

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 (I)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-040-052-

執行期間：93年08月01日至94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

共同主持人：王朝鐘

計畫參與人員：歐靜慈，陳宇欣，楊淑慧

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中 華 民 國 94 年 8 月 30 日

中文摘要

關鍵詞：原兒茶酸、動脈粥狀硬化、巨噬細胞、粒線體、自由基

由先前的研究中已經發現原兒茶酸 (PCA)對於氧化型 LDL 所引起的巨噬細胞死亡具有抑制作用，因此在本實驗中我們要進一步來探討其作用機轉。首先為探討細胞在處理過 OxLDL 及抗氧化劑後，細胞內有關細胞凋亡蛋白的變化。細胞粒線體的電位差在處理過 OxLDL 後下降為控制組的 27.4%，而預先處理 PCA 的組別則於最高劑量時可使膜電位恢復為 104%。而此時因為氧化壓力而誘發粒線體膜蛋白、MAPK 蛋白及 P53 改變，致使細胞趨向於凋謝死亡。然而，預處理 PCA 的組別 (特別是高濃度組) 則可改變這些蛋白的表達以使細胞趨向生存。另一方面，我們也測定細胞內外的維生素 E 及自由基的含量，以及 PCA 對 LDL 於細胞內外氧化抑制的情形，結果發現高濃度的 PCA 分別可以減緩細胞內外 LDL 氧化的程度，而這種抑制 LDL 氧化程度的作用應是來自於增加細胞內維生素 E 的含量與有限程度的減緩自由基的危害而達成。由這些結果推論，這種抗氧化劑在胞內外均具有減低氧化壓力的能力，而這種作用將可減緩 OxLDL 造成巨噬細胞死亡的情形。在這種情形下，PCA 將可運用這種機制以達到減緩動脈粥狀損傷的作用，而這正是 PCA 在預防心血管疾病上的一種重要的效能。

英文摘要

Keywords: protocatechuic acid、atherosclerosis、macrophage、mitochondria、free radicals

In our previous study, we observed the inhibitory effects of PCA on OxLDL-induced macrophage apoptosis. Based on that, we further investigated the mechanisms here. Firstly, we surveyed the changes of apoptotic proteins, such as mitochondrial proteins, MAPK proteins and P53. When treating with OxLDL in macrophages, the mitochondrial potent lowered to 27.4% compared to control (the group of native LDL). Interestingly, the group pretreating with PCA in highest concentration recovered the mitochondrial potent to 104%. At this moment, the mitochondrial proteins, MAPK proteins and P53 were changed because of the extreme oxidative stress, and more over than, this stress would make cell to trigger to apoptosis. However, pretreated with PCA (especially the groups in high concentrations) would change the expressions of these proteins and make cell survive. In addition to, we also detected the contents of vitamin E and free radicals existing in cell inside and in media. By the way, either in cell inside or in media, we examined the inhibitory level of OxLDL by pretreating PCA. We found that high concentration of PCA was able to decelerate the level of LDL oxidation, and the inhibitory effects could be contributed by increasing endogenous vitamin E and by decreasing the content of free radicals. Taken the above together, this antioxidant possessed the abilities to reduce oxidative stress in either cell inside or environment (media). These inhibitory effects would slow down the macrophage apoptosis induced by OxLDL. Under the circumstance, PCA was able to prevent the blood vessel from forming atherosclerotic lesions, and further prevent vascular diseases.

前言

在動脈粥狀硬化形成的主流假說中，可大分為「低密度脂蛋白氧化修飾 (LDL oxidative modification)」與「內皮功能變性 (endothelial dysfunction)」二種。其中氧化假說乃針對 oxLDL 在動脈粥狀硬化中究竟扮演何種角色而提出，許多的證據顯示了 oxLDL 的確具有關鍵的決定性因素 (1-10)。目前已證實 oxLDL 較 native LDL 更加有致動脈粥狀硬化的能力，且亦有諸多證據顯示 oxLDL 存在活體中 (in vivo) 是確與動脈粥狀硬化有關。許多 in vitro 及 in vivo 的證據也已為脂蛋白的生化、生理與代謝角色提供了明確的證據。由這些發現使得動脈粥狀硬化的機轉逐步明朗，也為下一階段的抗動脈粥狀藥物研發，與如何藉改變飲食與生活習慣以減緩疾病進展，提供理論基礎。由此敘述中我們可知 oxLDL 在動脈粥狀硬化的發展中實為一個基本且關鍵的致病因子。LDL 的氧化由於大多是在動脈血管壁中進行，而且 oxLDL

被清除受體移除的速度相當快，故無法由偵測半生期短、濃度低的 oxLDL 來評估 LDL 氧化的程度 (11)。一般而言，體外實驗中常用來判斷 LDL 氧化的程度的方法為利用一分子的氧化產物 malondialdehyde (MDA) 與二分子的 TBA 呈色，產物即 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)。另外也可利用高效能液相層析儀檢測 LDL 內維生素 E 與脂肪酸的含量，亦可作為 LDL 的氧化指標 (11)。因為 LDL 的氧化是引起動脈粥狀硬化的一個重要的致病因子，而動脈粥狀硬化乃老年退化性疾病，早期預防可見後效，且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心血管疾病的功效，因此對於預防動脈粥狀硬化早期的脂肪條塊產生，目前最常使用的策略為抑制低密度脂蛋白的過氧化與降低血脂，而藉由抗氧化劑的使用，可以有效的清除自由基、鉗合金屬離子與終止脂質氧化的起始期或延長遲滯期 (lag phase)。流行病學調查亦指出多種天然植物中所具有(如 α -tocopherol、polyphenols)與人工合成(如 Butylated hydroxytoluene (BHT)、probuocol)的抗氧化劑，其攝取量與心血管疾病的發生率呈現負相關 (12)。實驗動物模式中亦有報告指出抗氧化劑的介入 (intervention)對 LDL 的氧化敏感性有降低的趨勢，目前常被使用的幾種重要的抗氧化劑或在食物中存在的成份物質可分為：(1) 增加內源性的抗氧化劑如維生素 C、維生素 E 或類胡蘿蔔素 β -carotene 及 (2) 額外食入合成或天然的抗氧化劑如 BHT、N,N'-diphenyl 1,4-phenylenediamine (DPPD) 或 polyphenols (多元酚類化合物)。

原兒茶酸 (protocatechuic acid, PCA)是一種簡單的酚類化合物，由洛神乾燥花分離而來，Chinese herbal medicine (中醫本草藥典)記載，洛神花屬於錦葵科 (學名 Hibiscus Sabdariffa Linnaeus, HS)中洛神葵的花，具有解熱、利尿、降血壓等功能，常被當作夏季的清涼飲料。這種經乾燥而得的洛神花萃取物，廣佈於蔬菜、水果、花和胡桃中 (13)。在我們的研究室中發現 PCA 具有抗氧化以保護肝臟的作用、抑制腫瘤促進作用 (14, 15) 及促進 HL-60 apoptosis (16)，其作用大部分被認為與它的抗氧化特質有關。而在我們最近的研究中也發現由於 PCA 的抗氧化特性，在低密度脂蛋白 (Low density lipoprotein, LDL)的氧化過程中，PCA 表現出良好的抗 LDL 氧化的作用，包括減輕 ApoB fragmentation 及減少 cholesterol degradation (17)。另外，當我們將 oxLDL 加入巨噬細胞中而引起細胞凋亡的情況下，共同加入 PCA 的組別則被發現可以抑制這種死亡的現象；並且，當 oxLDL 誘發巨噬細胞分化為泡沫細胞時，PCA 可以抑制泡沫細胞的形成。

研究目的

由先前的研究中已經發現原兒茶酸 (PCA)對於氧化型 LDL 所引起的巨噬細胞死亡具有抑制作用，因此在本實驗中我們要進一步來探討其作用機轉為何？巨噬細胞同樣地預先處理不同劑量 PCA 後，再加入 OxLDL，共同培養後，分兩部分進行機轉的探討：第一為探討細胞在處理過 OxLDL 及抗氧化劑後，細胞內有關細胞凋亡蛋白的變化。首先將測定細胞粒線體的電位差改變的情形已確定 apoptosis 是否經由粒線體的途徑進行，接著再以細胞質蛋白測定 apoptosis-related 蛋白的量或磷酸化情形的改變；第二則是測定細胞內外的維生素 E 及自由基的含量，以區分這兩種抗氧化劑在胞內外抗氧化能力的差異。我們期望能藉此釐清原兒茶酸對於氧化型 LDL 所引起的巨噬細胞死亡中間的機轉。

文獻探討

PCA 在抗動脈粥狀硬化作用方面，至今多為現象上的觀察，此部份的結果相當正面，顯示 PCA 在抗動脈粥狀硬化極具潛力，但可惜的是在其相關之分子機轉迄今未曾被提及，目前相關的國內外研究包括：

- (1) 1998 年，Vieira 等人以 PCA 及 oxLDL 加入人類內皮細胞，發現 PCA 會抑制 oxLDL 所引起之內皮細胞凋謝死亡 (18)；
- (2) 2000 年，Holland 等人以 phorbol 12-myristate 13-acetate 誘發細胞產生氧化產物以造成內皮損傷的模式，發現 PCA 會抑制此種作用以減低內皮損傷 (19)；
- (3) 2002 年，我們發現 PCA 會抑制 LDL 的氧化作用(17)，並在其後的 ex vivo 研究中發現

PCA 會抑制 oxLDL 引起之巨噬細胞凋亡及泡沫細胞之形成 (整理發表中)。

研究方法

I. 粒線體膜通透性之測定 (mitochondrial membrane potential determination)

將 4×10^6 cell 加入 $1 \mu\text{M}$ rhodamine 123 反應 30 分鐘後，再加入 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM 之 PCA、及 OxLDL 培養 1.5 小時後收集細胞，以 3 ml PBS (含 1 % Triton X-100) 打破細胞，以 6000 g 離心 15 分鐘後取 2ml 上清液，於螢光光度儀 Ex_{490nm}/Em_{515nm} 下測定吸光值 (Hitachi F-2000)。

II. 維生素 E 的測定

本法乃修改自 Rocheford 等人的維生素 E 測定法 (20)，敘述如下：

(1) 樣本處理

製備好的 LDL (最終濃度為 $100 \mu\text{g protein/ml}$) 先加入不同濃度的 PCA (0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 mM)，再分別加入終濃度為 $10 \mu\text{M}$ 之 CuSO_4 於 37°C 下水浴 24 小時後收取樣本進行處理。處理方式為取 0.1 ml 樣本加入等量 5 mM PBS 稀釋，其後加入 2 ml 乙醇溶液 (alcohol : isopropanol = 95 : 5) 及 2 ml 正己烷進行萃取，在震盪 1-2 分鐘後，以 2000 rpm 離心 10 分鐘，移除上層乙醇溶液後以氮氣吹乾正己烷，再以 $150 \mu\text{l}$ 之溶液 (Methanol : Alcohol = 1 : 1) 復溶後即可進行分析。在細胞內維生素 E 的測定方面，則是將細胞依前述的處理方式加藥處理再進行收集，方法是將培養基去除後，以 PBS 清洗 2 次，用 scraper 刮下後離心 (1500 rpm, 5 分鐘) 以去除多餘的 PBS。其後則以 0.1 ml 之 5M PBS 再懸浮，並以超音波震盪器震 1 分鐘再進行萃取，萃取方式則與上述相同。

(2) 標準曲線

系統平衡 4 小時，檢測分析效果無誤後，將維生素 E 標準品以 methanol : alcohol = 1 : 1 稀釋成 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 進行測定，retention time 約為 17.8 分鐘，將結果積分計算後與濃度對照製作標準曲線。

管 柱：LiChrospher RP-18 (250×10 mm, $5\mu\text{m}$)，德國 E. Merck Co.

移動相：Acetonitrile : Methanol = 85 : 15 (v/v)

流 速：1 ml/min, at ambient temperature

偵測器：Hitachi D-2500 chromat-integrator UV-Vis detector (295 nm)

(3) 樣本測定

在製作好標準曲線後，將樣本打入，並依積分結果與標準曲線對照換算出濃度。

III. 自由基的測定

細胞處理方式同前。當細胞處理結束後將培養基及細胞分別收集，細胞部分則以 PBS 清洗 2 次後，以 1 ml PBS (含 1 % Triton X-100) 打破細胞。以自由基冷光測定儀 (Chemiluminescence Analyzer CLA-2100, TOHOKO Electronic industrial Co. LTD) 打入 $300 \mu\text{l}$ 的樣本進行 100 秒基準值的測定，隨即加入 luminol 以測定 hydrogen peroxide。清洗樣本槽後，另外再打入 $300 \mu\text{l}$ 的樣本，同樣進行 100 秒基準值的測定，隨即加入 lucigenin 以測定 superoxide。本實驗共測定 300 秒，實驗數值乃是以第 150 秒進行統計。細胞培養基及細胞抽取液皆須進行這兩種測定以比對 hydrogen peroxide 及 superoxide 的量。

IV. LDL-peroxidation-relative electrophoretic mobility (REM)

以 Beckman paragon lipo gel electrophoresis system (Beckman analytic, Milan, Italy) 進行分析，細胞經過如第二部分的處理後，取培養基 $5 \mu\text{l}$ 進行電泳，100V 通電 30 分鐘後，以固定液固定 5 分鐘後烘乾，再用染色液染色 5 分鐘，最後以脫色液脫色。依電泳結果以 band 移動的距離 (electrophoretic mobility; EM) 判定 LDL 氧化程度，以未氧化之 LDL 之 EM 為 1。

V. TBARS assay

利用 Yagi 氏 (1987) 等修飾之螢光測定法 (21)，細胞處理後，分別收取培養基及細胞 (細

胞以 PBS 清洗 2 次後以 1 ml phosphate buffer, 50 mM, pH7.0 刮取), 取 700 μ l 樣本加入 0.2 ml TCA [20% (W/V)] 及 0.2 ml TBA [0.67% (W/V) in 0.3% NaOH] 後於 90-95°C 加熱 45 分鐘, 待冷卻進行測定。

結果與討論

I. 預先處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜電位之影響

RAW 264.7 cell 預先處理 rhodamine 123 後, 加入原兒茶酸, 濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM, 爾後加入 OxLDL 培養 1.5 小時, 在螢光的測定下可以發現 OxLDL 會使膜電位下降 27.4% (控制組為只有 LDL 的組別), 原兒茶酸在濃度越高的情況之下對膜電位下降的抑制作用越強, 且呈現 dose-dependent 的現象, 在最高濃度處理下可將膜電位下降的情形抑制為控制組的 104%。(圖一)

II. 預先處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜蛋白之影響

RAW 264.7 cell 預先處理原兒茶酸, 濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM, 爾後加入 OxLDL 培養, 抽取蛋白之後觀察其 Bcl-2, Bax 及 cytochrome c 蛋白的變化。由結果中可以發現在只處理 OxLDL 的組別, 其 Bcl-2 的量下降為 26%、Bax 的量增加為 116%、cytochrome c 的量增加為 214%, 而隨著原兒茶酸濃度的增加, Bcl-2 的量逐漸增加, 且 Bax 及 cytochrome c 的量卻逐漸減少。當原兒茶酸濃度最高時, Bcl-2 的量增至約 100%、Bax 的量減至 52%、cytochrome c 的量減至 107%。(控制組為只有 LDL 的組別)(圖二)

III. 預先處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的 MAPK 蛋白之影響

RAW 264.7 cell 預先處理原兒茶酸, 濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM, 爾後加入 OxLDL 培養, 抽取蛋白之後觀察其 ERK 1/2, MEK 及 JNK/p-JNK 蛋白的變化。由結果中可以發現在只處理 OxLDL 的組別, 其 ERK 1/2 的量下降為 41%、MEK 的量下降 67%、p-JNK 的量增加為 166%, 而隨著原兒茶酸濃度的增加, ERK 1/2 及 MEK 的量逐漸增加, 而 JNK/p-JNK 的量卻逐漸減少。當原兒茶酸濃度最高時, ERK 1/2 的量增至約 100%、MEK 的量增至約 97%、p-JNK 的量減至約 92%。(控制組為只有 LDL 的組別)(圖三)

IV. 預先處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的 P53 蛋白之影響

RAW 264.7 cell 預先處理原兒茶酸, 濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM, 爾後加入 OxLDL 培養, 抽取蛋白之後觀察其 P53 蛋白的變化。由結果中可以發現在只處理 OxLDL 的組別, 其 P53 的量增加為 192%, 而隨著原兒茶酸濃度的增加, P53 的量逐漸下降。當原兒茶酸濃度最高時, P53 的量下降至 73%。(控制組為只有 LDL 的組別)(圖四)

V. 預先處理原兒茶酸對氧化型 LDL 及巨噬細胞中維生素 E 之影響

RAW 264.7 cell 預先處理原兒茶酸, 濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM, 爾後加入 OxLDL 培養 15 小時, 收集並破碎細胞後測定細胞內維生素 E 含量; 另外在試管中分別加入原兒茶酸、LDL 及銅離子, 於 37°C 培養 24 小時後萃取 LDL 中維生素 E 測定。在結果中可以發現試管反應的維生素 E 幾乎無法測定出; 而細胞中的維生素 E 則在 0.5 及 1.0 mM 的組別可以測定到, 濃度為 5.32 及 9.47 μ g/ml。(表一)

VI. 預先處理原兒茶酸對培養基及巨噬細胞中自由基之影響

在 RAW 264.7 cell 中預先處理原兒茶酸, 濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml, 爾後加入 OxLDL 培養 15 小時, 收集並破碎細胞後測定細胞內自由基含量; 另外則收集培養基同步測定其自由基。在結果中可以發現在 hydrogen peroxide 的測定中, 當加入 OxLDL 後, 培養基中的 hydrogen peroxide 含量在加入原兒茶酸後被抑制約 22-30% 之間; 而細胞內的 hydrogen peroxide 含量在加或不加原兒茶酸則沒有差別。另外, 在 superoxide 的測定中, 當加入 OxLDL 後, 培養基中及細胞內的 superoxide 含量在加或不加原兒茶酸大多亦無明顯差異, 僅最高濃度之原兒茶酸 superoxide 及速增為控制組的 34 倍。(表二)

VII. 預先處理原兒茶酸對培養基中氧化型 LDL 之影響

在 RAW 264.7 cell 中預先處理原兒茶酸, 濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM, 爾後

加入 OxLDL 培養 15 小時，取培養基以電泳測定 OxLDL 被抑制的情形。在結果中可以發現當加入原兒茶酸後，可以逐漸抑制 OxLDL 的氧化狀態，在濃度為 0.5 mM 時，可以看到明顯的抑制效果，而當其濃度為 1.0 mM 時，抑制的現象最為顯著。(圖五)

VIII. 預先處理原兒茶酸對培養基及細胞中 MDA 含量之影響

RAW 264.7 cell 預先處理原兒茶酸，濃度分別為 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mM，再加入 OxLDL 後培養 15 小時，分別取培養基及細胞測定 MDA 的量。結果顯示不論培養基或細胞中的 MDA 在存有 OxLDL 時皆會被誘發，且培養基中的 MDA 量較多，但在加入原兒茶酸的組別中則可發現的組別中則可發現 MDA 被明顯抑制。(圖六)

參考文獻

1. Sterinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, *et al.* Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915.
2. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95: 1062.
3. Lusis AJ, Navab M. Lipoprotein oxidation and gene expression in the artery wall. *Biochem Pharm* 1993; 46: 2119.
4. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42: 498.
5. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9748.
6. Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1984; 74: 1890.
7. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984; 4: 357.
8. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, *et al.* Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3883.
9. Parthasarathy S, Printz DJ, Byrd D, *et al.* Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 505.
10. Hiramatsu K, Rosen H, Heinecke JW, *et al.* Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 55.
11. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42: 498.
12. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF. Antioxidant and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 408.
13. Tanaka T, Kojima T, Suzui M, Mori H. Chemoprevention of colon carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protocatechuic acid: suppressing effects on tumor development and biomarker expression of colon tumorigenesis. *Cancer Res* 1993; 53: 3908.
14. Tseng TH, Wang CJ, Kao ES, Chu CY. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem Biol Interact* 1996; 101: 137.
15. Wang CJ, Wang JM, Lin WL, *et al.* Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Fd Chem Toxicol* 2000; 38: 411.
16. Tseng TH, Kao TW, Chu CY, *et al.* Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of RB phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 307.
17. Lee MJ, Chou FP, Tseng TH, *et al.* Hibiscus protocatechuic acid or esculetin can inhibit oxidative LDL induced by either copper ion or nitric oxide donor. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 2130.
18. Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O, *et al.* Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 565.
19. Holland JA, O'Donnell RW, Chang MM, Johnson DK, Ziegler LM. Endothelial cell oxidant production: effect of NADPH oxidase inhibitors. *Endothelium*. 7(2):109-19, 2000.

20. Rocheford TR, Wong JC, Egesel CO, Lambert RJ. Enhancement of vitamin E levels in corn. J Am Col Nutri 2002; 21 (3Suppl): 191S.

21. Yagi K. Lipid peroxidation and human disease. Chem Phys Lipid 1987; 45: 337.

計畫成果自評

- (i) 從天然物中找尋有效的 compounds 作為心血管疾病之預防性藥物，並研究其對作用機制，在預防醫學上應是重要工作。這種研究結果不僅能提供民眾對天然物抗心血管疾病功效之科學數據，並能在使用上提供安全的保障，更重要的是能將治療醫學導向為預防醫學以減低龐大的醫療成本。
- (ii) 我們已有相關論文發表 (17) 或正在整理發表中，支持 PCA 之抗動脈粥狀硬化作用有助於 (1) 了解抗動脈粥狀硬化物質作用之機轉；(2) 將此機轉應用於探討其他天然物或藥物之作用上。
- (iii) 完成 PCA 抑制巨噬細胞凋謝死亡之分子機轉，並釐清 PCA 在此分子機轉中較為顯著的位置。
- (iv) 完成 PCA 抑制泡沫細胞形成的分子機轉並確知其介入之位置。
- (v) 提出 PCA 為一有效抗動脈粥狀硬化物質。
- (vi) 提出 PCA 在抗動脈粥狀硬化過程中之相關機轉。

附圖及附表

圖一、預先處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜電位之影響

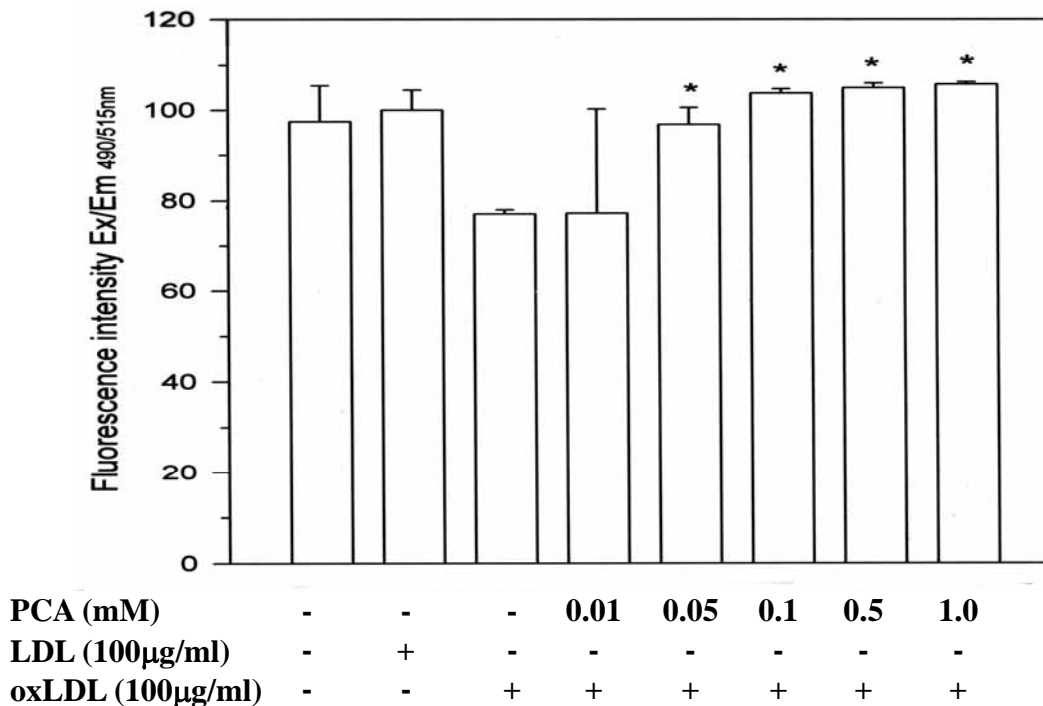


Fig. 1. The effect of PCA on oxLDL-induced mitochondrial potent decrease in macrophage. Cells were treated and assayed for mitochondrial potent as described in Materials and Methods. Each vertical bar represents mean \pm SD from triplicate determinations. The P value was calculated by an unpaired *t*-test as compared with the control (native LDL treated group). * $P < 0.05$.

圖二、預先處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的粒線體膜蛋白之影響

PCA (mM)	-	-	-	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
LDL (100µg/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100µg/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+

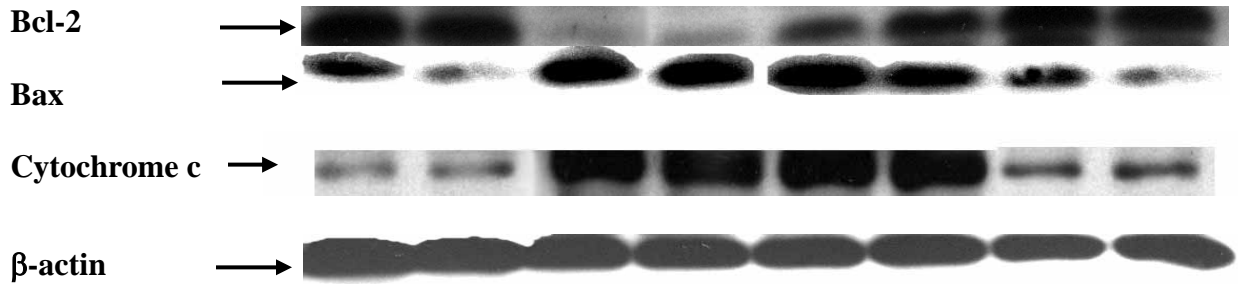


Fig. 2. Immunoblotting examination of the effect of PCA on oxLDL-induced the expressions of mitochondrial proteins in macrophage. Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the expressions of mitochondrial proteins. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; lane 5, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; lane 6, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; lane 7, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; lane 8, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL.

圖三、預先處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的 MAPK 蛋白之影響

PCA (mM)	-	-	-	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
LDL (100µg/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100µg/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+

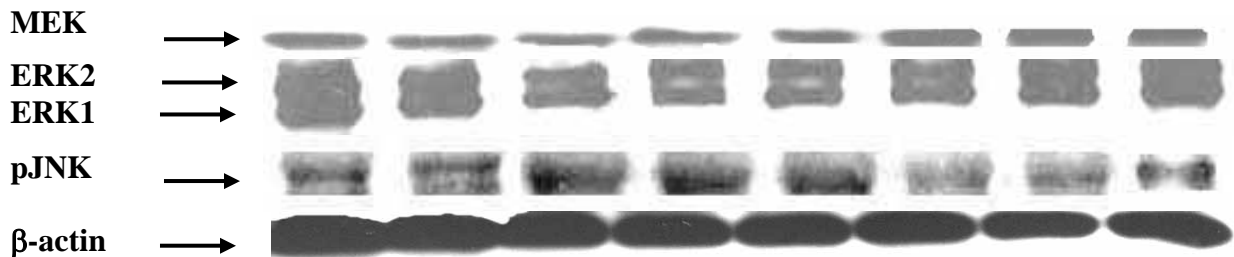


Fig. 3. Immunoblotting examination of the effect of PCA on oxLDL-induced the expressions of MAPK proteins in macrophage. Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the expressions of MAPK proteins. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; lane 5, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; lane 6, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; lane 7, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; lane 8, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL.

圖四、預先處理原兒茶酸對氧化型 LDL 所引起的 P53 蛋白之影響

PCA (mM)	-	-	-	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
LDL (100µg/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-
oxLDL (100µg/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+

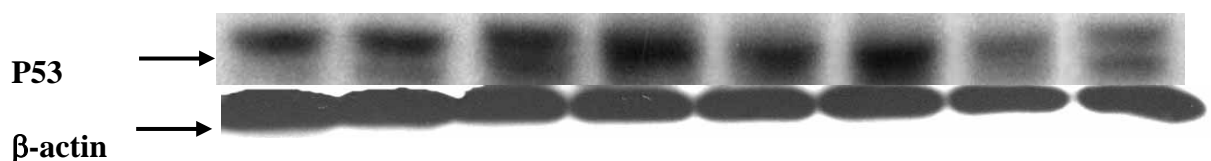


Fig. 4. Immunoblotting examination of the effect of PCA on oxLDL-induced the expression of P53 protein in macrophage. Protein lysate was obtained from macrophages and subjected to Western blot analysis for the expression of P53 protein. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; lane 5, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; lane 6, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; lane 7, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; lane 8, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL.

圖五、預先處理原兒茶酸對培養基中氧化型 LDL 之影響

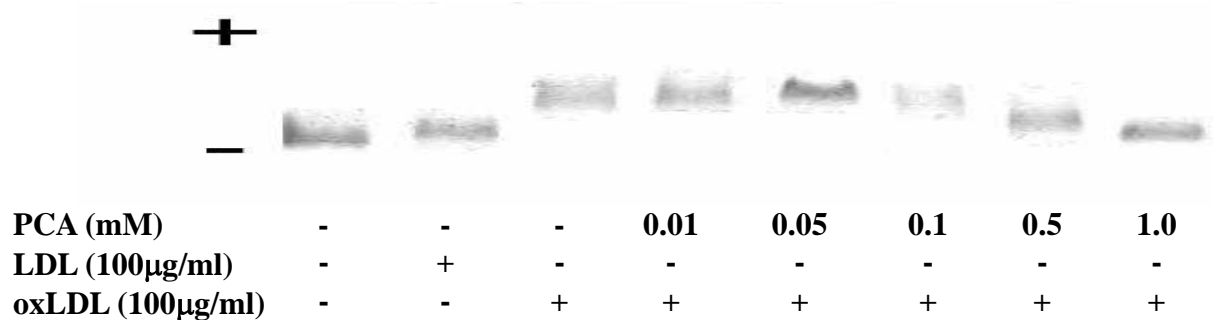


Fig. 5. The oxidation level of oxLDL in the media of PCA and oxLDL cotreated macrophage. Media was obtained from macrophage culture and subjected to lipogel electrophoresis analysis for the oxidation level of oxLDL. Lane 1, normal (no treatment); lane 2, native LDL; lane 3, oxidized LDL; lane 4, 0.01 mM PCA plus oxidized LDL; lane 5, 0.05 mM PCA plus oxidized LDL; lane 6, 0.1 mM PCA plus oxidized LDL; lane 7, 0.5 mM PCA plus oxidized LDL; lane 8, 1.0 mM PCA plus oxidized LDL.

圖六、預先處理原兒茶酸對培養基及細胞中 MDA 含量之影響

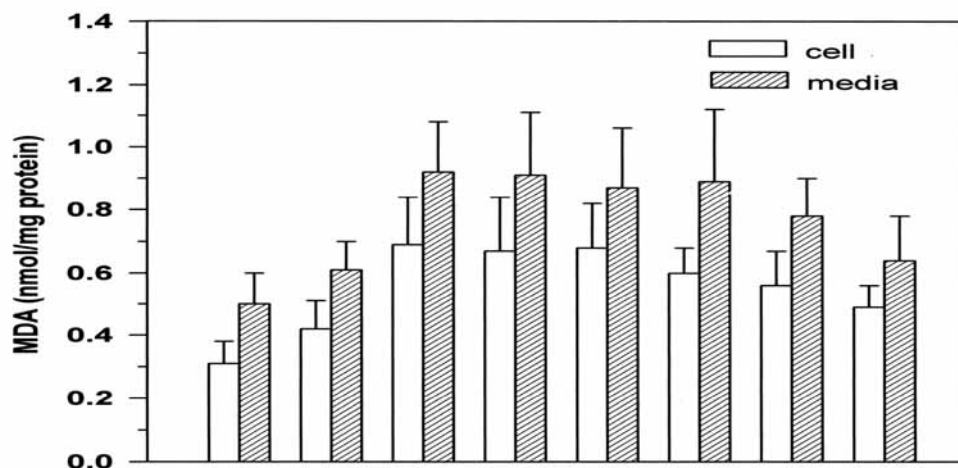


Fig. 6. Effects of PCA on OxLDL-induced lipid peroxidation in the macrophage culture and the media. The samples were obtained from macrophage culture and assayed for lipid peroxidation (MDA).

表一、預先處理原兒茶酸對氧化型 LDL 及巨噬細胞中維生素 E 之影響

No.	Treatment ^a			concentration of vitamin E (μg/ml)	
	PCA (mM)	LDL	OxLDL (100μg/ml)	cell lysate	in tube assay
1	--	--	--	--	--
2	--	+	--	--	--
3	--	--	+	--	--
4	0.01	--	+	--	--
5	0.05	--	+	--	--
6	0.1	--	+	--	--
7	0.5	--	+	5.32	--
8	1.0	--	+	9.47	--

^a Cell or LDL were pretreated with various concentrations of PCA as described in “Materials and Methods”.

表二、預先處理原兒茶酸對培養基及巨噬細胞中自由基之影響

No.	Treatment ^a			Inhibitory percentage of free radicals ^b			
	PCA (mM)	LDL	OxLDL (100µg/ml)	hydrogen peroxide cell lysate	media	superoxide cell lysate	media
1	--	--	--	93.7	77.4	101.5	92.2
2	--	+	--	97.1	88.6	105.4	93.9
3	--	--	+	100	100	100	100
4	0.01	--	+	100.3	70.6	99.5	93.1
5	0.05	--	+	108.5	74.7	100.2	94.2
6	0.1	--	+	94.9	75.4	99.2	94.3
7	0.5	--	+	91.0	71.0	100.9	84.89
8	1.0	--	+	99.4	78.7	101.2	3408.7

^a Cells were pretreated with various concentrations of PCA as described in “Materials and Methods”.

^b All data compared with native LDL as 100%.

