

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

桑葉多酚抑制血管病變之作用及分子機轉研究(第3年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2628-B-040-022-MY3
執行期間：98年08月01日至99年07月31日
執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：王朝鐘

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：鐘佩君
博士班研究生-兼任助理人員：楊孟元
博士班研究生-兼任助理人員：洪嘉鴻

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 99年10月29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

桑葉多酚抑制血管病變之作用及分子機轉研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2628-B-040-022-MY3

執行期間：96年08月01日至99年07月31日

計畫主持人：王朝鐘

共同主持人：

計畫參與人員：楊孟元 鍾佩君 洪嘉鴻

成果報告類型： 精簡報告 完整報告

執行單位：中山醫學大學

中華民國九十九年十月十一日

目 錄

壹、中文摘要.....	4
貳、英文摘要 Abstract.....	5
參、緒論.....	6
肆、文獻回顧.....	8
動脈粥狀硬化症發展的相關機轉.....	8
動脈粥狀硬化 的起始因子.....	8
泡沫細胞的生成.....	8
血管平滑肌細胞的增生、移動.....	9
氧化自由基	9
抗氧化酵素.....	10
桑葉 (<i>Morus alba L. leaves</i>) 之背景介紹.....	11
伍、研究動機.....	13
陸、研究架構.....	14
柒、實驗材料與方法.....	15
捌、實驗方法.....	19
桑葉萃取物之萃取.....	19
MLE 成份分析	19
DPPH 自由基清除效應.....	21
分離人類血中之低密度脂蛋白.....	21
氧化型低密度脂蛋白的製備.....	22
低密度脂蛋白表面電荷改變試驗.....	22
脂質過氧化試驗.....	22
桑葉萃取物對巨噬細胞毒性試驗.....	23
泡沫細胞生成試驗.....	23
細胞內脂質的萃取.....	23
桑葉萃取物對巨噬細胞吞噬 ox-LDL 能力之影響	25
桑葉萃取物對血管平滑肌細胞毒性試驗.....	25
血管平滑肌細胞增生試驗	25
細胞週期分析.....	25
血管平滑肌細胞傷口癒合試驗.....	26
血管平滑肌細胞侵入性分析.....	26
基質金屬水解蛋白酶活性分析	26
紐西蘭白兔之胸主動脈平滑肌細胞的初代培養.....	27
紐西蘭白兔之胸主動脈平滑肌細胞的純度鑑定.....	27
高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈硬化症.....	28
Oil red O 染色的樣本製備	28
免疫組織染色.....	28
統計分析.....	29
玖、實驗結果.....	30
桑葉萃取物清除自由基之效力.....	30
桑葉萃取物抑制體外誘發 LDL 氧化之作用.....	30
低密度脂蛋白表面電荷改變試驗.....	30

脂質過氧化試驗.....	31
桑葉萃取物對巨噬細胞之毒性試驗.....	31
桑葉萃取物降低 ox-LDL 所誘導的巨噬細胞內氧化壓力	31
桑葉萃取物抑制泡沫細胞之生成.....	31
桑葉萃取物抑制細胞脂質之堆積.....	32
桑葉萃取物抑制巨噬細胞之吞噬能力.....	32
桑葉萃取物抑制泡沫細胞生成之機制探討.....	33
桑葉萃取物抑制平滑肌細胞的增生.....	34
桑葉萃取物對血管平滑肌細胞的毒殺效果.....	35
桑葉萃取物抑制血管平滑肌細胞之生長.....	35
桑葉萃取物誘導血管平滑肌細胞之細胞週期停滯作用	36
桑葉萃取物抑制平滑肌細胞移動能力.....	36
桑葉萃取物抑制血管平滑肌細胞的傷口癒合.....	36
桑葉萃取物抑制血管平滑肌細胞的轉移能力.....	36
桑葉萃取物抑制初代培養的胸主動脈平滑肌細胞之移動能力	37
拾、討論.....	39
拾壹、參考文獻.....	41
拾壹、實驗圖表與說明.....	47

壹、中文摘要

追尋抗氧化、抗衰老的過程中，科學家發現在一些高等植物中所含之天然化合物，具有抗氧化、抗衰老的作用，藉由抗氧化的作用來抑制 LDL 的氧化修飾，是一種有效預防動脈粥狀硬化發生的方法。本研究之目的為評估由桑葉所分離出的水萃取物(MLE) 與多酚萃取物(MLPE)，其保護 LDL 避免被氧化及抑制動脈粥狀硬化發生之效果，而進行體外抗氧化實驗與細胞實驗來驗證。本實驗利用新鮮桑葉為材料，以銅離子誘導 LDL 氧化的模式進行體外抗氧化實驗，並以 LDL 氧化時其蛋白部分的氧化修飾反應與脂質部分的過氧化反應作為氧化指標。藉由 LDL 蛋白表面電荷改變的程度與脂質過氧化產物 MDA 的生成量減少的結果發現，MLE 與 MLPE 皆具有抑制 LDL 被氧化的能力，此外也具有清除 DPPH 自由基之作用。而在細胞實驗方面，而在給予低濃度的 MLE 或 MLPE 時，即可有效地減少巨噬細胞轉形為泡沫細胞，這些現象都證明 MLE 與 MLPE 確實具有減緩動脈硬化的發生過程之能力。由上述體外抗氧化實驗與細胞實驗結果顯示，MLE 與 MLPE 具有極佳的抗氧化活性並能抑制 LDL 的氧化，此外也透過抑制清除者接受器 CD36 與 SR-A 的表現調控巨噬細胞因吞噬過量的 ox-LDL 而造成的泡沫細胞之形成，進而達到降低動脈粥狀硬化發生。綜合以上結果，我們認為桑葉萃取物具有預防動脈粥狀硬化的作用，而能應用於保健食品的開發。

貳、英文摘要 Abstract

Cardiovascular disease has been a major cause of mortality in human and hyperlipidemia plays an important role contributing to atherosclerosis. Oxidated LDL (ox-LDL) has known to damage the endothelial cells and cause endothelial dysfunction. And ox-LDL-mediated foam cell formation by macrophage initiates the cascade of atherosclerosis. This study was to evaluate the anti-oxidative and anti-atherosclerotic effects of the MLE and MLPE by a model of in vitro antioxidation and cell culture. As shown in previous studies *Morus alba L.* leaves extract is a nature plant containing a lot of pigments that was found to possess antioxidative activity. In this study, we evaluated the antioxidative activity of the *Morus alba L.* leaves extract (MLE and MLPE) by measuring their effects on LDL oxidation and anti-atherosclerotic abilities. MLE and MLPE possessed the ability of DPPH radical scavenging. The antioxidative activity of the MLE and MLPE on LDL oxidation was defined by relative electrophoretic mobility (REM) and thiobarbituric acid-relative substances (TBARS) assay. Our results showed that MLE and MLPE were able to reduce REM and inhibit TBARS assay in the Cu^{2+} -mediated oxidative LDL. Taken together, low concentration of MLE and MLPE could reduce marked the cellular cholesterol and triglycerides accumulation in macrophage and inhibit the formation of foam cells. MLE inhibits ox-LDL-induced CD36 and SR-A expression. We found MLE also reduced ox-LDL-mediated ROS increased. MLE reduces macrophage phagocytosis by Dil-acLDL. Our study demonstrates the MLE and MLPE can inhibit the oxidation of LDL and has the anti-oxidatic and anti-atherosclerotic properties.

參、緒論

動脈粥狀硬化 (atherosclerosis)

根據衛生署統計，心血管疾病為國人十大死因之前五名，且為西方國家普遍的疾病之一。而心血管疾病中動脈粥狀硬化更是主要的致死原因(1, 2)。動脈粥狀硬化的發生為一種複雜且為漸進式的致病過程，包括脂質進入血管壁、脂蛋白氧化、泡沫細胞形成與堆積，血管平滑肌細胞遷移和增生等(3)。在動脈粥狀硬化的病理致病機轉研究中，動脈粥狀硬化的形成機制是一種脂質與發炎細胞間的聚集，伴隨著血管平滑肌細胞增生與細胞外間質液分泌所引起的細胞內膜纖維變性(4)，目前已知，當血液中血脂成份過高的話，易造成血管內皮細胞 (endothelial cell) 的受損，使血管腔 (vascular lumen) 間隙增加，使得脂蛋白如: "低密度脂蛋白" (LDL) 容易穿過血管腔間隙進入血管內膜 (intima) 當中堆積，而血管內膜當中的低密度脂蛋白又容易受到血管內膜中的一些內生性氧化酵素的作用，發生脂質過氧化作用修飾，因而形成 "氧化型低密度脂蛋白" (ox-LDL)，而這些修飾後的氧化型低密度脂蛋白因為立體結構的改變，就變得不容易穿透血管腔間隙離開血管內膜而堆積下來(5, 6)。這些堆積在血管內膜的氧化型低密度脂蛋白會影響血管內皮細胞的正常功能，諸如維持血管的形狀，防止血液的流失，平衡血管的通透性等，而受傷的內皮細胞將變得容易被血液內的物質吸附，更佳影響其原本之功能(7)。因此，這些受損的血管內皮細胞便會吸引血液中的清道夫--單核球細胞 (monocyte) 的聚集，而單核球細胞便會由血管內轉移至血管內皮細胞外的內膜 (intima)，以清除這些影響血管內皮細胞的氧化型低密度脂蛋白。當單核細胞轉移到血管內膜時，會同時分化並活化，形成更具有清除能力的巨噬細胞 (macrophage)(8-10)。此時，巨噬細胞對過分堆積的氧化型低密度脂蛋白進行無限制的吞噬，而這些富含膽固醇的低密度脂蛋白將會逐漸累積在巨噬細胞體內，使得巨噬細胞形成另一種病態的細胞型態，稱之為泡沫細胞 (foam cell)(11, 12)。這些泡沫細胞的大量堆集在血管內膜會形成所謂的脂肪條紋 (fatty streak)，是動脈粥狀硬化過程中最早可以辨識的病灶，這些脂肪條紋會緩慢地造成血管的纖維化，硬化，形成所謂的粥樣硬化斑 (13)。而血管纖維化的發生，是由於血管平滑肌細胞 (smooth muscle cell) 受到氧化型低密度脂蛋白的刺激，分泌酵素，逐步分解彈性纖維層後，由血管中層移動到血管內膜層，且在內膜當中大量增殖(14, 15)，其中，血管平滑肌細胞也會透過吞噬氧化態低密度脂蛋白而形成泡沫細胞(16)。在這些病灶中，由巨噬細胞以及血管平滑肌所形成的泡沫細胞持續增加、堆集，進而形成一個明顯以脂質為核心，外環包圍著泡沫細胞的粥樣瘤狀病變。正常的血管內壁並無腫塊，而動脈粥狀硬化是指動脈血管壁中，因粥樣瘤狀的現象惡化變大，導致血管管徑變小、血流阻力增大、血流量變少，使組織間氧氣與養分供應減少，血管壁所承受壓力過大，再加上血小板的作用，誘導血栓的形成 (thrombosis)(17, 18)。血栓的產生，是由於動脈粥樣硬化斑的增大並且突出於血管腔，使血管內皮細胞損傷、破裂而引起血小板 (platelets) 的吸附聚集，此外若動脈粥樣硬化斑的結構不穩定，也會因粥樣硬化斑的破裂使其內的脂質與一些相關因子的暴露而引起血小板的吸附聚集。若粥樣硬化斑的破裂會造成血小板再一次的凝血現象，反覆的破裂 (rupture)、凝血 (coagulation)，將會促使血塊增大而阻塞住血管造成血栓 (thrombosis)(19)，最後導致心肌梗塞、中風的發生。

促使阻塞情形更加惡化，而血栓更是引起中風的潛在因子，這些現象都是導致晚期動脈血管壁粥狀塊呈現複雜、具不可逆性，造成治療上困難的原因。

所以低密度脂蛋白所受到的氧化性修飾，泡沫細胞的形成及血管平滑肌細胞的增生與遷移，在動脈粥狀硬化的早期皆扮演著重要的角色，因此有效的阻止這些病灶的發生，將有助於減緩動脈粥狀硬化症的發展。

肆、文獻回顧

一、動脈粥狀硬化症發展的相關機轉 (pathogenesis)

1-1. 動脈粥狀硬化(atherosclerosis) 的起始因子—LDL 的氧化

動脈粥狀硬化的發生為一複雜且為漸進式的一種致病過程。現有的證據認為當血管內皮細胞(endothelial cell) 受到損害或是功能不全時，造成內皮細胞對脂蛋白以及血漿中的其他組成分子的通透性增加，進而造成單核球以及內皮細胞的黏著分子(adhesion molecules) 表現增加，顯示動脈硬化是一種長期性的發炎反應(4)。一旦血管腔(vascular lumen) 間隙增加，LDL 就可由變大的間隙進入血管內膜(intima) 當中，之後容易受到血管內膜中內生性的氧化因子如：myeloperoxidase、nitric oxide synthase 與 15-lipoxygenase 等氧化，形成氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL) (5, 6, 20, 21)。而ox-LDL 的形成將吸引巨噬細胞趨化，並加以清除(macrophage uptake)。

脂質的過氧化作用先從LDL 表面磷脂質的多元不飽和脂肪酸開始，然後擴增至核心脂質，因而導致多元不飽和脂肪酸、膽固醇、磷脂質的氧化修飾以及ApoB 的分解。ox-LDL 組成包含有oxidized phospholipids、phosphatidyl choline、modified ApoB proteins、oxidized lipids 等，這類物質具有促使血管內皮細胞(endothelium cell) 損傷，使內皮細胞的功能失調的特性，容易造成更多循環於血液中的LDL 進入血管內膜中，進入血管內膜的LDL 失去血液中抗氧化劑的保護，並受到內生性因子的氧化，形成更多的ox-LDL 導致一惡性循環(7)。ox-LDL 會促使內皮細胞表達單核球(monocyte) 的附著分子(adhesion molecules) 如：VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule-1)、E-selectin、P-selectin、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 等(8, 10, 22)，而吸引T cell 與monocyte 黏附於內皮細胞表面，並受到來自於血管內皮細胞或ox-LDL 所誘發表達的趨化分子(chemotactic molecules) 如：MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)、MCP-1 接受器CCR-2 的作用，而轉移進入血管內膜(23-26)。

由於在動脈硬化病人的血管病灶中可以發現有ox-LDL 的存在，且動脈硬化之病人其LDL 中較容易被氧化，而抗氧化劑也具有抗動脈硬化之作用等理由推測，ox-LDL 在動脈硬化的形成中扮演著非常重要的角色。ox-LDL 進入到血管內皮下空間後，會大量被巨噬細胞辨識並進一步吞噬，促使巨噬細胞轉變形成泡沫細胞(foam cell)(27)。且ox-LDL 會顯著地誘導由人類單核球所衍生成巨噬細胞的生長(28)。同時，ox-LDL 會吸引血液中的單核球(monocyte) 和血管中層的平滑肌細胞(smooth muscle cell) 進入血管內皮下空間，也會阻止巨噬細胞離開血管壁，造成內皮細胞的損傷或功能異常，形成惡性循環而加速動脈硬化病變或血管再狹窄病變的形成(29)。因此，能夠抑制ox-LDL 形成之物質，則被認為有效於減少ox-LDL 產生，減少泡沫細胞的形成，抑制生長因子及細胞激素的表現，降低平滑肌細胞的增生，進而減緩動脈硬化的形成和氣球擴張術後的血管再狹窄。

1-2. 泡沫細胞(foam cell) 的生成

當單核球轉移至血管內膜後，單核球會受 M-CSF (macrophage monocyte-colony-stimulating factor) 影響而分化形成巨噬細胞(macrophage)(9)。巨噬細胞會表達吞噬 ox-LDL 的清除者接受器(scavenger receptors)，CD36 與 SR-A (scavenger receptors A) 而將 ox-LDL 吞噬到細胞體內。ox-LDL 可透過活化一些細胞內的分子機制來誘導巨噬細胞吞噬 ox-LDL，如：ox-LDL 可活化轉錄因子 PPAR γ 來促使 CD36 大量表達(30)，ox-LDL 也可以經活化轉錄因子 AP-1 來促

使 SR-A 大量表達，這些清除者接受器若表達過多則會使巨噬細胞吞噬過量的 ox-LDL，而使得膽固醇、脂質堆積過多於細胞中，導致巨噬細胞改變型態，形成泡沫細胞(foam cell)。泡沫細胞的形成是早期動脈粥狀硬化發生的主要特徵。大量的泡沫細胞聚集堆積在動脈管壁上形成脂肪斑(fatty streak)。在動脈硬化發展的過程當中，泡沫細胞會逐漸走向細胞死亡(apoptosis 或 necrosis)(13)，當細胞死亡後，原本經吞噬而囤積於細胞內的膽固醇、脂質便會流出，並與死亡的細胞殘骸形成局部性壞死區域(necrotic core)(31)。Necrotic core 發生之後則會促使”gruel”的形成。”Gruel”為一種糜粥狀的油脂聚合物，也是形成動脈粥狀硬化斑的主因。

1-3. 血管平滑肌細胞的增生 (proliferation)、移動 (migration)

平滑肌細胞是構成大型血管的主要細胞。目前已知的證據顯示，在許多的心血管相關疾病的形成過程中，在病程的發展中期，巨噬細胞會與血管內膜中的 T cell 交互作用釋放大量的細胞激素(Th1、Th2 cytokines) 而促使一連串的免疫反應(immunologic responses) 的發生(32)，同時周圍的血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cell) 及內皮細胞(endothelium cell) 同樣也會表達生成 IL-1 (interleukin-1)、TNF α (tumor necrosis factor α) 等因子，而這些分子的生成會刺激血管平滑肌細胞的增生，並轉移至 intima 或 subendothelial 當中。由此可知，平滑肌細胞往血管內層的移動和增生是造成血管內層增厚的主要原因。血管平滑肌細胞轉移至 intima 後，同樣也會受 ox-LDL 影響開始表達清除者接受器(scavenger receptor) 而吞噬 ox-LDL 形成泡沫細胞。此外，血管平滑肌細胞也會開始分泌 MMPs，改變細胞外基質的構成，促使局部區域形成 ”fibrous cap”，而將 gruel 覆蓋形成動脈粥狀硬化斑 (plaque)。自此病程由初期單純的脂肪斑形成轉入一個複雜的血管壁管腔損傷的階段。

1-4. 氧化自由基 (reactive oxygen species, ROS)

自然界中，所有物質皆必須帶有成雙成對的電子，才能維持其物理性質的穩定，然而自由基(free radical) 即是含有獨立不成對電子的原子、分子或離子，這類物質因為具有很強的活性，容易引起細胞物質的氧化或過氧化作用，進而破壞細胞的原有結構，導致細胞的損傷或死亡。ROS 泛指以氧和氮原子為中心的自由基與 ROS 代謝後產物如：超氧陰離子(superoxide)、氫氧自由基(hydroxyl radical)、氧化氮(NO)，另外包含一些非自由基的氧化劑如：過氧化氫(H₂O₂)、次氯酸(hypochlorous acid; HOCl)、臭氧(ozone; O₃) 等具有活性的氧化物等。在生物體中 ROS 的來源有幾個方面：(1)粒線體及內質網已被證實會產生 ROS (33)。正常的生理情況下，細胞的粒線體會將 95% 的氧還原成水，在電子轉移過程中約有 1-2% 的電子會漏出，這些漏出的電子，藉由輔酶 Q 或 NADH 氧化酵素與氧分子作用，形成超氧陰離子；(2)ROS 的另一個重要的來源，是來自脂質的代謝，例如在花生四烯酸(arachidonic acid) 代謝過程中，環氧化酶(cyclooxygenase) 和脂氧化酶(lipoxygenase) 代謝產生 ROS。(3)在發炎反應過程中，ROS 可以被嗜中性白血球、巨噬細胞及內皮細胞本身所產生(33)。

ROS 目前已知會影響許多生物程序，並且與一些跟老化過程容易發生的疾病息息相關，ROS 會調節許多細胞內的功能，包括基因表現、轉錄因子的活化、DNA 的合成、細胞的增生等等。在目前的報導中發現，在多種細胞中，加入細胞激素(cytokine) 或生長因子，會刺激 H₂O₂ 及 NO 的產生，並與基因的表現有

關。ROS 被認為是調節多種細胞生理功能的一種二級訊息傳遞分子，大量的ROS 可以活化細胞內的訊息傳遞路徑 JNK1/2、p38 MAPK，抑制Bcl-2 的表現(34)，活化p53 (35) 或活化其它轉錄因子(AP-1或NF- κ B)。許多文獻與證據皆指出動脈硬化中的血管中有表現大量ROS 的存在，大量的ROS 可能會造成ox-LDL 的出現，或是促使巨噬細胞轉變成泡沫細胞，而ROS 所產生的氧化壓力(oxidative stress)，也會逐漸累積並造成血管細胞的損傷，進一步導致動脈粥狀硬化症的惡化(36, 37)。

1-5. 抗氧化酵素 (antioxidative enzyme)

當細胞受到ROS 導致的氧化壓力所危害時，通常會利用細胞中的抗氧化機制，採取一些防禦措施，將損害減至最低程度。細胞內的抗氧化機制主要分成兩大部份：初級的抗氧化防禦 (primary antioxidant defenses) 及次級的抗氧化防禦 (secondary antioxidant defenses)。初級的抗氧化防禦是以直接分解或清除 superoxide、 H_2O_2 及OH 為主，多數屬於抗氧化酵素所組成，包括：過氧化氫酶 (catalase)、超氧歧化酶 (superoxide dismutase; SOD)、穀胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase; GPx)、穀胱甘肽還原酶 (glutathione reductase; GRd) 等；而次級的抗氧化防禦則是以修復受到氧化損害的生物分子為主，包括：維生素C、維生素E、*b*-胡蘿蔔素、穀胱甘肽、膽紅素等。

1-5-1. 超氧歧化酶 (superoxide dismutase; SOD)

SOD 廣泛存在於真核或原核生物當中，SOD 能將superoxide 催化成 O_2 或 H_2O_2 ，提供生物體抵抗ROS 所帶來的傷害與破壞。SOD 是含有金屬離子的酵素蛋白，根據其活性位置所結合的金屬輔酶因子的不同，一般可區為：銅鋅型 (Cu/ZnSOD)、錳型(MnSOD)、胞外超氧歧化酶(EcSOD)、鐵型(FeSOD)(38)，而這幾種不同類型的SOD 分布於不同的物種與不同的區域。① Cu/ZnSOD存在於各種生物體內，在真核細胞中Cu/ZnSOD 主要存在於細胞質及胞器中，其分子量為：32 kDa (39)。Cu/ZnSOD 與superoxide 的反應速度極快，銅離子在歧化反應中扮演了氧化與還原的兩種角色，但鋅離子並沒有參與催化作用其功能主要是在安定整個酵素結構，若以其它金屬離子取代銅離子酵素將失去活性(40)。② MnSOD 主要位在於真核細胞與原核細胞的粒線體中，其分子量約 40 kDa (41)。③ EcSOD：於1982 年被發現，它含有一個銅及一個鐵離子但卻不同於Cu/ZnSOD(42)。EcSOD 僅存在於少數幾種細胞當中，如纖維母細胞及內皮細胞。EcSOD 主要存在於細胞外液與循環的血液中，對於調節血管張力上扮演相當重要的角色。④ FeSOD 分布於原核細胞基質、藻類及某些高等植物及其葉綠體中，在所有的動物組織中都沒有發現FeSOD 的存在。FeSOD 在核酸與胺基酸序列上與MnSOD 類似，對熱及pH 值的改變較敏感，其分子量約18.5~22 kDa (43)。

1-5-2. 過氧化氫酶 (catalase)

Catalase 是第一個被發現的抗氧化酵素，其分子量約為60 kDa。主要的作用是将過 H_2O_2 催化 O_2 及 H_2O 。Catalase 由四個蛋白質次單元所組成，每次單元都包含了一個血紅素及一個NADPH 分子(44)。Catalase 大部份分佈於細胞內的過氧化體(lysosome)，在肝細胞與紅血球含量豐富，在一般的組織中也有存在。Catalase 在對於抗氧化系統裡扮演了重要的角色，當細胞內的 H_2O_2 濃度在10 mM 以下時，GPx 會將 H_2O_2 催化 O_2 及 H_2O ；然而當 H_2O_2 濃度在10 - 20 mM

時，catalase 則會將 H_2O_2 催化 O_2 及 H_2O (45)。一旦 H_2O_2 濃度超過20 mM 時便會開始對細胞產生傷害，超過100 mM 時則容易活化嗜中性白血球產生更多 H_2O_2 並進一步造成細胞的死亡(46, 47)。

1-5-3. 穀胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxide; GPx)

血液中存在的GPx 主要是由腎臟所產生，而GPx 廣泛的存在於身體各組織中，其中以肝臟及紅血球的含量最高(48)。GPx 必須含有硒(selenium; Se) 當作co-factor，才能完整的發揮作用(49)。GPx 有兩種：不須依賴硒的GPx (selenium dependent glutathione peroxide; Se-GPx) 及需要依賴硒的GPx。在細胞內，GPx 存在於細胞質及粒線體；對於 H_2O_2 而言，Se-GSH-Px 是一個最主要的清除者(49)。

二、桑葉 (*Morus alba L. leaves*) 之背景介紹

桑樹屬於多年生落葉無刺喬木或灌木之葉用作物，為不甚選擇土質的植物，大凡一般土質均適於生長，在溫帶以至於亞熱帶地區均有栽培，其自然分布的範圍甚廣。桑葉是家蠶 (*Bombyx mori*) 最優良之天然飼料，桑葉中含有構成蠶體及生成絹絲等所需之水份、蛋白質、碳水化合物、脂肪、灰質及纖維等營養成分(50)。

台灣的蠶桑葉在過去有過輝煌的歷史，擁有廣大的栽桑面積，直至民國七十年，由於絹絲技術的落伍，蠶桑銷售數量的降低，使桑園的面積也逐漸的減少。桑樹的可利用部位極多，成熟桑果(椹)榨汁為營養飲料，乾果可以浸酒，稱為桑椹酒，有滋補及補血之效。其根部去栓皮稱為桑白皮，為利尿鎮咳、解熱及緩下藥。枝稱為桑枝，可治風濕及高血壓諸痛。而桑葉在本草綱目中記載具有除寒熱、出汗、清熱、去宿血、明目、及汁解蜈蚣毒等功效，其煎汁代茗常服，令人聰明，膚色光澤，變白，具養顏健胃，安魂鎮神作用，因此又有神仙草之稱。尤其對老年人有較好的保健作用。

1. 桑葉之型態:

桑葉(mulberry leaves) 呈現互生，具柄。葉片卵圓形或寬卵形，長7~15 cm，卵圓形寬5~12 cm，先端尖或長尖，基部近心形，邊緣有粗鋸齒，有時不規則分裂，上面鮮綠色，無毛，有光澤，下面色略淡，脈上有疏毛。常見於鄉村旁、田間、地埂或山坡。平地則以栽培食用或觀賞為主。

2. 桑葉之已知成分與性狀:

已知成分：

桑葉所含成分比桑椹、桑枝及桑白皮複雜的多，包括含有多種類黃酮(flavonoids)，如：芸香苷(rutin)、槲皮黃酮(querletin)、異槲皮黃酮(isoquercitrin)等，另外還含有胡蘿蔔素、腺嘌呤(adenine)、膽鹼(choline)、胡蘆巴鹼(trigonelline)、麥角甾醇、維生素 B_1 、糖、鞣質等。目前有9種已知的類黃酮由桑葉中分離出來，最主要為槲皮黃酮及其衍生物。桑葉性味甘、苦，寒。

新鮮桑葉較具活性，中藥店則以乾躁的桑葉作為藥材。桑葉除民間作為飼養蠶的原料及中藥材之外，近年來亦被開發為保健茶飲或美白用品，研究上顯示其能抑制黑色素的形成(51)。市面上可見到科技加工之桑葉茶飲等等。

實驗結果證實其具有抗氧化的功能，並且能清除自由基 DPPH (52)。另外桑葉中還含有三種的植物性抗毒素，具有抗發炎反應的效果(53)。關於桑葉的研究

針對抗高血糖、高血脂及抗氧化的作用上已有文獻證實，例如：以第二型糖尿病人為對象的研究中發現，桑葉能有效的降低血糖及血液中三酸甘油酯、膽固醇的含量，並使高密度脂蛋白 (HDL) 的量增加(54)。而高血糖、高血脂均為動脈粥狀硬化發生的主要原因，因此推測桑葉對於心臟血管疾病具有很好的保健效果。

伍、研究動機

近年來由於飲食習慣及環境改變的種種因素，導致了許多慢性病的高發生率，而其中的致病機轉不外乎與自由基及過氧化物的生成有關(55, 56)。目前許多研究趨向以探討天然物中所含的成份，是否具有預防疾病發生之功能為目的。在許多中草藥典籍上，有許多適用於治療心血管疾病，而如何藉由中草藥之特性與發展，提升動脈粥狀硬化的治療與預防，將是值得我們深入討論的議題，目前許多中草藥的研究，例如：丹參、厚朴酚，還有銀杏的萃取物等，都可降低內皮細胞損傷程度，且在實驗動物模式中證實可以減緩動脈粥狀硬化的發生與進行 (57, 58)。此外，近年來動脈粥狀硬化的發生率不斷升高，現今重大疾病的治療大多採用放射線治療或是投予化學藥物，此兩者皆會對人體造成極大的傷害。現今許多研究趨向以天然藥物來達到其治療的目的，因此本實驗室致力於開發天然物中所含的特殊成份，希望可以由攝取食品來達到預防疾病的發生之目的。

脂質的過氧化傷害，低密度之蛋白的氧化，巨噬細胞所形成之泡沫細胞以及及血管平滑肌細胞的增生與遷移被證實是動脈粥狀硬化發生過程的生成主要原因。在天然物的開發上，利用天然物所萃取物的萃取物作為抗氧化劑來預防低密度脂蛋白的氧化反應是現今廣被大眾所接受有效的抑制動脈粥狀硬化發生的方法。在此我們想利用桑葉所含之豐富的類黃酮及多酚成份之抗氧化的作用，期待桑葉萃取物能夠藉由抑制低密度脂蛋白氧化而達到預防動脈粥狀硬化的發生。因此，我們擬以桑葉水萃取物(MLE) 進行試驗，首先想測試MLE是否可抑制LDL 氧化並介入調控動脈粥狀硬化發生過程中，再進一步評估桑葉多酚萃取物(MLPE) 是否也具有相似之功效。希望由本論文的研究，能夠得到一種天然、安全無毒性並具有醫療藥用價值的化合物，應用於預防或抑制動脈粥狀硬化藥物的發展。

陸、研究架構



巨噬細胞

抗氧化能力試驗.....	}	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>蛋白質氧化修飾</u> Electrophoretic mobility 2. <u>脂質過氧化修飾</u> TBARS formation 3. <u>清除自由基能力</u> DPPH scavenging 4. <u>細胞內ROS</u> 5. <u>抗氧化酵素表現</u>
泡沫細胞生成試驗.....	}	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>細胞毒性試驗</u> MTT assay 2. <u>泡沫細胞生成試驗</u> Oil red stain 3. <u>細胞內脂質的萃取</u> TG content Cholesterol content

血管平滑肌細胞

抑制血管平滑肌細胞增生.....	}	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>細胞毒性試驗</u> MTT assay Cell number counting 2. <u>細胞週期分析</u> Flow cytometry CDK/cyclin, RB/E2F, p53, p21, p16, p19, p27
抑制血管平滑肌細胞遷移.....	}	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>細胞遷移試驗</u> Wound healing Boyden chamber MMP activity 2. <u>機制探討</u> Rac1, RhoA, cdc42, src, NF-κB, FAK, PI3K/Akt,

實驗動物模式

動物試驗-紐西蘭白兔模式.....	}	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Plasma lipid level</u> TG, cholesterol, HDL-c, LDL-c 2. <u>Oil Red stain</u> 3. <u>Immunohistochemistry stain</u> Macrophage – anti-CD68 VSMC – anti-SM α actin anti-PCNA
動物檢體--紐西蘭白兔血管.....	}	<ol style="list-style-type: none"> <u>Immunohistochemistry stain</u> proliferation – anti-PCNA migration – anti-SM α actin

柒、實驗材料與方法

抗體名稱	編號	廠商
Akt1	sc-5298	Santa Cruz
Anti-Goat IgG	A-5420	Sigma
Anti-Mouse IgG	A-9044	Sigma
Anti-Rabbit IgG	A-0545	Sigma
C23	sc-8031	Santa Cruz
Catalase	C-0979	Sigma
CD31	N-1596	Dako
CD36	sc-9154	Santa Cruz
CD68	N-1577	Dako
Cdk4	sc-23896	Santa Cruz
c-Fos	sc-52	Santa Cruz
c-Jun	sc-44	Santa Cruz
COX-2	sc-19999	Santa Cruz
CTGF	sc-14939	Santa Cruz
ERK2	sc-154	Santa Cruz
Glutathione peroxidase 1	LF-PA0019	LabFrontier
iNOS	sc-7271	Santa Cruz
IκBα	sc-847	Santa Cruz
JNK2	sc-7345	Santa Cruz
LDLR	sc-18823	Santa Cruz
NF-κB	sc-109	Santa Cruz
p38	sc-7972	Santa Cruz
PCNA	N-1529	Dako
phospho-Akt ^{ser473}	P-4112	Sigma
phospho-ERK	sc-7383	Santa Cruz
phospho-JNK ^{Thr183/185}	9251	Cell Signaling
phospho-Jun ^{ser73}	9146	Cell Signaling
phospho-p38 ^{Thr180/182}	sc-17852	Santa Cruz
phospho-p53 ^{Ser15}	9284	Cell Signaling
phospho-p53 ^{Ser392}	9281	Cell Signaling
PI3-Kinase	610045	BD Biosciences
PPARγ	sc-7196	Santa Cruz
SOD-1	sc-11407	Santa Cruz
SR-A	sc-20445	Santa Cruz
β actin	A-5441	Sigma

細胞培養藥品	編號	廠商
0.5% Trypsin-EDTA	15400	Gibco
Dil-acLDL	L3484	Molecular Probes, Inc
DMEM	SH30003.01	HyClone
DPBS/modified	SH30013.01	HyClone
EDTA	EDS	Sigma
FBS	26140	Gibco
L-Glutamine	25030	Gibco

MTT	M2128	Sigma
Oil Red O	O0625	Sigma
Paraformaldehyde	P6148	Sigma
PD98059	P215	Sigma
Pen Strep	15140	Gibco
Pifithrin α	P4359	Sigma
Propidium iodide (PI)		Sigma
Ribonuclease A (RNase)	R4875	Sigma
Rosiglitazone	71742	Cayman
Rottlerin	R5648	Sigma
RPMI 1640	31800-022	Gibco
SB203580	S8307	Sigma
Sodium bicarbonate	S5761	Sigma
Sodium Pyruvate	SH30239.01	HyClone
SP600125	S5567	Sigma
Wortmannin	W1628	Sigma

綜合藥品	編號	廠商
1,4-Dithiothreitol (DTT)	F780	Mallinckrodt Baker, Inc
Acrylamide /Bis	501099	MDBio, Inc
Ammonium persulfate	21558	Sigma
CHOLESTEROL liquicolor kit	10019	Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Coomassie Blue		Kenlor Industries, Inc
ECL kit	WBKLS0500	Millipore
Giemsa stain, modified	GS500	Sigma
Glycine	UR-GLY001	UniRegion BioTech
HDL CHOLESTEROL liquicolor kit	10084	Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
IGEPAL CA-630 (NP-40)	I3021	Sigma
LDL CHOLESTEROL liquicolor kit	10094	Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Leupetin	A2183	AppliChem
LightShift Chemiluminescent EMSA kit	20148	Pierce
PMSF	P7626	Sigma
Protein A Sepharose	17-0780-01	GE Healthcare
SDS	0227	Amresco
Sodium chloride	121659	Panreac
Sodium deoxycholate	D1379	Sigma
Sodium orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	S6508	Sigma
TEMED	87690	Fluka

TRIGLYCERIDES liquicolor kit	10724	Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Tris-Base	UR-TRIS	UniRegion BioTech
Triton X-100	T8787	Sigma
Tween 20	P1379	Sigma

儀器	編號	廠商
2 & 3D waver shaker	MW-23	Major Science
48 Well Chemotaxis Chamber	AP-48	Neuro Probe, Inc
Centrifuge	5415 R	Eppendorf
Centrifuge	5415 D	Eppendorf
Centrifuge	2420	Kubota
CO ₂ Incubator	Forma Direct-Heat CO ₂ Incubators	Thermo Fisher Scientific, Inc
Dry bath incubator	MD-01N-110	Major Science
Electronic Balance	B303-S	Mettler Toledo
Electronic Balance	AB204-L	Mettler Toledo
FACSCalibur	FACS101	BD Biosciences
Fluorescence Spectrophotometer	F2000	Hitachi
Homogenizer	Z-1100	Tokyo Rikakikai co, Inc
Luminescent Image Analyzer	LAS3000	Fujifilm
Mini PROTEIN 3 Electrophoresis Cell	165-3301	Bio Rad
Mini Trans-Blot Cell	170-3930	Bio Rad
Nikon epifluorescent microscope	TE300	Nikon
Nikon microscope		Nikon
PowerPac Power Supply	164-5050	Bio Rad
Rotary Evaporators	N-1000S	EYELA
Low Temp. Circulators	CCA-1110	EYELA
Water Bath	SB-1000	EYELA
Spectrophotometer	U3210	Hitachi
Spectrophotometer	U2001	Hitachi
Stirrer/Hot Plate	PC420D	Corning
Ultracentrifuge	TL100	Beckman
UV crosslinker	Select XLE1000	Spectrolics

HPLC 分析儀器	編號	廠商
HPLC System Manager program	D7000	Hitachi
HPLC Intelligent Pump	L6200	Hitachi
HPLC UV-VIS Detector	L4250	Hitachi
HPLC Mightysil RP-18	GP250-4.6 (5 μm)	Kanto Chemical co, Inc

column		
--------	--	--

冷凍乾燥設備		
Vacuum Oven	1465	Shel Lab
BenchTop 2K Freeze Dryer	001	VirTis

捌、實驗方法

一、桑葉萃取物之萃取

1-1. 桑葉水萃取物之製備 (MLE)

取乾燥新鮮桑葉約 100 g 剪碎加 3000 mL 的二次水靜置 1 小時，將水煮沸後，再滾 40 分鐘，待冷卻後，以濾紙 Whatman paper No.1 過濾，於 40 °C 下減壓濃縮，再以真空冷凍乾燥去除水份，得乾燥之萃取物，即為桑葉水萃取物(MLE)。實驗時，以乾燥粉末稱重，配取不同濃度 MLE。使用於細胞實驗操作之桑葉萃取物配製的各濃度溶液需先經 0.22 μm filter 過濾除菌。

1-2. 桑葉多酚萃取物之製備 (MLPE)

取 100 g 乾燥桑葉加入 300 mL 甲醇於 50°C 水浴萃取 3 小時後，過濾，收集濾液，反覆萃取 3~5 次，以減壓濃縮法乾燥之，再以 500 mL 二次水回溶萃取物，加入 200 mL 正己烷，利用分液漏斗混合均勻兩種溶液，靜置隔夜，收集水層溶液。再加入 180 mL 乙酸乙酯萃取溶於水層中的多酚成分，靜置隔夜，收集上層溶液，重覆萃取 3~5 次，利用減壓濃縮乾燥後，最後溶於 250 mL 二次水，經過真空冷凍乾燥後所得之粉末即為桑葉多酚萃取物(MLPE)。在各種細胞實驗之前，將此乾燥粉末溶於 50% 酒精溶液後，再經過 0.22 μm filter 過濾除菌進行後續實驗。

二、MLE 成份分析

2-1. MLE 總多酚含量分析

取 gallic acid、quercetin (5 mg/mL) 以甲醇溶解後，分別製成不同濃度(50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$) 的標準品，各取 20 μL 的不同濃度的標準品以二次水補體積至 1.6 mL，接著加入 2N Folin-Ciocalteu phenol reagent 100 μL 後，再加入 20% Na_2CO_3 300 μL 後混合均勻，在 40°C 下反應 40 分鐘，以 725 nm 測吸光值，同時處理一組以二次水代替標準品同樣進行加 reagent 與加熱步驟的組別進行歸零，以吸光值為結果繪製標準曲線。取 20 μL 待測樣品(濃度為 1 mg/mL) 以相同的方式進行處理，依回歸方程式計算 MLE 與 MLPE 中總多酚類的含量。

2-2. MLE 總類黃酮含量分析

文獻中指出， AlCl_3 乃是針對 Flavone 及 Flavonol 兩類化合物進行衍生化， AlCl_3 可與 C 環中 C3 或 A 環之 C5 及 B 環中 C3' 或 C4' 位置上帶有羥基(-OH) 及 C 環中 C4 位置為酮基之類黃酮物質衍生化，使其於特定波長下具有吸光特性；另外，2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNP) 則是針對 Flavanone 及 Flavanonol 二類物質有較佳的反應，而根據 Nagy 和 Granci 等人所推測，DNP 主要與類黃酮反應之作用位置為醛基或酮基。DNP 僅對 Flavanone 及 Flavanonol 具有作用，而對 Flavonol 及 Flavone 則無法反應呈色，相較其結構，Flavanone 及 Flavanonol 之 C 環的 C2 及 C3 位置呈單鍵型態，而 Flavonol 及 Flavone 之相關位置則呈雙鍵型態，故推測 DNP 無法與之作用的原因大概是由於其立體空間障礙所致 (59)。故本研究即用 AlCl_3 和 DNP 之衍生法，分別進行 MLE 與 MLPE 中總類黃酮物質之測定。

2-2-1. AlCl_3 測定總類黃酮方法

A. 試劑配製

a. 10% AlCl_3 溶液配製

精稱18.09 g 之 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，以蒸餾水定量至100 mL。

b. 1 M CH_3COOK 溶液配製

精稱9.815 g 醋酸鉀，以蒸餾水定量至100 mL。

c. 標準品之配製

精稱標準品Quercetin 10 mg，以80%酒精溶液溶解後，定量至10 mL。再分別予以稀釋40、20 和10 倍，使最後濃度為25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。80% 乙醇之比重為0.9488 g/mL，故標準品之濃度亦相當於26.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、52.7 $\mu\text{g}/\text{g}$ 及105.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

B. 樣品之處理

a. 待測樣品：

取0.5 mL 待測樣品直接進行呈色反應。

b. 標準品(quercetin)：

取0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之quercetin 標準品0.5 mL，進行呈色反應，並繪製標準曲線。

C. 呈色反應

取樣品0.5 mL 加入95% 酒精溶液1.5 mL，再添加10% AlCl_3 0.1 mL 與1 M CH_3COOK 0.1 mL，補水 ddH_2O 2.8 mL 混合後，室溫下靜置30 分鐘，在波長415 nm 下測其吸光值。以二次水 0.5 mL 加入95% 酒精溶液1.5 mL，在不加10% AlCl_3 的情況下，添加1 M CH_3COOK 0.1 mL，補水 ddH_2O 2.8 mL 混合後作為對照組。

2-2-2. 2,4-Dinitrophenylhydrazine 測定總類黃酮方法

A. 試劑配製

a. 2,4-Dinitrophenylhydrazine 溶液(DNP solution) 配製

取1 g DNP 溶於96% 硫酸2 mL，以甲醇定容至100 mL。

b. 氫氧化鉀甲醇溶液(KOH 甲醇溶液) 配製

10 g KOH 溶於30 mL 蒸餾水，並以甲醇定量至100 mL。

c. 標準品之配製

精稱標準品Naringenin 20 mg，以甲醇溶解、定量至10 mL (2 mg/mL)。再分別予以稀釋，使最後濃度為500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

B. 樣品之處理

a. 待測樣品：

取1 mL 直接進行呈色反應。

b. 標準品(naringenin)：

取0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之naringenin 標準品1 mL，進行呈色反應，並繪製標準曲線。

C. 呈色反應

取待測樣品1 mL 加入2 mL 之DNP 溶液及2 mL 甲醇，置於50°C 水浴中加熱50 分鐘。冷卻後加入5 mL KOH 甲醇液混和，室溫下靜置2 分鐘，再取1 mL 混合液至裝有5 mL 甲醇之離心瓶中，振盪後以1108 × g 離心10 分鐘，經過濾後，上清液以甲醇定量至25 mL，並在波長494 nm 下測其吸光值。

2-3. MLE 碳水化合物含量分析

此原理乃根據五碳糖(pentose) 和六碳糖(hexose) 在酸性、高溫的條件之下

會因脫水作用分解成喃甲醛 (furfural)，喃甲醛進一步與酚(phenol) 反應而生成橘黃色產物，最後，以吸光值變化換算出多醣類含量(60)。配製10 mg/mL 之MLE，加入5% phenol 溶液0.5 mL，再加入2.5 mL 濃硫酸混合均勻(待測液：5 % phenol：濃硫酸 = 1：1：5)，於100 °C 水浴20 分鐘，待溫度冷卻後，以490 nm 波長測定吸光值。利用0，10，20，30，40，50 µg/ml glucose 為標準品。

2-4. MLE 蛋白含量分析

蛋白質的定量採用Broadford protein assay 方法，其原理為蛋白質可與Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深代表蛋白質含量越高。取30 µL MLE，加入1 mL Coomassie brilliant blue，在室溫下反應1 分鐘後，以波長595 nm 下測定吸光值，以0，0.2，0.4，0.8，1.6 mg/mL BSA 為標準品。

2-5. MLE 總油脂含量分析

取1 g MLE 粉末加入20 mL 濃鹽酸，75 °C 隔水加熱約50 分鐘，放涼，加入乙醇混合，倒入分液漏斗內，再加入乙醚與之混合均勻，靜置20 分鐘，收集上層溶液，下層溶液反覆進行乙醚提煉步驟數次，直到上清液呈無色透明，將收集起來的上層溶液放置於室溫下待其自然風乾，所得之產物即為MLE 中油脂的部份(61)。

2-6. MLE 定性分析

HPLC 標準品溶液配製

以二次水配製 0.05 mg/mL 標準品，。

HPLC 使用之桑葉萃取物配製

以二次水配製 10 mg/mL MLE 與 MLPE 後，再以 0.22 µm filter 過濾。

HPLC 分析

HPLC 分析條件如下---使用 Mightysil RP-18 GP 250 管柱，動相條件為(A: 2% acetic acid/water , B: 0.5% acetic acid in water/ acetonitrile)，動相梯度為(Time, %B) (5, 30) (50, 35) (55, 40) (60, 100)，流速 1 mL/min，偵測波長 260 nm，注射體積為 10 µL，最後以偵測器進行分析。

三、DPPH 自由基清除效應

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 在甲醇溶液中呈現藍紫色，為一種穩定的自由基，是一種常被使用作為抗氧化指標的實驗。其結構上可以產生穩定的共振結構，當 DPPH 自由基被清除時，呈現顏色會由原先的藍紫色脫色為淡黃色；脫色程度越高，則表示 DPPH 自由基被清除的程度越高。且 DPPH 甲醇溶液於 517 nm 波長下有特定之吸光值(62) 可藉由在 517 nm 下吸光值的減少來代表 DPPH 自由基被清除的程度。取 0.1 mL 桑葉萃取物(0.005-10 mg/mL) 以甲醇稀釋至 4 mL，加入 1 mL 新鮮配製 0.2 mM DPPH 之甲醇溶液，均勻混合靜置 30 分鐘後，以分光光度計於 517 nm 波長下測量吸光值變化。利用此原理可測定出特定物質清除自由基之效力。計算公式如下：

$$\text{scavenging effects (\%)} = \left[\frac{1 - (A_{\text{sample at 517nm}} - A_{\text{blank at 517 nm}})}{(A_{\text{control at 517 nm}} - A_{\text{blank at 517 nm}})} \right] \times 100$$

四、分離人類血中之低密度脂蛋白 (LDL isolation)

取 2 mL 的人類之血清，加入 0.5 M NaCl 及 0.3 mM EDTA (pH 7.4) 的混合

液 0.7 mL，放入 Beckman TL-100 桌上型超高速離心機中，離心 90000 rpm，10°C，10 分鐘，取出下層液 2 mL，再加入 0.5 M NaCl 及 0.3 mM EDTA (pH7.4) 的混合液 700 μ L，離心 90000 rpm，10°C，3.5 小時，取出下層液 2 mL，加入 166.8 g 的 KBr，使其溶解均勻，再離心 90000 rpm，10°C，3.5 小時，收取上層液 0.6 mL，即為分離好的低密度脂蛋白(63)。所得到的 LDL，需再經過 PD-10 column 的處理，將 LDL 中的 EDTA 去除，先以 25 mL PBS 通過清洗 PD-10 column，待其不流動後，再加 2.5 mL LDL，也是待其不流動後，再加 3.5 mL PBS，去掉前 0.5 mL，收取後 3 mL 即為去 EDTA 的 LDL，連續步驟直至 LDL 取完。

五、氧化型低密度脂蛋白的製備 (LDL oxidation)

LDL 先過 PD-10 column 後，再加入 10 μ M CuSO₄ 於 37°C 水浴槽中，一起反應 24 小時，反應後再過一次 PD-10 column 即可得實驗用之 ox-LDL。而 ox-LDL 經蛋白定量將其蛋白量調整為 500 μ g/mL，使依實驗所需之稀釋至最後反應濃度為 50 μ g/mL(64)。ox-LDL 若要加入細胞反應前，須先以 0.22 μ m filter 過濾除菌，以防實驗進行中造成細胞污染，並以 TBARS 法測定 ox-LDL 之氧化值達 4 以上再進行實驗。

六、低密度脂蛋白表面電荷改變試驗

LDL 氧化時，胺基酸序列中的離胺酸(lysine)、組胺酸(histidine) 等，帶正電荷的胺基酸會與氧化後的產物(malondialdehyde, MDA, hexanal, 4-hydroxynoneal, 4-HNE)結合，使得 LDL 蛋白表面正電荷減少，造成負電荷增加的情形。而 LDL 蛋白表面電荷改變的情形，可以利用 LDL 蛋白在膠體中，往正電場移動的相對距離來觀察(65)。在 LDL (100 μ g/mL) 中加入銅離子(10 μ M)來誘導 LDL 形成 ox-LDL，再添加不同濃度的 MLE 或 MLPE (0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mg/mL)，放入 37°C 水浴槽中反應 24 小時。利用 BACKMAN lipoprotein (LIPO) electrophoresis system，取一片已製備好的膠體，用模板濾紙，將多餘的水分吸掉，將紫色板輕輕對準 c 點放下，輕壓紫色板，使其附著在 gel 上，在 10 個 well 各注入 5 μ L 的樣本，靜置 5 分鐘，用長條濾紙小心的放在紫色板上，吸掉多餘的樣本，將長條濾紙和紫色板一起拿掉，將膠體架在電泳槽上，加入適量的電泳液 (6.07 g/500 mL，配置好可置於室溫下 60 天)，以 100 伏特的電壓進行電泳 30 分鐘，然後取出膠體，用專用夾固定好，接著置於固定槽(180 mL 酒精，90 mL 水與 30 mL 冰醋酸混合，可保存七天)，固定 5 分鐘，取出烘乾(需至完全乾)，放入染色槽(染色液：165 mL 酒精與 3 mL paragon Lipo stain，再加上 135 mL 的水混合，可保存七天)，待其染色均勻分佈後，放入脫色槽(脫色液：450 mL 酒精與 550 mL 水混合，可保存七天)，脫色 2 次後，用去離子水沖洗，再烘乾即可。

七、脂質過氧化試驗 (TBARS formation assay)

其原理是利用 LDL 氧化的過程中，會生成過氧化物(malondialdehyde, MDA)，而一分子的 MDA 會與兩分子的 TBA (thiobarbituric acid) 形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，可被偵測到特定的螢光波長(66)。利用 TEP (1,1,3,3-tetramethoxypropane) 為標準品做標準曲線來定量 LDL 被氧化的程度。在 LDL (100 μ g/mL) 中加入銅離子(10 μ M) 來誘導 LDL 形成 ox-LDL，再添加不同濃度的 MLE 或 MLPE (0.05、0.1、0.2、0.5 mg/mL)，放入 37°C 水浴槽中反應 24 小時。再加入等體積 25 % TCA 溶液 (trichloroacetic acid) 將蛋白質變

性沉澱下來，並以 10,000 rpm 在 10°C 下離心 30 分鐘，目的是為了將蛋白質去掉只留下脂質的部分，接著取上清液再加入等體積的 TBA 溶液反應，在避光的環境下以 95°C 加熱 40 分鐘，待其冷卻後，使用 Hitachi F-2000 螢光光度儀於特定波長 Ex/Em_{532/600} 下測定 MDA 產生的量。

八、桑葉萃取物對巨噬細胞毒性試驗 (cytotoxicity assay)

本實驗是用於測試細胞對於桑葉萃取物的感受度是如何，以決定後續細胞實驗所選用桑葉萃取物之劑量。此法是根據 Alley 等人(67) 所研究的結果所設計之實驗，其原理為在有活性的活細胞會將 MTT (thiazolyl blue) 經由粒腺體中 dehydrogenase 作用代謝還原為藍紫色結晶，之後再以異丙醇將結晶溶出，並於波長 563 nm 下測定溶液吸光值變化，由吸光值的大小可得知存活的細胞數目之多寡，而死細胞是無法進行此作用，因此若溶液的吸光值有降低的話，表示細胞有死亡或無法代謝 MTT reagent 的情形。將巨噬細胞 J774A.1 (4×10^5 cell/well) 培養於 24 well culture plate，加入不同濃度的 MLE 或 MLPE (0.5、1、2、3、4 mg/mL) 處理 24 小時後，移除舊的培養基(含萃取物)，加入新的培養基和 MTT (0.5 mg/mL) 反應 4 小時，移除培養基，加入異丙醇將結晶溶出，在波長 563 nm 下測定吸光值的變化。

九、泡沫細胞生成試驗 (foam cell formation assay)

觀察泡沫細胞(foam cell) 的形成，是以油脂染劑—油紅 O (oil-Red O) 將細胞內中性脂肪染成紅色再加以觀察(68)。J774.1 細胞 (1×10^5 cell/well) 在同時處理不同濃度的 MLE 或 MLPE (0.1、0.5、1.0 mg/mL)，以及事先氧化後之 ox-LDL (50 μ g/mL) 24 小時後，將培養液移除，並以 PBS 清洗二次，再以 10% paraformaldehyde 將細胞固定 1 小時。移除固定液，並以 PBS 清洗二次，再以 50% 的異丙醇浸潤片刻，加入 60% oil-Red O 染劑覆蓋細胞，15 - 20 分鐘後移除染劑，以 PBS 清洗三次(15 分鐘/次)。完成上述步驟後，於光學顯微鏡下，觀察細胞內有無被染為深紅色的脂肪油滴，即為泡沫細胞。

染色液配置

油紅(oil red O) 原液：98% 異丙醇 100 mL 加油紅粉末 0.5 g。

油紅使用液：油紅原液 6 容量加水 4 容量，放置約 10 分鐘，過濾紙後使用。

十、細胞內脂質的萃取

觀察桑葉萃取物對泡沫細胞內脂質含量之影響。將 J774.1 細胞 (1×10^5 cell/well) 在同時處理不同濃度的 MLE 或 MLPE (0.1、0.5、1 mg/mL)，以及事先氧化後之 ox-LDL (50 μ g/mL) 24 小時後，將培養液移除，並以 PBS 清洗二次，再以 0.5 mL 之 hexane:isopropanol (3:2, v/v) 萃取細胞內脂質，將脂質萃取物移至玻璃離心管中自然風乾，再以 200 μ L 的 isopropanol 回溶，即可得細胞內脂質萃取液(69)。

10-1. 細胞內膽固醇含量之測定

利用市售之測定膽固醇含量之酵素測定法試劑，測定細胞內膽固醇含量之變化。取 10 μ L 之細胞內脂質萃取液與 1 mL 之試劑混合，於室溫下反應 10 分鐘，於波長 500 nm 下測定吸光值變化，以已知濃度之標準品作對照，計算出細胞內之膽固醇含量，其公式如下：

$$C = 200 \times \Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{STD}} \text{ [mg/dL]}$$

10-2. 細胞內三酸甘油酯含量之測定

利用市售之測定三酸甘油酯含量之酵素測定法試劑，測定細胞內三酸甘油酯含量之變化。取 10 μ L 之細胞內脂質萃取液與 1 mL 之試劑混合，於室溫下反應 10 分鐘，於波長 500 nm 下測定吸光值變化，以已知濃度之標準品作對照，計算出細胞內之三酸甘油酯含量，其公式如下：

$$C = 200 \times \Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{STD}} [\text{mg/dL}]$$

十一、西方點墨法 (western blotting)

11-1. 細胞溶解物 (cell lysate) 之製備

將培養皿內培養液吸走，以 PBS 沖洗細胞二次，細胞收集起後，加入細胞溶解緩衝液(RIPA buffer)，及蛋白質水解酶抑制劑，在 4 $^{\circ}$ C 下震盪 30 分鐘，4 $^{\circ}$ C 高速離心 10,000 \times g，10 分鐘，吸取上清液到新的微量離心管中，儲存在 -70 $^{\circ}$ C。取定量之 whole cell lysate，加水補至固定體積，然後再加入 5 倍追蹤染劑 (loading dye)，混合均勻，以 100 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘，再迅速置於冰上，即可。

11-2. 蛋白質定量

利用 Coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595 nm 下有一較大之吸光值，以此定量蛋白質。首先以 BSA (bovine serum albumin) 為蛋白質標準溶液，以換算個樣本細胞萃取液之蛋白質濃度。取 30 μ L 細胞萃取液加入 1 mL 的 Coomassie blue，在室溫下反應 1 分鐘，於波長 595 nm 下測定吸光值變化。

11-3. 鑄膠

將電泳玻璃片洗淨，擦拭乾淨後，用厚度約 1.00 mm 或 1.50 mm 之 spacer 為間隔裝好電泳片，並架到電泳座上固定，若欲做小分子量之蛋白，則配置 12% 的下層 separating gel；若做大分子量蛋白，則配製 8 - 10% 的 separating gel。配膠所需物質混合均勻後，直到液面離 well 約 1.5 公分處為止，加入二次水覆蓋液面，待膠體凝固後，將上層的二次水吸乾，再配置上層 stacking gel 倒入，將電泳齒梳插入電泳片之 stacking gel 中，若有氣泡則上下移動齒梳，使氣泡脫離 stacking gel，待上層膠凝固後，抽出齒梳，用二次水清洗 well 數次，再將配好之整組電泳玻璃膠體，置入電泳槽中，準備將樣品加到 well 中。

11-4. 蛋白質電泳 (SDS-PAGE)

首先將電泳液(running buffer) 倒入電泳槽內槽中，再把處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出 well，其中一個 well 注入 protein standard marker，樣品 loading 完後，持續加入新的電泳液直到蓋過最內側之玻璃上緣；外槽以回收的電泳液補至蓋過電導線為止。連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 70 伏特的電壓跑過 stacking gel，直至色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電壓為 100 伏特，當色帶跑至底線時才停止電泳。

11-5. 蛋白質樣本之轉漬 (electrotransfer)

電泳完畢後將膠體取出，截去多餘之部份，將膠體置於兩張經轉漬液 (transfer buffer) 潤濕過的濾紙上，膠體上面再放上與膠體大小相同之硝化纖維紙 (硝化纖維紙也需事先經轉漬液浸濕)，再放上兩張經轉漬液浸濕過的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在其中的氣泡，最後再以夾板(內含海綿襯墊)夾緊，放入轉漬槽中，同時要將轉漬槽放在冰上，以固定 300 毫安培轉漬 2 個小時。

11-6. 免疫墨點法 (immunoblotting)

轉漬完後將硝化纖維紙取出，用 TBS buffer 漂洗數分鐘，再以 5% blocking

buffer 於室溫下 1 小時作用。之後，倒掉 blocking buffer，再以 TBS-tween 漂洗三次 10 分鐘。換上一級抗體，置於 4 °C 下，作用 12~16 小時，再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 分鐘。接著，換上二級抗體，於室溫下溫和作用 1 小時，再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 分鐘。最後加入 ECL 顯色，並以冷光儀偵測。

十二、桑葉萃取物對巨噬細胞吞噬 ox-LDL 能力之影響 (phagocytosis)

觀察細胞的巨噬現象(phagocytosis)，並了解 MLE 與 MLPE 對巨噬細胞的吞噬 ox-LDL 能力之影響。根據文獻指出，acLDL 與 ox-LDL 皆屬於修飾後之 LDL，其對細胞的影響相似，故本試驗利用以標記有螢光之 acLDL (Dil-acLDL) 觀察桑葉萃取物對於巨噬細胞吞噬 Dil-acLDL 能力的影響，藉由 Dil-acLDL 的處理，再以 Flow cytometer 的分析，可以看到細胞數目與細胞螢光含量的分佈，進而分析 MLE 與 MLPE 對巨噬細胞之影響。將 J774A.1 巨噬細胞種入 60 mm 培養皿，需八成滿，加入不同濃度的 MLE 或 MLPE 以及含 Dil-acLDL 5 µg/mL 的培養基處理 4 小時後，移除培養基並以 PBS 清洗二次，取細胞專用刮勺，刮下盤內的細胞，使細胞漂浮。再將細胞懸浮液分別移入離心管內，以 1000 rpm 轉速離心 5 分鐘。離心完後將上清液倒掉，以 1 mL PBS 將細胞懸浮均勻，以 Flow cytometer 進行分析(70, 71)。

十三、桑葉萃取物對血管平滑肌細胞毒性試驗 (cytotoxicity assay)

將血管平滑肌細胞 A7r5 (4×10^5 cell/ well) 養於 24 well 培養皿中，加入不同濃度的 MLE 或 MLPE (0.1、0.2、0.4、0.6、1、2、3 mg/mL) 處理 24 小時後，移除舊的培養基(含萃取物)，加入新的培養基和 MTT 試劑 (0.5 mg/mL) 混合反應 4 小時，移除培養基，加入異丙醇將結晶溶出，在 OD 563 nm 下測吸光值的變化。

十四、血管平滑肌細胞增生試驗 (cell proliferation assay)

14-1. MTT assay

將血管平滑肌細胞 A7r5 (4×10^5 cell/ well) 養於 24 well 培養皿中，加入含有 20% FBS 之培養液以促進細胞增生，再以不同濃度的 MLE (0.5、1、2 mg/mL) 或 MLPE (0.2、0.4、0.6 mg/mL) 處理 24 小時後，移除舊的培養基(含萃取物)，加入新的培養基和 MTT 試劑(0.5 mg/mL) 混合反應 4 小時，移除培養基，加入異丙醇將結晶溶出，在 OD 563 nm 下測吸光值的變化。

14-2. Trypan blue 細胞計數

將血管平滑肌細胞 A7r5 (4×10^5 cell/ well) 養於 24 well 培養皿中，加入含有 20% FBS 之培養液以促進細胞增生，再以不同濃度的 MLE (0.5、1 mg/mL) 或 MLPE (0.2、0.6 mg/mL) 處理 24 小時後，利用 .5% trypsin-EDTA 與細胞作用，使細胞從培養皿上脫離，離心 1000 rpm 5 分鐘後，與 trypan blue 染劑以 1: 1 比例混合後，用細胞計數盤計算細胞之數目。

十五、細胞週期分析 (flow cytometry)

Propidium iodide (PI) 能與核酸(包含 DNA 與 RNA) 結合，在以雷射光 488 nm 波長的激發下可放出橘紅色波長的螢光。而流式細胞儀則利用壓力將待測細胞在鞘液的包圍之下呈單行排列，依次通過雷射照射區，由雷射光源激發出 488 nm 波長的光波打在細胞上，會依細胞的不同特性而產生不同的螢光強度與光散射，在雷射光束垂直的 90° 位置收集紅色螢光訊號 (617 nm)，可偵測細胞中染

上 PI 的 DNA 含量。將血管平滑肌細胞 A7r5 (1×10^7 cell/100 mm dish) 加入含有 20% FBS 之培養液促進細胞增生，以不同濃度的 MLE 或 MLPE 後 24 小時，先以 PBS 清洗數次，再利用 0.5% trypsin-EDTA 與細胞作用，使細胞與培養皿脫離，切忌不可用刮的，以免造成細胞死亡，離心去除上清液，重複清洗沉澱物，離心去除上清液，最後取沉澱物即細胞。隨即將沉澱物打散後加入 1 mL 事先保存於 -20°C 的 70% 乙醇固定細胞，最少 12 ~ 16 小時。分析前先將檢體離心去除乙醇，再以 PBS 清洗，離心後取沉澱物。將沉澱物輕彈打散，加入 1 mL 的 PI 染劑(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A、0.1% triton-X 100)，於室溫下染色 15 分鐘，需避光，以流式細胞儀分析，藉此將細胞內不同時期的 DNA 含量以 Cell Quest 軟體作紀錄，並將處於不同細胞週期的細胞數百分比作區別與統計分析，藉以觀察 MLE 與 MLPE 是否具有抑制血管平滑肌細胞增生的能力。

十六、血管平滑肌細胞傷口癒合試驗 (wound healing assay)

藉由 yellow tip 在培養皿中央劃出一道沒有細胞的區域(wound)，來持續觀察細胞增生及遷移的能力，若此區域一直沒有細胞進入，即表示細胞的增生或遷移能力受到了抑制。將血管平滑肌細胞 A7r5 (5×10^5 cell/well) 培養於 6 well culture plate，當細胞密度約八分滿時，加入含有不同劑量的 MLE (0.5、1、2 mg/mL) 或 MLPE (0.2、0.4、0.6 mg/mL) 培養基，並培養於 5% CO_2 、 37°C 的恆溫環境中，每隔 24 小時(0、24、48、72 小時) 以倒立顯微鏡觀察細胞型態，並計數進入 wound 區域的數目，並且隨機選取 5 個視野進行細胞數目的計數。

十七、血管平滑肌細胞移動性分析 (migration assay)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 20% FBS 的培養液；將細胞處理藥物 24 小時後，以 0.5% trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞(5×10^4) 於 upper chamber，待細胞移動 6 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa stain (1: 20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 200 倍顯微鏡下隨機選取 5 個視野，作移動細胞數之統計。

十八、血管平滑肌細胞侵入性分析 (invasion assay)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，事先在薄膜上處理 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Matrigel，並在 laminar flow 風乾 3 ~ 5 小時(視天氣而定)，lower chamber 為含有 20% FBS 的培養液，將細胞處理藥物 24 小時後，以 0.5% trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞(5×10^4) 於 upper chamber，待細胞移動 6 小時後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa stain (1: 20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 200 倍顯微鏡下隨機選取 5 個視野，作移動細胞數之統計。

十九、基質金屬水解蛋白酶活性分析 (matrix metalloproteinase activity)

利用受質(substrate) 與蛋白水解酶(proteinase) 結合的原理，將受質加入 SDS-PAGE 的下層膠中，而電泳後，樣品中所含的蛋白水解酶會根據分子量大小不同而停留在膠體中的特定位置。再利用 triton-X 100 除去 SDS 使蛋白水解酶恢復活性後，蛋白水解酶便可以分解膠體中的受質。當受質被分解後，就不會被蛋白質染劑(coomassie blue) 染上，因此在藍色背景下，蛋白水解酶所在的位置便會呈現白色區域，再根據白色區域的深淺和大小可判斷此蛋白水解酶的活性大

小。將血管平滑肌細胞 A7r5 (1×10^7 cell/100 mm dish) 加入含有 20% FBS 之培養液以促進細胞增生，以不同濃度的 MLE 與 MLPE 後 24 小時，以不含 FBS 的培養液收集細胞分泌的基質金屬水解蛋白酶(MMP) 為樣本，以 5 倍的追蹤染劑與樣本均勻混合後，注入 0.1% gelatin - 8% SDS-PAGE 電泳膠片中，置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，分別以 100 V 的電壓進行電泳分離。待電泳分離結束後，以清潔液(2.5% triton-X 100) 去除 SDS，並在室溫下搖晃 30 分鐘 2 次，然後加入反應液(40 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl_2 , 0.01% NaN_3) 於 37°C 下反應 12 ~ 16 小時，反應完的膠片以染色液(coomassie blue) 染色 30 分鐘，再以脫色液(20% methanol, 10% acetic acid) 退染，觀看結果。

二十、紐西蘭白兔之胸主動脈平滑肌細胞的初代培養 (primary culture of aortic smooth muscle cells)

本實驗採用 2.5 kg 之紐西蘭白兔(New-Zealand rabbit) 之主動脈平滑肌細胞。主動脈平滑肌細胞的初代培養方式是利用酵素作用(collagenase、elastase) 分解細胞週邊組織，以得到相當數量的血管平滑肌細胞。將白兔以耳靜脈注射 sodium pentobarbital (50 mg/kg) 後進行麻醉，待白兔麻醉，將白兔以 75% 酒精消毒體表，固定於解剖盤上，並將其移至無菌操作台中進行解剖，以解剖器具剖開腹腔及胸腔，取出航隔膜以上的胸主動脈，將主動脈浸泡在分離液(isolation buffer, DMEM with 300 unit/ml penicillin and 300 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin) 中。將血管周圍的結締組織與脂肪團塊清除，再移至另一份乾淨的分離液中進一步去除殘餘的血塊與組織碎屑，把血管浸泡在含有酵素作用液 (digestion buffer, DMEM with 2 mg/mL collagenase, 125 $\mu\text{g/mL}$ elastase, 2 mg/mL BSA) 中，於細胞培養箱中反應 10 ~ 20 分鐘(37°C, 5% CO_2)。接著以滅過菌的鑷子剝除血管外膜(tunica adventitia) 後，將血管剪開在浸泡在之前的酵素作用液中作用約 20 ~ 30 分鐘，目的在於去除血管的內皮細胞，以得到位於組織中層的血管平滑肌細胞，接著再將經過處理的血管中層組織至於新的分離液中清洗後，將血管移至新的酵素作用液中，以解剖刀與解剖剪刀將血管分成約 1 mm^3 的小組織，於細胞培養箱中作用約 2 小時。再以微量注射器(pipetman) 將組織團塊與酵素作用液做上下沖吸約 30 次，目的在於將組織團塊分解成更為細小的組織團塊，加入 10 mL 細胞培養液 (culture medium, DMEM with 10 % FBS) 中止酵素作用，接著離心 1000 rpm 轉速離心 10 分鐘，再加入 10 mL 細胞培養液混合後靜置 5 分鐘，取上清液做進一步的細胞培養(73)。每隔三天更換新的細胞培養液，待長滿後以 1: 2 ~ 1: 3 進行一般的細胞繼代培養，後續實驗的細胞代數為 4 ~ 10 代。

二十一、紐西蘭白兔之胸主動脈平滑肌細胞的純度鑑定

將白兔的胸主動脈平滑肌細胞培養至 6 well 中，待細胞生長至一定密度即可進行血管平滑肌細胞的純度鑑定。將培養皿中的細胞培養液移除，以 PBS 清洗細胞後，以 2% formaldehyde 於室溫下固定細胞 3 分鐘，接著將細胞浸泡於含有 0.5% triton-X-100 的 PBS 中 20 分鐘，共 3 次，以 anti-smooth muscle α actin primary 抗體(1: 40, in PBS) 在 37°C 下反應 1 小時，再以含有 0.5% triton-X-100 的 PBS 浸洗細胞 20 分鐘，共 3 次，以去除殘留之抗體。再以 goat anti-mouse-FITC second 抗體(1: 80, in PBS) 在 37°C 避光的環境下作用 1 小時，再以含有 0.5% triton-X-100 的 PBS 浸洗細胞 10 分鐘，共 3 次，以去除殘留之抗體。接著以 0.9% NaCl (in PBS) 浸潤 10 分鐘後，利用 DAPI (1 $\mu\text{g/mL}$, in PBS) 在室溫下反應 10 分鐘染細胞核。最後在以螢光顯微鏡觀察，並紀錄細胞染色的情形。

二十二、高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈硬化症

本實驗模式乃根據先前實驗室之前所建立之模式(72)。概述如下，將 24 隻約 2.5 公斤重之紐西蘭大白兔(New-Zealand rabbit) 分為四組，每籠一隻，每天 150 g diet，飼養於中山醫學大學實驗動物中心，生活週期(light-dark cycle) 維持 12 小時光照、12 小時黑暗，光照時間為早上 6 時至下午 7 時，室溫維持 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。進入實驗前充分供應飼料及飲水。

分組如下：

Group A : Normal control group, Purina Lab Diet 5031

Group B : Induced group, HCD diet

(95.7% Purina Lab Diet 5031 + 3% lard oil + 0.5% cholesterol)

Group C: 1% MLE group, HCD diet + 1% MLE

Group D: 2% MLE group, HCD diet + 2 % MLE

飼養 25 週，誘導兔子產生動脈粥狀硬化發生，同時處理 1% 與 2% 之 MLE，25 週後，動物禁食一夜，以 sodium pentothal (120 mg/kg) 麻醉後放血，血液收集入 EDTA-coated tubes，然後離心，一部份分析血脂肪，包括 cholesterol、triglyceride、HDL、LDL。為分析 MLE 之毒性，血液生化值包括 AST、ALT、BUN、creatinine，也一併分析，做為肝功能、腎功能是否受 MLE 之影響。

麻醉犧牲後，取出實驗動物之主動脈弓(aortic arch) 部份，後浸入 10%中性福馬林固定，以石蠟包埋，以 hematoxylin and eosin 染色觀察病灶。

此外，實驗動物之胸動脈亦由主體小心剝離，並在解剖顯微鏡下將管腔外側之體脂肪小心去除，再以縱切方式將血管剖開，隨後以 oil red O 進行染色，觀察在胸動脈管腔內壁中脂肪斑之沉積與分布。

二十三、Oil red O 染色的樣本製備

將 oil red O (300 mg/dL) 的飽和溶液溶於 99% isopropyl alcohol 中，做為保存溶液。將配置好之 oil red 保存溶液與 PBS 以 6:4 的比例混合後，靜置 10 分鐘之後，離心過濾即可使用。取先前以中性福馬林固定之胸主動脈，用 PBS 洗淨後，以 50% isopropanol 浸泡 5 分鐘，並以 oil red O 浸泡染色 3 分鐘，再以 20% isopropanol 清洗 1 分鐘後，最後用 PBS 將過多的染料洗淨。如果血管內壁有脂肪堆積(fatty streak) 就會被 oil red O 染成紅色，照相後將照片掃描輸入電腦，以電腦程式(Image Pro plus) 計算有脂肪堆積之血管面積的百分比。

二十四、免疫組織染色 (immunohistochemistry stain)

免疫組織化學染色法(immunohistochemistry, IHC) 是利用對蛋白質具有特異性的抗體(如：anti-PCNA, proliferation marker；anti-SM α -actin, SMC marker；anti-CD31, endothelial marker) 及免疫染色技術來達到偵測組織當中異常蛋白質表現變化為目的。從冰箱中拿出冷凍 slide，讓其回溫至室溫，用 SecurelineR pen 標示所有 slide，並置於 PBS 中，再利用 2-3 \times PBS 潤溼 slide，去除冰凍 mounting media (SecurelineR pen 在脫水及清洗 slide 不會掉色)，拭去在樣本周圍過多的 buffer，加 100 μL 已經稀釋好濃度的一級抗體至 slide 上，在室溫下培養一小時，抗體的量依組織的大小而定，利用 PBS 潤溼 slide 三次，每次二分鐘，擦拭 slide，接著加入 100 μL 已稀釋濃度的生物素結合二級抗體，其中二級抗體必須能與 speice 或一次抗體 isotype 相互 match)。在室溫下培養 30 分鐘，利用 PBS 溼潤 slide 三次，每次二分鐘。擦拭 slide，接著加入 100 μL Streptavidin/HRP 到

每個 slide，在室溫下反應 30 分鐘，利用 PBS 溼潤 slide 三次，每次 2 分鐘。置備 DAB (DAB 是種 carcinogen，操作時須小心，最好戴手套)，小心的滴掉 slide 液體並將 slide 置於平面，如果使用 SeguenzaR rack，去除 coverplates，將 slide 置於平面(不要讓 slide 乾掉)，每個 slide 加入大約 400 μ L DAB 溶液，確定所有組織都覆蓋溶液，在 humid chamber 反應五分鐘左右。小心的拿起每片 slide，在紙巾上滴掉多餘 DAB，置於染色架上放入大水盤中。用清水潤濕 slide 三次。

二十五、統計分析

試管外及細胞實驗過程每組皆三重複以上，採用 Student's *t*-test 統計分析，凡 $p < 0.05$ 以下時表示為有意義的差異。

玖、實驗結果

本實驗以新鮮桑葉為材料，萃取其主要成分，並經過分析後得到 MLE 的總多酚含量約有 19.94% (以 gallic acid 與 quercetin 當標準品)，總類黃酮含量約有 3.90% (以 quercetin 與 naringenin 當標準品)，碳水化合物約有 25.43%，蛋白質約佔 2.43% 以及脂肪含量約為 8.40% (Tab. 1)。而 MLPE 的總多酚含量為 47.94%，總類黃酮含量約有 21.67% (Tab. 1)。以 HPLC 分析 MLPE 後之多酚成份後目前已知其主要成分為 protocatechuic acid 3.71%、gallo catechin 1.11%、gallo catechin gallate 10.06%、caffeic acid 2.12%、rutin 5.42%、quercetin 11.7% 與 naringenin 9% (Fig. 1, Tab. 2)。

桑葉萃取物清除自由基之效力

DPPH 為結構穩定的自由基並於 517 nm 波長下有特定之吸光值。當 DPPH 的濃度降低時其吸光值也會隨之降低，利用此原理可測定出特定物質清除自由基之效力。在 *in vitro* 實驗中以 1 mM DPPH 為 positive group，而後在同條件下添入不同濃度的 MLE 或 MLPE 測定各濃度下清除 DPPH 的效力。由實驗結果顯示，MLE 與 MLPE 濃度越高對自由基之捕捉的能力越強，具有劑量依存性關係 (Fig. 2)。

桑葉萃取物抑制體外誘發 LDL 氧化之作用

低密度脂蛋白的氧化指標於本實驗中分為兩方面來討論，即 LDL 蛋白氧化修飾反應(oxidative modifications) 與脂質的過氧化作用(lipid peroxidation)。在實驗上，以蛋白表面電荷改變實驗(LDL peroxidation-related electrophoretic mobility)，來測定 LDL 蛋白氧化修飾程度，而脂質的過氧化作用的指標則以 TABRS 的生成含量變化來表示。

低密度脂蛋白表面電荷改變試驗

LDL 氧化時，蛋白序列中的離胺酸(lysine)、組胺酸(histidine) 等帶正電荷胺基酸的 ϵ -amino group 與氧化產物的醛類如：malondialdehyde (MDA)、hexanal 與 4-hydroxynoneal (4-HNE) 交聯生成 Schiff base 而使 LDL 表面正電荷減少而負電荷增多。而 LDL 氧化後蛋白表面的電荷改變情形，可以用膠體上色帶往正電場移動的距離來判定，以對照組(control group) 色帶移動的位置(EM, electrophoretic mobility) 為 1。在 *in vitro* 實驗中，以 10 μ M 銅離子誘導 LDL 於 37°C 氧化 24 小時後，其色帶移動距離比對照組多了 3.3 倍(Fig. 3)。而在同時添入不同濃度的 MLE 或 MLPE 一起反應後，在 MLE 0.01 mg/mL 濃度下其色帶移動距離為對照組的 3.30 倍，在 MLE 0.05 mg/mL 濃度下其 EM 為對照組的 2.88 倍。此外在 MLE 0.1 mg/mL 濃度下，其 EM 為對照組的 1.67 倍，MLE 0.2 mg/mL 濃度下之 EM 為對照組的 1.53 倍，在 MLE 0.5 和 1.0 mg/mL 濃度下，其 EM 同為對照組的 1.44 倍(Fig. 3)。在 MLPE 0.01 mg/mL 濃度下其色帶移動距離為對照組的 3.62 倍，在 MLPE 0.05 mg/mL 濃度下其 EM 為對照組的 2.20 倍。此外在 MLPE 0.1 mg/mL 濃度下，其 EM 為對照組的 1.45 倍，MLE 0.2 mg/mL 濃度下之 EM 為對照組的 1.34 倍，在 MLE 0.5 和 1.0 mg/mL 濃度下，其 EM 同為對照組的 1.19 與 1.17 倍(Fig. 3)。

由上述實驗結果顯示，有添加 MLE 或 MLPE 的組別，其 EM 皆比 positive group (完全不添加桑葉萃取物，但有加入銅離子誘導的組別) 為低，而顯示出具

有抑制及預防 LDL 氧化的作用。

脂質過氧化試驗 (TBARS formation assay)

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，以此聚合物的吸光值可換算 MDA 濃度。以脂質過氧化之終產物 MDA 生成濃度當作脂質過氧化的指標，如(Fig. 4)所示，單獨以 10 μ M 銅離子處理之控制組，其中 MDA 濃度急速升高，而在同時添入不同濃度的 MLE 或 MLPE 一起反應後，有意義的降低 MDA 的形成，尤其是再添加了 MLE 0.5 mg/mL 的組別，明顯地降低了九成以上的 MDA 生成量。由上述實驗結果顯示，有添加 0.5 mg/mL 以上的桑葉萃取物之組別，其 MDA 的生成量比 positive group 降低近 92~99%，而顯示出 MLE 具有抑制銅離子所誘發之脂質過氧化的作用(Fig. 4)。然而在 MLPE 0.2 mg/mL 組別中，明顯地降低八成以上的 MDA 生成量，更加突顯 MLPE 的保護作用(Fig. 4)。

桑葉萃取物對巨噬細胞之毒性試驗

首先觀察 J774A.1 巨噬細胞對於桑葉萃取物之敏感度為何，以決定後續細胞試驗所須之萃取物劑量。由 Fig. 5 中之結果可以得知，MLE 對於要造成巨噬細胞之致死毒性，所需之劑量相當大(IC₅₀ > 4 mg/mL)，因此後續實驗選用 0.1 ~ 1 mg/mL 之 MLE。而相對於 MLE，MLPE 就顯現出對於巨噬細胞具有一定的作用，經計算 MLPE 對 J774A.1 巨噬細胞的半致死劑量為 0.83 mg/mL，故後續實驗選用 0.1 ~ 0.5 mg/mL 之 MLPE。

桑葉萃取物降低 ox-LDL 所誘導的巨噬細胞內氧化壓力

由結果中得知，ox-LDL 確實造成細胞內的氧化壓力增加，在隨著 MLE 與 MLPE 的加入，可以觀察到細胞內的氧化壓力有所降低，MLE 1 mg/mL 可以降低 ox-LDL 所誘導的氧化壓力 31%，而 MLPE 0.25 mg/mL 即可降低 ox-LDL 所誘導的氧化壓力 38%，MLPE 0.5 mg/mL 則可降低 ox-LDL 所誘導的氧化壓力 41%，而抗氧化藥物 NAC 則為對照組(Fig. 6)。

由上述結果可以得知，MLE 與 MLPE 不僅可以避免 LDL 被氧化，同時也具有降低 ox-LDL 所誘導之細胞內氧化壓力之增加。

有文獻指出，抗氧化酵素在調控脂質代謝的功能上，也扮演一個舉足輕重的角色(74)。接著我們進一步觀察細胞內的抗氧化酵素的蛋白變化，藉以評估 MLE 與 MLPE 是否是透過增加抗氧化酵素來達到降低細胞內的氧化壓力之作用。由結果中可以發現，在 MLE 或 MLPE 處理之下，皆能夠有效增加抗氧化酵素 catalase、SOD-1 與 GPx 的蛋白表現量，而在相同劑量下 MLPE 的效果更為顯著(Fig. 7)。

桑葉萃取物抑制泡沫細胞之生成

泡沫細胞的形成是早期動脈粥狀硬化發生的特徵，所謂的泡沫細胞是指進入血管內膜的單核性白血球趨化而成的巨噬細胞內堆積了大量的膽固醇，大量的泡沫細胞形成會聚集於血管內膜中而形成脂肪斑。巨噬細胞會受 ox-LDL 的刺激下，大量表達清除者接受器(scavenger receptors)而將 ox-LDL 吞噬至細胞內(30)，而主要擔任吞噬 ox-LDL 的 scavenger receptors 為 CD36 與 SR-A (scavenger receptors A)。ox-LDL 均可透過活化一些分子機制而使其大量表達來吞噬 ox-LDL，如 ox-LDL 可活化轉錄因子 PPAR γ 來促使 CD36 大量表達(30)，而這些

scavenger receptors 若表達過多則會間接使巨噬細胞吞噬過量的 ox-LDL 進入細胞內，堆積過量的膽固醇於細胞體內，進而促使巨噬細胞變成泡沫細胞。因此抑制泡沫細胞之生成，可視為降低動脈粥狀硬化發生關鍵指標。

在試管試驗中，我們已然可以得知，桑葉萃取物可有效地預防 LDL 的氧化，避免進一步造成 ox-LDL 的堆積，減少巨噬細胞吞噬後形成泡沫細胞的機會。接著我們再以 J774A.1 巨噬細胞處理是先氧化好之 ox-LDL，觀察是否能夠成功誘導泡沫細胞之生成。由 Fig. 8 中可以明顯觀察到，在細胞內部有呈現大量的由 oil red O 染劑所染上之中性脂肪堆積的現象，相較於正常組中，卻不見任何的紅色顆粒堆積，可知我們成功地誘導泡沫細胞之形成。而在 ox-LDL 刺激下，細胞同時處理不同濃度之 MLE 或 MLPE (0.1 ~ 1 mg/mL) 後，可以觀察到巨噬細胞內所堆積的紅色顆粒之銳減的情形(Fig. 8)。

由於 oil red O 在波長 510 nm 下有一明顯之變化，因此我們利用異丙醇將培養皿中的染劑溶出，並在波長 510 nm 下，求得相關的定量數據。由結果可知，MLE 與 MLPE 在 0.1 mg/mL 下，即可有效降低泡沫細胞之生成，而 MLE 在 1 mg/mL 下效果更好，相對的，MLPE 在 0.5 mg/mL 即有相似的作用出現(Fig. 8)。由此可知，桑葉萃取物能夠有效抑制泡沫細胞之生成，進而減緩動脈粥狀硬化之發生。

桑葉萃取物抑制細胞脂質之堆積

在 ox-LDL 的誘導下會刺激巨噬細胞過量吞噬 ox-LDL，使得細胞內大量堆積原先存在於 LDL 當中的膽固醇與三酸甘油酯，因而形成充滿脂質的泡沫細胞。再給予不同濃度之 MLE 或 MLPE (0.1 ~ 2 mg/mL) 後，觀察細胞內脂質含量之變化。由結果得知，在 oxLDL 的誘導之下，細胞內的膽固醇含量增加了 2.5 倍，而在有桑葉萃取物的保護下，有效地降低了細胞對膽固醇的過量攝取 (Fig. 9)。相同的效果也出現在細胞內的三酸甘油酯變化上，ox-LDL 誘導 J774A.1 細胞內的三酸甘油酯增加至將近正常組的 2 倍，而在 MLE 與 MLPE 的保護下，同樣也抑制了細胞對於三酸甘油酯的過量堆積 (Fig. 10)。這些數據同樣說明了 MLE 與 MLPE 皆能夠有效地抑制細胞過量攝取脂質，進而降低了泡沫細胞形成之機會。

桑葉萃取物抑制巨噬細胞之吞噬能力

巨噬細胞在生物體內扮演清道夫的角色，故其本身即具有強大的吞噬能力，也因為如此，巨噬細胞才能再血管內膜當中吞噬過量的 ox-LDL，因而轉變形成泡沫細胞。故我們接著利用巨噬細胞會吞噬外來物質的特性，利用以標記螢光的 acLDL 來觀察桑葉萃取物對於影響巨噬細胞吞噬 ox-LDL 能力之情形，也藉由此試驗，間接證明 MLE 與 MLPE 是否能透過抑制吞噬作用來達到調控泡沫細胞的生成。而利用流式細胞儀將細胞所吞噬的 Dil-acLDL 加以定量，可以觀察到 MLE 與 MLPE 確實有效地減少細胞內的所吞噬 acLDL (Fig. 11)，說明著桑葉萃取物確實能夠抑制細胞的吞噬作用，而也藉由此試驗間接證明桑葉萃取物能透過抑制吞噬作用來達到調控泡沫細胞的生成。

因為沒有人類的巨噬細胞細胞株，所以我們利用 TPA 誘導人類的單核球細胞 THP-1 進行分化，以試驗 MLE 與 MLPE 對於人類巨噬細胞株吞噬 ox-LDL 的影響(71)。首先利用 200 nM TPA 誘導 THP-1 分化成巨噬細胞，THP-1 經 TPA 誘導後會由懸浮的細胞分化形成貼壁的巨噬細胞型態，利用此依特性進行試驗，

取貼壁的細胞添加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Dil-acLDL 於培養基中，在同時處理不同濃度的 MLE 或 MLPE 再利用流式細胞儀將細胞所吞噬的 Dil-acLDL 加以定量。由結果中可以發現，MLE 與 MLPE 確實可以降低分化後的 THP-1 吞噬 Dil-acLDL (Fig. 12)，再一次證實 MLE 與 MLPE 確實具有避免巨噬細胞吞噬過量的 ox-LDL 之能力，進而減緩動脈粥狀硬化的發生。

桑葉萃取物抑制泡沫細胞生成之機制探討

泡沫細胞(foam cell)的形成是由於巨噬細胞吞噬過多的LDL，導致細胞內囤積過量的膽固醇(cholesterol)所造成的結果，也由於巨噬細胞無法限制對膽固醇的吞噬，因此巨噬細胞具有一套讓膽固醇流出的機制，減少細胞成為泡沫細胞的機會(75)。根據文獻指出，巨噬細胞表面帶有獨特之清道夫接受器(scavenger receptors, SRs) 與動脈粥狀硬化(atherosclerosis)的發展有相當密切的關聯性，其中以the type A scavenger receptor (SR-A) 與the type B scavenger receptor (CD36) 最為重要。此外，巨噬細胞另具有膽固醇逆轉運輸體系統(reverse cholesterol transporters)，可透過ABCT (ATP-binding cassette protein) 或the class B type I scavenger receptor (SR-BI) 進行膽固醇逆轉運輸的動作(reverse cholesterol transport)，將膽固醇送出細胞體外，避免成為泡沫細胞並降低動脈粥狀硬化的發生(75)。因此調控巨噬細胞內膽固醇進出之機制，對於影響泡沫細胞的形成，與動脈粥狀硬化的發展來說相當重要。

巨噬細胞的細胞膜上，平時就有常態表現低密度脂蛋白接受體(LDL receptor)，可將未經修飾的低密度脂蛋白(native LDL) 吞噬，並透過與脂蛋白(apolipoprotein A- I, apoA- I) 或高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL) 結合將膽固醇送回肝臟做進一步的代謝。另外，當巨噬細胞辨識到有修飾過後的低密度脂蛋白(modified LDL) 出現的時候，則會透過SRs 的幫助將modified LDL 做進一步吞噬。近年來，透過分生的技術將巨噬細胞細胞膜上的SRs 逐一辨識，並根據其蛋白結構而分為8 大類，每一類都可辨識不同修飾的modified LDL，其中又以SR-A 和CD36 對泡沫細胞 形成的影響最大。

SR-A 於1979 年首次發表，是首度發現在巨噬細胞上可和modified LDL 有連結，並幫助吞噬modified LDL 的分子(76)，又可分為I、II 和III 等3 種亞型，而經由許多分析發現，SR-A 與帶陰電性(polyanionic) 的大分子均可結合，包括乙酰化低密度脂蛋白(ac-LDL)、氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)、polyribonucleotide、細菌性脂多糖(LPS) 等(77-80)。在人體動脈硬化斑中的泡沫細胞發現SR-A I 和SR-A II 的大量表現，顯示其與動脈粥狀硬化的相關性(81, 82)。在apoE^{-/-} 或LDLR^{-/-} 的研究模式下，若再將SR-A 表現剔除，將可減少20 – 60% 動脈粥狀硬化的發生(12, 83)。

CD36 屬於B 型清除接受體，是一個表現於細胞膜上，分子量大小約88 kDa 的糖蛋白，分布於血管內皮細胞、平滑肌細胞及巨噬細胞等細胞膜上(84, 85)，具有可辨識並連結ox-LDL 的功能區塊(domain)，因此其主要功能為幫助巨噬細胞辨識並吞噬ox-LDL(86)。而在CD36 和apoE 同時剔除的動物模式下，其主動脈所產生的動脈斑的面積約可減少76%，且巨噬細胞所吞噬的ox-LDL 也可降低60% (87)。由此更可確立CD36 和ox-LDL之間的關聯，以及對於動脈粥狀硬化的影響。目前已知，M-CSF 與某些cytokine 可誘導SR-A 蛋白表現量增加(88)，當細胞受到M-CSF 的刺激，會引發蛋白激酶C (protein kinase C, PKC) 的活性上升，進而促使轉錄因子AP-1 活化，使SR-A 蛋白量表現增加(89)；另一方面，SR-A

的表現也會受到過氧化物增殖體活化受體 γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR γ) 的影響(90)。然而，CD36 的表現則受到PPAR γ 的調控，而增加其蛋白量的表現。當細胞受到ox-LDL 等分子的刺激，會促使絲裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 訊號的活化，而活化PPAR γ 並和視黃醇類X 接受體(retinoid X receptor, RXR) 形成異型雙體(hetero-dimer) 進入細胞核作用，增加CD36 蛋白量表現(30, 66)。

為了釐清桑葉萃取物是透過調控何種分子機轉，進而抑制泡沫細胞之生成，接下來以西方點墨法分析，在以 ox-LDL 所誘導的情況下，同時伴隨 MLE 與 MLPE 的處理，泡沫細胞中相關蛋白的變化。

首先觀察位於巨噬細胞表面的清除者接受器(scavenger receptors) 表現是如何，結果看到，再有 ox-LDL 的刺激之下，清除者接受器無論是 CD36 亦或是 SR-A 蛋白，皆可明顯看到比正常對照組高上許多，顯示 ox-LDL 成功地誘導清除者接受器大量表現，但是在伴隨著 MLE 或 MLPE 的處理之下，兩種清除者接受器的蛋白表現皆有顯著地下降，意謂著 MLE 或 MLPE 是透過降低清除者接受器的蛋白表現，使巨噬細胞無法吞是過量的 ox-LDL，因而無法形成泡沫細胞，藉此達到減緩動脈粥狀硬化之發生(Fig. 10)。

ox-LDL 可透過活化巨噬細胞內的一些分子機制，而使清除者接受器大量表達，進而吞噬 ox-LDL，如 ox-LDL 可活化轉錄因子 PPAR γ 來促使 CD36 大量表達(30)。因此我們觀察轉錄因子 PPAR γ 蛋白表現量的情形，發現在 ox-LDL 刺激之下，PPAR γ 並沒有顯著的改變，但是在同時處理 MLE (0.1 ~ 1 mg/mL) 或 MLPE (0.1 ~ 0.5 mg/mL) 的情況下，PPAR γ 的蛋白表現明顯地降低了許多，說明 MLE 與 MLPE 可透過調控 PPAR γ 的蛋白表現，進而影響清除者接受器的表達(Fig. 14)。

所以我們接著使用 PPAR γ 的 agonist (Rosiglitazone, RSG) 來驗證 MLE 與 MLPE 對於調控巨噬細胞吞噬 acLDL 作用之影響。由結果發現在單獨使用 RSG 的情況下，RSG 能夠透過活化 PPAR γ 來達到提升巨噬細胞吞噬更多的 acLDL，相對的在使用 PPAR γ 的 antagonist (GW9662) 時則會降低 PPAR γ 的活化，進而減少 acLDL 的攝入(Fig. 15)。而在有 RSG 的情況下同時使用 MLE 或 MLPE，則會因為 MLE 與 MLPE 的作用，降低的 RSG 所誘導的 acLDL 的吞噬(Fig. 15)，進一步驗證 MLE 與 MLPE 確實是透過降低 PPAR γ 的活化來達到減緩 ox-LDL 所誘導的 foam cell 產生。

欲探究 MLPE 中何種成分是主要調控巨噬細胞吞噬 ox-LDL 的能力，我們緊接著再利用 HPLC 所分析出目前已知 MLPE 的多酚成份，去評估何種單一成份最有效，由結果發現，以 ECG、EGCG 與 GCG 的效果最為顯著，另外 quercetin 也具有相當程度的抑制作用(Fig. 17)，而根據 MLPE 的 HPLC 成分分析結果中顯示，MLPE 也是以 GCG 與 quercetin 含量最為豐富(Fig. 1, Tab. 1)，故推測是 GCG 與 quercetin 的作用，但詳細的機轉是否與 MLE 或 MLPE 相似尚待進一步的分析與研究。

桑葉萃取物抑制平滑肌細胞的增生

動脈粥狀硬化的發生為一連串複雜且漸進式的一種致病過程，在正常的動脈血管壁中，其內皮細胞與平滑肌細胞的增生與死亡維持很低的比率來置換，但在疾病狀況下，血管平滑肌細胞(VSMC) 會不斷的複製增生，而使血管壁增厚進而移動到 intima 或 subendothelial 中，此便是動脈硬化斑(plaque) 形成的原因之

一。若能在動脈粥狀硬化初期抑制平滑肌細胞的異常增生和移動，則可避免動脈硬化斑的形成，是一個可以減緩動脈粥狀硬化生成的方法。

透過之前的結果顯示，MLE 與MLPE 皆具有良好的抗氧化能力及抑制泡沫細胞生成之能力，而在動物實驗當中也證明MLE 具有降低動脈粥狀硬化發生的能力，但是MLE 能夠抑制動脈粥狀硬化發生的能力是否尚存在其他的機制，則需要進一步實驗去證明。

平滑肌細胞是構成大型血管的主要細胞，目前已知的證據顯示，在許多的心血管相關疾病的形成過程中，巨噬細胞會釋放大量的細胞激素(Th1、Th2 cytokines) 而促使一連串的免疫反應的發生(32)，造成周圍的血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cell, VSMC) 同樣表達生成IL-1、TNF α 等因子，而這些分子的生成會刺激血管平滑肌細胞的增生，並轉移至intima 或subendothelial 當中。由此可知，平滑肌細胞往血管內層的移動和增生是造成血管內層增厚的主要原因。因此，我們接下來便要探討，MLE 與MLPE 是否具有抑制血管平滑肌增生與遷移之作用。所以後續的實驗中將著重於血管平滑肌細胞(A7r5) 的增生和移動之作用。

桑葉萃取物對血管平滑肌細胞的毒殺效果

首先觀察 A7r5 血管平滑細胞對於桑葉萃取物之敏感度為何，以決定後續細胞試驗所須之萃取物劑量。由 Fig. 25 中之結果可以得知，MLE 造成 A7r5 細胞之致死毒性，所需之劑量約為 $IC_{50} = 2.45 \text{ mg/mL}$ ，因此後續實驗選用 $0.5 \sim 2 \text{ mg/mL}$ 之 MLE。而相對於 MLE，MLPE 就顯現出對於 A7r5 細胞具有一定的作用，經計算 MLPE 對 A7r5 細胞的半致死劑量為 0.54 mg/mL ，兩者之結果皆呈現高度之劑量依賴性(Fig. 19)。

然後我們為了要模擬 VSMC 大量增生與遷移的狀態，所以我們利用含有多種生長因子(growth factor)，且又富含細胞生長必要物質的 FBS 做為我們的催化劑，誘導 VSMC 產生細胞增生與遷移作用的產生。首先我們利用 20% FBS 與 MLE 或 MLPE 共同處理細胞，由結果可以發現，原本 MLE 與 MLPE 在 $1 - 2 \text{ mg/mL}$ 劑量下是具有抑制細胞生長的能力，但是在伴隨著 20% FBS 處理下，細胞的存活率有顯著地提升，且均高於 50% 的細胞存活率(Fig. 19)，為了有別於觀察 MLE 與 MLPE 是否具有不同於誘導細胞死亡的機制，也為了避免使用對於其他細胞具有毒性的劑量，故後續實驗選用不會造成 A7r5 細胞死亡的劑量進行實驗。

桑葉萃取物抑制血管平滑肌細胞之生長

由前面結果已知桑葉萃取物對於血管平滑肌細胞(A7r5) 具有些許毒殺作用，所以進一步觀察桑葉萃取物是否也會抑制動脈平滑肌細胞的增生作用。以 20% FBS 誘導細胞增生作用後，經結果發現 24 小時後，MLPE 0.2 與 0.4 mg/mL 的劑量即能有效地抑制細胞之增生數量，而 MLPE 0.4 mg/mL 的抑制作用能夠持續到 48 小時尚有效，而當時間到 72 小時後，已可見到細胞的數量有慢慢地增加，顯示 MLPE 確實可以減緩細胞之生長速度(Fig. 21)。

另外在細胞計數的分析當中證實，在 20% FBS 所誘導之下，確實造成 A7r5 細胞的數量有所增加，而在同時處理 MLE 1 mg/mL 或 MLPE 0.2 或 0.6 mg/mL 的劑量下，皆能夠有效降低細胞增生的數目(Fig. 22)。由上述的結果證明，MLE 與 MLPE 確實具有能夠降低 A7r5 細胞的增生作用之能力。

桑葉萃取物誘導血管平滑肌細胞之細胞週期停滯作用

在流式細胞儀分析結果發現，starvation 狀態下，大部份細胞處於G0/G1 arrest 約有80.32%，而在以20% FBS 誘導增生的組別中僅有49.82% 處於G0/G1 時期，隨著加入的MLE 劑量提高，G0/G1 時期則有增加的趨勢，分別約為62.61%、75.76% 及78.49%，而當處理MLPE 時，則發現到抑制的效果更為明顯，其細胞數約為78.59%、79.34% 及82.72% ，上述的結果再一次驗證桑葉萃取物 (MLE 與MLPE) 確實能夠透過誘導血管平滑肌細胞之細胞週期停滯作用，來達到抑制細胞生長之作用，結果也呈現高度之劑量依賴性(Fig. 23)。而在隨著不同時間所分析的細胞週期變化當中也證實，MLE 與MLPE 確實具有誘導血管平滑肌細胞之細胞週期停滯作用之能力(Fig. 24)。

桑葉萃取物抑制平滑肌細胞移動能力

利用較低的劑量(不造成細胞死亡的劑量下)來分析MLE 與MLPE 抑制血管平滑肌細胞轉移(migration) 與浸潤作用(invasion)。

桑葉萃取物抑制血管平滑肌細胞的傷口癒合

藉由yellow tip 在培養皿中劃出一道所謂的“傷口”來持續觀察細胞增生的能力。採用加入正常medium 並且處理處理MLE 或MLPE 之組別進行測試。細胞分別加入不同濃度的MLE：0.5、1.0 或2.0 mg/mL 於37°C、5% CO₂ 培養，每隔一段固定時間(分別是0、24、48、72 小時)，將細胞以倒立顯微鏡在100 倍下觀察傷口癒合的情形；並拍照計數爬進傷口的細胞數量。結果得知，A7r5 細胞正常在72 小時後會將缺口癒合。在處理MLE 組別方面，24 小時後，處理較低劑量的MLE 組別，細胞已有移動的現象，然而在72 小時可以看出1.0 mg/mL MLE 已有抑制細胞移動的能力，但是MLE 2.0 mg/mL 效果更為顯著(Fig. 27)。而MLPE 的組別中可以發現在MLPE 低劑量(0.2 mg/mL) 即能夠有效地抑制細胞的移動能力(Fig. 27)，由傷口邊緣處的平整度和量化傷口內的細胞多寡可以得知在較高劑量的兩組別中期細胞幾乎沒有移動(Fig. 27)。

桑葉萃取物抑制血管平滑肌細胞的轉移能力

為了更進一步的確認傷口癒合的發現是抑制細胞的轉移能力而不是抑制增生或者是造成細胞死亡的現象，在此利用了Boyden chamber assay 來加以驗證。首先，以MLE 處理細胞48 小時後，將細胞以trypsin 打下來，以trypan blue 計數活細胞後，在Boyden chamber 下層放置20% 血清之培養液做為趨化物，經過6 小時的反應時間後收集物中間的濾膜加以染色，利用倒立顯微鏡在100 倍下觀察細胞移動情形並且計數有多少的細胞能夠移動到下層。結果發現，以下層 放置starvation medium 之組別為negative control (此組別細胞幾乎不會移動到下層)，以無添加MLE 的細胞而下層放置含有20% FBS 之組別作為誘導之對照組(細胞移動的能力很強)，當處理MLE 時，可以觀察到隨著MLE 劑量增加，細胞移動的能力受到明顯的抑制。且由量化的結果發現，在MLE 1.0 mg/mL 處理下就已具有抑制43.42% 的細胞轉移(Fig. 28)。而在以MLPE 處理下，則可以發現到低劑量MLPE 0.2 mg/mL 就有顯著地抑制細胞轉移達到88.01% 以上(Fig. 28)。而在研究細胞浸潤作用時，可以發現到，在MLE 1.0 mg/mL 的組別就能夠有效抑制65.99% 以上的細胞之浸潤作用(Fig. 28)，相對的，MLPE 的作用更為顯著，在MLPE 0.2 mg/mL 的劑量處理下，則有86.43% 的抑制效果，顯示桑葉萃取物(MLE 與MLPE) 對於抑制細胞的轉移作用上具有相當大的潛力。

桑葉萃取物抑制初代培養的胸主動脈平滑肌細胞之移動能力

接著我們利用初代培養的大白兔胸主動脈平滑肌細胞做試驗，評估 MLE 與 MLPE 對於不同的血管平滑肌細胞的影響，首先我們利用 SMC 特有的 SMC actin 證明我們所 primary culture 的細胞確實是血管平滑肌細胞(Fig. 38)。然後我們利用 Boyden chamber assay 評估 MLE 與 MLPE 的抑制作用，結果發現，MLE 與 MLPE 確實能夠抑制 SMC 的 migration (Fig. 38)，此部分的結果也可呼應之前的動物實驗，證明 MLE 確實具有抑制主動脈平滑肌細胞的遷移作用(Fig. 28)。然而，MLE 與 MLPE 是透過何種路徑或機制來達到抑制血管平滑肌的增生與遷移作用，尚需要更進一步分析。

MLE 對於 HCD 所誘導兔子產生動脈粥狀硬化症之影響

在上述的結果中，證實 MLE 與 MLPE 具有保護 LDL 避免被氧化之作用，同時也具有降低 ox-LDL 所產生之氧化壓力，進而抑制泡沫細胞之產生，說明著 MLE 與 MLPE 具有降低動脈粥狀硬化產生之潛力，因此，我們進一步利用實驗動物模式分析 MLE 是否具有抑制動脈硬化的作用。

兔子是最早的研究動脈粥樣硬化之實驗動物模式。其病變呈現血管位置和人不同。但是餵飼含有高脂肪、低膽固醇飼料及注射外來蛋白質，在動脈可發生與人相似的病變。其大多脂蛋白代謝部分與人體相似。目前最常使用的為紐西蘭白兔(NZW rabbit) 與家族性高血脂實驗兔(WHHL rabbit)。

一般而言，在飼育之過程中日常飲食混合入 0.5% 之膽固醇，連續 10 - 12 週後幾可觀察出在實驗白兔主動脈弓及腹主動脈處有病灶生成。若提高或降低飼料中 cholesterol 含量即可模擬出更為接近人類病灶之病程。因此，有大部分研究動脈硬化之實驗，喜歡選用 NZW rabbit 為試驗動物。NZW rabbit 之動脈粥狀硬化病灶的初期產生方式並無差異，但除早期病灶(foam cell、脂肪斑塊等) 與人體相似外，但在晚期病灶的型態(如纖維化斑塊、血栓) 則是與人類病灶不同(91)。而至今，雖有基因轉殖鼠的出現，但在開發動脈硬化症相關藥物與發展保健食品方面，實驗用白兔依舊為一般實驗室的首選。

MLE 對於高膽固醇飲食誘導兔子動脈硬化之血脂質影響

我們利用高膽固醇飲食誘導兔子 25 週後，誘導組之血清 triglyceride，較正常組上升約 1.17 倍，但在額外給予 MLE 之組別，1% MLE 組與誘導組相較下降了 33%，2% MLE 組將低了 41%，且都有統計上的意義 ($p < 0.05$, Tab. 3)。

在 cholesterol 方面，在試驗過程中，正常組為 169.80 ± 112.45 mg/dL，在經由高膽固醇飲食誘導下，誘導組較正常組上升 6 倍，上升至 1304.67 ± 181.18 mg/dL，而在給予 MLE 之組別下，1% 的 MLE 的給予下血中 cholesterol 為 697.40 ± 101.24 mg/dL，而當劑量提升為 2% 之 MLE 後，試驗組之血中 cholesterol 為 515.00 ± 112.46 mg/dL，與誘導組相較下皆有下降的趨勢，01% 的 MLE 約有抑制血脂上升約 46%，2% 的 MLE 約有抑制血脂上升約 60%，上升的趨勢皆有被明顯的抑制，且具統計上的意義(Tab. 3)。

在 LDL-C 方面，在試驗過程中，正常組為 57.31 ± 3.88 mg/dL，在經由高膽固醇飲食誘導下，誘導組較正常組上升 8 倍，上升至 547.00 ± 90.74 mg/dL，而在給予 MLE 之組別下，1% 的 MLE 血中 LDL-C 為 430.50 ± 90.56 mg/dL，而當劑量提升為 2% 之 MLE 後，試驗組之血中 LDL-C 305.66 ± 76.17 mg/dL，與誘導組相較下皆有下降的趨勢，1% 的 MLE 約有抑制血脂上升約 21%，2% 的 MLE

約有抑制血脂上升約 44%，則上升的趨勢有被明顯的抑制，且具統計上的意義 (Tab. 3)。

但是在針對 HDL-C 方面，正常組為 27.43 ± 5.37 mg/dL，在經由高膽固醇飲食誘導下，上升至 78.83 ± 15.32 mg/dL，而在給予 MLE 之組別下，1% 的 MLE 的血中 HDL-C 為 98.16 ± 9.45 mg/dL，而當劑量提升為 2% 之 MLE 血中 HDL-C 為 121.66 ± 12.19 mg/dL (Tab. 3)。

在危險因子方面，正常的試驗動物 LDL-C /HDL-C 的比值為 1.21，而經由高膽固醇飲食誘導之試驗組下，誘導組 LDL-C /HDL-C 的比值為 7.41，在給予 MLE 之組別下，1% 的 MLE 的給予下 LDL-C /HDL-C 的比值為 4.35，而當劑量提升為 2% 之 MLE 後，試驗組之 LDL-C /HDL-C 的比值為 2.55，與誘導組相較下皆有下降的趨勢 (Tab. 3)。

MLE 對於高膽固醇飲食誘導產生兔子動脈硬化斑之影響

在藉由高膽固醇所誘導的兔子動脈硬化症上，我們選取兔子的胸主動脈進行分析，發現在主動脈內層的表面，正常組的試驗動物，並沒有發現有 atherosclerosis lesion 的產生 (Fig. 35)。而在藉由高膽固醇誘導的誘導組則發現有明顯的脂肪斑沉積，利用定量的分析下佔據胸動脈內層表面積約 80%。而在飼料中給予 MLE 1%、2% 後，胸動脈內層表面積的脂肪斑則為 25%、18%，皆有顯著的抑制病程的發展 (Fig. 35)。由此可知，MLE 確實可以有效的延緩動脈粥狀硬化的發展，並可以減少動脈硬化沉積。

MLE 對於高膽固醇飲食誘導兔子動脈硬化之病理切片觀察

接著我們選取試驗動物的主動脈弓部分，進行病理切片分析，觀察 foam cell 的分佈及病灶上平滑肌細胞及微觀的變化。在病理的分析下，正常組的血管壁中，並沒有發現有 foam cell 的形成，也沒有發現到有 smooth muscle cell 的位移。在誘導組方面，我們明顯的發現，誘導組的病理切片上發現有顯著的 foam cell 堆積，且動脈內層的厚度也有變厚並發現有 smooth muscle cell (SMC) 位移的現象 (Fig. 36)，進一步利用 SMC α actin 驗證血管平滑肌的分布狀態，發現在 HCD 所誘導下，SMC 確實有大量增生造成血管壁增厚，以及有 SMC 位移至動脈脂肪斑的情形，同時給予 MLE 餵食後確實有降低 SMC 的增生與位移現象 (Fig. 39)。然後增生標記 PCNA 的免疫組織染色也說明在脂肪斑塊附近的細胞有大量表現的情形，說明次區域的細胞正處於高度增生的狀態，而在同時給予 MLE 餵食後確實有降低 SMC 的增生作用 (Fig. 40)。在血管壁的表層部分，我們利用受損的內皮細胞滲透率較高的特性，使用 Evan Blue 染劑，證明在 HCD 誘導下，確實造成血管內皮細胞的受損 (Fig. 41)，而在內皮細胞的 CD31 免疫組織染色中也發現到，在脂肪斑塊上的內皮細胞數量確實較少，顯示管壁有出現內皮細胞受損的現象，而同時給予 MLE 餵食後，內皮細胞受損的情形皆有所改善，且主動脈內層的厚度也明顯的低於誘導組 (Fig. 42)。

拾、討論

桑葉本身具有解熱、抗高血壓、治療肝病的效果；而科學家進一步研究發現桑葉的萃取物，對於預防癌症、動脈粥狀硬化、幫助消化以及抗老化、抑制自由基活動具有相當的功效。而桑葉所含的成分存在相當多種的天然抗氧化劑。而桑葉中以多酚類 (polyphenolic acid) 的抗氧化物居多，這些成分能藉由清除活性氧、氮化合物、過度性金屬離子的螯合作用，達到保護低密度脂蛋白，避免發生脂質過氧化的情形。脂質的過氧化及低密度之蛋白的氧化被證實是動脈粥狀硬化發生過程的致病因子，由實驗結果顯示我們所製備的桑葉萃取物具有抑制 LDL 被氧化的能力，不論在 LDL 的蛋白氧化修飾或脂質過氧化作用，由各實驗結果來看 MLE 在 0.1 mg/mL 濃度下即可達到抑制 LDL 氧化的作用。而桑葉萃取物在本實驗中，具有顯著地抑制 LDL 氧化的效果，明顯地阻止了銅離子促進氧化作用時生成的自由基，防止自由基對 LDL 的氧化攻擊。已有文獻指出在動脈粥狀硬化的過程中，LDL 的氧化作用是造成這個病症發展的主要原因(92)。而由清除自由基的試驗中(DPPH bleaching assay)，發現 MLE 具有清除自由基的功能，表示其具有保護 LDL 不受由銅離子促氧化作用生成的自由基攻擊之作用，而可抑制 LDL 氧化。因桑葉萃取物具有抑制 LDL 氧化的效力，將可預期其具有抑制動脈粥狀硬化發生之作用。

降低或減緩巨噬細胞轉形為泡沫細胞，被證實是一個可以達預防或減緩動脈粥狀硬化發生的方式。在單獨處理桑葉萃取物對巨噬細胞(J774A.1 細胞)致死率之敏感度方面，由結果中我們發現，萃取物的劑量提高到 4 mg/mL 也未見到細胞的死亡(Fig. 5)，顯示要利用 MLE 殺死 J774A.1 細胞需要極高之劑量($IC_{50} > 4$ mg/mL)，也代表本實驗當中所選用之劑量不會造成細胞的死亡，而 MLE 降低泡沫細胞之生成，也不是透過造成細胞死亡的方式(apoptosis)。而我們在泡沫細胞形成的分析實驗中所使用之 MLE 濃度最高為 1 mg/mL，結果也顯示在此濃度之下，MLE 具有降低或減緩巨噬細胞轉形為泡沫細胞之能力，有效地減少泡沫細胞的形成(Fig. 8, 11, 12)。但是在 MLE 清除自由基效力的實驗結果中，我們發現，在 MLE 濃度 1 mg/mL 時，其 DPPH 清除效力僅為 36.39%，而在 MLE 濃度 2、5、10 mg/mL 時，DPPH 清除效力分別為 67.03%、91.00%、91.74% (Fig. 2)。這些結果顯示，MLE 不只是透過清除自由基，抑制 LDL 的氧化作用，還能夠透過增加細胞內抗氧化酵素的表現，來減緩巨噬細胞轉形為泡沫細胞，減少泡沫細胞的形成。

巨噬細胞利用清除者接受器(scavenger receptor) 辨識 ox-LDL，並經由吞噬作用將 ox-LDL 吞噬入細胞體內。清除者接受器是一群 family proteins，為一種嵌入型的膜蛋白，被發現其與修飾型低密度脂蛋白(modified LDL)，與氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)、乙醯化脂蛋白(ac-LDL) 有很專一的鍵結能力(93)。這些清除者接受器中，巨噬細胞主要利用來辨識 ox-LDL 的清除者接受器被證實為 CD36 (94)。而 CD36 於細胞內的表達機制已被證實可經由 PPAR γ 轉錄因子所調控，PPAR γ 的 ligands 如 BRL (brosiglitazone)、TZD (thiazolidinedione)、ox-LDL 均會促使 CD36 的表達(30, 95)。因此，在泡沫細胞生成試驗的實驗結果顯示，MLE 與 MLPE 皆有效地降低泡沫細胞的形成(Fig. 8, 11, 12)，而 Fig. 13 的結果也證實，MLE 與 MLPE 皆能透過降低 PPAR γ 的表現，進而影響 CD36 的表達。而是否賞有其他的分子機制調控 CD36 的表達，而抑制巨噬細胞轉變為泡沫細胞，則是另一個有待研究的方向。

在本試驗中，發現 MLE 與 MLPE 皆能夠有效地降低泡沫細胞的生成，且能

夠抑制 CD36 與 SR-A 的表現，而 MLE 與 MLPE 皆同樣也能使細胞內的脂質含量也所下降，不得不考慮 MLE 與 MLPE 是否是透過加速分解細胞中的 ox-LDL 來達到降低泡沫細胞的生成，會否是透過促進 ABCA1 等，脂質輸出通道的表現來達到抑制泡沫細胞的生成，將是我們未來的目標。在本試驗中發現，桑葉萃取物能夠有效保護 LDL 避免遭受氧化，且能夠有效抑制泡沫細胞之生成，我們評估桑葉萃取物具有預防動脈粥狀硬化之潛力，而能應用於保健食品的開發。

拾壹、參考文獻

1. Steinberg, D.; Witztum, J. L., Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *Jama* **1990**, 264, (23), 3047-52.
2. Navab, M.; Berliner, J. A.; Watson, A. D.; Hama, S. Y.; Territo, M. C.; Lusis, A. J.; Shih, D. M.; Van Lenten, B. J.; Frank, J. S.; Demer, L. L.; Edwards, P. A.; Fogelman, A. M., The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1996**, 16, (7), 831-42.
3. Glass, C. K.; Witztum, J. L., Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **2001**, 104, (4), 503-16.
4. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **1999**, 340, (2), 115-26.
5. Heinecke, J. W., Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* **1998**, 141, (1), 1-15.
6. Harats, D.; Shaish, A.; George, J.; Mulkins, M.; Kurihara, H.; Levkovitz, H.; Sigal, E., Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**, 20, (9), 2100-5.
7. Hsieh, C. C.; Yen, M. H.; Yen, C. H.; Lau, Y. T., Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **2001**, 49, (1), 135-45.
8. Cybulsky, M. I.; Gimbrone, M. A., Jr., Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **1991**, 251, (4995), 788-91.
9. Qiao, J. H.; Tripathi, J.; Mishra, N. K.; Cai, Y.; Tripathi, S.; Wang, X. P.; Imes, S.; Fishbein, M. C.; Clinton, S. K.; Libby, P.; Lusis, A. J.; Rajavashisth, T. B., Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol* **1997**, 150, (5), 1687-99.
10. Dong, Z. M.; Chapman, S. M.; Brown, A. A.; Frenette, P. S.; Hynes, R. O.; Wagner, D. D., The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* **1998**, 102, (1), 145-52.
11. Yamada, Y.; Doi, T.; Hamakubo, T.; Kodama, T., Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* **1998**, 54, (7), 628-40.
12. Suzuki, H.; Kurihara, Y.; Takeya, M.; Kamada, N.; Kataoka, M.; Jishage, K.; Ueda, O.; Sakaguchi, H.; Higashi, T.; Suzuki, T.; Takashima, Y.; Kawabe, Y.; Cynshi, O.; Wada, Y.; Honda, M.; Kurihara, H.; Aburatani, H.; Doi, T.; Matsumoto, A.; Azuma, S.; Noda, T.; Toyoda, Y.; Itakura, H.; Yazaki, Y.; Kodama, T.; et al., A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* **1997**, 386, (6622), 292-6.
13. Colles, S. M.; Irwin, K. C.; Chisolm, G. M., Roles of multiple oxidized LDL lipids in cellular injury: dominance of 7 beta-hydroperoxycholesterol. *J Lipid Res* **1996**, 37, (9), 2018-28.
14. Vijayagopal, P.; Menon, P. V., Varied low density lipoprotein binding property of proteoglycans synthesized by vascular smooth muscle cells cultured on extracellular matrix. *Atherosclerosis* **2005**, 178, (1), 75-82.
15. Mueck, A. O.; Seeger, H., Estrogens acting as cardiovascular agents: direct vascular actions. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* **2004**, 2, (1), 35-42.
16. Argmann, C. A.; Sawyez, C. G.; Li, S.; Nong, Z.; Hegele, R. A.; Pickering, J. G.;

- Huff, M. W., Human smooth muscle cell subpopulations differentially accumulate cholesteryl ester when exposed to native and oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2004**, 24, (7), 1290-6.
17. Davies, M. J.; Richardson, P. D.; Woolf, N.; Katz, D. R.; Mann, J., Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* **1993**, 69, (5), 377-81.
 18. Lee, R. T.; Libby, P., The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1997**, 17, (10), 1859-67.
 19. Galis, Z. S.; Sukhova, G. K.; Lark, M. W.; Libby, P., Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **1994**, 94, (6), 2493-503.
 20. Cyrus, T.; Witztum, J. L.; Rader, D. J.; Tangirala, R.; Fazio, S.; Linton, M. F.; Funk, C. D., Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest* **1999**, 103, (11), 1597-604.
 21. Knowles, J. W.; Reddick, R. L.; Jennette, J. C.; Shesely, E. G.; Smithies, O.; Maeda, N., Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)ApoE(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* **2000**, 105, (4), 451-8.
 22. Collins, R. G.; Velji, R.; Guevara, N. V.; Hicks, M. J.; Chan, L.; Beaudet, A. L., P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* **2000**, 191, (1), 189-94.
 23. Han, K. H.; Han, K. O.; Green, S. R.; Quehenberger, O., Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res* **1999**, 40, (6), 1053-63.
 24. Gu, L.; Okada, Y.; Clinton, S. K.; Gerard, C.; Sukhova, G. K.; Libby, P.; Rollins, B. J., Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* **1998**, 2, (2), 275-81.
 25. Gosling, J.; Slaymaker, S.; Gu, L.; Tseng, S.; Zlot, C. H.; Young, S. G.; Rollins, B. J.; Charo, I. F., MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* **1999**, 103, (6), 773-8.
 26. Boring, L.; Gosling, J.; Cleary, M.; Charo, I. F., Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* **1998**, 394, (6696), 894-7.
 27. Steinbrecher, U. P.; Loughheed, M.; Kwan, W. C.; Dirks, M., Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation. *J Biol Chem* **1989**, 264, (26), 15216-23.
 28. Sakai, M.; Miyazaki, A.; Hakamata, H.; Sato, Y.; Matsumura, T.; Kobori, S.; Shichiri, M.; Horiuchi, S., Lysophosphatidylcholine potentiates the mitogenic activity of modified LDL for human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1996**, 16, (4), 600-5.
 29. Diaz, M. N.; Frei, B.; Vita, J. A.; Keaney, J. F., Jr., Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* **1997**, 337, (6), 408-16.
 30. Tontonoz, P.; Nagy, L.; Alvarez, J. G.; Thomazy, V. A.; Evans, R. M., PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **1998**, 93, (2), 241-52.
 31. Bennett, M. R.; Boyle, J. J., Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **1998**, 138, (1), 3-9.

32. Hansson, G. K., Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **1997**, 8, (5), 301-11.
33. Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **1993**, 362, (6423), 801-9.
34. Maundrell, K.; Antonsson, B.; Magnenat, E.; Camps, M.; Muda, M.; Chabert, C.; Gillieron, C.; Boschert, U.; Vial-Knecht, E.; Martinou, J. C.; Arkinstall, S., Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J Biol Chem* **1997**, 272, (40), 25238-42.
35. Schreiber, M.; Kolbus, A.; Piu, F.; Szabowski, A.; Mohle-Steinlein, U.; Tian, J.; Karin, M.; Angel, P.; Wagner, E. F., Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* **1999**, 13, (5), 607-19.
36. Stocker, R.; Keaney, J. F., Jr., Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* **2004**, 84, (4), 1381-478.
37. Aviram, M., Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radic Res* **2000**, 33 Suppl, S85-97.
38. Bannister, J. V.; Bannister, W. H.; Rotilio, G., Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* **1987**, 22, (2), 111-80.
39. Lin, C. T.; Yeh, K. W.; Kao, M. C.; Shaw, J. F., Cloning and characterization of a cDNA encoding the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase from sweet potato tuberous root. *Plant Mol Biol* **1993**, 23, (4), 911-3.
40. Fridovich, I., Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1986**, 58, 61-97.
41. Yan, T.; Oberley, L. W.; Zhong, W.; St Clair, D. K., Manganese-containing superoxide dismutase overexpression causes phenotypic reversion in SV40-transformed human lung fibroblasts. *Cancer Res* **1996**, 56, (12), 2864-71.
42. Marklund, S. L.; Westman, N. G.; Lundgren, E.; Roos, G., Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* **1982**, 42, (5), 1955-61.
43. Stallings, W. C.; Pattridge, K. A.; Strong, R. K.; Ludwig, M. L., Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *J Biol Chem* **1984**, 259, (17), 10695-9.
44. Kirkman, H. N.; Galiano, S.; Gaetani, G. F., The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem* **1987**, 262, (2), 660-6.
45. Erzurum, S. C.; Lemarchand, P.; Rosenfeld, M. A.; Yoo, J. H.; Crystal, R. G., Protection of human endothelial cells from oxidant injury by adenovirus-mediated transfer of the human catalase cDNA. *Nucleic Acids Res* **1993**, 21, (7), 1607-12.
46. Young, I. S.; Woodside, J. V., Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* **2001**, 54, (3), 176-86.
47. Schraufstatter, I.; Hyslop, P. A.; Jackson, J. H.; Cochrane, C. G., Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest* **1988**, 82, (3), 1040-50.
48. Roxborough, H. E.; Mercer, C.; McMaster, D.; Maxwell, A. P.; Young, I. S., Plasma glutathione peroxidase activity is reduced in haemodialysis patients. *Nephron* **1999**, 81, (3), 278-83.
49. Diplock, A. T., Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Clin Nutr* **1991**, 53, (1 Suppl), 189S-193S.
50. 盧英權, 栽桑學. 國立編譯館, 台北 **1988**, pp 41-77.

51. Lee, S. H.; Choi, S. Y.; Kim, H.; Hwang, J. S.; Lee, B. G.; Gao, J. J.; Kim, S. Y., Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull* **2002**, *25*, (8), 1045-8.
52. Kim, S. Y.; Gao, J. J.; Lee, W. C.; Ryu, K. S.; Lee, K. R.; Kim, Y. C., Antioxidative flavonoids from the leaves of *Morus alba*. *Arch Pharm Res* **1999**, *22*, (1), 81-5.
53. Sharma, R.; Sharma, A.; Shono, T.; Takasugi, M.; Shirata, A.; Fujimura, T.; Machii, H., Mulberry moracins: scavengers of UV stress-generated free radicals. *Biosci Biotechnol Biochem* **2001**, *65*, (6), 1402-5.
54. Andallu, B.; Suryakantham, V.; Lakshmi Srikanthi, B.; Reddy, G. K., Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* **2001**, *314*, (1-2), 47-53.
55. Willcox, J. K.; Ash, S. L.; Catignani, G. L., Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2004**, *44*, (4), 275-95.
56. Paoletti, R.; Gotto, A. M., Jr.; Hajjar, D. P., Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation* **2004**, *109*, (23 Suppl 1), III20-6.
57. Chen, Y. L.; Lin, K. F.; Shiao, M. S.; Chen, Y. T.; Hong, C. Y.; Lin, S. J., Magnolol, a potent antioxidant from *Magnolia officinalis*, attenuates intimal thickening and MCP-1 expression after balloon injury of the aorta in cholesterol-fed rabbits. *Basic Res Cardiol* **2001**, *96*, (4), 353-63.
58. Chen, Y. H.; Lin, S. J.; Ku, H. H.; Shiao, M. S.; Lin, F. Y.; Chen, J. W.; Chen, Y. L., Salvianolic acid B attenuates VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF-alpha-treated human aortic endothelial cells. *J Cell Biochem* **2001**, *82*, (3), 512-21.
59. Nagy, M.; Grancai, D., Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie* **1996**, *51*, 100-101.
60. DuBois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Fred., S., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* **1956**, *28*, (3), 350-356.
61. Chan, K. C.; Ho, H. H.; Huang, C. N.; Lin, M. C.; Chen, H. M.; Wang, C. J., Mulberry leaf extract inhibits vascular smooth muscle cell migration involving a block of small GTPase and Akt/NF-kappaB signals. *J Agric Food Chem* **2009**, *57*, (19), 9147-53.
62. Ursini, F.; Maiorino, M.; Morazzoni, P.; Roveri, A.; Pifferi, G., A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radic Biol Med* **1994**, *16*, (5), 547-53.
63. Havel, R. J.; Eder, H. A.; Bragdon, J. H., The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **1955**, *34*, (9), 1345-53.
64. Hsu, H. Y.; Twu, Y. C., Tumor necrosis factor-alpha -mediated protein kinases in regulation of scavenger receptor and foam cell formation on macrophage. *J Biol Chem* **2000**, *275*, (52), 41035-48.
65. Reid, V. C.; Mitchinson, M. J., Toxicity of oxidised low density lipoprotein towards mouse peritoneal macrophages in vitro. *Atherosclerosis* **1993**, *98*, (1), 17-24.
66. Zhao, M.; Liu, Y.; Wang, X.; New, L.; Han, J.; Brunk, U. T., Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL. *Apmis* **2002**, *110*, (6), 458-68.
67. Alley, M. C.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Hursey, M. L.; Czerwinski, M. J.; Fine, D. L.; Abbott, B. J.; Mayo, J. G.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R., Feasibility of

- drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* **1988**, 48, (3), 589-601.
68. 高銘都; 黃義祿., 病理組織切片技術. 南山堂出版社, 台北 **1998**.
 69. Mendez, A. J.; Oram, J. F.; Bierman, E. L., Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J Biol Chem* **1991**, 266, (16), 10104-11.
 70. Gough, P. J.; Greaves, D. R.; Suzuki, H.; Hakkinen, T.; Hiltunen, M. O.; Turunen, M.; Herttuala, S. Y.; Kodama, T.; Gordon, S., Analysis of macrophage scavenger receptor (SR-A) expression in human aortic atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**, 19, (3), 461-71.
 71. Liao, H. S.; Matsumoto, A.; Itakura, H.; Doi, T.; Honda, M.; Kodama, T.; Geng, Y. J., Transcriptional inhibition by interleukin-6 of the class A macrophage scavenger receptor in macrophages derived from human peripheral monocytes and the THP-1 monocytic cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**, 19, (8), 1872-80.
 72. Chen, C. C.; Hsu, J. D.; Wang, S. F.; Chiang, H. C.; Yang, M. Y.; Kao, E. S.; Ho, Y. C.; Wang, C. J., Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Agric Food Chem* **2003**, 51, (18), 5472-7.
 73. Schiffrin, E. L., Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* **1995**, 25, (6), 1135-43.
 74. Mondola, P.; Seru, R.; Santillo, M.; Damiano, S.; Bifulco, M.; Laezza, C.; Formisano, P.; Rotilio, G.; Ciriolo, M. R., Effect of Cu,Zn superoxide dismutase on cholesterol metabolism in human hepatocarcinoma (HepG2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, 295, (3), 603-9.
 75. Pennings, M.; Meurs, I.; Ye, D.; Out, R.; Hoekstra, M.; Van Berkel, T. J.; Van Eck, M., Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. *FEBS Lett* **2006**, 580, (23), 5588-96.
 76. de Winther, M. P.; van Dijk, K. W.; Havekes, L. M.; Hofker, M. H., Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**, 20, (2), 290-7.
 77. Krieger, M.; Herz, J., Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* **1994**, 63, 601-37.
 78. Zhang, H.; Yang, Y.; Steinbrecher, U. P., Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages. *J Biol Chem* **1993**, 268, (8), 5535-42.
 79. Hampton, R. Y.; Golenbock, D. T.; Penman, M.; Krieger, M.; Raetz, C. R., Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* **1991**, 352, (6333), 342-4.
 80. Dunne, D. W.; Resnick, D.; Greenberg, J.; Krieger, M.; Joiner, K. A., The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91, (5), 1863-7.
 81. Naito, M.; Suzuki, H.; Mori, T.; Matsumoto, A.; Kodama, T.; Takahashi, K., Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* **1992**, 141, (3), 591-9.
 82. Matsumoto, A.; Naito, M.; Itakura, H.; Ikemoto, S.; Asaoka, H.; Hayakawa, I.; Kanamori, H.; Aburatani, H.; Takaku, F.; Suzuki, H.; et al., Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, 87, (23), 9133-7.

83. Sakaguchi, H.; Takeya, M.; Suzuki, H.; Hakamata, H.; Kodama, T.; Horiuchi, S.; Gordon, S.; van der Laan, L. J.; Kraal, G.; Ishibashi, S.; Kitamura, N.; Takahashi, K., Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* **1998**, 78, (4), 423-34.
84. Swerlick, R. A.; Lee, K. H.; Wick, T. M.; Lawley, T. J., Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J Immunol* **1992**, 148, (1), 78-83.
85. Matsumoto, K.; Hirano, K.; Nozaki, S.; Takamoto, A.; Nishida, M.; Nakagawa-Toyama, Y.; Janabi, M. Y.; Ohya, T.; Yamashita, S.; Matsuzawa, Y., Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**, 20, (4), 1027-32.
86. Puente Navazo, M. D.; Daviet, L.; Ninio, E.; McGregor, J. L., Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1996**, 16, (8), 1033-9.
87. Febbraio, M.; Podrez, E. A.; Smith, J. D.; Hajjar, D. P.; Hazen, S. L.; Hoff, H. F.; Sharma, K.; Silverstein, R. L., Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* **2000**, 105, (8), 1049-56.
88. de Villiers, W. J.; Fraser, I. P.; Hughes, D. A.; Doyle, A. G.; Gordon, S., Macrophage-colony-stimulating factor selectively enhances macrophage scavenger receptor expression and function. *J Exp Med* **1994**, 180, (2), 705-9.
89. Wu, H.; Moulton, K.; Horvai, A.; Parik, S.; Glass, C. K., Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. *Mol Cell Biol* **1994**, 14, (3), 2129-39.
90. Ricote, M.; Li, A. C.; Willson, T. M.; Kelly, C. J.; Glass, C. K., The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **1998**, 391, (6662), 79-82.
91. Mehta, D.; Angelini, G. D.; Bryan, A. J., Experimental models of accelerated atherosclerosis syndromes. *Int J Cardiol* **1996**, 56, (3), 235-57.
92. Ferns, G. A.; Lamb, D. J.; Taylor, A., The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus. *Atherosclerosis* **1997**, 133, (2), 139-52.
93. Freeman, M.; Ekkel, Y.; Rohrer, L.; Penman, M.; Freedman, N. J.; Chisolm, G. M.; Krieger, M., Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, 88, (11), 4931-5.
94. Sambrano, G. R.; Parthasarathy, S.; Steinberg, D., Recognition of oxidatively damaged erythrocytes by a macrophage receptor with specificity for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91, (8), 3265-9.
95. Nagy, L.; Tontonoz, P.; Alvarez, J. G.; Chen, H.; Evans, R. M., Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* **1998**, 93, (2), 229-40.

拾壹、實驗圖表與說明

拾壹、實驗圖表與說明

Table 1. Components of MLE and MLPE.

	MLE (%)	MLPE (%)
Polyphenol		
Gallic acid as STD	10.20 ± 0.05	27.61 ± 0.09
Quercetin as STD	6.74 ± 0.09	20.33 ± 0.11
Flavonoid		
Flavone & Flavonol	1.91 ± 0.04	5.71 ± 0.08
Flavanone & Flavanonol	1.99 ± 0.15	15.96 ± 0.18
Carbohydrate	25.43 ± 3.56	
Protein	2.43 ± 0.26	
Lipid	8.40 ± 1.63	

Table 2. Characterization of Phenolic Compounds of MLPE

Peak no.	Retention time (min)	Assigned identity	Recovery (%)
2	14.43	PCA	3.71 ± 1.13
4	23.03	GC	1.11 ± 1.21
5	26.21	GCG	10.06 ± 2.48
6	27.58	CA	2.12 ± 0.88
7	32.49	R	5.42 ± 1.36
8	50.27	Q	11.70 ± 1.19
9	54.87	N	9.00 ± 1.72

PCA, protocatechuic acid; GC, gallic acid; CA, caffeic acid; GCG, gallic acid gallate; R, rutin; Q, quercetin; N, naringenin.

Table 3. Effects of oat on the serum biochemical parameters of rabbits induced by a High Cholesterol - Diet^a

Variable	ND	HCD	HCD + MLE 1%	HCD + MLE 2%
GOT (U/L)	27.43 ± 7.82	323.69 ± 27.38 ^b	99.80 ± 41.22 ^c	74.20 ± 11.70 ^d
GPT (U/L)	18.00 ± 0.79	72.25 ± 6.70 ^b	41.00 ± 6.32 ^c	22.83 ± 5.53 ^d
Cholesterol (mg/dL)	169.80 ± 112.45	1304.67 ± 181.18 ^b	697.40 ± 101.24 ^d	515.00 ± 112.46 ^d
Triglycerides (mg/dL)	34 ± 9	74 ± 7 ^b	49.50 ± 4 ^d	43 ± 3 ^d
LDL-c (mg/dL)	57.31 ± 3.88	547.00 ± 90.74 ^b	430.50 ± 90.56 ^c	305.66 ± 76.17 ^d
HDL-c (mg/dL)	27.43 ± 5.37	78.83 ± 15.32	98.16 ± 9.45	121.66 ± 12.19
LDL-c / HDL-c	1.21 ± 0.13	7.41 ± 2.09 ^b	4.35 ± 0.57 ^c	2.55 ± 0.80 ^d
BUN (mg/dL)	16.1 ± 4.7	30.1 ± 17.2	21.9 ± 3.3	27.7 ± 10.8
CRE (mg/dL)	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.4	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.1

a, Each value is expressed as the mean ± SD (*n* = 6/group). Results were statistically analyzed with Student's *t*-test.

b, *p* < 0.05 compared with the ND group.

c, *p* < 0.05 compared with the HCD group.

d, *p* < 0.01 compared with the HCD group.

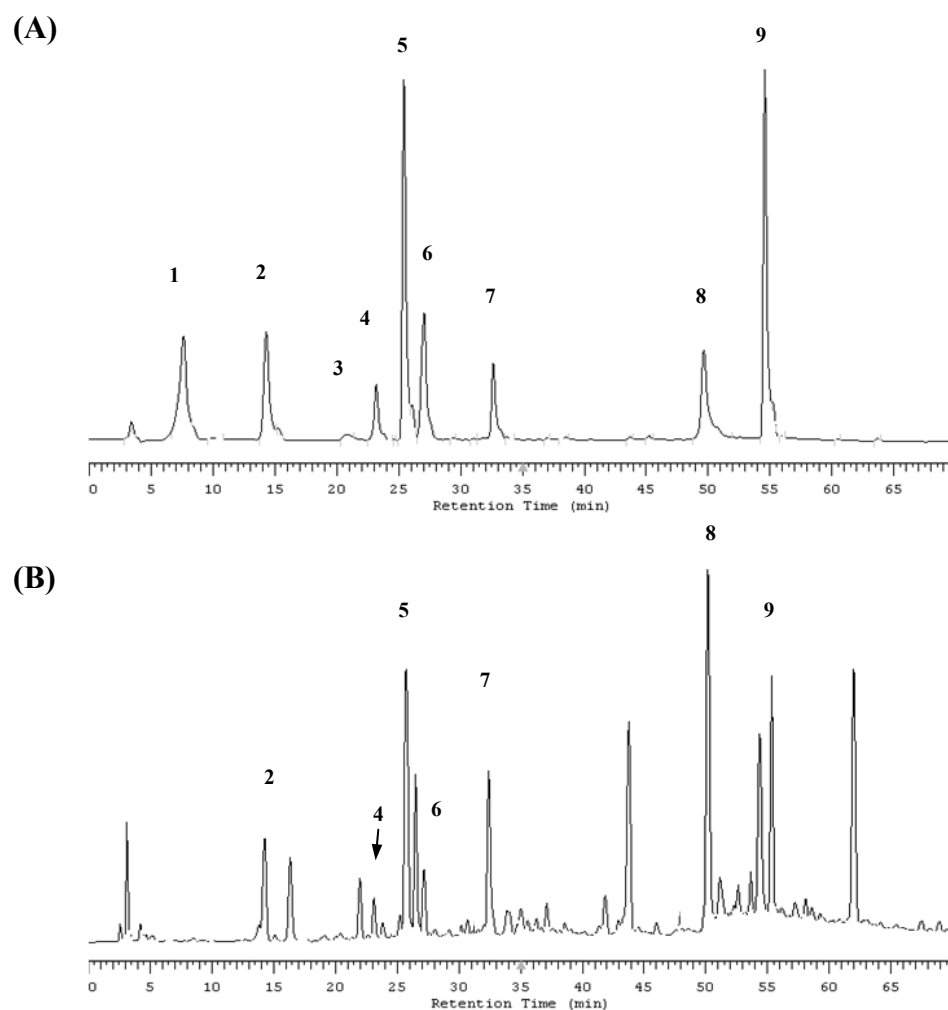


Figure 1. The HPLC chromatogram of MLPE. (A) HPLC chromatogram of nine kinds of standard polyphenols (1 mg/mL; 10 μ L). Peaks: 1, gallic acid; 2, protocatechuic acid; 3, catechin; 4, gallocatechin; 5, gallocatechin gallate; 6, caffeic acid; 7, rutin; 8, quercetin; 9, naringenin. (B) HPLC chromatogram of free polyphenols from MLPE (10 mg/mL, 10 μ L).

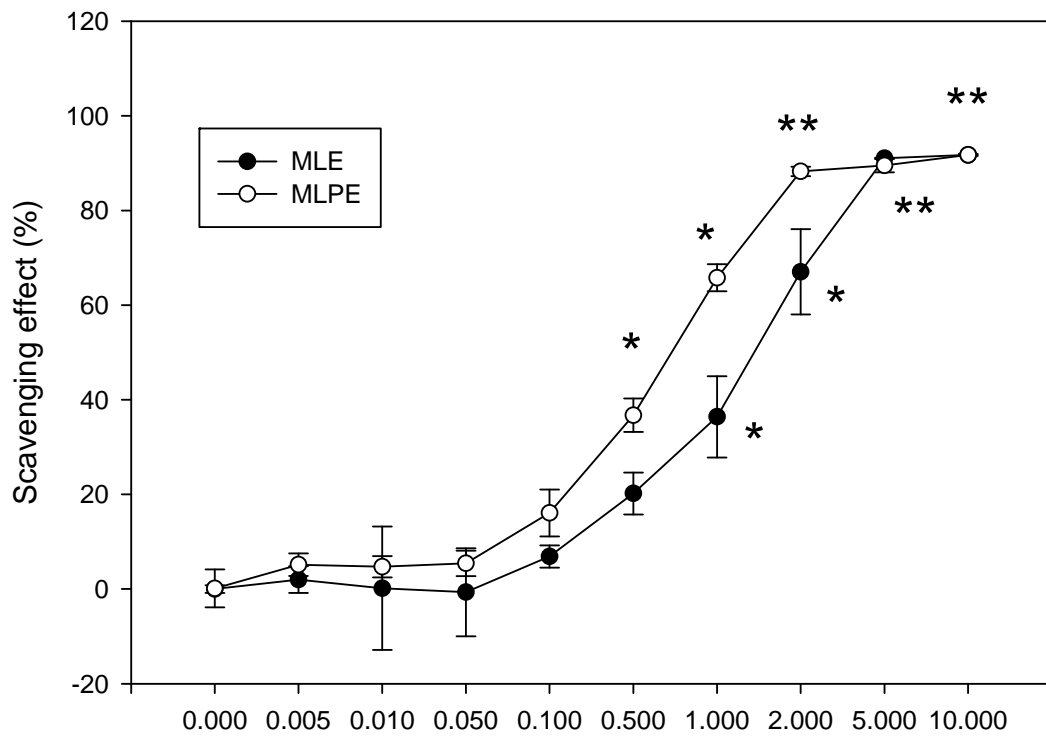


Figure 2. The effects of MLE and MLPE on the DPPH bleaching. DPPH (1 mM) was incubated with presence or absence of different concentrations MLE or MLPE (mg/mL). The data were means \pm SD from three samples of each group. *, $p < 0.05$ compared with control group; **, $p < 0.01$; compared with control group.

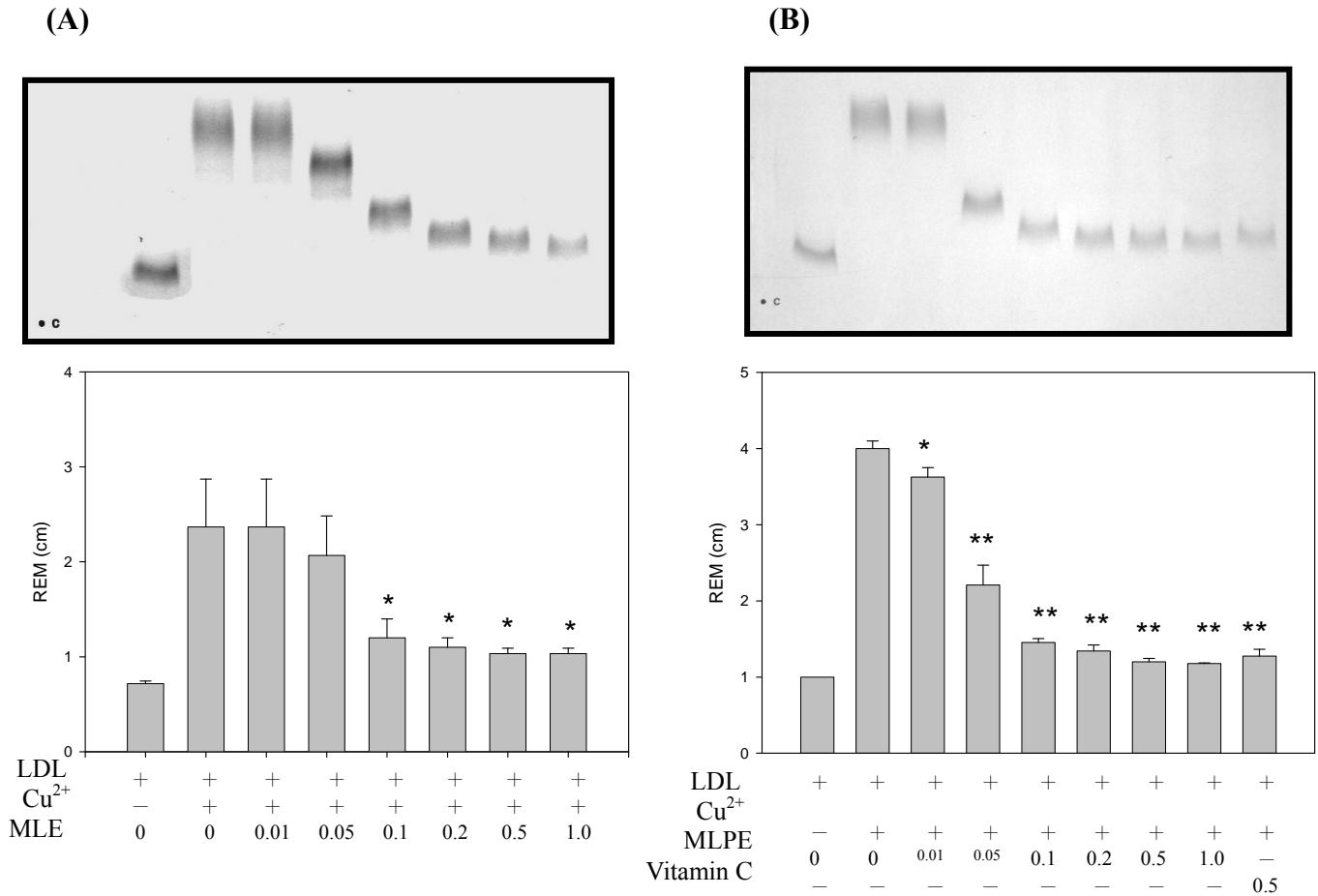


Figure 3. Inhibitory effects of MLE and MLPE on the Cu²⁺-induced oxidation LDL. LDL (100 µg) was incubated with 10 µM CuSO₄ at 37°C for 24 hrs in the presence or absence of different concentrations MLE (A) or MLPE (B). The change in relative electrophoretic mobility (REM) was determined. Vitamin C as a positive control. The data were means ± SD from three samples of each group. *, *p* < 0.05 compared with column 2 ; **, *p* < 0.01 compared with column 2.

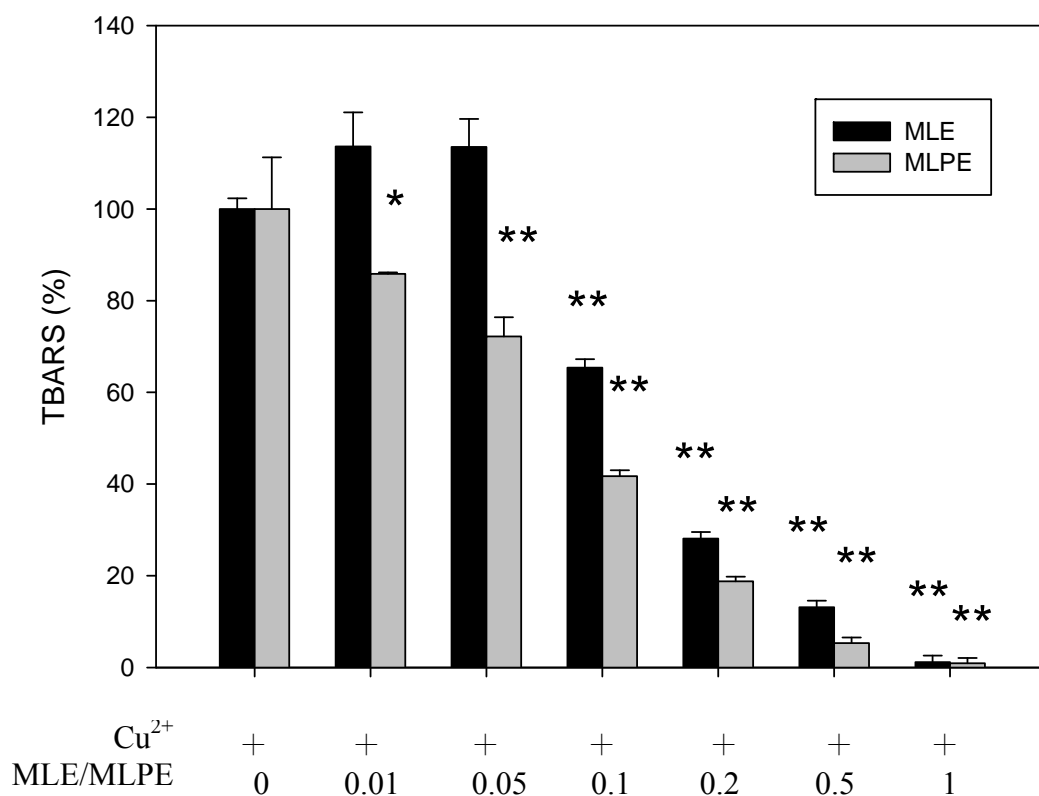


Figure 4. Inhibitory effects of MLE and MLPE on the Cu²⁺-induced lipid peroxidation in LDL. LDL (100 µg) was incubated with 10 µM CuSO₄ at 37°C for 24 hrs in the presence or absence of different concentrations MLE or MLPE (0.1-1 mg/mL). The data were means ± SD from three samples of each group. *, *p* < 0.05 compared with column 1 positive control group. **, *p* < 0.01 compared with column 1 positive control group.

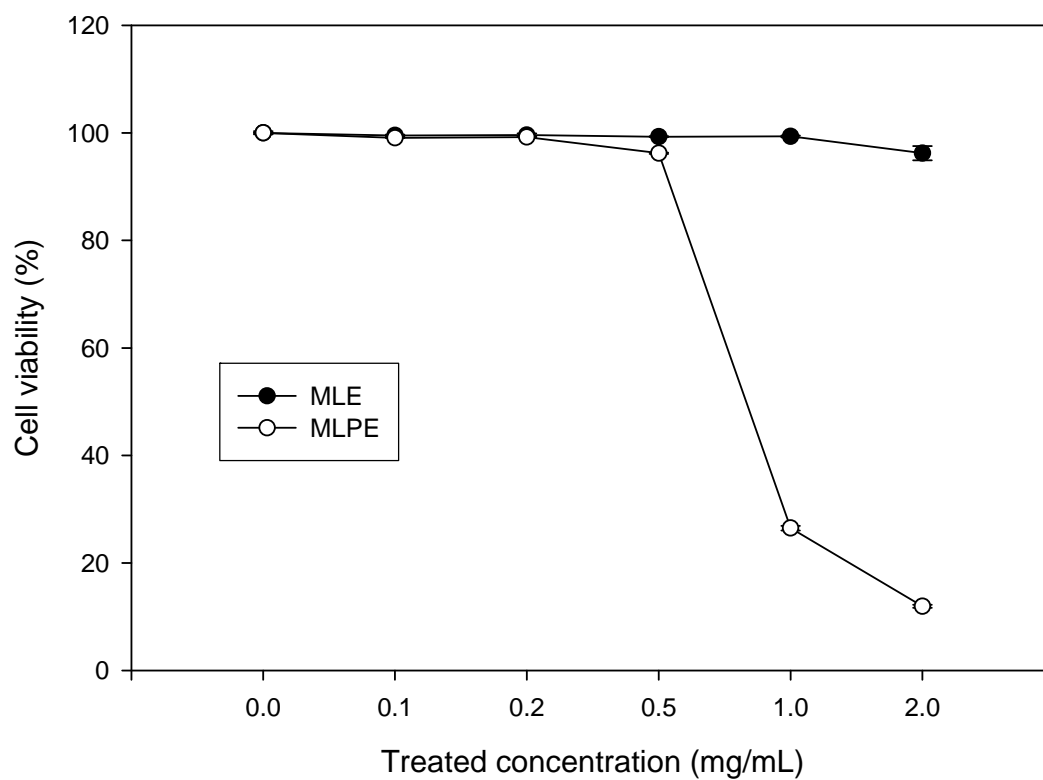


Figure 5. MLE or MLPE incuded the cytotoxicity of J774A.1 macrophage cells. J774A.1 cells were incubated with various concentrations of MLE or MLPE (0.1 ~ 2 mg/mL) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment.

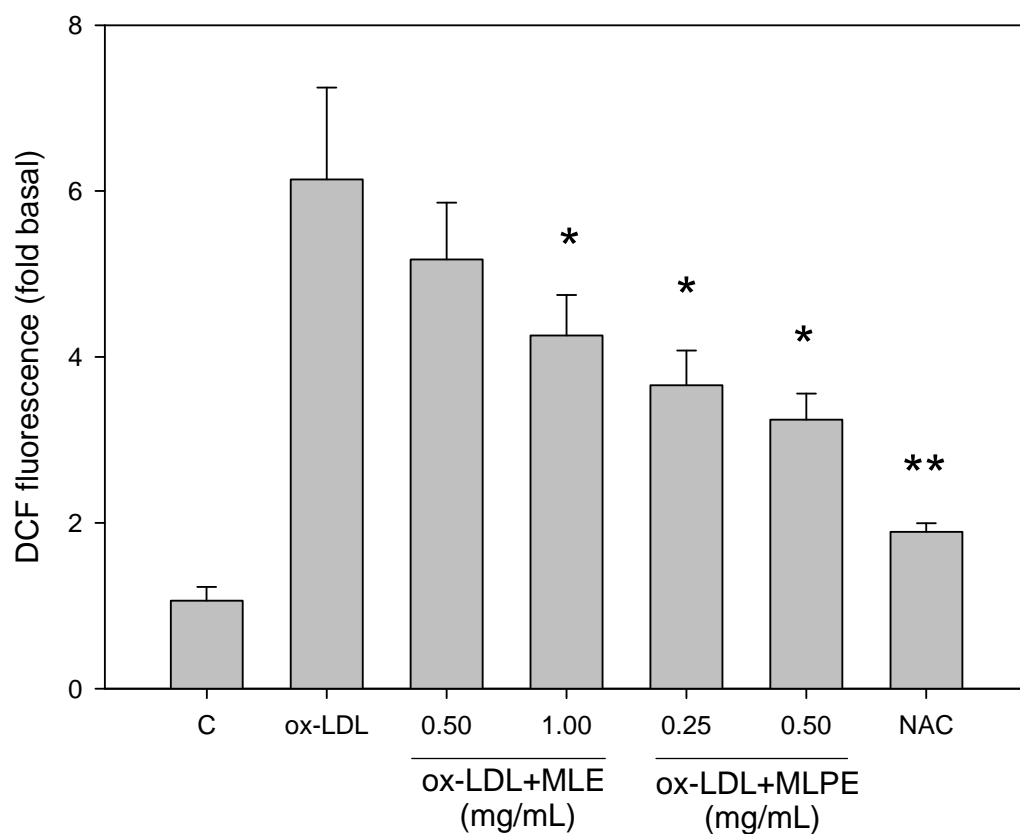


Figure 6. Effects of MLE and MLPE on ox-LDL-induced intracellular ROS production. Macrophages were preincubated with indicated concentration of MLE or MLPE (mg/mL), 1 mM NAC for 1 hr, and then incubated with 50 μ g/mL ox-LDL for 30 min. The intracellular ROS level was determined by H₂DCF-DA. Data represent the mean \pm SD of three separate experiments. *, $p < 0.05$ compared with ox-LDL group. **, $p < 0.01$ compared with ox-LDL group.

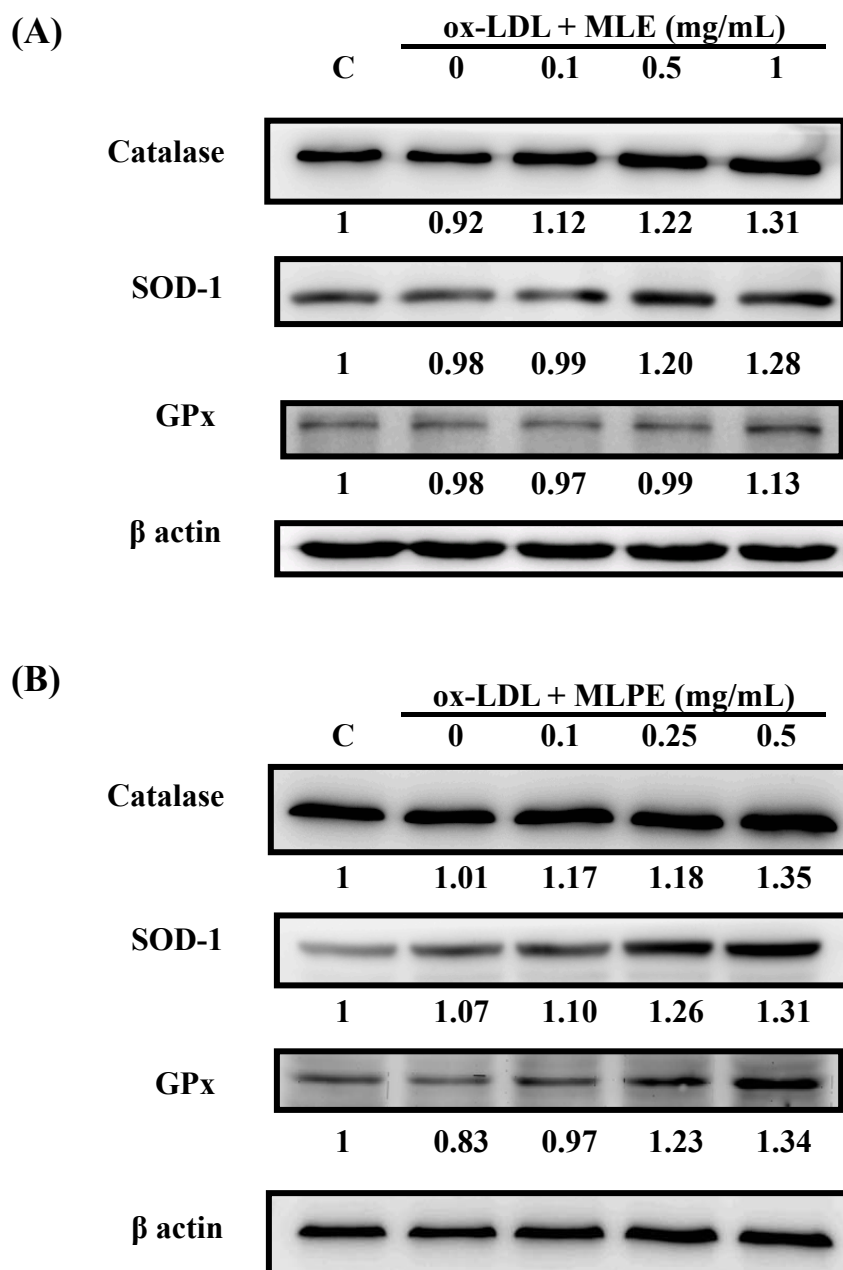


Figure 7. Effect of MLE and MLPE on the anti-oxidative enzyme protein expression in J774A.1 cells. Western blotting analysis of anti-oxidative enzyme protein expression in ox-LDL-treated J774A.1 cells. Cells were treated with or without 50 μ g/mL ox-LDL for 20 hrs. Co-treated with MLE or MLPE for various concentration as indicated. The proteins isolated from cell were analyzed via Western blot with anti-catalase, SOD-1 and GPx antibody. The detailed method is described under "Experimental Procedures." The indicated arrow on the *right side* represents indicated protein. All data are expressed as a fold relative to control untreated cells. This result is representative of three independent experiments.

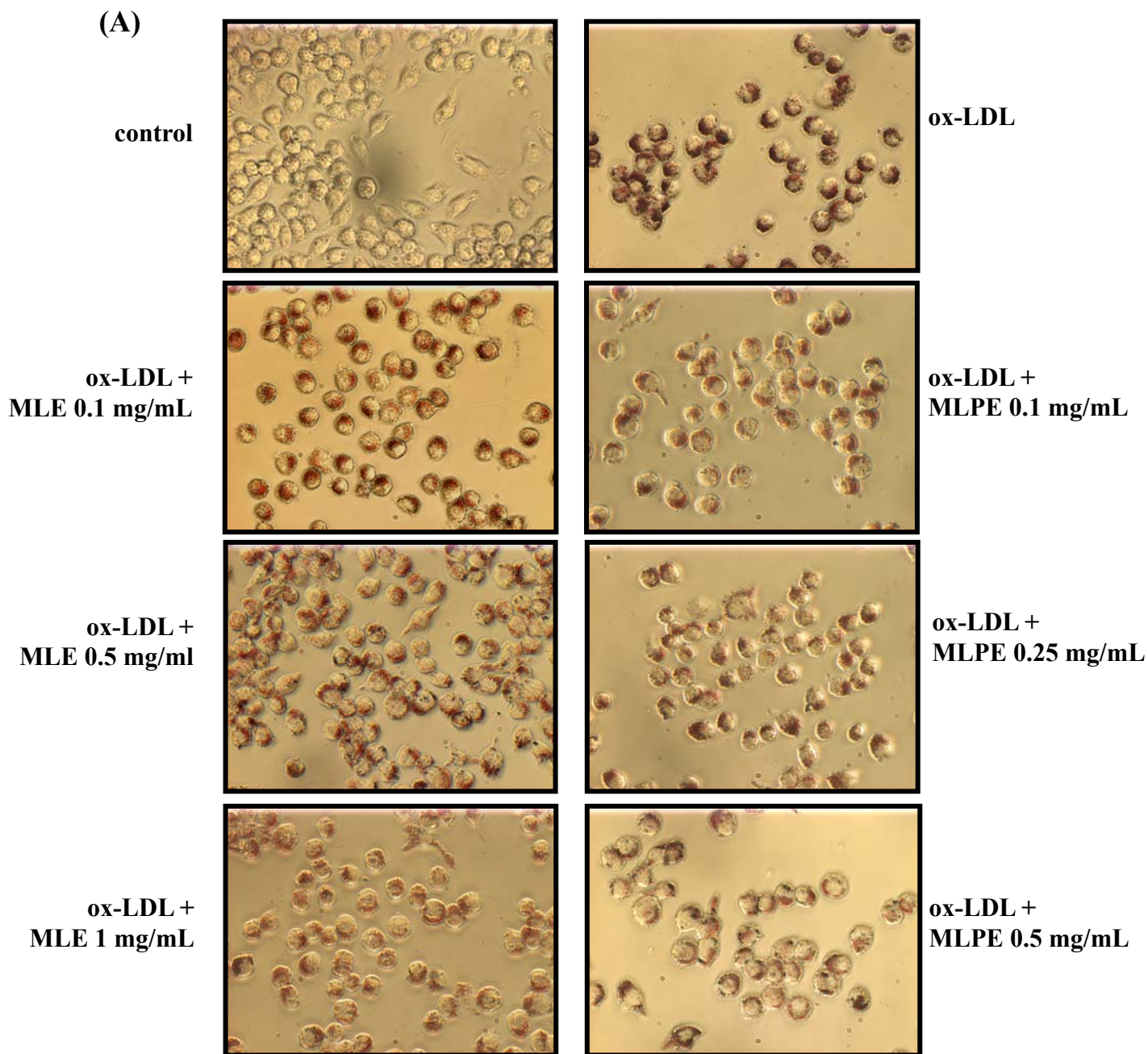


Figure 8 (A). Inhibitory effects of MLE and MLPE on the ox-LDL-induced foam cell formation. J774A.1 cells was incubated in DMEM medium with MLE or MLPE and then added to 50 $\mu\text{g/mL}$ of ox-LDL cultured in 37°C, 5% CO₂ for 24 hrs. The cells were stained with Oil Red O and observed under the microscope (200 \times).

(B)

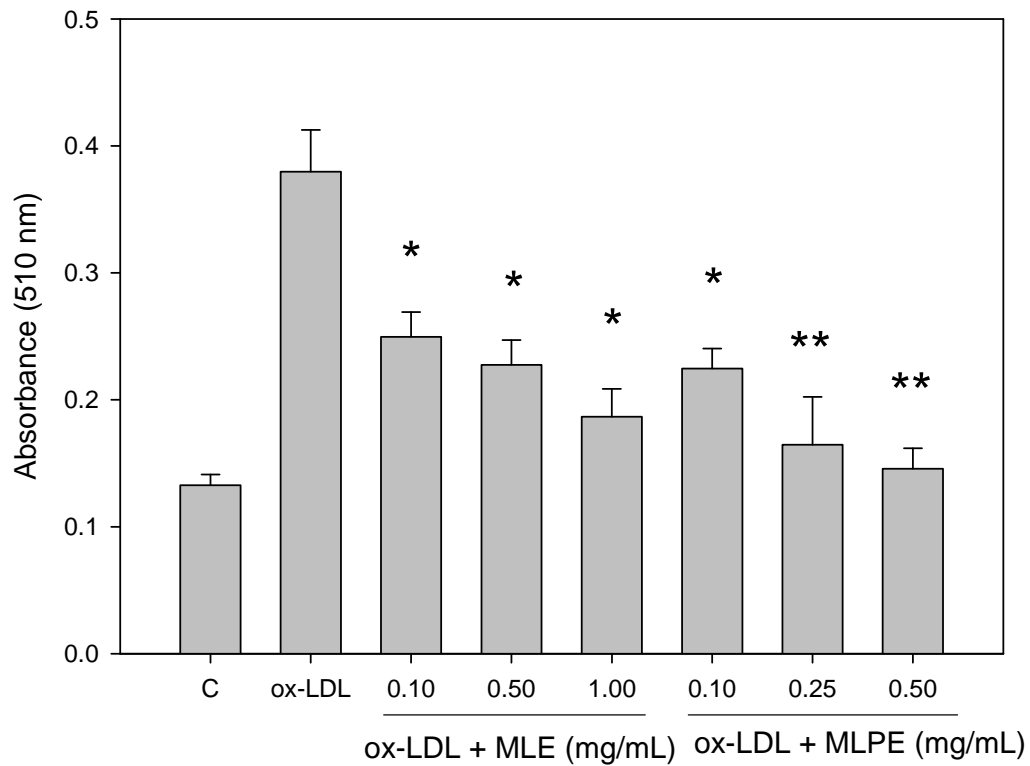
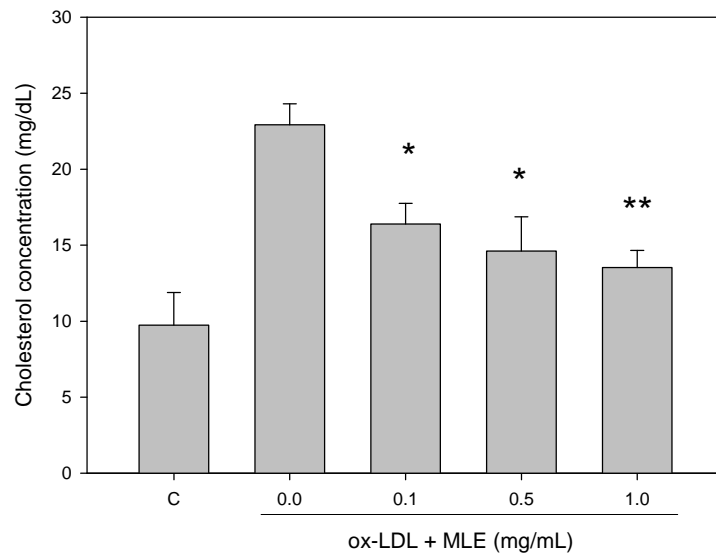


Figure 8 (B). Inhibitory effects of MLE and MLPE on the ox-LDL-induced foam cell formation. J774A.1 cells were incubated in DMEM medium with MLE or MLPE and then added to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ox-LDL cultured in 37°C, 5% CO₂ for 24 hrs. The cells were stained with Oil Red O and quantitative assessment of the cells at 510 nm. The data were means \pm SD from three experiments for each group. *, $p < 0.05$ compared with ox-LDL-induced group. **, $p < 0.01$ compared with ox-LDL-induced group.

(A)



(B)

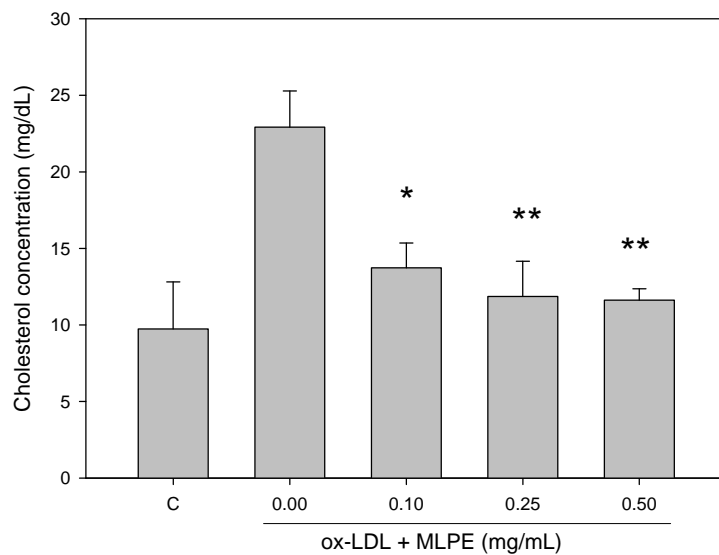
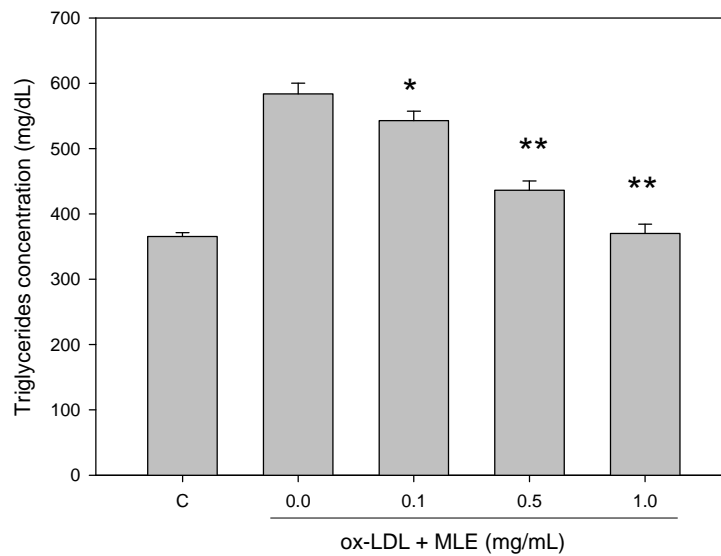


Figure 9. MLE and MLPE reduced ox-LDL-induced intracellular cholesterol accumulation in J774A.1 cell. J774A.1 cells was incubated in DMEM medium with MLE (A) or MLPE (B) and then added to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ox-LDL cultured in 37°C, 5% CO₂ for 24 hrs. Total intracellular cholesterol were analysis using enzymatic colometric method and expressed as mg/dL. The data were means \pm SD from three samples of each group. *, $p < 0.05$ compared with ox-LDL-induced group. **, $p < 0.01$ compared with ox-LDL-induced group.

Normal control

(A)



(B)

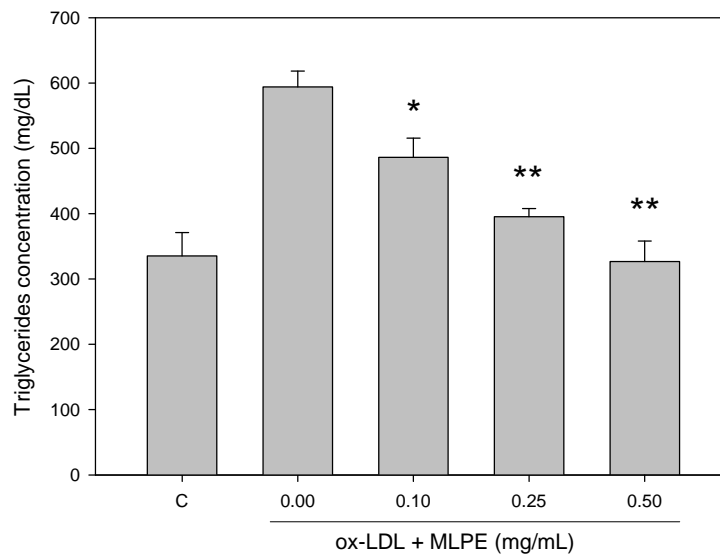


Figure 10. MLE and MLPE reduced ox-LDL-induced intracellular triglycerides accumulation in J774A.1 cell. J774A.1 cells was incubated in DMEM medium with MLE (A) or MLPE (B) and then added to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ox-LDL cultured in 37°C, 5% CO₂ for 24 hrs. Total intracellular triglycerides were analysis using enzymatic coloimetric method and expressed as mg/dL. The data were means \pm SD from three samples of each group. *, $p < 0.05$ compared with ox-LDL-induced group. **, $p < 0.01$ compared with ox-LDL-induced group.

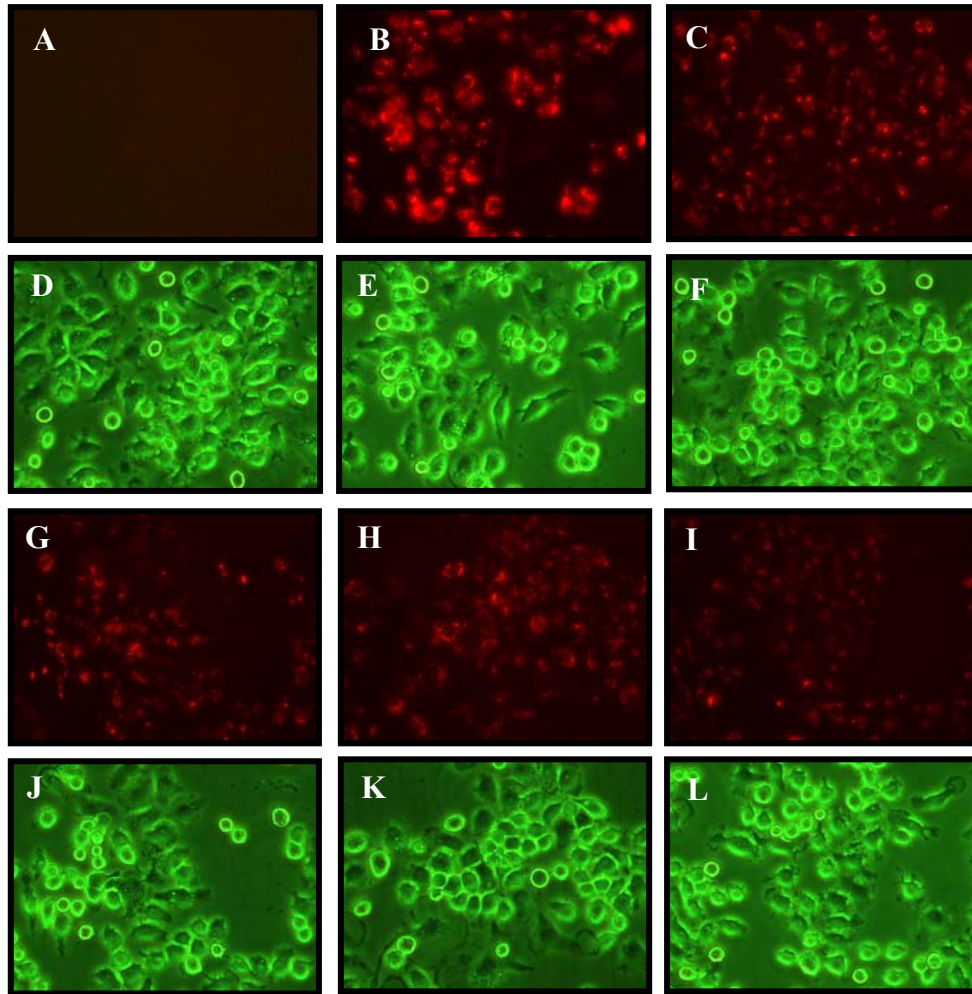


Figure 11. MLE and MLPE inhibited DiI-acLDL uptake in J774A.1 cells. Murine Macrophage J774A.1 cell treated with MLE (0.5 or 1 mg/mL) or MLPE (0.25 or 0.5 mg/mL) and incubated with 5 μ g/mL of DiI-acLDL in DMEM medium for 4 hrs. DiI fluorescence was observed by fluorescence microscope (A-C, G-H). Cell morphology were observed by light microscope (D-F, J-K). A & G, Cell was incubated without DiI-acLDL. B & E, Cell was incubated with DiI-acLDL. C & F, Cell was incubated with DiI-acLDL and MLE 0.5 mg/mL. G & J, Cell was incubated with DiI-acLDL and MLE 1 mg/mL. H & K, Cell was incubated with DiI-acLDL and MLPE 0.25 mg/mL. I & L, Cell was incubated with DiI-acLDL and MLPE 0.5 mg/mL.

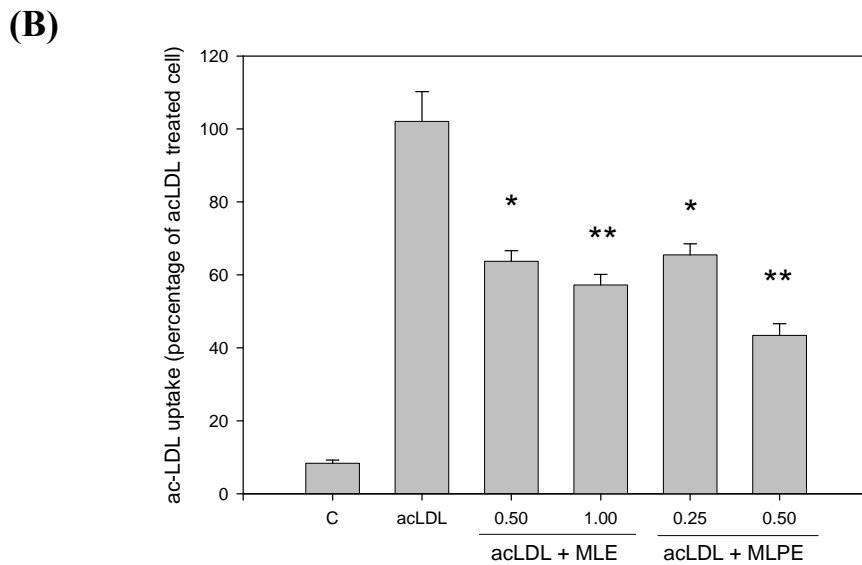
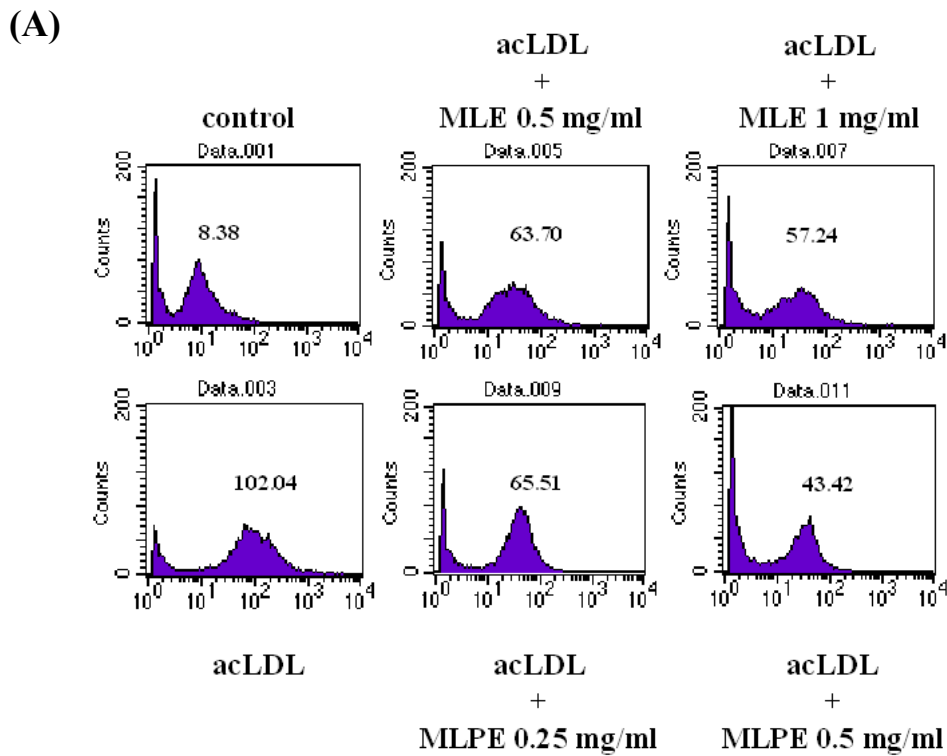
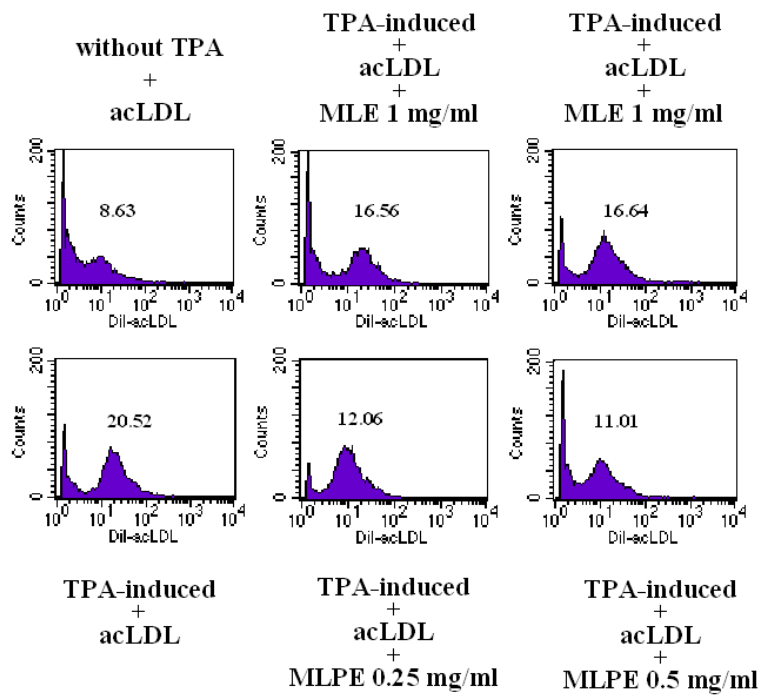


Figure 12. Concentration-dependent inhibition by MLE and MLPE of DiI-acLDL uptake in J774A.1 cells. Murine Macrophage J774A.1 cell treated with MLE (0.5 or 1 mg/mL) or MLPE (0.25 or 0.5 mg/mL) were incubated with 5 μ g/mL of DiI-acLDL in DMEM medium for 4 hrs. DiI fluorescence as analysis by flow cytometry and specific fluorescent intensity was determined by subtracting the mean fluorescent intensity of unlabeled cells (autofluorescence) from that of DiI-acLDL incubated cells. The data are shown as mean \pm SD of three independent experiments.

(A)



(B)

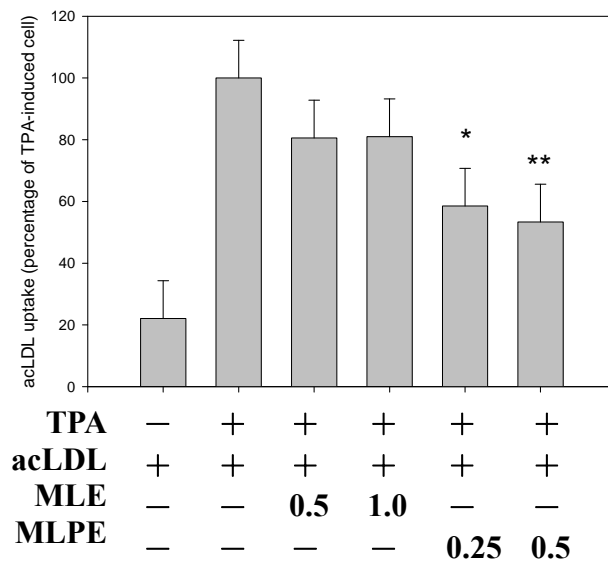


Figure 13. Concentration-dependent inhibition by MLE and MLPE of DiI-acLDL uptake in differentiated THP-1 cells. THP-1 cells treated with or without TPA (200 nM) in the presence or absence of MLE (0.5 or 1 mg/mL) or MLPE (0.25 or 0.5 mg/mL) were incubated with 5 μ g/mL of DiI-acLDL in RPMI-1640 medium for 4 hrs. DiI fluorescence as analysis by flow cytometry and specific fluorescent intensity was determined by subtracting the mean fluorescent intensity of unlabeled cells (autofluorescence) from that of DiI-acLDL incubated cells. The data are shown as mean \pm SD of three independent experiments.

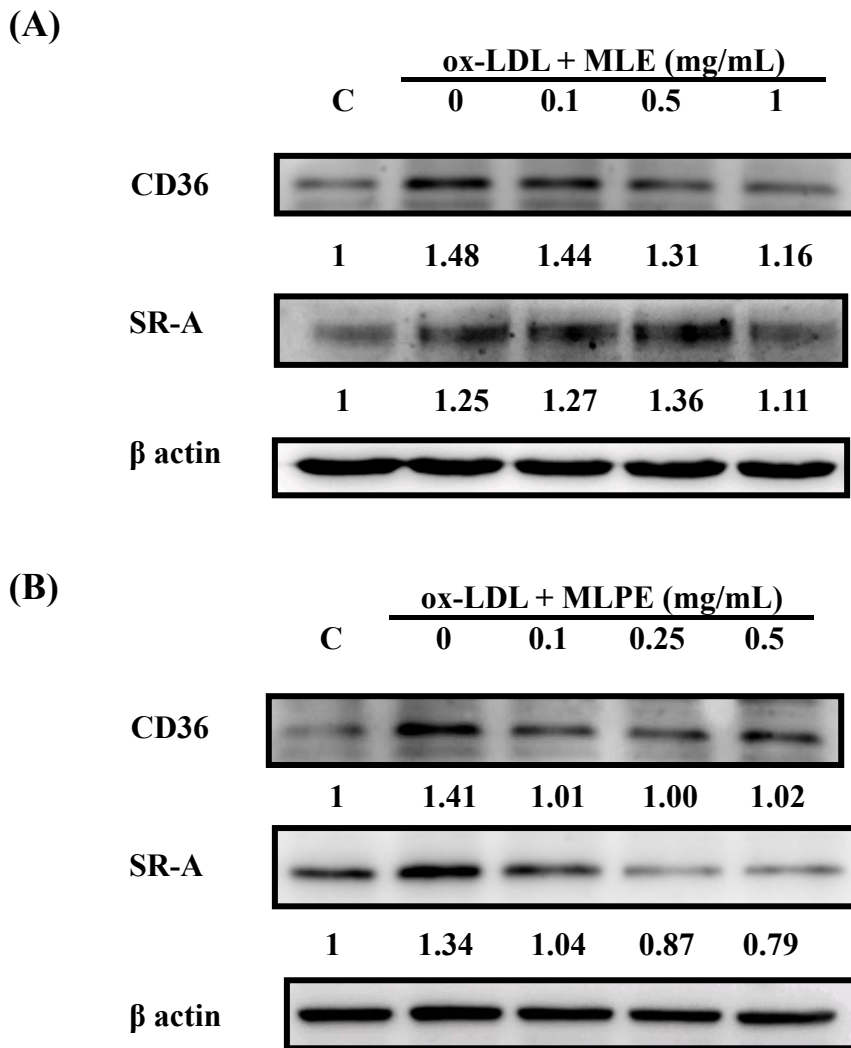


Figure 14. Effect of MLE and MLPE on the expression of macrophage scavenger receptor in J774A.1 cells. Western blotting analysis of CD36 and SR-A protein expression of ox-LDL-treated J774A.1 cells. Cells were treated with or without 50 μ g/mL ox-LDL for 20 hrs. Co-treated with MLE or MLPE for various concentration as indicated. The proteins isolated from cell membrane were analyzed via Western blot with anti-CD36 and SR-A antibody. The detailed method is described under "Experimental Procedures." All data are expressed as a fold relative to control untreated cells. This result is representative of three independent experiments.

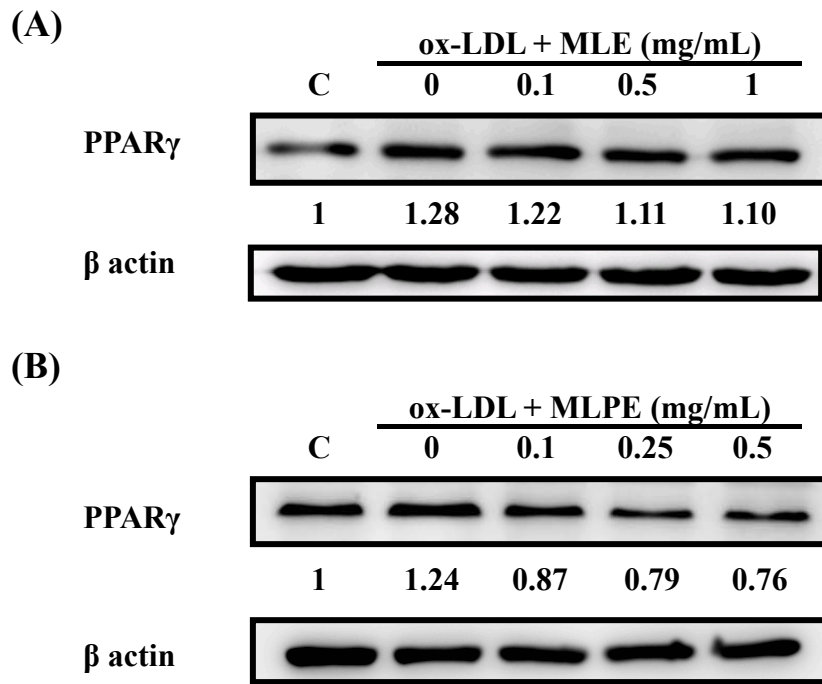


Figure 15. Effect of MLE and MLPE on the PPAR γ protein expression in macrophage J774A.1 cells. Western blotting analysis of PPAR γ protein expression of ox-LDL-treated J774A.1 cells. Cells were treated with or without 50 μ g/mL ox-LDL for 20 hrs. Co-treated with MLE or MLPE for various concentration as indicated. The proteins isolated from cell membrane were analyzed via Western blot with anti-PPAR γ antibody. The detailed method is described under "Experimental Procedures." All data are expressed as a fold relative to control untreated cells. This result is representative of three independent experiments.

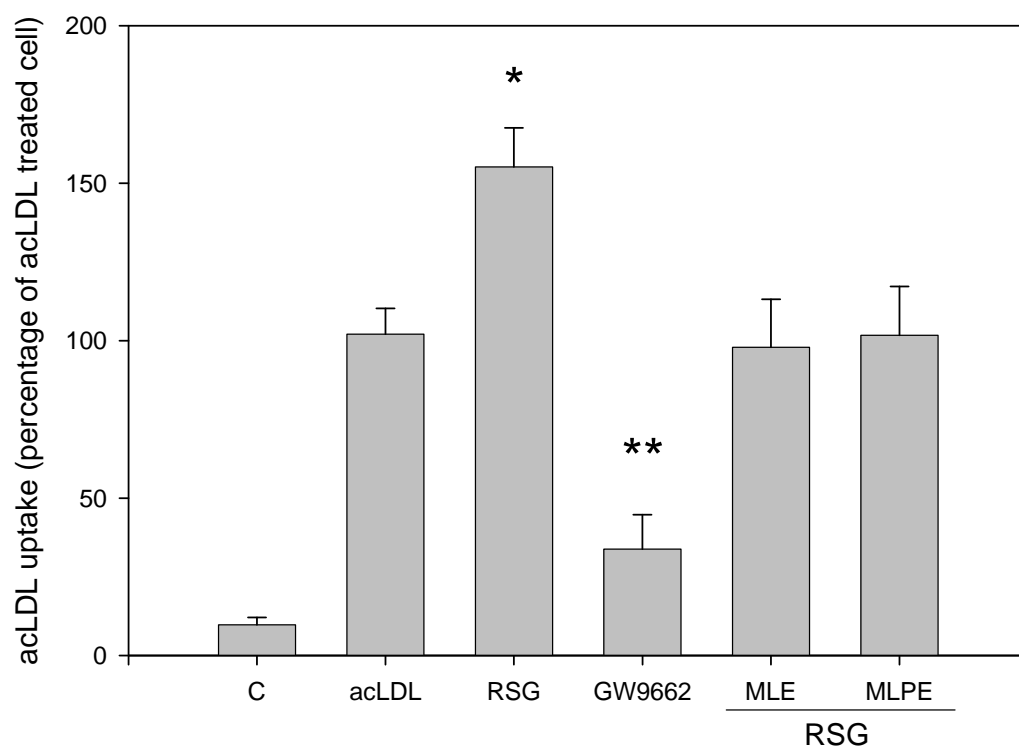


Figure 16. PPAR γ agonist induced acLDL uptake in macrophage J774A.1 cells. J774A.1 macrophages were pretreated with rosiglitazone (1 μ M), GW9662 (1 μ M) for 48 hrs and then incubated with MLE (1 mg/mL) or MLPE (0.5 mg/mL) in containing DiI-acLDL (5 μ g/mL) DMEM medium for 4 hrs. Cell associated fluorescence was quantified by flow cytometry. Mean fluorescence of the counted populations is presented. This result is representative of three independent experiments.

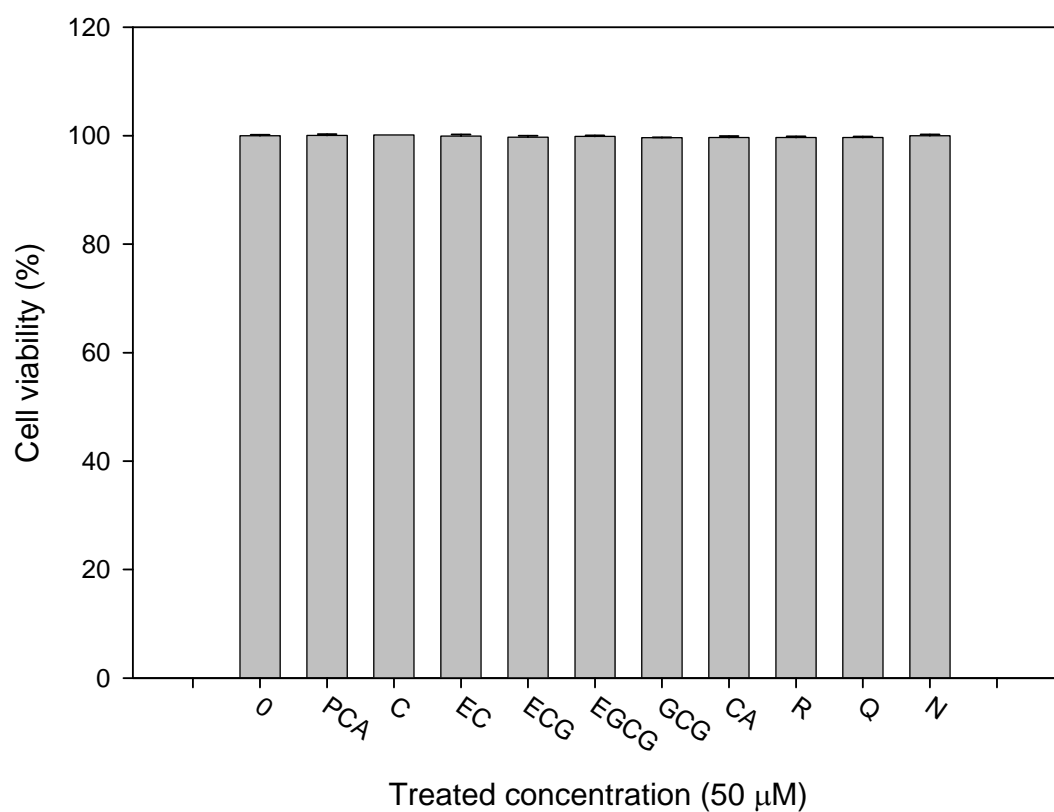


Figure 17. Effect of various polyphenol on J774A.1 macrophage cells. J774A.1 cells were incubated with several kinds of polyphenol (50 μM) at 37°C for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means ± SD from three replicates per treatment. PCA, protocatechuic acid; C, catechin; EC, epicatechin, ECG, epicatechin gallate; EGCG, epigallocatechin gallate; GCG, gallic acid; CA, caffeic acid; R, rutin; Q, quercetin; N, naringenin.

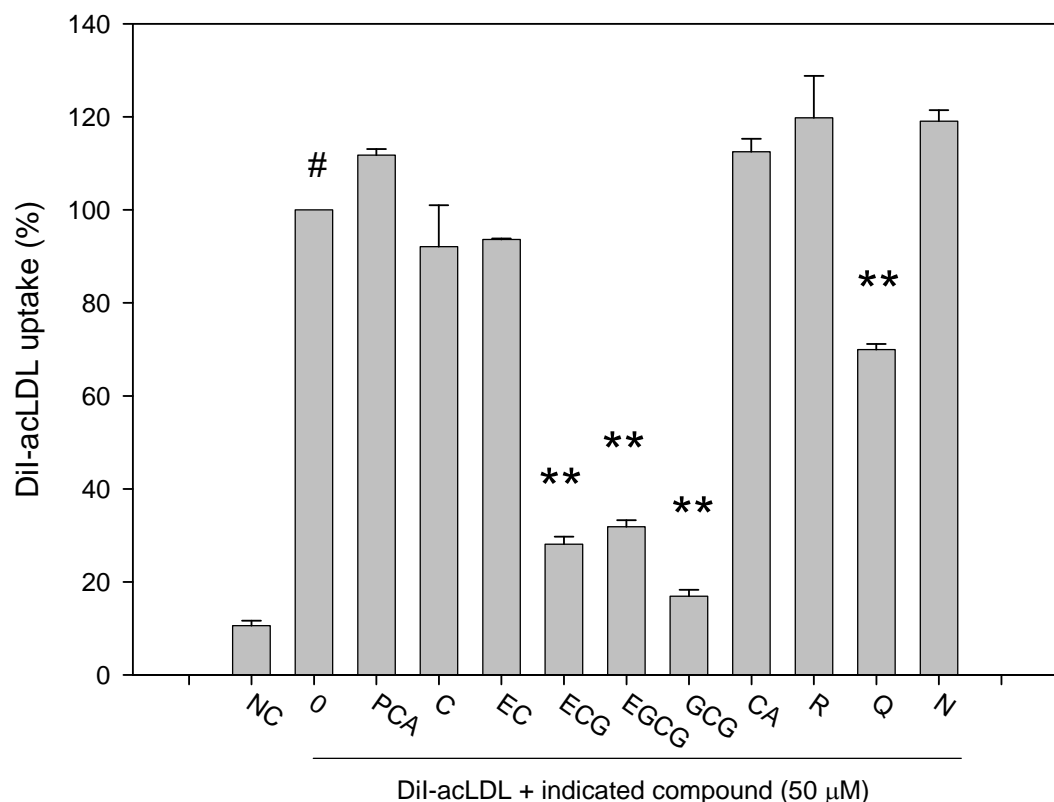
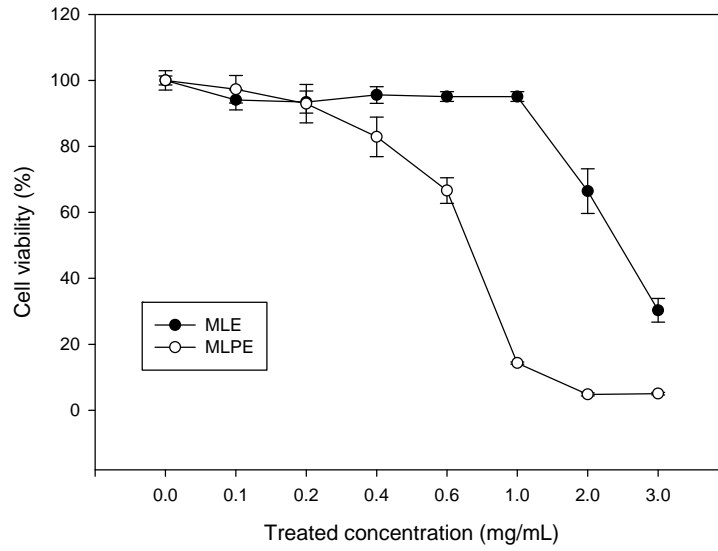


Figure 18. Effect of Polyphenol inhibited acLDL uptake in J774A.1 macrophage cells. J774A.1 cell treated with several kinds of polyphenol (50 μM) were incubated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Dil-acLDL in DMEM medium for 4 hrs. Dil fluorescence as analysis by flow cytometry and specific fluorescent intensity was determined by subtracting the mean fluorescent intensity of unlabeled cells (autofluorescence) from that of Dil-acLDL incubated cells. The data are shown as mean \pm SD of three independent experiments. PCA, protocatechuic acid; C, catechin; EC, epicatechin, ECG, epicatechin gallate; EGCG, epigallocatechin gallate; GCG, gallic acid gallate; CA, caffeic acid; R, rutin; Q, quercetin; N, naringenin.

(A)



(B)

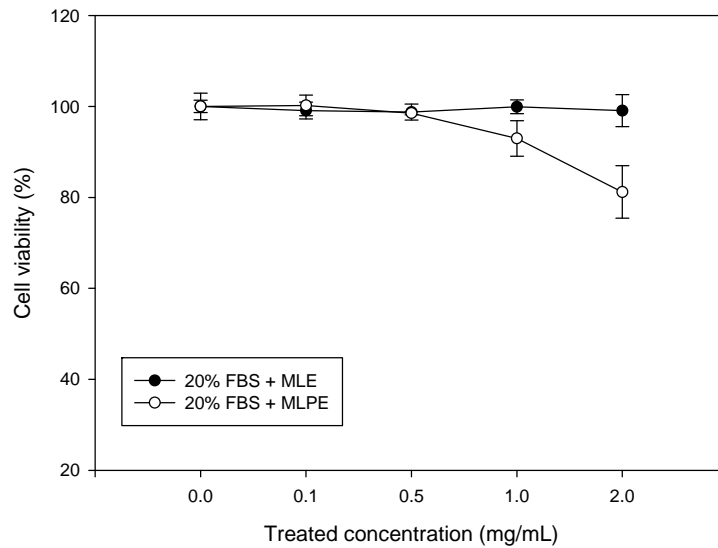
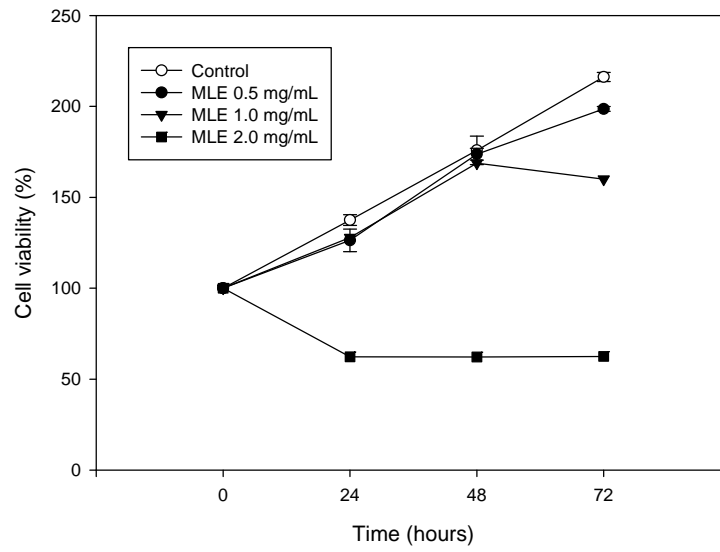


Figure 19. The cytotoxicity effects of MLE or MLPE on vascular smooth muscle cell. A, A7r5 cell was incubated with different concentration MLE or MLPE (0.1 - 3 mg/mL) in 37°C for 24 hrs. B, A7r5 cell was incubated with 20% FBS and different concentration MLE or MLPE (0.1 - 2 mg/mL) in 37°C for 24 hrs. The data were means \pm SD for three replicates per treatment.

(A)



(B)

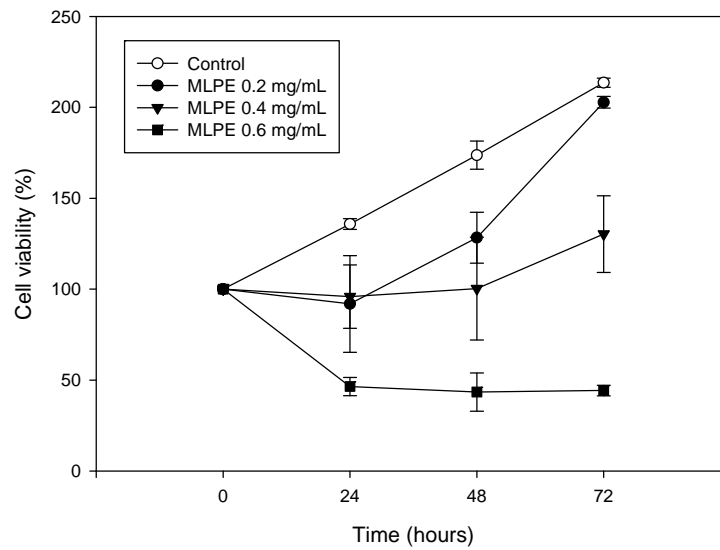
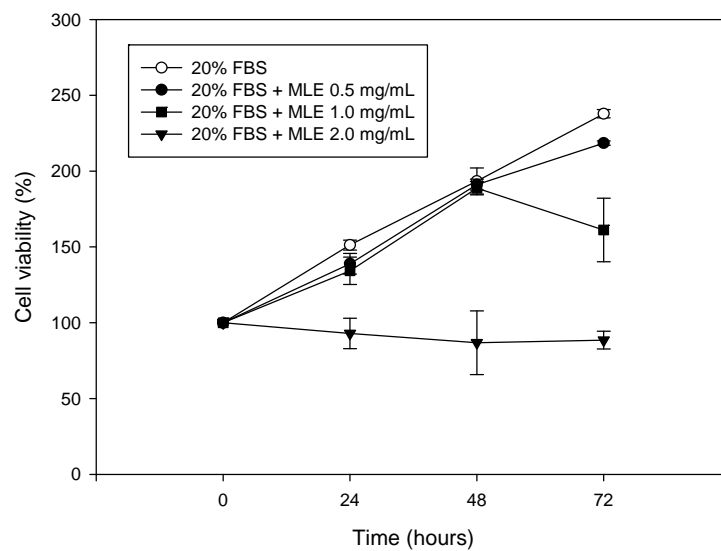


Figure 20. Effect of MLE and MLPE on VSMC by MTT assay. Vascular smooth muscle cells were treated with different concentrations of MLE (A) or MLPE (B), and the culture medium was changed daily. At each indicated time point, cell viability was analyzed by MTT assay. The data were means \pm SD from three samples for each group.

(A)



(B)

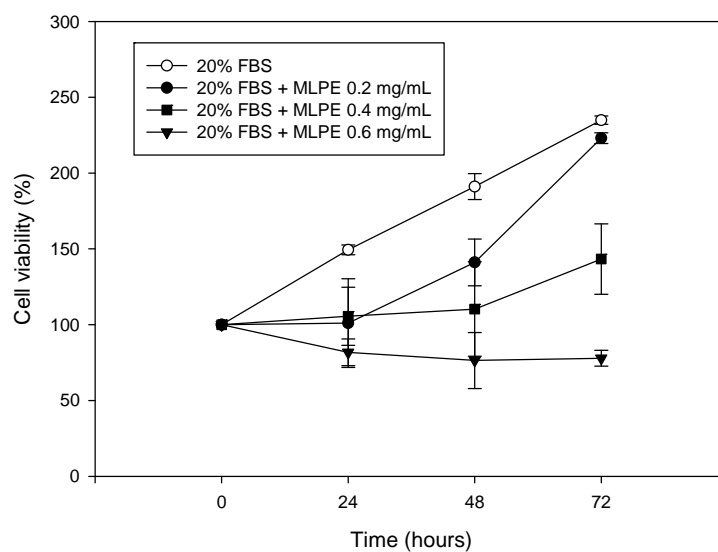


Figure 21. MLE and MLPE reduced 20% FBS-induced proliferation by MTT assay. Vascular smooth muscle cells were treated with 20% FBS and different concentrations of MLE or MLPE, and the culture medium was changed daily. At each indicated time point, cell viability was analyzed by MTT assay. The data were means \pm SD from three samples for each group.

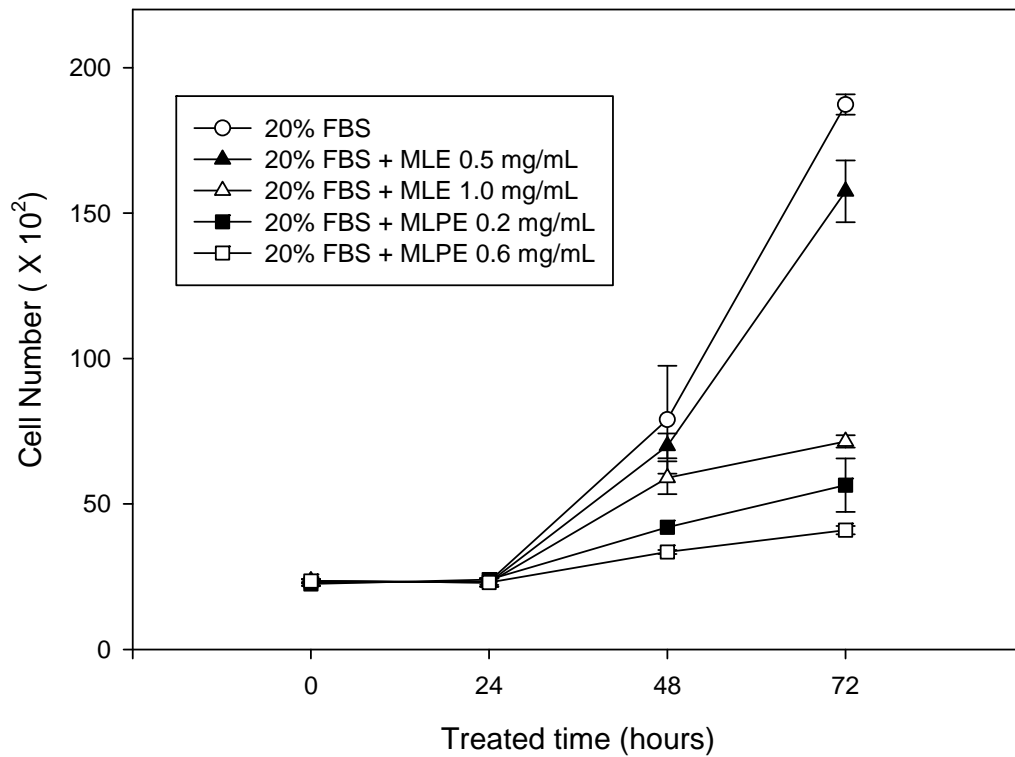


Figure 22. MLE and MLPE reduced 20% FBS-induced proliferation by cell counting. Vascular smooth muscle cells were seeded into 24-well plate at a density of 2×10^3 cells/well. After 24 hrs, cells were treated with 20% FBS and different concentrations of MLE or MLPE, and the culture medium was changed daily. At each indicated time point, the viable cell number was determined by the trypan-blue exclusion test. Data are the means \pm SD of three independent studies.

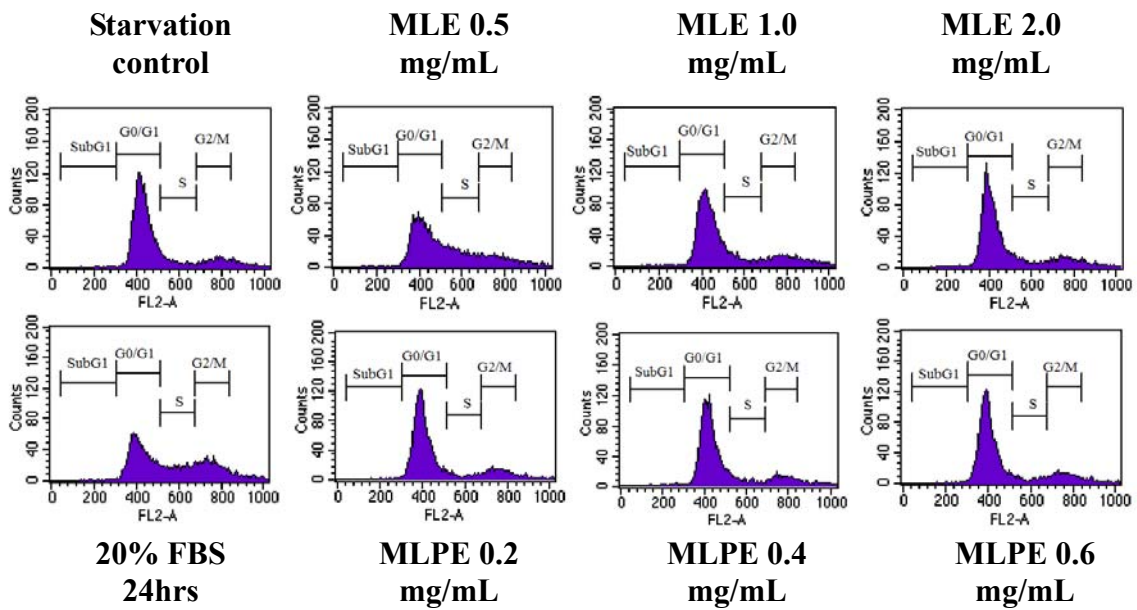


Figure 23. MLE and MLPE induced cell cycle arrest at a dose-dependant in A7r5 cells by flow cytometry assay. Cultured cells were pre-treated with 0.5% FBS for 48 hrs. Then cell were induced cell cycle progression by 20% FBS and combine with MLE, MLPE or not for 24 hrs. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. The quantitative data were presented as means \pm SD of three independent studies.

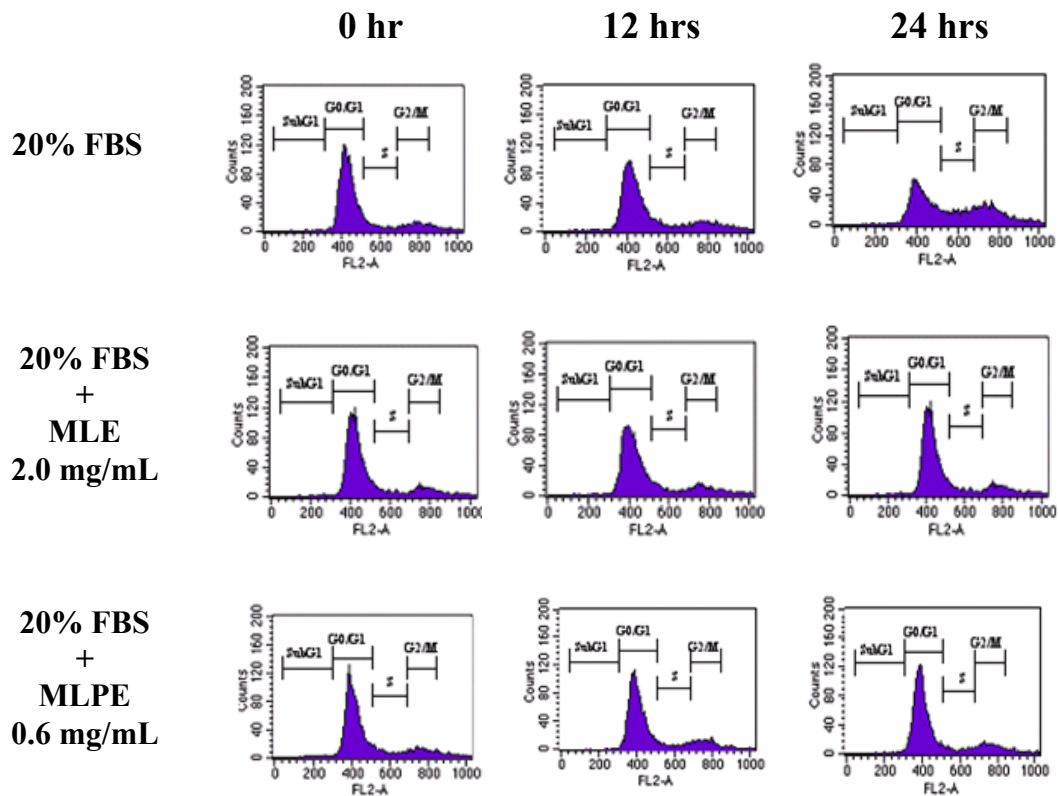


Figure 24. MLE and MLPE induced cell cycle arrest at a time-dependant in A7r5 cells by flow cytometry assay. Cultured cells were pre-treated with 0.5% FBS for 48 hrs. Then cell were induced cell cycle progression by 20% FBS and combine with MLE, MLPE or not for 0, 12, 24 hrs. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. The quantitative data were presented as means \pm SD of three independent studies.

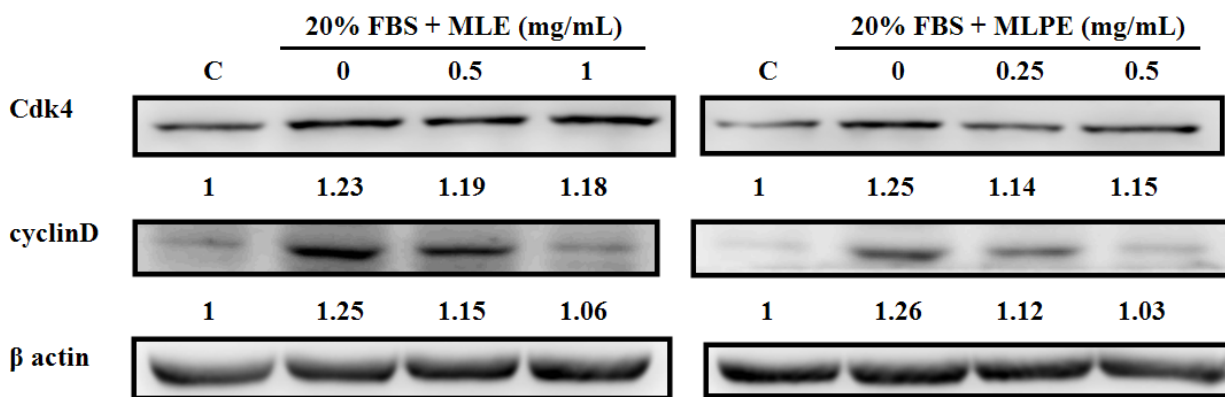


Figure 25. Effect of MLE and MLPE on the protein levels of CDK4 and cyclinD in A7r5 cells. Western blotting analysis of cyclins and CDKs protein expression in A7r5 cells. Cultured cells were pre-treated with 0.5% FBS for 48 hrs. Then cell were induced cell cycle progression by 20% FBS and combine with MLE, MLPE or not for 24 hrs. Co-treated with MLE or MLPE for various concentration as indicated. The proteins isolated from cell were analyzed via Western blot with anti-cdk4 and cyclinD antibody. The detailed method is described under "Experimental Procedures." The indicated arrow on the *right side* represents indicated protein. All data are expressed as a fold relative to control untreated cells. This result is representative of three independent experiments.

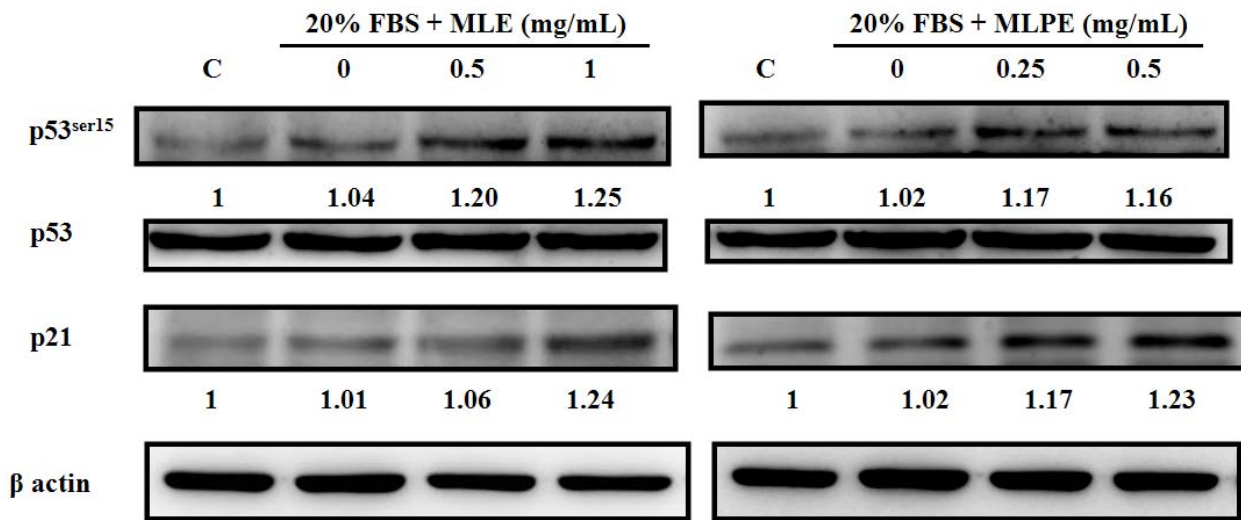
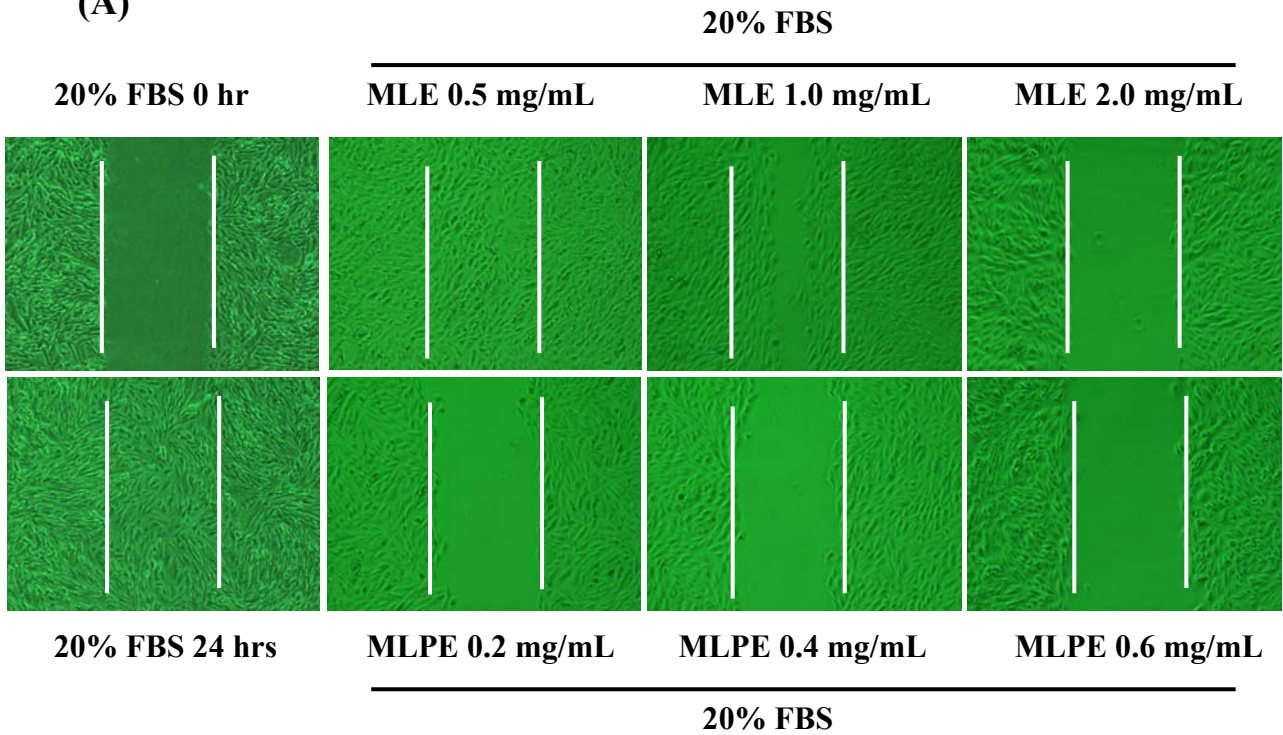


Figure 26. Effect of MLE and MLPE on the protein levels of p53 and CDKI in A7r5 cells. Western blotting analysis of p53 and CDKI protein expression in A7r5 cells. Cultured cells were pre-treated with 0.5% FBS for 48 hrs. Then cell were induced cell cycle progression by 20% FBS and combine with MLE, MLPE or not for 24 hrs. Co-treated with MLE or MLPE for various concentration as indicated. The proteins isolated from cell were analyzed via Western blot with anti- phospho-p53, p53 and p21 antibody. The detailed method is described under "Experimental Procedures." The indicated arrow on the *right side* represents indicated protein. All data are expressed as a fold relative to control untreated cells. This result is representative of three independent experiments.

(A)



(B)

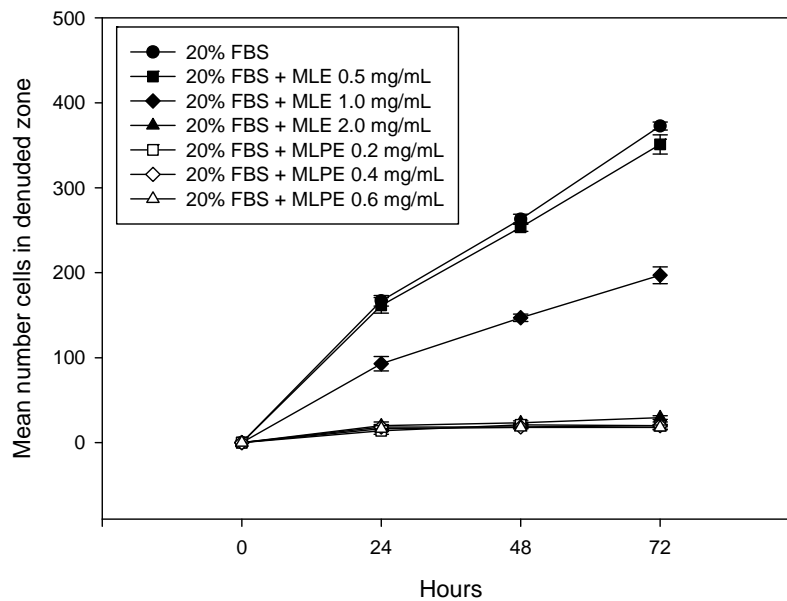


Figure 27. Cell migration of A7r5 cells was inhibited by MLE and MLPE. (A) Monolayers of growth-arrested A7r5 cells were scraped and the number of cells in the denuded zone and treated with 20% FBS plus various concentrations of MLE or MLPE. At indicated time, to observe the cells under a light microscopy. White lines indicate the wound edge. (B) Quantitative assessment of the mean number of cells at indicated time (0, 24, 48, 72 hrs) in the denuded zone and represents the average of three independent experiments means \pm SD.

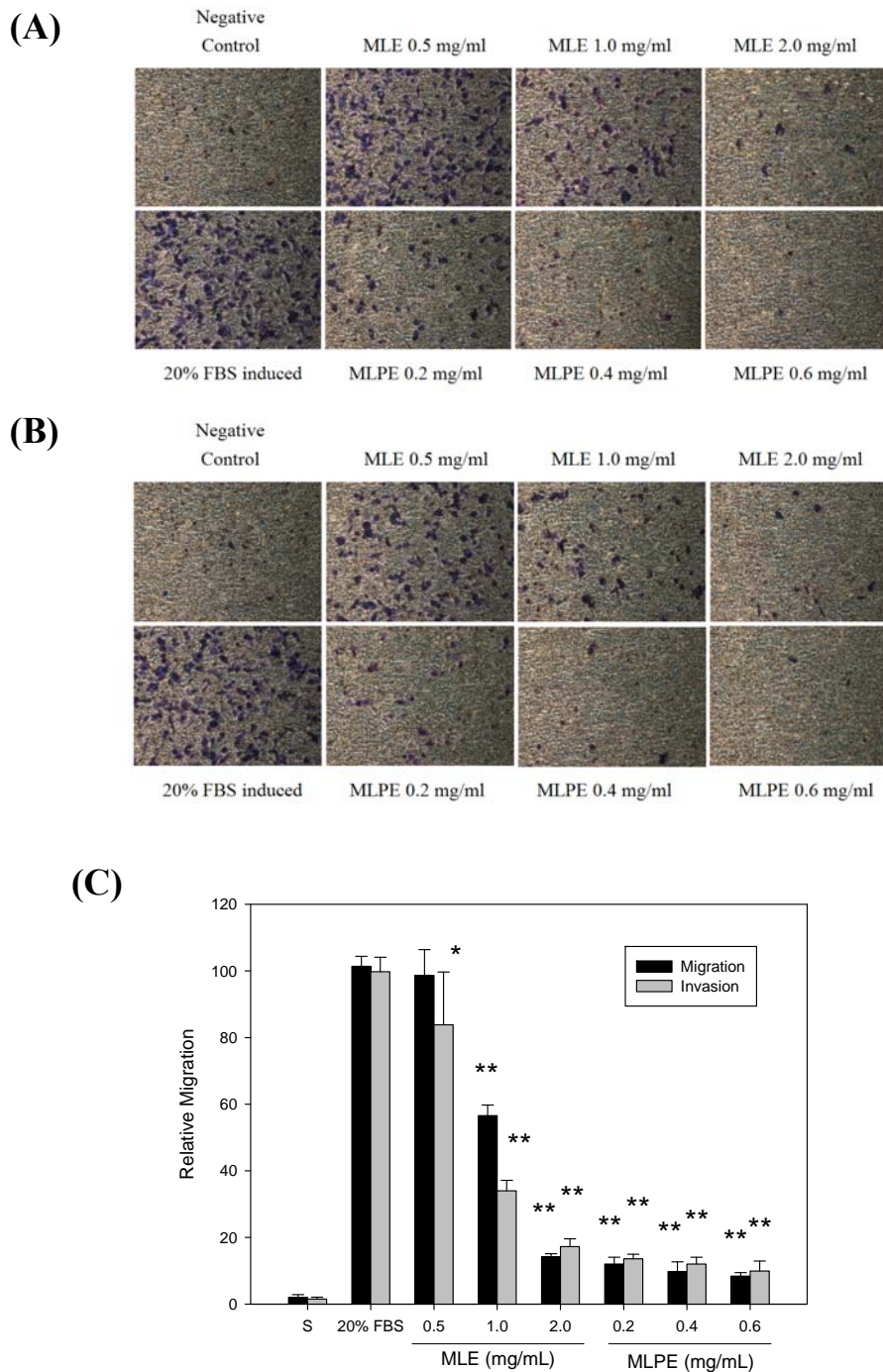


Figure 28. MLE and MLPE on cell migration and invasion of A7r5 cells by Boyden chamber assay. A7r5 cells treated with MLE or MLPE which were plated in the upper chamber of a modified Boyden chamber containing a membrane, and the number of cells on the underside of the membrane was quantitated 6 hrs later under a light microscopy. Representative photomicrographs of the migration cells (A) and invasion cells (B) were assayed by Giemsa stain. (C) Quantitative assessment of the mean number of cells. The data were means \pm SD from three experiments for each group. (* $p < 0.05$, compared with control and ** $p < 0.01$, compared with control).

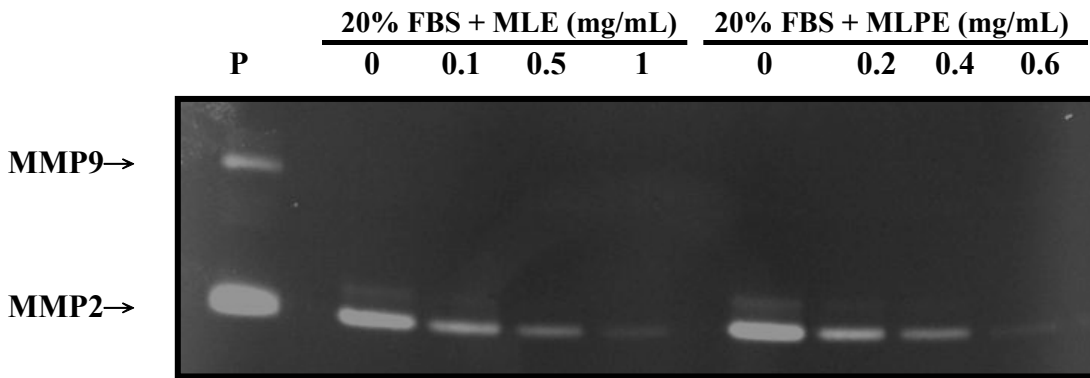


Figure 29. MLE and MLPE reduced MMP-2 activity by smooth muscle cells. A7r5 smooth muscle cells were separated into aliquots in 12-well plates in DMEM, 20% FBS (1×10^5 /well). After indicated of incubation, cells were washed with PBS, and media were replaced with serum-free DMEM to collect MMP-2. Conditioned media were collected and assayed for MMP-2 activity by zymography and as described under “Materials and Methods.” The data are representative of three experiments.

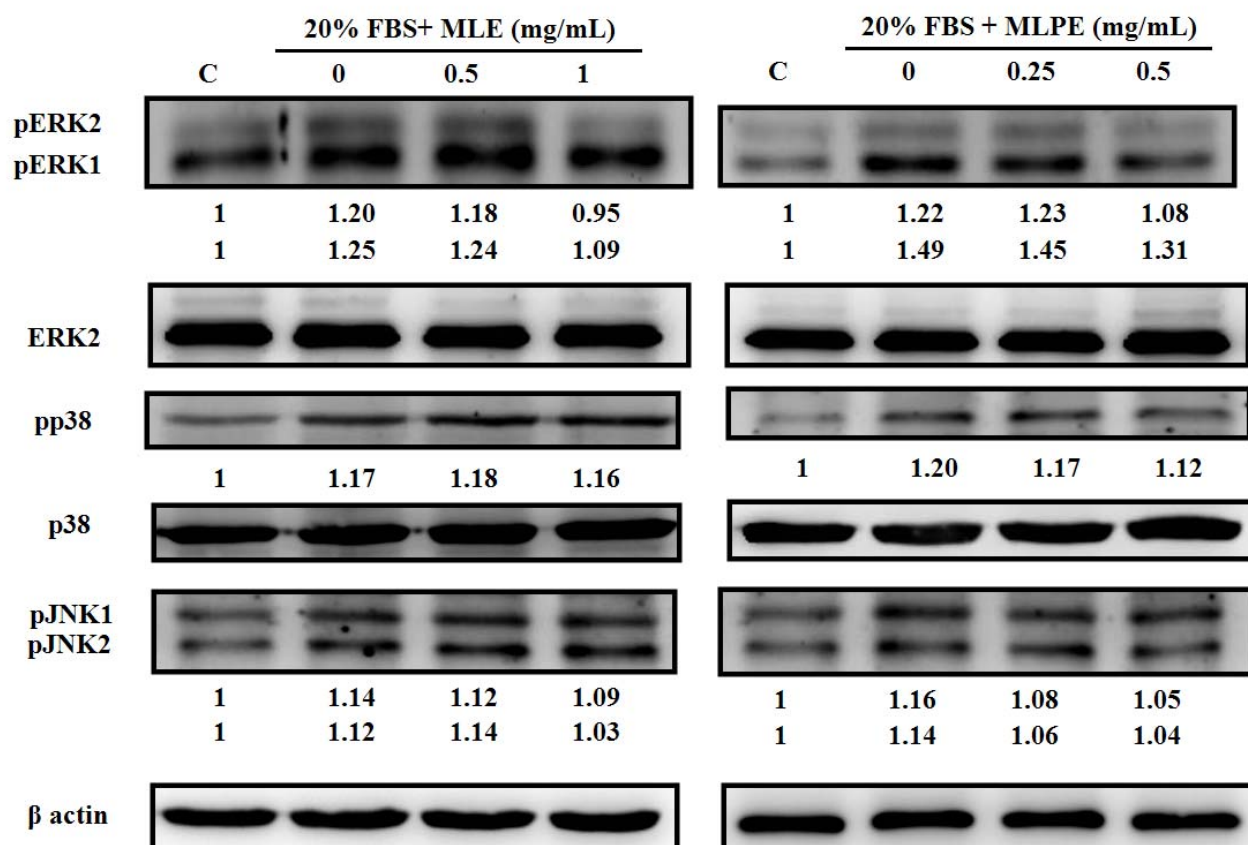


Figure 30. Effect of MLE and MLPE on the protein levels of MAPK family in A7r5 cells. Western blotting analysis of ERK1/2, p38 and JNK1/2 protein expression in A7r5 cells. Then cell were induced cell cycle progression by 20% FBS and combine with MLE, MLPE or not for 24 hrs. Co-treated with MLE or MLPE for various concentration as indicated. The proteins isolated from cell were analyzed via Western blot with anti- phospho-ERK, ERK2, phospho-p38, p38 phospho-JNK1/2 and β actin antibody. The detailed method is described under "Experimental Procedures." The indicated arrow on the *right side* represents indicated protein. All data are expressed as a fold relative to control untreated cells. This result is representative of three independent experiments.

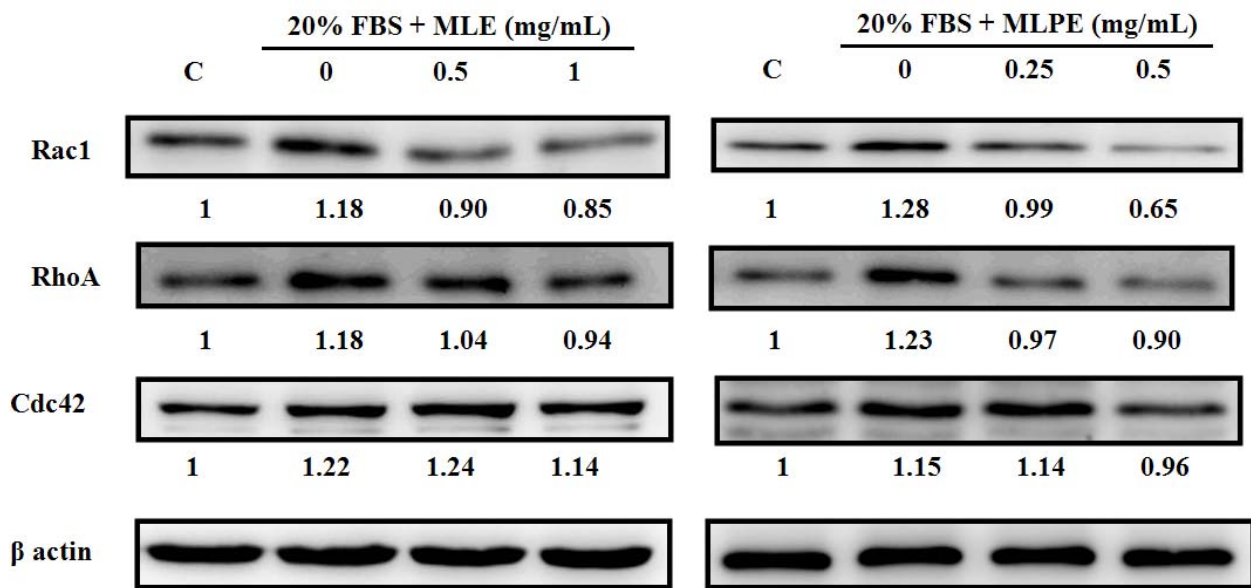


Figure 31. Effect of MLE and MLPE on the protein levels of Rac1, RhoA and Cdc42 in A7r5 cells. Western blotting analysis of Rac1, RhoA and Cdc42 protein expression in A7r5 cells. Then cell were induced cell cycle progression by 20% FBS and combine with MLE, MLPE or not for 24 hrs. Co-treated with MLE or MLPE for various concentration as indicated. The proteins isolated from cell were analyzed via Western blot with anti-Rac1, RhoA, Cdc42 and β actin antibody. The detailed method is described under "Experimental Procedures." The indicated arrow on the *right side* represents indicated protein. All data are expressed as a fold relative to control untreated cells. This result is representative of three independent experiments.

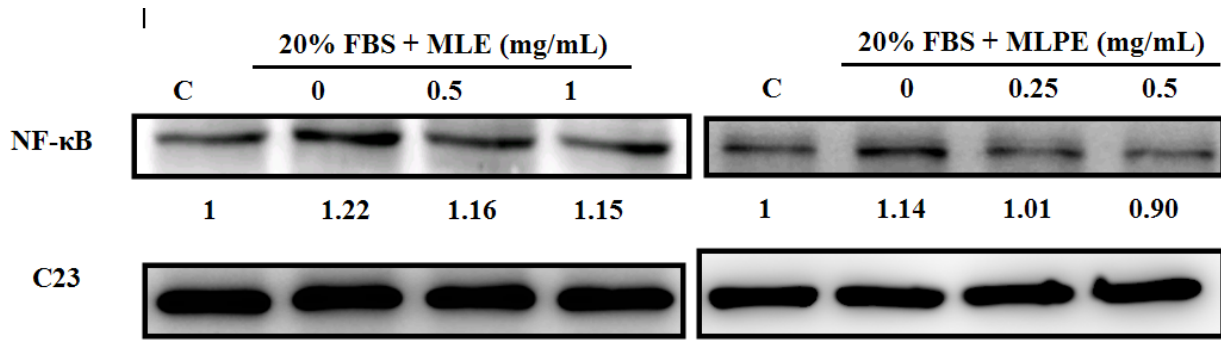


Figure 32. Effect of MLE and MLPE on translocation of NF-κB in A7r5 cells. Western blotting analysis of NF-κB and C23 protein expression in A7r5 cells. Then cell were induced cell cycle progression by 20% FBS and combine with MLE, MLPE or not for 24 hrs. Co-treated with MLE or MLPE for various concentration as indicated. The proteins isolated from cell were analyzed via Western blot with anti-NF-κB and C23 antibody. C23 as a nuclear protein control. The detailed method is described under "Experimental Procedures." The indicated arrow on the *right side* represents indicated protein. All data are expressed as a fold relative to control untreated cells. This result is representative of three independent experiments.

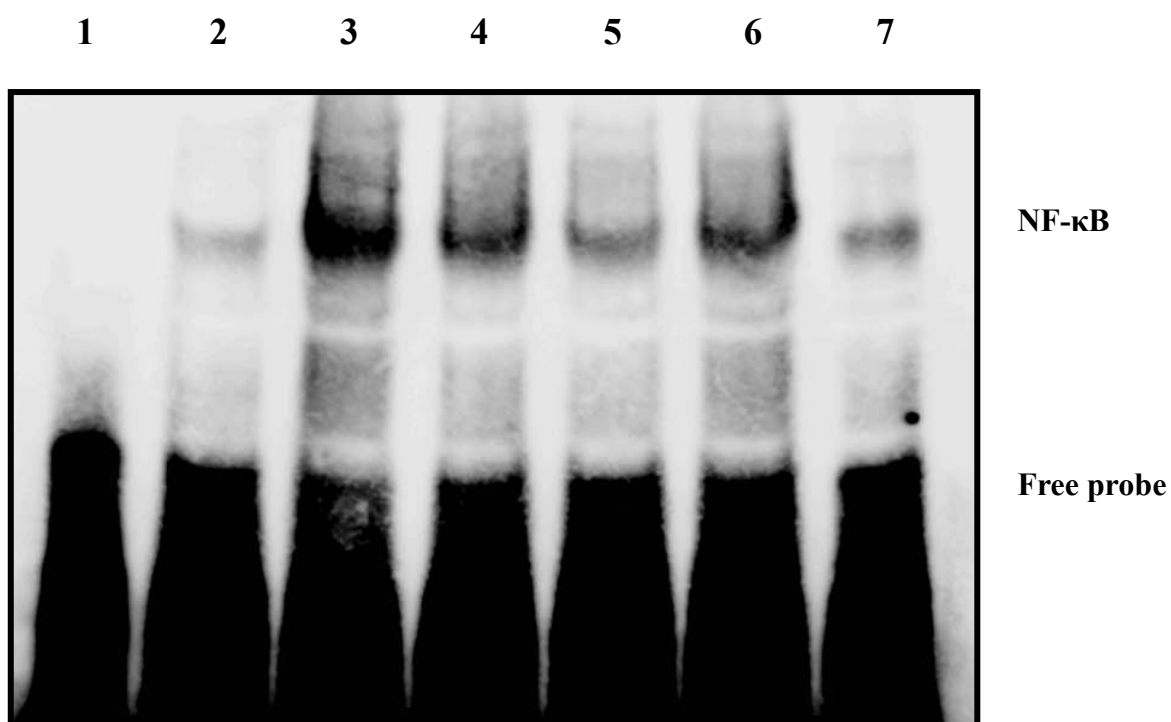


Figure 33. MLE and MLPE reduced NF- κ B DNA binding activity in 20% FBS-induced smooth muscle cells. A7r5 smooth muscle cells were separated into aliquots in 75T flask in DMEM. Cells were treated with 20% FBS and MLE (0.5 or 1.0 mg/mL) or MLPE (0.25 or 0.5 mg/mL) for 48 hrs. The cell nuclei protein were collected to analyzed in NF- κ B DNA binding activity by EMSA. Lane 1, specific oligonucleotide only without nuclei protein. Lane 2, Normal control group without 20% FBS-induced. Lane 3, Cell was treated with 20% FBS. Lane 4, Cell was treated with 20% FBS and MLE 0.5 mg/mL. Lane 5, Cell was treated with 20% FBS and MLE 1.0 mg/mL. Lane 6, Cell was treated with 20% FBS and MLPE 0.25 mg/mL. Lane 7, Cell was treated with 20% FBS and MLPE 0.5 mg/mL. The data are representative of three experiments.

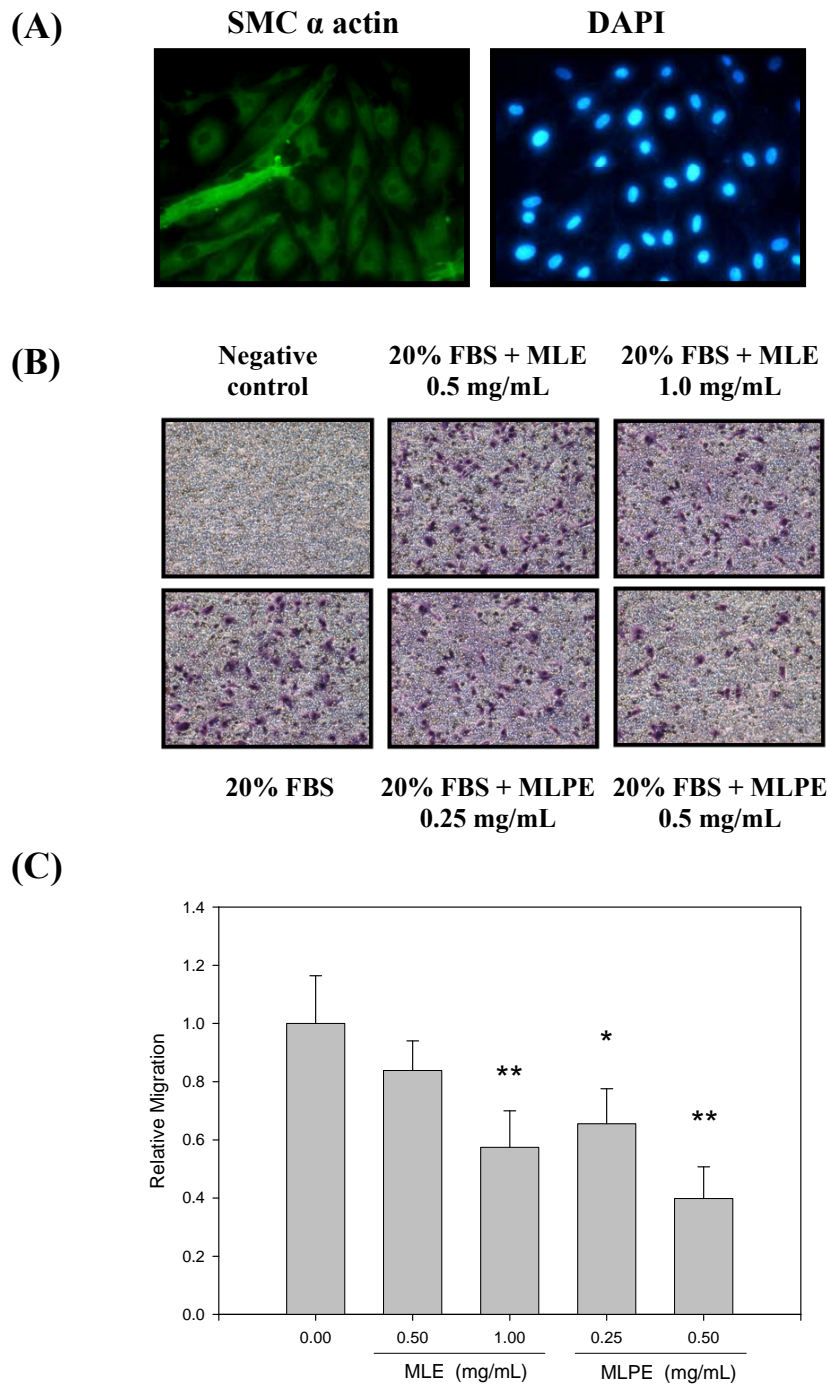
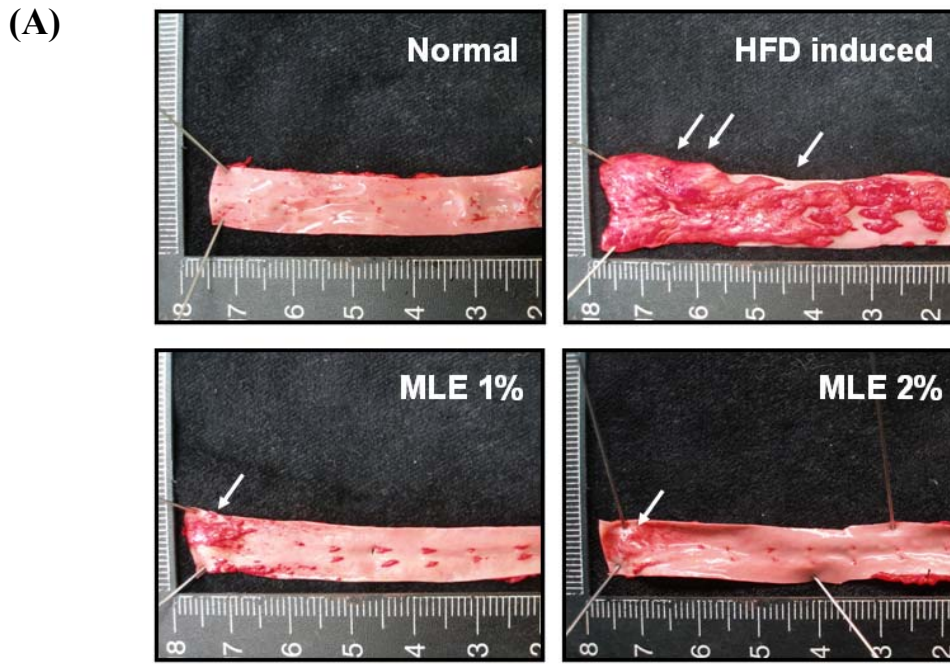


Figure 34. MLE and MLPE inhibited migration in rabbit aortic smooth muscle cells. A, Rabbit aortic smooth muscle cells were stained with SMC α actin and DAPI. Cells (5×10^4) were seeded onto the upper chamber for 6 hours. The 20% FBS was applied to the lower chamber as a chemoattractive agent. Cells that had migrated or invaded to the lower surface of the membranes were counted under a light microscope. B, Representative photomicrographs of the migration cells. C, The quantitative data was represented as mean \pm SD from three independent experiments. The migratory effect inhibited by MLE or MLPE was analyzed by *t* test. *, $p < 0.05$, compared with 20% FBS induced control. **, $p < 0.01$, compared with 20% FBS induced control.



Figure 35. Effect of MLE administration on atheromatous plaque formation in thoracic aortas of HCD-fed rabbits. Representative aortas photographs from rabbits fed HCD, HCD + MLE 1% or HCD + MLE 2% were dissected from its origin at the aortic valve to bifurcation of the internal iliac arteries.



(B)

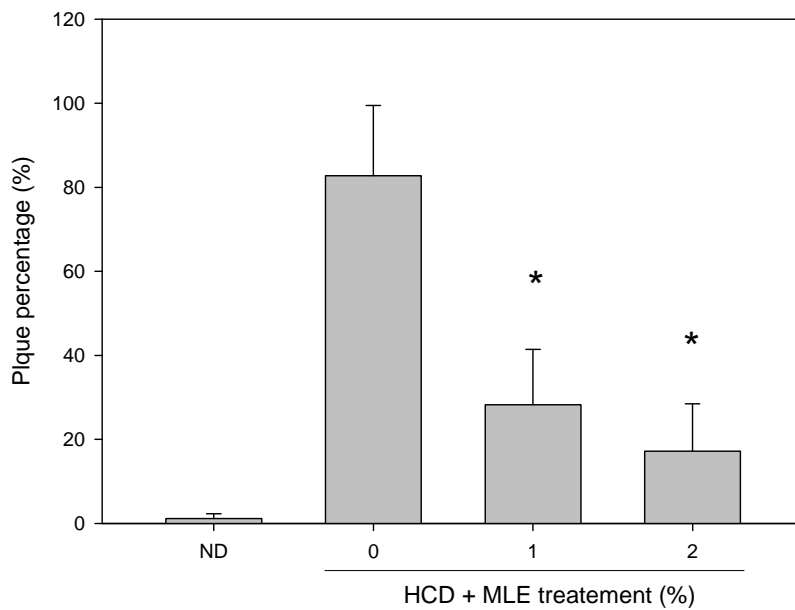


Figure 36. MLE inhibits atherosclerosis in HCD-fed rabbits. (A) Representative aortas photographs from rabbits fed HCD, HCD + MLE 1% or HCD + MLE 2% were dissected from its origin at the aortic valve to bifurcation of the internal iliac arteries and stained with oil red O. (B) The percent aortic area positively staining with oil red O was calculated. Values are shown as means \pm SD. *, $p < 0.01$, compared with HCD group.

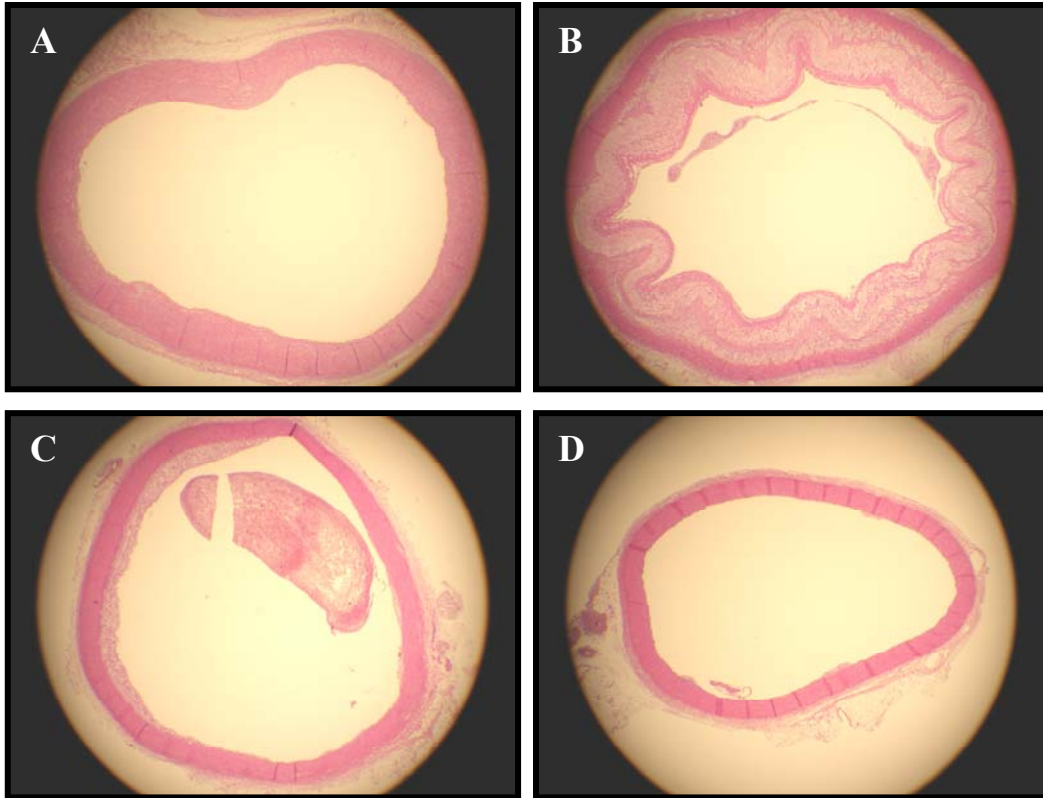


Figure 37. Histological photomicrographs of aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with HCD. A, The aortic segment of normal control group which was no lesion on luminal surface of aortic arch (H & E stain). B, The aortic segment of HCD-induced group which was high subintimal deposits of foam cells and extracellular lipids showing the extension and thickness of the aortic arch. C, The aortic segment of HCD + MLE 1% group which was subintimal deposits of foam cells which have a moderated extension with a medium thickness of thoracic aorta. D, The aortic segment of HCD + MLE 2% which was development of fatty streak in the intimal of abdominal aortoiliac bifurcation. (40 ×)

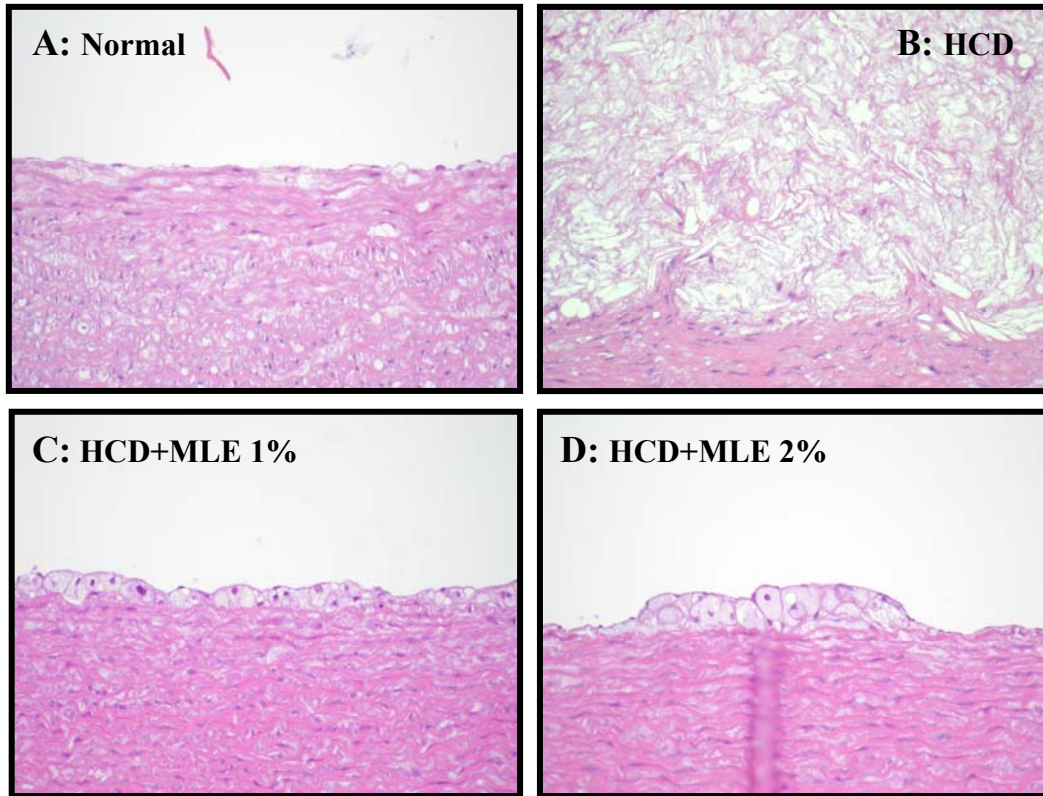


Figure 38. Histological photomicrographs of aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with HCD. A, The aortic segment of normal control group which was no lesion on luminal surface of aortic arch (H & E stain). B, The aortic segment of HCD-induced group which was high subintimal deposits of foam cells and extracellular lipids showing the extension and thickness of the aortic arch. C, The aortic segment of HCD + MLE 1% group which was subintimal deposits of foam cells which have a moderated extension with a medium thickness of thoracic aorta. D, The aortic segment of HCD + MLE 2% which was development of fatty streak in the intimal of abdominal aortoiliac bifurcation. (200 ×)

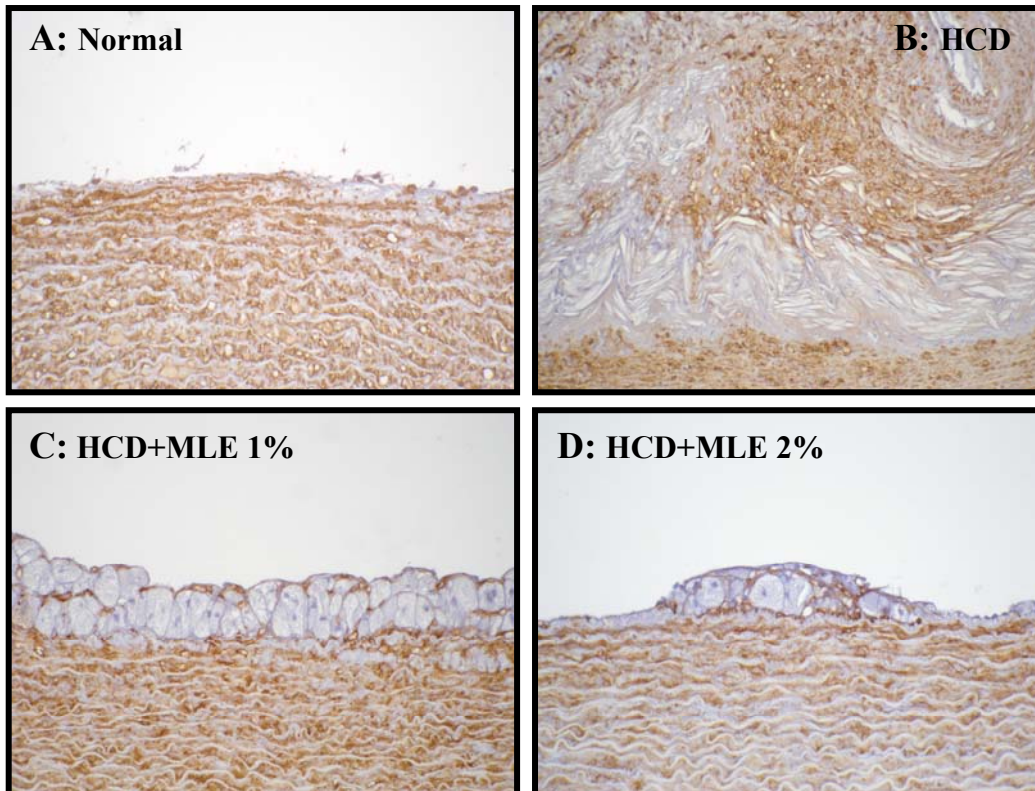


Figure 39. MLE reduced HCD-induced smooth muscle cells migration in the intimal of aortic arch. Immunohistochemistry for Smooth muscle cell α actin reveal smooth muscle cells location in the aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with HCD. A, The aortic segment of normal control group which was no lesion on luminal surface of aortic arch (SMC α actin). B, The aortic segment of HCD-induced group which was high subintimal deposits of foam cells and extracellular lipids showing the the aortic arch. C, The aortic segment of HCD + MLE 1% group which was subintimal deposits of foam cells which have a few SMC α actin positive cells in thoracic aorta. D, The aortic segment of HCD + MLE 2%. (200 \times)

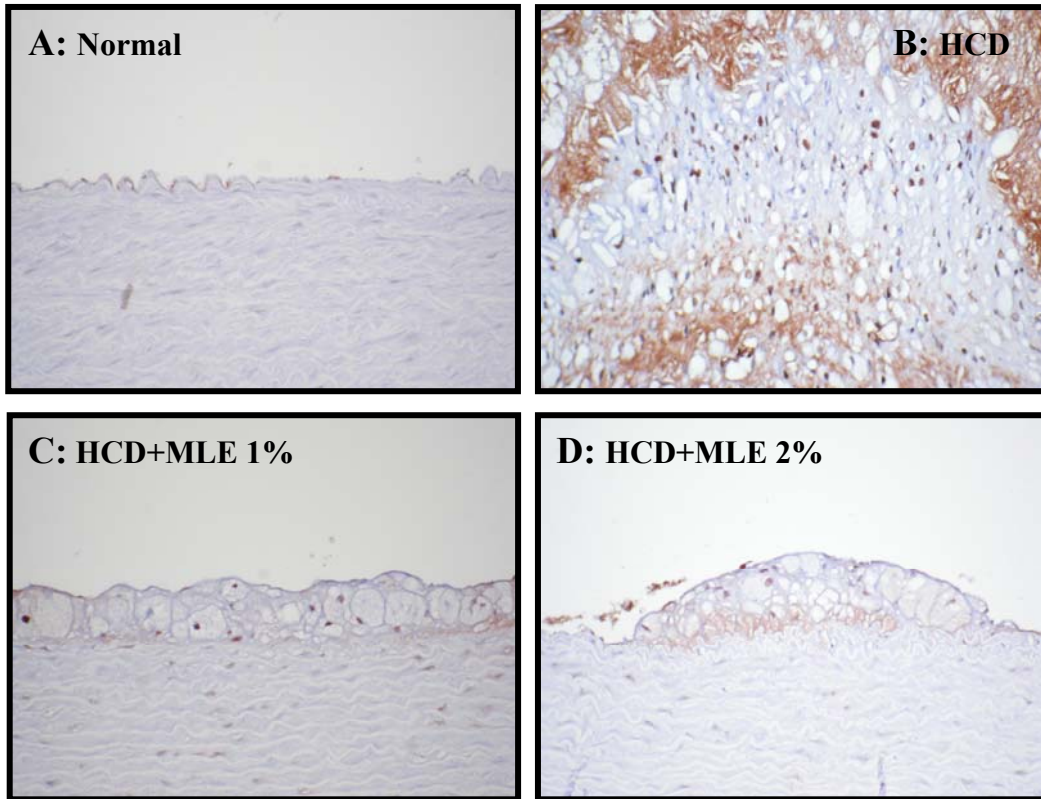


Figure 40. MLE reduced HCD-induced smooth muscle cells proliferation in the intimal of aortic arch. Immunohistochemistry for PCNA reveal proliferation cells in the aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with HCD. A, The aortic segment of normal control group which was no lesion on luminal surface of aortic arch (PCNA). B, The aortic segment of HCD-induced group which was high subintimal deposits of foam cells and extracellular lipids showing the aortic arch. C, The aortic segment of HCD + MLE 1% group which was subintimal deposits of foam cells which have a few PCNA positive cells in thoracic aorta. D, The aortic segment of HCD + MLE 2% which was no lesion on luminal surface of aortic arch. (200 ×)

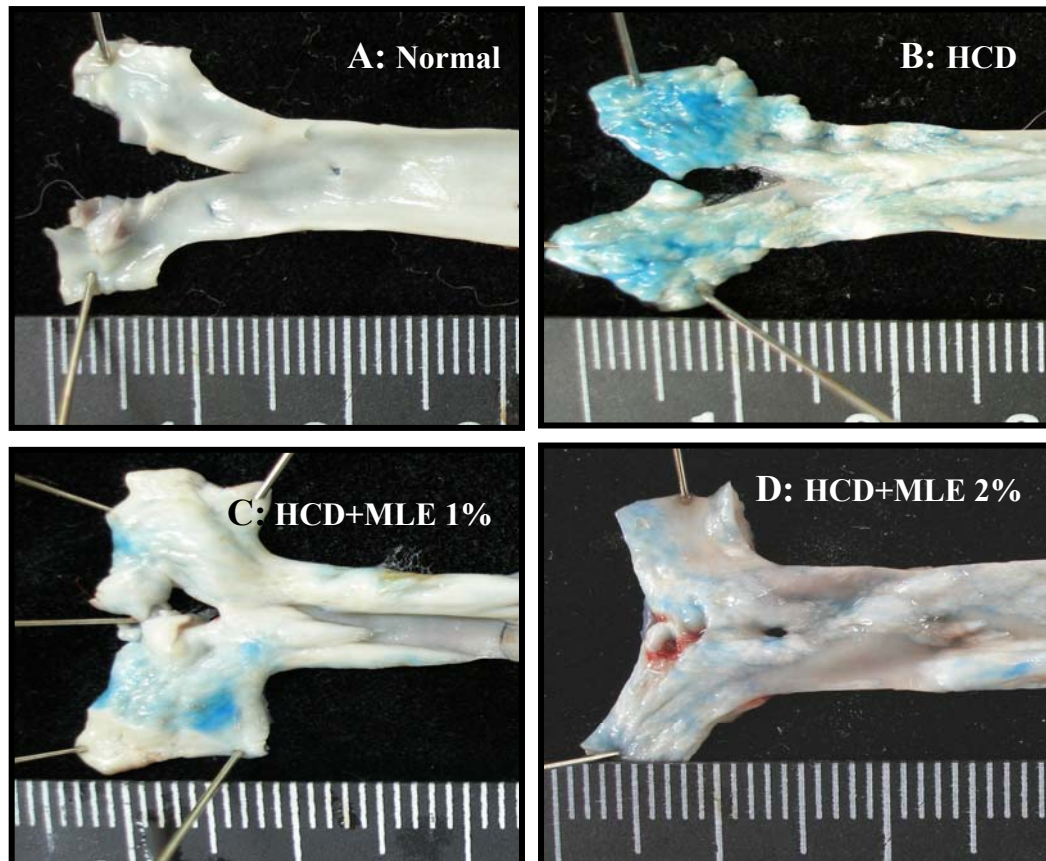


Figure 41. MLE reduced aortic endothelial injury in HCD-fed rabbit. Evans blue indicated the endothelial injury site. The aortic segment of normal control group which was no lesion on luminal surface of aortic arch. The aortic segment of HCD-induced group which was positive Evans blue stain showing the extension and endothelial injury of the aortic arch. The aortic segment of HCD + MLE 1% group which was moderated Evans blue stain extension on thoracic aorta. The aortic segment of HCD + MLE 2% which was weakly Evans blue stain extension on the aortic arch.

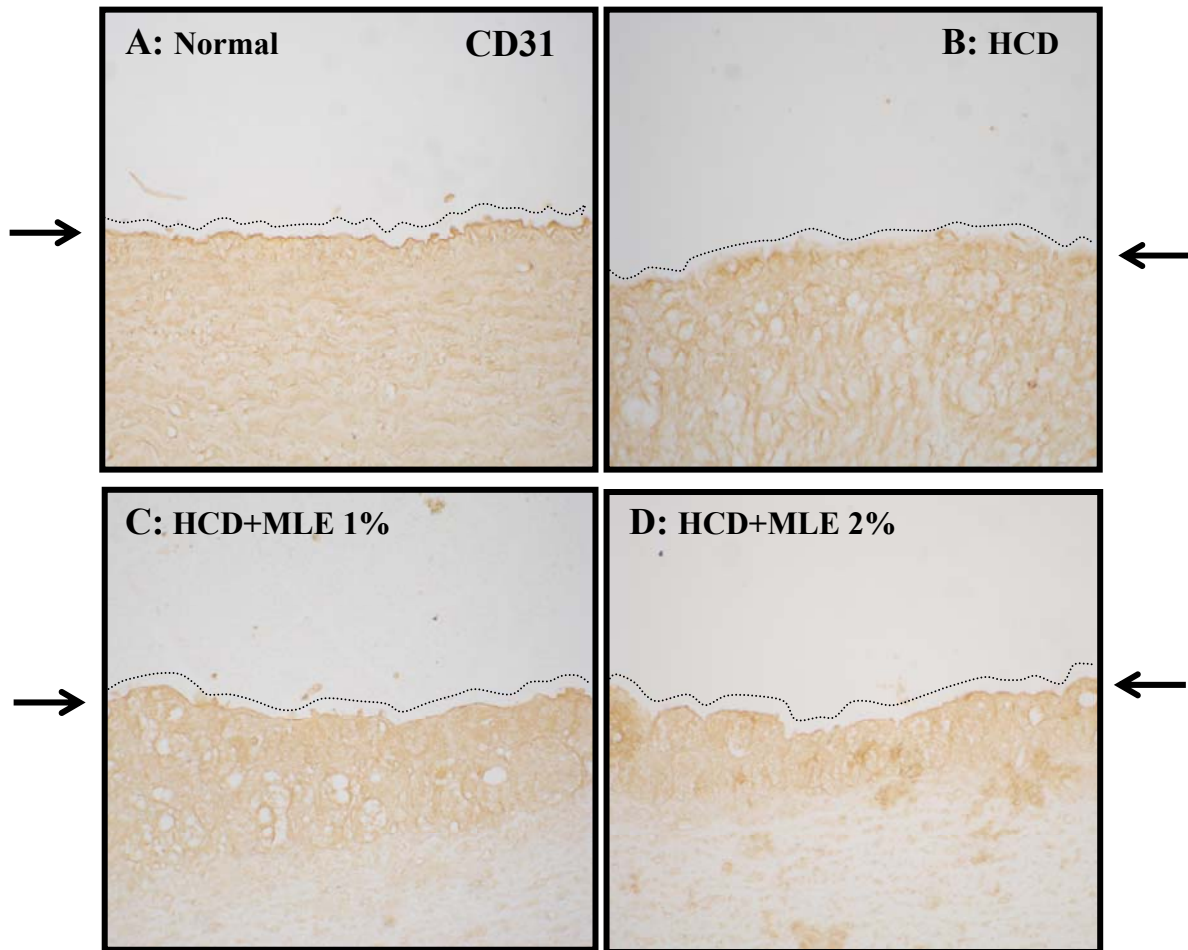


Figure 42. MLE reduced aortic endothelial injury in HCD-fed rabbit. Immunohistochemical evaluation of CD31 expression on cryostatic sections reveals the weak positivity of endothelial cells in an area far from branches of HCD-induced atherosclerotic rabbit (B), in contrast with the marked positive reaction in the same area in normal rabbit aorta (A). C, Representative aortas photomicrographs was the aortic segment of HCD + MLE 1%. D, Representative aortas photomicrographs was the aortic segment of HCD + MLE 2%.

本計畫已有相關期刊論文發表

1. Chan, K. C. Ho, H. H. Huang, C. N. Lin, M. C. Chen, H. M. Wang, C. J. **Mulberry leaf extract inhibits vascular smooth muscle cell migration involving a block of small GTPase and Akt/NF-kappaB signals.** *J Agric Food Chem* 57, 9147-53, 2009
2. Chan KC, Ho HH, Peng CH, Lan KP, Lin MC, Chen HM, Wang CJ. **Polyphenol-rich extract from mulberry leaf inhibits vascular smooth muscle cell proliferation involving upregulation of p53 and inhibition of cyclin-dependent kinase.** *J Agric Food Chem.* 24, 58, 2536-42, 2010
3. Mon-Yuan Yang, Chiung-Huei Peng, Chien-Ning Huang, Chau-Jong Wang. **Mulberry Leaves Extract Reduces Macrophage Oxidative State and Foam Cell Formation Induced By Oxidative LDL.** *Journal Agricultural Food and Chemistry* 2010, (Submitted)

無衍生研發成果推廣資料

96 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：王朝鐘		計畫編號：96-2628-B-040-022-MY3					
計畫名稱：桑葉多酚抑制血管病變之作用及分子機轉研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	2	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	2	0	100%	人次	
		博士生	2	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

桑葉水萃取物與桑葉多酚萃取物確實具有減緩動脈粥狀硬化之作用，由於桑葉在國內廣泛遍佈，因此本研究成果可應用於發展為降低心血管疾病發生之健康食品。