



RRPG94020090 ( 61.P)

計畫編號：DOH94-TD-F-113-014

## 行政院衛生署九十四年度科技研究計畫

大蒜及其組成成分對氧化態 LDL 所誘發血管內皮細胞黏  
附分子表現之探討

### 研究報告

執行機構：中山醫學大學

計畫主持人：李宗貴

研究人員：雷燕萍

執行期間：94 年 1 月 26 日至 94 年 12 月 31 日

\*\*\*本研究报告仅供參考，不代表本署意見\*\*\*

# 目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、中文摘要	(1)
貳、英文摘要	(3)
參、計畫內容	
一、前言	(5)
二、材料與方法	(16)
三、結果	(23)
三、討論	(27)
四、結論	(32)
五、重要參考文獻	(33)
六、圖、表	(50)
七、計畫研究人力之職級與學歷分析表	

共 (59) 頁

## 中文摘要

慢性心血管疾病在很多開發國家均是其國民名列前茅的死因，台灣也不例外，衛生署公佈九十二年國人十大死因排名中，腦血管疾病、心臟疾病、高血壓性心臟病已分居第二、三、十位，顯見心血管疾病已成為現代人的「隱形殺手」。不少心血管疾病的發生與飲食有密切關係，所以排除或減少飲食中危險因子接觸機會或增加保護因子的攝食，就成為預防這些疾病的重要課題。已知氧化修飾的低密度脂蛋白(ox-LDL)誘發血管內皮細胞黏附分子不正常的表現，在粥狀動脈硬化的起始及產生扮演一個重要的角色。在一些臨床研究中，粥狀動脈硬化患者血漿中的 P-selectin 和 ICAM-1 等黏附分子的濃度的確是較健康者高。近來，食物中所謂的植物性化合物(phytochemicals)可能具有的生理機能性已吸引越來越多的注意，例如酚類化合物、大豆異黃酮、類黃酮、類胡蘿蔔素等，所表現出的免疫調節活性、抗氧化活性、抑制腫瘤生長活性、降血脂質活性等，便廣為受到重視。大蒜在預防心血管疾病上雖已有不少相關研究，但在抑制 ox-LDL 誘發血管內皮細胞黏附分子表現的分子機轉上則仍有待釐清，本計劃將以人類臍帶靜脈內皮細胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)為對象，探討在 ox-LDL 處理下，三種大蒜有機硫成分-DAS, DADS, and DATS 對 ox-LDL 誘發血管內皮細胞黏附分子(ICAM-1, VCAM-1, E-selectin)表現表現之效應，

並同時探討 PKB 路徑之角色。結果顯示：DADS and DATS 可以有效抑制 ox-LDL 誘發 E-selectin 與 VCAM-1 蛋白及 mRNA 表現，同時細胞表面 E-selectin 與 VCAM-1 的表現也減少，至於 ox-LDL 誘發 ICAM-1 表現的現象僅輕微受到 DADS and DATS 的影響，相較 DADS and DATS，DAS 對黏附分子大量表現的保護效果則較低。ox-LDL 抑制 PKB 磷酸化已知與其誘發黏附分子表現有關，DADS and DATS 則對 ox-LDL 抑制 PKB 磷酸化有回復效果，而且 DADS and DATS 對 E-selectin 不正常大量表現的保護作用會因 PKB 磷酸化抑制劑-Wortnammin 的處理而消失，然而 DADS and DATS 對 ICAM-1 的抑制作用並不因 Wortnammin 改變。這些結果指出：大蒜抗粥狀動脈硬化可能與其活性有機硫成分抑制血管內皮細胞黏附分子表現有關，其中 PKB 訊號途徑應在其保護 E-selectin 表現中扮演重要角色。

**關鍵字：**大蒜、有機硫成分、粥狀動脈硬化、氧化態低密度脂蛋白、黏附分子、蛋白質激酶 B

## Abstract

Cardiovascular disease is one of the most common causes of death in Taiwan recently. As the dysfunction of cerebral vascular, cardiac, and blood pressure is the highest risk factor causing death, the cardiovascular disorder is the “silent killer”. Therefore, reducing the risk and increasing the protective factors from foods is an important way to prevent such diseases. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) plays a critical role in the initiation and progression of atherosclerosis. The induction of ox-LDL on the cell surface adhesion molecule expression is the key event in early events of atherosclerosis. In patients with atherosclerotic disease, serum levels of soluble P-selectin and ICAM-1 are elevated as compared with the healthy subjects. Recently, several phytochemicals including phenolic compounds, isoflavones, and carotenoids have been demonstrated to display diverse biological activities and, thus, are regarded as nutraceutical agents. Garlic has been used as a traditional medicine for prevention and treatment of cardiovascular diseases. However, the molecular mechanism of garlic active components on ox-LDL-induced adhesion molecule expression on vascular endothelial cells is not clearly elucidated yet. The present study was designed to examine the effect of DAS, DADS, and DATS on E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in the presence of ox-LDL. The role of PKB pathway was also investigated. Results showed DADS and DATS are effective on suppressing ox-LDL-induced E-selectin and VCAM-1 protein and mRNA levels and also their cells expression on cell surface. DAS, however, only a minor effect was noted. Compared to E-selectin and VCAM-1, ICAM-1

expression induced by ox-LDL was moderately inhibited by garlic organosulfur components. PKB phosphorylation was noted to be inhibited by ox-LDL. DADS and DATS reversed the inhibition of ox-LDL on PKB phosphorylation. Moreover, DADS and DATS suppressed ox-LDL-induced E-selectin expression was diminished by co-treating with Wortmannin, a PKB phosphorylation inhibitor. In contrast, the inhibition of VCAM-1 expression by garlic components was not changed by Wortmannin. Results suggest the antiatherosclerotic effect of garlic can be attributed to, at least in part, the effectiveness of DADS and DATS on the suppression of ox-LDL-induced adhesion molecule expression. Furthermore, PKB signal pathway is likely involved in the protection of DADS and DATS on E-selectin expression.

Keyword: Garlic · organosulfur components · ox-LDL · atherosclerosis · adhesion molecules · protein kinase B

## 前言

現代人由於生活型態改變，不但工作忙碌也缺少運動，加上飲食不均衡，使得體重過重、血壓過高、血脂肪不正常等。而肥胖、高血壓、血脂肪異常是導致血管硬化、阻塞的重要原因，因而增加狹心症、心肌梗塞、粥狀動脈硬化、腦中風發生。根據衛生署發布的民國九十二年台灣地區國人十大死因資料，腦血管疾病、心臟疾病、高血壓性心臟病已分居第二、三、十，顯見心血管疾病已成為現代人的「隱形殺手」。

腦血管疾病、心臟疾病與高血壓疾病等心血管疾病之發生機轉是多因的，由大型研究得知，心血管疾病的危險因子除了大家所知的環境污染物之外，以下多種危險因子也與其發生有密切相關性，例如：糖尿病、高血壓、抽煙、總膽固醇過高、高密度脂蛋白膽固醇過低、有家族史者等，其中有多項與生活習慣及飲食習慣有關。所以，為了預防心血管疾病，控制飲食中與慢性疾病有關的危險因子或增加保護因子的攝食，便成為預防這些疾病的最好方法，這也是近年來保健營養所以日漸受到重視的主因。專家學者們嘗試從各種食物中尋找可能的機能性成分，並探討其作用機轉，目前已有不少這方面的相關研究，其中又以普遍存於蔬菜及水果中的天然成分受到最多注意，如：phenolic compounds, isoflavones, allium organosulfur compounds 及

indoles 等(Fleischhauer and Arab, 2001; Shirin et al., 2001)，無論在流行病學或是臨床的研究上，都證實它們具有改善體質與調節生理機能之效應，對於一些慢性疾病也具有不等程度的預防作用。

心血管疾病是一種複雜的疾病，它被認為與身體全面性發炎和動脈壁受損而導致細胞增生有關(Schwartz et al., 1993)，早期之動脈粥狀硬化(atherosclerosis)即與內皮細胞遭受破壞有極密切關係。高血脂、高血壓及抽煙導致動脈壁製造血管加壓素 II (angiotensin II)和一氧化氮(nitric oxide)功能發生失調(Dusting et al., 1998; Luscher and Noll, 1995)，因而損害了內皮細胞，也使得內皮細胞變得敏感及脆弱，並具通透性(Guretzki et al., 1994)，增加 LDL 穿越血管、儲存在血管內層(intima)，發生氧化而產生大量 ox-LDL。已知 ox-LDL 可引發血管壁發生變化，包括：增加內皮細胞表面表現黏附分子(adhesion molecules)、單核細胞侵入血管壁、泡沫細胞(foam cells)生成、血小板增生及蓄積(Ross, 1993)、刺激生長因子(growth factor)及化學激素(chemokines)分泌、平滑肌細胞增生等(Holvoet and Collen, 1995)，因此，降低血中 LDL 是預防動脈粥狀硬化的第一步驟。大蒜即由於在減少 LDL 及增加 HDL 具有不錯的生理效應，而被認為具有降低心血管疾病發生的功能(Adler and Holub, 1997; Morcos, 1997; Yeh and Liu, 2001)。除了大蒜之外，不少蔬菜、水果與紅酒也因其所含之類黃酮(flavonoids)具



有抗氧化特性，且其攝取量與血漿總膽固醇濃度呈現負相關 (Arai et al., 2000)，而被認為有助於維持心血管系統的功能。大豆食品也因其豐富的異黃酮 (isoflavones) 而對心血管也具有有良好的保護作用 (Anthony et al., 1998)。

LDL 氧化已被證實在粥狀動脈硬化的發生與進行中扮演不可忽視的角色 (Berliner and Heinecke, 1996; Cox and Cohen, 1996; Steinberg et al., 1989ab)，事實上，粥狀動脈硬化患者的 LDL 的確較易發生氧化傷害 (Halevy et al., 1997; Regnstrom et al., 1992)。LDL 氧化所形成的 ox-LDL 將誘發內皮細胞表現多種黏附分子，例如：血管內皮細胞-黏附分子 1 (vascular cell-adhesion molecule 1, VCAM-1) 及單核球向化性蛋白質 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)，後者可以誘使單核球穿越並進入血管壁內。單核球是白血球的一類，是吞噬性巨噬細胞的先趨細胞，進入血管壁後，受到巨噬細胞單核球群落激發因子 (macrophage monocyte-colony-stimulating factor, M-CSF) 活化，轉形成巨噬細胞。Ox-LDL 進一步也會抑制巨噬細胞的位移 (Holvoet and Collen, 1995)，將之固定在內皮下空隙，也因膜上存有清除者接受器 (scavenger receptor)，大量吞噬 ox-LDL，而形成脂質過度負載之泡沫細胞 (foam cells)，泡沫細胞聚集在動脈管壁上所形成可見之斑紋，即是初期粥狀動脈硬化最主要的組織學現象 (Gerrity, 1981)。Ox-LDL 也會增加發炎誘導物質的產生與釋放，如：介白質-1 (interleukin-1, IL-1)、介白質

-6 (interleukin-1, IL-6) 或腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )、血小板相關的生長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、花生四烯酸 (arachidonic acid) 的代謝物及一氧化氮等(Durum and Oppenheim, 1989; Fu et al., 1990; Marletta et al., 1988), 這些發炎誘導物質進一步透過轉錄因子 (transcription factors) 的活化, 調節細胞內氧化還原狀態 (redox states), 而導致周圍細胞及組織的傷害(Ide and Lau, 2001)。

整體上, 在體內由乳糜微粒及 VLDL 的代謝所構成三酸甘油酯的分配網路, 我們稱之為脂蛋白代謝之燃料途徑 (fuel transport pathway)。在燃料分配工作完成後, 燃料運輸途徑會產生 LDL, 接著就進入脂蛋白代謝的溢出物途徑 (overflow pathway)。不管是燃料運輸途徑或溢出物途徑, 負載過重的結果都會對動脈管壁造成傷害, 在正常情況下, 含有 apoE 之剩餘物應該會在燃料運輸途徑中快速代謝, 並不會在循環中產生 LDL, 然而假如從飲食中攝取過量的膽固醇, 或是 LDL (apoB/E) 接受器數目降低時, 則會有更多的脂蛋白進入溢出物途徑, 血漿中 LDL 濃度也會提高。當 LDL 留在血漿中, 血漿內之抗氧化劑如維生素 C 及 E、 $\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene) 會保護 LDL 免於被氧化, 同時 LDL 內也含有抗氧化物質, 如 $\alpha$ -生育醇 ( $\alpha$ -tocopherol) (Ohkawa et al., 2004; Tribble et al., 1995)。儘管如此, LDL 仍會受到某種程度的氧化, 尤其是體內抗氧化力不足時, 所以如何減少 LDL

氧化的發生，對於預防心血管疾病的發生絕對有正面的助益。減少或預防 ox-LDL 的產生可由降低血中 LDL 濃度與提昇體內抗氧化力著手。

體內抗氧化系統由多種抗氧化分子與抗氧化酵素所組成，其中抗氧化分子方面，以維生素 E、維生素 C 與 glutathione (GSH) 最重要，抗氧化酵素則包括有 GSH peroxidase, GSH reductase, superoxide dismutase (SOD) 與 catalase 等。根據前述之氧化傷害與粥狀動脈硬化間的關係，一般認為，提升體內或胞內抗氧化分子濃度或抗氧化酵素活性，將有助於減少氧化傷害，達到預防粥狀動脈硬化發生的目的(Diaz et al., 1997)。大蒜萃取物在預防粥狀動脈硬化生成的原因中，除了降低 LDL 濃度外(Morcos, 1997; Yeh and Liu, 2001)，減少細胞內氧化壓力比如：增加內皮細胞內 GSH 含量(Ide and Lau, 2001)、降低血中膽固醇及三酸甘油酯(Lau et al., 1987)、增加胞內抗氧化酵素的活性(Borek, 2001; Wu et al., 2002)或增加自由基的清除力(Kim et al., 2001)等效應，也在其中扮演重要的角色。

發炎 (inflammation) 雖然是身體防禦微生物入侵時的正常反應，然而過度或不當的發炎也與不少慢性病的發生有密切的關係。體內遭受病原體入侵時，免疫系統即刻展開防衛工作，其中，巨噬細胞和肥大細胞在受到活化後將分泌多種細胞激素，例如：TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 或 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

及組織胺等發炎誘導物質，細胞激素吸引白血球位移至受傷或發炎的部位，移除入侵的微生物或受傷的組織，因而引起損傷處產生發炎反應，使得血管擴張，導致局部發熱與紅腫。血管內皮細胞受傷所引發的發炎反應，也會導致受傷的組織釋放細胞激素（cytokines）。細胞激素亦可促使抗體、補體及其他抗感染蛋白質分泌到發炎組織處，吸引更多巨噬細胞到組織感染部位，吞噬侵入之病原體，清除受損細胞、微生物殘骸及分解代謝後之產物，最後，受損組織經凝血等修補機制恢復到正常狀態。白血球所以能夠自血流中移動至受傷的組織，是因為在其細胞膜上醣蛋白或醣脂質上含有路易士-X（Lewis-X）抗原成分。此抗原成分能夠被外源凝集素（lectin）所辨識，這類外源凝集素我們稱之為 E-selectin，普遍存在內皮細胞表面上。Selectin 與路易士-X 抗原間的交互作用是白血球在血液壓力下仍能與血管壁黏附的原因。白血球與內皮細胞之黏附是對抗感染的重要步驟。

除了增加細胞激素分泌外，發炎反應亦會促使很多活性分子的產生。當血管平滑肌細胞或巨噬細胞受到發炎誘導物質（如：TNF- $\alpha$ ）活化時，除了釋放大量的活性氧（reactive oxygen species, ROS）外，也因大量增加誘導型一氧化氮合成酶（inducible nitric oxide synthase, iNOS）的活性，製造大量一氧化氮（nitric oxide, NO）。雖然活性氧與一氧化氮在感染和腫瘤的免疫反應中有著重要的角色，但是過量的活性氧與 NO 所產生的效果卻如刀之兩

面。事實上，NO 也是一種自由基 (free radical)，在高濃度下易引起細胞傷害(Moro et al., 1996)，且高濃度 NO 也易與超氧陰離子 (superoxide anion) 快速反應形成過氧化硝酸根(Beckman et al., 1990)。過氧化硝酸根不但可以增加血小板凝集作用，也因其強氧化特性，易使 LDL 氧化。Matsunaga 等人(2001) 即證實過氧化硝酸根修飾過的高密度與低密度脂蛋白均會傷害動物內皮細胞的完整性。事實上，由粥狀動脈硬化、神經退化疾病、風濕性關節炎等慢性疾病病理組織中，均可檢測出高量硝化蛋白質存在，即指出兩者間可能的因果關係(Alfon et al., 1999; Torreilles et al., 1999; Ungvari et al., 2002)。至於活性氧也與各種生物效應有關，如：細胞的活化、增生、存活與凋亡等，已知這些生物效應均藉由相關訊息傳遞物質 ( MAPK, NF- $\kappa$ B, PKB/Akt, caspases 及 calcium 等)媒介而發生(Irani, 2000)。Ox-LDL 導致細胞凋亡，即與其活化 caspase 級聯機制有關 (Salvayre et al., 2002)。

細胞黏附分子 (cell adhesion molecules) 也是討論內皮細胞與粥狀動脈硬化相關性時的焦點之一。細胞黏附分子是細胞與細胞間或細胞與環境間訊息溝通過程中相當重要的因子(Albelda et al., 1994; Frenette and Wagner, 1996)。已知內皮細胞表現多種細胞黏附分子，如：E-selectin, P-selectin, VCAM-1, ICAM-1 等(Dustin et al., 1986)。當發炎反應發生時，這些黏附分子是使白血球黏著到血管內皮細胞並進入血管壁內的關鍵因子(Noursargh and

Williams, 1990)。不少實驗指出，動脈受傷處的內皮細胞的 ICAM-1 表現確實較周圍正常細胞高(Takei et al., 2001; Li and Mehta, 2000)，另外，由 ox-LDL 增加主動脈內皮細胞 P-selectin 與人類臍帶靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) ICAM-1 表現(Takei et al., 2001; Li and Mehta, 2000; Li et al., 2001; Chen et al., 2001)這些證據看來，黏附分子與粥狀動脈硬化間的確極可能存在著因果的關係。ICAM-1 基因表現已知受到發炎細胞激素 (inflammatory cytokines) (Wertheimer et al., 1992)或氧化壓力的調控，當內皮細胞以脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)、phorbol esters、發炎細胞激素 (inflammatory cytokines)(如：TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ ) 或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理時，ICAM-1 的表現即會大量增加(Takei et al., 2001; Kita et al., 2001)，且 ICAM-1 和 VCAM-1 表現所以增加，也與 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 等轉錄因子被活化有關(Geng et al., 1997; Sen and Packer, 1996)。因此黏附分子表現與轉錄因子之間的相關性，近年來已被廣泛的探討。

Protein kinase B (PKB)是一種絲氨酸-蘇氨酸激酶 (serine-threonine kinases)，除參與細胞增生 (proliferation)及存活 (survival)之訊息傳遞外 (Downward, 1998; Songyang et al., 1997)，也有研究指出，PKB 路徑的活化與粥狀動脈硬化有關(Breitschopf et al., 2001; Du et al., 2001)。Chavakis 等人 (2001)研究即發現，ox-LDL (0.1-50  $\mu$ g/ml)會導致 HUVECs 內 PKB 去磷酸

化，進而影響 eNOS 的活性；Li 等人(2001)研究也發現，ox-LDL 雖不影響 PKB 蛋白質表現，但確會降低內皮細胞中 PKB 的活化；另外，也有研究指出抑制 PKB 活化會增加 ox-LDL 誘發黏附分子表現，並增加單核球與 HUVECs 的黏著(Chen et al., 2003)。這些證據支持，ox-LDL 誘發細胞黏附分子的表現可能與 PKB 去活化有關。

大蒜是廣為各方使用的一種食材，除了作為調味用途外，大蒜也具有相當多樣的生理機能性，其中包括有：殺菌、增加解毒酵素活性(Chen et al., 2003; Chen et al., 2001; Munday et al., 2003)、降低 LDL 濃度(Morcos, 1997; Yeh and Liu, 2001)、抑制 LDL 氧化(Yin et al., 2002)、增加胞內抗氧化酵素活性(Borek, 2001; Wu et al., 2001)、自由基清除力(Kim et al., 2001)、減少血栓生成或降低血小板凝集(Ali, 1995; Vanderhoek et al., 1980)、抑制 phospholipase A2 (Liu et al., 1998; Srivastava and Tyagi, 1993)或 5-lipoxygenase 活性 (Belman et al., 1989; Sendle et al., 1992)、保護內皮細胞受損(Ide and Lau, 2001)等，因此被認為對於心血管疾病的預防有一定的成效(Koch and Lawson, 1996)。大蒜生物活性主要來自其豐富且多樣的有機硫成分 (organosulfur compounds)，然而這些活性成份的種類及含量與大蒜的儲存方式或加工條件有密切關係(Yu et al., 1989)，這也解釋為何不同大蒜產品間有機硫成分的種類與含量會有如此明顯的差異。例如，以水蒸氣蒸餾法收集的油狀萃取物 (大蒜精油) 含有豐富的

脂溶性有機硫成分：diallyl sulfide (DAS), diallyl disulfide (DADS), diallyl trisulfide (DATS), allylmethyl trisulfide 等，但萃取自長期浸泡在食醋或酒中的後熟大蒜萃取物 (aged garlic extract, AGE) 中，卻是含有豐富的水溶性有機硫成分：S-allyl cysteine (SAC), S-ethyl cysteine (SEC), S-allyl mercaptocysteine 等。近年來大蒜之相關研究，以後熟大蒜的水溶性萃取物及其主要成份-SAC 最常見，報導的生物活性有抗氧化 (antioxidation) (Helen et al., 2003; Ho et al., 2001)、抗癌生成 (anticarcinogenesis) (Ippoushi et al., 2002)、抗粥狀動脈硬化症 (antiatherogenesis) (Kim et al., 2001)、免疫刺激 (immunostimulation) (Sumiyoshi, 1997)、保護肝臟(Liu and Yeh, 2000; Liu and Yeh, 2001)與抗老化(Peng et al., 2002)等。在抗氧化相關報導中 AGE 及 SAC 可以使血管內皮細胞免於  $H_2O_2$  所引起的傷害(Ho et al., 2001)、抑制 LDL 的氧化(Ho et al., 2001; Ide et al., 1997)、AGE 可以調節 glutathione (GSH) 氧化還原反應(Ide and Lau, 2001)、SAC 可以抑制 NF- $\kappa$ B 的活化(Ho et al., 2001; Kim et al., 2001)。至於脂溶性有機硫成分相關研究，則以 DAS 與 DADS 為多，在抗氧化(Haber et al., 1995; Sheen et al., 1999)、降血脂(Yeh and Liu, 2001)、抑制血小板凝集(Bordia et al., 1996)、保護化學性肝傷害(Brady et al., 1991; Wang et al., 1996)、抗腫瘤(Yang et al., 1994)等生理活性方面已有不少相關研究，但它們抑制粥狀動脈硬化的分子機制則尚未清楚；至於大蒜精油中



另一重要含硫成分-diallyl trisulfide (DATS)在預防心血管疾病的生理效應，則是很少見諸報導。

由分子結構比較各種有機硫成分的相對生理活性也是一有趣的課題 (structure-function relationship)，我們曾比較 DAS, DADS 與 DATS 對抗氧化酵素與解毒酵素活性之影響，結果顯示三者間對酵素活性或蛋白表現之作用強弱與其硫原子數目有關，且呈現酵素專一性。類似分子結構與生理活性間相關性研究也常見諸於酚類化合物 (phenolic compounds) 或類黃酮化合物 (flavonoids)，例如：Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) 及 daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone) 在清除氫氧自由基(Giles and Wei, 1997)、過氧化硝酸根與抑制 iNOS 表現(Lai and Yen, 2002)的效應上，即與其氫氧基數目和位置有關。所以 DAS, DADS 與 DATS 這三種分子結構差異僅是硫原子數目的大蒜 OSCs 在抗粥狀動脈硬化效應上是否也與其分子結構有關，將是一有趣的議題。

鑒於血管內皮細胞黏附分子的大量表現與粥狀動脈硬化的發生有密切相關，本實驗將以探討及比較 DAS, DADS 和 DATS 抑制 ox-LDL 誘發臍帶靜脈內皮細胞黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 與 E-selectin 蛋白質或 mRNA 表現之效應，並探討 PKB 活性在此一抑制效應之角色，最後，再分析此一保

護作用其清除活性氧化物能力高低之相關性。

## 材料與方法

### 1. 大蒜有機硫成分

Dially sulfide (DAS) 及 dially trisulfide (DATS) 將分別由 Fluka Chemical Co. (Buchs, Switzerland) 和 LKT Laboratories Inc. (St. Paul, MN) 購得； Diallyl disulfide (DADS) 則由 Tokyo Kasei Chemical Co. (Tokyo, Japan) 購得。 Mouse anti-human CD54(ICAM-1)-FITC, Mouse anti-human CD62 (E-selectin)-FITC, CD106(VCAM-1)-FITC。 Phosphorylated protein kinase B 購自 Cell Signaling Technology (USA)。

### 2. 氧化態 LDL (ox-LDL) 的製備

從人類血漿中利用密度梯度以超高速離心法分離出低密度脂蛋白 (LDL;  $d=1.019-1.05$  g/ml) (Uittenbogaard et al., 2000)。將 LDL (0.5 mg/ml) 和濃度為 5  $\mu$ M 的硫酸銅在 37°C 下處理 6 小時，再以 500 倍體積之 1 X PBS 緩衝液在 4°C 下進行 24 小時透析，以除去銅離子 (Kuzuya et al., 1991)。脂質過氧化分析乃參考 Fraga 等人(1988)與 Sano 等人(1986)之方法，以螢光光度計 (LS-3 Fluorescence Spectrophotometer, PerkinElmer, Norwalk, CT) 在 excitation 515 nm 及 emission 555 nm 下，利用此一紅色質 (TBA chromagen)

即可測定 TBARS 產生濃度，並以 1,1,3,3-tetramethoxy propane (TMP)製作標準曲線進行定量分析。蛋白質定量分析方法乃參考 Lowry (1951)之方法。脂質過氧化以 nmol TBARS/mg protein 表示之。

### 3. 細胞株

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, American Clonetics Co., San Diego, CA) 懸浮培養於含有 20%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 units/ml penicillin、100 mg/ml streptomycin、0.1 g/L heparin、0.04 g/L endothelial cell growth supplement (ECGS) 之 M199 培養液中，並種植到以 gelatin 包覆之 10 cm<sup>2</sup> 培養皿。培養箱的條件設為溫度 37°C/5% CO<sub>2</sub>，每兩天更換培養液，待 90% confluence，細胞可再分殖於包覆 gelatin 之 24 孔或直徑 6 公分之培養皿中，生長至 90% confluence 時，分別加入大蒜有機硫成分及 ox-LDL，處理濃度及時間將依各項分析而定。

### 4. 細胞存活率 (cell viability) 分析：MTT assay (Sheu et al., 2001)

將 HUVEC ( $8 \times 10^4$  cells/well) 培養在 24 孔之培養皿中，待生長至 90% confluence 時，加入不等濃度 DAS, DADS 或 DATS 預培養 24 小時，隨後加入 40 µg/ml ox-LDL。繼續培養 24 小時，吸除培養液，以冰冷 PBS 清洗兩次，加入含 0.5 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide (MTT) 之培養液再培養三小時，加入 250  $\mu$ l isopropanol，反應十分鐘以溶解 formazan，並以分光光譜儀於波長 550 nm 下讀取吸光值。MTT 還原為 formazan 的程度將作為細胞存活率的指標。

#### 5. Western blot 分析：磷酸化 PKB 或黏附分子 (VCAM-1、ICAM-1、E-selectin) 蛋白質表現

細胞處理同前段，將細胞以 PBS 清洗之後，以 cell lysis buffer [100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH7.4, 1% (v/v) Nonidet P-40, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, and 10  $\mu$ g/ml leupeptin] 收取細胞，均質後，離心十分鐘(12,000g, 4°C)，取上清液，定量蛋白質。取 30  $\mu$ g 蛋白質與等體積之 sample buffer 混合，沸水浴 5 分鐘，隨後以 7.5% SDS-PAGE 進行電泳分析。電泳完成後，以 100 伏特電壓於冰水浴中進行轉印 90 分鐘，使蛋白質轉印至 Hybond-C nitrocellular membrane (NC) 膜上(Amersham, Braunschweig, Germany)。取出 NC 膜，於含 5% 脫脂奶粉溶液中進行 blocking 反應 90 分鐘，加入磷酸化 PKB、VCAM-1、ICAM-1 或 E-selectin 初級抗體，4°C 下隔夜反應，再與二級抗體 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Chemicon Int.) 作用一小時，最後加入 ECL solution (Amersham Pharmacia Biotech) 之顯影液反應 2 分鐘，於暗房中壓片即可。

#### 6. 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay (Vowells et al., 1995;

Wan et al., 1993)

DCF-DA 是一個非螢光物質，然而過氧化氫或脂質過氧化物可將其去乙酰化(deacetylated)，生成螢光產物-2',7'-dichlorofluorescein (DCF)，因此，由螢光強弱可表示胞內氧化還原狀態(redox states)。分析方法如下：將內皮細胞以 DAS, DADS 或 DATS 預培養 2 小時，加入 40  $\mu\text{g/ml}$  ox-LDL，24 小時後，加入 5  $\mu\text{M}$  DCF-DA 繼續培養 20 分鐘，以冰冷 PBS 清洗兩次，加入 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA 切離細胞，250g 離心 5 分鐘，將細胞懸浮在 600  $\mu\text{l}$  含 0.1% bovine serum albumin 與 0.1% sodium azide 之 PBS 緩衝液 (pH7.4) 中，以流式細胞儀在 excitation 488 nm 下量測 10,000 個細胞螢光值。

#### 7. 細胞表面黏附分子(adhesion molecules)表現分析

本分析法將採用流式細胞儀 (FACScan, Becton Dickinson) 分析。HUVEC 置於 6 公分培養皿中，至 90% confluence 時，分別以 DAS, DADS 或 DATS 預處理 16 小時，隨後加入 40  $\mu\text{g/ml}$  ox-LDL 誘發黏附分子表現。24 小時後，吸除培養液，以 PBS 清洗三次，加入 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA 切離細胞，250g 離心 5 分鐘，加入 200  $\mu\text{l}$  含 0.1% bovine serum albumin 與 0.1% sodium azide 之 PBS 緩衝液(pH7.4)，離心，加入 100  $\mu\text{l}$  fluorescence isothiocyanate (FITC) 標定之 CD54 (ICAM-1)、CD62 (E-selectin)、CD106 (VCAM-1) 單株抗體 (Serotec Co., UK)，暗反應 45 分鐘，離心清洗後，將細

胞懸浮在 600  $\mu$ l 含 0.1% bovine serum albumin 與 0.1% sodium azide 之 PBS 緩衝液(pH7.4)中，此時即可以流式細胞儀分析黏附分子的表現。

#### 8. 單核球細胞黏著分析(Makondo et al., 2004)

本實驗使用 human myelogenous leukemia 細胞株-HL-60 與 HUVEC 進行黏著分析。HL-60 先以 10  $\mu$ M 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM, Sigma-Aldrich)標定，並以含有 10% FBS 之 RPMI-1640 培養液在 37°C 下培養一小時，以 PBS 緩衝液清洗三次，將 HL-60 ( $8 \times 10^5$  cells/well) 加入培養在 6 孔培養皿中且已預先以 ox-LDL 及大蒜 OSCs 處理過之 HUVEC 中 30 分鐘後，利用含有 1% FBS 之 RPMI-1640 培養液將未黏著至 HUVEC 的 HL-60 以清洗四次的方式移除，再以 PBS 緩衝液清洗兩次。最後以含有 0.1% SDS 的 50 mM Tris-HCl (pH8.0)將與 HUVEC 黏著之 HL-60 溶出，即可以螢光光度計在 excitation 485 nm 及 emission 530 nm 下測量細胞螢光值。

#### 9. RT-PCR (Zapolska-Downar et al., 2004)

利用 RT-PCR 觀察 VCAM-1、ICAM-1 和 E-selectin mRNA 在 HUVEC 中表現。VCAM-1 兩條引子分別為： forward 5'-CCCTTGACCGGCTGGAGATT-3' 和 reverse 5'-CTGGGGGCAACATTGACATAAAGTG-3'。ICAM-1 二條引子分別為 forward 5'-TGAAGGCCACCCCAGAGGACAAC-3' 和 reverse

5'-CCCATTATGACTGCGGCTGCTGCTACC-3'。E-selectin 二條引子則為 forward 5'-TCTCTCAGCTCTCACTTTG-3' 和 reverse 5'-TTCTTCTTGCTG CACCTCT-3'。而作為內標控制的 GAPDH 二條引子分別為 forward 5'-GAG TCAACGGATTTGGTCGT-3' 和 reverse 5'-GTTGTCATGGATGACCTTGG -3'。RT-PCR 步驟如下：將 500 ng RNA 加入含有 2.5 mM dATP、dTTP、dCTP、dGTP，20 U RNase inhibitor，100 pM random hexamers 和 20 U MMLV reverse transcriptase 之反應液中(總體積為 20  $\mu$ l)，以 37°C/60 分鐘和 94°C/5 分鐘進行反轉錄，之後以 4°C 終止反應。取 5  $\mu$ l RT 混合液加入含有 10X PCR buffer ( $Mg^{2+}$  最終濃度為 1.5 mM)，2.5 mM dATP、dTTP、dCTP、dGTP，10 pM forward and reverse primers (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin 和 GAPDH) 及 1 U *Taq* polymerase 之反應液中(總體積為 25  $\mu$ l)，放入 PCR 儀器(GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) 中，進行 DNA 複製。

DNA 電泳-將每一管 PCR DNA 產物加入 5  $\mu$ l 10X loading dye 均勻混合，注入含 Ethidium bromide 之 2.5% agarose (SeakemLE agarose) 之膠片中，於電泳槽中以 90 伏特進行電泳，最後利用紫外燈照射拍攝電泳圖，並利用分析軟體(Alpha Innotech, Digital Image Analyzer) 定量 mRNA 之表現。

#### 10. 統計分析：

本實驗所得之數據將先以一元變方分析(one-way analysis of variance)行

統計分析，隨後再以 Tukey's multiple comparison test 行處理組間差異性檢定，當  $p < 0.05$  則視為具顯著差異。



## 結 果

### 一、ox-LDL 劑量抑制效應或 DATS 對 ox-LDL 抑制 HUVEC 內皮細胞黏附分子表現之劑量與時間效應

本分析探究 ox-LDL 劑量抑制效應或 DATS 對抑制 ox-LDL 誘發 HUVECs 黏附分子蛋白質表現之劑量與時間效應。HUVECs 給予不同的濃度 ox-LDL 處理 24 小時或不同濃度或時間 DATS 預處理後，再給予 40  $\mu\text{g/ml}$  ox-LDL 處理 24 小時後取樣，以 Western blot 分析黏附分子 E-selectin 蛋白質表現，結果發現：40  $\mu\text{g/ml}$  ox-LDL 處理組可誘發 E-selectin 蛋白質表現(圖一)，且在各種 DATS 濃度對抑制 E-selectin 表現之效果以 100  $\mu\text{M}$  預處理 16 小時時較佳，因此在本實驗中將以 40  $\mu\text{g/ml}$  ox-LDL 處理 24 小時或大蒜有機硫化物預處理 16 小時為時間點。

### 二、大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 誘發 HUVECs 內皮細胞黏附分子蛋白質表現之影響

本分析進一步探究大蒜有機硫化物是否抑制 ox-LDL 誘發 HUVECs 黏附分子蛋白質之表現。給予 HUVECs 不同大蒜有機硫化物預處理 16 小時後，再以 40  $\mu\text{g/ml}$  ox-LDL 處理 24 小時，以 Western blot

分析 VCAM-1、ICAM-1、E-selectin 三種黏附分子蛋白質表現，結果發現：單獨以 ox-LDL 處理組細胞黏附分子蛋白質明顯增加(圖二)，大蒜有機硫化物對抑制 ox-LDL 誘發 VCAM-1 和 E-selectin 表現之效果較 ICAM-1 佳，其中又以 DATS 抑制效應最為顯著，DADS 與 DAS 效果則較 DATS 弱。另外，若細胞預處理 PKB 磷酸化抑制劑-wortmannin，可見 DAS、DADS 或 DATS 對 E-selectin 蛋白質表現之效應受到抑制。

### 三、大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 誘發 HUVECs 內皮細胞黏附分子 mRNA 表現之影響

接著，進一步探討不同大蒜有機硫化物影響 ox-LDL 誘發 HUVECs 內皮細胞黏附分子蛋白質表現是否作用在轉譯階段，RT-PCR 顯示 HUVEC 在 40 µg/ml ox-LDL 或預處理不同大蒜有機硫化物 16 小時後，黏附分子 VCAM-1、ICAM-1、E-selectin mRNA 表現與蛋白質表現結果相似(圖三)，DATS 抑制 VCAM-1、ICAM-1、E-selectin mRNA 表現之效果最佳，DADS 與 DAS 效果較差。

### 四、大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 誘發 HUVECs 內皮細胞黏附分子表現之影響

本分析主要探討不同大蒜有機硫化物抑制 ox-LDL 誘發 HUVECs 內皮細胞細胞表面黏附分子表現之影響，結果顯示：相較 vehicle control 組，ox-LDL 明顯增加 VCAM-1、ICAM-1 與 E-selectin 在內皮細胞表面之表現(圖四)，進一步比較各種不同大蒜有機硫化物對 ox-LDL 誘發細胞表面黏附分子表現之影響，可見 DADS 和 DATS 顯著抑制 ox-LDL 誘發三種內皮細胞黏附分子表現，抑制效果則是 DATS > DADS，DAS 抑制效應僅見於 VCAM-1 與 E-selectin，但其強度仍低於 DAS 與 DATS。比較 ICAM-1, VCAM-1 與 E-selectin 三者表現之抑制程度，也是以 E-selectin 受到 OSCs 抑制的程度最高。

#### 五、大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 抑制 HUVECs 內皮細胞 PKB 磷酸化之影響

本實驗接著探究不同大蒜有機硫化物是否能影響 ox-LDL 抑制 HUVECs 內皮細胞 PKB 磷酸化的表現。結果如圖五所示，與 vehicle control 組相較下，40  $\mu\text{g/ml}$  ox-LDL 可抑制 PKB 磷酸化，DADS 與 DATS 則明顯反轉 ox-LDL 對 PKB 磷酸化的抑制，且 DATS 效果較 DADS 略佳，至於 DAS 效果最小。然而預處理 HUVECs PKB 磷酸化抑制劑

-Wortmannin，結果顯示 DADS 或 DATS 對 PKB 磷酸化之效應將減小。

#### 六、大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 誘發 HUVECs 內皮細胞胞內過氧化物的抑制效應

進一步分析不同大蒜有機硫化物對 ox-LDL 誘發 HUVECs 胞內過氧化物產生的影響。結果顯示(圖六):DADS (200  $\mu$ M)與 DATS (100  $\mu$ M)對 ox-LDL 所誘發內皮細胞胞內過氧化物的生成具有抑制的效應，兩者間也是以 DATS 效果較佳，至於 DAS 雖然處理濃度高達 1 mM，仍未能有效降低過氧化物生成。

#### 七、大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 誘發 HUVECs 內皮細胞與 HL-60 單核球黏著之影響

最後分析大蒜有機硫化物對 ox-LDL 誘發 HUVECs 內皮細胞與 HL-60 單核球細胞黏著之效應。結果顯示(圖七):在 200  $\mu$ M DADS 與 100  $\mu$ M DATS 預處理下，ox-LDL 誘發內皮細胞與單核球黏著之效應顯著受到抑制，DAS 則效果有限。

## 討論

氧化態低密度脂蛋白(oxLDL)是動脈硬化形成的主要致病因素之一。已知其中機制與 oxLDL 經由巨噬細胞的清道夫接受體路徑，大量進入巨噬細胞而形成泡沫細胞有關，同時 oxLDL 和其所誘發細胞激素也會吸引血液中的單核球和血管中層的平滑肌細胞進入血管內皮下空間，另外，氧化態低密度脂蛋白也會直接引起內皮細胞進一步的損傷，因而加速動脈硬化病變或血管再狹窄病變的形成。因此，抑制低密度脂蛋白氧化的發生，將有助於減少泡沫細胞的形成，抑制生長因子及細胞激素的表現，降低平滑肌細胞的增生，進而減緩動脈硬化的形成。在動物實驗中，發現多種抗氧化劑如  $\alpha$ -tocopherol、butylated hydroxytoluene (BHT)、probucol、ascorbate 等均可減少 LDL 氧化，抑制損傷後的動脈新內膜的增生，以及巨噬細胞和平滑肌細胞的堆積，緩解兔子因高膽固醇血症引起的動脈粥狀硬化(Nachtigal et al., 2004; Kugiyama et al., 1990; Clubb et al., 2001; Rekhter et al., 2000)。許多日常食物被認為能提供健康或醫療益處並預防慢性病發生，此一生理機能性與它們富含具抗氧化活性和清除自由基能力的化合物有關。這些所謂的"化學預防物質"(chemopreventers)在我們日常生活最主要的來源包括蔬菜、水果、穀類、香料、藥草、黃豆、大蒜、茶、咖啡等，而多酚類(polyphenolic)又是其中吸引最多人注意的化學預防物質。已知不少酚類化合物在降低血

脂肪、抑制低密度脂蛋白的氧化、抑制血小板凝集、降低血栓的形成、減少動脈粥狀硬化形成、預防心臟血管疾病的發生上有不錯成效(Masella et al., 2001; Kamiya et al., 2004; Fragopoulou et al., 2003; Kerry and Abbey, 1997)。

大蒜(garlic)除了是日常食用的辛香調味品外，長久以來也被當作是藥用植物，用來改善許多不同疾病的症狀，如心臟病、頭痛或腫瘤等(Agarwal, 1996)，除此外，也有不少研究證實大蒜及其有機硫化物的生理效用尚包括解毒、抗糖尿病、抗高血壓、抗腫瘤生成、抗癌、抗氧化、抗動脈粥狀硬化、抗心血管疾病及抗發炎等(Agarwal, 1996; Khalid et al., 2003)。雖然大蒜及其有機硫化物具有多重生理調節作用，然而其作用機轉尚有不少值得進一步研究的空間。雖大蒜調控發炎反應，預防或改善心血管疾病與動脈粥狀硬化的作用機制已有不少研究，以大蒜脂溶性成分為例，就以 diallyl sulfide (Sethi et al.)及 diallyl disulfide (DADS)兩種揮發性硫成分最為常見，且研究主要以降血膽固醇或抗氧化等方面為主，然而它們在抑制粥狀動脈硬化的分子機制上，則尚少討論。至於另一重要硫成分-diallyl trisulfide (DATS，大蒜精油中主要的有機硫化合物之一，含量約 30%，僅次於 DADS)，則是尚未見諸報導。因此，本計畫乃以 DAS, DADS, DATS 三種大蒜脂溶性成分為主要研究對象，探討它們對 ox-LDL 誘發血管內皮細胞黏附分子表現之效應，同時也探究絲氨酸-蘇氨酸激酶 (serine-threonine kinase)

中的 Protein kinase B (PKB)路徑的活性在其中扮演之角色。

ox-LDL 造成粥狀動脈硬化已知與血管內皮細胞黏附分子表現增加有關，本實驗比較了 DAS, DADS, DATS 三種大蒜硫化物降低 oxLDL 誘發黏附分子表現之效應，由 Western blot, RT-PCR 與細胞流式儀結果顯示，DATS 抑制效果最佳，DADS 次之，DAS 效果最弱；再比較 VCAM-1, ICAM-1, E-selectin 三種黏附分子表現之差異時，似乎可看出大蒜有機硫化物對抑制 E-selectin 與 VCAM-1 表現之效果較佳，其中又以 DATS 抑制 E-selectin 表現之效果最為顯著。過去曾有研究指出大蒜 OSCs 之硫原子數目及丙烯基 (allyl groups) 在大蒜之生理效應上扮演重要角色 (Sumiyoshi and Wargovich, 1990)。Sparnins 等 (1988) 指出大蒜組成分中之 DADS 含有雙硫原子及雙丙烯基，對於抑制因 Benzo[a]pyrene 誘發大鼠之前胃腫瘤 (forestomach neoplasia) 之效果比含有單硫原子之 DAS 或含雙丙基 (propyl group) 之二丙基二硫化物 (dipropyl disulfide) 顯著。Wang (1996) 進一步發現大蒜 OSCs 中含有雙烯丙基結構者，例如 DADS 對於避免肝細胞因 acetaminophen 造成之肝毒性傷害比僅具有單烯丙基結構者效果佳。由此可推測三種含硫化合物在結構上可能因硫原子數目不同，而導致不同之生理效用。E-selectin 使白血球發生轉移、並穿透內皮細胞表面，同時 ICAM-1 加強此作用 (Gearing and Newman, 1993)；VCAM-1 與週狀動脈硬化具有高相關性，因此 VCAM-1

可被用來作為粥狀動脈硬化程度的分級(Carlos and Harlan, 1994)。綜合上述結果推論：大蒜有機硫化物含硫數目的多寡與抑制黏附分子表現有關，其中以抑制 E-selectin 與 VCAM-1 效果較顯著。

另外，文獻指出 oxLDL 誘發內皮細胞黏附分子表現與 PKB 的活化受到抑制有關(Chen et al., 2003)。因此，本實驗也探討大蒜有機硫化物抑制 oxLDL 誘發內皮細胞黏附分子表現隻分子機轉是否透過調控 PKB 的活性。由 Western blot 結果(圖二)得知，大蒜有機硫化物反轉 ox-LDL 誘發 E-selectin 蛋白分子表現可因 wortamannin 的預處理而消失，顯示 PKB 活化途徑在 DADS 與 DATS 抑制 E-selectin 表現中扮演著重要角色，至於 VCAM-1 與 ICAM-1 的表現並沒有因 PKB 磷酸化的抑制劑 wortamnnin 而回復表現量，我們猜測可能是由於 VCAM-1 與 ICAM-1 的表現可能也會透過其他路徑。

由前述證據顯示大蒜有機硫化物降低 oxLDL 誘發 E-selectin 黏附分子表現與其反轉 oxLDL 降低 PKB 磷酸化有關，其機轉是否與大蒜有機硫化物調控胞內氧化還原狀態(redox status)有關。結果顯示 DAS, DADS 與 DATS 確能有效抑制 oxLDL 誘發內皮細胞過氧化物的生成(圖六)，DAS 效果則有限，三者間抑制效果與其抑制黏附分子表現一致，顯示大蒜有機硫化物保護作用應與其抗氧化調節性有關。



再者，細胞黏附分子是細胞與細胞間或細胞與環境間訊息溝通過程中相當重要的因子(Albelda et al., 1994; Frenette and Wagner, 1996)。已知發炎反應發生時，這些黏附分子是使白血球黏著到血管內皮細胞並進入血管壁內的關鍵因子(Noursargh and Williams, 1990)，因此大蒜有機硫化物是否可以透過降低黏附分子表現進而降低單核球與內皮細胞之黏著，將是減少粥狀動脈硬化之生成的必要步驟。結果顯示大蒜有機硫化物確實能減少單核球與內皮細胞之黏著，與前述降低黏附分子表現的結果一致，因此更能進一步證實大蒜有機硫化物可以透過降低黏附分子表現、減少單核白血球之黏著，而達到抑制粥狀動脈硬化之生成。

## 結論

綜合以上結果，此一作用機轉可解釋大蒜抗粥狀動脈硬化之生理機能性可能經由大蒜有機硫化物增加 PKB 活性而抑制 ox-LDL 誘發黏附分子 E-selectin，達到抗粥狀動脈硬化之效用，然而大蒜 OSCs 降低 VCAM-1 表現可能是透過非 PKB 活化途徑。因此大蒜精油也許具有發展為抗氧化健康食品，進而改善或預防心血管疾病之潛能。

## 参考文献

- Adler AJ, and Holub BJ. Effect of garlic and fish-oil supplementation on serum lipid and lipoprotein concentrations in hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr* 1997; 65, 445-450.
- Agarwal KC. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev* 1996; 16: 111-124.
- Albelda SM, Smith CW, and Ward P A. Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb J* 1994; 8: 504-512.
- Alfon J, Guasch JF, Berrozpe M, and Badimon L. Nitric oxide synthase II (NOS II) gene expression correlates with atherosclerotic intimal thickening preventive effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 1999; 145: 325-331.
- Ali M. 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* 1995; 53: 397-400.
- Anthony MS, Clarkson TB, and Williams JK. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1390S-1393S.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, and Kinoshita N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and their inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr* 2000; 130: 2243-2250.

- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA., and Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci*; 1990; 87: 1620-1624.
- Belman S, Solomon J, Segal A, Block E, and Barany G. Inhibition of soybean lipoxygenase and, mouse skin tumor promotion by onion and garlic components. *J Biochem Toxicol*; 1989; 4: 151-160.
- Berliner JA, and Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20: 707-27.
- Bordia T, Mohammed N, Thomson M, and Ali M. An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 54: 183-186.
- Borek C.: Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 2001; 131: 1010S-1015S.
- Brady JF, Wang MH, Hong JY, Xiao F, Li Y, Yoo JS, Ning SM, Lee MJ, Fukuto J M, Gapac, JM, and et al.: Modulation of rat hepatic microsomal monooxygenase enzymes and cytotoxicity by diallyl sulfide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 108: 342-354.
- Breitschopf K, Zeiher AM, and Dimmeler, S. Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism. *FEBS Lett* 2001; 493: 21-25.
- Carlos TM, Harlan JM.: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101.
- Chavakis E, Dernbach E, Hermann C, Mondorf UF, Zeiher AM, and Dimmeler

- S. Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Circulation* 2001; 103: 2102-2107.
- Chen HW, Tsai CE, Yung JJ, Liu CT, Kuo WW, and Lii CK. The combined effects of garlic oil and fish oil on the drug metabolism and antioxidation systems of rats. *Brit J Nutri* 2001 89, 189-200.
- Chen HW, Yang JJ, Tsai CW, Wu JJ, Sheen LY, Ou CC, and Lii CK. Dietary fat and garlic oil independently regulate hepatic cytochrome p(450) 2B1 and the placental form of glutathione S-transferase expression in rats. *J Nutr* 2001; 131: 1438-1443.
- Chen H, Li D, Chen J, Roberts GJ, Saldeen T, and Mehta JL. EPA and DHA attenuate ox-LDL-induced expression of adhesion molecules in human coronary artery endothelial cells via protein kinase B pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 769-775.
- Chen H, Li D, Saldeen T, and Mehta, JL. Transforming growth factor-beta(1) modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: role of LOX-1. *Circ Res* 2001; 89: 1155-1160.
- Clubb FJ, Cerny JL, Deferrari DA, Butler-Aucoin MM, Willerson JT, and Buja LM. Development of atherosclerotic plaque with endothelial disruption in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit aortas. *Cardiovasc Pathol* 2001; 10: 1-11.
- Cox DA, and Cohen ML. Lysophosphatidylcholine stimulates phospholipase D in human coronary endothelial cells: role of PKC. *Am J Physiol* 1996; 271: H1706-1710.

- Deisher TA, Haddix TL, Montgomery KF, Pohlman TH, Kaushansky K, and Harlan JM. The role of protein kinase C in the induction of VCAM-1 expression on human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett* 1993; 331: 285-290.
- Diaz MN, Frei B, Vita JA, and Keaney JF, Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 408-416.
- Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 262-267.
- Du X L, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, and Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 2001; 108: 1341-1348.
- Durum SK, and Oppenheim JJ. (1989) Macrophage-derived mediators: interleukin-1, tumor necrosis factor, interleukin-6, interferon and related cytokines. In *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed. (Lancaster, CA, Raven Press), pp. 639-661.
- Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, and Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986; 137: 245-254.
- Dusting GJ, Fennessy P, Yin ZL, and Gurevich V. Nitric oxide in atherosclerosis: vascular protector or villain? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1998; 25: S34-41.
- Efendy JL, Simmons DL, Campbell GR, and Campbell JH. The effect of the aged garlic extract, 'Kyolic', on the development of experimental

- atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1997; 132: 37-42.
- Fleischhauer AT, and Arab L. Garlic and cancer: a critical review of the epidemiologic literature. *J Nutr* 2001; 131: 1032S-1040S.
- Fraga CG, Leibovitz BE, and Tappel AL. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic Biol Med* 1988; 4: 155-161.
- Fragopoulou E, Antonopoulou S, Nomikos T, Demopoulos CA. Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1632: 90-99.
- Frenette PS, and Wagner DD. Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med* 1996; 334: 1526-1529.
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, and Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990; 265: 16737-16740.
- Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993; 14: 506-512.
- Geng Z, Rong Y, and Lau BH. S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 345-350.
- Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981; 103: 181-190.
- Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981;

103: 181-190.

Giles D, and Wei H. Effect of structurally related flavones/isoflavones on hydrogen peroxide production and oxidative DNA damage in phorbol ester-stimulated HL-60 cells. *Nutr Cancer* 1997; 29: 77-82.

Guretzki HJ, Gerbitz KD, Olgemoller B, and Schleicher E. Atherogenic levels of low density lipoprotein alter the permeability and composition of the endothelial barrier. *Atherosclerosis* 1994; 107: 15-24.

Haber D, Siess MH, Canivenc-Lavier MC, Le Bon AM, and Suschetet M. Differential effects of dietary diallyl sulfide and diallyl disulfide on rat intestinal and hepatic drug-metabolizing enzymes. *J Toxicol Environ Health* 1995; 44: 423-434.

Halevy D, Thiery J, Nagel D, Arnold S, Erdmann E, Hofling B, Cremer P, and Seidel D. Increased oxidation of LDL in patients with coronary artery disease is independent from dietary vitamins E and C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1432-1437.

Helen A, Krishnakumar K, Vijayammal PL, and Augusti KT. A comparative study of antioxidants S-allyl cysteine sulfoxide and vitamin E on the damages induced by nicotine in rats. *Pharmacology* 2003; 67: 113-117.

Ho SE, Ide N, and Lau BH. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* 2001; 8: 39-46.

Holvoet P, and Collen D. Lipid lowering and enhancement of fibrinolysis with niacin. *Circulation* 1995; 92: 698-699.

Ide N, and Lau BH. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kappa b activation. *J Nutr* 2001; 131:



1020S-1026S.

- Ide N, Nelson AB, and Lau BH. Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu(2+)-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med* 1997; 63: 263-264.
- Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, and Cybulsky MI. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 1999; 85: 199-207.
- Ippoushi K, Itou H, Azuma K, and Higashio H. Effect of naturally occurring organosulfur compounds on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Life Sci* 2002; 71: 411-419.
- Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circulation Research* 2000; 87: 178-183.
- Kamiya K, Tanaka Y, Endang H, Umar M, and Satake T. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 5843-5848.
- Kerry NL, and Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 1997; 135: 93-102.
- Khalid A, Peterson M, and Slivka A. Secretin-stimulated magnetic resonance pancreaticogram to assess pancreatic duct outflow obstruction in evaluation of idiopathic acute recurrent pancreatitis: a pilot study. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1475-1481.

- Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, and Medford RM. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 1262-1270.
- Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG, Chung HT, Billiar T. R, and Kim YM. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 747-756.
- Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 947: 199-205; discussion 205-196.
- Koch HP, and Lawson LD. (1996) *Garlic: Science and Therapeutic Application of Allium sativum L and Related Species*, 2nd edn (Baltimore, MD, Williams & Wilkins).
- Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, and Henry PD. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990; 344: 160-162.
- Kuzuya M, Naito M, Funaki C, Hayashi T, Asai K, and Kuzuya F. Lipid peroxide and transition metals are required for the toxicity of oxidized low density lipoprotein to cultured endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1096: 155-161.
- Lai HH, and Yen GC. Inhibitory effect of isoflavones on peroxynitrite-mediated low-density lipoprotein oxidation. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66:

22-28.

- Lau BHS, Lam F, and Wang-Cheng R. Effects of an odor-modified garlic preparation on blood lipids. *Nutr Res* 1987; 7: 139-149.
- Li DY, Chen HJ, and Mehta JL. Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation. *Cardiovasc Res* 2001; 52: 130-135.
- Li D, and Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2000; 101: 2889-2895.
- Li D, Chen H, Mhatre A, Romeo F, Saldeen T, and Mehta JL. Statins inhibits ox-LDL-induced expression of adhesion molecules and monocyte adhesion to human coronary endothelial cells: role of mitogen-activated proteins kinase and NF- $\kappa$ B. *Circulation* 2000; 102: II -251.
- Li D, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2000; 101: 2889-2895.
- Li, DY, Chen HJ, and Mehta JL. Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation. *Cardiovasc Res* 2001; 52: 130-135.
- Liu CT, Chen HW, Sheen LY, Kung YL, Chen PCH, and Lii CK. Effect of garlic oil on hepatic arachidonic acid content and immune response in rats. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 4642-4647.

- Liu L, and Yeh YY. Inhibition of cholesterol biosynthesis by organosulfur compounds derived from garlic. *Lipids* 2000; 35: 197-203.
- Liu L, and Yeh YY. Water-soluble organosulfur compounds of garlic inhibit fatty acid and triglyceride syntheses in cultured rat hepatocytes. *Lipids* 2001; 36: 395-400.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 93: 265-275.
- Luscher TF, and Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995; 118: Suppl, S81-90.
- Makondo K, Kimura K, Kitamura T, Yamaji D, Dong Jung B, Shibata H, and Saito M. Hepatocyte growth factor/scatter factor suppresses TNF-alpha-induced E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 9-15.
- Manka DR, Wiegman P, Din S, Sanders JM, Green SA, Gimple LW, Ragosta M, Powers ER, Ley K, and Sarembock IJ. Arterial injury increases expression of inflammatory adhesion molecules in the carotid arteries of apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res* 1999; 36: 372-378.
- Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, and Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988; 27: 8706-8711.
- Masella R, Giovannini C, Vari R, Di Benedetto R, Coni E, Volpe R, Fraone N, and Bucci A. Effects of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients. *Lipids* 2001; 36: 1195-1202.

- Matsunaga T, Nakajima T, Sonoda M, Koyama I, Kawai S, Inoue I, Katayama S, Hirano K, Hokari S, and Komoda T. Modulation of reactive oxygen species in endothelial cells by peroxyxynitrite-treated lipoproteins. *J Biochem* 2001; 130: 285-293.
- Morcos NC. Modulation of lipid profile by fish oil and garlic combination. *J Natl Med Assoc* 1997; 89: 673-678.
- Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V, and Moncada S. Nitric oxide and peroxyxynitrite exert distinct effects on mitochondria respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 1996; 314: 877-880.
- Munday R, Munday J, and Munday C. Comparative effects of mono-, di-, tri-, and tetrasulfides derived from plants of the Allium family: redox cycling in vitro and hemolytic activity and Phase 2 enzyme induction in vivo. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1200-1211.
- Nachtigal P, Semecky V, Kopecky M, Gojova A, Solichova D, Zdansky P, and Zadak Z. Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract* 2004; 200: 219-229.
- Noble RP. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J Lipid Res* 1968; 9: 693-700.
- Noursargh S, and Williams TJ. (1990) The endothelium: an introduction to current research. In, J. B. Warren, ed. (New York, Wiley-Liss), pp. 171-186.
- Ohkawa S, Yoneyama T, Shimoi K, Takita T, Maruyama Y, and Kumagai H. Pro-oxidative effect of alpha-tocopherol in the oxidation of LDL isolated

from co-antioxidant-depleted non-diabetic hemodialysis patients.

*Atherosclerosis* 2004; 176: 411-418.

Peng Q, Buz'Zard AR, and Lau BH. Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid-beta peptide-induced apoptosis in vitro. *Med Sci Monit* 2002; 8: BR328-337.

Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, and Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 1992; 339: 1183-1186.

Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Hallak H, Kindt E, Chen J, Rosebury WS, Anderson MK, Kuipers PJ, Ryan MJ. Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma : local collagen loss as a prerequisite of plaque rupture. *Circ Res* 2000; 86: 101-108.

Roebuck KA, Rahman A, Lakshminarayanan V, Janakidevi K, and Malik AB. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tumor necrosis factor-alpha activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. *J Biol Chem* 1995; 270: 18966-18974.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.

Sano M, Motchnik PA, and Tappel AL. Halogenated hydrocarbon and hydroperoxide-induced peroxidation in rat tissue slices. *J Free Radic Biol Med* 1986; 2: 41-48.

Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, and Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 1993; 88: 782-784.

- Sen CK, and Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* 1996; 10: 709-720.
- Sendle A, Elbl G, Steinke B, Redl K, Breu W, and Wagner H. Comparative pharmacological investigations of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Planta Med* 1992; 58: 1-7.
- Sethi S, Ziouzenkova O, Ni H, Wagner DD, Plutzky J, and Mayadas TN. Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leukocyte-endothelial interactions through activation of PPAR alpha. *Blood* 2002; 100: 1340-1346.
- Sheen LY, Chen HW, Kung YL, Liu CT, and Lii CK. Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high- and low-fat diets. *Nutr Cancer* 1999; 35: 160-166.
- Sheu F, Lai HH, and Yen GC. Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 1767-1772.
- Shirin H, Pinto JT, Kawabata Y, Soh JW, Delohery T, Moss SF, Murty V, Rivlin RS, Holt PR, and Weinstein IB. Antiproliferative effects of S-allylmercaptocysteine on colon cancer cells when tested alone or in combination with sulindac sulfide. *Cancer Res* 2001; 61: 725-731.
- Songyang Z, Baltimore D, Cantley LC, Kaplan DR, and Franke TF. Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 11345-11350.
- Sparnins VL, Barany G, and Wattenberg LW. Effects of organosulfur compounds from garlic and onions on benzo[a]pyrene-induced neoplasia and glutathione

- S-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis* 1988; 9: 131-134.
- Srivastava KC, and Tyagi OD. Effects of a garlic-derived principle (ajoene) on aggregation and arachidonic acid metabolism in human blood platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993; 49: 587-595.
- Steinberg D, Carew TE, Fielding C, Fogelman AM, Mahley RW, Sniderman AD, and Zilversmit DB. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* 1989a;80: 719-723.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, and Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989b; 320: 915-924.
- Steiner M, and Lin RS. Changes in platelet function and susceptibility of lipoproteins to oxidation associated with administration of aged garlic extract. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 904-908.
- Sumiyoshi H. (1997)[New pharmacological activities of garlic and its constituents]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 110 Suppl 1, 93P-97P.
- Sumiyoshi H, and Wargovich MJ. Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice by naturally occurring organosulfur compounds. *Cancer Res* 1990; 50: 5084-5087.
- Takei A, Huang Y, and Lopes-Virella MF. Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. *Atherosclerosis* 2001; 154: 79-86.
- Torreilles F, Salman-Tabcheh S, Guerin M, and Torreilles J. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 30:



153-163.

- Tribble DL, Thiel PM, van den Berg JJ, and Krauss RM. Differing alpha-tocopherol oxidative lability and ascorbic acid sparing effects in buoyant and dense LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 2025-2031.
- Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, and Smart EJ. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem* 2000; 275: 11278-83.
- Ungvari Z, Csiszar A, Bagi Z, and Koller A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced coronary dilation in hyperhomocysteinemia: morphological and functional evidence for increased peroxynitrite formation. *Am J Pathol* 2002; 161: 145-153.
- Vanderhoek JY, Makheja AN, and Bailey JM. Inhibition of fatty acid oxygenases by onion and garlic oils. Evidence for the mechanism by which these oils inhibit platelet aggregation. *Biochem Pharmacol* 1980; 29: 3169-3173.
- Vora DK, Fang ZT, Liva SM, Tyner TR, Parhami F, Watson AD, Drake TA, Territo, MC, and Berliner JA. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ Res* 1997; 80: 810-818.
- Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, and Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods*. 1995; 178: 89-97.
- Wan CP, Myung E, and Lau BH. An automated micro-fluorometric assay for monitoring oxidative burst activity of phagocytes. *J Immunol Methods* 1993;

159: 131-138.

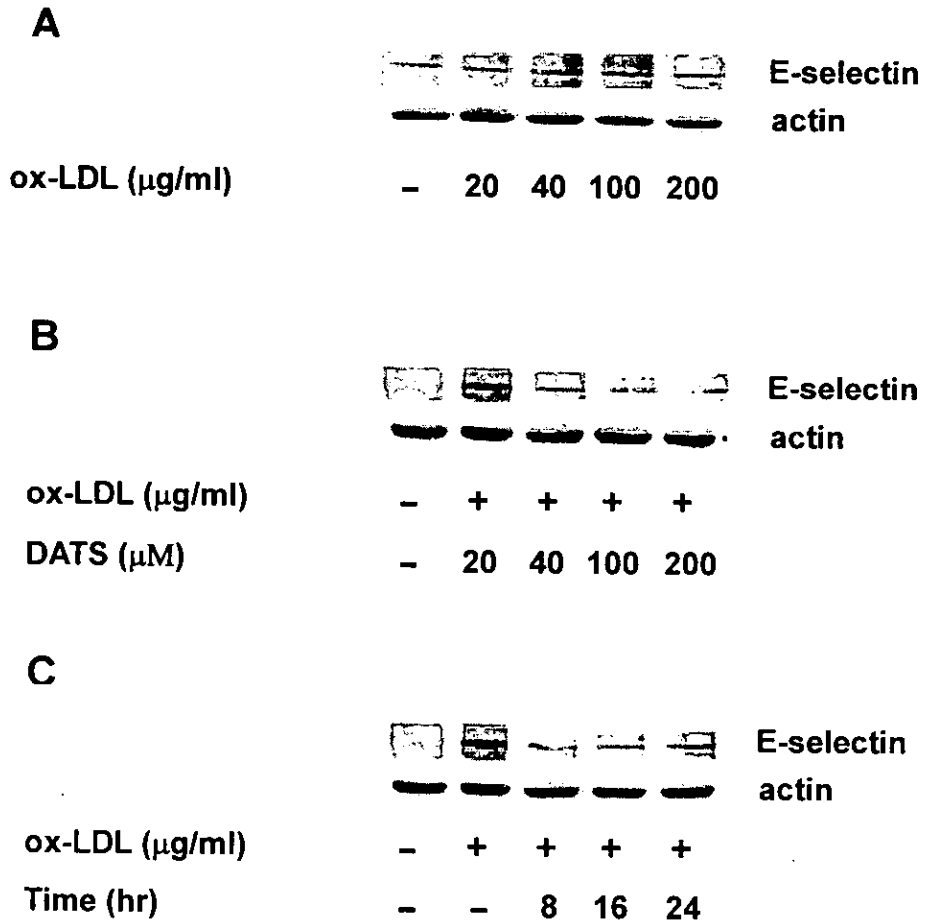
- Wang EJ, Li Y, Lin M, Chen L, Stein AP, Reuhl KR, and Yang CS. Protective effects of garlic and related organosulfur compounds on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 136: 146-154.
- Wertheimer SJ, Myers CL, Wallace RW, and Parks TP. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* 1992; 267: 12030-12035.
- Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Kuo WW, Tsai SJ, and Lii CK. Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 378-383.
- Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Tsai SJ, and Lii CK. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 563-569.
- Yang CS, Smith TJ, and Hong JY. Cytochrome P-450 enzymes as targets for chemoprevention against chemical carcinogenesis and toxicity: opportunities and limitations. *Cancer Res* 1994; 54: 1982s-1986s.
- Yeh YY, and Liu L. Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. *J Nutr* 2001; 131: 989S-993S.
- Yin MC, Hwang SW, and Chan KC. Nonenzymatic antioxidation activity of four organosulfur compounds derived from garlic. *J Agric Food Chem* 2002; 50:

6143-6147.

Yu TH, Wu CM, and Chen SY. Effects of pH adjustment and heat treatment on the stability and the formation of volatile compounds of garlic. *J Agric Food Chem* 1989; 37: 730-734.

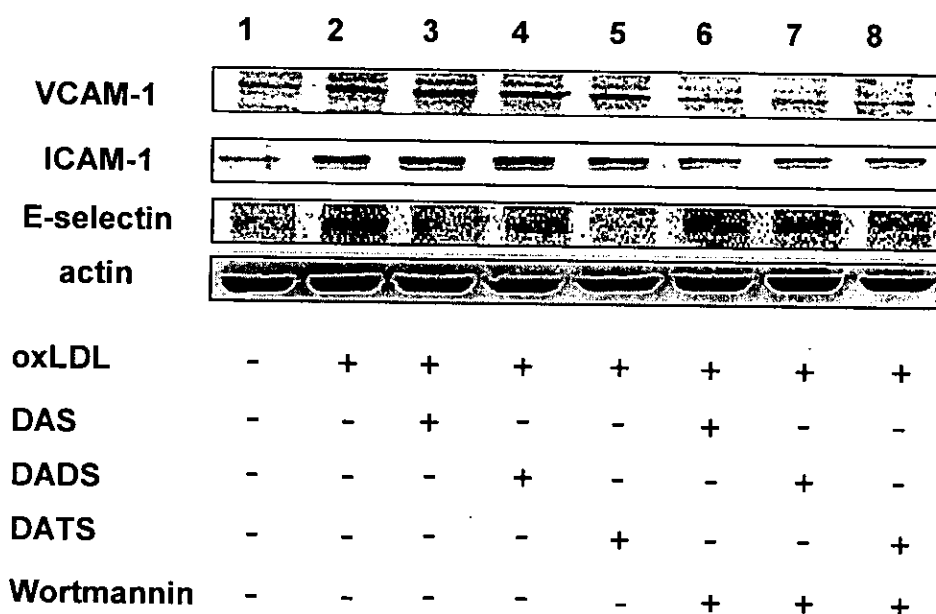
Zapolska-Downar D, Siennicka A, Kaczmarczyk M, Kolodziej B, and Naruszewicz M. Simvastatin modulates TNFalpha-induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Sci* 2004; 75: 1287-1302.

圖、表



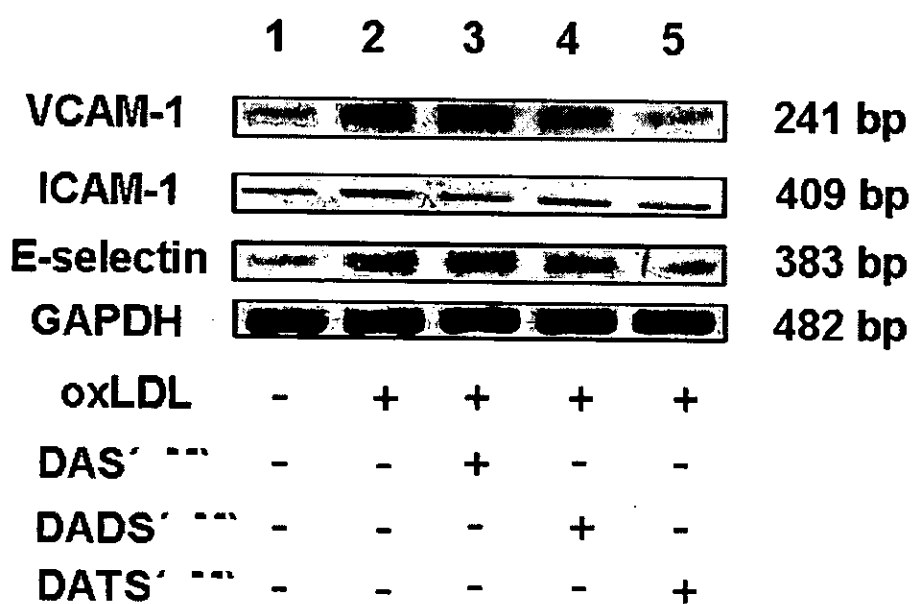
圖一、ox-LDL劑量抑制效應(A)或DATS對ox-LDL抑制HUVEC內皮細胞E-selectin表現之劑量(B)與時間(C)效應

HUVECs 分別以 50-200 µM DATS 預處理 16 小時或以 100 µM DATS 預處理 8-24 小時，再以 ox-LDL 40 µg/ml 處理 24 小時，收集細胞蛋白質，進行免疫西方墨點法分析。



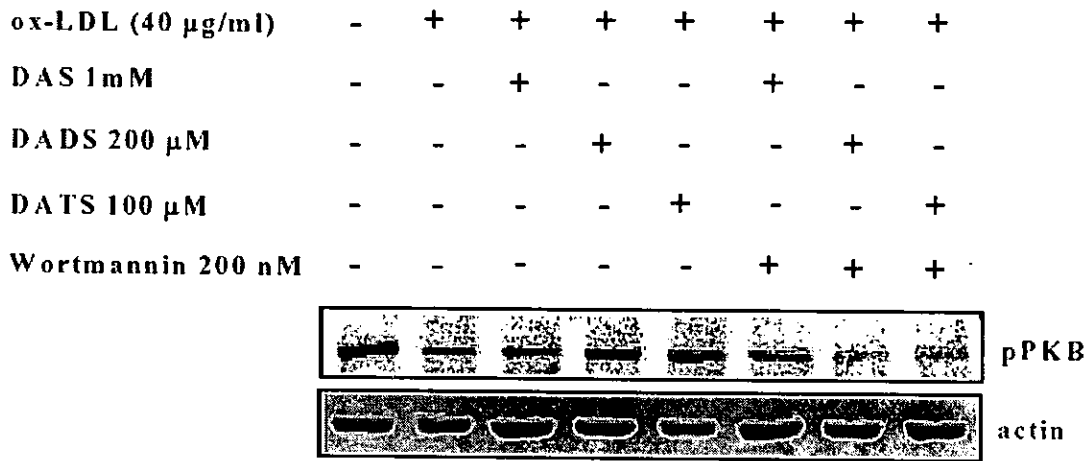
圖二、大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 誘發 HUVECs 內皮細胞黏附分子蛋白質表現之影響

HUVECs 分別以 1 mM DAS、200  $\mu$ M DADS 或 100  $\mu$ M DATS 在有或無 200 nM wortmannin 存在下預處理 16 小時，加入 40  $\mu$ g/ml ox-LDL 再處理 24 小時，收取細胞蛋白質，以 Western blot 分析 VCAM-1, ICAM-1 及 E-selectin 蛋白質表現。



圖三、大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 誘發 HUVECs 內皮細胞黏附分子 mRNA 表現之影響

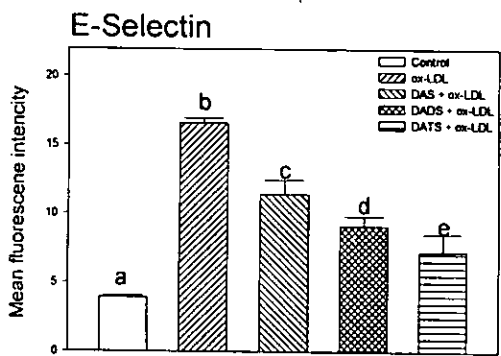
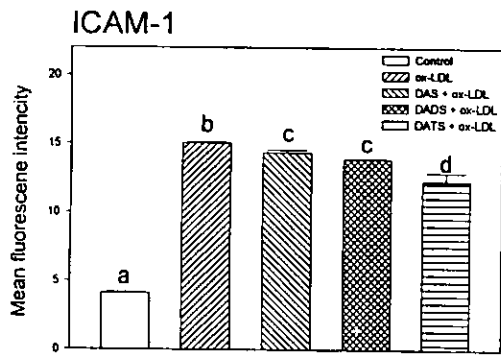
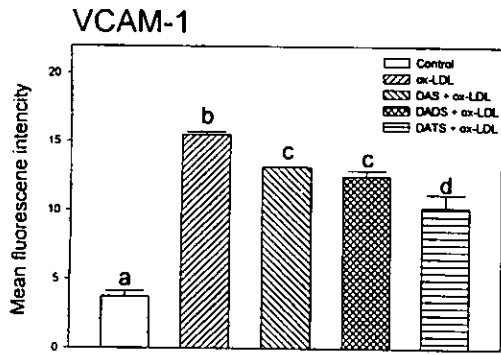
HUVECs 分別以 1 mM DAS、200  $\mu$ M DADS 及 100  $\mu$ M DATS 預處理 16 小時後，加入 40  $\mu$ g/ml ox-LDL 再處理 24 小時，收取細胞 RNA，以 RT-PCR 分析 VCAM-1, ICAM-1 及 E-selectin mRNA 表現。



圖五、大蒜有機硫化物 DAS 、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 抑制 HUVECs

內皮細胞 PKB 磷酸化之影響

HUVECs 分別以 1 mM DAS、200  $\mu$ M DADS 或 100  $\mu$ M DATS 在有或無 200 nM wortmannin 存在下預處理 16 小時，加入 40  $\mu$ g/ml ox-LDL 再處理 24 小時，收取細胞蛋白質，以 Western blot 分析 PKB 磷酸化表現。



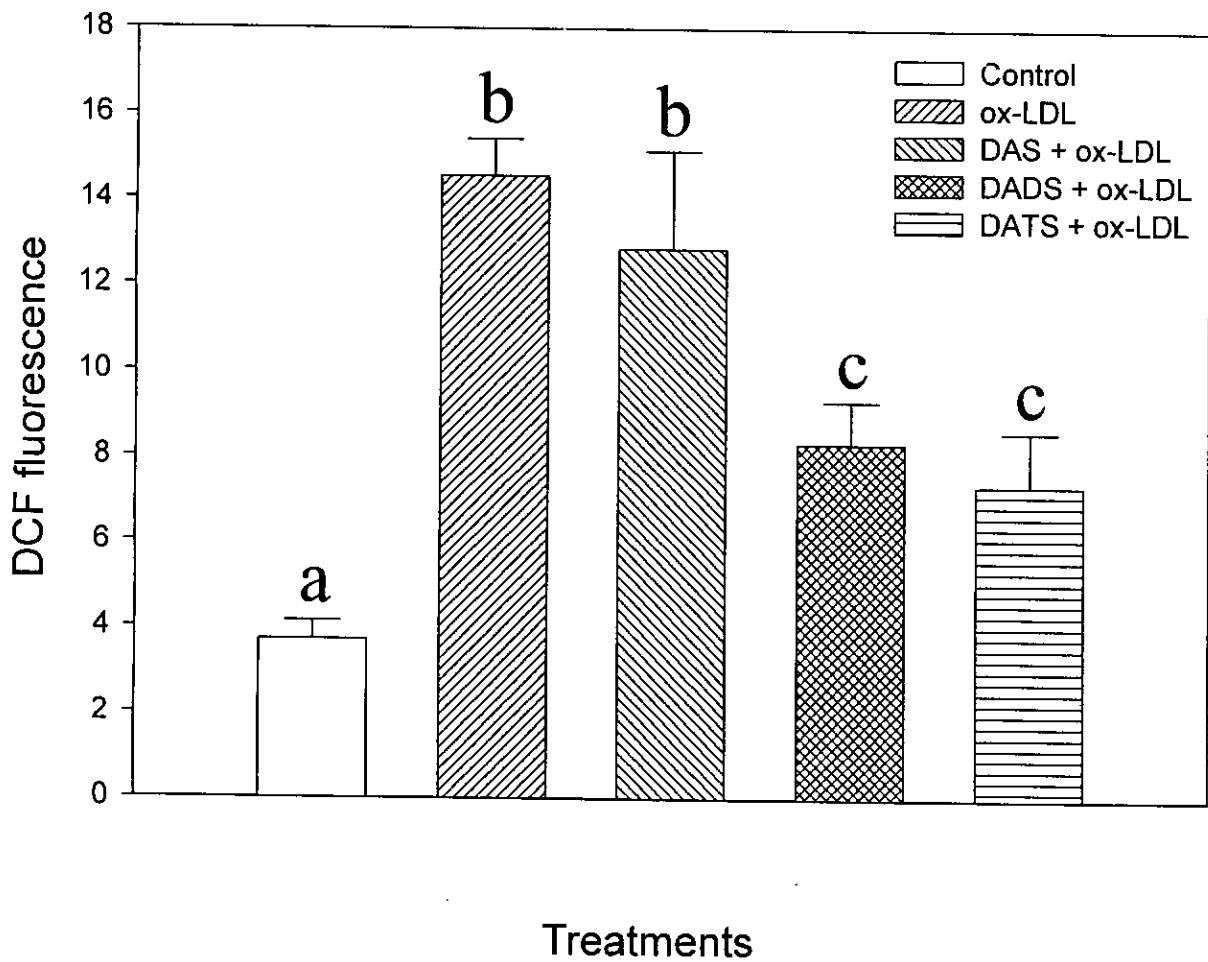
圖四、大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 誘發 HUVECs

內皮細胞表面黏附分子表現之影響



HUVECs 分別以之 1 mM DAS、200  $\mu$ M DADS 或 100  $\mu$ M DATS 預處理 16 小時後，再以 40  $\mu$ g/ml ox-LDL 處理 24 小時，以 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA 切離細胞，加入 100  $\mu$ l fluorescence isothiocyanate (FITC) 標定之 CD54 (ICAM-1)、CD62 (E-selectin) 或 CD106 (VCAM-1) 單株抗體，以流式細胞儀分析黏附分子的表現。數據以 Means  $\pm$  SE 表示 (n=3)。

a-e：未見相同字母者表示各組間具有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

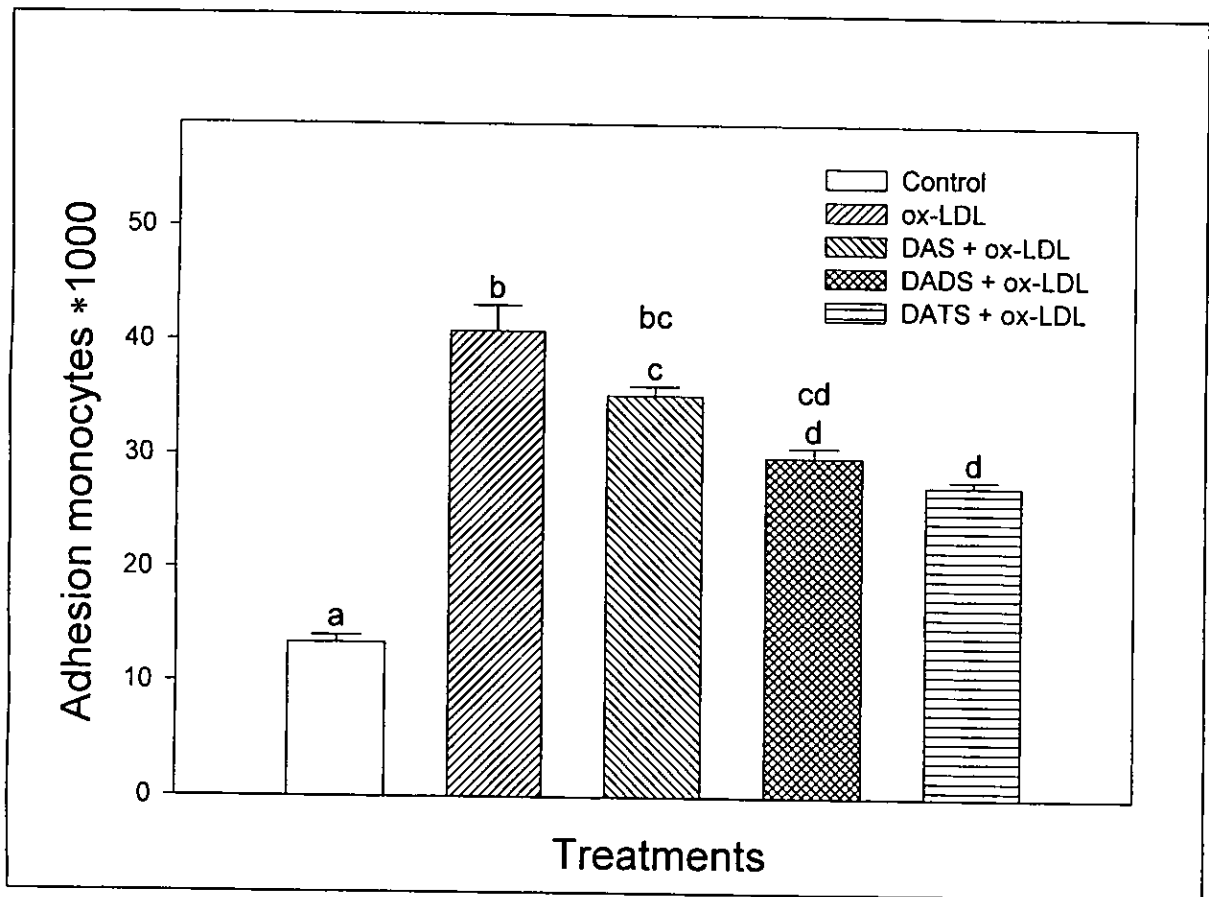


圖六、大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 誘發 HUVECs 內皮細胞胞內過氧化物生成的抑制效應

HUVECs 分別以 1 mM DAS、200  $\mu$ M DADS 及 100  $\mu$ M DATS 預處理 16 小時，加入 40  $\mu$ g/ml ox-LDL 再處理 24 小時，加入 DCF-DA，反應 45 分鐘，收取細胞，以流式細胞儀分析胞內過氧

化物濃度。本圖以僅給予 ox-LDL 處理之細胞與不同大蒜硫成分處理組細胞之螢光表現強度比值表示。數據以 Means  $\pm$  SE 表示(n=3)。

a-c：未見相同字母者表示各組組間具有顯著差異( $P < 0.001$ )。



圖七、大蒜有機硫化物 DAS、DADS 及 DATS 對 ox-LDL 誘發 HUVECs

內皮細胞與 HL-60 單核球細胞黏著之影響

給予 HUVECs 內皮細胞處理不同濃度之 DAS、DADS 及 DATS (1 mM、200  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M)16 小時後，再以 40  $\mu$ g/ml ox-LDL 處理 24 小時後，使用 human myelogenous leukemic 細胞株- HL-60 與 HUVECs 進行黏著分析。將已標定 10  $\mu$ M 螢光物

2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM, Sigma-Aldrich)HL-60 在 37°C 下培養一小時，之後將 HL-60 ( $4 \times 10^5$  cells/ml) 與 HUVEC 在 37°C 下共同培養 30 分鐘後，以螢光光度計在 excitation 485 nm 及 emission 530 nm 下測量細胞螢光值。數據以 Means  $\pm$  SE 表示(n=3)。

a-d：未見相同字母者表示各組組間具有顯著差異( $P < 0.05$ )