中  $\beta$ -glucosidase 參與了許多重要生理機制，例如種子的發芽，木質素的合成與色素的變化等 [112, 114] 。而以植物為主食的昆蟲也會分泌  $\beta$ -glucosidase ，分解消化植物的纖維素做為能量 [115] 。  $\beta$ -glucosidase 也常被用於製酒工業，用來調整葡萄酒的香氣以及風味 [116-117] 。

## 第四節、梔子

### 一、梔子

梔子，學名為 *Gardenia jasminoides*，別名又稱黃梔子、山梔子、山枝子、大紅梔或白禪。是一種開花植物，屬於茜草科 (Rubiaceae) 梔子屬 (*Gardenia*) 的多年生常綠灌木植物，適生長於溫暖濕潤的氣候，分佈在印尼、菲律賓、日本、中國以及台灣中南部 [19]。一般庭院常見的觀賞植物，過去常用於食品色素與中草藥來使用。

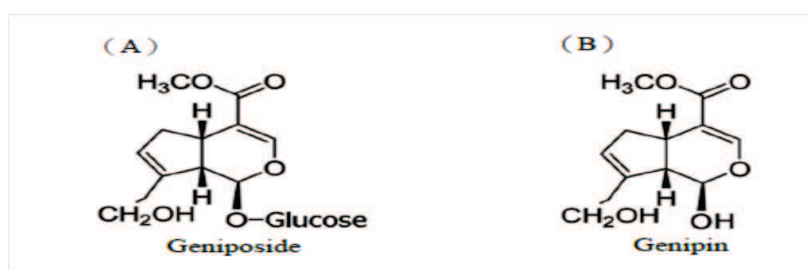
梔子果實的主要成分包含類胡蘿蔔色素 (yellow carotenoid pigments) 以及環烯醚萜類 (iridoid omponents) 化合物。類胡蘿蔔色素中包含藏紅花素 (crocin) 以及藏紅花酸 (crocetin) 等黃色色素，主要是添加於彩色果汁、糖果以及麵食中 [118]。而環烯醚萜類化合物中的 genipin 容易與胺基酸反應形成藍色的混合物即為梔子藍 (gardenia blue)。在日本常做為食品的著色劑添加在飲料、糖果、果凍以及麵食 [119]，在相關的動物實驗之中，也證實 gardenia blue 的安全性高 [109,120-121]。

在亞洲如中國、日本與韓國等國家，乾燥過後的梔子果實為常用的

中藥材，梔子的主要有利膽保肝，解熱，去黃疸，鎮靜、鎮痛，止血，降壓，促進胰腺分泌作用，抗菌以及消炎等功能。經常使用於治療發炎，頭痛，黃疸，水腫，發燒，肝臟疾病，高血壓與皮膚潰瘍等病狀 [122]。而有研究指出，梔子能對氧化損傷，炎症和腫瘤促進其保護活動 [123]。

## 二、梔子苷與梔子素

梔子果實含有大量的環烯醚萜類化合物，包含 geniposide、genipin、羥異梔子苷 (gardenoside)、山梔苷 (shanzhiside)、梔子酮苷 (gardoside)、梔子苷酸 (geniposidic acid)、梔子黃素 (gardenin)、雞屎藤次苷甲酯 (scandoside methyl ester) 等。其中 geniposide 是梔子果實中最主要的成分 [124-126]，它是一種環烯醚萜糖苷，其結構如圖二 (A)。Geniposide 因為具有  $\beta$ -1,4-糖苷鍵的結構，所以會被  $\beta$ -glucosidase 水解，形成去糖體的 genipin (圖二(B)) 以及葡萄糖 [17]。



圖二：(A) 梔子苷與 (B) 梔子素之結構

## (一)、梔子苷

化學名：Methyl 9-(hydroxymethyl)-2-[3,4,5 - trihydrox-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-diene-5-carboxylate

分子量：388.36

Geniposide 具有保護肝臟、增加膽汁分泌、減少胃液分泌與促進胰液分泌的功能 [16]，研究指出，在大鼠實驗中 geniposide 能藉由抑制 5-lipoxygease 達到治療氣喘 [127]。也能增加老鼠肝臟中 glutathione 的含量 [128]。並藉由誘導癌細胞凋亡與改變細胞週期達到抗癌的功能，並且降低病人接受放射治療的傷害 [129-130]。

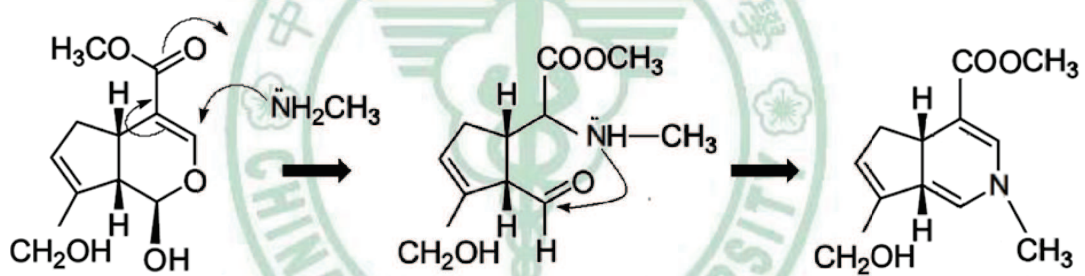
## (二)、梔子素

化學名：Methyl 2-hydroxy-9-(hydroxymethyl)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona -4,8 - diene-5-carboxylate

分子量：226.23

Genipin 具有蛋白質交聯的物理性質，在蛋白質上的自由電子對 genipin 做親核攻擊，使得 genipin 開環形成醛基，而開環後的 genipin 再以其醛基與生物組織上的胺基產生鍵結，進而達到交聯生物組織的效

果如圖三，在生醫材料上常被拿來做為交聯劑使用 [22, 132-133]。研究指出， genipin 具有抗細胞凋亡的功能，也是梔子中主要的抗發炎物質，對於化學性刺激所引起的胃炎，具有良好的治療能力 [23-25]。而 genipin 與胺基酸結合，形成穩固結構的複合體，呈現藍色 (gardenia blue)，其結構穩定不會因時間或酸鹼改變，且易容於水，因此過去梔子萃取物也被當成天然的藍色色素使用 [132-135]。



圖三：一級胺對梔子素進行親核攻擊

## 參、材料與方法

### 第一節、梔子萃取物分析

梔子萃取物 (gardenia extract ,GE) ，購自鴻元生物科技股份有限公司 ，以高效液相層析儀 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 分析萃取物中 geniposide 與 genipin 含量 [16] 。

#### 一、 溶液配置

##### (一)、 內標準溶液

精確秤取 2.0 mg 咖啡酸 (caffeic acid, CA) (Sigma Chemical Co., USA) ，加入甲醇 (LC Grade) (J. T. Baker , USA) 定容至 2.0 ml ，及得 1.0 mg/ml 之儲備溶液。再以甲醇稀釋為 20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  。

精確秤取 2.0 mg methylparaben (MP) ，加入乙酸乙酯 (ethyl ethanoate) 定容至 2.0 ml，及得 1.0 mg/ml 之儲備溶液，再以乙酸乙酯稀釋為 20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  。

##### (二)、 梔子苷與梔子素儲備溶液

精確秤取 10 mg geniposide (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. , Japan) ，加入甲醇定容至 2.0 ml，及得 0.5 mg/ml 之儲備溶液。保存於



-20 °C，待繪製檢量線時以甲醇稀釋至需求濃度。

精確秤取 20 mg genipin (Challenga Bioproducts Induster, Ltd, USA)，加入甲醇定容至 2.0 ml，及得 1.0 mg/ml 之溶液，genipin 需在使用前新鮮配製。

## 二、梔子苷 HPLC 分析條件

- 分析管柱：Apollo C18 5  $\mu$  (250  $\times$  4.6 mm) (P.J. Cobert Associates, Inc., USA)
- 移動相：0.1 % phosphoric acid : acetonitrile = 85:15
- 衝提時間：15 min
- 流速：1.0 ml/min
- 檢測波長：240 nm
- 內標：20.0  $\mu$ g/ml CA

## 三、梔子苷檢量線繪製

取出 100  $\mu$ l geniposide 儲備溶液加 900  $\mu$ l 甲醇，配製為 50  $\mu$ g/ml 的標準溶液，再以甲醇序列稀釋取得 25、12.5、6.25、3.125 與 1.0625  $\mu$ g/ml 的標準溶液，由 6 管標準溶液各取 50  $\mu$ l 加入等量含內標

(20.0  $\mu\text{g/ml}$  CA) 的 methanol，取 50  $\mu\text{l}$  以 HPLC 進行分析，所得之 geniposide 與內標波峰面積比值，與濃度進行線性迴歸，求得檢量線方程式。

#### 四、梔子素 HPLC 分析條件

- 分析管柱：Apollo C18 5  $\mu$  (250  $\times$  4.6 mm)
- 移動相：0.1 % phosphoric acid : acetonitrile = 78:22
- 衝提時間：30 min
- 流速：1 ml/min
- 檢測波長：240 nm
- 內標：1.0  $\mu\text{g/ml}$  MP

#### 五、梔子素檢量線繪製

取出 100  $\mu\text{l}$  genipin (1.0 mg/ml) 溶液加入 900  $\mu\text{l}$  甲醇，配製為 100  $\mu\text{g/ml}$  的標準溶液，再以甲醇序列稀釋取得 50、25、12.5、6.25、3.125  $\mu\text{g/ml}$  的標準溶液，每管標準溶液取 100  $\mu\text{l}$  加入 900  $\mu\text{l}$  二次水，以震盪機混合後，快速取出 300  $\mu\text{l}$  加入等量含內標 (10  $\mu\text{g/ml}$  MP) 之乙酸乙酯，以震盪器混合後，以 10,000  $\times g$  離心 10 分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾，以 50  $\mu\text{l}$  甲醇回溶，進行 HPLC 分析。所得之 genipin 與

內標波峰面積比值，與濃度進行線性迴歸，求得檢量線方程式。

## 第二節、幽門螺旋桿菌的培養

實驗中使用的 *H. pylori* 包括 *H. pylori* 26695 (ATCC 700392) 、 *H. pylori* v633 、 *H. pylori* v1254 與 *H. pylori* v1354 。標準菌株 ATCC 700392 由財團法人食品工業發展研究所生物物資資源保存及研究中心購入，臨床分離株由中國醫藥大學賴志河老師實驗室提供，均為抗藥菌株 [134-135] 。除最低殺菌濃度測試以外，其餘實驗均以 ATCC 700392 為測試菌株。 *H. pylori* 以 Brucella broth (BD, USA) 加入 5 % sheep blood (TPM, Taiwan) 與 12 % agar 配製而成的血液培養基培養，在置入 GasPak™ EZ Campy Container System Sachets (BD, USA) 的厭氧箱，37 °C 培養 48 小時。

## 第三節、乳酸菌株分離與培養

實驗收集 67 株田間分離株，及 1 株由吳金濱老師研究室分讓的人類腸內菌株，供本次研究篩選菌株所用。菌株的分離方式如下，將含菌

的樣本以 phosphate buffered saline (PBS) buffer (8 g phosphate-buffered saline ; sodium chloride , 0.2 g potassium chloride , 2.16 g sodium phosphate dibasic heptahydrate 以及 0.2 g potassium dihydrogen phosphate , 溶於 1 l 的二次水) 100 倍稀釋，取 100  $\mu$ l 的稀釋液均勻塗抹於以 deMan-Rogosa- Sharpe (MRS) broth (BD, USA) 加 1.5 % agar (Bio Basic, Canada ) 製成的平板培養基上，放至 37  $^{\circ}$ C 培養箱，隔夜培養 18 小時。在培養基上依菌落型態不同，挑選分離不同的菌落，將單一菌落以四區劃菌法的方式，畫到新的 MRS 平板培養基上，再放入 37  $^{\circ}$ C 培養箱培養 18 小時。確認為單一菌株後，製備菌種保留樣本 (stock) 。

菌株在進行活性測試時，以接種環自 stock 中沾取適量劃至 MRS 平板培養基，培養 18 小時之後，自 MRS 平板培養基中取單一菌落，接種至 MRS broth，在 37  $^{\circ}$ C 震盪 (130rpm) 培養 8 小時，後將菌量調整為  $OD_{600} = 0.1$ ，再以 37  $^{\circ}$ C 隔夜震盪培養 16 小時。以便進行酵素活性測試。

#### 第四節、最低殺菌濃度測試

最低殺菌濃度測試 (minimum bactericidal concentration, MBC) 為殺死 99.9 % 細菌所需的最低藥物濃度。

##### 一、梔子對於幽門螺旋桿菌之最低殺菌濃度測試

自血液培養基中取適量的 *H. pylori*，以含 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 Brucella broth 稀釋至  $10^6$  colony - forming unit (CFU) /ml，取 100  $\mu$ l 的菌液至 96 孔盤中，加入 100  $\mu$ l 以含 10 % FBS 之 Brucella broth 二倍序列稀釋 geniposide、genipin 與 GE，genipin 最終濃度由 4 mM 至 0.032 mM，geniposide 最終濃度由 10 mM 至 0.075 mM，GE 則由 2 % 稀釋至 0.015 %，在置入 GasPak™ EZ Campy Container System Sachets (BD, USA) 的厭氧箱，37 °C 培養 24 小時。於 24 時後，取 10  $\mu$ l/well 滴在血液培養基上，培養於置入 GasPak™ EZ Campy Container System Sachets 的厭氧箱中以 37 °C 培養 48 小時，取出血液培養基觀察菌落生長情形，沒有生長出菌落的最小濃度視為最低殺菌濃度。每組實驗重複 3 次，求取平均值表示之。

## 二、梔子對於乳酸菌之最低殺菌濃度測試

將隔夜培養的菌液離心收集菌體，以 Mueller Hinton broth (BD, USA) 稀釋至  $10^6$  CFU/ml，取 100  $\mu$ l 的菌液至 96 孔盤中，加入 100  $\mu$ l 以 Mueller Hinton broth 二倍序列稀釋 geniposide、genipin 與 GE，genipin 最終濃度由 4 mM 至 0.032 mM，geniposide 最終濃度由 10 mM 至 0.075 mM，GE 則由 2% 稀釋至 0.015%，於 37  $^{\circ}$ C 培養 24 小時，取 10  $\mu$ l/well 滴在 MRS 養基上，再以 37  $^{\circ}$ C 培養 18 小時，取出培養基觀察菌落生長情形，沒有生長出菌落的最低濃度視為最低殺菌濃度。每組實驗重複 3 次，求取平均值表示之。

## 第五節、掃描式電子顯微鏡檢測

掃描式電子顯微鏡 (Scanning electron microscopy, SEM) 是藉由電子束撞擊至樣品後，反射出二次電子 (secondary electrons) 呈現出樣本表面的影像。

在 6 孔盤中加入 1 ml 的 *H. pylori* ( $10^9$  CFU/ml) 與 1 ml 的 PBS 或 2 mM genipin，在置入 GasPak™ EZ Campy Container System Sachets

的厭氧箱中以 37 °C 培養 6 小時，之後以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，收取菌體，再以 PBS 清洗 3 次去除上清液，加入 1 ml 37 % 的福馬林中固定後，委請慈濟大學何翰綦老師進行脫水、鍍金包埋並以掃描式電子顯微鏡掃描菌體表面變化。將樣品放置於 1 % pH=7.3 的 0.1 M 磷酸緩衝液中，以 2.5 % 戊二醛 (Glutaraldehyde) 固定在載玻片上，後以系列酒精 (30 %、50 %、70 %、85 %、95 %、無水酒精) 脫水與臨界點乾燥程序，再以離子覆膜機使其表面包覆金原子，以 15 kV (Hitachi S-4700, Hitachi, Japan) 在掃描電子顯微鏡下觀察。隨機在三個不同區域，以 10,000 倍放大攝影，以代表性的影像顯示。

## 第六節、細胞培養

人類胃癌上皮癌細胞株 (human gastric cancer epithelial cell line, AGS cells) 與老鼠巨噬細胞株 (mouse leukaemic monocyte macrophage cell line, RAW 264.7 cells) 由財團法人食品工業發展研究所生物物資資源保存及研究中心購入。AGS cells 培養於含有 10 % FBS 與 1 % PSA (100 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin 與

0.25 µg/ml amphotericin B)的 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI1640) (GIBCO, USA), RAW 264.7 cells 培養於含有 10 % FBS 與 1 % PS (100 units /ml penicillin 與 0.1 mg/ml streptomycin) 的 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (GIBCO, USA), 於 5 % CO<sub>2</sub> 之培養箱以 37 °C 培養。

### 一、細胞株的保存

將細胞懸浮於含有 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) (siegmaldrich, USA) 之培養液的冷凍管中, 先放置於 4 °C 冷藏 30 分鐘, 再移置 -20 °C 冷凍 2 至 4 小時, 後移置 -80 °C 隔夜冷凍, 再將冷凍管移置液態氮中保存。

### 二、細胞繼代

#### (一)、人類胃癌上皮癌細胞株

以 PBS 清洗 3 次, 加入 0.05 % trysin (Biological Industries, Israel) 反應 5 分鐘將細胞拍下, 以 1,500 rpm 離心 5 分鐘 去除 trysin 後, 加入含抗生素之培養液移至新培養皿中。



## (二)、老鼠巨噬細胞株

以原培養液緩慢衝提細胞，使細胞懸浮於培養液中，以 1,000 rpm 離心 5 分鐘 去除原培養液後，加入含抗生素之培養液移至新培養皿中。

### 第七節、細胞存活率測試

#### 一、人類胃癌上皮癌細胞

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 是一種黃色的化合物，會作用在活細胞的粒線體呼吸鏈中，接受琥珀酸脫氫酶 (SDH) 的作用後，會產生紫色的結晶，而死細胞中的琥珀酸脫氫酶會消失，不能將 MTT 還原。故可利用測量 OD 值得知細胞還原 MTT 的能力，用以作為細胞存活率的指標 [139]。

將 100  $\mu$ l AGS cells ( $10^4$  CFU/well) 植入 96 孔盤，於 37  $^{\circ}$ C 培養 18 至 24 小時後，加入 100  $\mu$ l/well 以 RPMI 1640 細胞培養液二倍序列稀釋 geniposide、genipin 與 GE，genipin 最終濃度由 4 mM 至 0.032 mM，geniposide 最終濃度由 10 mM 至 0.075 mM，GE 則由 2 % 稀

釋至 0.015 %，以 37 °C 培養 24 小時，除去上清液，以 PBS 清洗3次，加入100 µl MTT，靜置 3 至 4 小時，除去上清液，加入 100 µl/well 的 DMSO 使 MTT 溶出，測量 OD<sub>570</sub> 值，每組實驗重複 3 次，求取平均值表示之。

## 二、老鼠巨噬細胞

使用倒立式電子顯微鏡觀察細胞存活情形，以 typan blue (Biological Industries, Israel) 做為染劑進行細胞計數計算存活之細胞數。其原理利用細胞死亡後細胞膜會變得不完整，因此 typan blue 染劑可以進入細胞，將其染成深藍色，活細胞則因為細胞膜完整具有選擇性通透的能力，故染劑無法進入細胞內而成無色透明狀。

將100 µl RAW 264.7 cells ( $10^5$  CFU/well) 植入 96 孔盤，以37 °C 培養 24 小時，加入 100 µl/well 以 DMEM 細胞培養液二倍序列稀釋 geniposide、genipin 與 GE，genipin 最終濃度由 4 mM 至 0.032 mM，geniposide 最終濃度由 10 mM 至 0.075 mM，GE 則由 2 % 稀釋至 0.015 %，以 37 °C 培養 24 小時，以 typan blue做為染劑，以 1 : 1的比例與細胞混合均勻，注入細胞計數盤，使用倒立式電子顯微鏡觀察細

胞存活情形，並計數存活之細胞數量，細胞計數盤使用，計數九宮格中4角與中間之正方形內之細胞數目，其計算公式如下，每組實驗重複3次，求取平均值表示之。

$$\text{細胞數 (cell/ml)} = \text{計數數量}/5 \times \text{稀釋倍率} \times 10^4$$

## 第八節、菌種的鑑定與β-葡萄糖苷酶活性測試

### 一、菌種的鑑定

利用細菌 16S rDNA 的高度保留性，以 rDNA 序列分析對照菌株種類。步驟分為 1.由菌體中抽取 genomic DNA 2.以聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 方式增幅其 16S rDNA 片段 3.將增幅的片段定序，與資料庫中的 16S rDNA 做相似性比對。

取 1 ml 隔夜培養的菌液，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘，去除上清液後，使用 Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit (GeneMark, Taiwan) 抽取 DNA。革蘭氏陽性菌需加入 180 μl 的 lysozyme buffer (20 mM Tris(hydroxymethyl) aminomethane-HCl (Tris-HCl) pH 8.0, 2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) , 1.2 % Triton X-100 與 4 mg lysozyme powder) 混合，以 37 °C 乾浴 30 分鐘；革蘭氏陰性菌則

不需要此步驟。預處理後的溶液，加入 200  $\mu$ l extraction solution 與 20  $\mu$ l proteinase K solution 混合均勻後，以 56  $^{\circ}$ C 乾浴 3 小時。再加入 200  $\mu$ l binding solution，以 70  $^{\circ}$ C 乾浴 10 分鐘，將溶液移至 column，加入 200  $\mu$ l 的 99 % ethanol，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒去上清液後，加入 300  $\mu$ l binding solution，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒去上清液，加入 700  $\mu$ l wash solution，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，清洗膜上雜質兩次，最後以 13,000 rpm 離心 3 分鐘。用 100  $\mu$ l 的高溫 (70  $^{\circ}$ C) 二次水，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，收取 DNA。

取得 DNA 後，進行 PCR 增幅 16S rDNA 之片段。將 5  $\mu$ l 的 DNA 與 5  $\mu$ l PCR Master Mix (GeneMark, Taiwan)、各 1  $\mu$ l 的 forward (5'- CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') 及 reverse (5'- CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC -3') [136] 引子及 13  $\mu$ l 無菌二次水混合後進行 PCR，最開始以 95  $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘使 DNA 形成單股，再以 35 個循環增幅放大 DNA，每個循環設定為：以 95  $^{\circ}$ C 使 DNA 變性 (denaturation) 1 分鐘，接著以 63  $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘，使 DNA 與引子黏合 (annealing)，再以 72  $^{\circ}$ C 使 DNA 延

長 (extension) 2 分鐘。循環結束後，以 72 °C 使 DNA 繼續延長 15 分鐘，反應結束後溫度維持在 4 °C 存放。

經 PCR 反應後的產物，委託明欣生物科技股份有限公司定序。使用機型為 ABI3730，以 Sanger Method (dideoxy nucleotide chain termination) 之實驗原理，以相同引子，進行 16S rDNA 之片段定序。

在取得序列後，與 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站中 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 的 nucleotide blast ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM = blastn&BLAST](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST)) 內已知菌種之 16S rDNA 進行比對，藉以判斷該菌株種類。

## 二、 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性測試

實驗利用  $p$ -Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside (Sigma-aldrich<sup>TM</sup>，USA) 會被  $\beta$ -glucosidase 分解成葡萄糖以及呈現黃色的  $p$ -nitrophenyl (圖四)，來測量  $\beta$ -glucosidase 的活性 [137]。

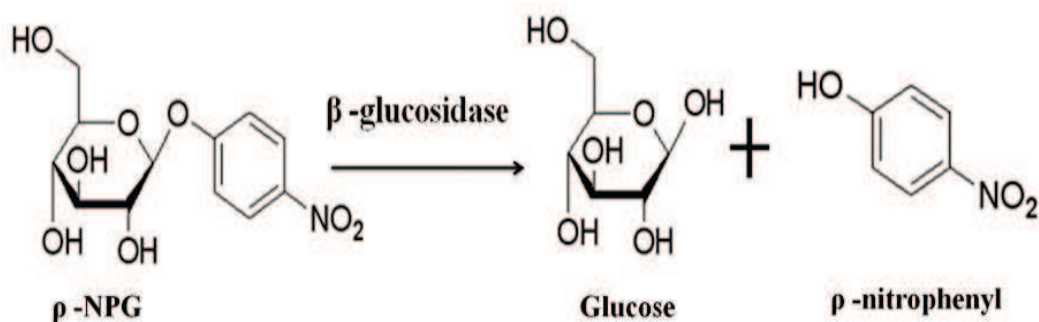
實驗流程如下，取 1.5 ml 菌液至微量離心管中，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘收集菌體，移除上清液之後，加入 300  $\mu$ l 的 A buffer (0.1 M

disodium hydrogen phosphate-citric acid ; pH 5.8) 與菌體均勻混合，取 100  $\mu$ l 菌體混合液測量其 OD<sub>600</sub> 之值。再取 100  $\mu$ l 混合液移至新的微量離心管，加入 15  $\mu$ l 之 10 mM 溶於 0.1 M sodium phosphate 的  $\rho$ -NPG，之後置於 37  $^{\circ}$ C 乾浴器中反應，並觀察其顏色變化，直到顏色不再加深，表示反應完全，添加 900  $\mu$ l 的反應終止劑 (0.25 M sodium carbonate, pH=10.0) 使反應終止並記錄反應時間，最後以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，取 100  $\mu$ l 上清液，測量其 OD<sub>400</sub> 的值。每組實驗重複 3 次，求取平均值表示之。

利用下列公式計算酵素活性：

$$\text{酵素活性 (Unit)} = (\text{OD}_{400} \times 1000) / (\text{OD}_{600} \times V \times T); V \text{ 為體積 (ml),}$$

T 為反應時間 (min)。



圖四： $\beta$ -葡萄糖苷酶活性測試原理

## 第九節、轉換液的製備與成分分析

### 一、體外實驗之轉換液製備

將隔夜培養的菌液離心收集菌體，以隔夜培養時同體積的 Brain-Heart Infusion (BHI) 液態培養基培養 3 小時，優化酵素活性 [138]。離心去除 BHI 培養基後，取優化完成的菌體，加入無菌二次水稀釋至需求菌量 ( $2.5 \times 10^7$  CFU/ml、 $5 \times 10^7$  CFU/ml、 $1 \times 10^8$  CFU/ml、 $2 \times 10^8$  CFU/ml、 $4 \times 10^8$  CFU/ml)，在每一管菌液中加入 0.4 % 的 GE，置於 37 °C 反應 1 小時，反應完成後，於 4 °C 以 12,000 ×g 離心 5 分鐘，上清液以 0.2 μm 的濾膜過濾後為實驗使用之轉換液，轉換液保存於 -20 °C，待分析時取用，組別代號如表一所示。

表一：體外實驗之轉換液之組別

Group	Treatment
B-1	0.4 % GE + $2.5 \times 10^7$ CFU/ml JB3
B-2	0.4 % GE + $5 \times 10^7$ CFU/ml JB3
B-3	0.4 % GE + $1 \times 10^8$ CFU/ml JB3
B-4	0.4 % GE + $2 \times 10^8$ CFU/ml JB3
B-5	0.4 % GE + $4 \times 10^8$ CFU/ml JB3

## 二、轉換液分析之樣品製備

取優化後的菌體，以無菌二次水稀釋至需求菌量 ( $2.5 \times 10^8$  CFU/ml、 $2.5 \times 10^9$  CFU/ml、 $2.5 \times 10^{10}$  CFU/ml)，分別加入 0.5 %、1 %、2 %、4 % GE 6 ml (表二)，取 300  $\mu$ l 至微量離心管。取 3 管微量離心管，立即加入含內標 (10  $\mu$ g/ml MP) 之乙酸乙酯 300  $\mu$ l 萃取，以震盪器混合後，以  $10,000 \times g$  離心 10 分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾。其餘置於 37  $^{\circ}$ C 反應，分別於 1、5、15、30、60 分鐘各取 3 管檢品，加入含內標之乙酸乙酯 300  $\mu$ l 萃取，以震盪器混合後，以  $10,000 \times g$  離心 10 分鐘，取出乙酸乙酯層，以氮氣吹乾，保存於 4  $^{\circ}$ C，後進行 HPLC 分析。樣品分析以 50  $\mu$ l 甲醇回溶，每組實驗重複 3 次，求取平均值表示之。

表二：轉換液分析之組別

Group	Treatment
BA-1	1 % GE + $2.5 \times 10^8$ CFU/ml JB3
BA-2	1 % GE + $2.5 \times 10^9$ CFU/ml JB3
BA-3-1	0.5 % GE + $2.5 \times 10^{10}$ CFU/ml JB3
BA-3-2	1 % GE + $2.5 \times 10^{10}$ CFU/ml JB3
BA-3-3	2 % GE + $2.5 \times 10^{10}$ CFU/ml JB3
BA-3-4	4 % GE + $2.5 \times 10^{10}$ CFU/ml JB3



## 第十節、幽門螺旋桿菌之黏附與侵入測試

將 AGS cells ( $5 \times 10^4$  cell/well) 以 multiplicity of infection (MOI) = 10 的比例感染 *H. pylori* 後，與各組轉換液置於 37 °C 共同培養 6 小時，以 PBS 清洗 3 次加入 200  $\mu$ l 的 0.05 % trypsin 反應 5 分鐘，加入 800  $\mu$ l 的 RPMI 1640 細胞培養液，取部分溶液適量稀釋後塗抹於血液培養基上，置入 GasPak™ EZ Campy Container System Sachets 的厭氧箱中以 37 °C 培養 2 至 3 天，計算菌落數目。此數代表黏附於細胞表面與侵入細胞的菌數，將菌數除以細胞數後，得值為 1 個細胞黏附與侵入的細菌數，表示方式為黏附侵入比例 (association rate)。而以相同方式以 *H. pylori* 感染 AGS cells，但於 PBS 清洗 3 次後，加入 100  $\mu$ l/ml 的 10 mM gentamicin (GIBCO, USA) 反應 2 小時，再以上述方式培養並計算菌落數目，可推算出細菌侵入能力，表示方式為侵入比例 (invasion rate)。將 association rate 減去 invasion rate 即為黏附比例 (adhesion rate)。每組實驗重複 3 次，求取平均值表示之。

## 第十一節、介白素-8 表現量分析

將以 *H. pylori* 感染 (MOI=100) 之 AGS cells ( $5 \times 10^4$  cell/well) 培養於各組轉換液後，置於 37 °C 培養 6 小時後，收取上清液測試各組間 IL-8 的表現量。使用 human IL-8/NAP-1 module set (Bender MedSystems Inc., USA)。實驗步驟如下，以 PBS 稀釋 capture antibody 成 5 µg/ml 的 coating buffer，在 96 孔盤中加入 100 µl coating buffer，靜置 4 °C 冰箱中 16 小時。除去 coating buffer，以 250 µl wash buffer (PBS 加 0.05 % Tween-20) 清洗 1 次，加入 200 µl assay buffer 室溫震盪 2 小時，除去 assay buffer 以 250 µl wash buffer 清洗 2 次，在 96 孔盤中分別加入 50 µl/well 以 assay buffer 序列稀釋的標準液與樣品，同時於每個孔中加入以 assay buffer 稀釋 1,000 倍之 50 µl 之 biotin-conjugate，室溫震盪 1 小時，以 250 µl wash Buffer 清洗 3 次，加入 100 µl tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution 避光反應約 5 分鐘 (至樣品成色) 後，加入 4 N sulfuric acid 終止反應。測量 OD<sub>450</sub> 的值，以標準液的趨勢線計算濃度，測量各組間 IL-8 產生量，每組實驗重複 3 次，求取平均值表示之。

## 第十二節、一氧化氮表現量分析

一般實驗不容易直接測定一氧化氮 (NO)，是因為 NO 不穩定與半衰期短，但當 NO 產生後會迅速氧化為穩定的亞硝酸 (nitrite) 或硝酸 (nitrate)，利用 Griess Reagent 進行呈色反應，讀取吸光質，以其結果以代表 NO 含量。

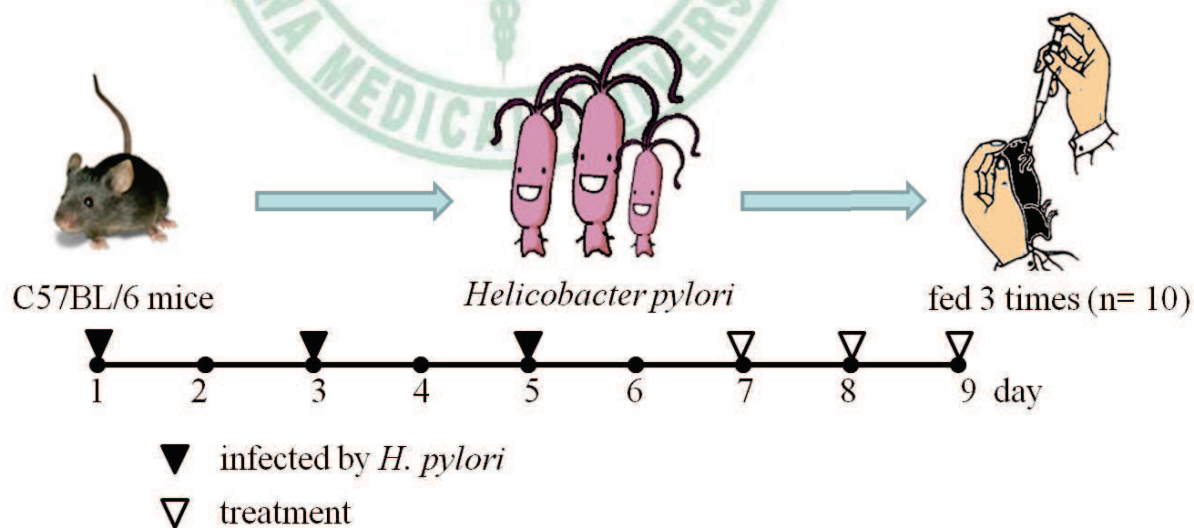
將以 *H. pylori* 感染(MOI=100)之 AGS cells ( $5 \times 10^4$  cell/well) 培養於各組轉換液後，置於 37°C 培養 6 小時。至 96 孔盤中分別加入 100  $\mu$ l 標準溶液與各組樣品，每個孔以等比例加入 4 % Griess reagent powder，反應 15 分鐘，測量 OD<sub>570</sub> 的值。以標準液的趨勢線計算濃度，測量各組間 NO 產生量。每組實驗重複 3 次，求取平均值表示之。

配製標準溶液之配置方法如下，以二次水配製 200 mM 的 sodium nitrite 為儲備溶液。實驗時，以 PBS 稀釋儲備溶液為 200  $\mu$ M，再以序列稀釋取得 100 $\mu$ M、50 $\mu$ M、25 $\mu$ M、12.5 $\mu$ M、6.25 $\mu$ M、3.125 $\mu$ M 的標準溶液。

### 第十三節、幽們螺旋桿菌感染小鼠之實驗模式

實驗使用4週大的 C57BL/6 小鼠，購買至國家實驗動物中心。飼養於中國醫藥大學動物實驗中心 (室溫  $23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 $55\% \pm 5\%$ ，12 / 12 小時日夜週期)，自由取飲水及飼料。

以 10 隻小鼠為一組，共分 10 組。每隻小鼠以隔日感染的方式，使用胃管餵食  $200\text{ }\mu\text{l } 5\times 10^9\text{ CFU}$  的 *H. pylori* 共 3 次。小鼠感染後第二天開始每組分別餵食水、genipin、GE、乳酸菌或 GE 加乳酸菌，治療三天後犧牲以便進行分析。感染模式如圖五，投藥組別如表三所示。



圖五：小鼠感染模型

表三：小鼠投藥組別

Group	Treatment
Control	0.2 ml of Water (not infected)
Infection	0.2 ml of Water
GN 10	0.2 ml of 10 mM genipin
GN 20	0.2 ml of 20 mM genipin
G 0.2	0.2 ml of 2 % GE
G 0.4	0.4 ml of 2% GE
L 0.2	0.2 ml of $2.5 \times 10^{10}$ CFU/ml JB3
L 0.4	0.4 ml of $2.5 \times 10^{10}$ CFU/ml JB3
LG 0.2	0.2 ml of 2 % GE and $2.5 \times 10^{10}$ CFU/ml
LG 0.4	0.4 ml of 2 % GE and $2.5 \times 10^{10}$ CFU/ml

小鼠犧牲時，以心臟採血的方式取得小鼠血液 (800  $\mu$ l至1 ml) ， 以 3,000 rpm 離心10分鐘收取得血清，以測量抗體與細胞激素的含量。並取出胃底至幽門的組織，加入500  $\mu$ l PBS，以研磨棒磨碎後，於4  $^{\circ}$ C以 12,000 rpm 離心5分鐘，磨碎後的組織進行mRNA抽取。

## 第十四節、RNA 表現量測試

### 一、小鼠胃組織之 mRNA 抽取

將 lysozme (GeneMark, USA) 溶於 TE buffer (100 mM Tris-Cl pH

8.0, 10mM Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA pH 8.0) 濃度為 4  $\mu\text{g/ml}$ , 加入 100  $\mu\text{l}$  於磨碎後的小鼠胃組織中, 置於冰上 30 分鐘, 期間每隔 10 分鐘震盪混勻 1 次, 加入 500  $\mu\text{l}$  Trisolution (GeneMark, USA), 置於冰上 5 分鐘後於 4  $^{\circ}\text{C}$  以 12,000  $\times g$  離心 10 分鐘, 將上清液移至新的微量離心管, 加入 200  $\mu\text{l}$  chloroform, 震盪混合後置冰上 15 分鐘, 於 4  $^{\circ}\text{C}$  以 12,000 rpm 離心 15 分鐘, 抽取上層至新的微量離心管, 加入等量之 isopropanol 置於 -20  $^{\circ}\text{C}$  靜置 2 小時後, 於 4  $^{\circ}\text{C}$  以 12,000 rpm 離心 15 分鐘, 除去上清液, 加入 1ml 70% 酒精再於 4  $^{\circ}\text{C}$  以 2,000 rpm 離心 15 分鐘, 重複 2 次後, 倒去酒精放置室溫風乾, 加入 30  $\mu\text{l}$  diethylpyrocarboate (DEPC) water, 存放置 -80  $^{\circ}\text{C}$ 。使用分光光度計  $\text{OD}_{260}$  讀值測量 mRNA 濃度, 濃度計算由公式計算。

$$\text{mRNA 濃度公式: mRNA 濃度 (ng/}\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times \text{稀釋倍率} \times 40$$

## 二、反轉錄

取 5  $\mu\text{l}$  1 ng/ $\mu\text{l}$  mRNA、2  $\mu\text{l}$  random hexamer 與 8.3  $\mu\text{l}$  DEPC water, 以 65  $^{\circ}\text{C}$  加熱 5 分鐘, 再加 4  $\mu\text{l}$  5 $\times$  reaction buffer、2  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP Pre-Mix 與 0.5  $\mu\text{l}$  M-MuLV, 於 25  $^{\circ}\text{C}$  反應 10 分鐘, 42  $^{\circ}\text{C}$  反應 1 小時,

最後以 70 °C 反應 10 分鐘，即可將 mRNA 轉錄為 cDNA。

### 三、即時聚合酶連鎖反應

將轉為 cDNA 之樣品委託明欣生物科技股份有限公司進行即時聚合酶連鎖反應 (Real-Time Quantitative polymerase chain reaction)。

Quantitative PCR 使用 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) 與 200 mM forward (5'- CTGGAGCCGGGAGGAAA G -3')及 reverse (5'- GGCGCCATCATAAAGAGAAATTT -3') 引子進行 *vacA* 定量分析。最開始以 95 °C 反應 10 分鐘始 DNA 形成單股，再以 40 個循環增幅放大 DNA，每個循環設定為：以 95 °C 反應 15 分鐘，接著以 60 °C 反應 1 分鐘。所有的實驗步驟皆在 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system 進行，並使用 comparative C<sub>T</sub> method 分析。

### 第十五節、抗體測試

測量各組小鼠血清中針對 *H. pylori* 的 IgA、IgG 與 IgM 抗體含量測試。自血液培養盤上以 PBS 收取 *H. pylori*，以 70 °C 加熱 30 分鐘進

行破菌，以 5,500 rpm 離心 15 分鐘收集菌體，加入 coating buffer (8.4 g 碳酸氫鈉 sodium bicarbonate、3.56 g 碳酸鈉 sodium chloride與二次水加至總量 1 l, Ph = 9.5) ，以 100  $\mu$ l/well 加入 96 孔盤中，每格約有  $10^6$  CFU的 *H. pylori* ，在 4  $^{\circ}$ C 冰箱中靜置 16 小時。除去 coating buffer，以 250  $\mu$ l wash buffer 清洗 1 次，加入 200  $\mu$ l assay diluent (PBS 含 1 % BSA) 室溫震盪 1 小時，除去 assay diluents 以 250  $\mu$ l wash buffer 清洗 2 次，在 96 孔盤中分別加入樣品，每個樣品重複2次，室溫震盪 2 小時，以 250  $\mu$ l wash buffer 清洗 3 次，加入 100  $\mu$ l antibody (IgA、IgG 或 IgM) 室溫震盪 1 小時，以 250  $\mu$ l wash buffer 清洗 4 次，加入 100  $\mu$ l substrate solution 避光反應約 5-10 分鐘 (至樣品成色) 後，加入 4 N sulfuric acid終止反應。測量 OD<sub>450</sub> 的值，比較各組間抗體含量。

#### 第十六節、干擾素- $\gamma$ 表現量測試

測量各組小鼠血清 IFN- $\gamma$  的含量，使用 Mouse IFN- $\gamma$  ELISA MAX™ Standard (Biolegend<sup>R</sup>, USA) 套組。在 96 孔盤，加入 100  $\mu$ l



coating buffer 含 0.005 % 的 capture antibody，在 4 °C 冰箱中靜置 16 小時。除去 coating buffer，以 250  $\mu$ l wash buffer 清洗 1 次，加入 200  $\mu$ l assay diluent 室溫震盪 1 小時，除去 assay diluent 以 250  $\mu$ l wash buffer 清洗 2 次，在 96 孔盤中分別加入 100  $\mu$ l/well 以 assay diluent 序列稀釋的標準液與樣品，每個樣品重複 2 次，室溫震盪 2 小時，以 250  $\mu$ l wash buffer 清洗 3 次，加入 100  $\mu$ l detection antibody 室溫震盪 1 小時，以 250  $\mu$ l wash buffer 清洗 3 次，加入 100  $\mu$ l avidin -HRP (horseradish-peroxidase) 室溫震盪 30 分鐘，以 250  $\mu$ l wash buffer 清洗 4 次，加入 100  $\mu$ l substrate solution 避光反應約 5-10 分鐘 (至樣品成色) 後，加入 4 N sulfuric acid 終止反應。測量 OD<sub>450</sub> 的值，以標準液的趨勢線計算濃度，測量各組間細胞激素產生量。

## 第十七節、統計學分析

實驗結果之數據分析使用軟體 Excel (version 7.0, Microsoft) 之成對母體平均數差異檢定 (Paired t test) 進行統計學分析。各組間之  $p$  值小於 0.05 即判定具有顯著差異。

## 肆、結果

### 第一節、梔子對幽門螺旋桿菌的殺菌能力的評估

為了瞭解梔子對於 *H. pylori* 的影響，測試 genipin 與 geniposide 對於 *H. pylori* 分離株的殺菌能力，結果如表四所示。Genipin 對於 4 株 *H. pylori* 均有殺菌能力，而具抗藥性的臨床分離株 v 633、v 1254 與 v 1354 [134-135] 對 genipin 的敏感性較標準菌株要強。整體來說，genipin 的殺菌能力比 geniposide 高出 20 倍以上，所以 genipin 是在梔子成份中具有較強殺菌能力的成分。而梔子萃取液 GE 除了可以 2 % 毒殺標準菌株外，對抗藥分離株的毒殺能力較弱。

表四：GE、geniposide 與 genipin 對 *H. pylori* 之最低殺菌濃度分析

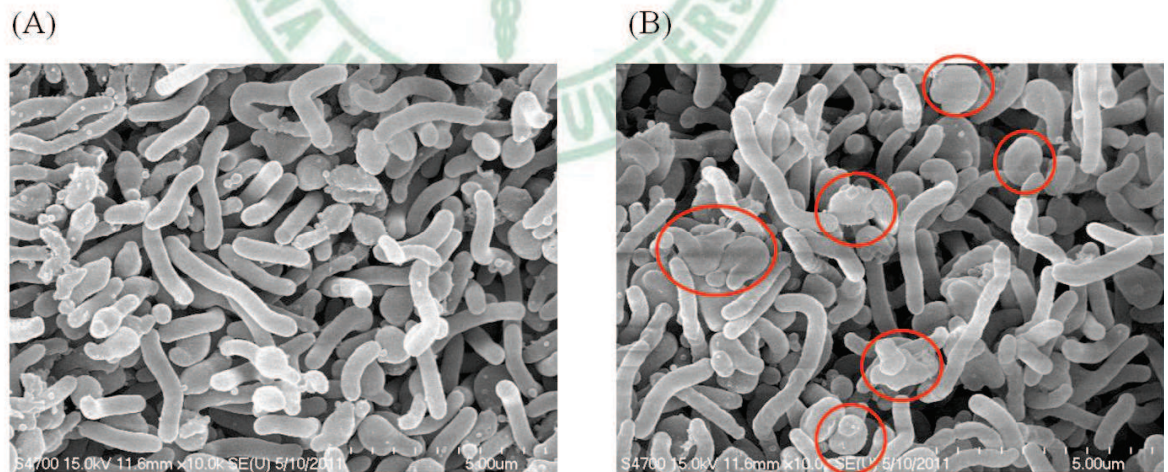
strain \ compound	26695	v633	v1254	v1354
GE	2 %	> 2 %	> 2 %	> 2 %
Geniposide	> 10 mM	> 10 mM	> 10 mM	> 10 mM
Genipin	0.5 mM	0.25mM	0.25mM	0.25mM

## 第二節、梔子素對幽門螺旋桿菌形態與*vacA*基因表現的影響

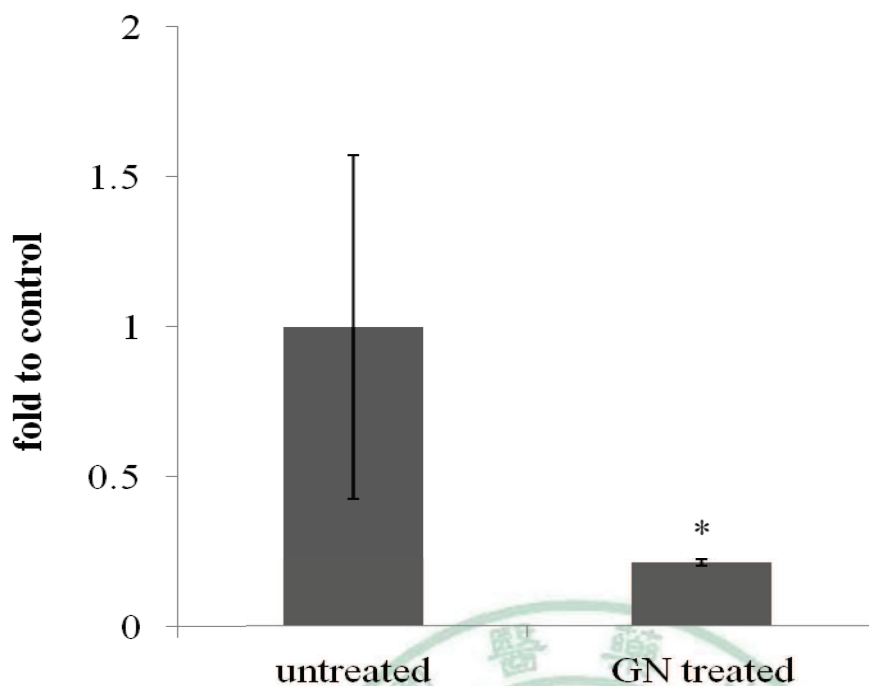
因為 *H. pylori* 受到刺激會有型態上的改變，所以以掃描式電子顯微鏡觀察以 genipin 刺激後 *H. pylori* 的型態上的變化，結果如圖六所示。

經由 genipin 刺激後 *H. pylori* 出現 U 型的凹折。

而在感染導致細胞凋亡的 *H. pylori* 相關基因 *vacA* 的 RNA 表現量上，於 genipin 刺激 6 小時後，*H. pylori* 的 *vacA* 表現量降低了 6 倍 (圖七)。此兩項結果顯示 genipin 對 *H. pylori* 的型態與導致細胞凋亡的基因表現有顯著的影響力。



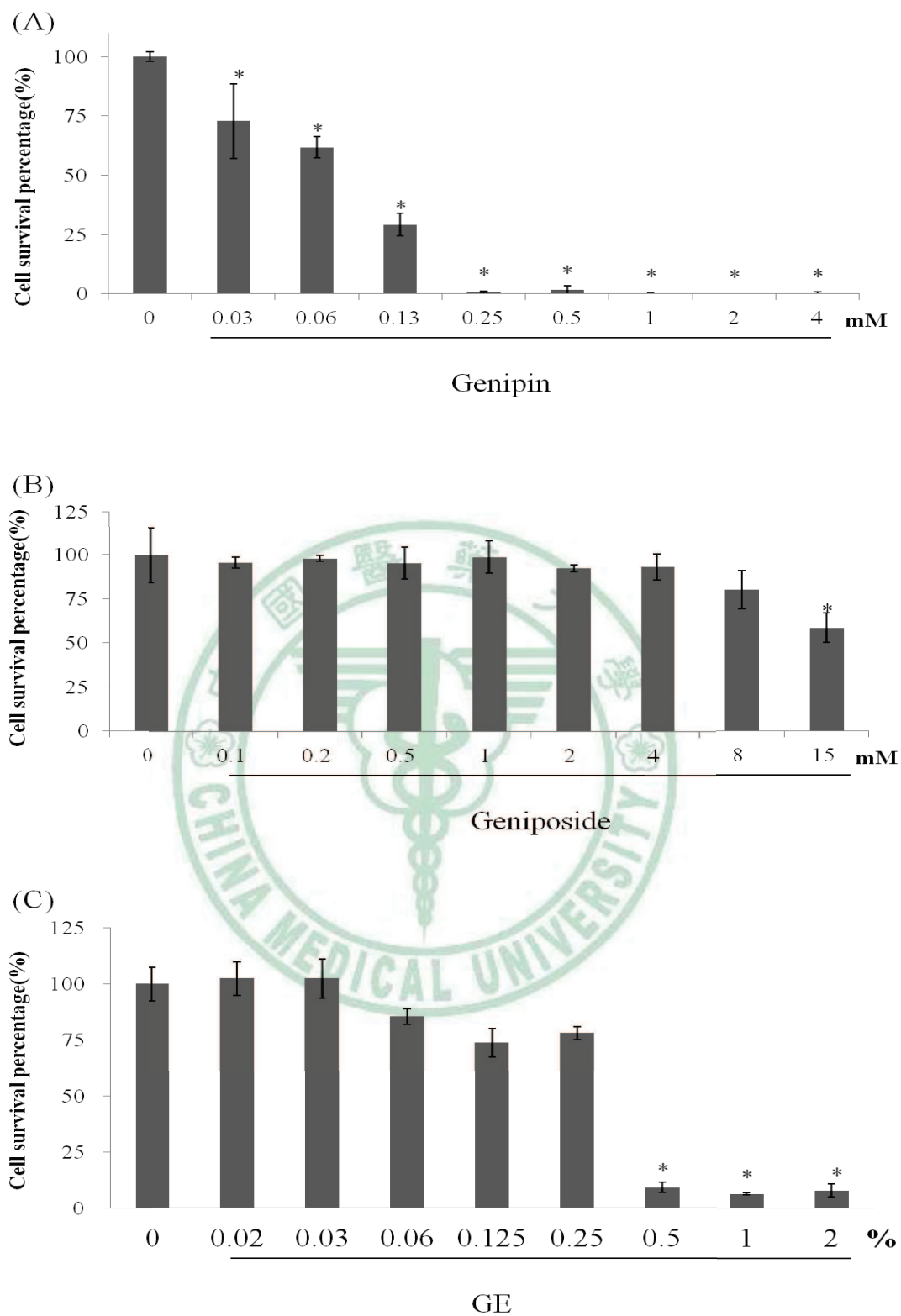
圖六： *H. pylori* 受 genipin 刺激(A)前(B)後形態之改變



圖七：Genipin 對 *H. pylori* 之 *vagA* 基因 RNA 表現量之影響 (\*表示與 untreated 組相比  $p < 0.05$ )

### 第三節、梔子苷與梔子素對於胃上皮細胞的影響

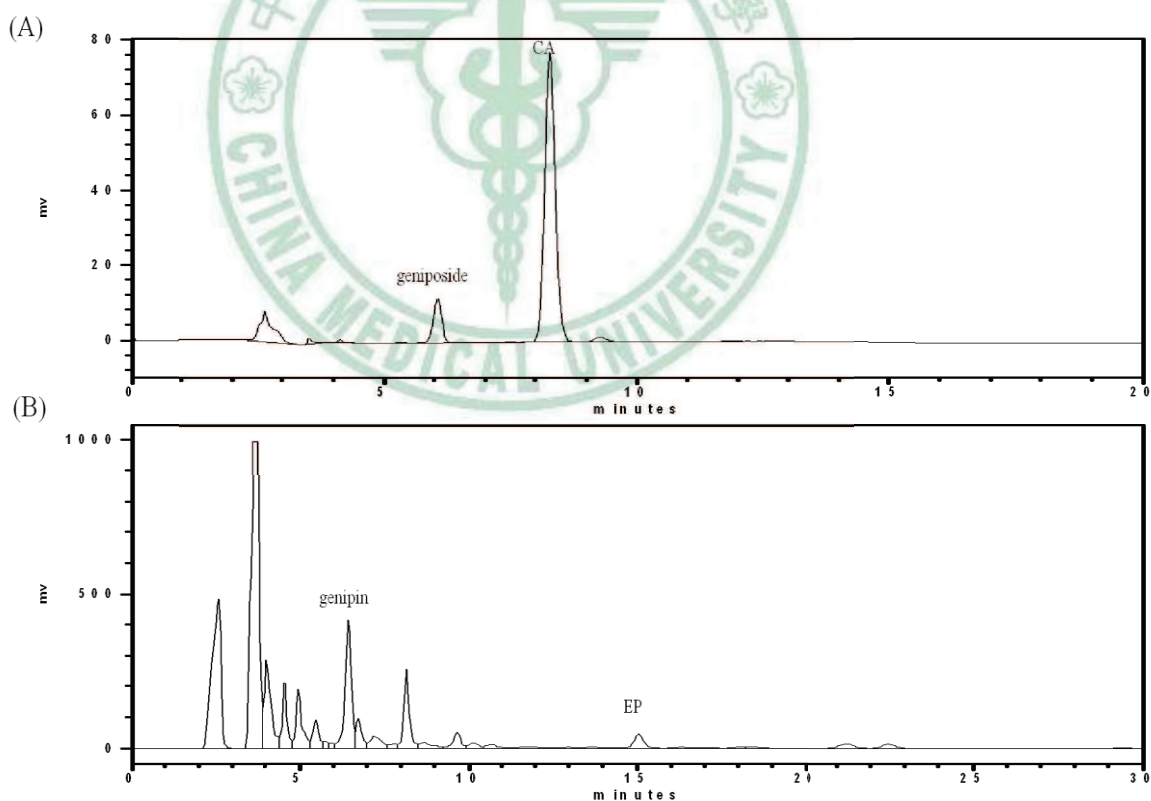
利用 genipin、geniposide 與 GE 對 AGS cells 的存活率影響評估其對於胃上皮細胞的毒性，細胞存活率測試結果如圖八所示。Genipin 對於 AGS 細胞只需 0.09 mM 就會影響半數的細胞存活 (half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )，而 geniposide 於 15 mM 僅影響 58% 的細胞存活，這結果表示 genipin 對細胞毒性較 geniposide 強 167 倍以上。



圖八：(A) Genipin、(B) geniposide 與 (C) GE 對於 AGS cells 存活率之影響 (\*表示與未加藥組比較，  $p < 0.05$ )

#### 第四節、梔子萃取物之定量分析

為了瞭解實驗所用的 GE 中 geniposide 與 genipin 的含量，以 HPLC 分析萃取液中兩者之成份含量。GE 在稀釋 10,000 倍後 geniposide 層析結果良好，層析圖如圖九 (A)，而 GE 在稀釋 100 倍後 genipin 層析圖如圖九 (B)，將其結果分別帶入檢量線中，以求取 geniposide 與 genipin 濃度。以內插法計算，GE 中 geniposide 含量為 437.1 mg/ml (438 mM)，而 genipin 含量為 5.9 mg/ml (26.3 mM)。



圖九：GE 中 (A) 10,000 倍稀釋後 geniposide 與 (B) 100 倍稀釋後 genipin 之層析圖

## 第五節、菌種鑑定與篩選

為了能使 GE 達到最好的轉換率，本研究篩選  $\beta$ -glucosidase 活性較強的菌株，以便進行生物轉換。本研究收集之乳酸菌分離株依 16S rDNA 序列分析之結果 (表五)，有 6 株為 *Enterococcus faecium*，3 株為 *L. acidophilus*，2 株為 *L. fermentum* CECT 5716，1 株為 *L. fermentum* strain C65-1，5 株為 *L. plantarum*，1 株為 *L. plantarum* strain 70810，30 株為 *L. plantarum* strain AF1，1 株 *L. plantarum* strain b2，1 株為 *L. plantarum* strain CWBI B-1419，2 株為 *L. plantarum* strain D14，6 株為 *L. plantarum* strain KW30，3 株為 *L. plantarum* strain MNFS-7，1 株為 *L. plantarum* strain ZDY128，1 株為 *L. rhamnosus*，1 株為 *L. rhamnosus* strain NWL28，4 株為 *Lactobacillus* sp. T23/3。

將所有的分離株以  $p$ -NPG 測試  $\beta$ -glucosidase 活性結果如表五。

其中編號 JB3 (*L. rhamnosu*)，在培養 16 小時後，達到 178 units，具有最高的  $\beta$ -glucosidase 活性。故以下實驗皆以 JB3 為生物轉換之菌株。

表五：菌種鑑定與酵素能力

編號	菌種 (NCBI 編號)	相似%	$\beta$ -glucosidase assay (Unit) *
A1	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	62
A2	<i>L. plantarum</i>	98 %	35
A3	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	33
A4	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	33
A5	<i>L. plantarum</i> strain KW30	98 %	40
A6	<i>L. plantarum</i> strain ZDY128	94 %	31
A7	<i>L. plantarum</i>	97 %	25
A8	<i>L. plantarum</i> strain KW30	97 %	25
A9	<i>L. fermentum</i> strain C65-1	94 %	29
B1	<i>L. fermentum</i> CECT 5716	98 %	25
B2	<i>L. rhamnosus</i> strain NWL28	98 %	29
B3	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	26
B4	<i>L. plantarum</i> strain AF1	97 %	25
B5	<i>L. fermentum</i> CECT 5716	97 %	24
B6	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	23
B7	<i>L. plantarum</i> strain CWBI B-1419	95 %	22
B8	<i>L. plantarum</i> strain 70810	97 %	21
B9	<i>Enterococcus faecium</i>	97 %	14



---

C2	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	26
C3	<i>Enterococcus faecium</i>	94 %	102
C4	<i>L. plantarum</i> strain KW30	97 %	23
C5	<i>L. plantarum</i> strain b2	97 %	18
C6	<i>L. plantarum</i> strain AF1	99 %	25
C7	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	25
C8	<i>Enterococcus faecium</i>	94 %	21
C9	<i>L. plantarum</i> strain AF1	90 %	26
D1	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	25
D2	<i>L. plantarum</i> strain AF1	99 %	30
D3	<i>L. plantarum</i> strain AF1	96 %	23
D4	<i>L. plantarum</i> strain AF1	97 %	32
D5	<i>L. plantarum</i> strain D14	98 %	30
D6	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	29
D7	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	35
D8	<i>Lactobacillus</i> sp. T23/3	98 %	28
D9	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	37
E1	<i>Lactobacillus</i> sp. T23/3	97 %	31
E2	<i>L. plantarum</i>	98 %	31
E5	<i>L. plantarum</i> strain KW30	98 %	34
E6	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	36

---

---

E7	<i>L. plantarum</i> strain AF1	97 %	28
E8	<i>L. plantarum</i> strain KW30	96 %	27
E9	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	33
F1	<i>L. plantarum</i> strain AF1	99 %	28
F2	<i>L. plantarum</i> strain D14	98 %	35
F3	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	27
F5	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	34
F6	<i>L. plantarum</i> strain AF1	99 %	32
F7	<i>L. plantarum</i>	98 %	42
F8	<i>L. plantarum</i> strain MNFS-7	98 %	34
G1	<i>L. plantarum</i> strain AF1	99 %	28
G2	<i>L. plantarum</i> strain MNFS-7	98 %	31
G5	<i>L. plantarum</i> strain MNFS-7	97 %	19
G6	<i>Lactobacillus</i> sp. T23/3	97 %	28
G7	<i>Lactobacillus</i> sp. T23/3	97 %	28
G8	<i>L. plantarum</i> strain AF1	97 %	39
G9	<i>Enterococcus faecium</i>	92 %	83
H1	<i>L. plantarum</i> strain AF1	98 %	25
H2	<i>Enterococcus faecium</i>	92 %	91
H3	<i>L. plantarum</i>	98 %	28
H5	<i>Enterococcus faecium</i>	85 %	90

---

H6	<i>L. plantarum</i> strain KW30	97 %	34
H7	<i>L. plantarum</i> strain AF1	97 %	31
H8	<i>L. plantarum</i> strain AF1	99 %	37
H9	<i>L. plantarum</i> strain AF1	99 %	35
in1	<i>L. acidophilus</i>	97 %	44
in2	<i>L. acidophilus</i>	98 %	44
MB-1	<i>L. acidophilus</i>	98 %	33
JB3	<i>L. rhamnosus</i>	100 %	178

\*: 酵素活性以三次實驗平均值表示。

## 第六節、梔子對乳酸菌的殺菌能力的評估

為了瞭解梔子對於 JB3 的影響，並比較梔子影響 JB3 與 *H. pylori* 的差異，測試萃取液 GE、geniposide 與 genipin 對於 JB3 的殺菌能力，結果如表六所示。GE 與 genipin 對 JB3 的最低殺菌濃度比較 *H. pylori* 要高，相反的，geniposide 對 JB3 的毒殺性較強。因此，geniposide 與 genipin 對細菌之毒殺作用有其專一性。

表六：GE、geniposide 與 genipin 對 *H. pylori* 與 JB3 之最低殺菌濃度分析

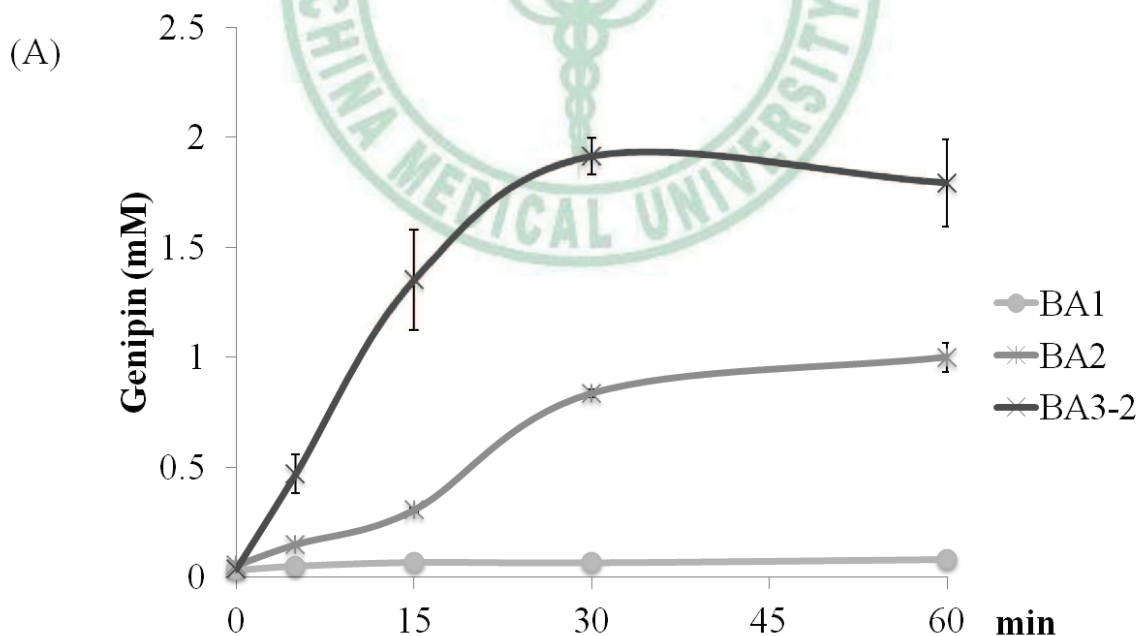
strain \ compound	26695	JB3
GE	2 %	> 2 %
Geniposide	> 10 mM	5 mM
Genipin	0.5 mM	4 mM

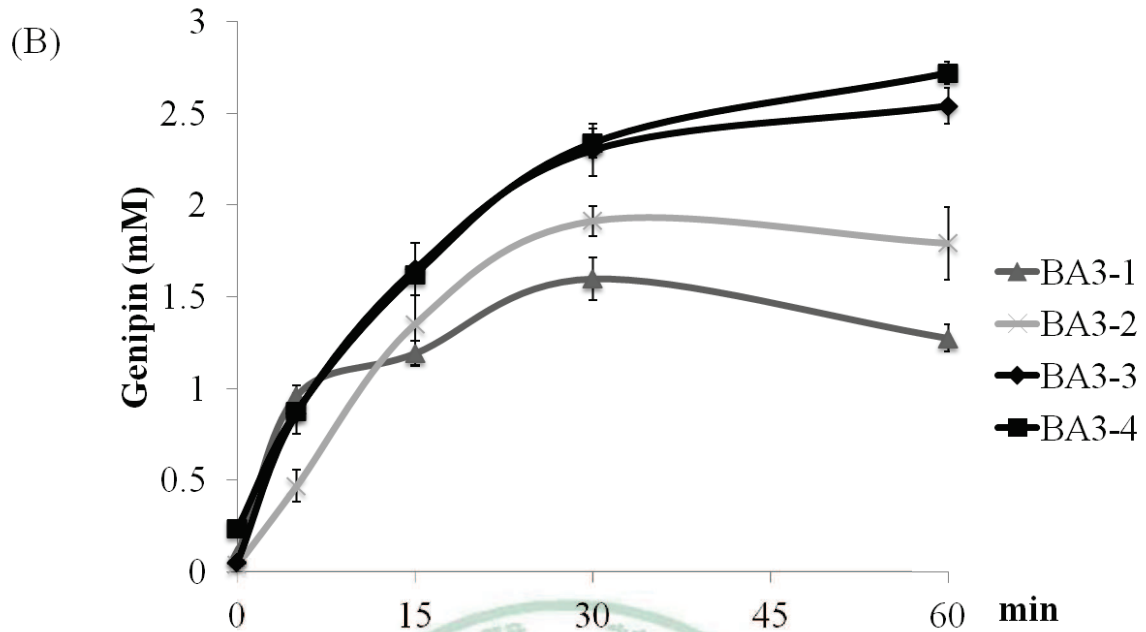
### 第七節、轉換速率檢測

為瞭解 JB3 轉換 GE 的速率，利用 HPLC 測量不同時間點，JB3 轉換 GE 生成 genipin 的含量。利用  $2.5 \times 10^8$  CFU/ml、 $2.5 \times 10^9$  CFU/ml 與  $2.5 \times 10^{10}$  CFU/ml 的 JB3 在對 1 小時內轉換 1 % GE 生成 genipin 的含量，結果如圖十 (A)。在 30 分鐘內，轉換液中 genipin 的含量與 JB3 的菌量成正比，當菌量越高時，genipin 的生成量就越高。在轉換 30 分鐘後， $2.5 \times 10^{10}$  CFU/ml 的 JB3 (BA3-2 組) 轉換生成 genipin 達最高量，以 BA3-2 組轉換生成 genipin 的含量是  $2.5 \times 10^9$  CFU/ml (BA2 組) 的 2.3 倍、 $2.5 \times 10^8$  CFU/ml (BA1 組) 的 31.9 倍。在轉換 60 分鐘後， $2.5 \times 10^{10}$  CFU/ml 的 JB3 轉換生成 genipin 的含量還是能有  $2.5 \times 10^9$  CFU/ml 的 1.8 倍。

為提高 genipin 生成量，接下來測試利用  $2.5 \times 10^{10}$  CFU/ml 的 JB3

在60分鐘內轉換 0.5 %、1 %、2 % 及 4 % 的GE生成 genipin 的含量，結果如圖十 (B)。以相同菌量轉換不同劑量的 GE，其生成genipin 的含量大致不變，但在轉換 60 分鐘時，在含 0.5 % 與 1 % GE 的轉換液中所測得 genipin 的含量均下降，可能是因 GE 中的 geniposide 已消耗殆盡，而生成的 genipin 於反應中不穩定並轉變成 gardenia blue 所至。而在轉換 60 分鐘時，2 % 與 4 % 的 GE 轉換為 genipin 的濃度達最高量，故後續小鼠實驗以  $2.5 \times 10^{10}$  CFU/ml 的JB3與 2 % 的 GE 為飼食的劑量，用以治療 *H. pylori* 感染。





圖十：利用 JB3 轉換 GE 生成 genipin 之速率分析。(A) 利用  $2.5 \times 10^8$  CFU/ml (BA-1 組)、 $2.5 \times 10^9$  CFU/ml (BA-2 組) 與  $2.5 \times 10^{10}$  CFU/ml (BA3-2 組) 的 JB3 轉換 1% GE 生成 genipin 的速率；(B) 利用  $2.5 \times 10^{10}$  CFU/ml 的 JB3 轉換 0.5% (BA3-1 組)、1% (BA3-2 組)、2% (BA3-3 組) 及 4% (BA3-4 組) 的 GE 生成 genipin 的速率

#### 第八節、轉換液對胃上皮細胞與細菌的影響

為了取得不同 genipin 含量的轉換液，並減少操作時計量時間的誤差，以固定時間收取不同菌量之轉換液作為體外實驗使用。以 GE 對於 AGS cells 的  $IC_{50}$  濃度 (0.4%) 加入不同菌量之 JB3 於  $37^\circ C$  反應 60 分鐘後所得之轉換液，以進行後續實驗。

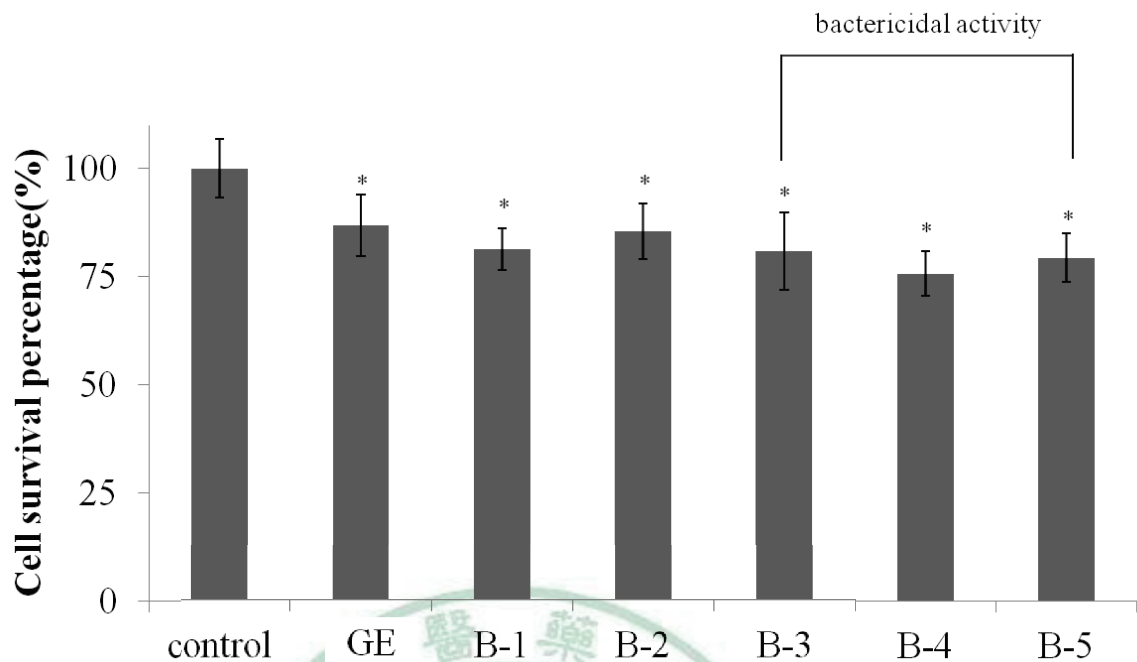
為了瞭解 GE 轉換後對 *H. pylori* 與胃上皮細胞的影響，取轉換過

後的上清液對 *H. pylori* 與 AGS cells 進行最低殺菌濃度與細胞存活率的分析。並以 HPLC 定量分析所用轉換液含有的 genipin 與 geniposide 濃度，分析結果如表七所示。隨著 JB3 菌量的升高，genipin 的生成量亦隨之上升。

表七：轉換液中 genipin 濃度

Group	Treatment	Genipin (mM)	Geniposide (mM)
GE	0.4 % GE	0.0195	0.4802
B-1	0.4 % GE + $2.5 \times 10^7$ CFU/ml JB3	0.0252	0.4934
B-2	0.4 % GE + $5 \times 10^7$ CFU/ml JB3	0.0272	0.5812
B-3	0.4 % GE + $1 \times 10^8$ CFU/ml JB3	0.0365	0.4368
B-4	0.4 % GE + $2 \times 10^8$ CFU/ml JB3	0.0494	0.3936
B-5	0.4 % GE + $4 \times 10^8$ CFU/ml JB3	0.0795	0.3934

在轉換液對於 *H. pylori* 的最低殺菌濃度測試中，B - 3、B - 4 與 B - 5 組在轉換1小時後，對於 *H. pylori* 具有殺菌的能力。而在細胞存活率的測試中，轉換液降低 25 % 以下 AGS cells 的存活率 (圖十一)。由這結果看來，轉換液不會影響細胞的存活率，但再高菌量的組別對 *H. pylori* 具毒性，故轉換適合用於治療感染。

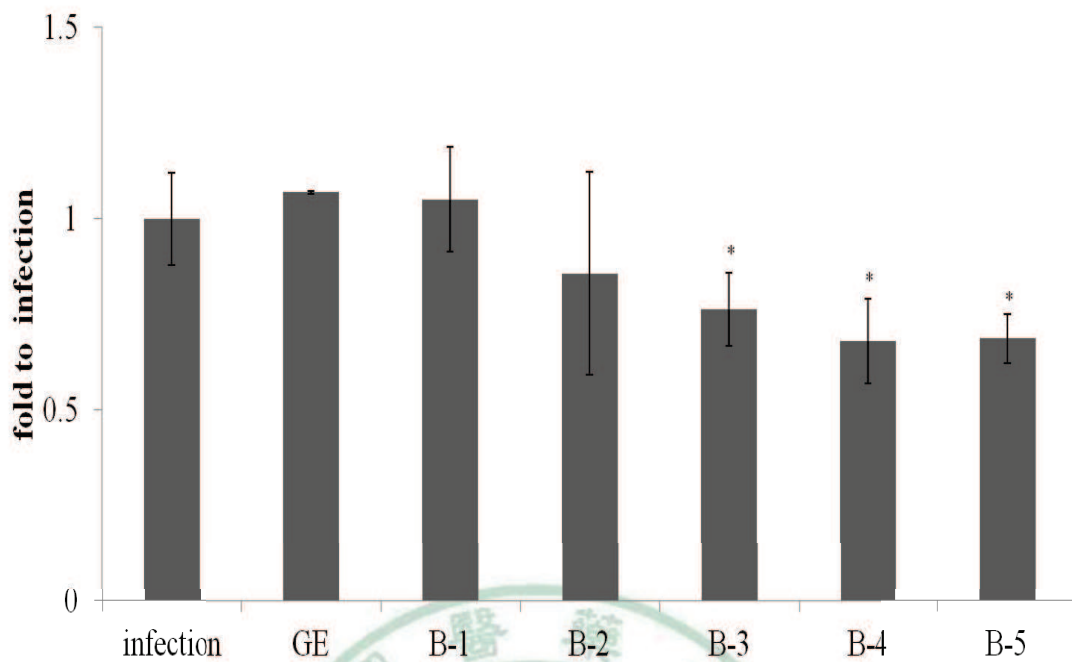


圖十一：轉換液對 AGS cells 細胞存活率之影響 (\*表示與 control 組比較  $p < 0.05$ )

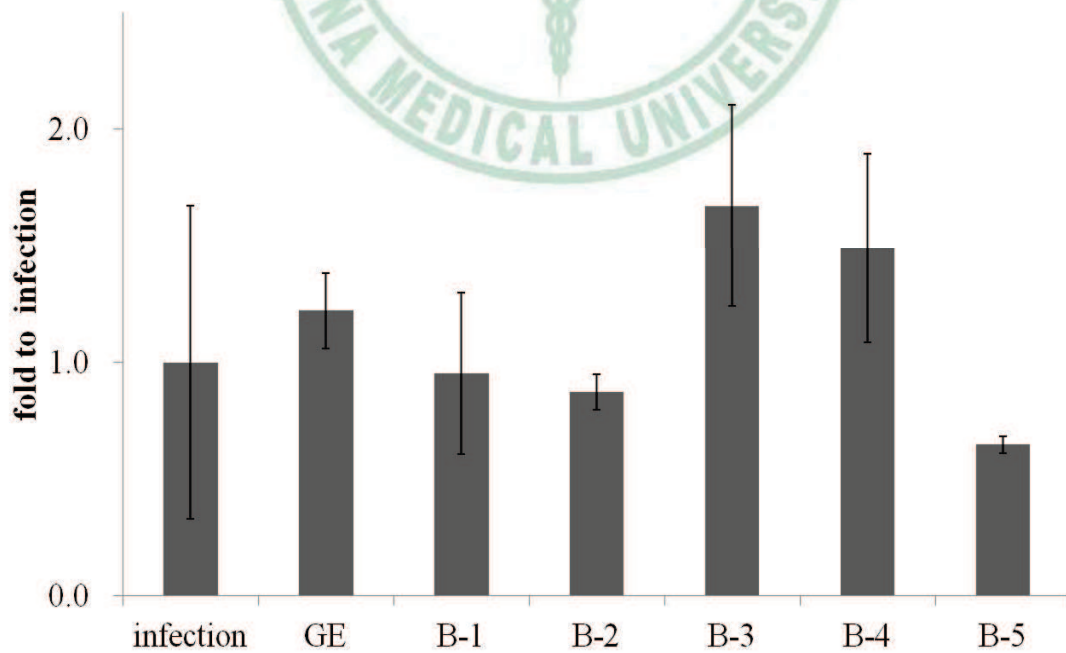
#### 第九節、轉換液對幽門螺旋桿菌黏附與侵入胃上皮細胞的影響

*H. pylori* 能造成慢性胃炎主要是因為細菌本身具有黏附與入侵細胞的功能，故測試轉換液對於細菌黏附與侵入細胞比例的影響，結果如圖十二與圖十三所示。轉換液 B-3、B-4 與 B-5 組均可減弱 20 - 30 % 的 *H. pylori* 的入侵，但對於黏附的能力的影響卻不顯著。





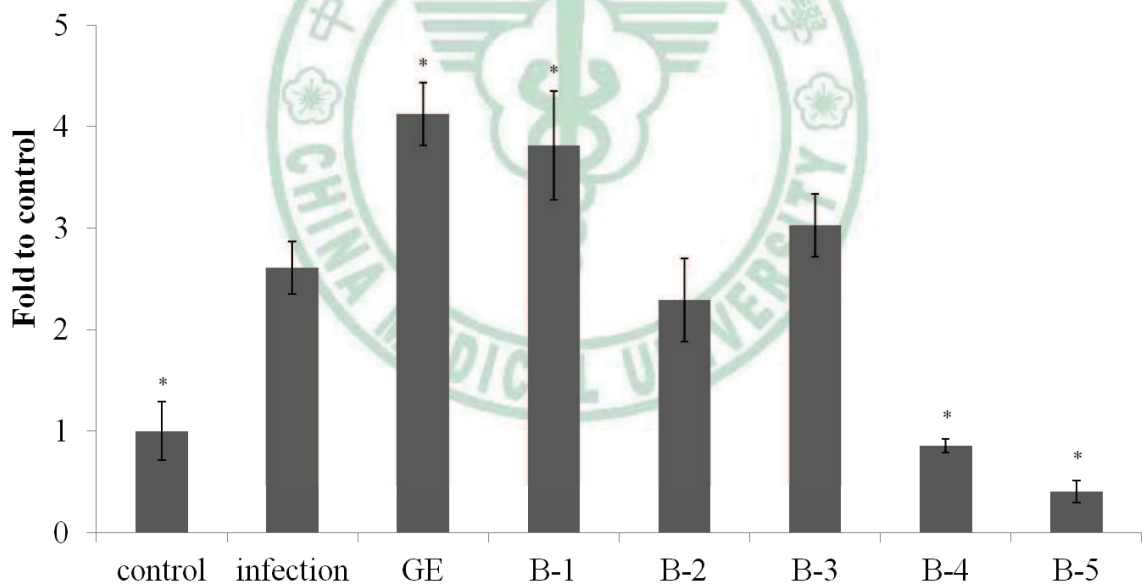
圖十二：轉換液對 *H. pylori* 侵入能力之影響 (\*表示與 infection 組比較  $p < 0.05$ )



圖十三：轉換液對 *H. pylori* 黏附能力之影響

## 第十節、轉換液對幽門螺旋桿菌引起感染細胞介白素-8表現量的影響

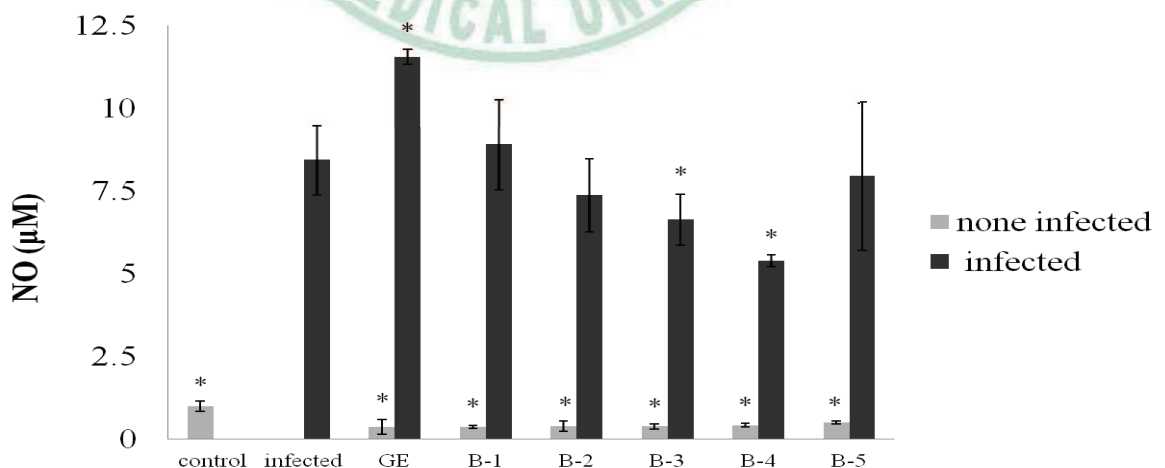
*H. pylori* 感染後會導致感染細胞 IL-8 的表現量上升，將轉換液與 *H. pylori* 感染之 AGS cells 共同培養 6 小時後收取細胞培養液，並測試各組間 IL-8 表現的差異，結果如圖十四所示。當轉換液 B-4 與 B-5 組能有效抑制 *H. pylori* 感染所產生 IL-8 的表現至未受感染前的程度，而 GE 和 B-1 組反而引起更高的 IL-8 表現。



圖十四：轉換液對 *H. pylori* 感染 AGS cells 表現 IL-8 量之影響 (\*表示與 infection 組比較  $p < 0.05$ )

## 第十一節、轉換液對幽門螺旋桿菌引起感染細胞一氧化氮表現量的影響

當細胞受到細菌感染常會釋放一氧化氮協助抵抗感染，因此，將轉換液與 *H. pylori* 感染之 RAW264.7 cells 共同培養 6 小時後檢測其一氧化氮產量，結果如圖十五所示。當轉換液 B-3 與 B-4 組能有效降低 *H. pylori* 感染所引起之一氧化氮的表現。但是在 B-5 組，肉眼可見 gardenia blue 所呈現的藍色，影響 OD<sub>570</sub> 的吸光值，因此，一氧化氮量的測量應有所誤差。而僅以 GE 與各轉換液與 RAW264.7 cells 共同培養 6 小時，並未引發一氧化氮量的表現，表示 GE 與各轉換液並不會刺激 RAW 264.7 cells 引發氧化壓力。



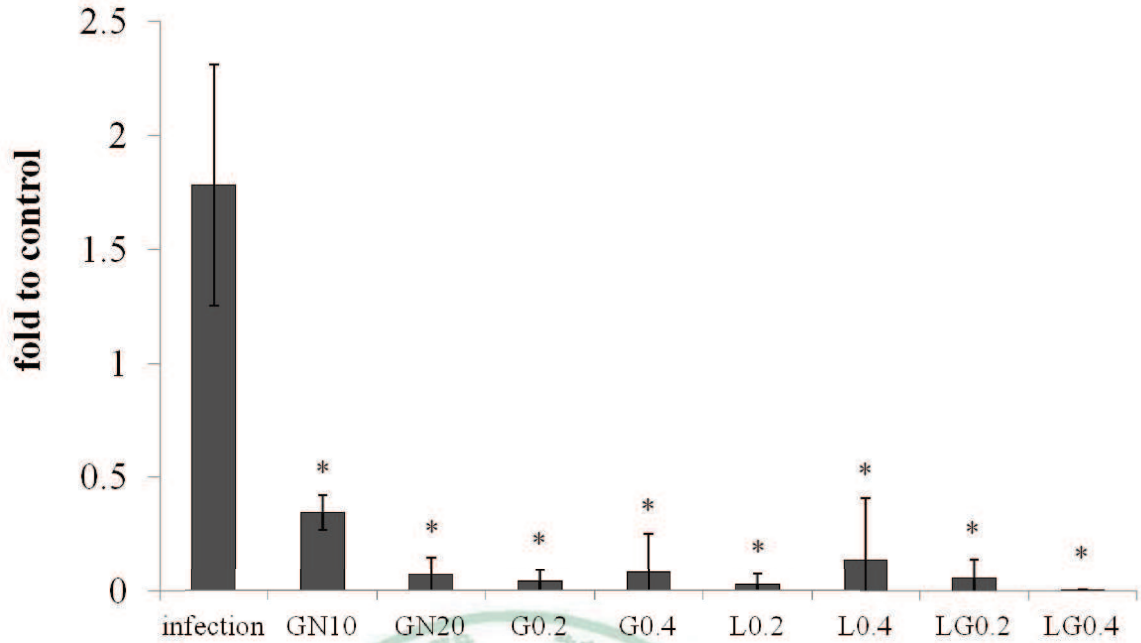
圖十五：轉換液對 *H. pylori* 感染 RAW 264.7 cells 產生一氧化氮表現

之影響 (\*表示與 infection 組比較  $p < 0.05$ )

## 第十二節、GE轉換對幽門螺旋桿菌感染小鼠能力的影響

於體外試驗中確認轉換液具毒殺 *H. pylori* 之能力，並可降低其侵入細胞之能力，並可降低因感染所引起之發炎反應與氧化壓力。因此利用小鼠感染模式評估其體內轉換之生物活性。以隔日感染的方式，餵食 *H. pylori* 三次。小鼠感染後第二天開始每組分別餵食水、genipin、GE、JB3 或 GE 加 JB3，治療三天後犧牲以便進行分析，投藥組別如材料方法中表三所示。

利用 *H. pylori* 感染後會產生的 VacA 蛋白的特性，以 Quantitative PCR 的方式監測各組間 *vacA* 基因的 RNA 表現量，結果如圖十六。由各組 *vacA* 的表現率看來，經過 3 天的治療後，各組 *vacA* 的表現量比感染組均有顯著的下降，其中 LG0.4 組的 *vacA* 的表現量最低，顯示 GE 轉換後可有效抑制 *H. pylori* 感染。而其他實驗組亦顯示有效抑制感染之能力。



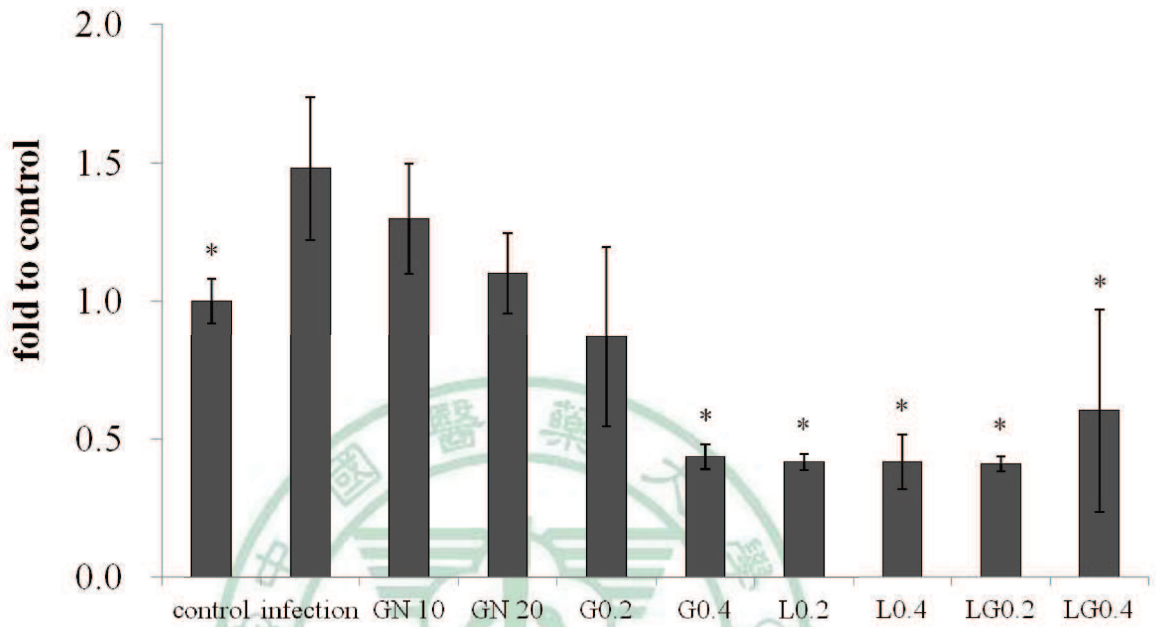
圖十六：Genipin、GE、JB3 與轉換液對 *H. pylori* 感染小鼠能力的影響 (\*表示與 infection 組比較  $p < 0.05$ )

### 第十三節、GE轉換對感染小鼠之幽門螺旋桿菌特異抗體表現量的影響

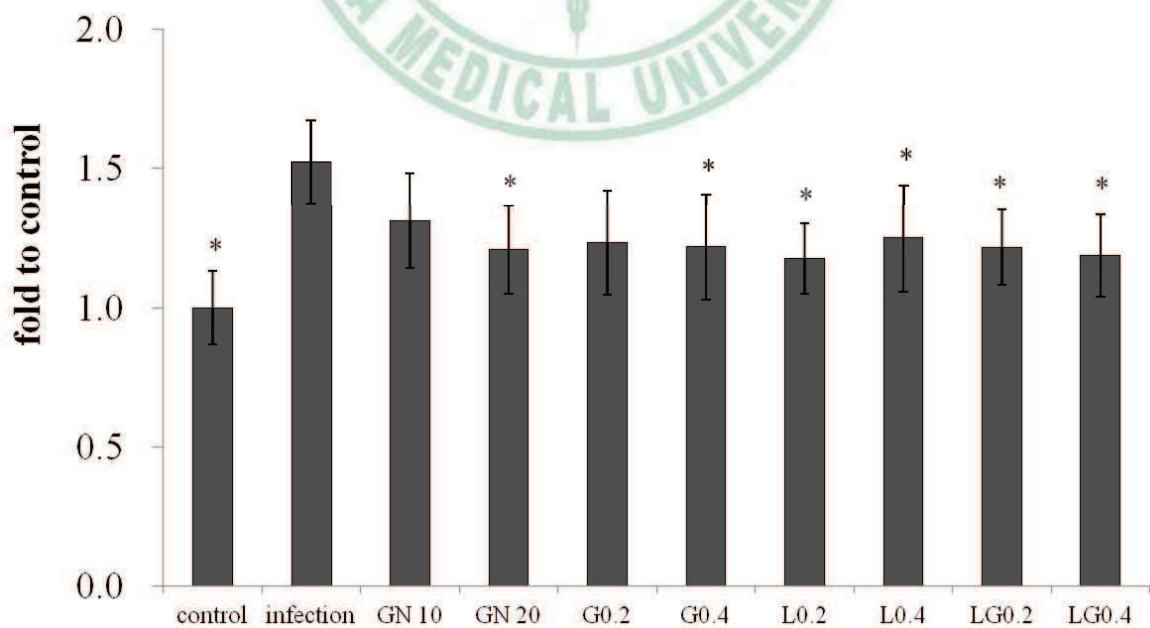
小鼠感染後 *H. pylori* 特異抗體 (*H. pylori* specific antibodies) IgA、IgG 與 IgM 的表現量均升高。在治療 3 天之後，血清中 IgA (圖十七) 與 IgG (圖十八) 的量，在餵食 0.4 ml 的 GE (G0.4組)，乳酸菌組 (L0.2 與 L0.4) 與 GE 轉換組 (LG0.2與 LG0.4) 等各組中均顯著下降。而餵食 20 mM 的genipin小鼠 (GN20組) 之血中 IgG 表現量亦下降。而就血清中 IgM 的表現量來看 (圖十九)，餵食 20 mM 的genipin (GN20組) 與 0.2ml 的 JB3 組 (L0.2)，以及 GE 轉換組 (LG0.2與 LG0.4)

等各組中表現量均顯著下降。整體而言，GE 轉換組 (LG0.2與 LG0.4)

可降低血清中因感染引起的 IgA、IgG 與 IgM 的表現。

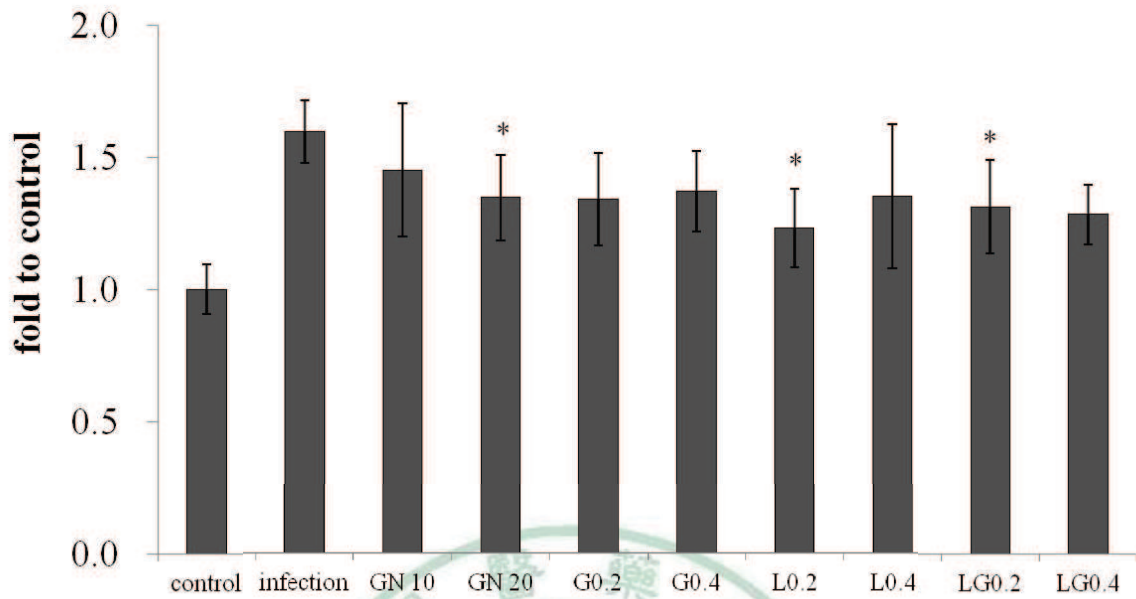


圖十七：Genipin、GE、JB3 與轉換液對 *H. pylori* 感染小鼠之 IgA 表現量的影響 (\*表示與 infection 組比較  $p < 0.05$ )



圖十八：Genipin、GE、JB3 與轉換液對 *H. pylori* 感染小鼠之 IgG 表

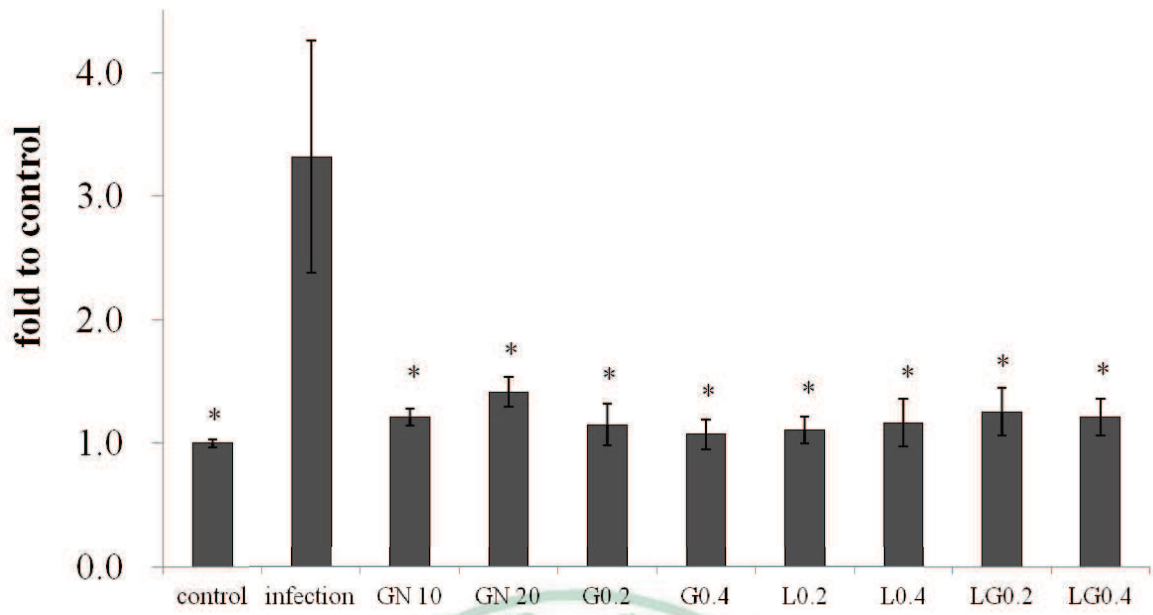
現量的影響 (\*表示與 infection 組比較  $p < 0.05$ )



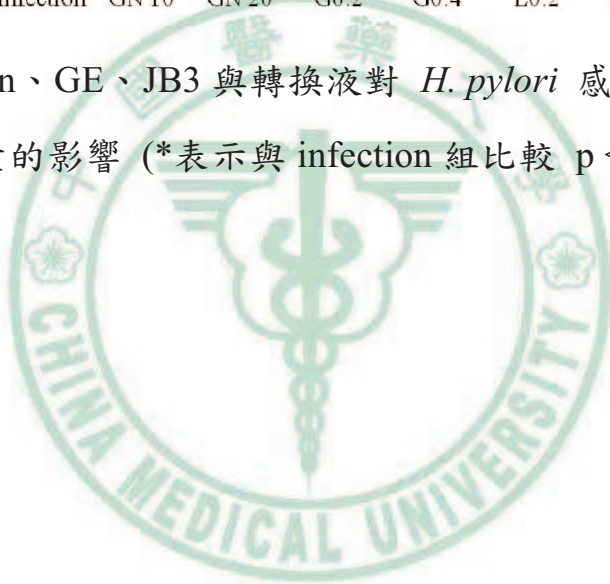
圖十九：Genipin、GE、JB3 與轉換液對 *H. pylori* 感染小鼠之 IgM 表現量的影響 (\*表示與 infection 組比較  $p < 0.05$ )

#### 第十四節、GE轉換對感染小鼠之干擾素- $\gamma$ 表現量的影響

小鼠血清中 IFN- $\gamma$  的表現量因感染而升高如圖二十所示，而各實驗組均可降低血清中 IFN- $\gamma$  的表現量至未感染的量。



圖二十：Genipin、GE、JB3 與轉換液對 *H. pylori* 感染小鼠之 IFN- $\gamma$  表現量的影響 (\*表示與 infection 組比較  $p < 0.05$ )





## 伍、討論

全世界約有 50 % 人口感染 *H. pylori*，而 *H. pylori* 與慢性胃炎、胃潰瘍和胃癌有密切之關聯 [36-39]。而抗生素的治療，確遭遇瓶頸，因此尋找新的治療方式，為現今之研究方向。中草藥與乳酸菌已在文獻中顯現其對治療 *H. pylori* 感染的潛力 [15-16, 33]，但未有兩者並行之研究發表。而梔子在中醫上，被用來治療肝、膽囊疾病以及炎症和發燒 [18-21]。研究上也證實，梔子對抗氧化損傷，以及細胞毒性和抗發炎活性的作用 [123]。但梔子對 *H. pylori* 治療之效果，也未於現行研究中顯現。

從我們的實驗結果中發現，genipin 的殺菌效果與細胞毒性遠高於 geniposide 與 GE。而 genipin 更可以抑制 *H. pylori* 毒力因子 *vacA* 基因表現，並改變菌體形態，使其產生 U 型凹折，推測有可能由 genipin 具交聯特性所致 [22]。而 genipin 並未對 *cagA* 基因的表現有所影響，因此，genipin 可能對 VacA 引起之細胞凋亡 [61] 有其抑制作用。

為克服現行抗生素治療，因破壞腸內菌相引起副作用，如腹瀉、腹脹等 [12]，本研究的實驗設計重點在口服毒性較低的 GE，利用乳

酸菌的酵素轉換，使 GE 在胃中轉換為具殺菌效果之 genipin。由於 genipin 不穩定，容易與胺基酸結合成為安全性較高之藍色食用色素 [132-133]，因此可以克服抗生素干擾腸內益生菌造成之副作用。

為達成此目標，篩選具酵素活性之益生菌，並能成功將梔子萃取液 (GE) 轉換為有療效之 genipin 為首要條件。於 68 株實驗室收集所得之乳酸菌中，JB3 為酵素活性最強之菌株，而其轉換 GE 所得之轉換液，在體外實驗中證實對 *H. pylori* 具殺菌效果，並可抑制 *H. pylori* 侵入 AGS cells，降低感染所引發 IL-8 的表現。對於感染 RAW264.7 cells 所造成的 NO 的表現也有明顯的下降。因此，乳酸菌轉換 GE 所得之轉換液，具有對抗 *H. pylori* 感染以及其所引起的發炎與氧化壓力之效能。黏著能力測試中發現，轉換液未能有效抑制 *H. pylori* 附著於胃上皮細胞上，但卻在侵入實驗中顯示轉換液能有效抑制 *H. pylori* 侵入胃上皮細胞。由於在細胞存活實驗中發現，以 5 種轉換液培養 AGS cells 24 小時後存活率均高於 75%，且在細菌毒殺實驗中 B-3，B-4 與 B-5 具有殺菌能力，因此推測可能由於轉換液中的 genipin 具有殺菌能力使侵入細菌量減少，而因為 genipin 具交聯作用影響細菌黏

附能力 [22]，因此可能將菌體交聯於細胞上，因此未見其干擾 *H. pylori* 附著之現象。

在轉換分析測試發現 JB3 轉換 GE 的能力，在  $2.5 \times 10^{10}$  CFU/ml 與 2 % GE 反應後能達到最高的 genipin 生成量，因此，以此條件進行感染小鼠的治療。在小鼠感染後進行 3 天的治療，同時口服 JB3 與 GE 的感染小鼠，其胃組織中 *vacA* 基因之表現量下降，顯示 *H. pylori* 的感染受到抑制，而在 *H. pylori* 特異抗體 IgA、IgG 與 IgM 在血清中的表現量也較感染組低，也抑制血清中因感染引發的 IFN- $\gamma$  的表現量。我們的研究也發現，在小鼠的實驗中，genipin、GE 與 JB3 也可降低 *H. pylori* 在胃中的感染，genipin 在體外實驗以證實具殺菌效果，而 GE 可能在胃的環境中不穩定而形成 genipin，在動物實驗中顯現抑制毒力因子表現能力，而 JB3 可能與 *H. pylori* 在胃中競爭附著，因此降低 *H. pylori* 的感染率。服用 genipin、GE 與 JB3 的感染小鼠，其血清中 IFN- $\gamma$  的表現量也下降。但在感染引起的 *H. pylori* 特異抗體 IgA、IgG 與 IgM 的表現量上，genipin 與 GE 則未能有效降低其表現量，推測兩者可能刺激較強之免疫反應產生，其細部機轉仍須進一步

釐清。

於本研究中，我們證實梔子中的 genipin 具毒殺 *H. pylori* 的功效，並可抑制因感染所造成的發炎反應與氧化壓力，減低慢性發炎的機會。而在小鼠感染實驗中證實生物轉換對 *H. pylori* 感染的療效。Genipin 對治療 *H. pylori* 感染的細部機轉仍有待釐清，而小鼠實驗中如何調整轉換至最佳劑量與最佳治療時程，仍需後續實驗評估。藉此研究，可降低抗藥菌株的產生，並減輕治療副作用的發生，提供了治療 *H. pylori* 感染的新興治療方式。



## 陸、參考文獻

1. Atherton J. C., The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. , Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 2006, 63-96
2. Franco A. T., et al., Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. , Cancer Res., 2008, 379-387
3. Mobley H. L. T., et al., *Helicobacter pylori* urease: properties and role in pathogenesis. , Scand. J. Gastroenterol., 2001, 39-46
4. Shistosomiasis, Liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic Risks to humans. , IARC, 1994, 177-220
5. NIH consensus Development panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. , JAMA, 1994, 65-69
6. Lin J., et al., A systematic review of treating *Helicobacter pylori* infection with Traditional Chinese Medicine. , World J Gastroenterol., 2009, 4715-4719
7. Dore MP, et al., Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: a meta-analytical approach. , Dig Dis Sci., 2000,68-76
8. Wu DC, et al., Sequential and concomitant therapy with four drugs is equally effective for eradication of *H. pylori* infection. , Clin Gastroenterol Hepatol, 2010, 36-41
9. Romano M, et al., Failure of first-line eradication treatment significantly increases prevalence of antimicrobial-resistant

- Helicobacter pylori* clinical isolates. , J. Clin Pathol., 2008, 1112 - 1115
10. Yakoob J., et al., Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in the Chinese population. , J. Gastroenterol Hepatol., 2001, 981-985
  11. Megraud F., *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. , Gut, 2004, 1374-1384
  12. 林俊谷，許秉毅，曾暉華，幽門螺旋桿菌除菌治療之新進展，內科學誌 2010, 252-257
  13. Du P, et al., Antibacterial activity of 20 kinds of Chinese medicinal materials for *Helicobacter pylori* in vitro. , Zhongyaocai., 2001, 188-189
  14. Liu B, et al., Bactericidal action of 5 kinds of traditional herbal drugs for *Helicobacter pylori*. , Zhongguo Xinyao Zazhi. , 2002, 457-459
  15. Koo, H.J., et al., Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. , European J. of Pharmacology, 2004, 201-208
  16. Pei - Yun L., Metabolic pharmacokinetics of geniposide in gardenia fruits and interactions with western medicines in rats. , China Medical University, Taiwan, 2006, 1-147
  17. Akao T., et al., Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide. , Biol Pharm Bull, 1994, 1573 - 1576
  18. Harada M., et al., Pharmacological studies of gardeniae fructus. I. Effect of geniposide and genipin on the biliary excretion, the gastric juice secretion, and the gastric contraction, and other pharmacological actions (author's transl). , Yakugaku Zasshi, 1974, 157 - 162
  19. Peng, C.H., et al., The anti- tumor effect and mechanisms of action of

- penta-acetyl geniposide. , Current Cancer Drug Targets, 2005, 299-305
20. Aburada M., et al., Pharmacological studies of Gardeniae fructus. II. Contribution of the constituent crude drugs to choleric activity of "Inchinko - to" in rats (author's transl). , Yakugaku Zasshi, 1976, 147-53
21. Takeda S., et al., Pharmacological studies on iridoid compounds. II. Relationship between structures and choleric actions of iridoid compound. , J Pharmacobiodyn, 1980, 485 - 92
22. Kim M.S., et al., The Development of genipin - crosslinked poly (caprolactone) (PCL)/gelatin nanofibers for tissue engineering applications. , Macromol Biosci, 2009, 91 - 100
23. Yamamoto M., et al., Genipin, a metabolite derived from the herbal medicine Inchin -ko - to, and suppression of Fas-induced lethal liver apoptosis in mice. , Gastroenterology., 2000, 380 - 389
24. Koo H. J., et al., Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. , J. Ethnopharmacol, 2006, 496 - 500
25. Lee JH, et al., *Gardenia jasminoides* Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. , Food Chem Toxicol, 2009, 1127 - 1131
26. Parales, R.E., et al., Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (b3). , Appl Environ Microbiol, 2002, 4699 - 4709
27. Liu, W., et al., Fast identification of thermostable beta-glucosidase mutants on cellobiose by a novel combinatorial selection/screening approach. , Biotechnol Bioeng, 2009, 1087 - 1094
28. Shen, Y., et al., Simultaneous saccharification and fermentation of acid

- pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing beta - glucosidase. , *Bioresour Technol*, 2008,5099 - 5103
29. Otieno, D.O., et al., Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. , *Food Research International*, 2006, 394 - 407
30. Donkor, et al., Production of beta -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. , *J. of Food Science*, 2008, 15 - 20.
31. Wei-Kee Wang, Effects of lactic acid bacteria on amelioration of inflammatory response and ulcerative colitis. , National Yang-Ming University, 2010
32. Min - Lun Tu, Study on the Inhibition of the Growth of *Helicobacter pylori* by *Bifidobacterium* spp. , Fu Jen Catholic University, 2005, 1 - 94
33. Lebeer S, et al., Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. , *Appl Environ Microbiol*, 2007, 6768 - 6775
34. Marshall BJ, et al., Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration., *Lancet*, 1984, 1311 - 1315
35. Goodwin CS, et al., Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen.nov.and *Helicobacter pylori* comb.nov.and *Helicobacter mustelae* cimb.nov, respectively. *Int J*



- Syst Bacteriol, 1989, 397 - 405.
36. Pounder RE., et al., The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. , Aliment Pharmacol Ther, 1995, 33-39
37. Das JC, et al., Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. , Indian J Pediatr, 2007, 287 - 290
38. Smith VC, et al., Role of *Helicobacter pylori* gastritis in gastric atrophy, intestinal metaplasia, and gastric neoplasia. , Microsc Res Tech, 2000, 313 - 320
39. Calvino-Fernández M., et al., *H. pylori* and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress, Rev Esp Enferm Dig, 2010, 41-50
40. Sheu BS, et al., Induction of coccoid form of *H. pylori* by kanamycin. , Taiwan J. Gastroenterol, 2000, 59 - 60
41. Mizoguchi H., et al., Diversity in protein synthesis and viability of *Helicobacter pylori* coccoid forms in response to various stimuli. , Infect Immun, 1998, 5555 - 5560
42. Eaton KA, et al., Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. , J Infect Dis, 1995, 459-462
43. Lai-King NG, et al., Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studies by electron microscopy. , J. Bacteriol, 1985, 338 - 343
44. Tomb JF, et al., The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. , Nature, 1997, 539 - 547
45. Alm RA, et al., Genomic- sequence comparison of two unrelated

- isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. , Nature, 1999, 176 - 180
46. Fan, X., et al., *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. , J. Immunol, 2000, 1918-1924
47. Eaton KA, et al., *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. , Infect Immun, 1989, 1119–1125
48. Scott D, et al., The life and death of *Helicobacter pylori*. , Gut 1998, 56 - 60
49. Evans J., et al., Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. , Infect Immun, 1995, 2213 - 2220
50. Wen-Cheng Chiang, Study of gene profile and adhesion of blood group antigen-binding adhesin (babA) in *Helicobacter pylori*. , National Cheng Kung University, 2008, 1-134
51. Hua, J., et al., Predominance of a single strain of *Helicobacter pylori* in gastric antrum. *Helicobacter*. , 1999, 28 - 32
52. Yamaguchi, et al., Heat - shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori* is associated with adhesion of *H. pylori* to human gastric epithelial cells. , J. Med Microbiol, 1997, 825 - 831
53. Ilver, D., et al., *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. , Science, 1998, 373 - 377
54. Odenbreit, S., et al., Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to

- human gastric tissue. , Mol Microbiol, 1999, 1537 - 1548
55. Peck, B., et al., Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. , Nucleic Acids Res, 1999, 3325 - 3333
56. Yamaoka, Y., et al., *Helicobacter pylori cagA* gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. ,Gastroenterology, 1996, 1744 - 1752
57. Mahdavi, J., et al., *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. , Science, 2002, 573 – 578
58. Montecucco C, et al., Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. , Microbes Infect., 2003, 715-721
59. Amieva MR, et al., Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. , Gastroenterology., 2008, 306 -323
60. Montecucco C, et al., Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. , Nat Rev Mol Cell Biol., 2001, 457 - 466
61. Antoine Galmiche, et al., The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. EMBO J., 2000, 6361-6370
62. S. Odenbreit, et al., Role of the AlpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. , Int. J. Med. Microbiol., 2002, 247 - 256

63. Higashi, H., et al., Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. , Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 14428 -14433
64. Yamazaki, S., et al., The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. , J. Infect Dis, 2003, 334 - 337
65. Selbach, et al., The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. , EMBO J., 2003, 515 - 528
66. Markus Stein, et al., Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation, Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 1263 - 1268
67. Tummuru, M. K., et al., *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the Bordetella pertussis toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. , Mol. Microbiol., 1995, 67 - 876
68. Ghiara, P., et al., Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease. Infect., Immun., 1995, 4154-4160
69. Konturek P. C., et al., Gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. ,J. Physiol Pharmacol., 2006, 51-65
70. Kim SY, et al., *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. , Cell Microbiol 2006, 97-106
71. Guiney DG, et al., *Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic

- cells., *Infect Immun.*, 2003, 4163-4166
72. Karttunen RA, et al., Expression of mRNA for interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 (p40) in normal gastric mucosa and in mucosa infected with *Helicobacter pylori.*, *Scand J Gastroenterol.*, 1997, 22-27
73. Lydia E. Wroblewski, et al., *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk., *Clin Microbiol Rev.*, 2010, 713-739
74. Marshall BJ., et al.,. A 20-minute breath test for *Helicobacter pylori.* , *American J. of Gastroenterology.*, 1991, 438-445
75. Konturek P. C., et al., *Helicobacter pylori* infection in gastric cancerogenesis., *J Physiol Pharmacol.*, 2009, 3-21
76. Marshall BJ., et al.,. A 20-minute breath test for *Helicobacter pylori.* , *American J. of Gastroenterology.*, 1991, 438-445
77. Yu-Ming C. Effects of Hyperbaric Oxygen in the Eradication of *Helicobacter pylori* - Animal Model, National Defense Medical Center, 2003, 1-69
78. Marshall BJ., et al., Rapid urease test in the management of *Campylobacter pylori* dis-associated gastritis. , *American J. of Gastroenterology*, 1987, 200-210
79. Wang WM., et al., Evaluation of urease test, gram stain, culture, and histology in the detection of *Campylobacter pylori.* , *J. of the Formosan Medical Association*, 1990, 683 - 686
80. Dixon MF., et al., Classification and grading of gastritis. The updated

- Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. , American J. of Surgical Pathology, 1996, 1161 - 1181
81. Huang MS., et al., Utility of brushing cytology in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Acta Cytologica. , 1996, 714 - 718
82. Piccolomini R., et al., Optimal combination of media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. , J. of Clinical Microbiology., 1997, 1541 - 1544
83. Rautelin H., et al., Culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies transported in biopsy urease test tubes. , European J. of Clinical Microbiology & Infectious Diseases., 1997, 380-383
84. Graham DY., et al., *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the <sup>13</sup>C-urea breath test. , Lancet., 1987, 1174-1177
85. Sheu BS., et al., Lower-dose (<sup>13</sup>C)-urea breath test to detect *Helicobacter pylori* infection-comparison between infrared spectrometer and mass spectrometry analysis., Alimentary Pharmacology & Therapeutics., 2000, 1359-1363
86. Savarino V., et al., Isotope ratio mass spectrometry (IRMS) versus laser-assisted ratio analyzer (LARA): a comparative study using two doses of. , Digestive Diseases & Sciences. , 2000, 2168-2174
87. Wang WM., et al., Long-term follow-up and serological study after triple therapy of *Helicobacter pylori*-associated duodenal ulcer. , American J. of Gastroenterology. , 1994, 1793-1796
88. Vaira D., et al., Blood, urine, stool, breath, money, and *Helicobacter*

- pylori.* , Gut.,2001, 287-289
89. Vaira D., et al.,Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA European study group., Lancet., 1999, 30-33
90. Trevisani L., et al.,Evaluation of a new enzyme immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* in feces: a prospective pilot study. , American J. of Gastroenterology., 1999, 1830-1833
91. Vaira D., et al.,Noninvasive antigen-based assay for assessing *Helicobacter pylori* eradication: a European multicenter study. The European *Helicobacter pylori* HpSA Study Group. , American J. of Gastroenterology., 2000, 925-929
92. Bravo LE. et al., Effects of acid suppression and bismuth medications on the performance of diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. , American J. of Gastroenterology., 1999, 2380-2383
93. Martin B, et al., Therapy of *Helicobacter pylori* infection. , Current opinion in gastroenterology., 1997, 56-62
94. Katelaris PH., Proton pump inhibitors. , M J A., 1998, 208-211
95. Stern MA, et al., *Helicobacter pylori*: diagnosis and treatment update. , Formulary., 1999, 654-663
96. Malfertheiner P, et al., *Helicobacter pylori* infection in ulcer pathogenesis. , Digestion., 1997, 17-20
97. Lind T, et al., Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies combining omeprazole with two antimicrobials: The MACH I study. , Helicobacter., 1996, 138-144

98. Lind T, et al., The MACH 2 study: role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. *Gastroenterology*, 1999, 248-253
99. Lin PZ, et al., Evolution of resistance rate of *H. pylori* to metronidazole - 3 years' follow-up. , *Gastronenterol J. Taiwan*, 1997, 14-88
100. Jui-Ling Tsai, Enhancing productions of sorbitol through metabolic engineering of *Lactobacillus rhamnosus* TCELL-1 National Tsing Hua University, 2004, 1-87
101. Hui Ping Liu, Construct lactic acid bacterial vectors and study methods for gene transfer National Tsing Hua University, 2008
102. Fuller R, Probiotics in man and animals. , *J. Appl Bacteriol.*, 1989, 365-378
103. Coconnier MH, et al., Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. , *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 299-306
104. FuKase, K., et al., Total synthesis of peptide antibiotic nisin, *Tetrahedron Lett*, 1988, 759-798
105. Malin M, S et al., Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Ann Nutr Metab*, 1996, 137-145
106. Kruis W, et al., Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative



- colitis., *Aliment Pharmacol Ther*, 1997, 853-858
107. Neidzielin K, et al., A controlled double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. , *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 1143-1147
108. Wang Y, et al., *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury. , *Am J. Pathol*, 2011, 2866-2875
109. Kaila M, et al., Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Ped Res*, 1992, 141-144
110. Gupta P, et al., Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J. Ped Gastroenterol Nutr*, 2000, 4593-4597
111. Saxelin M., *Lactobacillus* GG-a human probiotic strain with thorough clinical documentation. , *Food Rev Int.*, 1997, 293-313
112. Bhatia, Y., et al., Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. , *Crit Rev Biotechnol*, 2002, 375-407
113. Dhake, A.B. et al., Production of beta-glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. , *Brazilian J. of Microbiology*, 2005, 170-176
114. Boonclarm, D., et al., beta-Glucosidase catalyzing specific hydrolysis of an iridoid beta-glucoside from *Plumeria obtusa*., *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2006, 563- 570
115. YAPI, D.Y.A., et al., Biochemical characterization of a strictly

- specific beta-galactosidase from the digestive juice of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* larvae. , Entomological Science, 2007, 343-352
116. Rosi I., et al., Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. J Appl Bacteriol. , 1994, 519-527
117. Michlmayr H., et al., Isolation and basic characterization of a beta-glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture. , J. Appl Microbiol, 2010, 550-559
118. Watanabe T., et al., Separation and determination of yellow gardenia pigments for food and iridoid constituents in gardenia fruits by micellar electrokinetic chromatography. , Food Science and Technology International. , Tokyo, 1998, 54-58
119. Lee S.W., et al., Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*., Analytica Chimica Acta, 2003, 267-274
120. Moritome, N., et al., Properties of red pigments prepared from geniposidic acid and amino acids. , J. of the Science of Food and Agriculture, 1999, 810-814
121. Touyama R., et al., Average molecular weight and gastro-intestinal absorption of a natural food color gardenia Blue. , Japanese J.of Toxicology and Environmental Health, 1994, 259-265
122. Tseng TH, et al., Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes., Cancer Lett.,1995, 61-67
123. Lim W, et al., Dichloromethane fraction from *Gardenia jasminoides*:

- DNA topoisomerase 1 inhibition and oral cancer cell death induction. ,  
Pharm Biol., 2010, 1354-1360
124. Ozaki A., et al., Genotoxicity of gardenia yellow and its components. ,  
Food Chem Toxicol, 2002, 1603-1610
125. Yang, B., et al., Extraction optimization of bioactive compounds  
(crocin, geniposide and total phenolic compounds) from Gardenia  
(*Gardenia jasminoides* Ellis) fruits with response surface methodology.,  
Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009, 610-615
126. Tsai T.R., et al., Identification and determination of geniposide  
contained in *Gardenia jasminoides* and in two preparations of mixed  
traditional Chinese medicines. , J. Chromatogr A, 2002, 83-88
127. Nishizawa M, et al., 5-Lipoxygenase inhibitors isolated from  
*gardeniae fructus*. , Chem Pharm Bull (Tokyo)., 1988, 87-95
128. Kang J., et al., Modulation of cytochrome P-450-dependent  
monooxygenases, glutathione and glutathione S-transferase in rat liver  
by geniposide from *gardenia jasminoides*. , Food & Chem. Toxicol.,  
1997, 957-965
129. H. Y. Hsu, J et al., Comparison of geniposidic acid and geniposide on  
antitumor and radioprotection after sublethal irradiation, Cancer Lett.,  
1977, 31-37
130. C. J. Wang, et al., Penta-acetyl geniposide inhibits the growth and  
development of C-6 glioma cells in rats. , Cancer Lett, 1993, 70,  
113-118
131. Yamazaki M, et al., Prevention of the neurotoxicity of the amyloid

- beta protein by genipin. , Biol Pharm Bull., 2001, 1454-1455.
132. Touyama R., et al., Studies on the Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. I. Structures of the Brownish-Red Pigments, Intermediates Leading to the Blue Pigments. , Chemical & pharmaceutical bulletin, 1994, 668-673
133. Touyama R., et al., Studies on the Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. II .On the Formation Mechanisms of Brownish-Red Intermediates Leading to the Blue Pigment Formation. , Chemical & pharmaceutical bulletin, 1994, 1571-1578
134. Lai C., et al., Association of antibiotic resistance and higher internalization activity in resistant *Helicobacter pylori* isolates. , J Antimicrob Chemother, 2006, 466-471
135. Poon S. K., et al., Primary resistance to antibiotics and its clinical impact on the efficacy of *Helicobacter pylori* lansoprazole-based triple therapies. Aliment Pharmacol Ther 2002, 291-296
136. William G., et al., 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. , J. Of Bacteriology, 1991, 697-703
137. Krogh Kristian B. R. M., et al., Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 $\beta$ -glucosidase from *Penicillium brasilianum*, Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 143 - 154
138. Yao-Jen Kuo, Optimization and application of  $\beta$ -glucosidase and carboxylesterase in biotransformation, China Medical University, 2010,1-93
139. Liang Peng, et al., Peng Ren, Reduction of MTT by flavonoids in the

absence of cells, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 108-111

