

## 第一部分

在試管中測定原兒茶酸或洛神花水萃取物對氧化型低密度脂蛋白  
的作用



## 目 錄

中文摘要 .....	3
英文摘要 (Abstract) .....	4
緒論 .....	5
研究目的 .....	18
實驗材料和方法 .....	19
I. 化學藥劑.....	19
II. 洛神花水萃取物的萃取.....	19
III. 脂蛋白的製備 .....	19
IV. 脂蛋白的製備 OxLDL 的製備及抗氧化劑的給予 .....	20
V. 總膽固醇含量的測定.....	20
VI. ApoB 蛋白片段化 (fragmentation) 的測試.....	21
結果 .....	22
I. 銅離子與 LDL 共同培養後的總膽固醇改變的情形 .....	22
II. 洛神花水層粗萃取物對 Cu <sup>++</sup> 所造成的氧化型 LDL 中總膽固醇降解的抑制效果...22	
III. 原兒茶酸對 Cu <sup>++</sup> 所造成的氧化型 LDL 中膽固醇降解的抑制效果 .....	22
IV. 銅離子與 LDL 共同培養後 ApoB 片段化的情形 .....	23
V. 洛神花水層粗萃取物對 Cu <sup>++</sup> 所造成的氧化型 LDL 中 ApoB 片段化的抑制效果 .23	
VI. 原兒茶酸對 Cu <sup>++</sup> 所造成的氧化型 LDL 中 ApoB 片段化的抑制效果 .....	23
討論 .....	25
參考文獻 .....	28
圖 .....	40
附圖及附表.....	47

## 中文摘要

天然的抗氧劑中具有抗動脈粥狀硬化形成的有 Vit E、Vit C、beta-carotene，這些已經很清楚能使 LDL 氧化情形減少或減低氧化型 LDL 被噬入的作用。在先前的研究中，我們已經發現原兒茶酸 (PCA) 和洛神花水萃取物 (HSE) 對於氧化型 LDL 所表現的負電荷增加 (lipogel electrophoresis) 及脂肪酸氧化 (TBARS) 有抑制氧化的作用，在本實驗中我們以 PCA 和 HSE 進一步探討其對抗 LDL 氧化的作用強弱。我們以 10  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$  與 100  $\mu$ g protein/ml 的 LDL 在 37°C 下共同培養 12 小時誘發總膽固醇量降解，當加入不同劑量的 PCA 或 HSE 同時作用，我們發現 0.1 mg/ml 的 HSE 使總膽固醇降解的現象被回復 18.15%，而 0.5 mg/ml 的 HSE 則回復了 67.25%；PCA 則是隨著濃度的增加，總膽固醇降解也出現逐漸被回復的現象，在 0.05 mg/ml 的濃度下總膽固醇降解的現象約被回復 74.96 %。而在分析 OxLDL 片段化的情形時，我們發現隨著 HSE 的濃度增加，ApoB 片段化的現象逐漸被回復，在 0.5 mg/ml 的濃度下 ApoB 片段化的現象被回復近乎 100%；而 PCA 則在 0.03 及 0.05 mg/ml 的濃度下 ApoB 片段化的現象皆約被回復 100 %。藉此，我們推測 PCA 與 HSE 的抗 LDL 氧化的能力，應可以在預防動脈粥狀硬化的發生上扮演一個重要的角色。

## 英文摘要 (Abstract)

The natural antioxidants, such as Vit E, Vit C and beta-carotene, has been found to possess the ability to avoid LDL oxidation or reduce oxidized LDL (oxLDL) uptaken by macrophage; and furthermore, they were able to prevent the formation of atherosclerosis. In our previous studies, we explored that both protocatechuic acid (PCA) and the aqueous extract of its original plant, *Hibiscus Sabdariffa* (HSE), showed strong inhibitory effects on the negative charge increasing of protein moiety in oxLDL (lipogel electrophoresis) and on the lipid peroxidation of lipid moiety in oxLDL (TBARS). At present, we further investigate the effects of PCA and HSE on LDL oxidation. We incubated 10  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> and 100  $\mu$ g protein/ml of LDL at 37°C for 12 hrs to induce the degradation of cholesterol. When cotreating with various concentrations of PCA or HSE, the results showed that 0.1 mg/ml of HSE recover the degradation of cholesterol by 18.15% and 0.5 mg/ml of HSE by 67.25% compared to native LDL. On the other side, the more concentrated PCA showed more significant recovery of cholesterol degradation. At the concentration of 0.05 mg/ml, the degradation of cholesterol was recovered by 74.96 %. On the investigation of ApoB fragmentation, HSE recovered the fragmentation gradually depending on the increasing concentrations. Moreover than, the ApoB fragmentation recovered almost by 100% at the concentration of 0.5 mg/ml. When cotreating with PCA, the similar situation also occurred. At the concentration of 0.03 and 0.05 mg/ml, ApoB fragmentation was recovered by 100 %. Taken above together, we suggested that PCA or HSE should play an important role on preventing atherosclerosis via inhibiting LDL oxidation.

## 緒論

健康照護是人類的的基本需求之一，也是衡量一個國家進步的重要指標。健康的人民是國家競爭力的一部份，也是國家永續發展很重要的推動力，為配合民眾健康需求的轉變，我國衛生政策的走向從注重醫療服務轉向促進民眾的健康。改變以往傳統的診斷與治療而代之以促進健康及預防疾病，換言之，即以購買「健康」代替購買「治療」。在醫療衛生與國民生活進步但生活習慣轉變下，國人的十大死因亦由急性傳染病、肺炎等轉為惡性腫瘤、事故傷害及腦血管疾病、心臟疾病、糖尿病、慢性肝病及肝硬化等慢性疾病。1997 年衛生署完成之「國民營養健康狀況變遷調查」，發現四十五歲以上民眾糖尿病、高血壓盛行率各為 11%、43.1%，血膽固醇 (240mg/dl) 的盛行率達 22.8%，依此數據推估，國內四十五歲以上糖尿病約 66 萬人，高血壓患者約 260 萬人，血膽固醇過高者約 137 萬人，而高血壓與高血膽固醇經常是一體兩面，並無二致。每年健保給付的心臟血管藥物費用最多，高達 135 億（佔總藥物用度 16.3%）。因此目前有許多研究致力於找尋能廣為民眾接受且有效的降血膽固醇物質，以期在預防醫學上能得到更大效益。

高血壓及血膽固醇過高者之成因皆與膽固醇有關，膽固醇的運送與位於細胞膜上運送膽固醇的脂蛋白息息相關，脂蛋白為脂肪與蛋白質的複合體，依密度共可將脂蛋白質分成五種: chylomicron、very-low density lipoprotein (VLDL)、intermediate density lipoprotein (IDL)、low density lipoprotein (LDL)、high density lipoprotein (HDL)，其中 high density lipoprotein 又可細分為 HDL<sub>2</sub> 及 HDL<sub>3</sub>。不同的脂蛋白質上所含的脂肪及蛋白(apolipoprotein)組成均不相同(附圖一、附表一)。自來高膽固醇與動脈粥狀硬化

(Atherosclerosis)的形成皆被劃上等號，但是近來許多研究發現只有膽固醇並不會引起動脈粥狀硬化，而是由 LDL 上的不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 受到氧化而形成氧化型脂蛋白質 (oxidized LDL) 所造成的 (1-5)。在動脈粥狀硬化形成的假說上，「內皮功能變性 (endothelial dysfunction)」與「低密度脂蛋白氧化修飾 (LDL oxidative modification)」已漸成主流。另外，轉殖動物被引為病理動物模式，也為許多脂蛋白的生化、生理與代謝角色提供了明確的證據，在動物與人體基因治療「動脈粥狀硬化」與「再阻塞 (restenosis)」方面，亦獲相當進展。整體而言，近年來基於分子醫學的一些進展，又已將動脈粥狀硬化的分子病因學 (molecular pathogenesis) 推展許多，而從血脂異常到動脈硬化形成之過程亦漸明朗。基本上，在粥狀硬化過程中，單核顆粒 (monocytes) 受到氧化型低密度脂蛋白的趨化作用，而穿過內皮細胞進入血管壁中，再分化為滿載油脂的巨噬細胞 (macrophages)，巨噬細胞的清道夫受體 (scavenger receptors) 會認識並內飲 (endocytosis) 氧化型低密度脂蛋白形成泡沫細胞 (foam cell)，泡沫細胞集中在脂肪條紋 (fatty streaks)，是粥狀硬化過程中最早可辨識的病灶。脂肪條紋會緩慢的形成纖維斑 (fibrous plaque)，纖維斑的轉變是發生在當平滑肌細胞由血管中層移入血管內層時，其型態 (phenotype) 會由收縮型轉變為合成型，而在內膜增生。在這些病灶中，大量的脂質持續的聚集在泡沫細胞，最後使細胞分裂，結果大量的細胞外脂質取代了正常的細胞與間質，而形成一個明顯的以脂質為核心，外環包圍著死亡巨噬細胞的粥狀瘤 (atheroma) 病灶。氧化型低密度脂蛋白不但會抑制單核顆粒離開血管壁，同時也會傷害內皮細胞和讓其功能失調；在血管壁內皮細胞功能失調上，先是改變血管壁的通透性，接著增加內皮細胞 (endothelium) 和白血球 (leukocyte) 的附著分子 (adhesion molecules)，白血球則會大量的遷移到血管壁上，而使得內皮細胞

的功能失調 (6-12, 附圖二)。這些發現使得動脈粥狀硬化的機轉逐步明朗，也為下一階段的抗動脈粥狀藥物研發，與如何藉改變飲食與生活習慣以減緩疾病進展，提供理論基礎。

LDL 是一群平均直徑約為 25 nm 組成的不均勻球狀複合粒子，包含於人類血液中，正常人之 LDL 密度介於 1.019-1.063g/mL，由蛋白質與脂質所構成。每顆 LDL 上約有 1600 個酯化膽固醇 (cholesterol ester)、500-600 個未酯化膽固醇 (free cholesterol)、800 個磷脂質 (phospholipids)、170-180 個三酸甘油酯 (triacylglycerol) 及一個 apolipoprotein (apoB-100)，平均質量為 2500- 2800kDa (附表二)。每個 LDL 粒子的構型可分為構造緊密的親水性表層 (hydrophilic surface) 與親油性的核心 (hydrophobic core)，表層則由磷脂質單層 (monolayer) 所構成，上面有未酯化膽固醇與一個分子量約為 550 kDa 的 apoB (含 4536 個氨基酸) 所纏繞。每個 LDL 分子內含有 6-12 個分子的  $\alpha$ -tocopherol，是 LDL 中最主要的內源性抗氧化劑，其餘的抗氧化劑如  $\beta$ -carotene、lycopene、ubiquinone-10 等，都僅介於 0.1-0.5 個分子之間。LDL 的各型脂質共約含有 2700 個脂肪酸分子，其中約一半為長鏈脂肪酸，最主要的一種為亞麻油酸 (linoleic acid, C<sub>18:2</sub>)。人體血清中膽固醇的總濃度約為 200 mg/dL，其中約 65% 由 LDL 所攜帶；LDL 在血液循環中的半衰期 (half life) 約為 2—3 天，由 receptor-mediated 途徑 (B/E receptor；LDL-receptor) 與 nonspecific endocytosis 的方式進入細胞與肝臟中代謝 (13-15)。

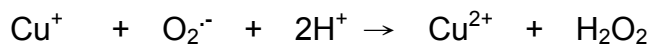
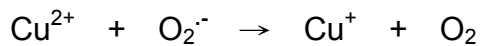
LDL 的氧化是一種由自由基所引起的連鎖反應過程，牽涉了 LDL 中脂質與蛋白質的氧化修飾與構造上的改變 (15)。在脂質的氧化方面，主要是 LDL 內鍵結於磷脂質與膽固醇酯上的 PUFA 遭氧化，開始是由活性氧 (可能是 OH $\cdot$  或 ROOH 的 Fenton reaction

產物 RO·) 對 PUFA 上的 bis-allylic site 進行氫自由基 (hydrogen radical; H·) 的轉移，接著產生雙鍵的重排而形成共軛雙烯 (conjugated diene)(附圖三)。自由基與動脈粥狀硬化的關係已被深入探討(附圖四)，主導此自由基反應的兩大系統，其一為細胞系統，如巨噬細胞 (macrophages)、動脈平滑肌細胞 (arterial smooth muscle cells)、內皮細胞 (endothelial cells) 與淋巴細胞 (lymphocytes)，均會釋放活性氧物質(如  $O_2^-$ 、 $OH^-$ 、RS·、RSO·)，再由過渡金屬離子 (銅離子與鐵離子) 催化氧化的發生；另一系統為酵素所引起的氧化，如 lipoxygenase (15-lipoxygenase、5-lipoxygenase)、xanthine oxidase、NADPH oxidase、phospholipase 與 myeloperoxidase 等，均可催化 PUFA 雙鍵位置的氧化與加氧作用。脂肪酸氧化產生的共軛雙烯，會再與分子氧反應而加氧形成過氧化物(peroxides)，再進一步斷裂成醛 (aldehyde)、酮 (ketone) 等小分子，而可與自由基或共軛雙烯對 LDL 上的蛋白質 (apoB-100) 進行氧化修飾 (6, 13-17)。而在蛋白質的氧化修飾方面，當 apoB 受到自由基或共軛雙烯的攻擊後，會使蛋白質序列中的離胺酸 (lysine) 與組胺酸等帶正電胺基酸的  $\epsilon$ -amino group 與氧化產物的醛類交聯 (cross-linking) 而產生 Schiff base，而使 LDL 表面的正電荷減少及負電荷增加，此種改變使氧化之 LDL 不再被 LDL receptor (B/E receptor) 所辨識，反由巨噬細胞表現之清除受體 (scavenger receptor) 所辨認。其中最主要與  $\epsilon$ -amino group 作用的醛類包括 malondialdehyde (MDA)、4-hydroxynoneal (4-HNE) 與 hexanal (15, 18)。遭氧化與修飾後，apoB 會斷裂(fragmentation)，可由電泳觀察而得。Kreuzer 等(19) 指出經氧化修飾後的 apoB 主要是藉由 N 端序列與清除受體進行辨識，而且僅需其序列的前 23% 之胺基酸即足夠讓清除受體辨認。

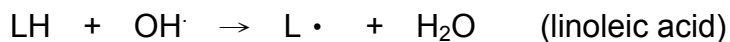


過渡金屬離子可催化 LDL 內脂質的過氧化反應，Ferns 等 (20) 指出銅離子參與了在動脈血管壁的 LDL 氧化。由銅析催化之似 Fenton reaction 的氧化機制如下：

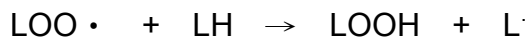
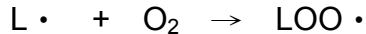
#### **Fenton-like reaction (to generate OH · )**



#### **Initiation of chain reaction**



#### **Propagation of autoxidation**



不同階段的氧化可造成不同類型與氧化程度的 LDL，如輕微修飾的 LDL (minimally modified LDL; MM-LDL)、完全氧化的 LDL (extensively oxidized LDL; OxLDL)、體積小且組成緻密的 LDL (small, dense LDL; sd-LDL) 與糖化之 LDL (glycated-LDL; Gly-LDL) 等均在動脈粥狀硬化或其他退化性疾病中扮演重要的角色 (18)。

LDL 的氧化由於大多是在動脈血管壁中進行，而且 OxLDL 被清除受體移除的速度相當快，故無法由偵測半生期短、濃度低的 OxLDL 來評估 LDL 氧化的程度 (15)。體外實驗中常用來判斷 LDL 氧化的程度的方法為利用一分子的氧化產物 malondialdehyde (MDA) 與二分子的 TBA 呈色，產物即 thiobarbituric acid reactive substance

(TBARS)。另外也可利用高效能液相層析儀檢測 LDL 內維生素 E 與脂肪酸的含量，亦可作為 LDL 的氧化指標 (15)。

因為 LDL 的氧化是引起動脈粥狀硬化的一個重要的致病因，而動脈粥狀硬化乃老年退化性疾病，早期預防可見後效，而飲食控制及特殊食物成分，可能具有減緩動脈粥狀硬化和預防心血管疾病的功效，因此對於預防動脈粥狀硬化早期的脂肪條塊產生，目前最常使用的策略為抑制低密度脂蛋白的過氧化與降低血脂，而藉由抗氧化劑的使用，可以有效的清除自由基、鉗合金屬離子與終止脂質氧化的起始期或延長遲滯期 (lag phase)。流行病學調查亦指出多種天然植物中所具有(如 $\alpha$ -tocopherol、polyphenols)與人工合成(如 BHT、probutol)的抗氧化劑，其攝取量與心血管疾病的發生率呈現負相關(21)。實驗動物模式中亦有報告指出抗氧化劑的介入 (intervention)對 LDL 的氧化敏感性有降低的趨勢，包括了 LDL receptor-deficient rabbit、cholesterol-fed New Zealand White rabbit (NZW rabbit)、Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit (WHHL rabbit)、cholesterol-fed hamster、LDL receptor-deficient mice、apoE-deficient mice (apoE 缺陷小鼠) 與 nonhuman primates 等動物模式，均使用了一或多種的抗氧化劑，藉由抗氧化的效果而減緩了動脈粥狀硬化的效果 (18)(附表四)。目前常被使用的幾種重要的抗氧化劑或在食物中存在的成份物質可分為：(1) 增加內源性的抗氧化劑如維生素 C、維生素 E 或類胡蘿蔔素 $\beta$ -carotene 及 (2) 額外食入合成或天然的抗氧化劑，其在抑制 LDL 氧化與減低動脈粥狀硬化的效果 (結構式請見圖五)為：

### 1. 維生素 C

維生素 C 是位於細胞質內的一種抗氧化劑，係一種水溶性的清除細胞質內自由基的物質，可因此而預防這些自由基進入 LDL 粒子(22)，維生素 C 亦可再生出具活性

的維生素並增加膽固醇釋出。另一方面，維生素 C 會改善 endothelium-dependent vasodilation 並減少單核細胞黏著 (monocyte adhesion) (23-25)。另外，曾有學者指出在食入高脂肪餐食之前補充維生素 C (1,000 mg) 及維生素 E (800 IU) 被發現可回復內皮之損傷及血管收縮的能力(26)。一般而言，維生素富含於柑橘類水果、草莓、番茄、萵苣及綠葉蔬菜中，然而經由烹調會破壞絕大多數的維生素 C，所以必須經由額外補充來保持維生素 C 在體內的濃度 (recommended dietary allowance, RDA: 60 mg/day)。

## 2. 維生素 E

維生素 E 可在細胞膜上預防多不飽和脂肪酸的過氧化，其在自然界中之分類有  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tocopherol 等四種，其中最具生物活性者為  $\alpha$ -tocopherol。在氧化型 LDL 的預防上，維生素 E 的作用為嵌入脂蛋白及細胞膜中，經此減少活性氧的含量以降低 LDL 的氧化。維生素 E 不僅在實驗數據上甚至在臨床應用上皆被認為是 LDL 的最有利的抗氧化劑 (27, 28)。此外，維生素 E 還具有抑制血小板活化 (減低凝血作用)及抑制單核球黏著的作用。維生素 E 大量存在於蔬菜油及種籽油中，另外在魚肉類、水果及蔬菜中則含量較少，RDA 的建議為每天 30 IU (相當於每天 30 mg)。若要單由食物中補充如此高量的維生素 E 是相當困難，因此仍須由多重維生素的補充劑額外補充。

## 3. 類胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene)

類胡蘿蔔素是維生素 A 的前趨物，存在於細胞質及 LDL 中 (29)，它的作用為降低氧化型 LDL 被攝入 (uptake)而非預防 LDL 氧化 (30)。類胡蘿蔔素的飲食來源為水果、橘黃色蔬菜如胡蘿蔔、南瓜及番薯、深綠色蔬菜如菠菜及綠花菜、RDA 並無建議類胡蘿蔔素的每日用量。

#### 4. Probucol

為一臨床上所使用的脂溶性降脂藥物，在 NZW 與 WHHL 兔子模式中，均可有效降低 LDL 對氧化的敏感性與減少動脈粥狀硬化病害的發生(31, 32)。但在人類的 PQRST (probucol quantitative regression Swedish trial)，probucol 並無法改善高膽固醇患者的股動脈粥狀硬化 (femoral atherosclerosis)。這可能是由於 probucol 雖降低了會致動脈粥狀硬化的 LDL-cholesterol，但卻也同時降低了 HDL<sub>2b</sub> (33)，亦會降低血清中的維生素 E (降低 14%) 與胡蘿蔔素 (降低 30-40%) (34)，故使用脂溶性抗氧化劑可能會有使血液中其他保護形態的脂溶性抗氧化劑減少之疑慮 (35)。Zhang et al. (36) 亦指出，給予 apoE 缺陷小鼠 0.5% 的 probucol 連續三個月後，雖可減低血漿總膽固醇 40%，但亦同時減低了 HDL 達 70%，並且非常矛盾地使動脈粥狀硬化病灶面積增加了 2-4 倍。Bird et al. (37) 分別利用低濃度 (0.025%) 與高濃度 (0.5%) 之 probucol 餵予 receptor-deficient mice，並配合 0.1% 維生素 E 之使用，來觀察 LDL 氧化與動脈粥狀硬化。結果發現，即使給予維生素 E，仍無法改變低濃度 probucol 所造成的動脈粥狀硬化之趨勢，而高濃度 probucol 組則有明顯之動脈粥狀硬化病灶。顯示在小鼠模式中，縱使減低了血液中膽固醇的含量，但若影響了 HDL 膽固醇之含量，或減低了 LDL 的內生性抗氧化劑，則並不一定對動脈粥狀硬化的抑制有正面且顯著的效果。

#### 5. Butylated hydroxytoluene (BHT)

BHT 為一種脂溶性抗氧化劑，在食品中被廣泛地使用。在不降低血膽固醇甚至升高的情況下，BHT 被證實在大白兔模式中可藉抗氧化的作用而使動脈粥狀硬化病害面積下降約 32% (38)。在經氣球擴張術 (PTCA) 處理使內皮細胞損傷的 NZW 兔模式中，BHT 亦可減緩血管內膜的增厚現象 (39)。但 C57BL/6 品系小鼠餵食含 1% BHT 15 週卻助長了動脈粥狀硬化，因此無法完全支持由抗氧化觀點所連結動脈硬化形成機制

(40)。

## 6. N,N'-diphenyl 1,4-phenylenediamine (DPPD)

DPPD 為一種脂溶性的抗氧化劑，在 NZW 兔與 apoE 缺陷小鼠的模式中均顯示了良好的抑制 LDL 氧化與抗動脈粥狀硬化效果 (41, 42)，可減輕病害面積 71% (大白兔模式)與 36% (apoE 缺陷小鼠模式)。但其具有致突變性 (41)，且在 apoE 缺陷小鼠模式中會使動物的體重輕微下降，故無法進一步開發為抗動脈粥狀硬化的臨床藥物。

## 7. Polyphenols

目前對多元酚類化合物抗氧化的報告多集中在可抑制 LDL 的抗氧化修飾方面，如紅酒中的 resveratrol 與其他多酚類化合物在體外實驗中被證實其抗氧化性 (43, 44)，而在離體實驗中亦可增加血清中的總抗氧化力 (45)。Fuhrman et al. (46) 指出甘草乙醇萃出物與其主要的多酚類化合物--glabridin，可在 apoE 缺陷小鼠的模式中有效抑制 LDL 的氧化，且連續餵食 6 週後其血管內膜中僅剩下少量的泡細胞存在。Tijburg et al. (47) 的研究中指出，綠茶可降低 NZW 兔 31% 的動脈粥狀硬化，但紅茶、維生素 E 與β-胡蘿蔔素則無此效果。Hayek et al (48) 的研究中發現，不論餵食 ApoE 缺陷小鼠紅酒、quercetin 或兒茶素類，均可減少動脈粥狀硬化病灶之面積，此與減少 LDL 氧化敏感性有關。

目前一些抗氧化劑的使用已支持可改善一些退化性疾病，如：動脈粥狀硬化、糖尿病、癌症、免疫疾病神經系統疾病等 (49)。目前已有許多研究指出抗氧化劑有抑制低密度脂蛋白氧化方面的效果，但對於降低動脈粥狀硬化的效果則較為缺乏，這顯示除了 LDL 氧化導致動脈粥狀硬化的早期發展外，尚有其他因素(如細胞激素、內皮損傷等)可影響了病變的發生。但整體而言，抗氧化抗動脈粥狀硬化兩者之間實有密不可分之關連，而由食物或天然植物中找尋有效的抗氧化劑更為未來發展的方向。

高等植物為抵抗環境中自由基的攻擊，而發展出許多不同形式的保護系統，以防止活性氧 (reactive oxygen species) 對植物體的傷害，包括了 (1) 酵素系統---如過氧化酵素 (peroxidase)、過氧化氫酵素 (catalase)、超氧歧化酵素 (superoxide dismutase) 等; (2) 多元酚類化合物---如生育酚、酚酸 (phenolic acid)、類黃酮 (flavonoids) 與其他酚類化合物 (如木質素、ubiquinol 等); (3) 含氮物質---如植物鹼 (alkaloids) 與葉綠素 (chlorophyll); (4) 胡蘿蔔素; (5) 其他小分子水溶性抗氧化劑，如抗壞血酸 (50)。其中最受學者重視的即為多元酚類化合物中之 flavonoids，長久以來被認為與抗突變、抗氧化與抗發炎有密切的關係(51)。Flavonoids 為植物的二級代謝產物，其主要化學結構為 2-phenyl-benzo- $\alpha$ -pyrones，是一種 diphenylpropane (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>) 的骨架 (52)，在其雜環上因不同取代基之存在而衍生出約 4000 多種不同的結構，廣泛存在於蔬菜、水果與中草藥中，但其種類與含量則隨植物之不同而有差異 (53)。譬如茶葉中最多可含 30% flavonoids。Flavonoids 的功能已經被明確知道的有抗菌、抗發炎、抗過敏、抗突變、抗病毒、抗腫瘤、抗血栓等作用。這些功能可能都源自於其潛在的抗氧化功能，即為清除自由基。在流行病學、臨床及實驗數據中皆指出氧化傷害與許多的疾病相關，而 flavonoids 及 Catechin 和他們的衍生物如 oligomeric proanthocyanidins, quercetin, quercetin chalcone, Ginkgo flavone glycosides, silymarin, 及其他的一些抗氧化劑也被指出可預防心血管疾病、癌症、發炎、氣喘及肝疾病等。

Flavonoids 基本環狀架構雖相同，但其羥取代基數目與位置不同而具有不同的抗氧化能力，Rice-Evans et al. (52, 54) 利用 Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) 來定義各種 flavonoids 的抗氧化能力，TEAC 值愈高者顯示其抗氧化力愈強。有關 flavonoids 之基本結構見圖六，其抗氧化力與結構之關係見表五。另外在 1990 年，Das

及 Pereira 也曾依 flavonoid 的雙鍵位置指出在第四個碳上具有碳酸鹽基及第二、第三碳間為雙鍵者特別具有高度的抗氧化力，如異黃酮 (isoflavones) 中較具抗氧化活性者通常具有 4-碳酸根基及 5-氫氧基。

目前 flavonoids 在疾病預防方面的功效有一些流行病學上的研究廣受注目 (55)，Zutphen 研究中指出，食用富含 flavonoids 的 28 種蔬菜、12 種水果與 9 種飲料的飲食來源 5 與 15 年，均可降低罹患心血管疾病的發生率，其中又以茶、洋蔥與蘋果的效果為最好 (56, 57); 在一個 25 年的七國研究計畫 (Seven Countries Study) 中發現攝取不同含量的 flavonoids 可以解釋不同族群中心血管疾病發生率的差異性，但並未發現癌症的發生與 flavonoids 的攝食量有統計上的差異 (58); 芬蘭的群體試驗 (Cohort Study) 中指出攝取較少量的 flavonoids 會有較高罹患心血管疾病的可能性，且發生率為男性高於女性 (59); 日本對飲用綠茶的四年人體實驗中發現，增加綠茶的攝取量與降低血清中總膽固醇、三酸甘油酯、LDL 膽固醇的降低有關 (60); 而在英國威爾斯地區的 Caerphilly Study (61) 與其他研究中 (62) 則並未發現攝取 flavonoids 與降低心血管疾病的發生率有關，甚至有些微上升的趨勢。另有離體與體外實驗指出 flavonoids 與紅酒的多酚類化合物 (44, 63-65)、兒茶素類 (47, 66-69) 可抑制 LDL 的氧化，亦可清除自由基與保護紅血球細胞不受氧化 (70-72)，且與某些心臟疾病有關 (73)。

原兒茶酸 (protocatechuic acid, PCA) 是一種簡單的酚類化合物，其結構如附圖七，由洛神的乾燥花分離而來，Chinese herbal medicine (中醫本草藥典) 記載，洛神花屬於錦葵科 (學名 *Hibiscus Sabdariffa* Linnaeus, HS) 中洛神葵的花，具有解熱、利尿、降血壓等功能。常被當作夏季的清涼飲料。這種經乾燥而得的洛神花萃取物，廣佈於蔬菜、水果、花和胡桃中 (74)(附圖八)。近年來學者指出，原兒茶酸是一種 chemopreventive

agent，因此漸漸受到重視 (75-78)。也有多位學者指出原兒茶酸在動物實驗上確實有抑制化學致癌的能力 (79-81)，更有報告指出原兒茶酸具有很強的抗氧化能力 (82)。因為它的抗氧化能力很強，因此我們想進一步探討在抑制 OxLDL 的效果如何。另外，由於 PCA 萃取自洛神花，而一般來說，PCA 並不會被拿來當作常用藥，洛神花才會被一般民眾長期的飲用，所以，在探討 PCA 作用的同時，若能評估洛神花粗萃取物的效用，相信能在日常保健上提供民眾多的資訊，因此本實驗將同時測定 PCA 及洛神花的水層粗萃取物 (HSE) 的效用。由於本實驗室在先前已經針對 PCA 與 LDL 的氧化作用之相關性進行試管實驗，偵測的方式為 TBARS (測定 LDL 的脂質部分氧化的情形) 及 lipogel electrophoresis (測定 LDL 的蛋白質部分陰電性改變的情形)，結果發現此二部分所表達的 LDL 氧化情形皆可被 PCA 所抑制。但是除了這些改變之外，OxLDL 會因脂質部分的氧化作用而產生脂質片斷並與蛋白部分產生重組，這種結果會使 OxLDL 表現出片段化 (fragmentation) 的現象，另外總膽固醇也會在 LDL 氧化的時候表現出減少的情形，這些都是我們想要進一步偵測的部分。



## 研究目的

許多研究人員都注意到，抗氧化維生素在冠狀動脈疾病(coronary heart disease, CHD)的角色，天然的抗氧劑中具有抗動脈粥狀硬化形成的有 Vit E、Vit C、beta-carotene，這些已經很清楚能使 LDL 氧化情形減少或減低氧化型 LDL 被噬入的作用。在本實驗室先前的研究中已經發現 PCA 對於氧化型 LDL 所表現的負電荷增加 (lipogel electrophoresis) 及脂肪酸氧化 (TBARS) 有抑制氧化的作用，在本實驗中我們要以原兒茶酸 (PCA)和洛神花水萃取物 (HSE)為題材來探討其對抗 LDL 氧化的作用強弱。首先在試管中加入不同劑量的 PCA 或 HSE 與 oxidative modified LDL 作用，再分析其 OxLDL 片段化的情形及總膽固醇的濃度，藉此以初步釐清 PCA 與 HSE 的抗 LDL 氧化的能力，以提供天然物在預防冠狀動脈疾病的指標。

## 實驗材料和方法

### I. 化學藥劑

Protocatechuic acid (PCA), EDTA,  $\text{CuSO}_4$ , sodium chloride, sodium dihydrophosphate, sodium dedecyl sulfate, glycine, acrylamide, bisacrylamide, Tris, glycerol, bromophenol blue, coomassie Brilliant blue R250, acetic acid, methol 購自 Sigma 公司 (US); TEMED,  $\beta$ -mercaptoethanol 購自 Bio-Rad 公司 (US); potassium bromide 購自 Merck 公司; coomassie blue, Sephadex G-25 column (Pharmacia PD-10) 購自 Pharmacia 公司; Beckman paragon lipo gel electrophoresis system 及 lipoge 購自 Beckman analytic 公司 (Milan, Italy); MENAGENT Cholesterolo 購自 Menarini 公司 (Italy)。

### II. 洛神花水萃取物的萃取

稱取 50g 的乾洛神花 (購自台東縣農會)，加入 2 公升的二次水，沸水煮 2 小時後以濾紙將渣滓濾除，得到的液體重約為 800g，再分批置入冷凍乾燥機進行乾燥以得到粉末。粉末秤重後以二次水溶解配置成 100 mg/ml 分裝置於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中保存待用。

### III. 脂蛋白的製備

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)。靜置一段時間後，3000 rpm 離心十分鐘，取上清液即是血清。然後用得到的血清來製備 LDL。取 48 ml 的血清加入 16.8 ml 的 sodium chloride 及 EDTA 混合液 (包含有 0.5 M NaCl and 0.3 mM EDTA, pH7.4)，混合均勻後分裝成 8 管在超高速離心機 (Beckman T-80L, rotar Ti90) 以 200,000g 在  $10^\circ\text{C}$  下離心 10 分鐘，取下層 (但須避免紅血球的部分，上層為 chylomicron)，每管各 6 ml，共 48 ml，再加入 16.8 ml 的 sodium chloride 及 EDTA

混合液，其後便以相同離心條件離心 3.5 小時。在此次離心之後，取下層黃色液體的部分（若吸取到黃色沉澱部份亦可），每管各 6 ml，共 48 ml，其後稱取 4.0032 g 之 potassium bromide，以相同離心條件再離心 3.5 小時，小心取出上層薄薄的黃色液體部分（即為 LDL）。在蛋白定量（coomassie blue, Pharmacia）後以 PBS (1.37 M sodium chloride and sodium dihydrophosphate, pH 7.4) 將濃度調整為 0.5 mg/ml，然後通過 Sephadex G-25 column (Pharmacia PD-10; bed volume, 9.1 ml) 以去除殘留於 LDL 之 EDTA (83)。已經通過 column 的 LDL 必須保存於 4°C 及暗處，並且必須在 1 週內使用。LDL 與 CuSO<sub>4</sub> 反應完畢後則以 Beckman paragon lipo gel electrophoresis system (Beckman analytic, Milan, Italy) 測定 LDL 氧化的程度必須與先前實驗一致。（10 mM CuSO<sub>4</sub> 在加入 LDL 培養 24 小時後必須能使 LDL 氧化程度為 OxLDL 在 lipogel 上位移是 native LDL 的 4 倍以上）

#### IV. OxLDL 的製備及抗氧化劑的給予

製備好的 LDL（最終濃度為 100 μg protein/ml）先加入不同濃度的 PCA (0.01、0.03、0.05 mM) 或 HSE (0.01、0.03、0.05、0.07 mg/ml)，再分別加入終濃度為 10 μM 之 CuSO<sub>4</sub> 於 37 °C 下水浴 24 小時後收取樣本進行測定。

#### V. 總膽固醇含量的測定

在反應時間結束之後，加入終濃度為 1 mM 之 EDTA 以終止反應並預防以終止反應並預防 LDL 繼續氧化。總膽固醇的測定乃是使用酵素法，所使用的測定組為 MENAGENT Cholesterolo (Menarini Co., Italy)。本試驗中，樣本必須先與反應劑混合（反應劑中含有 cholesterol-esterase, cholesterol oxidase 和 peroxidase），在 37°C 下反應 10 分鐘以形成 chinoeimmine 的有色物質，此後便可在 500 nm 波長下讀

取其吸光值 (Hitachi U-2001 fluorescence spectrophotometer)，在此測定中，200 mg/dl cholesterol 被用來當作標準品以換算樣品總膽固醇的濃度。

#### **VI. 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 °C 加熱 5 分鐘。接著配製 3-15% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)，取樣本 40 µl 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 (68)。

## 結果

### (一) 銅離子與 LDL 共同培養後的總膽固醇改變的情形

在本實驗中，我們分別以 5, 10, 15  $\mu\text{M}$  (終濃度) 的  $\text{CuSO}_4$  與終濃度為 100  $\mu\text{g}$  protein/ml 的 LDL 在  $37^\circ\text{C}$  下共同培養 0, 2, 8, 12, 24 小時，結果發現在 12 小時所測得的總膽固醇量，10 及 15  $\mu\text{M}$  的  $\text{CuSO}_4$  皆可使總膽固醇量降解約 41%，在延長時間為 24 小時後，其總膽固醇降解的比例並沒有明顯增加，又由於本實驗室先前實驗所使用的  $\text{CuSO}_4$  劑量為 10  $\mu\text{M}$ ，所以在此我們決定以 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  與 100  $\mu\text{g}$  protein/ml 的 LDL 在  $37^\circ\text{C}$  下共同培養 12 小時作為誘發總膽固醇量降解的條件以進行以下的實驗 (圖一)。

### (二) 洛神花水層粗萃取物對 $\text{Cu}^{++}$ 所造成的氧化型 LDL 中總膽固醇降解的抑制效果

我們以上述的誘發總膽固醇降解的條件，在樣本中共同處理以洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，結果發現隨著洛神花水層粗萃取物的濃度增加，總膽固醇降解的現象逐漸被回復 (圖二)，在 0.1 mg/ml 的濃度下總膽固醇降解的現象被回復 18.15%，而在 0.5 mg/ml 則回復了 67.25%，但在 1.0 mg/ml 卻比控制組 (LDL 與  $\text{CuSO}_4$  共同處理者) 下降 26.6%。

### (三) 原兒茶酸對 $\text{Cu}^{++}$ 所造成的氧化型 LDL 中膽固醇降解的抑制效果

若在樣本中共同處理以原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05 mM，結果發現隨著原兒茶酸的濃度增加，總膽固醇降解也出現逐漸被回復的現象 (圖三)，在 0.05 mg/ml 的濃度下總膽固醇降解的現象約被回復 74.96% ( $P < 0.01$ )。

### (四) 銅離子與 LDL 共同培養後 ApoB 片段化的情形

在本實驗中，我們分別以 5, 10, 15  $\mu\text{M}$  (終濃度) 的  $\text{CuSO}_4$  與終濃度為 100  $\mu\text{g}$  protein/ml 的 LDL 在  $37^\circ\text{C}$  下共同培養 0, 2, 4, 8 小時，結果發現 10 及 15  $\mu\text{M}$  的  $\text{CuSO}_4$  在 2 小時所誘發的 ApoB 片段化的比例約為 76%，在 4 小時後，10 及 15  $\mu\text{M}$  的  $\text{CuSO}_4$  所誘發的 ApoB 片段化的比例則近乎 100%，8 小時後，10 及 15  $\mu\text{M}$  的  $\text{CuSO}_4$  所誘發的 ApoB 片段化的比例較之於 4 小時者則無太大變化。在此，若所使用的  $\text{CuSO}_4$  劑量為 5  $\mu\text{M}$ ，即使處理 8 小時，也與控制組 (LDL 不加入  $\text{CuSO}_4$ ) 相似，並無 ApoB 片段化的現象。所以我們同樣以 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  與 100  $\mu\text{g}$  protein/ml 的 LDL 在  $37^\circ\text{C}$  下共同培養 4 小時作為誘發 ApoB 片段化的條件以進行以下的實驗 (圖四)。

#### (五) 洛神花水層粗萃取物對 $\text{Cu}^{++}$ 所造成的氧化型 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，在樣本中共同處理以洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，結果發現隨著洛神花水層粗萃取物的濃度增加，ApoB 片段化的現象逐漸被回復 (圖五)，在 0.5 mg/ml 的濃度下 ApoB 片段化的現象被回復近乎 100%。

#### (六) 原兒茶酸對 $\text{Cu}^{++}$ 所造成的氧化型 LDL 中 ApoB 片段化的抑制效果

若在樣本中共同處理以原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05 mM，結果發現隨著原兒茶酸的濃度增加，ApoB 片段化也出現逐漸被回復的現象 (圖六)，在 0.03 及 0.05 mg/ml 的濃度下 ApoB 片段化的現象皆約被回復 100%。

## 討論

氧化型 LDL 會因為其作用而促使動脈粥狀硬化的發生，包括細胞毒性、在單核細胞的趨化作用、並被巨噬細胞的清道夫接受器所辨識以至於引起膽固醇堆積及泡沫細胞的形成 (84)，因此抑制 LDL 的氧化修飾作用在預防動脈粥狀硬化的過程變成一種藥物開發的極重要策略。在過去的許多文獻中報導了各種抗氧化劑對抗氧化型 LDL 的功效，包含增加一些內源性的抗氧化劑如維生素 C、維生素 E、及類胡蘿蔔素  $\beta$ -carotene，這些維生素皆被發現可以降低 LDL 氧化作用並因此而保持了血管的活性及減低了纖維斑塊發生及破裂的危險。此外，尚有類黃酮類化合物易被指出具有抗 LDL 氧化及抗動脈粥狀硬化的功效 (附表七)。由於這些報告，本實驗室先前曾以原兒茶酸及洛神花萃取物與維生素 C、維生素 E 進行抗 LDL 氧化作用的比較，結果發現原兒茶酸及洛神花萃取物的抗氧化作用優於維生素 E 而相近於維生素 C，而其更大的優勢在於原兒茶酸係萃取自洛神花，洛神花乃是原產於印度及馬來亞而後被引進台灣生長的一種一年生灌木，台東花蓮等東海岸區域為其主要產區，中南部亦有栽培出產，在盛夏時被用為清涼飲料，由於其日常的食用方式可廣為大眾接受，所以在推廣上及民眾接受度上極為適妥。另外，近年來不論在本國或西方各國對於抗氧化劑的補充都有一定的認知，且逐漸的以天然食品的補充為主要選擇，因此洛神花將在推廣上具有其潛能。

在本實驗中所使用的原兒茶酸及洛神花萃取物皆會明顯的降低氧化型 LDL 的各種表現型，其中原兒茶酸所使用的濃度只要 0.03-0.05 mM 即可達到很好的抑制效果，而洛神花萃取物則是在 0.5 mg/ml 可達到很好的抑制效果。若將此二者以相同的重量百分比來換算，洛神花水萃取物所使用的量約為原兒茶酸的 7 倍。依據先前的實驗中指出原兒茶酸約佔洛神花萃取物成分中的 0.4-2 % (85-87)，由此可以推測洛神花水萃取物中

的有效抗 LDL 氧化的成分應不只原兒茶酸一種。依據“原色生藥學”一書中記載 (88)，洛神花水萃取物中除原兒茶酸外尚含有檸檬酸 (citric acid)、Hibiscus acid 及一些 Flavonoids 如 gossypetin 等，其中檸檬酸及 flavonoids 已被證實具有抗氧化的作用，而洛神花水萃取物的抗氧化功效可能是其中的活性成分加成之結果，關於這些活性成分則值得再進一步研究探討。此外，由圖二結果可以發現濃度 1 mg/ml 的洛神花萃取物並無法顯出抗氧化的效果，反而會出現相反的作用。關於此點，2000 年時，Skibola 及 Smith (89)曾提出濃度過高的類黃酮將會有助於自由基的形成，這種結果將不僅導致類黃酮的抗氧化性消失，且會加速自由基的危害，這是一般人對於天然抗氧化劑較容易忽略的層面，也就是任何一種抗氧化劑，不論是天然或合成者皆需適度攝取、不可過量。

在現今生活中，環境 (包括空氣、水、飲食) 中經常會產生許多的自由基，人類也會因長期慢性的感染或發炎而產生大量的自由基，自由基依其來源可以分為活性氮 (Reactive nitrogen species, RNS) 如 NO, ONOO<sup>-</sup> 及活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 如 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO· 等兩大類，這兩大類都已被指出會使 LDL 變成 OxLDL 而促使動脈粥狀硬化進行 (90-93)，在本實驗室先前亦曾指出原兒茶酸可有效抑制 NO donor (sodium nitroprusside)所引起的 LDL 氧化，因此 flavonoids 抑制 OxLDL 的形成可謂是治本。在 2001 年，Fuhrman 及 Aviram (94) 指出 flavonoids 可以分為親水性及親脂性，多數親水性的 flavonoid 並未直接與 LDL 結合來達成抗氧化作用，而是以 (1) 以還原劑的形式提供氫原子及抑制單氧分子的形成以清除自由基；(2) 螯合不穩定的金屬離子以減低自由基的產生；(3) 與維生素 E 或類胡蘿蔔素等內源性的抗氧化劑協同作用以保護 LDL 不被氧化；(4) 保持或增加血清中 paraoxonase 的活性以促使血管細胞及 LDL 所衍生的自由基儘速水解以減低自由基的含量。而迄今，已經有許多的 flavonoids



的抗氧化劑被報告(46, 95-100)，但因其地域性的關係，所以許多有效的物質並不在本地出產，即因為此，我們應多多開發在本地最可隨處易得的物質才可提高其可用性。

由上述的敘述中已知 flavonoids 的抗氧化能力無庸置疑，而在本實驗中在試管中亦得知洛神花水萃取物及原兒茶酸具有極佳的抗 LDL 氧化能力，因此接下來需要釐清的是這些物質在細胞中的作用及其機轉為何，這將有助於了解洛神花水萃取物及原兒茶酸的功效。

## 參考文獻

1. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785.
2. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341.
3. Navab M, Berliner JA, Watson AD, *et al.* The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak: a review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Atheroscler Throm Vasc Biol* 1996; 16: 831.
4. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 707.
5. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998; 141: 1.
6. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, *et al.* Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915.
7. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1815.
8. Stocker R. Dietary and pharmacological antioxidants in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 589.
9. Fruebis J, Steinberg D, Dresel HA, *et al.* A comparison of the antiatherogenic effects of probucol and a structural analogue of probucol in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits. *J Clin Invest* 1994; 94: 392.
10. Fruebis J, Bird DA, Pattison J, *et al.* Extent of antioxidant protection of plasma

- LDL is not a receptor of the antiatherogenic effect of antioxidants. *J Lipid Res* 1997; 38: 2455.
11. Witting PK, Pettersson K, Östlund-Lindqvist A-M, *et al.* Dissociation of atherogenesis from aortic accumulation of lipid hydro(pero)xides in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J Clin Invest* 1999; 104: 213.
  12. Witting PK, Pettersson K, Letters J, *et al.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: e26.
  13. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34.
  14. Halliwell B. Oxidation of low-density lipoprotein: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 670S.
  15. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42: 498.
  16. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272: 20963.
  17. Westhuyzen J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Annu Clin Lab Sci* 1997; 27: 1.
  18. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95: 1062.
  19. Kreuzer J, White AL, Knott TJ, *et al.* Amino terminus of apolipoprotein B suffices to produce recognition of malondialdehyde-modified low density lipoprotein by the scavenger receptor of human monocyte-macrophages. *J Lipid Res* 1997; 38: 324.
  20. Ferns GAA, Lamb DJ, Taylor A. The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus. *Atherosclerosis* 1997; 133: 139.

21. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF. Antioxidant and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 408.
22. Kwiterovich PO Jr. The effect of dietary fat, antioxidants, and pro-oxidants on blood lipids, lipoproteins, and atherosclerosis. *J Am Diet Assoc* 1997; 97(7 suppl): S31.
23. Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996; 94: 6.
24. Reilly M, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 1996; 94: 19.
25. Ting HH, Timimi FK, Haley EA, *et al.* Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 95: 2617.
26. Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA* 1997; 278: 1682.
27. Jha P, Flather M, Lonn E, *et al.* The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann Intern Med* 1995; 123: 860.
28. Odeh RM, Cornish LA. Natural antioxidants for the prevention of atherosclerosis. *Pharmacotherapy* 1995; 15: 648.
29. Jialal I, Grundy SM. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 669: 237.
30. Gaziano JM, Hattar A, Flynn M, *et al.* Supplementation with beta-carotene in vivo and in vitro does not inhibit low-density lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 1995;

112: 187.

31. Mao S, Yates M, Parker R, et al. Attenuation of atherosclerosis in a modified strain of hypercholesterolemic Watanabe rabbits with use of probucol analogue (MDL 29,311) that does not lower serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991; 11: 1266.
32. Prasad K, Kalra J, Lee P. Oxygen free radicals as a mechanism of hypercholesterolemic atherosclerosis: effects of probucol. *Int J Angio* 1994; 3: 100.
33. Johnasson J, Olsson AG, Bergstrand L, et al. Lowering of HDL2b by probucol partly explains the failure of the drug to affect femoral atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia: a probucol quantitative regression Swedish trial (PQRST) report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1049.
34. Elinder LS, Hadell K, Johnasson J, et al. Probuco treatment decreases serum concentrations of diet-derived antioxidants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1057.
35. Andersson CM, Hallberg A, Högberg T. Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. *Advances Drug Res* 1996; 28: 65.
36. Zhang SH, Reddock RL, Avdievich E, et al. Paradoxical enhancement of atherosclerosis by probucol treatment in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 2858.
37. Bird DA, Tangirala RK, Fruebis J, et al. Effect of probucol on LDL oxidation and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* 1998; 39: 1079.
38. Björkhem I, Freyschuss A, Breuer O, et al. The antioxidant butylated hydrotoluene protects against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 15.
39. Freyschuss A, Stiko-Rahm A, Sweddenborg J, et al. Antioxidant treatment inhibits

- the development of intimal thickening of after balloon injury of the aorta in hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest* 1993; 91: 1282.
40. Munday JS, Thompson KG, James KAC, Manktelow BW. Dietary antioxidants do not reduce fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 114.
41. Sparrow CP, Doebber TW, Olszewski J, *et al.* Low density lipoprotein is protected from oxidation and the progression of atherosclerosis is slowed in cholesterol-fed rabbits by the antioxidant N,N'-diphenylenediamine. *J Clin Invest* 1992; 89: 1885.
42. Tangirala RK, Casanada F, Miller E, *et al.* Effect of antioxidant N,N'-diphenyl-1,4-phenylenediamine (DPPD) on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1625.
43. Frankel EN, Eaterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993; 341: 1103.
44. Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 1997; 135: 93.
45. Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* 1994; 344: 193.
46. Fuhrman B, Buch S, Vaya J, *et al.* Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 267.
47. Tijburg LBM, Wiseman SA, Meijer GW, Weststrate JA. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in

- hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis* 1997; 135: 37.
48. Halevy D, Thiery J, Nagel D, *et al.* Increased oxidation of LDL in patients with coronary artery disease is independent from dietary vitamins E and C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1432.
49. Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995; 49: 345.
50. Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 1988; 27: 969.
51. Hertog MGL, Hollman PCH. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Euro J Clin Nutr* 1996; 50: 63.
52. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 933.
53. Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem* 1996; 57: 43.
54. Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 790.
55. Katan MB. Flavonoids and heart disease. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1542.
56. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PC, *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007.
57. Keli SO, Hertog MGL, Feskens EJ, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen Study. *Arch Intern Med* 1996; 156: 637.
58. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, *et al.* Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Studies. *Arch Intern Med* 1995; 155: 381.

59. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoids intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J* 1996; 312: 478.
60. Imai K, Nakachi K. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *Br Med J* 1995; 310: 693.
61. Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, *et al.* Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1489.
62. Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, *et al.* Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 1996; 125: 384.
63. Salah N, Miller NJ, Paganga G, *et al.* Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 1995; 322: 339.
64. Ishikawa T, Suzukawa M, Ito T, *et al.* Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 261.
65. Catapano AL. Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology* 1997; 48: 39.
66. Luo M, Kannar K, Wahlqvist ML, O'Brien RC. Inhibition of LDL oxidation by green tea extract. *Lancet* 1997; 349: 360.
67. Miura S, Watanabe J, Sano M, *et al.* Effects of various natural antioxidants on the Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 1.
68. Miura S, Watanabe J, Tomita T, *et al.* The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidative modification of low density



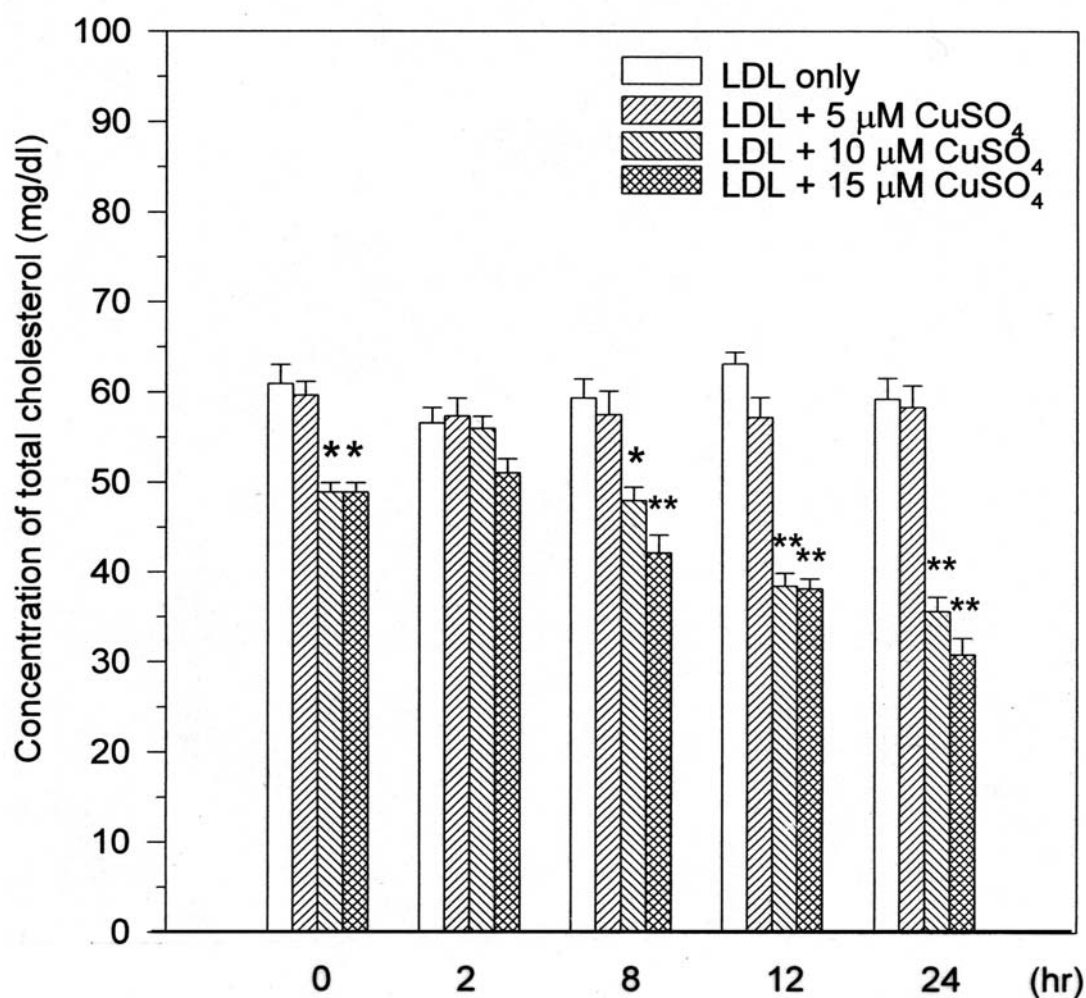
- lipoprotein. Biol Pharm Bull 1994; 17: 1567.
69. Yamanaka N, Oda O, Nagao S. Green tea catechins such as (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin accelerate Cu<sup>2+</sup>-induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. FEBS letter 1997; 401: 230.
70. Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. J Agric Food Chem 1997; 45; 304.
71. Yen GC, Chen HY, Peng HH. Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. J Agric Food Chem 1997; 45: 30.
72. Grinberg LN, Newmark H, Kitrossky N, *et al.* Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. Biochem Pharm 1997; 54: 973.
73. Spanos GA, Wrolstad RE. Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage and review. J Agric Food Chem 1992; 40:1478.
74. Tanaka T, Kojima T, Suzui M, Mori H. Chemoprevention of colon carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protocatechuic acid: suppressing effects on tumor development and biomarker expression of colon tumorigenesis. Cancer Res 1993; 53: 3908-3913.
75. Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, *et al.* chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rats. Cancer Res 1993; 53:2775.
76. Tanaka T, Kawamori T, Ohnishi M, *et al.* Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and postinitiation phases. Cancer Res 1994; 54: 2359.
77. Kawamori T, Tanaka T, Kojima T, *et al.* Suppression of azoxymethane-induced

- rat colon aberrant crypt focal by dietary protocatechuic acid. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 686.
78. Nomura AMY, Kolonel LN, Hankin JH, Yoshizawa CN. Dietary factors in cancer of the lower urinary tract. *Int J Cancer* 1991; 48:199.
79. Hung M, Ferrano T. Phenolic compounds in food and cancer prevention. In Huang MT, Ho CT, Lee CY. (eds). *Phenolic compounds in Food and Their Effects on Health H: Antioxidants and Cancer prevention*. American Chemical Society Symposium Series 507, American Chemical Society, Washington, DC, 1992 pp 8-34.
80. Nakamura T, Nakauawa Y, Onizuka S, *et al.* Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves). The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mutat Res* 1995; 388: 7.
81. Paya M, Ferrandiz F, Miralles C, *et al.* Effects of coumarin derivatives on superoxide anion generation. *Arzneimittel Forsch* 1993; 43: 655.
82. Hiramoto, K., Ojima, N., Sako, K.I., and Kikugawa, K. Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. *Biol Pharm Bull.* 19, 558-563, 1996.
83. Havel RJ, Eden HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1995; 34: 1345.
84. Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5949.
85. Tseng Th, Wang CJ, Kao ES, Chu CY. Hibiscus protocatechuic acid protects

- against oxidantive damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem Biol Interact* 1996; 101: 137.
86. Tseng TH, Hsu JD, Lo MH, *et al.* Inhibitory effect of hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Lett* 1998; 126: 199.
87. Tseng TH, Kao TW, Chu CY, *et al.* Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 307.
88. 賴榮祥, 洛神花, 原色生藥學. pp327-329.
89. Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoids intake. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 375.
90. Napoli C, Ignarro JL. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001; 5: 88.
91. Sevanian A, Ursini F. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 306.
92. Mashima R, Witting KP, Stocker R. Oxidants and antioxidants in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 411.
93. Chisolm MG, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1815.
94. Fuhrman B, Aviram M. Flavonoids protect LDL from oxidant and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 41.
95. Nigdikar SV, Willians NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 258.
96. Caccetta RA, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo

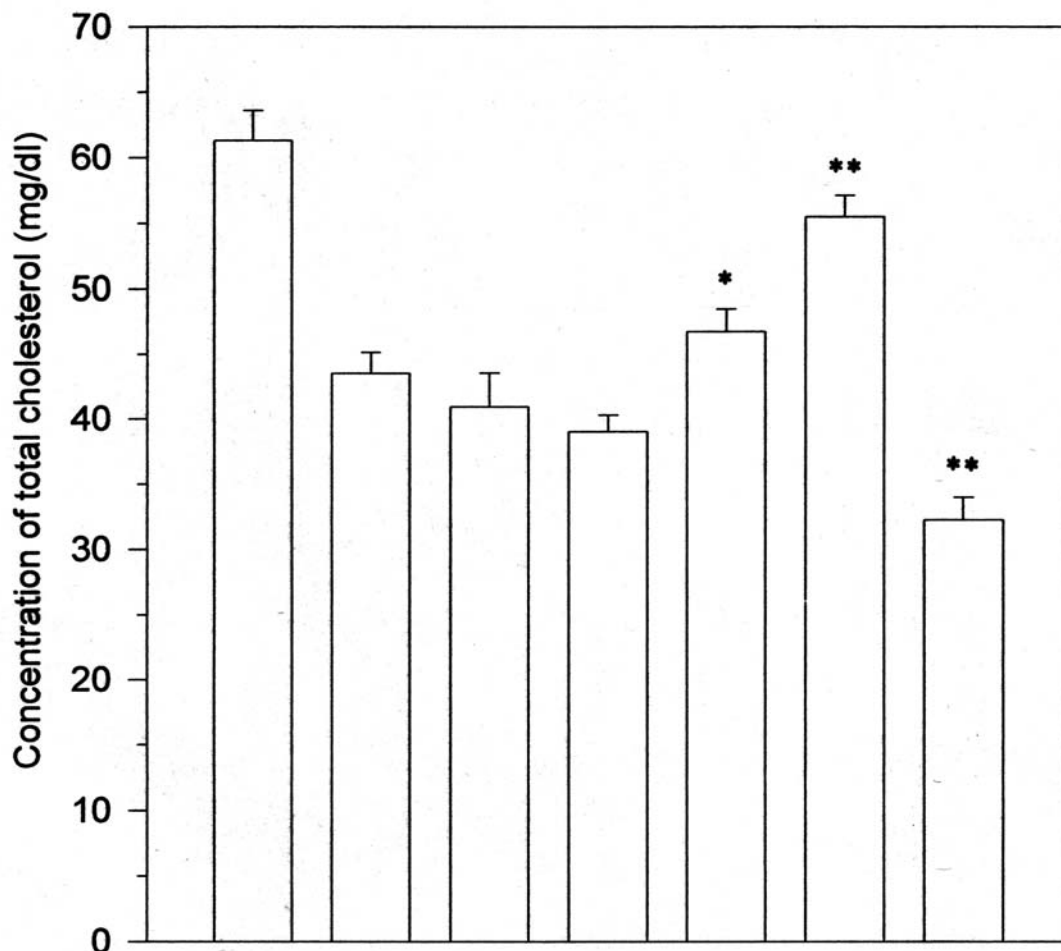
- lipoprotein oxidizability. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 67.
97. Belinky PA, Aviram M, Fuheman B, *et al.* The antioxidative effects of the isoflavan glabridin on endogenous constituents of LDL during its oxidation. *Atherosclerosis* 1998; 137: 49.
98. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, *et al.* Reduced progression of atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2744.
99. Meng QH, Lewis P, Wahala K, *et al.* Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low density lipoprotein. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1438: 369.
100. Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and LDL to undergo lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 549.

圖一、不同銅離子濃度在不同時間下對 LDL 的總膽固醇降解作用



**Fig. 1. The effects of  $\text{Cu}^{2+}$  mediated cholesterol degradation in LDL.** LDL (100mg protein/ml) was incubated with 0, 1, 5, 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  at  $37^\circ\text{C}$  as indicated periods. After the incubation, EDTA (final concentration 1 mM) was added to prevent any further oxidation and the total cholesterol contents were determined enzymatically. Each vertical bar represented mean  $\pm$ SD for triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired t-test respectively compared with the control (LDL and  $\text{CuSO}_4$  incubated together); \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

圖二、洛神花水層粗萃取物對銅離子誘發 LDL 總膽固醇降解之抑制作用

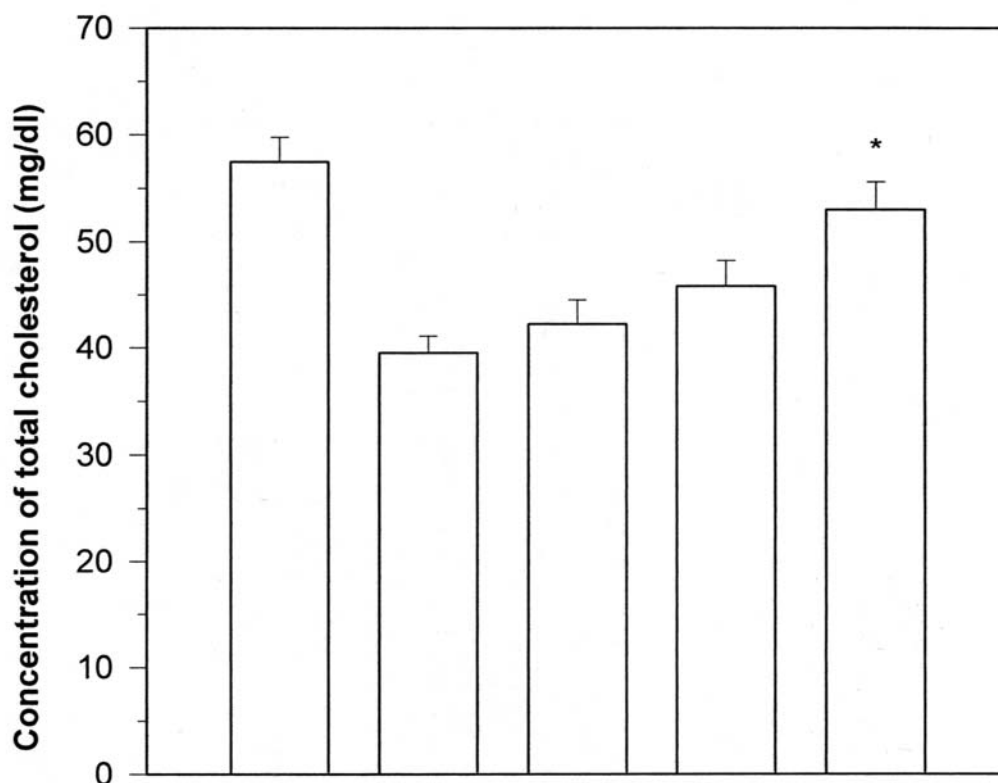


HSE (mg/ml)	-	-	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
CuSO <sub>4</sub> (10 μM)	-	+	+	+	+	+	+
LDL (100 μg/ml)	+	+	+	+	+	+	+

Fig. 2.  
Inhibi  
tion of

**Cu<sup>2+</sup> mediated cholesterol degradation in LDL by HSE.** LDL (100mg protein/ml) was incubated with 10 μM CuSO<sub>4</sub> at 37°C in the presence or absence of HSE for 12 hours. After the incubation, EDTA (final concentration 1 mM) was added to prevent any further oxidation and the total cholesterol contents were determined enzymatically. Each vertical bar represented mean ±SD for triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired t-test respectively compared with the control (LDL and CuSO<sub>4</sub> incubated together); \*, P<0.05; \*\*, P<0.01.

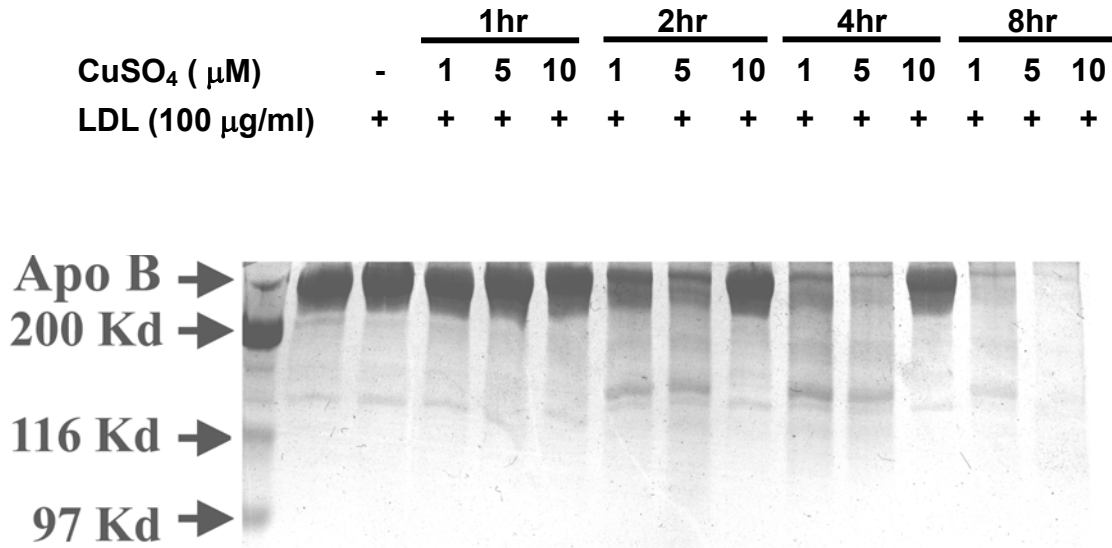
圖三、原兒茶酸對銅離子誘發 LDL 總膽固醇降解之抑制作用



<b>PCA (mM)</b>	-	-	<b>0.01</b>	<b>0.03</b>	<b>0.05</b>
<b>CuSO<sub>4</sub> (10 μM)</b>	-	+	+	+	+
<b>LDL (100 μg/ml)</b>	+	+	+	+	+

**Fig. 3. Inhibition of Cu<sup>2+</sup> mediated cholesterol degradation in LDL by PCA.** LDL (100mg protein/ml) was incubated with 10 μM CuSO<sub>4</sub> at 37°C in the presence or absence of PCA for 12 hours. After the incubation, EDTA (final concentration 1 mM) was added to prevent any further oxidation and the total cholesterol contents were determined enzymatically. Each vertical bar represented mean ±SD for triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired t-test respectively compared with the control (LDL and CuSO<sub>4</sub> incubated together); \*, P<0.05.

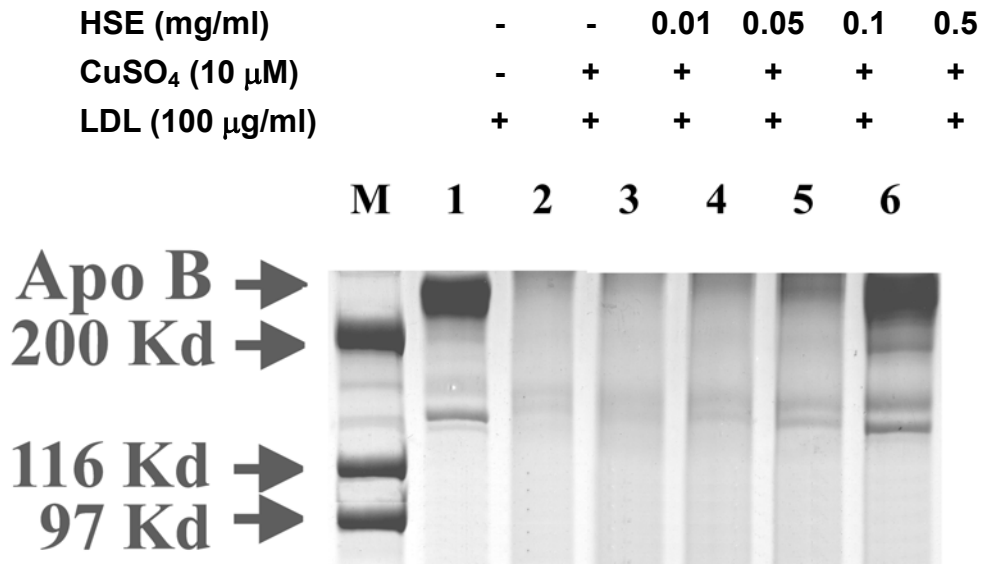
圖四、CuSO<sub>4</sub> 濃度及處理時間對 ApoB 片段化作用的影響



**Fig. 4. The effect of Cu<sup>2+</sup> mediated ApoB fragmentation in LDL.** LDL (100 μg protein/ml) was incubated with 1, 5, 10 μM CuSO<sub>4</sub> at 37°C as indicated periods. After the incubation, EDTA (final concentration 1 mM) was added to prevent any further oxidation. 25 μg Protein of LDL was applied to SDS-PAGE (3-15% gradient). After the electrophoresis, each band was stained with Coomassie Brilliant blue R250.

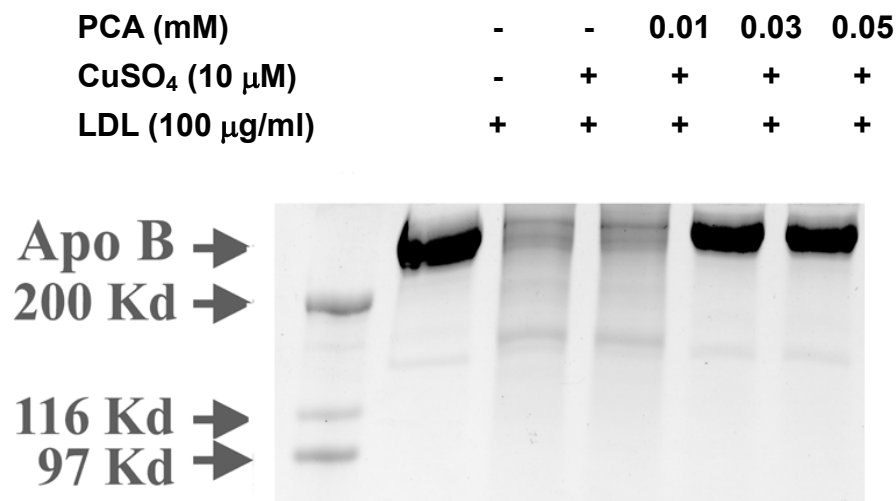


圖五、洛神花水層粗萃取物對 ApoB 蛋白片段化的抑制作用



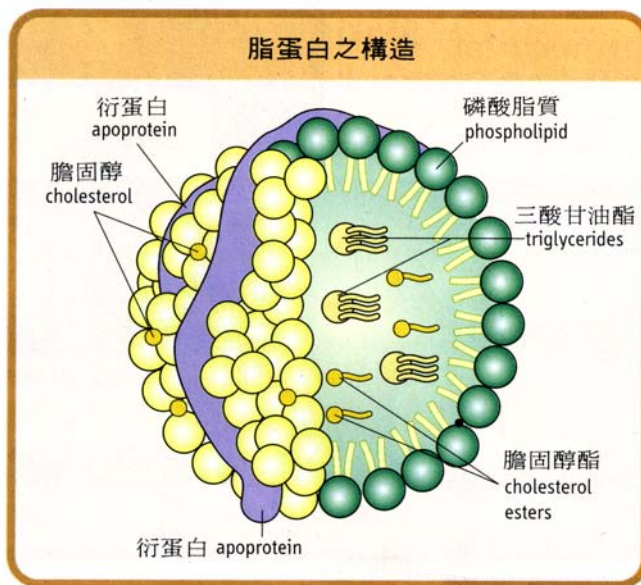
**Fig. 5. Inhibition of Cu<sup>2+</sup> mediated ApoB fragmentation in LDL by HSE.** LDL (100 μg protein/ml) was incubated with 10 μM CuSO<sub>4</sub> at 37°C in the presence or absence of HSE for 4 hours. After the incubation, EDTA (final concentration 1 mM) was added to prevent any further oxidation. 25 μg Protein of LDL was applied to SDS-PAGE (3-15% gradient). After the electrophoresis, each band was stained with Coomassie Brilliant blue R250.

圖六、原兒茶酸對 ApoB 蛋白片段化的抑制作用

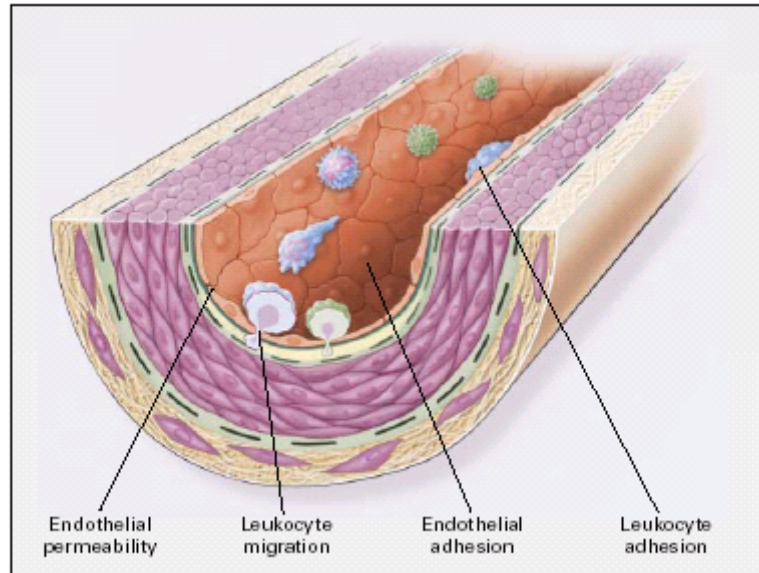


**Fig. 6. Inhibition of Cu<sup>2+</sup> mediated ApoB fragmentation in LDL by PCA.** LDL (100 μg protein/ml) was incubated with 10 μM CuSO<sub>4</sub> at 37°C in the presence or absence of PCA for 4 hours. After the incubation, EDTA (final concentration 1 mM) was added to prevent any further oxidation. 25 μg Protein of LDL was applied to SDS-PAGE (3-15% gradient). After the electrophoresis, each band was stained with Coomassie Brilliant blue R250.

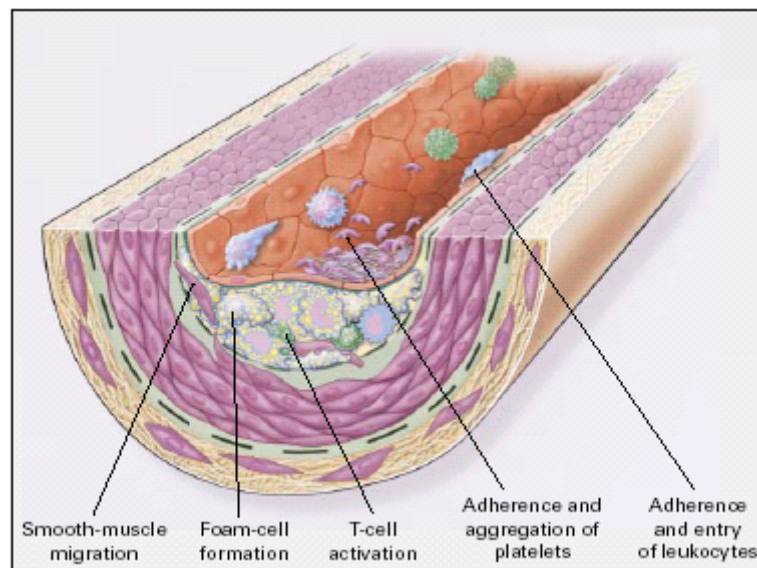
附圖一、脂蛋白之結構



附圖二、動脈粥狀硬化的演變機制

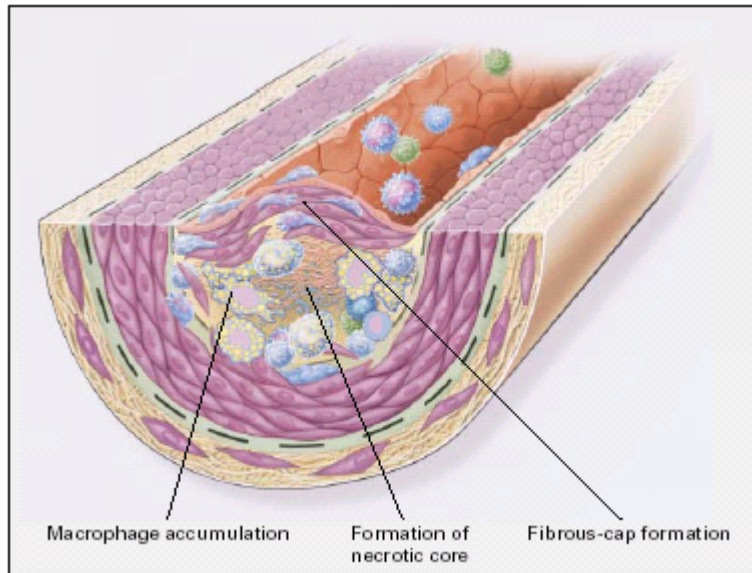


(Stage I: 早期內皮的失能)

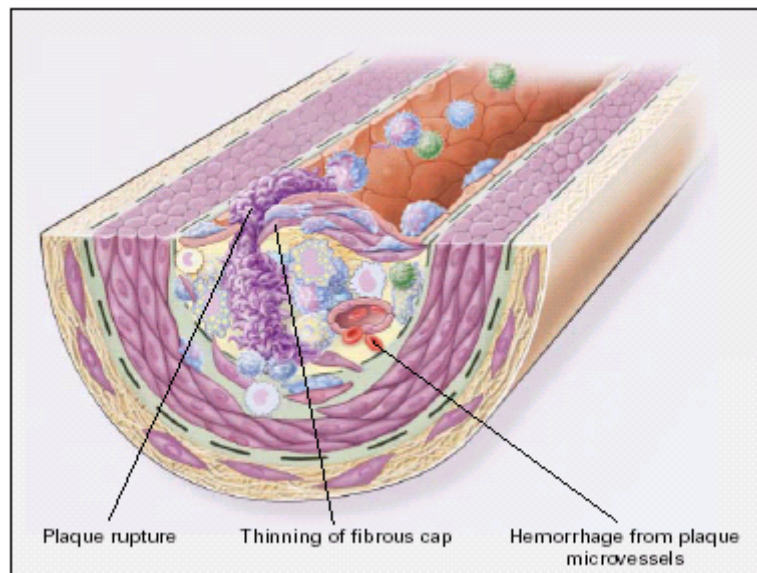


(Stage II: 脂肪條塊的形成)

附圖二、動脈粥狀硬化的演變機制 (續上)



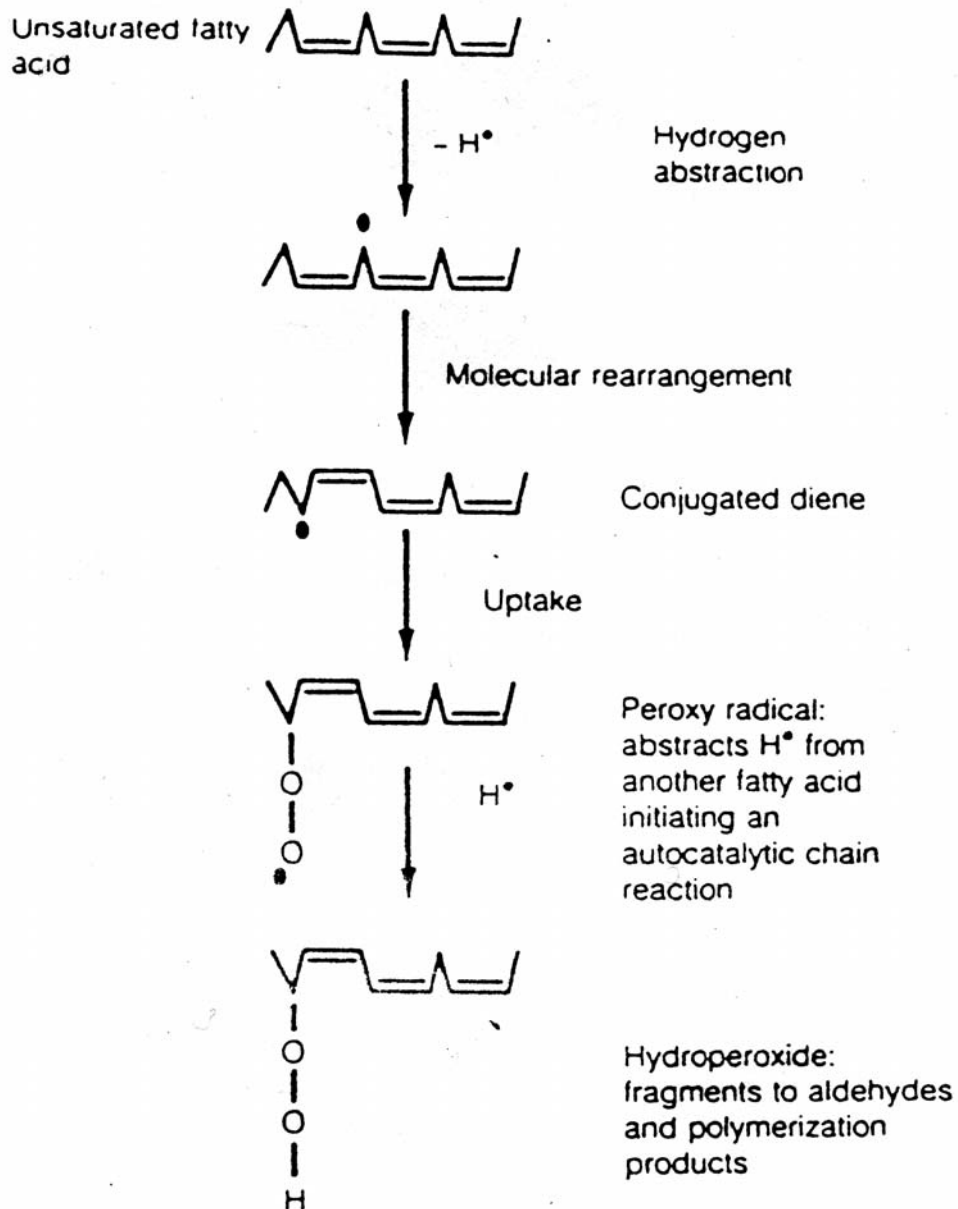
(Stage III: 持續形成病態損傷)



(Stage IV: 不穩定的纖維班塊)

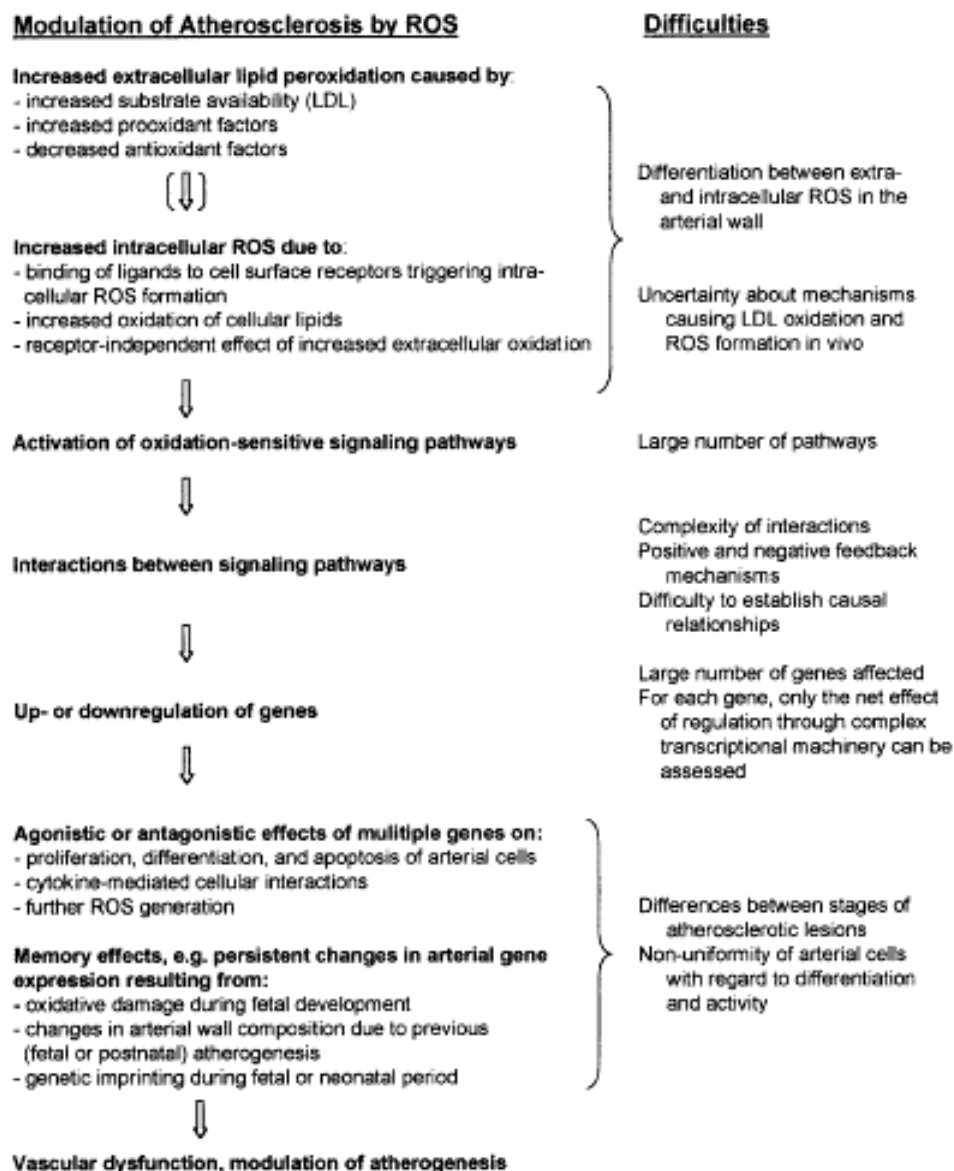
(摘自 The New England Journal of Medicine, 340, 115, 1999)

附圖三、多不飽和脂肪酸之過氧化反應



(摘自 Clinical Chemistry, 42, 498, 1996)

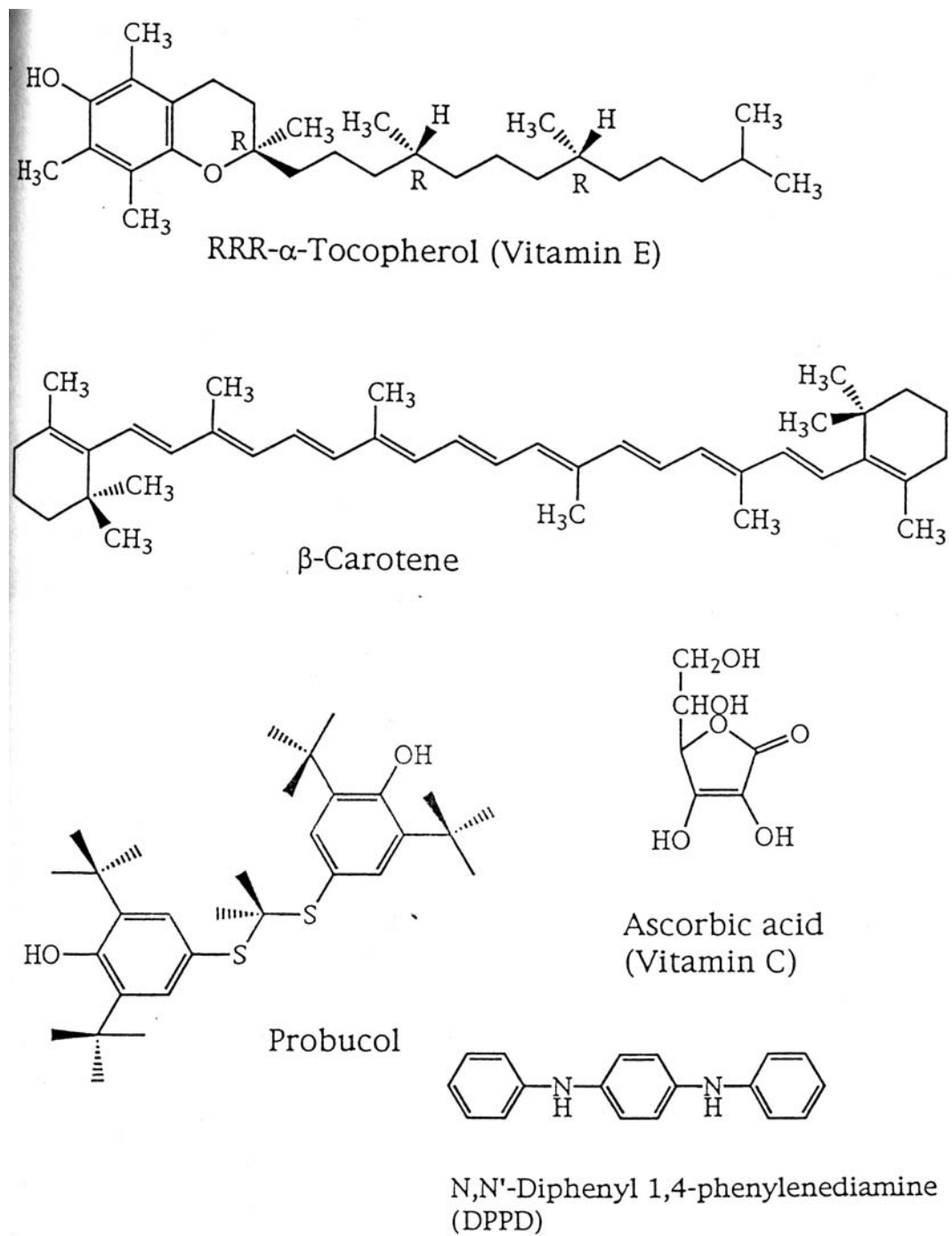
## 附圖四、ROS 在動脈粥狀硬化中的角色



**Fig. 1.** Role of ROS in atherogenesis and main experimental difficulties encountered in determining the mechanisms by which lipid peroxidation and ROS modulate atherogenesis, using conventional approaches. Simultaneous assessment of the expression of a broad spectrum of genes by array techniques and correlation of expression patterns with the effect on atherosclerosis may contribute to overcome these problems.

(摘自 Journal of Cellular Biochemistry, 82, 674, 2001)

附圖五、一般抗氧化劑的結構





附圖六、多酚類的基本結構

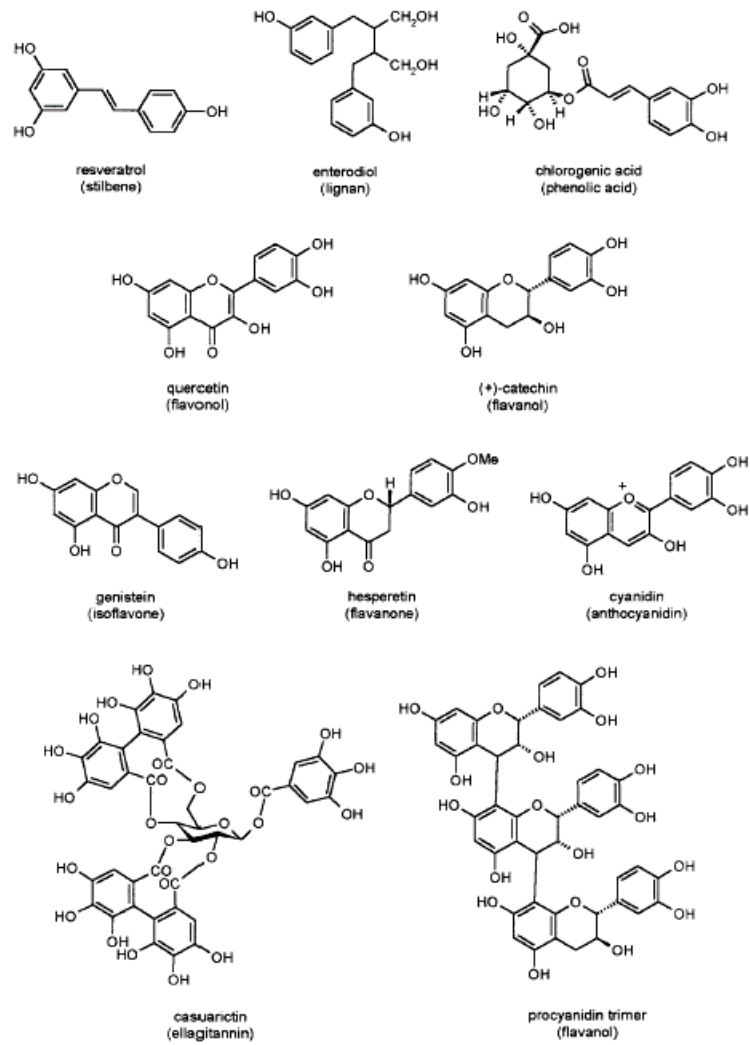
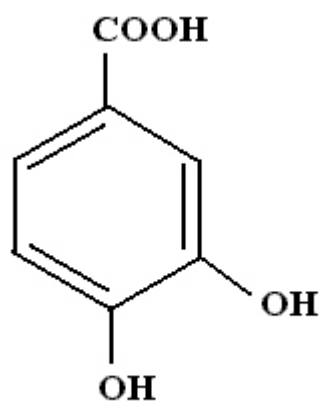


FIGURE 1 Chemical structures of the main classes of polyphenols.

(摘自 American Society for Nutritional Sciences, 2073S, 2000)

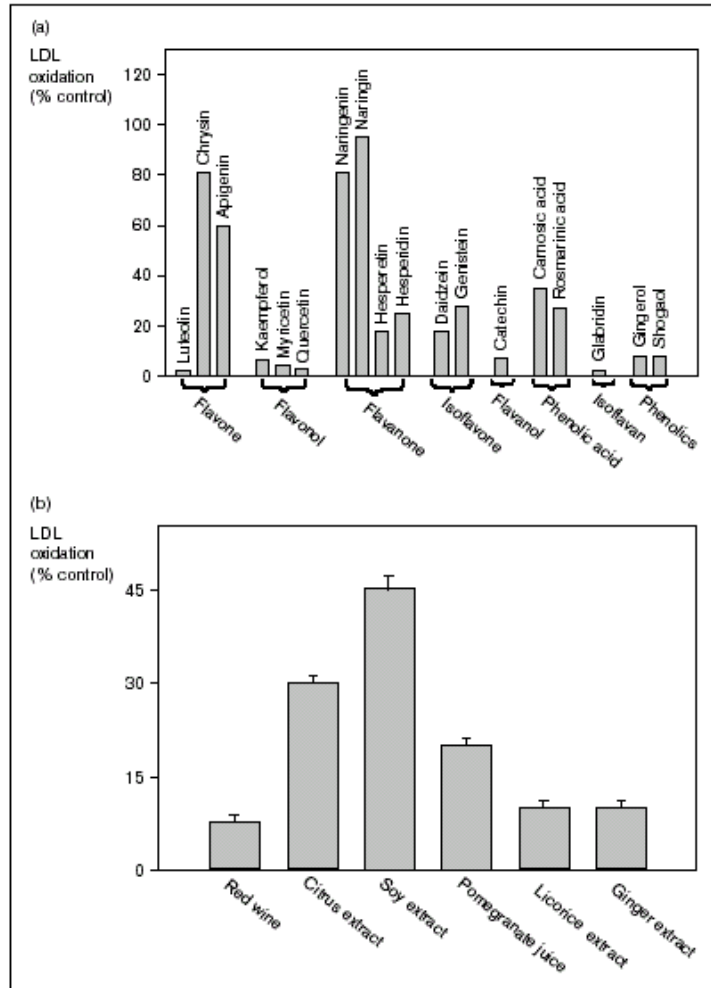
附圖七、原兒茶酸之結構圖



附圖八、類黃酮物質抑制銅離子誘發之氧化型 LDL 的作用比較

Figure 1. Inhibition of copper ion-induced LDL oxidation

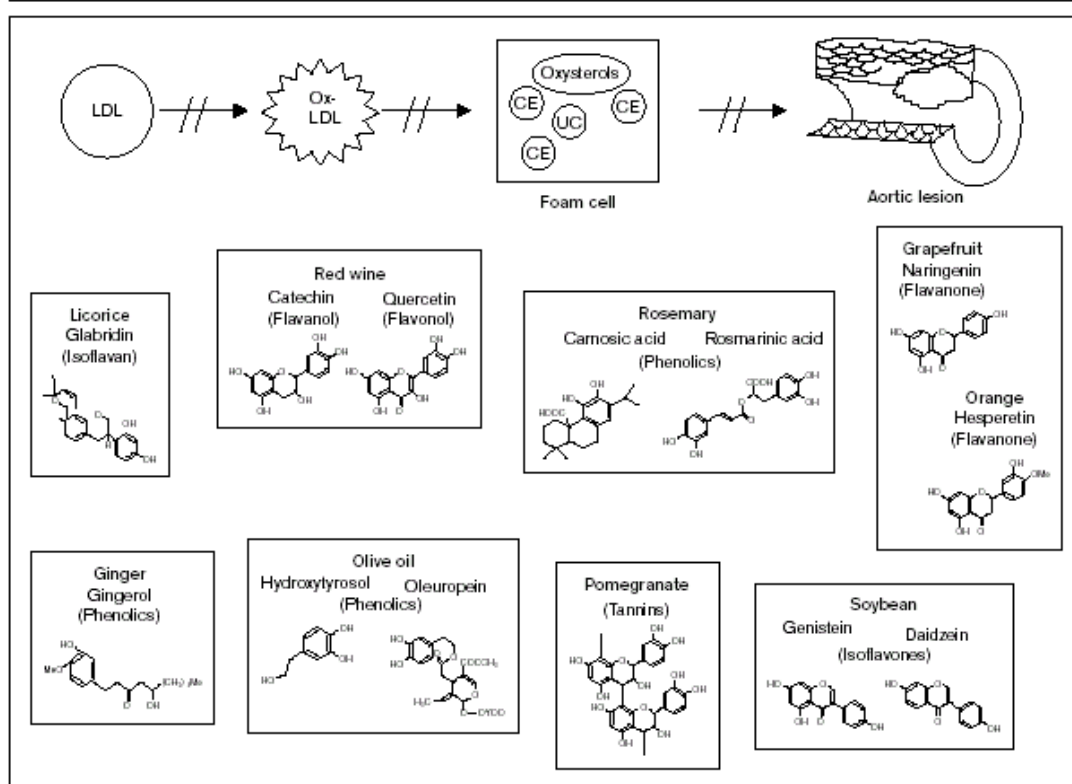
(a) Purified flavonoids. LDL (100  $\mu\text{g}$  protein/ml) was incubated at 37°C for 2 h with 5  $\mu\text{mol/l}$   $\text{CuSO}_4$  in the absence (control) or presence of 10  $\mu\text{mol/l}$  of flavonoids [flavone (luteolin, chrysin, apigenin), flavanol (kaempferol, myricetin, quercetin), flavanone (naringenin, naringin, hesperetin, hesperidin), isoflavone (daidzein, genistein), and flavanol (catechin)], or with 75  $\mu\text{mol/l}$  of phenolic acids (carosolic acid, rosmarinic acid), or 3  $\mu\text{mol/l}$  of the isoflavan glabridin, or 0.3  $\mu\text{mol/l}$  of the phenolics gingerol and shogaol. The extent of LDL oxidation was measured using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. (b) Flavonoid-rich nutrients. LDL (100  $\mu\text{g}$  protein/ml) was incubated at 37°C for 2 h with 5  $\mu\text{mol/l}$   $\text{CuSO}_4$  in absence (control) or presence of 1 ml red wine, 20 mg/l citrus extract, 50 mg/l soy extract, 30  $\mu\text{l}$ /l pomegranate juice, 3 mg/l licorice extract, or 1 mg/l ginger extract. The control value (LDL incubated with no flavonoids) was  $39 \pm 6$  nmol malondialdehyde equivalents/mg LDL protein. LDL oxidation is expressed as a percentage of the control value.



(摘自 Current Opinion in Lipidology, 12, 41, 2001)

附圖九、多酚類黃酮物質抗動脈粥狀硬化的作用

Figure 2. Anti-atherogenic effects of dietary polyphenolic flavonoids

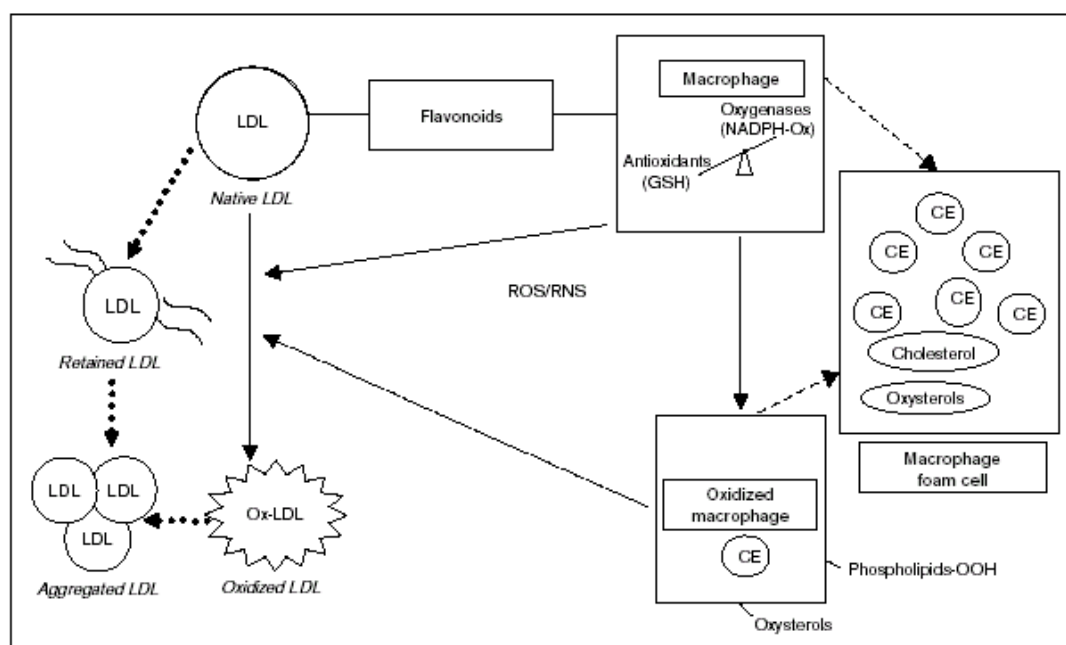


Dietary consumption of nutrients rich in flavonoids inhibit LDL oxidation, foam cell formation and the development of aortic atherosclerotic lesions. Major flavonoid-rich nutrients are shown, along with the chemical structure of their flavonoids. CE, cholesteryl ester; Ox-LDL, oxidized LDL; UC, unesterified cholesterol.

(摘自 Current Opinion in Lipidology, 12, 41, 2001)

附圖十、類黃酮物質抑制巨噬細胞—氧化型 LDL 及泡細胞形成

Figure 3. Flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and foam cell formation



Flavonoids can associate directly with LDL, resulting in the inhibition of LDL oxidation. Flavonoids can also associate with arterial cells such as macrophages, resulting in the inhibition of cellular oxygenases such as nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form oxidase (NADPH-Ox) system, or in the activation of cellular antioxidants such as the glutathione (GSH) system. Reduction in the formation and release of macrophage-reactive oxygen species/nitrogen species (ROS/RNS) by flavonoids, inhibit the formation of 'oxidized macrophages', and hence reduce cell-mediated oxidation of LDL. Together, these effects lead to a reduced formation of macrophage-foam cells, and thus attenuate the development of atherosclerosis.

(摘自 Current Opinion in Lipidology, 12, 41, 2001)

附表一、脂蛋白的分類

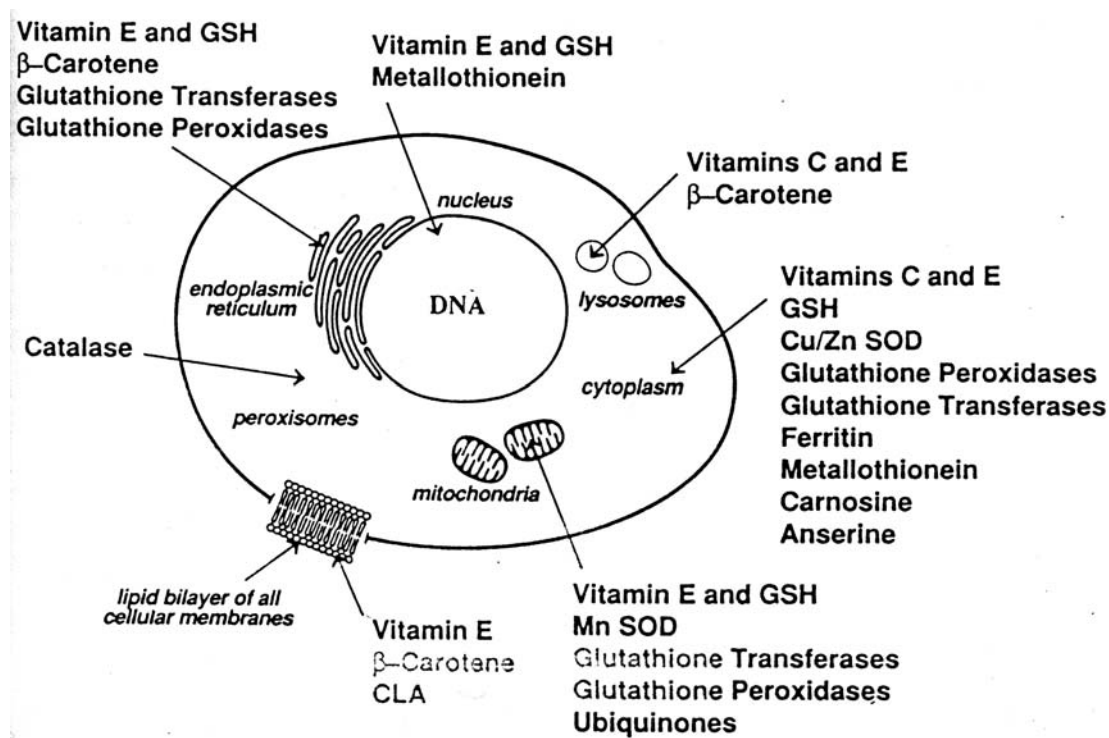
脂蛋白之類別				
粒子	密度 (公斤/升)	主要組成	衍蛋白	直徑 (微米)
乳糜微粒	<0.95	TG	B48 (A, C, E)	75-1200
VLDL	0.95-1.006	TG	B100 (A, C, E)	30-80
IDL	1.006-1.019	TG 及膽固醇	B100, E	25-35
LDL	1.019-1.063	膽固醇	B100	18-25
HDL	1.063-1.210	蛋白質	AI, AII (C, E)	5-12

附表二、低密度脂蛋白之組成

Component	Molecules/LDL particle
Protein	
Apo B-100	1
Total lipids	
Triacylglycerol	170
Phospholipids	700-900
Free cholesterol	500-600
Esterified cholesterol	1500-1700
Fatty acid esters	
Palmitic	693
Stearic	143
Oleic	454
Linoleic	1100
Arachidonic	153
Total PUFAs	1282
Antioxidants	
$\alpha$ -Tocopherol	6-12
$\gamma$ -Tocopherol	0.5
$\beta$ -Carotene	0.3
Lycopene	0.2
Ubiquinol 10	0.1-0.5

(摘自 American Journal of Clinical Nutrition, 61, 670S, 1995)

附表三、內源性抗氧化劑



(摘自 Nutritional Toxicology, 19, 1994)



附表四、在動物動脈粥狀硬化模式中抗氧化劑的效用

Table 2. Effects of antioxidants in animal models of atherosclerosis

Type of study	Reference	Result
Probucol in LDLR <sup>-/-</sup> rabbits	Carew et al. (1987)	+
	Kita et al. (1987)	+
	Mao et al. (1991)	+
	Daugherty et al. (1991)	±
	Fruebis et al. (1994)	+
	Witting et al. (1999a)	+
Probucol analogs in LDLR <sup>-/-</sup> rabbits	Mao et al. (1991)	+
	Fruebis et al. (1994)	-
	Witting et al. (1999a)	-
Probucol in cholesterol-fed rabbits	Stein et al. (1989)	-
	Daugherty et al. (1989)	+
	Prasad et al. (1994)	+
	Shaish et al. (1995)	+
Other antioxidants in rabbits		
DPPD	Sparrow et al. (1992)	+
BHT	Bjorkhem et al. (1991)	+
Vitamin E	Mantha et al. (1993)	+
	Morel et al. (1994)	-
	Kleinveld et al. (1995)	-
	Shaish et al. (1995)	-
Fruebis et al. (1996)	-	
Antioxidants in rodents		
Probucol in hamsters	Parker et al. (1995)	+
Vitamin E in hamsters	Parker et al. (1995)	+
DPPD in apoE <sup>-/-</sup> mice	Tangirala et al. (1995)	+
Probucol in apoE <sup>-/-</sup> mice	Zhang et al. (1997)	-±
Probucol in LDLR <sup>-/-</sup> mice	Bird et al. (1998)	-±
Probucol in LDLR <sup>-/-</sup> mice	Cynshi et al. (1998)	-±
Probucol in apoE <sup>-/-</sup> mice	Witting et al. (2000)	+/-±
Probucol analog in LDLR <sup>-/-</sup>	Cynshi et al. (1998)	+
Probucol metabolite in LDLR <sup>-/-</sup> /apoE <sup>-/-</sup>	Witting et al. (1999)	+
Vitamin E in apoE <sup>-/-</sup>	Praticò et al. (1998)	+
Dietary antioxidants in LDLR <sup>-/-</sup>	Crawford et al. (1998)	+
Antioxidants in nonhuman primates		
Probucol	Sasahara et al. (1994)	+
Vitamin E	Verlangieri and Bush (1992)	±

Modified from Steinberg and Witztum (1999). + = positive study (atherosclerosis decreased); - = negative study (atherosclerosis unchanged); ± = atherosclerosis equivocal; -± = atherosclerosis enhanced.

(摘自 Trends in Cardiovascular Medicine, 11, 93, 2001)

附表五、類黃酮類的抗氧化能力

Compounds	Sources	Free OH-substituents	TEAC (mM)
Flavonols			
Quercetin	Onion, apple skin, tea	3, 5, 7, 3', 4'	4.7±0.1
Kaempferol	Grapefruit, tea	3, 5, 7, 4'	1.34±0.08
Flavone			
Rutin	(Rutinoside of quercetin)	5, 7, 3', 4'	2.4±0.06
Luteolin	Lemon, olive, red pepper	5, 7, 3', 4'	2.1±0.05
Apigenin	Celery, parsley	5, 7, 4'	1.45±0.08
Flavanols			
Epicatechin	Black grapes	3, 5, 7, 3', 4'	2.5±0.02
Epigallocatechin	Tea	3, 5, 7, 3', 4', 5'	2.8±0.06
Epigallocatechin gallate	Tea	3, 5, 7, 3', 4', 5', 3'', 4'', 5''	4.8±0.06
Epicatechin gallate	Tea	3, 5, 7, 3', 4', 3'', 4'', 5''	4.9±0.02
Flavanones			
Naringenin	Peel of citrus fruit	5, 7, 4'	1.53±0.05

TEAC, trolox equivalent antioxidant activity, is defined as the concentration of trolox solution with equivalent antioxidant potential to a 1 mM concentration of the compound under investigation.

(摘自 Free Radical & Biological Medicine, 20, 933, 1996)

附表六、多酚類在人體之生物可獲得量

Bioavailability in humans of polyphenols consumed alone or in foods<sup>1</sup>

Polyphenol	Source	Quantity of polyphenol ingested	Maximum concentration in plasma	Excretion in urine	Reference
		mg	μM	%	
<b>Phenolic acids</b>					
Caffeic acid		1000		27	Jacobson et al. 1983
<b>Flavonols</b>					
Quercetin	Onion	68	0.74	1.39	Hollman et al. 1997
Quercetin	Apple	98	0.30	0.44	Hollman et al. 1997
Quercetin-4-O-rhamnoglucoside	Pure compound	202	0.30	0.35	Hollman et al. 1997
Quercetin-4-O-glucoside	Pure compound	144	3.2		Hollman et al. 1999
Quercetin	Onion	139	1.34	0.8	Aziz et al. 1998
Quercetin	Mixed black currant and apple juice, 1000 ml/d for 7 d	6.4		0.5	Young et al. 1999
<b>Catechins</b>					
Epigallocatechin gallate	Green tea infusion, 1.2 g	88	0.33	ND	Lee et al. 1995
Epigallocatechin		82	0.67	3.6	
Epicatechin gallate		33	ND	ND	
Epicatechin		32	0.27	6.2	
Epigallocatechin gallate	Green tea infusion, 5 g	105	0.13–0.31		Unno et al. 1996
Epigallocatechin gallate	Green tea infusion, 6 g		5.0		Maiani et al. 1997
Epigallocatechin gallate	Green tea extract	525	4.4		Nakagawa et al. 1997
Catechin	Red wine, 120 ml	34	0.072		Donovan et al. 1999
Catechin	Pure compound	500	2.0	0.45	Balant et al. 1979
<b>Isoflavones</b>					
Genistein	Soy milk	19	0.74	19.8	Xu et al. 1994
Daidzein		25	0.79	5.3	
Genistein	Soy proteins, 60 g/d for 1 mo	20		9.2	Cassidy et al. 1994
Daidzein		25		2.5	
Genistein	Soy proteins, 60 g/d for 28 d	80	0.50		Gooderham et al. 1996
Daidzein		36	0.91		
Genistein	Soy proteins, 20 g/d for 9 d	23		8.7	Karr et al. 1997
Daidzein		13		26	
<b>Flavanones</b>					
Naringin	Grapefruit juice, 120 ml	43	<4	8.8	Fuhr and Kummert 1995
Naringin	Grapefruit and orange juice, 1250 ml each	689		6.8	Ameer et al. 1996
Hesperidin		89		24.4	
Naringin	Pure compounds	500		4.9	Ameer et al. 1996
Hesperidin		500		3.0	
<b>Anthocyanins</b>					
Anthocyanins	Red wine, 300 ml	218		1.0–6.7	Lapidot et al. 1998

<sup>1</sup> Polyphenols, principally in the form of conjugated metabolites, as sulfate esters or glucuronides, in plasma and urine, were hydrolyzed by acid or enzymes before chromatographic or colorimetric analysis.  
ND, not detected.

(摘自 American Society for Nutritional Sciences, 2073S, 2000)

## 附表七、類黃酮物質抗氧化及抗動脈粥狀硬化的效用

Table 1. Antioxidative and antiatherosclerotic effects of flavonoids

Nutrient/flavonoid	Inhibitory effect (% of control)				Ref.
	LDL oxidative state	LDL oxidation (copper ion-induced)	LDL aggregation (vortexing)	Atherosclerotic lesion area	
Red wine:	49	43	50	48	[40,45]
Catechin	39	39	33	39	[45]
Quercetin	48	54	48	46	[45]
Liborice	54	68	29	35	[43]
Glabridin	51	37	25	30	[43,60]
Pomegranate juice	30	60	43	44	[29**]
Ginger (gingerol)	62	50	33	44	[27]

Control values are the following: LDL oxidative state,  $3.0 \pm 1.1$  nmol thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)/mg LDL protein; LDL oxidation (copper ion-induced),  $30 \pm 7$  nmol TBARS/mg LDL protein; LDL aggregation,  $0.45 \pm 0.04$  Optical Density at 680 nm; atherosclerosis lesion area,  $17\,000 \pm 1500 \mu\text{m}^2$ .

(摘自 Current Opinion in Lipidology, 12, 41, 2001)

## 第二部分

原兒茶酸或洛神花水萃取物對氧化型低密度脂蛋白處理之巨噬細胞的作用

胞的作用

## 目 錄

中文摘要 .....	67
英文摘要 (Abstract) .....	68
緒論 .....	70
研究目的 .....	78
實驗材料和方法 .....	79
VII. 化學試劑及藥品 .....	79
VIII. 細胞株培養 .....	79
IX. LDL 的抽取 .....	79
X. OxLDL 之製備 .....	79
XI. 細胞加入 OxLDL 後之存活情形 .....	80
XII. 細胞型態的變化 .....	80
XIII. Leukostat 染色法 .....	80
XIV. DNA 萃取與 agarose 電泳 .....	81
XV. TUNEL Assay .....	82
XVI. 蛋白質抽取及定量 .....	83
XVII. 蛋白質電泳 .....	83
XVIII. 西方墨點法 (Western Blotting)分析 PARP 蛋白 .....	83
XIX. caspase-3 蛋白質活性的測定 .....	84
XX. Migration assay .....	84
結果 .....	86
I. 細胞加入不同濃度之 CuSO <sub>4</sub> 在不同時間下誘發 OxLDL 後之存活情形 .....	86
洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的細胞死亡之影響 .....	86
II. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的細胞死亡之影響 .....	86
細胞加入不同濃度之 CuSO <sub>4</sub> 在不同時間下誘發 OxLDL 後細胞型態的變化 .....	87
洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的細胞型態改變之影響 .....	87
III. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的細胞型態改變之影響 .....	87
IV. 以 Leukostat 染色法判斷氧化型 LDL 所引起的細胞死亡是否為 apoptosis .....	87
V. 以洋菜膠電泳測定氧化型 LDL 所引起的細胞死亡應出現的 DNA 斷裂現象 .....	88
VI. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所造成之 DNA 斷裂之影響 .....	88
VII. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所造成之 DNA 斷裂之影響 .....	88
VIII. 西方墨點法 (Western Blotting)分析 PARP 蛋白 .....	88
IX. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所造成之 PARP 蛋白質的變化 .....	89
X. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所造成之 PARP 蛋白質的變化 .....	89
XI. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所造成之 Caspase-3 蛋白質活性的變 化 .....	89
XII. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所造成之 caspase-3 蛋白質活性的變化 .....	89
XIII. 洛神花水層粗萃取物與巨噬細胞/OxLDL 作用的相關性 .....	90
XIV. 原兒茶酸與巨噬細胞/OxLDL 作用的相關性 .....	90
XV. 洛神花中各種萃取物對 OxLDL 造成巨噬細胞死亡的影響 .....	90
討論 .....	92

參考文獻 .....	96
圖 .....	102
附圖 .....	121



## 中文摘要

由先前的研究中已經發現原兒茶酸 (PCA)和洛神花水萃取物 (HSE) 具有抑制 LDL 氧化的作用，因此在本實驗中我們將巨噬細胞共同處理原兒茶酸或洛神花水萃取物以及 100  $\mu\text{g/ml}$  氧化型 LDL (OxLDL)，藉此來觀察細胞的變化。在此，我們發現 OxLDL 會引起程度嚴重的細胞死亡，而此種死亡經過 Leukostat 染色及 DNA 片段化 (TUNEL assay) 的測試後，證實此種細胞死亡為程式性死亡 (apoptosis)。當處理不同劑量的 PCA 或 HSE，則發現細胞死亡的情形可隨著 PCA 或 HSE 的濃度增加而呈現良好的抑制，在 1.0 mM 的 PCA 或 0.5 mg/ml HSE 所處理的組別甚至可使細胞型態與控制組一致。而在 apoptosis 的指標測定包括 PARP 蛋白斷裂及 Caspase-3 蛋白活性，可發現 PCA 或 HSE 可依劑量增高而使 PARP 蛋白斷裂被抑制至 100% 或 93%；另外在 Caspase-3 蛋白活性的測定上，則發現 PCA 或 HSE 可抑制 74.2% 或 72.3%。另外，我們也利用 migration assay 發現不管是 PCA 或 HSE 除了可以直接抑制 OxLDL 的被巨噬細胞攝入之外，也可能與巨噬細胞自己有某種交互作用，藉此使巨噬細胞不因 OxLDL 的存在而死亡。在前人研究中指出巨噬細胞吞噬 OxLDL 後將可進一步將其分解，倘若細胞吞噬 OxLDL 後即死亡，將無法分解 OxLDL；且大量死亡的巨噬細胞可能加速脂肪條塊 (fatty streak) 的形成而演變為動脈粥狀瘤。由於這些結果，我們推測 PCA 或 HSE 應可保護巨噬細胞在攝入 OxLDL 後免於死亡，如此將可使細胞能充分分解 OxLDL，藉此將可減緩動脈粥狀硬化的進程而達到預防動脈粥狀硬化的作用。



## 英文摘要 (Abstract)

In our previous study, we found that protocatechuic acid (PCA) and the aqueous extract of *Hibiscus Sabdariffa* (HSE) possessed the abilities to inhibit LDL oxidation. Because of that, in this study, OxLDL was added to RAW264.7 macrophages to further investigate the effects of PCA or HSE. When treating with 100  $\mu\text{g/ml}$  OxLDL, the cell was induced severe death. Under the demonstrations of Leukostat stain and DNA fragmentation (TUNEL assay), we proved that the cell death was apoptosis. When co-treating with PCA or HSE, the apoptosis was able to reduce in a dose-dependent. At the concentration of 1.0 mM PCA or 0.5 mg/ml, the cell morphology showed almost same as the control. We further detect PARP protein cleavage and Caspase-3 activity to confirm the inhibitory effects of PCA or HSE on macrophage apoptosis. The levels of PARP protein cleavage was able to decrease to 100% by 1.0 mM PCA and 93% by 0.5 mg/ml HSE; and Caspase-3 activity was also inhibited by 74.2% or 72.3% when co-treating with 1.0 mM PCA or 0.5 mg/ml HSE. In migration assay, we found that the inhibitory effect of PCA or HSE attributed to reduce the uptake of OxLDL by macrophage, and some interactions between PCA/HSE and macrophage. Some researchers pointed that the OxLDL-laden macrophages possessed the ability to digest OxLDL. However, when macrophage uptaking too much OxLDL, they would die, and they would not digest OxLDL. Furthermore, the abundant death macrophages could accelerate the formation of fatty streak to process to atheroma. According to these results, we suggested that PCA or HSE was able to protect macrophage from dead when uptaking OxLDL; and

that could make macrophage to digest OxLDL and further decelerate atherosclerosis.

Under the circumstance, PCA and HSE were able to prevent atherosclerosis.

## 緒論

數十年來台灣社會變遷甚劇，經濟突飛猛進，已近邁入已開發國家之林。除了由農業社會步入工業時代不可避免的所謂 *sedentary life* 的增加外，隨著生活之富裕及麥當勞等速食店的入侵，國人的飲食習慣已漸趨向如歐美的高熱量、高膽固醇型態，而疾病型態也逐漸趨近於歐美西方國家，諸如動脈粥狀硬化、冠狀動脈疾病及高血壓等。而在國人的前十大死因中，心血管疾病相關者佔了近乎一半，且排名有逐年往上的趨勢，因此在預防醫學上必須投注更多的心力方可。雖然在台灣有關冠狀動脈心臟病盛行率之正式文獻報告不多，但各大醫院的臨床醫師皆觀察到了冠狀動脈心臟病病例之顯著增加，且年齡似乎亦有下降之趨勢。動脈硬化 (*arteriosclerosis*) 及動脈粥狀硬化 (*atherosclerosis*) 為腦血栓之主要病因，乃由於血管硬化管腔變窄而形成血栓 (*thrombosis*)。血管硬化是自然老化現象，其可因高血壓、糖尿病、血脂肪過高等加速形成。急性心肌梗塞在年輕人相當少見，但近年來則有增加的趨勢。除動脈硬化為主要原因外，冠狀動脈栓塞、Takayasu 式動脈炎及胸部挫傷皆為可能之病因。在西方國家，心血管疾病也是最主要的死因，而這個死因的始作俑者即為平滑肌細胞增生、白血球及胞外間質堆積所共同促成的動脈粥狀硬化。到底是什麼引發動脈粥狀損傷？數十年來科學家不斷提問也不斷的尋找原因。從流行病學的角度來看，可以得知動脈粥狀硬化的危險因子為年齡、性別、抽煙、缺乏運動、過重、高血壓、糖尿病、高血脂及高半胱氨酸 (*homocysteine*)(1-7)，這些可以經由改變飲食及生活習慣來改善。但是其機制仍需更深入探究。

動脈粥狀硬化 (*atherosclerosis*) 是一種脂質與發炎細胞的聚集並伴隨著平滑肌

細胞 (smooth muscle cell, SMC) 增生與細胞外間質液分泌 (extracellular matrix secretion) 所引起的細胞內膜纖維變性行為 (intimal fibrosis)。脂蛋白質中的 LDL 及 HDL 和動脈硬化有很強的相關性 (8)。動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 的發展過程中，最早期是單核細胞 (monocyte) 會向內皮的表面黏著 (adhesion)，這現象是由存在於白血球與內皮細胞的黏著分子 (adhesion molecules) 互相作用而形成的。單核細胞與內皮表面黏著之後，會移動到內皮下間隙 (subendothelial space)，在此分化長駐的巨噬細胞 (resident macrophage)。接著是低密度脂蛋白質 (LDL) 受到脂質的過氧化作用 (lipid peroxidation) 修飾成氧化型低密度脂蛋白質 (oxidized LDL, OxLDL)，而此 OxLDL 能為巨噬細胞的清道夫受體 (scavenger receptors) 所認識，內飲而形成巨噬泡沫細胞 (macrophage foam cell)(9-11)(附圖一)，泡沫細胞集中在脂肪條紋 (fatty streaks) 是粥狀硬化過程中最早可辨識的病灶。這脂肪條紋會緩慢的形成纖維斑 (fibrous plaque)，纖維斑的轉變是發生在當平滑肌細胞由血管中層移入血管內層時，其型態 (phenotype) 由收縮型轉變為合成型，而在內膜增生。在這些病灶中，大量的脂質持續的聚集在泡沫細胞，最後使細胞分裂，結果大量的細胞外脂質取代了正常的細胞與間質，而形成一個明顯的以脂質為核心，外環包圍著死亡巨噬細胞的粥狀瘤 (atheroma) 病灶。

動脈粥狀硬化為一種複雜的致病過程，由膽固醇、脂蛋白、脂質、血小板、結締組織與鈣質等沈積於動脈血管內膜 (intima)，牽涉眾多細胞參與而使動脈因斑塊 (plaque) 生成而增厚變狹的現象。其病理特徵可分為下列幾個階段來判斷：(1) 血管內膜增厚 (intimal thickening); (2) 脂肪斑塊 (fatty streak); (3) 中間病灶 (intermediate lesions); (4) 纖維性斑塊 (fibrous plaque); (5) 複雜性病灶 (complicated lesion)(12)。動脈粥狀

硬化的危險因子 (risk factors)包括血漿中膽固醇濃度過高、LDL 濃度高、HDL 濃度低、LDL 遭氧化修飾、高血壓、抽菸、喝酒、糖尿病、高濃度的半胱胺酸 (homocysteine) 等 (13)。

臨床上對動脈硬化症狀的診斷有以下四種現象來觀察 (14)：(1) 由於斑塊的生成 (脂肪堆積、結締組織生成)，而侵佔 (encroach)了血管腔的空間使血流受限；(2) 斑塊可能處於不穩定狀態而產生血栓 (thrombosis)，最後可能產生破裂致傷害末梢微血管；(3) 在不正常的動脈中可能於運動後產生不規律的血管搏動；(4) 血管中層 (media) 的萎縮或破壞而導致了血管瘤 (aneurysm) 的產生。流行病學調查顯示，人體血漿中低密度脂蛋白濃度與動脈粥狀硬化及其他相關心血管疾病的產生率呈正相關；而由分子與細胞學的角度來看，動脈粥狀硬化牽涉了包括內皮細胞功能失調(endothelial cell dysfunction)、單核細胞 (monocytes) 侵入並趨化為巨噬細胞 (macrophages)、平滑肌的移位 (migration) 與增生 (proliferation)；高膽固醇症 (hypercholesterolemia) 亦與動脈粥狀硬化的發生有密切關係 (15-17)。

動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 的致病機轉 (pathogenesis) 在近年來不斷被探討，關於動脈粥狀硬化的形成，學者曾提出許多假說，其中最重要的兩個為：

#### **(i) 損傷反應假說 (Response to injury hypothesis)**

此為 Ross 在 1986 與 1993 年 (13, 17)所提出修正後之假說，強調內皮細胞功能失調，致使細胞做出急性與慢性的發炎反應以作為保護。造成內皮細胞損傷的原因可能有：物理性傷害 (如血管分支處的擾流、氣球擴張術)、化學性傷害 (如抽煙、自由基攻擊)、與曝露於致毒性物質 (如 OxLDL)，受到損傷的內皮細胞會在表面分泌一種黏附性的糖蛋白 (adhesive glycoprotein)，此種蛋白質會與血液循環中的單核細胞

(monocytes) 及 T-淋巴球 (T-lymphocytes) 上的特殊受體做作結合。此時內皮細胞、單核細胞與 T-淋巴球均會分泌許多黏附分子 (包括 E-elastin、P-selectin、VCAM-1、ICAM-1 等)，而內皮細胞與平滑肌細胞 (smooth muscle cells) 則亦分泌一些趨化物質 (chemoattractants)，如單核細胞化學誘引蛋白-1 (monocyte chemotactic protein; MCP-1)、血小板誘導生長因子 (platelet-derived growth factor; PDGF) 與群落刺激因子 (colony-stimulating factors; CSFs) 等，而加速各細胞間進行黏附與移位至血管內膜 (intima)。在血管內膜，單核細胞由於一些生長因子與細胞激素 (cytokines) 的作用而活化為巨噬細胞 (macrophages)，最後將某些經修飾的脂質 (特別是 OxLDL) 吞噬，並分泌黏附因子促使更多的單核細胞移入血管內膜 (13, 17)。由於以下的過程，導致了血管內膜早期動脈粥狀硬化斑塊的產生：

- (a) 局部動脈內膜移位與增生，且巨噬細胞、T-淋巴球與平滑肌細胞在此聚集 (accumulation)。
- (b) 結締組織生成，如 elastin fiber protein、collagen 與 proteoglycans。
- (c) 巨噬細胞與平滑肌細胞內大量脂質堆積而形成泡細胞 (foam cells)。

參與動脈粥狀硬化的內皮細胞與各生長因子、細胞激素的作用模式見附圖二。

### **(ii) 氧化假說 (oxidation hypothesis)**

這個假說乃針對 OxLDL 在動脈粥狀硬化中究竟扮演何種角色而提出，許多的證據顯示了 OxLDL 的確具有關鍵的決定性因素 (15-16, 18-25)。以下即為 OxLDL 的幾項特色：

- (a) MM-LDL 可促進白血球 (leukocytes) 與內皮細胞兩者間的黏附作用 (adhesion)，並可刺激內皮細胞分泌 MCP-1 (macrophage colony-stimulating factor (M-CSF))。

- (b) MM—LDL 可使單核細胞由循環中藉由趨化物質 (chemoattractant)之分泌而與內皮細胞結合，並移至內皮下方空間 (subendothelial space)，在發展中的病灶內扮演一種不斷補充 (recruitment)的角色。
- (c) OxLDL 為單核細胞的趨化物質，且可限制巨噬細胞的移動性，使其繼續留在動脈血管壁中而不回到血液循環。
- (d) OxLDL 具細胞毒殺性 (cytotoxic)，會使內皮細胞的功能失調與促使脂肪斑塊成為進一步的病害。
- (e) OxLDL 會改變動脈血管壁中其他基因的表現，如促使 interleukin-1 (IL-1) 由巨噬細胞中分泌，而 IL-1b 即可誘使平滑肌細胞增生與內皮細胞-白血球的黏附作用。
- (f) OxLDL 含影響凝血機制，如刺激 plasminogen activator inhibitor-1 的合成、減低 tumor necrosis factor(TNF)與 platelet—derived growth factor (PDGF)的表現，而使血小板的凝集作用增強。
- (g) OxLDL 會抑制由 endothelium-derived relaxation factor (EDRF) 所維持的冠狀血管舒張作用 (coronary vasodilation)，而使動脈血壓升高。
- (h) OxLDL 具有致免疫性 (immunogenicity)，可促使自體抗體 (autoantibodies) 的合成，而 Ox-LDL 所形成的免疫複體可有效地被巨噬細胞以 Fc receptor 的途徑進行 internalization。

目前已證實 OxLDL 較 native LDL 更加有致動脈粥狀硬化的能力，且亦有以下的證據顯示 OxLDL 存在活體中 (in vivo) 是確與動脈粥狀硬化有關：

- (a) OxLDL 在人類與 WHHL 兔的動脈粥狀硬化病灶中均被發現，而由此得到之 OxLDL 可由其物理性質 (如電泳中之泳動度) 與清除受體 (scavenger receptor) 之作用得

到確認。

- (b) 利用免疫組織化學法 (immunohistochemistry)，藉抗體可對 OxLDL 上特殊的抗原決定基 (epitope) 進行專一性的結合，亦認定 OxLDL 存在病灶與血液中。而此抗體可辨識病灶中的 OxLDL 而無法辨識動脈血管中正常的 LDL。
- (c) 在人類與兔子血清中均可找到 OxLDL 的自體抗體 (autoantibodies)
- (d) 由人類動脈粥狀硬化病害中所取得的 OxLDL，其不論在免疫、物化與生物性質方面均與體外實驗所得之 OxLDL 相似，如利用對 MDA-lysine 具專一性辨識的抗體可與體內所得之 OxLDL 作用。
- (e) 利用口服抗氧化劑所進行的動物實驗，如 probucol、 $\alpha$ -tocopherol、butylated hydroxytoluene (BHT) 與 N,N'-diphenyl 1,4-phenylenediamine (DPPD) 等，在兔子、倉鼠 (hamsters)、小鼠與非人類的靈長類動物中均可使動脈粥狀硬化的進展減緩，甚至有回復 (regression) 的現象。

動脈粥狀硬化可依不同的進展程度與病害狀況分為諸多階段 (26)，發生動脈粥狀硬化的關鍵位置為血管內膜，牽涉了脂肪條塊與斑塊的生成 (27)(附圖三)。早期的動脈粥狀硬化為泡細胞的生成，此與前述 LDL 的氧化、移入血管內膜、被攝入巨噬細胞及單核細胞的活化有關；巨噬細胞在表現了清除受體攝入大量 OxLDL 後，無法再對細胞內的膽固醇進行調控並維持恆定，會進一步刺激活性氧的產生，促使更多初移入血管內膜的 MM-LDL 被氧化成 OxLDL，在此惡性循環下使大量的泡細胞產生。大量的泡細胞堆積促使細胞激素與生長因子快速產生，誘使平滑肌細胞向血管腔的方向移位與增生，此即為進一步的動脈粥狀硬化病灶 (advanced lesion)，在定義上稱為 type IV lesion。此時血管腔因動脈粥狀瘤 (atheroma) 的產生而變狹，且因結締組織的增生而



使動脈粥狀瘤纖維化甚至鈣化 (calcification)，又由於血小板黏附且凝集，動脈便可能發生血栓現象 (thrombosis)。依動脈粥狀硬化的進展時期，可針對不同階段而發展的抑制劑使動脈粥狀硬化受到控制，如附圖四 (18)。針對抑制 LDL 過氧化所發展的抗氧化劑，可有效預防早期泡細胞的產生，為目前治療動脈粥狀硬化的一個主要方向。

人類動脈粥狀硬化的發展期很長，臨床診斷需要長時間的觀察，因此許多學者以動物模式來進行研究。然而在探討 OxLDL 與動脈粥狀硬化的機轉上，則多以細胞模式來進行探討。動脈粥狀硬化的過程中，最初產生的 OxLDL 會促使單核球轉形為巨噬細胞以利吞噬 OxLDL，而這些吞噬了 OxLDL 的巨噬細胞會促使細胞激素與生長因子快速產生，誘使平滑肌細胞向血管腔的方向移位與增生而逐漸形成動脈粥狀硬化的病灶。因此 (1) 單核球轉形為巨噬細胞；(2) 巨噬細胞吞噬 OxLDL 及 (3) 平滑肌細胞的移位與增生等三種過程便成為科學家在找尋抑制動脈粥狀硬化機轉上最常著眼之處。目前應用於探討動脈粥狀硬化致病機轉的細胞模式大致如下：

- (i) 由老鼠的主動脈管壁上分離出單核球，再以 OxLDL 給予刺激使其趨化為巨噬細胞，因為單核球-巨噬細胞的趨化作用在動脈粥狀硬化形成的整個過程中皆存在 (28, 29)，在脂肪條塊形成時，單核球會旋轉 (rolling) 並黏著到血管內皮細胞，這種作用可以被一些細胞激素如 monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 及 interleukin-8 (IL-8) 所媒介 (30)，因此以單核球為模式觀察其趨化為巨噬細胞的過程可有效了解動脈粥狀硬化早其所發生的事件。
- (ii) 利用來自動物的巨噬細胞細胞株如 J774A.1 (murine)，THP-1 (human), RAW 264.7 (murine) cells 直接給予 OxLDL 以觀察其作用，Atsumi 等人 (31)在 2000

年曾做過研究指出當 RAW 264.7 cells 暴露於 OxLDL 中，會誘使 migration inhibitory factor (MIF) mRNA 大量表達，而這種結果將促使 OxLDL 大量被攝入以加速 OxLDL 的降解，但若降解速率緩慢，這種現象將導致動脈粥狀硬化的產生；DeVries 等人以 OxLDL 加入 RAW 264.7 細胞中，結果發現其代謝速率加劇 (32)；而在 OxLDL 對 RAW 264.7 細胞的作用機轉中，Kim 等人則發現 Small heterodimer partner (SHP, 一種較少見的 nuclear receptor) 大量表達於正常態的 RAW 264.7 細胞中，可以當作 nuclear factor- $\kappa$ B 的 transcription coactivator，細胞以 OxLDL 給予後，可以發現 SHP 減少，作者推測這可能是 OxLDL 對 RAW 264.7 細胞的作用機轉之一 (33)。

- (iii) 在動脈粥狀硬化的生成過程中，許多科學家觀察到平滑肌細胞會出現大量增生並且移行到血管內膜。Ivanov 指出以抗壞血酸 (ascorbic acid) 加入分離自 guinea pigs 主動脈的平滑肌細胞中，結果證實抗壞血酸會以 dose-dependent 的現象誘發某種未知的抑制物合成及分泌而使平滑肌細胞的增生受到抑制，作者推測此種抑制物可能是一種來自胞外間質的蛋白並可能為結合到 hyaluronic acid 上，而他們也致力於分離此種蛋白以釐清其作用。而平滑肌細胞在動脈粥狀硬化的早期會出現增生的現象，因此亦有許多科學家在有關動脈粥狀硬化的研究上是利用藥物抑制平滑肌細胞增生以達到預防動脈粥狀硬化的目的。另外，Mayr (34) 也指出血管平滑肌細胞在動脈粥狀硬化的過程中，其受到 OxLDL 所誘發的程序性死亡 (apoptosis)，是一種血管傷害的重要因素。

## 研究目的

由先前的研究中已經發現原兒茶酸 (PCA)和洛神花水萃取物 (HSE) 對於氧化型 LDL 所表現的負電荷增加 (lipogel electrophoresis)、脂肪酸氧化 (TBARS)、及 ApoB 片段化有抑制的作用，因此在本實驗中我們要進一步以巨噬細胞為實驗模式，處理原兒茶酸或洛神花水萃取物後，再加入 OxLDL，藉此來觀察細胞的變化。我們將先在試管中加入不同劑量的 PCA 或 HSE，隨即加入 OxLDL，共同培養後進行觀察，藉此以測定 PCA 與 HSE 除了在試管中具有抗 LDL 氧化的能力外，是否在巨噬細胞中亦能表現此種特性？若 PCA 與 HSE 在巨噬細胞中表現了抗 LDL 氧化的能力，對細胞本身的影響為何？而此種影響又有何生理意義？這些都是在此部份實驗中我們將探討的重點。

## 實驗材料和方法

### XVI. 化學試劑及藥品

Tris-base, ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), sodium hydroxide, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), sodium chloride, sodium citrate, bovine serum albumin, Triton X-100, paraformaldehyde 皆購自美國 Sigma Chemical Co. ; RPMI 1640, Trypsin, Penicillin-Streptomycin mixed antibiotics, L-Glutamine, phosphate buffer solution (PBS)皆購自美國 Gibco Co. ; TUNEL assay kit (In situ cell death detection kit, TMR red) 購自德國 Roche Co.

### 細胞株培養

來自 male BALB/c mouse 之 RAW264.7 巨噬細胞購自於食品工業研究所，培養於 RPMI 1640 培養基 (含 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin 及 100 µg/ml streptomycin)，培養箱維持於 5% CO<sub>2</sub> 及 37°C 恆溫，每週繼代培養 2-3 次，自購買代數算起繼代培養 20 次後即更換低代數細胞繼續實驗以維持細胞的穩定性，每次實驗前計算細胞密度為  $4 \times 10^5$ /ml 以進行所有之測試，在加藥反應的期間必須使用無脂蛋白的培養基，本研究之所有實驗均使用 D-MEM/F12 培養基 (不含胎牛血清，僅含 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin 及 100 µg/ml streptomycin)。

### XVII. LDL 的抽取

同前述

### XVIII. OxLDL 之製備

將最終濃度為 0.5 mg/ml 的 LDL 加入 CuSO<sub>4</sub> 於 37°C 下反應 20 小時後，通過

PD-10 column 以去除多餘的銅離子，再以 0.45  $\mu\text{m}$  的過濾膜過濾後使 OxLDL 成無菌狀態備用。OxLDL 必須立即使用。

### **XIX. 細胞加入 OxLDL 後之存活情形**

將 RAW cell 依上述密度種入培養皿中，待貼壁 6 小時後更換培養基為 D-MEM/F12，再加入 OxLDL 至細胞中 (OxLDL 終濃度為 100  $\mu\text{g/ml}$ ，乃是以終濃度 1, 5, 10  $\mu\text{M}$  的  $\text{CuSO}_4$  誘發之不同氧化程度的 OxLDL)，分別培養 0、3、6、9、12、24 小時，再以 MTT 的方法測定細胞的存活。此細胞存活率分析係根據 alley 等之方法 (35)，其原理為存活的細胞能將 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-z-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)(tetrazolium salt) 經由粒線體中 dehydrogenase 作用代謝還原成 Formazan Crystal，來測其細胞存活。實驗方法是在進行上述時間的培養結束後，除去培養基，以 PBS 清洗一次後，加入新培養基與 100  $\mu\text{l}$  MTT (5 mg/ml，終濃度為 0.5 mg/ml) 作用四小時後，移去上清液再以 PBS 清洗一次，之後加入 1 ml isopropranol，將 formazan 溶解，於光波長 563 nm 下測定吸光值，由控制組與實驗組比較觀察細胞存活狀態。

### **細胞型態的變化**

細胞型態的觀察乃是依上述的細胞處理方式培養後，分別在不同時間於倒立顯微鏡 (Nikon, DIAPHOT 300) 觀察並拍照，觀察試劑處理細胞的型態。

### **XX. Leukostat 染色法**

在細胞進行 apoptosis 時，會出現一些特有的型態變化如：染色質濃縮及邊緣化 (chromatin condensation and margination)、DNA 斷裂 (DNA fragmentation)、細胞皺縮 (cell shrink)、與鄰近細胞脫離 (detach from neighboring cells) 並出現細胞

膜起泡 (membrane blebbing) 的現象，最後會引起凋亡體 (apoptosis bodies) 的形成，這個過程與細胞壞死 (cell necrosis) 相當不同，但是在細胞壞死之後有時也會出現凋亡體，因此在判定的過程可以使用 Leukostat 染色法來區分。在 Leukostat 染色法的結果中，正常細胞會出現完整細胞樣 (細胞核及細胞質皆非常清楚)；apoptosis 細胞則較少細胞質，反而看到明顯的細胞核濃染的現象；而壞死細胞只會出現很淺的細胞影像 (ghost)。本實驗之方法為細胞經過試劑處理特定時間後，以 PBS 清洗一次，然後以固定液 (含 2 mg/ml malachite green, 溶於 methanol 中) 固定 10 秒，吸乾固定液並將細胞風乾後，加入染細胞質的第一種染劑 (含 0.1% eosin Y; 0.1% formaldehyde; 0.4% sodium phosphate dibasic; 0.5% potassium phosphate monobasic) 染 10 秒，在衛生紙上扣乾後，再加入第二種染劑 (含 0.04% methylene blue; 0.04% azure A; 0.5% potassium phosphate monobasic) 再染 10 秒，隨即沖洗多餘的染劑並風乾即可觀察。

## **XXI. DNA 萃取與 agarose 電泳**

將細胞依前述條件培養後去除培養基，以 PBS 清洗 2 次，另外加 1 ml PBS 刮取並收集細胞，在 3000 rpm, 4°C 下離心 10 分鐘，去除上清液後加入 lysis buffer (20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 1% NP-40; 每  $10^6$  個細胞加入 10  $\mu$ l, 若不足  $5 \times 10^6$  個細胞則必須加入 50  $\mu$ l)，靜置 10 分鐘待其完全溶解，在 12000 rpm, 4°C 下離心 5 分鐘，取上清液後加入 SDS (final concentration: 1%) 及 RNase A (final concentration: 5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 後在 56°C 下反應 2 小時，其後再加入 proteinase K (final concentration: 2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 在 37°C 下反應 2 小時或至隔夜。接著是加入 1/2 溶液體積的 3M sodium acetate (pH5.2) 及 2.5 倍溶液體積的 ethanol，置入 -20°C 冰箱

1 小時，在 15000 rpm, 4°C 下離心 15 分鐘，去除上清液後加入滅菌水溶解沉澱，其後即可加入適量的 loading buffer 以進行電泳 (36)。洋菜膠電泳的配膠濃度為 1.5%。

## XXII. TUNEL Assay

大多數的細胞程序性死亡過程中，DNA 會被切斷成 200 kb 或 50 kb 的大分子量片段，這些片段並無法以單純的洋菜膠電泳觀察到 DNA ladder，因此其他偵測大片段 DNA 斷裂片的方式必須被應用。TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick-end labeling) 乃是一種 in situ 的偵測 DNA 斷裂片的方法 (37)。原理是當出現 DNA 斷裂片時，可能會出現雙股及單股的 DNA 片段，這兩種形式的片段皆可用修飾過的核苷酸 (modified nucleotides，如 biotin-dUTP, DIG-dUTP 或 fluorescein-dUTP) 結合在 DNA 斷裂片的游離 3'-OH 端以得到偵測 DNA 裂片的目的，而這種修飾過的核苷酸結合到 DNA 斷裂片的過程必須在 terminal deoxynucleotide transferase 的催化下方可進行。實驗方法為將細胞培養於 8-well chamber slide 中，密度為  $4 \times 10^5$ /ml，每一 well 種入 125  $\mu$ l，在與前述相同最終濃度的試劑加入處理後，以 PBS 清洗 2 次後加入新鮮配置之固定液 (2% paraformaldehyde in PBS, pH7.4) 於室溫下反應 1 小時，之後再以 PBS 清洗一次後放入 permeabilisation solution (0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate) 置於冰上反應 2 分鐘，去除 permeabilisation solution 後再以 PBS 清洗二次後再置入 TUNEL reaction mixture (terminal deoxynucleotidyl transferase from calf thymus (EC 2.7.7.31) in storage buffer, nucleotide mixture)，將 chamber slide 放入可保濕的盒子中再置入 37°C 預熱過的 incubation oven 中避光反應 1 小時，其後

再以 blocking buffer (0.1 % Triton X-100, 0.5 % bovine serum albumin in PBS) 清洗 3 次後在螢光顯微鏡 (Nikon, ECLIPSE, TE300) 下觀察。

### **XXIII. 蛋白質抽取及定量**

細胞經過處理後以 PBS 清洗並刮取，在 4°C 下離心 1500 rpm 後，置於 buffer 中 (20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.03 mM sodium orthovanadate, 2 mM EDTA, 2 mM magnesium chloride, 1 mM DTT, 250 mM sucrose, 2 mM PMSF 及 10 µg/ml leupeptin) 以震盪器震動 1 小時，在 800rpm 下離心 10 分鐘，取上清液後作蛋白質定量。此法乃利用蛋白質可與 Commassie Brilliant blue G-250 形成藍色的複合物，而這個藍色的複合物在 595 nm 有一個較大吸光值的原理來測定。首先製備以 BSA (Bovine Serum Albumin) 為標準液的蛋白質溶液數個濃度，做出標準曲線後再以此換算各個樣本的蛋白質濃度。

### **XXIV. 蛋白質電泳**

取總蛋白 50µg，加入 5 倍之 protein loading buffer 混合均勻，loading 至 5% stacking gel / 8% separating gel SDS-PAGE，進行電泳。

### **XXV. 西方墨點法 (Western Blotting) 分析 PARP 蛋白**

電泳完成後，以 4°C、100 mA 轉移蛋白至 NC membrane，16 小時後，將 membrane 浸入含 5% 脫脂奶粉之 TBS-T 緩衝液內，於 4°C 至少搖動 6 小時，加入一次抗體 (PARP) 於 4°C 作用 3 小時以上，再以 TBS-T 清洗三次，每次各 10 分鐘，後與二次抗體 (0.2 µg/ml) 反應 1 小時後，以 TBS-T 清洗三次，每次 10 分鐘，最後將 membrane 置入高透明度之塑膠袋中，加入 enhanced chemiluminescence substrate，進行反應 1 分鐘後，放至壓片匣中以 X-ray film 曝光後加入顯影劑顯影。(註: TBS-T



buffer 為 Tris-base 20 mM, NaCl 138 mM, Tween-20 0.1%)

## XXVI. Caspase-3 activity 的測定

當細胞發生計劃性的自然凋亡，常伴隨著 Caspase-3 活性的增高。測定 Caspase-3 活性，以反映出細胞 apoptosis 的狀況。本組 kit 利用 Caspase-3 具有切割蛋白的能力，當其受質經 Caspase-3 作用切割反應後將產生某一特定的吸光值，偵測此一吸光值的變化即可得知 Caspase-3 的活性。實驗方法為將細胞培養後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，PBS 沖洗後，以 1000 rpm 離心 5 分鐘，取沉澱細胞，加培養基使細胞懸浮，將細胞濃度調整成  $4 \times 10^5$ /ml，培養於 10 公分培養皿中。待細胞貼壁，更新培養基，同時依實驗需要加入試劑。培養 24 小時後以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，PBS 沖洗後以 1000 rpm 離心 5 分鐘，取沉澱細胞，加冰的 lysis buffer 於冰上震盪 10 分鐘後，以 10000 g 離心 1 分鐘。取上層液，並測定蛋白濃度，調整濃度至 1mg/ml。將以上製備好的 sample 取 12.5  $\mu$ l 加上等量的 reaction buffer (內含 10mM DTT)，再加 1.25 $\mu$ l 之 4mM DEVD-pMA substrate，於 37°C 下避光反應 1.5-2 小時，最後以波長 405nm 測定吸光值。

## XXVII. Migration assay

將 LDL 及 CuSO<sub>4</sub> 共同培養 20 小時後，過 PD-10 column 及 0.45  $\mu$ m filter 以得到無菌的 OxLDL，將洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸與 OxLDL 加在 48-well chemotaxis chamber (Neuro Probe, Inc) 的下層，蓋上 polycarbonate membrane (8  $\mu$ m, Neuro Probe, Inc)，小心的將 chamber 的上層與下層鎖緊，之後再將  $2 \times 10^5$  個細胞注入上層，在 37°C 下培養 4 小時後，將 membrane 取出，先以甲醇固定 8 分鐘，待甲醇揮發殆盡，再置入 Giemsa (Sigma Co.) 染劑中染色 1 小時後，將上

層殘留的細胞擦拭乾淨，在光學顯微鏡下數下層已移行的細胞數。另外我們也將 OxLDL 加在 chamber 的下層，洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸則與細胞共同加於上層，藉此觀察洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸與 OxLDL 的作用對細胞影響較強，抑或直接與細胞的作用影響較強。

## 結果

### XXVIII. 細胞加入不同濃度之 $\text{CuSO}_4$ 在不同時間下誘發 OxLDL 後之存活情形

RAW 264.7 cell 加入不同濃度包括 1, 5, 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  所誘發的 OxLDL (終濃度為 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 後分別培養 0、3、6、9、12、24 小時，在 MTT 的測定下可以發現細胞存活的情形。由圖一結果顯示 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  所誘發的 OxLDL 在 12 小時後會使細胞逐漸死亡，而 5  $\mu\text{M}$  及 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  所誘發的 OxLDL 則是在 9 小時後會使細胞逐漸死亡，而誘發死亡的速率則隨著 OxLDL 的氧化程度呈現 dose-dependent 的現象，但不論是哪一種氧化程度的 OxLDL 皆會使細胞在 24 小時全數死亡。在此，我們由結果決定以 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  誘發之 OxLDL 加入細胞培養 15 小時來進行接下來的實驗。

### 處理洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的細胞死亡之影響

RAW 264.7 cell 處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，後隨即加入 OxLDL 共同培養 15 小時，在 MTT 的測定下可以發現洛神花水層粗萃取物在濃度越高的情況之下對細胞死亡的抑制作用越強，且呈現 dose-dependent 的現象，在最高濃度處理下可將細胞死亡的情形抑制為控制組 (只有 LDL 的組別) 的 100%。(圖二)

### XXIX. 處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的細胞死亡之影響

RAW 264.7 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，後隨即加入 OxLDL 共同培養 15 小時，在 MTT 的測定下可以發現原兒茶酸也同樣的在濃度越高的情況之下對細胞死亡的抑制作用越強，且呈現 dose-dependent 的現象，在最高濃度處理下可將細胞死亡的情形抑制為控制組的 95%。(圖三)

### 細胞加入不同濃度 $\text{CuSO}_4$ 誘發之 OxLDL 在不同時間下觀察細胞型態的變化

RAW 264.7 cell 加入 1, 5, 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  所誘發的 OxLDL (終濃度為 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 後分別培養 0、3、6、9、12、24 小時，在倒立顯微鏡觀察細胞型態的變化，可以發現  $\text{CuSO}_4$  的濃度越高及培養時間越久，細胞的型態出現越明顯的改變，包括細胞質變少、細胞核愈趨明顯且邊緣化以及細胞膜出現類似 apoptosis body 的型態。

(圖四)

### 處理洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的細胞型態改變之影響

RAW 264.7 cell 處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，隨即加入 OxLDL 共同培養 15 小時，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處理的洛神花水層粗萃取物所抑制，且呈現 dose-dependent 的現象，在濃度高於 0.5 mg/ml 的情況下可將細胞死亡的情形抑制為與控制組幾乎一致。(圖五)

### XXX. 處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的細胞型態改變之影響

RAW 264.7 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，隨即加入 OxLDL 共同培養 15 小時，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原兒茶酸所抑制，在濃度為 1.0 mM 的情況下可將細胞死亡的情形抑制為與控制組幾乎一致。(圖六)

### XXXI. 以 Leukostat 染色法判斷氧化型 LDL 所引起的細胞死亡是否為 apoptosis

RAW 264.7 cell 加入不同濃度  $\text{CuSO}_4$  所誘發的 OxLDL (終濃度為 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 後培養 12 小時，以 Leukostat 染色法觀察細胞的形態及細胞核。由圖七結果顯示當加入 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  所誘發之 OxLDL 時，細胞會出現細胞質減少及核濃染的 apoptosis

現象；當加入 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  所誘發之 OxLDL 時，細胞所出現的 apoptosis 現象愈趨明顯；當加入 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  所誘發之 OxLDL 時，細胞則除了 apoptosis 的現象外，尚會出現少量壞死細胞所會顯現的 ghost 現象。

#### **XXXII. 以洋菜膠電泳測定氧化型 LDL 所引起的細胞死亡應出現的 DNA 斷裂現象**

RAW 264.7 cell 加入不同濃度包括 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  所誘發的 OxLDL (終濃度為 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 後培養 12 小時，在洋菜膠電泳的測定下發現氧化型 LDL 所引起的細胞死亡並無法出現小片段的 DNA 斷裂現象 (圖八)。

#### **XXXIII. 處理洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所造成之 DNA 斷裂之影響**

由於大多數的細胞程序性死亡過程中，DNA 會被切斷成 200 kb 或 50 kb 的大分子量片段，這些片段並無法以單純的洋菜膠電泳觀察到 DNA ladder，因此我們使用 TUNEL assay 大片段 DNA 斷裂片是否出現？而在洛神花水層粗萃取物的存在下對其影響又為何？在改以 TUNEL assay 進行 in situ 的測試後，結果在圖九中發現當細胞死亡的時候 (C 圖)，我們可以觀察到明顯的紅色 TMR red 螢光，而在濃度 0.5 mg/ml 的情況下可將細胞死亡的情形抑制得極為明顯。

#### **XXXIV. 處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所造成之 DNA 斷裂之影響**

在原兒茶酸的存在下對細胞影響又為何？同樣以 TUNEL assay 進行 in situ 測試，結果在圖十中發現當原兒茶酸濃度為 1.0 mM 時，對細胞死亡的情形抑制得與控制組幾乎一致。

#### **XXXV. 西方墨點法 (Western Blotting) 分析 PARP 蛋白**

RAW 264.7 cell 加入不同濃度包括 1, 5, 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (終濃度) 所誘發的 OxLDL (終濃度為 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 後分別培養 0、6、12、24 小時，在 PARP 蛋白的表現上可

以發現在 24 小時的時間點，PARP 蛋白由 110 kDa 斷裂為 85 及 25 kDa 的情形最為嚴重，由此推測 PARP 蛋白的斷裂應發生於 12 到 24 小時之間 (圖十一)。

#### **XXXVI. 處理洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所造成之 PARP 蛋白的變化**

RAW 264.7 cell 處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，再加入 OxLDL 後共同培養 15 小時，結果顯示 OxLDL 所誘發的 PARP 蛋白斷裂的情形可以在處理洛神花水萃取物後得到改善。在濃度為 0.5 mg/ml 時，PARP 蛋白斷裂的現象約可以回復 93% (相較於只處理 LDL 的組別)。(圖十二)

#### **XXXVII. 處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所造成之 PARP 蛋白的變化**

RAW 264.7 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，再加入 OxLDL 共同培養 15 小時，結果顯示氧化型 LDL 所誘發的 PARP 蛋白斷裂的情形可以在處理原兒茶酸後得到改善並呈現 dose-dependent 的現象。在濃度為 0.5 mM 時，PARP 蛋白斷裂的現象已約可以回復 100% (相較於只處理 LDL 的組別)。(圖十三)

#### **XXXVIII. 處理洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所造成之 Caspase-3 蛋白活性的變化**

RAW 264.7 cell 處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，再加入 OxLDL 後共同培養 15 小時，結果顯示 OxLDL 所誘發的 caspase-3 活性增加的情形可以在處理洛神花水萃取物後得到改善。在濃度為 0.5 mg/ml 時，caspase-3 活性約可以下降 72.3% (相較於只處理 LDL 的組別)。(圖十四)

#### **XXXIX. 處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所造成之 caspase-3 蛋白活性的變化**

RAW 264.7 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，再加入

OxLDL 培養 15 小時，結果顯示氧化型 LDL 所誘發的 caspase-3 活性增加的情形可以在處理原兒茶酸後得到改善並呈現 dose-dependent 的現象。在濃度為 0.5 mM 時，caspase-3 活性已約可以下降 74.2% (相較於只處理 LDL 的組別)。(圖十五)

#### **XL. 洛神花水層粗萃取物與巨噬細胞/OxLDL 作用的相關性**

由圖十六的結果得知當 OxLDL 置於 transwell chamber 的下層而細胞置於上層時，經培養 4 小時後，巨噬細胞會出現 migration 的現象以趨向 OxLDL，而洛神花水萃取物與細胞共同存在時對於細胞吞噬 OxLDL 的效果比之於洛神花水萃取物與 OxLDL 共存時的效果明顯，我們藉此推測洛神花水萃取物除了可以直接抑制 OxLDL 的量之外，它也可能與巨噬細胞有某種交互作用，藉此使 OxLDL 的量減少並使巨噬細胞不因 OxLDL 的存在而死亡，而洛神花水萃取物與巨噬細胞之間的交互作用為何？則是我們將進一步探討的範疇。

#### **XLI. 原兒茶酸與巨噬細胞/OxLDL 作用的相關性**

圖十七的結果與洛神花水萃取物的結果極為相近，因此我們也推想原兒茶酸也應該是除了可以直接抑制 OxLDL 的量之外，可能也與巨噬細胞有某種交互作用，而這些我們都將進一步探討。

#### **XLII. 洛神花中各種萃取物對 OxLDL 造成巨噬細胞死亡的影響**

因為洛神花水萃取物中所含有效抗氧化成分甚多，因此我們以原兒茶酸 (PCA)、多酚酸萃取物 (polyphenolic extracts, PHE) 及花青素萃取物 (anthocyanins extracts, ACE) 分別測定其在 OxLDL 所引起的細胞死亡中的抑制作用。結果發現 PHE 之  $IC_{50}=0.0335\text{mg/ml}$ ；PCA 之  $IC_{50}=0.037\text{mg/ml}$ ；ACE 之  $IC_{50}=0.0513\text{mg/ml}$ ，證實洛神花水萃取物中的有效成分確實在抑制 OxLDL 所引起的細胞死亡中扮演重要的

角色 (圖十八)。IC50 的計算乃是以 OxLDL 為基準點，與加藥後抑制細胞死亡百分比最高的藥物濃度所形成的線性關係換算而得。



## 討論

RAW 264.7 細胞在先前的研究中多為探討暴露於活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 中細胞的變化；或是以 lipopolysaccharide (LPS) 誘發 NO 產生所引起的細胞改變。在 2001 年，Cho 等人 (38) 預先處理類黃酮類物質，再以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加入細胞以誘發活性氧，結果發現對於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所誘發自由基對細胞造成之 proinflammatory cytokines interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 及 interleukin-2 (IL-2) 的基因表達增加，類黃酮類物質具有 dose-dependent 的抑制作用，而其抑制的作用位置是在於阻斷 IL-1 $\beta$  及 IL-2 的轉錄因子 nuclear factor kappaB (NF-kappaB) 及 activator protein-1 (AP-1) 的活化，以致於可以達到保護細胞的作用。另外在 2001 年，Ishii 等人 (39) 亦曾指出以 LPS 誘發 inducible NO synthase (iNOS) 增加而產生 NO，phloroglucinol derivatives 這些抗氧化劑預先處理後可以抑制 iNOS 蛋白及 mRNA 的表達，當然 NO 的產生也會受到抑制。而在以 RAW264.7 細胞探討巨噬細胞在動脈粥狀硬化角色的研究中，OxLDL 是最常被用來加入細胞的一種，因為巨噬細胞在動脈粥狀硬化的早期即會倚賴其清道夫接受器 (scavenger receptor) 吞噬 OxLDL (40)，至於吞噬 OxLDL 後對巨噬細胞的影響則與 OxLDL 的濃度有關，在 2001 年 Hundal 等人 (41) 曾提出處理 50  $\mu$ g/ml 以下的 OxLDL 會使巨噬細胞增生，而高於 100  $\mu$ g/ml 的 OxLDL 會對巨噬細胞產生毒性而使細胞死亡，而此種實驗結果在 Han 人的研究中亦曾出現 (42)。另外 Tabas 等人也曾提出過多的游離膽固醇 (未酯化) 將增加巨噬細胞死亡的機率並會增加動脈粥狀損傷 (43)。據此而推測，當細胞曝露於低濃度的 OxLDL 時，細胞增生是為了加強吞噬 OxLDL 並將其分解的能力；而當細胞曝露於高濃度的 OxLDL 時，細胞則會因此而死亡。所以在這種情形下，巨噬細胞的增生可能是為了保護血管免於形成動脈粥狀瘤；反之，若細

胞死亡則可能加速動脈粥狀硬化的發生 (44)。至於細胞增生及細胞死亡在動脈粥狀硬化的演變上其真實意義為何將有待釐清。

在本篇實驗的研究結果中，我們發現以高濃度 OxLDL 處理巨噬細胞，結果會發現嚴重的細胞死亡，並且其死亡是以 apoptosis 的方式進行。但是在預先處理洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸後，這種死亡現象將有效被抑制。其中洛神花水層粗萃取物的作用乃是內含各種有效抗氧化成分所貢獻 (圖十八)，在這些不同抗氧化成分中，我們仍須注意高濃度的抗氧化劑對於抑制細胞死亡亦出現相反作用，此現象猶如第一部分所提及之過多的類黃酮類化合物將加速自由基的形成而失去抗氧化的能力，一般而言，天然抗氧化劑本就廣泛存在於植物中，實不需過度額外補充，以免造成反效果。而在本研究所觀察到的處理不同抗氧化劑所造成的巨噬細胞死亡抑制作用的意義應該是在動脈粥狀硬化的不同階段皆為可逆的，在 1993 年，Russell Ross 指出在動脈粥狀硬化的過程中，肇始者為 OxLDL (也可能是機械傷害或 homocysteine, immunologic, toxins, viruses 等物質)，它使得單核細胞趨化為巨噬細胞，巨噬細胞因為攝食 OxLDL 而形成 foam cell，在這期間，巨噬細胞會以 lipoprotein lipase (脂蛋白脂解酵素) 分解食入之 OxLDL，除此之外，Baoutina 等人 (45) 也在 2001 年提出證據證實巨噬細胞可以降低 cholesteryl ester hydroperoxides (CEOOH, 為一種 LDL 進行氧化時早期的產物)，因此若能使 macrophage 在受到 OxLDL 傷害的情況之下維持其存活不死，那麼將使巨噬細胞有充裕的時間分解食入之 OxLDL，也就有機會減低 fatty streak 甚而減低動脈粥狀硬化。而我們所推測的此種論點在 1990 年及 1983 年曾分別被 Darley-Usmar 及 Steinberg 等人所提及，他們認為在特定狀況下，巨噬細胞的增生可能是一種保護血管的角色 (46, 47)。此外，Ross 也說明當脂肪大量堆積的 foam cell、T cells 及 smooth

muscle cells 形成 fatty steak 後，就會逐漸形成纖維斑 (fibrous plaque)以致於慢慢演化成粥狀瘤。而形成 fatty steak 的組成物則多是一些死亡的細胞及結締組織，這也就說明了讓巨噬細胞大量死亡在動脈粥狀硬化的演變上其實是一個相當有害的狀況。

在本研究的結果中，我們已得知洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸可能經由 (1) 減少 OxLDL 的產生；(2) 直接作用於巨噬細胞的某種機轉以維持細胞存活。這中間仍有許多的問題殘留，其一為減少 OxLDL 的產生是由於減低自由基的含量？亦或增加/協同 LDL 內源性抗氧化劑如維生素 E、維生素 C、類胡蘿蔔素的作用？其二則是洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸是倚賴巨噬細胞上的 receptor 作用而影響細胞內部的訊息傳遞或是直接經由細胞內飲作用 (endocytosis) 進入細胞以進行增加細胞存活能力的作用？在 1992 年 Esterbauer 等人 (48) 的研究指出，當以銅離子誘導 LDL 氧化時，LDL 內所含之眾多內源性抗氧化劑會逐漸消失，最先遭遇的防線即為 $\alpha$ -tocopherol。另外也有其他學者的研究發現當額外補充維生素 E 時，亦會藉由增加 LDL 內源性  $\alpha$ -tocopherol 的數量而改變 LDL 的氧化敏感性(49, 50)。 $\alpha$ -tocopherol 主要是藉著血液循環中水溶性抗氧化劑之幫助而再生(recycling)，如維生素 C、ubiquinone 等；Wu 等人也在 1998 年指出 (51)，餵食富含水溶性抗氧化劑之丹參水溶液成份可顯著增加紐西蘭大白兔 LDL 中 $\alpha$ -tocopherol 之數量。而在洛神花水層粗萃取物中也含有椴杞酸及類黃酮等水溶性抗氧化劑，而原兒茶酸本身即為一種類黃酮結構，因此在細胞中所看到的抗 OxLDL 作用可能是經由這些水溶性物質使得 $\alpha$ -tocopherol 獲得再生而增加數目。Terao (52) 等人亦指出具有兒茶素類結構之類黃酮化合物 (如 catechuic acid, quercetin)在磷脂質雙層膜 (phospholipid bilayer)系統中是可穩定存在與具備抗氧化能力，由於類黃酮的親水性比 $\alpha$ -tocopherol 要來得高，故在磷脂質雙層膜系統中為聚集在膜的表面，其作用為清

除水相中的氫氧自由基與膜中的脂質過氧化物；當面對 LDL 的系統時，更可藉由以上的抗氧化機制與保護內源性 $\alpha$ -tocopherol 而具抗氧化效果。但是當面對高度氧化的體內環境時，如 Princene 在 1998 年 (53) 以抽煙族群所作的研究中發現，飲用紅茶、綠茶或綠茶多元酚類萃出物 4 週後並無法影響脂質代謝與改變 LDL 的氧化敏感性。由此結果顯示，抗氧化物質雖可在體外有良好之抗氧化作用，但可能因體內消化吸收狀況不佳，或面對高濃度自由基環境時所能顯現的抗氧化能力不足，而導致無法觀察到其與體外實驗相呼應之結果。但即使多元酚類化合物在體內可表現出的抗氧化能力有限，卻可藉由與 LDL 內內源性抗氧化劑之交互作用，而達到保護 LDL 免受氧化修飾之目的。但由本實驗中並無法完全證實這項說法，若要釐清則需要進一步的實驗證實方可。最近亦有報告指出補充 quercetin 與 apigenin 二週並無法改變人體內抗凝血系統的部份因子與酵素的活性 (54)，顯示動脈粥狀硬化患者可藉服用含類黃酮類化合物而改善病徵的情況，並非由於凝血機制改變的緣故。

綜合上述，我們已經明確得知高濃度的 OxLDL 可對細胞造成毒性以令細胞 apoptosis，而預先處理洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸可以抑制這種死亡的現象，至於其機轉則是我們接下來將要探討的主題。

## 參考文獻

1. Ball K, Turner R. Smoking and the heart. The basis for action. *Lancet* 1974; 2: 822.
2. Stam H, Hulamann WC, Jongkind JF, *et al.* Endothelial lesions, dietary composition and lipid peroxidation. *Eicosanoids* 1989; 2: 1.
3. Gey KF, Moser UK, Jordan P, *et al.* Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 787S.
4. Church DF, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implication. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 111.
5. Wingard DL, Suarez L, Barrett-Connor E. The sex differential in mortality from all causes and ischaemic heart disease. *Am J Epidemiol* 1983; 117: 165.
6. Hulley S, Grady D, Bush T, *et al.* randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 1998; 280: 605.
7. Herrington DM, Reboussin DM, Brosnihan KB, *et al.* Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery arteriosclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 522.
8. Goldsten J, Brown MS. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1977; 46: 897.
9. Rosenfeld ME, Tsukuda T, Grown AM, Ross R. Fatty streak initiation in

- Watanabe heritable hyperlipidemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 9.
10. Fogelman AM, Schechter JS, Hokom M, *et al.* Malondialdehyde alteration in human monocyte-macrophage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 2214.
  11. Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells: continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J Biol Chem* 1980; 255: 9344.
  12. Hegele RA. The pathogenesis of atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 1996; 246: 21.
  13. Ross R, Fuster V. The pathogenesis of atherosclerosis. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ. Eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. Chap 1996; 25: pp441-460.
  14. Davies MJ, Woolf N. Atherosclerosis: what is it and why does it occur? *Br Heart J* 1993; 69 (suppl): S1.
  15. Sterinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, *et al.* Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915.
  16. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95: 1062.
  17. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801.
  18. Lusis AJ, Navab M. Lipoprotein oxidation and gene expression in the artery wall. *Biochem Pharm* 1993; 46: 2119.
  19. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and

- atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. Clin Chem 1996; 42: 498.
20. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 9748.
  21. Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. J Clin Invest 1984; 74: 1890.
  22. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. Arteriosclerosis 1984; 4: 357.
  23. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, *et al.* Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 3883.
  24. Parthasarathy S, Printz DJ, Byod D, *et al.* Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. Arteriosclerosis 1986; 6: 505.
  25. Hiramatsu K, Rosen H, Heinecke JW, *et al.* Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. Arteriosclerosis 1987; 7: 55.
  26. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, *et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15: 1512.
  27. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ERM. The intimal soil for atherosclerosis and restenosis. Circu Res 1995; 77: 445.
  28. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340: 115.

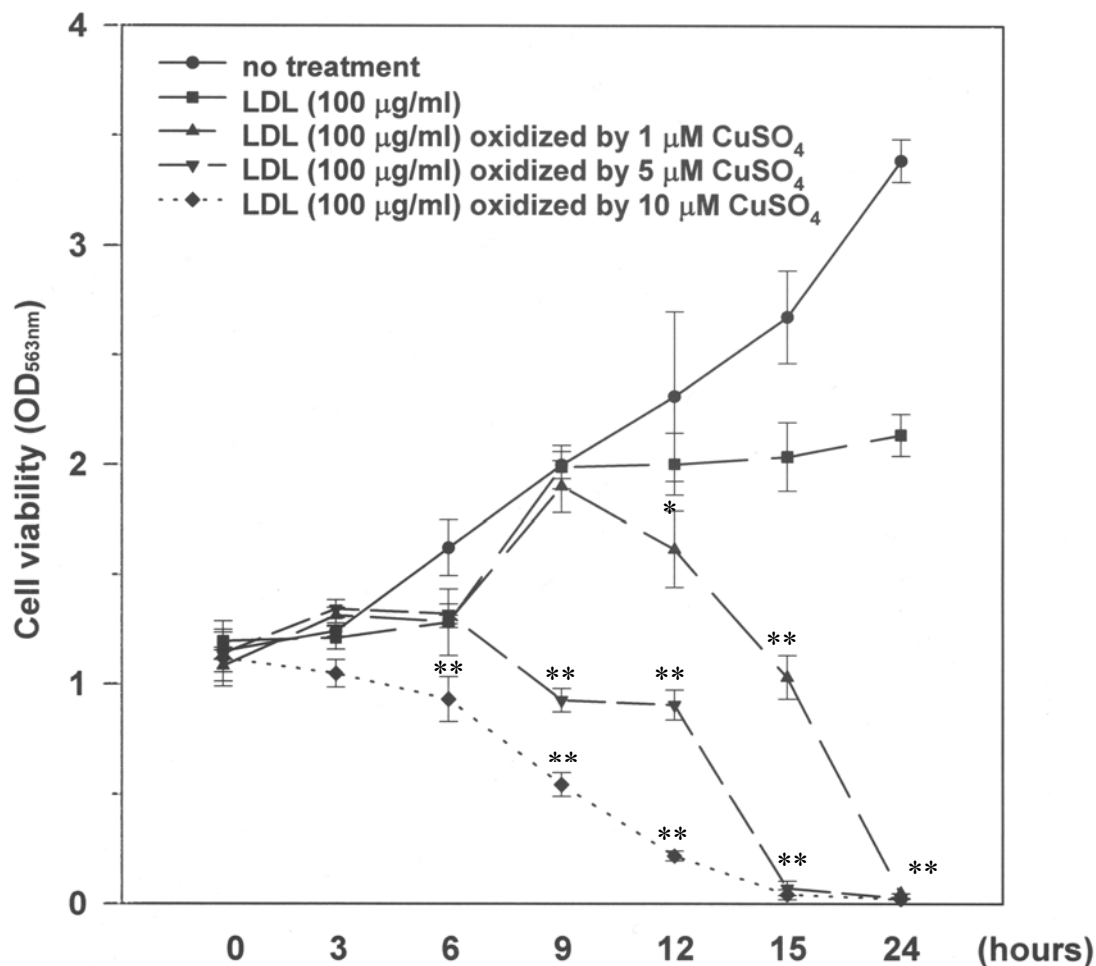
29. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, *et al.* Atherosclerosis: basic mechanisms, oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 1995; 91: 2488.
30. Davaraj S, Harris A, Jialal I. Modulation of monocyte-macrophage function with  $\alpha$ -tocopherol: implications for atherosclerosis. *Nutr Rev* 2002; 60: 8.
31. Atsumi T, Nishihira J, Makita Z, Koike T. Enhancement of oxidized low-density lipoprotein uptake by macrophages in response to macrophage migration inhibitory factor. *Cytokine* 2000, 12: 1553.
32. DeVries HE, Ronken E, Reinders JH, *et al.* Acute effects of oxidized low density lipoprotein on metabolic responses in macrophages. *FASEB J* 1998; 12: 111.
33. Kim YS, Han CY, Kim SW, *et al.* The orphan nuclear receptor small heterodimer partner as novel coregulator of nuclear factor-kappa b in oxidized low density lipoprotein-treated macrophage cell line RAW 264.7. *J Biol Chem* 2001; 276: 33736.
34. Mayr M, Xu Q. Smooth muscle cell apoptosis in arteriosclerosis. *Exper Gerontol* 2001; 36: 969.
35. Alley MC, Scudiero DA, Monkds A. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988; 48: 599.
36. Herrmann M, Lorenz HM, Voll R, *et al.* A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 1994; 122: 5506.
37. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493.



38. Cho KJ, Yun CH, Packer L, Chung AS. Inhibition mechanisms of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on the expression of proinflammatory cytokines. *Ann New York Acad Sci* 2001; 928: 141.
39. Ishii R, Horie M, Saito K, *et al.* Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus* on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, activated by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1568: 74.
40. Hans J, Nicholson AC. Lipoproteins modulate expression of the macrophage scavenger receptor. *Am J Pathol* 1998; 152:1647.
41. Hundal RS, Salh BS, Schrader JW, *et al.* Oxidized low density lipoprotein inhibits macrophage apoptosis through activation of the PI 3-kinase/PKB pathway. *J Lipid Res* 2001; 42: 1483.
42. Han CY, Pak YK. Oxidation-dependent effects of oxidized LDL: proliferation or cell death. *Exp Mol Med* 1999; 31: 165.
43. Tabas I. Free cholesterol-induced cytotoxicity: a possible contributing factor to macrophage foam cell necrosis in advanced atherosclerotic lesions. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7: 256.
44. Tabas I. P53 and atherosclerosis. *Circ Res* 2001; 88: 747.
45. Baoutina A, Dean RT, Jessup W. Antioxidant properties of macrophages toward low-density lipoprotein. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 1.
46. Darley-Usmar VM, Lelchuk R, O'Leary VJ, *et al.* Oxidation of low-density lipoprotein and macrophage derived foam cells. *Biochem Soc Trans* 1990; 18: 1064.
47. Steinberg D. Lipoproteins and atherosclerosis: a look back and a look ahead.

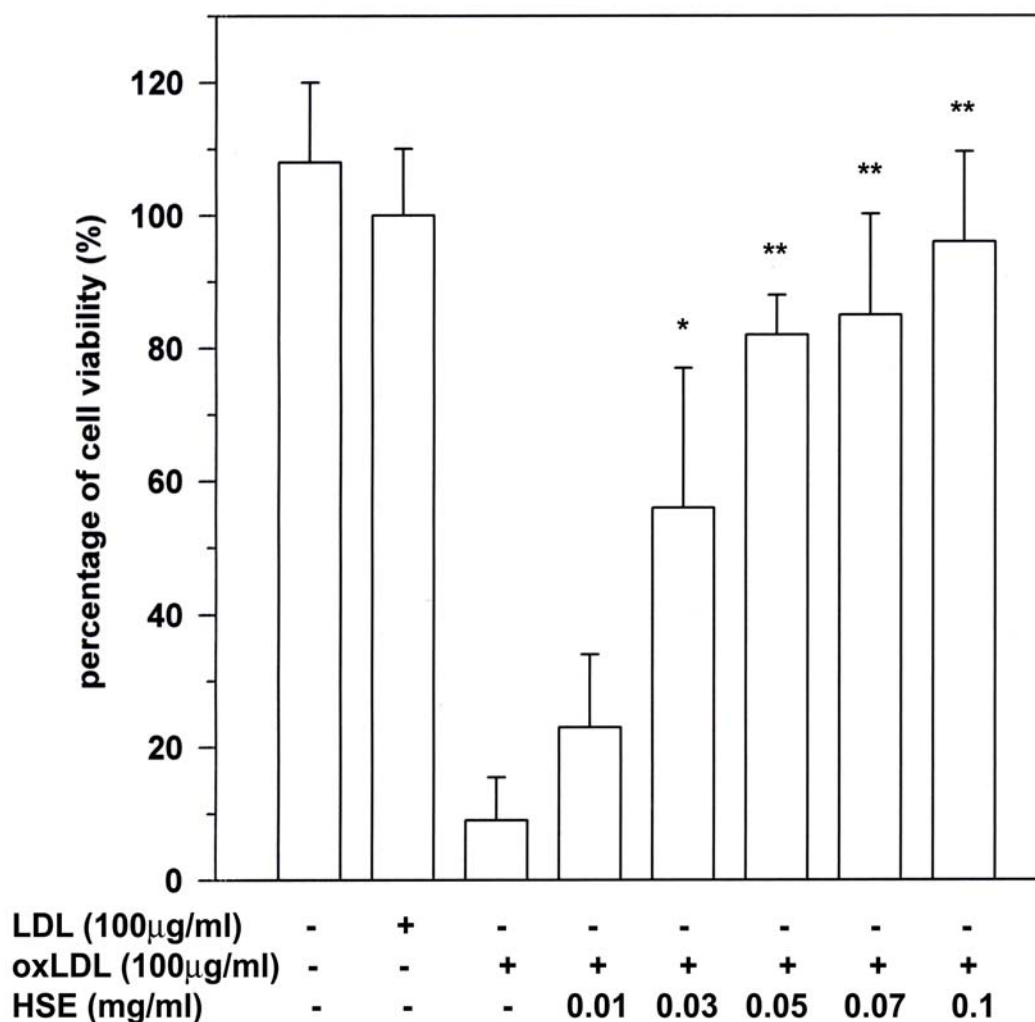
- Arteriosclerosis 1983; 3: 283.
48. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341.
49. Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, *et al.* Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by  $\beta$ -carotene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993; 13: 590.
50. Dieber-Rotheneder M, Puhl H, Waeg G, *et al.* Effect of oral supplementation with D- $\alpha$ -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J Lipid Res* 1991; 32: 1325.
51. Wu YJ, Hong CY, Lin SJ, *et al.* Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 481.
52. Terao J, Piskula M, Yao Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayer. *Arch Biochem Biophys* 1994; 308: 278.
53. Princen HMG, Duyvenvoorde W, Buytenhek R, *et al.* No effect of consumption of green and black tea on plasma lipid and antioxidant levels and on LDL oxidation in smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 833.
54. Janssen PLTMK, Mensink RP, Cox FJJ, *et al.* Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an *in vitro* and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 255.

圖一、不同濃度之  $\text{CuSO}_4$  在不同時間下誘發 OxLDL 後對細胞之影響



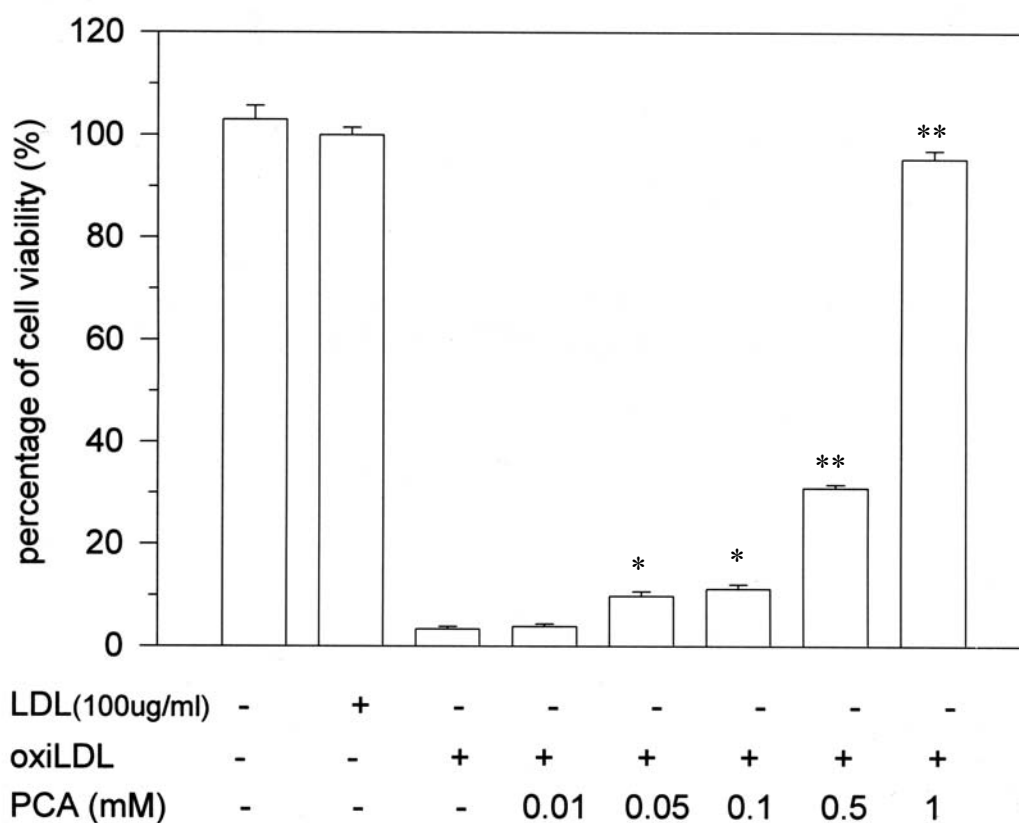
**Fig. 1. The effect of oxLDL in macrophage.**  $4 \times 10^5/\text{ml}$  cells were seeded for at least 4 hrs before incubated with  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  oxLDL for various durations. The viable cell was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. The experiment was repeated three times, and the data were presented as mean  $\pm$  SD from the triplicate. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

圖二、洛神花水萃取物以觀察對 OxLDL 引起細胞死亡之影響



**Fig. 2. Inhibitory effect of HSE on oxLDL-induced macrophage death.**  $4 \times 10^5$ /ml cells were seeded for at least 4 hrs before incubated with 100 µg/ml oxLDL for 15 hours. Prior to the treatment of oxLDL, 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1 or 0.5 mg/ml of HSE was added to the cells. The viable cell was measured by MTT assay as described in Materials and Methods, and represented as percentage of the control group (treated with 100 µg/ml native LDL). The experiment was repeated three times, and the data were presented as mean  $\pm$  SD from the triplicate. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

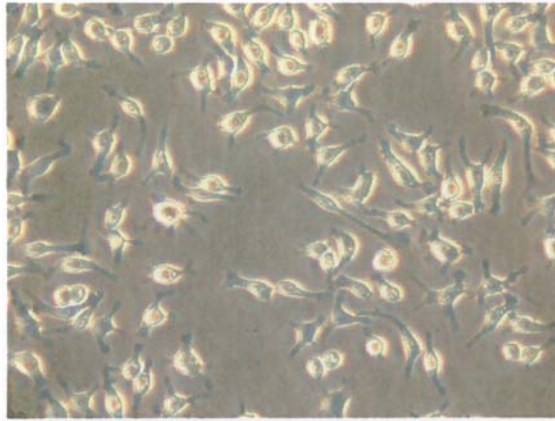
圖三、原兒茶酸以觀察對 OxLDL 引起細胞死亡之影響



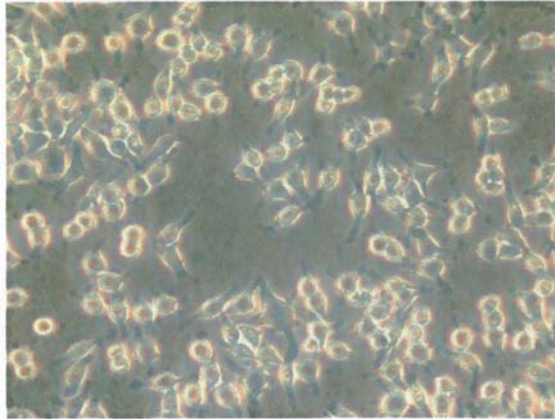
**Fig. 3. Inhibitory effect of PCA on oxLDL-induced macrophage death.**  $4 \times 10^5$ /ml cells were seeded for at least 4 hrs before incubated with 100  $\mu$ g/ml oxLDL for 15 hours. Prior to the treatment of oxLDL, 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 or 1.0 mM of PCA was added to the cells. The viable cell was measured by MTT assay as described in Materials and Methods, and represented as percentage of the control group (treated with 100  $\mu$ g/ml native LDL). The experiment was repeated three times, and the data were presented as mean  $\pm$  SD from the triplicate. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

圖四、不同濃度銅離子誘發之氧化型 LDL 對細胞形態之影響

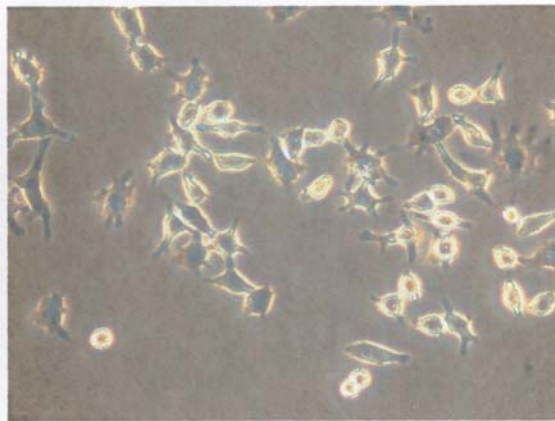
Normal (12 h)



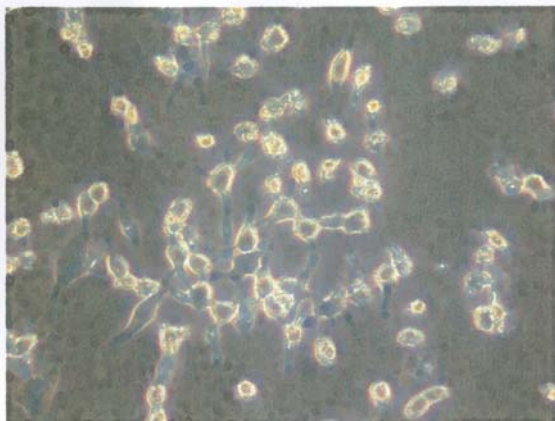
Normal (24 h)



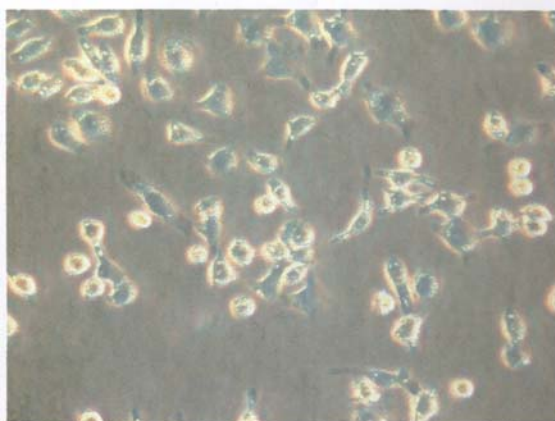
LDL only (12 h)



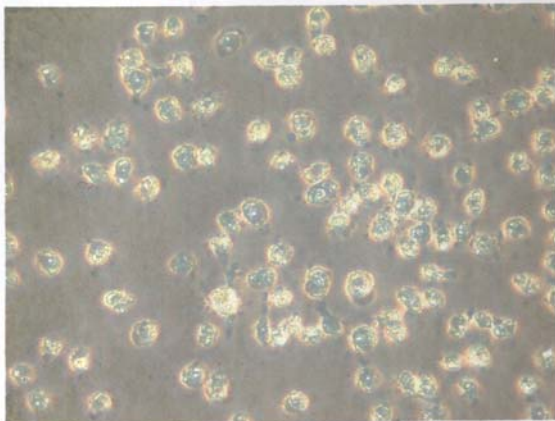
LDL only (24 h)



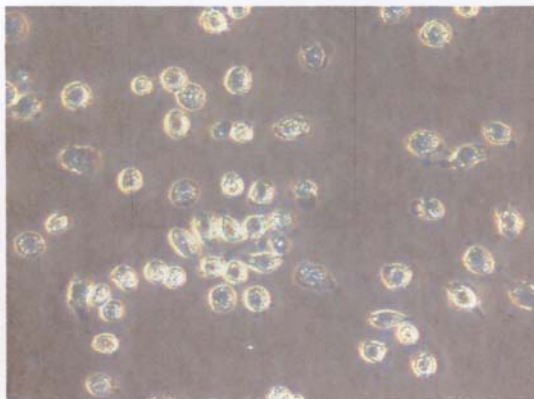
1  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> oxidized LDL (12 h)



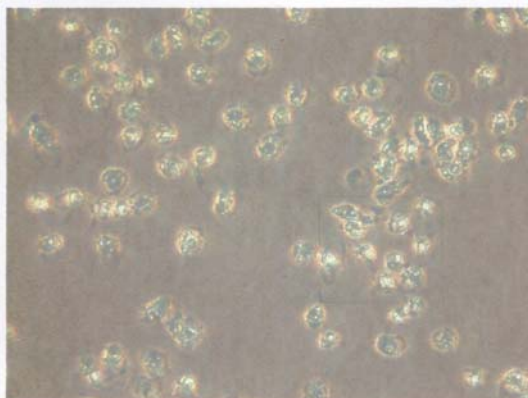
1  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> oxidized LDL (24 h)



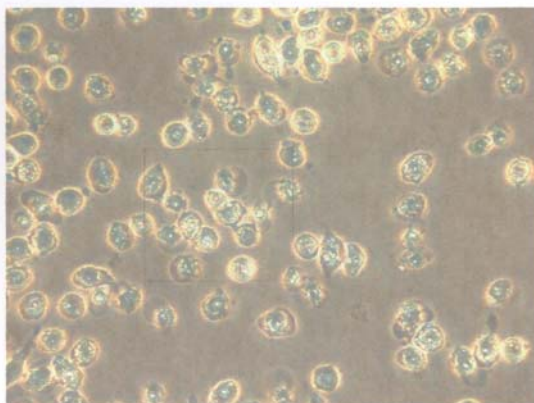
5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  oxidized LDL (12 h)



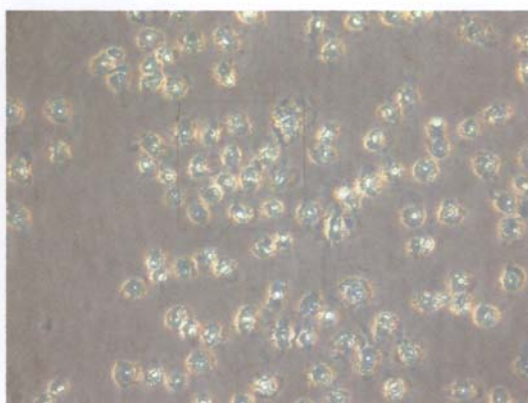
5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  oxidized LDL (24 h)



10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  oxidized LDL (12 h)



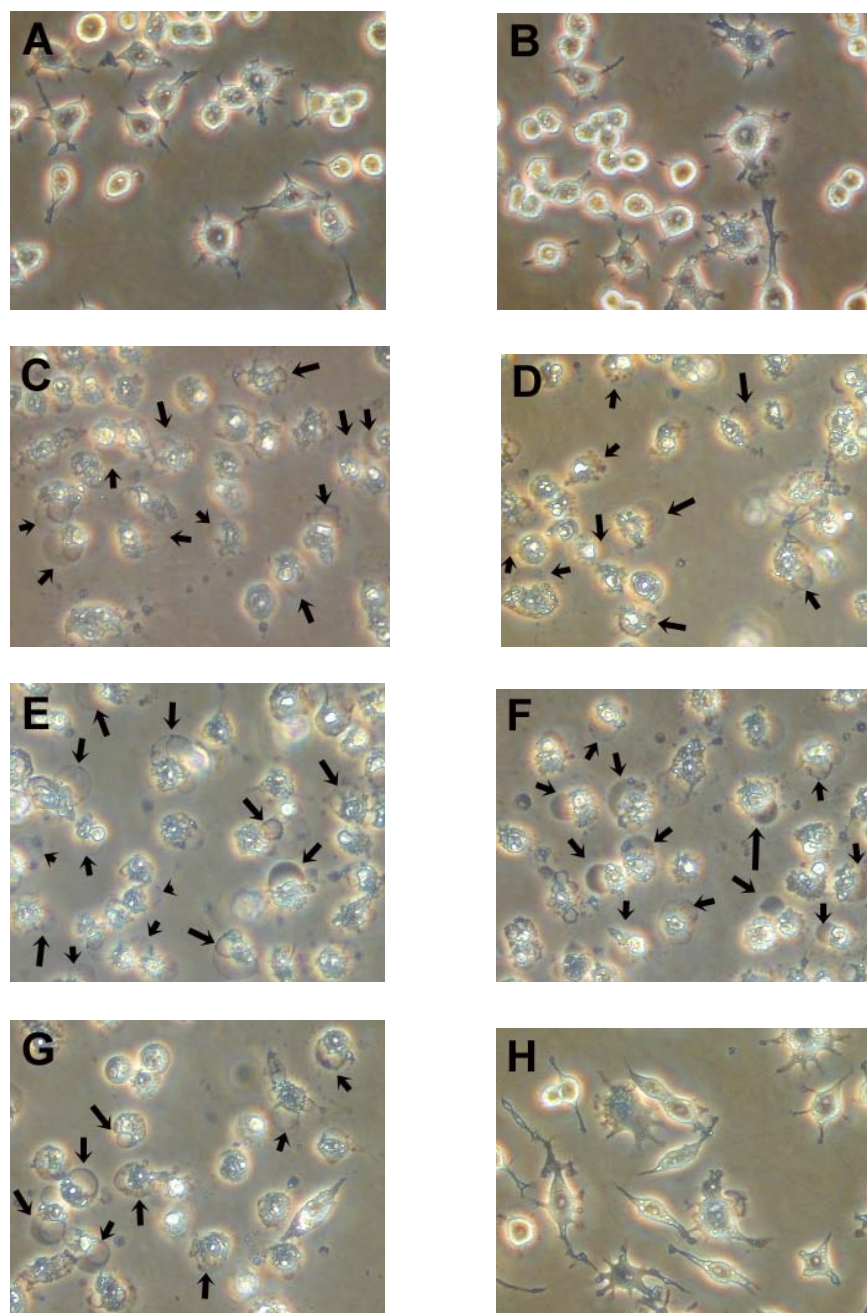
10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  oxidized LDL (24 h)



**Fig. 4. The morphological changes on oxLDL-treated macrophages.** Cells were treated and observed as “Materials and Methods” section.



圖五、洛神花水萃取物對 OxLDL 誘發細胞型態改變的影響

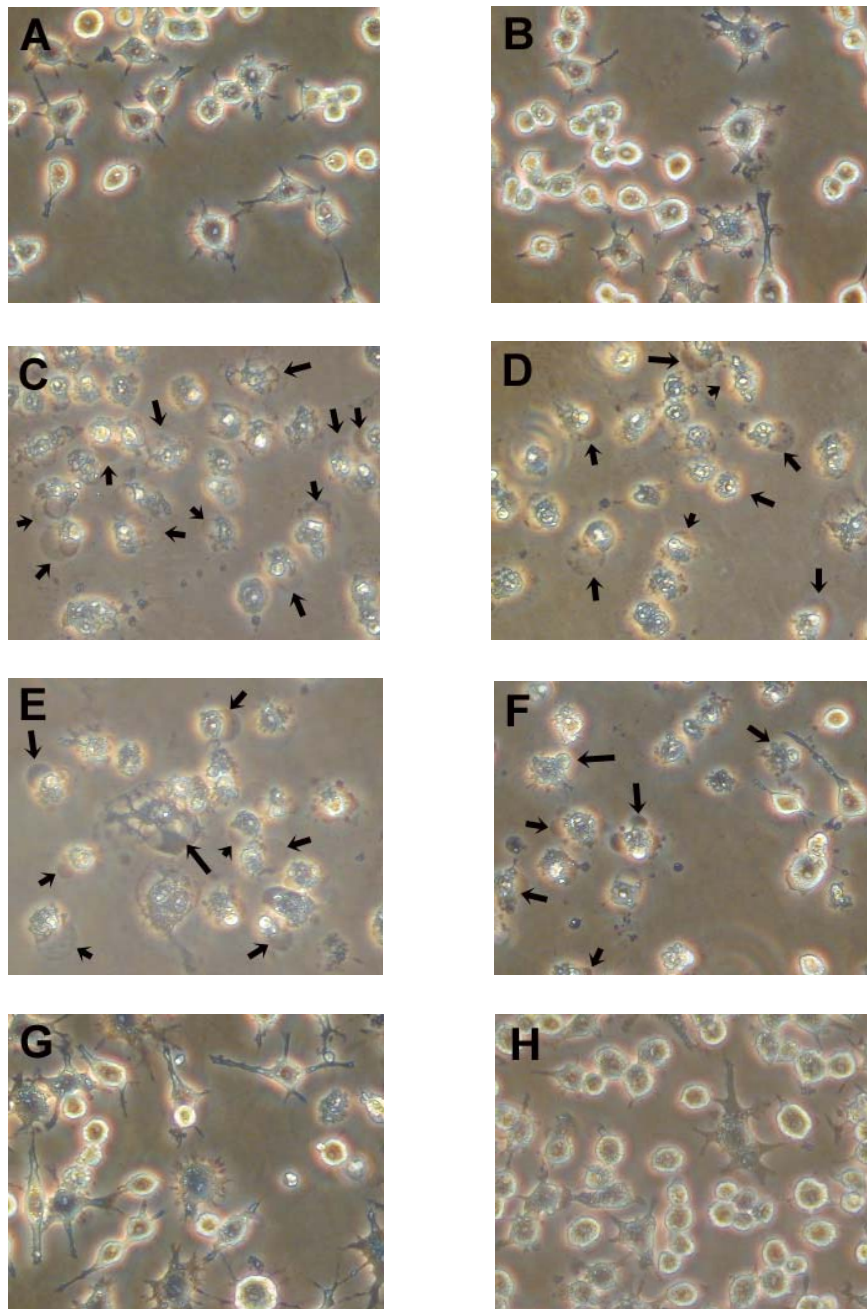


**Fig. 5.** The morphological changes of HSE on oxLDL-treated macrophage. Cells were treated and observed as “Materials and Methods” section. A, normal (no treatment); B, native LDL; C, oxidized LDL; D, 0.01 mg/ml



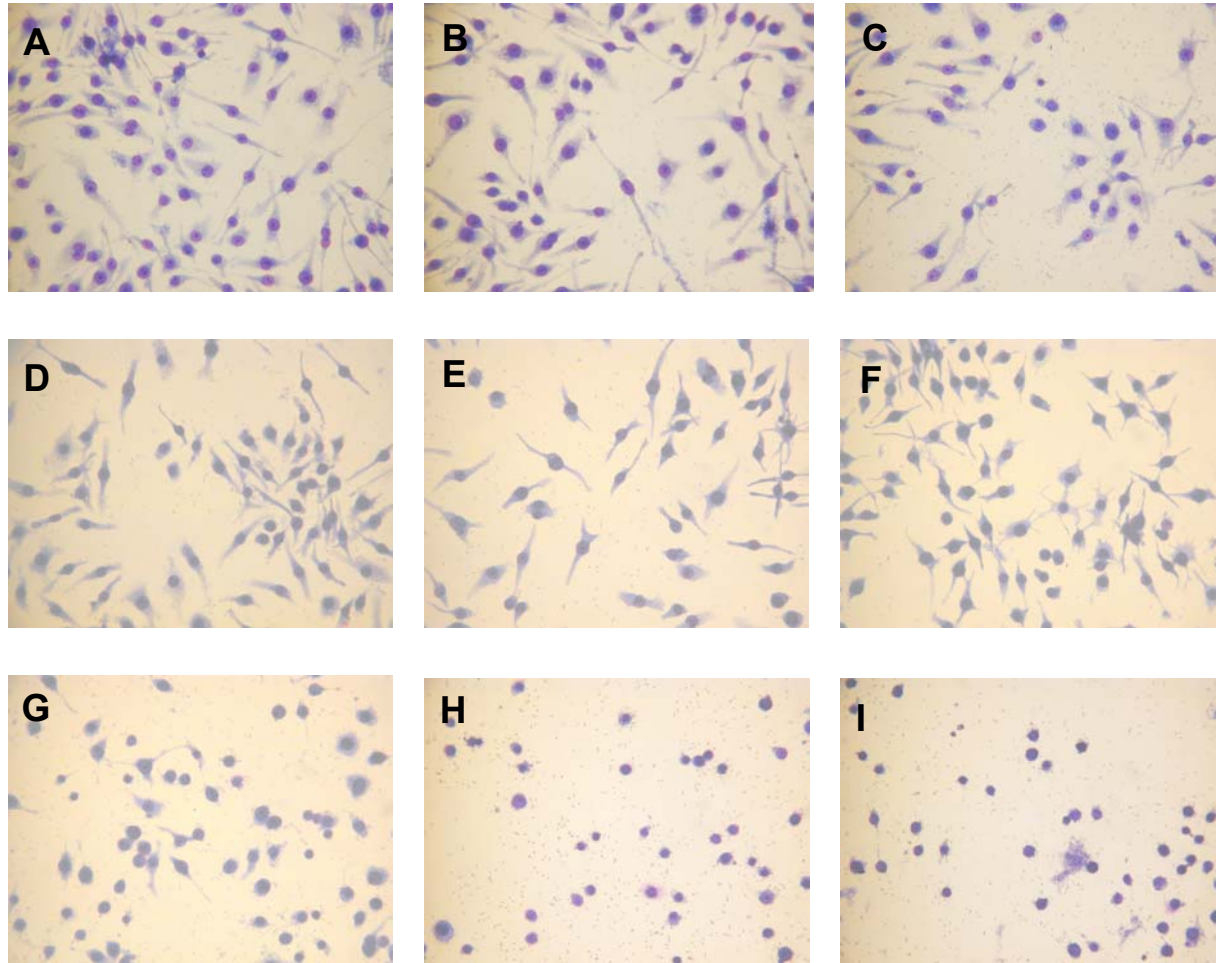
HSE plus oxidized LDL; E, 0.03 mg/ml HSE plus oxidized LDL; F, 0.05 mg/ml HSE plus oxidized LDL; G, 0.1 mg/ml HSE plus oxidized LDL; H, 0.5 mg/ml HSE plus oxidized LDL. The arrows pointed out the locations of apoptotic-like bodies.

圖六、原兒茶酸對 OxLDL 誘發細胞型態改變的影響



**Fig. 6. The morphological changes of PCA on oxLDL-treated macrophage.** Cells were treated and observed as “Materials and Methods” section. A, normal (no treatment); B, native LDL; C, oxidized LDL; D, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; E, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; F, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; G, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; H, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL. The arrows pointed out the locations of apoptotic-like bodies.

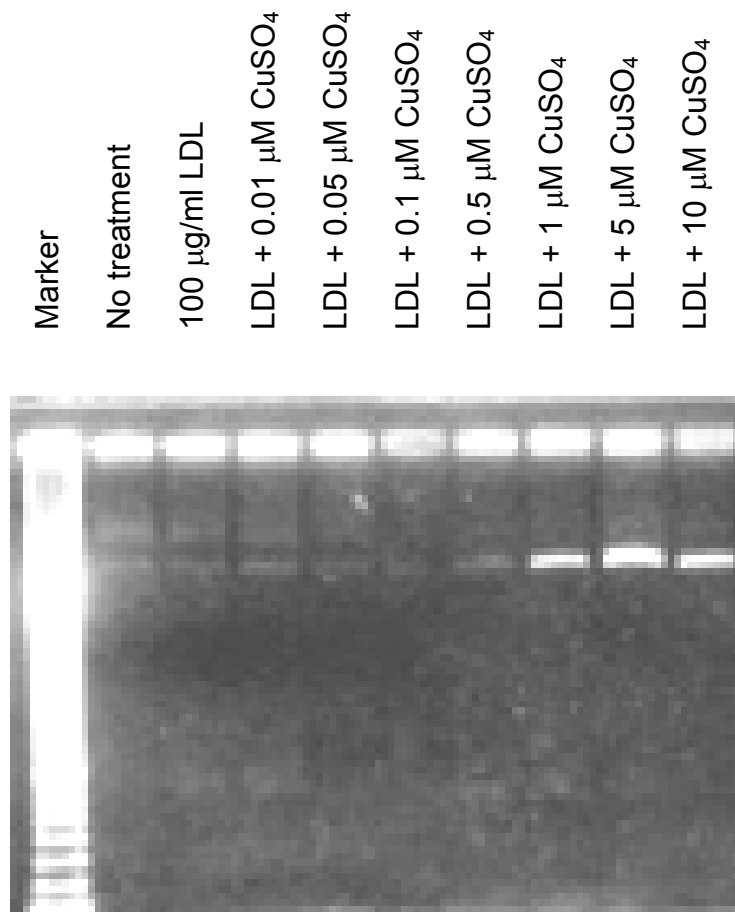
圖七、不同濃度的銅離子所誘發的 OxLDL 對巨噬細胞的影響



**Fig. 7. RAW cell were treated with 100 µg/ml LDL and CuSO<sub>4</sub> and incubated at 37°C for 12 h to observe the apoptotic cell.**

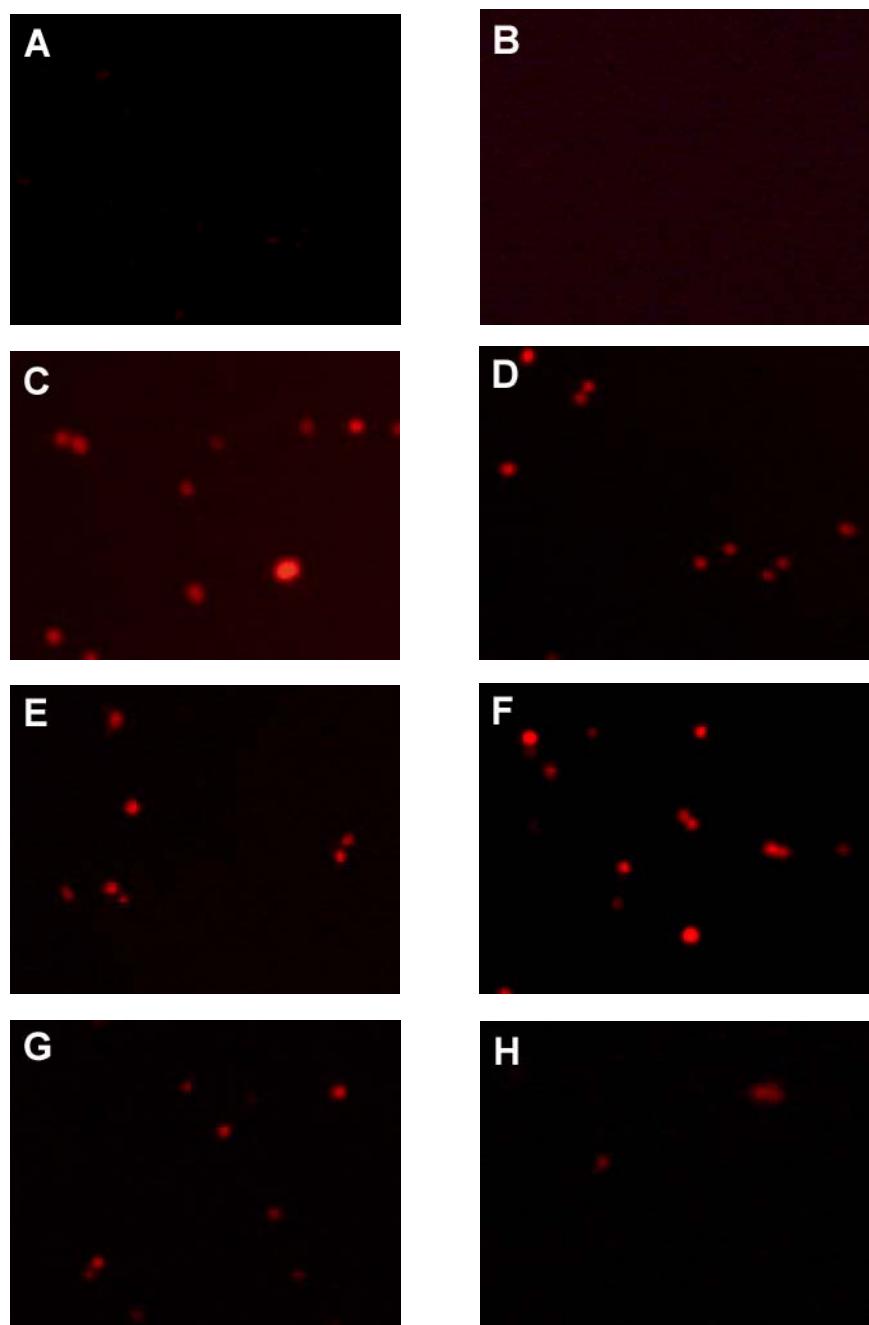
A, normal; B, LDL only; C, LDL and 0.01 µM CuSO<sub>4</sub>; D, LDL and 0.05 µM CuSO<sub>4</sub>; E, LDL and 0.1 µM CuSO<sub>4</sub>; F, LDL and 0.5 µM CuSO<sub>4</sub>; G, LDL and 1.0 µM CuSO<sub>4</sub>; H, LDL and 5.0 µM CuSO<sub>4</sub>; I, LDL and 10 µM CuSO<sub>4</sub>.

圖八、以洋菜膠電泳測定 OxLDL 所引起的 apoptosis 應出現的 DNA 斷裂



**Fig. 8.** The DNA fragmentation observed by agarose gel electrophoresis on oxLDL-treated macrophages. Cells were treated and observed as “Materials and Methods” section.

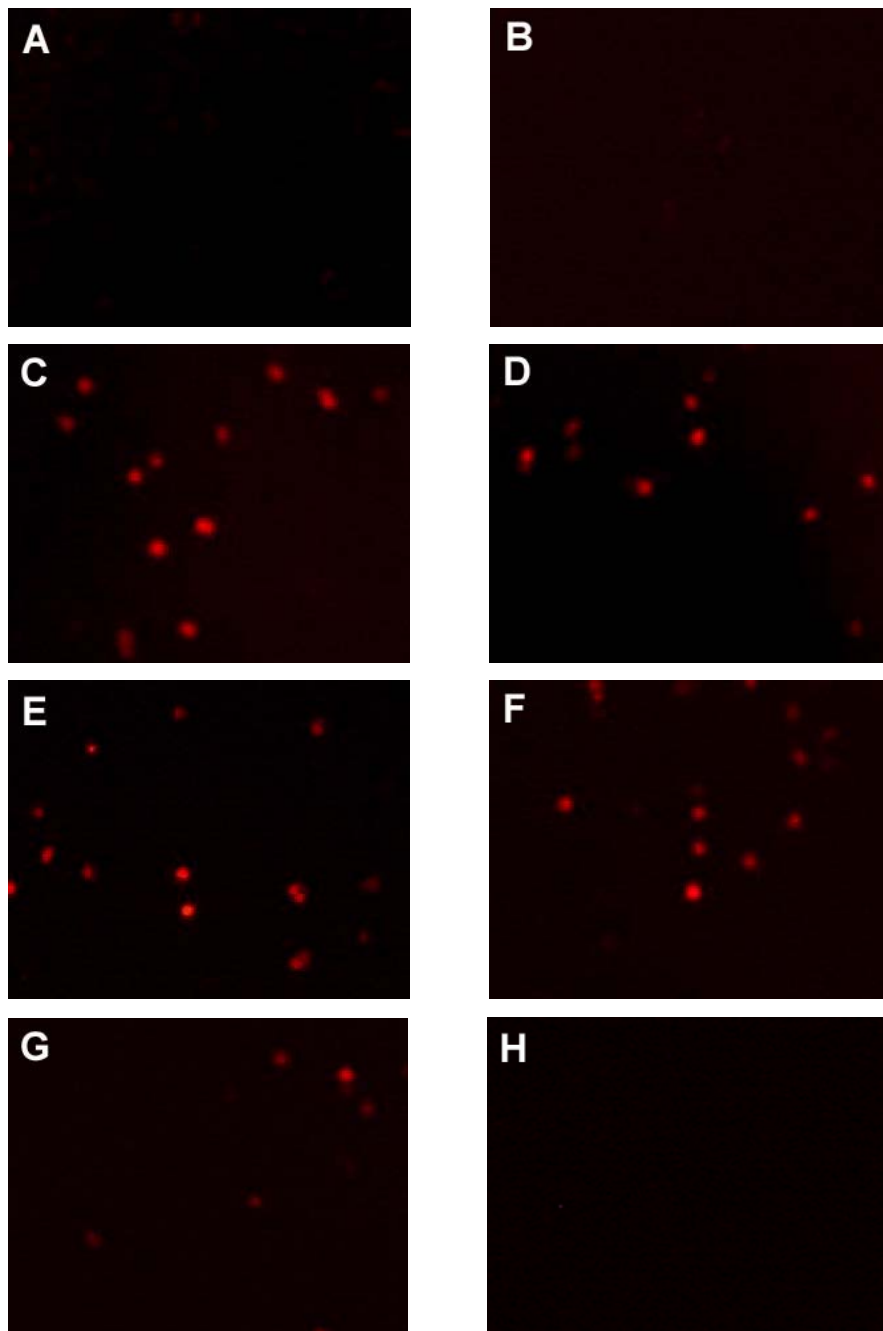
圖九、洛神花水萃取物對 OxLDL 誘發細胞 apoptosis 的影響



**Fig. 9. The inhibitory effect of HSE on oxLDL-induced macrophage DNA fragmentation.**

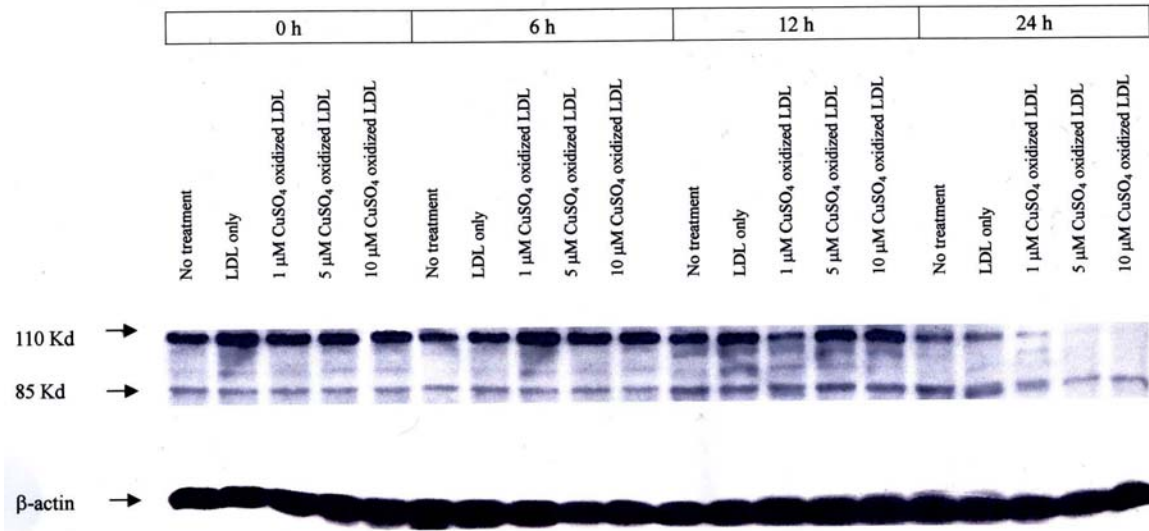
The detail of the treatments was described in Materials and Methods. A, normal (no treatment); B, native LDL; C, oxidized LDL; D, 0.01 mg/ml HSE plus oxidized LDL; E, 0.03 mg/ml HSE plus oxidized LDL; F, 0.05 mg/ml HSE plus oxidized LDL; G, 0.1 mg/ml HSE plus oxidized LDL; H, 0.5 mg/ml HSE plus oxidized LDL. The red signals represent positive for DNA fragments.

圖十、原兒茶酸對 OxLDL 誘發細胞 apoptosis 的影響



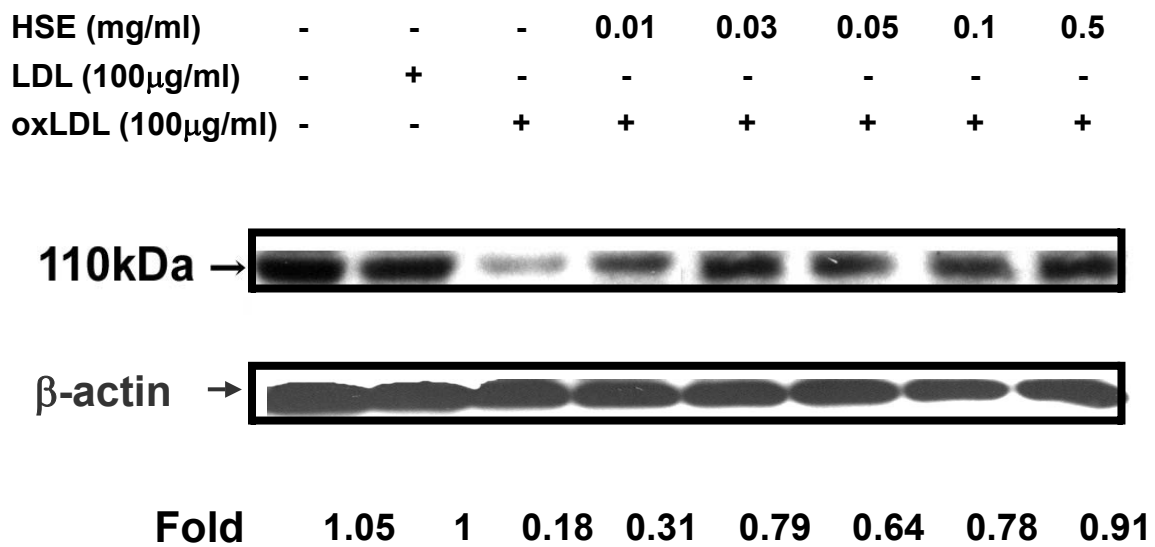
**Fig. 10. The inhibitory effect of PCA on oxLDL-induced macrophage DNA fragmentation.** The detail of the treatments was described in Materials and Methods. A, normal (no treatment); B, native LDL; C, oxidized LDL; D, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; E, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; F, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; G, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; H, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL. The red signals represent positive for DNA fragments.

圖十一、OxLDL 在巨噬細胞中造成 PARP 蛋白斷裂之情形



**Fig. 11. Immunoblotting examination of the effect on oxLDL-induced PARP cleavage in macrophage.** Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the cleavage of PARP. Cells were treated and observed as “Materials and Methods” section.

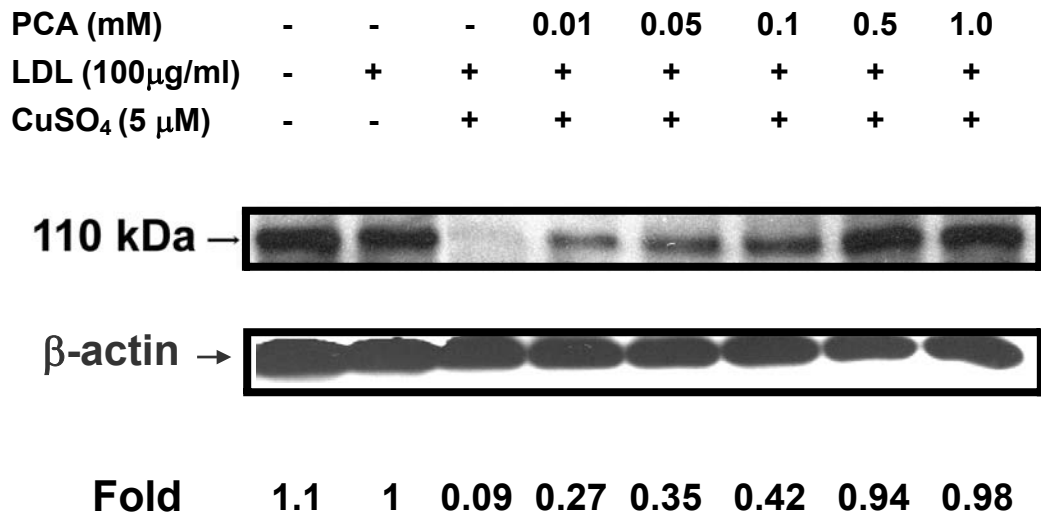
圖十二、洛神花水萃取物對 OxLDL 所造成之 PARP 蛋白的變化



**Fig. 12. Immunoblotting examination of the effect of HSE on oxLDL-induced PARP cleavage in macrophage.** Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the cleavage of PARP. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 5, 0.03 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 6, 0.05 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 7, 0.1 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 8, 0.5 mg/ml HSE plus oxidized LDL.

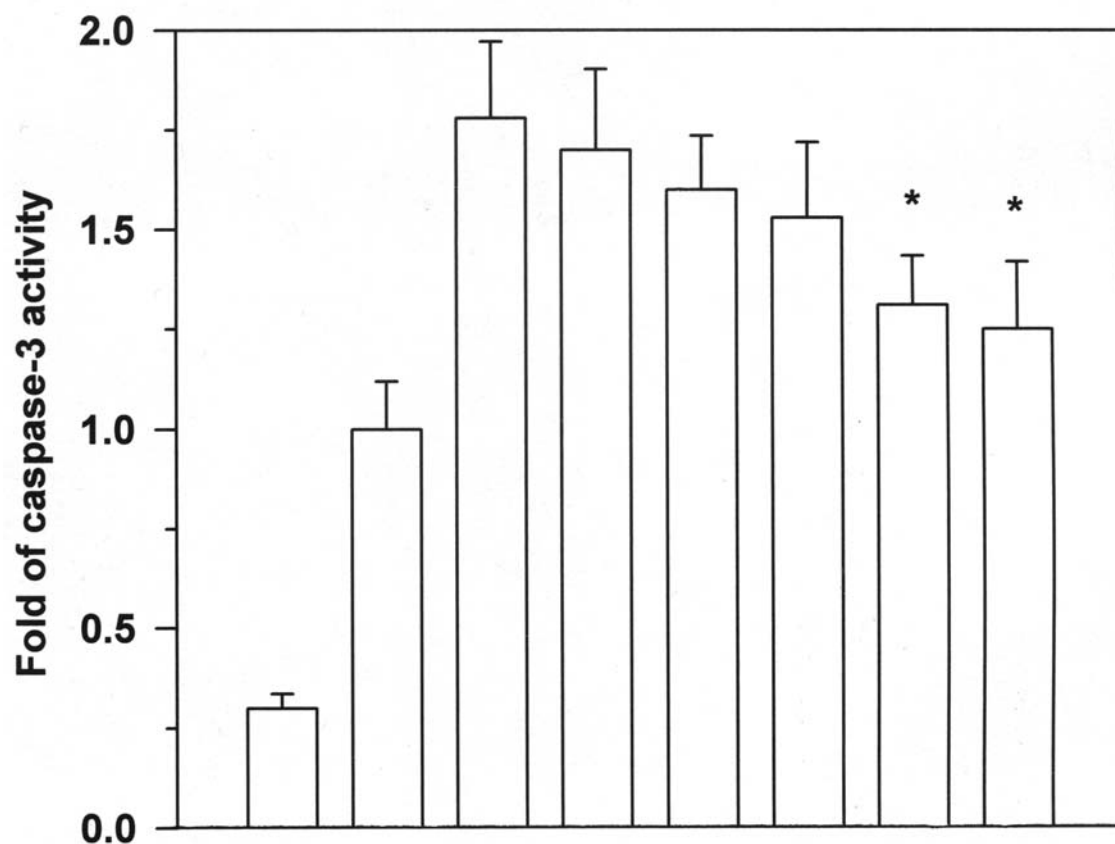


圖十三、原兒茶酸對 OxLDL 所造成之 PARP 蛋白的變化



**Fig. 13. Immunoblotting examination of the effect of PCA on oxLDL-induced PARP cleavage in macrophage.** Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the cleavage of PARP. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; lane 5, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; lane 6, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; lane 7, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; lane 8, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL.

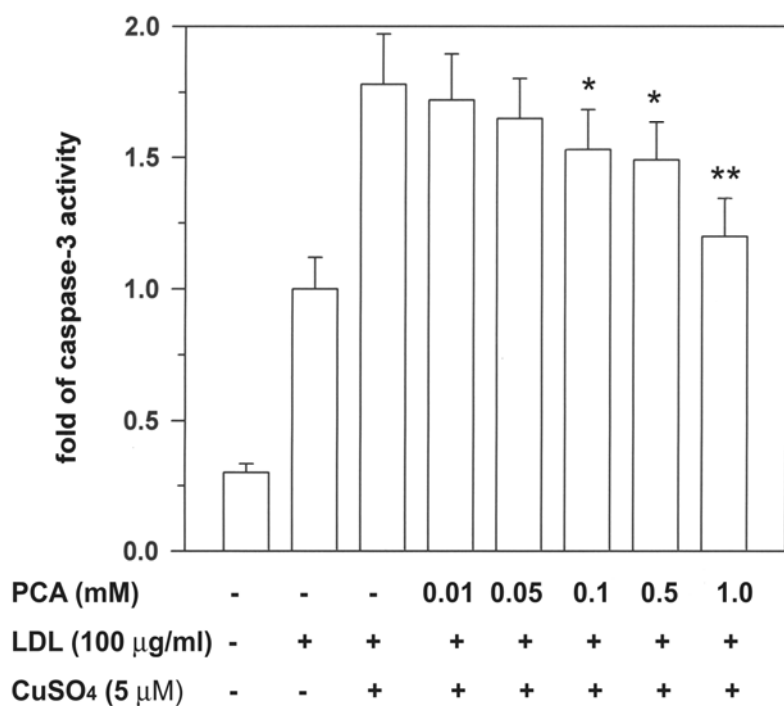
圖十四、洛神花水萃取物對 OxLDL 所造成之 Caspase-3 蛋白活性的變化



HSE (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5
LDL (100 $\mu$ g/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL(100 $\mu$ g/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+

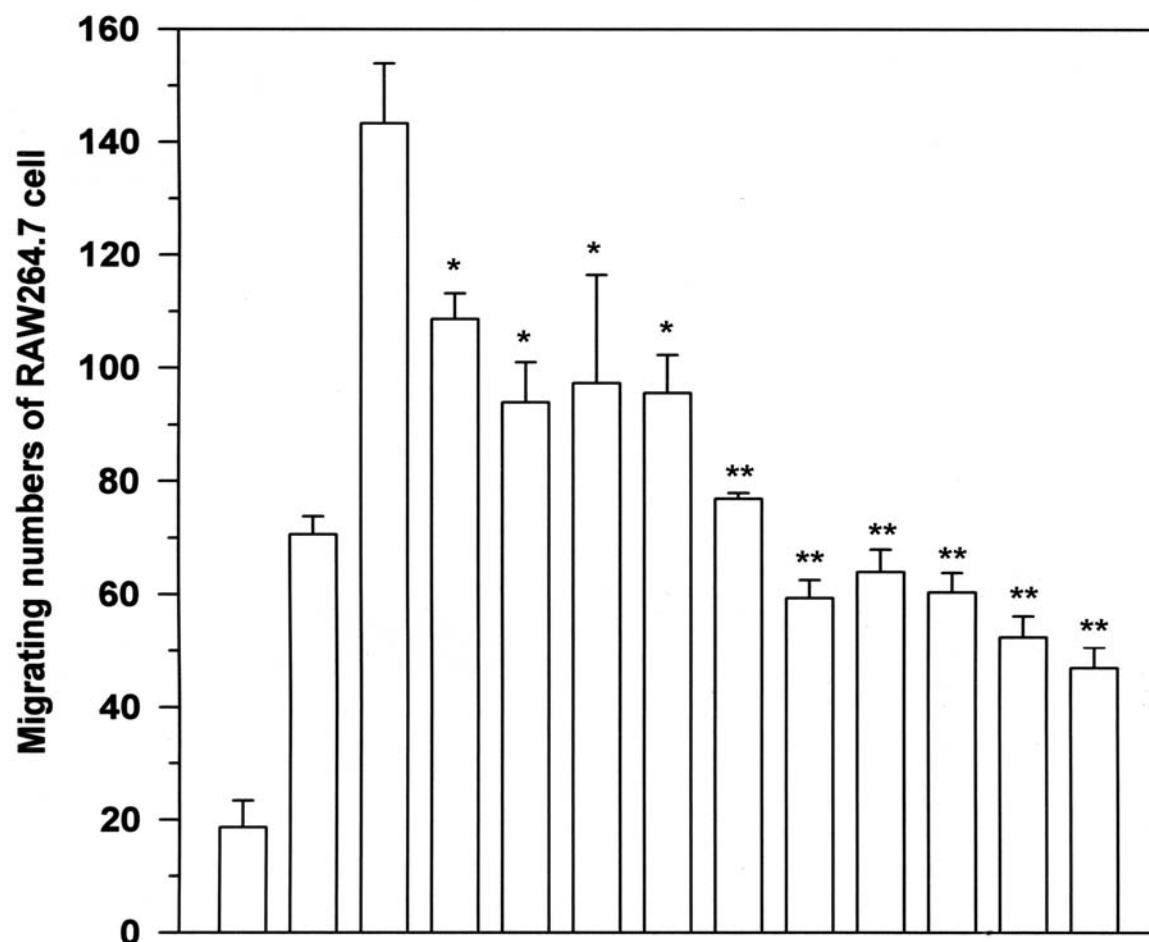
**Fig. 14. The inhibitory effect of HSE on oxLDL-induced caspase-3 activity in macrophage.** Cells were treated and assayed for caspase-3 activity as described in Materials and Methods. Each vertical bar represents mean  $\pm$  SD from triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \* P< 0.05.

圖十五、原兒茶酸對 OxLDL 所造成之 Caspase-3 蛋白活性的變化



**Fig. 15. The inhibitory effect of PCA on oxLDL-induced caspase-3 activity in macrophage.** Cells were treated and assayed for caspase-3 activity as described in Materials and Methods. Each vertical bar represents mean  $\pm$  SD from triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

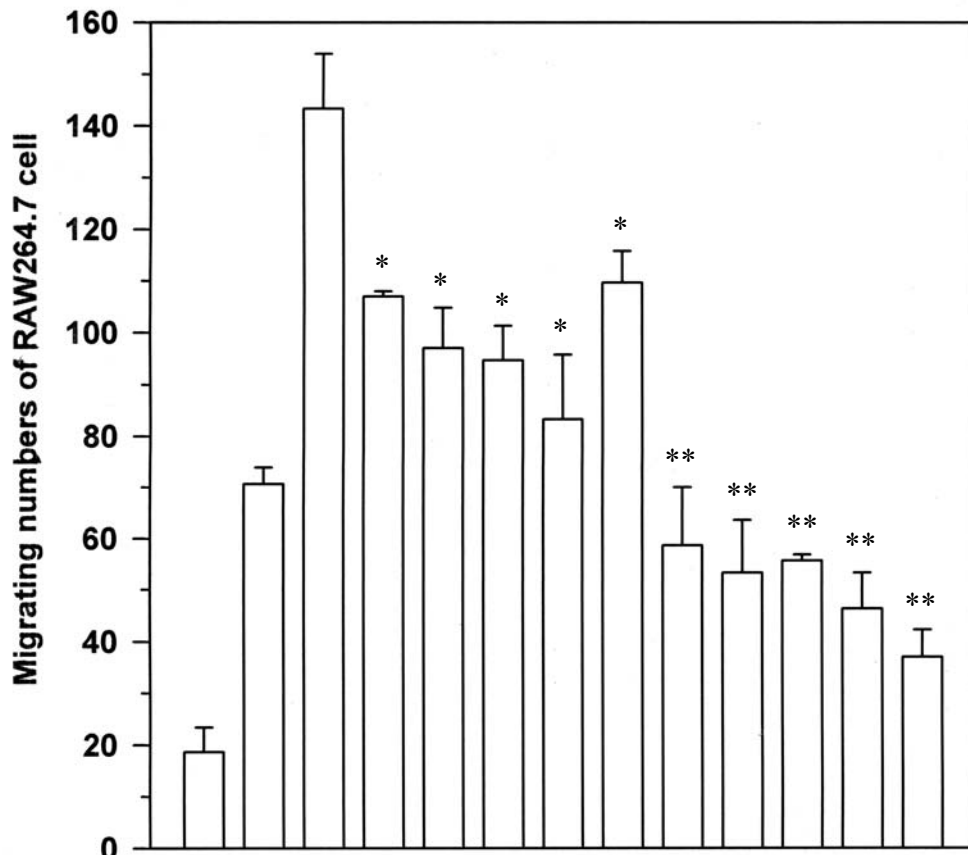
圖十六、洛神花水萃取物對與巨噬細胞/OxLDL 作用的相關性



Up chamber	Cell	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	HSE (mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5
Low chamber	LDL	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OxLDL	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	HSE (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.0	0.05	0.1	0.5	-	-	-	-	-
						3								

**Figure 16. The inhibitory effect of HSE on the migration of macrophages attracted by oxLDL.** In these experiments, cells were treated and counted as described in Materials and Methods. Each vertical bar represented mean  $\pm$  SD from triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \* P < 0.05; \*\* P < 0.01.

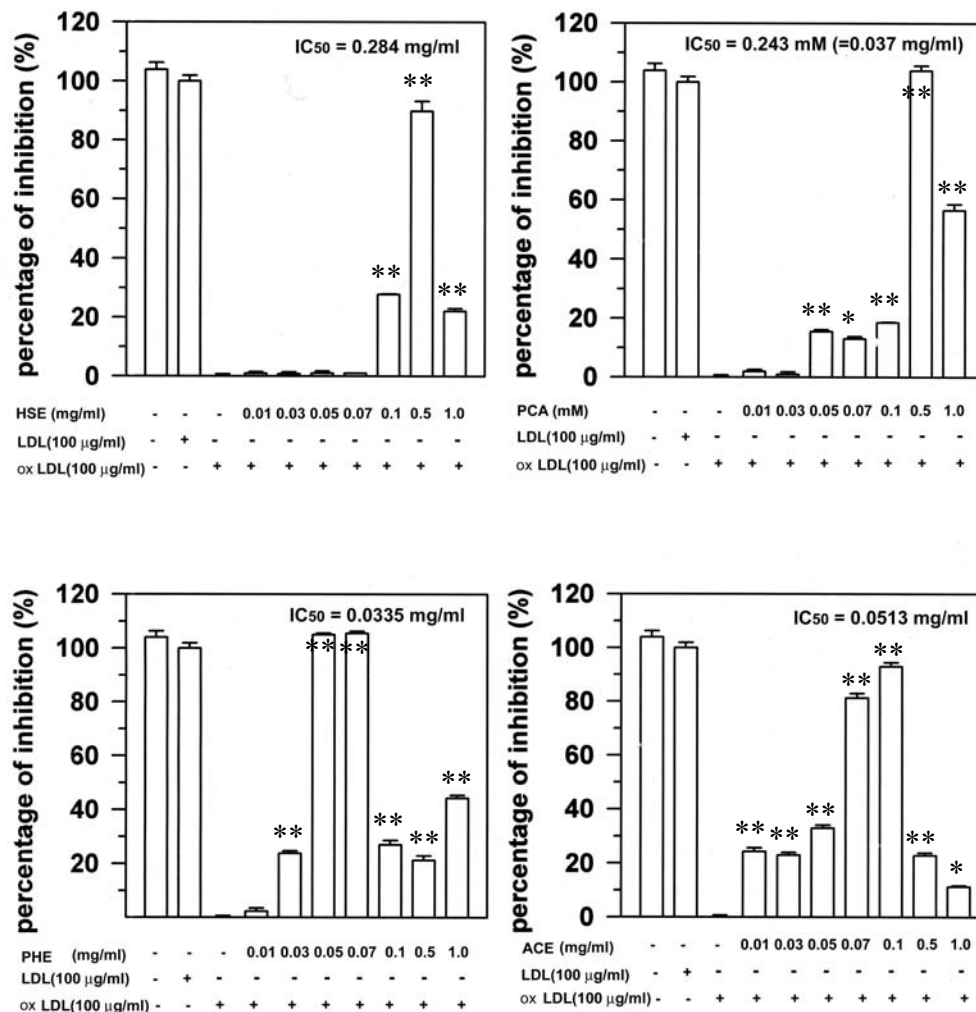
圖十七、原兒茶酸對與巨噬細胞/OxLDL 作用的相關性



Up chamber	Cell	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	PCA (mM)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
Low chamber	LDL	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OxLDL	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PCA (mM)	-	-	-	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0	-	-	-	-	-

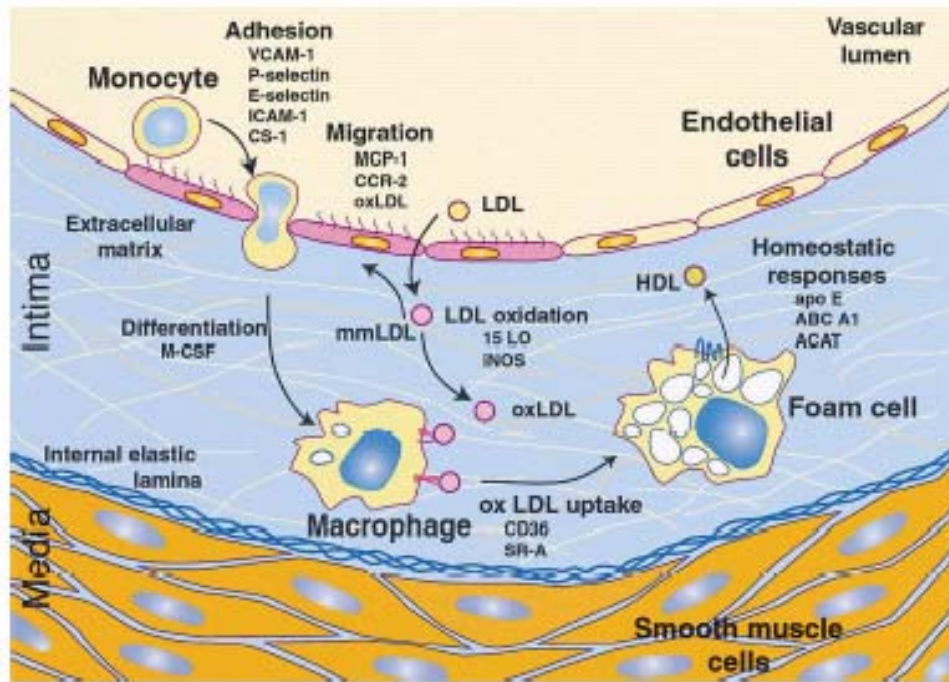
**Fig. 17. The inhibitory effect of PCA on the migration of macrophages attracted by oxLDL.** In these experiments, cells were treated and counted as described in Materials and Methods. Each vertical bar represented mean  $\pm$  SD from triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \* P < 0.05; \*\* P < 0.01.

圖十八、洛神花中各種萃取物對 OxLDL 造成巨噬細胞死亡的影響



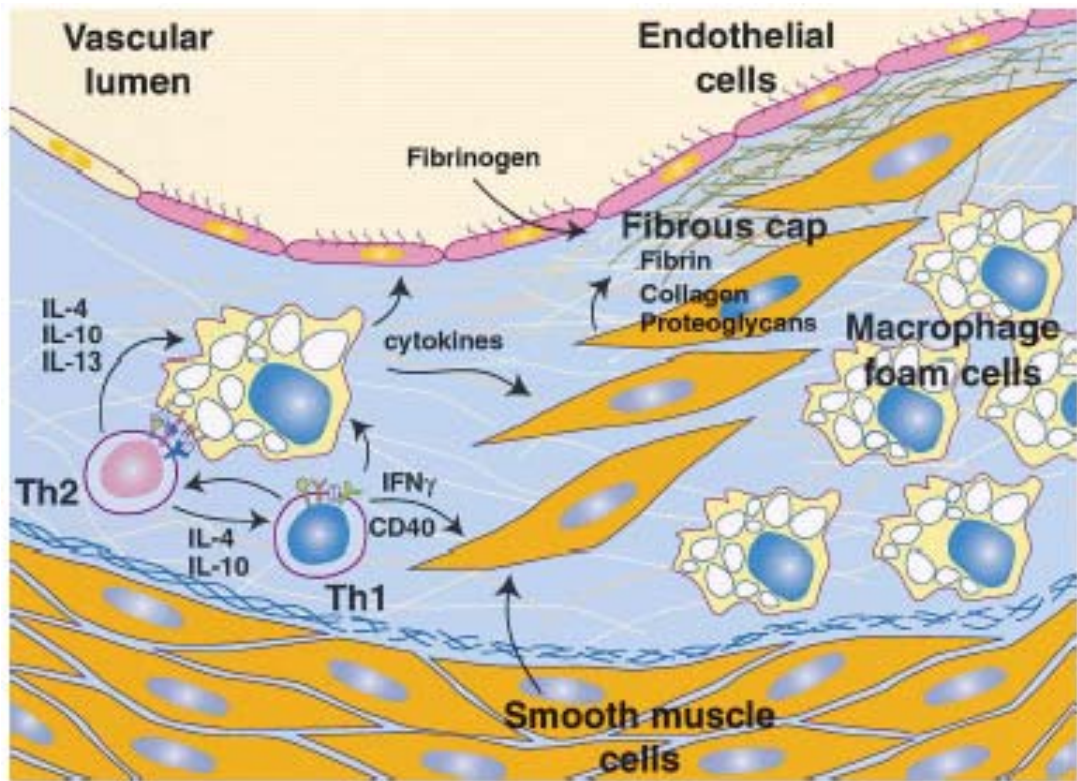
**Fig. 18. The inhibitory effects of different components in HSE on oxLDL-induced macrophage death.** In these experiments,  $4 \times 10^5$ /ml cells were seeded for at least 4 hrs before incubated with 100 μg/ml oxLDL for 15 hr. Prior to the treatment of oxLDL, the components isolated from HSE were added to the cells. The viable cell was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. The experiment was repeated three times, and the data were presented as mean ± SD from the triplicate. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \* P<0.05; \*\* P<0.01.

附圖一、發展脂肪條紋損傷的起始狀態

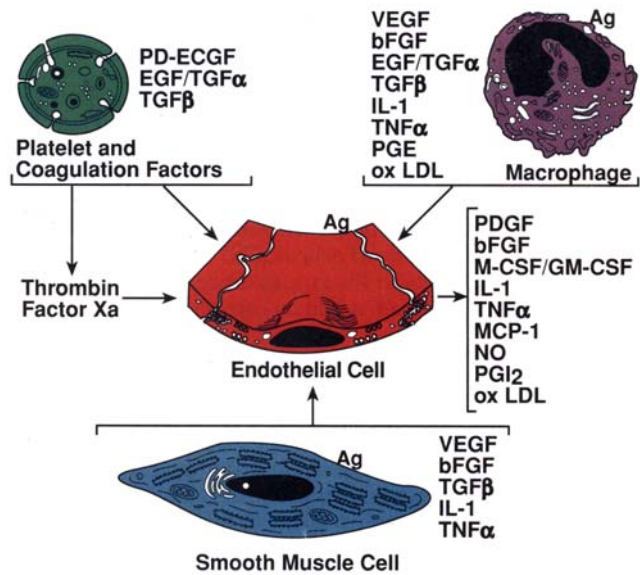


(摘自 Cell, 104, 503, 2000)

附圖二、參與動脈粥狀硬化的內皮細胞與生長因子及細胞激素的作用



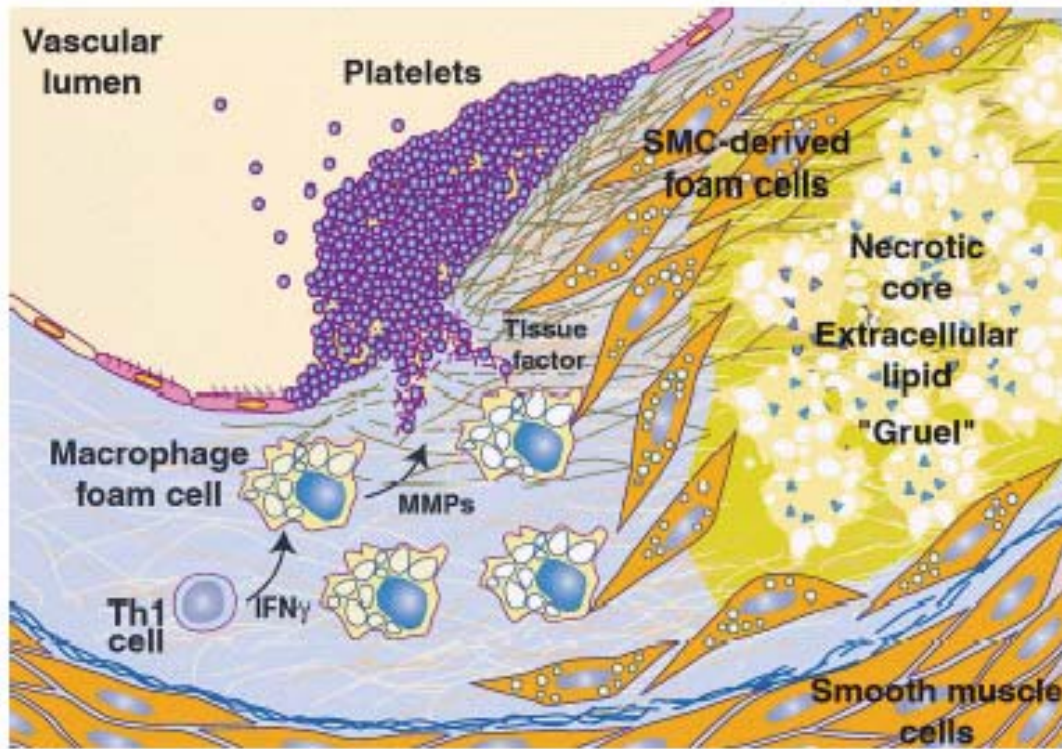
(摘自 Cell, 104, 503, 2000)



(摘自 Nature, 362, 801, 1993)

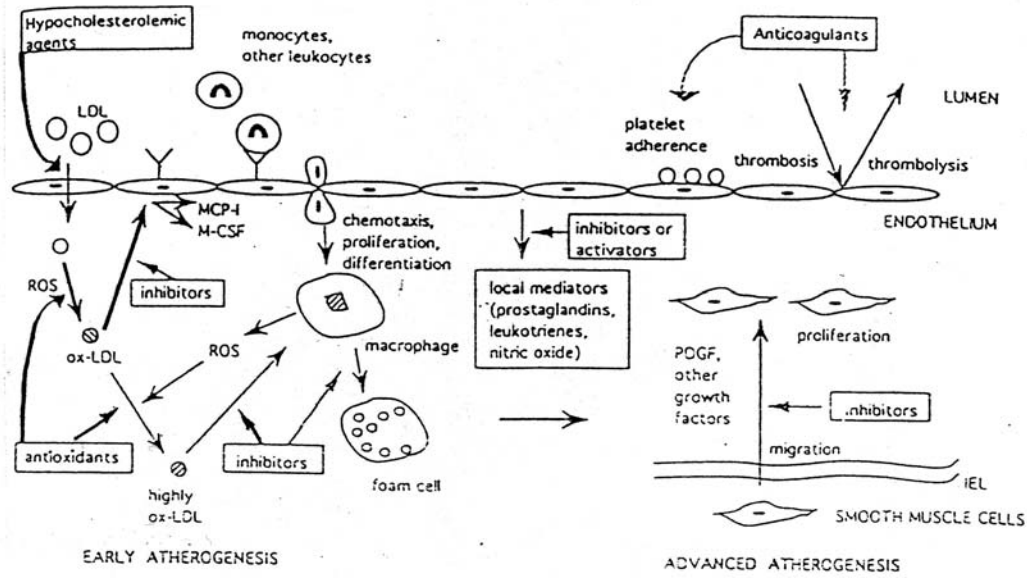


附圖三、血管內膜與動脈栓塞之關係



(摘自 Cell, 104, 503, 2000)

附圖四、動脈硬化過程中各種藥物介入位置



(摘自 Biochemical Pharmacology, 46, 2119, 1993)

## 第三部分

原兒茶酸或洛神花水萃取物對氧化型低密度脂蛋白處理之巨噬細胞抑制細胞程序性死亡的作用機轉

## 目錄

中文摘要 .....	127
英文摘要 (Abstract) .....	128
緒論 .....	129
研究目的 .....	139
實驗材料和方法 .....	140
XXI. 化學試劑及藥品 .....	140
XXII. LDL 的抽取 .....	140
XXIII. OxLDL 之製備 .....	140
XXIV. 細胞培養 .....	140
XXV. 粒線體膜通透性之測定 (mitochondrial membrane potential determination) .....	140
XXVI. 蛋白質抽取及定量 .....	141
XXVII. 蛋白質電泳 .....	141
XXVIII. Western Blotting 分析 .....	141
XXIX. 維生素 E 的測定 .....	141
XXX. 自由基的測定 .....	142
XXXI. LDL-peroxidation-relative electrophoretic mobility (REM) .....	143
XXXII. TBARS assay .....	143
XXXIII. Foam cell formation 的測定 .....	143
結果 .....	144
I. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜電位之影響 .....	144
II. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜電位之影響 .....	144
III. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜蛋白之影響 .....	144
IV. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜蛋白之影響 .....	144
V. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的 MAPK 蛋白之影響 .....	145
VI. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的 MAPK 蛋白之影響 .....	145
VII. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的 P53, P21 蛋白之影響 .....	145
VIII. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的 P53, P21 蛋白之影響 .....	146
IX. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 及巨噬細胞中維生素 E 之影響 .....	146
X. 原兒茶酸對氧化型 LDL 及巨噬細胞中維生素 E 之影響 .....	146
XI. 洛神花水層粗萃取物對培養基及巨噬細胞中自由基之影響 .....	146
XII. 原兒茶酸對培養基及巨噬細胞中自由基之影響 .....	147
XIII. 洛神花水層粗萃取物對培養基中氧化型 LDL 之影響 .....	147
XIV. 原兒茶酸對培養基中氧化型 LDL 之影響 .....	147
XV. 洛神花水層粗萃取物對培養基及細胞中 MDA 含量之影響 .....	148
XVI. 原兒茶酸對培養基及細胞中 MDA 含量之影響 .....	148
XVII. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所造成 foam cell formation 的影響 .....	148
XVIII. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所造成 foam cell formation 的影響 .....	148
討論 .....	149
參考文獻 .....	152
圖及表 .....	158
附圖及附表 .....	180

## 中文摘要

由先前的研究中已經發現原兒茶酸 (PCA)和洛神花水萃取物 (HSE) 對於氧化型 LDL 所引起的巨噬細胞死亡具有抑制作用，因此在本實驗中我們要進一步以來探討其作用機轉。首先為探討細胞在處理過 OxLDL 及抗氧化劑後，細胞內有關細胞凋亡蛋白的變化。細胞粒線體的電位差在處理過 OxLDL 後下降為控制組的 27.4%，而處理 HSE 和 PCA 的組別則於最高劑量時可使膜電位恢復為 100% 及 104%。而此時因為氧化壓力而誘發粒線體膜蛋白、MAPK 蛋白及 P53 改變，致使細胞趨向於凋謝死亡。然而，處理 HSE 或 PCA 的組別 (特別是高濃度組) 則可改變這些蛋白的表達以使細胞趨向生存。另一方面，我們也測定細胞內外的維生素 E 及自由基的含量，以及 HSE 或 PCA 對 LDL 於細胞內外氧化抑制的情形，結果發現高濃度的 HSE 與 PCA 分別可以減緩細胞內外 LDL 氧化的程度，而這種抑制 LDL 氧化程度的作用應是來自於增加細胞內維生素 E 的含量與有限程度的減緩自由基的危害而達成。由這些結果推論，這兩種抗氧化劑在胞內外均具有減低氧化壓力的能力，而這種作用將可減緩 OxLDL 造成巨噬細胞死亡的情形。在這種情形下，HSE 及 PCA 將可運用這種機制以達到減緩動脈粥狀損傷的作用，而這正是 HSE 及 PCA 在預防心血管疾病上的一種重要的效能。

## 英文摘要 (Abstract)

In our previous study, we observed the inhibitory effects of HSE and PCA on OxLDL-induced macrophage apoptosis. Based on that, we further investigated the mechanisms here. Firstly, we surveyed the changes of apoptotic proteins, such as mitochondrial proteins, MAPK proteins and P53. When treating with OxLDL in macrophages, the mitochondrial potent lowered to 27.4% compared to control (the group of native LDL). Interestingly, the group co-treating with HSE and PCA in highest concentrations recovered the mitochondrial potent to 100% and 104%. At this moment, the mitochondrial proteins, MAPK proteins and P53 were changed because of the extreme oxidative stress, and more over than, this stress would make cell to trigger to apoptosis. However, co-treated with HSE or PCA (especially the groups in high concentrations) would change the expressions of these proteins and make cell survive. In addition to, we also detected the contents of vitamin E and free radicals existing in cell inside and in media. By the way, either in cell inside or in media, we examined the inhibitory level of OxLDL by co-treating HSE or PCA. We found that high concentrations of HSE and PCA were able to decelerate the level of LDL oxidation, and the inhibitory effects could be contributed by increasing vitamin E and by decreasing the content of free radicals. Taken the above together, these two antioxidants possessed the abilities to reduce oxidative stress in either cell inside or environment (media). These inhibitory effects would slow down the macrophage apoptosis induced by OxLDL. Under the circumstance, HSE and PCA were able to prevent the blood vessel from forming atherosclerotic lesions, and further prevent vascular diseases.

## 緒論

一些藉著家族型高膽固醇血症而研究的結果發現“遺傳”其實是一個很重要的致病因子，特別是一些製造細胞表面接受器的基因若發生缺損後，往往會影響低密度脂蛋白運送回肝臟代謝的速率或氧化型低密度脂蛋白的廓清率已至於增加動脈粥狀損傷及猝死（一對基因皆缺損時較易發生）的機率。目前對這些疾病的治療方法為降低高膽固醇食物的攝食、降低內在的合成量及增加低密度脂蛋白代謝分解速率，經由上述方法以期能延緩動脈粥狀損傷及增加病患壽命。另外，相當吊詭的是有一些人雖然攝取了高脂肪的食物且在血液中具有高濃度低密度脂蛋白，但他們卻從不會有動脈粥狀硬化的現象，因此也有一部分科學家探討這一方面的問題，結果在動物實驗模式中發現可能有九種未知的基因具有阻斷 (resistance) 動脈粥狀硬化的可能，而這些基因作用的分子機轉也正在被探討中，這些應該在未來預防心血管疾病上將有很大的應用。而現今，我們又能夠如何應用現有的資訊來執行預防心血管疾病？我們可以改變生活中的危險因子如：禁菸（因為香菸燃燒中會產生許多的自由基）、減少生活中的壓力、保持適當體重、持續運動、減少油炸性食物（油炸過程會導致脂肪酸氧化，而其中的一些不穩定的氧化性脂肪酸會嵌入 LDL 中而引起 LDL 氧化）及減低油脂的攝取。當然，目前最被建議的是在日常生活中增加抗氧化劑的食用量及多食用富含 flavonoids 的食物。我們在之前的實驗中已經證實原兒茶酸 (PCA) 和洛神花水萃取物 (HSE) 具有抑制 OxLDL 的能力，並且發現在高濃度的氧化性 LDL 存在巨噬細胞中時將引起細胞凋謝死亡，而 PCA 及 HSE 具有抑制巨噬細胞凋謝死亡的能力，但是這種抑制作用的機轉至今並不清楚，因此我們將要做一深入的探討。

### (i) 凋謝死亡 (Apoptosis) 與動脈粥狀硬化

在先前的實驗中，我們已經證實 OxLDL 會造成 RAW 264.7 細胞的凋謝死亡 (apoptosis)。在正常的生理狀態下，細胞必須於增殖 (proliferation)、生長停止 (growth

arrest)，以及細胞的程序性死亡 (programmed cell death, apoptosis )之間維持著動態的平衡，亦即細胞的數目必須經過嚴密的調控，使細胞數目不至於太少或過度增生甚或失控地生長。細胞的凋謝死亡也就是細胞程序性死亡 (programmed cell death)，目的就在確保與維持體內任何一特定部份之實際大小及組成，使其不超過生理所需的上限。這種現象可能發生於胚胎發育及生理成長階段，如生物體於變態時期之幼體器官退化；另一則是在外力刺激下所引起的細胞反應，如在細胞受到嚴重傷害，或患有免疫缺乏症候群，及老化或退化疾病出現時。當細胞進行凋謝死亡時，其特徵為細胞核與細胞質會聚合 (condensation)、DNA 退化分解或斷裂，而後細胞分裂為數個由細胞膜所包含的小體 (apoptotic bodies) (1-2)。一般來說，當淋巴球細胞受到病毒感染、細胞數目過高或發生自體反應時，細胞便會啟動這個程序；另外在個體發育的早期細胞大量增生，當進入分化時期則會以 apoptosis 使細胞數目減少以利分化。但就另一方面來說，不當的活化凋謝死亡程序，卻往往導致諸如缺血性中風 (ischemic stroke) 與愛滋病 (AIDS)等疾病。其終極的生理意義在於消除多餘的、老化的、已失去功能的或突變的不正常細胞。

太多的細胞死亡會導致發展的不平衡及一些退化性疾病的產生，然而太少的細胞死亡，則會導致發育生長障礙或癌症的形成。而在心血管疾病方面，凋謝死亡於近十年來被探討甚多。在 *in vivo* 的觀察中，許多學者已經發現一些證據支持心血管疾病與凋謝死亡的相關性 (3-5)，他們發現在動脈粥狀硬化斑塊 (atherosclerotic plaque) 中出現了包括凋謝死亡及壞死 (necrosis) 兩種類型的死細胞，1994 年，Escargueil-Blanc 等人也發現要將此二種細胞區分清楚相當困難 (6)，因此多數的研究仍專注於探討細胞凋亡在心血管疾病中扮演的角色。而在臨床上發現，隨著動脈硬化損傷的增加，在病灶中所出現的凋謝死亡細胞越多 (7-9)。在研究報告中指出病灶中出現的凋謝死亡細胞的比例平均由 2% 到 30%，甚至也有報告達 60% (10-14)，Kockx 依據動脈粥狀損傷的發展分析細胞凋亡的程度，結果發現在細胞內膜增厚 (intimal thickening) 及形成脂肪條塊 (fatty streak) 的時期，凋亡細胞的數量極少；相對的，



在已形成動脈粥狀硬化斑塊的時期方可見明顯凋亡細胞出現，且大多數出現的區域皆伴隨著巨噬細胞浸潤 (macrophage infiltration) (附圖一，4)。在動脈粥狀硬化的病灶中，巨噬細胞及平滑肌細胞 (smooth muscle cells, SMCs) 皆會出現細胞凋亡，而這兩種細胞凋亡的重要性相當不同。平滑肌細胞的凋謝死亡會使得動脈粥狀硬化斑塊不穩定而趨向瓦解；而巨噬細胞的凋謝死亡引起的則是動脈粥狀硬化斑塊趨於穩定而降低瓦解的可能 (15, 16)。早先對於巨噬細胞在動脈粥狀硬化過程中的角色界定，是由於在病灶中發現大量巨噬細胞吞噬了脂質後所形成的泡沫細胞堆積，並且，在細胞培養中給予氧化型 LDL (OxLDL) 會引起巨噬細胞增生，因為如此的結果，有一些科學家認為增生的巨噬細胞應會促進動脈粥狀硬化的發展。然而，在 1999 年，Han 等人發現氧化程度低的 OxLDL 會使得巨噬細胞增生，而氧化程度高的 OxLDL 會使得巨噬細胞凋謝死亡 (17)。再參考先前的研究資料指出巨噬細胞吞噬了 OxLDL 後具有破壞這些脂蛋白的潛力 (18, 19)，因此 Tabas 於 2001 年提出在巨噬細胞增生的情況下可能是具有保護血管的作用；反之，倘若巨噬細胞死亡甚速，則這種保護作用不僅喪失，甚至因為死細胞的大量累積而導致動脈粥狀損傷的發展加速而引起更大的傷害 (20)。

## (ii) 凋謝死亡進行時的粒線體

粒線體 (Mitochondria) 一詞起於 1850 年，顯微鏡專家在觀察細胞內部結構時發現許多線條狀 (mitos) 和顆粒狀 (chondros) 的特異形胞器，故將其以形命名為粒線體。而 1912~1913 年，Kingsbury 和 Warbury 等人發現粒線體為細胞的產能中心，故將其稱之為 "powerhouse of the cell"，1920~1930 年 Kerbs 發現了 citric acid cycle 及 1931 年 ATP 的發現更證明了粒線體在細胞內能量的供應佔舉足輕重的地位。一些證據指出，當初原生細菌進到細胞內的同時，不但將產能的方式帶入細胞內，以提供細胞生長、活動、分化之用；更將一些目前認為與細胞凋亡 (apoptosis) 的基因帶入細胞內，最明顯的例子是與 Bcl-2 相似的基因 CED-9 (*C. elegans*) 其在染色體的位置恰好在粒線體電子傳遞鏈的重要蛋白質 cytochrome b 的旁邊，這些 Bcl-2 家族的成員不論結構或功能都與一些細菌毒素相似 (如

diphtheria toxin 和 colicins)，且 Bcl-2 家族的許多成員都會結合在粒線體的膜上，並能在粒線體表面形成許多孔洞，而這些孔洞的形成會造成粒線體間質釋放出 cytochrome c 和 apoptosis-inducing factor (AIF) 去活化 caspases 而引起一連串細胞凋亡的現象發生。也因此粒線體被稱之為細胞凋亡的劊子手 (executioner)。調控這些粒線體內容物的釋放被認為與粒線體膜上一種稱為 mitochondrial permeability transition pore (PT pore) 的巨大通道有關，它包含了兩大部分：一是在粒線體內膜與 adenine nucleotide translocator (ANT) 相關之蛋白質；另一是在外膜的蛋白質 (包括了 porin, voltage-dependent anion channel, VDAC)。打開此一通道會造成粒線體內膜兩側  $H^+$  gradient 消失、粒線體膜電位下降、matrix 滲透壓增高，造成粒線體漲大，外膜漲破之後，caspase-inducing factors (cytochrome c 和 AIF) 釋放到細胞質中造成細胞凋亡 (21, 22)。在研究 PT pore 過程中發現，許多抑制 PT pore 打開的化合物可以抑制細胞凋亡的發生。這些研究使得研究粒線體膜電位的改變就顯得相當重要。因為，粒線體膜電位下降不但是細胞凋亡的一個重要指標；也可能是調控此一機轉相當重要的關鍵。粒線體在呼吸氧化過程中，將所產生的能量以電化學位能儲存於粒線體內膜 (約 250 mV/5~10 nm)，稱之為 mitochondrial membrane potential (Dym)，並以此位能來進行電子傳遞鏈，最終產生 ATP 以供細胞使用。而此一電位差形成於粒線體內膜，為外正內負的形式。許多親脂性的陽離子化合物會結合到粒線體內膜，在雷射激發光下放出螢光，可以非常方便地使用螢光顯微鏡或共軛焦顯微鏡來觀察粒線體的形態和移動的變化情形。最早被發現的粒線體染劑為 rhodamine 123 (Rh123)，Dr. Lan-Bo Chen 的實驗室發現 Rh123 可特異性的染在活細胞的粒線體上，而 ionophores, uncoupler 或是一些抑制電子傳遞鏈的藥物 (rotenone, antimycin, cyanide) 都會降低 Dym，並會減少粒線體攝入 Rh123 的量。Rh123 以 490 nm 激發光下會放出 515 nm 的螢光，因此 Rh123 可被當成一種簡易的測定膜電位的染劑。

### (iii) 粒線體蛋白與動脈粥狀硬化

Apoptosis 的進行與 cysteine aspartases (caspases) 有極大的關係，因為 caspases 會在細

胞遭受凋亡刺激 (apoptotic stimuli) 時被活化而進行蛋白水解的作用。目前可將 Apoptosis 的機制分為兩部分進行：(1) 外在途徑 (extrinsic pathway)，為粒線體外的細胞凋亡機制。此途徑乃起始於 transmembrane death receptor (如 CD95, TNF receptor 及 TRAIL receptor) 與一些 ligands 結合後會活化 membrane-proximal (activator) caspases (caspase-8 及 caspase-10)，在促使其下游之 effector caspases 如 caspase-3, 6, 7 活化之後，便接著進行 apoptosis，這個過程可以被 c-FLIP (可抑制上游活化的 caspases) 及凋亡蛋白抑制劑 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 負調節 (附圖二)；(2) 內在途徑 (intrinsic pathway)，即為與粒線體密切相關的細胞凋亡。此途徑需破壞粒線體膜並釋放出粒線體蛋白如 Smac/DIABLO, HtRA2 及 cytochrome c，cytochrome c 會與 Apaf-1 結合並使 caspase-9 活化以啟動 apoptotic caspase cascade，而 Smac/DIABLO 及 HtRA2 的作用則在於結合並箝制 IAPs (23, 24)。粒線體膜的通透性可以藉由兩類 Bcl-2 family 之相反的作用彼此調節，其一為 proapoptotic proteins (如 Bak, Bax)，它們可以在與 Bid (BH3-only Bcl-2 protein) 進行交互作用後直接被活化而引起 apoptosis；其二為如 Bcl-2 及 Bcl-XL 等 antiapoptotic proteins 則是在細胞進行 apoptosis 時產生而對抗 apoptosis 的蛋白。除此之外，proapoptotic 及 antiapoptotic 蛋白也可以進行交互作用，例如其他 BH3-only Bcl-2 protein 如 Noxa, Puma, Bad 及 Bim 可以和 antiapoptotic 蛋白結合以使 Bax 及 Bak 活化以進行 apoptosis。至於 Bcl-2 蛋白控制粒線體膜的通透性是倚賴在粒線體外膜形成通道直接控制，抑或藉由調節膜上通道的開或關以進行間接調控目前則尚未可知，但是可以確定的是位於粒線體膜上的這些 proapoptosis 及 antiapoptosis 的蛋白之間的淨作用將會影響細胞走向死亡或生存。在 extrinsic 及 intrinsic 途徑也會出現交互作用，例如 caspase-8 可以使 Bid 活化而促使 cytochrome c 釋出，這種現象將會對 death receptor 所引起的 apoptosis 產生加成的作用 (25)。而在關於動脈粥狀硬化發展的過程中，學者發現在人類的脂肪斑塊中的平滑肌細胞及巨噬細胞皆發現有 Bax 蛋白存在，而 Bcl-2 卻不曾在此病灶中被測定到 (26)。

凋謝死亡雖然與粒線體息息相關，但是有一些蛋白也是決定細胞存活不可忽略的因素。其中與動脈粥狀硬化較為相關的是 P53 蛋白：

#### **(iv) p53 蛋白與動脈粥狀硬化**

p53，為一腫瘤抑制基因，在很多的腫瘤細胞內其 p53 基因已經被突變(mutation) 或刪除(deletion)，這些含有突變 p53 的細胞都較具有抗細胞凋亡的能力，而且有強的增生能力及擴散 (Metastasis) 能力。除上述之外，P53 蛋白也是目前已知與細胞程式性死亡的機轉較為相關的蛋白 (27)，它為一種分子量 53 KDa 的蛋白質，可以調控 DNA 傷害及一些基因毒物壓力所造成的反應，是維持基因穩定的重要因子。在一些癌症的發展過程中，時常會出現 P53 的功能喪失或 P53 突變的情形。將 P53 轉殖入已經發生變性 (transformed) 的細胞中，可以造成細胞的生長停滯 (cell growth arrest) 及細胞的凋謝死亡。因此可知 P53 可以導致細胞生長停滯及細胞的凋謝死亡。至於應該走生長停滯或細胞的凋謝死亡，則必須仰仗環境及細胞的種類而定。在正常的情況下，P53 蛋白的表現量很低，但是當發生 DNA 傷害時會活化 P53，它不僅會增加 P53 的量，並且會使得 P53 活化，去當一個轉錄因子，去活化下游一些在標的區段 (target element) 上具有 P53 反應促進子的基因。P53 下游可以調控細胞之兩種路徑：細胞生長週期停滯 (cell cycle arrest) 及細胞的凋謝死亡 (apoptosis)。在細胞生長週期停滯方面，P53 可以藉由調控 p21<sup>WAF1</sup>，p16 cyclin D1，cdk4 及 Rb 來導致細胞週期停止 (cell cycle arrest)。在 apoptosis 方面，則是利用 bax 及 IGF-BP3 來決定 P53 所調控細胞之凋謝死亡途徑 (28-31)。過度表現 Bcl-2 可以抑制 P53 導致的 apoptosis，而 Bax 可以與 Bcl-2 結合而產生拮抗作用。所以由 P53 所調控的 Bax, Bak, PUMA 及 Noxa 等的生成可以促使細胞走向 apoptosis (32-35)。除了這些作用之外，P53 尚可以 transactivate 一些會導致 apoptosis 的蛋白如 PTEN, Apaf-1, PERP, p53AIP1 等；轉錄活化 death receptor 如 CD95 及 TRAIL receptor 2；另外它還可以活化一些製造 reactive oxygen species (ROS)的基因表達，以加速 apoptosis 的進行。因此，P53 蛋白在 apoptosis 的過程中實為一種主宰的角色。除了 P53 的

轉錄調節外，Bcl-2 的活化也可能磷酸化以進行轉譯後修飾，譬如一些 pro-survival kinases 包括 Akt, p90S6K, p70S6K 及 PKA 會使 Bad 磷酸化，這會抑制 Bad 與 anti-apoptotic Bcl-2 蛋白的交互作用並誘發 Bad 遠離粒線體而和 14-3-3 adaptor proteins 結合，最近更有證據指出 Bcl-2 蛋白也可能被 MAP kinases 磷酸化而改變其活性 (36-38)。

此外，Ihling 等人分別於 1997 和 1998 年提出在人類的動脈粥狀損傷中進行免疫組織染色發現 P53、P21 及 MDM2 的表達皆有增加的現象，特別的是這些蛋白乃是存在於一些未增生或 apoptosis 的巨噬細胞，這暗示著與 P53 相關的機轉正控制著動脈粥狀損傷的形成 (39-43)。而首先在 *in vivo* 的系統中發現 P53 在動脈粥狀硬化過程中的角色者是 Guevara 等人 (44)，他們發現當 P53 被 knockout 的小白鼠在超過 10 週的高脂肪餵食後會出現較多的高血脂現象及出現動脈粥狀損傷的現象，而在這些病灶中則出現較多細胞死亡的現象。因此作者認為 P53 在動脈粥狀硬化的形成中應在平滑肌細胞、內皮細胞中扮演了一個重要的角色，因為 P53 及其下游的 p21WAF1 皆被發現存在於未增生動脈粥狀損傷的平滑肌細胞及內皮細胞中，所以 P53 在動脈粥狀硬化的致病機轉中所扮演的角色也會是一個有趣的課題。

#### (v) 環境因素

細胞之生死間的內在平衡時則受到許多因素之調控，除了內在基因的改變外，影響基因表達的環境因素更不容忽視。氧的氧化產物則是環境因素中極重要的一群，因為在生物體中隨時都會產生包括超氧陰離子 (superoxide anion)、過氧化氫 (hydrogen peroxide)、單氧 (singlet oxygen)、氫氧基 (hydroxyl radical) 及過氧基 (peroxy radical) 等，這些物質皆會提高體內毒性並影響代謝功能 (45, 附表一)。在體內存在有內源性的抗氧化劑如維生素 E 可以去除或減弱自由基的毒性，但當內源性的抗氧化劑不敷使用時，殘留的自由基即會攻擊蛋白質或核酸等大分子而引起細胞傷害，因此有許多的證據顯示氧化壓力會引起細胞死亡 (46, 附圖三)。

#### (a) 氧化壓力與動脈粥狀硬化

隨著人類的進化以及各種文明的高度發展，使人類的生活越來越便利，但卻也造成許多

環境污染及公害。進而使人類的細胞產生了各種不良的影響，這些危害往往是由於活性氧引起過氧化脂質等化學物質在人體所造成的結果。自由基的理論首先是在西元 1956 年由英國的 Harman 提出，自由基 (free radical) 簡單的說是具有一個或多個未配對電子的原子或分子，由於極不穩定，容易與各種無機或有機化合物如：蛋白質、脂質、碳氫化合物等作用，進而攻擊 DNA，而使細胞產生變化。生物學上最重要的自由基是以碳和氫為中心的自由基，而體內的自由基活性大都來自所謂的氧自由基，其中最重要的有：1. 氫氧自由基( $\cdot\text{OH}$ )；2. 過氧化氫( $\text{H}_2\text{O}_2$ )；3. 過氧離子( $\text{O}_2^-$ )等。這些含氧的產物或中間產物都有很大的化學活性 (又稱為活性氧)；本身具有強烈的氧化作用，會給組織細胞帶來氧化壓力，破壞身體的細胞膜、血管壁、蛋白質和基因。自由基所涉及的相關疾病，由美國著名學者 Halliwell 教授所提出的自由基參與的各種疾病中，即可發現自由基是導致各種慢性病、癌症甚至老化的主要因素。其研究中發現與自由基有關的疾病有下列：1. 心臟循環系統：心肌病變、動脈硬化症；2. 肺臟：肺氣腫、成年人呼吸窘迫症；3. 腎臟：腎毒素、腎臟移植排斥作用；4. 消化系統：肝毒素、肝炎、糖尿病、胰臟炎；5. 腦：老年痴呆症、巴金氏症、高血壓之血管病變；6. 癌症、老化 (退化性疾病)、自體免疫疾病 (紅斑性狼瘡、關節炎)。現代人因為飲食中易於食入大量的油脂，因此極易形成過氧化脂質而造成心血管疾病，所以在自由基與動脈粥狀硬化的關係中，最常被研究的即為一群稱之為氧化固醇類 (oxysterols) 的物質，共包含有膽固醇遭氧化修飾的 12 種型態 (附圖四，47)，而此種過程即為形成氧化型低密度脂蛋白而逐漸演變為動脈粥狀硬化的元兇 (48)。在 2002 年，Heinle 等人以紐西蘭大白兔為研究對象，在高膽固醇飲食誘發的動脈粥狀硬化過程中，以 luminol 標定自由基並發出冷光的方法於不同時期測定主動脈中自由基的含量。他們發現自由基濃度越高，血漿中的 OxLDL 越高，而且動脈粥狀斑塊也越大 (49)。除此之外，氧化壓力下所造成的自由基增加，也可能經由活化一些對氧化作用敏感的轉錄因子 (譬如 nuclear factor-kappaB, c-Myc, 及 peroxisome proliferator-activated receptor family 等) 而使細胞死亡，造成血管病變而發展為動脈粥狀硬化或其他心血管疾病 (50)。

## (b) 維生素 E ( $\alpha$ -tocopherol) 與動脈粥狀硬化

雖然自由基的產生來源如此多元且影響甚遠，但是體內存有二大抗氧化系統可與之對抗，一為酵素型例如：超氧化歧化酵素 (superoxide dismutase); 麩胱甘太過氧化酵素 (glutathione peroxidase)等，可由體內自行合成，但因環境、年紀等因素的影響，導致生理機能不順暢，而造成合成的能力漸漸減少。另一種則為非酵素型，例如：內生性維生素 C、維生素 E 及  $\beta$ -carotene；外在飲食所補充的兒茶酸 (Catechins) 及類黃酮 (Flavonoids)甚至許多存有抗氧化物質的天然植物，如五穀類食物、十字花科蔬菜、蕃茄、黃豆、綠茶、有機酸等抗氧化物質。在以銅離子誘導 LDL 氧化時，LDL 內所含之眾多內源性抗氧化劑會逐漸消失，最先遭遇的防線為 $\alpha$ -tocopherol (51)；因此在內源性的抗氧化劑方面，維生素 E 被研究最多。Reaven 等人的研究發現當額外補充維生素 E 時，亦會藉由增加 LDL 內源性  $\alpha$ -tocopherol 的數量而改變 LDL 的氧化敏感性(52, 53)。 $\alpha$ -tocopherol 主要是藉著血液循環中水溶性抗氧化劑之幫助而再生 (recycling)，如維生素 C、ubiquinone 等；Wu 等人也在 1998 年指出，餵食富含水溶性抗氧化劑之丹參水溶液成份可顯著增加紐西蘭大白兔 LDL 中 $\alpha$ -tocopherol 之數量(54)。而在臨床及流行病學的調查中卻是眾說紛紜。在 1996 年 Stephens 等人的研究中 (Cambridge Heart Antioxidant Study, CHAOS)指出給予高濃度維生素 E (800 mg/day) 比控制組降低了 47% 心血管疾病的死亡率；但是在 2000 年 Yusuf 的研究 (The Heart Outcomes Prevention Evaluation, HOPE)及 Boaz 的研究 (The Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular disease in Endstage renal disease, SPACE) 中卻發現維生素 E 未能影響心血管疾病的發生及死亡率 (55-57)。由這些研究我們可以發現，額外補充維生素 E 的效果不一，但假如能增加內生性的維生素 E 則會使抗動脈粥狀硬化的作用較為顯著。因此，如第二部分的討論所論述，即使多元酚類化合物在體內可表現出的抗氧化能力有限，卻可藉由與 LDL 內源性抗氧化劑之交互作用，而達到保護 LDL 免受氧化修飾之目的。

我們即將探討的 apoptosis 與動脈粥狀硬化的主題中，目前已有許多證據顯示 OxLDL 所

造成的細胞死亡與動脈粥狀硬化有相當明顯的正相關。因此我們將以上述之 apoptosis 相關之機轉及相關的環境因素來探討洛神花水萃取物及原兒茶酸在氧化型 LDL 誘發巨噬細胞死亡時的抑制位置。



## 研究目的

由先前的研究中已經發現原兒茶酸 (PCA)和洛神花水萃取物 (HSE) 對於氧化型 LDL 所引起的巨噬細胞死亡具有抑制作用，因此在本實驗中我們要進一步來探討其作用機轉為何？巨噬細胞同樣地預先處理不同劑量 PCA 或 HSE 後，再加入 OxLDL，共同培養後，分兩部分進行機轉的探討：第一為探討細胞在處理過 OxLDL 及抗氧化劑後，細胞內有關細胞凋亡蛋白的變化。首先將測定細胞粒線體的電位差改變的情形已確定 apoptosis 是否經由粒線體的途徑進行，接著再以細胞質蛋白測定 apoptosis-related 蛋白的量或磷酸化情形的改變；第二則是測定細胞內外的維生素 E 及自由基的含量，以區分這兩種抗氧化劑在胞內外抗氧化能力的差異。我們期望能藉此釐清原兒茶酸和洛神花水萃取物對於氧化型 LDL 所引起的巨噬細胞死亡中間的機轉。

## 實驗材料和方法

### **XIX. 化學試劑及藥品**

rhodamine 123, Tris-base, ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), sodium hydroxide, sodium chloride, copper sulfate, HEPES, EGTA, KCl, DTT, leupeptin, PMSF, sodium orthovanadate, Vitamin E, luminol, lucigenin 皆購自美國 Sigma Chemical Co. ; RPMI 1640, Trypsin, Penicillin-Streptomycin mixed antibiotics, L-Glutamine, phosphate buffer solution (PBS)皆購自美國 Gibco Co. ; Oil red 及 Hematoxylin 購自日本武藤化學藥品株式會社。

### **XX. LDL 的抽取**

同第一部分。

### **XXI. OxLDL 之製備**

同第二部分。

### **XXII. 細胞培養**

同第二部分。

### **XXIII. 粒線體膜通透性之測定 (mitochondrial membrane potential determination)**

當細胞中粒線體損傷時，一般即表示細胞受到了傷害，而粒線體損傷初步可由 mitochondrial membrane potential 觀察，本實驗擬以 rhodamine 123 滯留作用來評估粒線體膜電位之變化，粒線體會因為細胞傷害 (apoptosis) 後失去膜電位，而使原來嵌在粒線體膜上的 pre-apoptotic 及 anti-apoptosis 相關的一些蛋白釋放出來，因此粒線體膜電位之變化是一種在 apoptosis 早期發展中重要的指標。實驗方法乃將  $4 \times 10^6$  cell 加入  $1 \mu\text{M}$  rhodamine 123 反應 30 分鐘後，再加入前述之 HSE 或 PCA、及 OxLDL 培養 1.5 小時後收集細胞，以 3 ml PBS (含 1 % Triton X-100) 打破細胞，以 6000 g 離心 15 分鐘後取 2ml 上清液，於螢光光度儀  $\text{EX}_{490\text{nm}}/\text{EM}_{515\text{nm}}$  下測定吸光值 (Hitachi F-2000)。

#### **XXIV. 蛋白質抽取及定量**

同第二部分。但是由於本部分的實驗將探討 apoptosis 的進行機轉，所以必須將膜的部分及細胞質分開。步驟為將細胞收集並以 PBS 清洗後，加入 cold-ice lysis buffer (10 mM HEPES, pH7.9; 10 mM KCL; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0.5 mM PMSF; proteinase inhibitor containing 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml apoptinin, 0.03 mM sodium orthovanadate)，置於冰上作用 15 分鐘，加入 10% NP-40 後劇烈震盪 10 秒，以 10000g, 4°C 離心 10 分鐘，取上清液 (cytosol)。沉澱部分則再加入 ice-cold nuclear extraction buffer (20 mM HEPES, pH7.9; 400 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml apoptinin, 0.03 mM sodium orthovanadate)，置於冰上作用 30 分鐘 (隨時拿起搖晃混合)，再以 12000g, 4°C 離心 15 分鐘，取上清液 (membrane)。

#### **XXV. 蛋白質電泳**

同第二部分。

#### **XXVI. Western Blotting 分析**

同第二部分。唯其所使用的一次抗體需改換成本部份實驗需要之抗體，包括 MEK, ERK, pJNK, Bcl-2 及 Bax 及 P53。

#### **XXVII. 維生素 E 的測定**

本法乃修改自 Rocheford 等人的維生素 E 測定法 (58)，敘述如下：

##### **(1) 樣本處理**

製備好的 LDL (最終濃度為 100 µg protein/ml) 先加入不同濃度的 PCA (0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mM) 或 HSE (0.01、0.03、0.05、0.1、0.5 mg/ml)，再分別加入終濃度為 10 µM 之之 CuSO<sub>4</sub> 於 37 °C 下水浴 24 小時後收取樣本進行處理。處理方式為取 0.1 ml 樣本加入等量 5 mM PBS 稀釋，其後加入 2 ml 乙醇溶液 (alcohol : isopropanol = 95 : 5) 及 2 ml 正己烷進行萃取，在震盪 1-2 分鐘後，以 2000 rpm 離心 10 分鐘，

移除上層乙醇溶液後以氮氣吹乾正己烷，再以 150  $\mu$ l 之溶液 (Methanol : Alcohol = 1 : 1) 復溶後即可進行分析。在細胞內維生素 E 的測定方面，則是將細胞依第二部分的處理方式加藥處理再進行收集，因為細胞中的維生素 E 含量甚低，因此至少須收集  $4 \times 10^7$  個細胞方可。另外在細胞的處理方面則是將培養基去除後，以 PBS 清洗 2 次，用 scraper 刮下後離心 (1500 rpm, 5 分鐘) 以去除多餘的 PBS。其後則以 0.1 ml 之 5M PBS 再懸浮，並以超音波震盪器震 1 分鐘再進行萃取，萃取方式則與上述相同。

## (2) 標準曲線

系統平衡 4 小時，檢測分析效果無誤後，將維生素 E 標準品以 methanol : alcohol = 1 : 1 稀釋成 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/ml 進行測定，retention time 約為 17.8 分鐘，將結果積分計算後與濃度對照製作標準曲線。

管 柱：LiChrospher RP-18 (250 $\times$ 10 mm, 5 $\mu$ m)，德國 E. Merck Co.

移動相：Acetonitrile : Methanol = 85 : 15 (v/v)

流 速：1 ml/min, at ambient temperature

偵測器：Hitachi D-2500 chromato-integrater UV-Vis detector (295 nm)

## (3) 樣本測定

在製作好標準曲線後，將樣本打入，並依積分結果與標準曲線對照換算出濃度。

## XXVIII. 自由基的測定

細胞處理方式同第二部分。當細胞處理結束後將培養基及細胞分別收集，細胞部分則以 PBS 清洗 2 次後，以 1 ml PBS (含 1 % Triton X-100) 打破細胞。以自由基冷光測定儀 (Chemiluminescence Analyzer CLA-2100, TOHOKO Electronic industrial Co. LTD) 打入 300  $\mu$ l 的樣本進行 100 秒基準值的測定，隨即加入 luminol 以測定 hydrogen peroxide。清洗樣本槽後，另外再打入 300  $\mu$ l 的樣本，同樣進行 100 秒基準值的測定，隨即加入 lucigenin 以測定 superoxide。本實驗共測定 300 秒，實驗數值乃是以第 150 秒進行統計。細胞培養

基及細胞抽取液皆須進行這兩種測定以比對 hydrogen peroxide 及 superoxide 的量。

### **XXIX. LDL-peroxidation-relative electrophoretic mobility (REM)**

以 Beckman paragon lipo gel electrophoresis system (Beckman analytic, Milan, Italy) 進行分析，細胞經過如第二部分的處理後，取培養基 5  $\mu$ l 進行電泳，100V 通電 30 分鐘後，以固定液固定 5 分鐘後烘乾，再用染色液染色 5 分鐘，最後以脫色液脫色。依電泳結果以 band 移動的距離 (electrophoretic mobility ; EM) 判定 LDL 氧化程度，以未氧化之 LDL 之 EM 為 1。

### **XXX. TBARS assay**

利用 Yagi 氏 (1987) 等修飾之螢光測定法 (59)，其原理因 LDL 氧化會生成過氧化物 Malondialdehyde (MDA)，一分子的 MDA 與二分子的 thiobarbituric acid (TBA) 會生成具螢光性質的聚合物 TBARS (thiobarbituric acid reactive substance)，此物質於激發波長 (Ex) 為 532 nm，發射波長 (Em) 為 600 nm 時可被螢光光度計偵測到。以 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TEP) 為標準液做標準曲線而可定量 LDL 氧化程度，單位為 nmol MDA/mg protein。細胞經過如第二部分的處理後，分別收取培養基及細胞 (細胞以 PBS 清洗 2 次後以 1 ml phosphate buffer, 50 mM, pH7.0 刮取)，取 700  $\mu$ l 樣本加入 0.2 ml TCA [20% (W/V)] 及 0.2 ml TBA [0.67% (W/V) in 0.3%NaOH] 後於 90-95°C 加熱 45 分鐘，待冷卻進行測定。

### **XXXI. Foam cell formation 的測定**

細胞處理方式如同第二部分，唯必須將氧化型 LDL 的終濃度改為 25  $\mu$ g/ml，培養細胞 16 小時後，去除培養基後以 PBS 清洗 2 次，加入 10% paraformaldehyde 固定 15 分鐘。接著加入 oil red 染色至少 1 小時，其後吸出 oil red，以水洗去多餘的染劑後，再用 hematoxylin 染核以觀察 foam cell。

## 結果

### XXXII. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜電位之影響

RAW 264.7 cell 預先處理 rhodamine 123 後 30 分鐘，加入洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，隨即加入 OxLDL 培養 1.5 小時，在螢光的測定下可以發現 OxLDL 會使膜電位下降 27.4% (控制組為只有 LDL 的組別)，洛神花水層粗萃取物在濃度越高的情況之下對膜電位下降的抑制作用越強，且呈現 dose-dependent 的現象，在最高濃度處理下可將膜電位下降的情形抑制為控制組的 100%。(圖一)

### XXXIII. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜電位之影響

RAW 264.7 cell 預先處理 rhodamine 123 後 30 分鐘，加入原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，隨即加入 OxLDL 培養 1.5 小時，在螢光的測定下可以發現 OxLDL 會使膜電位下降 27.4% (控制組為只有 LDL 的組別)，原兒茶酸在濃度越高的情況之下對膜電位下降的抑制作用越強，且呈現 dose-dependent 的現象，在最高濃度處理下可將膜電位下降的情形抑制為控制組的 104%。(圖二)

### XXXIV. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜蛋白之影響

RAW 264.7 cell 處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，隨即加入 OxLDL 培養 6 小時，抽取蛋白之後觀察其 Bcl-2, Bax 及 cytochrome c 蛋白的變化。由結果中可以發現在只處理 OxLDL 的組別，其 Bcl-2 的量下降為 37%、Bax 的量增加為 142%、cytochrome c 的量增加為 205%，而隨著洛神花水層粗萃取物濃度的增加，Bcl-2 的量逐漸增加，且 Bax 及 cytochrome c 的量卻逐漸減少。當洛神花水層粗萃取物濃度最高時，Bcl-2 的量增至 147%、Bax 的量減至 67%、cytochrome c 的量則減至約 100% (接近控制組)。(控制組為只有 LDL 的組別)(圖三)

### XXXV. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜蛋白之影響

RAW 264.7 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，隨即加入

OxLDL 培養 6 小時，抽取蛋白之後觀察其 Bcl-2, Bax 及 cytochrome c 蛋白的變化。由結果中可以發現在只處理 OxLDL 的組別，其 Bcl-2 的量下降為 26%、Bax 的量增加為 116%、cytochrome c 的量增加為 214%，而隨著原兒茶酸濃度的增加，Bcl-2 的量逐漸增加，且 Bax 及 cytochrome c 的量卻逐漸減少。當原兒茶酸濃度最高時，Bcl-2 的量增至約 100%、Bax 的量減至 52%、cytochrome c 的量減至 107%。(控制組為只有 LDL 的組別)(圖四)

#### **XXXVI. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的 MAPK 蛋白之影響**

RAW 264.7 cell 處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，隨即加入 OxLDL 培養 6 小時，抽取蛋白之後觀察其 ERK 1/2, MEK 及 JNK/p-JNK 蛋白的變化。由結果中可以發現在只處理 OxLDL 的組別，其 ERK 1/2 的量下降為約 51%、MEK 的量下降為 18%、p-JNK 的量增加為 185%，而隨著洛神花水層粗萃取物濃度的增加，ERK 1/2 及 MEK 的量逐漸增加，而 JNK/p-JNK 的量卻逐漸減少。當洛神花水層粗萃取物濃度最高時，ERK 1/2 的量增至約 100%、MEK 的量增至約 103%、p-JNK 的量減至約 43%。(控制組為只有 LDL 的組別)(圖五)

#### **XXXVII. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的 MAPK 蛋白之影響**

RAW 264.7 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，隨即加入 OxLDL 培養 6 小時，抽取蛋白之後觀察其 ERK 1/2, MEK 及 JNK/p-JNK 蛋白的變化。由結果中可以發現在只處理 OxLDL 的組別，其 ERK 1/2 的量下降為 41%、MEK 的量下降 67%、p-JNK 的量增加為 166%，而隨著原兒茶酸濃度的增加，ERK 1/2 及 MEK 的量逐漸增加，而 JNK/p-JNK 的量卻逐漸減少。當原兒茶酸濃度最高時，ERK 1/2 的量增至約 100%、MEK 的量增至約 97%、p-JNK 的量減至約 92%。(控制組為只有 LDL 的組別)(圖六)

#### **XXXVIII. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的 p-P53 蛋白之影響**

RAW 264.7 cell 處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，隨即加入 OxLDL 培養 6 小時，抽取蛋白之後觀察其 p-P53 蛋白的變化。由結果中可以發

現在只處理 OxLDL 的組別，其 p-P53 的量增加為 273%，而隨著洛神花水層粗萃取物濃度的增加，p-P53 的量逐漸下降。當洛神花水層粗萃取物濃度最高時，p-P53 的量下降至約 122%。(控制組為只有 LDL 的組別)(圖七)

#### **XXXIX. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的 p-P53 蛋白之影響**

RAW 264.7 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，隨即加入 OxLDL 培養 6 小時，抽取蛋白之後觀察其 p-P53 蛋白的變化。由結果中可以發現在只處理 OxLDL 的組別，其 p-P53 的量增加為 192%，而隨著原兒茶酸濃度的增加，p-P53 的量逐漸下降。當原兒茶酸濃度最高時，p-P53 的量下降至 73%。(控制組為只有 LDL 的組別)(圖八)

#### **XL. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 及巨噬細胞中維生素 E 之影響**

在 RAW 264.7 cell 中處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，爾後加入 OxLDL 培養 15 小時，收集並破碎細胞後測定細胞內維生素 E 含量；另外在試管中分別加入洛神花水層粗萃取物、LDL 及銅離子，於 37°C 培養 24 小時後萃取 LDL 中維生素 E 測定。在結果中可以發現試管反應的維生素 E 幾乎無法測定出；而細胞中的維生素 E 則只在 0.5 mg/ml 的組別可以測定到，濃度分別為 7.51 µg/ml。(表一)

#### **XLI. 原兒茶酸對氧化型 LDL 及巨噬細胞中維生素 E 之影響**

RAW 264.7 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，爾後加入 OxLDL 培養 15 小時，收集並破碎細胞後測定細胞內維生素 E 含量；另外在試管中分別加入原兒茶酸、LDL 及銅離子，於 37°C 培養 24 小時後萃取 LDL 中維生素 E 測定。在結果中可以發現試管反應的維生素 E 幾乎無法測定出；而細胞中的維生素 E 則在 0.5 及 1.0 mM 的組別可以測定到，濃度為 5.32 及 9.47 µg/ml。(表二)

#### **XLII. 洛神花水層粗萃取物對培養基及巨噬細胞中自由基之影響**

在 RAW 264.7 cell 中處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，爾後加入 OxLDL 培養 15 小時，收集並破碎細胞後測定細胞內自由基含量；另外



則收集培養基同步測定其自由基。在結果中可以發現在 hydrogen peroxide 的測定中，當加入 OxLDL 後，培養基中的 hydrogen peroxide 含量在加或不加洛神花水萃取物可發現有些微被抑制的現象 (約 20-28%之間);而細胞內的 hydrogen peroxide 含量在加或不加洛神花水萃取物則無明顯差異。另外，在 superoxide 的測定中，當加入 OxLDL 後，培養基中及細胞內的 superoxide 含量在加或不加洛神花水萃取物皆無明顯差異。(表三)

#### **XLIII. 原兒茶酸對培養基及巨噬細胞中自由基之影響**

在 RAW 264.7 cell 中處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，爾後加入 OxLDL 培養 15 小時，收集並破碎細胞後測定細胞內自由基含量；另外則收集培養基同步測定其自由基。在結果中可以發現在 hydrogen peroxide 的測定中，當加入 OxLDL 後，培養基中的 hydrogen peroxide 含量在加入原兒茶酸後被抑制約 22-30%之間;而細胞內的 hydrogen peroxide 含量在加或不加原兒茶酸則沒有差別。另外，在 superoxide 的測定中，當加入 OxLDL 後，培養基中及細胞內的 superoxide 含量在加或不加原兒茶酸大多亦無明顯差異，僅最高濃度之原兒茶酸 superoxide 急速增為控制組的 34 倍。(表四)

#### **XLIV. 洛神花水層粗萃取物對培養基中氧化型 LDL 之影響**

在 RAW 264.7 cell 中處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，爾後加入 OxLDL 培養 15 小時，取培養基以電泳測定 OxLDL 被抑制的情形。在結果中可以發現當加入洛神花水層粗萃取物後，可以逐漸抑制 OxLDL 的氧化狀態，在濃度為 0.5 mg/ml 時，其抑制的效能達到最高。(圖九)

#### **XLV. 原兒茶酸對培養基中氧化型 LDL 之影響**

在 RAW 264.7 cell 中處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，爾後加入 OxLDL 培養 15 小時，取培養基以電泳測定 OxLDL 被抑制的情形。在結果中可以發現當加入原兒茶酸後，可以逐漸抑制 OxLDL 的氧化狀態，在濃度為 0.5 mM 時，可以看到明顯的抑制效果，而當其濃度為 1.0 mM 時，抑制的現象最為顯著。(圖十)

#### **XLVI. 洛神花水層粗萃取物對培養基及細胞中 MDA 含量之影響**

RAW 264.7 cell 處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，再加入 OxLDL 後培養 15 小時，分別取培養基及細胞測定 MDA 的量。結果顯示不論培養基或細胞中的 MDA 在存有 OxLDL 時皆會被誘發，且培養基中的且培養基中的 MDA 量較多，但在加入洛神花水層粗萃取物的組別中則可發現的組別中則可發現 MDA 被明顯抑制。(圖十一)

#### **XLVII. 原兒茶酸對培養基及細胞中 MDA 含量之影響**

RAW 264.7 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，再加入 OxLDL 後培養 15 小時，分別取培養基及細胞測定 MDA 的量。結果顯示不論培養基或細胞中的 MDA 在存有 OxLDL 時皆會被誘發，且培養基中的且培養基中的 MDA 量較多，但在加入原兒茶酸的組別中則可發現的組別中則可發現 MDA 被明顯抑制。(圖十二)

#### **XLVIII. 洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所造成 foam cell formation 的影響**

RAW 264.7 cell 處理洛神花水層粗萃取物，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，再加入 OxLDL 培養後，結果顯示 OxLDL 所誘發的 foam cell formation 的情形可以在處理洛神花水萃取物後得到改善，並且隨著濃度增加而有 dose-dependent 的現象。(圖十三)

#### **XLIX. 原兒茶酸對氧化型 LDL 所造成 foam cell formation 的影響**

RAW 264.7 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，再加入 OxLDL 培養後，結果顯示 OxLDL 所誘發的 foam cell formation 的情形可以在處理原兒茶酸後得到改善，並且隨著濃度增加而有 dose-dependent 的現象。(圖十四)

## 討論

在前一部分的研究結果中，我們針對洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸降低 OxLDL 所引起的巨噬細胞死亡的機轉進行推測，進而在此實驗求證，結果發現在巨噬細胞內，我們確實觀察到在給予 OxLDL 時，細胞會被誘發凋謝死亡，此時的粒線體會產生電位的改變，並且粒線體膜上的蛋白也會隨之發生變化。在 proapoptotic proteins 中，我們看到 Bax 蛋白在此時會增加，這與 Kockx 在人類動脈粥狀硬化斑塊中觀察到巨噬細胞死亡時，所出現的 Bax 增加的情形一致 (26)，而這種增加是不曾在正常細胞中觀察到。另外在 antiapoptotic proteins 中，我們則是觀察了 Bcl-2 蛋白的角色，這與上述 Kockx 研究中的結果一致，在人類動脈粥狀硬化斑塊中觀察到巨噬細胞死亡時，並無法觀察到 Bcl-2 蛋白。另外在同樣的 antiapoptotic proteins 中，Bcl-X 在心血管疾病中的角色也曾被研究。Perlman 指出 Bcl-X 存在於正常老鼠血管中 (60)，Pollman 則是以 antisense probe 競爭 Bcl-X 的 mRNA，則血管中將形成動脈粥狀斑塊 (61)。另外我們尚且觀察了 MAPK 中的一些蛋白的角色，在令細胞增生的蛋白系統如 MEK 及 ERK1/2 蛋白，可以發現在加入 OxLDL 後，其表現量明顯下降，必須在加入洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸後才可觀察到蛋白增加的現象。另外在受到氧化壓力後會活化的 MAPK 蛋白中，我們則觀察到 JNK 蛋白磷酸化，這結果應也是導致巨噬細胞凋謝死亡的路徑之一。P53 蛋白的角色在動脈粥狀硬化發展過程中被探討甚多，P53 同時具有 antiproliferation 及 proapoptosis 的角色 (62-64)。在一些細胞壓力 (Cellular stress) 下，諸如 DNA 損傷、缺氧或氧化型脂蛋白等皆會導致 P53 活化，而活化的 P53 將會透過：(1) 活化一些蛋白，如 p21<sup>WAF1</sup> 及 Bax；(2) 抑制如 IGF-II 及 bcl-2 基因的表達；(3) 直接與 helicases 及 caspases 有 protein-protein interaction 等作用以達到 antiproliferation 及 proapoptosis 的細胞生理作用 (63, 64)。另外與 P53 屬同一家族的 P73 和 P63 蛋白也都被發現是 proapoptotic proteins。而如緒論中所提及，在動脈粥狀硬化損傷中已被發現 P53 蛋白會表現在一些未增生或已凋亡的

細胞中，這些結果正如在我們的實驗中所觀察到的，當 OxLDL 存在巨噬細胞時會使 P53 蛋白質表達增加，而在加入洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸後能減少這種蛋白增加的現象。由這些結果進行推測，在氧化壓力的存在下，細胞將會透過許多機轉的協同作用而死亡，然則雖然我們在這些機轉中看到了洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸會因為改變這些蛋白的表現而達到抑制細胞死亡的作用，但是這兩種抗氧化劑的主要作用應是在減低氧化壓力上。

脂質的氧化作用已被認為是動脈粥狀硬化病理發展上的重要因子 (65-68)，在 *in vivo* 的實驗中也發現自由基濃度越高，血漿中的 OxLDL 越高，而且動脈粥狀斑塊也越大 (49)；而在 *in vitro* 的實驗中也發現氧化壓力下所造成的自由基增加，也可能經由活化一些對氧化作用敏感的轉錄因子使細胞死亡，造成血管病變而發展為動脈粥狀硬化或其他心血管疾病 (50)。自由基的來源除了環境中的污染因子之外，體內的糖類、蛋白質及脂肪也都會有過氧化產物產生 (69)。例如在先前的研究資料中發現糖尿病患（特別是第二型糖尿病）易於產生心血管的併發症，其原因可能是血中過多的糖類會形成過多的自由基以加速 LDL 的氧化 (70-72)，因此，消除血液中的自由基應是對於預防心血管疾病的治本之道。有許多的研究指出，飲食中的一些物質如 flavonoid 或 isoflavones 皆具有清除自由基的功能，除此之外，他們還可能因為增加了 LDL 或細胞中的內生性抗氧化劑如維生素 E、維生素 C 或  $\beta$ -carotene 等而加強了抗脂質氧化的能力。在我們的研究結果中發現洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸在細胞內及環境（培養基）中確實可以降低脂質過氧化物及 OxLDL 的量，並且在濃度高的組別則可以發現細胞內的維生素 E 有增加的現象，因此可以推斷這兩種抗氧化劑減低氧化壓力的方式之一可能是增加細胞中內生性維生素 E 的含量而達成。

另外在自由基的清除作用方面，我們則從結果中觀察到在環境（培養基）中，自由基（不論 hydrogen peroxide 或 superoxide）並無法被洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸所清除，其中不論有無添加洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸，superoxide 在細胞及環境中並無改變；而在細胞內則觀察到 hydrogen peroxide 可以有限的被洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸減低，但

superoxide 依然在處理洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸前後亦無甚改變；而其中處理 1 mM 原兒茶酸的組別在培養基中出現大量的 superoxide 可能是因為溶解原兒茶酸的溶劑 DMSO 所引致。在 Patel 等人研究大豆萃取物抗動脈粥狀硬化機轉時發現此種物質具有減低脂質過氧化作用的能力，但是這種作用僅止於減低過氧化作用，而與清除自由基的能力較無相關 (73)，這些自由基是屬於一些過氧化脂質的基團，此類抗氧化劑對這些自由基並無鍵結能力。另外在 2003 年 Moridani 的研究中也指出 flavonoids (包括 Taxifolin, Luteolin, Rutin, Quercetin, Kaempferol 及 Fisetin) 要減低過氧化脂質危害的機轉應是與造成脂質過氧化作用的二價離子產生氧化反應，此時還原態的 flavonoid 將會轉變為氧化態，藉此機轉以達到減低過氧化脂質的目的 (74)。因此洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸在減低脂質過氧化的機轉上可能有部分是透過此類作用而進行。

在探討動脈粥狀硬化的機轉中，巨噬細胞的重要角色其實是無庸置疑，在本研究結果中我們已經歸納出在高濃度的 OxLDL 刺激下會引起巨噬細胞死亡，而參考先前的文獻推知此種過程會加速動脈粥狀硬化的進程。當處理洛神花水層粗萃取物或原兒茶酸可以改善巨噬細胞的死亡現象，而這種過程可能是透過增加內生性維生素 E、減低脂蛋白氧化的能力且改變細胞內訊息傳遞蛋白的表現所致。雖然巨噬細胞在動脈粥狀硬化過程中有重要角色，但是參與這個複雜機制的除了巨噬細胞外，尚有平滑肌細胞及血管內皮細胞，假如要模擬血管中的狀況而進行 *in vitro* 實驗的話，目前的研究乃是以巨噬細胞及內皮細胞共同培養以觀察內皮細胞的變化，在未來的工作中，我們將以此模式更進一步探討洛神花水層粗萃取物及原兒茶酸在動脈粥狀硬化中的角色，以期能更加確認這些物質在日常保健上的功能。

## 參考文獻

1. Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 2000; 102: 1.
2. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 485.
3. Crisby M, Kallin B, Thyberg J, *et al.* Cell death in human atherosclerotic plaques involves both necrosis and apoptosis. *Atherosclerosis* 1997; 130: 17.
4. Kockx MM. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1519.
5. Mitchinson MJ, Hardwick SJ, Bennett MR. Cell death in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 324.
6. Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *FASEB* 1994; 8: 1075.
7. Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol* 1995; 147: 251.
8. Imanishi T, McBride J, Ho Q, *et al.* Expression of cellular FLICE-inhibitory protein in human coronary arteries and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 2000; 156: 125.
9. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 1995; 91: 2703.
10. Hegyi L, Skepper JN, Cary NR, Mitchinson MJ. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J Pathol* 1996; 180: 423.
11. Kockx MM, De Meyer GRY, Muhring J, *et al.* Distribution of cell replication and apoptosis in atherosclerotic plaque of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1996; 120: 115.
12. Han DKM, Haudenschild CC, Hong MK, *et al.* Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 1995; 147: 267.
13. Bjorkerud S, Bjorkerud B. 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* 1996; 149: 367.
14. Mallat Z, Ohan J, Leseche G, Tedgui A. Colocalization of CPP-32 with apoptotic cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 96: 424.
  15. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996; 94: 2013.
  16. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, *et al.* Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 330.
  17. Han CY, Pak YK. Oxidation-dependent effects of oxidized LDL: proliferation or cell death. *Exp Mol Med* 1999; 31: 165.
  18. Darley-Usmar VM, Lelchuk R, O'Leary VJ, *et al.* Oxidation of low-density lipoprotein and macrophage derived foam cells. *Biochem Soc Trans* 1990; 18: 1064.
  19. Steinberg D. Lipoproteins and atherosclerosis: a look back and a look ahead. *Arteriosclerosis* 1983; 3: 283.
  20. Tabas I. P53 and atherosclerosis. *Circ Res* 2001; 88: 747.
  21. Pierre G. Controlling cell death. *Science* 1997; 275: 1081.
  22. Yoshihiro S, Noriaki N, Hisataka M, Yasutoshi M. Rapid loss in the mitochondria membrane potential during geranylgeranoic acid-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 230: 58.
  23. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922.
  24. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, *et al.* A serine protease, Htra2, is released from the mitochondria and interacts with xiap, inducing cell death. *Mol Cell* 2001; 8: 613.
  25. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 1: 63.
  26. Kockx MM, De Meyer GRY, Muhring J, *et al.* Apoptosis and related proteins in different

- stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998; 97: 2307.
27. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 1: 63.
  28. Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 94.
  29. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957.
  30. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 1994; 54: 3131.
  31. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293.
  32. Bartke T, Seigmund D, Peters N, *et al.* p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene* 2001; 20: 571.
  33. Hoffman WH, Biade S, Zifou JT, *et al.* Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2001; 19: 19.
  34. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 332.
  35. Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, *et al.* Negative redulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 2001; 20: 240.
  36. Bonni A, Brunet A, West AE, *et al.* Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and –independent mechanisms. *Science* 1999; 286: 1358.
  37. Harada H, Andersen JS, Mann M, *et al.* p70S<sup>6</sup> kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9666.



38. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922.
39. Lohrum MA, Vousden KH. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 197.
40. Gottlieb TM, Oren M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1998; 8: 359.
41. Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 2000; 182: 171.
42. Ihling C, Menzel G, Wellens E, *et al.* Topographical association between the cyclin-dependent kinases inhibitor P21, p53 accumulation, and cellular proliferation in human atherosclerotic tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2218.
43. Ihling C, Haendeler J, Menzel G, *et al.* Co-expression of p53 and MDM2 in human atherosclerosis: implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions. *J Pathol* 1998; 185: 303.
44. Guevara NV, Kim HS, Antonova EI, Chan L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* 1999; 5: 335.
45. Sies H. Chapter 1: oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H. ed. *Oxidative stress*. 1985, London: Academic Press.
46. Chandra D, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 323.
47. Björkhem I, Diczfalusy U. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 734.
48. Iuliano L. The oxidant stress hypothesis of atherogenesis. *Lipids* 2001; 36 Suppl: S41.
49. Heinle H, Brehme U, Friedemann G. *et al.* Intimal plaque development and oxidative stress in cholesterol-induced atherosclerosis in New Zealand rabbits. *Acta Physiol Scandi* 2002; 176: 101.
50. De Nigris F, Lerman LO, Condorelli M, *et al.* Oxidation-sensitive transcription factors and

- molecular mechanisms in the arterial wall. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 1119.
51. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341.
  52. Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, *et al.* Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by  $\beta$ -carotene. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1993; 13: 590.
  53. Dieber-Rotheneder M, Puhl H, Waeg G, *et al.* Effect of oral supplementation with D- $\alpha$ -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J Lipid Res* 1991; 32: 1325.
  54. Wu YJ, Hong CY, Lin SJ, *et al.* Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 481.
  55. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, *et al.* Randomized controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347: 781.
  56. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, *et al.* Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: 154.
  57. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, *et al.* Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 356: 1213.
  58. Rocheford TR, Wong JC, Egesel CO, Lambert RJ. Enhancement of vitamin E levels in corn. *J Am Col Nutri* 2002; 21 (3Suppl): 191S.
  59. Yagi K. Lipid peroxidation and human disease. *Chem Phys Lipid* 1987; 45: 337.
  60. Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis

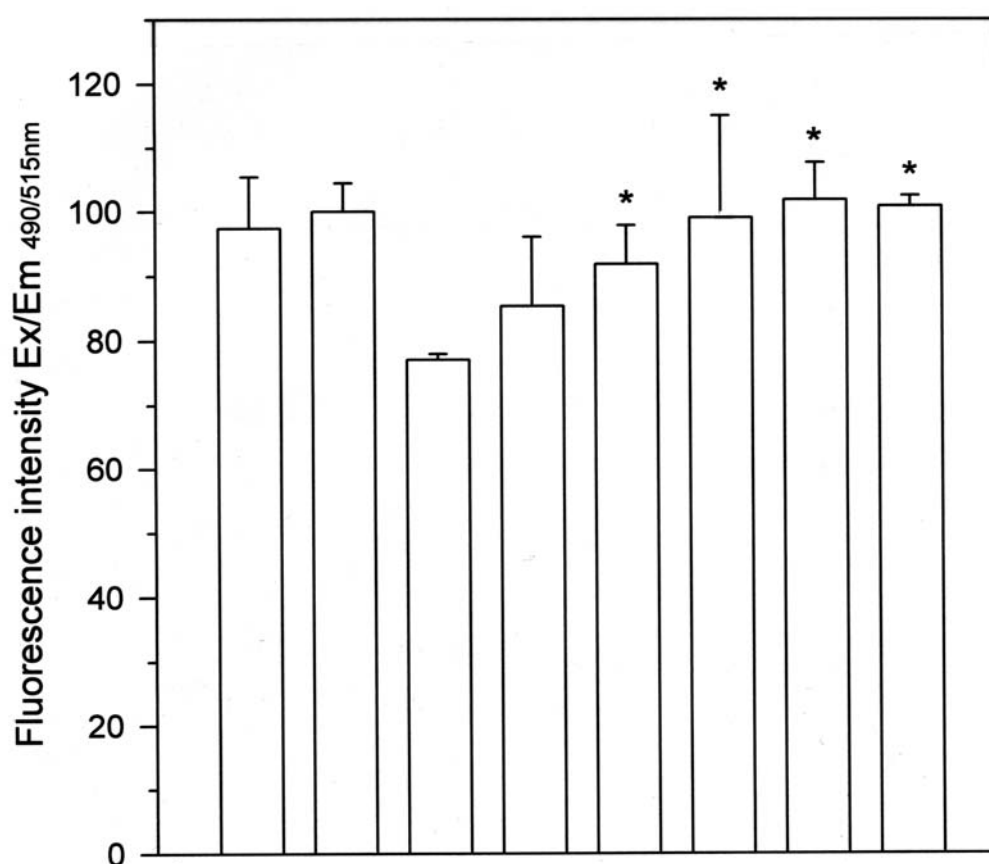
- in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation* 1997; 95: 981.
61. Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, *et al.* Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med* 1998; 4: 222.
  62. Lohrum MA, Vousden KH. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 197.
  63. Gottlieb TM, Oren M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1998; 8: 359.
  64. Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 2000, 182: 171.
  65. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 707.
  66. Parthasarathy S, Santanam N. Mechanisms of oxidation, antioxidants, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 371.
  67. Parthasarathy S, Santanam N, Auye N. Oxidized low-density lipoprotein, a two faced Janus in coronary artery disease? *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 279.
  68. Patel RP, Meollering D, Murphy-Ullrich J, *et al.* Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1780.
  69. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998; 141: 1.
  70. Chen HC, Guh JY, Shin SJ, *et al.* Reactive oxygen species enhances endothelin-1 production of diabetic rat glomeruli in vitro and in vivo. *J Lab Clin Med* 2000; 135: 309.
  71. Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, *et al.* Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6434.
  72. Chen HC, Guh JY, Shin SJ, Lai YH. Pravastatin suppress superoxide and fibronectin production of glomerular mesangial cells induced by oxidized-LDL and high glucose.

Atherosclerosis 2002; 160: 141.

73. Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, *et al.* Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1570.

74. Moridani MY, Pourahmad J, Bui H, *et al.* Dietary flavonoids iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 243.

圖一、洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜電位之影響

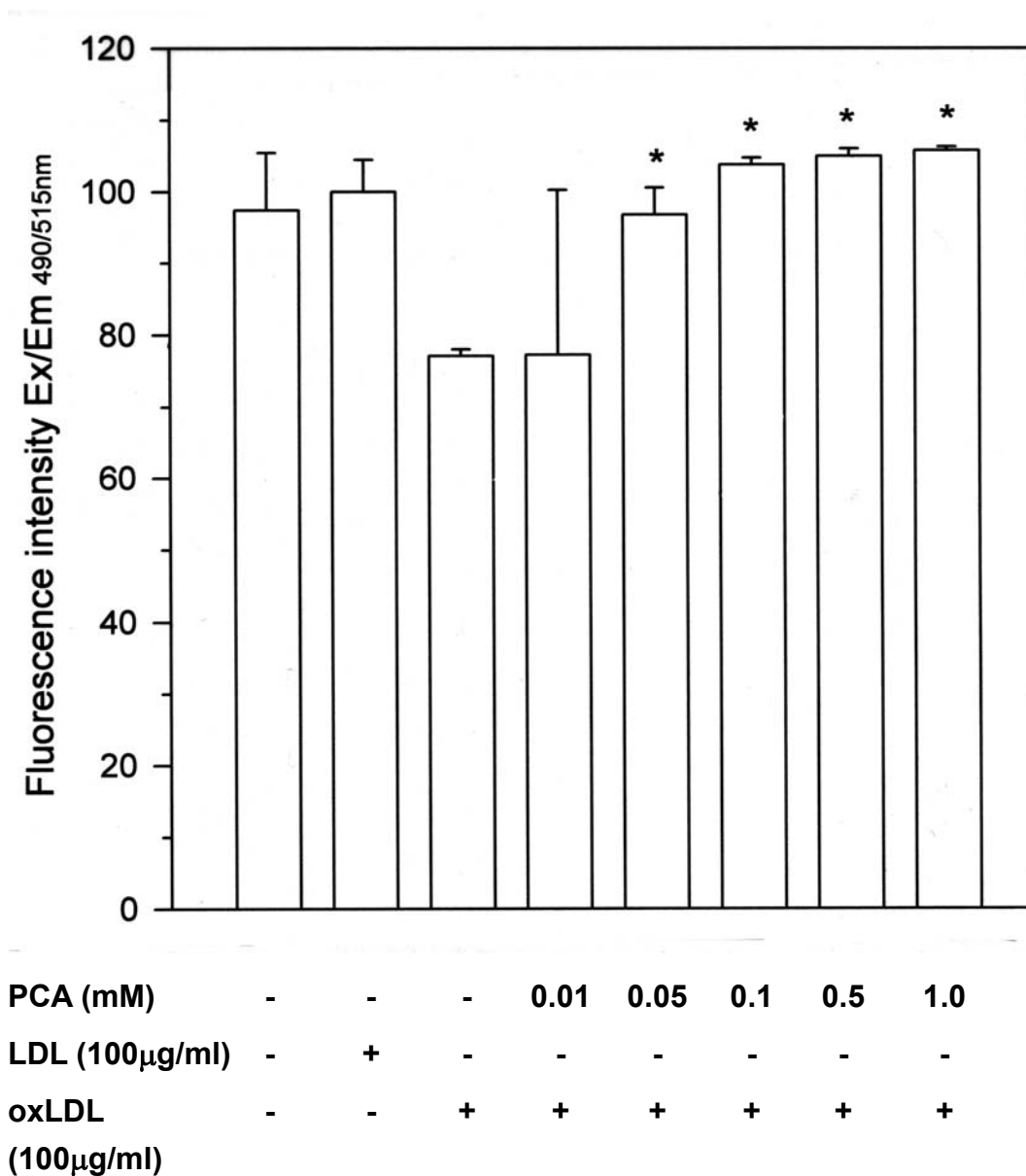


HSE (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5
LDL (100μg/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100μg/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+

Fig. 1. The effect of HSE on oxLDL-induced mitochondrial potent decrease in macrophage. Cells were treated and assayed for mitochondrial potent as described in Materials and Methods. Each

vertical bar represents mean  $\pm$  SD from triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \* P<0.05.

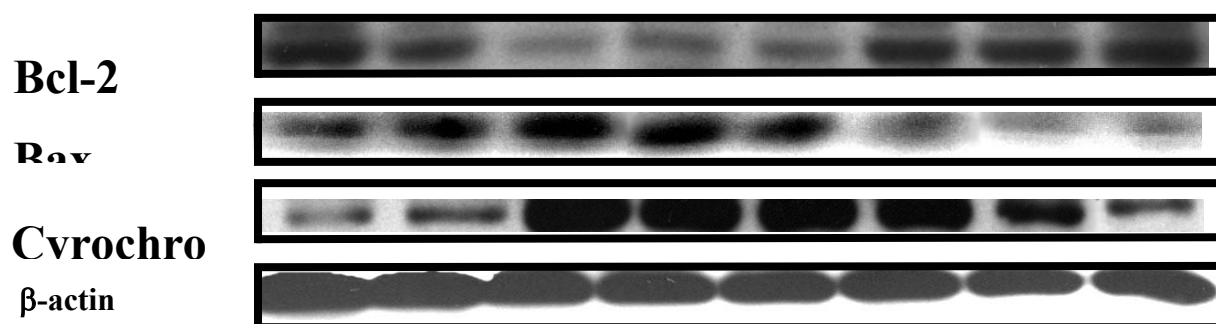
圖二、原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜電位之影響



**Fig. 2. The effect of PCA on oxLDL-induced mitochondrial potent decrease in macrophage.** Cells were treated and assayed for mitochondrial potent as described in Materials and Methods. Each vertical bar represents mean  $\pm$  SD from triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \* P<0.05.

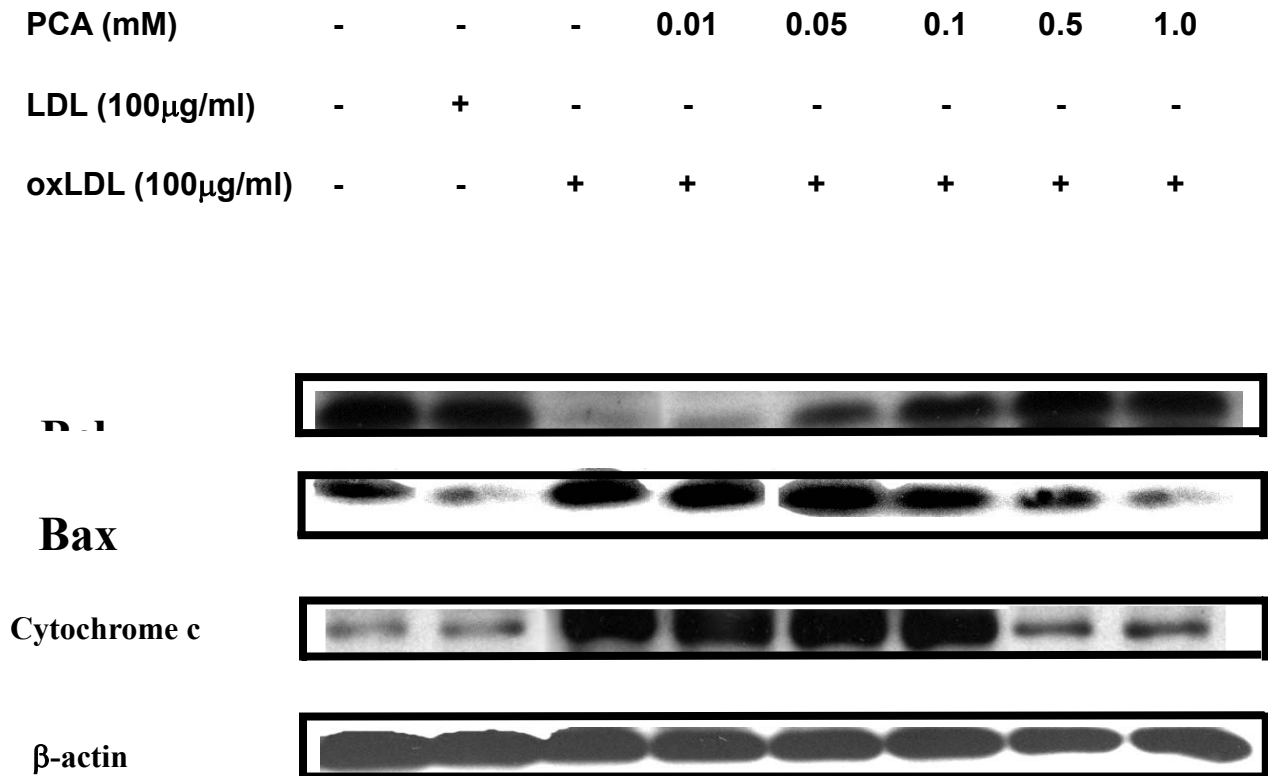
圖三、洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜蛋白之影響

HSE (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5
LDL (100 $\mu$ g/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100 $\mu$ g/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+



**Fig. 3. Immunoblotting examination of the effect of HSE on oxLDL-induced the expressions of mitochondrial proteins in macrophage.** Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the expressions of mitochondrial proteins. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 5, 0.03 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 6, 0.05 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 7, 0.1 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 8, 0.5 mg/ml HSE plus oxidized LDL.

圖四、原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜蛋白之影響

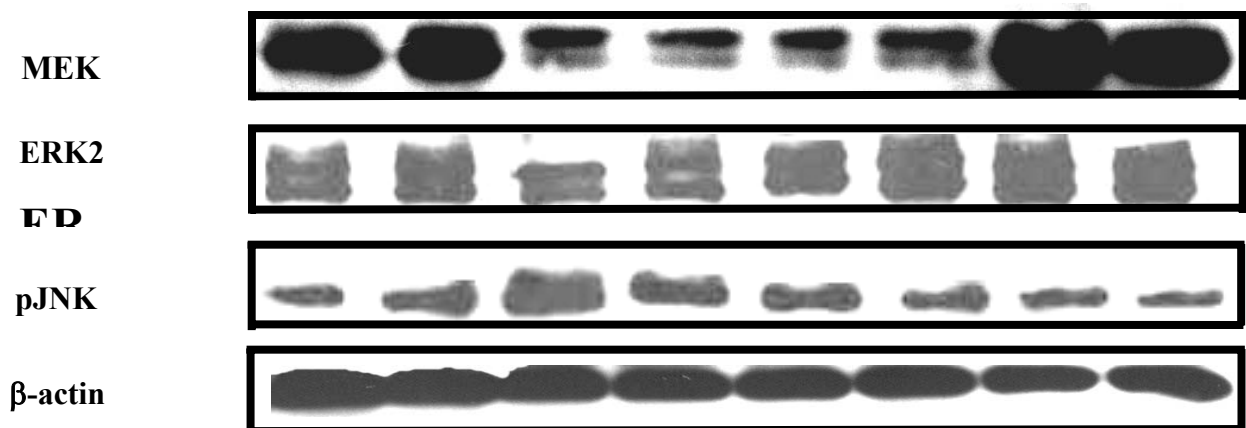


**Fig. 4. Immunoblotting examination of the effect of PCA on oxLDL-induced the expressions of mitochondrial proteins in macrophage.** Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the expressions of mitochondrial proteins. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; lane 5, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; lane 6, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; lane 7, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; lane 8, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL.



圖五、洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的 MAPK 蛋白之影響

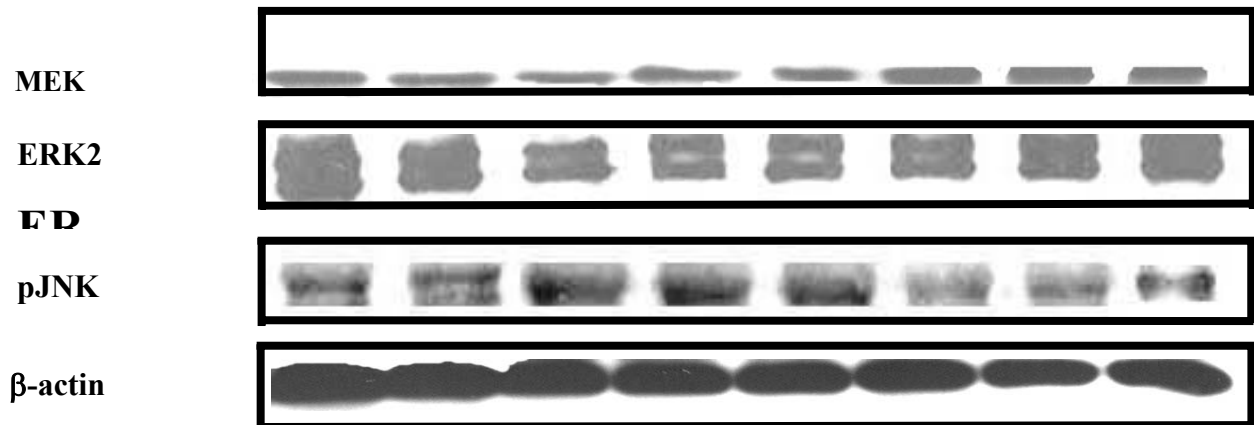
HSE (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5
LDL (100 $\mu$ g/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100 $\mu$ g/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+



**Fig. 5. Immunoblotting examination of the effect of HSE on oxLDL-induced the expressions of MAPK proteins in macrophage.** Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the expressions of MAPK proteins. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 5, 0.03 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 6, 0.05 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 7, 0.1 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 8, 0.5 mg/ml HSE plus oxidized LDL.

圖六、原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的 MAPK 蛋白之影響

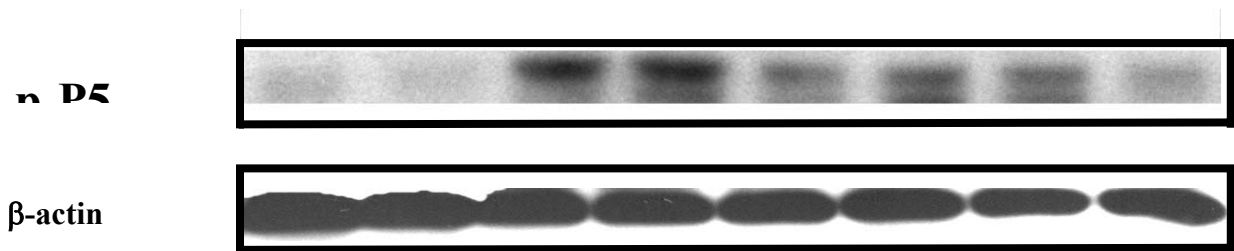
PCA (mM)	-	-	-	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
LDL (100 $\mu$ g/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100 $\mu$ g/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+



**Fig. 6. Immunoblotting examination of the effect of PCA on oxLDL-induced the expressions of MAPK proteins in macrophage.** Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the expressions of MAPK proteins. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; lane 5, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; lane 6, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; lane 7, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; lane 8, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL.

圖七、洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所引起的 p-P53 蛋白之影響

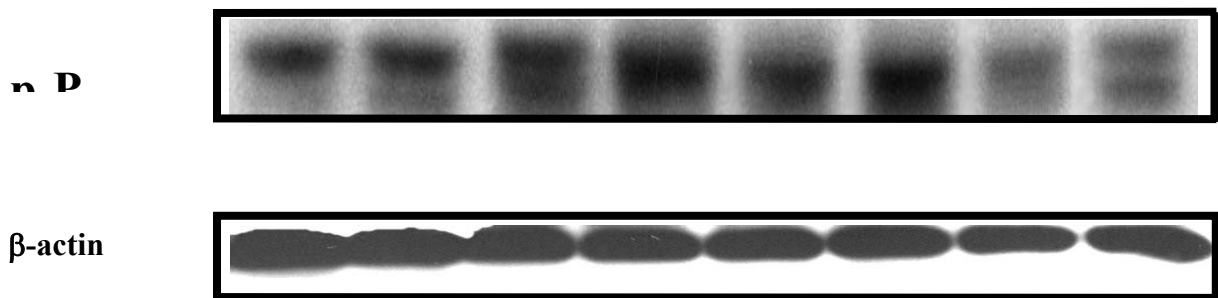
HSE (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5
LDL (100 $\mu$ g/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100 $\mu$ g/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+



**Fig. 7. Immunoblotting examination of the effect of HSE on oxLDL-induced the expression of P53 protein in macrophage.** Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the expression of p-P53 protein. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 5, 0.03 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 6, 0.05 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 7, 0.1 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 8, 0.5 mg/ml HSE plus oxidized LDL.

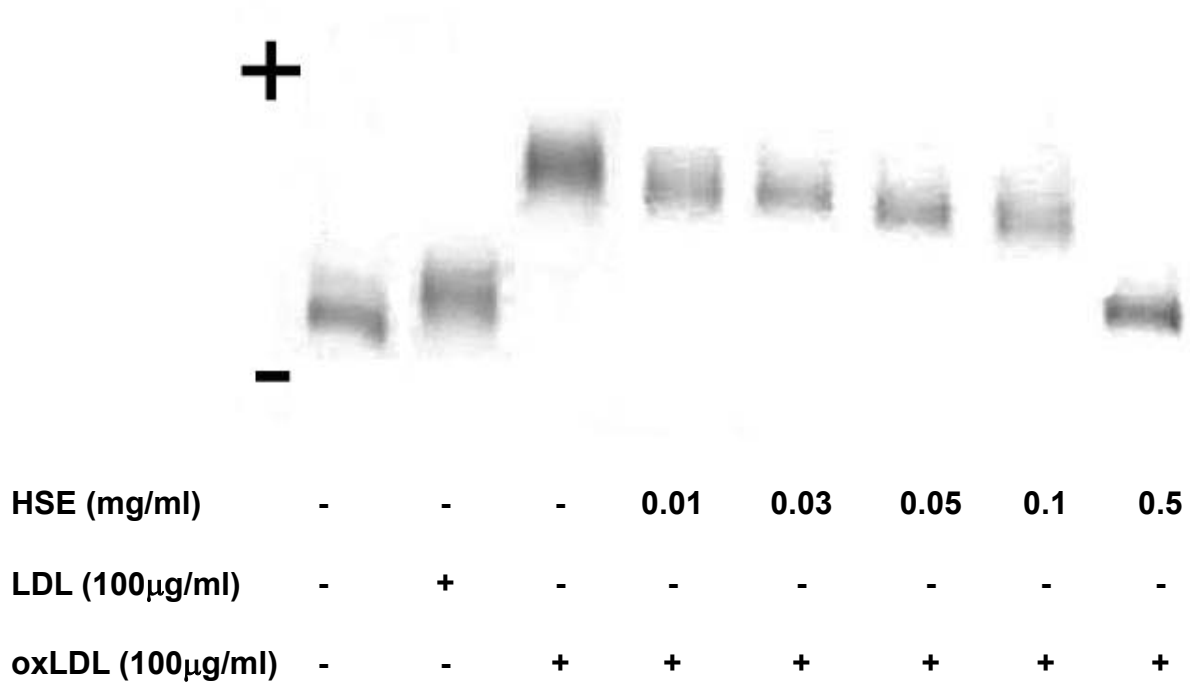
圖八、原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的 p-P53 蛋白之影響

PCA (mM)	-	-	-	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
LDL (100 $\mu$ g/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100 $\mu$ g/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+



**Fig. 8. Immunoblotting examination of the effect of PCA on oxLDL-induced the expression of P53 protein in macrophage.** Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the expression of p-P53 protein. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; lane 5, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; lane 6, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; lane 7, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; lane 8, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL.

圖九、洛神花水層粗萃取物對培養基中氧化型 LDL 之影響



**Fig. 9. The oxidation level of oxLDL in the media of HSE and oxLDL cotreated macrophage.** Media was obtained from macrophage culture and subjected to lipogel electrophoresis analysis for the oxidation level of oxLDL. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 5, 0.03 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 6, 0.05 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 7, 0.1 mg/ml HSE plus oxidized LDL; lane 8, 0.5 mg/ml HSE plus oxidized LDL.

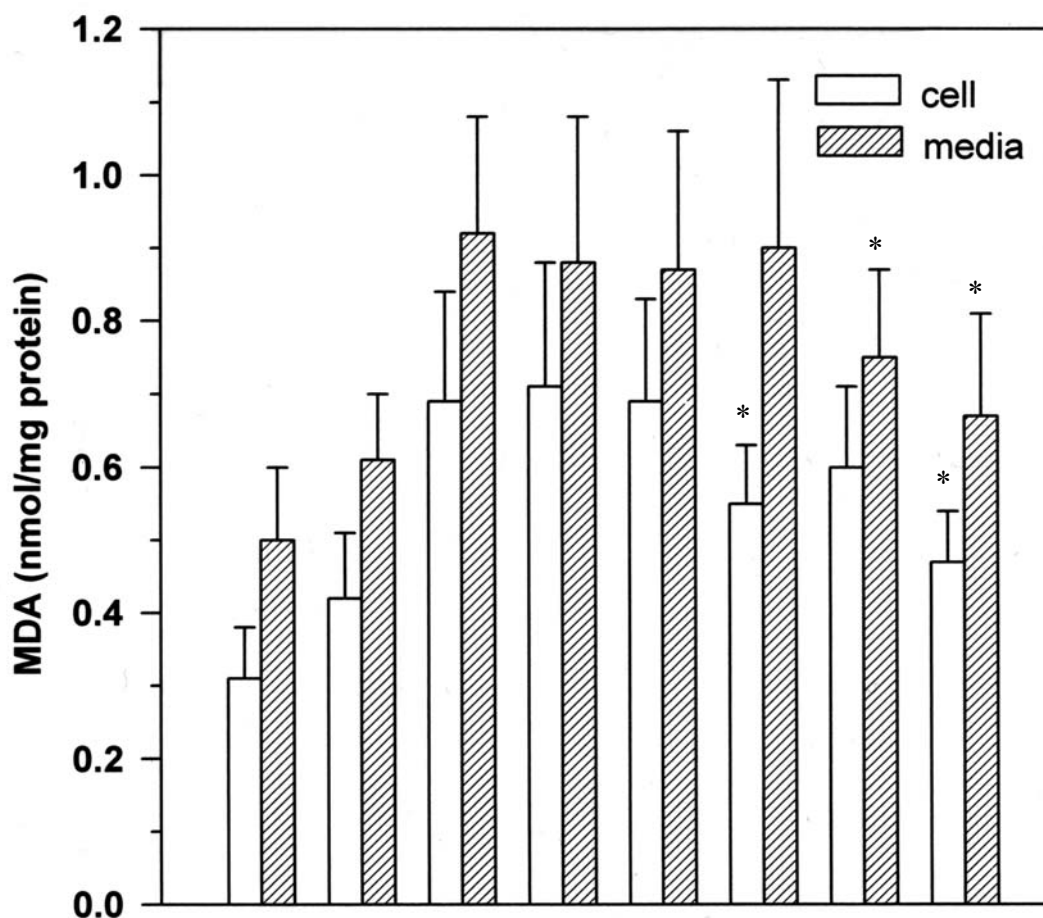
圖十、原兒茶酸對培養基中氧化型 LDL 之影響



PCA (mM)	-	-	-	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
LDL (100 $\mu$ g/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100 $\mu$ g/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+

**Fig. 10. The oxidation level of oxLDL in the media of PCA and oxLDL cotreated macrophage.** Media was obtained from macrophage culture and subjected to lipogel electrophoresis analysis for the oxidation level of oxLDL. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; lane 5, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; lane 6, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; lane 7, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; lane 8, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL.

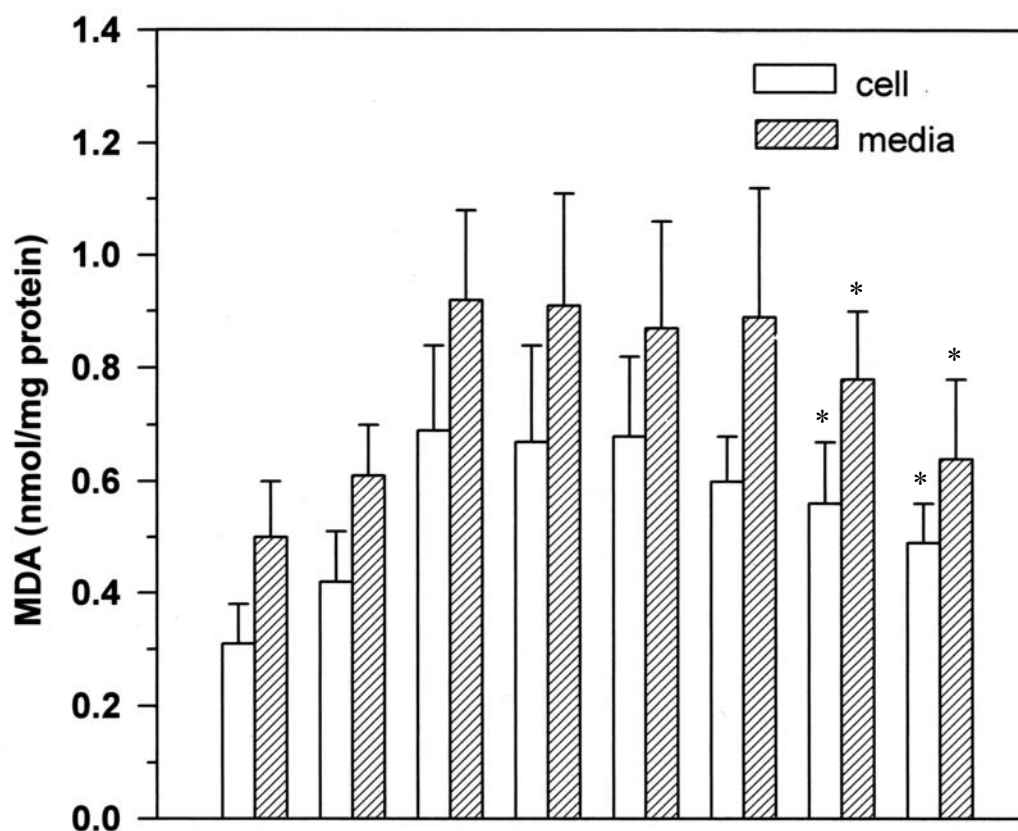
圖十一、洛神花水層粗萃取物對培養基及細胞中 MDA 含量之影響



HSE (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5
LDL (100µg/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100µg/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+

**Fig. 11. Effects of HSE on OxLDL-induced lipid peroxidation in the macrophage culture and the media.** The samples were obtained from macrophage culture and assayed for lipid peroxidation (MDA). Each vertical bar represents mean  $\pm$  SD from triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \* P<0.05.

圖十二、原兒茶酸對培養基及細胞中 MDA 含量之影響

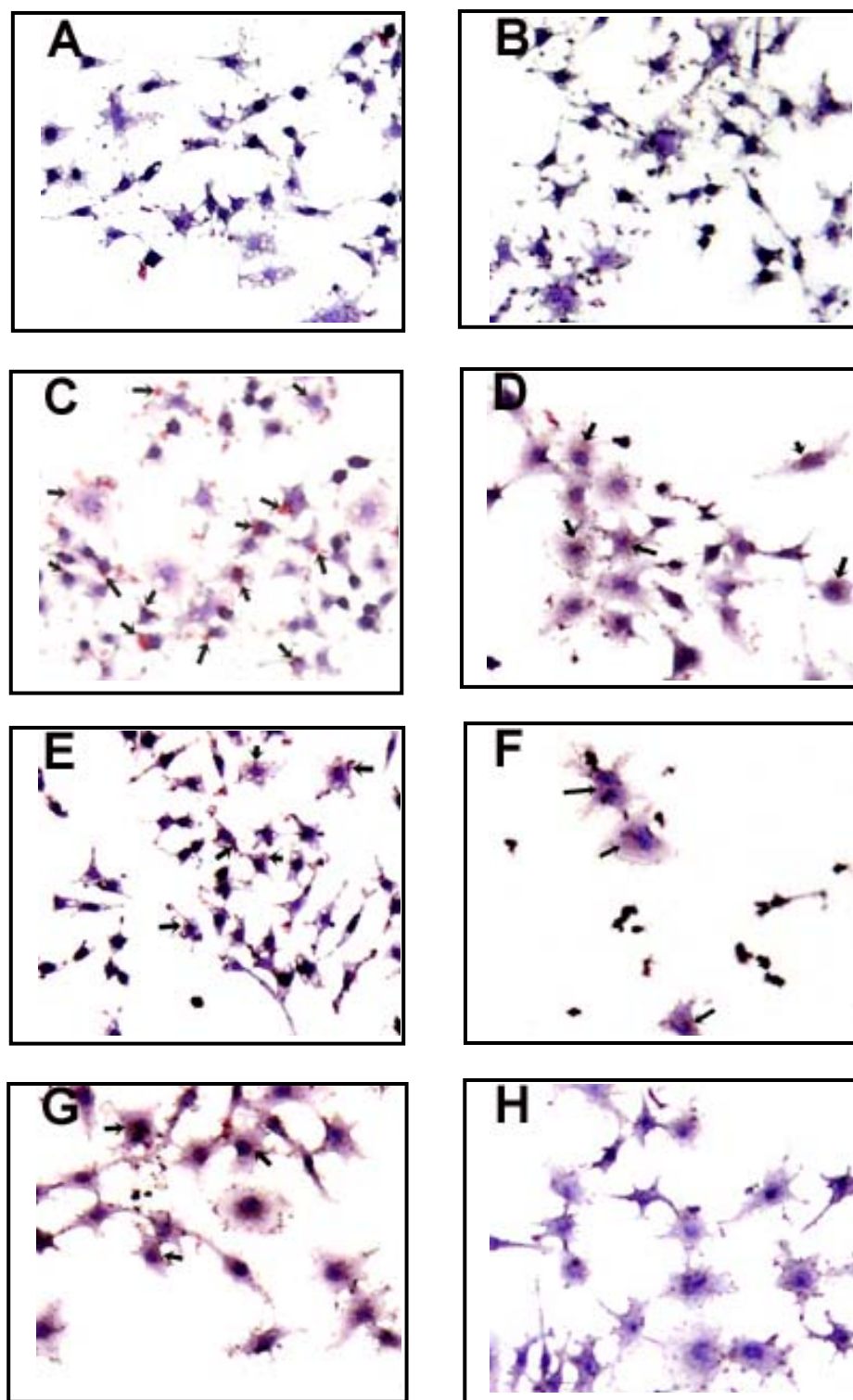


PCA (mM)	-	-	-	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
LDL (100µg/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100µg/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+

Fig. 12. Effects of PCA on OxLDL-induced lipid peroxidation in the macrophage culture and the media. The samples were obtained from macrophage culture and assayed for lipid peroxidation (MDA). Each vertical bar represents mean  $\pm$  SD from triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired t-test as compared with the control (native LDL treated group). \* P<0.05.

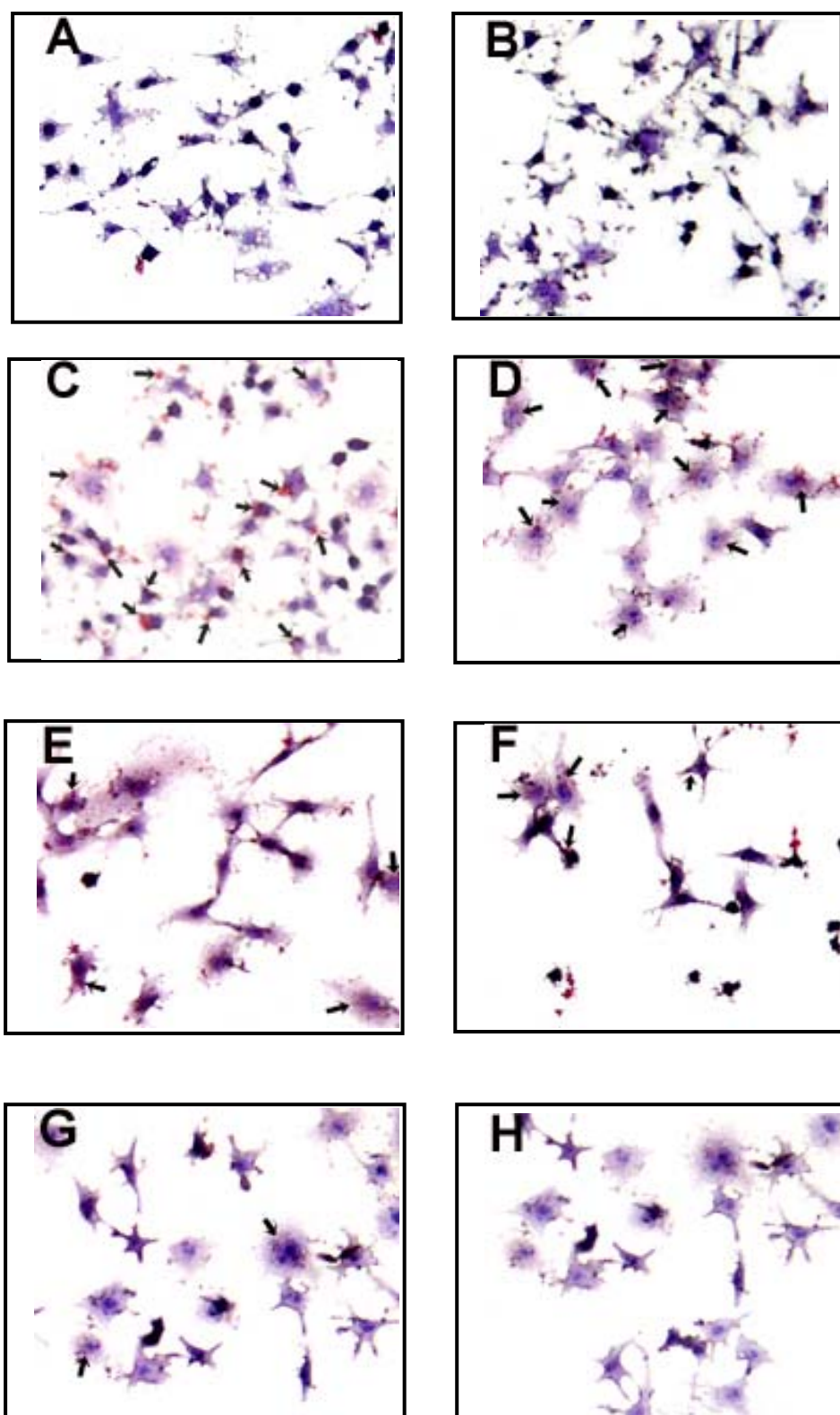


圖十三、洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 所造成 foam cell formation 的影響



**Fig. 13. The inhibitory effect of HSE on oxLDL-induced macrophage foam cell formation.** The detail of the treatments was described in Materials and Methods. A, normal (no treatment); B, native LDL; C, oxidized LDL; D, 0.01 mg/ml HSE plus oxidized LDL; E, 0.03 mg/ml HSE plus oxidized LDL; F, 0.05 mg/ml HSE plus oxidized LDL; G, 0.1 mg/ml HSE plus oxidized LDL; H, 0.5 mg/ml HSE plus oxidized LDL. The arrows represent positive for foam cell.

圖十四、原兒茶酸對氧化型 LDL 所造成 foam cell formation 的影響



**Fig. 14. The inhibitory effect of PCA on oxLDL-induced macrophage foam cell formation.** The detail of the treatments was described in Materials and Methods. A, normal (no treatment); B, native LDL; C, oxidized LDL; D, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; E, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; F, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; G, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; H, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL. The arrows represent positive for foam cell.



圖十五、OxLDL 誘發巨噬細胞凋謝死亡的機轉

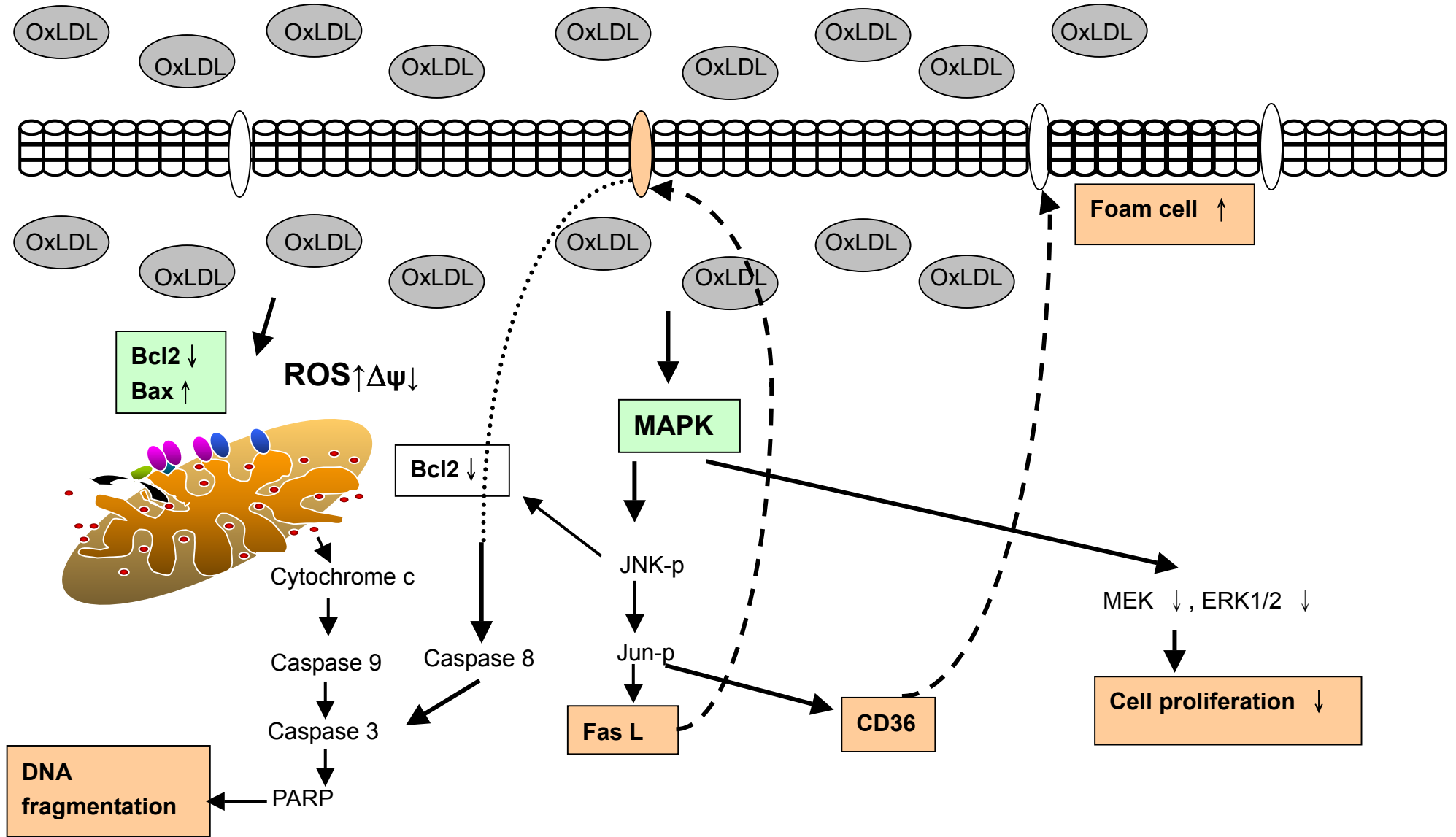
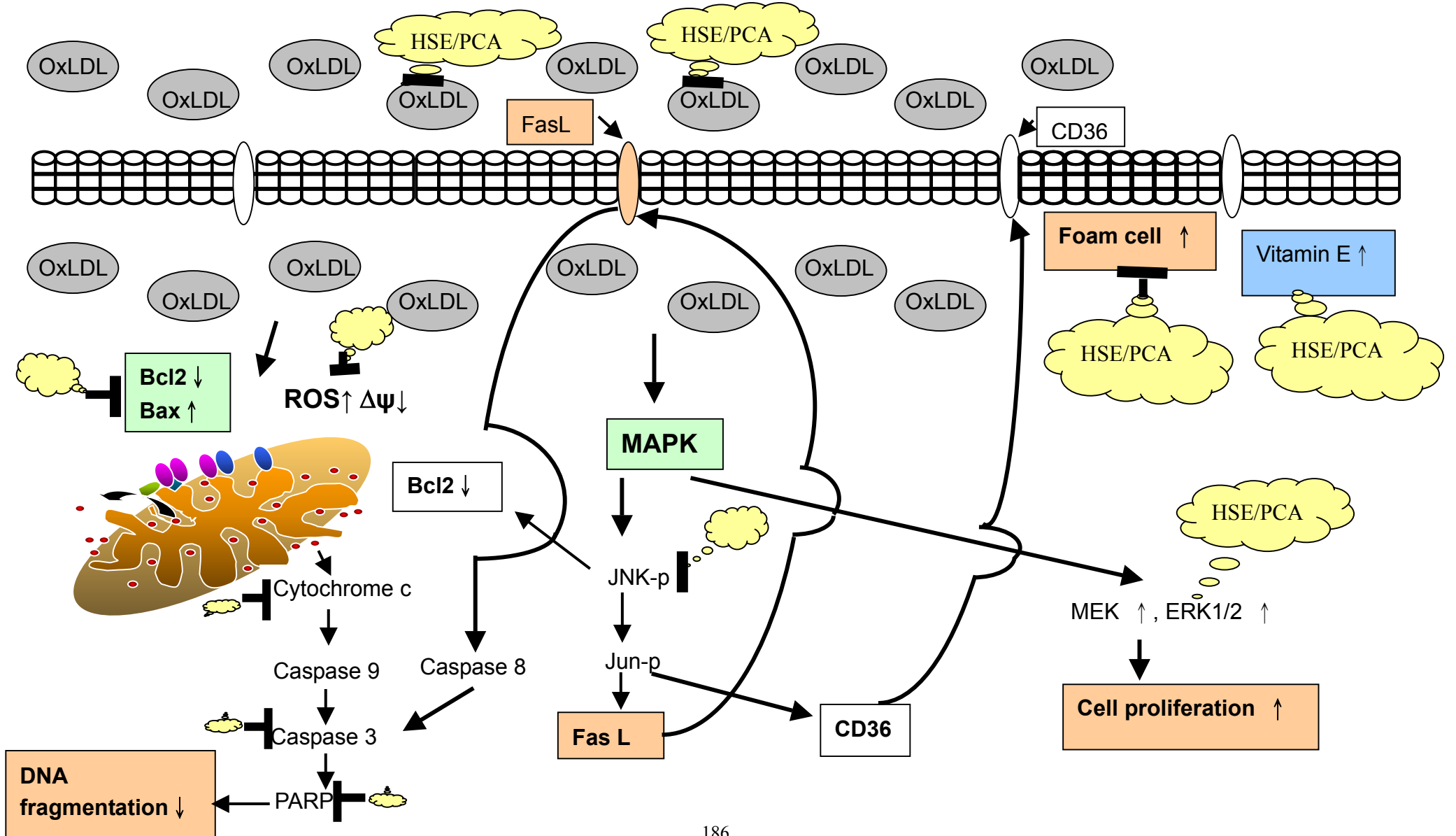


Fig.15. Schematic mechanisms of oxLDL-induced macrophage apoptosis.

圖十六、HSE 或 PCA 在 OxLDL 誘發巨噬細胞凋謝死亡的機轉





PCA/HSE

Fig.16. Schematic inhibitory mechanisms of HSE or PCA on oxLDL-induced macrophage apoptosis.

表一、洛神花水層粗萃取物對氧化型 LDL 及巨噬細胞中維生素 E 之影響

No.	Treatment <sup>a</sup>			concentration of vitamin E (μg/ml)	
	HSE (mg/ml)	LDL	OxLDL (100μg/ml)	cell lysate	in tube assay
1	--	--	--	--	--
2	--	+	--	--	--
3	--	--	+	--	--
4	0.01	--	+	--	--
5	0.03	--	+	--	--
6	0.05	--	+	--	--
7	0.1	--	+	--	--
8	0.5	--	+	7.51	--

<sup>a</sup> Cell or LDL were co-treated with various concentrations of HSE as described in “Materials and Methods”.

表二、原兒茶酸對氧化型 LDL 及巨噬細胞中維生素 E 之影響

No.	Treatment <sup>a</sup>			concentration of vitamin E (μg/ml)	
	PCA (mM)	LDL	OxLDL (100μg/ml)	cell lysate	in tube assay
1	--	--	--	--	--
2	--	+	--	--	--
3	--	--	+	--	--
4	0.01	--	+	--	--
5	0.05	--	+	--	--
6	0.1	--	+	--	--
7	0.5	--	+	5.32	--
8	1.0	--	+	9.47	--

<sup>a</sup> Cell or LDL were co-treated with various concentrations of PCA as described in “Materials and Methods”.



表三、洛神花水層粗萃取物對培養基及巨噬細胞中自由基之影響

No.	Treatment <sup>a</sup>			Inhibitory percentage of free radicals <sup>b</sup>			
	HSE (mg/ml)	LDL	OxLDL (100μg/ml)	hydrogen peroxide		superoxide	
				cell lysate	media	cell lysate	media
1	--	--	--	93.7	77.4	101.5	92.2
2	--	+	--	97.1	88.6	105.4	93.9
3	--	--	+	100	100	100	100
4	0.01	--	+	100.3	80.3	91.4	100
5	0.03	--	+	108.5	72.1	105.7	91.3
6	0.05	--	+	99.1	78.3	109.4	99.3
7	0.1	--	+	97.4	78.2	110.2	99.1
8	0.5	--	+	97.5	79.2	101.7	100.4

<sup>a</sup> Cells were co-treated with various concentrations of HSE as described in “Materials and Methods”.

<sup>b</sup> All data compared with oxLDL as 100%.

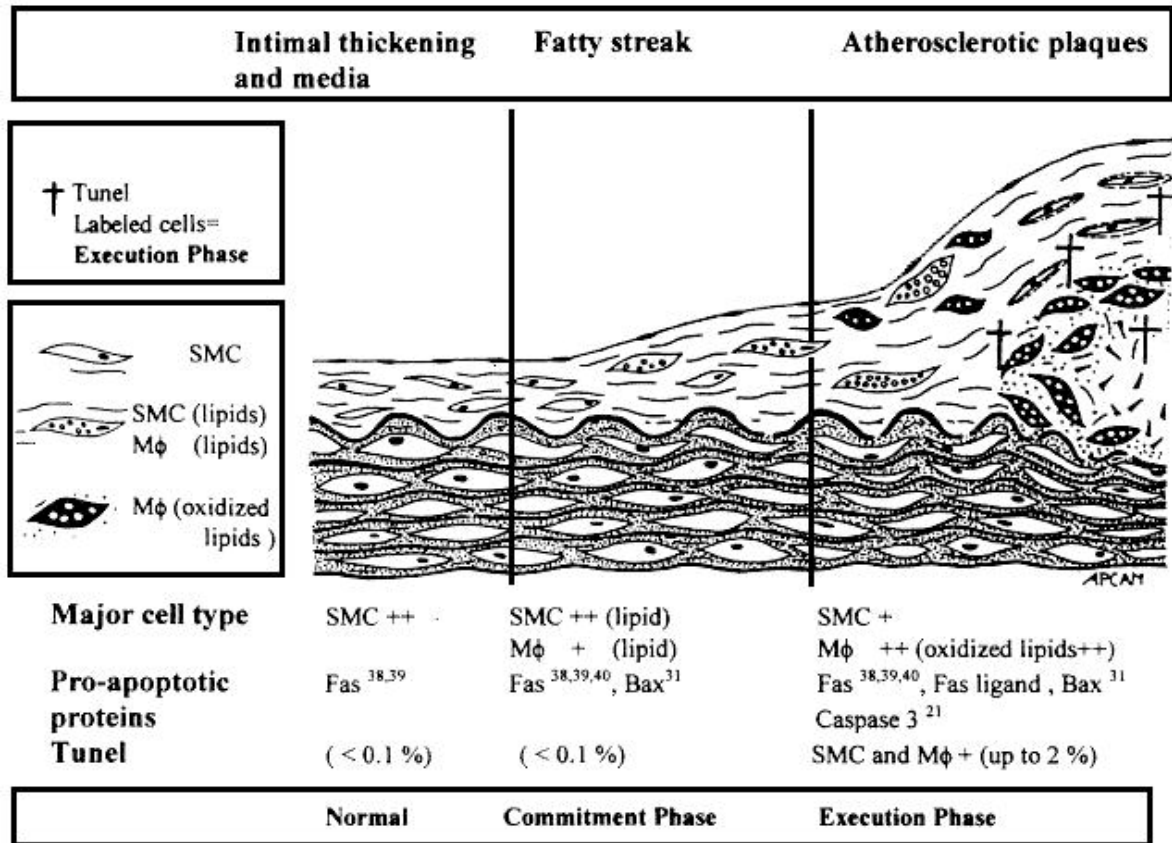
表四、原兒茶酸對培養基及巨噬細胞中自由基之影響

No.	Treatment <sup>a</sup>			Inhibitory percentage of free radicals <sup>b</sup>			
	PCA (mM)	LDL	OxLDL (100μg/ml)	hydrogen peroxide		superoxide	
				cell lysate	media	cell lysate	media
1	--	--	--	93.7	77.4	101.5	92.2
2	--	+	--	97.1	88.6	105.4	93.9
3	--	--	+	100	100	100	100
4	0.01	--	+	100.3	70.6	99.5	93.1
5	0.05	--	+	108.5	74.7	100.2	94.2
6	0.1	--	+	94.9	75.4	99.2	94.3
7	0.5	--	+	91.0	71.0	100.9	84.89
8	1.0	--	+	99.4	78.7	101.2	3408.7

<sup>a</sup> Cells were co-treated with various concentrations of PCA as described in “Materials and Methods”.

<sup>b</sup> All data compared with native LDL as 100%.

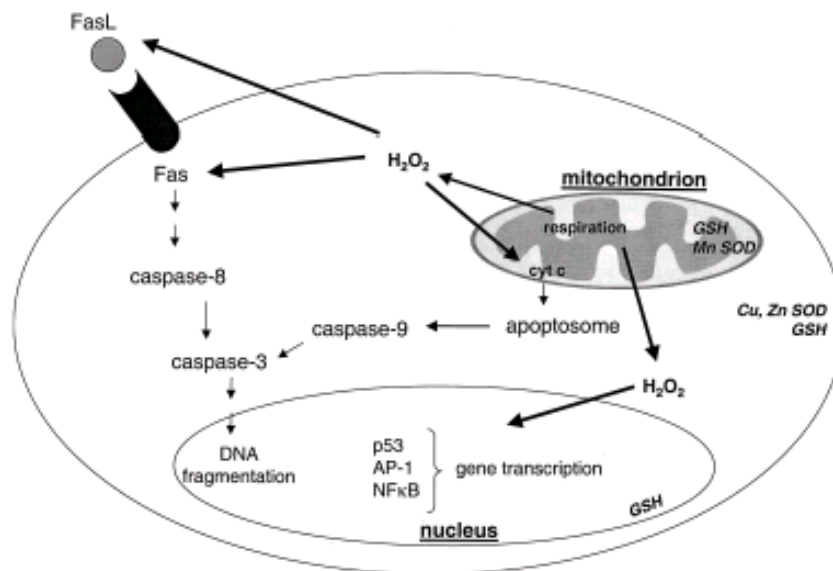
附圖一、在動脈粥狀斑塊形成的不同時期出現凋謝性細胞死亡的情形



Schematic representation of the commitment and execution phases of apoptotic cell death in different stages of atherosclerotic plaque formation.

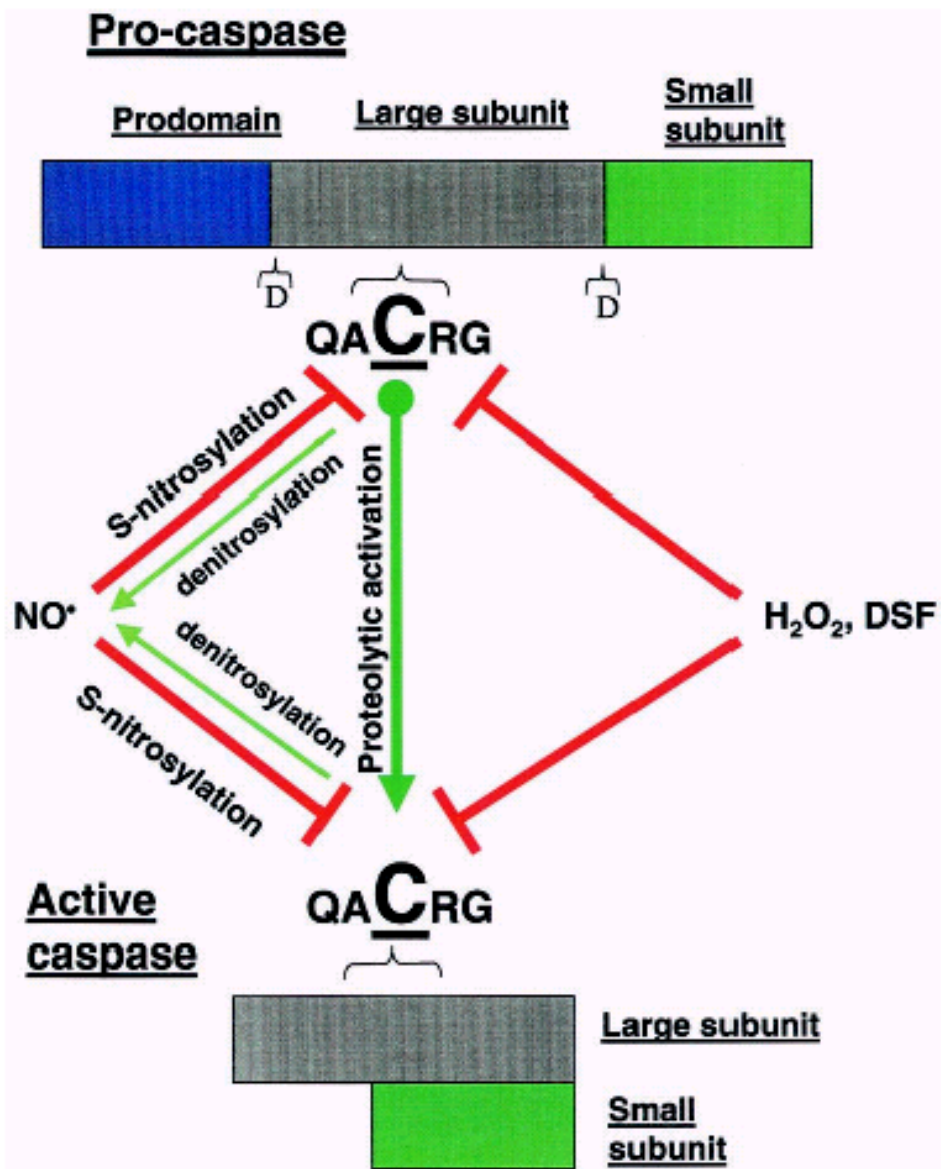
(摘自 Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology, 18, 1519-1522, 1998)

附圖二、氧化壓力促使細胞進行程式型死亡



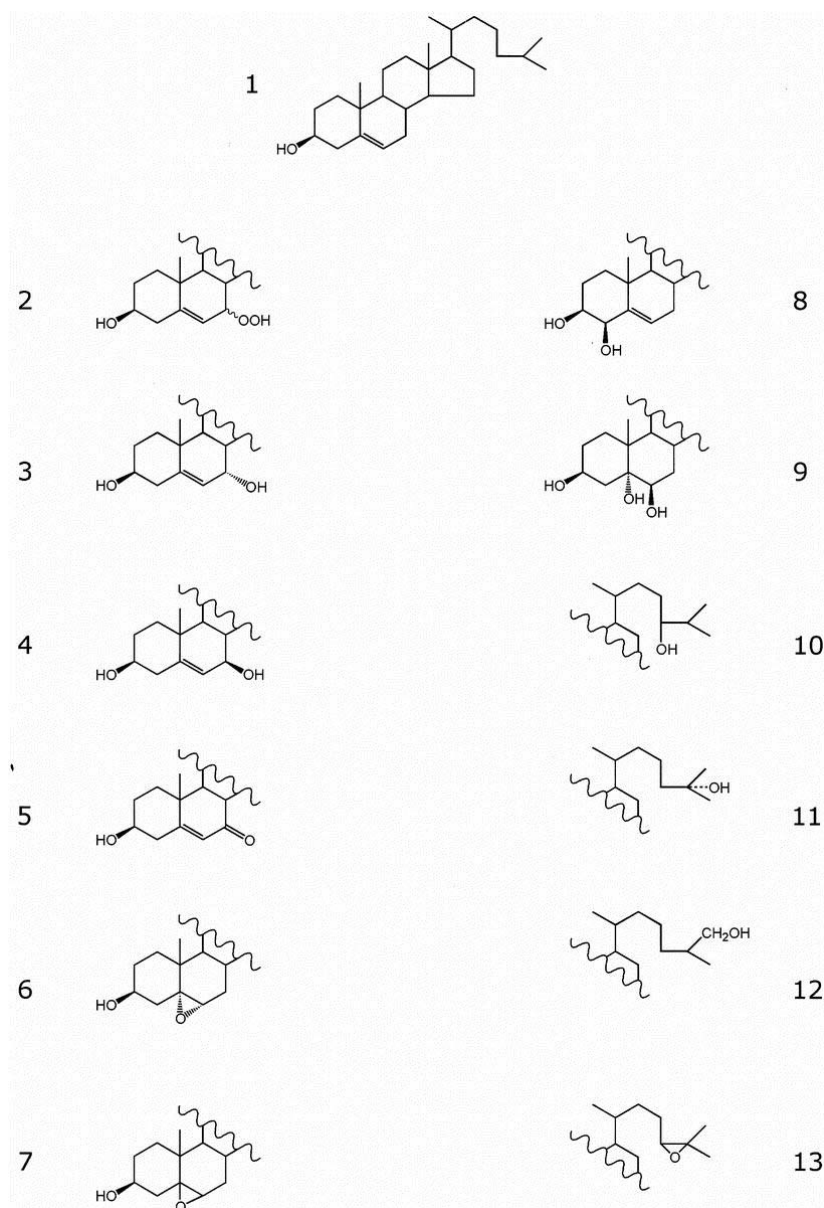
(摘自 Free Radical Biology & Medicine, 29, 323-333, 2000)

附圖三、氧化壓力促使細胞進行程式型死亡



(摘自 Free Radical Biology & Medicine, 29, 323-333, 2000)

附圖四、不同氧化位置的膽固醇結構形成的 oxysterols



Structure of 1, cholesterol, and the most important oxysterols; 2, 7-hydroperoxycholesterol; 3, 7[alpha]-hydroxycholesterol; 4, 7[beta]-hydroxycholesterol; 5, 7-oxocholesterol; 6, cholesterol-5[alpha],6[alpha]-epoxide; 7, cholesterol-5[beta],6[beta]-epoxide; 8, 4[beta]-hydroxycholesterol; 9, cholestane-3[beta],5[alpha],6[beta]-triol; 10, 24-hydroxycholesterol; 11, 25-hydroxycholesterol; 12, 27-hydroxycholesterol; and 13, 24,25-epoxycholesterol.

(摘自 *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology*, 22, 734-742, 2002)

附表一、自由基與活性氧

Name	Formula	Comments
Hydrogen atom	H <sup>·</sup>	The simplest radical
Singlet oxygen	<sup>1</sup> ΔO <sub>2</sub>	Producing from photosensitizing agents and superoxide dismutase (SOD)
Superoxide anion	O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Producing from uncoupled electron transport and enzyme oxidative system
Hydrogen peroxide	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Producing from SOD or reduction of superoxide
Hydroxyl radical	OH <sup>·</sup>	A highly reactive oxygen centered radical producing from metal ion-catalyzed Fenton reaction Attacks all molecules in the human body
Alkoxyl radical	RO <sup>·</sup>	Formed during the breakdown of organic peroxides
Nitric oxide	NO <sup>·</sup>	One of the reactive nitrogen species (RNS) formed <i>in vivo</i> from amino acid L-arginine

(摘自 Nutritional Toxicology, 19, 1994 及 Nutrition Review, 52, 253, 1994)

