

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

大蒜精油及其有機含硫成分對於內毒素誘發之系統性發炎
中嗜中性球活性之影響及相關機制之探討(第2年)
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2320-B-040-030-MY2
執行期間：97年08月01日至98年07月31日
執行單位：中山醫學大學營養科學研究所

計畫主持人：劉承慈

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 98年10月31日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

大蒜精油及其有機含硫成分對於內毒素誘發之系統性
發炎中嗜中性球活性之影響及相關機制之探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2320-B-040-030-MY2

執行期間：96年 8月01日至 98年 7月31日

計畫主持人：劉承慈

計畫參與人員：沈立言 李宗貴 郭家豪 林郁婷 蘇博輝 李蒔華

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 完整報告

執行單位：中山醫學大學營養學系

中 華 民 國 98年 10月 31日

中文摘要及關鍵詞

在系統性發炎反應症候群(SIRS)中,已知嗜中性球過度浸潤小腸黏膜與腸道菌轉移及後續敗血症發展有關。本研究觀察大蒜精油(GO)及其有機硫化物(OSCs)可否藉由調控嗜中性球浸潤組織之活性而改善 SIRS 所致之腸黏膜損傷。將 Wistar 大鼠隔日胃灌載劑玉米油(CO)、GO (10、50、100mg/kgBw)或大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS (0.125 或 0.025 mmol/kg BW) 共 8 次後,以 LPS (i. p., 5mg/kgBw)誘發 SIRS,測定血中溶解態細胞黏附分子含量、周邊血嗜中性球表面 CD11b/CD18 含量;小腸黏膜 IL-1 β 、TNF- α 、CINC-1 及 ICAM-1 含量;嗜中性球浸潤程度以 MPO 組織化學染色法及組織 MPO 活性分析法測定,並以 HE 形態學染色觀察小腸上皮組織之完整性。結果顯示,在不影響大鼠正常代謝下,低劑量但非中、高劑量 GO 可改善 LPS 所致之嗜中性球浸潤作用,且單獨以相當於 GO10 或 GO50 劑量之 DAS、DADS 及 DATS 皆可改善 LPS 誘發之嗜中性球浸潤腸道組織的程度,其中 DAS 與 DADS 呈現優於 DATS 之保護效果。雖然所有劑量之 GO 皆可逆轉 LPS 所致之嗜中性球表面黏附分子 CD11b 表現量上升的情形,但僅低、中劑量 GO 可改善 LPS 誘發之血中 sCD62E、sICAM-1 上升,且高劑量 GO 甚至會惡化 LPS 誘發之周邊血嗜中性球上升數量。在小腸黏膜,GO 灌食非但未改善 LPS 所致之 IL-1 β 及 CINC-1 含量上升,高劑量 GO 甚至顯著惡化 LPS 所致之黏膜 TNF- α 含量上升;DAS 不論在高或低劑量,均顯著降低周邊血嗜中性球數目、其表面 CD11b/CD18 表現、血清 sICAM-1 和 CINC-1 含量以及迴腸黏膜上皮組織 ICAM-1、CINC-1、TNF- α 及 IL-1 β 含量。DADS 不論在高或低劑量,均可顯著降低嗜中性球表面 CD11b 表現、迴腸 ICAM-1、TNF- α 及 CINC-1 含量,但僅在高劑量下顯著降低迴腸 IL-1 β 含量。DATS 不論低或高劑量下均顯著抑制嗜中性球表面 CD11b 表現,且在低劑量時即能顯著降低迴腸 ICAM-1、TNF- α 及 IL-1 β 含量,但在高劑量 DATS 下,反而惡化 LPS 誘發增加之小腸 CINC-1 含量,並伴隨惡化之小腸受損型態。由以上結果可推論,低劑量 GO 可透過降低黏附分子的表現及血中嗜中性球數目以減少嗜中性球浸潤腸黏膜組織,減輕 SIRS 下之發炎性損傷,而高劑量 GO 則會因惡化小腸局部的發炎因子而對 LPS 所致之嗜中性球浸潤改善有限。在相當於 GO10 劑量之大算 OSCs,特別是 DAS 與 DADS 可有效改善嗜中性球與血管壁黏附因子及趨化因子的表現、降低促發炎細胞激素在組織中的含量,此生物學活性應在大蒜抗發炎作用中扮演一重要角色。

關鍵詞：CD11b, 大蒜精油, 有機硫化物, ICAM-1, 脂多醣, 嗜中性球, 系統性發炎反應症候群

Abstract and keywords

Systemic inflammation response syndrome (SIRS) is a clinical condition with overt neutrophil infiltration occurred in the small intestine and can cause bacterial translocation and the development of sepsis. This study investigated the effect of GO and its OSCs on infiltration activity of neutrophils in SIRS. Male Wistar rats were gavaged with corn oil, GO (10 to 100mg/kg Bw), or its OSCs, DAS, DADS and DATS (0.125 or 0.025 mmol/kg BW) . After receiving garlic compositions every other day for 8 times, animals were injected with LPS (i.p. , 5mg/kgBw) and then were analyzed for soluble adhesion molecules in plasma, CD11b/CD18 on surface of neutrophils, and cytokines and ICAM-1 in intestinal mucosa. MPO activity was measured as an indication of neutrophil infiltration in the small intestine. HE staining was used for morphological study. GO at low dose significantly ameliorated neutrophil infiltration. This effect of GO was consistent with that of either one of the OSCs along at dose equivalent to their content in 10 or 50 mg/kg Bw of GO. Although all the tested doses of GO reversed the elevated CD11b content on cell surface, high-dose of GO failed to reduce levels of sCD62E and sICAM-1 in plasma. In addition, high dose GO worsen the elevated peripheral numbers of neutrophils. In the intestinal, GO failed to suppress content of IL-1 β and CINC-1, and even elevated TNF- α level at high dose. DAS at both doses decreased peripheral neutrophil number, surface CD11b/CD18 content on cells, plasma levels of sICAM-1 and CINC-1, and intestinal content of ICAM-1, CINC-1, TNF- α and IL-1 β . DADS at both doses showed a similar effect as that of DAS for most measurements. DATS suppressed surface content of CD11b on neutrophils at both doses but ameliorated intestinal content of ICAM-1, TNF- α and IL-1 β only at low dose. When provided at high dose, DATS further elevate intestinal content of CINC-1 and worsen intestinal damage. In conclusion, GO at 10 mg/kg BW ameliorated LPS-induced intestinal damage and neutrophil infiltration via reducing the expression of adhesion molecules cells and suppressing the number of peripheral neutrophils. Garlic OSCs, especially DAS and DADS showed similar benefit as that of low dose GO and appeared to have additional benefit through suppressing levels of proinflammatory cytokines and chemokine in the intestine.

Keywords: CD11b, Garlic oil, Organosulfur Compounds, ICAM-1, Lipopolysaccharides, Neutrophils, Systemic inflammation response syndrome

項次	頁次
中文摘要	I
英文摘要	II
目錄	III
一、前言	1
二、研究目的	2
三、文獻探討	3
四、研究方法	6
五、結果	9
(一)、大蒜成分對大鼠生長代謝之影響	9
(二)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠臟器體重百分比之影響	9
(三)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠血中嗜中性球數目之影響	9
(四)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠迴腸黏膜嗜中性球浸潤指標 MPO 含量及活性之影響	9
(五)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠血中可溶性黏附分子 sCD62L (sL-selectin)含量之影響	10
(六)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠血中可溶性黏附分子 sCD62E 含量之影響	10
(七)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠嗜中性球黏附分子 CD11b/CD18 影響	11
(八)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠血中可溶性黏附分子 sICAM-1 影響	11
(九)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠迴腸黏膜細胞激素及黏附分子 含量之影響	12
(十)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠迴腸黏膜完整性之影響	13
六、討論	14
七、結論與建議	18
八、計畫成果自評	19
九、參考文獻	20
附圖	25
附表	41

一、前言

嗜中性球係人體周邊血中最主要的白血球類型，在宿主抵抗細菌感染時，可因黏附與趨化活性，迅速經血管遷移至受感染的組織中，而成為宿主對抗急性細菌感染的重要防線。嗜中性球在遷移過程中所受到的活化作用及抵達發炎組之後透過各種 receptor 與外來物 (e.g. 微生物) 交互作用，進行殺菌及清除外來物之活性，並活化與脂質氧化代謝有關之酵素 (e.g. phospholipase A, cyclooxygenase, Lipoxygenase)，引導後續發炎反應的進行。由於此過程亦傷及發炎部位正常健康的宿主細胞，造成組織傷害，因而也代表著許多急慢性發炎反應的病理生理學特徵。過去許多致力於解決與嗜中性球相關之發炎疾病的研究，曾提出各種醫藥策略，包括(1)抑制氧化壓力；(2)抑制或阻斷脂質氧化代謝產物 eicosanoids；及(3)發炎性細胞激素阻斷劑。由於在這些免疫病理學狀況下，常見過多的嗜中性球浸潤於組織中，因而，阻斷細胞的黏附及趨化活性，也成為目前發展抗發炎藥物之重要策略之一。另一方面，已有許多科學報導建議大蒜及其製備物之抗發炎用途，但過去對於其抗發炎作用是否透過調節嗜中性球活性並無完整有系統的探討。由於大蒜製備物的生物學活性被認為主要與其中的有機含硫化合物(OSCs)有關，而本計畫主持人與同僚過去已利用正常或內毒素 LPS 在大鼠誘發系統性發炎反應的模式，針對富含 OSCs 之大蒜精油及其含硫衍生物觀察過包括其對於脂質氧化代謝(Liu et al., 1998)，抗氧化(Chen et al., 2003; Sheen et al., 1999) 及對於發炎性細胞激素產生(Chiang et al., 2006)等生物學活性之影響，其中亦觀察到大蒜精油在適當劑量下餵食大鼠可抑制內毒素所誘發之嗜中性球在腸黏膜之浸潤伴隨小腸黏膜損傷之改善，因而本研究希望能釐清 GO 及其 OSCs 在急性系統性發炎反應中抑制嗜中性球浸潤腸道組織之機制是否與影響其黏附及趨化活性有關，以利於了解大蒜衍生物在急性發炎反應疾病上之臨床應用性。以下係針對研究背景之詳細說明。

二、研究目的

本研究的目的是在了解大蒜精油抑制嗜中性球遷移活性的作用，在第一年希望利用我們過去以建立之LPS誘發之系統性發炎模式的動物模型瞭解服用大蒜精油對於動物之以下影響：(1)對於嗜中性球黏附分子表現、趨化及釋放顆粒活性之影響(2)對於血管內皮黏附分子表現之影響(3)對於小腸黏膜促發炎細胞激素及趨化物質含量之影響(4)對於小腸上皮黏附分子表現之影響，及上述作用與小腸黏膜組織嗜中性球浸潤之間的關係，以瞭解GO透過調控嗜中性球各項活性之抗發炎作用，並且在執行計畫的第二年進一步驗證GO中主要有機硫化物(OSCs)，DAS、DADS及DATS在上述作用中所扮演的角色。

三、文獻探討

嗜中性球(neutrophils)是血液循環中白血球的成員之一，在人類約占白血球數量70%，為血液中數量僅次於紅血球的細胞類型。發生感染時，體內嗜中性球數量會急遽增加。此細胞不僅是宿主在細菌感染早期免疫反應的主力，具有毒殺細菌功能，也在後續的發炎反應中扮演重要角色，引導發炎反應的進行(Riollet et al., 2001)。正常情形下，嗜中性球不進入組織，但受到感染或組織受傷部位的趨化作用引導，則會穿越血管內皮遷移進入組織(Labro, 2000; Smith, 1994)。在受感染或受傷的上皮組織，e.g. 泌尿道、支氣管、肺及胃腸道，嗜中性球不但穿越血管進入組織，尚能更進一步穿越上皮至 apical 端的 lumen 進行吞噬、殺菌及分解組織的功能 (Huber et al., 1999; Zen and Parkos, 2003)。雖然嗜中性球遷移趨化活性對於正常宿主抵抗力是必要的，但是其在組織中進行之非特異性殺菌活性也是造成發炎性組織傷害的主因。在許多疾病及急性發炎性病變，主要病理學特徵都與嗜中性球遷移，釋放出 ROS(reactive oxygen species)及顆粒物質的能力有關，包括各種形式缺血與復甦後的受傷，如敗血性休克(Parent and Eichacker, 1999; Paterson and Webster, 2000; Sharma and Kumar, 2003)。我們過去的研究也發現，LPS 在大鼠誘發之系統性發炎反應，會增加腸黏膜氧化壓力，伴隨黏膜組織損傷 (Chiang et al., 2006)。

在發炎病灶中，受損之宿主細胞釋放細胞激素及產生趨化物質，進而活化血液中嗜中性球與血管壁之黏附性，使大量嗜中性球因趨化物質的牽引移入組織並被活化，成為組織二次傷害之主因 (Grisham and Granger, 1988)。嗜中性球穿越血管壁進入組織的過程受到細胞黏附分子(cell adhesion molecules; CAMs)家族及 chemoattractant/activator 分子交互作用，形成複雜的活化 cascade。嗜中性球遷移之最初過程為著邊(margination)其特徵為細胞沿著內皮空腔表面 rolling；在血管壁存在血流剪力(shear stress)的情況下，支持嗜中性球減速著邊的因子是血球與血管壁一些黏附分子之間的交互作用力。目前已知與 rolling 作用有關的黏附分子為 selectins。這些 selectin 分子可辨識位於，形成嗜中性球與內皮細胞間微弱的黏附作用，即以上所稱之著邊作用。著邊作用使得此細胞可偵測到局部環境中所存在來自感染或受傷部位之活化因子(e.g. 趨化物質 chemotactic substances; 在大鼠主要為 CINC-1)，誘發嗜中性球產生具有方向性的 locomotion 及刺激更有效之黏附分子 (i.e. beta-2 integrins; 主要為 CD11b/CD18)在嗜中性球表面表現(Wang and Doerschuk, 2002; Ley, 1996; Dransfield, 1995; Smith, 1993)。另一方面，感染或受傷部位產生之發炎性細胞激素，如 IL-1、TNF 及細菌組成份(e.g. LPS)，亦誘發內皮細胞黏附分子(e.g. ICAM-1, ELAM-1)之合成與表現以與嗜中性球 beta-2 integrins 交互作用，使其緊密結合在血管內皮細胞上。然後血球穿出血管，循著組織中所釋出的可溶性 chemoattractants 的濃度梯度為方向自血管滲出至組織內。使細胞穿透內皮細胞進入組織發炎位置之過程即稱為趨化 (chemotaxis) (Labro, 2000; Witko-Sarsat et al., 2000)。由於血管內皮細胞表現 selectin 與 ICAM-1 後可因自細胞脫落且以可溶形式出現在循環中，故許多研究以定量循環中的可溶性 selectin 與 ICAM-1 濃度反應血管壁黏附性活化的情形(Leeuwenberg et al., 1992; Pigott et al., 1992; Haught et al., 1996; Cummings et al., 1997)。有研究顯示，在缺氧再灌流(復甦)造成組織傷害的模式中，不論是抑制嗜中性球黏附能力或利用 ANS (antineutrophil serum) 減少嗜中性球數目，皆會使血管的滲透性降低，並減緩發炎現象(Arfors et al., 1987)。因而，近年來抗發炎醫藥研發的策略之一是 target 在嗜中性球之黏附及趨化活性(Albelda et al., 1994; Cameron, 1996; Luster, 1998; Donnelly and Rogers, 2003; Calixto et al., 2004)。

嗜中性球由血管內皮穿出後，若所浸潤的組織為黏膜系統，則會因為黏膜腔存在之致病

微生物或發炎物質與上皮交互作用，而繼續引導嗜中性球的遷移，使細胞由上皮層的 basolateral side 穿出至 apical side，即 lumen side (Huber et al., 1999; Zen and Parkos, 2003)。嗜中性球穿越上皮之遷移作用是許多上皮系統，包括胃腸道 (Parkos, 1997a, b; Madara, 1997; Okada et al., 1998; Stadnyk et al., 2005)，發炎性病症狀的重要特徵。嗜中性球係在黏膜發炎反應發生時首先抵達受侵犯部位之血球細胞類型，而其遷移至黏膜表面可說是其活化旅程的最後階段。這些細胞在達到上皮層空腔時，其活性直接參與清除黏膜部位細菌的免疫作用，但在大規模反應中也可能惡化組織損傷，形成上皮系統免疫病理學問題。嗜中性球穿越上皮的步驟涉及此細胞上特殊 receptor 與上皮細胞表面分子間的黏附作用，接著發生迅速 transmigration。目前對於此過程調節之分子機制之了解尚不如對於細胞穿越血管內皮之了解，但是近年來的研究結果初步顯示，嗜中性球穿越上皮的作用主要因感染上皮的病原菌體或其產物 (e.g. LPS) 作用在上皮細胞，使上皮細胞產生趨化因子及表現黏附分子有關 (Khair et al., 1996, Agace, 1996, Madjdpour et al., 2000)；而在腸道上皮細胞之研究中亦顯示嗜中性球穿越上皮的遷移活性與活化的上皮細胞表現之 ICAM-1 和嗜中性球 CD11b/CD18 間的交互作用有關 (Madara, 1997; Parkos, 1997a, b)。

大蒜 (*Allium sativum*) 用於在一般人的日常生活之中已超過 5000 年，在研究論文中已被提出之大蒜生理機能包括：抗腫瘤、抗動脈粥狀硬化、抗凝血、抗糖尿病、抗發炎及多種其他生物學活性 (Sato and Miyata, 2000; Agarwal, 1996; Augusti, 1996)。過去的研究中對於大蒜成份抗發炎作用機制的了解主要係根據對於其抗動脈周狀硬化及抗腫瘤效果之觀察。這些研究中顯示大蒜的效益至少有部分是源自於其抑制 lipoygenase、cyclooxygenase 及 phospholipase A2 活性 (Ali et al., 2000)。近年來的研究則顯示，大蒜 OSCs 可抑制活化之周邊血單核球與巨噬細胞表現促發炎細胞激素及 inducible nitric oxide synthase 活性 (Kim et al., 2001; Hodge et al., 2002; Keiss et al., 2003; Chang et al., 2005)。然而，關於大蒜的抗發炎功是否涉及其對於嗜中性球活性之調控，以及涉及何項嗜中性球活性的相關研究，早期僅有相當少數的報導，e.g. 就本計畫申請人可取得的資料中，最早的相關報導在 1988 年，研究人員發現在活體外 allicin 可抑制 inophore A23187 所刺激之嗜中性球釋放 lysosomal 酵素，即抑制細胞釋放顆粒作用 (Mayeux et al., 1988)，其後的研究則陸續指出，alliin 加強嗜中性球吞噬能力 (Salman et al., 1999)，而大蒜萃取物則會降嗜中性球穿越臍帶血管內皮細胞 monolayers 之活性 (Hobauer et al., 2000; 2001)。在大鼠膽管阻塞的肝硬化及氧化傷害或肝臟及腎臟缺血/復甦傷害的動物活體試驗模式中也發現，大蒜水萃物可降低 MPO (嗜中性球浸潤指標酵素) 在受損臟器內之含量 (Gedik et al., 2005; Sener et al., 2005, 2007; Kabasakal et al., 2005)。在黏附分子的表現方面，研究報告顯示在急性腦血管梗塞病患嗜中性球細胞膜上增加之黏附分子 CD11a 含量，顯著因在活體外以大蒜成分 garlicin 處理而降低 (Zhang et al., 2002)。而最近的報導顯示，大蒜水萃物可抑制 IL-1 所誘發之人類初代冠狀動脈上皮細胞表現 ICAM-1 及 VCAM-1 (Rassoul et al., 2006)。而目前並不清楚大蒜是否影響黏膜上皮細胞表現黏附分子或影響嗜中性球 transepithelial migration 活性。

我們過去已報導長期餵食大蒜精油 garlic oil 及其主要含硫成分對於 LPS 誘發之系統性發炎反應中小腸損害 (Chiang et al., 2006)，及嗜中性球在小腸組織之浸潤及活體外嗜中性球在 chemotaxis chamber 之遷移活性的影響 (蘇等人, 2004)。本研究則針對大蒜精油及其有機含硫成分對於以下作用之影響加以觀察，以說明過去我們發現這些大蒜成分在注射 LPS 大鼠活體內所造成的小腸病理生理學變化 (Chiang et al., 2006) 的機制，並進一步釐清不同大蒜及其 OSCs 對於嗜中性球遷移作用的影響在其抗發炎作用上所扮演的角色：(1) 抑制嗜中性球黏附分子表現、趨化活性及其後續引起之嗜中性球活化作用；(2) 抑制血管內皮黏附分子表

現; (3)抑制小腸上皮分泌趨化物質;(4)抑制小腸上皮黏附分子表現。此外，由於我們並未發現週邊血中 IL-1、TNF-alpha 及 IL-6 濃度受到餵食 GO 的影響，但不能排除腸道局部這些細胞激素的含量受影響的可能性，因此亦在本研究中加以觀察。

四、研究方法

壹、大蒜精油製備及含硫成分分析

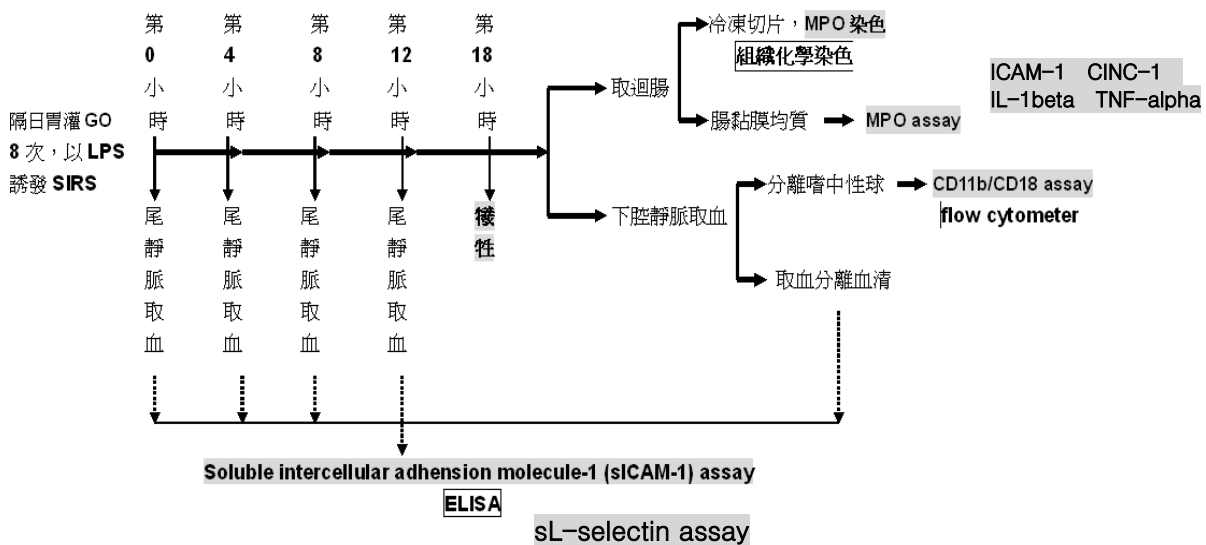
大蒜精油由中山醫學大學營養科學研究所李宗貴老師實驗室所提供。萃取步驟則依據 Chen 等人所述之方法進行(Chen et al., 2003)。取 1.5 公斤新鮮大蒜加入 3 公升蒸餾水於 Waring blender 中打碎，以水蒸氣蒸餾法(steam distillation method)萃取 4 小時後，抽取可揮發部份之油狀物即為大蒜精油，每公斤生鮮大蒜約可抽取 2 至 2.5 克精油。以氣相層析儀(Gas Chromatograph, GC)分析精油成分，GC 分析條件採用氮氣流速每分鐘 1.8 毫升，並使用火焰離子偵測器進行偵測，管柱溫度以初溫 50°C，每分鐘 5°C 的速度升至 200°C 終溫後維持 10 分鐘，所得精油主要組成分別為 10% diallyl sulfide, 39% diallyl disulfide, 31% diallyl trisulfide, 2% methyl allyl disulfide, 8% methyl allyl trisulfide。

貳、實驗動物

由國家科學委員會動物中心委外之樂斯科生物科技股份有限公司提供 4 週齡(約 100g 重)Wistar 雄性大白鼠。飼養條件為自動光照控制(12 小時白晝及 12 小時黑夜)，室溫控制於 25°C，相對溼度為 55%，動物自由進食標準飼料及蒸餾水。

參、實驗 protocol

第一年：



第二年: 灌食 GO 的步驟改以大蒜 OSCs 進行，且 sICAM-1 及 sL-selectin 之分析僅在 LPS 注射前(第 0 小時)及注射後第 18 小時犧牲動物時取樣進行。

肆、系統性發炎反應動物模式

本研究採非致死性之系統發炎反應模式。動物誘發模式依據 Chiang 等人所述之方法進行(Chiang et al., 2006)。以來自 *Salmonella Tryphimurium* 之內毒素溶於生理食鹽水經由腹腔注射(5mg/ml/kgBW)至大鼠體內，控制組則注射等量生理食鹽水。

伍、樣品收集

1. 動物犧牲

大白鼠秤重後以 CO₂ 窒息犧牲，剪開腹部由下腔靜脈抽取血液，依序取下全段小腸(胃幽

門至盲囊端)、脾臟及淋巴結。分別於冰上剔除脂肪、以冰冷 PBS 洗去血液並以紙巾吸乾水分，秤重後置於冰上或液態氮中備用。

2. 血液收集

大鼠以注射內毒素誘發發炎反應，於注射前第 0 小時及注射後第 4、8、12 小時或注射前第 0 小時及注射後第 1、2、4 小時於尾靜脈抽血，存於冰冷不含抗凝血劑之試管中以備血清。第 18 小時犧牲收集之血液分別存於不含抗凝血劑之冰冷試管中以備血清或含 Sodium heparin 之採血管中以備後續分離嗜中性球。不含抗凝血劑之全血在冰上靜置 30 分鐘後以 1000g 在 4°C 下離心 30 分鐘，所得上清液即為血清，存於-80°C。

3. 分離嗜中性球

取含 Sodium heparin 全血以 4:1(v/v)加入 4.5% Dextran/Saline(w/v)混合均勻後，在 37°C 下沉降 45 分鐘，取出上層富含白血球之懸浮液於 400g、25°C 下離心 10 分鐘，以 BSS 清洗後於 250g、25°C 下離心 10 分鐘，以 4ml BSS 再懸浮細胞後利用 Ficoll-Paque(Pharmacia Biotech)進行密度梯度離心，離心後顆粒型白血球伴隨少許污染之紅血球將位於最下層，以 BSS 清洗細胞後利用 RBC lysis buffer 破除污染之紅血球後，收集嗜中性球，再懸浮於 RPMI-1640 培養基或 HBSS 再懸浮後備用。此置備流程所獲得之顆粒性白血球經 Trypan blue 染色及細胞形態學判定，存活率及純度均分別在 95%以上。

4. 迴腸黏膜樣品收集

以十二指腸曲至盲囊端的前 1/3 定義為空腸，後 2/3 定義為迴腸。新鮮取下之迴腸以冰冷無菌且含蛋白酶抑制劑之 PBS 灌洗以清除腸道內容物及碎屑，縱剖後以紙巾擦去黏液與水分。由迴盲瓣開始計算，取 1-11 公分處，以玻片刮下腸黏膜存於-80°C 下備用於 Cytokine 及 ICAM-1 分析，取 11-12 公分處置於福馬林中用於 HE 形態學切片染色，取 12-13 公分處如上述刮下腸黏膜用於 MPO 化學活性分析，取 14-15 公分用於 MPO 組織冷凍切片染色。

5. 腸道冷凍切片

小腸以保鮮膜包裹後，置於-20°C 下冷凍 2 小時，再置於-80°C 下 4 小時冷凍組織，將組織置於乾冰上以組織冷凍包埋液(Sakura Finetek, NO. 4583)包埋後儲存於-80°C 備用。包埋之組織使用冷凍切片機(Leica, CM3050s)以 8 μ m 進行切片，並置於冰冷 acetone 中固定 10 分鐘後於室溫下風乾，儲存於-80°C 備用。

陸、分析項目

1. 嗜中性球黏附分子 CD11b/CD18 分析

將細胞以 PBS 調整密度至 $1 \times 10^6 / 100 \mu$ l 後，以直接免疫螢光染色法分別加入 10 μ l Mouse anti-Rat CD11b-FITC(AbD Serotec, MCA275FT)與 10 μ l Mouse anti-Rat CD18-RPE(AbD Serotec, MCA775PE)抗體雙螢光染色，於冰上暗反應 30min 後於 250g、4°C 下離心 10 分鐘，以冰冷 PBS 清洗兩次，將細胞以 1ml 冰冷 PBS 再懸浮，使用直徑 35 μ m 尼龍網篩(BD Falcon, NO. 352235)過濾至上機專用試管(BD Falcon, NO. 352052)後以流式細胞儀(FACS Calibur, BD)測量單位細胞之螢光強度。以 SCO 組細胞為 negative control，每組分別收取圈選之顆粒球區域內 10000 顆細胞為代表，數據以軟體 WinMDI 2.8 分析後以 Mean fluorescence intensity(MFI)為統計依據。

2. 周邊血 sICAM-1(CD54)、sL-selectin 及小腸黏膜 IL-1 β 、TNF- α 、CINC-1、ICAM-1 分析

此項分析採用商業 Rat ICAM-1、L-selectin、CINC-1(Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1) IL-1 β 及 TNF- α ELISA Kit，依廠商說明書之說明進行。

3. 小腸黏膜嗜中性球浸潤指標 Myeloperoxidase(MPO)分析

根據 Beril Gok 等人所述，組織間 MPO 的活性測定可作為嗜中性球含量的 enzyme marker，故可視為一種浸潤的指標。此項分析採用 Beril Gok 等人所述方法加以修飾後利用分

光光度計進行分析(Beril Gok et al., 2007)。

4. 小腸嗜中性球浸潤指標 Myeloperoxidase(MPO)切片染色

此項分析採用商業 MPO 染色 Kit(Sigma-Aldrich, 391A kit)，依廠商說明書之說明進行。將小腸切片靜置回溫 30 分鐘，以冰冷 PBS 清洗 2 次，滴上適量含 DAB 與 H_2O_2 的受質溶液反應 2 分鐘後，以冰冷 PBS 清洗 1 次，加上適量 $Cu(NO_3)_2$ 溶液呈色 2 分鐘後，以冰冷 PBS 清洗 1 次，使用 Hematoxyline 背景染色 5 秒鐘後，以冰冷 PBS 清洗 2 次，切片以酒精 50%、75%、95%及 Xylene 序列脫水後，以封片膠封片保存。判定方法以光學顯微鏡 200 倍鏡頭下隨機取 5 個視野拍照紀錄。

5. 蛋白質定量

根據 Lowry 法進行。標準曲線以 0、0.25、0.5、0.75、1mg/ml 之 BSA 為基準。

柒、統計分析

各組分析所得數據以平均值加減一個正負標準差(mean±SD)表示。統計分析在 SAS(SAS 9.1 for Windows)系統下進行。載劑處理之注射生理食鹽水與注射 LPS (LCO 與 SCO)組間，差異性以 Student' s t-test 進行分析，以 $p < 0.05$ 為具有顯著差異。各 LPS 刺激組間組數據以 one-way analysis of variance (ANOVA)分析後，採用 Duncan' s test 事後檢定組間之顯著性差異與否($p < 0.05$)。

五、結果

(一)、大蒜成分對大鼠生長代謝之影響

大鼠隔日灌食載劑玉米油(CO, 2ml/kg Bw)、大蒜精油(GO10, 10mg/kg Bw; GO50, 50mg/kgBw; GO100, 100mg/KgBw)或二烯炳基硫化物(DAS-L, 0.025mmol/kg BW; DAS-H, 0.125mmol/kg BW)、二烯炳基二硫化物(DADS-L, 0.025mmol/kg BW; (DADS-H, 0.125mmol/kg BW)、二烯炳基三硫化物(DATS-L, 0.025mmol/kg BW; DATS-H, 0.125mmol/kg BW)共 8 次直至犧牲前一天,期間大鼠飼養於代謝籠中,紀錄攝食量、飲水量、糞便量及排尿量,並記錄體重,以觀察灌食大蒜精油對於大鼠生長代謝之影響,結果示於圖一及圖二。

由結果可知,各組之體重、攝食量、飲水量、糞便量及排尿量隨著灌食天數增加,觀察期間各組數據皆平穩上升且組間無顯著差異。本結果顯示以大蒜精油及其有機硫化物在本研究使用之劑量及灌食時間下並不會影響大鼠正常生長代謝。

(二)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠臟器體重百分比之影響

灌食 CO 之大鼠在隨機分為兩組後,分別注射 saline (SCO 組)及 LPS (LCO 組),且灌食 GO, DAS, DADS, 及 DATS 之大鼠均注射 LPS (LGO10、LGO50、LGO100 組及 DAS-L, DAS-H, DADS-L, DADS-H, DATS-L, DATS-H 組),經 18 小時後犧牲,收集肝臟、腎臟、脾臟及淋巴結秤重,並以犧牲前體重換算臟器體重百分比,結果示於表一及表二。

由結果可知,在未給予 GO 或其 OSCs 之大鼠中,以 LPS 誘發發炎反應之大鼠(LCO 組)與控制組(SCO 組)相較,肝臟、腎臟、脾臟及淋巴結皆有顯著腫大的情形($p<0.05$);灌食 GO 之大鼠在 LPS 刺激下,LGO10 及 LGO50 組其肝臟、腎臟及脾臟腫大情形與 LCO 組無顯著差異,但 LGO100 組此三臟器腫大情形則均顯著大於 LCO 組($p<0.05$),此高劑量 GO 促進的肝脾腫大,與我們過去在正常大鼠所獲得之結果相似;另一方面,所有受測大蒜 OSCs 無論在低或高劑量下,對於注射 LPS 大鼠之組織及臟器體重百分比皆無顯著影響,這應是由於本研究採用的 OSCs 劑量大約僅相當於或低於 GO 在劑量 50 mg/kg BW 之 OSCs 含量。

(三)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠血中嗜中性球數目之影響

灌食 CO 之大鼠在隨機分為兩組後,分別注射 saline (SCO 組)及 LPS (LCO 組),且灌食 GO, DAS, DADS, 及 DATS 之大鼠均注射 LPS (LGO10、LGO50、LGO100 組及 DAS-L, DAS-H, DADS-L, DADS-H, DATS-L, DATS-H 組),經 18 小時後犧牲,收集血液用以分離嗜中性球計數,並以血液體積校正,結果示於圖三及圖四。

由結果可知,在未灌食大蒜成分之大鼠中,以 LPS 誘發發炎反應之大鼠(LCO 組)與控制組(SCO 組)相較,顯示發炎反應下血中嗜中性球數目顯著上升($p<0.05$);大鼠在 LPS 刺激下與未灌食 GO 及 OSCs 的 LCO 組相較,LGO10 組血中嗜中性球數目顯著下降($p<0.05$),隨著灌食劑量增加,大鼠血中嗜中性球數目隨之增加,LGO100 組與 LCO 組呈顯著差異($p<0.05$)。本結果顯示在系統性發炎反應下,大蒜精油劑量 10mg/KgBw 可逆轉血中嗜中性球數目上升之情形,然而當劑量達 100mg/KgBw 時則反會導致嗜中性球數目增加,因而可能惡化後續與嗜中性球相關之免疫病理學。

進一步觀察 OSCs 之作用發現,相較於未灌食大蒜成分之 LCO 組,灌食 DAS 呈現劑量依賴性的降低周邊血液中嗜中性球的數目,且不論在低或高的劑量都具有顯著性 ($p<0.05$),而其他 OSCs 組也有下降血中嗜中性球數目的趨勢,但不具統計學上的意義。

(四)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠迴腸黏膜嗜中性球浸潤指標 MPO 含量及活性之影響

骨髓過氧化酶(myeloperoxidase, MPO)為嗜中性球所富含的過氧化酵素,故組織中 MPO

的活性或含量可做為嗜中性球浸潤組織的指標。灌食 CO 之大鼠在隨機分為兩組後，分別注射 saline (SCO 組)及 LPS (LCO 組)，且灌食 GO, DAS, DADS, 及 DATS 之大鼠均注射 LPS (LGO10、LGO50、LGO100 組及 DAS-L, DAS-H, DADS-L, DADS-H, DATS-L, DATS-H 組)，經 18 小時後犧牲，收集迴腸黏膜製備均質液並以化學法分析 MPO 活性，另外收集整段迴腸進行冷凍切片，以組織化學染色法辨識 MPO 顆粒，結果示於圖五(A)及(B)與圖六(A)及(B)。

由化學法分析法之結果可發現，在未以大蒜成分灌食之大鼠中，以 LPS 誘發發炎反應之大鼠(LCO 組)其腸黏膜組織中 MPO 活性顯著高於 SCO 控制組($p < 0.05$)；大鼠在 LPS 刺激下與未灌食 GO 及 OSCs 的 LCO 組相較，LGO10 顯著降低黏膜組織內 MPO 活性($p < 0.05$)，而 LGO50 及 LGO100 組則與 LCO 組無顯著差異。此結果顯示在系統性發炎反應下，大蒜精油劑量在 10mg/KgBw 時，具有改善嗜中性球浸潤腸道黏膜組織之生理活性，但在劑量 50 及 100mg/KgBw 下則無顯著效果。

進一步觀察 OSCs 之作用發現，相較於未灌食大蒜成分之 LCO 組，DAS 和 DADS 呈現劑量依賴性的降低周邊血液中嗜中性球的數目，且不論在低或高的劑量都具有顯著性 ($p < 0.05$)，而 DATS 組在低或高的劑量有相似的降低血中嗜中性球數目的作用，且都具有顯著性 ($p < 0.05$)。

(五)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠血中可溶性黏附分子 sCD62L(sL-selectin)含量之影響

CD62L 係表現在嗜中性球上，調控嗜中性球受到活化後滾動、與血管內皮細胞及黏附的重要分子。而 CD62L 在嗜中性球活化與其配體結合後，會進行裂解，形成 sCD62L，因此，在發炎反應下，血清中 sCD62L 含量可做為嗜中性球活化程度的指標之一。

灌食 CO 之大鼠在隨機分為兩組後，分別注射 saline (SCO 組)及 LPS (LCO 組)，且灌食 DAS, DADS, 及 DATS 之大鼠均注射 LPS (LGO10、LGO50、LGO100 組及 DAS-L, DAS-H, DADS-L, DADS-H, DATS-L, DATS-H 組)，經 18 小時後犧牲。其中部分 LCO, SCO 及所有灌食 GO 之動物於注射後第 0、1、2、4 小時由尾靜脈或第 18 小時犧牲由下腔靜脈抽取血液並製備血清，以 ELISA 分析血中 sCD62L 含量，結果示於圖七。由於此結果顯示在 LPS 誘發後 18 小時時 SCO 組血中 sCD62L 含量方顯著高於 LCO 組，故後續對於 OSCs 之觀察僅在 LPS 注射前(0 小時)及後 18 小時犧牲動物時採血進行，結果示於圖八。

由圖七中的結果可知，在第 0 小時，各組間血中 sCD62L 含量並無顯著差異。在未給予灌食大蒜成分之大鼠中，以 LPS 誘發發炎反應之大鼠(LCO 組)與控制組(SCO 組)相較，誘發後第 1、2 小時，兩組血中 sCD62L 含量並無顯著差異，當誘發後第 4、18 小時，LCO 組 sCD62L 含量則顯著高於 SCO 組($p < 0.05$)；灌食 GO 之大鼠在 LPS 刺激下，誘發後第 1、2 小時，LGO100 組之大鼠血中 sCD62L 含量顯著增加($p < 0.05$)，誘發後第 4 小時，LCO 組與 LGO10 組含量顯著增加($p < 0.05$)，誘發後第 18 小時，LGO10 組、LGO50 組含量顯著低於 LCO 組($p < 0.05$)。本結果顯示在系統性發炎反應下，嗜中性球數量上升且伴隨 sCD62L 表現增加。而大蒜精油劑量在 10mg/KgBw 及 50mg/KgBw 時，可能可藉由抑制嗜中性球 CD62L 表現量或抑制嗜中性球數量及活化，以致血中 sCD62L 表現量下降。在劑量 100mg/KgBw 時，血中顯著增加之 sCD62L 可能來自於高量的嗜中性球數目及活化所致。

進一步觀察 OSCs 的作用發現，相較於未灌食大蒜成分之 LCO 組，DAS-L 顯著降低血清中 sCD62L 的含量，但其他大蒜 OSCs 處理組血清中 sCD62L 的含量雖都有較 LCO 組低的趨勢，但不具統計學上的意義。由結果推測，GO 降低血中 sCD62L 含量主要藉由其中 DAS 之作用(圖八)。

(六)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠血中可溶性黏附分子 sCD62E 含量之影響

血管內皮細胞上 CD62E 為調控嗜中性球滾動的重要黏附分子，而在發炎反應下，血中之

sCD62E 含量則可做為血管內皮細胞活化程度的指標之一。

灌食 CO 之大鼠在隨機分為兩組後，分別注射 saline (SCO 組)及 LPS (LCO 組)，且灌食 DAS, DADS, 及 DATS 之大鼠均注射 LPS (LGO10、LGO50、LGO100 組及 DAS-L, DAS-H, DADS-L, DADS-H, DATS-L, DATS-H 組)，經 18 小時後犧牲。其中部分 LCO, SCO 及所有灌食 GO 之動物於注射後第 0、1、2、4 小時由尾靜脈或第 18 小時犧牲由下腔靜脈抽取血液並製備血清，並以 western blot 分析血中 sCD62E 含量，結果示於圖九。由結果可知，LPS 刺激組血中 sCD62E 隨刺激時間增加，含量有上升的趨勢。在未給予 GO 之大鼠中，以 LPS 誘發發炎反應之大鼠(LCO 組)與控制組(SCO 組)相較，誘發後第 18 小時，LCO 組血中 sCD62E 明顯增加；灌食 GO 之大鼠在 LPS 刺激下，LGO10 組之大鼠在誘發後第 18 小時，血中 sCD62E 減少，而 LGO50 及 LGO100 組之大鼠，血中 sCD62E 則反有增加的趨勢。

(七)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠嗜中性球黏附分子 CD11b/CD18 含量之影響

CD11b 和 CD18 是讓嗜中性球能穩固黏著於內皮細胞的重要黏附分子，嗜中性球受到活化時，其表現量會增加，幫助嗜中性球黏著和遷移至發炎位置，與嗜中性球穿越血管障壁、組織間遷移與辨識補體調理之致病原等生理功能相關。CD11b 和 CD18 以 heterodimers 的形式形成 integrin，與內皮細胞表現的 ICAMs 形成穩定黏著，其中 CD18 為此黏附作用的重要因子，測定嗜中性球表面 CD11b 與 CD18 表現量可反映其與血管壁黏著的活性。灌食 CO 之大鼠在隨機分為兩組後，分別注射 saline (SCO 組)及 LPS (LCO 組)，且灌食 DAS, DADS, 及 DATS 之大鼠均注射 LPS (LGO10、LGO50、LGO100 組及 DAS-L, DAS-H, DADS-L, DADS-H, DATS-L, DATS-H 組)，經 18 小時後犧牲，收集血液並分離嗜中性球，然後以流式細胞儀分析嗜中性球上 CD11b 及 CD18 表現量，結果示於圖十及圖十一)。

由圖十(A)的結果可知，在未給予灌食大蒜成分之大鼠中，以 LPS 誘發發炎反應之大鼠(LCO 組)與控制組(SCO 組)相較，LCO 組嗜中性球 CD11b 表現量雖有增加的趨勢(圖十 A)，但並不具統計學上的意義；灌食 GO 之大鼠在 LPS 刺激下，與 LCO 組相較，所有 GO 劑量處理均顯著降低嗜中性球 CD11b 表現量($p < 0.05$)。另外 CD18 表現量在發炎反應下皆顯著上升($p < 0.05$)，但大蒜精油對其並無顯著影響(圖十(B))。本結果顯示在系統性發炎反應下，大蒜精油具有減少嗜中性球黏附分子 CD11b 表現量之生理活性，可推測進而抑制嗜中性球 CD11b/CD18 所調控的相關生理功能。

在大蒜 OSCs 之作用方面，本研究發現 DAS 組呈劑量依賴性降低 CD11b 的表現量，且具顯著性 ($p < 0.05$)，而 DADS 和 DATS 組與 LCO 組不論在低或高劑量下皆有相似且顯著降低細胞 CD11b 表現量的效果。在細胞 CD18 表現量方面，DAS 和 DADS 呈劑量依賴性的下降 LPS 所增加之 CD18 表現，且兩者均在高劑量時與 LCO 組相較達統計學上意義。而 DATS 組雖也有劑量依賴性下降嗜中性球 CD18 表現量的趨勢，但不具統計學上的意義(圖十一)。

(八)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠血中可溶性黏附分子 sICAM-1 含量之影響

ICAM-1 係表現在血管內皮上，是讓嗜中性球能穩固黏著於內皮細胞的重要配體，發炎反應下，其表現量會增加，且成為 soluble form (sICAM-1) 脫落於血液中，因此，測血清中的 sICAM-1 可反映血管內皮細胞上 ICAM-1 之表現量。灌食 CO 之大鼠在隨機分為兩組後，分別注射 saline (SCO 組)及 LPS (LCO 組)，且灌食 DAS, DADS, 及 DATS 之大鼠均注射 LPS (LGO10、LGO50、LGO100 組及 DAS-L, DAS-H, DADS-L, DADS-H, DATS-L, DATS-H 組)，經 18 小時後犧牲。其中部分 LCO, SCO 及所有灌食 GO 之動物於注射後第 0、4、8、12 小時由尾靜脈或第 18 小時犧牲由下腔靜脈抽取血液並製備血清，以 ELISA 分析血中 sICAM-1 含量，結果示於圖十二。

由圖十二中的結果可知，在第 0 小時無 LPS 作用下，GO100 組血中 sICAM-1 含量顯著

較高($p<0.05$)。在未給予灌食大蒜成分之大鼠中，以 LPS 誘發發炎反應之大鼠(LCO 組)與控制組(SCO 組)相較，誘發後第 4、8、12 及 18 小時，LCO 組血中 sICAM-1 含量皆顯著高於 SCO 組($p<0.05$)；灌食 GO 之大鼠在 LPS 刺激下，在誘發後第 4 小時，LGO50 組血中 sICAM-1 含量顯著低於 LCO 組($p<0.05$)，在誘發後第 8 小時，不論以任何劑量 GO 處理，血中 sICAM-1 含量與 LCO 組皆無顯著差異，在誘發後第 12 小時，LGO50 組血中 sICAM-1 含量顯著低於 LCO 組($p<0.05$)，在誘發後第 18 小時，LGO10 及 LGO50 組血中 sICAM-1 含量皆顯著低於 LCO 組($p<0.05$)，其中 LGO10 組約下降 26.4%、LGO50 組約下降 40.1%而 LGO100 組約下降 13.3%。本結果顯示在系統性發炎反應下，大蒜精油劑量在 10mg/KgBw 及 50mg/KgBw 時，具有逆轉 ICAM-1 表現量上升之生物活性，但在劑量 100mg/KgBw 下則無此效應，且可能造成慢性發炎的可能性，導致在第 0 小時 baseline 即有較高 sICAM-1 含量。

由於上述血中 sICAM-1 結果顯示在 LPS 誘發後第 4 至 18 小時期間 SCO 組血中 sCD62L 含量均有相似的水準，且均顯著高於 LCO 組，故後續對於 OSCs 之觀察僅在 LPS 注射前(0 小時)及後 18 小時犧牲動物時採血進行，結果示於圖六(B)。在大蒜 OSCs 之作用方面，本研究發現 DAS 組不論在低或高的劑量都有相似降低血清中 sICAM-1 含量的作用，且皆具有顯著性 ($p<0.05$)，而 DADS 組在低劑量時也能顯著降低血清中 sICAM-1 的含量，但在高劑量時雖有降低趨勢但不具統計學上的意義，而 DATS 組不論在低或高的劑量都不影響血清中 sICAM-1 的含量(圖十三)。

(九)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠迴腸黏膜細胞激素及黏附分子含量之影響

組織中促發炎性細胞激素含量是調控組織發炎反應的重要關鍵，此外，在發炎的腸上皮組織中，上皮細胞會受到刺激而分泌可與嗜中性球交互作用的黏附因子 ICAM-1，趨化因子 CINC-1；另外，也會產生促發炎激素 TNF- α 及 IL-1 β 來調控發炎反應。灌食 CO 之大鼠在隨機分為兩組後，分別注射 saline (SCO 組)及 LPS (LCO 組)，且灌食 DAS, DADS, 及 DATS 之大鼠均注射 LPS (LGO10、LGO50、LGO100 組及 DAS-L, DAS-H, DADS-L, DADS-H, DATS-L, DATS-H 組)，經 18 小時後犧牲，收集迴腸黏膜製備均質液，以 ELISA 分析黏附分子 ICAM-1 及促發炎細胞激素 IL-1 β 、TNF- α 與趨化物質 CINC-1 含量。結果於 IL-1 β 及 CINC-1 方面，在未給予大蒜成分灌食之大鼠中，以 LPS 誘發發炎反應之大鼠(LCO 組)其含量顯著高於 SCO 控制組($p<0.05$)；灌食 GO 不論在任何劑量下，均不影響 LPS 刺激下迴腸黏膜 IL-1 β 及 CINC-1 之含量。於 TNF- α 方面，在未給予大蒜成分灌食之大鼠中，以 LPS 誘發發炎反應之大鼠(LCO 組)其含量顯著高於 SCO 控制組($p<0.05$)；灌食 GO 之大鼠在 LPS 刺激下，低劑量 GO 不影響小腸 TNF- α 含量，但高劑量(LGO100 組)則顯著增加 LPS 誘發之 TNF- α 於小腸黏膜之含量($p<0.05$)。於小腸黏膜 ICAM-1 含量方面，在未給予灌食大蒜成分之大鼠中，以 LPS 誘發發炎反應之大鼠(LCO 組)其含量顯著高於 SCO 控制組($p<0.05$)；灌食 GO 之大鼠在 LPS 刺激下，其含量呈劑量依賴性下降，LGO50 組時與 LCO 組達顯著差異($p<0.05$) (表三)。

進一步觀察大蒜 OSCs 之作用發現，DAS 劑量依賴性的下降小腸黏膜中 ICAM-1 的含量，且不論在低或高劑量下皆有顯著效果($p<0.05$)，DADS 不論在低或高劑量均有相似下降 ICAM-1 含量的效果且相較於 LCO 組皆有統計學上的意義，然而 DATS 組僅在低劑量時有顯著的降低 LPS 刺激下的作用，在高劑量時則無影響。在 CINC-1 方面，發現 DAS 組和 DADS 組呈現劑量依賴性的降低黏膜組織 CINC-1 的含量，且 DAS 組不論高或低劑量和 DADS 高劑量時皆達統計學上的意義；另外在腸黏膜組織中 TNF- α 的含量方面，GO 含硫化物除 DATS-H 組外，其它組皆有相似下降的情形，且皆有顯著差異 ($p<0.05$)。而在 IL-1 β 方面，GO 含硫化物各組在低劑量和高劑量時都分別有相似的降低情形，且皆具統計學上的意義 ($p<0.05$) (表四)。

由於上述結果係針對小腸黏膜進行觀察，而小腸細胞的發炎反應亦有可能受到小腸組織(包括黏膜下組織)中局部發炎因子調控之影響，故在進行大蒜 OSCs 之研究時，除了小腸上皮外，亦觀察了小腸段完整組織之中上述分子含量，結果示於表四。在完整小腸組織中，LCO 組的 ICAM-1、CINC-1 及 IL-1 β 含量均顯著高於 SCO 組 ($p < 0.05$)。在注射 LPS 且以 GO 含硫化物處理之下，相較於 LCO 組，在 ICAM-1 和 TNF- α 在各組均沒有統計學上的意義；而在 CINC-1 方面，DAS 組相較於 LCO 組呈劑量依賴性下降，且在高劑量時達顯著性 ($p < 0.05$)，而 DADS 組相較於 LCO 組則不影響 CINC-1 的含量，但 DATS 組不論低或高劑量皆有顯著惡化 CINC-1 上升的情形。另外在 IL-1 β 方面，DAS 組相較於 LCO 組呈現相似的下陷情形，且不論在低或高劑量皆具顯著性 ($p < 0.05$)，而 DADS 組相較於 LCO 組有劑量依賴性降低 IL-1 β 的含量，且在高劑量時有顯著性 ($p < 0.05$)，而 DATS 組在低劑量時相較於 LCO 組有顯著降低 IL-1 β 含量的作用 ($p < 0.05$)，但在高劑量時則沒有影響。

(十)、大蒜成分對系統性發炎反應大鼠迴腸黏膜完整性之影響

灌食 CO 之大鼠在隨機分為兩組後，分別注射 saline (SCO 組)及 LPS (LCO 組)，且灌食 DAS, DADS, 及 DATS 之大鼠均注射 LPS (LGO10、LGO50、LGO100 組及 DAS-L, DAS-H, DADS-L, DADS-H, DATS-L, DATS-H 組)，經 18 小時後犧牲，收集整段迴腸進行臘塊包埋切片，以 HE 染色觀察迴腸型態之變化，結果示於圖十四及圖十五。

由結果可知，在未給予大蒜成分灌食之大鼠中，以 LPS 誘發發炎反應之大鼠(LCO 組)其腸上皮絨毛組織型態較控制組(SCO 組)破碎不完整；灌食 GO 之大鼠在 LPS 刺激下，與 LCO 組相較，其腸上皮絨毛組織型態均較完整，但仍有絨毛水腫(空泡處)情形發生，而大蒜精油在劑量 100mg/KgBw 時，其水腫情形較為嚴重，且絨毛密度較低，顯示有較嚴重的黏膜損傷(圖十四)。而灌食 GO 含硫化物 DAS 在低劑量時，其小腸絨毛型態與 SCO 組相似，而在高劑量時，絨毛排列較為稀疏，頂端也較為破損高度也較矮。在 DADS 低劑量時，絨毛排列較稀疏且完整性不佳有水腫的情形，而在高劑量時絨毛排列不緊密，頂端有破損。在 DATS 組低劑量時，絨毛排列稀疏，而在高劑量時排列稀疏、完整性差、破損位置多，絨毛較短且常有水腫的情形(圖十五)。

六、討論

本實驗利用 LPS 經腹腔注射至動物體內之內毒素中毒模式(endotoxicosis)引發系統性發炎反應。誘發後之發炎性指標如血中嗜中性球數量、血管內皮細胞黏附分子 sCD62L、sCD62E、sICAM-1、嗜中性球黏附分子 CD18、腸黏膜嗜中性球浸潤指標 MPO、發炎性細胞激素 IL-1 β 、TNF- α 、CINC-1 及黏附分子 ICAM-1 含量皆顯著上升(SCO 組 vs LCO 組, $p < 0.05$)，顯示本動物模式可成功誘發大鼠之系統性發炎反應伴隨小腸之嗜中性球浸潤及組織損傷。

在 LPS 刺激組間，大蒜精油劑量在 100mg/KgBw(LGO100)時，可發現其在肝臟、腎臟及脾臟之臟器體重比顯著高於 LCO、LGO10 及 LGO50 組，此結果與我們過去在正常大鼠灌食高劑量 GO 的結果相似；以大蒜精油(200mg/KgBw) 每週 3 次共灌食 7 週，發現大蒜成分可促進脾臟細胞的增生及促進肝臟與紅血球之抗氧化能力，且大蒜精油處理組皆有脾臟腫大的情形發生(Liu et al., 1998; Sheen et al., 1999)。其他學者則報導，以新鮮大蒜(250mg/KgBw)連續灌食大鼠 30 天，雖可增加肝臟及腎臟中抗氧化酵素 SOD 及降低脂質過氧化指標 TBARS 含量，但當劑量達 1000 mg/KgBw 時則會失去抗氧化效應並造成肝臟及腎臟損傷(Banerjee et al., 2001)。亦有學者將大鼠以大蒜有機硫成分 DADS (1 mmol/KgBw)連續灌食 4 天，發現肝臟及腎臟皆有腫大的情形發生(Guyonnet et al., 1999)。過量大蒜成份也會產生紅血球氧化傷害之毒性而導致貧血(Amagase et al., 2000)，由於肝臟及脾臟為體內清除老廢紅血球之臟器，大蒜成分是否因造成紅血球毒性而導致肝臟脾臟腫大，需在未來更進一步探討釐清。

本研究發現，以大蒜精油劑量 10mg/KgBw (LGO10)灌食之大鼠，在 LPS 刺激下血中嗜中性球數量顯著的下降，甚至與正常生理狀態下之 SCO 組大鼠無顯著性差異，其可能原因包括：(1)血中嗜中性球浸潤至組織中數量增加，或(2)骨髓中所釋出之嗜中性球數量下降。由於本研究在腸道黏膜上皮組織中並無發現 LGO10 促進嗜中性球浸潤組織的現象，且在腎臟/肝臟缺血後復甦、膽管阻塞後肝硬化及燒燙傷等動物模式下，皆顯示大蒜成份的處理能顯著降低嗜中性球浸潤組織的程度(Sener et al., 2003; Gedik et al., 2005; Kabasakal et al., 2005; Sener et al., 2005)，故推論大蒜精油可能抑制骨髓中嗜中性球的分化及釋出，此推論在值得在未來的研究中加以驗證。另外，在大蒜精油劑量 100mg/KgBw 時，經 LPS 刺激之大鼠血中嗜中性球數量顯著的上升，有學者將大鼠以大蒜粉溶液連續灌食 15 天發現，在劑量為 100mg/day 時其血中白血球含量及嗜中性球比例會上升，當劑量為 200mg/day 時可達到顯著差異($p < 0.05$) (Oluwole, 2001)，顯示正常情況下攝取高劑量的大蒜萃取物，有增加血中嗜中性球含量的現象發生。而由於本研究採用的 OSCs 劑量大約僅相當於或低於 GO 在劑量 50 mg/kg BW 之 OSCs 含量，其中僅 DAS 顯著降低 LPS 誘發之嗜中性球增加，顯示其可能為 GO 中主要抑制此白血球分化增生的 OSCs 成分。

過去有許多研究都以組織中MPO含量來觀察嗜中性球浸潤組織的情形，在LPS處理下會造成組織發炎以及發炎組織中MPO的活性上升(Beril Gok et al., 2007; Chiu et al., 2007; Rana et al., 2005)。而在本研究中，LPS刺激下也提高組織中MPO的活性，與先前研究相符。過去其他學者的研究在腎臟/肝臟缺血後復甦、膽管阻塞後肝硬化及燒燙傷等動物模式下，皆顯示透過腹腔注射大蒜成份能顯著降低嗜中性球浸潤組織的程度(Sener et al., 2003; Gedik et al., 2005; Kabasakal et al., 2005; Sener et al., 2005)。在本研究中，以化學法分析系統性發炎反應大鼠小腸上皮組織中嗜中性球浸潤指標MPO活性，發現大蒜精油劑量10 mg/KgBw處理組與未給予大蒜之LCO組相較，可顯著降低組織中嗜中性球浸潤指標MPO活性，此與先前其他研究者之結果一致。由本研究HE型態染色切片則確認，在MPO活性較高組別其小腸上皮組

織完整性則下降。推論在LPS作用下，先前灌食不同劑量的GO對於大鼠腸黏膜損傷的影響與該大蒜製備物對嗜中性球浸潤活性之調控有關。針對GO中主要OSCs之觀察則發現，GO改善嗜中性球在小腸浸潤的作用可來自DAS、DADS及DATS。由於嗜中性球浸潤組織的程度與嗜中性球活化後的遷移作用有關(Hobauer et al., 2000; Seely et al., 2003)，嗜中性球遷移作用主要會受到相關黏附及趨化分子的調控，因此，本研究進一步觀察參與嗜中性球遷移過程的主要作用分子，以了解GO含硫化物是否對這些分子有所影響。

當 CD62L (L-selectin)與其配體連接、受血管內皮細胞上之細胞激素活化或嗜中性球活化時，可活化基質金屬蛋白酶(MMPs)而從嗜中性球上脫落，形成 soluble form，因此可做為血中嗜中性球活化程度的指標(Kishimoto et al., 1995; Radi et al., 2001)。在 LGO100 組中可發現，於 LPS 誘發後第 1、2 小時血清中 sCD62L 表現量顯著性的增加，由於 CD62L 並不會被誘發而增加表現量，而 LGO100 組血中嗜中性球含量亦高於其他組別，因此，血中顯著性增加之 sCD62L 應是來自於較大量嗜中性球的活化所導致。在誘發後第 18 小時，LGO10 及 LGO50 組血中 sCD62L 表現量與 LCO 組相較則顯著減少且此作用與 GO 中所含的 DAS 之作用一致，顯示 DAS 為主要作用成分。另外，由於 LGO10 及 LGO50 組血中嗜中性球含量較 LGO100 組低，且 LGO10、LGO50 及 LGO100 血中 sCD62L 含量與其血中嗜中性球數量趨勢相似，因此，造成血中 sCD62L 含量的差異有可能源自於血中嗜中性球數量及其活化程度的差異。另外嗜中性球中調控 CD62L 剝落之 MMPs 其活性是否會受到大蒜精油效應的影響，則需要在未來進一步探討。至於大蒜精油是否可直接調控嗜中性球上 CD62L 之含量，必須同時分析血中及嗜中性球上之含量做比較，才能有較明確的證據證實。因此，我們推論在系統性發炎反應下，低劑量大蒜精油(10mg/KgBw)可能藉由改善嗜中性球增加之數量及活化程度，而降低嗜中性球對組織的浸潤並減少其對組織的傷害；高劑量大蒜精油(100mg/KgBw)可顯著增加血中嗜中性球之數量，因而可能導致後續組織免疫病理學的惡化。

β 2-integrin CD11b/CD18 (CR3)為調控嗜中性球穩固黏著於血管內皮細胞上重要的黏附分子，亦與其穿越血管障壁、組織中遷移及辨識補體調理之致病原等生理活性有關。此交互作用會受到嗜中性球表面 CD11b/CD18 與血管壁黏附因子 ICAM-1 表現量之調控(Glynn et al., 1999; von Asmuth et al., 1991)。過去其他學者的研究也顯示注射 LPS 會提高嗜中性球與血管內皮黏附因子的表現量 (Sawa et al., 2008; Shan et al., 2002; Zhou et al., 2005)。雖然本研究發現在 CD11b 在細胞表面表現量在誘發 18 小時時，LCO 組雖較 SCO 組高，但並不具統計學上意義，而根據本研究室過去將大鼠以 LPS 誘發系統性發炎反應以觀察迴腸損傷的程度，發現於第 18 小時損傷程度最為嚴重，18 小時後系統性發炎反應即開始復甦(江, 2001)，因此，可能是本研究模式中嗜中性球在發炎反應趨緩後導致嗜中性球 CD11b 表現量的下降(Riollet et al., 2001)。而在 LPS 刺激下，大蒜精油處理組(LGO)與玉米油控制組(LCO)相較，可顯著降低嗜中性球表面 CD11b 的含量，且在相同動物模式下，LGO50 組與 LCO 組周邊血中促發炎細胞激素如 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6 並無顯著性差異(Chiang et al., 2006)，屏除細胞激素的影響，至少 GO50 組應有降低嗜中性球 CD11b 表現量的作用。因此，在系統性發炎反應下，大蒜精油可藉由逆轉嗜中性球上 CD11b 的表現量而抑制 CD11b/CD18 所調控之生理功能。此外，灌食 GO 含硫化物 DAS 組和 DADS 組有劑量依賴性的降低嗜中性球表面 CD11b/CD18 的表現，而 DATS 組主要是會影響 CD11b 的表現。故 GO 中不同 OSCs 提供不同的作用以降低嗜中性球遷移活性。

過去的研究發現，當嗜中性球受到發炎調節物質如 LPS 及 TNF- α 刺激後，其細胞表面 CD11b/CD18 表現量是依賴胞內顆粒儲存形式運送至細胞表面及基因轉錄轉譯作用的啟動

(Wagner and Roth, 2000) (Laskay et al., 2008; Seely et al., 2003)，而由於本研究測定的是 CD11b 和 CD18 於嗜中性球表面表現量，因此，灌食 GO 或其含硫化物是否會因改變嗜中性球分化過程中 CD11b 和 CD18 的製造或是影響發炎下 CD11b 和 CD18 的移位作用 (translocation)，而造成嗜中性球表面 CD11b 和 CD18 表現量降低，進而調控了嗜中性球浸潤組織的作用，仍須進行相關分子機制的探討。

ICAM-1 在未活化之血管內皮細胞上表現量並不高，但當內皮細胞受到如 IL-8、IL-1、TNF- α 等細胞激素或促發炎物質 PAF 及 LPS 的活化，可啟動基因轉錄轉譯而大量表現在血管內皮細胞上 (Wagner and Roth, 2000; Radi et al., 2001)。ICAM-1 自血管壁剝落進入血液中，便成為 soluble form (sICAM-1)，而其濃度可反映血管內皮細胞壁上之濃度 (Pigott et al., 1992)。在第 0 小時無 LPS 效應下，GO100 組血中之 sICAM-1 含量顯著較高，顯示在此劑量下有造成體內發炎的可能性，亦與 GO100 組增加周邊血嗜中性球含量相呼應。在 LPS 誘發後第 18 小時，大蒜精油處理組 (LGO10 及 LGO50 組) 血中 sICAM-1 表現量皆顯著低於玉米油控制組 (LCO)，但 LGO100 組可能伴隨造成發炎之效應，導致 sICAM-1 表現量顯著高於 LGO10 及 LGO50 組。本研究在 GO10 及 GO50 組之結果與其他學者進行之體外細胞實驗相符，如使用人類冠狀動脈內皮細胞 (HCAEC) 以大蒜粉之水萃液預培養後以 IL-1 α 刺激後，大蒜處理組可顯著降低 HCAEC 上 ICAM-1 之表現量 (Rassoul et al., 2006)，或以人類臍帶靜脈內皮細胞 (HUVEC) 以大蒜成分 allicin 預培養後，以游離輻射 (IR) 刺激內皮細胞，大蒜處理組可顯著降低 HUVEC 上 ICAM-1 之 mRNA 及蛋白質表現量 (Son et al., 2006)。而本研究結果則提出，在系統性發炎反應下，大蒜精油可藉由逆轉血管內皮細胞上 ICAM-1 的表現量以降低嗜中性球的貼附能力而抑制其遷移至組織中的活性。且本研究也證實 GO 逆轉 LPS 誘發之血管內皮細胞 ICAM-1 的表現量的作用可由相當於 GO 在劑量 10 或 50 mg/kg BW 時所含有的 DAS、DADS 或 DATS 劑量達成。

發炎部位所產生的促發炎激素或趨化物質等微環境的改變是調控發炎反應的重要因子，根據先前的研究指出在發炎部位組織中其黏附、趨化及促發炎激素的表現皆會上升，在發炎的腸上皮組織中也可表現與嗜中性球交互作用的黏附蛋白及趨化激素 (Komori et al., 2003; Myers et al., 1992; Sawa et al., 2008)。在體外實驗中，將人類腸上皮細胞株 HT-29 及 Caco-2 以大蒜成份 allicin (0~80 μ M) 預培養並以 TNF- α (200ng/ml) 刺激，發現大蒜預培養之控制組與 TNF- α 刺激組，allicin 皆可顯著降低 IL-1 β 、IL-8 的分泌及 mRNA 表現量，且在 TNF- α 刺激組中，allicin 可抑制 I κ B 的降解進而抑制 NF- κ B pathway (Lang et al., 2004)。在本研究中，以 LPS 注射之大鼠小腸黏膜上皮組織中 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1 及 CINC-1 含量均顯著上升，雖然先前有研究指出，大蒜中的成分 alliin 具有調節促發炎激素產生的作用 (Keiss et al., 2003; Youn et al., 2008)，進而能調節發炎反應，減少嗜中性球的趨化或黏附，降低嗜中性球過度浸潤組織所造成的傷害，但本研究並未發現先前灌食 GO 可影響小腸黏膜中 IL-1 β 及 CINC-1 含量，甚至 LGO100 組之 TNF- α 含量則顯著高於未給予大蒜精油之 LCO 組，顯示系統性發炎反應下之大鼠，在此大蒜劑量處理下可能有促進小腸上皮組織發炎反應的現象發生。但是，LGO100 組之 ICAM-1 表現量與 TNF- α 引發之發炎程度並不符合，在過去灌食期間，以大蒜精油劑量 100mg/KgBw 連續灌食之大鼠發現會有類似腹瀉之軟便現象，可見此劑量處理下之大鼠腸道有慢性發炎的情況，因而可能導致腸道上皮細胞的死亡與剝落，而另外與 HE 形態染色切片判斷，LGO100 組之腸上皮破碎較為嚴重。因此，我們推論 LGO100 組 ICAM-1 的含量可能與腸上皮細胞因發炎性損傷導致死亡及剝落而下降有關。

在另一方面，當以 GO 中單一 OSCs 進行觀察時，本研究發現灌食 GO 含硫化物 DAS 相較於

LCO組可降低發炎部位其黏附、趨化及促發炎激素的表現；反之DATS在0.125mmol/kg BW 的劑量下，無論是在黏膜組織或整段迴腸組織內，其黏附分子、趨化因子或促發炎激素的含量相較於LCO組皆無下降的情形，甚至還有上升的情形，配合HE組織型態分析本研究推論：灌食高劑量DATS時，DATS會對腸道組織引起些微毒性或刺激而造成發炎相關物質的表現增加，因而雖然其具有抑制嗜中性球遷移活性的效果，但卻未能有效改善LPS誘發之小腸損傷，且在GO中抵銷了DAS抑制發炎性細胞激素產生的效果。

本研究結果顯示，在系統性發炎反應下，大鼠先前隔日灌食 GO 劑量達 10mg/KgBw (本研究採用之最低劑量) 即可透過降低嗜中性球數量及黏附分子的表現以改善嗜中性球導致腸黏膜組織之發炎性損傷。以成人用藥劑量(mg/KgBw) = 折算係數(W) × 大鼠用藥劑量(mg/KgBw) 做換算，成人用藥劑量即 $0.16 (W) \times 10 (mg/KgBw) = 1.6 (mg/KgBw)$ ，本研究採用的最低 GO 劑量約相當於一位體重 60kg 之成人每隔一日攝取 96mg GO，約 288mg/week。就本計畫主持人所知，目前並未有 GO 應用於人體研究的流病文獻，故並無 GO 對人體達生物活性之有效劑量及安全劑量範圍可供對照。於 1988 年，德國 Kommission E 專刊提出每日攝取 4g 生鮮大蒜(raw garlic)對人體可能是有助益的，且亦有文獻以此數據為建議攝取量，但此建議量並無科學性的研究文獻加以支持(Amagase et al., 2001; Tattelman, 2005)，近期有學者以每天 4g 生鮮大蒜、每週 6 天達 6 個月之人體實驗觀察受試者血中 low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)濃度變化，發現生鮮大蒜攝取組與安慰劑控制組相較，血中 LDL-C 濃度在六個月期間並無顯著性差異(Gardner et al., 2007)，顯示此建議攝取量至少在調控血中 LDL-C 濃度方面並無有效生物活性。在本研究 GO 之製備過程中，每公斤生鮮大蒜約可製備成 2-2.5g 之 GO (即 2-2.5mg GO/g raw garlic)，若每天攝取 4g 生鮮大蒜(28g/week)，一週約可攝取 $28 \times 2-2.5mg = 56-70mg$ GO，約相當於本實驗最低劑量的 1/4，未來可進一步在更低劑量範圍探討 GO 之抗系統性發炎反應活性。

七、結論與建議

綜合本研究結果，可了解灌食 GO 及其 OSCs 在適當劑量下含確實能透過(1)抑制嗜中性球黏附分子表現、趨化活性；(2)抑制血管內皮黏附分子表現；(3)抑制小腸上皮分泌趨化物質；(4)抑制小腸上皮黏附分子表現，而改善發炎反應下，嗜中性球浸潤腸道組織的程度，但不同 GO 含硫化物對於嗜中性球遷移作用中，相關分子的影響程度有所不同，如 DAS 及 DADS 相較於 DATS 可能為毒性小而具此生物學活性的大蒜 OSCs，未來可能利用其來開發抗發炎製劑，減少系統性發炎反應下嗜中性球浸潤組織的程度和降低嗜中性球過度浸潤組織所造成的組織損傷。由於本研究僅以腸道組織進行觀察，未來可在其他嗜中性球相關的發炎疾病及模式中，進一步觀察 DAS 及 DATS 之抗發炎機制是否也可以在腸道以外的其他發炎組織呈現效果。

八、計畫成果自評

關於大蒜成份對於嗜中性球趨化活性的研究，過去缺乏系統性觀察。本研究根據一系列相關研究結果，逐步釐清大蒜精油(GO)抗發炎作用與其調控嗜中性球遷移趨化活性之間的關係，本研究重要的結論包括：在不影響大鼠正常代謝下，GO可逆轉LPS所致之血液中 primary adhesion molecule, sL-selectin 及 secondary adhesion molecule, sICAM-1 含量伴隨降低血中嗜中性球數目及嗜中性球表面黏附分子 CD11b 表現量，且抑制LPS所致之迴腸黏膜 ICAM-1 及趨化物質 CINC-1 含量；這些結果與小腸 MPO 組織化學染色及 MPO 活性之結果（顯示嗜中性球浸潤程度）相符合，此外，上述作用除了腸黏膜 ICAM-1 與 CINC-1 之外，其餘在GO劑量為 10mg/kg BW 時即達顯著效果。由以上結果可推論，適當劑量之GO對於解決嗜中性球涉及的臨床病理問題，應存在應用價值。且本研究進一步確認 DAS 與 DADS 為 GO 中有此應用性之組成分。DATS 在抑制嗜中性球組織浸潤方面雖也呈現好處，但其本身似乎對上皮細胞存有毒性，因而未能改善LPS誘發的腸道損傷，此毒性及其機制有待未來更進一步釐清。另外，本研究延續過去建立之LPS誘發大鼠腸黏膜損傷模式，進一步確認此模式存在與臨床缺血/復甦所致之發炎性上皮病灶相似之上皮 ICAM-1 及趨化因子 CINC-1 表現增加的特徵，也使我們對於此動物模式的病理學變化有更完整的了解。本研究及過去我們對於此模式建立的各項生理學、生化學、組織學及免疫學數據將有助於未來廣泛利用此動物模式於此類發炎性疾病飲食療法關研究。

在我們原先提出計畫中，預計驗證的GO及其OSCs抗發炎角色及機制大致均已完成；整體而言，本計畫依預計進度執行，評估本計畫之執行率符合90%以上，限於經費的刪減，原先預計觀察的嗜中性球吞噬及釋放顆粒活性，未如預期進行，較為可惜，未來將視取得研究經費的狀況盡力完成觀察。本研究結果，在GO及其OSCs作用之部分，已分別於去年(九十七年)五月及今年(九十八年)發表於第三十四及三十五屆台灣營養學會年會暨學術研討會(高雄義守大學及台中靜宜大學)，目前正以這些結果為基礎撰寫學術論文。尚待釐清的問題則包括：在非LPS作用下，GO100組之血中sICAM-1已顯著高於灌食玉米油組，但是在LPS誘發發炎後18h之迴腸黏膜中，ICAM-1含量卻顯著受到此劑量GO之抑制。過去曾有研究指出大蒜成分之腸道毒性，我們過去也報導過灌食高劑量GO會導致大鼠腹瀉，本研究之發現，是否由於高劑量GO本身，存在對於腸道細胞之毒性，破壞其完整性，而造正常時的高血sICAM-1，但卻減少可產生ICAM-1之腸細胞數量所致，我們已利用大鼠小腸細胞株 IEC-18 細胞加以釐清，部分結果亦已發表於本年(九十七年)五月三十一日發表於第三十四屆台灣營養學會年會暨學術研討會(高雄，義守大學)，大蒜OSCs中的DATS是否為GO此種細胞毒性的主要作用分子目前也逐步設計實驗評估中。

九、參考文獻

- 江怡萱 (2001) 大蒜精油及其有機含硫成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物、二烯丙基三硫化物-對內毒素誘發大鼠腸道細菌轉移之影響。中山醫學大學營養科學研究所碩士論文。
- 蘇筱媛 (2004) 大蒜精油及其有機含硫成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物、二烯丙基三硫化物-對於系統性發炎之大鼠嗜中性球生理活性之影響。中山醫學大學營養科學研究所碩士論文。
- Agace WW. (1996) The role of the epithelial cell in Escherichia coli induced neutrophil migration into the urinary tract. *European Respiratory Journal* 9, 1713-1728.
- Agarwal KC. (1996) Therapeutic actions of garlic constituents. *Medical Research Review* 16, 111-124.
- Albelda SM, Smith CW, Ward PA. (1994) Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB Journal* 8, 504-512.
- Ali M, Thomson M, Afzal M. (2000) Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. *Prostaglandins, Leukocyte and Essential Fatty Acids* 62, 55-73.
- Arfors KE, Lundberg C, Lindbom L, Lundberg K, Beatty PG, Harlan JM. (1987) A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 69, 338-340.
- Amagase H, Moriguchi T, Kasuga S. (2000) Comparison of oxidative damage of garlic preparation including enteric-coated garlic powder preparation and allicin-derived compounds on erythrocyte and duodenum. *Phytomedicine (Suppl. II)*, 118.
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. (2001) Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr.* 131: 955S-62S.
- Augusti KT. (1996) Therapeutic values of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.). *Indian Journal of Experimental Biology* 34, 634-640.
- Banerjee SK, Maulik M, Manchanda SC, Dinda AK, Das TK, Maulik SK. (2001) Garlic-induced alteration in rat liver and kidney morphology and associated changes in endogenous antioxidant status. *Food Chem Toxicol.* 39: 793-7.
- Beril Gok H, Solaroglu I, Okutan O, Cimen B, Kaptanoglu E, Palaoglu S. (2007) Metoprolol treatment decreases tissue myeloperoxidase activity after spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci* 14, 138-142.
- Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos ARS. (2004) Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica* 70, 93-103.
- Cameron D. (1996) Initiation of white cell activation during cardiopulmonary bypass: cytokines and receptors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 27, S1-S5.
- Chang HP, Huang SY, Chen YH. (2005) Modulation of cytokine secretion by garlic oil derivatives is associated with suppressed nitric oxide production in stimulated macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2530-2534.
- Chen HW, Tsai CW, Yang JJ, Liu CT, Kuo WW, Lii CK. (2003) The combined effects of garlic oil and fish oil on the hepatic antioxidant and drug-metabolizing enzymes of rats. *British Journal of Nutrition* 89, 189-200.
- Chiang YH, Jen LN, Su HY, Lii CK, Sheen LY, Liu CT. (2006) Effects of garlic oil

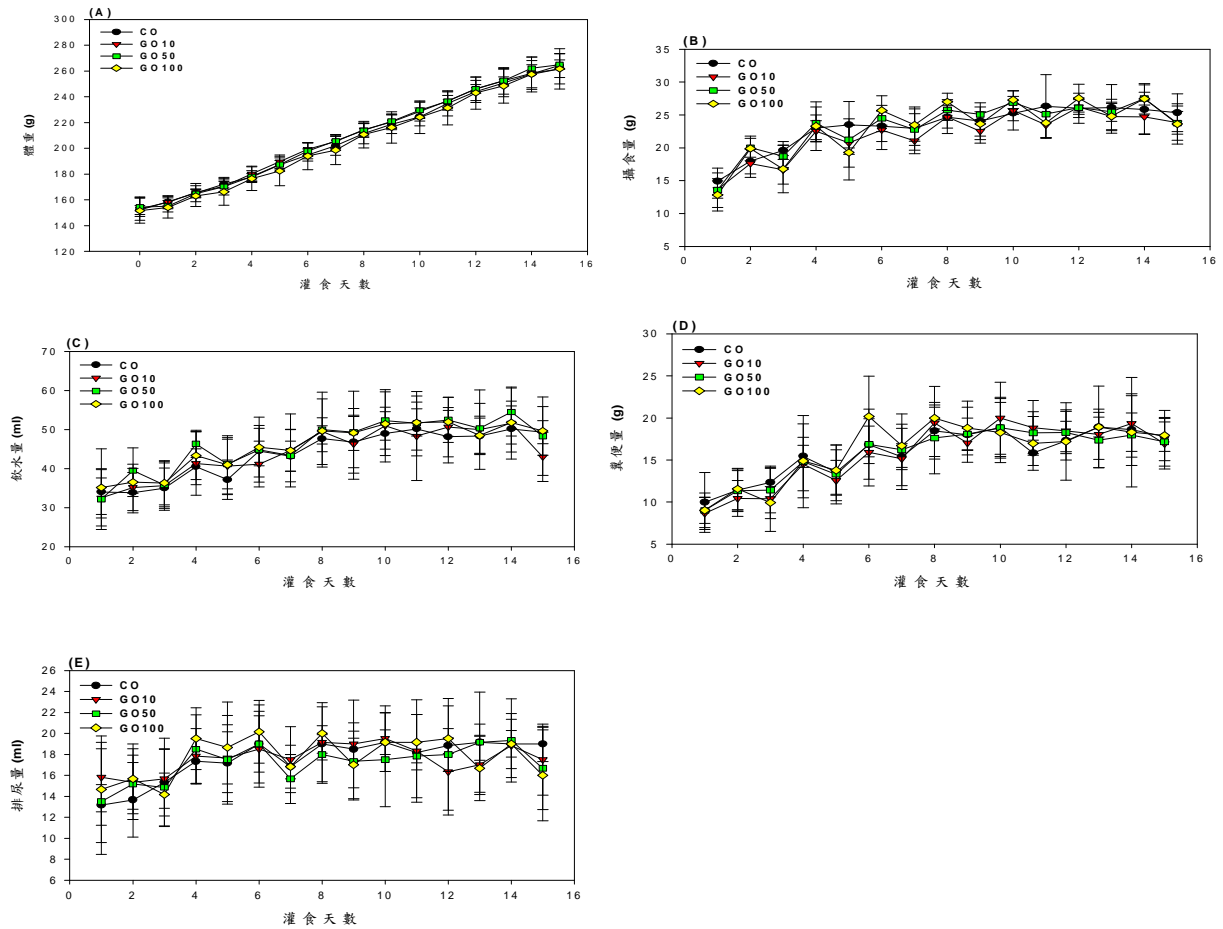
- and two of its major organosulfur compounds, diallyl disulfide and diallyl trisulfide, on intestinal damage in rats injected with endotoxin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 213: 46-54.
- Chiu WC, Hou YC, Yeh CL, Hu YM, Yeh SL. (2007) Effect of dietary fish oil supplementation on cellular adhesion molecule expression and tissue myeloperoxidase activity in diabetic mice with sepsis. *Br J Nutr* 97, 685-691.
- Cummings CJ, Sessler CN, Beall LD, Fisher BJ, Best AM, Fowler AA 3rd, (1997) Soluble E-selectin levels in sepsis and critical illness. Correlation with infection and hemodynamic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med.* 156, 431-7.
- Donnelly LE, Rogers DF. (2003) Therapy for chronic obstructive pulmonary disease in the 21st century. *Drugs* 63, 1973-1998.
- Dransfield I. (1995) Granulocyte adhesion molecules—structure/function relationships. *Seminars in Cell Biology* 6, 337-344.
- Gardner CD, Lawson LD, Block E, Chatterjee LM, Kiazand A, Balise RR, Kraemer HC. (2007) Effect of raw garlic vs commercial garlic supplements on plasma lipid concentrations in adults with moderate hypercholesterolemia: a randomized clinical trial. *Arch Intern Med.* 167:346-53.
- Gedik N, Kabasakal L, Sehirli O, Ercan F, Sirvanci S, Keyer-Uysal M, Sener G. (2005) Long-term administration of aqueous garlic extract (AGE) alleviates liver fibrosis and oxidative damage induced by biliary obstruction in rats. *Life Sci* 76, 2593-2606.
- Grisham MB, Granger DN. (1988) Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Digestion Disease Science* 33, 6S-15S.
- Guyonnet D, Siess MH, Le Bon AM, Suschetet M. (1999) Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds from allium vegetables in rat tissues. *Toxicol Appl Pharmacol.* 154: 50-8.
- Glynn P, Coakley R, Kilgallen I, O'Neill S. (1999) Neutrophil CD11b and soluble ICAM-1 and E-selectin in community acquired pneumonia. *Eur Respir J* 13, 1380-1385.
- Haught WH, Mansour M, Rothlein R, Kishimoto TK, Mainolfi EA, Hendricks JB, Hendricks C, Mehta JL. (1996) Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am Heart J* 132, 1-8.
- Hobauer R, Frass M, Gmeiner B, Kaye AD, Frost EA. (2000) Garlic extract (*Allium sativum*) reduces migration of neutrophils through endothelial cell monolayers. *Middle East J Anesthesiol* 15, 649-658.
- Hofbauer R, Frass M, Gmeiner B, Kaye AD, Frost EAM. (2001) Effect of garlic extract (*Allium sativum*) on neutrophil migration at the cellular level. *Heart Disease* 3, 14-17.
- Hodge G, Hodge S, Han P. (2002) *Allium sativum* (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production in vitro: potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytometry* 48, 209-215.
- Huber D, Balda MS, Matter K. (1999) Transepithelial migration of neutrophils. *Invasion & Metastasis* 18, 70-80.
- Kabasakal L, Sehirli O, Cetinel S, Cikler E, Gedik N, Sener G. (2005) Protective effect of aqueous garlic extract against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Med Food* 8, 319-326.
- Kabasakal L, Sehirli O, Cetinel S, Cikler E, Gedik N, Sener G. (2005) Protective effect of aqueous garlic extract against renal ischemia/reperfusion injury in

- rats. *Journal of Medicinal Food* 8,319-326.
- Keiss HP, Dirsch VM, Hartung T, Haffner T, Trueman L, Auger J, Kahane R, Vollmar AM. (2003) Garlic (*Allium sativum* L.) modulates cytokine expression in lipopolysaccharide-activated human blood thereby inhibiting NF-kappaB activity. *J Nutr* 133, 2171-2175.
- Khair OA, Davies RJ, Devalia JL. (1996) Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *European Respiratory Journal* 9, 1913-1922.
- Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG, Chung HT, Billiar TR, Kim YM. (2001) Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radical Biology & Medicine* 30, 747-756.
- Kishimoto TK, Kahn J, Migaki G, Mainolfi E, Shirley F, Ingraham R, Rothlein R. (1995) Regulation of L-selectin expression by membrane proximal proteolysis. *Agents Actions Suppl* 47, 121-134.
- Komori E, Shoga K, Aoe M, Sawada S, Ichiba S, Simizu N. (2003) Partial liquid ventilation does not affect BALF TNF-, MIP-2, CINC-1 concentrations, or CD11b cell surface expression, but does increase macrophage proportion among BALF cells in the acute phase of rat LPS-induced lung injury. *Acta Med Okayama* 57, 133-141.
- Labro MT. (2000) Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clinical Microbiology Review* 13, 615-650.
- Lang A, Lahav M, Sakhnini E, Barshack I, Fidder HH, Avidan B, Bardan E, Hershkoviz R, Bar-Meir S, Chowers Y. (2004) Allicin inhibits spontaneous and TNF-alpha induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines from intestinal epithelial cells. *Clin Nutr.* 23: 1199-208
- Lang A, Lahav M, Sakhnini E, Barshack I, Fidder HH, Avidan B, Bardan E, Hershkoviz R, Bar-Meir S, Chowers Y. (2004) Allicin inhibits spontaneous and TNF-alpha induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines from intestinal epithelial cells. *Clin Nutr.* 23: 1199-208.
- Leeuwenberg JF, Smeets EF, Neefjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme TM, Ahern TJ, Buurman WA. (1992) E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunol.* 77, 543-549.
- Ley K. (1996) Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovascular Research* 32, 733-742.
- Luster AD. (1998) Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England Journal of Medicine* 338, 436-445.
- Liu CT, Chen HW, Sheen LY, Kung YL, Chen CHP, Lii CK. (1998) Effect of garlic oil on hepatic arachidonic acid content and immune response in rats. *Agric. Food Chem.* 46: 4642 -4647.
- Madara JL. (1997) Review article: Pathobiology of neutrophil interactions with intestinal epithelia. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 11, S57-S62.
- Madjdpour C, Oertli B, Ziegler U, Bonvini JM, Spasch T, Beck-Schimmer B. (2000) Lipopolysaccharide induces functional ICAM-1 expression in rat alveolar epithelial cells in vitro. *American Journal of Physiology: Lung Cell Molecular Physiology* 278, L572-579.
- Mayeux PR, Agrawal KC, Tou JS, King BT, Lipton HL, Hyman AL, Kadowitz PJ, McNamara DB. (1988) The pharmacological effects of allicin, a constituent of

- garlic oil. *Agents Actions* 25, 182-190.
- Myers CL, Wertheimer SJ, Schembri-King J, Parks T, Wallace RW. (1992) Induction of ICAM-1 by TNF-alpha, IL-1 beta, and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *Am J Physiol* 263, C767-772.
- Okada A, Kinoshita Y, Waki S, Fukui H, Maekawa T, Matsushima Y, Kawanami C, Kishi K, Nakata H, Wang H-Y, Hassan S, Chiba T. (1998) Rat gastric mucosal cells express ICAM-1 and proinflammatory cytokines during indomethacin-induced mucosal injury. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine* 131, 538-547.
- Oluwole FS. (2001) Effect of garlic on some haematological and biochemical parameters. *Afr. J. Biomed. Res.* 4: 139-141.
- Parent C, Eichacker PQ. (1999) Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules. *Infectious Diseases Clinics of North America* 13, 427-447.
- Parkos CA. (1997a) Cell adhesion and migration 1. Neutrophil adhesive interactions with intestinal epithelium. *Journal of Physiology* 273, G763-G768.
- Parkos CA. (1997b) Molecular events in neutrophil transepithelial migration. *Bioessays* 19, 865-873.
- Paterson RL, Webster NR. (2000) Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. *Journal of the Royal College of Surgeons Edinburgh* 45, 178-182.
- Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ. (1992) Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 187: 584-9.
- Radi ZA, Kehrl ME, Jr Ackermann MR. (2001) Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration. *J Vet Intern Med* 15, 516-529.
- Rana SN, Li X, Chaudry IH, Bland KI, Choudhry MA. (2005) Inhibition of IL-18 reduces myeloperoxidase activity and prevents edema in intestine following alcohol and burn injury. *J Leukoc Biol* 77, 719-728.
- Rassoul F, Salvetter J, Reissig D, Schneider W, Thiery J, Richter V. (2006) The influence of garlic (*Allium sativum*) extract on interleukin 1alpha-induced expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. *Phytomedicine* 13, 230-235.
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. (2001) Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci.* 84: 1077-84.
- Salman H, Bergman M, Bessler H, Punsky I, Djaldetti M. (1999) Effect of a garlic derivative (alliin) on peripheral blood cell immune responses. *International Journal of Immunopharmacology* 21, 589-597.
- Sato T, Miyata G. (2000) The nutraceutical benefit, part iv: garlic. *Nutrition* 16, 787-788.
- Sawa Y, Ueki T, Hata M, Iwasawa K, Tsuruga E, Kojima H, Ishikawa H, Yoshida S. (2008) LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human lymphatic endothelium. *J Histochem Cytochem* 56, 97-109.
- Sener G, Satyroglu H, Ozer Sehirli A, Kacmaz A. (2003) Protective effect of aqueous garlic extract against oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Life Sci.* 73: 81-91.
- Sener G, Sehirli O, Ipci Y, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N, Yegen BC. (2005) Aqueous garlic extract alleviates ischaemia-reperfusion-induced oxidative hepatic injury in rats. *J Pharm Pharmacol.* 57: 145-50.

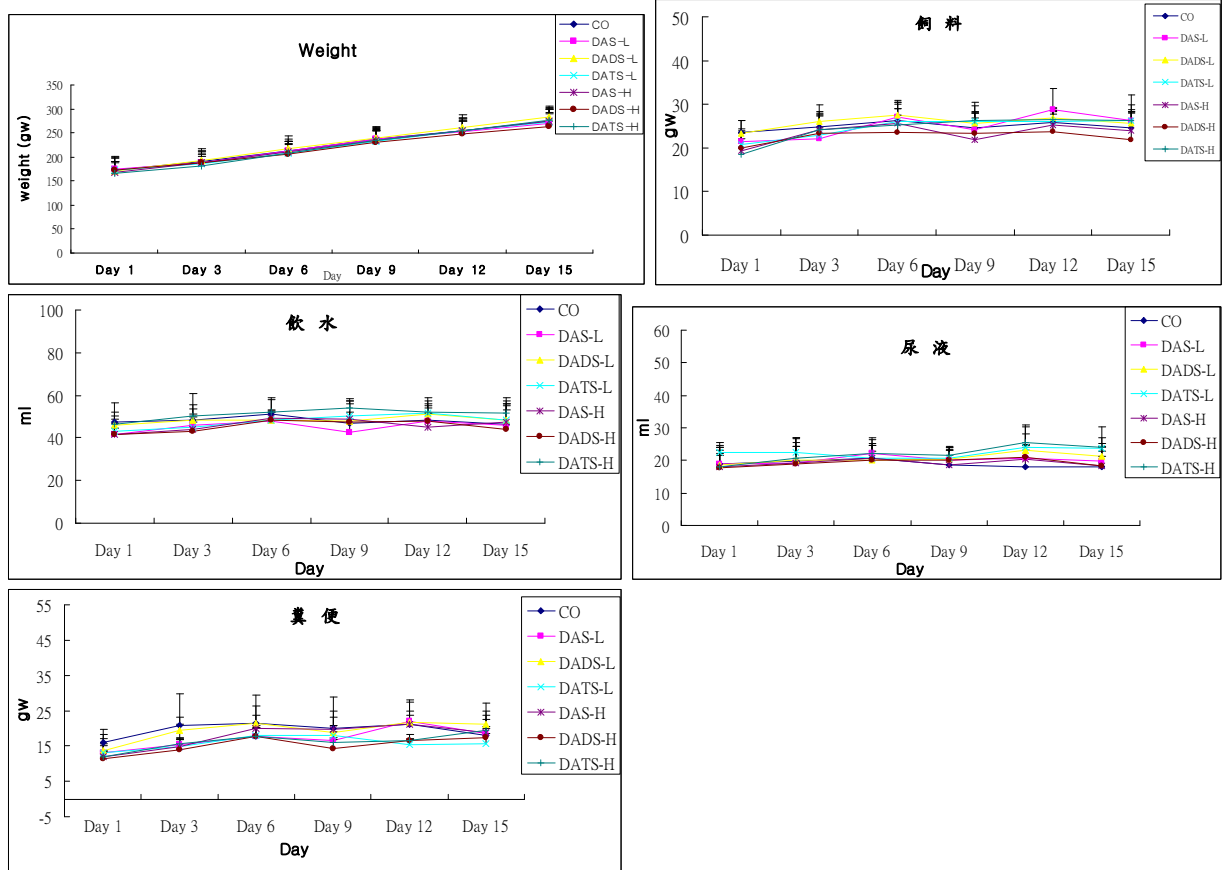
- Sener G, Sakarean A, Yegen BC. (2007) Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 1345-1352.
- Shan Y, Su Y, Luo X, Yang Z. (2002) [The significance of the expression of endothelial ICAM-1 induced by LPS]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 18, 279-281.
- Sharma S, Kumar A. (2003) Septic shock, multiple organ failure, and acute respiratory distress syndrome. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 9, 199-209.
- Sheen LY, Chen HW, Kung YL, Liu CT, Lii CK. (1999) Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high- and low-fat diets. *Nutr Cancer*. 35: 160-6.
- Smith CW. (1993) Leukocyte-endothelial cell interactions. *Seminars in Hematology* 30, S45-S53.
- Smith JA. (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of Leukocyte Biology* 56, 672-686.
- Son EW, Mo SJ, Rhee DK, Pyo S. (2006) Inhibition of ICAM-1 expression by garlic component, allicin, in gamma-irradiated human vascular endothelial cells via downregulation of the JNK signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. 6: 1788-95.
- Stadnyk AW, Dollard C, Issekutz TB, Issekutz AC. (2005) Neutrophil migration into indomethacin induced rat small intestinal injury is CD11a/CD18 and CD11b/CD18 co-dependent. *Gut* 50, 629-635.
- Tattelman E. (2005) Health effects of garlic. *Am Fam Physician*. 72:103-6.
- von Asmuth EJ, van der Linden CJ, Leeuwenberg JF, Buurman WA. (1991) Involvement of the CD11b/CD18 integrin, but not of the endothelial cell adhesion molecules ELAM-1 and ICAM-1 in tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil toxicity. *J Immunol* 147, 3869-3875.
- Wagner JG, Roth RA. (2000) Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev*. 52 :349-74.
- Wang Q, Doerschuk CM. (2002) The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion. *Antioxidants & Redox Signaling* 4, 39-47.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigations* 80, 617-653.
- Youn HS, Lim HJ, Lee HJ, Hwang D, Yang M, Jeon R, Ryu JH. (2008) Garlic (*Allium sativum*) extract inhibits lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 dimerization. *Biosci Biotechnol Biochem*. 72: 368-75.
- Zhang JL, Sun RJ, Shi ZX. (2002) Effect of garlicin on adhesion molecules expression and deformability of peripheral neutrophils in patients with acute cerebral infarction. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 22, 423-425.
- Zen K, Parkos CA. (2003) Leukocyte-epithelial interactions. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 557-564.
- Zhou X, Gao XP, Fan J, Liu Q, Anwar KN, Frey RS, Malik AB. (2005) LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD11b/CD18 expression in neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L655-662.

附圖



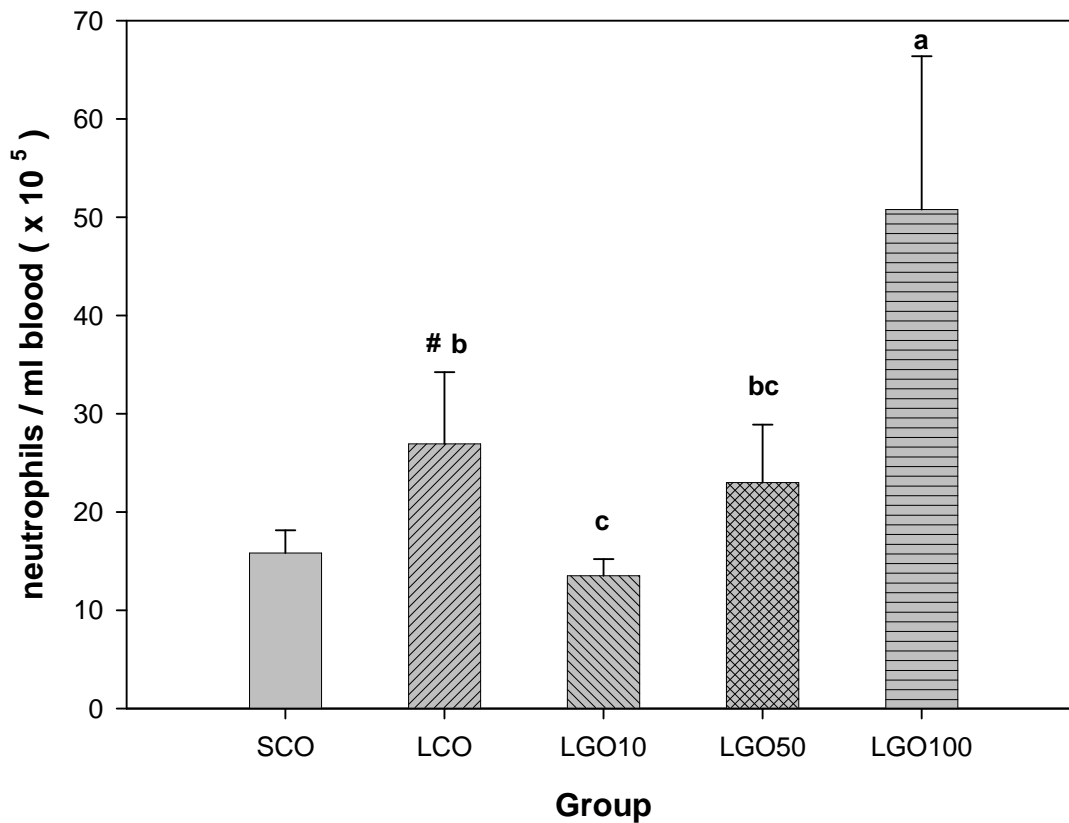
圖一、灌食大蒜精油對大鼠生長代謝之影響

大鼠以載劑玉米油及不同劑量大蒜精油灌食期間，大鼠皆飼養於代謝籠中紀錄其(A)體重、(B)攝食量、(C)飲水量、(D)糞便量及(E)排尿量，觀察其生長代謝情形。玉米油 CO 組與大蒜精油 GO10、GO50、GO100 處理組結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示，數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan's test 進行事後檢定，各組別 $n=6$ 。



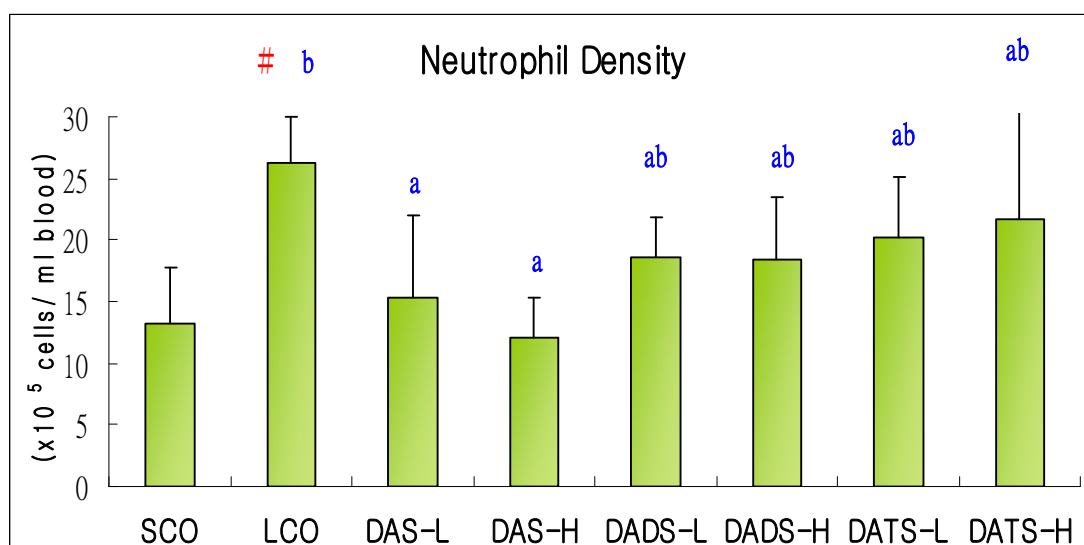
圖二、灌食不同大蒜有機硫成分對大鼠生長代謝的影響

隔日胃灌大鼠，載劑玉米油 Corn oil, 2 ml/kg BW (CO 組)，有機硫成份，二烯丙基硫化物 DAS- 0.025 mmol/kg BW (DAS-L 組)、0.125 mmol/kg BW (DAS-H 組)、二烯丙基二硫化物 DADS- 0.025 mmol/kg BW (DADS-L 組)、0.125 mmol/kg BW (DADS-H 組)、二烯丙基三硫化物 DATS- 0.025 mmol/kg BW (DATS-L 組)、0.125 mmol/kg BW (DATS-H 組)。灌食期間，大鼠皆飼養於代謝籠內，並紀錄 (A) 體重、(B) 攝食量、(C) 飲水量、(D) 尿量與 (E) 糞便量，觀察其代謝情形。組結果以 mean \pm SD 表示，數據以 one-way ANOVA 分析同一時間點不同組間之差異，且採 Duncan's test 進行事後檢定，各組別 n=7。



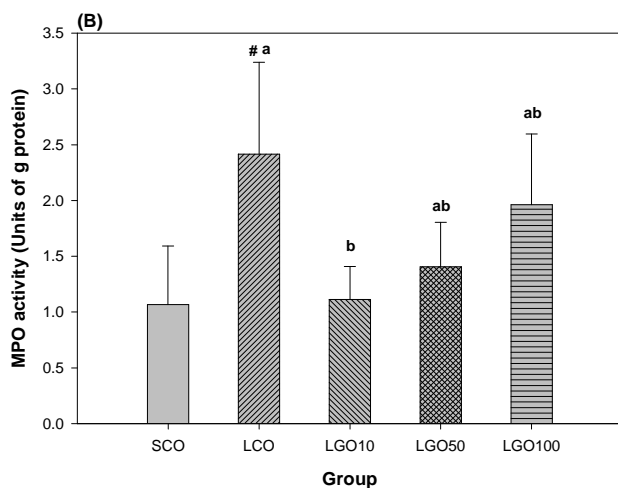
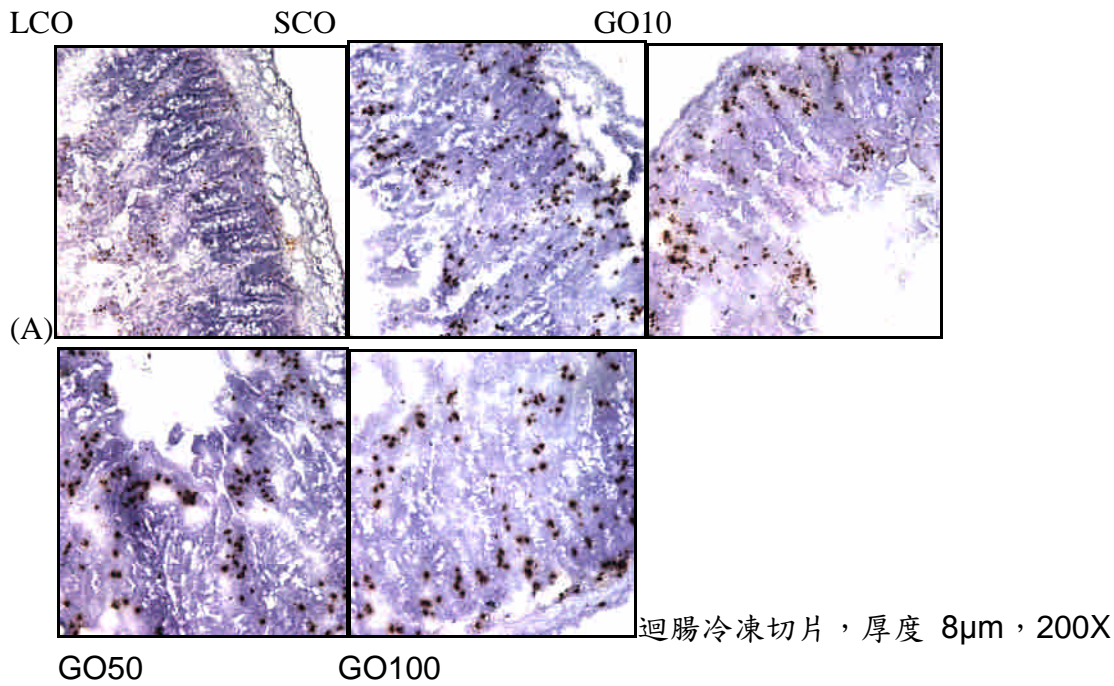
圖三、灌食大蒜精油對系統性發炎反應大鼠血中嗜中性球數之影響

注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、LGO10、LGO50、LGO100)大鼠，犧牲後收集血液用以分離嗜中性球計數，並以血液體積校正。結果以 Mean±SD 表示，SCO 組與 LCO 組組間數據以 Student's t-test 進行分析，標示[#]表具顯著性差異(p<0.05)；LPS 刺激組各組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan's test 進行事後檢定，組間無標示相同字母^{abc}者表具顯著性差異(p<0.05)，各組別 n=6。



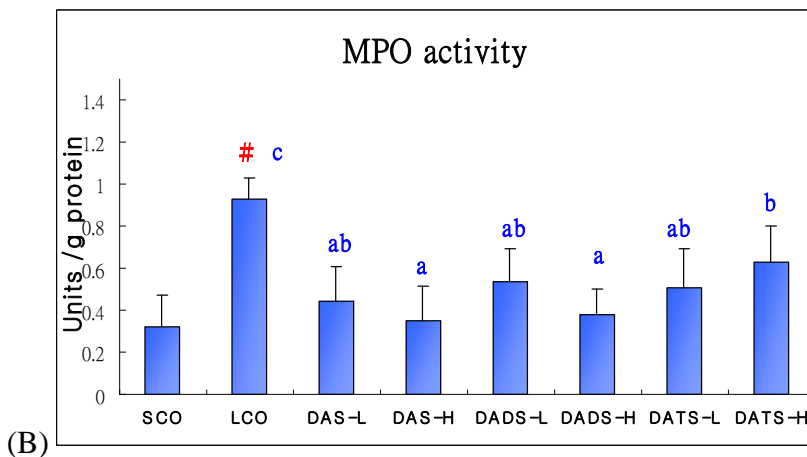
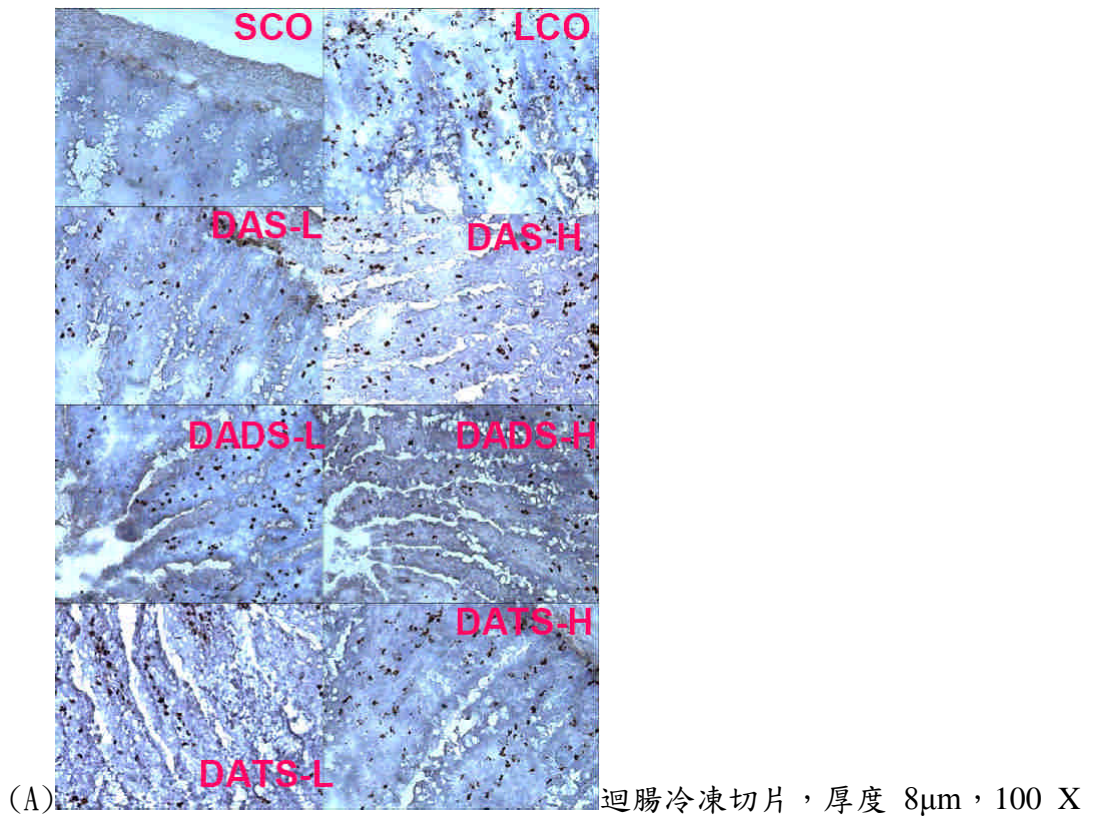
圖四、灌食不同大蒜含硫成份對於系統性發炎大鼠血液嗜中性球之影響

注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組 (LCO、DAS-L、DADS-L、DATS-L、DAS-H、DADS-H、DATS-H) 大鼠，犧牲後取下腔靜脈血分離嗜中性球，分析嗜中性球密度。各組結果以 mean ± SD 表示，SCO 組與 LCO 組間數據以 Student's t-test 分析，# 表示組間有顯著差異 (p<0.05)；LPS 刺激組組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan's test 進行事後檢定，組間無標示相同字母^{ab}者表具顯著性差異(p<0.05)，各組別 n=6。



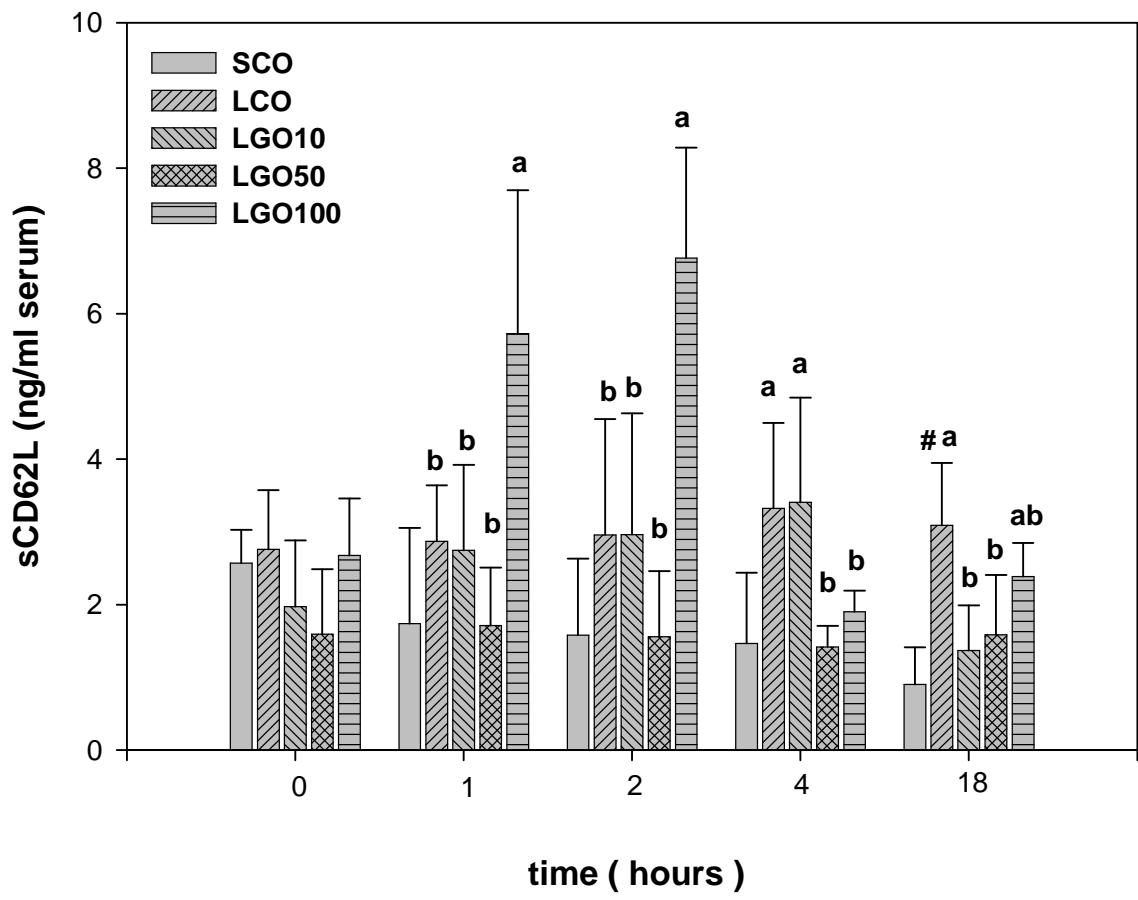
圖五、灌食大蒜精油對系統性發炎反應大鼠迴腸黏膜嗜中性球浸指標 MPO 含量之影響

注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、LGO10、LGO50、LGO100)大鼠，犧牲後收集迴腸進行(A) MPO 組織化學染色及(B) 黏膜 MPO 活性分析。組間結果以 Mean±SD 表示，玉米油控制組(SCO 組)與 LPS 刺激組(LCO 組)組間數據以 Student' s t-test 進行分析，標示[#]表具顯著性差異(p<0.05)；LPS 刺激組各組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan' s test 進行事後檢定，組間無標示相同字母^{ab}者表具顯著性差異(p<0.05)，各組別 n=3~4。



圖六、灌食不同大蒜含硫成份對於系統性發炎大鼠迴腸黏膜嗜中性球浸潤指標 MPO 活性之影響

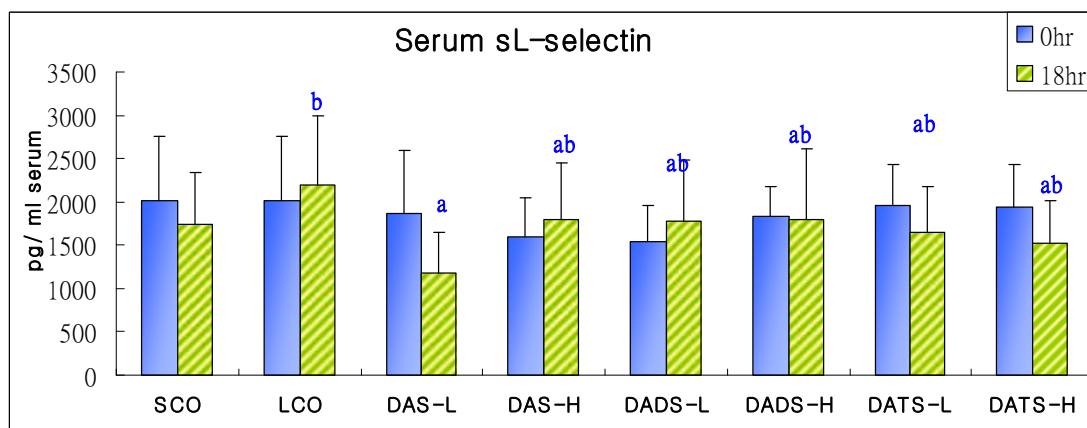
注射 saline (控制組-SCO) 或 LPS (刺激組—LCO、DAS-L、DADS-L、DATS-L、DAS-H、DADS-H、DATS-H) 之大鼠，犧牲後取迴腸黏膜組織分析 MPO 活性。結果以 mean \pm SD 表示，SCO 組與 LCO 組間數據以 Student's t-test 分析，# 表有顯著差異 ($p < 0.05$)；LPS 刺激組組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan's test 進行事後檢定，組間無標示相同字母^{ab}者表具顯著性差異 ($p < 0.05$)，各組別 $n=5$ 。



圖

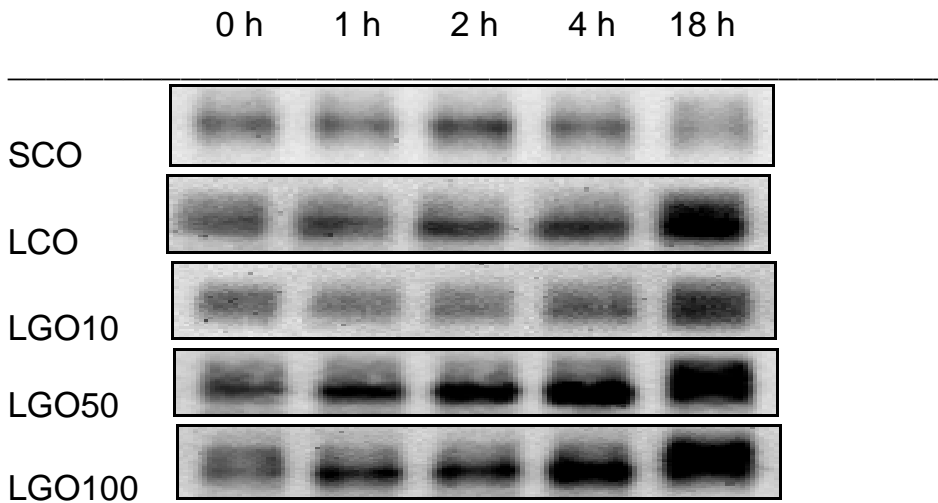
七、灌食大蒜精油對系統性發炎反應大鼠血中可溶性黏附分子 sCD62L 之影響

注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、LGO10、LGO50、LGO100)大鼠，於誘發後第 0、1、2、4 小時由尾靜脈或第 18 小時由下腔靜脈抽取血液製備血清，並以 ELISA 分析血中 sCD62L 含量。結果以 Mean±SD 表示，SCO 組與 LCO 組組間數據以 Student's t-test 進行分析，標示[#]表具顯著性差異(p<0.05)； LPS 刺激組各組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan's test 進行事後檢定，各時間點組間無標示相同字母^{ab}者表具顯著性差異(p<0.05)，各組別 n=4~6。

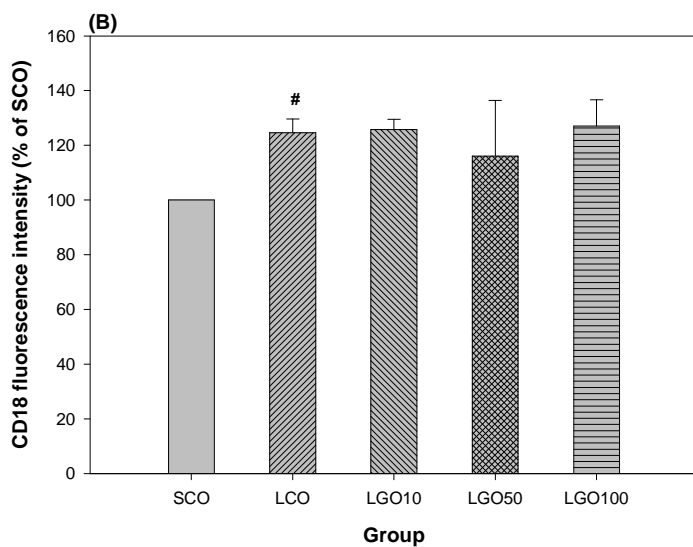
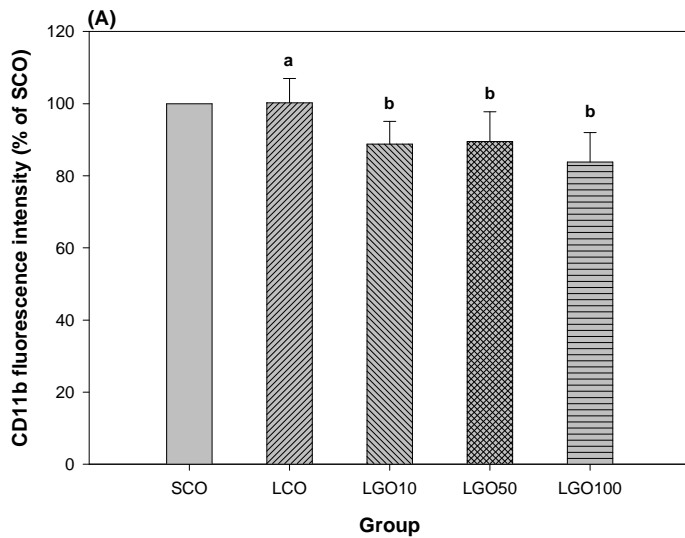


圖八、灌食不同大蒜含硫成分對於系統性發炎大鼠血清中 sL-selectin 含量的影響

注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組 (LCO、DAS-L、DADS-L、DATS-L、DAS-H、DADS-H、DATS-H) 大鼠，在注射 LPS 前 (0 hr)，於尾靜脈抽取血液和注射 LPS 後 (18 hr) 犧牲時，於下腔靜脈抽取血液，分析血清中可溶性黏附因子 sL-selectin 的含量。各組結果以 mean \pm SD 表示，SCO 組與 LCO 組間數據以 Student's t-test 分析，# 表示組間有顯著差異 ($p < 0.05$)，另外，LPS 刺激組組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan's test 進行事後檢定，以符號 ab 表組間是否有顯著差異 ($p < 0.05$)，各組別 n=5。

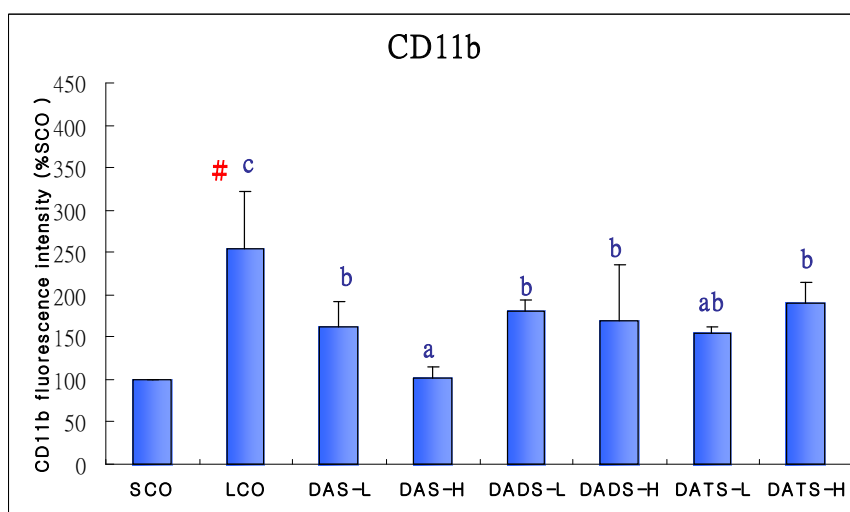


圖九、灌食大蒜精油對系統性發炎反應大鼠血中可溶性黏附分子 sCD62E 含量的影響
 注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、LGO10、LGO50、LGO100)大鼠，於
 誘發後第 0、1、2、4 小時由尾靜脈或第 18 小時由下腔靜脈抽取血液製備血清，並以 western
 blot 分析血中 sCD62E 含量。

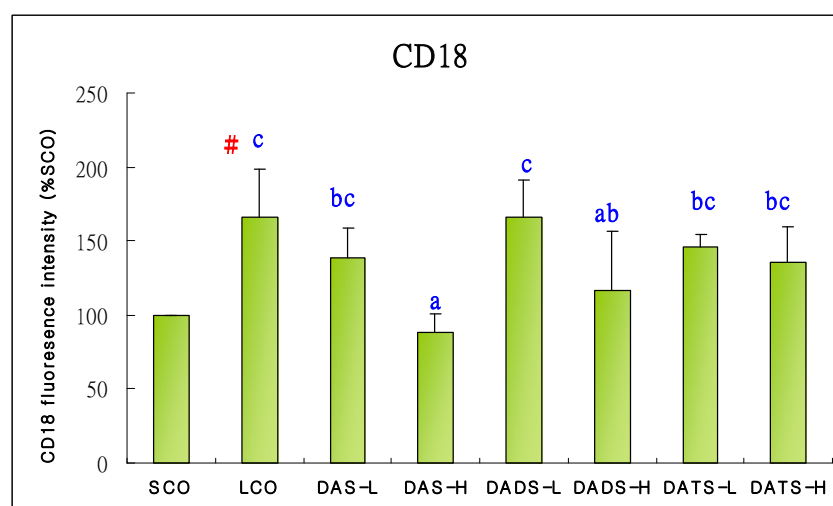


圖十、灌食大蒜精油對系統性發炎反應大鼠嗜中性球黏附分子 CD11b/CD18 含量之影響。注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、LGO10、LGO50、LGO100)大鼠，以流式細胞儀分析嗜中性球(A) CD11b 及(B) CD18 表現量。結果 MFI (% of SCO)以 Mean±SD 表示，SCO 組與 LCO 組間數據差異以 Student's t-test 進行分析，標示#表具顯著性差異(p<0.05)；LPS 刺激組組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan's test 進行事後檢定，組間無標示相同字母^{ab}者表具顯著性差異(p<0.05)，各組別 n=6。

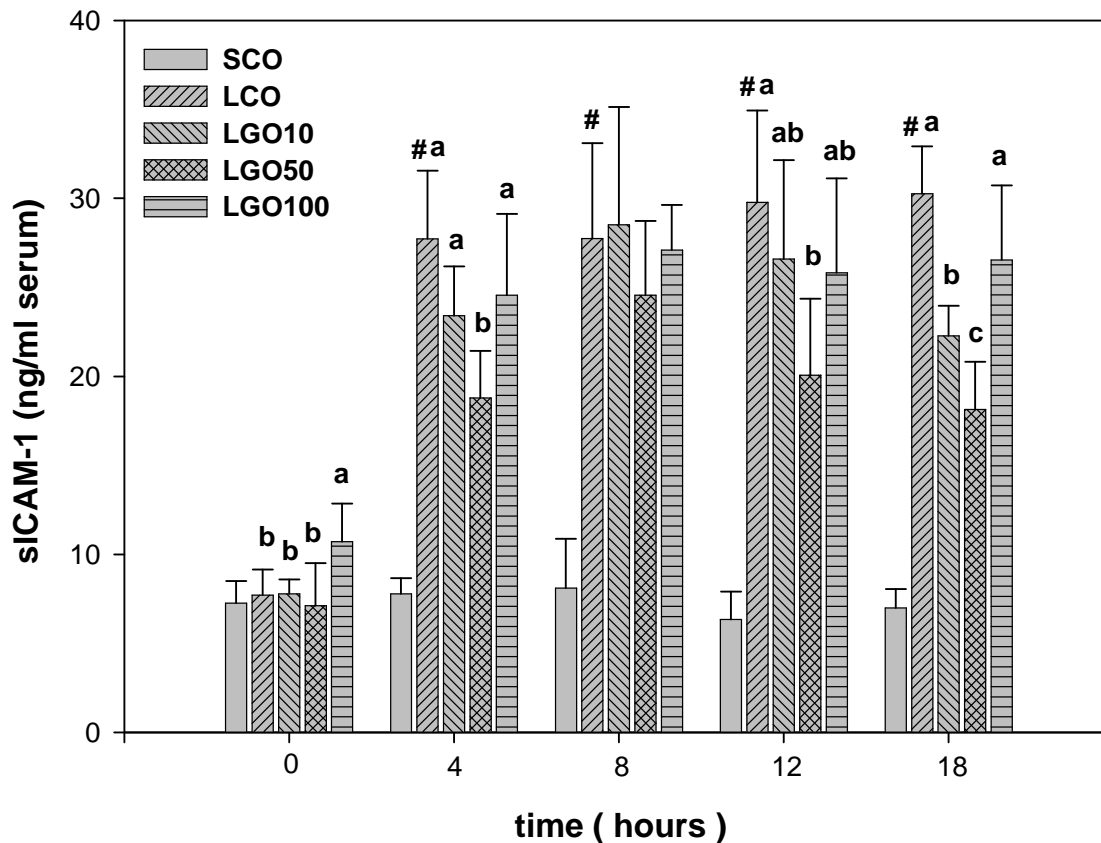
(A) CD11b



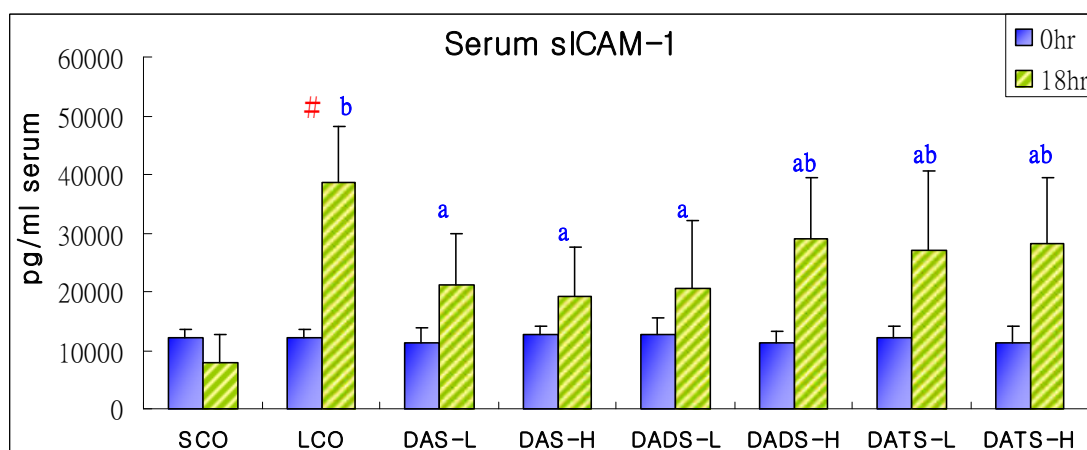
(B) CD18



圖十一、灌食不同大蒜含硫成份對於嗜中性球表面黏附分子 CD11b 和 CD18 表現之影響
注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、DAS-L、DADS-L、DATS-L、DAS-H、DADS-H、DATS-H) 大鼠，犧牲後取血純化嗜中性球，並以流式細胞儀分析嗜中性球 (A) CD11b (B) CD18 表現量，結果 MFI (% SCO) 以 mean ± SD 表示。SCO 組與 LCO 組間數據以 Student's t-test 分析，# 表有顯著差異 (p<0.05)；LPS 刺激組組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan's test 進行事後檢定，組間無標示相同字母^{abc}者表具顯著性差異(p<0.05)，各組別 n=5。

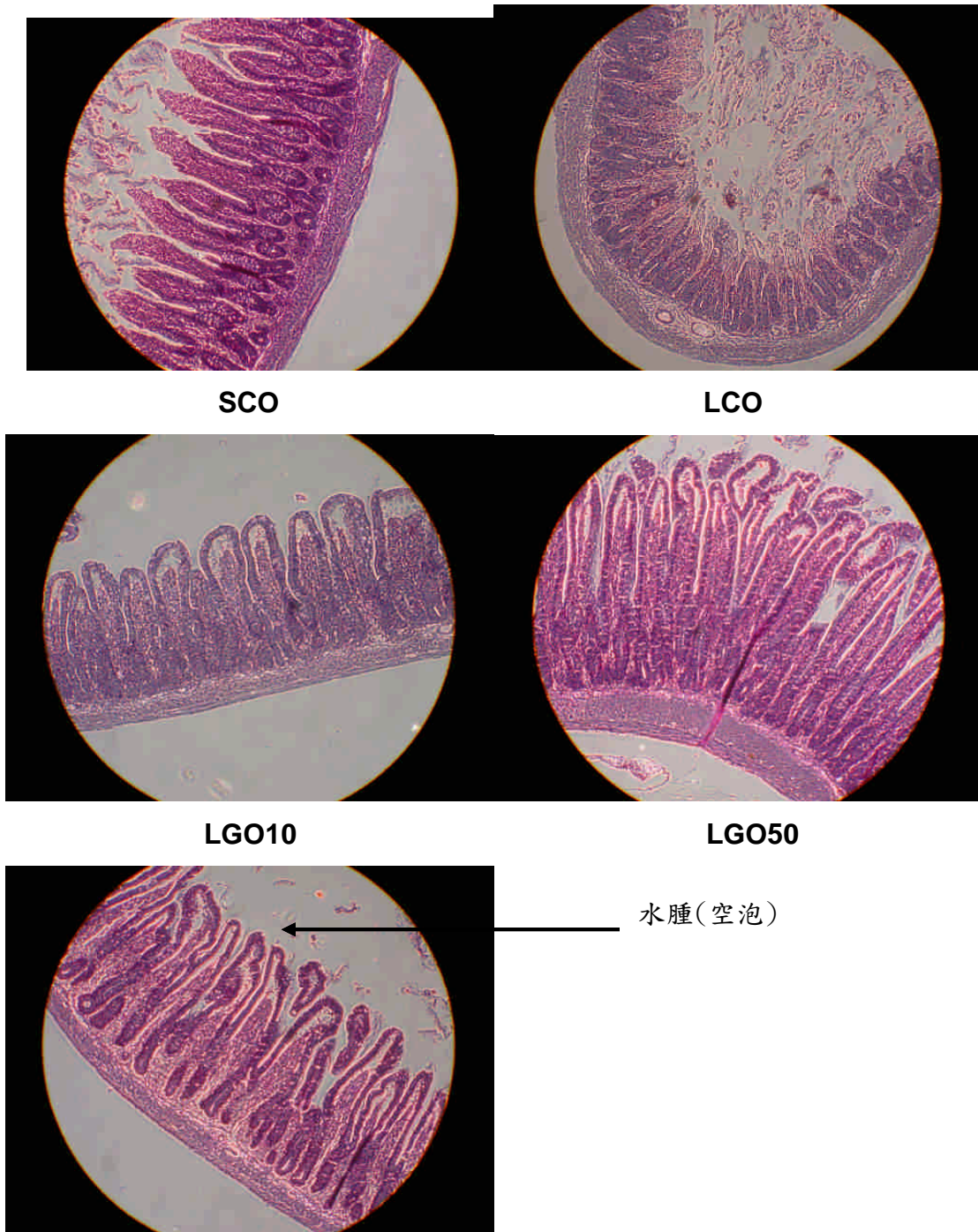


圖十二、灌食大蒜精油對系統性發炎反應大鼠血中可溶性黏附分子 sICAM-1 含量之影響。注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、LGO10、LGO50、LGO100)大鼠，於誘發後第 0、4、8、12 小時由尾靜脈或第 18 小時由下腔靜脈抽取血液製備血清，並以 ELISA 分析血中 sICAM-1 含量。結果以 Mean±SD 表示，SCO 組與 LCO 組組間數據以 Student's t-test 進行分析，標示[#]表具顯著性差異(p<0.05)；LPS 刺激組各組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan's test 進行事後檢定，各時間點組間無標示相同字母^{abc}者表具顯著性差異(p<0.05)，各組別 n=4~6。



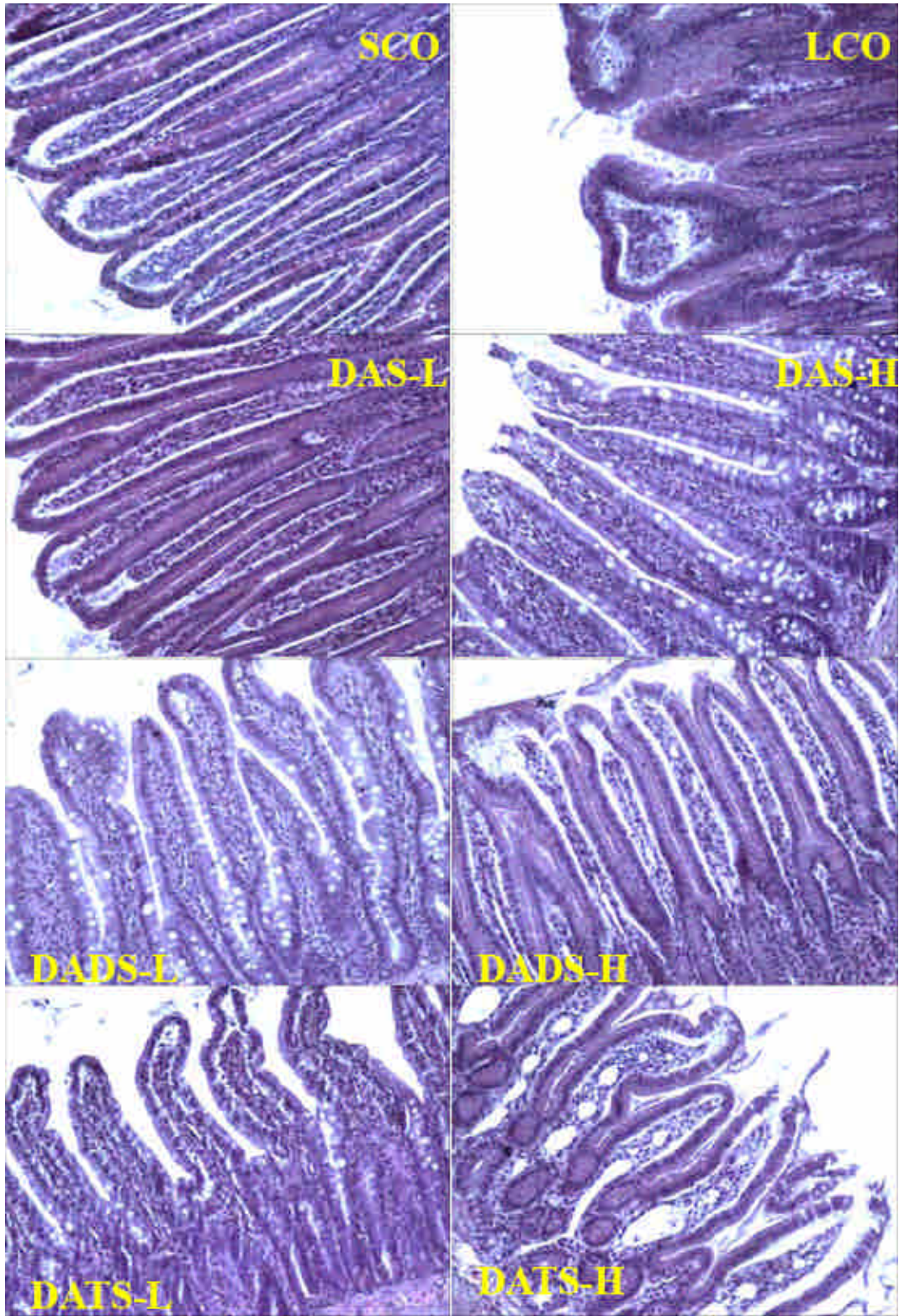
圖十三、灌食不同大蒜含硫成分對於系統性發炎大鼠血清中 sICAM-1 含量的影響

注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、DAS-L、DADS-L、DATS-L、DAS-H、DADS-H、DATS-H)大鼠，在注射 LPS 前(0 hr)，於尾靜脈抽取血液和注射 LPS 後(18 hr)犧牲時，於下腔靜脈抽取血液，分析血清中可溶性黏附因子 sICAM-1 的含量。各組結果以 mean ± SD 表示，SCO 組與 LCO 組間數據以 Student's t-test 分析，# 表有顯著差異 (p < 0.05)；LPS 刺激組組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan's test 進行事後檢定，組間無標示相同字母^{ab}者表具顯著性差異(p < 0.05)，各組別 n=6。



圖十四、灌食大蒜精油對系統性發炎反應大鼠迴腸黏膜完整性之影響

注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、LGO10、LGO50、LGO100)大鼠，犧牲後收集迴腸進行 HE 組織形態染色，厚度 5 μ m，200X。



圖十五、灌食不同大蒜含硫成份對於系統性發炎大鼠迴腸組織完整性之影響。

注射 saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、DAS-L、DAS-H、DADS-L、DADS-H、DATS-L、DATS-H)大鼠，犧牲後收集迴腸進行 HE 組織形態染色，厚度 $5\mu\text{m}$ ，200X。

附表

Organ wt. /BW (%)	Liver	Kidney	Spleen	Lymph node
SCO	4.17 ± 0.17	0.93 ± 0.02	0.339 ± 0.023	0.045 ± 0.012
LCO	4.45 ± 0.19 ^{#b}	1.06 ± 0.05 ^{#b}	0.411 ± 0.044 ^{#b}	0.061 ± 0.009 [#]
LGO10	4.45 ± 0.18 ^b	1.03 ± 0.03 ^b	0.410 ± 0.041 ^b	0.062 ± 0.010
LGO50	4.55 ± 0.28 ^{ab}	1.04 ± 0.04 ^b	0.461 ± 0.086 ^b	0.054 ± 0.015
LGO100	4.74 ± 0.36 ^a	1.14 ± 0.14 ^a	0.532 ± 0.084 ^a	0.063 ± 0.019

注射 Saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、LGO10、LGO50、LGO100)大鼠，犧牲後收集肝臟、腎臟、脾臟及頸部淋巴結秤重，並以犧牲前體重換算臟器體重百分比。結果以 mean ± SD 表示，SCO 組與 LCO 組間數據以 Student' s t-test 分析，[#]表組間具顯著性差異(p<0.05)；LPS 刺激組組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan' s test 進行事後檢定，組間無標示相同字母^{ab}者表具顯著性差異(p<0.05)，各組別 n=10。

Organ wt/BW (%)	Liver	Kidney	Spleen	Lymph node
SCO	3.97 ± 0.31	0.97 ± 0.07	0.339 ± 0.032	0.046 ± 0.011
LCO	4.47 ± 0.35 [#]	1.06 ± 0.06	0.427 ± 0.056 [#]	0.068 ± 0.022 [#]
DAS-L	4.27 ± 0.39	1.03 ± 0.07	0.377 ± 0.057	0.053 ± 0.017
DAS-H	4.42 ± 0.38	1.04 ± 0.08	0.415 ± 0.062	0.064 ± 0.008
DADS-L	4.39 ± 0.38	1.09 ± 0.07	0.376 ± 0.042	0.051 ± 0.008
DADS-H	4.55 ± 0.41	1.03 ± 0.08	0.385 ± 0.043	0.066 ± 0.017
DATS-L	4.48 ± 0.33	1.04 ± 0.08	0.373 ± 0.049	0.069 ± 0.028
DATS-H	4.50 ± 0.41	1.11 ± 0.09	0.428 ± 0.064	0.061 ± 0.022

注射 saline (控制組-SCO)和注射 LPS (刺激組—LCO、DAS-L、DADS-L、DATS-L、DAS-H、DADS-H、DATS-H) 大鼠，犧牲後收集肝臟、腎臟、脾臟和頸部淋巴結秤重，以犧牲前體重換算臟器體重百分比。結果以 mean ± SD 表示，SCO 組與 LCO 組間數據以 Student' s t-test 分析，[#]表組間具顯著性差異(p<0.05)；LPS 刺激組組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan' s test 進行事後檢定，組間無標示相同字母^{ab}者表具顯著性差異(p<0.05)，各組別 n= 8。

表三、灌食大蒜精油對系統性發炎反應大鼠迴腸黏膜中，黏附、趨化因子(ICAM-1、CINC-1)和促發炎激素(TNF- α 、IL-1 β)含量的影響

pg/mg protein	Mucosa			
	ICAM-1	CINC-1	TNF- α	IL-1 β
SCO	2389 \pm 1123	ND	12.1 \pm 1.7	40.7 \pm 20.8
LCO	5569 \pm 1729 ^{#a}	41.2 \pm 9.2 [#]	18.6 \pm 1.8 ^{#b}	245.8 \pm 103.9 [#]
LGO10	4374 \pm 1897 ^{ab}	23.1 \pm 8.2	23.8 \pm 4.9 ^{ab}	275.9 \pm 136.7
LGO50	2942 \pm 767 ^b	36.8 \pm 20.8	15.4 \pm 1.7 ^b	205.3 \pm 83.1
LGO100	2614 \pm 779 ^b	33.3 \pm 9.2	29.8 \pm 8.6 ^a	255.5 \pm 104.6

注射 Saline 控制組(SCO)與注射 LPS 刺激組(LCO、LGO10、LGO50、LGO100)大鼠，犧牲後收集迴腸黏膜製備均質液，以 ELISA 分析黏附分子 ICAM-1 及促發炎細胞激素 IL-1 β 、TNF- α 與趨化物質 CINC-1 含量，並以蛋白質濃度校正。結果以 mean \pm SD 表示，SCO 組與 LCO 組間數據以 Student' s t-test 分析，[#]表組間具顯著性差異(p<0.05)；LPS 刺激組組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan' s test 進行事後檢定，組間無標示相同字母^{ab}者表具顯著性差異(p<0.05)，各組別 n=3~6。ND；not detectable。

表四、灌食不同大蒜含硫成分對於系統性發炎反應大鼠迴腸黏膜及整段組織中,黏附、趨化因子(ICAM-1、CINC-1)和促發炎激素(TNF- α 、IL-1 β)含量的影響

pg/mg protein	Mucosa				Whole tissue			
	ICAM-1	CINC-1	TNF- α	IL-1 β	ICAM-1	CINC-1	TNF- α	IL-1 β
SCO	2474 \pm 833.0	13.22 \pm 4.974	12.14 \pm 3.048	36.76 \pm 15.62	223.1 \pm 76.60	4.210 \pm 1.223	3.511 \pm 0.883	2.040 \pm 0.183
LCO	4544 \pm 1492 ^{#d}	39.78 \pm 9.883 ^{#d}	29.30 \pm 6.452 ^{#b}	118.6 \pm 31.03 ^{#c}	340.9 \pm 38.35 ^{#ab}	13.70 \pm 3.829 ^{bc}	4.268 \pm 0.622	4.409 \pm 1.035 ^{#c}
DAS-L	1641 \pm 635.3 ^{ab}	22.07 \pm 3.652 ^{bc}	19.02 \pm 5.861 ^a	48.45 \pm 17.44 ^{ab}	297.3 \pm 66.23 ^{ab}	9.708 \pm 3.955 ^{ab}	3.478 \pm 0.901	3.232 \pm 0.754 ^{ab}
DAS-H	1280 \pm 692.5 ^a	13.82 \pm 5.001 ^a	18.35 \pm 6.298 ^a	62.42 \pm 8.057 ^{bc}	400.1 \pm 41.73 ^b	6.875 \pm 1.099 ^a	3.918 \pm 1.024	3.401 \pm 0.840 ^{ab}
DADS-L	1843 \pm 680.4 ^{ab}	23.46 \pm 8.204 ^{bcd}	16.59 \pm 7.653 ^a	39.88 \pm 17.13 ^{ab}	399.4 \pm 93.02 ^{ab}	10.44 \pm 4.213 ^{ab}	3.699 \pm 0.875	3.532 \pm 1.287 ^{ab}
DADS-H	2944 \pm 943.7 ^{bc}	17.01 \pm 2.57 ^{ab}	16.62 \pm 3.147 ^a	82.96 \pm 15.84 ^{cd}	308.9 \pm 89.76 ^a	16.758 \pm 5.063 ^{cd}	3.519 \pm 1.629	2.674 \pm 0.966 ^a
DATS-L	2249 \pm 444.5 ^{abc}	31.39 \pm 4.832 ^d	16.46 \pm 4.561 ^a	35.06 \pm 3.382 ^a	384.9 \pm 111.0 ^{ab}	19.23 \pm 3.527 ^d	4.778 \pm 1.455	2.921 \pm 0.271 ^{ab}
DATS-H	3355 \pm 1422 ^{cd}	25.98 \pm 6.493 ^{cd}	23.50 \pm 8.788 ^{ab}	93.14 \pm 14.21 ^d	420.8 \pm 52.35 ^{ab}	26.19 \pm 3.741 ^e	4.674 \pm 1.189	5.273 \pm 1.416 ^c

注射 Saline 控制組(SCO) 和注射 LPS 刺激組— (LCO、DAS-L、DADS-L、DATS-L、DAS-H、DADS-H、DATS-H) 大鼠,犧牲後收集迴腸黏膜及整段迴腸組織製備均質液,以 ELISA 分析黏附因子 ICAM-1、趨化因子 CINC-1、促發炎細胞激素 TNF- α 及 IL-1 β 的含量,且以蛋白質濃度校正。結果以 mean \pm SD 表示,SCO 組與 LCO 組間數據以 Student' s t-test 分析,[#]表組間具顯著性差異(p<0.05); LPS 刺激組組間數據以 one-way ANOVA 分析後採 Duncan' s test 進行事後檢定,組間無標示相同字母^{abcde}者表具顯著性差異(p<0.05),各組別 n=4~6。