

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

蓮蓬萃取物成份抑制血管病變作用及分子機制之研究

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 101-2313-B-040-003-
執行期間：101年08月01日至102年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

計畫主持人：林慧萱
共同主持人：陳璟賢
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：林佳良
碩士班研究生-兼任助理人員：徐英華
碩士班研究生-兼任助理人員：李庭暄

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 102年10月29日

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(atherosclerosis)是主要的致死原因。在早期動脈硬化中，低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化修飾扮演很重要的角色。藉由抗氧化(antioxidation)作用來抑制 LDL 氧化修飾是一種有效預防動脈粥狀硬化發生的方法。蓮蓬(lotus seedpod)自古即被用來行氣除脹、益補脾胃、止血化瘀、清熱、降肝火及止血功效。過去研究顯示蓮蓬原花青素(procyanidins of lotus seedpod, LSPCs)具有抗氧化以及免疫調節之活性。本研究之目的則為評估蓮蓬水萃取物(lotus seedpod extract, LSE)抗 LDL 氧化及抗動脈粥狀硬化之作用。首先鑑定 LSE 主成份為 catechin 及 EGC (兩者為原花青素之裂解產物)等類黃酮(flavonoid)。利用銅離子誘導 LDL 氧化的模式進行體外抗氧化試驗，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 LDL 蛋白表面電荷改變的程度、輔脂蛋白 apoB 斷裂現象與脂質過氧化產物 MDA 的生成量減少等結果發現：LSE 具有抑制 LDL 氧化的能力，此外也具有清除 DPPH 自由基的作用。而在細胞實驗方面，LSE 可引發由氧化型 LDL(oxidized LDL, ox-LDL)誘導 J774A.1 巨噬細胞轉型的泡沫細胞(foam cell)形成以及有效地減低細胞內三酸甘油酯和膽固醇的含量。並提出 LSE 可能透過調控 PPAR gamma 的表現，進而抑制 CD36 之表達；也可能藉由誘導 LXR alpha-ABCA1 分子機制，以促進膽固醇反向運輸，進而減低細胞內脂質的堆積。進一步利用高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈粥狀硬化病變之動物模式，結果顯示動物血清中總膽固醇、三酸甘油酯及 LDL-C 會因同時餵食 LSE 而降低，其動脈粥狀硬化的損傷面積也比誘導組兔子減少許多。由以上實驗結果顯示，LSE 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。綜合上述，我們提出蓮蓬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。

中文關鍵詞： 心血管疾病、動脈粥狀硬化、低密度脂蛋白、抗氧化、蓮蓬、類黃酮、泡沫細胞。

英文摘要： Cardiovascular disease has been a major cause of mortality in human and hyperlipidemia plays an important role contributing to atherosclerosis. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) and its uptake by macrophage are the hallmark in atherogenesis. In the present study, we aimed to

investigate the antiatherogenic effect of lotus seedpod extract (LSE), which contained flavonoid including catechin and EGC. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity assay showed the addition of > 50 μ M of LSE could scavenge over 60% of DPPH radicals. The inhibitory effects of LSE on the lipid and protein peroxidation of LDL were defined by thiobarbituric acid relative substances (TBARS) assay, the relative electrophoretic mobility (REM) of ox-LDL, and fragmentation of apoB in the Cu^{2+} -induced oxidation of LDL. LSE showed potential in reducing foam cell formation and intracellular lipid accumulation in ox-LDL-induced macrophage cells under non-cytotoxic concentrations. Molecular data showed that these influences of LSE might be mediated via liver-X receptor alpha (LXR alpha)/ ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and PPAR gamma/scavenger receptor CD36 pathways. Finally, we have observed that consumption of LSE reduced the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Histological photomicrographs of aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with a high cholesterol diet (HCD) showed that the specific binding of ox-LDL to macrophages was inhibited by an anti-CD68 IgG in the group of HFD plus 1.0% LSE. In conclusion, these results suggested that LSE potentially could be developed as an anti-atherosclerotic agent.

英文關鍵詞： cardiovascular disease, atherosclerosis, oxidized low-density lipoprotein, lotus seedpod extract, flavonoid, oxidation, lipid peroxidation, foam cells.

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

蓮蓬萃取物成份抑制血管病變作用及分子機制之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 101-2313-B-040 -003

執行期間：101 年 08 月 01 日至 102 年 07 月 31 日

計畫主持人：林慧萱

共同主持人：陳璟賢

計畫參與人員：林佳良、徐英華、李庭暄

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學 醫學檢驗暨生物技術學系(所)

中 華 民 國 102 年 10 月 28 日

§ 中英文摘要

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(atherosclerosis)是主要的致死原因。在早期動脈硬化中，低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化修飾扮演很重要的角色。藉由抗氧化(antioxidation)作用來抑制 LDL 氧化修飾是一種有效預防動脈粥狀硬化發生的方法。蓮蓬(lotus seedpod)自古即被用來行氣除脹、益補脾胃、止血化瘀、清熱、降肝火及止血功效。過去研究顯示蓮蓬原花青素(procyanidins of lotus seedpod, LSPCs)具有抗氧化以及免疫調節之活性。本研究之目的則為評估蓮蓬水萃取物(lotus seedpod extract, LSE)抗 LDL 氧化及抗動脈粥狀硬化之作用。首先鑑定 LSE 主成份為 catechin 及 EGC (兩者為原花青素之裂解產物)等類黃酮(flavonoid)。利用銅離子誘導 LDL 氧化的模式進行體外抗氧化試驗，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 LDL 蛋白表面電荷改變的程度、輔脂蛋白 apoB 斷裂現象與脂質過氧化產物 MDA 的生成量減少等結果發現：LSE 具有抑制 LDL 氧化的能力，此外也具有清除 DPPH 自由基的作用。而在細胞實驗方面，LSE 可引發由氧化型 LDL(oxidized LDL, ox-LDL)誘導 J774A.1 巨噬細胞轉型的泡沫細胞(foam cell)形成以及有效地減低細胞內三酸甘油酯和膽固醇的含量。並提出 LSE 可能透過調控 PPAR γ 的表現，進而抑制 CD36 之表達；也可能藉由誘導 LXR α -ABCA1 分子機制，以促進膽固醇反向運輸，進而減低細胞內脂質的堆積。進一步利用高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈粥狀硬化病變之動物模式，結果顯示動物血清中總膽固醇、三酸甘油酯及 LDL-C 會因同時餵食 LSE 而降低，其動脈粥狀硬化的損傷面積也比誘導組兔子減少許多。由以上實驗結果顯示，LSE 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。綜合上述，我們提出蓮蓬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。

關鍵詞：心血管疾病、動脈粥狀硬化、低密度脂蛋白、抗氧化、蓮蓬、類黃酮、泡沫細胞。

Cardiovascular disease has been a major cause of mortality in human and hyperlipidemia plays an important role contributing to atherosclerosis. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) and its uptake by macrophage are the hallmark in atherogenesis. In the present study, we aimed to investigate the antiatherogenic effect of lotus seedpod extract (LSE), which contained flavonoid including catechin and EGC. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity assay showed the addition of > 50 μ M of LSE could scavenge over 60% of DPPH radicals. The inhibitory effects of LSE on the lipid and protein peroxidation of LDL were defined by thiobarbituric acid relative substances (TBARS) assay, the relative electrophoretic mobility (REM) of ox-LDL, and fragmentation of apoB in the Cu²⁺-induced oxidation of LDL. LSE showed potential in reducing foam cell formation and intracellular lipid accumulation in ox-LDL-induced macrophage cells under non-cytotoxic concentrations. Molecular data showed that these influences of LSE might be mediated via liver-X receptor α (LXR α)/ ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and PPAR γ / scavenger receptor CD36 pathways. Finally, we have observed that consumption of LSE reduced the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Histological photomicrographs of aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with a high cholesterol diet (HCD) showed that the specific binding of ox-LDL to macrophages was inhibited by an anti-CD68 IgG in the group of HFD plus 1.0% LSE. In conclusion, these results suggested that LSE potentially could be developed as an anti-atherosclerotic agent.

Keywords: cardiovascular disease, atherosclerosis, oxidized low-density lipoprotein, lotus seedpod extract, flavonoid, oxidation, lipid peroxidation, foam cells.

(一) 前言

一、動脈粥狀硬化 (Atherosclerosis)

根據衛生署統計心血管疾病為國人十大死因之第二名，且為西方國家普遍的疾病之一。而心血管疾病中動脈粥狀硬化更是主要的致死原因(1, 2)。動脈粥狀硬化的發生為一種複雜且為漸進式的致病過程，包括脂質進入血管壁、脂蛋白氧化、泡沫細胞形成與堆積，血管平滑肌細胞遷移和增生等(3)。在動脈粥狀硬化的病理致病機轉研究中，動脈粥狀硬化的形成機制是一種脂質與發炎細胞間的聚集，伴隨著血管平滑肌細胞增生與細胞外間質液分泌所引起的細胞內膜纖維變性(4)，目前已知，當血液中血脂成份過高的話，易造成血管內皮細胞(endothelial cell)的受損，使血管腔 (vascular lumen) 間隙增加，使得脂蛋白如："低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)"容易穿過血管腔間隙進入血管內膜(intima) 當中堆積，而血管內膜當中的 LDL 又容易受到血管內膜中的一些內生性氧化酵素的作用，發生脂質過氧化作用修飾，因而形成"氧化型低密度脂蛋白(oxidative LDL, ox-LDL)"，而這些修飾後的 ox-LDL 因為立體結構的改變，就變得不容易穿透血管腔間隙離開血管內膜而堆積下來(5, 6)。這些堆積在血管內膜的 ox-LDL 會影響血管內皮細胞的正常功能，諸如維持血管的狀，防止血液的流失，平衡血管的通透性等，而受傷的內皮細胞將變得容易被血液內的物質吸附，更佳影響其原本之功能(7)。因此，這些受損的血管內皮細胞便會吸引血液中的清道夫--單核球細胞(monocyte)的聚集，而單核球細胞便會由血管內轉移至血管內皮細胞外的內膜，以清除這些影響血管內皮細胞的 ox-LDL。當單核細胞轉移到血管內膜時，會同時分化並活化，形成更具有清除能力的巨噬細胞(macrophage)(8-10)。此時，巨噬細胞對過分堆積的 ox-LDL 進行無限制的吞噬，而這些富含膽固醇的 LDL 將會逐漸累積在巨噬細胞體內，使得巨噬細胞形成另一種病態的細胞型態，稱之為泡沫細胞(foam cell)(11, 12)。這些泡沫細胞的大量堆集在血管內膜會形成所謂的脂肪條紋 (fatty streak)，是動脈粥狀硬化過程中最早可以辨識的病灶，這些脂肪條紋會緩慢地造成血管的纖維化，硬化，形成所謂的粥樣硬化斑(13)。促使阻塞情形更加惡化，而血栓更是引起中風的潛在因子，這些現象都是導致晚期動脈血管壁粥狀塊呈現複雜、具不可逆性，造成治療上困難的原因。所以 LDL 所受到的氧化性修飾及泡沫細胞的形成，在動脈粥狀硬化的早期皆扮演著重要的角色，因此有效的阻止這兩種病灶的發生，將有助於減緩動脈粥狀硬化的發展。

二、蓮蓬 (Lotus seedpod)

植物蓮學名 *Nelumbo nucifera* Gaertner。英名 East Indian Lotus，俗稱 Lotus，中文亦稱「荷」、「蓮」，是宿根性多年生水生植物。蓮在印度、中國及日本菲律賓等國皆有產，但主產地在印度，近百年內才由日本傳入臺灣，並開始大量種植，主要分佈在白河鎮、嘉義及台南市郊一帶，蓮的經濟作物以生產蓮子、蓮藕及藕粉等加工品為主。近年有關於植物蓮的研究多著重於蓮心及荷葉等功能性成份之分析、生物活性之探討(14-22)，然而對於蓮蓬則極少有科學文獻報導。蓮蓬為蓮的花心，別稱蓮房。蓮蓬為傳統中藥材，味苦性溫，本草綱目記載蓮蓬可用來行氣除脹、益補脾胃、止血化瘀、清熱、降肝火及止血，但目前蓮蓬被視為廢棄物大量丟棄。近年來已有文獻證實蓮蓬中富含原花青素(proanthocyanidins) (23-25)，此成份屬於類黃酮(flavonoid)。進一步研究顯示蓮蓬原花青素(procyanidins of lotus seedpod, LSPCs)具有抗氧化(23, 24)、抗老化、增強記憶力(24-29)、免疫調節(30)以及抗癌(31)之功效。此類黃酮亦具有抗氧化、抗發炎、降血脂、防癌及抑制心血管疾病等作用(32, 33)，所以推論蓮蓬萃取物具有化學預防的活性。

(二) 研究目的

脂質的過氧化傷害、LDL 的氧化以及巨噬細胞所形成之泡沫細胞被證實是動脈粥狀硬化發生過程的生成主要原因。在天然物的開發上，利用天然物所萃取的萃取物作為抗氧化劑來預防 LDL 的氧化反應是現今廣被大眾所接受有效的抑制動脈粥狀硬化發生的方法。在此我們想利用蓮蓬所含豐富的原花青素成份之抗氧化作用，期待蓮蓬萃取物能夠藉由抑制 LDL 氧化而達到預防動脈粥狀硬

化的發生。因此，我們擬以蓮蓬萃取物進行試驗，首先測試蓮蓬萃取物是否可抑制 LDL 氧化並介入調控動脈粥狀硬化發生過程中。希望藉由本研究，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。因此本計劃將以台灣本土蓮蓬萃取物(LSE)進行研究。主要分成幾個部分來探討：(1) LSE 成分分析以及是否具有抗氧化的功能？能否抑制 LDL 氧化修飾作用？(2) LSE 對於泡沫細胞生成作用之影響？(3) LSE 是否具有降三酸甘油酯和膽固醇，以及抑制動脈粥狀硬化之作用？(4) 以上之作用是透過哪些機制所調控？

植物蓮在台灣用途多在庭園造景欣賞及供人食用，故為著名食用、藥用兼觀賞植物，經濟價值極高。近年有關於植物蓮的研究多著重於蓮心及荷葉等功能性成份之分析與生物活性之探討，然而對於蓮蓬則極少有科學文獻報導。蓮蓬為傳統中藥材，但目前在臺灣蓮蓬被視為廢棄物大量丟棄。過去的研究顯示蓮蓬成分富含原花青素，並報導其具有較強的清除自由基和抗氧化能力，顯示蓮蓬具有開發為預防心血管疾病物質之潛力。因此，本研究將針對台灣生產之蓮蓬進行初步之類黃酮定性、定量分析，以及抗氧化與抗動脈粥狀硬化活性分析。目的在釐清於複雜且為漸進式的動脈粥狀硬化過程中，蓮蓬萃取物所參與影響的範疇及抗動脈粥狀硬化之分子機制。天然物抗動脈粥狀硬化之分子機制的研究無論對於類黃酮醫藥化評估，亦或針對心血管疾病治療之分子標的，都是重要的參考指標。研究期望能提供國人食用蓮蓬時，有一參考依據；為符合新時代講究自然與健康飲食的觀念，提供一無毒性的天然抗氧化劑與保健食品，並且提高植物蓮農業作物之經濟效益。

(三) 文獻探討

過去研究證實荷葉水萃取物可抑制 LDL 氧化，降血脂及抑制血管病變(21)，並進一步發現荷葉水萃取物可抑制血管平滑肌細胞增生和位移(22)。多酚類對心血管病變亦有助益。紅酒中的多酚可抑制酪胺酸激酶(tyrosine kinase)，進而抑制內皮細胞形成 ET-1 (34)。而綠茶多酚 EGCG 則透過訊息分子 p53 與 NF- κ B 來抑制血管平滑肌細胞生長與促進其凋亡(35)。來自燕麥的多酚類 avenanthiamide，則有抑制血管平滑肌細胞生長與增加內皮細胞產生 NO 的效果(36)。傳統醫療中，黃酮類也作為抗心血管疾病的藥物。黃酮類 onychin 藉 MAPK 而抑制氧化壓力所引起的內皮凋亡(37)。而另一黃酮 genistein 因抑制酪胺酸激酶，而證明此激酶對血管平滑肌細胞移動的重要性(38, 39)。對於蓮蓬在醫學上的報導，國外的研究甚少，只有蓮蓬原花青素抗氧化、抗老化及抑制小鼠黑色素細胞瘤試驗等(23-31)，國內也幾乎無相關之研究。至於蓮心及荷葉之抗氧化、抗癌、抗肥胖及抗心血管疾病等研究則較多(14-22)。從安全及經濟價值考量，由植物萃取出有機物質作為預防或治療疾病之物質已為各國所重視，例如 tea polyphenolic extracts, curcuminoid extracts 及 broccoli extracts (sulforaphane) 已被廣泛的應用為化學預防物質(chemopreventive agents) (40)。而本實驗室致力於開發天然物中所含的特殊成份，希望可以由攝取食品來達到預防或延緩疾病之目的，因此本計劃將以台灣鄉間常見大慈蓮之蓮蓬部位，萃取其中所富含之功能性成份(LSE) 針對動脈硬化以 in vitro 與 in vivo 方式進行研究。根據我們初步的成份定量實驗結果顯示：蓮蓬萃取物之類黃酮含量 85.7%(Table 1)高於荷葉萃取物 (56%) (20)，更具有成為化學預防物質之潛力。況且 LSE 是蓮蓬直接經由水煮萃取而來，保留天然植物本身最原始之生物活性，一來不會有殘存有機溶劑之虞；二來它不會如人工合成化學物質對人體衍生氧化性傷害之作用。期盼本計畫所獲得之初步結果，對於日後保健產品及農業之開發與應用上能有所貢獻。

(四) 研究方法

一、蓮蓬水萃取物 (LSE) 之製備及成份分析

1.1. LSE 水萃取物之製備

秤取乾燥蓮蓬 100 g，加入 6 L distilled water，以 100°C 煮 2 小時，待冷後過濾，將濾液進行冷凍乾燥，得其粉末即為蓮蓬粗萃取物，最後進行冷凍乾燥為粉末。

1.2. 總多酚含量測定 (Total phenolic content assay)

測定酚的含量，以 gallic acid (GA) (mg/kg) 為標準品 (standard)，甲醇溶解後分別取不同的量，以甲醇稀釋補足 1 ml 後，各加 0.5 ml 之 2N Folin-Ciocalteu phenol reagent 後搖勻，再加 3 ml Na_2CO_3 (200 g/L) 搖勻，並於室溫靜置 15 分鐘後，加 5 或 10 ml 去離子水後搖勻，以 $1250\times g$ 離心 5 分鐘，在波長 725 nm 下測吸光值 (甲醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線，並計算回歸方程式。樣品泡好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算酚的含量。

1.3. 總黃酮含量測定 (Total flavonoid content assay)

測定黃酮的含量，以 rutin (mg/ml) 為標準品。甲醇溶解後分別取不同的體積，以 30% 乙醇稀釋並補足體積至 10 ml 搖勻。接著各加 0.3 ml 之 1M NaNO_3 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。再加 0.3 ml 之 10% AlNO_3 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。最後加入 4 ml 之 4% NaOH 溶液混合均勻，補 0.4 ml 去離子水至刻度，放置 15 分鐘。在波長 510 nm 下測吸光值 (乙醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線。並計算回歸方程式。樣品泡好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算黃酮的含量。

1.4. 總花青素含量測定 (Total anthocyanin content assay)

花青素通常微弱酸性，在酸性環境下可以形成穩定的 flavylium 陽離子構造。本次實驗採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，精確定量待測樣品，得體積 V ，並從中吸取 2 ml 試樣，經適當稀釋以濃鹽酸或氫氧化鈉溶液調 pH，使一份 pH 為 1.0，另一份 pH 4.5。兩份稀釋液分別以分光光度計測其在 520 nm 的吸光值，得 A_1 (pH 1.0 者) 與 A_2 (pH 4.5 者)，再以下列公式計算每 100 克水果中所含總花青素毫克數。

總花青素含量(mg 花青素/100 mg 萃取物):

$$\frac{(A_1 - A_2) \times F \times MW \times V \times 100}{\epsilon \times \omega}$$

MW: 花青素分子量以 delphinidin-3-diglycoside 之分子量 518.5 計算

V: 總抽出液體積(mL)

F: 稀釋倍數

ϵ : 花青素之莫耳吸光係數(Molecular extinction coefficient)，以 delphinidin-3-diglycoside 在含 0.1% 鹽酸的甲醇溶液之吸光係數 ϵ 值 301.6 計算。

ω : 水果總重(g)

1.5. 高效能液相層析儀 (HPLC) 分析

為使 LSE 製備固定標準化，實驗利用 HPLC 鑑定其多酚成份。使用 17 個多酚標準品：1. gallic acid (GA)、2. protocatechuic acid (PCA)、3. catechin、4. procyanidin B2、5. epicatechin、6. caffeic acid、7. epigallocatechin gallate (EGCG)、8. ellagic acid (EA)、9. rutin、10. p -Coumaric acid、11. epigallocatechin (EGC)、12. ferulic acid (FA)、13. epicatechin gallate (ECG)、14. gossypin、15. gossypetin、16. quercetin、17. naringenin。分析條件為用 C-18 reverse-phase column (5 μm , Hypersil ODS, 200 mm X 2.1 mm)，將 LSE 過濾 (0.45 μm) 後，取 20 μl 注入 HPLC，mobile phase 為 A：0.1% Formic acid；B：acetonitrile wit 0.1% formic acid；0-5 min 為 90% A、10% B；5-14 min 為 70% A、30% B；14-19 min 為 60% A、40% B；19-23 min 為 40% A、60% B；23-24 min 為 10% A、90% B；24-33 min 為 100% B，monitored at 285 and 345 nm。

二、LSE 抑制體外誘發 LDL 氧化之作用

2.1. DPPH 自由基清除效應

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 在甲醇溶液中呈現藍紫色，為一種穩定的自由基，是一種常被使用作為抗氧化指標的實驗。其結構上可以產生穩定的共振結構，當 DPPH 自由基被清除時，

呈現顏色會由原先的藍紫色脫色為淡黃色；脫色程度越高，則表示DPPH 自由基被清除的程度越高。且DPPH甲醇溶液於517 nm波長下有特定之吸光值，可藉由在517 nm下吸光值的減少來代表DPPH自由基被清除的程度。取0.1 ml LSE以甲醇稀釋至4 ml，加入1 ml 新鮮配製0.2 mM DPPH 之甲醇溶液，均勻混合靜置30 分鐘後，以分光光度計於517 nm 波長下測量吸光值變化。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：

$$\text{scavenging effects (\%)} = \left[\frac{1 - (A_{\text{sample at 517nm}} - A_{\text{blank at 517nm}})}{(A_{\text{control at 517nm}} - A_{\text{blank at 517nm}})} \right] \times 100$$

2.2. 低密度脂蛋白的離心萃取 (LDL isolation)

取 2 ml 的人類之血清，加入 0.5 M NaCl 及 0.3 mM EDTA (pH 7.4)的混合液 0.7 ml，放入 Beckman TL-100 桌上型超高速離心機中，離心 90000 rpm，10°C，10 分鐘，取出下層液 2 ml，再加入 0.5 M NaCl 及 0.3 mM EDTA (pH 7.4)的混合液 700 μ l，離心 90000 rpm，10°C，3.5 小時，取出下層液 2 ml，加入 166.8 g KBr，使其溶解均勻，再離心 90000 rpm，10°C，3.5 小時，收取上層液 0.6 ml，即為分離好的低密度脂蛋白。但我們所得到的 LDL，需再經過 PD-10 column 的處理，將 LDL 中的 EDTA 去除，我們先以 25 ml PBS 通過清洗 PD-10 column，待其不流動後，再加 2.5 ml LDL，也是待其不流動後，再加 3.5 ml PBS，去掉前 0.5 ml，收取後 3 ml 即為去 EDTA 的 LDL，連續步驟直至 LDL 取完。

2.3. 氧化型低密度脂蛋白的製備 (LDL oxidation)

LDL先過PD-10 column後，再加入10 μ M CuSO₄於37°C水浴槽中，一起反應24小時，反應後再過一次PD-10 column即可得實驗用之ox-LDL。而ox-LDL經蛋白定量將其蛋白量調整為500 μ g/ml，使依實驗所需之稀釋至最後反應濃度為50 μ g/ml。ox-LDL若要加入細胞反應前，須先以0.22 μ m filter 過濾除菌，以防實驗進行中造成細胞污染。

2.4. 脂質過氧化試驗 (TBARS formation assay)

LDL 的結構主要是由脂質、蛋白質及少量的醣類所組成。因此，研究 LDL 的氧化程度則可從研究脂質與蛋白質兩方面著手。根據 Yagi 等(1987)所修飾的方法，其原理是利用 LDL 氧化的過程中，會生成過氧化物 MDA (malondialdehyde)，而一分子的 MDA 會與兩分子的 TBA (thiobarbituric acid)形成具螢光性質的聚合物 TBARS (thiobarbituric acid reactive substance)，此物質於激發波長 (Ex)532 nm，發射波長 (Em) 600 nm 時，可被偵測到特定的螢光波長。利用 TEP (1,1,3,3-tetramethoxypropane)為標準品做標準曲線來定量 LDL 被氧化的程度。在 LDL(100 μ g/ml)中加入銅離子(10 μ M)來誘導 LDL 形成 ox-LDL，再添加不同濃度的 LSE，放入 37°C 水浴槽中反應 24 小時。再加入等體 25% TCA 溶液 (richloroacetic acid) 將蛋白質變性沉澱下來，並以 10,000 rpm 在 10°C 下離心 30 分鐘，目的是為了將蛋白質去掉只留下脂質的部分，接著取上清液再加入等體積的 TBA 溶液反應，在避光的環境下以 95°C 加熱 40 分鐘，待其冷卻後，使用 Hitachi F-2000 螢光比色計於特定波長 Ex/Em532/600 下測定 MDA 產生的量。

2.5. 低密度脂蛋白表面電荷改變試驗 (LDL peroxidation-relative electrophoretic mobility assay)

LDL 氧化時，胺基酸序列中的離胺酸 (lysine)、組胺酸 (histidine) 等，帶正電荷的胺基酸會與氧化後的產物 MDA、hexanal、4-hydroxynoneal (4-HNE) 結合，使得 LDL 蛋白表面正電荷減少，造成負電荷增加的情形。而 LDL 蛋白表面電荷改變的情形，可以利用 LDL 蛋白在膠體中，往正電場移動的相對距離來觀察。在 LDL (100 μ g/ml) 中加入銅離子(10 μ M)來誘導 LDL 形成 ox-LDL，再添加不同濃度的 LSE，放入 37°C 水浴槽中反應 24 小時。利用 BACKMAN lipoprotein (LIPO) electrophoresis system，取一片已製備好的膠體，用模板濾紙，將多餘的水分吸掉，將紫色板輕輕對準 c 點放下，輕壓紫色板，使其附著在 gel 上，在 10 個 well 各注入 5 μ l 的樣本，靜置 5 分鐘，用長條濾紙小心的放在紫色板上，吸掉多餘的樣本，將長條濾紙和紫色板一起拿掉，將膠體架在電泳槽上，加入適量的電泳液 (6.07 g/500 ml)，以 100 伏特的電壓進行電泳 30 分鐘，然後取出膠體，用專

用夾固定好，接著置於固定槽(180 ml 酒精，90 ml 水與 30 ml 冰醋酸混合)，固定 5 分鐘，取出烘乾(需至完全乾)，放入染色槽(染色液：165 ml 酒精與 3 ml paragon Lipo stain，再加上 135 ml 的水混合)，待其染色均勻分佈後，放入脫色槽(脫色液：450 ml 酒精與 550 ml 水混合)，脫色 2 次後，用去離子水沖洗，再烘乾即可。

2.6. ApoB 輔脂蛋白斷裂試驗 (ApoB fragmentation assay)

當 LDL 被氧化時，輔蛋白 apoB 蛋白(約 512 kDa) 會被自由基攻擊而分解為不同大小的蛋白片段，因此利用梯度膠體分析觀察 apoB 輔蛋白斷裂情形。在 LDL (100 $\mu\text{g/ml}$)中加入銅離子(10 μM)來誘導 LDL 形成 ox-LDL，再添加不同濃度的 LSE，放入 37°C 水浴槽中反應 24 小時。待 LDL 氧化後加入追蹤染劑 (loading dye) 於 100°C 下反應 10 分鐘後冷卻之。另一方面，於低溫下配製 3~15% 的梯度膠體，將以混和追蹤染劑的 LDL 樣本小心注入膠體中，然後進行電泳(50 V, 20 mA, 13 小時)。電泳完成後，以染色液(1.25 g coomassie blue, 0.5 g amido black, 227 ml methanol, 46 ml acetic acid, 227 ml ddH₂O)染色 1 小時，最後以脫色液(40% methanol, 10% acetic acid, 50% ddH₂O)脫色，脫色至無染色液殘留於背景中，封膠後取下保存。

三、LSE 抑制泡沫細胞之生成

3.1. 細胞毒性試驗 (cytotoxicity assay)

本實驗是用於測試細胞對於LSE的感受度是如何，以決定後續細胞實驗所選用萃取物之劑量。此法是根據Alley等人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，並於波長563 nm 下測定溶液吸光值變化，由吸光值的大小可得知存活的細胞數目之多寡，而死細胞是無法進行此作用，因此若溶液的吸光值有降低的話，表示細胞有死亡或無法代謝 MTT reagent 的情形。將巨噬細胞 J774A.1 (4×10^5 cell/well) 培養於24 well culture plate，加入不同濃度的LSE處理24小時後，移除舊的培養基 (含萃取物)，加入新的培養基和MTT (0.5 mg/ml)反應4小時，移除培養基，加入異丙醇將結晶溶出，在波長563 nm下測定吸光值的變化。

3.2. 泡沫細胞生成試驗 (foam cell formation assay)

觀察泡沫細胞的形成，是以油脂染劑—油紅O (oil-Red O) 將細胞內中性脂肪染成紅色再加以觀察。J774A.1細胞(1×10^5 cell/well)在同時處理不同濃度的LSE，以及事先氧化後之ox-LDL (50 $\mu\text{g/ml}$) 24小時後，將培養液移除，並以PBS清洗二次，再以10% paraformaldehyde 將細胞固定1 小時。移除固定液，並以PBS清洗二次，再以50%的異丙醇(isopropyl alcohol) 浸潤片刻，加入60% oil-Red O 染劑覆蓋細胞，15-20 分鐘後移除染劑，以PBS 清洗三次(15分鐘/次)。完成上述步驟後，於光學顯微鏡下，觀察細胞內有無被染為深紅色的脂肪油滴，即為泡沫細胞。

3.3. 細胞內脂質的萃取

觀察LSE對泡沫細胞內脂質含量之影響。將J774.1細胞(1×10^5 cell/well)在同時處理不同濃度的LSE，以及事先氧化後之ox-LDL (50 $\mu\text{g/ml}$) 24小時後，將培養液移除，並以PBS清洗二次，再以0.5 ml之hexane:isopropanol (3:2, v/v)萃取細胞內脂質，將脂質萃取物移至玻璃離心管中自然風乾，再以200 μl isopropanol回溶，即可得細胞內脂質萃取液。

3.4. 細胞內膽固醇含量之測定

利用市售之測定膽固醇含量之酵素測定法試劑，測定細胞內膽固醇含量之變化。取10 μl 之細胞內脂質萃取液與1 ml之試劑混合，於室溫下反應10分鐘，於波長500 nm下測定吸光值變化，以已知濃度之標準品作對照，計算出細胞內之膽固醇含量，其公式如下：

$$C = 200 \times \Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{STD}} \text{ [mg/dl]}$$

3.5. 細胞內三酸甘油酯含量之測定

利用市售之測定三酸甘油酯含量之酵素測定法試劑，測定細胞內三酸甘油酯含量之變化。取10 μl 之細胞內脂質萃取液與1 ml之試劑混合，於室溫下反應10分鐘，於波長500 nm下測定吸光值變化，

以已知濃度之標準品作對照，計算出細胞內之三酸甘油酯含量，其公式如下：

$$C = 200 \times \Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{STD}} \text{ [mg/dl]}$$

四、高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈硬化症

4.1. 動物模式

本實驗模式分組概述如下：(a)正常飼料餵食組、(b)高脂肪(HFD)餵食組、(c)HFD + 0.5% LSE、(d)HFD + 1.0% LSE、(e) 1.0% LSE (毒性試驗組)，一般組以normal diet餵食，2~5組以HFD：89.8% chow，10% coconut oil 及 0.2% 膽固醇，實驗過程中定期記錄動物飲食以及體重的變化，並登記動物死亡的數目。飼養25週後可誘導產生高脂血症，動物禁食一夜後犧牲，犧牲後收集血液分析血脂肪，包括總膽固醇、三酸甘油酯、HDL、LDL，另一部份取肝組織測定其肝內總脂質膽固醇及LDL之濃度。犧牲後，取出實驗動物之主動脈弓(aortic arch)部份，後浸入10%中性福馬林固定(neutral buffered formalin)，以石蠟包埋，以hematoxylin and eosin (H&E)染色觀察病灶。此外，實驗動物之胸動脈亦由主體小心剝離，並在解剖顯微鏡下將管腔外側之體脂肪小心去除，再以縱切方式將血管剖開，隨後以oil red O進行染色，觀察胸動脈管腔內壁中脂肪斑之沉積與分布。

4.2. oil red O染色的樣本製備

將oil red O (300 mg/dl)的飽和溶液溶於99% isopropyl alcohol 中，做為保存溶液。將配置好之oil red保存溶液與PBS 以6:4 的比例混合後，靜置10分鐘之後，離心過濾即可使用。取先前以10% neutral buffered formalin固定之胸主動脈，用PBS洗淨後，以50% isopropanol浸泡5分鐘，並以oil red O浸泡染色3分鐘，再以20% isopropanol 清洗1 分鐘後，最後用PBS 將過多的染料洗淨。如果血管內壁有脂肪堆積(fatty streak)就會被oil red O 染成紅色，照相後將照片掃描輸入電腦，以電腦程式(Image Pro plus)計算有脂肪堆積之血管面積的百分比。

4.3. 動物血脂肪及肝臟脂肪測定分析

抽取紐西蘭白兔血液樣品以及肝臟組織前，已先將動物空腹12-14小時為原則，採樣後進行下列項目分析：

4.3.1. 三酸甘油酯 (serum triacylglycerol, TG)

利用酵素法，在定量的血清及肝臟均質液中加入呈色劑，經22-25°C下水浴，以分光光度計於500 nm下測定吸光值，計算TG濃度。

4.3.2. 總膽固醇 (total cholesterol, TC)

採用enzymatic colorimetric method，定量的血清及肝臟均質液中加入呈色劑，經37°C水浴，作用之後可生成紅色化合物，以分光光度計500 nm波長下測定吸光值，而換算TC濃度。

4.3.3. 高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-C)

採用酵素作用與比色測定原理，取定量的血清及肝臟均質液中加入適當沉澱劑，將chylomicrons、VLDL、LDL沉澱，作用完全後離心，取定定量上清液加入膽固醇測定試劑，以分光光度計在適當波長(500 nm)下測定吸光值，而換算HDL-C濃度。

4.3.4. 低密度脂蛋白膽固醇 (LDL-C)

採用酵素作用與比色測定原理，取定量的血清及肝臟均質液中加入適當沉澱劑，將chylomicrons、VLDL、LDL 沉澱，作用完全後離心，取定定量上清液加入膽固醇測定試劑，以分光光度計在適當波長(500 nm)下測定吸光值，經計算後，再以總膽固醇值扣除上清液膽固醇值，可得LDL-C濃度。

五、統計分析 (Statistical Analysis)

數據以 means \pm SD 表示。以 Student t-test-Unpaired 來評估統計差異。P < 0.05 表示具有顯著性。

(五) 結果與討論 (含結論與建議)

一、蓮蓬水萃取物 (LSE) 成份分析及鑑定

1.1. 定性分析

以 HPLC 分析 13 個多酚標準品：1. GA、2. PCA、3. catechin、4. procyanidin B2、5. epicatechin、6. caffeic acid、7. EGCG、8. EA、9. rutin、10. ρ -Coumaric acid、11. EGC、12. FA、13. ECG、14. gossypin、15. gossypetin、16. quercetin、17. naringenin。其滯留時間 (retention time, RT) 分別依序出現 (Fig. 1A)；另外，將蓮蓬水萃取物 LSE 與標準品 (LSE + standard) 兩兩混合，其 RT 分別在幾個時間點相吻合，從 Fig. 1B 結果可得。總結 Table 1 顯示 LSE 包含四個成份 catechin、procyanidin B2、 ρ -Coumaric acid 和 EGC，各別含量大約有 4.6%、3.4%、2.8% 和 12.5%。

1.2. 定量分析

利用 Folin-Ciocalteu 方法測定 LSE 約莫得到 29.6% 總多酚含量 (Table 1)。比較 LSE 經 HPLC 分析結果之多酚加總則為 23.3%，兩種試驗的多酚含量出現些許的落差。以 HPLC 來論，它屬於定性分析，為使 LSE 製備固定標準化的一種評估方法；測定總多酚含量的 Folin-Ciocalteu 方法卻會受制於標準品而有不同的分析結果。另一方面，根據 HPLC 之結果顯示：類黃酮 (catechin + procyanidin B2 + quercetin = 20.5%) 這類多酚占 LSE 成分比例最高，續利用 Jia 方法分析萃取物之總黃酮含量。Table 1 結果顯示：LSE 約莫得到 85.7% 黃酮測定值。而花青素之純度測定是採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，由分光光度計分析 LSE，其吸光值再經公式換算，而換算出所萃取出 LSE 的花青素純度約有 6.3%。上述成分鑑定試驗證實 LSE 確為富含類黃酮之萃取物，其中以 EGC 的比例最高。

二、蓮蓬萃取物 (LSE) 抑制體外誘發 LDL 氧化之作用及清除自由基之效力

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，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 來測定。

2.1. 脂質過氧化試驗 (TBARS formation assay)

LDL 氧化會生成過氧化物 MDA，一分子的 MDA 與二分子的 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。以脂質過氧化之終產物 MDA 生成濃度當作脂質過氧化的指標，如 Fig. 2A 所示，單獨以 10 μ M 銅離子處理之控制組，其中 MDA 濃度急速升高，而在同時添入不同濃度的 LSE 一起反應後，有意義的降低 MDA 的形成。以添加了 LSE 50 μ g/ml 的組別來論，明顯地降低了五成以上的 MDA 生成量 (Fig. 2A)，顯示出 LSE 具有抑制銅離子所誘發之脂質過氧化的作用。

2.2. 蛋白表面的電荷改變實驗 (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 e-amino group 與氧化產物的醛類如：MDA、hexanal 與 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，可以用膠體上色帶往正電場移動的距離來判定，以對照組 (control group) 色帶移動的位置 (REM, relative electrophoretic mobility) 為 1 cm。在 in vitro 實驗中，以 10 μ M 銅離子誘導 LDL 於 37°C 氧化 24 小時後，其色帶移動距離比對照組多了約 3 倍；而在同時添入不同濃度的 LSE 一起反應後，在 LSE 100 μ g/ml 濃度下其 REM 回復到與對照組相當 (Fig. 2B, left panel)。由上述實驗結果顯示，有添加 LSE 的組別，其 REM 皆比 positive group (完全不添加萃取物，但有加入銅離子誘導的組別) 降低，顯示出具有抑制及預防 LDL 氧化的作用。

2.3. ApoB 輔蛋白斷裂試驗 (ApoB protein fragmentation assay)

在 in vitro 實驗中以 10 μ M 銅離子誘導下，LDL 於 37°C 氧化 24 小時後，其 LDL 的輔蛋白 apoB 約有 90% 斷裂。而在同時添入不同濃度的 LSE 一起反應後，在 LSE 50 μ g/ml 濃度 apoB 約有 48% 斷裂 (保留 52%)，而在 100 μ g/ml 濃度下 apoB 約有 20% 斷裂 (保留 80%)。由上述實驗結果顯示，有添加 LSE 的組別，其 apoB 斷裂量比 positive group 降低 (Fig. 2B, right panel)，證實 LSE 具有抑制

LDL 氧化之作用。

2.4. DPPH 自由基清除效應

DPPH 為結構穩定的自由基並於 517 nm 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* 實驗以 1 mM DPPH 為 positive group, 而後在相同條件下添入不同濃度的 LSE 測定各濃度下清除 DPPH 的效力。由 Fig. 2C 實驗結果顯示, LSE 濃度越高對自由基之捕捉的能力越強, 具有濃度依賴性關係。

脂質過氧化及 LDL 氧化被證實是動脈粥狀硬化發生過程的致病因子, 由上述實驗結果顯示 LSE 具有抑制 LDL 被氧化的能力, 不論在 LDL 的蛋白氧化修飾或脂質過氧化作用, 由各實驗結果來看 LSE 在 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下可達到抑制 LDL 氧化作用。而由清除自由基的試驗中發現 LSE 具有螯合自由基的功能, 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, 而可抑制 LDL 氧化。因 LSE 具有抑制 LDL 氧化的效力, 將可預期其具有抑制動脈粥狀硬化發生之作用。然而, 我們發現在 LSE 濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ 時, 其 DPPH 清除效力約為 62% (Fig. 2C), 此結果顯示 LSE 可能並不只是透過清除自由基抑制 LDL 的氧化作用, 進而減緩巨噬細胞轉形為泡沫細胞。減少泡沫細胞的形成, 可能尚有其他未知的機制有待釐清。

三、蓮蓬萃取物 (LSE) 抑制泡沫細胞生成及細胞內脂質堆積

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斑。巨噬細胞會受 ox-LDL 的刺激下, 大量表達清除者接受器 (scavenger receptors, SRs) 而將 ox-LDL 吞噬至細胞內, 因此抑制泡沫細胞之生成, 可視為降低動脈粥狀硬化發生關鍵指標。

3.1. 細胞毒性試驗

首先觀察 J774A.1 巨噬細胞對於 LSE 之敏感度為何, 以決定後續細胞試驗所須之萃取物劑量。由 Fig. 3A 中之結果可以得知, LSE 對於要造成巨噬細胞之致死毒性所需之劑量相當大 ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$), 因此後續實驗選用 LSE 無毒性劑量 10-50 $\mu\text{g/ml}$ 。

3.2. 泡沫細胞生成試驗

在試管試驗中, 我們已然可以得知 LSE 可有效地預防 LDL 的氧化, 避免進一步造成 ox-LDL 的堆積, 減少巨噬細胞吞噬後形成泡沫細胞的機會。接著我們再以 J774A.1 巨噬細胞處理先氧化好之 ox-LDL, 觀察是否能夠成功誘導泡沫細胞之生成。由 Fig. 3B 中可以明顯觀察到在細胞內部有呈現大量的由 oilred O 染劑所染上之中性脂肪堆積的現象, 相較於正常組中, 卻不見任何的紅色顆粒堆積, 可知我們成功地誘導泡沫細胞之形成。然而在 ox-LDL 刺激下, 細胞同時處理不同濃度之 LSE 後, 光學顯微鏡下觀察到巨噬細胞內所堆積的紅色顆粒之銳減 (Fig. 3B)。由結果推知, 在處理 LSE 10-50 $\mu\text{g/ml}$ 下, 有效降低泡沫細胞生成之作用。實驗進一步將驗證 LSE 是否透過調控 LDL 代謝的方式, 以減少泡沫細胞生成。

3.3. 細胞脂質含量分析

在 ox-LDL 誘導下會刺激巨噬細胞過量吞噬 ox-LDL, 使得細胞內大量堆積原先存在於 LDL 當中的膽固醇與三酸甘油酯, 因而形成充滿脂質的泡沫細胞。在給予不同濃度之 LSE 後, 觀察細胞內脂質含量之變化。由結果得知, 在 ox-LDL 的誘導之下, 細胞內的總膽固醇 (total cholesterol, TC) 和膽固醇酯 (cholesterol ester, CE) 含量各增加約 2 倍和 2.7 倍; 而在有 LSE 的保護下, 有效地降低了細胞對 TC 和 CE 的過量攝取 (Fig. 3C)。相同的效果也出現在細胞內的三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 變化上, ox-LDL 誘導 J774A.1 細胞內的 TG 增加至將近正常組的 1.4 倍, 而在 LSE 的處理下, 同樣也抑制了細胞對於三酸甘油酯的過量攝取, 在 LSE 50 $\mu\text{g/ml}$ 作用下, 即回復到與正常組差不多的現象 (Fig. 3D)。如此說明 LSE 能夠有效地抑制細胞過量攝取脂質, 進而降低泡沫細胞形成之機會。

3.4. 泡沫細胞生成之機制探討

3.4.1. 巨噬細胞 uptake oxLDL 之作用

巨噬細胞利用清除者接受器 SRs 辨識 ox-LDL，並經內飲作用將 ox-LDL 吞噬入細胞內。SRs 是一群家族蛋白，為一種嵌入型的膜蛋白，被發現其與修飾型低密度脂蛋白（如 ox-LDL、乙醯化低密度脂蛋白 ac-LDL）有很專一的鍵結能力。這些 SRs 中，巨噬細胞主要利用來辨識 ox-LDL 的 SRs 被證實為 type A SR (SR-A) 或 type B SR (SR-B 或稱為 CD36)。CD36 於細胞內的表達機制已被證實是由核內轉錄因子 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) 所調控，PPAR γ 的配位體 (ligands) 如 BRL (rosiglitazone)、TZD (thiazolidinedione) 及 ox-LDL 均會促使 CD36 的表達。因此，以 Western blotting 分析在 ox-LDL 誘導的情況下，同時伴隨有 LSE 處理的 J774.1 細胞中 CD36、SR-A 及 PPAR γ 蛋白表現之情形。結果發現在 ox-LDL 刺激之下，CD36 和 PPAR γ 的蛋白表現增加；SR-A 的表現不受影響。但在同時處理 LSE (10-50 μ g/ml) 的組別中 CD36 和 PPAR γ 的蛋白表現明顯下降許多，說明 LSE 可能透過調控 PPAR γ 的表現，進而影響 CD36 之表達 (Fig. 4A, line 1-3)。

3.4.2. 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)」。「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 (ATP-binding cassette protein)。ABCA1 是一個運輸蛋白，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 γ -LXR 的分子機制調控其表達。基於此理論若 LSE 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。上述結果透過 Western blotting 證實：ox-LDL 似乎些許促進 LXR α 和 ABCA1 蛋白表現；然而 LSE 可以顯著增加兩者蛋白表現之趨勢。說明 LSE 也可能藉由 LXR α -ABCA1 分子機制，以促進膽固醇反向運輸 (Fig. 4A, line 4-5)。LXR α 和 ABCA1 mRNA 表現也得到同樣的結果顯示於 Fig. 4B。

四、蓮蓬萃取物 (LSE) 對於高膽固醇飲食誘導兔子動脈硬化之影響

4.1. 血脂質測定

我們利用高膽固醇飲食誘導兔子 25 週後，誘導組之血清 TC 較正常組上升約 16 倍，但再額外給予 LSE 之組別，0.5% LSE 組與誘導組相較之下，降低約 22.8%；1.0% LSE 則降低了 32.2%，且都有統計上的意義。在 TG 方面，正常組為 48.67 ± 12.86 mg/dL，在經由高膽固醇飲食誘導下，誘導組相較正常組上升 1.9 倍，上升至 94.33 ± 20.98 mg/dL；而分析給予 LSE 之組別，在 0.5% LSE 的給予下，兔子血中 TG 為 78.63 ± 26.78 mg/dL，當劑量提升為 1.0% 之 LSE 後，試驗組之 TG 則為 55.25 ± 12.57 mg/dL，與誘導組相較之下皆有下降的趨勢。0.5% LSE 約有抑制血脂上升 34.4%；而 1.0% LSE 抑制力為 86%。同樣在 LDL-C 項目，0.5% 和 1.0% LSE 試驗組有類似的抑制作用。但是在針對 HDL-C 方面，正常組為 21.39 ± 7.50 mg/dL，在經由膽固醇飲食誘導下，上升至 88.04 ± 10.65 mg/dL；而在給予 LSE 的組別，0.5% LSE 的血中 HDL-C 為 94.63 ± 17.61 mg/dL，並無統計上的意義。當劑量提升為 1.0% 之 LSE 的血中 HDL-C 為 170.83 ± 49.82 mg/dL，則具有明顯增加之效果。進一步分析危險因子方面，正常組 LDL-C/HDL-C 的比值為 1.49，誘導組 LDL-C/HDL-C 的比值為 7.76，試驗組 LDL-C/HDL-C 的比值在 0.5% 及 1.0% LSE 中分別為 6.68 及 4.72，與誘導組相較之下也皆有下降的趨勢 (Table 2)。另外，在正常飲食之下給予的 1.0% LSE 作為毒性組，分析其所有的血脂測定數值皆與正常組相似，顯示 LSE 無毒性之虞。

4.2. 動脈硬化斑分析

在高膽固醇所誘導的兔子產生動脈硬化症上，我們選取兔子的胸動脈進行動脈硬化斑分析。發現在主動脈內層的表面，正常組及毒性組的動物並沒有發現 atherosclerosis lesion 的產生。而在膽固

醇的誘導組則發現有明顯的脂肪斑沉積；而在飼料中給予 LSE 0.5%和 1.0%後，胸動脈內層的脂肪斑則明顯下降，具有抑制病程發展之作用(Fig. 5)。由此可知，活體試驗中 LSE 確實可以減少動脈硬化斑沉積，並可以有效的延緩動脈粥狀硬化的發展。

4.3. 病理切片觀察

接著我們選取試驗動物的主動脈弓部分進行病理切片分析，觀察泡沫細胞的分佈、病兆上平滑肌細胞及組織微觀之變化。在病理分析下，正常組的血管壁中，並沒有發現有泡沫細胞的形成，也沒有發現血管平滑肌細胞的位移。在誘導組方面，我們發現其病理切片上有明顯的泡沫細胞堆積，且動脈內層的厚度也有變厚並發現有血管平滑肌細胞位移的現象；而給予LSE之組別，其主動脈內層之厚度明顯低於誘導組，高劑量之1.0% LSE組別回復到與正常組相當(Fig. 6A)。此外，主動脈弓部分也進行免疫組織染色分析，偵測組織當中巨噬細胞CD68的表現。在免疫染色技術中顯示：在正常組的血管壁中並沒有發現有此特異性蛋白的表現。在誘導組方面，我們發現其有明顯的 anti-CD68 特異性染色呈現，且動脈內層的厚度也有變厚(Fig. 6B)，以此可推論有巨噬細胞吞噬 ox-LDL 的現象；LSE 組別則具有抑制作用，此結果可做為細胞實驗之對照。

五、總結

首先，以銅離子誘導 LDL 氧化的模式進行體外抗氧化試驗結果證實：LSE 具有抑制 LDL 氧化的能力，此外也具有清除 DPPH 自由基的作用。而在細胞實驗方面，LSE 可引發由 ox-LDL 誘導巨噬 J774A.1 細胞轉型的泡沫細胞形成以及有效地減低細胞內三酸甘油脂和膽固醇的含量，並釐清其作用機轉。進一步利用高膽固醇飲食誘導紐西蘭白兔產生動脈粥狀硬化病變之動物模式，體內試驗結果顯示動物血清中總膽固醇、三酸甘油酯及 LDL-C 會因同時餵食 LSE 而降低，其動脈粥狀硬化的損傷面積也比誘導組兔子減少許多。選取試驗動物的主動脈弓部分進行免疫組織染色分析 anti-68 觀察巨噬細胞吞噬 ox-LDL 之表現，驗證在細胞實驗得到的結果。由以上實驗結果顯示，LSEE 具有極佳的抗氧化活性並能抑制 LDL 氧化作用，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過程中(Fig. 7)。

§ 參考文獻

1. Steinberg, D. and Witztum, J. L. Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *Jama*, 264: 3047-3052, 1990.
2. 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., Edwards, P. A., and Fogelman, A. M. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16: 831-842, 1996.
3. Glass, C. K. and Witztum, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 104: 503-516, 2001.
4. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115-126, 1999.
5. Heinecke, J. W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis*, 141: 1-15, 1998.
6. Harats, D., Shaish, A., George, J., Mulkins, M., Kurihara, H., Levkovitz, H., and Sigal, E. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 2100-2105, 2000.
7. Hsieh, C. C., Yen, M. H., Yen, C. H., and Lau, Y. T. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 49: 135-145, 2001.
8. Cybulsky, M. I. and Gimbrone, M. A., Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 251: 788-791, 1991.
9. Dong, Z. M., Chapman, S. M., Brown, A. A., Frenette, P. S., Hynes, R. O., and Wagner, D. D. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 102: 145-152, 1998.
10. 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., Lusis, A. J., and Rajavashisth, T. B. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol*, 150: 1687-1699, 1997.
11. Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T., and Kodama, T. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 54: 628-640, 1998.
12. Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Kodama, T., and et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386: 292-296, 1997.
13. Colles, S. M., Irwin, K. C., and Chisolm, G. M. Roles of multiple oxidized LDL lipids in cellular injury:

- dominance of 7 beta-hydroperoxycholesterol. *J Lipid Res*, 37: 2018-2028, 1996.
14. Kashiwada Y, Aoshima A, Ikeshiro Y, Chen YP, Furukawa H, Itoigawa M, Fujioka T, Mihashi K, Cosentino LM, Morris-Natschke SL, Lee KH. Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorg Med Chem*. 13, 443-8, 2005.
 15. Ishida H, Umino T, Tsuji K, Kosuge T. Studies on the antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VIII. On the antihemorrhagic principle in nelumbins receptaculum. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 36, 4585-7, 1988.
 16. Rai S, Wahile A, Mukherjee K, Saha BP, Mukherjee PK. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *J Ethnopharmacol*. 104, 322-7, 2006.
 17. Duan Y, Zhang H, Xie B, Yan Y, Li J, Xu F, Qin Y. Whole body radioprotective activity of an acetone-water extract from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. seedpod. *Food Chem Toxicol*. 48, 3374-84, 2010.
 18. Liu CP, Tsai WJ, Lin YL, Liao JF, Chen CF, Kuo YC. The extracts from *Nelumbo Nucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci*. 75, 699-716, 2004.
 19. Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol*. 106, 238-244, 2006.
 20. Lin MC, Kao SH, Chung PJ, Chan KC, Yang MY, Wang CJ. Improvement for high fat diet-induced hepatic injuries and oxidative stress by flavonoid-enriched extract from *Nelumbo nucifera* leaf. *J Agric Food Chem*. 57, 5925-32, 2009.
 21. Lee HJ, Chen CC, Wang CJ. Water extracts from *Neulumbo nucifera* leaf reduced plasma lipids and atherosclerosis in cholesterol fed rabbits. *J Food Biochem*. In Press, 2009.
 22. Ho HH, Hsu LS, Chan KC, Chen HM, Wu CH, Wang CJ. Extract from the leaf of *nucifera* reduced the development of atherosclerosis via inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Food Chem Toxicol*. 48, 159-68, 2010.
 23. Ling ZQ, Xie BJ, Yang EL. Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J Agric Food Chem*. 53, 2441-5, 2005.
 24. Gong Y, Liu L, Xie B, Liao Y, Yang E, Sun Z. Ameliorative effects of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive deficits and oxidative damage in senescence-accelerated mice. *Behav Brain Res*. 194, 100-7, 2008.
 25. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Zhang L, Wu H, Yao P, Zhang Y, Liu L. Procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorate scopolamine-induced memory impairment in mice. *Phytother Res*. 23, 1742-7, 2009.
 26. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Zhang L, Wu H, Yao P, Zhang X, Zhang Y, Liu L. Rejuvenation of antioxidant and cholinergic systems contributes to the effect of procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorating memory impairment in cognitively impaired aged rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 19, 851-60, 2009.
 27. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Zhang L, Wu H, Yao P, Hao L, Liu L. Procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorate age-related antioxidant deficit in aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 65, 236-41, 2010.
 28. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Deng Q, Wu H, Bao W, Wang D, Yao P, Huang F, Liu L. Memory impairment in cognitively impaired aged rats associated with decreased hippocampal CREB phosphorylation: reversal by procyanidins extracted from the lotus seedpod. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 65, 933-40, 2010.
 29. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Deng Q, Bao W, Wang D, Yao P, Huang F, Liu L. Changes in the nitric oxide system contribute to effect of procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorating memory impairment in cognitively impaired aged rats. *Rejuvenation Res*. 14, 33-43, 2011.
 30. Duan Y, Zhang H, Xie B, Yan Y, Li J, Xu F, Qin Y. Whole body radioprotective activity of an acetone-water extract from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. seedpod. *Food Chem Toxicol*. 48, 3374-84, 2010.
 31. Duan Y, Zhang H, Xu F, Xie B, Yang X, Wang Y, Yan Y. Inhibition effect of procyanidins from lotus seedpod on mouse B16 melanoma in vivo and in vitro. *Food Chem*. 122, 84-91, 2010.
 32. Rankin SM, De Whalley CV, Hoult RS, Jessup W, Wilkins GM, Collard T, Leake DS. The modification of low density lipoprotein by the flavonoids muricetin and gossypetin. *Biochem Pharmacol*. 45, 67-75, 1993.
 33. De Whalley CV, Rankin SM, Hoult JR, Jessup W, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol*. 39, 1743-50, 1990.
 34. Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R. Comparison of redmwine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin Sci (Lond)*. 103 Suppl 48, 72S-5S, 2002.
 35. Hofmann CS, Sonenshein GE. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate induces apoptosis of proliferating vascular smooth muscle cells via activation of p53. *Faseb J*. 17,702-4, 2003.
 36. Nie L, Wise ML, Peterson DM, Meydani M. Avenanthramide, a polyphenol from oats, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and enhances nitric oxide production. *Atherosclerosis* 186, 260-6, 2006.
 37. Tuo QH, Wang C, Yan FX, Liao DF. MAPK pathway mediates the protective effects of onychin on oxidative stress-induced apoptosis in ECV304 endothelial cells. *Life Sci*. 76, 487-97, 2004.
 38. Ward MR, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Jennings G, Bobik A. Inhibition of protein tyrosine kinases attenuates increases in expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors following arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17, 2461-70, 1997.
 39. Shimokado K, Yokota T, Umezawa K, Sasaguri T, Ogata J. Protein tyrosine kinase inhibitors inhibit chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 14, 973-81, 1994.
 40. Kelloff GJ, Sigman CC, Greenwald P. Cancer prevention: progress and promise. *Eur J Cancer* 35, 2031-8, 1999.

Fig. 1

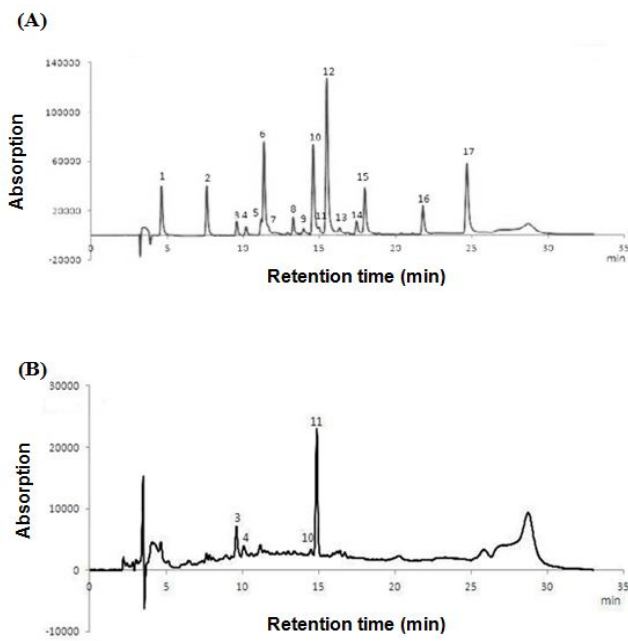


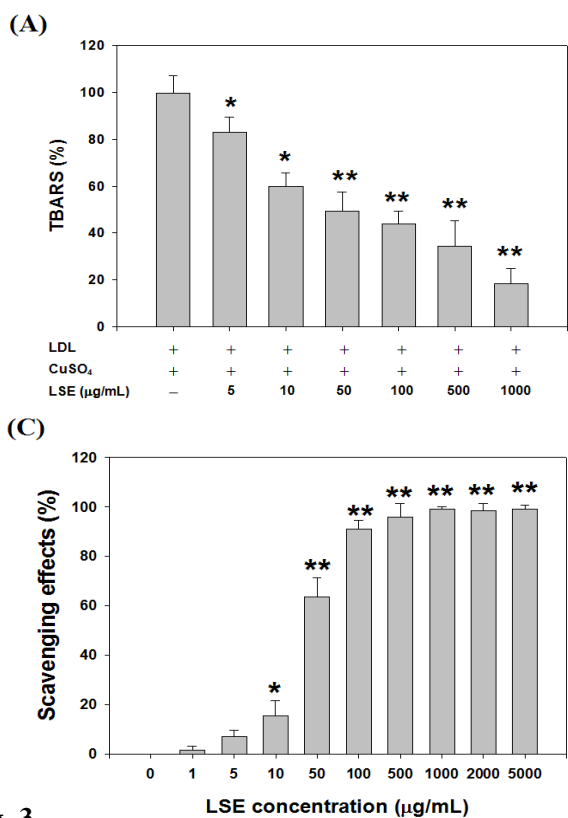
Table 1 – Composition of the LSE

Polyphenolic compound	Peak no. ^a	LSE (%)
Catechin	3	4.6 ± 1.8
Procyanidin B2	4	3.4 ± 0.7
p-coumaric acid	10	2.8 ± 0.5
EGC	11	12.5 ± 1.2
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)		29.6 ± 9.0
Total flavonoid (Jia method)		85.7 ± 3.2
Total anthocyanin (Fuleki and Francis method)		6.3 ± 2.8

^a Phenolic compounds correspond to peaks as in HPLC chromatogram of 12 kinds of standard polyphenols.

Fig. 1. The chromatogram of the identification of the active compounds in LSE after 33 min using HPLC technique, X axis represents retention time (min), Y axis represents absorption. (A) HPLC chromatogram of 17 kinds of standard polyphenols (10 mg/mL; 10 µl). Peaks: 1. GA, 2. PCA, 3. catechin, 4. procyanidin B2, 5. epicatechin, 6. caffeic acid, 7. EGCG 8. EA, 9. rutin, 10. p-Coumaric acid, 11. EGC, 12. FA, 13. ECG, 14. gossypin, 15. gossypetin, 16. quercetin, and 17. naringenin. (B) HPLC chromatograms of free polyphenols from LSE (5 mg/mL; 10 µl). Phenolic compounds correspond to peaks 3, 4, 10 and 11 as in (A). Detector was set at 285 and 345 nm.

Fig. 2



(B)

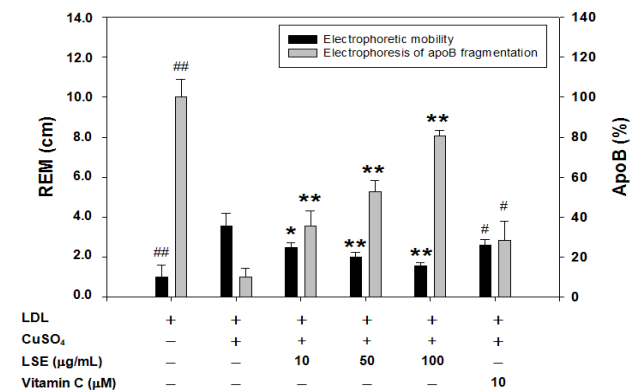


Fig. 3

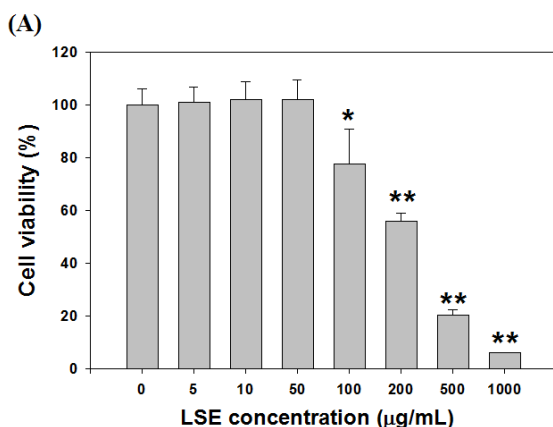


Fig. 2. Effect of LSE on DPPH scavenging, and the Cu²⁺-induced lipid peroxidation and oxidation of LDL. (A, B) LDL was incubated with 10 µM CuSO₄ at 37°C for 24 h in the presence or absence of different concentrations of LSE. After the incubation, lipid peroxidation (A), electrophoretic mobility (left panel, B), and apoB fragmentation (right panel, B) of the LDL were measured. The lipid peroxidation of LDL was assessed by measuring the TBARS. TBARS activity was expressed using concentration (%) of the ox-LDL-treated group) of MDA, as lipid peroxidation indicator. The change in REM (cm) was determined to evaluate the extent of LDL oxidation by agarose gel electrophoresis. The formation of ox-LDL was further confirmed by the apoB fragmentation. Vitamin C (Vit. C, 0.2 mg/mL)-treated group was used as a suitable positive control. The quantitative data are presented as means ± SD of three repeats from one independent study. #p < 0.01 compared with the LDL-treated group. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the ox-LDL-treated group. (C) DPPH was incubated with different concentrations of LSE (0-5000 µg/mL). The result represents the average of three independent experiments ± SD. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control.

Fig. 3. Inhibitory effect of LSE on the ox-LDL-induced foam cell formation and intracellular lipid accumulation. (A) J774A.1 cells were treated with various concentrations (0-1000µg/mL) of LSE for 24 h. Cell viability was analyzed by MTT assay. The results represent the average of three independent experiments ± SD. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control. (continue)

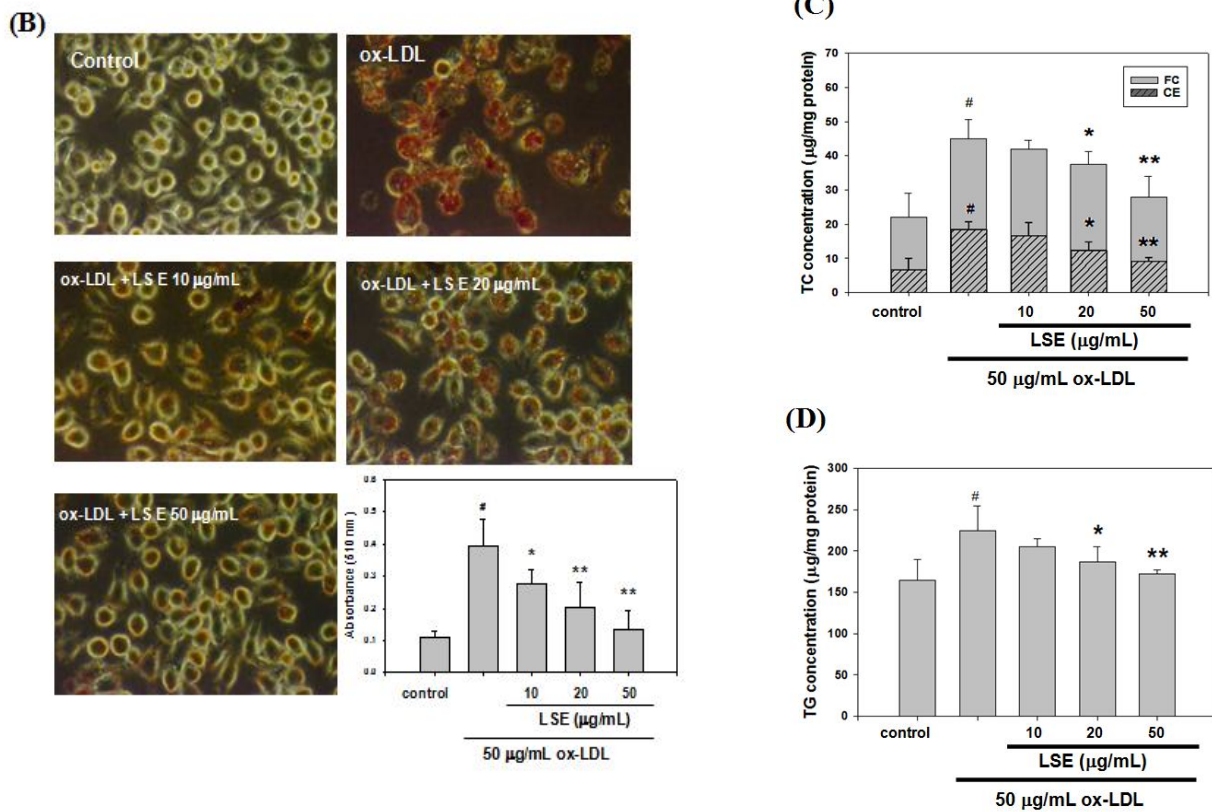


Fig. 3. (B-D) J774A.1 cells were treated with 50 µg/mL of ox-LDL in the presence or absence of different concentrations of LSE (10, 20 and 50 µg/mL) for 24 h. **(B)** After the incubation, the cells were stained with Oil Red O and then observed under the microscope (200×). The red droplets accumulated in the cells were indicated as the stained lipid. Adding 1 mL of isopropanol to the stained culture dish, the extracted dye was diluted 5× in ddH₂O, and then its absorbance was monitored at 510 nm. Total intracellular cholesterol (TC), free cholesterol (FC) **(C)** and triglyceride (TG) **(D)** contents of the extracts were measured using enzymatic colorimetric method and expressed as µg/mg protein. The mass of cholesterol ester (CE) was calculated by subtracting FC from TC (FC plus CE). #*p* < 0.01 compared with the LDL-treated group (control). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared with the ox-LDL-treated group.

Fig. 4

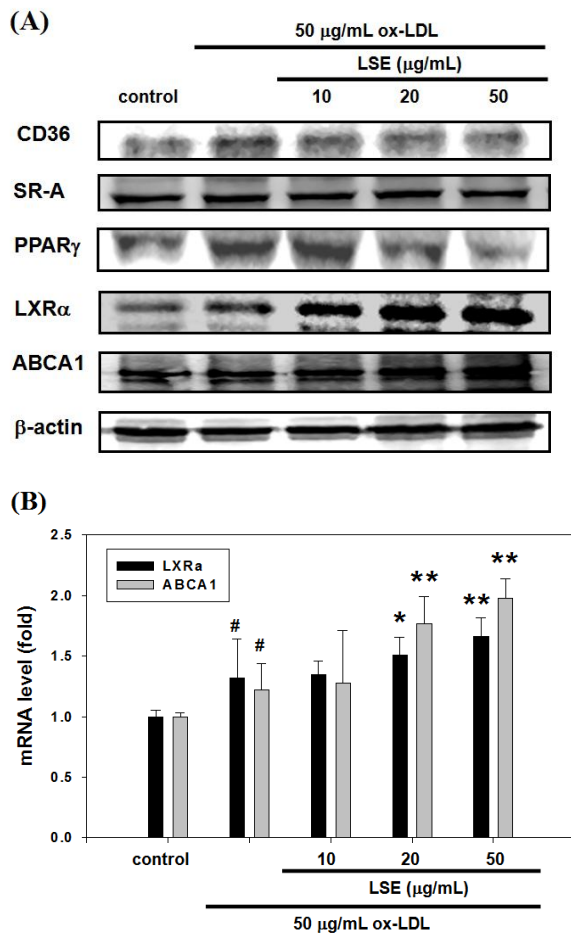


Fig. 4. Effect of LSE on the expressions of macrophage scavenger receptors and LXRα/ABCA1 pathway in ox-LDL-treated J774A.1 cells. **(A)** Total cell lysates (50 µg) of J774A.1 cells treated with 50 µg/mL of ox-LDL in the presence or absence of different concentrations of LSE (10, 20 and 50 µg/mL) for 24 h were analyzed by SDS-PAGE and, subsequently, immunoblotted with antibodies against CD36, SR-A, PPARγ, LXRα, ABCA1, and β-actin that served as an internal control. **(B)** Real-time PCR analysis of mRNA expression LXRα and ABCA1 in the cells treated with ox-LDL in the presence or absence of different concentrations of LSE and harvested at 24 h. The quantitative data are presented as means ± SD of three repeats from one independent study. #*p* < 0.01 compared with the LDL-treated group (control). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared with the ox-LDL-treated group.

Table 2. Effects of LSE on the serum biochemical parameters of rabbits induced by a high-cholesterol diet^a

variable ^b	Control group	HCD group	HCD + LSE 0.5% group	HCD + LSE 1.0% group	LSE 1.0% group	HCD + Vit. E group
Cholesterol (mg/dL)	54.45 ± 23.06	912.34 ± 99.60 ^c	717.00 ± 84.58 ^d	636.50 ± 63.74 ^e	63.77 ± 26.75	776.5 ± 69.41 ^d
Triglycerides (mg/dL)	48.67 ± 12.86	94.33 ± 20.98 ^c	78.63 ± 26.78 ^d	55.25 ± 12.57 ^e	68.96 ± 20.48	81.33 ± 36.40
LDL-c (mg/dL)	28.69 ± 11.18	747.91 ± 83.50 ^c	610.03 ± 81.08 ^d	473.67 ± 46.07 ^e	39.50 ± 11.56	392.58 ± 94.65 ^e
HDL-c (mg/dL)	21.39 ± 7.50	88.04 ± 10.65	93.64 ± 17.61	170.83 ± 49.82 ^d	27.80 ± 5.90	96.64 ± 31.70 ^d
LDL-c/HDL-c	1.49 ± 0.66	7.76 ± 2.50 ^c	6.68 ± 1.96 ^d	4.72 ± 1.01 ^e	1.22 ± 0.63	6.40 ± 1.28 ^d
GOT (U/L)	40.77 ± 9.29	73.60 ± 25.59 ^c	68.09 ± 22.04	58.67 ± 19.31 ^d	48.22 ± 18.39	86.65 ± 36.78
GPT (U/L)	45.75 ± 11.85	67.38 ± 16.63	53.50 ± 16.22	39.96 ± 14.90 ^d	52.50 ± 25.95	57.05 ± 20.61
BUN (mg/dL)	18.47 ± 3.43	21.50 ± 5.81	19.70 ± 2.31	22.33 ± 4.77	15.87 ± 2.47	22.55 ± 2.195
CRE (mg/dL)	1.63 ± 0.06	1.50 ± 0.26	1.604 ± 0.20	1.63 ± 0.35	1.50 ± 0.12	1.50 ± 0.10

^aEach value is expressed as the mean ± SD (n = 6/group). Duration of the experiment = 25 weeks. Results were statistically analyzed with Student's t test. ^bLDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine. ^cp < 0.05 compared with the control group. ^dp < 0.05 compared with the HCD group. ^ep < 0.01 compared with the HCD group.

Fig. 5

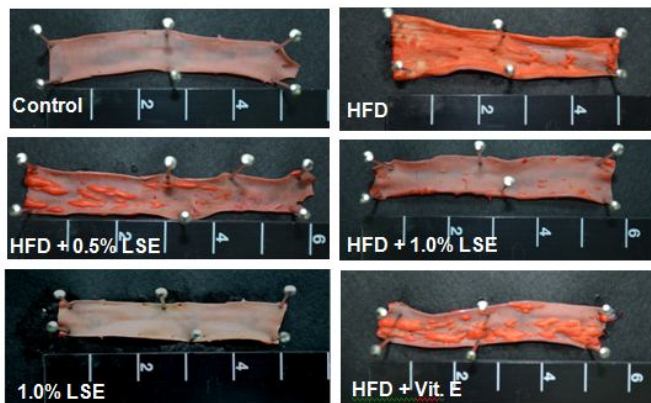


Fig. 5. Extent of the development of atherosclerosis lesions and densitometric analysis of the relative area of atherostic lesion in the thoracic aorta after high cholesterol feeding with the experimental diet in the presence or absence of different concentrations of LSE (0.5% and 1.0%), or Vit. E.

Fig. 6

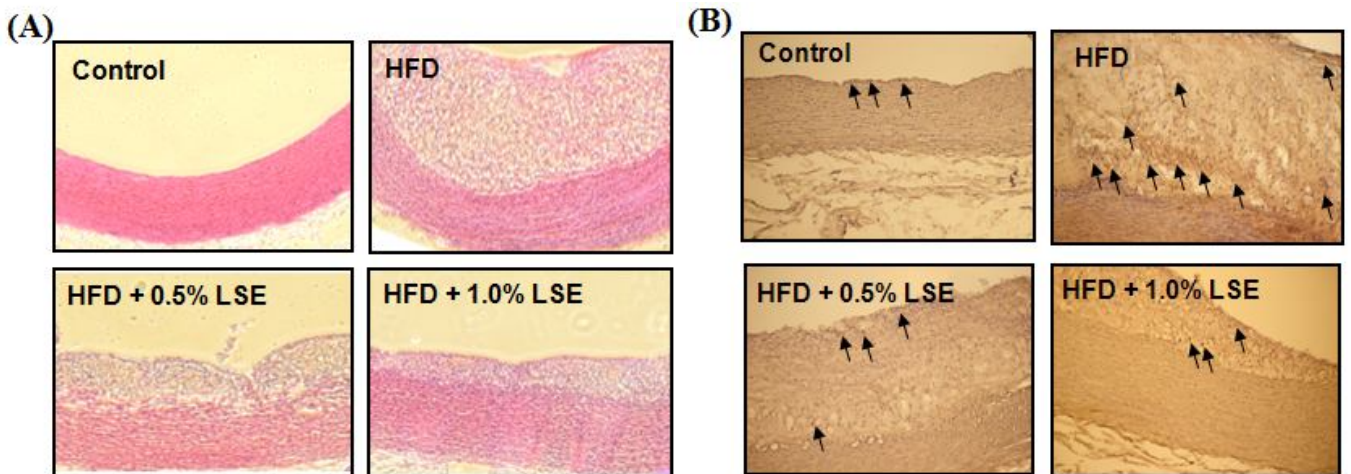


Fig. 6. Histological photomicrographs of aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with HCD. **(A)** The aortic segment of normal control group which was no lesion on luminal surface of aortic arch (H&E stain), HCD-fed group which was high subintimal deposits of foam cells and extracellular lipids showing the extension and thickness of the aortic arch, HCD + 0.5% LSE group which was subintimal deposits of foam cells which have a moderated extension with a medium thickness of thoracic aorta, and HCD + 1.0% LSE group which was development of fatty streak in the intimal of abdominal aortoiliac bifurcation. **(B)** Immunohistochemistry for CD68 reveal the specific binding of ox-LDL with macrophage in the aortic segments from atherosclerotic rabbit fed with HCD. The aortic segment of normal control group which was no lesion on luminal surface of aortic arch, HCD-induced group which was high subintimal deposits of foam cells and extracellular lipids showing the aortic arch, HCD + LSE 0.5% group which was subintimal deposits of foam cells which have a few CD68 positive cells in thoracic aorta, and HCD + LSE 1% group which was subintimal deposits of foam cells which have a few CD68 positive cells in thoracic aorta. (100×).

Fig. 7

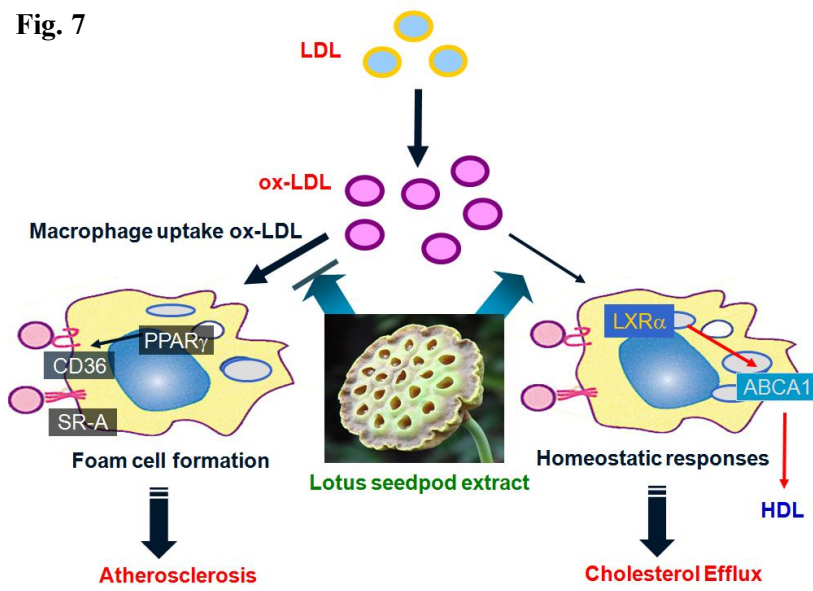


Fig. 7. Schematic representation of the anti-atherosclerotic mechanism of lotus seedpod extract (LSE). The results of the present study revealed the following scheme for the major mechanism of ox-LDL-induced the macrophage uptake of ox-LDL and formation of foam cells, which is attributed by the expressions of CD36 and SR-A, and PPAR γ activation (left pathway). On the other hand, few macrophages also make homeostasis response to ox-LDL (right pathway). Ox-LDL homeostasis regulates the expression of LXR α /ABCA1 signaling pathway, contributing positively to cholesterol efflux in these macrophages. LSE functions against ox-LDL through LXR α /ABCA1 activation and/or PPAR γ /CD36 depression, which in turn led to stimulation of cholesterol removal from macrophages and delay atherosclerosis.

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得 申請中 無

技轉：已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

Jing-Hsien Chen, and Hui-Hsuan Lin*. Anti-atherosclerotic potential of lotus seedpod extract via inhibiting LDL oxidation and foam cell formation. Food Chemistry. Prepared, 2013. **[SCI] [Impact factor: 3.334; Ranking: 10/124]** (NSC 101-2313-B-040 -003)

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

- (1) 本計畫之研究之成果確認蓮蓬萃取物成份具有降血脂、抑制LDL氧化、以及抑制泡沫細胞生成等功效，將提供臨床患者新的治療方向。
- (2) 本研究計畫已順利達成預定目標，不僅可以有效地充分利用天然的萃取物及其成分可以抑制心血管病變之作用及相關機轉，而且，可以更深入地瞭解造成人類血管動脈粥狀硬化病變的原因、過程和機制，對心血管疾病的預防和控制具有重要的貢獻。
- (3) 本計畫除功能性研究外，同時也可做蓮蓬萃取物對於兔子之動物毒理評估。
- (4) 本研究也建立ox-LDL促進泡沫細胞生成及細胞內脂質堆積之作用，作為探討動脈粥狀硬化之致病成因模式，可應用為將來發展預防心血管疾病保健食品開發之研究，在學術研究上有貢獻。
- (5) 研究之成果可推廣台灣本土作物—蓮蓬為可食用之資源，提升植物蓮農業作物的經濟效益，符合現今節能減碳之概念。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/10/28

國科會補助計畫	計畫名稱: 蓮蓬萃取物成份抑制血管病變作用及分子機制之研究
	計畫主持人: 林慧瑩
	計畫編號: 101-2313-B-040-003- 學門領域: 食品及農化
無研發成果推廣資料	

101 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：林慧瑩		計畫編號：101-2313-B-040-003-					
計畫名稱：蓮蓬萃取物成份抑制血管病變作用及分子機制之研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	3	3	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

論文：Jing-Hsien Chen, and Hui-Hsuan Lin*. Anti-atherosclerotic potential of lotus seedpod extract via inhibiting LDL oxidation and foam cell formation. Food Chemistry. Prepared, 2013. [SCI] [Impact factor: 3.334; Ranking: 10/124] (NSC 101-2313-B-040-003)

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

(1) 本計畫之研究之成果確認蓮蓬萃取物成份具有降血脂、抑制 LDL 氧化、以及抑制泡沫細

胞生成等功效，將提供臨床患者新的治療方向。

(2) 本研究計畫已順利達成預定目標，不僅可以有效地充分利用天然的萃取物及其成分可以

抑制心血管病變之作用及相關機轉，而且，可以更深入地瞭解造成人類血管動脈粥狀硬

化病變的原因、過程和機制，對心血管疾病的預防和控制具有重要的貢獻。

(3) 本計畫除功能性研究外，同時也可做蓮蓬萃取物對於兔子之動物毒理評估。

(4) 本研究也建立 ox-LDL 促進泡沫細胞生成及細胞內脂質堆積之作用，作為探討動脈粥狀

硬化之致病成因模式，可應用為將來發展預防心血管疾病保健食品開發之研究，在學術

研究上有貢獻。

(5) 研究之成果可推廣台灣本土作物—蓮蓬為可食用之資源，提升植物蓮農業作物的經

濟效

益，符合現今節能減碳之概念。