

中山醫學大學生化暨生物科技研究所碩士論文
Master Thesis, Institute of Biochemistry and Biotechnology,
Chung Shan Medical University

荷葉水萃物抑制動脈粥狀硬化機轉之探討

Studies on the effect and mechanisms of liquid extract of
Nuciferine Leaf in inhibiting atherosclerosis

指導教授：王朝鐘 教授 Chau-Jong Wang, Ph. D.

研究生：林櫻芳 Ying-Fang Lin

中華民國九十四年六月

January, 2005

謝誌

進入中山生化所兩年了，感謝恩師 王朝鐘教授指導與指正，使得論文能順利完成，感激之情溢於言表，在此由衷感謝。

文稿初成，復蒙口試委員台灣大學醫學院生化暨分生所林仁混教授及本所李慧禎副教授耐心審閱、指正，使得論文臻至完善，在此特申感謝。

一本論文的完成非一己之力能夠達成，首先感謝實驗室的慧禎、小佩老師的指導、解說。感謝實驗室的學長姐（佳紋學姊、雲菁學姊、純華學姊、滄澤學長、大綱學長、小豆學長.....）及學弟妹（益偉、柏如、嘉鴻、淑慧、雅芳、聖庭.....），還有我的同窗好友（靜慈、小芸、宸宣、智英、美梧.....），感謝大家的關心及鼓勵。

接下來要感謝媽媽、爸爸、胖胖、小肥在精神上及生活上的支持，讓我無後顧之憂完成學業（所以最愛你們嚕），最後要謝的人實在很多，沒唱名到的請多包函，不過還是要感謝曾經在這段時間出現過及陪伴過我的朋友，謝謝你們，感激不盡。

林櫻芳

中山醫學大學生化暨生物科技所

中華民國九十四年七月

中文摘要

動脈粥狀硬化最被接受的致病理論之一即是內皮功能失調 (Endothelial dysfunction)，例如：平滑肌細胞的遷移及增生，因此有效的抑制平滑肌細胞的遷移及增生將是一個防禦動脈粥狀硬化的主要方向。荷葉(*Nuciferine Leaf*)自古以來均記載著對於『活血化淤』具有強大的功效。「活血化淤」與現代預防動脈粥狀硬化的產生有著異曲同工之妙。目前荷葉的醫學功能並沒有深入研究。先前本實驗室的研究已顯示荷葉水萃物有抑制血管病變能力，本研究將探討荷葉對於預防動脈粥狀硬化機轉，利用抑制低密度脂蛋白氧化的實驗和使用平滑肌細胞進行抑制增生及位移的實驗。在抑制低密度脂蛋白氧化的實驗發現，在荷葉水萃物的處理之下，可抑制銅離子誘發低密度脂蛋白氧化、抑制 Apo B 蛋白的斷裂、抑制 TBARS 的生成及延緩 Diene 的生成，又透過 Flow cytometry、MTT、DNA 斷裂的分析，發現荷葉水萃物可誘導增生的平滑肌細胞走向細胞凋亡路徑，也從一系列細胞凋亡的蛋白增加（如：Fas、Fas-L、Bax、Cyt C、Cap 3, 8, 9、p53、phosphorus-p53）證實荷葉水萃物的確促使增生的平滑肌細胞走向細胞凋亡的路徑，另外、從傷口癒合實驗、Gelatin zymography 分析、Boyden chamber 分析，亦發現荷葉水萃物有抑制平滑肌細胞遷移的能力。如此的結果顯示荷葉或許對未來心

血管疾病的治療提供一個新的對策。

關鍵字：荷葉、動脈粥狀硬化、平滑肌細胞、抗氧化、降血脂、
細胞凋亡。

Abstract

Atherosclerosis is the major reason to cause these diseases. Based on the most acceptable theory is endothelial dysfunction represented as migration and proliferation in smooth muscle cell, the efficacious inhibition of migration and proliferation in smooth muscle cell is the major direction to preventing atherosclerosis. Traditionally, *Nuciferine leaf* was reported to possess powerful effect on decreasing serum lipids. It means that *Nuciferine leaf* also possess the same effect on preventing atherosclerosis. But upon to now, the researchers just emphasized the effects of *Nuciferine leaf* in clinical research but not in the mechanisms on preventing atherosclerosis. Because of that, we designed a series of experiments to study how *Nuciferine leaf* prevents atherosclerosis, and what were the mechanisms. The experimental results showed that *Nuciferine leaf* extract has efficacious inhibition on LDL-oxidation-related electrophoretic mobility, Apo B fragmentation, TBARS formation and diene formation. we used flow cytometry assay, MTT assay, DNA fragment assay and the result showed that *Nuciferine leaf* extract could induced apoptosis of the proliferated smooth muscle cell and activated the caspase cascade and triggered apoptosis. Further wound healing, gelatin zymography and Boyden chamber study found that *Nuciferine leaf* extract could inhibited smooth muscle cell migration. According to the above, we suggested that *Nuciferine leaf* possessed the ability to reduce atherosclerosis via inhibiting the endothelial dysfunction. Furthermore, it had the potential to develop to a new health-caring herb to prevent atherosclerosis.

Key word : *Nuciferine Leaf*, atherosclerosis, smooth muscle cell,
antioxidation, serum lipids, apoptosis.

目錄

中文摘要.....	III
Abstract.....	V
目錄.....	VII
表次.....	XI
圖次.....	XII
壹、 文獻整理.....	1
一、 心血管疾病與動脈粥狀硬化.....	1
二、 動脈粥狀硬化.....	2
1. 動脈粥狀硬化過程.....	2
2. 血脂肪與動脈粥狀硬化.....	3
3. 氧化與動脈粥狀硬化.....	5
4. 抗氧化防禦機制.....	6
三、 平滑肌細胞（SMC）與動脈粥狀硬化的關連性.....	7
1. 平滑肌細胞（SMC）的遷移在動脈粥狀硬化扮演之角色.....	7
2. 平滑肌細胞（SMC）的增生在動脈粥狀硬化扮演之角色.....	8
四、 荷葉.....	10
1. 荷葉(<i>Nuciferine Leaf</i>).....	10

2. 化學成分	11
3. 生理活性	11
貳、研究動機	12
參、實驗設計	13
肆、材料與方法	14
一、實驗材料	14
1. 荷葉	14
2. 血清	14
3. 實驗藥品	14
二、儀器設備	17
三、分析方法	18
1. 荷葉水萃物 (NLE) 製備	18
2. 荷葉多酚萃取物 (NPRE) 製備	18
3. 荷葉水萃物 (NLE) 定性	18
A. 可見光光譜分析	18
B. HPLC 標準品溶液配製	19
C. HPLC 使用之荷葉水萃物配製	19
D. HPLC 分析	19
4. 荷葉水萃物 (NLE) 多酚含量測定	19

5. 低密度脂蛋白 (LDL) 製備	19
6. LDL electrophoretic mobility assay	20
7. LDL apoB protein fragmentation assay	20
8. TBARS assay.....	20
9. Diene conjugation assay	21
10. 細胞培養	21
11. 細胞型態的變化	22
12. MTT (Microculture Tetrazolium) assay.....	22
13. Flow cytometric analysis.....	22
14. DNA Fragmentation assay.....	22
15. Western blotting.....	23
16. Wound healing assay	23
17. Gelatin Zymography assay.....	24
18. Boyden Chamber Migration Assay	24
伍、實驗結果.....	26
一、荷葉水萃物(NLE)定性與定量	26
(1)荷葉水萃物(NLE)的製備	26
(2)荷葉水萃物(NLE)定性分析	26
(3)荷葉水萃物(NLE)多酚含量測定.....	26
二、荷葉水萃物(NLE)的抗氧化能力	27
(1) LDL Electrophoretic mobility assay.....	27
(2) LDL Apo B fragmentation assay	28

(3)TBARS assay	28
(4)Diene conjugation assay 分析	29
三、荷葉水萃物(NLE)抑制動脈粥狀硬化之機轉	30
(1)細胞型態的變化	30
(2)細胞加入不同劑量荷葉水萃物 (NLE) 在不同時間反應下其 細胞存活率	31
(3)Flow cytometric analysis	31
(4)DNA Fragmentation assay	32
(5)Western blotting	32
(6)Wound healing assay	33
(7)Gelatin Zymography assay	33
(8) Boyden Chamber Migration Assay.....	34
陸、 綜合討論	35
柒、 實驗結果圖表	39
捌、 附表	59
玖、 附圖	60
十、 參考文獻	70

表次

附表 一 人類血漿脂蛋白的物理特性與組成。.....59

圖次

圖 一 荷葉水萃物全圖譜掃描。.....	39
圖 二 荷葉水萃物之高效能液相層析分析。.....	40
圖 三 荷葉水萃物對銅離子誘導 LDL 氧化的抑制效果。.....	41
圖 四 荷葉水萃物對銅離子誘導 Apo B 蛋白斷裂的抑制效果。.....	42
圖 五 荷葉水萃物對銅離子誘導過氧化的抑制效果。.....	43
圖 六 荷葉水萃物對銅離子誘導脂質過氧化的抑制效果。.....	44
圖 七 荷葉水萃物處理下之 A7r5 細胞的生長型態。.....	45
圖 八 荷葉水萃物處理下之細胞生長測試。.....	46
圖 九 荷葉水萃物處理下之細胞週期分析。.....	47
圖 十 荷葉水萃物處理下之 DNA 斷裂分析。.....	48
圖 十一 荷葉水萃物處理下之 Fas 和 Fas-L 的表現。.....	49
圖 十二 荷葉水萃物處理下之 Bax 的表現。.....	50
圖 十三 荷葉水萃物處理下之 Cytochrome C 的表現。.....	51
圖 十四 荷葉水萃物處理下之 Caspase-3 的表現。.....	52
圖 十五 荷葉水萃物處理下之 Caspase-9 和 Caspase-8 的表現。.....	53
圖 十六 荷葉水萃物處理下之 p53 與磷酸化 p53 的表現。.....	54
圖 十七 荷葉水萃物處理下之傷口癒合測試 (wound healing assay)。	55

圖 十八 荷葉水萃物處理下之 MMP 蛋白表現。.....	56
圖 十九 荷葉水萃物處理下之 A7r5 細胞遷移測試。.....	57
圖 二十 荷葉水萃物處理下之 NF- κ B 的表現。.....	58
附圖 一 荷葉水萃物 (NLE) 之訊息傳导图。.....	60
附圖 二 動脈的構造。.....	61
附圖 三 動脈粥狀硬化的過程。.....	62
附圖 四 氧化壓力與動脈粥狀硬化。.....	63
附圖 五 生物體中抗氧化防禦機制。.....	64
附圖 六 平滑肌細胞的遷移 (Migration)。.....	65
附圖 七 參與平滑肌細胞的遷移 (Migration) 訊息傳遞路徑。.....	66
附圖 八 細胞週期 (Cell cycle) 的調控。.....	67
附圖 九 荷葉化學成分。.....	68
附圖 十 荷葉.....	69

壹、文獻整理

一、心血管疾病與動脈粥狀硬化

現代人平均 7 個人就有一個人過於肥胖，高油脂的食物吃太多不只造成現代人的肥胖問題，還增加罹患心臟血管疾病的風險。長期的高血脂，就如前所述，會增加罹患動脈粥狀硬化及各種心臟血管疾病的機會，這是慢性長期的影響，往往是在患者不知不覺當中慢慢發生，最糟糕的是，它所產生的變化是不可逆的。根據衛生署統計數據，每年國人的十大死因中，腦血管疾病及心血管疾病仍高居不下，平均每 42 分鐘，就有 1 人死於腦血管疾病，每 47 分鐘，就有 1 人死於心臟疾病。雖然腦血管疾病或心臟疾病都是由多項因子交互作用所導致，但動脈粥狀硬化（Atherosclerosis）是導致這些血管疾病的最主要原因。

動脈粥狀硬化是一種可怕而高致命性的疾病，不只是歐美常見的死亡原因，也一直列居為台灣十大死亡原因之一。所謂動脈硬化的疾病主要是因為冠狀動脈硬化，造成血管狹窄甚至完全阻塞，而臨床上可以是無症狀或是狹心痛、急性心肌梗塞甚至於猝死，而這項疾病通常與高血壓、糖尿病、高血脂症、抽煙、肥胖、壓力、家族史、缺乏運動有關(1-3)。

目前的研究，在動物實驗，常以直接解剖或間接測定的方式來探討動脈粥狀硬化的構成導因或危險因子的程度；但在人體試驗，通常只能採間接的方式，主要常包括測定血清或血漿之各種脂質和脂蛋白（Lipoproteins）的含量，以及其低密度脂蛋白（LDL）氧化

程度或對氧化之敏感度，來評估其可能罹患動脈粥狀硬化的危險機率。

二、動脈粥狀硬化

1. 動脈粥狀硬化過程

動脈血管的組成主要包含內膜層（Intima）的內皮細胞（Endothelial cells）及內彈性板（Internal elastic membrane），緊接著是中膜層（Media）的平滑肌細胞（Smooth muscle cells）及外彈性板（External elastic membrane），最後則是外膜層（Adventitia）的結締組織（connective tissue）包覆住整條血管，如附圖二。(4)

動脈粥狀硬化顧名思義就是牽涉到動脈的狀態改變，而動脈粥狀硬化是一個有系統性的疾病。動脈粥狀硬化的損傷源自於脂肪條紋（Fatty streaks），主要是因為發炎性細胞（Inflammatory cells），脂肪及泡沫細胞的堆積所造成。而脂肪條紋又會發展成更進一步的損傷或是纖維斑（Fibrous plaque）。如此的發生過程參予了許多不同的發炎反應，例如：當單核球（Monocytes）受到趨化作用，而穿透內皮細胞進入血管壁中，並分化為巨噬細胞（Macrophages），進而吞噬脂肪形成泡沫細胞（Foam cells），泡沫細胞堆積成為脂肪條紋（Fatty streaks），然後漸漸的形成纖維斑（Fibrous plaque），緊接著平滑肌細胞（Smooth muscle cells, SMC）遷移（Migration）進入血管內層並增生（Proliferation）包住纖維斑（Fibrous plaque），形成纖維冠（fibrous cap），週而復始，最後形成一個以脂質為核心，外部

包圍著死亡細胞的粥狀瘤（Atheroma）病徵，如附圖三(5,6)。當粥狀瘤（Atheroma）不斷變大而突出時，血流被阻塞就會造成血栓（Thrombosis），形成缺血狀態，而對人體產生極大的損傷。

動脈粥狀硬化的致病機轉，很多學者提出不同的假說，不過其中有兩個目前較為被接受：【1】內皮功能失調（endothelial dysfunction）(7)、【2】氧化修飾（oxidative modification hypothesis）。也因此，動脈粥狀硬化的治療也圍繞著這兩大主題而有所發展。(7-11)

2. 血脂肪與動脈粥狀硬化

血脂肪包括三酸甘油酯（Triacylglycerols）、膽固醇（Cholesterol）、磷脂質（Phospholipids）和游離脂肪酸（Free fatty acids）等。膽固醇是體內的一種脂質，分為：和脂肪酸結合的酯型，以及個別分離的游離型兩種，合稱為總膽固醇。膽固醇主要儲存於大腦及肌肉，膽固醇其主要來源為由人體的肝臟產生和從食物而來，其正常值應低於 200mg/dL，血膽固醇值愈高，則血管壁中脂肪堆積的機會和程度也就愈高，相對的其危險性就愈高。而三酸甘油酯正常值應低於 200 mg/dL，長期三酸甘油酯過高，易導致其蓄積於肝細胞內，引起脂肪肝病變，如果三酸甘油酯濃度超過 800~1000 mg/dL 時，會有併發急性胰臟炎的危險。

一般而言，當血中總膽固醇過高、高密度脂蛋白（HDL）過低、低密度脂蛋白（LDL）過高、三酸甘油酯過高等任何一種情形或是合併多種情形發生皆稱為「血脂異常」。我國與歐洲動脈硬化學會

(European Atherosclerosis Society) 將血脂異常分成三類：(1) 高膽固醇血症：血漿總膽固醇(TC) > 200 mg/dL；(2) 混合型高脂血症：血漿總膽固醇(TC) > 200 mg/dL、三酸甘油酯(TG) > 200 mg/dL；(3) 三酸甘油酯血症：血漿三酸甘油酯(TG) > 200 mg/dL，且高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C) < 35 mg/dL 或 TC/HDL-C > 5。而美國國家膽固醇教育計畫小組 (American National Cholesterol Education Program) 則依 TC、LDL-C 和 HDL-C 濃度分為：(1) 理想膽固醇濃度：TC < 200 mg/dL 或 LDL-C < 130 mg/dL；(2) 邊緣型高膽固醇濃度：TC = 200 ~ 239 mg/dL 或 LDL-C = 130 ~ 159 mg/dL；(3) 過高的膽固醇濃度：TC ≥ 240 mg/dL 或 LDL-C ≥ 160 mg/dL；(4) 過低的高密度脂蛋白膽固醇濃度：HDL-C < 35 mg/dL。

三酸甘油酯和膽固醇無法溶解於水性的血漿中，故需藉由蛋白質和磷脂質等兩性乳化劑包圍在外側而形成可親水性的脂蛋白顆粒，才能溶解於血漿中，而隨著血液循環運送至身體的各器官組織中。血漿中之脂蛋白依其顆粒大小或密度，可分為乳糜粒 (Chylomicrons)、極低密度脂蛋白 (Very low density lipoproteins; VLDL)、低密度脂蛋白 (Low density lipoproteins, LDL)、高密度脂蛋白 (High density lipoproteins; HDL)。人類血漿脂蛋白的物理特性和其組成大致如附表一，如加以細分時，密度在 1.006 ~ 1.019 g/ml 部分可歸為中密度脂蛋白 (Intermediate density lipoproteins; IDL)，密度在 1.019 ~ 1.063 g/ml 部分才算為低密度脂蛋白 (LDL)。不同物種的哺乳類或實驗動物之血漿脂蛋白之密度可能會略有差異，但許多研究還是沿用人類的密度來分離，不過亦有針對該物種而選用特殊密度範圍者，例如選用 1.020 ~ 1.055 g/ml 為倉鼠之低密度脂蛋白

(LDL)。

膽固醇在血中主要藉著高密度脂蛋白及低密度脂蛋白來攜帶；低密度脂蛋白含大量的膽固醇(佔血漿總膽固醇的 60~70%)，具有趨動脈粥狀硬化特質，較容易滲入血管壁內。當其中的脂質被氧化形成氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)，而被滲入血管壁的巨噬細胞(Macrophages)所吞食，形成泡沫細胞(Foam cells)，再經一連串變化而形成動脈粥狀硬化，因此目前認為 LDL 的氧化修飾是引發初期動脈粥狀硬化病變的最主要之導因之一(8,12,13)。相反的，高密度脂蛋白含大量的磷脂質與少量的膽固醇(佔血漿總膽固醇的 20~30%)，從肝臟釋出進入血液循環後，從周邊組織移走多餘的膽固醇，因此，具有可減少膽固醇在血管壁沈積的作用。目前，已普遍接受如果血漿總膽固醇(TC)或低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)過高是導致動脈粥狀硬化疾病的正相關危險因子；而升高血漿高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)或 HDL-C/LDL-C 的比率，則是導致動脈粥狀硬化疾病的負相關危險因子。又血漿中含太少量的抗氧化劑、含太高比率的多元不飽和脂肪酸(PUFAs)或血漿中太高濃度的 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 等因素，亦會導致 LDL 容易氧化，也是產生動脈粥狀硬化的最重要正相關危險因子。(3)

3. 氧化與動脈粥狀硬化

動脈粥狀硬化早期的發展有許多因素，例如：自由基、氧化壓力、低密度脂蛋白的氧化等。90 年代初期，科學家就已經發現了自由基，自由基係指一分子或原子其原子外殼(Valence shell)以不成對電子(Unpair electron)存在稱之。當身體受到外加或是內在環境

的刺激下，就會產生大量的自由基，而自由基其因本身帶有不成對電子，因此容易引起一連串的連鎖反應（Chain reaction）對身體造成傷害，而生物體內自有一套解除經自由基導致傷害的機制。(14)

當生物體中的抗氧化物（Antioxidants）與促氧化物（Prooxidant）互相抗衡失效將導致氧化壓力（Oxidative stress）的產生並產生活氧因子（Reactive oxygen species, ROS），因而進一步攻擊身體的細胞組織，對人體造成損傷。目前認為不管是內在或是外在所產生的自由基皆與許多疾病有高度的關連性，其中包含了：動脈粥狀硬化、癌症、高血壓、關節炎、發炎反應、糖尿病、帕金森症、阿茲海默症等。因此，許多心血管疾病的發生牽涉體內的氧化壓力的增高，又動脈粥狀硬化最主要的特徵即是脂蛋白的氧化，血液中低密度脂蛋白（LDL）被金屬離子氧化形成氧化型低密度脂蛋白（oxLDL）而進入內膜層，趨化單核球的進入內膜層分化為巨噬細胞，吞噬氧化型低密度脂蛋白，造成堆積形成泡沫細胞，促使平滑肌細胞的移動與增生，如附圖四(15)，進而造成動脈粥狀硬化，由此可見氧化壓力與動脈粥狀硬化息息相關。

4. 抗氧化防禦機制

當生物體中的抗氧化物（antioxidants）與促氧化物（prooxidant）互相抗衡失效時，自然需要防禦機制來抵抗，防禦機制可分為「體內自生」及「體外補充」兩種。「體內自生」的防禦機制很多，例如：超氧化物歧化酵素（Superoxide dismutase；SOD）能將超氧陰離子轉變成過氧化氫、過氧化氫酶（Catalase）可將過氧化氫經氧化還原反應形成不具傷害的水、麩胺基硫過氧化酶（Glutathione peroxidase；

GSHpx) 與過氧化氫酶 (Catalase) 一樣有著清除過氧化氫的能力，如附圖五。

許多證據已指出「體外補充」的防禦機制主要是靠抗氧化劑的補充(16)。目前常被使用及在食材中萃取出來的抗氧化成分有：維生素 C、維生素 E、類胡蘿蔔素、多酚類化合物、類黃酮、薑黃素等(17-24)，且不管是流行病學的調查或是動物模式的研究，在在顯示藉由抗氧化的效果降低體內氧化壓力，將可減緩動脈粥狀硬化的產生(20)。

三、平滑肌細胞 (SMC) 與動脈粥狀硬化的關連性

1. 平滑肌細胞 (SMC) 的遷移在動脈粥狀硬化扮演之角色

動脈粥狀硬化是一個複雜的過程：脂質被氧化形成氧化型低密度脂蛋白 (oxLDL)，因而被滲入血管壁的巨噬細胞 (Macrophages) 所吞食，形成泡沫細胞 (Foam cells)，再經一連串變化而形成動脈粥狀硬化。當傷害一產生後，不同的細胞，例如：內皮細胞 (Endothelial cell)、血小板及其他發炎的細胞皆會釋出一些調控因子，並誘發其他不同的反應，例如：平滑肌細胞的遷移 (Migration) 等。因此，要了解動脈粥狀硬化的形成，平滑肌細胞的遷移 (Migration) 是一個不可或缺的重要因素。

平滑肌細胞的遷移 (Migration) 主要是受到化學趨引 (Chemoattractant) 所移動，如附圖六(25)。目前牽涉細胞的遷移 (Migration) 最被常用的有兩個說法：Chemotaxis 和 Haptotaxis。Chemotaxis 指的是細胞遷移是透過可溶性 (Soluble) 的化學趨引因

子濃度的增加所造成，例如：血漿中的因子。Haptotaxis 則是指透過不可溶性 (Insoluble) 趨引方式，例如：鍵結到基質 (Matrix) 上。

在文獻上又指出，誘導細胞遷移 (Migration) 的因子很多，例如：血小板生長因子 (PDGF)、Fibronectin (Fn)、Matrix Metalloproteinases (MMP)、Integrins 等。這其中當然也涉及了許多的訊息傳遞，其中主要是透過兩個 Receptor-coupled 系統：Guanosine 5'-triphosphate (GTP) - binding proteins (G protein) - coupled 和 Tyrosine kinase - coupled proteins。而可能參與遷移 (Migration) 的訊息傳遞更是多到數不清，如附圖七(25)。

由以上可知，平滑肌細胞的遷移 (Migration) 在動脈粥狀硬化是一個重要且已被認可的作用過程，因此，抑制平滑肌細胞的遷移 (Migration) 可作為治療動脈粥狀硬化的一個方向。

2. 平滑肌細胞 (SMC) 的增生在動脈粥狀硬化扮演之角色

平滑肌細胞 (SMC) 的增生 (Proliferation) 在動脈粥狀硬化中是一個重要的現象(7)。在正常的動脈中，平滑肌細胞 (SMC) 會停留在不增生的靜止期而且呈現良好的分化收縮的型態 (Differentiated contractile phenotype)；當血管受到損傷後，平滑肌細胞 (SMC) 會由分化的形態轉成合成的型態 (Synthetic phenotype)，並伴隨著進入細胞週期 (Cell cycle) 而造成增生。

細胞的增生主要是受到細胞週期 (Cell cycle) 的調控。細胞週期 (Cell cycle) 可分為四期：G1、S、G2 及 M 期；(1) 在 G1 (Gap1) 時期細胞維持正常代謝並且繼續生長，再進入 S (Synthesis) 時期之

前會檢查染色體 (Chromosome) DNA 是否受到破壞以進行修補 (Repair) 的工作，此時期需要花十到十二小時。細胞也可能由此脫離細胞週期進入不生長的休止狀態 (G0 時期)，需要有適當的訊息才會重新投入細胞週期；(2) 當細胞進入 S 時期會花六到八小時進行 DNA 的合成，將原本的二十三對染色體複製另一份；(3) 當細胞進入 G2 (Gap2) 時期需要花三到四小時，除了繼續生長並且合成蛋白質之外，細胞也會負責檢查染色體 DNA 的複製是否完整以準備進行有絲分裂 (Mitosis)；(4) 進入 M (Mitosis) 時期之後細胞會由一個母細胞變成兩個子細胞，已複製完整的染色體會各自分配到子細胞內，使得子細胞內的染色體與母細胞完全一樣，此時期只有一小時。之後子細胞再開始進入下一個細胞週期。而細胞週期 (Cell cycle) 是經過 Cyclin 與 Cdk 嚴密的調控，因為大量合成與累積的 Cyclin 與 Cdk 結合後會導引 Cdk 到目標蛋白質上，Cdk 會把磷酸基加在調節 DNA 複製或引發細胞分裂的關鍵蛋白質上，藉由改變蛋白質的功能而進一步控制細胞週期，如附圖八。

細胞週期 (Cell cycle) 除了受到 Cyclin 與 Cdk 的調控外，亦受到其他因子的調控，如：Cdk 的抑制物 (Inhibitor)、p53 等。因此，有效的抑制平滑肌細胞 (SMC) 的增生 (Proliferation) 將是阻斷動脈粥狀硬化的重要元件之一。

四、荷葉

1. 荷葉(*Nuciferine Leaf*)

荷葉始載於《本草綱目》，列於果部蓀類蓮藕項下；嫩者稱荷錢，貼水者名藕荷，出水者是芰荷。《神農本草經》將蓮藕列為上品，謂其根為藕，其實為蓮，其莖葉為荷，皆指荷葉而言。荷葉為常用中藥。屬睡蓮科植物蓮 (*Nelumbo nucifera Gaertn.*--睡蓮科 *Nymphaeaceae*) 的葉，如附圖十。

蓮，別名為荷。多年生水生草本。根莖肥厚橫走，外皮黃白色，節部縊縮，節上生鱗片葉及鬚根。葉伸出水面，圓盾形，直徑 25~90cm，全緣稍呈波狀，上面暗綠色，光滑具白粉，下面淡綠色，葉柄粗大，著生於葉背中央，圓柱形，中空，高達 1~2m，有刺毛。花大，單生於花梗頂端，直徑 14~24cm，白色或粉紅色，芳香；萼片 4~5，綠色，早落；花瓣多數，有脈；雄蕊多數，早落，花藥線形，黃色，藥隔先端有一棒狀附屬物；心皮多數，20~30，離生，嵌於平頭倒圓錐形的肉質花托內，花托於果期膨大呈蓮蓬頭狀（習稱蓮蓬），直徑 5~10cm，海綿質。堅果卵形或橢圓形，外果皮堅硬光滑，內有種子 1 枚。花期 6~7 月，果期 9~10 月。各地湖沼或池塘中均有栽培。6~9 月採摘，曬至七、八成幹時，除去葉柄，折成半圓形或扇形，乾燥，紮成小捆。夏季亦用鮮葉或初生嫩葉（荷錢）。

荷葉通常折疊成半圓形或扇形，完整或稍破碎。葉片展開後呈盾形，直徑 30~60cm。上表面灰綠色或棕綠色，有白色短粗毛，脈稍凹入；下表面灰黃色或淡灰綠色，平滑，有光澤，在中心有棕色

突起的葉柄殘基，全緣，葉脈輻射狀，粗脈 21~22 條，由中心向外射出，並分生多數細脈，在近葉緣處先端互相聯合，葉脈凸出。質脆而易碎。氣微、味淡。以葉大，完整，色綠，無黴變者為佳。

2. 化學成分

荷葉含多種生物鹼：荷葉鹼（Nuciferine）、N-去甲荷葉鹼（N-nornuciferine）O-去甲荷葉鹼（O-nornuciferine）、牛心果鹼（Anonaine）、繞袂鹼（Roemerine）、亞美帕鹼（Armejavine）、N-甲基衡州烏藥鹼（N-methylcocclaurine）、原荷葉鹼（Pronuciferine）、鵝掌楸鹼（Liriodenine）及去氧繞袂鹼（Dehydroroemerine）等等。又另含荷葉甙（Nelumboside）、槲皮素、異槲皮甙以及維生素 C、酒石酸、枸橼酸、蘋果酸、草酸、琥珀酸、葡萄糖酸、鞣質，另外、還含抗有絲分裂作用的鹼性成分，如附圖九。

3. 生理活性

荷葉，味苦澀，性平。本草綱目：「荷葉服之，令人瘦劣，單服可以消陽水浮腫之氣」；本草在新：「清涼解暑，止渴生津，治瀉痢，去火熱」。中醫則稱荷葉有清熱解暑，升發清陽，涼血止血之功能。用於暑熱煩渴，暑濕泄瀉，脾虛泄瀉，血熱吐衄，便血崩漏。荷葉炭收斂化瘀止血。用於多種出血症及產後血暈。古代楊貴妃亦以飲用荷葉茶來減重而聞名。近來研究則指出荷葉具有降血脂與抗氧化之功效(26-33)。

貳、研究動機

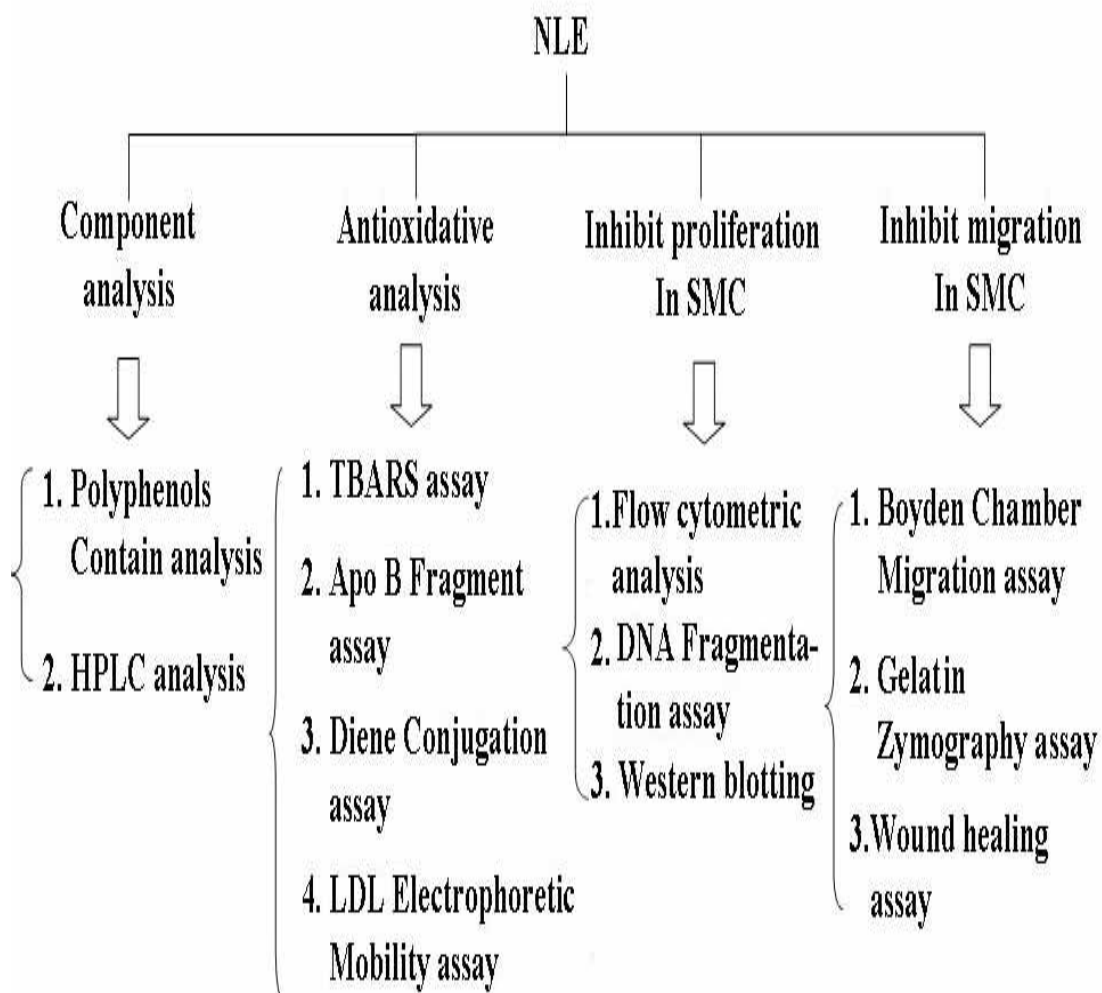
目前的研究指出動脈粥狀硬化（Atherosclerosis）是導致血管疾病的最主要原因。而動脈粥狀硬化的形成主要是由於血脂的堆積和氧化壓力的傷害，進而造成一連串的發炎反應，而導致血管的病變。

荷葉自古以來均記載著對於『活血化淤』具有強大的功效。「活血化淤」與現代預防動脈粥狀硬化的產生有著異曲同工之妙，而近代的研究也著重於荷葉對於抗氧化與降血脂研究。

不過，目前荷葉的研究偏重於臨床，並沒有深入研究，而從本實驗室學長研究中，在利用高膽固醇飼料餵食倉鼠及兔子進而誘發高血脂症及動脈粥狀硬化的動物模式中，再混入不同濃度之荷葉，發現可降低動物血中膽固醇及減少主動脈中動脈硬化斑之沉積，由實驗初步證實荷葉具有降血脂及預防動脈粥狀硬化的形成。不管是透過文獻的搜尋或是本實驗室的研究發現，在在顯示出荷葉對於動脈粥狀硬化的預防具有強大的潛力。

因此，本論文的研究希望探究荷葉對於預防動脈粥狀硬化機轉為何？以期望能發展出降低國人罹患動脈粥狀硬化的風險的對策。

參、實驗設計



肆、材料與方法

一、實驗材料

1. 荷葉

本實驗所使用之荷葉品種為大憨連，取自台中縣大雅鄉蘇茂林先生之蓮花農場所捐贈。

2. 血清

取自台中捐血中心

3. 實驗藥品

廠牌	藥品名
PALLI CORPORATION	0.45 μ m syringe filter
TEDIA	Methanol
	Hexane
	Ethyl Acetate
SIGMA	Ethidium Bromide
	Propidium Iodide, PI
	Protocatechuic acid
	Epigallocatechin gallate
	Gallic acid
	Rutin
	Microculture tetrazolium, MTT

	Caffeic acid
	1,1,3,3-Tetramethoxypropane, TEP
	2-Thiobarbituria acid, TCA
	Trichloroacetic acid, TCA
	Tris-HCl
	Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA
	Rnase A
	Ethidium Bromide, EtBr
	Gelatin
	Giemsa stain
	Protein inhibitor
	4',6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI
	Catechin
TEDIA	Acetonitrile
MERCK	Folin ciocalteu reagent
	Sodium chloride
	SDS
	Potassium bromine
日本 林 純藥工業株式會社	Copper sulfate
日本 昭和化學株式會社	Ammorium peroxodisulfate, APS
GILSON	Acrylamide
BIO-RAD	TEMED

HYCLONE ®	Glucose
	Trypsin
GIBCOBRL ®	Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM
	L-glutamine
	Sodium bicarbonate
	Fetal bovine serum, FBS
	Penicillin streptomycin
	Dulbecco's phosphate-buffered saline, PBS
FISHER CHEMIC	Isopropanol
PANREAC	Absolute ethanol
AMERSHAM BIOCIENCES	PD-10 column
MILLOPORE	Nitrocellulose transfer membrane
KODAK	Developer
	Fixer
	X-ray Film
NEURO PROBE	Polycarbonate membranes, 8 μ m pore

二、儀器設備

儀器	廠牌
高速離心機	SIGMA 2K15
加熱攪拌器	CORNINQ STRIRRER/HOTPLATE
微量高速離心機	EPPENDORF CENTRIFUGE 5415C
桌上型離心機	KUBOTA 2010
天平	PRECISA 3100C
微量天平	METTLER TOLEDO AB104
冷凍乾燥機	LABCONCO
真空減壓濃縮機	HETO VR-MAXI ST.A
分光光度計	HITACHI U-2001
高效能液相層析儀	HITACHILC-ORGANIZER
水浴槽	FIRSTEK SHAKER BATH B601
數位影像分析儀	ALPHAR IMAGER 2000
直立式電泳槽	PHARMACLA BIOTECK
電源供應器	BIO-RAD POWER PAC3000
螢光光度計	HITACHI F-2000
恆溫培養箱	NUAIRE US AUTOFLOW
無菌操作台	NUAIRE CLASS 2TYPE A/B3
酸鹼測定儀	HANNA PH301
DNA 電泳槽	MUPID-2
冷光螢光影像分析系統	FUJIFILM LAS-1000
流式細胞儀	FASC CALIBAR, BD
高壓滅菌釜	TOMIN TM322

到立螢光顯微鏡	NIKON
電泳轉漬槽	BIO-RAD , HOEFER

三、 分析方法

1. 荷葉水萃物 (NLE) 製備

取乾燥荷葉粉末 20 克加入 1000 毫升的二次水在 4°C 下浸放，再先經濾網過濾粗渣，而後於 -80°C 冷凍，以真空冷凍乾燥使其形成粉末。實驗時，以乾燥粉末稱重，配取不同濃度荷葉水萃物。若使用於細胞實驗操作時，荷葉水萃物配製的各濃度溶液需先經 0.22µm filter 過濾除菌。

2. 荷葉多酚萃物 (NPRE) 製備

取荷葉水萃物 (NLE) 加入甲醇 (NLE : Methnol = 10 g : 100 mL) 在 50°C 下浸煮 3 小時，連續處理 3 次，經濾網過濾粗渣，而後在 50°C 下減壓濃縮乾燥，以適量的二次水溶解，再加入適量的己烷，取水層，再加入適量的乙酸乙酯萃取，連續處理 3 次，取乙酸乙酯層，而後在 50°C 下減壓濃縮乾燥，以適量的二次水溶解，再以真空冷凍乾燥使其形成粉末。實驗時，以乾燥粉末稱重，配取不同濃度荷葉多酚萃物。若使用於細胞實驗操作時，荷葉水萃物配置的各濃度溶液需先經 0.22µm filter 過濾除菌。

3. 荷葉水萃物 (NLE) 定性

A. 可見光光譜分析

配置 0.5 mg/mL 荷葉水萃物，以可見光光譜儀掃描 200 nm 至

700 nm 觀察其吸光值變化情形。

B. HPLC 標準品溶液配製

以二次水配製 0.05 mg/mL 標準品，。

C. HPLC 使用之荷葉水萃物配製

以二次水配製 5 mg/mL 荷葉水萃物後，再以 0.22 μ m filter 過濾。

D. HPLC 分析

HPLC 分析條件如下---使用 Symmetry shield RP18 管柱，動相條件為(A : Formic acid / Water = 10 : 90 , B : Formic acid / Water / Acetonitrile = 10 : 60 : 30)，動相梯度為(Time,%B)，(0,20)， (55,80) ， (60,20)，流速 1 mL/min，偵測波長 280 nm，注射體積：10 μ L，最後以偵測器進行分析。

4. 荷葉水萃物 (NLE) 多酚含量測定

以 Rutin 做標準曲線。取處理好的各組 SAMPLE 20 μ L，加入 1.58 mL 的二次去離子水，再加入 100 μ L Folin-Ciocateu reagent，混合均勻後，加入 300 μ L sodium carbonate solution，在 40°C 恆溫水浴槽中反應 30 分鐘，並在 765 nm 下測定吸光值，最後以迴歸方程式計算樣品中多酚的含量。多酚含量百分比計算為多酚含量除以 Sample 配製的濃度。

5. 低密度脂蛋白 (LDL) 製備

血清樣品取自捐血中心之正常人類血清，2 mL 血清加入 0.7 ml

的 0.15M NaCl 及 0.3mM EDTA (PH7.4)，在 10°C 下以 60,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上層液後重複上述步驟後再離心 3.5 小時，再取下層液之後加入適量 KBr，再離心 3.5 小時，取上層液中淡黃色油層即為 LDL。LDL 經蛋白定量後，使其於實驗加藥後最後反應濃度為 100 μ g/mL。使用前，以 PD-10 desalting column 過濾後即可使用，製備好的 LDL 冰藏於 4°C 以不超過一星期為限。

6. LDL electrophoretic mobility assay

使用 BECKMAN lipoprotein (LIPO) electrophoresis system，隨後加入 Sample 和 Buffer 後，通電 100V，30 min 後，以固定液固定 5 分鐘後烘乾，再用染色液染色 5 分鐘，最後以脫色液脫色。最後，依電泳結果以 band 移動的距離 (Electrophoretic mobility; EM) 判定 LDL 氧化程度，以未氧化之 LDL 之 EM 為 1。

7. LDL apoB protein fragmentation assay

配製 3~15% Gradient acrylamide gel，置於電泳槽中加入電泳緩衝液。取適量 Sample 與 Dye 混合，加入到電泳片中，以 400 V 進行電泳分離，大約 2 小時後將膠片取下，電泳後以染色液 (0.1% Coomassie blue) 染色 1 hr，再以脫色液 (40% 甲醇，10% 醋酸，50% 水) 脫色。最後以數位影像分析儀分析。

8. TBARS assay

以 1,1,3,3-Tetramethoxypropane (TEP) 為標準液做標準曲線，取 0.2mL 處理好的各組 Sample 與 0.2mL TCA 和 0.2mL TBA 混合，

加熱 90-95°C，45 分鐘後冷卻，以 Fluorescence Ex / Em = 532nm / 600nm 測定。

9. Diene conjugation assay

將配製好的各組 NLE Sample 加入 CuSO₄，在 37°C 下反應 540 分鐘，在其間每隔 30 分鐘以 UV Spectrophotometry (230 ~ 235nm) 測量一次。最後以 Diene 生成量 (吸光值) 為縱座標，氧化時間為橫座標做圖。

10. 細胞培養

本實驗所使用之細胞為自食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心購買之 Rat smooth muscle of thoracic aorta-----A7r5 cell。A7r5 cell 培養於 DMEM (GIBCOBRL®) 培養液中 (pH7.3)，培養液中含 90% Dulbecco's modified Eagle's medium、4 mM L-glutamine、1.5 g / L Sodium bicarbonate、4.5 g / L-Glucose、10% Fetal bovine serum (FBS)、1% Penicillin。A7r5 cells 同培養液一起培養於恆溫培養箱 (37°C；5% CO₂)，更換培養液的時間及次數依細胞生長速度而定，原則上每二至三天更換一次。細胞於培養或加藥時均在無菌操作環境下完成，所加的藥需先以 0.25µm Filter 過濾滅菌。每次實驗前計算細胞密度為 5×10^5 cells / mL，以 0.5% FBS DMEM 培養 (90% Dulbecco's modified Eagle's medium、4 mM L-glutamine、1.5 g / L Sodium bicarbonate、4.5 g / L-Glucose、0.5% Fetal bovine serum (FBS)、1% Penicillin) 48 小時後，方可進行實驗。

11. 細胞型態的變化

A7r5 cells (5×10^5 cells / mL) 以 0.5% FBS DMEM 培養 48 小時後，加入 Medium 與不同劑量的荷葉水萃取物，在 37°C 恆溫培養箱反應 24 小時後，以倒立顯微鏡觀察並拍照，觀察處理過後細胞的型態。

12. MTT (Microculture Tetrazolium) assay

將 A7r5 cell (2×10^4 cells / mL) 培養於 12 well culture plate，以 0.5% FBS DMEM 培養 48 小時後，加入不同濃度的荷葉水萃取物 (NLE)，在 37°C 恆溫培養箱中反應 24 小時後，移除培養液(含藥)，加入新的培養液 (不含藥) 並同時加入 0.5 mg/ml MTT，在 37°C 恆溫培養箱中反應 4 小時後，移除培養液 (含 MTT) 以 PBS 清洗，加入 Isopropanol 將結晶溶出，在 OD 563 nm 下測定溶液吸光。

13. Flow cytometric analysis

將 A7R5 細胞 (5×10^5 cells / mL) 以 0.5% FBS DMEM 培養 48 小時後，加入不同劑量的荷葉水萃取物 (NLE) 與培養液，在 37°C 恆溫培養箱反應 24 小時後，去除培養液，以 PBS 清洗，加入 Trypsin-EDTA 使細胞去貼附能力，收集細胞，在 1500rpm、5 分鐘，去除上清液，以 70% 酒精固定 24 小時，接著 1500rpm、5 分鐘，去除上清液，加入 PI 反應 15 分鐘，最後以流式細胞儀測定。

14. DNA Fragmentation assay

將 A7r5 細胞 (5×10^5 cells / mL) 以 0.5% FBS DMEM 培養 48 小

時後，加入不同劑量的荷葉水萃取物（NLE）與培養液，在 37°C 恆溫培養箱反應 24 小時後，去除培養液，以 PBS 清洗，加入 Trypsin-EDTA 使細胞去貼附能力，收集細胞，在 1500rpm、5 分鐘，去除上清液，接著遵照 DNeasy® Tissue Kit (QIAGEN) 處理步驟萃取 DNA，萃取出 DNA 置入 -20°C 冰箱保存。配製 2% Agrose gel，取適量的 DNA 及加入 running buffer，進行電泳，電泳完畢後以 EtBr 染色，最後以 UV 數位影像分析儀偵測。

15. Western blotting

將 A7r5 細胞 (5×10^5 cells / mL) 以 0.5% FBS DMEM 培養 48 小時後，加入不同劑量的荷葉水萃取物（NLE）與培養液，在 37°C 恆溫培養箱反應 24 小時後，去除培養液，以 PBS 清洗，加入 Trypsin-EDTA 使細胞去貼附能力，收集細胞，在 1500rpm、5 分鐘離心，去除上清液，加入 RIPA 與適量蛋白質抑制劑，震盪反應 1 小時，在 10000×g、10 分鐘，收集上清液，即為蛋白。配製適當 SDS-PAGE，置於電泳槽中加入電泳緩衝液。取適量 Sample 與 Dye 混合，加入到電泳片中，以 140 V 進行電泳分離，大約 3 小時後將膠片取下，接著把 SDS-PAGE 上之分離的蛋白轉漬到 NC Paper 上，再以 Blocking buffer 室溫下反應 2 小時，之後洗去 Blocking buffer 後，加入所需之一次抗體反應 2 小時，接著洗去多餘的一次抗體，再加入所需之二次抗體反應 1 小時，最後加入 ECL 顯色，並以冷光儀偵測。

16. Wound healing assay

將 A7r5 細胞 (1×10^6 cells / mL) 以 0.5% FBS DMEM 培養 48 小

時後，以 Yellow tip 在培養皿上製造出一條傷口，再以 PBS 清洗數次，隨後加入不同劑量的荷葉水萃取物 (NLE) 與 20% FBS DMEM 培養液，反應 48 小時，最後以數位顯微鏡觀察。

17. Gelatin Zymography assay

將 A7r5 細胞 (5×10^5 cells / mL) 以 0.5% FBS DMEM 培養 48 小時後，加入不同劑量的荷葉水萃取物 (NLE) 與 20% FBS DMEM 培養液，在 37°C 恆溫培養箱反應 24 小時後，換上 No serum DMEM 培養液反應 24 小時後，收集 MMP 蛋白。製備 0.1% Gelatin - 8% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中加入電泳緩衝液。取適量 Sample 與 Dye 混合，加入到電泳片中，以 140 V 進行電泳分離，大約 3 小時後將膠片取下，加入適量 Washing buffer，反應 30 分鐘，共 2 次，倒掉 Washing buffer 之後，加入適量 Reaction buffer，於 37°C 恆溫箱下反應 12 個小時，將反應完後的膠片，以 Staining buffer 染色，之後再以退色液退染觀看結果。

18. Boyden Chamber Migration Assay

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，Lower chamber 為含有 20% FBS DMEM 的培養液，將處理不同劑量的荷葉水萃取物 (NLE) 24 小時後的細胞，以 Trypsin-EDTA 打下細胞並計算細胞數，然後注入定量的細胞數 (5×10^5 cells / mL) 於 Upper chamber，待細胞移動 6 小時後，取下於 Upper chamber 和 Lower chamber 之間的薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa 染色 1 小時，最後固定薄膜，擦拭掉薄膜上層的細胞，在 400X 數位顯微鏡

下隨機選取 3 個視野，作為移動細胞數之統計。

伍、 實驗結果

一、 荷葉水萃物(NLE)定性與定量

欲探求荷葉水萃物(NLE)對動脈粥狀硬化的影響，首先就要先了解到荷葉水萃物(NLE)的內容物為何？才能往下延伸之後的實驗。

(1)荷葉水萃物(NLE)的製備

取乾燥的荷葉粉末 20 克，以二次去離子水浸泡後，濾去殘渣，經真空冷凍乾燥機真空濃縮後，所得荷葉水萃物(NLE)產率約為 15 % 左右。

(2)荷葉水萃物(NLE)定性分析

接著為了確認荷葉水萃物 (NLE) 其內容物為何，使用了全圖譜的掃描及 HPLC 的分析，探究荷葉水萃物 (NLE) 其內容物。由圖一的結果顯示，荷葉水萃物 (NLE) 最大吸光值出現在 260 nm 及 340 nm 附近左右。透過 HPLC 的標準品的比對，可得知荷葉水萃物 (NLE)內可能含有多種多酚類化合物，其中以 Gallic acid 含量最多。
(圖二)

(3)荷葉水萃物(NLE)多酚含量測定

由文獻及 HPLC 的分析結果，得知荷葉水萃物(NLE)含多酚類化合物，因此，利用 Waterhose, A.L.和 Singleton, V.L.(34,35)的方法測定荷葉水萃物(NLE)其多酚化合物的含量。荷葉水萃物 (NLE) 是採用 Waterhose, A.L.和 Singleton, V.L.的方法做延伸，將體積等比例減

少，測出吸光值後，套入公式計算，計算公式為：

$$\frac{\text{吸光值相對應之標準曲線之濃度}}{\text{原始濃度}} \times 100\%$$

經比對之下，利用 Gallic Acid 作為標準曲線，可得知荷葉水萃物(NLE)多酚含量約為 14.8%左右；利用 Rutin 作為標準曲線，可得知荷葉水萃物(NLE)多酚含量約為 56%左右。

二、荷葉水萃物(NLE)的抗氧化能力

由以上的實驗，得知荷葉水萃物（NLE）的內容物之後，接下來就要探究荷葉水萃物(NLE)抑制動脈粥狀硬化的機轉，首先，以低密度脂蛋白（LDL）的氧化程度當做探討荷葉水萃物（NLE）的抗氧化能力。低密度脂蛋白（LDL）的氧化指標可由兩方面來討論，一是低密度脂蛋白（LDL）的蛋白氧化修飾反應（Oxidative modifications），利用 LDL-preoxidation-relative electrophoretic mobility assay 及 Apo B fragmentation assay 來分析；另一為低密度脂蛋白（LDL）的脂質過氧化作用（Lipid pre-oxidation），則利用 TBARS assay 及 Diene conjugation assay 來分析。

(1) LDL Electrophoretic mobility assay

低密度脂蛋白（LDL）氧化時其帶電荷會由正電性轉為陰電性，利用此特性可以將不同程度的氧化型低密度脂蛋白（Ox-LDL）分離，Lane 1 為低密度脂蛋白（LDL）對照組，Lane 2 為銅離子誘發的氧化型低密度脂蛋白（Ox-LDL）組，Lane 3 ~ Lane 8 為不同劑量（0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL）荷葉水萃物（NLE）

處理組。由圖三實驗結果顯示，隨著荷葉水草物（NLE）劑量的提高其 EM 值降低呈現 dose-dependent 趨勢，顯示銅離子誘發的氧化型低密度脂蛋白（Ox-LDL）有逐漸被抑制的效果，其抑制能力隨之增加，在 0.01mg / mL 處理之下其抑制效果改變不大，0.02 mg / mL 處理之下其抑制效果為 10%左右，0.03 mg / mL 處理之下其抑制效果為 20%左右，0.04 mg / mL 處理之下其抑制效果為 40%左右，0.05 mg / mL 處理之下其抑制效果為 60%左右。

(2) LDL Apo B fragmentation assay

低密度脂蛋白（LDL）上的 apoB 蛋白於低密度脂蛋白（LDL）氧化時會分解為不同大小的蛋白片段，因此，利用不同濃度（3~15% gradient）的 Acrylamide gel 可將這些片段分離。Lane 1 為低密度脂蛋白（LDL）對照組，Lane 2 為銅離子誘發的氧化型低密度脂蛋白（Ox-LDL）組，Lane 3 ~ Lane 8 為不同劑量（0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL）荷葉水草物（NLE）處理組。由圖四結果可知，銅離子誘發的氧化型低密度脂蛋白（Ox-LDL）組可看出 apo B 蛋白因為氧化誘導分解成不同的蛋白片段，而 Lane 3 ~ Lane 8 為不同劑量荷葉水草物（NLE）處理組隨著劑量的增加，其抑制由銅離子誘發的氧化作用的能力亦隨之增加。

(3)TBARS assay

其原理因 LDL 氧化會生成過氧化物 Malondialdehyde (MDA)，一分子的 MDA 與二分子的 Thiobarbituric acid (TBA)會生成具螢光性質的聚合物 TBARS (Thiobarbituric acid reactive

substance)，此物質於激發波長 (Ex) 為 532 nm，發射波長 (Em) 為 600 nm 時可被螢光光度計偵測到。並以 1,1,3,3-Tetramethoxypropane (TEP) (31) 做為標準曲線，定量 LDL 氧化程度。Bar 1 為低密度脂蛋白 (LDL) 對照組，Bar 2 為銅離子誘發的氧化型低密度脂蛋白 (Ox-LDL) 組，Bar 3 ~ Bar 10 為不同劑量 (0.005、0.0075、0.01、0.025、0.05、0.1、0.5、1) 荷葉水萃物 (NLE) 處理組。由圖五結果可知，Bar 2 為銅離子誘發的氧化型低密度脂蛋白 (Ox-LDL) 組，Bar 3 ~ Bar 6 為低劑量荷葉水萃物 (NLE) 處理組其氧化程度與 Bar 2 相差不大，從 Bar 7 ~ Bar 10 的提高劑量的荷葉水萃物 (NLE) 處理組，隨著劑量的增加，其抑制能力隨之增加，在 0.005、0.0075、0.01、0.025 mg / mL 處理之下其抑制效果改變不大，0.05 mg / mL 處理之下其抑制效果為 80% 左右，0.1 mg / mL 處理之下其抑制效果為 90% 左右，0.5、1 mg / mL 處理之下其抑制效果為 95% 左右。

(4) Diene conjugation assay 分析

脂質過氧化的重要特徵之一為其氧化產物共軛雙烯 (Diene) 之生成量會隨氧化時間增長而增加。因此，利用共軛雙烯 (Diene) 在 230 ~ 235nm 吸光值下可被偵測，當作其脂質氧化的指標。● 為低密度脂蛋白 (LDL) 對照組；○ 為銅離子誘發的氧化型低密度脂蛋白 (Ox-LDL) 組；▲、△、■ 為不同劑量 (0.001、0.01、0.1 mg/mL) 荷葉水萃物 (NLE) 處理組。由圖六實驗結果可知，低密度脂蛋白 (LDL) 對照組【●】由於沒有銅離子誘發，其產生的共軛雙烯 (Diene) 呈現最低狀態，銅離子誘發的氧化型低密度脂蛋白 (Ox-LDL) 組【○】

所生成的共軛雙烯 (Diene) 最多代表其氧化程度處於最高狀態，而在不同劑量荷葉水萃物 (NLE) 處理組【▲、△、■】，在處理荷葉水萃物 (NLE) 劑量最低的▲ (0.001 mg / mL) 組其氧化程度與銅離子誘發的氧化型低密度脂蛋白 (Ox-LDL) 組【○】相似，在處理荷葉水萃物 (NLE) 最高劑量的■ (0.1 mg / mL) 組，其延緩共軛雙烯 (Diene) 生成則與低密度脂蛋白 (LDL) 對照組【●】相似。因此，隨著劑量的增加，荷葉水萃物 (NLE) 有延緩共軛雙烯 (Diene) 生成。

三、荷葉水萃物(NLE)抑制動脈粥狀硬化之機轉

透過抗氧化的實驗結果顯示，荷葉水萃物 (NLE) 具有良好的抗氧化能力。因此，接下來將要去探究荷葉水萃物(NLE) 是如何進行抑制動脈粥狀硬化機轉。動脈粥狀硬化的過程參與了很多機轉，在接下來的實驗將著重於抑制平滑肌細胞 (SMC) 的遷移與平滑肌細胞 (SMC) 的增生。

(1)細胞型態的變化

A7r5 cells (5×10^5 cells / mL) 以 0.5% FBS DMEM 培養 48 小時後，加入 Medium 與不同劑量 (0、1、2、3、4 mg / mL) 的荷葉水萃物 (NLE)，在 37°C 恆溫培養箱反應 24 小時後，以倒立顯微鏡觀察，發現到在低劑量的處理之下 (0、1 mg / mL) 細胞狀態呈現正常的生長，而在 2 mg / mL 的 NLE 處理之下細胞似乎有被抑制生長的情形，在高劑量的處理之下 (3、4 mg / mL) 細胞狀態有皺縮的現

象（圖七，箭頭處）。

(2)細胞加入不同劑量荷葉水萃物（NLE）在不同時間反應下其細胞存活率

利用有活性的活細胞會將 MTT（Thiazolyl blue）經由粒腺體中 Dehydrogenase 作用代謝還原為藍紫色結晶，之後再以異丙醇（Isopropanol）將結晶溶出，並於 OD 563nm 下測定溶液吸光，由吸光度的大小可得知有活性的細胞數目多寡，而死細胞是無法進行此作用的，藉此方法來判定細胞存活與死亡的情形。A7r5 細胞在不同濃度（0、0.5、1、2.5、5、10 mg / mL）之荷葉水萃物（NLE）處理之下，反應 24、48 小時後，再以 MTT assay 測定，可得知細胞存活的狀態。由圖八結果顯示，隨著 NLE 的濃度逐漸提高，細胞存活率呈現 Dose-dependent 的趨勢；另外，相同 NLE 濃度處理之下，細胞存活率差異不大，但是不管在 24 或 48 小時的處理，細胞在 5 mg/mL 的荷葉水萃物（NLE）處理之下皆全數死亡。因此，選用 0、1、2、3、4 等五個荷葉水萃物（NLE）的濃度點，培養反應 24 小時，以進行以下的反應。

(3)Flow cytometric analysis

細胞週期的分析係利用 PI 嵌入 DNA 的特性，以分辨細胞生長的狀態。A 為不加荷葉水萃物（NLE）的對照組，B、C、D、E 為處理不同劑量（1、2、3、4 mg / mL）之荷葉水萃物（NLE）的組別，由圖九結果可知，A 組在不加荷葉水萃物（NLE）處理，細胞處於正常的細胞週期狀態，隨著荷葉水萃物（NLE）劑量的提高，其細

胞的狀態逐漸走向 SUB-G1 期，且在最高劑量處理的 E 組(4 mg / mL) 其 SUB-G1 期分佈將近 50%左右，而在低劑量組 B (1 mg / mL) 顯示細胞週期有停止於 G0/G1 之趨勢。

(4)DNA Fragmentation assay

由細胞週期的分析得知，在高劑量的荷葉水萃物 (NLE) 處理之下細胞走向細胞凋亡，而細胞走向細胞凋亡時，有一個很大的特徵就是 DNA 會程序性的斷裂成一定大小的片斷，利用 Agrose gel 的分離會呈現出 DNA Ladder 表現，因此利用 DNA Fragmentation assay 驗證是否高劑量的荷葉水萃物 (NLE) 處理細胞真的走向細胞凋亡。Lane 1 為 Marker, Lane 2 為不加荷葉水萃物 (NLE) 的對照組, Lane 3 ~ 6 為處理不同劑量 (1、2、3、4 mg / mL) 之荷葉水萃物 (NLE) 的組，由實驗結果圖十可知，不加荷葉水萃物 (NLE) 的對照組與處理不同劑量 (1、2、3 mg / mL) 之荷葉水萃物 (NLE) 組皆無 DNA 斷裂的情形不顯著，然而在處理 (4 mg / mL) 之荷葉水萃物 (NLE) 組則可看出有 DNA 斷裂的情況產生。

(5)Western blotting

當細胞接受到死亡訊息 (Death signal) 時，會透過死亡接受器 (Death receptor)，開啟下游的訊息傳遞路徑，最常見的有：Cytochrome C 由粒線體中釋放出、Caspase famliy 蛋白的活化等。由實驗結果顯示，當 A7r5 細胞處理荷葉水萃物 (NLE) 時，隨著劑量增加，Fas 和 Fas-L 隨之增加 (圖十一)，進而誘導下游蛋白活化，如：隨 NLE 劑量提高，Bax 隨之增加 (圖十二)。又隨 NLE 劑量提

高 Cytochrome C 呈現 Dose dependent，且在最高劑量（4 mg / mL）時高出 3.8 倍（圖十三）。接下來也看到 caspase 3 被活化因而被切割（圖十四）。而在 caspase 3 下游的 caspase 8、caspase 9 亦隨著 NLE 劑量提高而增加其活化態的蛋白（圖十五）。另外，在實驗中也發現到 p53 有被活化而堆積的情形產生且在處理 4 mg / mL 的荷葉水草物收不同時間點（0、1/2、1、2 小時）的結果，可清楚看出隨處理荷葉水草物時間之增長，p53 逐漸被磷酸化趨勢。（圖十六）。

(6)Wound healing assay

藉由 Yellow tip 在培養皿上劃出一道所謂的 ”傷口” 觀察細胞遷移的能力。(A) 為 0.5% FBS DMEM 處理組、(B) 為不加荷葉水草物 (NLE) 的對照組，(C) ~ (F) 分別為處理不同劑量 (0.2、0.5、1、2 mg / mL) 之荷葉水草物 (NLE) 的組別。由實驗結果圖十七，可以看出，0.5% FBS DMEM 處理組(A)由於含最低量的 FBS 誘導，只有些許的遷移。在加藥組方面，低劑量的荷葉水草物 (NLE) 的組別 (C)、(D) 抑制遷移的能力很低，但在較高劑量的荷葉水草物 (NLE) 的組別 (E)、(F) 其抑制遷移的能力大幅提升，且從傷口的邊緣處的平整及量化的結果可以推斷這兩個組別幾乎沒有遷移。

(7)Gelatin Zymography assay

係利用細胞遷移的特性，分泌出 MMP 蛋白將基質分解的原理，探究細胞遷移的能力。Lane 2 為不加荷葉水草物 (NLE) 的對照組，Lane 3 為 0.5% FBS DMEM 處理組，Lane 4~7 為處理不同劑量(0.2、0.5、1、2 mg / mL) 之荷葉水草物 (NLE) 的組別。由實驗結果圖

十八得知，不加荷葉水萃物 (NLE) 的對照組及 0.5% FBS DMEM 處理組其 MMP-2 蛋白分泌量最大，隨著不同劑量 (0.2、0.5、1、2 mg / mL) 之荷葉水萃物 (NLE) 處理的組別其 MMP-2 及 MMP-9 蛋白分泌量逐漸減少，其中以最高劑量 (2 mg / mL) 之荷葉水萃物 (NLE) 處理的組別 MMP-2 蛋白分泌最少，其表現量相對減了 60%。

(8) Boyden Chamber Migration Assay

為了再次驗證細胞遷移的能力，使用 Boyden Chamber Migration Assay。(A) 為不加荷葉水萃物 (NLE) 的對照組，(B) ~ (E) 為處理不同劑量 (0.2、0.5、1、2 mg / mL) 之荷葉水萃物 (NLE) 的組別。由實驗結果圖十九得知，不加荷葉水萃物 (NLE) 的對照組，細胞遷移的能力最強，隨著不同劑量 (0.2、0.5、1、2 mg / mL) 之荷葉水萃物 (NLE) 處理的組別，細胞遷移的能力亦逐漸被抑制，且在處理最高劑量 (2 mg / mL) 時，其抑制細胞的能力高達 100%。

陸、綜合討論

由本實驗結果初步得知，荷葉水萃物 (NLE) 具有強效的抗氧化作用，其中荷葉水萃物 (NLE) 所使用的濃度只要 0.05 mg / mL 即可達到很好的抑制且延緩氧化的效果。另外，在動脈粥狀硬化生成的過程中荷葉水萃物 (NLE) 亦含有抑制平滑肌細胞的遷移及增生作用，其作用可能是透過抑制 MMP-2 蛋白的分泌及誘導增生的平滑肌細胞走向細胞凋亡路徑所造成。

由圖四、圖五實驗結果發現到，0.01 mg / mL 就可抑制 Apo B 斷裂，0.05 mg / mL 就可抑制 TBARS 氧化，這兩者皆是抑制蛋白氧化，但其抑制的程度卻有差異，在文獻上並未提及當 LDL 氧化時其差異性，但從文獻上的搜尋卻發現到其他的研究者亦有相同的狀況產生，也就是抑制 Apo B 斷裂與抑制 TBARS 氧化的濃度點不一致 (50)。因此，或許這樣的現象可以提供未來實驗的一個思考方向。

從文獻上可得知，天然物含有抗氧化成分，例如多酚類化合物、黃酮類化合物等，由全圖譜掃描分析中得知，荷葉水萃物 (NLE) 有兩個吸收峰，分別在 260 nm 及 340 nm，推測 260 nm 的吸收峰可能為多酚類化合物居多，而在 340 nm 則可能為類黃酮化合物居多。因此，在後續的實驗中將可探討荷葉水萃物 (NLE) 所造成的抗氧化作用是經由哪種化合物所造成？亦或是探討在荷葉水萃物 (NLE) 中是哪一個單一的有效成分造成如此的抗氧化效果。

荷葉水萃物 (NLE) 抑制平滑肌細胞增生作用在本實驗中是透過誘導細胞走向細胞凋亡的路徑，由結果得知可能是透過 Fas 和

Fas-L 的結合，活化下游 Caspase 8、9，使 Cytochrome C 釋放出，活化 Caspase 3，進而使細胞走向細胞凋亡。雖然在此過程中亦有產生 Bcl-2，但其效果不足以抵抗細胞走向細胞凋亡的路徑(36)。又文獻上指出調控平滑肌細胞的增生有許多因子，例如：Heparin、Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) 等，所以推測荷葉水萃物 (NLE) 抑制平滑肌細胞增生作用很有可能也透過其他的 Ligand 與 Receptor 的結合而誘導細胞凋亡的路徑，因此有必要去釐清是單一或多重因子所誘導荷葉水萃物 (NLE) 抑制平滑肌細胞增生作用。

在圖十六結果中顯示，隨著荷葉水萃物 (NLE) 劑量的提高，p53 有增加的趨勢，文獻中指出，在平滑肌細胞中 P53 可誘導其細胞凋亡和細胞週期停滯(37-41)，因此推斷荷葉水萃物 (NLE) 可能經由 P53 促使 BAX 的活化導致細胞凋亡的發生，所以接下來的研究將進一步探討 p53 的功能以及它是如何被調控和影響其下游的蛋白表現。

文獻上指出平滑肌細胞增生作用，MAPK pathway 扮演一個很重要的角色(42,43)，因此在後續的實驗中將探討在荷葉水萃物 (NLE) 的處理之下，其抑制平滑肌細胞增生作用，是否會藉由 MAPK pathway 的調控？因此，釐清荷葉水萃物 (NLE) 抑制平滑肌細胞增生作用到底是透過單一路徑或是多條路徑所調控，將有助於荷葉在治療動脈粥狀硬化上發展的對策。

平滑肌細胞的不正常增生與遷移是導致動脈粥狀硬化的主因之一(7)，當動脈粥狀硬化發生時，基質 (Extracellular matrix) 會被分

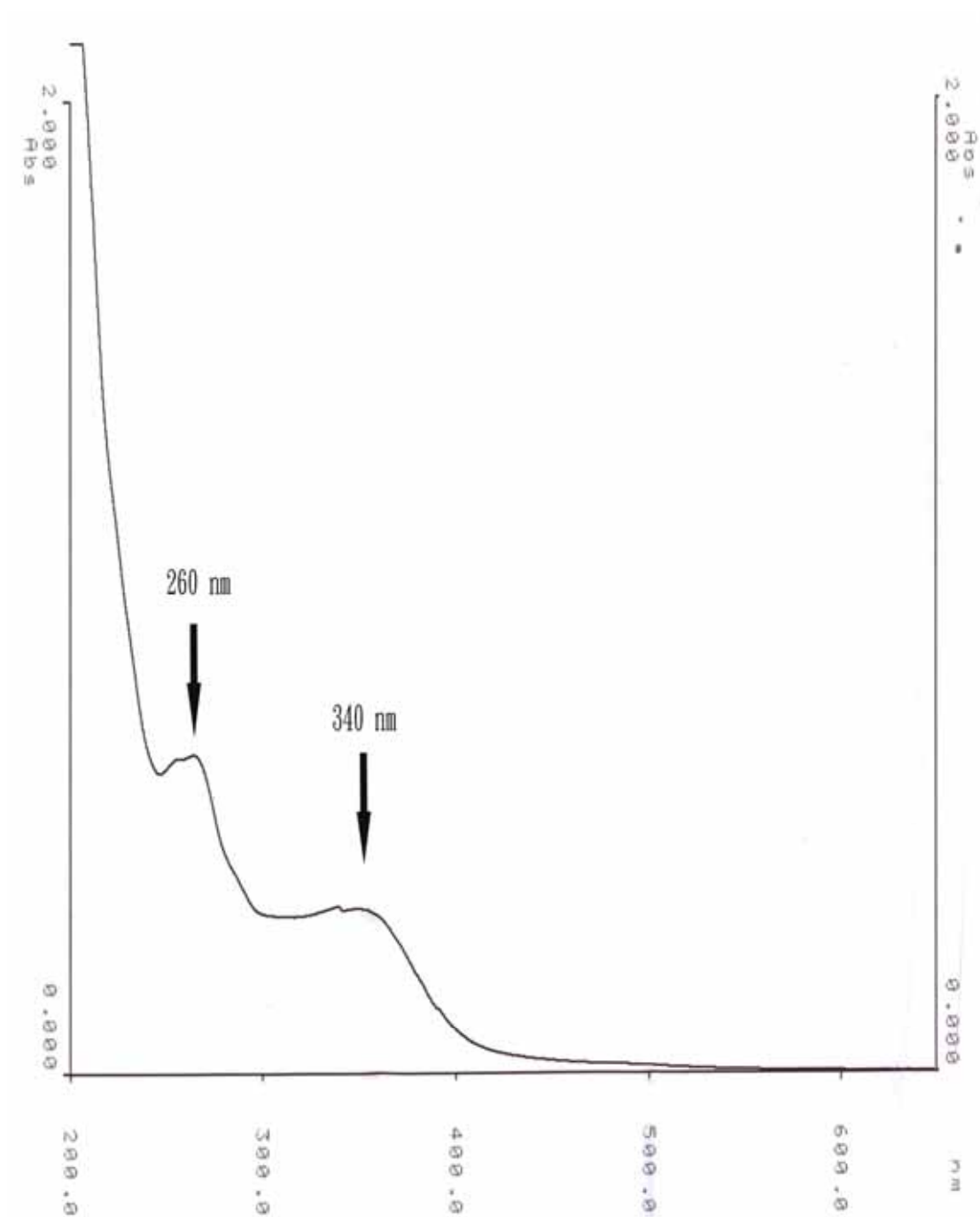
解，讓平滑肌細胞遷移及增生，而基質的分解就需要基質金屬水解蛋白酶（Matrix metalloproteinases, MMP）的參與，如：MMP-2、MMP-9(44)。由實驗結果可知，隨著荷葉水萃物（NLE）劑量的提高，MMP-2 有減少的趨勢，MMP-9 沒有明顯的改變，有文獻指出 MMP-2 可在平滑肌細胞中表現，但其表現並不是由細胞激素（Cytokines）或是生長因子（Growth factors）調控。MMP-9 的表現則較弱並且可被 TNF- α 所調控而 MMP-9 已被證實其 Promoter 可被 NF- κ B and AP-1 活化，又 MMP-2 與 MMP-9 具有相似的受質特異性（Substrate specificities）(45-48)。而後續將可探討隨著荷葉水萃物（NLE）劑量的提高，MMP-2 有減少的趨勢，是否是由於 NF- κ B 被抑制所導致。因此，補做了在 Western blotting 中 NF- κ B 的表現，由圖二十的結果得知，隨著處理荷葉水萃物的劑量提高，NF- κ B 的表現量有被抑制的現象，所以接下來的實驗方向將可繼續探討荷葉水萃物是否也會影響基因層次的表達。

當血管受到損傷後，平滑肌細胞會遷移到 Intima 並增生(49)，使得原本的平滑肌細胞處於靜止狀態（Quiescent state）就會進入細胞週期，由實驗結果得知，荷葉水萃物（NLE）具有抑制增生的能力，那是否荷葉水萃物（NLE）是透過抑制細胞週期的蛋白達到抑制增生的能力將是往後應該探討的重點。

最後由以上的實驗結果與文獻參考，可歸納出一個結論，荷葉水萃物（NLE）主要是透過 Fas 和 Fas-L 的活化，開啟下游細胞凋亡的機制，使得增生的平滑肌細胞走向細胞凋亡的命運，而這其中 P53 可能扮演不可忽略的角色，如附圖一，而是怎樣的機制使 P53 活化

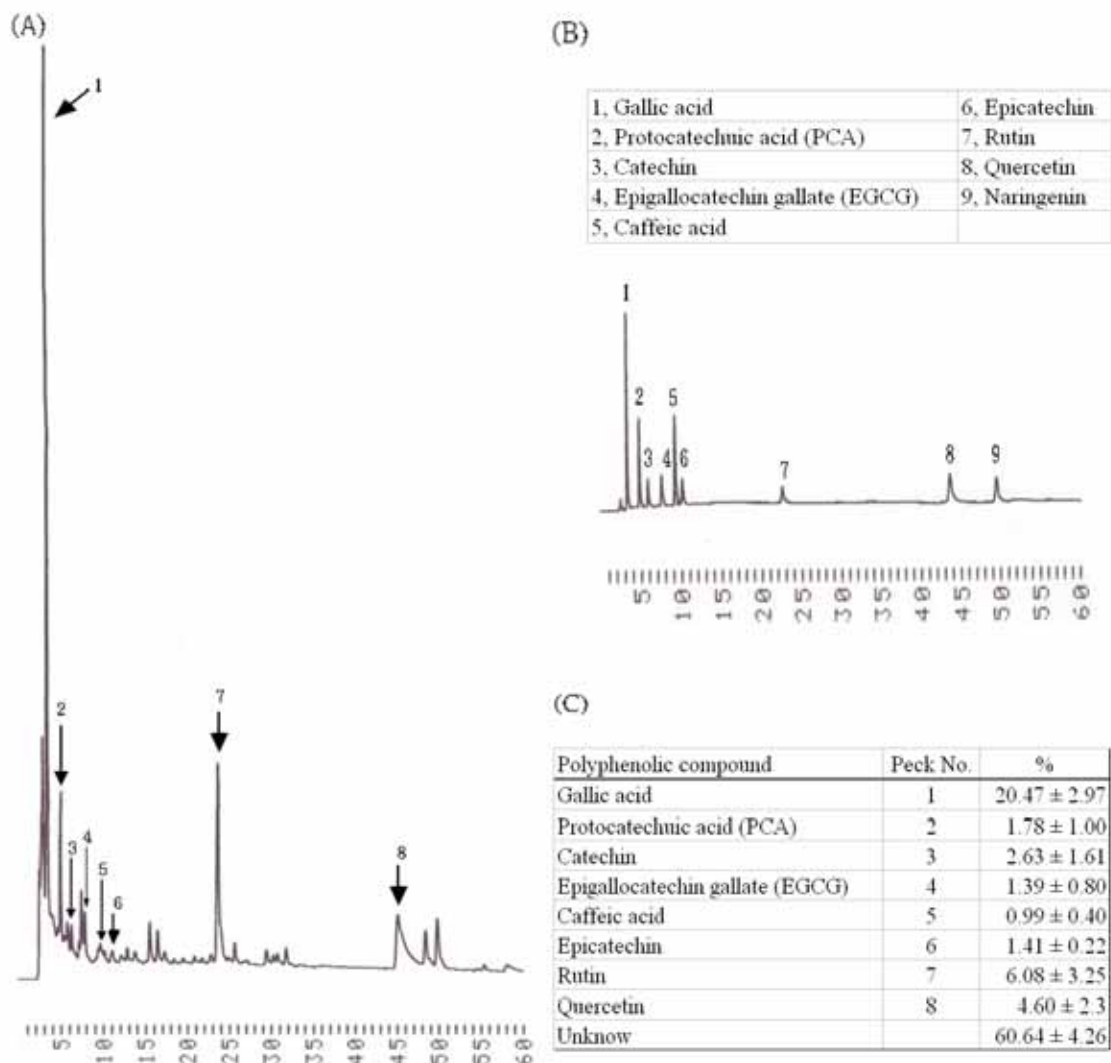
及 p53 是怎樣調控平滑肌細胞的生死或是抑制遷移和增生將有待進一步的研究，才能解開這個謎團。

柒、實驗結果圖表



圖一 荷葉水萃物全圖譜掃描。

Figure 1 UV-Visible spectra form *Nuciferine Leaf extract* (NLE).



圖二 荷葉水萃物之高效能液相層析分析。

Figure 2 **The HPLC chromatogram of *Nuciferine Leaf* extract (NLE).**

(A) HPLC chromatograms of free polyphenols from *Nuciferine Leaf* extract (NLE) (5 mg/mL; 10 μ L) (B) HPLC chromatogram of nine kinds of standard polyphenols (0.1 mg/mL; 10 μ L). Peaks: 1, gallic acid; 2, protocatechuic acid (PCA); 3, catechin; 4, epigallocatechin gallate (EGCG); 5, caffeic acid; 6, epicatechin; 7, rutin; 8, quercetin; 9, naringenin. (C) Composition of the NLE.

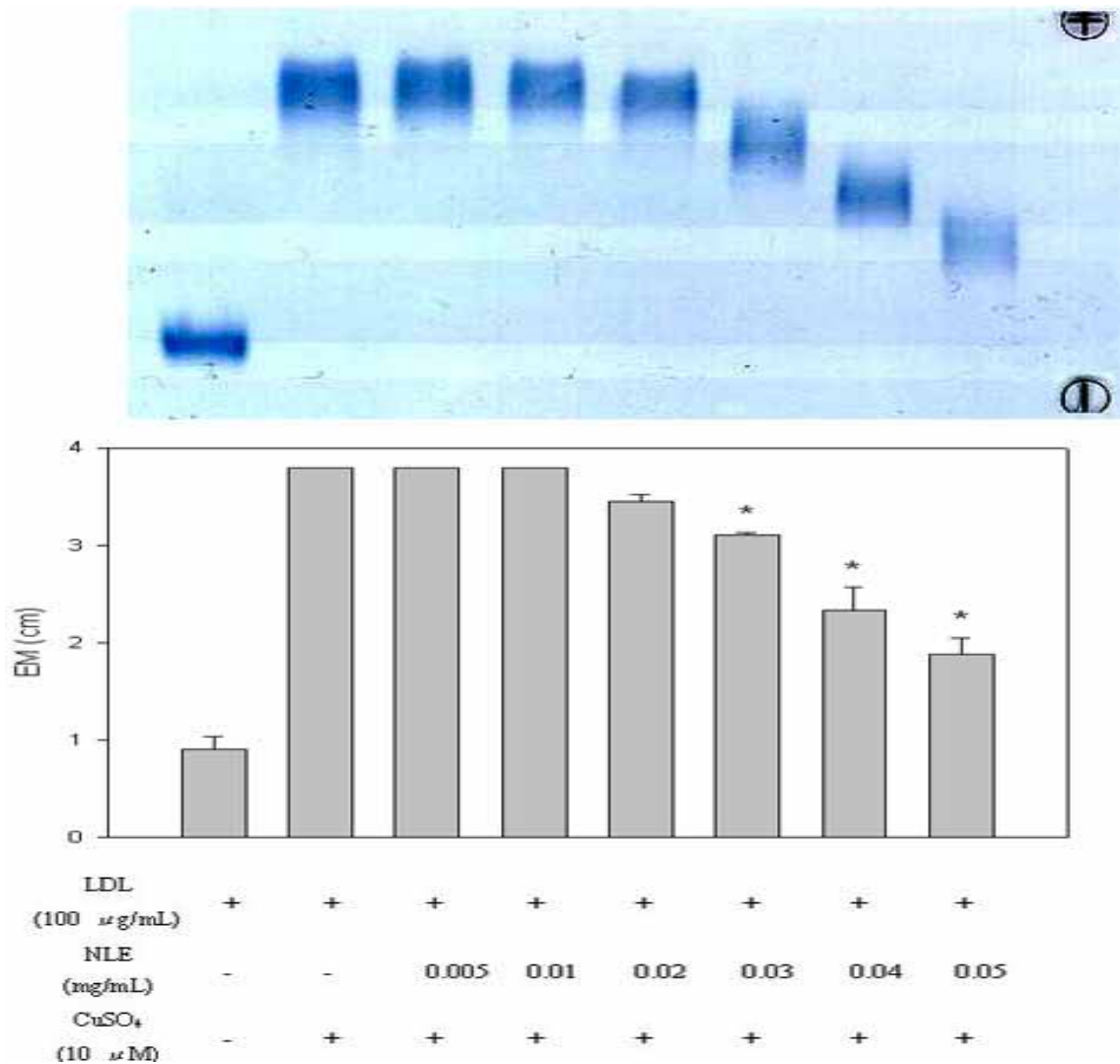


圖 三 荷葉水萃物對銅離子誘導 LDL 氧化的抑制效果。

Figure 3 **Inhibitory effects of NLE on the Cu²⁺-induced LDL oxidation.** LDL(100 μ g/mL) was incubated with 10 μ M CuSO₄ at 37 °C、24 hr in the presence or absence of different concentrations of NLE (0 ~ 0.05 mg/mL). This result was expressed as the distance moved from origin(EM). The data were represented as means \pm SD, n = 3. The P value was calculated by an unpaired t-test respectively compared with the control (LDL and CuSO₄ incubated together); * P < 0.01.

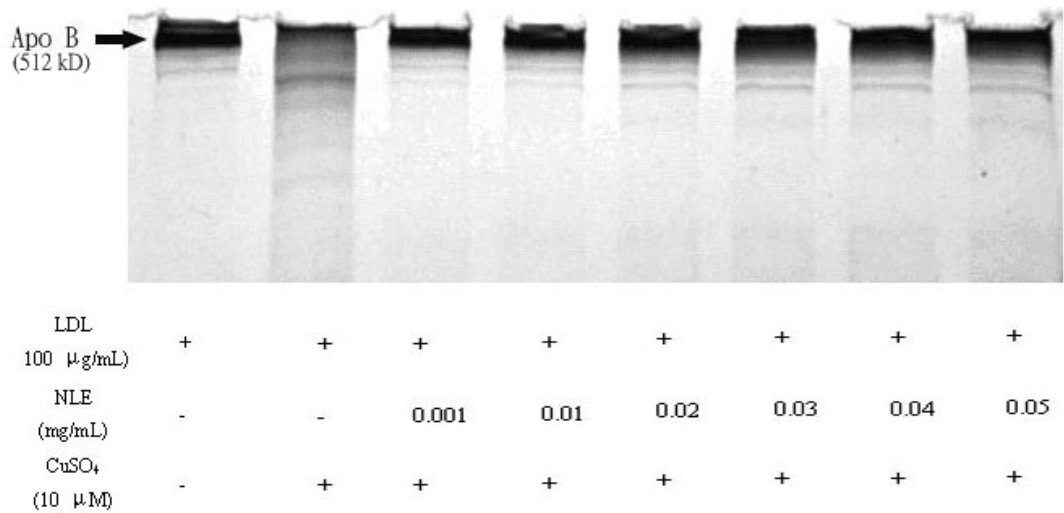


圖 四 荷葉水萃物對銅離子誘導 Apo B 蛋白斷裂的抑制效果。

Figure 4 **Inhibition of Cu²⁺-mediated ApoB protein fragmentation in LDL by NLE.** LDL (100 μ g/mL) was incubated with 10 μ M CuSO₄ at 37°C for 4 hr in the presence or absence of various concentrations of NLE (0 ~ 0.05 mg/mL).

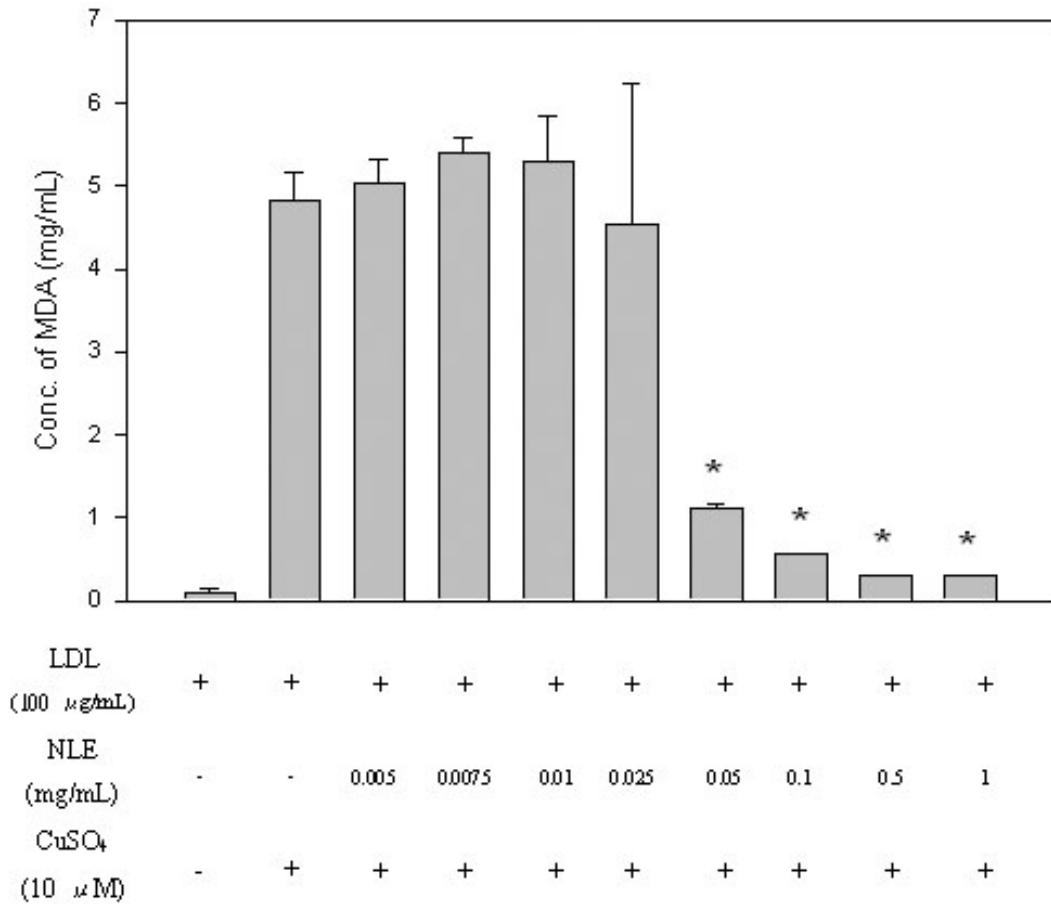


圖 五 荷葉水萃物對銅離子誘導過氧化的抑制效果。

Figure 5 Inhibitory effects of NLE on the Cu²⁺-induced peroxidation in LDL. LDL (100µg/mL) was incubated with 10 µM CuSO₄ at 37°C、24 hr in the presence or absence of different concentrations of NLE(0.005 ~ 1 mg/mL). The data were represented as means ± SD, n = 3. The P value was calculated by an unpaired t-test respectively compared with the control (LDL and CuSO₄ incubated together); * P < 0.005.

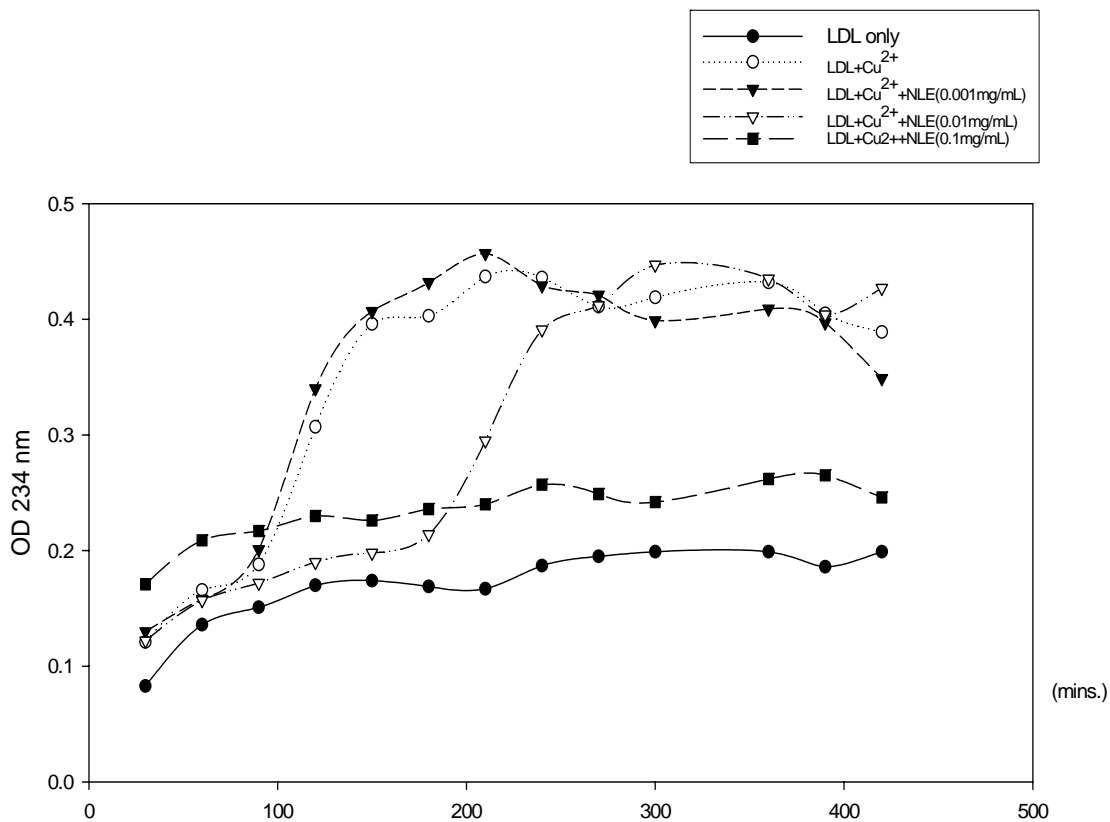


圖 六 荷葉水萃物對銅離子誘導脂質過氧化的抑制效果。

Figure 6 **Inhibitory effects of NLE on the Cu²⁺-induced LDL oxidation in diene conjugation assay.** LDL(100μg/mL) was incubated with 10 μM CuSO₄ at 37°C for 0 ~ 420 mins in the presence or absence of different concentrations of NLE (0 ~ 0.1 mg/mL).

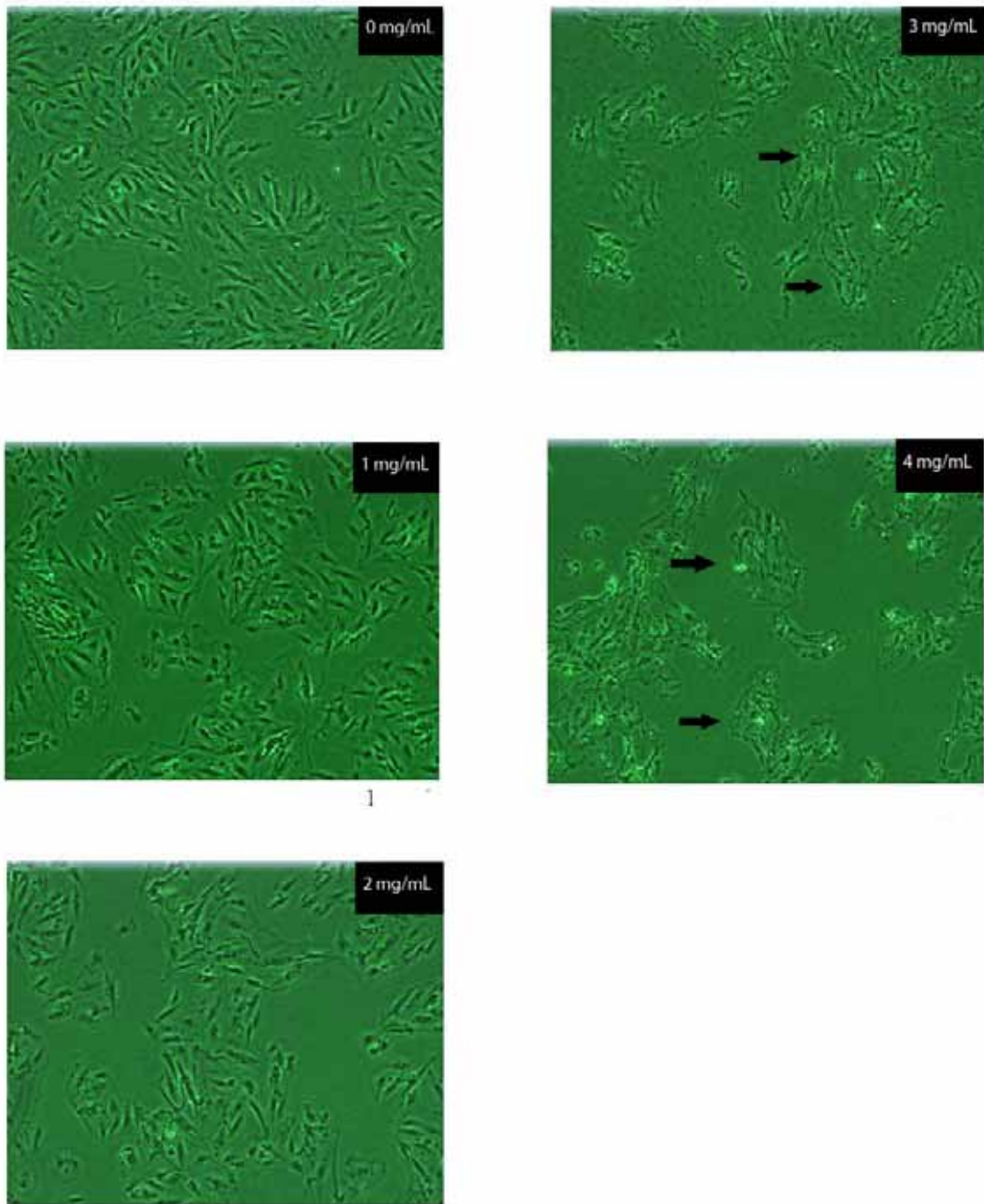


圖 七 荷葉水萃物處理下之 A7r5 細胞的生長型態。

Figure 7 **Morphology of A7r5 cells.** A7r5 cell incubated with DMEM and in the presence or absence of different concentrations (0 ~ 4 mg/mL) *Nuciferine Leaf* extract (NLE). Arrow indicated cell shrinkage.

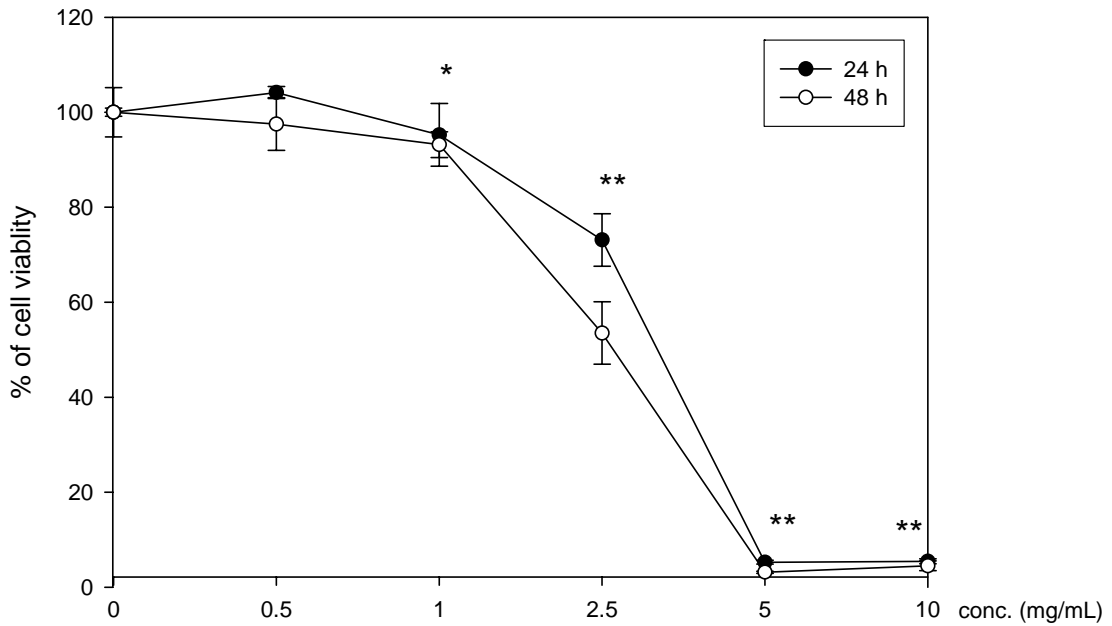


圖 八 荷葉水萃物處理下之細胞生長測試。

Figure 8 Effect of *Nelumbo nucifera* leaf extract(NLE) on the growth of A7r5 cells. A7r5 cells (10^5 cells/well) were treated with various concentrations of NLE (0 ~ 10 mg/mL) for 24 h or 48 h. Cell viability was determined by MTT assay. The values were represented as means \pm SD, n = 3. The P value was calculated by an unpaired t-test respectively compared with the control; * P < 0.005, ** P < 0.0005.

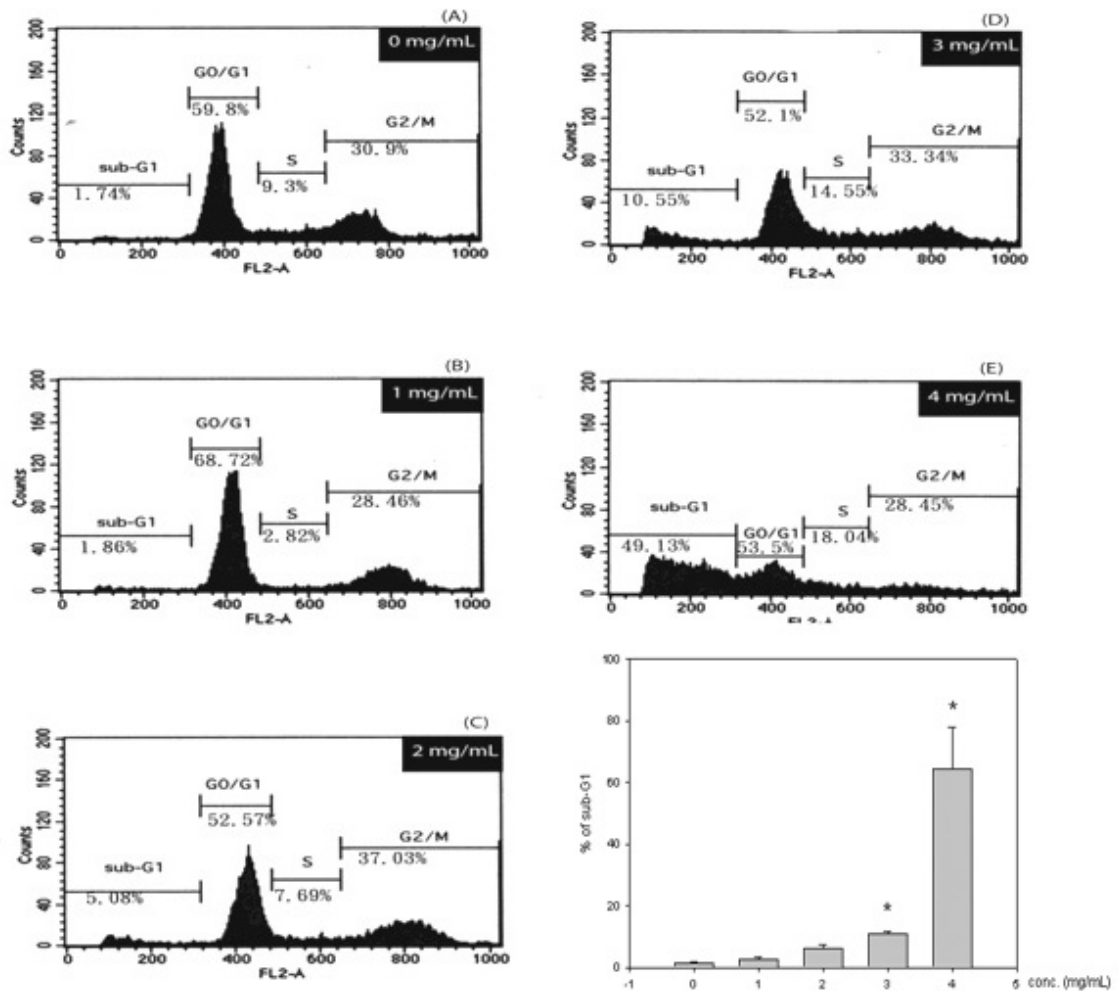


圖 九 荷葉水萃物處理下之細胞週期分析。

Figure 9 **The effects of NLE on A7r5 cell cycle distribution.** A7r5 cells (5×10^5 cells/dish) were treated with various concentrations of NLE (0 ~ 4 mg/mL) for 24 h . The DNA content was analyzed using fluorescence flow cytometry. The position of the sub-G1 peak (hypodiploidy), integrated by apoptotic cells, and the G0/G1 and G2/M peaks are indicated. The values were represented as means \pm SD, n = 3. The P value was calculated by an unpaired t-test respectively compared with the control; * P < 0.001.

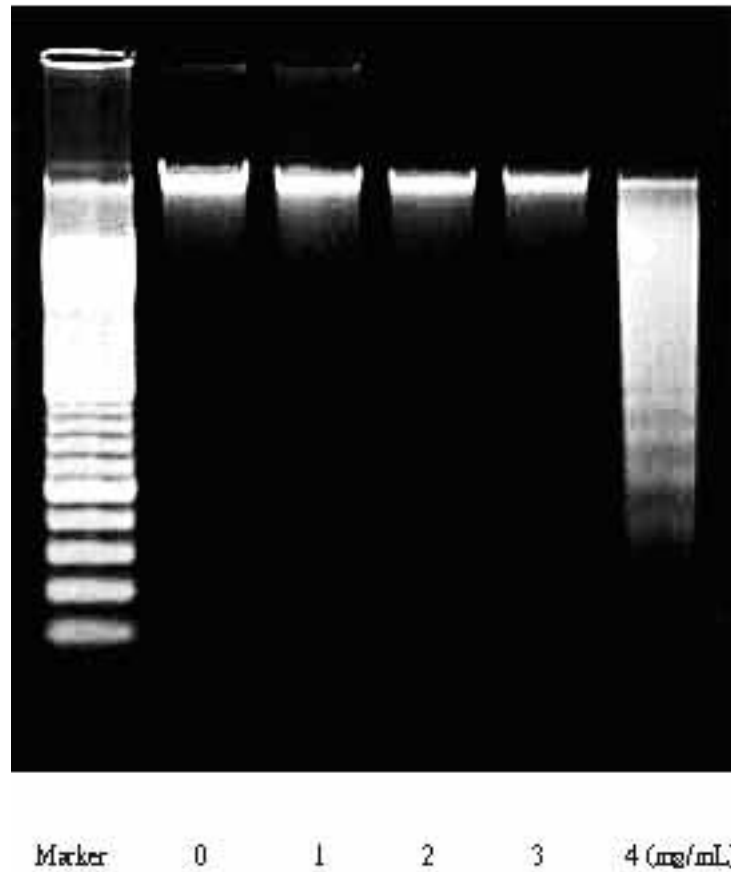


圖 十 荷葉水萃物處理下之 DNA 斷裂分析。

Figure 10 **Electrophoresis of DNA fragments in A7r5 cells treated with NLE.** Genomic DNA was isolated from A7r5 cells (5×10^5 cells/dish) treated with various concentrations of NLE (0 ~ 4 mg/mL) for 24 h. The level of DNA fragmentation was evaluated by electrophoresis on agarose gel containing ethidium bromide which was photographed under UV light. The DNA ladder was detected in cells treated with 5 mg/ml NLE. The experiment was repeated for three times to represent the histograms.

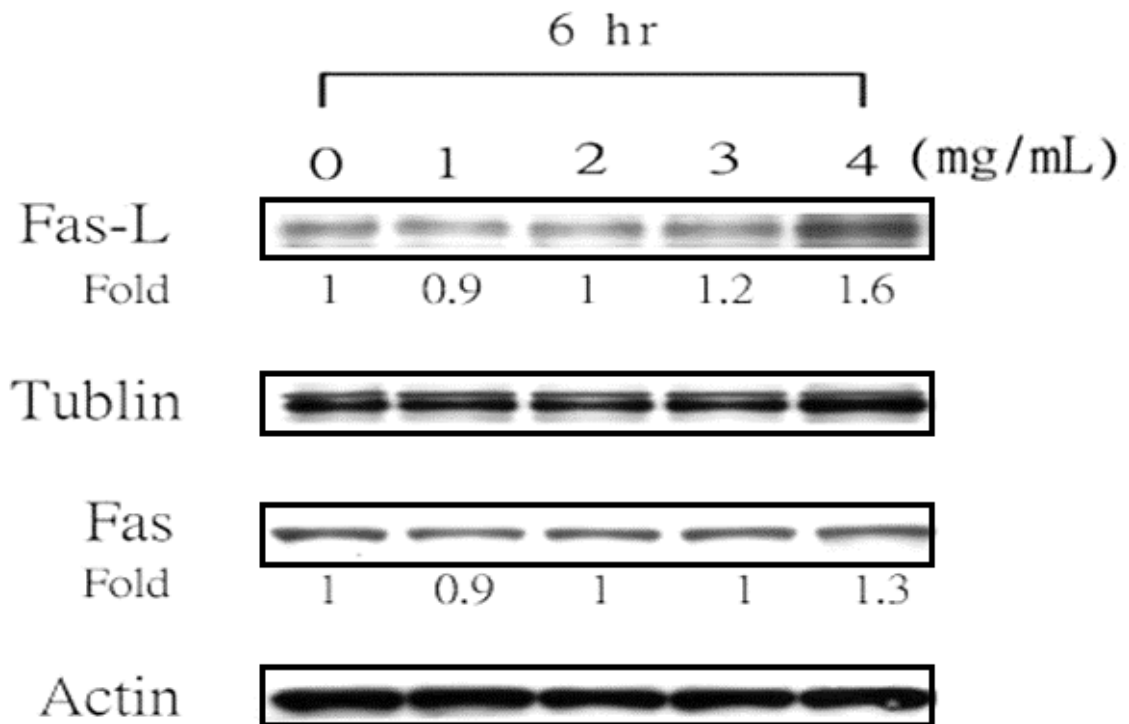


圖 十一 荷葉水萃物處理下之 Fas 和 Fas-L 的表現。

Figure 11 **Effect of NLE-induced Fas and Fas-L activation in A7r5 cells.** A7r5 cells were treated with NLE (6 h) for the indicated concentration, protein were determined by Western blotting using anti-Fas and anti-Fas-L. Actin and Tublin, load controls. This figure is a representative of three independent experiments with similar results.

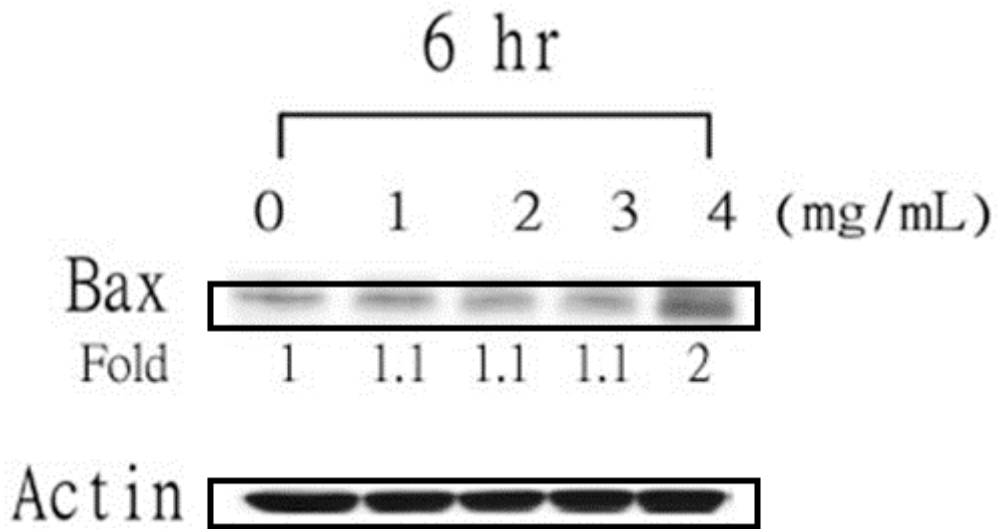


圖 十二 荷葉水萃物處理下之 Bax 的表現。

Figure 12 **Effect of NLE-induced Bax activation in A7r5 cells.** A7r5 cells were treated with NLE (6 h) for the indicated concentration, protein were determined by Western blotting using anti-Bax. Actin, load controls. This figure is a representative of three independent experiments with similar results.

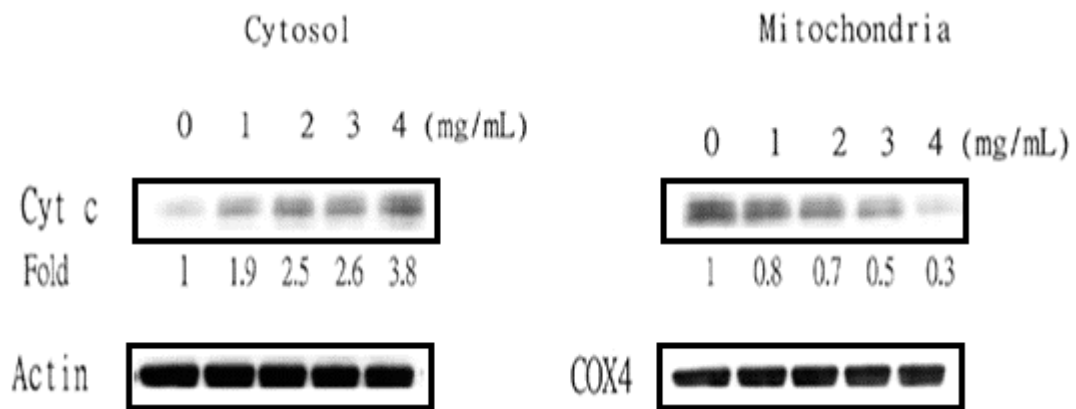


圖 十三 荷葉水萃物處理下之 Cytochrome C 的表現。

Figure 13 **Effect of NLE-induced cytochrome c release.** A7r5 cells were treated with NLE (6 h) for the indicated concentration and the expression of cytochrome c in the cytosol and the mitochondria of the untreated and NLE-treated A7r5 cells was assayed by western blotting.

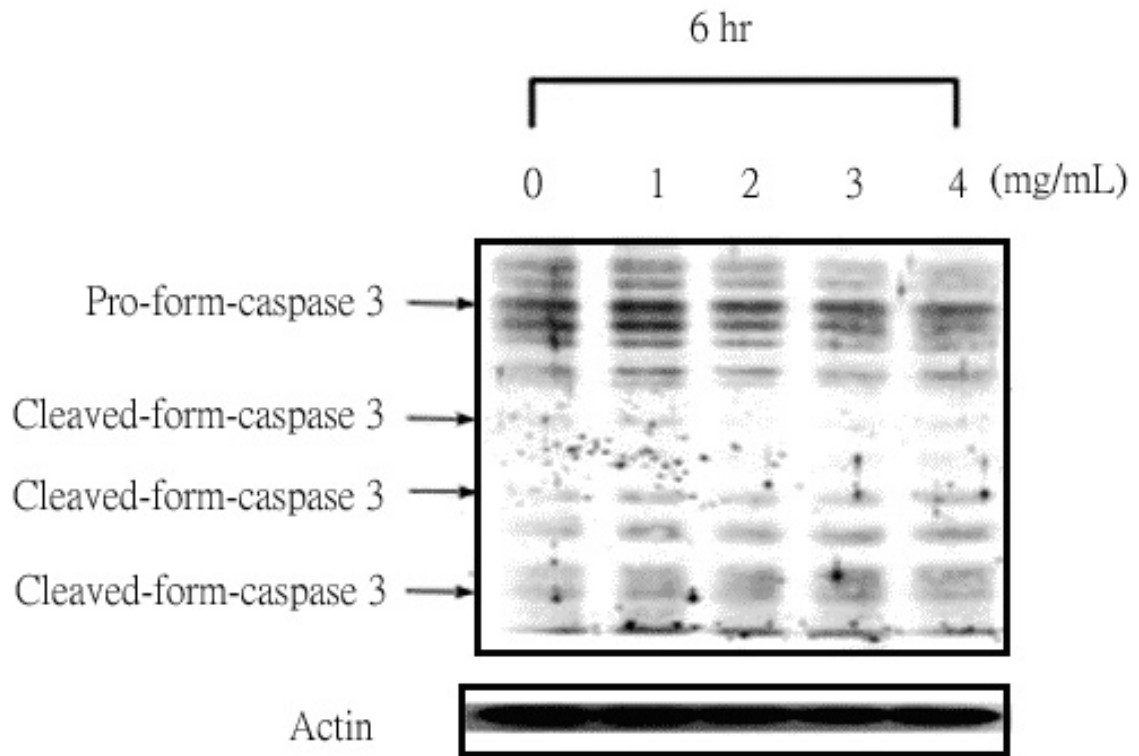


圖 十四 荷葉水萃物處理下之 Caspase-3 的表現。

Figure 14 **Involvement of caspase-3 in NLE-induced apoptosis.** A7r5 cells were treated with NLE (6 h) for the indicated concentration and analyzed using Western blotting with anti-cleaved-caspase 3 and pro-caspase-3 antibody. Actin was the loading controls. This figure is a representative of three independent experiments with similar results.

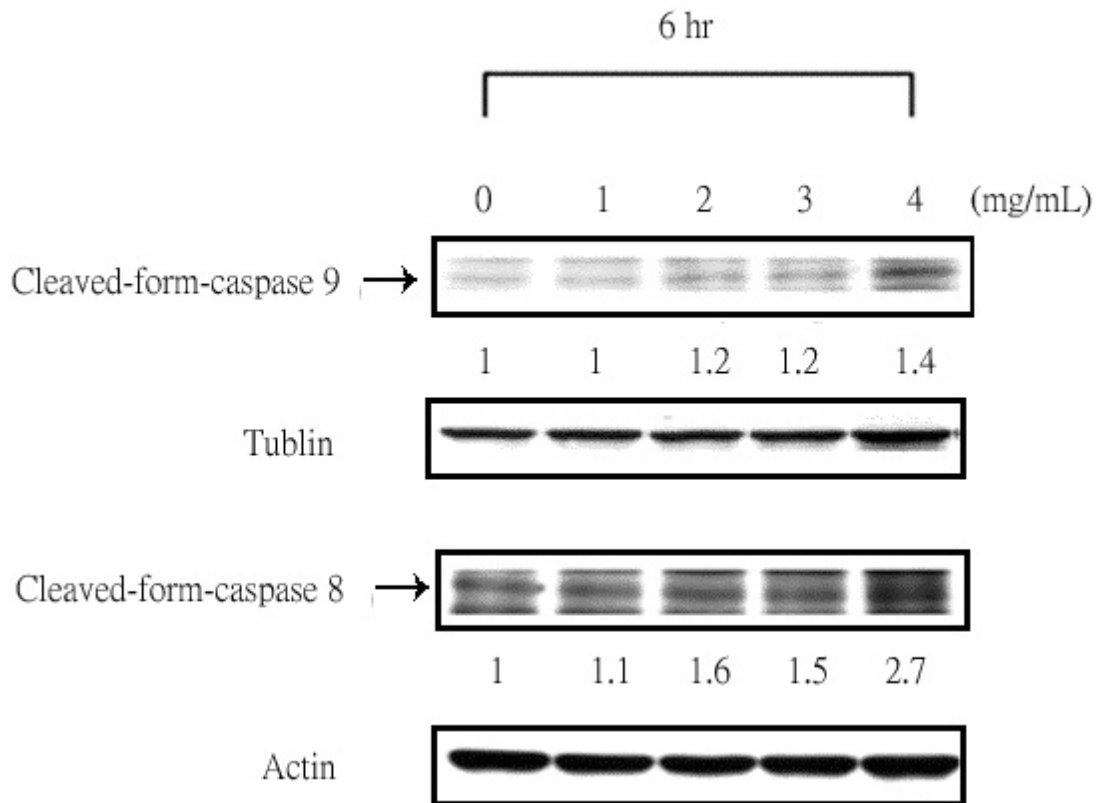


圖 十五 荷葉水萃物處理下之 Caspase-9 和 Caspase-8 的表現。

Figure 15 **Involvement of caspase-9 and caspase-8 in NLE-induced apoptosis.** A7r5 cells were treated with NLE (6 h) for the indicated concentration and analyzed using Western blotting with anti-cleaved-caspase-8, pro-caspase-8, anti-cleaved-caspase-9 and pro-caspase-9 antibody. Actin was the loading controls. This figure is a representative of three independent experiments with similar results.

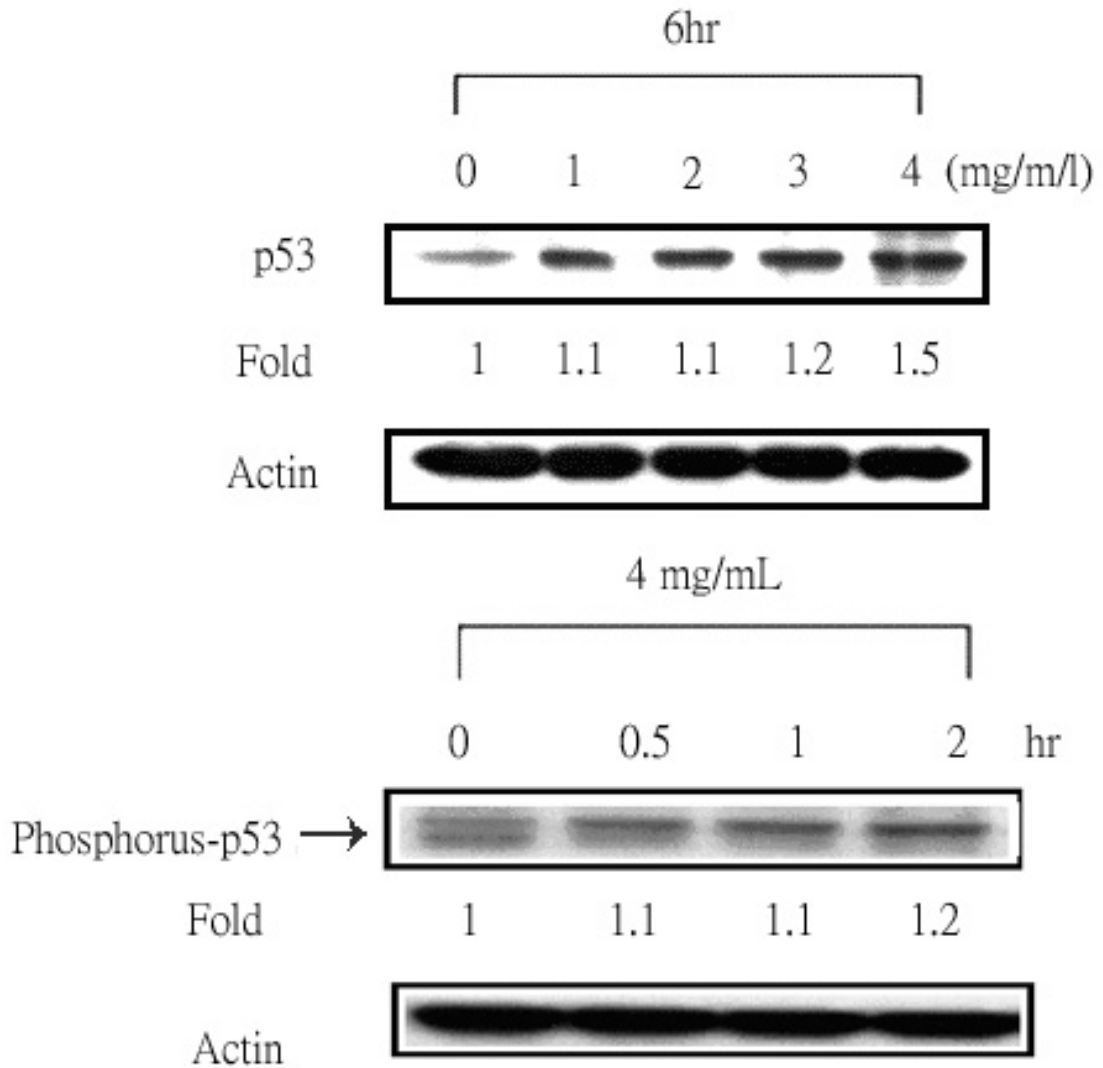


圖 十六 荷葉水萃物處理下之 p53 與磷酸化 p53 的表現。

Figure 16 **Effect of NLE-induced p53 and phosphorus-p53 activation in A7r5 cells.** A7r5 cells were treated with NLE (6 h) for the indicated concentration, protein were determined by Western blotting using anti-p53 and anti-phosphorus-p53 antibody. Actin, load controls. This figure is a representative of three independent experiments with similar results.

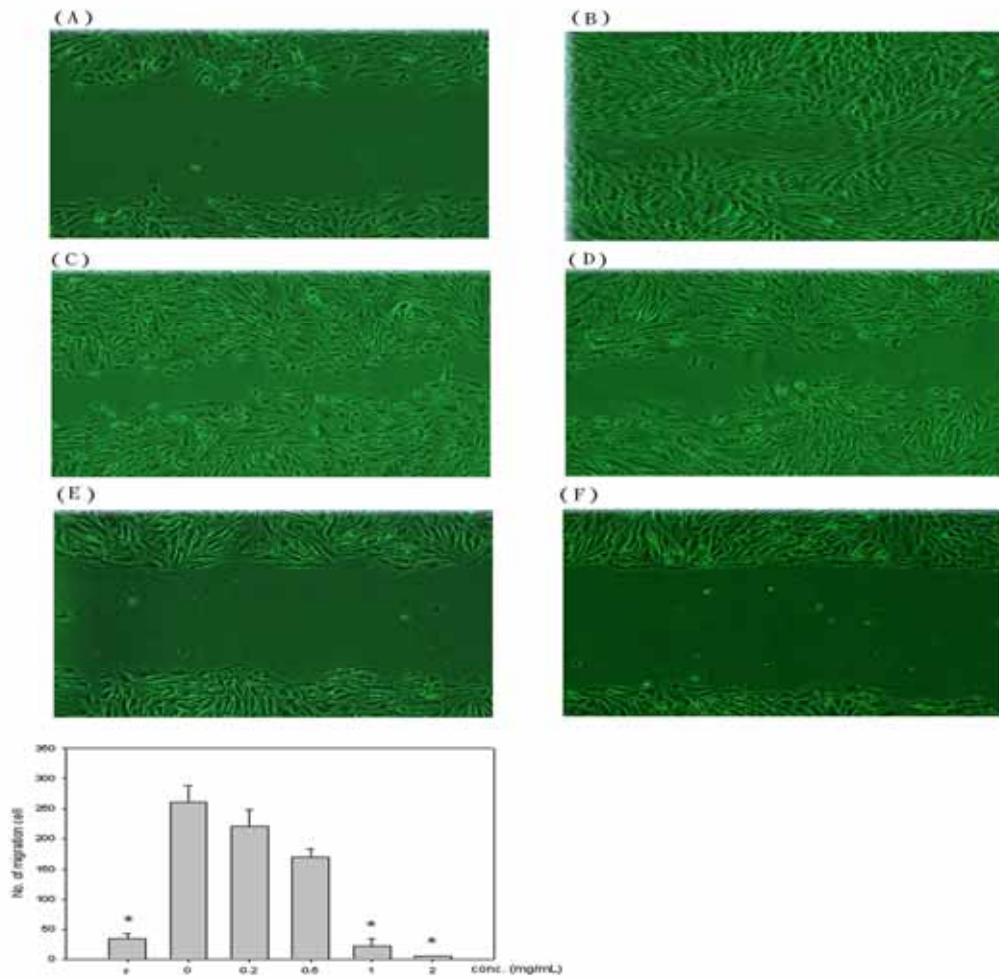


圖 十七 荷葉水萃物處理下之傷口癒合測試 (wound healing assay)。

Figure 17 **Effects of NLE on cell migration in wound healing assay.**

A7r5 cell incubated with DMEM and in the presence or absence of different concentrations (0 ~ 2 mg/mL) *Nuciferine Leaf* extract (NLE).

The values were represented as means \pm SD, n = 3. The P value was calculated by an unpaired t-test respectively compared with the control;

* P < 0.01.

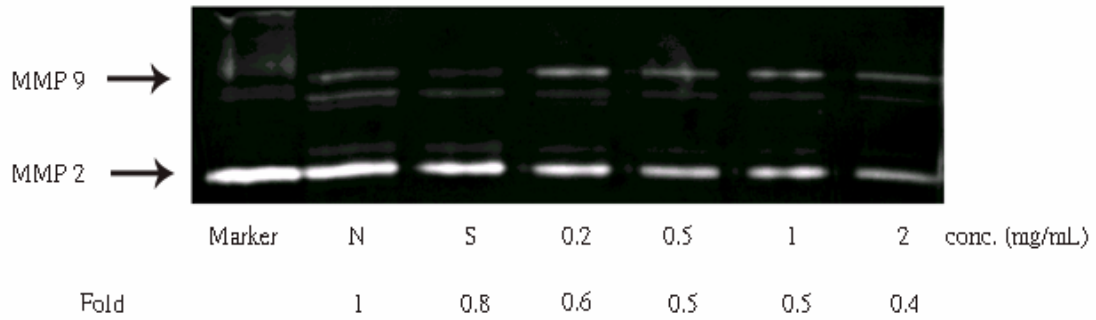


圖 十八 荷葉水萃物處理下之 MMP 蛋白表現。

Figure 18 Gelatin zymography assay of A7r5 cells treated with NLE. A7R5 cells were treated with various concentrations (0 ~ 2 mg/ml) of NLE for 24 h .Removing the incubated medium and adding fresh serum-free medium , the cells were allowed to incubate for 24 hr. After the incubation, conditioned medium were collected and MMP-2 and MMP-9 activity were detected by gelatin zymography.

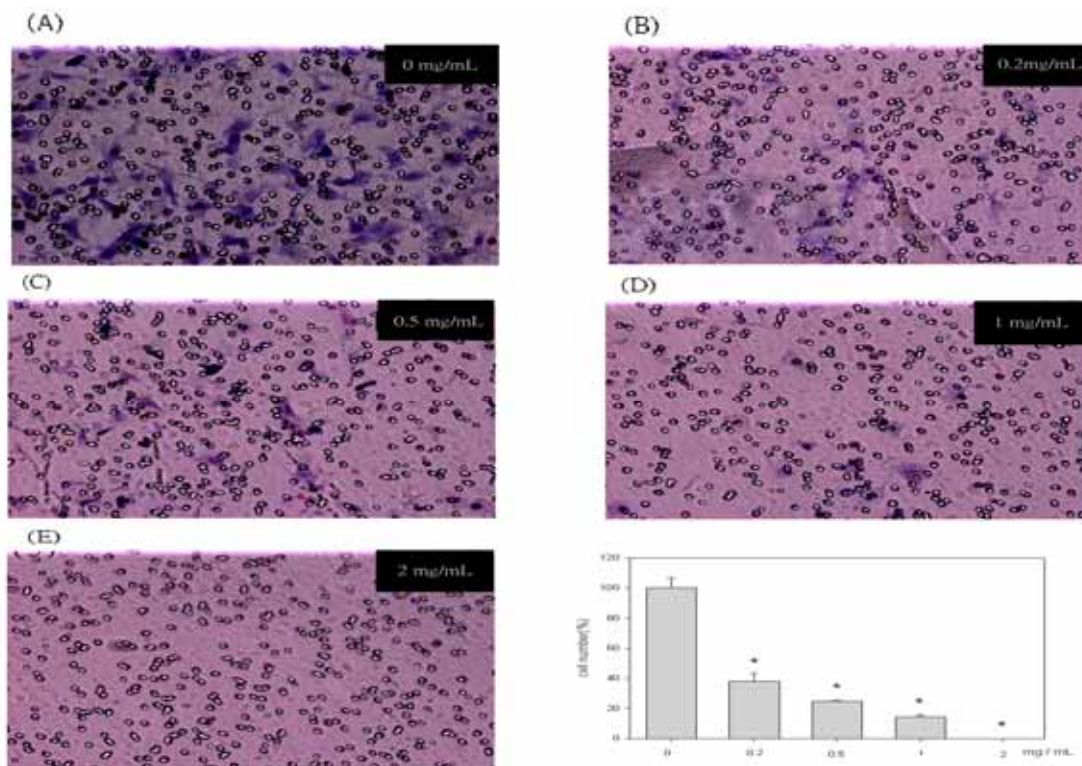


圖 十九 荷葉水草物處理下之 A7r5 細胞遷移測試。

Figure 19 Effects of NLE on cell migration in Boyden chamber assay. A7r5 cells were treated with various concentrations of NLE (0 ~ 2 mg/ml) for 24 h. The migrated cells were analyzed using a modified Boyden chamber. Cells (5×10^5 cell/ mL) in serum-free DMEM were added to the upper chamber and allow to migrate for 6 hour through $8\text{-}\mu\text{m}$ porous membrane toward the lower chamber to conditioned medium. Motility was quantified by counting the number of cells that migrated to the undersides of the membrane under microscopy (400X). The results are shown in means \pm SD of octuple independent experiments. The P value was calculated by an unpaired t-test respectively compared with the control; * $P < 0.001$.

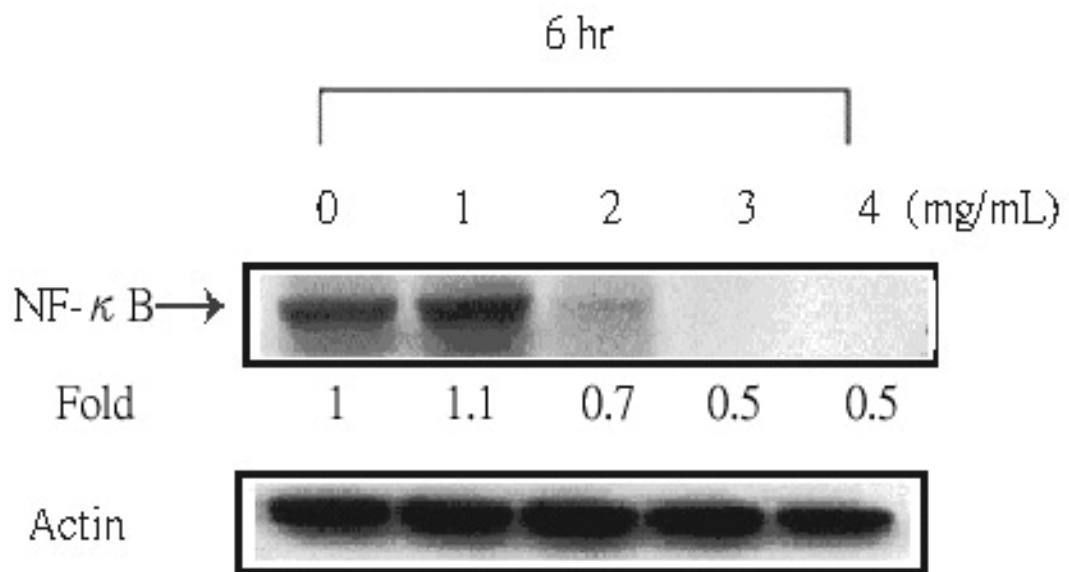


圖 二十 荷葉水萃物處理下之 NF- κ B 的表現。

Figure 20 **Effect of NLE-induced NF- κ B activation in A7r5 cells.** A7r5 cells were treated with NLE (6 h) for the indicated concentration, protein were determined by Western blotting using anti-NF- κ B. Actin, load controls. This figure is a representative of three independent experiments with similar results.

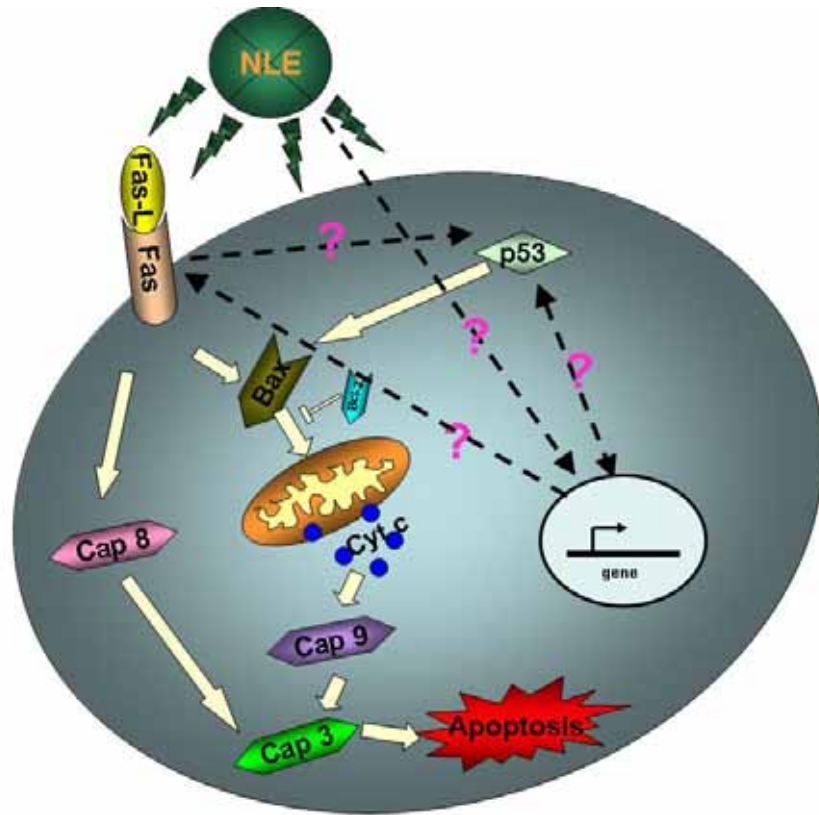
捌、附表

脂蛋白	平均直徑	密度	蛋白質	三酸甘油脂	膽固醇	磷脂質
	(nm)	(g/ml)	(%)	(%)	(%)	(%)
乳糜粒	100 ~ 1000	< 0.95	1 ~ 2	87	3	8
VLDL	43	0.95 ~ 1.006	10	55	17	18
LDL	24-26	1.006 ~ 1.063	25	8	45	22
HDL	7 ~ 11	1.063 ~ 1.210	44	3	23	30

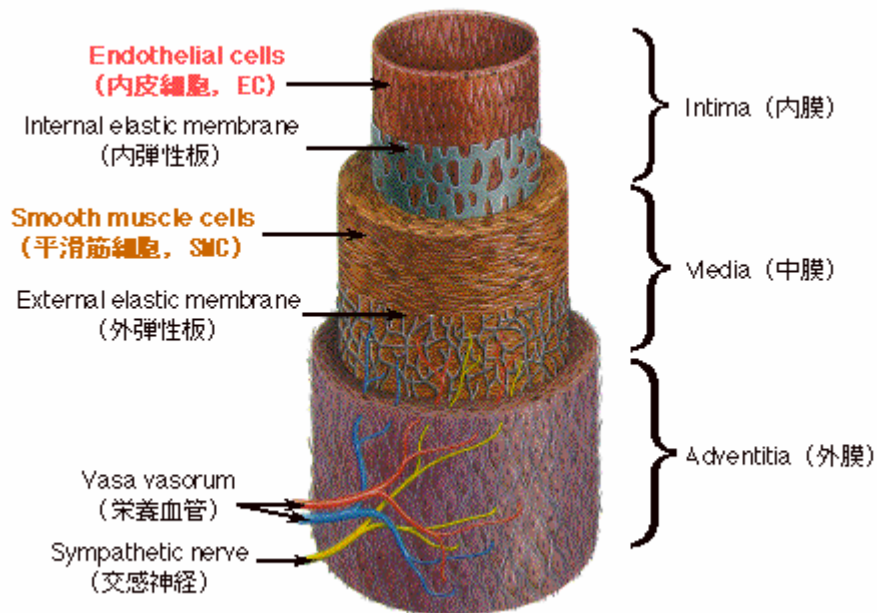
附表 一 人類血漿脂蛋白的物理特性與組成。

(摘自：Thompson, G.R., Handbook of Hyperlipidemia, 1989)

玖、附圖



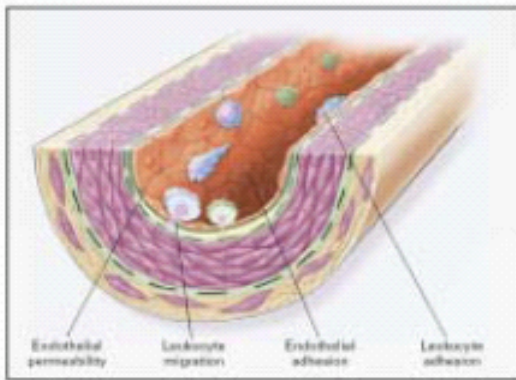
附圖 一 荷葉水萃物 (NLE) 之訊息傳導圖。



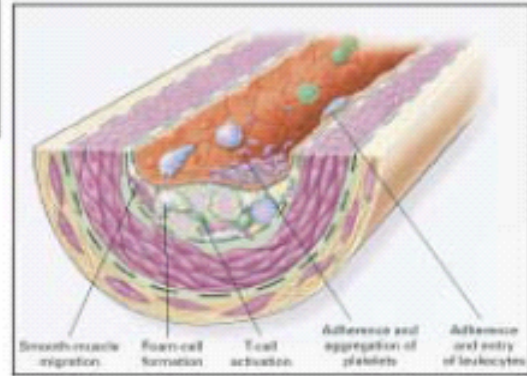
附圖 二 動脈的構造。

(摘自：Biomechanics Laboratory Nagoya Institute of Technology 的網頁)

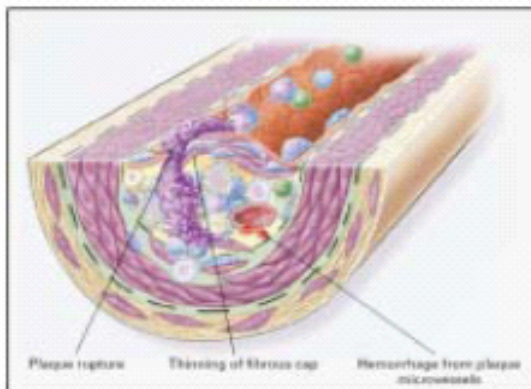
Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis



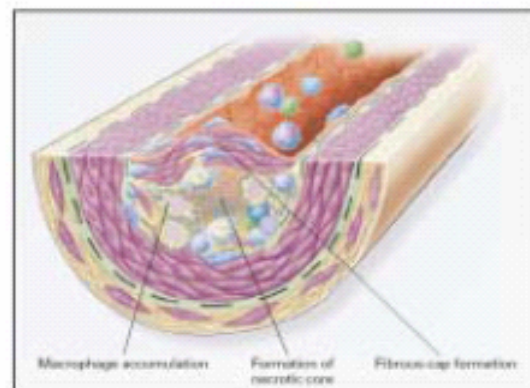
Fatty-Streak Formation in Atherosclerosis



Formation of an Advanced, Complicated Lesion of Atherosclerosis

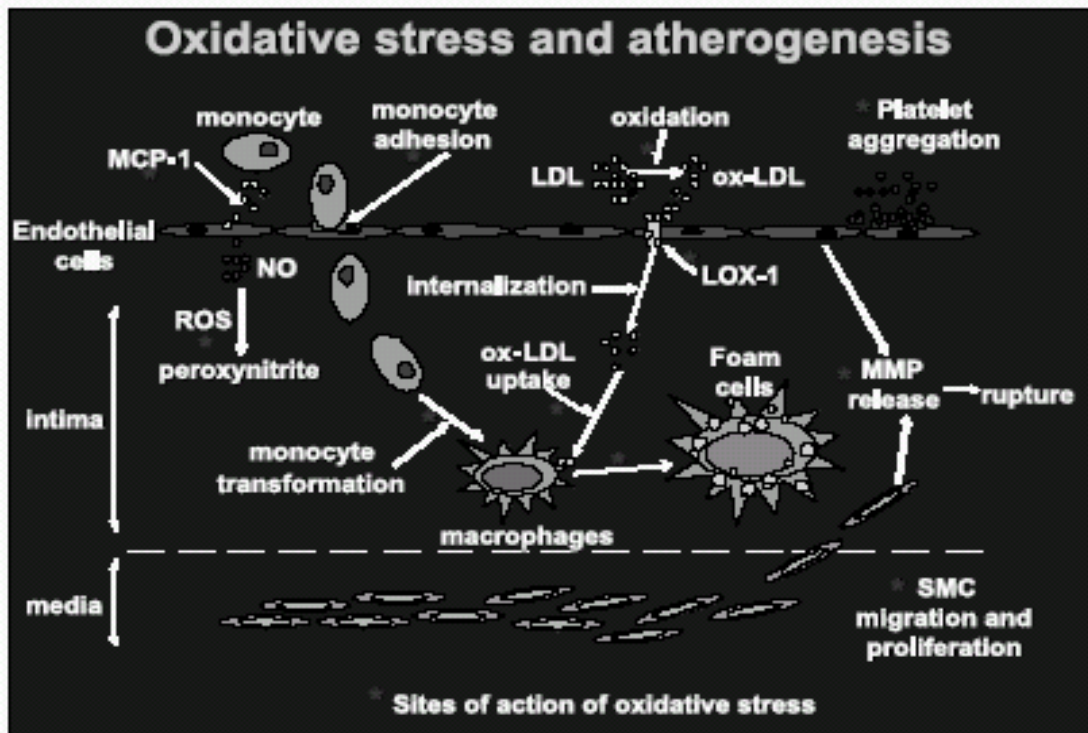


Unstable Fibrous Plaques in Atherosclerosis



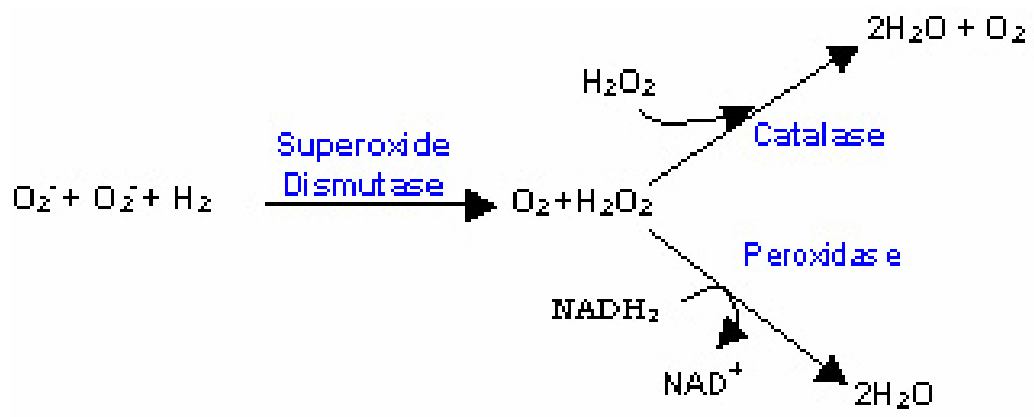
附圖 三 動脈粥狀硬化的過程。

(摘自 The New England Journal of Medicine, 340, 115,1999)

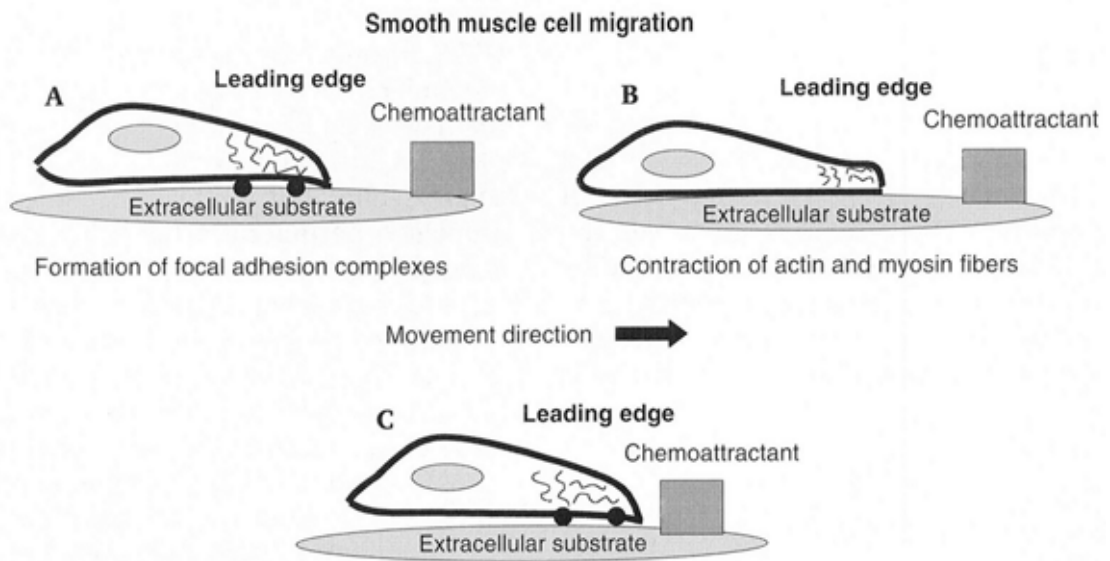


附圖 四 氧化壓力與動脈粥狀硬化。

(摘自：Indian Heart J. 56(2):163-73. 2004)

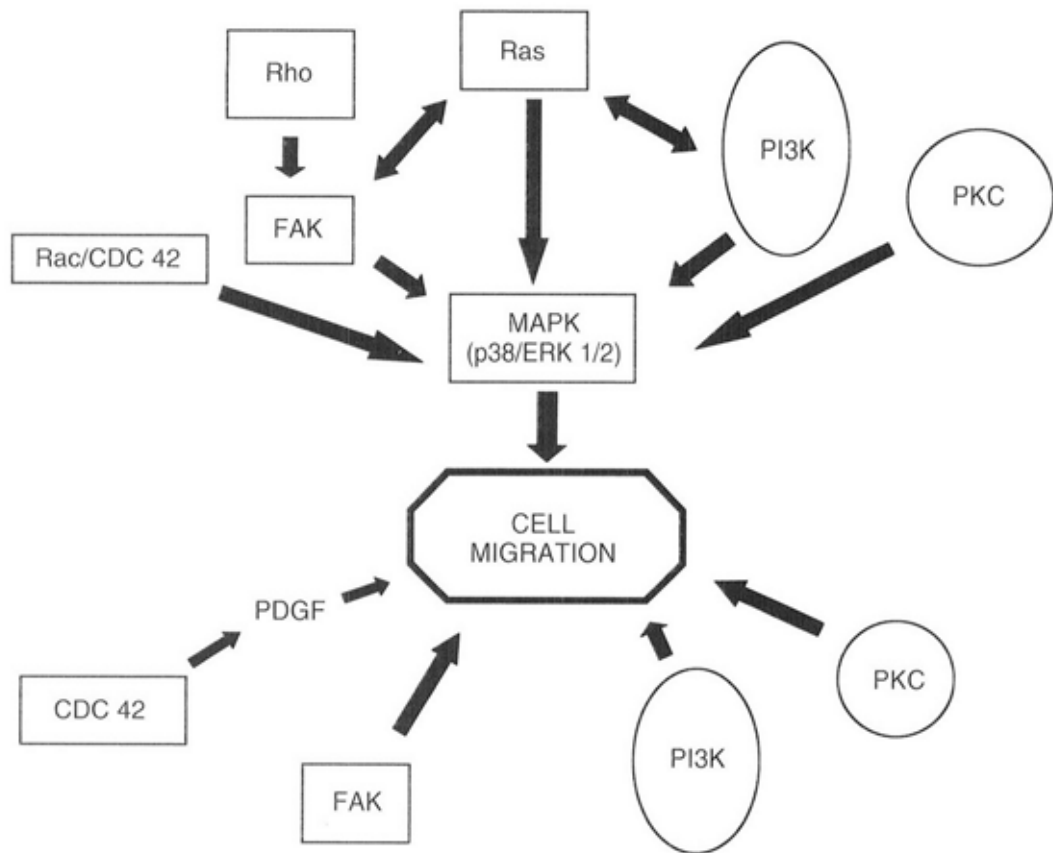


附圖 五 生物體中抗氧化防禦機制。



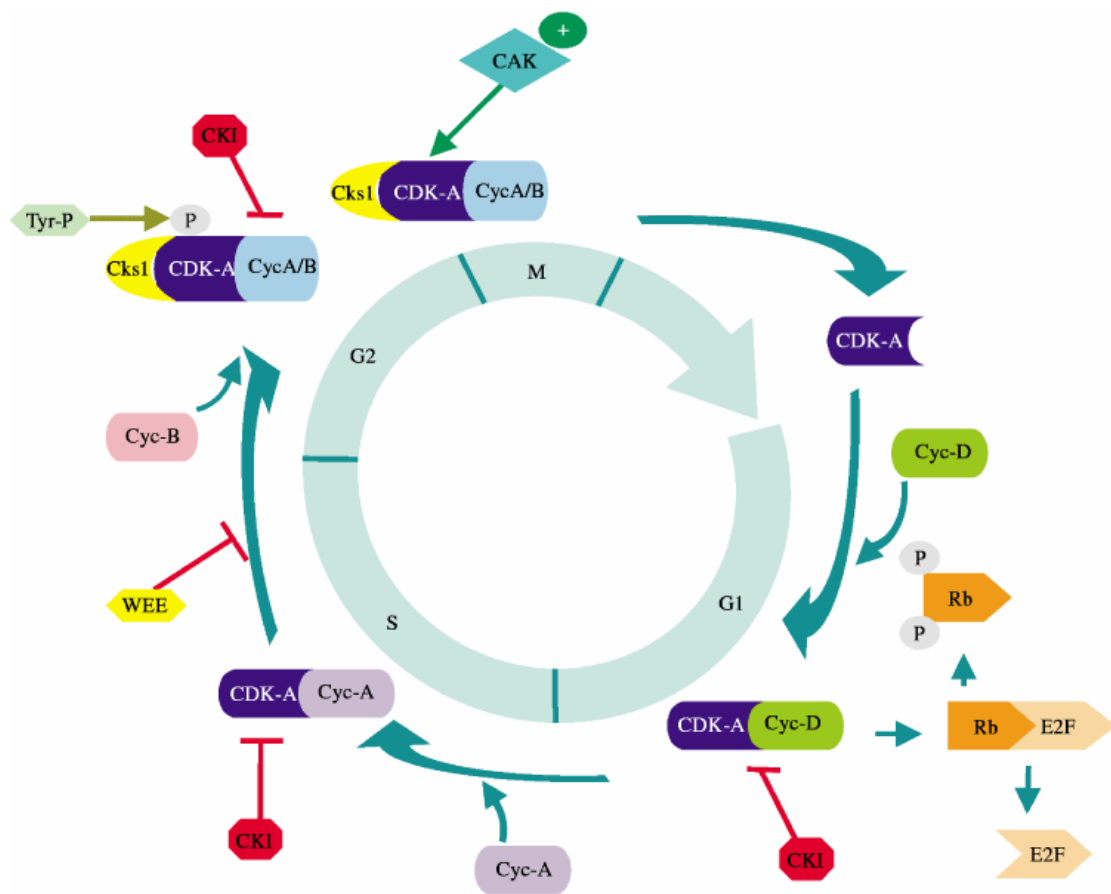
附圖 六 平滑肌細胞的遷移 (Migration)。

(摘自：Vascular and Endovascular Surgery; 38, 1, 2004.)



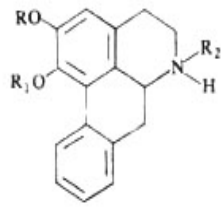
附圖 七 參與平滑肌細胞的遷移 (Migration) 訊息傳遞路徑。

(摘自：Vascular and Endovascular Surgery; 38, 1, 2004.)

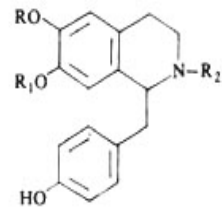


附圖 八 細胞週期 (Cell cycle) 的調控。

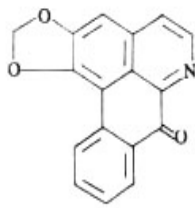
摘自：Genet. Mol. Biol. vol.24 no.1-4 São Paulo Jan./Dec. 2001



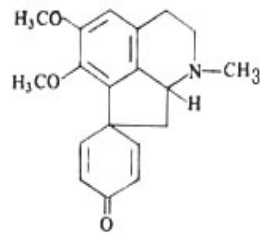
Nuciferine: $R_1=R_2=CH_3$
 N-nornuciferine: $R=H, R_1=R_2=CH_3$
 Anonaine: $R_1=-CH_2-, R_2=H$



Armeparine: $R=R_1=R_2=CH_3$
 N-methylcoclaurine: $R_1=H, R_2=CH_3$
 N-isomethylcoclaurine: $R=H, R_1=R_2=CH_3$



Liriodenine



Pronuciferine

附圖 九 荷葉化學成分。



附圖 十 荷葉

十、 參考文獻

1. Ball, K. & Turner, R. Smoking and the heart. The basis for action. *Lancet* **2**, 822-6 (1974).
2. Gey, K. F. et al. Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin Nutr* **57**, 787S-797S (1993).
3. Stam, H., Hulsmann, W. C., Jongkind, J. F., van der Kraaij, A. M. & Koster, J. F. Endothelial lesions, dietary composition and lipid peroxidation. *Eicosanoids* **2**, 1-14 (1989).
4. Stoneman, V. E. & Bennett, M. R. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Sci (Lond)* **107**, 343-54 (2004).
5. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-26 (1999).
6. Glass, C. K. & Witztum, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**, 503-16 (2001).
7. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-9 (1993).
8. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. & Witztum, J. L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* **320**, 915-24 (1989).
9. Lusis, A. J. & Navab, M. Lipoprotein oxidation and gene expression in the artery wall. New opportunities for pharmacologic intervention in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* **46**, 2119-26 (1993).
10. Jialal, I. & Devaraj, S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* **42**, 498-506 (1996).
11. Heinecke, J. W., Rosen, H. & Chait, A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* **74**, 1890-4 (1984).
12. Witztum, J. L. & Steinberg, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* **88**, 1785-92 (1991).
13. Reaven, P. D. Mechanisms of atherosclerosis: role of LDL oxidation.

- Adv Exp Med Biol* **366**, 113-28 (1994).
14. Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S. & Aruoma, O. I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr* **35**, 7-20 (1995).
 15. Chen, J. & Mehta, J. L. Role of oxidative stress in coronary heart disease. *Indian Heart J* **56**, 163-73 (2004).
 16. Diaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A. & Keaney, J. F., Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* **337**, 408-16 (1997).
 17. Iijima, K. et al. Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. *Circulation* **105**, 2404-10 (2002).
 18. Chen, H. W. & Huang, H. C. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* **124**, 1029-40 (1998).
 19. Huang, H. C., Wang, H. R. & Hsieh, L. M. Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell. *Eur J Pharmacol* **251**, 91-3 (1994).
 20. Steinberg, D. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* **95**, 1062-71 (1997).
 21. Heitzer, T., Just, H. & Munzel, T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* **94**, 6-9 (1996).
 22. Plotnick, G. D., Corretti, M. C. & Vogel, R. A. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *Jama* **278**, 1682-6 (1997).
 23. Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M. & Yusuf, S. The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann Intern Med* **123**, 860-72 (1995).
 24. Odeh, R. M. & Cornish, L. A. Natural antioxidants for the prevention of atherosclerosis. *Pharmacotherapy* **15**, 648-59 (1995).
 25. Willis, A. I., Pierre-Paul, D., Sumpio, B. E. & Gahtan, V. Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications. *Vasc Endovascular Surg* **38**, 11-23 (2004).

26. 徐劍，黃元元，沈玲，頤淑芳. 複方荷葉沖劑降脂作用研究. *中成藥* 11, 24-25 (1989).
27. 肖華山，黃代青，傅文慶，趙保路，忻文娟. 荷葉對體外氧自由基的清除作用及其對果蠅壽命的影響. *中國老年學* 16, 373-375 (1996).
28. 許臘英，毛維倫，江向東，聶朝輝，劉運苟，劉秀英，葉澤秀. 荷葉降血脂的開發研究. *湖北中醫雜誌* 4, 42-43 (1996).
29. 龔康敏，魏克民，厲美娜，姚雪豔，沈金妹. 荷葉飲對高脂血症大鼠血脂及血流變學的影響. *河南中醫* 19, 28-29 (1999).
30. 陶波，帥景賢，吳鳳蓮. 荷葉水煎劑對高脂血症大鼠血脂及血液流變學的影響. *中醫藥學報* 6, 55-56 (2000).
31. 陳海光，余以剛，曾慶孝. 荷葉水提物清除自由基的 ESR 研究. *中草藥* 32, 693-695 (2001).
32. 陳海光，曾慶孝. 荷葉功能成分的提取及其對自由基清除作用的研究. *食品及發酵工業* 27, 34-38 (2001).
33. 陳海光，余以剛，曾慶孝. 荷葉保健茶的研製及其功效研究. *食品工業技術* 23, 53-54 (2002).
34. Singleton, V. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates *ana antioxidants* by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology* **299**, 152-178 (1999).
35. Waterhouse, A. L. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, I1.1.1-I1.1.8 (2002).
36. Bennett, M. R., Evan, G. I. & Schwartz, S. M. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and -independent pathways. *Circ Res* **77**, 266-73 (1995).
37. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. p53 function and dysfunction. *Cell* **70**, 523-6 (1992).
38. Speir, E. et al. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* **265**, 391-4 (1994).
39. Johnson, T. M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Lowenstein, R. A. & Finkel, T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11848-52 (1996).
40. Yonemitsu, Y. et al. Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Circ Res* **82**, 147-56 (1998).

41. Aoki, M. et al. Inhibition of the p53 tumor suppressor gene results in growth of human aortic vascular smooth muscle cells. Potential role of p53 in regulation of vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* **34**, 192-200 (1999).
42. Davis, R. J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **268**, 14553-6 (1993).
43. Nishida, E. & Gotoh, Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci* **18**, 128-31 (1993).
44. Newby, A. C. & Zaltsman, A. B. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* **190**, 300-9 (2000).
45. Galis, Z. S. et al. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* **75**, 181-9 (1994).
46. Fabunmi, R. P., Baker, A. H., Murray, E. J., Booth, R. F. & Newby, A. C. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J* **315** (Pt 1), 335-42 (1996).
47. Okada, Y. et al. Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem* **267**, 21712-9 (1992).
48. Senior, R. M. et al. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem* **266**, 7870-5 (1991).
49. Ross, R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* **57**, 791-804 (1995).
50. Jeong, T. S. et al. Inhibitory effects of multi-substituted benzyliidenethiazolidine-2,4-diones on LDL oxidation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 4017-4023 (2004)