國立臺灣師範大學理學院營養科學碩士學位學程

碩士論文

Graduate Program of Nutrition Science

College of Science

National Taiwan Normal University

Master's Thesis

小根蒜萃取物對葡聚醣硫酸鈉誘導小鼠急性腸炎之保護效應

Protective effect of *Allium macrostemon* Bunge extract against acute colitis in dextran sulfate sodium-treated mice

毛語葳

Yu-Wei Mao

指導教授：蔡帛蓉 博士 (Po-Jung Tsai, Ph. D.)

共同指導教授：侯又禎 博士 (Yu-Chen Hou, Ph. D.)

中華民國 111 年 7 月

July 2022

中文摘要

發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease) 是反覆發炎的慢性疾病，其致病因子涉及基因、環境、腸道上皮損傷、腸道菌群失衡與異常的免疫反應等。T 細胞及其相關細胞激素的調節與平衡，為維持腸道免疫恆定之重要因子。本研究首先對於台灣花蓮原住民作物「火蔥」進行植株特徵比對及基因序列分析，結果鑑定此「火蔥」為小根蒜 (*Allium macrostemon* Bunge) 的鱗莖。小根蒜屬於石蒜科蔥屬之藥食兩用的植物，將小根蒜的鱗莖進行蒸煮、乾燥後做為傳統中藥的「薤白」。本研究以葡聚醣硫酸鈉 (dextran sulfate sodium, DSS) 誘導 C57BL/6J 小鼠急性腸炎模式，探討小根蒜的新鮮鱗莖萃取物是否具緩解腸炎之能力。首先製備小根蒜的水 (aqueous extract, AE) 與 50% 乙醇萃取物 (50% hydro-ethanolic extract, HEE) 進行實驗一，結果發現預先管餵小根蒜 HEE (200 mg/kg/day)，可降低 DSS 引致急性腸炎小鼠的血液之嗜中性白血球次群、減少大腸組織免疫細胞浸潤、維持完整腸道上皮，具緩解急性腸炎的潛力；然而 AE 則無此效用。接續進行實驗二，探討補充小根蒜 HEE 減輕急性腸炎之效用與機轉。C57BL/6J 小鼠分為 4 組：正常控制 (NC) 組、腸炎控制 (DC) 組，與腸炎並介入 250 mg HEE/kg/day (DL) 組或 500 mg HEE/kg/day (DH) 組。NC 和 DC 組預先管餵水，而 DL 和 DH 組預先管餵 HEE，經一週後再給予 3% DSS 飲水引致急性腸炎並持續管餵 HEE，經一週後犧牲。實驗結果當與 DC 組比較，DL 和 DH 組顯著降低血漿 haptoglobin 濃度；在血液嗜中性白血球、發炎性單核球和調節性 T 細胞之比率皆降低，以及淋巴球比率上升；脾臟調節型 T 細胞與輔助型 T 細胞 17 相關細胞激素與轉錄因子 forkhead box p 3、interleukin (IL)-10、transforming growth factor-β1、IL-17A 和 retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-t 之 mRNA 表現量降低；大腸組織促發炎相關基因 C-C chemokine ligand 2、tumor necrosis factor-α和 C-X-C motif chemokine ligand-1 與腸道黏膜屏障相關保護因子 trefoil factors 3 之 mRNA 表現量，以及大腸沖洗液 Immunoglobulin G 的濃度皆降低，並發現 DL 和 DH 組有較低的疾病活動指數與大

腸水腫程度，另於大腸組織切片觀察其腸道免疫細胞浸潤程度較低，且具有相對較完整的隱窩與腸道上皮。本研究結果顯示，預防性給予小根蒜 HEE 可透過免疫調節與抑制發炎反應，具有緩解急性腸炎的潛力。

關鍵詞：小根蒜、發炎性腸道疾病、葡聚醣硫酸鈉、抗發炎

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory disorder of the intestine. The pathogenesis of IBD is complex, including gene, environment, epithelial barrier disruption, gut microbiota dysbiosis and immune response dysregulation. T cells play an important role in maintaining intestinal immunity underling IBD pathogenesis. *Allium macrostemon* Bunge is a traditional crop from the indigenous people in Taiwan. The purpose of this study was to evaluate whether the bulb extract of *A. macrostemon* Bunge extract attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis in C57BL/6J mice. Aqueous extract (AE) and hydro-ethanolic extract (HEE; 50% ethanol) of *A. macrostemon* bulb were prepared. The preliminary experiment showed that HEE supplementation (200 mg/kg/day) alleviated DSS-induced murine acute colitis, but AE did not. Subsequently, the protective effect and mechanism of HEE against DSS-induced acute colitis were investigated. C57BL/6J mice were divided into normal control (NC) group, DSS-treated control (DC) group, DSS+ 250 mg/kg HEE (DL) group and DSS+ 500 mg/kg HEE (DH) group. All animals were given free access to standard chow diet. Mice in the DC, DL, and DH groups received drinking water containing 3% (w/v) DSS for 7 days to induce acute colitis. The DL and DH groups received HEE by daily oral gavage for one week before starting the DSS treatment and throughout the entire experimental period. Results showed that the disease activity index, plasma haptoglobin, immunoglobulin G of colon lavage fluid, the percentage of circulating neutrophils, inflammatory monocyte and regulatory T cells levels in blood were lower, whereas the lymphocyte populations in blood were higher in the DL and DH groups, as compared with the DC group. HEE supplementation reduced mRNA levels of forkhead box p 3, interleukin (IL)-10, transforming growth factor-β1, IL-17A and retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-t in spleens and also down-regulated the C-C chemokine ligand-2, tumor necrosis factor-α, C-X-C motif chemokine ligand-1 and trefoil factors 3 in colons. The histological observation of the colon further implied that HEE could reduce inflammatory cell infiltration and restore intestinal epithelial barrier integrity. In conclusion, HEE could significantly alleviate the signs and symptoms of the DSS-induced acute colitis by modulating immune responses and suppressing expression of inflammatory mediators.

Keywords: *Allium macrostemon* Bunge, inflammatory bowel disease, dextran sodium sulfate, anti-inflammatory

致謝

來到臺北這個陌生的城市，在這不長不短的兩年歲月裡，一路上有淚水有歡笑，過程遇到各種人、事、物使我漸漸成長與獨立。不僅在專業學術上或各種人生課題中，皆受到多位老師、學長姐、同學們以及家人的協助與陪伴，讓我受益良多、滿載而歸，為我的碩士生活增添一頁色彩。

首先，最為感謝的是我的指導教授蔡帛蓉老師與共同指導教授侯又禎老師，使得剛入學慌張懵懂的我，跌跌撞撞找到研究的方向與完整的實驗規畫，並具有耐心和細心的教導與討論，在多次的實驗挫折中找到需要改善與發生的問題點，順利地讓每一項實驗循序漸境的完成，也在我情緒低落受挫時給我鼓勵跟打氣，使我有繼續努力的動力。另外，也很感謝實踐大學張美鈴教授，以及口試委員國立臺灣大學龔秀妮教授和臺北醫學大學陳玉華教授的指導與帶領，給予相當寶貴的建議與想法，使我在實驗操作上與論文內容更加精準與豐富。於碩二進行的動物實驗與相關分析過程時，很榮幸也非常感謝臺北醫學大學侯又禎教授提供優良的實驗環境、分析條件以及溫柔細心的指導，使得動物實驗順利的如期完成；臺北醫學大學劉俊仁教授協助分析小根蒜之相關組成分；以及國立臺灣大學曲芳華教授協助小根蒜與其他蔥屬植物之 ITS 序列分析，以上授予資深與專業教授們的相互協助下，才能順利完整了這本碩士論文，在此致上深深的謝意。

兩年碩士生涯時光飛逝，除了要感謝實驗小黑鼠們的犧牲貢獻外，也特別感謝安生學長在我剛入學時，萃取技術的帶領與動物實驗上的協助教導；貼心學妹加綺與開心果學弟勝崴，當我遇到實驗或生活中的迷茫挫折時，總是在一旁的鼓勵與提供意見，蔡家實驗室有你們的加入有趣了許多，未來也希望你們的實驗都能順順利利完成；既聰明又暖心的娗瑜與其他同學們采蘋、家妤、千翔等，提供我許多實驗上的寶貴意見，以及陪伴我度過各種生活中的大小事；還有北醫的少玫學姐，常常陪我聊心事與協助我實驗上的難題，也帶我吃遍北醫附近的各項美食；可愛的北醫學弟妹振宇與馨之，在我犧牲小鼠之非常慌亂時期給予大大的幫忙與協助，也從中認識了許多北醫可愛又熱情的好同學們荷晴、劉臻等，陪我一起當實驗室的最早開燈與最晚關燈之人類，還有吃不完的小點心，真的非常感謝你們，有你們在讓我感到十分安心。

謝謝我最親愛的家人們，媽媽毛麗貞、哥哥顏琮儒和伯父顏金泰，有你們的存在我很幸福，在背後給我大大的溫暖與支援，讓我無憂無慮朝著遠大的目標邁進，並順利於兩年取得碩士文憑。最後，也謝謝在天上的爸爸一路伴隨我度過這兩年的碩士時光，每當想起您我總是抬頭遠望天空，相信您一直都在。期許未來的自己能成為您感到最驕傲的模樣。

毛語葳 謹誌

中華民國一百一十一年七月

目錄

中文摘要 ..... **II**

Abstract ..... **IV**

致謝 ..... **V**

目錄 ..... **VI**

圖目錄 ..... **IX**

表目錄 ..... **XI**

縮寫表 ..... **XII**

第一章 文獻回顧 **1**

第一節 腸道與免疫系統 1

一、 腸道功能與結構 1

二、 先天性免疫反應 (innate immunity) 2

三、 後天性免疫反應 (adaptive immunity) 7

第二節 發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel diseases, IBD) 10

一、 IBD 簡介與流行病學 10

二、 IBD 致病因子與機轉 11

三、 改善與治療 IBD 的策略 15

四、 葡聚醣硫酸鈉 (dextran sulfate sodium, DSS) 誘發 IBD 模式 16

第三節 小根蒜 18

第二章 研究動機與目的 **21**

第三章 材料與方法 **22**

第一節 實驗材料與儀器設備 22

一、 小根蒜 22

二、 實驗試劑與材料 24

三、 實驗抗體 25

四、 實驗分析套組 26

五、 實驗設備 26

第二節 小根蒜萃取物製備 27

第三節 營養組成與分析 28

一、 營養成分分析.....28
二、 氣相層析質譜儀 (gas chromatography–mass spectrometry) 定量揮發性組成分.....28
三、 液相層析質譜儀 (liquid chromatography–mass spectrometry) 鑑定組成分.....29
第四節 動物實驗.....30
一、 動物飼養與實驗流程.....30
二、 飼料成分.....34
三、 檢體採集與處理.....35
四、 分析方法與項目.....36
第五節 統計分析.....51
第四章 結果.....52
第一節 營養組成.....52
第二節 氣相層析質譜儀定量結果.....53
第三節 液相層析串聯質譜儀鑑定結果.....56
第四節 實驗 (一).....60
一、 飲水與體重變化.....60
二、 疾病活動指數.....62
三、 脾臟重量.....63
四、 大腸組織.....64
五、 血液先天性免疫細胞之比率.....66
六、 血液淋巴球之比率.....67
七、 脾臟淋巴球之比率.....68
八、 大腸組織促發炎相關因子之 mRNA 表現量.....69
九、 大腸組織切片.....70
第五節 實驗 (二).....71
一、 飲水與體重變化.....71
二、 疾病活動指數.....73
三、 脾臟重量.....74
四、 大腸組織.....75
五、 血漿結合球蛋白 (haptoglobin) 與 CLF 的 IgG 濃度.....77
六、 血液先天性免疫細胞之比率.....78

七、 血液淋巴球之比率 79
八、 脾臟淋巴球之比率 80
九、 脾臟 Th17 與 Treg 細胞相關細胞激素及轉錄因子之 mRNA 表現量 81
十、 大腸組織促發炎相關因子之 mRNA 表現量 83
十一、 腸道黏膜屏障相關保護因子之 mRNA 表現量 84
十二、 大腸組織切片及損傷程度評分 85
第五章 討論 87
第一節 小根蒜之組成分 88
第二節 小根蒜對於腸道發炎之影響 89
第三節 小根蒜對於腸道黏膜屏障之影響 90
第四節 小根蒜對於先天性免疫之影響 91
第五節 小根蒜對於後天性免疫之影響 93
第六章 結論 96
第七章 參考文獻 99

圖目錄

圖 1-1、大腸組織結構 1
圖 1-2、大腸之防禦系統 3
圖 1-3、大腸黏膜屏障 4
圖 1-4、各種 $CD4^+$和 $CD8^+$ T 細胞次群及其功能。 9
圖 1-5、IBD 之致病機制 13
圖 1-6、葡聚醣硫酸鈉之結構式 16
圖 3-1、小根蒜 22
圖 3-2、小根蒜 (kenaw) 與其他蔥屬植物之 ITS 序列使用 Neighbor-Joining 法計算及繪製之演化樹 (由臺灣大學曲芳華教授提供) 23
圖 3-3、實驗一流程圖 32
圖 3-4、實驗二流程圖 33
圖 3-5、血液先天性免疫細胞之流式細胞儀圈選流程圖 39
圖 3-6、血液淋巴細胞之流式細胞儀圈選流程圖 39
圖 3-7、血液 Treg 細胞之流式細胞儀圈選流程圖 40
圖 3-8、脾臟淋巴細胞之流式細胞儀圈選流程圖 42
圖 4-1、實驗一 DSS 誘導後小鼠的飲水量與體重變化百分比 61
圖 4-2、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的疾病活動指數之影響 62
圖 4-3、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的脾臟重量之影響 63
圖 4-4、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的大腸組織之影響 65
圖 4-5、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之血液先天性免疫細胞比率的影響 66
圖 4-6、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之血液 T 淋巴球比率的影響 67
圖 4-7、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之脾臟 T 淋巴球比率的影響 68
圖 4-8、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之大腸組織促發炎因子 mRNA 表現量的影響 69
圖 4-9、實驗一大腸組織切片 70
圖 4-10、實驗二 DSS 誘導後小鼠的飲水量與體重變化百分比 72
圖 4-11、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的疾病活動指數之影響 73
圖 4-12、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的脾臟重量之影響 74

圖 4-13、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的大腸組織之影響..... 76
圖 4-14、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠血漿 haptoglobin 與 CLF 的 IgG 濃度之影響..... 77
圖 4-15、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之血液先天性免疫細胞比率的影響 78
圖 4-16、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之血液淋巴球比率的影響 79
圖 4-17、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之脾臟淋巴球比率的影響 80
圖 4-18、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠脾臟 Th17 及 Treg 細胞相關細胞激素與轉錄因子之 mRNA 表現量的影響 82
圖 4-19、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之大腸組織促發炎因子 mRNA 表現量的影響..... 83
圖 4-20、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之腸道黏膜屏障相關保護因子 mRNA 表現量的影響 84
圖 4-21、實驗二大腸組織切片的觀察及損傷評分 86

表目錄

表 3-1、ITS 基因序列分析結果 22
表 3-2、流動沖提梯度條件 29
表 3-3、市售 Chow diet 組成分 34
表 3-4、疾病活動指數之評分標準 37
表 3-5、糞便黏稠度與直腸出血之評估表 37
表 3-6、分析項目表 47
表 3-7、流式細胞儀所使用之抗體 48
表 3-8、大腸組織損傷評分標準 49
表 3-9、即時定量聚合酶連鎖反應之引子序列 49
表 3-10、qPCR 反應溶液配置 50
表 3-11、qPCR 之反應條件 50
表 4-1、小根蒜之營養組成 52
表 4-2、小根蒜含有的揮發性化合物 53
表 4-3、小根蒜 AE 之組成分 56
表 4-4、小根蒜 HEE 之組成分 58
表 6-1、實驗一數據總結 97
表 6-2、實驗二數據總結 98

縮寫表

縮寫	全名
AMP	antimicrobial peptide
APC	antigen-presenting cell
ANOVA	analysis of variance
BCR	B cell receptor
BSA	bovine serum albumin
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
CCR	C-C motif chemokine receptor
CCL2	C-C chemokine ligand 2
CD	Crohn's Disease
CLF	colon lavage fluid
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DSS	dextran sulfate sodium
DAI	disease activity index
DC	dendritic cell
DEPC	diethyl pyrocarbonate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Foxp3	forkhead box p 3
GC-MS	gas chromatography–mass spectrometry
H&E	hematoxylin and eosin
IEC	intestinal epithelial cell
IESC	intestinal epithelial stem cell
IBD	inflammatory bowel disease
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
IFN	interferon
KC	keratinocyte-derived chemokine
Ly6C	lymphocyte antigen 6 complex, locus C1
Ly6G	lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
MHC	major histocompatibility complex
MLN	mesenteric lymph node
Muc	mucin
M1	classically activated macrophages
M2	alternatively activated macrophages

MIP	macrophage inflammatory protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NK cell	natural killer cell
NET	neutrophil extracellular trap
NOD2	nucleotide-binding and oligomerization domain containing protein 2
NF-κB	nuclear factor kappa B
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PRR	pattern recognition receptor
Q-PCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
ROS	reactive oxygen species
ROR-γt	retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-t
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tff	trefoil factor
TGF	transforming growth factor
Th	helper T cell
Tc	cytotoxic T cell,
Treg	regulatory T cell
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
TCR	T cell receptor
UC	Ulcerative colitis
ZO-1	zonula occludens-1

第一章 文獻回顧

第一節 腸道與免疫系統

一、腸道功能與結構

胃腸道主要功能是藉由消化酶的分泌和營養吸收之複雜過程，來消化所攝入的營養物質。管腔內容物經平滑肌分節運動 (segmentation) 以確保足夠的接觸時間和暴露於吸收性上皮黏膜表面，而沿胃腸道移動。人體消化道由多個器官所組成，可分為上消化道和下消化道。下消化道之組織結構，包括：小腸和大腸兩部分。大腸管壁由內向外大致可劃分為四個分層，為黏膜層 (mucosa)、黏膜下層 (submucosa)、肌肉層 (muscular layer) 與漿膜層 (serosa) (圖 1-1)。黏膜層包括：上皮組織、其下方由較疏鬆的結締組織構成之固有層 (lamina propria)，及由兩層平滑肌所構成的黏膜肌層 (muscularis mucosae)；黏膜下層則為介於黏膜肌層與肌外層間之緻密的結締組織，含黏膜下神經叢 (submucous plexus) 以控制腸道內分泌與血流；肌肉層藉由腸肌神經叢 (myenteric) 所控制，推動消化道的內容物 (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017)。人體消化道內部的總黏膜表面積約為 32 平方公尺，其中大腸約佔 2 平方公尺，廣大的面積不僅提高了消化與吸收營養的能力，同時也增加暴露於外來物質之接觸面積，故阻止外來物入侵、維持腸道恆定性之免疫反應對腸道健康是很重要的 (Helander & Fändriks, 2014)。

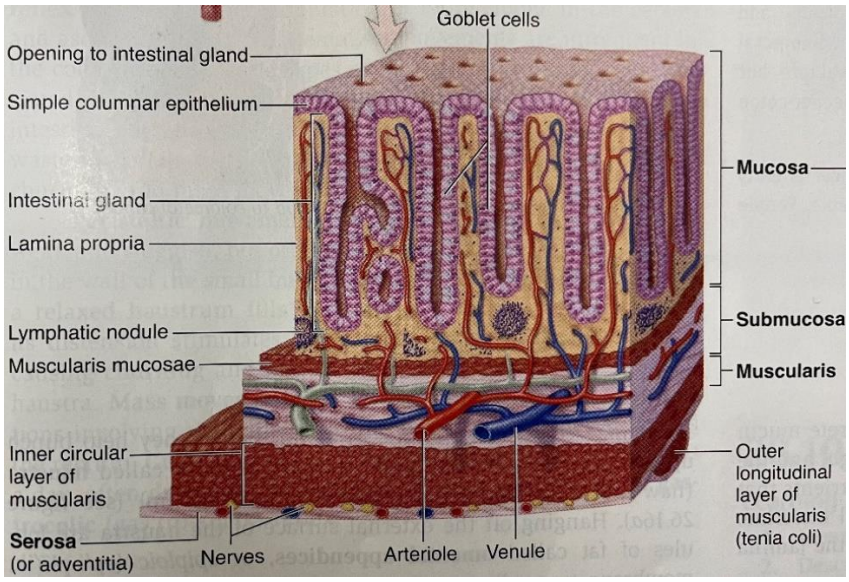


圖 1-1、大腸組織結構

Figure 1-1. The structure of large intestine. (McKinley & O'Loughlin, 2012)

二、先天性免疫反應 (innate immunity)

先天性免疫系統為抵禦病原體的內在防禦系統，具非特異性且不會賦予持久性免疫力之特徵，當微生物入侵時能夠快速而有效的引起發炎反應，是抵禦感染之第一道防線。

腸道的先天性免疫包括：腸道黏膜屏障與多種免疫細胞，例如：嗜中性白血球 (neutrophil)、單核球 (monocyte)、巨噬細胞 (macrophage)、樹突細胞 (dendritic cell, DC) 和自然殺傷細胞 (natural killer cell, NK cell)，以及相關免疫激素的作用，來維持腸道的免疫恆定性 (Geremia et al., 2014)。當細胞對抗外來病源侵襲時，免疫反應起始於細胞模式辨識受器 (pattern recognition receptor, PRR) 與病源上的病原體相關分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 做辨識，便會激活發炎相關激素的轉錄與表現，例如：細胞激素 (cytokine)、化學趨化激素 (chemokine) 等物質，而啟動先天性免疫防衛之機制 (Hill & Diehl, 2018; Plato et al., 2015)。分述如下：

(一) 腸道黏膜屏障

完整的腸道黏膜屏障，由多種上皮細胞和非上皮細胞相互形成，為多層且高度動態的物理、化學和免疫之保護作用，具選擇性與滲透性，能吸收水分和營養物質，亦同時持續阻止有害物的入侵，以維持腸道組織之恆定性，避免失調而誘導發炎反應的產生 (Nagler-Anderson, 2001)。構成上皮黏膜屏障之多層防禦，從外 (腔) 向內 (固有層) (圖 1-2)。簡述如下：

(1) 最外層由黏液所組成，作為物理性屏障；(2) 黏液中具有抗微生物肽 (antimicrobial peptide, AMP) 和免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 等化學物質，以加強抑制並阻隔外來有害物，防止免疫系統的過度刺激 (Gallo & Hooper, 2012; Johansson & Hansson, 2016; Mantis et al., 2011)；(3) 第二層為腸上皮細胞 (intestinal epithelial cell, IEC) 形成的單細胞保護層，其散佈著上皮內淋巴細胞 (intraepithelial lymphocyte)，為平衡保護性免疫與上皮屏障完整性之能力 (Cheroutre et al., 2011)；(4) 腸道隱窩 (crypt) 內的腸上皮幹細胞 (intestinal epithelial stem cell, IESC)，是填補鞏固上皮表面之關鍵；(5) 第三層為固有層，存有多種白血球，以維持先天性免疫防禦並提供免疫之記憶性 (Thoo et al., 2019)。

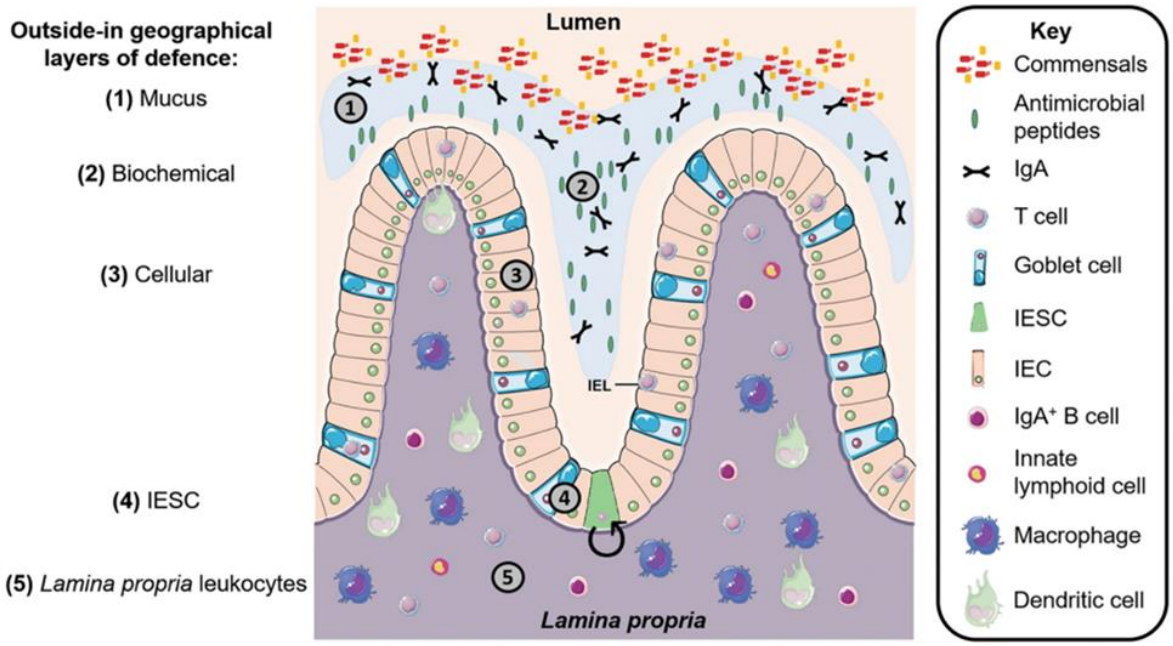


圖 1-2、大腸之防禦系統

Figure 1-2. Defence systems of intestine (colon). (Thoo et al., 2019)

腸道的黏膜屏障分為化學屏障和物理屏障，使得腸道微生物群和宿主免疫細胞互相調節並在空間上做區隔，以避免對腸道共生微生物產生異常的免疫反應。於腸道黏膜中之化學屏障，如：潘氏細胞 (paneth cell, PC) 所分泌大量的 AMP、溶菌酶 (lysozyme) 等物質；而具有覆蓋腸黏膜的黏液層，以及於 IEC 間的緊密連結 (tight junction) 之結構組織為扮演物理屏障 (圖 1-3)。以上綜述，使腸道細菌與 IEC 分隔，以抑制微生物侵入腸道黏膜。因此，若腸道黏膜屏障功能失常時，細菌易侵入腸道黏膜中，而誘導宿主免疫細胞產生過度免疫反應，引起腸道發炎 (Choy et al., 2017; Jäger et al., 2013; McGuckin et al., 2011; Okumura & Takeda, 2018)。

黏液層由堅固的內層和鬆散的外層所組成，是黏附於 IEC 且直接與有害微生物接觸之第一道屏障。主要由杯狀細胞 (goblet cell) 所分泌的黏液，富含黏液素 (mucin, Muc) 等多種醣蛋白、三葉因子 (trefoil factor, Tff) 及 AMP 之物質。在腸胃道的各區域中存有許多不同類型的 Muc，如：分泌型醣蛋白 Muc2，是小腸和大腸中黏膜屏障的主要成分，與 trefoil factors 3 (Tff3) 具協同作用，以增強黏液層保護屏障之特性 (Bergstrom et al., 2008; Nakamura et al., 2018)；也是作為腸道細菌的主要能量來源之一，並維持腸道黏膜屏障及

降低病原體之易感性 (Desai et al., 2016)。另外，Tff3 不僅已被證實，可藉由誘導並調節在上皮細胞膜上的 E-鈣黏素 (E-cadherins) 之表現量，來促進潰瘍性結腸炎 (Ulcerative colitis, UC) 與克隆氏症 (Crohn's disease, CD) 患者之腸上皮細胞的傷口癒合 (Karayiannakis et al., 1998)；還具刺激並增加組成緊密連結結構之水閘蛋白-1 (claudin-1) 和細胞連結蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 的表現量，來降低腸道黏膜細胞之通透性，以維持腸道屏障功能 (Buda et al., 2012; Meyer zum Büschenfelde et al., 2006)。

IEC 間緊密連結之結構，由多種水閘蛋白與細胞連結蛋白等所共同組成的，是構成 IEC 作為物理屏障，具高度動態和選擇性之特徵 (Garcia-Hernandez et al., 2017)。因此，維持腸道黏膜屏障之完整性與其功能，已被證實為先天性免疫反應中的關鍵角色。

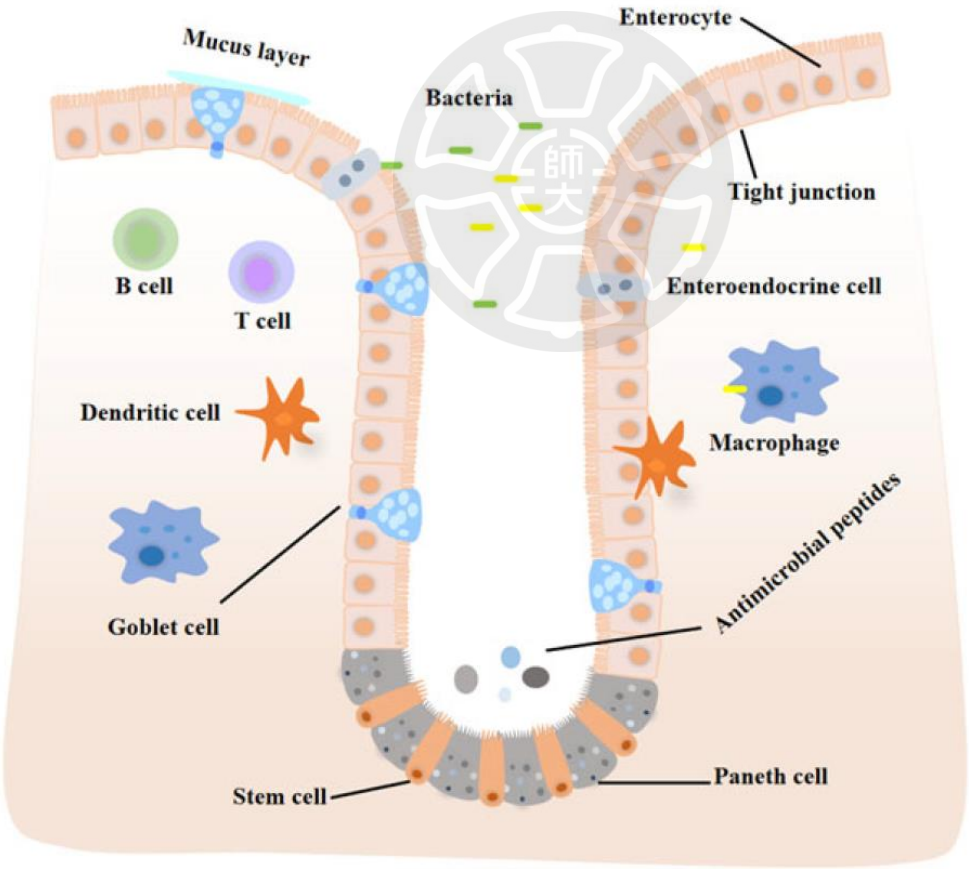


圖 1-3、大腸黏膜屏障

Figure 1-3. The intestinal mucosal barrier. (Wu et al., 2019)

(二) 免疫細胞

1. 嗜中性白血球

嗜中性白血球是人類血液中最豐富的血球細胞群。一旦與微生物接觸時，為發炎的第一反應者，具快速的遷移 (migration) 且被募集至發炎組織中，並藉由吞噬作用 (phagocytosis)、去顆粒作用 (degranulation)、產生活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS) 及釋放嗜中性白血球胞外網狀結構 (neutrophil extracellular trap, NET) 等多種機制來清除微生物 (Bennike et al., 2015; Brinkmann et al., 2004)。於腸腔發炎時，嗜中性白血球遷移到腸腔後，會遇到各種微生物，進行吞噬作用以消滅微生物。可將由 DNA、組蛋白和顆粒蛋白所組成的 NET 釋放到細胞外環境中，困住並吞噬入侵的微生物，再進一步釋放大量 ROS、AMP 和其他有效破壞病原體的有毒分子以清除之。一旦免疫耐受失調，大量嗜中性白血球在發炎的腸黏膜內聚集，使隱窩結構被破壞，形成隱窩炎和隱窩膿腫，更加劇腸道黏膜發炎 (Kolaczkowska & Kubes, 2013; Zhou & Liu, 2017)。先前的研究顯示，CD 患者體內的嗜中性白血球，其吞噬功能和釋出 ROS 的能力降低，導致腸道細菌聚積和淋巴細胞的過度活化 (Korzenik & Dieckgraefe, 2000)。總而言之，在先天性免疫反應中，嗜中性白血球對於維持腸道恆定性是必要的。

2. 單核球與巨噬細胞

單核球與巨噬細胞是先天性免疫反應的重要角色之一，在宿主防禦病原體、免疫的調節、發炎反應的啟動與抑制以及組織修復等過程中發揮著關鍵作用。單核球是骨髓群系 (myeloid lineage) 的先天性免疫細胞，大致分為兩種類別，包括：表現 CCR2 (C-C motif chemokine receptor 2) 的發炎性單核球 (inflammatory monocyte)；表現 CX3CR1 (CX3C chemokine receptor 1) 的抗發炎性單核球 (anti-inflammatory monocyte) (Shi & Pamer, 2011; Wolf et al., 2019)。在恆定狀態下，發炎性單核球細胞會儲備於骨髓或其他髓外部位中，且可立即部署到感染或受傷的組織，分化產生巨噬細胞或單核球衍生的樹突細胞 (mo DCs) 來控制感染與發炎損傷等作用；而抗發炎性單核細胞則為促進組織的修復 (Yona et al.,

2013)。進入腸道組織的單核球，會分化為巨噬細胞和樹突細胞，並於免疫系統中發揮吞噬作用、抗原呈現和產生細胞激素等功能。各種巨噬細胞的表型和功能，是隨著腸道周圍微環境與細胞激素的刺激而所分化，主要為 M1 巨噬細胞 (classically activated macrophages, M1) 及 M2 巨噬細胞 (alternatively activated macrophages, M2) (Cedric Auffray et al., 2009; Ginhoux & Jung, 2014; Jakubzick et al., 2017)。在發炎的腸道黏膜中，使得處於促發炎環境的單核球，會先分化為具促發炎性的 M1 巨噬細胞，而腸道中大量 M1 巨噬細胞浸潤，會分泌促發炎細胞激素，如：tumor necrosis factor alpha (TNF)-α、interleukin (IL)-6、IL-8、IL-23、IL-1β、interferon (IFN)-γ以及化學趨化激素 (C-C motif chemokine ligand 2, CCL2)，並吸引更多單核球匯集來抵禦微生物 (Kühl et al., 2015; Schenk et al., 2007)；而具抗發炎性的 M2 巨噬細胞，則分泌 IL-10 和 transforming growth factor (TGF)-γ等抗發炎之細胞激素，以促進腸道組織修復和免疫調節作用。因此，M1/ M2 巨噬細胞分化的平衡，對於免疫反應之調節是重要的 (Shapouri-Moghaddam et al., 2018)。

三、後天性免疫反應 (adaptive immunity)

後天性免疫反應又稱為適應性免疫反應，於接觸病原體後，通常需要幾天的時間才能激活適應性免疫反應，並啟動特異性免疫的保護作用，分別由 B 細胞和 T 細胞所引起之免疫反應，對於組織的發炎與修復皆相當重要。T 細胞和抗原呈現細胞 (antigen-presenting cell, APC) 為適應性免疫之重要調節角色，體內重要的 APC 包括：巨噬細胞與 DCs。藉由 APC 的抗原特異性信號以及各種細胞激素的影響，如：IL-1、TNF-α和防禦素 (defensins)，刺激初始 $CD4^+$ T 細胞 (naïve $CD4^+$ T cells)，依功能分化為不同類型的輔助型 T 細胞 (helper T cell, Th)，包括：T-helper 1 (Th1)、T-helper 2 (Th2)、T-helper 17 (Th17) 細胞以及調節型 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) (Zhu & Paul, 2010)。

(一) B 細胞

B 細胞膜上的 B 細胞抗原受體 (B cell receptor, BCR) 與抗原結合，使得下游 BCR 信號的傳遞，並藉由 MHC II 進行抗原呈現，而起始 B 細胞的活化。另外，Th 細胞，特別是濾泡輔助 T 細胞 (T follicular helper cell)，將以自身的 T 細胞受體 (T cell receptor, TCR) 辨識 B 細胞表面結合抗原片段的 MHC-II 分子，並分泌細胞激素，來促進 B 細胞的活化 (Crotty, 2015)。活化後的 B 細胞分化為記憶型 B 細胞 (memory B cell) 與漿細胞 (plasma B cell)。記憶型 B 細胞的壽命很長，是處於休眠期的 B 細胞。於血液中循環，一旦遇到其原來分化來的 B 細胞曾辨識之特定抗原，即可迅速產生新的記憶型細胞和漿細胞；漿細胞則分泌大量的免疫抗體，如：IgG、IgM 及 IgA 等，是引起體液性免疫反應 (humoral response)，作為消滅外來抗原之角色 (Cooper, 2015; Kurosaki et al., 2015; Kwak et al., 2019; Nutt et al., 2015)。

(二) T 細胞

T 細胞根據其功能性的不同，主要分為的類型，包括：表面帶有 CD4 標誌的輔助型 T 細胞 (helper T cell, Th)，以及表面帶有 CD8 標誌的細胞毒殺型 T 細胞 (cytotoxic T cell, Tc) (Gutcher & Becher, 2007; Hu et al., 2018)。Tc 細胞負責殺傷被病毒感染的細胞與癌細胞，藉由辨識有核細胞表面 MHC-I 分子上的短胜肽抗原，來分辨出應殺傷的異常細胞，並分泌大量的細胞激素 (如：

IL-2 和 IFN-γ)、穿孔素 (perforin) 與顆粒酶 (granzyme) 等，使受病毒感染的細胞凋亡，以控制病毒的感染 (Arsenio, 2020)。初始 $CD4^+$ T 細胞在遇到抗原呈現細胞表面之 MHC-II 分子結合的外部抗原時，一旦被激活即快速分裂，並開始分泌調節免疫反應的細胞激素，來增強免疫能力。在受到不同細胞激素的刺激下，進一步分化成各類型的 Th 細胞 (Saravia et al., 2019) (圖 1-4)。分述如下：

1. Th1 細胞與 Th2 細胞

初始 $CD4^+$ T 細胞在 IL-12 刺激下，分化為 Th1 細胞，其特徵在於分泌 IFN-γ、TNF-α和 IL-2 等促發炎激素，促進 M1 巨噬細胞生成，負責細胞性免疫反應 (cell-mediated response) 和吞噬細胞依賴之宿主防禦反應；另一方面，在 IL-4 刺激下所分化的 Th2 細胞，其特徵則是分泌 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13 等抗發炎激素，促使 M2 巨噬細胞之極化和 B 細胞生成抗體，並參與體液性免疫反應 (humoral immunity)。Th1 細胞所分泌的 IFN-γ，會抑制 Th2 細胞的增殖；而 Th2 細胞分泌的 IL-4 則會拮抗 Th1 細胞的分化作用。因此，Th1 細胞和 Th2 細胞為藉由細胞激素的分泌來相互調節，以維持免疫恆定性 (Huang & Chen, 2016; Romagnani, 1999; Zhu & Paul, 2010)。

2. Th17 細胞與 Treg 細胞

Th17 細胞和 Treg 細胞分別具有保護宿主免受病源微生物侵犯，以及抑制過度免疫 T 細胞反應的作用。TGF-β是誘導 Th17 細胞和 Treg 細胞之共同信號。初始 $CD4^+$ T 細胞，於 TGF-β濃度低且在 IL-6 刺激下分化為 Th17 細胞，並分泌 IL-17、IL-22 和 IL-23。其中 IL-17 會刺激大量促發炎趨化激素與細胞激素，包括：巨噬細胞發炎蛋白-2 (macrophage inflammatory protein-2, MIP-2 又稱 C-X-C motif chemokine ligand-2, CXCL2)、KC (keratinocyte-derived chemokine 又稱 C-X-C motif chemokine ligand-1, CXCL1)、TNF-α和 IL-8 等，進而誘導嗜中性白血球之聚集，以促進腸道的發炎反應，來消滅外來微生物 (Awane et al., 1999; Kolls & Lindén, 2004; Shen et al., 2005; Ye et al., 2001)；IL-22 和 IL-23 則是與 IL-

17 一同誘導 AMP 的激活，以增強清除細菌之能力 (Liang et al., 2006; Tsai et al., 2013)。當初始 $CD4^+$ T 細胞處於 TGF-β高濃度且 IL-2 活化時，Th17 細胞的產生受到抑制，同時會經由 STAT5 路徑，刺激轉錄因子 forkhead box p 3 (Foxp3) 的表現，促進具有抑制免疫功能之 Treg 細胞的分化產生 (Kanamori et al., 2016; Mahmud et al., 2013)。另外，腸道共生菌及其代謝產物也能促進分化腸道 Treg 細胞的生成，並分泌抗發炎細胞激素 TGF-β和 IL-10，抑制多種免疫細胞的活性，而抑制免疫反應，以增加腸道黏膜之耐受性。IL-10 不僅抑制 Th17 細胞的產生，且亦促進 Treg 之分化和 Foxp3 的表現 (Chaudhry et al., 2011; Huber et al., 2011; Rubtsov et al., 2008)。此外，根據研究證實，Treg 細胞會使得 Th1 細胞上 CXCR3 之表現下降，並干擾其趨向遷移至腸道發炎部位，來抑制腸道發炎 (Murai et al., 2009; Wadwa et al., 2016)。因此，Th17/Treg 細胞平衡的機制，對於腸道的免疫反應及免疫耐受性皆至關重要 (Lee, 2018; Littman & Rudensky, 2010; Omenetti & Pizarro, 2015; Marc Veldhoen et al., 2006)。

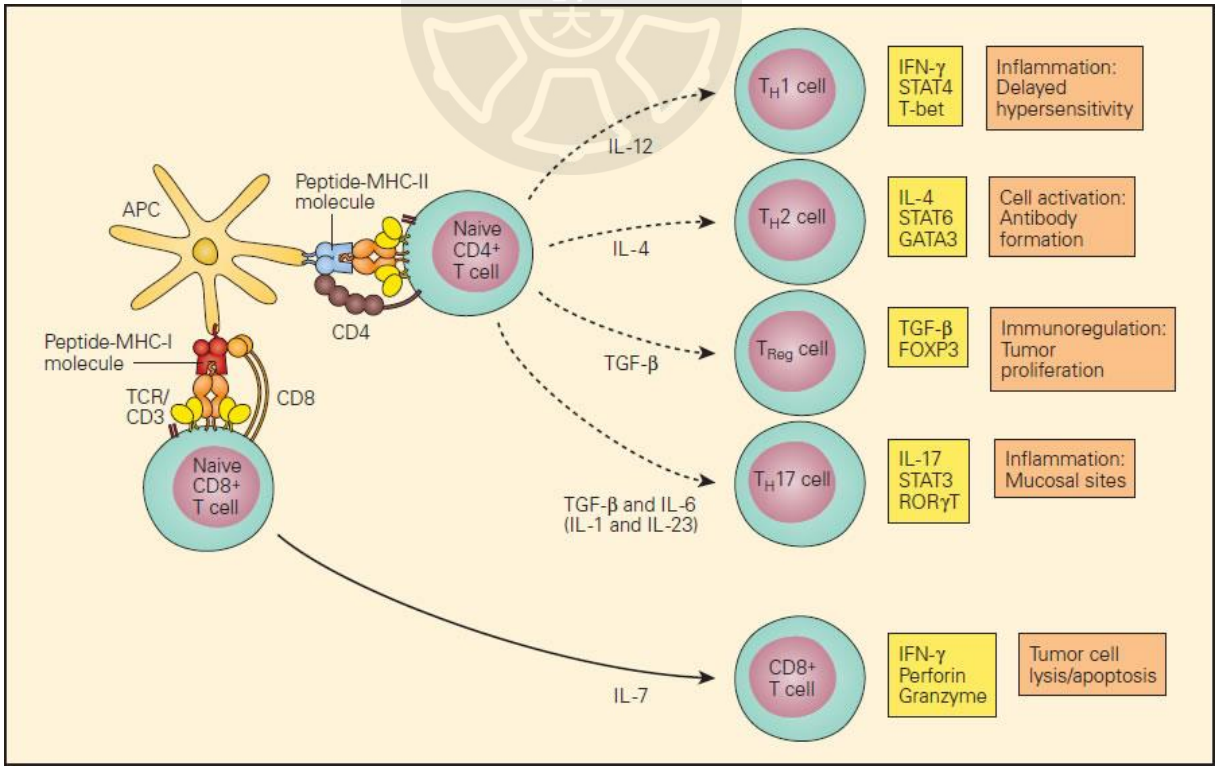


圖 1-4、各種 $CD4^+$和 $CD8^+$ T 細胞次群及其功能。

Figure 1-4. Schematic representation of various populations of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells together with their functions. (Stiehm, 2012)

第二節 發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel diseases, IBD)

一、IBD 簡介與流行病學

發炎性腸道疾病屬於反覆發炎的慢性腸胃道疾病，也是一種免疫誘導的發炎性疾病 (immunologically mediated disease)。過去 IBD 的盛行率在世界各地中不斷增加，尤其在美洲、歐洲等西方國家，但近年來隨著許多新興工業化國家，例如：韓國、台灣、中國等亞洲國家，其生活方式和飲食習慣的西化，使得 IBD 的盛行率及發生率逐漸上升，即對全球醫療有巨大的經濟負擔，因此各國逐漸重視 (Ananthakrishnan, 2015; Mak et al., 2020; Sugihara & Kamada, 2021; Vavricka et al., 2015)。IBD 根據在腸壁中侵犯的深度和位置的不同而區分，主要分為兩型：CD 和 UC。在台灣根據國家健康保險研究數據庫 (National Health Insurance Research Database) 分析，於 2001 年至 2015 年間進行一項回顧性研究，顯示出盛行率逐年上升。CD 盛行率從 0.6/10 萬人增加至 3.9/10 萬人，患病年齡主要集中於 20 至 39 歲之間；UC 的盛行率從 2.1/10 萬人增加到 12.8/10 萬人，患病年齡介於 40 至 59 歲之間 (Yen et al., 2019)。

IBD 常見的症狀為腹痛、嚴重腹瀉和血便等，與發炎的嚴重程度有關。CD 病徵較為深層，且從口腔到肛門的任何腸道部位都可能受侵犯，大多發生在迴腸末端或結腸處，而發炎區域不完整，具有跳躍性質 (skip lesion)，並涉及反覆性的全層腸壁 (transmural) 發炎，導致腸壁變窄或瘻管，伴隨慢性腹痛、腹瀉、阻塞或肛門周圍病變；UC 僅為腸道黏膜層和黏膜下層發炎，始於直腸和下結腸黏膜發炎，隨著病程發展，以連續方式向近端擴展而影響整段結腸，主要的侵犯部位於結腸末端，其典型症狀是血性腹瀉、腹痛、糞便急迫 (fecal urgency) 和裡急後重 (rectal tenesmus) (Feuerstein & Cheifetz, 2017; Feuerstein et al., 2019)。

IBD 臨床診斷主要為病史、臨床表徵、血液和糞便檢查，加上大腸鏡檢查配合組織病理學的評估。常見表徵有腹瀉、腹痛、直腸出血、體重減輕和疲勞；血液與糞便檢查，如：紅血球、C 反應蛋白 (C-reactive protein) 推斷身體是否貧血或發炎程度，以及糞便鈣衛蛋白 (fecal calprotectin) 的測定，反映參與發炎之嗜中性白血球的數量 (Bjarnason, 2017; Torres et al., 2017; Veauthier & Hornecker, 2018)；內視鏡嚴重程度指數 (endoscopic index of severity) 以評估疾病嚴重程度與範圍，包括 Mayo score 與 SES-CD 之評分標準 (Daperno et al., 2004; Travis et al., 2013)。

二、IBD 致病因子與機轉

IBD 是一種多因素所致的慢性疾病，其病因與致病機制尚未定論，廣泛涉及基因遺傳、環境因素、腸道上皮損傷、腸道菌群的失衡與異常的免疫反應等複雜的交互作用下所致 (Guan, 2019b)。分述如下：

(一) 基因遺傳

目前全基因組關聯分析 (genome-wide association study) 中，已證實具 242 個宿主基因座與罹患 IBD 風險有關，其中大約 30 個基因座共存在 CD 和 UC 之間 (Mirkov et al., 2017; Huang et al., 2017; Peters et al., 2017)，與 IBD 最具遺傳關聯的是對應於 16 號染色體上的核苷酸結合和寡聚化結構域的蛋白 2 (nucleotide-binding and oligomerization domain-containing 2, NOD2) 基因座，NOD2 在宿主微生物免疫反應中，是一個重要的 PRR，該受體識別並結合其配體胞壁酰二肽 (muramyl dipeptide)，導致寡聚化並誘導 NF-κB (nuclear factor kappa B) 和 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 的激活，而增加促發炎細胞激素 IL-8、TNF-α和 IL-1β的轉錄作用 (Horowitz et al., 2021; Hugot et al., 1996; Strober et al., 2008; Van Limbergen et al., 2014; Yamamoto & Ma, 2009)。儘管大多數人帶有與 IBD 風險有關的基因座，但只有少數人會進展成 IBD。因此，IBD 的進展還需加上環境因素、腸道微生物菌群的失衡與黏膜免疫系統 (mucosal immune system) 的異常，相互影響之作用下而致病 (Guan, 2019b)。

(二) 環境因素

流行病學的研究中，認為環境因素的相互作用在 IBD 的致病機制是重要的，包括飲食、酒精、吸煙、社會壓力與心理因素等引起 IBD 之易感性 (Guan, 2019b)。腸胃道微生物群是一個複雜的生態系統，與宿主建立共生、互利的穩定關係，但會因飲食、藥物等環境因素而失衡。過去研究證實，西方飲食中普遍富含飽和脂肪、精緻的碳水化合物和食品添加劑等，可能藉由干擾腸道屏障功能、改變腸道微生物菌群、增加腸道通透性，而促進發炎反應之產生，導致 IBD 的風險增加 (Dixon et al., 2015; Dolan & Chang, 2017; Weber et al., 2019)；酒精的吸收代謝，在小腸和結腸中，會耗盡腸道中具有抗

發炎活性的細菌，逐漸使得腸道受損，最終導致“腸漏” (leaky gut)；吸煙則會導致腸道微生物菌群的改變，提高罹患 IBD 的風險 (Capurso & Lahner, 2017)。

(三) 腸道屏障

腸道黏膜屏障牢固黏附於上皮細胞，是維持腸道恆定性的微生物和宿主行為間交互關係之主要界面。腸道上皮細胞是抵禦外部環境的有效屏障，從隱窩 (crypt) 向腸絨毛處更替換新，伴隨死亡和脫落，以控制細菌的定植來維持腸道免疫恆定性 (Seo et al., 2021)。研究顯示，於 IBD 患者腸道中發現，異常分化的杯狀細胞使得分泌 Muc2 的能力下降；腸道上皮間之緊密連結蛋白結構的缺失，而引起腸道發炎 (Bankole et al., 2021; Lee, 2015; Tanaka et al., 2015)。在 IBD 患者之腸道微生物基因體中，也發現大量病源菌附著在腸道黏膜上，例如：黏附侵襲性大腸桿菌 (adherent-invasive Escherichia coli, AIEC) 和梭桿菌 (Fusobacterium species) 等。以上綜述，腸上皮細胞受到細菌入侵，使得腸道屏障功能的缺失，增加細菌滲透性並與腸上皮表面更緊密接觸，易引起腸道的異常發炎反應 (Costa et al., 2020; Liu et al., 2020; Mirsepasi-Lauridsen et al., 2019)。

(四) 腸道菌群

腸道中擁有複雜而豐富的微生物菌群，具有與營養、免疫系統和宿主防禦相關的生理功能。臨床和實驗數據已證實，與健康人群相比，在 IBD 患者中，腸道微生物菌群的組成和功能改變，破壞腸道微生物菌群的代謝和最佳的恆定性，稱為腸道菌群生態失調，是引發 IBD 之關鍵機制 (Halfvarson et al., 2017; Nishida et al., 2018)。過去研究指出，於 IBD 患者腸道中，有益於腸道的代謝物大量減少，其因是產生短鏈脂肪酸 (short-chain fatty acid) 的羅斯氏菌屬 (Roseburia) 和考拉桿菌屬 (Phascolarctobacterium) (Parada Venegas et al., 2019)；及產生丁酸的普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*, F. *prausnitzii*) 數量顯著減少 (Machiels et al., 2014)。隨著腸道微生物代謝能力的喪失、腸道屏障功能的缺失，致腸道通透性增加，進而誘發異常的發炎反應與免疫反應，更加劇 IBD 的發病進展 (Morgan et al., 2012)。

(五) 免疫反應

先天性免疫反應和適應性免疫反應的功能失常，是導致 IBD 患者出現異常的腸道發炎反應原因之一 (Halfvarson et al., 2017)。IBD 患者的免疫反應失調，例如：腸道黏液分泌的異常及修復功能的缺失，造成腸道上皮細胞之損傷；由腸道菌群和大量的免疫細胞 (如：嗜中性白血球、巨噬細胞、DC、B 細胞和 T 細胞等)，浸潤到固有層，而活化的固有層細胞在局部組織中產生大量的促發炎細胞激素 (TNF-α、IL-1β、IFN-γ和 IL-23/Th17)，擴大並驅動發炎反應，以致免疫系統的失調 (圖 1-5) (Abraham & Cho, 2009; Ahluwalia et al., 2018; Choy et al., 2017; Chandra et al., 2021; Korzenik & Podolsky, 2006)。

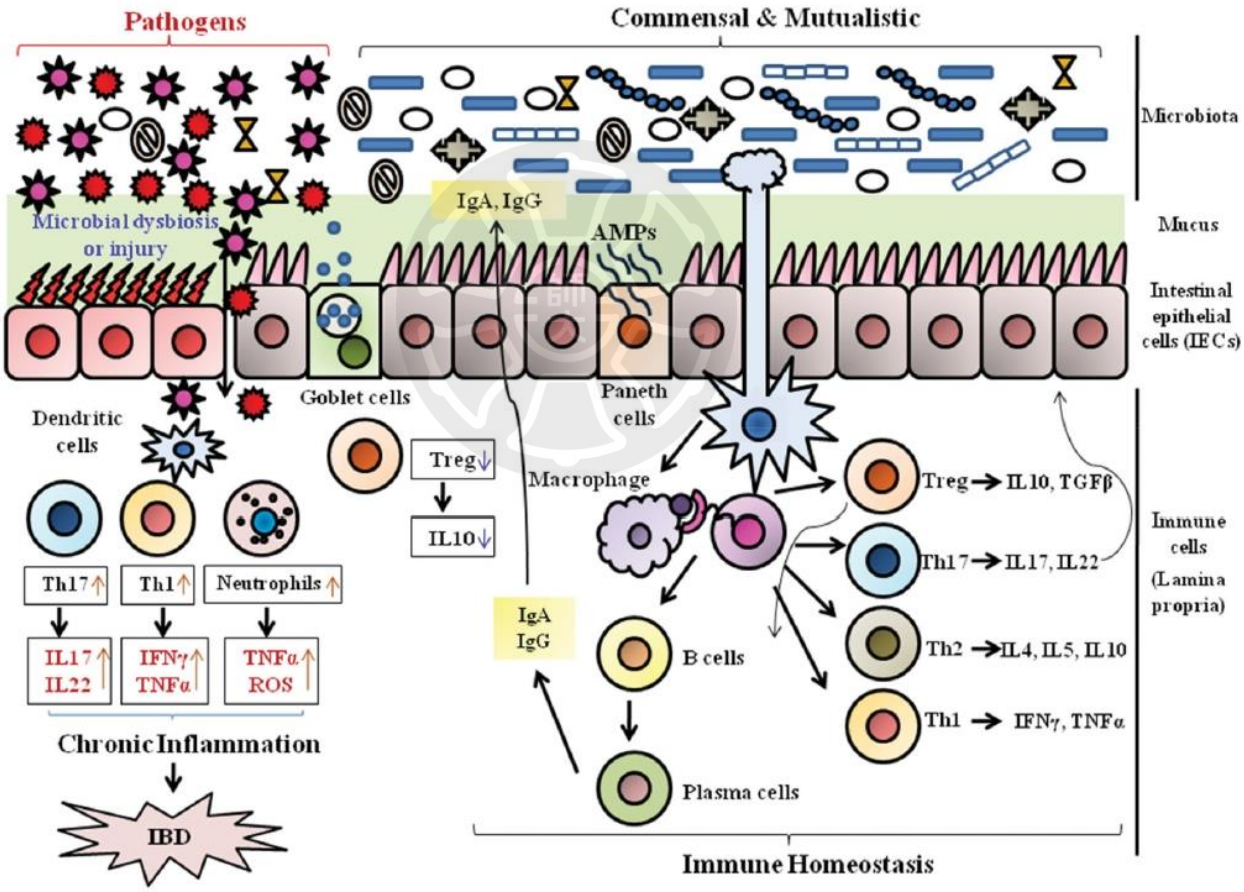


圖 1-5、IBD 之致病機制

Figure 1-5. Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases. (Chandra et al., 2021)

先天性免疫反應是屬於非特異性的抵禦病原體之第一道防線。其由腸細胞和特化的上皮細胞 (如：杯狀細胞和潘氏細胞等) 所組成的腸上皮細胞，除了作為細菌、病原體的物理屏障外，還具有分泌多種 AMP 之特性。過去研究，於 IBD 患者腸道中發現，可能由環境因素或感染而引起黏膜屏障的缺陷 (de Souza & Fiocchi, 2016; Kaistha & Levine, 2014; Salim & Söderholm, 2011)。也在 CD 患者中觀察到分泌 AMP 的表現量缺失，而增加腸道通透性 (Wehkamp et al., 2003)。另外，有許多類型的先天性免疫細胞已被證實可能與 IBD 的發病機制有關，例如：嗜中性白血球的浸潤藉由破壞上皮屏障功能及釋放多種發炎細胞激素，使腸道持續性的處於發炎狀態 (de Souza & Fiocchi, 2016)；促發炎的單核球刺激分化為 M1 巨噬細胞，被大量募集到發炎的腸道組織中 (Grainger et al., 2017)；多項研究表示，腸道 DC 的功能亦會受到腸道微生物的影響而產生異常反應 (Z.-J. Yang et al., 2021)。由於，上述先天性免疫細胞的失調，將破壞腸道防線，可能使微生物的入侵，引起長期的發炎反應，並趨化適應性免疫細胞的大量浸潤，而使免疫系統功能出現異常。

適應性免疫反應則是高度特異性的，通常需要幾天的時間才能做出反應，並取決於 T 細胞的類型和數量而有所不同。T 細胞主要分為 Th 細胞與 Tc 細胞。先前研究顯示，IBD 患者中，Th1 細胞、Th2 細胞以及 Th17 細胞等的過度免疫反應及免疫失衡，會導致細胞激素與趨化激素的過度釋放，而引起發炎 (Huang & Chen, 2016)。其中，CD 與 Th1 細胞引起的免疫反應有關；UC 具有 Th2 免疫反應之特徵；Th17 細胞則是兩者間的促發炎反應介質 (Matsuno et al., 2017; Nemeth et al., 2017)。在 IBD 患者的腸道中，大量的 Th17 細胞滲入後，產生 IL-17 與 IL-22 等促發炎細胞激素，而加劇發炎反應 (Gálvez, 2014a)。Th 細胞和 Trges 細胞之間的免疫平衡對於維持免疫恆定性至關重要 (Tindemans et al., 2020; Yan et al., 2020)。Trge 細胞是抑制異常的免疫反應和維持免疫耐受性之重要角色 (Pereira et al., 2017)，若其功能缺失，會使細胞的生成受到抑制，導致腸道發炎及其他併發症的產生 (Bacchetta et al., 2018)。先前研究與健康對照組相比，發現 IBD 患者的 Trges 細胞數量顯著減少 (Boschetti et al., 2016; Sznurkowska et al., 2020)。另外，$CD8^+$毒殺性 T 細胞反應能力的降低，亦是造成腸道屏障的免疫力失調之潛在因素 (Noble et al., 2019)。

三、改善與治療 IBD 的策略

由於目前 IBD 尚無法治癒，因此對於疾病的發作期和緩解期 (remission) 管理很重要。常規的治療重點是控制腸壁發炎使其黏膜的修復癒合、預防長期併發症和降低手術之需求，使患者可達到較佳的生活品質。採用的治療方式取決於多種因素，包括：疾病的嚴重程度、發炎部位的不同以及患者的臨床反應等。對於輕度至中度的患者，常以 5-氨基水楊酸 (5-aminosalicylic acid, 5-ASA) 類藥物為第一線用藥，誘導治療 (induction therapy) 並維持緩解期。若有中度至重度症狀及預後不良者，會考慮使用皮質類固醇，及採用免疫抑制劑，如：硫唑嘌呤 (azathioprine) 來維持皮質類固醇誘導的緩解。常規治療無效者，則使用生物製劑，如：腫瘤壞死因子抑制劑。不過，目前的治療藥物仍有其侷限性，如：5-ASA 僅一般有效；類固醇易產生不良反應；TNF-α抑制劑雖效果較佳，但易患有嚴重感染等 (Hanauer, 2017; Jeong et al., 2019; Ko et al., 2019; Magro et al., 2020; Neurath, 2017)。

其他的輔助療法以減輕 IBD 病症，例如：腸道微生物群的組成、代謝與宿主免疫系統有關。飲食型態調整的建議，包括：給予短期的低 FODMAP (fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols) 飲食改善 IBD 患者的腹脹、腹痛等功能性腸胃道症狀 (Gibson, 2017; Prince et al., 2016)；採用地中海飲食 (mediterranean diet) 增加患者腸道微生物群中的有益性細菌，助於維持腸道屏障功能、減少患者的疾病活動指數 (disease activity index, DAI) 及發炎反應 (Chicco et al., 2020; Illescas et al., 2021)。飲食中之補充劑，據先前研究發現，對於 IBD 患者服用益生菌 (probiotics) 和益生元 (prebiotics) 可以改變其腸道微生物群，進而改善臨床症狀 (Astó et al., 2019; Derwa et al., 2017; Jia et al., 2018; Nishida et al., 2018)。過去動物實驗指出，口服補充生物素 (biotin) 有助於減少 NF-κB 的激活，並減少了發炎性細胞激素的表現及降低了腸道通透性，以維持疾病緩解 (Skupsky et al., 2020)。

傳統上，許多藥用植物中衍生的天然化合物與功能性食品之有效萃取物療法，例如：辣木 (*Moringa oleifera* Lam.)、野櫻梅 (*Aronia* Berry)、大蒜 (*Allium sativum* L.)、紫菜 (*Porphyra tenera*) 與黃芩 (Scutellaria baicalensis Georgi) 等，已被證實具有改善小鼠腸炎嚴重程度之功效 (Cui et al., 2021; Kang et al., 2017; Kim et al., 2020; Shao et al., 2020; Zhang et al., 2020)。因此尋找有效用於預防或治療 IBD

的天然物或萃取物，可能作為輔助治療的策略之一。

四、葡聚醣硫酸鈉 (dextran sulfate sodium, DSS) 誘發 IBD 模式

目前常用 IBD 動物模式包括：化學誘導模式、細胞轉移模式、先天突變和基因轉殖模式 (Mizoguchi, 2012)。其中，化學誘導的小鼠腸道發炎是最常用的模式之一，因其簡單、快速而容易誘導發炎，且疾病的持續時間和嚴重程度具可控性 (Wirtz et al., 2017)。葡聚醣硫酸鈉 (圖 1-6)，為一種具有抗凝特性的化學結腸原 (chemical colitogen)，可直接作用於腸上皮細胞而導致上皮之損傷，並改變其黏膜屏障功能。藉由給予不同的 DSS 濃度和頻率，來建立急性與慢性 IBD 動物模式 (Chassaing et al., 2014; Kiesler et al., 2015)。

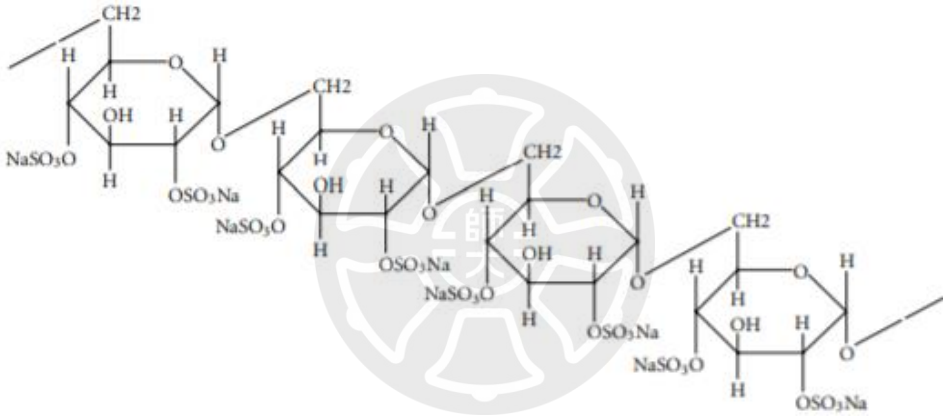


圖 1-6、葡聚醣硫酸鈉之結構式

Figure 1-6. Structural formula of dextran sulfate sodium. (Tanaka, 2012)

DSS 誘導腸炎的有效性取決於許多因素，包括：DSS 濃度 (通常為 1%-5%)、給藥的持續時間和頻率 (誘導急性或慢性)、DSS 的分子量、動物品系 (C57BL/6 或 BALB/c) 和動物的微生物環境等 (Eichele & Kharbanda, 2017)。DSS 是一種水溶性、帶負電荷的硫酸化多醣，其分子量具可變性，範圍 5 到 1400 kDa 之間。一般於分子量 40-50 kDa 可誘發較佳的腸炎效果，目前實驗方式，是將 36-50 kDa DSS 添加到無菌水，以誘導小鼠腸炎 (Kitajima et al., 2000)。C57BL/6 品系小鼠對 DSS 誘導的腸炎有較高的易感性 (Melgar et al., 2005)，可能引起腸道黏膜醣蛋白和杯狀細胞的損耗；對腸道上皮細胞的侵蝕，進而使腸道上皮通透性增加，最終損害屏障之完整性，且其抗凝特性會加重腸道出血；誘導嗜中性白血球浸潤至固

有層和黏膜下層，及跨上皮細胞的遷移，進入黏膜上皮而引起隱窩炎，或遷徙到隱窩腔導致隱窩膿腫等 (Eichele & Kharbanda, 2017; Okayasu et al., 1990; Perše & Cerar, 2012)。

DSS 誘導腸炎的臨床和組織病理學特徵，反應了在人類 IBD 中所見的病徵。急性腸炎通常為短期，約 7-10 天的連續給予 2-5% DSS (w/v) 誘發，臨床表徵常有體重減輕、腹瀉、大便潛血、貧血等 (Eichele & Kharbanda, 2017; Okayasu et al., 1990; Perše & Cerar, 2012)。免疫反應以 Th1 誘導，小鼠腸道中 TNF-α、IL-1β和 IL-10 等細胞激素的表現增加 (Yan et al., 2009)；慢性腸炎則由連續或週期性的給予低濃度之 DSS 來誘導，當急性腸炎轉化為慢性腸炎狀態下，其特徵為單核球的嚴重浸潤和上皮細胞的再生異常 (regeneratory atypia simulating dysplasia) (Okayasu et al., 1990)。免疫反應由 Th2 誘導，使 IL-6、IL-4 和 IL-10 表現增加 (Alex et al., 2008)。

第三節 小根蒜

蔥屬 (*Allium*) 植物約有 500 多種，其中做為蔬菜食用的包括常見的洋蔥 (*Allium cepa* L.)、大蒜 (*Allium sativum*)、蔥 (*Allium fistulosum*)、小根蒜 (*Allium macrostemon* Bunge)、韭菜 (*Allium tuberosum*) 等。蔥屬植物多含有機硫化合物 (organosulfur compounds, OSCs) 是主要的揮發性物質，具典型蔥、蒜等的氣味，也由於含有豐富的抗氧化化合物，傳統上，食用蔥屬植物，被認為對人類健康是有益的，常用來做為蔬菜、食物調味品和香料以及傳統醫藥上的治療劑 (Asemani et al., 2019)。蔥屬植物的主要生物活性化合物，包括：多酚化合物 (polyphenol compounds)、有機硫化合物 (OSCs)、膳食纖維、花青素 (anthocyanins) 和皂苷 (saponins) 等。常見的大蒜和洋蔥，是兩種最為大宗且已被大量研究的蔬菜，其生理效應包括：抗菌、抗癌、抗發炎、抗哮喘、抗糖尿病、抗血栓形成和抗血小板活性等作用 (Cao et al., 2014; El-Sayed et al., 2017; Marefati et al., 2018; Putnik et al., 2019; Schäfer & Kaschula, 2014; Suleria et al., 2015; Trio et al., 2014)。

小根蒜 (*Allium macrostemon* Bunge) 為石蒜科 (family Amaryllidaceae) 蔥屬 (*Allium*) 的多年生草本植物，其新鮮鱗莖可做蔬菜食用，經蒸煮及乾燥後的鱗莖則為傳統中醫學 (Traditional Chinese Medicine) 所使用的藥材，稱之為「薤白」(Allii Macrostemonis Bulbus；音譯 Xiebai)，故為藥食兩用的植物。

小根蒜全植株粗 0.7~1.5 (2) 釐米，葉片約 3-5 枚，呈半圓柱狀，或因背部縱稜發達而使較近底部 (根) 有典型的三稜半圓柱形、中空以及上面有溝槽 (中國植物誌, 1980)。基部常具小鱗莖近球狀、高度約 1.5-2 公分，表面呈黃白色或淡黃棕色、質地硬、有蒜臭及辛辣味。

小根蒜原產於中國大陸 (除新疆和青海以外) 生長於海拔 1500 公尺以下的山坡、丘陵、山谷或草地上。分布韓國、日本、琉球和台灣等國家，為台灣東部地區歷史悠久的特有野菜，其口感風味嗆辣備受阿美族人喜愛，可供沾著醬油、鹽水生食或醃漬後食用。原住民常以生食或醃豬肉、香腸一起搭配著食用，而味道類似洋蔥且入口時伴隨著更為強烈嗆鼻的特殊氣味，苦韻及濃厚氣味長存於口鼻間久不散去。在台灣市面上少見販售小根蒜，於花蓮地區阿美族人有栽培和食用習慣，少量出現於北部宜蘭等地。阿美族語稱小根蒜為 kenaw，由於外型表徵，容易被誤認為小洋蔥、玻璃珠、蕗蕎和火蔥等蔥屬植物 (全，2003; 游等人，2020)。

薤白味辛、苦，性溫，無毒；入心、胃與大腸經，以鱗莖入藥具有理氣化痰、治子宮血腫、月經閉血、哮喘 (asthma)、胸痹 (thoracic obstruction) 和胃灼熱 (cardialgia)、胃腸炎及胃癌之藥用功效 (藥用植物圖像數據庫, 2022)。先前研究已指出具降血脂、抗氧化、抗粥狀動脈硬化、抗腫瘤、鎮痙、抗菌和殺蟲活性等功能 (Yao et al., 2016)，其生物活性分述如下：

一、降血脂

薤白皂苷 A (macrostemonoside A, MSS.A) 似類固醇 (steroid) 結構，可降低高脂飲食誘導的 C57BL/6 小鼠內臟脂肪組織重量、空腹血糖、血清三酸甘油脂、總膽固醇和 LDL-c，為潛在改善高血糖、高脂血症和內臟脂肪堆積之功效 (Xie et al., 2008)。另以薤白為主要成分的血脂通膠囊 (Xuezhitong capsules)，降低雄性 ApoE $^{-/-}$ C57BL/6J 小鼠中血漿和肝臟的氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 含量；降低肝臟和骨骼肌中的脂肪酸合成酶；增加肝臟 LDLR、ABCA1 和 SRB1 表現；增加血漿 LCAT 和肝臟 ApoA1 以及降低血漿 ApoB，改善異常的脂質代謝，誘導膽固醇逆向運輸之活化，並增加 HDL 表現，對高脂血症具保護效應 (Meng et al., 2019)。

二、抗粥狀動脈硬化

薤白皂苷藉由促進 TNF receptor-associated factor 2 蛋白誘導的泛素化降解，抑制泛素化蛋白 k48 和 k63 的表現，來降低 Cluster of differentiation 40 相關的信號蛋白 PI3K/Akt、MAPK 和 NF-κB 之活性，也發現具減少血小板活性標誌物 Thromboxane B2 的釋放，以抑制血小板活化，於粥狀動脈硬化病程中發揮抗發炎和抗血栓之作用 (Ling et al., 2020)。

三、抗腫瘤

MSS.A 可藉由誘導 ROS 的產生來抑制結直腸癌細胞 Caco2 和 SW480 的生長，使其細胞週期停滯並誘導細胞凋亡，具有治療人類結直腸癌的潛力 (Wang et al., 2013)。

四、鎮痛

薤白水萃取物在熱 (hot plate) 和化學誘發 (acetic acid and formalin test) 的疼痛試驗皆具有緩解作用，藉由降低動作電位的放電頻率，以抑制周圍神經元的興奮性，為抑制鈉離子通道 (Nav1.7 channel) 的鎮痛藥物之來源 (X. Yang et al., 2021)。

五、殺蟲活性

薤白中二甲基三硫醚 (dimethyl trisulfide) 和甲基丙基二硫醚 (methyl propyl disulfide) 兩種之主要成分，對於白紋伊蚊 (Skuse) 幼蟲具有很強的殺蟲活性，為良好天然殺蟲劑之來源 (Liu et al., 2014)。

目前的研究報告已指出，薤白具降血脂、抗腫瘤等生理活性 (Yao et al., 2016)，而新鮮小根蒜鱗莖的研究相對缺乏，先前研究發現其鱗莖富含游離必需胺基酸與有機硫化物等物質，具有清除自由基之抗氧化能力 (Wu et al., 2020)。另外，實驗以60%乙醇萃取的新鮮小根蒜葉子中分離出 caffeic acid ester of sophorose (glucosyl - (1→2) - glucose) 和五種類黃酮化合物 (Usui et al., 2017)。本研究欲探討新鮮小根蒜鱗莖組成分與其食用之相關抗發炎保護功效。因此，建立急性腸炎動物模式，透過預先食用新鮮小根蒜萃取物，探討對於腸道發炎之免疫細胞與相關發炎激素的影響。

第二章 研究動機與目的

IBD 是一種慢性和復發性之腸胃道疾病，疾病類型分為 CD 和 UC，其常見的臨床症狀有腹痛、嚴重腹瀉和血便等。目前治療之安全和有效性有很大的局限，尤其在長期給藥期間與停藥後復發，皆可能會導致嚴重的不良反應，亦會提高罹癌機率 (Connell et al., 1994; Zuo & Ng, 2018)。故副作用較少的自然輔助療法，如天然藥用植物與功能性食品中萃取物之研究興起。

小根蒜 (*A. macrostemon* Bunge) 深受台灣花蓮地區原住民喜愛，也被認為是安全且有治療效果的食用野菜之一。長久歷史以來，由於蔥屬植物富含有效生物活性成分，已被大眾用於預防疾病之功效的藥用植物種類，例如：洋蔥具有抗發炎、抗氧化等作用 (Jakaria et al., 2019)。小根蒜具嗆辣風味，有別於常見的洋蔥和藠薯 (*Allium chinense*) 等蔥屬 (*Allium*) 草本植物，且相較於薤白，新鮮小根蒜鱗莖的研究較少。因此，參考蔥屬植物藥用之用途，以科學方法探討其是否具有生物活性成分與生理效應。透過模擬現實生活中的食用方式，例如：水煮、泡酒或以料理米酒入菜等，所以主要利用乙醇萃取之溶劑，分別為水、50%乙醇做為實驗萃液，以 3% DSS 誘導急性腸炎之動物模式，探討預先給予小根蒜萃取物對於急性腸炎的可能保護效應與作用機轉。

第三章 材料與方法

第一節 實驗材料與儀器設備

一、小根蒜

新鮮小根蒜鱗莖樣品為行政院農委會花蓮農改場於 2021/02-2021/05 在花蓮縣 (23°59‘ 14.0“ N, 121°36’ 07.2” E) 鳳林鎮所採集 (農民栽種)，不同成熟期之植株 (圖 3-1A 和 3-1B) 與其鱗莖外觀 (圖 3-1C)。小根蒜樣品 (NTNU#2021-O3) 保存於國立臺灣師範大學蔡帛蓉老師研究室。本實驗所用的材料小根蒜經萃取 DNA 和 PCR 後，進行 ITS 基因序列分析，將獲得之 ITS 基因序列訊號與 NCBI nucleotide collection 資料庫比對，發現 kenaw 與 *A. macrostemon* 有相當高之相同度，證實樣品為小根蒜 (吳等人，2022 投稿中) (表 3-1)。

表 3-1、ITS 基因序列分析結果

Table 3-1. Internal transcribed spacer.

樣品	Best hit 物種	相同度	登錄碼
Kenaw	*Allium macrostemon* voucher H20110219	622/651(96%)	KF693243.1
	Allium macrostemon isolate A	625/657(95%)	GQ412213.1
	Allium macrostemon voucher T2012060603	619/651(95%)	KF693244.1

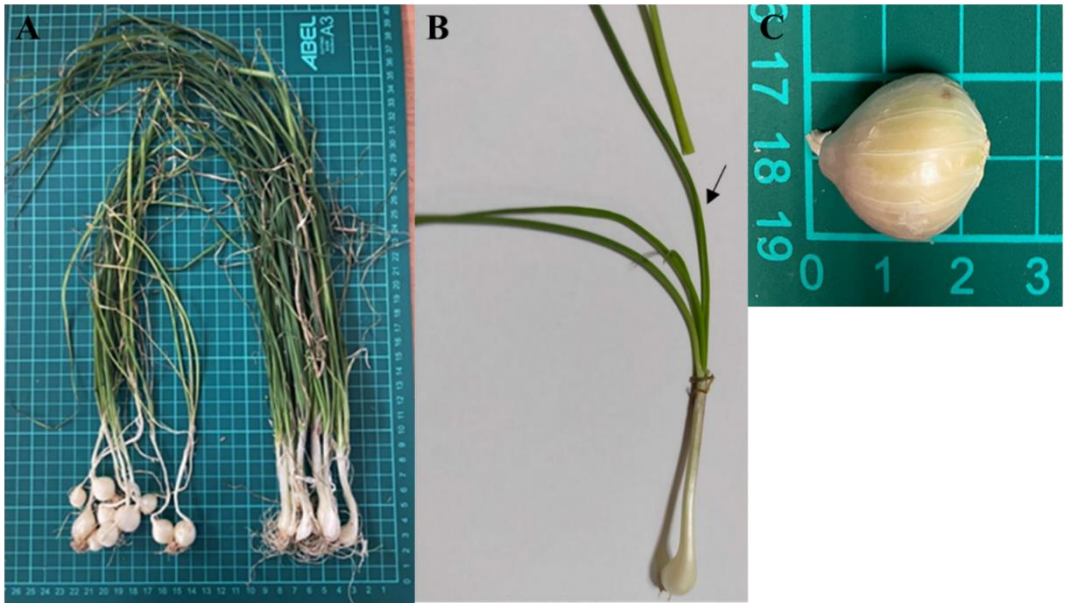


圖 3-1、小根蒜

Figure 3-1. Morphology of *A. macrostemon*.

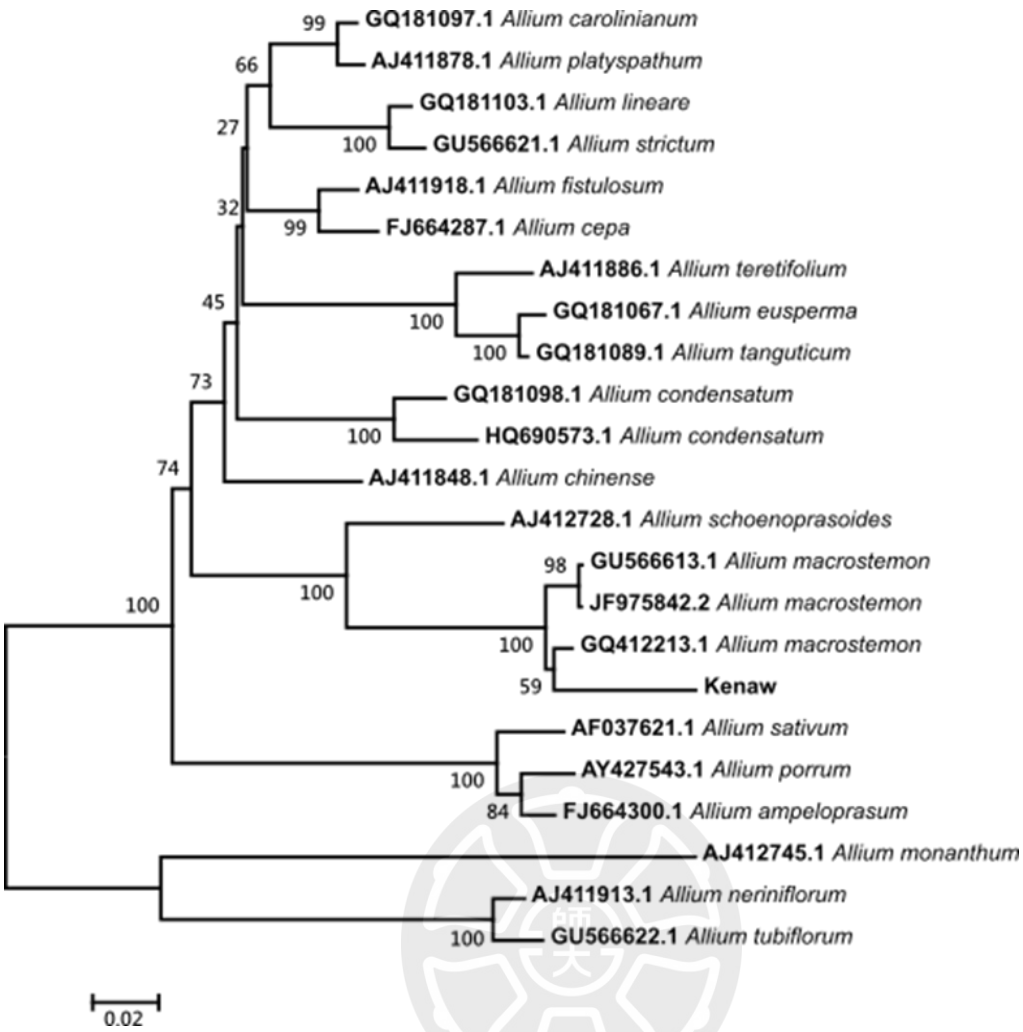


圖 3-2、小根蒜 (kenaw) 與其他蔥屬植物之 ITS 序列使用 Neighbor-Joining 法計算及繪製之演化樹 (由臺灣大學曲芳華教授提供)

二、實驗試劑與材料

(一) 新鮮小根蒜萃取

1. Ethanol: Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
2. Qualitative filter papers: No.1, ADVANTEC, Tokyo, Japan.

(二) 動物實驗

1. Bovine serum albumin: A4503, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
2. Bradford protein assay reagent: Bio-Rad, Richmond, CA, U.S.A
3. Cell strainer 40 μm Nylon: 352340, FALCON, Mexico.
4. Chloroform: C2432, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
5. Disposable syringe (without needle): MDSS03S, Terumo, China.
6. Dextran sulfate sodium: 36-50 kDa, 160100, MP Biomedicals, Solon, U.S.A.
7. Diethyl ether: 60297, Honeywell, MI, U.S.A.
8. Dulbecco's phosphate buffered saline: D5652, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
9. Eppendorf: MCT-150-C, AXYGEN, China.
10. Ethanol: 64-17-5, J.T. Baker, Malaysia.
11. Foxp3/Transcription factor staining buffer set: 00-5523-00, eBioscience, San Diego, U.S.A.
12. Hematoxylin solution acc. to GILL: 105175, MERCK, Darmstadt, Germany.
13. Hexane: 110-54-3 (含 methylcyclopentane, 96-37-7), J.T. Baker, U.S.A.
14. Hypodermic needles: nipro 26 g x 1/2", Nipro syringe, Idonesia.
15. Isopropanol: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
16. IC fixation buffer: 00-8222-49, eBioscience, San Diego, U.S.A.
17. Lithium chloride (LiCl): L7026, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.
18. Polystyrene round-bottom tube (5 mL): 352052, FALCON, Mexico.
19. Phosphate buffered saline: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
20. Permeabilization buffer (10X): 00-8333-56, eBioscience, San Diego, U.S.A.
21. RBC lysis buffer (10X): 420301, Biolegend, San Diego, U.S.A.
22. Sodium acetate: 567422, Merk KGaA, Darmstadt, Germany.
23. Sodium azide (NaN_3): S8032, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
24. Sodium heparin (NH) 75 USP Units BLOOD Collection Tubes: BD Vacutainer, U.S.A.

25. Strip tube and caps (0.1 mL): 981103, QIAGEN, Germany.
26. Trizol reagent: 15596-018, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.

三、實驗抗體

1. AlexaFluor®700-conjugated anti-mouse CXC3R1: SA011F11 (clone number), 149021 (catalog number), Biolegend, San Diego, CA, U.S.A.
2. APC-conjugated anti-mouse CCR2: 475301, FAB5538A-100, R&D systems, MN, U.S.A.
3. APC-conjugated anti-mouse CD4: 17-0041-82, eBioscience, San Diego, CA U.S.A.
4. APC-conjugated anti-mouse CD25: 17-0251-81, eBioscience, San Diego, CA, U.S.A.
5. FITC-conjugated anti-mouse CD3: 11-0031-82, eBioscience, San Diego, CA, U.S.A.
6. FITC-conjugated anti-mouse Ly6G: 127606, Biolegend, San Diego, CA, U.S.A.
7. Pacific blue-conjugated anti-mouse CD11b: M1/70, 101224, Biolegend, San Diego, CA, U.S.A.
8. Pacific blue-conjugated anti-mouse CD4: RM4-5, 100534, Biolegend, San Diego, CA, U.S.A.
9. Pacific blue-conjugated anti-mouse CD19: 115523, Biolegend, San Diego, CA, U.S.A.
10. PE-conjugated anti-mouse CD8: 12-0081-82, eBioscience, San Diego, CA, U.S.A.
11. PE-conjugated anti-mouse Foxp3: 126404, Biolegend, San Diego, CA, U.S.A.
12. PE-conjugated anti-mouse Ly6C: HK1.4, 128008, Biolegend, San Diego, CA, U.S.A.
13. PerCP-conjugated anti-mouse CD45: 30-F11, 103130, Biolegend, San Diego, CA, U.S.A.

四、實驗分析套組

1. Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X): K0222, Thermo, Lithuania.
2. RevertAid first strand cDNA Synthesis Kit: K1622, Thermo, Lithuania.
3. Mouse haptoglobin ELISA: E-90HPT, Immunology Consultants Laboratory, OR, U.S.A.
4. Mouse IgG ELISA: E-90G, Immunology Consultants Laboratory, OR, U.S.A.

五、實驗設備

1. 食物調理機: Vita mix VM0101C, U.S.A.
2. 減壓真空濃縮機: EYELA, Tokyo, Japan.
3. 乾浴機: Thermolyne, U.S.A.
4. 冷卻循環機: EYELA CCA-11111, Japan.
5. 單槽式雙頻超音波萃取機: ES-600N, Taiwan Supercritical Technology Co., Ltd., Changhua County, Taiwan.
6. 真空冷凍乾燥機: SCANVAC, 丹麥 (ScanSpeed & CoolSafe).
7. 桌上型冷凍離心機: 75004270, Thermo, Carlsbad, CA, U.S.A.
8. 全光譜吸收光判讀儀: SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Germany.
9. 流式細胞儀: Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer, Thermo, Carlsbad, CA, U.S.A.
10. -30 度低溫冷凍櫃: MDF-U5312, Panasonic, Osaka, Japan.
11. -80 度超低溫冷凍櫃: NV-94839C, NuAire, Plymouth, MN, U.S.A.
12. 超純水機: SmartPak® DQ3 Purification Pack, MERCK, Darmstadt, Germany.
13. 酸鹼度計: FiveEasy F20, Columbus, Ohio, U.S.A.
14. qPCR machine: Rotor-Gene Q, QIAGEN, Hilden, Germany.
15. 微量手持式均質儀 (電池型): HH-13L, ChromTech, Great Tide Instrument Co., Ltd., Taipei, Taiwan.
16. 四位數天平: PA224C, OHAUS, U.S.A.
17. 精密 4 度冷藏櫃: CR-520, Chih Chin H&W Enterprise Co., Ltd., Taiwan.
18. 掃片機: Basler acA1920-40uc, BASLER, Ahrensburg, Germany.

第二節 小根蒜萃取物製備

取新鮮小根蒜 (花蓮農改場提供) 將之水洗把外層髒污去除且不傷其組織，於室溫陰乾一天後，使用食物調理機進行攪打破碎，分別用水 (distillation-distillation H_2O, ddH_2O) 與 50%乙醇 (ethanol, EtOH) 萃取。將小根蒜與溶劑以 1:10 (w:v) 比例置玻璃容器，於單槽式雙頻超音波萃取機 (ES-600N)，進行超音波輔助萃取 (ultrasonic-assisted extraction) (常溫、低頻 40 kHZ 和 20 分鐘)，再以布式漏斗 (whatman No.1 濾紙) 抽氣過濾後收集上清濾液，進行減壓濃縮 (EYELA, Tokyo, Japan) 移除酒精，得到之萃取液存放-80°C 隔夜，以冷凍乾燥機 (SCANVAC, 丹麥 (ScanSpeed & CoolSafe)) 冷凍乾燥，即得小根蒜水 (aqueous extract, AE) 與 50%乙醇萃取物 (50% hydro-ethanolic extract, HEE)。試驗樣品以水或酒精溶解萃取物，配製適當濃度的 stock 溶液置於-20°C 供日後實驗分析用。

參考或修飾 Piechowiak 等人 (2020) 之方法，產率計算如下列方程式所示：產率 (%) =萃取物重量(g) ÷小根蒜鱗莖重量(g) x 100%。

第三節 營養組成與分析

一、營養成分分析

新鮮小根蒜鱗莖樣品進行測定。其所含水分含量，依據國家標準食品中水分之檢驗方法 (CNS 5033, 1984) 所測得，檢驗範圍為 0.01~99.99%；粗灰分，依據國家標準食品中粗灰分之檢驗方法 (CNS 5034, 1984) 所測得，檢驗範圍為 0.05~20%；粗脂肪，依據國家標準食品中粗脂肪之檢驗方法-Soxhlet 法 (CNS 5036, 1984) 所測得，檢驗範圍為 0.01~99.99%；粗蛋白質，依據國家標準食品中粗蛋白質之檢驗方法 (CNS 5035, 1986) 所測得，檢驗範圍為 0.03~99.9 g/100 g；粗纖維，依據國家標準食品中粗纖維之檢驗方法 (CNS 5037, 1997) 所測得；維生素 C，依據 AOAC 984.26 (1984) 之方法所測得，檢驗範圍為 4~100 mg/100 g。糖類含量，包括：總糖、葡萄糖、蔗糖、果糖、麥芽糖、乳糖、半乳糖，皆由衛生福利部公開建議方法 (104.12.12) 所檢驗，檢驗範圍為 0.05~80%。熱量及總碳水化合物是由計算而得。以上是委託食品工業發展研究所 (Food industry research and development institute) (新竹，台灣) 所檢測。

二、氣相層析質譜儀 (gas chromatography–mass spectrometry, GC-MS) 定量揮發性組成分

取新鮮小根蒜鱗莖樣品 10 克，切開壓碎後快速放入樣品瓶 (headspace bottle)，以頂空固相微萃取-氣相層析質譜法 (HS-SPME-GC-MS) (7890A/5975 GC-MS, Agilent) 分析其揮發性組成分。SPME (solid phase microextraction) 萃取纖維 (50/30 mm DVB/CAR/PDMS, Supelco)。管柱 (HP-5MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Agilent)，進樣口溫度為 240℃，解吸時間 5 min，載氣高純氦氣 (He)，流量 1 mL/min，不分流。升溫條件：初溫 40℃，保持 2 min，然後以 3℃/min 升至 210℃，保持 1 min，再以 10℃/min 升至 280℃，保持 1min。質譜條件：採用電子撞擊游離方式 (electronic ionization, EI)、四極桿溫度 150℃，傳輸線溫度 250℃，離子源溫度 230℃，電子能量 70 eV，質量範圍為 30~500 m/z，以掃描模式進行分析。樣品中加入內標準品十二烷 (dodecane) 一起分析，使用 Nist14 資料庫比對各分離的組成分並以 dodecane 計算相對含量 (ppb)。以上係委託食品工業發展研究

所 (新竹，台灣) 進行氣相層析質譜儀分析，取得報告編號為 109SA01445。

三、液相層析質譜儀 (liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS) 鑑定組成分

將小根蒜 AE 及 HEE 樣品經過濾後導入超效液相層析儀，藉由前置管柱 (ACQUITY UPLC® HSS T3 1.8 μm) 及分離管柱 (ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 μm) 進行層析。流動相系統：Solvent Name A: H_2O+0.1% Formic acid 與 Solvent Name B: Acetonitrile+0.1% Formic acid；流動沖提梯度 (表 3-1)。

於 ESI-MS (Vion IMS QTof) 中液體樣品以 Positive Ion ESI 電離模式，於 Source temperature: 120°C; Desolvation temperature: 400°C; Cone gas: 30 L/h; Desolvation gas: 950 L/h 和 Capillary voltage: 3.00 kV 條件下氣化，離子化的樣品進入四極棒質量分析器 (quadrupole) 及飛行時間分析器 (time-of-flight) 進行質量分析，並透過離子測量器放大訊號。使用 Waters traditional medicine library 數據庫與 MS 所得到的資訊經演算後得到檢體中含有之成分。以上係委託臺北醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系劉俊仁教授進行分析。

表 3-2、流動沖提梯度條件

Table 3-2. The gradient elution profile.

Time (min)	Flow Rate	Composition A (%)	Composition B (%)	Curve
0.00	0.400	90.0	10.0	Initial
3.00	0.400	40.0	60.0	6
10.00	0.400	5.0	95.0	6
22.00	0.400	5.0	95.0	6
23.00	0.400	90.0	10.0	6
25.00	0.400	90.0	10.0	6

第四節 動物實驗

一、動物飼養與實驗流程

(一) 動物飼養

雄性 C57BL/6J 小鼠，購自國家實驗動物中心 (台北，台灣)，飼養於國立台灣師範大學生命科學系動物房之獨立通氣飼育籠 (individually ventilated cage)，飼養期間皆自由飲水與飲食 chow diet (LabDiet, 5053)，環境溫濕度控制在 19-23℃與 50-65%，採各 12 小時光暗循環 (光照期 07:00 a.m.-19:00 p.m；黑暗期 19:00 p.m-隔日 07:00 a.m.)，所有動物實驗操作皆經 IACUC 書核通過。

(二) 實驗流程

1. 實驗一

探討預先給予小根蒜萃取物對於 DSS 誘導腸炎急性期之影響，將 20 隻 5 週齡小鼠根據體重隨機分為 4 個組別，為正常控制組 (normal control, NC 組)、DSS 控制組 (DSS control, DC 組)、DSS+小根蒜水萃取物組 (200 mg AE/kg B.W., DW 組) 與 DSS+小根蒜酒水萃取物組 (200 mg HEE/kg B.W., DHE 組)。適應二週後，於七週齡 (Day 1) 開始進行實驗，NC 與 DC 組每天管餵純水溶液 (ddH_2O)；DW 與 DHE 組預先每天管餵試驗樣品 (小根蒜萃取物溶於水)，管餵體積為 10 mL/kg B.W./day，為期一週。八週齡時，開始給予 DSS 引致腸炎，將 DC、DW 與 DHE 組的飲水更換為含有 3% DSS (w/v) 之無菌 (sterile reverse osmosis, RO) 水給予，來誘導腸道發炎 (Day 8)，並持續管餵且在誘導一週後 (Day 15) 進行犧牲 (圖 3-3)。

2. 實驗二

探討預先給予小根蒜 HEE 對於 DSS 誘導腸炎急性期之影響，將 40 隻 4 週齡小鼠根據體重隨機分為 4 個組別，為正常控制組 (normal control, NC 組)、DSS 控制組 (DSS control, DC 組)、DSS+低劑量小根蒜酒水萃取物組 (250 mg HEE/kg B.W., DL 組) 與 DSS+高劑量小根蒜酒水

萃取物組 (500 mg HEE/kg B.W., DH 組)。適應三週後，於七週齡 (Day 1) 開始進行實驗，NC 與 DC 組每天管餵含有 50%乙醇水溶液；DL 與 DH 組預先每天管餵試驗樣品 (小根蒜萃取物溶於 50%乙醇溶液)，管餵體積為 10 mL/kg B.W./day，為期一週。八週齡時，開始給予 DSS 引致腸炎，將 DC、DL 與 DH 組的飲水更換為含有 3% DSS (w/v) 之無菌 RO 水給予，來誘導腸道發炎 (Day 8)，並持續管餵且在誘導一週後 (Day 15) 進行犧牲 (圖 3-4)。

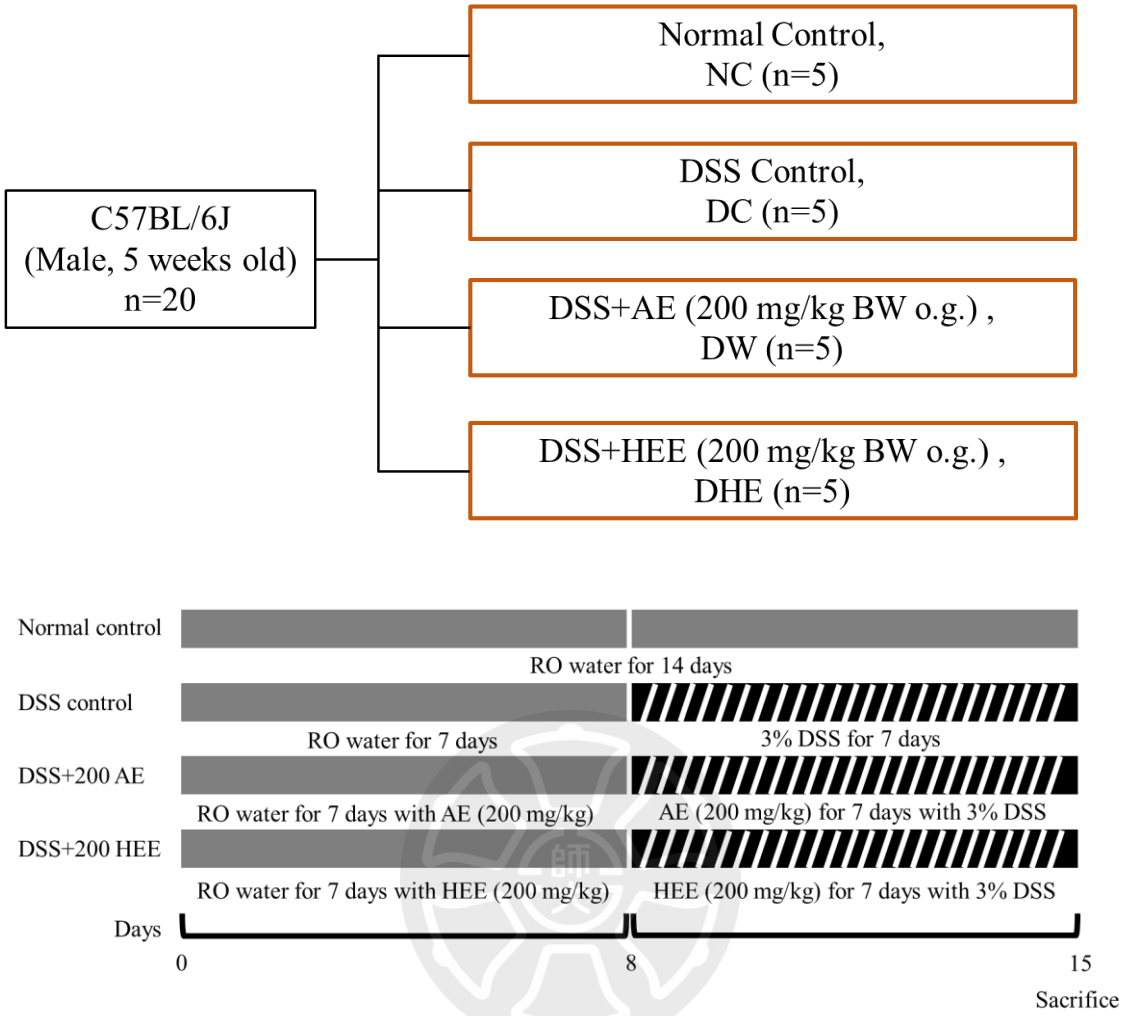


圖 3-3、實驗一流程圖

Figure 3-3. Schematic diagram of experimental 1 design.

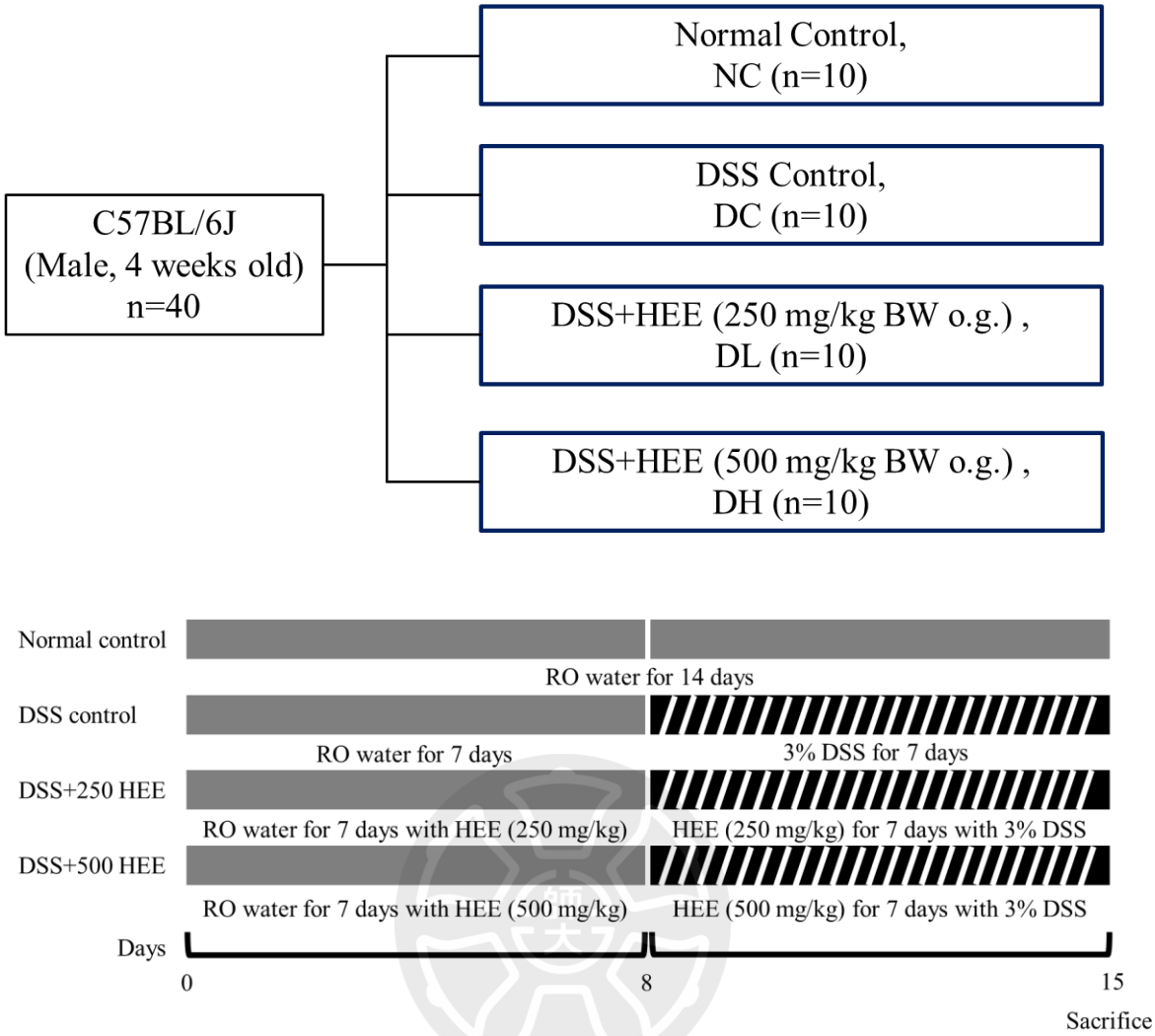


圖 3-4、實驗二流程圖

Figure 3-4. Schematic diagram of experimental 2 design.

二、飼料成分

Chow diet (LabDiet, 5053) 飼料成分、營養素組成與熱量百分比 (表 3-3)。

表 3-3、市售 Chow diet 組成分

Table 3-3. Composition of commercial chow diet.

PicoLab® Rodent Diet 20 5053*

DESCRIPTION

PicoLab® Rodent Diet 20 is a 20% protein diet formulated for rat, hamster and mouse breeding colonies. This diet is formulated using the unique and innovative concept of Constant Nutrition®, paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies. Irradiation gives reliable microbial control and eliminates the need for autoclaving. Irradiation treatment and special 3-ply packaging provide virtually bacteria-free dietary control.

Features and Benefits

- Constant Nutrition® formula helps minimize nutritional variables
- Formulated with 20% protein
- High quality animal protein added to create a superior balance of amino acids for optimum performance
- Recommended for rat breeding colonies and mice not requiring a higher energy diet
- Precision processing and selection of highest quality ingredients assures Constant Nutrition® quality
- Irradiation gives reliable microbial control and eliminates the need for autoclaving

Product Forms Available

- Oval pellet, 10 mm x 16 mm x 25 mm length (3/8"x5/8"x1")
- Meal (ground pellets), special order

Other Versions Available

- 5061 Pico-Vac® Lab Rodent Diet

GUARANTEED ANALYSIS

Crude protein not less than	20.0%
Crude fat not less than	4.5%
Crude fiber not more than	6.0%
Ash not more than	7.0%

INGREDIENTS

Ground corn, dehulled soybean meal, wheat middlings, ground wheat, fish meal, cane molasses, wheat germ, dried beet pulp, brewers dried yeast, dehydrated alfalfa meal, ground oats, soybean oil, dried whey, calcium carbonate, salt, DL-methionine, menadione dimethylpyrimidinol bisulfite (vitamin K), choline chloride, pyridoxine hydrochloride, cholecalciferol, vitamin A acetate, dl-alpha tocopheryl acetate, biotin, thiamin mononitrate, folic acid, vitamin B_{12} supplement, nicotinic acid, riboflavin, calcium pantothenate, manganous oxide, zinc oxide, ferrous carbonate, copper sulfate, zinc sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate, sodium selenite.

FEEDING DIRECTIONS

Feed ad libitum to rodents. Plenty of fresh, clean water should be available to the animals at all times.

Rats- All rats will eat varying amounts of feed depending on their genetic origin. Larger strains will eat up to 30 grams per day. Smaller strains will eat up to 15 grams per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days supply of feed at one time.

Mice-Adult mice will eat up to 5 grams of pelleted ration daily. Some of the larger strains may eat as much as 8 grams per day per animal. Feed should be available on a free choice basis in wire feeders above the floor of the cage.

Hamsters-Adults will eat up to 14 grams per day.

12/11/09

CHEMICAL COMPOSITION[1]

Nutrients[2]

Protein, %	**20.0**
Arginine, %	1.22
Cystine, %	0.28
Glycine, %	0.96
Histidine, %	0.50
Isoleucine, %	0.97
Leucine, %	1.56
Lysine, %	1.16
Methionine, %	0.70
Phenylalanine, %	0.90
Tyrosine, %	0.59
Threonine, %	0.77
Tryptophan, %	0.26
Valine, %	1.00
Serine, %	1.03
Aspartic Acid, %	2.19
Glutamic Acid, %	4.34
Alanine, %	1.15
Proline, %	1.47
Taurine, %	0.02
Fat (ether extract), %	**5.0**
Fat (acid hydrolysis), %	**5.6**
Cholesterol, ppm	141
Linoleic Acid, %	2.19
Linolenic Acid, %	0.26
Arachidonic Acid, %	<0.01
Omega-3 Fatty Acids, %	0.33
Total Saturated Fatty Acids, %	0.93
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	0.99
Fiber (Crude), %	**4.7**
Neutral Detergent Fiber[3], %	16.4
Acid Detergent Fiber[4], %	6.0
Nitrogen-Free Extract (by difference), %	**52.9**
Starch, %	33.9
Glucose, %	0.19
Fructose, %	0.23
Sucrose, %	3.18
Lactose, %	1.34
Total Digestible Nutrients, %	**76.2**
Gross Energy, kcal/gm	**4.07**
Physiological Fuel Value[5], kcal/gm	**3.41**
Metabolizable Energy, kcal/gm	**3.07**

Minerals

Ash, %	**6.1**
Calcium, %	0.81
Phosphorus, %	0.63
Phosphorus (non-phytate), %	0.33
Potassium, %	1.07
Magnesium, %	0.22
Sulfur, %	0.34
Sodium, %	0.30
Chlorine, %	0.51
Fluorine, ppm	10
Iron, ppm	220
Zinc, ppm	87
Manganese, ppm	85
Copper, ppm	13
Cobalt, ppm	0.71
Iodine, ppm	0.97
Chromium, ppm	0.81
Selenium, ppm	0.30

Vitamins

Carotene, ppm	1.5
Vitamin K (as menadione), ppm	3.3
Thiamin Hydrochloride, ppm	17
Riboflavin, ppm	8.0
Niacin, ppm	90
Pantothenic Acid, ppm	17
Choline Chloride, ppm	2000
Folic Acid, ppm	3.0
Pyridoxine, ppm	9.6
Biotin, ppm	0.30
B_{12}, mcg/kg	51
Vitamin A, IU/gm	15
Vitamin D_3 (added), IU/gm	2.2
Vitamin E, IU/kg	99
Ascorbic Acid, mg/gm	—

Calories provided by:

Protein, %	24.651
Fat (ether extract), %	13.205
Carbohydrates, %	62.144

*Product Code

1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.
2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.
3. NDF = approximately cellulose, hemi-cellulose and lignin.
4. ADF = approximately cellulose and lignin.
5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.

LabDiet
www.labdiet.com

三、檢體採集與處理

檢體項目包括：血液、脾臟 (spleen)、大腸 (colon) 和大腸沖洗液 (colon lavage fluid, CLF)，並進行分析相關生物指標，後續觀察小根蒜萃取物對於 DSS 誘導之急性期腸炎時，是否有達預防效果。

(一) 全血與血漿 (whole blood and plasma)

使用乙醚 (diethyl ether) 麻醉小鼠後進行犧牲，確認四肢已無痛覺反射後，將之固定於解剖版上。藉由指腹輕摸心跳來確定心臟位置，再以 1 mL 無菌針管進行心臟採血，收集血液於含有抗凝血劑 (heparin) 之 4 mL 採血管中，並立即混合均勻以避免凝固結塊。將部分血液以螢光抗體染色後藉由流式細胞儀 (flow cytometer) 進行後續分析，剩餘血液於 3000 xg、10 min 和 4°C條件下離心，以分離出血漿。取出上層的血漿放置-80°C 冷凍保存，供日後做 ELISA 分析用。

(二) 脾臟 (spleen)

使用鑷子輕夾取小鼠肚皮並剪開腹腔，將脾臟取出後，修剪其周邊組織並秤重紀錄，先剪取一小段的鈍端部分，浸泡於 4°C Hanks' balanced salt solution 中，待後續上 flow cytometer 分析用，將剩餘脾臟的尖端及中間段部分放入 eppendorf，並移至液態氮急速冷凍後，保存於-80°C，供日後做 Quantitative PCR (qPCR) 分析用。

(三) 大腸及大腸沖洗液 (colon and CLF)

於已剪開的小鼠腹腔中，先將胃及附近的器官往上撥，剪取大腸至盲腸肛門口，再修剪肛門口的雜毛以及其餘周邊組織，修剪乾淨後測量其長度，再將大腸與盲腸剪開分離後記錄大腸重量，並計算大腸重量與長度的比值，以評估每公分大腸之重量。將大腸末端 (約 1 cm) 處輕輕剪取，浸泡於 4°C福馬林溶液中，並暫存 4°C冰箱，供做組織切片觀察。剪開剩餘的大腸組織在裝有 2 mL phosphate buffered saline (PBS) 之 dish 來回沖洗數次，收集 CLF 後將剩餘的大腸組織放入 eppendorf 中，移至-80°C冷凍保存，供後續做 ELISA 與 qPCR 分析用。

四、分析方法與項目

(一) 體重與飲水的變化量

於飼養過程直到犧牲，分別記錄小鼠每日體重與每籠的飲水量，來觀察體重與飲水量的變化情形。以 DSS 誘導腸炎第 0 天的體重 (Day 8) 作為原始體重，並記錄每日之體重測量值，計算方式：[(測量體重-原始體重)/原始體重] x 100。

(二) 疾病活動指數

參考並修飾 Murthy 等人 (1993) 之研究，使用疾病活動指數表 (表 3-4)，來評估小鼠誘導腸炎後所產生的狀況與其嚴重程度。觀察紀錄期間為自給予 DSS 誘導腸炎至犧牲，每日皆進行肛門外觀與糞便質地的評估。各別從小鼠的體重變化、糞便的黏稠程度與直腸出血狀況，來給予相對應分數 (表 3-5)。詳細方式如下：體重以 DSS 誘導第 0 天作為原始體重 (Day 8) 計算每日體重下降程度，分別給予 1-4 分；糞便由軟黏至稀糊，分別給予 1-3 分；直腸為少量出血至嚴重出血，分別給予 1-3 分。最後的加總為疾病活動指數 (disease activity index, DAI)，分數越高其腸炎的嚴重程度越高，總分共 10 分。

表 3-4、疾病活動指數之評分標準

Table 3-4. Criteria for disease activity index (DAI).

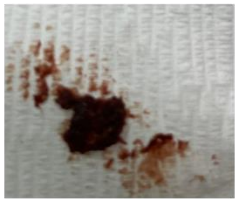
Score	Body weight loss (%)	Stool consistency	Rectal bleeding
0	0-1	Normal	Negative
1	1-5	Loose stool	Positive
2	5-10	Loose stool	Positive
3	10-15	Diarrhea	Gross bleeding
4	>15	-	-

表 3-5、糞便黏稠度與直腸出血之評估表

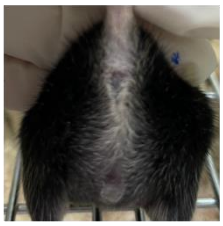
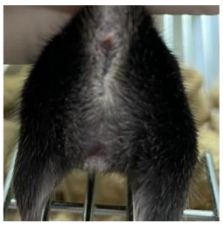
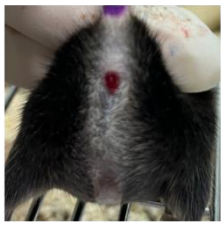
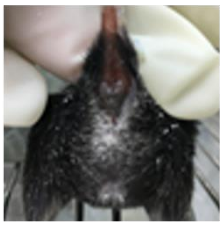
Table 3-5. Stool consistency and rectal bleeding assessment.

(A) Stool consistency; (B) Rectal bleeding.

(A)

分數	0	1	2	3
糞便黏稠度	一般	軟黏	濕軟	稀糊
外觀				

(B)

分數	0	1	2	3
直腸出血程度	正常	少量出血	中度出血	嚴重出血
外觀				

(三) 全血

1. 先天性免疫細胞與淋巴球次群的表現比率

小鼠血液個別取出 50 μL 之全血置於流式細胞儀專用康氏管中 (5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube)，再加入 50 μL staining buffer (含 0.5% BSA 和 0.09% NaN_3 之 PBS, PH7.4)，並與單核球、嗜中性白血球和淋巴球之外染抗體 (表 3-7) 混勻後，置 4℃避光反應 30 分鐘，以標定細胞膜表面蛋白。接著加入 2 mL RBC lysis buffer 混勻，並再次加入 1 mL RBC lysis buffer，置室溫下避光反應 13 分鐘以打破紅血球，再進行離心 (1500 rpm、5 min 和 4℃) 並吸除上清液。加入 2 mL staining buffer 使離心後之沉澱物 (細胞) 懸浮，以 1500 rpm、5 min 和 4℃條件下離心，重複上述加入 staining buffer 和離心的步驟後，吸除上清液，最後加入 0.5 mL staining buffer 再次將沉澱物 (細胞) 懸浮，置 4℃避光保存，以流式細胞儀做後續分析。

置流式細胞儀 (Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer, Thermo, Carlsbad, CA, U.S.A)，使用前向角散射 (Forward scatter, FSC) 和側向角散射 (Side scatter, SSC) 分別分析細胞大小與顆粒性，以圈選 (gating) 出血液白血球次群 ($CD45^+$)，測定先天性免疫細胞次群，如：嗜中性白血球 ($CD45^+ CD11b^+ Ly6G^+$)、發炎性單核球 ($CD45^+ CD11b^+ Ly6C^{hi} CCR2^+$)、抗發炎性單核球 ($CD45^+ CD11b^+ Ly6C^{lo} CX3CR1^+$) (圖 3-5)；以及淋巴球 B 細胞 ($CD45^+ CD19^+$)、Th 細胞 ($CD45^+ CD3^+ CD4^+$) 與 Tc 細胞 ($CD45^+ CD3^+ CD8^+$) 於 $CD45^+$之表現比率 (圖 3-6)。

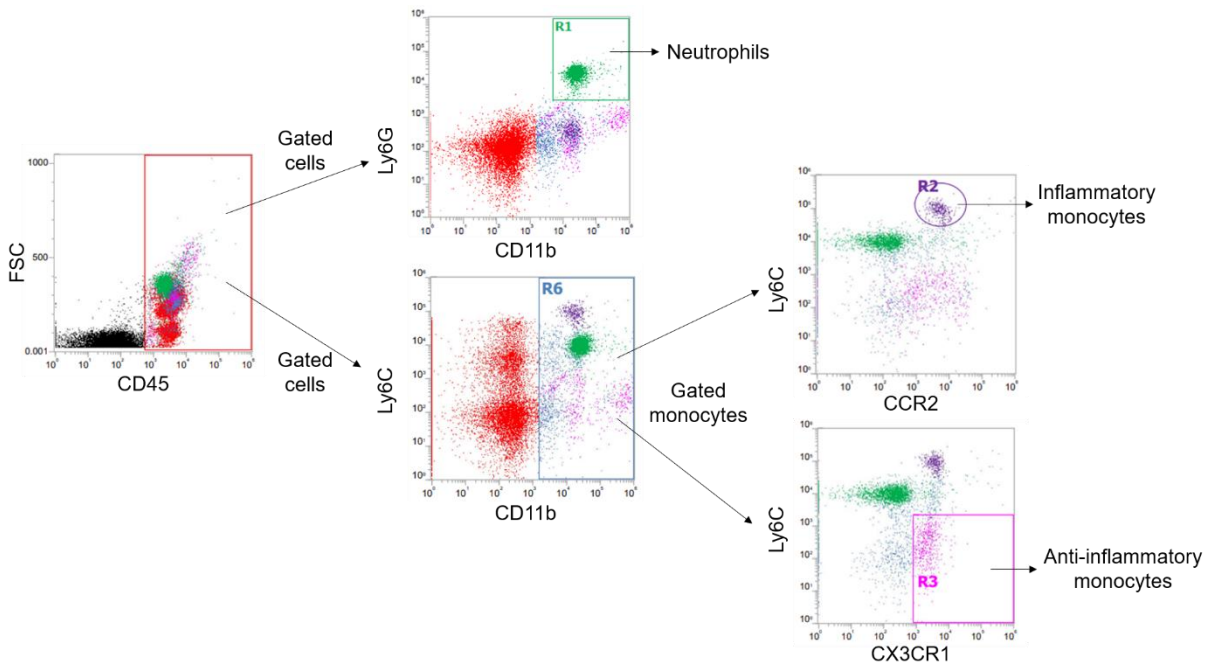


圖 3-5、血液先天性免疫細胞之流式細胞儀圈選流程圖

Figure 3-5. Gated for innate immune cell analysis and representative flow cytometry data for neutrophil and monocytes in the blood.

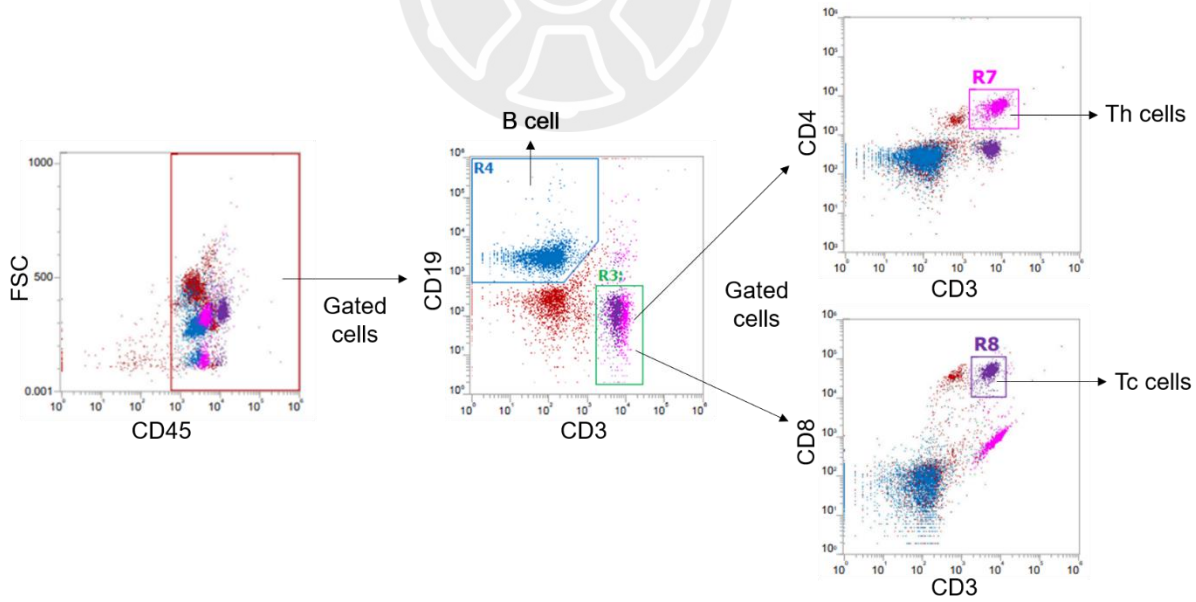


圖 3-6、血液淋巴細胞之流式細胞儀圈選流程圖

Figure 3-6. Representative flow cytometry data for Th, Tc and B cells in the blood.

2. Treg 的表現比率

小鼠血液個別取出 100 μL 之全血置於流式細胞儀專用康氏管中 (5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube)，並與 Treg 細胞之外染抗體 (表 3-7) 混勻後，置 4℃下避光反應 30 分鐘，以標定細胞膜表面蛋白。接著加入 2 mL RBC lysis buffer 混勻，並再次加入 1 mL RBC lysis buffer，於室溫下避光反應 13 分鐘以打破紅血球，再進行離心 (1500 rpm、5 min 和 4℃) 並吸除上清液。加入 2 mL staining buffer 使離心後之沉澱物 (細胞) 懸浮，以 1500 rpm、5 min 和 4℃條件下離心，重複上述加入 staining buffer 和離心的步驟後，吸除上清液。再加入 1 mL 1X Foxp3 Fix/Perm buffer 將沉澱物 (細胞) 懸浮，並於室溫避光反應 50 分鐘，以固定細胞膜。加入 2 mL permeabilization buffer，以 1500 rpm、5min 和 4℃條件下離心，吸除上清液，再次加入 3 mL permeabilization buffer 使沉澱物 (細胞) 懸浮，為將細胞膜穿孔。加入 Treg 細胞內染抗體 (表 3-7) 於室溫避光反應 40 分鐘，以標定細胞核內之轉錄因子。加入 3 mL staining buffer 離心 (1500 rpm、5min 和 4℃) 後，並吸除上清液，最後加入 0.5 mL staining buffer 再次將沉澱物 (細胞) 懸浮，置 4℃避光保存，以流式細胞儀做後續分析。

置流式細胞儀 (Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer, Thermo, Carlsbad, CA, U.S.A)，分析 Treg 細胞 ($CD4^{+}CD25^{+}$ $Foxp3^{+}$) 於 $CD4^{+}$之表現比率 (圖 3-7)。

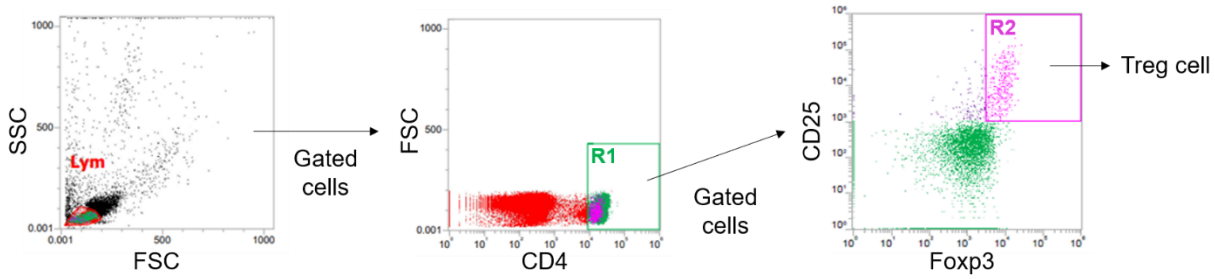


圖 3-7、血液 Treg 細胞之流式細胞儀圈選流程圖

Figure 3-7. Representative flow cytometry data for Treg cell in the blood.

(四) 血漿發炎指標血紅素結合蛋白 (haptoglobin)

依照市售 ELISA 試劑組 (E-90HPT, Immunology Consultants Laboratory, OR, U.S.A.) 分析 haptoglobin 濃度。將套組之標準品與血漿適當稀釋後，各取出 100 μL 到已經有抗體塗層之 96 孔盤中，以透明封膜覆蓋於室溫反應約 15 分鐘，移除溶液後，以 1X wash buffer 重複清洗共四次，再加入 1X HRP conjugate (100 μL/well) 並以透明封膜覆蓋，於室溫避光反應約 15 分鐘，再次以 1X wash buffer 重複清洗共四次，清洗後加入 TMB substrate solution (100 μL/well) 於室溫避光反應 10 分鐘，最後在每孔加入 100 μL stop solution，於 30 分鐘內使用全光譜吸收光判讀儀 (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Germany) 測定吸光值 450 nm，並推算稀釋倍數以得到血漿 haptoglobin 濃度 (μg/ml)。

(五) 脾臟

1. 淋巴球次群的表現比率

將小鼠脾臟 (約三分一體積)，放置於 40 μm cell strainer 上，加入 2 mL staining buffer，同時以不帶針的針筒 (3 c.c) 推桿磨碎並過濾在 50 mL 離心管中，即收集取得脾臟細胞液。進行離心 (1500 rpm、5 min 和 4°C)，吸除上清液，再將沉澱物 (細胞) 懸浮並加入 3 mL RBC lysis buffer 混勻，放置室溫 5 分鐘。再次以 1500 rpm、5min 和 4°C條件下離心，吸除上清液，將沉澱物懸浮後加入 1 mL staining buffer 回融，從中取出 100 μL 於康氏管中並加入淋巴球的外染抗體，混勻之 (表 3-7)，置 4°C避光反應 30 分鐘，以標定細胞膜表面蛋白。加入 2 mL staining buffer 以 1500 rpm、5 min 和 4°C條件下離心，重複上述加入 staining buffer 和離心的步驟後，吸除上清液，最後加入 0.5 mL staining buffer 將沉澱物再次懸浮，置 4°C避光保存，以流式細胞儀做後續分析。

置流式細胞儀 (Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer, Thermo, Carlsbad, CA, U.S.A)，測定脾臟中 B 細胞 ($CD19^+$)，以及 Th 細胞 ($CD3^+$ $CD4^+$) 與 Tc 細胞 ($CD3^+$ $CD8^+$) 於 $CD3^+$之表現比率 (圖 3-8)。

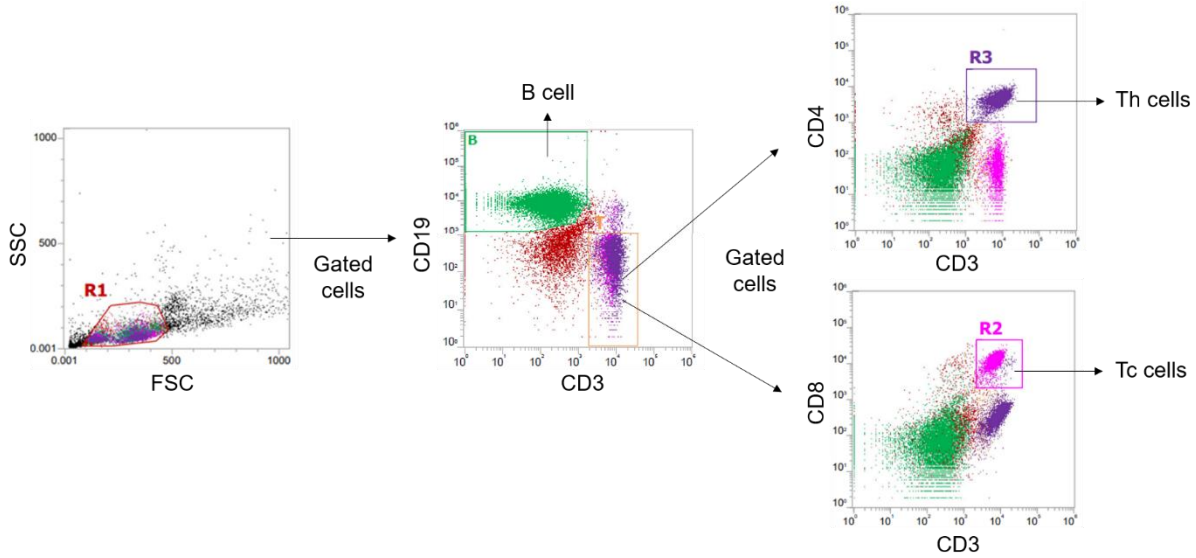


圖 3-8、脾臟淋巴細胞之流式細胞儀圈選流程圖

Figure 3-8. Representative flow cytometry data for Th, Tc and B cells in the spleen.

2. T 細胞次群相關基因之 mRNA 表現量

自 GenBank database (NCBI) 中找出特定基因序列並設計引子 (primers)，並以即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, Q-PCR) 分析脾臟中的 IL-17A、TGF-β1、ROR-γt、Foxp3、IL-10 及 GAPDH 之 mRNA (messenger RNA) 表現量。

(1) 總 RNA 抽取

取脾臟組織 (約 25 mg) 放入已滅菌的 eppendrof 中，加入 1 mL TRIzol 並以均質機，進行均質並磨碎組織，再加入 0.2 mL 氯仿 (chloroform) 搖晃 10-15 秒，並於室溫靜置 5 分鐘後進行離心 (12000 xg、15 min 和 4°C)。取出上清液 0.5 mL 裝入新的 eppendrof 中，並加入 0.5 mL 異丙醇 (isopropanol)，稍搖晃後於室溫靜置 10 分鐘，沉澱出 RNA 後進行離心 (12000 xg、10 min 和 4°C) 並吸除上清液。用 1 mL 75% ethanol 洗滌，並離心 (7500 xg、5 min 和 4˚C)，吸除上清液，以抽真空機加速酒精揮發，待完全揮發使之變透明狀，再於室溫以 50 μL DEPC-water 回溶，即得總 RNA。以分光光度計測定 RNA 溶液吸光值，同時以 OD260/OD280 定量 RNA 濃度與判定 RNA 品質，若比值接近 2.0 表示 RNA 純度越高。

(2) 總 RNA 反轉錄為 complementary DNA (cDNA)

使用反轉錄試劑套組 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit。取出新的 microtube 中加入 4 μg total RNA，並以 DEPC-water 將總體積補至 11 μL。各別加入 1 μL Oligo (dT) primer 放入聚合酶連鎖反應器 (Rotor-Gene Q, QIAGEN, Hilden, Germany)。取出再加入 4 μL reaction buffer、2 μL dNTP mix、1 μL RNase inhibitor/ribolock R1 及 1 μL MMLV/revert Aid RT 後，再次放入聚合酶連鎖反應器 (Rotor-Gene Q, QIAGEN, Hilden, Germany)，最後，將 mRNA 反轉錄所得之 cDNA 保存於-20℃中。

(3) 即時定量聚合酶連鎖反應 (Q-PCR)

將適當稀釋之 cDNA (10 ng/μL) 取出 5 μL、目標基因的前置引子 (forward primer)、反置引子 (reverse primer) (表 3-9)、SYBR master mix 與 DEPC-water 在 PCR stripping tube 中混勻，總反應體積為 25 μL 進行反應 (表 3-10)，以即時核酸定量系統分析目標 mRNA 表現量，反應條件 (表 3-11)。最後，以 no-template control 和 melting curve analysis 確認即時定量聚合酶連鎖反應之專一性，使用 GAPDH 作為參考基因 (reference gene)，計算之 mRNA 表現量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (2-ΔΔCycle threshold) 表示，並做後續數據統計分析 (ΔCt 表示測試基因與 GAPDH 之間閾值循環的差異，ΔΔCt 表示腸炎組和正常對照組之間的 ΔCt)。

(六) 大腸

1. 長度與重量

將大腸組織自然平攤，由近心端之迴盲瓣至遠心端之直腸末端長度 (cm) 測量記錄，且秤量大腸重量 (g)。再將大腸組織的重量除上長度，以計算出重量長度比 (g/cm)。

2. 病理組織切片

委託於國立台灣大學實驗動物中心進行組織切片。先將浸泡於含 4% 福馬林 (paraformaldehyde) 溶液中固定的腸組織取出進行石蠟包埋，再將組織切成 3 μm 之薄片平貼於載玻片上。實驗以蘇木精-伊紅 (hematoxylin and eosin, H&E) 染色，詳細步驟如下：將組織切片分別進行兩次 30 分鐘二甲苯 (xylene) 與 10 分鐘 100% ethanol 浸泡，以及再分別各一次 5 分鐘 90% ethanol、1 分鐘 70% ethanol、1 分鐘 50% ethanol、1 分鐘 30% ethanol 與 5 分鐘 PBS 之浸入後，再將 200 μL hematoxylin 滴入組織待 5 分鐘，並以流水洗去染劑，浸泡於 PBS 中 5 分鐘後，取出組織並滴上 400 μL Eosin 待 30 秒後，再次以流水洗去染劑並浸泡於 PBS 中 5 分鐘，隨後浸入各兩次之 2 分鐘 100% ethanol 與 10 分鐘 xylene 使組織脫水，最後蓋上玻片使用顯微鏡觀察。參考 Erben 等人 (2014) 予以修飾 (Erben et al., 2014; Liu et al., 2018) 之大腸組織發炎評分指標，評分項目根據上皮細胞損傷缺失、隱窩耗竭和免疫細胞浸潤程度與範圍 (表 3-8)，並由三人進行評分取平均值作為實驗數據，分數越高表示其損傷程度越嚴重，總分共 10 分。

3. 促發炎基因及黏膜屏障相關保護基因之 mRNA 表現量

自 GenBank database (NCBI) 中找出特定基因序列並設計引子 (primers)，並以即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, Q-PCR) 分析大腸組織中的 CCL2、CXCL1、TNF-α、Tff3、ZO-1、Muc2 及 GAPDH 之 mRNA (messenger RNA) 表現量。

(1) 總 RNA 抽取

參考 Viennois 等人 (2013) 先前研究之淨化步驟去除干擾物質 DSS，以利後續做 PCR 之分析，詳細步驟如下：取大腸組織 (約 30 mg) 放入已滅菌的 eppendrof 中，加入 1 mL TRIzol 並以均質機，進行均質並磨碎組織，再加入 0.2 mL 氯仿 (chloroform) 搖晃 10-15 秒，並於室溫靜置 5 分鐘後進行離心 (12000 xg、15 min 和 4°C)。取出上清液 0.5 mL 裝入新的 eppendrof 中，並加入 0.5 mL 異丙醇 (isopropanol)，稍搖晃後於室溫靜置 10 分鐘，沉澱出 RNA 後進行離心 (12000 xg、10 min 和 4°C) 並吸除上清液。用 200 μL DEPC-water 回溶，並加入 20 μL 8M LiCl，置於冰上 2 小時讓 RNA 沉澱析出 (8 M LiCl 體積為 RNA 體積的 10%) 後，進行離心 (14000 xg、30 min 和 4˚C)，並吸除上清液，再重複此步驟一次。吸除上清液後再次加入 200 μL DEPC-water 回溶，並加入 20 μL 3M sodium acetate 和 400 μL 100% ethanol 後，放於-30˚C 至隔夜以利 RNA 析出 (overnight) (3M sodium acetate 體積為 RNA 體積的 10%；100% ethanol 體積為 RNA 體積的 200%)。最後，進行離心 (14000 xg、30 min 和 4˚C)，並吸除上清液後，用 100 μL 75% ethanol 洗滌，並離心 (14000 xg、10 min 和 4˚C)，吸除上清液，以抽真空機加速酒精揮發，待完全揮發使之變透明狀，再於室溫以 50 μL DEPC-water 回溶，即得總 RNA。以分光光度計測定 RNA 溶液吸光值，同時以 OD260/OD280 定量 RNA 濃度與判定 RNA 品質，若比值接近 2.0 表示 RNA 純度越高。

(2) 總 RNA 反轉錄為 complementary DNA (cDNA)

使用反轉錄試劑套組 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit。取出新的 microtube 中加入 4 μg total RNA，並以 DEPC-water 將總體積補至 11 μL。各別加入 1 μL Oligo (dT) primer 放入聚合酶連鎖反應器 (Rotor-Gene Q, QIAGEN, Hilden, Germany)。取出再加入 4 μL reaction buffer、2 μL dNTP mix、1 μL RNase inhibitor/ribolock R1 及 1 μL MMLV/revert Aid RT 後，再次放入聚合酶連鎖反應器 (Rotor-Gene Q, QIAGEN, Hilden, Germany)，最後，將 mRNA 反轉錄所得之

cDNA 保存於-20℃中。

(3) 即時定量聚合酶連鎖反應 (Q-PCR)

將適當稀釋之 cDNA (10 ng/μL) 取出 5 μL、目標基因的前置引子 (forward primer)、反置引子 (reverse primer) (表 3-9)、SYBR master mix 與 DEPC-water 在 PCR stripping tube 中混勻，總反應體積為 25 μL 進行反應 (表 3-10)，以即時核酸定量系統分析目標 mRNA 表現量，反應條件 (表 3-11)。最後，以 no-template control 和 melting curve analysis 確認即時定量聚合酶連鎖反應之專一性，使用 GAPDH 作為參考基因 (reference gene)，計算之 mRNA 表現量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (2-ΔΔCycle threshold) 表示，並做後續數據統計分析 (ΔCt 表示測試基因與 GAPDH 之間閾值循環的差異，ΔΔCt 表示腸炎組和正常對照組之間的 ΔCt)。

(七) CLF 中的免疫球蛋白

依照市售 ELISA 試劑組 (E-90G, Immunology Consultants Laboratory, OR, U.S.A.) 分析 IgG 之表現量並同時進行蛋白質定量。

首先，將 CLF 解凍後，進行離心 (3000 xg、10 min 和 4℃)，並取出上清液。將套組之標準品與 CLF 適當稀釋後，各取出 100 μL 到已經有抗體塗層之 96 孔盤中，以透明封膜覆蓋於室溫反應約 60 分鐘，移除溶液後，以 1X wash buffer 重複清洗共四次，再加入 1X HRP conjugate (100 μL/well) 並以透明封膜覆蓋，於室溫避光反應約 30 分鐘，再次以 1X wash buffer 重複清洗共四次，清洗後加入 TMB substrate solution (100 μL/well) 於室溫避光反應 10 分鐘，最後在每孔加入 100 μL Stop solution，於 30 分鐘內使用全光譜吸收光判讀儀 (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Germany) 測定吸光值 450 nm。配置不同濃度的 BSA (0、0.025、0.05、0.25 和 0.5 mg/ml) 作為定量之標準曲線，依序將 10 μL 的 BSA 標準品及適當稀釋後的 CLF 加入透明 96 孔盤中，再加入 200 μL 1X Bradford protein assay reagent (Bio-Rad, Richmond, CA, U.S.A)，置室溫待五分鐘後即可，於一小時內使用全光譜吸收光判讀儀 (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Germany) 測定吸光值 595 nm 以定量其蛋白質濃度。

表 3-6、分析項目表

Table 3-6. The biochemical analysis.

Sample	Type	Items	Methods
Blood	Innate immune cells	1. Neutrophil ($CD45^+$ $CD11b^+$ $Ly6G^+$) 2. Inflammatory monocyte ($CD45^+$ $CD11b^+$ $Ly6C^{hi}$ $CCR2^+$) 3. Anti-inflammatory monocyte ($CD45^+$ $CD11b^+$ $Ly6C^{lo}$ $CX3CR1^+$)	Flow cytometry
	Lymphocytes	1. Th cell ($CD45^+$ $CD3^+$ $CD4^+$) 2. Tc cell ($CD45^+$ $CD3^+$ $CD8^+$) 3. B cell ($CD45^+$ $CD19^+$)	
	Treg cell	$CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$	
Plasma	Inflammation evaluation	Haptoglobin	ELISA
Spleen	Lymphocytes	1. Th cell ($CD3^+$ $CD4^+$) 2. Tc cell ($CD3^+$ $CD8^+$) 3. B cell ($CD19^+$)	Flow cytometry
	T cells related gene	IL-17A, ROR-γt, Foxp3, IL-10 and TGF-β1	Real-time PCR
Colon	Inflammatory related gene	CCL2, TNF-α and CXCL1	Real-time PCR
	Mucosal barrier related gene	Muc2, Tff3 and ZO-1	
	Tissue damage	Histopathology	H&E
CLF	Immunoglobin	IgG	ELISA

表 3-7、流式細胞儀所使用之抗體

Table 3-7. Antibodies used for flow cytometry.

Sample	Cell type	Antibody	Catalog number	Vender	Volume (μL)
Blood	Innate immune cells	PerCP-conjugated anti-mouse CD45	103130	Biolegend	1.25
		Pacific blue-conjugated anti-mouse CD11b	101224	Biolegend	2
		FITC-conjugated anti-mouse Ly6G	127606	Biolegend	0.5
		PE-conjugated anti-mouse Ly6C	128008	Biolegend	1.25
		APC-conjugated anti-mouse CCR2	FAB5538A-100	R&D	10
		AlexaFluor® 700-conjugated anti-mouse CX3CR1	149021	Biolegend	0.5
	T cells	PerCP-conjugated anti-mouse CD45	103130	Biolegend	1
		FITC-conjugated anti-mouse CD3	11-0031-82	eBioscience	1
		APC-conjugated anti-mouse CD4	17-0041-82	eBioscience	1
		PE-conjugated anti-mouse CD8	12-0081-82	eBioscience	1
	Treg cell	Pacific blue-conjugated anti-mouse CD4	100534	Biolegend	2
		APC-conjugated anti-mouse CD25	17-0251-81	eBioscience	1.25
		PE-conjugated anti-mouse Foxp3	126404	Biolegend	5
	B cell	PerCP-conjugated anti-mouse CD45	103130	Biolegend	1
		Pacific blue-conjugated anti-mouse CD19	115523	Biolegend	0.5
Spleen	T cells	FITC-conjugated anti-mouse CD3	11-0031-82	eBioscience	1
		APC-conjugated anti-mouse CD4	17-0041-82	eBioscience	1
		PE-conjugated anti-mouse CD8	12-0081-82	eBioscience	0.5
	B cell	Pacific blue-conjugated anti-mouse CD19	115523	Biolegend	0.5

表 3-8、大腸組織損傷評分標準

Table 3-8. Histological scores of colon damage.

Score	Inflammatory cell infiltrate		Crypt damage and epithelial changes
	Inflammation severity	Inflammation extent	
0	None	None	None
1	Mild (0-25%)	Mucosa	Basal 1/3 damaged
2	Moderate (26-50%)	Mucosa and submucosa	Basal 2/3 damaged
3	Severe (>51%)	Transmural	Crypts lost, surface epithelium present
4	-	-	Crypts and surface epithelium lost

表 3-9、即時定量聚合酶連鎖反應之引子序列

Table 3-9. List of primer sequences for qRT-PCR.

Gene symbol	Primer	Primer sequence (5′ to 3′)
GAPDH	F R	ACAATACAGGACTCTTTCGAG GAGCTTTTTAACTGCAGCAAC
CCL2	F R	CTGAAGCCAGCTCTCTCTTCCTC TTCCTTCTTGGGGTCAGCACAGAC
TNF-α	F R	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT GCTACGACGTGGGCTACAG
CXCL1	F R	TGGGAGGCTGTGTTTGTATG GAGACGAGACCAGGAGAAAC
Muc2	F R	ATGCCCACCTCCTCAAAGAC GTAGTTTCCGTTGGAACAGTGAA
Tff3	F R	TAATGCTGTTGGTGGTCCTG CAGCCACGGTTGTTACACTG
ZO-1	F R	CCAGCAACTTTCAGACCACC TTGTGTACGGCTTTGGTGTG
Foxp3	F R	GGCCCTTCTCCAGGACAG GCTGATCATGGCTGGCTGGTTG
IL-10	F R	AAGGCAGTGGAGCAGGTGAA CCAGCAGACTCAATACACAC
TGF-β1	F R	GGAGCCACTGCCCATCGTCTACTAC GGAGCGCACGATCATGTTGGAC
IL-17A	F R	CAATCCCACGAAATCCAGGATG GGAGCGCACGATCATGTTGGAC
ROR-γt	F R	CCACTGCCAGCTGTGTGCTGT CTTGGCTCCCTGTCCTCCTCAGT

F: forward primer, R: reverse primer

表 3-10、qPCR 反應溶液配置

Table 3-10. Mixture solution of qPCR.

Reagent	Volume (μL)
SYBR master mix	12.5
DEPC-water	5.5
Forward primer (5 μM)	1
Reverse primer (5 μM)	1
cDNA (10 ng/μL)	5
Total	25

表 3-11、qPCR 之反應條件

Table 3-11. Reaction conditions of qPCR.

	Step1	Step2	Step3		Step4	Step5
Temperature（℃）	50	95	95	60	72	95
Time	5 min	10 min	15 sec	1 min	1 min 30 sec	5 sec
Cycle	1		40		1	

第五節 統計分析

實驗之體重、飲水量、疾病活動指數數據以 TWO-way ANOVA 分析並使用 Bonferroni 做事後檢定，其他數據皆是用 Student's t test 做分析，數值均以 mean ± SEM 表示。實驗數據，皆藉由 GraphPad Prism 6 軟體進行統計分析與作圖，當 p value < 0.05 表示具有統計上的顯著差異。

第四章 結果

第一節 營養組成

新鮮小根蒜樣品的基本營養組成 (表 4-1)。

表 4-1、小根蒜之營養組成

Table 4-1. Nutritional characterization of *A. macrostemon*.

Proxiamte analysis	Content
Calories (kcal/100g)	95.0
Total carbohydrate (g/100g)	19.88
Crude fat	0.13 ± 0.00
Crude protein	3.57 ± 0.02
Moisture	75.30 ± 0.22
Ash	1.13 ± 0.01
Sugars (g/100g)	1.24
Glucose	0.08 ± 0.00
Sucrose	0.63 ± 0.02
Fructose	0.53 ± 0.01
Maltose	N.D.
Lactose	N.D.
Galactose	N.D.
Vitamin C (mg/100g)	4.42 ± 0.21
Crude fiber	1.61 ± 0.03

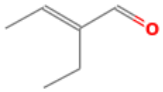
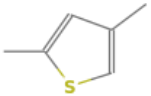
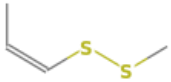
1. Data are presented as the mean ± SD.
2. N.D: non-detectable.

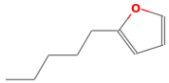
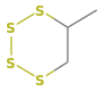
第二節 氣相層析質譜儀定量結果

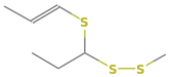
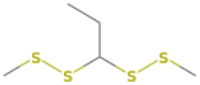
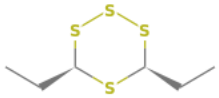
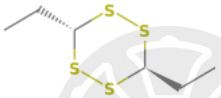
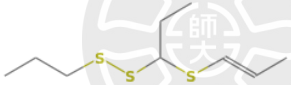
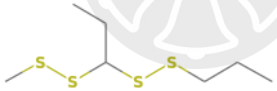
新鮮小根蒜共測得 30 種發揮性化合物，其中含有 dipropyl trisulfide、dipropyl disulfide 和 methyl propyl disulfide 等 24 種含硫化合物 (表 4-2)。

表 4-2、小根蒜含有的揮發性化合物

Table 4-2. Volatile organic compounds in *A. macrostemon*.

No.	RT (min) #	Compound	Structure	CAS ID	Area	Content (ppb) *	Relative quantity (%) †
1	2.534	Propanal		123-38-6	2766199	8.1	0.77
2	5.486	Dimethyl disulfide		624-92-0	24369846	71.3	6.81
3	7.053	Hexanal		66-25-1	1180731	3.5	0.33
4	8.181	2-Ethyl-trans-2-butenal		63883-69-2	951958	2.8	0.27
5	9.647	1-Hexanol		111-27-3	1372750	4.0	0.38
6	9.958	2,4-Dimethyl thiophene		638-00-6	1474541	4.3	0.41
7	12.329	Methyl propyl disulfide		2179-60-4	38102766	111.5	10.64
8	12.69	(Z)-1-Methyl-2-(prop-1-en-1-yl) disulfane		23838-18-8	25384326	74.3	7.09

No.	RT (min) #	Compound	Structure	CAS ID	Area	Content (ppb) *	Relative quantity (%) †
9	14.048	Dimethyl trisulfide		3658-80-8	19378653	56.7	5.41
10	15.208	2-Pentyl-furan		3777-69-3	492241	1.4	0.13
11	20.455	(E)-1-Allyl-2-(prop-1-en-1-yl) disulfane		122156-02-9	693203	2.0	0.19
12	20.846	Dipropyl disulfide		629-19-6	39673641	116.1	11.08
13	21.249	(E)-1-(Prop-1-en-1-yl)-2-propyldisulfane		23838-21-3	36730874	107.5	10.26
14	22.236	Methyl 2-propenyl trisulfide		34135-85-8	780899	2.3	0.22
15	22.902	Methyl propyl trisulfide		17619-36-2	30699132	89.8	8.57
16	23.607	(E)-1-Methyl-3-(prop-1-en-1-yl) trisulfane		23838-25-7	14085366	41.2	3.93
17	25.404	Dodecane		112-40-3	95460531	Internal standard	-
18	25.551	Decanal		112-31-2	288339	0.8	0.08
19	25.905	Dimethyl tetrasulfide		5756-24-1	4709030	13.8	1.32
20	30.369	1-Allyl-3-propyltrisulfane		33922-73-5	710302	2.1	0.20
21	31.002	Dipropyl trisulfide		6028-61-1	40512299	118.5	11.31
22	31.362	(E)-1-(Prop-1-en-1-yl)-3-propyltrisulfane		23838-27-9	33395185	97.7	9.33
23	31.618	1,3-Di((E)-prop-1-en-1-yl) trisulfane		115321-81-8	19493528	57.0	5.44
24	32.477	5-Methyl-1,2,3,4-tetrathiane		116664-30-3	645781	1.9	0.18

No.	RT (min) [#]	Compound	Structure	CAS ID	Area	Content (ppb) *	Relative quantity (%) [†]
25	35.383	Methyl 1-(1-propenylthio) propyl disulfide		126876-23-1	3282249	9.6	0.92
26	37.131	4-Ethyl-2,3,5,6-tetrathiaheptane		126876-42-4	1999044	5.8	0.55
27	40.813	Dipropyl tetrasulfide		52687-98-6	548512	1.6	0.15
28	41.525	Cis-4,6-diethyl-1,2,3,5-tetrathiane		137363-91-8	5315985	15.6	1.49
29	41.633	Trans-3,6-diethyl-1,2,4,5-tetrathiane		934273-77-5	3904198	11.4	1.09
30	42.027	1-(1-Propenylthio) propyl propyl disulfide		143193-11-7	3955555	11.6	1.11
31	43.424	6-Ethyl-4,5,7,8-tetrathianonane		126876-30-0	1149614	3.4	0.32
Total						1048	100

*以十二烷計

[#]RT: retention time

[†]Relative quantity (%): the percentage of each detected volatile components relative to the total mass of the volatile components in *A. macrostemon* (100%).

第三節 液相層析串聯質譜儀鑑定結果

新鮮小根蒜 AE 測得組成分包括：procyanidin A2、nor-ψ-tropine 和 hexitol 等化合物 (表 4-3)。新鮮小根蒜 HEE 測得組成分包括：procyanidin A2、nor-ψ-tropine 和 menthoside 等化合物 (表 4-4)。

表 4-3、小根蒜 AE 之組成分

Table 4-3. Compounds identified from AE of *A. macrostemon*.

No.	Compound	Neutral mass (Da)	Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Observed RT (min)	Detector counts	Response	Adducts
1	Procyanidin A2	576.12678	576.1264	577.1336	5.6	192350	146753	+H
2	Nor-ψ-tropine	127.09971	127.0991	128.1064	18.95	114440	108717	+H
3	Hexitol	182.07904	182.0776	183.0849	1.91	56121	56121	+H
4	Siraitic acid C	440.29266	440.2949	441.3022	15.73	58269	54583	+H
5	Bis (2-ethylhexyl) phthalate	390.27701	390.2764	391.2837	5.13	54515	51897	+H
6	Pomolic acid	472.35526	472.3573	473.3646	7.08	47677	47677	+H
7	Nigakilactone H	424.20972	424.2074	425.2147	6.75	54335	45194	+H
8	Hyodeoxycholic acid	392.29266	392.2914	393.2987	19.03	43507	35790	+H
9	Allitol	182.07904	182.0776	183.0849	3.53	32921	32921	+H
13	Blestrianol B	588.2148	588.2161	589.2233	19.03	31248	25421	+H
17	Decumbesterone A	506.32435	506.3224	507.3296	6.45	21241	21241	+H
18	Yakuchinone A	312.17254	312.1754	311.1681	5.81	133464	116511	-H
19	Pregna-4,16-diene-3, 12,20-trione	326.18819	326.1913	325.1841	7.34	77130	70300	-H

No.	Compound	Neutral mass (Da)	Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Observed RT (min)	Detector counts	Response	Adducts
20	Dihydroxy stearic acid	316.26136	316.2615	315.2542	4.66	35737	32040	-H
21	Gallocatechin (4α→8)-epicatechin	594.13734	594.1384	593.1312	3.57	28874	24350	-H
22	Laevigatin A	802.08649	802.0861	801.0788	5.43	25996	20614	-H

表 4-4、小根蒜 HEE 之組成分

Table 4-4. Compounds identified from HEE of *A. macrostemon*.

No.	Compound	Neutral mass (Da)	Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Observed RT (min)	Detector counts	Response	Adducts
1	Procyanidin A2	576.12678	576.1269	577.1342	5.64	212935	155448	+H
2	Nor-ψ-tropine	127.09971	127.099	128.1062	18.93	108438	105770	+H
3	Menthoside	740.19525	740.1965	741.2038	8.92	69366	69366	+H
4	Bis (2-ethylhexyl) phthalate	390.27701	390.2763	391.2835	6.31	81594	68286	+H
5	Chenodeoxycholic acid	392.29266	392.2911	393.2984	6.06	67871	67871	+H
6	Siraitic acid C	440.29266	440.2952	441.3025	18.94	68784	62094	+H
7	Nigakilactone H	424.20972	424.2072	425.2145	6.83	61907	51277	+H
8	Hexitol	182.07904	182.0774	183.0847	6.19	46139	46139	+H
9	Blestrianol B	588.2148	588.2159	589.2231	19.03	45408	39785	+H
12	Quercetin 3-glucosyl-(1->4)-xylosyl-(1->4)-rhamnoside	742.19564	742.1887	743.1959	8.93	37823	37823	+H
14	Decumbesterone A	506.32435	506.3217	507.329	6.51	26909	26909	+H
15	α-Monolinolein	354.27701	354.2762	355.2835	6.16	28689	24060	+H
17	26,27-Dihydroxy-lanosta-7,9(11),24-triene-3,16-dion	468.32396	468.3251	469.3324	10.89	29014	22130	+H
18	Epianhydrobelachinal	468.32396	468.3251	469.3324	10.89	29014	22130	+H
19	Dihydro-N-methyl isopelletierine	157.14666	157.1451	158.1524	18.88	21040	21040	+H
22	Pregna-4,16-diene-3,12,20-trione	326.18819	326.1914	325.1842	6.91	186157	159719	-H
23	Dihydroxy stearic acid	316.26136	316.2618	315.2545	4.67	35289	32003	-H

No.	Compound	Neutral mass (Da)	Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Observed RT (min)	Detector counts	Response	Adducts
24	Laevigatin A	802.08649	802.0856	801.0783	5.45	25651	20199	-H

第四節 實驗 (一)

一、飲水與體重變化

小鼠的飲水量與 NC 組相比，實驗第 9 天開始，DC 組的飲水量皆顯著降低；與 DC 組相比，DW 與 DHE 組在整個實驗過程中皆無顯著差異 (圖 4-1A)。在小鼠的體重百分比變化，跟 NC 組相比，實驗第 13 天開始 DC 組的體重百分比皆顯著下降；與 DC 組相比，DW 與 DHE 組的體重變化在整個實驗過程中皆無顯著差異 (圖 4-1B)。

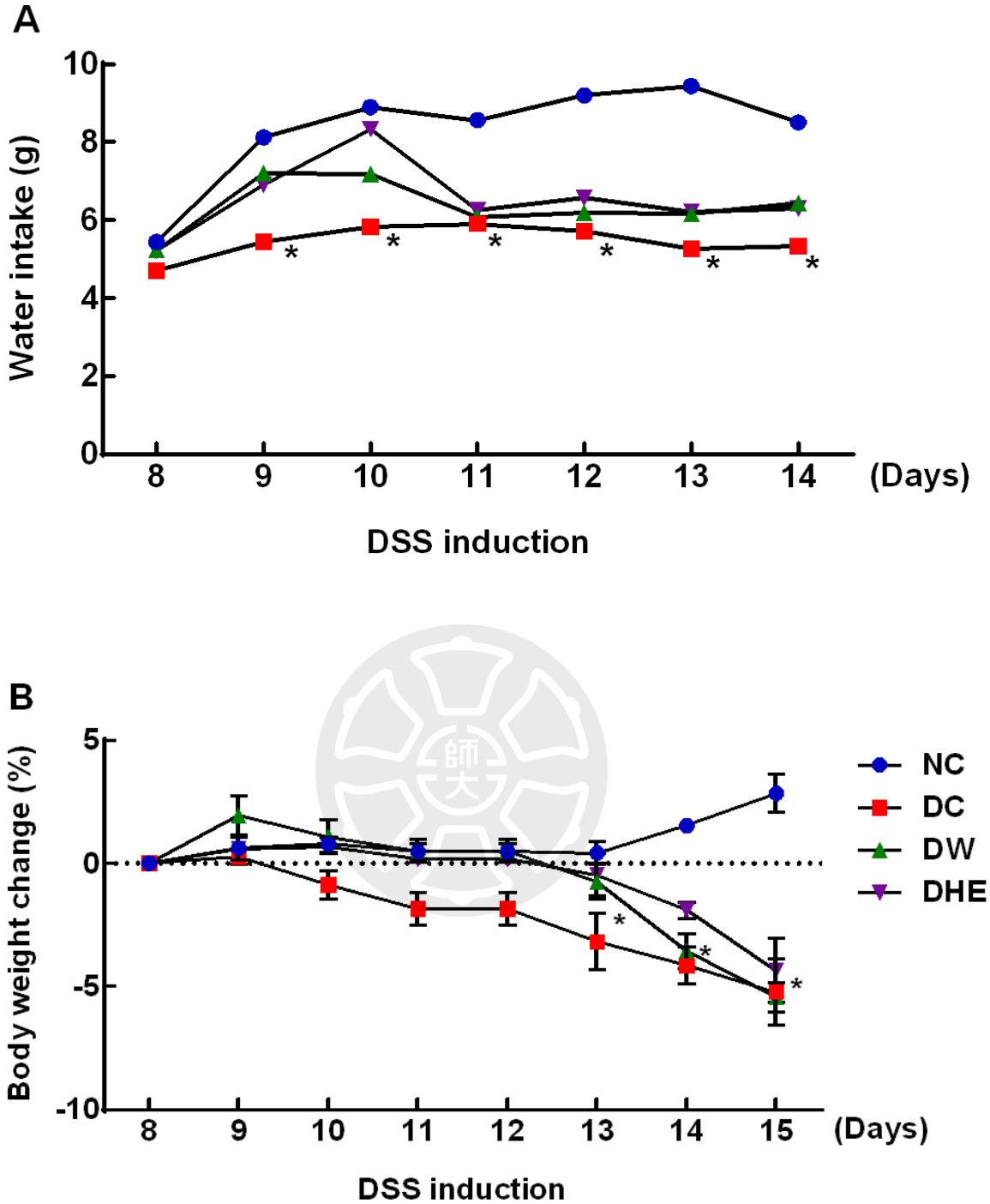


圖 4-1、實驗一 DSS 誘導後小鼠的飲水量與體重變化百分比

Figure 4-1. Experiment 1- water intake and percentage of body weight change in mice after DSS induction. (A) Water intake change and (B) Weight change. Data are presented as the mean ± SEM. Differences among groups analyzed by two-way ANOVA using the Bonferroni posttest. *Significantly differs from the control group (NC). (p<0.05)

二、疾病活動指數

實驗過程中，小鼠的疾病活動指數之變化 (圖 4-2)。與 NC 組相比，在實驗第 9 天開始 DC 組的 DAI 分數顯著升高；跟 DC 組相比，DW 組在整個實驗過程中皆無顯著差異，而 DHE 組於第 14 天顯著下降。

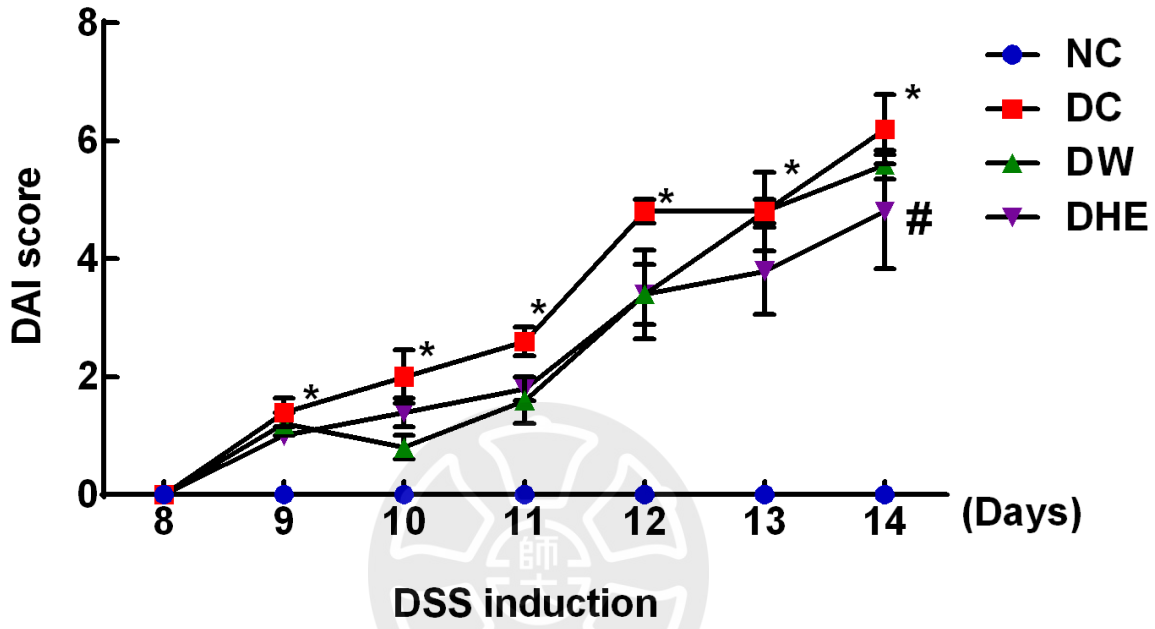


圖 4-2、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的疾病活動指數之影響

Figure 4-2. Experiment 1- effect of *A. macrostemon* extract on the disease activity index in murine DSS-induced acute colitis. Data are presented as the mean ± SEM. Differences among groups analyzed by two-way ANOVA using the Bonferroni posttest. *Significantly differs from the control group (NC). (p<0.05) #Significantly differs from the DSS group (DC). (p<0.05)

三、脾臟重量

在脾臟絕對重量，DSS 誘導一週後發現，DC 組的脾臟重量顯著高於 NC 組，而 DW 與 DHE 組的脾臟重量又顯著高於 DC 組 (圖 4-3A)。由於小鼠的脾臟重量，會隨著個體間體型的差異而受影響，所以分別再將小鼠脾臟重量除以本身體重，計算得脾臟相對之重量。在脾臟之相對重量結果與絕對重量皆呈一致 (圖 4-3B)。

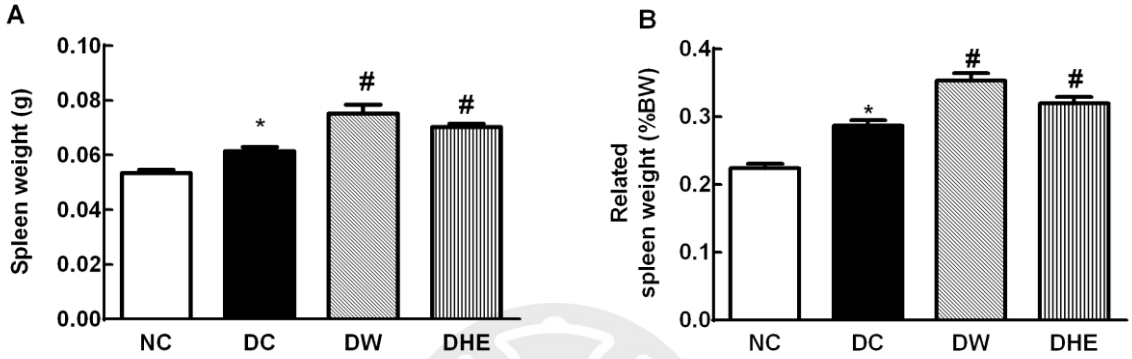


圖 4-3、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的脾臟重量之影響

Figure 4-3. Experiment 1- effect of *A. macrostemon* extract on the weights of spleen in murine DSS-induced acute colitis. (A) Absolute weight and (B) Relative weight. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test. *Significantly differs from the control group (NC). ($p<0.05$) #Significantly differs from the DSS group (DC). ($p<0.05$)

四、大腸組織

小鼠之大腸組織其外觀、長度、重量與重量長度比 (圖 4-4)。在 DSS 誘導一週後發現，與 NC 組相比，DC 組的大腸重量顯著增加；與 DC 組相比，DW 與 DHE 組皆無顯著差異 (圖 4-4B)。於大腸長度，跟 NC 組相比，DC 組的大腸長度顯著縮短；與 DC 相比，DW 和 DHE 組皆無顯著差異 (圖 4-4C)。由於大腸組織的長度或重量，會隨著小鼠間個體差異而所受影響，故分別再將大腸組織的重量除於對應之長度，計算以得大腸組織的重量長度比。結果顯示，跟 NC 組相比，DC 組的大腸重量長度比顯著增加；與 DC 相比，DW 和 DHE 組皆無顯著差異 (圖 4-4D)。

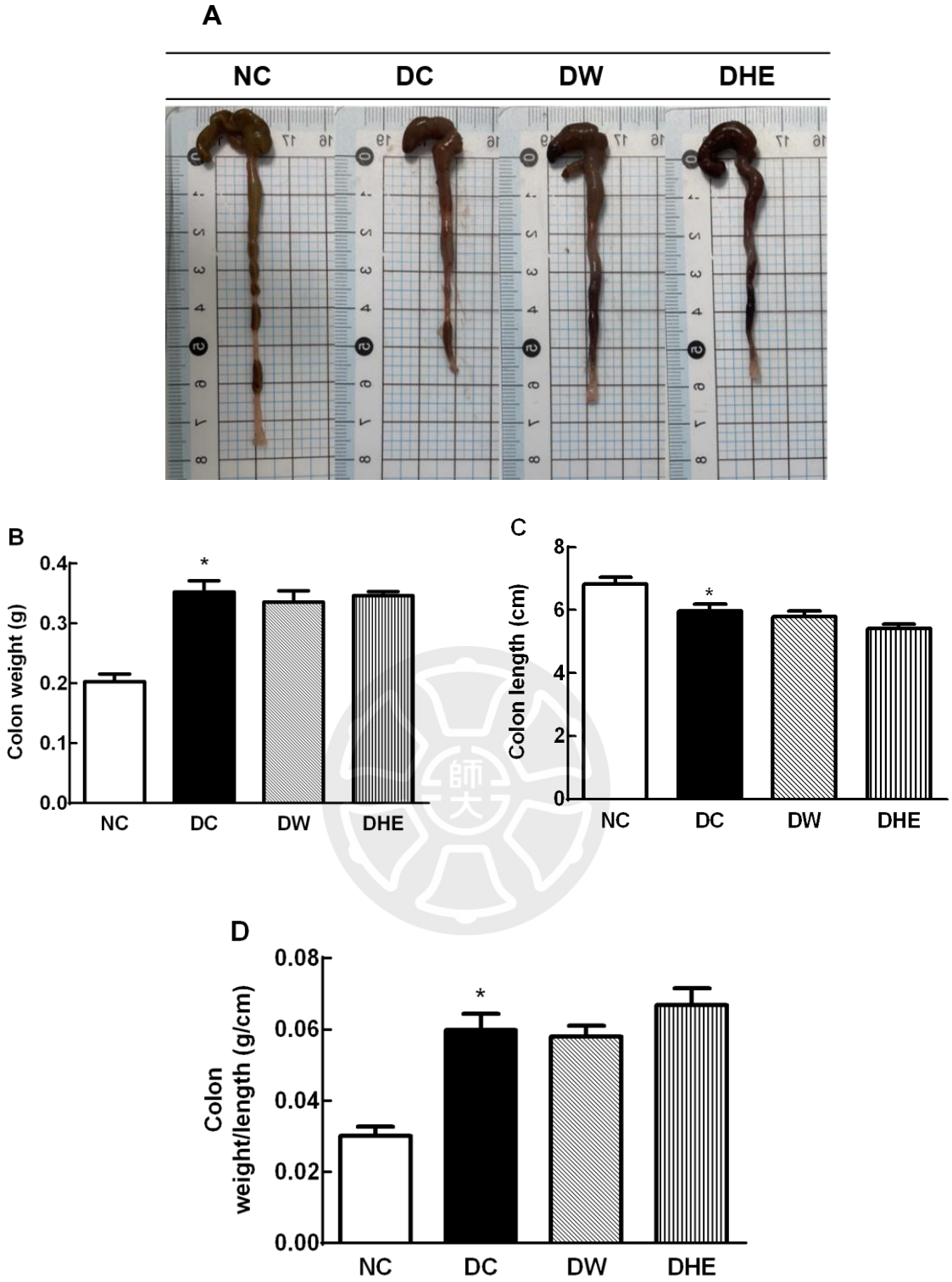


圖 4-4、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的大腸組織之影響

Figure 4-4. Experiment 1- effect of *A. macrostemon* extract on the colon shortening in murine DSS-induced acute colitis. (A) Gross pictures of colons, (B) Colon weight, (C) Colon length and (D) Colon weight/length. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test *Significantly differs from the control group (NC). (p<0.05)

五、 血液先天性免疫細胞之比率

血液先天性免疫細胞比率 (圖 4-5)，在給予 DSS 誘導一週後發現，DC 組血液嗜中性白血球 ($CD45^+ CD11b^+ Ly6G^+$) 比率顯著高於 NC 組，DHE 組跟 DC 組相比具顯著下降，而 DW 組與 DC 組相比則無顯著差異 (圖 4-5A)。另外，在血液發炎性單核球 ($CD45^+ CD11b^+ Ly6C^{hi} CCR2^+$) 比率，四組間均無顯著差異 (DC 組 vs. NC 組；DW 與 DHE 組 vs. DC 組) (圖 4-5B)；抗發炎性單核球 ($CD45^+ CD11b^+ Ly6C^{lo} CX3CR1^+$) 比率的部分，與 NC 組相比，DC 組顯著下降，跟 DC 組相比，DW 與 DHE 組則皆無顯著差異 (圖 4-5C)。

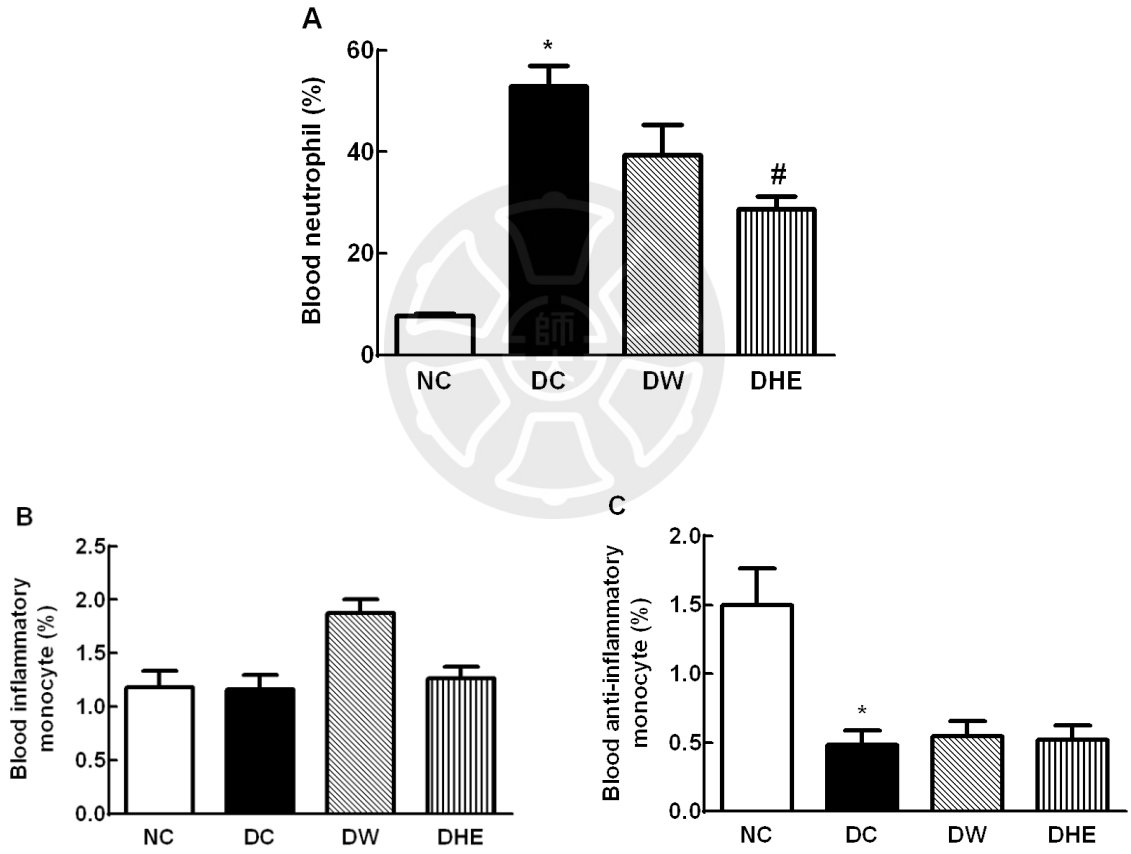


圖 4-5、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之血液先天性免疫細胞比率的影響

Figure 4-5. Experiment 1- effect of *A. macrostemon* extract on the percentage of innate immune cells in blood during DSS-induced acute colitis. (A) Neutrophil, (B) Inflammatory monocyte and (C) Anti-inflammatory monocyte. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test. *Significantly differs from the control group (NC). ($p<0.05$) #Significantly differs from the DSS group (DC). ($p<0.05$)

六、血液淋巴球之比率

血液淋巴球比率 (圖 4-6)，在給予 DSS 誘導一週後發現，與 NC 組相比，DC 組之 Th 細胞 ($CD3^+CD4^+$) 與 Tc 細胞 ($CD3^+CD8^+$) 比率顯著下降；跟 DC 組相比，DW 與 DHE 組則皆無顯著差異。

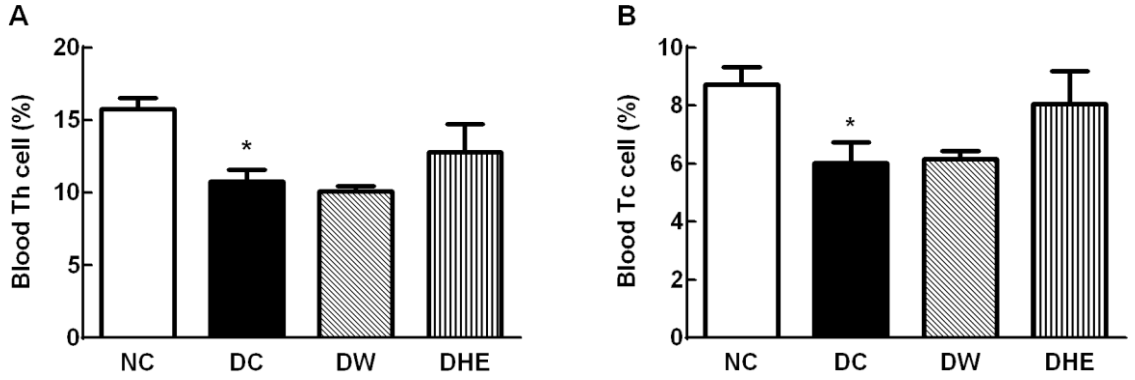


圖 4-6、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之血液 T 淋巴球比率的影響

Figure 4-6. Experiment 1- effect of *A. macrostemon* extract on the percentage of T lymphocyte in blood during DSS-induced acute colitis. (A) Th cell and (B) Tc cell. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test. *Significantly differs from the control group (NC). ($p<0.05$)

七、脾臟淋巴球之比率

脾臟淋巴球之比率 (圖 4-7)，在給予 DSS 誘導一週後發現，跟 NC 組相比，在 DC 組脾臟中的 Th 細胞 ($CD3^+CD4^+$) 無顯著差異，而 DW 組與 NC、DC 組比較，皆顯著下降 (圖 4-7A)。Tc 細胞 ($CD3^+CD8^+$) 則是四組間均無顯著差異 (DC 組 vs. NC 組；DW 與 DHE 組 vs. DC 組) (圖 4-7B)。

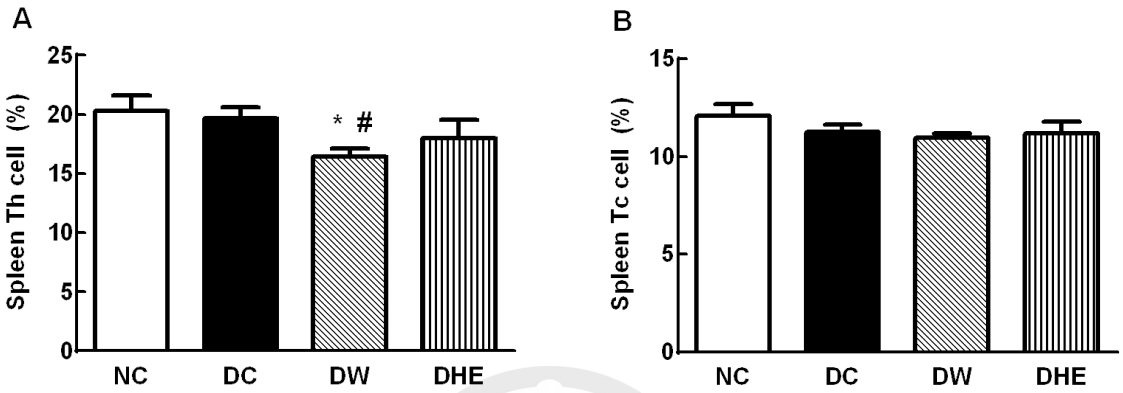


圖 4-7、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之脾臟 T 淋巴球比率的影響

Figure 4-7. Experiment 1- effect of *A. macrostemon* extract on the percentage of T lymphocyte in spleen during DSS-induced acute colitis. (A) Th cell and (B) Tc cell. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test. *Significantly differs from the control group (NC). ($p<0.05$) #Significantly differs from the DSS group (DC). ($p<0.05$)

八、大腸組織促發炎相關因子之 mRNA 表現量

腸道促發炎因子 CCL2、TNF-α和 CXCL1 之 mRNA 表現量 (圖 4-8)，在 DSS 誘導一週後，跟 NC 組相比，DC 組的大腸組織中 CCL2 及 TNF-α mRNA 表現量皆顯著增加；跟 DC 組相比，DW 與 DHE 組之 CCL2 及 TNF-α mRNA 表現量皆無顯著差異 (圖 4-8A 和 4-8B)。另外，在 CXCL1 mRNA 表現量中，則是四組間均無顯著差異 (DC 組 vs. NC 組；DW 與 DHE 組 vs. DC 組) (圖 4-8C)。

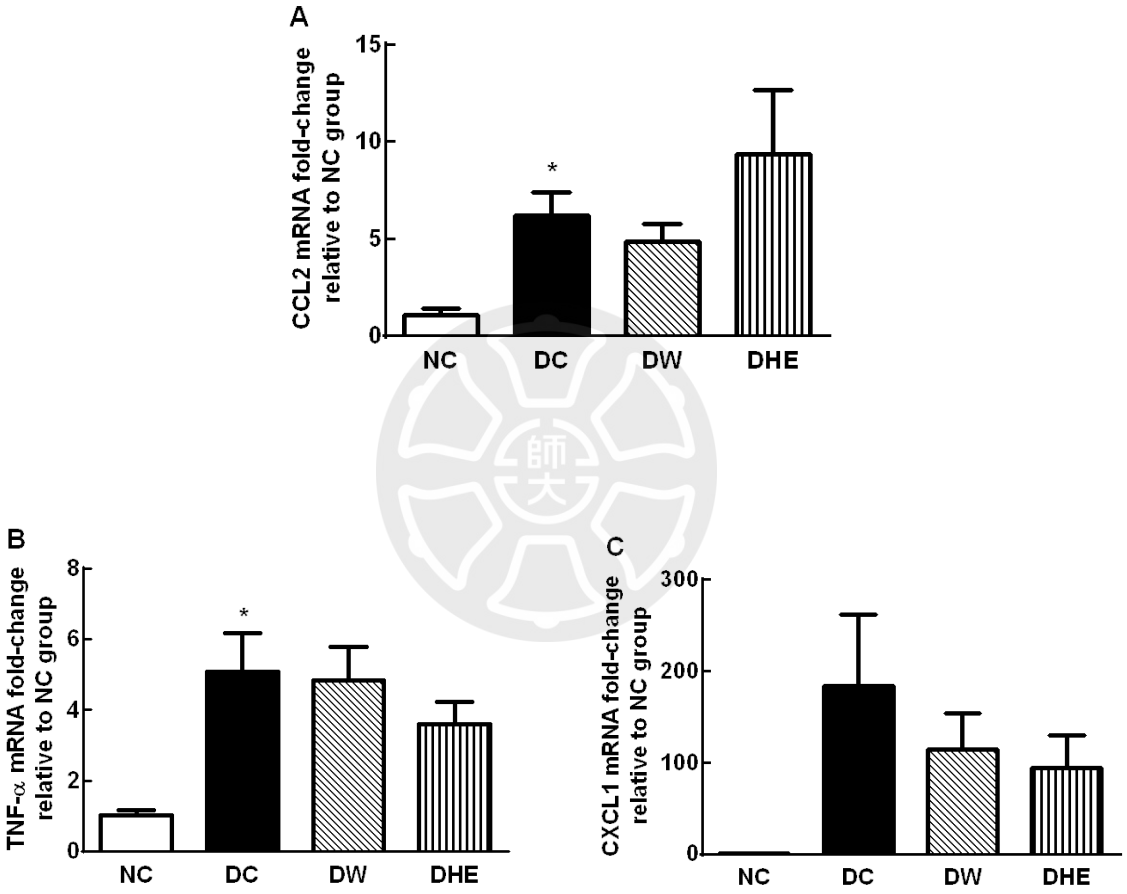


圖 4-8、實驗一小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之大腸組織促發炎因子 mRNA 表現量的影響

Figure 4-8. Experiment 1- effect of *A. macrostemon* extract on the mRNA levels of pro-inflammatory mediators in murine DSS-induced acute colitis. The mRNA levels of (A) CCL2, (B) TNF-α and (C) CXCL1 were determined and normalized to GAPDH. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test *Significantly differs from the control group (NC). ($p<0.05$)

九、大腸組織切片

於大腸組織切片 (圖 4-9)，DC 組之黏膜層與黏膜下層具有明顯的上皮損傷 (黑色箭頭)；黏膜層具免疫細胞浸潤 (紅色短箭頭) 與黏膜下層免疫細胞浸潤 (藍色長箭頭)，而 DHE 組之黏膜層與黏膜下層免疫細胞浸潤程度較低，且具有相對較完整的腸道上皮。

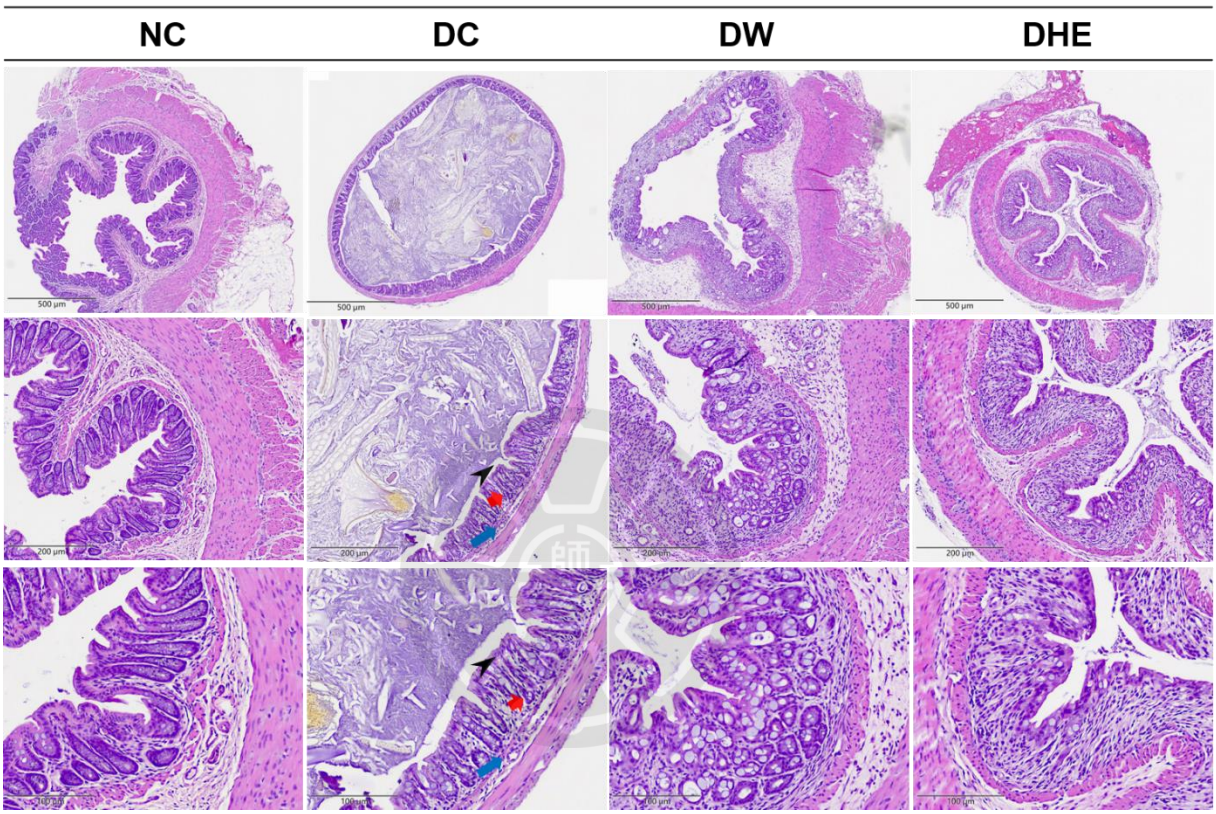


圖 4-9、實驗一大腸組織切片

Figure 4-9. Experiment 1- histopathology of colon tissues in murine DSS-induced acute colitis. Representative images (40×, 100× and 200×) depicting H&E staining of colon tissues in mice fed *A. macrostemon* extract. Colonic inflammation and tissue damage, including epithelial damage (➢ black arrowhead), mucosal immune cell infiltration (➡red short arrow), and submucosal immune cell infiltration (➡blue long arrow). Scale bar represents 500 µm, 200 µm and 100 µm. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test *Significantly differs from the control group (NC). (p<0.05) #Significantly differs from the DSS group (DC). (p<0.05)

第五節 實驗 (二)

一、飲水與體重變化

小鼠的飲水量在整個實驗過程中皆無顯著差異 (圖 4-10A)。在小鼠的體重百分比變化中，跟 NC 組相比，實驗第 12 天開始，DC 組的體重百分比顯著下降；跟 DC 組相比，DL 組的體重變化，在整個實驗過程中皆無顯著差異，而 DH 組於第 12 天有顯著上升，其他則無顯著差異 (圖 4-10B)。

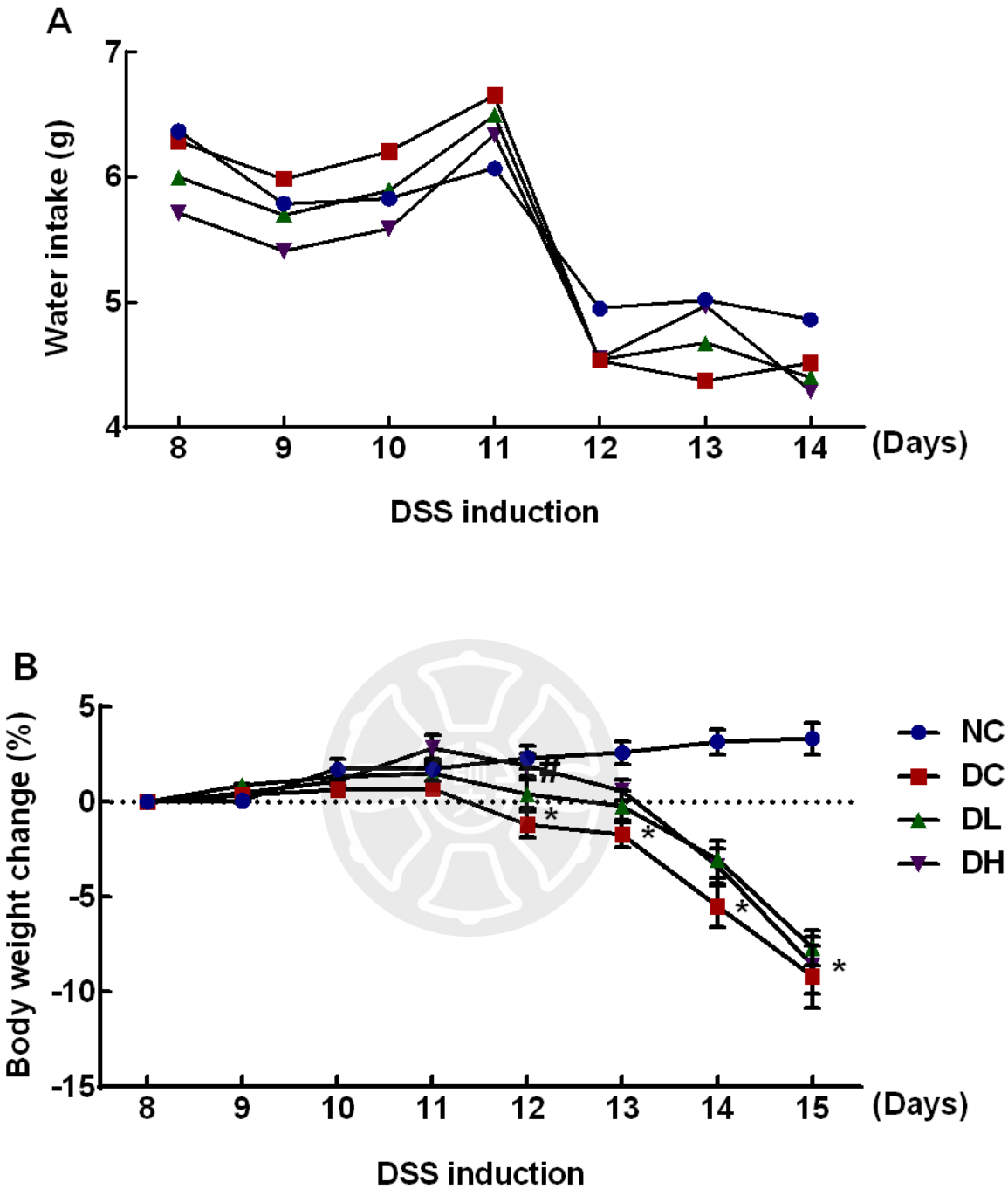


圖 4-10、實驗二 DSS 誘導後小鼠的飲水量與體重變化百分比

Figure 4-10. Experiment 2- water intake and percentage of body weight change in mice after DSS induction. (A) Water intake change and (B) Weight change. Data are presented as the mean ± SEM. Differences among groups analyzed by two-way ANOVA using the Bonferroni posttest. *Significantly differs from the control group (NC). (p<0.05) #Significantly differs from the DSS group (DC). (p<0.05)

二、疾病活動指數

實驗過程中，小鼠的疾病活動指數之變化 (圖 4-11)，與 NC 組相比，在實驗第 10 天開始 DC 組顯著升高；跟 DC 組相比，DL 組於第 12 天及第 13 天顯著下降，而 DH 組則於第 11 天至第 13 天顯著下降。

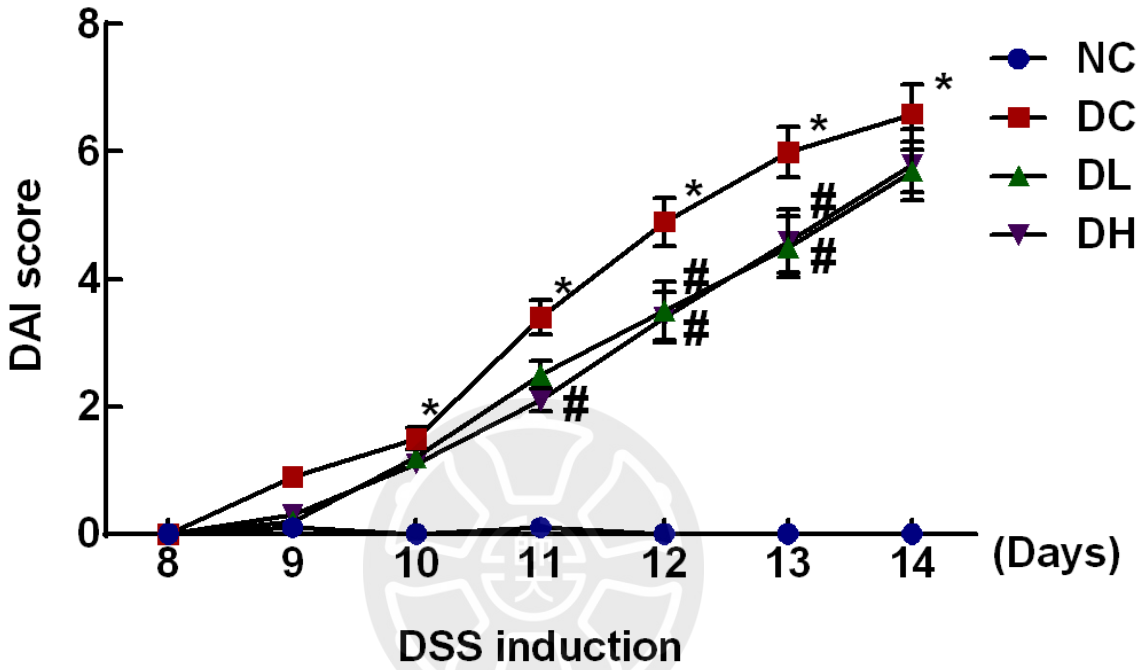


圖 4-11、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的疾病活動指數之影響

Figure 4-11. Experiment 2- effect of *A. macrostemon* HEE extract on the disease activity index in murine DSS-induced acute colitis. Data are presented as the mean ± SEM. Differences among groups analyzed by two-way ANOVA using the Bonferroni posttest. *Significantly differs from the control group (NC). (p<0.05) #Significantly differs from the DSS group (DC). (p<0.05)

三、脾臟重量

在脾臟絕對重量，DSS 誘導一週後發現，DC 組的脾臟重量顯著高於 NC 組；與 DC 組相比，DL 與 DH 組皆無顯著差異 (圖 4-12A)。由於小鼠的脾臟重量，會隨著個體間體型的差異而受影響，所以分別再將小鼠脾臟重量除以本身體重，計算得脾臟相對之重量。在脾臟之相對重量結果與絕對重量皆呈一致 (圖 4-12B)。

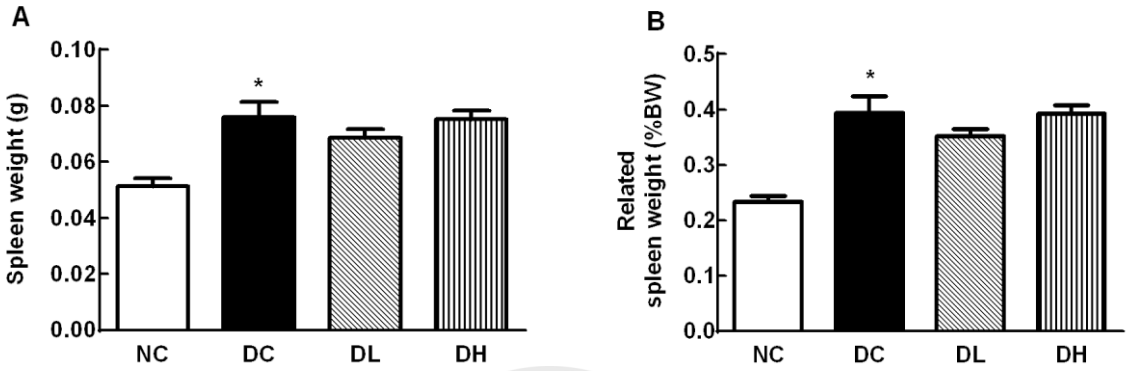


圖 4-12、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的脾臟重量之影響

Figure 4-12. Experiment 2- effect of *A. macrostemon* HEE extract on the weights of spleen in murine DSS-induced acute colitis. (A) Absolute weight and (B) Relative weight. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test. *Significantly differs from the control group (NC). (p<0.05)

四、大腸組織

小鼠之大腸組織其外觀、長度、重量與重量長度比 (圖 4-13)。在 DSS 誘導一週後發現，跟 NC 組相比，DC 組的大腸重量顯著增加；與 DC 相比，DL 和 DH 組皆顯著降低 (圖 4-13B)。於大腸長度，跟 NC 組相比，DC 組的大腸長度顯著縮短；與 DC 相比，DL 和 DH 組皆無顯著差異 (圖 4-13C)。由於大腸組織的長度或重量，會隨著小鼠間個體差異而所受影響，故分別再將大腸組織的重量除於對應之長度，計算以得大腸組織的重量長度比。結果顯示，跟 NC 組相比，DC 組的大腸重量長度比顯著增加；與 DC 相比，DL 和 DH 組皆顯著降低 (圖 4-13D)。

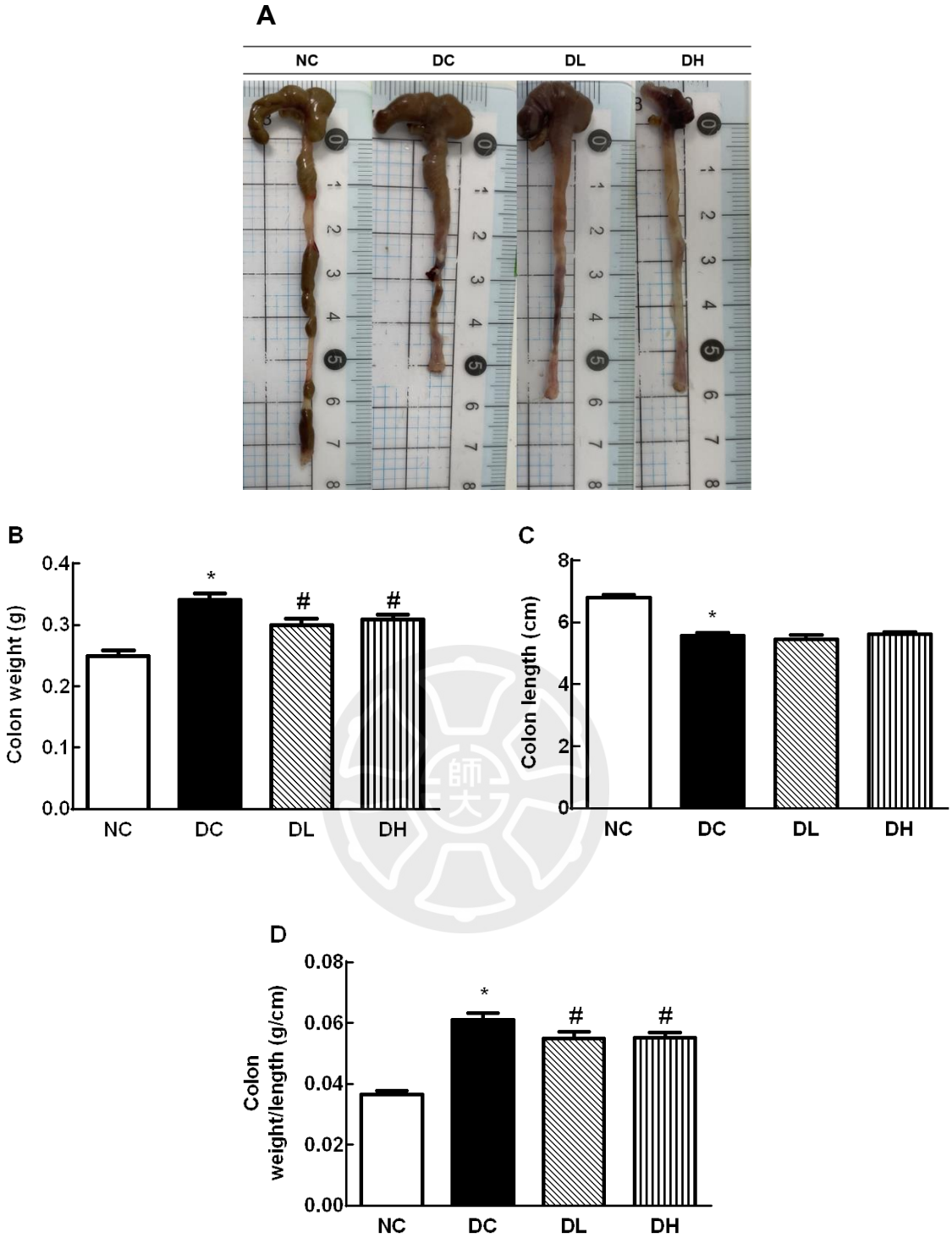


圖 4-13、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠的大腸組織之影響

Figure 4-13. Experiment 2- effect of *A. macrostemon* HEE extract on the colon shortening in murine DSS-induced acute colitis. (A) Gross pictures of colons, (B) Colon weight, (C) Colon length and (D) Colon weight/length. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test *Significantly differs from the control group (NC). (p<0.05) #Significantly differs from the DSS group (DC). (p<0.05)

五、血漿結合球蛋白 (haptoglobin) 與 CLF 的 IgG 濃度

血漿 haptoglobin 與 CLF 的 IgG 濃度為評估腸道發炎之指標。在給予 DSS 誘導一週後發現，與 NC 組相比，DC 組血漿 haptoglobin 濃度顯著上升；跟 DC 組相比，DL 和 DH 組皆顯著下降 (圖 4-14A)。另外，與 NC 組相比，DC 組 CLF 的 IgG 濃度顯著上升；跟 DC 組相比，DL 和 DH 組皆顯著下降 (圖 4-14B)。

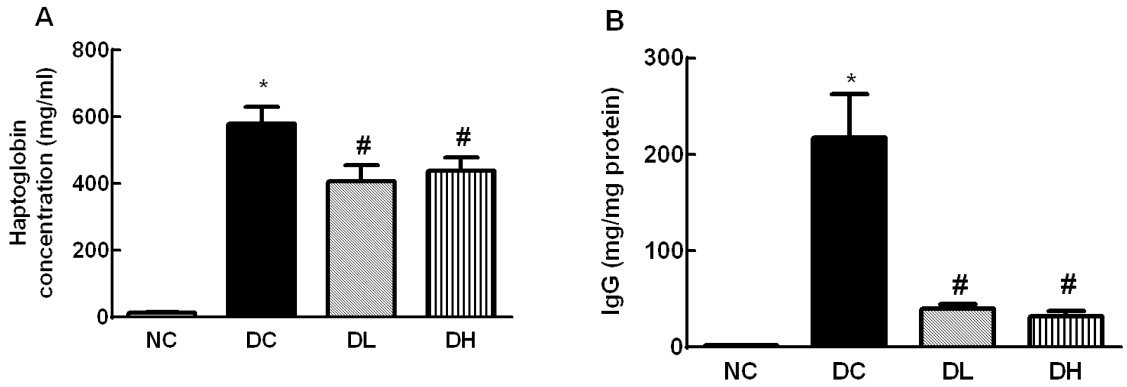


圖 4-14、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠血漿 haptoglobin 與 CLF 的 IgG 濃度之影響

Figure 4-14. Experiment 2- effect of *A. macrostemon* HEE extract on the haptoglobin of plasma and IgG of CLF in murine DSS-induced acute colitis. (A) Haptoglobin and (B) IgG. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test. *Significantly differs from the control group (NC). ($p<0.05$) #Significantly differs from the DSS group (DC). ($p<0.05$)

六、血液先天性免疫細胞之比率

血液先天性免疫細胞比率 (圖 4-15)，在給予 DSS 誘導一週後發現，與 NC 組相比，DC 組血液嗜中性白血球 ($CD45^+ CD11b^+ Ly6G^+$) 與發炎性單核球 ($CD45^+ CD11b^+ Ly6C^{hi} CCR2^+$) 比率皆顯著上升；跟 DC 組相比，DL 和 DH 組皆顯著下降 (圖 4-15A 和 4-15B)。抗發炎性單核球 ($CD45^+ CD11b^+ Ly6C^{lo} CX3CR1^+$) 比率的部分，與 NC 組相比，DC 組顯著下降，而跟 DC 組相比，DL 與 DH 組則皆無顯著差異 (圖 4-15C)。

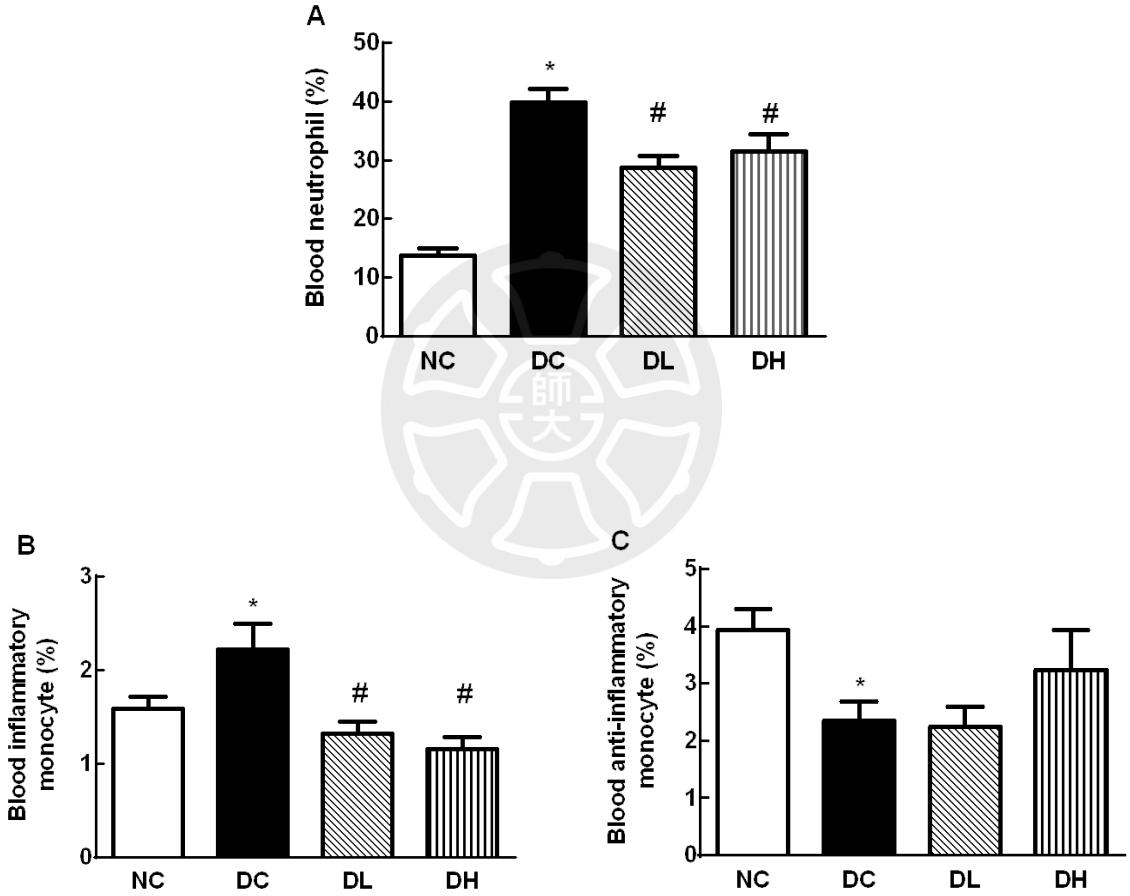


圖 4-15、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之血液先天性免疫細胞比率的影響

Figure 4-15. Experiment 2- effect of *A. macrostemon* HEE extract on the percentage of innate immune cells in blood during DSS-induced acute colitis. (A) Neutrophil, (B) Inflammatory monocyte and (C) Anti-inflammatory monocyte. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test. *Significantly differs from the control group (NC). ($p<0.05$) #Significantly differs from the DSS group (DC). ($p<0.05$)

七、血液淋巴球之比率

血液淋巴球比率 (圖 4-16)，在給予 DSS 誘導一週後發現，與 NC 組相比，DC 組之血液 Th 細胞 ($CD3^+ CD4^+$)、Tc 細胞 ($CD3^+ CD8^+$) 與 B 細胞 ($CD19^+$) 比率顯著下降；跟 DC 組相比，DL 和 DH 組皆顯著上升 (圖 4-16A、4-16B 和 4-16C)。至於 Treg 細胞 ($CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$) 比率，與 NC 組相比，DC 組顯著上升；與 DC 組相比，DL 和 DH 組皆顯著下降 (圖 4-16D)。

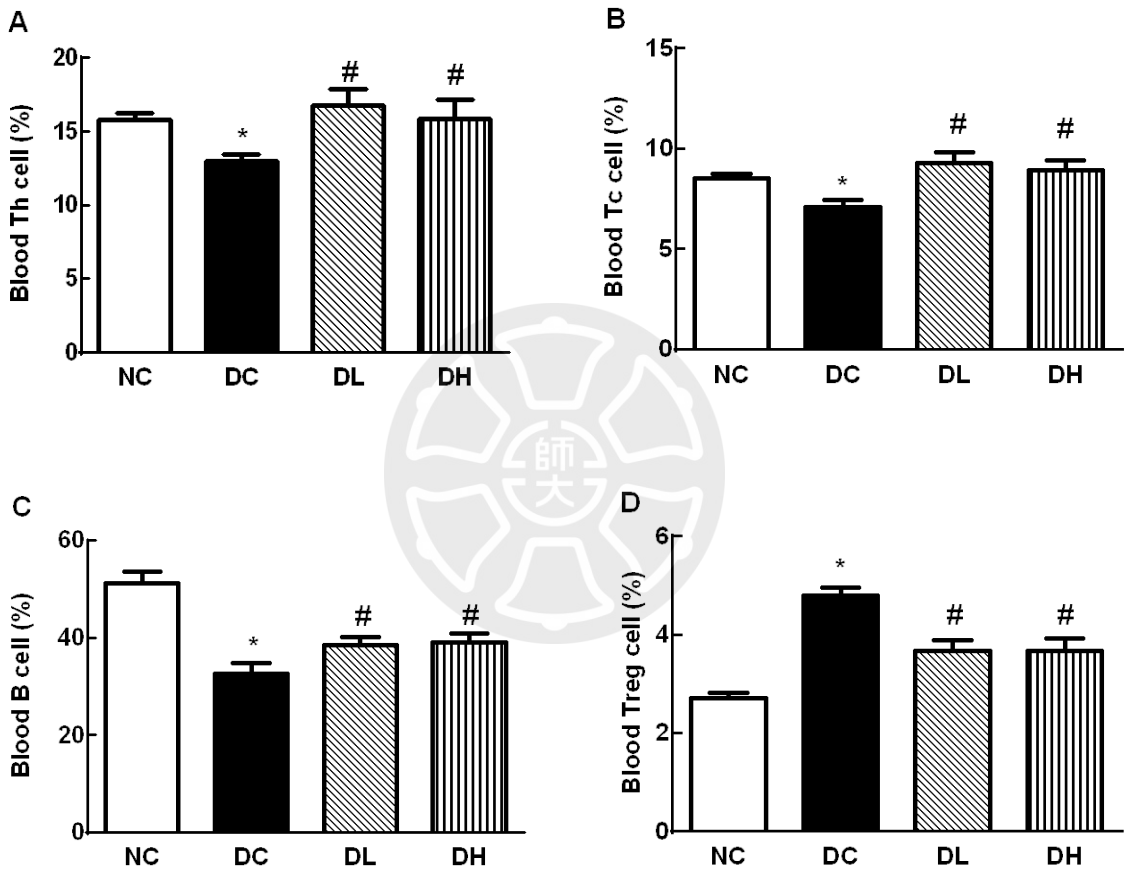


圖 4-16、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之血液淋巴球比率的影響

Figure 4-16. Experiment 2- effect of *A. macrostemon* HEE extract on the percentage of lymphocyte in blood during DSS-induced acute colitis. (A) Th cell, (B) Tc cell, (C) B cell and (D) Treg cell. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test. *Significantly differs from the control group (NC). ($p<0.05$) #Significantly differs from the DSS group (DC). ($p<0.05$)

八、脾臟淋巴球之比率

脾臟淋巴球之比率 (圖 4-17)，在給予 DSS 誘導一週後發現，跟 NC 組相比，DC 組脾臟中的 Th 細胞 ($CD3^+CD4^+$) 及 Tc 細胞 ($CD3^+CD8^+$) 皆顯著下降，B 細胞 ($CD19^+$) 則為上升；而跟 DC 組相比，DL 與 DH 組之 Th 細胞、Tc 細胞及 B 細胞皆無顯著差異。

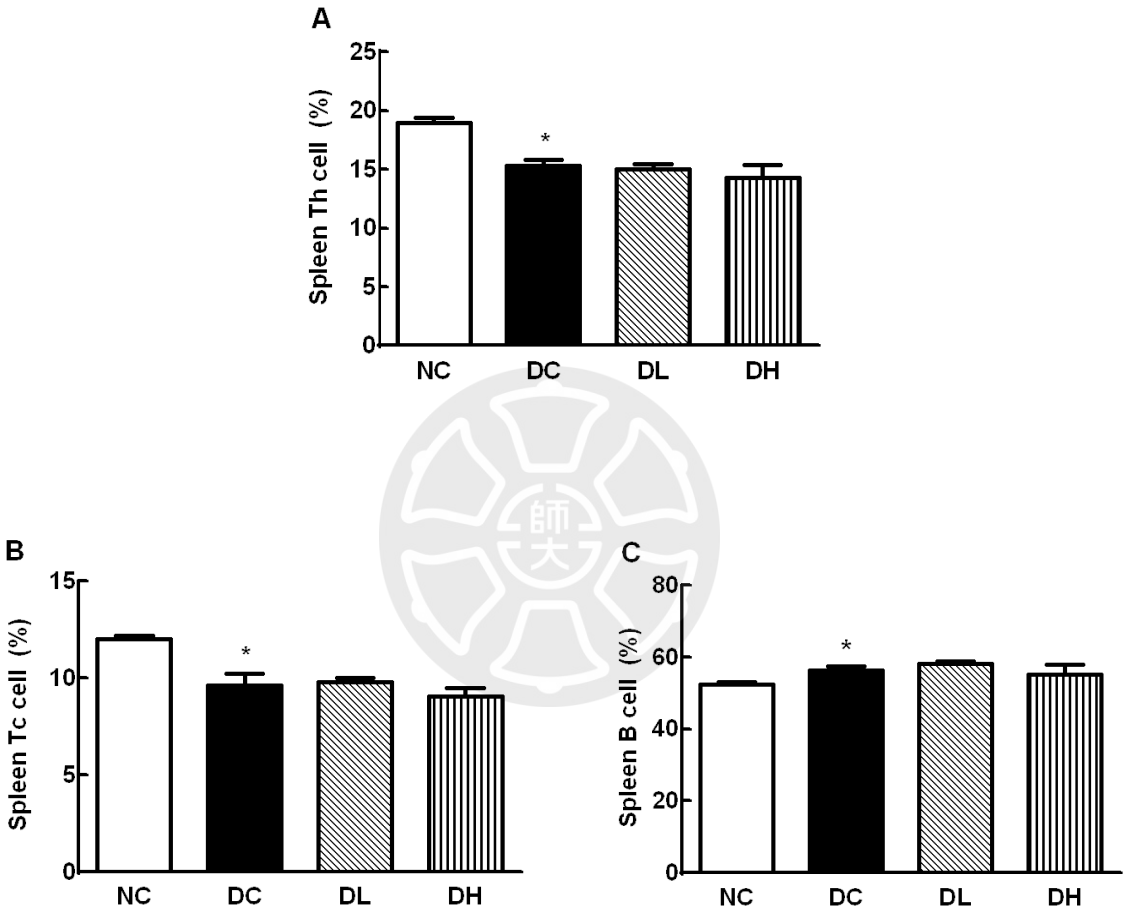


圖 4-17、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之脾臟淋巴球比率的影響

Figure 4-17. Experiment 2- effect of *A. macrostemon* HEE extract on the percentage of lymphocyte in spleen during DSS-induced acute colitis. (A) Th cell, (B) Tc cell and (C) B cell. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test. *Significantly differs from the control group (NC). ($p<0.05$)

九、脾臟 Th17 與 Treg 細胞相關細胞激素及轉錄因子之 mRNA 表現量

脾臟 Th17 細胞相關細胞激素 IL-17A 及其轉錄因子 ROR-γt；Treg 細胞相關細胞激素 IL-10 與 TGF-β1，及其轉錄因子 Foxp3 之 mRNA 表現量 (圖 4-18)。與 NC 組相比，DC 組脾臟中 IL-17A、ROR-γt、Foxp3、IL-10 與 TGF-β1 之 mRNA 表現量皆顯著增加；與 DC 組比較，DL 和 DH 組之 IL-17A、ROR-γt、Foxp3、IL-10 與 TGF-β1 mRNA 表現量皆顯著降低。

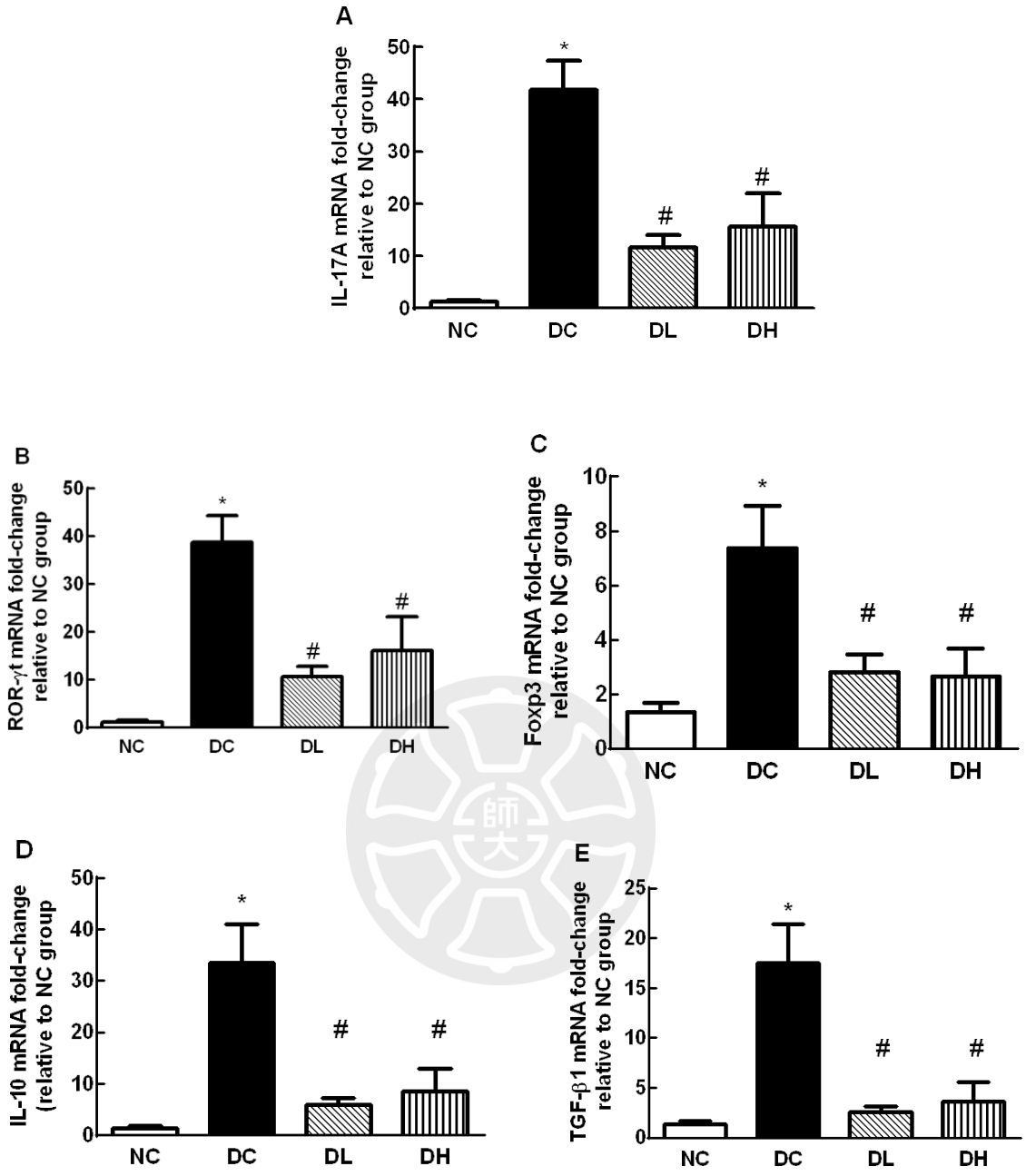


圖 4-18、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠脾臟 Th17 及 Treg 細胞相關細胞激素與轉錄因子之 mRNA 表現量的影響

Figure 4-18. Experiment 2- effect of *A. macrostemon* HEE extract on the mRNA levels of cytokines and transcription factors associated with Th17 and Treg in murine DSS-induced acute colitis. The mRNA levels of (A) IL-17A, (B) ROR-γt, (C) Foxp3, (D) IL-10 and (E) TGF-β1 were determined and normalized to GAPDH. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test *Significantly differs from the control group (NC). (p<0.05) #Significantly differs from the DSS group (DC). (p<0.05)

十、大腸組織促發炎相關因子之 mRNA 表現量

腸道促發炎因子 CCL2、TNF-α和 CXCL1 之 mRNA 表現量 (圖 4-19)，在 DSS 誘導一週後，跟 NC 組相比，DC 組的大腸組織中 CCL2、TNF-α 及 CXCL1 mRNA 表現量皆顯著增加；跟 DC 組相比，DL 與 DH 組之 CCL2、TNF-α 及 CXCL1 mRNA 表現量皆下降。

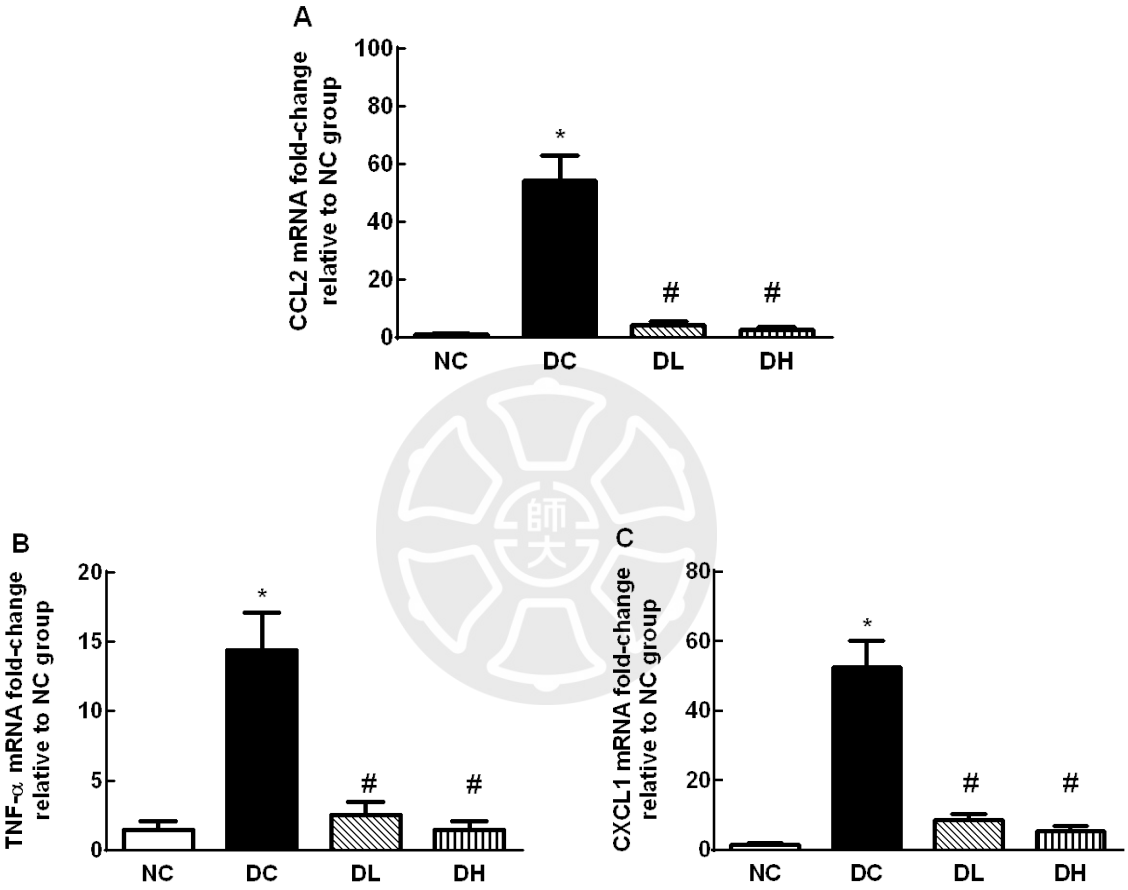


圖 4-19、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之大腸組織促發炎因子 mRNA 表現量的影響

Figure 4-19. Experiment 2- effect of *A. macrostemon* HEE extract on the mRNA levels of pro-inflammatory mediators in murine DSS-induced acute colitis. The mRNA levels of (A) CCL2, (B) TNF-α and (C) CXCL1 were determined and normalized to GAPDH. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test *Significantly differs from the control group (NC). ($p<0.05$) #Significantly differs from the DSS group (DC). ($p<0.05$)

十一、 腸道黏膜屏障相關保護因子之 mRNA 表現量

腸道黏膜屏障相關保護因子 Muc2、Tff3 及 ZO-1 之 mRNA 表現量 (圖 4-20)，在 DSS 誘導一週後，跟 NC 組相比，DC 組的大腸組織中 Tff3 mRNA 表現量顯著增加；跟 DC 組相比，DL 與 DH 組之 Tff3 mRNA 表現量下降 (圖 4-20B)，而 Muc2 及 ZO-1 之 mRNA 表現量於各組間皆無顯著差異 (NC 組 vs. DC 組；DC 組 vs. DL 與 DH 組)。

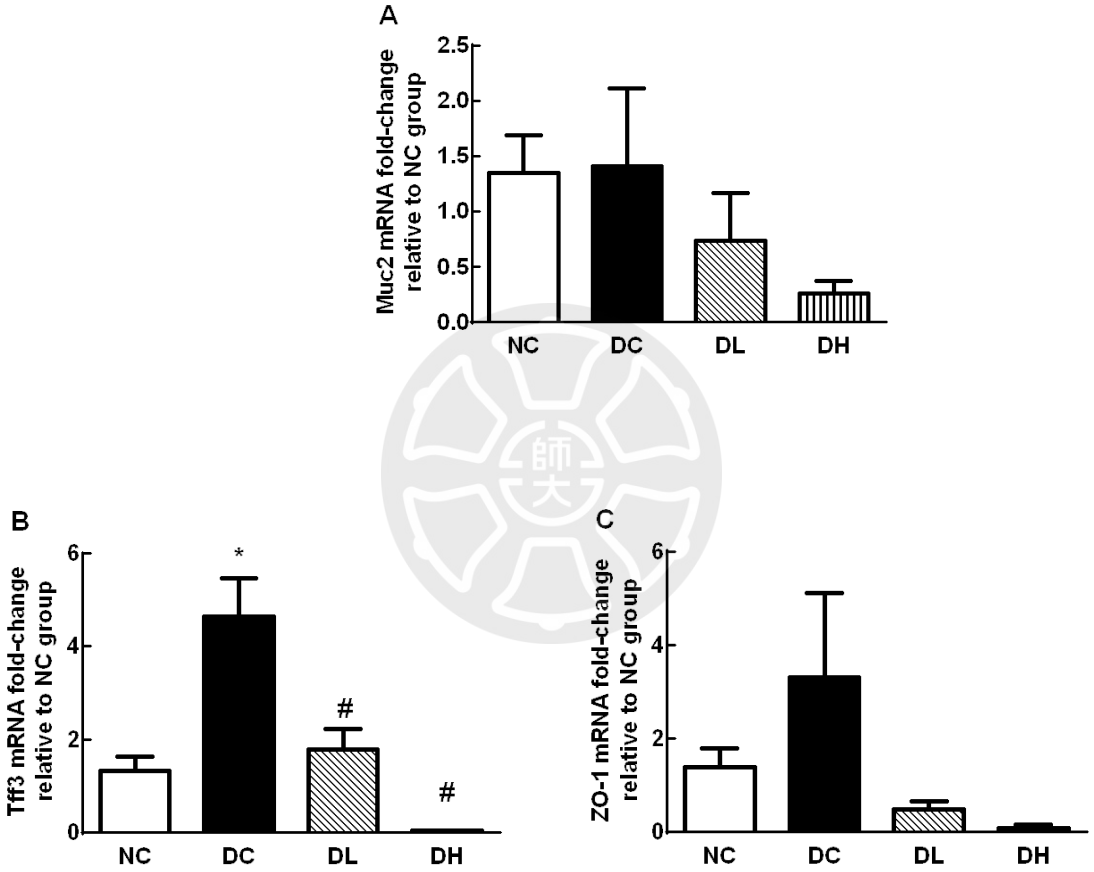


圖 4-20、實驗二小根蒜萃取物對於急性期腸炎小鼠之腸道黏膜屏障相關保護因子 mRNA 表現量的影響

Figure 4-20. Experiment 2- effect of *A. macrostemon* HEE extract on the mRNA levels of Muc2, Tff3 and ZO-1 in murine DSS-induced acute colitis. The mRNA levels of (A) Muc2, (B) Tff3 and (C) ZO-1 were determined and normalized to GAPDH. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test *Significantly differs from the control group (NC). (p<0.05) #Significantly differs from the DSS group (DC). (p<0.05)

十二、 大腸組織切片及損傷程度評分

於大腸組織切片 (圖 4-21)，DC 組之黏膜層與黏膜下層具有明顯的隱窩缺失與上皮損傷 (黑色箭頭)；黏膜層具免疫細胞浸潤 (紅色短箭頭)與黏膜下層免疫細胞浸潤 (藍色長箭頭)，而 DL 和 DH 組之黏膜層與黏膜下層免疫細胞浸潤程度較低，且具有相對較完整的隱窩與腸道上皮 (圖 4-21A)。大腸組織損傷評分結果發現，與 NC 組相比，DC 組分數顯著提高，與 DC 組相比，DL 與 DH 組則具顯著下降 (圖 4-21B)。

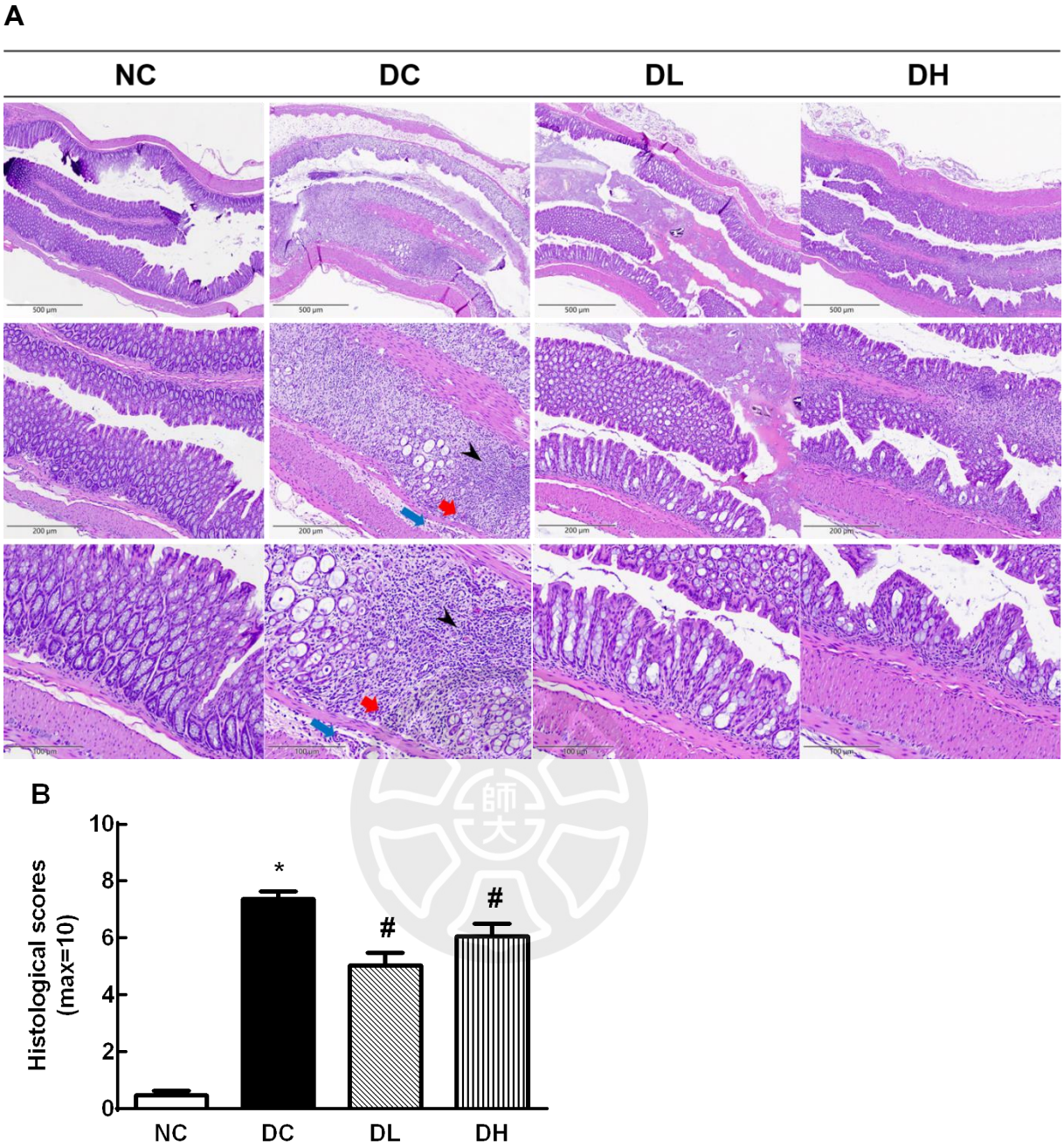


圖 4-21、實驗二大腸組織切片的觀察及損傷評分

Figure 4-21. Experiment 2- histopathology of colon tissues and colon injury score in murine DSS-induced acute colitis. (A) Representative images (40×, 100× and 200×) depicting H&E staining of colon tissues in mice fed *A. macrostemon* HEE extract. Colonic inflammation and tissue damage, including epithelial damage (➢ black arrowhead), mucosal immune cell infiltration (➡red short arrow), and submucosal immune cell infiltration (➡blue long arrow). Scale bar represents 500 µm, 200 µm and 100 µm. (B) Histological scores. Data are presented as the mean ± SEM. Differences between groups analyzed by t-test *Significantly differs from the control group (NC). (p<0.05) #Significantly differs from the DSS group (DC). (p<0.05)

第五章 討論

腸道的免疫系統為黏膜的屏障功能、微生物菌群與免疫細胞所構成，若其反應平衡被干擾或破壞，容易引起腸道發炎甚至導致 IBD (Guan, 2019a)。多種先天性免疫細胞、Th 細胞和 Treg 細胞的產生與作用，是維持免疫恆定之重要調節者。從食物或植物中萃取的藥用植化物具有緩解 IBD 之潛力 (Mijan & Lim, 2018)，這些植物萃取物、抗氧化劑可透過調節發炎誘導的細胞激素和訊號路徑之作用而對 IBD 具保護功效 (Chen et al., 2015; Chen et al., 2022; Farombi et al., 2013)。蔥屬植物例如洋蔥可藉由降低促發炎細胞激素之表現與超氧化物的釋放，並增加體外嗜中性白血球的自發凋亡，以降低小鼠結腸炎之嚴重程度 (Khajah et al., 2020)；大蒜具改善腸道黏膜屏障、抑制促發炎細胞激素、提高短鏈脂肪酸的產生和調節腸道微生物群，改善 DSS 誘導小鼠的結腸炎 (Sharma et al., 2020)。小根蒜同為蔥屬植物，雖知具有數種生物活性，但對於腸炎是否具有保護效應仍待探究，因此本研究探討預防性給予小根蒜萃取物，對於 DSS 引致急性腸炎小鼠體內 T 細胞之免疫調節與抑制大腸發炎的影響。

首先，實驗一探討不同萃取溶劑之小根蒜萃取物對於腸炎的保護效應，以了解不同溶劑萃取物是否有療效差異，並找出合適的萃取方式。我們於實驗一分別預先管餵小鼠給予小根蒜 (200 mg AE/kg/day 或 200 mg HEE/kg/day) 經一週後，結果發現 HEE 降低小鼠血液嗜中性白血球次群、減緩大腸組織之免疫細胞浸潤與維持完整的腸道上皮，AE 則皆無效用，故推論 HEE 相較於 AE 具有緩解腸炎之潛在效應。接續在實驗二我們調整 HEE 劑量並增加小鼠數量，並分別預先管餵一週小根蒜 (250 mg HEE/kg/day 或 500 mg HEE/kg/day)，以證實預防性給予 HEE 對於小鼠急性腸炎的保護效應與作用機轉。

第一節 小根蒜之組成分

測得新鮮小根蒜鱗莖具 30 種揮發性化合物 (total volatile components)，其含硫化合物之含量依序包括 dipropyl trisulfide、dipropyl disulfide 和 methyl propyl disulfide 等 (表 4-2)。若將這 30 種化合物總量 (total mass of the volatile components) 作為 100%計算各化合物的相對含量百分比 (relative quantity %)，其中含硫化合物 24 種，佔總揮發性化合物比例為 98.03%，包括 16 種直鏈含硫化合物中，含丙烯基的有 8 種，以及支鏈與環狀含硫化合物分別各有 4 種，以上這些揮發性物質應是賦予小根蒜獨特辛嗆氣味的主要來源。

相較於薤白，新鮮小根蒜鱗莖的研究較少。Wu 等人 (2020) 分析新鮮小根蒜鱗莖中具揮發性物質共測得 27 個化合物，其中有 15 個化合物為含硫化合物，其含量依序為 dimethyl trisulfide、1,3-dithiane 和 methanol 等，佔總揮發性組成分的 52.11%，大多為直鏈含硫化合物。另外，彭等人 (2020) 也分析新鮮小根蒜測得之結果與上述相同，且其中含有 10 種直鏈與 4 種環狀含硫化合物。在本研究小根蒜亦含 dimethyl trisulfide 等含硫化合物，佔總揮發性化合物的含量比例高達 98.03%，造成與其它結果的差異 (Wu et al., 2020; 彭等人, 2020)，可能因不同栽種環境條件、代謝基因差異或分析條件等差異有關。

本研究以 LC/MS 鑑定出新鮮小根蒜鱗莖 AE 與 HEE 之活性組成分皆含有 Procyanidin A2 和 nor-ψ-tropine 等化合物 (表 4-3 和 4-4)。原花青素 A2 (Procyanidin A2) 是種多酚類化合物，於 LPS 誘導的 RAW264.7 細胞發現，Procyanidin A2 具有抑制促發炎細胞激素 TNF-α、IL-6、prostaglandin E2、nitric oxide 以及 ROS 之作用機制 (Wang et al., 2020)；Procyanidin A2 可調節 IL-4 誘導之人類肺泡上皮細胞 A549 產生的趨化因子 CCL26，以減輕肺部發炎 (Coleman et al., 2016)。比較 AE 和 HEE 的組成分差異，我們推測 HEE 中 menthoside、chenodeoxycholic acid、quercetin 3-glucosyl-(1->4)-xylosyl-(1->4)-rhamnoside、α-monolinolein、26,27-dihydroxy-lanosta-7,9 (11), 24-triene-3,16-dion、epianhydrobelachinal 和 dihydro-N-methyl isopelletierine 等化合物或許可能具有抗發炎和調節免疫作用。先前研究指出 chenodeoxycholic acid 對於果糖誘導的 Wistar 大鼠腎損傷，具有調節腎臟脂質代謝、減少蛋白尿、改善腎纖維化、降低發炎和減緩氧化壓力之作用 (Hu et al., 2012)。槲皮素 (quercetin) 是一種常見於蔬菜和水

果中的類黃酮。quercetin 可藉由降低血液和腸道組織中促發炎激素、增強腸道緊密連結蛋白與維持上皮之完整性、減緩嗜中性白血球與巨噬細胞浸潤至腸道組織，並降低 Th17 細胞和增加 Treg 細胞數量，以緩解 DSS 引起的結腸炎 (Diez-Echave et al., 2021; Dong et al., 2020; Long et al., 2020; Riemschneider et al., 2021)。然而這些化合物對於腸炎的保護效應和是否為小根蒜萃取物的主要活性組成分，仍有待未來進一步的研究與探討。

第二節 小根蒜對於腸道發炎之影響

DSS 是一種以化學誘導的腸炎模式，其對腸上皮細胞產生毒性，並破壞上皮層和腸壁，而增加腸道通透性和細菌的浸潤。於腸炎動物模式中，可明顯觀察到發炎的腸道結構被破壞，具有長度縮短、水腫而重量增加之特徵，因此當大腸組織長度愈短或重量愈重時，表示腸炎程度越高；給予 DSS 誘導後，小鼠即表現出嚴重的直腸出血、血便、體重減輕和活動能力下降之現象 (Okayasu et al., 1990)，學界普遍採用 Nunes 等人 (2018) 之方法或修飾，透過評估直腸出血、血便、體重減輕之程度，來給予相對應分數，並以 DAI 分數表示。當 DAI 分數越高，即腸炎嚴重程度越高 (Chassaing et al., 2014; Melgar et al., 2005; Nunes et al., 2018)。

結合球蛋白 (haptoglobin) 為一種急性期蛋白，可反應出以 DSS 誘導之小鼠腸炎的發炎程度，可作為評估發炎指標之一 (Melgar et al., 2005)。腸道灌洗液 (CLF) 中免疫球蛋白質濃度的測定，因其簡易且客觀，故為臨床診斷之指標 (Choudari et al., 1993)。臨床試驗發現，一般健康者之腸道中主要所分泌的免疫球蛋白為 IgA，而 IBD 患者的 CLF 則發現具有高濃度的 IgG (Macpherson et al., 1996)，因此，IgG 濃度的測定被認為是評估 IBD 患者疾病活動度分級之特定指標 (正常範圍：IgG < 1-10 μg/ml) (Brydon et al., 1993; O'Mahony et al., 1991)。

實驗一以 DSS 誘導小鼠急性腸炎，使其大腸組織顯著縮短與增重，而大腸重量長度比顯著增加 (圖 4-4)，DAI 分數亦顯著升高 (圖 4-2)，與先前研究相符，表示皆已成功藉由 3% DSS 誘導急性腸炎之動物模式的建立。預先給予小根蒜 AE 和 HEE 在大腸重量長度比皆無顯著變化，在 DAI 分數部分，僅觀察到小根蒜 HEE 於實驗第 14 天具有顯著降低，因此，推測小根蒜 HEE 較 AE 具減緩腸炎症狀之潛

能。

實驗二以 DSS 誘導小鼠急性腸炎，使其大腸組織顯著縮短與增重，而大腸重量長度比顯著增加 (圖 4-13)，DAI 分數亦顯著升高 (圖 4-11)，與先前研究相符。此外，也顯著增加血漿 haptoglobin 與 CLF 的 IgG 濃度 (圖 4-14)，提升腸道發炎之重要指標，顯示已成功建立急性腸炎的動物模式。預先給予小根蒜 HEE，在大腸重量長度比、DAI 分數、血漿 haptoglobin 與 CLF 的 IgG 濃度皆顯著降低。因此，結果顯示預先給予小根蒜 HEE，對於急性期腸炎症狀具有改善之效果。

第三節 小根蒜對於腸道黏膜屏障之影響

腸道黏膜屏障的主要功能為腸腔與外部環境的區隔，以防止細菌或有害物的侵入。腸道黏液層是覆蓋在腸黏膜表面的保護性凝膠狀物質，由杯狀細胞分泌的大量黏液素所構成之第一道屏障 (Hayes et al., 2018)。Muc2 有效阻止病原體入侵腸上皮細胞，亦可供腸道中的共生細菌之棲息地和作為營養物質。Tff3 則藉由抑制 IEC 細胞凋亡，來使黏膜癒合 (Taupin & Podolsky, 2003)，先前臨床研究也顯示 Tff3 的表現可作為 UC 患者的腸道黏膜癒合之指標 (Kondo et al., 2018)。異常的免疫反應和腸道發炎，可能引發黏膜屏障損壞，如：功能受損導致杯狀細胞數量減少，使得黏液產生異常而減少黏液層之厚度。Muc2 和 Tff3 的缺乏，導致腸道內的病原體侵入腸道上皮細胞，增強腸道發炎反應並阻礙黏膜修復與恢復 (Kim & Ho, 2010; Loncar et al., 2003)。以 1.5% DSS 誘導雄性 C57BL/6 小鼠腸炎五天後，其 Muc2 和 Tff3 之 mRNA 表現量上升，表示此腸道黏膜損傷劇嚴重，而更加需要進行調節和黏膜修復，並可用來作為急性發炎之指標 (Hoebler et al., 2006; Hsiung et al., 2014)。至於，上皮細胞間的緊密連接蛋白，主要為跨膜蛋白 occludin 和 claudin-1 與細胞連結蛋白 ZO-1 所組成之物理屏障，以維持正常的細胞通透性 (Tan & Zheng, 2018)。以 2.5% DSS 誘導雄性 C57BL/6 小鼠腸炎一週後，顯著降低 ZO-1、occludin-1 和 claudin-1 之 mRNA 表現量，推測表示此時 DSS 已嚴重損壞黏膜屏障的完整性與功能性，且緊密連接組織亦被破壞 (Qu et al., 2021; Rui et al., 2021; Wu et al., 2021)。

實驗二以 DSS 誘導小鼠急性腸炎，Muc2 及 ZO-1 之 mRNA 表現量相較於正

常小鼠皆仍有增加之趨勢，但未達顯著差異 (圖 4-20A 和 4-20C)，而 Tff3 則顯著上升 (圖 4-20B)。與先前研究稍不同，推測本急性腸炎誘導模式，腸道屏障破壞與發炎程度尚未至非常嚴重階段，因此僅觀察到 Tff3 的表現量顯著上升，以促進黏膜之修復癒合；或因組內個體間差異大而導致部分無顯著效應。預先給予小根蒜 HEE 使 Tff3 之 mRNA 表現量顯著下降，而 Muc2 及 ZO-1 之 mRNA 表現量則皆無顯著影響，另外，於大腸組織切片亦觀察到，DL 與 DH 組皆有較完整的杯狀細胞 (圖 4-21)，結果推論小根蒜 HEE 可能具減緩腸道損傷並有相對較低發炎之潛力。

第四節 小根蒜對於先天性免疫之影響

當受到感染或損傷時，體內啟動發炎反應為正常之生理反應，先天性免疫系統是第一道防線，開啟即時的保護反應，也有助於啟動後天性免疫反應。先天性免疫系統由上皮細胞、嗜中性白血球、單核球、巨噬細胞和 DC 等所組成。這些細胞藉由分泌細胞激素及趨化因子等共同作用而引起發炎。嗜中性白血球是人體血液中最豐富的血球細胞群，也是對於病原體防禦的第一線免疫細胞。IBD 患者於發炎初期，嗜中性白血球大量進入腸道黏膜，吞噬微生物並促進黏膜癒合和減緩發炎。然而，若大量嗜中性白血球浸潤於發炎的腸黏膜並堆積在上皮細胞，則導致黏膜結構、上皮屏障受損及促發炎介質的產生 (Zhou & Liu, 2017)。腸道所分泌的趨化因子 CXCL1，增加趨化嗜中性白血球浸潤至腸道組織，進行發炎反應，若過度活化或大量浸潤於發炎的腸道組織，會產生和釋放過多的促發炎激素，便會造成腸道通透性增加與加劇黏膜之損傷 (Li et al., 2021; Shea-Donohue et al., 2008)。相較於健康者，在 IBD 患者與 DSS 誘導小鼠急性腸炎中，其血液和大腸組織皆具有大量嗜中性白血球堆積，以及增加嗜中性白血球所釋放 ROS 與 NET 的形成 (Li et al., 2020; Zhou et al., 2018)，以 DSS 誘導小鼠腸炎之大腸組織中具有大量嗜中性白血球的浸潤，以及分泌過多的趨化因子，促使更多發炎性細胞激素的產生，引起腸道黏膜損傷，而腸道黏膜受損，再進一步刺激嗜中性白血球浸潤，形成過度且持續發炎之惡性循環 (Li et al., 2021; Liu et al., 2016)。

單核球和巨噬細胞亦是先天性免疫反應的重要角色，腸道上皮細胞具有表現

CCR2 之功能。其中 CCL2 是促使單核球或巨噬細胞浸潤至發炎腸道的關鍵趨化因子 (Nakanishi et al., 2015)。巨噬細胞所極化之不同表型與其功能，取決於進入的環境而異，當進入發炎腸道組織的單核球，會先分化為具促發炎性的 M1 巨噬細胞，使腸道大量浸潤並分泌促發炎細胞激素與趨化因子，以吸引更多單核球匯集來抵禦微生物 (Kühl et al., 2015; Schenk et al., 2007)；再促使具抗發炎性的 M2 巨噬細胞產生，分泌抗發炎之細胞激素，以促進腸道組織修復和免疫調節作用。故 M1/ M2 巨噬細胞分化的平衡，對於免疫反應之調節是重要的 (Gordon & Martinez, 2010; Zhu et al., 2014)。You 等人 (2016) 以 DSS 誘導小鼠急性腸炎之動物實驗，血液發炎性單核球與抗發炎性單核球的比率皆上升，也發現具有大量巨噬細胞浸潤到腸道組織，並顯著增加促發炎細胞激素 TNF-α、IL-6 和 IL-12/23 之 mRNA 表現量。當減少這些先天性免疫細胞的比率，以及抑制發炎細胞激素之表現，即有緩解腸炎症狀之保護效應，顯示血液與大腸組織之單核球與巨噬細胞皆是發炎反應之調節者。

細胞激素於免疫細胞之間的相互作用，是產生局部和全身發炎反應中之關鍵角色。於正常情況下，腸道可以維持促發炎細胞激素 (TNF-α、IFN-γ、IL-6 和 IL-12) 與抗發炎細胞激素 (IL-4、IL-10 和 IL-11) 之間的平衡，若腸道恆定性以及促發炎和抗發炎細胞激素之間的平衡被受破壞，使促發炎細胞激素的數量和活性增加，進而導致腸道組織損傷和過度發炎反應 (Zhu et al., 2019)。過去動物實驗發現，腸炎小鼠之腸道組織中 IFN-γ、IL-6、TNF-α和 IL-17A 之 mRNA 表現量顯著提升，為導致腸炎關鍵因素之一 (Chen et al., 2017; Strober & Fuss, 2011)。另外 DSS 誘導小鼠腸炎，其腸道單核球與巨噬細胞浸潤明顯增加，若藉由抑制 M1 巨噬細胞之極化、抑制 NF-κB 的激活，以及降低 TNF-α等促發炎細胞激素的表現，則可減緩腸炎嚴重程度 (Ginzel et al., 2017; He et al., 2019)。

實驗一以 DSS 誘導小鼠急性腸炎，造成血液嗜中性白血球比率上升；抗發炎性單核球比率下降；發炎性單核球則無影響 (圖 4-5)，並顯著提升大腸組織 CCL2 及 TNF-α 之 mRNA 表現量，而 CXCL1 之 mRNA 表現量提升但未達顯著影響 (圖 4-8)，與先前研究稍不同，推測因組內小鼠個體差異較大或樣本數較小所導致。另外，也觀察到大腸組織具有嚴重損傷之現象 (圖 4-9)。預先給予小根蒜 AE，無論在血液中先天性免疫細胞比率，以及大腸組織之促發炎相關因子皆無顯著效應，而 HEE 顯著降低血液嗜中性白血球之比率，也減緩大腸組織之免疫細胞的浸潤程

度，並維持完整腸道上皮，至於促發炎相關因子則皆無顯著影響。結果顯示在此實驗設計條件之下，小根蒜 HEE 較 AE 具有減緩腸炎之潛能。

實驗二以 DSS 誘導小鼠急性腸炎，造成血液嗜中性白血球與發炎性單核球比率上升，而抗發炎性單核球比率下降 (圖 4-15)，並顯著提升大腸組織 CCL2、TNF-α及 CXCL1 之 mRNA 表現量 (圖 4-19)，另於大腸組織切片發現具有大量免疫細胞浸潤與損傷 (圖 4-21)。上述觀察與先前研究相符，顯示急性腸炎之血液具有大量先天性免疫細胞堆積，而大腸組織對於單核球與嗜中性白血球亦有較強的募集能力，導致腸道處於嚴重發炎狀態。然而預先給予小根蒜 HEE 顯著降低急性腸炎小鼠血液嗜中性白血球、發炎性單核球比率，以及大腸組織促發炎相關因子 CCL2、TNF-α及 CXCL1 之 mRNA 表現量，並於大腸組織切片觀察其腸道隱窩、上皮細胞與絨毛較為完整；黏膜層與黏膜下層之免疫細胞浸潤程度較低。根據這些結果推論預先給予小根蒜 HEE 能調節腸道外周血液 (peripheral blood) 的先天性免疫細胞比率，以及抑制腸道促發炎相關激素的表現，來降低腸道免疫細胞浸潤與減緩發炎反應。

此外，從血液嗜中性白血球比率觀察，實驗二嗜中性白血球比率約佔 40% (圖 4-14A)，而實驗一比率高達近 60% (圖 4-5A)，推論實驗一腸炎嚴重程度可能較高，或因小根蒜萃取物劑量不足，而導致小根蒜萃取物的預先介入使部分結果無顯著改善。

第五節 小根蒜對於後天性免疫之影響

T 細胞在 IBD 發病機制中為調節免疫反應之重要角色。腸道處於發炎時，血液中的 T 淋巴球比率會下降，而浸潤至發炎的腸道中進行免疫反應。過去動物研究顯示，在 DSS 誘導的腸炎急性期的大腸組織中，可以發現到 T 細胞和 B 細胞數量明顯增加，同時於脾臟及 MLN 中的 T 細胞數量則是減少的 (Hall et al., 2011)，由此可知，外周 T 細胞 (peripheral blood T lymphocyte) 皆匯集並浸潤到腸道中，進一步加劇腸道黏膜的損傷。因此，推論 T 細胞為引起腸道發炎的重要關鍵角色之一 (Hall et al., 2011)。$CD4^+$ T 細胞是腸道的免疫誘導和效應位點 (immunological inductive and effector sites)，也是免疫恆定性和發炎反應之重要調節者，因此，若

過多的 T 細胞活化與浸潤，導致腸道組織損傷，便是引發 IBD 之關鍵特徵 (Shale et al., 2013)。於腸道上皮細胞和固有層中皆含有大量活化的 $CD4^+$記憶 T 細胞，因腸道菌群的定植生態位、抗原類型和代謝特性而異，導致不同 T 細胞次群的產生與其功能的可塑性。經微生物群的激活後，APC 抗原呈現，分化為各種 Th 細胞和 Treg 細胞，並啟動對腸道抗原之後天性免疫反應 (Tindemans et al., 2020)。

Th17/Treg 細胞平衡是維持腸道免疫恆定之重要因子 (Fasching et al., 2017; Yan et al., 2020)。Th17 細胞在 IBD 的發病機制中具有雙重作用 (主要為促發炎作用)，不僅可以藉由維持免疫微環境的平衡來保護腸道黏膜，亦可使得促發炎細胞激素加劇腸道之發炎反應 (Daniels & Teixeiro, 2015)。Th17 細胞的分化過程受細胞激素之影響，可分為三個階段：首先 IL-6 和 TGF-β刺激細胞的分化；IL-21 促使擴大細胞的分化狀態；分化後期以 IL-23 維持細胞的穩定成熟 (Ueno et al., 2018)。而腸道組織中的 Treg 細胞，具有抑制免疫反應作用，在維持免疫耐受和平衡方面為重要角色，主要藉由分泌 TGF-β和 IL-10 等抗發炎細胞激素參與各種免疫疾病，以抑制免疫細胞的活性並控制發炎反應 (Harrison & Powrie, 2013; Pereira et al., 2017)。急性腸炎小鼠之脾臟、MLN 和腸道固有層中 Th17 細胞與 Tregs 細胞皆顯著增加 (Chen et al., 2017)。臨床研究也顯示，與一般健康者相比，IBD 患者的腸道黏膜具有大量 Th17 細胞的浸潤及其增加分泌 IL-17A、IL-21 和 IL-23 等細胞激素，以觸發、放大發炎反應並增加疾病活動指數 (Fujino et al., 2003; Jiang et al., 2014; M. Veldhoen et al., 2006)。Th17 細胞的不斷產生與促使分泌過量的發炎性細胞激素，遠超過 Tregs 細胞的免疫耐受性，便引起劇烈發炎反應 (Noack & Miossec, 2014)。C57BL/6 小鼠腸道中 Tregs 細胞數量高達 50%的耗竭，引發過度巨噬細胞浸潤並增加促發炎細胞激素的表現，來加劇 DSS 誘導的結腸炎 (Zhang et al., 2016)，另外，若其功能缺失，亦會使細胞的生成受到抑制，導致腸道發炎及其他併發症的產生 (Bacchetta et al., 2018)。臨床和動物實驗皆發現，Treg 細胞對於抑制腸道發炎反應相當重要 (Velikova et al., 2020)。因此，Th17/Treg 細胞失衡是造成 IBD 進展之關鍵因素 (Gálvez, 2014b; Mayne & Williams, 2013; Yan et al., 2020)。目前研究對於 IBD 患者血液中 Treg 細胞數目增加或減少尚未定論。在 IBD 患者血液中發現 Treg 細胞數量減少，且 Treg 細胞比率與疾病活動指數成反比 (Dige et al., 2011; Maul et al., 2005; Pedros et al., 2016)；相反的是，於另一項臨床與動物研究發現，IBD 患者或急性腸炎小鼠之血液和大腸組織中，Treg 細胞數量皆

是顯著增加的 (Li et al., 2019; Sznurkowska et al., 2020)，推測可能因其 Treg 細胞的功能缺失而無法進行免疫調節作用，或為了來抑制過度的免疫反應，而促使產生更多 Treg 細胞，以維持免疫之恆定性。

實驗一以 DSS 誘導小鼠急性腸炎，造成血液 Th 細胞與 Tc 細胞比率皆顯著下降 (圖 4-6)；脾臟 Th 細胞與 Tc 細胞比率則皆無影響 (圖 4-7)，與先前研究稍不符，推論因外周血 (peripheral blood) 之 T 細胞匯集並浸潤至發炎腸道，而脾臟為聚集許多 T 細胞仍處於嚴重發炎狀態。預先給予小根蒜 AE 使得脾臟中 Th 細胞顯著較低，而 HEE 則無論於血液或脾臟之淋巴球比率則皆無顯著影響，推測因急性期脾臟仍具嚴重免疫細胞之堆積，或小根蒜萃取物劑量不足而未達減緩腸炎之效果。

實驗二以 DSS 誘導小鼠急性腸炎，造成血液 Th 細胞、Tc 細胞、B 細胞，以及脾臟中 Th 細胞與 Tc 細胞比率皆顯著下降，與先前研究相符，故推論因周邊之 T 細胞與 B 細胞皆匯集並浸潤至發炎腸道 (圖 4-16 和 4-17)。另外，急性腸炎小鼠的脾臟中 Th17 細胞與 Treg 細胞相關細胞激素及轉錄因子 (IL-17A、ROR-γt、Foxp3、IL-10 與 TGF-β1) 之 mRNA 表現量皆顯著上升 (圖 4-18)，以及血液 Treg 細胞比率亦上升 (圖 4-16D)，推論因其 Treg 細胞的功能缺失而無法進行免疫調節作用，或於腸炎急性期時仍為嚴重發炎狀態，而促使產生更多的 Treg 細胞來抑制與調節免疫反應，以維持免疫恆定性。預先給予小根蒜 HEE 顯著提高於血液 T 細胞與 B 細胞比率，推測以減緩兩種淋巴球浸潤至大腸組織。也使得脾臟 Th17 細胞和 Treg 細胞相關細胞激素及轉錄因子 (IL-17A、ROR-γt、Foxp3、IL-10 與 TGF-β1) 之 mRNA 表現量皆顯著下降，並同時與血液 Treg 細胞比率下降。結果推測小根蒜 HEE 可能具有調節周邊與腸道間的 T 細胞分布比率，並維持 Th 細胞和 Treg 細胞之間的恆定，進而減少腸道中免疫細胞的浸潤與減緩發炎反應之潛能。

第六章 結論

實驗結果顯示，新鮮小根蒜鱗莖至少含有 30 種揮發性化合物，其中含硫化合物高達 24 種。小根蒜 AE 和 HEE 皆測得含有 procyanidin A2 和 nor-ψ-tropine 等化合物。然而相較於 AE，HEE 具有 chenodeoxycholic acid 和 quercetin 3-glucosyl-(1->4)-xylosyl-(1->4)-rhamnoside 等組成分。預先給予小根蒜 250 mg HEE/kg/day 或 500 mg HEE/kg/day，對於 DSS 誘導小鼠之急性腸炎，具降低血液先天性免疫細胞比率、調節周邊與腸道間的 T 細胞分布和減輕大腸組織之發炎與損傷程度，以降低發炎指標並減緩腸道發炎之反應。因此，本研究結果推論，預防性給予小根蒜 HEE 可透過免疫調節與抑制發炎反應，具有緩解急性腸炎之潛力。

表 6-1、實驗一數據總結

Table 6-1. Summary of experiment 1 results.

Sample	**Items**		**3% DSS (DC)**	**200 mg AE/kg (DW)**	**200 mg HEE/kg (DHE)**
Body weight			↓	-	-
DAI score			↑	-	↓ **(Day14)**
Organ	Spleen weight		↑	↑	↑
	Colon weight/length		↑	-	-
Blood	Innate immune cells	Neutrophil	↑	-	↓
		Inflammatory monocyte	-	-	-
		Anti-inflammatory monocyte	↓	-	-
	Lymphocyte	Th cell	↓	-	-
		Tc cell	↓	-	-
Spleen	Lymphocyte	Th cell	**X**	↓	-
		Tc cell	**X**	-	-
Colon	Inflammatory related gene	CCL2 and TNF-α	↑	-	-
		CXCL1	**X**	-	-
	Histopathology		↑	-	↓

X: no significant difference compared with NC.
-: no significant difference compared with DC.

表 6-2、實驗二數據總結

Table 6-2. Summary of experiment 2 results.

Sample	Items		3%DSS (NC vs. DC)	HEE (DC vs. DL/DH
Body weight			↓	-
DAI score			↑	↓
Organ	Spleen weight		↑	-
	Colon weight/length		↑	↓
Blood	Innate immune cells	Neutrophil	↑	↓
		Inflammatory monocyte	↑	↓
		Anti-inflammatory monocyte	↓	-
	Lymphocyte	Th cell, Tc cell and B cell	↓	↑
		Treg cell	↑	↓
Plasma	Inflammation evaluation	Haptoglobin	↑	↓
Spleen	Lymphocyte	Th cell and Tc cell	↓	-
		B cell	↑	-
	Th17 and Treg related gene	Foxp3, IL-10, TGF-β1, IL-17A and ROR-γt	↑	↓
Colon	Mucosal barrier related gene	Muc2 and ZO-1	**X**	-
		Tff3	↑	↓
	Inflammatory related gene	TNF-α, CCL2 and CXCL1	↑	↓
	Histopathology	Injury score	↑	↓
CLF	Immunoglobin	IgG	↑	↓

X: no significant difference compared with NC.
-: no significant difference compared with DC.

第七章 參考文獻

《中國植物誌》。錢崇澍、陳煥鏞 (1980)。第十四卷 265-266。科學出版社。

藥用植物圖像數據庫。中 (2022)。薤白 Xiebai。

吳雪月 (2021)。台灣新野菜主義 (阿美族語版; U tadadateng nu Pangcah)，第 1 版。邦城文化事業股份有限公司。

全中和 (2003)。花蓮阿美族的特有蔬菜－火蔥。花蓮區農業專訊。44:19-20。

游之穎、詹庭筑、張育森等人 (2020)。宜花地區野菜資源盤點與營養價值初探。花蓮區農業改良場研究彙報 (Bull. Hualien DARES)。39:13-33。

黃涵、洪立 (1988)。蔥類：洋蔥。台灣蔬菜彩色圖說。97-99。

彭穎、黃晴、李珂 (2020)。發酵對小根蒜揮發性物質、有機硫化合物及其抗氧化活性的影響。食品工業科技。第 41 卷，第 22 期。

Abraham, C., & Cho, J. H. (2009). Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*, *361*(21), 2066-2078.

Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M. K., & Öhman, L. (2018). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *53*(4), 379-389.

Alex, P., Zachos, N. C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T.-E., Conklin, L. S., Centola, M., & Li, X. (2008). Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *15*(3), 341-352.

Ananthakrishnan, A. N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *12*(4), 205-217.

Arsenio, J. (2020). Single-cell analysis of CD8 T lymphocyte diversity during adaptive immunity. *WIREs Systems Biology and Medicine*, *12*(2), e1475.

Asemani, Y., Zamani, N., Bayat, M., & Amirghofran, Z. (2019). Allium vegetables for possible future of cancer treatment. *Phytotherapy Research*, *33*(12), 3019-3039.

Astó, E., Méndez, I., Audivert, S., Farran-Codina, A., & Espadaler, J. (2019). The efficacy of probiotics, prebiotic inulin-type fructans, and synbiotics in human ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, *11*(2), 293.

Awane, M., Andres, P. G., Li, D. J., & Reinecker, H.-C. (1999). NF-κB-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-α-, and IL-1β-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *The Journal of Immunology*, *162*(9), 5337-5344.

Ayaka Usui, Yosuke Matsuo, Takashi Tanaka, Kazusato Ohshima, Shinji Fukuda & Kanji Ishimaru. (2017). Phenolic constituents from *Allium macrostemon* Bunge. 生藥學雜誌, 71(1), 51-52.

Bacchetta, R., Barzaghi, F., & Roncarolo, M.-G. (2018). From IPEX syndrome to Foxp3 mutation: a lesson on immune dysregulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1417*(1), 5-22.

Bankole, E., Read, E., Curtis, M. A., Neves, J. F., & Garnett, J. A. (2021). The relationship between mucins and ulcerative colitis: a systematic review. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(9), 1935.

Bennike, T. B., Carlsen, T. G., Ellingsen, T., Bonderup, O. K., Glerup, H., Bøgsted, M., Christiansen, G., Birkelund, S., Stensballe, A., & Andersen, V. (2015). Neutrophil extracellular traps in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *21*(9), 2052-2067.

Bergstrom, K. S. B., Guttman, J. A., Rumi, M., Ma, C., Bouzari, S., Khan, M. A., Gibson, D. L., Vogl, A. W., & Vallance, B. A. (2008). Modulation of intestinal goblet cell function

during infection by an attaching and effacing bacterial pathogen. *Infection and Immunity*, *76*(2), 796-811.
Bjarnason, I. (2017). The use of fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & hepatology*, *13*(1), 53-56.
Boschetti, G., Kanjarawi, R., Bardel, E., Collardeau-Frachon, S., Duclaux-Loras, R., Moro-Sibilot, L., Almeras, T., Flourié, B., Nancey, S., & Kaiserlian, D. (2016). Gut inflammation in mice triggers proliferation and function of mucosal $Foxp3^+$ regulatory T cells but impairs their conversion from $CD4^+$ T cells. *Journal of Crohn's and Colitis*, *11*(1), 105-117.
Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, *303*(5663), 1532-1535.
Brydon, W. G., Choudari, C. P., & Ferguson, A. (1993). Relative specificity for active inflammatory bowel disease of plasma-derived proteins in gut lavage fluid. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, *5*(4), 269-274.
Buda, A., Jepson, M. A., & Pignatelli, M. (2012). Regulatory function of trefoil peptides (TFF) on intestinal cell junctional complexes. *Cell Communication & Adhesion 19*(5-6), 63-68.
Cao, H.-X., Zhu, K.-X., Fan, J.-G., & Qiao, L. (2014). Garlic-derived allyl sulfides in cancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *14*(6), 793-799.
Capurso, G., & Lahner, E. (2017). The interaction between smoking, alcohol and the gut microbiome. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *31*(5), 579-588.
Cedric Auffray, Michael H. Sieweke, & Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 669-692.
Chandra, H., Sharma, K. K., Tuovinen, O. H., Sun, X., & Shukla, P. (2021). Pathobionts: mechanisms of survival, expansion, and interaction with host with a focus on clostridioides difficile. *Gut microbes*, *13*(1), 1979882-1979882.
Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*, *104*(1), 15.25.1-15.25.14.
Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J. M., Jack, R. S., Wunderlich, F. T., Brüning, J. C., Müller, W., & Rudensky, A. Y. (2011). Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity*, *34*(4), 566-578.
Chen, P., Zhou, X., Zhang, L., Shan, M., Bao, B., Cao, Y., Kang, A., & Ding, A. (2015). Anti-inflammatory effects of Huangqin tang extract in mice on ulcerative colitis. *Journal Ethnopharmacol*, *162*, 207-214.
Chen, X., Fang, D., Li, L., Chen, L., Li, Q., Gong, F., & Fang, M. (2017). Glycyrrhizin ameliorates experimental colitis through attenuating interleukin-17-producing T cell responses via regulating antigen-presenting cells. *Immunology Research*, *65*(3), 666-680.
Chen, Y. S., Lian, Y. Z., Chen, W. C., Chang, C. C., Tinkov, A. A., Skalny, A. V., & Chao, J. C. (2022). Lycium barbarum polysaccharides and capsaicin inhibit oxidative stress, inflammatory responses, and pain signaling in rats with dextran sulfate sodium-induced colitis. *International Journal Molecular Sciences*, *23*(5), 2423.
Cheroutre, H., Lambolez, F., & Mucida, D. (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, *11*(7), 445-456.
Chicco, F., Magrì, S., Cingolani, A., Paduano, D., Pesenti, M., Zara, F., Tumbarello, F., Urru, E., Melis, A., Casula, L., Fantini, M. C., & Usai, P. (2020). Multidimensional impact

of mediterranean diet on IBD patients. *Inflammatory Bowel Diseases*, *27*(1), 1-9.
Choudari, C. P., O'Mahony, S., Brydon, G., Mwantembe, O., & Ferguson, A. (1993). Gut lavage fluid protein concentrations: objective measures of disease activity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *104*(4), 1064-1071.
Choy, M. C., Visvanathan, K., & De Cruz, P. (2017). An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *23*(1), 2-13.
Coleman, S. L., Kruger, M. C., Sawyer, G. M., & Hurst, R. D. (2016). Procyanidin A2 modulates IL-4-induced CCL26 production in human alveolar epithelial cells. *International Journal Molecular Sciences*, *17*(11), 1888.
Connell, W. R., Kamm, M. A., Dickson, M., Balkwill, A. M., Ritchie, J. K., & Lennard-Jones, J. E. (1994). Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet*, *343*(8908), 1249-1252.
Cooper, M. D. (2015). The early history of B cells. *Nature Reviews Immunology*, *15*(3), 191-197.
Costa, R. F. A., Ferrari, M. L. A., Bringer, M.-A., Darfeuille-Michaud, A., Martins, F. S., & Barnich, N. (2020). Characterization of mucosa-associated Escherichia coli strains isolated from Crohn's disease patients in Brazil. *BMC Microbiology*, *20*(1), 178.
Crotty, S. (2015). A brief history of T cell help to B cells. *Nature Reviews Immunology*, *15*(3), 185-189.
Cui, L., Guan, X., Ding, W., Luo, Y., Wang, W., Bu, W., Song, J., Tan, X., Sun, E., Ning, Q., Liu, G., Jia, X., & Feng, L. (2021). Scutellaria baicalensis Georgi polysaccharide ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by improving intestinal barrier function and modulating gut microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*, *166*, 1035-1045.
Daniels, M. A., & Teixeiro, E. (2015). TCR signaling in T cell memory. *Frontiers in Immunology*, *6*, 617-617.
Daperno, M., D'Haens, G., Van Assche, G., Baert, F., Bulois, P., Maunoury, V., Sostegni, R., Rocca, R., Pera, A., Gevers, A., Mary, J. Y., Colombel, J. F., & Rutgeerts, P. (2004). Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc*, *60*(4), 505-512.
de Souza, H. S. P., & Fiocchi, C. (2016). Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *13*(1), 13-27.
Derwa, Y., Gracie, D. J., Hamlin, P. J., & Ford, A. C. (2017). Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *46*(4), 389-400.
Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G., & Martens, E. C. (2016). A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell*, *167*(5), 1339-1353.e1321.
Diez-Echave, P., Ruiz-Malagón, A. J., Molina-Tijeras, J. A., Hidalgo-García, L., Vezza, T., Cenis-Cifuentes, L., Rodríguez-Sojo, M. J., Cenis, J. L., Rodríguez-Cabezas, M. E., Rodríguez-Nogales, A., Gálvez, J., & Lozano-Pérez, A. A. (2021). Silk fibroin nanoparticles enhance quercetin immunomodulatory properties in DSS-induced mouse colitis. *International Journal of Pharmaceutics*, *606*, 120935.
Dige, A., Hvas, C. L., Deleuran, B., Kelsen, J., Bendix-Struve, M., Dahlerup, J. F., & Agnholt, J. (2011). Adalimumab treatment in Crohn's disease does not induce early changes in regulatory T cells. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *46*(10), 1206-1214.
Dixon, L. J., Kabi, A., Nickerson, K. P., & McDonald, C. (2015). Combinatorial effects of diet

and genetics on inflammatory bowel disease pathogenesis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *21*(4), 912-922.
Dolan, K. T., & Chang, E. B. (2017). Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(1), 1600129.
Dong, Y., Lei, J., & Zhang, B. (2020). Dietary quercetin alleviated DSS-induced colitis in mice through several possible pathways by transcriptome analysis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *21*(15), 1666-1673.
Eichele, D. D., & Kharbanda, K. K. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: an indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, *23*(33), 6016-6029.
El-Sayed, H. S., Chizzola, R., Ramadan, A. A., & Edris, A. E. (2017). Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. *Food Chemistry*, *221*, 196-204.
Erben, U., Loddenkemper, C., Doerfel, K., Spieckermann, S., Haller, D., Heimesaat, M. M., Zeitz, M., Siegmund, B., & Kühl, A. A. (2014). A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *International journal of clinical and experimental pathology*, *7*(8), 4557-4576.
Farombi, E. O., Adedara, I. A., Ajayi, B. O., Ayepola, O. R., & Egbeme, E. E. (2013). Kolaviron, a natural antioxidant and anti-inflammatory phytochemical prevents dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *113*(1), 49-55.
Fasching, P., Stradner, M., Graninger, W., Dejaco, C., & Fessler, J. (2017). Therapeutic potential of targeting the Th17/Treg axis in autoimmune disorders. *Molecules*, *22*(1), 134.
Feuerstein, J. D., & Cheifetz, A. S. (2017). Crohn disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Mayo Clinic Proceedings*, *92*(7), 1088-1103.
Feuerstein, J. D., Moss, A. C., & Farraye, F. A. (2019). Ulcerative colitis. *Mayo Clinic Proceedings*, *94*(7), 1357-1373.
Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., & Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, *52*(1), 65.
Gallo, R. L., & Hooper, L. V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Reviews Immunology*, *12*(7), 503-516.
Garcia-Hernandez, V., Quiros, M., & Nusrat, A. (2017). Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1397*(1), 66-79.
Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G. R., & Di Sabatino, A. (2014). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews*, *13*(1), 3-10.
Gibson, P. R. (2017). Use of the low-FODMAP diet in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *32*, 40-42.
Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, *14*(6), 392-404.
Ginzel, M., Feng, X., Kuebler, J. F., Klemann, C., Yu, Y., von Wasielewski, R., Park, J.-K., Hornef, M. W., Vieten, G., Ure, B. M., Kaussen, T., Gosemann, J. H., Mayer, S., Suttkus, A., & Lacher, M. (2017). Dextran sodium sulfate (DSS) induces necrotizing enterocolitis-like lesions in neonatal mice. *PLoS ONE*, *12*(8), e0182732-e0182732.
Gálvez, J. (2014a). Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD. *ISRN Inflammation*, *2014*, 1-14.

Gálvez, J. (2014b). Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD. *ISRN Inflammation*, *2014*, 928461-928461.
Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, *32*(5), 593-604.
Grainger, J. R., Konkel, J. E., Zangerle-Murray, T., & Shaw, T. N. (2017). Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, *469*(3-4), 527-539.
Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A. C., & Grundy, D. (2017). Gastrointestinal physiology and function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *239*, 1-16.
Guan, Q. (2019a). A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Immunology Research*, *2019*, 7247238.
Guan, Q. (2019b). A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Immunology Research*, *2019*, 1-16.
Gutcher, I., & Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(5), 1119-1127.
Halfvarson, J., Brislawn, C. J., Lamendella, R., Vázquez-Baeza, Y., Walters, W. A., Bramer, L. M., D'Amato, M., Bonfiglio, F., McDonald, D., Gonzalez, A., McClure, E. E., Dunklebarger, M. F., Knight, R., & Jansson, J. K. (2017). Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nature Microbiology*, *2*(5), 17004.
Hall, L. J., Faivre, E., Quinlan, A., Shanahan, F., Nally, K., & Melgar, S. (2011). Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, *56*(1), 79-89.
Hanauer, S. B. (2017). Combination therapy for inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (N Y)*, *13*(5), 296-298.
Harrison, O. J., & Powrie, F. M. (2013). Regulatory T cells and immune tolerance in the intestine. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(7), a018341.
Hayes, C. L., Dong, J., Galipeau, H. J., Jury, J., McCarville, J., Huang, X., Wang, X.-Y., Naidoo, A., Anbazhagan, A. N., Libertucci, J., Sheridan, C., Dudeja, P. K., Bowdish, D. M. E., Surette, M. G., & Verdu, E. F. (2018). Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis. *Scientific Reports*, *8*(1), 14184-14184.
He, R., Li, Y., Han, C., Lin, R., Qian, W., & Hou, X. (2019). L-fucose ameliorates DSS-induced acute colitis via inhibiting macrophage M1 polarization and inhibiting NLRP3 inflammasome and NF-κB activation. *International Immunopharmacology*, *73*, 379-388.
Helander, H. F., & Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract - revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *49*(6), 681-689.
Hill, A. A., & Diehl, G. E. (2018). Identifying the patterns of pattern recognition receptors. *Immunity*, *49*(3), 389-391.
Hoebler, C., Gaudier, E., De Coppet, P., Rival, M., & Cherbut, C. (2006). Muc genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. *Digestive Diseases and Sciences*, *51*(2), 381-389.
Horowitz, J. E., Warner, N., Staples, J., Crowley, E., Gosalia, N., Murchie, R., Van Hout, C., Fiedler, K., Welch, G., King, A. K., Reid, J. G., Overton, J. D., Baras, A., Shuldiner, A. R., Griffiths, A., Gottesman, O., Muise, A. M., & Gonzaga-Jauregui, C. (2021). Mutation spectrum of NOD2 reveals recessive inheritance as a main driver of early onset Crohn's disease. *Scientific Reports*, *11*(1), 5595.
Hsiung, Y. C., Liu, J. J., Hou, Y. C., Yeh, C. L., & Yeh, S. L. (2014). Effects of dietary glutamine on the homeostasis of $CD4^+$ T cells in mice with dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *PLoS ONE*, *9*(1), e84410.

Hu, Z., Ren, L., Wang, C., Liu, B., & Song, G. (2012). Effect of chenodeoxycholic acid on fibrosis, inflammation and oxidative stress in kidney in high-fructose-fed Wistar rats. *Kidney and Blood Pressure Research*, *36*(1), 85-97.

Hu, Z., Zou, Q., & Su, B. (2018). Regulation of T cell immunity by cellular metabolism. *Frontiers of Medicine*, *12*(4), 463-472.

Huang, Y., & Chen, Z. (2016). Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. *American Journal of Translational Research*, *8*(6), 2490-2497.

Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor, W., Jr., Huber, F. J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, C. J., Rudensky, A. Y., Roncarolo, M. G., Battaglia, M., & Flavell, R. A. (2011). Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by $Foxp3^{-}$ and $Foxp3^{+}$ regulatory $CD4^{+}$ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity*, *34*(4), 554-565.

Hugot, J.-P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J. M., Lee, J. C., Beaugerie, L., Naom, I., Dupas, J.-L., Van Gossum, A., Groupe D'Etude Thérapeutique Des, A., Orholm, M., Bonaiti-Pellie, C., Weissenbach, J., Mathew, C. G., Lennard-Jones, J. E., Cortot, A., Colombel, J.-F., & Thomas, G. (1996). Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*, *379*(6568), 821-823.

Illescas, O., Rodríguez-Sosa, M., & Gariboldi, M. (2021). Mediterranean diet to prevent the development of colon diseases: a meta-analysis of gut microbiota studies. *Nutrients*, *13*(7), 2234.

Jakaria, M., Azam, S., Cho, D. Y., Haque, M. E., Kim, I. S., & Choi, D. K. (2019). The methanol extract of *Allium cepa* L. Protects inflammatory markers in LPS-induced BV-2 microglial cells and upregulates the antiapoptotic gene and antioxidant enzymes in N27-a cells. *Antioxidants (Basel)*, *8*(9), 348.

Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., & Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, *17*(6), 349-362.

Jeong, D. Y., Kim, S., Son, M. J., Son, C. Y., Kim, J. Y., Kronbichler, A., Lee, K. H., & Shin, J. I. (2019). Induction and maintenance treatment of inflammatory bowel disease: a comprehensive review. *Autoimmunity Reviews*, *18*(5), 439-454.

Jia, K., Tong, X., Wang, R., & Song, X. (2018). The clinical effects of probiotics for inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Medicine*, *97*(51), e13792.

Jiang, W., Su, J., Zhang, X., Cheng, X., Zhou, J., Shi, R., & Zhang, H. (2014). Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammation Research*, *63*(11), 943-950.

Jäger, S., Stange, E. F., & Wehkamp, J. (2013). Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbeck's Archives of Surgery*, *398*(1), 1-12.

Johansson, M. E., & Hansson, G. C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews Immunology*, *16*(10), 639-649.

Kühl, A. A., Erben, U., Kredel, L. I., & Siegmund, B. (2015). Diversity of intestinal macrophages in inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology*, *6*, 613-613.

Kaistha, A., & Levine, J. (2014). Inflammatory bowel disease: the classic gastrointestinal autoimmune disease. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, *44*(11), 328-334.

Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., & Yoshimura, A. (2016). Induced regulatory T cells: their development, stability, and applications. *Trends in Immunology*, *37*(11), 803-811.

Kang, S. H., Jeon, Y. D., Moon, K. H., Lee, J. H., Kim, D. G., Kim, W., Myung, H., Kim, J. S., Kim, H. J., Bang, K. S., & Jin, J. S. (2017). Aronia berry extract ameliorates the severity of dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice. *Journal of Medicinal Food*, *20*(7), 667-675.

Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Efstathiou, J., Valizadeh, A., Noda, M., Playford, R. J., Kmiot, W., & Pignatelli, M. (1998). Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. *Journal of Pathology*, *185*(4), 413-418.

Khajah, M. A., El-Hashim, A. Z., Orabi, K. Y., Hawai, S., & Sary, H. G. (2020). Onion bulb extract can both reverse and prevent colitis in mice via inhibition of pro-inflammatory signaling molecules and neutrophil activity. *PLoS ONE*, *15*(10), e0233938.

Kiesler, P., Fuss, I. J., & Strober, W. (2015). Experimental models of inflammatory bowel diseases. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *1*(2), 154-170.

Kim, J., Choi, J. H., Ko, G., Jo, H., Oh, T., Ahn, B., & Unno, T. (2020). Anti-inflammatory properties and gut microbiota modulation of porphyra tenera extracts in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *9*(10), 988.

Kim, Y. S., & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep*, *12*(5), 319-330.

Kitajima, S., Takuma, S., & Morimoto, M. (2000). Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Journal of Experimental Animal Science*, *49*(1), 9-15.

Ko, C. W., Singh, S., Feuerstein, J. D., Falck-Ytter, C., Falck-Ytter, Y., Cross, R. K., Crockett, S., Falck-Ytter, Y., Feuerstein, J., Flamm, S., Inadomi, J., Ko, C., Muniraj, T., O'Shea, R., Pandolfino, J., Patel, A., Sharaf, R., Siddique, S., Su, G., Wang, K., & Weizman, A. (2019). AGA clinical practice guidelines on the management of mild-to-moderate ulcerative colitis. *Gastroenterology*, *156*(3), 748-764.

Kolaczkowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *13*(3), 159-175.

Kolls, J. K., & Lindén, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, *21*(4), 467-476.

Kondo, S., Araki, T., Toiyama, Y., Tanaka, K., Kawamura, M., Okugawa, Y., Okita, Y., Saigusa, S., Inoue, Y., Uchida, K., Mohri, Y., & Kusunoki, M. (2018). Downregulation of trefoil factor-3 expression in the rectum is associated with the development of ulcerative colitis-associated cancer. *Oncology letters*, *16*(3), 3658-3664.

Korzenik, J. R., & Dieckgraefe, B. K. (2000). *Digestive Diseases and Sciences*, *45*(6), 1121-1129.

Korzenik, J. R., & Podolsky, D. K. (2006). Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, *5*(3), 197-209.

Kurosaki, T., Kometani, K., & Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*, *15*(3), 149-159.

Kwak, K., Akkaya, M., & Pierce, S. K. (2019). B cell signaling in context. *Nature Immunology*, *20*(8), 963-969.

Lee, G. R. (2018). The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 730.

Lee, S. H. (2015). Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal Research*, *13*(1), 11.

Li, G., Lin, J., Zhang, C., Gao, H., Lu, H., Gao, X., Zhu, R., Li, Z., Li, M., & Liu, Z. (2021). Microbiota metabolite butyrate constrains neutrophil functions and ameliorates mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. *Gut microbes*, *13*(1), 1968257.

Li, T., Wang, C., Liu, Y., Li, B., Zhang, W., Wang, L., Yu, M., Zhao, X., Du, J., Zhang, J., Dong, Z., Jiang, T., Xie, R., Ma, R., Fang, S., Zhou, J., & Shi, J. (2020). Neutrophil extracellular traps induce intestinal damage and thrombotic tendency in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, *14*(2), 240-253.

Li, X., Tan, J., Zhang, F., Xue, Q., Wang, N., Cong, X., & Wang, J. (2019). H.pylori infection

alleviates acute and chronic colitis with the expansion of regulatory B cells in mice. *Inflammation*, *42*(5), 1611-1621.

Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., & Fouser, L. A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(10), 2271-2279.

Ling, S., Jin, L., Li, S., Zhang, F., Xu, Q., Liu, M., Chen, X., Liu, X., Gu, J., Liu, S., Liu, N., & Ou, W. (2020). *Allium macrostemon* saponin inhibits activation of platelet via the CD40 signaling pathway. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 570603.

Littman, D. R., & Rudensky, A. Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, *140*(6), 845-858.

Liu, H., Hong, X. L., Sun, T. T., Huang, X. W., Wang, J. L., & Xiong, H. (2020). Fusobacterium nucleatum exacerbates colitis by damaging epithelial barriers and inducing aberrant inflammation. *Journal of Digestive Diseases*, *21*(7), 385-398.

Liu, W., Zhang, Y., Qiu, B., Fan, S., Ding, H., & Liu, Z. (2018). Quinoa whole grain diet compromises the changes of gut microbiota and colonic colitis induced by dextran sulfate sodium in C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, *8*(1), 14916.

Liu, X., He, H., Huang, T., Lei, Z., Liu, F., An, G., & Wen, T. (2016). Tanshinone IIA protects against dextran sulfate sodium- (DSS-) induced colitis in mice by modulation of neutrophil infiltration and activation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2016*, 7916763-7916763.

Liu, X. C., Liu, Q., Zhou, L., & Liu, Z. L. (2014). Evaluation of larvicidal activity of the essential oil of *Allium macrostemon* Bunge and its selected major constituent compounds against Aedes albopictus (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*, *7*, 184.

Loncar, M. B., Al-azzeh, E. D., Sommer, P. S., Marinovic, M., Schmehl, K., Kruschewski, M., Blin, N., Stohwasser, R., Gött, P., & Kayademir, T. (2003). Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappaB inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide. *Gut*, *52*(9), 1297-1303.

Long, X., Kim, Y. G., Pyo, Y. K., Yi, R., Zhao, X., & Park, K. Y. (2020). Inhibitory effect of Jangkanghwan (Korean traditional food) on experimental ulcerative colitis in mice. *Journal of Food Biochemistry*, *44*(12), e13488.

Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijs, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Van Immerseel, F., Verbeke, K., Ferrante, M., Verhaegen, J., Rutgeerts, P., & Vermeire, S. (2014). A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*, *63*(8), 1275-1283.

Macpherson, A., Khoo, U. Y., Forgacs, I., Philpott-Howard, J., & Bjarnason, I. (1996). Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut*, *38*(3), 365-375.

Magro, F., Cordeiro, G., Dias, A. M., & Estevinho, M. M. (2020). Inflammatory bowel disease – non-biological treatment. *Pharmacological Research*, *160*, 105075.

Mahmud, S. A., Manlove, L. S., & Farrar, M. A. (2013). Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *Jakstat*, *2*(1), e23154.

Mak, W. Y., Zhao, M., Ng, S. C., & Burisch, J. (2020). The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *35*(3), 380-389.

Mantis, N. J., Rol, N., & Corthésy, B. (2011). Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunology*, *4*(6), 603-611.

Marefati, N., Eftekhar, N., Kaveh, M., Boskabadi, J., Beheshti, F., & Boskabady, M. H. (2018). The effect of *Allium cepa* extract on lung oxidant, antioxidant,

and immunological biomarkers in ovalbumin-sensitized rats. *Medical Principles and Practice*, *27*(2), 122-128.

Matsuno, H., Kayama, H., Nishimura, J., Sekido, Y., Osawa, H., Barman, S., Ogino, T., Takahashi, H., Haraguchi, N., Hata, T., Matsuda, C., Yamamoto, H., Uchino, M., Ikeuchi, H., Doki, Y., Mori, M., Takeda, K., & Mizushima, T. (2017). $CD103^+$ dendritic cell function is altered in the colons of patients with ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *23*(9), 1524-1534.

Maul, J., Loddenkemper, C., Mundt, P., Berg, E., Giese, T., Stallmach, A., Zeitz, M., & Duchmann, R. (2005). Peripheral and intestinal regulatory $CD4^+CD25$ high T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *128*(7), 1868-1878.

Mayne, C. G., & Williams, C. B. (2013). Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *19*(8), 1772-1788.

McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(4), 265-278.

McKinley, M. P., & O'Loughlin, V. D. (2012). *Human anatomy, 3rd edition*. Boston: McGraw-Hill Higher Education.

Melgar, S., Karlsson, A., & Michaëlsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *288*(6), G1328-G1338.

Meng, X. B., Zhu, T., Yang, D. H., Liang, W., Sun, G. B., & Sun, X. B. (2019). Xuezhitong capsule, an extract of *Allium macrostemon* Bunge, exhibits reverse cholesterol transport and accompanies high-density lipoprotein levels to protect against hyperlipidemia in ApoE(-/-) mice. *Annals of Translational Medicine*, *7*(11), 239.

Meyer zum Büschenfelde, D., Tauber, R., & Huber, O. (2006). TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression. *Peptides*, *27*(12), 3383-3390.

Mijan, M. A., & Lim, B. O. (2018). Diets, functional foods, and nutraceuticals as alternative therapies for inflammatory bowel disease: present status and future trends. *World journal of gastroenterology*, *24*(25), 2673-2685.

Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Vallance, B. A., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2019). Escherichia coli pathobionts associated with inflammatory bowel disease. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(2), e00060-18.

Mizoguchi, A. (2012). Animal models of inflammatory bowel disease. In P. M. Conn (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 105, pp. 263-320). Academic Press.

Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., Reyes, J. A., Shah, S. A., Leleiko, N., Snapper, S. B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B. E., Xavier, R. J., & Huttenhower, C. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology*, *13*(9), R79.

Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C. L., Cheroutre, H., & Kronenberg, M. (2009). Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nature Immunology*, *10*(11), 1178-1184.

Murthy, S. N. S., Cooper, H. S., Shim, H., Shah, R. S., Ibrahim, S. A., & Sedergran, D. J. (1993). Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Digestive Diseases and Sciences*, *38*(9), 1722-1734.

Nagler-Anderson, C. (2001). Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nature Reviews Immunology*, *1*(1), 59-67.

Nakamura, H., Tomuschat, C., Coyle, D., O'Donnel, A.-M., Lim, T., & Puri, P. (2018). Altered goblet cell function in Hirschsprung's disease. *Pediatric Surgery International*, *34*(2), 121-128.

Nakanishi, Y., Sato, T., & Ohteki, T. (2015). Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization. *Mucosal Immunology*, *8*(1), 152-160.

Nemeth, Z. H., Bogdanovski, D. A., Barratt-Stopper, P., Paglinco, S. R., Antonioli, L., & Rolandelli, R. H. (2017). Crohn's disease and ulcerative colitis show unique cytokine profiles. *Cureus Journal of Medical Science*, *9*(4), e1177.

Neurath, M. F. (2017). Current and emerging therapeutic targets for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *14*(5), 269-278.

Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., & Andoh, A. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology*, *11*(1), 1-10.

Noack, M., & Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity Reviews*, *13*(6), 668-677.

Noble, A., Durant, L., Hoyles, L., Mccartney, A. L., Man, R., Segal, J., Costello, S. P., Hendy, P., Reddi, D., Bouri, S., Lim, D. N. F., Pring, T., O'Connor, M. J., Datt, P., Wilson, A., Arebi, N., Akbar, A., Hart, A. L., Carding, S. R., & Knight, S. C. (2019). Deficient resident memory T cell and CD8 T cell response to commensals in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, *14*(4), 525-537.

Nunes, N. S., Kim, S., Sundby, M., Chandran, P., Burks, S. R., Paz, A. H., & Frank, J. A. (2018). Temporal clinical, proteomic, histological and cellular immune responses of dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *World journal of gastroenterology*, *24*(38), 4341-4355.

Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., & Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*, *15*(3), 160-171.

O'Mahony, S., Choudari, C. P., Barton, J. R., Walker, S., & Ferguson, A. (1991). Gut lavage fluid proteins as markers of activity of inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *26*(9), 940-944.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, *98*(3), 694-702.

Okumura, R., & Takeda, K. (2018). Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. *Inflammation and Regeneration*, *38*(1), 5.

Omenetti, S., & Pizarro, T. T. (2015). The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome [mini review]. *Frontiers in Immunology*, *6*(639).

Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N., & Hermoso, M. A. (2019). Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases [review]. *Frontiers in Immunology*, *10*(277).

Pedros, C., Duguet, F., Saoudi, A., & Chabod, M. (2016). Disrupted regulatory T cell homeostasis in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*, *22*(3), 974-995.

Pereira, L. M. S., Gomes, S. T. M., Ishak, R., & Vallinoto, A. C. R. (2017). Regulatory T cell and forkhead box protein 3 as modulators of immune homeostasis [review]. *Frontiers in Immunology*, *8*(605).

Perše, M., & Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*, 1-13.

Piechowiak, T., Grzelak-Błaszczyk, K., Bonikowski, R., & Balawejder, M. (2020).

Optimization of extraction process of antioxidant compounds from yellow onion skin and their use in functional bread production. *LWT-Food Science and Technology*, *117*, 108614.

Plato, A., Hardison, S. E., & Brown, G. D. (2015). Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Seminars in Immunopathology*, *37*(2), 97-106.

Prince, A. C., Myers, C. E., Joyce, T., Irving, P., Lomer, M., & Whelan, K. (2016). Fermentable carbohydrate restriction (low FODMAP diet) in clinical practice improves functional gastrointestinal symptoms in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *22*(5), 1129-1136.

Putnik, P., Gabrić, D., Roohinejad, S., Barba, F. J., Granato, D., Mallikarjunan, K., Lorenzo, J. M., & Bursać Kovačević, D. (2019). An overview of organosulfur compounds from *Allium* spp.: From processing and preservation to evaluation of their bioavailability, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. *Food Chemistry*, *276*, 680-691.

Qu, L., Lin, X., Liu, C., Ke, C., Zhou, Z., Xu, K., Cao, G., & Liu, Y. (2021). Atractylodin attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis by alleviating gut microbiota dysbiosis and inhibiting inflammatory response through the MAPK pathway. *Front Pharmacol*, *12*, 665376.

Riemschneider, S., Hoffmann, M., Slanina, U., Weber, K., Hauschildt, S., & Lehmann, J. (2021). Indol-3-carbinol and quercetin ameliorate chronic DSS-induced colitis in C57BL/6 mice by AhR-mediated anti-inflammatory mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(5), 2262.

Romagnani, S. (1999). Th1/Th2 cells. *Inflammatory Bowel Diseases*, *5*(4), 285-294.

Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W. R., Jr., Muller, W., & Rudensky, A. Y. (2008). Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, *28*(4), 546-558.

Rui, X., Li, J., Yang, Y., Xu, L., Liu, Y., Zhang, M., & Yin, D. (2021). Painong san, a traditional chinese compound herbal medicine, restores colon barrier function on DSS-induced colitis in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2021*, 2810915.

Salim, S. Y., & Söderholm, J. D. (2011). Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, *17*(1), 362-381.

Saravia, J., Chapman, N. M., & Chi, H. (2019). Helper T cell differentiation. *Cellular & Molecular Immunology*, *16*(7), 634-643.

Schenk, M., Bouchon, A., Seibold, F., & Mueller, C. (2007). TREM-1--expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(10), 3097-3106.

Schäfer, G., & Kaschula, C. H. (2014). The immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic organosulfur compounds in cancer chemoprevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *14*(2), 233-240.

Seo, K., Seo, J., Yeun, J., Choi, H., Kim, Y.-I., & Chang, S.-Y. (2021). The role of mucosal barriers in human gut health. *Archives of Pharmacal Research*, *44*(4), 325-341.

Shale, M., Schiering, C., & Powrie, F. (2013). CD4(+) T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunological Reviews*, *252*(1), 164-182.

Shao, X., Sun, C., Tang, X., Zhang, X., Han, D., Liang, S., Qu, R., Hui, X., Shan, Y., Hu, L., Fang, H., Zhang, H., Wu, X., & Chen, C. (2020). Anti-inflammatory and intestinal microbiota modulation properties of jinxiang garlic (*Allium sativum* L.) polysaccharides toward dextran sodium sulfate-induced colitis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(44), 12295-12309.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A.,

Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(9), 6425-6440.

Sharma, P., Sharma, S. R., Dhall, R. K., & Mittal, T. C. (2020). Effect of γ-radiation on post-harvest storage life and quality of onion bulb under ambient condition. *Journal of Food Science and Technology*, *57*(7), 2534-2544.

Shea-Donohue, T., Thomas, K., Cody, M. J., Aiping, Z., Detolla, L. J., Kopydlowski, K. M., Fukata, M., Lira, S. A., & Vogel, S. N. (2008). Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO-alpha), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Journal of Innate Immunity*, *14*(2), 117-124.

Shen, F., Ruddy, M. J., Plamondon, P., & Gaffen, S. L. (2005). Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17-and TNF-α-induced genes in bone cells. *Journal of leukocyte biology*, *77*(3), 388-399.

Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *11*(11), 762-774.

Skupsky, J., Sabui, S., Hwang, M., Nakasaki, M., Cahalan, M. D., & Said, H. M. (2020). Biotin supplementation ameliorates murine colitis by preventing NF-κB activation. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *9*(4), 557-567.

Stiehm, E. R. (2012). Joseph A. Bellanti (ed) immunology IV: clinical applications in health and disease. *Journal of Clinical Immunology*, *32*(3), 647-647.

Strober, W., & Fuss, I. J. (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, *140*(6), 1756-1767.

Strober, W., Kitani, A., Fuss, I., Asano, N., & Watanabe, T. (2008). The molecular basis of NOD2 susceptibility mutations in Crohn's disease. *Mucosal Immunology*, *1*(S1), S5-S9.

Sugihara, K., & Kamada, N. (2021). Diet-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nutrients*, *13*(5), 1533.

Suleria, H. A. R., Butt, M. S., Anjum, F. M., Saeed, F., & Khalid, N. (2015). Onion: nature protection against physiological threats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(1), 50-66.

Sznurkowska, K., Luty, J., Bryl, E., Witkowski, J. M., Hermann-Okoniewska, B., Landowski, P., Kosek, M., & Szlagatys-Sidorkiewicz, A. (2020). Enhancement of circulating and intestinal T regulatory cells and their expression of helios and neuropilin-1 in children with inflammatory bowel disease. *Journal of Inflammation Research*, *13*, 995-1005.

Tan, Y., & Zheng, C. (2018). Effects of alpinetin on intestinal barrier function, inflammation and oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis mice. *The American Journal of The Medical Sciences*, *355*(4), 377-386.

Tanaka, H., Takechi, M., Kiyonari, H., Shioi, G., Tamura, A., & Tsukita, S. (2015). Intestinal deletion of Claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice. *Gut*, *64*(10), 1529-1538.

Tanaka, T. (2012). Development of an inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention. *International journal of inflammation*, *2012*, 658786.

Taupin, D., & Podolsky, D. K. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *4*(9), 721-732.

Thoo, L., Noti, M., & Krebs, P. (2019). Keep calm: the intestinal barrier at the interface of peace and war. *Cell Death & Disease*, *10*(11), 849.

Tindemans, I., Joosse, M. E., & Samsom, J. N. (2020). Dissecting the heterogeneity in T-cell mediated inflammation in IBD. *Cells*, *9*(1), 110.

Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease.

Lancet, *389*(10080), 1741-1755.
Travis, S. P., Schnell, D., Krzeski, P., Abreu, M. T., Altman, D. G., Colombel, J. F., Feagan, B. G., Hanauer, S. B., Lichtenstein, G. R., Marteau, P. R., Reinisch, W., Sands, B. E., Yacyshyn, B. R., Schnell, P., Bernhardt, C. A., Mary, J. Y., & Sandborn, W. J. (2013). Reliability and initial validation of the ulcerative colitis endoscopic index of severity. *Gastroenterology*, *145*(5), 987-995.
Trio, P. Z., You, S., He, X., He, J., Sakao, K., & Hou, D. X. (2014). Chemopreventive functions and molecular mechanisms of garlic organosulfur compounds. *Food and Function*, *5*(5), 833-844.
Tsai, H. C., Velichko, S., Hung, L. Y., & Wu, R. (2013). IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection. *Clinical & Developmental Immunology*, *2013*, 267971.
Ueno, A., Jeffery, L., Kobayashi, T., Hibi, T., Ghosh, S., & Jijon, H. (2018). Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease. *J Autoimmun*, *87*, 38-49.
Van Limbergen, J., Radford-Smith, G., & Satsangi, J. (2014). Advances in IBD genetics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *11*(6), 372-385.
Vavricka, S. R., Schoepfer, A., Scharl, M., Lakatos, P. L., Navarini, A., & Rogler, G. (2015). Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *21*(8), 1982-1992.
Veauthier, B., & Hornecker, J. R. (2018). Crohn's disease: diagnosis and management. *American Family Physician*, *98*(11), 661-669.
Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, *24*(2), 179-189.
Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, *24*(2), 179-189.
Velikova, T. V., Miteva, L., Stanilov, N., Spassova, Z., & Stanilova, S. A. (2020). Interleukin-6 compared to the other Th17/Treg related cytokines in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, *26*(16), 1912-1925.
Viennois, E., Chen, F., Laroui, H., Baker, M. T., & Merlin, D. (2013). Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA. *BMC Research Notes*, *6*(1), 360.
Wadwa, M., Klopfleisch, R., Adamczyk, A., Frede, A., Pastille, E., Mahnke, K., Hansen, W., Geffers, R., Lang, K. S., Buer, J., Büning, J., & Westendorf, A. M. (2016). IL-10 downregulates CXCR3 expression on Th1 cells and interferes with their migration to intestinal inflammatory sites. *Mucosal Immunol*, *9*(5), 1263-1277.
Wang, Q. Q., Gao, H., Yuan, R., Han, S., Li, X. X., Tang, M., Dong, B., Li, J. X., Zhao, L. C., Feng, J., & Yang, S. (2020). Procyanidin A2, a polyphenolic compound, exerts anti-inflammatory and anti-oxidative activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *PLoS ONE*, *15*(8), e0237017.
Wang, Y., Tang, Q., Jiang, S., Li, M., & Wang, X. (2013). Anti-colorectal cancer activity of macrostemonoside A mediated by reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *441*(4), 825-830.
Weber, A. T., Shah, N. D., Sauk, J., & Limketkai, B. N. (2019). Popular diet trends for inflammatory bowel diseases: claims and evidence. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, *17*(4), 564-576.
Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Mueller, O., Herrlinger, K. R., Fellermann, K.,

Schroeder, J. M., & Stange, E. F. (2003). Inducible and constitutive β-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *9*(4), 215-223.

Wirtz, S., Popp, V., Kindermann, M., Gerlach, K., Weigmann, B., Fichtner-Feigl, S., & Neurath, M. F. (2017). Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nature Protocols*, *12*(7), 1295-1309.

Wolf, A. A., Yáñez, A., Barman, P. K., & Goodridge, H. S. (2019). The ontogeny of monocyte subsets [mini review]. *Frontiers in Immunology*, *10*(1642).

Wu, B., Zhou, Q., He, Z., Wang, X., Sun, X., & Chen, Y. (2021). Protective effect of the abelmoschus manihot flower extract on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2021*, 7422792.

Wu, Y., Tang, L., Wang, B., Sun, Q., Zhao, P., & Li, W. (2019). The role of autophagy in maintaining intestinal mucosal barrier. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(11), 19406-19419.

Wu, Z. Q., Li, K., Ma, J. K., Huang, Q., Tian, X., & Li, Z. J. (2020). Antioxidant activity of organic sulfides from fresh *Allium macrostemon* Bunge and their protective effects against oxidative stress in Caenorhabditis elegans. *Journal of Food Biochemistry*, *44*(11), e13447.

Xie, W., Zhang, Y., Wang, N., Zhou, H., Du, L., Ma, X., Shi, X., & Cai, G. (2008). Novel effects of macrostemonoside A, a compound from *Allium macrostemon* Bung, on hyperglycemia, hyperlipidemia, and visceral obesity in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. *European Journal of Pharmacology*, *599*(1-3), 159-165.

Yamamoto, S., & Ma, X. (2009). Role of Nod2 in the development of Crohn's disease. *Microbes and Infection*, *11*(12), 912-918.

Yan, J.-B., Luo, M.-M., Chen, Z.-Y., & He, B.-H. (2020). The function and role of the Th17/Treg cell balance in inflammatory bowel disease. *Journal of Immunology Research*, *2020*, 1-8.

Yan, Y., Kolachala, V., Dalmasso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S. V., & Merlin, D. (2009). Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS ONE*, *4*(6), e6073.

Yang, X., Dai, Y., Ji, Z., Zhang, X., Fu, W., Han, C., & Xu, Y. (2021). *Allium macrostemon* Bunge. exerts analgesic activity by inhibiting NaV1.7 channel. *Journal of Ethnopharmacology*, *281*, 114495.

Yang, Z.-J., Wang, B.-Y., Wang, T.-T., Wang, F.-F., Guo, Y.-X., Hua, R.-X., Shang, H.-W., Lu, X., & Xu, J.-D. (2021). Functions of dendritic cells and its association with intestinal diseases. *Cells*, *10*(3), 583.

Yao, Z. H., Qin, Z. F., Dai, Y., & Yao, X. S. (2016). Phytochemistry and pharmacology of Allii Macrostemonis Bulbus, a traditional Chinese medicine. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *14*(7), 481-498.

Ye, P., Rodriguez, F. H., Kanaly, S., Stocking, K. L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J. E., Bagby, G. J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J. J., & Kolls, J. K. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *Journal of Experimental Medicine*, *194*(4), 519-527.

Yen, H.-H., Weng, M.-T., Tung, C.-C., Wang, Y.-T., Chang, Y. T., Chang, C.-H., Shieh, M.-J., Wong, J.-M., & Wei, S.-C. (2019). Epidemiological trend in inflammatory bowel disease in Taiwan from 2001 to 2015: a nationwide populationbased study. *Intestinal Research*, *17*(1), 54-62.

Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov,

S., Guilliams, M., Misharin, A., David, Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, *38*(1), 79-91.

You, Y., Zhou, C., Li, D., Cao, Z. L., Shen, W., Li, W. Z., Zhang, S., Hu, B., & Shen, X. (2016). Sorting nexin 10 acting as a novel regulator of macrophage polarization mediates inflammatory response in experimental mouse colitis. *Scientific Reports*, *6*, 20630.

Zhang, H. L., Zheng, Y. J., Pan, Y. D., Xie, C., Sun, H., Zhang, Y. H., Yuan, M. Y., Song, B. L., & Chen, J. F. (2016). Regulatory T-cell depletion in the gut caused by integrin β7 deficiency exacerbates DSS colitis by evoking aberrant innate immunity. *Mucosal Immunology*, *9*(2), 391-400.

Zhang, Y., Peng, L., Li, W., Dai, T., Nie, L., Xie, J., Ai, Y., Li, L., Tian, Y., & Sheng, J. (2020). Polyphenol extract of moringa oleifera leaves alleviates colonic inflammation in dextran sulfate sodium-treated mice. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, *2020*, 6295402-6295402.

Zhou, G., Yu, L., Fang, L., Yang, W., Yu, T., Miao, Y., Chen, M., Wu, K., Chen, F., Cong, Y., & Liu, Z. (2018). CD177(+) neutrophils as functionally activated neutrophils negatively regulate IBD. *Gut*, *67*(6), 1052-1063.

Zhou, G. X., & Liu, Z. J. (2017). Potential roles of neutrophils in regulating intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease. *Journal of Digestive Diseases*, *18*(9), 495-503.

Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Peripheral $CD4^+$ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological Reviews*, *238*(1), 247-262.

Zhu, L., Gu, P., & Shen, H. (2019). Gallic acid improved inflammation via NF-κB pathway in TNBS-induced ulcerative colitis. *International Immunopharmacology*, *67*, 129-137.

Zhu, W., Yu, J., Nie, Y., Shi, X., Liu, Y., Li, F., & Zhang, X. L. (2014). Disequilibrium of M1 and M2 macrophages correlates with the development of experimental inflammatory bowel diseases. *Immunological Investigations*, *43*(7), 638-652.

Zuo, T., & Ng, S. C. (2018). The gut microbiota in the pathogenesis and therapeutics of inflammatory bowel disease. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2247.