

中山醫學大學生物化學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Biochemistry, Chung Shan
Medical University

桑椹萃取物降血脂及預防動脈粥狀硬化形成之作用

(The effects of Mulberry extracts on decreasing
lipidemia and preventing Atherosclerosis)



指導教授 : 王朝鐘 博士 (Chau - Jong Wang, Ph. D.)

研究生 : 劉力綱 撰 (Li - Kaung Liu)

中華民國九十一年六月

目錄

壹、中文摘要.....	4
貳、英文摘要.....	6
參、緒論.....	7
一、低密度脂蛋白與動脈粥狀硬化.....	7
二、動脈粥狀硬化 (atherosclerosis)	14
肆、研究動機.....	19
伍、研究架構.....	21
陸、實驗方法.....	22
一、桑椹萃取物抑制 LDL 氧化之作用.....	22
二、桑椹萃取物調控 oxLDL 對巨噬細胞作用影響.....	31
三、桑椹萃取物預防高膽固醇飲食誘導紐西蘭兔動脈粥狀硬化生成.....	34
柒 實驗藥品與器材.....	38
捌 結果.....	42
一、桑椹萃取物抑制體外誘發 LDL 氧化之作用.....	42
二、桑椹萃取物調控 oxLDL 對巨噬細胞的作用影響.....	47
三、桑椹萃取物預防高膽固醇飲食誘導紐西蘭兔動脈粥狀硬化生成.....	49
玖 討論.....	55
一、桑椹萃取物：MWEs、MFs 抑制 LDL 氧化之作用.....	55
二、桑椹萃取物調控 oxLDL 對巨噬細胞的作用影響.....	56
拾 實驗結果圖表.....	58
拾壹 參考附圖.....	82
拾貳 參考文獻.....	93

誌謝

一開始寫論文的時候實在是不知道從何著手，同學總是開玩笑的說：「寫不出來就先寫致謝吧！」可是我的心理總是覺得致謝一定要留在最後寫，當完成所有的事情後，細細回想這二年來的一切後，秋後算帳...不是啦！...失言，是『衷心感謝啦！』。但是現在的我卻千頭萬緒難以下筆，因為要感謝的人實在是太多了。

首先感謝 林仁混老師、周芬碧老師對本論文的指導改正，使我的論文更嚴謹，也因此使我對自己的研究更有信心，謝謝你們。再來要謝謝 王朝鐘老師二年來的指導，我承認我不是一個很『標準』的學生，謝謝老師您寬大的包容，當然也得感謝常常 cover 我的妙真老師、小佩學姊、雲菁、佳紋和靜芬這些 802 的夥伴，謝謝妳們啦！（雖然妳們把我當姊妹...）。還有滄澤、璟賢、安中、慧萱、思琦、小豆，有你們在，生活多很多八卦樂趣，尤其是兩個學長，我覺得可以從你們身上學到很多（體重除外），以後還請多多指教喔！

總之，要謝謝曾經陪我一起趕實驗、熬夜拼 seminar、打球到虛脫、唱個唱到失聲的同學們、學長姊跟弟妹、別人家的學長姊跟弟妹、好姊妹、路人甲、路過的辣妹、辛苦倒垃圾的阿桑.....還有我最愛的家人跟豐富我另一部分生活的小霜，謝謝你們啦！

壹、中文摘要：

心血管疾病與癌症為現代人生命健康的二大殺手，而心血管疾病中動脈粥狀硬化是主要的致死原因，動脈粥狀硬化會引起血栓、中風與心肌梗塞等疾病而致死。而低密度脂蛋白（low density lipoprotein；LDL）的氧化修飾在早期的動脈粥狀硬化中扮演很重要的角色，藉由抗氧化的作用來抑制 LDL 的氧化修飾，是一種有效預防動脈粥狀硬化發生的方法。桑椹是一種天然植物果實具有豐富的植物色素成分，而具有抗氧化活性，本研究之目的為評估由桑椹所分離的萃取物（水萃取物：MWEs；花青素萃取物：MACs），其抗 LDL 氧化及抗動脈硬化之作用效果，而進行體外抗氧化實驗與細胞實驗，最終驗證於動物實驗結果。

以銅離子誘導 LDL 氧化的模式進行體外抗氧化實驗，並以 LDL 氧化時其蛋白部分的氧化修飾反應與脂質部分的過氧化反應作為氧化指標。藉由 ApoB 衍蛋白斷裂現象及 LDL 蛋白表面電荷改變的程度與脂質過氧化產物 MDA 及 diene 的生成量均減少的結果發現，MWEs 與 MACs 具有抑制 LDL 氧化的能力，此外也具有清除 DPPH（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl）自由基的作用。而在細胞實驗方面，桑椹萃取物也具有保護巨噬細胞不受因 LDL 氧化作用而死亡，也會減少巨噬細胞轉形為泡沫細胞（foam cell），這些現象都會減緩動脈

硬化的發生過程。最後由動物實驗的結果顯示，以高膽固醇飲食誘導動脈硬化生成的兔子，其血清中的總膽固醇量會因有同時餵食桑椹萃取物而降低，且其動脈中動脈粥狀硬化的損傷面積也比只以高膽固醇飲食餵食的兔子減少許多。

由上述體外抗氧化實驗與細胞實驗及動物實驗結果顯示，桑椹萃取物具有極佳的抗氧化活性並能抑制 LDL 的氧化，此外也參與調控巨噬細胞因 LDL 的氧化而產生促進動脈粥狀硬化生成的反應。綜合以上結果，我們認為桑椹萃取物具有預防動脈粥狀硬化的作用，而能應用於保健食品的開發。

貳、英文摘要：

Atherosclerosis, a disease occurring in arteries, is one of the primary causes of heart diseases and stroke. The complications of atherosclerosis often lead to death. The oxidative modification of low density lipoprotein plays a key role in the pathogenesis of atherosclerosis. Antioxidative reagents, which can effectively inhibit LDL oxidation, may prevent atherosclerosis via reducing early atherogenesis, and slowing down the progression to advance stages.

As shown in previous studies Mulberry is a nature fruit containing a lot of pigments that was found to possess antioxidative activity. In this study, we evaluated the antioxidative activity of the mulberry extracts, mulberry water extracts (MWEs) and mulberry anthocyanins extracts (MACs) by measuring their effects on LDL oxidation (in vitro) and anti-atherosclerotic abilities (in animal). The antioxidative activity of the extracts on LDL oxidation was defined by Apo B fragmentation, relative electrophoretic mobility (REM), thiobarbituric acid-relative substances (TBARS) assay and diene conjugation. Our results showed that MWEs and MACs were able to inhibit the Apo B fragmentation, REM, TBARS assay and delay the diene conjugation in the Cu^{2+} -mediated oxidative LDL. MWEs and MACs also possessed the ability of DPPH radical scavenging. Taken together, both MWEs and MACs showed strong potency to inhibit the LDL oxidation induced by copper. Further studies demonstrated that MWEs and MACs could reduce the cholesterol accumulation in macrophage, and that, subsequently, inhibit the formation of foam cells. In the in vivo experiment, male New-Zealand rabbits fed with a 1.3% cholesterol diet were used as the animal model. The results showed that the New-Zealand rabbits fed with the MWEs and high cholesterol diet revealed a less extent of the atherosclerotic lesion and total cholesterol concentration than the animals fed only with a high cholesterol diet.

In conclusion, mulberry extracts, mulberry water extracts (MWEs), and mulberry anthocyanin extracts (MACs) possess strong antioxidative ability to inhibit LDL oxidation and foam cell formation. Therefore, it is suggestive the mulberry could be a healthy food to prevent individuals from atherosclerosis.

參、緒論：

一、低密度脂蛋白與動脈粥狀硬化：

1. 脂蛋白 (lipoproteins)：

脂蛋白 (lipoproteins) 的組成為膽固醇酯 (cholesterol ester) 與三酸甘油酯 (triglycerides) 所形成的疏水性中心，其外圍由游離脂肪酸 (free fatty acid)、磷酸脂質 (phospholipids) 與衍蛋白 (apoproteins) 如：衍蛋白 B (apoprotein B)、衍蛋白 C (apoprotein C) 所組成之混合物包圍組成。依其脂蛋白分子組成的大小及密度可分類為乳糜微粒 (chylomicrons)、極低密度脂蛋白 (VLDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、中密度脂蛋白 (IDL) 與高密度脂蛋白 (HDL)。

衍蛋白 (apoprotein) 是脂蛋白粒子中之蛋白質組成，衍蛋白主要分為 Apo A、Apo B、Apo C、Apo E 及 Apo (a)，不同的脂蛋白所含有的衍蛋白種類及特性均不相同。衍蛋白的功能如：Apo B、Apo E 可被低密度脂蛋白接受器 (LDL receptor) 辨識，而幫助細胞包飲吞噬脂蛋白進入細胞內。此外，衍蛋白也會參與促使參與脂蛋白代謝的酵素活化或抑制，如 Apo A 中的 Apo A 會促卵磷脂/膽固醇醯基轉移酶 (lecithin/cholesterol acyltransferase ; LCAT) 活化，而將 HDL 表面的膽固醇酯化幫助 HDL 形成完整的球型構型。而由衍蛋白蛋白片段是否被分解可來判定脂蛋白是否被氧化 (1、2)。

2. 低密度脂蛋白 (LDL):

低密度脂蛋白 (LDL)【圖一】為循行在血液中的球狀複合粒子，是由 VLDL 釋出三酸甘油酯後轉型為 IDL，再經 IDL 轉型為 LDL。其密度介於 1.019~1.063 (公斤/升)，直徑大小為 18~25 微米，血液循環中的半生期 (half life) 為 2~3 天。LDL 主要由膽固醇組成，其衍蛋白為 Apo B-100 可被 LDL 接受器辨識而鍵結。其球狀複合粒子的構型分為親油性核心及親水性磷脂質單層表層，而 Apo B 即纏繞於表層上。

LDL 富含膽固醇，人體總血清中約有 65% 的膽固醇由 LDL 攜帶傳送至周圍組織，因此 LDL 的吸收與膽固醇的代謝息息相關。若 LDL 無法有效的被細胞組織吸收，而在血液循環系統中存在過多的 LDL 會增加罹患心血管循環系統疾病的風險。

低密度脂蛋白 80% 可由肝吸收，另 20% 則由周圍組織吸收，吸收方式是經由 LDL 接受器 (LDL receptor) 攝取，藉由 receptor-mediated 途徑與 nonspecific endocytosis 方式進入細胞及肝臟中。有實驗證據顯示 LDL receptor 的功能失常的病人如：家族性高脂血症 (familial hypercholesterol) 患者，其會導致血液中 LDL 堆積而增加併發動脈粥狀硬化的風險 (3)。而在 LDL receptor 表達的調控上發現，當血液中 cholesterol 濃度降低時，會促使 SREBP transcription factor 活化促

使 LDL receptor 大量表達 (4) 而實驗上若將動物的 LDL receptor gene knockout 或使之 lack functional 再輔與特定條件如：促使 12/15-lipoxygenase gene over expression, 則其發生動脈粥狀硬化機率會增加 (5)

因此，若人體內有大量的 LDL 循行於血管中，LDL 十分容易受到一些氧化因子的攻擊而被氧化修飾 (oxidative modifications), LDL 會轉變為氧化修飾型的 LDL 如：minimally modified LDL、oxidative LDL 及 small, dense LDL 等，這些氧化修飾型的 LDL 均為引起動脈粥狀硬化發生的主因，其關係容待後述。

3. 低密度脂蛋白過氧化作用：

LDL 的過氧化作用是一種由自由基所引起的連鎖反應，包含了 LDL 蛋白質及脂質的氧化修飾及構型上的改變。LDL 氧化時其蛋白部分會進行氧化修飾，其衍蛋白 Apo B 會受自由基或共軛雙烯攻擊，使蛋白序列中的離胺酸 (lysine)、組胺酸 (histidine) 等帶正電荷胺基酸的 α -amino group 與氧化產物的醛類如：malondialdehyde (MDA)、hexanal 與 4-hydroxynoneal(4-HNE) 交聯 (cross-linking) (6)，生成 schiff base 而使 LDL 表面正電荷減少而負電荷增多。此結果會促使 LDL 無法被 LDL 接受器辨識，而會由巨噬細胞的清除者接受器 (scavenger receptor) 專一的辨識吸收 (1)。

LDL 脂質氧化的起因，主要由細胞如：巨噬細胞 (macrophages)、內皮細胞 (endothelial cells)、血管平滑肌細胞 (arterial smooth muscle cells) 等所釋出的活性氧物質 (O_2^- 、OH) 經金屬離子催化氧化。另外酵素也會催化 LDL 脂質氧化，如 15-lipoxygenase (15-LO)、nitric oxide synthase 與 myeloperoxidase 等 (2、7) 也會促使 LDL 脂質的氧化。

LDL 脂質的氧化為 LDL 磷脂質與膽固醇上的不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid; PUFA) 受到活性氧攻擊，使不飽和脂肪酸上的 bis-allylic site 進行氫自由基 (hydrogen radical) 轉移，而促使

其雙鍵的重排而形成共軛雙烯 (conjugated diene)。而氧化過程中生成的過氧化物及醛、酮分子，也會促使 LDL 蛋白部分的氧化修飾。

不同階段的 LDL 過氧化作用，會促使 LDL 轉變為不同程度、類型的氧化型。如：輕微氧化修飾的 LDL (minimally modified LDL ; mm-LDL)、氧化型低密度脂蛋白 (oxidative LDL ; oxLDL)、體小質密的 LDL (small, dense LDL) 等。而這些氧化型 LDL 是促使動脈粥狀硬化發生的主因 (8、9)。

4. 氧化型低密度脂蛋白 (oxidative LDL) 與動脈粥狀硬化的關係：

動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 是一種慢性的發炎反應且為許多複雜因子如：modified lipoproteins、 monocyte-derived macrophages、 T cell 與其它許多血管壁細胞內因子交互作用而生成的疾病。而在動脈粥狀硬化的病理致病機轉研究中，modified lipoproteins 被視為主要引起動脈粥狀硬化過程的主因，而在許多動脈粥狀硬化動物的組織切片中，在其病灶部位也觀察到有許多的 oxidative LDL components 堆積。

Oxidative LDL components 包含 oxidized phospholipids、 phosphatidyl choline、 modified apoB proteins、 oxidized lipids 等。已有許多實驗證實，這些分子參與調控了引起或促進動脈粥狀硬化發生的機制，統整如下：

1. **oxLDL** 具有細胞毒性會促使血管內皮細胞 (endothelium cell) 損傷使其功能失調，而促使更多循行於血液中的 LDL 進入血管內膜 (intima) 受氧化為 oxLDL。oxLDL 亦會促使巨噬細胞(macrophages)、血管平滑肌細胞(smooth muscle cells) apoptosis 或 necrosis，而使 necrotic core 的生成與細胞中吞噬的 cholesterol、 oxidized lipid 與 insoluble lipid 流出，最後形成糜粥狀聚合物”Gruel”促進動脈粥狀硬化的病程 (10、 11)。

2. **oxLDL** 會促使血管內皮細胞表達單核性白血球 (monocyte) 的附著分子 (adhesion molecules) 如：VCAM-1、 ICAM-1、 P-selectin

等而吸引血液中 monocyte、T cells 附著於血管壁上。而單核性白血球並進一步受血管內皮細胞表達的 chemotactic molecules 如：MCP-1、CCR-2 而 migration 進入血管內膜，當單核性白血球、T cells 進入血管內膜後，便會引發一連串免疫反應並與其它細胞因子進行交互作用，而促使動脈粥狀硬化病成的發生。oxLDL 也會直接促使這些 chemotactic molecules 的表達 (12、 13)。

3. oxLDL 會促使泡沫細胞 (foam cell) 的形成。泡沫細胞的形成是早期動脈粥狀硬化發生的特徵，所謂的泡沫細胞是指進入血管內膜的單核性白血球趨化而成的巨噬細胞內堆積了大量的膽固醇，大量的泡沫細胞形成會聚集於血管內膜中而形成脂肪班(fatty streak)。

巨噬細胞會受 oxLDL 的刺激下大量表達清除者接受器 (scavenger receptors) 而將 oxLDL 吞噬至細胞內 (14)，而主要擔任吞噬 oxLDL 的 scavenger receptors 為 CD36 與 SR-A (scavenger receptors A)。oxLDL 均可透過活化一些分子機制而使其大量表達來吞噬 oxLDL，如 oxLDL 可活化轉錄因子 PPAR γ 來促使 CD36 大量表達 (15)，oxLDL 也可以經活化轉錄因子 AP-1 來促使 SR-A 大量表達，這些 scavenger receptors 若表達過多則會使巨噬細胞吞噬過量的 oxLDL 進入細胞內，而使得膽固醇堆積於細胞中而使巨噬細胞變成泡沫細胞。

二、動脈粥狀硬化 (atherosclerosis)

1. 動脈粥狀硬化的發生及危險因子

心血管疾病與癌症為現代人生命健康的二大殺手，現代人於飲食中攝取大量的動物性脂肪，使的身體中血膽固醇量增加，因而引起心血管疾病的發生，而心血管疾病中動脈粥狀硬化是主要的致死原因，因動脈粥狀硬化會引起血栓 (thrombosis)，造成局部組織缺血缺氧而壞死，若發生於腦動脈則會引起中風 (stroke)；若發生於冠狀動脈則會引起心肌梗塞 (myocardial infarction) 而致死 (2、13、16)。

除了高膽固醇飲食是引起動脈粥狀硬化的危險因子外，有些疾病也容易併發動脈粥狀硬化的發生，如：高血壓、高血脂症、血脂異常及糖尿病患者也是動脈粥狀硬化的高危險群。遺傳上基因的突變也會造成動脈粥狀硬化，如：若細胞吞噬 LDL 的 LDL receptor gene 缺陷會促使血液中 LDL 濃度增加，而增加 LDL 受氧化攻擊的機會而易引起動脈粥狀硬化，此點在 LDL receptor gene knock out 的小鼠 (mice) 上可觀察到 (17)；還有如 Apo B protein gene overexpression 的小鼠也有同樣的發現，因 Apo B protein gene overexpression 會造成 LDL 大量生成。相對的，若另一個脂蛋白 HDL 的合成基因 Apo E gene 缺陷卻會促使動脈粥狀硬化發生，在動脈粥狀硬化研究實驗上 Apo E gene knock out 的 mice 是常用的促使動脈粥狀硬化的動物模式(18)

2. 動脈粥狀硬化的機轉 (pathogenesis)

(1) 動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 的起始因子 :

動脈粥狀硬化的發生為一複雜且為漸進式的一種致病過程【圖二】主要是因血管內皮細胞(endothelial cell)受損,使血管腔(vascular lumen)間隙增加,使得脂蛋白可以進入血管內膜(intima)中並被內生性的氧化因子如: myeloperoxidase、nitric oxide synthase 與 15-lipoxygenase 等氧化後形成氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL) (39~43) ox-LDL 會促使 endothelial cell 表達 cell adhesion molecules 如: VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule-1)、E-selectin、P-selectin、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule- 1) 等 (44~46) , 而使 T cell 與單核性白血球 (monocyte) 黏附於血管腔表面並促其轉移(migration)至血管內膜中。oxLDL 也參與促進此 migration 作用, 藉由促進 MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) 及 MCP-1 的接受器 CCR2 (monocyte chemoattractant protein-1 receptor) 表達所致 (47~51)【圖三】

(2) 泡沫細胞 (foam cell) 的生成 :

當單核性白血球轉移至血管內膜後,單核性白血球會受 M-CSF (macrophage monocyte-colony-stimulating factor) 影響而分化 (differentiation) 為巨噬細胞 (52)。巨噬細胞會表達清除者接受器

SA-A、CD36 來辨識 ox-LDL (53、54)，並經將 ox-LDL 吞噬至細胞內，當巨噬細胞吞噬過多 ox-LDL 時，會使得大量的膽固醇、脂質堆積在細胞內而形成泡沫細胞【圖四】。大量的泡沫細胞聚集堆積在動脈管壁上形成脂肪斑 (fatty streak)。到最後，泡沫細胞會走向 apoptosis 或 necrosis ，(55) 當細胞死亡後，原本經吞噬而堆積於細胞內的膽固醇、脂質會流出，而一些細胞的死亡會形成 necrotic core(56)。Necrotic core 與細胞流出的膽固醇、脂質聚集而促使”gruel”的形成。”Gruel”為一種糜粥狀的油脂聚合物，也是形成動脈粥樣硬化斑的主因【圖五】

(3) 免疫反應 (immunologic responses) 與 Lesion progression :

到病程的中期巨噬細胞會與 intima 中 T cell 作用而生成 cytokines (Th1、Th2) 而促使一連串的免疫反應 (immunologic responses) 發生 (57)，周圍的血管平滑肌細胞 (smooth muscle cell) 及內皮細胞也會表達生成 IL-1 (interleukin-1)、TNF (tumor necrosis factor) 等因子，這些分子的生成會引起血管平滑肌細胞轉移至 intima 或 subendothelial 中【圖四】。血管平滑肌細胞轉移至 intima 後也會受 ox-LDL 影響開始表達 scavenger receptor 而吞噬 ox-LDL 形成泡沫細胞。此外，血管平滑肌細胞也會開始合成細胞外基質蛋白(extracellular matrix proteins)促使形成”fibrous cap”而將 gruel 覆蓋形成動脈粥樣硬化斑。這些作用會使動脈粥狀硬化斑的生成過程由初期單純的脂肪斑

形成，進入一個複雜且許多作用併合（complex lesion）的階段。

（4）動脈粥狀硬化斑（plaque）的結構穩定度：

動脈粥樣硬化斑會因上述作用的持續進行而逐年緩慢生長、增大突出於動脈管腔（lumen），到最後可能會阻塞住動脈使血流量減少、血流速變慢，更嚴重的還會進一步引起血栓（thrombosis）（58）。血栓的產生，是因為動脈粥樣硬化斑的增大並且突出於 lumen，使血管內皮細胞損傷、破裂而引起血小板（platelets）的吸附聚集【圖五】，此外若動脈粥樣硬化斑的結構不穩定，也會因斑的破裂使其內的 lipids 與 tissue factor 暴露而引起血小板的吸附聚集。若 plaque 的破裂會造成血小板再一次的凝血現象，反覆的破裂（rupture）、凝血（coagulation），會促使血塊增大而阻塞住血管造成血栓（thrombosis）（59），最後導致心肌梗塞、中風的發生【圖六】。

動脈粥樣硬化斑的破裂是形成血小板的吸附聚集的起因，有一些因子的表達會促使斑結構的不穩定而破裂，如：巨噬細胞會表達基質金屬蛋白酶（matrix metalloproteinases；MMP）而能分解細胞外基質（19、20）。T cell 也會產生 interferon- γ 而抑制血管平滑肌細胞合成膠原而弱化動脈粥樣硬化斑的結構，因此斑變的容易破裂而引發之後血小板的吸附聚集及血栓。

3. 動脈粥狀硬化治療及預防的研究方向：

動脈粥狀硬化的致病機轉，特別是在闡明「動脈粥狀硬化」形成的假說上，「內皮功能變性(endothelial dysfunction)」與「低密度脂蛋白氧化修飾(LDL oxidative modification)」漸成主流，許多動脈粥狀硬化治療及預防的研究方向也以此二方向為基準。已有證據顯示在許多的動物實驗上，給予抗氧化的處理如：補充適度的抗氧化劑，可降低動脈粥狀硬化的發生(2、21)。但在臨床上，給予已罹患動脈粥狀硬化的病人抗氧化劑的補充如：Vit E 與 β -carotene，並沒有觀察到使病人動脈粥狀硬化病症回復的情形(22)。因此，給予補充抗氧化劑的方式對動脈粥狀硬化的病症上應該是為預防的作用。

而除依此二方向提出調控降低動脈粥狀硬化發生的治療或預防方式外，「調控巨噬細胞清除者接受器表達的分子機制」，也是另一個被期待的方向。在 Apo E-deficient mice 中若再將其清除者接受器：SA-A、CD36 的基因去除，其動脈粥狀硬化的發生率會較原本 Apo E-deficient mice 低(23、24)。清除者接受器表達的減少可以使細胞轉變為泡沫細胞的情形減少，降低之後所引起的傷害，而與泡沫細胞形成相關的調控蛋白，除清除者接受器外，介入調控一些擔任細胞內膽固醇流通的蛋白(cholesterol transporter protein)如：ABCA1 的表達，也是另一個調控降低動脈粥狀硬化發生的方向。

肆、研究動機

一、天然性植物於保健醫學之應用：桑椹之萃取物成分

桑椹 (mulberry) 是一種天然植物桑科落葉喬木”桑”(*Morus alba* L.) 的果實，其科、屬、種名為 MORACEAE *Morus* spp.。桑椹嫩時色清、味酸；成熟時紫黑、多汁。椹味甘酸、性涼，具滋陰養血、生津止渴、潤腸通便等作用，自古即被用來防治頭暈、目眩、盜汗、消渴、腸燥、便秘等現象，許多古籍記載了桑椹的藥用價值，但是在科學研究上卻缺乏科學證據來證實。

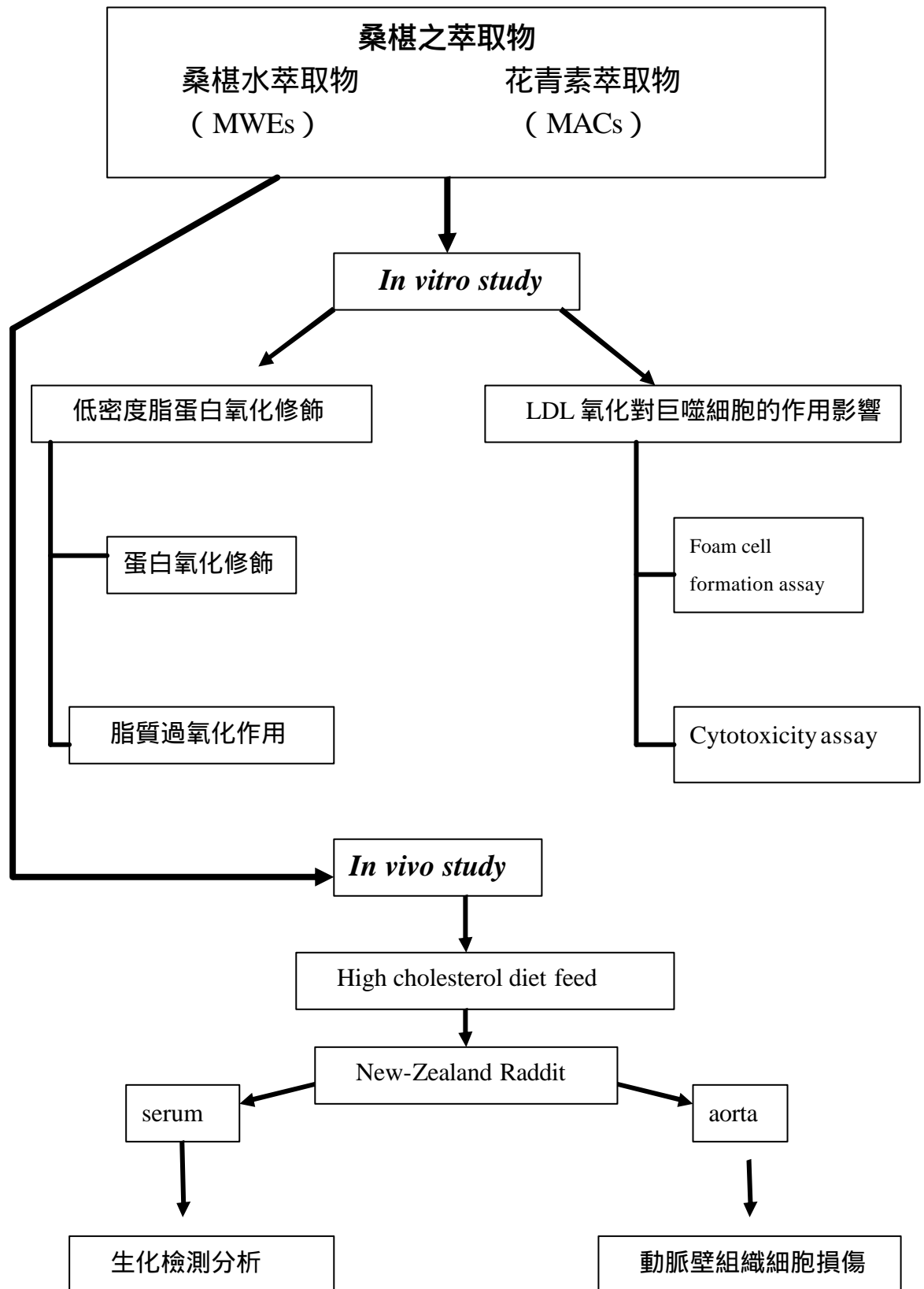
而由桑椹果實顏色為深度的紫紅顏色，顯示出桑椹具有豐富的色素成分，而許多的色素成分被證實是一種很好的抗氧化物質。由 Toscano 和 Lamonica(1975) 鑑定出桑椹的色素成分為花色素? (awobanin) ，而桑椹的花色素? 為 cyandin 3-glucoside 及 cyandin 3-rutinoside (25) ，因此我們推測桑椹具有豐富的天然抗氧化成分。此外桑椹除含有豐富的 flavonoides(如 quercetin , gossypetin , hibiscetin) 亦含有原兒茶酸 (protocatechuic acid) ，這些成份都以具有抗氧化、防癌、抑制心血管病變 (26 ~ 29) 。

脂質的過氧化及低密度之蛋白的氧化被證實是動脈粥狀硬化發生過程的致病因子。利用抗氧化劑預防低密度脂蛋白的氧化反應可能使是一種有效的抑制動脈粥狀硬化發生過程的方法。利

用桑椹豐富的天然抗氧化色素成分，我們期待桑椹可抑制低密度脂蛋白氧化而達到預防動脈粥狀硬化的發生。因此，我們以桑椹中所分離的成分（水萃取物 MWEs；花青素萃取物：MACs）來設計實驗，測試桑椹是否可抑制 LDL 氧化並介入調控動脈粥狀硬化發生過程中，一些相關的細胞變化如：巨噬細胞。此外，並以高膽固醇飲食混和桑椹萃取物餵食之動物實驗模式，觀察動物血脂變化及血管的病理變化，最終以科學證據驗證桑椹具有抑制預防動脈粥狀硬化發生的效果。

希望由本論文的研究，能夠得到一種天然、安全無毒性並具有醫療藥用價值的化合物，應用於預防或抑制動脈粥狀硬化藥物的發展。不但如此，更能提供證據，建議指導一般大眾如何由日常生活中的飲食裡或得具有保健預防功效的化合物。

伍、研究架構

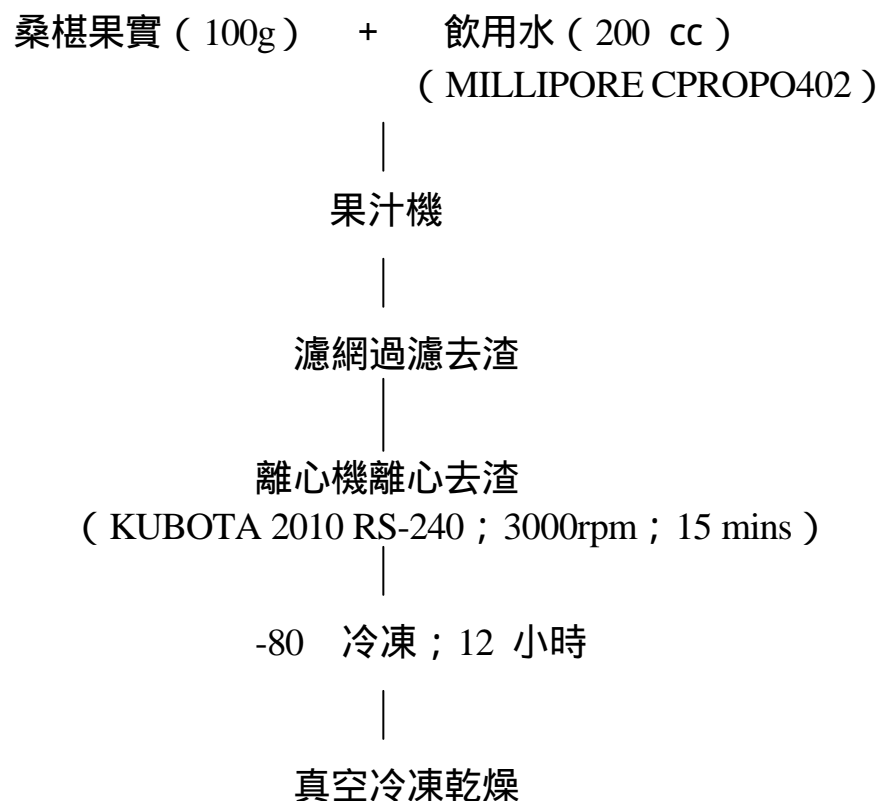


陸、實驗方法：

第一部份、桑椹萃取物抑制 LDL 氧化之作用

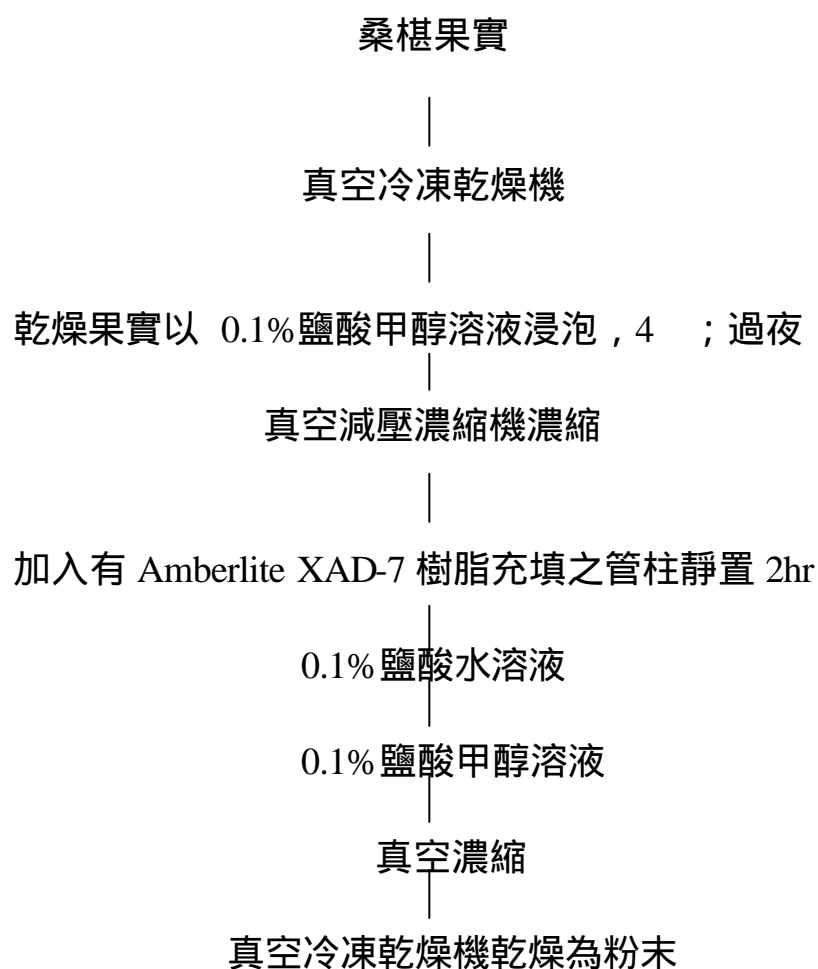
1. 桑椹之水萃取物 (MWEs) 製備

將桑椹果實與飲用水(室溫)以 1 : 2 的比例以絞碎機打成果汁，果汁先經濾網過濾去粗渣後，再以離心機使汁液與果渣分離，可得澄清的桑椹果汁，而後於-80 冷凍 12 小時，再以真空冷凍乾燥使果汁水分脫離而形成粉末。以桑椹果汁乾燥粉末稱重，以配取不同濃度桑椹水萃取物。MWEs 之產率約為 1~2%，若使用於細胞實驗操作時，由 MWEs 配置的各濃度溶液需先經 0.45 μ m filter (MILLEX[®]-HA) 過濾除菌。



2.桑椹花青素萃取物:(MACs)製備

將桑椹果實先以真空冷凍乾燥機將果實乾燥，而後以 0.1% 鹽酸
甲醇溶液於 4℃ 下浸泡過夜，隔日過濾後以真空減壓濃縮機濃縮再過
濾。將濃縮之溶液加入有 Amberlite XAD-7 樹脂充填之管柱靜置 2hr，
之後以 0.1% 鹽酸水溶液清洗雜色素，再以 0.1% 鹽酸甲醇溶液將花色
素洗出後以真空濃縮，所得產物再經真空冷凍乾燥機乾燥為粉末，而
可稱重以配取不同濃度桑椹花青素萃取物溶液。MACs 之產率約為
1.5%，若使用於細胞實驗操作時，由 MFs 配置的各濃度溶液需先經
0.22µm filter (MILLEX[®]-HA) 過濾除菌。



3. LDL 製備 (60)

將取自於捐血中心之正常人類血清，加入 0.7 ml 的 0.15M NaCl 及 0.3mM EDTA (PH7.4) 離心 90,000 rpm , 10 , 10mins , 取上層液 2 ml 後重複上述步驟後再離心 3.5hrs , 再取上層液 2 ml 之後加入 KBr 離心 3.5hrs , 取上層液中淡黃色油層即為 LDL。製備好的 LDL 冰藏於 4 以不超過一星期為限。

人類血清 (2 ml) + 0.15M NaCl 及 0.3mM EDTA (0.7ml)

超高速離心機離心

(BECKMAN Optima™ TL100)

90,000 rpm , 10 , 10mins

取上層液 (2 ml) + 0.15M NaCl 及 0.3mM EDTA (0.7ml)

超高速離心機離心

(BECKMAN Optima™ TL100)

90,000 rpm , 10 , 3.5 hrs

取上層液 (2 ml) + 166.8 mg KBr

超高速離心機離心

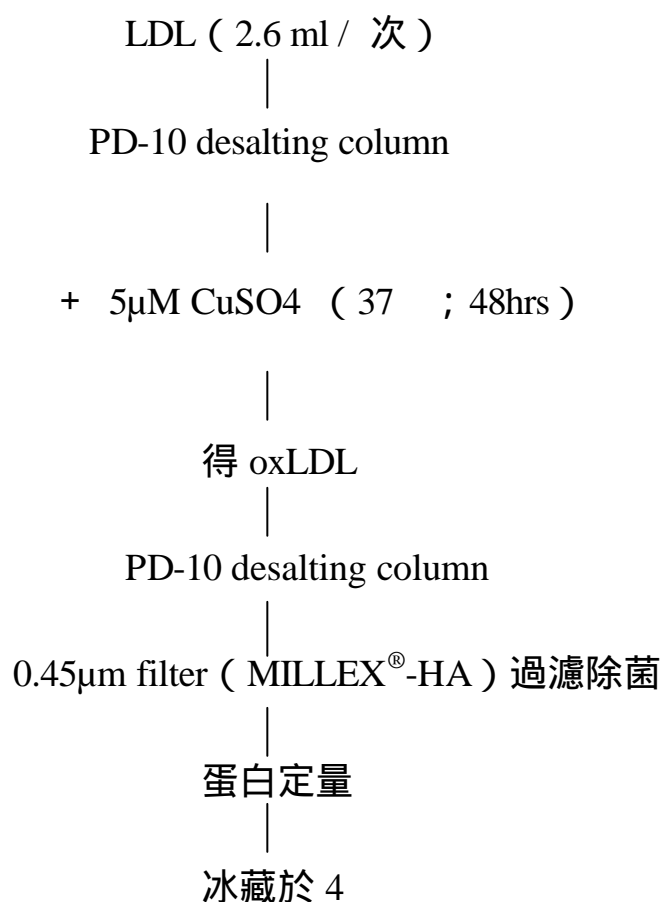
(BECKMAN Optima™ TL100)

90,000 rpm , 10 , 3.5 hrs

取上層液中淡黃色油層 (LDL)

4. Ox-LDL 製備 (34)

LDL 先過 PD-10 desalting column 後，再以 $5\mu\text{M}$ CuSO_4 於 37°C 水浴一起反應 48hrs，反應後再過一次 PD-10 desalting column 即可得實驗用之 Ox-LDL。Ox-LDL 經蛋白定量將其蛋白量調整為 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ，使其於實驗加藥後最後反應濃度為 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 。Ox-LDL 若要加入細胞反應則須先以 $0.45\mu\text{m}$ filter 過濾除菌，以防實驗培養中造成細胞污染。製備好的 Ox-LDL 冰藏於 4°C 以不超過一星期為限。

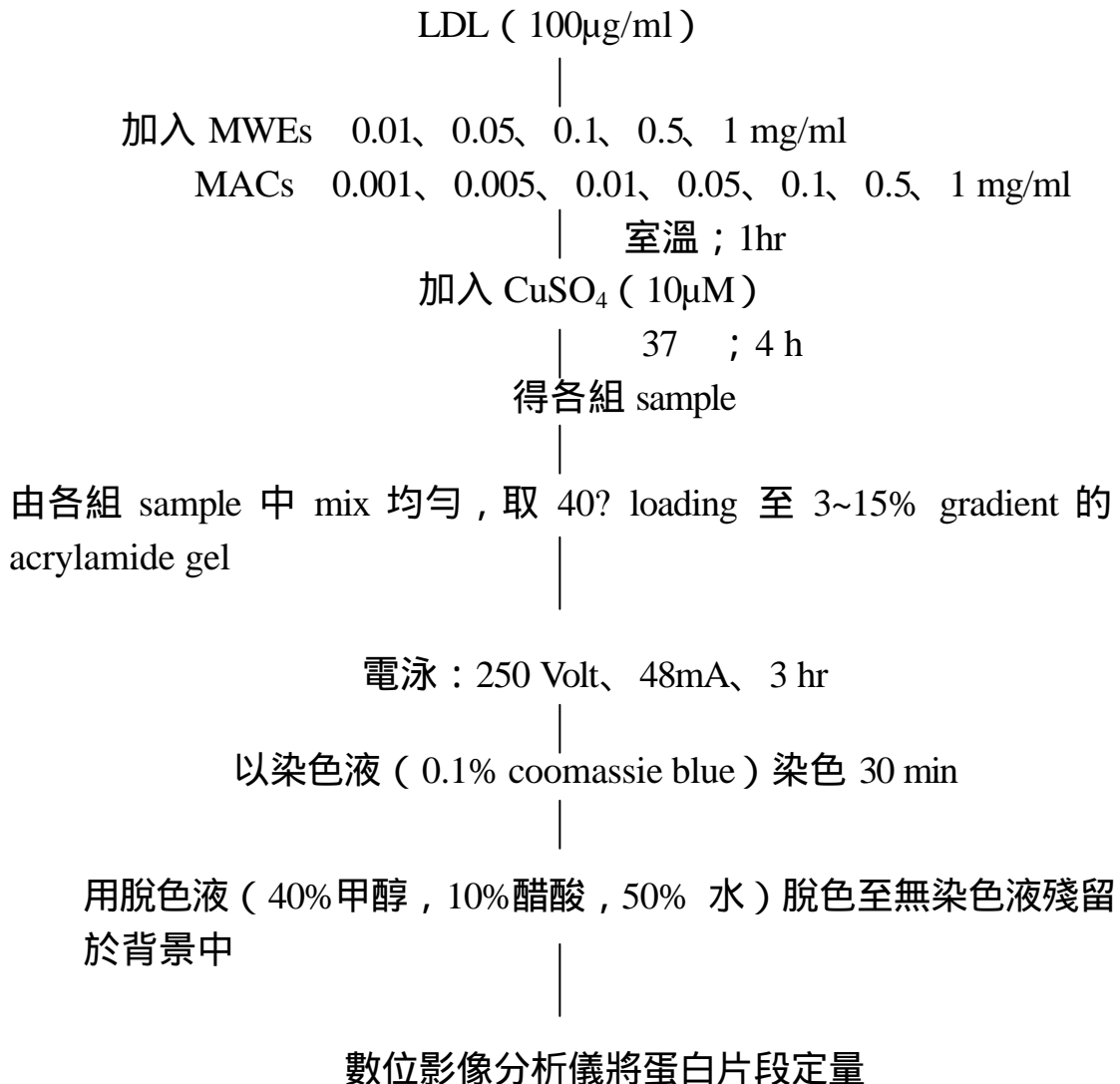


5. LDL apoB protein fragmentation assay

1. 原理 : (61)

配製 3~15% gradient acrylamide gel 於加入 sample 及 buffer 後進行電泳 (400V , 48Amp , 2 hr) LDL apoB protein 於 LDL 氧化時會分解為不同大小的蛋白片段 , 利用不同濃度 (3~15% gradient) 的 acrylamide gel 可將這些片段分離。電泳後以染色液 (0.1% coomassie blue) 染色 1 hr , 最後以脫色液 (40% 甲醇 , 10% 醋酸 , 50% 水) 脫色。結果以數位影像分析儀將蛋白片段定量表示。

2. 實驗步驟 :

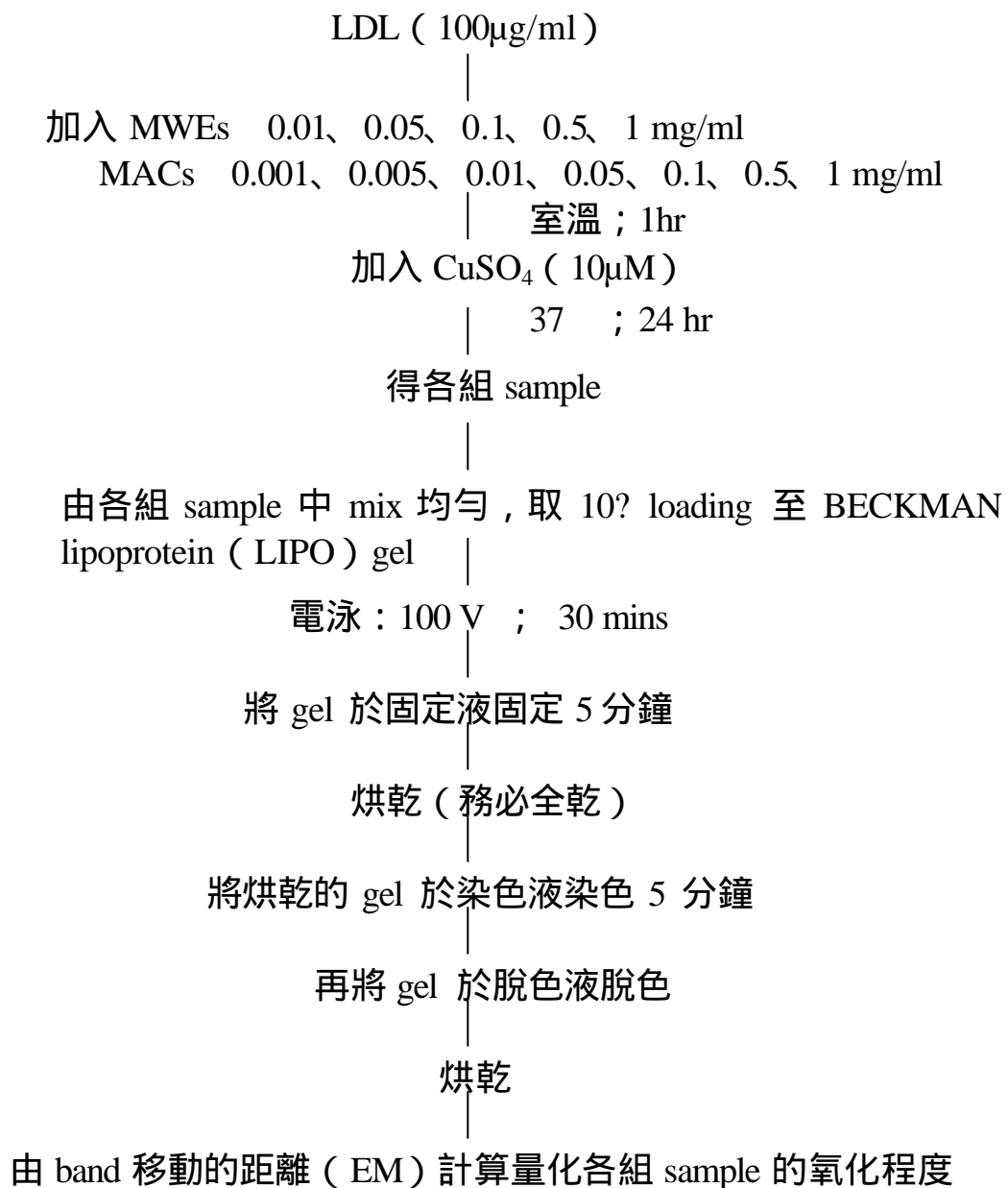


6. LDL electrophoretic mobility assay

1. 原理 : (62)

以 BECKMAN lipoprotein (LIPO) electrophoresis system , 利用 lipoprotein 氧化後其帶電荷會由正電性轉為陰電性的特性 , 加入 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。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。

2. 實驗步驟 :

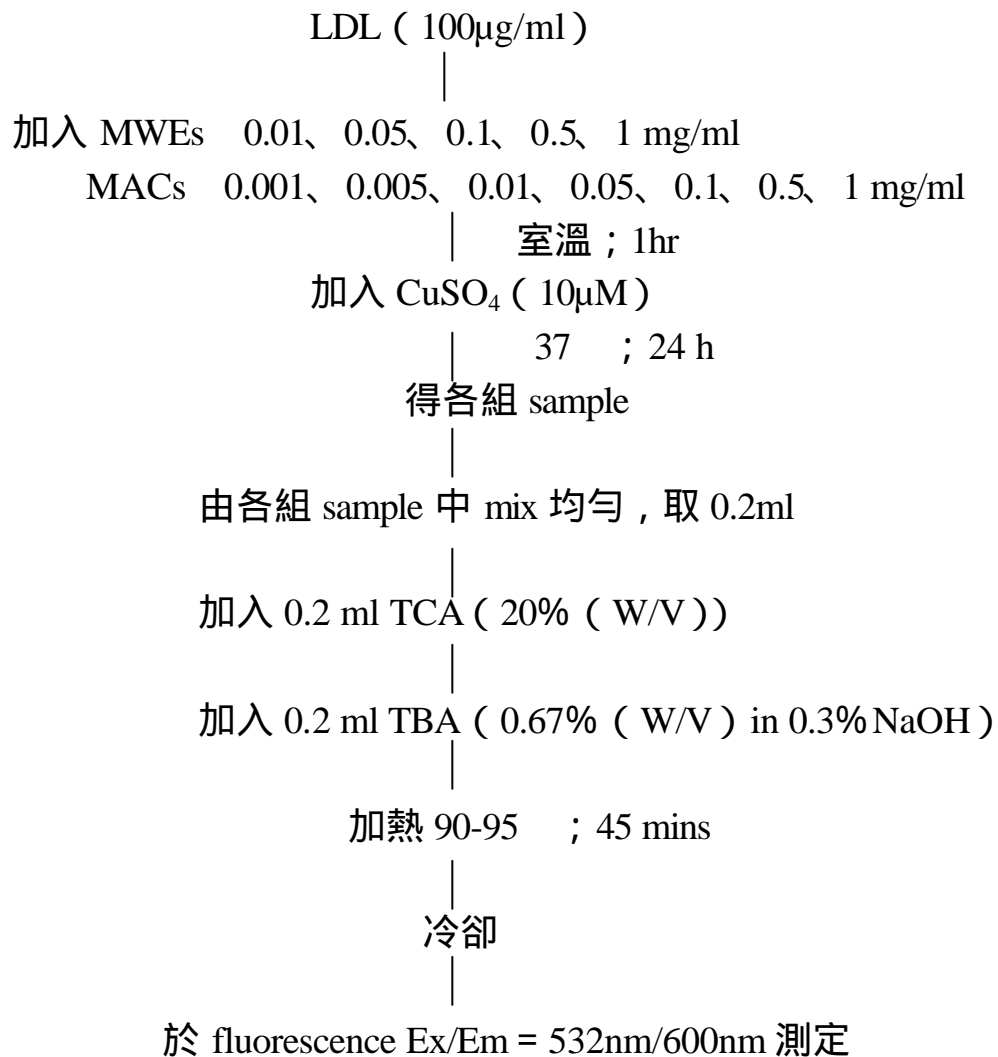


7. TBARS assay

1. 原理：

利用 Yagi 氏 (1987) 等修飾之螢光測定法 (30), 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。以 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TEP) (31) 為標準液做標準曲線而可定量 LDL 氧化程度, 單位為 TBARS / ml LDL。

2. 實驗步驟：

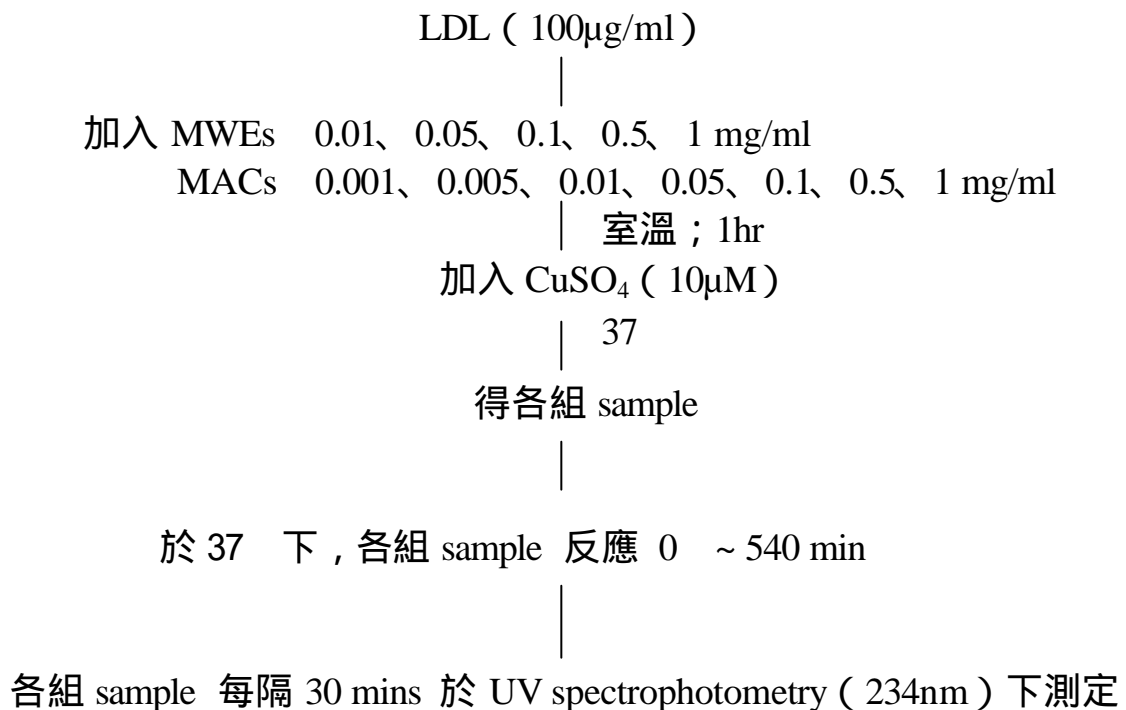


8. Diene conjugation assay

1. 原理：

脂質過氧化之重要特徵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。利用共軛雙烯可在 230~235nm 吸光值下被偵測之原理, 將 sample 以銅離子於 37 誘導 LDL 氧化 540 min (約 9 hr), 反應開始起每 30 min 測量一次吸光值, 以 Diene 生成量(吸光值) 為縱座標, 氧化時間為橫座標做圖。

2. 實驗步驟：



9. DPPH bleaching

1. 原理：

DPPH 自由基 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 因其結構上可以產生穩定的共振結構，且其於 517nm 波長下有特定之吸光值 (32)。當 DPPH 的濃度降低時其吸光值也會隨之降低。利用此原理可測定出特定物質清除自由基之效力。計算公式如下：

$$\% \text{ bleaching} = (A_0 - A - A_B) / A_0 \times 100\%$$

A_0 ：不添加萃取物之吸光值 (DPPH only)

A ：加入萃取物後之吸光值 (萃取物 + DPPH)

A_B ：萃取物本身的吸光值 (萃取物 only)

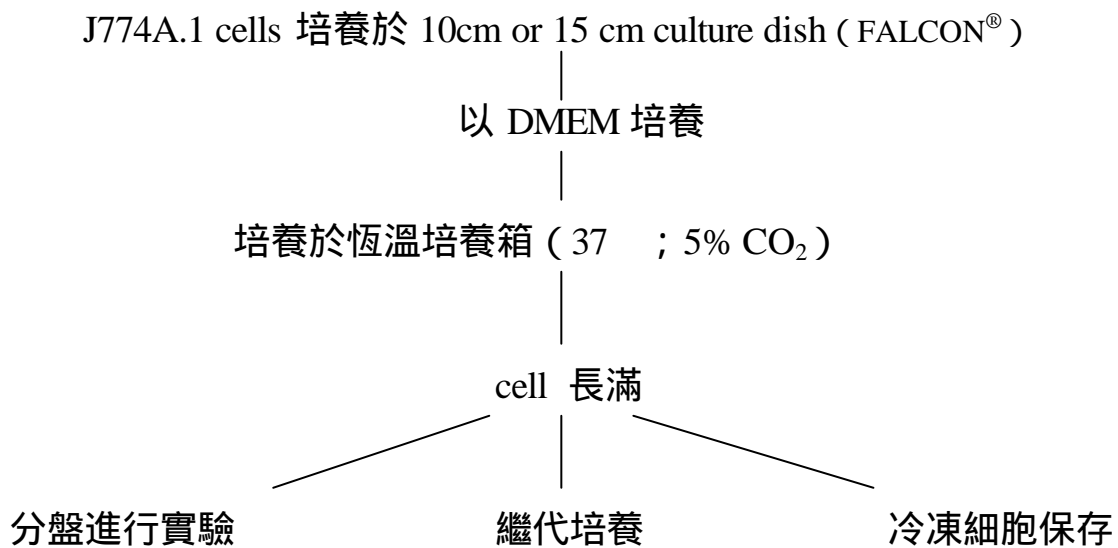
2. 實驗步驟：

取 2.87 ml methanol 加入 30 μ l 10 mM DPPH
|
加入 100 μ l 水或 100 μ l MWEs (0.01、 0.05、 0.1、 0.5、 1 mg/ml)
或 100 μ l MACs (0.001、 0.005、 0.01、 0.05、 0.1 mg/ml)
|
靜置於室溫中 30 mins
|
加入 1ml redistilled water 與 3 ml toluene
|
充分混合
|
3000rpm 離心 10 mins
|
取上層液於 spectrophotometry (OD517nm) 下測定

第二部份、桑椹萃取物調控 oxLDL 對巨噬細胞作用影響

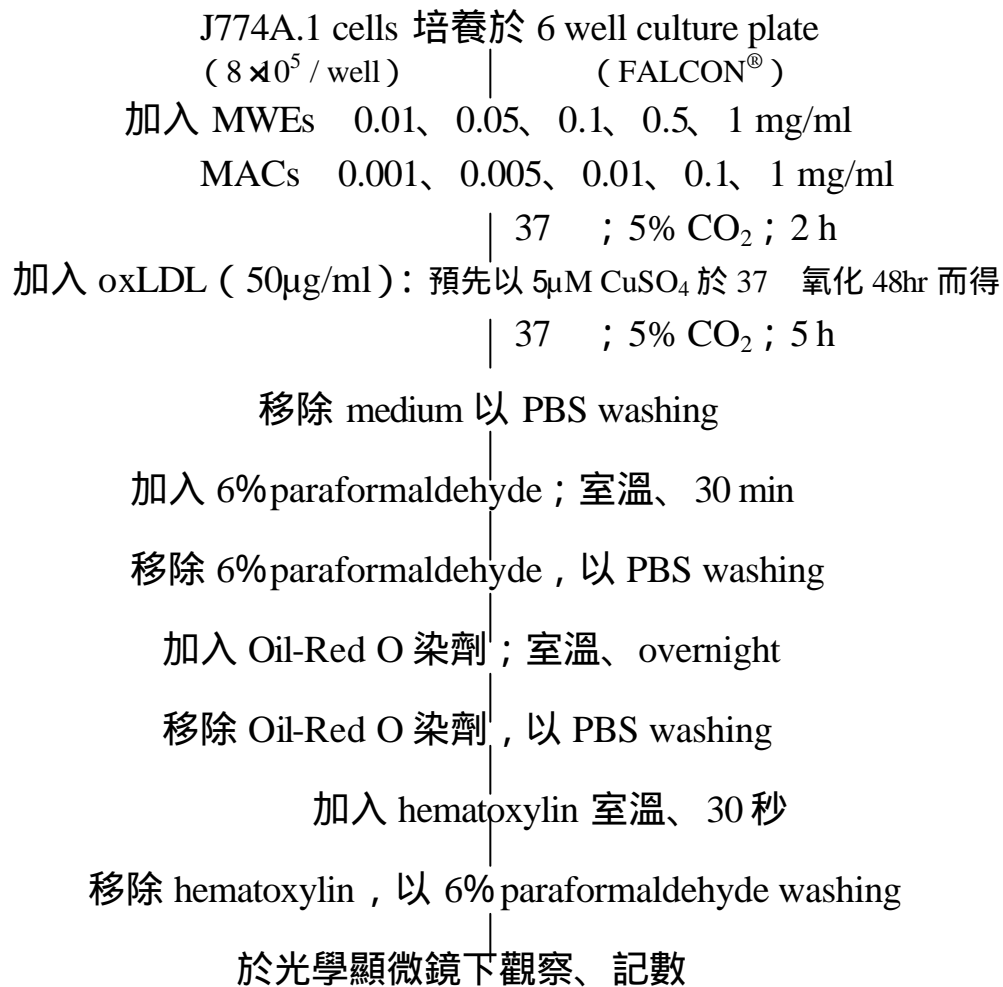
1.細胞培養：

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巨噬細胞 murine macrophage J774A.1 cells。J774A.1 cells 是由人類血液中 monocyte 趨化成的巨噬細胞，其細胞特性適用於模擬人類動脈粥狀硬化生成過程中巨噬細胞的角色。J774A.1 cells 培養於 DMEM (GIBCOBRL®) 培養液中 (PH7.3)，培養液中另添加 10%FBS (foetal bovine serum；胎牛血清)(GIBCOBRL®)、1%penicillin streptomycin (GIBCOBRL®) 與 1%L-glutamine (GIBCOBRL®)。J774A.1 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 filter 過濾滅菌。



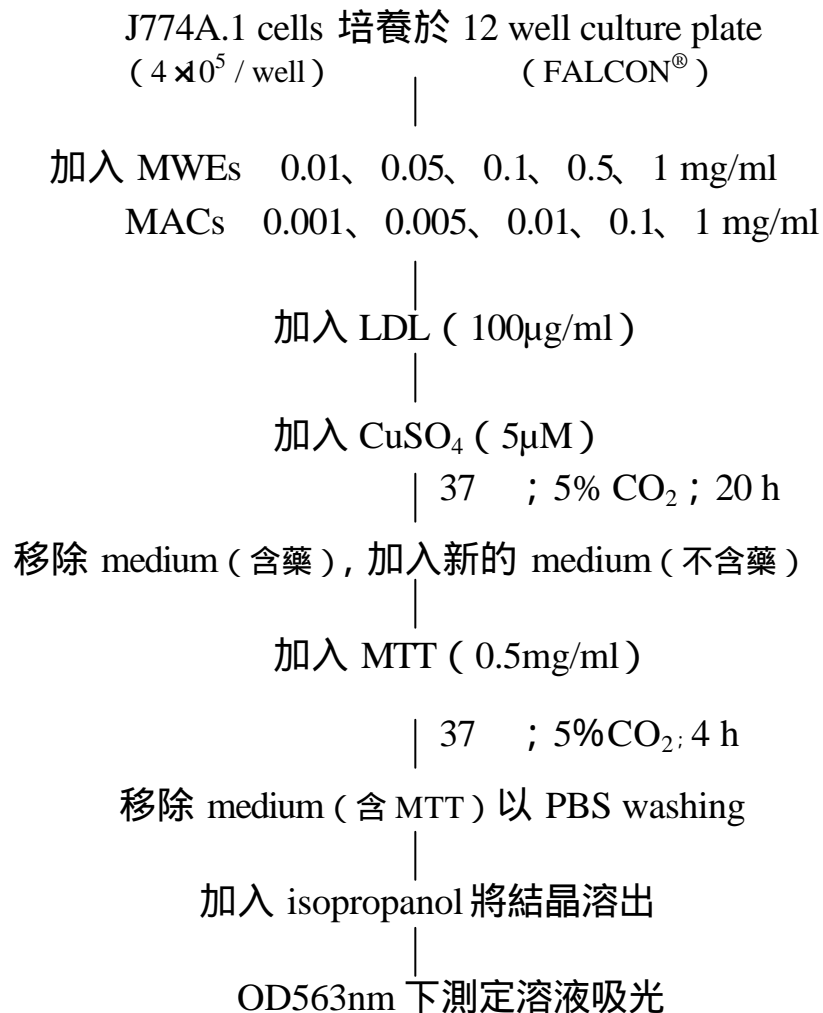
3. Foam cell formation assay :

巨噬細胞 Foam cell formation assay 是以油脂染劑 Oil-Red O 染色法 (34) 將細胞內油脂染色 (紅色)。細胞在加藥處理後將培養液移除, 並以 PBS 清洗二次, 之後以 6% paraformaldehyde 將細胞固定 30 min。30 min 後移除 paraformaldehyde 以 PBS 清洗二次, 加入 Oil-Red O 染劑覆蓋細胞 overnight 後, 移除 Oil-Red O 染劑再加入 hematoxylin 染細胞核 (紫黑色)。完成上述步驟後, 於光學顯微鏡下觀察, 細胞內有被染為深紅色的即為 foam cells。



2. MTT (Microculture Tetrazolium) assay ; Cytotoxicity assay :

本實驗是應用於測試細胞是否具有活性、存活的方法。此法是根據 Alley 等人 (33) 所研究的結果所設計之實驗，其原理為在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 OD563nm 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，因此若溶液的吸光值有降低的話，表示細胞有死亡的現象發生，故也可以藉此方法來判定細胞存活與死亡的情形。



第三部份、桑椹萃取物預防高膽固醇飲食誘導紐西蘭兔動脈粥狀硬化生成實驗：

1.動物實驗計畫審核：

本動物實驗計畫經中山醫學大學實驗動物使用及動物實驗管理小組（IACUC）審核通過。

2.動物品種：

購自經中山醫學大學 IACUC 小組認可之”鹿和牧場”飼養之健康、體重約二公斤的雄性紐西蘭兔。

3.動物分組與飼養方式：

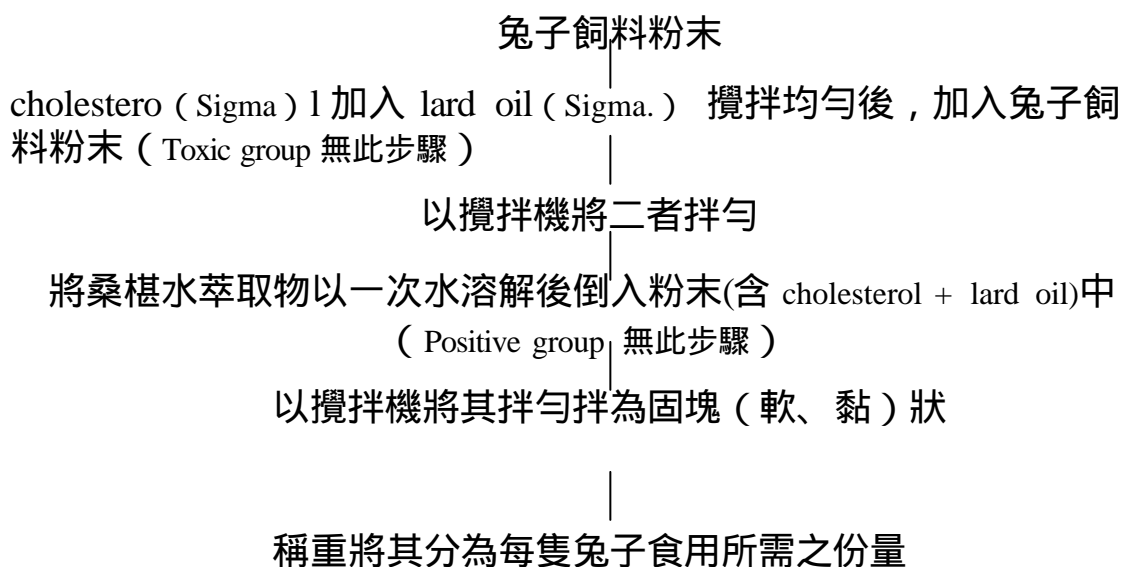
動物飼養於中山醫學大學動物實驗中心十二樓動物房，12F 的普通動物飼育室係採用封閉式的飼育，全部的飼育及清潔工作由動物飼育中心代為服務，飼育管理標準比照行政院國家科學委員會國家實驗動物繁殖及研究中心操作程序。動物的餵食採每天一次，飼料及飲水之供應採自由攝食（ad libitum），當日份飼料若未攝食完即拋棄不留隔天繼續餵食。

動物入室後給予一個星期的適應期，飲食為一般正常飼料。適應期過後，動物隨機分為下列五組，飼養期為十周：

組別 (每組六隻)	飼料組成 (%)			
	feed	cholesterol	lard oil	MWES
控制組 (control group)	100	0	0	0
高膽固醇飲食組 (High cholesterol diet feed ; Positive group)	98.4	1.3	3	0
桑椹水萃取物毒性測試組 (Toxic group)	99	0	0	1
高膽固醇飲食+0.5%桑椹水萃取物組 (Positive + 0.5% MWES feed group)	95.2	1.3	3	0.5
高膽固醇飲食+1%桑椹水萃取物組 (Positive + 1% MWES feed group)	94.7	1.3	3	1

4.動物飼料配製：

兔子飼料 (Rabbit Chow-complete blend. Purina[®]Mills, Inc.) 以絞碎機絞碎為粉末，每隻兔子每日餵食 50g/kg體重的飼料，控制組的飼料全為 Rabbit Chow-complete blend(Purina[®]Mills, Inc.)，其於各組飼料配方比例如上表所述。飼料之配製流程如下：



5.動物之生化與病理分析：

a.動物血清收集：

飼養期十周後，以靜脈注射 120mg/kg 之 pentobarbitol，使動物深度昏迷。將動物固定於手術盤上後迅速檢開腹腔及胸腔，立即以針筒進行心臟採血以收集全血，收集之全血製做血清供做生化檢測分析。

b.動物主動脈截取：

採血後以 9 %生理食鹽水進行灌流清除血管中殘血使組織清潔，灌流後進行動物的主動脈截取。先清除腹、胸腔中的脂肪組織、結締組織及內臟如：肺臟、肝臟、腎臟等，使心臟及主動脈顯露出。以手術剪將與主動脈弓 (aortic arch) 相連的 right common carotid artery、left common carotid artery 與 left subclavian artery 剪斷，再以鑷子夾住心臟與主動脈弓，小心挑起主動脈並沿著脊柱，往胸腔經橫隔向腹腔將貼覆於脊柱上之主動脈剝離，至下肢動脈分剝處停止，而得由與心臟接連的主動脈弓起至下肢動脈處的整段主動脈。用剪刀剪下心臟後與整段主動脈迅速以 PBS 浸潤清洗後冰於-80 等待處理。

c.動物主動脈切片染色：

1. H&E stain 步驟如下：

1. 脫蠟後，以紫蘇木 (Hematoxylin) 溶液染 2-15 分鐘。(時間可長可短，視紫蘇木溶液之不同而異)

2. 以水浸洗。
3. 以 0.5% 鹽酸溶液行分辨染色色度，約 1-5 秒。
4. 浸入氨水(水 1000ml 中滴入氨水 2 滴)至組織呈現藍色，約 1 分鐘。
5. 於流水中清洗，至少須 15 分鐘。
6. 染以 0.5% 伊紅 Y 溶液，數秒至 2 分鐘。
7. 依次通過 80%，90%，95% 酒精。
8. 移入 100% 酒精，二甲苯-100% (1:1)，二甲苯-木餾油 (4:1)，二甲苯(I)，二甲苯(II)各半分鐘。
9. 以二甲苯使之透明後封蓋。

c.動物主動脈脂肪斑染色：

1. 將動物主動脈至於 4℃ 退冰。
2. 以 Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) 將主動脈浸泡清洗。
3. 將清洗後的主動脈浸泡於 Sudan 染色液約一分鐘。
4. 以 PBS 浸泡清洗。
5. 重複 3、4 步驟至主動脈上脂質沉積部位有明顯受染。
6. 將染色後之組織以光學掃描器 (photo density meter) 掃描受染部分面積，並與全血管面積相除以計算受染部分面積佔全血管面積之百分比。

柒、實驗藥品與器材

1.桑椹：本實驗所使用之桑椹品種為台桑十九號，購自台中縣太平市林先生之桑果農場。

2. Apo B protein fragmentation :

1. 實驗藥品：

(1) 3 ~ 15 % acrylamide gradient gel :

1. acrylamide (GILSON)
2. TEMED (Bio-RAD)
3. Ammonium peroxodisulfate ; APS (日本昭和化學株式會社)
4. SDS (MERCK)
5. Tris-HCL (SIGMA)

(2) Running buffer :

1. Tris base (GILSON)
2. SDS (MERCK)
3. Glycine (SIGMA)

(3) 4x Dye :

1. SDS (MERCK)
2. Glycerol (SIGMA)
3. 2-mercaptoethanol (SIGMA)
4. Bromophenol blue (SIGMA)

(4) non-stand high ranger maker (Bio-RAD)

(5) Coomassie blue (SIGMA)

2. 實驗器材：

(1) 直立式電泳槽：SE400-15-1.5 (Pharmacia Biotech)

(2) 電源供應器：Bio-Rad powder PAC3000 (Bio-RAD)

(3) 水平式搖晃器：KS orbital shaker OS701 (TKS)

3. LDL electrophoretic mobility assay

1. 實驗藥品：

(1) BECKMAN lipoprotein (LIPO) electrophoresis system :

1. LIPO gels (0.5% **agerose** ; 1 % **barbital buffer**)
2. B-2 barbital buffer (PH8.6) : 6.07 g **B-2 barbital**
493.93 ml **deionized water**
3. Paregon Lipo Stain solution : 165 ml **reagent alcohol**
3 ml **Paragon LIPO Stain**
135 ml **deionized water**
4. Fixative solution : 180 ml **reagent alcohol**
30 ml **glacial acetic acid**
90 ml **deionized water**
5. Destain solution : 450 ml **reagent alcohol**
550 ml **deionized water**

2. 實驗器材：

- (1) BECKMAN (LIPO) electrophoresis tank.
- (2) BECKMAN (LIPO) electrophoresis powder supply.

4. TBARS assay

1. 實驗藥品：

- (1) TBA (2-thiobarbituria acid) (SIGMA)
- (2) TCA (trichloroacetic acid) (SIGMA)
- (3) TEP (1,1,3,3-tetramethoxypropane) (SIGMA)

2. 實驗器材：

- (1) 螢光光度計 (HITACHI F-2000)

5. DPPH bleaching assay

1. 實驗藥品、器材：

- (1) DPPH (SIGMA)
- (2) 分光光度計 (HITACHI U-2001)

6. 細胞培養 (cell culture)：

1. 實驗藥品：

- (1) medium : DMEM (GIBCOBRL[®])
- (2) serum : FBS (foetal bovine serum ; 胎牛血清) (GIBCOBRL[®])
- (3) penicillin streptomycin (GIBCOBRL[®])
- (4) L-glutamine (GIBCOBRL[®])
- (5) culture dish (FALCON[®])
- (6) sodium bicarbonate (GIBCOBRL[®])
- (7) Dulbecco' s phosphate-buffered saline (PBS) (GIBCOBRL[®])

2. 實驗器材：

- (1) 恆溫培養箱 (NUAIRE us autoflow)
- (2) 無菌操作台 (NUAIRE class2 typeA/B3)

7. Foam cell formation：

1. 實驗藥品：

- (1) Oil-Red O 染劑 (武藤化學株式會社)

(2) paraformaldehyde (SIGMA)

(3) hematoxylin (武藤化學株式會社)

8. MTT assay :

1. 實驗藥品、器材 :

(1) MTT (Thiazolyl blue) (SIGMA)

(2) isopropanol (Fisher Chemic)

(3) 分光光度計 (HITACHI U-2001)

捌、結果

一、桑椹萃取物抑制體外誘發 LDL 氧化之作用：

低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化指標於本實驗中分為兩方面來討論，即 LDL 蛋白氧化修飾反應 (oxidative modifications) 與脂質的過氧化作用 (lipid pre-oxidation)。在實驗上，以衍蛋白 Apo B 的斷裂 (Apo B fragmentation assay) 與蛋白表面的電荷改變實驗 (LDL peroxidation - relative electrophoretic mobility)，來測定 LDL 蛋白氧化修飾程度，而脂質的過氧化作用的指標則以 TABRS assay 與 diene conjugation assay 來測定。

(1) LDL peroxidation-relative electrophoretic mobility assay :

LDL 氧化時，蛋白序列中的離胺酸 (lysine) 組胺酸 (histidine) 等帶正電荷胺基酸的 -amino group 與氧化產物的醛類如：malondialdehyde (MDA) hexanal 與 4-hydroxynoneal (4-HNE) 交聯生成 Schiff base 而使 LDL 表面正電荷減少而負電荷增多。而 LDL 氧化後蛋白表面的電荷改變情形，可以用 gel 上 band 往正電電場移動的距離來判定，以 control group band 的位置 (EM ; electrophoretic mobility) 為 1。

在 in vitro 實驗中以 10 μ M 硫酸銅誘導 LDL 於 37 $^{\circ}$ C 氧化 24 小時後，其 band 移動距離比 control group 多了二倍 (EM 為 3)【Fig.3】。而在同時添入不同濃度的桑椹水萃取物 (MWEs) 一起反應後，在 0.5

mg/ml 濃度下其 band 移動距離 (EM) 為 1.5, 而在 1 mg/ml 濃度下 EM 為 0.5 此外在 0.01 0.05 0.1mg/ml 濃度下, 其 EM 同 positive group (EM 為 3)。而在同樣氧化條件添入不同濃度的桑椹花青素萃取物 (MACs) 一起反應後, 在 0.05、0.1、0.5、1 mg/ml 濃度下其 band 移動距離 (EM) 為 1.5, 此外在 0.001、0.005、0.01mg/ml 濃度下, 其 EM 同 positive group (EM 為 3)【Fig.4】。

由上述實驗結果顯示, 由上述實驗結果顯示, 有添加 0.5 1 mg/ml MWEs 及添加 0.05、0.1 0.5 1 mg/ml MACs 的組別, 其 EM 比 positive group 降低, 而顯示出具有抑制 LDL 氧化的作用。比較桑 MWEs 與 MACs 之效力發現, MACs 在低濃度下 (0.05 mg/ml) 即具有效力而優於 MWEs。

(2) Apo B fragmentation assay :

在 in vitro 實驗中以 10 μ M 硫酸銅誘導 LDL 於 37 氧化 4 小時後, 其 LDL 的衍蛋白 Apo B 約有 50% 斷裂。而在同時添入不同濃度的桑椹水萃取物 (MWEs) 一起反應後, 在 0.1mg/ml 濃度下 Apo B 約有 30% 斷裂 (保留 70%), 而在 0.5、1 mg/ml 濃度下 Apo B 約有 20% 斷裂 (保留 80%), 而在低濃度 0.01、0.05 mg/ml 濃度下, Apo B 斷裂的程度同 positive group【Fig.1】。由上述實驗結果顯示, 有添加 0.5 1 mg/ml MWEs 的組別, 其 Apo B 斷裂量比 positive group 降低,

而顯示出具有抑制 LDL 氧化的作用。

而在同樣氧化條件添入不同濃度的桑椹花青素萃取物 (MACs) 一起反應後, 在 0.01、0.05、0.1、0.5、1 mg/ml 濃度下其 Apo B 約有 20% 斷裂 (保留 80%), 此外在 0.001、0.005、mg/ml 濃度下, 其 Apo B 斷裂的程度同 positive group 【Fig.2】。MACs 在低濃度下(0.01 mg/ml) 即具有抑制 Apo B 斷裂的效力, 因此在抑制 LDL 氧化的作用優於 MWEs。

(3) TBARS assay :

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, 以此聚合物的吸光值可換算 MDA 濃度。

在 in vitro 實驗中以 10 μ M 硫酸銅誘導 LDL 於 37 $^{\circ}$ C 氧化 24 小時後, 其 MDA 生成量約為 3mg/ml。而在同時添入不同濃度的桑椹水萃取物 (MWEs) 一起反應後, 在 0.5 mg/ml 濃度下其 MDA 生成量約為 0.5mg/ml, 而在 1 mg/ml 濃度下 MDA 生成量約為 0.3mg/ml。此外在 0.01、0.05、0.1mg/ml 濃度下, 其 MDA 生成量約為 3.5mg/ml, 反較 positive group 高【Fig.5】。由上述實驗結果顯示, 有添加 0.5、1 mg/ml MWEs 的組別, 其 MDA 的生成量比 positive group 降低近 5~6

倍，而顯示出具有抑制 LDL 氧化的作用。

而在同誘導 LDL 氧化的條件下，加入桑椹花青素萃取物 (MACs) 一起反應後發現，MACs 在低濃度下 (0.05 mg/ml) 即具有抑制 MDA 生成的效力【Fig.6】，其 MDA 生成量比 positive group 減少了六倍以上。而在高濃度 (0.5、1mg/ml) 其效力更佳。

(4) Diene conjugation assay :

脂質過氧化之重要特徵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。在 *in vitro* 實驗中以 10 μ M 硫酸銅誘導 LDL 於 37 $^{\circ}$ C 氧化由 0~540 min，每隔 30 min 於 OD234nm 下測量一次吸光值，其 diene 生成曲線發現其最大生成量約氧化反應後 200 min 左右，之後 diene 生成量趨於平緩、飽和。而在同時添入 0.5、1 mg/ml 濃度的桑椹水萃取物 (MWEs) 一起反應後，diene 生成情形與 positive group 相比則有明顯被抑制現象【Fig.7】，約為 positive group 的一半。而在同誘導 LDL 氧化的條件下，加入桑椹花青素萃取物 (MACs) 一起反應後發現，其在 0.1mg/ml 濃度下，即具有 diene 生成情形的作用【Fig.8】，其抑制 LDL 氧化的效力優於 MWEs。

(5) DPPH bleaching assay:

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 為結構穩定的自由基並於 517nm 波長下有特定之吸光值。當 DPPH 的濃度降低時其吸光值也會

隨之降低，利用此原理可測定出特定物質清除自由基之效力。

在 *in vitro* 實驗中以 10mM DPPH 為 positive group，而後在同條件下添入不同濃度的桑椹水萃取物 (MWEs) 測定各濃度下清除 DPPH 的效力。在 MWEs 濃度 0.01、0.05、0.1、0.5、1 mg/ml 其 DPPH 清除效力分別為 5%、12%、30%、80%、75%【Fig.9】。而桑椹花青素萃取物 (MACs) 各濃度下清除 DPPH 的效力，在 MACs 濃度 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1 mg/ml 其 DPPH 清除效力分別為 16%、72%、88%、87%、83%【Fig.10】。

由上述實驗結果顯 MWEs 在 0.5-1 mg/ml 濃度下有較佳的 DPPH 效力 (70~80%)。而 MACs 則在 0.005 mg/ml 濃度下即具有約 80% 的清除效力，顯示出在清除 DPPH 的效力上 MACs 遠優於 MWEs。

二、桑椹萃取物調控 oxLDL 對巨噬細胞的作用影響：

(1) MTT assay ; Cytotoxicity assay :

LDL 氧化所形成的氧化型低密度脂蛋白(oxLDL) 已證實是促進動脈硬化過程中巨噬細胞死亡的主因。巨噬細胞的死亡會促成”necrotic core”生成且會與因巨噬細胞死亡而釋放出不溶性油脂(insoluble lipid) 生成聚合，這些物質是動脈硬化斑(plaque) 形成的成分。此外巨噬細胞死亡也會引起其它的免疫發炎反應，而促使動脈硬化病成加速。若能保護巨噬細胞不會因大量的 LDL 氧化而死亡，是一個可以減緩動脈粥狀硬化生成的方法。

在細胞實驗中以加入 5 μ m 硫酸銅及 LDL 於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 與 RAW 264.7 細胞一起培養 20 小時後，以 MTT assay 的結果顯示細胞會大量死亡。而在同條件下添入不同濃度的桑椹水萃取物(MWEs) 一起培養後發現，在 MWEs 濃度 0.01、0.05、0.1、mg/ml 細胞死亡情形同 positive group，但在高濃度 0.5、1、mg/ml 的組別，細胞死亡情形明顯被抑制，細胞數目同 control group【Fig.11】，此結果顯示 MWEs 具有保護巨噬細胞不會因 LDL 氧化所引起的傷害而死亡。而桑椹花青素萃取物(MACs) 也有同樣效力且優於 MWEs，其在 0.01mg/ml 及具有抑制 50%細胞死亡的能力，在高濃度(0.1、1mg/ml) 下則可完全抑制細胞的死亡【Fig.12】。

(2) Foam cell formation assay :

巨噬細胞會藉由表達的清除者接受器 (scavenger receptor) 將 oxLDL uptake 至細胞中 , 以達清除 oxLDL 而避免 oxLDL 所引起的一些細胞傷害。但若有過多的 LDL 氧化形成 oxLDL , 使巨噬細胞 uptake 過多 oxLDL 於細胞內而又不及代謝 , 巨噬細胞會轉形為泡沫細胞 (foam cell) 而聚集形成脂肪斑 (fatty streak) , 是引起動脈粥狀硬化的起始點。因此 , 若能降低或減緩巨噬細胞轉形為 foam cell , 減少 foam cell 的形成 , 是一個可以達預防或減緩動脈粥狀硬化發生的方式。

在細胞實驗中以加入 50 μ g/ml oxLDL 於 37 $^{\circ}$ C 、 5% CO₂ 與 J774A.1 細胞一起培養 5 小時後 , 以 Oil-Red O 染色法將細胞內油脂染色 (紅色) , 於光學顯微鏡下觀察 , 發現細胞內有許多被染為深紅色的細胞(foam cell)【Fig13.A】而在加入 oxLDL 前若先添入 1mg/ml 桑椹水萃取物 (MWEs) 一起培養 2hr 後再加入 oxLDL 培養 5 小時 , 之後於光學顯微鏡下觀察發現 foam cell 數目有減少的現象【Fig13.C】。而桑椹花青素萃取物 (MACs) 在同濃度下也有同樣效力【Fig13.D】 , 但是無論是 MWEs 或 MACs 在濃度小於 0.5mg/ml 時其結果並不顯著。

三、桑椹萃取物預防高膽固醇飲食誘導紐西蘭兔動脈粥狀硬化生成實驗：

1. 動物血清生化分析：

(1). Triglycerode：

以高膽固醇飲食來誘導紐西蘭兔動脈粥狀硬化生成實驗中，紐西蘭兔血清中的總三酸甘油酯 (triglycerode; TG) 各組間並沒有差異性的變化【Fig15】，主要是因本誘導模式為非誘導 TG 增加之誘導方式。

(2). Cholesterol：

高膽固醇飲食來誘導紐西蘭兔動脈粥狀硬化生成實驗中，紐西蘭兔血清中的總膽固醇量 (total cholesterol) 於 high cholesterol diet feed group (positive group) 有明顯增加的情形，較 basal diet feed group (control group) 增加約十倍，表示本實驗的誘導模式成功。但若於 high cholesterol diet 中添加 0.5%、1% 的桑椹水萃取物 (MWEs) 一起餵食後發現，兔子血清中的總膽固醇量與 positive group 相比，會由 950mg/dl 分別下降至 300~400mg/dl，較 positive group 下降約 30~40% 【Fig14】。顯示 MWEs 具有降低在高膽固醇誘導飲食下紐西蘭兔血液中的膽固醇量。

(3). HDL :

高密度脂蛋白 (HDL) 具有擔任將血液中的膽固醇 (cholesterol) 運送至肝臟代謝的角色，因此若能增加血清中的 HDL 則可降低血清中膽固醇量而達預防動脈粥狀硬化的發生。而在本實驗血清中的總 HDL 濃度於 positive group(80mg/dl)有明顯較 control group(20mg/dl) 增加的情形，可能是因以高膽固醇飲食誘導下促使 HDL 生成而增加。而在有添加 0.5%、1% 桑椹水萃取物 (MWEs) 的組別其 HDL 濃度則較 positive group 降低，分別為 30、25mg/dl【Fig16】。可能因為在有添加 MWEs 的組別本身血液中總膽固醇減少所致。由此顯示 MWEs 並無法有效增加 HDL 濃度。

(4). LDL :

低密度脂蛋白 (LDL) 是體內擔任攜帶膽固醇之角色，人體總血清中約有 65%的膽固醇由 LDL 攜帶傳送至周圍組織，若血清中的 LDL 濃度上升，是增加動脈粥狀硬化發生的指標。因此若能降低血清中的 LDL 濃度則可降低血清中膽固醇量，而達預防動脈粥狀硬化的發生。在本實驗血清中的總 LDL 濃度計算方式採用 Friedewald 公式： $LDL (mg/dl) = \text{全部膽固醇} - HDL - \text{三酸甘油酯} (TG)$ 。

結果顯示 positive group (約 880mg/dl) 有明顯較 control group 增加的情形，而在有添加 0.5%、1% MWEs 的組別其 LDL 濃度則較

positive group 降低，約為 330~350mg/dl【Fig16】。較 positive group 下降約 30~40%【Fig14】，顯示 MWEs 具有降低在高膽固醇誘導飲食下紐西蘭兔血液中的 LDL 量。

(5). Non-HDL :

所謂的 non-HDL 指的是血液中不是 HDL 的脂蛋白，包含乳糜微粒(chylomicrons)、極低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)、中密度脂蛋白(IDL)，這些脂蛋白的生成增加為新血管疾病發展的正相關性指標，因其參與膽固醇酯(cholesterol ester)、三酸甘油酯(triglycerides)、游離脂肪酸(free fatty acid)等物質的代謝。因此血液中 non-HDL 的濃度可降作為一些新血管疾病的生成如動脈粥狀硬化、高脂血症的指標。

在本實驗 positive group 血清中的 non-HDL 濃度約為 800mg/dl，而在有添加 0.5%、1% 桑椹水萃取物(MWEs)的組別其 non-HDL 濃度則較 positive group 降低，為 200~300mg/dl，其 non-HDL 生成量較 positive group 約 30~40%【Fig18】。顯示 MWEs 的添加下，高膽固醇誘導飲食的紐西蘭兔血液中 non-HDL 的生成量會減少。

(6). Risk ratio (LDL-C/HDL-C) :

Risk ratio 可以判定罹患動脈粥狀硬化的風險機率，以 LDL-cholesterol 與 HDL-cholesterol 的比值為計算方式，比值越高風險越大。由本實驗結果觀察顯示，顯示高濃度 1% MWEs 的添加下，高膽固醇誘導飲食的紐西蘭兔的 risk ratio 有減少的趨勢【Fig19】，與 positive group 的 ratio 相比其比值約由 11 降至 7。但在 0.5% MWEs 的濃度下其 ratio 比值與 positive group 相比則無太大差異，可能與 MWEs 無法有效增加 HDL 濃度所致。

(7). 桑椹水萃取物 (MWEs) 餵食下動物生物毒性分析：

為證實以桑椹水萃取物 (MWEs) 餵食動物是否會對動物產生生物毒性，我們在實驗中設計了單以 MWEs 混於正常飼料後給予紐西蘭兔餵食，並於犧牲後收集血清進行肝、腎的生化毒性分析，分別進行了 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)、glutamic pyruvic transaminase (GPT)、鹼性磷酸酶 (ALP)、尿素氮 (BUN)、肌酸酐 (CRE) 項目的測試。結果顯示單以 MWEs 混於正常飼料餵食的組別上述各項生化檢測值均為正常值同於 control group【Fig20A、B】，顯示 MWEs 添加於飲食中並不會有生化毒性。

2. 動物動脈組織切片之病理分析：

以高膽固醇飲食來誘導紐西蘭兔動脈粥狀硬化生成實驗中，在動物犧牲後擷取其主動脈，進行切片及組織染色分析。結果顯示，在 control group 的紐西蘭兔動脈切片觀察，其動脈的內膜（intima；I）很完整，中層（media；M）的血管平滑肌細胞也沒有增生、轉移的現象，是一個未發生動脈粥狀硬化的健康動脈血管【Fig21.A】。

而在 positive group 的紐西蘭兔動脈切片，我們觀察到有大量白色透明的聚合物堆積在 intima 內，這些聚合物即為”Gruel”是一種糜粥狀的油脂聚合物，也是形成動脈粥樣硬化斑的主因。而在 intima 中我們也觀察到有血管平滑肌細胞的存在，顯示血管平滑肌細胞已由動脈中層增生而移動至 intima【Fig21.B】，這些都是形成動脈粥狀硬化時會發生的現象。

但在高膽固醇飲食中添加 1% 桑椹水萃取物（MWEs）的組別，其紐西蘭兔動脈切片顯示出”Gruel”堆積在 intima 的量與 positive group 相比明顯減少了【Fig21.C】，雖然還是有部分堆積但其量與面積是有降低的。顯示有 MWEs 的添加下，高膽固醇誘導飲食紐西蘭兔的動脈硬化的生成及損傷面積的確會減少，而具有預防及減緩動脈粥狀硬化生成的效力。

3. 動物動脈脂肪斑 (fatty streak) 染色：

以高膽固醇飲食來誘導紐西蘭兔動脈粥狀硬化生成實驗中，在動物犧牲後擷取其主動脈，以 Sudan [?] 染色液進行脂肪班的染色分析。結果顯示，在 control group 的紐西蘭兔動脈切片觀察，其動脈血管管壁十分光滑，並沒有脂肪斑 (fatty streak) 堆積之情形【Fig22.A】，而 MWEs (1%) only 的組別也如 control group 一樣【Fig22.C】。

而在 positive group 的紐西蘭兔動脈切片，我們觀察到有大量脂肪堆積在動脈血管內的主動脈弓 (aortic arch) 中，經 Sudan [?] 染色液染色後可以十分明顯的被觀察到橘黃色的脂肪堆積【 Fig22.B】，約佔整條血管面積的 36%。

若在高膽固醇飲食中添加 0.5%、1% 桑椹水萃取物 (MWEs) 的組別，其染色結果顯示出脂肪斑堆積之情形與 positive group 相比，其脂肪堆積情形與面積有減少的情形，各約佔整條血管面積的 21% 及 13%【Fig22.D、 E】。顯示有 MWEs 的添加下，高膽固醇誘導飲食紐西蘭兔的動脈脂肪班的生成及損傷面積會減少。

玖、討論

一、桑椹萃取物：MWEs、MACs 抑制 LDL 氧化之作用

由實驗結果顯示我們所製備的桑椹萃取物：水萃取物 (MWEs) 或花青素萃取物 (MACs) 二者皆具有抑制 LDL 氧化的能力，不論在 LDL 的蛋白氧化修飾或脂質過氧化作用，MWEs 與 MACs 均可防止 LDL 的氧化作用。而效力上，MACs 顯然優於 MWEs，由各實驗結果來看 MACs 在 0.05mg/ml 濃度下即達抑制 LDL 氧化的作用，而 MWEs 需要大於 0.1mg/ml 通常為 0.5mg/ml 濃度下才会有作用，為 MACs 的十倍，由此顯示 MACs 的效力確實優於 MWEs，也代表桑椹抑制 LDL 氧化的能力主要成份是花青素成分，與我們的預期吻合。

而桑椹萃取物在本實驗中抑制 LDL 氧化的方式，應該是捕捉銅離子促氧化作用時生成的自由基，防止自由基對 LDL 的氧化攻擊。以有文獻指出在動脈粥狀硬化的過程中，銅離子促使 LDL 氧化是一個起因 (36)，其機制如圖十一。而由 DPPH bleaching assay 發現 MWEs、MACs 均具有清除自由基的功能，表示其具有保護 LDL 不受由銅離子促氧化作用生成的自由基攻擊之作用，而可抑制 LDL 氧化。脂質的過氧化及低密度之蛋白的氧化被證實是動脈粥狀硬化發生過程的致病因子，因桑椹萃取物具有抑制 LDL 氧化的效力，而可被預期其可具有抑制動脈粥狀硬化發生之作用。

二、桑椹萃取物調控 oxLDL 對巨噬細胞的作用影響：

降低或減緩巨噬細胞轉形為 foam cell，減少 foam cell 的形成，被證實是一個可以達預防或減緩動脈粥狀硬化發生的方式。降低 foam cell 的形成主要可由二方面討論，一為減少巨噬細胞 uptake oxLDL，另一方面為促進巨噬細胞內膽固醇的代謝【圖八】。

(1). 巨噬細胞 uptake oxLDL 之作用：

巨噬細胞利用清除者接受器 (scavenger receptor) 辨識 ox-LDL，並經內飲作用將 ox-LDL 吞噬入細胞內。清除者接受器是一群 family proteins，為一種嵌入型的膜蛋白，被發現其與修飾型低密度脂蛋白 (modified LDL) 如氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL)、乙醯化脂蛋白 (Ac-LDL) 有很專一的建結能力 (37)。

這些清除者接受器中，巨噬細胞主要利用來辨識 ox-LDL 的清除者接受器被證實為 CD36 (38)。CD36 於細胞內的表達機制已被證實是由 PPAR 所調控，PPAR 的 ligands 如 BRL (rosiglitazone)、TZD (thiazolidinedione)、ox-LDL 均會促使 CD36 的表達 (15)。因此，在 foam cell formation 的實驗結果顯示，桑椹萃取物可使 foam cell 形成降低，是否是因經由介入此分子機制調控 CD36 的表達，而抑制巨噬細胞轉變為泡沫細胞，是另一個可以研究的方向【圖九】。

(2). 巨噬細胞內膽固醇的代謝作用：

VLDL-IDL-LDL 之轉型反應可使內生性脂質由肝臟運送至周圍細胞，而細胞內也有另外一套機制，可將周圍細胞內膽固醇移除至肝臟代謝的運輸機制，稱之為「膽固醇反向運輸 (reverse cholesterol transport)」【圖十】。「膽固醇反向運輸」須以 HDL 為媒介，由周圍細胞組織中獲取膽固醇後運輸至肝臟代謝，而將周圍細胞內膽固醇由細胞內運輸至細胞外的蛋白即為 ABCA1。

ABCA1 是一個 transporter protein, 其功能為將細胞內的膽固醇運輸至細胞外給 HDL 後由 HDL 將膽固醇運至肝臟代謝。而由實驗證實動脈硬化中，增加 ABCA1 的表達可以促使巨噬細胞轉變為泡沫細胞的情形減緩，此試驗更證實 ABCA1 可由 PPAR α -LXR 的分子機制調控其表達 (35)。基於此理論若桑椹萃取成分若可介入調控此機制促使 ABCA1 表達，則可幫助巨噬細胞進行「膽固醇反向運輸」而減少膽固醇於細胞內堆積而形成泡沫細胞。

拾、實驗結果圖表

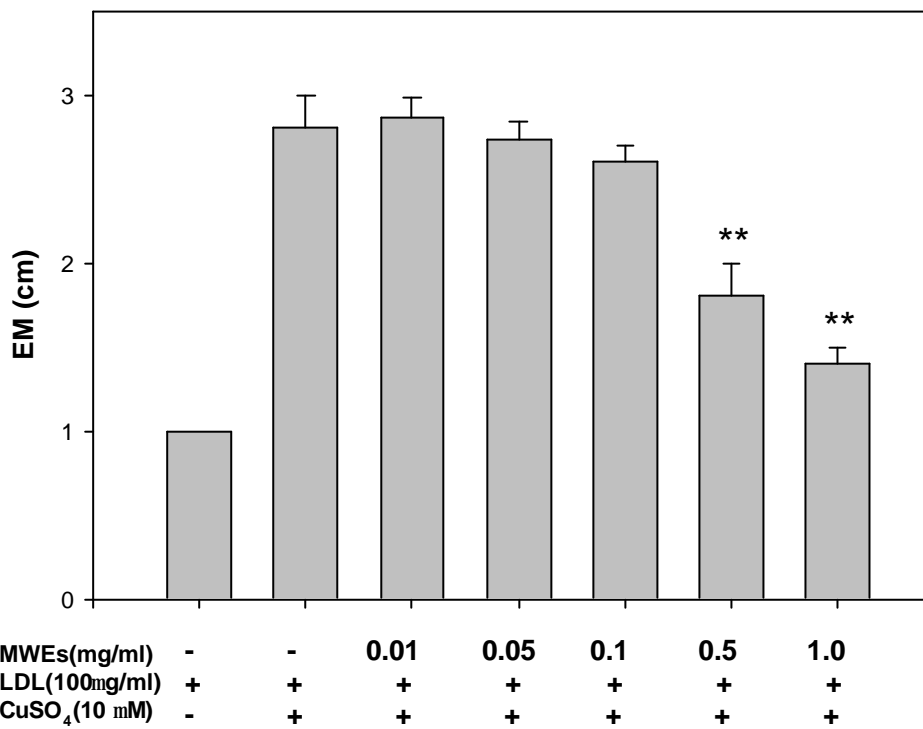
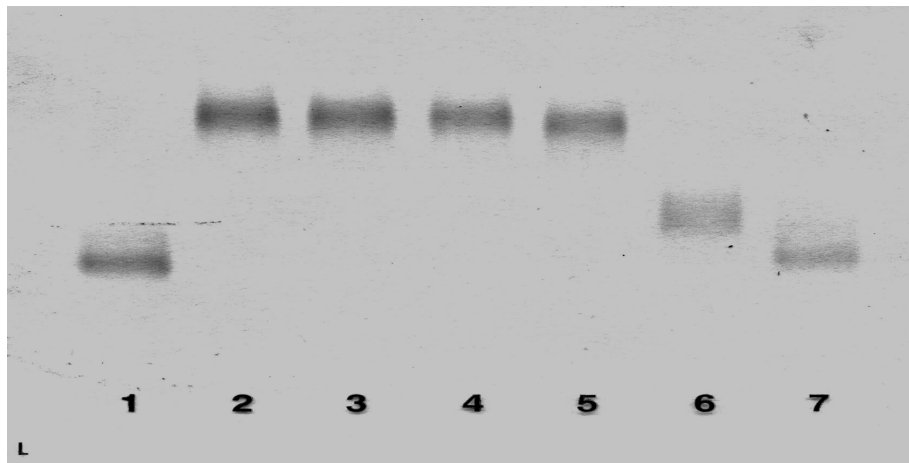


Fig 1. Inhibitory effects of MWEs on the Cu²⁺-induce LDL-preoxidation-related electrophoretic mobility. LDL(100μg/ml)was incubated with 10 μM CuSO₄ at 37 °C、24hr in the presence or absence of different concentrations of MWEs (0.01~1 mg/ml).The data were means ± SD from 3 samples for each group. ** P<0.001 compared with positive group.

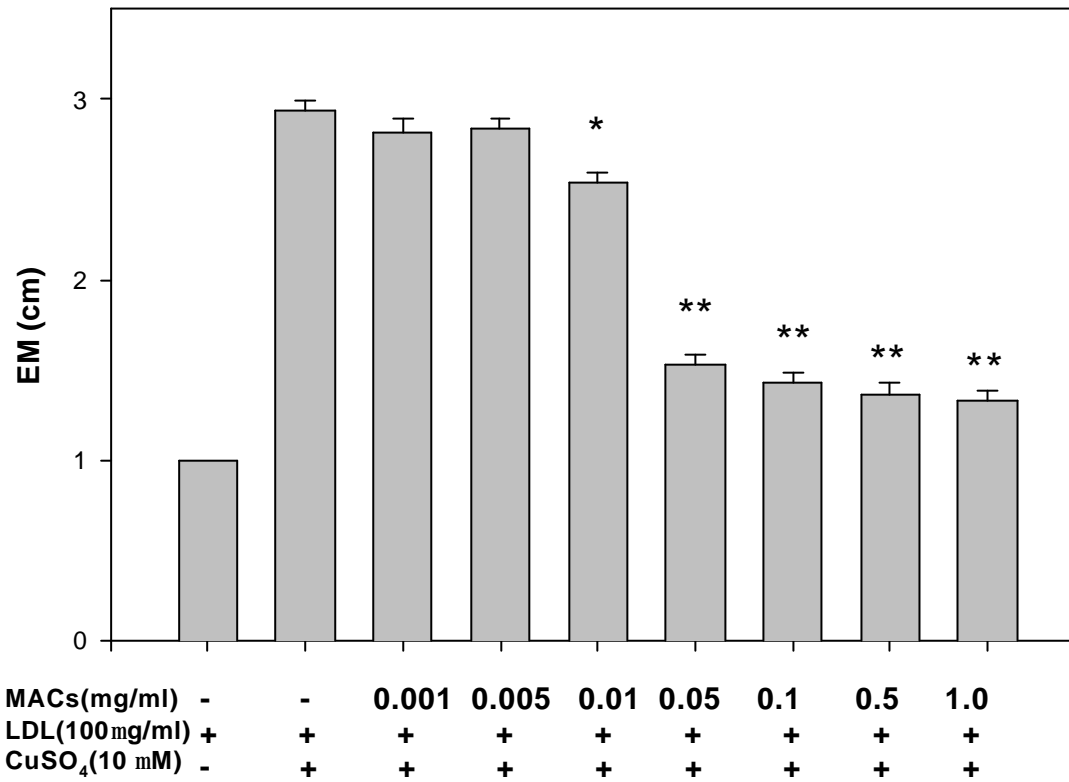
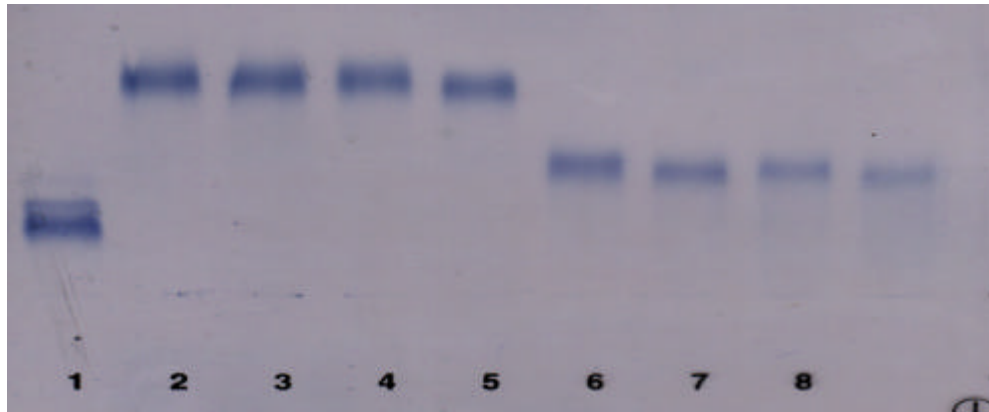


Fig 2. Inhibitory effects of MACs on the Cu²⁺-induce LDL-preoxidation-related electrophoretic mobility. LDL(100μg/ml)was incubated with 10 μM CuSO₄ at 37 °C、24hr in the presence or absence of different concentrations of MACs (0.001~1 mg/ml).The data were means ± SD from 3 samples for each group. * P<0.01, ** P<0.001 compared with positive group.

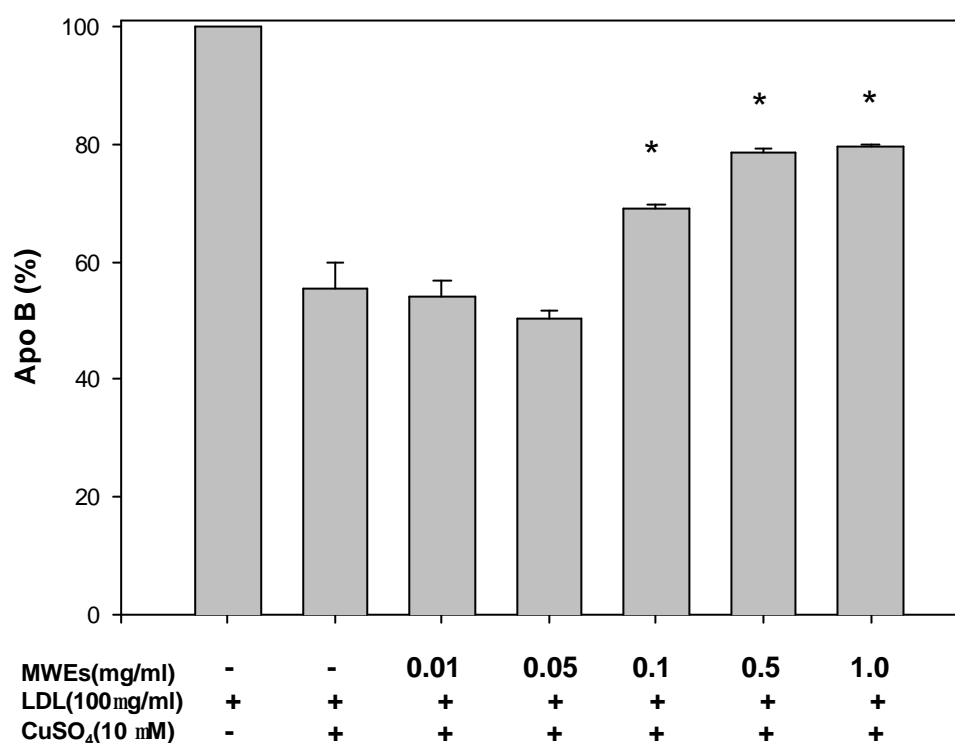
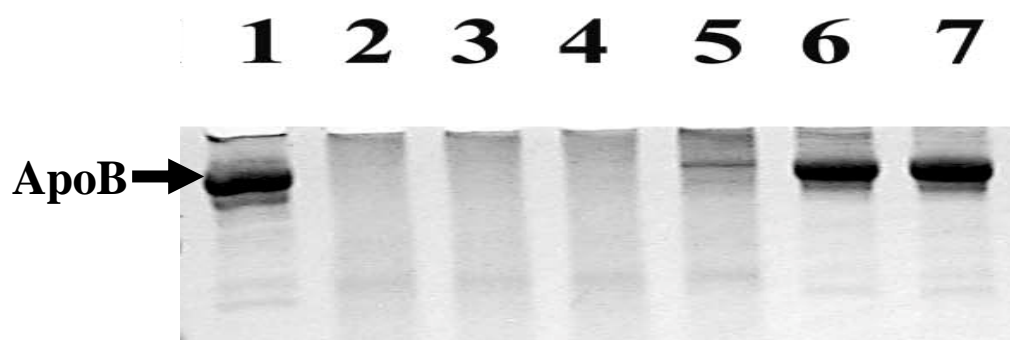


Fig3. Inhibition of Cu²⁺-mediated ApoB protein fragmentation in LDL by MWEs. LDL(100µg/ml)was incubated with 10 µM CuSO₄ at 37 °C, 24hr in the presence or absence of different concentrations of MWEs (0.01~1 mg/ml).The data were means ± SD from 3 samples for each group. * P<0.01, compared with positive group.

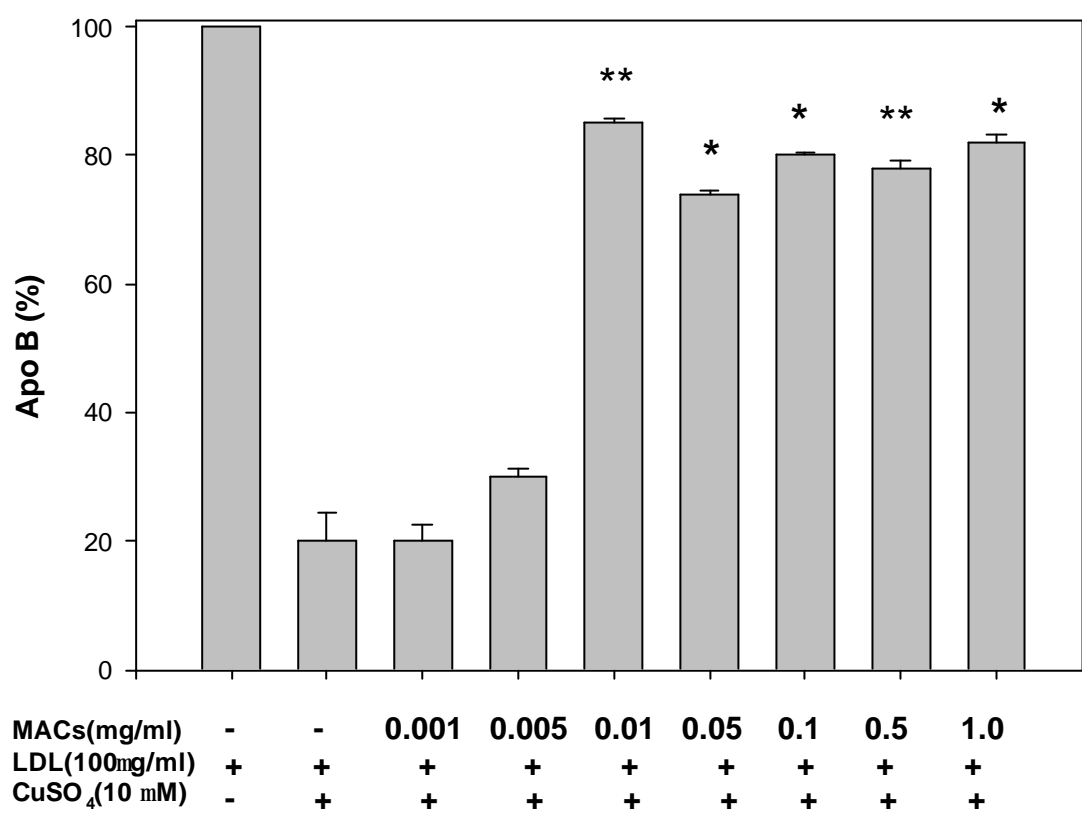
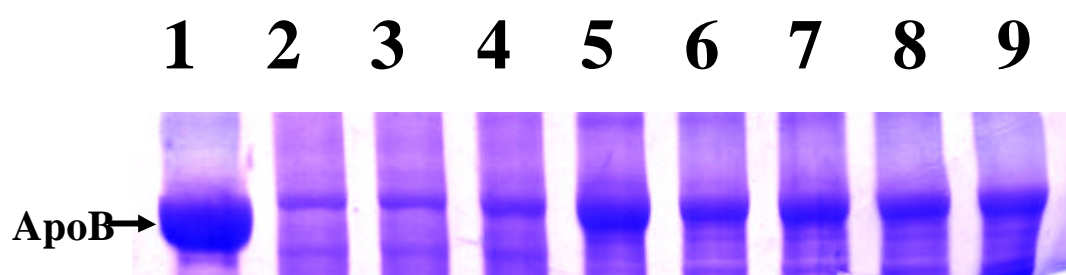


Fig4. Inhibition of Cu²⁺-mediated ApoB protein fragmentation in LDL by MACs . LDL(100µg/ml)was incubated with 10 µM CuSO₄ at 37 °C, 24hr in the presence or absence of different concentrations of MACs (0.001~1 mg/ml).The data were means ± SD from 3 samples for each group. * P<0.01, ** P<0.001 compared with positive group.

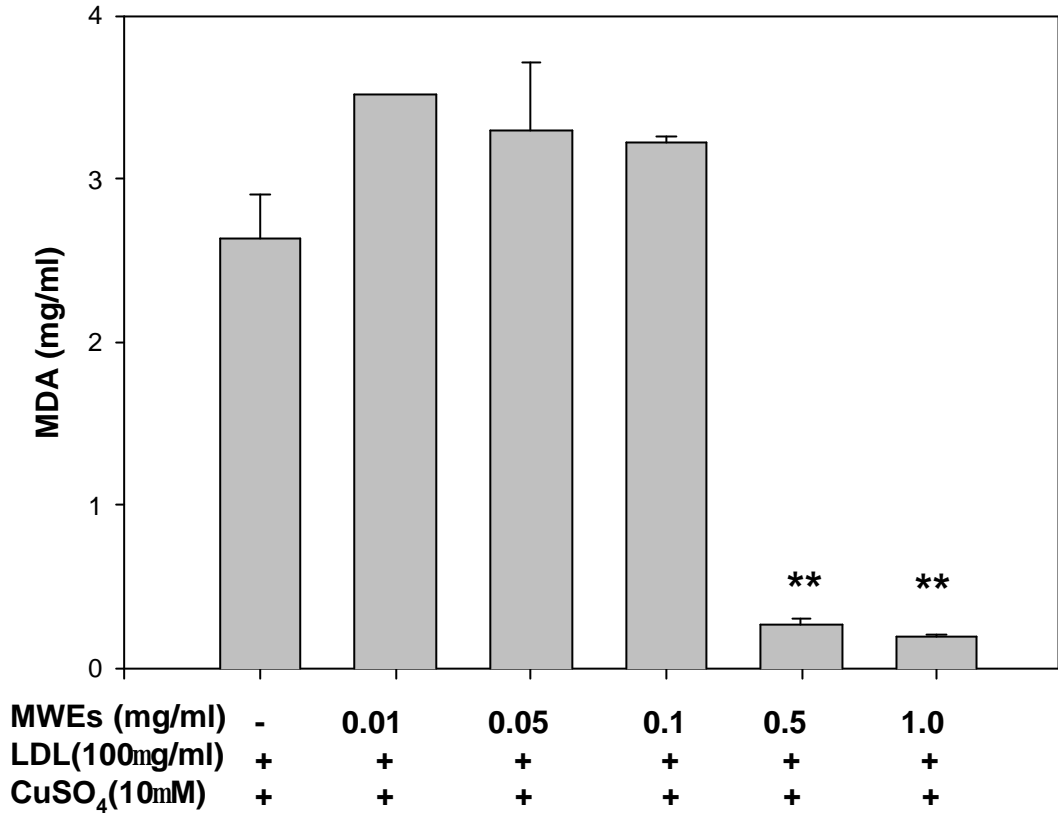


Fig 5. Inhibitory effects of MWEs on the Cu²⁺-induce LDL oxidation product MDA formation LDL(100μg/ml)was incubated with 10 μM CuSO₄ at 37 °C, 24hr in the presence or absence of different concentrations of MWEs (0.01~1 mg/ml) .The data were means ± SD from 3 samples for each group. ** P<0.001 compared with positive group.

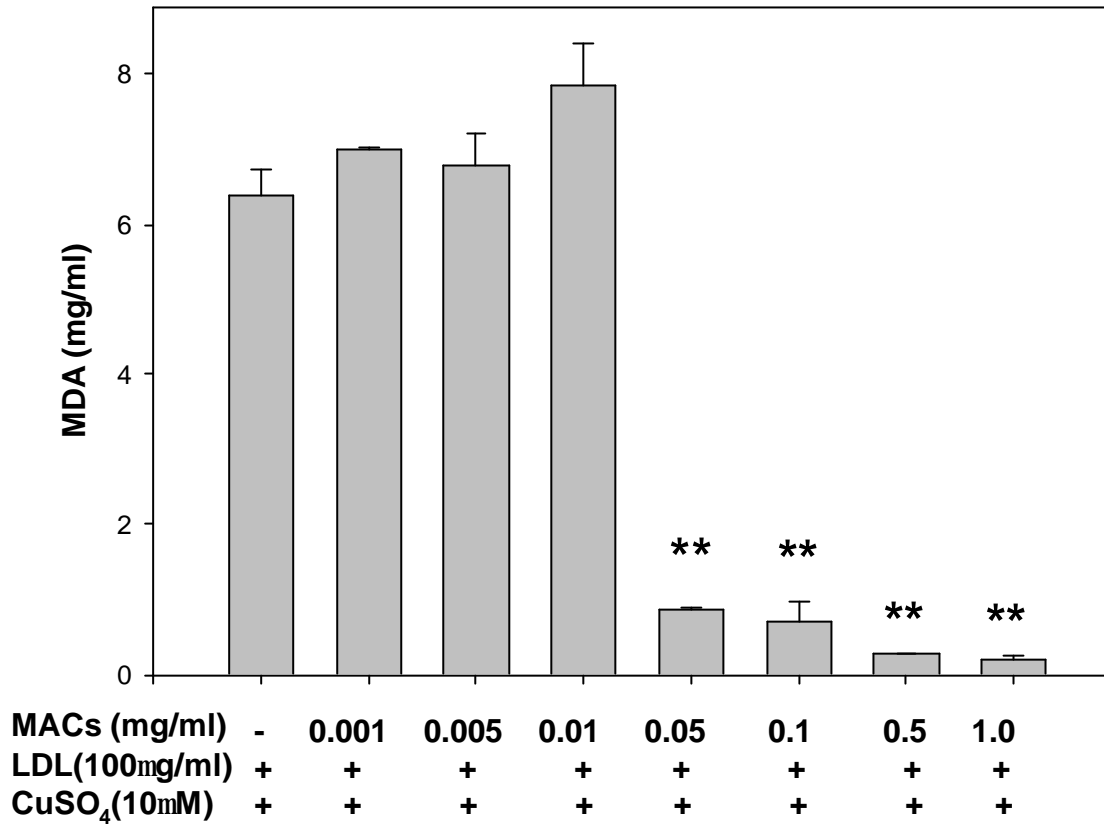


Fig 6. Inhibitory effects of MACs on the Cu²⁺-induce LDL oxidation product MDA formation LDL(100μg/ml)was incubated with 10 μM CuSO₄ at 37 °C, 24hr in the presence or absence of different concentrations of MACs (0.001~1 mg/ml).The data were means ± SD from 3 samples for each group. ** P<0.001 compared with positive group.

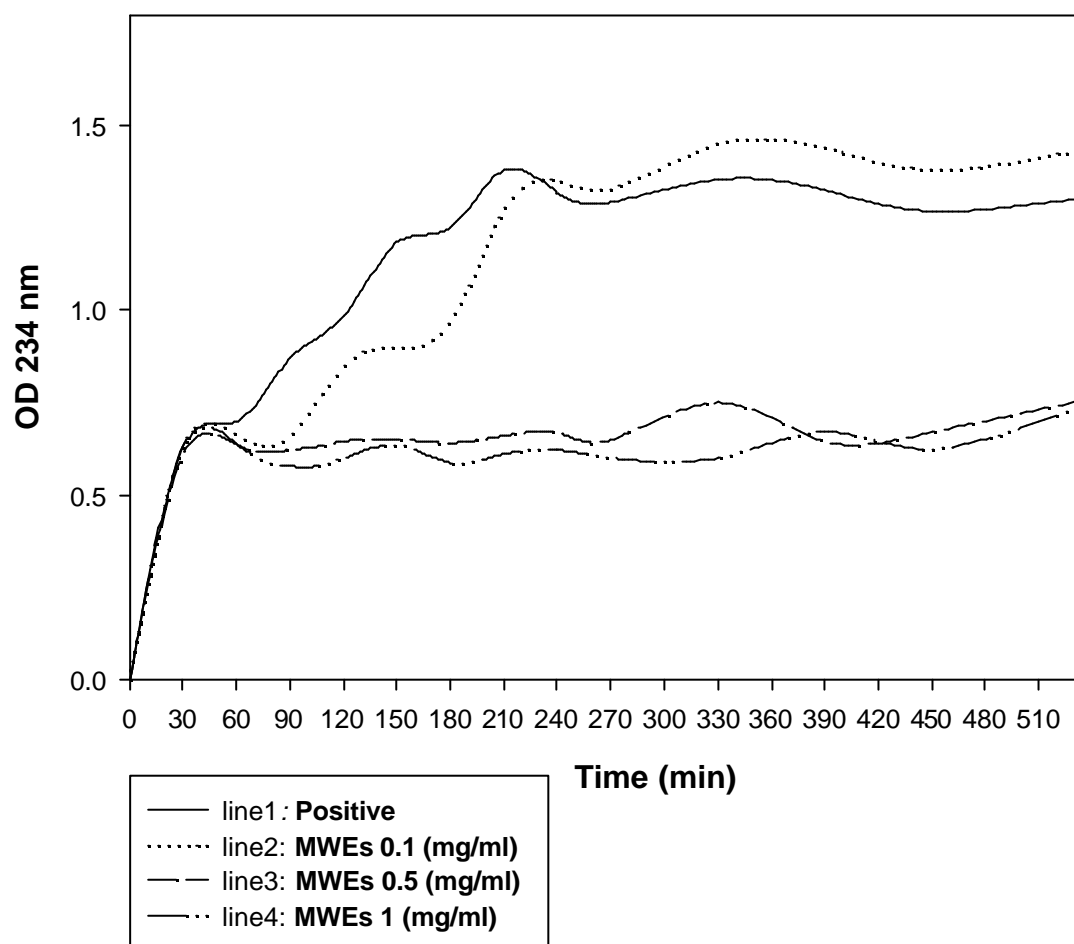


Fig7. Inhibitory effects of MWEs on the Cu^{2+} -induce LDL oxidation of diene conjugation. LDL(100 $\mu\text{g/ml}$)was incubated with 10 μM CuSO_4 at 37 °C, 0 ~ 510 min in the presence or absence of different concentrations of MWEs (0.1, 0.5, 1 mg/ml).

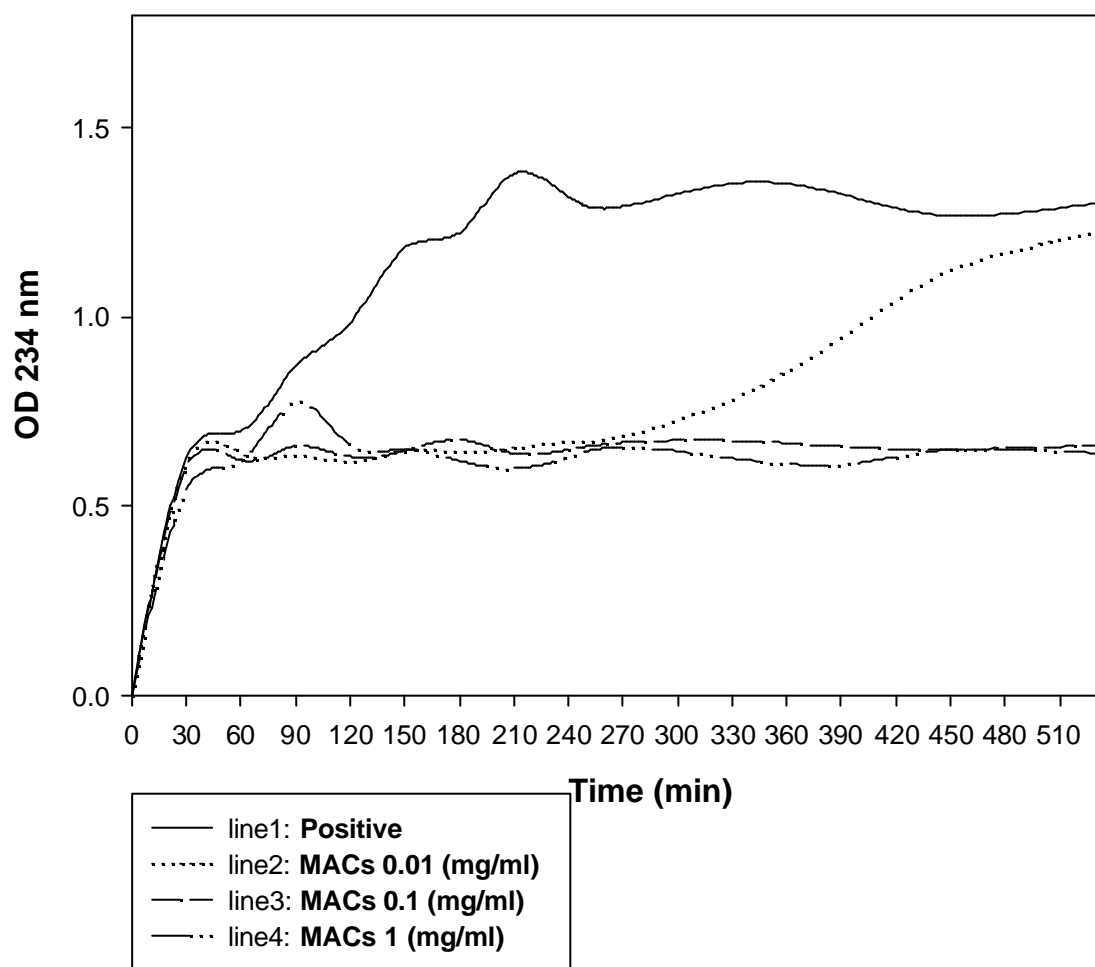


Fig8. Inhibitory effects of MACs on the Cu²⁺-induce LDL oxidation of diene conjugation. LDL(100μg/ml)was incubated with 10 μM CuSO₄ at 37 °C, 0 ~ 510 min in the presence or absence of different concentrations of MACs(0.01, 0.1, 1 mg/ml).

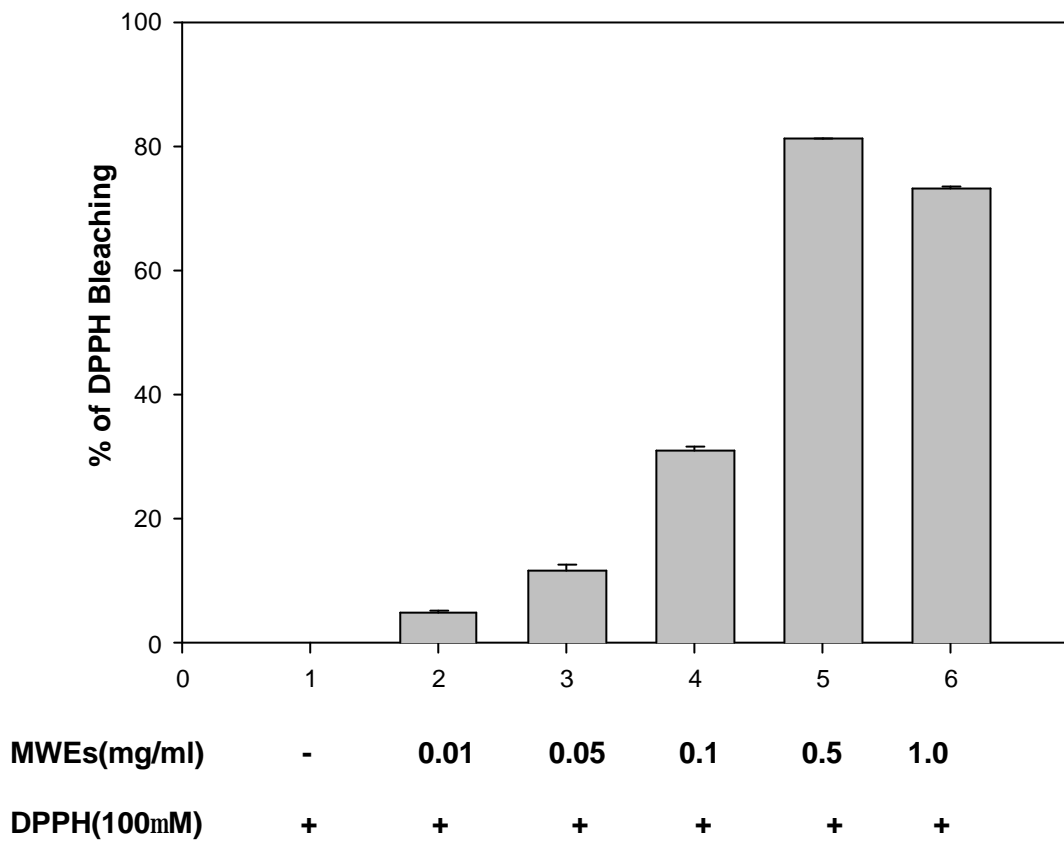


Fig9. The effects of MWEs on DPPH bleaching. DPPH(1mM) was incubated with presence or absence of different concentrations of MWEs (0.01~1 mg/ml). The data were means \pm SD from 3 samples for each group.

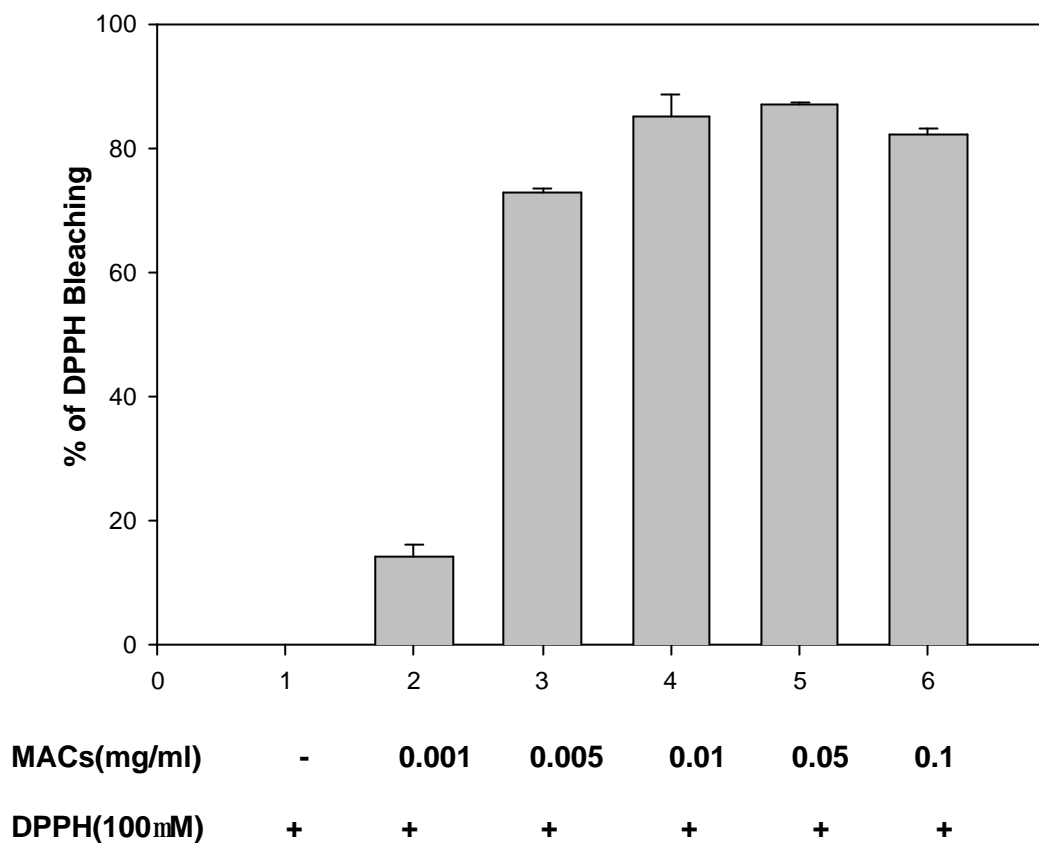


Fig10. The effects of MACs on DPPH bleaching. DPPH(1mM) was incubated with presence or absence of different concentrations of MACs (0.001~1 mg/ml). The data were means \pm SD from 3 samples for each group.

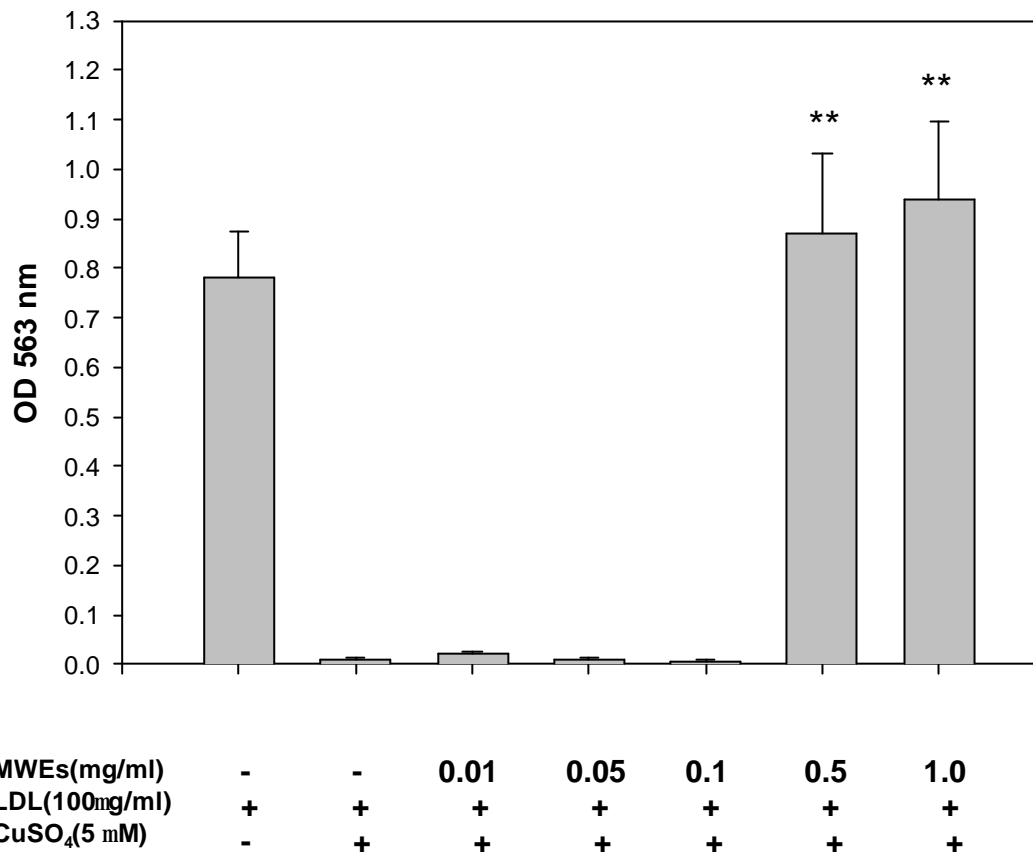


Fig11. The effects of MWEs on macrophage cytotoxicity. J774A.1 cells were incubated with 100 μ g/ml LDL, 5 μ M CuSO₄ and different concentrations of MWEs (0.01~1 mg/ml) for 20hr. The data were means \pm SD from 3 samples for each group. ** P<0.01, compared with control group.

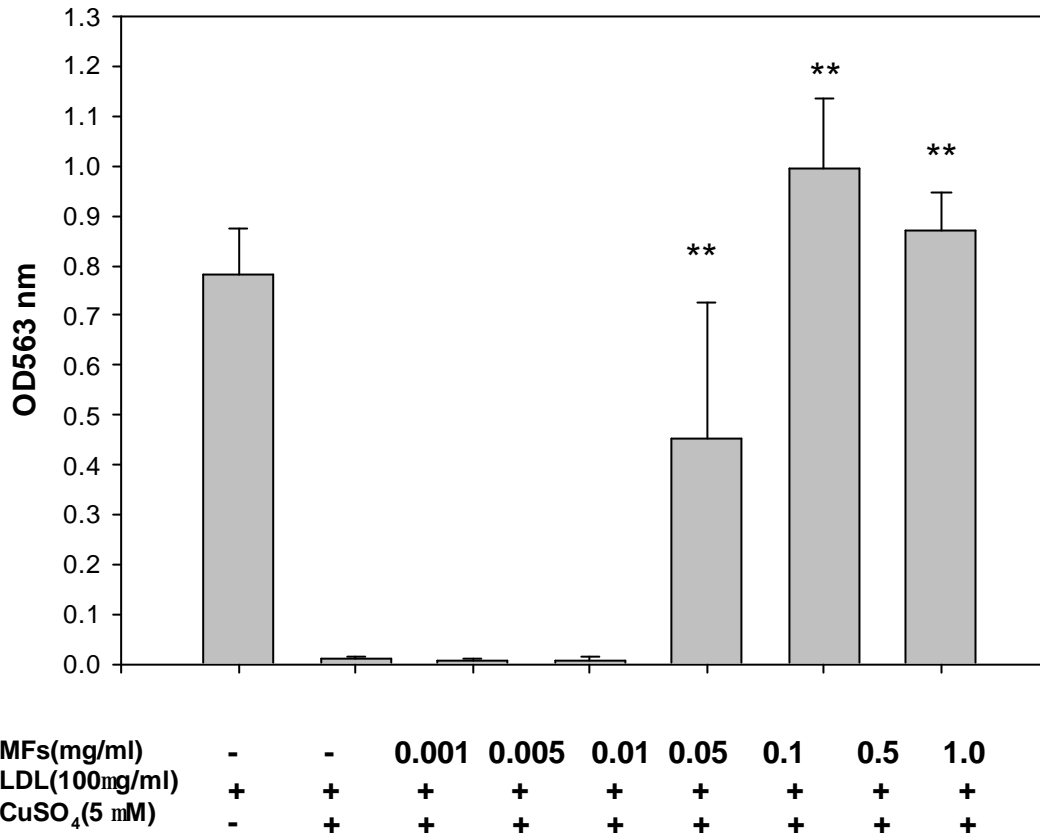


Fig12. The effects of MACs on macrophage cytotoxicity. J774A.1 cells were incubated with 100 μ g/ml LDL, 5 μ M CuSO₄ and different concentrations of MACs (0.001~1 mg/ml) for 20hr. The data were means \pm SD from 3 samples for each group. ** P<0.01, compared with control group.

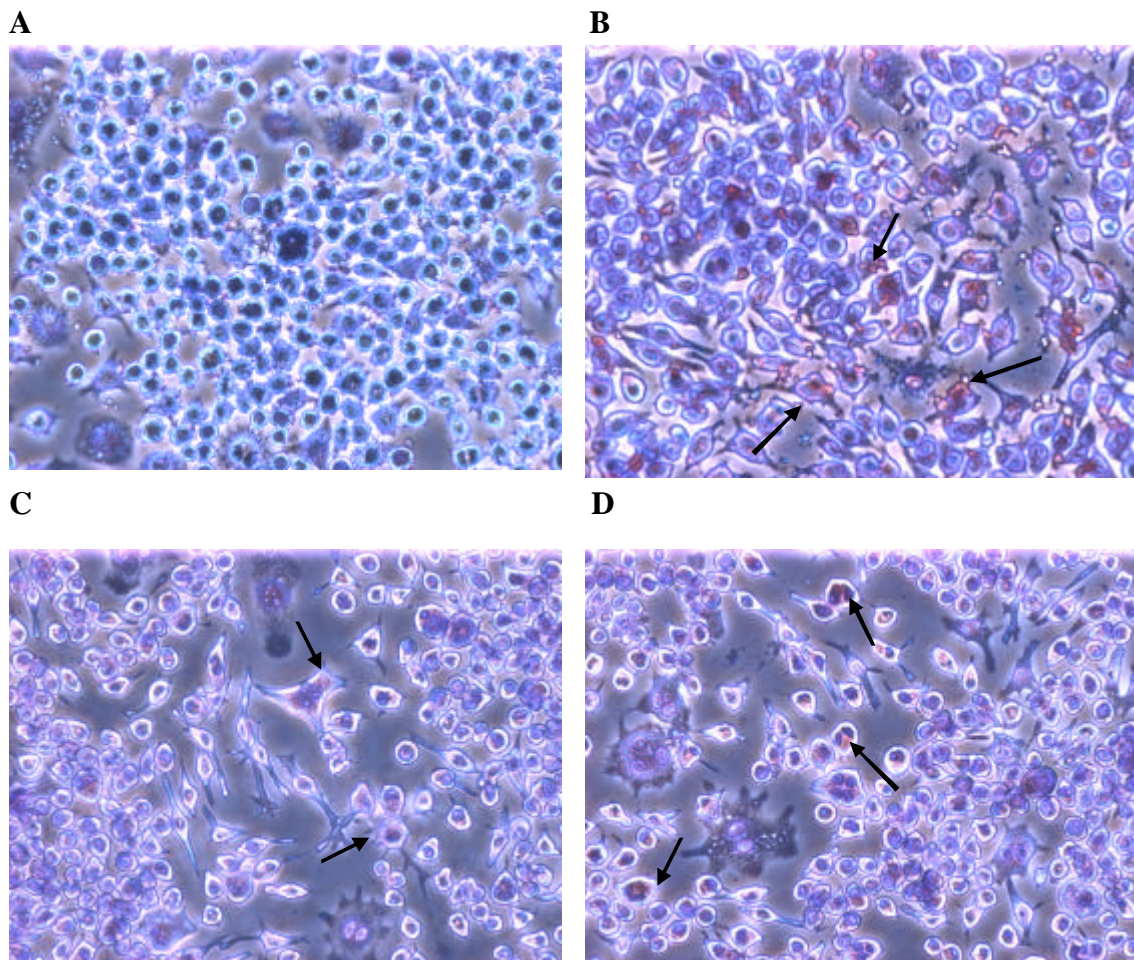


Fig13. Inhibitory effects of mullberry extracts (MWEs、 MACs) on foam cell formation. J774A.1 cells was incubated in DMEM medium with 1 mg/ml MWEs and MACs for 2 hr than added to 50 μ g/ml oxLDL at 37 $^{\circ}$ C、 5%CO $_2$ for 6 hrs. The cells were stained with Oil Red O and observed under the microscope. The *red* droplets accumulated in the cells were stained lipids. (A) Normal (B) positive (C) MACs (1mg/ml)(D) MWEs group(1mg/ml). The arrows pointed locations are foam cells.

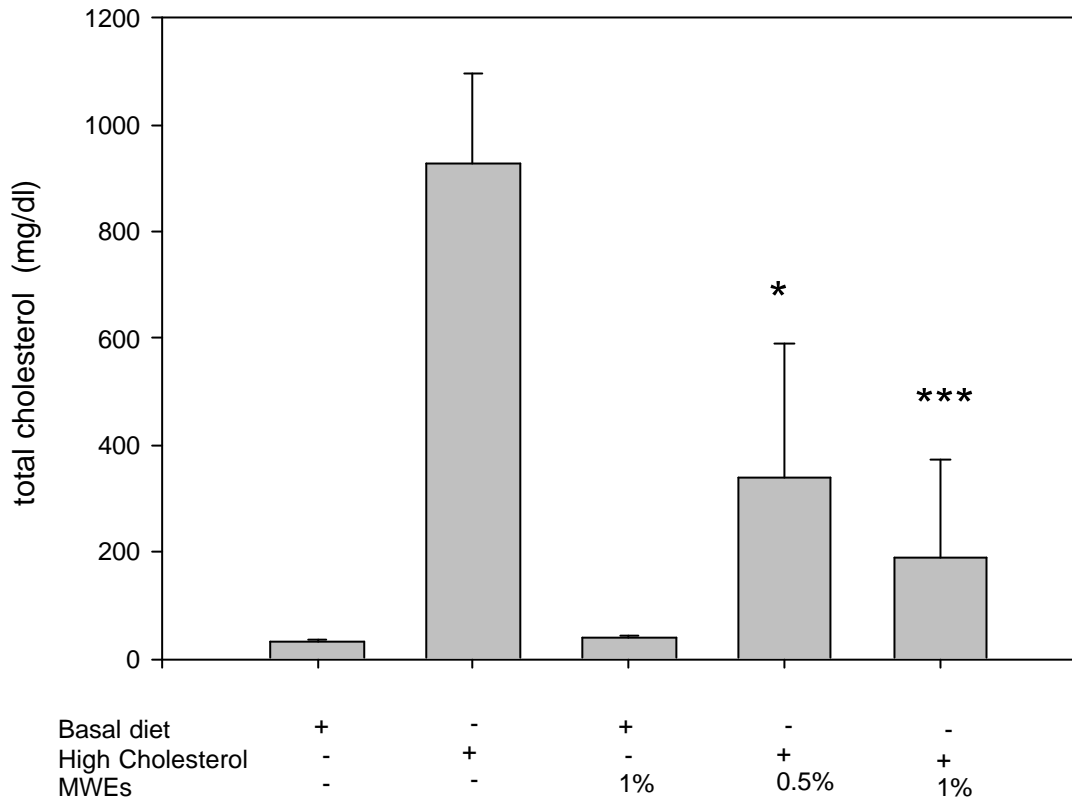


Fig14. Inhibitory effects of MWEs on total cholesterol concentration in high cholesterol diet feed New-Zealand Rabbit serum. New-Zealand Rabbits are fed with high cholesterol (1.3%) diets and different concentrations of MWEs .The data were means \pm SD from 6 animals for each group.*p < 0.05, ***p < 0.001, compared with high cholesterol diet feed group.

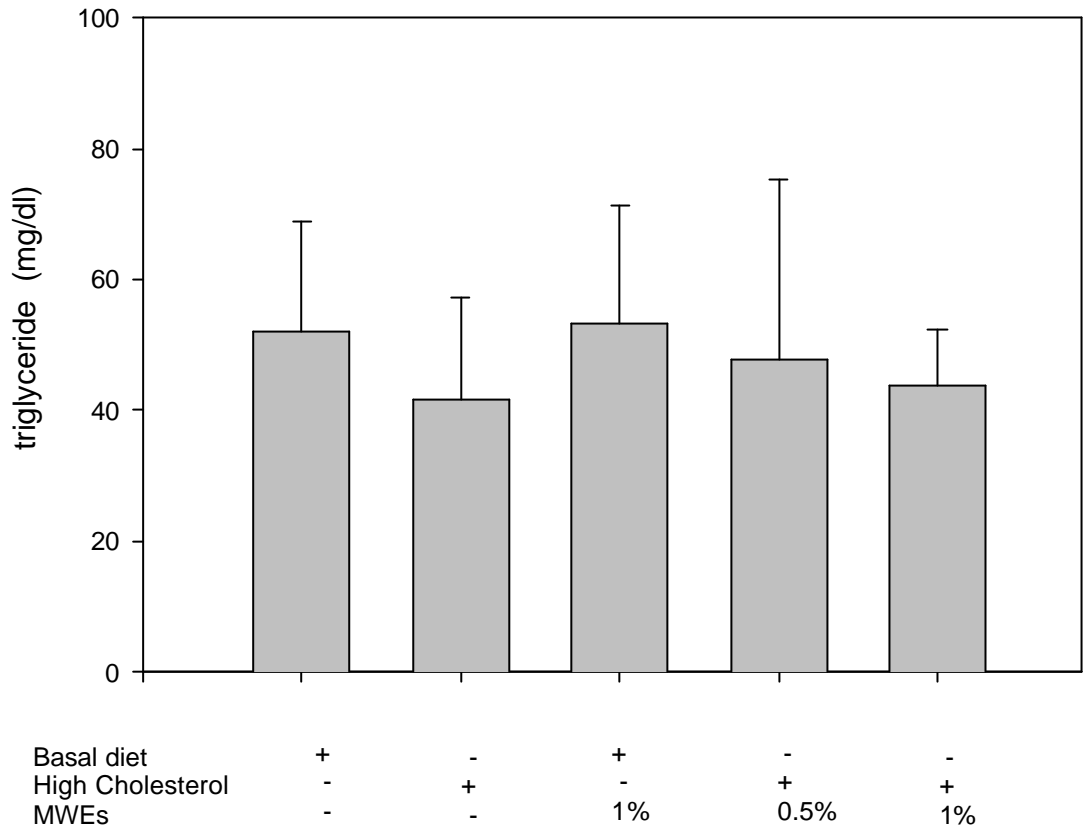


Fig15. Inhibitory effects of MWEs on total triglyceride concentration in high cholesterol diet feed New-Zealand Rabbit serum. New-Zealand Rabbits are fed with high cholesterol (1.3%) diets and different concentrations of MWEs .The data were means \pm SD from 6 animals for each group.

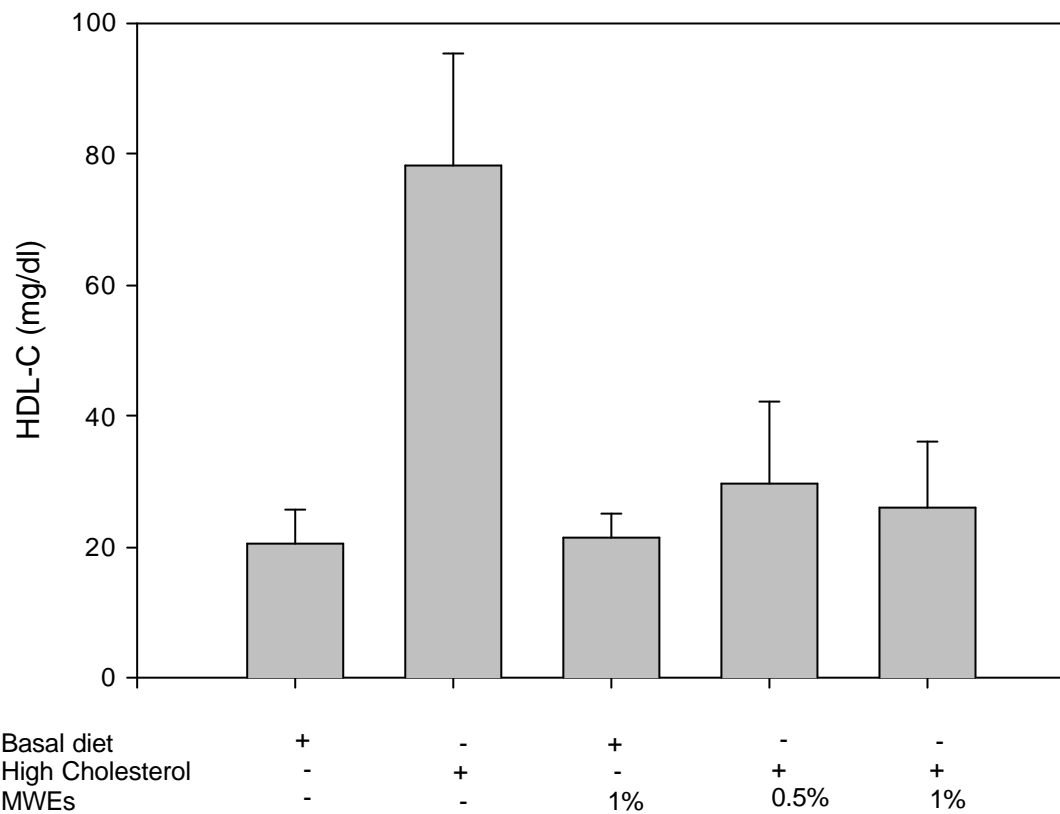


Fig16. Inhibitory effects of MWEs on HDL-cholesterol concentration in high cholesterol diet feed New-Zealand Rabbit serum. New-Zealand Rabbits are fed with high cholesterol (1.3%) diets and different concentrations of MWEs .The data were means \pm SD from 6 animals for each group.

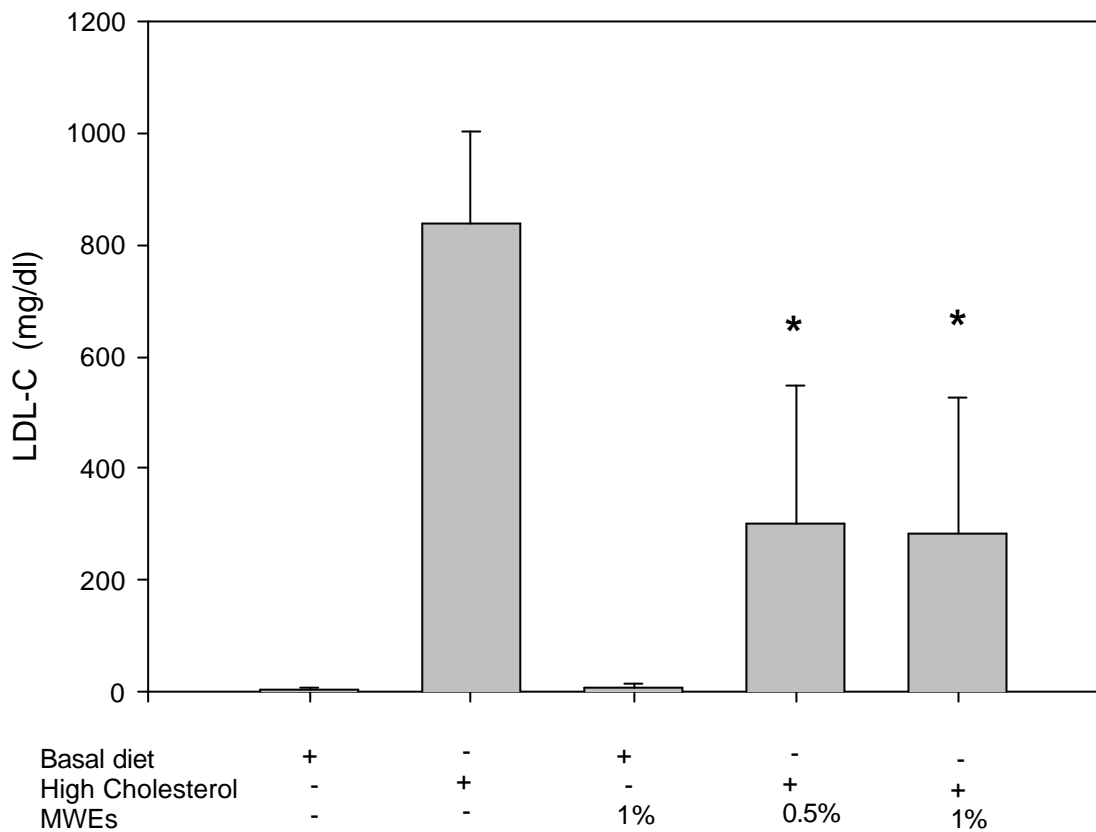


Fig17. Inhibitory effects of MWEs on decreasing LDL-cholesterol concentration in high cholesterol diet feed New-Zealand Rabbit serum. New-Zealand Rabbits are fed with high cholesterol(1.3%)diets and different concentrations of MWEs .The data were means \pm SD from 6 animals for each group.*p < 0.05, compared with high cholesterol diet feed group. LDL was counted by Friedewald formula : $LDL(mg/dl) = \text{total cholesterol} - HDL - \text{triglyceride}(TG)/5$.

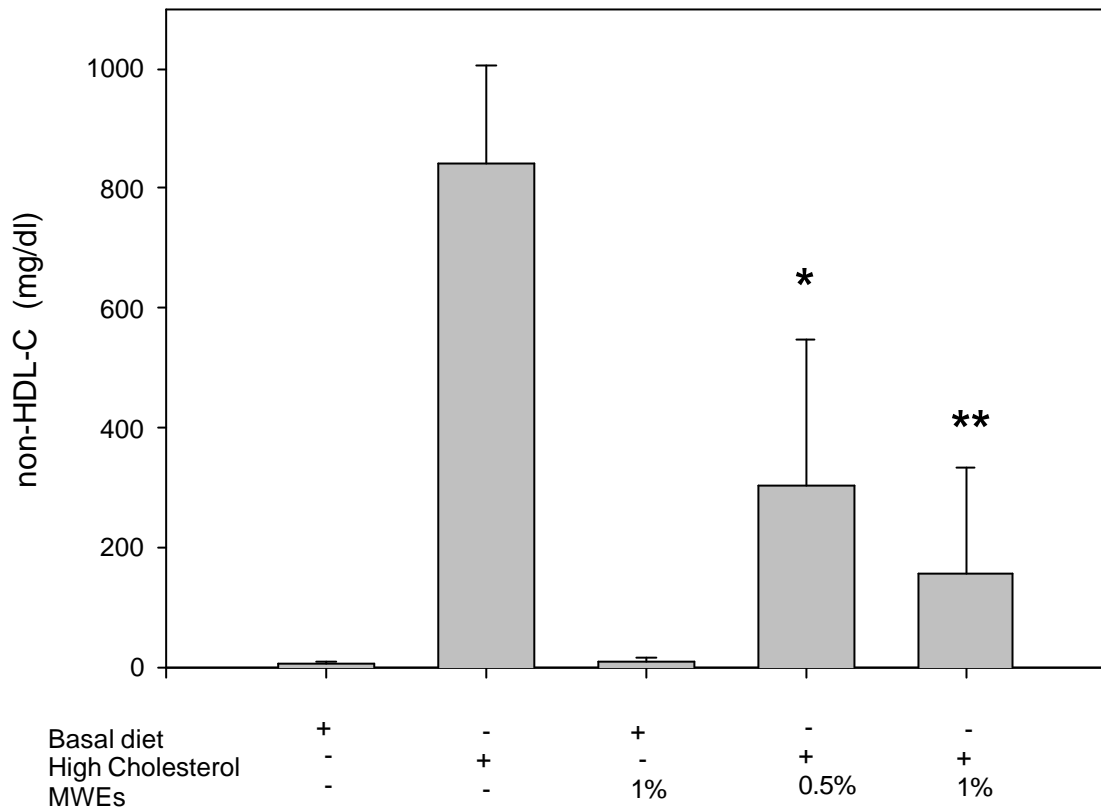


Fig18. Inhibitory effects of MWEs on decreasing non-HDL-cholesterol concentration in high cholesterol diet feed New-Zealand Rabbit serum. New-Zealand Rabbits are fed with high cholesterol (1.3%) diets and different concentrations of MWEs .The data were means \pm SD from 6 animals for each group.*p < 0.05, **p < 0.01, compared with high cholesterol diet feed group.

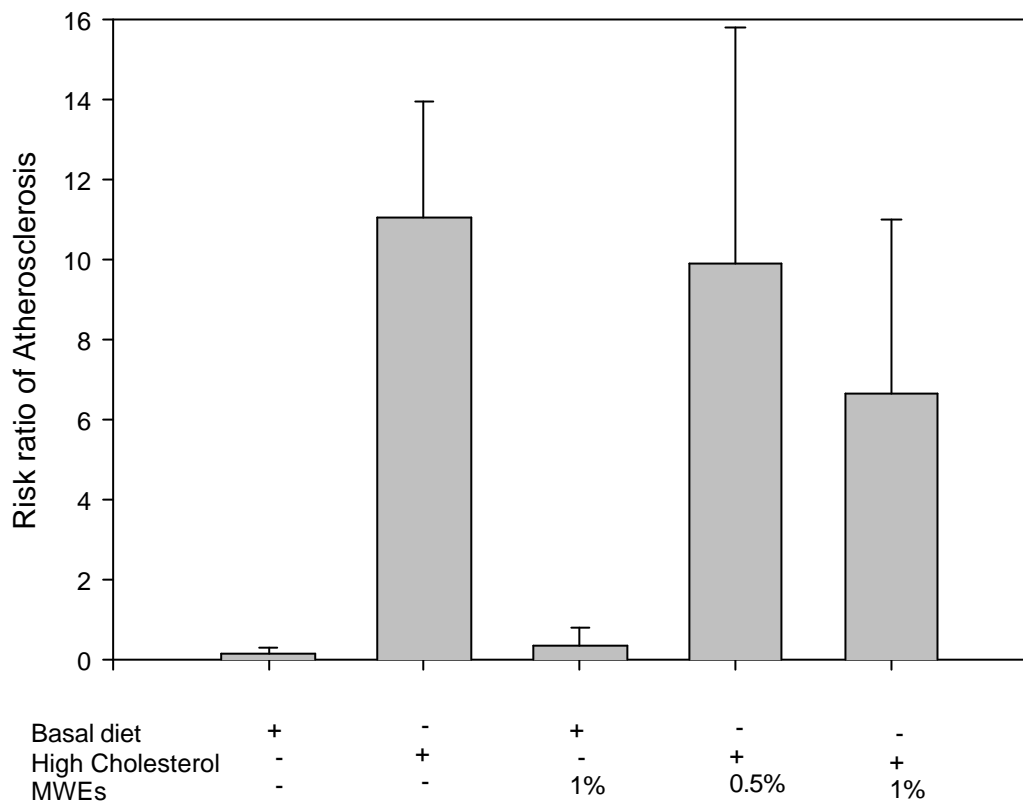


Fig19. The effects of MWEs on risk ratio (LDL-C/HDL-C) in high cholesterol diet feed New-Zealand Rabbit . New-Zealand Rabbits are fed with high cholesterol (1.3%)diets and different concentrations of MWEs .The data were means \pm SD from 6 animals for each group.

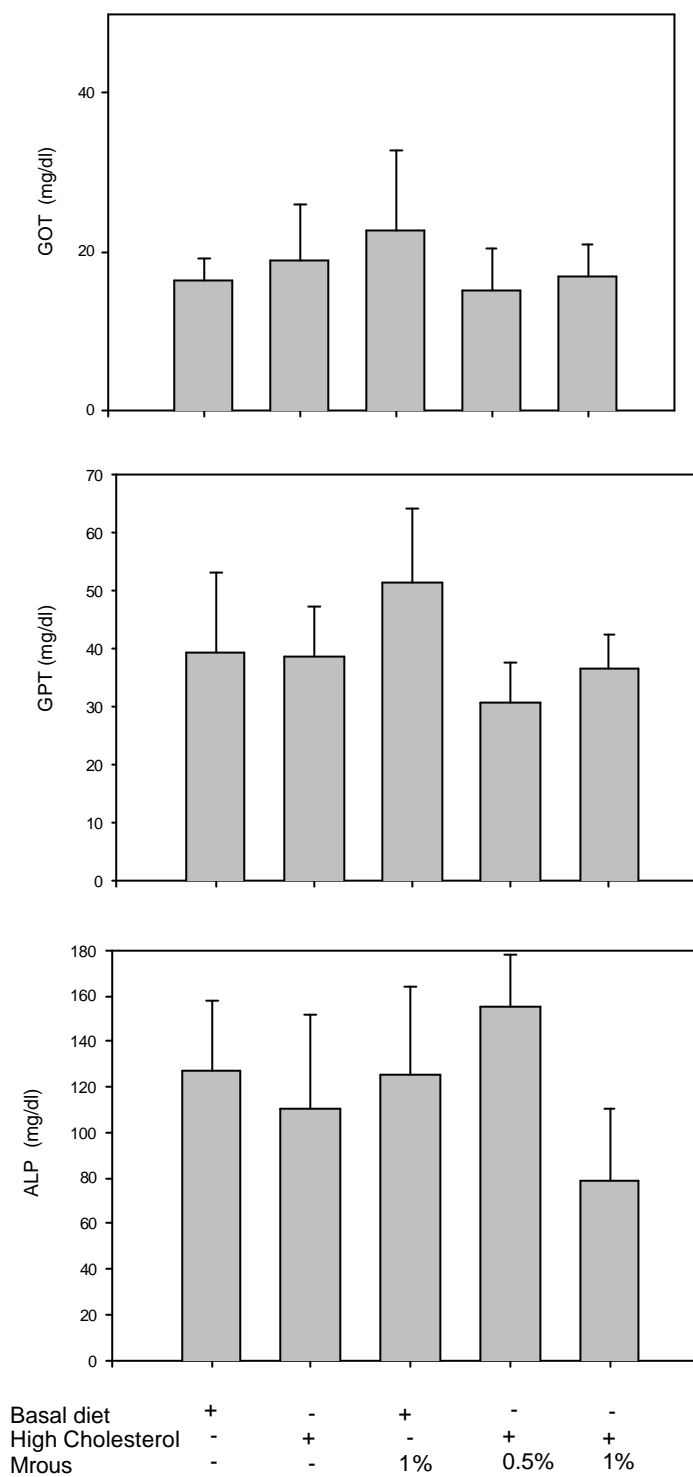


Fig20A. The liver toxicity of MWEs on New-Zealand Rabbits. New-Zealand Rabbits are fed with high cholesterol (1.3%) diets and different concentrations of MWEs .The data were means \pm SD from 6 animals for each group.

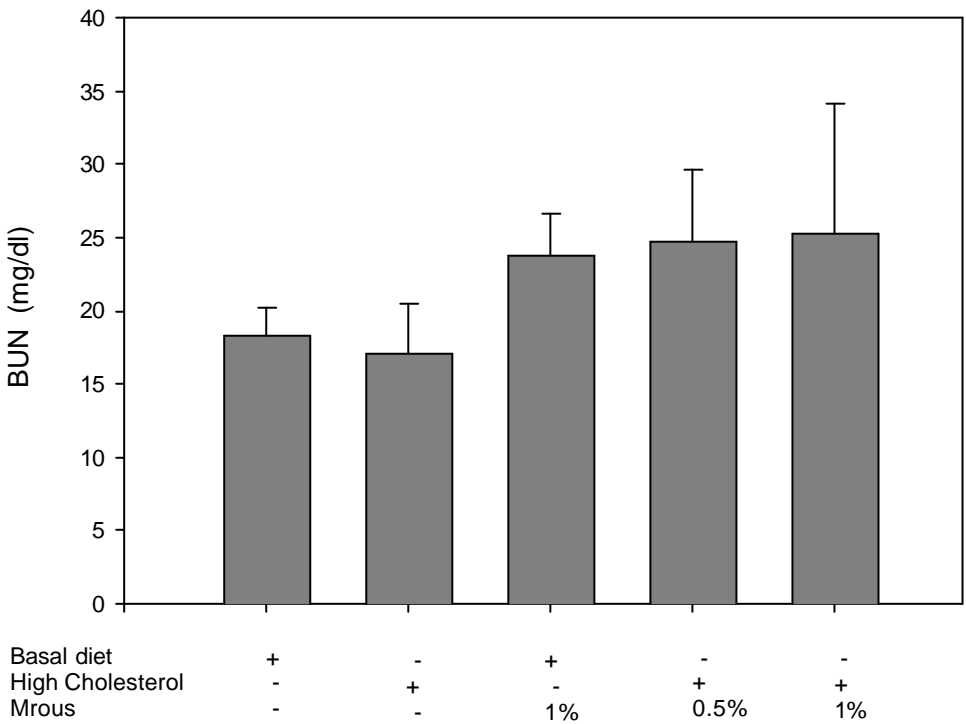
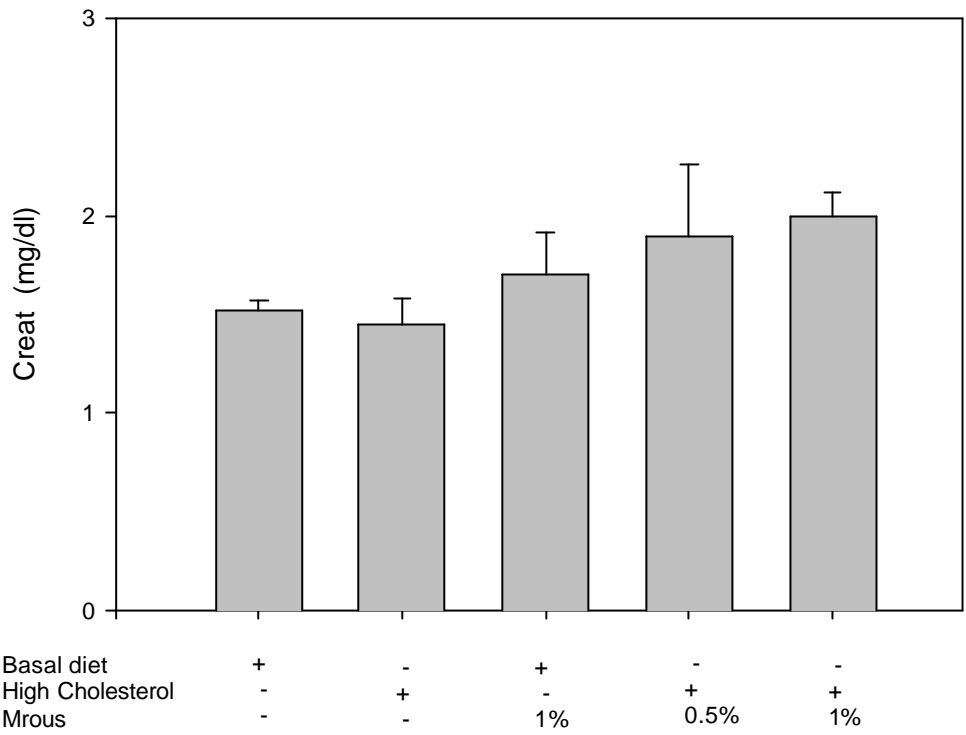


Fig20B. The renal toxicity of MWEs on New-Zealand Rabbits. New-Zealand Rabbits are fed with high cholesterol (1.3%) diets and different concentrations of MWEs .The data were means \pm SD from 6 animals for each group.

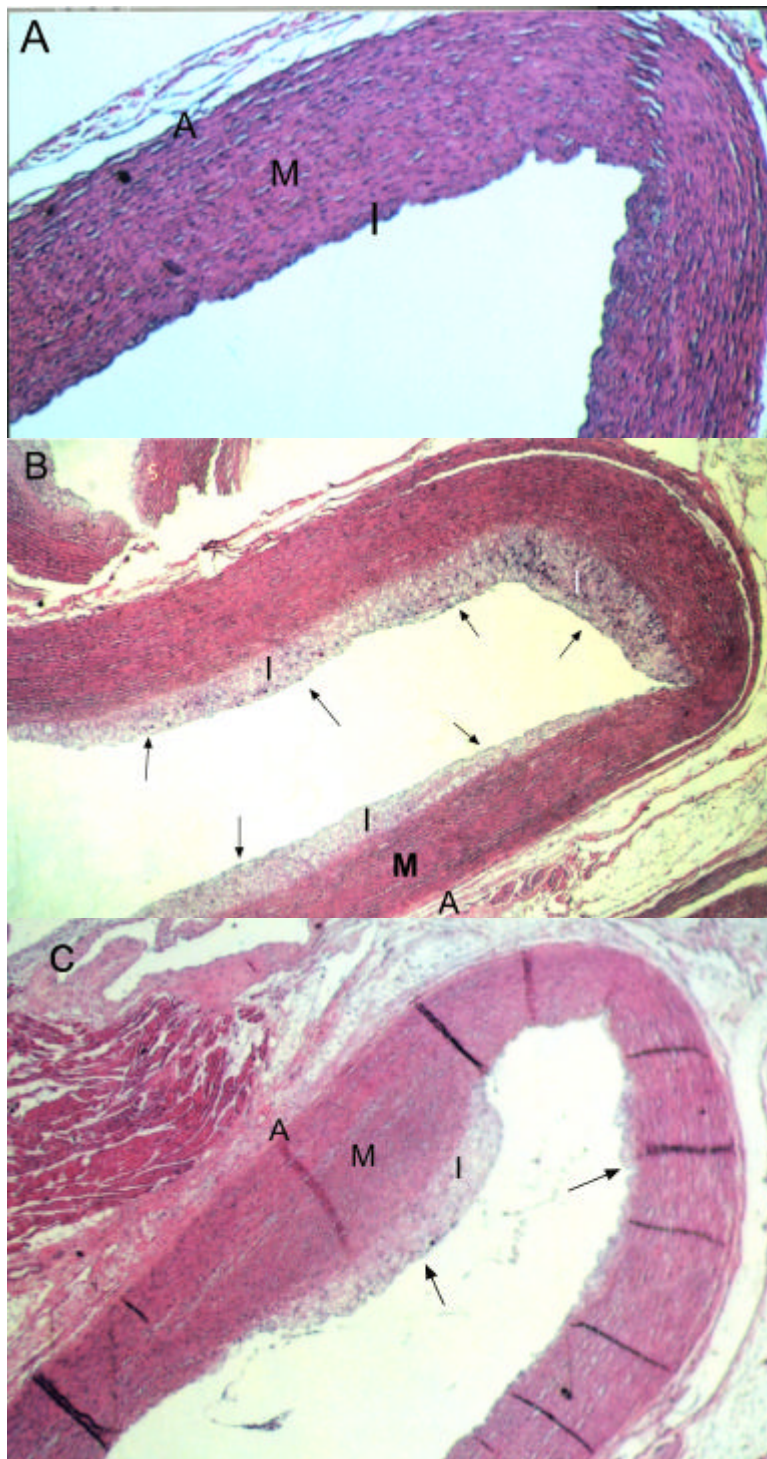
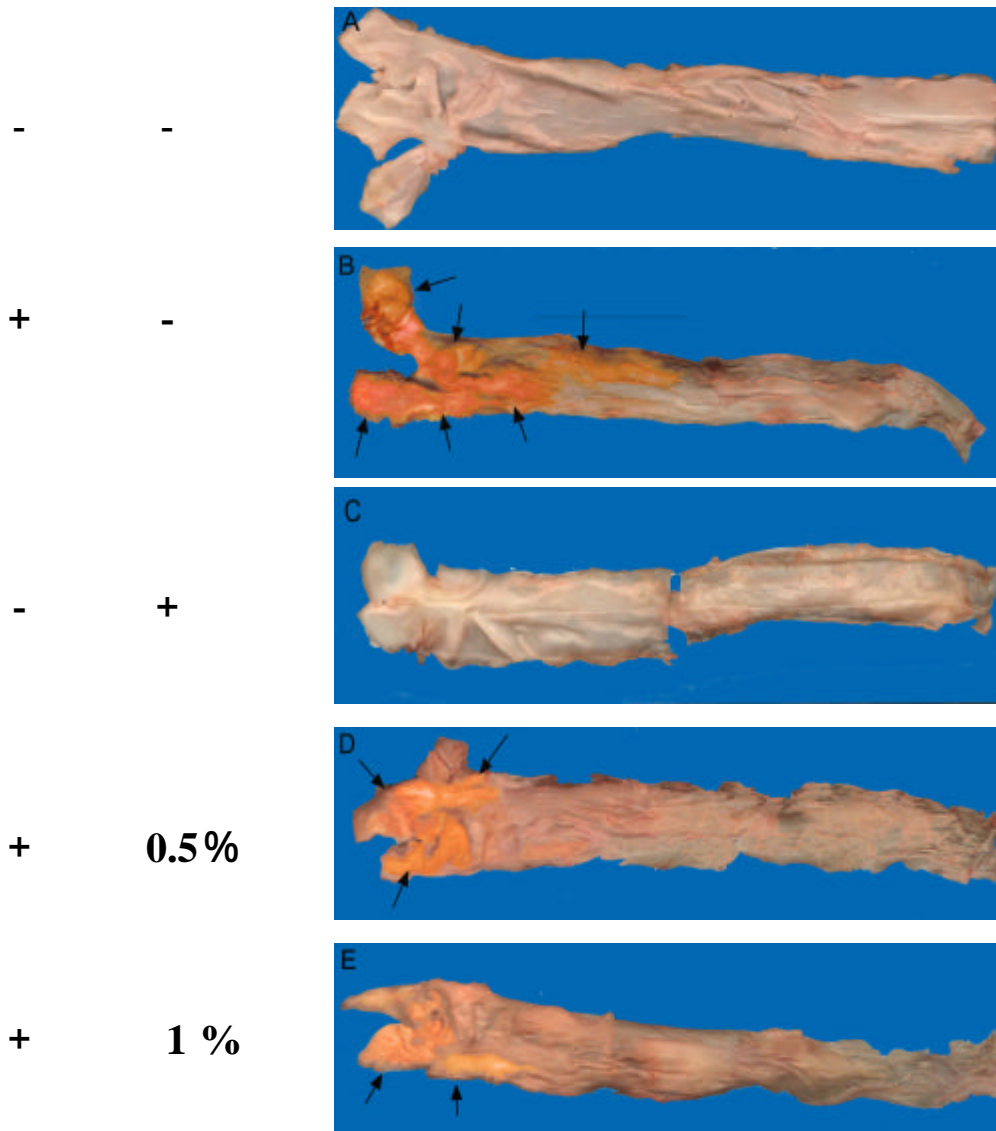


Fig21. Inhibitory effects of MWEs on aortic atherosclerotic lesion in high cholesterol diet feed New-Zealand Rabbit . (A) Normal (B) High cholesterol diet (HCD) (C) HCD +MWEs 1%. The arrows pointed locations are gruel. Light micrograph ($\times 200$) . I : intima ; M : media ; A : adventitia.

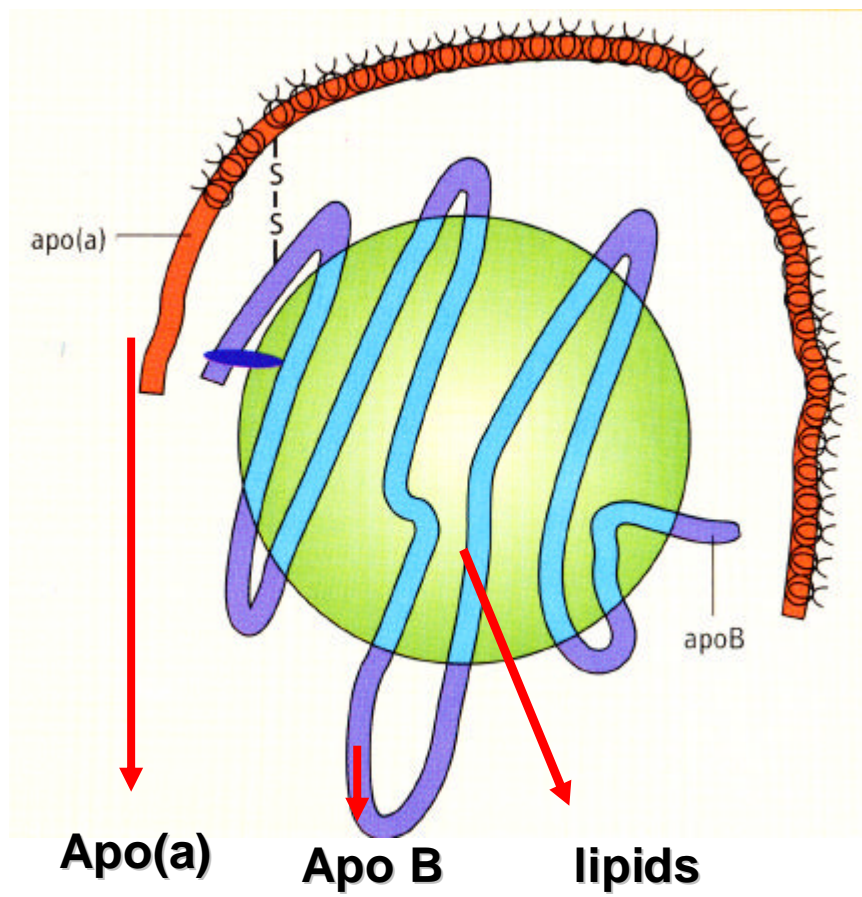
HCD MWEs



Group	Fatty streak (%)
Normal	0 %
MWEs 1 %	0 %
HCD	36.7 \pm 6.4 %
HCD+MWEs 0.5 %	21.2 \pm 3.3 %
HCD +MWEs 1 %	13.5 \pm 2.7 %

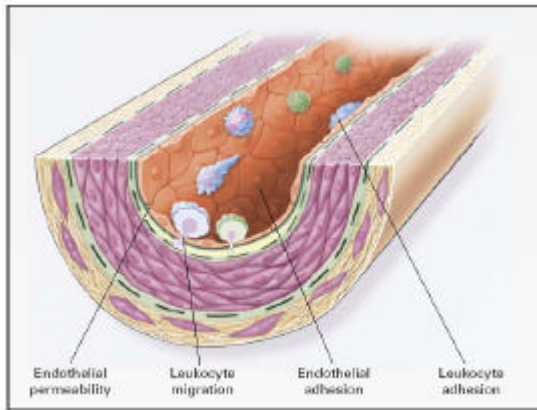
Fig22. Inhibitory effects of MWEs on aortic fatty streak in high cholesterol diet feed New-Zealand Rabbit. (A) Normal (B) High cholesterol diet (HCD)(C) MWEs only (D) HCD +MWEs 0.5% (E) HCD +MWEs 1%. The arrows pointed locations are fatty streak .

拾壹、參考附圖

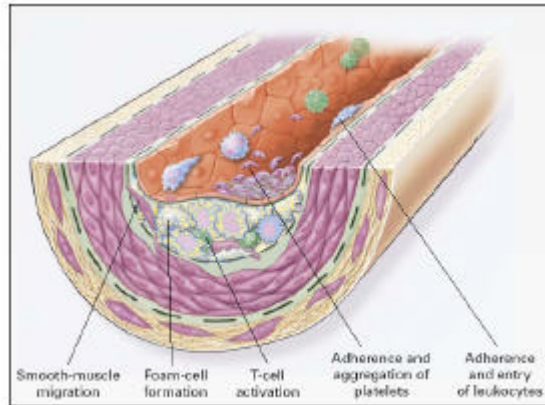


圖一、低密度之蛋白組成結構。

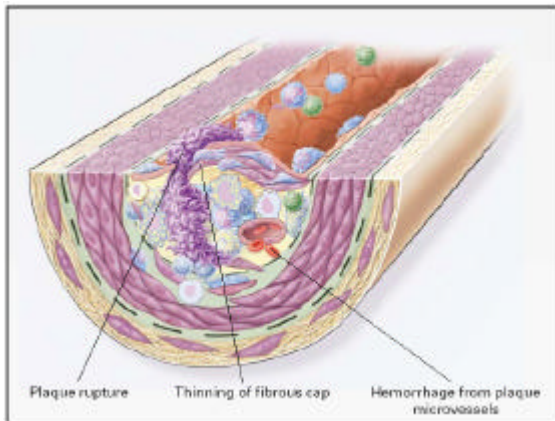
Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis



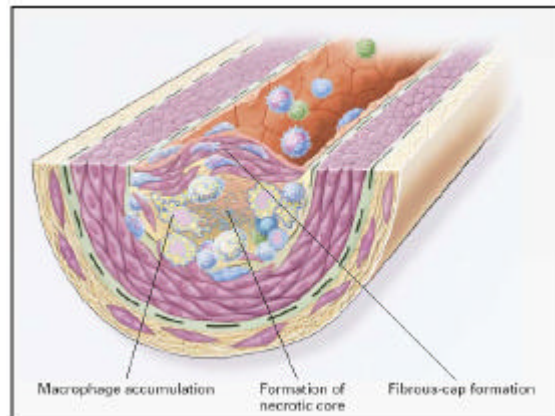
Fatty-Streak Formation in Atherosclerosis



Formation of an Advanced, Complicated Lesion of Atherosclerosis

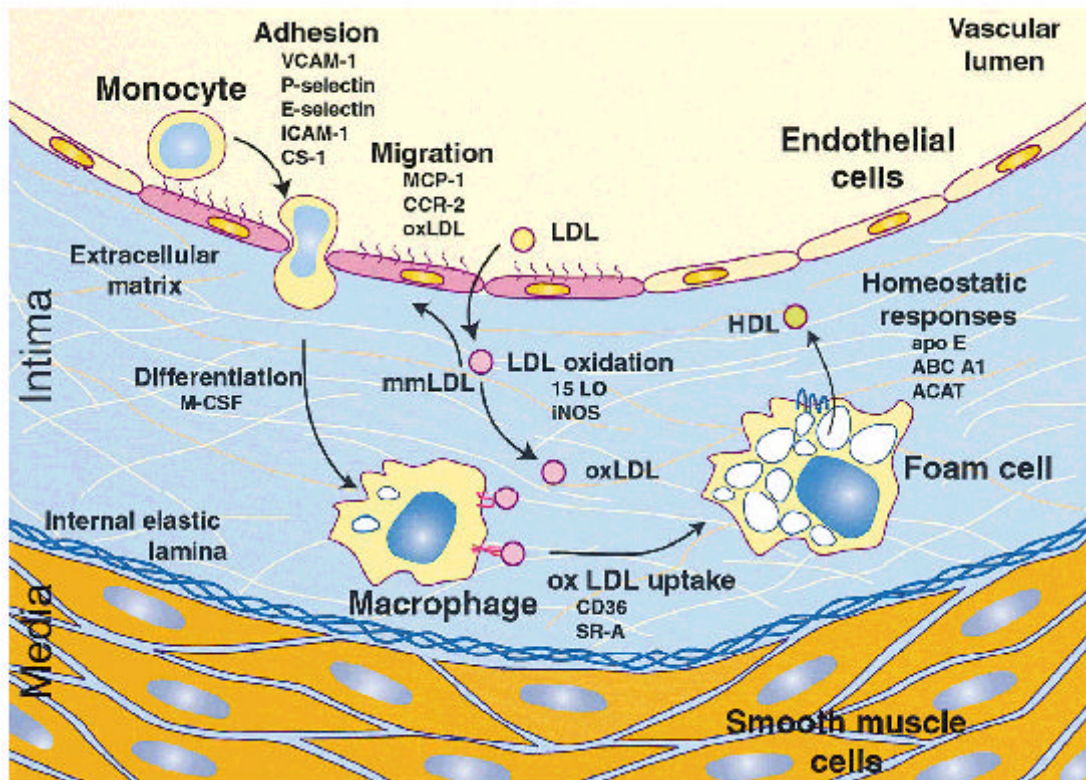


Unstable Fibrous Plaques in Atherosclerosis



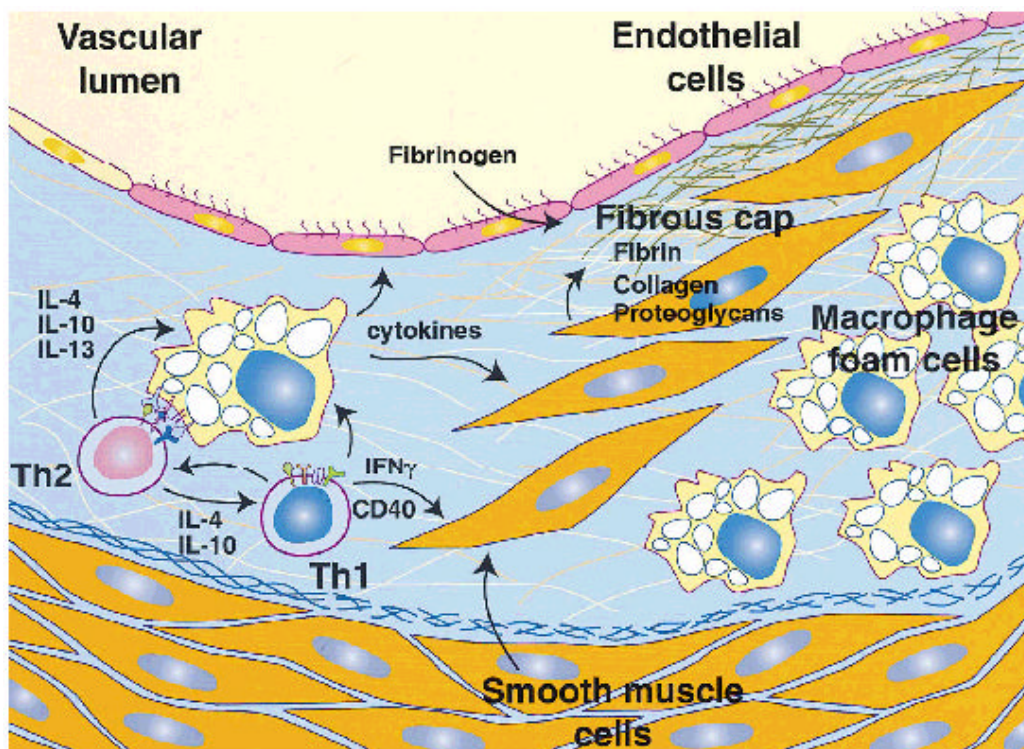
圖二、 . The pathogenesis of Atherosclerosis.

(modified from Heinecke, J.W. 1998)



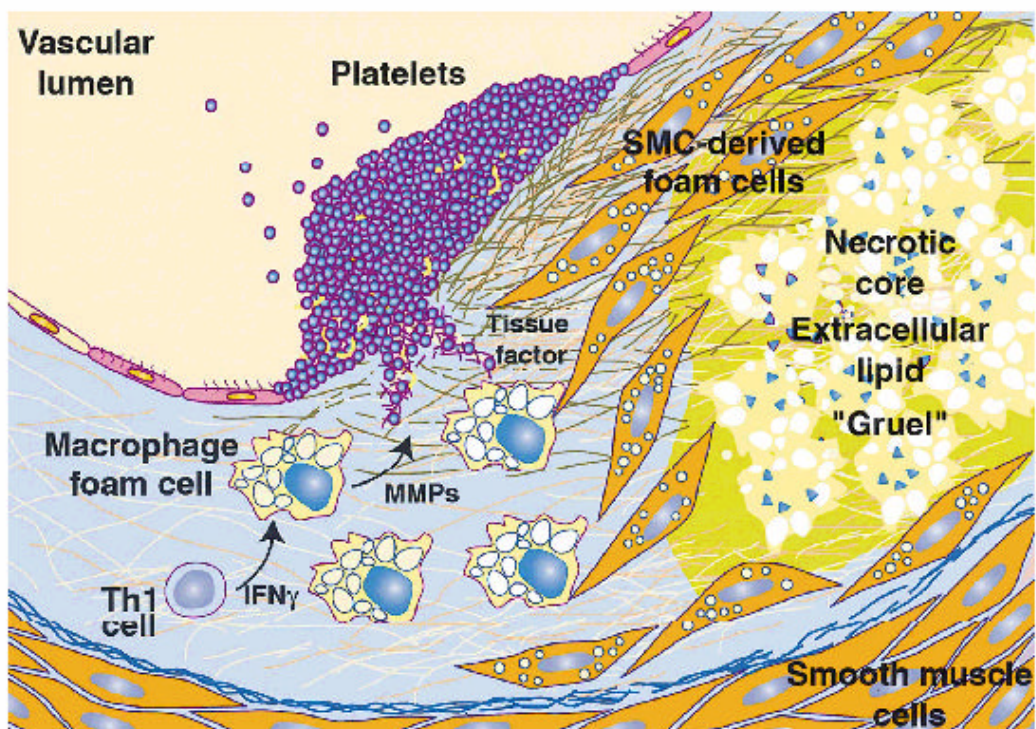
圖三. Initiating Events in the Development of a Fatty Streak Lesion.

(from Christopher K. G. and Joseph L. W., 2001)



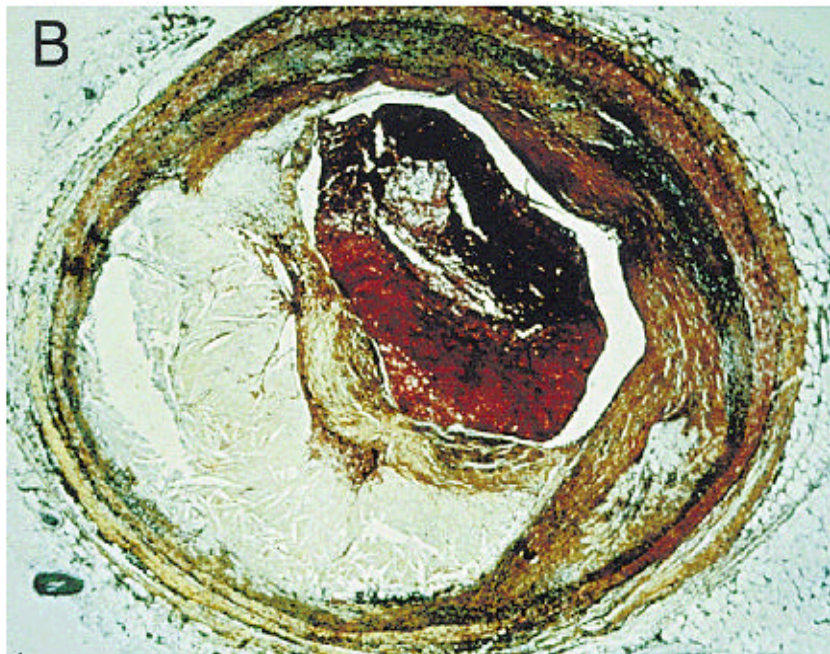
圖四. Lesion Progression.

(from Christopher K. G. and Joseph L. W., 2001)



圖五. Plaque Rupture and Thrombosis.

(from Christopher K. G. and Joseph L. W., 2001)

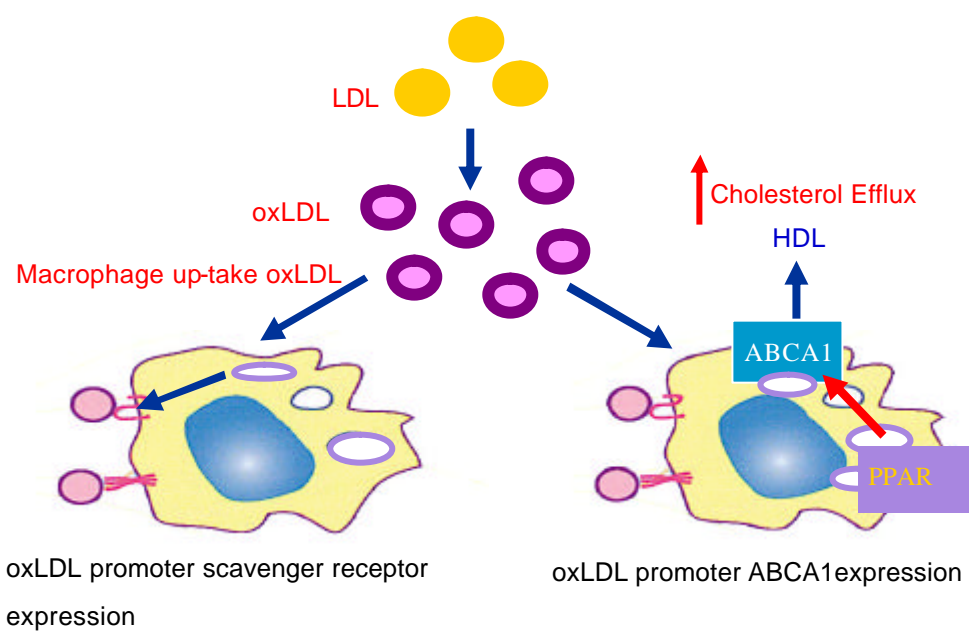


圖六、 Atherosclerosis Lesions

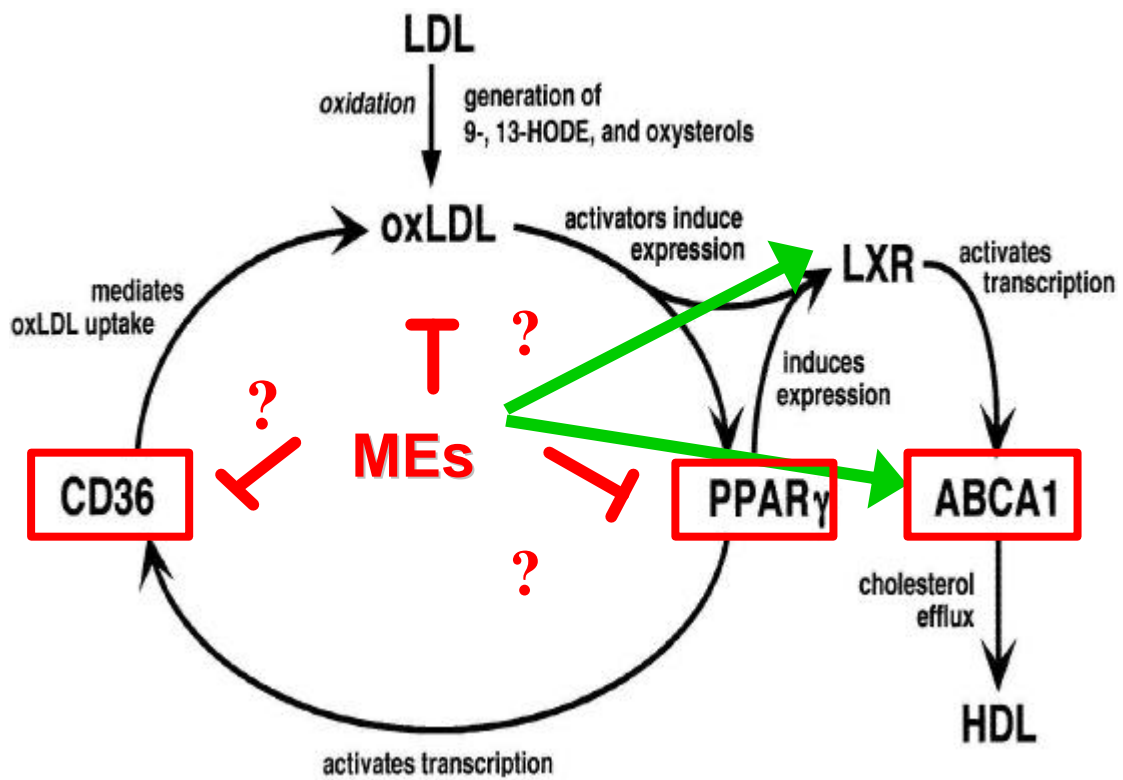
(from Christopher K. G. and Joseph L. W., 2001)



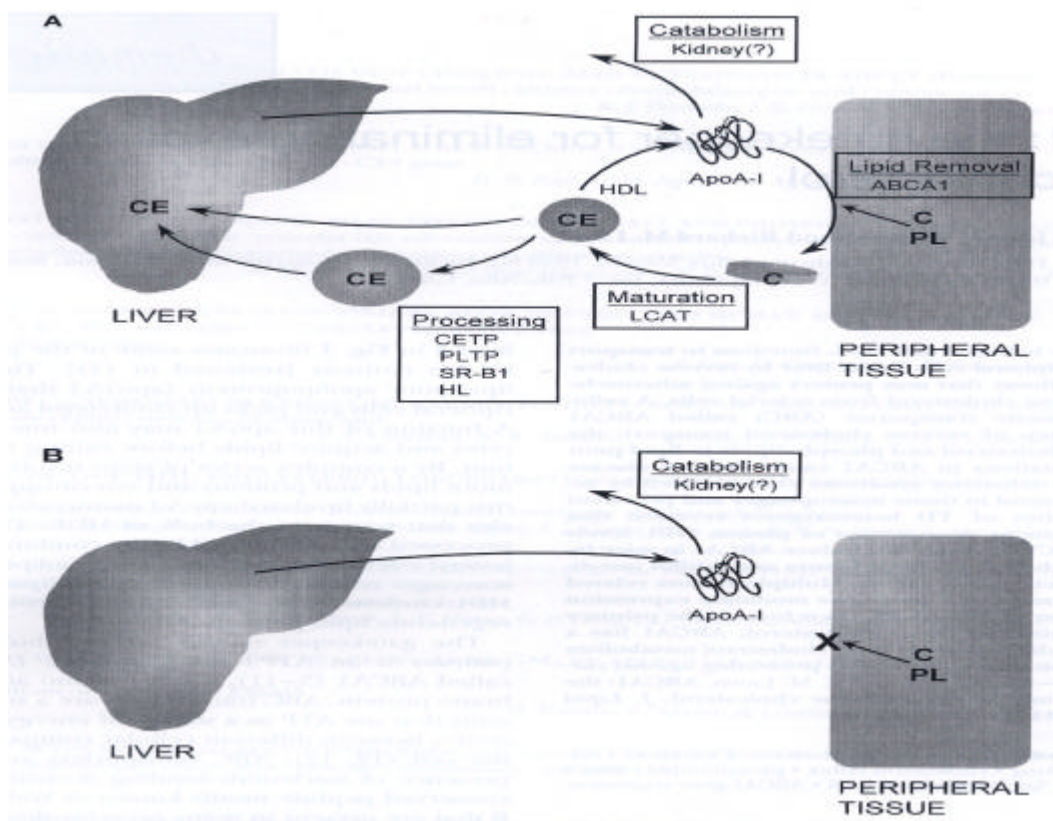
圖七、桑椹果樹與果實



圖八、巨噬細胞 uptake oxLDL 與細胞內膽固醇的代謝。

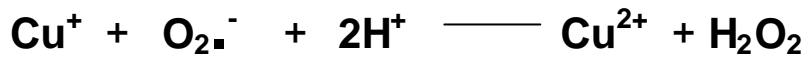


圖九、桑椹萃取物 (MEs) 可能調控巨噬細胞表達 CD36 與 ABCA1 蛋白之機制。
 (modified from Tontonoz, P. *et al.*, 1998)

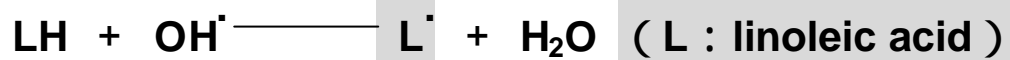


圖十、Reverse Cholesterol efflux.
 (from Ajay Chawla, William A., 1998)

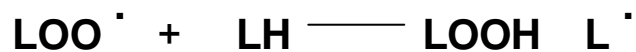
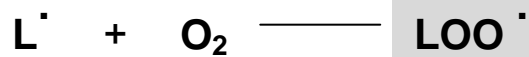
Fenton-like reaction (to generate OH[·])



Initiation of chain reaction



propagation of autoxidation



圖十一、銅離子催化之氧化機制
(from Ferns *et al.*, 1997)

拾貳、參考文獻：

1. Kreuzer, J., White, A. L., Knott, T. J. and Haberland, M. E. (1997). Amino terminus of apoB suffices to produce recognition of malondialdehyde-modified low density lipoprotein by the scavenger receptor of human monocyte-macrophages. *J. Lipid Res.* 38: 324-342.
2. Steinberg, D., and Witztum, J.L. (1999). Lipoproteins, Lipoprotein, Oxidation, and Atherogenesis, K.R. Chien, ed. (Philadelphia: W.B. Saunders Co.).
3. Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Review Biochem.* 46, 897–930.
4. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane bound transcription factor. *Cell* 89, 331–340.
5. Harats, D., Shaish, A., George, J., Mulkins, M., Kurihara, H., Levkovitz, H., and Sigal, E. (2000). Overexpression of 15-Lipoxygenase in Vascular Endothelium Accelerates Early Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2100–2105.
6. Steinberg, D. (1997a). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272(34): 20963-20966
7. Heinecke, J.W. (1998). Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 141, 1–15.

8. Navab, M., Berliner, J.A., Watson, A.D., Hama, S.Y., Territo, M.C., Lusis, A.J., Shih, D.M., Van Lenten, B.J., Frank, J.S., Demer, L.L., et al. (1996). The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 831–842.

9. Napoli, C., D' Armiento, F.P., Mancini, F.P., Postiglione, A., Witztum, J.L., Palumbo, G., and Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 100, 2680–2690.

10. Colles, S.M., Irwin, K.C., and Chisolm, G.M. (1996). Roles of multiple oxidized lipids in cellular injury. *J. Lipid Res.* 37, 2018–2028.

11. Bennet, M.R. (1999). Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovascular Res.* 41, 361–368.

12. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., and Witztum, J.L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320, 915–924.

13. Navab, M., Berliner, J.A., Watson, A.D., Hama, S.Y., Territo, M.C., Lusis, A.J., Shih, D.M., Van Lenten, B.J., Frank, J.S., Demer, L.L., et al. (1996). The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 831–842.

14. Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T., and Kodama, T. (1998). Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell. Mol. Life* 54, 628–640.

15. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A., and Evans, R.M. (1998). PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93, 241–252.
16. Ross, R. (1999). Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N. Eng. J. Med* 340, 115–126.
17. Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Review Biochem.* 46, 897–930.
18. Caligiuri, G., Levy, B., Pernow, J., Thoren, P., and Hansson, G.K. (1999). Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6920–6924.
19. Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W., and Libby, P. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 94, 2493–2503.
20. Carmeliet, P. (2000). Proteins in cardiovascular aneurysms and rupture: targets for therapy? *J. Clin. Invest.* 105, 1519–1520.
21. Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M., and Yusuf, S. (1995). The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann. Intern. Med.* 123, 860–872.
- Jiang, C., Ting, A.T., and Seed, B. (1998). PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391, 82–86.
22. Yusuf, S., Dagenais, G., Pogue, J., Bosch, J., and Sleight, P. (2000). Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study

Investigators. *N. Engl. J. Med.* 342, 154–160.

23. Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., et al. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386, 292–296.
24. Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K., and Silverstein, R.L. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J. Clin. Invest.* 105, 1049–1056.
25. Toscano, M. A. and Lamonica, G. (1975) Pigments from *Morus nigra* fruits. *Chem. Abstr.* 83,55669.
26. 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
27. 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.
28. De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R., Jessup, W. and Leake, D.S. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1743-1750.
29. 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.
30. Yagi K. (1987) Lipid peroxidation and human disease. *Chem. Phy. Lipids.*, 45:337-51.

31. 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.*, 72:248-54.
32. Ursim F., Maiorino M. (1994) A novel antioxidant flavonoid (IdB1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free radical Biology & Medicine*. 10: 547-53.
33. Alley M.C. (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48 : 589-92.
34. H. Y. Hsu (2000) Tumor Necrosis Factor- α -mediated Protein Kinases in Regulation of Scavenger Receptor and Foam Cell Formation on Macrophage. *J. Biol. Chem.* Vol. 275, No. 52, 41035-41048.
35. Ajay Chawla, William A. (2001) A PPAR γ -LXR-ABCA1 Pathway in Macrophages Is Involved in Cholesterol Efflux and Atherogenesis. *Molecular cell*. Vol. 7, 161-171.
36. Ferns, G. A. A., Lamb, D. J. and Taylor, A. 1997. The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus. *Atherosclerosis*. 133: 139-152.
37. M Freeman, Y Ekkel, L Rohrer, M Penman, NJ Freedman, GM Chisholm, and M Krieger (1991) Expression of Type I and Type II Bovine Scavenger Receptors in Chinese Hamster Ovary Cells: Lipid Droplet Accumulation and Nonreciprocal Cross Competition by Acetylated and Oxidized Low Density Lipoprotein. *PNAS. USA* 88: 4931-4935.
38. GR Sambrano, S Parthasarathy, and D Steinberg (1994) Recognition of Oxidatively Damaged Erythrocytes by a Macrophage Receptor with Specificity for Oxidized Low Density Lipoprotein. *PNAS. USA* ,91: 3265-3269.

39. Heinecke, J.W. (1998). Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* ,141, 1–15.
40. Steinberg, D., and Witztum, J.L. (1999). Lipoproteins, Lipoprotein, Oxidation, and Atherogenesis, K.R. Chien, ed. (Philadelphia: W.B. Saunders Co.).
41. Cyrus, T., Witztum, J.L., Rader, D.J., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M.F., and Funk, C.D. (1999). Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 103, 1597–1604.
42. Harats, D., Shaish, A., George, J., Mulkins, M., Kurihara, H., Levkovitz, H., and Sigal, E. (2000). Overexpression of 15-Lipoxygenase in Vascular Endothelium Accelerates Early Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2100–2105.
43. Knowles, J.W., Reddick, R.L., Jennette, J.C., Shesely, E.G., Smithies, O., and Maeda, N. (2000). Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(2/2)ApoE(2/2) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J. Clin. Invest.* 105, 451–458.
44. Cybulsky, M.I., and Gimbrone, M.A., Jr. (1991). Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* .251, 788–791.
45. Dong, Z., Chapman, S., Brown, A., Frenette, P., Hynes, R., and Wagner, D. (1998). The Combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 102, 145–152.
46. Collins, R.G., Velji, R., Guevara, N.V., Hicks, M.J., Chan, L., and Beaudet, A.L. (2000). P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis

- in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191, 189–194.
47. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., and Witztum, J.L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320, 915–924.
48. Han, K.H., Han, K.O., Green, S.R., and Quehenberger, O. (1999). Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia: differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J. Lipid Res.* 40, 1053–1063.
49. Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., and Rollins, B.J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein-deficient mice. *Mol. Cell* 2, 275–281.
50. Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C.H., Young, S.G., Rollins, B.J., and Charo, I.F. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J. Clin. Invest.* 103, 773–778.
51. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I.F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894–897.
52. Qiao, J.H., Tripathi, J., Mishra, N.K., Cai, Y., Tripathi, S., Wang, X.P., Imes, S., Fishbein, M.C., Clinton, S.K., Libby, P., Luis, A.J., and Rajavashisth, T.B. (1997). Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteoporotic mice. *Am. J. Pathol.* 150, 1687–1699.
53. Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T., and Kodama, T. (1998). Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and

- disorders of the central nervous system. *Cell. Mol. LifeSci.*54,628–640.
54. Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., et al. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386, 292–296.
55. Colles, S.M., Irwin, K.C., and Chisolm, G.M. (1996). Roles of multiple oxidized lipids in cellular injury. *J. Lipid Res.* 37, 2018–2028.
56. Bennet, M.R. (1999). Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovascular Res.* 41, 361–368.
57. Hansson, G.K. (1997). Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 8, 301–311.
58. Davies, M.J., Richardson, P.D., and Woolf, N. (1993). Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.* 69, 377–381.
59. Lee, R.T., and Libby, P. (1997). The unstable atheroma. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1859–1867.
60. Havel, R. J., Eden, H. A., Bragdon, J. H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*34, 1345-1353.
61. Miura, S., Watanabe, J., Tomita, T., Sano, M., and Tomita, I. (1994). The inhibitory effects of tea polyphenol (flavon-3-ol derivatives) on Cu²⁺ mediated oxidative modification of LDL. *Biol. Pharm. Bull.* 17,1567-1572.

62.Reid, V. C., Mitchinson, M. J. (1993) Toxicity of oxidized low-density lipoprotein towards mouse peritoneal macrophage in vivo. *Atherosclerosis* ,98, 17–24.