



計畫編號：DOH91-TD-1009

行政院衛生署九十一年度科技研究發展計畫

洛神花水萃取物抑制心血管病變之研究(二)

研究報告

執行機構：中山醫學大學生化所

計畫主持人：王朝鐘

研究人員：李妙真

執行期間：90年8月1日至91年7月31日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見\*\*

# 目 錄

一、摘要 (中文).....	2
二、摘要 (英文).....	4
三、前言.....	5
四、材料與方法.....	8
五、結果.....	15
六、討論.....	19
七、結論與建議 .....	23
八、參考文獻.....	24
九、圖表.....	30

## 摘 要

洛神花(*Hibiscus Sabdariffa* Linnaeus) 為錦葵科(Malvaceae)植物，原產熱帶地區，分部於印度，馬來西亞及東南亞，台灣東部及南部也盛產。其花成份包含有機酸(如檸檬酸、壞血酸、原兒茶酸等)；糖分主要為半乳糖，葡萄糖及果糖；Pectin 及類黃酮素，黃酮素包括有 hibiscetin, gossypetin, quercetin。國外之研究，在體外試驗顯示其水萃取物有 anti-spasmodic, 降膽固醇, 降血壓及抗菌作用。其成份 flavonoids 具有抗氧化及抑制心血管疾病；原兒茶酸(protocatechuic acid; PCA) 可抑制化學致癌物誘導之癌化，本研究室也顯示洛神花中之 PCA 及花青素有強的抗氧化作用，另外 PCA 亦有抗 TPA 促腫瘤作用及促進 HL-60 凋謝死亡之作用。

在上一年度 (90 年度)，本研究計畫顯示洛神花水萃取物 (*Hibiscus Sabdariffa* Extract, HSE) 具有抑制 LDL 氧化作用，並以高果糖誘發 SD 大白鼠產生高血脂症及以 lard oil 餵食兔子產生高血脂症的實驗模式證實洛神花水萃取物具有降低高血脂及抑制 atherosclerosis lesion 的作用。而本年度的研究內容則在於探討 HSE 對動脈粥狀硬化抑制的可能機轉。我們以 RAW264.7 巨噬細胞為實驗模式，並以銅離子誘發 LDL 氧化加入巨噬細胞中，結果發現 100  $\mu\text{g/ml}$  的 LDL 被誘發成 OxLDL 後，會使得巨噬細胞死亡，並且這種死亡形式為程式型死亡 (apoptosis)。而預處理 HSE 依劑量逐漸增高 (0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5  $\text{mg/ml}$ ) 對這種死亡的現象抑制情形也越明顯，包括細胞型態在 0.5  $\text{mg/ml}$  時可將細胞型態恢復為與未處理者相同，而隨著 HSE 的濃度增高，將有效地減低 DNA fragmentation 的程度、

caspase-3 activity 及 PARP 蛋白斷裂等 apoptosis 的現象，同時我們也發現 HSE 有抑制 macrophage migration 的現象。由此我們推測 HSE 抑制動脈粥狀硬化的作用機轉可能在於抑制氧化型 LDL 使巨噬細胞死亡或 migration 以減低動脈脂肪斑塊 (fatty steak)形成的速率，藉此達到抑制動脈粥狀硬化的作用。

關鍵詞: 洛神花，氧化型低密度脂蛋白，動脈粥狀硬化，程式型死亡

## Abstract

Hibiscus sabdariffa Linne (Malvaceae), an attractive plant believed to be native to Africa is cultivated in Sudan and in eastern and Taiwan. It has been reported to contain a number of flavonoids including gossypetin, hibiscetin and quercetin. In vitro experimental studies have shown that administration of the aqueous extract produces anti-inflammation, hypotensive and hypocholesterolemic. In spite of the wide use of H. sabdariffa extract (HSE) in folk medicine for treating various diseases, there is no report in the literature on their anti-atherosclerosis activity. In previous study, we have proved HSE can inhibit the production of OxLDL, and can inhibit hyperlipidaemic or atherosclerosis in animal model. But, the mechanisms on HSE inhibiting atherosclerosis were not clarified. In this study, we find that  $\text{Cu}^{2+}$ -induced OxLDL cause RAW264.7 macrophage death. Interestingly, HSE can rescue effectively on OxLDL-induced cell apoptosis in dose-dependent. Furthermore, we used some apoptosis criteria including cell morphology, DNA fragmentation, caspase-3 activity and PARP protein cleavage to evaluate the effect on HSE-reducing macrophage death. In these experiments, HSE showed powerful potential to inhibit cell apoptosis. Moreover, we also found HSE can inhibit macrophage migration. According to above, we assumed the mechanisms on HSE-inhibiting atherosclerosis could be via inhibiting OxLDL-induced macrophage death and migration. In this way, the rate on fatty steak formation will be slowed down, and athersocleretic progress will also be suppressed.

Keywords: Hibiscus sabdariffa extract (HSE), LDL oxidation, hypolipidemia, atherosclerosis.

## 前 言

洛神花(*Hibiscus Sabdariffa* Linnaeus) 為錦葵科(Malvaceae)植物，原產熱帶地區，分部於印度，馬來西亞及東南亞，台灣東部及南部也盛產。其花成份包含有機酸(如檸檬酸、壞血酸、原兒茶酸等)(1, 2)；醣分主要為半乳糖，葡萄糖及果糖(3,4)；Pectin 及類黃酮素(5)，黃酮素包括有 hibiscetin, gossypetin, quercetin。國外之研究，在體外試驗顯示其水萃取物有 anti-spasmodic(6)，降膽固醇(7)，降血壓(8)及抗菌作用(9)。其成份 flavonoids 具有抗氧化及抑制心血管疾病(10,11)；原兒茶酸(protocatechuic acid; PCA)可抑制化學致癌物誘導之癌化(12-16)；本研究室也顯示洛神花中之 PCA 及花青素有強的抗氧化作用(17, 18)；我們也發現 PCA 亦有抗 TPA 促腫瘤作用(19)及促進 HL-60 凋謝死亡之作用(20)；另外，近來我們也發現 PCA 亦具有抑制低密度脂蛋白氧化的能力(21)。

血脂肪 plasma lipids 包含膽固醇(cholesterol)及三酸甘油脂(triglyceride)。cholesterol 及 triglyceride 不能溶解於水性血漿，故需與血漿蛋白結合形成親水性的脂蛋白(lipoprotein)，才能溶解於血漿，隨著血液循環，流至身體各器官組織中。我們將脂蛋白依密度的不同分成四種，chylomicron、very-low density lipoprotein(VLDL)、low density lipoprotein(LDL)及 high density lipoprotein(HDL)，其中 high density lipoprotein 又可細分成 HDL<sub>2</sub> 及 HDL<sub>3</sub>。不同的脂蛋白上所含的脂肪及脂蛋白元(apolipoprotein)組成均不相同。

低密度脂蛋白含有大量的 cholesterol (佔 plasma cholesterol 的 60-70%)，且體積小，所以容易滲入血管壁內，為形成粥狀動脈硬化(atherosclerosis)的重要因子，故血漿中 LDL 濃度愈高，罹患粥狀動脈

硬化的危險性就愈高。高密度脂蛋白含大量的磷脂類 (phospholipids) 及少量的 cholesterol (佔血漿 cholesterol 的 20-30%)，其功能為自血管壁帶走滲入的 cholesterol 具有清潔血管壁的作用，故與血管中 HDL 濃度愈高，表示清除血管壁 cholesterol 的能力愈強，因而罹患粥狀動脈硬化的機率則愈低。

血清中 60-70 %的 cholesterol 是由 LDL 所攜帶，所以當 LDL 的合成過多或代謝太慢時，將導致血中 cholesterol 的濃度過高，造成粥狀動脈硬化。由於血中 cholesterol 濃度主要受細胞表面 LDL 受體的管制，而食物中的脂肪酸種類、膽固醇含量、荷爾蒙及藥物等物質，會改變肝細胞表面 LDL 受體的數目，進而影響血中 cholesterol 濃度以及粥狀動脈硬化的程度。

脂蛋白中的 LDL 及 HDL 和粥狀動脈硬化有很強的相關性，動脈硬化最早期的 subendothelial space 聚集 cholesterol ester rich 的 foam cell，而這些 cholesterol ester 則來自被 modified 的 LDL，當 macrophage 或 monocyte 吞噬大量的被修飾過的氧化型 LDL 後，即形成 foam cell，macrophage 對於 native 含 B,E-apolipoprotein 的 LDL 並沒有吞噬效果，而經 chemically modified negative charged LDL(如 acetyl-LDL)則可快速被 macrophage 上的 receptor 辨識，並由 macrophage 吞噬。吞噬了過多 OxLDL 的 macrophage 會死亡並與其他死亡的平滑肌細胞逐漸形成 fatty streak，若能使 macrophage 在受到 OxLDL 傷害的情況之下維持其存活不死，那麼將使巨噬細胞有充裕的時間分解食入之 OxLDL，也就有機會減低 fatty streak 甚而減低動脈粥狀硬化。

Atherosclerosis 是一種複雜多樣性的過程，脂蛋白的氧化在 atherosclerosis 之致病佔有重要角色，在許多研究中被認為是一種

atherosclerosis agent。從 atherosclerosis lesions 也發現 LDL 有氧化傷害(22, 23), 氧化型 LDL 發生於 endothelial cells, monocyte/macrophages 及 smooth muscle cells (24), 在 macrophage 之 ox-LDL 能夠結合 LDL-receptor 再經由下列四種機轉成為一種 proatherogenic: (1) 加強 macrophage 作用, 造成 cholesteryl ester 增加及 foam-cell 產生; (2) 促使 circulating monocytes and T-lymphocytes 產生; (3) cytotoxic 作用; (4) 改變血小板 aggregation (25)。

許多 antioxidants, 已被認為具有降低 LDL 的氧化作用及 atherosclerosis, 如 curcumin (26)及 baicalein (27), 抑制 macrophage apoptosis 也抑制 vascular smooth muscle cell 的增生或促進 vascular smooth muscle cell apoptosis (28), 洛神花含有豐富的 flavonoides (如 quercetin, gossypetin, hibiscetin)及原兒茶酸 (protocatechuic acid), 這些成份都以具有抗氧化、防癌、抑制心血管病變之報告 (7-17)。綜合這些成份之 HSE 其效果在抗心血管疾病已經得到證實。本研究將觀察 HSE 對氧化型 LDL 所處理過的巨噬細胞有何影響, 藉此釐清 HSE 在抗動脈粥狀硬化之機轉。



## 材 料 與 方 法

### <化學試劑及藥品>

Tris-base, ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), sodium hydroxide, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), sodium chloride, sodium citrate, bovine serum albumin, Triton X-100, paraformaldehyde 皆購自美國 Sigma Chemical Co. ; RPMI 1640, Trypsin, Penicillin-Streptomycin mixed antibiotics, L-Glutamine, phosphate buffer solution (PBS) 皆購自美國 Gibco Co. ; TUNEL assay kit (In situ cell death detection kit, TMR red) 購自德國 Roche Co.

### <洛神花水萃取物的萃取>

稱取 50g 的乾洛神花 (購自台東縣農會)，加入 2 公升的二次水，沸水煮 2 小時後以濾紙將渣滓濾除，得到的液體重約為 800g，再分批置入冷凍乾燥機進行乾燥以得到粉末。粉末秤重後以二次水溶解配置成 100 mg/ml 分裝置於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存待用。

### <細胞株培養>

來自 male BALB/c mouse 之 RAW264.7 巨噬細胞購自於食品工業研究所，培養於 RPMI 1640 培養基 (含 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin 及 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin)，培養箱維持於 5%  $\text{CO}_2$  及  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫，每週繼代培養 2-3 次，自購買代數算起繼代培養 20 次後即更換低代數細胞繼續實驗以維持細胞的穩定性，每次實驗前計算細胞密度為  $4 \times 10^5/\text{ml}$  以進行所有之測試，在加藥反應的期間必須使用無脂蛋白

的培養基，本研究之所有實驗均使用 D-MEM/F12 培養基 (不含胎牛血清，僅含 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin 及 100  $\mu$ g/ml streptomycin)。

### <LDL 的抽取>

取健康自願者的血清，靜置一段時間後，3000 rpm 離心十分鐘，取上清液既是血清。然後用得到的血清來製備 LDL(29-31)。取血清 2.0 ml 加入 0.15 M NaCl 及 0.3 ml EDTA (PH 7.4)放入 Beckman TL-100 桌上型超高速離心機，離心 90,000 rpm，10  $^{\circ}$ C，10 分鐘，除去上清液，再加入 0.15 M NaCl 及 0.3 ml EDTA (PH 7.4)，離心 90,000 rpm，10 $^{\circ}$ C，3.5 hrs，上層液即為 LDL。LDL 製備後的處理，LDL 純化過程中含有 EDTA 的藥劑，所以必須以透析法去除 LDL 裡的 EDTA (31,32)，我們用 column PD-10 (G-25 PD 10 Sephadex column; Pharmacia)，先以 25 ml PBS 通 PD-10 column，再加 2.5 ml sample (LDL)，然後再加 3.5 ml PBS，去除前 0.5 ml 收後 3 ml 即為去 EDTA 的 LDL。

### <OxLDL 之製備>

將最終濃度為 0.5 mg/ml 的 LDL 加入終濃度為 25  $\mu$ M 的  $\text{CuSO}_4$  於 37 $^{\circ}$ C 下反應 20 小時後，通過 PD-10 column 以去除多餘的銅離子，再以 0.45  $\mu$ m 的過濾膜過濾後使 OxLDL 成無菌狀態備用。OxLDL 必須立即使用。

### <細胞加入 OxLDL 後之存活情形>

將 RAW cell 依上述密度種入培養皿中，待貼壁 6 小時後更換培

養基為 D-MEM/F12，再加入 LDL (終濃度為 100  $\mu\text{g/ml}$ )，隨即將不同濃度包括 1, 5, 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (終濃度) 加入細胞中，分別培養 0、3、6、9、12、24 小時，再以 MTT 的方法測定細胞的存活。此細胞存活率分析係根據 alley 等之方法 (33)，其原理為存活的細胞能將 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-z-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)(tetrazolium salt) 經由粒線體中 dehydrogenase 作用代謝還原成 Formazan Crystal，來測其細胞存活。實驗方法是在進行上述時間的培養結束後，除去培養基，以 PBS 清洗一次後，加入新培養基與 100  $\mu\text{l}$  MTT (5 mg/ml) 作用四小時後，移去上清液再以 PBS 清洗一次，之後加入 1 ml isopropranol，將 formazan 溶解，於光波長 563 nm 下測定吸光值，由控制組與實驗組比較觀察細胞存活狀態。

#### <細胞型態的變化>

細胞型態的觀察乃是依上述的細胞處理方式培養後，分別在不同時間於倒立顯微鏡觀察並拍照，觀察試劑處理細胞的型態。

#### <Leukostat 染色法>

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

以使用 Leukostat 染色法來區分。在 Leukostat 染色法的結果中，正常細胞會出現完整細胞樣（細胞核及細胞質皆非常清楚）；apoptosis 細胞則較少細胞質，反而看到明顯的細胞核濃染的現象；而壞死細胞只會出現很淺的細胞影像 (ghost)。本實驗之方法為細胞經過試劑處理特定時間後，以 PBS 清洗一次，然後以固定液（含 2 mg/ml malachite green, 溶於 methanol 中）固定 10 秒，吸乾固定液並將細胞風乾後，加入染細胞質的第一種染劑（含 0.1% eosin Y; 0.1% formaldehyde; 0.4% sodium phosphate dibasic; 0.5% potassium phosphate monobasic）染 10 秒，在衛生紙上扣乾後，再加入第二種染劑（含 0.04% methylene blue; 0.04% azure A; 0.5% potassium phosphate monobasic）再染 10 秒，隨即沖洗多餘的染劑並風乾即可觀察。

### <TUNEL Assay>

大多數的細胞程序性死亡過程中，DNA 會被切斷成 200 kb 或 50 kb 的大分子量片段，這些片段並無法以單純的洋菜膠電泳觀察到 DNA ladder，因此其他偵測大片段 DNA 斷裂片的方式必須被應用。TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick-end labeling) 乃是一種 in situ 的偵測 DNA 斷裂片的方法 (34)。原理是當出現 DNA 斷裂片時，可能會出現雙股及單股的 DNA 片段，這兩種形式的片段皆可用修飾過的核苷酸 (modified nucleotides, 如 biotin-dUTP, DIG-dUTP 或 fluorescein-dUTP) 結合在 DNA 斷裂片的游離 3'-OH 端以得到偵測 DNA 裂片的目的，而這種修飾過的核苷酸結合到 DNA 斷裂片的過程必須在 terminal deoxynucleotide

transferase 的催化下方可進行。實驗方法為將細胞培養於 8-well chamber slide 中，密度為  $4 \times 10^5/\text{ml}$ ，每一 well 種入  $125 \mu\text{l}$ ，在與前述相同最終濃度的試劑加入處理後，以 PBS 清洗 2 次後加入新鮮配置之固定液 (2% paraformaldehyde in PBS, pH7.4) 於室溫下反應 1 小時，之後再以 PBS 清洗一次後放入 permeabilisation solution (0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate) 置於冰上反應 2 分鐘，去除 permeabilisation solution 後再以 PBS 清洗二次後再置入 TUNEL reaction mixture (terminal deoxynucleotidyl transferase from calf thymus (EC 2.7.7.31) in storage buffer, nucleotide mixture)，將 chamber slide 放入可保濕的盒子中再置入  $37^\circ\text{C}$  預熱過的 incubation oven 中避光反應 1 小時，其後再以 blocking buffer (0.1 % Triton X-100, 0.5 % bovine serum albumin in PBS) 清洗 3 次後在螢光顯微鏡 (型號) 下觀察。

#### <蛋白質抽取及定量>

細胞經過處理後以 PBS 清洗並刮取，在  $4^\circ\text{C}$  下離心 1500 rpm 後，置於 buffer 中 (20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.03 mM sodium orthovanadate, 2 mM EDTA, 2 mM magnesium chloride, 1 mM DTT, 250 mM sucrose, 2 mM PMSF 及  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin) 以震盪器震動 1 小時，在 800rpm 下離心 10 分鐘，取上清液後作蛋白質定量。此法乃利用蛋白質可與 Commassie Brilliant blue G-250 形成藍色的複合物，而這個藍色的複合物在 595 nm 有一個較大吸光值的原理來測定。首先製備以 BSA (Bovine Serum Albumin) 為標準液的蛋白質溶液數個濃度，做出標準曲線後再以

此換算各個樣本的蛋白質濃度。

### <蛋白質電泳>

取 50 $\mu$ g 總蛋白含量之細胞萃取液，加入 5 倍之 protein loading buffer 混合均勻，loading 至 5% stacking gel / 8% separating gel SDS-PAGE，進行電泳。

### <西方墨點法 (Western Blotting) 分析 PARP 蛋白>

電泳完成後，以 4 $^{\circ}$ C，100 mA 轉移蛋白至 NC membrane，16 小時後，將 membrane 浸入含 5% 脫脂奶粉之 TBS-T 緩衝液內，於 4 $^{\circ}$ C 至少搖動 6 小時，加入一次抗體 (PARP) 於 4 $^{\circ}$ C 作用 3 小時以上，再以 TBS-T 清洗三次，每次各 10 分鐘，後與二次抗體 (0.2  $\mu$ g/ml) 反應 1 小時後，以 TBS-T 清洗三次，每次 10 分鐘，最後將 membrane 置入高透明度之塑膠袋中，加入 enhanced chemiluminescence substrate，進行反應 1 分鐘後，放至壓片匣中以 X-ray film 曝光後加入顯影劑顯影。(註：TBS-T buffer 為 Tris-base 20 mM, NaCl 138 mM, Tween-20 0.1%)

### <Caspase-3 activity>

當細胞發生計劃性的自然凋亡，常伴隨著 Caspase-3 活性的增高。測定 Caspase-3 活性，以反映出細胞 apoptosis 的狀況。本組 kit 利用 Caspase-3 具有切割蛋白的能力，當其受質經 Caspase-3 作用切割反應後將產生某一特定的吸光值，偵測此一吸光值的變化即可得知 CPP32 的活性。實驗方法為將細胞培養後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，PBS 沖洗後，以

1000rpm 離心 5 分鐘，取沉澱細胞，加培養基使細胞懸浮，將細胞濃度調整成  $4 \times 10^5$ /ml，培養於 10 公分培養皿中。待細胞貼壁，更新培養基，同時依實驗需要加入試劑。培養 24 小時後以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，PBS 沖洗後以 1000rpm 離心 5 分鐘，取沉澱細胞，加冰的 lysis buffer 於冰上震盪 10 分鐘後，以 10000g 離心 1 分鐘。取上層液，並測定蛋白濃度，調整濃度至 1mg/ml。將以上製備好的 sample 取 12.5  $\mu$ l 加上等量的 reaction buffer(內含 10mM DTT)，再加 1.25 $\mu$ l 之 4mM DEVD-pMA substrate，於 37°C 下避光反應 1.5-2 小時，最後以波長 405nm 測定吸光值。

#### <Migration assay>

將 LDL 及  $\text{CuSO}_4$  共同培養 20 小時後，過 PD-10 column 及 0.45  $\mu$ m filter 以得到無菌的 OxLDL，將 HSE 與 OxLDL 加在 48-well chemotaxis chamber (Neuro Probe, Inc) 的下層，蓋上 polycarbonate membrane (8  $\mu$ m, Neuro Probe, Inc)，小心的將 chamber 的上層與下層鎖緊，之後再將  $2 \times 10^5$  個細胞注入上層，在 37°C 下培養 4 小時後，將 membrane 取出，先以甲醇固定 8 分鐘，待甲醇揮發殆盡，再置入 Giemsa (Sigma Co.) 染劑中染色 1 小時後，將上層殘留的細胞擦拭乾淨，在光學顯微鏡下數下層已移行的細胞數。另外我們也將 OxLDL 加在 chamber 的下層，HSE 則與細胞共同加於上層，藉此觀察 HSE 與 OxLDL 的作用對細胞影響較強，抑或直接與細胞的作用影響較強。

## 結果

### <細胞加入不同濃度之 $\text{CuSO}_4$ 在不同時間下誘發 OxLDL 後之存活情形>

RAW 264.7 cell 加入 LDL (終濃度為  $100 \mu\text{g/ml}$ ) 及不同濃度包括 1, 5,  $10 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (終濃度) 後分別培養 0、3、6、9、12、24 小時，在 MTT 的測定下可以發現細胞存活的情形。由圖一結果顯示  $1 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  在 12 小時後會使細胞逐漸死亡，而  $5 \mu\text{M}$  及  $10 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  則是在 9 小時後會使細胞逐漸死亡，而誘發死亡的速率則隨著  $\text{CuSO}_4$  的劑量呈現 dose-dependent 的現象，但不論是哪一種濃度的  $\text{CuSO}_4$  皆會使細胞在 24 時全數死亡。

### <預先處理 HSE 對氧化型 LDL 所引起的細胞死亡之影響>

RAW 264.7 cell 預先處理 HSE，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5  $\text{mg/ml}$ ，爾後加入以  $5 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  誘發之 OxLDL 培養 15 小時，在 MTT 的測定下可以發現 HSE 在濃度越高的情況之下對細胞死亡的抑制作用越強，且呈現 dose-dependent 的現象，在最高濃度處理下可將細胞死亡的情形抑制為控制組 (只有 LDL 的組別) 的 100%。(圖二)

### <細胞加入不同濃度之 $\text{CuSO}_4$ 在不同時間下誘發 OxLDL 後細胞型態的變化>

RAW 264.7 cell 加入 LDL (終濃度為  $100 \mu\text{g/ml}$ ) 及不同濃度包括 1, 5,  $10 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (終濃度) 後分別培養 0、3、6、9、12、24 小時，在倒立顯微鏡觀察細胞型態的變化，可以發現  $\text{CuSO}_4$  的



濃度越高及培養時間越久，細胞的型態出現越明顯的改變，包括細胞質變少、細胞核愈趨明顯且邊緣化以及細胞膜出現類似 apoptosis body 的型態。(圖三)

#### <預先處理 HSE 對氧化型 LDL 所引起的細胞型態改變之影響>

RAW 264.7 cell 預先 HSE，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，爾後加入 LDL 及 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> 後培養 15 小時，在倒立顯微鏡觀察細胞型態的變化，可以發現 OxLDL 所誘發的細胞死亡可被預先處理的 HSE 所抑制，且呈現 dose-dependent 的現象，在濃度高於 0.03 mg/ml 的情況下可將細胞死亡的情形抑制為與控制組幾乎一致。(圖四)

#### <以 Leukostat 染色法判斷氧化型 LDL 所引起的細胞死亡是否為 apoptosis>

RAW 264.7 cell 加入 LDL (終濃度為 100  $\mu$ g/ml) 及不同濃度包括 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> (終濃度) 後培養 12 小時，以 Leukostat 染色法觀察細胞的形態及細胞核。由圖五結果顯示當 CuSO<sub>4</sub> 濃度為 1  $\mu$ M 時，細胞開始出現細胞質減少及核濃染的 apoptosis 現象；當 CuSO<sub>4</sub> 濃度為 5  $\mu$ M 時，細胞所出現的 apoptosis 現象愈趨明顯；當 CuSO<sub>4</sub> 濃度為 10  $\mu$ M 時，細胞則除了 apoptosis 的現象外，尚會出現少量壞死細胞所會顯現的 ghost 現象。

#### <預先處理 HSE 對氧化型 LDL 所造成之 DNA 斷裂之影響>

由於大多數的細胞程序性死亡過程中，DNA 會被切斷成 200 kb

或 50 kb 的大分子量片段，這些片段並無法以單純的洋菜膠電泳觀察到 DNA ladder，因此我們使用 TUNEL assay 大片段 DNA 斷裂片是否出現？而在 HSE 的存在下對其影響又為何？在改以 TUNEL assay 進行 in situ 的測試後，結果在圖六中發現當細胞死亡的時候 (C 圖)，我們可以觀察到明顯的紅色 TMR red 螢光，而在濃度 0.5 mg/ml 的情況下可將細胞死亡的情形抑制得極為明顯。

#### <西方墨點法 (Western Blotting) 分析 PARP 蛋白>

RAW 264.7 cell 加入 LDL (終濃度為 100  $\mu$ g/ml) 及不同濃度包括 1, 5, 10  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$  (終濃度) 後分別培養 0、6、12、24 小時，在 PARP 蛋白的表現上可以發現在 24 小時的時間點，PARP 蛋白由 110 kDa 斷裂為 85 及 25 kDa 的情形最為嚴重，由此推測 PARP 蛋白的斷裂應發生於 12 到 24 小時之間 (圖七)。

#### <預先處理 HSE 對氧化型 LDL 所造成之 PARP 蛋白的變化>

RAW 264.7 cell 預先處理 HSE，濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml，再加入 LDL (終濃度為 100  $\mu$ g/ml) 及 5  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$  後培養 15 小時，結果顯示氧化型 LDL 所誘發的 PARP 蛋白斷裂的情形可以在預先處理 HSE 後得到改善。在濃度為 0.5 mg/ml 時，PARP 蛋白斷裂的現象約可以回復 93% (相較於只處理 LDL 的組別)。(圖八)

#### <預先處理 HSE 對氧化型 LDL 所造成之 caspase-3 活性增加的影響>

RAW 264.7 cell 預先處理 HSE, 濃度分別為 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml, 爾後加入 LDL 及 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> 後培養 15 小時, 經 caspase-3 活性測定後, 可以發現 OxLDL 所誘發的 caspase-3 活性增加可被預先處理的 HSE 所抑制, 且呈現 dose-dependent 的現象。(圖九)

### <HSE 與巨噬細胞/OxLDL 作用的相關性>

由圖十的結果得知當 OxLDL 置於 transwell chamber 的下層而細胞置於上層時, 經培養 4 小時後, 巨噬細胞會出現 migration 的現象以趨向 OxLDL, 而 HSE 與細胞共同存在時對於細胞吞噬 OxLDL 的效果比之於洛神花水萃取物與 OxLDL 共存時的效果明顯, 我們藉此推測 HSE 除了可以直接抑制 OxLDL 的量之外, 它也可能與巨噬細胞有某種交互作用, 藉此使 OxLDL 的量減少並使巨噬細胞不因 OxLDL 的存在而死亡, 而 HSE 與巨噬細胞之間的交互作用為何? 則是我們將進一步探討的範疇。

## 討論

RAW 264.7 細胞在先前的研究中多為探討暴露於活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 中細胞的變化；或是以 lipopolysaccharide (LPS) 誘發 NO 產生所引起的細胞改變。在 2001 年，Cho 等人 (35) 預先處理類黃酮類物質，再以  $H_2O_2$  加入細胞以誘發活性氧，結果發現對於  $H_2O_2$  所誘發自由基對細胞造成之 proinflammatory cytokines interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 及 interleukin-2 (IL-2) 的基因表達增加，類黃酮類物質具有 dose-dependent 的抑制作用，而其抑制的作用位置是在於阻斷 IL-1 $\beta$  及 IL-2 的轉錄因子 nuclear factor kappaB (NF-kappaB) 及 activator protein-1 (AP-1) 的活化，以致於可以達到保護細胞的作用。另外 Ishii 等人 (36) 亦曾指出以 LPS 誘發 inducible NO synthase (iNOS) 增加而產生 NO，phloroglucinol derivatives 這些抗氧化劑預先處理後可以抑制 iNOS 蛋白及 mRNA 的表達，當然 NO 的產生也會受到抑制。而在以 RAW264.7 細胞探討巨噬細胞在動脈粥狀硬化角色的研究中，OxLDL 是最常被用來加入細胞的一種，因為巨噬細胞在動脈粥狀硬化的早期即會倚賴其清道夫接受器 (scavenger receptor) 吞噬 OxLDL (37)，至於吞噬 OxLDL 後對巨噬細胞的影響則與 OxLDL 的濃度有關，在 2001 年 Hundal 等人 (38) 曾提出處理 50  $\mu\text{g/ml}$  以下的 OxLDL 會使巨噬細胞增生，而高於 100  $\mu\text{g/ml}$  的 OxLDL 會對巨噬細胞產生毒性而使細胞死亡。據此而推測，當細胞曝露於低濃度的 OxLDL 時，細胞增生是為了加強吞噬 OxLDL 並將其分解的能力；而當細胞曝露於高濃度的 OxLDL 時，細胞則會因此而死亡，至於細胞增生及細胞死亡在動脈粥狀硬化的演變上其真實意義為何將有待釐清。

在本篇實驗的研究結果中，我們發現以高濃度 OxLDL 處理巨噬細胞，結果會發現嚴重的細胞死亡，並且其死亡是以 apoptosis 的方式進行。但是在預先處理 HSE 後，這種死亡現象將有效被抑制。其意義應該是在動脈粥狀硬化的不同階段皆為可逆的，在 1993 年，Russell Ross 指出在動脈粥狀硬化的過程中，肇始者為 OxLDL (也可能是機械傷害或 homocysteine, immunologic, toxins, viruses 等物質)，它使得單核細胞趨化為巨噬細胞，巨噬細胞因為攝食 OxLDL 而形成 foam cell，在這期間，巨噬細胞會以 lipoprotein lipase (脂蛋白脂解酵素) 分解食入之 OxLDL，除此之外，Baoutina 等人 (39) 也在 2001 年提出證據證實巨噬細胞可以降低 cholesteryl ester hydroperoxides (CEOOH, 為一種 LDL 進行氧化時早期的產物)，因此若能使 macrophage 在受到 OxLDL 傷害的情況之下維持其存活不死，那麼將使巨噬細胞有充裕的時間分解食入之 OxLDL，也就有機會減低 fatty steak 甚而減低動脈粥狀硬化。另外作者也說明當脂肪大量堆積的 foam cell、T cells 及 smooth muscle cells 形成 fatty steak 後，就會逐漸形成纖維斑 (fibrous plaque) 以致於慢慢演化成粥狀瘤。而形成 fatty steak 的組成物則多是一些死亡的細胞及結締組織，這也就說明了讓巨噬細胞大量死亡在動脈粥狀硬化的演變上其實是一個相當有害的狀況。

在本研究的結果中，我們已得知 HSE 可能經由 (1) 減少 OxLDL 的產生；(2) 直接作用於巨噬細胞的某種機轉以維持細胞存活。這中間仍有許多的問題殘留，其一為減少 OxLDL 的產生是由於減低自由基的含量？亦或增加/協同 LDL 內源性抗氧化劑如維生素 E、維生素 C、類胡蘿蔔素的作用？其二則是 HSE 是倚賴巨噬細胞上的 receptor 作用而影響細胞內部的訊息傳遞或是直接經由細胞內飲作用

(endocytosis) 進入細胞以進行增加細胞存活能力的作用？在 1992 年 Esterbauer 等人 (40) 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逐漸消失，最先遭遇的防線即為 $\alpha$ -tocopherol。另外也有其他學者的研究發現當額外補充維生素 E 時，亦會藉由增加 LDL 內源性  $\alpha$ -tocopherol 的數量而改變 LDL 的氧化敏感性(41, 42)。 $\alpha$ -tocopherol 主要是藉著血液循環中水溶性抗氧化劑之幫助而再生(recycling)，如維生素 C、ubiquinone 等；Wu 等人也在 1998 年指出 (43)，餵食富含水溶性抗氧化劑之丹參水溶液成份可顯著增加紐西蘭大白兔 LDL 中 $\alpha$ -tocopherol 之數量。而在 HSE 中也含有椴杞酸及類黃酮等水溶性抗氧化劑，因此在細胞中所看到的抗 OxLDL 作用可能是經由這些水溶性物質使得  $\alpha$ -tocopherol 獲得再生而增加數目。Terao (44) 等人亦指出具有兒茶素類結構之類黃酮化合物 (如 catechuic acid, quercetin) 在磷脂質雙層膜 (phospholipid bilayer) 系統中是可穩定存在與具備抗氧化能力，由於類黃酮的親水性比 $\alpha$ -tocopherol 要來得高，故在磷脂質雙層膜系統中為聚集在膜的表面，其作用為清除水相中的氫氧自由基與膜中的脂質過氧化物；當面對 LDL 的系統時，更可藉由以上的抗氧化機制與保護內源性 $\alpha$ -tocopherol 而具抗氧化效果。但是當面對高度氧化的體內環境時，如 Princene 在 1998 年 (45) 以抽煙族群所作的研究中發現，飲用紅茶、綠茶或綠茶多元酚類萃出物 4 週後並無法影響脂質代謝與改變 LDL 的氧化敏感性。由此結果顯示，抗氧化物質雖可在體外有良好之抗氧化作用，但可能因體內消化吸收狀況不佳，或面對高濃度自由基環境時所能顯現的抗氧化能力不足，而導致無法觀察到與體外實驗相呼應之結果。但即使多元酚類化合物在體可表現出的抗氧化能力有限，卻可藉由與 LDL 內源性抗氧化劑之交互作用，

而達到保護 LDL 免受氧化修飾之目的。但由本實驗中並無法完全證實這項說法，若要釐清則需要進一步的實驗證實方可。最近亦有報告指出補充 quercetin 與 apigenin 二週並無法改變人體內抗凝血系統的部份因子與酵素的活性 (46)，顯示動脈粥狀硬化患者可藉服用含類黃酮類化合物而改善病徵的情況，並非由於凝血機制改變的緣故。

綜合上述，我們已經明確得知高濃度的 OxLDL 可對細胞造成毒性以令細胞 apoptosis，而預先處理 HSE 可以抑制這種死亡的現象，至於其機轉則是我們接下來將要探討的主題。

## 結論與建議

本研究第一年及第二年計劃結果確認洛神花水萃取物(HSE)具有預防心血管疾病之功能，其作用機轉為：(1) 抑制 LDL 氧化作用；(2) 降低血脂肪（包括三酸甘油脂、總膽固醇及低密度脂蛋白膽固醇）；(3) 減少 atherosclerotic lesion（包括泡沫細胞生成、平滑肌細胞位移及鈣化）；(4) 抑制氧化型 LDL 所引起的巨噬細胞凋謝死亡。而其結果在生理意義上則是預防動脈粥狀硬化之病灶之產生。

因此本研究計劃建議將 HSE 推廣為預防心血管疾病之保健食品。



## 參 考 文 獻

1. Reaubourg, G. and Monceuse, R.H. (1940) The chemical botanical and pharmacological characteristics of the Karkade (rosella) *Hibiscus sabdariffa* (grossypifolius). *J. Pharm. Chem.*, 1, 292-305.
2. Kerharo, J. (1971) Senegal bisap (*Hibiscus sabdariffa* or Guinea sorrel or red sorrel) *Plant. Med. Phytoher.*, 5, 277-281.
3. El-Afry, M.M.F., Khafaga, E.R., El-Sayed, R., Koch, H., and Prinz, D. (1980) Stage of maturity and quality of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *Sabdariffa*) III. Mucilage, pectin and carbohydrates. *Angrew. Bot.*, 54, 301-309.
4. El-Hamidi, A., Saleh, M. and Ahmed, S.S. (1966) *Hibiscus sabdariffa*. *J. Chem. U.S.A.*, 90, 127-130.
5. Koepfli, J.B. (1932) Chemical investigations of *Rauwolfia caffra*. *J. Amer. Chem. Soc.*, 54, 2412-2418.
6. Ali, M.B., Satih, W.M., Mohamed, A.H. and Homeida, A.M. (1991) Investigation of antispasmodic potential of *Hibiscus sabdariffa* calyces. *J. Ethnopharmacol.*, 31, 249-257.
7. El-Saadany, S.S., Sitohy, M.Z., Labib, S.M. and El-Marsy, R.A. (1991) Biochemical dynamics and hypocholesterolemic action of *Hibiscus sabdariffa*. *Nahrung.*, 35, 567-576.
8. Esselene, W.B. and Sammy, G.M. (1973) Roselle natural red colorant for foods. *Food Prod. Develop.*, 7, 80-82.
9. Leclere H. (1938) *Sida sabdariffa* (*Hibiscus sabdariffa*). *Presse. Med.*, 46, 1060.
10. Rankin, S.M., De Whalley, C.V., Houlst, R.S., Jessup, W., Wilkins, G.M., Collard, T. and Leake, D.S. (1993) The

- modification of low density lipoprotein by the flavonoids muricetin and gossypetin. *Biochem. Pharmacol.*, 45, 67-75.
11. De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R., Essup, W. and Leake, D.S. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1743-1750.
  12. Thanka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Yoshimi, N. and Mori, H. (1993) Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rat. *Cancer Res.*, 53, 2775-2779.
  13. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Okamoto, M., Mori, H. and Hara, A. (1994) Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and post-initiation phase. *Cancer Res.*, 54, 1359-2365.
  14. Kawamori, T., Thanka, T., Kojima, T., Suzui, M., Ohnishi, M. and Mori, H. (1994) Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn. J. Cancer Res.*, 54, 2359-2365.
  15. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M. and Mori, H. (1995) Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer (Suppl.)*, 75, 1433-1439.
  16. Hirose, Y., Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita H. and Satoh, K. (1995) Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rat. *Carcinogenesis*, 16, 2337-2342.
  17. Tseng, T.H., Wang, C.J., Kao, E.S. and Chu, C.Y. (1996)

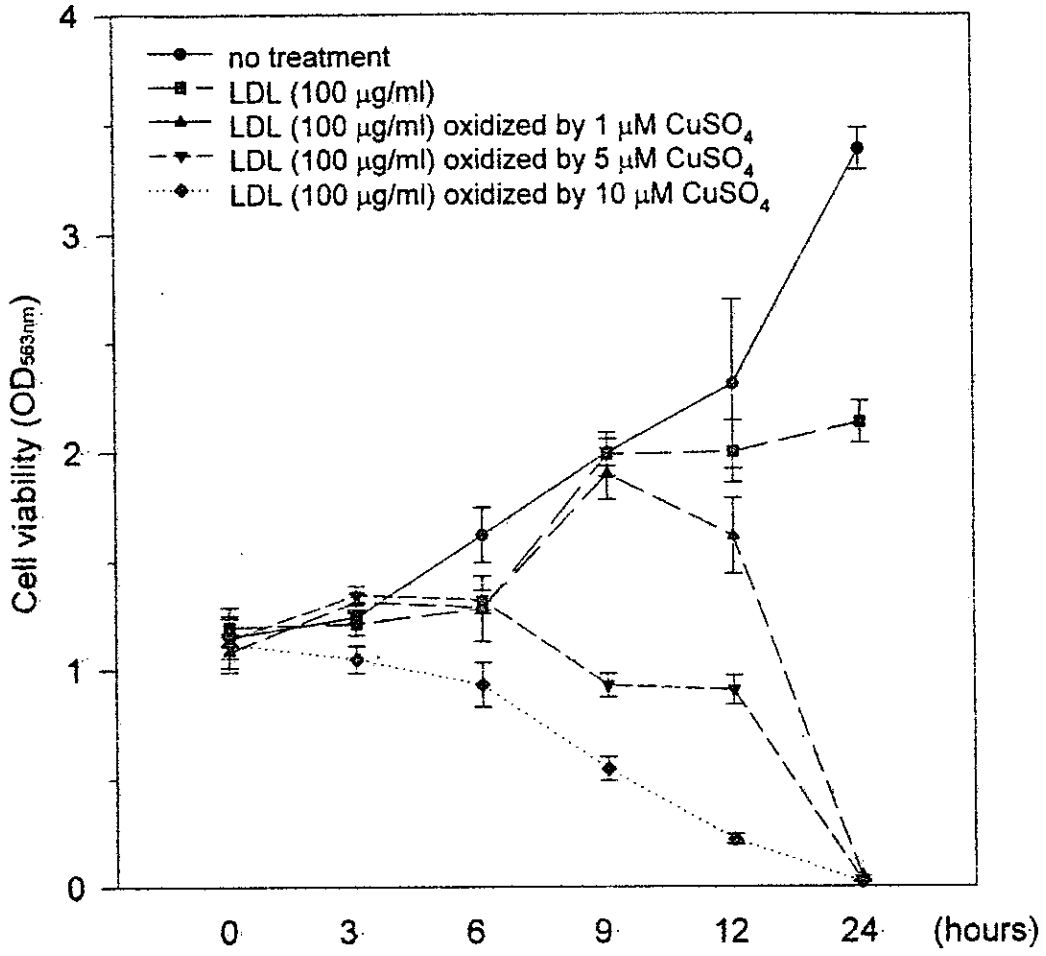
- Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, 101, 137-148.
18. Wang, C.J., Wang, J.M., Lin, W.L., Chu, C.Y., Chou, F.P. and Tseng, T.H. (2000) Protective effect of Hibiscus anthocyanins against t-butylhydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Fd. Chem. Toxicol.*, 38, 411-416.
  19. Wang, C.J., Lee, M.J., Chang, M.C. and Lin, J.K. (1995) Inhibition of tumor promotion in benzo(a)pyrene-initiated CD-1 mouse skin by crocetin. *Carcinogenesis*, 16, 187-191.
  20. Tseng, T.H., Kao, T.W., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.L. and Wang, C.J. (2000) Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of RB phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem. Pharmacol.*, 60, 307-315.
  21. Lee, M.J., Chou, F.P., Tseng, T.H., Hsieh, M.H., Lin, M.C., and Wang, C.J. (2002) Hibiscus protocatechuic acid or esculetin can inhibit oxidative LDL induced by either copper ion or nitric oxide donor. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2130-2136.
  22. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.C. (1989) Beyond cholesterol modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320, 915-924.
  23. Witztum, J.C. and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, 88, 1785-1792.
  24. Bruja, L.M., Kita, T., Glosatein, J.L., Watanabe, Y. and Brown, M.S., (1983) Cellular pathology of progressive model of familial

- hypercholesterolemia Arterio scerosis., 3, 87-101.
25. Reaven, P. and Witztum, J.L. (1995) The role of oxidatin of LDL in atherogenesis. *Endocrinologist*, 5, 44-54.
  26. Huang, H.C., Jan, T.R. and Yeh, S.F. (1992) Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.*, 221, 381-384.
  27. Huang, H.C., Wang, H.R. and Hsieh, L.M. (1994) Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell. *Eur. J. Pharmacol.*, 251, 91-93.
  28. Chen, H.W. and Huang, H.C. (1998) Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, 124, 1029-1040.
  29. Bronzert T.J., brewer H.B. (1977) New micromethod for measuring cholesterol in plasma lipoprotein fraction. *Clin. Chem.* 23, 2089.
  30. Keaney J.F., Simon D.I., Freedman J.E. (1999) Vitamin E and vascular homeostatsis: implications for atherosclerosis. *FASEB J.* 13, 865-876.
  31. Kim H., Shim J., Han P.I., Choi F.J. (1997) Nitric oxide modulates the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activity through activating c-Jun N-treminal kinase kinase. *Biochemistry* 36, 13677-13681.
  32. Kleinvels H.A., Heidi L.M., Hectors M.P.C., Nanneke J., Demacker P.N.M., Stalenhoef A.F.H. (1995) Vitamin E and fatty acid intervention does not attenuate the progression of atherosclerosis in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atheroscler Thomb. Biol.* 15, 290-297.

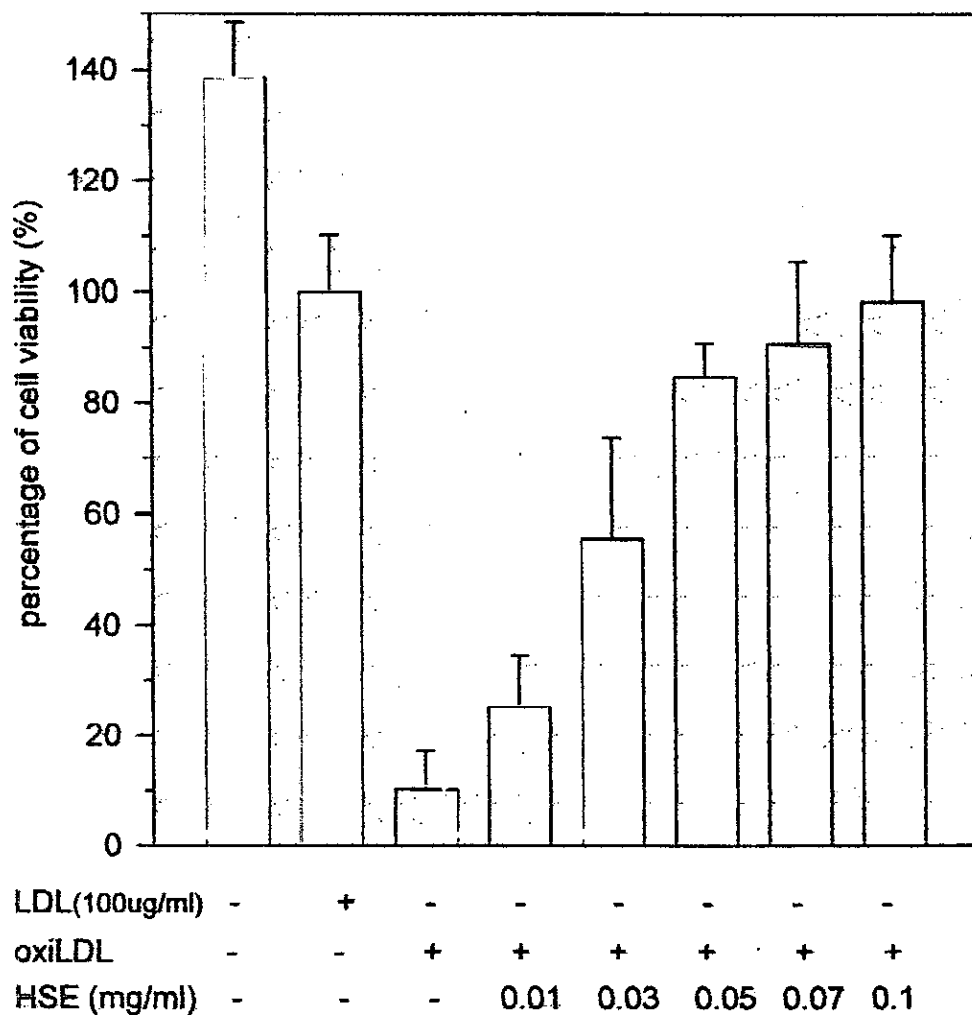
33. Alley MC, Scudiero DA, Monkds A. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988; 48: 599.
34. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493.
35. Cho KJ, Yun CH, Packer L, Chung AS. Inhibition mechanisms of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on the expression of proinflammatory cytokines. *Ann New York Acad Sci* 2001; 928: 141.
36. Ishii R, Horie M, Saito K, *et al.* Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus* on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, activated by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1568: 74.
37. Hans J, Nicholson AC. Lipoproteins modulate expression of the macrophage scavenger receptor. *Am J Pathol* 1998; 152:1647.
38. Hundal RS, Salh BS, Schrader JW, *et al.* Oxidized low density lipoprotein inhibits macrophage apoptosis through activation of the PI 3-kinase/PKB pathway. *J Lipid Res* 2001; 42: 1483.
39. Baoutina A, Dean RT, Jessup W. Antioxidant properties of macrophages toward low-density lipoprotein. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 1.
40. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341.
41. Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, *et al.* Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by

- vitamin E but not by  $\beta$ -carotene. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1993; 13: 590.
42. Dieber-Rotheneder M, Puhl H, Waeg G, *et al.* Effect of oral supplementation with D- $\alpha$ -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J Lipid Res* 1991; 32: 1325.
  43. Wu YJ, Hong CY, Lin SJ, *et al.* Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 481.
  44. Terao J, Piskula M, Yao Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayer. *Arch Biochem Biophys* 1994; 308: 278.
  45. Princen HMG, Duyvenvoorde W, Buytenhek R, *et al.* No effect of consumption of green and black tea on plasma lipid and antioxidant levels and on LDL oxidation in smokers. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 833.
  46. Janssen PLTMK, Mensink RP, Cox FJJ, *et al.* Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 255.

圖一、不同濃度之  $\text{CuSO}_4$  在不同時間下誘發 OxLDL 後對細胞之影響



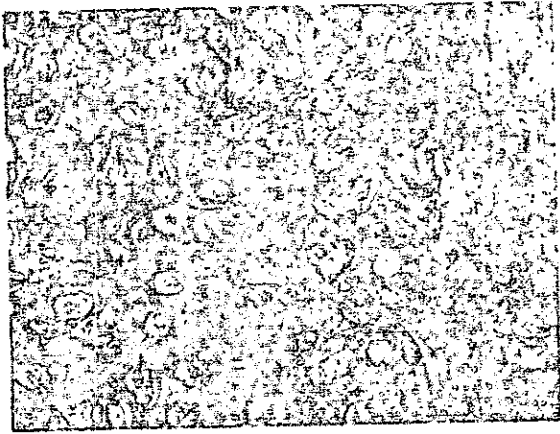
圖二、預先處理 HSE 對 OxLDL 引起細胞死亡之影響



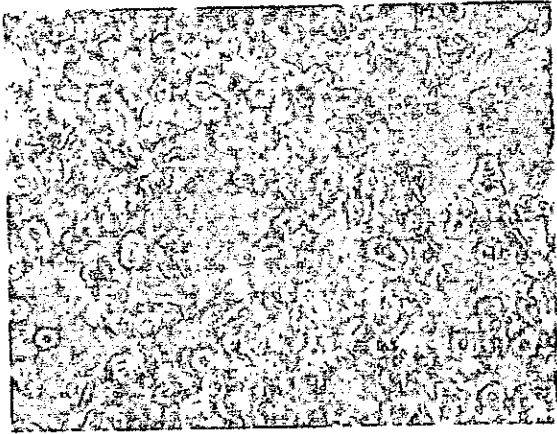


圖三、不同濃度銅離子誘發之氧化型 LDL 對細胞形態之影響

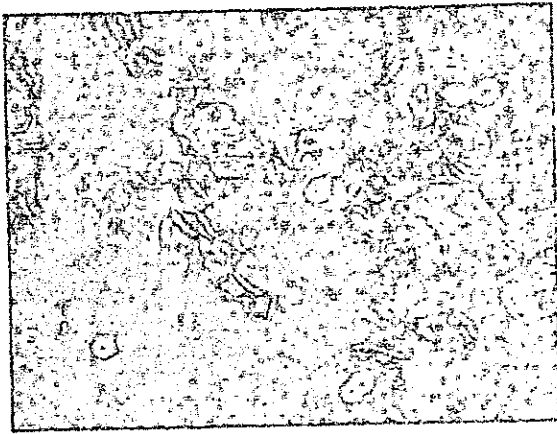
Normal (12 h)



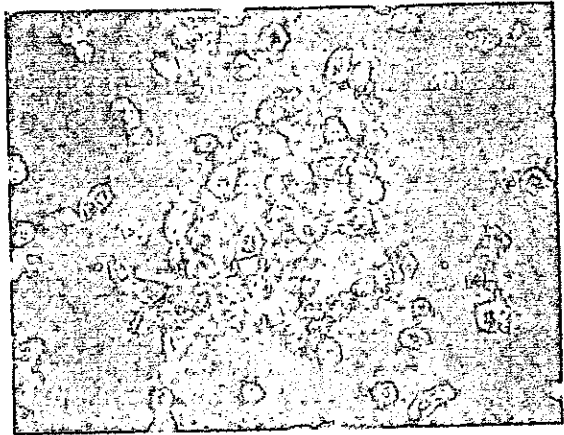
Normal (24 h)



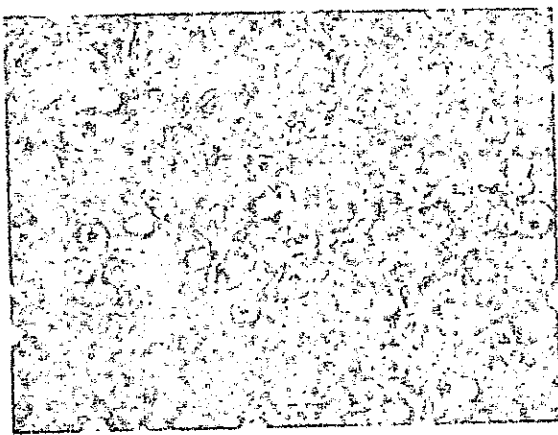
LDL only (12 h)



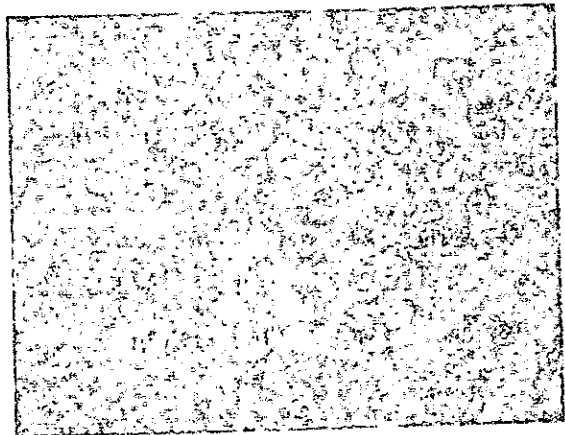
LDL only (24 h)



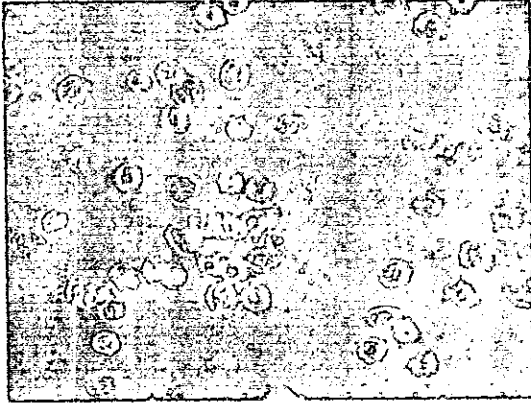
1  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> oxidized LDL (12 h)



1  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> oxidized LDL (24 h)



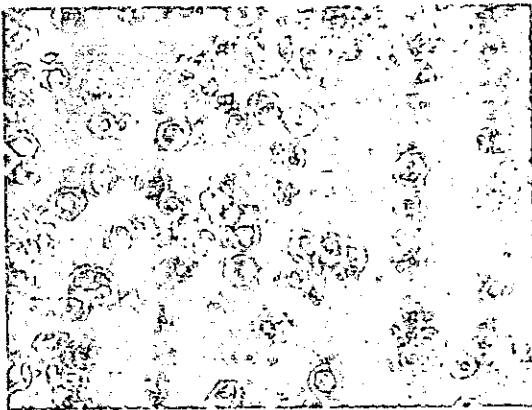
5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  oxidized LDL (12 h)



5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  oxidized LDL (24 h)



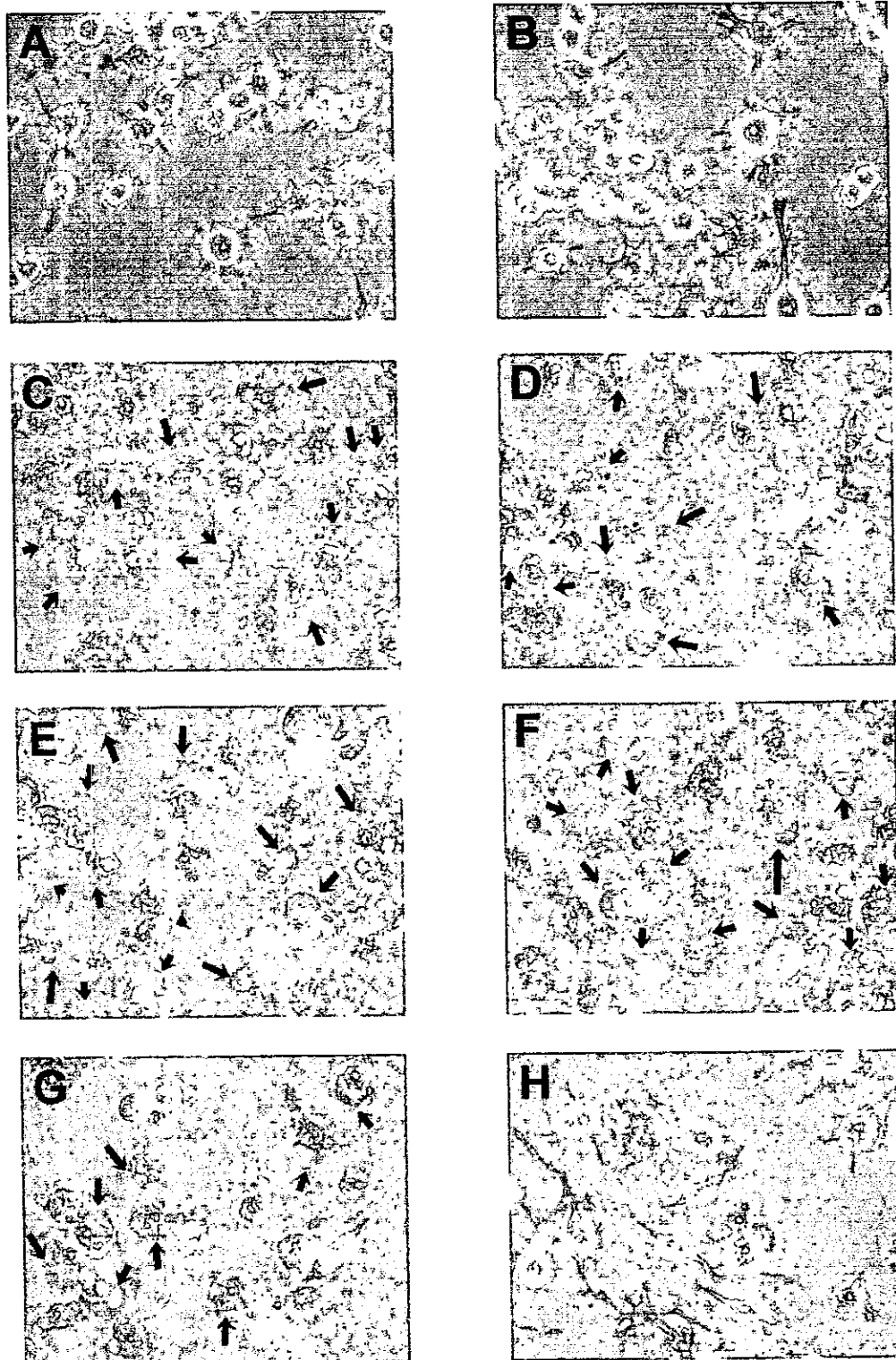
10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  oxidized LDL (12 h)



10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  oxidized LDL (24 h)

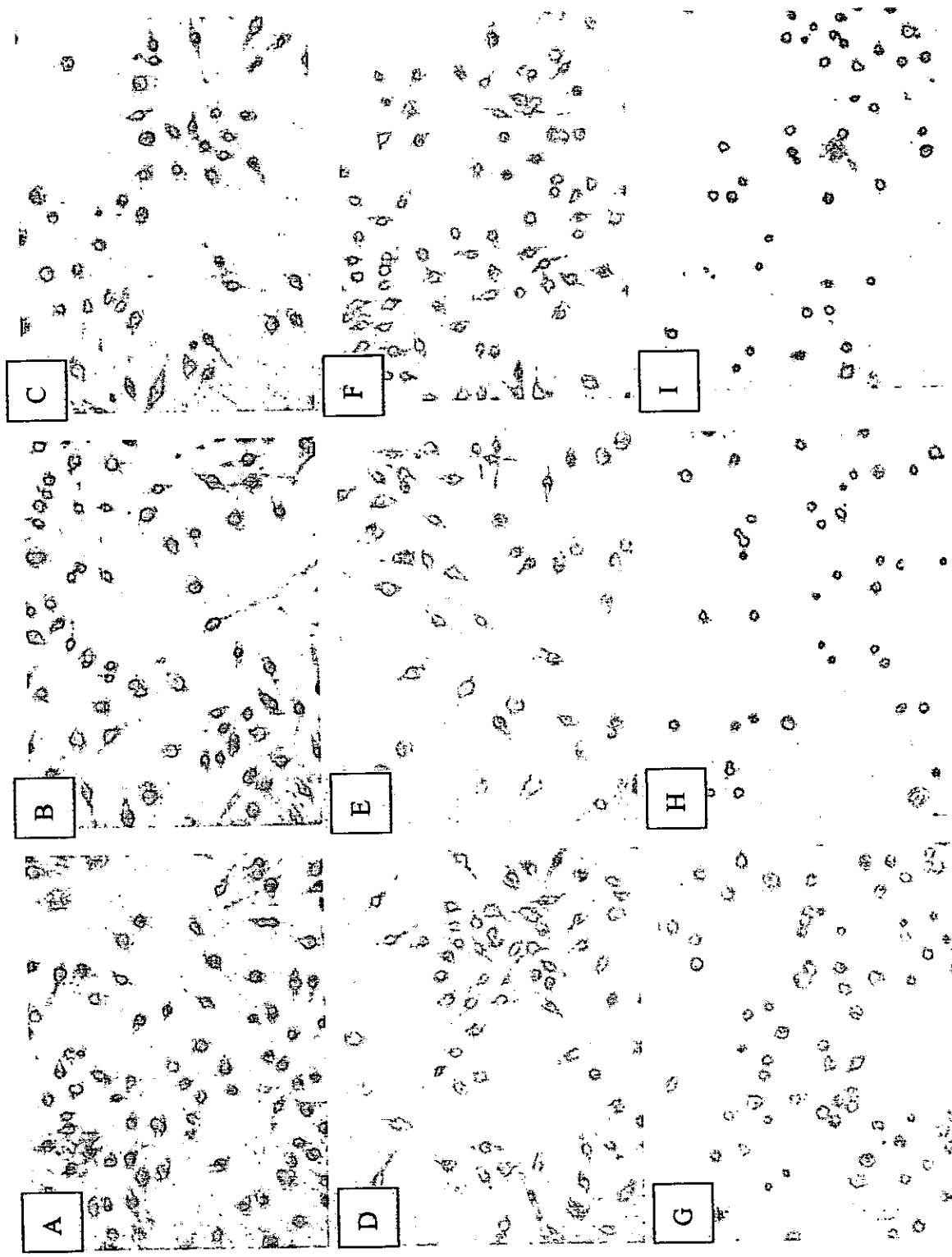


圖四、預先處理 HSE 對 OxLDL 誘發細胞型態改變的影響



A: Normal; B: 100  $\mu\text{g/ml}$  LDL only; C: LDL + 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ; D: 0.01 mg/ml HSE co-treated with C; E: 0.03 mg/ml HSE co-treated with C; F: 0.05 mg/ml HSE co-treated with C; G: 0.1 mg/ml HSE co-treated with C; H: 0.5 mg/ml HSE co-treated with C

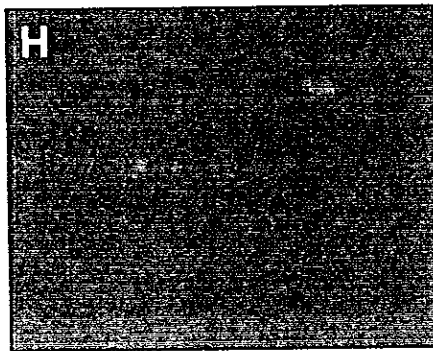
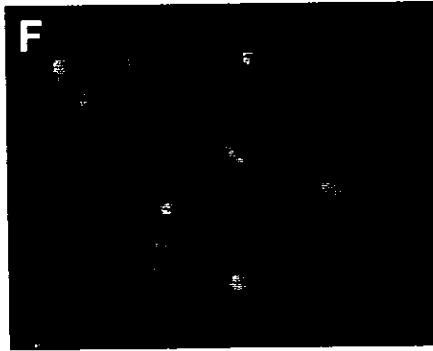
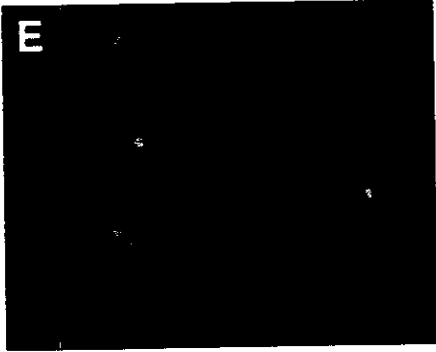
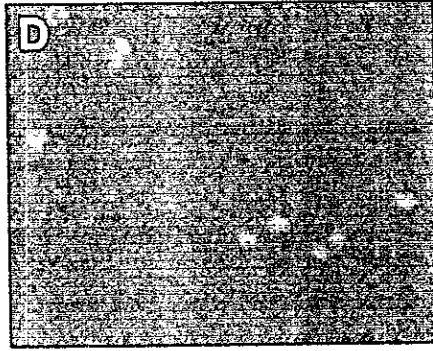
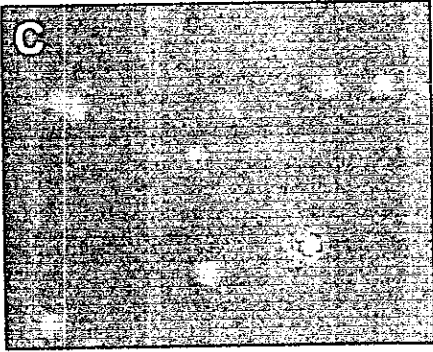
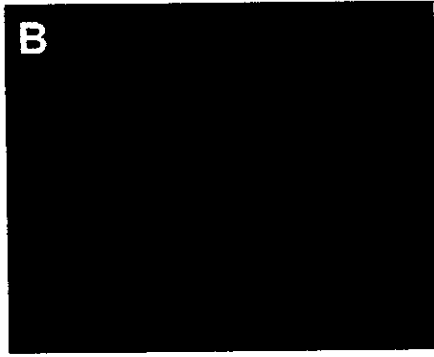
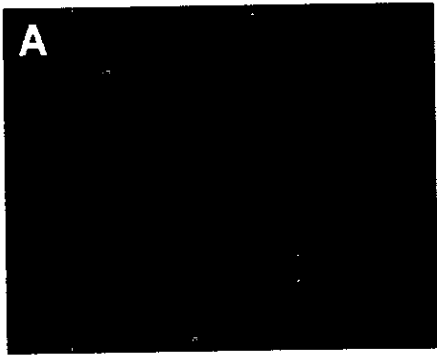
圖五、不同濃度的銅離子所誘發的 OXLDL 對巨噬細胞的影響 (Leukostat stain)



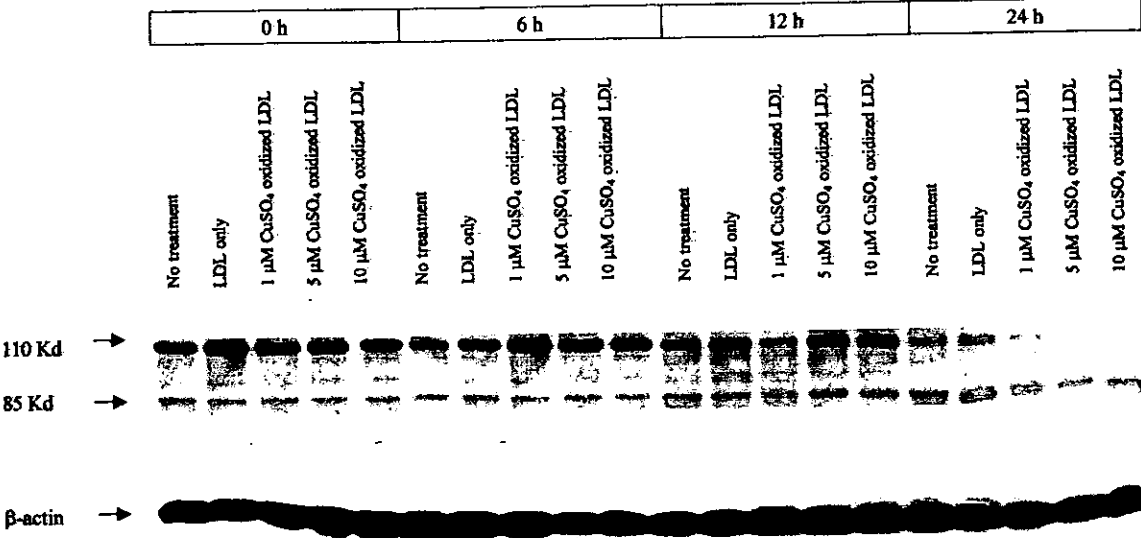
RAW cell were treated with 100 μg/ml LDL and CuSO<sub>4</sub> and incubated at 37°C for 12 h to observe the apoptotic cell.

A: normal; B: LDL only; C: LDL and 0.01 μM CuSO<sub>4</sub>; D: LDL and 0.05 μM CuSO<sub>4</sub>; E: LDL and 0.1 μM CuSO<sub>4</sub>; F: LDL and 0.5 μM CuSO<sub>4</sub>; G: LDL and 1.0 μM CuSO<sub>4</sub>; H: LDL and 5.0 μM CuSO<sub>4</sub>; I: LDL and 10 μM CuSO<sub>4</sub>.

圖六、預先處理洛神花水萃取物對 OxLDL 誘發細胞 apoptosis 的影響

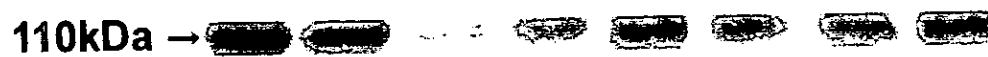


圖七、OxLDL 在巨噬細胞中造成 PARP 蛋白斷裂之情形

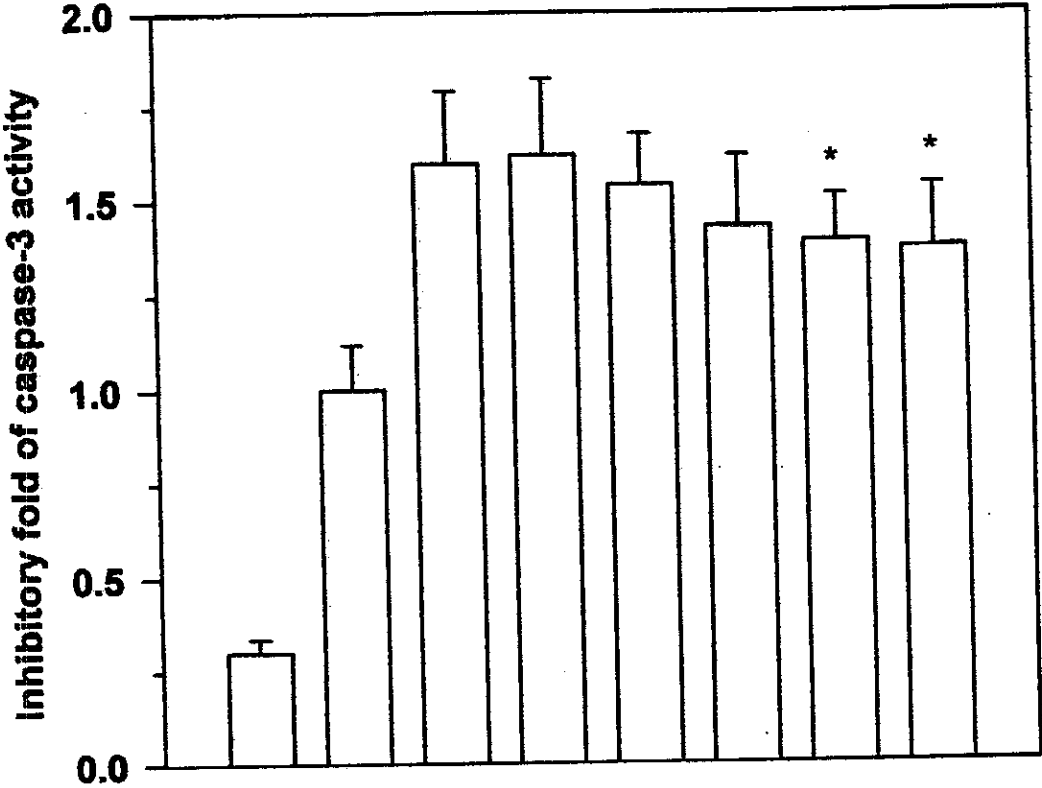


圖八、預先處理洛神花水層粗萃取物對 OxLDL 所造成之 PARP 蛋白的變化

HSE (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5
LDL (100 $\mu$ g/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+
CuSO <sub>4</sub> (5 $\mu$ M)	-	-	+	+	+	+	+	+



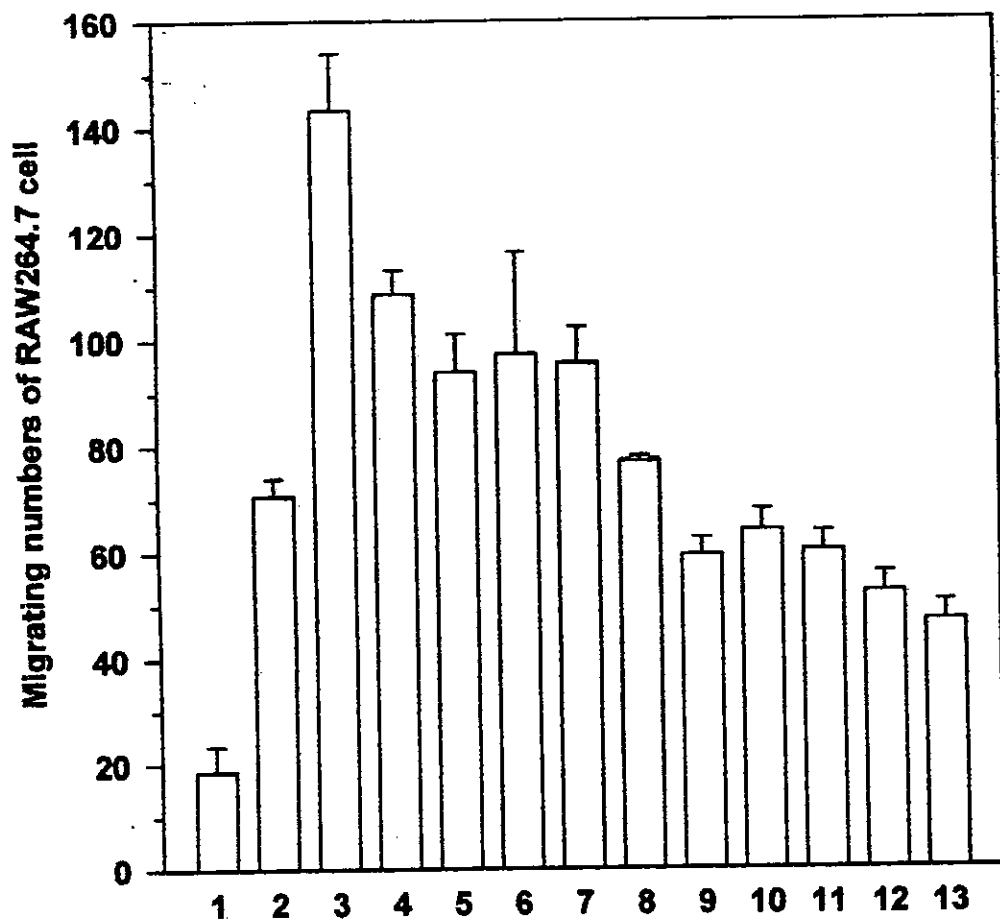
圖九、預先處理 HSE 對 OxLDL 所造成之 caspase-3 蛋白活性增加的影響



HSE (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5
LDL (100 $\mu$ g/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+
CuSO <sub>4</sub> (5 $\mu$ M)	-	-	+	+	+	+	+	+



圖十、HSE 與巨噬細胞/OxLDL 作用的相關性



Up chamber	Cell	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	HSE (mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5
Low chamber	LDL	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	OxLDL	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	HSE (mg/ml)	-	-	-	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5	-	-	-	-	-