

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

原兒茶酸抗動脈粥狀硬化機轉之研究 (II)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-040-038-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：李慧禎

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 20 日

一、中文摘要

粥狀動脈硬化是形成心臟血管疾病的一個重要病因，粥狀動脈硬化主要是因為血液中的膽固醇及低密度脂蛋白在血液的含量過高，受到自由基的氧化，形成氧化態的低密度脂蛋白，進而影響內皮細胞的增生及動脈粥狀斑塊的現象。在天然的抗氧化劑中，已清楚的報導具有抗動脈粥狀硬化的形成，例如 Vit C、Vit E、beta-carotene。而在之前的研究中指出，原兒茶酸 (PCA) 對氧化型低密度脂蛋白處理巨噬細胞 (RAW264.7) 具有抑制其凋謝死亡 (apoptosis) 的作用。

本實驗繼續探討原兒茶酸 (PCA) 對氧化型低密度脂蛋白處理人類單核球細胞 (THP-1) 是否具有抑制其凋謝死亡的作用。利用脂質過氧化分析 TBARS、Migration assay、Flow cytometric DNA fluorescence profiles 等實驗方法，結果我們發現隨著洛神花水萃取物和原兒茶酸劑量的增加可以抑制由 OxLDL 所引起的細胞凋謝現象。結果在高濃度 PCA，其抑制脂質過氧化物 MDA 的產生分別為 91% 及 85%；migration assay 中高濃度 PCA 可抑制 migration 分別為 70% 及 76%；flow cytometry 發現 PCA 抑制細胞凋謝死亡可達 81% 及 93%。由以上結果得知，PCA 可保護單核球細胞於處理 oxLDL 後分化為巨噬細胞的作用。

二、英文摘要

In developed countries, atherosclerosis and its complications are becoming a major cause of death. Several studies showed that free radical-mediated oxidation of low density lipoprotein leading to the production of oxidized LDL (OxLDL) is a key event in initiating endothelial cells proliferation and atherosclerosis plaque. Some natural antioxidants such as vitamin C, vitamin E, β -carotene have been revealed clearly to prevent the atherosclerosis. As shown in previous studies, we found that protocatechuic acid (PCA) could be able to inhibit the apoptosis of macrophage induced by OxLDL. In this study, we used the human monocyte, THP-1 to further detect the effects induced by OxLDL, and what kind of role could PCA play. Using TBAR, migration assay, flow cytometric DNA fluorescence and detecting apoptosis-related proteins, our results showed that increasing the dosage of PCA could inhibit monocyte apoptosis caused by OxLDL. At the high concentration of PCA, the concentrations of MDA produced from lipid peroxidation were inhibited up to 91% and 85%; the inhibitory percentage on migration were 70% and 76%; and the level of apoptosis was reduced to 81% and 93%. Taken the above, we concluded that the inhibitory mechanisms of PCA on atherosclerosis could also be contributed to the other pathway by inhibiting monocyte apoptosis and differentiation.

三、報告內容

(一) 前言

PCA 是一種簡單的酚類化合物 (1)，近年來有研究報告指出原兒茶酸是一個有效的化學預防試劑 (chemoprevention agent) (2-4)，用來抑制一些化合物所導致的腫瘤形成作用，PCA 有很強的抗氧化力 (5)，並具有清除自由基的能力，亦有許多研究報告指出 PCA 在動物實驗上確實有抑制化學致癌的能力，故 PCA 對於肝癌、口腔癌、胃癌、結腸癌等有抑制作用 (6, 7)。PCA 的抗氧化能力很強，因此我們想進一步探討在抑制 oxLDL 的效果如何。

(二) 研究目的

在之前的研究指出，原兒茶酸 (PCA) 對於氧化型低密度脂蛋白所表現的負電荷增加 (lipogel electrophoresis)、脂肪酸氧化 (TBARS) 有抑制作用，因此本實驗中進一步以人類單核球細胞 (THP-1 cell) 為模式，處理原兒茶酸後，再加入

氧化型低密度脂蛋白，以觀察細胞的變化，藉此測定是否不同濃度的 PCA，在人類單核球細胞中具有抗 LDL 的氧化能力？若 PCA 在人類單核球細胞中表現具有抗 LDL 的能力，其對細胞本身的影響為何？將是我們在此部分實驗中所探討的重點。

(三) 文獻參考

高膽固醇與粥狀動脈硬化息息相關，膽固醇的運送與細胞膜上運送膽固醇的脂蛋白 (lipoprotein) 有關，脂蛋白為脂肪與蛋白質的複合體，其組成為膽固醇脂 (cholesterol ester) 與三酸甘油 (triglyceride)、游離脂肪酸 (free fatty acid)、磷酸脂質 (phospholipide)、衍蛋白 (apolipoprotein) 等。依密度可將脂蛋白分為五種：chylomicron、very-low density lipoprotein (VLDL)、intermediate density lipoprotein (IDL)、low density lipoprotein (LDL)、high density lipoprotein (HDL) (8)。

近年來研究發現 LDL 上的不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 受到氧化會形成氧化型脂蛋白 (oxidized LDL)，進而引起動脈粥狀硬化 (9, 10)。動脈粥狀硬化的發生為複雜且漸進式的過程，當血管內皮細胞 (endothelial cell) 受損，使血管腔 (vascular lumen) 間隙增加，此時脂蛋白可以進入血管內膜 (intima) 中被內生性氧化因子氧化形成氧化型低密度脂蛋白 (oxLDL)，單核球細胞 (monocytes) 受到氧化型低密度脂蛋白的趨化作用，而穿透過內皮細胞進入血管壁中，當單核球細胞轉移至血管內膜後，單核球細胞會受趨化物質 (chemoattractants) 如單核細胞化學誘引蛋白-1 (monocyte chemotactic protein; MCP-1)、血小板誘導生長因子 (platelet-derived growth factor; PDGF)、群落刺激因子 (colony-stimulating factors; CSFs) 與 M-CSF (macrophage monocyte-colony-stimulating factor) 等影響而分化 (differentiation) 為載滿油脂的巨噬細胞 (macrophage) (11, 12)。巨噬細胞會表達清除者接受器 SA-A (scavenger receptor)、CD36 來辨識 ox-LDL，並經將 ox-LDL 內飲 (endocytosis) 至細胞內，當巨噬細胞吞噬 (endocytosis) 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 (foam cell) (13-15)。大量的泡沫細胞聚集堆積在動脈管壁上形成脂肪斑 (fatty streaks)，是粥狀動脈硬化過程中最早可辨識的病灶。脂肪條紋會緩慢的形成纖維斑 (fibrous plaque)。在這些病灶中，大量的脂質持續的聚集在泡沫細胞，結果大量的細胞外脂質取代了正常細胞間質，形成一個以脂質為核心，外為包著死亡巨噬細胞的粥狀瘤 (atheroma) 病灶。

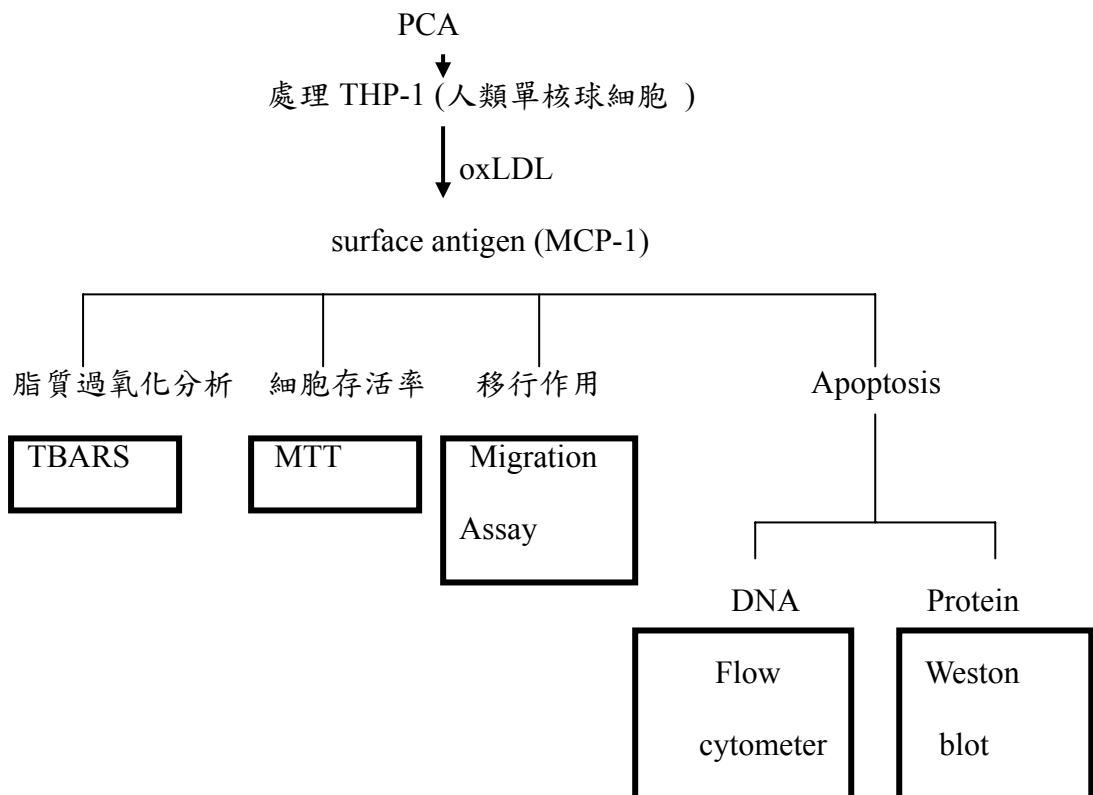
因此，氧化型 LDL 會增加單核球細胞黏附 (adhesion) 到內皮細胞 (endothelial cell) 且誘導化學趨化因子如 MCP-1 的分泌而刺激單核球細胞移行 (migration) 至 transendothelial 的作用，MCP-1 可以當作單核球細胞移行至內皮細胞進入血管壁中分化成為巨噬細胞的表面抗原 (16)。MCP-1 是細胞激素 (chemokines) 中的 CC 家族 (CC family) 成員，主要由 CCR2 來調節其分泌，CCR2 是一個 seven- transmembrane - spanning G protein-coupled receptor，其主要表現在單核球細胞、嗜鹼性細胞及 T 細胞 (17)。

LDL 的氧化大多是在動脈血管中進行，因此 LDL 的氧化是引起動脈粥狀硬化的一個重要致病因，而飲食控制及特殊食物成分可能具有減緩動脈粥狀硬化和預防動脈粥狀硬化的效果。

在心血管疾病方面，凋謝死亡於近十年來被探討許多。許多學者發現在動脈粥狀硬化斑塊 (atherosclerotic plaque) 中出現了凋謝死亡與壞死 (necrosis) 兩種類型的細胞，要將此二種細胞分清楚並不容易 (18)，因此大部分學者仍專注在凋謝死亡與心血管疾病的相關性 (19-21)。Kockx 依據動脈粥狀損傷的發展分析細胞凋

亡的程度，結果發現在細胞內膜增厚及形成脂肪斑塊的時期，細胞凋亡的數目極少，在已形成動脈粥狀硬化斑塊的時期，細胞凋亡的數目增多。Apoptosis 的進行與 caspases (cysteins aspartase) 有關，當細胞受到凋亡刺激時會活化 caspases 而進行蛋白水解作用。細胞進行 apoptosis 時可分為兩部份進行：(1) 外在途徑 (extrinsic pathway)：主要在粒線體外進行的細胞凋亡機制。此途徑由 transmembrane death receptor (如 CD95、TNF receptor 及 TRAIL receptor) 與 ligand 結合而活化 caspases (caspase 8 及 caspase 10)，再促使下游的 effector caspases 3、6、7 活化之後進行 apoptosis；(2) 內在路徑 (intrinsic pathway)：與粒線體有關的細胞凋亡機制。主要與 Bcl-2 family 有關，其成員會結合在粒線體的膜上，控制粒線體膜的通透性。當細胞進行凋亡時，Bcl-2 family 在粒線體表面形成許多孔洞，這些孔洞會造成粒線體間質釋出 cytochrome c 和 apoptosis-inducing factor (AIF) 而活化 caspases-9，進而活化 caspase 3、6、7，引起一連串細胞凋亡現象發生。Bcl-2 family 可分為兩類而互相拮抗，一為 proapoptotic protein：Bak，Bax，它們與 Bid 進行交互作用引起 apoptosis；另一為 antiapoptosis protein：Bcl-2 及 Bcl-XL，它們在細胞進行 apoptosis 時產生抗細胞凋亡的蛋白。這些 proapoptotic protein 及 antiapoptosis protein 之間的競爭作用會影響細胞走向生存或死亡。

(四) 研究架構及方法



(五) 結果

1. 細胞加入不濃度 CuSO₄ 在不同時間下誘發 oxLDL 後存活情形

THP-1 cell 加入不同濃度的 CuSO₄ 包括 1、5 μM 所誘發的 oxLDL (終濃度為 100 μg/ml) 後分別培養 0、6、12、24 小時，在 MTT 的測定下觀察細胞的存活情形。由圖一結果顯示 1 μM CuSO₄ 所誘發的 oxLDL 在 24 小時後始細胞死亡，5μM CuSO₄ 所誘發的 oxLDL 在 12 小時後開始細胞死亡，因此不論是哪一種氧化

程度的 LDL 皆會使細胞在 24 小時全數死亡。

2. 處理原兒茶酸 (PCA) 對 oxLDL 所引起的細胞死亡的影響

THP-1 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mM，再加入 oxLDL 共同培養 20 小時。利用 MTT 的測定可以發現 THP-1 cell 只加入 oxLDL 時細胞存活為 7%，加入原兒茶酸在低濃度 0.01 mM 的情況下，即可抑制細胞死亡的現象為正常組 (THP-1 cell only) 的 96%。在最高濃度 1 mM 處理下將細胞死亡的情形抑制為正常組的 72%。(圖二)

3. 原兒茶酸對培養基及細胞中 MDA 含量的影響

THP-1 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mM，再加入 oxLDL 共同培養 20 小時。分別取培養基及細胞測定 MDA 的含量，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。結果顯示培養基中的 MDA 在存有 oxLDL 時會被誘發，以 oxLDL 產生 MDA 的量為 100%，在加入原兒茶酸的組別於低濃度(0.01 mM) 時 MDA 的生成被明顯的抑制為 oxLDL 的 12.5%，1 mM PCA 時 MDA 的生成降至 oxLDL 的 15%(圖三.A)。而在細胞中的 MDA 在存有 oxLDL 時並沒有明顯被誘發的情形，加入原兒茶酸的組別也沒有抑制的情形。(圖三.B)

4. 處理原兒茶酸 (PCA) 對 oxLDL 所引起的細胞移行 (migration) 影響

當 oxLDL 置於 transwell chamber 的下層而 THP-1 cell 置於上層時，經過 6 小時培養後，THP-1 cell 會出現 migration 的現象以趨向 oxLDL，當原兒茶酸與細胞共同存在時，原兒茶酸亦會抑制 THP-1 cell migration 的現象，PCA 0.01 mM 其抑制 migration 為 oxLDL 的 63%，0.05 mM 為 67%，0.1 mM 為 39%，0.5 及 1 mM 分別為 26%與 24%。且隨著劑量的增加抑制效果更加明顯。(圖四 A/B)

5. 處理原兒茶酸 (PCA) 對 oxLDL 所引起的細胞凋亡

THP-1 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mM，再加入 oxLDL 共同培養 20 小時，收細胞再加入 annexin V 及 PI，避光 20 分鐘，以 flow cytometry 分析細胞凋亡情形。結果顯示控制組 (native LDL) 細胞存活為 93.69%，而 THP-1 cell 加入 oxLDL 引起細胞凋亡 62% (其右上象限:46.01%；右下象限:14.24%)，若加入原兒茶酸可明顯抑制由 oxLDL 所引起的細胞凋亡，在加入原兒茶酸劑量 0.01 mM 時引起細胞凋亡 5.27% (其右上象限:1.36%；右下象限:3.87%)，劑量 0.05 mM 時引起細胞凋亡 3.62% (其右上象限:0.45%；右下象限:3.17%)，劑量 0.1 mM 時引起細胞凋亡 2.68% (其右上象限:0.51%；右下象限:2.71%)，劑量 0.5 mM 時引起細胞凋亡 6.06% (其右上象限:1.26%；右下象限:4.80%)，劑量 1 mM 時引起細胞凋亡 3.5% (其右上象限:0.26%；右下象限:3.24%)，因此原兒茶酸在低濃度 (0.01 mM) 時即可抑制細胞凋亡 100%。(圖五)

6. 處理原兒茶酸 (PCA) 對 oxLDL 所引起 p53 及 pRb 的蛋白變化

THP-1 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mM，再加入 oxLDL 共同培養 12 及 6 小時，收細胞分析 p53 及 pRb 蛋白變化量。發現 P53 在加入 oxLDL 時蛋白沒有明顯的變化，而磷酸化的 p53 增加為正常組 (THP-1 cell only) 的 1.4 倍，加入不同濃度 PCA 則可回復；pRb 加入 oxLDL 後其蛋白的表現量下降為正常組的 0.77 倍，加入不同濃度 PCA 發現 pRb 蛋白有回復(圖六)。

7. 處理原兒茶酸 (PCA) 對 oxLDL 所引起 Bax 及 Bcl-2 的蛋白變化

THP-1 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mM，再加入 oxLDL 共同培養 12 小時，收細胞分析 Bax 及 Bcl-2 蛋白變化量。加入 oxLDL 使 Bax 蛋白增加為正常組的 2.45 倍，加入 1 mM PCA 回復為正常組的 1.8 倍；而細胞處理 oxLDL 使 Bcl-2 的蛋白減少為正常組的 0.58 倍，加入不同濃度的 PCA 於低濃度時則可恢復 Bcl-2 的蛋白表現量與控制組一致。然而 PCA 高濃度反而有抑制現象（圖七）。

8. 處理原兒茶酸 (PCA) 對 oxLDL 所引起 caspase 3 及 caspase 9 的蛋白變化

THP-1 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mM，再加入 oxLDL 共同培養 12 小時，收細胞分析 caspase 3 及 caspase 9 蛋白變化量。發現 caspase 3 會因細胞加入 oxLDL 而使其蛋白被切割，蛋白呈片段化，加入 PCA 其抑制蛋白片段化的現象並不明顯，亦沒隨著劑量的增加而有所改變。細胞加入 oxLDL 使 Caspase 9 活化而被切割，在加入不同濃度的 PCA 其切割的情形被抑制（圖八）。

9. 處理原兒茶酸 (PCA) 對 oxLDL 所引起 MCP-1 的分泌

THP-1 cell 處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mM，再加入 oxLDL 共同培養 2 小時，離心將細胞與培養基分開，取培養基以 ELISA kit 分析 MCP-1 的表現量。發現細胞加入 oxLDL 時會誘導 MCP-1 的分泌增加，加入 PCA 之後則可抑制 MCP-1 的分泌。於 PCA 濃度 0.01mg/ml 及有很好的抑制效果。

(六) 討論

洛神花原產於印度及馬來西亞，之後被引進台灣生長的一年生灌木，在台東花蓮等東海岸地區為主要產區，為盛夏時節的清涼飲料，廣為大眾喜愛。

在粥狀動脈硬化的過程中，單核球細胞 (monocyte) 受到氧化型 LDL 的趨化作用，而移行 (migration) 穿過內皮細胞進入血管壁 (intima) 中，再分化成滿載油脂的巨噬細胞 (macrophage)，之後被巨噬細胞接受體 scavenger receptor 辨識，經由內飲 (endocytosis) 作用將氧化型 LDL 堆積在細胞內形成泡沫細胞 (Foam cell)，泡沫細胞集中在脂肪條紋 (fatty streak) 是粥狀動脈硬化過程最早可辨識的病灶。因此抑制 LDL 的氧化修飾作用在預防動脈粥狀硬化的過程中為重要的藥物開發策略。在本實驗中的原兒茶酸具有很強的抗氧化作用，且在之前的研究指出原兒茶酸的抗氧化作用大於維生素 E 而與維生素 C 較為相近。由實驗可得知原兒茶酸會明顯降低氧化型 LDL 所造成的細胞毒性；原兒茶酸在低濃度 0.01 mM 即可達到很好的抑制效果（圖二）。

動脈粥狀硬化的過程中，最初產生的 oxLDL 會促使單核球細胞轉形為巨噬細胞，以利吞噬 oxLDL，巨噬細胞吞噬了 oxLDL 會促使細胞激素與生長因子快速產生，使平滑肌細胞向血管腔的方向位移與增生逐漸形成動脈粥狀硬化的病灶，因為單核球-巨噬細胞的趨化作用在動脈粥狀硬化過程中皆存在，單核球會旋轉 (rolling) 並黏附到血管內皮細胞，這種作用可以被細胞激素如 monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)，macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 及 interleukin-8 (IL-8) 所媒介，Mayumi Okada 等人在 1997 年指出 oxLDL 會增加單核球細胞黏附 (adhesion) 到內皮細胞主要是誘導 MCP-1 及 IL-1 的分泌使其有 migration 到內皮細胞的現象；在動物模式中已經有更多的證據顯示 MCP-1 缺乏時動脈粥狀硬化發生會降低，相反的過度表現 MCP-1 會加速動脈粥狀硬化的發生 (22-24)。因此以單核球為模式觀察其趨化為巨噬細胞的過程可有效了解動脈粥狀硬化早期所發生的事件。由圖四可知原兒茶酸可以抑制 oxLDL 所誘導的

THP-1 cell 移行 (migration)的作用，我們探討其原因可能是減少 oxLDL 的產生，包括減低自由基的含量亦或增加 LDL 內源性抗氧化劑如維生素 E、維生素 C 等作用。在 1992 年 Esterbauer 等人的研究指出，當以銅離子誘導 LDL 氧化時，LDL 內所含之眾多內源性抗氧化劑會喪失，最先喪失的抗氧化劑為 α -tocopherol，當額外補充維生素 E 時亦會使 LDL 內源性 α -tocopherol 增加而改變 LDL 的氧化敏感性。

在本篇的研究結果中，我們發現以高濃度的 oxLDL (100 μ g) 處理單核球細胞，結果發現嚴重的細胞死亡，且其死亡是以 apoptosis 的方式進行。在處理 PCA 24 小時後，這種死亡現象有效被抑制(圖五)；於圖三中我們發現 THP-1 cell 加入 oxLDL 會誘使脂質過氧化物 MDA 的量增加，加入 PCA 時會抑制脂質过氧化物的生成。然而 Lillemor Mattsson Hulthen 在 2005 年指出等人指出 oxLDL 會誘導人類的巨噬細胞經由細胞內的抗氧化防禦系統去修飾氧化產物 MDA，亦即巨噬細胞在氧化壓力下會反應內生性的抗氧化活性(endogenous antioxidant activity)，進而降低 LDL 及 oxLDL 所造成的自由基增加。表示動脈粥狀硬化的過程中巨噬細胞的抗氧化活性是不足的，因此在動脈粥狀硬化的過程，巨噬細胞扮演一個重要的角色，包括促進或抑制 LDL 的氧化(25)。

細胞進行 apoptosis 時 Bax 會增加而 Bcl-2 減少，我們可以從圖七看到這樣的結果。當細胞受到損傷時其本身可決定進行 DNA 修復或是走向 apoptosis，其受到 p53 及 pRb 調控，我們發現 oxLDL 使 Rb 去磷酸化，加入 HSE 及 PCA 會回復其表現量，而 p53 被磷酸化加入 HSE 及 PCA 使 p53 去磷酸化，而 p53 蛋白的表現量卻不變。pRb 是一個磷酸化蛋白，其可調節 cell cycle progression 及抑制 apoptosis (26)。當 pRb 高度磷酸化會失去其阻斷 cell cycle progression 的能力，而 pRb 去磷酸化時其為活化的，可誘導細胞週期停在 G1 phase。pRb 的活化可經由 p53 誘導 p21/waf1 的表現而調控，增加 p21/waf1 的表現量使 pRb 活化且去磷酸化使 cell cycle 停止在 G1 phase (27, 28)。我們推測當細胞損傷時或許是透過 pRb 及 p53 使 cell cycle arrest 或是 apoptosis。

細胞進行細胞凋亡的訊息傳遞路徑是相當複雜的，尚有許多的現象需要再確認及努力，以更加確認動脈粥狀硬化過程中單核球細胞所扮演的角色。

(七) 參考文獻

1. Tanaka T., Kojima T., Suzui M., Mori H. Chemoprevention of colon carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protocatechuic acid: suppressing effect on tumor development and biomarker expression of colon tumorigenesis. *Cancer Res.*, 1993; 53: 3908-3913.
2. Tanaka T., Kojima T., Kawamori T., et al. Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rats. *Cancer Res.*, 1993; 53: 2775.
3. Tanaka T., Kawamori T., Ohnishi M., et al. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and postinitiation phases. *Cancer Res.*, 1994; 54: 2359.
4. Kawamori T., Tanaka T., Kojima T., et al. Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt focal by dietary protocatechuic acid. *Jpn J Cancer Res.*, 1994; 85: 686.
5. Hiramoto, K., Ojima, N., Sako, K.I., and Kikugawa, K. Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. *Biol. Pharm. Bull.*, 1996; 19, 558-563.
6. Hung M., Ferrano T. Phenolic compound in food and cancer prevention. In Huang

- MT, Ho CT, Lee CY. (eds). Phenolic compound in Food and Their Effect on Health H: Antioxidant and Cancer prevention. American Chemical Society Symposium Series 507, American Chemical Society, Washington, DC,1992 pp 8-34.
7. Nakamura T, Nakauawa Y, Onizuka S, et al. Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves).The clastogen-suppression effects of Tochu tea in CHO cell and mices. *Mutat. Res.*, 1995; 388: 7.
 8. Kreuzer, J., White, A. L., Knott, T. J.and Haberland, M. E.Amino terminus of apoB suffices to produce recognition of malondiald ehyde-modified low density lipoprotein by the scavenger receptor of human monocyte-macrophages. *J. Lipid Res.*,1997; 38: 324-342.
 9. Witztum JL. Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, 1991;88:1785.
 10. Esterbauer H, Gebicki J. Puhl H, Jurgenes G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.*, 1992;13:341.
 11. Ross R, Fuster V.The pathogenesis of atherosclerosis. In: Fuster V, Ross R,Topol EJ. Eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia :Lippincott-Raven Publishers. Chap 1996;25:pp441-460.
 12. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* ,1993;362:801..
 13. Rosenfeld ME, Tsukuda T, Grown AM, Ross R. Fatty steak initiation in Watanabe heritable hyperlipidemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* ,1987;7:9.
 14. Fogelman AM, Schechter JS, Hokom M, et al. Malondialdehyde alteration in human monocyte-macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci .USA* ,1980;77:2214.
 15. Brown NS, Ho YK, Coldstein JL. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells: continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J. Biol .Chem.*, 1980;255:9344.
 16. Mayumi Okada. et al. Effect of 17 β -estradiol and progesterone on migration of human monocytic THP-1 cells stimulated by minimally oxidized low-density lipoprotein in vitro.*Cardio.Res.*,1997; 34:529-535.
 17. Ki Hoon Han, Mi Kyung Chang, Agnes Boullier, Simone R. Green, Andrew Li, Christopher K. Glass, and Oswald Quehenberger. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator–activated receptor γ . *J. Clin. Invest.*,2002; 106:793–802
 18. Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Negre- Salvayre A. Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *FASEB*, 1994;8:1075.
 19. Crisby M, Kallin B, Thyberg J, et al. Cell death in human atherosclerotic plaques involves both necrosis and apoptosis. *Atherosclerosis*, 1997;130:17.
 20. Kockx MM. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998;18:1519.
 21. Mitchinson MJ, Hardwick SJ, Bennett MR. Cell death in atherosclerotic plaques. *Curr. Opin. Lipidol.*, 1996;7:324.
 22. Gu, L., et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell*,1998 ; 2:275–281.
 23. Gosling, J., et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J. Clin.Invest.*,1999; 103:773–778.

24. Aiello, R.J., et al. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*,1999; 19:1518–1525.
25. Lillemor.M.H. et al. Human macrophages limit oxidation products in low density lipoprotein. *Lipids in Health and Disease* ,2005; 4: 6
26. Wang,J., Guo,K., Wills,K.N. and Walsh,K. Rb functions to inhibit apoptosis during myocyte differentiation. *Cancer Res.*, 1997; **57**: 351–354.
27. Gorospe,M., Cirielli,C., Wang,X.T., Seth,P., Capogrossi,M.C. and Holbrook,N.J. p21 (Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene*, 1997;14: 929–935.
28. Wang,J. and Walsh,K. Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science*,1996; **273**: 359–361.

(八) 附圖

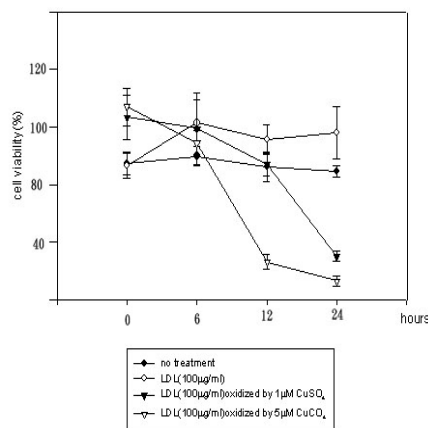


Fig 1 . The effect of oxLDL in THP-1 cell . 2×10^5 /cell were seeds for at least 4 hrs before incubated with 100 μg/ml oxLDL for various duration .The viable cell was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. The experiment was repeat three times, and the data were presented as mean ± SD from the triplicate.

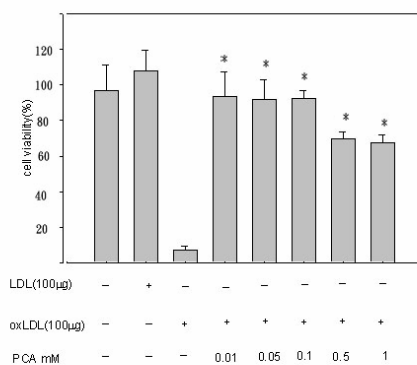


Fig 2. Inhibitory effect of PCA on

oxLDL-induced THP-1 death . 2×10^5 /ml cell were incubated with 100 μg/ml oxLDL for 20 hr. Prior to the treatment of oxLDL, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM of PCA was added to the cell. The viable cell was measured by MTT assay as described in Material and Methods. The experiment was repeated three times, and the data were presented as mean ± SD from the triplicate. The P value was calculated by an unpaired t-test as compares with the normal (THP-1 cell only treated group). *P < 0.01.

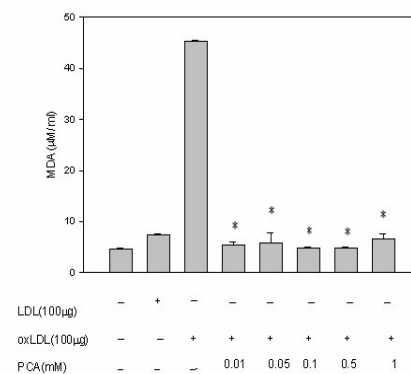


Fig3A. Effect of PCA on OxLDL-induced lipid peroxidation in the THP-1 Culture medium . 2×10^5 /ml cell were incubated with 100 μg/ml oxLDL for 20 hr. Prior to the treatment of oxLDL, 0.01, 0.05, 0.01, 0.5, 1 mM of PCA was added to the cell. The culture medium were assayed for lipid peroxidation (MDA). The data were presented as mean ± SD from the triplicate. The P value was calculated by

an unpaired t-test as compares with the oxidative LDL treated group. *P < 0.01.

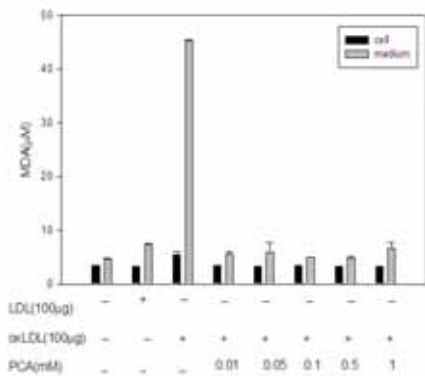


Fig3B. Effect of PCA on OxLDL-induced lipid peroxidation in the THP-1 Culture cell. 2×10^5 /ml cell were incubated with 100 µg/ml oxLDL for 20 hr. Prior to the treatment of oxLDL, 0.01, 0.05, 0.01, 0.5, 1 mM of PCA was added to the cell. The culture cell were assayed for lipid peroxidation (MDA). The data were presented as mean \pm SD from the triplicate.

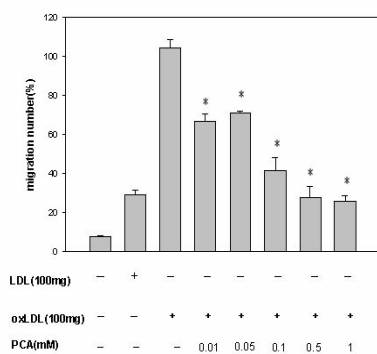


Fig4A . The inhibitory effect of PCA on the migration of THP-1 cell attracted by oxLDL. 1×10^6 cell were treated 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM of PCA in the up chamber, the lower chamber was treated oxLDL. The viable cell was measured by migration assay as described in Material and Methods. The data were presented as mean \pm SD from the triplicate. The P value was calculated by an unpaired t-test as compares with the normal (THP-1 cell only treated group). *P < 0.01.

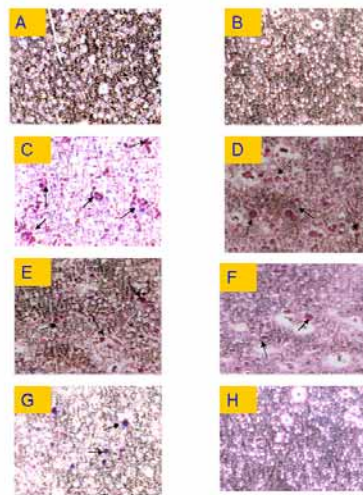


Fig4B. The inhibitory effect of PCA on the migration of THP-1 cell attracted by oxLDL. A. normal (no treatment); B. native LDL C. oxLDL only D. oxLDL + 0.01 mM PCA E. oxLDL + 0.05 mM PCA F. oxLDL + 0.1 mM PCA G. oxLDL + 0.5 mM PCA H. oxLDL + 1 mM PCA.

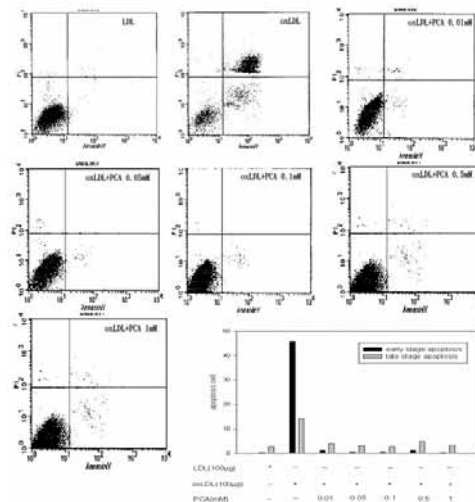


Fig 5. The inhibitory effect of PCA on the flow cytometry of THP-1 cell attracted by oxLDL. 2×10^5 /ml cell were incubated with 100 µg/ml oxLDL for 20 hr. Prior to the treatment of oxLDL, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM of PCA was added to the cell. The viable cell was measured by flow cytometry as described in Material and Methods. The experiment was repeated three times, and the data were presented as mean \pm SD from the triplicate.

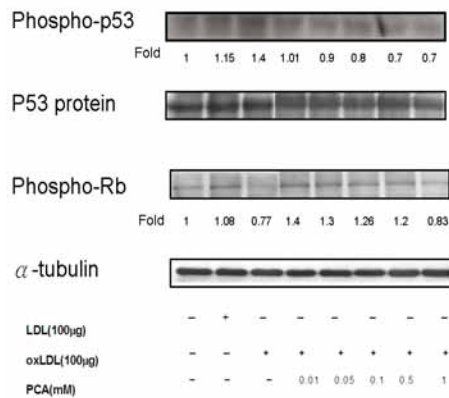


Fig6. Immunoblotting examination of the effect of PCA on oxLDL-induced the expression of p53 and pRb protein in THP-1 cell . 2×10^5 /ml cell were incubated with 100 μ g/ml oxLDL for 12 hr. Prior to the treatment of oxLDL, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM of PCA was added to the cell. Protein lysate was obtained from THP-1 cell, and immunoblot analysis was performed for the expressions of p53 and pRb proteins.

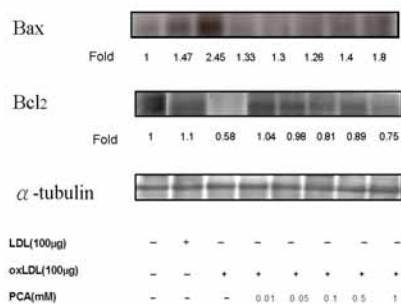


Fig7. Immunoblotting examination of the effect of PCA on oxLDL-induced the expression of Bax and Bcl-2 protein in THP-1 . 2×10^5 /ml cell were incubated with 100 μ g/ml oxLDL for 12 hr. Prior to the treatment of oxLDL, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM of PCA was added to the cell. Protein lysate was obtained from THP-1 cell, and immunoblot analysis was performed for the expressions of Bax and Bcl-2 proteins.

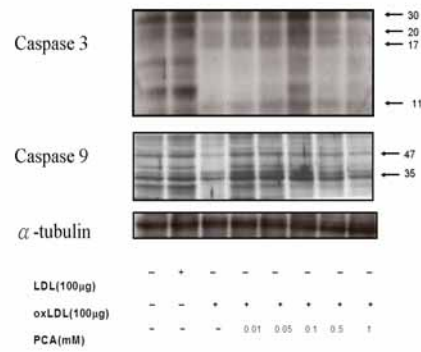


Fig8. Immunoblotting examination of the effect of PCA on oxLDL-induced the expression of caspase 3 and caspase 9 protein in THP-1. 2×10^5 /ml cell were incubated with 100 μ g/ml oxLDL for 12 hr. Prior to the treatment of oxLDL, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM of PCA was added to the cell. Protein lysate was obtained from THP-1 cell, and immunoblot analysis was performed for the expressions of caspase 3 and caspase 9 proteins.

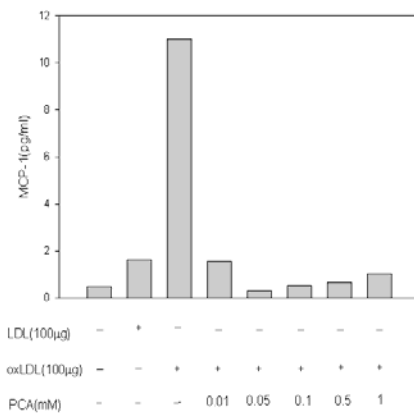


Fig9. Effects of PCA on the secretion of MCP-1 from THP-1 cell by oxLDL. 2×10^6 /ml cell were incubated with 100 μ g/ml oxLDL for 2 hr. Prior to the treatment of oxLDL, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 0.1 mM of PCA was added to the cell. The concentrations of MCP-1 were measured by ELISA kit supplied from Biosource biotechnology. After we confirmed the linearity of the standard curves with the kits which we used, we performed our experiment.