

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

龍葵保健食品研究開發--龍葵萃取物抑制心血管疾病之研究(2/3)

期中進度報告(精簡版)

計畫類別：整合型

計畫編號：NSC 96-2321-B-040-003-

執行期間：96年08月01日至97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

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 97年06月17日

(I) 前言

龍葵 (Solanum nigrum) 始載於《唐本草》。原名龍葵、又名苦菜。龍葵醫學功能有：

1. 防止自由基所造成的DNA 傷害 (1,2)；2. 具有保肝作用，可保護肝臟免於四氯化碳誘導的肝損傷 (3,4)；3. 誘導氮氧化物的產生 (5)；4. 在TPA 所刺激的乳癌細胞MCF-7 中，能抑制細胞內轉錄因子NF- κ B 和AP-1 與DNA 結合的活性 (6)；5. 在墨西哥的傳統醫學中已被視為鎮定神經之藥物 (7)；6. 具有抑制小鼠肉瘤S-180 的活性 (8)；7. 抑制乳癌細胞MCF-7 的生長及誘導細胞凋亡 (9)；8. 降低膽固醇 (10)；9. 用於肝炎、肺癌、膀胱癌治療 (11-14)；10. 輔助腫瘤治療 (15,16)；11. 抑制腸癌乙炔轉移酶活性 (17)。另外本群體計畫初步結果顯示：12. 龍葵水萃取物促進肝癌細胞HepG2 死亡，及增加GST Mu 之表現及降血脂作用。綜合以上結果可歸納出龍葵具有【1】 抗氧化；【2】 抗發炎；【3】 抑制癌症發生率；【4】 護肝作用；及【5】 降血脂之功能。

脂蛋白中的 LDL 及 HDL 和粥狀動脈硬化有很強的相關性，動脈硬化最早期的徵狀為在 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。

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 有抗氧化傷害 (18, 19)，氧化型 LDL 發生於 endothelial cells，monocyte/macrophages 及 smooth muscle cells (20)，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 (21)。

許多 antioxidants，已被認為具有降低 LDL 的氧化作用及 atherosclerosis，如 curcumin 及 baicalein，也抑制 vascular smooth muscle cell 的增生及促進 apoptosis，龍葵水萃取物除具有抗氧化、防癌之作用外，本實驗室也已發現其可能具有降血脂之功能。綜合這些結果，龍葵水萃取物作用在抗心血管疾病應無疑問。本計畫擬進一步證明發展保健食品之證據及其必要性。

Apoptosis 是一種細胞凋亡的機制，包含了正常的發育及許多 pathological 狀況，如細胞受到 oxidative stress 而產生 apoptosis，最近有許多報告指出 ox-LDL 能夠誘導 smooth muscle cells，macrophages，dorsal root ganglia 及 lymphoblastoid 及 human coronary artery endothelial cells，產生 apoptosis 的現象在人的 atherosclerotic lesions 發現有許多 apoptotic cells，尤其是發炎細胞，如 macrophages 及 T cells，此 apoptotic cells 可能是造成 gruel 堆積及 plaque instability，因此 ox-LDL 可能造成 apoptotic cells 堆積於 atherosclerotic plaques 成為 atherosclerosis。

(II) 研究目的

龍葵成份已有多項抗癌及抗氧化之報告，在我們上年度的試驗中也發現龍葵水萃取物 (SNWE) 及龍葵多酚萃取物 (SNPE) 含有高量的多酚，並且能夠抑制血脂肪及 LDL 氧化，及在 *in vitro*、*ex vivo* 及 *in vivo* 中抑制心血管疾病的作用，本年度將繼續進行機轉的探討，內容為 SNWE 及 SNPE 抑制巨噬細胞 apoptosis，以期能將此成果藉由科學研究證據發展為抑制心血管疾病的保健食品。

(III) 參考文獻

1. Sultana et al., (1995) Crude extracts of hepatoprotective plants, Solanum nigrum and Cichorium intybus inhibit free radical-mediated DNA damage. J. Ethnopharmacol, 45, 189-92.
2. Prashanth et al. (2001) alpha-Glucosidase inhibitory activity of Mangifera indica bark. Fitoterapia, 72, 686-8.
3. Jindal, V.K. Patel and N.B. Patel (1975) Some pharmacological activities of aqueous and

- alcoholic extracts of *Cichorium intybus* Linn. *Indian Journal of Pharmacology*, 7, 104.
4. A. Saxena and N.K. Garg (1979) Effect of Liv-52 on hepatic enzymes. *Indian Journal of Experimental Biology* 17, 662.
 5. An et al. (2005) *Solanum nigrum* produces nitric oxide via nuclear factor- κ B activation in mouse peritoneal macrophages. *Eur. J. Cancer prevention*, 14, 345.
 6. K. S. Heo, S. J. Lee, J. H. Ko, K. Lim and K. T. Lim (2004) Glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. inhibits the DNA-binding activities of NF- κ B and AP-1, and increases the production of nitric oxide in TPA-stimulated MCF-7 cells, *Toxicol. In Vitro*, 18, 755.
 7. Perez et al. (1998) Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. *J. Ethnopharmacol.*, 62, 43.
 8. Yen, G.C., Chen, H.Y., Peng, H.H. (2001) Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1045-1053.
 9. Son, Y.-O., Kim, J., Lim, J.-C., Chung, Y., Chung, G.-H., Lee, J.-C. (2003) Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1421-1428.
 10. Lee et al. (2005) 150 kDa glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* Linne enhances activities of detoxicant enzymes and lowers plasmic cholesterol in mouse. *Pharmacol. Res.*, 51, 399-408.
 11. 呂翠霞等，1999，*山東中醫藥大學學報*，23：224
 12. 王云啟，2002，*遼寧中醫雜誌*
 13. 羅開明等，1999，*右江醫學*27：105
 14. 張書元等，2000，*華北煤炭醫院學報*，2：380
 15. 王泳，2000，*中醫藥研究*，16：20
 16. 陸克勤，2000，*中國醫刊*，35：51
 17. 蘇進成等，2003，*J. Chin. Med.*, 14：151
 18. 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.
 19. Witztum, J.C. and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, 88, 1785-1792.
 20. Bruja, L.M., Kita, T., Glosstein, J.L., Watanabe, Y. and Brown, M.S., (1983) Cellular pathology of progressive model of familial hypercholesterolemia Arterio sclerosis., 3, 87-101.
 21. Reaven, P. and Witztum, J.L. (1995) The role of oxidized LDL in atherogenesis. *Endocrinologist*, 5, 44-54.

(IV) 研究方法

由於巨噬細胞之 apoptosis 與 atherosclerosis 有關，而巨噬細胞經由 ox-LDL 誘導產生 apoptosis 與 atherosclerosis 已被證實，因此本年擬探討 SNWE 或 SNPE 抑制 ox-LDL-induced apoptosis 之作用，以說明抑制 atherosclerosis 之機轉。

(A) Cell culture

本試驗取用 THP-1 cells 培養於 DMEM 培養液中 (PH7.3)，培養液中另添加 10% FBS (foetal bovine serum；胎牛血清)、1% penicillin streptomycin 與 1% L-glutamine。THP-1 cells 同培養液一起培養於恆溫培養箱 (37°C；5% CO₂)，更換培養液的時間及次數依細胞生長速度而定，進行誘導前先以 TPA 處理 48 小時以使 THP-1 分化為 macrophage。

(B) LDL-oxidation

以 sequential ultracentrifugation 分離之 LDL (同上方法)，置於 Tris-HCl buffer (0.01 M, PH 7.4) 含 1 mM EDTA，以通過 0.22 μ M pore-size Millipore membrane 滅菌，備用，可保存三星期。ox-LDL 製備則以 LDL 與 5 μ M CuSO₄ 在 37°C 下作用 24 hr，然後去除 EDTA。

(C) 凋謝死亡分析

分化後之巨噬細胞 (4×10^6) 置於 25 cm^2 flask 培養兩天後加入 LDL (控制組), 及 ox-LDL, 再以不同濃度 SNE 或 SNPE 加入培養 24 hr 或 48 hr。凋謝死亡分析則分別以: (1) MTT 分析; (2) flow cytometer 分析 hypodiploid DNA; (3) DNA fragmentation 分析 (4) 細胞型態觀察。

(1) MTT 分析

經上述方法處理 ox-LDL 及 SNE 或 SNPE 後, 培養 24 hr 或 48 hr 後, 以離心去培養基, 加入 2ml 新鮮無血清之培養基 (DMEM-F12) 與 200MI MTT (5 mg/ml) 繼續培養 4 hr, 去除培養液後, 加入 1.5 ml isopropanol, 均勻分散細胞後離心, 取 1 ml 上清液在 563 nm 測其吸光。

(2) 凋謝體及細胞週期分析

本實驗主要採用 Becton Dickinson 公司所生產的 CyaleTESTTM PLUS DNA Reagent Kit 來完成。細胞 (5×10^5) 以 900 rpm, 5 min 離心去除培養液後, 以 PBS (含 1 mM ZnCl_2) wash 細胞一次。加入 250 μ l Solution A (trypsin buffer), 25 °C 輕緩混合 10 min 之後, 250 μ l Solution B (trypsin inhibitor and RNase buffer), 於 25 °C 輕搖混合 10 min, 接著於 4 °C 下加入 200 μ l Solution C (propidium iodide), 避光反應 10 min, 最後以 Flow cytometer (FACS) 測定。

(3) DNA 斷裂片段之測定

收集處理之細胞, 經 800x g, 4 °C 離心 10 min 後, 以 0.05 SDS 和 100 mM EDTA 溶解, 加入 20 μ g/ml RNase A, 37 °C, 1hr 後, 再加入 100 μ g/ml proteinase K 於 50 °C 處理三小時, 再用 phenol, chloroform 和 isoamylalcohol (25:24:1) 萃取後, 加入兩倍體積之 alcohol 及 0.1 倍體積之 3 M sodium acetate (pH 7.2), 置於 -20 °C 過夜, 沉澱物以 14,700 rpm 離心 30 min, 再以 DNase-free RNase 在 37 °C 作用 1 hr, 溶於 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), 以 1.5% agarose gel electrophoresis。

(4) 細胞型態觀察與核染色

在細胞培養液中加入 SNWE 或 SNPE, 培養 24 hr 後, 以倒立式顯微鏡於 100 倍拍照, 而核內染色則是先以 PBS wash 細胞, 再將細胞懸浮於冰冷的 PBS 中, 細胞濃度調整為 5×10^5 /ml, 取 0.5 ml 滴入 cytospin cup 內, 以 850 rpm, 5min 將細胞均勻離心打至玻片, 之後用絕對酒精固定, 以 0.1% hematoxylin 或 50 μ g/ml propidium iodide 染色 5 min, 最後經蒸餾水沖洗, 蓋上蓋玻片, 置於顯微鏡下觀察。

(D) SNWE 或 SNPE 抗 ox-LDL-induced apoptosis 機轉分析

同 (C) 處理後, 以 Western blotting 分析 bcl-2 family、Caspase3、caspase 8。

< Western blotting 分析 >

取 100 μ g 蛋白含量之細胞萃取液, 加入等體積之 protein loading buffer 混合均勻, loading 至 10% SDS-PAGE, 電泳完成後, 以 4 °C, 100 mA 轉移蛋白, 浸入含 3% 胎牛血清之 TBST 緩衝液內, 於室溫下搖動 2 hr, 加入 Ab (p53、c-myc、bcl-2 family、CPP32) 作用 3.5 hr, 再以 TBST 清洗三次, 再與 secondary Ab (0.2 μ g/ml) 反應 1 hr 後, 以 TBST 清洗, 浸入受質緩衝液 (內含有 BCIP、NBT) 進行呈色反應, 約 10-30 min, 直至色帶出現。(註: buffer A 為 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, EDTA 2 mM, glycerol 10%, sucrose 0.33 M, β -mercaptoethanol 50 mM, PMSF 2 mM 及 leupeptin 25 μ g/ml; TBST buffer 為 Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0.1%)

(V) 結果與討論

1. 預先處理 SNWE 對氧化型 LDL 所引起的細胞死亡之影響

細胞預先處理 SNWE，濃度分別為 1, 2, 3 mg/ml，爾後加入 LDL 及 5 μ M CuSO₄ 後培養 24 小時，測定 MTT，可以發現 OxLDL 所誘發的細胞死亡可被預先處理的 SNWE 所抑制，在濃度為 3.0 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。(Figure 1)

2. 預先處理 SNWE 對氧化型 LDL 所造成之 DNA 斷裂之影響

以 DAPI stain 進行 in situ 的測試後，結果在 Figure 2 中發現當細胞死亡的時候，我們可以觀察到明顯的藍色螢光，而在濃度 3.0 mg/ml 的情況下可將細胞死亡的情形抑制得極為明顯。

3. 預先處理 SNWE 對氧化型 LDL 所引起的 subG1 之影響

細胞預先處理 SNWE，培養 24 小時，測定 subG1，可以發現 OxLDL 所誘發的 subG1 上升被預先處理的 SNWE 所抑制，在濃度為 3.0 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。(Figure 3)

4. 預先處理 SNWE 對氧化型 LDL 所造成之 extrinsic pathway 之影響

Figure 4 顯示 Caspase3 及 caspase8 在 oxLDL 加入後皆被 cleavage，而加入 SNWE 後則隨濃度增加而呈現不 cleavage 的現象，但在 Fas 及 FasL 則無明顯改變。

5. 預先處理 SNWE 對氧化型 LDL 所造成之 intrinsic pathway 之影響

Figure 5 顯示在 oxLDL 加入後 Bax 表現量上升及 Bcl 表現量下降，而加入 SNWE 後則隨濃度增加而呈現 Bax 表現量逐漸下降及 Bcl 表現量逐漸上升。

6. 預先處理 SNPE 對氧化型 LDL 所引起的細胞死亡之影響

細胞預先處理 SNPE，濃度分別為 1, 5, 10 μ g/ml，爾後加入 LDL 及 5 μ M CuSO₄ 後培養 15 小時，測定 MTT，可以發現 OxLDL 所誘發的細胞死亡可被預先處理的 SNPE 所抑制，在濃度為 10 μ g/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。(Figure 6)

7. 預先處理 SNPE 對氧化型 LDL 所造成之 DNA 斷裂之影響

以 DAPI stain 進行 in situ 的測試後，結果在 Figure 7 中發現當細胞死亡的時候，我們可以觀察到明顯的藍色螢光，而在濃度 10 μ g/ml 的情況下可將細胞死亡的情形抑制得極為明顯。

8. 預先處理 SNPE 對氧化型 LDL 所引起的 subG1 之影響

細胞預先處理 SNPE，培養 24 小時，測定 subG1，可以發現 OxLDL 所誘發的 subG1 上升被預先處理的 SNPE 所抑制，在濃度為 10 μ g/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。(Figure 8)

9. 預先處理 SNPE 對氧化型 LDL 所造成之 extrinsic pathway 之影響

Figure 9 顯示 Caspase3 及 caspase8 在 oxLDL 加入後皆被 cleavage，而加入 SNPE 後則隨濃度增加而呈現 cleavage 減緩的現象，但在 Fas 及 FasL 表現則無明顯改變。

10. 預先處理 SNPE 對氧化型 LDL 所造成之 intrinsic pathway 之影響

Figure 10 顯示在 oxLDL 加入後 Bax 表現量上升及 Bcl 表現量下降，而加入 SNPE 後則隨濃度增加而呈現 Bax 表現量逐漸下降及 Bcl 表現量逐漸上升。

(VI) 計畫成果自評

1. 已達成預定成效。

(1) 完成 ox-LDL-induced macrophage apoptosis 之模式。

(2) 完成 SNWE 或 SNPE 抑制 ox-LDL-induced macrophage apoptosis 之作用。

(3) 完成 ox-LDL-induced macrophage cell apoptosis 之 signaling pathway。

2. 已整理部分內容投稿中。

Figure 1. The inhibitory effect of SNWE on oxLDL-induced macrophage death

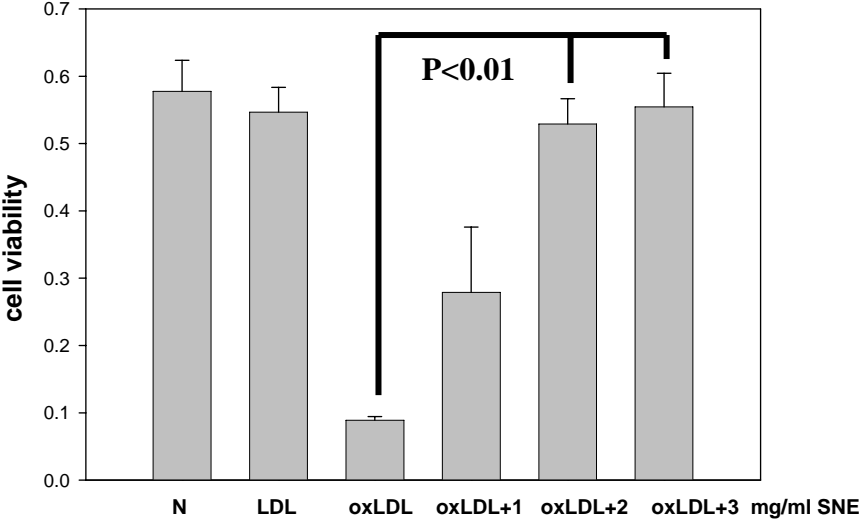


Figure 2. DNA fragmentation of SNWE on oxLDL-induced macrophage death

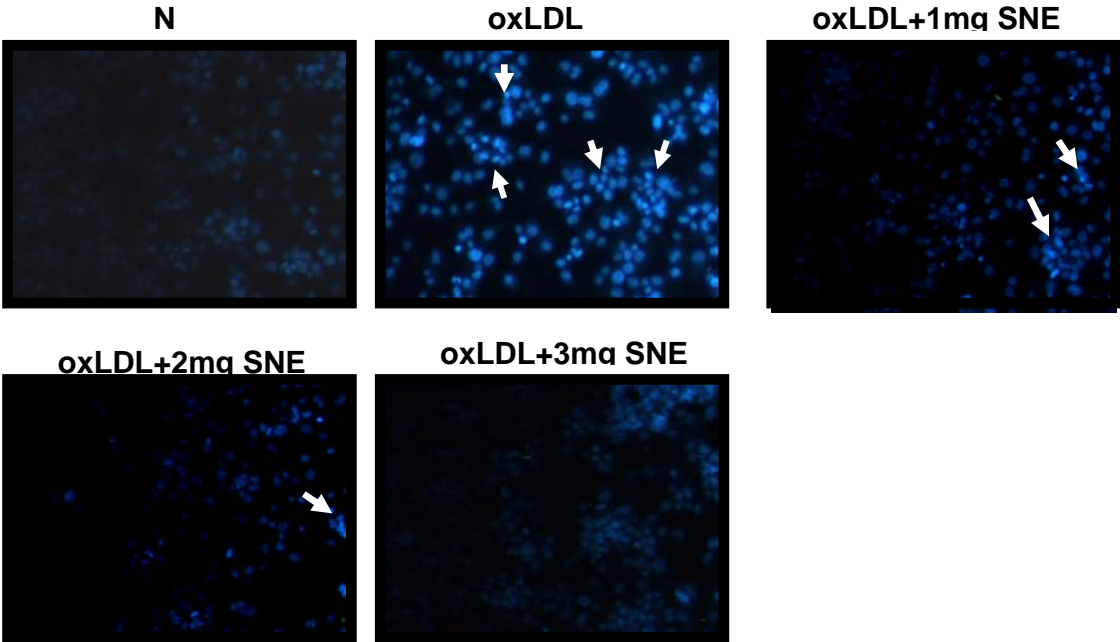
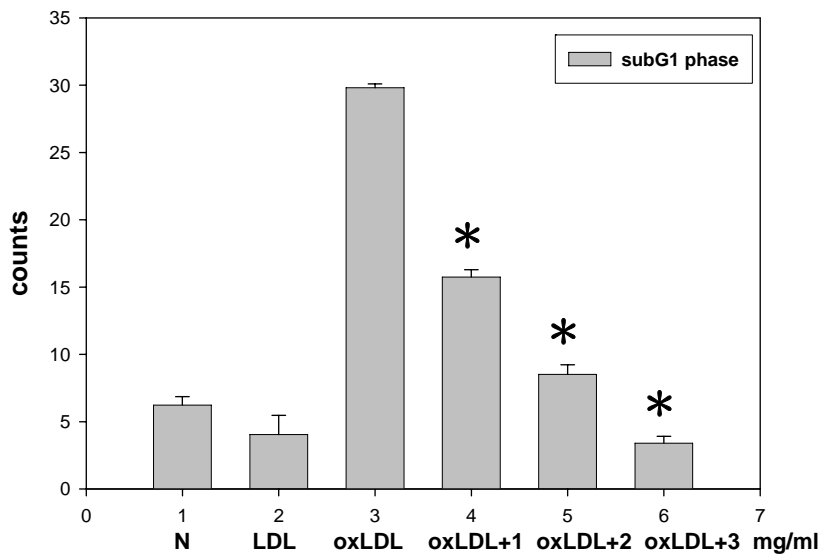
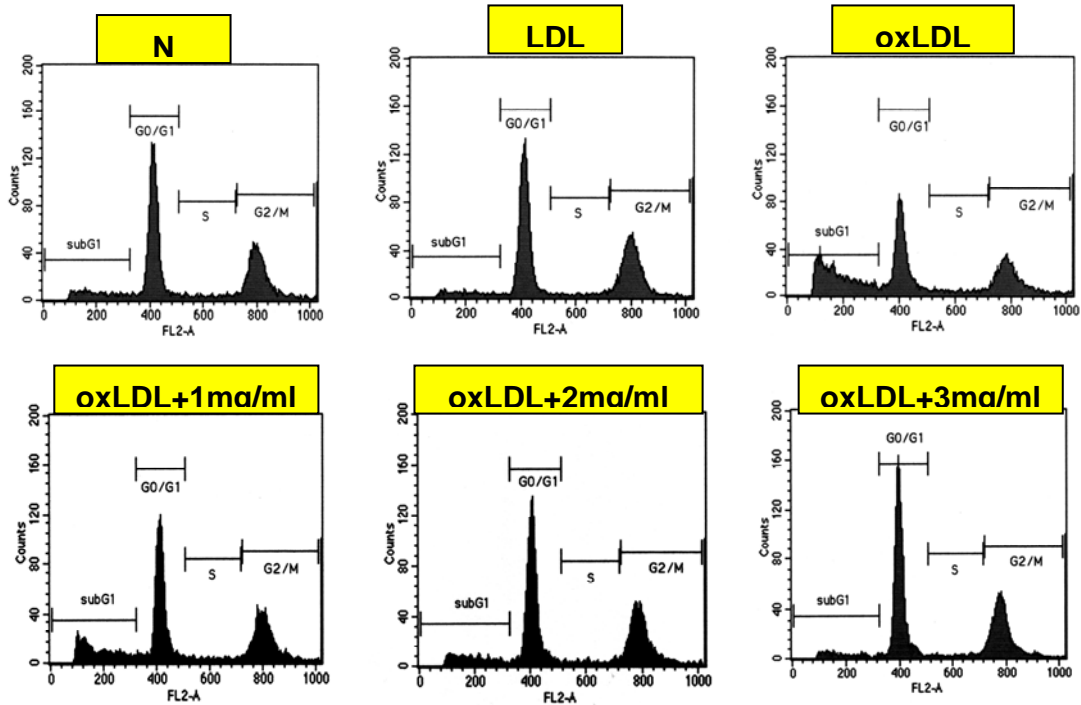


Figure 3. subG1 analysis of SNWE on oxLDL-induced macrophage death



*** P<0.001 compare with oxLDL**

Figure 4. Extrinsic apoptotic molecules of SNWE on oxLDL-induced apoptosis

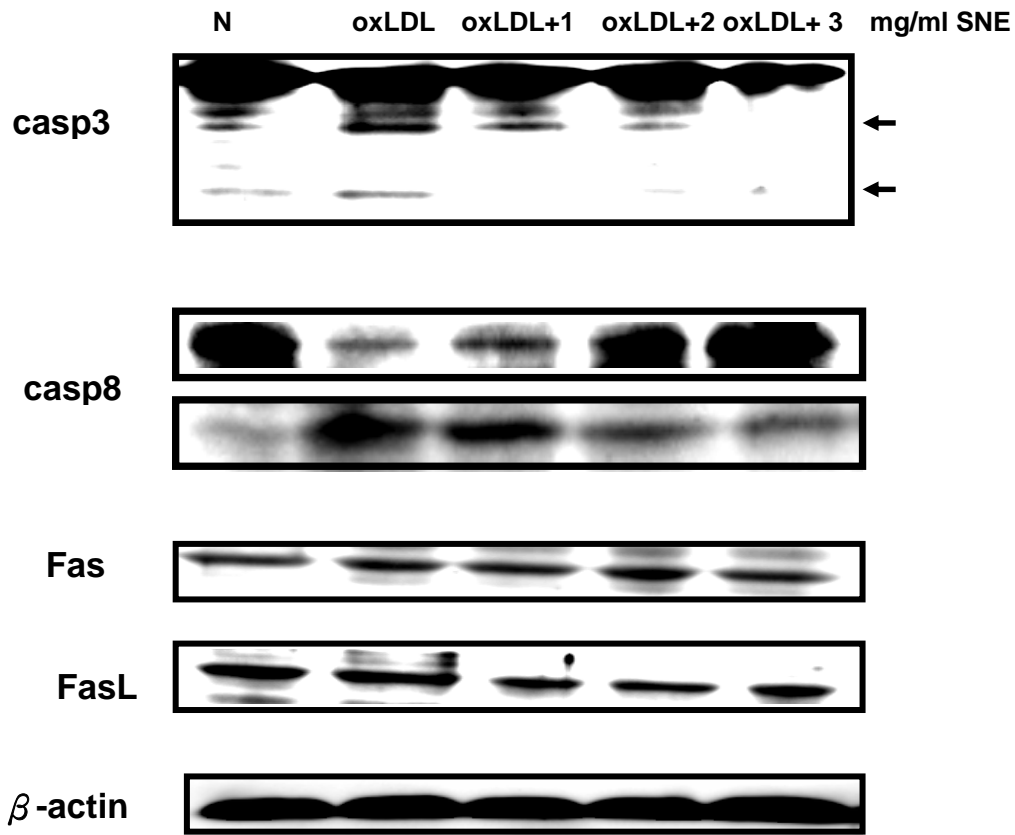


Figure 5. Intrinsic apoptotic molecules of SNWE on oxLDL-induced apoptosis

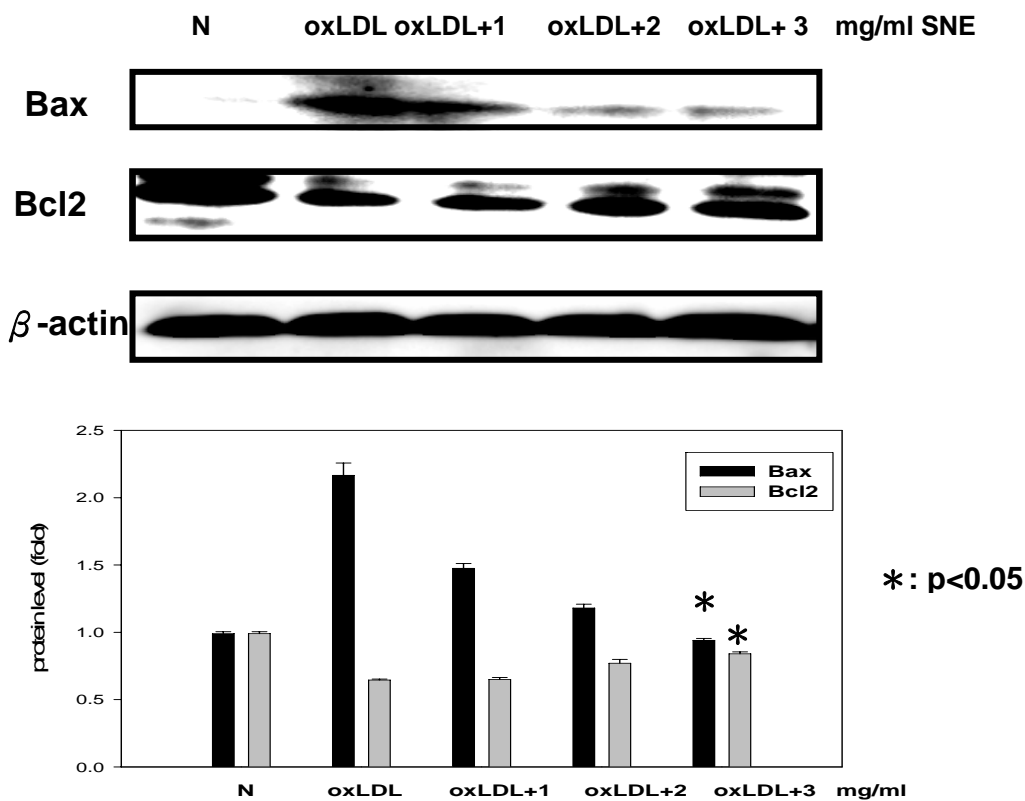


Figure 6. The inhibitory effect of SNPE on oxLDL-induced macrophage death

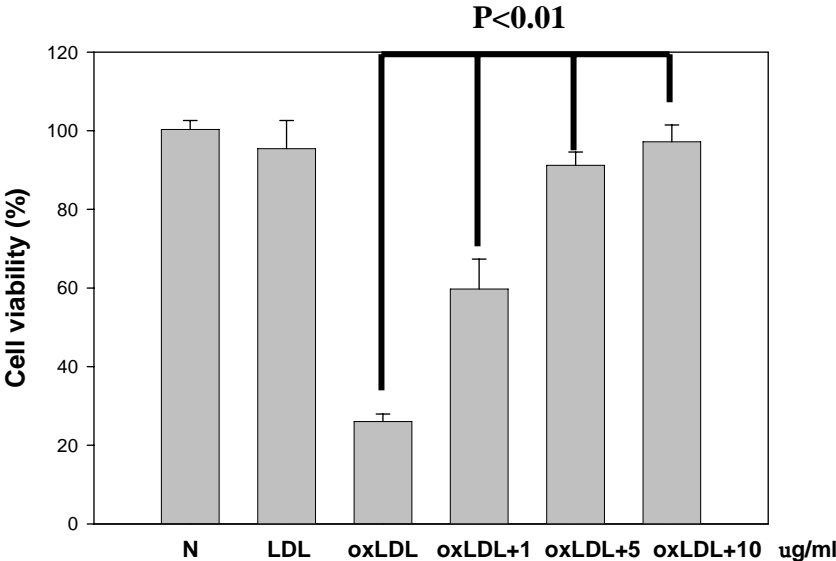


Figure 7. DNA fragmentation of SNPE on oxLDL-induced macrophage death

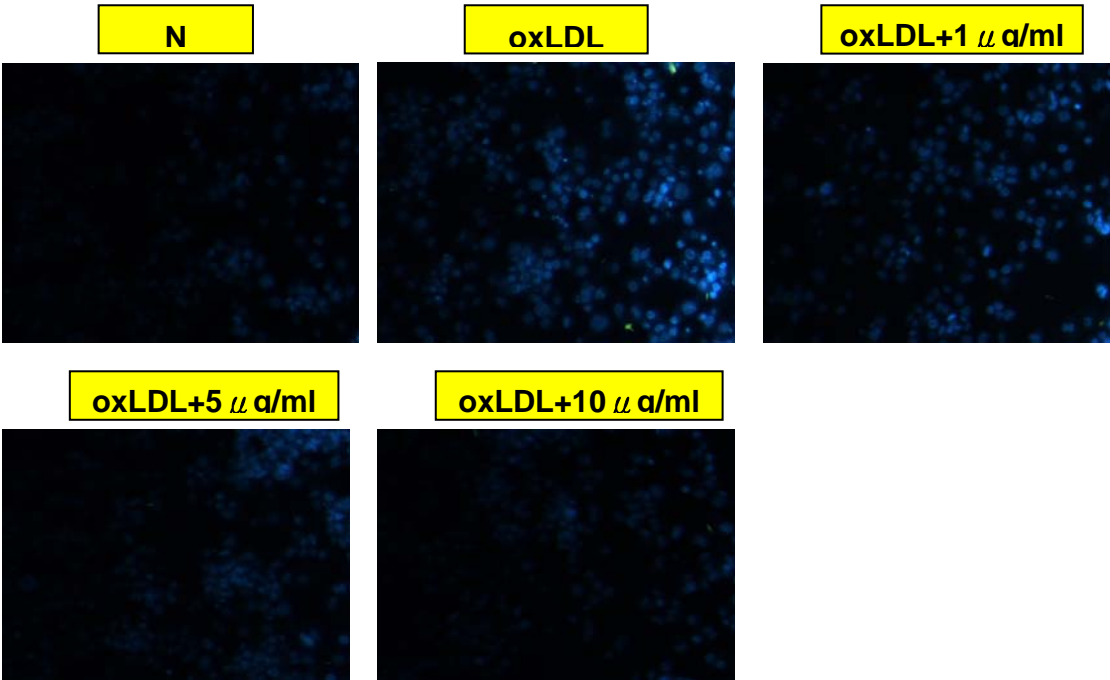
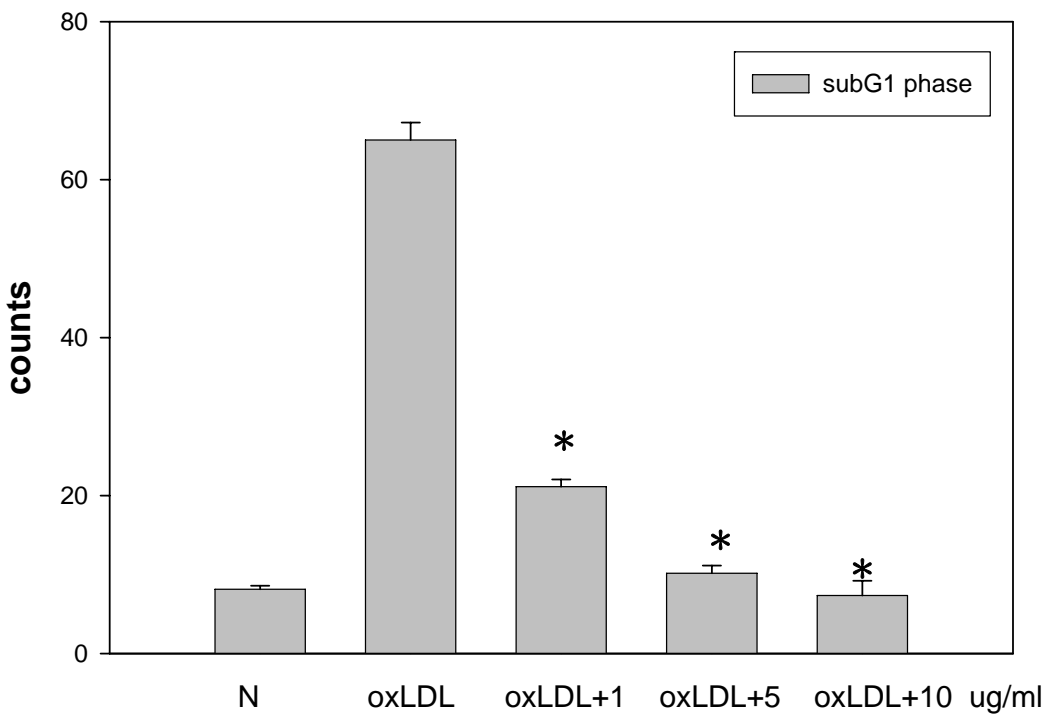
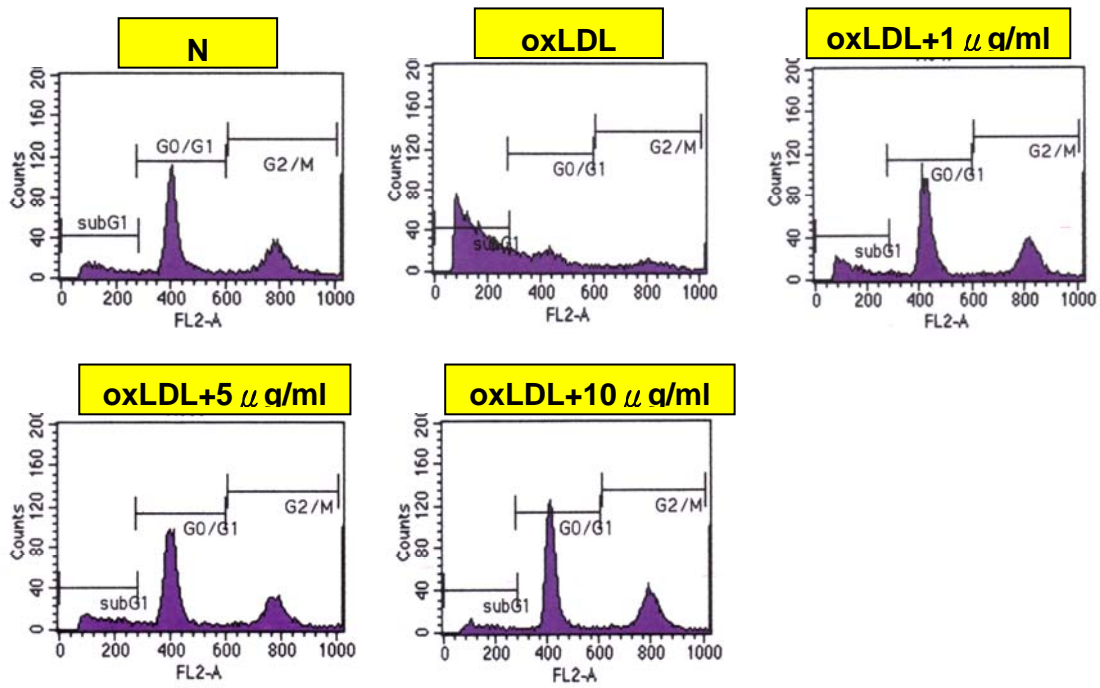


Figure 8. subG1 analysis of SNPE on oxLDL-induced macrophage death



*** P<0.001 compare with oxLDL**

Figure 9. Extrinsic apoptotic molecules of SNPE on oxLDL-induced apoptosis

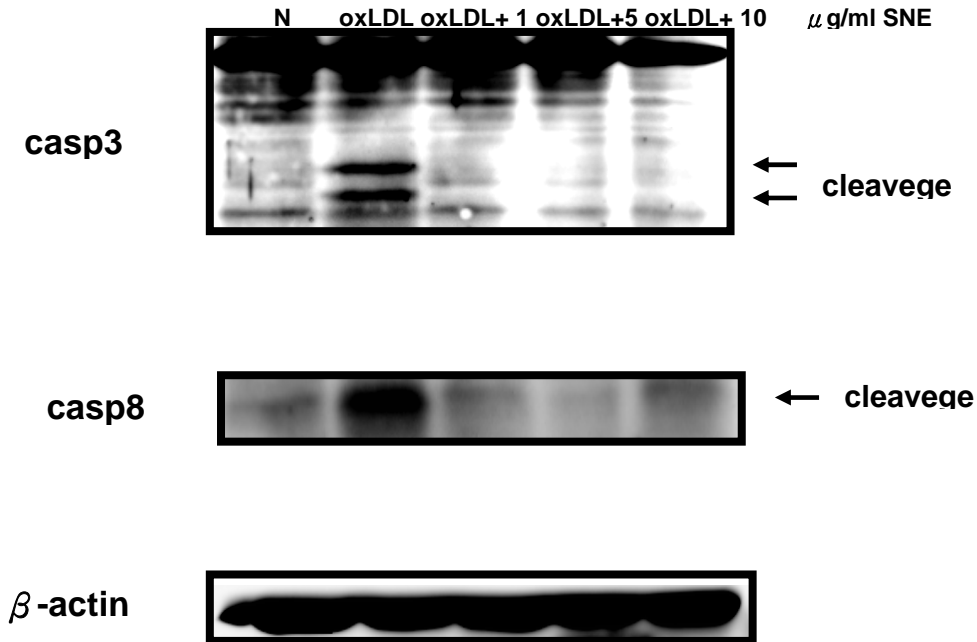


Figure 10. Intrinsic apoptotic molecules of SNPE on oxLDL-induced apoptosis

