

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

大蒜精油及其有機含硫成分對於促發炎性細胞激素誘發之
IEC-18 細胞死亡及障壁衰竭之調節作用探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-040-035-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中山醫學大學營養科學研究所

計畫主持人：劉承慈

共同主持人：沈立言

計畫參與人員：李宗貴 鄭琳霓

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

中文摘要

在促發炎細胞激素作用下，可因誘發 iNOS 表現、產生大量 NO，使小腸上皮細胞受損，且促發炎細胞激素在許多正常細胞類型可同時誘生調節細胞凋亡及抗凋亡分子之表現。大蒜含硫成分雖然可抑制 iNOS 基因轉錄作用，但相同的機制亦會抑制抗凋亡蛋白 bcl-X_L 基因轉錄。本研究之目的是觀察大蒜精油(GO)及其含硫成分(OSCs)在有或無促發炎細胞激素存下對於小腸上皮細胞株 IEC-18 存活率之影響及其相關機制。研究方法係以促發炎細胞激素混合物(CM)或載劑加入細胞培養液中，並添加 GO(0-250 µg/mL)，DAS (0-5 mM)，DADS (0-5 mM)，DATS (0-5 mM)，觀察對於細胞存活率，NO 產量，抗凋亡蛋白 bcl-X_L 表現及 apoptosis 之影響，並以 iNOS 抑制劑 aminoguanidine (0.5 or 5 mM) 做為 positive control，觀察 NO 產生與細胞存活率之間的關係。結果顯示，CM 顯著增加 NO 產生，伴隨降低之細胞存活率。而在 CM 存在下，除 DAS 無顯著作用外其餘受試之 GO 及其 OSCs 均呈劑量依賴性抑制 NO 產生，而細胞存活率在所有 GO 及其 OSCs 處理組均呈劑量依賴性下降。此外，GO，DAS，DADS 及 DATS 在無 CM 存在下之 LC₅₀ 分別為 3.9 µg/mL，0.052 mM，0.032 mM，0.022 mM；而在 CM 存在下之 LC₅₀ 分別為 0.75 µg/mL，0.047 mM，0.0074 mM，0.0027 mM，且對於細胞存活率最大抑制作用亦隨大蒜精油成分之含硫數增加而增加。相反於 GO 及其 OSCs 之作用，以 AG 抑制 CM 所致之 NO 產生時，可逆轉 CM 降低之細胞存活率，顯示 GO 及其 OSCs 導致細胞流失的作用並非因為使細胞產生較低量之 NO。Western blotting 之結果顯示，GO 及其 OSCs 抑制 CM 所誘發之抗凋亡蛋白 bcl-X_L 表現且惡化 CM 所誘發之細胞 apoptosis。由本研究之結果顯示：促發炎性細胞激素作用下，小腸上皮細胞存活率對於 GO 及其 OSCs 之細胞毒性感受性增加，且與 GO 及其 OSCs 作用下所致之 NO 產生減少無關而至少有部分與其抑制細胞抗凋亡蛋白表現有關。

關鍵字:促發炎細胞激素、大蒜精油、有機含硫化合物、細胞凋亡、小腸上皮細胞

英文摘要

Proinflammatory cytokines-induced iNOS expression and the subsequent massive NO production can result in the damage of intestinal epithelial cells. In addition, the expression of both apoptotic and anti-apoptotic molecules can be induced by proinflammatory cytokines in several normal cell types. Although the OSCs derived from garlic inhibit the transcription of iNOS gene, they may inhibit the transcription of the gene of bcl-X_L, an anti-apoptotic protein, through the same mechanism. The aim of the present study is to investigate the effect of garlic oil and its OSCs on the viability of an intestinal epithelial cell line IEC-18 in the absence or presence of proinflammatory cytokines and the underlying mechanisms. This study was carried out by investigating cell viability, NO production, anti-apoptotic protein bcl-X_L expression and apoptosis after adding GO(0-250 µg/mL), DAS (0-5 mM), DADS (0-5 mM), DATS (0-5 mM) into the culture medium of IEC-18 cell line in the absence or

presence of a cytokine mix (CM). The effect of aminoguanidine (0.5 or 5 mM), an iNOS inhibitor, on the viability of IEC-18 was investigated as a positive control for clarifying the association of NO production and cell viability. CM significantly elevated NO production in accompany with suppressed cell viability. All tested garlic compounds, except DAS, showed dose-dependent inhibitory effect on NO production in the presence of CM in accompany with suppressed cell viability. In addition, values of LC₅₀ for GO, DAS, DADS and DATS are 3.9 µg/mL, 0.052 mM, 0.032 mM and 0.022 mM, respectively, in the absence of CM and are 0.75 µg/mL, 0.047 mM, 0.0074 mM and 0.0027 mM, respectively, in the presence of CM. The inhibitory effect of OSCs on cell viability increased when the sulfur number in the compound increase. In contrast to the effect of GO and OSCs, the inhibition of NO production by AG reversed CM-suppressed cell viability, suggesting the loss of cells by GO and its OSCs are not associated with the suppression of NO production by these compounds. The result from Western blotting demonstrated that GO and its OSCs inhibit CM-induced expression of bcl-X_L and worsened CM-induced apoptosis. These results suggest that in the presence of proinflammatory cytokines, IEC is more susceptible to the cytotoxicity of GO and its OSCs. The cytotoxicity of GO and its OSCs to IEC in the presence of CM is not associate with the inhibition of NO production but is, at least partly, associate with the inhibitory effect on the expression of anti-apoptotic protein.

Keywords: Proinflammatory cytokines; Garlic oil; Organosulfur compounds; Apoptosis; Intestinal epithelial cells

報告内容

一、前言

已知大蒜及其有機含硫成分(OSCs)有許多有利的生理及生化作用，故被積極開發為健康食品。另一方面，大蒜及其 OSCs 對於異常的贅生細胞具有抗增生及毒殺之細胞毒性，可透過促進程式凋亡路徑在低劑量下造成一些贅生細胞死亡。雖然在健康人體，服用大蒜製備物有其安全性，但尚不清楚某些病理狀態是否會促進大蒜對於正常細胞之細胞毒性。我們過去以內毒素誘發大鼠腸道菌叢感染的活體研究模式發現，在正常狀態下不造成小腸黏膜損傷之大蒜精油 OSCs 之劑量，卻會促進發炎狀態下小腸黏膜之破壞，促進腸道菌轉移。雖然文獻中建議，內毒素誘發大鼠腸道菌叢感染的原因之一是透過誘生 iNOS 活性及伴隨之大量 NO 產生，但是我們對去的發現卻顯示 *in vivo* 大蒜精油及其 OSCs 在注射內毒素大鼠之小腸黏膜毒性伴隨對於 iNOS 活性之抑制作用。因為已知大蒜精油及其 OSCs 抑制 iNOS 活性的主要機制之一是藉由抑制轉錄因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 的活化所致，然而 NF- κ B 亦能調控抗程式凋亡因子 e. g. bcl- χ _L 之轉錄。因此，我們懷疑上述大蒜成分在注射內毒素小鼠所致之腸道損傷惡化，可能是由於注射內毒素所致之促發炎細胞激素增加了小腸上皮細胞對於上述大蒜成分細胞毒性之感受性，因此希望藉由活體外研究模式，利用大鼠迴腸上皮細胞株 IEC-18，觀察在促發炎細胞激素作用下 GO 及其 OSCs 對於細胞存活率之影響及相關機制。

二、研究目的

根據文獻報導及我們過去以大鼠進行之活體研究結果，本計畫申請人之研究目的係為驗證以下假說：(1)在發炎性 cytokines 作用下，IEC 存活率對於大蒜精油及其有機含硫成分之感受性高於在正常狀況下因而較亦受損，且(2) 大蒜精油及其有機含硫成分可能經由調節細胞之 apoptosis 而影響細胞存活，且(3)其對於細胞存活率之影響與降低細胞 NO 產量無關。由於大蒜精油之有機含硫成分生物學作用被認為與含硫數有關，故本研究觀察比較 DAS、DADS 及 DATS 及富含這些成分之天然製品—GO 之上述作用，以利對於實際應用這些成分時之參考。

三、文獻探討

小腸上皮細胞(intestinal epithelial cell, IEC)由腺窩(crypt)增生而來，是人體 turnover rate 最快的細胞之一，因為頻繁與來自飲食之各種物理性及化學性或微生物性質之傷害因子接觸，因此須快速增生更新以維持正常功能。不論因腸道組織受傷(例如潰瘍性腸炎或截腸術)、缺血-復甦(例如系統性發炎反應)或腸道病菌感染引起之發炎性腸道灶，都會因淋巴細胞或單核細胞浸潤黏膜組織而持續在黏膜局部增加發炎性 cytokines 含量，包括 IL-1 β 、TNF α 及 IFN γ ，而促進更多白血球黏著及遷移至發炎部位及促進發炎細胞產生殺菌物質(包括氧自由基，nitric oxide)以利排除病原，但也會造成上皮細胞破壞之病理狀態，影響其障壁功能¹⁻⁷。雖然在活體內小腸黏膜在發炎時的變化，是循環系統、免疫系統、黏膜系統及腸腔 flora 等變化之多重系統間交互作用的結果，但在發炎狀態下於活體內所觀察到的小腸障壁功能、增生及存活率變化至少部分可單獨以 IEC 受到發炎性 cytokines 之作用所發生的變化來解釋。

在動物實驗中發現 TNF 會作用在 TNFR1，經由誘發 caspase 活性誘發小鼠小腸絨毛尖的上皮細胞 apoptosis 及細胞剝落⁸⁻¹⁰。活體外觀亦顯示，以 TNF 直接刺激小腸上皮細胞會造成其 apoptosis^{11,12}；而 IFN γ 及其他促發炎細胞激素可更進一步增加 TNF 對於小腸上皮細胞之細胞毒性⁸。然而一些研究也指出，在許多正常細胞，包括小腸上皮細胞，TNF 可能不易啟動大規模 apoptosis，因為在這些細胞 TNFR 活化時可同時誘發 apoptotic factor 及 inhibitor，而 apoptotic inhibitor 之表現有賴轉錄因子 NF- κ B 活化；若刺激 TNFR 時同時存在 NF- κ B inhibitor，則可誘發細胞 apoptosis¹³⁻¹⁶。另一方面，發炎性 cytokines IL-1 β 、IFN γ 及 TNF α 可透過在 IEC 誘發 iNOS 活性致使大量 NO 產生。人類小腸發炎性病灶上皮有持續之 iNOS 表現增加，組織形態學研究顯示小腸細胞 apoptosis 之位置與增加 iNOS 活性的位置相符¹⁷。動物實驗投用內毒素後於十二指腸及迴腸之上皮細胞也發現 iNOS 表現及其活性增加，且與細胞死亡及腸道細菌轉移有關^{18,19}；且若在內毒素或其他原因引起的發炎性腸道投用 NOS 抑制劑 L-NAME、Aminoguanidine 或 NOX，均可消除內毒素誘發之小腸細胞 apoptosis 及傷害並減少腸道菌轉移¹⁹⁻²²。活體外研究結果顯示，發炎時 IEC 之 iNOS 表現及其活性之增加及大量 NO 產生至少部分是直接因受到發炎性 cytokines 之作用；IEC 細胞株單獨暴露在 IFN- γ 或同時暴露於 IL-1 β 與 TNF- α 之下時，呈現時間依賴性 NO 產量之增加^{23,24}。

過去對於大蒜細胞毒性之了解多來自於對於腫瘤細胞的研究。許多以不同大蒜製備物進行的 chemopreventive 活性研究顯示，大蒜精油及許多衍生自大蒜之有機含硫成分(OSCs)中 chemopreventive 活性主要是來自其 OSCs，且其中又以油溶性 allyl sulfide 化合物之 antiproliferative 作用較有效，而其抑制增生的作用與抑制細胞週期進行及誘發 apoptosis 有關²⁵。且文獻中也指出，這些大蒜成分對於腫瘤細胞之細胞毒性與含硫數有關，在對於人類 neoplastic A549 及 nonneoplastic MRC-5 肺細胞株之觀察中發現，10 μ M DATS 即可降低病變細胞 A549 生長達 47%，但 10 μ M DADS 僅降低 A549 生長達 20%，且同上劑量之 DATS 不影響非病變細胞 MRC-5 生長，表示異常細胞與正常細胞對於 DATS 之感受性不同²⁶。另一方面，過去其他學者的研究發現長時間食用大蒜對於 iNOS 活性具有抑制效果²⁷；以 LPS 活化之巨噬細胞株 RAW264.7 發現，allicin 及 ajoene 兩種大蒜成分均可抑制巨噬細胞之 iNOS 的表現，減少 nitrite 的產生²⁸。而以 LPS 及 IFN- γ 活化之巨噬細胞株 RAW264.7 則發現，大蒜萃取物及主要成分 S-allyl cysteine (SAC) 可經由抑制 iNOS 表現來抑制 NO 產生²⁹。這似乎建議，大蒜成分有利於對於腸道發炎性病灶之保護。然而，本計畫申請人過去在活體試驗發現，對 iNOS 抑制作用最大的 DATS 也呈現最大惡化 BT 的作用³⁰。雖然有可能 iNOS 活性下降可能是細胞存活率降低的後果，但本計畫申請人推論由於 iNOS 之活化及包括 bcl-X_L 之 anti-apoptotic factors 之表現均需透過轉錄因子 NF- κ B^{31,32}，而大蒜 OSCs 在發炎性 cytokine 刺激下之淋巴細胞及血管內皮細胞可抑制 NF- κ B 活性^{33,34}，故發炎性細胞激素刺激下大蒜 OSCs 造成之 IEC 破壞與 iNOS 活性降低極有可能都是抑制 NF- κ B 活化的後果。本研究希望釐清在有或無促發炎細胞激素存在下 GO 及其 OSCs 對於 IEC 細胞毒性的差異以及釐清調節 NO 產生是否對於大蒜成分影響 IEC 細胞存活率扮演一個角色。

四、研究方法

(一)大蒜精油製備及含硫成分分析

大蒜精油之製備如 Sheen et al. (1992)所述³⁵。簡言之，將新鮮大蒜去皮破碎後立即利用蒸氣蒸餾技術收集其中揮發性精油衍生物；所收集的大蒜精油經分析其中主要成份包括 40% diallyl disulfide (DADS), 35% diallyl trisulfide (DATS), 10% diallyl sulfide (DAS), 及許多其他少量揮發性化合物。

(二)IEC-18 細胞培養

腸道上皮細胞株 IEC-18 購自新竹食工所菌種中心，細胞培養在 DMEM 培養液 (含 5% FBS, 1 unit/ml insulin, 1% penicillin-streptomycin [10 units/ml penicillin 和 10 μ g/ml streptomycin]) 中，並置放於 37°C 含 5% CO₂ 之培養箱中，實驗所用細胞繼代數維持在 n+9 至 n+12 代間。待 75T flask 的細胞長至八分滿時，分盤於 6 cm dish 中，密度分別為 0.25 $\times 10^5$ 、0.5 $\times 10^5$ 、1 $\times 10^5$ 、2.5 $\times 10^5$ cells/100 μ L，在所需的培養時間(24、48、72、96hrs)結束後將細胞打下，離心 300 g、5 分鐘後，加入 1ml DMEM，取 10 μ l 計數細胞，作細胞計數實驗。剩下的 cell 再次離心 300g、5 分鐘，去除上清液，細胞沉澱物以 Bio-Rad kit 進行蛋白質濃度測定實驗。

(三)細胞存活率測定

細胞以 0.5 $\times 10^5$ cells/100 μ l/well 接種於 96 孔盤並在二氧化碳培養箱(5% CO₂, 37°C)培養 4 h 使其貼盤，然後如在有或無加入 cytokine mix (CM; 200 U/ml IFN- γ 、5ng/ml IL-1 β 及 100 ng/ml TNF- α)³⁶ 條件下加入不同濃度 garlic oil (GO; 0-250 μ g/mL), DAS (0-5 mM), DADS (0-5 mM) 或 DATS (0-5 mM) 並以 iNOS 抑制劑 aminoguanidine (AG; 0.5 or 5 mM) 為 positive control。其後再經 24 或 48 h 以 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide) 分析套組，以分光光度計依廠商說明分析細胞存活率。

$$\text{細胞存活率}(\%) = \frac{(A_{570\text{nm}} - A_{630\text{nm}})_{\text{sample}}}{(A_{570\text{nm}} - A_{630\text{nm}})_{\text{control}}} \times 100\%$$

(四)一氧化氮 (Nitrite; NO₂⁻) 分析

細胞產生之 NO 會很快的轉為較穩定的 NO₂+NO₃ 形式，因此測量細胞培養液中 NO₂+NO₃ 濃度代表細胞之 NO 產量。細胞以 0.5 $\times 10^5$ cells/100 μ l/well 接種於 96 孔盤並在二氧化碳培養箱(5% CO₂, 37°C)培養 4 h 使其貼盤，然後加入或不加入 CM，並在有 CM 條件下加入如上述不同濃度 GO, DAS, DADS 或 DATS 並以 iNOS 抑制劑 aminoguanidine (AG; 0.5 or 5 mM) 為 positive control。其後再經 48 小時，取出上清液依據廠商說明書，利用 NO₂/NO₃ kit 分析，並利用 NaNO₂ 及 KNO₃ 製作標準品所得曲線比對，計算樣品濃度。

(五) Bcl-X_L 蛋白質定量分析(西方墨點法)

Bcl-X_L 是屬於抗細胞凋亡蛋白，使用購自 Biosource 公司的 Mouse anti-bcl-X monoclonal IgG，可抗 bcl-X_S 和 bcl-X_L，分子量分別為 21 kDa 和 27 kDa，因 bcl-X_S 產量少儀器偵測不到，因此本研究只觀察 bcl-X_L 表現量。細胞培養於 5 cm dish 中 4hr 待貼盤，加入或不加入 CM，或於加入 CM 之條件下分別加入如上述不同濃度 GO, DAS, DADS 或 DATS，再繼續培養 48 h，收集細胞，製備細胞 lysate 並以 Bio-Rad 蛋白質分析 kit 定量蛋白質，然後保存於 -20°C。進行 Western blot

分析時，取 30 μg 蛋白質製成電泳樣品加至 12% polyacrylamide gel 樣品槽中，以 80-100 伏特電壓進行電泳分析。然後轉印至 PVDF 膜然後倒入初級抗體(mouse anti-bcl-X monoclonal IgG:buffer B=1:400)，於 4°C 反應 overnight。沖洗後倒入二級抗體(goat anti mouse IgG:buffer B=1:100000)，於室溫反應 2 小時然後以 buffer。接著將 PVDF 膜內加入 2 ml ECL 顯色液 (Enhanced luminal reagent 與 oxidizing reagent 以 1:1 比例混合均勻)進行 ECL 呈色，以冷光螢光數位影像儀器進行分析。

(六)細胞 apoptosis 定量測定

本實驗利用 Cell Death Detection ELISA^{PLUS} 分析套組，依據廠商說明書進行，將 IEC-18 培養於 96 孔盤中培養於有或無 CM 存在下，另於加入 CM 之條件下分別加入如上述不同濃度 GO, DAS, DADS 或 DATS。於 96 孔盤並在二氧化碳培養箱(5% CO₂, 37°C)培養 4 h，製備細胞 lysate 並與 Anti-histone 抗體反應，然後利用 ELISA 原理進行呈色，並以分光光度計定量之。

(七)統計分析

各組分析所得數據以平均值加減一個正負標準差(mean \pm SD)表示，統計利用 SPSS 系統分析。控制組與刺激組組間之差異以 Independent-Sample T test 分析。CM 刺激組各組間差異先以 one-way analysis of variance (ANOVA)分析($P < 0.05$)，再以 Tukey's test 進行事後檢定。

五、結果與討論

(一)IEC-18 細胞生長曲線

為建立具有適當生長活性之細胞培養條件，本研究先觀察在不同接種細胞密度(0.25×10^5 、 0.5×10^5 、 1×10^5 或 2.5×10^5 個/100 μL)下之細胞生長曲線；在不同培養時間(24、48、72、96hrs)收集細胞，並計算細胞數及總蛋白質量。結果發現不論以何密度接種，IEC-18 於培養至 48hr 時細胞數量皆在線性生長範圍(Figure 1A)，而培養 48 h 時總蛋白質量在線性增加範圍的條件則侷限於細胞接種密度 $\leq 1 \times 10^5$ 個/100 μL (Figure 1B)。因此，除非另有說明，否則以下實驗皆以 0.5×10^5 個/100 μL 接種，培養時間在 48hr 內為實驗條件。

(二)促發炎性細胞激素對於 IEC-18 細胞存活率之影響

在細胞存活率的實驗中(MTT 分析法)，細胞分別培養 4、24、48 小時，觀察有或無促發炎細胞激素存在下對於細胞存活率之影響。結果顯示，不論有或無 CM 刺激下，各時間點的 CM 組細胞存活率均顯著低於無 CM 組 (Figure 2)。發炎反應發生時，一些細胞激素如：IL-1、IL-6、TNF- α 、IL-4、IFN- γ 產生並作用在發炎部位，增加發炎部位對於白血球的黏著(adhesion)、遷移(migration)及細胞通透性 (Roitt et al., 2002)。在本實驗中發現，以促發炎性 cytokine mix 刺激 IEC-18，在 4 小時後即開始顯著降低細胞 MTT 反應且此作用維持到刺激後 48h，這與先前其他文獻中報導在人類腸道上皮細胞株 Caco-2 培養物中加入 TNF- α 、IL-1 β 及 IFN- γ 培養 24 小時後，對於細胞 MTT 反應活性無顯著影響的結果有所差異³⁶。推論這可能是由於觀察之細胞株不同所致。因為由於本研究所觀察的細胞株 IEC-18，是一種源自大鼠小腸線窩之 nontransforming 細胞株，其與 Caco-2 細胞株相較下好處是其並非腫瘤細胞，且因為是大鼠小腸細胞，其觀察結果可用以說明我們先前在以大鼠為模式的活體實驗中所觀察到的現象。

(三)促發炎性細胞激素存在下大蒜精油成分對於 IEC-18 細胞存活率之影響

無 CM 存在下，不同濃度的大蒜精油成分對於細胞存活率的影響結果顯示於 Figure 3。培養 24 小時，GO 濃度增加至 5 $\mu\text{g/ml}$ 後，隨 GO 濃度上升細胞存活率顯著遞減；DAS、DADS 或 DATS 均在濃度增加至 0.01 mM 後，隨各含硫成分濃度上升使細胞存活率顯著遞減。且在 24 小時培養條件下，GO、DAS、DADS 及 DATS 最大抑制細胞生長作用分別達 63.6%，54.7%，77.4%及 83.2%，顯示大蒜精油含硫成分之細胞毒性隨含硫數增加而增加，此與過去其他學者在腫瘤細胞株的發現一致²⁶。在培養 48 小時，細胞存活率隨大蒜精油各成分濃度變化之趨勢相似，但是隨劑量增加所致之存活率抑制作用不如 24 小時的結果；GO、DAS、DADS 及 DATS 最大抑制細胞生長作用分別達 31.1%，47.8%，52.5%及 72.7%。由於大蒜精油成分為揮發性，培養 48 h 後之存活率在高濃度大蒜精油成分下高於培養 24 h 之存活率可能是由於培養較長時間使部分大蒜精油成分揮發所致。

在 CM 存在下，不同濃度的大蒜精油成分對於細胞存活率的影響結果顯示於 Figure 4。培養 24 小時，GO 濃度增加至 50 $\mu\text{g/ml}$ 後，隨 GO 濃度上升細胞存活率顯著遞減；DAS 濃度增加至 10 mM 後，細胞存活率顯著下降；DADS 及 DATS 濃度則在 0.01 mM 後，隨濃度上升細胞存活率顯著遞減。此結果與無細胞激素存在下相較顯示細胞激素提高細胞可耐受之 GO 及 DAS 最低濃度，但是不影響細胞耐受 DADS 及 DATS 的最低濃度。且在培養 48 小時時，細胞進一步降低對於 DATS 濃度的耐受性，在 DATS 濃度增加至 0.005 mM 後，隨 DATS 濃度上升細胞存活率顯著遞減。將不同時間不同濃度 GO 及 DAS、DADS、DATS 的細胞存活率計算出其 LC_{50} 發現不論有無 CM 存在，培養 24 小時之 LC_{50} 均相似，但比較有無 CM 刺激下培養 48 小時之 LC_{50} ，結果顯示無 CM 刺激下 GO、DAS、DADS 及 DATS 之 LC_{50} 分別為 3.9 $\mu\text{g/ml}$ 、0.052 mM、0.032 mM 及 0.022 mM，而有 CM 刺激下之 LC_{50} 分別為 0.75 $\mu\text{g/ml}$ 、0.047 mM、0.0074 mM、0.0027 mM。即在培養 48h 條件下 IEC-18 細胞株對於受試大蒜精油成分細胞毒性的感受性可因存在促發炎細胞激素而增加，此結果印證本研究之假說。為了解 CM 誘發細胞存活率改變及大蒜精油成分之作用與細胞產生 NO 產量是否有關，本實驗另外測量 NO 在 48 小時細胞培養液中的含量。

(四)促發炎性細胞激素存在下大蒜精油成分對於 IEC-18 細胞產生 NO 之影響

由於細胞產生之 NO 會很快的轉為較穩定的 NO_2+NO_3 形式，因此可利用培養液中 NO_2+NO_3 的濃度來代表細胞 NO 的產量。細胞分別與 CM 和不同濃度的 GO 及其 OSCs 共同培養 48 小時，Figure 5 中的結果顯示，CM 顯著誘發 NO 產生。由於大蒜精油成分降低 NO 產生被認為對細胞具有保護作用²⁹，因此本研究進一步觀察 CM 存在下，GO、DAS、DADS、DATS 對於 IEC-18 細胞 NO 產量之影響。結果發現，NO 含量隨大蒜精油及其有機含硫成分濃度遞增而逐漸下降呈劑量依賴反應(Figure 5)。此與過去研究 DADS 與 DATS 明顯抑制 LPS 誘導之巨噬細胞株 RAW 264.7 之 iNOS 的表現，而抑制 NO 的生成相同結果³⁷。對照 Figure 4 之結果發現，DAS (0-2.5 mM)、DADS (0-2.5 mM)、DATS (0-1 mM)隨濃度遞增細胞存活率遞減，而在相同濃度範圍下的 NO 含量亦隨濃度遞增而遞減。這顯示 CM 刺激下，DAS、DADS 以及 DATS 抑制 IEC-18 產生會伴隨細胞存活率下降。

(五)促發炎細胞激素存在下 NO 抑制劑對於 IEC-18 存活率及 NO 產生之影響

由於本研究希望釐清 CM 存在下，GO 及其 OSCs 降低細胞存活率是否與其抑制 NO 產生有關，因此本研究以 iNOS 抑制劑 aminoguanidine (AG)降低 NO 產量作為 positive control，觀察 NO 產量與細胞死亡之關係。細胞分別與 CM 和不同濃度的 AG (0.5 mM 或 5 mM)共同培養 48 小時。Figure 6A 結果顯示，在 CM 存在下，加入 AG 可顯著逆轉 CM 所致之細胞存活率降低作用，且伴隨對於 CM 所誘發之 NO 產生的抑制作用(Figure 6B)。此結果與上述發現大蒜精油、DADS 及 DATS 隨濃度增加降低 IEC-18 細胞株 NO 產量伴隨細胞存活率下降之結果並不一致。進一步比較大蒜精油成分抑制 NO 產生與 0.5 mM AG 抑制 NO 產生在相似程度下之細胞存活率; i.e. 0.5 mM AG、2.5 mM DADS 與 0.25 mM DATS (NO 含量分別為 55.98、56.5 及 78 mmol/mg protein; Figure 7A)，則發現 AG 組細胞存活率遠高於 DADS 或 DATS 組 (Figure 7B)。探討其原因，至少可能是因 AG 與這些 OSCs 降低 NO 產生的機制並不相同;AG 直接抑制 iNOS 活性，而這些 OSCs 則是透過降低 iNOS 轉錄因子 NF- κ B 的活化^{33,34}。然而因 NF- κ B 也是抗凋亡蛋白 bcl-X_L之轉錄因子³¹，此蛋白質在一些細胞受到 cytokines 刺激下會被表現用來 anti-apoptosis³²。由於大蒜精油成分在促發炎性細胞激素刺激下可抑制淋巴細胞及血管內皮細胞 NF- κ B 的活化^{33,34}，故本研究推論大蒜精油成分除了抑制 iNOS 蛋白質表現也可能抑制 bcl-X_L 蛋白質表現。

(六)促發炎性細胞激素存在下大蒜精油成分對於 IEC-18 細胞表現 bcl-X_L之影響

利用 Western blotting 方法分析細胞 bcl-X_L 之表現，結果顯示於 Figure 8。在 CM 存在下(lane 10)此蛋白質的表現顯著高於無 CM 存在下的表現(lane 1)，此結果符合過去在其他細胞類型的發現³²。在 CM 存在下，加入 1-5 μ g/ml GO 使 bcl-X_L 表現逐漸下降，而 GO 濃度(10 μ g/ml) 其 bcl-X_L 表現雖稍有增加，但皆低於 CM 組(lane 10);加入 0.1-0.5 mM DAS 濃度使 bcl-X_L 表現逐漸增加且高於 CM 組(lane 10)，而 DAS 在濃度 1 mM 使 bcl-X_L 表現下降;加入 0.05-0.5 mM DADS 之 bcl-X_L 表現量均相似，且皆低於有 CM 組(lane 10);加入 0.0025-0.05 mM DATS 隨濃度上升 bcl-X_L 表現逐漸遞增，但皆低於有 CM 組(lane 10) (Figure 8)。

以上結果顯示造成 bcl-X_L 蛋白質表現受抑制的大蒜精油成分濃度範圍與 NO 產生受抑制的範圍大致相符，顯示極有可能大蒜精油成分因抑制 NF- κ B 活化而抑制 bcl-X_L 蛋白質表現。至於大蒜精油及其有機含硫成分其濃度的高低對於 bcl-X_L 蛋白質表現呈現隨濃度增加先減後增或先增後減的情況，探討其原因，可能是 NF- κ B 並非 IEC-18 細胞株中唯一在 CM 作用下調節此 gene 表現之轉錄因子，有可能 GO、DAS、DADS、DATS 也能對其他相關活化路徑或轉錄因子有所調節。例如，bcl-X_L 之表現亦受到 AP-1 的調控^{38,39}，此部分未來可對分子調控機制再做更深入之探討。另外，由於以上在細胞存活率及 NO 產量測定的實驗均為培養液中累積 48 小時之後果，而 bcl-X_L 之測定為細胞於添加 GO、DAS、DADS、DATS 成分後 48 小時時所測定，故可能錯失細胞表現該蛋白質之高峰期。未來應進行 time course bcl-X_L expression 之觀察，釐清大蒜精油成分對於此蛋白質表現之劑量效應與細胞存活率之間的關係。

(七)促發炎性細胞激素存在下大蒜精油成分對於 IEC-18 細胞 apoptosis 之影

過去其他學者活體外觀察發現 TNF- α 誘發 IEC-6 細胞株的 apoptosis¹²。此

外，有研究發現正常小腸細胞不表現 Fas，但在發炎性細胞激素刺激(IFN- γ 及 TNF- α)下，會表現大量 Fas，因而使細胞極易受 Fas-induced apoptosis 而死亡¹²。由於本研究發現 CM 顯著降低 IEC-18 細胞存活率且大蒜精油成分進一步降低細胞存活率，且以上實驗亦驗證在 CM 存在下抗凋亡蛋白 bcl-X_L 可不同程度受到各種大蒜精油成分之抑制，故接下來藉由商業 apoptosis kit 進一步了解 IEC-18 細胞在 CM 存在下受到這些大蒜成分作用對於其 apoptosis 之影響。此 kit 分析可偵測細胞 apoptosis 時其內生性 endonuclease 作用於雙股 DNA 後產生斷裂的 histone-associated-DNA-fragments (mono-及 oligonucleosomes)。結果如 Figure 9 所示，CM 刺激下明顯增加小腸上皮細胞株 IEC-18 apoptosis，而在有 CM 刺激下，所加入之 GO 濃度增加到 50 $\mu\text{g/ml}$ 時，細胞 apoptosis 顯著增加，但是在濃度 ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$ 時細胞 apoptosis 卻反而下降，此 apoptosis 下降經以 trypan blue 染劑證實為多數細胞發生 necrosis 所致。DAS (0-2.5 mM)、DADS (0-2.5 mM)、DATS (0-1 mM) 則隨添加濃度遞增 apoptosis 遞增。根據本實驗結果推論，促發炎性細胞激素導致細胞存活率降低及 DAS、DADS、DATS 進一步造成細胞死亡的原因至少有部分是透過早期增加 apoptosis 而來。

(八) 結論與建議

經由本實驗發現以 IFN- γ 、IL-1 β 及 TNF α 同時刺激迴腸上皮細胞株 IEC-18 模擬發炎反應時，細胞存活率降低而 NO 產量增加。受這些促發炎細胞激素刺激下，不論是 GO、DAS、DADS、DATS，對於小腸細胞株 IEC-18 之細胞毒性均大於未受促發炎細胞激素刺激之細胞，即，促發炎細胞激素增加小腸細胞株 IEC-18 對於這些大蒜精油成分細胞毒性之感受性，因而呈現較低之 LC₅₀；此外，隨受試 OSCs 含硫數越高其細胞毒性越強。促發炎細胞激素導致細胞存活率降低且 DAS、DADS、DATS 進一步惡化促發炎細胞激素所致之細胞死亡伴隨增加之 apoptosis，且伴隨降低之抗凋亡蛋白 bcl-X_L 表現而與抑制 NO 的產生無關。

由於在促發炎細胞激素作用下，調節 bcl-X_L gene 表現之轉錄因子有一種以上，e.g. NF κ B，AP-1，且促發炎細胞激素尚可能活化其他抗凋亡蛋白及凋亡蛋白，GO、DAS、DADS、DATS 是否對其他與細胞凋亡相關之蛋白表現之活化路徑或轉錄因子有所調節應在未來做更深入之探討。另外，完整的蛋白質表現觀察，應進行 time course study，以避免錯失該蛋白質之高峰期，將在未來的研究計畫中加以規劃進行。

六、計畫成果自評

本研究結果初步驗證了研究之初本計畫申請人所提出的三點研究假說。由於在執行計畫期間，根據每項實驗的結果步步推衍，因而過程中對於計畫內容稍做調整，但與原計畫內容大致相符，且無礙於達到驗證研究假說之目的。本研究之學術價值在於首次提出大蒜成分在正常及病理狀態下對於小腸細胞的差異性影響及其可能機制，而此研究成果在應用大蒜於預防性或治療性用途上也提供可能副作用之參考。本研究部分數據已於 2005 年營養學會年會中發表⁴⁰，且經整理後，將投稿至學術期刊希望能與相關研究領域的學者就本研究之主題有更多互動及討論。

七、参考文献

1. Mitchell P & Fink MD. 2003. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr Opin Crit Care*. 9, 143-151.
2. Suenart P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Geuppens JL & Rutgeerts P. 2002. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 97,2000-2004.
3. Ruemmele FM & Seidman EG. 1998. Cytokine-intestinal epithelial cell interaction—implications for immune-mediated bowel disorders. *Acta Paediatr. Sinica* 39, 1-8.
4. Van Leeuwen PA, Boermeester MA, Houdijk AP, Ferwerda CC, Cuesta MA, Meyer S & Westorp RI. 1994. Clinical significance of translocation. *Gut*. 35, S28-34.
5. Sansonetti PJ. 1998. Molecular and cellular mechanisms of invasion of the intestinal barrier by enteric pathogens. The paradigm of shigella. *Folia Microbiol*. 43, 239-246.
6. Bloom PD, Boedeker EC. 1996. Mucosal immune responses to intestinal bacterial pathogens. *Semin. Gastrointest. Dis*. 7, 151-166.
7. MacDermott RP. 1996. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 31, 907-916.
8. Guy-Grand D, DiSanto JP, Henchoz P, Malassis-Seris M, Vassalli P. 1998. Small bowel enteropathy: Role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur. J. Immunol*. 28, 730-44.
9. Piguet PT, Vesin C, Donati Y, Barazzone C. 1999. TNF-induced enterocyte apoptosis and detachment in mice: induction of caspases and prevention by a caspase inhibitor, ZVAD-fmk. *Lab. Invest*. 79, 495-500.
10. Piguet PT, Vesin C, Guo J, Donati Y, Barazzone C. 1998. TNF-induced enterocyte apoptosis in mice is mediated by the TNF receptor 1 and does not require p 53. *Eur. J. Immunol*. 28, 3499-2505.
11. Piguet PF, Vesin C, Guo J, Donati Y, Barazzone C. 1998. TNF-induced enterocyte apoptosis in mice is mediated by the TNF receptor 1 and does not require p53. *European J Immunol*. 28, 3499-3505.
12. Ruemmele FM, Dionne S, Levy E & Seidman E. 1999. TNF α -induced IEC-6 cell apoptosis requires activation of IEC caspases whereas complete inhibition of the caspase cascade leads to necrotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260, 159-166.
13. Neurath M, Becker C & Barbulescu K. 1998. Role of NF-kB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 43, 856.
14. Pritts TA, Moon R, Fischer JE, Salzman AL & Hasselgren P-O. 1998. Nuclear factor-kB is activated in intestinal mucosa during endotoxemia. *Arch. Surg* 133, 1311.

15. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA Scholmerich j & Gross V. 1998. Nuclear factor kB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterol* 115, 357.
16. Wang CY, Mayo MW & Baldwin A-SJ. 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 247,784.
17. Crow JP, Beckman JS. 1995. Reaction between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: Footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol* 34,17-43.
18. Sorrells DL, Friend C, Koltuksuz U, Courcoulas A, Boyle P, Garrett MS, Watkins S, Rowe MI, Ford HR. 1996. Inhibition of nitric oxide with aminoguanidine reduces bacterial translocation after endotoxin challenge in vivo. *Arch Surg* 131, 1155-1163.
19. Unno N, Wang H, Meconi MJ, Tytgat SH, Larkin V, Smith M, Morin MJ, Chavez A, Hodin RA & Fink MP. 1997. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorate endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterol* 113, 1246-1257.
20. Mishima S, Xu M, Lu Q & Deitch EA. 1998. The relationships among nitric oxide production, bacterial translocation, and intestinal injury after endotoxin challenge in vivo. *J Trauma: Injury, Infection and Critical Care.* 44, 175-182.
21. Tepperman BL, Brown JF and Whittle BJR. 1993. Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. *Am J Physiol.* 265, G214-218.
22. Dichinson EC, Tuncer R, Nadler EP, Boyle P, Alber SM, Watkins SC & Ford HR. 1999. Nox, a nitric oxide scavenger reduces bacterial translocation in rats after endotoxemia by decreasing enterocyte apoptosis. *Am J Physiol.* 277, 61281-61287.
23. Hoffman RA. 2000. Intraepithelial lymphocytes coinduce nitric oxide synthase in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol.* 278, G886-894.
24. Potoka DA, Nadler EP, Zhou X, Zhang XR, Upperman JS & Ford HR. Inhibition of NF-kappa B by Ikappa B prevents cytokine-induced NO production and promotes enterocyte apoptosis in vitro. *Shock* 14, 366-373.
25. Knowles & Milner, 2001. Possible mechanism by which allyl sulfides suppress neoplastic cell proliferation. *J Nutr* 131,1061S-1066S.
26. Sakamoto K, Lawson LD & Milner JA. 1997. Allyl sulfides from garlic suppress the in vitro proliferation of human A549 lung tumor cells. *Nutr Cancer* 29, 152-156.
27. Banerjee SK, Maulik M, Mancahanda SC, Dinda AK, Gupta SK & Maulik SK. 2002. Dose-dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. *Life Sci* 70, 1509-1518.
28. Dirsch VM, Kiemer AK, Wagner H & Vollmar AM. 1998. Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric oxide synthase. *Atherosclerosis.* 139, 333-339.
29. Kim KM, Chun, SB, Koo, MS, Choi WJ, Kim, TW, Kwon YG, Chung HT, Billiar TR & Kim YM. 2001. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free*

- Radic Biol Med 30, 747-756.
30. Yi-Hsuan Chiang, Lin-Ni Jen, Hsiau-Yuan Su, Chong-Kuei Lii, Lee-Yan Sheen, Cheng-Tzu Liu. 2005. Effects of garlic oil and two of its major organosulfur compounds, diallyl disulfide and diallyl trisulfide, on intestinal damage in rats injected with endotoxin. *Toxicology and Applied Pharmacology* (In press).
 31. Glasgow, J. N., J. Qiu, D. Rassin, M. Grafe, T. Wood, and J. R. Perez-Pol. 2001. Transcriptional regulation of the BCL-X gene by NF-kappaB is an element of hypoxic responses in the rat brain. *Neurochem Res* 26:647-59.
 32. Manna, S. K., V. Haridas, and B. B. Aggarwal. 2000. Bcl-x(L) suppresses TNF-mediated apoptosis and activation of nuclear factor-kappaB, activation protein-1, and c-Jun N-terminal kinase. *J Interferon Cytokine Res* 20:725-35.
 33. Ide N & Lau BH. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kappa b activation. *J Nutr.* 131,1020S-1026S.
 34. Geng Z, Rong Y & Lau BH. 1997. S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med.* 23, 345-350.
 35. Sheen, L.Y., Lin, S.Y., Tsi, S.J., 1992. Odor assessments for volatile compounds of garlic and ginger essential oils by sniffing method of gas chromatography. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.* 30, 14-24.
 36. Cavicchi, M., and B. J. Whittle. 1999. Regulation of induction of nitric oxide synthase and the inhibitory actions of dexamethasone in the human intestinal epithelial cell line, Caco-2: influence of cell differentiation. *Br J Pharmacol* 128:705-15.
 37. 王瑞筠. 2004. 大蒜有機硫化物對脂多糖體誘發 RAW264.7 巨噬細胞發炎反應及基因表現之影響. 中山醫學大學營養科學研究所碩士論文.
 38. Dorai, T., and B. B. Aggarwal. 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett* 215:129-40.
 39. Liacini, A., J. Sylvester, W. Q. Li, and M. Zafarullah. 2002. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol* 21:251-62.
 40. 鄭琳霓 王奕雯 劉承慈 李宗貴 沈立言. 2005. 大蒜精油及其有機含硫成分對於促發炎性細胞激素誘發 IEC-18 細胞死亡之影響. 中華民國營養學會第三十一屆年會, 台北.

附圖

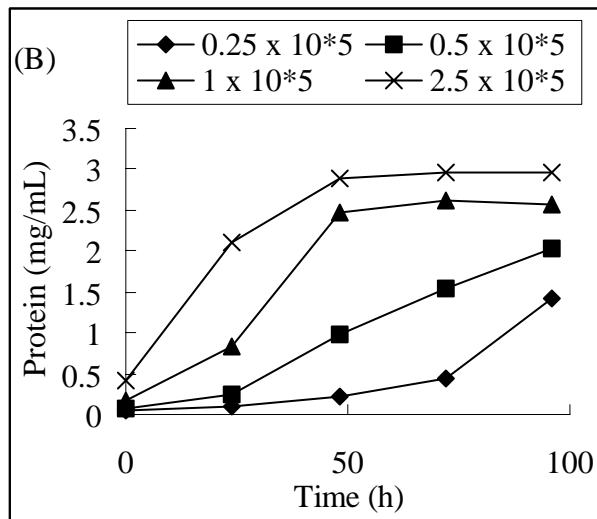
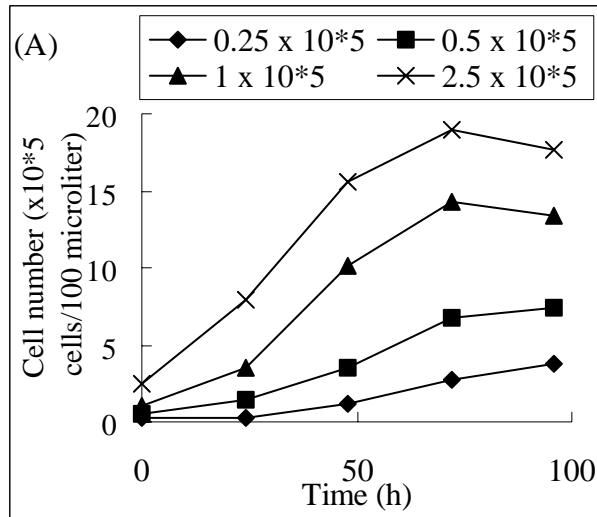


Figure 1. 接種之細胞密度及培養時間對於 IEC-18 細胞株生長之影響。(A) 細胞數 (B) 蛋白質含量。細胞培養於 6 cm dish 中，密度分別為 0.25×10^5 、 0.5×10^5 、 1×10^5 、 2.5×10^5 cells/100 μ L，在培養時間(24、48、72 或 96 h)結束時，收集細胞計數細胞數並以 Bio-Rad kit 進行蛋白質濃度測定實驗。

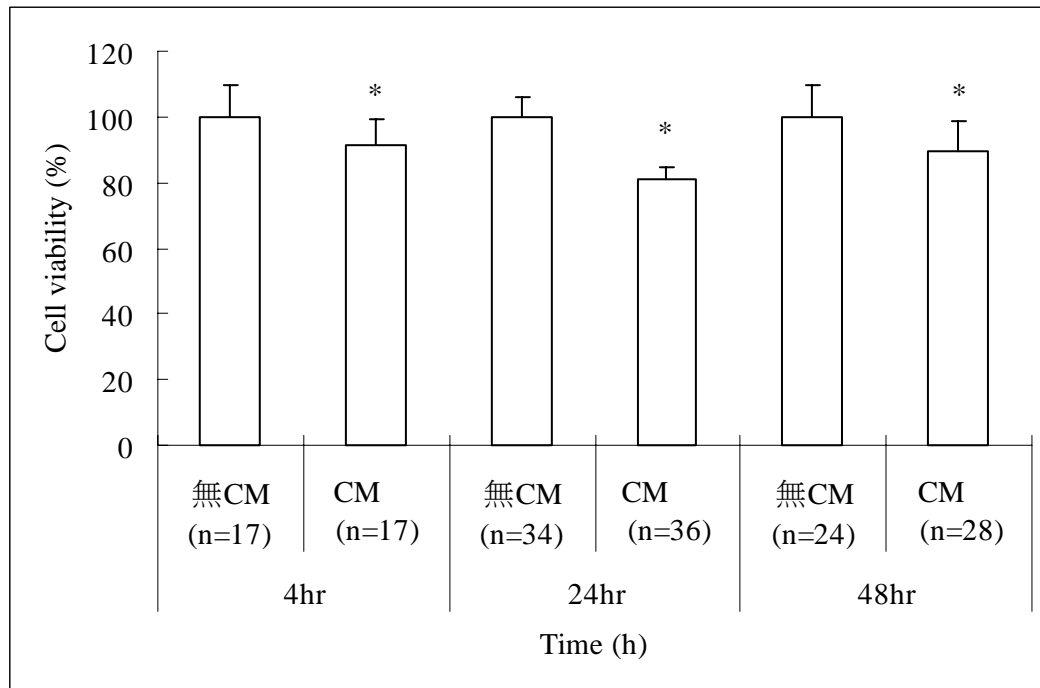


Figure 2. 促發炎性細胞激素刺激腸道上皮細胞株 IEC-18 後不同時間對於細胞存活率之影響。細胞以 0.5×10^5 cells/ $100 \mu\text{l}$ /well 接種於 96 孔盤並培養 4 h 使其貼盤，然後在有或無加入 cytokine mix (CM; 200 U/ml IFN- γ 、5ng/ml IL-1 β 及 100 ng/ml TNF- α) 條件下再培養 4, 24 或 48 h，然後以 MTT 分析套組，利用分光光度計依廠商說明分析細胞存活率。結果以 means \pm SD 表示。*表示相同培養間有 CM 與無 CM 存在下有顯著差異(P<0.05)。

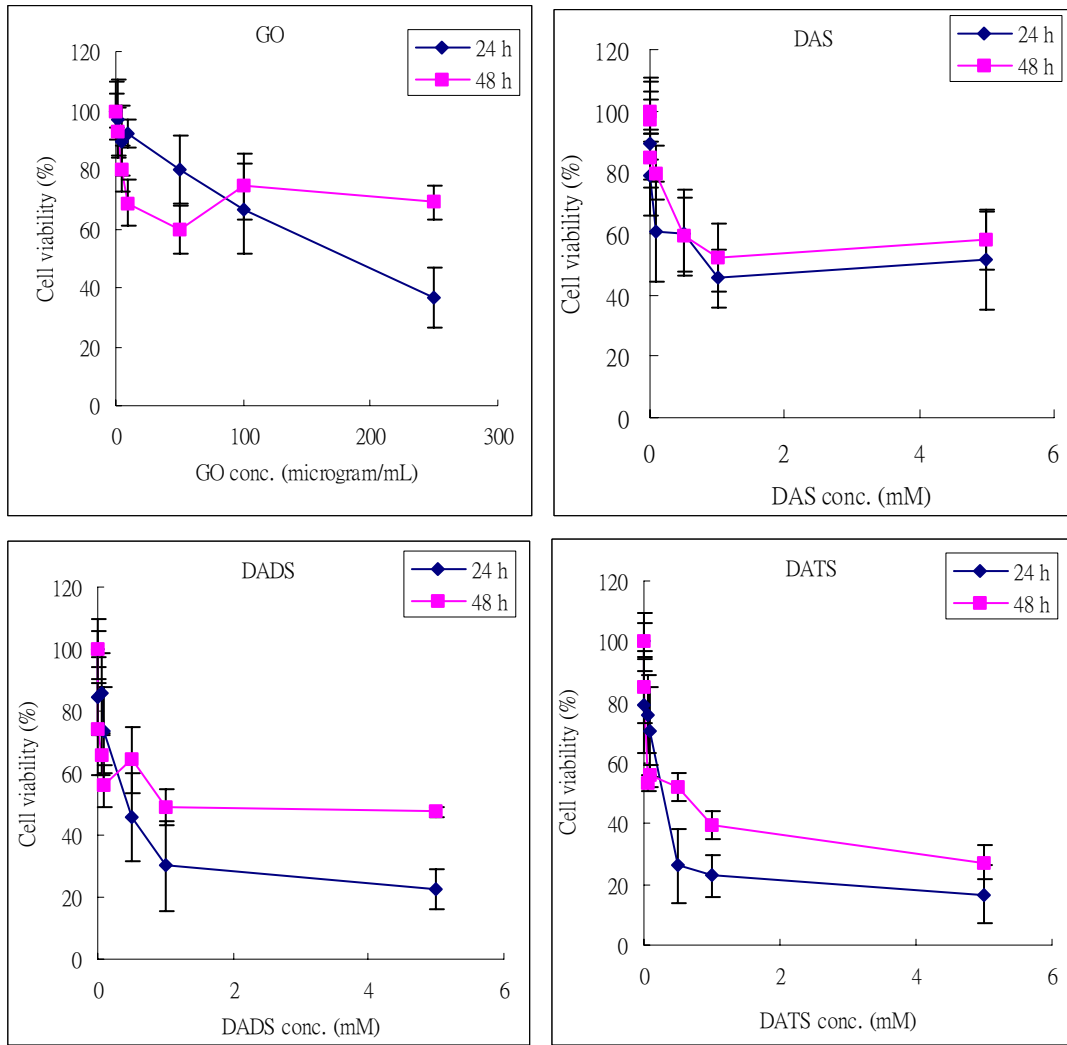


Figure 3. 大蒜精油及其有機含硫成分對於 IEC-18 細胞株存活率之影響。細胞以 0.5×10^5 cells/100 μ l/well 接種於 96 孔盤並培養 4 h 使其貼盤，然後加入不同濃度 GO (A)，DAS (B)，DADS (C) 或 DATS (D)，其後再經 24 或 48 h 培養後以 MTT 分析套組，利用分光光度計依廠商說明分析細胞存活率。結果以 means \pm SD 表示 (n=6~14)。

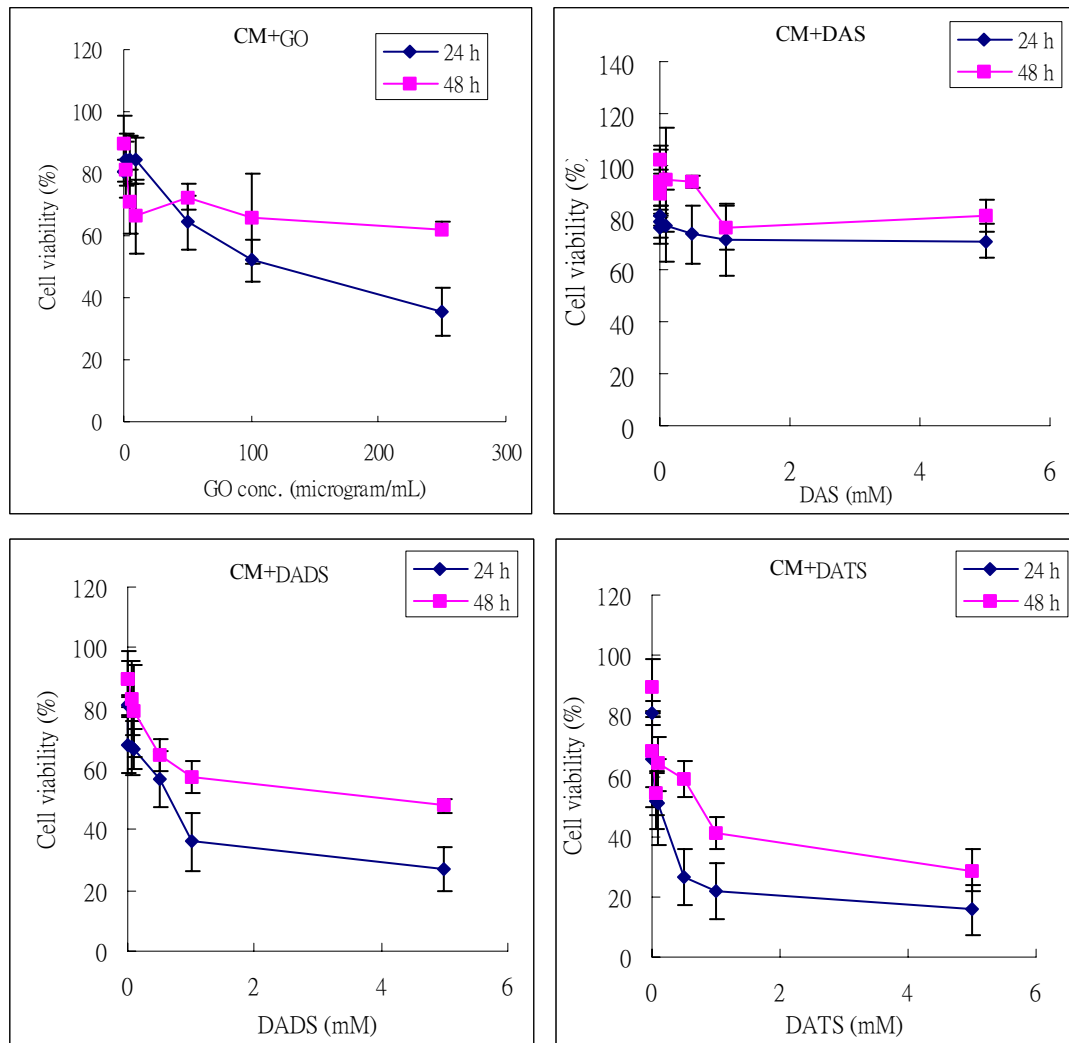


Figure 4. 促發炎性細胞激素刺激下，大蒜精油及其有機含硫成分對於 IEC-18 MTT 反應之影響。細胞以 0.5×10^5 cells/ $100 \mu\text{l}$ /well 接種於 96 孔盤並培養 4 h 使其貼盤，然後在有 cytokine mix (CM; 200 U/ml $\text{IFN-}\gamma$ 、5ng/ml $\text{IL-1}\beta$ 及 100 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$) 存在下加入不同濃度 GO (A), DAS (B), DADS (C) 或 DATS (D), 其後再經 24 或 48 h 培養後以 MTT 分析套組，利用分光光度計依廠商說明分析細胞存活率。結果以 means \pm SD 表示 (n=6~14)。

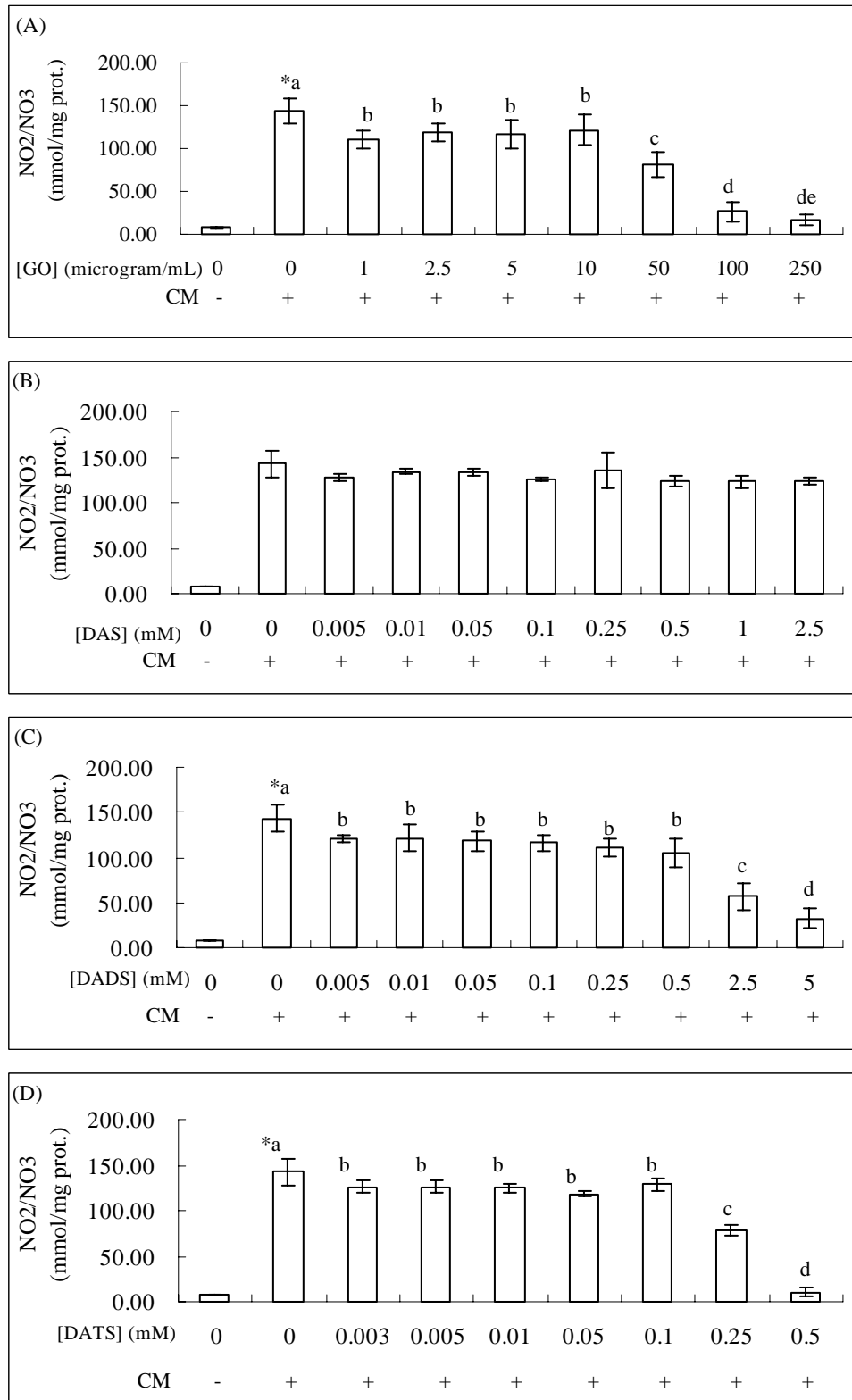


Figure 5. 促發炎性細胞激素刺激下，大蒜精油及其有機含硫成分對於 IEC-18 產生 NO 之影響。細胞以 0.5×10^5 cells/100 μ l/well 接種於 96 孔盤並培養 4 h 使其貼盤，然後在 CM 存在下加入不同濃度 GO (A)，DAS (B)，DADS (C) 或 DATS (D)，其後再經 48 h 培養後以 NO₂/NO₃ 分析套組，利用分光光度計依廠商說明分析。結果以 means \pm SD 表示 (n=6-14)。*表示相同培養間有 CM 與無 CM 存在下有顯著差異(P<0.05)。abcde 符號不相同表示在 CM 存在下，不同濃度之相同大蒜精油成分處理組間有顯著差異(P<0.05)。

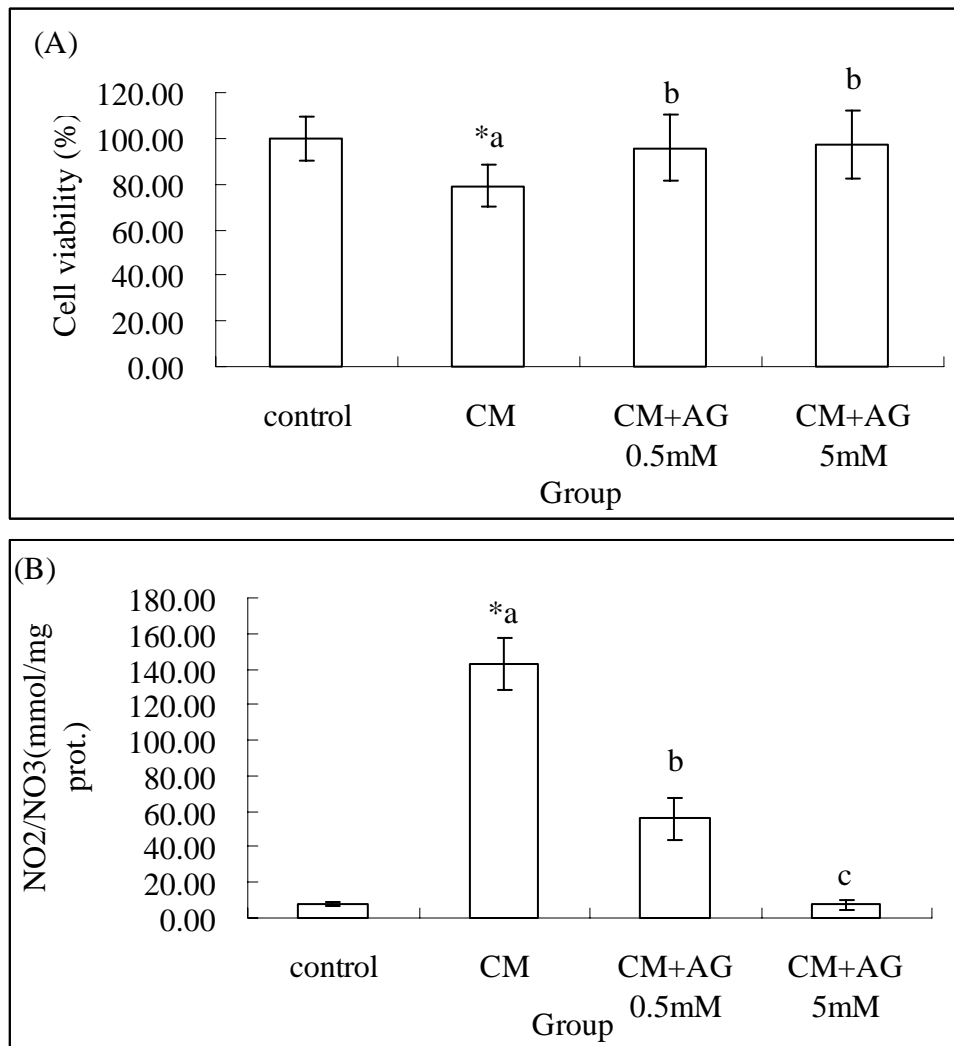


Figure 6. 促發炎性細胞激素與 iNOS 抑制劑 aminoguanidine 刺激腸道上皮細胞株 IEC-18 後對於細胞存活率及 NO 含量之影響。 細胞以 0.5×10^5 cells/100 μ l/well 接種於 96 孔盤並培養 4 h 使其貼盤，然後在有 CM 存在下加入不同濃度 aminoguanidine (AG; 0.5 or 5 mM) 並以載劑組(無 CM 存在下之培養條件)為控制組。其後再經 48 h 培養後，以 MTT 分析套組，利用分光光度計依廠商說明分析存活率(A)，及以 NO₂/NO₃ 分析套組，利用分光光度計依廠商說明分析 NO 產量(B)。結果以 means \pm SD 表示 (n=6~14)。*表示 CM 與控制組間有顯著差異 (P<0.05)。abc 符號不相同表示在 CM 存在下，不同濃度之 AG 處理組間有顯著差異 (P<0.05)。

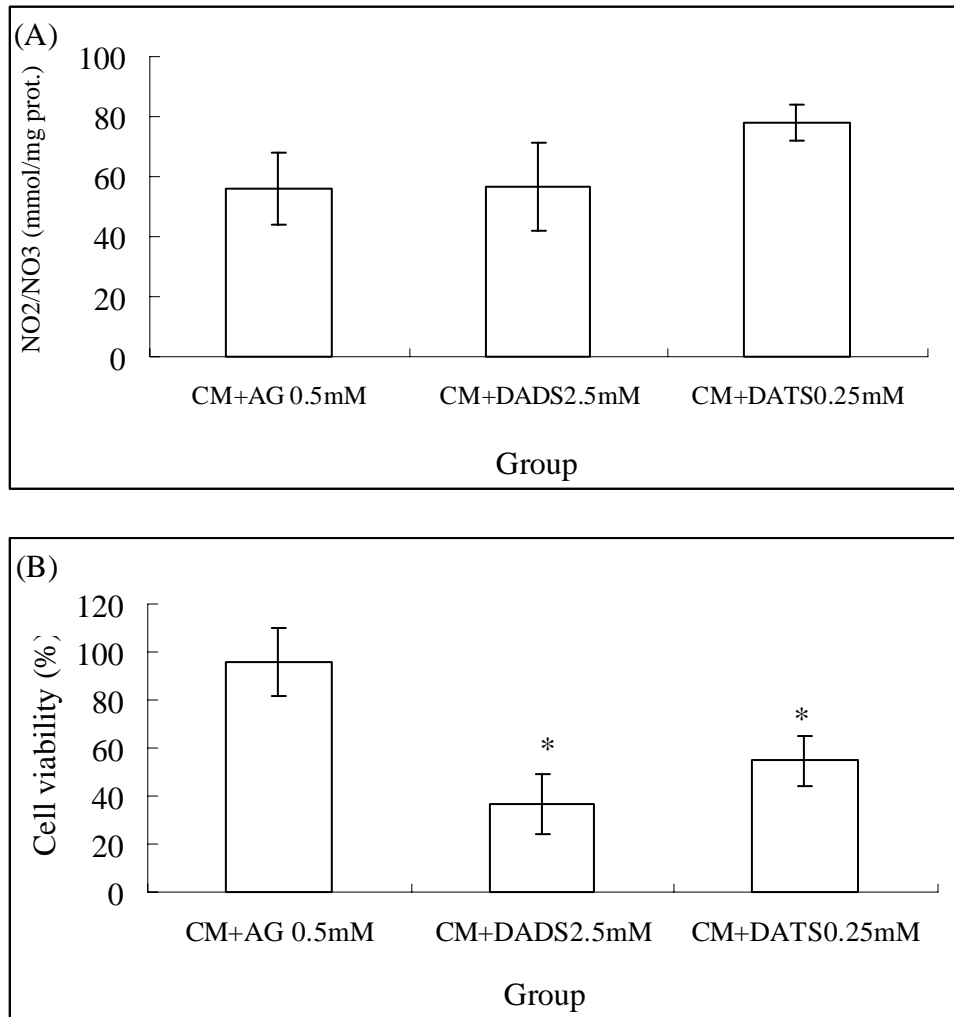


Figure 7. 對於 NO 產生有相似程度之 aminoguanidine 與 DADS, DATS 劑量下對於 cytokines 刺激之腸道上皮細胞株 IEC-18 存活率之影響。結果取自 Figure 4, 5 及 6。*表示與 CM+AG 組間有顯著差異(P<0.05)。

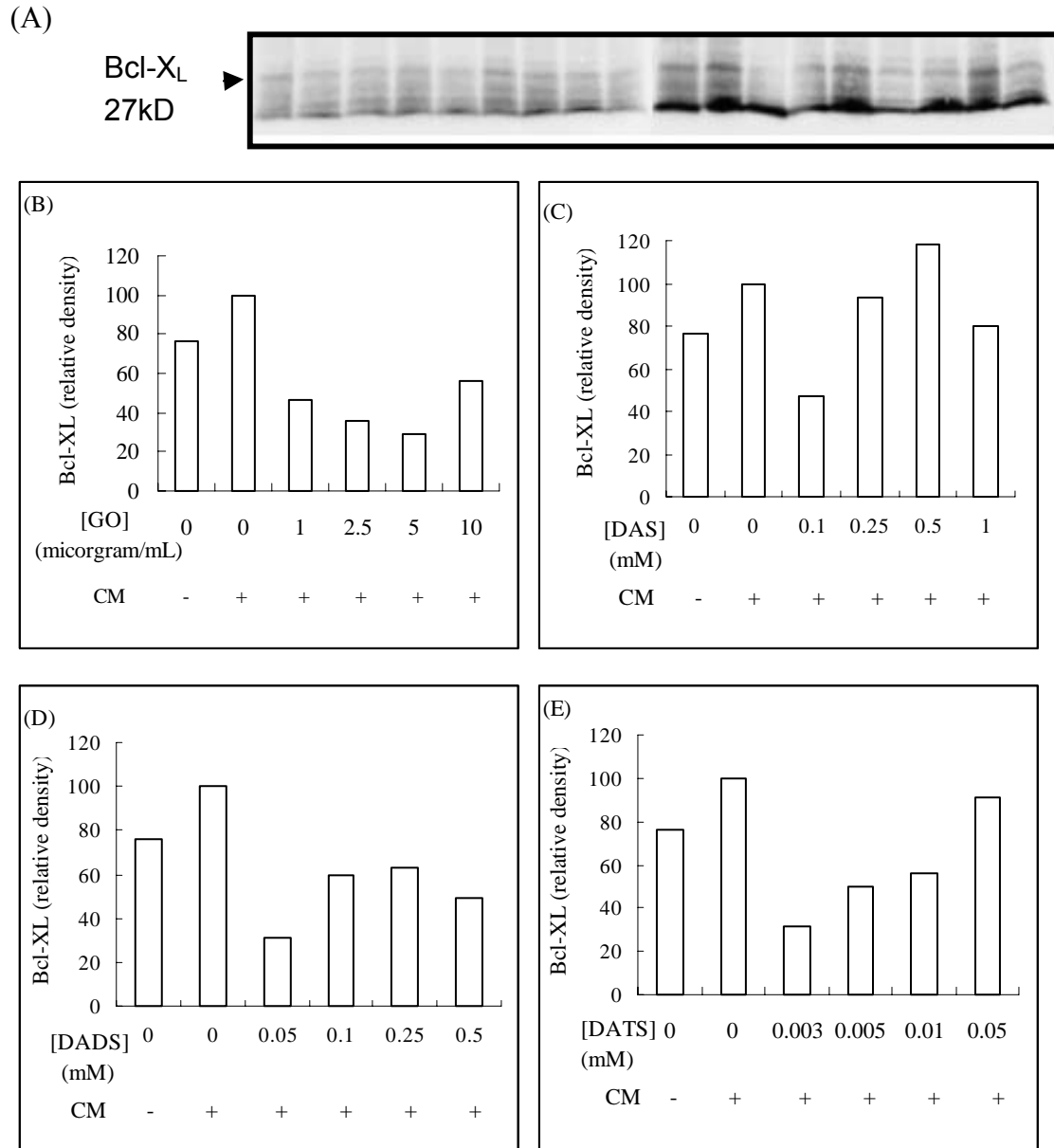


Figure 8. 大蒜精油及其有機含硫成分對於促發炎性細胞激素刺激 IEC-18 之 iNOS 與 bcl-X_L 蛋白質表現之影響。(A) Lane 1: Control; Lane 2: GO 1 μ g/ml; Lane 3: GO 2.5 μ g/ml; Lane 4: GO 5 μ g/ml; Lane 5: GO 10 μ g/ml; Lane 6: DATS 0.0025 mM; Lane 7: DATS 0.005 mM; Lane 8: DATS 0.01 mM; Lane 9: DATS 0.05 mM; Lane 10: CM; Lane 11: CM + DAS 0.1 mM; Lane 12: CM + DAS 0.25 mM; Lane 13: CM + DAS 0.5 mM; Lane 14: CM + DAS 1 mM; Lane 15: CM + DADS 0.05 mM; Lane 16: CM + DADS 0.1 mM; Lane 17: CM + DADS 0.25 mM; Lane 18: DADS 0.5 mM; bcl-X_L 蛋白質表現 intensity 以 CM 組為 100% 量化之 GO 組結果(B); DAS 組結果(C); DADS 組結果(D); DATS 組結果(E)。細胞培養於 5 cm dish 中 4hr 待貼盤，加入或不加入 CM，或於加入 CM 之條件下分別加入不同濃度 GO、DAS、DADS 或 DATS 再繼續培養 48 h。Western blotting 中，初級抗體(mouse anti-bcl-X monoclonal IgG:buffer B=1:400)，二級抗體(goat anti mouse IgG:buffer B=1:100000)，結果以冷螢光數位影像儀器分析並以 beta-actin 含量校正。

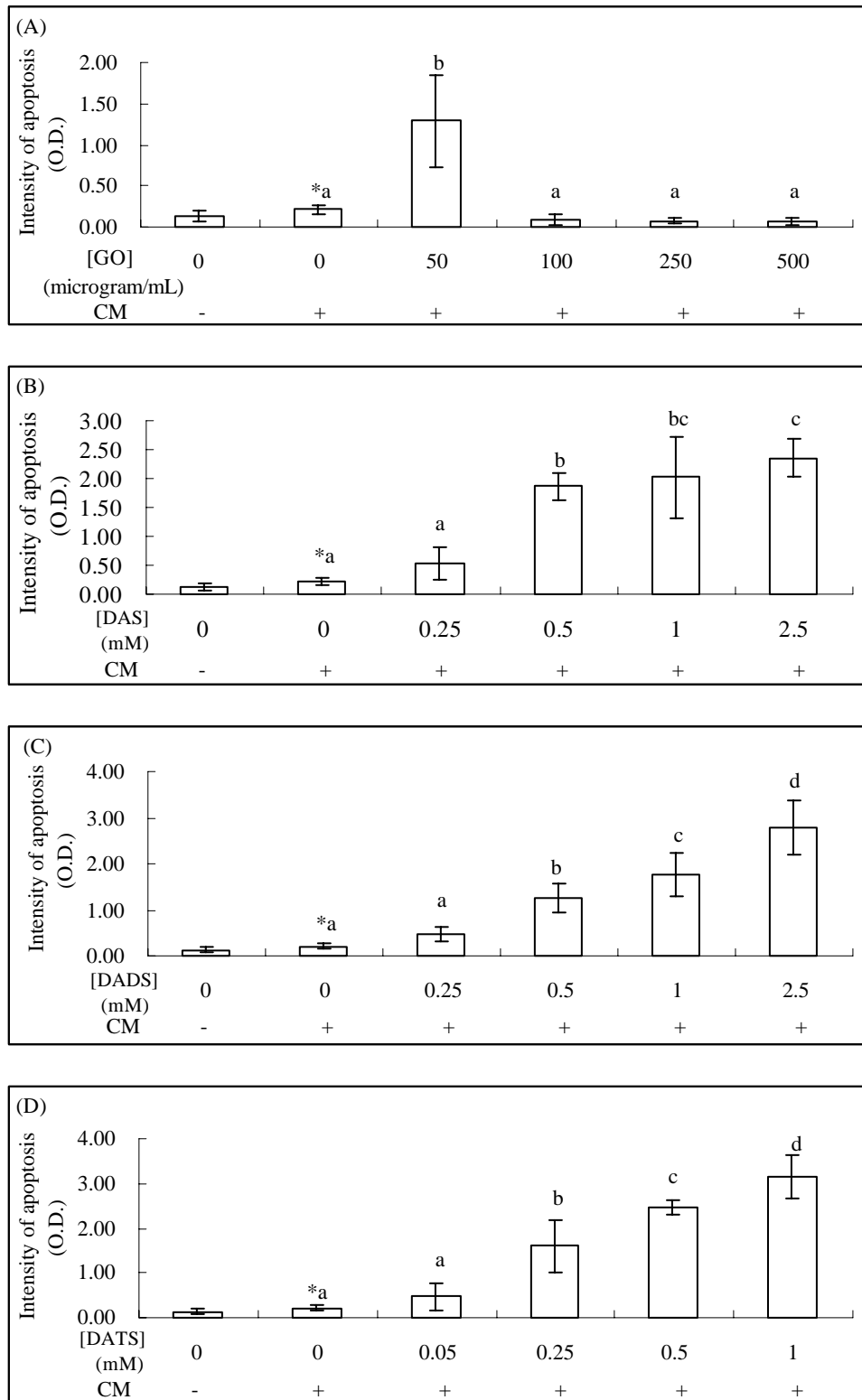


Figure 9. 大蒜精油及其有機含硫成分對於 IEC-18 細胞株 apoptosis 之影響
 利用 Cell Death Detection ELISA^{PLUS} 分析套組，依據廠商說明書進行，將 IEC-18 培養於 96 孔盤中培養於有或無 CM 存在下，另於加入 CM 之條件下分別加入不同濃度之 GO (A)、DAS (B)、DADS (C) 或 DATS (D)，於 96 孔盤在二氧化碳培養箱 (5% CO₂, 37°C) 培養 4 h 後進行。結果以 means±SD 表示 (n=6~14)。*表示相同培養間有 CM 與無 CM 存在下有顯著差異 (P<0.05)。abcd 符號不相同表示在 CM 存在下，不同濃度之相同大蒜精油成分處理組間有顯著差異 (P<0.05)。