

R  
608.8  
1204  
87

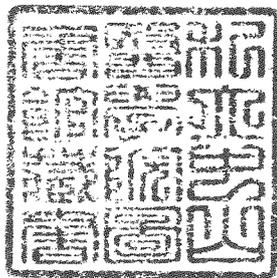
私立中山醫學院營養科學研究所碩士論文

Master Thesis, Graduate Institute of Nutritional Science,  
Chung-Shan Medical and Dental College

指導教授：李宗貴 博士 (Chong-Kuei Lii, Ph. D.)

大蒜精油及其活性成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基  
二硫化物對老鼠免疫系統、解毒酵素系統及抗氧化  
系統之影響

Effect of garlic oil and it's active principle-diallyl  
sulfide、diallyl disulfide on immune system、  
biotransformation system and antioxidant system in  
Sprague-Dawley rats.



研究生：孔韻蘭 (Yun-Lan Kung)

中華民國八十七年七月

July, 1998

中山醫學院圖書館



C050078

參考書恕不外借

# 授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 營養科學研究所  
\_\_\_\_\_ 組 86 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 年輕素食及非素食者的營養素攝取與體內鐵狀況之研究

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 \_\_\_ 年 \_\_\_ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 李宗貴

研究生簽名: 孔韻蘭 學號: R85308  
(親筆正楷)

日期: 民國 87 年 7 月 28 日

- 備註: 1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。  
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。  
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

## 簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：  
在美國授權博碩士論文予 UMI 公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10% 的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如 第 5 項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：  
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞  
地址：台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

---

研究生姓名：孔韻蘭 聯絡電話：(04)2203403

地址：台中市民生路 41 號 7 樓之 1

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

## 口試委員

私立中國醫藥學院營養學系副教授

沈立言 博士

沈立言

私立中山醫學院營養科學研究所副教授 劉承慈 博士

劉承慈

私立中山醫學院營養科學研究所教授

李宗貴 博士

(論文指導教授)

李宗貴

中華民國八十七年七月

學生孔韻蘭論文題目為大蒜精油及其活性成分—二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物對老鼠免疫系統、解毒酵素系統及抗氧化系統之影響研究，其論文題目已經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：李宗貴 博士

簽名：李宗貴

中華民國八十七年七月

## 謝誌

感謝指導教授 李宗貴博士兩年來在學業及實驗上的熱心指導與教誨，使本論文得以順利完成，藉此致最深的敬禮和謝意。文稿初成，承蒙 沈立言博士與 劉承慈博士撥冗審閱及斧正，使本論文更臻完善，併此衷忱致謝。

在平日實驗期間感謝 沈立言博士、劉承慈博士的指導以及大白鼠的犧牲奉獻。兩年求學過程中，承蒙許多學長、學姐、同學及朋友的支持與鼓勵，也因為有你們的陪伴，使的研究所的日子更加充實而多采多姿。謝謝玉珍、明才在實驗上的協助與相伴。振宇學長、佩琳學姐、心瑜、曉琪、偉爵、威徹、秀君、國峯等同學在平日的幫忙與鼓勵，在此一併致最誠摯的謝意。

最後，感謝父母及兄長、姊姊在這兩年來的體諒及支持，讓我能順利完成學業，僅以此論文獻給我最愛的家人及從小到大關心我、疼愛我的人。

中華民國八十七年七月 孔韻蘭 謹識

# 目錄

	頁次
中文摘要 -----	1
英文摘要 -----	4
壹、前言 -----	7
貳、文獻探討 -----	9
一、大蒜及其成分 -----	9
二、大蒜對生理影響 -----	11
三、大蒜對免疫之影響 -----	15
四、大蒜與癌症 -----	19
五、大蒜對抗氧化酵素與抗氧化分子之影響 -----	23
六、大蒜對血脂質的影響 -----	25
參、材料與方法 -----	27
一、實驗材料 -----	27
二、實驗方法 -----	29
(一) 動物飼養 -----	29
(二) 樣品收集與製備 -----	30
(三) 實驗分析項目 -----	31
1. 肝中磷脂質脂肪酸代謝 -----	31
(1) 肝中磷脂質脂肪酸分析 -----	31
(2) 肝中 $\Delta^6$ desaturase 活性測定 -----	32
(3) 肝中 PLA <sub>2</sub> 活性測定 -----	33
(4) 血漿 PGE <sub>2</sub> 濃度分析測定 -----	34
2. 免疫反應分析 -----	34

(1) 脾臟淋巴細胞複製率之測定 -----	34
(2) 接觸性過敏反應測定 -----	35
(3) 刺激性皮膚炎反應測定 -----	35
3. 解毒酵素系統分析 -----	36
(1) 肝臟 total cytochrome P450 content 測定 -----	36
(2) 肝臟 cytochrome P450 reductase 活性測定 -----	36
(3) 肝臟 Pentoxoresorufin O- deakylase (2B1) 活性測定 -----	37
(4) 肝臟 N-nitrosodimethylamine (NDMA) demethylase (2E1) 活性測定 -----	37
(5) 肝臟 Glutathione-S-transferase (GST) 活性測定 ---	38
(6) 2B1、2E1、GST—免疫西方墨點法分析 -----	39
4. 抗氧化分子及酵素測定 -----	41
(1) 肝臟樣本	
① 脂質過氧化分析—(TBARS) -----	41
② 維生素 E 測定-----	42
③ 還原態麩胱甘肽(GSH)及氧化態麩胱甘肽(GSSG)分析-	43
④ GSH peroxidase 活性測定 -----	43
⑤ GSH reductase 活性測定 -----	44
⑥ 細胞質 superoxide dismutase (SOD) 活性測定 -----	44
(2) 紅血球 GSH 及 GSSG 分析-----	45
三、統計分析 -----	45
<b>肆、結果</b> -----	46
一、動物生長情形	
1. 動物狀況 -----	46
2. 體重及相對肝重、相對脾重 -----	47
二、肝中磷脂質脂肪酸代謝	

1. 肝中磷脂質脂肪酸 -----	47
2. 肝中 $\Delta^6$ desaturase、PLA <sub>2</sub> 活性及血漿中PGE <sub>2</sub> 濃度-----	48
<b>三、免疫分析</b>	
1. 脾臟淋巴球增殖力 -----	48
2. 接觸性過敏反應與刺激性皮膚炎反應-----	49
<b>四、解毒酵素系統作用</b>	
1. 解毒酵素活性 -----	49
2. 蛋白質表現 -----	50
<b>五、抗氧化酵素系統分析</b>	
1. 肝中脂質過氧化及抗氧化分子濃度 -----	50
2. 肝中抗氧化酵素活性 -----	51
3. 紅血球 GSH 濃度 -----	52
<b>伍、結果圖表</b> -----	53
<b>陸、討論</b> -----	64
<b>柒、結論</b> -----	77
<b>捌、參考文獻</b> -----	78
<b>玖、附錄</b> -----	93



## 中文摘要

本研究目的在探討大蒜精油 (garlic oil, GO) 及大蒜精油活性成分-二烯丙基硫化物 (diallyl sulfide, DAS)、二烯丙基二硫化物 (diallyl disulfide, DADS) 對大鼠免疫調節作用、肝中磷脂質脂肪酸代謝、肝中解毒酵素系統與抗氧化系統的生理效應。

實驗以四週大離乳雄性 SD 大鼠為對象，隨機分為 6 組，分別為餵飼高油飲食四組，並於實驗期間分別灌食玉米油 (CO, 2 ml/kg, 對照組)、GO (200 mg/kg)、DAS (200 mg/kg) 或 DADS (200 mg/kg)；另外二組則為餵飼 AIN-76 低油飲食，分別灌食 CO 與 GO (200 mg/kg)。每週灌食 3 次，為期 7 週，犧牲後解剖取出肝臟、脾臟或採血進行生化分析，也有部分老鼠則在犧牲前進行 CDNB 或巴豆油 (croton oil) 處理，誘發接觸性過敏反應 (contact hypersensitivity) 或刺激性皮膚炎 (irritant dermatitis) 反應。

結果顯示，在肝中磷脂質脂肪酸組成方面，GO 與 DADS 皆會增加亞麻油酸 (18:2, n-6) 及減少花生四烯酸 (20:4, n-6) ( $P < 0.05$ )，其中又以 GO 組最為明顯，至於 DAS 則只增加亞麻油酸，但對花生四烯酸則無影響。進一步分析  $\Delta^6$  去飽和酶 ( $\Delta^6$  desaturase) 和磷脂質脂解酶  $A_2$  (phospholipase  $A_2$ ,  $PLA_2$ ) 酵素活性及前列線素 (prostaglandin  $E_2$ ,  $PGE_2$ ) 濃度，發現 GO 組抑制約 45% 的  $\Delta^6$  去飽和酶活性 ( $P < 0.05$ )，但  $PLA_2$  活性和  $PGE_2$  濃度則不受 GO、DAS 或 DADS 影響。

在脾臟淋巴球增生、CDNB 誘發的接觸性過敏反應及巴豆油誘發的刺激性皮膚炎反應方面，結果顯示，相較對照組，GO 處理顯著增加脾臟淋巴球增生，並抑制接觸性過敏反應 ( $P < 0.05$ )，但對刺激性皮膚炎反應則沒顯著影響。

在肝中解毒酵素方面，無論是活性分析或是蛋白質表現，DAS 處理會增加 2B1-POD 活性及表現，2E1 方面，則僅在蛋白質表現方面受到 GO、DAS 及 DADS 的抑制；除此外，GO、DAS 與 DADS 處理也顯著增加了 GST 活性 ( $P < 0.05$ )，如以免疫西方墨點法分析，則顯示 pGST 明顯被誘發，其中又以 DADS 效果最顯著。

在肝臟氧化及抗氧化作用方面，不同處理對肝中 TBARS、維生素 E、還原態麩胱甘肽 (GSH)、氧化態麩胱甘肽 (GSSG) 及 GSH/(GSH+GSSG) 皆不影響，但維生素 E 及 GSH 濃度會受飲食處理影響，AIN-76 飲食組肝中維生素 E 較高油飲食組低；除此外，AIN-76 飲食組也有較多 GSH 濃度及較高 GSH/(GSH+GSSG) 比值。在抗氧化酵素方面，GO、DAS 與 DADS 均明顯抑制麩胱甘肽過氧化酶 (GSH peroxidase) 活性，但均增加麩胱甘肽還原酶 (GSH reductase) 活性 ( $P < 0.05$ )，至於超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性，僅見 GO 灌食在高油飲食組中有活化作用 ( $P < 0.05$ )。在紅血球 GSH 濃度方面，高油組 DAS 與 DADS 及低油組 GO 灌食皆可顯著增加 GSH 濃度 ( $P < 0.05$ )，至於高油組中 GO 灌食雖也可增加紅血球 GSH 濃度但未達統計上差異。

由以上結果得知，GO 減少肝臟磷脂質脂肪酸組成花生四烯酸量，可能是透過抑制 $\Delta^6$  desaturase 酵素活性所至。除此外，GO 可增加脾臟淋巴細胞增生的活性但抑制 CDNB 誘發的接觸性過敏反應，因此 GO 在免疫調節上扮演的角色值得做更進一步探討，並瞭解其活性成分為何。

除此外，GO 的生理活性是可能透過改變解毒酵素或抗氧化酵素活性，但 GO 的這些生理活性並不一定完全與其活性成分 DAS 或 DADS 顯現出的效果一致，因此，GO 應尚有其他活性成分值得進一步分析。除此外，GO 的部分生理效應似乎受到飲食中油脂量的影響。

關鍵字：大蒜精油、二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物、花生四烯酸、脾臟淋巴細胞增生、解毒酵素、抗氧化酵素

## Abstract

The purpose of this study was to investigate the physiological roles of garlic oil (GO) and its active components—diallyl sulfide (DAS), diallyl disulfide (DADS) on the metabolism of hepatic phospholipid fatty acids; on the immunoresponsiveness: including splenocytes proliferation, CDNB-induced contact hypersensitivity, and croton oil-induced irritant dermatitis; on the liver detoxification enzyme system, including P450 content, P450 reductase, P450 2B1-POD, P450 2E1-NDMA, and glutathione-S-transferase (GST) activities, and also to investigate the effect of GO, DAS, and DADS on the antioxidant system, including vitamin E, glutathione (GSH) levels, GSH peroxidase, GSH reductase, and superoxide dismutase (SOD) activities. Meanwhile, the concentration of GSH in RBC was also measured in this study.

In the components of hepatic phospholipid fatty acids, both GO and DADS increased linoleic acid (18 : 2, n-6) and decreased arachidonic acid (20 : 4, n-6), but GO showed the stronger effect than DADS. DAS also increased linoleic acid but had no effect on arachidonic acid. By examining the activities of hepatic  $\Delta^6$  desaturase, PLA<sub>2</sub> and the concentration of plasma PGE<sub>2</sub>, results showed that GO significantly inhibits the activity of  $\Delta^6$  desaturase (P<0.05), however, the activity of PLA<sub>2</sub> and the concentration of PEG<sub>2</sub> were not affected by GO, DAS or DADS.

The results of splenocytes proliferation, contact hypersensitivity and irritant dermatitis showed that GO increases the splenocyte

proliferation and inhibits the contact hypersensitivity, but shows no effect on the irritant dermatitis.

In detoxification system GO, DAS, and DADS significantly increased the activity of GST. Immuno blotting analysis indicated that pGST expression is apparently induced and DADS shows the strongest effects. In cytochrome P450 system, however, only DAS show the stronger effect than GO and DADS. DAS significantly increased the activity of POD and such a result was supported by the immunoblot assay.

In the hepatic antioxidant system, GO, DAS, and DADS showed no effects on the hepatic TBARS, vitamin E, GSH, and GSSG level, but GO decreased GSH/(GSH+GSSG) than controls ( $P<0.05$ ). Of the antioxidant enzyme activities, GO, DAS and DADS significantly inhibited the activity of GSH peroxidase but increased the activity of GSH reductase ( $P<0.05$ ), the activity of SOD was only observed to increase in GO-treated group ( $P<0.05$ ). Although hepatic GSH status was not affect by GO and it's two active components, the level of GSH in RBC was increased by GO, DAS and DADS, and those obtained in DAS- and DADS-treated groups were significant higher than control.

AS stated above, GO, DAS, and DADS showed physiological activities in rats, but these activities, somehow, are modulated by dietary fat level, such as hepatic vitamin E, GSH, and GSH/(GSH+GSSG) level.

Results suggest that the biological activities of GO may affect the synthesis of arachidonic acid or modulate the activity of cytochrome

P450 or antioxidant enzymes, but these biological activities of GO are not as the same with its components-DAS and DADS. Hence, the presence of other active components of GO are worth being further evaluated. Besides, the dietary oil level seems to affect the partially biological function of GO.

Key words : Garlic oil, Diallyl sulfide, Diallyl disulfide, Arachidonic acid, Splenocytes proliferation, Cytochrome P450s, Antioxidant enzymes.

## 壹、前言

大蒜 (Garlic ; *Allium sativum*)在中、西式食品烹調上，長久以來一直扮演著重要角色。除食品上被當作食物及調味品外，在名間醫療保健上，大蒜亦扮演著重要地位。大蒜精油 (garlic oil)及其中之主要成分 diallyl disulfide (DADS)和 diallyl sulfide (DAS)近幾十年來一直被廣泛所探討。許多研究都證實大蒜具有抗粥狀動脈硬化 (antiatherosclerosis)、抗血液凝集 (antithrombosis)、促進纖維溶解 (fibrinolysis)、抗腫瘤生成 (antitumorigenesis)、抗癌 (anticarcinogenesis)性質，並具有降低血中膽固醇、三酸甘油脂、降血壓、血糖及抗菌等作用 (Ali, 1995 ; Agarnal, 1996 ; Dorant, 1993 ; Fenwick and Hanley, 1985)。

在大蒜凝血試驗中發現，大蒜是透過抑制環氧化酶 (cyclooxygenase)及脂氧化酶 (lipoxygenase)活性，而減少花生四烯酸 (arachidonic acid)代謝成二十碳烯酸 (eicosanoids)，因此具有抗凝血之生理作用 (Ali, 1995 ; Sendle et al., 1992 ; Mayeux, 1988)。而二十碳烯酸除了與凝血有關外，也會影響其他的生理功用，如免疫反應。雖然先前學者已證實大蒜成分可影響二十碳烯酸之生成，但大蒜是否也可影響二十碳烯酸之前驅物花生四烯酸的生成則不清楚，因此本實驗針對花生四烯酸的生成是否也受大蒜成分的影響進行探討，並同時測定餵食大蒜精油後之免疫功能反應。

近幾年來，癌症一直高居國人十大死亡原因之首，因此對

於如何降低癌症的發生或增強抗癌及解毒功能的天然食物或其成分，引起廣泛的研究。其中很多研究證實大蒜具有抗癌作用的機制與大蒜影響解毒酵素系統及具有清除自由基的能力有關 (Perhellet, 1986; Shalinsky et al., 1989; Liu, 1992; Brady, 1991)，因此本實驗也針對大蒜精油及其活性成分 diallyl disulfide (DADS)和 diallyl sulfide (DAS)同時探討他們在解毒酵素系統和抗氧化系統方面的作用。

## 貳、文獻探討

### 一、大蒜及其成分

大蒜的主要成分除了水、碳水化合物、蛋白質、纖維及脂質外，大蒜亦含有豐富的磷、鉀、硫、鋅、硒、鈣、鎂、鈉、鐵、錳等礦物質及維生素 A、維生素 C 和維生素 B 群 (Abdullab et al., 1988 ; Agarnal, 1996)。除此外，大蒜也含有多種的含硫化合物一般認為這些含硫成分在大蒜生理活性表現方面扮演了重要角色。依製備方法的不同可萃取提煉出不同的含硫成分 (organosulfur compounds ; OSCs)。OSCs 依溶解性可分為有機的油溶性及水溶性兩大類，均為大蒜特殊風味之來源 (Block, 1985 ; Fenwick and Hanley, 1985)。有機含硫化合物之來源，主要與位於大蒜球莖細胞細胞質中之 alliin 在大蒜細胞經破壞時，受到細胞液泡 (vacuole) 中 alliinase 的作用有關，而將 alliin 生成大蒜素 (allicin) (Lancaster and Collin, 1981)，大蒜素是造成大蒜新鮮大蒜特殊風味的主要成分 (Cavallito and Bailey, 1944)。然而大蒜素並不穩定，因此會很快地轉變成 mono-, di-, tri-, poly-sulfides, sulfur oxides 及其他如 ajoene 等含硫化合物 (Block, 1985 ; Raghavan et al., 1983)。Brodnitz 等人 (1971) 指出，大蒜素在 20°C 中放置 20 小時後，會裂解成 diallyl disulfide (DADS, 66%)、diallyl sulfide (DAS, 14%)、diallyl trisulfide (DATS, 9%) 及少量二氧化硫。

大蒜精油 (garlic oil) 是新鮮大蒜以水蒸氣蒸餾法萃取而得。其主要成分是 diallyl disulfide，含量可高達 40~60% 左右。沈等人 (1992) 指出，1 公斤新鮮大蒜加 3 公斤水，以水蒸氣蒸餾法蒸餾 3 小時，約可得到 2 g 的大蒜精油，利用 GC 分析可得其主要成分為：diallyl disulfide (40%)、diallyl trisulfide (24%)、methyl trisulfide (13%)、methyl disulfide (6.6%)、diallyl sulfide (5%)、2-vinyl-4H-1,3-dithin (2%) 等。Block (1985) 也指出，以水蒸氣蒸餾法製備大蒜精油，產品中最主要的成分是 diallyl disulfide。至於以酒精在室溫下 (25°C) 萃取，將可得到較多的大蒜素 (allicin)，但如在 0°C 以下萃取時，最主要的產物是大蒜素。

#### 大蒜含硫成分的結構式

Compound	Chemical struction
alliin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
allicin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2$
ajoene	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2$
diallyl sulfide	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$
dially disulfide	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$
dially trisulfide	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$
dipropyl sulfide	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
dipropyl disulfide	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
propyl methyl disulfide	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_3$
allyl methyl disulfide	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_3$

allyl methyl trisulfide	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_3$
allyl mercaptan	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SH}$
S-allyl cysteine	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$
S-allyl meca-cysteine	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$
S-propyl cysteine	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$
dipropyl trisulfide	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
propyl methyl trisulfide	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_3$
cysteine	$\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$

## 二、大蒜對生理的影響

### (一) 大蒜的生理效用

大蒜中的有機含硫化合物不但賦予了大蒜特殊風味，並具有多種生理效應，已被應用為保健食品或來預防或治療疾病。到目前為止很多研究證實，大蒜具有抗粥狀動脈硬化 (antiatherosclerosis)、抗血液凝集 (antithrombosis)、促進纖維溶解 (fibrinolysis)、抗腫瘤生成 (antitumorigenesis)、抗癌 (anticarcinogenesis) 作用，並具有降低血中膽固醇、三酸甘油脂、降血壓、血糖及抗菌等作用。根據學者研究指出，大蒜中多種活性成分的生理活性如下表所示：

生理效用	活性成分	參考文獻
Antithrombotic	Alliin	Lawson et al., 1992
	Allicin	Lawson et al., 1992

	<p>Ajoene</p> <p>Diallyl disulfide</p> <p>Diallyl trisulfide</p> <p>Methyl allyl trisulfide</p> <p>1,5-hexadienyl trisulfide</p> <p>2-vinyl-1,3-dithiene</p> <p>3-vinyl-1,2-dithiene</p> <p>Allyl-1,5-hexadienyl trisulfide</p>	<p>Srivastava and Tyagiet, 1993</p> <p>Bordia et al., 1978</p> <p>Fenwick and Hanley, 1985</p> <p>Fenwick and Hanley, 1985</p> <p>Fenwick and Hanley, 1985</p> <p>Fenwick and Hanley, 1985</p> <p>Block, 1985</p> <p>Fenwick and Hanley, 1985</p>
Anti-lipidemic	<p>Alliin</p> <p>Allicin</p> <p>Ajoene</p> <p>Diallyl disulfide</p> <p>Allyl propyl disulfide</p> <p>S-allyl cysteine</p> <p>S-methylcysteine sulfoxide</p>	<p>Kamanna et al., 1984</p> <p>Orekhov et al., 1997</p> <p>Sendl et al., 1992</p> <p>Oi et al., 1995</p> <p>Bordia et al., 1978</p> <p>Lau et al., 1987</p> <p>Kamanna et al., 1984</p>
Fibrinolysis	<p>Methyl cysteine sulfide</p> <p>Methane-thiol-3,4-dimethyl- thiophene</p> <p>Propyl cysteine sulfide</p> <p>Propyl allyl sulfide</p>	<p>Augusti and Benaim, 1975</p> <p>Augusti and Benaim, 1975</p> <p>Augusti and Benaim, 1975</p> <p>Augusti and Benaim, 1975</p>
Anticancer	<p>Allicin</p> <p>Allixin</p> <p>Ajoene</p> <p>Diallyl sulfide</p> <p>Diallyl disulfide</p>	<p>Shalinsky et al., 1989</p> <p>Nishino, 1990</p> <p>Scharfenberg, 1990</p> <p>Hayes et al., 1987</p> <p>Schaffer et al., 1997</p>

	Diallyl trisulfide Dipropenyl sulfide Methyl allyl trisulfide S-allyl cysteine S-allyl mercapto cysteine	Sundaram and Milner, 1993 Perchellet, 1986 Sparmins et al., 1986 Weissler et al., 1997 Sigounas, 1997
Antibiotic	Allicin Ajoene Diallyl disulfide Diallyl trisulfide	Cavallito and Bailey, 1944 Fenwick and Hanley, 1985 Fenwick and Hanley, 1985 Fenwick and Hanley, 1985
Anti-hyperglycemia	Allicin Diallyl disulfide S-allyl cysteine	Cavallito and Bailey, 1944 Fenwick and Hanley, 1985 Sheela et al., 1992

## (二) 大蒜的負面影響

雖然大蒜具有上述各種正面的生理功效，但也有研究指出大蒜可能同時具有負面的影響。Fenwick and Hanley (1985)、Lau 等人 (1987) 及 Shashikanth 等人 (1986) 即指出，若食用過量大蒜可能會導致體重降低、生長受阻、嘔吐、厭食、貧血、降低血清白蛋白、下痢、氣喘、降低腸中有益菌群、皮膚病變等負面影響。

Malone (1989) 指出，毒理評估對於具有化學保護作用的化合物 (chemoprevention compounds) 是相當需要的工作。以大

蒜中活性成分 DAS 為例，若以一個新鮮大蒜僅含 1 mg (Wargovich, 1987)而言，需要每公斤體重吃進達 25-400 個新鮮大蒜才有致癌性，但也有研究指出僅食用少量大蒜，也可能會有毒性反應 (Dorant, 1993)。

大蒜精油或新鮮大蒜在啮齒動物之毒性評估曾有一些報告發表，Joseph 等人 (1989)以白化傾向之大鼠 (albino rats)為對象，在禁食後以胃管灌方式 (ig)給予大蒜精油 100 mg/kg BW 的劑量，發現老鼠幾小時內即因肺水腫 (pulmonary edema)而死，若改以飲水中添加新鮮大蒜萃取物 (200g/L)的方式投與，亦會出現非特異性的肝傷害 (non-specific liver injury)，但若在正常未禁食狀況下，灌食 100 mg/BW 的大蒜精油，則不會有前述毒性反應，顯示飲食方式會影響大蒜精油的毒性作用。然而 Hussain 等人 (1990)使用磨碎的新鮮大蒜以每公斤體重高達 400 mg 劑量經口給予老鼠，則未看到毒性反應。

### 三、大蒜對免疫之影響

近十年來相當多研究曾針對大蒜及其活性成分在生理上扮演的功能進行多樣化研究，然而這些研究大多著重於心血管系統 (cardiovascular system)、惡性腫瘤 (malignancies)、和抗菌性 (antimicrobial) 方面，而這些生理功效的可能機制與大蒜誘發或抑制酵素活性或是大蒜的抗氧化性質有關 (Agarnal, 1996)。然而大蒜是否在免疫調節方面也有生理活性，則是目前學者有興趣探討的方向。以下針對大蒜在免疫、解毒酵素系統、抗氧化、及降低血脂質等作用上，加以詳細敘述。

早期研究指出，大蒜具有抗血液凝集之性質，主要是大蒜具有抑制環氧化酶 (cyclooxygenase) 活性，因而減少了 Thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 之生成，而達到抗血小板凝集之作用 (Ali, 1995 ; Sendle et al., 1992)。1988 年 Mayeux 等人研究大蒜抑制血小板凝集之機制，結果顯示大蒜精油中之大蒜素，會抑制環氧化酶及脂氧化酶 (lipoxygenase) 活性，而減少花生四烯酸 (arachidonic acid) 代謝成二十碳烯酸 (eicosanoids)。Batirel 等學者 (1996) 也指出，給予大蒜萃取物可以降低腦部缺血再灌流後所增加的 LTC<sub>4</sub> (leukotriene C<sub>4</sub>) 和 PGE<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>)，因而達到保護作用。

二十碳烯酸是由前驅物質花生四烯酸經環氧化酶及脂氧化酶代謝後所合成，合成方式如下圖所示：

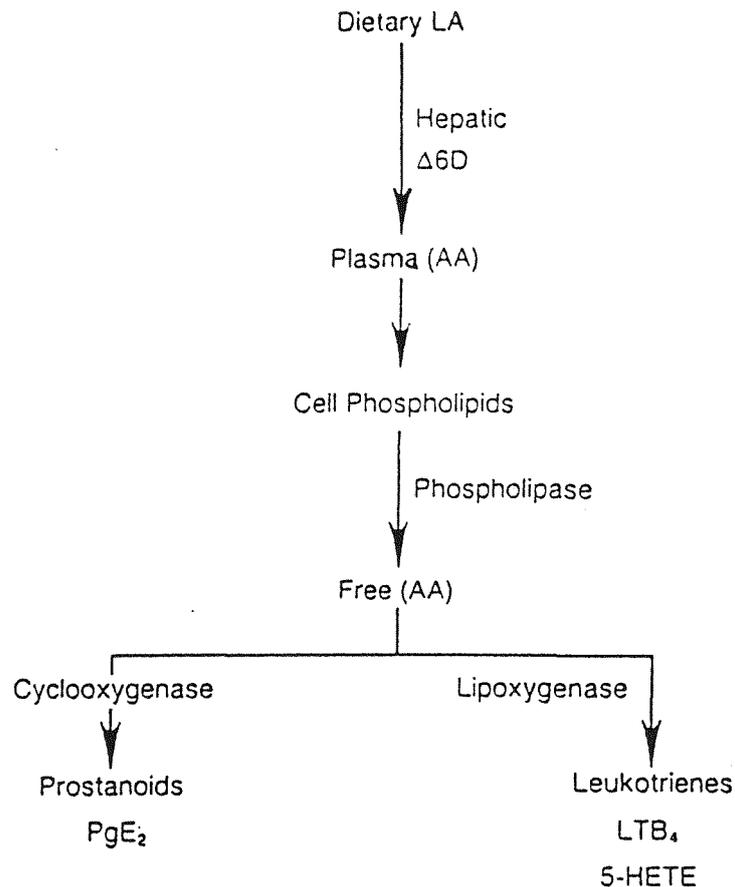


FIG. Outline of synthesis of prostanoids, i.e., PGE<sub>2</sub>, by cyclooxygenase, and HETE by lipoxygenase in macrophages from AA released from membrane phospholipids by the action of phospholipase. The AA is derived via conversion of dietary LA to AA in liver by a pathway in which  $\Delta^6$  desaturase ( $\Delta^6D$ ) is the rate-limiting enzyme.

(Kinsella and Lokesh, 1990)

飲食中的亞麻油酸 (linoleic acid, n-6)，在胞內經 $\Delta^6$ 去飽和酶 ( $\Delta^6$  desaturase) 及 $\Delta^5$ 去飽和酶 ( $\Delta^5$  desaturase) 與增長酶 (elongase) 作用可合成二十碳多元不飽和脂肪酸，如花生四烯酸，再併入細胞膜磷脂質中，細胞膜上花生四烯酸透過磷脂質脂解酶 A<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>) 作用，將細胞膜磷脂質 C2 位置上的花生四烯酸切下，花生四烯酸此時再分別經環氧化酶或脂氧化酶作用，進而形成不同二十碳烯酸產物。此兩種途徑

的共同特色為氧分子皆直接參與反應形成過氧化中間產物，而最大不同在於前者的產物為五碳環，後者的產物為直鏈狀。經由環氧化酶途徑產生之二十碳烯酸產物有：PGE<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>等，經脂氧化酶所生成之產物如：LTB<sub>4</sub>、5-HETE (5-hydroxy eicosatetraenoic acid)等。

大蒜透過抑制此兩酵素之活性而減少二十碳烯酸物質合成，因此有可能影響二十碳烯酸物質所調節之生理效應，例如：免疫反應或與抗腫瘤免疫 (antitumor immunity) (Belman et al., 1989; Shalinsky et al., 1989)。過去學者研究大多針對大蒜對二十碳烯酸生成之影響，然而並未針對大蒜是否也會影響二十碳烯酸之前驅物花生四烯酸的合成，因此本實驗分析肝中磷脂質脂肪酸成分及測定肝中 $\Delta^6$ 去飽和酶及磷脂質脂解酶 A<sub>2</sub> 酵素活性來更進一步探討大蒜在花生四烯酸合成代謝之生理作用。

1991 年 Lau 等學者發現，大蒜有活化巨噬細胞及淋巴細胞之能力。Marsh 等學者 (1987)也指出大蒜抑制老鼠膀胱癌 (bladder tumor)生長，有可能是透過活化 T 淋巴細胞之免疫反應。先前本實驗室曾發現，老鼠在每週灌食 3 次 200 mg/kg BW 之大蒜精油，7 週後，老鼠脾臟重量明顯高於控制組，暗示著大蒜精油可能影響免疫功能。因此本實驗利用 Con A (concanavalin A)刺激脾臟淋巴細胞增生模式來瞭解大蒜精油造成脾臟重量增加是否與脾臟淋巴細胞增生有關。另外，也以體內試驗方式分別以 CDNB 誘發接觸性過敏反應 (contact

hypersensitivity)及巴豆油 (croton oil)誘發刺激性皮膚炎 (irritant dermatitis)反應，來作為免疫功能的測試模式。

### 淋巴細胞免疫作用：

淋巴細胞是由原發性淋巴器官胸腺與骨髓生成，其中一些淋巴細胞經由血液循環而轉移至續發性淋巴器官及組織如：脾臟、淋巴結、扁桃腺及黏膜。

當抗原入侵後，會被免疫系統的細胞，例如：單核細胞 (monocytes)及巨噬細胞 (macrophage)經由非專一性受器或和免疫細胞上 Fc 受器結合的抗體形成免疫複合物，而吞噬抗原，經過修飾後，將分解的抗原胜肽片斷送回到免疫細胞表面，此即為抗原呈現細胞 (antigen-presenting cells；APC)，可與主組織相容性複合物 (major histocompatibility complex；MHC)結合。當 T 淋巴細胞膜上所擁有的特殊標記 T 細胞抗原受器 (T cell receptor；TCR)和 APC 表面的抗原/MHC 複合物結合時，T 細胞使受到抗原的刺激後，進而開始進行複製及分泌淋巴激素 (lymphokines)調控免疫反應。

### T 細胞活化：

淋巴細胞可受到多種分裂原 (mitogen)的刺激而活化，例如：Con A 及植物凝集素 (phytohaemagglutinin；PHA)，便可透過特殊細胞表面的接受器與 T cells 結合，進而刺激 T 細胞。

Con A 是由蓖麻子所萃取出來，俗稱刀豆素，是一種促細

胞分裂素，可促進淋巴細胞的複製。作用機制可能是 Con A 與 T 細胞活化有關之表面分子，如 T 細胞受器 CD<sub>3</sub> 結合，在刺激過程中，輔助型 T 細胞 (T<sub>H</sub>) 會釋放淋巴激素，例如 IL-2，它也是 T 細胞增殖因子；同時 T 細胞表面也會表現 IL-2 receptor 而與 IL-2 結合。當 IL-2 receptor 與 IL-2 結合後可引起基因的轉譯作用 (transcription)，例如增加細胞表面 transferrin receptor 的表現，進而增加與 transferrin 的結合，此現象對於細胞增殖有促進作用 (Neckers and Cossman, 1983；Heikkila et al., 1987)。Depper 等人 (1985) 年指出 IL-2 receptor 與 IL-2 結合能力可為細胞複製能力判定的指標。

#### 四、大蒜與癌症

隨著社會的進步，環境污染等問題也日益嚴重，加上國人飲食的精緻化，因而造成癌症的發生機率大為增加，近十年來癌症一直是國人十大死亡原因之首。因此以天然食物中具有化學預防作用 (chemoprevention) 的抑制物來預防癌症的發生，近來引起廣泛的注意。其中蔬菜蔥蒜屬所富含的有機含硫化合物，即吸引了不少學者們的重視。Fewick 及 Hanley (1985) 兩人曾針對大陸兩個省分進行流行病學調查，結果發現胃癌死亡率在較少攝食大蒜的省分較攝食較多大蒜的省分高，顯示大蒜與胃癌發生有關。Agarnal (1996) 的綜論文章中也提及在中國高大蒜消耗地區 (20 g/day) 比低攝食地區因胃癌死亡人數分別

為每十萬人有為 3.45 與 40 人。You 等人 (1989) 的研究也指出，蔥蒜屬蔬菜(洋蔥、大蒜)的大量消耗，的確會使胃癌的罹患率降低。

除流行病學研究外，體內及體外試驗研究也證實，大蒜是具有預防癌症發生之效用，抑制的癌症種類有：胃癌 (Buiatti, 1989)、結腸直腸癌 (Hoenszel, 1972)、膀胱癌 (Marsh, 1987)、肝癌 (Hayes et al., 1987; Jang et al., 1989; 1991)、皮膚癌 (Nishino et al., 1989) 等。大蒜抑制癌症的可能機制有：1. 增強對自由基的清除能力、2. 增加免疫系統的調控、3. 增加癌細胞的細胞毒性 (direct cytotoxic effect on cancer cells) 及 4. 增加解毒功能等 (Sumiyoshi and Wargovich, 1989; Abdullah et al., 1988; Dausch and Nixon, 1990)。除此外，大蒜抑制癌症也可能是與誘發或抑制酵素活性有關，例如：Perchellet 等人 (1986) 即指出，在腫瘤促進 (tumor promotion) 試驗中，大蒜精油、洋蔥精油 (onion oil) 和 dipropenyl sulfide 會增加 glutathione peroxidase 酵素活性，且大蒜精油有助於維持 reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) 的比值 (Shalinsky et al., 1989)。在 Pinto 等人 (1997) 及 Belman 等人 (1989) 的研究中也指出大蒜精油抑制癌細胞生成與其腫瘤生成階段 (tumor promotion stage) 重要酵素 ornithine decarboxylase (ODC) 及脂氧化酶 (lipoxygenase) 活性有關。

在解毒酵素方面，大蒜精油成分 Allyl methyl trisulfide 可增加老鼠不同組織：胃、小腸黏膜、肝臟、肺臟中 glutathione

S-transferase (GST)活性 (Sparnins et al., 1986)。隨後，Liu 等人 (1992)也指出飲食中加入 2%大蒜粉末，可顯著增加老鼠肝臟 GST 活性。除了 GST 活性外，Brady 等人 (1991) 也有研究也進一步指出，大蒜中 DAS 和其他含硫化合物抑制藥物誘發癌生成和毒性反應的機制，主要是抑制肝中 cytochrome P450 依賴前致癌作用和前毒性作用 (bioactivation of the procarcinogens and protoxicants)。因此解毒酵素系統在大蒜成分抑制癌症生成上扮演了重要的角色。

### **解毒酵素系統或生物轉化酵素系統 (Biotransformation enzyme systems)**

解毒酵素系統廣泛分佈於全身組織中，而且也存在於很多的細胞間質中。肝臟是生物轉化酵素系統的主要存在區域，因此成為動物體內進行藥物代謝及解毒代謝的主要器官。藥物或毒物等外來物從腸道吸收後由門脈系統運送到肝臟，進行代謝清除作用，減少毒性。除肝臟外，解毒酵素系統也存在於皮膚、肺、鼻黏膜細胞、眼睛及腸胃道。

解毒酵素系統在胞內主要存在內質網或細胞質中，少部分則在粒線體、細胞核及溶小體。其代謝作用可分成兩個階段 (Phase I 及 Phase II)。Phase I 酵素系統的代謝作用主要包括氧化、還原及水解，這些反應可視為功能性反應 (functional reactions)，其生成物可繼續作為 Phase II 代謝作用之受質 (Anders, 1988；Guengerich and Liebler, 1985)。Phase I 酵素作

用後，首先改變 xenobiotic 現有的官能基，使這些產物較易溶於水。相較 Phase I 的作用，Phase II 酵素系統則主要是結合反應 (conjugative reaction)，可將 xenobiotic 既有或是經 Phase I 作用生成的新的功能基，接上內生性的 sulfate、glucuronic acid、amino acids 或是 glutathione 等具有高水溶解性的小分子，增加這些代謝後生成物的水溶性，使其易排出體外 (Paulson et al., 1986)。

Phase I 酵素系統中以 cytochrome P450 為最主要的成員，P-450 酵素存在微粒體中且是一種含鐵蛋白 (heme-containing proteins)，heme iron 的形式通常為 ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ )，當還原成 ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 時，P450 會結合配位子 (ligand) (如氧、一氧化氮)，此時 ferrous P450 及一氧化碳複合物最大吸光質約在 450 nm 附近，因此以 cytochrome P450 命名。Cytochrome P450 催化反應是 monooxygenation，將氧原子併入受質，再由 NADPH 獲得電子而使受質形成具有氫氧基複合物及水的過程 (Guengerich, 1991)。P450 酵素又稱為混合功能氧化酶 (mixed function oxidases)，其功能單位除 P450 酵素本身外，還包括有 NADPH cytochrome P450 reductase，兩種相輔相成。

Phase II 酵素系統則主要分佈在細胞質中，包含的酵素有 sulfotransferase、UDP-glucuronic acid transferase、glutathione S-transferase、N-acetyltransferase、amino acid conjugase、methyltransferase。其反應包括 glucuronidation、sulfation、acetylation、methylation、glutathionation 或氨基酸的結合。Phase

II 酵素作用後可顯著增加外來物之水溶解性，因此增加排出體外之機會 (Paulson et al., 1986)。

雖然 Phase I 及 Phase II 是體內代謝毒物加速排出體外的保護機制，但近年來也有研究指出，Phase I 及 Phase II 酵素具有生物活化作用 (bioactivation reactions)，因而使外來物在解毒過程中也可能因而生成更具活性的中間產物，進而加深細胞的傷害，例如許多致癌物質即需 cytochrome P450 的活化，Czgan 等人 (1973) 指出 dimethylnitrosamine (DEN) 被代謝或活化成致突變物的過程必需有 cytochrome P450 的參與。至於 Phase II 的代謝途徑也可能有生物活化作用，例如：glutathione conjugate，於 xenobiotics 的生物轉化作用中即可扮演活化者的角色，其代謝中間產物具有毒性或致突變性 (Anders et al., 1988；Dekant et al., 1989)。

生物轉化酵素系統在癌化過程中扮演了重要角色，而先前學者在研究大蒜與此酵素系統的關係時，大多與 P450 誘發劑 (如 alcohol) 同時處理，但對於正常未誘發狀況下，飲食中大蒜精油及其中 DAS 和 DADS 兩主要含硫成分是否也會影響生物轉化酵素系統，則是本實驗想探討的。

## 五、大蒜對抗氧化酵素與抗氧化分子之影響

近年來很多研究指出，活性氧 (reactive O<sub>2</sub> species) 或氧自由基 (oxygen free radicals) 是造成一些疾病發生的主要原因，

如：高膽固醇血症造成的粥狀動脈硬化 (hypercholesterolemic atherosclerosis)、出血再灌流心臟傷害及衰竭 (ischemia-reperfusion cardiac injury and heart failure)等 (Prasad et al., 1989, 1992, 1993; Steinberg, 1992)。

動物體內為防護這些活性氧分子的傷害，因而必需有一套有效的保護系統與之抗衡。生物體內的抗氧化系統可分為兩大部分 (Cotgreave et al., 1988)，包括：1. 抗氧化分子，如：維生素 E (tocopherol)、 $\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene)、麩胱甘肽 (glutathione, GSH)、維生素 C (ascorbic acid)、尿酸 (uric acid)、膽紅素 (bilirubin)等。2. 抗氧化酵素，如：超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、觸酶 (catalase)、麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH Px)、麩胱甘肽硫轉移酶 (glutathione-S-transferase, GST)等，及多種輔助酵素，如：麩胱甘肽還原酶 (glutathione reductase, GSH Rd)、葡萄糖 6 磷酸去氫酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase)等。其中在抗氧化分子方面，細胞膜中以維生素 E、細胞內又以麩胱甘肽及維生素 C 最為重要。

很多研究也證實，大蒜對於高膽固醇血症造成的粥狀動脈硬化 (hypercholesterolemic atherosclerosis)、出血再灌流所造成的心律不整或梗塞 (ischemia-reperfusion arrhythmias and infarction)等疾病具有預防及治療作用 (Jain, 1976; Rietz et al., 1993; Arora et al., 1993; Foushee et al., 1982; Ernst et al., 1985)，且可能與大蒜的抗氧化性能力有關。在體外試驗模式

下，Popov 及 Lewin (1994)年指出以直接 UV 照射方式 (photo-induced radicals)或使用  $\text{Cu}^{2+}$ 誘發低密度脂蛋白 (LDL)氧化實驗中，證實大蒜萃出物具有減少 LDL 氧化之能力。Prasad 等人 (1996)報告也指出，大蒜萃出物可抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  所誘發自由基的生成，因而減少脂質過氧化程度。

但在中長期餵飼時間中，大蒜的抗氧化性質，是否可能會因此而影響到其他抗氧化分子或抗氧化酵素，也是本實驗另一想探討的方向。

## 六、大蒜對血脂質的影響

除癌症外，粥狀動脈硬化和冠狀動脈疾病也是現代人常見的疾病。臨床及流行病學顯示，高血脂、高血壓為粥狀動脈硬化之危險因子，因此具有降血脂、降血壓性質的大蒜，近來也被學者廣泛的研究。

在臨床實驗上，Bhushan 等人 (1979)指出給予患有缺血性心臟疾病 (ischemic heart disease)患者每天口服 5~10 g 的生大蒜 2~3 個月，確有降低血中膽固醇及三酸甘油脂濃度的效應。另一實驗中，高膽固醇血症病人每天服用大蒜汁 (0.5 ml/kg BW) 2 個月，血中膽固醇濃度明顯的較服用前低 (Augusti, 1977)。Bordia 等人 (1978)也指出，若給予冠狀動脈心臟疾病患者每天食用 1 g 生大蒜，可增加血清中分解纖維蛋白的活性 (fibrinolytic activity) 80%之多，至於在健康受試者，則可增加

達 130%。Lau 等人 (1987)也提及不管是新鮮大蒜或大蒜精油均有降低血中膽固醇、低密度脂蛋白 (LDL)、和極低密度脂蛋白 (VLDL)及增加高密度脂蛋白 (HDL)濃度之功用。目前為止，大蒜降低膽固醇可能機制有 (Qureshi et al., 1987; Jain, 1976; Yeh et al., 1994): 1.抑制膽固醇合成酵素活性，減少膽固醇合成，如：抑制 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase)及 cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase 酵素活性、2.增加膽酸 (bile acid)分泌以利於膽固醇的排除。

至於大蒜降低血中三酸甘油脂濃度主要是透過抑制脂質合成 (lipogenic enzymes)酵素 (Chi et al., 1982; Qureshi et al., 1987; Yeh et al., 1994; Oi et al., 1995)，如：1.降低 glucose-6-phosphate dehydrogenase 活性及 malic dehydrogenase 活性、2.增加正腎上腺素 (norepinephrine; NE)分泌，促進三酸甘油脂的分解。

雖然如此，但在部分動物試驗中也曾發現，大蒜萃取物並無降低血中膽固醇及血脂質之功能 (Augusti and Mathew, 1973)。Simons 等人 (1995)進行的臨床研究中也指出，給予高膽固醇血症患者每日三次 300 mg 大蒜粉末，對患者血漿膽固醇、三酸甘油脂、脂蛋白濃度及血壓皆沒作用。所以到目前為止，大蒜或大蒜成分在降血脂質方面的探討並不一致，這有可能與實驗模式、實驗對象或大蒜萃取物成分的不同有關。

## 參、材料及方法

### 一、實驗材料

#### (一) 試驗動物

4 週齡離乳 Sprague Dawley (SD) 雄性大白鼠，購自國科會實驗動物中心。

#### (二) 飼料

本實驗所採用 AIN-76 飲食及高油脂飲食 (High-fat diet) 成分如表 1 所示，成分分別購自 TekLad (Madison, WI)、台糖公司及 CPC Intl. Inc.。

#### (三) 大蒜樣品

1. 大蒜精油 (GO, garlic oil)，由中國醫學院營養系沈立言老師所提供。利用氣相層析分析，主要成分為：diallyl sulfide (4%)、methyl allyl disulfide (4%)、methyl allyl trisulfide (8%)、diallyl trisulfide (31%)、diallyl disulfide (39%)。
2. 二烯丙基硫化物 (DAS, diallyl sulfide) 購自 Fluka Chemical Co. 純度：GC 97%,  $(\text{H}_2\text{C}=\text{CHCH}_2)_2\text{S}$
3. 二烯丙基二硫化物 (DADS, diallyl disulfide) 購自 Aldrich Chemical, Inc. 純度：GC 80%,  $(\text{H}_2\text{C}=\text{CHCH}_2)_2\text{S}_2$

#### (四) 化學試劑

##### 1. 一般分析用藥

見附錄 1

##### 2. 放射線分析用藥

(1) [6- $H^3$ ]Thymidine (1mCi/ml) 購自英國 Amersham。

(2) Linoleic acid [1- $^{14}C$ ] (58mCi/mmol) 購自 NEN。

(3) L- $\alpha$ -1-palmitoyl-2-arachidonyl-[arachidonyl-1- $^{14}C$ ]

(55mCi/mmol) 購自 NEN。

##### 3. 電泳分析及免疫染色分析用藥

① Sodium dodecyl-sulfate (SDS)、Trizma Base (Tris)、 $\beta$ -mercaptoethanol、KCl、等購自美國 Sigma Chemical Company。

② NaCl 購自德國 Merck Chemical Company。

③ Iso-butanol 購自美國 Fisher Scientific Company。

④ Methanol 購自美國 Tedia Chemicals Inc。

⑤ Comassie brilliant blue R-250、glycine、30% acrylamide/0.8% N,N'-methylene-bis-acrylamide 溶液、bromophenol blue 購自美國 Bio-Rad Laboratories。

⑥ Ammonium persulfate、N,N,N',N'-tetramethylethylene-

diamine (TEMED) 購自 Phamacia Biotech。

⑦ Peroxidase anti-rabbit IgG ABC kit 購自美國 Vector Laboratories。

⑧ Polyvinlidene difluoride (PVDF) membrane 購自美國 Millipore。

⑨ Monoclonal anti-rat P450 2E1 antibody 購自美國 Oxford Biomedical Research, Inc。

⑩ Rat CYP 2B1/2 polyclonal antibody 購自 Chemicon Interanational Inc。

## 二、實驗方法

### (一) 動物飼養

自國科會實驗動物中心購得 4 週齡離乳之 SD 雄性大白鼠，隨機分入各處理組中，飼養於塑膠老鼠籠中，飼養條件為 12 小時晝夜循環 (12 hrs light/ dark cycle ; light : 8:00~20:00)，溫度設定為  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。實驗期間，水和飼料均自由攝食。依飲食及大蒜成分不同共分為 6 組，如下表所示：

組別	飲食	灌食成分及劑量 (mg/kg BW)
1	High-fat diet	corn oil
2	High-fat diet	garlic oil (200 mg/kg BW)
3	High-fat diet	diallyl sulfide (DAS) (100 mg/kg BW)

- 4 High-fat diet diallyl disulfide (DADS) (200 mg/kg BW)
  - 5 AIN-76 diet corn oil
  - 6 AIN-76 diet garlic oil (200 mg/kg BW)
- 

飲食組成如表 1，待 3 天適應期後，開始以口灌方式 (p.o.) 灌食玉米油 (CO, 2 ml/kg, 對照組)或大蒜精油 (GO, 200 mg/kg BW)或 DAS (100 mg/kg BW) 或 DADS (200 mg/kg BW)，每週灌食 3 次，為期 7 週，實驗結束後，斷頭犧牲。

## (二) 樣品收集與製備

### 1. 樣品收集

大白鼠於實驗結束時以斷頭方式犧牲，取出肝臟、脾臟稱重。部分肝臟立刻進行細胞質與微粒體製備，其餘部分則以液態氮急速冷凍並保存於 $-80^{\circ}\text{C}$ 。所收集血液則進行血漿及紅血球製備。

### 2. 血漿及紅血球製備

老鼠斷頭後，收集 9 ml 血液樣本(以 5% 檸檬酸鈉為抗凝血劑)，以 500xg 離心 10 分鐘後，取上層為血漿部分，置於 $-80^{\circ}\text{C}$  待日後分析用。下層紅血球部分則經兩次含 10 mM glucose 之 PBS 清洗後，再稀釋成 10%之紅血球懸浮液，並立刻進行紅血球還原態及氧化態麩胱甘肽分析。

### 3. 肝臟細胞質與微粒體之製備

新鮮肝臟，以 4 倍體積 (w/v) 含 1.15% KCl 的 0.01 M potassium phosphate buffer (pH, 7.4) 均質，均質液於 4°C 下先以 10000xg 離心 30 分鐘去除細胞膜及雜質，取上層液再以 105,000xg，進行超高速離心 1 小時。離心後上層液即細胞質 (cytosol) 部份，沈澱部分即為微粒體 (microsome)，分別將細胞質上層液及加入 1 ml 微粒體懸浮液 (0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.6，含 1 mM EDTA) 的微粒體，封存於 -80°C。

### (三) 實驗分析項目

#### 1. 肝中磷脂質脂肪酸代謝

##### (1) 肝臟磷脂質脂肪酸分析 (Lepage et al., 1986)

0.2 g 肝臟加入 1.5 ml CH<sub>3</sub>Cl : Methanol (2:1) 混合液均質，以濾紙過濾，收集液以氮氣吹乾，加入 50 µl CH<sub>3</sub>Cl，充分振盪萃取脂質，利用 TLC aluminum sheets (Silica gel 60, 20×20 cm)(Merck) 分離不同脂質成分，展開液為 hexane/diethylether/formic acid (80:20:4, v/v/v)，展開完成後取出 TLC 片吹乾，噴上 2,7-dichlorofluorescein (0.1% w/v in methanol) 呈色，將殘留於原點之磷脂質刮下並收集在有蓋玻璃試管中，加

入 2 ml methanol:benzene (4:1,v/v)混合液充分混合，然後沿管壁慢慢加入 200  $\mu$ l acetyl chloride，蓋子鎖緊後充分振盪，置於 90-92°C 水浴 1 小時，冷卻後加入 5 ml 6%  $K_2CO_3$  混合均勻，在 1100xg 下離心 10 分鐘，取上層液並以氮氣吹乾，最後加入 20  $\mu$ l n-hexane 即完成樣本製備。

取 1  $\mu$ l 注射於 GC 中測定， $N_2$  為 carrier gas，管柱溫度先於 150°C 下 持續 8 分鐘，再以每分鐘 3°C 上升到 190°C，injector 及 flame-ionized detector (FID)的溫度皆設定為 220°C，不同脂肪酸則與脂肪酸標準品 (Alltech, Deerfield, IL)滯留時間比較，脂肪酸百分比是以個別脂肪酸所佔面積之比來計算。

GC 系統包括: Gas Chromatograph G3000 (Hitachi Tokyo, Japan)，D-2500 integrator (Hitachi Tokyo, Japan)，GC column : SP-2330 fused silica capillary column, 30m $\times$ 0.25mm ID，0.20  $\mu$ m film thickness (Supelco Bellefonte, PA)。

## (2) 肝中 $\Delta^6$ desaturase 活性測定 (Garg et al., 1988)

1 g 肝臟加入 2.5 ml 均質液(含 0.25 M sucrose、0.05 M  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 mM glutathione, pH 7.4)，均質後以 12,000xg 離心 15 分鐘，取 1 ml 上層液 (5 mg protein /ml)，依次加入 200 nmol 含有  $^{14}C$  標定之 linoleic acid (0.1  $\mu$ Ci)、2 ml 反應混合液 (50 mM  $Na_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 、7.5 mM ATP、3.8 mM  $MgCl_2$ 、0.2 mM NADPH、0.5 mM NADH、0.2 mM coenzyme A)，37°C 反應 20

分鐘後，加入 2 ml 10% KOH (溶於 methanol)，85°C 下皂化 2 小時，隨後加入 1 ml 8 M HCl 進行中和反應，最後以 hexane 萃取，氮氣吹乾後。加入 1 ml 14% BF<sub>3</sub> (boron trifluoride)，100°C 下甲基化反應 1 小時，再以 hexane 萃取並以氮氣吹乾，最後溶於 60 µl hexane 中，以 TLC 分析 (TLC 片預先以含 10% AgNO<sub>3</sub> 之 acetonitrile 溶液浸泡 15 分鐘)，展開液為 hexane:diethyl ether= 17:3 (v/v)，18:2 及 18:3 脂肪酸分離位置則分別與標準品比較後再做確認。將 18:2 及 18:3 脂肪酸刮下，以 β-counter 計數， $\Delta^6$  desaturase 活性以 pmol 18:3 formed/min/mg protein 表示。

### (3) 肝中 PLA<sub>2</sub> 活性測定 (Rao et al., 1996)

取肝臟 0.3 g 加入 900 µl 均質液 (含 50 mM Tris-HCl、250 mM sucrose、1 mM EDTA、1 mM EGTA、0.1 mM PMSF、20 µM leupeptin、5 µg/ml trypsin inhibitor, pH 7.4)，均質後以 10,5000xg 離心 1 小時，取上層 cytosol 部分進行 PLA<sub>2</sub> 活性測定及蛋白質定量分析。

取 100 µg cytosolic proteins，加入反應混合液 (100 mM Tris-HCl、15 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.5) 至總體積為 100 µl，加入 4.6 µl 910 µM PAPC (10 µci/umol)，最終濃度為 40 µM，37°C 下反應 30 分鐘後，加入 300 µl chloroform:methanol=3:2 (v/v) 終止反應，再加入 200 µl chloroform 萃取，充分混合後取下層

chloroform 層，以氮氣吹乾，加入 5  $\mu\text{g}$  AA 及 50  $\mu\text{l}$  chloroform 後，即可進行 TLC 分析，展開液比例為 chloroform : methanol : acetic acid : water = 90 : 12 : 2 : 1(v/v/v/v) ，AA 及 PAPC 分離，位置則以  $\text{I}_2$  蒸汽顯示。AA 及 PAPC 刮下後，以  $\beta$ -counter 計數， $\text{PLA}_2$  活性以 pmol AA release/min/mg protein 表示。

#### (4) 血漿 $\text{PGE}_2$ 濃度分析測定

血漿稀釋 150 倍後，採用 Prostaglandin  $\text{E}_2$  [ $^{125}\text{I}$ ]RIA Kit (NEN<sup>®</sup> Research Products) 分析血漿  $\text{PGE}_2$  濃度。

## 2. 免疫反應分析

### (1) 脾臟淋巴細胞複製率測定 (splenocyte proliferation

assay) (Szondy and Newsholeme, 1991)

大白鼠犧牲時取出脾臟，稱重後立即置於 PBS 緩衝液 (140 mM NaCl, 0.68 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.68 mM KCl, 4.92 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH=7.2~7.4) 中，利用夾子撕成小碎片，使淋巴細胞釋出。濾紙過濾後，400xg 離心 10 分鐘，倒掉上層液，加入 PBS 以同樣步驟再清洗兩次。將取得的細胞懸浮於 10 ml 梯度離心液 (Histopaque<sup>®</sup>1077, 密度  $1.077\text{kg}/\text{m}^3$ ) 中，以 400xg 離心 15 分鐘 ( $18^\circ\text{C}$ )，此時淋巴細胞位於密度梯度溶液與 PBS 界面中。用滴管將淋巴細胞取出，以 PBS 沖洗細胞後，再於 400xg  $18^\circ\text{C}$  下離心 10 分鐘，移除

上層液，沉降在底層的淋巴細胞以 RPMI-1640 沖洗，離心 10 分鐘，除去上層液，最後加入 1 ml RPMI-1640，以滴管小心重複吸放數次，使細胞均勻懸浮，並計算每毫升中所含細胞數目。

淋巴細胞以每個 well  $5 \times 10^5$  之細胞數接種於 96-wells 的培養盤中，並加入不同濃度的 concanavalin A (Con A) 刺激淋巴細胞之複製。48 小時後，加入  $20 \mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -thymidine ( $10 \mu\text{Ci/ml}$ )，再繼續培養 18 小時，利用半自動細胞收集器以甲醇沖洗將其收集到玻璃纖維濾紙上，將其放入閃爍計數瓶中加入 2 ml 閃爍計數液，以閃爍偵測器測定 1 分鐘。計算  $^3\text{H}$ -thymidine 併入胞內 DNA 的量。

(2) 接觸性過敏反應 (contact hypersensitivity) 測定 (Claman, 1976; Levis et al., 1975)

老鼠灌食 7 週後，於下腹部剃毛，塗上  $50 \mu\text{l}$  0.5% CDNB 溶液 (溶於 acetone : olive oil = 4 : 1, v/v)，24 小時後塗抹第二次，96 小時後，則將 0.3% CDNB 改塗抹在大白鼠右耳上，再 24 小時後將老鼠犧牲，沿耳骨剪取老鼠左右耳分別秤重，以兩耳差值作為接觸性過敏反應測定指標。

(3) 刺激性皮膚炎 (irritant dermatitis) 測定 (Clementi et al., 1994)

老鼠灌食 7 週後，於其中右耳塗抹  $15 \mu\text{l}$  croton oil (溶於

acetone)，6 小時後將老鼠犧牲，沿耳骨剪取老鼠左右耳分別秤重，以兩耳差值作為刺激性皮膚炎測定指標。

### 3. 解毒酵素系統分析

#### (1) 肝臟 total cytochrome P450 content 測定 (Omura et al., 1964)

將存放於 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷凍櫃的微粒體樣品取出，解凍後磨開，使其成為均勻的微粒體懸浮溶液，測量蛋白質濃度後，將懸浮液稀釋為每 ml 含 1.5 mg 蛋白質，取出 2 ml 的稀釋懸浮液，加入 1 mg 的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  還原細胞色素 P450，混合均勻後分二次各別取出 1 ml，置入兩管石英管中，分別置入分光光譜儀的 reference cell 及 sample cell，以波長 400 ~ 500 nm 進行掃瞄，首先記錄樣品在 450 nm 及 490nm 之初次掃瞄吸光值，完成後取出 sample cell 之石英管，緩緩的注入 40 個 CO 的氣泡，混合後再放回分光光譜儀中，進行第二次掃瞄並記錄 450nm 及 490nm 之掃瞄吸光值，濃度以 n mol/mg protein 表示。

#### (2) 肝臟 cytochrome P450 reductase 活性測定 (Phillips et al., 1962)

微粒體製備同上，但最終蛋白質濃度則為 0.5 mg/ml。1 ml 的石英管中，依次加入 320  $\mu\text{l}$  0.5 mM 的 cytochrome c 溶液，40  $\mu\text{l}$  粒線體的樣品 360  $\mu\text{l}$  之 0.3 M 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.7) 混合後置於室溫下 3 分鐘，再加入 40  $\mu\text{l}$  10 mM NADPH，在波長 550nm 下紀錄三分鐘內吸光值的變化，P450 reductase 活性以

nmole cytochrome c/min/mg protein 表示。

(3) Pentoxoresorufin O-Dealkylase ( 2B1 ) 活性測定 ( Lubet et al., 1985 )

樣品製備同上，蛋白質濃度也稀釋在 1 mg protein/ml。1.5 ml 微量離心管中加入 100  $\mu$ l 500 mM  $MgCl_2$ 、400  $\mu$ l ( 1 mg/ml ) 微粒體樣品，20  $\mu$ l 1 mM pentoxoresorufin，380  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)，最終總體積為 900  $\mu$ l，混合後再加入 100  $\mu$ l 2.5 M NADPH 並於室溫下反應 5 分鐘，最後加入 20  $\mu$ l 25%  $ZnSO_4$  及 20  $\mu$ l 飽和  $Ba(OH)_2$  終止反應 (空白實驗則在加入 NADPH 之前，先加入 20  $\mu$ l 25%  $ZnSO_4$  及 20  $\mu$ l 飽和  $Ba(OH)_2$ )。終止反應後以 1000xg 下離心 5 分鐘，取 0.7 ml 的上層液，放入螢光光譜儀進行掃描 (excitation  $\lambda$ =522nm 及 emission  $\lambda$ =586nm)。標準濃度曲線則用已知濃度的 resorufin 來定量，POD 的活性以 pmol/mg protein/min。

(4) N-nitrosodimethylamine ( NDMA ) demethylase ( 2E1 ) 活性測定 ( Nash, 1952 )

樣品的製備同 P450 content，微粒體蛋白質濃度則稀釋至 1 mg/ml，分析時於 1.5 ml 微量離心管中加入 100  $\mu$ l 100 mM  $MgCl_2$ 、100  $\mu$ l 1.5M KCl、400  $\mu$ l ( 1 mg/ml ) 微粒體均質液、100  $\mu$ l 40 mM NDMA 和 200  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)，使

總體積達 900  $\mu\text{l}$ ，混合後再加入 100  $\mu\text{l}$  100 mM NADPH 並於 37°C 下反應 10 分鐘，最後加入 50  $\mu\text{l}$  25%  $\text{ZnSO}_4$  及 50  $\mu\text{l}$  飽和  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  終止反應（空白實驗則在加入 NADPH 之前，先加入 50  $\mu\text{l}$  25%  $\text{ZnSO}_4$  及 50  $\mu\text{l}$  飽和  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ）。終止反應後進行離心 1000 $\times$ g 5 分鐘，取出 0.7 ml 上層液，加入新鮮配製的 0.3 ml Nash 試液（含 5 g ammonium sulfate、0.1 ml acetylacetone 於 6 ml 3% acetic acid），混合後在 50°C 水浴下反應 30 分鐘，利用分光光譜儀在波長 412nm 下測定，甲醛生成濃度，標準曲線則利用已知濃度甲醛來做標準曲線，NDMA 的活性以 nmole 甲醛/min/mg protein 表示。

(5) Glutathione S-Transferase ( GST ) 活性測定 ( Habig et al., 1974 )

於 1.5 ml 石英管中加入 880  $\mu\text{l}$  反應液（含 1 mM GSH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液，pH 6.5），再依序加入 20  $\mu\text{l}$  50 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)（溶於 99.5% ethanol）、80  $\mu\text{l}$  20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 及 20  $\mu\text{l}$  經 20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 稀釋 150 倍後的細胞質均質液樣本。混合均勻後於 340nm 下掃描吸光值變化 5 分鐘 (25°C)，GST 活性以 CDNB-GSH 生成速率來計算，最終活性以 nmole CDNB conjugate formed/min/mg protein 表示，CDNB-GSH  $\Delta\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

(6) 2B1、2E1、GST—西方墨點法分析 (Towbin et al., 1979 ;

Laemmli, 1970)

A. 電泳分析

將同組所有老鼠之細胞質或微粒體樣本等量混合後，分析蛋白質濃度 (Lowry et al., 1951)，並將樣品蛋白質濃度調整為 1 或 2 mg/ml，加入等量體積的 sample buffer，95°C 下煮 5 分鐘，隨後將等量蛋白質樣本加入各個樣本凹形槽中，利用 10% SDS-polyacrylamide gels 將不同蛋白質分離。

B. 西方墨點法 (Western blotting)

將完成電泳後之 stacking gel 切除，剩下的 separating gel 則浸泡於 transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol) 中 15 分鐘，將大小約與膠片相同之 PVDF 轉印膜，先以 methanol 處理 5 分鐘，再與膠片共同浸泡於 transfer buffer 內。浸泡後依序將海綿、濾紙、膠片、PVDF 膜、濾紙、海綿放置於三明治式塑膠版中，隨後放入轉印槽中，以 100 伏特進行轉移，1 小時後取出 PVDF 膜，先以 buffer A (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.3% Tween-20, pH 7.4) 沖洗 3 次，每次 5 分鐘，隨後放置於 blocking solution (20 ml 含 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4 的 buffer B 加上 normal goat serum 150  $\mu$ l) 中，於 4°C 下隔夜處理或 37°C 水浴下半小時，即可進行免疫染色。

### C. 免疫染色

- a. 將 PVDF 轉印膜由 blocking solution 取出，以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
- b. 倒入含初級抗體 (anti-rat cytochrome P450 2E1、2B1 或 pGST 抗體) 的 buffer B，於 37°C 水浴中震盪 30 分鐘，抗體溶液配製比例如下表所示。
- c. 取出初級抗體溶液，以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
- d. 接著倒入二級抗體 (goat anti-mouse IgG antiserum 或 anti-rabbit IgG biotinylated antibody)，於 37°C 水浴中震盪 30 分鐘。
- e. 取出二級抗體溶液，以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
- f. 接著倒入 A-B complex (Avidin-Horseradish Peroxidase) 溶液，於 37°C 水浴中震盪 30 分鐘。
- g. 取出 A-B complex 溶液，以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
- h. 最後加入 DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (10ml buffer B 加入 4  $\mu$ l 3%  $H_2O_2$  及 40  $\mu$ l 25 mg/ml DAB) 呈色。
- i. 倒出顯色液，以 buffer A 沖洗 5 分鐘。
- j. 取出 PVDF 膜，陰乾即可。

### 1°Ab 或 2°Ab 配製比例

	1°Ab	2°Ab
2E1	P450 2E1 antibody : buffer B =1:1000	anti-mouse IgG : buffer B=1:400
2B1	P450 2B1 antibody : buffer B =1:1000	anti-rabbit IgG : buffer B=1:400
pGST	pGST antibody : buffer B =1:400	anti-rabbit IgG : buffer B=1:1500

#### 4. 抗氧化分子及抗氧化酵素活性測定

##### (1) 肝臟樣本

##### ① 脂質過氧化 (lipid peroxidation) 分析—(thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS) (Fraga et al., 1988)

0.3 g 肝臟加入 9 倍體積的 50 mM 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.0) 均質，取 0.2 ml 肝臟均質液，置於冰浴中分別加入 0.3 ml 50 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.4)、0.5 ml 3% sodium dodecyl sulfate (SDS)、2 ml 0.1 N HCl、0.3 ml 10% phosphotungstic acid 及 1 ml 0.7% TBA，混合均勻，置於沸水中反應 30 分鐘，再置於冷水中冷卻，加入 5 ml 1-butanol，萃取 TBARS，在 1100xg 下離心 15 分鐘，取上層液於 excitation 515nm 及 emission 555nm 下，利用螢光分光光譜儀 (F-4500, Hitachi, Tokyo, Japan) 分析。

所得數值再與 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP)所作出的標準曲線圖比較，計算出樣品中 TBARS 的濃度，濃度以每公克蛋白質含多少 nmole TBARS 表示。

② 維生素 E 測定 (Catignani and Bieri, 1983)

0.1 g 肝臟加入 1 ml 均質液 (50 mM 磷酸鉀緩衝液, pH 7.0) 均質。取 200  $\mu$ l 肝臟均質液，加入 100  $\mu$ l  $\alpha$ -tocopheryl acetate (50 ng/ml in 99.5% ethanol) 當作內標準。振盪混合 1 分鐘後，以 200  $\mu$ l hexane 萃取 1 分鐘。在 6500xg 下離心 3 分鐘，取上層液並收集在於 1.5 ml eppendorff tube 中，下層液再以上述同樣方式重覆 3 次，收集所有上層液並以氮氣吹乾，加入 350  $\mu$ l methanol 溶解內容物後，以 4.5  $\mu$ m 濾膜過濾，取 50  $\mu$ l 注射入 HPLC 中。由標準曲線圖之斜率，依公式計算出維生素 E 濃度，分別以每克肝臟含  $\mu$ g 維生素 E 表示。

HPLC 系統由以下所組成：L-6200A intelligent pump，L-4200UV-VIS detector，D-6000 interface 及 LC organizer (Hitachi, Tokyo, Japan)；Mobile phase：98% methanol；Flow rate：1.2ml/min；Detector wavelength：290nm；Sensitivity：0.01 A.U.F.S. (absorbance units full scale)；HPLC column：3.9  $\times$  300 nm stainless steel packed with micro Bondapak C18 (Waters, Inc, Milford, MA)。

### ③ 還原態麩胱甘肽(GSH)及氧化態麩胱甘肽(GSSG)分析

(Reed et al., 1988)

0.3 g 肝臟，加入 9 倍體積的 50 mM 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.0) 均質，均質後迅速取出 400  $\mu$ l 均質液，加入等量含 2.5 mM phenanthroline 的 10% perchloric acid (PCA)，靜置 40 分鐘，於 4°C 下以 2000xg 離心 3 分鐘，取出 400  $\mu$ l 上層液，加入 40  $\mu$ l 新鮮製備的 100 mM indoacetic acid (IAA) 溶液，接著慢慢添加入  $\text{KHCO}_3$  (potassium bicarbonate) 粉末直到不起泡為止以中和酸液，暗反應 15 分鐘後，再加入 440  $\mu$ l 3% 2,2-dinitrofluorobenzene (FDNB)(溶於 99.5% ethanol) 溶液，混合均勻後放在 4°C 下隔夜處理，以 4000xg 離心 5 分鐘，取出上層液，0.45  $\mu$ m 過濾膜過濾後，即可進行 HPLC 分析，GSH 及 GSSG 濃度以 n mol/mg protein 表示。

### ④ GSH peroxidase 活性測定 (Lawrence and Burk, 1976)

樣本製備同前述 GST 活性分析之細胞質樣本。1.5 ml 石英管中依次加入 0.8 ml 反應液(含有 1 mM EDTA、1 mM  $\text{NaN}_3$ 、0.2 mM NADPH、1 U/ml GSH reductase 及 1 mM GSH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液, pH 7.0)、100  $\mu$ l 經 20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 稀釋 150 倍的樣品，室溫下靜置 5 分鐘後，加入 0.1 ml 2.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，以分光光譜儀於 340nm 下測定 3 分鐘內吸光值的變化 (25°C)，依 NADPH 的減少的速率來計算 GSH peroxidase 的活

性，以 nmole NADPH/min /mg protein 表示。

⑤ GSH reductase 活性測定 (Bellomo et al., 1978)

於 1.5 ml 石英管中依序加入 0.9 ml 反應液(含 1.1 mM MgCl · 6H<sub>2</sub>O、5.0 mM GSSG 及 0.1 mM NADPH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液, pH 7.0)、80 µl 20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)及 20 µl 細胞質樣品。利用分光光譜儀，在 25°C 下以 340nm 測吸光值在 5 分鐘內的變化，以 NADPH 減少的速率來計算 GSH reductase 活性，並以 nmole NADPH/min /mg protein 表示。

⑥ 細胞質 superoxide dismutase (SOD)活性測定

實驗原理：

superoxide dismutase (SOD)可將超氧自由基(superoxide radicals ; O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)作用形成過氧化氫 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)及氧，以減少自由基造成的傷害。因此實驗利用 xanthine 經 xanthine oxidase 作用生成尿酸 (uric acid)時，伴隨著 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>生成，而 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>會與 INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride)形成紅色物質，所以利用 SOD 抑制此反應的程度來換算出 SOD 酵素活性。

實驗方法係參考套件的使用說明 (Williams, 1983)。細胞質先用 Sample Diluent (0.01 mol/L phosphate buffer , pH 7.0) 稀釋，希望使細胞質的抑制落差在 30% ~ 60% 的範圍區間，

標準曲線的配製是用已知濃度的 S6 (6.2u) 來配製。將反應試劑均勻混合後，在分光光譜儀波長 550 nm 下進行少掃描三分鐘，SOD 活性以 units/min/mg protein 方式表示。

## (2) 紅血球 GSH 及 GSSG 分析

取 200  $\mu$ l 10% 紅血球懸浮液，加入等量新鮮製備含 100 mM indoacetic acid (IAA) 的 PBS 緩衝液，於 4°C 下暗反應 15 分鐘，取 300  $\mu$ l 再加入等量 10% perchloric acid (PCA)，靜置 30 分鐘，以 2000xg 離心 10 分鐘，取出 400  $\mu$ l 上層液，接著緩慢加入  $\text{KHCO}_3$  (potassium bicarbonate) 粉末直到不起泡為止以中和酸液，隨後再加入 480  $\mu$ l 3% 2,2-dinitrofluorobenzene (FDNB)(溶於 99.5% ethanol)，混合均勻後放在 4°C 下隔夜，以 4000xg 離心 5 分鐘，上層液用 0.45  $\mu$ m 過濾膜過濾後，即可進行 HPLC 分析。分析條件與肝臟相同。

## 三、統計分析

資料以平均值加減一個正負標準差 (Mean $\pm$ SD) 表示，統計分析以 one-way analysis of variance (ANOVA)(SAS, Cary, NJ) 分析在不同飲食中大蒜成分處理效應，並以 Duncan's test 進行顯著差異分析，至於飲食中脂質效應則以 two-way ANOVA 分析，當  $P < 0.05$  表示具有顯著差異。

## 肆、結果

### 一。動物生長情形

#### 1. 動物狀況

老鼠隨機分籠適應幾天後，分別開始灌食 CO、GO、DAS、DADS，為期 7 週，灌食後生理狀況分述如下：

CO 組：

毛色健康、鬍鬚正常、活動力佳。

GO 組：

GO 組於灌食 2 週後，於耳朵後之頸部處開始出現掉毛現象，且老鼠眼睛四周紅腫，鬍鬚也有斷裂之情形，其中又以餵飼 AIN-76 Diet 較 High-fat Diet 組明顯。在灌食狀況上，GO 組較其他組別排斥灌食，並於灌食後活動力較差，且飼料攝食減少，此組老鼠的墊料較濕且臭味重。於灌食 7 週後，身體明顯掉毛、鬍鬚斷裂光、眼睛浮腫及有不明分泌物分泌之現象，但這些症狀在 High-fat Diet 組較不明顯。

DAS 組：

與控制組大致相同，無不正常生理狀況。

DADS 組：

於灌食 4 週後也出現鬍鬚斷裂之情形，且常有下痢之情形，活動力也較差。

## 2. 體重及相對肝重、相對脾重

表二為老鼠之增體重、肝重、相對肝重、脾重及相對脾重結果。在體重方面，灌食 GO、DAS 和 DADS 組均會造成體重增加減少 ( $P<0.05$ )，至於 GO 的效應在餵飼 AIN-76 飼料時也有類似結果，而以飲食來看，但 High-fat 飲食明顯較 AIN-76 飲食增加較多體重 ( $P<0.05$ )。

在肝重和相對肝重上，雖然灌食 GO、DAS 和 DADS 組肝重較 CO 組輕，但以相對肝重來看，則較 CO 組略為增加，但均無統計上的差異。以飲食來看，High-fat 飲食明顯可增加肝重和相對肝重 ( $P<0.0001$ )。

在脾重和相對脾重上，無論 High-fat 飲食或 AIN-76 飲食，灌食 GO 後均明顯增加脾臟重量與相對脾重 ( $P<0.05$ )，至於 DAS 及 DADS 則減少脾臟重量現象 ( $P<0.05$ )，但如以相對脾重表示則與控制組無差異。相對脾重如以 Two-way ANOVA 分析 GO 處理及飲食處理效應時，結果顯示除了 GO 明顯改變脾臟重外，飲食中脂質或飲食中脂質與 GO 之間交互作用也均呈現顯著性效果。

## 二、肝中磷脂質脂肪酸代謝

### 1. 肝中磷脂質脂肪酸

GO、DAS 或 DADS 的灌食，可改變肝中磷脂質脂肪酸組成，尤其是 18:2 與 20:4 兩種脂肪酸如表三所示，GO 及 DADS

灌食老鼠的肝臟磷脂質中均有較對照組高的 18:2，同時 20:4 則較玉米油組低 ( $P<0.05$ )，顯示 GO 及 DADS 可能影響 20:4 脂肪酸之生合成。至於 DAS 處理組也有較高的 18:2 ( $P<0.05$ )，但是 20:4 與玉米油組相較則沒有顯著差異。在其他脂肪酸方面，與玉米油組相較下，GO 處理會減少 16:1、22:6，增加 18:1、20:2 脂肪酸；DADS 處理也減少了 16:1、22:6，但只增加 18:1 脂肪酸；至於 DAS 則同樣減少了 20:6，但只增加了 18:1。

## 2. 肝中 $\Delta^6$ 去飽和酶、磷脂質脂解酶 $A_2$ 活性及血漿中前列腺素 $E_2$ 濃度

由結果得知，GO、DAS、DADS 可能影響 20:4 脂肪酸的生合成，尤其在 GO 灌食組最明顯，因此更進一步分析參與 20:4 脂肪酸生合成酵素 $\Delta^6$ 去飽和酶及將磷脂質中 20:4 釋放出來的  $PLA_2$  活性代，結果如表四，GO 組 $\Delta^6$ 去飽和酶活性明顯受到抑制 ( $P<0.05$ )，相較玉米油組約僅為其 55%，但此酵素活性在 DAS 或 DADS 組則不受影響。至於磷脂解酶  $A_2$  活性在 4 組中沒有差異。本實驗同時分析了花生四烯酸代謝產物  $PGE_2$  濃度(表四)，結果顯示  $PGE_2$  濃度也不受大蒜成分處理的影響。

## 三、免疫分析

### 1. 脾臟淋巴球增殖力

由之前結果顯示，GO 明顯增加老鼠脾臟重量，因此從餵

飼高油脂飲食且接受 GO 處理老鼠的脾臟中分離出脾臟淋巴球，進一步分析 Con A 誘發的增殖能力 (圖一)。不管分離至 CO 或 GO 組的脾臟淋巴球在 Con A 濃度為 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  時，其細胞複製率達到最大，隨後則遞減。至於 GO 與 CO 相較下，結果顯示在不同 Con A 濃度下，GO 組淋巴細胞複製皆明顯高於 CO 組 ( $P < 0.05$ )。

## 2. 接觸性過敏反應與刺激性皮膚炎反應

免疫測試結果顯示 (表五)，GO 可抑制 CDNB 誘發的 contact hypersensitivity ( $P < 0.05$ )，GO 組耳朵腫大程度約僅為 CO 組的 36%。至於 croton oil 所誘發耳朵發炎反應，GO 也較 CO 低，但未達統計上的差異。

## 四、解毒酵素系統作用

### 1. 解毒酵素活性

Phase I 酵素系統部分測定 P450 濃度及 P450 reductase、P450-2B1 (POD) 或 P450-2E1 (NDMA) 活性，Phase II 酵素則分析 GST 活性，結果顯示於表六。在 P450 酵素活性方面，高油組的 P450 濃度、P450 reductase 及 2E1 活性均不因 GO、DAS 或 DADS 處理而有顯著改變，至於 2B1 活性則是 DAS 處理組顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )。GO 在 AIN-76 飲食組中的影響大至與高油組相似，唯一不同的是在 AIN-76 飲食組中，GO

處理會增加 P450 reductase 酵素活性 ( $P < 0.05$ )，顯示飲食中油脂會影響 GO 對 P450 reductase 活性的作用 ( $P < 0.05$ )。在 Phase II 酵素系統方面，GO、DAS、DADS 處理均可明顯增加 GST 活性 ( $P < 0.05$ )，至於 GO 效應在 AIN-76 飲食組中意可觀察到，但整體而言，GST 活性在 High-fat 飲食組較 AIN-76 飲食組有較高 ( $P < 0.05$ )，顯示飲食中脂質高低會影響此酵素活性。

## 2. 蛋白質表現

除活性分析外，P450-2B1、P450-2E1 及胎盤型 GST (pGST) 進行免疫染色分析(圖二)，結果顯示，P450-2B1 的表現與酵素活性測定結果相似，DAS 灌食明顯增加 2B1，其次為 GO 和 DADS 組。在 P450-2E1 蛋白質表現方面，則與酵素活性分析的結果並不完全一致，在活性方面，大蒜處理組與玉米油組相似，但是在 2E1 的表現上則是 GO、DAS 及 DADS 均可抑制 2E1。至於在 pGST 方面，與酵素活性測定結果相似，GO、DAS、DADS 都可增加 pGST 的表現，尤其中以 DADS 的效果最顯著。

## 五、抗氧化酵素系統分析

### 1. 肝中脂質過氧化及抗氧化分子濃度

肝中脂質過氧化產物-TBARS 及抗氧化分子分析結果顯示於表七。在 TBARS 濃度方面，大蒜灌食及不同飲食處理皆不影響 TBARS 的生成。在抗氧化分子濃度方面，High-fat 飲食

中，大蒜成分處理組相較於玉米油組均無差異。但 DADS 灌食的老鼠肝中維生素 E 的濃度則較 GO 組低 ( $P<0.05$ )；雖然大蒜成分對肝中維生素 E 的濃度作用不明顯，但飲食效應則顯示 High-fat 飲食組肝中維生素 E 的濃度皆比餵飼 AIN-76 飲食組高 ( $P<0.0001$ )。在 GSH 方面，則無論是 AIN-76 飲食或高油飲食組，大蒜成分處理組與玉米油間皆無差異，但 GSH 濃度在餵飼 AIN-76 飲食明顯較餵飼 High-fat 飲食組高 ( $P<0.0001$ )。在氧化態 GSH (GSSG)濃度方面，結果與 GSH 相似但同樣的，低油組飲食 (AIN-76)組較 High-fat 飲食有較低 GSSG 濃度。如果以 GSH 氧化還原狀態 (GSH redox status)表示為  $GSH/(GSH+GSSG)$ 的比值，則顯示 GO 灌食可減少此比值，且與玉米油組相較下，在高油飲食組中有顯著差異 ( $P<0.05$ )；如果比較飲食效應，則明顯看出高油組老鼠的  $GSH/(GSH+GSSG)$ 比值均較 AIN-76 飲食組高 ( $P<0.05$ )。

## 2. 肝中抗氧化酵素活性

結果顯示於表八，在 High-fat 飲食組麩胱甘肽過氧化酶活性方面，GO、DAS、DADS 均可抑制麩胱甘肽過氧化酶活性 ( $P<0.05$ )，其中又以 DADS 抑制效果最顯著，但在 AIN-76 飲食組中，GO 灌食雖也有較低麩胱甘肽過氧化酶活性但並不顯著。至於麩胱甘肽還原酶分析方面，在 High-fat 飲食組 GO、DAS、DADS 則明顯增加此酵素活性 ( $P<0.05$ )；在 AIN-76 飲

食中 GO 也有相似結果，GO 灌食可以增加此酵素活性。在 SOD 酵素方面，High-fat 飲食組中，GO 處理顯著增加 SOD 活性，但 DAS 或 DADS 則無此作用，然而老鼠餵飼 AIN-76 低油飲食，GO 組的 SOD 活性則與 CO 組無差異，但這兩組的 SOD 活性則均較高油組低 ( $P<0.05$ )。

### 3. 紅血球 GSH 濃度

結果顯示於表九，GO、DAS、DADS 處理均會增加紅血球 GSH 濃度，其中高油組的 DAS 及 DADS 達到顯著效果 ( $P<0.05$ )，至於 GO 的效果則僅見於餵飼 AIN-76 飲食組 ( $P<0.05$ )。在 GSSG 濃度方面，則僅在 AIN-76 飲食組中，觀察到 GO 灌食顯著增加 GSSG 濃度 ( $P<0.05$ )。如以  $GSH/(GSH+GSSG)$  比值來比較，則無論高油或低油飲食或大蒜活性成分均無差異。

## 伍、結果圖表

表一、實驗飼料組成

Table1. Composition of experimental diet.

Ingredients	AIN-76 diet	High-fat diet
		%
Casein <sup>1</sup>	20.0	20.0
Sucrose <sup>4</sup>	50.0	39.5
Corn starch <sup>1</sup>	15.0	15.0
Corn oil <sup>5</sup>	5.0	15.0
Cellulose <sup>1</sup>	5.0	5.0
AIN mineral mix <sup>2</sup>	3.5	3.5
AIN vitamin mix <sup>2</sup>	1.0	1.0
DL-Methionine <sup>1</sup>	0.3	0.3
Choline bitartrate <sup>1</sup>	0.2	0.2
Cholesterol <sup>3</sup>	-	0.5

<sup>1</sup>Teklad, Madison, USA.

<sup>2</sup>ICN Biomedical, Inc.

<sup>3</sup>和光純藥工業株式會社

<sup>4</sup>台糖公司

<sup>5</sup>CPC Intl. Inc.

表二、大蒜精油及其活性成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物對體重增重、肝重、相對肝重、脾重、相對脾重之影響  
 Table 2. Effect of garlic oil, diallyl sulfide (DAS) and diallyl disulfide (DADS) on body weight gain, liver weight, and spleen weight.

Group	n	Body wt gain (g)	Liver wt (g)	Liver wt /body wt (%)	Spleen wt (g)	Spleen wt /body wt (%)
<b>High-fat Diet</b>						
CO	6	403±44 <sup>a</sup>	23.7±3.2	4.8±0.3	1.1±0.06 <sup>b</sup>	0.22±0.02 <sup>b</sup>
GO	6	306±41 <sup>b</sup>	20.3±2.9	5.2±0.3	1.6±0.16 <sup>a</sup>	0.41±0.02 <sup>a</sup>
DAS	6	319±60 <sup>b</sup>	21.1±3.9	5.2±0.3	0.9±0.10 <sup>c</sup>	0.22±0.03 <sup>b</sup>
DADS	6	304±51 <sup>b</sup>	19.3±4.2	4.9±0.4	0.9±0.02 <sup>c</sup>	0.22±0.02 <sup>b</sup>
<b>AIN-76 Diet</b>						
CO	4	342±26 <sup>a</sup>	16.3±1.9	3.8±0.2	0.9±0.14 <sup>b</sup>	0.21±0.02 <sup>b</sup>
GO	4	271±28 <sup>b</sup>	14.1±1.4	4.0±0.3	1.7±0.22 <sup>a</sup>	0.47±0.04 <sup>a</sup>
Two-way ANOVA		P	P	P	P	P
TRT		0.0001	0.0255	0.0120	0.0001	0.0001
Diet		0.0120	0.0001	0.0001	NS	0.0326
TRT*Diet		NS	NS	NS	NS	0.0041

Values are means±SD. Groups in the same diet that not share the same letter are significantly different (P<0.05).

n = number of rats in each group.

TRT: CO vs. GO.

Diet: High-fat diet vs. AIN-76 diet.

表三、大蒜精油及其活性成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物對大白鼠肝中磷脂質脂肪酸之影響  
 Table 3. Garlic oil, diallyl sulfide (DAS) and diallyl disulfide (DADS) effect on the fatty acid composition of hepatic phospholipids in rats fed high fat diet.

Fatty acids	Control	Garlic oil	DAS	DADS
			%	
16:0	14.5±1.07 <sup>ab</sup>	14.5±0.77 <sup>ab</sup>	13.4±0.68 <sup>b</sup>	14.8±1.44 <sup>a</sup>
16:1	0.7±0.17 <sup>a</sup>	0.4±0.12 <sup>c</sup>	0.6±0.12 <sup>ab</sup>	0.5±0.07 <sup>bc</sup>
18:0	21.4±1.64	19.6±1.31	19.7±1.93	20.4±0.57
18:1	3.2±1.35 <sup>b</sup>	4.9±0.30 <sup>a</sup>	4.6±0.53 <sup>a</sup>	5.5±0.58 <sup>a</sup>
18:2	13.9±2.73 <sup>b</sup>	19.7±1.90 <sup>a</sup>	17.0±2.53 <sup>a</sup>	18.4±1.31 <sup>a</sup>
20:2	1.9±0.53 <sup>b</sup>	3.1±0.32 <sup>a</sup>	2.5±0.75 <sup>ab</sup>	1.8±0.92 <sup>b</sup>
20:3	1.6±0.62	1.8±0.34	1.7±0.41	1.3±0.24
20:4	36.9±2.28 <sup>a</sup>	31.5±1.57 <sup>b</sup>	35.8±1.90 <sup>a</sup>	32.7±1.28 <sup>b</sup>
22:0	0.3±0.06	0.3±0.05	0.3±0.06	0.3±0.06
24:0	0.9±0.10	0.9±0.07	0.9±0.10	0.9±0.09
22:6	4.7±0.86 <sup>a</sup>	3.2±0.49 <sup>b</sup>	3.6±0.55 <sup>b</sup>	3.7±0.33 <sup>b</sup>

Values are means±SD of 6 rats in each group. Groups not sharing a symbol are significantly different (P<0.05).

表四、大蒜精油及其活性成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物對大白鼠肝 $\Delta^6$ 去飽和酶磷脂解酶 A<sub>2</sub> 及血漿中前列腺素 E<sub>2</sub> 之影響

Table 4. Hepatic  $\Delta^6$  desaturase, phospholipase A<sub>2</sub> activity, and serum PGE<sub>2</sub> level in rat fed high fat diet and treated with garlic oil, diallyl sulfide (DAS) and diallyl disulfide (DADS).

Group	$\Delta^6$ desaturase	phospholipase A <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub>
	p mol/min/mg protein		n mol/ml
CO	185.5±55.9 <sup>a</sup>	5.9±2.9	37.5±5.2
GO	98.6±32.4 <sup>b</sup>	5.0±0.8	36.0±7.5
DAS	228.3±102 <sup>a</sup>	4.5±0.6	34.8±8.3
DADS	218.6±52.4 <sup>a</sup>	4.8±2.4	39.6±10.8

Values are means±SD of 6 rats in each group. Groups in each column not sharing a symbol are significantly different (P<0.05).

表五、大蒜精油對 CDNB 誘發接觸性過敏症及巴豆油誘發刺激性皮膚炎之影響

Table 5. Effect of garlic oil rats fed high fat diet on contact hypersensitivity response to 14-chloro-2,4-dinitrobenzene and irritant dermatitis response to croton oil.

Group	Contact hypersensitivity	Irritant dermatitis
	-----ear swelling, g-----	
CO	0.078±0.027 <sup>a</sup> (4)	0.277±0.061 (3)
GO	0.028±0.026 <sup>b</sup> (4)	0.211±0.078 (5)

Values are means±SD of the weight differences between two ears. Value in parenthesis is the number of rats in each group. Groups not sharing the same letter are significantly different (P<0.05).

表六、大蒜精油及其活性成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物對肝中解毒酵素之影響

Table 6. Effect of garlic oil, diallyl sulfide (DAS) and diallyl disulfide (DADS) on hepatic cytochrome P450 and GST activities.

Group	n	P450	P450 reductase	POD	NDMA	GST
		n mol/mg protein	n mol/min/mg protein	p mol/min/mg protein	n mol/min/mg protein	n mol/min/mg protein
<b>High-fat Diet</b>						
CO	6	0.35±0.13	258±34	7.1±2.5 <sup>b</sup>	0.51±0.30	2586±272 <sup>b</sup>
GO	6	0.44±0.05	276±29	7.2±1.2 <sup>b</sup>	0.90±0.32	3603±596 <sup>a</sup>
DAS	6	0.34±0.08	282±54	13.1±3.7 <sup>a</sup>	0.50±0.24	3945±883 <sup>a</sup>
DADS	6	0.30±0.11	218±53	8.2±2.0 <sup>b</sup>	0.73±0.31	4219±571 <sup>a</sup>
<b>AIN-76 Diet</b>						
CO	4	0.44±0.08	187±43 <sup>b</sup>	6.8±1.1	0.64±0.38	1961±298 <sup>b</sup>
GO	4	0.48±0.06	261±31 <sup>a</sup>	7.5±2.4	0.73±0.50	2736±462 <sup>a</sup>
Two-way ANOVA		P	P	P	P	P
TRT		NS	0.0159	NS	NS	0.0002
Diet		NS	0.0129	NS	NS	0.0018
TRT*Diet		NS	NS	NS	NS	NS

Values are means±SD. Groups that not share the same letter are significantly different from one another (P<0.05).

n = number of rats in each group. TRT: CO vs. GO. Diet: High-fat diet vs. AIN-76 diet.

表七、大蒜精油及其活性成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物對肝中脂質過氧化、維生素E、麩胱甘肽之影響  
 Table 7. Effect of garlic oil, diallyl sulfide (DAS) and diallyl disulfide (DADS) on hepatic TBARS, vitamin E, GSH level.

Group	n	TBARS (n mol/mg protein)	vitamin E (ug/g liver)	GSH (n mol/mg protein)	GSSG (n mol/mg protein)	GSH/(GSH+GSSG)
<b>High-fat Diet</b>						
CO	6	0.098±0.02	21.24±5.07 <sup>ab</sup>	15.8±2.9	1.75±0.67	0.897±0.05 <sup>a</sup>
GO	6	0.113±0.02	26.51±7.87 <sup>a</sup>	11.9±1.7	2.51±0.24	0.822±0.02 <sup>b</sup>
DAS	6	0.103±0.01	23.35±8.02 <sup>ab</sup>	16.2±5.3	2.56±0.83	0.858±0.05 <sup>ab</sup>
DADS	6	0.105±0.01	14.83±2.91 <sup>b</sup>	12.7±0.7	1.74±0.36	0.883±0.03 <sup>ab</sup>
<b>AIN-76 Diet</b>						
CO	4	0.115±0.01	8.91±1.47	19.3±2.3	0.80±0.15	0.960±0.01
GO	4	0.107±0.01	8.61±2.35	18.6±1.3	1.10±0.42	0.945±0.02
Two-way ANOVA		P	P	P	P	P
TRT		NS	NS	0.0166	0.0096	0.0019
Diet		NS	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
TRT*Diet		NS	NS	NS	NS	NS

Values are means±SD. Groups in the column that not share the same letter are significantly different from one another (P<0.05). n = number of rats in each group. TRT: CO vs. GO. Diet: High-fat diet vs. AIN-76 diet.

表八、大蒜精油及其活性成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物對大白鼠肝中麩胱甘肽過氧化酶、麩胱甘肽還原酶、超氧化歧化酶活性之影響

Table 8. Effect of garlic oil, diallyl sulfide (DAS) and diallyl disulfide (DADS) on the activity of GSH peroxidase, GSH reductase and SOD.

Group	n	GSH peroxidase	GSH reductase	SOD
		n mol/min/mg protein	n mol/min/mg protein	U/mg protein
<b>High-fat Diet</b>				
CO	6	699±171 <sup>a</sup>	64.2±5.4 <sup>b</sup>	0.089±0.02 <sup>b</sup>
GO	6	420±58 <sup>bc</sup>	83.6±9.6 <sup>a</sup>	0.132±0.03 <sup>a</sup>
DAS	6	515±89 <sup>b</sup>	97.7±16. <sup>a</sup>	0.098±0.01 <sup>b</sup>
DADS	6	319±90 <sup>c</sup>	91.8±10.3 <sup>a</sup>	0.073±0.01 <sup>b</sup>
<b>AIN-76 Diet</b>				
CO	4	689±148	55.0±6.7 <sup>b</sup>	0.073±0.00
GO	4	505±93	66.5±5.0 <sup>a</sup>	0.080±0.01
Two-way ANOVA		P	P	P
TRT		0.0006	0.0001	0.0086
Diet		NS	0.0009	0.0028
TRT*Diet		NS	NS	NS

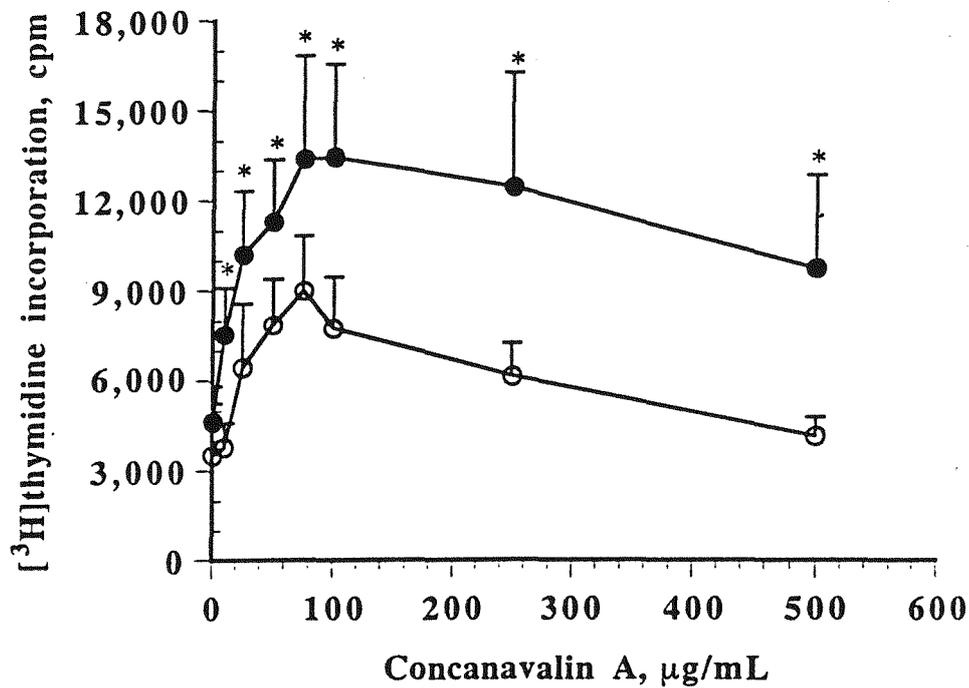
Values are means±SD. Groups that not share the same letter are significantly different from one another (P<0.05). n = number of rats in each group. TRT: CO vs. GO. Diet: High-fat diet vs. AIN-76 diet.

表九、大蒜精油及其活性成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物對大白鼠紅血球還原態及氧化態巯胱甘肽之影響

Table 9. Effect of garlic oil, diallyl sulfide (DAS) and diallyl disulfide (DADS) on the GSH, GSSG and GSH/(GSH+GSSG) in rat RBC.

Group	n	GSH (n mol/mg protein)	GSSG (n mol/mg protein)	GSH/(GSH+GSSG)
<b>High-fat Diet</b>				
CO	6	4.30±1.8 <sup>b</sup>	0.045±0.05	0.992±0.006
GO	6	6.66±2.1 <sup>ab</sup>	0.053±0.03	0.991±0.005
DAS	6	7.51±2.0 <sup>a</sup>	0.056±0.03	0.993±0.002
DADS	6	9.11±0.8 <sup>a</sup>	0.067±0.04	0.993±0.004
<b>AIN-76 Diet</b>				
CO	4	5.02±0.5 <sup>b</sup>	0.030±0.00 <sup>b</sup>	0.993±0.001
GO	4	7.62±1.2 <sup>a</sup>	0.048±0.01 <sup>a</sup>	0.994±0.001
Two-way ANOVA		P	P	P
TRT		0.0040	NS	NS
Diet		NS	NS	NS
TRT*Diet		NS	NS	NS

Values are means±SD. Groups that not share the same letter are significantly different from one another (P<0.05). n = number of rats in each group. TRT: CO vs. GO. Diet: High-fat diet vs. AIN-76 diet.



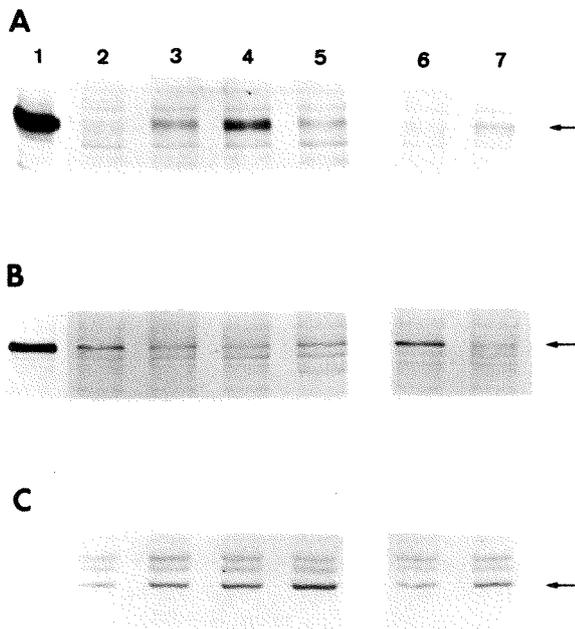
圖一、餵食大蒜精油對 Con A 誘發之脾臟淋巴球增生之影響

Fig 1. Effect of garlic oil on concanavalin A-induced splenocyte proliferation.

標示 ● 為灌食 200 mg/kg BW 大蒜精油組

標示 ○ 為灌食玉米油組 (控制組)

脾臟淋巴細胞以不同濃度 Con A 刺激 (0, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 µg/ml) 培養 48 小時，加入標定的 [<sup>3</sup>H] thymidine 再繼續培養 18 小時，測定 [<sup>3</sup>H] thymidine 併入細胞量以 cpm 表示。每個點來自 6 隻老鼠及三重覆結果，取其平均值±標準差。標示\* 表示與控制組有顯著差異 (P<0.05)。



圖二、攝食大蒜精油及其活性成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物對老鼠肝臟 2B1、2E1 和 pGST 之免疫分析

Fig 2. Immunoblot analysis of rat hepatic 2B1、2E1 and pGST from garlic oil, diallyl sulfide (DAS) and diallyl disulfide (DADS) treated rats.

圖 A：2B1，圖 B：2E1，圖 C：pGST；蛋白質濃度分別為 2  $\mu\text{g}$ 、5  $\mu\text{g}$ 、2.5  $\mu\text{g}$ ；樣品依序為標準品 (lane 1)、High-fat 飲食組 CO (lane 2)、GO (lane 3)、DAS (lane 4)、DADS (lane 5)及 AIN-76 飲食組 CO (lane 6)、GO (lane 7)。

## 陸、討論

### 1. 動物生長狀況

在灌食期間，發現大白鼠在灌食 GO 2 週後，出現掉毛的現象，且鬍鬚也較易斷裂，當實驗在 7 週結束時則可見明顯掉毛情形。Sumiyoshi 等人 (1984) 曾就大蒜萃取物進行長達 6 個月的毒性試驗，發現大蒜萃取物確會引起大白鼠被毛斷落現象，本實驗雖然只進行 7 週，卻同樣引起皮毛之異常現象。除了掉毛情形外，GO 灌食組老鼠眼睛四周也出現有紅腫現象，且有不明分泌物，根據 Sumiyoshi 等人 (1984) 之報告指出，餵食大量大蒜萃取物給 Wister 品系老鼠，可在眼及鼻孔附近產生輕度污染情形，但原因不明，或許與 GO 可增加眼部分泌物有關，但 DAS 與 DADS 灌食則無此現象。

### 2. 體重、相對肝重及相對脾重

除了上述皮毛異常現象外，GO、DAS 及 DADS 分別在 200, 100 及 200 mg/kg BW 劑量下也會影響老鼠增重。Augasti 及 Mathew (1973) 指出如果餵飼生大蒜萃取物 5 ml/kg BW 給予大鼠，持續 3 週後將導致部分大鼠死亡，即使存活者也有生長遲緩、智力下降的現象，且可對胃部上皮細胞造成刺激；他們認為大蒜導致生長遲緩的原因，可能是飼料攝取率及攝水率下降所致；顯示大蒜成分的確可能存在副作用。然而，

Sumiyoshi 等人 (1984)曾以高達 2000 mg/kg BW 之熟成大蒜萃取物給予 Wistar 品系老鼠，卻發現僅有雌性大鼠體重有些許下降，對雄性則沒有影響。Morguchi 等人 (1994)也指出熟成大蒜萃取物 (aged garlic extract)並不會影響老鼠食物攝取量及體重。

本實驗除了發現體重增加較慢外，也觀察到 DADS 或 GO 灌食有促成軟便或間歇性下痢之情形，此種現象在 Fenwick 及 Hanley (1985) 報告中也曾出現，當食用過量大蒜萃取物是會引起嘔吐、厭食及下痢，因而導致生長受阻。Shashikath 等人 (1986)認為大蒜萃取物也會改變腸道中微生物，例如 *Streptococci*, *Lacobacilli*, *Coliform*, *Aerbes*, *Anaerobes*，並使菌數均降低，而導致生長受阻。Desai 等人 (1990)也指出，不管生或熟的大蒜均對腸黏膜有傷害性。

由以上學者的報告看來，似乎顯示大蒜萃取物造成體重下降，主要是因攝取率、攝水率的降低，或腸中菌數的降低或對胃部的刺激，所以影響了營養素的吸收率，進而使生長受阻。而灌食 GO 或 DADS 組出現下痢狀況有可能與降低或改變腸中菌數及刺激胃黏膜有關。

在肝重、相對肝重及脾重及相對脾重方面，結果顯示，大蒜成分的灌食並不影響肝重及相對肝重。Sumiyoshi 等人 (1984)長期餵飼熟成大蒜萃取物給予大鼠，發現肝重及脾重並不會受到影響。然而，Takada 等人 (1994)卻指出，大部分大

蒜中之有機含硫化合物會導致體重下降，進而使相對肝重上升，但在本實驗，老鼠體重雖有下降現象，但因肝重也隨之下降，因而相對肝重並無改變。

至於在脾重及相對脾重方面，灌食 GO 組明顯高於其他組別 ( $P < 0.05$ )，此結果與先前實驗結果相同 (陳, 1996)，並推測可能是 GO 對大白鼠脾臟造成長期慢性刺激所致。脾臟為續發性的淋巴器官，因此本實驗更進一步分析脾臟淋巴球複製能力，以瞭解脾臟增重與脾臟功能是否具有相關性。結果的確顯示 GO 組大鼠脾臟增生能力顯著大於玉米油組，顯示 GO 組脾重及相對脾重較高可能與脾臟淋巴細胞增生有關。雖然 DADS 與 DAS 是 GO 中的主成分(分別有~40%或~5%)，但他們對脾重並無影響，這個證據也顯示 GO 中應另有其他活性成分存在，其中 diallyl trisulfide (約~35%)或許是可能的因子。

### 3. 肝中磷脂質脂肪酸代謝

當動物體攝入亞麻油酸 (linoleic acid, 18:2, n-6)後，可經由去飽和酶與加長酶作用而轉變為二十碳烯酸脂肪酸，如：花生四烯酸，在此過程 $\Delta^6$ 去飽和酶為速率限制酵素 (Horrobin and Manku, 1990)，因此改變了此酵素活性，將會影響花生四烯酸生合成，並進而影響花生四烯酸代謝產物，如：前列腺素等之生成，而造成不同的生理效應。

本實驗發現 GO、DAS 或 DADS 灌食均會改變肝中磷脂質脂肪酸，尤其是增加 18:2 並且減少 20:4 脂肪酸，其中以 GO 的效應最明顯，DADS 則次之。在進一步分析 $\Delta^6$  去飽和酶及 PLA<sub>2</sub> 酵素活性後，我們認為 GO 改變磷脂質 18:2 及 20:4 脂肪酸成分的原因與 GO 抑制 $\Delta^6$  去飽和酶活性有關。雖然在改變 18:2 及 20:4 脂肪酸的作用上，DADS 與 GO 相似，但 $\Delta^6$  去飽和酶活性卻未受到 DADS 的抑制，目前為止，我們並不清楚真正原因，但推測有可能與亞麻油酸在合成花生四烯酸過程中，其他酵素如：加長酶 (elongase) 受到影響有關 (附錄 2)。因此 DADS 於花生四烯酸生合成上影響，可再針對其他相關酵素做進一步的分析。

除了本次實驗所使用的放射線標定法測定 $\Delta^6$  去飽和酶以外，Nassar 等人 (1992) 也曾提出其他間接的方法，如 $\Delta^6$  去飽和酶活性可直接以 20:4/18:2 脂肪酸比值來表示，或 $\Delta^5$  去飽和酶活性則以 20:4/20:3 脂肪酸比值來表示；如果真以此比值來看，則可發現 20:4/18:2 比值在 CO、GO、DAS、DADS 分別為：2.77±0.69, 1.62±0.23, 2.15±0.41 及 1.78±0.15，而 20:4/20:3 比值則依序為：26.04±12.02, 18.64±4.42, 21.86±6.21, 26.50±5.36。的確可看到，GO 在抑制 $\Delta^6$  去飽和酶及 $\Delta^5$  去飽和酶活性上有最好的效果。

雖然很多學者指出，大蒜可以抑制環氧化酶及脂氧化酶的酵素活性 (Ail, 1995; Mayeux, 1988; Sendle et al, 1992)，

因而減少二十碳烯酸的合成，如：降低 TXA<sub>2</sub> 或 PGE<sub>2</sub> 濃度，但本次實驗血漿中 PGE<sub>2</sub> 濃度卻不見 GO、DAS 或 DADS 有任何作用，推測可能與 PGE<sub>2</sub> 濃度被周邊血液稀釋有關。大蒜成分對 PGE<sub>2</sub> 合成的真正效應尚需再進一步探討。

由以上結果得知，GO 影響肝中磷脂質脂肪酸組成，尤其在 20:4 脂肪酸生合成上，可能是透過抑制 $\Delta^6$  去飽和酶活性所致。但此作用並未在 GO 中主要成分 DADS (40%) 上發現，由於大蒜精油中除了 DADS 外，尚有其他多種含硫化合物 (Sheen et al, 1992)，至於是哪種成分造成 GO 有此生理作用，值得再研究。

#### 4. 免疫分析

脾臟不僅與造血系統有關，並且在免疫上也扮演了重要角色，本實驗除了發現 GO 明顯增加脾臟重量可能與增加脾臟淋巴球的複製能力有關外。其他活體免疫反應測試中，也指出 CDNB 所誘發的接觸性過敏反應受到 GO 的抑制。CDNB 所誘發的接觸性過敏反應是屬於與 T 細胞有關的細胞調節免疫反應 (cell-mediated immune reaction)。當半抗原 (hapten) 第一次入侵時會與上皮中半抗原蛋白質 (hapten protein) 結合，而存在於表皮蘭格漢氏細胞 (Langerhans' cell) 中，在經轉移至淋巴結 (lymph nodes) 時可產生記憶性 T 細胞 (memory CD4+ T cells)，當第二次再接觸到相同抗原時，則會造成 T

細胞活化與增殖 (activation and proliferation)，釋放出更多細胞素 (cytokine)，而產生免疫反應 (Hauser, 1990)，因此可以作為測定 T 細胞功能的指標。如果此反應增加則代表 T 細胞功能增加，但本實驗發現 GO 抑制了 CDNB 誘發的接觸性過敏反應，顯示 GO 可能影響 T 細胞的活化與增殖，但我們並不排除此結果也有可能與 GO 影響老鼠皮膚 (掉毛等現象) 有關，因而干擾了 CDNB 在蘭格漢氏細胞中的作用。

Croton oil 塗抹於耳朵的測試也廣泛應用在抗發炎藥物的鑑定上，雖然其誘發皮膚炎的機制尚未十分清楚，但已知可能是與活化巨噬細胞 (macrophages) 進而誘發細胞素反應 (cytokine response) 有關，與 CDNB 經由 T 淋巴細胞的作用並不相同 (Thestrup-Pedersen and Halkier Sorensen, 1996)。雖然本次實驗結果中亦看到 GO 可以減少 croton oil 誘發的刺激性皮膚炎，但不明顯，原因可能也與 GO 組老鼠的皮膚異常有關，因此使塗抹於皮膚的 croton oil 無法完全表現出應有的作用，或許利用其他模式，如：以注射 LPS (lipopolysaccharide) 方式來誘發發炎反應，可能是一個較好的選擇。Reeve 等人 (1993) 即指出，大蒜具有抗水腫 (antiedema) 效果，可以保護紫外線 B (ultraviolet B) 所造成的裸鼠 (nude mice) 水腫現象。

## 5. 解毒酵素系統作用

解毒酵素系統 (Phase I 及 Phase II)，主要是將外來的有毒

物質或藥物，經轉化作用後形成較不具毒性的物質，以利於排出體外，而達到解毒目的。

Wattenberg (1985) 報告中提及，具有化學抑制 (chemoprevention) 癌症的物質，都與增強 Phase I 及 Phase II 酵素活性有關。而在這些具有化學保護作用的物質中，蔥屬植物中的大蒜及其有機含硫化合物曾引起廣泛的注意。本實驗結果發現，高油飲食組的肝中 P450 濃度、P450 reductase 及 2E1-NDMA 活性均不因 GO、DAS 或 DADS 處理而有顯著改變，至於 2B1-POD 活性則是 DAS 處理組顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )。GO 在 AIN-76 低油飲食組中的影響大致與高油組相似，唯一不同的是在低油飲食組中，P450 reductase 酵素活性會因 GO 而增加 ( $P < 0.05$ )，顯示飲食中油脂會影響 GO 對 P450 reductase 的作用 ( $P < 0.05$ )。除了 P450 酵素系統外，Phase II 系統中重要酵素-GST 也受到 GO、DAS、DADS 的影響，這些大蒜成分均也可明顯增加 GST 活性 ( $P < 0.05$ )，GST 活性在 High-fat 飲食組較 AIN-76 低油飲食組高，顯示飲食中脂質的高低也會影響此酵素的活性 ( $P < 0.05$ )。

GST 酵素是由多種次單元 (subunit) 以 dimer 形式所組合而成，在大鼠體內這些次單元中以 Ya, Yb, Yc 為主，至於 Yp 則是可誘發型，常被用來作為癌化過程中的一種生化指標，本實驗證據也明顯指出 GST 活性增加與 Yp 的大量表現有密切關係。

Kwak 等人 (1995) 曾針對大蒜精油對 P450 2E1 活性的影響進行探討；以 SD 大鼠灌食大蒜精油 (200~1000 mg/kg BW) 18 小時後犧牲及另一組以單一劑量大蒜精油 (200 mg/kg BW) 連續灌食 3 天，來觀察對 2E1 影響。結果顯示，大蒜精油可抑制 2E1 酵素活性，在蛋白質表現上也有相似結果，雖然如此但分析 2E1 mRNA 則不受影響，因此他們認為大蒜精油對 2E1 影響並不是在轉錄作用 (transcription) 上。Kwak 等人 (1995) 實驗中也同時分析了 GST 活性、GST 表現及 mRNA 濃度，結果也顯示他們都受 GO 的影響。相同的，在 Manson 等人 (1997) 的研究也指出大蒜精油的確增加 GST 的活性，這些結果均與本次實驗結果相似。但在 2E1 分析上，本次實驗所獲得的結果並不一致，雖然 2E1 活性不受大蒜成分影響，但在 2E1 蛋白質表現上，則可明顯受到 GO、DAS 及 DADS 的抑制，因此以此實驗模式下 2E1 的表現須在作更進一步的確認。

針對大蒜精油中活性成分 DAS 在解毒酵素的研究相當多，Dalvi (1992) 以腹腔注射方式將單一高劑量的 DAS (500 mg/kg BW) 投與 SD 大鼠，24 小時後分析肝臟中解毒酵素活性，發現 DAS 可減少 P450 content 活性，但對 NADPH-cytochrome c reductase 及 GST 活性則無影響。然而，若以 50 mg/kg 劑量連續注射 5 天，P450 content 活性反而會增加，但 NADPH-cytochrome c reductase 及 GST 活性仍不改變。

除了 2E1 外，2B1 也是可能受到大蒜成分作用的另一個

可能 P450 酵素，1993 年 Pan 等學者以灌食方式給予 SD 大鼠 DAS (200 mg/kg BW)，分別於 6, 12, 18, 24 小時觀察 P450 2B1/2 及 2E1 酵素活性，結果顯示，隨著處理時間，DAS 明顯增加 2B1/2 活性，相同結果在蛋白質表現及 mRNA 上也可看到；而在 2E1 方面，DAS 則抑制了 2E1 酵素活性及蛋白質表現，但不影響 mRNA 濃度。Brady 等人 (1991) 也有相同結果報告。Marla 等人 (1996) 在以丙酮誘發 2E1 狀況下，也發現 DAS 具有抑制 2E1 的作用。但本次實驗在 DAS 上並未發現有抑制 2E1 作用，可能是在未誘發狀況下 DAS 作用不明顯因而顯不出差異；但在 2B1 方面所觀察到的結果不管在酵素活性及蛋白質表現上則與其他學者相似，因此可以推測 DAS 增加 2B1 表現可能是在轉錄上。

至於 DADS 與解毒酵素相關的研究，也有 Pushpendran 等人 (1982) 指出，將放射線標定 DADS 注射於小鼠體中，發現於 90 分鐘內 DADS 會快速進入肝臟中，並有 80 % 會轉變形成硫酸鹽類 (sulfates)，其中主要是透過肝中 P450 酵素作用所致，因此 DADS 是有可能影響肝中解毒酵素活性。Marla 等人的 (1996) 研究即指出在以丙酮為誘發劑的模式下，DADS 可以降低 2E1 活性，但對 P450 及 2B1 則無影響。在本實驗中，大鼠灌食 200 mg/kg 劑量為期 7 週，雖然在活性分析不見有抑制效果，但在 2E1 蛋白質表現上則減少。在 Phase II 解毒酵素 GST 方面，結果也顯示，DADS 的活化效果最顯著，此結

果與之前結果相似 (陳, 1996)。DADS 為大蒜精油中之主要成分 (40%)，因此推測大蒜增加 GST 活性，可能部分來自 DADS 的作用。

## 6. 抗氧化酵素系統分析

生物體內抗氧化系統可以有效清除活性氧分子，而保護生物體免受氧化傷害(附錄 3)。麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 是由 glutamate、cysteine、glycine 三個氨基酸組成的小分子 (r-Glu-Cys-Gly)，廣泛存在於生物細胞中，主要的功能包括抗氧化作用。對於細胞產生的過氧化氫 ( $H_2O_2$ ) 及有機過氧化物，GSH 可利用 GSH peroxidase 作用將他們還原成水或醇類，此時 GSH 氧化為氧化態 GSH (GSSG)，而 GSSG 再藉由 GSH reductase 還原為 GSH。因此 GSH 及 GSSG 的相對濃度可以作為體內氧化及抗氧化指標。

GSH 除了具有抗氧化角色外，同時也參與解毒作用，但須藉由 glutathione-S-transferase (GST) 的作用時。當外來物質 (Xenobiotics, Xe) 進入胞內時，GST 可將 GSH 與此外來物質結合，增加其水溶解性以利排出胞外，此時 Xe-GSH 再由細胞膜上  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT) 作用脫去 glutamic acid，所剩下 Cys-Gly-Xe 再經由雙肽酶 (dipeptidase) 作用將 glycine 切除，Cys-Xe 最後接上 acetyl group 形成硫醚尿酸 (mercapturates)，即可加速排出體外，降低對身體的傷害。

本次實驗結果發現，在高油飲食組中雖然 GSH 及 GSSG 濃度並無統計上差異，但 GO 組 GSH/(GSH+GSSG)比率相較對照組則顯著減少的情形，顯示 GO 會影響肝細胞內氧化-還原狀態 (GSH redox status)；至於 DAS 或 DADS 雖然沒有顯著影響，但仍有減少 GSH/(GSH+GSSG)比值的現象。然而，當飲食中油脂由 15%降為 5%時，GO 對 GSH 氧化-還原狀態的作用則不再見到，顯示飲食中油脂含量會影響 GO 的作用，這有可能因為高油飲食相較低油飲食可讓肝中含有較多脂肪酸，當然也就會有較多不飽和脂肪酸，如此一來而放大 GO 的作用。而以 GSH 相關抗氧化酵素 GSH peroxidase 及 GSH reductase 活性分析來看，GO、DAS 及 DADS 均降低了 GSH peroxidase 的活性，但相反地，GSH reductase 的活性卻增加了。綜合以上結果，顯示 GSH 代謝包括 GSH 生合成或 GSH 相關酵素活性的確可以受到大蒜精油及其活性成分影響。

驗證以往實驗卻發現大蒜成分對 GSH 代謝的效應並不一致；Sklan (1992)報告中指出，飲食中加入 2%大蒜粉末餵飼 14 天後，會降低小雞肝中的 GSH peroxidase 活性；然而 Hayes 等人 (1987)在以 25-100 mg DAS /kg BW 餵飼大鼠時，卻發現 DAS 對 GSH peroxidase、GSH reductase 活性並無影響。Perchellet 等人 (1986)在體外模式下卻指出 5  $\mu$ g/ml GO 可以增加 GSH peroxidase 活性，且降低 GSH/GSSG 比值。這些結果的差異或許與實驗模式、動物種類及劑量的不同有關。

另外在胞內另一重要抗氧化酵素-SOD 方面，發現高油脂飲食組中 GO 也可以增加 SOD 活性。然而大蒜與 SOD 活性相關性的報告很少見，僅有 Sklan 等人 (1992)指出，餵飼小雞含 2%大蒜粉末 14 天後，可以增加肝臟中 Mn-SOD 的活性。

維生素 E 為胞內重要的脂溶性抗氧化劑，具有很強的自由基清除能力，與其他抗氧化分子及酵素共同扮演生物體防禦的角色，因此維生素 E 濃度也可表示胞內抗氧化能力的強弱。在本實驗中，我們觀察到相較於對照組肝中維生素 E 濃度，雖然並不受到 GO、DAS 與 DADS 的影響，然而飲食中油脂高低卻對肝中維生素 E 濃度有明顯作用，高油飲食組中維生素 E 濃度均明顯高於低油飲食，由此可知肝中維生素 E 濃度反應出高油飲食中含較多量的維生素 E。

雖然肝中還原型 GSH 的濃度並不受到大蒜成分的影響，但在紅血球中，結果卻發現 GO、DAS 及 DADS 對紅血球有顯著的效應，高油飲食組中，GO、DAS 及 DADS 均增加了 GSH 的濃度，尤其 DAS 與 DADS 更是達顯著效果 ( $P < 0.05$ )。在低油組中，GO 也是顯著增加了 GSH 的濃度。至於 GSSG 濃度方面，僅在 AIN-76 飲食 GO 組中看到增加的情形，但以  $GSH/(GSH+GSSG)$  比率來看則各組間並無差異。雖然以往並無針對大蒜或其成分對紅血球中 GSH 的相關研究可以相印證，但本實驗室先前研究中也曾得到相似結果 (陳, 1996)。

紅血球在動物體內是一非常特殊的細胞，負責輸送氧氣

到全身各個部位。由於紅血球存在一個高氧分壓的環境且富含血紅素 (Hb)，因此特別需要一個有效的抗氧化系統，否則很容易受到氧化傷害，加上紅血球的平均壽命只有 120 天，因此是一個可以作為飲食成分調控體內氧化-抗氧化狀態指標。如與肝中的結果相比較，由於肝細胞代謝的多樣性或複雜性，相信紅血球在探討氧化-抗氧化狀態時，尤其是 GSH redox status 時，應是一個不錯的選擇。

近幾年探討大蒜抗氧化能力的研究大多針對大蒜成分本身是否擁有抗氧化能力，很少是針對大蒜成分在動物體內與其他抗氧化分子及酵素間的交互關係。在本次實驗中的確也發現大蒜精油及其成分可能會對肝中或紅血球中 GSH redox status 及抗氧化酵素活性有所影響。

## 柒、結論

GO 減少肝臟磷脂質脂肪酸組成花生四烯酸量，可能是抑制 $\Delta^6$  desaturase 活性所至，因而可能影響二十碳烯酸(eicosanoids)的生合成。在免疫調節方面，GO 可增加脾臟淋巴細胞增生的活性，但抑制 CDNB 誘發的接觸性過敏反應，因此 GO 在免疫調節上扮演的角色值得進一步探討，並瞭解其活性成分為何。

GO 可能透過改變解毒酵素或抗氧化酵素活性而表現其生理活性，但 GO 的這些生理活性，並不一定完全與其活性成分 DAS 或 DADS 顯現出的效果一致，因此，GO 應尚有其他活性成分值得進一步分析。

除此外，GO 的部分生理效應似乎可受到飲食中油脂含量的影響。

## 捌、參考文獻

沈立言、林淑媛、蔡順仁(1992) 以氣相層析儀嗅聞法進行蒜、薑精油揮發性成分香氣之評估。中國農業化學會誌，30(1)：14-24。

陳蕙琳 (1996)大蒜精油及其活性成分二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物對老鼠肝癌形成、血脂質、紅血球 GSH 及 GSH 相關代謝性素活性之影響，中山醫學院營養科學研究所碩士論文。

Abdullah, T. H., Kandil, O., Elkadi, A. and Carter, J. (1988) Garlic revisited : therapeutic for the major disease of our times? J. Natl. Med. Assoc. 80 : 493-445.

Agarwal, K. C. (1996) Therapeutic actions of garlic constituents. Med. Res. Rev. 16(1) : 111-124.

Ali, M. (1995) Mechanism by which garlic (*Allium sativum*) inhibits cyclooxygenase activity. Effect of raw versus boiled garlic extract on the synthesis of prostanoids. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty acids 53 : 397-400.

Anders, M. W., Lash, L. H., Dekant, W., Elfarra, A. A. and Dohn, D. R. (1988) Biosynthesis and biotransformation of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. CRC Crit. Rev. Toxicol. 18 : 311-341.

Arora, R. C., Arora, S. and Gupta, P. K. (1993) Cardioprotective actions of garlic (*Allium sativum*). Drug Res. 43 : 94-98.

Augusti, K. T. and Mathew, P. T. (1973) Effect of long-term feeding of the aqueous extracts of onion (*Allium cepa* Linn) and garlic (*Allium sativum* Linn) on normal rats. Ind. J. Expt. Biol. 11 : 239-241.

Augusti, K. T. and Benaim, M. E. (1975) Effect of essential oil of onion (allyl propyl disulfide) on blood glucose, free fatty acid and

insulin levels of normal subjects. Clinica. Chemica. Acta. 60 : 121-123.

Augusti, K. T. (1977) Hypercholesteraemic effect of garlic (*Allium sativum* Linn). Ind. J. Exp. Biol. 15 : 489-490.

Batirel, H. F., Aktan, S., Aykut, C., Yegen, B. C. and Coskun T. (1996) The effect of aqueous garlic extract on the levels of arachidonic acid metabolites (leukotriene C<sub>4</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub>) in rat forebrain after ischemia-reperfusion injury. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty acids 54 : 289-292.

Bellomo, G., Mirabelli, F., Dimonte, D., Richelmi, P., Thor, H., Orreniuns, C. and Orrenius, S. (1978) Formation and reduction for glutathione protein mixed disulfides during oxidative stress. Biochem. Pharmacol. 36 : 1313-1320.

Belman, S. (1983) Onion and garlic oils inhibit tumor promotion. Carcinogenesis 4 : 1063-1065.

Belman, S., Solomon, J., Segal, A., Block, E. and Barany, G. (1989) Inhibition of soyben lipoxygenase and mouse skin tumor promotion by onion and garlic components. J. Biochem. Toxicol. 4 : 151-160.

Bhushan, S., Sharma, S. P., Singh, S. P., Agrawal, S., Indrayan, A. and Seth, P. (1979) Effect of garlic on normal blood cholesterol level. Indian J. Physiol. Pharmacol. 23 : 211-214.

Block, E. (1985) The chemistry of garlic and onions. Sci. Am. 252 : 114-119.

Bordia, A. K., Sanadhya, S. K., Pathoro, A. S. and Bhu, N. (1978) Essential oil of garlic on blood lipids and fibrinolytic activity in patients with coronary artery disease. I. J. Assoc. Physic. Ind. 26 : 327-331.

Brady, J. F., Wang, M. H., Hong, J. Y., Xiao, F., LI, Y., Yoo, J. S. H., Ning, S. M., Lee, M. J. and Fukuto, J. F. (1991) Modulation of rat hepatic microsomal monooxygenase enzymes and cytotoxicity by diallyl sulfide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108 : 342-354.

Brodnitz, M. H., Pascale, J. V. and Darslice, L. V. (1971) Flavor component of garlic extract *J. Agric. Food Chem.* 19 : 273-275.

Buiatti, E., Palli, D., Decarli, A., Amadori, D., Avellini, C., Bianchi, S., Biserni, R., Cipriani, F., Cocco, P., Giacosa A., Marubini, E., Puntoni R., Vindignic., Fraumeni, J. and Blot, W. (1989) A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *Intl. J. Cancer* 44 : 611-616.

Catignani, G. L. and Bieri, J. G. (1983) Simultaneous determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin. Chem.* 2914 : 708-712.

Cavallito, C. J. and Baily, J. H. (1944) Allicin, the antibacterial principle of *allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.* 66 : 1950-1951.

Chi, M. S., Koh, E. T. and Stewart, T. J. (1982) Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. *J. Nutr.* 112 : 241-248.

Chi, M. S. (1982) Effects of garlic products on lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 171 : 174-178.

Chow, C. K. (1991) Vitamine E and oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* 11 : 215-232.

Claman , H. N. (1976) Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice induction of tolerance with DNP compounds and with free and membrane- associated DNFB. *J. Immunol.* 116 : 704-709.

Clementi, G., Amico, R. M., Caruso, A., Cutuli, V. M. C., Prato, A., Maugeri, S., Bemardis, E. and Scapagnini, U. (1994) Effect of CGRP in different models of mouse ear inflammation. *Life Sci.* 54 : 119-124.

Clement, I. P. and Donald, J. L. (1997) Modulation of Phase I and Phase II xenobiotic-metabolizing enzyme by selenium-enriched garlic in rats. *Nutr. Cancer* 28 : 184-188.

Cotgreave, I. A., Moldeus, P. and Orrenius, S. (1988) Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28 : 189-212.

Czgan, P., Greim, H., Garro, A. J., Hutterer, F., Schaffner, F., Popper, H., Rosenthal, O. and Cooper, D. Y. (1973) Microsomal metabolism of dimethylnitrosamine and the cytochrome P-450 dependency of its activation to a mutagen. *Cancer Res.* 33 : 2983-2986.

Dalvi, R. R. (1992) Alterations in hepatic Phase I and Phase II biotransformation enzymes by garlic oil in rats. *Toxiol. Lett.* 60 : 299-305.

Dausch, J. G. and Nixon, D. W. (1990) Garlic : a review of its relationship to malignant disease. *Prev. Med.* 19 : 346-361.

Dekant, W., Vamvakas, S. and Anders, M. W. (1989) Bioactivation of nephrotoxic haloalkenes by glutathione conjugation : Formation of toxic and mutagenic intermediates by cysteine conjugate  $\beta$ -lyase. *Drug Metab. Rev.* 20 : 43-83.

Depper, J. M., Leonard, W. J., Drogual, C., Kronke, M., Waldmann, T. A. and Greene, W. C. (1985) Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 4230-4234.

Desai, H. G., Kairo, R. H. and Choksi, A. P. (1990) Effect of ginger

and garlic on DNA content of gastric aspirate. *Indian. J. Med. Res.* 92 : 139-141.

Dorant, E., Vanden Brandt, P.A., Goldbohm, R.A., Hermus, R. T. J., and Sturmans, F. (1993) Garlic and its significance for the prevention of cancer in human : a critical view. *Brit. J. Cancer* 67 : 424-429.

Ernst, E., Weihmayr, T. H. and Matrai, A. (1985) Garlic and blood lipids. *Brit. Med. J.* 291 : 139.

Fenwick, G. R. and Hanley, A. B. (1985) The genus *Allium*-Part3. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 23 : 1-73.

Foushee, D. B., Ruffin, J. and Banerjee, U. (1982) Garlic as a natural agent for the treatment of hypertension : A preliminary report. *Cytobios.* 34 : 145-152.

Fraga, C. G., Leibovitz, B. E. and Tappel, A. L. (1988) Lipid tissueslices: characterization and comparison with homogenates and microsoms. *Free Rad. Biol. Med.* 4 : 155-161.

Garg, M.L., Sebokova, E., Thomson, A. B. R., Clandinin, M. T. (1988)  $\Delta 6$  desaturase activity in liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and /or  $\omega 3$  fatty acids. *Biochem. J.* 249 : 351-356.

Guengerich, F. P. and Liebler, D. C. (1985) Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolite. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 14 : 259-307.

Guengerich, F. P. (1991) Reaction and significance of cytochrome P450 enzyme. *J. Biol. Chem.* 266 : 10019-10022.

Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249 : 7130-7139.

Hauser, C. (1990) Cultured epidermal Langerhans cells activate effector T cells for contact sensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 95 : 436-440.

Hayes, M. A., Rushmore, T. H. and Goldberg, M. T. (1987) Inhibition of hepatocarcinogenic response to 1,2-dimethylhydrazine by diallyl sulfide, a component of garlic oil. *Carcinogenesis* 8 : 1155-1157.

Heikkila, K., Schwab, G., Wickstrom, E., Loke, S. L., Pluznik, D. H., Watt, R. and Neckers, L. M. (1987) AC-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from Go to G1. *Nature* 328 : 445-449.

Horrobin, D. F. and Manku, M. S. (1990) Clinical biochemistry of essential fatty acids. In *Omega-6 essential fatty acids-pathophysiology and roles in clinical medicine*; Horrobin, D. F., Ed.; Wily-Liss Inc. New York, p21-53.

Hussain, S. P., Jannu, L. N. and Rao, A. R. (1990) Chemopreventive action of garlic on methylcholanthrene-induced carcinogenesis in the uterine cervix of mice. *Cancer Lett.* 49 : 175-180.

Jain, R. C. (1976) Onion and garlic in experimental cholesterol-induced atherosclerosis. *Ind. J. Med. Res.* 64 : 1509-1515.

Jang, J. J., Cho, K. J. and Kim, S. H. (1989) Effect of Allyl sulfide, Germanium and NaCl on the development of glutathione-S-transferase P-Positive rat hepatic foci initiated by diethylnitrosamine. *Anticancer Res.* 9 : 273-276.

Jang, J. J., Cho, K. J., Lee, Y. S. and Bae, J. H. (1991) Modifying responses of allyl sulfide, andole-3-carbinol and germanium in a rat multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 12 : 691-695.

Joseph, P. K., Rao, J. R. and Sundaresh, C. S. (1989) Toxic effects of

- garlic extract and garlic oil in rats. *Indian J. Exp. Biop.* 27 : 977-979.
- Kamanna, V. S. and Chandrasekhara, N. (1984) Hypocholesteremic activity of different fractions of garlic. *Indian J. Med. Res.* 580-583.
- Kwak, M. K., Kim, S. G. and Kim, N. D. (1995) Effects of garlic oil on rat hepatic P 450 2E1 expression. *Xenotoca* 25 : 1021-1029.
- Kinsella, J. E. and Lokesh, B. (1990) Dietary lipids, eicosanoids, and the immune system. *Critical Care Med.* 18 : 94-113.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- Lancaster, J. E. and Collin, H. A. (1981) Presence of allinase in isolated vacuoles and alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Sci. Lett.* 22 : 169-176.
- Lau, B., Lam, F. and Wang-Cheng, R. (1987) Effect of an odour-medified garlic preparation on blood lipids. *Nutr. Res.* 7 : 139-149.
- Lau, B. H. S., Yamasaki, T. and Gridley, D. S. (1991) Garlic compounds modulate macrophage and T-lymphocyte functions. *Mol. Biother.* 3 : 103-107.
- Lawson, L. D., Ransom, D. K. and Hughes, B. G. (1992) Inhibition of whole blood platelet-aggregation by compound in garlic clove extracts and commercial garlic products. *Thromb. Res.* 65 : 141-156.
- Lawrence, R. A. and Burk, R. F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Communic.* 71 : 952-958.
- Lepage, G. and Roy, C. C. (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* 27 : 114-120.

Levis, W. R., Powell, J. A., Whalen, J. J. (1975) Carrier specificity vs. hapten specificity in classical cell-mediated contact sensitivity to dinitrochlorobenzene. *J. Immunol* 115 : 1170-1173.

Lewin, G. and Popov, I. (1994) Antioxidant effects of aqueous garlic extract : 2nd communication : Inhibition of the Cu<sup>2+</sup>-initiated oxidation of low density lipoproteins. *Arzneim-Forsch. Drug Res.* 44 : 604-607.

Liu, J., Lin, R. I. and Milner, J. A. (1992) Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors and DNA adducts by garlic powder. *Carcinogenesis* 13 : 1847-1851.

Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.

Lubet, R. A., Mayer, R. T., Comeron, J. W., Nims, R. W., Burke, M. D., et al. (1985) Dealkylation of pentoxifyresorufin : a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 238 : 43-48.

Malone, W. E. (1989) Chemoprevention research. In mechanisms of carcinogenesis, Vol.2, Kluwer Academic Press:Dordrecht, 31-42.

Manson, M. M., Ball, H. W. L., Barrett, M. C., Clark, H. L., Judah, D., Williamson, G. and Neal, G. E. (1997) Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of Phase I and Phase II drug metabolizing enzymes and aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis* 18 : 1729-1738.

Marla, M., Reicks and Duane, L. C. (1996) Modulation of rat hepatic cytochrome P450 activity by garlic organosulfur compounds. *Nutr.*

Cancer 2 : 241-248.

Marsh, C. I., Torrey, R. R., Woolley, J. L., Barker, G. R. and Lau, B. H. S. (1987) Superiority of intravesical immunotherapy with corynebacterium parvum and Allium sativum in control of murine bladder cancer. J. Urol. 137 : 359-362.

Mayeux, P. R., Agrawal, K. C., Tou J. S. H., King, B. T., Lippton, H. L., Hyman, A. L., Kadowitz, P. J. and McNamara, D. B. (1988) The pharmacological effects of allicin, a constituent of garlic oil. Agents and Actions 25 : 182-190.

Moriguchi, T., Takashina, K., Chu, P. J., Saito, H. and Nishiyama, N. (1994) Prolongation of life span and improved learning in the senescence accelerated mouse produced by aged garlic extract. Biol. Pharm. Bull. 17 : 1589-1594.

Nash, T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem. J. 55 : 416-421.

Nassar, B. A., Das, U. N., Huang, Y. S., Ells, G. and Horrogon, D. F. (1992) The effect of chemical hepatocarcinogenesis on liver phospholipid composition in rats fed n-6 and n-3 fatty acid supplemented diet. Chemical Hepatocarcinogenesis 199 : 365-368.

Neckers, L. M. and Cossman, J. (1983) Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 3494-3498.

Nishino, H., Iwashima, A., Itakura, Y., Matsuura, H. and Fuwa, T. (1989) Antitumor promoting activity of garlic extracts. Oncology 46 : 277-280.

Nishino, H., Nishino, A., Takayasu, J., Iwashima, A., Itakura, Y.,

Kodera, Y., Matsuura, H. and Fuwa, T. (1990) Antitumor-promoting activity of allixin, a stress compound produced by garlic. *Cancer J.* 3 : 20-21.

Oi, Y., Kawada, T., Kitamura, K., Oyama, F., Nitta, M., Kominato, Y., Nishimura, S. and Iwai, K. (1995) Garlic supplementation enhances norepinephrine secretion, growth of brown adipose tissue and triglyceride catabolism in rats. *Nutr. Biochem.* 6 : 250-255.

Omura, T., and Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239 : 2379-2385.

Orekhov, A. N. and Tertov, V. V. (1997) In vitro effect of garlic powder extract on lipid content in normal and atherosclerotic human aortic cells. *Lipids* 32(10) : 1055-1060.

Pan, J., Hong, J. Y., Ma, B. L., Ning, S. M., Paranawithana, S. R. and Yang, C. S. (1993) Transcriptional activity of cytochrome P450 2B1/2 genes in rat liver by diallyl sulfide, a compound derived from garlic. *Arch. Biochem. Biophys.* 302 : 337-342.

Paulson, G. D., Caldwell, J., Hutson, D. H. and Menn, J. J (eds) (1986) *Xenobiotic conjugation chemistry*. Washington, DC. American Chemical Society.

Perchellet, J. P., Prechellet, E. M., Abney, N. L., Zirnstein, O. A. and Belman, S. (1986) Effects of garlic and onion oils on glutathione peroxidase activity, the ratio of reduced/oxidized glutathione and ornithine decarboxylase induction in isolated mouse epidermal cells treated with tumor promoters. *Cancer Biochem. Biophys.* 8 : 299-312.

Phillips, A. H. and Langdon, R. G. (1962) Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase : isolation, characterization, and kinetic studies. *J. Biol. Chem.* 237 : 2652-2660.

Pinto, J. T., Qiao, C., Xing, J., Rivlin, R. S., Protomastro, M. L., Weissler, M. L., Thaler, Y. T. H. and Heston, W. D. W. (1997) Effect of garlic thioallyl derivatives on growth, glutathione concentration, and polyamine formation of human prostate carcinoma cells in culture. *Am. J. Clin. Nutr.* 66 : 398-405.

Popov, I., Blumstein, A. and Lewin, G. (1994) Antioxdant effects of aqueous garlic extract : 1st communication : Direct detection using the photochemiluminescence. *Arzneim-Forsch. Drug Res.* 44 : 602-604.

Prasad, K., Kalra, J., Bharadwaj, B. and Chaudhary, A. K. (1992) Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aorto-coronary bypass surgery. *Am. Heart J.* 123 : 37-45.

Prasad, K. and Kalra, J. (1993) Oxygen free radicals and hyperchlesterolemic atherosclerosis : Effect of vitamin E. *Am. Heart J.* 125 : 958-973.

Prasad, k., Laxdal, V. A., Yu, M. and Raney, B. L. (1996) Evaluation of hydroxyl radival-scavenging property of garlic. *Mol. Cell Biochem.* 154 : 55-63.

Pushpendran, C. K., Devasagayam, J. P. and Eapen, J. (1982) Age related effect of diallyl disulphide in rats. *Ind. J. Exp. Biol.* 20 : 428-429.

Qureshi, A. A., Grenshaw, T. D., Abuirmeileh, N., Peterson, D. M. and Elson, C. E. (1987) Influence of minor plant constituents on procine hepatic lipid metabolism impact on serum lipids. *Atherosclerosis* 64 : 109-115.

Raghavan, B., Abraham, K. O. and Shankaranarayana, M. C. (1983) Chemistry of garlic and garlic products. *J. Sci. Ind. Res.* 42 : 401-409.

Rao, C. V., Simi, B., Wynn, T. T., Garr, K. and Reddy, B. S. (1996) Modulating effect of amount and types of dietary fat on colonic mucosal phospholipase A<sub>2</sub>, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities, and cyclooxygenase metabolite formation during different stages of colon tumor promotion in male F344 rats. *Cancer Res.* 56 : 532-537.

Reed, D. J., Babson, J. R., Beatty, P. W., Brodie, A. E., Ellis, W. W and Potter, D. W. (1988) High performance liquide chromatography analysis of nanomole levels of glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.* 106 : 55-62.

Reeve, V. E., Bosnic, M., Rozinova, E. and Boehm-Wilcox, C. (1993) A garlic extract protects from ultraviolet B (280-320 nm) radiation-induced suppression of contact hypersensitivity. *Photochem. Photobiol.* 58 : 813-817.

Rietz, B., Isensee H., Strobach, H., Makdessi, S. and Jacob, R. (1993) Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Mol. Cell Biochem.* 119 : 143-150.

Schaffer, F. M., Liu, J. Z. and Milner, J. A. (1997) Garlic powder and allyl sulfur compounds enhance the ability of dietary selenite to inhibit 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary DNA adducts. *Nutr. Cancer* 27(2) : 162-168.

Scharfenberg, K., Wagner, R. and Wagner, K. G. (1990) The cytotoxic effect of ajoene, a natural product from garlic, investigated with different cell lines. *Cancer Lett.* 53 : 103-108.

Sendle A., Elbl, G., Steinke, B., Breu, W. and Wanger, H. (1992) Compapartive pharmacological investigations of *Aillium ursinum* and *Allium sativum*. *Planta Med.* 58 : 1-7.

Sendl, A., Schliack, M., Loser, R., Stanislaus, F. and Wagner, H. (1992) Inhibition of cholesterol synthesis in vitro by extracts and isolated compounds prepared from garlic and wild garlic. *Atherosclerosis* 94 : 79-85.

Shalinsky, D. R., McNamara, D. B. and Agrawal, K. C. (1989) Inhibition of GSH-dependent PGH-2 isomerase in mammary adenocarcinoma cells by allicin. *Prostaglandins* 37 : 135-148.

Shashikanth, K. N., Basappa, S. C. and Murthy, V. S. (1986) Effect of feeding raw and bioled garlic (*A.Sativum L*) extracts on the growth, caecal microflora and serum proteins of albino rats. *Nutr. Reports Intl.* 33 : 313-319.

Sheela, C. G. and Augusti, K. T. (1992) Antidiabetic effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from garlic *allium sativum* Linn. *Indian J. Exp. Biol.* 30 : 523-526.

Sheen, L. Y., Lin, S. Y. and Tsai, S. J. (1992) Odor asesments for volatile compounds of garlic and ginger essential oils by sniffing method of gas chromatography. *J. Chinese Agri. Chem. Soc.* 30 : 14-24.

Simons, L. A., Balasubramaniam, S., Konigsmark, M. V., Parfstt, A., Simons, J. and Peters, W. (1995) On the effect of garlic on plasma lipids and lipoproteins in mild hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 113 : 215-219.

Sigounas, G., Hooker, J., Anagnostou, A. and Steiner, M. (1997) S-allylmercaptocysteine inhibits cell proliferation and reduces the viability of eyrthroleukemia, breast and prostate cancer cell lines. *Nutr. Cancer* 27(2) : 186-191.

Sklan, D., Berner, Y. N. and Rabinowitch, H. D. (1992) The effect of dietary onion and garlic on hepatic lipid concentrations and activity of

antioxidative enzymes in chicks. *J. Nutr. Biochem.* 3 : 322-325.

Sparnins, V. L. , Mott, A. W. Barany, G. and Wattenberg, L. W. (1986) Effects of allylmethyltrisulfide on glutathione S-transferase activity and BP-induced neoplasia in the mouse. *Nutr. Cancer* 8 : 211-215.

Steinberg, D. (1992) Antioxidants in the prevention of human atherosclerosis. *Circulation* 85 : 2338-2345.

Sumiyoshi, H., Kanenzawa, A., Masamoto, K., Harada, H., Nakagami, S., YoKota, A., Nishikawa, M. and Nakagawa, S. (1984) Chronic toxicity test of garlic extract in rat. *J. Toxcol. Sci.* 9 : 61-75.

Sumiyoshi, H and Wargovich, M. J. (1989) Effect of organ sulfur compounds on 1,2-dimethylhydrazine-induced nuclear toxicity and GST activity in mouse colon. *Proc. Am. Asso. Cancer Res.* 30 : 181-185.

Sundaram, S. G. and Milner, A. J. (1993) Impact of organosulfur compounds in garlic on canine mammary tumor cells in culture. *Cancer Lett.* 74 : 85-90.

Szondy , Z. and Newsholme, E. A. (1991) The effect of time of addition of glutamine or nucleosides on proliferation of rat cervical lymph-node T-lymphocytes after stimulation by concanavalin A. *Biochem. J.* 278 : 471-474.

Takada, N., Matsuda, T., Otoshi, T., Yano, Y., Otani, S., Hasegawa, T., Nakae, D., Konishi, Y. and Fukuchims, S. (1994) Enhancement by organosulfur compounds from garlic and onino of diethylnitrosamine-induced glutathione-S-transferase positive foci in the rat liver. *Cancer Res.* 54 : 2895-2899.

Thestrup-Pedersen, K. and Halkier-Sorensen, L. (1996) Mechanisms of irritant contact dermatitis. In the irritant contact dermatitis

syndrome; Van der Valk, P. G.; Maibach, H. I., Eds.; CRC Press: New York. P305-309.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 7 : 4350-4356.

Wattenberg, L. W. (1985) Chemoprevention of cancer. Cancer Res. 45 : 1-8.

Wargovich, M. J. (1987) Diallyl sulfide, a flavor component of garlic (*Allium sativum*), inhibits dimethylhydrazine-induced colon cancer. Carcinogenesis 8 : 487-489.

Weissler, M. L., Tao, Y., Thaler, H. and Heston, W. DW. (1997) Effect of garlic thioallyl derivatives on growth, glutathione concentration and polyamine formation of human prostate carcinoma cells in culture. Am. J. Clin. Nutr. 66 : 398-405.

Williams, J. A., Wiener, G., Anderson, P. H. and McMurray, C. H. (1983) Res. in Veter. Sci. 34 : 253-256.

Yeh, Y. Y. and Yeh, S. M. (1994) Garlic reduces plasma lipids by inhibiting hepatic cholesterol and triacylglycerol synthesis. Lipids 29 : 189-193.

You, W. C., Blot, W. J., Chang, U. S., Ershow, A. G., Yang, Z. T., An, Q., Henderson, B., Fraumeni, J. F. and Wang T. G. (1989) Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer. J. Natl Cancer Inst. 81 : 162-164.

## 玖、附 錄

### 附錄 1. 一般分析用藥

試劑	來源
Acetic acid	Tedia Company Inc.
Acetone	Merck
Acetonitrile	Tedia Company Inc.
Acetylacetone	Sigma chemical Co.
AgNO <sub>3</sub>	Wako
Acetyl chloride	Janssen Chemical.
Alcohol (95%)	臺灣省菸酒公賣局
Ammonium acetate	和光純藥工業株式會社
ATP; Adenosin-5'-triphosphorsäure dinatriumsalz	Merck
Aracharic acid, AA	Sigma chemical Co.
Baroium hydroxide	Sigma chemical Co.
Benzene	Fischer
BF <sub>3</sub> ; boron trifluoride methanol complex	Merck
BSA; Bovine serum albumin	Sigma chemical Co.
Bromphenol blue	Bio-Rad
BHT; butylated hydroxytoluene	Sigma chemical Co.
Butanol	Merck
CaCl <sub>2</sub> ; calcium chloride	Sigma chemical Co.
CDNB; 1-chloro-2,4-dinitrobenzene	Sigma chemical Co.
CHCl <sub>3</sub> ; chloroform	Tedia Company Inc.
CoA; coenzyme A	ICN Biomedicals Inc.
Con A; Concanavalin A	Sigma chemical Co.
CuSO <sub>4</sub> ; copper sulfate	島久藥品株式會社
Cytochrome C	Merck
2',7'-dichlorofluorescein	Sigma chemical Co.

試劑	來源
Diethylether	Merck
DMSO; dimethyl sulfoxide	Sigma chemical Co.
Economical biodegradable counting cocktail	Research products international corp
EDTA; ethylene diaminetetra acetic acid	Sigma chemical Co.
EGTA; Ethylene glycol-bis-N,N,N',N'-tetraacetic acid	Sigma chemical Co.
Ethanol	昭和化學株式會社
formic acid	Merck
FDNB; 2,4-dinitrofluoro-benzene	Sigma chemical Co.
Folin-cicalteu reagent; Phenol reagent	Wako
Glycine	Bio-rad laboratories.
GSH; reduced glutathione	Sigma chemical Co.
GSH reductase	Sigma chemical Co.
GSSG; oxidized glutathione	Sigma chemical Co.
HCl; hydrochloric acid	Merck
Hexane	Merck
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; hydrogen peroxide	Merck
IAA; iodoacetic acid	Sigma chemical Co.
KCl	Sigma chemical Co.
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	和光純藥工業株式會社
KHCO <sub>3</sub>	Sigma chemical Co.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma chemical Co.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma chemical Co.
KOH; potassium hydroxide	Merck
Leupeptin	Sigma chemical Co.
Linolic acid 18:2 (n-6)	Sigma chemical Co.
MeOH; Methanol	Tedia Company Inc.
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Merck

試劑	來源
NaCl; sodium chloride	Merck
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma chemical Co.
β-NADH; β-Nicotinamide adenine dinucleotide	Sigma chemical Co.
β-NADPH; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Sigma chemical Co.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma chemical Co.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma chemical Co.
NaN <sub>3</sub> ; sodium azide	Sigma chemical Co.
NaOH; sodium hydroxide	Wako
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ; sodium hydrosulfite	Sigma chemical Co.
PAPC; L-α-1-palmitoyl-2-arachidonyl phosphatidylcholine	Sigma chemical Co.
PCA; perchloric acid	GFS Chemicals Inc.
Phenanthroline	Sigma chemical Co.
Phosphotungstic acid	Sigma chemical Co.
Petroleum ether	Merck
PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride	Sigma chemical Co.
POD; 7-pentoxoresorufin	Sigma chemical Co.
Resorufin	Sigma chemical Co.
Sodium acetate	Sigma chemical Co.
Sodium borate	Sigma chemical Co.
SDS; sodium dodecyl sulfate	Sigma chemical Co.
Sucrose	Sigma chemical Co.
TBA; thiobarbituric acid	Sigma chemical Co.
TCA; trichloroacetic acid	Merck
TLC aluminum sheets (20×20cm)	Merck
TMP; 1,1,3,3-tetramethoxy propane	Sigma chemical Co.
α-tocopheryl acetate	Sigma chemical Co.
Triton X-100	Sigma chemical Co.

試劑	來源
Trizma base; Tris[hydroxymethyl]aminomethane	Sigma chemical Co.
Trpsin inhibitor	Sigma chemical Co
Tween 20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate)	Sigma chemical Co.
Zinc sulfate	Sigma chemical Co.

附錄 2.

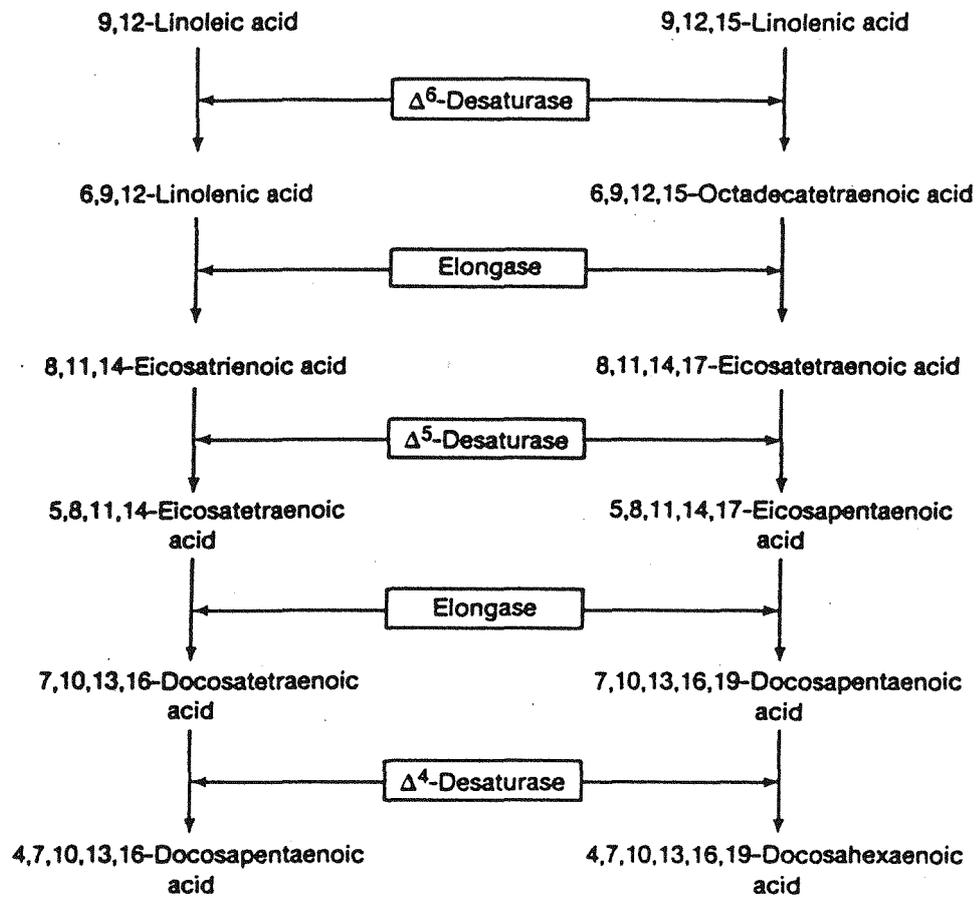
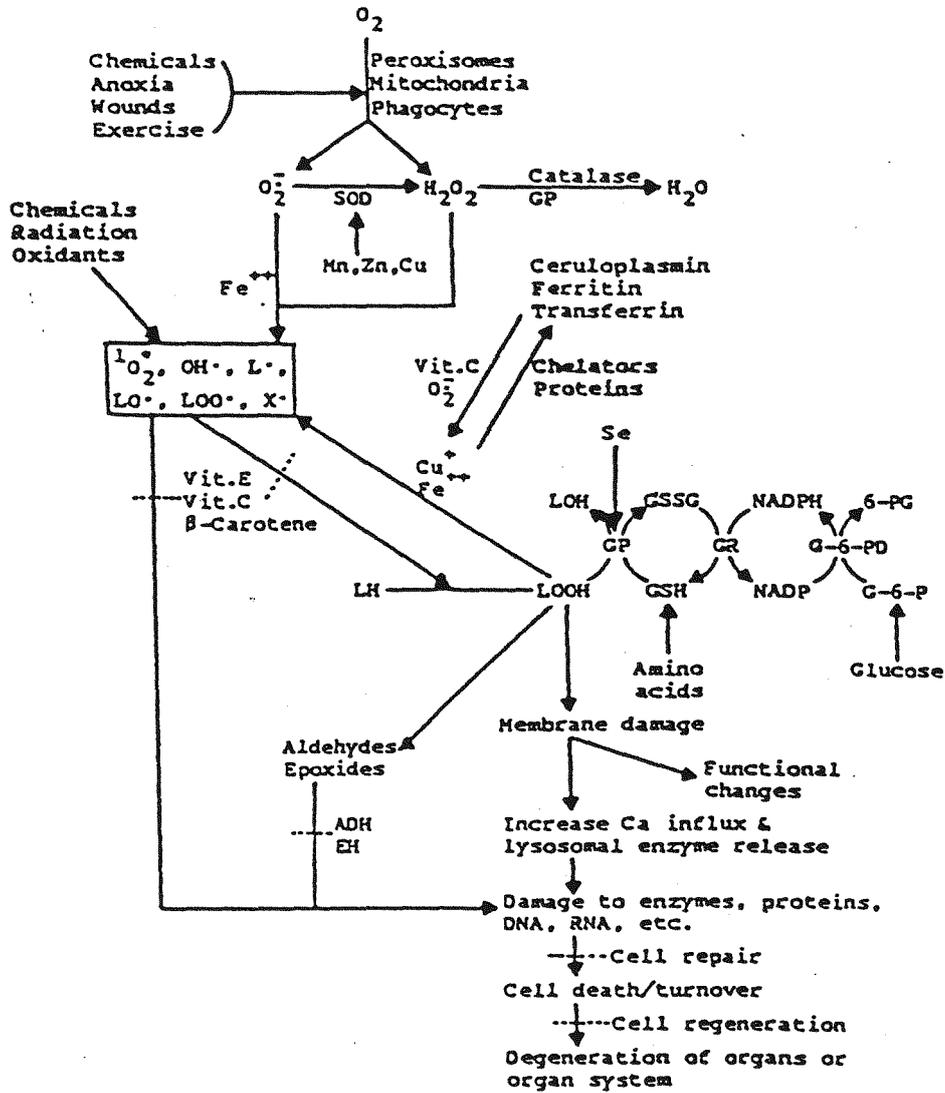


FIGURE 1 Pathways of linoleic (18:2 $\omega$ 6) and linolenic (18:3 $\omega$ 3) acid metabolism.

(Garg et al., 1988a)

附錄 3.



圖一、自由基誘發脂質過氧化造成組織傷害與抗氧化系統之關係

Fig. 1. Possible scheme of free radical-induced lipid peroxidation tissue damage and antioxidant defense. LH represents membrane or polyunsaturated lipids; LOOH, lipid hydroperoxides; LOH, hydroxy acid; LOO·, peroxy radical; L·, alkyl radical; LO·, alkoxy radical; OH·, hydroxyl radical; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide radical; X·, other free radicals; <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, singlet oxygen; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; SOD, superoxide dismutase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GP, GSH peroxidase or phospholipid hydroperoxide GSH peroxidase; GR, GSSG reductase; G-6-PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; 6-PG, 6-phosphogluconate; ADH, aldehyde dehydrogenase/oxidase; EH, epoxide hydrolase; vit., vitamin; NADPH or NADP, reduced or oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. The symbol—denotes interruption of process or event.

(Chow, 1981)