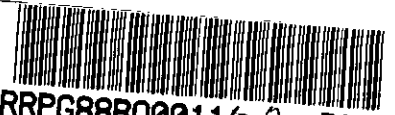


計畫編號：DOH88-CM-039

PG88B0-0011



RRPG88B00011(01).P)



行政院衛生署八十八年度委託研究計畫

厚朴及澤瀉抗動脈粥狀硬化之研究

委託研究成果報告

執行機構：私立中國醫藥學院

計畫主持人：吳介信

執行期限：87年1月1日至88年6月30日

本研究報告僅供參考用，不代表本署意見

目 錄

	頁碼
(一) 封面	1
(二) 目錄	2
(三) 中文摘要.....	3
(四) 英文摘要.....	5
(五) 前言.....	7
(六) 材料與方法.....	9
(七) 結果.....	13
(八) 討論.....	16
(九) 結論與建議.....	19
(十) 參考文獻.....	20
(十一) 圖 1-4.....	23
(十二) 表 1.....	27
(十三) 自我評估表計畫目的.....	28

厚朴及澤瀉抗動脈粥狀硬化之研究

吳介信

中國醫藥學院醫學系藥理學科

摘要

中藥在心臟血管的保健方面，一直以來皆有相當卓越的作用，然而大部分這些藥物的分子作用機轉仍是未知。如果我們能深入的瞭解其作用機轉，那麼這些中藥製劑在一些疾病上所扮演的角色就能更清楚的定位。臨床上，粥狀動脈硬化一直是引起許多心血管疾病的主因。由於低密度脂蛋白的氧化反應是造成粥狀動脈硬化中泡沫細胞形成的主要步驟，而氧化這一脂蛋白的過氧化離子會被超氧歧化酵素(SOD)給清除掉，所以本計畫的研究便來探討中藥厚朴提取物 Honokiol 和 Magnolol 的抗氧化作用是否經由活化超氧歧化酵素的基因表達。而低密度脂蛋白接受器是負責低密度脂蛋白的清除，所以我們便從低密度脂蛋白接受器的基因表達來探討另一中藥的提取物澤瀉之降血

脂的作用。實驗的結果顯示兩種厚朴的主成份 Honokiol 和 Magnolol，在 10nM 到 100 μ M 的濃度區間內，對於 SOD-RNA 的基因表達呈現一個濃度依附性的增強作用。而對於 SOD 的蛋白質表達程度上，10 μ M 的 Honokiol 明顯高於 1 μ M 和 0.1 μ M 的 Honokiol 的作用；Magnolol 則不論是在 10 μ M、1 μ M 或是 0.1 μ M 的濃度上，對於 SOD 蛋白質的表達雖有加強的作用，卻沒有程度上的差異。這一結果顯示 Honokiol 和 Magnolol 對於 SOD 的基因表達在 translation 的階段上有不一樣的作用程度。至於澤瀉的降血脂作用，則是在高濃度(100 μ g/ml 和 10mg/ml)的處理下，對於低密度脂蛋白接受器 RNA 的表達有明顯的增強作用。在這些體外實驗數據的證實下，我們亦觀察到餵食 10 週含有 1mg/kg 和 10mg/kg 的厚朴澤瀉膽固醇飼料的兔子，其粥狀動脈硬化的程度有明顯下降的趨勢。這些體內及體外的實驗結果均顯示中藥的厚朴和澤瀉，對於改善因高膽固醇飼料所引起的粥狀動脈硬化應有良好的預防作用，值得進一步探討應用在人體抗粥狀動脈硬化的可行性。

關鍵詞：粥狀動脈硬化；低密度脂蛋白；超氧歧化酵素；澤瀉；厚朴

The antiatherogenic effects of Magnolol and Alismatis Rhizoma

Chieh-Hsi Wu

China Medical College

ABSTRACT

Chinese medicine has been widely used in protecting cardiovascular function; however, most of the molecular mechanisms remained to be elucidated. It was believed that the mechanisms of these drugs could be related to the antioxidization and lipid lowering effects. Two Chinese medicine, *Magnolia Officinalis* and *Alismatis Rhizoma*, have been regarded as an antioxidant and a lipid lowering agent, respectively. We therefore aimed in this study to elucidate the roles of these drugs in protecting cardiovascular functions. Atherosclerosis has been known to be a key injury to elicit cardiovascular diseases. Formation of atherosclerosis is mainly resulted from accumulation of foam cells which were formed by macrophage stuffed with excessive oxidized LDL. Since SOD is a very potent enzyme to scavenge superoxide anions which may aggravate LDL oxidization, it would be rational to look into the relationship between *Magnolia Officinalis* and SOD gene expression. LDL receptors are believed to clean excessive plasma cholesterol. We therefore assumed that the gene expression of LDL receptor can be upregulated by *Alismatis Rhizoma*. Honokiol and Magnolol, two pure compounds of *Magnolia Officinalis*, were tested for their effects on SOD gene expression. We found that the RNA levels of SOD was increased by Honokiol and Magnolol in a dose-dependent manner. The SOD RNA level was increased by 100 μ M of Honokiol for 7 folds as compared to 10 nM while 10 folds by 100 μ M of Magnolol in comparison to 10 nM. Regarding the protein levels of SOD, three tested concentrations of Honokiol and Magnolol were shown to

potentiate the protein expression as compared to the controls. While 10 μ M of Honokiol was more potent than 0.1 μ M of Honokiol, no differential effects on SOD protein expression by 10 μ M, 1 μ M or 0.1 μ M of Magnolol were noticed, suggesting the different effects of these two compounds on translational efficiency of SOD. The lipid lowering effects of *Alismatis Rhizoma* were shown by increasing LDL receptor RNA expression levels in a dose-dependent manner. We finally applied these compounds to feed hypercholesterlemic rabbits and evaluated the antiatherosclerotic effects. With Sudan IV staining, we found that these compounds can significantly reduce atherosclerotic lesions on rabbit aorta. Based on these preliminary results, we believe that these Chinese medicine can be effective in preventing atherosclerosis formation. Further evaluation for the clinical application of these medicine on human subjects may benefit those who are suffered from cardiovascular diseases.

Key Words: atherosclerosis, SOD , Honokiol, Magnolol, *Alismatis*

Rhizoma

壹、前言

背景資料：

粥狀動脈硬化的形成是導致心臟血管疾病的一個非常重要的因子。粥狀動脈硬化形成的機轉主要是由於暴露在高血脂環境下的血管內皮下細胞，因破壞性的刺激和癒合性的反應啟動泡沫細胞的過度堆積所引起的(1)。粥狀動脈硬化一般好發於血管的分枝和轉彎處，主要是因為在這些部位由於血行動力的減緩而啟動了引起粥狀動脈硬化的訊號傳導路徑(14, 15, 16)。低密度脂蛋白(LDL)的血中含量是除了血行動力的因素外，形成粥狀動脈硬化的另一個非常重要的因子(2, 17, 18, 19)。在高血脂環境下，低密度脂蛋白極易穿過血管內皮細胞而受到活性氧的作用變成氧化的低密度脂蛋白(20)。氧化的低密度脂蛋白會被巨噬細胞(Macrophage)給吞噬而使得巨噬細胞轉變成泡沫細胞(foam cell)，逐漸累積在血管壁上的泡沫細胞最後就形成動脈粥瘤(Atheroma)。在正常的情況下，低密度脂蛋白是不會被巨噬細胞給吞噬的，只有被氧化的低密度脂蛋白才會被吞噬。在巨噬細胞上負責吞噬低密度脂蛋白的接受器和肝臟細胞的低密度脂蛋白的接受器不一樣，肝臟細胞的接受器在汲取一定的低密度脂蛋白後即停止作用，但是巨噬細胞上的接受器則無止境的吞噬低密度脂蛋白終而變成泡沫細胞。這時如果單核細胞和低密

度脂蛋白繼續的供應，則泡沫細胞會持續的產生，再加上氧化的低密度脂蛋白本身的細胞致毒性和血管平滑肌所分泌的膠原質 (Collagen)，這些泡沫細胞終而壞疽致纖維性塊狀物的產生，而導致粥狀動脈硬化。

臨床上用來預防或是改善粥狀動脈硬化的藥物或是效果不彰、或是副作用太大，尋找一個有效又安全的製劑是目前防治因粥狀動脈硬化所造成心血管疾病的一個重要研究方向。中藥在傳統醫學上一直被認為能有效且安全地調整體質，改善疾病，所以在治療粥狀動脈硬化形成的方面，本計畫便朝中藥研發的方面著手。在其他實驗室的研究報告指出，我們得知粥狀動脈硬化的形成主要是由於低密度脂蛋白的氧化所引起，所以我們即針對具有降血脂或是抗氧化的中藥來篩選具有改善粥狀動脈硬化的藥物。Honokiol 和 Magnolol 是中藥厚朴 (*Magnolia Officinalis*) 的主要成份，研究報導曾指出他們對於降低心臟堵塞面積和改善心室性的心律不整都有相當好的成效(3)。在另一缺血再灌流的實驗中發現，因 Honokiol 和 Magnolol 所產生的抗心律不整作用會被 Nitric Oxide (NO) 的拮抗劑 NO-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 給抑制住 (4)，所以 Honokiol 和 Magnolol 的部份作用機轉應和 NO 的傳導路徑有某種程度的關聯。儘管如此，Honokiol 和 Magnolol 的真正藥理機轉仍無

法確知，一般認為他們的過氧化離子自由基清除能力應扮演一個重要的角色(5)。由於超氧歧化酵素(Superoxide Dismutase, SOD)對於過氧化離子的清除有著相當程度的作用(6, 7, 8)，本篇研究即針對 Honokiol 和 Magnolol 與 SOD 之間的關係做一深入的探討。

在先前的實驗中，發現澤瀉(*Alismatis Rhizoma*)能有效的降低老鼠血中的總膽固醇和低密度脂蛋白的含量(9, 10)，同時高密度脂蛋白的含量亦被明顯的提高。研究報告指出，體內的高膽固醇通常會增加低密度脂蛋白接受器的數量(11, 12)，這可能是體內為了要清除這些過量的膽固醇所作的代償性反應。為了要進一步了解澤瀉的藥理作用，本計畫亦利用分子生物的技术來探討澤瀉是否影響低密度脂蛋白接受器的基因表達而產生其降血脂的作用。本研究計畫的主要目的即在於利用這兩種中藥之抗氧化及降血脂的作用，進而評估對於粥狀動脈硬化的改善效果。

貳、材料與方法

一，利用肝細胞的組織培養來定性 Honokiol 和 Magnolol 的抗氧化作用。

A. 肝細胞之培養及處理

將肝癌細胞株培養到 90% confluency 時，以含有 1 mmole/l

L-arginine, 1 $\mu\text{mol/l}$ insulin, 15 mmol/l HEPES, pH7.4, penicillin, streptomycin, and 10% heat-inactivated low endotoxin fetal calf serum (FCS)的新鮮組織培養液取代舊有的培養液，並加入 50 $\mu\text{g/ml}$ 的 lipopolysaccharide (LPS)，繼續在含有 95% O_2 和 5% CO_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 培養箱中培養 24 小時，以降低細胞內生性的 SOD 濃度(13)。我們在各組之組織培養液中加入 10nM 到 100 μM 等五種不同濃度的 Honokiol 和 Magnolol，藉以探討這兩種厚朴之主成份對於 SOD 之基因表達的影響。

B. 粹取肝細胞中之蛋白質以進行抗 SOD 之免疫轉漬實驗

肝細胞在加入 Honokiol 和 Magnolol 的培養後，以含有 β -glycerophosphate, 20 mM HEPES, pH 7.5, 100 μM sodium vanadate, 2mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 2 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 30 mM PMSF, 100 mM sodium fluoride, and 1 mM DTT buffer containing 的緩衝液來溶解培養之肝細胞。將定量過後的蛋白質通過 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)以分離不同分子重量的蛋白質，隨即轉漬到 nitrocellulose 的膜上並用 Ponceau S 染色以利目視不同分子量的蛋白質。這張轉漬膜用水清洗數次以去染色後，隨即浸泡十分鐘在含有 0.2%

Tween-20 and 2% bovine serum albumin (BSA) 的 PBS 緩衝液中。這時將抗 SOD 之抗體加入上述之 PBS 緩衝液中以結合在轉漬膜上的 SOD 蛋白質。這張轉漬膜隨後經過數次含有 0.2% Tween-20 and 2% bovine serum albumin (BSA) 的 PBS 緩衝液清洗後，利用 ECL 測定系統(Amersham, Arlington Height, IL, USA)中的 goat anti-mouse IgG-HRP 來定量經由不同處理之後的 SOD 蛋白質含量，藉此評估 Honokiol 和 Magnolol 是否能改變 SOD 蛋白質的基因表達。另一組同樣處理的細胞，則以細胞溶解緩衝液抽取 RNA，以 RT-PCR 來測定這兩種成份對於 SOD 基因表達的影響，所用順向引子為 5'-GATGGTGTGGCCGATGTGTCAT-3'，反向引子為 5'-TTCTACAGCTAGCAGGATAACA-3'，反應所得產物之大小為 252bp。

二，以 RT-PCR 來評估澤瀉是否能夠改變肝細胞中低密度脂蛋白接受器的基因表達。

將肝細胞培養到密度達到 90% confluency 時，再以含有 1 mmole/l L-argine, 1 μ mol/l insulin, 15 mmol/l HEPES, pH7.4, penicillin, streptomycin, and 0.5% heat-inactivated low endotoxin fetal calf serum (FCS) 的新鮮組織培養液取代舊有的培養液。然後將細胞培養液換成含有 10% 胎牛血清的培養液。

以降低內生性低密度脂蛋白接受器的基因表達。隨後，在肝細胞之培養皿中加入 1 μ g/ml， 10 μ g/ml， 100 μ g/ml， 1mg/ml 等四種不同濃度的澤瀉，再以細胞溶解緩衝液抽取 RNA，以 RT-PCR 來測定這一中藥對於低密度脂蛋白接受器基因表達的影響，所用順向引子為 5'-GCACGAGGTCAGGAAGATG-3'，反向引子為 5'-GCCCTTGGTATCCGCAACAG-3'，反應所得產物之大小為 298bp。

三，利用動物模型來評定含有厚朴及澤瀉的飼料是否能有效改善粥狀動脈硬化的形成。

六十隻紐西蘭純種白兔分別以含正常飼料，1%的膽固醇或是厚朴和澤瀉的混合飼料餵食 10 個禮拜。兔子共分成六組，每組有 10 隻兔子：對照組一的 10 隻兔子餵食正常飼料；對照組二的 10 隻兔子餵食含有 1% cholesterol 的飼料 10 週；實驗組一至四組分別餵食含有 1% cholesterol 和四種不同濃度的厚朴和澤瀉的混合飼料 10 週。在餵食過程中，每隔兩週抽 5ml 的血液樣本以供膽固醇含量之測定。總脂蛋白內膽固醇含量測定法是依據膽固醇測試組合試劑所提供之方法(台北泰達有限公司)，以微量吸管分別吸取 0.1ml 的未知檢品，標準檢品，空白檢品(去離子水)，各加入 5ml 之呈色劑並混勻，靜置於室溫 20 分鐘後，以分光光譜儀在 630 nm 的波長下比

色，先以空白檢品歸零，再測標準檢品及未知檢品，以 Libermann Burchard Reaction 之方程式計算，即可測得總脂蛋白內膽固醇之含量。

在膽固醇餵食終了之後將紐西蘭純種白兔用 Pentobarbitol (Nembutal sodium, Abbott Laboratories; 50 mg/kg) 麻醉後，取出位於動脈弓至腸動脈間的主動脈，以生理食鹽水清洗血漬後並去除血管周圍的結締組織，隨即以 Sudan IV 的甲醇試液進行染色，有粥狀動脈硬化的部份將呈現紅色的反應。將呈現紅色的粥狀動脈硬塊面積比上全部血管的面積即為血管形成粥狀動脈硬化的程度，而這一比值的改變即為藥物處理後改善粥狀動脈硬化的效價。

參、結果

本篇研究計畫的主要目的在於了解中藥提取物之分子藥理機轉，期能研發出可以抗粥狀動脈硬化的中藥製劑。以下為本計畫實驗結果之簡述：

第一，利用肝細胞的組織培養來定性厚朴之主成份和澤瀉的抗氧化作用。

在這個工作項目中，我們從分子生物方面來探討 Honokiol，Magnolol 和澤瀉對於負責清除自由基之超氧歧化酵素的基因表達的影響。我們假設 Honokiol，Magnolol 和澤瀉的抗氧化作用是藉由清

除過多的過氧化離子，而超氧歧化酵素在這方面扮演一個非常重要的角色，所以我們預期這三種藥物作用在肝細胞的組織培養上應會增加超氧歧化酵素的蛋白質及基因表達。圖一所表示的是五種不同濃度的 Honokiol 和 Magnolol 對於 SOD 之 RNA 表達能力的影響。利用 RT-PCR 的方法，以 SOD 的高專一性之引子來探討 SOD 之片段 DNA(252bp)的含量受到這些藥物的作用。結果顯示，Honokiol 和 Magnolol 對於 SOD 之 RNA 表達能力均呈現一個濃度依附性的關係。100 μ M 的 Honokiol 對於 SOD 的基因表達能力大約為 10nM 的 7 倍，而 100 μ M 的 Magnolol 對於 SOD 的基因表達能力則約為 10nM 的 10 倍，顯示 Honokiol 和 Magnolol 對於這一超氧歧化酵素的基因表達均有加強的作用。圖二則表示 Honokiol 和 Magnolol 對於超氧歧化酵素的蛋白質表達有著促進的作用。在這個實驗當中，我們發現 10 μ M 的 Honokiol 比 1 μ M 和 0.1 μ M 對 SOD 蛋白質表達能力有較強的作用。利用光學密度分析儀的檢測，10 μ M 的 Honokiol 對 SOD 蛋白質表達能力相較於 0.1 μ M 和 1 μ M 約有 1 至 3 倍的增加。至於 Magnolol 雖然相較於正向對照組而言，亦明顯的促進蛋白質表達，然而這一增加並沒有濃度依附性的關係。以上實驗結果顯示，厚朴的兩個主要成份 Honokiol 和 Magnolol 不僅對 SOD 的 RNA 有增強表達的作用且能促進其蛋白質的轉錄，顯示厚朴的抗氧化作用與 SOD 的基因表達有相

當密切的關係。

第二，利用肝細胞來評估是否澤瀉能改變低密度脂蛋白接受器的基因表達。

在這個工作項目中，我們將探討澤瀉之所以能降低血中脂肪過多的分子藥理機轉。一般而言，能降低血脂肪的機轉有很多，其中增加低密度脂蛋白接受器在肝細胞的數量是相當有效率的機轉之一。因此，我們預期在澤瀉的作用下，負責管制這個接受器蛋白質表達的基因應會增加。我們利用組織培養的肝細胞來粹取其中之蛋白質以進行抗低密度脂蛋白接受器之免疫轉漬實驗。實驗結果顯示，利用低密度脂蛋白接受器免疫抗體的染色，並未顯示澤瀉會增加這些接受器的數量。然而利用 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 的分析，發現澤瀉對於低密度脂蛋白接受器之 RNA 的作用呈現一個濃度依附性的正向關係 (圖三)。雖然 1mg/ml 和 100 μ g/ml 的澤瀉對於 SOD 之 RNA 的表達比 15% serum 的刺激作用還強，但較低濃度的 10 μ g/ml 和 1 μ g/ml 澤瀉對於 SOD 之 RNA 的表達則顯然較沒有影響。而這一表達程度的改變並不是由於在 RT-PCR 操作之初因為 RNA 的加量不同所產生，因為藉由 GAPDH 這一個基本上不受外在因素影響的基因表達，可發現每一組藥物處理之細胞所抽出的 RNA 含量都非常接近，表示低密度脂蛋白接受器及 SOD

的基因表達應是受藥物的作用而有所改變。

第三，利用動物模型來評定厚朴及澤瀉是否能有效抗粥狀動脈硬化的形成。

兔子在餵食 10 周的膽固醇之後，取出主動脈作 Sudan IV 染色，結果顯示有明顯的粥狀動脈硬化形成，而沒有餵食膽固醇的白兔主動脈則表面光滑，沒有任何紅色的粥狀動脈硬塊產生。圖四顯示沒有餵食膽固醇的光滑血管表面，餵食膽固醇的白兔之主動脈則有相當嚴重之粥狀動脈硬塊產生，而餵食含有 0.10mg/kg 及 1mg/kg 厚朴及澤瀉的膽固醇混合飼料並沒有明顯的改善動脈硬化的現象，而 10mg/kg 及 100mg/kg 的膽固醇混合飼料則明顯的縮小因長期餵食膽固醇所產生的粥狀動脈硬化面積。在表一中所表示的是含有 0.10mg/kg, 1mg/kg, 10mg/kg 及 100mg/kg 厚朴及澤瀉的膽固醇混合飼料對於降低血中總膽固醇含量的作用。

肆、討論

本篇計畫的主要目的，在於探討如何利用中藥製劑來改善粥狀動脈硬化的形成。我們已知粥狀動脈硬化的形成主要是因為過多的低密度脂蛋白被過度的氧化後，造成泡沫細胞堆積在血管內皮下層

細胞中。所以在篩選改善粥狀動脈硬化的中藥過程，找尋具有抗氧化或降血脂的藥物便成了一個相當重要的研究方向。藥物抗氧化的機轉有許多不同的路徑，包括直接清除自由基或是間接的活化自由基的代謝酵素，進而降低在心血管系統中的氧化作用。在本計畫中，我們選擇探討一特定的自由基代謝酵素，超氧歧化酵素，來評估厚朴及澤瀉對於抗氧化的作用。倘若這些中藥提取物能活化這一超氧歧化酵素，那麼體內過量的過氧化物便能有效的被代謝掉，從而減少脂肪被氧化的機會，對於粥狀動脈硬化的形成應有一定的保護作用。在研究厚朴及澤瀉對於超氧歧化酵素的影響，我們從兩方面來探討，一是 RNA 的表達量，另外一方面則是蛋白質含量的測定。在之前的敘述中，我們提到兩個厚朴的主成份 Honokiol 和 Magnolol 都能有效的增加 SOD 的 RNA 表達，而這一作用是呈現與濃度有正相關性的作用。這一結果顯示具有抗氧化作用的厚朴極可能是，即使不是全部，藉由影響超氧歧化酵素的基因表達。為了進一步了解厚朴的分子機轉，我們亦分析了超氧歧化酵素的蛋白質含量是否因這兩種成份的作用而增加。利用了西方免疫轉漬分析，我們發現 Honokiol 和 Magnolol 皆明顯的增加超氧歧化酵素的蛋白質含量，然而這一增加並非一致性的作用。Honokiol 在高濃度時對於蛋白質含量增加有較明顯的作用甚至於是高過於同劑量的 Magnolol。而在

本實驗中所使用的三種 Magnolol 濃度雖都能增加超氧歧化酵素的蛋白質含量，但並沒有因為不同濃度而有差異性的影響。這可能是由於 Magnolol 的作用已達高原期，進一步的實驗應從更低的濃度來研究，是否 Magnolol 對於超氧歧化酵素的蛋白質表達有濃度依附性的關係。

本計畫的另一個研究方向是來探討澤瀉是否具有抗粥狀動脈硬化的作用。在先前的實驗中，澤瀉被認為能降低大鼠的血中膽固醇含量，在兔子的動物實驗中，我們亦測試在長期餵食膽固醇之後，澤瀉能有效降低血中膽固醇的含量，然而其降血脂的機轉至今仍未完全的被了解。我們已知血中膽固醇的清除有大部份是經由細胞中的低密度脂蛋白接受器的吞噬，由其是肝臟細胞，所以為了探究澤瀉的分子機轉，我們以澤瀉處理的肝細胞後，抽取其 RNA 以探討低密度脂蛋白接受器的基因表達是否受到影響。從 RT-PCR 的實驗結果中，我們得知高劑量的澤瀉(100 μ g/ml 和 1mg/ml)能產生比 15% Serum 還要強的刺激作用，反觀低劑量的澤瀉(10 μ g/ml 和 1 μ g/ml)對於低密度脂蛋白接受器的基因表達卻只有些微的影響，這一濃度依附性的關係說明了低密度脂蛋白接受器的基因表達極有可能是澤瀉降血脂的一個機轉。

從以上的實驗中，我們得知厚朴和澤瀉對於抗氧化及降血脂

的作用，而利用這兩種特性，我們預期將這些中藥混入飼料中來餵食高血脂的兔子，應能有效的降低粥狀動脈硬化的產生。在餵食 10 週的厚朴和澤瀉的高血脂混合飼料後，將主動脈取出做粥狀動脈硬化的染色，我們發現 10mg/kg 和 100mg/kg 的厚朴和澤瀉的高血脂混合飼料能明顯降低粥狀動脈硬化的產生。這一作用正說明了抗氧化的厚朴和降血脂的澤瀉能保護粥狀動脈硬化的形成。

伍、結論與建議

為篩選能保護血管粥狀動脈硬化的中藥，並進而瞭解這些藥物的作用，我們利用直接而可靠的細胞培養來探討藥物的分子機轉。然而利用細胞培養所得到的數據卻只能用以分析藥物在單一細胞上的作用，然而這一藥物是否在體內會被代謝成其他產物而作用在目標細胞上，並無法在細胞培養上得知。所以體外細胞培養的實驗數據是提供藥物作用的初步評估，進一步探討藥物在體內的作用才能確認這藥物在臨床生理上的有效性。所以本計畫先從細胞培養方面來研究厚朴和澤瀉的分子機轉，待確認了這些藥物在細胞上的作用，而這些作用也被認為能改善粥狀動脈硬化的形成，我們便進而將這些藥物應用在患有高血脂的兔子上，來觀察是否藥物在動物體內能產生與在細胞培養中相同的機轉。實驗的結果顯示，我們在體

外的細胞培養上所探討的藥物機轉，的確發揮其抗氧化降血脂的作用而減少動脈硬塊斑的產生。雖然我們在兔子體內觀察到厚朴和澤瀉能抑制粥狀動脈硬化的形成，並不表示在人體也能產生同樣的作用，畢竟人類和兔子的生理系統仍有相當程度的差距，能否應用到臨床上的心血管病人，仍需進一步的研究。然而藉由本實驗的結果，確能提供我們開發抗粥狀動脈硬化藥物的一個動物模式，這對於縮短應用到臨床的時程，將有相當程度的助益。

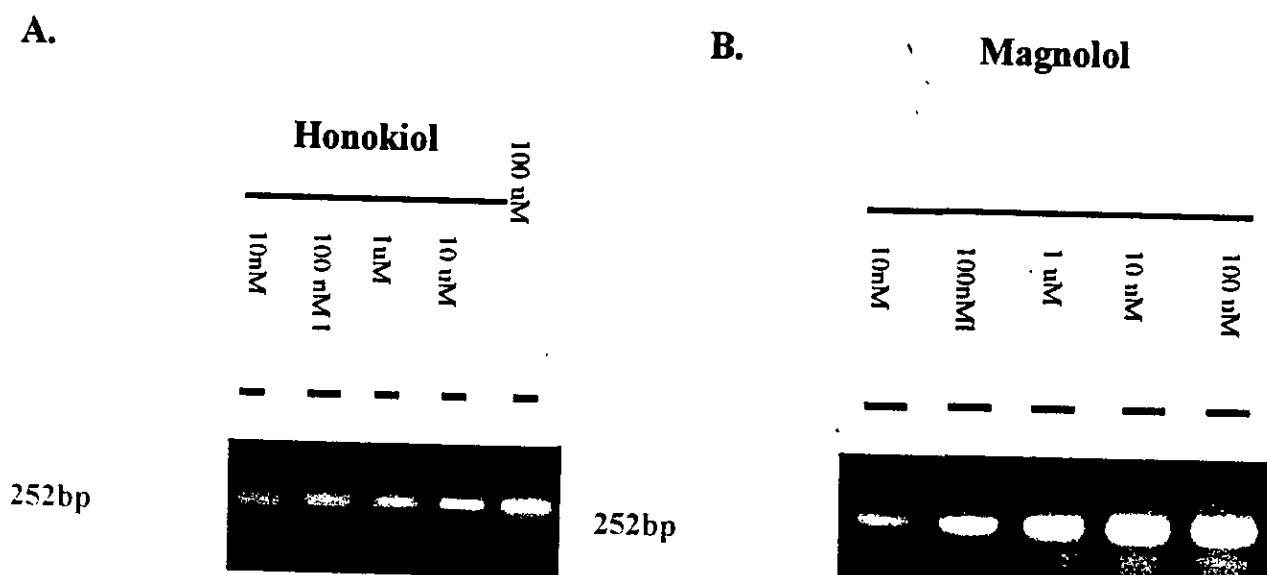
陸、參考文獻

1. Schwartz CJ. Valente AJ. Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol* 1993, 71:9B-14B.
2. Verbeuren TJ. Jordaens FH. Zonnekeyn LL. Van Hove CE. Coene MC. Herman AG. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res* 1986, 58(4):552-64.
3. Teng CM. Chen CC. Ko FN. Lee LG. Huang TF. Chen YP. Hsu HY. "Two antiplatelet agents from *Magnolia officinalis*. *Thromb Res* 1988, 50(6):757-65.
4. Chan P. Tsai SK. Chiang BN. Hong CY. Trilinolein reduces infarct size and suppresses ventricular arrhythmias in rats subjected to coronary ligation. *Pharm* 1995, 51(2):118-26.
5. Lo YC. Teng CM. Chen CF. Chen CC. Hong CY. Magnolol and honokiol isolated from *Magnolia officinalis* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. *Biochem Pharm* 1994, 47(3):549-53.

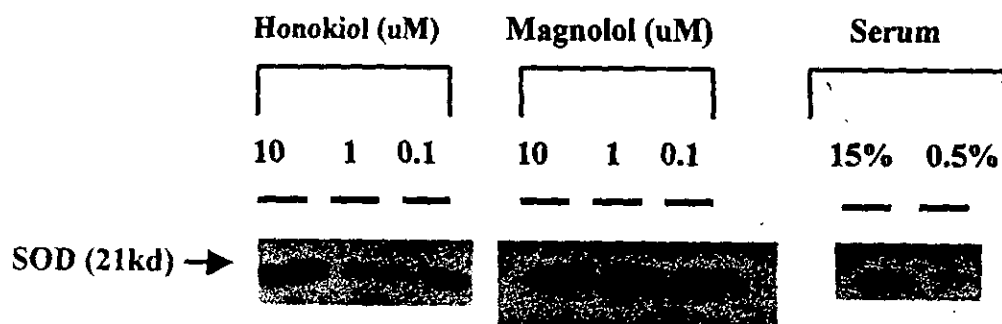
6. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Rad Bio Med* 1996, 20(7):957-65.
7. Santa Maria C, Ayala A, Revilla E. Changes in superoxide dismutase activity in liver and lung of old rats. *Free Rad Res* 1996, 25(5):401-5.
8. Liu TZ, Yang HL, Chan CP, Pan WL, Wu SK. Induction of superoxide dismutase isozymes by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide in cultured normal and hyperplastic gingival fibroblasts. *J. Form Med Asso* 1996, 95(3):236-40.
9. Chang HL, Wu CH, Chung JG, Lin WC, Chen GW, Lin JG. Antiatherogenic effect of Pou Yan Fan Wu Tan in hypercholesterolemic rat. *J Chin Med* 1998, 9 (1): 53-60.
10. Yoshikawa M,, Fukuda Y, Hatakeyama S, Tanaka N, Matsuda H, Yamahara J, Murakami N. Sulfoorientalols a, b, c, and d, four new biologically active sesquiterpenes from *Alismatis rhizoma*. *Chem Pharmaceu Bull* 1993, 41(6):1194-6,.
11. Wagner J, Thiele F, Ganten D. Transgenic animal as models for human disease *Clin Exper Hypertension* 1995, 17(4):593-605.
12. Hofmann SL, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL, Hammer RE. Overexpression of low density lipoprotein (LDL) receptor eliminates LDL from plasma in transgenic mice. *Science* 1988, 239(4845):1277-81.
13. Portoles MT, Ainaga MJ, Pagani R. The induction of lipid peroxidation by *E. Coli* lipopolysaccharide on rat hepatocytes as an important factor in the etiology of endotoxic liver damage. *Biochim Biophys Acta* 1993, 1158:287-92.
14. Cohen RA, Zitnay KM, Haudenschild CC, Cunningham LD. Loss of selective endothelial cell vasoactive functions caused by hypercholesterolemia in pig coronary arteries. *Circ Res* 1988, 63(5):903-10.

15. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *New Eng J Med* 1986, 315(17):1046-51.
16. Andrews HE, Bruckdorfer KR, Dunn RC, Jacobs M. Low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Nature* 1987, 327(6119):237-9.
17. Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990, 344(6262):160-2.
18. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1992, 90(4):1248-53.
19. Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest* 1992, 89(1):10-8.
20. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989, 83(5):1774-7.

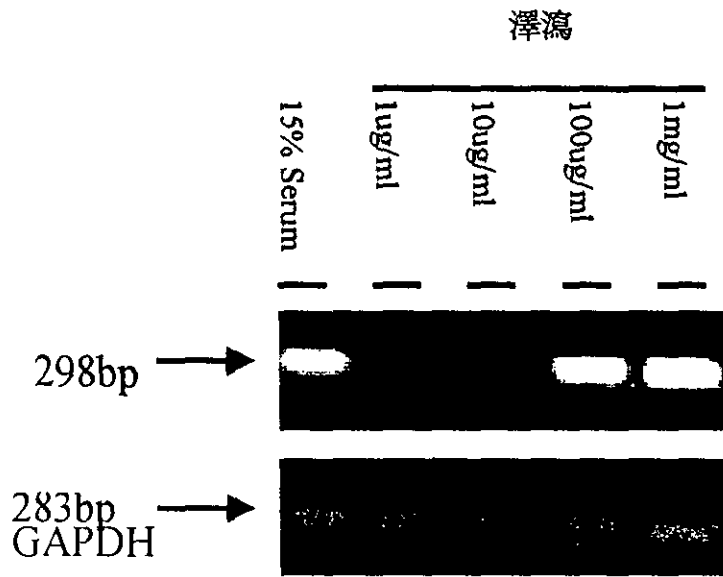
柒、圖 1-4



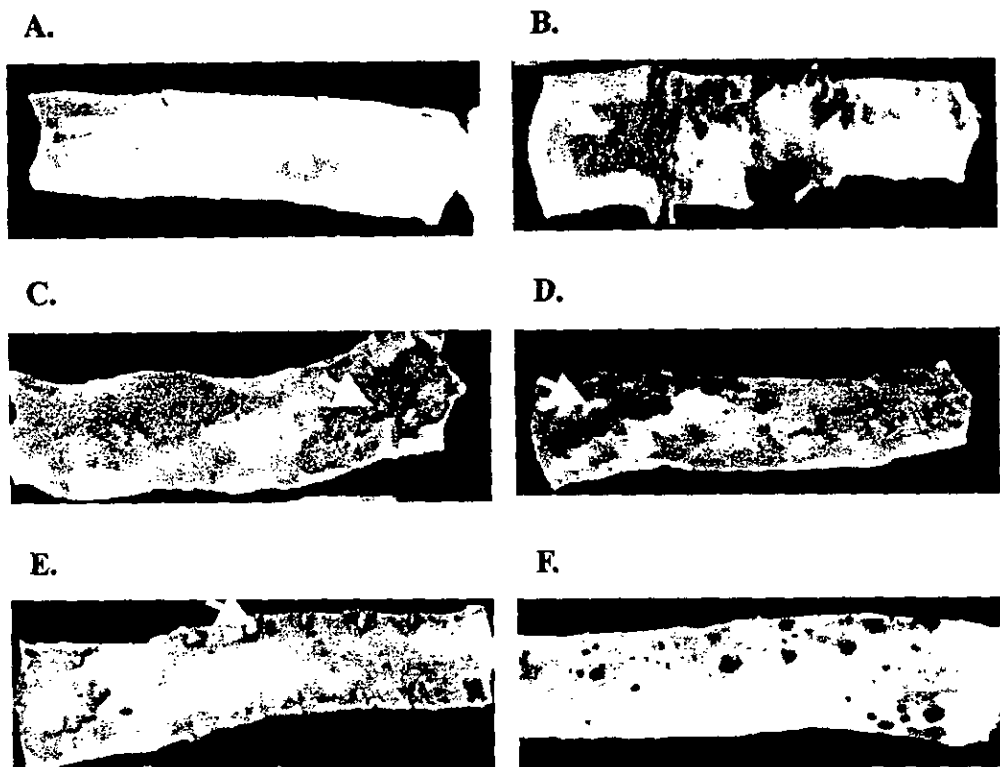
圖一：RT-PCR 的結果顯示五種不同濃度的 Honokiol 和 Magnolol 對於 SOD 之 RNA 表達能力的影響。藉由 Cu, Zn-SOD 的引子作用，35 個循環的 PCR 複製出一段 252bp 的 SOD cDNA，亮度越高表示越多的 SOD RNA 被藥物給誘發出來。



圖二，Magnolol 和 Honokiol 對於肝臟細胞超氧歧化酵素之蛋白質表達的影響。在不同濃度的處理下， $10\mu\text{M}$ 的 Honokiol 增加超氧歧化酵素之蛋白質表達最為明顯，而 Magnolol 對於肝臟細胞內的超氧歧化酵素蛋白質表達則沒有呈現一個濃度依附性的關係。圖中 15% 的 serum 和 0.5% 的 serum 分別代表正向和負向之對照組。



圖三：RT-PCR 的結果顯示四種不同濃度的澤瀉對於 LDL receptor 之 RNA 表達能力的影響。藉由 LDL receptor 的引子作用，35 個循環的 PCR 複製出一段 298bp 的 LDL receptor cDNA，亮度越高表示越多的 LDL receptor RNA 被藥物給誘發出來。15% Serum 代表 positive control。283bp 的 GAPDH 是一組內生性的對照組，代表各組所加入反應的 RNA 是等量。



圖四，厚朴及澤瀉的膽固醇混合飼料對於粥狀動脈的改善作用。A: 沒有餵食高膽固醇的兔子主動脈；B: 餵食高膽固醇的兔子主動脈，深黑色(箭頭所指)代表產生粥狀動脈硬塊斑的部位；C: 餵食 0.1mg/kg 厚朴及澤瀉的膽固醇混合飼料的兔子主動脈；D: 餵食 1mg/kg 的膽固醇混合飼料的主動脈；E: 餵食 10mg/kg 混合飼料的主動脈；F: 餵食 100mg/kg 混合飼料的主動脈。

捌、表一

表一，餵食 10 周膽固醇的兔子，在不同藥物處理之後其血中總膽固醇含量的比較，*表示和 1%膽固醇組的比較，p value < 0.05; **表示 p value < 0.01, n=10。

血中總膽固醇含量 (mg/dl)	
正常飼料組	86 ± 18
1%膽固醇組	1750 ± 365
0.10mg/kg 厚朴及澤瀉	1689 ± 253
1mg/kg 厚朴及澤瀉	1320 ± 316*
10mg/kg 厚朴及澤瀉	832 ± 192**
100mg/kg 厚朴及澤瀉	702 ± 201**