

計劃編號：DOH90-TD-1025

行政院衛生署九十年度科技研究發展計劃
洛神花水萃取物抑制心血管病變之研究(一)

研究報告

執行機構：中山醫學大學生化所

計劃主持人：王朝鐘

研究人員：陳滄澤

執行期間：89年8月1日至90年7月31日

本研究報告僅供參考，不代表本屬意見

目 錄

一、摘要 (中文).....	2
二、摘要 (英文).....	4
三、前言.....	5
四、材料與方法.....	8
伍、結果.....	12
六、討論.....	15
七、結論與建議.....	17
八、參考文獻.....	18
九、圖表.....	23

摘 要

洛神花(*Hibiscus Sabdariffa* Linnaeus) 為錦葵科(Malvaceae)植物，原產熱帶地區，分部於印度，馬來西亞及東南亞，台灣東部及南部也盛產。其花成份包含有機酸(如檸檬酸、壞血酸、原兒茶酸等)；糖分主要為半乳糖，葡萄糖及果糖；Pectin 及類黃酮素，黃酮素包括有 hibiscetin, gossypetin, quercetin。國外之研究，在體外試驗顯示其水萃取物有 anti-spasmodic, 降膽固醇，降血壓及抗菌作用。其成份 flavonoids 具有抗氧化及抑制心血管疾病；原兒茶酸(protocatechuic acid; PCA) 可抑制化學致癌物誘導之癌化，本研究室也顯示洛神花中之 PCA 及花青素有強的抗氧化作用，我們也發現 PCA 亦有抗 TPA 促腫瘤作用及促進 HL-60 凋謝死亡之作用。

本研究計畫顯示洛神花水萃取物具有抑制 LDL 氧化作用，抑制 LDL 中 apo-B 的 fragmentation 及抑制 LDL 中膽固醇之 degeneration，在餵食 SD 大白鼠 12 週，結果顯示洛神花水萃取物(1%, 2%)具顯著抑制總膽固醇及低密度脂蛋白中膽固醇，以高果糖(30%) 餵食大白鼠(6 個月) 產生之高血脂症，1% 及 2% 洛神花水萃取物，能夠抑制 triglycerides，但對 HDL 及 LDL 影響不大。0.5% 及 1% 洛神花水萃取物有顯著抑制 1.3% 膽固醇及 3% lard oil 餵食 10 週之兔子之 triglycerides 及膽固醇，並能增加 HDL 及降低 LDL，進一步以病理觀察也顯示洛神花水萃取物有抑制 atherosclerosis lesion 之作用。長期餵食洛神花水萃取物初步也顯示兔子及大白鼠之血清肝功能、腎功能等生化值無變化，顯示洛神花水萃取物無毒性可發展為抑制心血管疾病之物質。

關鍵詞: 洛神花，低密度脂蛋白氧化，三酸甘油脂，膽固醇，動脈硬化

Abstract

Hibiscus sabdariffa Linne (Malvaceae), an attractive plant believed to be native to Africa is cultivated in Sudan and in eastern and Taiwan. It has been reported to contain a number of flavonoids including gossypetin, hibiscetin and quercetin. In vitro experimental studies have shown that administration of the aqueous extract produces anti-inflammation, hypotensive and hypocholesterolemic. In spite of the wide use of *H. sabdariffa* extract (HSE) in folk medicine for treatment of various diseases, there are no reports in the literature on their anti-atherosclerosis activity. This study was to evaluate the effects of an aqueous extract obtained from *Hibiscus sabdariffa* (HSE) on the susceptibility of LDL to oxidation and on plasma lipid in rabbits and rats affected by experimental atherosclerosis induced by the intake of high levels of saturated fat and cholesterol. We have found that HSE inhibit Cu^{++} -mediated LDL-oxidation, apo-B fragmentation and cholesterol degeneration in LDL. Furthermore, we found that HSE inhibit plasma triglyceride, cholesterol and atherosclerotic lesions in cholesterol fed rabbit and rats. HSE also inhibit plasma triglyceride in high fructose fed rats. These results indicated that HSE possesses potential as a preventive agent against cardiovascular disease.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* extract (HSE), LDL oxidation, hypolipidemia, atherosclerosis.

前 言

洛神花(*Hibiscus Sabdariffa* Linnaeus) 為錦葵科(Malvaceae)植物，原產熱帶地區，分部於印度，馬來西亞及東南亞，台灣東部及南部也盛產。其花成份包含有機酸(如檸檬酸、壞血酸、原兒茶酸等)(1, 2)；醣分主要為半乳糖，葡萄糖及果糖(3,4)；Pectin 及類黃酮素(5)，黃酮素包括有 hibiscetin, gossypetin, quercetin。國外之研究，在體外試驗顯示其水萃取物有 anti-spasmodic(6)，降膽固醇(7)，降血壓(8)及抗菌作用(9)。其成份 flavonoids 具有抗氧化及抑制心血管疾病(10,11)；原兒茶酸(protocatechuic acid; PCA)可抑制化學致癌物誘導之癌化(12-16)，本研究室也顯示洛神花中之 PCA 及花青素有強的抗氧化作用(17, 18)，我們也發現 PCA 亦有抗 TPA 促腫瘤作用(19)及促進 HL-60 凋謝死亡之作用(20)。

血脂肪 plasma lipids 包含膽固醇(cholesterol)及三酸甘油脂(triglyceride)。cholesterol 及 triglyceride 不能溶解於水性血漿，故需與血漿蛋白結合形成親水性的脂蛋白(lipoprotein)，才能溶解於血漿，隨著血液循環，流至身體各器官組織中。我們將脂蛋白依密度的不同分成四種，chylomicron、very-low density lipoprotein(VLDL)、low density lipoprotein(LDL)及 high density lipoprotein(HDL)，其中 high density lipoprotein 又可細分成 HDL₂ 及 HDL₃。不同的脂蛋白上所含的脂肪及脂蛋白元(apolipoprotein)組成均不相同。

低密度脂蛋白含有大量的 cholesterol (佔 plasma cholesterol 的 60-70%)，且體積小，所以容易滲入血管壁內，為形成粥狀動脈硬化(atherosclerosis)的重要因子，故血漿中 LDL 濃度愈高，罹患粥狀動脈

硬化的危險性就愈高。高密度脂蛋白含大量的磷脂類 (phospholipids) 及少量的 cholesterol (佔血漿 cholesterol 的 20-30%)，其功能為自血管壁帶走滲入的 cholesterol 具有清潔血管壁的作用，故與血管中 HDL 濃度愈高，表示清除血管壁 cholesterol 的能力愈強，因而罹患粥狀動脈硬化的機率則愈低。

血清中 60-70% 的 cholesterol 是由 LDL 所攜帶，所以當 LDL 的合成過多或代謝太慢時，將導致血中 cholesterol 的濃度過高，造成粥狀動脈硬化。由於血中 cholesterol 濃度主要受細胞表面 LDL 受體的管制，而食物中的脂肪酸種類、膽固醇含量、荷爾蒙及藥物等物質，會改變肝細胞表面 LDL 受體的數目，進而影響血中 cholesterol 濃度以及粥狀動脈硬化的程度。

脂蛋白中的 LDL 及 HDL 和粥狀動脈硬化有很強的相關性，動脈硬化最早期的徵 *subendothelial space* 聚集 cholesterol ester rich 的 foam cell，而這些 cholesterol ester 則來自被 modified 的 LDL，當 macrophage 或 monocyte 吞嚥大量的被修飾過的氧化型 LDL 後，即形成 foam cell，macrophage 對於 native 含 B,E-apolipoprotein 的 LDL 並沒有吞嚥效果，而經 chemically modified negative charged LDL(如 acetyl-LDL)則可快速被 macrophage 上的 receptor 辨識，並由 macrophage 吞嚥。

Atherosclerosis 是一種複雜多樣性的過程，脂蛋白的氧化在 atherosclerosis 之致病佔有重要角色，在許多研究中被認為是一種 atherosclerosis agent。從 atherosclerosis lesions 也發現 LDL 有氧化傷害(21, 22)，氧化型 LDL 發生於 endothelial cells, monocyte/macrophages 及 smooth muscle cells (23)，在 macrophage 之 ox-LDL 能夠結合 LDL-receptor 再經由下列四種機轉成為一種 proatherogenic。① 加強

macrophage 作用，造成 cholesteryl ester 增加及 foam-cell 產生；② 促使 circulating monocytes and T-lymphocytes 產生；③ cytotoxic 作用；④ 改變血小板 aggregation (24)。

許多 antioxidants，已被認為具有降低 LDL 的氧化作用及 atherosclerosis，如 curcumin (25)及 baicalein (26)，也抑制 vascular smooth muscle cell 的增生及促進 apoptosis (27)，洛神花含有豐富的 flavonoides (如 quercetin，gossypetin，hibiscetin)及原兒茶酸 (protocatechuic acid)，這些成份都以具有抗氧化、防癌、抑制心血管病變之報告 (7-17)。因此綜合這些成份之洛神花萃取物其效果在抗心血管疾病應無疑問。本研究觀察洛神花水萃取物對高膽固醇或高果糖餵食之大白鼠之降血脂作用即對高脂肪餵食兔子之心血管傷害之影響。

材 料 與 方 法

脂蛋白製備

取健康自願者的血清，靜置一段時間後，3000 rpm 離心十分鐘，取上清液既是血清。然後用得到的血清來製備 LDL(28-30)。

取血清 2.0 ml 加入 0.15 M NaCl 及 0.3 ml EDTA (PH 7.4) 放入 Beckman TL-100 桌上型超高速離心機，離心 90,000 rpm，10°C，10 分鐘，除去上清液，再加入 0.15 M NaCl 及 0.3 ml EDTA (PH 7.4)，離心 90,000 rpm，10°C，3.5 hrs，上層液即為 LDL。

LDL 製備後的處理，LDL 純化過程中含有 EDTA 的藥劑，所以必須以透析法去除 LDL 裡的 EDTA (31,32)，我們用 column PD-10 (G-25 PD 10 Sephadex column; Pharmacia)，先以 25 ml PBS 通 PD-10 column，再加 2.5 ml sample (LDL)，然後再加 3.5 ml PBS，去除前 0.5 ml 收後 3 ml 即為去 EDTA 的 LDL。

LDL electrophoretic mobility 之分析

利用 Backman pargon lipo gel electrophoresis system (Backman analytic, Milan, Italy)，目的在測量脂蛋白的 electrophoretic mobility，取一片已製備好的 agarose gel，用濾紙吸取多餘的水份，架好 loading paper，每個 well 個 loading 5 μ l sample，靜置 5 分鐘，用濾紙小心放在 loading paper 上吸取多餘的 sample，將 loading paper 與濾紙一啟拿掉，取 gel 架在電泳槽上，加入適量的 buffer，以 100 V 通電 30 分

鐘，然後取出 gel 用專用夾固定好，放入固定槽固定 5 分鐘，取出烘乾約 20 分鐘，放入染色槽色 5 分鐘，脫色，烘乾。

TBARS 生成濃度分析

LDL 的脂質過氧化係根據 Yagi 氏等修飾之螢光測定法，藉著 thiobarbituric acid (TBA) 來測定 malondialdehyde (MDA) 的生成濃度。

實驗方法是在 LDL 加入不同濃度(0.5, 1.0, 2.0 mg/ml) 的洛神花水萃取物(HSE) 培養 37°C 一小時後，再加入 10 μ M CuSO₄ 或 nitroprusside 繼續在 37°C 培養 24 小時，然後各加入 25% TCA，以 10,000 rpm 在 10°C 離心 30 分鐘以去除沉澱，接著取上清液再加入 TBA 溶液，避光下在 90-95°C 加熱 40 分鐘，採用 Hitachi F2000 螢光比色計測定。根據 Bradford (33) 採用 1,1,3,3-tetramethoxyprpon 當作 standard，激發光波長 532 nm，發射光波長 600 nm 下測定。

Apo B fragmentation 分析

經 HSE 處理後之 LDL，以 3% SDS，10% glycerol 及 5% 2-mercaptoethanol 在 95°C 下作用 5 分鐘，使其變性，然後將其置於 SDS-PAGE (3-15% gradient)，在 48V 中電泳 150 分鐘，再以 Coomassie Brilliant blue R250 染色，可得 apo-B 之分解變化(34)。

LDL 中膽固醇分析

LDL 中之膽固醇分析係使用 MENAGENT Cholesterolo kit

(Mmenarini Co. Italy) 含 Cholesterol-esterase, Cholesterol oxidase 及 peroxidase 之溶液與 LDL 反應形成 chinoeimmine 以 500 nm 吸光度分析其濃度。

動物試驗

約 200 g 體重之 SD 大白鼠以 30% fructose 添加於飼料中，試驗組另添加 1% 或 2% HSE，餵食 6 個月每天飼料為 10g/100g 體重，另一試驗為以 3% lard oil 及 1.3% cholesterol 添加於飼料中，實驗組則添加 1% 或 2% HSE，餵食 12 週。

為了分析血管病變，進一步以 30 隻 New-Zealand Rabbit (2500 克重) 分為五組，每籠一隻，每天 150 g diet (控制組除外)，其餘三組以 95.7% chow, 3% lard 及 1.3% 膽固醇，飼養十週，可誘導產生 atherosclerosis process, HSE 試驗組則添加 0.5% 或 1% HSE, 十週後，動物禁食一夜，以 sodium pentothal (20 mg/kg) 麻醉後放血，血液收集入 EDTA-coated tubes，然後離心，一部份分析血脂肪，包括總脂質膽固醇、三酸甘油脂、HDL、LDL，另一部份分離 LDL，以 EM 及 TBARS 分析 ox-LDL。為分析 PCA 之毒性，血液生化值包括 AST、ALT、BUN、creatinine，也一併分析，做為肝功能、腎功能是否受 PCA 之影響。

Aortas 切取後浸入 3% glutaraldelye (0.1 mol/sodium cacodylate

buffer pH 7.4 及 0.01% calcium chloride) 固定，以 paraffin-包埋，以 hematoxylin and eosin，Masson-Goldner trichromic stain 及 Gieson's elastin stain 觀察 fatty streak，medial calcifications 及 fibrous plaque。

統計分析

實驗結果以 mean \pm S.D.表示，試驗組之比較利用無母數之 t test 分析或 ANOVA 分析其資料， $p < 0.05$ 表示具有統計意義。

結果

HSE 抑制 LDL 氧化作用

由圖一顯示以 0.5, 1.0 及 2.0 mg/ml 之 HSE 可抑制由 CuSO_4 (10 μM) mediated LDL electrophoretic mobility, 2.0 mg/ml 之 HSE 可完全抑制 CuSO_4 -mediated 之 electrophoretic mobility。由圖二顯示此種抑制作用，無論是預先處理 HSE 或 CuSO_4 先氧化 LDL 後在加入 HSE 均可有意義抑制 electrophoretic mobility 係因 LDL 氧化作用，相同的處理方法再進一步分析 TBARS 的生成，結果顯示於表一及表二，無論是預先處理 HSE (表一) 或 LDL 氧化後再加入 HSE (表二) 均顯示 HSE 可抑制 CuSO_4 -mediated 的 LDL 氧化作用在 1.0 及 2.0 mg/ml 之 HSE 處理下 TBARS 有意義的降低($p < 0.001$ 及 $p < 0.00001$)。

由於 LDL 的氧化作用，除了利用 electrophoretic mobility, lipid hydroperoxide (TBARS formation)外，也會造成 Apo B 的 fragmentation 及 LDL 中膽固醇的 degradation，圖三顯示以 CuSO_4 (10 μM) 處理 LDL 在 37°C 作用 4 小時，可造成 Apo B 分解 (圖三，第一行)，但經 0.1 及 0.5 mg/ml 的 HSE 處理則顯示此分解被抑制，圖四也顯示以 CuSO_4 (10 μM) 處理 LDL 12 小時，造成 LDL 中之膽固醇 degradation，而在加入 HSE 則抑制此作用，0.5 mg/ml HSE 處理顯示有意義($p < 0.01$) 的抑制 LDL 中膽固醇之 degradation。綜合以上結果顯示 HSE 確實有抑制 LDL 之氧化作用。

HSE 抑制血脂肪

以 1.3% 膽固醇及 3% lard oil 添加於兔子(New Zealand) 飼料中 10 週，實驗組則添加 0.5% 及 1% 之 HSE，10 週後結果顯示 HSE 有顯著抑制三酸甘油脂 ($p < 0.05$) (圖五)，膽固醇 ($p < 0.05$) (圖六) 及 LDL-cholesterol ($p < 0.05$, < 0.01) (圖六)，也顯示 LDL-cholesterol 與 HDL-cholesterol 之比例下降。另外也發現 HSE 可抑制二種不同方式誘導大白鼠血脂升高血脂作用，圖七顯示以 30% 果糖餵食六個月之 SD 大白鼠，其三酸甘油脂顯著增加，但有意義的被 1% 及 2% 之 HSE 抑制 ($p < 0.05$ 及 $p < 0.01$)，其 LDL-cholesterol 也被 2% HSE 降低 (圖七 D)，圖八顯示以 3% lard oil 及 1.3% cholesterol 添加於飼料中，餵食 12 週，結果顯示添加 1% 及 2% 的 HSE，有顯著降低總膽固醇 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)，LDL-cholesterol ($p < 0.01$) 及 risk ratio ($p < 0.05$, $p < 0.01$)，但沒有增加 HDL-cholesterol。但在餵食 20% HSE 隻老鼠中，HSE 本身增加鼠血清中之總膽固醇，其原因需進一步探討，所以 HSE 降膽固醇之作用在兔子之試驗中較明顯。

HSE 抑制 atherosclerotic lesion

以 1.3% cholesterol 及 3% lard oil 添加於兔子飼料中，餵食 10 週，結果顯示胸主動脈以 oil red 染色有顯著之 fatty streak (圖九)，主動脈弓以病理切片觀察顯示泡沫細胞形成、鈣化及平滑肌細胞移位 (migration) 之現象 (圖十)，均為 atherosclerotic lesions，在餵食過程中同時添加 0.5% 及 1% 之 HSE 上述的 lesions 有顯著的被抑制 (圖十)，因此 HSE 可抑制心血管病變。

HSE 之毒性分析

在餵食 10 週 1% HSE 的兔子，及餵食 2% HSE 6 個月之大白鼠，從病理切片上顯示，肝、腎、胰、肺等組織皆正常。其血清肝功能生化值(包括 ALT, AST, ALP)及腎功能生化值(包括 BUN, Creatin, Uric acid)均無顯著變化(表三, 四)，顯示 HSE 對二種動物之肝、腎、胰、肺等器官均無毒性。

討 論

在 *in vitro* 試驗中 HSE (0.5 mg/ml) 可抑制 Cu^{++} 促進 LDL 的 electrophoretic mobility，進一步分析其 TBARS，顯示 HSE 抑制 LDL 的氧化作用，一般而言，LDL 的氧化作用可造成 LDL 中 apo-B 能能被 alkoxy 及 peroxy radicals 作用產生 lipid peroxidation 造成分解(34) 及膽固醇的分解，在我們的數據中也顯示 HSE 確有抑制 LDL 的氧化在我們過去的研究中也顯示 HSE 中 protocatechuic acid (17) 及 anthocyanins (18) 具有抗氧化作用，而本試驗中之 HSE 中含有 1% protocatechuic acid 及 61% anthocyanins，因此 HSE 之抗 LDL 氧化，可能是 protocatechuic acid, anthocyanins 及其它 flavonoids (如 quercetin, gossypetin 及 hibiscetin) 之作用。LDL 的氧化能夠造成 monocyte 的細胞毒性，chemotactic effect，抑制 macrophage motility，同時可被吞噬形成 foam cell 促進 early stage atherogenesis (21-23)。

過去的研究顯示許多抗氧化劑，如 α -tocopherol，retinoids，carotenoids，curcumin (25) 及 baicalein (26) 能夠抑制 LDL 氧化，減少 atherogenesis。因此，HSE 之抑制 LDL 氧化可能是 protocatechuic acid, anthocyanins 及 flavonoids 之抗氧化能力。雖然 flavonoids 可以為 Cu^{++} 之 chelators，但 HSE 在預先處理及 LDL 氧化後處理效果一致，因此 flavonoids 做為 chelators 之影響不大。

高膽固醇，三酸甘油酯及 LDL 和 HDL 之變化已經被認為與粥狀動脈硬化有相當密切之關係(35, 36)，以 HSE 1% 及 2% 餵食於高果糖(30%) 6 個月之大白鼠，顯著抑制三酸甘油酯，但對膽固醇及脂蛋白之效果較不顯著，但以 HSE 添加以 3% lard oil 及 1.3% cholesterol 餵食之大白鼠 12 週，則顯示 HSE 抑制膽固醇及低密度脂蛋白膽固

醇，減少低密度脂蛋白與高密度脂蛋白之比值。因此，用不同機轉誘導大白鼠之高之血症，HSE 均有抑制血脂肪之作用，可能用抑制 atherosclerotic 之作用，為了進一步確認 HSE 可抑制 atherosclerosis，以 3% lard oil 及 1.3% cholesterol 餵食 New Zealand 兔子 10 週，顯示 HSE 可抑制血中三酸甘油脂，膽固醇及低密度脂蛋白，並很明顯的抑制 atherosclerotic lesions，包括 fatty streak，foam cell 產生，鈣化及平滑肌細胞移位，上述的現象都將造成 atherosclerosis 病變(37)。因此，HSE 確有抑制心血管疾病之功能。

HSE 為洛神花之水萃取物，含有 protocatechuic acid, anthocyanins 及 flavonoids (5)，這些成份都已被相繼報告為具有抗氧化之能力 (10-18)，因此 HSE 降血脂及抑制 atherosclerosis 之作用主要應為上述三種成份之抗氧化作用。本研究顯示 HSE 的作用為①抑制 LDL 氧化；降低膽固醇、三酸甘油脂，改變脂蛋白中之膽固醇；抑制 macrophage 形成 foam cell；抑制平滑肌細胞移位；及抑制血管 fatty streak 的產生。至於 HSE 如何抑制 atherosclerotic lesions，我們正進一步探討中。

結論與建議

本研究計劃結果確認洛神花水萃取物(HSE)具有預防心血管疾病之功能，其作用包括：① 抑制 LDL 氧化作用；② 抑制三酸甘油脂；③ 降膽固醇；④ 升高 HDL 膽固醇；⑤ 抑制 foam cell 產生；⑥ 抑制平滑肌細胞 migration 等。

因此本研究計劃建議將 HSE 推廣為預防心血管疾病之保健食品。

參 考 文 獻

1. Reaubourg, G. and Monceuse, R.H. (1940) The chemical botanical and pharmacological characteristics of the Karkade (rosella) *Hibiscus sabdariffa* (*grossypifolius*). *J. Pharm. Chem.*, 1, 292-305.
2. Kerharo, J. (1971) Senegal bisap (*Hibiscus sabdariffa* or Guinia sorrel or red sorrel) *Plant. Med. Phytoher.*, 5, 277-281.
3. El-Afry, M.M.F., Khafaga, E.R., El-Sayed, R., Koch, H., and Prinz, D. (1980) Stage of maturity and quality of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *Sabdariffa*) III. Mucilage, pectin and carbohydrates. *Angrew. Bot.*, 54, 301-309,.
4. El-Hamidi, A., Saleh, M. and Ahmed, S.S. (1966) *Hibiscus sabdariffa*. *J. Chem. U.S.A.*, 90, 127-130.
5. Koepfli, J.B. (1932) Chemical investigations of *Rauwolfia caffra*. *J. Amer. Chem. Soc.*, 54, 2412-2418.
6. Ali, M.B., Satih, W.M., Mohamed, A.H. and Homeida, A.M. (1991) Investigation of antispasmodic potential of *Hibiscus sabdariffa* calyces. *J. Ethnopharmacol.*, 31, 249-257.
7. El-Saadany, S.S., Sitohy, M.Z., Labib, S.M. and El-Marsy, R.A. (1991) Biochemical dynamics and hypocholestrolemic action of *Hibiscus sabdariffa*. *Nahrung.*, 35, 567-576.
8. Esselene, W.B. and Sammy, G.M. (1973) Roselle natural red colorant for foods. *Food Prod. Develop.*, 7, 80-82.
9. Leclere H. (1938) *Sida sabdariffa* (*Hibiscus sabdariffa*). *Presse. Med.*, 46, 1060.
10. Rankin, S.M., De Whalley, C.V., Hoult, R.S., Jessup, W., Wilkins, G.M., Collard, T. and Leake, D.S. (1993) The modification of low density lipoprotein by the flavonoids muricetin and gossypetin.

- Biochem. Pharmacol., 45, 67-75.
11. De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R., essup, W. and Leake, D.S. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1743-1750.
 12. Thanka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Yoshimi, N. and Mori, H. (1993) Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rat. *Cancer Res.*, 53, 2775-2779.
 13. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Okamoto, M., Mori, H. and Hara, A. (1994) Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and post-initiation phase. *Cancer Res.*, 54, 1359-2365.
 14. Kawamori, T., Thanka, T., Kojima, T., Suzui, M., Ohnishi, M. and Mori, H. (1994) Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn. J. Cancer Res.*, 54, 2359-2365.
 15. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M. and Mori, H. (1995) Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer (Suppl.)*, 75, 1433-1439.
 16. Hirose, Y., Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita H. and Satoh, K. (1995) Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rat. *Carcinogenesis*, 16, 2337-2342.
 17. Tseng, T.H., Wang, C.J., Kao, E.S. and Chu, C.Y. (1996) Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol.*

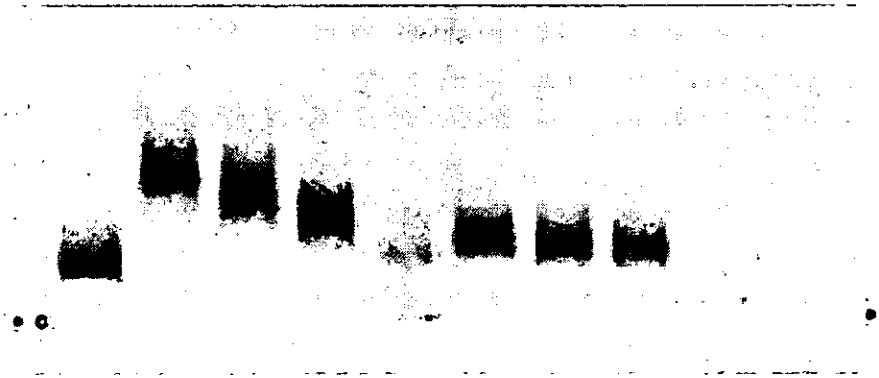
- Interact., 101, 137-148.
18. Wang, C.J., Wang, J.M., Lin, W.L., Chu, C.Y., Chou, F.P. and Tseng, T.H. (2000) Protective effect of Hibiscus anthocyanins against t-butylhydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Fd. Chem. Toxicol.*, 38, 411-416.
 19. Wang, C.J., Lee, M.J., Chang, M.C. and Lin, J.K. (1995) Inhibition of tumor promotion in benzo(a)pyrene-initiated CD-1 mouse skin by crocetin. *Carcinogenesis*, 16, 187-191.
 20. Tseng, T.H., Kao, T.W., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.L. and Wang, C.J. (2000) Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of RB phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem. Pharmacol.*, 60, 307-315.
 21. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.C. (1989) Beyond cholesterol modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320, 915-924.
 22. Witztum, J.C. and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, 88, 1785-1792.
 23. Bruja, L.M., Kita, T., Glosatein, J.L., Watanabe, Y. and Brown, M.S., (1983) Cellular pathology of progressive model of familial hypercholesterolemia Arterio scerosis., 3, 87-101.
 24. Reaven, P. and Witztum, J.L. (1995) The role of oxidatin of LDL in atherogenesis. *Endocrinologist*, 5, 44-54.
 25. Huang, H.C., Jan, T.R. and Yeh, S.F. (1992) Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.*, 221, 381-384.
 26. Huang, H.C., Wang, H.R. and Hsieh, L.M. (1994) Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular

- smooth muscle cell. *Eur. J. Pharmacol.*, 251, 91-93.
27. Chen, H.W. and Huang, H.C. (1998) Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, 124, 1029-1040.
 28. Bronzert T.J., brewer H.B. (1977) New micromethod for measuring cholesterol in plasma lipoprotein fraction. *Clin. Chem.* 23, 2089.
 29. Keaney J.F., Simon D.I., Freedman J.E. (1999) Vitamin E and vascular homeostasis: implications for atherosclerosis. *FASEB J.* 13, 865-876.
 30. Kim H., Shim J., Han P.I., Choi F.J. (1997) Nitric oxide modulates the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activity through activating c-Jun N-terminal kinase kinase. *Biochemistry* 36, 13677-13681.
 31. Kleinvels H.A., Heidi L.M., Hectors M.P.C., Nanneke J., Demacker P.N.M., Stalenhoef A.F.H. (1995) Vitamin E and fatty acid intervention does not attenuate the progression of atherosclerosis in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atheroscler Thomb. Biol.* 15, 290-297.
 32. Munday J.S., Thompson K.G., James K.A.C., Manktelow B.W. (1998) Dietary antioxidants do not reduce fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Atheroscler Thomb. Biol.* 18, 114-119.
 33. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
 34. Miura, S., Watanabe, J., Tomita, T., Sano, M. and Tomita, I. (1994) The inhibitory effects of tea polyphenols (flavon-3-ol derivatives) on Cu^{++} mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol.*

Pharm. Bull., 17, 1567-1572.

35. Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L. and Katan, M.B. (1996) Role of density flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochem. Sec. Trans.*, 24, 785-789.
36. Reaven, P.D. and Witztum, T.L. (1996) Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification. *Ann. Rev. Nutr.*, 16, 51-71.
37. Glass, C. K. and Witztum, J.L. (2001) Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*, 104, 503-516.

A



1 2 3 4 5 6 7 8 9

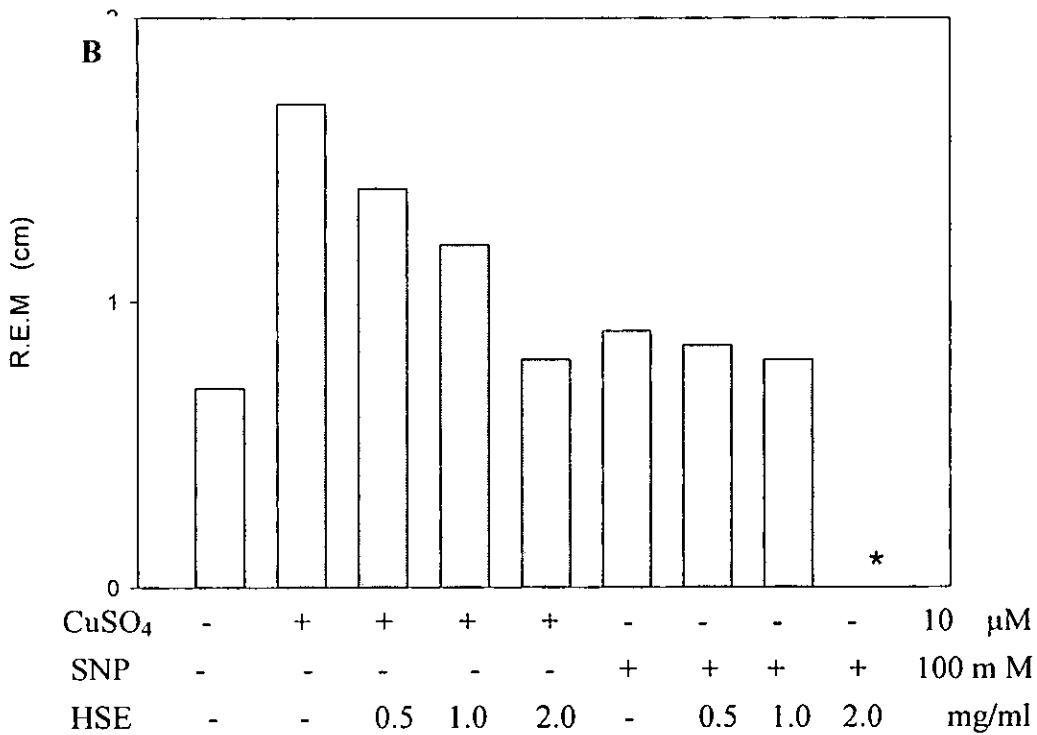


Fig. 1. (A) Agarose gel electrophoresis of LDL. LDL was incubated with CuSO₄ or SNP for 24 hr at 37 °C. The sample on the gel lanes are follows: lane 1, native LDL ; lane 2, LDL incubated with CuSO₄; lane 3-5, LDL incubated with CuSO₄ in the presence of 0.5 (lane 3), 1 (lane4) and 2 mg/ml(lane5) HSE; lane 6, LDL incubated with SNP; lane7-9, LDL incubated with SNP in the presence of 0.5 (lane7), 1 (lane8) and 2 mg/ml(lane9) HSE. (B) Determination of relative electrophretic mobility. * LDL degradation.

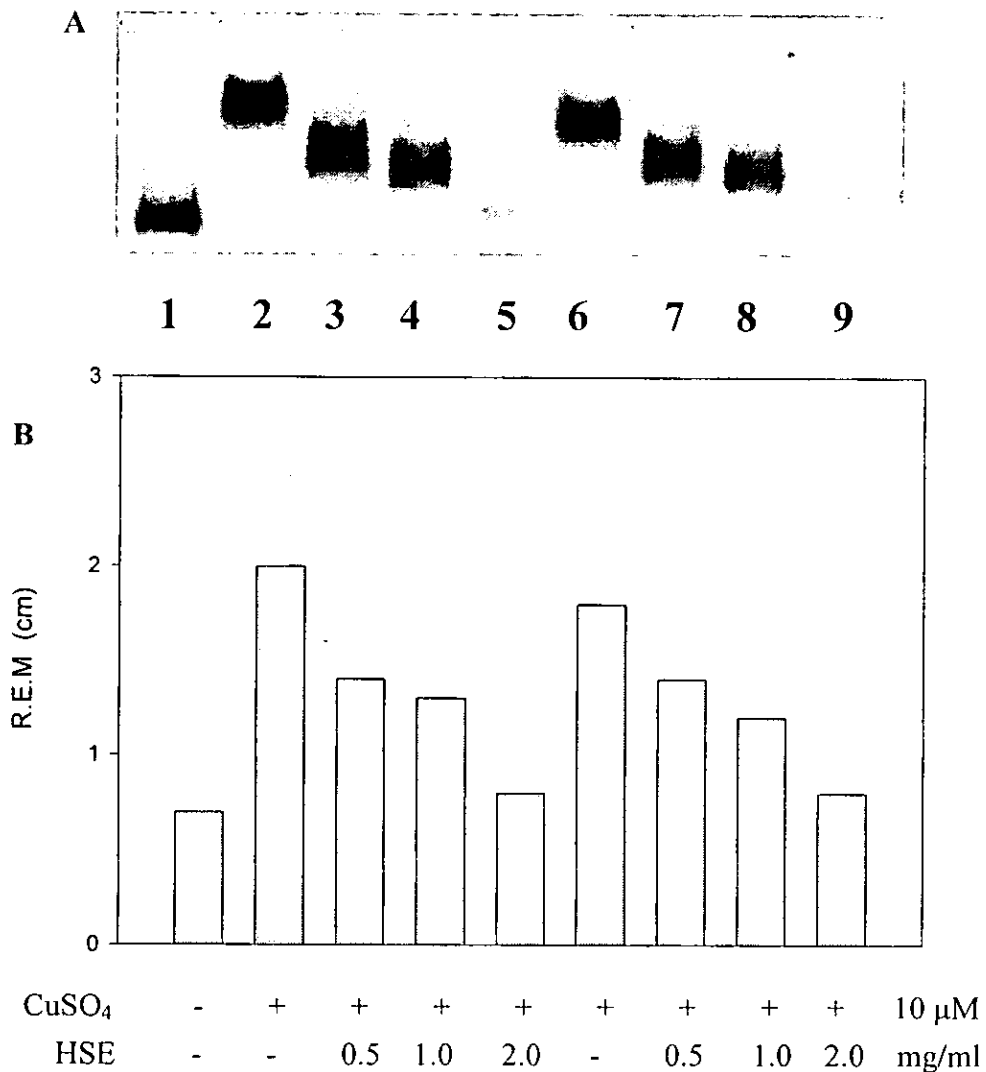


Fig. 2. (A) Agarose gel electrophoresis of LDL. LDL was incubated with CuSO₄ for 24 hr at 37°C. The sample on the gel lanes are follows: lane 1, native LDL; lane 2, LDL incubated with CuSO₄; lane 3-5, LDL incubated with CuSO₄ in the presence of 0.5 (lane3), 1 (lane4), 2 mg/ml(lane5) HSE; lane 6, CuSO₄ pre-incubated with LDL ; lane 7-9, CuSO₄ pre-incubated with LDL than addition of 0.5 (lane7), 1 (lane8) and 2 mg/ml(lane9) HSE.(B) Determination of relative electrophretic mobility.

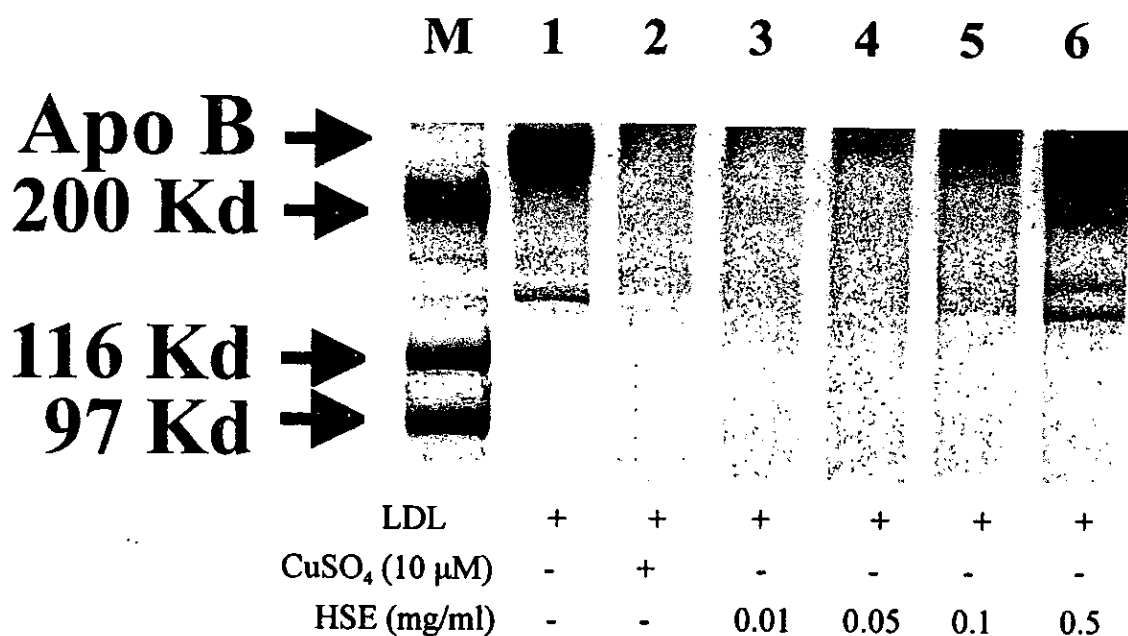


Fig.3. Inhibition of Cu²⁺ mediated Apo B fragmentation in LDL by HSE.LDL (120 μg/ml) was incubated with 10 μM CuSO₄ at 37 °C in the presence of HSE for 4 hr. After the incubation, EDTA (final concentration 1 mM) was added to prevent any further oxidation. Approximately 6 mg protein of the LDL was applied to SDS-PAGE (3-15% gradient). After the electrophoresis, each spot was stained with Coomassie Brilliant blue R250. M, standard molecular weight markers.

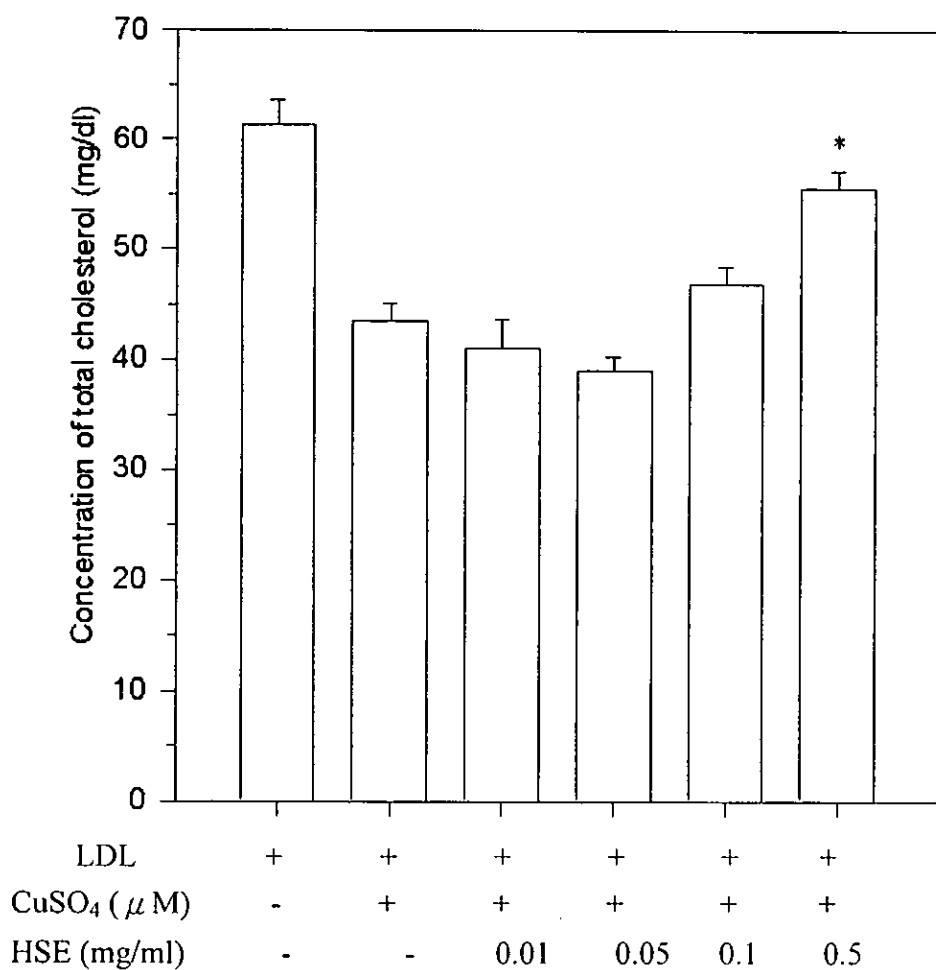


Fig. 4. Inhibition of Cu^{2+} mediated cholesterol degradation in LDL by HSE. LDL (120 μg protein/ml) was incubated with 10 μM CuSO_4 at 37 $^\circ\text{C}$ in the presence of HSE for 12 hr. After the incubation, EDTA (final concentration 1 mM) was added to prevent any further oxidation and the total cholesterol contents were determined enzymatically. Each point and vertical bar represents mean \pm S.D. for triplicate determinations. * $P < 0.01$, compared with CuSO_4 treated LDL group.

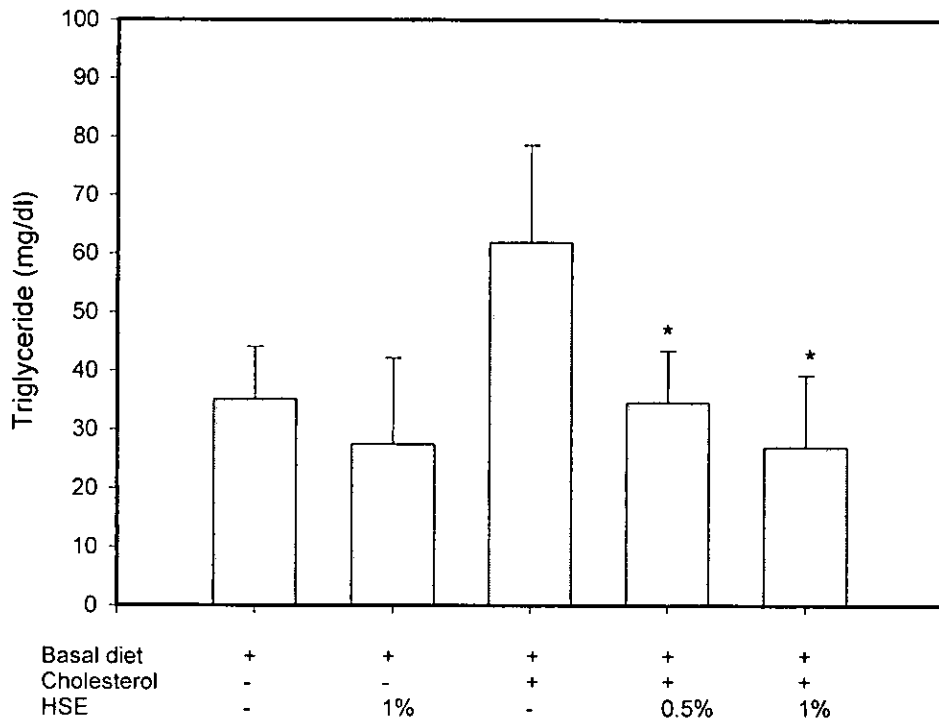


Fig. 5. Effect of HSE on plasma triglyceride levels in 10 week-period cholesterol fed rabbit. The data are presented as mean \pm SD from 6 rabbits per group. The cholesterol fed diet containing 1.3% cholesterol and 3% lard oil. * $p < 0.05$, compared with the group of cholesterol fed.

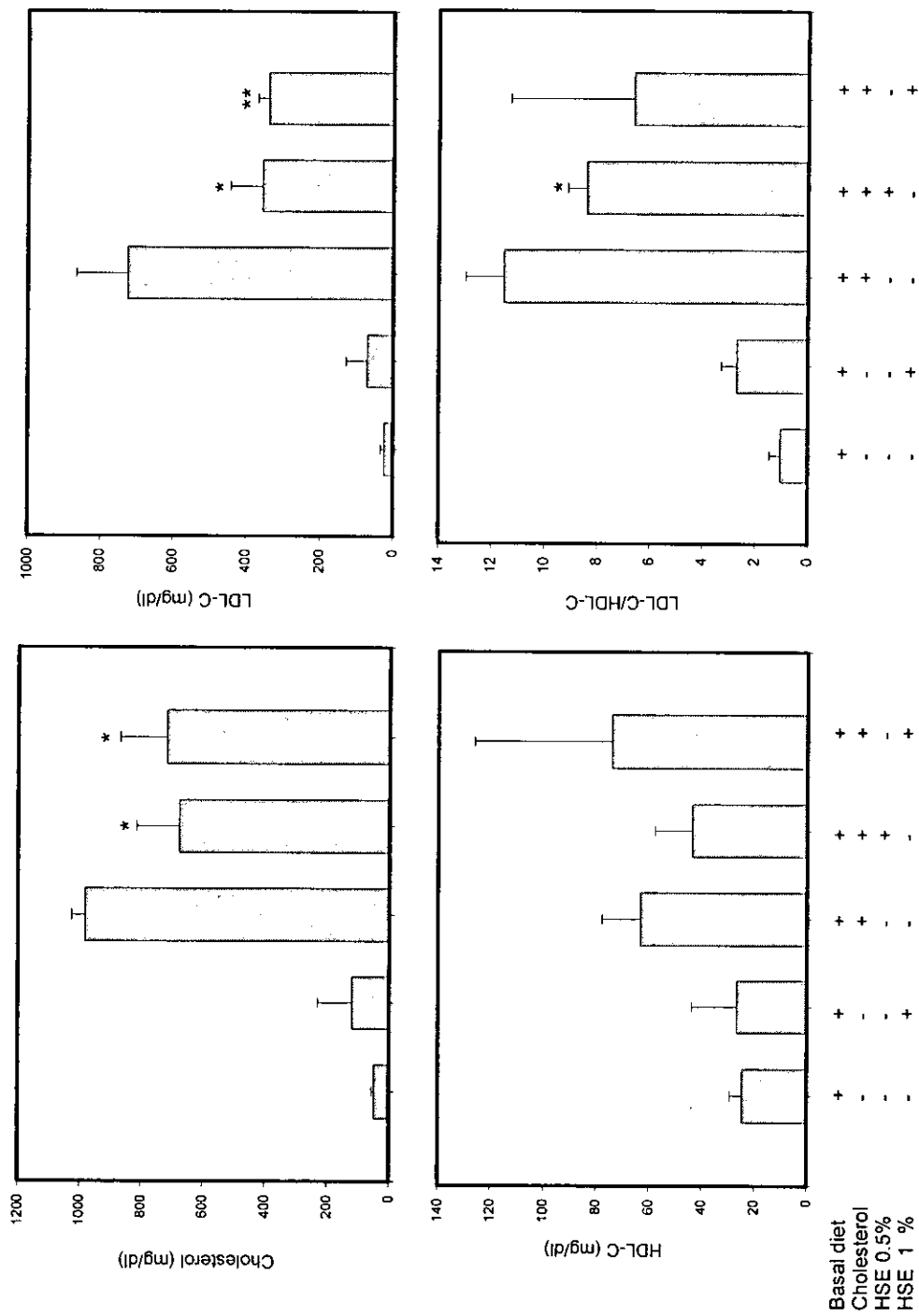


Fig. 6. Effect of HSE on plasma cholesterol levels in 10 week-period cholesterol fed rabbit. The data are presented as mean \pm SD from 6 rabbits per group. The cholesterol fed- diet containing 1.3% cholesterol and 3% lard oil.* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared with the group of cholesterol fed.

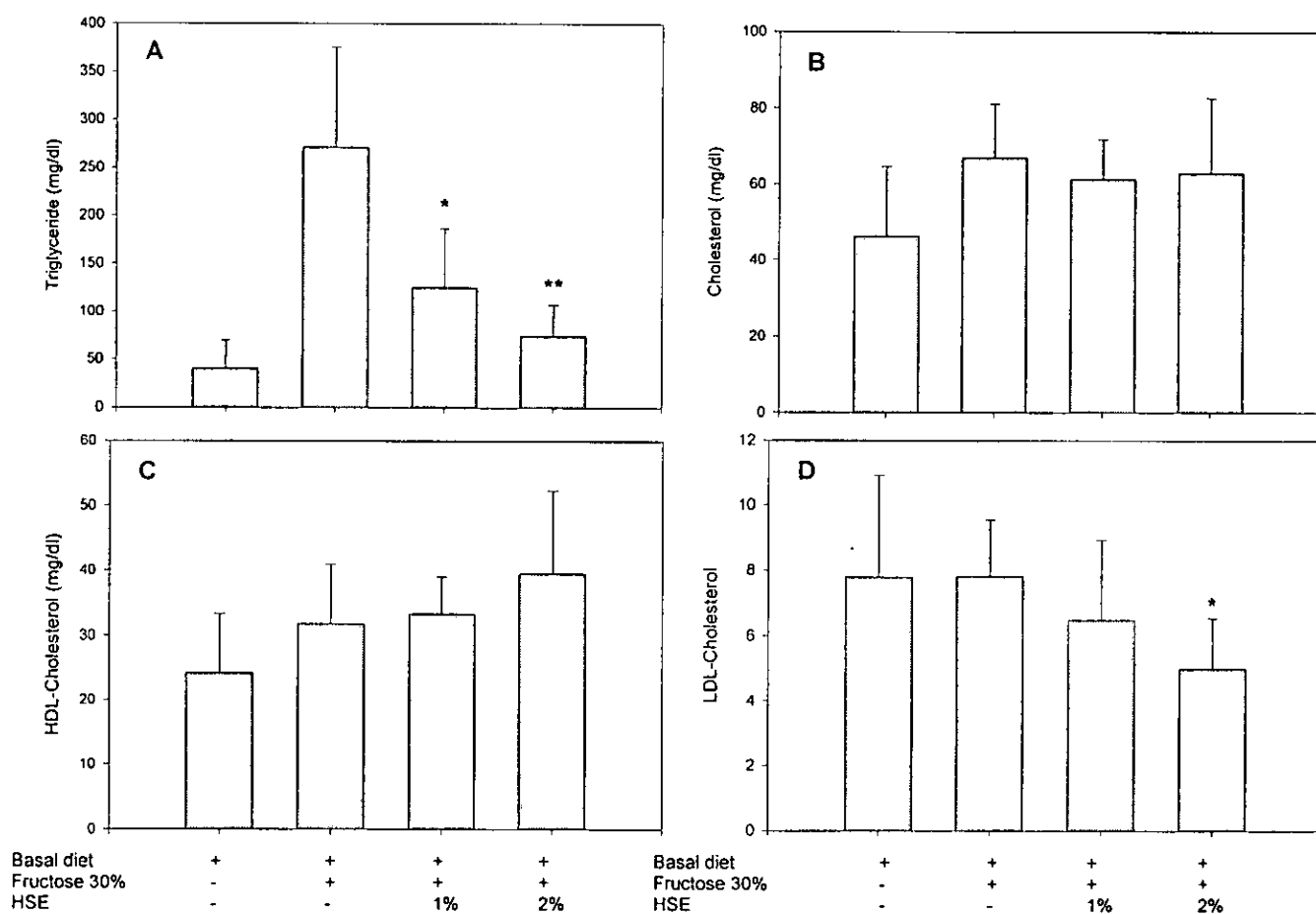


Fig. 7. Effect of HSE on plasma lipid levels in 6 month-period 30% fructose fed rats. The data are presented as mean \pm SD from 6 rat per group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared with the group of cholesterol fed.

Table 1. Pre-treative effect of HSE on the CuSO₄ induced lipid peroxidation in LDL

ox - LDL inducer	Treatment ^a		TBARs formation (nmol / mg) ^b
	Conc. of HSE (mg/ml)		
Control	-		0.19 ±0.01
CuSO ₄	-		10.12 ±0.49
CuSO ₄	0.5		8.47 ±1.00
CuSO ₄	1		5.61 ±0.56*
CuSO ₄	2		0.56 ±0.04* *

^a LDL were pretreated various concentrations of HSE for 5 min, and then incubated with 10 μM CuSO₄ for 24 hr at 37°C.

^b Statistically with Mean ±SD n=3, * p<0.001 ; ** p<0.00001, compared with CuSO₄ treated LDL group.

Table 2. Post-treatment effect of HSE on the CuSO₄ induced lipid peroxidation in LDL

Treatment ^a		TBARs formation (nmol / mg) ^b
ox - LDL inducer	Conc. of HSE (mg/ml)	
Control	-	0.19 ±0.01
CuSO ₄	-	10.41 ±1.02
CuSO ₄	0.5	8.90 ±0.20
CuSO ₄	1	5.53 ±1.31*
CuSO ₄	2	0.60 ±0.05**

^a LDL were pretreated with CuSO₄ 10 μM HSE for 5 min, and then incubated with various concentration of HSE for 24 hr at 37°C.

^b Statistically with Mean ±SD n=3, * p< 0.01 ; ** p< 0.0001, compared with CuSO₄ treated alone group.

Table 3. Effect of HSE on hepatic function in rabbit and rat

Hepatic function	Rabbit		Rat	
	Basal diet	HSE 1 %	Basal diet	HSE 2 %
ALT(UL/l) ^a	55.25±23.87 ^b	40.83±11.99	55.8±19.18	34.2±9.44
AST(UL/l)	98.75±34.09	89.50±55.49	108.8±20.85	67.7±11.06
ALP(UL/L)	38.00±3.83	26.83±9.56	121.0±101.0	103.0± 85.0

^a Abbreviation, ALT, alanine transaminase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase.

^b Meas±S.D., n=6

Table 4. Effect of HSE on renal function in rabbit and rat

Hepatic function	Rabbit		Rat	
	Basal diet	HSE 1 %	Basal diet	HSE 2 %
BUN (mg/dl) ^a	16.12± 4.7 ^b	30.10 ± 17.2	14.6±5.13	19.0±6.42
Creatinine (mg/dl)	1.65±0.29	1.50 ± 0.40	0.54±0.13	0.73±0.10
UA (mg/dl)	0.18±0.15	0.23±0.16	1.9±0.68	1.65±0.37

^a Abbreviation, BUN, blood urea nitrogen; UA, uric acid.

^b Meas±S.D., n=6

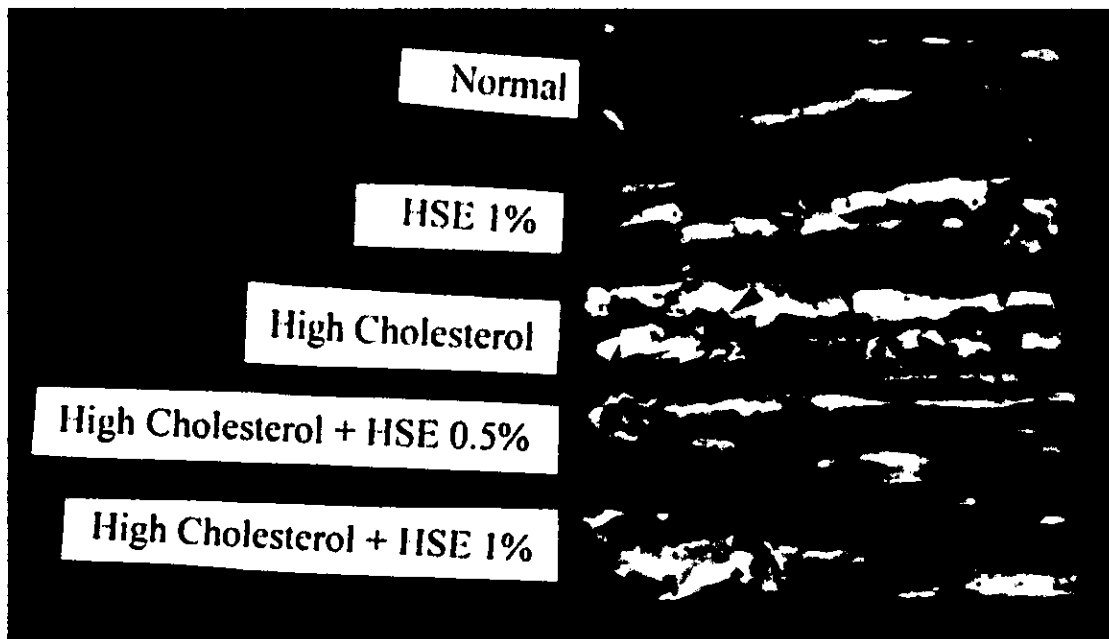
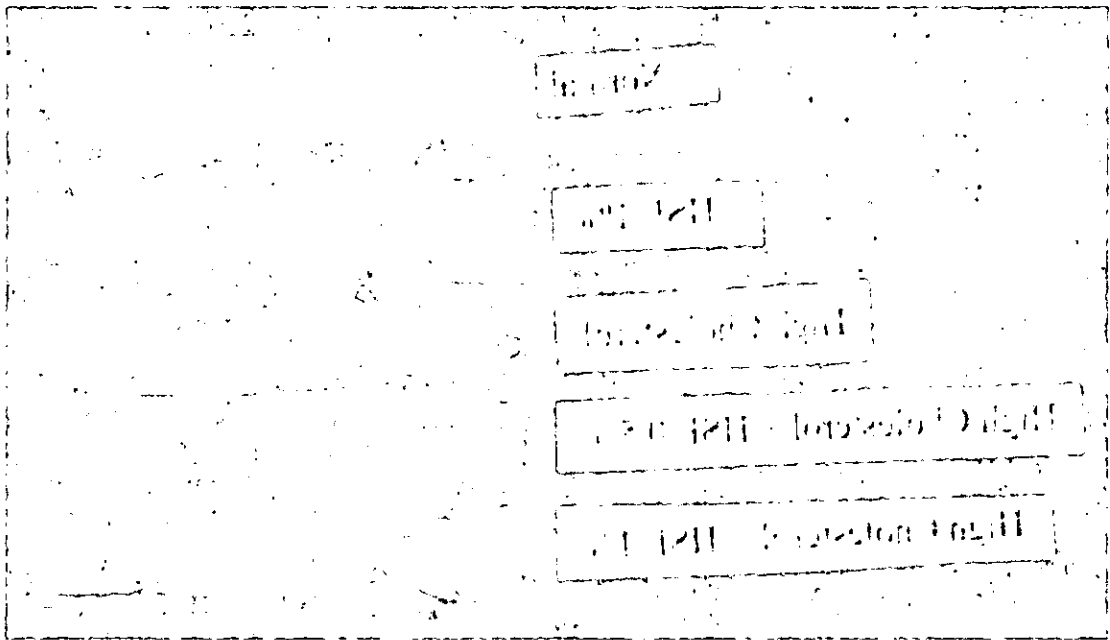


Fig. 9. Internal surface of the thoracic aortas from the five groups of rabbits showing Oil red O stainable lipid deposit, arrow indicated that atherosclerotic lesion in rabbit thoracic aortas.



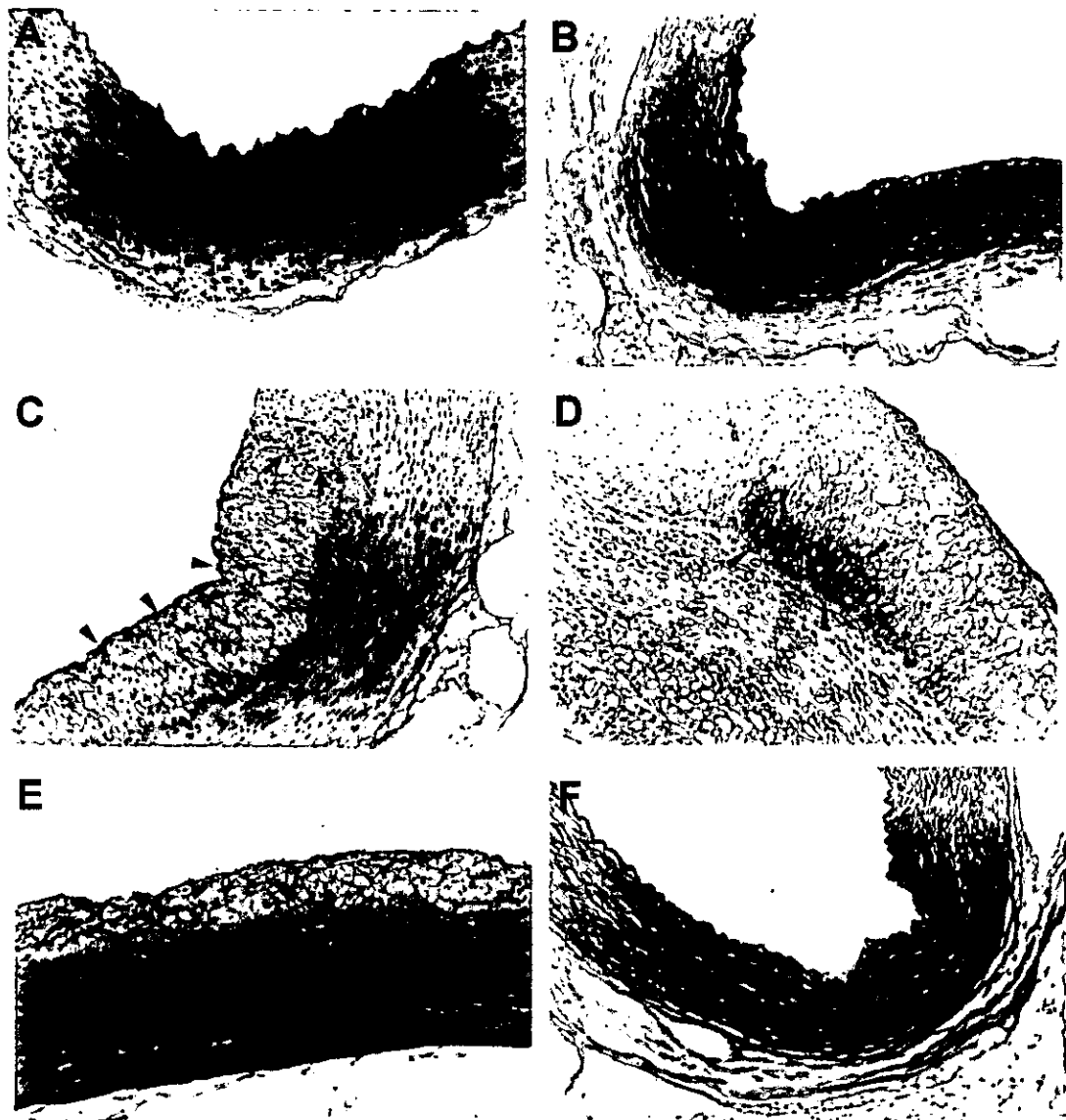


Fig. 10. Histological analysis of a representative atherosclerotic lesion from cholesterol-fed rabbits treated for 10 weeks with HSE 0.5% and HSE 1%. Basal diet (A); rabbits fed basal diet with HSE 1% (wt/wt) (B) ; rabbits fed with high cholesterol diet containing 3 % lard oil and 1.3 % cholesterol on basal diet (C and D). The arrow was shown for foam cell (▲) and smooth muscle cell migration () in (C); The calcification core was shown as arrow () in (D); high cholesterol diet fed rabbits and treated with HSE 0.5% (E) and 1% (F) on daily diet.

