

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

綠原酸下降 IL-1 β 誘發之內皮細胞黏附因子
的表現: NF- κ B 所扮演之角色

Chlorogenic acid (CA) attenuates adhesion molecules upregulation
in IL-1 β - treated HUVECs : Role of Nuclear factor - κ B

指導教授：余雅美 (Ya-Mei Yu) 博士

研究生：陳家欣 (Chia-Hsin Chen)

日期：民國九十五年六月二十一日

中文摘要

內皮細胞表現黏附因子，以及單核球黏附於內皮細胞上，在動脈粥狀硬化過程中扮演一個重要的角色。綠原酸 (chlorogenic acid) 為一種酚酸物質，主要存在於咖啡、蘋果、梨、莓類、桃仁、朝鮮薊和茄子中，在過去的體外實驗中指出綠原酸具有抗氧化活性。而在此次實驗中，主要探討綠原酸對於 IL-1 β 所誘導人類臍靜脈內皮細胞 ROS 及黏附因子表現之影響，並且和 probucol 比較其效果。結果顯示，綠原酸抑制 LDL 氧化之 IC₅₀ 為 3.1 \pm 0.4 μ M，而 Probucol 之 IC₅₀ 值為 5.5 \pm 0.7 μ M；綠原酸清除 DPPH 自由基之 IC₅₀ 值約為 36.3 \pm 2.7 μ M，而 Probucol 之 IC₅₀ 值約為 41.8 \pm 3.1 μ M。藉由同步定量聚合酶鏈反應發現，綠原酸可降低 IL-1 β 所誘導之 VCAM-1, ICAM-1 及 E-selectin 之 mRNA 表現，且抑制效果隨劑量增加而增強。綠原酸也能減少 IL-1 β 所誘導之細胞中 ROS。同時發現綠原酸可減低或阻斷 IL-1 β 所誘導之核轉錄因子 NF- κ B P50, P65, P52, Rel-B, C-Rel 的活化，亦表示綠原酸降低黏附因子表現是屬於轉錄層次的調控。此外綠原酸可顯著降低 IL-1 β 所誘導之人類單核球細胞 (U-937) 之黏附，並且發現抑制效果隨劑量增加而增強。此研究的結果證實綠原酸在體外實驗中具有抑制早期動脈粥狀硬化發展之作用。

關鍵字: 綠原酸 (Chlorogenic acid), 核轉錄因子 (NF- κ B),

細胞黏附因子 (Cell adhesion molecules), 動脈粥狀硬化
(Atherosclerosis)



英文摘要

Expression of cell adhesion molecules (CAM) by the endothelium and the attachment of monocytes to endothelium may play a major role in the early atherogenic process. Chlorogenic acid (CA) is a phenolic compound present in coffee, apple, pears, berries, almond, artichoke and aubergines. Previous study indicated that CA possess antioxidant activity *in vitro*. In this study, the effect of CA on the formation of intracellular reaction oxygen species (ROS) and expression of CAM in IL-1 β induced human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were investigated, and compared with the control probucol. Our data showed that the inhibition of LDL oxidation (IC₅₀) of CA and probucol were 3.1 \pm 0.4 μ M and 5.5 \pm 0.7 μ M, respectively. The Scavenging ability of DPPH radical (IC₅₀) of CA and probucol were 36.3 \pm 2.7 μ M and 41.8 \pm 3.1 μ M, respectively. CA dose-dependently suppressed IL-1 β -induced mRNA expression on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial cell selectin (E-selectin) by real-time PCR analysis. CA also suppressed IL-1 β -induced the production of ROS. We observed that CA attenuated or blocked nuclear translocation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) P50, P65, P52, Rel-B and C-Rel stimulated by IL-1 β , which in turn attenuated CAM expression at the transcription level. Furthermore, CA significantly reduced the adhesion of humans monocyte

cell line, U937, to HUVEC treated IL-1 β in a dose-response manner. These results demonstrate that CA has inhibitory effect on proatherosclerotic mechanism *in vitro*.

Key words: Chlorogenic acid (CA), Nuclear factor- κ B (NF- κ B), Cell adhesion molecules (CAM), Atherosclerosis



總目錄

	頁次
中文摘要	I
英文摘要	III
總目錄	V
表目錄	VIII
圖目錄	IX
英文縮寫	XII
第一章、 文獻回顧	1
第一節、 動脈粥狀硬化的介紹	1
第二節、 氧化壓力(自由基)與動脈粥狀硬化	13
第三節、 氧化低密度脂蛋白與動脈粥狀硬化	21
第四節、 抗氧化與動脈粥狀硬化	32
第五節、 內皮細胞與黏附因子	40
第六節、 轉錄因子 NF- κ B 與動脈粥狀硬化	47
第二章、 研究目的及假說	60
第三章、 材料與方法	62
第一節、 儀器設備	62

第二節、	消耗材料	63
第三節、	試劑	64
第四節、	試藥的製備	67
第五節、	實驗方法	72
第六節、	統計方法	91
第四章、	結果	93
第五章、	討論	101
第一節、	綠原酸之特性及抗氧化能力	103
第二節、	Probucol 之抗動脈粥狀硬化作用機制	105
第三節、	綠原酸及 Probucol 之劑量比較	107
第四節、	氧化低密度脂蛋白及細胞激素 IL-1 β 的誘導作用	108
第五節、	綠原酸抑制 IL-1 β 所誘導之黏附因子的表現及 單核球的黏附作用	110
第六節、	綠原酸藉由抑制 IL-1 β 誘導 NF- κ B 的活化來 降低黏附因子的表現	115
第七節、	其他具有抗氧化、抑制黏附因子表現及單核球 黏附之物質	119
第六章、	結論	123



表目錄

	頁次
表 I. IL-1 β , VCAM-1, ICAM-1, E-selectin 及 GAPDH 之 Primer	92
表 1. 綠原酸及 Probucol 在體外試驗中所具有的抗 氧化能力	125



圖目錄

	頁次
圖 I. 民國 93 年台灣地區十大死因	51
圖 II. 動脈粥狀硬化與氧化低密度脂蛋白、IL-1 β 、氧化壓力 、NF- κ B 以及黏附因子之相互關係	52
圖 III. NF- κ B 活化調控黏附因子基因的路徑	53
圖 IV. 黏附因子的種類及分布	54
圖 V. 白血球與內皮細胞沾黏並進入內皮下空間之過程	55
圖 VI. 綠原酸之結構式	56
圖 VII. Probucal 之結構式	57
圖 VIII. 食物中各種多酚類的含量	58
圖 IX. 多不飽和脂肪酸之過氧化反應	59
圖 1-1. 綠原酸及 probucol 捕捉 DPPH 自由基之曲線圖	126
圖 1-2. 綠原酸及 probucol 抑制 LDL 氧化曲線圖	127
圖 1-3. 綠原酸對抑制共軛雙醯及延長氧化遲滯期之影響	128
圖 2-1. 不同濃度綠原酸對於人類臍帶內皮細胞之毒殺性	129
圖 2-2. 不同濃度 Probucol 對於人類臍帶內皮細胞之毒殺性	130
圖 3-1. 氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)對於細胞激素 IL-1	131

mRNA 表現之影響

圖 3-2. 細胞激素 IL-1 β 之同步定量曲線圖 132

圖 3-3. 細胞激素 IL-1 β 之 melting curve 133

圖 4-1. 不同時間點上 IL-1 β 誘導細胞內自由基(ROS)產生 135

圖 4-2. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導細胞內自由基 137

(ROS)產生之影響

圖 5-1. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導細胞黏附因子 138

VCAM-1 表現之影響

圖 5-2. 黏附因子 VCAM-1 之同步定量曲線圖 139

圖 5-3. 黏附因子 VCAM-1 之 melting curve 140

圖 6-1. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導細胞黏附因子 141

ICAM-1 表現之影響

圖 6-2. 黏附因子 ICAM-1 之同步定量曲線圖 142

圖 6-3. 黏附因子 ICAM-1 之 melting curve 143

圖 7-1. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導細胞黏附因子 144

E- selectin 表現之影響

圖 7-2. 黏附因子 E- selectin 之同步定量曲線圖 145

圖 7-3. 黏附因子 E- selectin 之 melting curve 146

圖 8. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導 NF- κ B P50 活化之影響	147
圖 9. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導 NF- κ B P65 活化之影響	148
圖 10. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導 NF- κ B P52 活化之影響	149
圖 11. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導 NF- κ B C-Rel 活化之影響	150
圖 12. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導 NF- κ B Rel-B 活化之影響	151
圖 13. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導單核球細胞 (U937) 黏附於內皮細胞之影響	153

英文縮寫對照表

AP-1	Activator Protein-1
bp	Base pair
CA	Chlorogenic acid
CAD	Coronary artery disease
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HDL	High-density lipoprotein
HBSS	Hank's balanced salt solution
H ₂ O ₂	Hydrogen Peroxide
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule -1
I-κB	Inhibitory protein-κB
IKK	I-κB Kinase
LDL	Low-density lipoprotein
IL-1β	Interleukin-1β
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NF-κB	Nuclear factor kappa B
oxLDL	Oxidized Low Density Lipoprotein
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction
PCOOH	Phosphatidylcholine hydroperoxide
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standard deviation
SOD	Superoxide Dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1



第一章、文獻回顧

第一節、動脈粥狀硬化 (Atherosclerosis)

(一). 動脈粥狀硬化的發生及危險因子

在現代國民生活進步及生活習慣轉變下，國人的飲食習慣已漸趨向於歐美的高熱量、高膽固醇型態，而疾病型態也逐漸趨近於歐美西方國家，國人的十大死因由急性傳染病、肺炎…等，轉為惡性腫瘤、心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病…等慢性疾病。心血管疾病與癌症為現代人健康的二大殺手，現代人由於飲食中攝取大量的動物性脂肪，使得身體中血膽固醇量增加，因而使心血管疾病的發生率上升，而心血管疾病中動脈粥狀硬化是主要的致死原因，動脈粥狀硬化是動脈產生病變的一種現象，大多發生於主動脈、頸動脈、冠狀動脈及週邊小動脈，其主要特徵是動脈管壁本身的增厚及其管腔變窄、縮小 (Lusis, 2000)。動脈粥狀硬化會引起血栓，造成局部組織缺血缺氧而壞死，若發生於腦動脈則會引起中風；若發生於冠狀動脈則會引起心肌梗塞而致死 (Navab *et al.*, 1996; Kreuzer *et al.*, 1997; Ross, 1999)。在西方國家所發生的死亡原因中，動脈粥狀硬化便佔了50% (Lusis, 2000)，而在93年臺灣衛生署所統計的前十大死亡原因中，第二、第三及第十名亦和動脈粥狀硬化有很大之關係，如圖I. 所示。

早期學者認為動脈粥狀硬化形成與血中脂質含量過高有關(Stamler *et al.*, 1986 ; Grundy, 1988 ; Grundy *et al.*, 1990)，後來發現，動脈粥狀硬化處除了有脂質堆積外，還有白血球與淋巴球等的發炎反應傳導物質出現，因此推論動脈粥狀硬化可能跟發炎反應有關(Glass and Witztum, 2001; Libby *et al.*, 2002; Mikita *et al.*, 2001; Gram, 2002)。除了高膽固醇飲食是引起動脈粥狀硬化的危險因子外，從流行病學的角度來看，動脈粥狀硬化的危險因子包括年齡、性別、抽煙、缺乏運動、過重、高血壓、糖尿病、高血脂及高半胱胺酸…等(Ball and Turner, 1974; Stam *et al.*, 1989; Gey *et al.*, 1993; Church *et al.*, 1985; Wingard *et al.*, 1983; Hulley *et al.*, 1998; Herrington *et al.*, 2000)。而在動物實驗中發現，遺傳上基因的突變也會造成動脈粥狀硬化，如：LDL 接受器基因有缺陷，會促使血液中 LDL 濃度增加，而增加 LDL 受氧化攻擊的機會，容易引發動脈粥狀硬化，此論述在 LDL 接受器基因剔除的小鼠上可觀察到(Goldstein and Brown, 1977)；此外如 Apo B 基因過度表現的小鼠會造成 LDL 的大量生成。相對的，若另一種脂蛋白 HDL 的合成基因 Apo E 基因缺陷會促使動脈粥狀硬化發生，在動脈粥狀硬化研究實驗上，Apo E 基因剔除小鼠是常用的動脈粥狀硬化之動物模式(Caligiuri *et al.*, 1999)。

(二). 動脈粥狀硬化的發展過程

動脈粥狀硬化是一種脂質與發炎細胞聚積，並伴隨著平滑肌細胞 (smooth muscle cell, SMC) 的增生與細胞外間質的分泌 (extracellular matrix secretion) 所引起的血管內膜纖維化 (intimal fibrosis)。根據世界衛生組織 (World Health Organization; WHO) 對動脈粥狀硬化所下的定義為“因血中脂質、膽固醇、脂蛋白、血液產物及鈣質等沉積於動脈血管內膜，再形成斑塊或結節狀增厚之疾病”。因動脈粥狀硬化為一種複雜且多步驟的慢性發炎疾病，故依照其形成的先後順序，會出現不同的病理特徵，約可分為四至六個階段不等；美國心臟協會 (American Heart Association) 則依據此疾病的病理組織變化，將動脈粥狀硬化的發展分為以下六個階段來說明：

Type I lesion--起始階段 (initial)：血中脂質開始堆積於血管內膜上，此現象在嬰幼兒時期便可開始發生。

Type II lesion--脂肪條紋 (fatty streaks)：在動脈血管內膜之表面，明顯可見到黃色的斑點或條紋，此斑點就是細胞間脂質的累積：如泡沫細胞所造成的情形。

Type III lesion--中間階段 (intermediate)：藉由細胞外脂質的堆積而使血管開始出現脂質聚集的情形，一般認為此狀態在臨床

上是不易察覺的。

Type IV lesion--動脈粥樣化 (atheroma)：當上述情形越來越嚴重而使得脂質開始聚集，形成脂質堆積的核心，而影響到血管的構造，使血管變形，而此狀態在臨床是可辨識的。

Type V lesion--纖維動脈粥樣化 (fibroatheroma)：隨著不斷增生的平滑肌細胞及膠原在血管表面沉積，形成多個脂質堆積的核心，使原本的動脈粥樣化慢慢發展成纖維動脈粥樣化。

Type VI lesion--複雜階段 (complicated)：血管產生出血及血栓症狀，最後導致血管堵塞，引發其它與心血管相關的疾病。

而Ross在1999年發表的文獻中，將動脈粥狀硬化劃分為以下四個時期

(1) 內皮細胞功能不良 (endothelial cell dysfunction)：

動脈粥狀硬化的發生為一複雜且漸進式的一種致病過程。初期主要是因血管內皮細胞 (endothelial cell) 受損，使內皮細胞的通透性增加，而使血管腔間隙增加，使得脂蛋白可以進入血管內膜中，並被內生性的氧化因子如：myeloperoxidase、nitric oxide synthase與15-lipoxygenase等氧化後，形成氧化型低密度脂蛋白 (Ox-LDL) (Heinecke, 1998; Steinberg and Witztum, 1999; Cyrus *et al.*, 1999; Harats *et al.*, 2000;

Knowles *et al.*, 2000)。Ox-LDL會促endothelial cell表現黏附因子 (cell adhesion molecules) 如： E-selectin、P-selectin、VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule-1)、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 等(Cybulsky and Gimbrone, 1991; Dong *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2000)，而使T cell與單核性白血球 (monocyte) 黏附於血管腔表面並促其位移至血管內膜中。Ox-LDL也參與促進此位移的作用，此是藉由促進趨化因子MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) 及MCP-1的接受器CCR2 (monocyte chemoattractant protein-1 receptor) 的表達所致 (Steinberg *et al.*, 1989; Gu *et al.*, 1998; Boring *et al.*, 1998; Han *et al.*, 1999; Gosling *et al.*, 1999)

(2) 泡沫細胞 (foam cell) 及脂肪條的形成 (fatty streaks) :

當單核性白血球位移至血管內膜後，單核性白血球會受M-CSF (macrophage monocyte-colony-stimulating factor) 影響，而分化為巨噬細胞(Qiao *et al.*,1997)。巨噬細胞會表達清除者接受器SA-A、CD36 來辨識Ox-LDL (Suzuki *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 1998)，並經將Ox-LDL吞嚥至細胞內，當巨噬細胞吞嚥過多Ox-LDL時，大量的膽固醇、脂質堆積在細胞內而形成泡沫細胞。大量的泡沫細胞聚集堆積在動脈管壁上形成脂肪斑。到最後，泡沫細胞會走向apoptosis或necrosis的路徑(Colles *et al.*, 1996)，當細胞死亡後，原本經吞嚥而堆積於細胞內的膽固醇、脂

質會流出，而這些死亡的細胞會形成壞死核心 (necrotic core) (Bennet *et al.*, 1999)。壞死核心與細胞流出的膽固醇、脂質聚集而促使”Gruel”的形成。”Gruel”為一種糜粥狀的油脂聚合物，也是形成動脈粥狀硬化斑塊的主因。

(3) 形成纖維斑塊和纖維帽 (fibrous plaque and fibrous cap) :

病程的中期巨噬細胞會與血管內膜中的T cell作用而生成cytokines (Th1、Th2) 而促使一連串的免疫反應發生(Hansson, 1997)，此外周圍的血管平滑肌細胞及內皮細胞也會分泌IL-1 (interleukin-1)、TNF (tumor necrosis factor) 等細胞激素，這些細胞激素會引起血管平滑肌細胞移位至intima或subendothelial中。此外，血管平滑肌細胞也會開始合成細胞外基質蛋白 (extracellular matrix proteins) 促使形成纖維帽 (fibrous cap) 而將gruel 覆蓋，形成動脈粥狀硬化斑塊。這些作用會使動脈粥狀硬化斑塊的生成過程由初期單純的脂肪斑形成，進入到一個複雜斑塊 (complex lesion) 的階段。

(4) 形成不穩定斑塊 (unstable fibrous plaque) :

動脈粥狀硬化斑塊會因上述作用的持續進行，而逐漸緩慢生長、增大突出於動脈管腔，到最後可能會阻塞住動脈，使血流量減少、血流速度變慢，更嚴重的還會進一步引起血栓 (Davies *et al.*, 1993)。血栓的發

生，是由於動脈粥狀硬化斑塊的增大並突出於血管腔，使血管內皮細胞損傷、破裂而引起血小板的吸附聚集，此外若動脈粥狀硬化斑塊的結構不穩定，也會因斑塊的破裂，使其內的脂質與tissue factor暴露而引起血小板的吸附聚集。若斑塊的破裂會造成血小板再一次的凝血現象，反覆的破裂、凝血，會促使血塊增大而阻塞住血管造成血栓（Lee and Libby, 1997），而導致心肌梗塞、中風的發生。動脈粥狀硬化斑塊的破裂是形成血小板吸附聚集的起因，有一些因子的表達亦會促使斑塊結構的不穩定而導致破裂，如：巨噬細胞會表達基質金屬蛋白酶（matrix metalloproteinases；MMP），此能分解細胞外基質（Galis *et al.*, 1994; Carmeliet *et al.*, 2000）。T cell也會產生interferon，而抑制血管平滑肌細胞合成膠原，而弱化動脈粥狀硬化斑塊的結構，因此斑塊變得容易破裂，接著引發血小板的吸附聚集及血栓的形成。

(三). 動脈粥狀硬化的致病機轉 (pathogenesis)

近十年幾來，許多學者相繼提出關於動脈粥狀硬化形成的可能原因，其中以氧化修飾假說 (oxidative-modification hypothesis) 及損傷反應假說 (response-to-injury hypothesis) (Ross, 1993; Ross, 1999)最為大家所接受。根據氧化修飾假說，動脈粥狀硬化起因於低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的氧化(Quinn *et al.*, 1987)，此為一種低密度脂蛋白氧化修飾 (LDL oxidative modification) 及脂肪的過氧化作用所導致之疾病；而損傷反應假說為內皮細胞受到損傷，而導致內皮功能失調 (endothelial dysfunction) 所產生之反應有關的假說，此假說說明了動脈粥狀硬化，乃和內皮細胞遭受傷害所產生的發炎反應有關；以下將此兩種假說之致病機轉分述如下：

1. 氧化修飾假說 (oxidative-modification hypothesis) -低密度脂蛋白氧化修飾 (LDL oxidative modification)

根據此學說，低密度脂蛋白先堆積於動脈血管之內膜，隨後受到其周圍細胞的作用，使之開始慢慢氧化形成最低修飾低密度脂蛋白 (MM-LDL) (Quinn *et al.*, 1987)，此MM-LDL會誘導血管細胞產生化學刺激因子，刺激單核球細胞在血管壁中維持一定的數量與分化，並使得低密度脂蛋白做進一步的氧化，接著被單核球細胞所衍生的巨噬細胞

所辨識而吞噬，形成所謂的泡沫細胞，促進動脈粥狀硬化之形成與發展 (Diaz, 1997; Lusis, 2000; Schwenke., 1998)。而這個假說乃探討Ox- LDL 在動脈粥狀硬化中所扮演的角色，許多的證據顯示了Ox-LDL的確具有關鍵的決定性因素 (Heinecke *et al.*, 1984; Morel *et al.*, 1984; Steinbrecher *et al.*, 1984; Parthasarathy *et al.*, 1986; Hiramatsu *et al.*, 1987; Frei *et al.*, 1988; Sterinberg *et al.*, 1989; Lusis and Navab, 1993; Jialal and Devaraj, 1996; Steinberg, 1997)。

以下即為MM-LDL及Ox-LDL的幾項特色：

- (1) MM-LDL可促進白血球 (leukocytes) 與內皮細胞兩者間的黏附作用 (adhesion) 。
- (2) MM-LDL可刺激內皮細胞分泌趨化因子MCP-1，促使血液循環中的單核球細胞黏附於內皮細胞，並移至內皮下方空間 (subendothelial space) ，此作用為不斷演進的。
- (3) MM-LDL可刺激內皮細胞分泌macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) ，促使單核球分化為巨噬細胞。
- (4) Ox-LDL為單核球細胞的趨化物質，且會限制巨噬細胞的移出，使其繼續留在動脈血管壁中而不回到血液循環。
- (5) Ox-LDL具細胞毒殺性，會使內皮細胞的功能失調，另外會促使脂肪斑塊成為進一步的病害。

- (6) Ox-LDL會改變動脈血管壁中其他基因的表現，如促使巨噬細胞分泌 interleukin-1 β (IL-1 β)，而IL-1 β 即可誘使平滑肌細胞增生與內皮細胞-白血球的黏附作用。
- (7) Ox-LDL影響凝血機制，如刺激plasminogen activator inhibitor-1 的合成、增強tumor necrosis factor (TNF) 與 platelet—derived growth factor (PDGF)的表現，而使血小板的凝集作用增強。
- (8) Ox-LDL會抑制由 endothelium-derived relaxation factor (EDRF) 所維持的血管舒張作用，而使動脈血壓升高。

2. 內皮功能失調 (endothelial dysfunction) -損傷反應假說 (response-to-injury hypothesis)

此為 Ross 在1986與1993年 (Ross, 1993; Ross *et al.*, 1996) 所提出修正後之假說，強調內皮細胞受損後導致內皮細胞功能失調，而使細胞做出急性與慢性的發炎反應以作為保護。造成內皮細胞損傷的原因可能有：物理性傷害 (如血液在血管分支處流動造成的流動壓力 (shear stress)、氣球擴張術)、化學性傷害 (如抽煙、緊張、糖尿病及氧化壓力衍生之自由基)、與曝露於致毒性物質 (如Ox-LDL)，所帶來之傷害，這些傷害會使內皮細胞功能失調，進而產生一連串反應，我們稱為發炎

反應。

隨著動脈粥狀硬化發展時期之不同，其發炎反應及參與的細胞型態、發炎激素（inflammatory cytokines）亦不同。而受到損傷的內皮細胞會在表面分泌一種黏附性的醣蛋白（adhesive glycoprotein），此種蛋白質會與血液循環中的單核球細胞及T-淋巴球上的特殊受體作結合。此時內皮細胞、單核球細胞與T-淋巴球均會分泌許多黏附因子(包括E-selectin、P-selectin、VCAM-1、ICAM-1...等)，而內皮細胞與平滑肌細胞則亦分泌一些趨化物質（chemoattractants），如單核球化學趨化蛋白-1（monocyte chemotactic protein; MCP-1）、血小板衍生之生長因子（platelet-derived growth factor；PDGF）與群落刺激因子（colony-stimulating factors；CSFs）等，而加速各細胞間進行黏附與移位至血管內膜。在血管內膜，單核球由於一些生長因子與細胞激素（cytokines）的作用而活化為巨噬細胞，最後將某些經修飾的脂質(特別是Ox-LDL)吞噬，並分泌黏附因子促使更多的單核球移入血管內膜(Ross, 1993; Ross *et al.*, 1996)。由於以下的過程，導致了血管內膜早期動脈粥狀硬化斑塊的產生：

(1)局部動脈內膜移位與增生，且巨噬細胞、T-淋巴球與平滑肌細胞在此聚集。

(2)結締組織生成，如elastin fiber protein、collagen與proteoglycans。

(3)巨噬細胞內大量脂質堆積而形成泡沫細胞。



第二節、自由基與氧化壓力 (oxidative stress)

早在1900年代初期便由化學家鞏伯格(Gomberg)發現了自由基(free radical)的存在，根據量子力學的觀點，自由基是指一個分子或原子，其某原子之價殼以不成對電子存在者(Halliwell *et al.*, 1991)。生物體在正常生理下及病理狀況下皆會產生自由基(Evans and Halliwell, 2001)，例如：進行某些正常代謝如花生四烯酸代謝、甲狀腺生成與白血球吞噬殺菌作用(Warso and Cand., 1983; Taurog, 1991)時，常會產生自由基，而當身體在受到外在及內在環境的刺激時，亦會產生大量的自由基，依其來源可分為三類：(1).生物合成產生(2).新陳代謝產生(3).空氣污染、日光、輻射及藥物…等(McCord, 2000)。由於自由基本身具一不成對之電子，反應性強可引起一連串的連鎖反應(chain reaction)，其中包括氫原子的抓取(hydrogen abstraction)、電子傳遞(electron transfer)、加成作用(addition)、終止作用(termination)與不對稱反應(Kehrer, 1993)，因而可進一步攻擊人體細胞組織，對人體造成損傷，故不論是體內或體外所產生的自由基皆被認為和許多疾病具高度相關性，其中包括了：癌症、關節炎、發炎反應、糖尿病、動脈粥狀硬化、帕金森症與高血壓等(Cacciuttolo *et al.*, 1993; Kehrer, 1993)。

常見的自由基種類可分為活性氧(reactive oxygen species, ROS)和

活性氮(NOS)兩大類，活性氧包括：超氧化自由基(Superoxide; $\bullet\text{O}_2^-$)、
氫氧化自由基(Hydroxyl radical; $\bullet\text{OH}$)和過氧化氫(Hydrogen peroxide;
 H_2O_2)、單電子鍵氧分子($^1\text{O}_2$)、次氯酸(HOCl)、臭氧(O_3)...等。
而活性氮包括：一氧化氮(NO)、二氧化氮(NO_2)與過氧化亞硝酸自
由基($\bullet\text{ONOO}^-$)...等。自由基在人體扮演重要角色(McCord, 2000)，
如氧自由基具有作為訊息傳遞、基因轉錄和調節細胞中cGMP活性的功
能(Zheng and Storz., 2000; Lander, 1997)。而NO是分布最廣泛的訊息分
子之一，參與許多身體中器官與細胞的功能。

氧化壓力是指生物體中的抗氧化物與促氧化物的平衡趨向後者
(Sies, 1991)。在正常狀態下，生物體內具有一抗氧化系統可對抗自由
基所產生傷害，並達到一平衡狀態，但若是因免疫系統失調、缺氧或高氧、
輻射照射、藥物代謝、病毒作用、疾病或營養不良使細胞中所產生的自
由基過多，便可能對人體產生劇烈的傷害(Hyslop *et al.*, 1988)，並使身
體的Redox 環境傾向氧化狀態(Sies, 1991; Jacob, 1994)，此時體內的氧
化壓力過高，而產生上述疾病。

(一). 自由基與動脈粥狀硬化

自由基含有不成對電子的原子、分子或離子，具有很強的活性 (Gilbert *et al.*, 2000)，容易引起細胞物質的氧化作用、脂質的過氧化，導致細胞的受傷或死亡。體內氧化壓力過高則表示體內自由基產生過多，體內氧化壓力增高可導致許多心血管相關疾病的發生，如高膽固醇血症 (hypercholesterolemia)、高血糖 (hyperglycemia)、糖尿病 (diabetes)、動脈粥狀硬化 (Cai and Harrison, 2000; Napoli *et al.*, 2001)，在血管功能失調及致粥瘤性 (atherogenesis) 上更是扮演一重要角色。許多的證據及報導均提到動脈硬化血管有大量活性氧族群 (ROS)，及其衍生出的活性氧化代謝物的表現 (Harrison *et al.*, 2003) 顯示因活性氧屬所導致的氧化壓力增高，在動脈粥狀硬化之發展中，有其一定的重要性。

正常情況下，細胞本身所產生的活性氧族群會改變許多細胞內的功能，包括基因表現、轉錄因子活化等。許多研究顯示，細胞內過量的活性氧族群會使細胞受到傷害，如人類臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)、人類微血管內皮細胞 (human microvessel endothelial cell line, HMEC)、肺上皮細胞 (A549 lung epithelial cell line) 等，經由細胞激素或生長因子刺激後， H_2O_2 及 NO 濃度會上升，並與基因表現有相關性，例如 IL-1 β 及 TNF- α 可以經由活性氧族群調控轉錄因

子NF- κ B的活性，進而引發各種免疫反應及發炎反應。所以活性氧族群已被認為是一種二級訊息傳遞訊息以調節細胞生理功能(Wang *et al.*,1999; Lum and Roebuck, 2001; Schreck *et al.*, 1991)。以下便就活性氧屬做介紹。

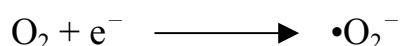
(二). 活性氧屬 (reactive oxygen species, ROS)

大氣中的氧乃是以安定的三重態氧 (triplet oxygen, $^3\text{O}_2$) 存在，活性氧屬則泛指反應能力較三重態氧強之含氧分子。由於活性氧為細胞進行增殖和分化時所須之化學傳遞物 (二次訊息) (Sauer and Wartenberg, 2001)，故人體在進行正常代謝會產生活性氧，甚至是在動脈粥狀硬化發展時也會產生活性氧，在哺乳類動物中，活性氧的可能來源包括了：粒線體呼吸作用 (mitochondria respiration)、花生四烯酸 (arachidonic acid) 代謝、脂氧合酶 (lipoxygenase)、環氧合酶 (cyclooxygenase)、細胞色素P450s (cytochrome P450s)、黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase)、NADH/NADPH 氧化酶 (NADH/NADPH oxidases)、一氧化氮合成酶 (NO synthase) 及過氧化酵素 (peroxidases) 等(Cai and Harrison, 2000)。活性氧種類繁多，大多是指具一不成對電子的自由基，有些則本身非自由基，但具強氧化力可造成氧化壓力者，與動脈粥狀硬化及血管功能失

調者主要有以下幾類：

1. 超氧陰離子自由基 (Superoxide anion radical, $\bullet\text{O}_2^-$)

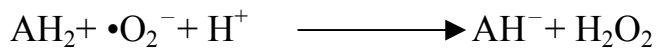
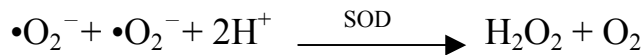
超氧陰離子自由基為體內最初也最常產生之自由基，為氧分子進行一個電子還原作用而形成的：



其半衰期短，較少對細胞造成直接傷害，但超氧陰離子自由基藉由連鎖反應所產生二級及三級產物，如過氧化氫、羥基自由基等，常常會對生物體造成更大的傷害，因此在生物體中扮演著關鍵性之角色，故又稱「自由基之母」。此類自由基可來自體內吞噬細胞及粒腺體中電子傳遞鏈中的黃嘌呤氧化酶及NADPH 氧化酶，也可能經由血中的葡萄糖及蛋白質作用而產生 (Halliwell, 1996)。

2. 過氧化氫 (Hydrogen peroxide, H_2O_2)

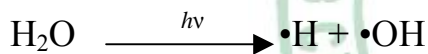
過氧化氫雖非自由基，但其本身具強氧化力、反應性高且又攜帶氧原子，所以也是活性氧的一種。為非自由基形態之活性氧，極容易在細胞間擴散與體內的一些微量過渡金屬離子 (Cu^{2+} or Fe^{2+}) 產生Fenton reaction (Gilbert *et al.*, 2000)，產生破壞性較大的羥基自由基，故過氧化氫對細胞及組織傷害遠大於超氧陰離子自由基。過氧化氫可經因超氧陰離子自由基和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 作用而來：



也可因吞噬細胞的吞噬作用，及其他氧化還原循環反應而產生，但過氧化氫也能藉由catalase 的催化而變成水。

3. 羥基自由基 (Hydroxyl radical, $\bullet\text{OH}$)

羥基自由基可說是體內反應性最高自由基之一，除可因自由基之轉換如：過氧化氫和金屬離子反應及超氧陰離子之作用反應而來之外，人體照射到X-ray、 γ -ray、短波電磁波等放射線時，也會產生大量的羥基自由基：



因羥基自由基反應性高，使得該部位一旦產生此自由基後，便會發生立即性的反應(Diplock *et al.*, 1998)，造成氧化而破壞細胞，且會與醣類、胺基酸、磷脂質、有機酸等細胞內多種物質反應，特別是對DNA中的氮鹼基（嘌呤或嘧啶）作用，造成細胞傷害、死亡或突變(Diplock *et al.*, 1998)。

4. 過氧化脂質 (lipid hydroperoxide, LOOH)

過氧化脂質可說是脂質經自由基如：羥基自由基或超氧陰離子過氧化作用後所得之產物，較常發生於細胞膜上的磷脂質或其他部位之多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 上，同時此產物可再繼續斷裂成其他自由基或形成有毒害或具致突變的醛類、或其他代謝物 (Cai and Harrison, 2000)。除此之外，過氧化脂質或其產物亦可和蛋白質、酵素、核酸等分子作用，而導致細胞或身體組織、器官的變異或死亡。

(三). 活性氧屬和動脈粥狀硬化

活性氧屬一般認為可刺激細胞增生和分化 (Sauer *et al.*, 2001)，活性氧屬除了可由刺激細胞增生和分化影響動脈粥狀硬化的發外，更可藉下列方法來影響 (Napoli *et al.*, 2001) 其發展。

1. 可藉由調節轉錄因子 (transcription factor) 如：nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B)、peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ)，來影響基因的表現。
2. 促進各種細胞如：平滑肌細胞、血管內皮細胞、纖維母細胞生長和分化。

3. 可影響細胞分泌細胞激素及生長因子如：腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、細胞間質素- β (interleukin- 1β , IL- 1β) 及干擾素 γ (interferon- γ)。
4. 影響細胞進程式化死亡 (programmed cell death) 及凋亡 (apoptosis)。
5. 決定oxidation-sensitive regulatory pathways 間的交互作用，而達到對於動脈粥狀硬化有不同效果。



第三節、氧化低密度脂蛋白與動脈粥狀硬化：

(一). 脂蛋白 (lipoproteins)：

脂蛋白 (lipoproteins) 的組成為膽固醇脂與三酸甘油脂所形成的疏水性中心，其外圍由游離脂肪酸、磷酸脂質與衍蛋白 (apoproteins) 如：衍蛋白B (apoprotein B)、衍蛋白C (apoprotein C) 所組成之混合物包圍組成。依其脂蛋白分子組成的大小及密度可分類為乳糜微粒 (chylomicrons)、極低密度脂蛋白 (VLDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、中密度脂蛋白 (IDL) 與高密度脂蛋白 (HDL)。

衍蛋白是脂蛋白粒子中之蛋白質組成，衍蛋白主要分為Apo A、Apo B、Apo C、Apo E 及Apo (a)，不同的脂蛋白所含有的衍蛋白種類及特性均不相同。衍蛋白的功能如：Apo B、Apo E可被低密度脂蛋白接受器 (LDL receptor) 辨識，而幫助細胞包飲吞噬脂蛋白進入細胞內。此外，衍蛋白也會促使參與脂蛋白代謝的酵素活化或抑制，如Apo A中的Apo A I 會促卵磷脂/膽固醇醯基轉基酶 (lecithin/ cholesterol acyltransferase；LCAT) 活化，而將HDL表面的膽固醇酯化幫助HDL形成完整的球型構型。有些實驗由衍蛋白蛋白片段是否被分解可來判定脂蛋白是否被氧化 (Kreuzer *et al.*, 1997; Steinberg and Witztum, 1999)。

(二). 低密度脂蛋白 (LDL) :

低密度脂蛋白為在血液循環中的球狀複合粒子，是由VLDL 釋出三酸甘油酯後轉型為IDL，再經IDL轉型為LDL。LDL是一群平均直徑約為18~25 nm 組成的不均勻球狀複合粒子，包含於人類血液中，正常人之LDL密度介於1.019-1.063 g/mL，由蛋白質與脂質所構成。每顆LDL上約有1600個酯化膽固醇、500-600個未酯化膽固醇、800個磷脂質、 170-180個三酸甘油酯及一個apolipoprotein (apoB-100)，平均質量為2500-2800 kDa。每個LDL粒子的構型可分為構造緊密的親水性表層與親油性的核心，表層則由磷脂質單層所構成，上面有未酯化膽固醇與一個分子量約為550 kDa的apoB (含4536個氨基酸) 所纏繞。每個LDL分子內含有6-12個分子的 α -tocopherol，是LDL中最主要的內源性抗氧化劑，其餘的抗氧化劑如 β -carotene、lycopene、ubiquinone-10等，都僅介於0.1-0.5個分子之間。LDL的各型脂質共約含有2700個脂肪酸分子，其中約一半為長鏈脂肪酸，最主要的一種為亞麻油酸 (linoleic acid C_{18:2})。人體血清中膽固醇的總濃度約為200 mg/dL，其中約65 %由LDL所攜帶傳送至周圍組織，因此LDL的吸收與膽固醇的代謝息息相關。

若LDL無法有效的被細胞組織吸收，而在血液循環系統中存在過多的LDL會增加罹患心血管循環系統疾病的風險。LDL在血液循環中的半

衰期 (half life) 約為2~3天，低密度脂蛋白80 %可由肝吸收，另20 %則由周圍組織吸收，吸收方式是經由LDL接受器 (LDL receptor) 攝取，藉由receptor-mediated途徑與nonspecific endocytosis 方式進入細胞及肝臟中。

有實驗證據顯示LDL receptor 的功能失常的病人如：家族性高脂血症 (familial hypercholesterol) 患者，其會導致血液中LDL堆積而增加併發動脈粥狀硬化的風險(Goldstein *et al.*, 1977)。而在LDL receptor 表達的調控上發現，當血液中cholesterol 濃度降低時，會促使SREBP transcription factor活化促使LDL receptor大量表達(Brown and Goldstein, 1997)。若將動物的LDL receptor gene knockout 或使之lack functional 再加上特定條件如：促使12/15- lipoxygenase gene over expression，則其發生動脈粥狀硬化機率會增加(Harats *et al.*, 2000)因此，若人體內有大量的LDL循行於血管中，LDL十分容易受到一些氧化因子的攻擊而被氧化修飾，LDL會轉變為氧化修飾型的LDL如：minimally modified LDL、oxidative LDL 及small LDL、dense LDL等，這些氧化修飾型的LDL 均為引起動脈粥狀硬化發生的主因。

(三). 低密度脂蛋白過氧化作用：

LDL的氧化是一種由自由基所引起的連鎖反應過程，牽涉了LDL中脂質與蛋白質的氧化修飾與構造上的改變 (Jialal and Devarj, 1996)。在脂質的氧化方面，主要是LDL內鍵結於磷脂質與膽固醇酯上的PUFA遭氧化，開始是由活性氧 (可能是 $\cdot\text{OH}$ 或脂質經Fenton reaction產生 $\cdot\text{RO}$) 對PUFA (polyunsaturated fatty acid) 上的bis-allylic site進行氫自由基 (hydrogen radical; $\cdot\text{H}$) 的轉移，接著產生雙鍵的重排而形成共軛雙烯 (conjugated diene)。一般在低密度脂蛋白氧化時，其共軛雙烯鍵的變化有以下三階段：

1. 遲滯期 (lag phase)

為其氧化的起始狀態，此時期受低密度脂蛋白本身所含抗氧化性物質所影響，故從此階段可得知低密度脂蛋白被氧化的程度。其定義為增殖期的切線對X軸之截距，截距的長短即為lag time，用以判斷低密度脂蛋白的抗氧化活性(Raal *et al.*, 1995)。

2. 增殖期 (propagation phase)

當其本身所含抗氧化性物質消耗之後，低密度脂蛋白會加速氧化使得共軛雙烯鍵大量產生。

3. 分解期 (decomposition phase)

於此階段共軛雙烯鍵開始裂解，產生醛、酮類物質。

自由基與動脈粥狀硬化的關係已被深入探討，主導此自由反應的兩大系統：

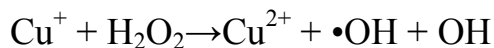
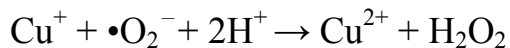
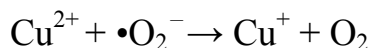
1. 細胞系統:如巨噬細胞、動脈平滑肌細胞、內皮細胞與淋巴細胞，均會釋放活性氧物質（如 $\cdot\text{O}^{2-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{RS}$ 、 $\cdot\text{RSO}$ ），再由過渡金屬離子（銅離子與鐵離子）催化促進氧化的發生
2. 酵素系統:如lipoxygenase（15-lipoxygenase 5-lipoxygenase）、xanthine oxidase、NADPH oxidase、phospholipase、myeloperoxidase等，均可催化PUFA雙鍵位置的氧化與加氧作用。

脂肪酸氧化產生的共軛雙烯，會再與分子氧反應而加氧形成過氧化物，再進一步斷裂成醛、酮等小分子，而可與自由基或共軛雙烯對LDL上的蛋白質（apoB-100）進行氧化修飾(Brown and Goldstein, 1986; Sterinberg *et al.*, 1989; Halliwell *et al.*, 1995; Jialal and Devarj, 1996; Steinberg, 1997; Westhuyzen, 1997)。而在蛋白質的氧化修飾方面，當apoB受到自由基或共軛雙烯的攻擊後，會使蛋白質序列中的離胺酸（lysine）與組胺酸等帶正電胺基酸的 ϵ -amino group 與氧化產物的醛類交聯（cross-linking）而產生Schiff base，而使LDL表面的正電荷減少及

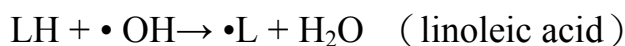
負電荷增加，此種改變使氧化之LDL不再被LDL receptor (B/E receptor) 所辨識，反由巨噬細胞表現之清除受體 (scavenger receptor) 所辨認。其中最主要與 ϵ -amino group作用的醛類包括malondialdehyde (MDA) 、4-hydroxynonenal (4-HNE) 與hexanal (Jialal and Devaraj, 1996; Steinberg, 1997)。遭氧化與修飾後，apoB會斷裂，可由電泳觀察而得。Kreuzer等 (Kreuzer *et al.*, 1997) 指出經氧化修飾後的apoB主要是藉由N端序列與清除受體進行辨識，而且僅需其序列的前23 %之胺基酸即足夠讓清除受體辨認。

過渡金屬離子可催化LDL內脂質的過氧化反應，Ferns 等 (Ferns *et al.*, 1997) 指出銅離子參與了在動脈血管壁的LDL氧化。由銅析催化之似Fenton reaction的氧化機制如下：

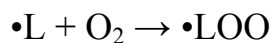
Fenton-like reaction (to generate $\bullet\text{OH}$)

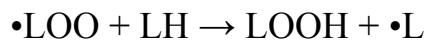


Initiation of chain reaction



Propagation of autoxidation





不同階段的氧化可造成不同類型與氧化程度的LDL，如輕微修飾的LDL (minimally modified LDL; MM-LDL)、完全氧化的LDL (extensively oxidized LDL; Ox-LDL)、體積小且密度高的LDL (small, dense LDL; sd-LDL) 與糖化之LDL (glycated-LDL; Gly-LDL) 等，均在動脈粥狀硬化或其他退化性疾病中扮演重要的角色 (Steinberg *et al.*, 1997)。

LDL的氧化由於大多是在動脈血管壁中進行，而且Ox-LDL被清除受體移除的速度相當快，故無法由偵測半生期短、濃度低的Ox-LDL來評估LDL氧化的程度 (Jialal and Devaraj, 1996)。體外實驗中常用來判斷LDL氧化的程度的方法為利用一分子的氧化產物 malondialdehyde (MDA) 與二分子的TBA呈色，產物即 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)。另外也可利用高效能液相層析儀檢測LDL內維生素E與脂肪酸的含量，亦可作為LDL的氧化指標 (Jialal and Devaraj, 1996)。

(四). 氧化型低密度脂蛋白與動脈粥狀硬化的關係：

動脈粥狀硬化是一種慢性的發炎反應疾病，且為許多複雜因子如：modified lipoproteins、monocyte-derived macrophages、T-Cell，與其他許多血管壁細胞內因子交互作用而生成的疾病。而在動脈粥狀硬化的致病機轉研究中，modified lipoproteins被視為主要引起動脈粥狀硬化過程的主因，而在許多動脈粥狀硬化動物的組織切片中，在其病灶部位也觀察到有許多的oxidative LDL components堆積。Oxidative LDL components包含 oxidized phospholipids、phosphatidyl choline、modified apoB proteins、oxidized lipids等。已有許多實驗證實，這些分子參與調控了引起或促進動脈粥狀硬化發生的機制，統整如下：

1. Ox-LDL具有細胞毒性，會促使血管內皮細胞損傷，而使其功能失調，促使更多循行於血液中的LDL進入血管內受氧化為Ox-LDL (Colles *et al.*,1996; Bennet, 1999; Patel *et al.*, 2000)。Ox-LDL亦會促使巨噬細胞、血管平滑肌細胞apoptosis 或necrosis，而使necrotic core 的生成與細胞中吞噬的cholesterol、oxidized lipid與insoluble lipid流出，最後形成糜粥狀聚合物”Gruel”促進動脈粥狀硬化的病程(Colles *et al.*, 1996; Bennet, 1999)。
2. Ox-LDL會促使血管內皮細胞表達單核性白血球的黏附因子如VCAM

-1、ICAM-1、E-selectin (Navab *et al.*, 1996)等而吸引血液中單核球、T cells 附著於血管壁上。而單核性白血球並進一步受血管內皮細胞表達的chemotactic molecules 如：MCP-1、CCR-2 而migration進入血管內膜，當單核性白血球、T cells 進入血管內膜後，便會引發一連串免疫反應，並與其他細胞因子進行交互作用，而促使動脈粥狀硬化病的發生 (Rajava- shisth *et al.*, 1990)。Ox-LDL也會直接促使這些chemotactic molecules的表達(Steinberg *et al.*, 1989; Navab *et al.*, 1996)。

3. Ox-LDL會促使泡沫細胞的形成。泡沫細胞的形成是早期動脈粥狀硬化發生的特徵，所謂的泡沫細胞是指進入血管內膜的單核性白血球，趨化而成的巨噬細胞，內堆積了大量的膽固醇，大量的泡沫細胞形成，會聚集於血管內膜中而形成脂肪斑。巨噬細胞會受Ox-LDL的刺激下大量表達清除者接受器而將Ox-LDL吞噬至細胞內(Yamada *et al.*, 1998)，而主要擔任吞噬Ox-LDL的scavenger receptors為CD36與SR-A (scavenger receptors A)。Ox-LDL均可透過活化一些分子機制而使其大量表達來吞噬Ox-LDL，如Ox-LDL可活化轉錄因子，PPAR γ 來促使CD36大量表達(Tontonoz *et al.*, 1998)，Ox-LDL也可以經活化轉錄因子AP-1來促使SR-A大量表達，這些scavenger receptors若表達

過多，則會使巨噬細胞吞噬過量的Ox-LDL進入細胞內，而使得膽固醇堆積於細胞中而使巨噬細胞變成泡沫細胞(Selzman *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2000)。

4. 促進平滑肌細胞的轉移至血管內膜中並促進其增生(Ross, 1999; Patel *et al.*, 2000)。

(五). 預防動脈粥狀硬化

因為LDL的氧化是引起動脈粥狀硬化的一個重要的致病因素，而動脈粥狀硬化乃老年退化性疾病，早期預防可見後效，而飲食控制及特殊食物成分，可能具有減緩動脈粥狀硬化和預防心血管疾病的效果，因此對於預防動脈粥狀硬化早期的脂肪條產生，目前最常使用的策略為抑制低密度脂蛋白的過氧化與降低血脂，而藉由抗氧化劑的使用，可以有效的清除自由基、鉗合金屬離子與終止脂質氧化的起始期或延長遲滯期。流行病學調查亦指出多種天然植物中所具有（如 α - tocopherol、polyphenols）與人工合成（如BHT、probulcal）的抗氧化劑，其攝取量與心血管疾病的發生率呈現負相關(Diaz *et al.*, 1997)。

實驗動物模式中亦有報告指出抗氧化劑的介入對LDL 的氧化敏感性有降低的趨勢，包括了LDL receptor-deficient rabbit、cholesterol-fed

New Zealand White rabbit (NZW rabbit) 、 Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit (WHHL rabbit) 、 cholesterol fed hamster 、 LDL receptor-deficient mice 、 apoE-deficient mice (apoE 缺陷小鼠) 與 nonhuman primates 等動物模式，均使用了一種或多種的抗氧化劑，藉由抗氧化的效果，而減緩了動脈粥狀硬化的效果 (Steinberg, 1997) 。

目前常被使用的幾種重要的抗氧化劑，或在食物中存在的抗氧化物質可分為：(1) 增加內源性的抗氧化劑如維生素C、維生素E 或類胡蘿蔔素 β -carotene 及 (2) 額外食入合成或天然的抗氧化劑，其在抑制LDL氧化與減低動脈粥狀硬化的效果。



第四節、抗氧化與動脈粥狀硬化

曾經有學者想藉由改變生活習慣及飲食方式來降低血中脂質，以達到降低動脈粥狀硬化發生機率，而結果顯示此方法卻無明顯的影響，於是學者便建議以降低體內氧化壓力之方法，來降低動脈粥狀硬化之發生率，降低體內氧化壓力方法主要有兩種，一為提高體內防禦系統，二為補充抗氧化物質，今就防禦系統及抗氧化物質兩方面做說明。

(一). 體內防禦系統：體內主要防禦系統分為很多種，其中一種為體內專門清除自由基之酵素系統，包括了以下幾種。

1. SOD (Superoxide dismutase)

SOD能將超氧陰離子轉變為過氧化氫，提供了生物體抵抗ROS所帶來的破壞與傷害，SOD依其存在位置不同，而有不同的過渡金屬離子作為輔因子來參與氧化還原反應，如在粒線體中含有以錳為反應中心的Mn-SOD，而在細胞質中則含有以鋅和銅為反應中心的Cu/Zn-SOD (Bannister *et al.*, 1987; Meyer and Isaksen, 1995)。

2. Catalase

過氧化氫酶其主要的作用是將過氧化氫催化成不具傷害性的水和氧，此酵素的活性需鐵參與，在抗氧化系統裡扮演了重要的角色。catalase大部份分佈於細胞內的過氧化體中，可保護因氧化長鏈脂肪酸的過程中

產生大量的過氧化氫所帶來之傷害，在肝細胞與紅血球含量豐富，嗜中性白血球及其他白血球也同樣含有大量的Catalase，可清除由respiratory burst而產生大量的過氧化氫。在許多細胞中如：內皮細胞、神經膠細胞、及肌細胞等，其catalase 含量很低並不足以清除自生的過氧化氫，因此在這些細胞中必須依賴另一種酵素—Glutathione peroxidase系統來清除過氧化氫(Meyer and Isaksen, 1995)。一旦 H_2O_2 濃度超過 $20 \mu M$ 時會開始對細胞產生傷害，超過 $100 \mu M$ 時則容易活化嗜中性白血球產生更多 H_2O_2 造成細胞死亡(Schraufstatter *et al.*, 1990 ; Young and Woodside, 2001)。

3. GSH-Px (Glutathione peroxidase)

Glutathione peroxidase (GSH-Px) 和catalase一樣有清除過氧化氫的能力。GSH-Px可以幫助清除過氧化氫，亦可使油脂或非油脂過氧化物還原。而GSH-Px需要硒元素作為cofactor，故體內硒元素含量不足時其酵素活性則會受損。GSH-Px在紅血球、肝臟、心臟、肺部及腦中含量高，相反的在肌肉含量中則較少，所以單靠GSH-Px的催化作用是不夠的，必須要有足夠的GSH及其他酵素系統才算完備，如：NADPH及glutathione reductase的還原作用。因此，若是NADPH 生成的來源出了問題，在GSH-Px抗氧化系統的效能則會減低，如：蠶豆症患者缺

乏NADPH生成的催化酵素G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 便會因氧化壓力過高，使GSH消耗完且無法補充，造成紅血球細胞膜遭氧化破裂(Hatheill *et al.*, 1991)。

(二). 抗氧化物質

抗氧化物質的作用可為清除自由基、螯合金屬離子、抑制氧化酵素作用等，而目前食品中的抗氧化物質開發，亦多從這方面著手，近來許多食品化學家從許多食品分離出許多有效的抗氧化物質，這些抗氧化物質大多為酚類化合物，此化合物在化學上的定義為結構中帶有一個或多個羥基的芳香環及其衍生物(Harborne *et al.*, 1989)，由於酚類化合物種類繁多，學者對其分法亦有所不同，根據Ho等(1992)之分法，酚類化合物可分為三大類：(1) simple phenol 和phenolic acids，(2) 類黃酮 (flavonoids) (3) hydroxycinnamic acid 及其衍生物，其中廣泛存在於各式蔬果中的phenol和flavonoids因具有抑制人體低密度脂蛋白氧化的能力(Porter *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 1996)，因此被認為具有抗動脈粥狀硬化之效果(Vaya *et al.*, 2003)。

(三). Polyphenol (多酚類)

多酚類可減低動脈粥狀硬化的發生率，來自於其對於血管病變具有的影響(Schramm and German, 1998)，同時可有效清除自由基、增進體內抗氧化酵素的活性，抑制體內過氧化酵素如：phospholipase A2、cyclooxygenase及lipoxygenase等的活性，以達到抑制體內低密度脂蛋白的氧化(Aviram and Fuhrman, 1998)及發炎反應的發生(Reed, 2002)，除此之外，尚能抑制血小板的凝集及單核球對於內皮細胞的通透性，來達到防止動脈粥狀硬化的發生。目前對多酚類化合物抗氧化的報告多集中在可抑制LDL的氧化修飾方面，如紅酒中的resveratrol與其他多酚類化合物在體外實驗中被證實其抗氧化性 (Frankel *et al.*, 1993; Kerry and Abbey, 1997)，而在離體實驗中亦可增加血清中的總抗氧化力 (Maxwell *et al.*, 1994)。

Fuhrman (Fuhrman *et al.*, 1997) 指出甘草乙醇萃出物與其主要的多酚類化合物--glabridin，可在apoE基因缺陷小鼠的模式中，有效抑制LDL的氧化，且連續餵食6週後其血管內膜中僅剩下少量的泡沫細胞存在。Tijburg (Tijburg *et al.*, 1997) 的研究中指出，綠茶可降低NZW兔31%的動脈粥狀硬化，但紅茶、維生素E與β-胡蘿蔔素則無此效果。Hayek (Halevy *et al.*, 1997) 的研究中發現，不論餵食ApoE 缺陷小鼠

紅酒、quercetin或兒茶素類，均可減少動脈粥狀硬化病灶之面積，此與減少LDL氧化敏感性有關。

目前一些抗氧化劑的使用已證實可改善一些退化性疾病，如：動脈粥狀硬化、糖尿病、癌症、免疫疾病神經系統疾病等（Maxwell *et al.*, 1995）。而許多研究指出抗氧化劑有抑制低密度脂蛋白氧化方面的效果，但除了LDL氧化導致動脈粥狀硬化的早期發展外，尚有其他因素（如細胞激素、內皮損傷等）影響了病變的發生。但整體而言，抗氧化與抗動脈粥狀硬化兩者之間實有密不可分之關連，而由食物或天然植物中找尋有效的抗氧化劑更為未來發展的方向。

(四). 綠原酸（Chlorogenic acid）

綠原酸是由咖啡酸和醌寧酸酯化而成的，其化學結構如圖VI所示，屬於桂皮酸（Hydroxycinnamic acids）中的一種多酚，且是咖啡中的主要酚酸物質（Olthf *et al.*, 2001），一公升的咖啡中約含有500-800 mg的綠原酸（Clifford, 1999）；每公斤蘋果也含有大於510 mg之綠原酸，其他的飲食來源有：梨、莓類、桃仁、朝鮮薊、蕃茄和茄子（Clifford, 1999; Takeoka and Dao, 2003），其在蔬果中的含量請參考圖VIII。在過去研究中由測試捕捉DPPH自由基及超氧自由基的能力得知，綠原

酸具有強的抗氧化活性(Kweon *et al.*, 2001)。在Fenton-type reaction 中，綠原酸藉由螯合鐵來抑制氫氧自由基的產生(Kono *et al.*, 1998)。氧化的低密度脂蛋白在動脈粥狀硬化的過程中扮演重要的角色(Heinecke, 1998)，而綠原酸在體外實驗中證實可預防LDL的氧化(Whalley *et al.*, 1990; Nardini *et al.*, 1995)，因此推測可能具有保護心血管疾病發生的功用(Heinecke, 1998)。

之前的研究指出綠原酸在許多動物模式中，具有降低化學致癌物質所誘發的致癌作用(Huang *et al.*, 1988; Kasai *et al.*, 2000)，最近的研究亦指出，綠原酸可抑制肺癌細胞的增生與TPA所誘導的腫瘤細胞轉移，推論此抗腫瘤的活性與抑制由TPA及UVB所誘發的NF- κ B, AP-1 與MAPK路徑，及第二期的基因活化有關(Feng *et al.*, 2005)。由於綠原酸在體外實驗中可抑制亞硝化反應，因此可能具有抑制突變的形成，及致癌物質N-nitroso的致癌作用(Kono *et al.*, 1995)，此外在體外實驗中証實綠原酸可抑制DNA的損傷(Kasai *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 1999)。而流行病學的研究中亦發現咖啡的攝取與結腸癌的發生呈負相關(Giovannucci, 1998; Baron *et al.*, 1994; Favero *et al.*, 1998; La Vecchia *et al.*, 1980; Tavain *et al.*, 1997)，而此作用可能與咖啡中含有綠原酸有關(Olthf *et al.*, 2001)

(五). Probucol

Probucol 為一種脂溶性的抗氧化劑，其結構如圖 VII.所示，為臨床上所使用的脂溶性降血脂藥物，可抑制氧自由基對低密度脂蛋白的修飾作用，抑制其致動脈粥狀硬化的作用，並可抑制泡沫細胞形成，進一步延遲動脈粥狀硬化疾病形成或使其逆轉。近 20 年經過大量的動物試驗和臨床循證醫學研究證實後，目前普遍認為有 probucol 是抗動脈粥狀硬化最具有前景和療效確實的第一線抗氧化劑。其藥理特性(Howard, 1989; Barnhart *et al.*, 1989; Holvoet and Collen, 1994; Fruebis *et al.*, 1997; Singal *et al.*, 1997; Marco *et al.*, 1997; David *et al.*, 1998; Stocker *et al.*, 2004)：

1. 可抑制平滑肌細胞增殖，改善內皮細胞功能。
2. 有效去除氧自由基，抑制血小板源性生長因子 (PDGF) 和 IL-1 的產生。
3. 保護 LDL 免受氧化，避免 Ox-LDL 對平滑肌細胞的化學吸引作用，防止平滑肌細胞增殖。
4. 可以競爭性抑制羥甲基戊二醯輔酶 A (HMG-COA)，從而顯著降低血清總膽固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白膽固醇 (LDL-C) 及 LDL-C/HDL-C。
5. 為高脂溶性，能結合到脂蛋白之中，從而顯著降低 Ox-LDL。

6. 可以提高患者運動耐量，減少心絞痛發作次數。

Probucol 的結構特性及抗動脈粥狀硬化作用：

- (1) Probucol 分子具有 14 個親脂性甲基，決定了 Probucol 與 LDL 結合能力遠遠強於其他脂溶性抗氧化劑，Probucol 在 LDL 中的分佈位置在 LDL 中單層磷脂和游離膽固醇組成的疏水性外殼，可以保護 LDL 表面 PUFAs 免受氧自由基的攻擊。
- (2) Probucol 本身就極容易被氧化，其抗氧化能力是 VitE 的 5~6 倍。LDL 氧化修飾過程的早期主要是 LDL 中抗氧化物質的消耗，1 個 LDL 顆粒中包含 6 個 VitE 和 2 個 β -胡蘿蔔素分子，所以與 LDL 結合的 Probucol 分子消耗氧自由基的能力遠遠強於 VitE 和 β -胡蘿蔔素。但是一個 LDL 顆粒可以結合幾個 Probucol 目前尚未研究，然而從 Probucol 高度親脂作用來看，結合數量相信應該在 VitE 之上。
- (3) 除了抗氧化作用外，Probucol 還是一個降膽固醇藥物。
- (4) 其對動脈粥狀硬化過程中諸多的細胞因子也有較強作用，此外可抑制平滑肌細胞增殖，改善內皮細胞功能，抑制黏附因子表現，而這些皆是抗動脈粥狀硬化所必需的。

第五節、內皮細胞與黏附因子

(一). 內皮細胞的功能

血管內皮細胞座落於血管組織的最內層，內皮細胞具有調控白血球通透的功能(Gimbrone *et al.*, 1997)，及維持血管壁細胞恆定的功能，血管內皮細胞還有另一個重要的功能，就是調節血管平滑肌細胞的移行與增生。過去有學者指出，動脈粥狀硬化症或re-stenosis 血管壁增厚的原因，主要是由於平滑肌細胞過度增生所造成 (Hanke *et al.* 1990; Pickering *et al.* 1993)，亦即在此疾病狀態下，內皮細胞受損，以致失去控制，血管平滑肌細胞則會產生異常增生的現象，相對的，在血管內皮細胞恢復功能後則可抑制此血管壁增厚的現象(Bochaton-Piallat *et al.*, 1995)。因此，維持內皮細胞存活及其功能，是目前被認為可以作為治療動脈粥狀硬化症或restenosis的一個方向。

血管內皮細胞可經由分泌各種引起血管擴張或收縮之物質，來調節血管之張力。引起血管擴張的物質包括NO、 prostacyclin、bradykinin 及endothelium- derived hyperpolarizing factor；引起血管收縮的物質包括endothelin、 superoxide anion、 angiotensin II 及thromboxane。這些物質不僅可調節血管的張力，並且可影響血小板的黏著及聚集、血栓之生成、調節細胞之增生，並進而影響動脈粥狀硬化之進行。

各種動脈粥狀硬化危險因子，例如高膽固醇血症、高血壓、糖尿病、抽煙、及抽煙等，皆會造成血栓生成的增加、斑塊的增長、以及血管張力的異常。一旦內皮細胞功能喪失甚至於死亡時就會引發許多的病理現象，例如高血壓和動脈粥狀硬化等等。另外，死亡後的內皮細胞也是血栓形成的因素之一，進而使血管堵塞造成局部組織的缺血而壞死。

細胞功能會因細胞內部氧化壓力之增加而受損，導致血管 cytokines (例如 interleukin-1 及 tumor necrosis factor- α) 之活化，進而增加黏附分子在細胞表面之分佈。這些黏附分子一般分為兩組：一組為 selectin 類 (例如 E-selectin 及 P-selectin)，另一組為免疫球蛋白 (immunoglobulin) 類 (例如血管細胞黏著分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 及細胞間黏著分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1))。這些黏附分子會調控白血球與內皮細胞之間的交互作用，並且會調控白血球進入血管壁之移行 (migration) (Jang *et al.*, 1994)。

Selectin 類主要是調控白血球與內皮細胞之間的交互作用；而 VCAM-1 及 ICAM-1 不僅是調控白血球與內皮細胞之間的交互作用，並調控白血球進入血管壁之移行。黏附分子 (如 VCAM-1, ICAM-1 及

E-selectin) ，會隨著氧化壓力的增加而增加，因此被認為是一個內皮細胞受損的指標 (Hackman *et al.*, 1996; Davi *et al.*, 1998)。

(二). 細胞激素 (cytokine)

近年來研究發現細胞激素和動脈粥狀硬化的慢性發展似乎具有協同作用，可以幫助動脈硬化斑塊及血栓的形成，而動脈硬化斑塊及血栓的內部中，可以發現大量的促發炎激素 (pro-inflammatory cytokine) 堆積在其中，同時這些細胞激素可藉由不同的方法如：促進細胞增生、移動及泡沫細胞形成，來促進血栓或纖維斑塊的形成，而造成動脈粥狀硬化惡化，因此瞭解細胞激素在動脈粥狀硬化形成的作用，或許可以幫助人預防此疾病的產生(Young *et al.*, 2002)。細胞激素在影響動脈粥狀硬化時，可以有兩種主要不同的方法，一為促進其形成：促發炎激素 (pro-inflammatory cytokine) ，另一則為抑制其形成：抗發炎激素 (anti-inflammatory cytokine) ，此兩種激素間的反應而影響動脈粥狀硬化形成，以下便針對促發炎激素做介紹。修飾過的低密度脂蛋白、自由基、血流壓力、高血壓及微生物的感染皆可促進此激素的產生，在動脈粥狀硬化的初期，其可增進血球黏附因子及趨化因子的表現(Fan *et al.*, 1993) ，並加強泡沫細胞的衍生，最後促進

fatty streak 的時期產生，interleukin-1 (IL-1) 及 tumor necrosis factor α (TNF- α) 為標準的促發炎激素(Young *et al.*, 2002; Lind, 2003)，在體外實驗中發現IL-1 α / IL-1 β 及TNF- α 皆可促進內皮細胞及平滑肌細胞分泌黏附因子(Li *et al.*, 1993)，加劇活性氧屬自由基所帶來的傷害，而IL-1 還可影響低密度脂蛋白代謝、刺激血管平滑肌增生及白血球吸附至內皮層上(Lipton *et al.*, 1995)，TNF- α 則可透過基因轉錄之方式影響巨噬細胞清除者受體的表現(Hsu and Twu, 2000)、促進VSMCs 生長及凋亡 (Selzman *et al.*, 2001)，因此IL-1及TNF- α 又被認為是動脈粥狀硬化的主要促發炎因子之一。

(三). 動脈硬化與黏附因子的關係

細胞的黏附因子是表現於細胞表面，調控細胞與細胞之間或細胞與細胞外基質間的黏附作用。在動脈硬化的病理過程中，一個最明顯的特徵為受傷的內皮細胞表面會大量增加黏附的白血球，接著會因為內皮層的通透性增加而使單核球穿透血管壁，而這些過程在發炎反應中是非常重要的，其中細胞表面的黏附因子扮演重要的角色(Collins, 1993 ; Collins *et al.*, 1995)。從白血球黏附到內皮細胞上，再轉移聚集到內皮下空間，此過程需要不同黏附因子的參與，而且此過程包含了

四個步驟(Carlos *et al.*, 1994; Springer, 1995)。首先白血球會與內皮細胞間短暫的反應並沾黏到內皮細胞上 (Capture/ tethering)，接著白血球沿著血管壁滾動 (rolling)，緊密黏附 (firm adhesion) 進而穿透內皮細胞層 (transmigration) 至內皮下腔，這一連串的動作分別需要不同的黏附因子。白血球起始的滾動由內皮細胞上之selectin媒介，而黏著反應是由白血球表面的integrins與內皮細胞表面之免疫球蛋白分子 (immunoglobulin molecules) 來調控。黏附因子廣泛表現及分佈於各種細胞，但與動脈硬化有關的可分為三類：selectins、immunoglobulin-like molecules 和integrins (Blankenberg Nelson, 2003)，請參照圖IV.。

1.Selectins

Selectins 依照表現的地方可分為三個成員：L-selectin表現於白血球、E-selectin表現於內皮細胞、P-selectin則主要表現於血小板，但在內皮細胞也會表現(Bevilacqua *et al.*, 1993)。其中E-selectin在正常情況下幾乎不表現，但會受到一些發炎的細胞激素 (inflammatory cytokines) 刺激而表現。Selectins是繫住 (Capture/ tethering) 白血球到內皮細胞上的重要因子。

2. 似免疫球蛋白分子 (Immunoglobulin-like molecules)

免疫球蛋白超級家族 (Immunoglobulin superfamily) 是細胞膜上糖蛋白接受器 (glycoprotein receptor)，由於細胞外的Ig domain不同，而有不同的isoform，例如ICAM、VCAM、PCAM (platelet endothelial cellular adhesion molecule)。其中ICAM-1在正常情形下會有少量的表現，當受到pro-inflammatory cytokines刺激時，內皮細胞及白血球會大量表現此黏附因子 (Leeuwenberg *et al.*, 1992)，藉由和白血球上之integrins結合，使白血球緊密黏附 (firm adhesion) 到內皮細胞，也參與白血球的外滲作用 (extravasation) (Blankenberg *et al.*, 2003)。VCAM-1表現於活化的內皮細胞，參與白血球的外滲，特別是在單核球、嗜鹼性球 (Basophils)、嗜酸性球 (Eosinophils) 以及淋巴球的滲出。在滾動步驟中，VCAM-1需經由單核球和淋巴球上的VLA-1 (very late activation antigen-1) 與內皮細胞相互作用，使得白血球更緊密的結合在血管管壁上 (Kuijpers and Harlan, 1993; Zapolaka-Downar *et al.*, 2001)。PECAM-1表現於白血球、血小板和內皮細胞上，會經由增加各種黏附因子的活性，使白血球細胞膜上之integrins和其他immunoglobulin superfamily相互作用，藉由此來調控白血球在內皮細胞間的移行，使白血球移行至組織中。

3.Integrins

Integrins主要由醣蛋白組成的兩個次單元，包括 α 鏈 β 鏈，可媒介細胞間的黏附及外圍物質的黏附(Hynes and Lander, 1992)。



第六節、轉錄因子NF- κ B與動脈粥狀硬化

NF- κ B/Rel首先在天竺鼠的B 淋巴細胞被發現，是具有序列特異性的轉錄因子(sequence-specific transcription factor)，會結合到*kappa*-light chain gene的enhancer上5'-GGGACTTTGG-3'序列，藉以調控天竺鼠B 淋巴細胞和漿細胞(plasma cell) *kappa*-light chain的表現；且因其為一種存在於細胞核中的 nuclear transcription factor，故被稱為NF- κ B (Nuclear factor-*kappa* B) (Sen and Baltimore, 1986; Schliessel and Baltimore, 1989)。

後來陸續發現更多NF- κ B可以辨認並結合的DNA 序列，便將這些序列歸納為*kB* elements。所謂的*kB* elements是指一段大約10 個base pair的一致性序列(consensus sequence)，即5'-GGGRNYYY CC-3' (R : unspecified purine ; Y : unspecified pyrimidine ; N : any nucleotide) (Chen *et al.*, 1998)。

NF- κ B轉錄因子已經在很多物種被發現，包括人類、老鼠、果蠅、魚類...等，且發現其基因序列具有相當的相似保守度，但在高等的單細胞生物，如酵母菌，及較低等的多細胞生物，如線蟲，則並未發現此基因的存在，可見此基因是在較高等的多細胞生物才開始演化出現，而其扮演的角色和複雜的細胞生理調控可能息息相關 (Thomas, 1999)。

NF- κ B是由N-端具有約300個胺基酸的Rel-homology domain (RHD) 蛋白以homo-或heterdimers型式所組成，RHD包含了兩個Immunoglobulin (Ig) like domains，C-端之Ig like domains可形成NF- κ B dimer及與I κ B之結合，而N-端之Ig like domains則可辨認DNA序列(Cramer *et al.*, 1999; Chen *et al.*,1998)。不活化狀態的NF- κ B是位於細胞質中，由三個次單元所組成，包含兩個標準 (prototypical) 次單元，分別為50 kDa (p50)、65 kDa (p65; RelA) 和一個抑制性 (inhibitory) 次單元I κ B，其會蓋住促進NF- κ B進入細胞核中的氨基酸序列 (nuclear localization sequence) ，使NF- κ B 滯留在細胞質中，並抑制其和DNA 結合的活性。當細胞受到發炎物質的刺激，I- κ B會受到其上游的蛋白：I- κ B kinase (IKK) 磷酸化其N端，接著I- κ B會被蛋白酶體 (proteasome) 所分解，進而造成NF- κ B的活化，而進入細胞核內和DNA結合(Baeuerle, 1991; Grimm Baeuerle, 1993 ; Heilker *et al.*, 1999 ; Goebeler *et al.*, 2001)，其活化機制圖如圖III. 所示。

然而，依照細胞種類、發育階段、環境因子等因素，細胞可能會表現出其他型態的NF- κ B DNA-binding subunits，NF- κ B家族在哺乳類細胞可分為p50/p105、p52/p100、p65 (RelA)、Rel B及c-Rel五種，I κ Bs如：Bcl-3, I κ B γ 等(Mattson and Gulmsee, 2000)。NF- κ B會以p50或p52與p65

或Rel A/c-Rel形成hetero- dimers，或形成p50/p50、p52/p52、Rel A/Rel A之homodimers，其中p65/p50是第一個被發現且含量最豐富，為大部分細胞主要存有的NF-kB heterodimer。並與生物活性最有關係(Baldwin, 1996; Barnes and Adcock, 1997; Huxford *et al.*, 1998)。而其transactivation能力與不同的NF-kB組成與有關，但是只有p65/p50的組合具有很強的transactivational activity。而形成homodimer 之p50/p50則可能是具有調控transcriptional repression的功能。在許多基因剔除 (gene knock-out) 小鼠的研究中發現，只有p65對於小鼠的存活是必要的(Ghosh *et al.*, 1998)。

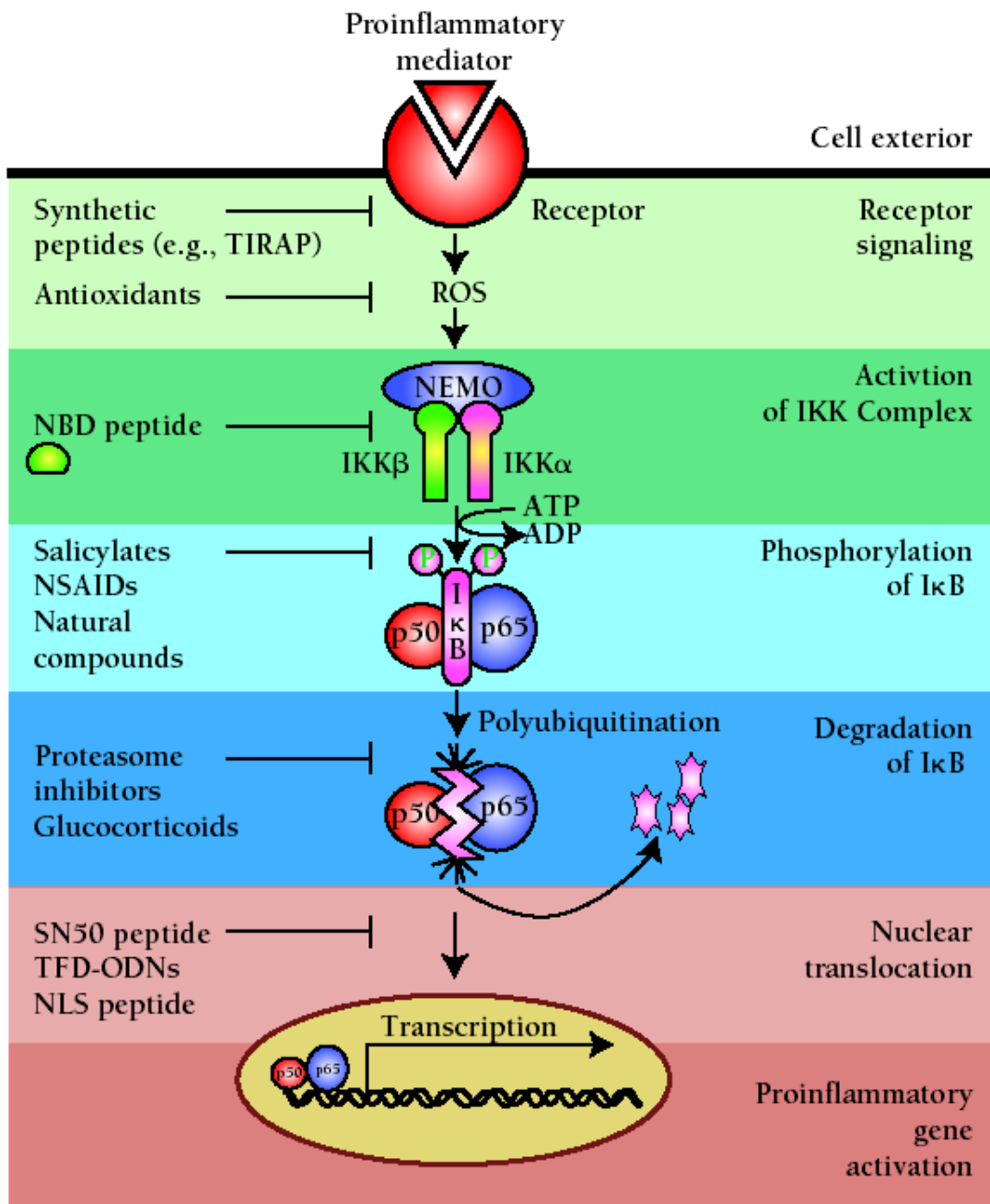
許多的刺激物皆會引發I κ B的磷酸化與分解，並造成NF-kB的活化，包括細菌感染、細菌產物、病毒感染、病毒產物、細胞激素 (cytokine)、腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、神經生長因子 (nerve growth factor, NGF)、神經興奮性傳導物質麩胺酸 (glutamate)、細胞生理反應的狀態、物理性及化學性的傷害、特定蛋白質的過度表現、細胞凋亡反應的調節物表現、成長因子及一些荷爾蒙的刺激... 等 (Baeuerle and Baichwal, 1997; Karin, 1999; Baldwin, 1996; Heike, 1999)，因此，NF-kB被認為是一個關鍵的調節者。NF-kB存在很多種類的細胞中調節免疫與發炎反應(Baeuerle and Henkel, 1994; Ghosh *et al.*, 1998)，它是屬於快速反應的轉錄因子，在1~2小時內便可啟動活化。

NF- κ B除了與免疫和發炎有關外，在cell cycle、細胞增生、分化、細胞凋亡、Oncogenesis、胚胎發育、T-cell與B-cell發育、體內平衡...等等方面亦扮演著重要的調控角色(Tong and Derez- Polo, 1995; Beg *et al.*, 1995 ; Kopp and Ghosh, 1995; Baeuerle and Baltimore, 1996; Grilli *et al.*, 1996; kaltschmidt *et al.*,1997; Kanegae *et al.*, 1998 ; Marty and Albert, 2000; Eunice *et al.*, 2000; Schulze-Osthoff and Stroh, 2000)。此外，在缺血性休克，腦部或脊椎物理性創傷，阿茲海莫氏症（Alzheimer's disease）和巴金森氏症（Parkinson's disease）等神經性退化性疾病，都被證實有NF- κ B活化的情形。NF- κ B可經由調節許多基因的表現，來達成上述的多項生理功能，包括細胞激素、chemokines、細胞吸附因子、生長激素因子、免疫接受體、acute phase proteins、轉錄因子、免疫球蛋白、oxidative stress-related ezymes ... 等(Baeuerle and Baichwal, 1997 ; Lee and Burckart, 1998 ; Heike, 1999)。

1.	惡性腫瘤
2.	心臟疾病
3.	腦血管疾病
4.	糖尿病
5.	事故傷害
6.	肺炎
7.	慢性肝病及肝硬化
8.	腎炎、腎徵候群及腎性病變
9.	自殺
10.	高血壓性疾病

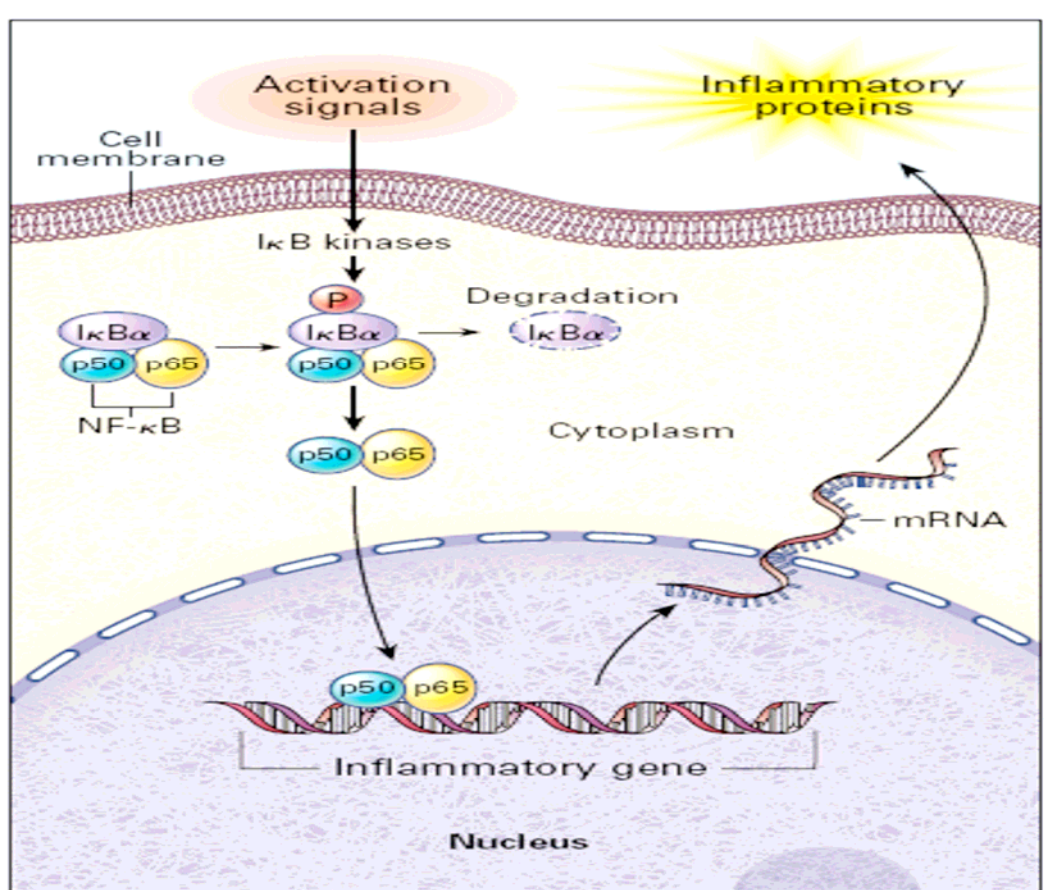
(摘自行政院衛生署, 2004)

圖 I. 民國 93 年台灣地區十大死因



(摘自 Mol.Intervent. 2002)

圖 II. 動脈粥狀硬化與氧化低密度脂蛋白、IL-1 β 、氧化壓力
、NF- κ B 以及黏附因子之相互關係



(摘自 N. Engl. J. Med. 1997)

圖 III. NF-κB 活化調控黏附因子基因的路徑

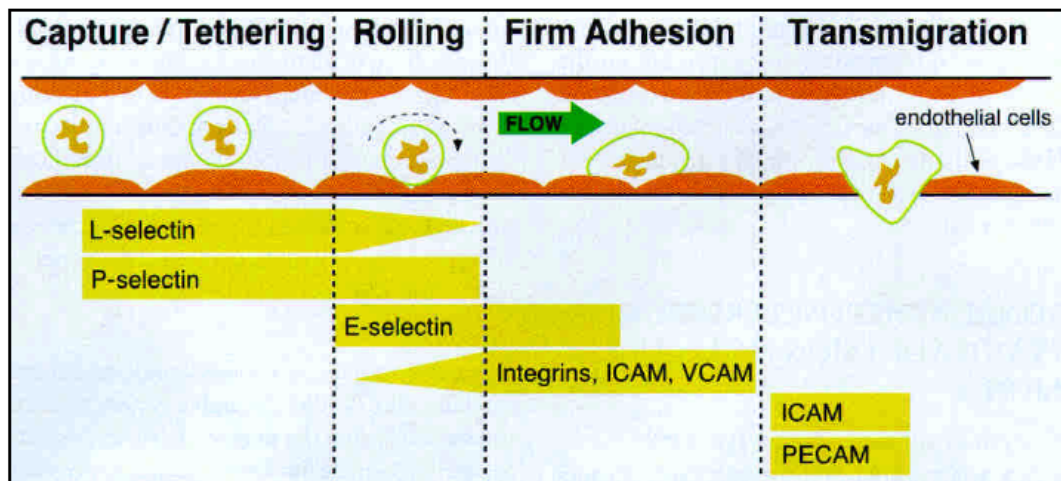
TABLE 1. *Leukocyte-endothelial cell adhesion receptors*

Molecule	Primary expression	Ligand
Selectins		
L-selectin	PMN and lymphs	CD34, GlyCAM-1*
P-selectin	EC, platelet	P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1) Sialyl Lewis ^x and others
E-selectin	EC	Sialyl Lewis ^x and others
Integrins		
LFA-1 (CD11a/CD18)	PMN and lymphs	ICAM-1 and ICAM-2
Mac-1 (CD11b/CD18)	PMN	ICAM-1, and others [‡]
VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ Integrin)	Eos and lymphs	VCAM-1, FN
Immunoglobulin superfamily		
ICAM-1	Lymphs and EC	LFA-1, Mac-1
ICAM-2	Lymphs and EC	LFA-1
VCAM-1	EC	VLA-4
PECAM-1	EC, PMN, lymphs, platelets	PECAM, others

*Ligands for lymphocyte L-selectin; the ligands for neutrophil L-selectin have not yet been identified. [‡]Other ligands for Mac-1 include iC3b, fibrinogen, and bacterial LPS. PMN, polymorphonuclear leukocyte; lymphs, lymphocytes; EC, endothelial cells; Eos, eosinophils.

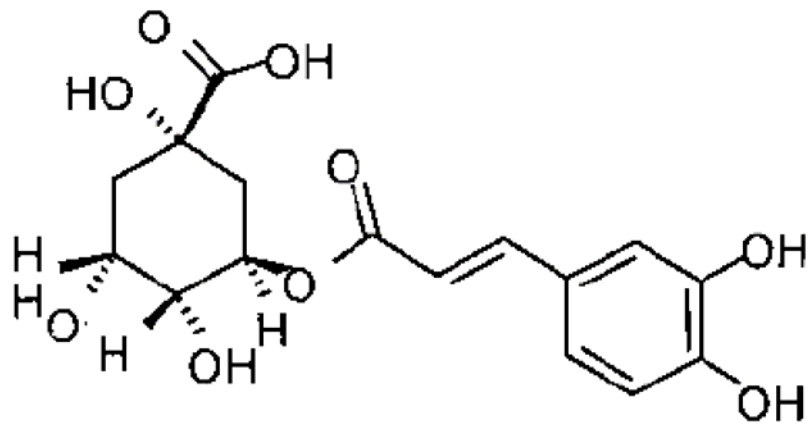
(摘自 FASEB J. 1994)

圖 IV.黏附因子的種類及分布



(摘自 Am J Med. 1999)

圖V. 白血球與內皮細胞沾黏並進入內皮下空間之過程



Chlorogenic acid



圖 VI. 綠原酸之結構式

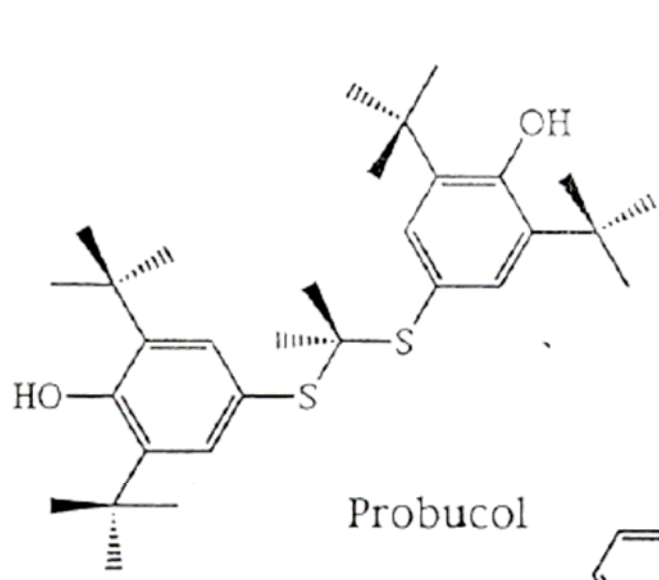


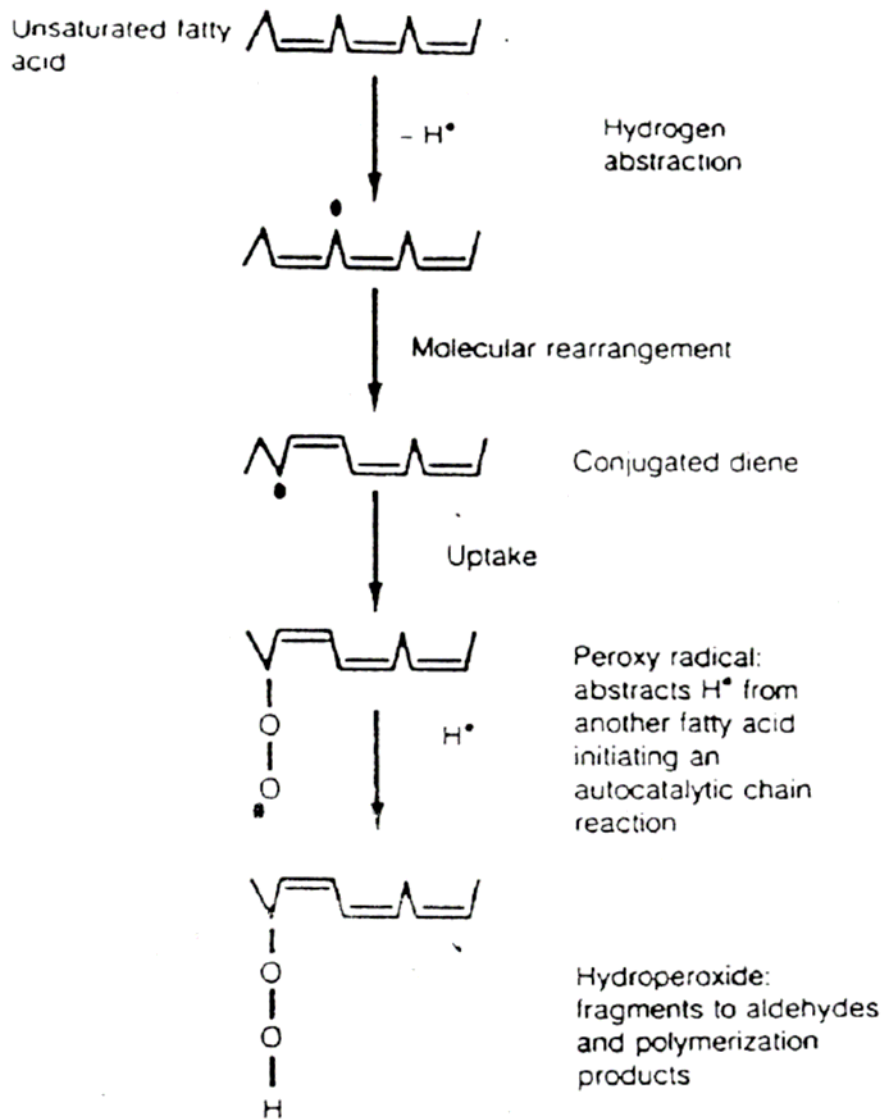
圖 VII. Probucol 之結構式

Polyphenols in foods

	Source (serving size)	Polyphenol content		
		By wt or vol	By serving	
		<i>mg/kg fresh wt (or mg/L)</i>	<i>mg/serving</i>	
Hydroxybenzoic acids (2, 6)	Blackberry (100 g)	80-270	8-27	
	Raspberry (100 g)	60-100	6-10	
Protocatechuic acid	Black currant (100 g)	40-130	4-13	
Gallic acid	Strawberry (200 g)	20-90	4-18	
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	Blueberry (100 g)	2000-2200	200-220	
Hydroxycinnamic acids (2, 5-7)	Kiwi (100 g)	600-1000	60-100	
	Chlorogenic acid	Cherry (200 g)	180-1150	36-230
	Coumaric acid	Plum (200 g)	140-1150	28-230
	Ferulic acid	Aubergine (200 g)	600-660	120-132
	Sinapic acid	Apple (200 g)	50-600	10-120
		Pear (200 g)	15-600	3-120
		Chicory (200 g)	200-500	40-100
		Artichoke (100 g)	450	45
		Potato (200 g)	100-190	20-38
		Corn flour (75 g)	310	23
		Flour: wheat, rice, oat (75 g)	70-90	5-7
		Cider (200 mL)	10-500	2-100
		Coffee (200 mL)	350-1750	70-350
Anthocyanins (8-10)	Aubergine (200 g)	7500	1500	
	Cyanidin	Blackberry (100 g)	1000-4000	100-400
	Pelargonidin	Black currant (100 g)	1300-4000	130-400
	Peonidin	Blueberry (100 g)	250-5000	25-500
	Delphinidin	Black grape (200 g)	300-7500	60-1500
	Malvidin	Cherry (200 g)	350-4500	70-900
		Rhubarb (100 g)	2000	200
		Strawberry (200 g)	150-750	30-150
		Red wine (100 mL)	200-350	20-35
		Plum (200 g)	20-250	4-50
Flavonols (11-18)	Yellow onion (100 g)	250	50	
	Quercetin	Yellow onion (100 g)	350-1200	35-120
	Kaempferol	Curly kale (200 g)	300-600	60-120
	Myricetin	Leek (200 g)	30-225	6-45
		Cherry tomato (200 g)	15-200	3-40
		Broccoli (200 g)	40-100	8-20
		Blueberry (100 g)	30-160	3-16
		Black currant (100 g)	30-70	3-7
		Apricot (200 g)	25-50	5-10
		Apple (200 g)	20-40	4-8
		Beans, green or white (200 g)	10-50	2-10
		Black grape (200 g)	15-40	3-8
		Tomato (200 g)	2-15	0.4-3.0
		Black tea infusion (200 mL)	30-45	6-9
		Green tea infusion (200 mL)	20-35	4-7
	Red wine (100 mL)	2-30	0.2-3	
Flavones (11-12, 14, 18)	Parsley (5 g)	240-1850	1.2-9.2	
	Apigenin	Celery (200 g)	20-140	4-28
	Luteolin	Capsicum pepper (100 g)	5-10	0.5-1
Flavanones (19-21)	Orange juice (200 mL)	215-685	40-140	
	Hesperetin	Grapefruit juice (200 mL)	100-650	20-130
	Naringenin	Lemon juice (200 mL)	50-300	10-60
	Eriodictyol			
Isoflavones (22-25)	Soy flour (75 g)	800-1800	60-135	
	Daidzein	Soybeans, boiled (200 g)	200-900	40-180
	Genistein	Miso (100 g)	250-900	25-90
	Glycitein	Tofu (100 g)	80-700	8-70
		Tempeh (100 g)	430-530	43-53
		Soy milk (200 mL)	30-175	6-35
Monomeric flavanols (6, 17, 26, 27)	Chocolate (50 g)	460-610	23-30	
	Catechin	Beans (200 g)	350-550	70-110
	Epicatechin	Apricot (200 g)	100-250	20-50
		Cherry (200 g)	50-220	10-44
		Grape (200 g)	30-175	6-35
		Peach (200 g)	50-140	10-28
		Blackberry (100 g)	130	13
		Apple (200 g)	20-120	4-24
		Green tea (200 mL)	100-800	20-160
		Black tea (200 mL)	60-500	12-100
		Red wine (100 mL)	80-300	8-30
		Cider (200 mL)	40	8

(摘自 Am J Clin Nutr. 2004)

圖 VIII. 食物中各種多酚類的含量



(摘自 Clinical Chemistry, 1996)

圖 IX. 多不飽和脂肪酸之過氧化反應

第二章、研究目的及假說

行政院衛生署所公布民國九十三年國人十大死因統計資料中，心血管疾病排名第二及第三名(行政院衛生署, 2004)，在心血管疾病中，又以動脈硬化為最主要的致死因素(Libby, 2002)，而在西方社會中，心血管病也是導致死亡的常見原因(Breslow, 1997; Braunwald, 1997)。許多研究顯示，動脈硬化是一種慢性發炎反應疾病，而且在動脈硬化初期，可以發現白血球的黏附及移行到血管壁，內皮細胞會表現黏附因子，使白血球和內皮細胞緊密黏附，內皮細胞的發炎反應扮演了極重要的角色，另一方面脂質的過氧化及低密度脂蛋白的氧化被證實是動脈粥狀硬化發生過程的致病因子。利用抗氧化劑預防低密度脂蛋白的氧化反應可能是一種有效抑制動脈粥狀硬化發生的方法。所以，深入瞭解動脈硬化的生成原因及其調控機轉，有助於預防及治療動脈硬化。近年來預防醫學越來越受重視，因此興起一股研究植物化學成分(phytochemical)的風潮，探討各種生物活性成分的生物化學作用及生理功能，以期達到預防疾病與促進健康的目的(Penny *et al.*, 2002)。目前研究發現，食品中之多酚類具有抗氧化特性，多酚類可減低動脈粥狀硬化的發生率來自於其對於血管病變具有影響(Schramm *et al.*, 1998)，其同時可有效清除自由基、增進體內抗氧化酵素的活性，抑制體內過氧化酵素的活性，以達到

抑制體內低密度脂蛋白的氧化(Aviram and Fuhrman, 1998)及發炎反應的發生(Reed, 2002)。

綠原酸 (chlorogenic acid) 是一種廣泛存在於咖啡、蘋果、梨、莓類、桃仁、朝鮮薊、茄子及中草藥(Clifford, 1999; Takeoka and Dao, 2003)中的酚酸物質。過去研究中顯示綠原酸具有強的抗氧化活性(Kweon *et al.*, 2001)。並且指出綠原酸在許多動物模式中具有降低化學致癌物質所誘發的致癌作用(Huang *et al.*, 1988; Kasai *et al.*, 2000)。過去研究顯示，Ox-LDL在動脈粥狀硬化過程中扮演重要的角色，且一些與發炎反應相關的細胞激素如IL-1 β 及TNF- α ，可以活化真核生物中氧化還原敏感型轉錄因子NF- κ B (Baeuerle and Baltimore, 1996; DiDonato *et al.*, 1997)及AP-1 (Kyriakis, 1999; Zhu *et al.*, 1998; Martin, 1997)，進而促使受NF- κ B調控的相關蛋白質表達，如黏附因子及趨化因子等(Manna *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1997)。因此本實驗首先探討Ox-LDL是否會增加細胞激素IL-1 β 的基因表現，接著探討綠原酸是否具有抑制IL-1 β 所誘導內皮細胞表現之ROS及黏附因子，並且和脂溶性抗氧化劑probucol比較其效果，以及探討綠原酸抑制黏附因子的作用機轉，是否是經由抑制其上游轉錄因子NF- κ B的活化，來探討綠原酸是否具有預防及延緩動脈粥狀硬化發展的作用，及探討其相關的機制。

第三章、材料與方法

第一節、儀器設備

細胞培養箱 (NU4500 CO2 incubator, NUAIRE, USA)

無菌操作檯 (NU-425-600 class II Type A/3, NUAIRE, USA)

流式細胞儀 (FACS Calibur, BD, USA)

細胞計數器 (Haemocytometer; Boeco, Germany)

超高速離心機 (eppendorf Centrifuge 5415R, Hamburg, Germany)

微量超高速離心機 (himac CS 100FX, HITACHI, Japan)

分光光度計 (HITACHI U-2000 spectrophotometer, HITACHI, Japan)

分光光度計 (DU-640 spectriphotometer, Beckman Coulter, UAS)

純水製造機 (Millipore milli-Q Plus, USA)

倒立式顯微鏡 (Nikon Diaphot 300, Japan)

恆溫水浴槽 (Immersion water bath, TKS, Taiwan)

螢光檢驗器 (MicroPlate fluorescence Reader, Bio-Tek, USA)

迴轉式震盪培養箱 (Orbital shaking incubator, UAS)

ELISA plate reader (μ QUANT, Bio-Tek, UAS)

PCR machine (iCycler, BioRad, USA)

Real-time PCR machine (iCycler, BioRad, USA)

1 ml, 200 μ l, 20 μ l pipetman (Gilson, France)

第二節、消耗材料

75T-flask, 25T-flask (Nunc, Denmark)

10 cm²-dish (Falcon, USA)

6 well plate, 96 well plate (Falcon, USA)

50 ml 離心管, 10 ml 離心管 (Falcon, USA)

2 ml tube, 1.5 ml tube (Axygen, USA)

200 µl PCR tube (Bio-rad, USA)

1 ml tip, 200 µl tip, 20 µl tip (Axygen, USA)

5 ml, 10 ml 移液管 (Falcon, USA)

PVC 無粉手套 (Tronex, USA)

過濾杯 (Millipore, USA)

血清瓶 (Boeco, germany)

三方活塞 (TOP three-way stopcock, Malaysia)

10 ml, 20 ml, 50 ml 注射針筒 (TOP plastic syringe, Taiwan)

Parafilm (USA)

試鏡紙 (Kimwipes, USA)

尼龍束縛繩 (Taiwan)

紗布墊 (Taiwan)

第三節、試劑

1. 1. 以下藥品構自 Sigma, MO, USA:

Bovine serum albumin (BSA)

Chlorogenic acid (CA)

Cupric sulfate (CuSO_4)

Diethyl pyrocarbonate (DEPC)

Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Endothelial cell growth supplement (ECG)

Gelatin (2% solution Type B)

Glucose

Hank's balanced salts modified (HBSS)

Heparin

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-terazoliumbromide (MTT)

Medium 199

Sodium chloride (NaCl)

Sodium Bicarbonate (NaHCO_3)

Probucol

2-thiobarbituric acid (TBA)

Trichloroacetic acid (TCA)

Trypan blue

Trypsin-EDTA (1X)

Iso-Propanol

2. 以下藥品購自 Bio-Rad, CA, USA:

Bradford reagent

iScript™ cDNA Synthesis Kit

Sodium dodecyl sulfate (SDS)

SYBR Green supermix

3. 以下藥品購自 GERBU, Gaiberg, Germany:

1,4-Dithio-D,L-threitol (DTT)

Ethylenediamine Tetraacetate Disodium Salt (EDTA-Disodium)

4. 以下藥品購自 Gibco, NY, USA:

Fetal Bovine serum (FBS)

Hepes buffer solution (1M)

L-Glutamine (200 mM)

Penicillin-Streptomycin

RPMI-1640

5. 以下藥品購自 BDH, Poole, England:

Chloroform (CHCl₃)

6. 以下藥品購自 Molecular Probe, Oregon, USA:

2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)



7. 以下藥品購自 Wako, Osaka, Japan:

Hydrochloric acid (HCl)

Hydrogen Peroxide (H₂O₂)

8. 以下藥品購自 SHOWA, Tokyo, Japan:

potassium bromide (KBr)

potassium chloride (KCl)

Disodium hydrogenphosphate (KH₂PO₄)

9. 以下藥品購自 Alderich, WI, USA:

malonaldehyde bis-(dimethylm acetal) (MDA)

6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)

10. 以下藥品購自 TEDIA, OH, USA

Methanol

11. 以下藥品購自 TransAM, Active Motif, CA, USA:

NF-κB kit

Nuclear Extract kit

12. 以下藥品購自 Invitrogen, CA, USA:

Trizol reagent

13. 以下藥品購自 ProSpec-Tany, Rehovot, Isreal:

Recombinant human interleukin-1 beta

14. 以下藥品購自景明化工, 台中, Taiwan

95 % Ethanol

第四節、試藥的配置

(一). 細胞培養用

1. Cord Buffer

秤取 NaCl 8 g, KCl 0.3 g, Hepes 2.38 g, Glucose 2 g 溶於 1 L 滅菌的二次水中，配成最終濃度 NaCl 136 mM, KCl 4 mM, Hepes 1 mM, Glucose 11 mM 之 Cord Buffer，搖勻後調整 pH 值至 7.2，過 0.22 μ M filter 後置於 4 °C 冰箱保存。

2. Collagenase

將每瓶含 1 g 的 Collagenase Type II 溶於 1 L cord buffer 後，過 0.22 μ M filter，分裝後置於 -20 °C 冰箱保存。

3. Gelatin

取 Gelatin (2 %) 原液 5 ml，加入 95 ml 滅菌的二次水中，配成體積百分比 0.1 % 之 Gelatin，置於 4 °C 冰箱保存。

4. M-199

將每瓶含 10.6 g 之 M-199 及 0.35 g NaHCO_3 ，溶於 1 L 滅菌的二次水中，搖勻後調整 pH 值至 7.2，過 0.22 μM filter 後置於 4 °C 冰箱保存。

5. ECG (Endothelial cell growth supplement)

將每瓶含 15 mg 之 ECG 溶於 6 ml 滅菌的二次水中，搖勻後置於-20 °C 冰箱保存。

6. Heparin

將每瓶含 100000 Unit 之 Heparin 溶於 100 ml 滅菌的二次水中，配成最終濃度 1000 U/ml，再過 0.22 μM filter 後置於-20 °C 冰箱保存

7. HBSS

將每瓶含 9.5 g 之 HBSS 及 0.35 g NaHCO_3 ，溶於 1 L 滅菌的二次水中，搖勻後調整 pH 值至 7.2，過 0.22 μM filter 後置於 4 °C 冰箱保存。

8. RPMI 1640

將每包含 10.4 g 之 RPMI 1640 及 2 g NaHCO_3 ，溶於 1 L 滅菌的二次水中，搖勻後調整 pH 值至 7.2，過 0.22 μM filter 後置於 4 °C 冰箱保存。

9. PBS

秤取 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.15 g, KH_2PO_4 0.2 g 溶於二次水中，配成最終濃度 NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM, Na_2HPO_4 7.9 mM 及 KH_2PO_4 1.5 mM 之 PBS，搖勻後調整 pH 值至 7.2，過 0.22 μM filter 後置於 4 °C 冰箱保存。

10. HUVEC Medium

取 10 ml FBS, 1 ml 二合一抗生素, 1 ml 200 mM 之 L-Glutamine, 1 ml 1 M 之 HEPES, 1 ml 1000 U/ml 之 Heparin 及 0.5 ml 2.5 mg/ml 之 ECG, 加入 85.5 ml M-199 中, 配成體積百分比 10% 之 FBS 和 1% 之二合一抗生素, 以及最終濃度 2 mM 之 L-Glutamine, 10 mM 之 HEPES, 10 U/ml 之 Heparin 及 12.5 μ g/ml 之 ECG, 此為臍帶內皮細胞的培養液, 置於 4 °C 保存。

(二). MTT assay

1. MTT

取 250 mg 之 MTT 溶於 50 ml PBS 中, 配成最終濃度 5 mg/ml 之 MTT 溶液, 置於 4 °C 避光保存。

2. SDS-HCL

秤取 10 g SDS 溶於二次水中, 再加入 1 M HCl 1 ml, 再加入二次水定量至 100 ml, 置於室溫保存即可。

(三). 蛋白質定量

1. BSA (Bovine serum albumin)

秤取 10 mg 之 BSA 加入二次水中定量至 100 ml, 配成最終濃度 0.1 mg/ml 之 BSA 溶液, 置於 4 °C 保存。

(四). LDL 的分離與促氧化

1. 0.9 % NaCl

秤取 0.9 g NaCl 加入二次水中定量至 100 ml，配成最終質量百分濃度 0.9 % 之 NaCl 溶液，置於 4 °C 保存。

2. CuSO₄ · 5H₂O

秤取 2.5 mg CuSO₄ · 5H₂O 加入二次水中定量至 100 ml，配成最終濃度 100 μM 之 CuSO₄ 溶液，置於室溫保存即可。

3. PBS-EDTA (透析液)

秤取 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.15 g, KH₂PO₄ 0.2 g, 及 EDTA 111.7 mg, 加入二次水中定量至 1 L, 配成最終濃度 NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM, Na₂HPO₄ 7.9 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, 及 EDTA 0.3 mM 之透析液，置於 4 °C 保存。

(五). TBAR

1. 0.67 % TBA (2-thiobarbituric acid)

秤取 TBA 0.67 g 及 NaOH 0.2 g，加入二次水中定量至 100 ml，配成最終質量百分比 0.67 % 之 TBA，於 4 °C 避光保存。

2. 20 % TCA (Trichloroacetic acid)

取 TCA 原液 20 ml 加入 80 ml 之二次水，配成體積百分比 20 % 之

TCA 溶液，於 4°C 避光保存。

(六). 萃取 RNA

1. DEPC-treated H₂O

取 100 µl DEPC 加入二次水定量至 1 L，配成最終濃度 0.01 % (體積比) 之 DEPC 水，再經高溫高壓滅菌。

(七). 配製 CA 及 Probucol

在捕捉 DPPH 自由基實驗中，秤取 CA 及 Probucol 粉末，溶於甲醇溶液中；在抑制 LDL 氧化實驗中，秤取 CA 及 Probucol 粉末，溶於乙醇溶液中；在抑制 Conjugate diene 實驗中，秤取 CA 及 Probucol 粉末，溶於 PBS 中；在細胞實驗中，秤取 CA 及 Probucol 粉末，加入細胞培養等級之 DMSO 幫助溶解，配製成 10 mM, 1 mM 之 stock solution。

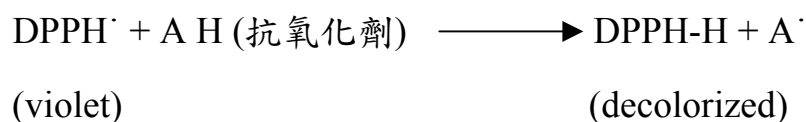
第五節、實驗方法

實驗一、評估 Chlorogenic acid 的抗氧化能力及清除自由基能力

(一) 清除 DPPH 自由基能力試驗

(A) 原理:

油脂在自氧化過程中，會產生自由基，接著發生連鎖反應產生氫過氧化物或氫過氧化自由基，當兩個自由基相互結合時，連鎖反應即終止(Thamas, 1995)，常見的抗氧化物是藉由提供一個氫原子，來清除脂質過氧化自由基，進而抑制氧化連鎖反應的進行。在抗氧化的研究上，通常使用 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 來評估抗氧化劑的供氫能力，DPPH 因其結構上可以產生穩定的共振結構，且其於 517nm 波長下有特定之吸光值。當 DPPH 與氧化劑作用時其吸光值也會隨之降低(Willians *et al*, 1995)。利用此原理可測定出特定物質清除自由基之效力。



(B) 步驟:

DPPH 的甲醇溶液會隨著 pH 的不同及時間的長短而有所變化，其在 pH=5.0-6.5 比較穩定，此外會隨著時間的增常而

劣化，故實驗時需新鮮配製(Blois, 1958)。將CA溶於甲醇中，與DPPH (0.2 mM)等體積混合，反應30分鐘後，以Spectrophotometer在波長517測吸光值。整個實驗均需避光進行，吸光值越低表示清除DPPH自由基的能力越強，以未添加CA的吸光值定為捕捉DPPH百分率0%來與其它濃度做比較。(Blois, 1958)

(C) 計算公式如下：

$$\% \text{ 清除率} = (A_0 - A) / A_0 \times 100 \%$$

A₀：不添加CA之吸光值 (DPPH only)

A：加入不同濃度CA後之吸光值 (CA+DPPH)

(二) 抑制 LDL 氧化能力 (IC₅₀)

1. 分離 LDL

健康及飲食正常之成年人經隔夜禁食後，由真空採血管抽取血液(約 30 mL)，將取出的血液於 37 °C 水浴中靜置 1.5 小時，再於 4 °C 冰箱中靜置 1 小時；而後在 4 °C 的環境下進行低速離心 (3000 rpm “1200×g”，15 分鐘)，以取得上層血清之部份。取 12 mL (2 ml ×6) 血清置入超高速離心管中(3 PC 管)，於每管中加入 0.7 ml 0.9 % NaCl 水溶液 (d=1.006 g/mL) 調整血清比重至 ρ=1.019 g/mL，於 4 °C 環

境下進行超高速離心（100,000 rpm、10 °C、3.5hr、Acc.5、Dec.7）。離心後去除上層 0.7 mL 呈乳白色的 VLDL ($\rho < 1.019$ g/mL) 部分，再加入 166.8 mg KBr 水溶液 ($d = 1.22$ g/mL) 將剩餘下層部分之比重調整至 $\rho = 1.063$ g/mL，混勻，一樣於 4 °C 的環境下進行超高速離心（100,000rpm、10°C、3.5hr、Acc.9、Dec.7）。離心後每管吸取最上層淡黃色之 LDL 部分 0.6 ml ($\rho = 1.019-1.063$ g/mL)，取得的 LDL 分裝於微量離心管中，在充氮氣後於 4 °C 下避光保存備用，而 LDL 的保存期以不超過一星期為佳 (Havel *et al.*, 1955)。

2. 定量 LDL Protein

檢量線：以測定出來的標準品吸光值與蛋白質濃度畫出檢量線，並求出檢量線方程式及 R^2 值， R^2 值需 > 0.99 以上準確度。

	1	2	3	4	5	6
蛋白質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	0	5	10	15	20	25
0.1mg/mlBSA (μl)	0	50	100	150	200	250
DDW (μl)	800	750	700	650	600	550
Bradford (μl)	200	200	200	200	200	200
總體積 (μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

樣品蛋白質濃度測定：

取 10 μl 的樣品與 790 μl 的 DDW 混合，再加入 200 μl Bradford 染劑，反應 5 分鐘後在 OD 595nm 測定吸光值。將樣品測得的吸光值 (y) 代入檢量線方程式中，可求出蛋白質濃度 (X) ($\mu\text{g/ml}$) (Bradford, 1976)

3. 抑制 LDL 氧化能力

(A). 原理:

本試驗原理是利用人體離體低密度脂蛋白，在氧化時會產生氧化產物，此物在232 ~ 234 nm 下有一最大吸收波峰，可用來檢測其低密度脂蛋白的氧化情形，故由健康成人血清所分出的低密度脂蛋白，和固定濃度的銅離子及試驗樣品（CA）共同培養一段時間後，於OD 232 nm 下測得其氧化產物的產生情形，可得到抑制50 % LDL氧化所需的CA濃度，簡稱IC₅₀

(B). 步驟:

先定量LDL 蛋白質，以PBS稀釋濃度至0.9 mg/ml。配製50 μM CuSO₄, 2 mM EDTA 再分別依下表將不同試藥加入不同組別中(96well)。

組別	LDL	10% EtOH	2×10 ⁻⁵ M CA	PBS	50 μM Cu ²⁺	2 mM EDTA
Blank	—	10ul	—	—	—	150ul
Control	50ul	10ul	—	40ul	—	150ul
Cu ²⁺	50ul	10ul	—	20ul	20ul	150ul
CA 2μM + Cu ²⁺	50ul	—	10ul	20ul	20ul	150ul
CA 3μM + Cu ²⁺	50ul	—	15ul	15ul	20ul	150ul
CA 4μM + Cu ²⁺	50ul	—	20ul	10ul	20ul	150ul
CA 5μM + Cu ²⁺	50ul	—	25ul	5ul	20ul	150ul
CA 6μM + Cu ²⁺	50ul	—	30ul	—	20ul	150ul

2-8 管各加入 50 μl LDL，1-3 管加 10 % EtOH 10μl，4-8 管

各加入 10.15.20.25.30 μl 的 $2 \times 10^{-5} \text{ M CA}$ ，用鋁箔紙包住，於 37°C 120 rpm 水平震盪 1 小時（使 probucol 及 CA 插入 LDL 中），再加入 PBS 及 CuSO_4 ， 37°C 120 rpm 水平震盪 2 小時（使 Cu^{2+} 作用），各加入 150 μl 2 mM EDTA（終止反應），Mix 後各取 100 μl 於 eppendorf（標示 Blank, 1, 2, 3....），各加入 900 μl isopropanol 混合均勻（沈澱蛋白質），於 12000 rpm 離心 10 min，取上清液於 cavette 中，波長 232-234nm 測吸光值。

(C). 計算公式:

$$\Delta\text{ACu}^{2+} = [\text{Cu}^{2+}] - \text{control}$$

$$\Delta\text{Acap} = [\text{Acap}] - \text{control}$$

$$\text{抑制氧化}\% = (\Delta\text{ACu}^{2+} - \Delta\text{Acap}) / \Delta\text{ACu}^{2+} \times 100\%$$

(三) . Conjugate diene (CD)

脂質過氧化之重要特徵為其氧化產物共軛雙烯 (Conjugate Diene) 之生成量會隨氧化時間增長而增加。利用共軛雙烯可在 230~235nm 吸光值下被偵測之原理，將不同濃度的 CA 溶於 PBS 中再以銅離子 (5mM) 於 37°C 誘導 LDL 960min，反應開始起每 15 min 測量一次吸光值，以 Conjugate Diene 生成量 (吸光值) 為縱座標，氧化時間為橫座標做圖。

實驗二、CA 的細胞毒性

(一) 萃取臍帶內皮細胞 (HUVEC)

將 2 ml Gelatin 黏附在 flask 上，置於培養箱中約 1 小時，倒 500 ml cord buffer 於 1000 ml 燒杯中，再加入 5 ml 抗生素，臍帶放入含 cord buffer 的燒杯中泡一下，再取出臍帶以紗布擦拭，並找到靜脈腔，將三向活塞一端插入靜脈端，並以束縛繩固定住，針筒抽 cord buffer，排出空氣再套在三向活塞的另一端，推動針筒洗臍靜脈 1-2 次，將臍帶靜脈內的 cord buffer 排乾淨後，以束縛繩夾住另一端封住臍帶兩端，以針筒取約 20 ml collagenase 套在三向活塞上，打入其靜脈至 8-9 分滿左右，轉動活塞避免流出，即可抽出針筒，反應約 8 分鐘（要一邊按摩臍帶），取 30 ml HBSS 於 50 ml 離心管中，針筒接到三向活塞上，轉動活塞，將臍帶內的 collagenase 反推回針筒中，將針筒內收集的置入 50 ml 離心管中，將 HBSS 打入臍帶內(wash)，鎖住活塞按摩一下後推回針筒內，置入含 collagenase 的離心瓶中，再離心 1200 rpm 10 min 倒掉上清液剩下約 3-5 ml，加入於培養箱中的 flask 中，HUVEC 10 ml 搖晃均勻，隔天再換新鮮 Medium，培養至固定代數進行 (Marin *et al.*, 2001)。

(二) 培養臍帶內皮細胞 (HUVEC)

HUVEC 以 37 °C, 5 % CO₂ 培養於 M-199 培養基中，培養基包括 10 % FBS, 1 % Penicillin/ Streptomycin (P/S), heparin, endothelial cell growth supplement (ECG), L-Glutamine。每兩天換一次 Medium，長滿後將之分盤繼代培養在新的 T-75 flask 中，取 2-5 代的 HUVEC 進行各項實驗 (Marin *et al.*, 2001; Bachetti and Morbidelli, 2000)。

(三) MTT test

(A). 原理:

MTT 全名 (3- [4, 5-Dimethylthiazol-2-yl] -2, 5- diphenyl tetrazolium bromide)，為一黃色的 chemical reagent, 可被活細胞吸收，其 tetrazolium 在粒腺體 (mitochondria) 內被酵素 succinate dehydrogenase 還原成藍紫色 formazan，此物在 590 nm 下具最大吸收波峰，可藉由 OD 570 的大小，得知活細胞數目，常常用於檢測樣品對細胞毒性及存活測試上 (Denizot And Lang, 1986)。

(B). 步驟:

將 HUVEC 分盤於 96 well plate 中 (2×10^4 /well) 10 % FBS-medium 100 μ l 培養約 24 小時後，以 HBSS wash 後以含 1 % FBS

之 medium 進行同步化 24 小時，wash 後再加入不同濃度含 CA 之 medium 培養 24 小時，加入 10 μ l /well MTT 反應 4 小時，再加入 100 μ l / well SDS-HCl over night 將細胞打破使色素溶出，隔天以 OD 590 測吸光值。

實驗三、Ox-LDL 誘發 HUVEC 表現 IL-1 β

(一)、Ox-LDL 的製備

1.Ox-LDL 促氧化

先定量 LDL protein (0.9 mg/ml) 加 0.1 ml CuSO₄ 100 μ M (最終濃度為 10 μ M)，37°C 下避光水平震盪 24 hr。

2.透析

將 LDL 放入透析膜內，以透析夾固定後，放入血清瓶中，將瓶子裝滿透析液，透析液的成分即含 0.3 mM EDTA 的 PBS，於 4 °C 環境下避光攪動，先透析 2 小時後更換新的緩衝液，再於 5 及 8 小時後更換一次，再進行透析 over night，而後取出的 LDL 過濾 (0.22 μ M) 再充氮氣後於 4 °C 下避光保存備用。

3.測 TBAR

利用 Yagi 氏 (1987) 等法，其原理因 LDL 氧化會生成過氧化物

Malondialdehyde (MDA) ，一分子的MDA與二分子thiobarbituric acid (TBA) 會生紅色聚合物TBARS (thiobarbituric acid reactive substance)，此物質於OD 532 nm具最大吸收波長，而加入TCA可使蛋白質沉澱，以不同濃度的MDA為標準液與TBA反應做檢量線而可定量LDL氧化程度，單位為n mol/ ml，值越高表示脂質氧化程度越高。

4. 氧化低密度脂蛋白蛋白質濃度之定量

取10 μ L 之Ox-LDL，加入790 μ L DDW及200 μ L Bio-Rad Dye Reagent (稀釋100倍)，在室溫下放5分鐘後，於OD 595 nm下測吸值，所得吸光值越高則表示Ox-LDL 中所含的蛋白質量越高。所測出的吸光值與小牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 之標準曲線做對照，便可求出Ox-LDL 中所含蛋白質含量。

(二)、Ox-LDL影響IL-1 β m-RNA的表現

1. 細胞加藥處理

將細胞培養在10 cm^2 -dish中，細胞數約 1×10^6 ，以含10 % FBS之medium培養24小時後，再以1 % FBS之medium同步化24小時後，控制組不加OX-LDL，而另一組則加入100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OX-LDL於medium中，反應24小時後以Trypsin-EDTA收細胞。離心後到掉上清液，其沈澱物即為細胞。

2.Total RNA的萃取

取沉澱後之細胞加入1 ml Trizol reagent，混勻後至於冰上5分鐘，各管再加入200 μ l CHCl_3 ，震盪混合15秒後靜至於冰上15分鐘，接著離心（12000xg, 15min, 4 $^{\circ}$ C），吸取上清液600 μ l至新的1.5ml微量離心管中，加入500 μ l isopropanol上下混合均勻，在靜置於冰上10分鐘，接著離心（12000xg, 10min, 4 $^{\circ}$ C）。去除上清液，留下底下白色沈澱物，加入1 ml 70% alcohol使RNA更純淨，接著離心（7500 xg, 5 min, 4 $^{\circ}$ C）。去除酒精再加入適量（20-50 μ l）DEPC-treated H_2O ，將RNA沈澱物溶解並保存於-80 $^{\circ}$ C。

3.RNA定量

先將分光光度計暖機至少10分鐘以穩定光源，利用OD 260/OD 280nm波長之紫外光測量RNA的純度，利用OD 230及OD 270測有機溶劑的殘留。先取石英管注入1000 μ l DEPC-treated H_2O 作為blank，接著取1 μ l Total RNA與999 μ l DEPC-treated H_2O 混合均勻後，Spectrophotometer測量。

計算Total RNA=OD 260 \times 40 \times 1000 (μ g/ml)

4.反轉錄反應（Reverse transcription）

取固定量的RNA（4 μ g）來進行單管的RT反應。在200 μ l PCR微

量離心管中加入下列試劑：

	Volume per reaction
5x iScript Reaction Mix	4 μ l
iScript Reverse Transcriptase	1 μ l
Nuclease-free water	15-X μ l
RNA template	X μ l
Total Volume	20 μ l

混合完全後置入PCR machine，進行反轉錄反應。

5. 同步定量聚合酶鏈反應 (Real-Time Polymerase chain reaction)

(A) 原理:

先要在要擴增的 DNA 片段兩端分別設計一個前置引子 (Forward Primer) 和反置引子 (Reverse Primer)，然後將溫度提高使得雙股的目標 DNA 變性成單股，再將引子與已變性的單股目標 DNA 配對結合後，利用 DNA 聚合酵素 (DNA Polymerase) 以目標 DNA 的兩股分別做為模板 (Template) 來合成新的 DNA 股，如此週而復始，就可以 2^n 的速率急速地複製 DNA 片段。

(B) 材料:

- (1) 要被複製的 DNA 模板 (Template)；
- (2) 界定複製範圍兩端的引子 (Primer)；

PCR 的引子是一種人工合成的寡聚核苷 (Oligonucleotide)，

引子的設計是聚合酶連鎖反應成功與否的關鍵因素，包括了前置引子(forward primer)和反置引子(reverse primer)，可分別 DNA 的雙股配對結合，作為合成新股的起點。成功引子的要點有：

- (a) 長度為 18-25 個鹼基，兩個引子的長度差距不可多於 3 個鹼基。
- (b) 任一引子的組成不能含有會在引子內部產生互補現象的 3 個以上連續鹼基，否則會在引子內部產生二級結構，影響引子和 DNA 模板的黏合效率。
- (c) 四種鹼基要平均分佈，(G+C)/(A+T)的比值大約是 0.4-0.6。
- (d) 引子之間的鹼基序列也不能有互補的情形，否則會彼此黏合生成引子二聚物(Primer Dimer)，減低引子和 DNA 模板的黏合效率。
- (e) 兩條引子之間的解鏈溫度(Melting Temperature)不可相差 5°C 以上，解鏈溫度指的是雙股 DNA 有半數達成變性而分開成單股 DNA 時的溫度。

(3) DNA 的合成酵素(Taq Polymerase)：

是從嗜熱性細菌所分離出來的酵素，目前最常用的 DNA 聚合酶是由學名為 *Thermus aquaticus* 細菌所分離出來的，因此名為 Taq，可以將四種核苷酸催化聚合成一股新的互補 DNA 鏈。

(4) 合成的主要原料：

包括了 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 等四種三磷酸去氧核苷酸 (dNTPs , Deoxynucleoside Triphosphates)，還有提供合成酵素作用活性的氯化鎂($MgCl_2$)緩衝液(Buffer)，鎂離子是聚合酶活性的要素，而且不同的 PCR 需要不同的鎂離子濃度。

(C). 步驟:

取200 μ l Optical grade PCR微量離心管，依序加入以下試劑：2x SYBR green Imaster mix, forward primer (500 nM), reverse primer (500 nM), RT product 與DDW使總體積為25 μ l，混合完全後置入 PCR machine 中。

(1) 變性(Denaturation)：通常使用 92°C-95°C之間的高溫，使雙股 DNA 變性而分開成單股的 DNA，作為往後複製的模板。

(2) 結合(Annealing)：通常在 40°C - 60°C之間，使引子(Primer)附著於單股的 DNA 模板上做配對結合。

(3) 延長(Elongation)：使用變性而來的單股 DNA 作為模板 (Template)，以引子(Primer)為起點，在 DNA 的合成酵素(Taq Polymerase)的催化及適當溫度的作用下，將四種核苷酸催化聚合成一股與模板互補的 DNA 新鏈。

實驗四、偵測細胞內自由基的形成

1. Time course

將細胞分盤至6 well plate細胞培養盤中，細胞數約為 2×10^5 ，以含10 % FBS之medium培養24小時後，再以1% FBS之medium同步化24小時後，接著以IL-1 β 刺激2, 4, 6小時後，以Trypsin-EDTA收細胞，離心1200 rpm, 10分鐘後去除上清液，以PBS重新混懸細胞，再以1200 rpm離心 10分鐘後去除上清液，最後加入含有螢光染劑的PBS，以流式細胞儀觀察結果。

2. 評估CA與probucol對IL-1 β 誘導ROS產生的影響

將細胞分盤至6 well plate細胞培養盤中，細胞數約為 2×10^5 ，以含10 % FBS之medium培養24小時後，再以1% FBS之medium同步化24小時後，再以含25 μ M, 50 μ M之CA或probucol的medium加入細胞反應18小時後，接著以IL-1 β 刺激6小時後，以Trypsin-EDTA收細胞，離心1200 rpm, 10分鐘後去除上清液，以PBS重新混懸細胞，再以1200 rpm離心10分鐘後去除上清液，最後加入含有螢光染劑的PBS，以流式細胞儀觀察結果。

實驗五、評估CA與probucol對IL-1 β 誘導黏附因子：VCAM-1, ICAM-1, E-selectin產生的影響

1. 細胞加藥處理

將細胞培養在10 cm²-dish中，細胞數約1 \times 10⁶，以含10 % FBS之medium培養24小時後，再以1 % FBS之medium同步化24小時後，再以含25 μ M, 50 μ M之CA或probucol的medium加入細胞反應18小時後，接著以IL-1 β 刺激6小時後，以Trypsin-EDTA收細胞，離心1200 rpm, 10分鐘後去除上清液。

2. Total RNA的萃取

加入1 ml Trizol reagent，混勻後至於冰上5分鐘，各管再加入200 μ l CHCl₃，震盪混合15秒後竟至於冰上15分鐘，接著離心（12000 xg, 15min, 4 $^{\circ}$ C），吸取上清液600 μ l至新的1.5 ml微量離心管中，加入500 μ l iso-propanol上下混合均勻，在靜置於冰上10分鐘，接著離心（12000 xg, 10min, 4 $^{\circ}$ C）。去除上清液，留下底下白色沈澱物，加入1 ml 70 % alcohol使RNA更純淨，接著離心（7500 xg, 5 min, 4 $^{\circ}$ C）。去除酒精再加入適量（20-50 μ l）DEPC-treated H₂O，將RNA沈澱物溶解並保存於-80 $^{\circ}$ C。

3. RNA定量

先將分光光度計暖機至少10分鐘以穩定光源，利用OD 260/OD

280nm波長之紫外光測量RNA的純度，利用OD 230及OD 270測有機溶劑的殘留。先取石英管注入1000 μ l DEPC-treated H₂O作為blank，接著取1 μ l Total RNA與999 μ l DEPC-treated H₂O混合均勻後，以Spectrophotometer測量。

計算Total RNA=OD 260 \times 40 \times 1000 (μ g/ml)

4. 反轉錄反應 (Reverse transcription)

取固定量的RNA (4ug) 來進行單管的RT反應。在200 μ l PCR微量離心管中加入下列試劑：

	Volume per reaction
5x iScript Reaction Mix	4 μ l
iScript Reverse Transcriptase	1 μ l
Nuclease-free water	15-X μ l
RNA template	X μ l
Total Volume	20 μ l

混合完全後置入PCR machine，進行反轉錄反應。

5. 同步定量聚合酶鍊反應 (Real-Time Polymerase chain reaction)

取200 μ l Optical grade PCR微量離心管，依序加入以下試劑：2x SYBR green Imaster mix, forward primer (500 nM), reverse primer (500 nM), RT product與DDW使總體積為25 μ l，混合完全後置入PCR machine中。

實驗六、以ELISA評估CA與probucal對IL-1 β 誘導轉錄因子NF- κ B活化產生的影響

1. 細胞加藥處理

將細胞培養在10 cm²-dish中，細胞數約 1×10^6 ，以含10 % FBS之medium培養24小時後，再以1 % FBS之medium同步化24小時後，再以含25 μ M, 50 μ M之CA或probucol的medium加入細胞反應18小時後，接著以IL-1 β 刺激6小時後，以Trypsin-EDTA收細胞於15 ml離心管中，離心1200 rpm, 10分鐘後去除上清液。

2. 萃取細胞核蛋白質

將細胞加入含有phosphatase inhibitor的PBS重新混懸細胞，再次以離心1200 rpm 離心10分鐘後，以hypotonic buffer 再混懸細胞後轉至eppendorf中，冰浴15分鐘，再加入detergent高速vortex 10秒，再以14000 xg離心30秒（4 $^{\circ}$ C），去除上清液後，將pellet以lysis buffer再次混懸，放置於水平震盪器150 xg，30分鐘（冰浴）後高速vortex 30秒，再離心（14000 xg, 10min, 4 $^{\circ}$ C），取上清液至新的eppendorf中，保存於-80 $^{\circ}$ C。

3. 核蛋白定量

檢量線：以測定出來的標準品吸光值與蛋白質濃度畫出檢量線，

並求出檢量線方程式及 R^2 值， R^2 值需 >0.99 以上準確度。

	1	2	3	4	5	6
蛋白質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	0	5	10	15	20	25
0.1mg/mlBSA (μl)	0	50	100	150	200	250
DDW (μl)	800	750	700	650	600	550
Bradford (μl)	200	200	200	200	200	200
總體積 (μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

取1 μl 細胞核蛋白質與799 μl 的DDW混合，再加入200 μl Bradford
染劑(稀釋1000倍)，混合均勻反應5分鐘後在OD 595nm測定吸值。

將樣品測得的吸光值(y)代入檢量線方程式中，則可求出蛋白質濃
度(X) ($\mu\text{g/ml}$) (Bradford, 1976)

4. NF- κ B family ELISA Kit

取5 μg 的核蛋白溶於lysis buffer中，加入預先固定化NF- κ B
Consensus oligonucleotide的well中，以Parafilm封住，室溫下水平振
盪(100 rpm, 1h)，再以200 μl Washing buffer/well 反覆洗三次，加
100 μl NF- κ B family一級抗體/well (1:1000 dilution in antibody
binding buffer) 以Parafilm封住，室溫下反應一小時，再wash 三次，
接著加100 μl Horse radish Peroxidase (HRP) antibody/well (1:1000
dilution in antibody binding buffer) 以Parafilm封住室溫下反應一小時
(設定ELISA reader，取出 Developing solution 於室溫下回溫(避
光))，再wash四次，加100 μl Developing solution/well，室溫下避光

反應約5 min(呈現出藍色), 再加入100 μ l /well stop solution (酸性: 顏色由藍便黃) 最後測OD 450 (Reference OD 655)。

實驗七、單核球黏附試驗

1. HUVEC

將細胞分盤至6 well plate或96 well plate細胞培養盤中，細胞數約為 2×10^5 或 2×10^4 ，以含10 % FBS之medium培養24小時後，再以1 % FBS之medium同步化24小時後，再以含25 μ M, 50 μ M之CA或probucol的medium加入細胞反應18小時後，接著以IL-1 β 刺激6小時後。

2. U-937 cell line

單核球細胞株(懸浮性)，購自台灣食品工業研究所，BCRC number : 60425。以含10 % FBS 之RPMI-1640 medium培養，並維持細胞生長密度約 10^5 - 10^6 之間，約3-4天更換一次medium，直至實驗時使用。

3. U937 Cell adhesion

取出 U937 cell，離心去除舊的 medium，再加入含 calcein AM (10 μ M) 之 RPMI-1640 反應 30 分鐘，再將 U937 離心後加入 M-199 混懸後加入 HUVEC 中 (6 well plate: 200000/well ; 96 well plate: 20000/well)，反應 30 分鐘，以 PBS 清洗掉未黏附的 U937 cell，最後測將 96 well plate 以螢光的 ELISA reader 測其吸光值：OD 485 (excitation) OD 528 (emission)(定量)。將 6 well plate 以螢光顯微鏡照相 (定性)。

第六節、統計方法

實驗結果之數值皆以mean \pm SD 表示。以SAS system做統計，以One-way ANOVA Doncan`s Multiple Range test 比較多組間的差異，並且以 $p < 0.05$ 視為差異具有統計上的意義。



表 I. IL-1 β 、VCAM-1、ICAM-1、E-selectin 及 GAPDH primer

	forward primer	reverse primer	product Tm	product length
IL-1 β	AGATGATAAGCCCACTCTACA	ACATTCAGCACAGGACTCTC	86	216
VCAM-1	TCCGTCTCATTGACTTGCAG	TTCCAGGGACTTCCTGTCTG	84	225
ICAM-1	GCGCCCCAGTCGACGCTGAGC	GGCAGTTGAGAAAGCTTTATTAACAAACAC	89	184
E-selectin	CTCTGACAGAAGAAGCCAAG	ACTTGAGTCCACTGAAGCCA	88	175
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	91	181



第四章、結果

實驗一、評估 Chlorogenic acid 的抗氧化能力及清除自由基能力

根據體外試驗結果發現，綠原酸清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值約為 $36.3 \pm 2.7 \mu M$ ，而正控制組 ProbucoI 之 IC_{50} 值約為 $41.8 \pm 3.1 \mu M$ ；在抑制 LDL 氧化能力方面，綠原酸之 IC_{50} 為 $3.1 \pm 0.4 \mu M$ ，ProbucoI 之 IC_{50} 值為 $5.5 \pm 0.7 \mu M$ ，由此兩種抗氧化試驗結果可知，綠原酸具有捕捉 DPPH 自由基及抑制 LDL 氧化的能力，且其抗氧化效果優於已知的脂溶性抗氧化劑 probucoI。結果如圖 1-1, 1-2 所示，及表一所整理。

另一方面，我們探討綠原酸是否具有抑制氧化發生，以及延長氧化遲滯期的作用，我們利用測量 Conjugate diene (CD) 的生成，結果發現當加入了 $25 \mu M$ 或 $50 \mu M$ 的綠原酸後，可以明顯的較正常組有較低的 Conjugate diene 生成量，且具有較長的氧化遲滯期。結果如圖 1-3 所示。

實驗二、利用 MTT 測試 CA 的細胞毒性

再進行各項細胞實驗前，先進行 MTT test 測量細胞存活率，可得到綠原酸及 ProbucoI 不會造成細胞毒性的濃度範圍。首先將人類臍靜脈內皮細胞分盤於 96 well plate 細胞培養盤中 (2×10^4 cell/well)，接著以含 1 % FBS 之 medium 同步化 24 小時，再分別加入不同濃度之綠原酸或

probucol (0-300 μM) 培養 24 小時，結果如圖 2-1, 2-2 所示。結果顯示無論是綠原酸或者是 probucol，在濃度 200 μM 以下時皆不具有細胞毒性 (細胞存活率 $>90\%$)，而在參考其他文獻之後，本實驗選定 25 μM 及 50 μM 兩個濃度去進行以下的實驗。

實驗三、以同步定量聚合酶鏈反應探討 Ox-LDL 是否誘發 HUVEC 表現 IL-1 β

首先先分離出 LDL 再以 CuSO_4 促氧化，測量 Ox-LDL 之 TBAR，其值約在 25 $\mu\text{mol/ml}$ 左右，再進行透析後其 TBAR 值降至 7 $\mu\text{mol/ml}$ 左右。接著定量 Ox-LDL 之蛋白質濃度，再參考其他文獻之後，決定加入細胞的最終濃度為 100 $\mu\text{g/ml}$ 。另一方面，將內皮細胞分盤於 6 well plate 中 (2×10^5 cell/well)，接著以含 1% FBS 之 medium 同步化 24 小時，再加入 Ox-LDL (100 $\mu\text{g/ml}$) 反應 24 小時，以 Trypsin-EDTA 收集細胞，再利用 Trizol reagent 萃取 RNA，再將所萃取之 RNA 定量及進行反轉錄作用，之後以同步定量聚合酶鏈反應觀察 IL-1 β mRNA 的表現。結果發現 Ox-LDL 與正常組相較下，其會誘導內皮細胞表現大量的 IL-1 β ，並達到統計上的差異 ($p < 0.05$)，如圖 3-1 所示。而在圖 3-2 中可觀察到 IL-1 β 在同步定量聚合酶鏈反應中，螢光強度變化的情形，隨著反應之 cycle

數增加，其螢光強度逐漸超過閾值(Ct)，而利用 Ct 值來計算其相對表現量。而圖 3-3 中，利用測定所合成 PCR 產物之 melting temperature 來確定其專一性，由結果可看出產物之 melting temperature 均落在同一溫度上，即可確定其合成的產物具有專一性。

實驗四、利用流式細胞儀偵測IL-1 β 所誘發細胞內自由基的生成及綠

原酸之抑制作用

先將內皮細胞分盤於 6 well plate 中 (2×10^5 cell/well)，接著以含 1% FBS 之 medium 同步化 24 小時，再分別以 IL-1 β 刺激 2、4、6 小時，以 Trypsin- EDTA 收集細胞，離心去除上清液，再加入含有螢光染劑之 PBS 重新混懸細胞，避光作用 30 分鐘後，以流式細胞儀觀察細胞中的 ROS。結果如圖 4-1 所示，發現以 IL-1 β 刺激 6 小時後可明顯增加細胞中的 ROS，並達到統計上的差異 ($p < 0.05$)，所以在接下來的實驗中，IL-1 β 刺激的時間點定為 6 小時。

另一方面，將內皮細胞分盤於 6 well plate 中 (2×10^5 cell/well)，接著以含 1% FBS 之 medium 同步化 24 小時，再分別加入 25 μ M 或 50 μ M 之綠原酸或 probucol 預培養 18 小時，並以 IL-1 β 刺激 6 小時，以 Trypsin- EDTA 收集細胞，離心去除上清液，再加入含有螢光染劑之 PBS 重新混懸細胞，避光作用 30 分鐘後，以流式細胞儀觀察綠原酸是否可降低 IL-1

所誘發之細胞自由基。結果如圖 4-2 所示，發現不論是加入 25 μM 或 50 μM 之綠原酸或 probucol，皆可以降低 IL-1 β 所誘發之細胞自由基，其可將細胞中 ROS 降至與正常組相似的範圍，亦再次證實綠原酸具有抗氧化的作用。

實驗五、評估CA與probucol對IL-1 β 誘導黏附因子：VCAM-1, ICAM-1, E-selectin產生的影響

將內皮細胞分盤於6 well plate中(2×10^5 cell/well)，接著以含1 % FBS 之medium同步化24小時，再分別加入25 μM 或50 μM 之綠原酸或probucol預培養18小時，並以IL-1 β 刺激6小時，以Trypsin- EDTA收集細胞，離心去除上清液，再利用Trizol reagent萃取RNA，再將所萃取之RNA定量及進行反轉錄作用，之後以同步定量聚合酶鏈反應觀察VCAM-1, ICAM-1, E-selectin mRNA的表現。結果發現加入IL-1 β 與正常組相較下，其會誘導內皮細胞表現大量的VCAM-1, ICAM-1, E-selectin，並達到統計上的差異($p < 0.05$)，如圖5-1, 6-1, 7-1所示。

由圖5-1之結果發現，無論加入了25 μM 及50 μM 之綠原酸或 probucol，皆可以降低IL-1 β 所誘發之VCAM-1表現，並且綠原酸及 probucol之抑制效果隨劑量增加而增強，同時發現綠原酸之抑制效果優

於probucol。而由圖6-1之結果也發現，無論加入了25 μ M及50 μ M之綠原酸或probucol，亦可以降低IL-1 β 所誘發之ICAM-1表現，並且綠原酸及probucol之抑制效果隨劑量增加而增強，亦發現綠原酸之抑制效果優於probucol。而圖7-1之結果中，無論加入了25 μ M及50 μ M之綠原酸或probucol，皆可以降低IL-1 β 所誘發之E-selectin表現，並且綠原酸及probucol之抑制效果皆呈劑量相關性。

而在圖5-2, 6-2, 7-2中分別可觀察到VCAM-1, ICAM-1, E-selectin在同步定量聚合酶鏈反應中，螢光強度變化的情形，隨著反應之cycle數增加，其螢光強度逐漸超過閾值(Ct)，而利用Ct值來計算其相對表現量。而圖5-3, 6-3, 7-3中，利用測定所合成PCR產物之melting temperature來確定其專一性，由結果可看出產物之melting temperature均落在同一溫度上，即可確定其合成的產物具有專一性。

實驗六、以酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 評估CA與probucol對IL-1 β

誘導核轉錄因子NF- κ B活化產生的影響

首先將細胞培養在10 cm²-dish中，細胞數約 1×10^6 ，以含10 % FBS之medium培養24小時後，再以1 % FBS之medium同步化24小時後，再分別以含25 μ M或50 μ M之CA或probucol的medium加入細胞作用18小時後，接著以IL-1 β 刺激6小時後，以Trypsin-EDTA收細胞，離心去除上清液後，

利用低張溶液打破細胞膜，收集細胞核，並進一步萃取核蛋白，再定量其蛋白質濃度，各組皆取5 μg 細胞核蛋白質加入ELISA plate中進行實驗，再依序加入一抗及二抗，接著加入受質呈色後終止反應，再波450nm下測其吸光值。

結果顯示，在IL-1 β 誘發下會促使NF- κ B活化，此時可測到細胞核中有大量的NF- κ B P50, P65, P52, Rel-B, C-Rel 蛋白質表現，並達到統計上的差異($p < 0.05$)，如圖8, 9, 10, 11, 12所示。而以25 μM 或50 μM 之綠原酸或probucol預培養之細胞中，由圖8可發現50 μM 之綠原酸及25 μM 或50 μM 之probucol可以明顯降低細胞核中由IL-1 β 所誘發之NF- κ B P50的表現，達到接近正常組的範圍，亦即表示其具有抑制IL-1 β 所誘發之NF- κ B的活化，且綠原酸抑制效果隨劑量增加而增強。由圖9可發現，不論加入25 μM 或50 μM 之綠原酸或probucol皆可以明顯降低細胞核中由IL-1 β 所誘發之NF- κ B P65的表現，即表示其皆具有抑制IL-1 β 所誘發之NF- κ B的活化，且其抑制效果具有隨著劑量增加而增強的趨勢，但尚未達到統計上的差異。

另一方面，我們測量細胞核中NF- κ B P52, Rel-B, C-Rel蛋白質的表現，圖10的結果顯示，不論加入25 μM 或50 μM 之綠原酸或probucol皆可以明顯降低細胞核中由IL-1 β 所誘發之NF- κ B P52的表現，並且發現綠原

酸抑制的效果較probucol佳，且抑制效果隨劑量增加而增強，發現當加入50 μM 之綠原酸後其NF- κB P52的表現較正常控制組為低。而圖11的結果顯示不論加入25 μM 或50 μM 之綠原酸或probucol，亦可以降低細胞核中由IL-1 β 所誘發之NF- κB C-Rel的表現，而當加入25 μM 或50 μM 之綠原酸後，其NF- κB C-Rel的表現較正常控制組為低，且抑制效果隨劑量增加而增強。在圖12的結果中，在加入25 μM 或50 μM 之綠原酸或probucol後，可明顯降低細胞核中由IL-1 β 所誘發之NF- κB Rel-B的表現，當加入25 μM 或50 μM 之綠原酸後，其NF- κB Rel-B的表現較正常控制組為低，且抑制效果隨劑量增加而增強。

實驗七、以單核球細胞株U-937探討綠原酸是否可降低由IL-1 β 所誘發之細胞黏附的情形

將單核球細胞（U937）以含10 % FBS之RPMI-1640 medium培養，並維持細胞生長密度約 10^5 - 10^6 之間，約3-4天更換一次medium，直至實驗時使用。實驗前先將內皮細胞分別分盤於6 well plate (2×10^5 cell/well)及96 well plate (2×10^4 cell/well)中，以1 % FBS之medium同步化24小時後，再以分別含25 μM 或50 μM 之CA或probucol的medium加入細胞反應18小時後，接著以IL-1 β 刺激6小時後，在結束前30分鐘加入以螢光染劑標定之單核球細胞（單核球:內皮細胞=1:1），與內皮細胞共培養30分鐘後，

以PBS wash一次，取6 Well plate以螢光顯微鏡直接觀察照相，並將96 Well plate置於螢光分析儀中測量其螢光強度。

由圖13(A)的定性結果中發現，在IL-1 β 刺激下會誘導較多的單核球細胞黏附於內皮細胞上，而在加入了25 μ M, 50 μ M之CA或probucol的組別中，皆可明顯的降低由IL-1 β 所誘導之單核球黏附情形。另一方面，以螢光分析儀測量其螢光強度的結果亦發現，在IL-1 β 刺激下會誘導較多的單核球細胞黏附於內皮細胞上，其螢光強度明顯增加，並達到統計上的差異($p < 0.05$)，而不論在加入了25 μ M或50 μ M之CA或probucol後，皆可明顯的降低由IL-1 β 所誘導之單核球黏附情形，且其抑制效果隨劑量增加而增強，結果如圖13(B)所示。



第五章、討論

在過去研究中指出，動脈粥狀硬化過程中會增加氧化壓力而導致低密度脂蛋白被氧化 (oxidation) (Libby, 2002) 或產生相對應的氧化傷害。當血管內皮細胞或白血球受到氧化低密度脂蛋白刺激時，會使其上之細胞黏附因子 (cell adhesion molecules) 暴露出來 (Quirino *et al*, 1997)，而且為了移除過量的氧化低密度脂蛋白，體內的免疫系統會吸引血管腔內的白血球 (特別是單核球) 進入血管內層，並促進單核球分化為巨噬細胞，吞噬氧化低密度脂蛋白 (Witztum *et al*, 1991)。所以內皮細胞表現大量黏附因子，及單核球黏附於內皮細胞表面為早期動脈粥狀硬化的特徵。所以我們主要是藉由探討綠原酸是否具有抑制內皮細胞表現大量黏附因子，及單核球黏附於內皮細胞表面，來判定綠原酸是否具有預防早期動脈粥狀硬化發生的作用。

在我們此次研究中，首先進行體外抗氧化試驗，發現綠原酸具有捕捉 DPPH 自由基，及抑制 LDL 氧化的能力，且其抗氧化效果優於已知的脂溶性抗氧化劑 probucol，並且綠原酸可以降低脂質過氧化中間產物 Conjugate diene 的生成量，及可延長氧化遲滯期。細胞實驗中，HUVEC 給予 25 μM 或 50 μM 之綠原酸或 probucol，皆可以降低 IL-1 β 所誘發之細胞內自由基，其可將細胞中 ROS 降至與正常組相似的範圍，亦再次

證實綠原酸具有抗氧化的作用。

接著進行細胞實驗，MTT test 的結果顯示無論是綠原酸或者是 probucol，在濃度 200 μM 以下時皆不具有細胞毒性(細胞存活率 $> 90\%$)；表示本研究所用的 CA 不會直接抑制細胞。另外，以同步定量聚合酶鏈反應發現 Ox-LDL 會誘發 HUVEC 表現 IL-1 β ，而綠原酸可以降低 IL-1 β 所誘導內皮細胞 VCAM-1, ICAM-1 以及 E-selectin mRNA 的表現，並具有劑量相關性。且綠原酸可減少由 IL-1 β 所誘導之單核球黏附情形，也同樣具有劑量相關性。接著以酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 證實綠原酸可以明顯降低細胞核中由 IL-1 β 所誘發之 NF- κ B P50, P65, P52, Rel-B, C-Rel 的表現；即代表綠原酸是藉由抑制氧化還原敏感型之轉錄因子 NF- κ B 的活化，來降低黏附因子基因表現及單核球細胞的黏附。

第一節、綠原酸之特性及抗氧化能力

綠原酸結構是由咖啡酸和醌寧酸酯化而成的，為一種酚酸成分(參照圖 VI.)，其飲食來源有：咖啡、蘋果、梨、莓類、桃仁、朝鮮薊和茄子(Clifford., 1999; Takeoka and Dao, 2003)。在過去研究中指出綠原酸具有強的抗氧化活性(Kweon *et al.*, 2001)，在結構中其雙環上具有多個羥基，可提供多個氫原子來捕捉自由基，故有較高的抗氧化能力，而本實驗測其捕捉 DPPH 自由基的能力，再一次證實其在體外試驗中所具有的抗氧化能力。氧化的低密度脂蛋白(Ox-LDL) 在動脈粥狀硬化的過程中扮演重要的角色(Heinecke., 1998)，而綠原酸在過去體外實驗中證實可預防 LDL 的氧化(Whalley *et al.*, 1990; Nardini *et al.*, 1995)，因此推論綠原酸可能具有保護心血管疾病發生的功用(Heinecke., 1998)。在 Chang *et al.*, (2001)年的研究中指出，Ox-LDL 會使人類臍靜脈內皮細胞的存活率下降，改變細胞生長速率、細胞型態，及增加細胞釋出乳酸去氫酶(LDH)，而綠原酸可以保護內皮細胞在 Ox-LDL 的刺激下，回復 3 倍細胞的生長速率，及降低 LDH 的釋出。而在 Auger *et al.*, (2004)年的研究中指出，給予倉鼠 1.46 mg /Kg /d 綠原酸 (相當於給予 70 公斤的人每天 100 mg 綠原酸，即每天吃 200 公克的蘋果)，可以明顯增加倉鼠血清中的抗氧化能力。而本實驗亦證實了綠原酸具有抑制早期動脈粥狀硬化的發生，與

其所具有的抗氧化活性有關。

在動物實驗發現，綠原酸在體內會代謝成咖啡酸、阿魏酸及香豆素。而最近的研究亦指出綠原酸可抑制肺癌細胞的增生與 TPA 所誘導的腫瘤細胞轉移，推論此抗腫瘤的活性與抑制由 TPA 及 UVB 所誘發的 NF- κ B, AP-1 與 MAPK 路徑及第二期的基因活化有關(Feng *et al.*, 2005)。而在本實驗中，我們探討綠原酸抑制黏附因子的表現，及單核球細胞的黏附作用，亦發現其是藉由抑制轉錄因子 NF- κ B 的活化作用所致。此外在體外實驗中也證實綠原酸可抑制 DNA 的損傷(Kasai *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 1999)。同時在流行病學的研究中亦發現咖啡的攝取與結腸癌的發生呈負相關，而此作用可能與咖啡中含有綠原酸有關(Olthf *et al.*, 2001)，而綠原酸在人體內吸收的情形，研究發現在到達迴腸前有 75%的綠原酸已被人體消化道吸收。而剩下的 25%在通過小腸到大腸的這短期間，能對腸道提供保護進而有預防節直腸癌的作用(Giovannucci., 1998; Baron *et al.*, 1994; Favero *et al.*, 1998; La Vecchia *et al.*, 1980; Tavain *et al.*, 1997)。

第二節、Probucol 之抗動脈粥狀硬化作用機制

Probucol 為一種脂溶性的抗氧化劑，因結構中其苯環上有多個羥基，可提供多個氫原子來捕捉自由基，故具有強的抗氧化能力，且為臨床上所使用的脂溶性降血脂藥物，可抑制氧自由基對低密度脂蛋白的修飾作用，抑制其致動脈粥狀硬化的作用，並可抑制泡沫細胞形成，進一步延遲動脈粥狀硬化發展或使其逆轉(Daugherty *et al.*, 1991; Sasahara *et al.*, 1994)。

本實驗選擇 probucol 作為正控制組之原因，因其具有較好的抗動脈粥狀硬化效果：(1) 在結構中 probucol 分子具有 14 個親脂性甲基，決定了 Probucol 與 LDL 結合能力遠遠強於其他脂溶性抗氧化劑，probucol 在 LDL 中的分佈位置在 LDL 中單層磷脂(PL)和游離膽固醇(FC)組成的疏水性外殼，可以保護 LDL 表面 PUFAs 免受氧自由基的攻擊。(2) probucol 本身就極容易被氧化，其抗氧化能力是 VitE 的 5~6 倍。LDL 氧化修飾過程的早期主要是 LDL 中抗氧化物質的消耗，1 個 LDL 顆粒中包含 6 個 VitE 和 2 個 β -胡蘿蔔素分子，所以與 LDL 結合的 probucol 分子消耗氧自由基的能力遠遠強於 VitE 和 β -胡蘿蔔素。但是一個 LDL 顆粒究竟可以結合幾個 probucol 目前尚沒有研究，然而從 probucol 高度親脂作用來看，結合數量相信應該在 VitE 之上。(3) 除了抗氧化作用外，

probucol 還是一個降膽固醇藥物，(4) 其對動脈粥樣硬化過程中諸多的細胞因子也有較強作用，此外可抑制平滑肌細胞增殖，改善內皮細胞功能，抑制黏附因子表現，而這些皆是抗動脈粥樣硬化所必需的。

而在 NZW 與 WHHL 兔子模式中，probucol 可有效降低 LDL 對氧化的敏感性與減少動脈粥狀硬化的發生(Mao *et al.*, 1991; Prasad *et al.*,1994)，而 probucol 可以恢復餵食高膽固醇飲食兔子之內皮細胞功能(Simon *et al.*, 1993)。在體外細胞實驗中，依據細胞種類及刺激物質的不同，其結果也不盡相同；probucal 可以降低 Ox-LDL 所誘導 HUVEC 產生之 VCAM-1 及 ICAM-1 (Cominacini *et al.*, 1997)，也可降低 LPS 所誘導 HUVEC 產生之 E-selectin (Kaneko *et al.*, 1996)。另外，probucal 在 2.5 及 5 μ M 可以降低 TNF- α 所誘導 HAEC 產生之 VCAM-1 (Chen *et al.*, 2001)。在此次實驗中，probucal 可以降低 IL-1 β 所誘導 HUVEC 產生之 VCAM-1, ICAM-1 及 E-selectin，其抑制作用會因濃度增加而增強，故以此作為正控制組，來當做比較。

第三節、綠原酸及 Probucol 之劑量

對於綠原酸及probucol在未進行研究前，實驗應先瞭解其對於細胞作用的適當濃度為何，並建構細胞毒性的資訊。MTT 分析細胞存活的原理主要是由於活細胞具有將MTT 轉換成藍紫色的formazan，因此可藉著測量570 nm 吸光值反映細胞的存活率。而使用96 well 進行MTT 分析時，可能因為更換或加入培養液的步驟，加上well面積很小，十分容易在前述步驟中造成細胞的損失，使得結果有很大的變異性，因此每組實驗最好增加樣本數，以縮小變異的產生。

本實驗發現綠原酸及Probucol具有較低的細胞毒性，其濃度在200 μ M以下時，細胞存活率皆大於90%。在Chen *et al.*, (2002)年的研究中，magnolol（厚朴酚）在低於30 μ M才不具有細胞毒性，而其使用濃度為5~10 μ M，而Stangl *et al.*, (2004)年的研究中指出，綠茶中的兒茶酚在濃度100 μ M以下也不具有細胞毒性，而存在於洋蔥、茶、蘋果及漿果類中的querctin (槲皮素)使用劑量約為50 μ M (Huang *et al.*, 2001)，普遍存在於蔬果中的類黃酮，如綠茶中的ECG, EGCG, EC及橘皮中的naringin, naringenin和柚皮中的hesperetin, hesperidin以及毛地黃黃酮（luteolin）和芹菜素（apigenin）使用劑量亦約為50 μ M (Ghoi *et al.*, 2004)。而綠原酸及Probucol雖具有較低的細胞毒性，但我們希望其能在較低的濃度下，

即能顯現出明顯的效果，以利人體能容易攝取到有效劑量，故本實驗取 25 μM 及50 μM 兩種濃度去進行各項實驗。

第四節、氧化低密度脂蛋白及細胞激素 IL-1 β 的誘導作用

LDL 的氧化為引起動脈粥狀硬化的一個重要的致病因素，而氧化修飾低密度脂蛋白Ox-LDL對動脈粥狀硬化的生成和惡化扮演著極重要的角色(Steinberg, 1989; Steinberg, 1997)，動脈粥狀硬化乃一種老年退化性疾病，早期預防如飲食控制及給予特殊食物成分，可能具有減緩動脈粥狀硬化和預防心血管疾病的效果，因此對於預防動脈粥狀硬化早期的脂肪斑塊產生，目前最常使用的策略為抑制低密度脂蛋白的過氧化與降低血脂，而藉由抗氧化劑的使用，可以有效的清除自由基、鉗合金屬離子與終止脂質氧化的起始期或延長遲滯期 (lag phase)。流行病學調查亦指出多種天然植物中所具有(如 α -tocopherol、polyphenols)，與人工合成(如BHT、probucol)的抗氧化劑，其攝取量與心血管疾病的發生率呈現負相關(Diaz *et al.*, 1997)。

已知Ox-LDL 會改變動脈血管壁中其他基因的表現，如促使IL-1 β 表現，而IL-1 β 可誘使內皮細胞-白血球的黏附作用。在本次實驗，再次證實Ox-LDL會調控內皮細胞IL-1 β 基因的表現，使其發生轉錄作用，而

使IL-1 β m-RNA大量的表現。interleukin-1 β (IL-1 β)及tumor necrosis factor α (TNF- α) 為標準的促發炎激素(Young *et al.*, 2002; Lind, 2003), 在體外實驗中發現IL-1 α / IL-1 β 及TNF- α 皆可促進內皮細胞及平滑肌細胞分泌黏附因子(Li *et al.*, 1993), 加劇活性氧屬自由基所帶來的傷害, 而IL-1 β 還可影響低密度脂蛋白代謝、刺激血管平滑肌增生及白血球吸附至內皮層上(Lipton *et al.*, 1995), TNF- α 則可透過基因轉錄之方式影響巨噬細胞清除者受體的表現(Hsu and Twu, 2000)、促進VSMCs 生長及凋亡 (apoptosis) (Selzman *et al.*, 2001), 因此IL-1 及TNF- α 又被認為是動脈粥狀硬化的主要促發炎因數之一。

在過去的研究, 有些以Ox-LDL來誘發血管內皮細胞黏附因子的表現, 但亦有很多的研究是直接以細胞激素IL-1 β 或TNF- α 來誘發細胞黏附因子的表現, 且由於Ox-LDL的製備費時, 氧化後的TBAR值易因透析而下降, 氧化程度不易控制, 所以我們接下來的實驗直接以純化之人類IL-1 β 來誘發內皮細胞產生ROS、細胞黏附因子表現, 及單核球黏附於內皮細胞上, 再探討綠原酸抑制內皮細胞中ROS、細胞黏附因子表現, 及單核球黏附於內皮細胞上的情形。

第五節、綠原酸抑制 IL-1 β 所誘導之黏附因子的表現及單核球的黏附作用

一. 綠原酸抑制 IL-1 β 所誘導之單核球的黏附作用

在動脈粥狀硬化的研究模式中，常利用人類單核球細胞株U-937，來觀察單核球與內皮細胞間的交互作用。根據研究顯示，血管內皮細胞不僅是一個具半透性的膜，它更是一個非常活潑的分泌組織細胞 (Imagami *et al.*, 1995)。內皮細胞功能不良是心血管疾病的一個明顯指標 (Anderson *et al.*, 1995)，與動脈粥狀硬化的發展息息相關 (Hashimoto *et al.*, 1999)。而此次單核球黏附試驗結果顯示，綠原酸在濃度 25 μ M 及 50 μ M 可減少由 IL-1 β 所誘導之單核球黏附情形。之前的研究中顯示，Vit E 在濃度 40 μ M 時，可以明顯抑制單核球黏附於內皮細胞上 (Meydani *et al.*, 1999)；綠茶的兒茶酚在濃度 100 μ M 時，也可以抑制單核球黏附於內皮細胞 (Stangl *et al.*, 2004)；而 50 μ M 的類黃酮 luteolin 和 apigenin 也幾乎可完全的抑制經由 TNF- α 所誘導之單核球的黏附 (Choi *et al.*, 2004)。

二. 黏附因子的特性

單核球與血管內皮細胞間的交互作用主要是透過黏附因子，包括 VCAM-1 (Cybulsky and Gimbrone, 1991)、ICAM-1 (Poston *et al.*, 1992) 和 E-selectin (Richardson *et al.*, 1994) 與血管內皮表面之間的作用而形

成。促發炎反應的細胞激素可誘導細胞黏附因子的表現，進而引發發炎反應(Ross, 1999)。在動脈粥狀硬化的研究模式，血管的細胞黏附因子(VCAM-1) 也會結合到單核球或淋巴球細胞而導致在血管發炎區堆積(Osborn *et al.*, 1989; Elices *et al.*, 1990; Cybulsky and Gimbrone, 1991)。VCAM-1及ICAM-1的表現會受到細胞激素如IL-1 β 或TNF- α 所誘發，E-selectin可在IL-1 β 和TNF- α 刺激下合成(Bevilacqua *et al.*, 1995)。而單核球及淋巴球明顯出現在動脈硬化早期脂肪條區域，也顯示了黏附因子表現在動脈粥狀硬化發展上的重要性(Cimbrone *et al.*, 1990)。

三.單核球黏附在不同階段黏附因子的作用（參照圖V.）

1. 單核球的滾動（Monocytes Rolling on Endothelial Cells）

單核球與血管內皮細胞的交互作用中首先是單核球的滾動(rolling)。不論血管內皮細胞或是白血球有無受到刺激，都會由表面原本就存在(constitutive existence)，黏著力不高的分子selectins，讓靠近血管壁的白血球和血管內皮細胞產生微弱的籍合(tethering)。舉例來說，若內皮細胞受到促發炎反應物質(pro-inflammatory cytokines)，如IL-1(interleukin-1)、TNF- α (tumor necrosis factor- α)和氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)刺激，會快速(3-5分鐘)暴露出原本內化(internalization)於Weible- Palade bodies 的

P-selectin這種黏著分子，而它會跟單核球（monocyte）、淋巴球（lymphocyte）或嗜中性白血球（neutrophil）上的配合基（P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1）結合(Liao *et al.*, 1997; Giuffre *et al.*, 1997);同樣的，原本就存在於白血球表面上的黏著分子E-selectin 及 L-selectin，也會被這些促發炎反應物質活化而切除（shedding），使白血球於內皮細胞表面產生滾動（Tedder *et al.*, 1995）。這種黏著反應會促使單核球的趨化因子（monocyte chemoattractant protein, MCP-1）增加，並向上調節（up-regulation）另一種黏著力更強的分
子integrin表現。

而在本實驗中在加入了25 μM 或50 μM 之綠原酸或probucol，皆可以降低IL-1 β 所誘發之E-selectin 表現，並且綠原酸及probucol 之抑制效果皆呈劑量相關性。

2.單核球與血管內皮細胞緊密結合（Arrest and Firm Adhesion）

Integrin 是由兩個次單元組合而成的，包括 α 及 β 次單元（ α and β subunits ），在不同細胞上的種類也各有不同，如白血球表面的LFA-1（lymphocyte functional-associated antigen-1）在接受刺激後，會由不活化態轉成活化態，並使白血球內的一種物質diacylglycerol（DAG）增加，進而活化蛋白酵素C（protein kinase C, PKC），使

細胞內鈣離子濃度上升，產生細胞骨骼（cytoskeletal）上的改變，然後鑽入因發炎反應而通透性（permeability）變大的血管內皮細胞間隙中(Mine *et al*, 2002)。而另一種白血球黏著分子Mac-1則是從細胞內被快速表現出來，進而使白血球與血管內皮細胞的ICAM-1，-2（intercellular adhesion molecule-1, -2）緊密結合，然後停止住（adhesion/arrest）。根據學者研究發現，這些黏附因子都和 β_2 -integrin 相關(Luscinskas *et al*, 1994; Lehr *et al*, 1995; Ragab *et al*, 1996; Kita *et al*, 1999)。另外嗜伊紅性球（eosinophil）或淋巴球上的VLA-4（very late antigen-4）則會和內皮細胞上的VCAM-1（vascular adhesion molecule-1）結合。這些白血球與內皮細胞的黏著分子交互作用便是動脈粥狀硬化的驅動源頭。

本實驗亦探討綠原酸對內皮細胞所表現之VCAM-1及ICAM-1兩種黏附因子的作用，結果發現無論加入了25 μ M或50 μ M之綠原酸或probucol，皆可以降低IL-1 β 所誘發之VCAM-1表現，並且綠原酸及probucol 之抑制效果皆具有劑量相關性，同時，發現綠原酸之抑制效果優於probucol。而由圖6-1之結果也發現，無論加入了25 μ M或50 μ M之綠原酸或probucol，亦可以降低IL-1 β 所誘發之ICAM-1表現，並且綠原酸及probucol 皆具有劑量相關性，亦發現綠原酸之抑制效果優於

probucol。

3.單核球變形鑽入血管內層 (Monocyte Trans-endothelial Migration)

而最後則是白血球被活化後，經由變形鑽入血管內皮細胞間隙的過程 (trans-endothelium migration via diapedesis through the junctions between endothelial cells)，這是由單核球趨化因子 (MCP-1) 與氧化低密度脂蛋白等趨化物吸引而成的，目的是誘導單核球變形鑽入血管內膜層 (Takei *et al*,2001)。



第六節、綠原酸藉由抑制 IL-1 β 誘導 NF- κ B 的活化來降低黏附因子的表現

基因進行轉錄作用時主要仰賴 RNA polymerase 及許多轉錄因子

(transcription factors, TFs) 的作用，轉錄因子主要可以分為兩種類型：

(1) basal factors；在轉錄作用中負責 promoter 的辨認與實際轉錄作用

的進行，如 TFII-D；

(2) regulatory factors：在轉錄作用中扮演基因活性調控的主要因子，

如 NF- κ B。(Koleske *et al.* 1994)調節性轉錄因子

(regulatory transcription factors) 與基因上游啟

動子 (promoter) 區域結合，調控該基因之轉

錄效能，為影響誘導性 (inducible) 基因，如

iNOS, CAM 之轉錄活性的主要因素。

一般狀況下，NF- κ B 持續表現並存在於細胞質中，但由於 I κ B 與其結合，使其 NLS 區域覆蓋住，而 NF- κ B 無法進入細胞核中，失去了調節基因表現的能力。因此，NF- κ B 之活化通常是當細胞受到外來刺激，之後引發 proteasome-mediated I κ B degradation，而當 I κ B 降解後，NF- κ B 露出的 NLS 便會造成 NF- κ B 移入 (translocation) 細胞核中，執行其轉錄因子的功能 (Karin *et al.*, 2000)。由於 NF- κ B 的活化必須自細胞質外移

入 (translocation) 細胞核中，再執行其調節作用，因此，NF- κ B 移入細胞核的能力，也是討論NF- κ B 活性的重要指標。

可以活化NF- κ B的訊號包括(1)細胞激素：如TNF- α 和IL-1 β ；(2) PKC (protein kinase C)的活化：如phorbol ester和血小板活化因子；(3)氧化物質：如過氧化氫和臭氧；(4) 病毒：如感冒病毒、腺病毒或E-B病毒；(5) 免疫刺激：如T-淋巴球的活化；(6)其他：如LPS或UV (Kopp and Ghosh, 1995; Siebenlist *et al.*, 1994; Baeuerle and Baltimore, 1996)。轉錄因子NF- κ B/Rel家族調節許多基因的表現，並且在免疫、壓力反應、發炎及細胞凋亡上扮演重要角色(Barnes and Karin, 1997; Baeuerle and Henkel, 1994; Baeuerle and Baltimore, 1996; Baichwal and Baeuerle, 1997)。許多研究也證實動脈粥狀硬化形成相關的蛋白質包括：TNF- α , IL-1 β , macrophage CSF, granulocyte CSF, granulocyte-macrophage CSF, MCP-1, tissue factor, VCAM-1, ICAM-1和E-selectin也受到轉錄因子NF- κ B的調節。而且有些研究證實給予atherogenic diet或以Ox-LDL刺激下，也會造成轉錄因子NF- κ B的活化(Liao *et al.*, 1993; Parhami *et al.*, 1993; Rajavashisth *et al.*, 1995; Brand *et al.*, 1997)。此外，在動脈粥狀硬化病灶區發現一些細胞激素或生長因子，如TNF- α 和 IL-1 β 也會活化巨噬細胞、內皮細胞、平滑肌細胞和淋巴球中的NF- κ B (Collins and Cybulsky,

2001)。

過去研究中指出 IL-1 β 及 TNF- α 可以經由活性氧族群調控轉錄因子 NF- κ B 的活性(Christman *et al.*, 1998)，進而引發各種免疫反應及發炎反應，並進而增加黏附因子 (adhesion molecules) 在細胞表面之分佈。所以活性氧族群已被認為是一種二級訊息傳遞訊息以調節細胞生理功能 (Wang *et al.*, 1999; Lum and Roebuck, 2001; Schreck *et al.*, 1991)。而處理抗氧化劑，如 PDTC 和 NAC，可以抑制 NF- κ B 的活化更證實了 ROS 對於 NF- κ B 的活化的重要性(Schreck *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1994)。紫草素衍生物具有之抗發炎能力認為與其抗氧化活性與 reactive oxygen species (ROS) scavenging activity (Kourounakis *et al.* 2002)有很大的關係。而此抗發炎能力很可能是與調控 NF- κ B 活化的能力有關。而本實驗由流式細胞儀結果證實綠原酸可抑制 IL-1 β 所誘發之細胞中 ROS，所以我們推論具有抗氧化能力之綠原酸，藉由抑制氧化還原敏感型之轉錄因數 NF- κ B 的活性，進而抑制下游黏附分子(adhesion molecules)的表現。所以推論綠原酸可能具有保護心血管，及預防動脈粥狀硬化發生的作用，與其抗氧化及抗發炎的特性有關。

而依照細胞種類、發育階段、環境因數等因素，細胞可能會表現出其他型態的NF- κ B DNA-binding subunits，NF- κ B家族在哺乳類細胞可分

為p50/p105、p52/p100、p65 (RelA)、Rel B及c-Rel 五種 (Mattson and Culmsee, 2000) 。NF- κ B 會以p50 或p52 與p65 或Rel A/c-Rel 形成 heterodimers，或形成p50/p50、p52/p52、Rel A/Rel A 之homodimers，其中p65/p50 是第一個被發現且含量最豐富，為大部分細胞主要存有的NF- κ B heterodimer，並與生物活性最有關係 (Baldwin, 1996；Barnes and Karin, 1997；Huxford *et al.*, 1998)。而研究發現不同的NF- κ B 組成與其 transactivation 能力有關，但是只有p65/p50 的組合具有很強的 transactivational activity。而形成homodimer 之p50/p50 則可能是具有調控transcriptional repression 的功能(Siebenlist *et al.*, 1944; Karin *et al.*, 2000)。

而在我們研究中發現綠原酸可以同時抑制p65、p50、p52、Rel B及c-Rel 五種NF- κ B family的活化，而p65/ p50的活化和調控VCAM-1, ICAM-1和E-sclectin基因表現有關，而c-Rel/p65的活化與調控ICAM-1基因表現有關。而綠原酸抑制p52、Rel B的活化其作用未明，其主要影響尚須進一步的研究。

第七節、其它具有抗氧化、抑制黏附因子表現及單核球黏附之物質

一、維生素 C

維生素C 會改善 endothelium-dependent vasodilation 並減少單核細胞黏著 (monocyte adhesion) (Heitzer *et al.*,1996; Reilly *et al.*, 1996; Ting *et al.*, 1997)，推論與其所具有的抗氧化特性有關，一般而言，維生素C 富含於柑橘類水果、草莓、番茄、萵苣及綠葉蔬菜中。

二、維生素 E

維生素 E 可在細胞膜上預防多不飽和脂肪酸的過氧化，其在自然界中之分類有 α , β , γ , δ -tocopherol 等四種，其中最具生物活性者為 α -tocopherol。在氧化型LDL 的預防上，維生素 E 的作用為嵌入脂蛋白及細胞膜中，經此減少活性氧的含量以降低LDL 的氧化。維生素 E 不僅在實驗數據上甚至在臨床應用上皆被認為是LDL 的最有利的抗氧化劑 (Jha *et al.*, 1995; Odeh and cornish, 1995)。此外，維生素E 還具有抑制血小板活化 (減低凝血作用)及抑制單核球黏著的作用。維生素 E 大量存在於蔬菜油及種籽油中。

三、多酚類(Polyphenols)

目前對多酚類化合物抗氧化的報告多集中在可抑制LDL 的抗氧化修飾方面，如紅酒中的resveratrol 與其它多酚類化合物在體外實驗中被

證實其抗氧化性 (Frankel *et al.*, 1993; Kerry and Abbey, 1997)，而在體外實驗中亦可增加血清中的總抗氧化力 (Maxwell *et al.*, 1994)。此外細胞實驗中發現，紅酒中的resveratrol 亦是藉由抑制LPS所誘發HUVEC之轉錄因子NF- κ B及AP-1的活化，來降低VCAM-1的表現和單核球的黏附 (Carluccio *et al.*, 2003)。而橄欖油中的多酚類oleuropein 及hydroxytyrosol 同樣是藉由抑制LPS所誘發HUVEC之轉錄因子NF- κ B及AP-1的活化，來降低VCAM-1的表現和單核球的黏附 (Carluccio *et al.*, 2003)。在本實驗中，綠原酸作用的機制與其相似。最近的研究也發現，丹參中的多酚類-原兒茶素醛可抑制TNF- α 所誘導HUVEC之轉錄因子NF- κ B的活化，來降低VCAM-1及ICAM-1的表現和單核球的黏附 (Zhou *et al.*, 2005)，而另一個有效成分丹參酸B亦具有相似的作用 (Chen *et al.*, 2001)。Tijburg在1997年的研究中指出，綠茶可降低NZW 兔31%的動脈粥狀硬化。Hayek *et al* (Halevy *et al.*, 1997) 的研究中發現，不論餵食ApoE 缺陷小鼠紅酒、quercetin 或兒茶素類，均可減少動脈粥狀硬化病灶之面積，此與減少LDL 氧化敏感性有關。

五、類黃酮 (Flavonoids)

Flavonoids為植物的二級代謝產物，其主要化學結構為2-phenylbenzo- α -pyrones，是一種diphenylpropane (C₆C₃C₆) 的骨架 (Rice-Evans

et al., 1996)，在其雜環上因不同取代基之存在而衍生出約4000 多種不同的結構，廣泛存在於蔬菜、水果與中草藥中，但其種類與含量則隨植物之不同而有差異 (Hollman *et al.*, 1996)。譬如茶葉中最多可含30% flavonoids。Flavonoids 的功能已經被明確知道的有抗菌、抗發炎、抗過敏、抗突變、抗病毒、抗腫瘤、抗血栓等作用。這些功能可能都源自於其潛在的抗氧化功能，即為清除自由基。如類黃酮中luteolin, apigenin, quercetin和Epigallocatechin gallate (EGCG)皆可藉由轉錄因子NF- κ B及AP-1的活化，來降低黏附因子的表現和單核球的黏附 (Choi *et al.*, 2004; Stangl *et al.*, 2004)。

在流行病學、臨床及實驗數據中皆指出氧化傷害與許多的疾病相關，而flavonoids 及 Catechin 和他們的衍生物如oligomeric proanthocyanidins, quercetin, quercetin chalcone, Ginkgo flavone glycosides, silymarin, 及其他的一些抗氧化劑也被指出可預防心血管疾病、癌症、發炎、氣喘及肝疾病等。許多研究顯示飲食攝取含類黃酮的食物會降低冠狀動脈心臟疾病及癌症的危險因數 (Hertog *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1995; Knekt *et al.*, 1996; Yochum *et al.*, 1999) 。而在Zutphen 研究中指出，食用富含flavonoids 的28 種蔬菜、12 種水果與9 種飲料的飲食來源5 與15 年，均可降低罹患心血管疾病的發生率，其中又以茶、洋蔥

與蘋果的效果為最好 (Hertog *et al.*, 1993; Keli *et al.*, 1996); 芬蘭的群體試驗 (Cohort Study) 中指出攝取較少量的 flavonoids 會有較高罹患心血管疾病的可能性，且發生率為男性高於女性 (Knekt *et al.*, 1996); 日本對飲用綠茶的四年人體實驗中發現，增加綠茶的攝取量與降低血清中總膽固醇、三酸甘油酯、LDL 膽固醇的降低有關 (Imai and Nakachi, 1995); 另有離體與體外實驗指出 flavonoids 與紅酒的多酚類化合物 (Salah *et al.*, 1995; Kerry and Abbey, 1997; Ishikawa *et al.*, 1997; Catapano, 1997)、兒茶素類 (Miura *et al.*, 1994; Miura *et al.*, 1995; Tijburg *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1997; Yamanaka *et al.*, 1997) 可抑制 LDL 的氧化，亦可清除自由基與保護紅血球細胞不受氧化 (Wang *et al.*, 1997; Yen *et al.*, 1997; Grinberg *et al.*, 1997)，且與某些心臟疾病有關 (Spanos and Witztum, 1992)。

第六章、結論

由本實驗結果證實:

1. 在體外實驗中證實綠原酸具有捕捉 DPPH 自由基，及抑制 LDL 氧化的能力，且其抗氧化效果優於已知的脂溶性抗氧化劑 probucol，並且綠原酸可以降低 Conjugate diene 的生成量，及延長氧化遲滯期。
2. Ox-LDL 可誘導內皮細胞 IL-1 β mRNA 大量表現。
3. HUVEC 給予 25 μ M 或 50 μ M 之綠原酸或 probucol，皆可以降低 IL-1 β 所誘發之細胞自由基，其可將細胞中 ROS 降至與正常組相似的範圍，亦再次證實綠原酸具有抗氧化的作用。
4. 綠原酸可以降低 IL-1 β 所誘導內皮細胞表現大量的 VCAM-1, ICAM-1, E-selectin，且抑制作用隨濃度增加而增強。
5. 綠原酸可以明顯降低細胞核中由 IL-1 β 所誘發之 NF- κ B P50, P65, P52, Rel-B, C-Rel 的表現，即代表綠原酸是藉由抑制轉錄因子 NF- κ B 的活化，來降低黏附因子表現及單核球的黏附。
6. 綠原酸明顯的減少由 IL-1 β 所誘導之單核球黏附情形。

綜合以上結果發現，存在於咖啡、蘋果、梨、莓類、桃仁、朝鮮薊和茄子中的多酚類物質-綠原酸，可能因其本身具有抗氧化能力，可抑制 LDL 的氧化作用，下降 IL-1 β 所誘導之細胞內自由基的產生，進而抑制氧

化還原敏感型的核轉錄因子NF- κ B之活化，而減低黏附因子的基因表現及單核球的黏附。因此，綠原酸在預防心血管疾病上，不只是因其具有抗脂質氧化的能力，亦可經由調控基因的表現之轉錄層次，來達到抑制動脈粥狀硬化發展的作用。



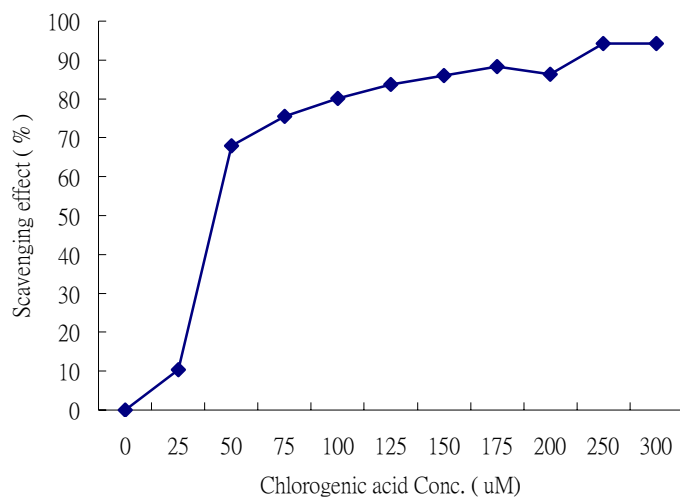
Table 1. Antioxidative capacities of chlorogenic acid in vitro

	Inhibition of LDL oxidation (IC ₅₀ , μM)	DPPH radicals scavenging ability (IC ₅₀ , μM)
Chlorogenic acid	3.1 ± 0.4 ^b	36.3 ± 2.7 ^b
Probucol	5.5 ± 0.7 ^a	41.8 ± 3.1 ^a

表 1. 綠原酸及 Probucol 在體外試驗中所具有的抗氧化能力



(A).



(B).

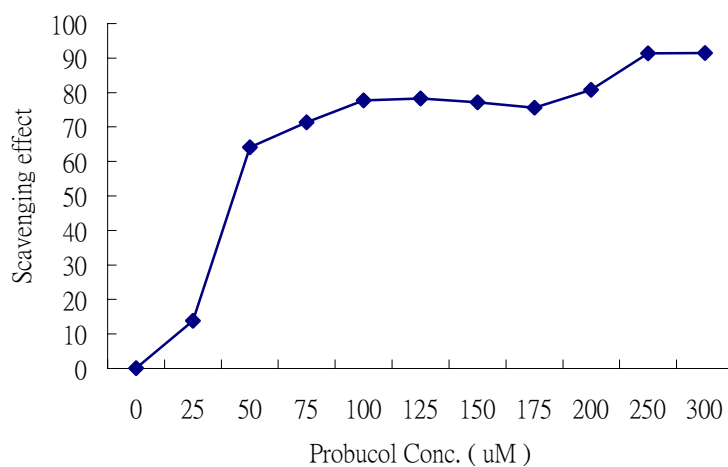
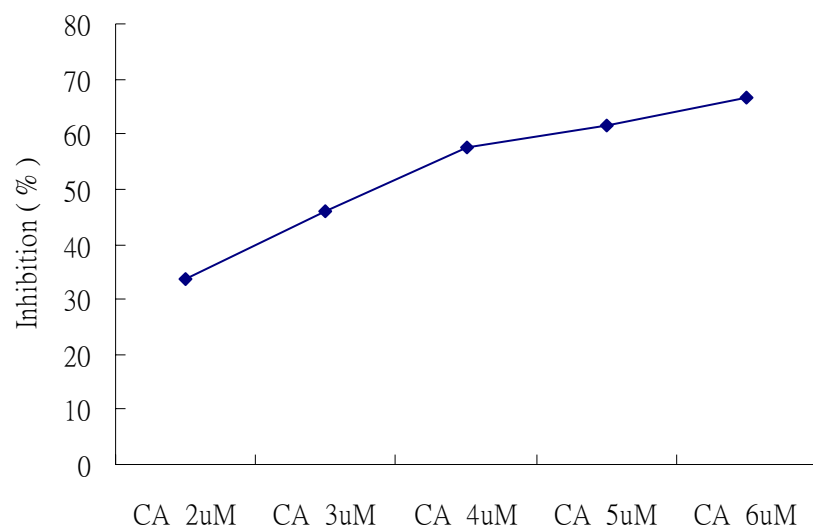


Figure. 1-1. DPPH radicals scavenging ability of (A) Chlorogenic_ and (B) probucol.

圖 1-1. 綠原酸及 probucol 捕捉 DPPH 自由基之曲線圖

(A).



(B).

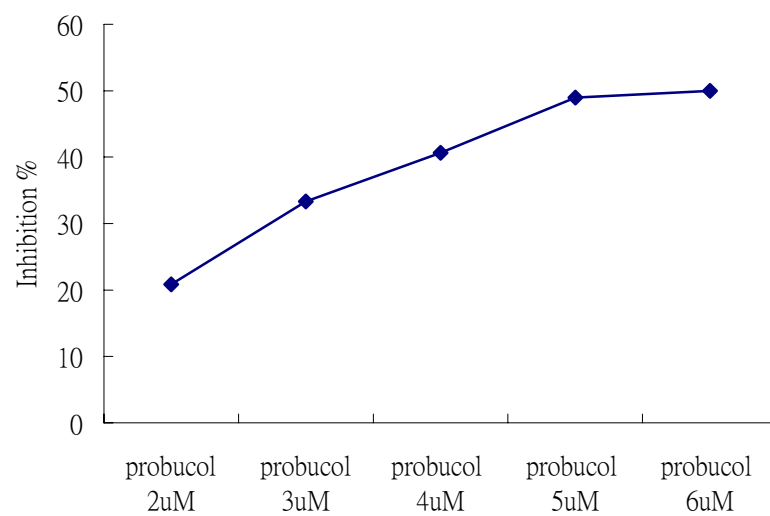


Figure. 1-2. Inhibition of LDL oxidation of (A) Chlorogenic_ and (B) probucol.

圖 1-2. 綠原酸及 probucol 抑制 LDL 氧化曲線圖

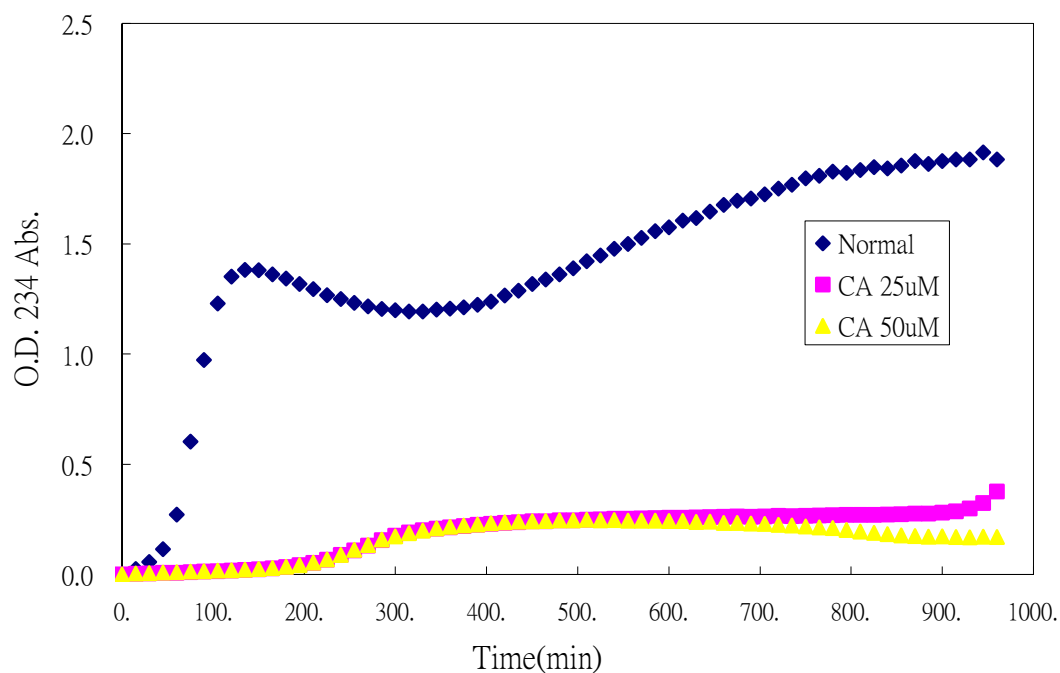


Figure. 1-3. Inhibitory effects of Chlorogenic acid on the Cu^{2+} -induced LDL oxidation of conjugation diene. LDL ($100\mu\text{g/ml}$) was incubated with $10\mu\text{M}$ CuSO_4 at 37°C 、 $0 \sim 960$ min in the presence or absence of different concentrations of Chlorogenic acid ($25, 50\mu\text{M}$)

圖 1-3. 綠原酸對抑制共軛雙醯及延長氧化遲滯期之影響

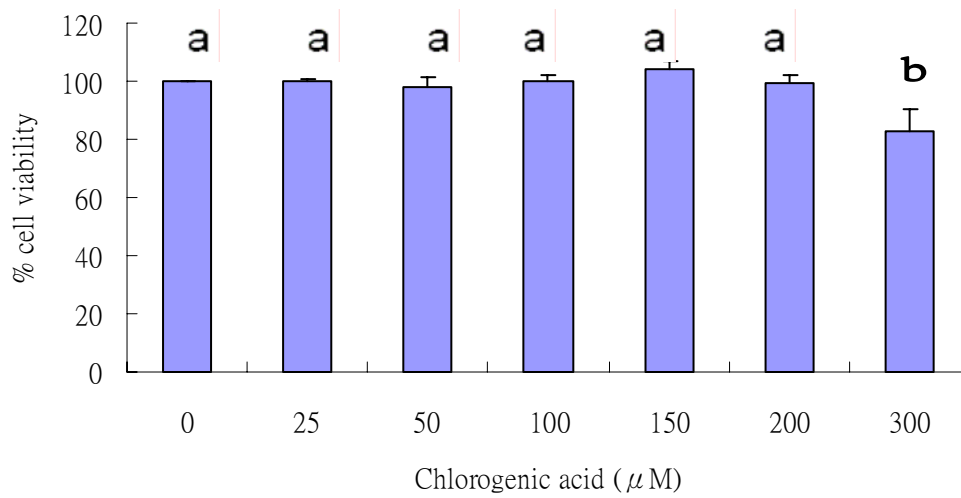


Figure. 2-1. Cytotoxic effect of chlorogenic acid in HUVECs with MTT test.

HUVECs were treated with increasing concentrations (0~300 μM) of chlorogenic acid for 24 hours in 10% FBS-M199 (0.3% DMSO). Values are mean \pm SD, n=12.

^{a-b}Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

圖 2-1. 不同濃度綠原酸對於人類臍帶內皮細胞之細胞毒性

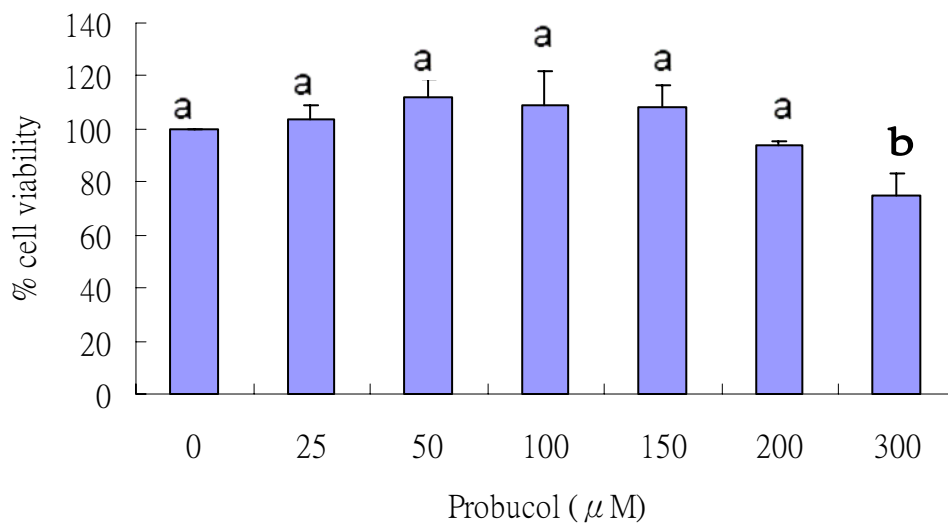


Figure. 2-2. Cytotoxic effect of Probucol in HUVECs with MTT test.

HUVECs were treated with increasing concentrations (0~300 μ M) of probucol for 24 hours in 10 % FBS-M199 (0.3 % DMSO). Values are mean \pm SD, n=12. ^{a-b} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

圖 2-2. 不同濃度 Probucol 對於人類臍帶內皮細胞之細胞毒性

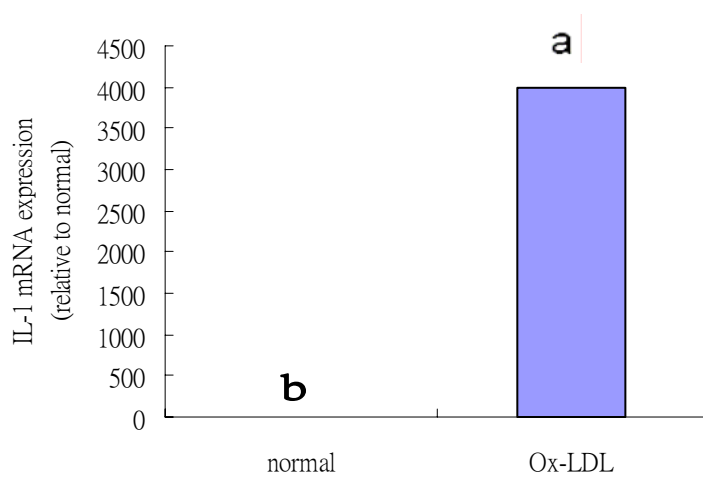


Figure. 3-1. Effect of Ox-LDL on IL-1 β expression in HUVECs.

HUVECs were induced by Ox-LDL (100 μ g/ml) for 24 hours. The mRNA expression of IL-1 β was measured by real-time PCR. ^{a-b} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$. n=5.

圖 3. 氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)對於細胞激素 IL-1 β mRNA 表現之影響

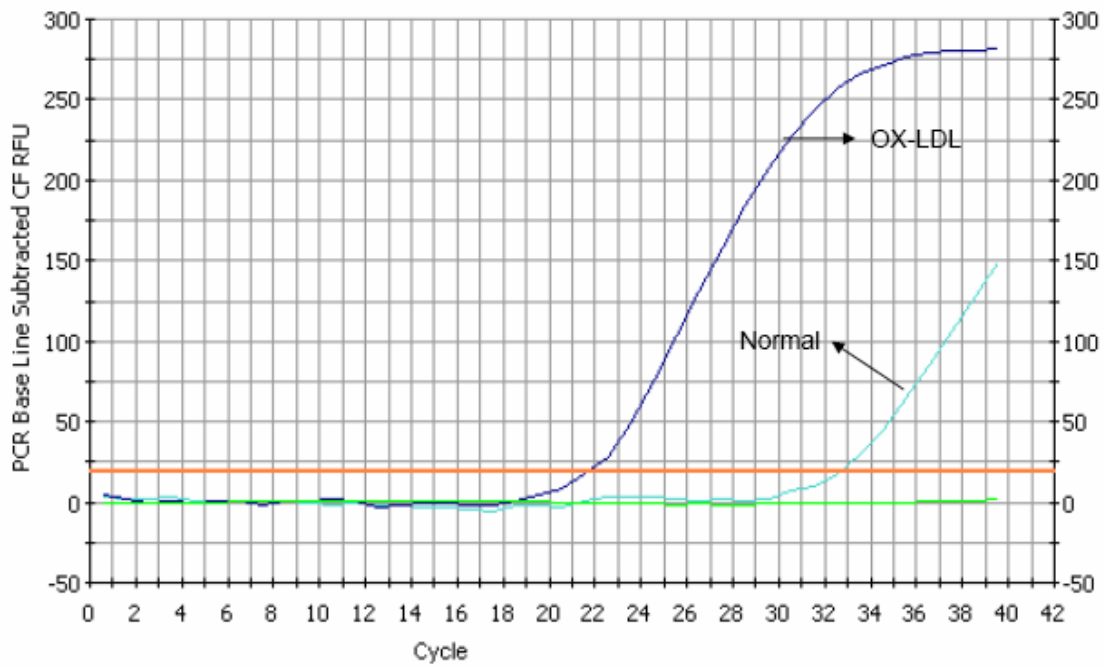


Figure. 3-2 (a). The amplification curve of IL-1 β for Normal and Ox-LDL

圖 3-2. 細胞激素 IL-1 β 之同步定量曲線圖

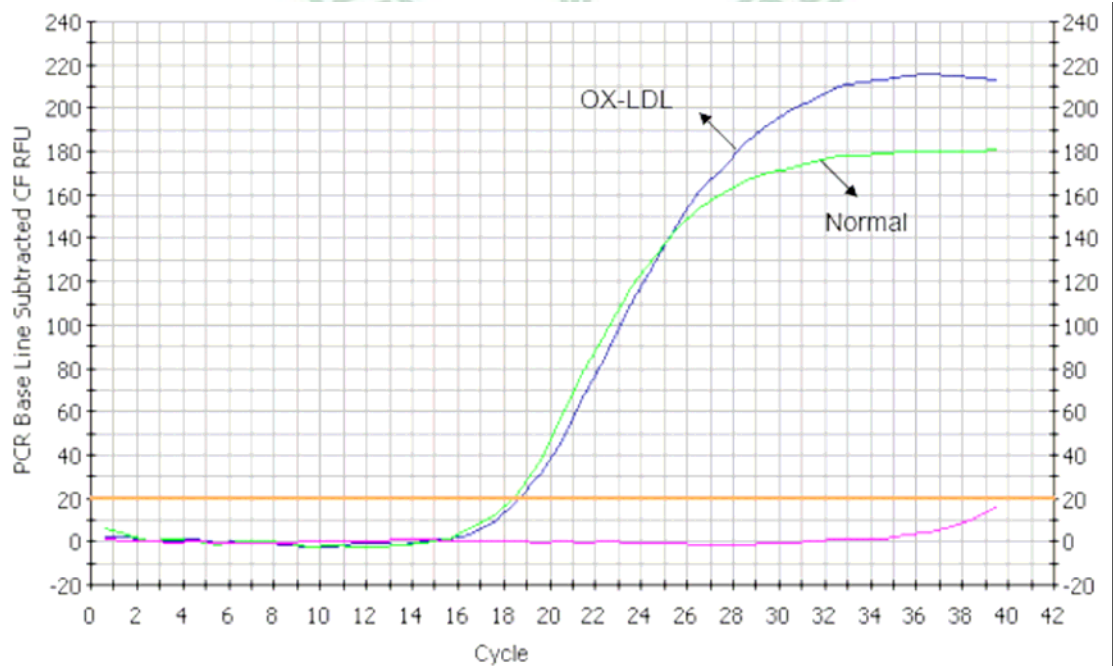


Figure. 3-2 (b). The amplification curve of GAPDH for Normal and Ox-LDL

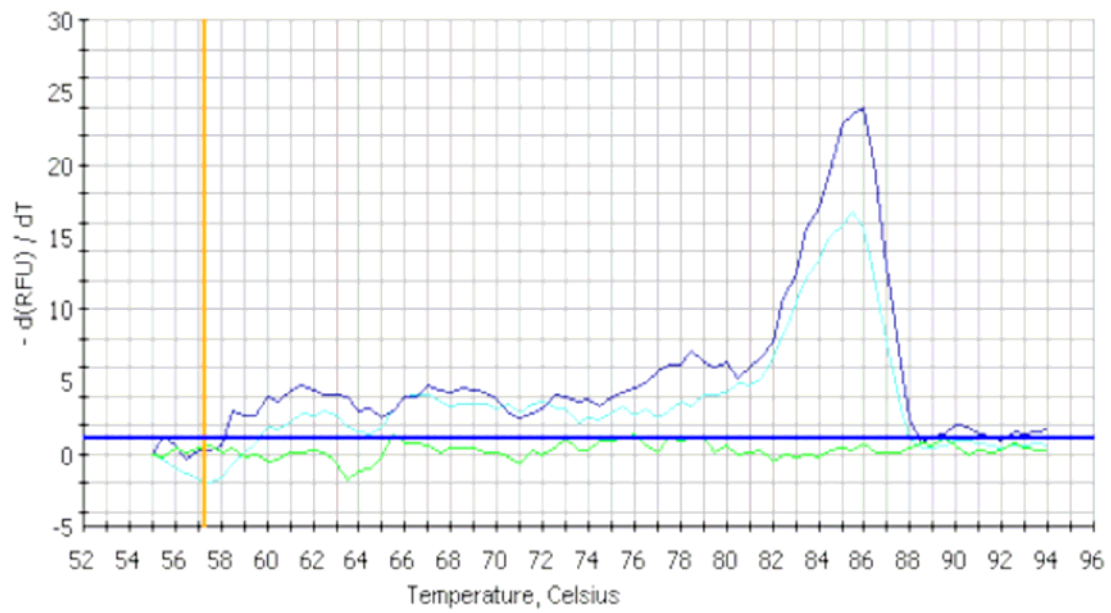


Figure. 3-3 (a). The melting temperature curve of IL-1 β

圖 3-3. 細胞激素 IL-1 β 之 melting curve

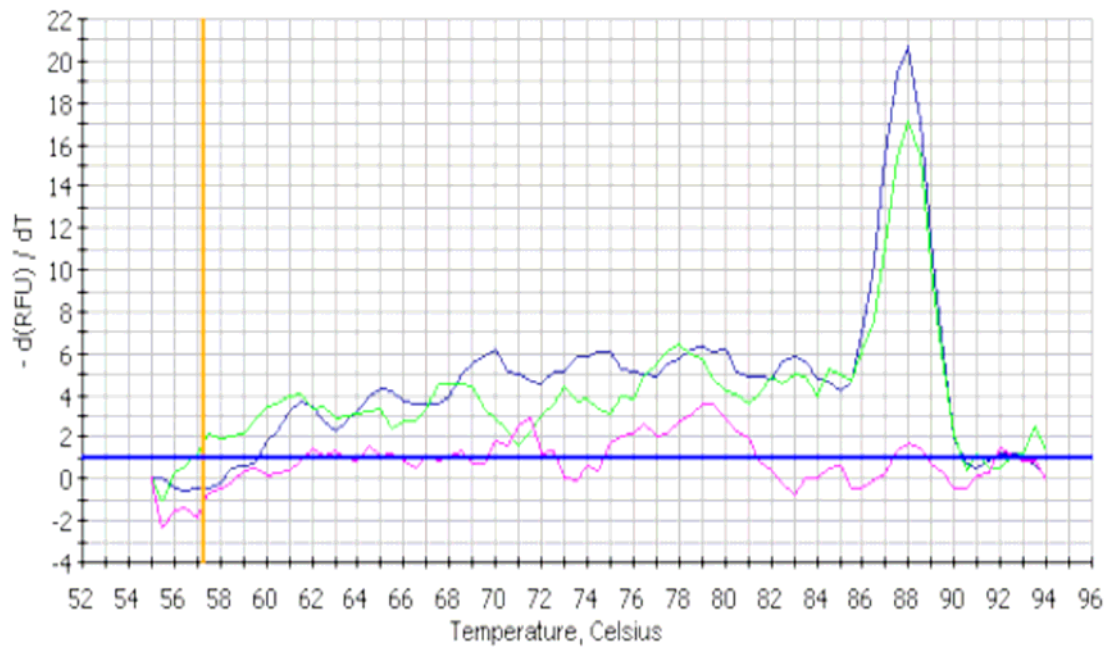
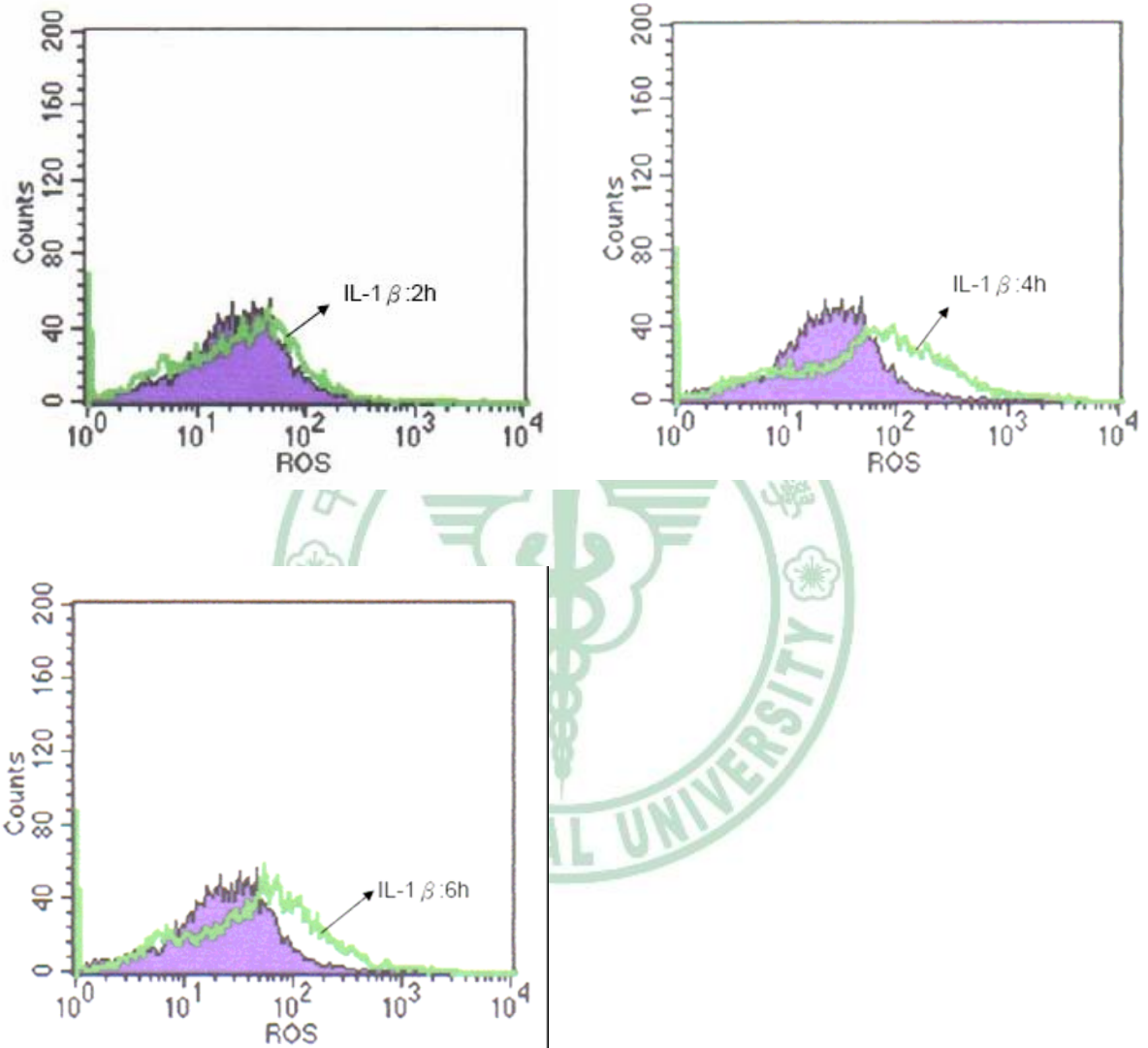
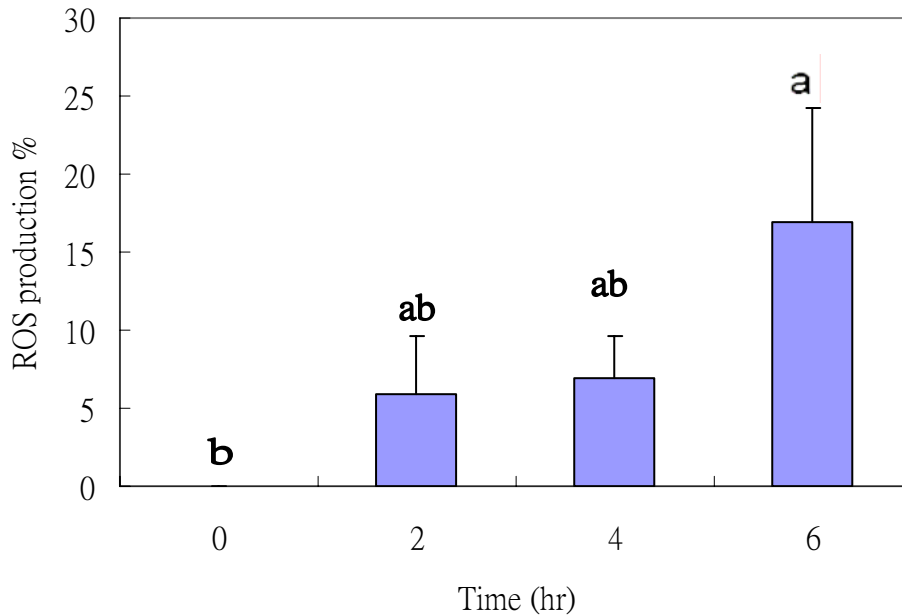


Figure. 3-3 (b). The melting temperature curve of GAPDH

(A)



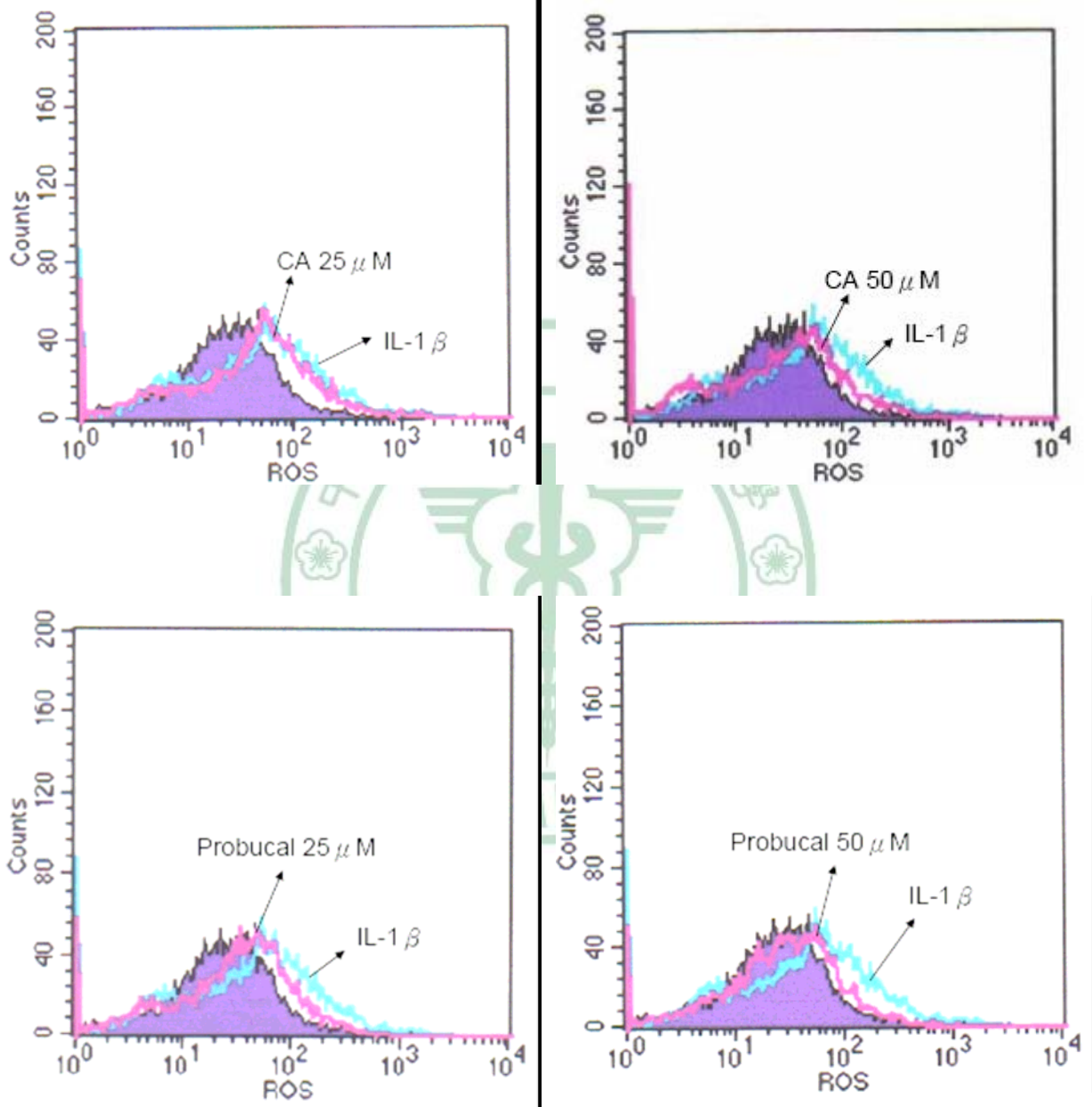
(B)



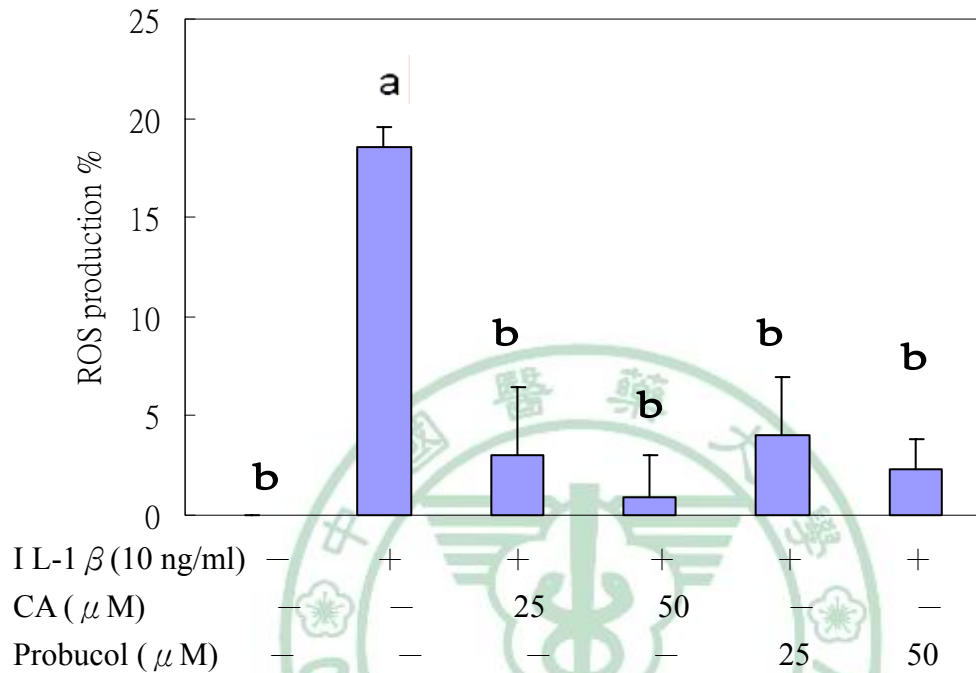
Figur. 4-1. IL-1 β -induced ROS production in HUVECs. (A) Time course response of ROS production on HUVECs stimulated with IL-1 β (10ng/ml). HUVECs were labeled with H₂O₂ - sensitive fluoreacent probe and were detected by flow cytometry. (B) Values are mean \pm SD, n=4. ^{a-b} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

圖 4-1. 不同時間點上 IL-1 β 誘導細胞內活性氧物質 (ROS) 產生

(A)

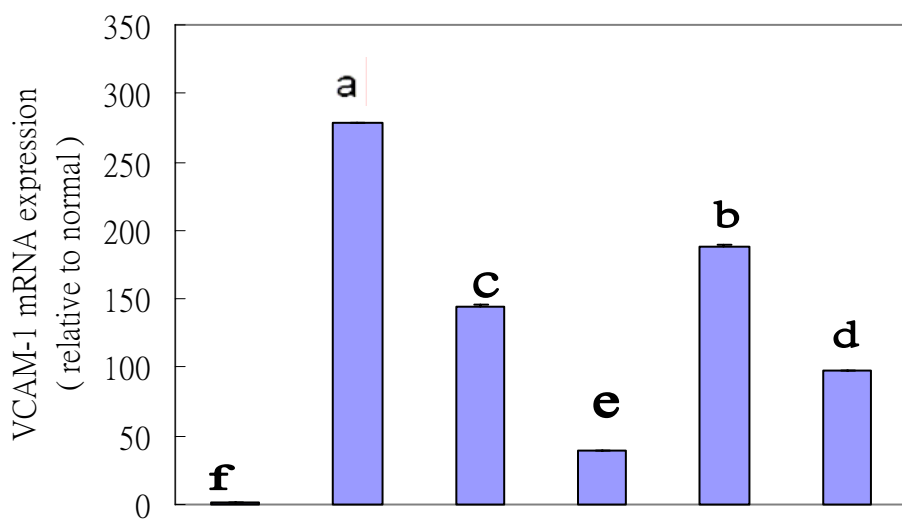


(B)



Figur. 4-2. Effect of Chlorogenic acid and Probucol on IL-1 β -induced ROS production in HUVECs. (A) HUVECs were stimulated with IL-1 β after pre-incubated with 25 μ M, 50 μ M chlorogenic acid or probuol for 18 hours, HUVECs were labeled with H₂O₂ - sensitive fluorescent probe and the fluorescent were detected by flow cytometry. (B) Values are mean \pm SD, n=4. ^{a-b} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

圖 4-2. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導細胞內活性氧物質 (ROS) 產生之影響



IL-1 β (10 ng/ml)	-	+	+	+	+	+
CA (μ M)	-	-	25	50	-	-
Probucol (μ M)	-	-	-	-	25	50

Figure. 5-1. Effect of chlorogenic acid on VCAM-1 expression in HUVECs.

HUVECs were pretreated with 25 μ M, 50 μ M chlorogenic acid or probucol for 18 hours, and induced by IL-1 β (10 ng/ml) for 6 hours. The mRNA expression of VCAM-1 was measured by real-time PCR. ^{a-f} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$. n=5.

圖 5-1. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導細胞黏附因子 VCAM-1 表現之影響

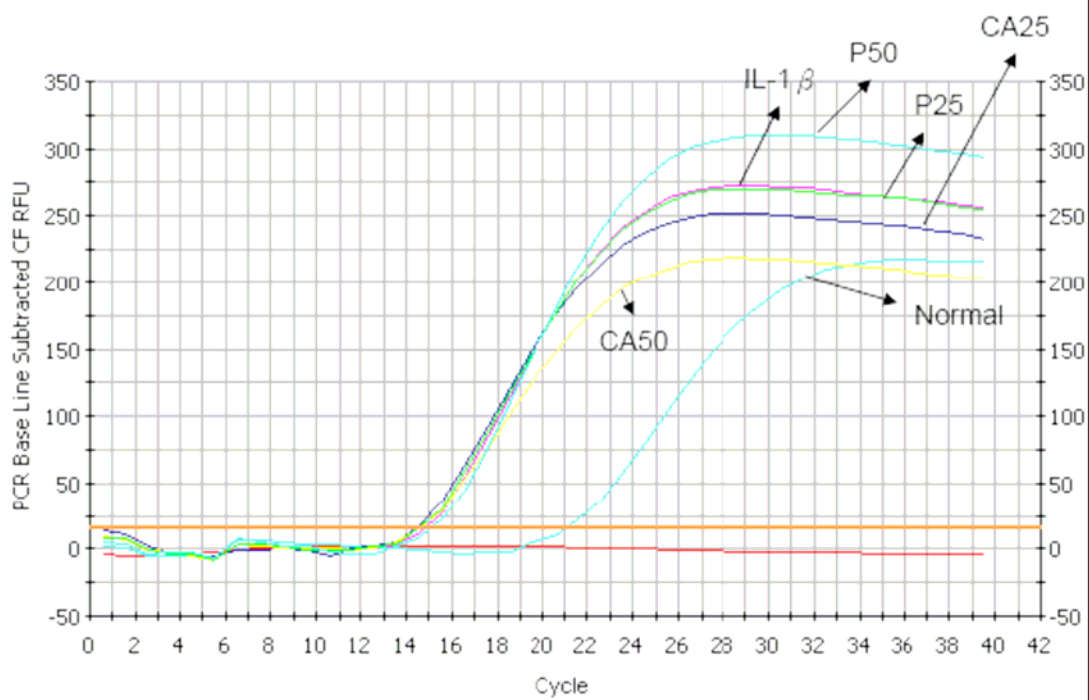


Figure. 5-2 (a). The amplification curve of VCAM-1 for Normal, IL-1 β , IL-1 β + CA 25 μ M, IL-1 β +CA 50 μ M, IL-1 β +P 25 μ M and IL-1 β +P 25 μ M

圖 5-2. 黏附因子 VCAM-1 之同步定量曲線圖

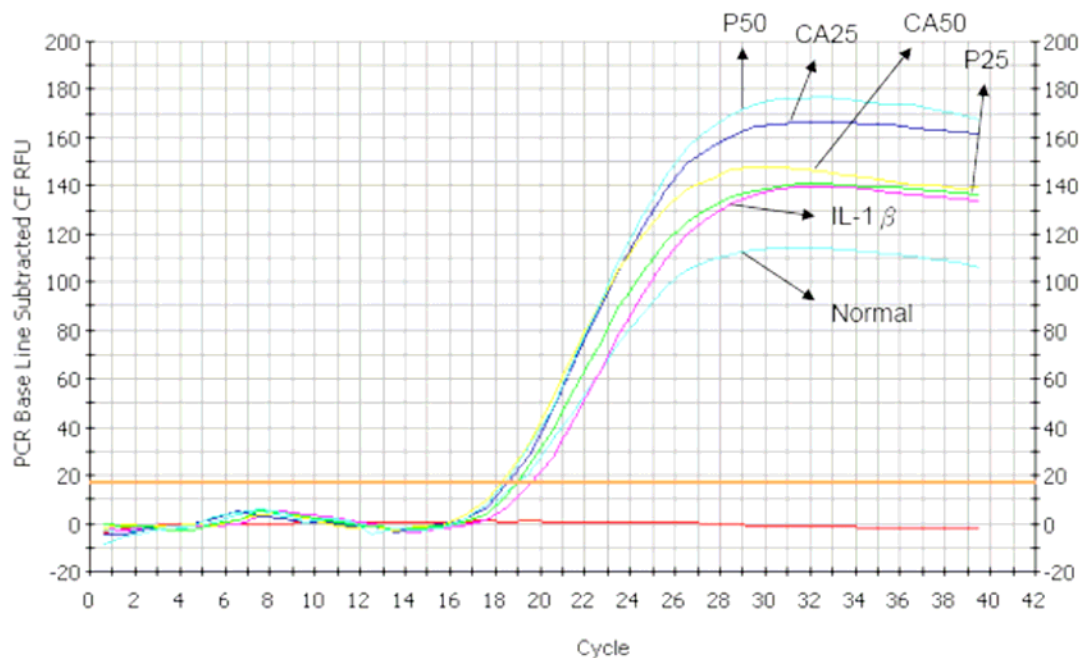


Figure. 5-2 (b). The amplification curve of GAPDH for Normal, IL-1 β , IL-1 β + CA 25 μ M, IL-1 β +CA 50 μ M, IL-1 β +P 25 μ M and IL-1 β +P 25 μ M

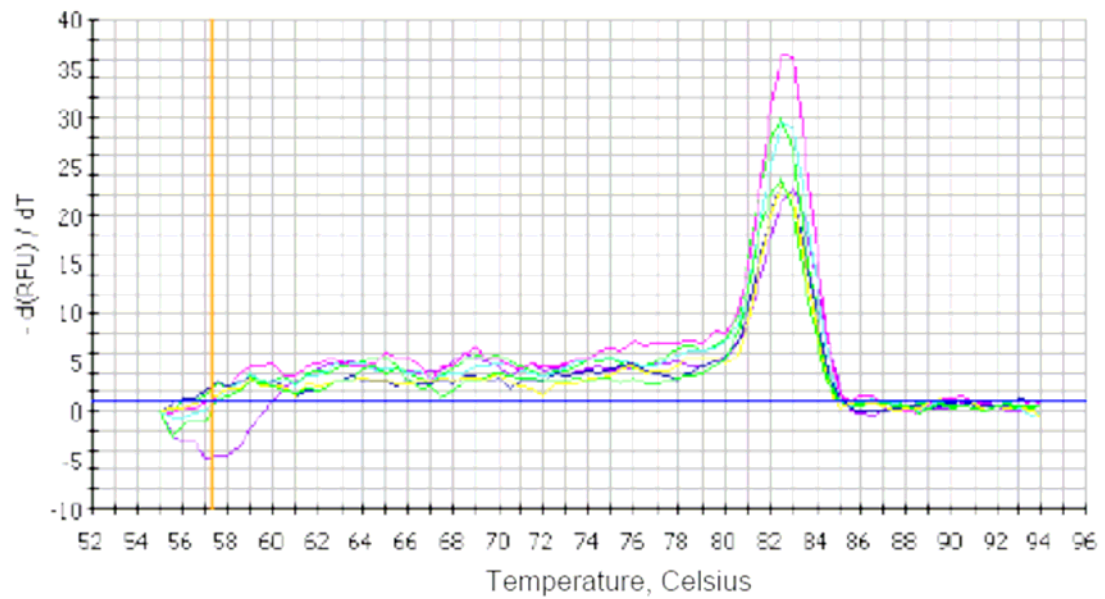


Figure. 5-3 (a). The melting temperature curve of VCAM-1

圖 5-3. 黏附因子 VCAM-1 之 melting curve

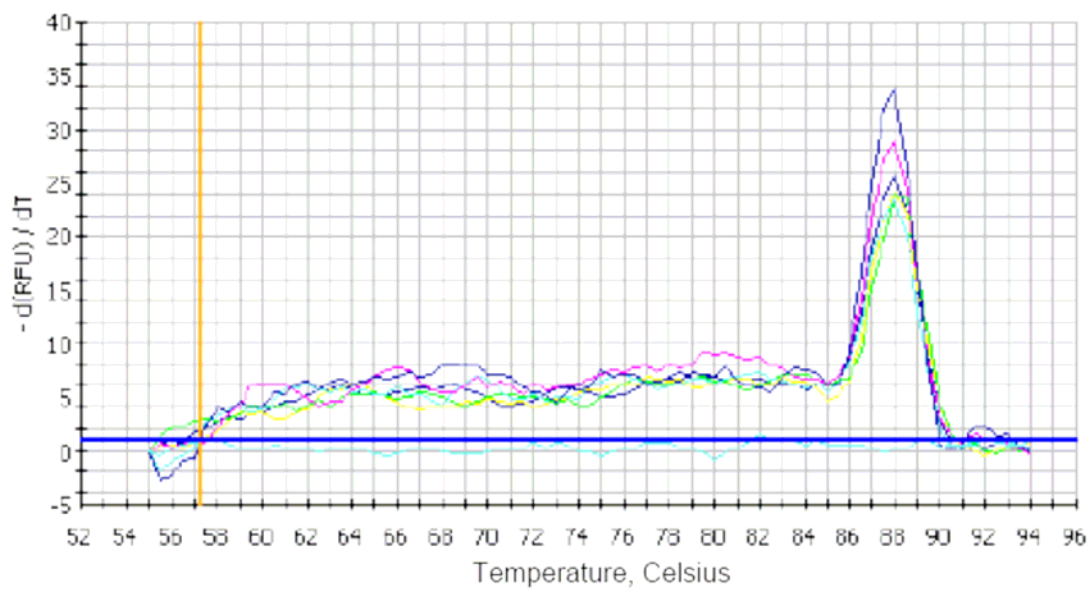


Figure. 5-3 (b). The melting temperature curve of GAPDH

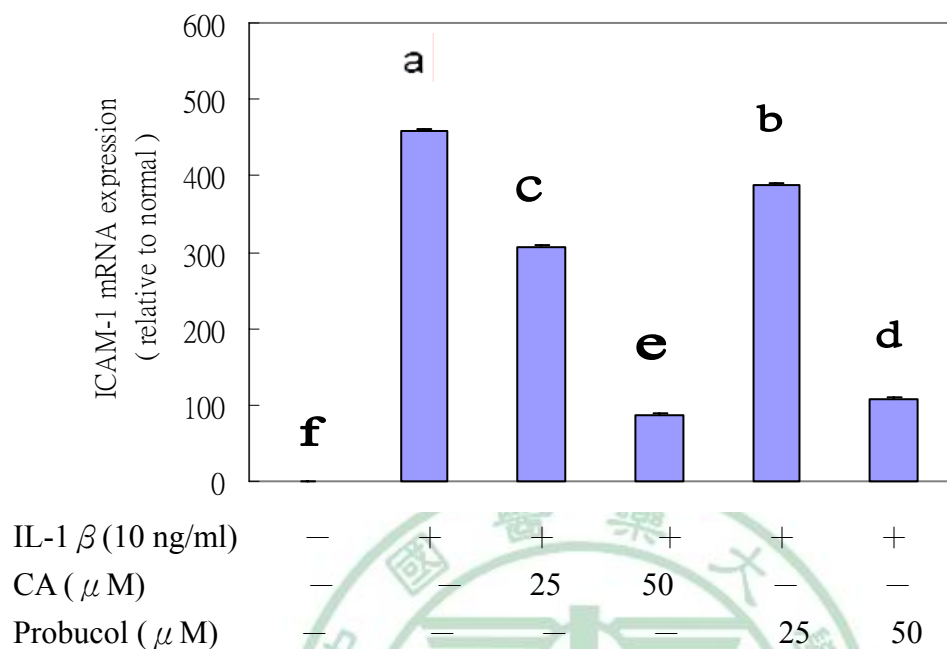


Figure. 6-1. Effect of chlorogenic acid on ICAM-1 expression in HUVECs. HUVECs were pretreated with 25 μ M, 50 μ M chlorogenic acid or probucol for 18 hours, and induced by IL-1 β (10 ng/ml) for 6 hours. The mRNA expression of ICAM-1 was measured by real-time PCR. ^{a-f} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$. n=5.

圖 6-1. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導細胞黏附因子 ICAM-1 表現之影響

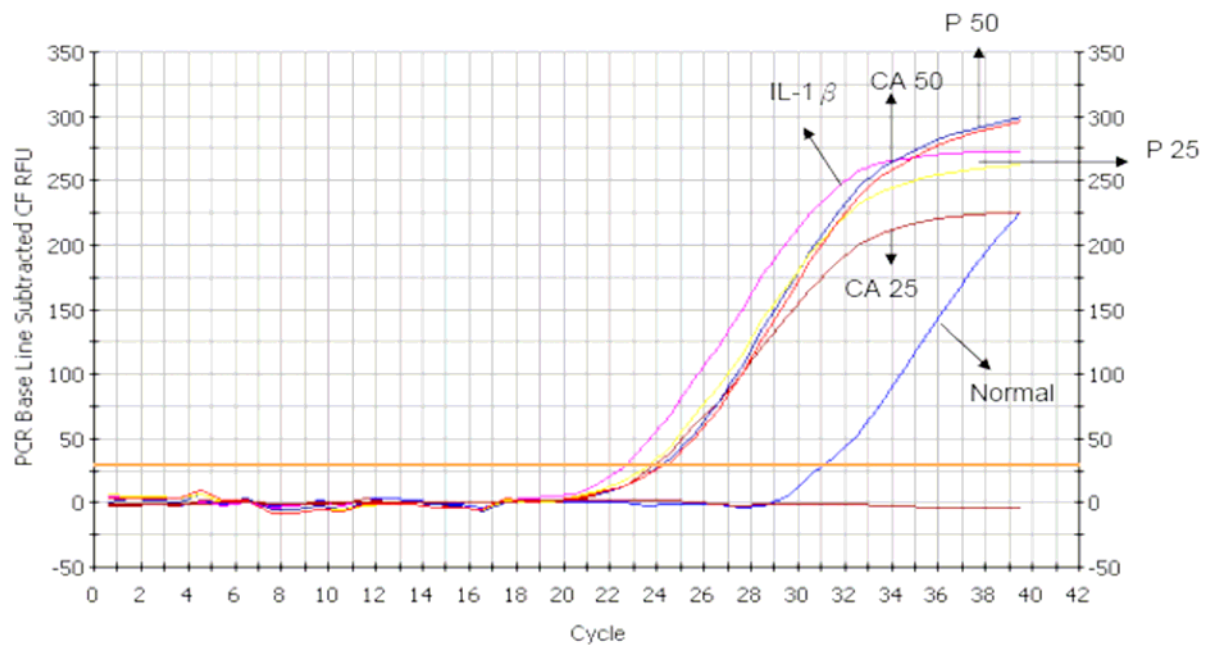


Figure. 6-2 (a). The amplification curve of ICAM-1 for Normal, IL-1 β , IL-1 β + CA 25 μ M, IL-1 β + CA 50 μ M, IL-1 β + P 25 μ M and IL-1 β + P 25 μ M

圖 6-2. 黏附因子 ICAM-1 之同步定量曲線圖

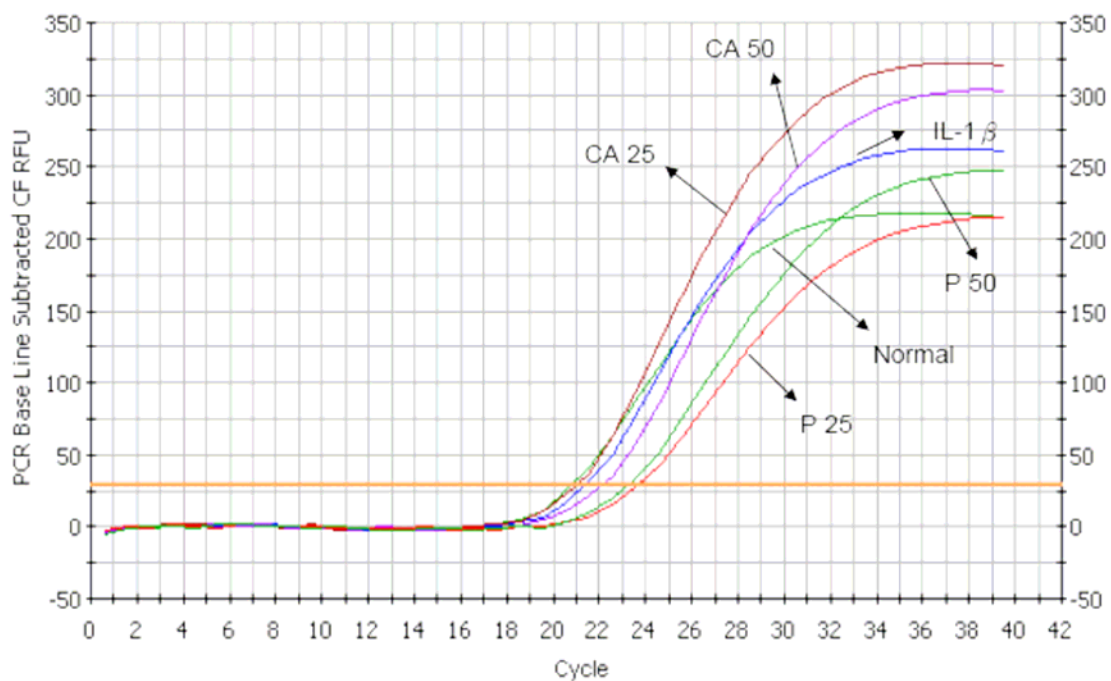


Figure. 6-2 (b). The amplification curve of GAPDH for Normal, IL-1 β , IL-1 β + CA 25 μ M, IL-1 β + CA 50 μ M, IL-1 β + P 25 μ M and IL-1 β + P 25 μ M

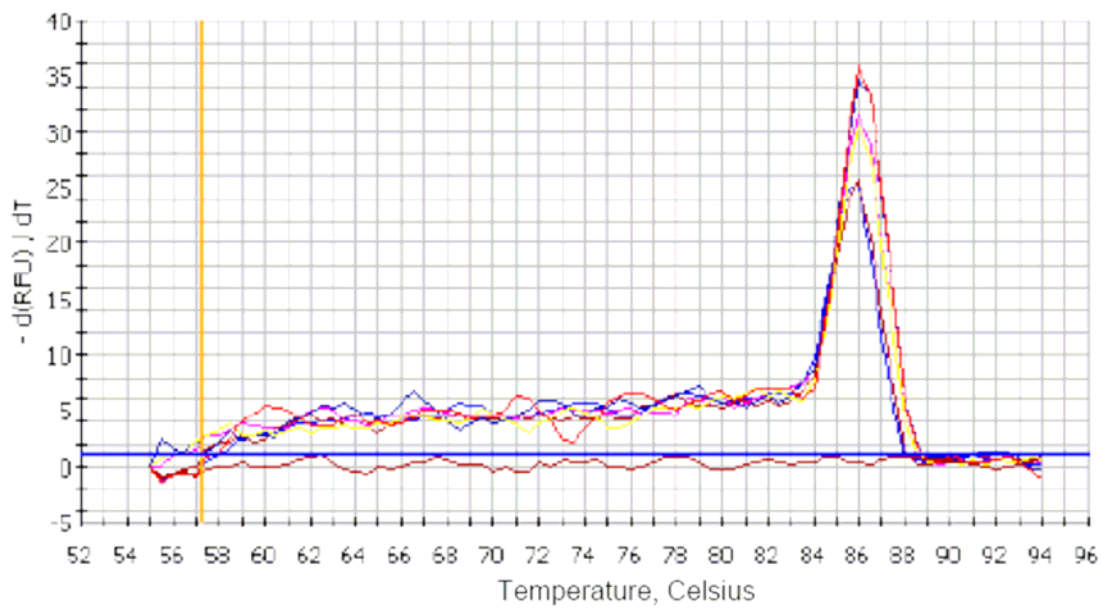


Figure. 6-3 (a). The melting temperature curve of ICAM-1

圖 6-3. 黏附因子 ICAM-1 之 melting curve

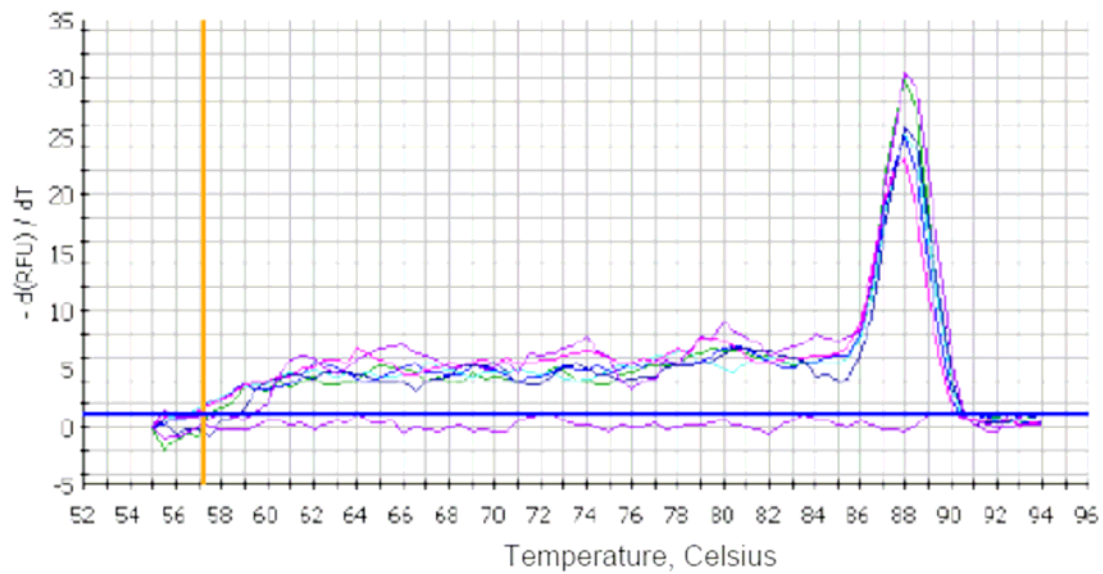
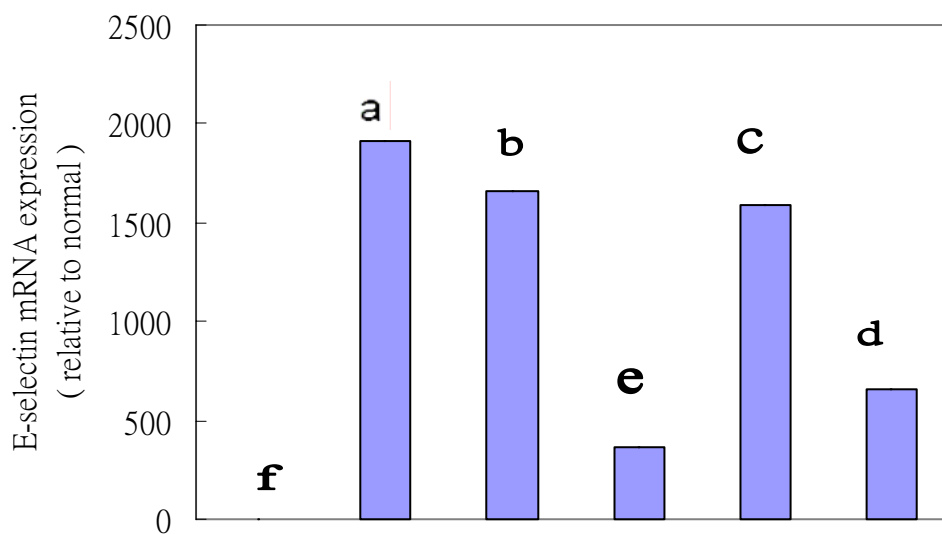


Figure. 6-3 (b). The melting temperature curve of GAPDH



IL-1 β (10 ng/ml)	-	+	+	+	+	+
CA (μ M)	-	-	25	50	-	-
Probucol (μ M)	-	-	-	-	25	50

Figure. 7-1. Effect of chlorogenic acid on E-selectin expression in HUVECs. HUVECs were pretreated with 25 μ M, 50 μ M chlorogenic acid or probucol for 18 hours, and induced by IL-1 β (10 ng/ml) for 6 hours. The mRNA expression of E-selectin was measured by real-time PCR. ^{a-f} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$. n=5.

圖 7-1. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導細胞黏附因子 E-selectin 表現之影響

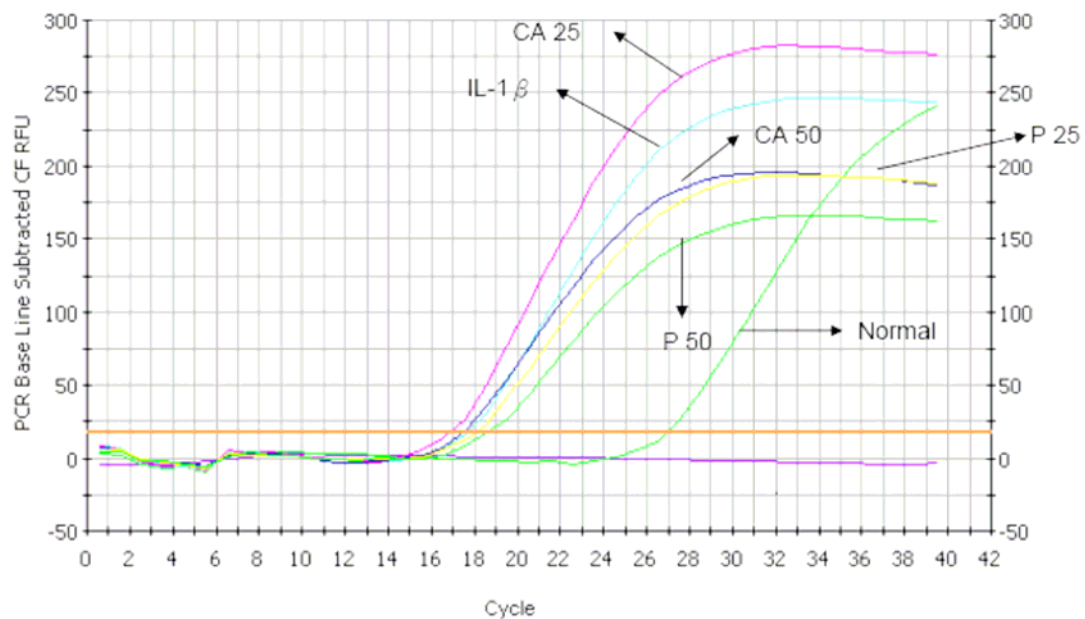


Figure. 7-2 (a). The amplification curve of E-selectin for Normal, IL-1 β , IL-1 β + CA 25 μ M, IL-1 β + CA 50 μ M, IL-1 β + P 25 μ M and IL-1 β + P 25 μ M

圖 7-2. 黏附因子 E-selectin 之同步定量曲線圖

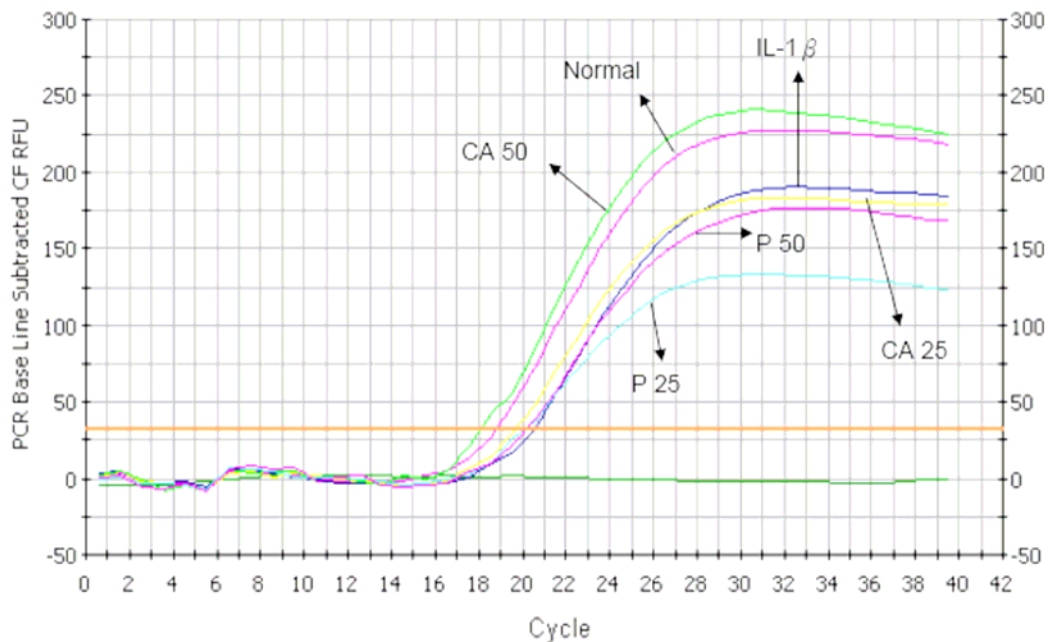


Figure. 7-2 (b). The amplification curve of GAPDH for Normal, IL-1 β , IL-1 β + CA 25 μ M, IL-1 β + CA 50 μ M, IL-1 β + P 25 μ M and IL-1 β + P 25 μ M

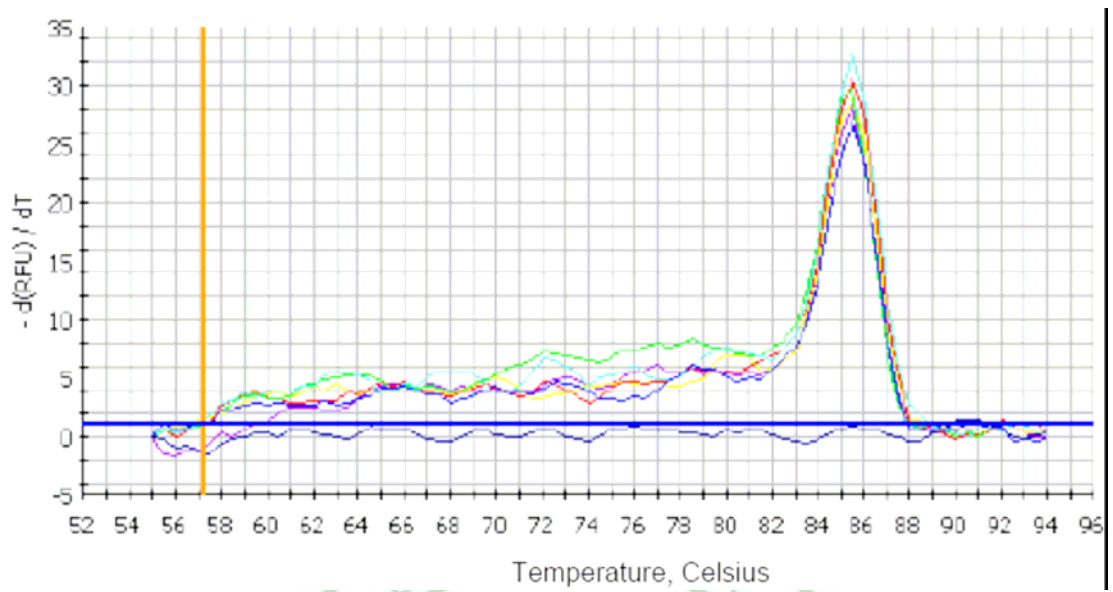


Figure. 7-3 (a). The melting temperature curve of E-selectin

圖 7-3. 黏附因子 E-selectin 之 melting curve

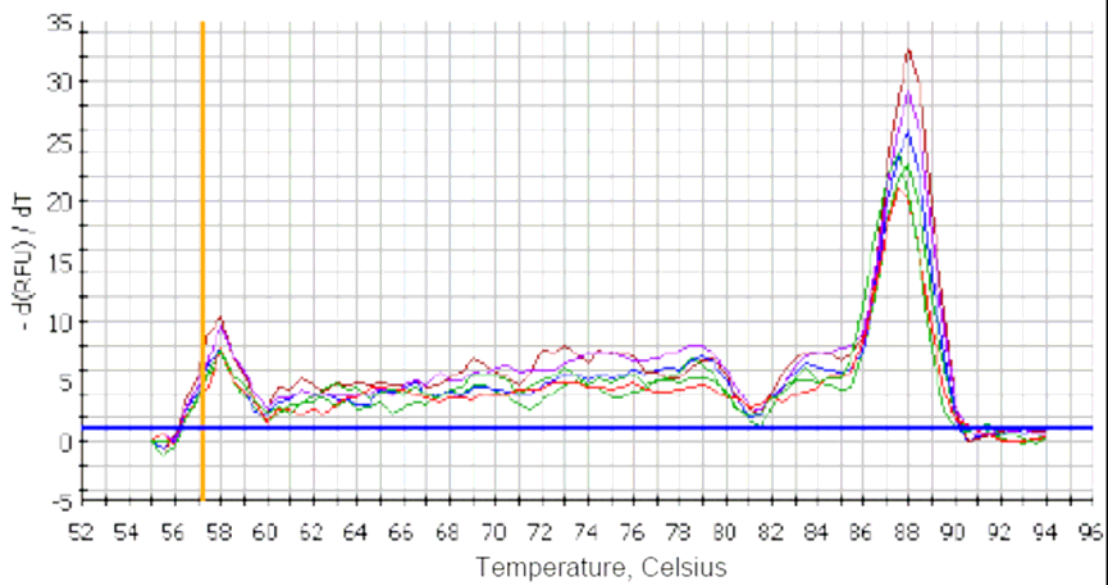
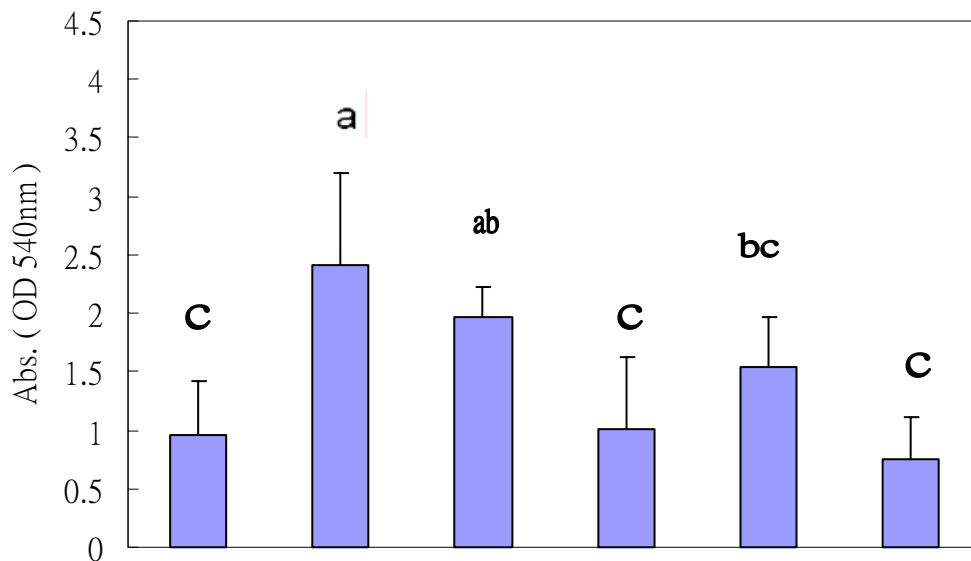


Figure. 7-3 (b). The melting temperature curve of GAPDH



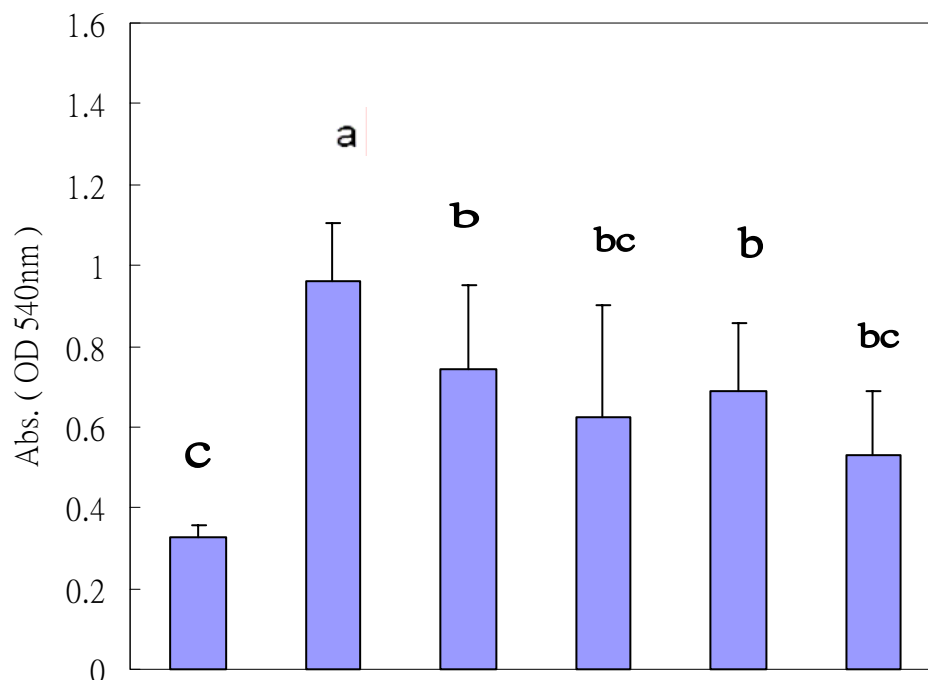
IL-1 β (10 ng/ml)	-	+	+	+	+	+
CA (μ M)	-	-	25	50	-	-
Probucol (μ M)	-	-	-	-	25	50

Figure 8. Effect of chlorogenic acid on IL-1 β - induced activation of NF- κ B P50.

HUVECs were pretreated with 25 μ M, 50 μ M chlorogenic acid or probucol for 18 hours, and induced by IL- 1 β (10 ng/ml) for 6 hours. 5 μ g nuclear extracts were prepared and analyzed for activation of NF- κ B P50 in each experiment. Values are mean \pm SD, n=3.

^{a-c} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

圖 8. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導 NF- κ B P50 活化之影響



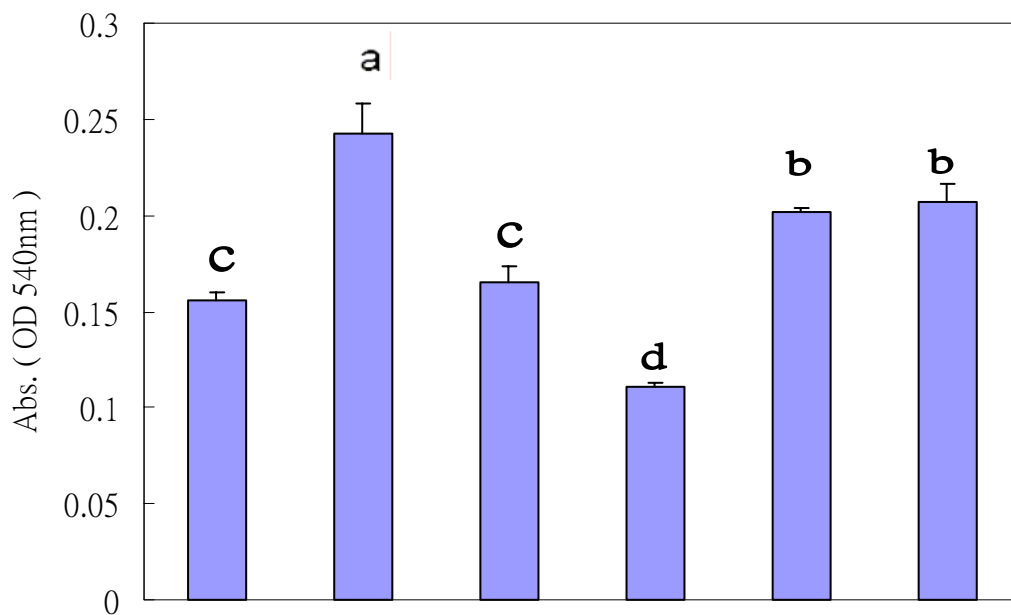
IL-1 β (10 ng/ml)	—	+	+	+	+	+
CA (μ M)	—	—	25	50	—	—
Probucol (μ M)	—	—	—	—	25	50

Figure 9. Effect of chlorogenic acid on IL-1 β - induced activation of NF- κ B P65.

HUVECs were pretreated with 25 μ M, 50 μ M chlorogenic acid or probucol for 18 hours, and induced by IL- 1 β (10 ng/ml) for 6 hours. 5 μ g nuclear extracts were prepared and analyzed for activation of NF- κ B P65 in each experiment. Values are mean \pm SD, n=3.

^{a-c} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

圖 9. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導 NF- κ B P65 活化之影響



IL-1 β (10 ng/ml)	-	+	+	+	+	+
CA (μ M)	-	-	25	50	-	-
Probucol (μ M)	-	-	-	-	25	50

Figure. 10. Effect of chlorogenic acid on IL-1 β - induced activation of NF- κ B P52
 HUVECs were pretreated with 25 μ M, 50 μ M chlorogenic acid or probucol for 18 hours, and induced by IL- 1 β (10 ng/ml) for 6 hours. 5 μ g nuclear extracts were prepared and analyzed for activation of NF- κ B P52 in each experiment. Values are mean \pm SD, n=3.
^{a-d}Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

圖 10. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導 NF- κ B P52 活化之影響

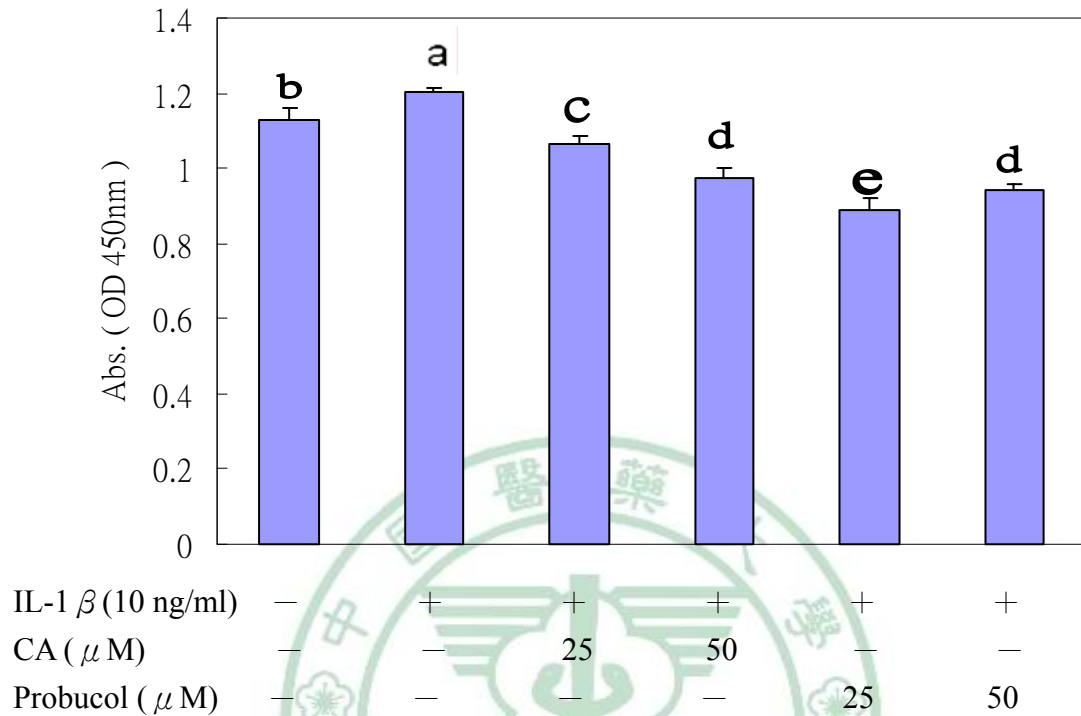
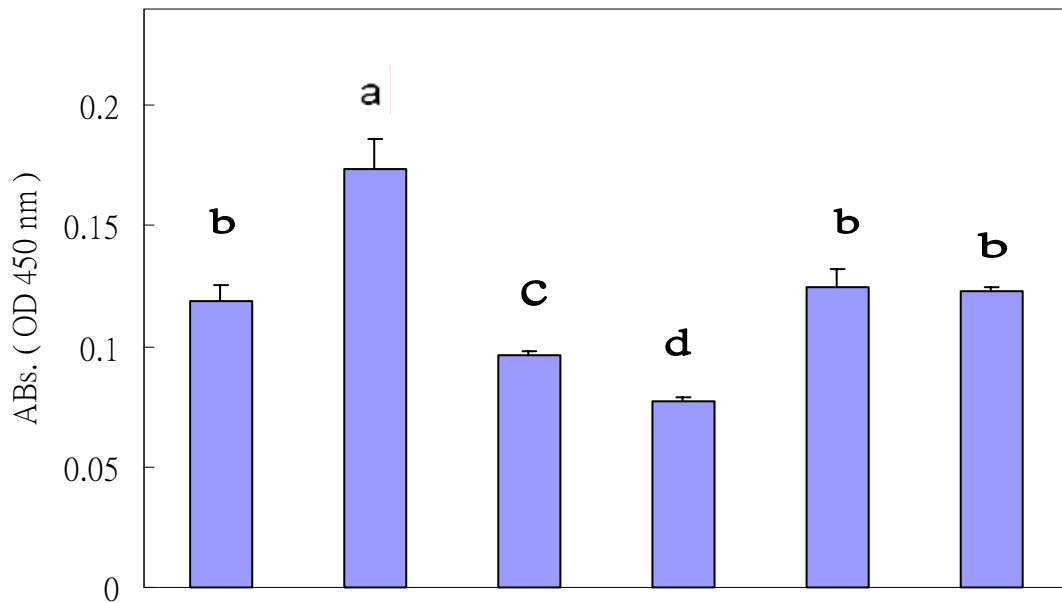


Figure. 11. Effect of chlorogenic acid on IL-1 β - induced activation of NF- κ B C-Rel. HUVECs were pretreated with 25 μ M, 50 μ M chlorogenic acid or probucol for 18 hours, and induced by IL- 1 β (10 ng/ml) for 6 hours. 5 μ g nuclear extracts were prepared and analyzed for activation of NF- κ B C-Rel in each experiment. Values are mean \pm SD, n=3. ^{a-e} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

圖 11. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導 NF- κ B C-Rel 活化之影響



IL-1 β (10 ng/ml)	-	+	+	+	+	+
CA (μ M)	-	-	25	50	-	-
Probucol (μ M)	-	-	-	-	25	50

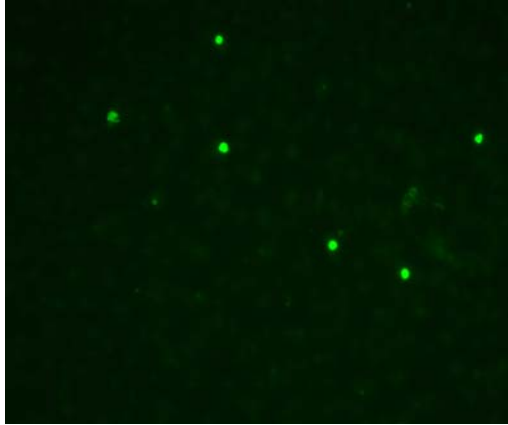
Figure 12. Effect of chlorogenic acid on IL-1 β - induced activation of NF- κ B Rel-B.

HUVECs were pretreated with 25 μ M, 50 μ M chlorogenic acid or probucol for 18 hours, and induced by IL- 1 β (10 ng/ml) for 6 hours. 5 μ g nuclear extracts were prepared and analyzed for activation of NF- κ B Rel-B in each experiment. Values are mean \pm SD, n=3. ^{a-d} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

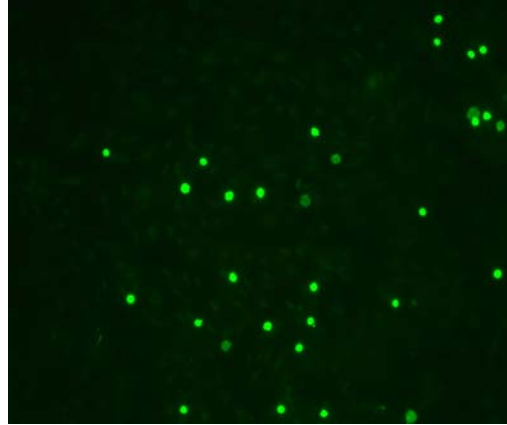
圖 12. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導 NF- κ B Rel-B 活化之影響

(A)

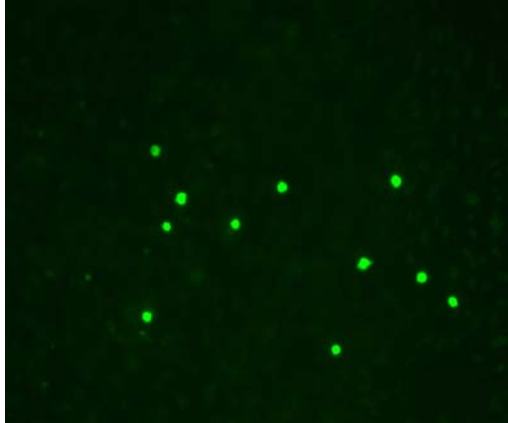
Normal



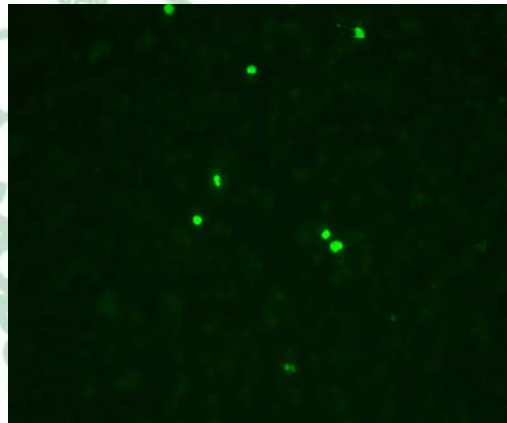
IL-1β



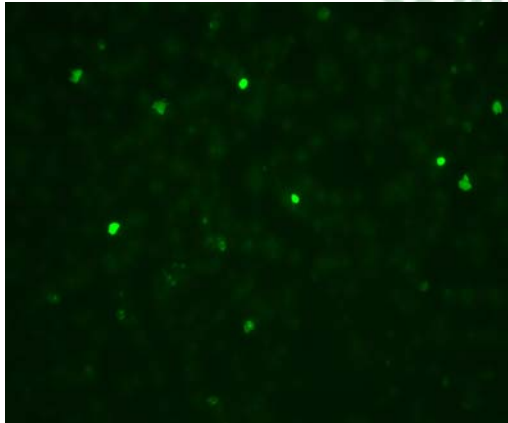
IL-1β+ CA 25μM



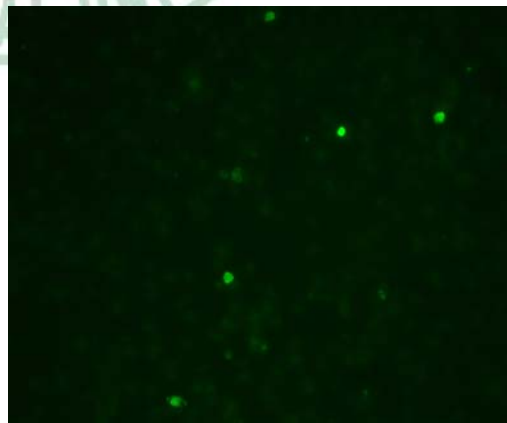
IL-1β+ CA 50μM



IL-1β+ Probucol 25μM



IL-1β+ Probucol 50μM



(B)

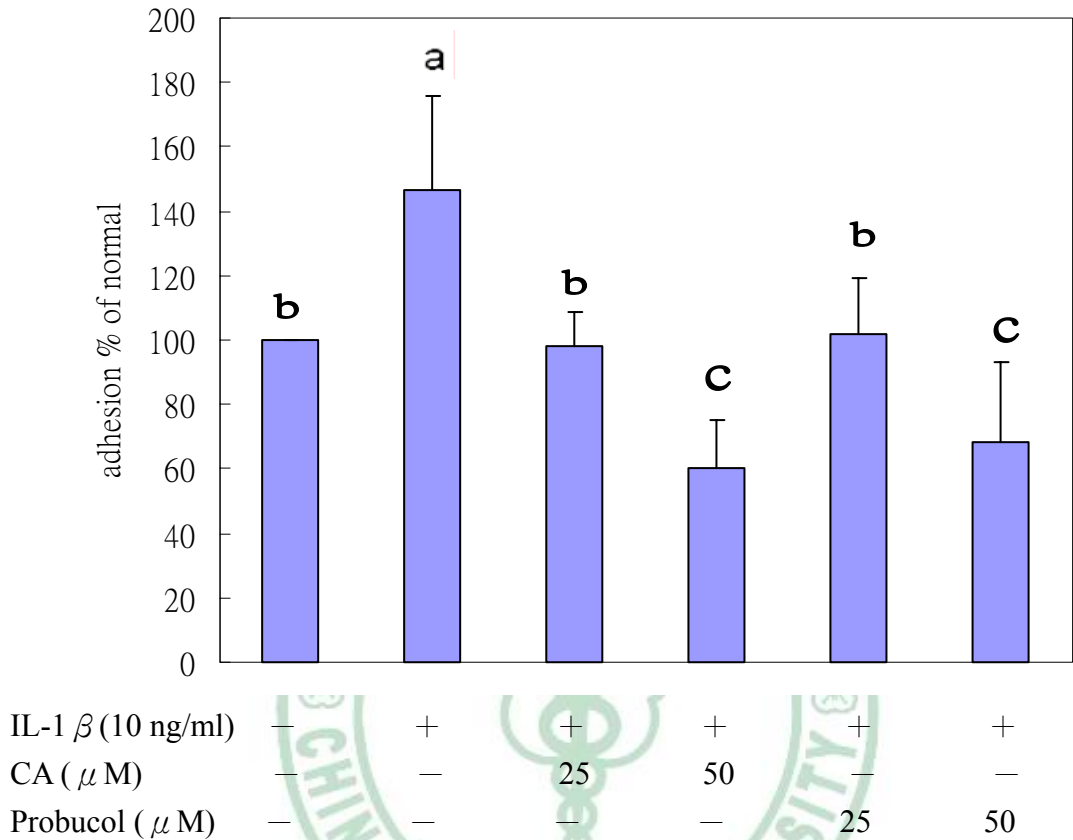


Figure. 13. Effect of chlorogenic acid on U937 monocyte adhesion to IL-1 β -activated HUVECs. HUVECs were pretreated with 25 μ M, 50 μ M chlorogenic acid or probucol for 18 hours, and induced by IL-1 β (10 ng/ml) for 6 hours, and cocultured with fluorescence-labeled U-937 30 min. (A) Micro-photography were obtained using fluorescence microscopy. (B) Values are mean \pm SD, n=8. ^{a-c} Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

圖 13. 綠原酸及 Probucol 對於 IL-1 β 所誘導單核球細胞 (U937) 黏附於內皮細胞之影響

第七章、参考文献:

Andersson CM, Hallberg A, Hogberg T. (1996) Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. *Advances Drug Res.* 28: 65-72.

Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, Selwyn AP. (1995) Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulation. *J Am Coll Cardiol.* 26: 1235-1241.

Auger C, Laurent N, Laurent C, Besancon, Caporiccio B, Teissedre PL, Rouanet JM. (2004) Hydroxycinnamic acids do not prevent aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamster. *Life Sci.* 74(19): 2365-2377.

Aviram M and Fuhrman B. (1998) Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis.* 137: S45-S50.

Bachetti T and Morbidelli L. (2000) Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res.* 42: 9-19.

Baeuerle PA. (1991) The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta.* 1072: 63-80.

Baeuerle PA and Henkel T. (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 12: 141-179.

Baeuerle PA and Baltimore D. (1996) NF-kB: ten years after. *Cell.* 87: 13-20.

Baeuerle PA and Baichwal VR. (1997) NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol.* 65: 111-137.

Baichwal VR and Baeuerle PA. (1997) Activate NF-kappa B or die? *Curr.*

Biol. 7: R94-96.

Baldwin AS. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 14: 649-683.

Ball K and Turner R. (1974) Smoking and the heart. The basis for action. *Lancet.* 2: 822-826.

Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem.* 22: 111-180.

Barnes PJ and Adcock IM. (1997) NF-kB: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 18: 46-50.

Barnes PJ and Karin M. (1997) Nuclear factor-kB-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 15 : 1066-1071.

Barnhart RL, Busch SJ, Jackson RL. (1989) Concentration-dependent antioxidant activity of probucol in low density lipoproteins in vitro: probucol degradation precedes lipoprotein oxidation. *J Lipid Res.* 30: 1703-1710.

Baron JA, Gerhardsson de Verdier M, Ekblom A. (1994) Coffee, tea, tobacco, and cancer of the large bowel. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 3: 565-570.

Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature.* 376: 167-170.

Bennet MR. (1999) Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovascular Res.* 41: 361-368.

Bevilacqua MP, Pober JS, Wheller ME, Cotran RS, Gimbrone MAJ. (1985) Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related

leukocyte cell lines. *J Clin Invest.* 76: 2003-2011.

Bevilacqua MP and Nelson RM. (1993) Selectins. *J Clin Invest.* 91: 379-387.

Bird DA, Tangirala RK, Fruebis J. (1998) Effect of probucol on LDL oxidation and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res.* 39: 1079-1090.

Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 170: 191-203.

Blois MS. (1958) Antioxidant determinations by use of a stable free radical. *Nature. (Lond.)* 181: 1199-1200.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann FJ, Mackman N, Baeurele PA, Walli AK, Neumeier D. (1997) Dysregulation of monocytic nuclear factor- κ B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:1901-1909.

Brown MS and Goldstein JL. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232: 34-47.

Brown MS, and Goldstein JL. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane bound transcription factor. *Cell.* 89: 331-340.

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. (1998) Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 394: 894-897.

Bochaton-Piallat ML, Gabbiani F, Redard M, Desmouliere A, Gabbiani G. (1995) Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol.* 146: 1059-1064.

Cacciuttolo MA, Trinh L, Lumpkin JA, Rao G. (1993) Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Rad Biol Med.* 14: 267-276.

Cai H and Harrison DG. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87: 840-844.

Caligiuri G, Levy B, Pernow J, Thoren P, Hansson GK. (1999) Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc. Natl Acad Sci.* 96: 6920-6924.

Carlos TM and Harlan JM. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 84: 2068-2101.

Carluccio M A, Siculella L, Ancora M A, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visiolo F, Distante D, Caterina RD. (2003) Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 622-629.

Carmeliet P. (2000) Proteins in cardiovascular aneurysms and rupture: targets for therapy? *J Clin Invest.* 105: 1519-1520.

Catapano AL. (1997) Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology.* 48: 39-44.

Chang C, Chen J, Wong H. (2001) Protective effects of organic acids on human vascular endothelial cells. *chinese journal of preventive medicine.* 35(2): 79-82.

Chen C C, Wang JK, Lin SB. (1998) Antisense oligonucleotide targeting protein kinase C- α , - β I, or - δ but not - η inhibit lipopolysaccharide- induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages: involvement of a nuclear factor kappa B-dependent mechanism. *J Immunol.* 161: 6206-

6214.

Chen CC, Chen JJ, Chou CY. (2000) Protein kinase calpha but not p44/42 mitogen-activated protein kinase, p38, or c-Jun NH(2)-terminal kinase is required for intercellular adhesion molecule-1 expression mediated by interleukin-1beta: involvement of sequential activation of tyrosine kinase, nuclear factor-kappaB-inducing kinase, and IkappaB kinase 2. *Mol Pharmacol.* 58: 1479-1489.

Chen C, Chou C, Sun Y, Huang W. (2001) Tumor necrosis factor alpha-induced activation of downstream NF-kappaB site of the promoter mediates epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of PKCalpha, tyrosine kinase, and IKK2, but not MAPKs, pathway. *Cell Signal.* 13: 543-553.

Chen YH, Lin SJ, Ku HH, Shiao MS, Lin FY, Chen JW, Chen YL. (2001) Salvianolic Acid B attenuates VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNE- α -treated human aortic endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry.* 82: 512-521.

Chen YL, Chen YH, Lin SJ, Chen JW, Ku HH. (2002) Magnolol attenuates VCAM-1 expression in vitro in TNF- α -treated human aortic endothelial cells and in vivo in the aorta of cholesterol-fed rabbits. *Br J Pharmacol.* 135: 37-47.

Choi JS, Choi YJ, Park SH, Kang JS, Kang YH. (2004) Flavones Mitigate Tumor Necrosis Factor- α -Induced Adhesion Molecule Upregulation in Cultured Human Endothelial Cells: Role of Nuclear Factor- κ B. *J Nutr.* 134: 1013-1019.

Church DF and Pryor WA. (1985) Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implication. *Environ Health Perspect.* 64: 111-126.

Clifford MN. (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 79: 362-372.

Colles SM, Irwin KC, Chisolm GM. (1996) Roles of multiple oxidized lipids in cellular injury. *J. Lipid Res.* 37: 2018–2028.

Collins T. (1993) Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest.* 68: 499-508.

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 9: 899-909.

Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. (2000) P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 191: 189-194.

Collins T and Cybulsky MI. (2001) NF-κB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest.* 107(3): 255-264

Cybulsky MI and Gimbrone MA. (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 251: 788-791.

Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. (1999) Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest.* 103: 1597-1604.

Davi G, Romano M, Mezzetti A, Procopio A, Iacobelli S, Antidormi T, Bucciarelli T, Alessandrini P, Cuccurullo F, Bittolo BG. (1998) Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients. *Circulation.* 97: 953-957.

David AB, Rajendra KT, Fruebis J, Steinberg D, Joseph LW, Palinski W. (1998) Effect of probucol on LDL oxidation and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res.* 39: 1079-1090.

Davies MJ, Richardson PD, Woolf N. (1993) Risk of thrombosis in human

atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.* 69: 377-381.

Denizot F and Lang R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 89: 271-277.

de Whalley CV, Rankin SM, Hoult JR, Jessup W, Leake DS. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol.* 39: 1743-1750.

Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF. (1997) Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl Med.* 337: 408-416.

DiCorleto PE and de la Motte CA. (1985) Characterization of the adhesion of human monocytic cell line U937 to culture endothelial cells. *J Clin Invest.* 75: 1153-1161.

Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Jok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J. (1998) Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Br J Nutr.* 80: S77-S112.

Dong Z, Chapman S, Brown A, Frenette P, Hynes R, Wagner D. (1998). The Combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 102: 145-152.

Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR. (1990) VCAM-1 on active endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell.* 60: 577-584.

Elinder LS, Hadell K, Johnasson J, Mølgaard J, Holme I, Olsson AG, Walldius G. (1995) Probucol treatment decreases serum concentrations of diet-derived antioxidants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15: 1057-1063.

Eunice NH, Daniel K, Claus S. (2000). NF- κ B and the innate immune

response. *Curr Opin Immunol.* 12: 52-58.

Evans P and Halliwell B. (2001) Micronutrients:oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr.* 85(suppl2): S67-S74.

Fan J, Shimokama T, Haraoka S, Tokunaga O, Watanabe T. (1993) Monocytes-endothelial cell interactions in vitro, with reference to the influence of interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Bio Cell.* 79: 17-26.

Favero A, Franceschi S, La Vecchia C, Negri E, Conti E, Montella M. (1998) Meal frequency and coffee intake in colon cancer. *Nutr Cancer.* 30: 182-185.

Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M. (2005) Inhibition of Activator Protein-1, NF- κ B, and MAPKs and Induction of Phase 2 Detoxifying Enzyme Activity by Chlorogenic Acid. *J Biol Chem.* 280 (30): 27888-27895.

Ferns GAA, Lamb DJ, Taylor A. (1997) The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus. *Atherosclerosis.* 133: 139-152.

Frances EC and Gourisankar G. (1999) Regulation of DNA binding by Rel/NF- κ B transcription factors: structural views. *Oncogene.* 18: 6845-6852.

Frankel EN, Eaterhouse AL, Kinsella JE. (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* 341: 1103-1104.

Frei B, Stocker R, Ames BN. (1988) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci.* 85: 9748-9752.

Fuhrman B, Buch S, Vaya J. (1997) Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 66: 267-275.

Fruebis J, Gonzalez V, Silvestre M, Palinski W. (1997) Effect of Probuocol Treatment on Gene Expression of VCAM-1, MCP-1, and M-CSF in the

Aortic Wall of LDL Receptor–Deficient Rabbits During Early Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 1289-1302.

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 94: 2493–2503.

Gaziano JM, Hatta A, Flynn M, Johnson EJ, Krinsky NI, Ridker PM, Hennekens CH, Frei B. (1995) Supplementation with beta- carotene in vivo and in vitro does not inhibit low-density lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis.* 112: 187-195.

Gey KF, Moser UK, Jordan P. (1993) Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin Nutr.* 57: 787S-797S.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260.

Gilbert DL. (2000) Fifty years of radical ideas. *Ann NY Acad Sci.* 899: 1-14.

Gimbrone MA , Nagel T, Topper JN. (1997) Biomechanical activation: An emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest.* 99: 1809-1813.

Gimbrone MAJ, Bevilacqua MP, Cybulsky MI. (1990) Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci.* 598: 77-85.

Giovannucci E. (1998) Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. *Am J Epidemiol.* 147: 1043-1052.

Glass CK and Witztum JL. (2001) Atherosclerosis: the road ahead. *Cell.* 104:

503-16.

Goldstein JL and Brown MS. (1977) The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Review Biochem.* 46: 897-930.

Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. (1999) MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest.* 103: 773-778.

Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, Utzel K, Brocker EB, Rapp UR, and Ludwig S (2001) Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. *Blood.* 97: 46-55.

Gram J. (2002) Inflammation in atherosclerosis and acute coronary syndromes. *International Congress Series.*1229: 95-102.

Grilli M, Goffi F, Memorandum M, Spano PF. (1999) Interleukin-1 β and glutamate activate the NF- κ B/Rel-binding site from the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures. *J Biol Chem.* 271: 15002-15007.

Grimm S and Baeuerle PA. (1993) The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J.* 290 (Pt 2): 297-308.

Grinberg LN, Newmark H, Kitrossky N, Rahamim E, Chevion M, Rachmilewitz EA. (1997) Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. *Biochem Pharm.* 54: 973-978.

Grundy SM. (1988) HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 319: 24-33.

Grundy SM and Denke MA. (1990) Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res.* 31: 1149-1172.

Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein- deficient mice. *Mol Cell.* 2: 275-281.

Hackman A, Abe Y, Insull W, Jr., Pownall H, Smith L, Dunn K, Gotto AM, Jr., Ballantyne CM. (1996) Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation.* 93: 1334-1338.

Halevy D, Thiery J, Nagel D. (1997) Increased oxidation of LDL in patients with coronary artery disease is independent from dietary vitamins E and C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 1432-1437.

Halliwell B, Gutteridge JMC. (1991) Free radicals in biology and medicine. Second Edition. Clarendon Press Oxford. 33:37-39.

Halliwell B. (1995) Oxidation of low-density lipoprotein: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *Am J Clin Nutr.* 61: 670S-677S.

Halliwell B. (1996) Oxidative stress, nutrition and health. *Free Radic Res.* 25: 57-74.

Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O. (1999) Expression of hte monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia: differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res.* 40: 1053-1063.

Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, Betz E, Karsch KR. (1990) Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty. *Circ Res.* 67: 651-659.

Hansson GK. (1997) Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 8: 301-311.

Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, Sigal E.

(2000) Overexpression of 15-Lipoxygenase in Vascular Endothelium Accelerates Early Atherosclerosis in LDL Receptor- Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 2100-2105.

Harborne JB. (1989) Plant phenolics in method in plant biochemistry. Harborne JB Ed. pp 1-28.

Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Horning B, Drexler H. (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 91: 7A-11A.

Hashimoto M, Eto M, Akishita M, Kozaki K, Ako J, Iijima K, Kim S, Toba K, Yoshizumi M, Ouchi Y. (1999) Correlation between flow-mediated vasodilatation of the brachial artery and intima media thickness in the carotid artery in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 2795-2800.

Hatheill JR, Till GO, Ward PA. (1991) Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents And Actions.* 32: 351-358.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 34: 1345-1353.

Heike LP. (1999) Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene.* 18: 6853-6866.

Heilker R, Freuler F, Vanek M, Pulfer R, Kobel T, Peter J, Zerwes HG, Hofstetter H, Eder J. (1999) The kinetics of association and phosphorylation of IkappaB isoforms by IkappaB kinase 2 correlate with their cellular regulation in human endothelial cells. *Biochemistry.* 38: 6231-6238.

Heinecke JW, Rosen H, Chait A. (1984) Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest.* 74: 1890-1894.

Heinecke JW. (1998) Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein

hypothesis. *Atherosclerosis*. 141: 1-15.

Heitzer T, Just H, Munzel T. (1996) Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation*. 94: 6-9.

Herrington DM, Reboussin DM, Brosnihan KB. (2000) Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery arteriosclerosis. *N Engl J Med*. 343: 522-529.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 342: 1007-1011.

Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkonic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*. 155: 381-386.

Hiramatsu K, Rosen H, Heinecke JW. (1987) Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis*. 7: 55-60.

Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB. (1996) Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem*. 57: 43-46.

Holvoet P and Collen D. (1994) Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J*. 8: 1279-1284.

Howard P. (1989) Probucol in hypercholesterolemia. *Ann Pharmacother*. 23: 880-881.

Hsu HY and Twu YC. (2000) Tumor necrosis factor- α -mediated protein kinases in regulation of scavenger receptor and foam cell formation on macrophage. *J Biol Chem*. 275: 41035-41048.

Huang MT, Smart R C, Wong C Q, Conney A H. (1988) Inhibitory effect of

curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 48: 5941-5946.

Huang Y, Song L, Xu M, Lopes-Virella MF. (2001) Quercetin inhibits Matrix metalloproteinase-1 Expression in human vascular endothelial cells through extracellular signal-regulated kinase. *Arch Biochem Biophys.* 391: 72-78.

Huang WC, Chen JJ, Chen CC (2003) c-Src-dependent tyrosine phosphorylation of IKKbeta is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem.* 278: 9944-9952.

Hulley S, Grady D, Bush T. (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA.* 280: 605-613.

Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G. (1998) The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell.* 95: 759-770.

Hynes RO and Lander AD. (1992) Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell.* 68: 303-322.

Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsy WA, Jackson JH, Cochrane CG. (1988) Mechanisms of oxidant-mediated injury. *J Biol Chem.* 263: 1665-1675.

Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. (1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 34: 879-886.

Imagami T, Naruse M, Hoover R. (1995) Endothelium as an endocrine organ. *Ann Rev Physiol.* 57: 171-189.

Imai K and Nakachi K. (1995) Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *Br Med J.* 310: 693-696.

Ishikawa T, Suzukawa M, Ito T, Yoshida H, Ayaori M, Nishiwaki M, Yonemura A, Hara Y, Nakamura H. (1997) Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am J Clin Nutr.* 66: 261-266.

Jacob RA. (1994) Nutrition, health and antioxidants. *Inform.* 5: 1271-1275.

Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. (1994) Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 24: 1591-1601.

Jha P, Flather M, Lonn E, Farkouh M, Yusuf S. (1995) The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann Intern Med.* 123: 860-872.

Jialal I and Devaraj S. (1996) Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem.* 42: 498-506.

Johnasson J, Olsson AG, Bergstrand L. (1995) Lowering of HDL2b by probucol partly explains the failure of the drug to affect femoral atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia: a probucol quantitative regression Swedish trial (PQRST) report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15: 1049-1056.

Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C. (1997). Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by amyloid β peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci.* 94: 2642-2647.

Kanegae Y, Tavares AT, Izpisua Belmonte JC, Verma IM. (1998) Role of Rel/NF-kappaB transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb. *Nature.* 392: 611-614.

Karin M. (1999) The beginning of the end: I κ B Kinase (IKK) and NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 274:27339-27342.

Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Mori H. (2000) Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol.* 38: 467-471.

Kehrer JP. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 23: 21-48.

Keli SO, Hertog MGL, Feskens EJ, Kromhout D. (1996) Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen Study. *Arch Intern Med.* 156: 637-642.

Kerry NL and Abbey M. (1997) Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis.* 135: 93-102.

Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. (1996) Flavonoids intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J.* 312: 478-481.

Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, Shesely EG, Smithies O, Maeda N (2000) Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(2/2) ApoE(2/2) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest.* 105: 451-458.

Kono Y, Kashine S, Yoneyama T, Sakamoto Y, Matsui Y, Shibata H. (1998) Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62(1): 22-7.

Kopp EB and Ghosh S. (1995) NF- κ B and related proteins in innate immunity. *Adv Immunol.* 58: 1-27.

Kreuzer J, White AL, Knott T J, Haberland ME. (1997) Amino terminus of apoB suffices to produce recognition of malondialdehyde-modified low

density lipoprotein by the scavenger receptor of human monocyte-macrophages. *J Lipid Res.* 38: 324-342.

Kweon MH, Hwang HJ, Sung HC. (2001) Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachy edulis*). *J Agric Food Chem.* 49(10): 4646-4655.

Kuijpers TW and Harlan JM. (1993) Monocyte-endothelial interactions: insights and questions. *J Lab Clin Med.* 122: 641-651.

Lander HM. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11:118-124

La Vecchia C, Ferraroni M, Negri E, D'Avanzo B, Decarli A, Levi F, Franceschi S. (1989) Coffee consumption and digestive tract cancers. *Cancer Res.* 49: 1049-1051.

Lee RT and Libby P. (1997) The unstable atheroma. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 17: 1859-1867.

Lee JI and Burckart GJ. (1998) Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol.* 38: 981-993.

Leeuwenberg JF, Smeets EF, Neefjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme TM, Ahern TJ, Buurman WA. (1992) E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology.* 77: 543-549.

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Libby P. (1993) An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb.* 13: 197-204.

Liao F, Andalibi A, deBeer FC, Fogelman AM, Susis AJ. (1993) Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kB-like transcription factor

activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* 91: 2572-2579.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 105: 1135-43.

Lind L. (2003) Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 169: 203-214.

Lipton BA, Parthasarathy S, Ord VA, Clinton SK, Lippy P, Rosenfeld ME. (1995) Components of the protein fraction of oxidized low density lipoprotein stimulate interleukin-1 alpha production by rabbit arterial macrophage-derived foam cells. *J Lipid Res*. 36(10): 2232-2242

Lum H and Roebuck KA. (2001) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 280: C719-C741.

Luo M, Kannar K, Wahlqvist ML, O'Brien RC. (1997) Inhibition of LDL oxidation by green tea extract. *Lancet*. 349: 360-361.

Lusis AJ and Navab M. (1993) Lipoprotein oxidation and gene expression in the artery wall. *Biochem Pharm*. 46: 2119-2126.

Lusis AJ. (2000) Atherosclerosis. *Nature*. 407: 233-241.

Mao SJ, Yates MT, Parker RA, Chi EM, Jackson RL. (1991) Attenuation of atherosclerosis in a modified strain of hypercholesterolemic Watanabe rabbits with use of probucol analogue (MDL 29,311) that does not lower serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 11: 1266-1275.

Marco ND, Frei B, Joseph AV, John FK. (1997) Antioxidants and Atherosclerotic Heart Disease. *N Engl J Med*. 337: 408 - 416.

Marin V, Kaplanski G, Grès S, Farnarier C, Bongrand P. (2001) Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods*. 254: 183-190.

Marty WM and Albert SB. (2000) The transcription factor NF- κ B: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta*. 1470: M55-M62.

Mattosn MP, Culmsee C, Yu ZF, Camandola S. (2000): Role of Nuclear Factor- κ B in Neuronal survival and Plasticity. *J Neurochem*. 74: 443-456.

Mattosn MP and Culmsee C. (2000) NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest*. 107: 247-254.

Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. (1994) Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet*. 344: 193-194.

Maxwell SRJ. (1995) Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 49: 345-361.

McCord JM. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*. 108: 652-659.

Meyer AS and Isaksen A. (1995) Application of enzymes as food antioxidants. *Trends in Food Sci & Tech*. 6: 300-304.

Meydani M, Wu D, Koga T, Martin KR. (1999) Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell production of chemokines and adhesion to monocytes. *Atherosclerosis*. 147: 297-307.

Mikita T, Porter G, Lawn RM, Shiffman D. (2001) Oxidized low density lipoprotein exposure alters the transcriptional response of macrophages to inflammatory. *J Bio Chem*. 276: 45729-45739.

Miura S, Watanabe J, Tomita T, Sano M, Tomita I. (1994) The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu²⁺-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol Pharm Bull*. 17: 1567-1572.

Miura S, Watanabe J, Sano M. (1995) Effects of various natural antioxidants

on the Cu²⁺ mediated oxidative modification of low density lipoprotein. Biol Pharm Bull. 18: 1-4.

Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. (1984) Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. Arteriosclerosis. 4: 357-364.

Napoli C, Nigris FD, Palinski W. (2001) Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. J Cell Boil. 82: 674-682.

Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di-Felice M, Scaccini C. (1995) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. Free Radic Biol Med. 19: 541-552.

Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL. (1996). The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 16: 831-842.

Odeh RM and Cornish LA. (1995) Natural antioxidants for the prevention of atherosclerosis. Pharmacotherapy. 15: 648-659.

Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. (2001) Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. J Nutr. 131: 66-71

Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R. (1989) Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule -1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. Cell. 59: 1203-1211

Parhami F, Fang ZT, Fogelman AM, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA. (1993) Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. J Clin Invest. 92: 471-478.

Parthasarathy S, Printz DJ, Byod D. (1986) Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis*. 6: 505-510.

Patel RP, Moellering D, Murphy-Ullrich J, Jo H, Beckman JS, Darley-Usmar VM. (2000) Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 28: 1780-1794.

Pickering JG, Weir L, Jekanowski J, Kearney MA, Isner JM. (1993) Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularisation. *J Clin Invest*. 91: 1469-1480.

Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. (1997) Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA*. 278: 1682-1686.

Porter ML, Krueger CG, Wiebe DA, Cunningham DG, Reed J. (2001) Cranberry proanthocyanidins associate with low-density lipoprotein and inhibit in vitro Cu²⁺-induced oxidation. *J Sci Food Agric*. 81: 1306-1313.

Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR. (1992) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*. 140: 665-673.

Prasad K, Kalra J, Lee P. (1994) Oxygen free radicals as a mechanism of hypercholesterolemic atherosclerosis: effects of probucol. *Int J Angio*. 3: 100-112.

Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP, Imes S, Fishbein MC, Clinton SK, Libby P, Luis AJ, Rajavashisth TB. (1997) Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteoporotic mice. *Am. J. Pathol*. 150: 1687-1699.

Quinn NT, Parthasarthy S, Fong LG, Steinberg D. (1987) Oxidatively modified low density lipoprotein: a potential role in recruitment and

retention of monocytes/macrophage during atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci.* 84: 2995-2998.

Raal FJ, Areias AJ, Waisberg R, Von AM. (1995) Susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 115: 9-15.

Rahman I. (2000) Regulation of Nuclear Factor- κ B, Activator Protein-1, and Glutathione Levels by Tumor Necrosis Factor- α and Dexamethasone in Alveolar Epithelial Cells. *Biochem Pharmacol.* 60: 1041-1049.

Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. (1990) Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoprotein. *Nature.* 344: 254-257.

Rajavashisth TB, Yamada H, Mishra NK. (1995) Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15: 1591-1598

Reed J. (2002) Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 42: 301-316.

Reilly M, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA. (1996) Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation.* 94: 19-25.

Richardson M, Hadcock SJ, DeReske M, Cybulsky MI. (1994) Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normalipemic and hyperlipemic diabetic rabbits. *Arterioscler Thromb.* 14: 60-769.

Ross R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 362: 801-809.

Ross R and Fuster V. The pathogenesis of atherosclerosis. (1996) *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Topol EJ. Eds. 25: 441-460.

Ross R. (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340: 115-126.

Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 322: 339-346.

Sauer H and Wartenberg M. (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 11: 173-186.

Schlissel M S and Baltimore D. (1989) Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. *Cell.* 58: 1001-1007.

Schramm DD and German JB. (1998) Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *J Nutr Biochem.* 9: 560-566.

Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA. (1992) Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kB activation in intact cells. *J Exp Med.* 175: 1181-1194

Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG. (1988) Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest.* 82: 1040-1050.

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10: 2247-2258.

Schulze-Osthoff K and Stroh C. (2000) Induced proximity model attracts NF-kB researchers. *Cell Death Differ.* 7: 1025-1026.

Schwenke DC. (1998) Antioxidants and atherogenesis. *J Nutr Biochem.* 9: 424-445.

Selzman CH, Miller SA, Harken AH. (2001) Therapeutic implications of

inflammation in atherosclerotic cardiovascular disease. *Ann Throac Surg.* 71: 2066-2074.

Sen R and Baltimore D. (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 46: 705-716.

Shen CM, Mao SJT, Huang GS, Yang PC, Chu RM. (2001) Stimulation of smooth muscle cell proliferation by ox-LDL and acetyl-LDL induced macrophage-derived foam cells. *Life Sci.* 70: 443-452.

Shibata H, Sakamoto Y, Oka M, Kono Y. (1999) Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63: 1295-1297

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. (1994) Structure, regulation and function of NF-k B. *Annu Rev Cell Biol.* 10: 405-455

Sies H. (1991) Oxidative stress. Oxidants and antioxidants. Academic Press Lodon. 26: 15-22.

Singale PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D. (1997) Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J.* 11: 931-936.

Spanos GA and Wrolastad RE. (1992) Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage and review. *J Agric Food Chem.* 40: 1478-1487.

Springer TA. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol.* 57: 827-872.

Stam H, Hulamann WC, Jongkind JF. (1989) Endothelial lesions, dietary composition and lipid peroxidation. *Eicosanoids.* 2: 1-14.

Stamler J, Wentworth D, Neaton J. (1986) Is the relationship between serum cholesterol and risk of death from CHD continuous and graded? *JAMA.* 256: 2323-2328.

Stangl V, Ludwig A, Lorenz M, Grimo N, Steinle F, Meiner S, Bartsch C, Stangl K, Baumann G. (2004) The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 316: 659-665

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 320: 915-924.

Steinberg D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 272: 20963-20966.

Steinberg D. (1997) Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation.* 95: 1062-1071.

Steinberg D and Witztum JL. (1999) Lipoproteins, Lipoprotein, Oxidation, and Atherogenesis. *Pennsylvania.* 2: 458-475.

Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS. (1984) Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci.* 81: 3883-3887.

Stocker R, John F. Keaney, Jr. (2004) Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol Rev.* 84: 1381 - 1478.

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T. (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature.* 386: 292-296.

Takeoka GR and Dao LT. (2003) Antioxidant constituents of almond [*Prunus dulcis*(Mill) D.A. Webb] hulls. *J Agric Food Chem.* 51(2): 496-501.

Taurog A. (1991) Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In "Werner and Ingbar's the thyroid", Braverman LE and Utiger RD, eds.

Philadelphia JB. Lippincott Co. 45: 51-97.

Tavani A, Pregnolato A, La Vecchia C, Negri E, Talamini R, Franceschi S. (1997) Coffee and tea intake and risk of cancers of the colon and rectum: a study of 3,530 cases and 7,057 controls. *Int J Cancer*. 73: 193-197.

Thomas DG. (1999) The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*. 18: 6842-6844.

Tijburg LBM, Wiseman SA, Meijer GW, Weststrate JA. (1997) Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis*. 135: 37-47.

Ting HH, Timimi FK, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, Creager MA. (1997) Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation*. 95: 2617-2622.

Tong L and Perez-Polo. (1995) Transcription factor DNA binding activity in PC12 cells undergoing apoptosis after glucose deprivation. *Neurosci Lett*. 191: 137-140.

Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. (1998) PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 93: 241-252.

Vaya J, Mahmood S, Goldblum A, Aviram M, Volkova N, Shaalan A, Musa R, Tamir S. (2003) Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. *Phytochemistry*. 62: 89-99.

Wang H, Cao G, Prior RL. (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem*. 45: 304-309.

Wang S, Leonard SS, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. (1999) The role of superoxide radical in TNF- α induced NF- κ B activation. *Ann Clin*

Lab Sci. 29: 192-199.

Warso MA and Land WEM. (1983) Lipid oxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. Brit Med Bull. 39: 277-280.

Weber C, Erl W, Pietsch A, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW, Weber PC. (1994) Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. Arterioscler Thromb. 14: 1665-1673.

Westhuyzen J. (1997) The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. Annu Clin Lab Sci. 27: 1-10.

Wingard DL, Suarez L, Barrett-Connor E. (1983) The sex differential in mortality from all causes and ischaemic heart disease. Am J Epidemiol. 117: 165-172.

Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T. (1998). Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. Cell Mol LifeSci. 54: 628-640.

Yamanaka N, Oda O, Nagao S. (1997) Green tea catechins such as (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin accelerate Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. FEBS letter. 401: 230-234.

Yen GC, Chen HY, Peng HH. (1997) Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. J Agric Food Chem. 45: 30-34.

Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR. (1999) Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. Am J Epidemiol. 149: 943-949.

Young IS and Woodside JV. (2001) Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol. 54: 176-186.

Young JL, Libby P, Schönbeck U. (2002) Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 88: 554-567.

Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Markiewski M, Ciechanowicz A, Kaczmarczyk M, Naruszewicz M. (2001) Selective inhibition by probucol of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 155: 123-130.

Zhang SH, Reddick RL, Avdievich E. (1997) Paradoxical enhancement of atherosclerosis by probucol treatment in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest.* 99: 2858-2866.

Zheng M and Storz G. (2000) Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol.* 59:1-6.

Zhou Z, Liu Y, Miao A D, Wang S Q. (2005) Protocatechuic aldehyde suppresses TNE- α -induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 513: 1-8.

行政院衛生署 民國 93 年台灣地區主要死亡原因統計資料 (2004)