

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

龍葵保健食品研究開發--龍葵萃取物抑制心血管疾病之研究(3/3)

研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型  
計畫編號：NSC 97-2321-B-040-003-  
執行期間：97年08月01日至98年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：李慧禎

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：蕭蓮如  
博士班研究生-兼任助理人員：歐靜慈

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 98年10月16日

# 目錄

內容	頁
前言	1
研究目的	4
文獻探討	4
研究方法	4
結果與討論	8
參考文獻	11
圖及表	14
計畫成果自評	52

## 一、前言

### (1) 龍葵 (國內外相關之研究及成果)

龍葵 (*Solanum nigrum*) 始載於《唐本草》。原名龍葵、又名苦菜。《圖經本草》名苦葵、老鴉眼睛草。《本草綱目》名水茄、天泡草。李時珍謂：“療癰疽腫毒”。為茄科植物，葉片為卵形帶有波狀邊緣，莖直立，多分枝，夏季開花，頂生，有4~10朵花，花梗下垂；花冠是白色，5裂；雄蕊5花藥，頂端有2孔開裂；子房2室，花柱長，基部有絨毛。未成熟的綠色果實有毒性，成熟後就不具毒性，是烏黑剔透的漿果，一般人喜愛採食，滋味酸甜可口。全草含甾類生物鹼：茄邊鹼 (澳洲茄邊鹼，Solamargine, C45H73O15N)、茄解鹼 (澳洲茄鹼，Solasonine, C45H73O16N)、茄微鹼 (Solavilline, C50H81O20N)、茄達鹼 (Solasodamine, C51H82O20N)、糖苷類、糖蛋白、多酚及皂苷。入肺、胃、膀胱經。苦，寒。有小毒。龍葵在台灣民間俗稱黑甜仔菜，屬野生植物，為農田雜草，民間有取其幼苗，嫩葉炒熟當菜食用，也有取其成熟的果實食用，也有取幼苗或嫩葉搗碎外敷消癰疽腫毒、跌打瘀傷。

#### 【龍葵醫學功能】

1. 防止自由基所造成的DNA 傷害 (1,2)
  2. 具有保肝作用，可保護肝臟免於四氯化碳誘導的肝損傷 (3,4)
  3. 誘導氮氧化物的產生 (5)
  4. 在TPA 所刺激的乳癌細胞MCF-7 中，能抑制細胞內轉錄因子NF- $\kappa$ B 和AP-1 與DNA 結合的活性 (6)
  5. 在墨西哥的傳統醫學中已被視為鎮定神經之藥物 (7)
  6. 具有抑制小鼠肉瘤S-180 的活性 (8)
  7. 抑制乳癌細胞MCF-7 的生長及誘導細胞凋亡 (9)
  8. 降低膽固醇 (10)；另外中國大陸亦有多項醫學功能的報導，包括 (9)
  9. 用於肝炎、肺癌、膀胱癌治療 (11-14)
  10. 輔助腫瘤治療 (15,16)
  11. 抑制腸癌乙烯轉移酶活性 (17)
- 另外本群體計畫初步結果顯示：
12. 龍葵水萃取物促進肝癌細胞HepG2 死亡，及增加GST Mu 之表現及降血脂作用。綜合以上結果可歸納出龍葵具有【1】抗氧化；【2】抗發炎；【3】抑制癌症發生率；【4】護肝作用；及【5】降血脂之功能。

### (2) 血脂肪與 atherosclerosis

血脂肪 plasma lipids 包含膽固醇 (cholesterol)及三酸甘油脂 (triglyceride)。Cholesterol 及 triglyceride 不能溶解於水性血漿，故需與血漿蛋白結合形成親水性的脂蛋白 (lipoprotein)，才能溶解於血漿，隨著血液循環，流至身體各器官組織中。我們將脂蛋白依密度的不同分成四種，chylomicron、very-low density lipoprotein (VLDL)、low density lipoprotein (LDL)及 high density lipoprotein (HDL)，其中 high density lipoprotein 又可細分成 HDL<sub>2</sub> 及 HDL<sub>3</sub>。不同的脂蛋白上所含的脂肪及脂蛋白元 (apolipoprotein)組成均不相同。

低密度脂蛋白含有大量的 cholesterol(佔 plasma cholesterol 的 60-70%)，且體積小，所以容易滲入血管壁內，為形成粥狀動脈硬化(atherosclerosis)的重要因子，故血漿中 LDL 濃度愈高，罹患粥狀動脈硬化的危險性就愈高。高密度脂蛋白含大量的磷脂類(phospholipids)及少量的 cholesterol(佔血漿 cholesterol 的 20-30%)，其功能為自血管

壁帶走滲入的 cholesterol 具有清潔血管壁的作用，故與血管中 HDL 濃度愈高，表示清除血管壁 cholesterol 的能力愈強，因而罹患粥狀動脈硬化的機率則愈低。

血清中 60-70 % 的 cholesterol 是由 LDL 所攜帶，所以當 LDL 的合成過多或代謝太慢時，將導致血中 cholesterol 的濃度過高，造成粥狀動脈硬化。由於血中 cholesterol 濃度主要受細胞表面 LDL 受體的管制，而食物中的脂肪酸種類、膽固醇含量、荷爾蒙及藥物等物質，會改變肝細胞表面 LDL 受體的數目，進而影響血中 cholesterol 濃度以及粥狀動脈硬化的程度。

脂蛋白中的 LDL 及 HDL 和粥狀動脈硬化有很強的相關性，動脈硬化最早期的徵狀為在 subendothelial space 聚集 cholesterol ester rich 的 foam cell，而這些 cholesterol ester 則來自被 modified 的 LDL，當 macrophage 或 monocyte 吞噬大量的被修飾過的氧化型 LDL 後，即形成 foam cell，macrophage 對於 native 含 B,E-apolipoprotein 的 LDL 並沒有吞噬效果，而經 chemically modified negative charged LDL (如 acetyl-LDL)則可快速被 macrophage 上的 receptor 辨識，並由 macrophage 吞噬。

### (3) Oxidized-LDL 與 atherosclerosis

Atherosclerosis 是一種複雜多樣性的過程，脂蛋白的氧化在 atherosclerosis 之致病佔有重要角色，在許多研究中被認為是一種 atherosclerosis agent。從 atherosclerosis lesions 也發現 LDL 有抗氧化傷害 (18, 19)，氧化型 LDL 發生於 endothelial cells, monocyte/macrophages 及 smooth muscle cells (20)，在 macrophage 之 ox-LDL 能夠結合 LDL-receptor 再經由下列四種機轉成為一種 proatherogenic：【1】加強 macrophage 作用，造成 cholesteryl ester 增加及 foam-cell 產生；【2】促使 circulating monocytes and T-lymphocytes 產生；【3】cytotoxic 作用；【4】改變血小板 aggregation (21)。

### (4) Apoptosis and atherosclerosis

Apoptosis 是一種細胞凋亡的機制，包含了正常的發育及許多 pathological 狀況，如細胞受到 oxidative stress 而產生 apoptosis (22, 23)，最近有許多報告指出 ox-LDL 能夠誘導 smooth muscle cells (24, 25)，macrophages (26, 27)，dorsal root ganglia (28) 及 lymphoblastoid (29) 及 human coronary artery endothelial cells (30)，產生 apoptosis 的現象在人的 atherosclerotic lesions 發現有許多 apoptotic cells，尤其是發炎細胞，如 macrophages 及 T cells，此 apoptotic cells 可能是造成 gruel 堆積及 plaque instability (31)，因此 ox-LDL 可能造成 apoptotic cells 堆積於 atherosclerotic plaques 成為 atherosclerosis。

### (5) 動脈硬化之血管平滑肌移行

VSMC 是血管壁的主要細胞成分之一，它是決定血管活性和血管構型的重要原素。在心血管疾病發生過程中，血管活性和血管構型皆會產生明顯變化，平滑肌細胞會有細胞增生及移行的情形，且平滑肌細胞也會由收縮態轉變為合成態。相應的血管管壁增厚，收縮功能增強而舒張功能減弱，細胞間膠質沉積增加，管腔狹窄，這些血管架構和功能的變化均涉及 VSMC 的參與。實際上血管舒縮回應就是 VSMC 的收縮和舒張，而血管壁增厚，順應性下降則主要是源於 VSMC 肥大、增生，和細胞外基質分泌增加等(32)。血管內皮細胞的損傷導致多種炎症因子和生長調節因子的表達、激活紊亂，誘導 VSMC 進行表型改變，刺激 VSMC 從血管中膜向內膜遷移(33)，發生過度增生和凋亡抑制。

細胞遷移需要內外原素的配合。外部的原素指的是細胞外的信號分子。內部原素則指細胞的信號傳導系統和執行運動的細胞骨架和分子馬達，還有參與黏著斑形成的各種分子。胞外信號種類繁多，但是當它們與細胞膜上受體結合之後，細胞內起作用的途徑卻只有有限的幾種。而與細胞遷移有關的信號傳導過程如下：信號分子結合到

膜上受體，或者是激活與受體偶聯的蛋白質—大 G 蛋白(34)，或者先是激活受體酪氨酸激酶，再激活下游的小 G 蛋白 Ras(35)。G 蛋白是一個很大的家族，包括 Rho(36)，Rac(37)，Ras 等小家族，它們在細胞中扮演著信號傳導開關的角色。當它們與 GDP 結合時，呈現失活狀態。在鳥嘌呤交換因子(Guanin exchange factor, GEF)的幫助下，G 蛋白脫離 GDP 並與 GTP 結合，進入激活狀態。G 蛋白的 GTP 會被 GTP 酶激活蛋白(GTPase-activating proteins, GAP)水解，並釋放出其中的能量，讓 G 蛋白行使其功能。就是說，G 蛋白透過這一 GTP/GDP 循環在激活/失活狀態中迴旋，傳遞信號。當 G 蛋白被激活後，它下游的多種分子會被激活(38)。這些下游分子本身會形成網路，相互制約，或者是相反相成。它們調控著細胞遷移中各個方面。

根據過去研究(39-41)已知，Ras這類small G protein 與細胞分裂、cytoskeletal rearrangement以及motility有關，Ras超級家族(Ras superfamily)，可分為六個家族而他們的功能分為：

1. Ras 家族：調控細胞週期、調節細胞凋亡及細胞exocytosis
2. Rho家族：調節actin cytoskeleton及控制細胞週期
3. Arf家族：調節細胞凋亡、actin cytoskeleton及囊泡運輸
4. Rab家族：調控囊泡運輸功能
5. Ran家族：負責蛋白質及核苷酸進出細胞核
6. Rad家族：目前功能並不清楚

#### (6) 龍葵萃取物抗心血管疾病的可能性

許多 antioxidants，已被認為具有降低 LDL 的氧化作用及 atherosclerosis，如 curcumin (42) 及 baicalein (43)，也抑制 vascular smooth muscle cell 的增生及促進 apoptosis (44)，龍葵水萃取物除具有抗氧化、防癌之作用外，本實驗室也已發現其可能具有降血脂之功能，並且以 TBARS assay 之方法發現其抑制 LDL 氧化之能力。綜合這些結果，龍葵水萃取物作用在抗心血管疾病應無疑問。本計劃擬進一步證明發展保健食品之證據及其必要性。

## 二、研究目的

1. 國人罹患心血管疾病之比例甚高，其成因相對複雜，包括高膽固醇、LDL 氧化、smooth muscle cell 及 endothelium cell 增生，或發炎細胞的凋謝死亡等因素。若能發展一無副作用的天然食品具有(1)降血脂；(2)抑制 LDL 氧化；(3)抑制 ox-LDL 的致病機轉；(4)抑制 smooth muscle cell 及 endothelium cell 增生(包括使細胞週期停止或促進 apoptosis)將可預防動脈粥狀硬化(atherosclerosis)的產生，減少國人心血管疾病之發生率。
2. 龍葵盛產於本省各處，易栽培且食用上無副作用，並含有多酚酸成分，具有抗氧化、防癌及抑制高血脂之作用，因此可發展為預防心血管疾病之保健食品，以減少國人罹患心血管疾病之風險及提高其農產價值。
3. 本計畫 SNWE 及 SNPE 發展為保健食品之關鍵性為：
  - (1) 已有預備實驗之成果，包括抗 LDL 氧化、降血脂等。
  - (2) 其成分含 polyphenols，已被證實具有抗氧化、防癌等作用。
  - (3) 龍葵在本省極易栽培，若經加工製造發展為保健食品，不但發展本省農業經濟，且助於國人健康。
  - (4) 本計畫具前瞻性，以能技術移轉為中程目標，進行產學合作為遠程目標導向之「個別研究計畫」。

## 三、文獻探討

對於龍葵在醫學上的報導，國外的研究甚多(見前述【龍葵之醫學功能】)，國內的研究從網路搜尋也只有龍葵 glycoprotein 抑制 N-actyltransferase 之作用，至於其他相關植物多酚之研究則甚多，已描述於背景資料中。

## 四、研究方法

本計劃為三年研究工作，第一年將完成 SNWE 及 SNPE 之萃取，並測定其降血脂、抗 LDL 氧化作用及抑制血管病變之效果；第二年探討 SNWE 及 SNPE 抑制 ox-LDL-induced atherosclerosis；第三年探討 SNWE 及 SNPE 抑制 ASMC 細胞增生(細胞週期停止及誘導 apoptosis)：

### 【第一年】SNE 或 SNPE 抑制 LDL 氧化或動脈粥狀硬化之作用

#### (A) 龍葵水萃物(SNWE)及多酚萃取物(SNPE)之製備

##### (1) SNWE 製備及定量

龍葵 (*Solanum nigrum*) 取自台灣苗栗山區全草採集，含根、莖、葉、花、未成熟果實及成熟果實。取龍葵全草(含根、莖、葉、成熟果實、未成熟果實)。洗淨後，陰乾兩日。全草切碎，置於 40 °C 的烘箱烘乾，經過兩日。乾品共重 825 公克。用 5000 ml 的水浸泡並加熱至沸騰，再煎 40 分鐘，將藥液倒出另放。藥材再加 5000 ml 的水加熱等沸騰，再煎 40 分鐘，將藥液倒出另放。藥材再加 5000 ml 的水加熱沸騰，再煎 40 分鐘，將藥液倒出另放。共取得 3 次萃取液，將 3 次所得藥液混合後。再置於 90 °C 的 Water Bath 中，濃縮成膏狀。將膏狀物再置於 70 °C 的烘箱中，烘乾成乾品，共得 215 公克備用。

## (2) SNWE 中多酚分析

HPLC 分析條件如下---使用Symmetry shieldRP18 管柱，動相條件為(A:acetic acid/Water=2:98 ,B:0.5% acetic acid/water=50:50)，動相梯度為(Time,%B)，(0,20)，(55,80)，(60,20)，流速1mL/min，偵測波長280nm，注射體積：10 $\mu$ L，最後以偵測器進行分析。

## (3) SNPE 之製備

將100 克攪拌之龍葵，以300ml 甲醇在50 $^{\circ}$ C中萃取3 小時過濾，連續三次，收集濾液，於減壓濃縮乾燥溶解於50 $^{\circ}$ C 500ml 水，再以200ml 己烷移除色素，水層再以180ml 乙酸乙酯萃取3 次，然後冷凍乾燥，即得SNPE。

## (B) In cell free system

以 separated 之 human LDL 與 Cu<sup>++</sup> 與 SNWE 或 SNPE 反應，LDL-oxidation 以 electrophoretic mobility (EM)、diene conjugation 及 TBARS 分析。

## (C) Human LDL 製備

健康志願者的血液取自台中捐血中心 (所使用之抗凝劑為 0.01% EDTA)，經檢驗過為正常者 (非特定疾病帶原者)，LDL 濃度為正常值 (1.019-1.063 g/ml)。

## (D) OxLDL 的製備及抗氧化劑的給予

製備好的 LDL (最終濃度為 100  $\mu$ g protein/ml) 先加入不同濃度的 SNWE 或 SNPE，再分別加入終濃度為 10  $\mu$ M 之 CuSO<sub>4</sub> 於 37  $^{\circ}$ C 下水浴 24 小時後收取樣本進行測定。

## (E) ApoB 蛋白片段化 (fragmentation) 的測試.

在反應結束之後，樣本須以 denaturing buffer (3% SDS, 10% glycerol 及 5% 2-mercaptoethanol) 在 95  $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘。接著配製 3-15% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)，取樣本 40  $\mu$ l 注入膠的孔洞中，然後以 48 V 進行電泳 150 分鐘。在電泳結束之後以 Coomassie Brilliant blue R250 染色 2 小時後再進行乾膠。

## (F) LDL electrophoretic mobility (EM) 之分析

取製備好之 agarose gel，每個 well 個加入等量之 ox-LDL，加入適量之 buffer，通電 100 V，30 min 後，固定並烘乾，染色及脫色後觀察結果。

## (G) TBARS 分析

以 LDL 的氧化程度以 MDA 為指標，MDA 與 thiobarbituric acid 在 pH 3.5 下可生成具有螢光性質之 conjugate，以 1,1,3,3-tetramethoxypropane 為標準液，激發波長為  $\lambda$  532 nm，發射波長為  $\lambda$  600 nm，結果表示為 TBARS / ml LDL。

## (H) 動物試驗

New-Zealand Rabbit (3000 克體重) 分為 6 組，每組 6 隻，每籠一隻，每天 150 g diet，除控制組外，其餘 5 組以 95.7% chow，3% lard 及 1.3% 膽固醇，飼養七週，可誘導產生 atherosclerosis process，SNWE 試驗組添加 0.25%、0.5% 或 1% SNWE 九週後，動物禁食一夜，以 sodium pentothal (16 mg/kg) 麻醉後放血，血液收集入 EDTA-coated tubes，然後離心，一部份分析血脂肪，包括總脂質膽固醇、三酸甘油脂、HDL、LDL，另一部份為分析 SNWE 之毒性，血液生化值包括 AST、ALT、BUN、creatinine，做為肝功能、腎功能是否受 SNWE 之影響。

## (K) Aortic atherosclerotic lesions

Aortas 切取後浸入 3% glutaraldehyde (0.1 mol/sodium cacodylate buffer pH 7.4 及 0.01% calcium chloride) 固定，以 paraffin-包埋，以 hematoxylin and eosin，Masson-Goldner trichromic stain 及 Gieson's elastin stain 觀察 fatty streak，medial

calcifications 及 fibrous plaque，凋謝死亡內皮細胞，或增生細胞等。

### 【第二年】SNE 或 SNPE 抑制 ox-LDL-induced apoptosis

由於巨噬細胞之 apoptosis 與 atherosclerosis 有關，而巨噬細胞經由 ox-LDL 誘導產生 apoptosis 與 atherosclerosis 已被證實，因此本年探討 SNE 或 SNPE 抑制 ox-LDL-induced apoptosis 之作用，以說明抑制 atherosclerosis 之機轉。

#### (A) Cell culture

本試驗取用 J774A.1 cells 培養於 DMEM 培養液中 (PH7.3)，培養液中另添加 10% FBS (foetal bovine serum；胎牛血清)、1% penicillin streptomycin 與 1% L-glutamine。J774A.1 cells 同培養液一起培養於恆溫培養箱 (37°C；5% CO<sub>2</sub>)，更換培養液的時間及次數依細胞生長速度而定，原則上每二天更換一次。

#### (B) LDL-oxidation

以 sequential ultracentrifugation 分離之 LDL (同上方法)，置於 Tris-HCl buffer (0.01 M, PH 7.4) 含 1 mM EDTA，以通過 0.22 μM pore-size Millipore membrane 滅菌，備用，可保存三星期。ox-LDL 製備則以 LDL 與 5 μM CuSO<sub>4</sub> 在 37°C 下作用 24 hr，然後去除 EDTA。

#### (C) 凋謝死亡分析

J774A.1 cells 細胞 (4x10<sup>6</sup>) 置於 25 cm<sup>2</sup> flask 培養兩天後加入 LDL (控制組)，及 ox-LDL (100，及 200 Mg/ml)，再以不同濃度 SNE 或 SNPE 加入培養 24 hr 或 48 hr。凋謝死亡分析則分別以：(1) MTT 分析；(2) flow cytometer 分析 hypodiploid DNA；(3) DNA fragmentation 分析 (4) 細胞型態觀察。

#### (D) SNE 或 SNPE 抗 ox-LDL-induced apoptosis 機轉分析

同 (C) 處理後，以 Western blotting 分析 bcl-2 family、CPP32。

### 【第三年】SNE 或 SNPE 抑制 ASMC 增生或移行之作用

#### (A) 細胞培養(Cell Culture)

本實驗所使用的細胞自食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心購買之 Rat smooth muscle of thoracic aorta-A7r5 cells。培養於 DMEM 培養液中，其中含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum)，及含 1% Penicillin、2% glutamine 和 1% pyruvate 培養於 5% CO<sub>2</sub>、37°C 及含飽和水蒸氣的培養箱。每 2 天更換一次 DMEM 培養液。當長滿至培養皿(dish) 單層長滿 (confluent) 時，便做轉殖。實驗期視實驗目的，以血球計數器計算細胞數目，再取適當細胞數目作分析。

#### (B) MTT assay

將 A7r5 cells 培養至 12 well plate 中，細胞數量為 1×10<sup>5</sup>/ml，加入 1ml 培養液，並且加入不同濃度 SNWE (0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/ml)、SNPE (0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/ml)，於培養箱中培養 24 或 48 小時，吸乾培養液後，以 PBS 清洗兩次，加入培養液與 MTT (0.5mg/ml) 的混合液，在 37°C 培養箱中反應 4 小時，移除培養液，加入 isopropanol 將結晶溶出，在 OD<sub>563nm</sub> 下測定。

#### (C) Wound healing assay

將 A7r5 cells 培養至 6 well plate 中，以含有 0.5% FBS 的培養液 starvation 24 小時後，以 yellow tip 在培養皿中劃出一條傷口，接著以 PBS 清洗二次後加入誘導劑 PDGF (32)，並同時處理不同劑量之 SNWE (0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/ml)、SNPE (0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/ml)，放入 37°C 培養箱中培養 24、48、72 小時以光學顯微鏡 400× 拍攝不同時間點細胞遷移至傷口的數目。

#### (D) Gelatin Zymography assay



將A7r5 cells培養至6 well plate中，以含有0.5%FBS的培養液starvation 24小時後，以PBS 清洗二次後加入誘導劑PDGF，並同時處理不同劑量之SNWE(0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/ml)、SNPE(0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/ml)，放入37°C培養箱中培養48小時，再以PBS 清洗二次後加入serium-free medium，放入37°C培養箱中培養24小時後收集medium。配置0.1% Gelatin-8%SDS-PAGE以140V進行電泳，再以2.5% Triton的Washing buffer(每次洗15 分鐘，共洗2次)將膠上的SDS洗去，最後加入Reaction buffer，於37°C反應16小時，最後以 Coomassie Brilliant blue R250 染色10分鐘後再進行脫色及照相分析。

#### **(E) 西方墨點法(Western blotting)**

#### **(F) 免疫組織化學染色法 IHC(immonohistochemical stain)**

##### **a.檢體處理**

將已製作好的腊塊切片(2-4 $\mu$ )並固定於特殊粘膠處理過之玻片上，置於70°C烤箱30分鐘後取出，脫腊

##### **b.脫腊步驟：**

由烤箱取出之玻片浸置二甲苯(xylene)5分鐘，(二甲苯共三缸，每缸5分鐘)。取出玻片直接浸置100%酒精1分鐘，(100%酒精共三缸，每缸1分鐘)。取出玻片直接浸置95%酒精1分鐘(95%酒精共二缸，每缸1分鐘)。取出玻片直接浸置85%酒精1分鐘(85%酒精共二缸，每缸1分鐘)。取出玻片直接浸置70%酒精1分鐘(70%酒精共二缸，每缸1分鐘)。取出玻片，用水輕洗去玻片及組織上之酒精，然後將玻片淨置於PBS buffer solution中。為去除製作腊塊時固定組織用的福馬林(formalin)，耐高溫缸內含2/3滿0.1% NP40的Citrate Buffer放入800w微波爐中以中或低火先微波5分鐘，取出，靜置3'~4'，放入脫腊好之玻片(Slide)再微波5分鐘，取出缸，加約10 ml distilled water 靜置5分鐘，再微波5分鐘，(加約10 ml distilled water 靜置5分鐘，再微波5分鐘重複操作三次)，最後，取出缸，靜置30分鐘，開始免疫組織化學染色。

##### **c.免疫組織化學染色 IHC stain (immonohistochemical stain)**

首先將已去除福馬林的玻片(Slide)浸置3% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)5分鐘，然後用水輕洗去(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)，浸置PBS buffer solution內5分鐘，倒掉PBS buffer solution，再浸置PBS buffer solution內5分鐘(重複操作三次)，取出玻片，滴Primary antibody於組織上，玻片置於37°C恆溫中1小時，(或隔夜)，取出玻片，浸置PBS buffer solution內5分鐘，倒掉PBS buffer solution，再浸置PBS buffer solution內5分鐘(重複操作三次)，滴Biotinylated link於組織上，玻片置於37°C恆溫中30分鐘，取出玻片，浸置PBS buffer solution內5分鐘，倒掉PBS buffer solution，再浸置PBS buffer solution內5分鐘(重複操作三次)，滴Streptavidin peroxidase於組織上，玻片置於37°C恆溫中30分鐘，取出玻片，浸置PBS buffer solution內5分鐘，倒掉PBS buffer solution，再浸置PBS buffer solution內5分鐘(重複操作三次)，滴AEC(呈色液)於組織上，5-10分鐘後水洗去AEC(呈色液)。

##### **d.對比染色**

若免疫化學染色呈色在細胞質，則Hematoxylin染3-5分鐘，若免疫化學染色呈色在細胞核，則Hematoxylin染5-10秒鐘

##### **e.Image-pro plus (IPP) Procedure:**

本實驗引用IPP4.0軟體來量化免疫組織化學染色(IHC stain)主動脈血管脂肪斑塊蛋白Area及IOD(Integrated optical density)分析。

## 五、結果與討論

第一年將 SNWE 及 SNPE 製備完成，並完成 cell-free system 及動物模式部份之成果，由結果中發現：

### (1) SNWE 或 SNPE 對氧化型 LDL 中 diene conjugation 的抑制效果

我們以上述的誘發 diene conjugation 的條件，在樣本中預先處理以 SNWE (濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml) 或 SNPE (濃度分別為 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 mg/ml)，結果發現隨著不論是 SNWE 或 SNPE，隨著濃度的增加，diene conjugation 的現象逐漸被回復 (Fig. 1 及 Fig. 2)，其回復之最顯著濃度分別是 SNWE 在 0.5 mg/ml，SNPE 在 0.05 mg/ml。

### (2) SNWE 或 SNPE 對氧化型 LDL 中 ApoB 片段化的抑制效果

我們以上述的誘發 ApoB 片段化的條件，在樣本中預先處理以 SNWE (濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml) 或 SNPE (濃度分別為 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 mg/ml)，結果發現隨著不論是 SNWE 或 SNPE，隨著濃度的增加，ApoB 片段化的現象逐漸被回復 (Fig. 3 及 Fig. 4)，其回復之最顯著濃度分別是 SNWE 在 0.1 mg/ml，SNPE 亦在 0.1 mg/ml。

### (3) SNWE 或 SNPE 對 LDL electrophoretic mobility (EM) 的抑制效果

針對 LDL 氧化後之蛋白質部分陰電性增加的特性，我們以 EM 測定 SNWE 及 SNPE 對其之影響，結果發現 SNWE 在 0.05 mg/ml，SNPE 亦在 0.05 mg/ml 可有效減低其陰電性增加 (亦即 LDL 氧化) 之現象。(Fig. 5 及 Fig. 6)

### (4) SNWE 或 SNPE 對 TBARs 的抑制效果

針對 LDL 氧化後之脂質部分氧化的程度，我們以 TBARs 測定 SNWE 及 SNPE 對其之影響，結果發現 SNWE 在 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml 對 MDA 產量分別抑制 16.5%, 17.1%, 71.7%, 89.1%, 89.1%；而 SNPE 在 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 mg/ml 對 MDA 產量則分別抑制 16.3%, 16.0%, 15.6%, 90.1%, 90.1%。(Fig. 7 及 Fig. 8)

### (5) SNWE 對紐西蘭大白兔之動脈粥狀硬化抑制作用

由 Fig. 9 顯示在高脂質餵食紐西蘭大白兔的狀況下，會出現粥狀硬化的斑塊，而 SNWE 依劑量之增加 (0.25%, 0.5% 及 1%) 呈現出抑制動脈粥狀硬化形成的現象。

### (6) SNWE 對高脂質餵食紐西蘭大白兔之血脂肪變化的影響

由 Fig. 10-13 得知在高脂質餵食紐西蘭大白兔的狀況下，高劑量的 SNWE 在第 3、6、9 週對 total cholesterol 及 LDL 並無顯著影響，但可增加 HDL-C 及減低 triglyceride 的血清值。

### (7) SNWE 對高脂質餵食紐西蘭大白兔之肝功能的影響

由 Fig. 14-16 的結果得知在高脂質餵食紐西蘭大白兔的狀況下，高劑量的 SNWE 在第 3、6、9 週對 albumin 並無顯著影響，但可減低 ALT 及 AST 的血清值。

### (8) SNWE 對高脂質餵食紐西蘭大白兔脂質氧化及抗氧化分子的影響

由 Fig. 17-19 的結果得知在高脂質餵食紐西蘭大白兔的狀況下，高劑量的 SNWE 具有減低肝臟組織脂質過氧化的能力，餵食 0.25%、0.5%、1% SNWE 的大白兔 LPO 的量比未餵食之大白兔(控制組)分別降低 22%、22% 及 85%。並會提升 GSH 含量及增高 catalase 活性，在餵食 SNWE 的組別分別依餵食濃度 0.25%、0.5%、1.0%，明顯提升 glutathione 21.6%、64.9% 及 76.9%，並使 catalase 提升 2.4%、94.1%、104.5%，且呈現 dose-dependent 的現象。

### (9) 以超音波檢查觀察 SNWE 對高脂質餵食紐西蘭大白兔肝臟的影響

大白兔在第 0 週及第 8 週分別進行腹部超音波掃描：由超音波掃描下脂肪肝影像

的表徵；以肝腎作為對比產生高回音的實質變化，或更嚴重時，肝深部回音會衰減及肝內門靜脈或肝靜脈枝的影像不清晰。從 Table 的分析，餵食 HFD 組，大白兔肝臟回音明顯增強，且肝臟的外觀呈現不規則與粗糙，而在餵食不同濃度的 SNWE+HFD 的各組，肝臟的回音下降且外觀平滑，推測在不同濃度 SNWE 下，HFD 並沒有造成肝實質回音增加。

第二年進行機轉的探討，我們將巨噬細胞與 oxLDL 共同處理後，觀察 SNWE 及 SNPE 由結果中發現：

### **I. 預先處理 SNWE 對氧化型 LDL 所引起的細胞死亡之影響**

細胞預先處理 SNWE，濃度分別為 1, 2, 3 mg/ml，爾後加入 LDL 及 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> 後培養 24 小時，以 MTT assay 發現 SNWE 引起細胞死亡 (Figure 20)，在倒立顯微鏡觀察細胞型態的變化，可以發現 OxLDL 所誘發的細胞死亡可被預先處理的 SNWE 所抑制，並且死亡型態可能為 apoptosis (Figure 21)。接著以 DAPI stain 及 flow cytometry 分別檢察，確認 SNWE 確實可以抑制 oxLDL 所引起的巨噬細胞凋亡 (Figure 22, 23)，且其途徑分別為抑制 extrinsic pathway (caspase 8) 及 intrinsic pathway (Bcl-2 and Bax) (Figure 24, 25)

### **II. 預先處理 SNPE 對氧化型 LDL 所引起的細胞型死亡之影響**

細胞預先處理 SNPE，濃度分別為 1, 5, 10  $\mu$ g/ml，爾後加入 LDL 及 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> 後培養 24 小時，以 MTT assay 發現 SNPE 引起細胞死亡 (Figure 26)，以 DAPI stain 及 flow cytometry 分別檢察，確認 SNPE 可以抑制 oxLDL 所引起的巨噬細胞凋亡 (Figure 27, 28)，且其途徑分別為抑制 extrinsic pathway (caspase 8) 及 intrinsic pathway (Bcl-2 and Bax) (Figure 29, 30)

### **III. 預先處理 SNPE 對氧化型 LDL 誘導之泡沫細胞具抑制作用**

在 Figure 31 中發現當 SNPE 處理細胞後，會抑制 oxLDL 誘導 foam cell formation。

第三年

#### **(1) 龍葵多酚及龍葵水萃取物之 MTT assay**

根據 Alley 等人研究的結果所設計之實驗，其原理為在有活性的活細胞會將 MTT (Thiazolyl blue) 經由粒腺體中 dehydrogenase 作用代謝還原為藍紫色結晶，之後再以異丙醇 (isopropanol) 將結晶溶出，並於 OD<sub>563nm</sub> 下測定溶液吸光，由於所測得的吸光值將與活細胞數量呈正比關係，藉此評估細胞的存活率。在細胞的培養液中加入不同濃度的龍葵水萃取物，分別為 0、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5mg/ml SNWE，在細胞在處理龍葵水萃取物 24 小時後發現，龍葵水萃取物並不會導致細胞的死亡，存活率為百分之百 (Figure 32)。而在細胞在處理龍葵水萃取物 48 小時後發現，細胞在 4mg/ml 的濃度下會造成細胞少量的死亡，因此本實驗將加藥濃度定在 4mg/ml 之前。在龍葵多酚的部份，使用 0、0.25、0.5、1、2mg/ml 的 SNPE，在處理龍葵多酚萃取物 24 及 48 小時後發現，龍葵多酚萃取物皆在 0.5mg/ml 會造成細胞少量的死亡 (Figure 33)，因此將加藥濃度定在 0.5mg/ml 之前。

#### **(2) 傷口癒合 (Wound healing)**

傷口癒合是利用 yellow tip 在培養的細胞中劃出一道傷口，來觀察細胞遷移的能力。將培養液中加入 PDGF 去誘導細胞的遷移，再同時加入 0.5、1、1.5、2mg/ml 的龍葵水萃取物，結果發現在 PDGF 的刺激之下細胞遷移的能力明顯增加，並且在 72 小時傷口癒合 (Figure 34A)。但是在 0.5mg/ml 龍葵水萃取物處理下，細胞遷移現象有明顯被抑制的情形，Figure 34B 是量化的結果。接下來是用不同濃度的龍葵多酚萃取物，使用相同的方法，觀察細胞遷移的能力。使用 0.25、0.5 mg/ml 濃度的龍葵多酚萃取物，發現多

酚萃取物在0.25mg/ml的濃度下，就能有效抑制細胞遷移的現象(Figure 35A, B)。另外以SNPE中的三種主要成分rutin, gallic acid 及caffeic acid進行研究，結果發現低濃度的Rutin、Gallic acid以及Caffeic acid就能有效的抑制平滑肌細胞的增生遷移。(Figure 36 A及B)

### 3. Gelatin Zymography assay

MMP是一類鋅離子倚賴性內源性蛋白水解酶，主要功能是降解ECM和基底膜，而其中的MMP-2和MMP-9為gelatinase，能夠分解gelatin，參與細胞外基質的分解機制，因而可以藉由Zymography測定MMP-2和MMP-9的酵素活性來了解細胞對細胞外基質的分解能力。由(Figure 37)中發現在PDGF的刺激下，MMP-2的分泌量比Normal組增加了20%，而加入了龍葵多酚萃取物在0.25mg/ml濃度下無法降低MMP-2的分泌，但是在0.5mg/ml濃度下，MMP-2的分泌降低了16%。在龍葵水萃取物0.5mg/ml濃度下，MMP-2的分泌降低了25%，2mg/ml濃度下降低了38%。

### 4. Expressions of Ras family

Ras 超家族是一類重要的功能蛋白。它們介導生長因子、細胞因子和多種細胞外信號的訊息通路，對細胞生長、分化、存活、增殖等多種功能的調節發揮重要作用。在Figure 38 中發現，使用 PDGF 刺激 48 小時後，RhoA, RhoB, Ras, CDC42 蛋白表現量跟 Normal 組相比有明顯的增加，而同時處理了不同濃度的 SNWE (0.5, 2mg/ml) SNPE (0.25, 0.5mg/ml)能夠有效降低 RhoA, CDC42 的蛋白表現，並且可以回復跟 Normal 組一樣。而 RhoB 雖然有下降，但本身表現並不明顯。而 Ras 蛋白表現量有降低的趨勢，但無法回復跟 Normal 組一樣。依據細胞的結果，我們檢查餵食高脂肪食物 (HFD)之大白兔的動脈弓部分血管，利用免疫組織化學染色檢查與血管平滑肌細胞移行相關的蛋白。在 Figure 39 中發現，HFD 組血管中血管增生因子 VEGF 會大量增加，且可被 SNWE 抑制；而與平滑肌細胞移行作用相關的 RhoA、CDC42 及 Rac 在 HFD 組亦會增加，並且也會被 SNWE 所抑制 (Figure 40-42)。

## 六、參考文獻

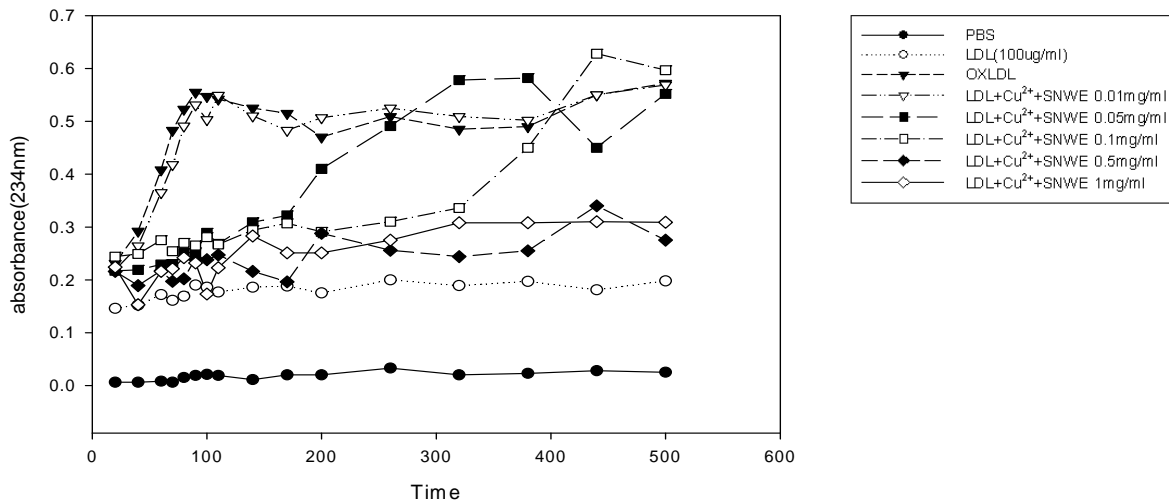
1. Sultana et al.,(1995) Crude extracts of hepatoprotective plants, *Solanum nigrum* and *Cichorium intybus* inhibit free radical-mediated DNA damage. *J. Ethnopharmacol*, 45, 189-92.
2. Prashanth et al. (2001) alpha-Glucosidase inhibitory activity of *Mangifera indica* bark. *Fitoterapia*, 72, 686-8.
3. Jindal, V.K. Patel and N.B. Patel (1975) Some pharmacological activities of aqueous and alcoholic extracts of *Cichorium intybus* Linn. *Indian Journal of Pharmacology* , 7, 104.
4. A. Saxena and N.K. Garg (1979) Effect of Liv-52 on hepatic enzymes. *Indian Journal of Experimental Biology* 17, 662.
5. An et al. (2005) *Solanum nigrum* produces nitric oxide via nuclear factor-[kappa]B activation in mouse peritoneal macrophages. *Eur. J. Cancer prevention*, 14, 345.
6. K. S. Heo, S. J. Lee, J. H. Ko, K. Lim and K. T. Lim (2004) Glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. inhibits the DNA-binding activities of NF- $\kappa$ B and AP-1, and increases the production of nitric oxide in TPA-stimulated MCF-7 cells, *Toxicol. In Vitro*, 18, 755.
7. Perez et al. (1998) Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. *J. Ethnopharmacol*, 62, 43.
8. Yen, G.C., Chen, H.Y., Peng, H.H. (2001) Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1045-1053.
9. Son, Y.-O., Kim, J., Lim, J.-C., Chung, Y., Chung, G.-H., Lee, J.-C. (2003) Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1421-1428.
10. Lee et al. (2005) 150 kDa glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* Linne enhances activities of detoxicant enzymes and lowers plasmic cholesterol in mouse. *Pharmacol. Res.*, 51, 399-408.
11. 呂翠霞等， 1999， 山東中醫藥大學學報， 23： 224
12. 王云啟， 2002， 遼寧中醫雜誌
13. 羅開明等， 1999， 右江醫學27： 105
14. 張書元等， 2000， 華北煤炭醫院學報， 2： 380
15. 王泳， 2000， 中醫藥研究， 16： 20
16. 陸克勤， 2000， 中國醫刊， 35： 51
17. 蘇進成等， 2003， *J. Chin. Med.*, 14： 151
18. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.C. (1989) Beyond cholesterol modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320, 915-924.
19. Witztum, J.C. and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, 88, 1785-1792.
20. Bruja, L.M., Kita, T., Glosatein, J.L., Watanabe, Y. and Brown, M.S., (1983) Cellular pathology of progressive model of familial hypercholesterolemia Arterio sclerosis., 3, 87-101.
21. Reaven, P. and Witztum, J.L. (1995) The role of oxidatin of LDL in atherogenesis. *Endocrinologist*, 5, 44-54.
22. Mathieu, J., Chancerelle, Y., Herodin, F., Multon, E., Drouet, M., Mestries, J.C. and Kergonou, J.F. (1996) Oxidative stress and apoptosis. *Ann. Pharm. Fr.*, 54, 193-201.
23. Wood, K.A. and Youle, R.J. (1994) Apoptosis and free radical. *Ann. N.Y. Acad Sci.*, 738, 400-407.

24. Nishio, E., Arimuria, S. and Watanabe, Y. (1996) Oxidized LDL induces apoptosis in cultured smooth muscle cells: a possible role for 7-ketocholesterol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 223, 413-418.
25. Nishio, E. and Watanabe, Y. (1996) Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein downregulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 928-934.
26. Hardwick, S.J., Hegyi, L., Clare, K., Law, N.S., Carpenter, K.L., Mitchinson, M.J. and Skepper, J.N. (1996) Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. *J. Pathol.*, 179, 294-302.
27. Yang, X., Galeano, N.F., Szabolcs, M., Sciacca, R.R. and Cannon, P.J. (1996) Oxidized low density lipoproteins alter macrophage lipid uptake, apoptosis, viability and nitric oxide synthesis. *J. Nutr. (Suppl)*, 126, 1072S-1075S.
28. Papassotiropoulos, A., Ludwig, M., Naib-Majani, W. and Rao, G.S. (1996) Induction of apoptosis and secondary necrosis in rat dorsal root ganglion cell cultures by oxidized low density lipoprotein. *Neurosci. Lett.*, 209, 33-36.
29. Escargueil-Blanc, I., Salvayre, R. and Negre-Salvayre, A. (1994) Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *FASEB J.*, 8, 1075-1080.
30. Li, D., Yang, B. and Mehta, J.L. (1998) Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am. J. Physiol.*, 275, H568-H576.
31. Bjorkerud, S. and Bjorkerud, B. (1996) Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am. J. Pathol.*, 149, 367-380.
32. Halka AT, Turner NJ, Carter A, *et al.* (2008) The effects of stretch on vascular smooth muscle cell phenotype in vitro. *Cardiovasc Pathol* 17, 98-102.
33. Gu L, Okada Y, Clinton SK, *et al.* (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2, 275-281.
34. Sugden PH, Clerk A. (2000) Activation of the small GTP-binding protein Ras in the heart by hypertrophic agonists. *Trends Cardiovasc Med* 10, 1-8.
35. Sun Y, Weber KT. (2003) RAS and connective tissue in the heart. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 919-931.
36. Nowak JM, Grzanka A, Zuryn A, Stepien A. (2008) [The Rho protein family and its role in the cellular cytoskeleton]. *Postepy Hig Med Dosw* 62, 110-117.
37. Kost B. (2008) Spatial control of Rho (Rac-Rop) signaling in tip-growing plant cells. *Trends Cell Biol* 18, 119-127.
38. Sahai E, Marshall CJ. (2002) RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 133-142.
39. Bokoch GM, Der CJ. (1993) Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB J* 7, 750-759.
40. Downward J. (1990) The ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15, 469-472.
41. Hall C, Sin WC, Teo M, *et al.* (1993) Alpha 2-chimerin, an SH2-containing GTPase-activating protein for the ras-related protein p21rac derived by alternate splicing of the human n-chimerin gene, is selectively expressed in brain regions and testes. *Mol Cell Biol* 13, 4986-4998.
42. Huang, H.C., Jan, T.R. and Yeh, S.F. (1992) Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.*, 221, 381-384.
43. Huang, H.C., Wang, H.R. and Hsieh, L.M. (1994) Antiproliferative effect of baicalein, a

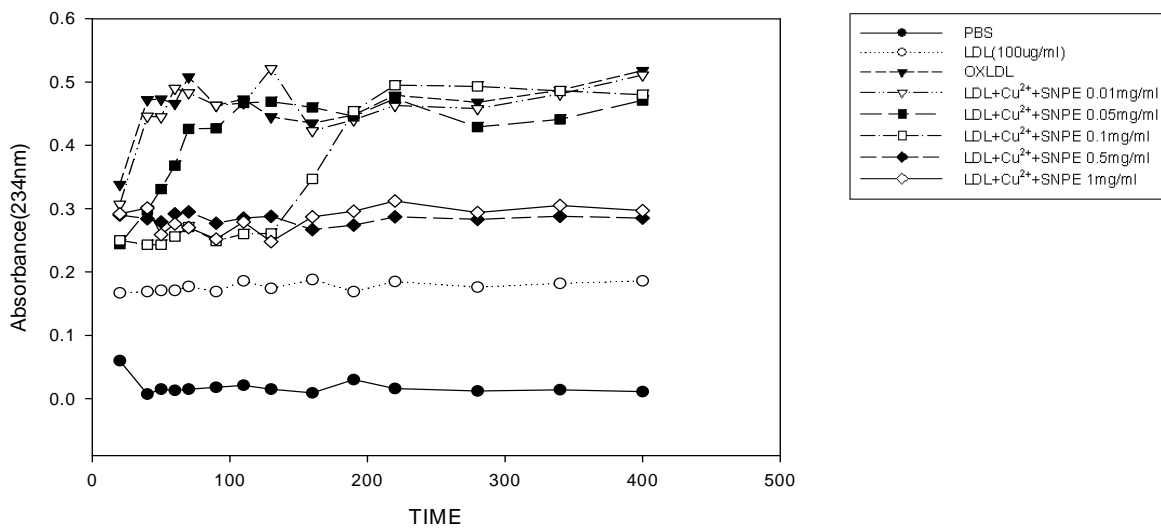
- flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell. *Eur. J. Pharmacol.*, 251, 91-93.
44. Chen, H.W. and Huang, H.C. (1998) Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, 124, 1029-1040.

七、圖及表

**Fig.1. Inhibition of SNWE on the Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation (in diene conjugation assay)**

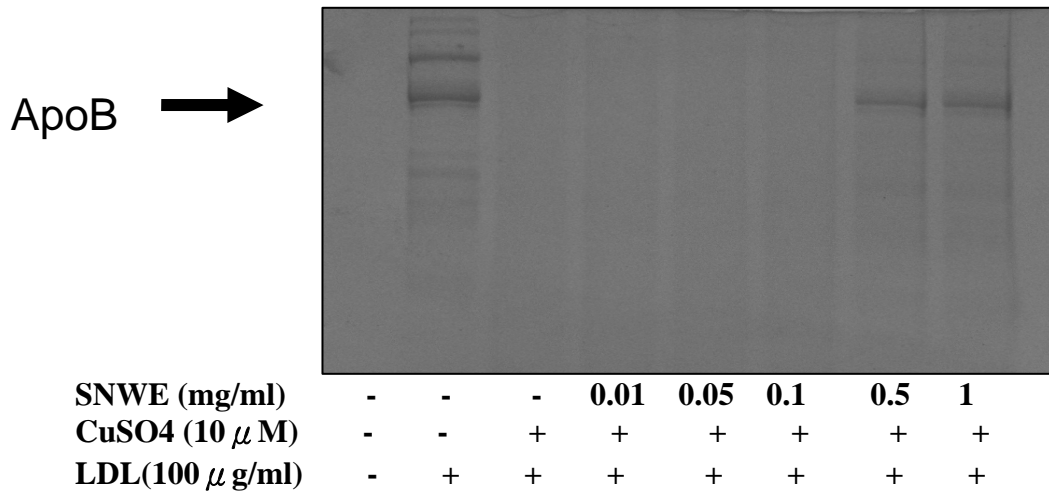


**Fig.2. Inhibition of SNPE on the Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation (in diene conjugation assay)**

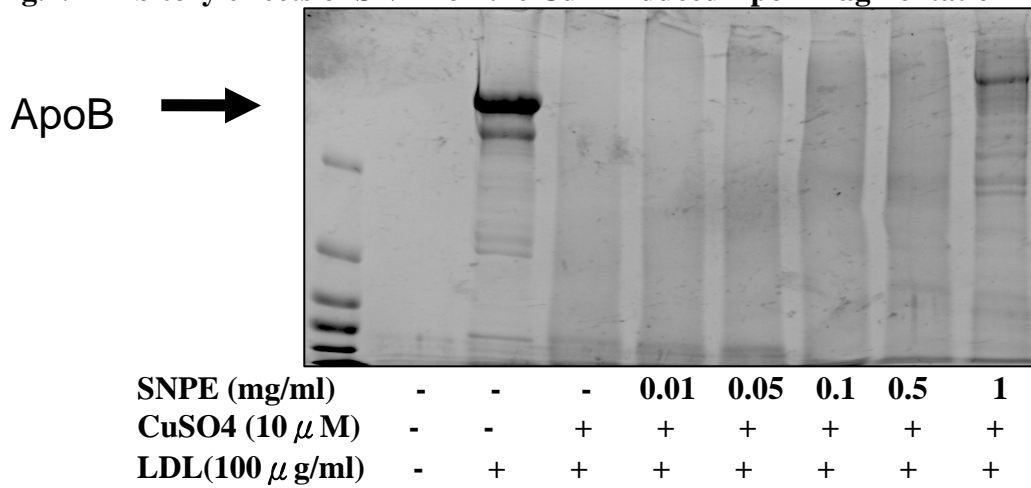




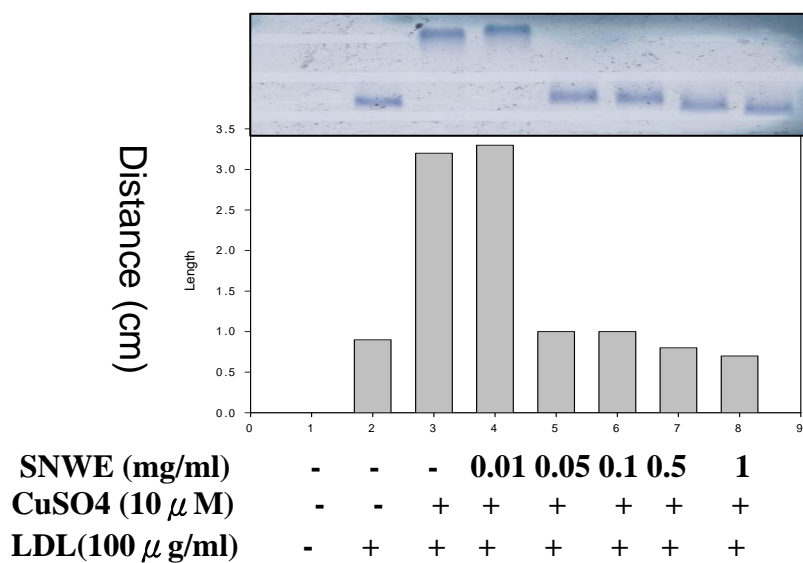
**Fig.3. Inhibitory effects of SNWE on the Cu<sup>2+</sup>-induced ApoB fragmentation**



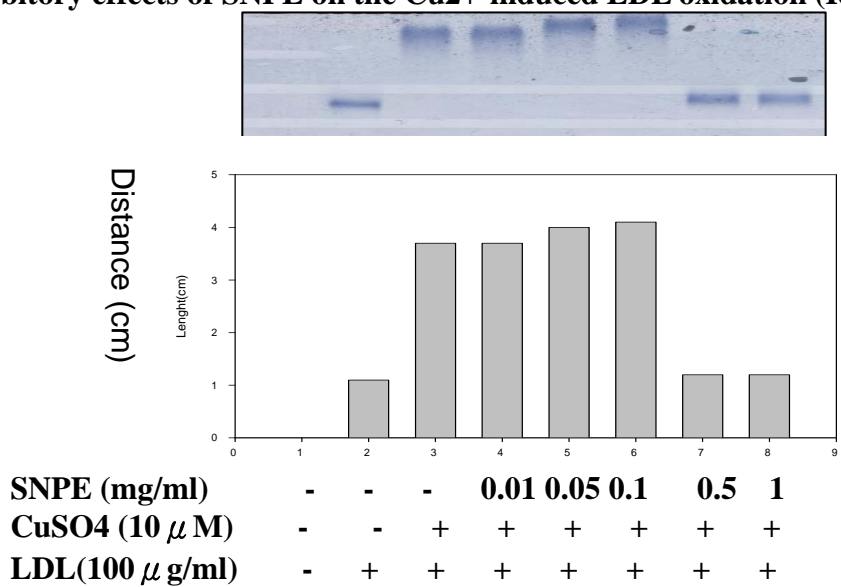
**Fig.4. Inhibitory effects of SNPE on the Cu<sup>2+</sup>-induced ApoB fragmentation**



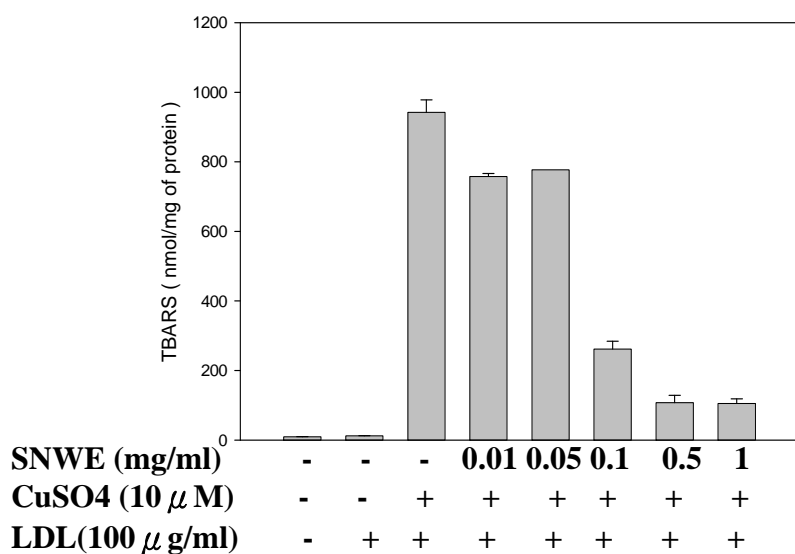
**Fig.5. Inhibitory effects of SNWE on the Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation (REM)**



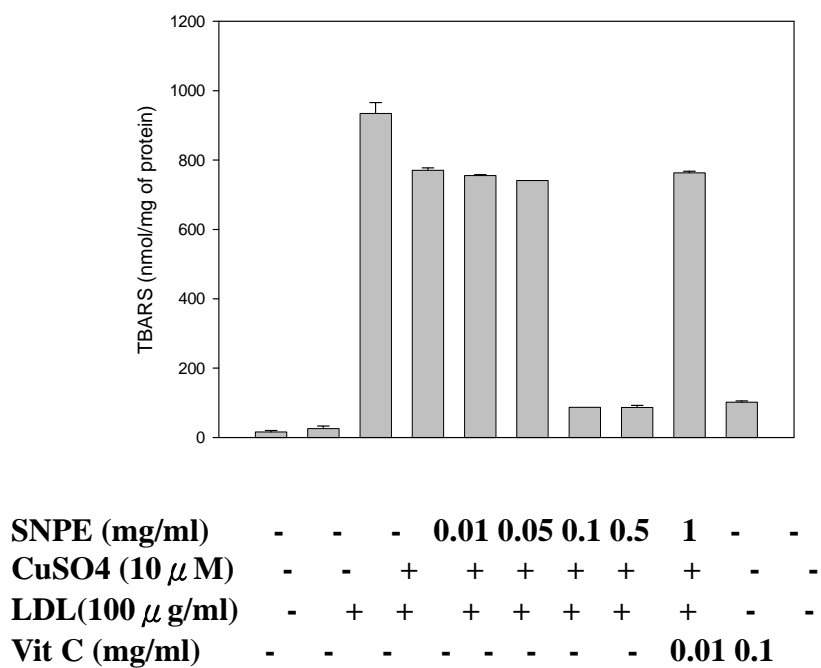
**Fig.6. Inhibitory effects of SNPE on the Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation (REM)**









**Fig.7. Inhibition of SNWE on the Cu<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in LDL (TBARs)**



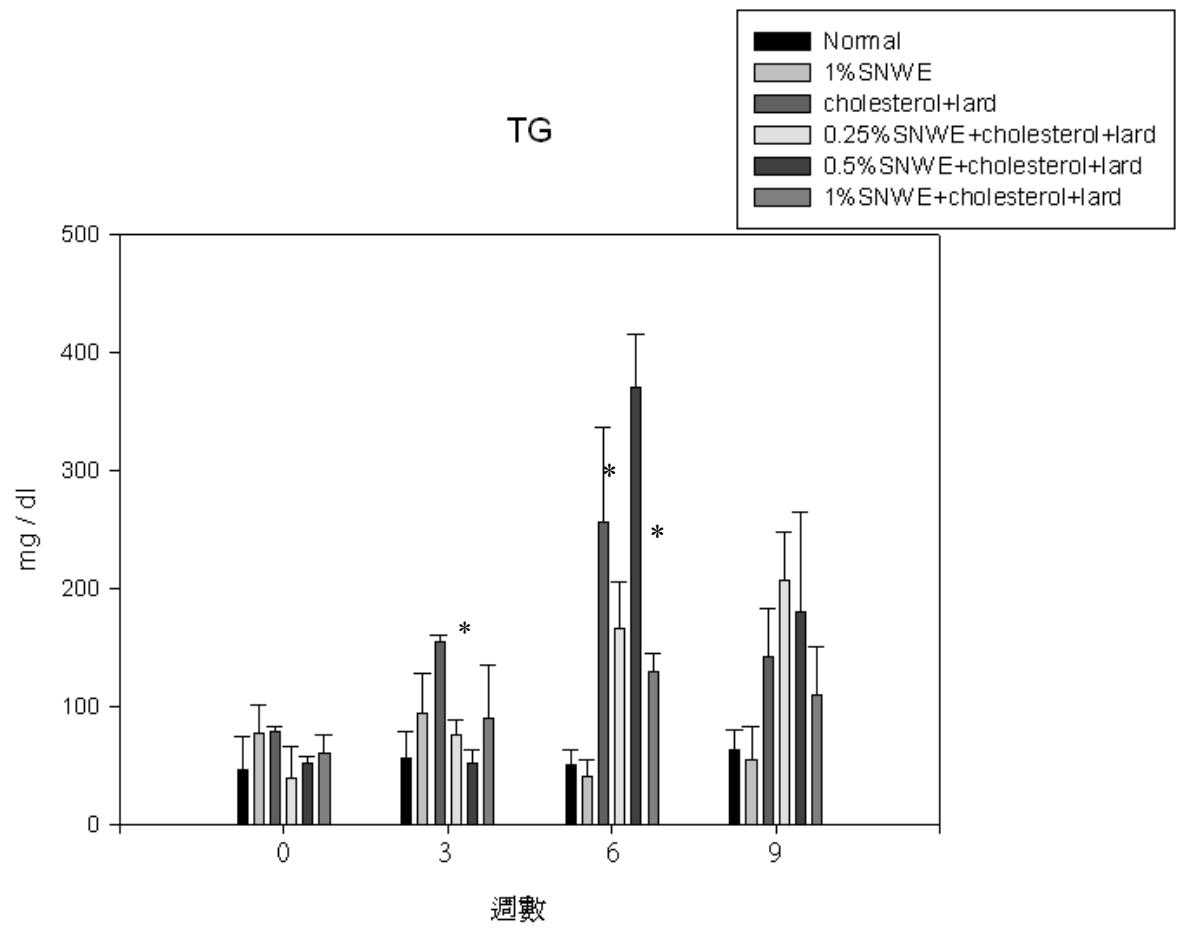
**Fig.8. Inhibition of SNPE on the Cu<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in LDL (TBARs)**



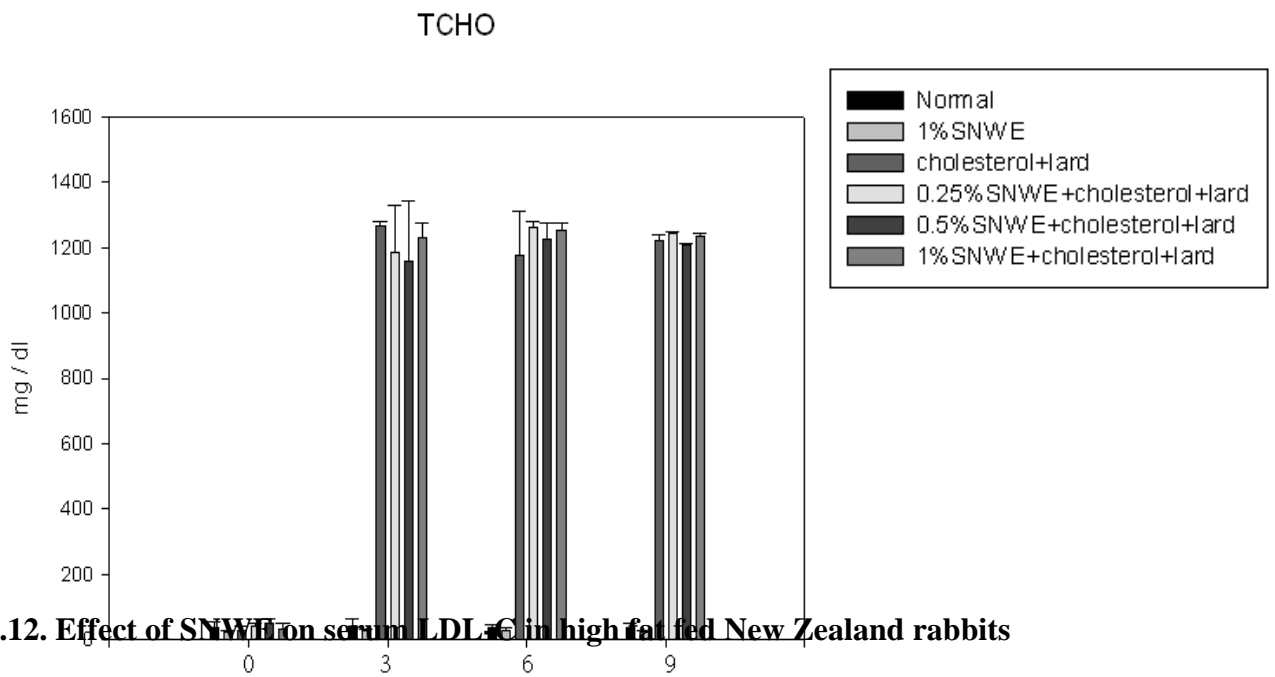
**Fig.9. Inhibition of SNWE on the atherosclerosis in high fat fed New Zealand rabbits**

SNWE	1.3%chol+3%Lard		Semi-quantity
—	—		+
1.0%	—		+
—	+		+++
0.25%	+		++
0.5%	+		++
1.0%	+		--

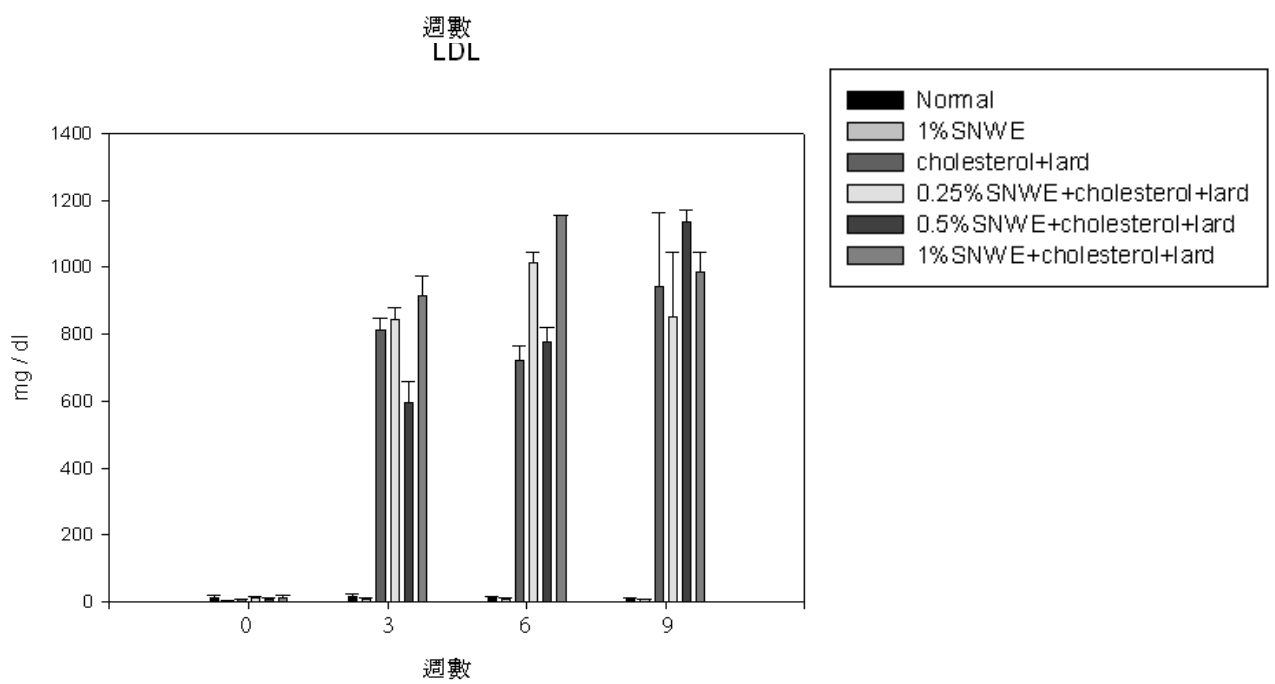
**Fig.10. Inhibition of SNWE on serum triglyceride in high fat fed New Zealand rabbits**



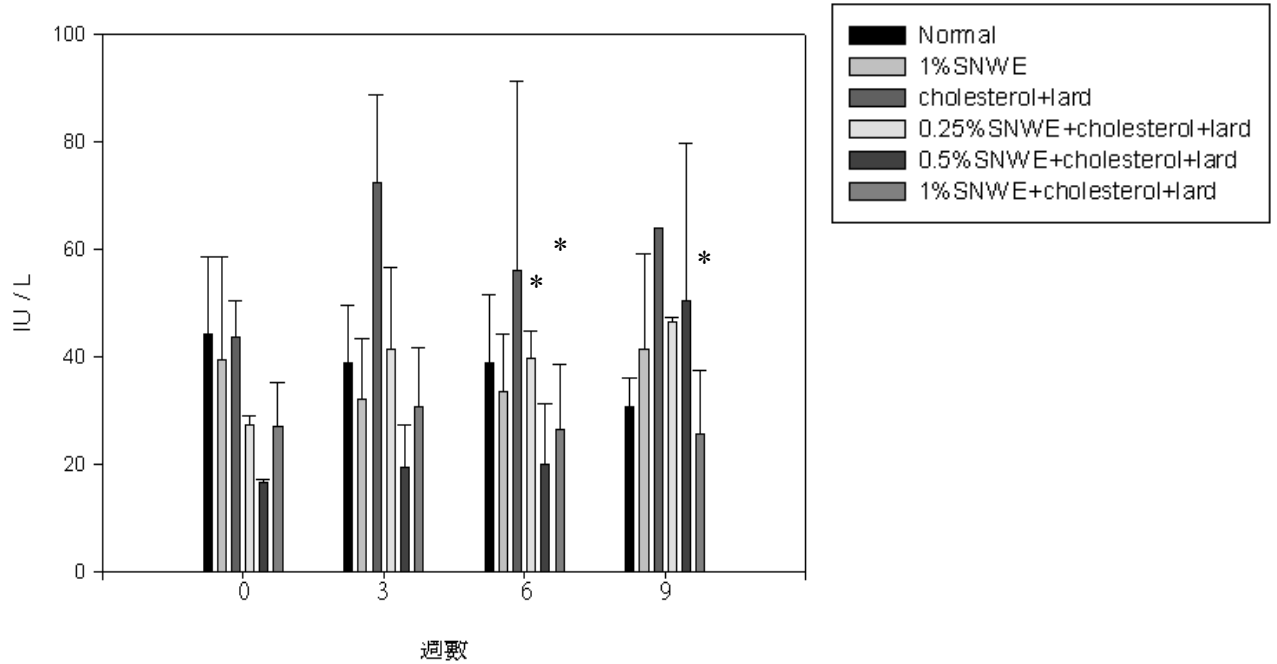
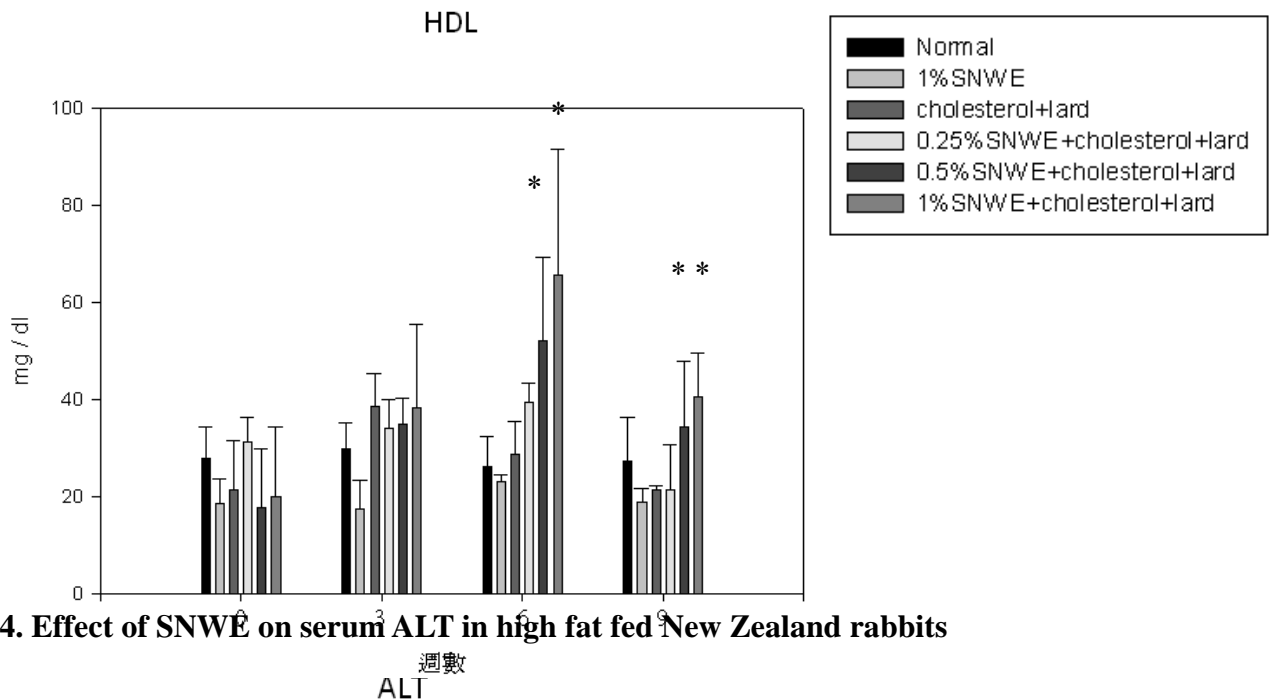
**Fig.11. Effect of SNWE on serum triglyceride in high fat fed New Zealand rabbits**



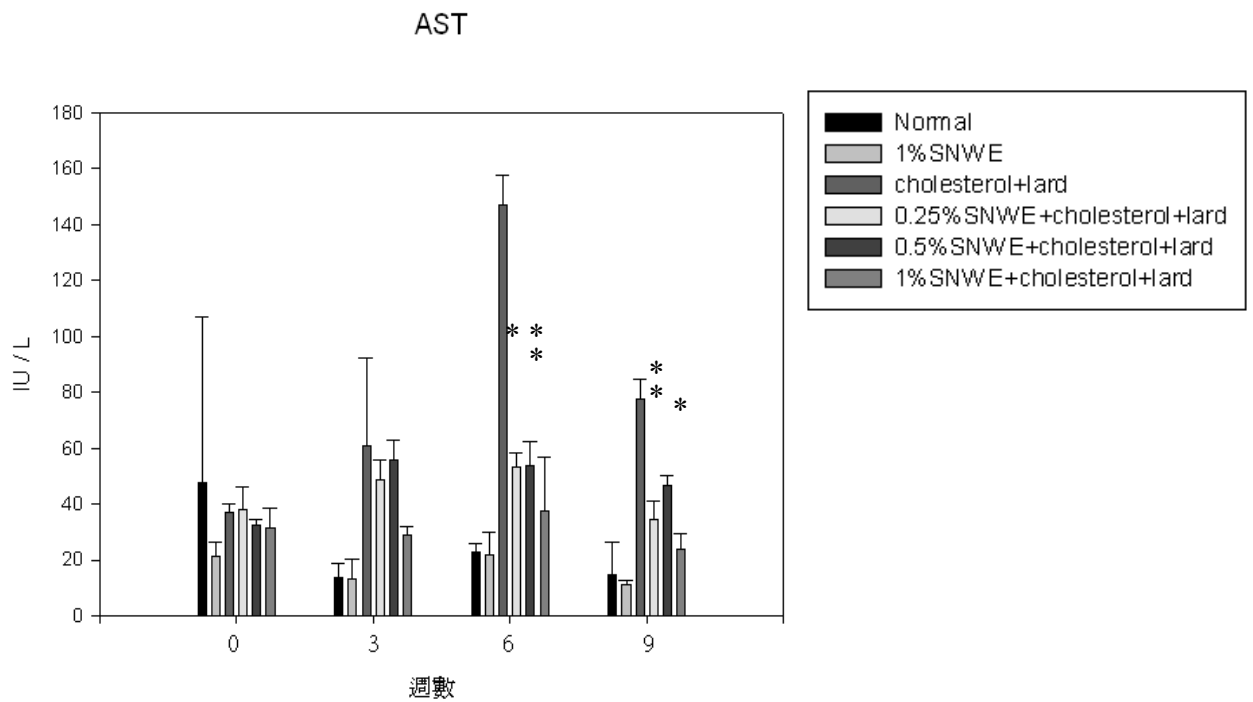
**Fig.12. Effect of SNWE on serum LDL-C in high fat fed New Zealand rabbits**



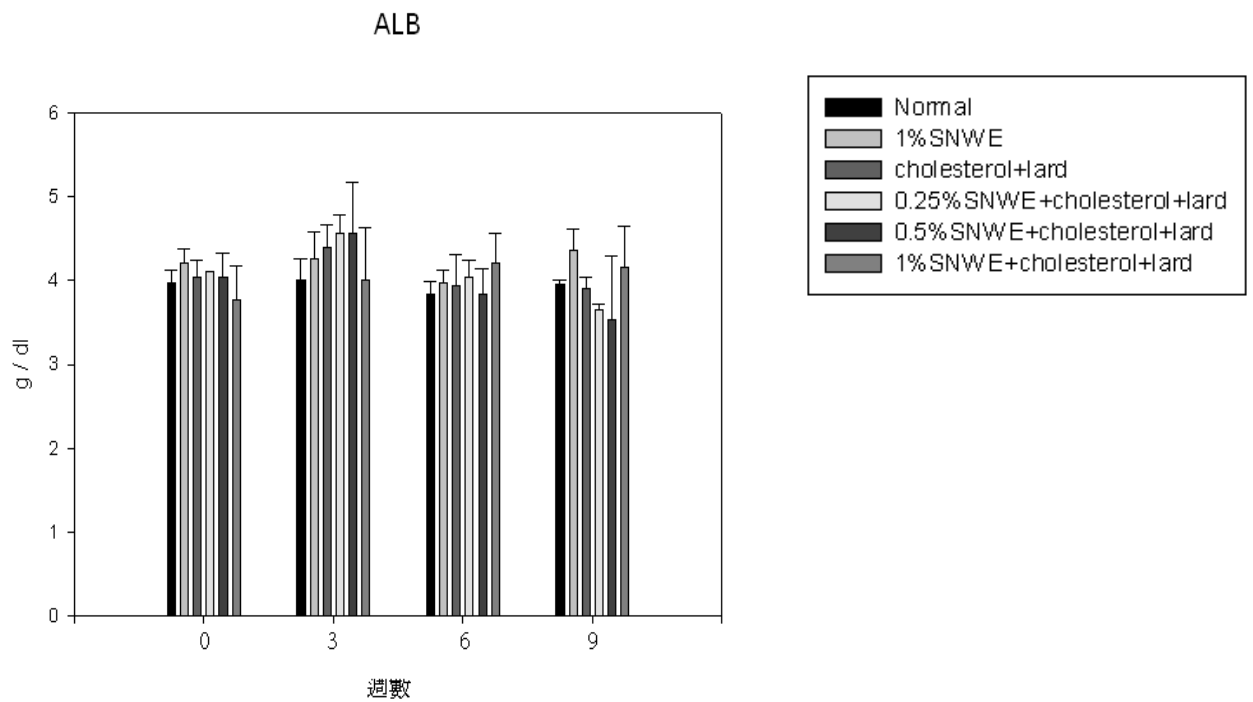
**Fig.13. Effect of SNWE on serum HDL-C in high fat fed New Zealand rabbits**



**Fig.15. Effect of SNWE on serum AST in high fat fed New Zealand rabbits**

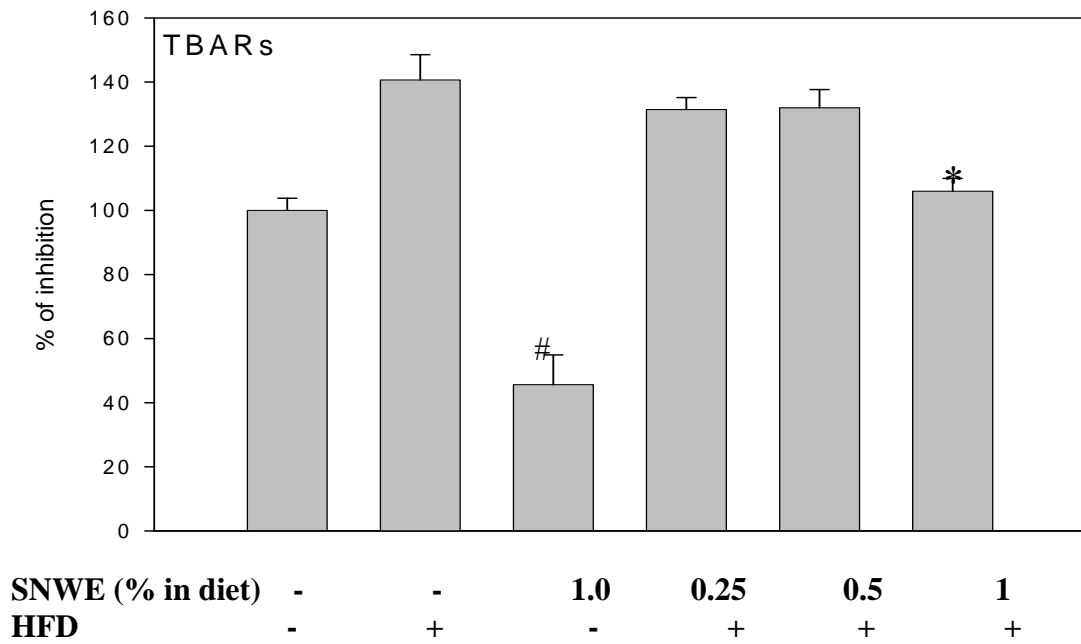


**Fig.16. Effect of SNWE on serum AST in high fat fed New Zealand rabbits**

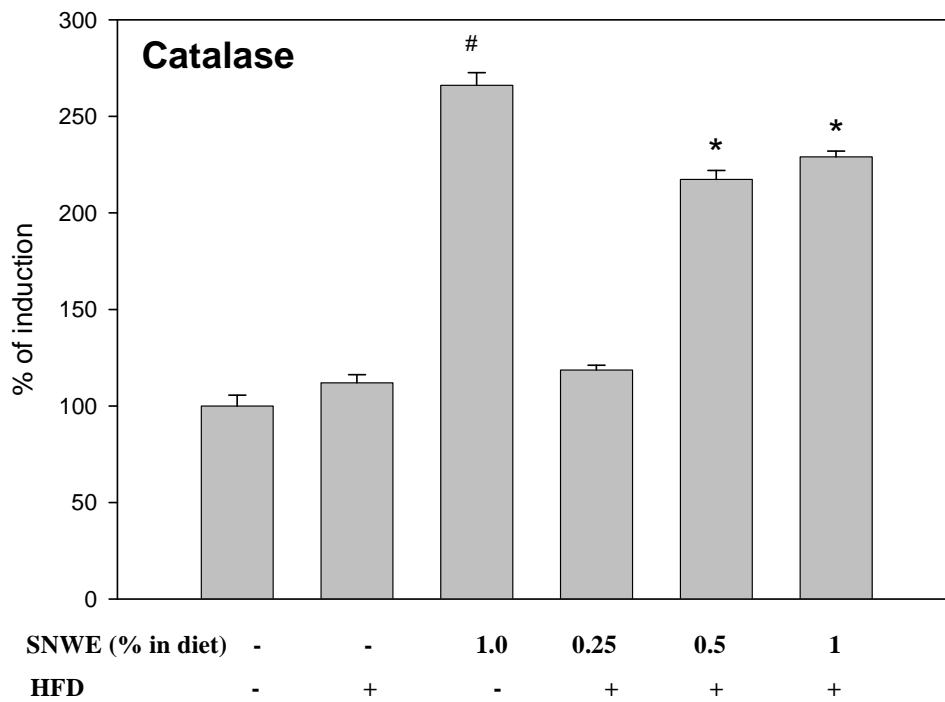




**Fig.17. Effect of SNWE on liver TBARs in high fat fed New Zealand rabbits**



**Fig.18. Effect of SNWE on liver catalase activity in high fat fed New Zealand rabbits**



**Fig.19. Effect of SNWE on liver GSH content in high fat fed New Zealand rabbits**

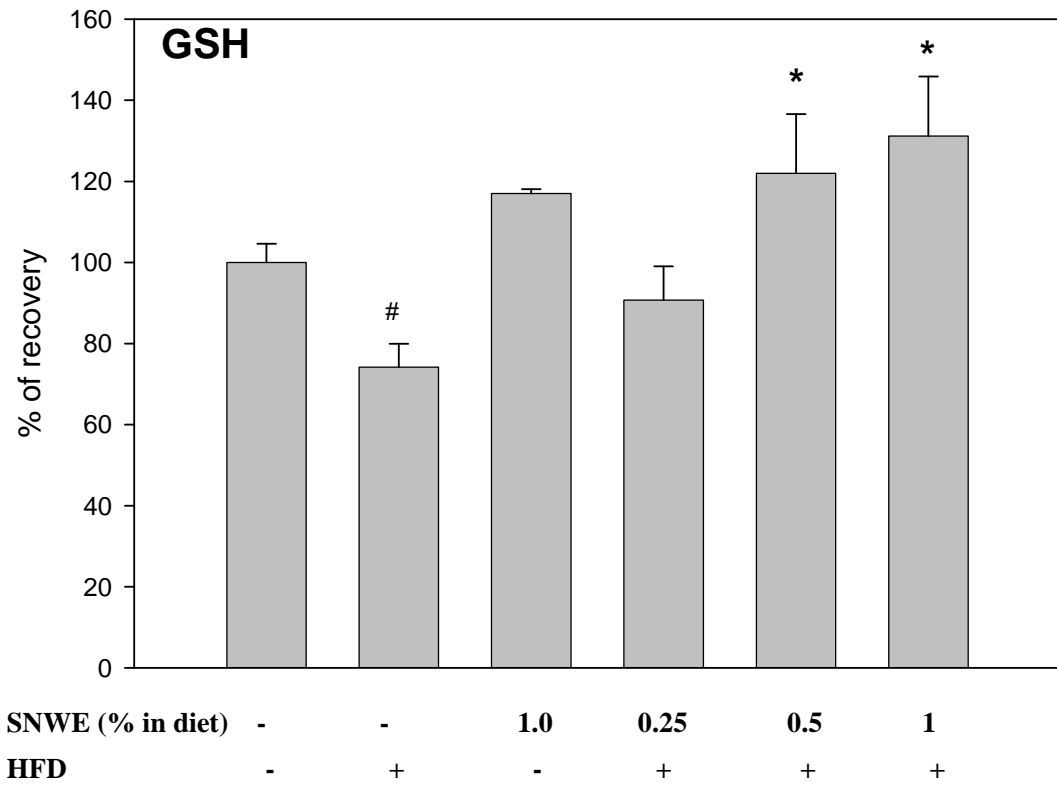
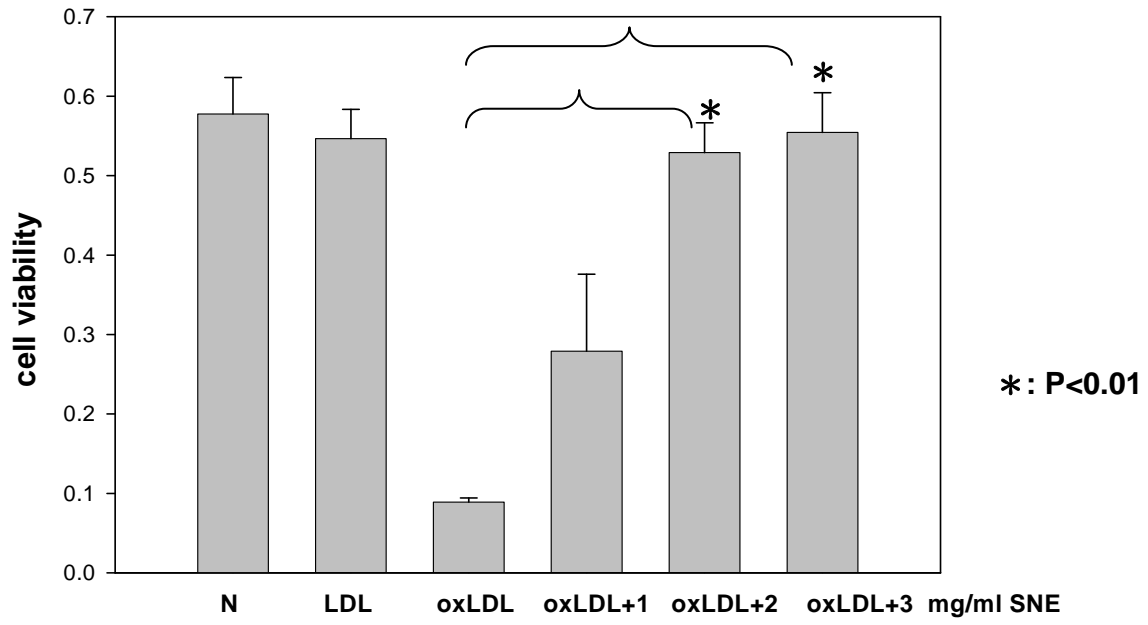


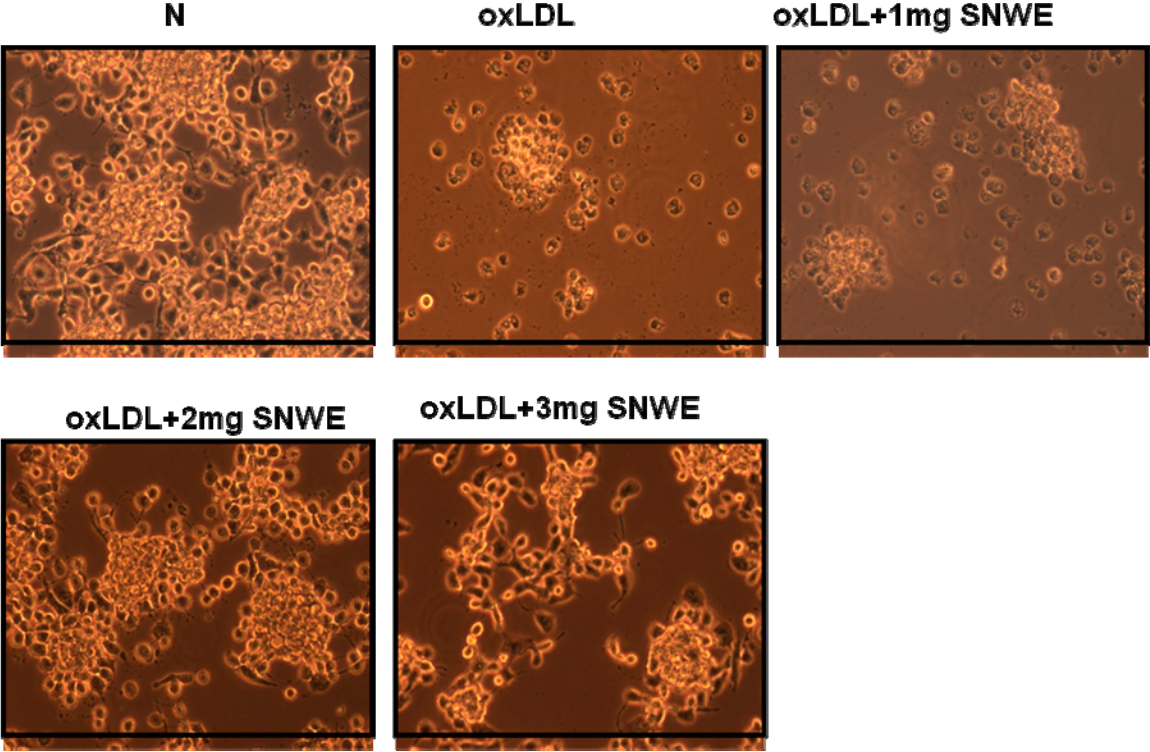
Table. Summary of Echo Findings of Liver imaging from the Six Groups of Rabbits

Group	Control Group	1%SNWE group	HFD	0.25%SNWE + HFD	0.5%SNWE + HFD	1%SNWE + HFD
Echo Finding						
Echogenicity of liver	No chang	No chang	Increase	Decrease	Decrease	Decrease
Echostructue of liver	Smooth	Smooth	Coarsening and irregular	Smooth	Smooth	Smooth

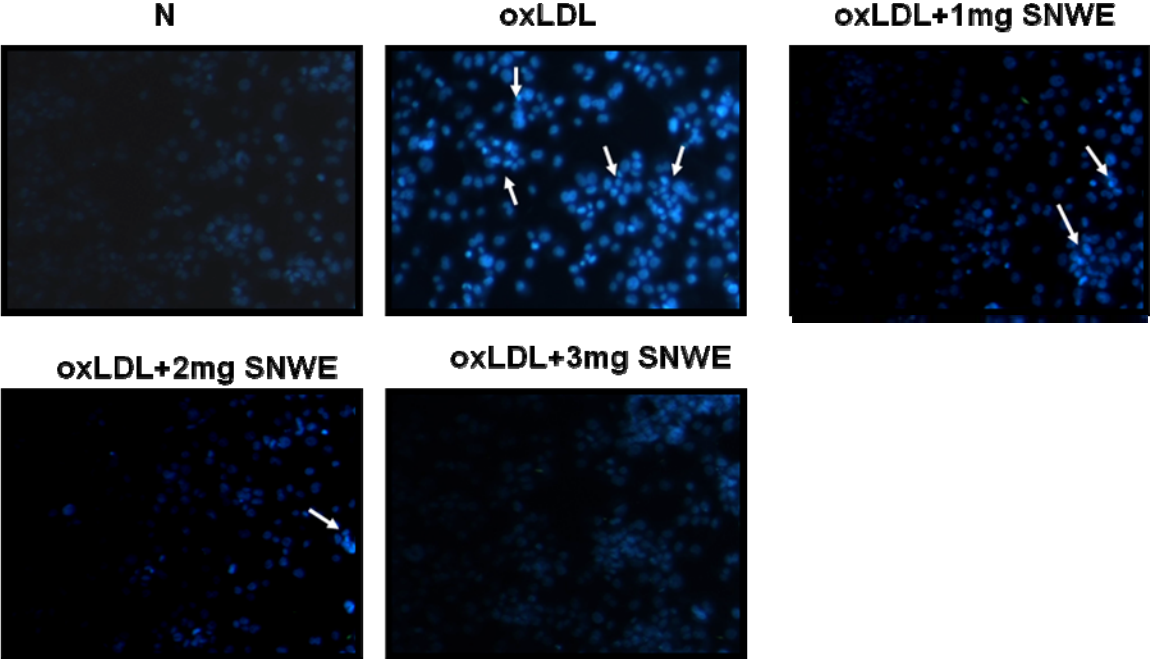
**Fig.20. Effect of SNWE on oxLDL-induced macrophage death**



**Fig.21. Effect of SNWE on oxLDL-induced macrophage death (morphological examination)**



**Fig.22. Effect of SNWE on oxLDL-induced macrophage death (DAPI stain)**



**Fig.23. Effect of SNWE on oxLDL-induced macrophage death (Flow cytometrical examination)**

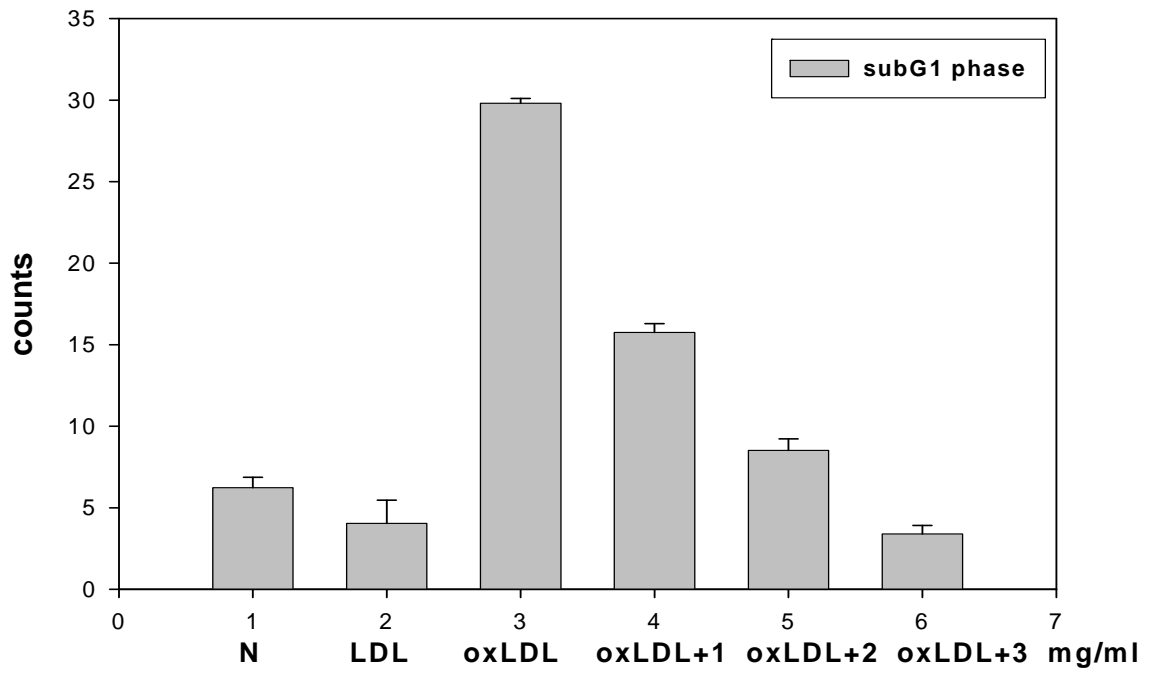
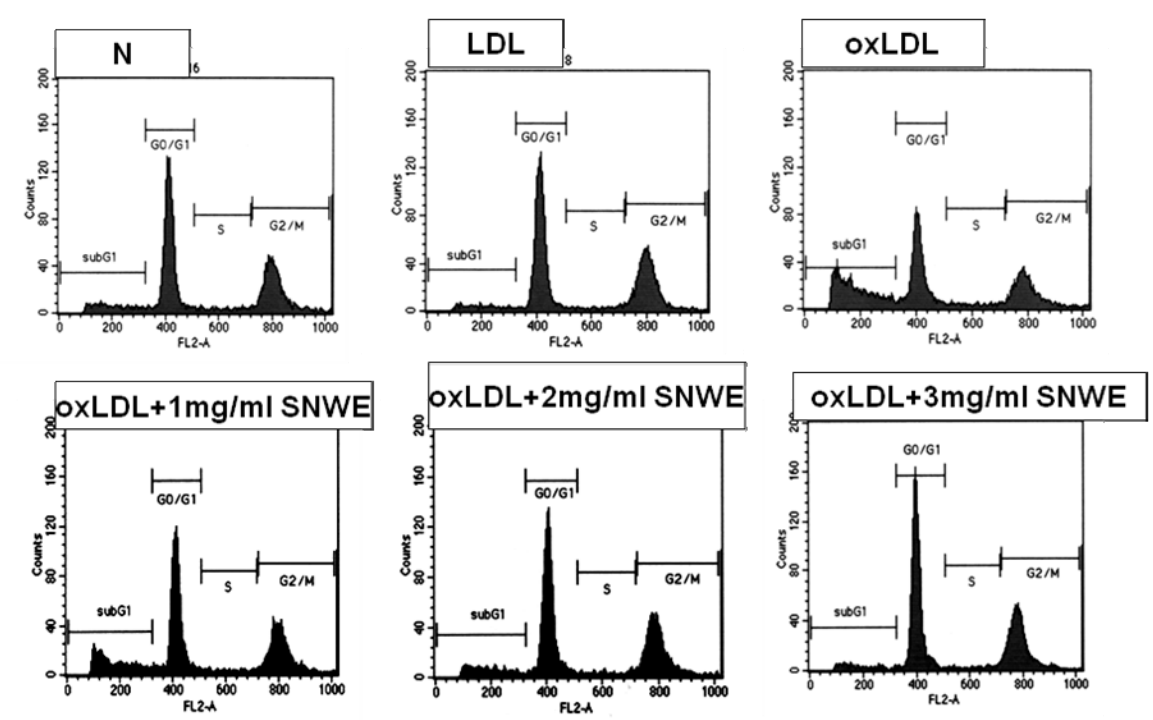
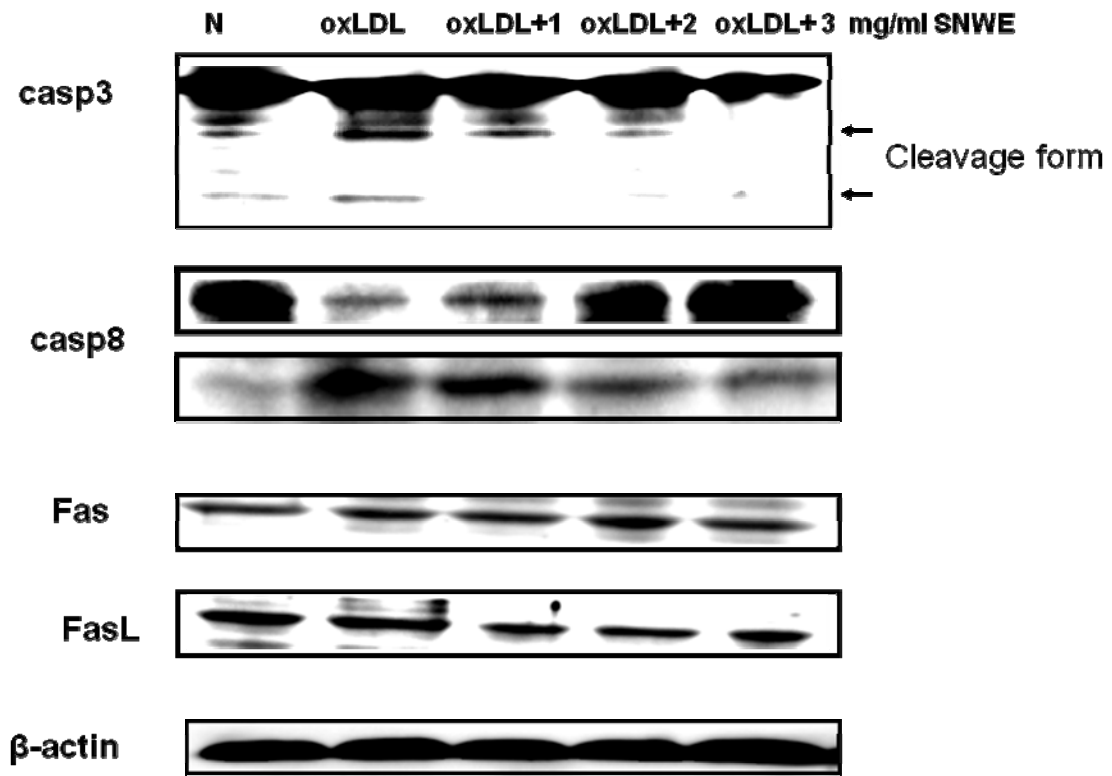
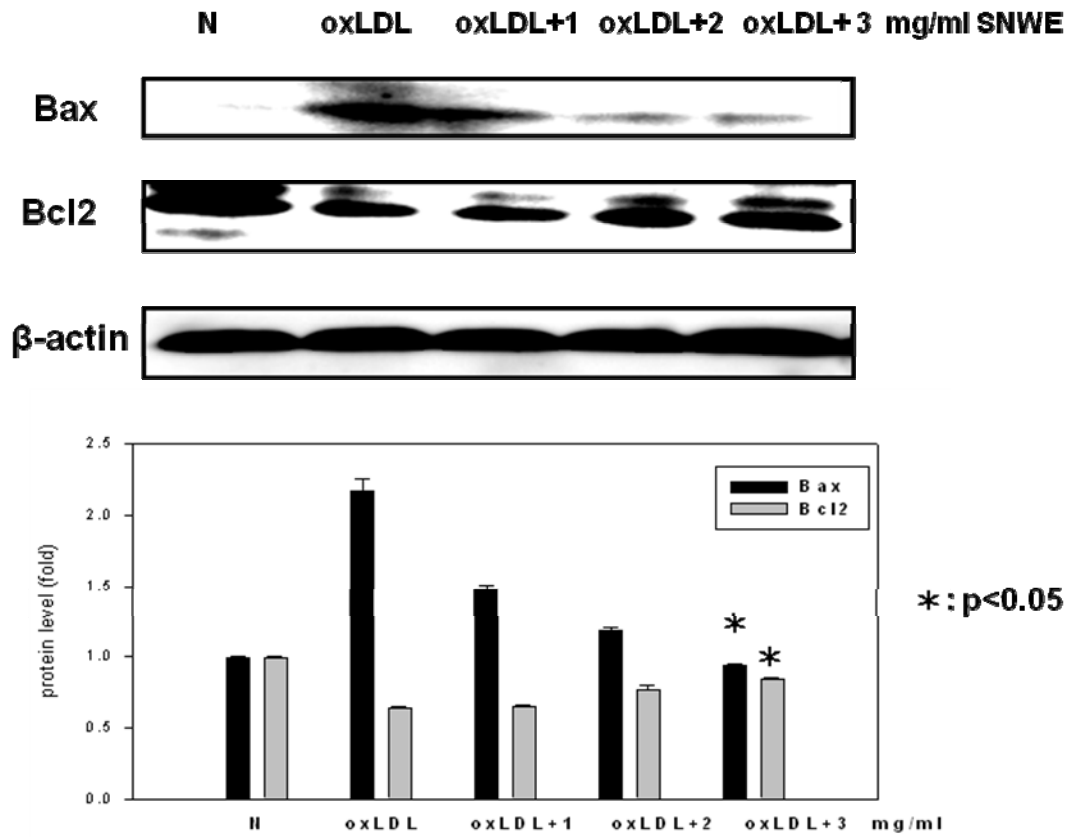


Fig.24. SNWE inhibiting oxLDL-induced macrophage death is via regulation of caspase 3 and caspase 8





**Fig.25. SNWE inhibiting oxLDL-induced macrophage death is via regulation of mitochondrial membrane proteins**



**Fig.26. Effect of SNPE on oxLDL-induced macrophage death (MTT assay)**

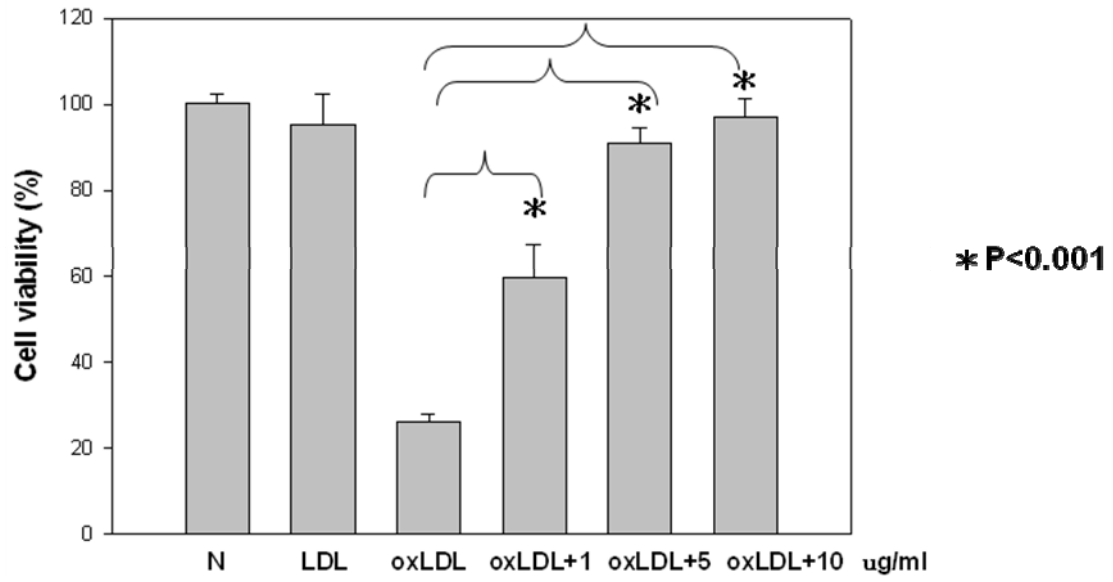
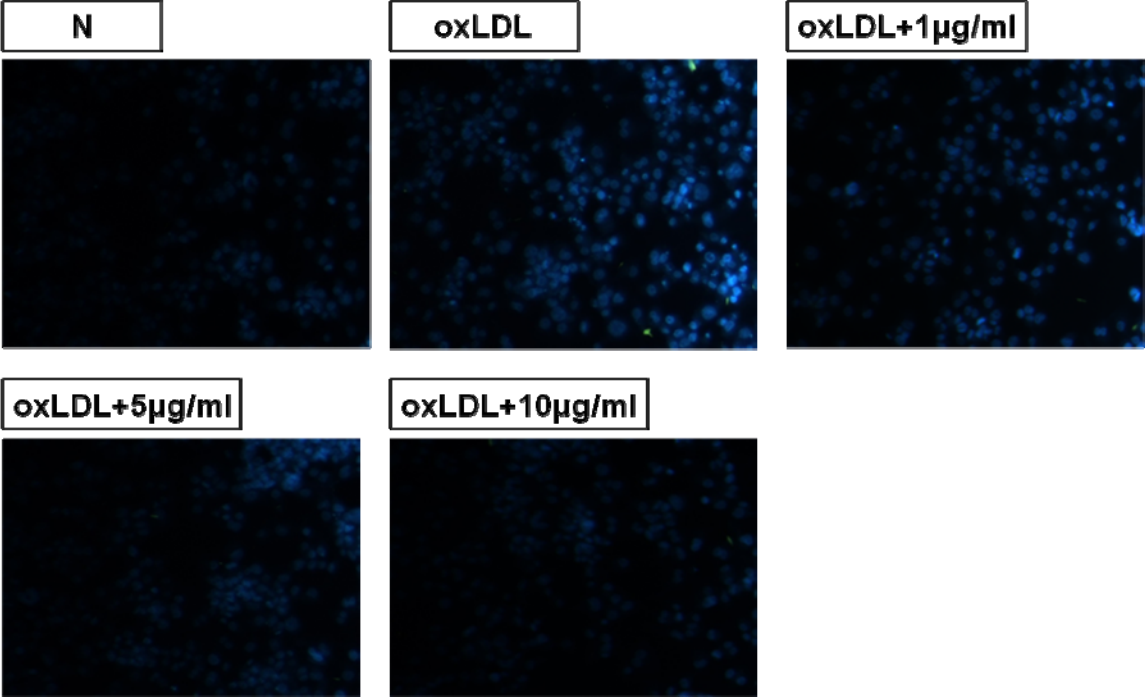
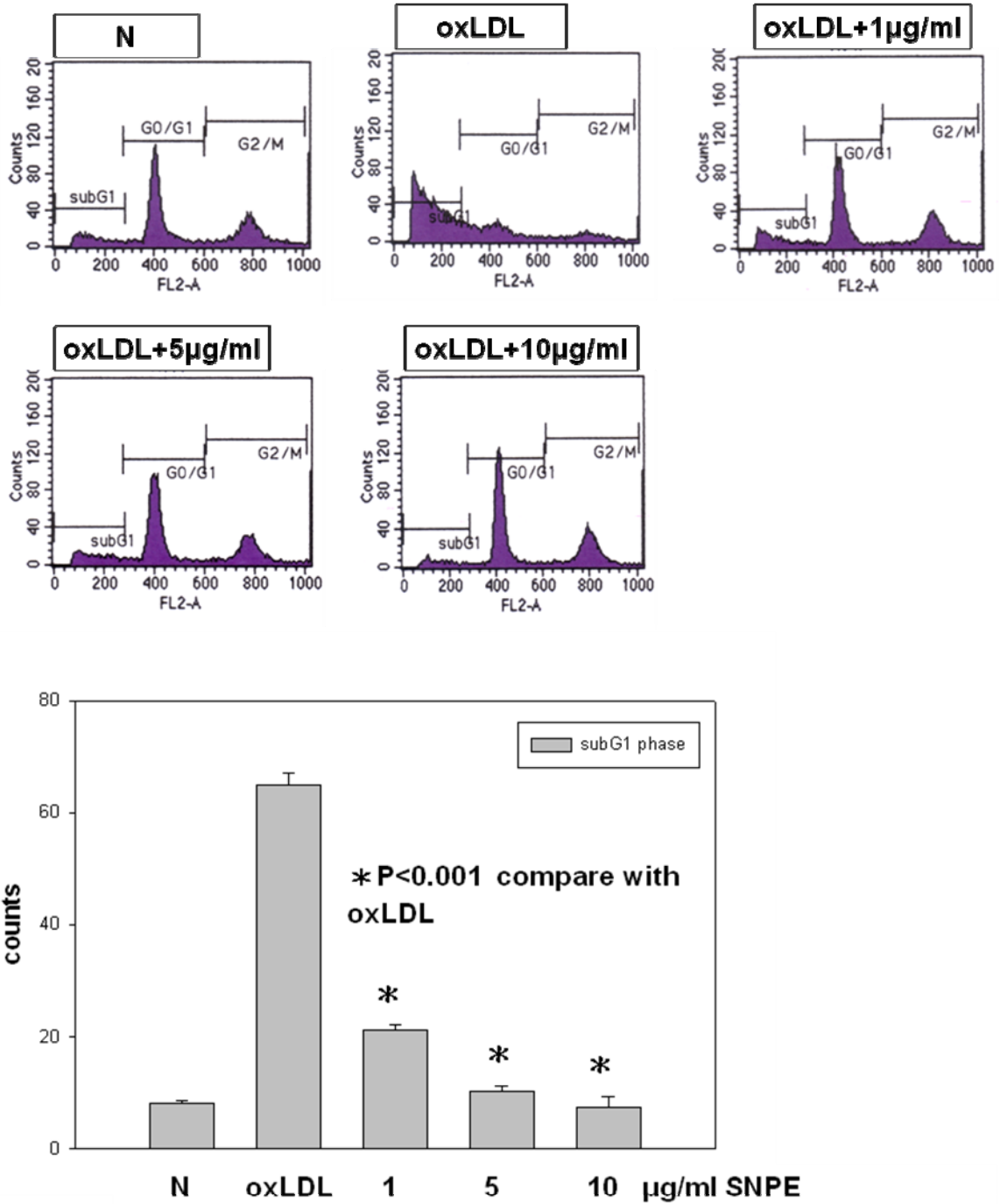


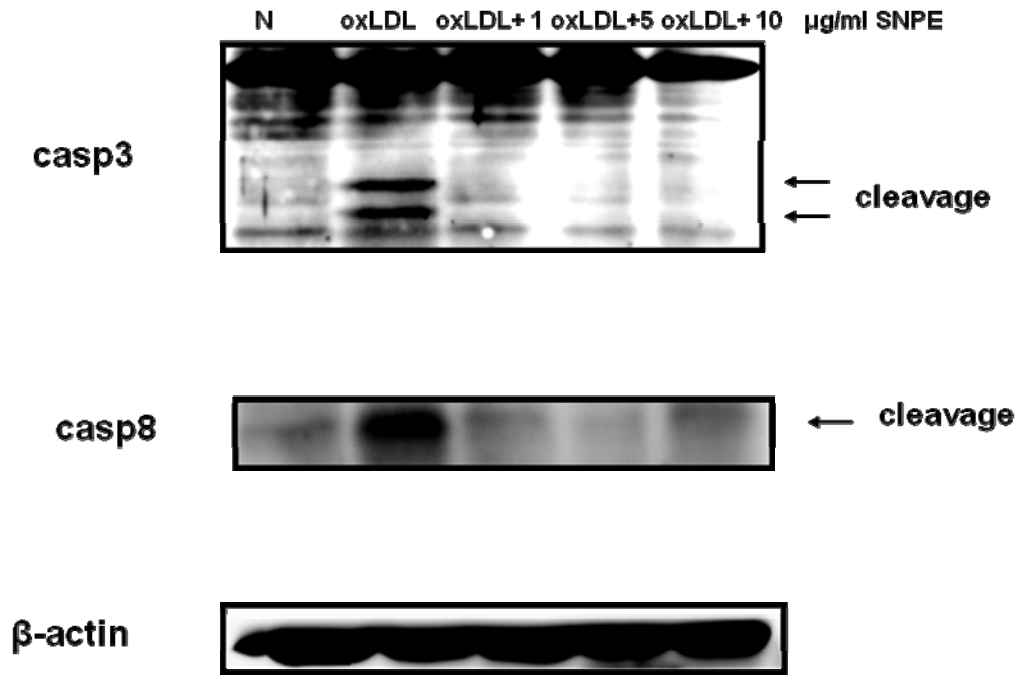
Fig.27. Effect of SNPE on oxLDL-induced macrophage death (DAPI stain)



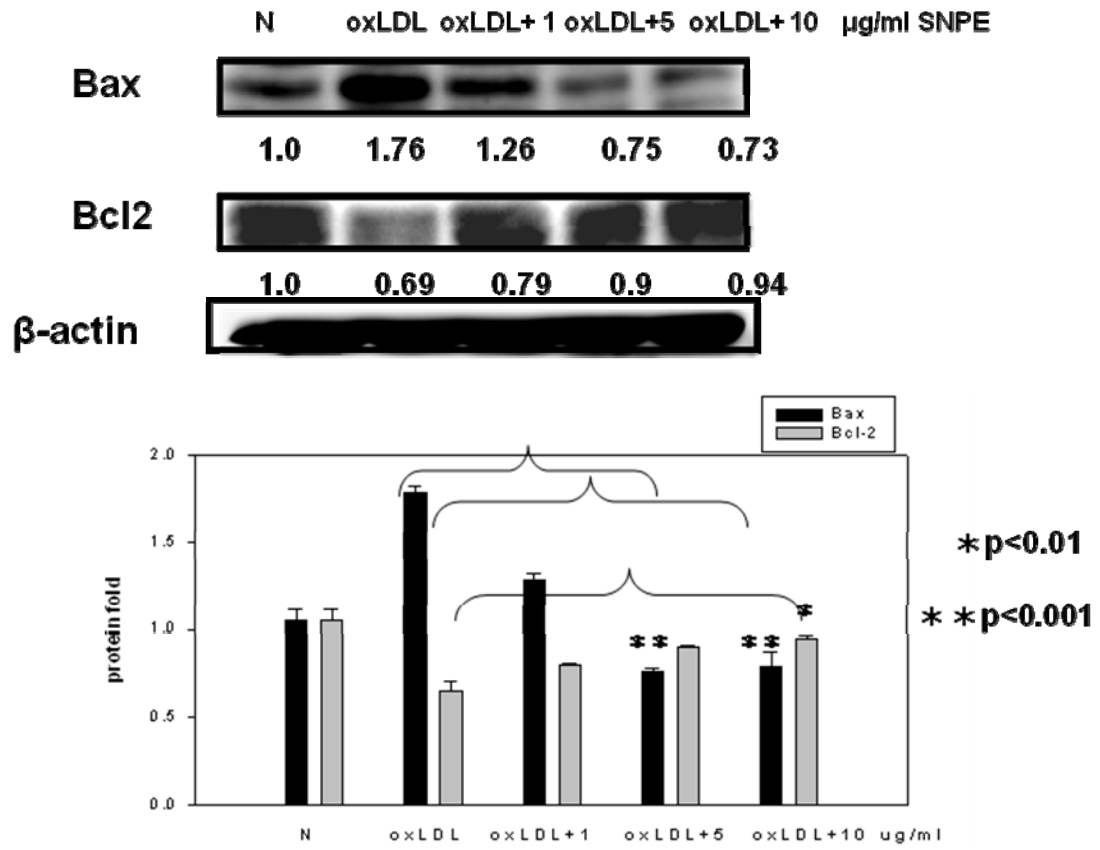
**Fig.28. Effect of SNPE on oxLDL-induced macrophage death (Flow cytometrical examination)**



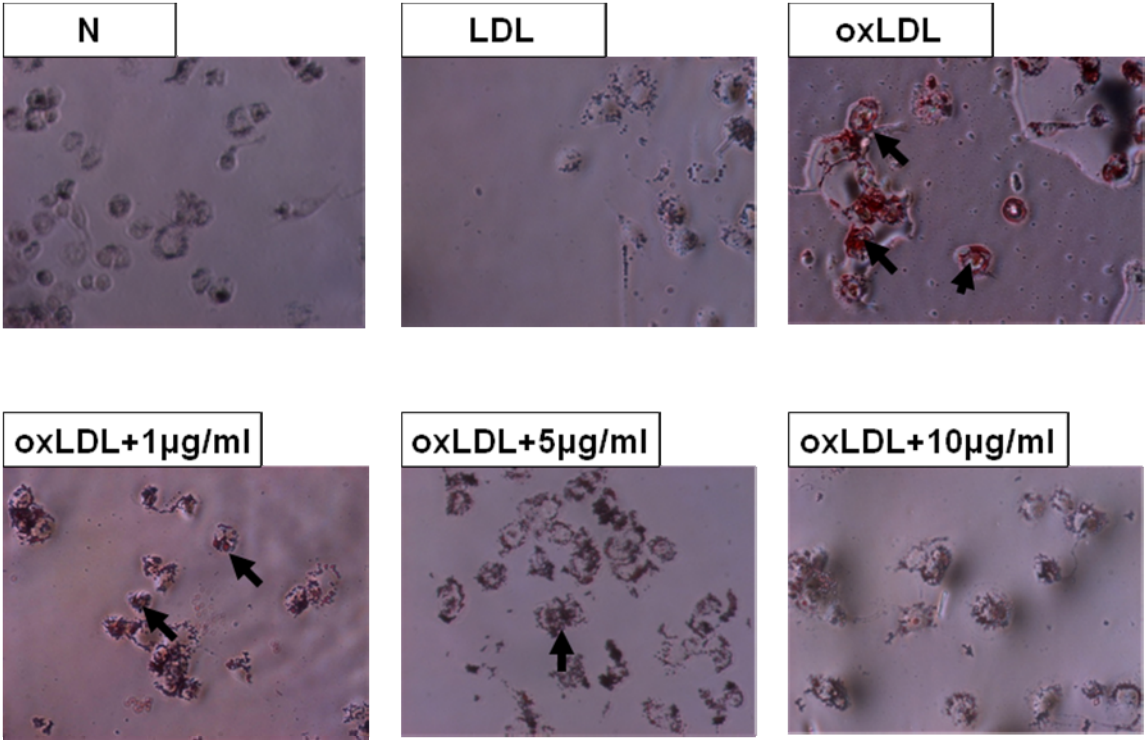
**Fig.29. SNPE inhibiting oxLDL-induced macrophage death is via regulation of caspase 3 and caspase 8**



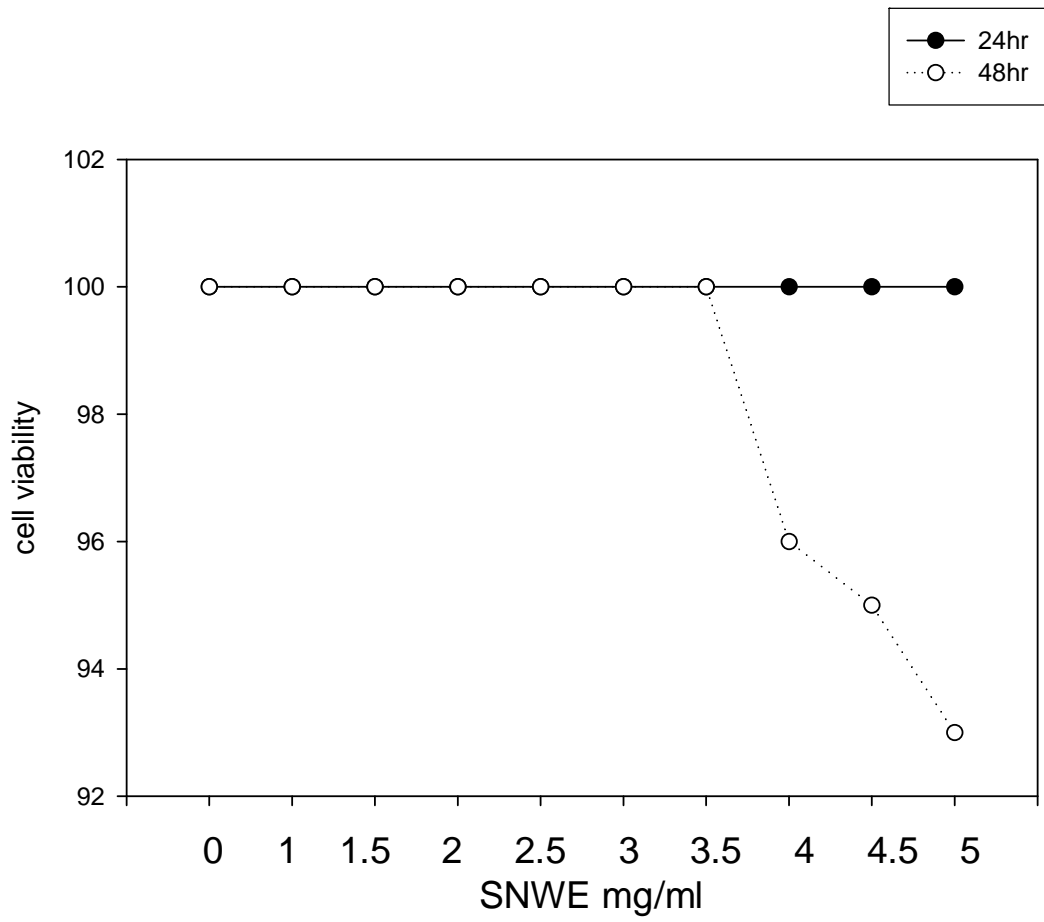
**Fig.30. SNPE inhibiting oxLDL-induced macrophage death is via regulation of mitochondrial membrane proteins**



**Fig. 31. SNPE can inhibit oxLDL-induced foam cell formation**



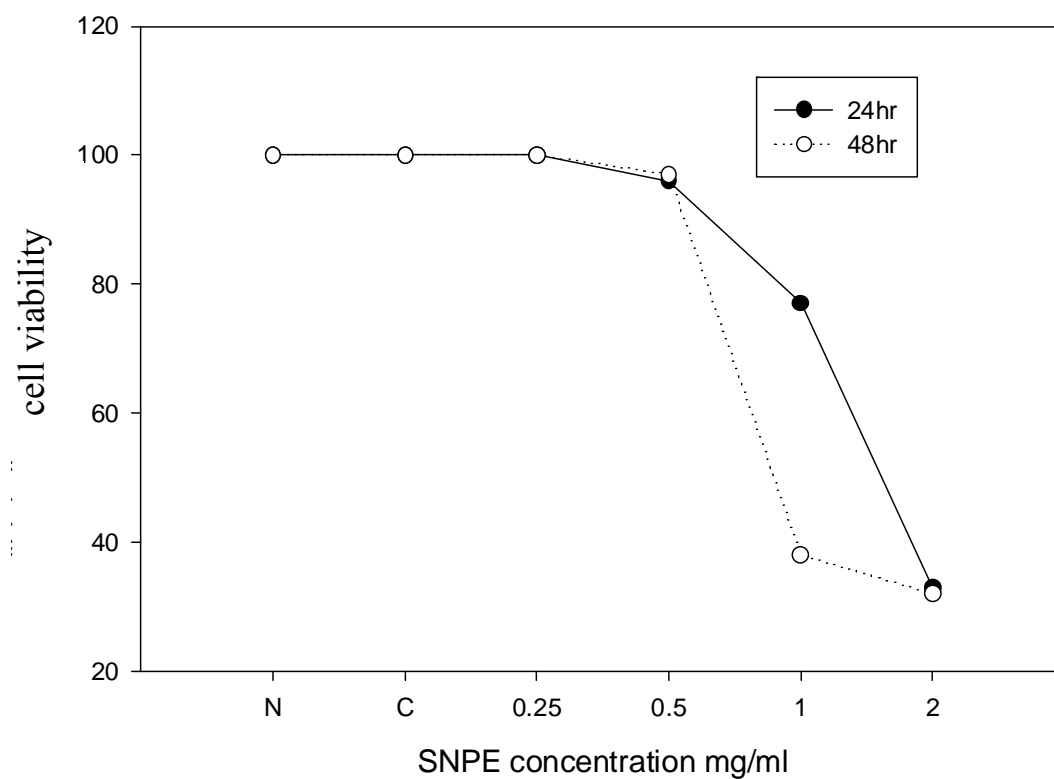
**Fig. 32. Effect of SNWE on cell viability of A7r5 cell.**



**Effect of SNWE on cell viability of A7r5 cell.** Cultured cells were treated with SNWE under different concentration for 24hr or 48hr. Cell viability were analyzed by MTT assay. The data were represented as means  $\pm$ SD for triplicate for each group.

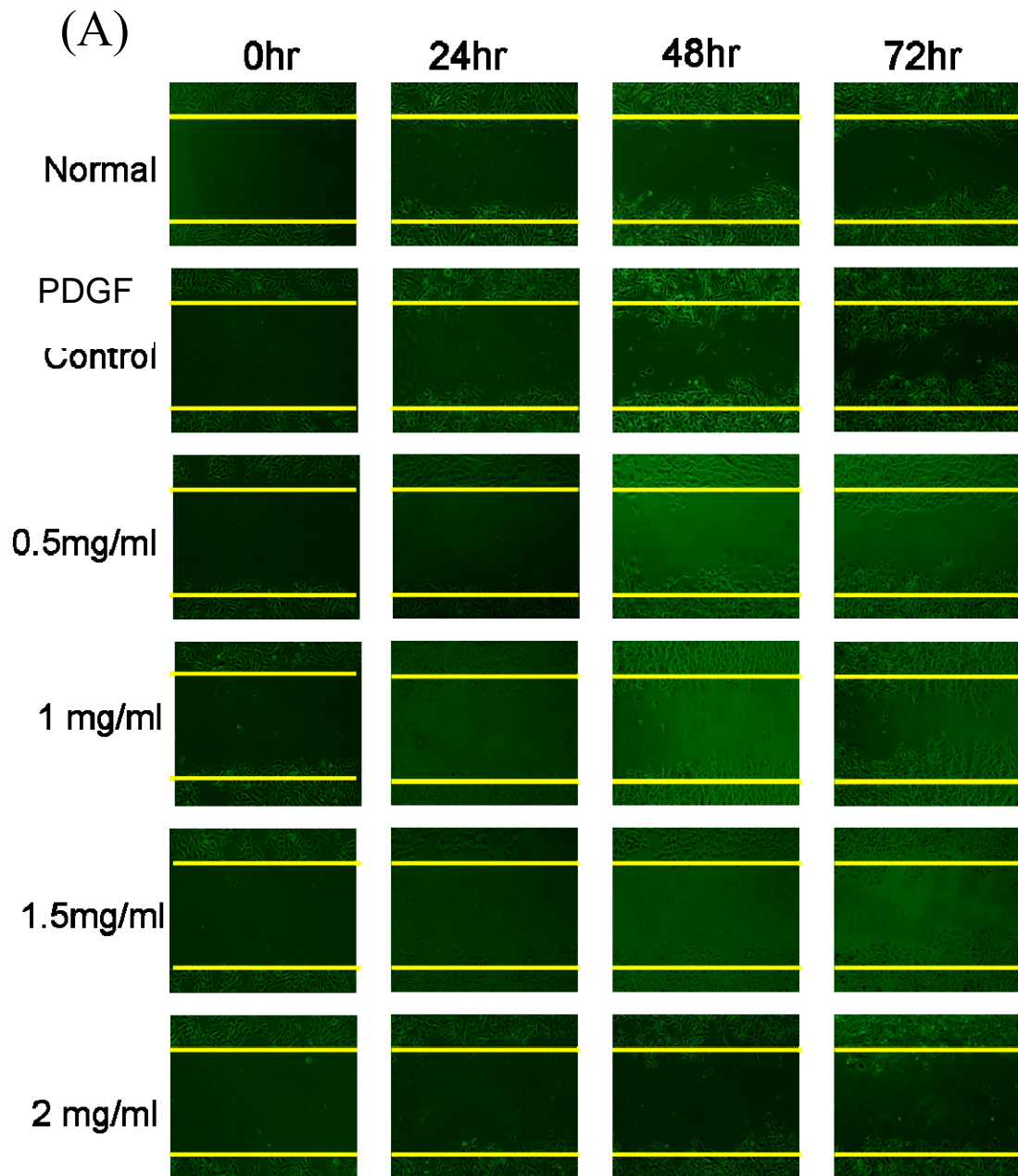


**Fig. 33. Effect of SNPE on cell viability of A7r5 cell.**

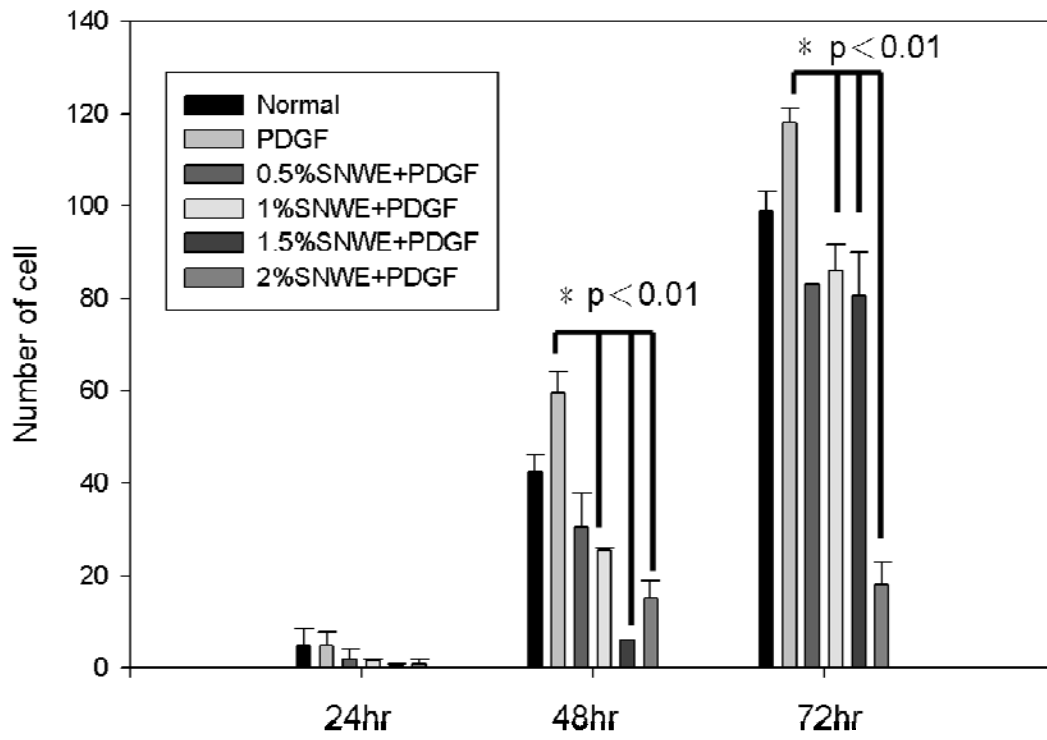


**Effect of SNPE on cell viability of A7r5 cell.** Cultured cells were treated with SNPE under different concentration for 24hr or 48hr. Cell viability were analyzed by MTT assay. The data were represented as means  $\pm$ SD for triplicate for each group.

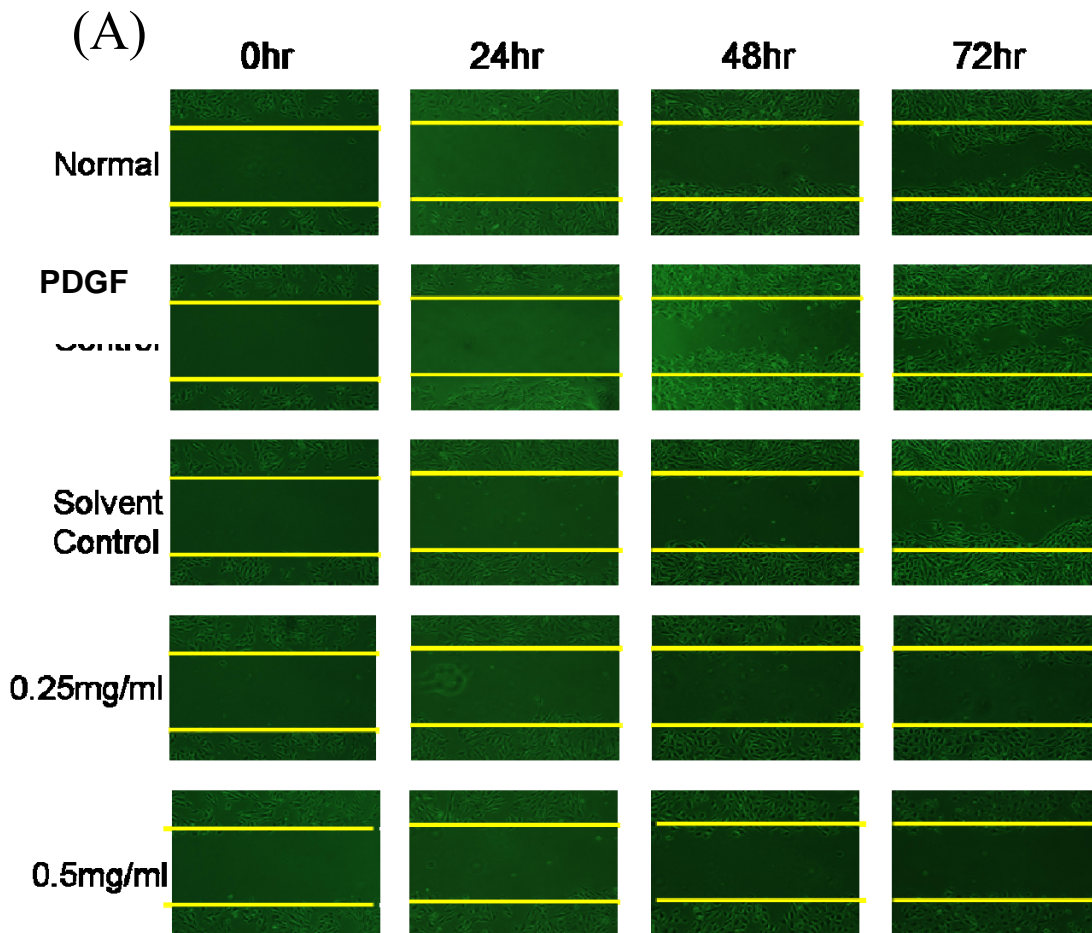
**Fig. 34. Cell migration of A7r5 cell were inhibited by SNWE.**



(B)

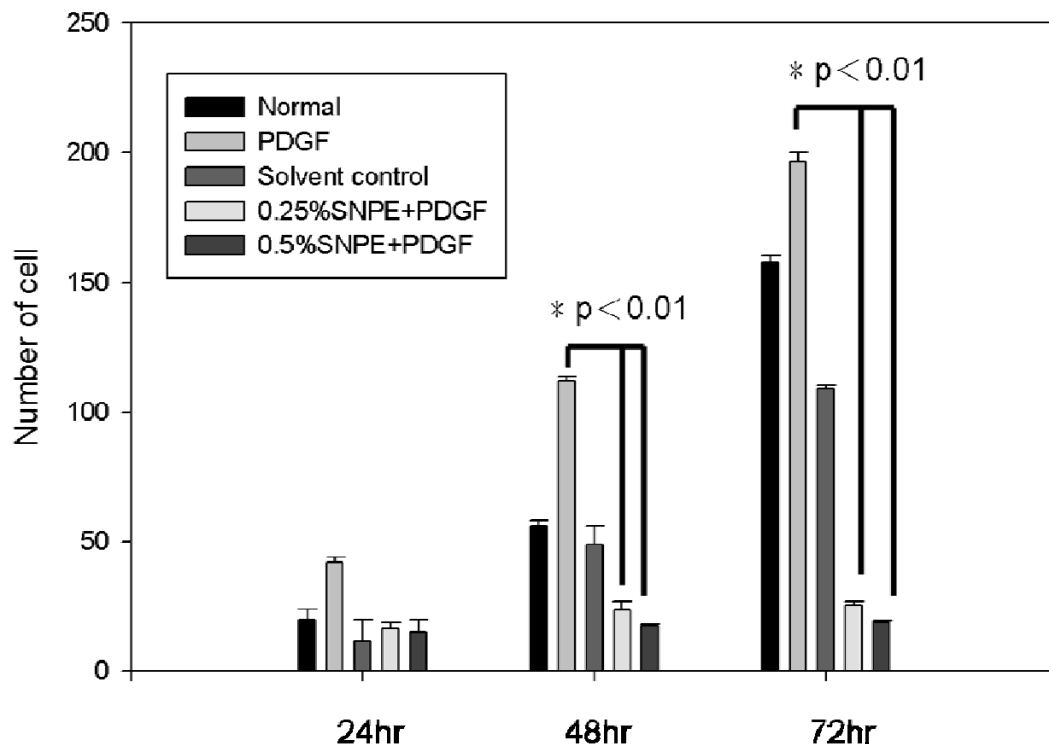


**Fig. 35. Cell migration of A7r5 cell were inhibited by SNPE**

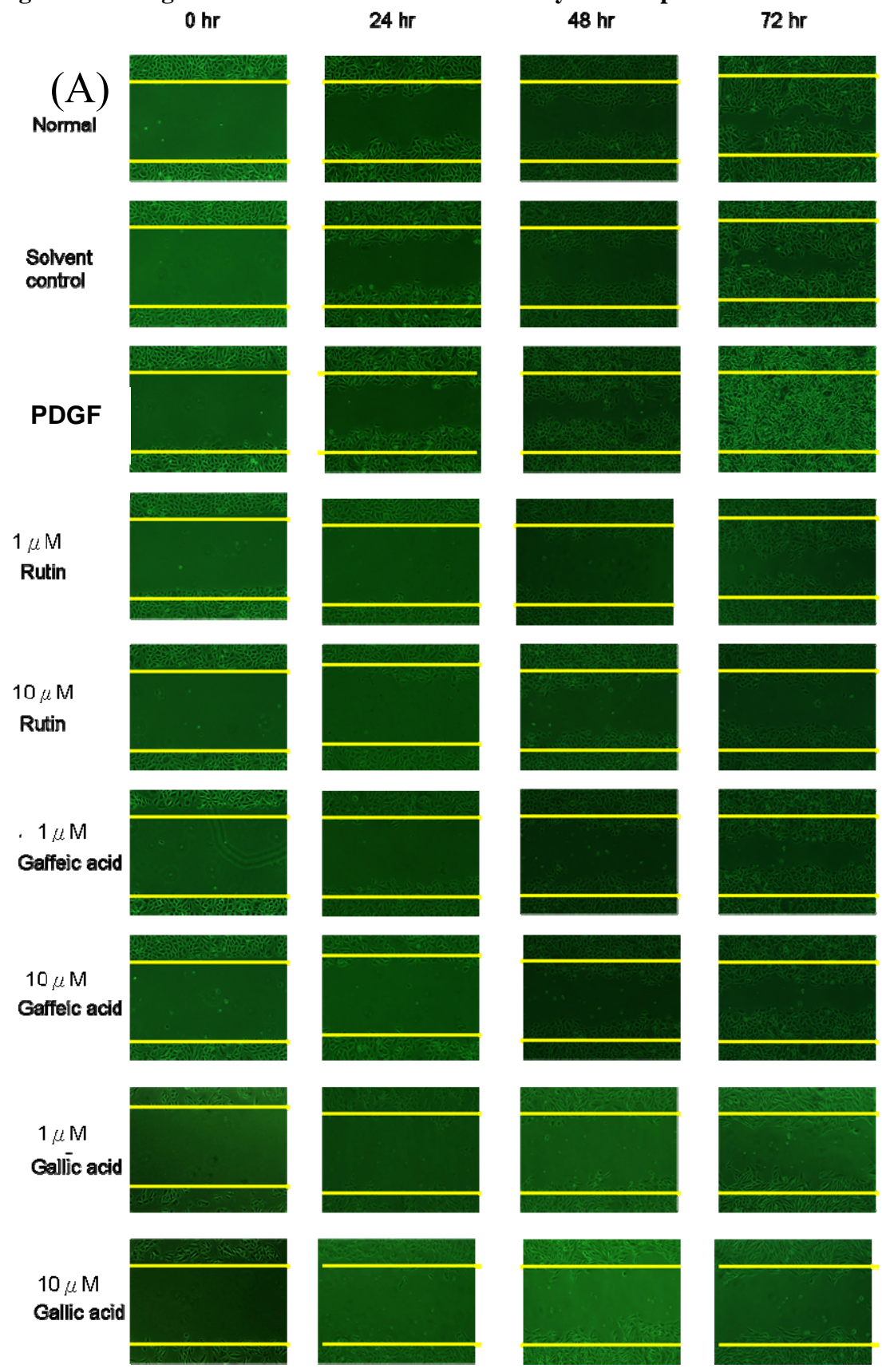


**Cell migration of A7r5 cell were inhibited by SNPE.** Monolayers of growth-arrested A7r5 cells induce by PDGF (30ng/ml) and treated with different concentration SNPE (0, 0.25, 0.5mg/ml).It were scraped and the number of cells in the denuded zone(i.e.,wound),at indicated time (0, 24, 48, 72hr),to observe the cell under a light microscopy. The data were represented as means  $\pm$ SD for triplicate for each group.

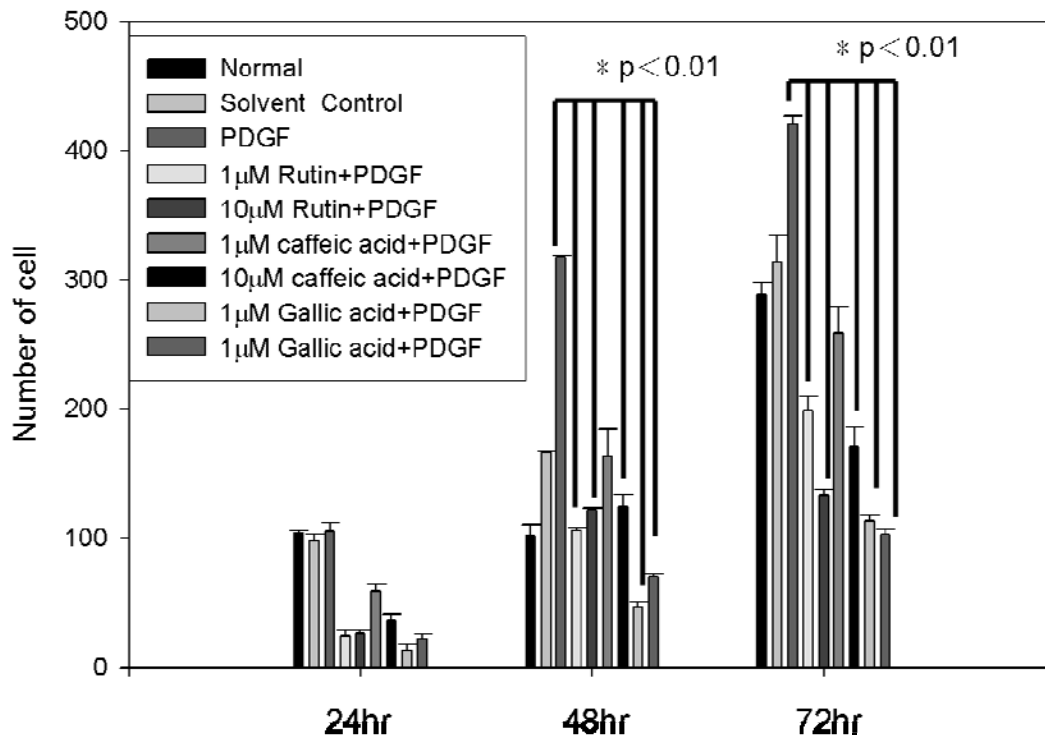
(B)



**Fig. 36. Cell migration of A7r5 cell were inhibited by the components of SNPE.**

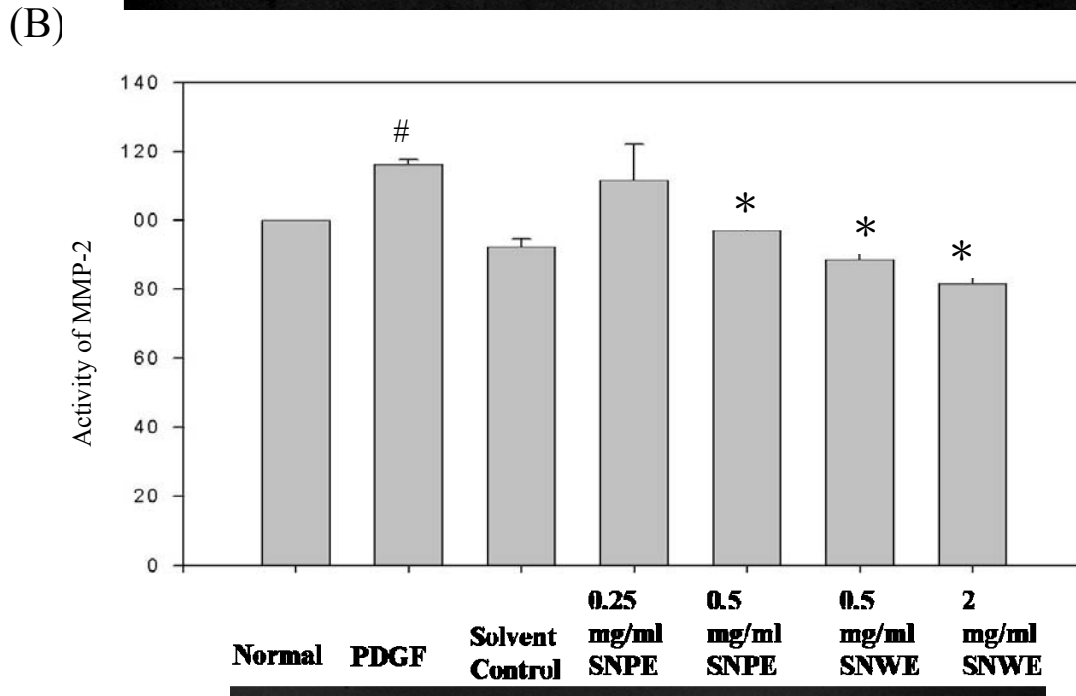
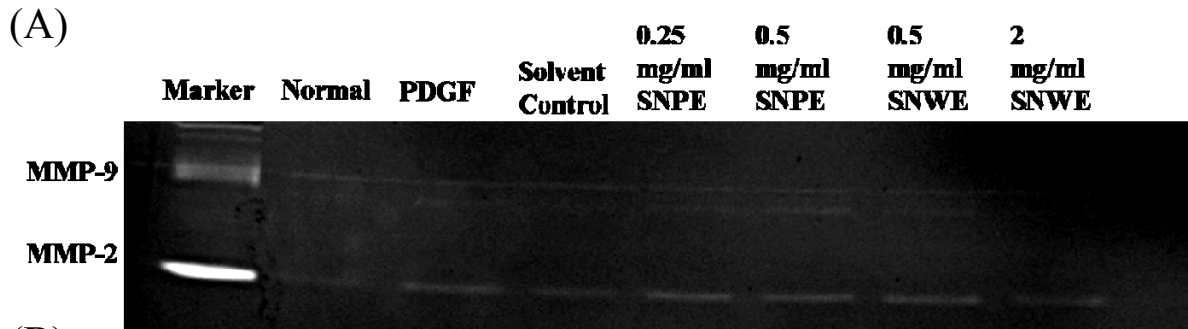


(B)



**Cell migration of A7r5 cell were inhibited by the components of SNPE. (A)** Monolayers of growth-arrested A7r5 cells induce by PDGF(30ng/ml) and treated with different concentration Rutin(1, 10µM), Caffeic acid(1, 10µM),Gallic acid(1, 10µM).It were scraped and the number of cells in the denuded zone(i.e.,wound),at indicated time (0, 24, 48, 72hr),to observe the cell under a light microscopy.(B) Quantitative assessment of the mean number of cells at indicated time (0, 24, 48, 72hr) in the denuded zone. The data were represented as means  $\pm$ SD for triplicate for each group. \* $p < 0.01$ , compared with PDGF group.

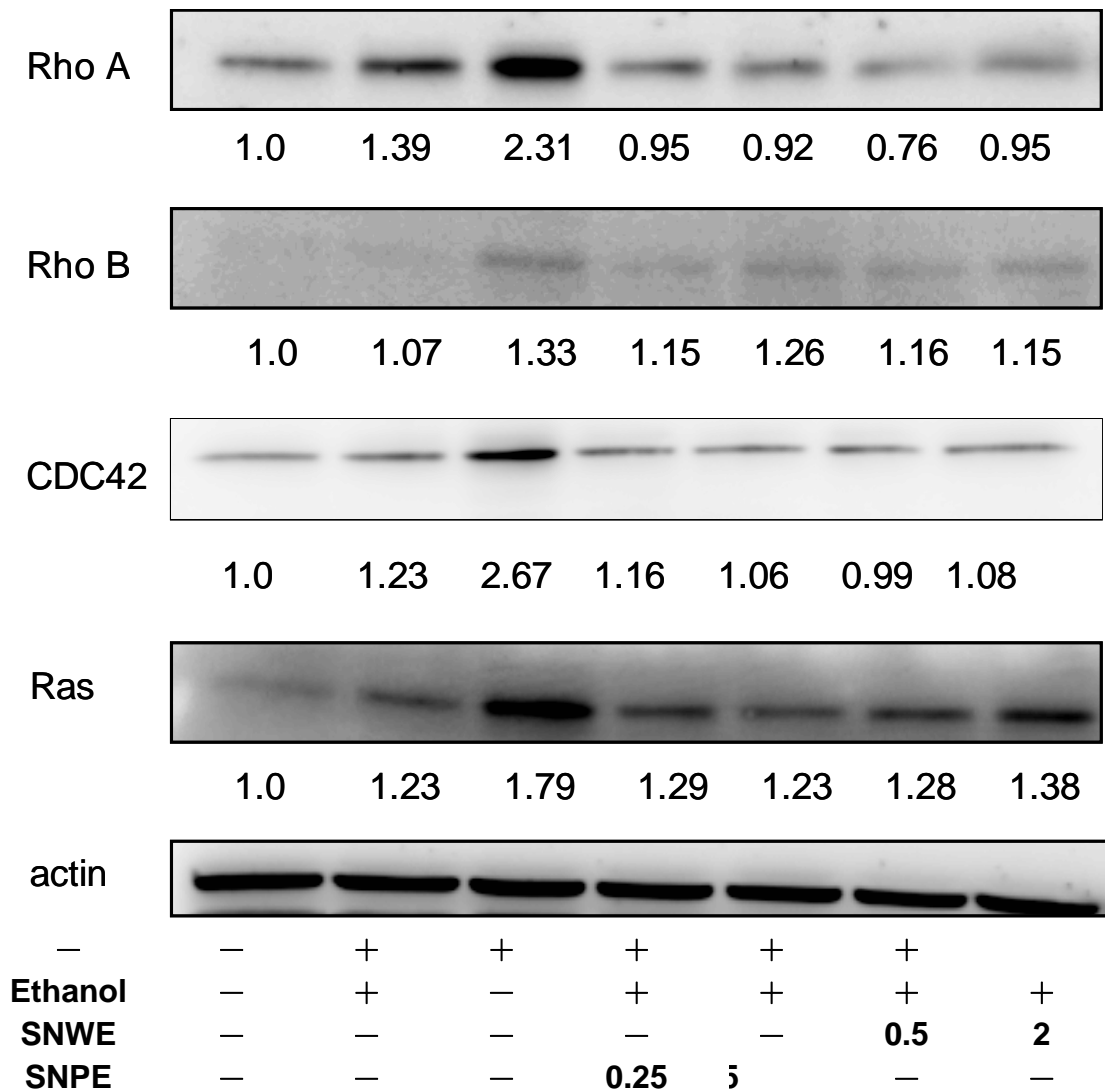
**Fig. 37. Effects of SNWE and SNPE on MMP-9 and MMP-2 activity of A7r5 cell by Gelatin Zymography assay.**



**Effects of SNWE and SNPE on MMP-9 and MMP-2 activity of A7r5 cell by Gelatin Zymography assay.** (A) A7r5 cells were induced by PDGF(30ng/ml) and treated with different concentration SNPE (0.25, 0.5mg/ml) or SNWE (0.5, 2mg/ml). (B) Quantitative assessment of the MMP-2. The data were represented as means  $\pm$ SD for triplicate for each group. # $p < 0.05$ , compared with Normal group. \* $p < 0.05$ , compared with PDGF group.

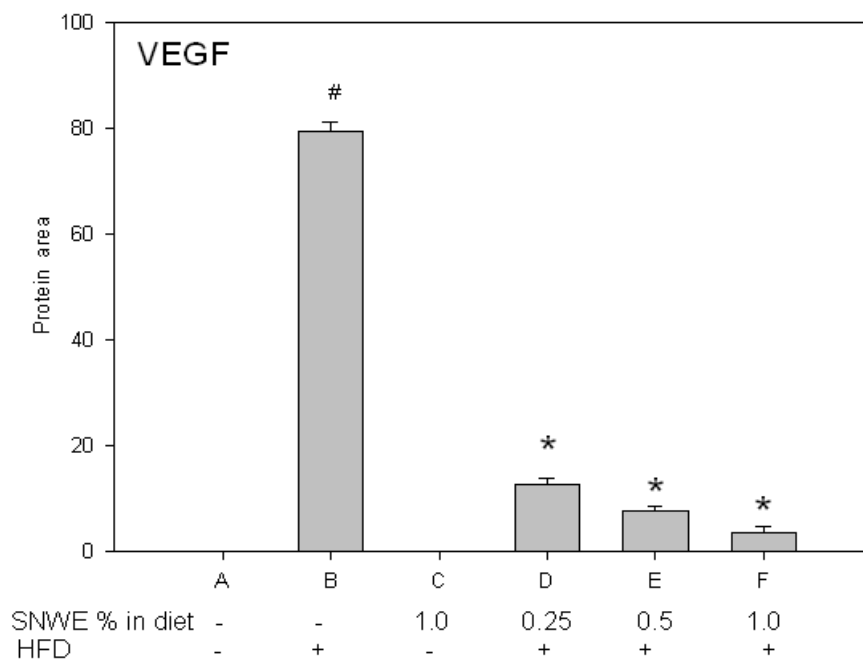
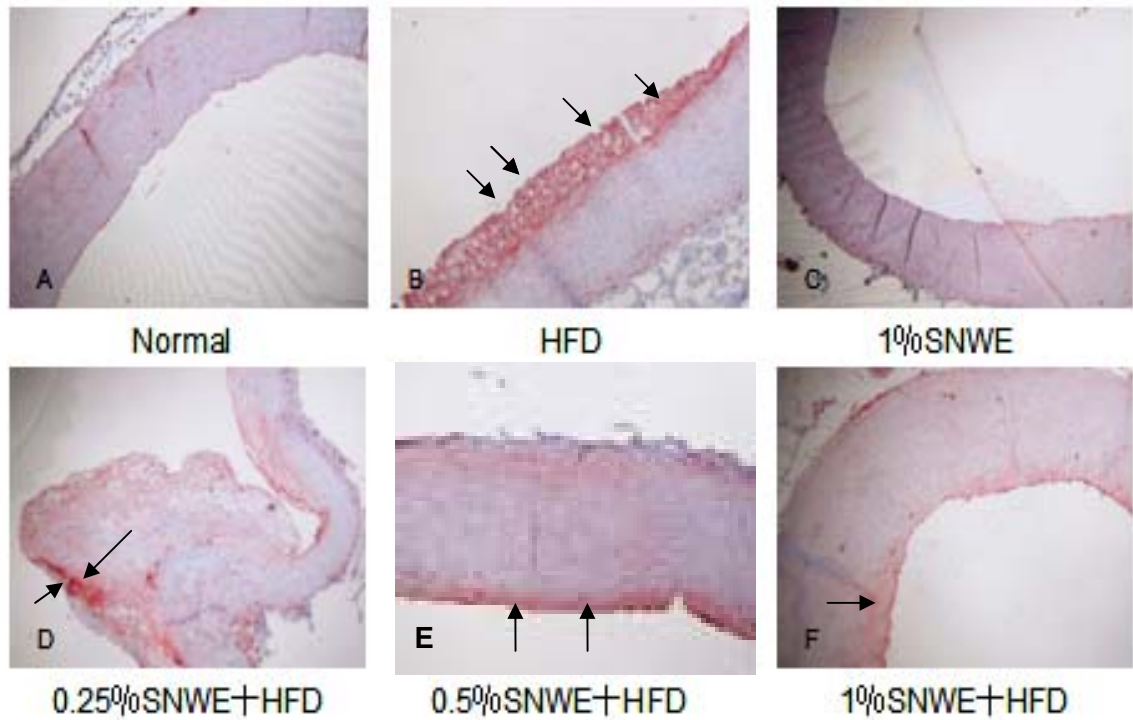


**Fig. 38. Expression of Ras superfamily protein were inhibited by SNWE and SNPE in A7r5 cells**



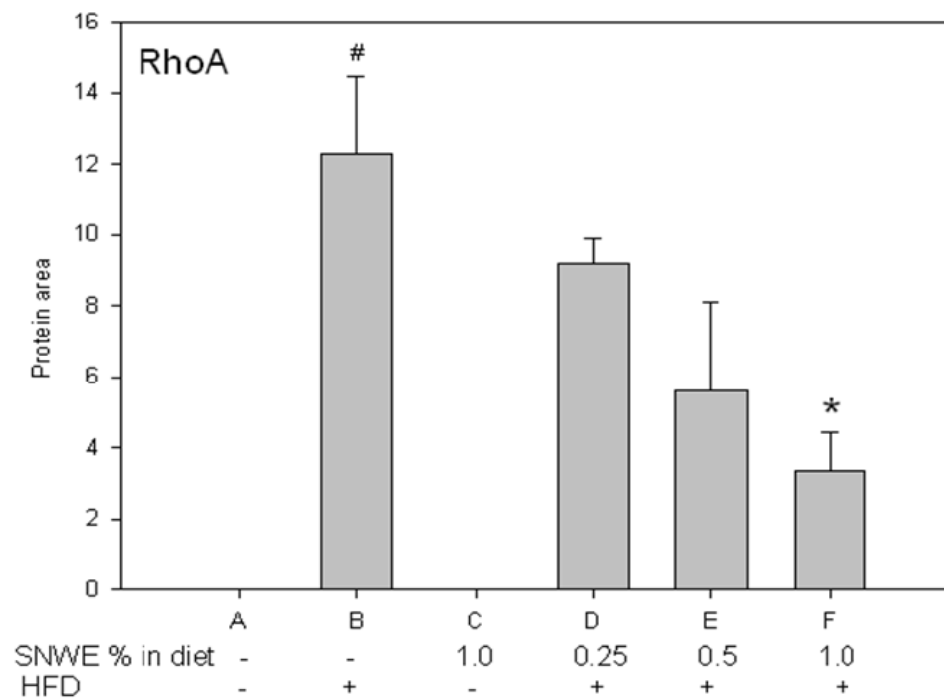
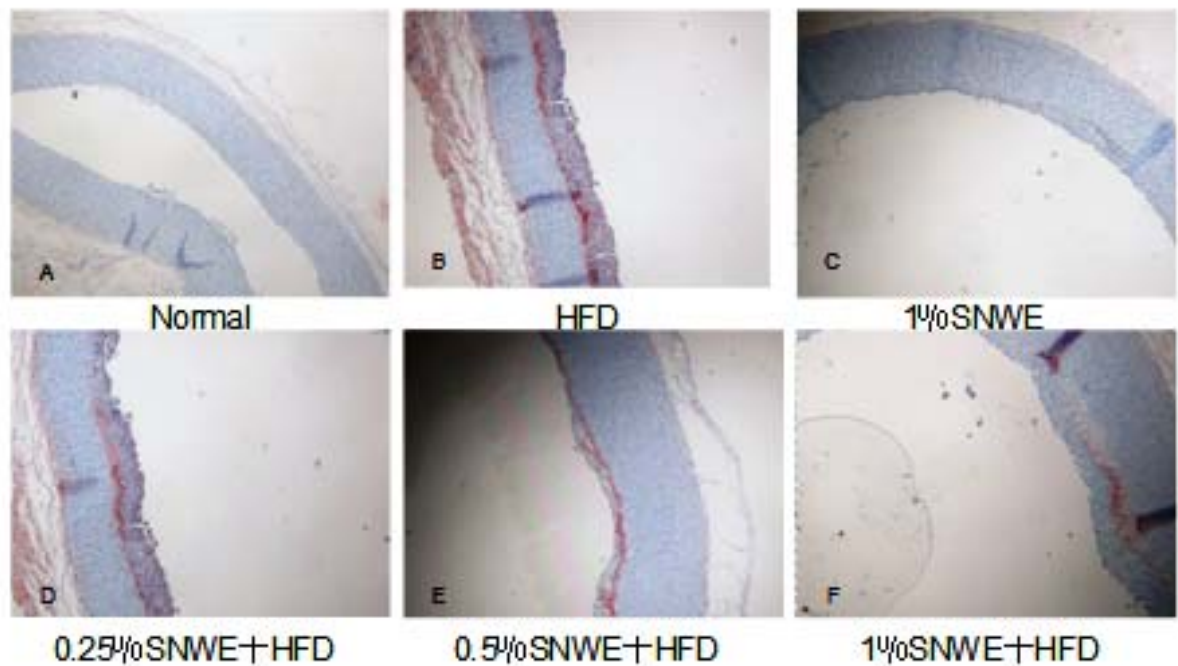
**Expression of Ras superfamily protein were inhibited by SNWE and SNPE in A7r5 cells**. Cultured cells were induce by PDGF(30ng/ml) and treated with different concentration SNPE (0.25, 0.5mg/ml) or SNWE (0.5, 2mg/ml) for 48hr. The protein level of RhoA, RhoB, Ras, CDC42 were analyzed by Western blotting. The data were represented as means  $\pm$ SD for triplicate for each group.

**Fig. 39. The effect of SNWE on VEGF level in aorta arch of HFD-induced New Zealand rabbit**



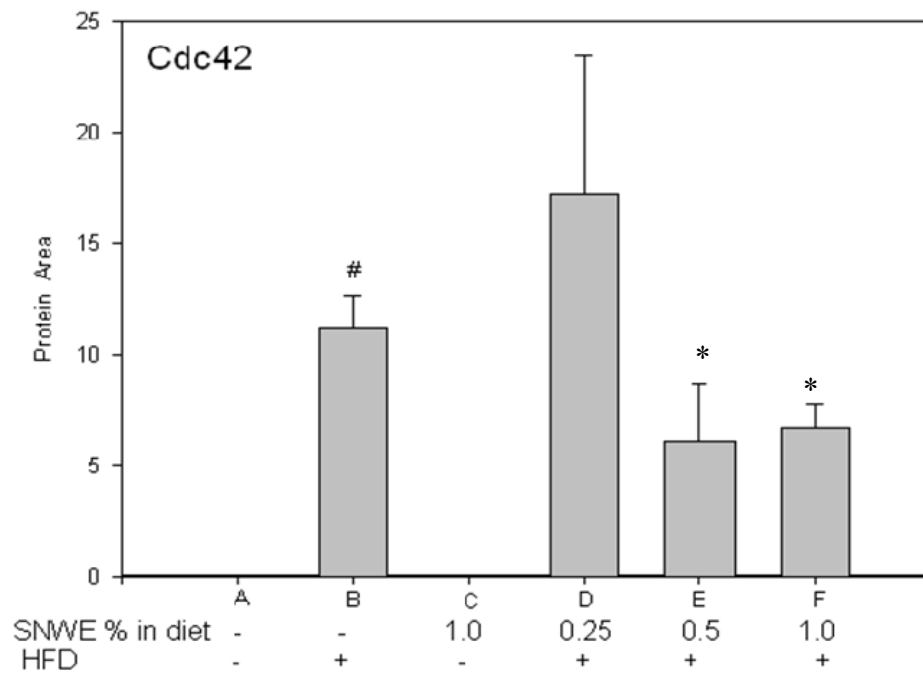
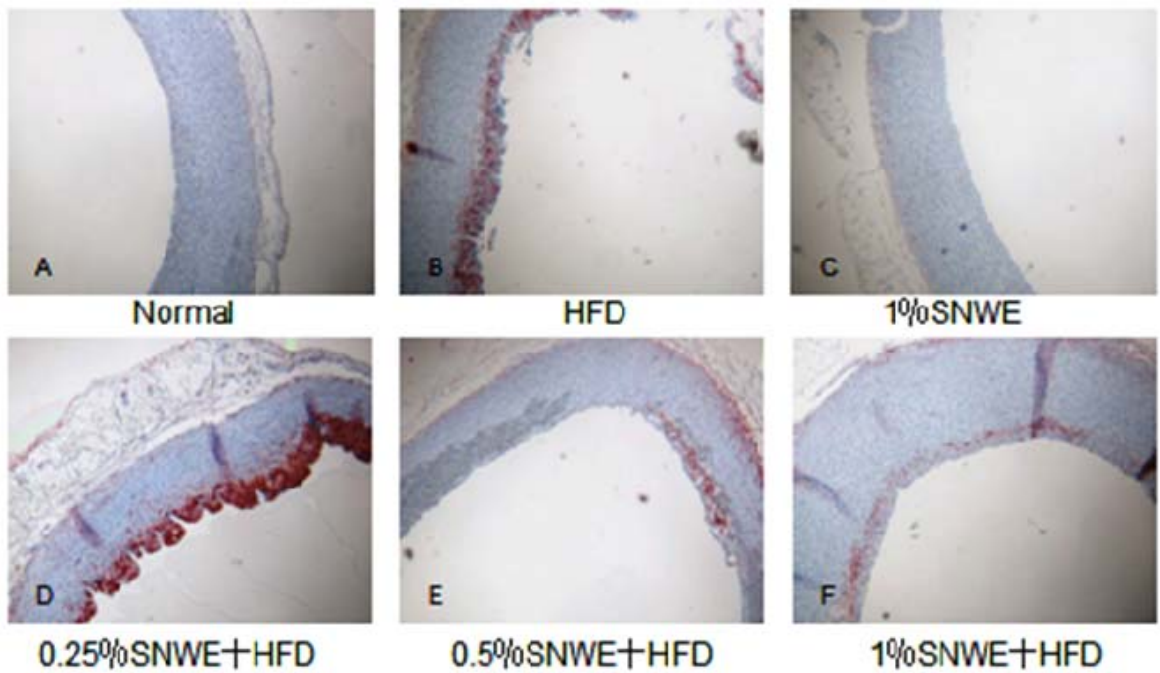
**The effect of SNWE on VEGF level in aorta arch of HFD-induced New Zealand rabbit. The arrows pointed red signals mean positive area. Data are represented as the means  $\pm$  SD. #,  $P < 0.01$ , compared with normal group; \*,  $P < 0.01$ , compared with HFD group.**

**Fig. 40. The effect of SNWE on RhoA level in aorta arch of HFD-induced New Zealand rabbit**



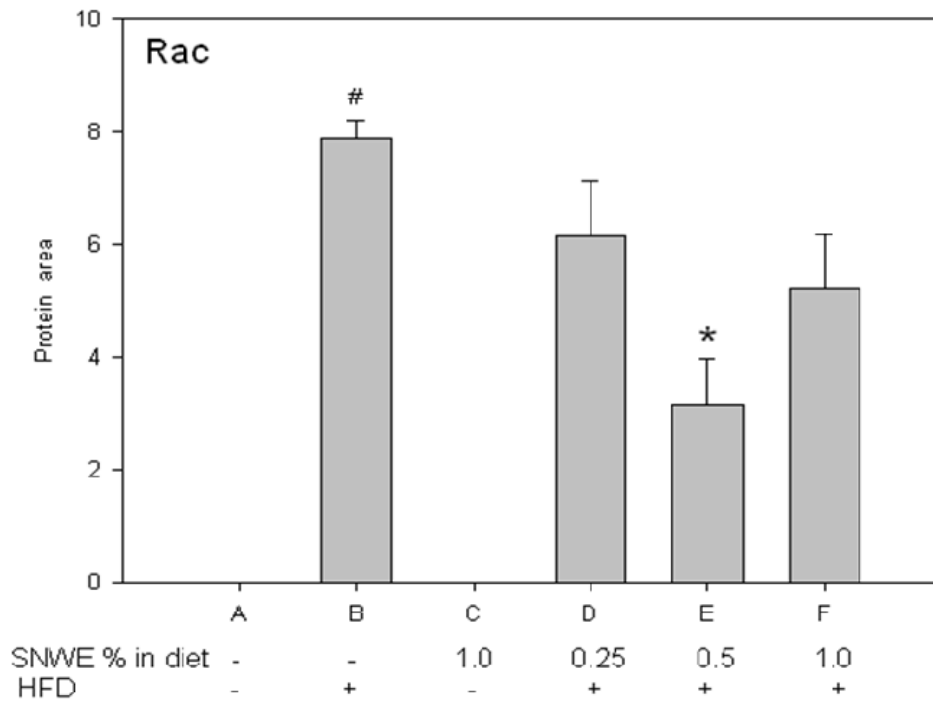
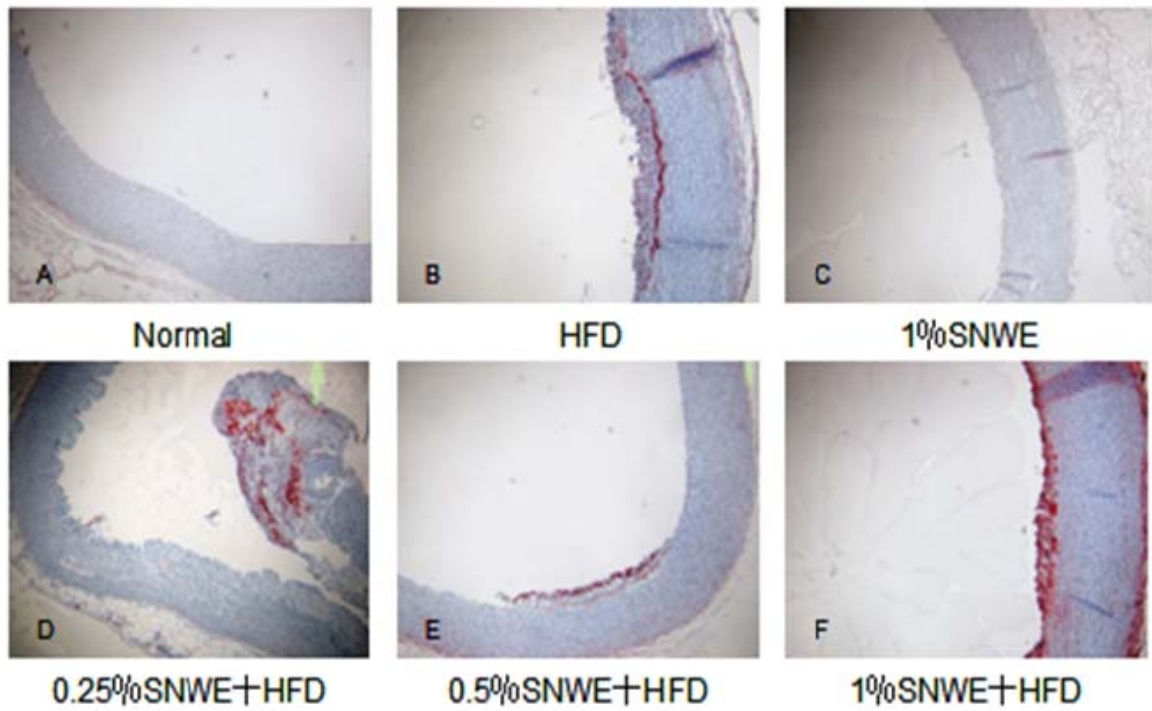
**The effect of SNWE on RhoA level in aorta arch of HFD-induced New Zealand rabbit. The arrows pointed red signals mean positive area. Data are represented as the means  $\pm$  SD. #,  $P < 0.01$ , compared with normal group; \*,  $P < 0.01$ , compared with HFD group.**

**Fig. 41. The effect of SNWE on CDC42 level in aorta arch of HFD-induced New Zealand rabbit**



**The effect of SNWE on CDC42 level in aorta arch of HFD-induced New Zealand rabbit. The arrows pointed red signals mean positive area. Data are represented as the means  $\pm$  SD. #,  $P < 0.01$ , compared with normal group; \*,  $P < 0.01$ , compared with HFD group.**

**Fig. 42. The effect of SNWE on Rac level in aorta arch of HFD-induced New Zealand rabbit**



**The effect of SNWE on Rac level in aorta arch of HFD-induced New Zealand rabbit. The arrows pointed red signals mean positive area. Data are represented as the means  $\pm$  SD. #,  $P < 0.01$ , compared with normal group; \*,  $P < 0.01$ , compared with HFD group.**

## 八、計畫成果自評：

### 【第一年】

- (1) 完成龍葵水萃物及多酚萃物支萃取
- (2) 確認龍葵對粥狀動脈硬化具抑制作用
- (3) SNWE 亦對高脂質飲食引起的脂肪肝有抑制效果

### 【第二年】

- (1) 完成 ox-LDL-induced macrophage apoptosis 之模式。
- (2) 完成 SNE 或 SNPE 抑制 ox-LDL-induced macrophage apoptosis 之作用。
- (3) 完成 ox-LDL-induced macrophage cell apoptosis 之 signaling pathway。
- (4) 完成 SNE 或 SNPE block ox-LDL atherosclerosis 之機轉。

### 【第三年】

- (1) 完成 PDGF-induced VSMC migration 之模式。
- (2) 完成 SNWE 或 SNPE 及其主要化合物抑制 PDGF-induced VSMC migration 之作用。
- (3) 完成 PDGF-induced VSMC migration 之 signaling pathway。
- (4) 完成 SNWE 抑制 atherosclerosis 的血管檢體中，關於 VSMC migration-related protein 之 immunohistological examination。

## 2. 學術研究、國家發展及應用之貢獻

- (1) 本計畫為保健食品研發之一，研究之成果已確認 SNWE 及 SNPE 具降血脂及抑制 ox-LDL 等作用，此研究成果將提供開發為預防心血管疾病之健康保健食品。
- (2) 本計畫除功能性研究外，同時也做動物體之毒理評估。
- (3) 本研究也建立 ox-LDL 經由促進 apoptosis 及生長因子促進 ASMC 增生作用，作為 atherosclerosis 之致病成因模式，可應用為將來發展預防心血管疾病保健食品開發之研究，在學術研究上有貢獻。
- (4) 本研究在探討 ox-LDL，及其他 stimulator（如：生長因子）對 cell cycle、progression 及 apoptosis、proliferation 之作用機轉，可為保健食品開發研究之參考。

## 3. 參與人員之訓練

- (1) 參與人員獲得動物試驗、細胞試驗等之技術。
- (2) 參與人員了解更多心血管疾病致病之機轉及研究模式。
- (3) 參與人員得知 cell cycle、apoptosis 等與 atherosclerosis 之相關性。