



91M02342 (96 .P)

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**

洛神花花青素萃取物抗氧化型低密度脂蛋白所引發
動脈粥狀硬化的機轉

**Hibiscus Anthocyanins inhibits oxLDL-mediated
macrophage apoptosis and CD36 expression**

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

研究生：黃安中 撰 (An-Chung Huang)

中華民國九十二年七月

本論文為中山醫學大學授予學位之必備條件之一，經中山醫學大學醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

臺大醫學院生物化學研究所教授

林仁混

林仁混

中山醫學大學應用化學系教授

曾翠華

曾翠華

中山醫學大學生物化學研究所教授
(論文指導教授)

王朝鐘

王朝鐘

中華民國九十二年六月

學生黃安中論文題目為「洛神花花青素萃
取物抗氧化型低密度脂蛋白所引發動脈粥
狀硬化的機轉」，其論文已經中山醫學大學
醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員
會審查合格及口試通過，並由其指導教授核
閱後無誤。

指導教授： 王朝鐘

簽名：王朝鐘

中華民國九十二年六月

誌 謝

本論文承蒙指導教授王朝鐘老師的悉心指導，謹致最深摯的感謝。

在論文完成過程中，承蒙台大生化所林仁混教授及本所曾翠華教授等提供寶貴的意見，使本論文更臻於完善，不勝感激。

在這段研究生活中，感謝周芬碧老師、妙真老師和滄澤學長在學業的實驗設計及技術的細心指導，同時感謝璟賢學長、順發學長、大綱、惠美、佳紋、雲菁學姊和逸憲學長，以及學妹慧萱和學弟孟元，於實驗及課業的討論與幫忙。也謝謝協勳、淑萍、建池和宥佐不斷地鼓勵，緩和了緊張的心情。另外深深感謝好友們：思綺、怡君、瓊雪、宥芳、靜芬和國智，在我沮喪時給我打氣。

特別要感謝父母與家人的支持與鼓勵，僅將此論文獻給所有幫助我與關愛我的人。

目錄

壹、中文摘要.....	2
貳、英文摘要.....	4
參、緒論.....	5
一、洛神花之背景介紹.....	5
二、花青素之背景介紹.....	7
三、動脈粥狀硬化 (atherosclerosis)	8
肆、研究動機.....	15
伍、研究架構.....	17
陸、實驗方法.....	18
柒、實驗藥品與器材.....	31
捌、結果.....	35
一、洛神花花青素之分離與鑑定.....	35
二、洛神花花青素萃取物抑制體外誘發 LDL 氧化之作用.....	36
三、洛神花花青素萃取物調控 oxLDL 對巨噬細胞的作用影響.....	39
四、洛神花花青素萃取物調控 oxLDL 所引發動脈粥狀硬化的機轉.....	42
玖、討論.....	45
一、洛神花花青素之分離.....	45
二、洛神花花青素萃取物抑制 LDL 氧化之作用.....	46
三、洛神花花青素萃取物調控 oxLDL 對巨噬細胞的作用影響.....	47
四、洛神花花青素萃取物調控 oxLDL 所引發動脈粥狀硬化的機轉.....	48
拾、實驗結果圖表.....	51
拾壹、參考附圖.....	71
拾貳、參考文獻.....	80
拾參、附錄.....	88

壹、中文摘要

近年來，科學家在追尋抗氧化、抗衰老的過程中，發現在一些高等植物中所含之多酚化合物，具有抗氧化作用，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。本研究之目的為評估由洛神花所分離的花青素萃取物：HAs，其抗 LDL 氧化及抗動脈粥狀硬化之作用效果，而進行體外抗氧化實驗與細胞實驗來驗證。

本實驗以乾燥洛神花為材料，以調酸的甲醇溶劑萃取其花青素，發現甲醇萃取率為 5%；純度測定約有 85~95%，另以 HPLC 分析後發現其花青素主要分為兩類，推測分別為 delphinidin 系及 cyanidin 系，其花青素含量分別為 3.7% 及 0.9%。

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 的生成量減少的結果發現，花青素萃取物具有抑制 LDL 氧化的能力，此外也具有清除 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基的作用。而在細胞實驗方面，花青素萃取物具有保護巨噬細胞不受因 LDL 氧化作用而死亡；而在給予低濃度的花青素萃取物時，會使 OxLDL 所引起的 CD36 表現有下降的情形，進

而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。

由上述體外抗氧化實驗與細胞實驗結果顯示，花青素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，我們認為花青素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

Recent investigations highlight the antioxidant components of plant that may decreased the risk of inflammatory diseases and certain forms of cancer. 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.

The major material of this experiment is anthocyanins which was extracted from dried *Hibiscus sabdariffa* L. by the acidic methanol. We found that only 5% anthocyanins could be extracted by acidic methanol as well as the purity could reach 85 to 90%. Two categories of anthocyanins were identified by the HPLC analysis. One is delphinidin that takes 3.7% of anthocyanins extraction, and the other one is cyanidin which holds 0.9% of anthocyanins extraction.

As shown in previous studies *Hibiscus sabdariffa* L. is a nature plant containing a lot of pigments that was found to possess antioxidative activity. In this study, we evaluated the antioxidative activity of the *Hibiscus* anthocyanins (HAs) by measuring their effects on LDL oxidation (in vitro) and anti-atherosclerotic abilities. The antioxidative activity of the extracts on LDL oxidation was defined by Apo B fragmentation, relative electrophoretic mobility (REM) and thiobarbituric acid-relative substances (TBARS) assay. Our results showed that HAs were able to inhibit the Apo B fragmentation, REM and TBARS assay in the Cu^{2+} -mediated oxidative LDL. HAs also possessed the ability of DPPH radical scavenging. Taken together, HAs showed strong potency to inhibit the LDL oxidation induced by copper. When given low concentration of HAs, the expression of CD36 induced by OxLDL was reduced. Further studies demonstrated that HAs could reduce the cholesterol accumulation in macrophage, and that, subsequently, inhibit the formation of foam cells.

In conclusion, *Hibiscus* anthocyanins (HAs) possess strong antioxidative ability to inhibit LDL oxidation and foam cell formation. Therefore, it is suggestive the anthocyanins could be a healthy food to prevent individuals from atherosclerosis.

參、緒論

一、洛神花之背景介紹

洛神葵，學名：*Hibiscus sabdariffa* Linnaeus，在植物中屬於灌木類，錦葵科，洛神花為洛神葵之花於為成熟時除去子房之萼片(圖一)。【別名】：Rozelle(英)、Asam susur(馬來)、Kachieb priew(泰)。

1. 洛神葵之型態與產地:

型態:

原產於印度及馬來西亞，臺灣引種栽培之一年生灌木。莖多分歧，表面紅紫色並被稀疏灰色粗毛。葉互生，具長柄(長4~6 cm)，呈掌狀3~5深裂之單葉，長8~12cm，裂片線形或長披針形，細鋸齒緣，表裏均散生粗毛。花腋生，單立，花梗長可達7 mm，小苞8~12枚，基部合生，長10 mm，有毛，萼粗厚多肉質，五裂，外呈紅紫色，花淡黃，花心紫黑色，5片，雄蕊多數，花絲合生，雌蕊自雄蕊筒抽出，均較花瓣遙短。蒴果為宿存之萼所包被，橢圓形，長約17 mm，徑約15 mm，外被白色毛，具5室，各生種子5~7粒。

產地:

洛神花原產印度及馬來西亞等地，本省引種栽培。今以臺東、花蓮等東海岸地區為主要產地，中南部亦有栽培出產。並以大量向日本輸出。

2. 洛神葵之性狀與已知成分：

性狀：

本品通常表面呈紫紅色，並略散生粗毛。因子房及花梗均已除去，故形狀頗規則。全體紙質易撕裂，微具特有之臭氣及愉快之酸味。新鮮品富黏液質，味酸。加熱可搗成果漿狀。

已知成分：

含 Carboxylic acid : D(+)-Apfelic acid(Malic acid) $C_4H_6O_5$ 、Citronenic acid $C_6H_8O_7$ 12.5 ~ 16.8 %、Protocatechuic acid $C_7H_6O_4$ 、Citric acid、Malonic acid、Hibiscusic acid。Hibiscin (Anthocyan)及 Flavonoids: Gossypetin $C_{15}H_{10}O_8$ Hibiscetin $C_{15}H_{10}O_9$ 、Hibiscitrin $C_{21}H_{20}O_{14}$ 。

3. 洛神葵之應用：

洛神花中肥厚的花萼，含豐富的果膠、碳水化合物、維生素，用其肥厚多肉質的花萼，採收曬乾使用，單味煎煮調製，稱作洛神花茶。洛神花的果實萼片含多量果膠質，可供製果醬、果汁、果凍、糖漬蜜餞及加糖釀水果酒，製品色味具佳。

在中藥的效用，洛神花益血養氣，味酸順肝醒脾，可活絡氣血循環，洛神花泡茶，可改善末梢神經的傳導，不但使唇色紅潤，臉色光彩，足趾手指的指甲光滑紅潤，更能使整個人顯得光鮮有朝氣。通常用來治療高血壓，且具有生津止渴的效果。

二、花青素之背景介紹：

花青素是一種廣布於植物界之水溶性紅色色素，是造成許多花、水果、蔬菜顏色鮮豔之原因，其存在於細胞漿中。對於花青素之構造已頗明瞭，但是物理、化學反應則未完全解明。

花青素(anthocyanins)屬於類黃酮化合物，以C6-C3-C6芳香環為結構骨架，環上具有氫氧基或甲氧基取代物，如(圖二)(1)所示。花青素的顏色和構造依pH值而異(2)，在酸性水溶液中因可以形成flavylium陽離子構造所以較為穩定；而在弱酸或中性水溶液中則是相當不穩定的，其顏色會快速消失(3)。

花青素為由花青素配質(anthocyanidin)和一個或多個糖酯化所組成。在食品中游離之配糖基很少存在，目前已發現有五種糖為花青素分子之一部分。由其含量之高低分別依次為葡萄糖、鼠李糖(rhamnose)、半乳糖、木糖及阿拉伯糖。花青素也可能被乙醯化，而使其分子附加第三種成分。香豆酸(coumaric acid)、咖啡酸、醋酸、丙二酸、香草酸等可與花青素之糖分子形成酯化。

花青素目前已知有二十種，但食品中重要的有六種：天竺葵色素(pelargonidin)、牽牛花素(petunidin)、矢車菊色素配質(cyanidin)、花翠配質(delphinidin)、牡丹素(peonidin)及鋪葵色素(malvidin)。

三、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 (4、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【圖三】。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)【圖四】。

(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【圖五】。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【圖六】。

(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【圖五】。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【圖六】，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【圖七】。

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. 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。

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。

4. 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(4、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。

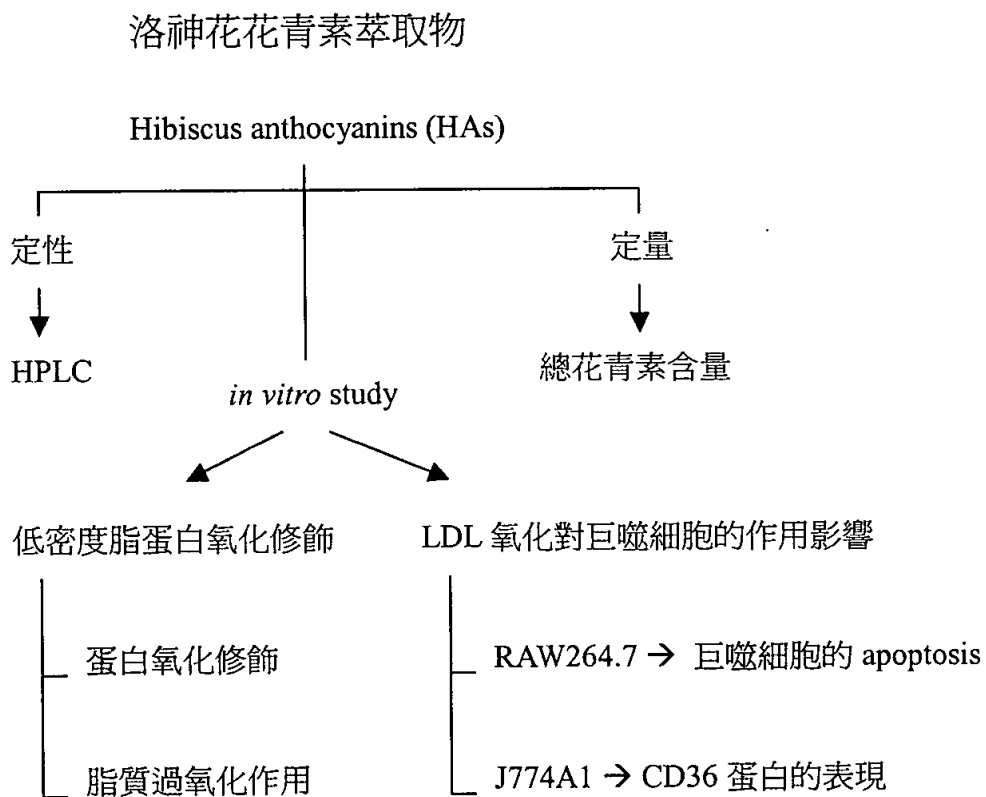
肆、研究動機

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。此外，加上近年來經濟富庶，飲食習慣種種因素，造就了癌症的高發生率，目前癌症形成的原因只有少數被了解，而治療的效果有限。現今對於癌症的治療大多採用化學治療或是投予抗癌藥物，此兩者皆會對人體造成極大的傷害。目前許多研究趨向以天然藥物來達到抑制癌細胞的增長及惡化，因此本實驗室致力於開發天然物中所含的抗癌成份，希望可以由攝取食品來達到預防癌症的發生。本篇論文是以台灣常見飲料中的成份之一，洛神花花青素萃提取物 (HAs)，來探討其對人類癌細胞的影響及其可能造成的死亡機制。

台灣屬於洛神花的盛產地之一，來源取得豐富且方便，所以我們採用洛神花(*Hibiscus sabdariffa*)為實驗材料，洛神花花萼中最主要的四種化學預防物質分別是類黃酮素 (flavonoids)、原兒茶酸 (protocatechuic acid ; PCA)、花青素 (anthocyanidins) 以及異黃酮素 (isoflavonoids) 等。國外之研究，在體外試驗顯示其水萃

取物有 anti-spasmodic，降膽固醇，降血壓及抗菌作用。其成份 flavonoids 具有抗氧化及抑制心血管疾病；PCA 可抑制化學致癌物誘導之癌化，而在 anthocyanidins 的部分卻還沒有明確的相關研究被提出。於是本研究計畫來驗證洛神花的花青素萃取物(Hibiscus anthocyanins；HAs)是否真有抗氧化的功能，進而利用 HAs 的抗氧化能力來抑制 LDL 氧化，其有助於預防心血管疾病及癌症的發生，使人人健康保健觀念可更上提升。

伍、研究架構



陸、研究方法

一、洛神花花青素萃取物的製備

稱取 20 克乾燥洛神花，以 0.1% 鹽酸甲醇溶液於 4°C 下浸泡過夜，隔日過濾收集後，進行減壓濃縮乾燥，最後加 250ml 的二次水溶解，將濃縮之溶液與 100 克 Diaion HP-20 反應，用以來吸附花青素，反應 24 小時之後以 0.1% 鹽酸水溶液清洗雜色素，再以 0.1% 鹽酸甲醇溶液將花青素洗出後，進行減壓濃縮乾燥，最後加 250ml 的二次水溶解，冰在 -70°C overnight，再經真空冷凍乾燥機乾燥為粉末，所得到的粉末即為花青素。另可稱重以配取不同濃度洛神花花青素萃取物(HAs) 溶液。

HAs 之產率約為 5%，若使用於細胞實驗操作時，由 HAs 配置的各濃度溶液需先經 0.22 μ m filter (MILLEX[®]-HA) 過濾除菌。

二、總花青素含量的測定

採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，精確定量上述所收集的濾液，得體積 V，並從濾液中吸取 2ml 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 pH4.5。兩份稀釋液分別以分光光度計測其在 520nm 的吸光值，得 A_1 (pH1.0 者)與 A_2 (pH4.5 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/100mg 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)

三、主要色素之純化分離鑑定

為使 HAs 製備固定標準化，我們利用 HPLC 方法(5)來評估。並以 Cyanidin 與 Delphinidine 為標準品來鑑定。

高效能液相層析儀操作方法：

(1). 高效能液相層分離管柱(RP-18, 4.6x150mm, 5 μ m)。

(2). Mobil phase : **water+10%formic acid /methanol(65/35,V/V)**。

(3). 操作方法：將整個管路接上，並確認管路中並無氣泡產生，UV 光源設定為 530 nm，幫浦流速設為每分鐘 1ml，整個系統平衡約需 2 小時，待平衡後，打入濃度為 0.1mg/ml 的花青素標準品(Cyanidin、Delphinidine)，

確定管柱的分離效果並無問題後，開始施打濃度為 1mg/ml 的洛神花花青素萃取物，並觀察兩者之間 peak 之變化。

四、LDL 的離心萃取(60)

取 2 ml 的血清，加入 0.5 M NaCl 及 0.3 mM EDTA (pH7.4) 的混和液 700 μ l，放入 Beckman TL-100 桌上型超高速離心機中，離心 90000 rpm，10 $^{\circ}$ C，10 min，取出下層液 2 ml，再加入 0.5 M NaCl 及 0.3 mM EDTA (pH7.4) 的混和液 700 μ l，離心 90000 rpm，10 $^{\circ}$ C，3.5 hrs，取出下層液 2 ml，加入 166.8 mg 的 KBr，使其溶解均勻，再離心 90000 rpm，10 $^{\circ}$ C，3.5 hrs，收取上層液 600 μ l，即為 LDL。

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 25ml PBS 通過清洗 PO-10column，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。

五、Ox-LDL 製備 (34)

LDL 先過 PD-10 desalting column 後，再以 5 μ M CuSO₄ 於 37 $^{\circ}$ 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 μ g/ml，使其於實驗加藥後最後反應濃度為 0-100 μ g/ml。Ox-LDL 若要加入

細胞反應則須先以 0.45 μ m filter 過濾除菌，以防實驗培養中造成細胞污染。

六、LDL electrophoretic mobility 的分析(62)

在 LDL 中加入不同濃度所萃取之洛神花花青素(0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml)，vitamine C(0.25 mg/ml)和 PCA (0.5 mg/ml)，放入 YIHDERN shaker bath BT 150 水浴槽中培養 37 $^{\circ}$ C，24 hrs。

利用 Backman paragon lipo electrophoresis system，取一片已製備好的 agarose gel，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，用 pipet 輕壓紫色板，使其附著在 gel 上，在 10 個 well 各 loading 5 μ l 的 sample，靜置 5 分鐘，用長條濾紙小心的放在紫色板上，吸掉多餘的 sample，將長條濾紙和紫色板一起拿掉，將 gel 架在電泳槽上，加入適量的 buffer，以 100 v 通電 30 分鐘，然後取出 gel，用專用夾固定好，接著置於固定槽固定 5 分鐘，取出烘乾(需至完全乾)，放入染色槽，待其染色均勻分佈後，放入脫色槽，脫色 2 次後，用去離子水沖洗，再烘乾。

七、MDA (TBARS) 生成濃度分析

在 LDL 中加入不同濃度所萃取之洛神花花青素(0.25 mg/ml、0.5

mg/ml、1 mg/ml、1.5mg/ml)，vitamine C(0.25 mg/ml)和 PCA (0.5 mg/ml)，放入 YIHDERN shaker bath BT 150 水浴槽中培養 37°C，24 hrs。加入 25% TCA (目的是為了將蛋白質去掉)，以 10,000 rpm 在 10°C 離心 30 分鐘來去除蛋白質沉澱，接著取上清液再加入 TBA 溶液，須在避光的環境下以 90-95°C 加熱 40 分鐘，待其冷卻後，使用 Hitachi 螢光比色計來測定 MDA 的值。

八、LDL apoB protein fragmentation assay (61)

配製 3~15% gradient acrylamide gel 於加入洛神花花青素 (0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml) 及 buffer 後，進行電泳 (400V, 48Amp, 2 hrs)。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，脫色至無染色液殘留於背景中，封膠後取下保存。

九、DPPH bleaching

DPPH 自由基 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 在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)。取 0.1ml 洛神花花青素(0.005-1mg/ml)以甲醇稀釋至 4 ml，加入 1ml 新鮮

配製 1mM DPPH 之甲醇溶液，均勻混和靜置 30 分鐘後，以分光光度計測量，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：

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

十、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)，染上後立即用 PBS 沖洗，接著以 6% paraformaldehyde 將細胞固定 30 min，30 min 後移除 paraformaldehyde 以 PBS 清洗二次。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。

十一、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。

將 RAW264.7 cells (4×10^5 / well) 培養於 24 well culture plate (FALCON®)，加入不同濃度的 HAs (0.05、0.1、0.2、0.5、1、3、4mg/ml) 後，加入 LDL (100 μ g/ml) 和 CuSO₄ (10 μ M) 37°C；5% CO₂；反應 18 h，移除 medium(含藥)，加入新的 medium(不含藥)和 MTT(0.5mg/ml) 37°C；5%CO₂；反應 4 h，移除 medium (含 MTT) 以 PBS washing，加入 isopropanol 將結晶溶出，在 OD563nm 下測定溶液吸光。

十二、Leukostat 染色法

在細胞進行 apoptosis 時，會出現一些特有的型態變化，如：染色質濃縮及邊緣化 (chromatin condensation and margination)、DNA 斷裂 (DNA fragmentation)、細胞皺縮 (cell shrink)、與鄰近細胞脫離 (detach from neighboring cells) 並出現細胞膜起泡 (membrane blebbing) 的現象，最後會引起凋亡體 (apoptosis bodies) 的形成，這個過程與細胞壞死 (cell necrosis) 相當不同，但是再細胞壞死之後有

時也會出現凋亡體，因此在判定的過程可以使用 Leukostat 染色法來區分。在 Leukostat 染色法的結果中，正常細胞會出現完整細胞樣（細胞核及細胞質皆非常清楚）；apoptosis 的細胞則較少細胞質，反而看到明顯的細胞核濃染的現象；而壞死細胞只會出現很淺的細胞影像（ghost）。

本實驗之方法為細胞經過試劑處理特定時間後，以 PBS 清洗一次，然後以固定液（含 2mg/ml malachite green，溶於 methanol 中）固定十秒，吸乾固定液並將細胞風乾後，加入染細胞質的第一種染劑（含 0.1% eosin Y；0.1% formaldehyde；0.4% sodium phosphate dibasic；0.5% potassium phosphate monobasic）染 10 秒，在衛生紙上扣乾後，再加入第二種染劑（含 0.04% methylene blue；0.04% azure A；0.5% potassium phosphate monobasic）再染 10 秒，隨即沖洗多餘的染劑並風乾即可觀察。

十三、細胞溶解物 (cell lysate) 之製備：

將 J774A1 細胞刮下加入 1 ml Buffer A（表一），放置研磨器研磨 30 次。吸取均質液至超高速離心機，離心（40,000 rpm，60 分鐘，4°C），收集上清液即為細胞質的成分。將離心下來的沉澱物加入 500 μ l Buffer B（表二）均質，步驟是放在冰浴上，每五分鐘搖晃一次，完成後離心（40,000 rpm，60 分鐘，4°C），取其上清液即為

細胞膜的部分。收集到的細胞質、細胞膜成分都保存在-70°C。

(表一) 《Homogenization Buffer A, pH 7.4》

成分	Stock	10 ml
20 mM Tris-HCl	200.0 mM	1.00 ml
0.03 mM Na ₃ VO ₄	30.0 mM	0.01 ml
2 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O	100.0 mM	0.20 ml
2 mM EDTA	100.0 mM	0.20 ml
0.5 mM EGTA	100.0 mM	0.05 ml
2 mM PMSF	200.0 mM	0.10 ml
1 mM DTT	500.0 mM	0.02 ml
250 mM Sucrose	342.3 M.W	0.86 g
10 µg/ml Leupeptin	1.0 mg/ml	0.1 ml

(表二) 《Homogenization Buffer B, pH 7.5》

成分	Stock	10 ml
20 mM Tris-HCl	200.0 mM	1.00 ml
0.03 mM Na ₃ VO ₄	30.0 mM	0.01 ml
5 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O	100.0 mM	0.50 ml
2 mM EDTA	100.0 mM	0.20 ml
0.5 mM EGTA	100.0 mM	0.05 ml
2 mM PMSF	200.0 mM	0.10 ml
1 mM DTT	500.0 mM	0.02 ml

5 mM NaF	100.0 mM	0.50 ml
10 µg/ml Leupeptin	1.0 mg/ml	0.1 ml
Triton X-100	0.1%	10 µl

十四、西方點墨法 (Western blotting)

首先製備 SDS-聚丙醯胺板膠電泳之下層膠為 6% 或 12% Separating gel 上層膠為 4% Stacking gel，置於電泳裝置槽中，並加入電泳緩衝液 (1×Tank buffer)，取蛋白總量 20g 加入 5 µl loading buffer (4µl loading buffer +1µl β-MSH)，總體積為 20µl 不足則以 PBS 補足，最後將 sample denature (99°C,10 min)後，立刻將 sample 置於冰上 5 min 後，再將 sample loading 到電泳片中，以 90 伏特進行電泳分離。大約 3.5 小時後，將下層膠取下後進行蛋白轉漬，將膠體平鋪在兩浸溼的 Whatman 3M 濾紙上片，此時將預先浸濕的硝化纖維紙 (NC paper) 覆蓋在膠片上，依次再覆蓋 2 張 3M 濾紙，並以玻棒輕趕其間之氣泡後裝入 Transfer Holder，之後置入 Electrotransfer buffer 於 4°C 下，以 100 伏特進行轉漬 3 小時之後，取出 NC paper 加入 Blocking buffer (5% milk)，在室溫下 shake 一個小時。之後加入一級抗體於 TBS buffer 中，在 4°C 下進行反應 overnight，隔天早上以 washing buffer (TBS+0.05% Tween 20)) 清洗三次，每次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，置於室溫作用二個小時後，以 washing buffer

清洗三次，每次 10 分鐘。最後將硝化纖維紙放入透明塑膠套中，用面紙壓去硝化纖維紙上多餘的 TBS-T buffer，再將 ECL substrate 覆蓋整個硝化纖維紙，同樣的，將多餘的 ECL substrate 用面紙擦拭掉，將塑膠封套放到感光夾中，以 X 光片感光，再將 X 光片以顯影液顯影，換上清水漂洗數次，再以定影液處理，最後換上清水漂洗乾淨即可。

十五、萃取 total RNA

將培養皿內培養液吸走，以 PBS 沖洗細胞二次，細胞收集起後，加入 0.5ml 冰的 Solution D-mercaptoethanol (Solution D 與 mercaptoethanol 之體積比為 50 比 0.36)，於冰上將細胞研磨成粘稠均勻透明狀，粘稠液倒至離心管中，依序加入 50 μ l pH4.0, 2M Solution acetate (1:0.1)、100 μ l chloroform (1:0.2)、及 0.5ml pH4.0 之 phenol (1:1)，(1 為 Solution D 之體積)，混合均勻，於冰上靜置 1 分鐘，重覆此步驟 (混合均勻，冰上靜置一分鐘) 達 20 分鐘，使其能充分作用，最後將混合液靜置於冰上，作用 5 分鐘，於 4 $^{\circ}$ C 下以轉速 12000g 離心 20 分鐘。將上層液吸取致另一新的離心管，以 chloroform 及 phenol 的混合液 (體積比為 1:1) 和 RNA 水層以體積比為 1:1 的比例混合均勻，重覆以上、靜置、離心步驟，重覆萃取 2~3 次，直到肉眼觀察不到水層和有機層之間白色的蛋白質。將水層移到新的離心管，並加入同體積的 isopropanol，混合均勻，放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中，沉澱 2 小時或隔夜。之後於 4 $^{\circ}$ C 下以轉速 12000g 離心 20 分鐘，以吸量管抽乾液體，加入 0.5ml 的 solution D 溶解白色沈澱物質 (PELLET)，放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中，沈澱 2 小時或隔夜。於 4 $^{\circ}$ C，以轉速 12000g 離心

20 分鐘，以吸量管抽乾液體，加入 1ml 70% 的酒精清洗沈澱物質 (pellet 跳起)，於 4°C，轉速 12000g 離心 20 分鐘，以吸量管抽乾液體，風乾 pellet，加入適量的 DEPC-H₂O 溶解 RNA，並測量其吸光值 (OD₂₆₀) 換算 RNA 濃度。

十六、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

16-1 : Reverse Transcription Reaction

RT (reverse transcription) : 取 4 μg 的 RNA，加入適量的 DEPC-H₂O (總體積為 33 μl)，以 70°C 處理 5 分鐘去除 Harpin。再加入 0.25 μl (40U/μl) RNase inhibitor，再加入 10 μl 5X RT buffer 及 4 μl (2.5mM) dNTP，和 1 μl (50 pmole/μl) Oligo dT 及 1 μl (200U/μl) RTase，在 42°C 反應 1 小時之後，以 99°C 作用 5 分鐘後保存於 4°C。

16-2 : 引子合成(Primer synthesis)

取 5 μl cDNA 加入 26 μl DEPC-H₂O，加入 primer-5' 和 primer-3' 各 5 μl，加入 (2.5mM) dNTP 3.2 μl 及 10X PCR buffer 5 μl 最後再加入 DNA polymerase 0.5 μl (2U/μl)，置於溫度循環機 94°C 1 分鐘之後，annealing 溫度 1 分鐘，72°C 2 分鐘，共 30 個循環，最後再以 72°C 反應 20 分鐘，並於 4°C 保存。而各個基因的 PCR primers 序列如[表三]

(表三) [6]

Enzyme	Sequences 5' 3'	Position (bp)	size	Temp(°C)
CD36	5'-GACTGCAAGGACATGAGCGA-3'	781-801	420bp	63°C
	5'-CGGTTGGTGAAGAGCAGATA-3'	1201-1221		
GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	566-585	451bp	60°C
	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	998-1017		

十七、DNA 電泳

預先配置 1.5% DNA gel，取 5 μ l 的 PCR 產物加入 1 μ l 的 6 倍 loading dye 充份混合後，加到 DNA gel。於電壓 100V，進行電泳 30 分鐘之後，以 1 μ g/ml Ethidium bromide 染色，再以 ddH₂O 退染，於 UV 燈下分析所要的位置是否有表現。

十八、CPP32 活性之分析

當細胞發生計劃性的自然凋亡，常伴隨著 CPP32 活性的增高。測定 CPP32 活性，以反映出細胞 apoptosis 的狀況。本組 kit 利用 CPP32 具有切割蛋白的能力，當其受質經 CPP32 作用切割反應後將產生某一特定的吸光值，偵測此一吸光值的變化即可得知 CPP32 的活性。實驗方法是將細胞培養 24 小時後以 trypsin - EDTA 將細胞由培養皿打下，PBS 沖洗後以 1000rpm 離心 5 分鐘，取沉澱細胞，加冰的 lysis buffer 於冰上震盪 10 分鐘後，以 10000g 離心 1 分鐘。取上層液，並測定蛋白濃度，調整濃度至 1mg/ml。將以上製備好的 sample 取 12.5 μ l 加上等量的 reaction buffer (內含 10mM DTT)，再加 1.25 μ l 之 4mM DEVD-pNA substrate，於 37°C 下避光反應 1.5 - 2 小時，最後以波長 405nm 測定吸光值。

十九、統計分析

試管外及細胞實驗過程每組皆三重複以上，採用 Student's t-test 統計分析，凡 $p < 0.05$ 以下時表示為有意義的差異。

柒、實驗藥品與器材

一、藥品試劑

1. 購自美國 SIGMA 化學公司

Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20), Sodium chloride, Albumin Bovine, DL-Dithiothreitol (DTT), Deoxycholic acid, Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF), Sodium orthovanadate, Tris-base, Tris-HCl, Glycine, NP-40, coomassie blue, Leupatin, propidium iodide, ribonuclease A (RNase A), Glycerol, 2-mercaptoethanol, Bromophenol blue, Coomassie blue, TBA(2-thiobarbituria acid), TCA(trichloroacetic acid), TEP(1,1,3,3-tetramethoxypropane), DPPH, paraformaldehyde, MTT(Thiazolyl blue)

2. 購自美國 GIBCO BRL 公司

Sodium bicarbonate, Dulbecco's phosphate-Buffered saline (PBS), Fetal Bovine Serum, L-Glutamine, Penicillin Streptomycin, Trypsin-EDTA, Minimum Essential Medium, DMEM, RPMI, culture dish

3. 購自美國 GILSON 公司

Acrylamide, Bis, Tris base

4. 購自美國 MERCK 公司

Glycerol, Sodium dodecyl sulphate (SDS)

5. 購自美國 TEDIA 公司

Acetic anhydride

6. 購自美國 FISHER 公司

1-Butanol, Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

7. 購自美國 Bio-RAD 公司

N,N,N',N'-Tetra-methylethylenediamine (TEMED),

non-stand high ranger maker

8. 購自美國 MILLOPORE 公司

Nitrocellulose transfer membrane

9. 購自美國 KODAK 公司

Developer, Fixer, X-ray film

10. 購自日本昭和化學株式會社

Sodium azide, Ammonium peroxodisulfate (APS), Pyridine,

Sodium Sulfate (Na_2SO_4)

11. 購自日本林純藥工業株式會社

Bromophenol blue, Sodium carbonate (Na_2CO_3)

12. 購自 Fisher Chemic

Isopropanol

13. 購自 Cell Signaling

Caspase-3

14. 購自 BD Pharmingen

Mcl-1, Bax

15. 購自 Extrasynthese

Cyanidin chloride (HPLC), Delphinidin chloride (HPLC)

16. 購自 Santa Cruz

CD36, cytochrome c, PARP, Bcl-2, caspase-8, tBid

17. 購自台東縣農會

洛神花

18. 購自武藤化學株式會社

Oil-Red O 染劑, hematoxylin

二、常用儀器

1. 天秤： Precisa 3100C
2. 微量天秤： Mettler Toledo AB104
3. 迷你直立式電泳槽： Bio-RAD Mini-protein II xi
4. 電泳轉印槽： Bio-RAD, Hoefer
5. 電源供應器： Bio-Rad power PAC 3000, Model 200/2.0
6. 加熱攪拌器： CORNING Stirrer/Hot Platte
7. 微量高速離心機： Eppendorf centrifuge 5415C
8. 桌上型離心機： KUBOTA 2010
9. 高速離心機： SIGMA 2K15
10. 分光光度計： HITACHI U-2001 Spectrophotometer
11. 酸鹼測定儀： HANNA pH301
12. 無菌操作台： NUAIRE class II Type A/B3
13. 細胞恆溫培養箱： NUAIRE us autoflow
14. 幫浦： GAST 0523-V4-G582DX
15. 烘箱： MEMMERT

16. 超音波震盪器： Branson PC620
17. 水浴槽： Firstek shaker bath B601
18. 水平式搖晃器： KS orbital shaker OS701
19. 倒立式顯微鏡： NIKON DIAPHOT 300
20. 高壓殺菌釜： TOMIN TM322
21. 感光夾： Okamoto 8X102
22. -70°C 冰箱： SANYO Ultra 6100
23. -20°C 冰箱： White-Westinghouse
24. 4°C 冰箱： Lian Shen enterprise F-750
25. 數位影像分析儀： Alphar Imager 2000
26. 有機溶劑濃縮機： HETO VR-maxi st.a.
27. 直立式電泳槽： SE400-15-1.5 (Pharmacia Biotech)
28. 螢光光度計： HITACHI F-2000
29. 冷凍乾燥機： Labconco
30. 高效能液相層析儀： L-4250 UV-VIS Detector

L-6200A Intelligent Pump

D-2500 Chromato-Integrator

捌、結果

一、洛神花花青素之分離與鑑定

1-1:洛神花花青素之分離:

乾燥洛神花秤取 20 g，以 0.1% 鹽酸甲醇溶液於 4°C 下浸泡，隔夜，將果實過濾後，以真空減壓濃縮機濃縮。濃縮後的溶液加入 250 ml 二次水溶解，再利用 Diaion HP-20 樹脂充填之管柱浸泡 24 hr，然後，以 0.1% 鹽酸水溶液清洗雜色素，再以甲醇將花青素沖提出後以真空濃縮，所得產物取二次水 250 ml 溶解再經真空冷凍乾燥機乾燥為粉末。HAs 之產率約為 5%。

1-2:花青素之純度測定:

【Fig.1】花青素之純度測定是採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，由 spectrophotometer 分析本實驗室所萃取出之洛神花花青素 (HAs)，其吸光值再經公式換算，而換算出所萃取出之花青素純度大約有 85~95%。

1-3: Cyanidin 與 Delphinidine 之含量測定:

經 HPLC 分析，Delphinidin 的滯留時間(retention time; RT)在 19.86 min；Sample，也就是本實驗室所萃取出之洛神花花青素水溶液 RT

為 19.88 min; 而 sample+standard 就是兩者所合併, 其 RT 在 19.83 min。從結果【Fig.2A】可得, 本實驗室所萃取出之洛神花花青素其 Dephinidine 含量大約有 3.7%。另外, Cyanidin 的 RT 在 21.68 min; Sample 的 Cyanidin RT 為 21.60 min; 而 sample+standard 其 RT 在 21.62 min。從結果【Fig.2B】可得, 本實驗室所萃取出之洛神花花青素其 Cyanidin 含量大約有 0.9%。

二、洛神花花青素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 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 ϵ -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洛神花花青素萃取物 (HAs) 一起反應後，在 1mg/ml 濃度下其 band 移動距離 (EM) 為 2.2，而在 1.5 mg/ml 濃度下 EM 為 2。此外在 0.25、0.5mg/ml 濃度下，其 EM 同 positive group (EM 為 3.3)。而在同樣氧化條件添入不同濃度的 Ascorbic acid (vit C) 與 Protocatechuic acid (PCA) 一起反應後，分別在 0.25、0.5 mg/ml 濃度下其 band 移動距離 (EM) 為 1.8 與 1.9。

由上述實驗結果顯示，有添加 1、1.5 mg/ml HAs 及添加 0.25 vit C 和 0.5 mg/ml PCA 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 HAs 和 vit C 與 PCA 之效力發現，vit C 與 PCA 在低濃度下即具有效力而優於 HAs。

(2) Apo B fragmentation assay :

在 in vitro 實驗中以 10 μ M 硫酸銅誘導 LDL 於 37 $^{\circ}$ C 氧化 4 小時後，其 LDL 的衍蛋白 Apo B 約有 90% 斷裂。而在同時添入不同濃度的洛神花花青素萃取物 (HAs) 一起反應後，在 0.25、0.5 mg/ml 濃度下 Apo B 約有 50% 斷裂 (保留 50%)，而在 1mg/ml 濃度下 Apo B

約有 30%斷裂（保留 70%）【Fig.4】。由上述實驗結果顯示，有添加 0.25、0.5、1 mg/ml HAs 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。

(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。

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【Table I】所示，單獨以 10 μ M 硫酸銅處理之控制組，其中 MDA 濃度急速升高，而在同時添入不同濃度的洛神花花青素萃取物(HAs)一起反應後，在 0.5、1、1.5mg/ml 有意義的降低 MDA(P>0.05)的形成。另外在處理低濃度的 vit C (0.25mg/ml)與 PCA (0.5 mg/ml) 下，皆具有抑制 MDA 生成的效力【Table I】。由上述實驗結果顯示，有添加 0.5、1 mg/ml HAs 的組別，其 MDA 的生成量比 positive group 降低近 2.5~4.5 倍，而顯示出 HAs 具有抑制硫酸銅所誘發之脂質過氧化的作用。

(4) DPPH bleaching assay:

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 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 1mM DPPH 為 positive group，而後在同條件下添入不同濃度的洛神花花青素萃取物 (HAs) 測定各濃度下清除 DPPH 的效力。在 HAs 濃度 0.005、0.0075、0.01、^{0.025}0.05、0.075、0.1、0.5、1 mg/ml 其 DPPH 清除效力分別為 8.4%、11.67%、17.09%、38.68%、62.43%、83.14%、95.39%、>100%、>100%【Fig.5】。由上述實驗結果顯示 HAs 對自由基之捕捉作用，具有劑量依存性關係。

三、洛神花花青素萃取物調控 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 10 μ m 硫酸銅及 LDL 於 37°C、5% CO₂ 與 RAW 264.7 細胞一起培養 18 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洛神花花青素萃取物 (HAs) 一起培養後發現，在 HAs 濃度 0.01mg/ml 細胞死亡情形同 positive group，但在高濃度 0.03、0.05、0.1、0.5mg/ml 的組別，細胞死亡情形明顯被抑制，細胞數目同 control group 【Fig.6】，此結果顯示 HAs 具有保護巨噬細胞不會因 LDL 氧化所引起的傷害而死亡。

(2) CPP32 活性之分析

由先前的實驗數據得知 oxLDL 能促使 RAW 264.7 細胞發生自然凋亡的發生，而 caspase-3 (CPP32) 的活化與 apoptosis 有關 (7)，所以在這個實驗中我們發現處理 10 μ M oxLDL 24 小時，CPP32 活性增高，而在添入不同濃度的洛神花花青素萃取物 (HAs) 一起培養後發現，有隨 HAs 劑量的增加而下降的趨勢 【Fig.7】。

(3) 西方墨點法 (Western Blotting) 分析相關 apoptosis 蛋白

RAW264.7 細胞加入 oxLDL(終濃度為 100 μ g/ml)及不同濃度 HAs(0.01,0.03,0.05,0.1,0.5 mg/ml)培養 18 小時，結果顯示氧化型 LDL 所誘發減少 caspase-3 蛋白表現的情形可以在預先處理 HAs 後得到改善 【Fig.8】；另外在 PARP 蛋白表現情形上，結果顯示氧化型 LDL 所誘發的 PARP 蛋白斷裂的情形可以在預先處理 HAs 後得到改善，且在濃度為 0.5mg/ml 時，PARP 蛋白斷裂的現象約可以回復 80% 【Fig.8】；而在 Bcl-2 family 蛋白表現上顯示 Bcl-2, Mcl-1 和 Bax 的蛋白表現量並沒有受到氧化型 LDL 的影響 【Fig.9】。

另外，在分析 cytochrome c 蛋白 release 情形發現氧化型 LDL 有些微誘發 cytochrome c 蛋白 release 的情形，並在預先處理 HAs 後有明顯抑制的表現【Fig.10】。

再分析其他 caspase cascade 蛋白表現，結果顯示氧化型 LDL 誘發 caspase-8 和 caspase-9 蛋白表現的情形減少，但在預先處理 HAs 的組別，只發現 caspase-8 和 tBid 些微地改善，但 caspase-9 蛋白的情形卻完全沒改善【Fig.11】。

(4) Leukostat 染色法

RAW264.7 細胞加入 LDL(終濃度為 $100 \mu\text{g/ml}$)及不同濃度 HAs ($0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 \text{ mg/ml}$)和 $\text{CuSO}_4(10\mu\text{M})$ 培養 24 小時，以 Leukostat 染色法觀察細胞的形態及細胞核。由【Fig.12】結果顯示在添加 oxLDL 這組，細胞出現細胞質減少及核濃染的 apoptosis 現象；而當隨著 HAs 劑量的增加，細胞所出現的 apoptosis 現象有愈趨回轉的趨勢。

四、洛神花花青素萃取物調控 oxLDL 所引發動脈粥狀硬化的機轉

(1) 洛神花花青素對癌細胞(J774A.1 細胞)致死率之敏感度

以 MTT assay 的方法，用 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 3, 4 mg/ml 等不同濃度的洛神花花青素處理 J774A.1 細胞，在 37°C 下作用 18 小時後，觀察其存活狀態，從結果【Fig.13】可知細胞依濃度的增加而增加死亡的現象。此實驗測出其 IC₅₀ 為 1.91。

(2) 氧化型 LDL 的氧化程度

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，來確立所加入細胞中的氧化型 LDL 是以確實被氧化的 LDL，實驗以 10μM 硫酸銅處理不同時間(0-72 h)反應後，其中 MDA 濃度隨著反應時間增加而升高，且皆為有意義的增加【Fig.14】。之後實驗所使用的 oxLDL 是硫酸銅處理 48 小時者。

(3) 西方墨點法 (WesternBlotting)分析 CD36 蛋白

J774A.1 細胞在不同時間點(0、4、8、12、24 hr)加入 100 μg/ml 的 oxLDL，結果顯示 CD36 蛋白在 4 小時就有很明顯的上升【Fig.15A】；另外將 J774A.1 細胞加入不同劑量的 oxLDL(0、6.25、12.5、25、50、

100 μ g/ml)處理 6 小時，結果在 25 μ g/ml 時 CD36 蛋白就有很明顯的增加【Fig.15B】，由以上觀察可知 CD36 蛋白會隨著 oxLDL 處理時間的延長及處理劑量的增加而增加，表示有 dose 及 time-dependent 的情形。接下來利用抑制劑來探討 oxLDL(終濃度為 25 μ g/ml)所引發的 CD36 蛋白表現是透過何路徑來進行的，由結果顯示在處理 SB203580 和 Wortmannin 的這兩組明顯有將 oxLDL 所引發的 CD36 蛋白表現抑制下來【Fig.17】；而在預先添加 HAs 後，CD36 蛋白的表現有減少的情形，在處理 SB203580 和 PD98059 的這兩組，觀察到有使 HAs 所抑制的 CD36 蛋白表現增加的情形【Fig.17】。

(4) RT-PCR 分析 CD36 mRNA 的表現

J774A.1 細胞在不同時間點(0、3、6、9 hr)加入 100 μ g/ml 的 oxLDL，結果顯示 CD36 mRNA 隨著處理時間的延長而有明顯減少的情形【Fig.16A】；另外將 J774A.1 細胞加入不同劑量的 oxLDL(0、6.25、12.5、25、50、100 μ g/ml)處理 6 小時，結果在 12.5、25 μ g/ml 時 CD36 mRNA 就有很明顯的增加，而在 50、100 μ g/ml 的這兩組 CD36 mRNA 的表現卻又減少了【Fig.16B】，由以上觀察可知 CD36 mRNA 會隨著 oxLDL 處理時間的延長及處理劑量的增加，而有 up-regulated 的情形。最後利用 J774A.1 細胞加入 oxLDL(終濃度為 25 μ g/ml)及不同濃

度的 HAs(0.01,0.05,0.1,0.2 μ g/ml)培養 6 小時，發現隨著 HAs 濃度的增加，CD36 mRNA 的表達有減少的情形【Fig.16C】。

(5) 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°C、5% CO₂ 與 J774A.1 細胞一起培養 20 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) 【Fig.18】。而在加入 oxLDL 前若先添入不同濃度 HAs(0.25,0.5,1mg/ml)一起培養 1hr 後再加入 oxLDL 培養 20 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【Fig.18】。

玖、討論

民間傳聞洛神花具有解熱、抗高血壓、治療肝病、平衡身體內的酸鹼值的效果；近年來，拜中草藥研究風潮之賜，科學家進一步發現洛神花的萃取物，對於預防癌症、動脈粥狀硬化、幫助消化以及抗老化、抑制自由基活動有相當的功效。

洛神花所含的成分中最受重視的是一群所謂化學預防物質 (chemopreventers)，簡單地說就是一群存在於植物中的抗氧化劑。而洛神花中以多酚類 (polyphenolic) 的抗氧化物居多，洛神花花萼中最主要的四種化學預防物質分別是類黃銅素 (flavonoids)、原兒茶酸 (protocatechuic acid; PCA)、花青素 (anthocyanidins) 以及異黃銅素 (isoflavonoids) 等。這些成分能藉由清除活性氧、氮化合物、過度性金屬離子的螯合作用，節省與 LDL (低密度脂蛋白) 相關的抗氧化劑消耗，來降低低密度脂蛋白的脂質過氧化作用。

一、洛神花花青素之分離

本研究以市售乾燥洛神花為材料，以調酸的極性溶劑萃取其花青素，發現以甲醇萃取率為 85%-95%。以 HPLC 分析後發現其花青素主要分為兩類，由其 UV 吸收圖譜與已知文獻比對，推測分別為 delphinidin 系及 cyanidin 系。以 HP-20 填充管柱對洛神葵花青素進行

區分，結果可分得三個主要的色層，色層 1 為 delphinidin 系色素，色層 2 為 cyanidin 系色素，而色層 3 為新產生的色素，推測其為色層 1 的水解產物。

洛神花花青素經酸水解及 Diaion HP-20 resin 分離糖分子，再以 TMS 衍生化後進行 GC 分析，發現其配糖體之糖分子含有 xylose 及 glucose。另在洛神花花青素之安定性試驗結果顯示，花青素在低 pH 下安定，隨著 pH 上升則安定性下降；溫度對洛神花花青素之影響與 pH 類似，隨溫度增加花青素亦傾向降解；在自由基捕捉能力的實驗結果顯示生育醇 > 花青素，在還原力方面則為生育酚 >> 花青素。此外，在實驗中發現花青素萃取物幾乎都會與糖分子作用，形成花青素。這或許可以來解釋為何經由 HPLC 的結果，本實驗室所萃取出之洛神花花青素其 Delphinidine 含量大約有 3.7%，而 Cyanidin 含量大約有 0.9%。我們懷疑是糖分子存在的關係，因為花青素是由花青素配質 (anthocyanidin) 和一個或多個糖酯化所組成。

二、洛神花花青素萃取物抑制 LDL 氧化之作用

由實驗結果顯示我們所製備的洛神花花青素萃取物具有抑制 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，均可防止 LDL 的氧化作用。由各實驗結果來看 HAs 在 1mg/ml 濃度下即達抑制 LDL 氧化的作用，而洛神花花青素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。已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)。而由 DPPH bleaching assay 發現 HAs 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，因洛神花花青素萃取物具有抑制 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。

三、洛神花花青素萃取物調控 oxLDL 對巨噬細胞的作用影響：

在 2001 年 Hundal 等人(8)曾提出處理 50 $\mu\text{g/ml}$ 以下的 OxLDL 會使巨噬細胞增生，而高於 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 OxLDL 會對巨噬細胞產生毒性而使細胞死亡。據此而推測，當細胞曝露於低濃度的 OxLDL 時，細胞增生是為了加強吞嚥 OxLDL 並將其分解的能力；而當細胞曝露於高濃度的 OxLDL 時，細胞則會因此而死亡，至於細胞增生及細胞死亡在動脈粥狀硬化的演變上其真實意義為何將有待釐清。

在本篇實驗的研究結果中，我們發現以高濃度 OXLDL 處理巨噬細胞，結果會發現嚴重的細胞死亡，並且其死亡是以細胞凋亡 (apoptosis) 的方式進行。但是在預先處理 HAs 後，這種死亡現象將有效被抑制。其意義應該是在動脈粥狀硬化的不同階段皆為可逆的，

在 1993 年，Russell Ross 指出在動脈粥狀硬化的過程中，肇始者之一為 OxLDL，它使得單核細胞趨化為巨噬細胞，巨噬細胞因為攝食 OxLDL 而形成 foam cell，在這期間，巨噬細胞會以 lipoprotein lipase（脂蛋白脂解酵素）分解食入之 OxLDL，除此之外，Baoutina 等人(9)也在 2001 年提出證據證實巨噬細胞可以降低 cholesteryl ester hydroperoxides（CEOOH，為一種 LDL 進行氧化時早期的產物），因此若能使 macrophage 在受到 OxLDL 傷害的情況之下維持其存活不死，那麼將使巨噬細胞有充裕的時間分解食入之 OxLDL，也就有機會減低 fatty steak 甚而減低動脈粥狀硬化。另外作者也說明當脂肪大量堆積的 foam cell、T cells 及 smooth muscle cells 形成 fatty steak 後，就會逐漸形成纖維斑（fibrous plaque）以致於慢慢演化成粥狀瘤。而形成 fatty steak 的組成物則多是一些死亡的細胞及結締組織，這也就說明了讓巨噬細胞大量死亡在動脈粥狀硬化的演變上其實是一個相當有害的狀況。

四、洛神花花青素萃取物調控 oxLDL 所引發動脈粥狀硬化的機轉：

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) 有很專一的鍵結能力 (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 γ 所調控，PPAR γ 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，洛神花花青素萃取物可使 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。

(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。

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 γ -LXR 的分子機制調控其表達 (35)。基於此理論若洛神花花青素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

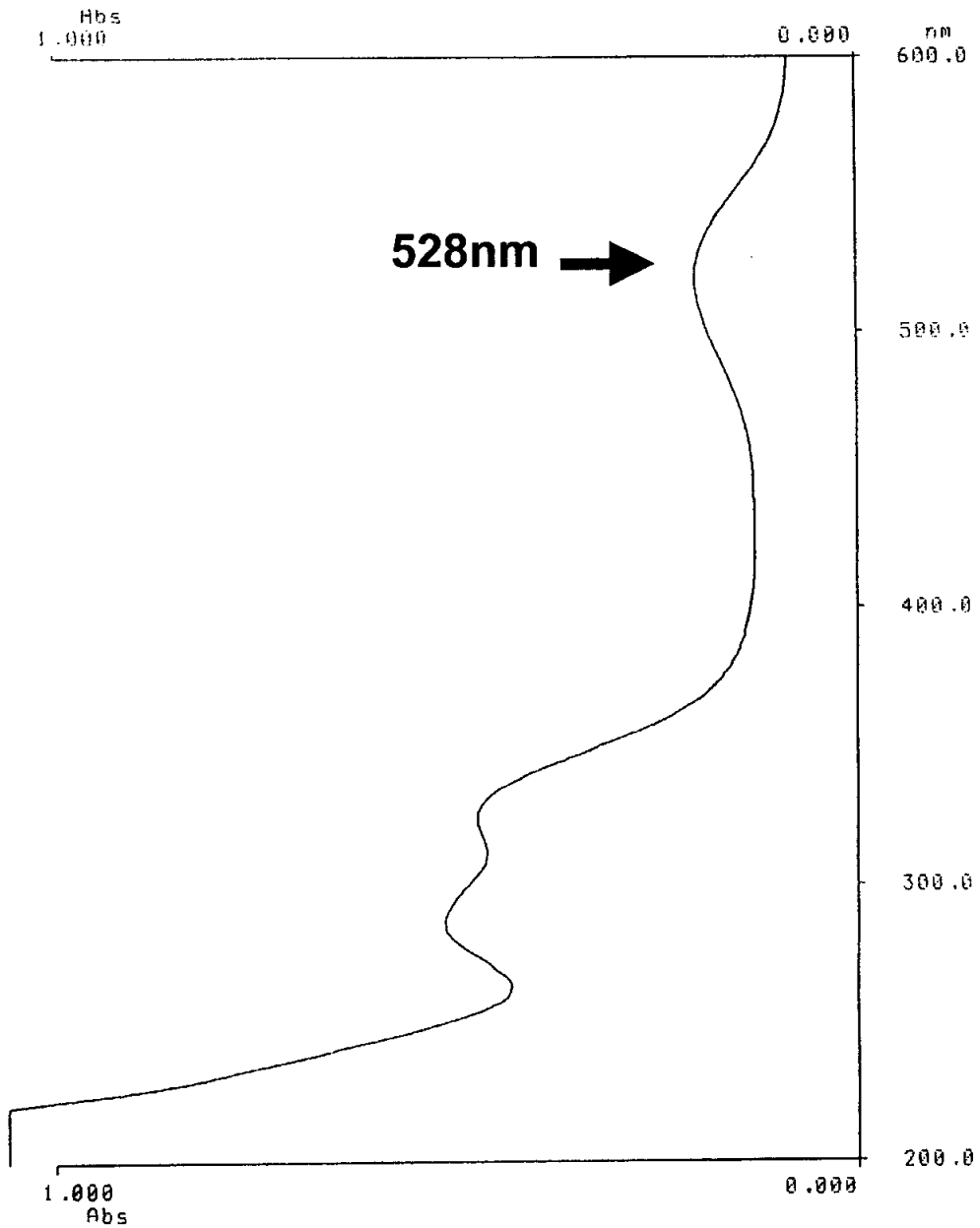


Figure 1. UV-Visible spectra form Hibiscus anthocyanins

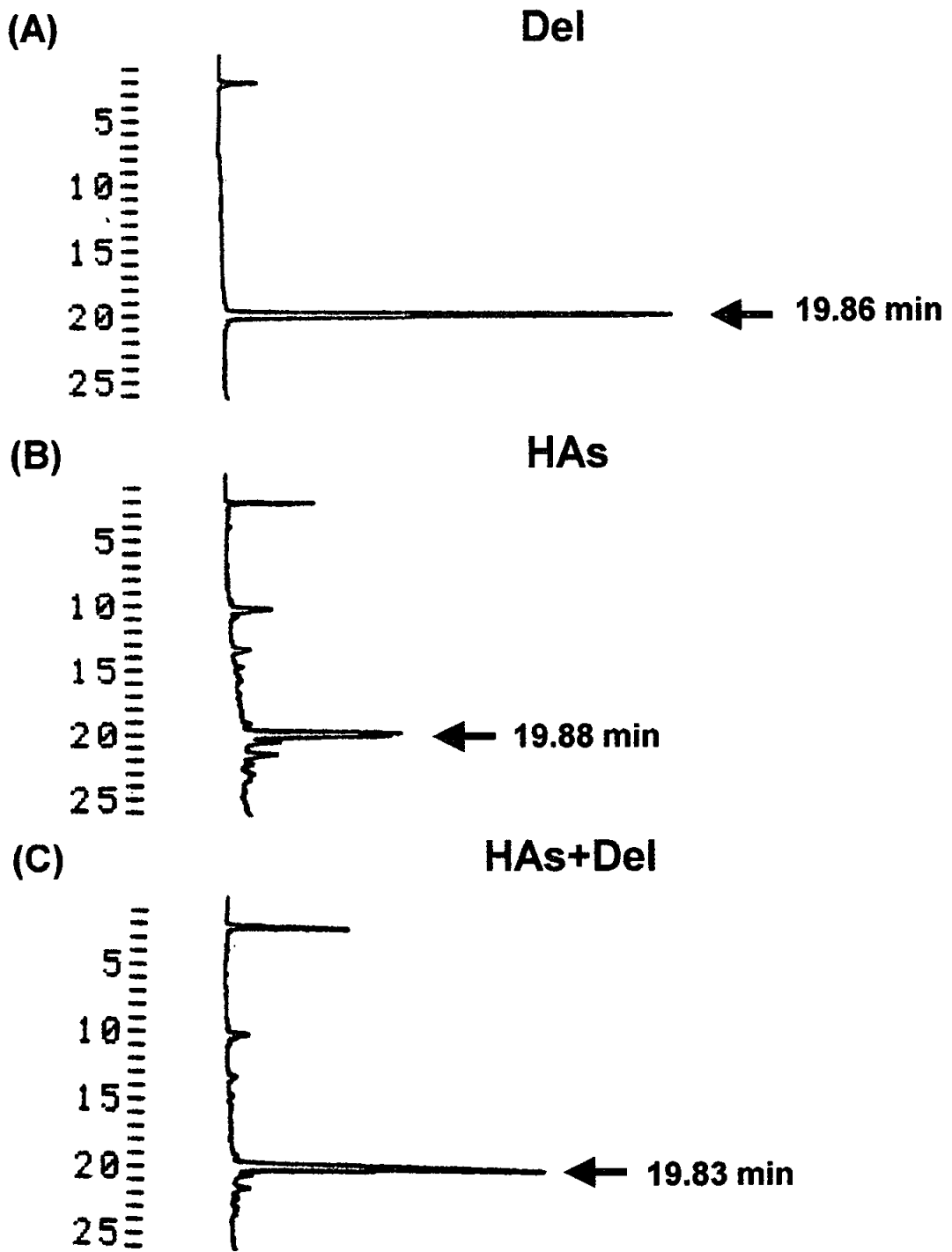


Figure 2A . Delphinidin content of HAs was analyzed by HPLC.(A) Standard is Delphinidin (0.1mg/ml; 10 μ l); (B) HAs extract (1mg/ml; 10 μ l); (C) HAs (1mg/ml; 5 μ l) + Delphinidin (0.1mg/ml; 5 μ l).

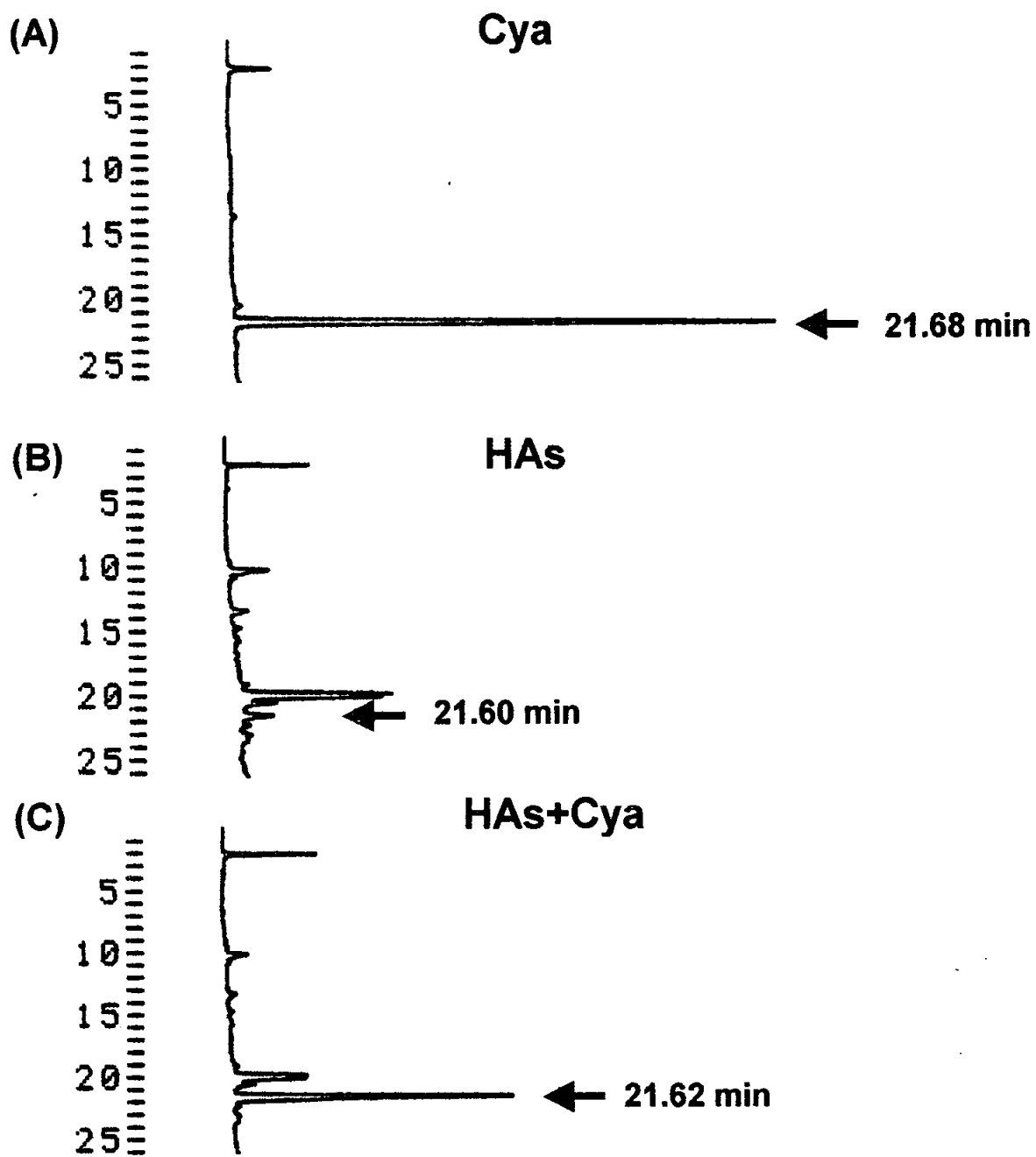
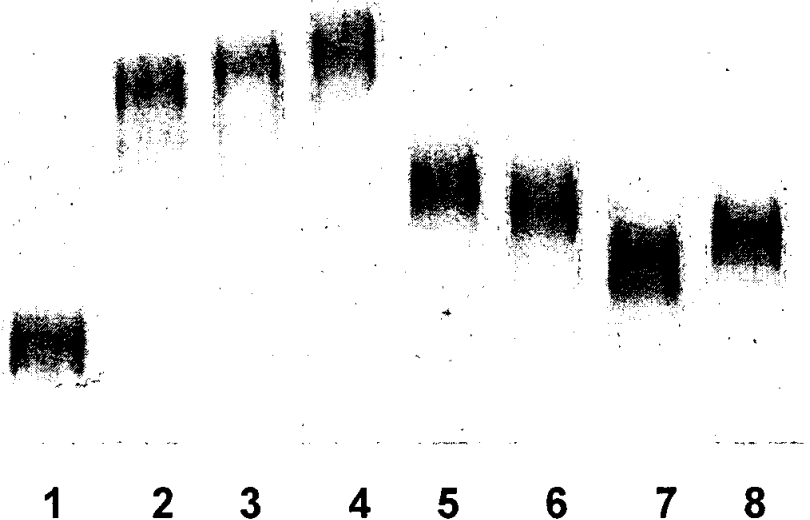


Figure 2B . Cyanidin content of HAs was analyzed by HPLC.(A) Standard is cyanidin (0.1mg/ml; 10 μ l); (B) HAs extract (1mg/ml; 10 μ l); (C) HAs (1mg/ml; 5 μ l) + cyanidin (0.1mg/ml; 5 μ l).

A



B

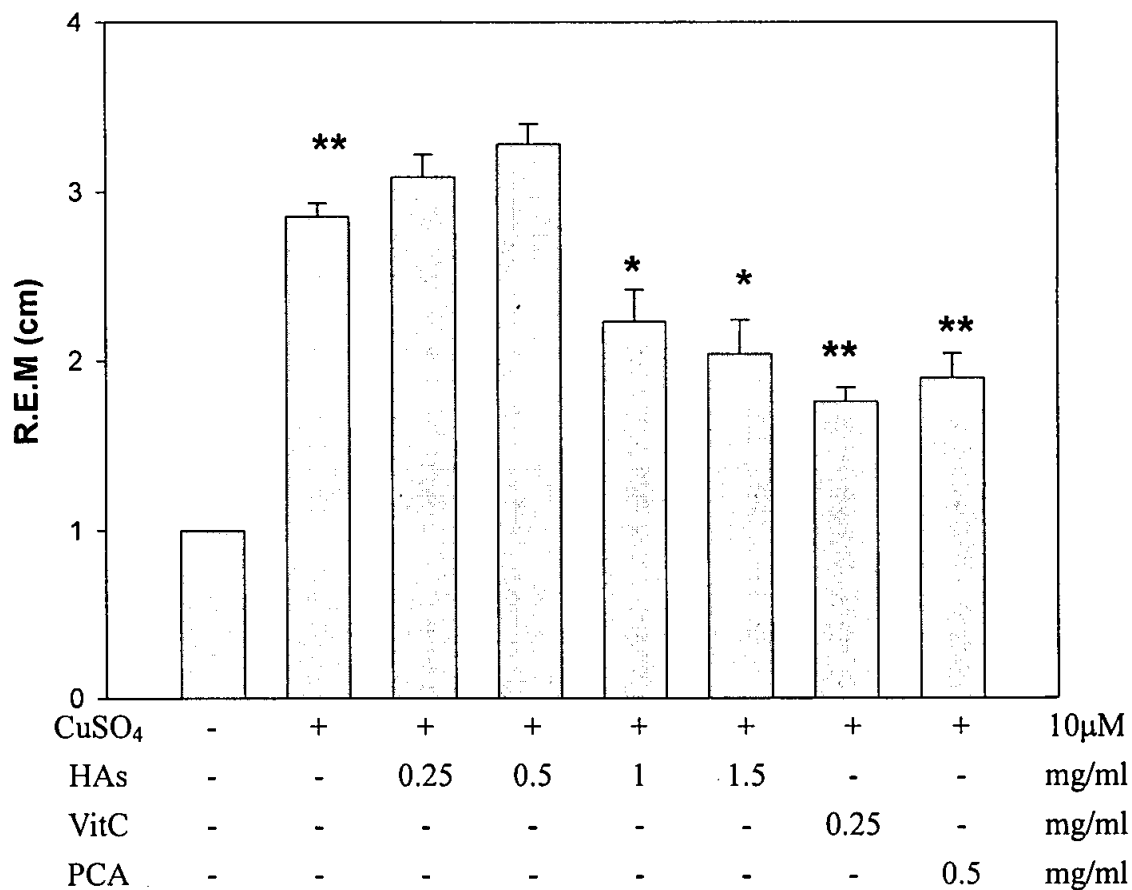


Figure 3.(A) Agarose gel electrophoresis of LDL. LDL was incubated with CuSO₄ or 24 hrs at 37°C . The sample on the gel lanes are follows: lane1, native LDL; lane2, LDL incubated with CuSO₄; lane3-6, LDL incubated with CuSO₄ presence of 0.25 (lane3). 0.5(lane4). 1 (lane5). 1.5(lane6) mg/ml/HAs; lane7, LDL incubated with vitC; lane8, LDL incubated with PCA.(B) Determination of relative electrophretic mobility.

*p<0.05;**p<0.005

Table I**Pre-treative effect of HAs on the CuSO₄ induced lipid peroxidation in LDL**

Treatment ^a			TBARs formation (nmol/mg) ^b
ox-LDL inducer	Conc.of	HAs (mg/ml)	
Control	-	-	37.46 ± 5.13
CuSO ₄	-	-	781.80 ± 47.66
CuSO ₄	0.25	0.25	658.50 ± 2.83
CuSO ₄	0.5	0.5	335.80 ± 8.63**
CuSO ₄	1	1	203.85 ± 11.67*
CuSO ₄	1.5	1.5	173.70 ± 6.36*
CuSO ₄	0.25	0.25 (Vit C)	234.05 ± 28.92**
CuSO ₄	0.5	0.5 (PCA)	243.05 ± 0.21*

- a. LDL were pretreated various concentrations of HAs at 1 hour, and then incubated with 10µM CuSO₄ for 24 hours 37°C.
- b. Values are the average of triplicate determinations.
- c. Statistically with mean ± SD, *p<0.05;**p<0.005

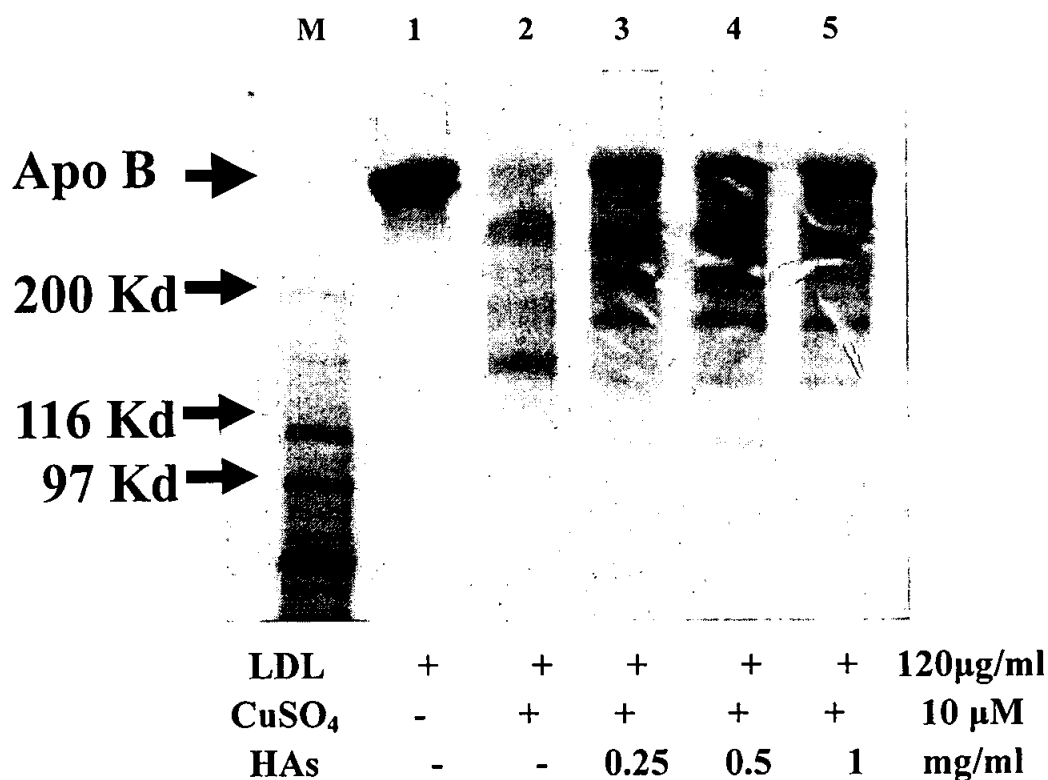


Figure 4 .Inhibition of Cu²⁺ mediated Apo B fragmentation in LDL by HAs.

LDL(120µg/ml) was incubated with 10µM CuSO₄ at 37°C in the presence of HAs for 4 hr. After the incubation,EDTA(final concentration 1mM) was added to prevent any further oxidation. Approximately 6 mg protein of the LDL was applied to SDS-PAGE (3-15% gradient).After the electrophoresis, each spot was stained with coomassie Brilliant blue R250.

M, standard molecular weight markers.

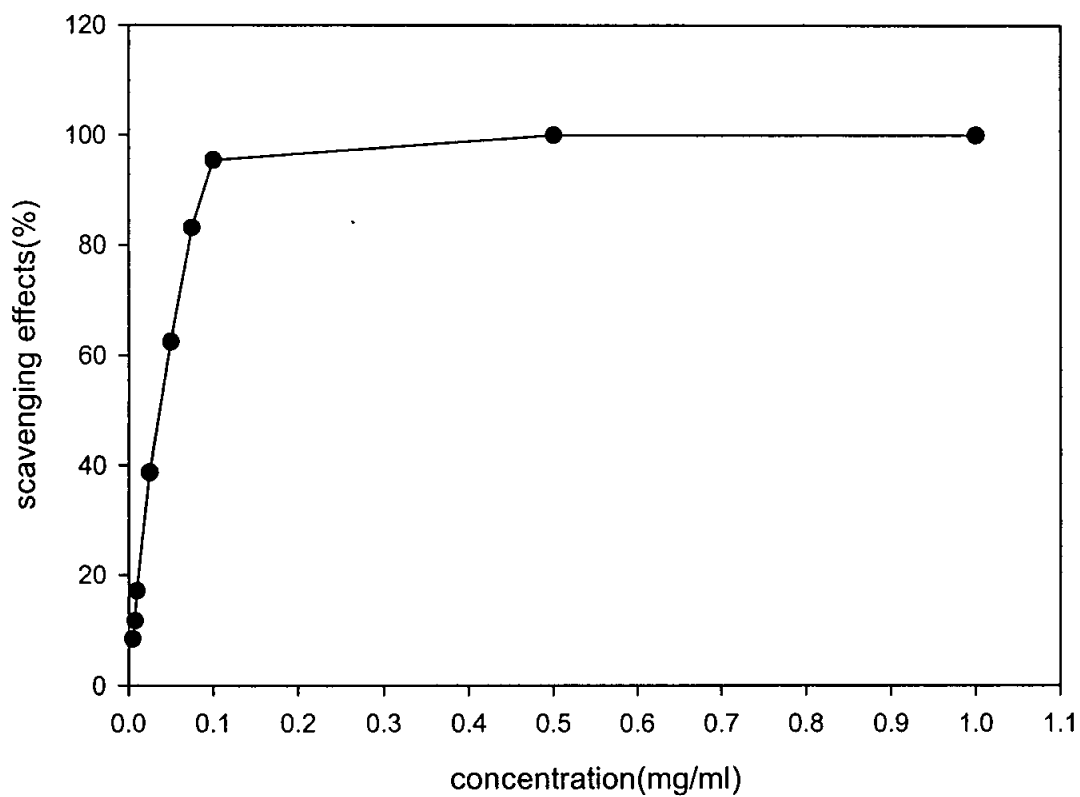


Fig 5. The effects of HAs on DPPH scavenging effect (%). DPPH(1mM) was incubated with presence or absence of different concentrations of HAs (0.005~1 mg/ml) .

HAs-raw264.7

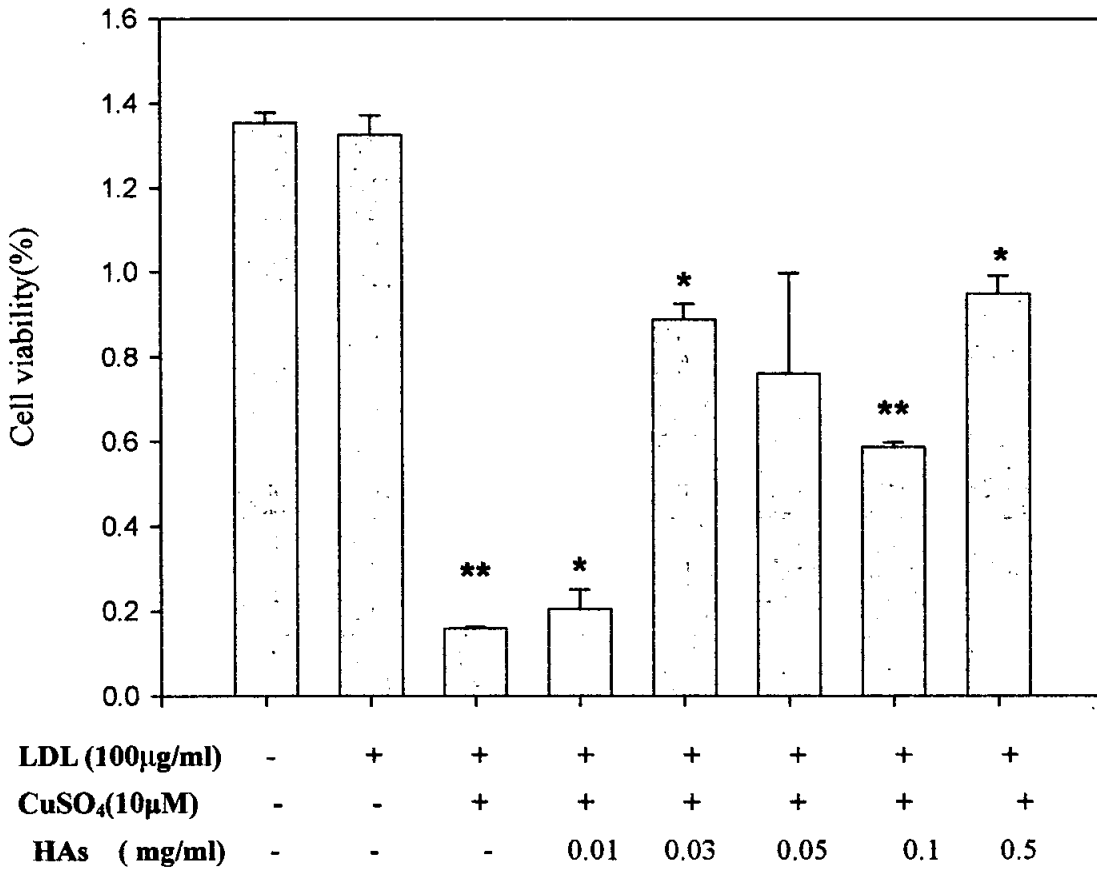
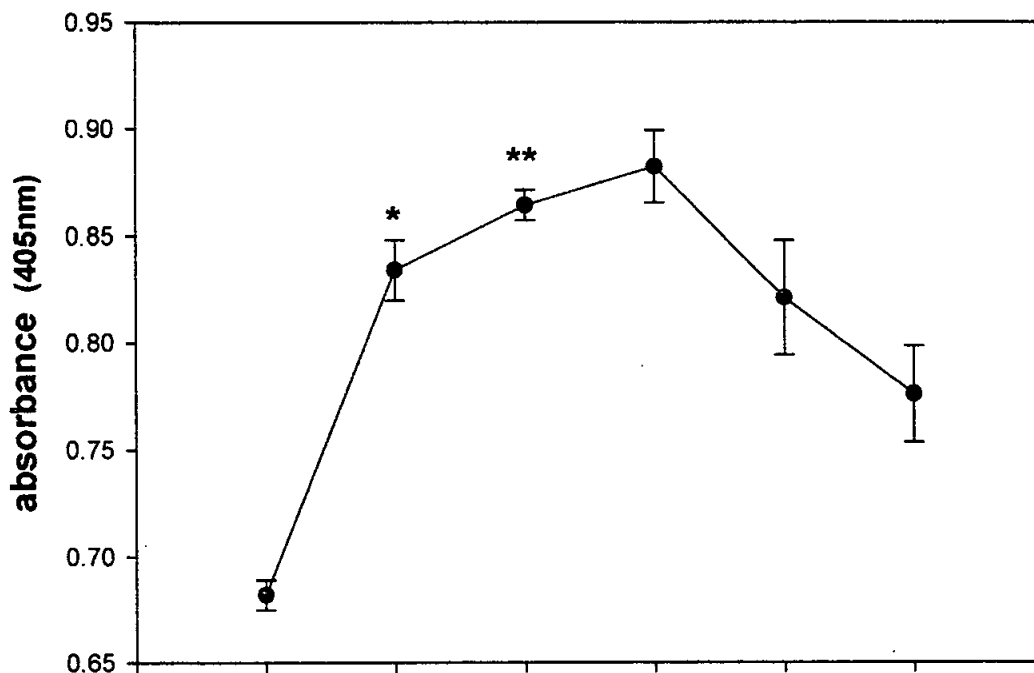


Figure 6. The effects of HAs on macrophage cytotoxicity. RAW 264.7 cell was incubated with 100 µg/ml LDL、10 µM CuSO₄ and different concentrations of HAs (0.01~0.5mg/ml) for 20 hr. The data were means ± SD from 3 samples for each group. *p<0.05,**p<0.005.

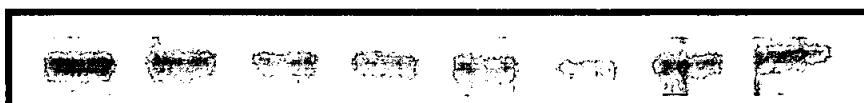


LDL (100 μg/ml)	-	+	+	+	+	+
CuSO4(10 μ M)	-	-	+	+	+	+
HAs (mg/ml)	-	-	-	0.03	0.05	0.5

Figure 7. CPP32 activity assay. The CPP32 activity was measured in cell extracts obtained from RAW264.7 cells were treated OxLDL and incubated at 37°C in the presence of HAs for 20 hr. . The CPP32 activity is then read at 405nm by a colorimetric assay kits. The data were means ± SD from 2 samples for each group. * p<0.05, ** p<0.005.

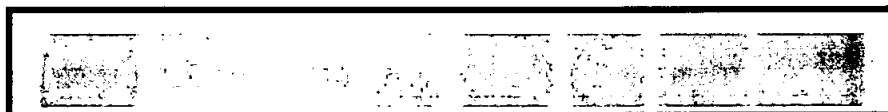
LDL (100 μ g/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+
CuSO ₄ (10 μ M)	-	-	+	+	+	+	+	+
HAs (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5

caspase-3



Fold 1 0.82 0.66 0.86 0.94 0.7 1.03 1.07

PARP



Fold 1 0.79 0.46 0.48 0.85 0.58 0.71 1.03

β -actin

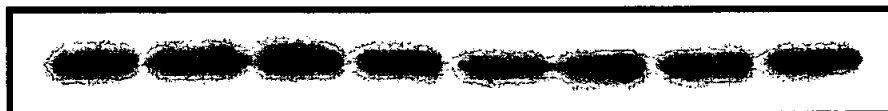


Figure 8. Dose course effect of HAs on apoptosis protein expression in RAW 264.7 cell. cells were treated HAs at the indicated dose and OxLDL (100 μ g/ml) incubated at 37°C for 20 hr. Cell lysates prepared and subjected to western blot analysis: 50 μ g of protein extract from each condition was electrophoresed in each lane of 10% SDS-PAGE and analysed by immunoblot with the anti-caspase-3,PARP antibody or actin used for equal loading. Values were the average of triplicate experiments.

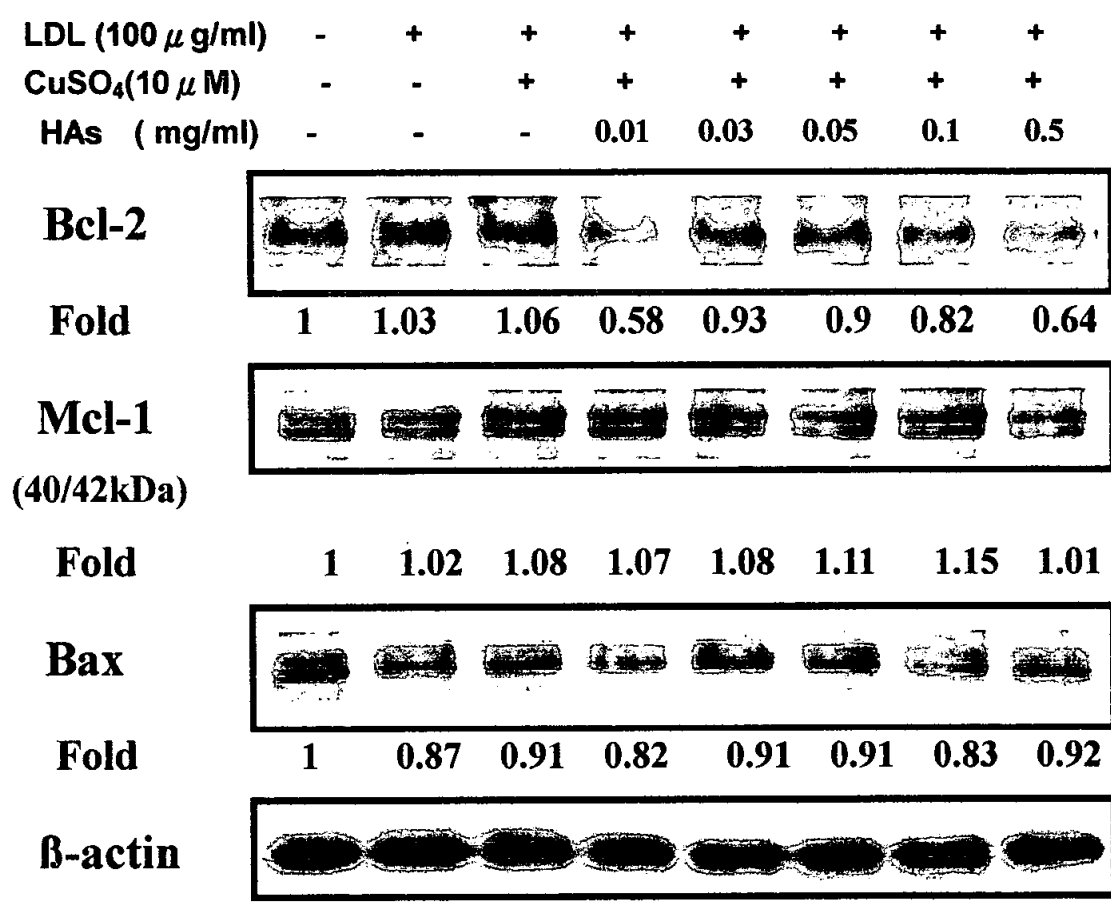


Figure 9. Dose course effect of HAs on Bcl-2 family protein expression in RAW 264.7 cell. Cells were treated HAs at the indicated dose and oxLDL (100 μ g/ml) incubated at 37°C for 20 hr. Cell lysates prepared and subjected to western blot analysis: 50 μ g of protein extract from each condition was electrophoresed in each lane of 10% SDS-PAGE and analysed by immunoblot with the anti-Bcl-2 family antibody or actin used for equal loading. Values were the average of triplicate experiments.

LDL (100 μ g/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+
CuSO ₄ (10 μ M)	-	-	+	+	+	+	+	+
HAs (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5

cytochrome c



(cytosol)

β -actin



Fold

1 0.94 1.16 1.29 1.1 1.12 1.05 0.79

Figure 10. Effect of HAs on cytochrome c protein expression in RAW 264.7 cell. Cells were treated HAs at the indicated dose and oxLDL (100 μ g/ml) incubated at 37°C for 20 hr. Cell lysates prepared and subjected to western blot analysis: 15 μ g of protein extract from each condition was electrophoresed in each lane of 10% SDS-PAGE and analysed by immunoblot with the anti- cytochrome c antibody or actin used for equal loading. Values were the average of triplicate experiments.

LDL (100 μ g/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+
CuSO ₄ (10 μ M)	-	-	+	+	+	+	+	+
HAs (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5

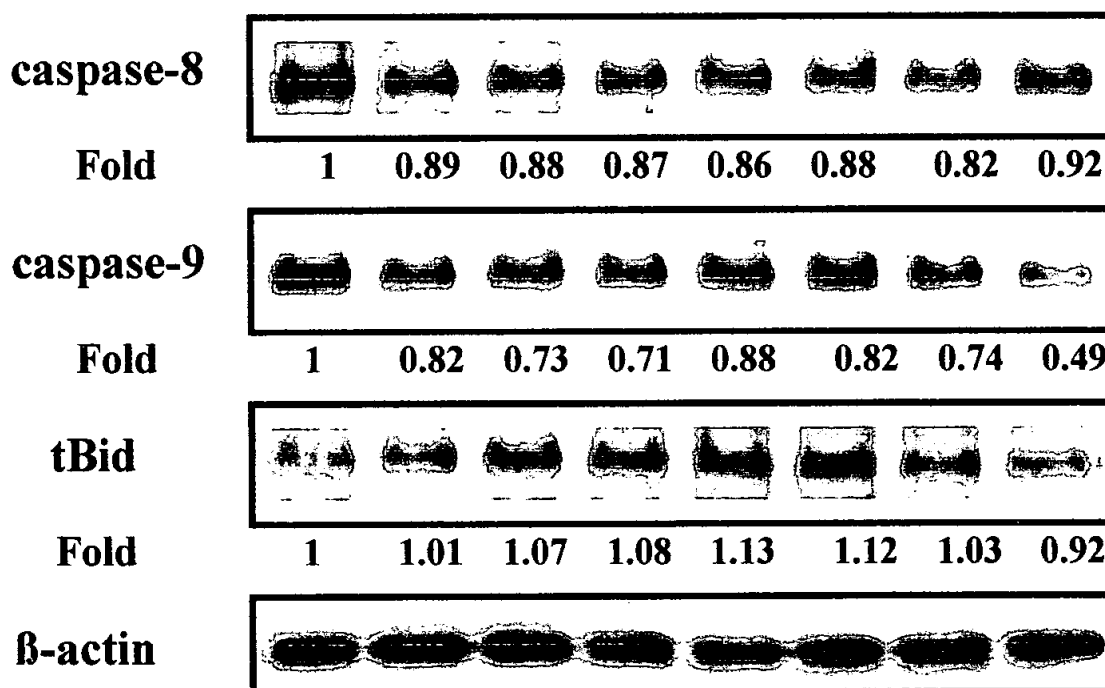


Figure 11. Concentration effect of HAs on caspase-8, caspase-9 and tBid protein expression in RAW 264.7 cell. Cells were treated HAs at the indicated dose and oxLDL (100 μ g/ml) incubated at 37°C for 20 hr. Cell lysates prepared and subjected to western blot analysis: 50 μ g of protein extract from each condition was electrophoresed in each lane of 10% SDS-PAGE and analysed by immunoblot with the anti-caspase-8, caspase-9 and tBid antibody or actin used for equal loading. Values were the average of triplicate experiments.

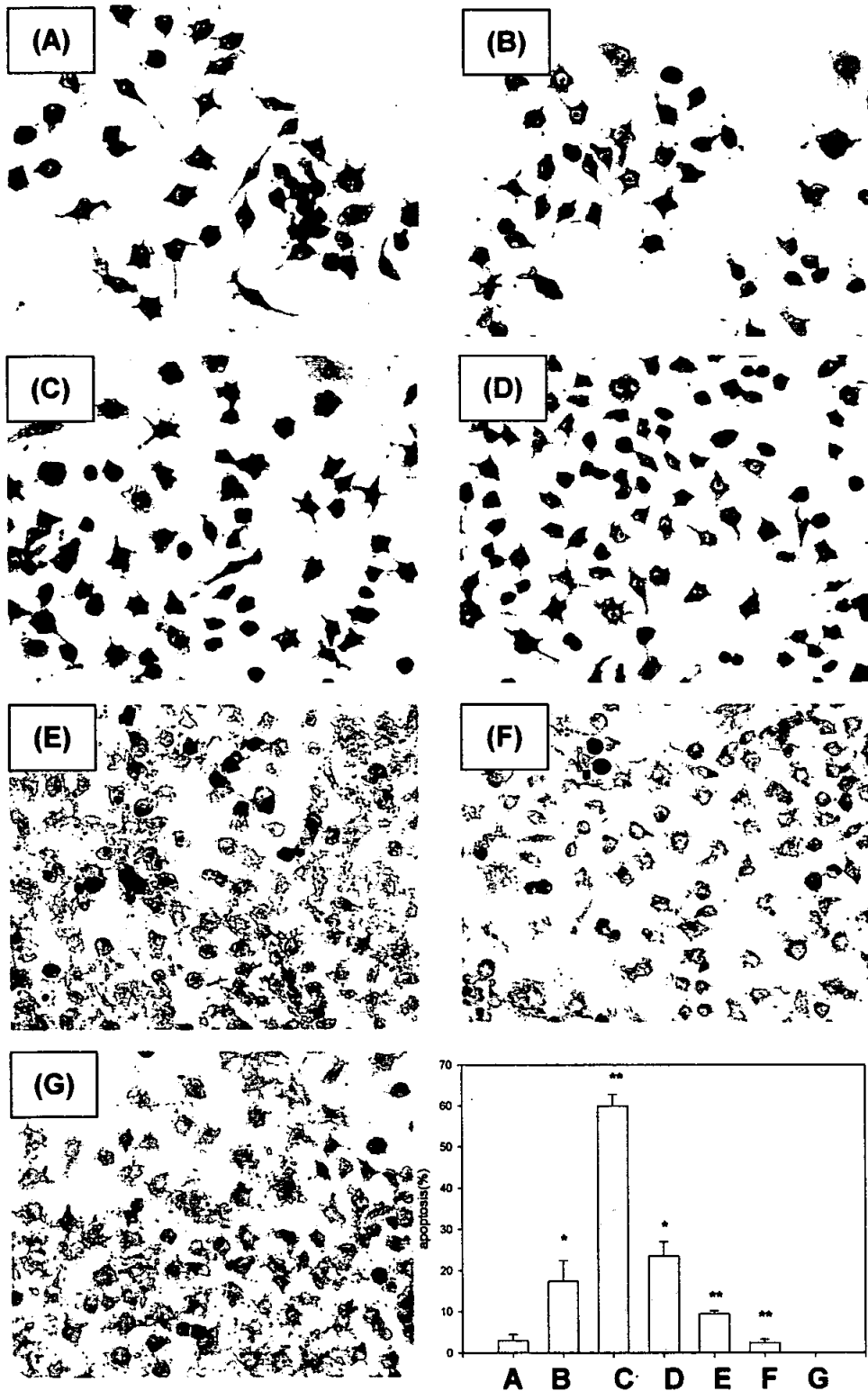


Figure 12. Morphology of RAW 264.7 treatment with HAS. Cells were treated HAS at the indicated dose and OxLDL (100 μ g/ml) incubated at 37°C for 20 hr to observe the apoptosis cell. (A) control;(B) LDL (100ug/ml);(C) oxLDL (100ug/ml); (D) oxLDL+ 0.01 mg/ml HAS;(E) oxLDL+ 0.05 mg/ml HAS;(F) oxLDL+ 0.1 mg/ml HAS;(G) oxLDL+ 0.5 mg/ml HAS;(H) The data were means \pm SD from 3 samples for each group. * p <0.05;** p <0.005.

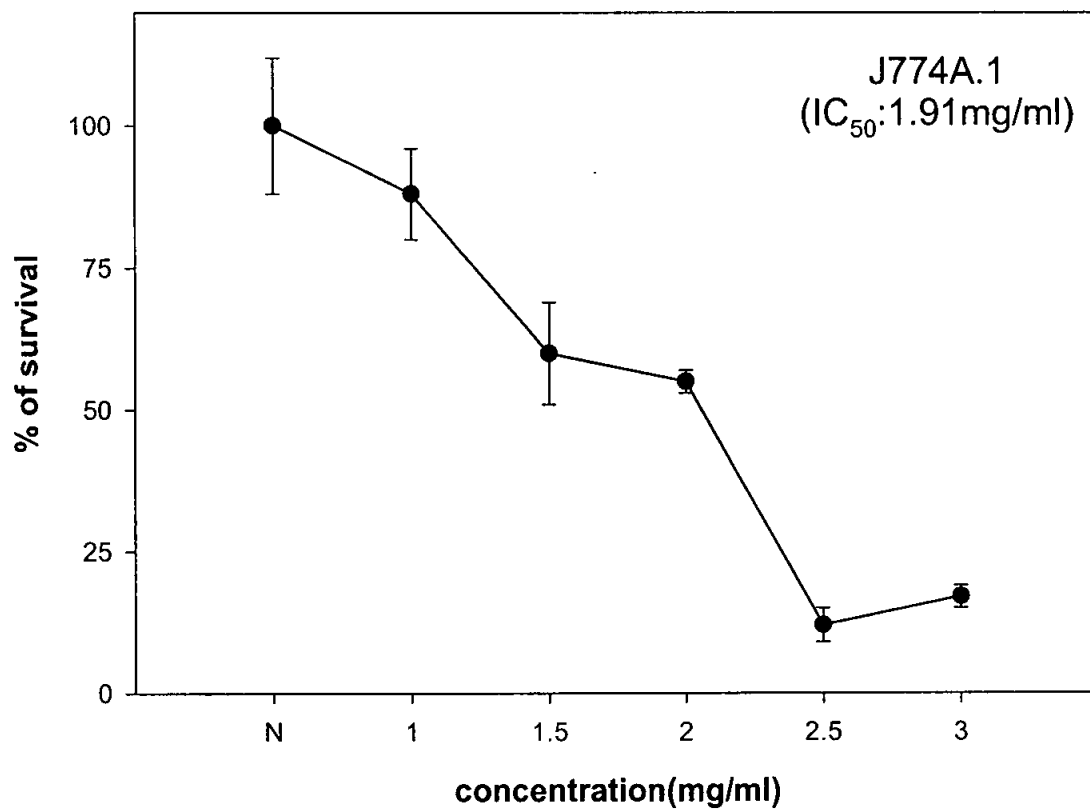


Figure 13. J774A.1 cell exposed HAs for dose-dependent by MTT. Cultured cells were treated with HAs 18 h for indicated dose. The data were means \pm SD form 3 samples for each group.

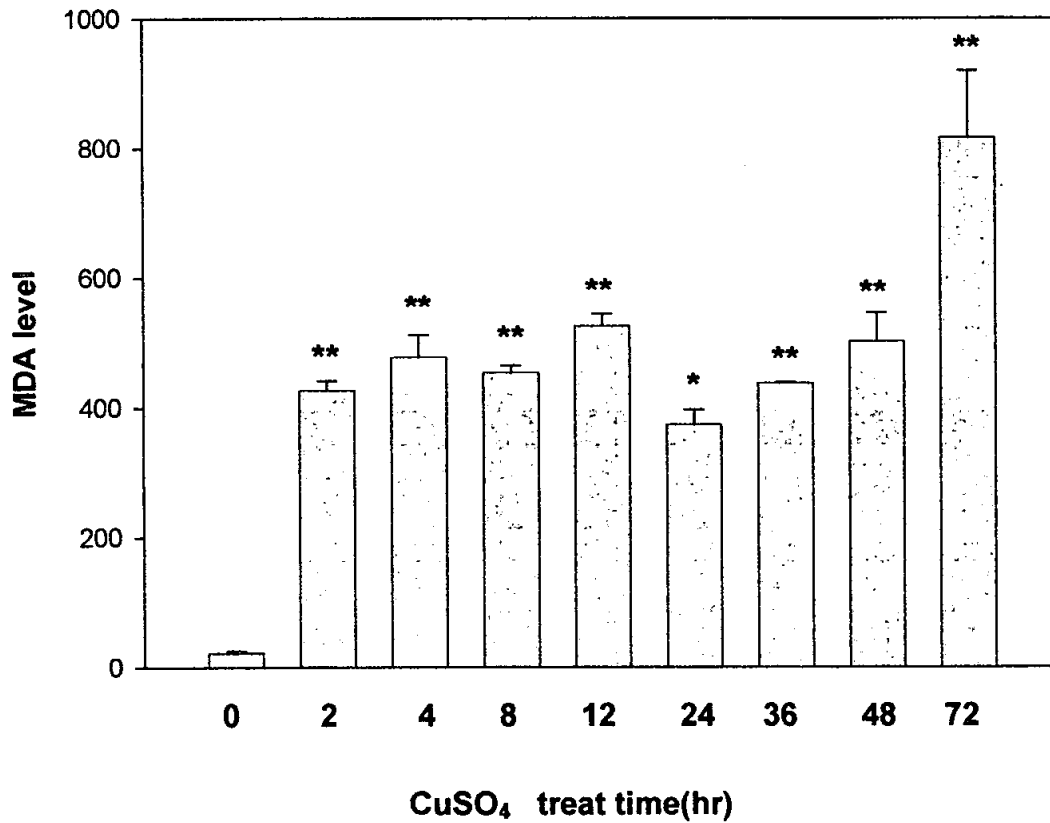


Figure 14. Oxidation level on LDL. LDL were incubated with 10 μ M CuSO₄ for 0-72 hours 37°C. Values were the average of triplicate determinations. Statistically with mean \pm SD, *p<0.05; **p<0.005 compared with control.

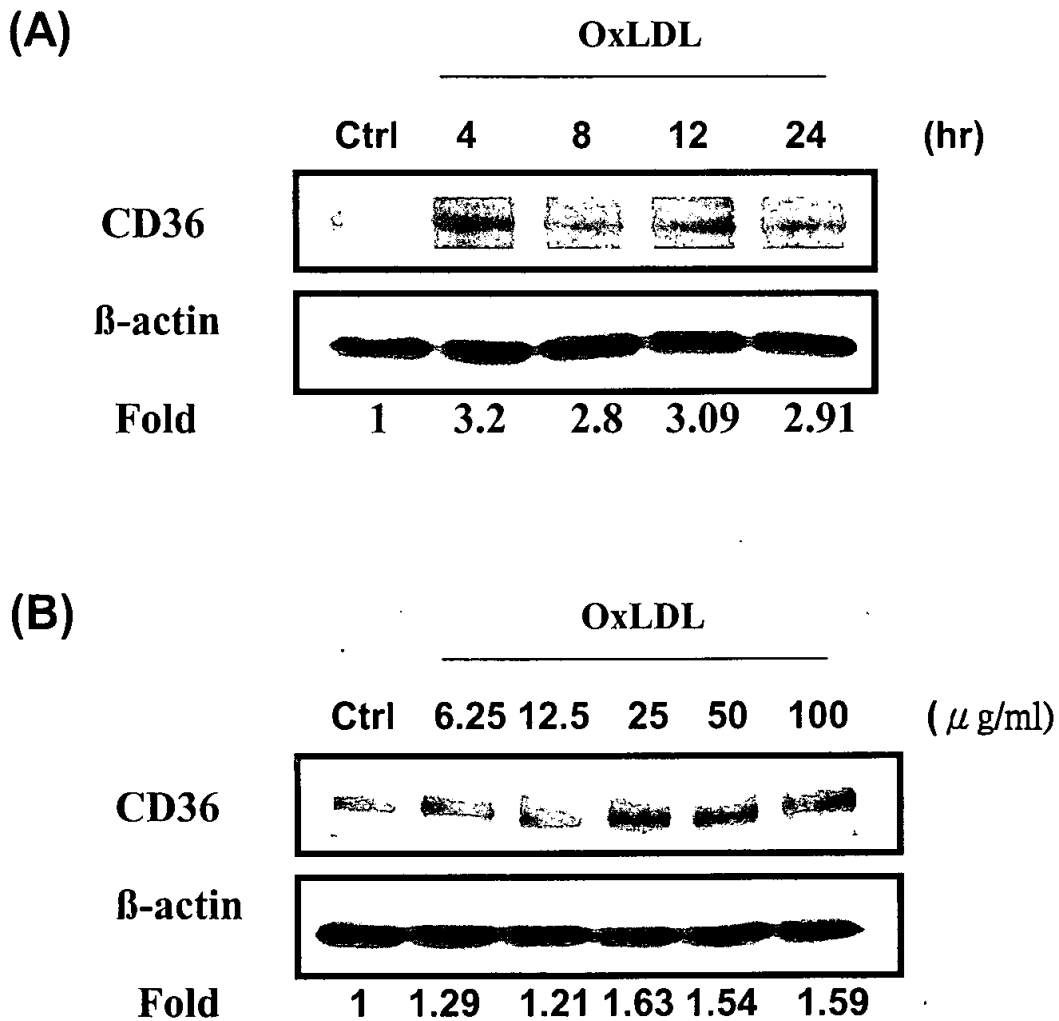


Figure 15 A. B. The CD36 protein was analyzed by immunoblotting. Values were the average of triplicate experiments. **(A)** Cultured cells were treated with oxLDL 100 μ g/ml for indicated time. It showed the time course of oxLDL treatment on CD36 protein expression in J774A.1 cell. **(B)** Cultured cells were treated with oxLDL 6 hr for indicated dose. It showed dose course of oxLDL treatment on CD36 protein expression in J774A.1 cell.

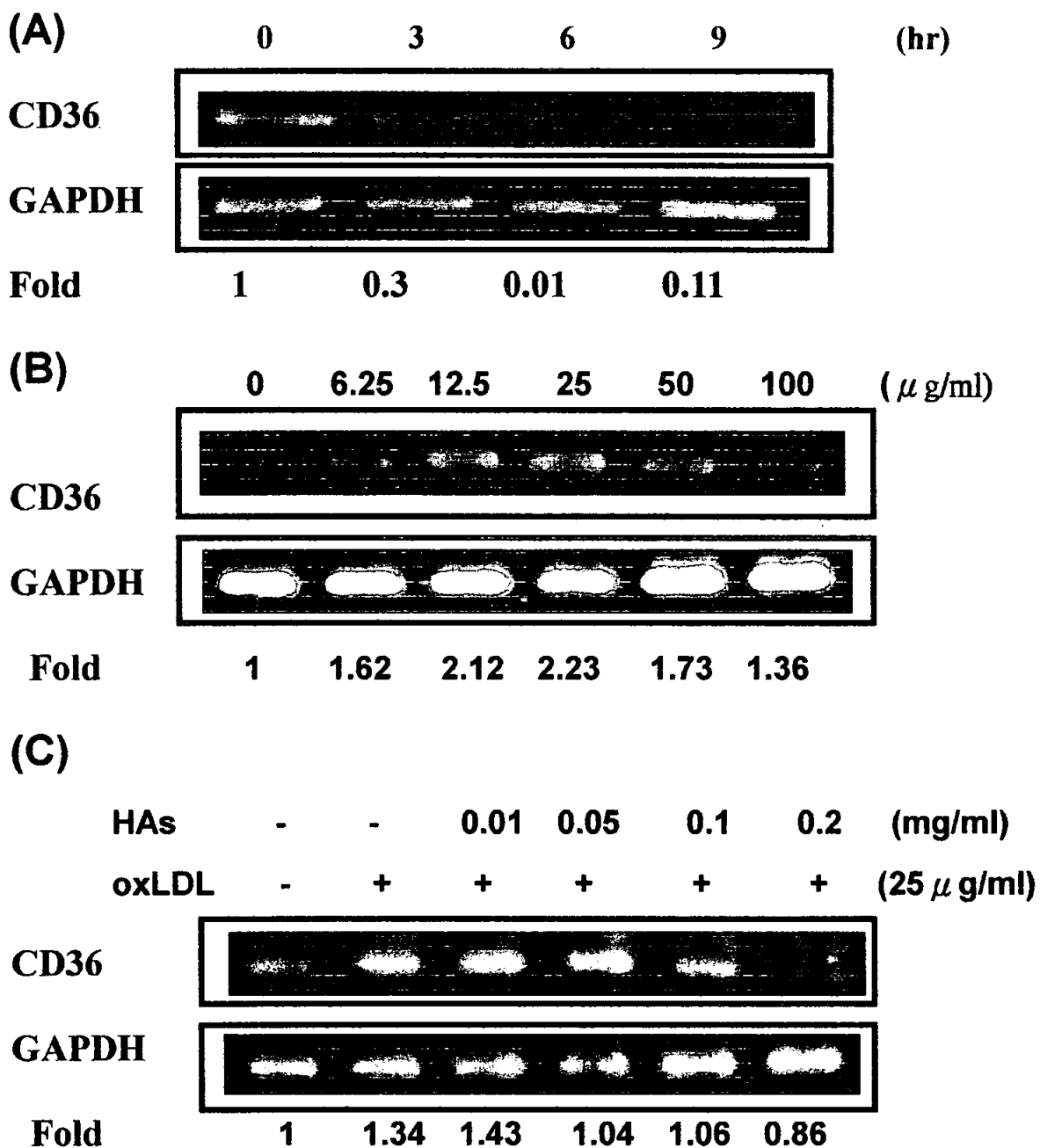


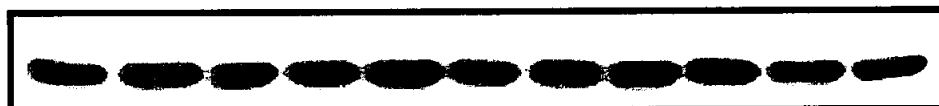
Figure 16A.B.C. The CD36 mRNA was analyzed by RT-PCR. Values were the average of triplicate experiments. **(A)** Cultured cells were treated with oxLDL 100 μ g/ml for indicated time. It showed the time course of oxLDL treatment on CD36 mRNA expression in J774A.1 cell. **(B)** Cultured cells were treated with oxLDL 6 hr for indicated dose. It showed the dose course of oxLDL treatment on CD36 mRNA expression in J774A.1 cell. **(C)** Cells were treated with HAs for indicated dose and then added to 25 μ g/ml oxLDL for 6 hrs. It showed the Inhibitory effects of anthocyanins (HAs) on CD36 mRNA in J774A.1 cell .

oxLDL	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
HAs	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
PD98059	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
SB203580	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Wortmannin	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

CD36



β-actin



Fold

1 1.15 1.22 0.86 1.21 1.12 0.82 1.19 0.46 0.67 1.17

Figure 17. Inhibitory effects of anthocyanins (HAs) on CD36 protein in J774A.1 cell . cells were pretreated various concentrations of 10 μ mPD98059, 10 μ m SB203580 and 1 μ m Wortmannin ,and then incubated with HAs for indicated dose and than added to 25 μ g/ml oxLDL for 6 hrs. The CD36 protein was analyzed by immunoblotting. Values were the average of triplicate experiments.

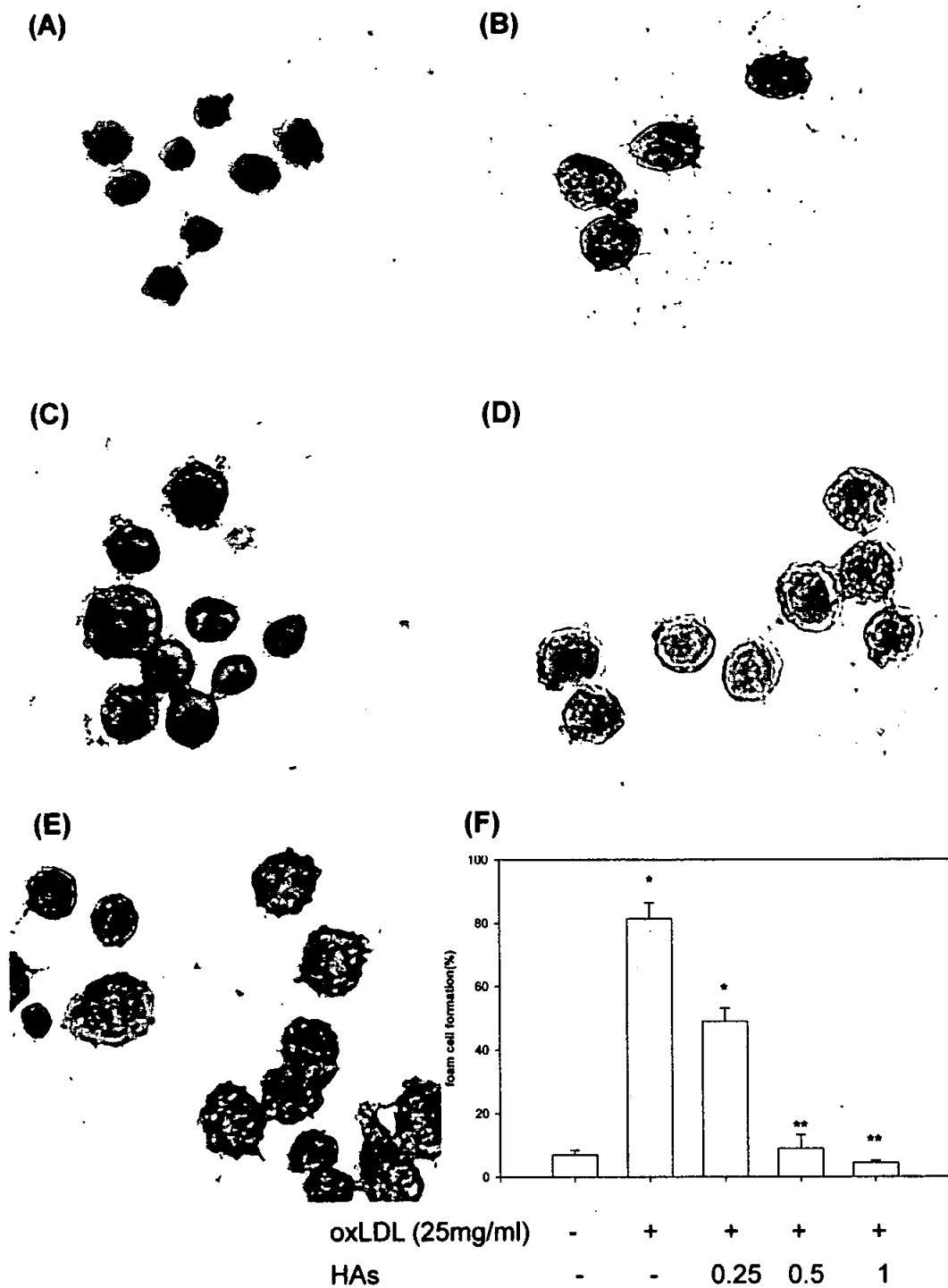
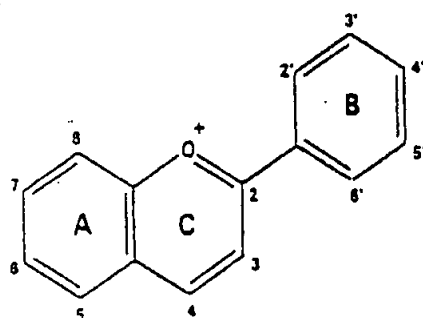


Figure 18. Inhibitory effects of anthocyanins (HAs) on foam cell formation. J774A.1 cells was incubated in RPMI medium with HAs and than added to 50µg/ml oxLDL at 37°C · 5%CO₂ for 18 hrs. The cells were stained with Oil Red O and observed under the microscope. The red droplets accumulated in the cells were stained lipids. (A) Normal (B) oxLDL (50ug/ml); (C) oxLDL+ 0.25 mg/ml HAs; (D) oxLDL+ 0.5 mg/ml HAs; (E) oxLDL+ 1 mg/ml HAs; (F) quantitative analysis. The data were means ± SD from 3 samples for each group. *p<0.05;**p<0.005.

拾壹、參考附圖



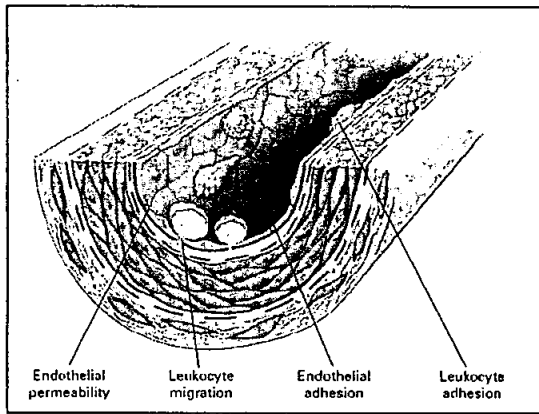
圖一、*Hibiscus sabdariffa* L. (HS)



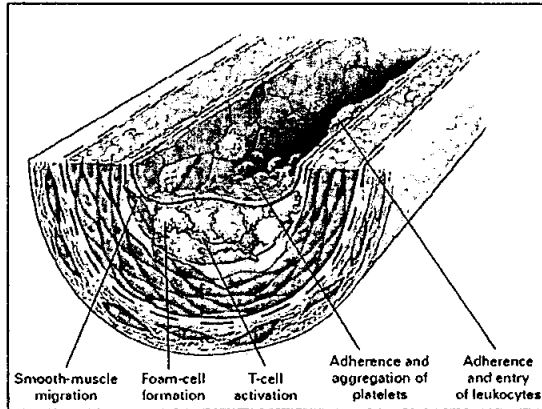
Aglycone	3	5	7	3'	5'	7'
Delphinidin	OH	OH	OH	OH	OH	OH
Cyanidin	OH	OH	OH	OH	OH	H
Pelargonidin	OH	OH	OH	H	OH	H
Malvidin	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
Peonidin	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	H

圖二、常見花青素化合物取代基的一般構造
(Wang et al., 1997)

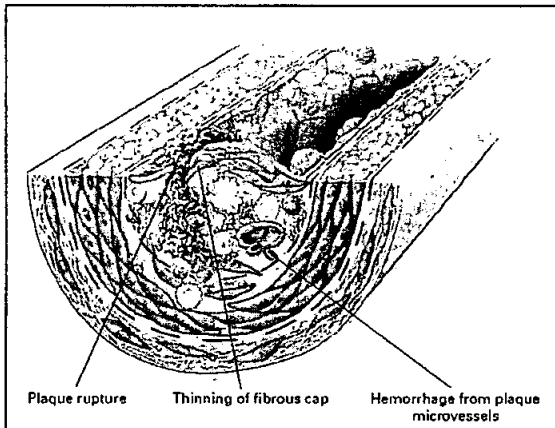
Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis



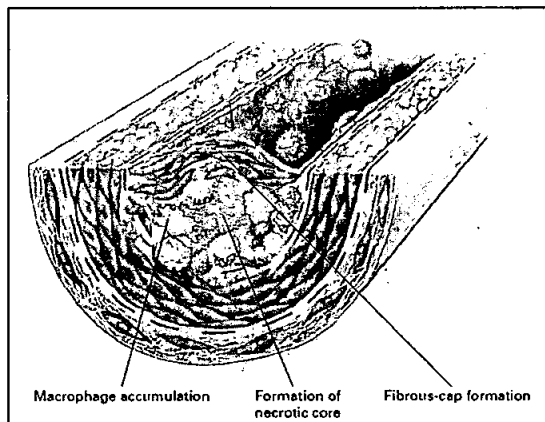
Fatty-Streak Formation in Atherosclerosis



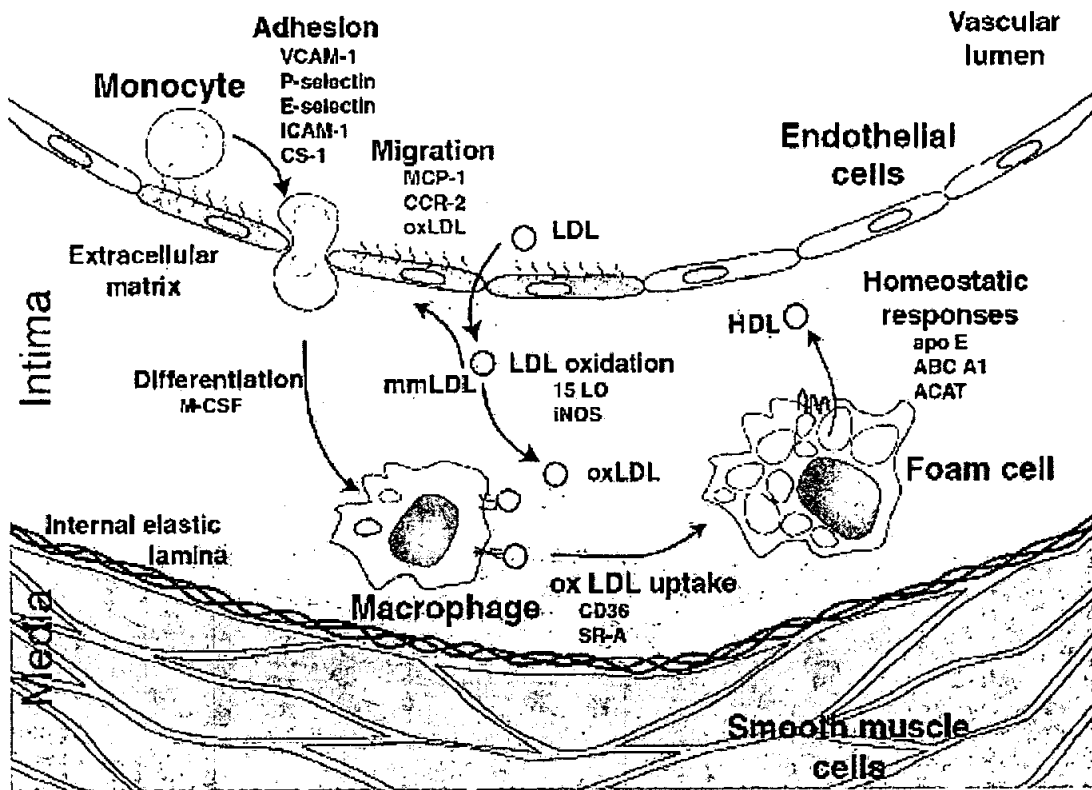
Formation of an Advanced, Complicated Lesion of Atherosclerosis



Unstable Fibrous Plaques in Atherosclerosis

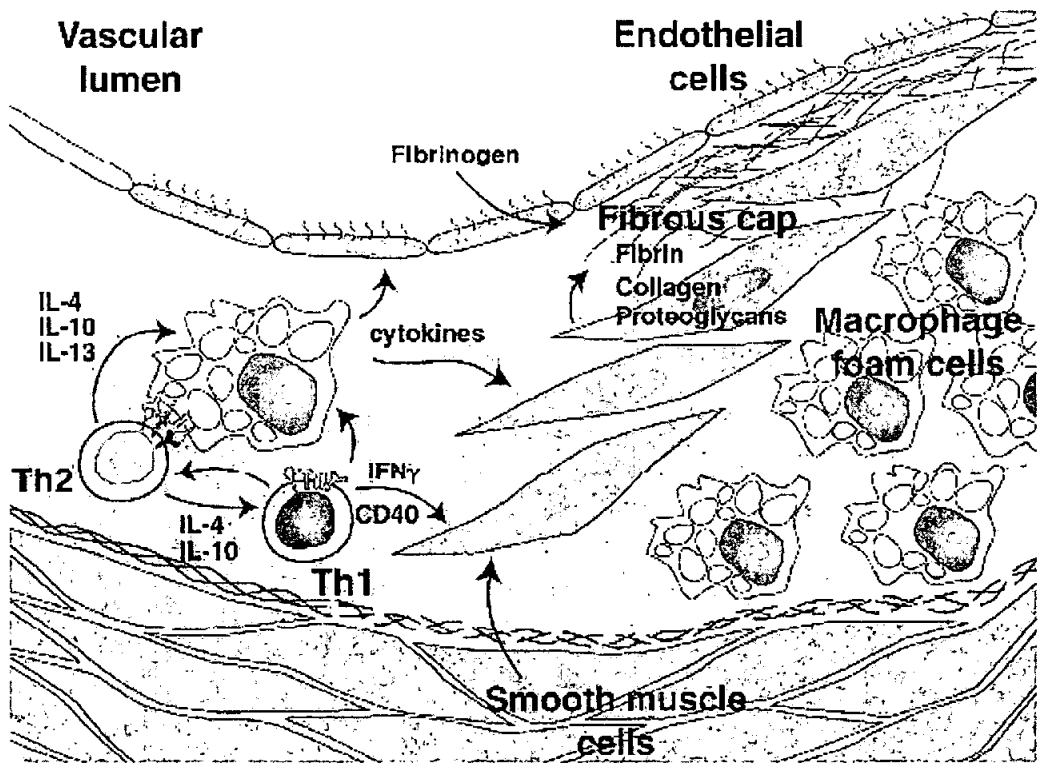


圖三、. The pathogenesis of Atherosclerosis.
(modified from Heinecke, J.W. 1998)



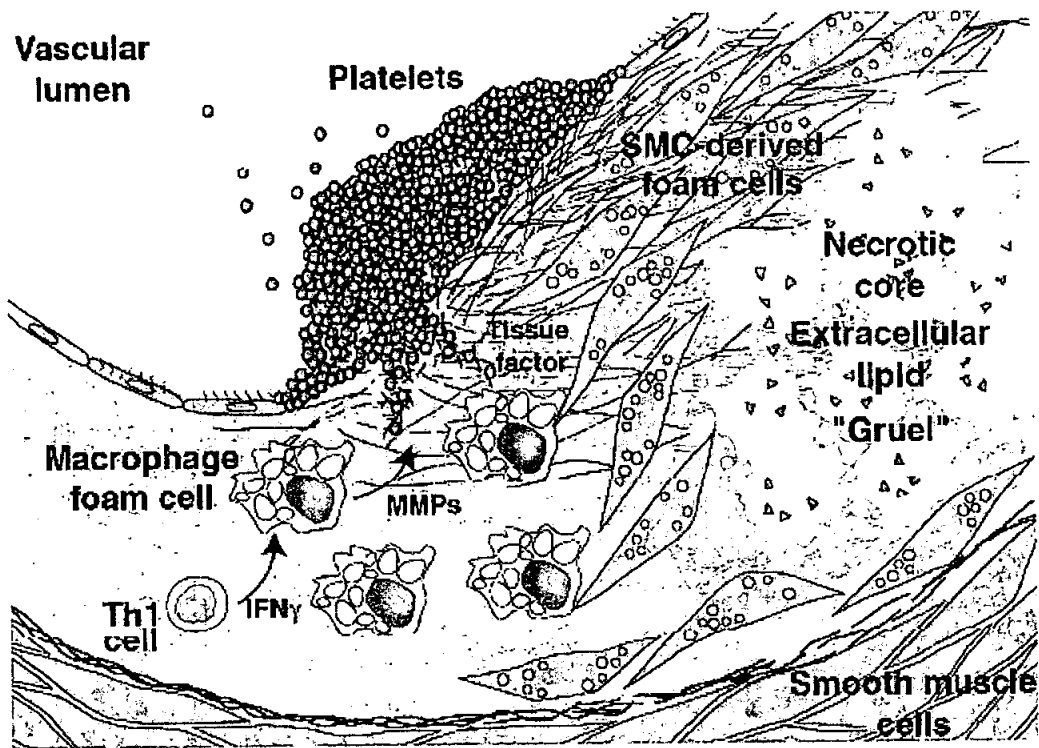
圖四. Initiating Events in the Development of a Fatty Streak Lesion.

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



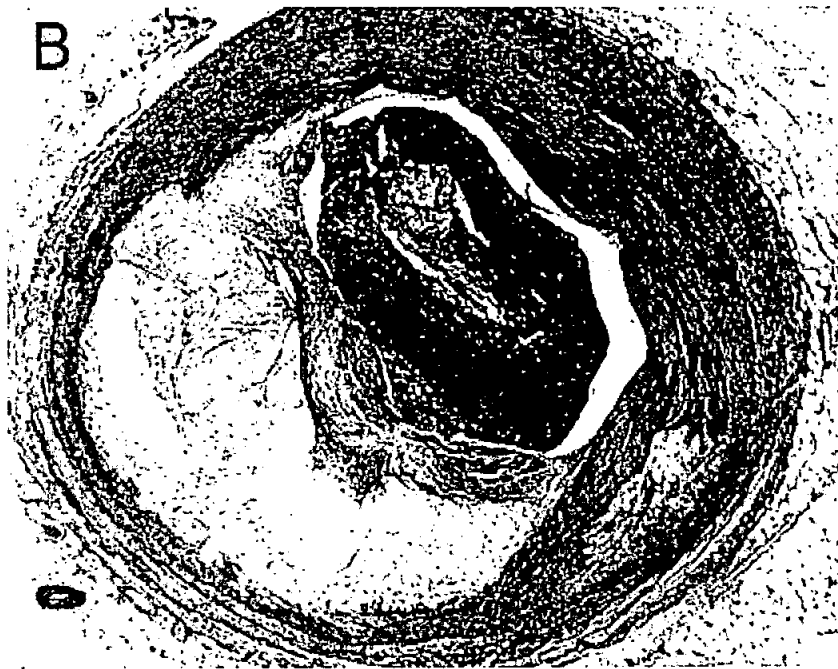
圖五. Lesion Progression.

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



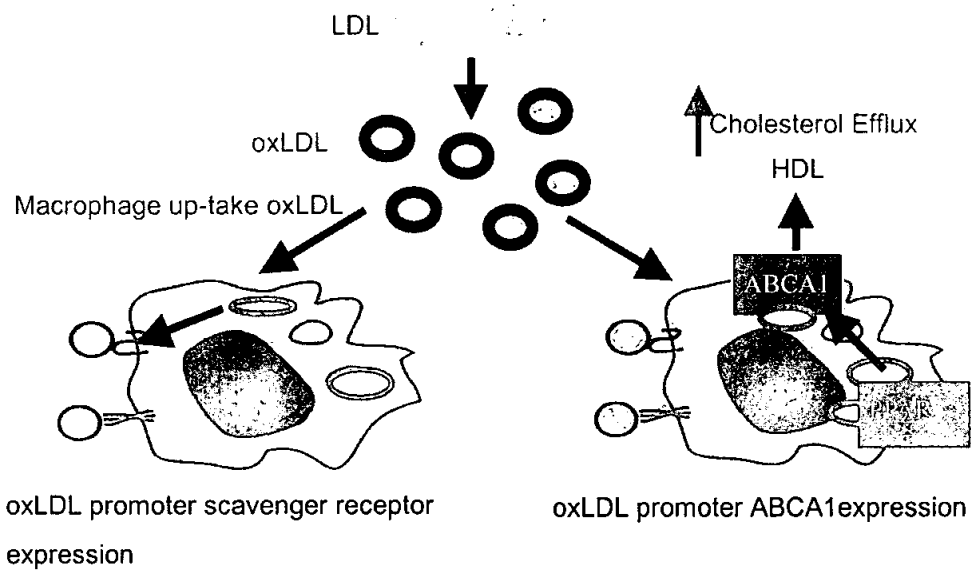
圖六. Plaque Rupture and Thrombosis.

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

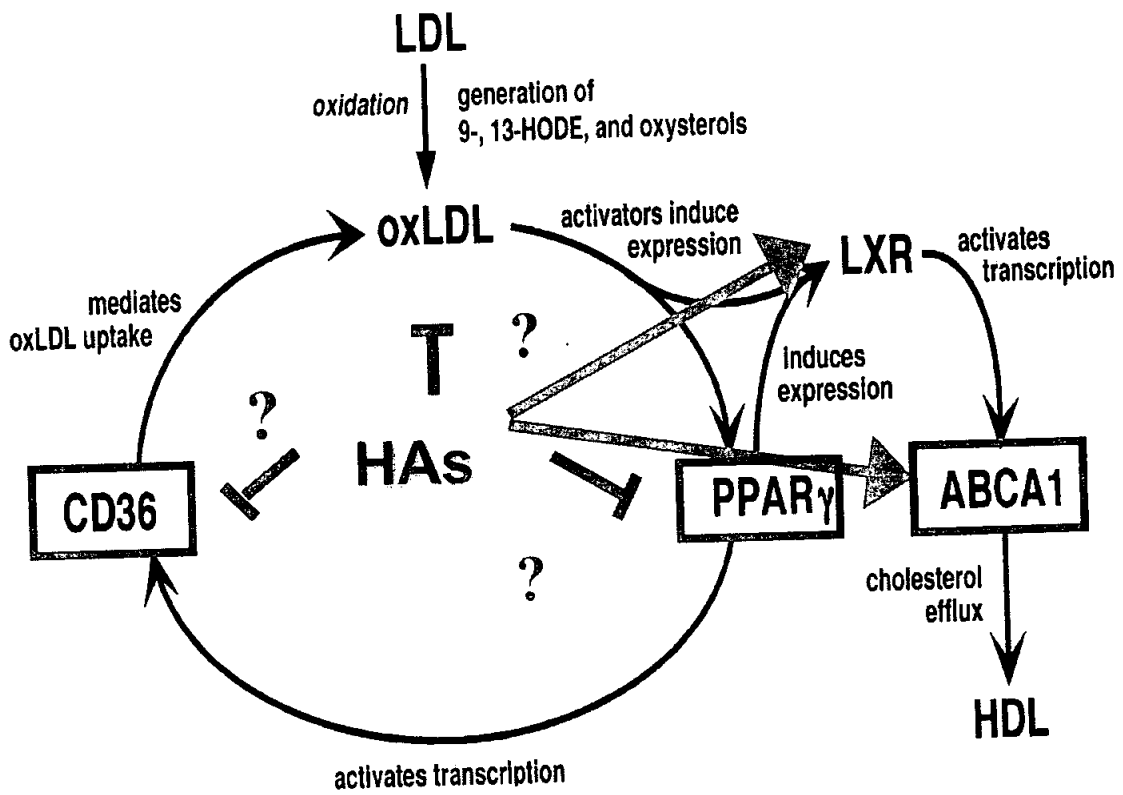


圖七、Atherosclerosis Lesions

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



圖八、巨噬細胞 uptake oxLDL 與細胞內膽固醇的代謝。



圖九、洛神花花青素萃取物 (HAs) 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)

拾貳、參考文獻：

1. Wang, H.,C. and Paior, R.L.(1997). Oxygen radical absorbing capacity of fruits. *J. Agric.food chem.* 45, 304-309.
2. Clifford, M. N. (2000). Review anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1063-1072.
3. Hayashi, K., Ohara, N. and Tsukui, A. (1996) Stability of anthocyanins in various vegetables and fruits. *Food Sci. Technol. Int.* 2, 30-33.
4. Steinberg, D., and Witztum, J.L. (1999). Lipoproteins, Lipoprotein, Oxidation, and Atherogenesis, K.R. Chien, ed. (Philadelphia: W.B. Saunders Co.).
5. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
6. Jihong H., David P. H., Maria F., and Andrew C. N.(1997)Native and Modified Low Density Lipoproteins Increase the Functional Expression of the Macrophage Class B Scavenger Receptor, CD36. *J.Biol.Chem.*Vol.272,No34,21654-21659.
7. Weinberg RA. (1995)The retinoblastoma protein and cell cycle control. [Review] [80 refs] *Cell*, 81 (3): 323-30.
8. Hundal R. S., Salh, B. S., Schrader, J. W., et al. (2001). Oxidized low density lipoprotein inhibits macrophage apoptosis through activation of the PI3-kinase/PKB pathway. *Journal of Lipid Research* , 42, 1483-1491.
9. Baoutina, A., Dean, R. T., & Jessup, W. (2001). Antioxidant properties of macrophages toward low-density lipoprotein. *Trends Cardiovasc Med.*, 11, 1-7.

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 sig-

- naling 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-gamma 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. Febraio, 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. Ursini 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, No52, 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. Life Sci.* 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 Cu^{2+} 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.

拾參、附錄

附錄一 萃取 RNA 相關藥品及配製

〈Solution D〉

成分	重量 / 體積
d ₂ H ₂ O	50 ml
Guanidine Thiocyanate (GNTC)	47.28 g
Sodium citrate	0.735 g
Adjust pH to	pH 7.0
N-lauroylsarcosine (sarcosyl)	0.5 g
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	99.9 ml
DEPC	100 µl
室溫靜置 2 小時以上	
Store at 4 °C (in the dark)	

〈DEPC-treated water〉

成分	重量 / 體積
d ₂ H ₂ O	1998 ml
DEPC	2 ml
室溫靜置 2 小時以上 (避光)	
Autoclaved	
Store at room temperature	

〈2 M Sodium acetate〉

成分	重量 / 體積
DEPC-treated water	75 ml
Sodium acetate	16.41 g
Adjust pH to	pH 4.0
Add DEPC-treated water until total volume is	100 ml
Filter	
Store at 4 °C	

附錄二 RNA 電泳相關藥品及配製

〈1.2 % RNA agarose gel〉

成分	重量 / 體積
Agarose	0.96 g
DEPC-treated water	69.6 ml
Heated	
10X MOPS	8 ml
37 % formamide	2.4 ml
鑄膠	
Fresh prepared	

〈RNA electrophoresis running buffer〉

成分	重量 / 體積
10X MOPS	35 ml
DEPC-treated water	315 ml
Fresh prepared	

〈10X MOPS〉

成分	重量 / 體積
DEPC-treated water	800 ml
Morpholinopropansulfonic acid (MOPS)	41.8 g
Sodium acetate	6.805 g
0.5 M EDTA	20 ml
Adjust pH to	pH 7.0
Add DEPC-treated water until total volume is	1000 ml
Store at room temperature (in the dark)	

附錄三 DNA 電泳相關藥品及配製

〈DNA 6X loading dye〉

成分	重量 / 體積
Bromophenol blue	0.025 g
Xylene cyanol FF	0.025 g
Glycerol	3 ml
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	10 ml
Store at 4 °C	

〈1.2 % Agarose gel〉

成分	重量 / 體積
Agarose	0.6 g
1X TAE buffer	50 ml
Heated	150sec
鑄膠	
Store at 4 °C	

〈50X TAE buffer〉

成分	重量 / 體積
Tris-base	48.4 g
Glacial acetic acid	11.42 ml
0.5 M EDTA (pH8.0)	20 ml
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	200 ml
Store at 4 °C	

附錄四 LDL electrophoretic mobility assay 相關藥品及配製

〈B-2 barbital buffer (PH8.6)〉

成分	重量 / 體積
B-2 barbital	6.07 g
deionized water	493.93 ml
Adjust pH to	pH 8.6
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	500 ml
Store at room temp	

〈Paregon Lipo Stain solution〉

成分	重量 / 體積
reagent alcohol	165 ml
Paragon LIPO Stain	3 ml
deionized water	135 ml

〈Fixative solution〉

成分	重量 / 體積
reagent alcohol	180 ml
glacial acetic acid	30 ml
deionized water	90 ml

〈Destain solution〉

成分	重量 / 體積
reagent alcohol	450 ml
deionized water	550 ml

博碩士論文授權書

(國科會科學技術資料中心版本，92.6.17)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學大學 生物化學研究所
91 學年度第二學期取得碩士學位之論文。

論文名稱：洛神花花青素萃取物抗氧化型低密度脂蛋白所引發動脈粥狀硬化的機轉

同意 不同意 (政府機關重製上網)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利（未申請者本條款請不予理會）的附件之一，申請文號為：_____，註明文號者請將全文資料延後半年後再公開。

同意 不同意 (圖書館影印)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鉤選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：王朝鐘

研究生簽名：黃安中
(親筆正楷)

學號：9009016
(務必填寫)

日期：民國 92 年 8 月 20 日