

計畫編號：DOH93-TD-F-113- 17

行政院衛生署九十三年度科技研究計畫

大蒜及其有機硫化物抑制一氧化氮合成之探討

研究報告

執行機構：中山醫學大學

計畫主持人：李宗貴

研究人員：王瑞筠、雷燕萍

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目 錄

頁 碼

封面

目錄

| | |
|---------|----|
| 中文摘要 | 1 |
| 英文摘要 | 3 |
| 壹、前言 | 4 |
| 貳、材料與方法 | 13 |
| 參、結果 | 19 |
| 肆、討論 | 23 |
| 伍、結論 | 25 |
| 陸、參考文獻 | 26 |
| 柒、圖、表 | 37 |

共(47)頁

中文摘要

動脈粥狀硬化的發生與不當或長期慢性的發炎反應有關，在發炎狀態下，會導致活化的巨噬細胞或肥大細胞釋放大量 NO、細胞激素或 PGE₂ 等發炎因子，因此，減少 NO 或其他發炎因子的生成，應有助於抑制發炎反應，而能預防、改善心血管疾病。雖已有研究證實大蒜及其組成分具有調控發炎反應，進而抗動脈粥狀硬化與心血管疾病之生理效用，然而有關大蒜脂溶性有機硫化物於此方面的研究尚少，故本實驗以 diallyl sulfide (DAS)、diallyl disulfide (DADS) 與 diallyl trisulfide (DATS) 三種各差一個硫原子的脂溶性大蒜有機硫化物為主要研究材料，探討它們在 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞發炎反應下，調控 iNOS 表現之效應，及其上游轉錄因子—NF- κ B 在其中扮演之角色，並將其作用與另兩種水溶性硫化物—S-allyl cysteine (SAC) 與 N-acetyl-cysteine (NAC) 之效應作比較。結果顯示，在 1 μ g/ml LPS 誘發發炎反應下，MTT 分析指出 100-1000 μ M DAS、50-400 μ M DADS、25-200 μ M DATS、1-10 μ M SAC 或 NAC 並不影響細胞存活率。在 NO 生成與 iNOS 表現效應方面，DAS 並無抑制 NO 生成與 iNOS 表現之作用，SAC 或 NAC 僅在 10mM 處理濃度下方能降低 NO 生成與 iNOS 蛋白質表現；然而，DADS 與 DATS 則明顯在抑制 LPS 活化 iNOS 蛋白質與 mRNA 表現上有較強效應，因而抑制 NO 生合成之效應也顯著高於 DAS、NAC 與 SAC。進一步探討 DADS 與 DATS 抑制發炎反應與上游轉錄因子—NF- κ B 的活化關係，結果也發現，DADS 與 DATS 抑制 iNOS 表現確實與 NF- κ B 轉錄因子活性受到抑制有關。由於 DADS 與 DATS 是大蒜精油中含量最多之硫成分，因此，本研究推論大蒜精油或許具有發展為抗發炎健康食品，進而改善或預防心血管疾病之潛能。

關鍵字：大蒜有機硫化物、脂多醣體、一氧化氮、RAW264.7 巨噬細胞、發炎反應

英文摘要

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease affecting arterial vessels. In atherosclerosis lesions, inflammatory processes upregulate iNOS expression in macrophages, resulting in excessive nitric oxide (NO) production and vascular damage. Thus, suppression of NO production, via inhibition of iNOS expression and/or activity, is an attractive therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases. Garlic has been used as a traditional medicine for prevention and treatment of cardiovascular diseases. However, the effect of lipid-soluble organosulfur compounds derived from garlic has not been clearly elucidated. The aim of this study was to investigate the inhibition of diallyl sulfide (DAS), diallyl disulfide (DADS) and diallyl trisulfide (DATS) on iNOS expression and NF- κ B activation in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages and compared the effect with two water soluble organosulfur compounds, i.e. S-allyl cysteine (SAC) and N-acetyl-cysteine (NAC). LPS-activated RAW264.7 cells were treated with 100-1000 μ M DAS, 50-400 μ M DADS, 25-200 μ M DATS, 1-10 μ M SAC or NAC, respectively, which did not reduce cell viability as measured by MTT assay. DAS did not affect NO production and iNOS expression. SAC or NAC at only 10 mM inhibited NO production and iNOS protein levels. In contrast, DADS and DATS showed more inhibitory potential at NO, iNOS protein and mRNA levels. By gel electrophoresis mobility shift assay, DADS and DATS were effective in the inhibition of NF- κ B activation. Results suggest that DADS and DATS, the two major organosulfur compounds of garlic, could be important in modulating the NF- κ B-related health impact.

Keyword: garlic organosulfur compounds, nitric oxide, NF- κ B, RAW264.7 macrophages, inflammation

壹、前言

活性氧傷害與疾病的因果關係近年來引起廣泛注意，尤其是它與多種慢性退化性疾病間的關係更是眾人焦點，因此減少或預防氧化傷害也就成了改善健康的手段之一，健康食品所以受到廣大消費者的使用，也就是此浪潮之下的必然結果。本人過去數年研究重點有二，第一：探討維生素 E 與麩胱氨酸(glutathione, GSH)兩種胞內重要抗氧化分子的保護作用與作用機轉，在 tert-butyl hydroperoxide 誘發初代肝細胞氧化傷害—membrane blebbing—模式下，結果顯示維生素 E 有效抑制細胞膜表面 bleb 的發生，此一效應和維生素 E 減少細胞膜蛋白質氧化與脂質過氧化有關，其中，細胞骨蛋白(cytoskeletal proteins)結構的維持，比如肌動蛋白(actin)與微管蛋白(microtubule)，應居於關鍵地位；麩胱氨酸在維持細胞膜結構上所扮演角色雖不似維生素 E 有效，但兩者間仍有互補功能(Kuo et al., 1997; Chen et al., 2001)；細胞發生氧化壓力時，胞內蛋白質易因活性氧而產生氧化相關傷害，或是產生蛋白質修飾作用 (protein modification)，蛋白質麩胱氨酸化(protein S-glutathionation)就是其中一種，利用等電點電泳法(isoelectric focusing analysis)，我們成功分離紅血球中 Hb、met-Hb 與麩胱氨酸化 Hb (Chen and Lii, 1997)。第二：探討食物因子如何調節體內抗氧化能力與解毒功能，此研究則以大蒜為實驗材料；大蒜數千年來在世界很多地區除被視為食物外，也是常見藥材之一。事實上，大蒜各種生理活性可歸因於其所富含的特殊的有機硫組成份，此一組成分相當複雜，其種類與含量易受大蒜加工條件與萃取方式所影響，目前本實驗室則以脂溶性的大蒜精油及精油中的三種主成分—diallyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide—為研究對象。結果顯示大蒜精油可顯著調控肝臟抗氧化酵素與多種解毒酵素活性及蛋白或訊息 RNA 表現，在解毒酵素方面，除了 cytochrome P450 (CYP) 1E1 活性與表現

受到抑制外，CYP 1A1、2B1、3A1 與 GSH S-transferases 活性、蛋白與 mRNA 表現均增加，其中，更以 CYP 2B1 增幅最大，比較三種有機硫成分作用強度，也顯示出特異性，對 CYP 1A1、2B1、3A1 三種 phase I 酵素，作用強弱依次為 diallyl sulfide、diallyl disulfide、diallyl trisulfide，但對 GSH S-transferase，則是 diallyl trisulfide 最強，Diallyl disulfide 次之，Diallyl sulfide 最弱。就調節體內抗氧化酵素活性而言，大蒜精油可增加 GSH reductase 與 SOD 活性，三種有機含硫成分也以 DATS 效果最大(Sheen et al., 1999; Wu et al., 2001,2002)；大蒜精油與魚油共處理下，兩者對大鼠肝臟 CYP 2B1、CYP 1A1、CYP 3A1 與鼈型 GST 酵素活性、蛋白或訊息 RNA 表現顯示出相加作用，大蒜精油也具有抑制 FeSO₄ 誘發脂質過氧化作用的效應(Chen et al., 2001, 2003)，除此外，目前正嘗試設計 CYP 2B1 與 PGST 報導基因 (reporter gene)，探討初代肝細胞中 diallyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide 調控此二基因表現的機制。除了前述兩項重點工作外，近年來也與彰化基督教醫院劉青山醫師及本系陳暉雯教授與劉承慈副教授分別就維生素 E／飲食油脂與肝癌生成(Ku et al., 2000; Lii et al., 2000)、飲食油脂與 CYP 2B1 表現(Tsai et al., 2001)、血液抗氧化指標與粥狀動脈硬化相關性(Liu et al., 2000)、大蒜與降血糖、大蒜與免疫活性(Liu et al., 1998)等課題積極合作中。

隨著科技文明的快速進展，近一世紀來，工商業的發展幅度遠超過過去歷史的總合，人類也因此享受著這些科技產品所帶來的便利，然而享受的同時，我們也付出不少的代價，比如，生態環境的劇烈變化、污染的增加、生活形態與飲食型態的改變等，反應出有得有失的宿命。事實上，慢性退化性疾病的盛行正是我們享受科技文明時付出的代價。當然，今日的台灣也不能自外此一潮流，衛生署 (2002)所公告台灣地區國人十大死因中，惡性腫瘤、心臟病、心血管疾病與糖尿病等慢性疾病

分居前四名此一事實，即可看出。

惡性腫瘤、心臟病、心血管疾病與糖尿病等慢性病發生機轉是多因的，除了大家熟知的環境污染物外，飲食因子也是其中一個相當重要的因素，Milner (1990)即估計高達 30%至 35%的腫瘤可歸因於飲食，至於心血管病變的增加，也有部份歸因於飲食中飽和脂質含量與熱量攝取的增加。所以排除或減少飲食中與慢性病有關的危險因子或增加保護因子的攝食，也就成為預防這些疾病的最好方法，這也是近來保健營養所以日漸受到重視的主因。專家學者們嘗試從各種食物中尋找可能的機能性成份，並探討其作用機轉。目前這方面的研究並不少見，其中又以普遍存於蔬菜及水果中的天然化學成分 (phytochemicals) 受到最多注意，如：phenolic compounds, isoflavones (Setchell, 1998), allium organosulfur compounds (Fleischauer and Arab, 2000; Shirin et al., 2001)等。流行病學或臨床研究上，也證實它們具有改善體質與調節生理機能之效應，比如，富含 organosulfur compounds 的大蒜(Alder and Holub, 1997; Morcos, 1997; Yeh and Liu, 2001)和富含類黃酮 (flavonoids) 的蔬果及紅酒(Anthony et al., 1998; Arai et al., 2000)，它們的抗氧化及降血膽固醇特性，即被認為對維持血管系統有重大保護作用。除傳統食材在保健營養的應用外，近年來，嘗試由傳統藥材或各式植物中尋找可能開發為藥物的標的也蔚為主流，加上生物技術近年來的快速發展，利用生物技術開發生產此類準藥物成份也就變的大為可行，由紫杉開發出的紫杉醇在腫瘤治療的應用即是一個很好的例子，另外，靈芝多糖體所表現的免疫調控活性也使其在腫瘤治療的應用變得可行。

前述多項慢性疾病，其發生原因均是多因的，也多少與發炎反應有關，以粥狀動脈硬化為例，它是一種病因相當複雜的疾病，高脂血症、高血壓、

或是抽煙者均是粥狀動脈硬化高危險群 (Haller, 1997)，他們常伴隨有動脈壁內皮細胞受損現象 (Pittilo, 2000; Ross, 1993a; Shimokawa, 1999)，使得動脈壁的 angiotensin II 和 nitric oxide 代謝發生失調 (Dusting et al., 1998; Luscher and Noll, 1995)，也引發一連串反應：內皮細胞表面黏附分子 (adhesion molecules) 不正常表現、脂蛋白氧化、單核細胞侵入血管壁、泡沫細胞生成、血小板增生及蓄積、血管壁肌肉細胞增生等 (Ross, 1993b)。在這些變化中有不少已知與發炎因子有關，比如，黏附因子表現、單核球入侵、泡沫細胞生成、動脈壁平滑肌細胞不正常增生 (Schwartz et al., 1993) 等，這也是為何粥狀動脈硬化被認為屬於慢性發炎疾病的原因 (Ross, 1999)。

發炎 (inflammation) 雖是身體防禦微生物入侵時的正常反應，然而過度或不當的發炎也是不少慢性病發生的原因。當體內遭受病原體入侵時，免疫系統即刻展開防衛工作，其中巨噬細胞或肥大細胞在受到活化後將分泌多種細胞激素 (cytokines)，例如 tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 (IL-1)、interleukin-6 (IL-6)、或 prostaglandin E₂ (PGE₂) 及組織胺等發炎誘導物質，使損傷處血管擴張並導致局部發熱、變紅與腫漲，引起發炎反應。細胞激素亦促使抗體、補體及其他抗感染蛋白質分泌到發炎組織處，同時吸引更多巨噬細胞至組織感染部位，吞噬侵入之病原體，清除受損細胞、微生物殘骸及分解代謝後之產物，最後受損之組織則經凝血等修補機制使其恢復到正常狀態。

然而，發炎反應亦會促進很多活性分子的產生。當巨噬細胞受到發炎因子或細胞激素活化時，除釋放大量活性氧外，也因 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 的活化而製造大量一氧化氮 (nitric oxide, NO)，雖活性氧

與 iNOS 所製造出的大量 NO 在感染和腫瘤的免疫反應中有著重要角色，但過量 NO 所產生的效果卻如刀之兩面。事實上，NO 也是一種自由基，在高濃度下極易引起細胞傷害 (Moro et al., 1996)，且高濃度 NO 易與超氧陰離子 (superoxide anion) 快速反應形成過氧化硝酸根 (peroxynitrite) (Beckman et al., 1990)。過氧化硝酸根雖非自由基，但其氧化活性卻比超氧陰離子與 NO 高 (Koppenol et al., 1992)，因此，極易與胞內蛋白質和 DNA 等分子發生反應，使得 DNA 及蛋白質中酪氨酸殘基、硫醇基 (sulfhydryl groups) 發生硝化作用 (nitrosylation)，生成 8-nitroguanine、3-nitrosylated proteins、S-nitrosylated proteins 等硝化產物 (Yermilov et al., 1995)。除此外，過氧化硝酸根也能誘使 LDL 氧化或增加血小板凝集作用，Matsunaga 等人 (2001) 即證實過氧化硝酸根修飾過的高密度與低密度脂蛋白均會使得動脈內皮細胞完整性受到傷害。由粥狀動脈硬化、神經退化疾病、風溼性關節炎等病理組織中檢測出高量硝化蛋白質存在，或許暗示過量 NO 極可能與這些慢性疾病間有著因果關係 (Alfon et al., 1999; Torreilles et al., 1999; Ungvari et al., 2002)。這也顯示抑制 iNOS 過度表現在預防慢性病中的重要性。

NO 是體內相當重要的調節分子，它在內皮細胞擔負的各項功能中，維持血管通透性、維持血管內腔穩定結構、調節凝血、維持內皮細胞與免疫細胞間交互作用均有著關鍵角色。一氧化氮分子量僅 30，因此在生物體內極易進出細胞。它是細胞內精氨酸氧化成瓜氨酸過程中，經一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 作用所生成的產物。內皮細胞中負責生合成 NO 的酵素稱為內皮細胞型一氧化氮合成酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)，是已知三種 NOS 中的一種，與另一神經細胞型 NOS (nNOS) 均屬構成性酶 (constitutive enzymes)，兩者活性依賴鈣離子與調鈣蛋白 (calmodulin) 調控，NO 生成濃度約是 pM 至 nM 水準。在體內，此濃度

範圍的一氧化氮即足以表現其調節內皮細胞通透性與吸附性、平滑肌細胞舒張、抑制平滑肌細胞增生、抑制血小板凝集等活性 (Alheid et al., 1987; Shears et al., 1998)。第三種 NOS 則是前述的 iNOS，它存在多種細胞中，易被內毒素與細胞激素誘發而大量表現 (Nathan and Xie, 1993)，生成濃度可高達 μM 。大量 NO 在發炎反應時，為了消滅外來微生物有其重要性，但當發炎反應轉為慢性時，iNOS 長時間製造出大量的 NO，將因其高活性而對生物體或細胞產生傷害，內皮細胞即是其中一種 (Beckman and Koppenol, 1996; Bult, 1995; Rubbo et al., 1995)。所以，就一氧化氮與血管功能兩者間關係而言，很顯然的維持內皮細胞正常且適量一氧化氮合成，且抑制慢性發炎反應誘發 iNOS 表現應有助於粥狀動脈硬化的預防 (Radomski et al., 1995)。

大蒜是廣為各方使用的一種食材，除了作為調味用途外，事實上，大蒜也擁有相當多樣的生理機能性，已知者包括有：殺菌、增加解毒酵素活性 (Chen et al., 2001, 2003; Munday et al., 2003; Wu et al., 2003)、降低 LDL 濃度 (Morcos, 1997; Yeh and Liu, 2001)、抑制 LDL 氧化 (Yin et al., 2002)、增加胞內抗氧化酵素活性 (Borek, 2001; Wu et al., 2001)、自由基清除力 (Kim et al., 2001)、減少血栓生成或降低血小板凝集 (Ali, 1995; Vanderhoek et al., 1980)、抑制 phospholipase A2 (Liu et al., 1998; Srivastava and Tyagi, 1993) 或 5-lipoxygenase 活性 (Belman et al., 1989; Sendle et al., 1992)、保護內皮細胞受損 (Ide and Lau, 2001) 等。大蒜生物活性主要來自其豐富且多樣的有機硫成份 (organosulfur compounds)，但這些成份的種類及其含量卻與大蒜加工條件或儲存方式有密切關係 (Yu et al., 1989)，這也是為何不同大蒜產品間，其有機硫成份會有如此明顯的差異。以水蒸汽蒸餾法收集的油狀萃出物 (大蒜精油) 為例，它的成份即以脂溶性有機硫成份-diallyl sulfide (DAS), diallyl

disulfide (DADS), diallyl trisulfide (DATS), allylmethyl trisulfide 為主，但萃自長期浸泡在食醋或酒中的後熟大蒜 (aged garlic) 的萃出物，其成份卻是以水溶性有機硫成份-S-allyl cysteine (SAC), S-ethyl cysteine (SEC), S-allyl mercaptocysteine 為主。由於脂溶性有機硫成份的刺激性及特殊味道，使其較不討喜，因此，近年來有關大蒜研究，逐漸以後熟大蒜的水溶性萃出物及其活性成份較受到注意，實驗結果也指出後熟大蒜與 SAC 在降血膽固醇 (Yeh and Liu, 2001)、抗氧化 (Borek, 2001; Ide and Lau, 1999; Lau, 2001)、抑制 iNOS 表現 (Geng et al., 1997; Kim et al., 2001) 上均有不錯效應，顯示後熟大蒜在預防粥狀動脈硬化的潛在應用性。相較於 SAC，其他後熟大蒜水溶性成份的研究則明顯少了許多。至於脂溶性成份，由文獻看來，DAS and DADS 一直是過去的主要研究對象，但重點主要集中在抗氧化 (Haber et al., 1995; Sheen et al., 1999)、降血脂質 (Yeh and Liu, 2001)、抑制血小板凝集 (Bordia et al., 1996)、保護化學性肝損傷 (Brady et al., 1991; Wang et al., 1996)、抗腫瘤 (Sparnins et al., 1988; Yang et al., 1994) 等方面，對 iNOS 的效應則尚不多見，至於 DATS，則仍未見諸文獻討論；但是，不能忽略的是，DATS 是大蒜精油中含量最豐富的有機硫成份(約 30-35%) (Yu et al., 1989; Wu et al., 2001)。

由於大蒜有機硫成份的分子結構可能決定它們的生理活性 (structure-function relationship)，我們曾針對分別相差僅一個硫元素的 DAS, DADS and DATS，比較它們對 glutathione (GSH) peroxidase and GSH reductase 等抗氧化酵素與 GSH S-transferase (GST) and cytochrome P450s (CYP) 等解毒酵素活性之效應，結果顯示三者間對這些酵素的活性或蛋白表現之作用強弱與其硫原子數目有關，就 GSH peroxidase, GSH reductase and GST 而言，作用強弱依次是 DATS>DADS>DAS，但對 CYP 1A1, 2B1 and

3A1 則是 DAS>DADS>DATS (Chen et al., 2001, 2003; Wu et al., 2002)。此類分子結構與生理活性間相關性研究，事實上也常見諸於同屬酚類化合物 (phenolic compounds) 或類黃酮化合物 (flavonoids) 間，比如差異僅有一個氫氧基 (hydroxyl group) 的 genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) 和 daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone) 在清除氫氧自由基 (Giles and Wei, 1997)、過氧化硝酸根 (Lai et al., 2001) 與 iNOS 抑制表現 (Sheu et al., 2001) 等效應上，即與其氫氧基數目及位置有關。由於 iNOS 表現與轉錄因子-NFκB 活化有密切關係，而 NFκB 之活化又受到胞內氧化還原狀態 (redox states) 所調控 (Bowie and O'Neill, 2000; Folh  et al., 1997)，換句話說，Genistein 及 daidzein 抑制 iNOS 之效應被認為應與其抗氧化活性有關。

Ide and Yeh (2001) 與 Kim 等人 (2001) 也指出水溶性大蒜有機硫成份 -SAC 所以抑制 iNOS 表現與其具備清除自由基活性有關，因此抑制了 NFκB 的活化，Yin 等人 (2002) 則指出 SEC, DAS, DADS and DATS 均具有不等的抗 Cu^{2+} -induced LDL 氧化的活性。因此，我們假設 SEC, DAS, DADS and DATS 應該也擁有抑制 iNOS 表現、減少 NO 生成的能力，其作用方式與 SAC 相似，係透過 NFκB 途徑。由於 DAS, DADS and DATS 抗氧化與調控抗氧化酵素活性與其硫原子數目有關 (Wu et al., 2001; Yin et al., 2002)，可預測在抑制 iNOS 表現效應上，也極可能與其分子結構有關。除了比較硫元素數目外，DAS, DADS and DATS 這些大蒜精油中脂溶性成份與後熟大蒜中水溶性的 SAC and SEC 在抑制 iNOS 效應上的高低也頗值得分析。事實上，在利用 RAW 264.7 巨噬細胞株實驗中，我們已有初步資料可顯示 (如下圖)：在抑制內毒素 lipopolysaccharide (LPS) 誘發 RAW 264.7 巨噬細胞 NO 生合成上，DATS 抑制能力高於 DADS，DADS 高於 DAS，

DADS 與 DATS 效果也明顯高於 SAC 與 N-acetyl cysteine，顯示大蒜精油在此方面的效果極可能比後熟大蒜有效的多，至於這些成份在抑制 iNOS 蛋白或 mRNA 表現之差異仍須再進一步檢測。

抑制 iNOS 的活化，可減少慢性發炎時過量 NO 可能導致的細胞或組織傷害，此一效應將有助於解釋大蒜在預防慢性發炎相關疾病時的作用機轉。本計畫預計採用 RAW264.7 巨噬細胞株，在 LPS 活化下，探討大蒜精油與五種大蒜有機硫組成份-SAC, SEC, DAS, DADS and DATS-抑制 iNOS 表現之效應。

貳、材料與方法

研究方法

[實驗材料]

1. 大蒜精油與大蒜有機硫成份

大蒜精油將在實驗室利用水蒸汽蒸餾法進行萃取 (Chen et al., 2001)，其有機硫成份組成則以氣相層析儀分析 (Sheen et al., 1992)。Diallyl sulfide (DAS) and diallyl trisulfide (DATS)將分別由 Fluka Chemical Co. (Buchs, Switzerland) 和 LKT Laboratories Inc. (St. Paul, MN)購得，S-ethyl cystein (SEC)將由 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)購得，Diallyl disulfide (DADS) and S-allyl cystein (SAC) 則由 Tokyo Kasei Chemical Co. (Tokyo, Japan)購得。

SAC, SEC, DAS, DADS or DATS 處理濃度預計將介於 0-1.0 mM，大蒜精油濃度則是 0-100 μ g/ml。

2. RAW 264.7

小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 將由新竹食品工業研究所菌種保存中心購得，細胞將以含 10%胎牛血清、100U penicillin/100 μ g streptomycin 之 RPMI 1640 培養液培養於 75 cm² 塑膠培養中，待 90% confluence，接種於 24 孔或 6 孔之培養盤中，培養條件設為 37°C 與 5% CO₂。生長至 90% confluence 後，分別加入不等濃度之大蒜精油或各種大蒜有機硫成份，濃度及處理時間將依分析而定。

[實驗方法]

1. 細胞存活率分析：MTT assay (Denizot and Lang, 1986)

巨噬細胞培養在 24 孔之培養盤中，待生長至 90% confluence 時，吸除培養液，以冰冷 PBS 清洗兩次，加入含 0.5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5,-diphenyltetrazolium bromide (MTT)之培養液再培養 1 小時，移除培養液，加入 1 mL isopropanol- 0.1 N HCl，暗反應 2 小時以完全溶解 formazan，MTT 還原為 formazan 的程度則以分光光譜儀於 570 nm 下定量。

2. 亞硝酸鹽 (nitrite) 分析 (Green et al., 1982)

取 100 微升細胞培養液放入 96 孔盤中，加入等量之 Griess reagent (1% sulfanilamide / 5% H₃PO₄、0.1 % N- (1-naphthyl)-ethylenediamine)，暗反應 10 分鐘進行呈色，再以 ELISA Reader 於波長 540nm 讀取 nitrite 吸光值，並採 NaNO₂ 標準品所得之標準曲線比對求得 nitrite 濃度，濃度以微升M 表示。

3. Nitric oxide synthase 活性分析 (Kobuchi et al., 1999)

iNOS 活性係以將 L-[³H]-arginine 代謝成 L-[³H]-citrulline 之速率表示之。RAW 264.7 細胞待生長至 90% confluence 時，先以 SAC, SEC, DAS, DADS or DATS 預培養 2 小時，再以 LPS (1 微升g/mL) 處理 20 小時，PBS 清洗三次後，加入含 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 M leupeptin and 1 mM dithiothreitol 之 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)，刮下細胞並以超音波破碎細胞，15,000 g 離心 15 分鐘，取適量上清液加入 100 微升L 反應液 (1 mM NADPH, 10 微升M FAD, 1 mM dithiothreitol, 100 微升M 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, 100 微升M arginine and L-[³H]-arginine (0.5 Ci/mL))，37°C 反應 60 分鐘，加入 4°C 之 50 mM morpholino ethanesulfonic acid/5 mM EDTA 緩衝液(pH 5.5)終止反應。反應液通過 Dowex 50W-X8 Na+

離子交換樹脂管柱 (Fluka) 所收集之過濾液，即可以液體閃爍計數儀定量。

4. Western blot 分析—iNOS 蛋白質之表現與硝化蛋白質之檢測

細胞處理同前段，蛋白質定量後 (Lowry et al., 1951)，取 60 微克蛋白質與等體積之 sample buffer 混合，沸水浴 5 分鐘，隨後以 7.5% polyacrylamide gels 進行電泳分析。電泳完成後，取下 separating gel 浸泡於 transfer buffer (20% methanol/192 mM glycine) 中 15 分鐘，放入轉印槽，以 100 伏特電壓於冰水浴中進行轉印 90 分鐘，使蛋白質轉印至 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) 膜上。取出 PVDF 膜，以 buffer A (25 mM Tris-HCl/150 mM NaCl/0.3% Tween-20, pH 7.4) 清洗三次，再於含 5% 脫脂奶粉溶液中進行 blocking 反應 90 分鐘，清洗三次後，加入 iNOS 或 anti-nitrated tyrosine 初級抗體，4°C 下隔夜反應，再與二級抗體作用 1 小時，ECL solution 處理後，即可壓片。

5. Northern blot 分析—iNOS mRNA 表現 (Chen et al., 2001)

細胞以 PBS 清洗後，加入 0.5 ml TRIzol™ reagent，靜置 5 分鐘將 RNA 萃出，接著將細胞刮下移入 eppendorf tube 中，加入 160 µl chloroform 充分搖晃 15 秒，置於室溫 5 分鐘，於 4°C 下離心 10 分鐘 (11,000 g)，取出上層液，加入 250 微升 isopropanol，混合均勻，靜置 10 分鐘使 RNA 沉澱，4°C 下 11,000 g 離心 10 分鐘，倒除上層液，加入 1 ml 70% ethanol 洗去沈澱物中殘餘之鹽類，再於 4°C 下 5,000 g 離心 5 分鐘，倒除上清液，最後將 RNA 保存於 70% cold ethanol 中或進行 RNA 定量。

將 20 µg RNA 樣品注入含 1% 洋菜膠之膠體樣品槽中，先以 75 伏特電壓進行電泳，待 RNA 全部進入膠體後，改以 25 伏特電壓進行電泳約 15-16

小時。取出膠體，數位相機拍攝 RNA 電泳圖後，即可將膠體上之 RNA 轉印至 HyBond nylon 膜 (Amershan Pharmacia) 上。轉印完成後，以 2X SSC buffer (300 mM NaCl/30 mM sodium citrate) 清洗 nylon 膜，置於紙巾上風乾，接著於 UV 燈下進行 5-10 分鐘 cross-linking，隨後以 2X SSC buffer 將膜潤濕並放入塑膠袋中，加入 10 ml 預雜交反應液 (containing 10 x Denhardt's reagent (0.2% Ficoll, 2 g/L polyvinylpyrrolidone, 2 g/L bovine serum albumin), 5 x SSPE (750 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM EDTA), 20 g/L SDS, 50% formamide, and 100 µg/mL of single strand sheared salmon sperm DNA)，42°C 下水浴 2 小時。

iNOS mRNA 探針製備方法簡述如下：取 1 µl template DNA，加入 30 µl 無菌水，混合均勻，95°C 加熱 5 分鐘，取出並立即置於冰上，隨後依序加入 5 µl 10X labeling buffer、6 µl dNTP mixture、5 µl ³²P dCTP (3,000 Ci/mmol) 及 1 µl DNA polymerase，37°C 水浴 1 小時，加入 200 µl TE buffer，通過 Sephadex G25 分離管柱，再將所得過濾液以 95°C 加熱 5 分鐘，置於冰上 5 分鐘後，即完成探針製備。將此探針加入已完成預雜交反應之塑膠袋中，並於 42°C 水浴行雜交反應 (hybridization)，隔天取出轉印膜，依次以 2X SSC/0.05% SDS 及 0.1X SSC/0.1% SDS 溶液清洗，最後置於感光夾中進行壓片。

6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)—NF-κB 活化之測定 (Revin, 1989)

RAW264.7 細胞生長至 90% confluence 時，先以不等濃度大蒜精油、SAC、SEC、DAS、DADS or DATS 預培養 3 小時，加入 1 µg/mL LPS，60 分鐘後，RAW264.7 先以 PBS 沖洗 2 次，加入 400 µl phosphate-buffered saline

將細胞刮取出，1,500 g 離心 5 分鐘，移除上清液，加入 200 μ l hypotonic buffer (10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂, 1.0 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 4 μ g/mL leupeptin, 20 μ g/mL apotonin and 0.5% NP-40)，靜置 15 分鐘，4,500 g 離心 15 分鐘，所得細胞核部份加入 50 μ l hypertonic buffer (10 mM HEPES (pH 7.9), 400 mM KCl, 10% glycerol, 1.0 mM MgCl₂, 1.0 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 4 μ g/mL leupeptin and 20 μ g/mL apotonin)，振盪 30 分鐘，最後，於 4°C 下以 10,000 g 離心 15 分鐘，所得上層液即為細胞核萃取液(cell nuclear extract)。蛋白質定量後，取 10 μ g 細胞核蛋白質與含有標定生物素之 NF- κ B binding probe (5'-AGTTGAGGGGACTTTC^{CC}CAG-GC-3'，sequences underlined is NF- κ B binding site) (Kim et al., 2001; Wagener et al., 1997) 之反應液(10 mM Tris, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 2.5% glycerol, 5mM MgCl₂, 1% NP-40 and 2 μ g poly(dI-dC))於冰上反應 30 分鐘，以 6% polyacrylamide gels 進行電泳，隨後以 100 伏特電壓於冰水浴中進行轉印 100 分鐘，使 protein-DNA 複合物轉印至 nylon membrane 上，5 分鐘 cross-linking 後，依次加入 blocking solution 與 SA-HRP，清洗後，將 nylon membrane 以保鮮膜固定於感光夾中，於暗房中置入 X 光片進行顯影反應。(AP-1 binding probe: 5'-CGCTTGATGAGTCAG-CCGGAA-3')

7. 2'-7',dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay (Vowells et al., 1995)

本計畫另以 DCFDA 分析胞內過氧化物濃度。DCFDA 在細胞內先行水解反應，且在過氧化物存在下將氧化為螢光產物 -2'-7'-dichlorofluorescein (DCF)，因此，由胞內螢光強弱可表示胞內氧化還原狀態(redox states)。分析方法簡述如下:RAW264.7 細胞先以 DAS, DADS, DATS, SEC 或 SAC 預處理 2 小時，加入 50 μ M DCFDA (0.05% ethanol final

concentration)，1 小時後，細胞以 0.1 mM hydrogen peroxide 誘發氧化物生成，1 小時後，收取細胞，以細胞流式儀在 excitation 488 nm 下量測 10,000 個細胞螢光值。

6. 統計分析：

本實驗所得數據將先以一元變方分析(one-way analysis of variance)行統計分析，隨後再以 Students t-test 或 Tukeys multiple comparison test 行處理組間差異性檢定，當 $P < 0.05$ 則視為顯著差異。

參、結果

一、在 LPS 誘發發炎反應下，不同大蒜有機硫化物對 RAW264.7 巨噬細胞細胞存活率之影響

本研究首先以 MTT assay 探討各種不同濃度大蒜有機硫化物的添加是否對 RAW264.7 巨噬細胞造成毒性傷害，結果發現，與 vehicle control 組(100%)比較，LPS 處理組與 vehicle control 組並無顯著差異(圖一、二)，顯示在 $1 \mu\text{g/ml}$ LPS 誘發發炎反應下，並不影響細胞存活率，而在同時處理 LPS 與 $100\text{-}1000 \mu\text{M}$ DAS、 $50\text{-}400 \mu\text{M}$ DADS、 $25\text{-}200 \mu\text{M}$ DATS(圖一)、 $1\text{-}10 \mu\text{M}$ SAC 或 NAC(圖二)之大蒜有機硫化物後，細胞存活率均可維持於 95% 以上，與 vehicle control 組比較並無統計上差異，表示在此濃度範圍內的大蒜有機硫化物並不會對 RAW264.7 巨噬細胞產生毒性傷害。然而，巨噬細胞若給予 $400 \mu\text{M}$ DATS 處理，細胞存活率則僅剩 $87.6\% \pm 4.0$ ，顯著低於 vehicle control 組($P=0.03$ ，圖一)，顯示此一濃度將對 RAW264.7 巨噬細胞造成毒性傷害。

二、不同大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞釋放 NO 之影響

本實驗主要探究不同大蒜有機硫化物是否能抑制 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞 NO 的生成。在脂溶性大蒜有機硫化物的效應方面，如圖三所示，與 vehicle control 組相較下， $1 \mu\text{g/ml}$ LPS 顯著誘發 NO 釋放(1.10 ± 0.33 vs $41.40 \pm 3.44 \mu\text{M}$)，然而同時添加 DAS、DADS 或 DATS 下，結果顯示 DAS 即使高達 $1000 \mu\text{M}$ 仍無抑制 NO 釋放之效果，但是 DADS 與 DATS 兩種脂溶性蒜有機硫成分則是顯著減少 LPS 誘發 NO 的釋放，並且均呈現劑量關

係(dose-dependent response)；其中 DATS 抑制能力優於 DADS，在 $100\ \mu\text{M}$ 濃度下，DADS 與 DATS 抑制效果分別是 43.7%及 63.1%。水溶性大蒜有機硫化的抑制效果上，結果則顯示不論是 SAC 或 NAC，只有在 10mM 高濃度處理下，方可抑制 NO 的生成，1mM SAC 或 NAC 處理組與 LPS 組比較，並無顯著差異(圖四)。

三、不同大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞 iNOS 蛋白質表現之影響

本分析進一步探究五種大蒜有機硫化物是否抑制 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞 iNOS 蛋白質之表現。RAW264.7 巨噬細胞同時給予 $1\ \mu\text{g/ml}$ LPS 及各種不同濃度之大蒜有機硫化物，24 小時後取樣，以 Western blot 分析 iNOS 蛋白質表現，結果發現：LPS 處理組顯著誘發 iNOS 蛋白質表現(圖五、六)，且在各種大蒜有機硫化物對 iNOS 表現之效應也與前述抑制 nitrite 生成之效應相似，DAS 對 iNOS 蛋白質表現並無效應，DADS 則在 200 與 $400\ \mu\text{M}$ 時，抑制 LPS 所誘發 iNOS 蛋白質的表現，DATS 則在 $50\ \mu\text{M}$ 時即可抑制 iNOS 蛋白質表現，並隨著濃度增加而遞減，呈現劑量效應(圖五)。在水溶性大蒜有機硫化物方面，如圖六所示，SAC 或 NAC 與 LPS 共同處理 24 小時後，1mM SAC 或 NAC 並無抑制 iNOS 蛋白質表現之效應，且處理 1mM SAC 組 iNOS 蛋白質表現還高於 LPS 處理組；然而，當 SAC 或 NAC 濃度增加至 10mM 時，LPS 誘發 iNOS 蛋白質的表現則明顯受到抑制。

四、不同大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞 iNOS mRNA 表現之影響

接著，進一步探討不同大蒜有機硫化物影響 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞 iNOS 蛋白質表現是否作用在轉譯階段，我們以 Northern blot 分析 RAW264.7 巨噬細胞在 1 μ g/ml LPS 或 LPS 與不同大蒜有機硫化物共同處理 24 小時後 iNOS mRNA 之表現，結果顯示：與 LPS 組相較下，400 μ M 與 1000 μ M DAS 組均不具抑制 iNOS mRNA 表現之作用(圖七)；DADS 則在濃度 200 或 400 μ M 時顯著抑制 iNOS mRNA 表現，然而 100 μ M DADS 則無抑制 iNOS mRNA 表現的效果；DATS 不論是 50、100 或 200 μ M 組，均能顯著地抑制 iNOS mRNA 之表現，且呈現劑量依賴性(圖七)。

五、不同大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞細胞核內 NF- κ B 與 NF- κ B binding probe 序列結合之影響

本分析主要探討不同大蒜有機硫化物抑制 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞 iNOS 基因表現是否與其上游轉錄因子—NF- κ B 之活化有關，故以 EMSA 進行分析(圖八)，結果顯示：LPS 組(A. lane 2)相較 vehicle control 組(A. lane 1)明顯活化 NF- κ B 與 NF- κ B binding probe 序列之結合作用，加入 cold NF- κ B binding probe(沒有 biotin 標誌之 probe 序列)，由於會與有標誌 biotin 之 probe 序列競爭 NF- κ B 的結合作用，因此不表現(A. lane 3)，加入 mutant NF- κ B binding probe 則減少 NF- κ B 與其 binding site 結合機會(A. lane 4)。進一步比較各種不同大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞細胞核內 NF- κ B 與 NF- κ B binding probe 結合之影響，可見 DAS 並無抑制 NF- κ B 與 NF- κ B binding probe 結合的效用，而 DADS 和 DATS 則分別在 400 與 200 μ M 時，即顯著抑制 LPS 誘發 NF- κ B 之活化作用(圖八 A. and C.)；在 SAC 與 NAC 方面，也可發現在 10mM NAC 也有抑制 NF- κ B 與 NF- κ B binding probe 結合之效果，然而，SAC 抑制作用有限(圖八 B. and C.)，比較

脂溶性 DADS 與 DATS 和水溶性 NAC 與 SAC 對 LPS 活化 NF- κ B 效果，明顯可見 DADS 與 DATS 抑制 NF- κ B 活化之效應高於 NAC 與 SAC (圖八 C.)。

六、不同大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞胞內過氧化物濃度抑制效應

本分析主要探討不同大蒜有機硫化物抑制 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞胞內過氧化物產生的效應。結果顯示：脂溶性 DAS (1 mM)、DADS (400 μ M) 與 DATS (200 μ M) 對 LPS 所誘發巨噬細胞胞內过氧化物的生成具有抑制的效應。

肆、討論

過渡或長期慢性的發炎反應是動脈粥狀硬化病程發展的病因之一，在此發炎狀態下，會誘使活化的巨噬細胞或肥大細胞釋放大量的 NO、TNF- α 、IL-1、IL6 和 ROIs (reactive oxygen intermediates) 等發炎調節物質(Wang et al., 1994)，因此，若能減少這些發炎調節物質過量的分泌，不但能抑制發炎反應且可能有助於抗動脈粥狀硬化，降低心血管疾病之罹患率。大蒜(garlic)除了是日常食用的辛香調味品外，長久以來也被當作是藥用植物用來改善許多不同疾病的症狀，如心臟病、頭痛或腫瘤等(Agarwal, 1996)，除此外，目前已有不少研究也已證實大蒜及其有機硫化物的生理效用尚包括解毒、抗糖尿病、抗高血壓、抗腫瘤生成、抗癌、抗氧化、抗動脈粥狀硬化、抗心血管疾病及抗發炎等(Agarwal, 1996; Khalid, 2003)。雖然大蒜及其有機硫化物具有多重生理調節作用，然而其作用機轉則尚有不少且值得進一步研究的空間，雖有關大蒜調控發炎反應，進而預防或改善心血管疾病與動脈粥狀硬化的作用機制已有不少研究，但近年來主要研究對象是以大蒜水萃物或後熟大蒜或水溶性有機硫化物為主，所以，本研究主要以脂溶性大蒜有機硫化物—DAS、DADS、DATS 為實驗對象，並將其其在 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞發炎反應下，調控 iNOS 表現之效應與水溶性的 NAC 與 SAC 作一比較，同時本實驗也探究 iNOS 基因上游轉錄因子—NF- κ B 在其中的角色。已知 N-acetyl-cysteine (NAC) 是一種抗氧化劑，能降低 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞 NO 的生合成(Wadsworth and Koop, 1999)，也可藉由抑制 NF- κ B 活化，抑制前發炎物質—TNF- α 、IL-6 及 IL8 之釋放(Lappas et al., 2003)，因此，本實驗即以 NAC 作為正對照組進行比較，期望本實驗所獲得結果能有助於進一步釐清大蒜抗動脈粥狀硬化與心血管疾病之效應及其作用機轉。

實驗先以 MTT assay 探討各種不同濃度大蒜有機硫化物的處理下，是否對 RAW264.7 巨噬細胞造成毒性傷害，影響其存活率(圖一、二)，結果顯示，在 $1 \mu\text{g/ml}$ LPS 誘發發炎反應下，除了 $400 \mu\text{M}$ DATS 使得細胞存活率僅剩 $87.6\% \pm 4.0$ 外， $100\text{-}1000 \mu\text{M}$ DAS、 $50\text{-}400 \mu\text{M}$ DADS、 $1\text{-}10 \text{mM}$ SAC 與 NAC 或 $200 \mu\text{M}$ 以下 DATS 均不會對細胞產生毒性傷害；比較各種有機硫化物的毒性效應，也可知在五種大蒜有機硫化物中，DATS 對 RAW264.7 巨噬細胞毒性最強。

文獻指出 LPS 促進 RAW264.7 巨噬細胞釋放大量 NO 是透過誘發 iNOS 表現及 NF- κ B/Rel 的活化作用(Jeon et al., 2000^a)。因此，本實驗證實 1mM DAS、SAC 或 NAC 均不具抑制 NO 釋放之效果，然而，DADS 與 DATS 降低 NO 釋放之效應則明顯高於 DAS、SAC 與 NAC，且呈現劑量關係(dose-dependent response)，在 $100 \mu\text{M}$ 濃度下，DADS 與 DATS 分別抑制了 43.7% 及 63.1% nitrite 之釋放(圖三、四)，且 DADS 與 DATS 抑制 NO_2 之 IC_{50} 分別是 $153.9 \mu\text{M}$ 與 $35.8 \mu\text{M}$ 。相較其他文獻，Wadsworth 和 Koop(1999)研究中也分析了 NAC 抑制 NO 生合成之效果，但該實驗中 NAC 濃度高達了 30mM ，另一文獻中雖然採用不同細胞(human fetal membranes)，但 NAC 處理濃度也是高達 $5\text{-}15 \text{mM}$ (Lappas et al., 2003)，與本研究所指出 NAC 濃度高於 10mM 方能降低 NO 釋放之結果相符。在脂溶性大蒜有機硫化物方面，僅有的文獻也指出 DAS 並無抑制 NO 釋放之作用，DADS 則可抑制 NO 生合成(Katsunari et al., 2002)，此一結果也與本實驗數據相符合。雖然 Kim 等人(2001)在利用 LPS 和 IFN- γ 誘發 RAW264.7 巨噬細胞釋放 NO 的研究中，指出 $20 \mu\text{M}$ SAC 即能顯著抑制 NO 合成，明顯與本實驗所用 SAC 濃度有極大差距，推測可能與 SAC 施予純度有關。

進一步討論不同大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞 iNOS

蛋白質和 mRNA 之表現，就 DAS、DADS 與 DATS 三種脂溶性大蒜有機硫化物而言，由結果可以發現 DAS 即使濃度高達 1000 μ M 仍無抑制 iNOS 蛋白質與 mRNA 表現之作用(圖五、七)，因此無法減少 LPS 活化 NO 之生成(圖三)；相較 DAS，DADS 和 DATS 對 iNOS 表現之抑制明顯強過 DAS，200 μ M DADS 和 50 μ M DATS 即能顯著抑制 iNOS 蛋白質和 mRNA 之表現(圖五、七)，此一結果與 DADS 與 DATS 顯著抑制 NO 釋放一致，此一結果也與一些多酚類成分(resveratrol、silymarin)或抗發炎藥物(Radicicol)透過抑制 iNOS 活化之作用路徑相同((Jeon et al., 2000^b; Kang et al., 2002; Wadsworth and Koop, 1999)。至於 SAC 與 NAC 此兩種水溶性硫化物，相較於 DADS 或 DATS，在 1mM 濃度下均無作用，而僅在高達 10mM 處理時方能抑制 iNOS 蛋白質之表現(圖六)，也才有抑制 NO 釋放之效果(圖四)。

iNOS mRNA 的表現受到轉錄因子之調控(Xie et al., 1992)，已知 iNOS 基因 promoter region 上擁有 NF- κ B binding site，且 iNOS 表現與 NF- κ B 之活化有相當密切關係(Xie et al., 1994)。為了瞭解大蒜有機硫化物抑制 iNOS 基因表現之調控機轉是否與轉錄因子 NF- κ B 活性受到抑制有關，本實驗進一步採用 EMSA 方法，分析 LPS 活化 NF- κ B 程度是否受到大蒜有機硫化物之抑制，結果發現，LPS 單獨處理組之 NF- κ B 顯著被活化，這與 Jeon 等人(2000^a)指出 LPS 誘發發炎反應是透過 NF- κ B 的活化結果相符，且各大蒜有機硫化物處理組之結果也如預期般，DAS 並無抑制 NF- κ B 與 NF- κ B binding probe 結合的效用，因此 DAS 無法抑制 iNOS 基因的轉錄作用，當然無法減少 iNOS 蛋白質表現，也不能減少 NO 大量生成，至於 DADS 與 DATS 兩種脂溶性有機硫化物則明顯抑制 NF- κ B 活化，400 μ M DADS 和 200 μ M DATS 抑制作用分別高達 44.62 \pm 9.44% 和 55.72 \pm 7.18%(圖八C.)。然而，此一抑制程度相較於 iNOS 蛋白質和 mRNA 表現之結果明顯不足，這可能與 DADS 與 DATS 除了透

過NF- κ B此轉錄因子抑制iNOS基因表現外，可能還可透過其他轉錄因子之活化，如Rel homology family、activator protein-1 (AP-1)、cAMP-response element-binding protein (CREB)或 CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)等轉錄因子而達到抗發炎反應之作用(Hecker et al., 1997；Lee et al., 2003)。

另外，在本實驗中，10mM NAC具有抑制NF- κ B與NF- κ B binding probe結合之作用，這與Lappas等人於2003年發表之研究報告結果相似，相較於其他文獻指出SAC可透過抑制LPS和IFN- γ 活化nuclear factor- κ B (NF- κ B)，減少NO生成而能抑制發炎反應(Kim et al., 2001)，然而，本研究結果則顯示SAC並無抑制NF- κ B活化之作用(圖八C.)，因此，推論SAC抑制LPS誘發NO釋放的能力可能尚有其他作用機轉。

伍、結論

綜合以上結果，DADS 與 DATS 明顯具有抑制 LPS 活化 iNOS 表現之效應，達到抗發炎之效用，且其作用強於 DAS、SAC 與 NAC，然而，且 DADS 與 DSTS 抑制 iNOS 表現與其 NF- κ B 活化有關。由於 DADS 與 DATS 是大蒜精油中含量最多之硫成分，因此大蒜精油也許具有發展為抗發炎健康食品，進而改善或預防心血管疾病之潛能。

陸、參考文獻

- 王聖予、李麗俐、陳慧玲、馮潤蘭、湯志元、謝國珍編譯 (1996) 免疫學。藝軒出版社
- 周正中、白果能 (2002) 科儀新知雙月刊。23: 5-13。
- Agarwal KC: Therapeutic actions of garlic constituents. *Med. Res. Rev.* 1996;16: 111-124.
- Alexander NO, Vladimir VT, Igor AS, Elena MP: Direct anti-atherosclerosis-related effects of garlic. *Annals Med.* 1995; 27: 63-65.
- Alexander NO, Jorg G: Effect of garlic on atherosclerosis. *Nutr.* 1997; 13: 656-663.
- Amagase H, Milner J: Impact of various sources of garlic and their constituents on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene binding to mammary cell DNA. *Carcinogenesis.* 1993; 14: 1627-1631.
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y: Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 2001; 131: 955S-962S.
- Anthony MS, Clarkson TB, Williams JK: Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; 68: 1390S-2393S.
- Baeuerle PA, Henkel T: Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 1994; 12: 141-179.
- Barkett M, Gilmore TD: Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6910-6924.
- Barnes PJ: Nuclear factor- κ B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997; 29: 867-870.
- Beckman JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite : the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: C1424-1437.
- Berthold HK, Sudhop TV, Bergmann K: Effect of a garlic oil preparation on serum lipoproteins and cholesterol metabolism: a randomized controlled trail. *J. Am. Med. Assoc.* 1998; 279: 1900-1902.
- Block E, Ahmad S, Jain M.K, Crecely RW, Apitz CR, Cruz MR: (E,Z)-Ajoene: a potent antithrombic agent from garlic. *J. Am. Chem. Soc.* 1984; 106: 8295-8296.
- Block E: The chemistry of garlic and onion. *Sci. Am.* 1985; 252: 114-119.
- Bordia A, Verma SK, Srivastava KC: Effect of garlic (*Allium sativum*) on blood lipid, blood sugar, fibrinogen and fibrinolytic activity in patients with coronary artery disease. *Prostag. Leukot. Essential Fatty Acids.* 1998; 58: 257-263.

- Borek C: Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J. Nutr.* 2001; 131: 1010S-1015S.
- Caragay AB: Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Tech.* April, 1992; 65-68.
- Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N: Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 2002; 4: 915-926.
- Carrie W, Laura L, Neil S: Antiproliferative effect of the garlic compound S-allyl cysteine on human neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Lett.* 1992; 63: 211-219.
- Chan AC: Vitamin E and atherosclerosis. *J. Nutr.* 1998; 128: 1593-1596.
- Chen CC, Shieh B, Jin YT, Laiu YE, Huang CH, Liou JT, Wu LW, Huang W, Young KC, Lai MD, Liu HS, Li C: Microarray profiling of gene expression patterns in bladder tumor cells treated with genistein. *J. Biomed. Sci.* 2001; 8: 214-222.
- Chen JJW, Wu R, Yang PC, Huang JU, Sher YP, Han MH, Wu CK, Peck K: Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics* 1998; 51: 313-324.
- Chinthalapally VR, Abraham R, Barbara S, Edith Z, Gary K, Vernon S, Bandaru SR: Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Res.* 1995; 55: 1464-1472.
- Cobb JP, Danner RL: Nitric oxide and septic shock. *J. Am. Med. Assoc.* 1996; 275: 1192-1196.
- Collin T, Cybulsky MI: NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 255-264
- Denizot F, Lang R: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to this tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; 89: 271-277.
- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM: Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet.* 1996; 14: 367-70
- Dirsch VM, Kierner AK, Wagner H, Vollmar AM: Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric oxide synthase. *Atherosclerosis* 1998; 139: 333-339.
- Dirsch VM, Vollmar AM: Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-like properties? *Biochem. Pharm.* 2001; 61: 587-593.
- Dusting GJ, Fennessy P, Yin ZL, Gurevich V: Nitric oxide in atherosclerosis: vascular protector or villain? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1998; 25: S34-41.

- Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR: Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 2002; 4: 837-851.
- Frantz DJ, Hughes BG, Nelson DR, Murray BK, Christensen MJ: Cell cycle arrest and differential gene expression in HT-29 cells exposed to an aqueous garlic extract. *Nutr Cancer.* 2000; 38:255-64.
- Glauser MP, Heumann D, Baumgartner JD, Cohen J: Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: an update. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 18: S205-216.
- Goyert SM, Ferrero E, Retting WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM: The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptor. *Science* 1998; 239: 497-500.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnock JS, Tannebaum SR: Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrite in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1982; 126:131-138.
- Grisham MB, Jourdain D, Wink DA: Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: G315-G321.
- Guha M, Mackman N: LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signalling* 2001; 13: 85-94.
- Haim S, John TP, Yuichi K, Jae-Won S, Thomas D, Steven FM, Vundavalli M, Richard SR, Peter RH, Weinstein IB: Antiproliferative effects of S-allylmercaptocysteine on colon cancer cells when tested alone or in combination with sulindac sulfide. *Cancer Res.* 2001; 61: 725-731.
- Hecker M, Preiss C, Schini-Kerth VB: Induction by staurosporine of nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells: role of NF-kappa B, CREB and C/EBP beta. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120: 1067-74.
- Hatono S, Jimenez A, Wargovich MJ: Chemopreventive effect of S-allylcysteine and its relationship to the detoxification enzyme glutathione S-transferase. *Carcinogenesis* 1996; 17:1041-1044.
- Hertzel S, Michael B, Hanna B, Igor P, Meir D: Effect of a garlic derivative (alliin) on peripheral blood cell immune responses. *Intl. J. Immunopharm.* 1999; 21: 589-597.
- Hirromichi S, Wargovich MJ: Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice by naturally occurring organosulfur compounds. *Cancer Res.* 1990; 50: 5084-5087.
- Ho SE, Ide N, Lau BH: S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* 2001; 8: 39-46.

- Hong JY, Wang ZY, Smith T, Zhou S, Shi S, Yang CS: Inhibitory effects of diallyl sulfide on the metabolism and tumorigenicity of the rovacco-specific carcinogen 40(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NHK) in A/J mouse lung. *Carcinogenesis* 1992; 13: 901-904.
- Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL, Diez-Roux A, Evans GW, McGovern P, Nieto FJ, Tell GS: Gigarette smoking and progression of atherosclerosis: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *J. Am. Med. Assoc.* 1998; 279: 119-124.
- Ide N, Lau BH: Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomedicine* 1999; 6: 125-131.
- Ide N, Lau BH: Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation. *J. Nutr.* 2001; 131: 1020S-1026S.
- Ignarro LJ: Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci. Report* 1999; 19: 51-71.
- Ignarro LJ, Buga CM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G: Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987; 84: 9265-9269.
- Jain KK: Applications of biochip and microarray systems in pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2000; 1: 289-307.
- Jeon YJ, Han SB, Ahn KS, Kim HM: Different activation of murine macrophages by angellan and LPS. *Immunopharmacology* 2000^a; 49: 275-284.
- Jeon YJ, Kim YK, Lee M, Paek SM, Han SB, Kim HM: Radicol suppresses expression of inducible nitric-oxide synthase by blocking p38 kinase and nuclear factor- κ B/Rel in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000^b; 294: 548-554.
- Julie HC, Johnny LE, Nicole JS, Gordon RC: Molecular basis by which garlic suppresses atherosclerosis. *J. Nutr.* 2001; 131: 1006S-1009S.
- Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang KH: Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 302: 138-144.
- Kannar D, Wattanapenpaiboon N, Savige GS, Wahlqvist ML: Hypocholesterolemic effect of an enteric-coated garlic supplement. *J. Am. Coll. Nutr.* 2001; 20: 225-231.
- Katsunari I, Hidekazu I, Keiko A, Hisao H: Effect of naturally occurring organosulfur compounds on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Life Sci.* 2002; 71:411-419.
- Keiss HP, Dirsch VM, Hartung T, Haffner T, Trueman L, Auger J, Kahane R, Villmar AM:

- Garlic (*Allium sativum* L.) modulates cytokine expression in lipopolysaccharide-activated human blood thereby inhibiting NF-kappaB activity. *J. Nutr.* 2003; 133:2171-2175.
- Khalid R: Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 2001; 131: 977S-979S.
- Khalid R: Garlic and aging: new insights into an old remedy. *Aging Res. Rev.* 2003; 2: 39-56.
- Khan J, Saal LH, Bittner ML, Chen Y, Trent JM, Meltzer PS: Expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Electrophoresis* .1999; 20: 223-229.
- Kiemer AK, Vollmar AM: Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 13444-13451.
- Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG, Chung HT, Billiar TR, Kim YM: Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 30: 747-756.
- Kim OK, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H: Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW264.7 cells. *Cancer Lett.* 1998; 125: 199-207.
- Knowles LM, Milner JA: Depressed p^{34cdc2} kinase activity and G₂/M phase arrest induced by diallyl disulfide in HCT-15 cells. *Nutr. Cancer* 1998; 30: 169-174.
- Kris-Etherton PM, Etherton TD, Carlson J, Gardner C: Recent discoveries in inclusive food-based approaches and dietary patterns for reduction in risk for cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 2002; 13: 397-407.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD: Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* 2002; 113: 71S-88S.
- Lappas M, Permezel M, Rice CE: N-acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity and nuclear factor-kappaB deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 1723-1729.
- Laroux FS, Pavlic KP, Hines IN, Kawachi S, Harada h, Bharwani S, Hoffman JM, Grisham MB: Role of nitric oxide in inflammation. *Acta. Physiol. Scand.* 2001; 173: 113-118.
- Lau BH: Suppression of LDL oxidation by garlic. *J. Nutr.* 2001; 131: 985S-988S.
- Lawson LD, Ransom DK, Hughes BG: Inhibition of whole blood platelet-aggregation by compound in garlic clove extracts and commercial garlic products. *Thromb. Res.* 1992; 65: 141-156.

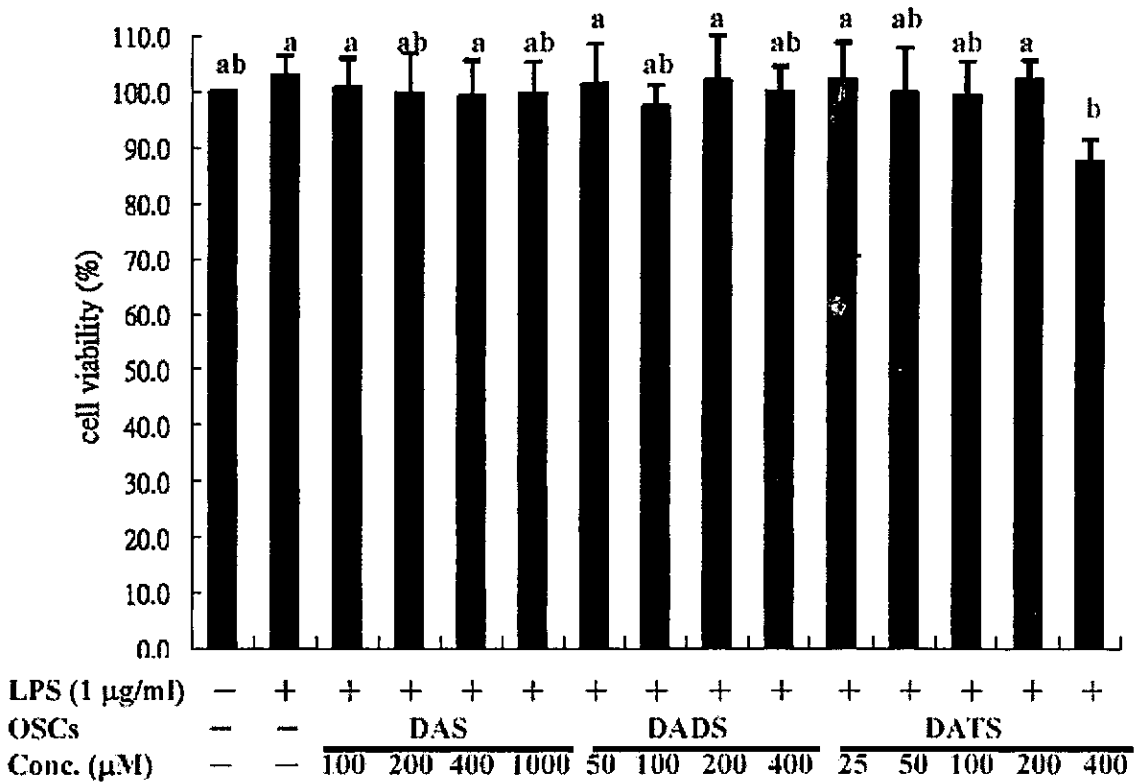
- Lawson LD: Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products. In: ACS Symposium Series 534, *Human Medicinal Agents From Plants*. 1993; pp:306-330.
- Lawson LD: The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: Koch, H.P., Lawson, L.D. (Eds.), *Garlic The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and related species*. Williams and Wilkins Press, USA. 1996; pp. 37-107.
- Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG: Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by saquinone effects of I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1. *Br. J. Pharmacol.* 2003; 139: 11-20.
- Liu L, Yeh YY: Water-soluble organosulfur compounds of garlic inhibit fatty acid and triglyceride syntheses in cultured rat hepatocytes. *Lipids* 2001; 36: 395-400.
- Liu L, Yeh YY: S-alk(en)yl cysteines of garlic inhibit cholesterol synthesis by deactivating HMG-CoA reductase in cultured rat hepatocytes. *J. Nutr.* 2002; 132: 1129-1134.
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Folletti MT Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 1996; 14: 1675-1680.
- Luscher TF, Noll G: The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and a mediator. *Atherosclerosis* 1995; 118: S81-90.
- Miller AB: Diet and cancer: a review. *Acta Oncol.* 1990; 29: 87-95.
- Moncada S: Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann. NY Acad. Sci.* 1997; 811: 60-67.
- Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329: 2002-2012.
- Moncada S, Plamer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43: 109-142.
- Marton MJ, DeRisi JL, Bennet HA, Iyer VR, Meyer MR, Roberts CJ, Stroughton R, Burchard J, Slade D, Dai H, Bassett DE, Jr Hartwell LH, Brown PO, Friend SH: Drug target validation and identification of secondary drug target effect using DNA microarrays. *Nature Med.* 1998; 4: 1293-1301.
- Munday R, Munday CM: Low doses of diallyl disulfide, a compound derived from garlic, increase tissue activities of quinone reductase and glutathione transferase in the gastrointestinal tract of the rat. *Nutr. Cancer* 1999; 34: 42-48.
- Murad F: Nitric oxide signals: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? *Recent Prog. Horm. Res.* 1998; 53: 43-59.

- Narayanan BA, Narayanan NK, Reddy BS: Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2001; 19:1255-62.
- Nathan C, Xie QW: Nitric oxide synthases: Role, Tolls, and Control. *Cell* 1994^a; 78: 915-918.
- Nathan C, Xie QW: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1994^b; 269: 13725-13728.
- Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett JC, Afshari CA: Microarray and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol. Carcinog.* 1999; 24: 153-159.
- Okuda T, Sumiya T, Muzutani K, Tago N, Miyata T, Tanabe T, Kato H, Katsuya T, Higaki J, Ogihara T, Tsujita Y, Iwai N: Analyses of differential gene expression in genetic hypertensive rats by microarray. *Hypertensim Res.* 2002; 25: 249-55.
- Pahl HL: Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-6866.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
- Pinto JT, Rivlin RS: Antiproliferative effects of allium derivatines from garlic. *J. Nutr.* 2001; 131:1058S-1060S.
- Qiao S, Pennanen P, Nazarova N, Lou YR, Tuohimaa P: Inhibition of fatty acid synthase expression by 1 α ,25-hydroxyvitamin D3 in prostate cancer cells. *J Syeroid Biochem Mol Biol.* 2003; 85:1-8..
- Revin A: Gel electrophoresis assays for DAN-protein interactions. *Biochem. Techniques* 1989; 7: 364-354.
- Robbins RA, Grisham MB: Nitric oxide. *Intl. J. Biochem. Cell Biol.* 1997; 29: 857-860.
- Romano EL, Montano RF, Brito B, Apitz R, Alonso J, Romano M, Gebran S, Soyano A: Effect of ajoene on lymphocyte and macrophage membrane-dependent function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1997; 19: 15-36.
- Schaffer EM, Liu JZ, Green J, Dangler CA, Milner JA: Garlic and associated allyl sulfur compounds inhibit N-methyl-Nnitiosourea induced rat mammary cacrinogenesis. *Cancer Lett.* 1996; 102: 199-204.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: Quantiative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-470.
- Schwacha MG: Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burn* 2003; 29: 1-14.

- Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS: Diagnostic criteria for the long QT syndrom. An update. *Circulation* 1993; 88: 782-784.
- Sheen LY, Chen HW, Kung YL, Liu CT, Lii CK: Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high- and low-fat diets. *Nutr. Cancer* 1999; 35: 160-166.
- Sheu F, Lai HH, Yen GC: Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 1767-1772.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown R: Structure, regulation and function of NF- κ B. *Am. Rev. Cell. Biol.* 1994; 10: 405-455.
- Slater TF, Sawyer B, Strauli U: Studies on succinate-tetrazolium reductase system III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochem. Biophys. Acta* 1963; 77: 383-393.
- Slowing K, Ganado P, Sanz M, Ruiz E, Tejerina T: Study of garlic extracts and fractions on cholesterol plasma levels and vascular reactivity in cholesterol-fed rats. *J. Nutr.* 2001; 131: 994S-999S.
- Sparnins VL, Barnay G, Wattenberg LW: Effects of organosulfur compounds from garlic and onion on benzo[a]pyrene-induced neoplasia and glutathione S-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis* 1988; 9:131-134.
- Steiner M, Khan AH, Holbert D, Lin RI: A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996; 64: 866-870.
- Steny K, Steny M, Swanepoel AS, Jordaan PC, Jooste PL, Fourie LM, Rossouw JE: Twelve-year results of the coronary risk factor study (CORIS). *Intl. J. Epidemiol.* 1997; 26: 964-971.
- Thanos D, Maniatis T: NF- κ B: a lesson in family values. *Cell* 1995; 9-532.
- Verena MD, Angelika MV: Ajene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-like properties? *Biochem. Pharmacol.* 2001; 7-593.
- Veena IM, Stevenson JK, van Antwerp D, Miyamoto S: Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 1995; 3-2735.
- Villeneuve PJ, Morrison HJ, Craig CL, Schaubel DE: Physical activity, physical fitness, and risk of dying. *Epidemiology* 1998; 6-631.
- Vo-Dinh T: Development of a DNA biochip: principle and applications. *Sensors Actuators B.* 1998; 52-59.
- Wadsworth TL, Koop DR: Effect of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on

- pro-inflammatory cytokine expression in RAW264.7 macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 1999; 57:941-948.
- Wagner MW, Klein CIL, Kleinert H, Euchhofer C, Forstermann U, Kirkpatrick CJ: Heavy metal ion induction of adhesion molecules and cytokines in human endothelial cells: the role of NF- κ B, I κ B- and AP-1. *Pathobiology.* 1997; 65:241-252.
- Wang SC, Rossignol DP, Christ WJ, Geller DA, Freeswick PD, Thia NL, Su GL, Simmons RL: Suppression of lipopolysaccharide-induced macrophage nitric oxide and cytokine production in vitro by a novel lipopolysaccharide antagonist. *Surgery* 1994; 116:339-346.
- Wattenberg LW, Sparnins VL, Barany G: Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res.* 1989; 49:2689-2692.
- Westphal O, Luderitz O: Chemische erforschung von lipopolysaccharide Gram-negativer bakterien. *Angew. Chemie.* 1954;66: 407-417.
- Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Tsai SJ, Lii CK: Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food Chem. Toxicol.* 2001;39: 563-569.
- Xie OW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophage. *Science* 1992;256: 225-228
- Xie OW, Kashiwabara Y, Nathan C: Role of transcription factor NF- κ B/Rel in inducible of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1994;269: 4705-4708.
- Yamamoto Y, Gaynor RB: Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 2001;107: 135-142.
- Ye RW, Wang T, Bedzyk L, Croker KM: Application of DNA microarrays in microbial systems. *J. of Microbiolo. Methods.* 2001;47: 257-272.
- Yeh YY, Liu L: Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. *J. Nutr.* 2001;131: 989S-993S.
- Yin MC, Hwang SW, Chan KC: Nonenzymatic antioxidant activity of four organosulfur compounds derived from garlic. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50: 6143-6147.
- Yu TH, Wu CM, Liou YC: Volatile compounds from garlic. *J. Agric. Food Chem.* 1989; 37: 725-730.

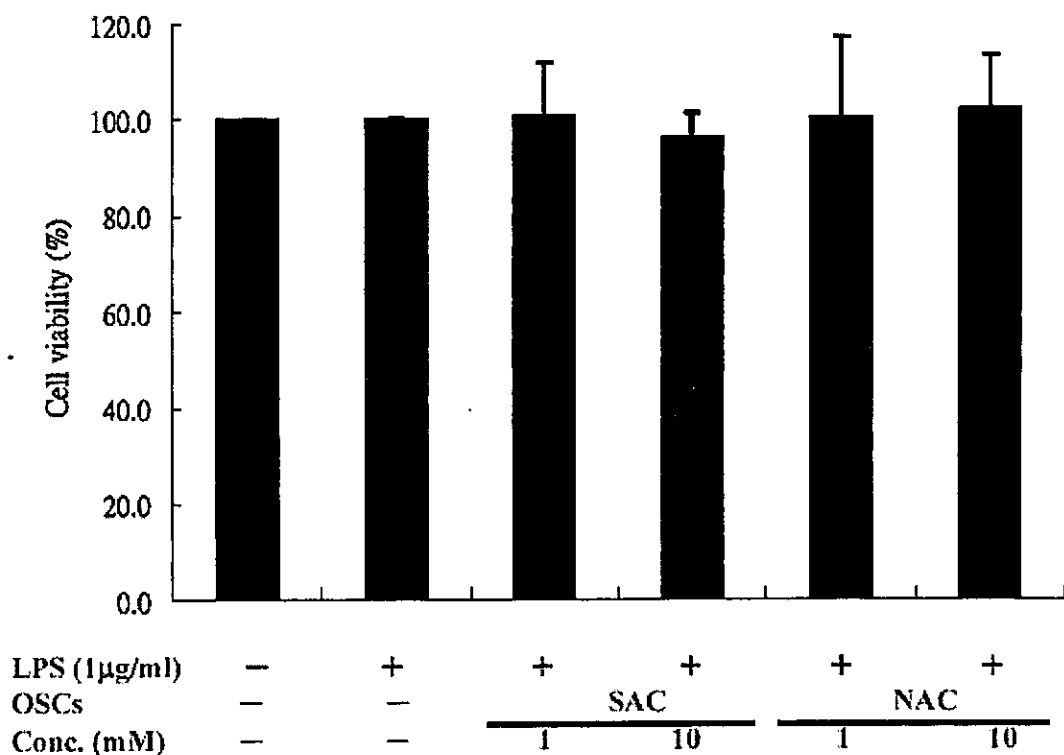
柒、圖、表



圖一、在 LPS 誘發發炎反應下，不同濃度之 DAS、DADS 及 DATS 對 RAW264.7 巨噬細胞細胞存活率之影響

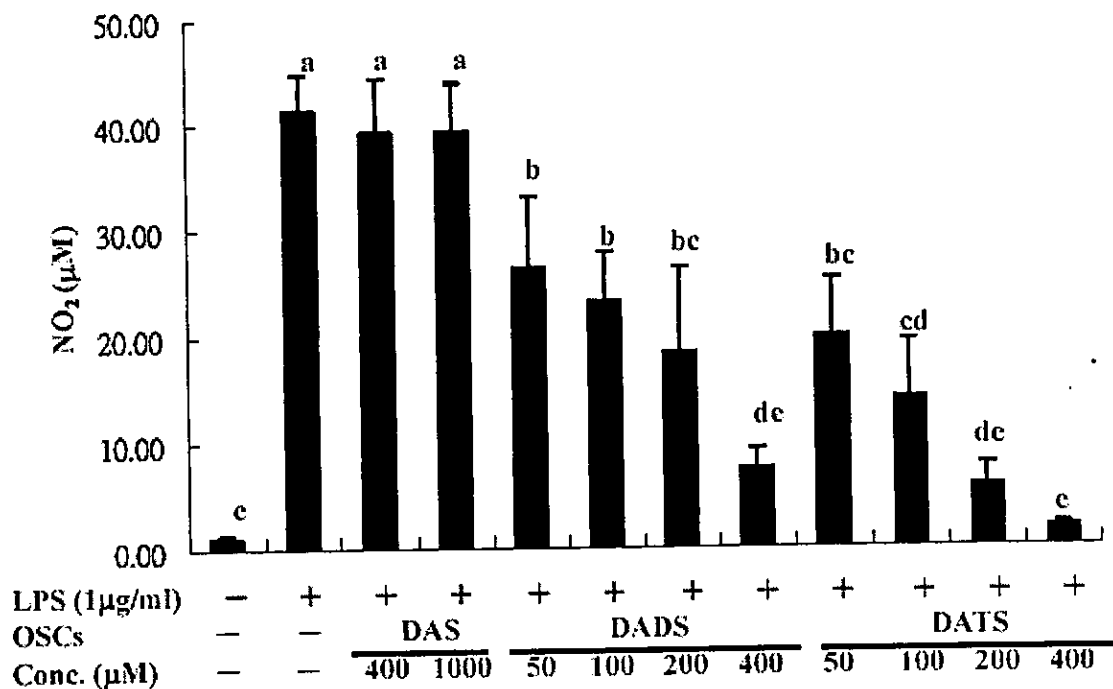
給予 RAW264.7 巨噬細胞處理不同濃度 DAS (100、200、400 和 1000 μ M)、DADS(50、100、200 和 400 μ M)及 DATS (25、50、100、200 和 400 μ M)，並同時處理 1 μ g/ml LPS 24 小時後進行 MTT 分析。本圖以不同濃度大蒜有機硫物處理細胞下所測得之吸光值與 vehicle control 組吸光值相較之比值表示，在此 vehicle control 組以 100%表示之。

ab：表示各組組間具有顯著差異(n=5，P<0.05)。



圖二、在 LPS 誘發發炎反應下，不同濃度之 SAC 及 NAC 對 RAW264.7 巨噬細胞細胞存活率之影響

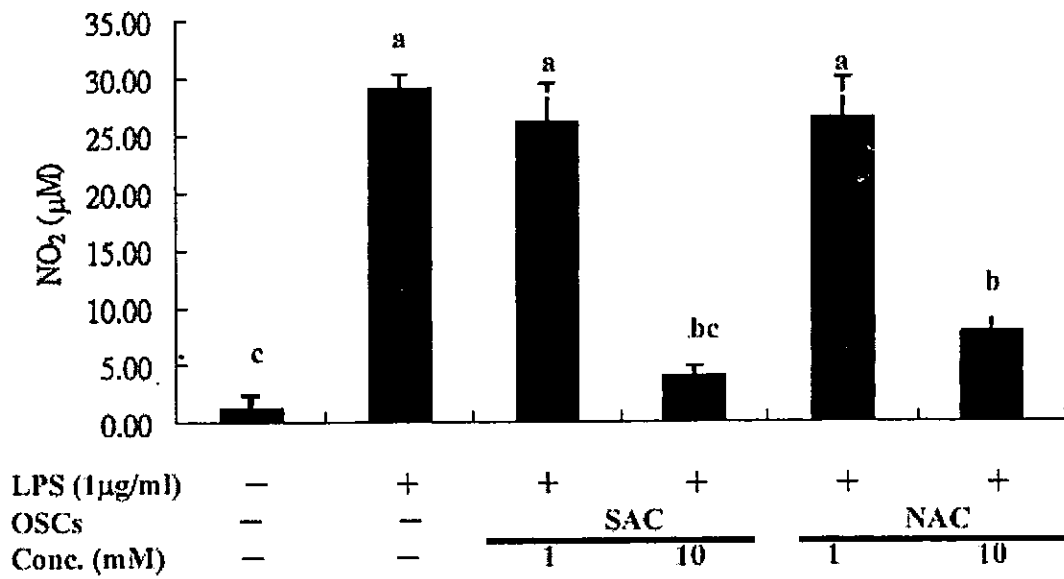
給予 RAW264.7 巨噬細胞處理不同濃度 SAC (1 和 10mM) 及 NAC (1 和 10mM)，並同時處理 1 µg/ml LPS 24 小時後進行 MTT 分析。本圖以不同濃度 SAC 和 NAC 處理細胞下所測得之吸光值與 vehicle control 組吸光值相較之比值表示，在此 vehicle control 組以 100% 表示之，(n=3, P=0.97)。



圖三、不同濃度 DAS、DADS 及 DATS 對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞釋放 NO 之影響

給予 RAW264.7 巨噬細胞同時處理 1 μg/ml LPS 及不同濃度之 DAS (400 和 1000 μM) DADS(50、100、200 和 400 μM)或 DATS (50、100、200 和 400 μM)24 小時後，收取細胞培養液，以 Griess reagent 分析 NO 釋放濃度。vehicle control 組測得平均濃度為 1.10±0.33 μM。

abcde：表示各組組間具有顯著差異(n=6, P<0.05)。



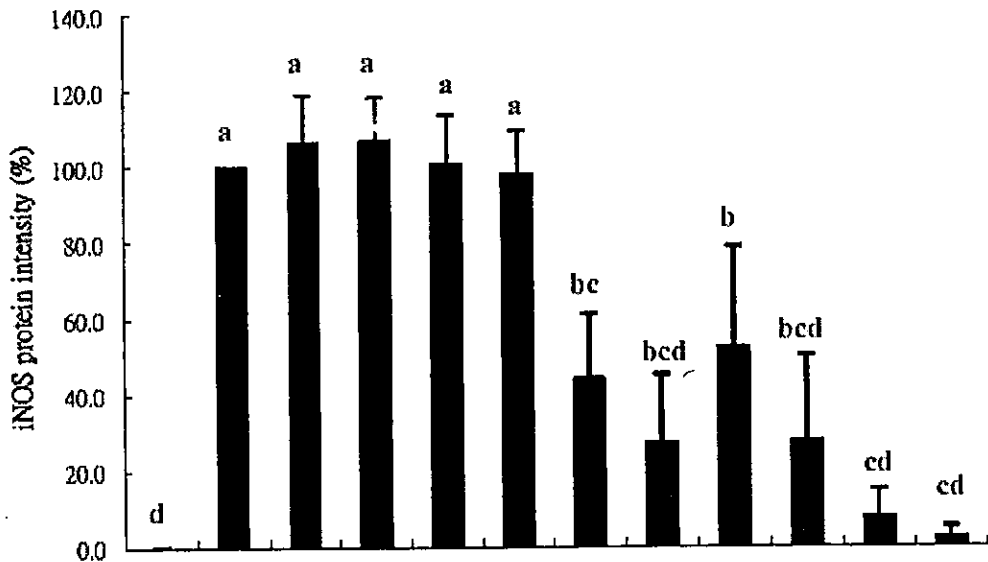
圖四、不同濃度 SAC 與 NAC 對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞釋放 NO 之影響

給予 RAW264.7 巨噬細胞同時處理 1 µg/ml LPS 及不同濃度之 SAC (1 和 10mM) 或 NAC (1 和 10mM) 24 小時後，收取細胞培養液，以 Griess reagent 分析 NO 釋放濃度。vehicle control 組測得平均濃度為 1.25±1.14 µM。

abc：表示各組組間具有顯著差異(n=6，P<0.05)。

| | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---|---|-----|------|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| OSCs | - | - | DAS | | DADS | | | | DATS | | | |
| Conc. (μM) | - | - | 400 | 1000 | 50 | 100 | 200 | 400 | 50 | 100 | 200 | 400 |

*i*NOS →



| | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---|---|-----|------|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| OSCs | - | - | DAS | | DADS | | | | DATS | | | |
| Conc. (μM) | - | - | 400 | 1000 | 50 | 100 | 200 | 400 | 50 | 100 | 200 | 400 |

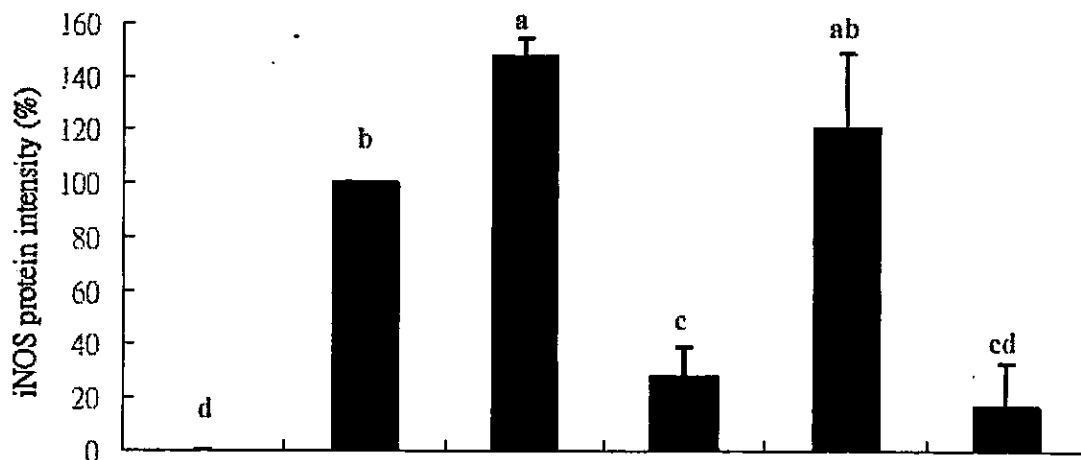
圖五、不同濃度 DAS、DAD 及 DATS 對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞 iNOS 蛋白質表現之影響

給予 RAW264.7 巨噬細胞同時處理 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS 及不同濃度之 DAS (400 和 1000M) DADS(50、100、200 和 400 μM)或 DATS (50、100、200 和 400 μM)24 小時後，收取 total protein，以 Western blot 分析 iNOS 蛋白質表現。本圖以細胞給予 LPS only 處理組與不同處理組之 iNOS 蛋白質表現強度比值表示，在此 LPS only 組以 100% 表示之。

abcd：表示各組組間具有顯著差異(n=5, P<0.05)。

| | | | | | | |
|--------------------|---|---|-----|----|-----|----|
| LPS (1 μ g/ml) | - | + | + | + | + | + |
| OSCs | - | - | SAC | | NAC | |
| Conc. (mM) | - | - | 1 | 10 | 1 | 10 |

iNOS →

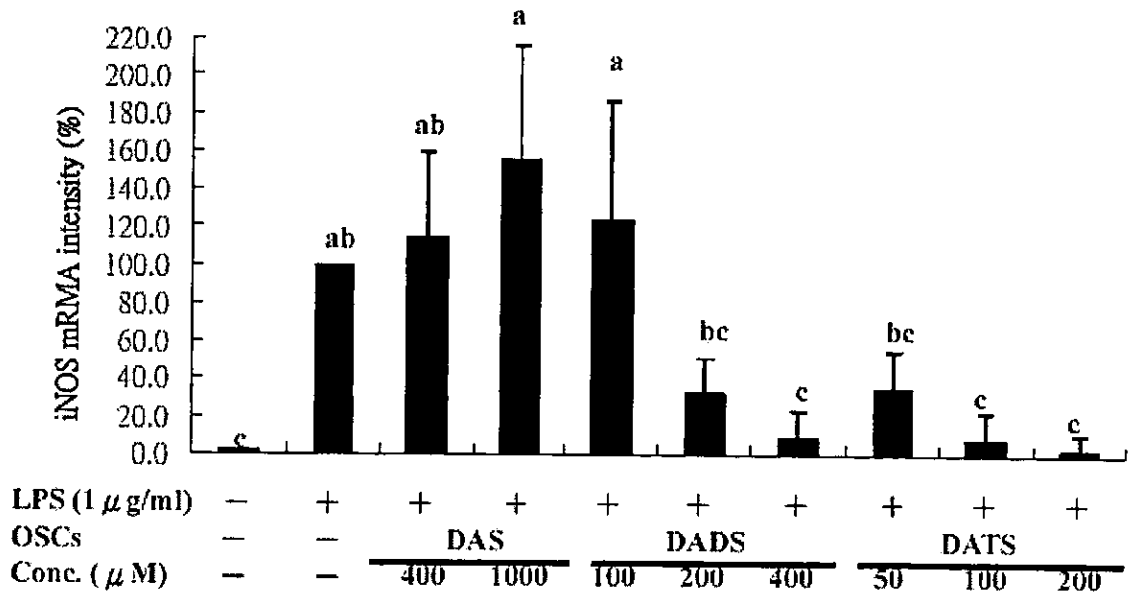
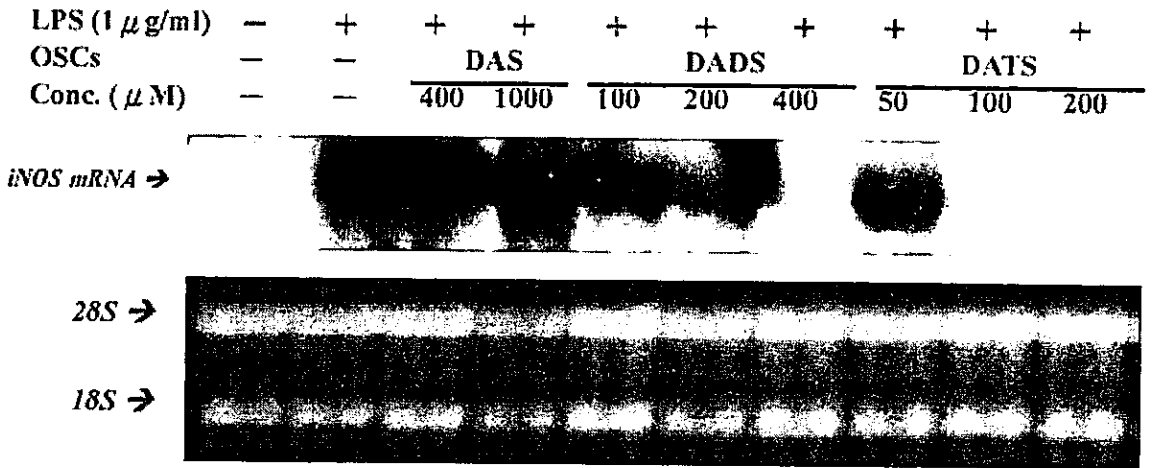


| | | | | | | |
|--------------------|---|---|-----|----|-----|----|
| LPS (1 μ g/ml) | - | + | + | + | + | + |
| OSCs | - | - | SAC | | NAC | |
| Conc. (mM) | - | - | 1 | 10 | 1 | 10 |

圖六、不同濃度 SAC 與 NAC 對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞 iNOS 蛋白質表現之影響

給予 RAW264.7 巨噬細胞同時處理 1 μ g/ml LPS 及不同濃度之 SAC (1 和 10mM) 或 NAC (1 和 10mM) 24 小時後，收取 total protein，以 Western blot 分析 iNOS 蛋白質表現。本圖以細胞給予 LPS only 處理組與不同處理組之 iNOS 蛋白質表現強度比值表示，在此 LPS only 組以 100% 表示之。

abcd：表示各組組間具有顯著差異(n=4, P<0.05)。

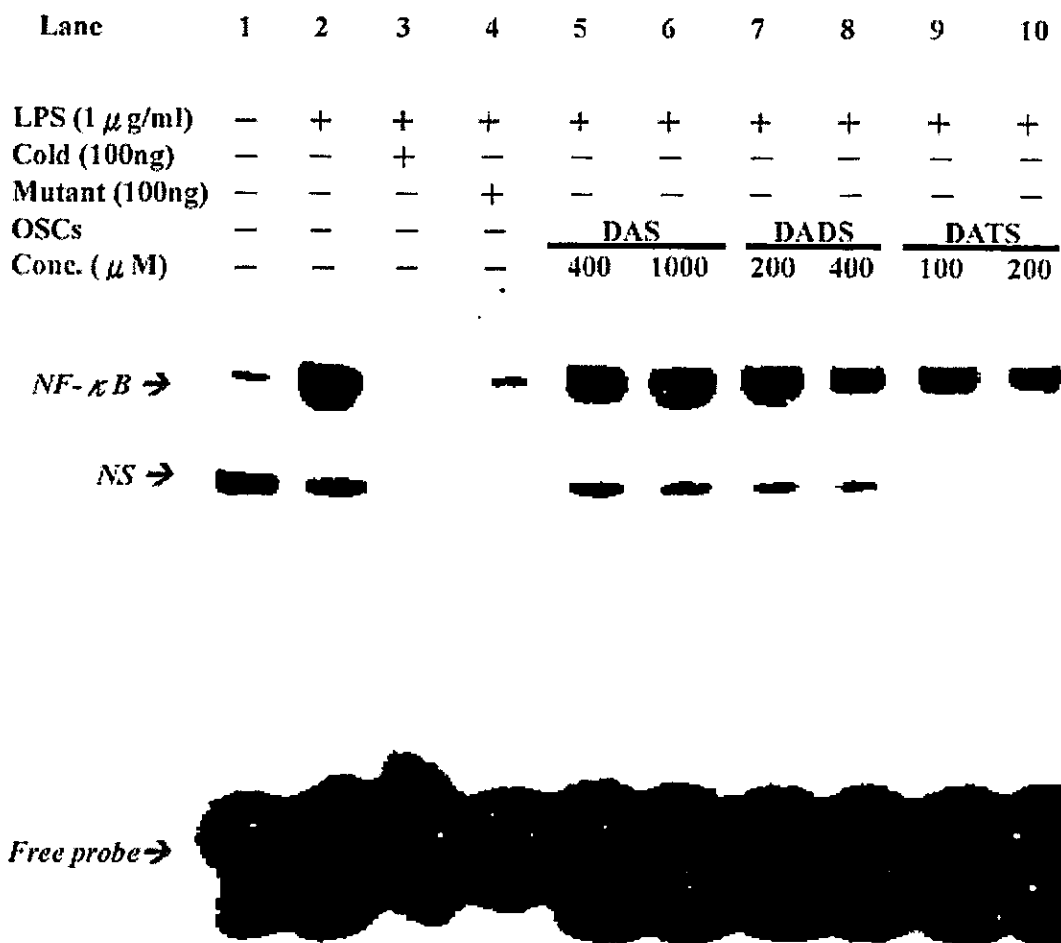


圖七、不同濃度 DAS、DADS 及 DATS 對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞 iNOS mRNA 表現之影響

給予 RAW264.7 巨噬細胞同時處理 1 μ g/ml LPS 及不同濃度之 DAS (400 和 1000M) DADS(100、200 和 400 μ M)或 DATS (50、100、和 200 μ M)24 小時後，收取細胞 total RNA，以 Northern blot 分析 iNOS mRNA 表現。本圖以細胞給予 LPS only 處理組與不同處理組之 iNOS mRNA 表現強度比值表示，在此 LPS only 組以 100% 表示之。

abc：表示各組組間具有顯著差異(n=4，P<0.05)。

A、

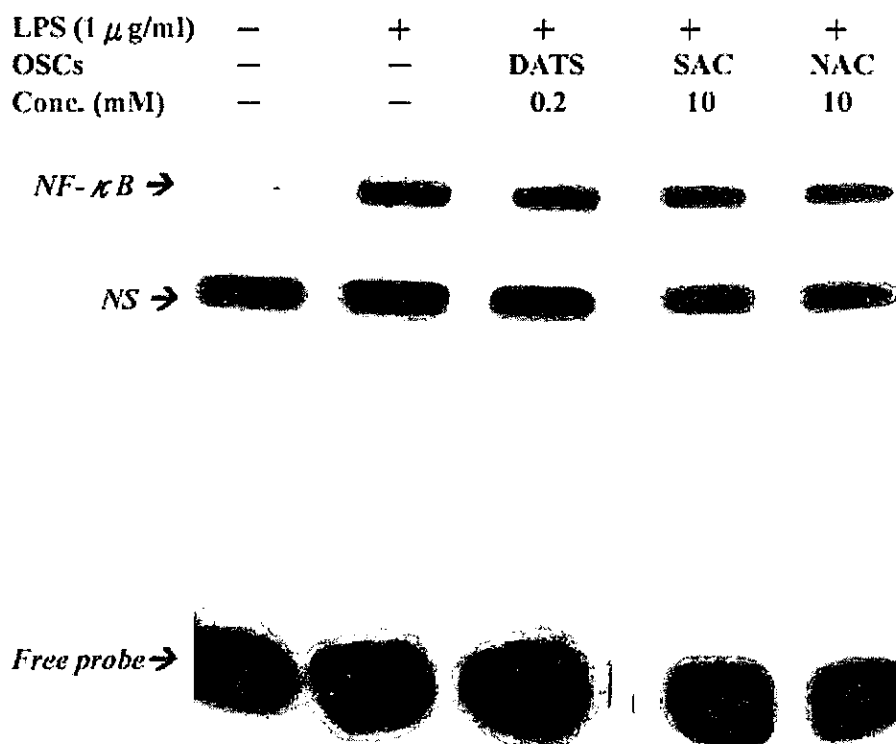


圖八、不同濃度大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞細胞核內 NF- κ B 與 DNA 結合之影響

RAW264.6 巨噬細胞預處理各種不同大蒜有機硫化物 3 小時後，以 1 μ g/ml LPS 刺激 90 分鐘，收取細胞核蛋白質，以 EMSA 分析方法分析 NF- κ B 與 DNA 結合之情形。(A.)為五種大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞細胞核內 NF- κ B 與 DNA 結合之影響。

NS: non-specific band

B、

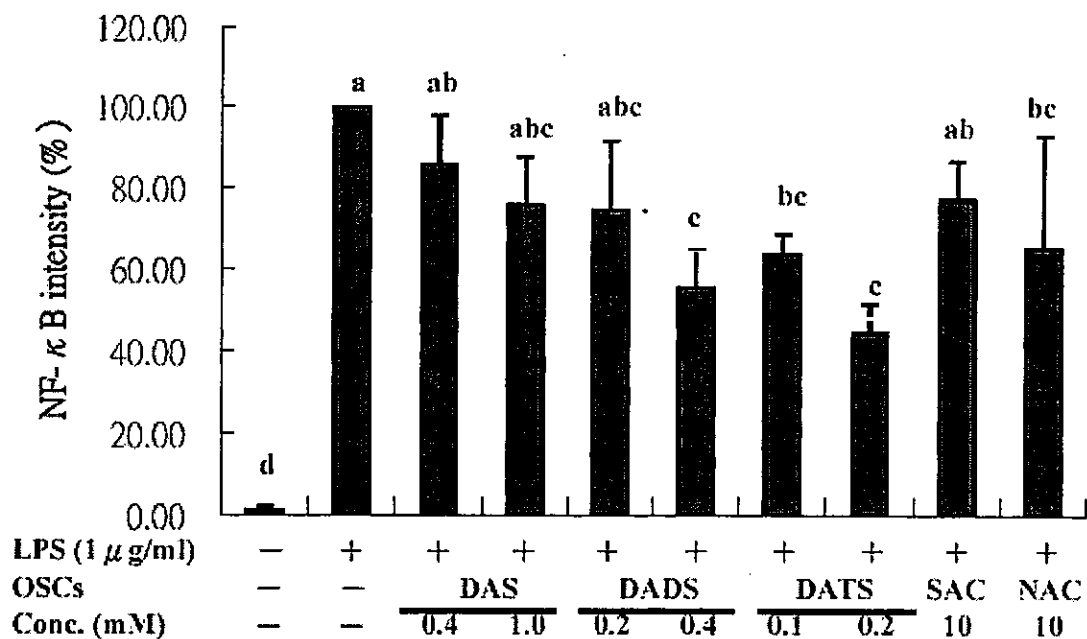


圖八、不同濃度大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞細胞核內 NF- κ B 與 DNA 結合之影響

RAW264.6 巨噬細胞預處理各種不同大蒜有機硫化物 3 小時後，以 1 μ g/ml LPS 刺激 90 分鐘，收取細胞核蛋白質，以 EMSA 分析方法分析 NF- κ B 與 DNA 結合之情形。(B.)為 DATS、SAC 與 NAC 對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞細胞核內 NF- κ B 與 DNA 結合之影響。

NS: non-specific band

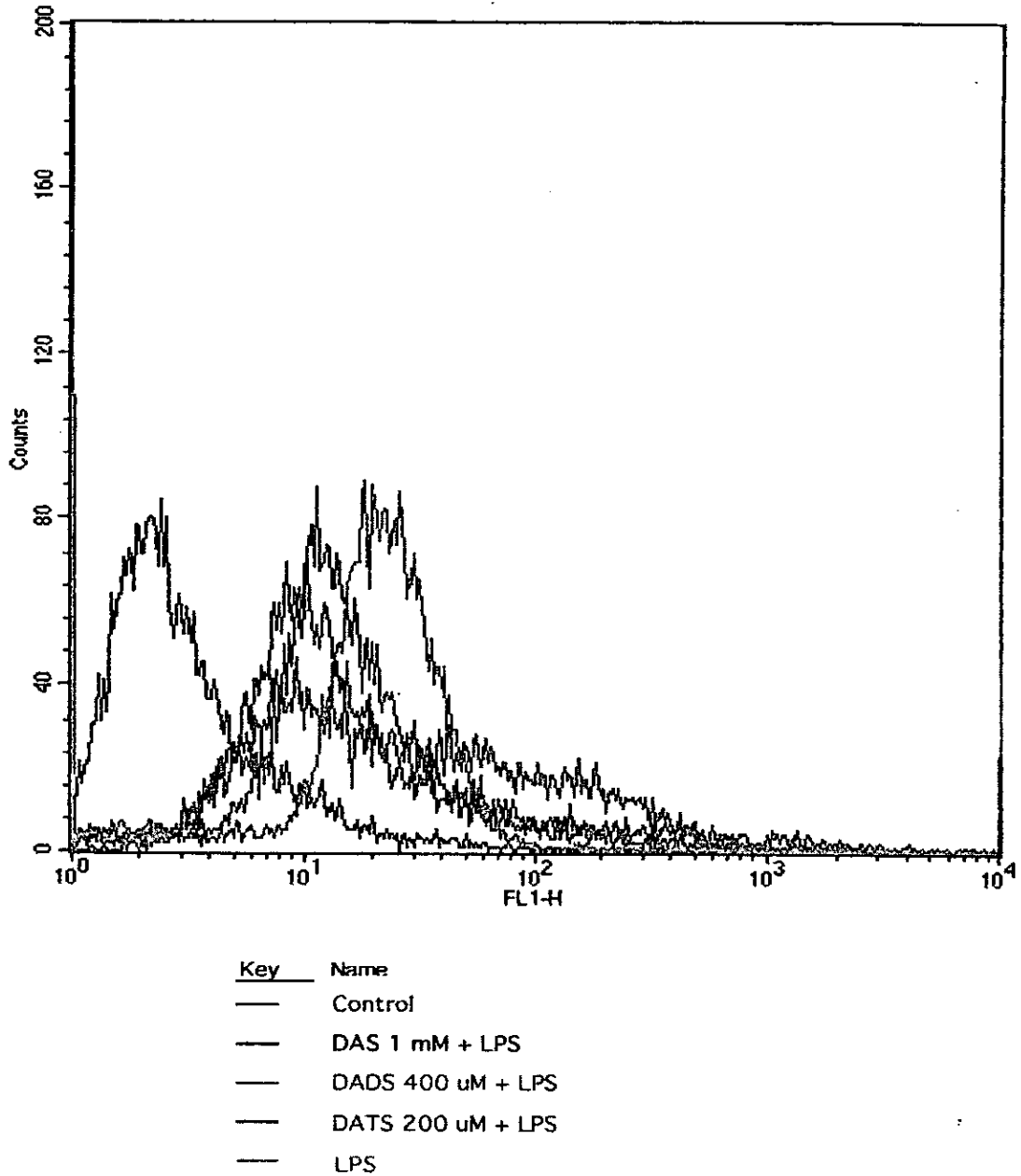
C.



圖八、不同濃度大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞細胞核內 NF-κB 與 DNA 結合之影響

RAW264.6 巨噬細胞預處理各種不同大蒜有機硫化物 3 小時後，以 1 μg/ml LPS 刺激 90 分鐘，收取細胞核蛋白質，以 EMSA 分析方法分析 NF-κB 與 DNA 結合之情形。(C.)為其統計定量圖。

abcd：表示各組組間具有顯著差異(n=3-4， P<0.05)。



圖九、大蒜有機硫化物對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞胞內過氧化物的抑制效應

RAW264.7 巨噬細胞預處理不同大蒜有機硫化物 3 小時後，以 $1 \mu\text{g/ml}$ LPS 刺激 90 分鐘，再加入 DCF-DA 反應 45 分鐘，收取細胞，以流式細胞儀分析胞內過氧化物濃度。