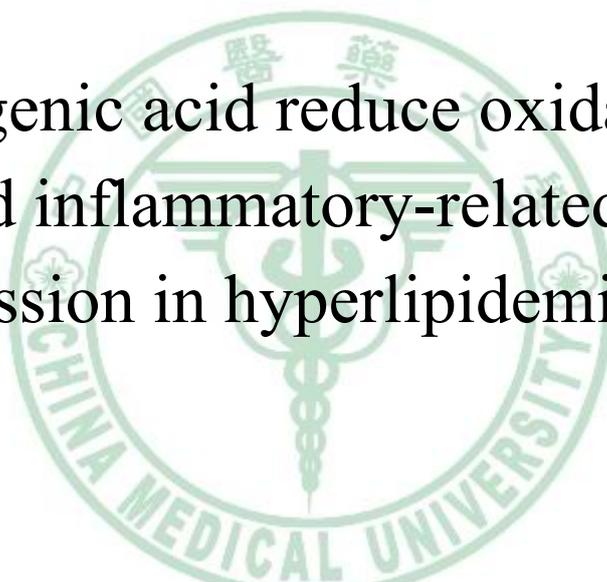


中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

綠原酸降低高血脂兔子  
氧化壓力與發炎相關基因表現

Chlorogenic acid reduce oxidative stress  
and inflammatory-related gene  
expression in hyperlipidemic rabbits



研究生：曾怡萱 撰

指導教授：余雅美 副教授

中華民國 95 年 7 月 14 日

## 中文摘要

動脈粥狀硬化是造成心血管疾病的主因。許多研究都指出氧化修飾的 LDL 對於動脈粥狀硬化的發展扮演重要角色危險因子之一。綠原酸 (chlorogenic acid, CA) 是一種酚類物質，廣泛存在於蔬果和飲品如：蘋果、西洋梨、漿果、萱草(*Hemerocallis spp.*)、紅茶和咖啡中。先前研究發現，綠原酸具有抗氧化、抗腫瘤與免疫調節的能力。本研究先以捕捉 DPPH 自由基、抑制 LDL 氧化作用以及總抗氧化能力 (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) 等體外試驗，探討綠原酸的抗氧化能力，接著以補充綠原酸對於高脂血症兔子體內氧化壓力與發炎相關基因表達進行探討。將紐西蘭大白兔隨機分為四組且飼養 8 週後犧牲，組別分別為餵食一般 rabbit chow 的正常組(N)；給予高油高膽固醇飲食的控制組(C)；高油高膽固醇飲食並添加 0.1 % (w/w) probucol 的 probucol 組(P)，以及添加相同劑量的綠原酸組(CA)。體外試驗顯示，綠原酸捕捉 DPPH 自由基以及抑制 LDL 氧化作用較 probucol 佳，綠原酸的總抗氧化能力與 probucol 相當。動物實驗部份，控制組相較於正常組有明顯地內膜增厚情形，綠原酸組和 probucol 組之內膜增厚情形皆較控制組低。綠原酸組和 probucol 組相較於控制組，皆可顯著降低血清中總膽固醇(TC)、LDL-C、三酸甘油脂(TG)、

MDA 的產量，以及胸主動脈 luminol-CL 的產生，並延長低密度脂蛋白的遲滯期(lag time)；綠原酸組和 probucol 組相較於控制組，皆可顯著降低 VCAM-1、MCP -1、腫瘤壞死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和腫瘤壞死因子- $\beta$  (tumor necrosis factor- $\beta$ , TNF- $\beta$ ) 之 mRNA 表現。綜合以上結果，綠原酸可藉由降低高脂血症兔子血清脂質、氧化壓力，以及降低發炎相關基因(TNF- $\alpha$ 、TNF - $\beta$ )、VCAM-1 與 MCP -1 之 mRNA 表現，達到降低初期動脈粥狀硬化的發展。



## 英文摘要

Atherosclerosis is a major cause of coronary heart disease. Previous studies have indicated that oxidized LDL plays an important role in initiation and progression of atherosclerosis. Chlorogenic acid (CA) is a phenolic compound present in fruits, vegetables and some drinks including apples, pears, berries, Chinese day lily (*Hemerocallis spp.*), black tea and coffee. It has been found to have antioxidant, antimutagenic, and immunomodulatory properties. In this study, we investigated the antioxidative effects of CA using the DPPH radicals scavenging ability, inhibition of LDL oxidation and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) in vitro, and the effects of chlorogenic acid on oxidative stress and anti-inflammatory gene expression in hyperlipidemic rabbits. Twenty-four New Zealand White (NZW) male rabbits were assigned randomly into four dietary groups and were scarified after eight weeks. The normal group was fed regular rabbit chow and the control group was fed a high fat and cholesterol diet. The probucol group and the CA group were fed the same diet as the control group plus 0.1 % (w/w) probucol or chlorogenic acid. The result indicated that CA had better antioxidant activity than probucol in DPPH radicals scavenging ability and inhibition of LDL oxidation, and as good as probucol in TEAC. The serum levels of total cholesterol (TC), LDL-cholesterol (LDL-C), triglyceride (TG), MDA, luminol-CL of thoracic aorta and intimal thickening was significantly increased in the control group compared with the normal group, and decreased in the probucol and the CA group. The lag time of LDL oxidation in the control group was shorter than the normal group, and longer in the

probucol and the CA group. The mRNA expression of VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), TNF- $\beta$  (tumor necrosis factor- $\beta$ ) and MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) was significantly increased in the control group compared with the normal group, and decreased in the probucol and the CA group. In conclusion, chlorogenic acid suppresses the progression of atherosclerosis by lowering serum lipid, reducing oxidative stress and inflammatory-related gene expression including TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , VCAM-1 and MCP-1 in hyperlipidemic rabbits.



## 總目錄

---

◇ 中文摘要	I
◇ 英文摘要	III
◇ 總目錄	V
◇ 表目錄	VIII
◇ 圖目錄	IX
◇ 縮寫對照表	XI
第一章 研究設計原理與目的	1
第二章 文獻回顧	
第一節 動脈粥狀硬化的成因	4
第二節 動脈血管壁的基本構造	6
第三節 動脈粥狀硬化的發展	8
第四節 自由基	11
第五節 氧化壓力與動脈粥狀硬化	15
第六節 抗氧化劑與動脈粥狀硬化	20
第七節 發炎與動脈粥狀硬化	24
第八節 黏附因子與動脈粥狀硬化	27
第九節 單核球趨附因子與動脈粥狀硬化	29

第三章	實驗設計	31
第四章	材料與方法	34
第五章	結果	
第一節	綠原酸的抗氧化力	62
第二節	實驗期間各組生長狀況的觀察	62
第三節	血液生化值的影響	63
第四節	綠原酸對抗氧化指標：血清脂質過氧化物 MDA、 LDL 過氧化遲滯期的影響	65
第五節	綠原酸對血管 Luminol-CL 的影響	66
第六節	綠原酸對發炎性基因：腫瘤壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 、腫瘤壞死因子- $\beta$ (TNF- $\beta$ ) mRNA 表現量的影響	66
第七節	綠原酸對血管黏附因子 (VCAM-1)、單核球趨化 因子 (MCP-1) mRNA 表現量的影響	68
第八節	觀察兔子胸主動脈形態學改變之組織切片圖	69
第六章	討論	
第一節	動脈粥狀硬化誘發模式與飲食劑量探討	91
第二節	餵食高油高膽固醇飲食和添加綠原酸對血液生化值 的影響	92

第三節	綠原酸和 probucol 的抗氧化作用	95
第四節	綠原酸對抗氧化指標：MDA 和 LDL 氧化遲滯期 之影響	98
第五節	綠原酸對血管中 Luminol-chemiluminescence (CL) 的影響	101
第六節	綠原酸對 TNF- $\alpha$ 和 TNF- $\beta$ mRNA 表現量的影響	102
第七節	綠原酸對血管黏附因子 (VCAM-1) 和單核球趨化 因子 (MCP-1) mRNA 表現量的影響	104
第八節	綠原酸對兔子主動脈弓形態學改變之影響	105
第九節	以補充 probucol 作為本研究正控制組之原因	106
第十節	綠原酸的吸收、消化代謝與其衍生物之探討	109
第十一節	未來研究發展	114
第七章	結論	116
第八章	參考文獻	117

## 表目錄

---

表 1-1	九十四年度國人十大死因排行	3
表 3-1	即時定量聚合酶鏈鎖反應引子序列表	60
表 4-1	綠原酸和 probucol 的抗氧化能力	70
表 4-2	紐西蘭大白兔體重紀錄表	71
表 4-3	八週紐西蘭大白兔血液生化值與脂質過氧化指標和 LDL 遲滯期	72



## 圖目錄

---

圖 2-1	動脈血管壁的構造	7
圖 2-2	脂質過氧化路徑	18
圖 2-3	氧化 LDL 在動脈粥狀硬化的調控	20
圖 2-4	抗氧化劑在動脈粥狀硬化的角色	21
圖 2-5	Probucol 的化學結構	22
圖 2-6	綠原酸的化學結構	24
圖 2-7	NF- $\kappa$ B 對動脈粥狀硬化的調控	27
圖 3-1	體外實驗流程簡圖	32
圖 3-2	體內實驗流程簡圖	33
圖 4-1	血清總膽固醇於實驗期間零週、四週、八週的變化圖	73
圖 4-2	血清三酸甘油酯於實驗期間零週、四週、八週的變化圖	74
圖 4-3	八週兔子胸主動脈 Luminol-CL 圖	75
圖 4-4	綠原酸對兔子胸主動脈腫瘤壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) mRNA 表現量的影響	76
圖 4-5	綠原酸對兔子胸主動脈腫瘤壞死因子- $\beta$ (TNF- $\beta$ ) mRNA 表現量的影響	77

圖 4-6	腫瘤壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 的同步定量曲線圖	78
圖 4-7	腫瘤壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 的熔點溫度曲線圖	79
圖 4-8	腫瘤壞死因子- $\beta$ (TNF- $\beta$ ) 的同步定量曲線圖	80
圖 4-9	腫瘤壞死因子- $\beta$ (TNF- $\beta$ ) 的熔點溫度曲線圖	81
圖 4-10	綠原酸對兔子胸主動脈血管細胞黏附因子 (VCAM-1) mRNA 表現量的影響	82
圖 4-11	綠原酸對兔子胸主動脈單核球黏附因子 (MCP-1) mRNA 表現量的影響	83
圖 4-12	血管細胞黏附因子-1 (VCAM-1) 的同步定量曲線圖	84
圖 4-13	血管細胞黏附因子-1 (VCAM-1) 的熔點溫度曲線圖	85
圖 4-14	單核球趨化因子-1 (MCP-1) 的同步定量曲線圖	86
圖 4-15	單核球趨化因子-1 (MCP-1) 的熔點溫度曲線圖	87
圖 4-16	紐西蘭大白兔主動脈弓組織切片圖 (倍率: 40 倍)	88
圖 4-17	紐西蘭大白兔主動脈弓組織切片圖 (倍率: 200 倍)	89
圖 4-18	綠原酸對紐西蘭大白兔動主脈弓內膜增厚的影響	90

## 縮寫對照表

---

ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid)

BSA : Bovine serum albumin

CA : Chlorogenic acid

CHCl<sub>3</sub> : Chloroform

Luminol-CL : Luminol-chemiluminescence

CuSO<sub>4</sub> : Cupric sulfate

DEPC : Diethyl pyrocarbonate

DDW : Distilled water

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acid

GK : Glycerokinase

GOP : Glycerolphosphate oxidase

C : High cholesterol diet

CA : High cholesterol + chlorogenic acid diet

HDL-C : How density lipoprotein-cholesterol

HE : Hematoxylin-eosin

KBr : Potassium bromide

KCl : Potassium chloride

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : Potassium dihydrogenphosphate

LDL-C : Low density lipoprotein-cholesterol

LPL : Lipoprotein lipase

MDA : Malondialdehyde

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1

N : Normal diet

NaCl : Sodium chloride

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : Disodium hydrogenphosphate

NZW rabbits : New Zealand White rabbits

P : High cholesterol + probucol diet

PBS : Phosphate buffer saline

PCR : Polymerase chain reaction

ROS : Reactive oxygen species

RT : Reverse transcription

TBA : Thiobarbituric acid

TBHP : turt-Butyl hydroperoxide

TCA : Trichloroacetic acid)



TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity

TG : Triglyceride

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

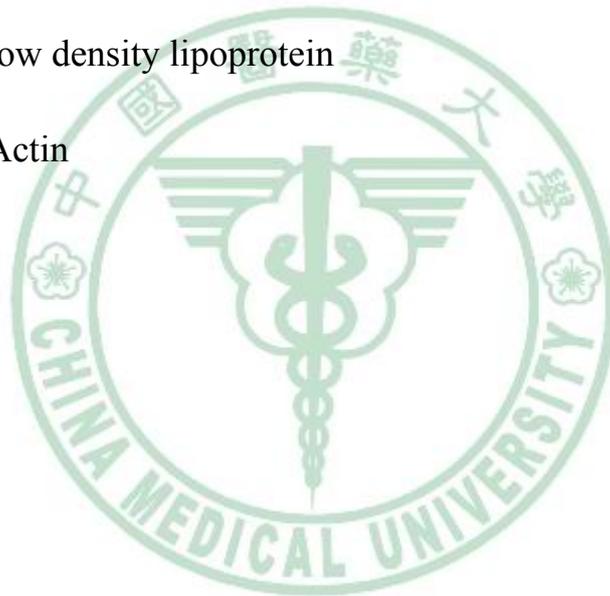
TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor-alpha

TNF- $\beta$  : Tumor necrosis factor-beta

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1

VLDL : Very low density lipoprotein

$\beta$ -actin : beta-Actin



## 第一章 研究設計原理與目的

台灣九十四年國人十大死因中如表 1-1 所示，腦血管疾病和心臟疾病分別為第二位及第三位。許多研究都指出，動脈粥狀硬化是導致心臟、腦血管疾病的主要原因。常見的心血管疾病包括：冠心病、中風、高血壓、風溼性心臟病。動脈粥狀硬化是一種慢性的發炎疾病與體內氧化壓力增加有關。當低密度脂蛋白被氧化時，氧化低密度脂蛋白 (oxLDL) 會誘發發炎相關的基因 (例如：IL-1、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ ) 和黏附因子、趨化因子 (如：VCAM-1、MCP-1) 等基因表現，而誘發動脈粥狀硬化的形成。

近年預防醫學漸漸受到人們的重視，於是飲食中的有效成分如：多酚類的研究風潮日益興盛。多酚類普遍具有抗氧化的特性，期望藉由平日飲食攝入有效成分，而對生理機能產生調節功能，達到預防或降低疾病發生的效果。流行病學的研究也發現，多酚類的攝取與心血管疾病和癌症的發生率呈反相關性。

本研究所使用的綠原酸 (chlorogenic acid, CA) 是廣泛存在於植物中的多酚類，在蔬菜水果和飲品中如：蘋果、西洋梨、藍莓、蕃茄、紅茶、咖啡都富含綠原酸。先前的研究也指出，綠原酸具有抗氧化、抗腫瘤的特性。因此本篇之研究目的以高油高膽固醇飲食誘發紐西蘭大白兔

高脂血症，進而發展動脈粥狀硬化的模式，探討綠原酸是否能降低血脂質、氧化壓力，並進一步以分子生物的角度，探討發炎反應相關基因、細胞黏附因子和單核球趨化因子調控動脈粥狀硬化的角色。



表 1-1 九十四年度國人十大死因排行

---

順位	死亡原因
1	惡性腫瘤
2	腦血管疾病
3	心臟疾病
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 2006/7/1 行政院衛生署 衛生統計資訊網)

## 第二章 文獻回顧

### 第一節 動脈粥狀硬化的成因

動脈粥狀硬化是一種主要發生在大血管如：胸主動脈的疾病，其中型血管和肌肉附近的血管也會發生。動脈粥狀硬化形成的斑塊破裂，容易引發血管栓塞，導致心臟、腦部與手腳四肢的缺血而壞死，是造成中風和心臟疾病的主因【1,2】。流行病學和解剖學的研究都顯示，身體老化的過程、血管平滑肌細胞與動脈粥狀硬化有相關性。在沒有確切的危險因子如：高血脂症、發炎因子如：TNF、IL-1 存在之下，老化過程仍然會改變血管壁的型態，尤其是增加血管內膜的增厚，而內膜增厚是動脈粥狀硬化初期很重要的特徵，且發現血管壁也有脂肪的囤積【3】。但也有研究顯示，人的一生都有可能伴隨著動脈粥狀硬化的發生。在出生的嬰兒胸主動脈中，發現有動脈粥狀硬化的形成，尤其是高膽固醇血症的母親，更會加強血管壁有內膜增厚與單核球囤積的情形【4】。

動脈粥狀硬化不只是一種老化過程，也是一種慢性發炎的狀態；一旦有斑塊破裂或栓塞的情形產生，亦可能轉變成急性的臨床症狀【1,2】。介白素-1 (interleukin-1, IL-1) 和腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 是一種前發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokine)，會誘發其他

細胞激素如：IL-4、IL-6、IL-10，和趨化因子如：單核球趨化因子的產生，並且會促進血管內皮細胞黏附因子的表現。在 Apo-E 剔除小鼠模式的實驗顯示，由於 IL-1 接受器拮抗劑（IL-1 receptor antagonist, IL-1 Ra）是一種急性時期蛋白質（acute phase protein），IL-1 Ra 會與 IL-1 相互競爭接受器，但卻不會產生下游發炎反應作用；因此，IL-1/IL-1 Ra 的比值對於血管發炎和動脈粥狀硬化上扮演重要的角色【5】。

愈來愈多研究者想了解參與動脈粥狀硬化的危險因子、致病路徑與訊息傳遞路徑。許多危險因子，如：抽菸、高糖血症（hyperglycemia）、高血壓、胰島素抗性、循環血液中有過多的脂肪，以及不足的運動習慣，都對動脈粥狀硬化的發展有正向的影響【6】。

低密度脂蛋白（low density lipoprotein, LDL）體積大小和血漿中高密度脂蛋白（high density lipoprotein, HDL）的濃度有正相關，而和三酸甘油酯（triglyceride, TG）的濃度有負相關，即血漿中有較多體積大的 LDL 時，會有較高濃度的 HDL 以及較低濃度的 TG 存在。因此，體積較小、濃度較高的 LDL 與較低的 HDL-cholesterol 濃度，以及較高的三酸甘油酯濃度—以上三者合併稱為「致動脈粥狀硬化生成之脂蛋白的表現型（atherogenic lipoprotein phenotype）」【7】，此種表現型可能會造成代謝性症候群的產生，亦可能增加罹患心血管疾病的危險【8,9】。

許多研究都證實氧化修飾的 LDL，會導致動脈粥狀硬化的生成：

- (1) 在體內實驗或體外試驗，皆發現氧化 LDL (oxLDL) 會促進動脈粥狀硬化的生成【10,11】。
  - (2) 在動脈粥狀硬化損傷的斑塊中，可以分離出類似受到氧化傷害 (oxidative damage) 的脂蛋白粒子 (lipoprotein-like particles)【12】。
  - (3) 脂肪氧化產生的脂質過氧化終產物如：丙二醛 (malondialdehyde)，在人類和動物的動脈粥狀硬化斑塊中，可以用免疫化學染色法測到【12】。
  - (4) 在高膽固醇血症動物，或非人類的哺乳類動物實驗中，發現有多種不同的抗氧化劑可減低初期動脈粥狀硬化損傷的形成【11-14】。
- 由此可見，脂蛋白的氧化傷害在動脈粥狀硬化中，扮演非常重要的角色【13】。

## 第二節 動脈血管壁的基本構造

正常的胸主動脈血管壁在組織學上主要分為三層如圖 2-1 所示，血管橫切面由外而內分別為：

- (1) 外層 (adventitia)：外層為血管壁的最外層，由結締組織和散佈的纖維母細胞 (fibroblasts) 與平滑肌細胞 (smooth muscle cell, SMC)

胞組成。

(2) 中層 (media): 位於血管的中層，平滑肌細胞為其主要成分，以及細胞外基質 (extracellular matrix)。

(3) 內膜 (intima): 正常的內膜非常薄，包含接觸血流的內皮細胞與細胞外結締組織基質 (extracellular connective tissue matrix)，如：蛋白醣 (proteoglycan) 和膠原蛋白 (collagen)。內部彈力層 (internal elastic lamina) 位於內膜，位置較靠近中層【1】。內皮細胞的正常功能包含：調控血流和區域性凝血的狀態 (local coagulation)，以及抗發炎狀態的維持，如：正常的內皮細胞可以藉由抑制 NF- $\kappa$ B 的活化，而降低白血球的活化作用【15】。

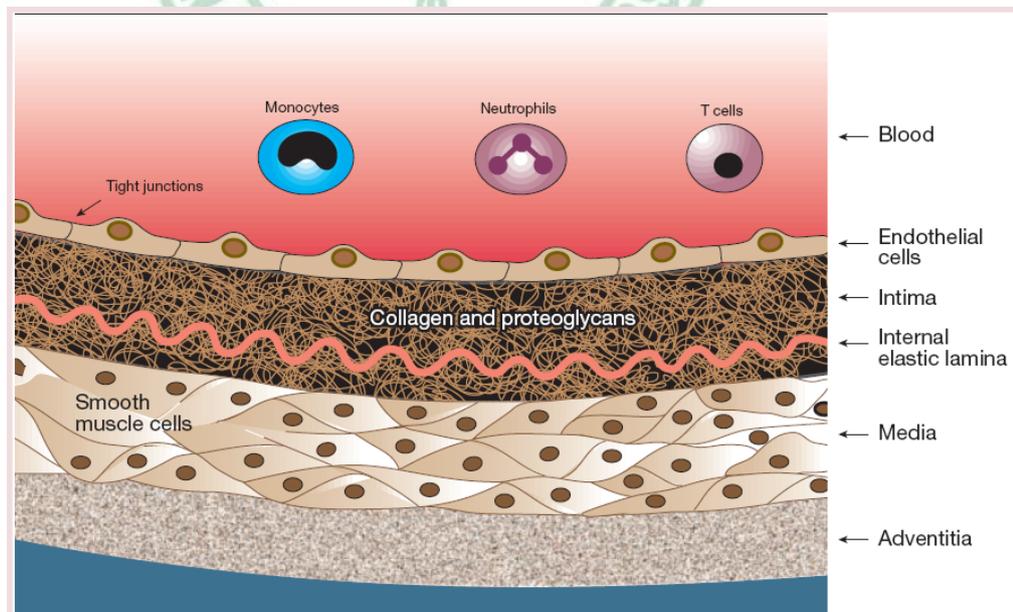


圖 2-1 動脈血管壁的構造 (Lusis AJ. 2000)

### 第三節 動脈粥狀硬化的發展

動脈粥狀硬化的進展主要分為四期【2】：

#### (1) 內皮功能不良 (endothelial dysfunction)

早期的動脈粥狀硬化損傷發生在內皮組織，除了血流變化而導致的 shear stress 改變會造成內皮功能不良外【16,17】，可藉由一氧化氮 (nitric oxide)【17】、前列腺素 (prostacyclin)、血小板衍生生長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、血管收縮素 II (angiotensin II) 和 endothelin 來增加血管的通透性【18】，而使得內皮層對血漿中脂蛋白與其他組成物之通透性增加【19】；並且會促進白血球黏附因子 (leukocyte adhesion molecules)、內皮黏附因子 (endothelial adhesion molecules) 的表現【20-22】；接著，藉由 oxLDL 和一些趨化因子如：單核球趨化因子，促使單核球進入血管內【23】。

#### (2) 脂肪條形成 (fatty-streak formation)

脂肪條一開始是由充滿脂肪的單核球和巨噬細胞，以及 T 淋巴球所組成，接著平滑肌細胞也會加入脂肪條形成的過程。此過程包括了平滑

肌的遷移 (migration)、T 細胞的活化、泡沫細胞的形成，以及血小板的黏附【24】。其中平滑肌的遷移是受到血小板衍生生長因子等生長因子的刺激【25】。T 細胞的活化則是因為腫瘤壞死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )【26】、介白素 interleukin-2 (IL-2)、IL-15、oxLDL【27】和顆粒球-巨噬細胞聚落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 的刺激【28】。泡沫細胞的形成則是受到 oxLDL【29】、巨噬細胞聚落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)【30】、TNF- $\alpha$  和 IL-1 的影響；而一些內皮細胞黏附因子，如：intergrin、P-selectin，以及血小板凝集素  $A_2$  (thromboxane  $A_2$ )，被認為和血小板的黏附有關【2】。

### **(3) 進一步複雜的動脈粥狀硬化損傷之形成 (formation of an advanced, complicated lesion of atherosclerosis)**

當脂肪條繼續發展成進一步的損傷時，就會形成纖維帽。纖維帽是由平滑肌細胞、膠原蛋白與細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 所組成【31】。此時，動脈粥狀硬化損傷的部份，仍有單核球不斷得黏附至內皮細胞，並受到單核球趨化因子 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 的刺激而進入血管壁，接著受到 M-CSF 的刺激而分化成巨噬

細胞，並且繼續吞噬 oxLDL 形成泡沫細胞而囤積於血管壁。泡沫細胞受到細胞凋亡（Apoptosis）與壞死（necrosis）作用，導致充滿脂肪的壞死核（necrotic core）形成；由於血小板衍生生長因子、TNF- $\alpha$ 、IL-1 等細胞激素的活化，以及降低結締組織的分解導致纖維帽的產生【32,33】。

#### (4) 不穩定的纖維斑塊（unstable fibrous plaques in atherosclerosis）的形成

較薄的纖維帽通常會導致纖維帽破裂，而可能進一步引發血栓（thrombosis）的情況。因為活化的巨噬細胞也會活化 T 細胞產生許多細胞激素如：IL-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、Fas-L，以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>等自由基，進而導致平滑肌細胞凋亡，也降低細胞外基質（extracellular matrix）的合成；再者，血管損傷處不斷有巨噬細胞的囤積，而活化的巨噬細胞會放出基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)和蛋白質分解酵素，基質金屬蛋白酶和蛋白質分解酵素均會分解細胞外基質，造成血管壁細胞與細胞之間的接合（cell-to-cell connection）減弱，致使不穩定的斑塊形成而使血管壁破裂導致血栓形成（thrombus formation），血栓透過血流堵塞血管進而引起冠狀動脈栓塞（coronary embolism）或（腦動脈栓塞（cerebral embolism），造成心肌梗塞（myocardial infarction）或

腦中風的發生【34,35】。血小板凝集 (Platelet aggregation) 在動脈粥狀引起的栓塞 (embolism) 扮演重要的角色，血清脂質可以顯著地影響血小板的凝集作用。血小板除了不會黏附到 VLDL 外，皆會黏附到其他的脂蛋白上如：LDL、HDL【36】。除此之外，血中膽固醇的濃度會直接影響血小板的凝集作用。有許多的研究都顯示：高膽固醇血症病患之血小板凝集較敏感，可能是因為 oxLDL 的增加而造成血小板凝集敏感性增加【37-40】。

#### 第四節 自由基

任何含有一個或多個不成對電子的物質都可以稱為自由基 (free radical)。

氧分子 (oxygen,  $O_2$ ) 是生命賴以存活的物質，常以雙分子的形式穩定存在，卻同時也是許多活性物質的受質。目前有許多的研究都指出，活性氧屬 (reactive oxygen species, ROS) 會參與一些病理過程，且對於一些功能性反應的調節，為不可缺少的物質。概括來說，ROS 是氧分子在不同環境下，與氫原子或氮原子進行的氧化作用或還原作用，所形成的化合物，包含：可以直接由還原氧分子所產生的超氧陰離子 (superoxide,  $O_2 \cdot^-$ )、具有生物活性的過氧化氫 (hydrogen

peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、氫氧自由基 (hydroxyl radicals, OH·)、hypochlorite ion (OCl<sup>-</sup>) 和過氧亞硝基陰離子 (peroxynitrite, ONOO<sup>-</sup>) 等含氧自由基【41,42】。

氧分子 O<sub>2</sub> 接受一個電子而生成超氧陰離子 (O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>)。O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> 在一般代謝過程或身體接受陽光照射的時候，經由「活化 (activation)」氧分子而產生，因此 O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> 為初級 (primary) 的 ROS；而初級 ROS 再藉由酵素活性或過度金屬催化的過程，會進一步和其他分子產生次級 (secondary) ROS 如：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> 在正常生理環境的 pH 值下非常脆弱，因為 O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> 為水溶性，所以無法輕易的通過細胞膜的脂質雙層，但卻可以穿越離子通道進入細胞【43,44】。但 O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> 在較低的 pH 值 (pK<sub>a</sub> = 4.8) 會和 H<sup>+</sup> 變成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，而在正常生理 pH 值下，則需要超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的協助，反應如下：

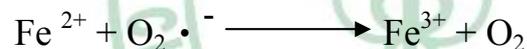


而且 dismutation 的速率非常快【45】。身體的調控在正常情況下，細胞內並沒有游離鐵離子 (free iron) 存在；但當體內呈現壓力狀態時 (under stress conditions)，O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> 就會刺激游離鐵離子從含鐵蛋白中游離出來，且研究指出人在高膽固醇血症、糖尿病和高血壓的情況下，體內 O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> 濃度都會增加【46】。

過氧化氫 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 相較於超氧陰離子，則較易進出細胞膜脂質層，這也使過氧化氫成為活性氧屬和細胞訊息傳導中，重要的生物活性物質【47,48】。超氧陰離子會刺激體內的抗氧化劑和酵素如：catalase、peroxidase，將  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解成水和氧分子，以維持細胞內  $\text{H}_2\text{O}_2$  的正常濃度。當身體處於壓力狀態下，超氧陰離子也會刺激含鐵蛋白釋放游離鐵 (free iron)；此時， $\text{H}_2\text{O}_2$  便可和這些過量的金屬離子如： $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^+$  會經由 Fenton reaction 產生氫氧自由基，反應式如下【49】：



若超氧陰離子接著參與二價鐵離子的還原作用，反應式如下：



合併以上和 Fenton reaction 兩個作用，稱為 Haber-Weiss reaction，反應式如下：



氫氧自由基 (hydroxyl radical,  $\text{OH} \cdot$ ) 具有高度的反應性，在體內的半衰期非常短，所以  $\text{OH} \cdot$  會就近與其他物質進行反應。氫氧自由基的產生方式有以下幾種：(1) 當水分子被輻射線照射後，即可使水分子分解形成  $\text{OH} \cdot$  和  $\text{H}^+$ ；(2) 在體內主要透過 Fenton reaction 進行過度金屬電子轉移而生。 $\text{OH} \cdot$  也會和 DNA 的鹼基或 DNA 去氧核酸的骨幹

(backbone) 反應，導致 DNA 鹼基或序列傷害或斷裂【50】。

氧衍生的自由基還有過氧自由基 (peroxyl radical 有時亦稱 peroxide)，過氧自由基是高能產物，依據 R group、所屬的環境、當時氧分子的濃度和反應物的不同，可從+ 0.77V 還原電位至+ 1.44V。脂質過氧化作用是目前最常被研究者偵測與觀察的項目，也代表了過氧自由基參與人類多種疾病發病與進程的證據【50-52】。

超氧陰離子會迅速地與一氧化氮 (nitric oxide, NO·) 反應而產生過氧亞硝基陰離子 (peroxynitrite, ONOO<sup>-</sup>) 反應式如下：



藉由使 NO· 對血管舒張的作用失活而導致內皮功能不良。另外，活性氧屬 (reactive oxygen species, ROS) 也會和血管裡的多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 反應，開始脂質過氧化的連鎖反應。脂質過氧化所產生的氫過氧自由基 (HOO·)，也會和 NO· 反應而產生 ONOO<sup>-</sup>，並直接降低內皮對 NO· 合成【46;50-52】。

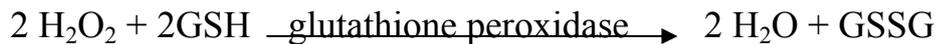
由以上自由基的介紹中發現，自由基與人體生理機能調控、代謝調控與疾病都息息相關。

## 第五節 氧化壓力與動脈粥狀硬化

活性氧屬 (reactive oxygen species, ROS)，可以參與眾多生化反應，有時候會對生物系統產生有害的影響。在哺乳類的細胞中，有許多的來源都可以產生活性氧屬，如：NADH/NADPH oxidase【53,54】、Xanthine oxidase【55】，代謝花生四烯酸路徑裡的脂氧酶 (lipoxygenase)【56】和環氧酶 (cyclooxygenase)【57】。在正常生理狀態下，細胞粒線體的氧化代謝作用就會產生活性氧屬，如：超氧陰離子。哺乳類的細胞擁有超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)，可以將兩個超氧陰離子 ( $O_2 \cdot^-$ ) 轉化 (dismutate) 成一個過氧化氫 ( $H_2O_2$ )【50】。而  $H_2O_2$  和  $O_2 \cdot^-$  可藉由 Fenton reaction 產生活性強大的氧化物如：氫氧自由基 (hydroxyl radical,  $OH \cdot$ )。在正常生理狀況下，體內自由基和抗氧化劑與抗氧化酵素會相互作用已達到平衡狀態。例如：過氧化氫會被 catalase 分解成水和氧分子 ( $O_2$ )，或透過 peroxidase 將其他受質氧化而抑制  $H_2O_2$  的累積，反應如下：



另外，glutathione peroxidase 廣泛的存在於體內可以和 catalase 共同作用，藉由還原 glutathione (GSH)，移除體內的  $H_2O_2$ ，反應式如下：



glutathione peroxidase 更可以和  $\text{H}_2\text{O}_2$  之外的過氧化自由基反應，最受矚目的是其可以還原血管壁內的 LOOH (lipid hydroperoxide) 成脂醇類，反應式如下：



所以在正常的生理狀態下，超氧歧化酶、peroxidase 和 catalase 是主要控制細胞內  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2 \cdot^-$  平衡的內生性抗氧化酵素系統【49】。

其他的酵素系統，NOS (nitric oxide synthase) 也被認為會調控細胞內活性氧屬的產生。此種酵素有三種異構型，有兩種為正常狀態就會表現的 eNOS (endothelial NOS) 和 nNOS (neuronal NOS)，另一種為誘發型的 iNOS (inducible NOS)【53,58】。

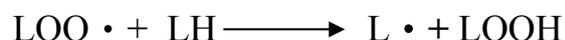
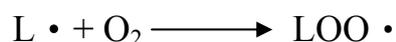
當 ROS 的產生和抗氧化劑之間不平衡，而傾向有較多的活性氧屬如： $\text{O}_2 \cdot^-$ 、 $\text{OH} \cdot$  和脂質過氧化自由基 (lipid peroxy radicals) 存在時，「氧化壓力」因此產生並會對細胞造成傷害。過多 ROS 累積於血管內皮細胞和平滑肌與心血管疾病如：缺血或再灌流所引發的發炎傷害 (ischemia/reperfusion-induced inflammatory injury)、缺血性心臟病、動脈粥狀硬化、高血壓和心臟衰竭有高度相關性【59,60】。活性氧屬也被認為可直接或間接影響細胞的訊息傳遞，氧化還原敏感性的轉錄因子如：NF- $\kappa$ B 和 AP-1 都是活性氧代謝物的受質【61】。透過活化 NF- $\kappa$ B

和 AP-1 則會導致血管的功能失調，包含：內皮功能不良、血管對 LDL 的通透性增加、促進內皮中 LDL 的氧化，也會增加血管內皮細胞上的黏附因子表現與促進發炎反應【62,63】，而更高濃度的 ROS 則會導致細胞死亡【61】。

當氧化壓力升高時，體內常發生脂質過氧化 (lipid peroxidation)，尤其是 LDL 脂質過氧化作用和動脈粥狀硬化初期發展有著密不可分的關係。巨噬細胞、血管平滑肌細胞或內皮細胞所產生的自由基會攻擊 LDL 內的不飽和脂肪酸 (unsaturated fatty acid, LH)，使其  $\alpha$ -methylene 產生脫氫化作用 (hydrogen abstraction)，而形成脂質烷基自由基 (lipid alkyl radical, L $\cdot$ )；由於在 lipid alkyl radical 上的電子非常不穩定，所以會形成共軛雙烯 (conjugated diene alkyl radical) 反應如下：



接著氧分子和 conjugated diene alkyl radical 反應則形成 lipid peroxy radical (LOO $\cdot$ )；而 lipid peroxy radical 會繼續攻擊旁邊的不飽和脂肪酸，形成 lipid hydroperoxide (LOOH) 和 lipid alkyl radical (L $\cdot$ )，而產生一發不可收拾的脂質過氧化連鎖反應，如圖 2-2 所示，反應如下：



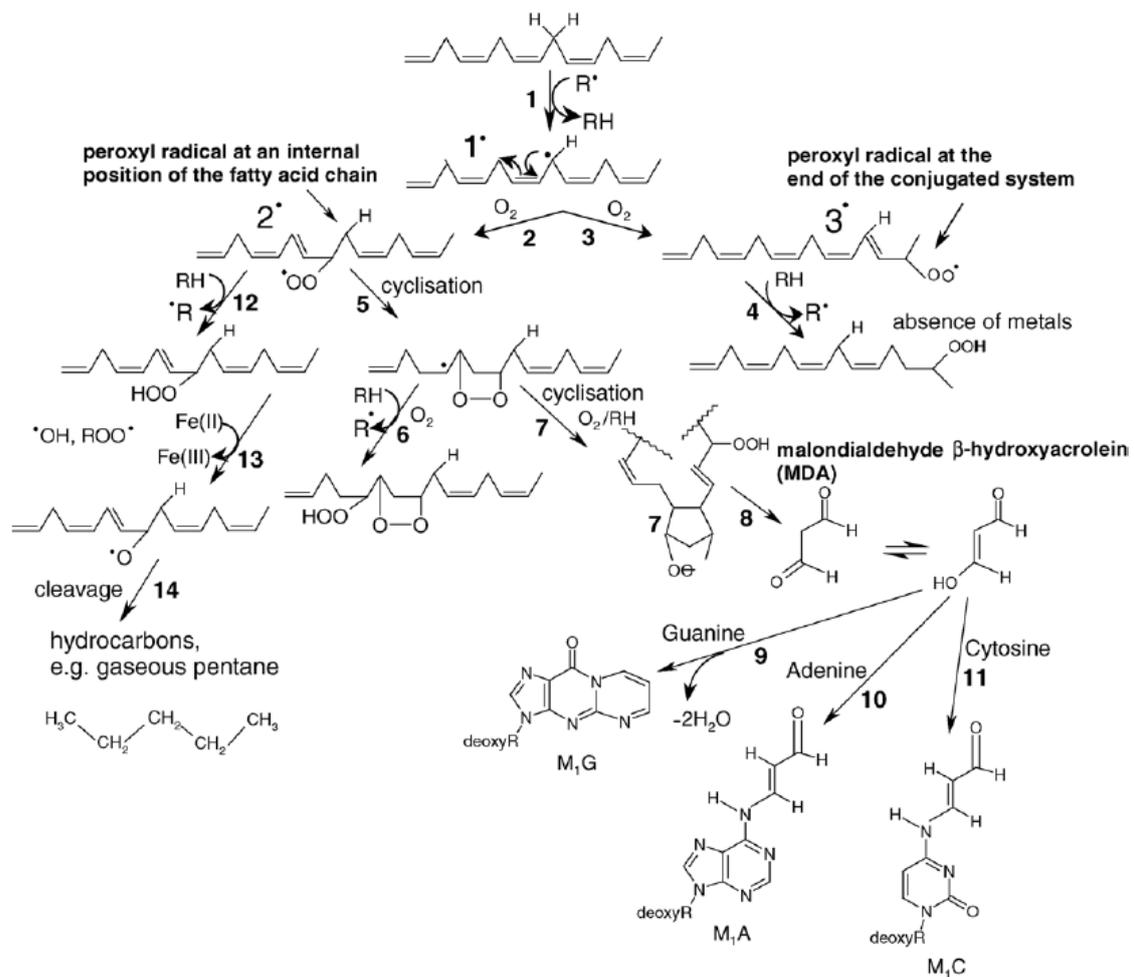


圖 2-2. 脂質過氧化路徑 Valko et al. (2006)

當有金屬離子存在時，LDL 內的 lipid hydroperoxide (LOOH) 會和  $Fe^{2+}$  或  $Cu^+$  進行 Fenton reaction，產生脂質烷氧基自由基 (lipid alkoxyl radical,  $LO\cdot$ ) 和  $OH\cdot$ ；接著，再經過  $\beta$ -scission 後產生帶有醛基的脂質過氧化終產物如：malondialdehyde (MDA)，這些產物會和 LDL 上的 Apo

B-100 結合而使 LDL 帶負電，因此，氧化修飾的 LDL 較易被巨噬細胞上的清道夫接受器（scavenger receptor）辨識【64-68】。

氧化修飾的 LDL（oxLDL）被認為可以透過下列機制，有效的影響動脈粥狀硬化的生成，如圖 2-3 所示【166】：

- (1) oxLDL 促進巨噬細胞的吞噬作用而產生泡沫細胞。
  - (2) oxLDL 具有細胞毒性。
  - (3) oxLDL 本身就會促進平滑肌細胞和巨噬細胞的有絲分裂，即具有促進增生的作用。
  - (4) oxLDL 會促進巨噬細胞上清道夫接收器（scavenger receptor）的表現。
- 【69】
- (5) oxLDL 具有免疫調節性，可以活化 T 細胞的功能。【27】
  - (6) oxLDL 會誘發細胞激素如：PDGF 的產生，造成血小板的凝集（platelet aggregation）。

若能抑制 LDL 的氧化作用，便能控制動脈粥狀硬化的發展【69】。

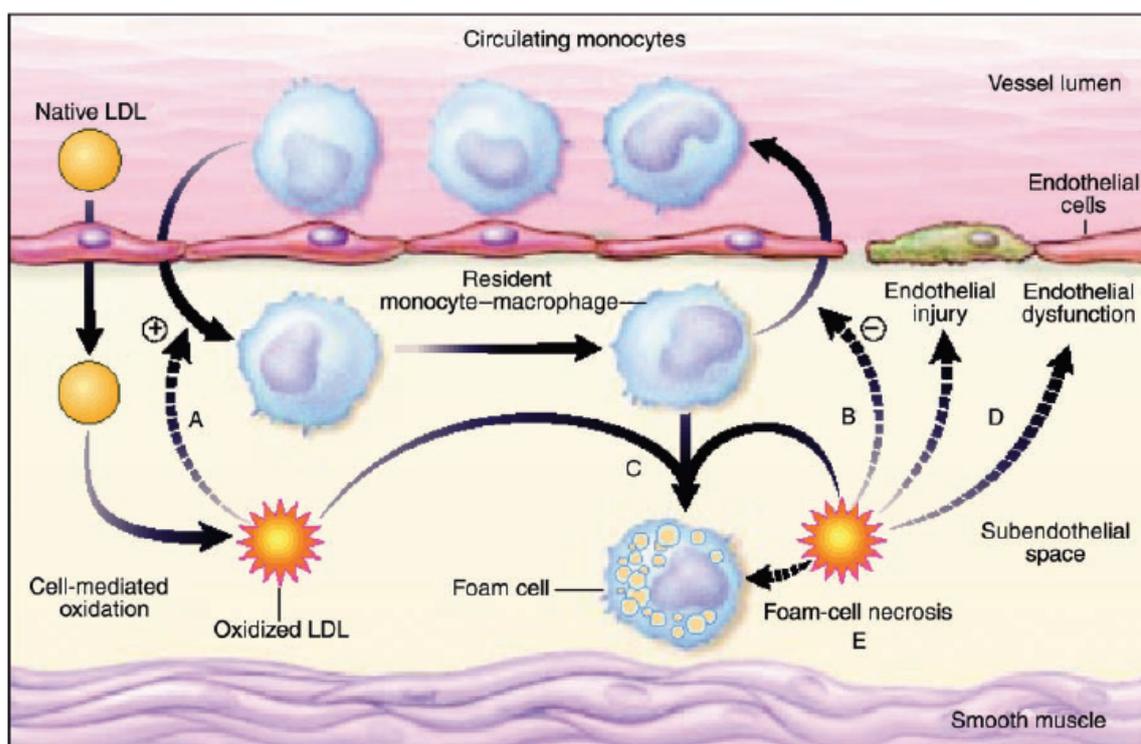


圖 2-3 氧化 LDL 在動脈粥狀硬化的調控 (Diaz M et al., 1997)

## 第六節 抗氧化劑與動脈粥狀硬化

多攝取蔬菜水果不只能降低油脂或其他高卡路里食物的攝取，其更富含許多抗氧化物，如：維生素 C、E、 $\beta$ -carotene、類黃酮和多酚類，可以移除或捕捉自由基【70】。類黃酮是廣泛存在於植物中的酚類代謝產物，在一般飲食的蔬菜水果、咖啡豆和茶葉中也有。流行病學的研究和動物模式的研究都顯示，大量攝取蔬果類食物中的酚類化合物有益健康【71】。紅酒裡的類黃酮物質 resveratrol，可以藉由抑制核酸因子 AP-1

的活化和 endothelin-1 的基因表現，進而抑制金屬基質蛋白酶-9（matrix metalloproteinase-9）的 mRNA 表現；且 resveratrol 透過減低活性氧屬形成而部份影響 ERK1/2 路徑。因此，如圖 2-4 所示，補充抗氧化劑可能具有降低動脈粥狀硬化的發展【72】。

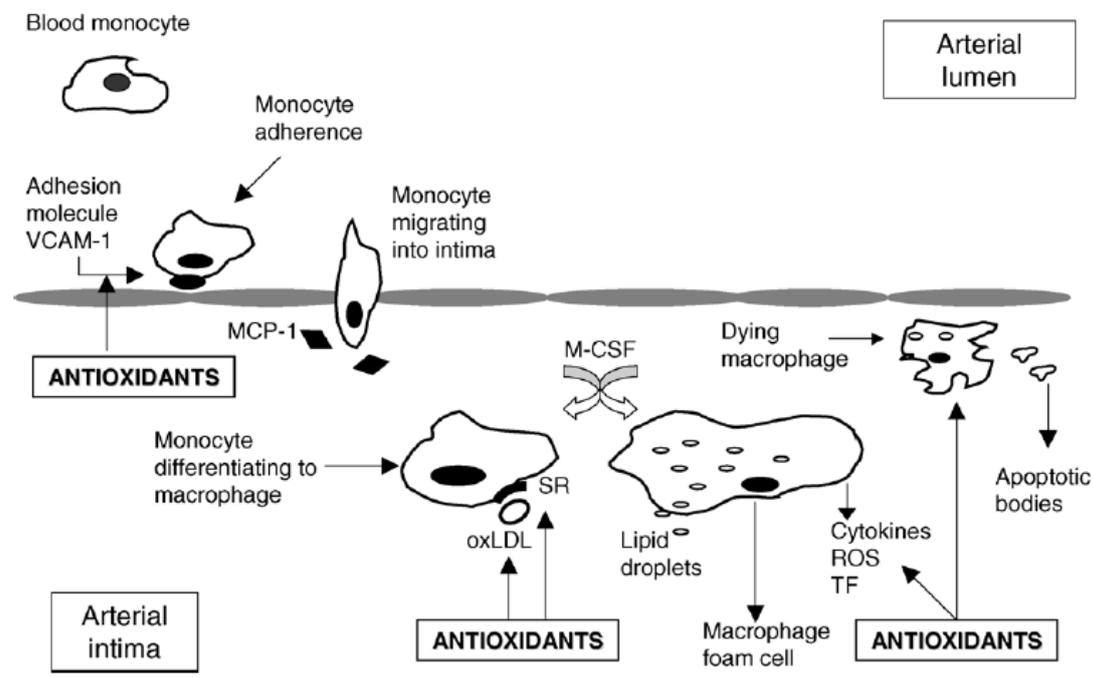


圖 2-4 抗氧化劑在動脈粥狀硬化的角色（Kaliora AC et al., 2005）

### < 綠原酸 (chlorogenic acid) >

綠原酸 (chlorogenic acid, CA) 是酚酸 (phenolic acid) 中桂皮酸 (cinnamic acid) 的一種，結構如圖 2-4 所示，經由咖啡酸和奎寧酸 (quinic acid) 酯化作用而成【73】。廣泛的存在於植物中，在下列的食物中也

有發現，如：蘋果、西洋梨、漿果類、洋薊、茄子、咖啡【74】紅茶【75】萱草 (*Hemerocallis*)【76】蕃茄【77】；CA 在蕃茄皮萃取物中佔總酚類的 50.3 %，並且擁有抗氧化、抗微生物【77~79】、抗腫瘤、抗癌的特性【80,81】，是人類飲食中最豐富的多酚類之一。有研究顯示，CA 可以促進細胞抗氧化酵素的活性，且抑制由 ROS 所媒介的 NF $\kappa$ B、AP-1 和 MAPK 的活化，對抗環境中的致癌物【82】。CA 可以降低 (fa/fa) Zucker 大鼠肝臟與血漿中膽固醇、三酸甘油酯的濃度，並且改善肝臟、血漿中礦物質濃度和葡萄糖耐受情形【83】；但並未發現 CA 參與肝臟上胰島素接受器 (insulin receptor) 和其 ligands 的調控，也未參與肝臟 insulin receptor 數量多寡的調控，只發現 CA 可改善 glucose-insulin index，且促進肝臟中脂蛋白之蛋白質和 DNA 的濃度【84】。在希臘香草植物貓薄荷 (*Nepeta sibthorpii*) 的甲醇萃取物中，也發現有少量 CA 的成分，其萃取物具有捕捉 DPPH 自由基的能力與降低水腫的能力【85】。

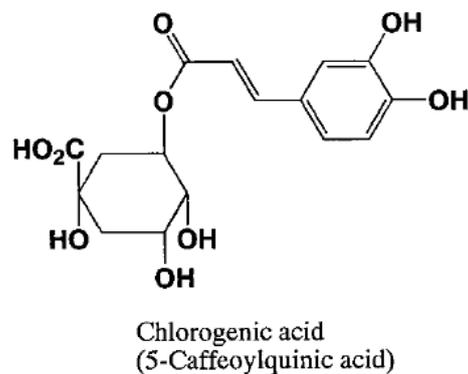


圖 2-5 綠原酸的化學結構 (Azuma K et al., 2000)

## < Probucol >

Probucol, 4,4'- (isopropylidenedithio) bis (2,6-di-tertbutylphenol), 是一種廣泛被使用的降膽固醇藥物，且因此而被認為具有抗動脈粥狀硬化的作用，其化學結構如圖 2-5。1986 年由 Parthasarathy 等人在細胞實驗中發現，probucol 可以抑制銅離子所誘發的 LDL 氧化修飾作用【86】。餵食 2% 膽固醇飲食的紐西蘭大白兔的動物模式，萃出紐西蘭大白兔內皮細胞與單核球進行培養，發現 probucol 可以降低單核球的黏附作用【87】。Probucol 也可以降低由自由基所引發的內皮功能不良情形【88】，且可以降低高血壓紐西蘭大白兔胸主動脈內膽固醇的氧化【89】。在 Apo-E 踢除的小鼠中，發現 probucol 可以降低胸主動脈之動脈粥狀硬化生成，且會降低胸主動脈中巨噬細胞的囤積【90】；在 Apo-E 和 HDL 接受器 (scavenger receptor class B) 基因雙重踢除的小鼠中，發現 probucol 可以藉由降低動脈粥狀硬化生成而有效地預防冠心病的發生和死亡【91】。以人類臍靜脈內皮細胞的細胞研究模式中，probucol 可以選擇性抑制由 TNF- $\alpha$  和 IL-1 所誘發的 VCAM-1 mRNA 的表現，但卻不會抑制 ICAM-1 mRNA 的表現【92】。研究指出，具有抗氧化效果的 probucol 除了可以降低 LDL-C 的濃度外，藉由促進透過 HDL-C 對膽固醇的傳輸，幫助週邊組織過量膽固醇運回肝臟，因而具有抗動脈粥狀硬化的作

用【93】。

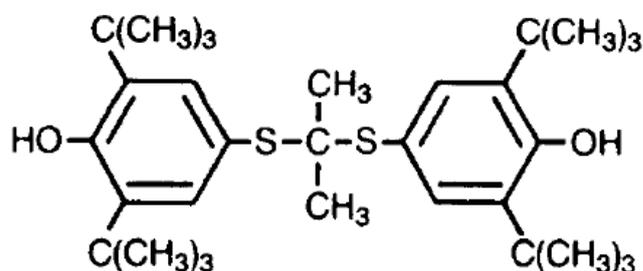


圖 2-6 Probucol 的化學結構 (Kuzuya M and Kuzuya F. 1993)

## 第七節 發炎與動脈粥狀硬化

動脈粥狀硬化是一種慢性的發炎疾病，其特徵包含前發炎細胞激素的產生，如：腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor, TNF)、介白素-1(Interleukin-1, IL-1)、介白素-6 (Interleukin-6, IL-6)、介白素-10 (Interleukin-10, IL-10)、介白素-12(Interleukin-12, IL-12)，和氧化脂質先質(pro-oxidative lipids)的形成，以及免疫反應的產生【94】。氧化態的 LDL 具有發炎性，會造成慢性的血管發炎【95】。在動脈粥狀硬化的損傷中發現有巨噬細胞、T 細胞、前發炎細胞激素和黏附分子的出現，映證了免疫反應參與動脈粥狀硬化發展的假說；顯示多元化的影響因子，如：發炎反應、感染、免疫系統都參與了這個過程【94】

## <腫瘤壞死因子 (tissue necrosis factor, TNF) >

腫瘤壞死因子 (TNF) 是具有多功能性的蛋白質，不但可以作為促發炎反應因子，也可以調節免疫功能。腫瘤壞死因子家族中的 TNF- $\alpha$ ，主要是由活化的巨噬細胞所分泌，在一些非專一性的機制，如：吞噬作用或 LPS 刺激所導致的巨噬細胞活化作用，都會產生 TNF- $\alpha$  和 IL-1 這類的細胞激素【96】，除了巨噬細胞外，淋巴球【97】、單核球、噬中性球 (neutrophils)、自然殺手細胞 (natural killer cells) 和 T 細胞在 LPS 的刺激下，也會產生 TNF- $\alpha$ 【98】。而腫瘤壞死因子- $\beta$  (tumor necrosis factor- $\beta$ , TNF- $\beta$ ) 則主要是由 T 細胞和 B 細胞分泌，TNF- $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的胺基酸序列非常類似【99, 100】，而 TNF- $\beta$  又被稱為 lymphotoxin(LT- $\alpha$ )；TNF- $\beta$  (LT- $\alpha$ ) 會和膜蛋白 TNF-C (LT- $\beta$ ) 以 heterodimer 的方式共同表現 (coexpress)，成為 LT- $\alpha\beta$  (lymphotoxin- $\alpha\beta$ ) 的複合體，廣泛存在於細胞膜的蛋白質上；LT- $\alpha_1\beta_2$  可以和 TNF 家族的接受器—LT $\beta$ R (lymphotoxin- $\beta$  receptor) 結合。當淋巴細胞被活化，或一些細胞激素、趨化因子，如：IL-4、IL-7 存在時，可以誘發 LT- $\alpha\beta$  的活化【101】。

有研究認為 TNF- $\beta$  對於有高胰島素血症的冠狀血管疾病患者而言，是一種危險因子，因為 TNF- $\beta$  會引發更複雜且敏感的代謝症候群徵狀 (metabolic syndrome)【102】。以微矩陣基因晶片 (micro array) 來探

討人類基因和心肌梗塞的相關性中，發現 TNF- $\beta$  基因會因為族群不同而對心肌梗塞有不同的關連性，日本人擁有 TNF- $\beta$  基因卻和心肌梗塞沒有相關；但以德國人為受試者的實驗，則顯示 TNF- $\beta$  基因和心肌梗塞有相關【101】。TNF- $\beta$  基因剔除 (TNF- $\beta$  -/-) 的小鼠相較於野生型 (wild-type) 小鼠，TNF- $\beta$  基因剔除小鼠可以下降約 62 % 的動脈粥狀硬化損傷型成【100】。如圖 2-7 所示，細胞激素如：TNF 和 IL-1 會透過活化 IKK (I- $\kappa$ B kinase) 的活性，促使 I- $\kappa$ B 磷酸化而與核酸因子 (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 分離，導致核酸因子 (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 活化而進入細胞核中與 DNA 結合，接著進行下游基因如：黏附因子、趨化因子表現【96】；且 TNF 也會和 IL-1 藉由產生 ROS (reactive oxygen species)，對傷口產生氧化壓力和發炎作用【98】。有研究指出，中藥藿香裡的 tilianin 可以有效的藉由抑制 NF- $\kappa$ B 活化，來降低由 TNF- $\alpha$  所活化的血管黏附因子 VCAM-1 的表現【103】；顯示 TNF- $\alpha$  和 TNF- $\beta$  在動脈粥狀硬化的發展中，對氧化壓力和發炎作用都扮演著調控的角色【98, 100, 103】。

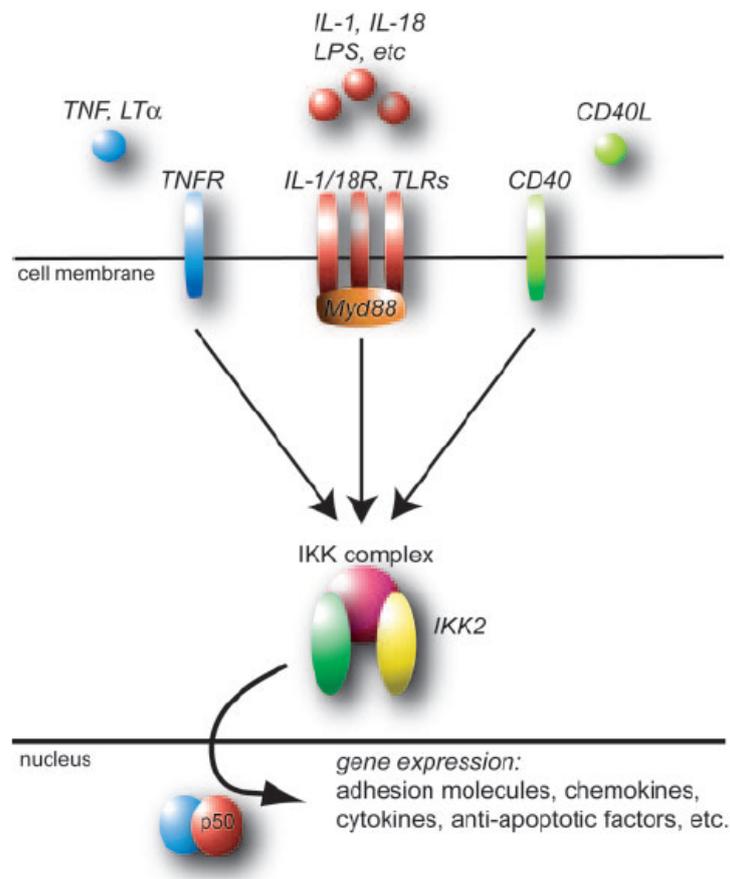


圖 2-7 NF- $\kappa$ B 對動脈粥狀硬化的調控 (de Winther MP et al., 2005)

## 第八節 黏附因子與動脈粥狀硬化

細胞黏附因子就是表現在細胞表面的分子，作為此細胞和其他細胞或細胞外基質黏附的媒介。約在 1993 年，研究者對於血管內皮細胞和循環血液中白血球上的細胞黏附因子已有廣泛的認知【104】。而這些可溶性的黏附分子大致分為三類：

(1) Selectins：包含：嗜酸性中性球 (eosinophils)、單核球、淋巴球表現的 L-selectin (CD62L)、內皮細胞表現的 E-selectin (CD62E)、內皮細胞和血小板表現的 P-selectin (CD62P) 等。

(2) Immunoglobulin superfamily 為免疫球蛋白的超級家族，如：血管細胞黏附因子 (vascular cell adhesion molecule, VCAM-1)、細胞間黏附因子 (intercellular adhesion molecule, ICAM-1) 【104】。

(3) Integrins：大多分佈於淋巴球、單核球與顆粒球上，每種不同的細胞帶有不同的 integrins，包括：

(A) VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ : CD49d/CD29)：分佈於嗜酸性白血球 (eosinophils)、淋巴球與單核球。

(B) LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ : CD11a/CD18)：分佈於多核型態白血球 (polymorphonuclear leukocytes, PMN)、單核球和淋巴球。

(C) Mac ( $\alpha_M\beta_2$ : CD11b/CD18)：分佈於多核型態白血球、單核球、自然殺手細胞與 T 細胞 【105】。

在高血壓病患之血漿中的可溶性黏附因子，如：VCAM-1、ICAM-1 較正常血壓的人高【106,107】，但 E-selectin 則和血壓正常者沒有顯著差異【107】。對於高血壓合併出現高膽固醇血症病患，高膽固醇血症會增強血漿可溶性黏附因子的活性【106】。高三酸甘油酯症年輕人和正常年輕

人相比，其 VCAM-1、ICAM-1 濃度較高，且血管舒張力（brachial artery flow mediated vasodilation）亦不正常【108】。細胞表面所表現的黏附因子，除了參與細胞的遷移（migration）、訊號傳遞和其他血管生理反應，其亦可與內皮和血球細胞作用，是造成初期動脈粥狀硬化發展的重要步驟【109】。在動脈粥狀硬化損傷血管的內皮細胞模式中，發現 VCAM-1、ICAM-1、E-selectin 與動脈粥狀硬化的生成有相關性。因此，偵測循環血液中的黏附分子不只能代表內皮功能不良，更是早期動脈粥狀硬化的指標【110】。

VCAM-1（CD106）專一性的分佈於血管內皮細胞上，可以辨識表現在嗜酸性白血球（eosinophils）上的  $\alpha 4$ -integrin，此糖蛋白也會出現在單核球和淋巴球上，但卻不會出現在中性顆粒球（neutrophils）上。抑制 VCAM-1 和  $\alpha 4$ -integrin 的結合，則可抑制嗜酸性白血球、淋巴球、單核球黏附到血管內皮細胞，預期可有效治療多種發炎性疾病【105,111】。

## 第九節 單核球趨化因子與動脈粥狀硬化

循環血液中的單核球和 T 細胞會不斷黏附到血管內皮上，此為早期動脈粥狀硬化生成的標記【112】。單核球趨化因子（monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1）對於黏附於血管內皮細胞的單核球之進入血管壁

內膜扮演重要角色。許多的細胞都會分泌 MCP-1，如：內皮細胞、平滑肌細胞、巨噬細胞，而這些細胞在動脈粥狀硬化的生成都佔有舉足輕重的地位【113】。

臨床的研究中，發現血漿中的 MCP-1 的濃度和心血管疾病如：高脂血症的危險因子相關；且在急性心肌梗塞相較於穩定心絞痛的病患，血中有較高的 MCP-1 濃度【114】。血管平滑肌細胞內的氧化脂質會透過 NF- $\kappa$ B，調控 MCP-1 的基因表現【115】。紐西蘭白兔的動物模式中，給予 0.5 % 膽固醇飲食相較於正常飲食兔子之胸主動脈 MCP-1 mRNA 和蛋白質的表現量都較高，而在給予 estradiol 後則發現其可降低高膽固醇飲食兔子胸主動脈 MCP-1 mRNA 和蛋白質的表現【116】；亦有研究指出，補充紐西蘭白兔類黃酮物質如：naringin 和 naringenin，則可以降低肝中 ACAT（acyl-CoA: cholesterol acyltransferase）的活性，以及胸主動脈 VCAM-1 與 MCP-1 mRNA 的表現【117】。

### 第三章 實驗設計

先以體外試驗：捕捉 DPPH 自由基、抑制 LDL 氧化與總抗氧化能力 (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) 測定綠原酸和 probucol 的抗氧化能力，接著進行動物實驗。

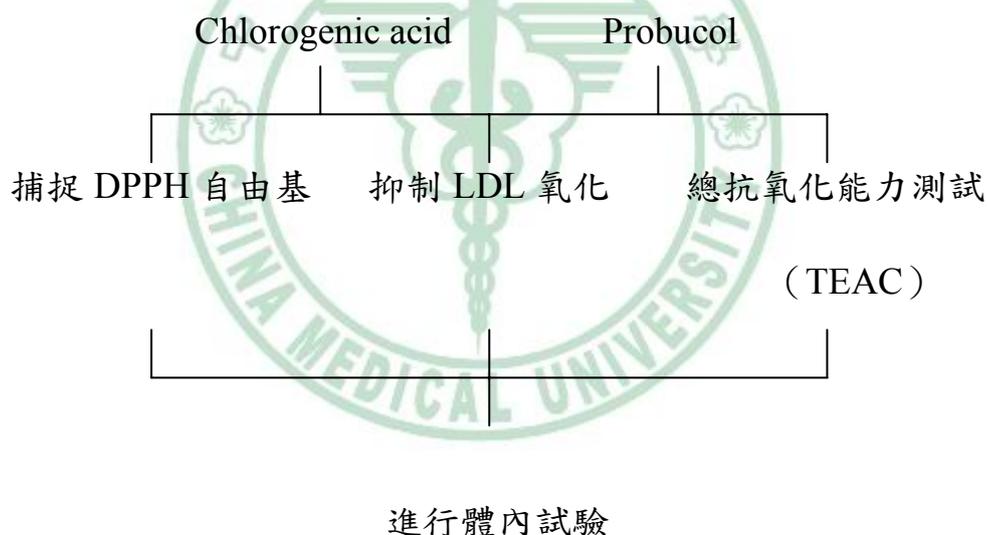
以紐西蘭大白兔 (New Zealand White rabbits, NZW rabbits) 餵食高油高膽固醇飲食導致高血脂症，且誘發血管動脈粥狀硬化的模式來進行研究。

紐西蘭大白兔飼養於動物中心，飼養於十二小時交替的日夜循環，室溫控制於  $21 \pm 1$  °C、溼度約 40~60 %，每隻兔子單獨飼養於籠子中。進入實驗期前，先以 rabbit chow 飼養一到兩個禮拜，使兔子適應 100 g/d 的飼料攝取量。24 隻紐西蘭大白兔體重約 2~2.5 kg，隨機分為四組，分別為餵食 rabbit chow 的正常組 (normal group, N)；第二組為餵食含有 10 % 大豆油、0.5 % 膽固醇的高油高膽固醇組 (high cholesterol diet group, C)；第三組則是餵食高油高膽固醇組加 probucol (1 g/Kg diet) (high cholesterol + probucol diet group, P)；第四組則是餵食高油高膽固醇組加綠原酸 (1 g/Kg diet) (high cholesterol + chlorogenic acid diet group, CA)，且自由給予飲水。每天記錄飲食量，每週記錄兔子的體重，

以作為飲食與兔子正常生長狀況的評估。實驗期為 8 週，於 0 週、4 週進行耳靜脈抽血，進行抽血實驗前禁食 12 小時；兔子於 8 週利用 CO<sub>2</sub> 進行犧牲，犧牲前亦禁食 12 小時。犧牲後，取出的組織分別依實驗不同，暫時存放於 DEPC 水或 PBS 進行清洗分裝，並立即冰入 -80 °C 冰箱。

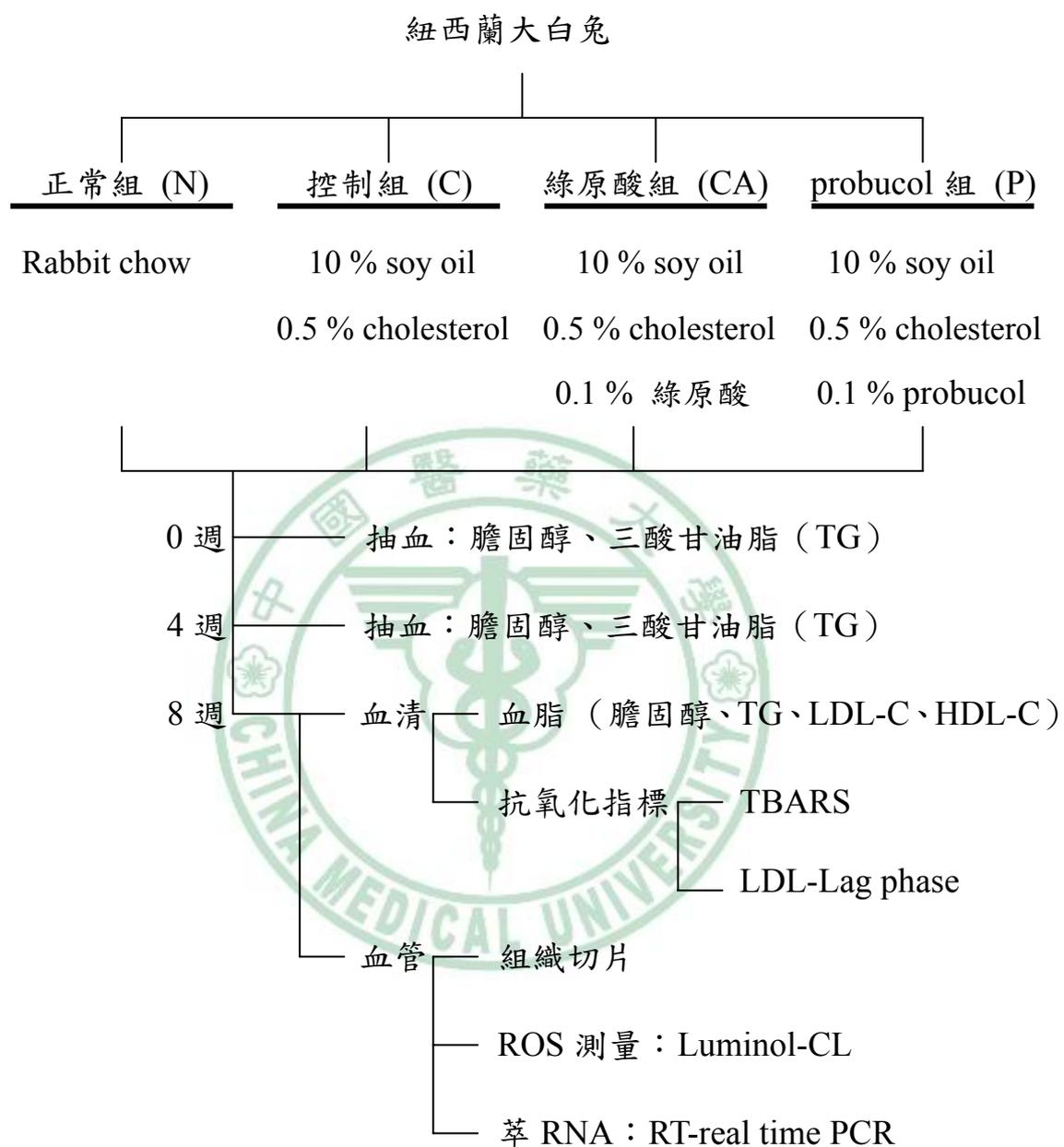
實驗流程簡圖如下：

圖 3-1 體外實驗流程簡圖



備註：TEAC：Trolox equivalent antioxidant capacity

圖 3-2 體內實驗流程簡圖



## 第四章 材料與方法

### < 一 > 體外試驗-1：捕捉 DPPH 自由基 (DPPH radicals scavenging ability)

#### A 器材：

DPPH (Sigma, MO, USA)

#### B 儀器：

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

#### C 原理：

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 可溶於酒精中，呈現深紫色，被抗氧化劑捕捉後會呈現淺黃色，且在 517 nm 有最大吸光值，所以利用其顏色變化的原理來評估物質的抗氧化性。

#### D 步驟：

將不同濃度的 chlorogenic acid 和 probucol 分別加入 DPPH 自由基之甲醇溶液，混和 30 min 後，以 spectrophotometer 在波長 517 nm 測吸光值。整個實驗流程均需避光進行。當吸光值愈低表示清除 DPPH 自由基能力愈強，以未添加 chlorogenic acid 或 probucol 為控制組，以控制組吸光值為 100 % 來作比較。紀錄抑制 50 % DPPH 自由基產生之 chlorogenic

acid 和 probucol 的濃度 (IC<sub>50</sub>)。

E 計算方式：

$$\text{清除率 (\%)} = \frac{\text{控制組吸光值} - \text{實驗組吸光值}}{\text{控制組吸光值}} \times 100 \%$$

## < 二 > 體外試驗-2：抑制 LDL 氧化作用

A 儀器：

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

B 步驟：

從健康人的血清中分離出 LDL，先進行蛋白質定量並經 PBS 稀釋至 0.9 mg/ml 後均分至各試管中。之後各試管再加入不同濃度綠原酸和 probucol，並以 50 μM CuSO<sub>4</sub> 誘發氧化，再利用 EDTA 終止氧化。加入 2-propanol 沈澱蛋白質，並以 12000 rpm 離心 10 分鐘後，吸取上清液在波長 234 nm 測吸光值，以未添加其他抗氧化劑之 CuSO<sub>4</sub> 誘發 LDL 氧化組別做為控制組，以下列算式求的抑制百分比為橫軸，抗氧化劑濃度為縱軸做出抑制曲線，求綠原酸或 probucol 抑制 50 % 之 LDL 氧化時，所需莫耳濃度即為 IC<sub>50</sub>。

C 計算：

$$\text{抑制 LDL 氧化 (\%)} = \frac{(\text{控制組吸光值} - \text{實驗組吸光值}) \times 100 \%}{\text{控制組吸光值}}$$

< 三 > 體外試驗-3：總抗氧化能力測試 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC assay)

A 儀器：

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

B 試劑炮製：

Peroxidase 由原來濃度 1000 unit/mg，用二次水稀釋成 44 unit/mg；由 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 原液取 57 μL 加二次水泡成 1L 的 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>；取 8.23 mg ABTS 用 95 % 酒精泡成 20 mL 的 750 μM ABTS 溶液。

C 步驟：

將 0.5 mL 之 44 unit/mg peroxidase、0.5 mL 之 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以及 0.5 mL 之 750 μM ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid)) 與 3 mL 的二次水混和均勻，於室溫反應 6 分鐘後生成穩定之藍綠色的陽離子自由基 ABTS·<sup>+</sup>，再分別加入 0.5 mL 不同濃度的 trolox 及 chlorogenic acid 與之反應 6 分鐘，在波長 734 nm 下測量吸光值，利

用 trolox 清除 ABTS ·<sup>+</sup>陽離子自由基的能力來定義 chlorogenic acid 的 TEAC。利用相同方式，測定 probucol 的抗氧化力。TEAC 值愈大表抗氧化能力愈佳。

D 計算：

(1) 利用 trolox 檢量線求得樣品的濃度

(2) TEAC 值=  $\frac{\text{樣品的吸光值}}{0.028^{\text{註}} \times \text{樣品的濃度}}$

註：0.028 是迴歸係數

< 四 > 飼料製備

A 藥品：

Cholesterol (Sigma, MO, USA)

Probucol (Sigma, MO, USA)

Chlorogenic acid (Sigma, MO, USA)

大豆油 (泰山, Taichung, Taiwan)

兔飼料 (福壽牌, Taichung, Taiwan)

B 步驟：

秤取十天份的 cholesterol, probucol, chlorogenic acid 與一般兔飼料

(rabbit chow)。先將冷凍的飼料熱炒，逼出飼料內的水氣，使飼料較容易吸附油脂，倒入秤好的 cholesterol、probucol 或 chlorogenic acid，接著加入十天份的大豆油以低溫拌炒均勻，注意火候不要太大以免燒焦。炒好放入夾鏈袋，標明製作日期、天份、飲食種類、實驗室負責人，儲存於-20 °C 冰箱。

### < 五 > 抽血

#### A 器材：

23 1/2 G 蝴蝶針 (華杏, Meditop Corporation, Malaysia)

棉花 (藤旺, 彰化, 台灣)

10 mL 針筒 (特浦, 高雄, 台灣)

15 mL 離心管 (Sastedt, Germany)

兔架

#### B 步驟：

抽血實驗需兩人以上方可進行。將兔子從籠中抱出，先進行安撫使其情緒穩定，將其抱入兔架固定，使其身體無法動彈。一人用雙手固定兔子的頭部，避免其因疼痛而亂動導致更嚴重傷害，且在固定頭部的同時，注意兔子的呼吸，以及眼睛瞳孔狀況。若有眼睛翻白、瞳孔縮小的

情形，則需趕快鬆開兔架使兔子回覆呼吸。先噴酒精且按摩兔子耳朵直到血管清楚浮現，再將蝴蝶針整支插入血管內，以免因為兔子掙扎而針脫落，整支插入後開始進行抽血。取出全血先冰於 4 °C，待進一步處理。

#### < 六 > 分離血清 (Isolation of serum)

##### A 儀器：

往復式震盪恆溫水浴機 (Reciprocal shaking baths, TKS, Taiwan )

離心機 (Himac CR21, HITACHI, Japan )

氮氣 (吉源行, Taichung, Taiwan )

##### B 步驟：

血清分離過程全程避光。從冰桶中取出兔子全血，立即放入 37°C 水浴槽，水浴 1.5 小時，取出水浴槽中的樣本放入 4 °C 冰箱中 1 小時，以利血液凝結、血球沉澱；再反覆以 4 °C、4000g 離心 15 分鐘，抽取上清液。上清液即為血清，血清充氮氣並保存於 4 °C 或 -20 °C。

#### < 七 > 組織切片染色 (Histochemistry)

##### A 器材：

## 包埋盒

10% 福馬林

### B 藥品泡製：

10% 福馬林：取甲醛原液（原液濃度：37%）270.3 mL 加入 DDW 至 1 L。調配成 10% 福馬林溶液放置室溫即可使用。

### C 步驟：

犧牲時，將血管放入 PBS 中稍微清洗，縱切下約 3~5 mm 血管放入包埋盒中，將包埋盒完全浸置於 10% 的福馬林，固定組織。接著進行組織脫水，用石蠟浸潤並包埋，組織內的水分會被石蠟所取代，組織經過石蠟包埋成臘塊，有利於保存；接著用切片機切成約 3-5  $\mu\text{m}$  的石蠟切片，並且用蘇木紫-伊紅（hematoxylin-eosin, HE）染色。蘇木紫可將細胞核染為藍紫色，伊紅則可將細胞質染為淡粉紅色。利用 alphasoft 2200 軟體計算內膜增厚的面積，將內膜增厚(含血管管腔)之面積減去血管管腔面積，即得到血管內膜增厚的面積。相較於控制組的內膜增厚百分比計算方式，如下：

$$\text{內膜增厚 (\%)} = \frac{\text{各組內膜增厚面積}}{\text{控制組內膜增厚面積}} \times 100 \%$$

## < 八 > 血清總膽固醇測試 (Total cholesterol level of serum)

### A 試劑：

SMT calibrator (Merck, Germany)

cholesterol reagent (Merck, Germany)

LDL precipitant reagent (Merck, Germany)

### B 儀器：

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

### C 原理：

利用膽固醇酯解酶水解膽固醇酯，產生膽固醇和脂肪酸，再以膽固醇氧化酶氧化膽固醇，進而產生  $H_2O_2$  和 cholestrol-3-one，最後利用 peroxidase 將  $H_2O_2$  和 4-aminoantipyrine 及 phenol 作用，產生  $H_2O$  和紅色的 quinonimine 呈色物質作為定量的依據。

### D 步驟：

所有的試劑保存於  $4\text{ }^\circ\text{C}$  皆可直接使用。取  $10\text{ }\mu\text{L}$  的血清加入  $1000\text{ }\mu\text{L}$  膽固醇試劑，取  $10\text{ }\mu\text{L}$  的二次水和標準液作為 blank 和 standard，混合均勻後室溫靜置 10 分鐘，於波長  $500\text{ nm}$  測吸光值。

E 計算：

$$\text{cholesterol (mmol/L)} = \frac{(\text{樣本吸光值} - \text{blank 吸光值}) \times 6.03}{\text{Standard 吸光值}}$$

註：6.03 為 standard 的濃度 (mmol/L)

### < 九 > 血清低密度脂蛋白測試 (LDL-cholesterol level of serum)

A 試劑：

SMT calibrator (Merck, Germany)

cholesterol reagent (Merck, Germany)

LDL precipitant reagent (Merck, Germany)

B 儀器：

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

C 原理：

樣品加入 heparin 將大部分的 LDL 沉澱，離心之後 HDL 和 VLDL 仍可留在上清液，接著測量上清液殘餘的膽固醇，則總膽固醇減去上清液膽固醇，就等於此樣品的 LDL-C 濃度。

D 步驟：

(1) 沉澱法：

取 100  $\mu\text{L}$  的血清加入 1000  $\mu\text{L}$  的 LDL 沉澱劑，混合均勻後室溫靜置 15 分鐘，接著以 2500 g 離心 20 分鐘。在一小時內，抽取上清液進行以下實驗。

(2) 酵素法：

取 100  $\mu\text{L}$  的上清液加入 1000  $\mu\text{L}$  膽固醇試劑，亦取 100  $\mu\text{L}$  的標準液加入 1000  $\mu\text{L}$  膽固醇試劑做為 standard。混合均勻後室溫靜置 10 分鐘，於 45 分鐘之內在波長 500 nm 測吸光值。

E 計算：

(1) 計算上清液中的膽固醇

$$\text{cholesterol (mmol/L)} = \frac{(\text{樣本吸光值} - \text{blank 吸光值}) \times 6.03^{\text{註}}}{\text{Standard 吸光值}}$$

註：6.03 為 standard 的濃度 (mmol/L)

(2) 計算樣本 LDL-cholesterol

$$\text{LDL-cholesterol (mmol/L)} = \text{總膽固醇} - \text{上清液中的膽固醇}$$

< 十 > 血清高密度脂蛋白測試 (HDL-cholesterol level of serum)

A 試劑：

SMT calibrator (Merck, Germany)

cholesterol reagent (Merck, Germany)

HDL precipitant reagent (Merck, Germany)

B 儀器：

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

C 原理：

利用 phosphotungstic acid 和鎂離子將乳糜微粒、VLDL 和 LDL 沉澱。離心之後上清液僅存 HDL-C (high density lipoprotein- cholesterol, HDL-C)，膽固醇含量同樣可用方法< 八 >測得。

D 步驟：

(1) 沉澱法：

取 200  $\mu\text{L}$  的血清加入 500  $\mu\text{L}$  的 HDL 沉澱劑，混合均勻後室溫靜置 15 分鐘，接著以 2500 g 離心 20 分鐘。在二小時內，抽取上清液進行以下實驗。

(2) 酵素法：

取 100  $\mu\text{L}$  的上清液加入 1000  $\mu\text{L}$  膽固醇試劑，亦取 100  $\mu\text{L}$  的標準液加入 1000  $\mu\text{L}$  膽固醇試劑做為 standard。混合均勻後室溫靜置 10 分鐘，於波長 500 nm 測吸光值。

E 計算：

$$\text{HDL-cholesterol (mmol/L)} = \frac{(\text{樣本吸光值} - \text{blank 吸光值}) \times 6.03^{\text{註}}}{\text{Standard 吸光值}}$$

註：6.03 為 standard 的濃度 (mmol/L)

### < 十一 > 血清三酸甘油酯測試 (Triglyceride level of serum)

A 試劑：

SMT calibrator (Merck, Germany)

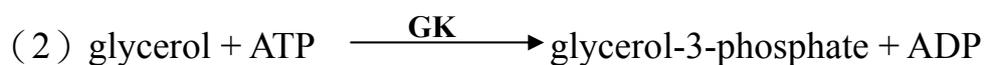
Triglyceride reagent (Merck, Germany)

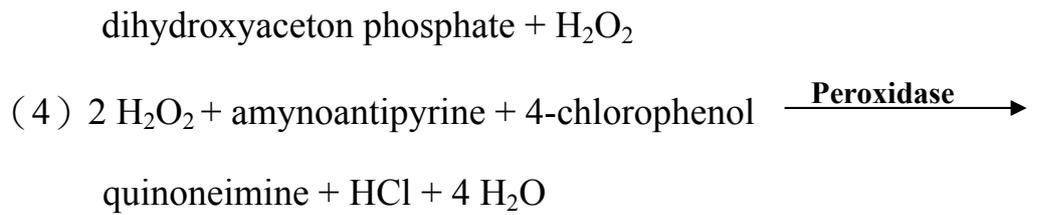
B 儀器：

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

C 原理：

利用脂蛋白脂解酶 (LPL) 會分解三酸甘油酯的特性，而為 quinoneimine 為指標辨識物，酵素反應公式如下：





D 步驟：

所有的試劑保存於 4 °C 皆可直接使用。取 10 μL 的血清加入 1000 μL 膽固醇試劑，取 10 μL 的二次水和標準液作為 blank 和 standard，混合均勻後室溫靜置 10 分鐘，於波長 550 nm 測吸光值。

E 計算：

$$\text{Triglyceride (mmol/L)} = \frac{(\text{樣本吸光值} - \text{blank 吸光值}) \times 2.63}{\text{Standard 吸光值}}$$

註：2.63 為 standard 的濃度 (mmol/L)

## < 十二 > 血清脂質過氧化物 MDA 之測試 (TBARS of serum)

A 試劑：

MDA (Aldrich, WI, USA)

95 % Ethanol (景明化工, Taichung, Taiwan)

TBA (Sigma, MO, USA)

TCA (Sigma, MO, USA)

CuSO<sub>4</sub> (Sigma, MO, USA)

B 儀器：

往復式震盪恆溫水浴機 (Reciprocal shaking baths, TKS, Taiwan)

ELISA plate reader ( $\mu$  QUANT, Bio-Tek, USA)

離心機 (5415R centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany)

C 原理：

丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 是脂質過氧化作用的終產物，而 TBA (thiobarbituric acid) 會和 MDA 結合產生粉紅色的物質，此物質在波長 532 nm 時有最大的吸光值。所以將血清用 CuSO<sub>4</sub> 誘發血清過氧化，而 TCA (trichloroacetic acid) 能和蛋白質結合而沉澱，使蛋白質不至於干擾吸光值的測定。

D 步驟：

血清 25  $\mu$ L 加入 60  $\mu$ M 的 CuSO<sub>4</sub> 2.5  $\mu$ L 促氧化，且加入 22.5  $\mu$ L 的 PBS 混合均勻。Blank 的部份則用 95 % Ethanol 代替 sample；用標準品 MDA (1 g/mL) 稀釋成所需要的濃度，做出檢量線，將配置好的檢量線濃度、Blank 和 sample 抽取 50  $\mu$ L，依序加入 0.67 % TBA、20 % TCA 各 350  $\mu$ L 混合均勻後，放入 67 °C 水浴槽水浴 30 分鐘，接著以 10000 rpm 離心 2 分鐘，小心吸取上清液 200  $\mu$ L 放入 96 well，利用 ELISA plate reader

測量其在波長 532 nm 的吸光值。做出檢量線，用檢量線推出 sample 中 MDA 的濃度，以 nmol/mL 表示。

### < 十三 > 分離 LDL (Isolation of LDL)

#### A 試劑：

NaCl (Sigma, MO, USA)

KBr (SHOWA, Tokyo, Japan)

#### B 藥劑泡製：

0.9 % NaCl：秤取 0.9 g 的 NaCl 泡成 100 mL，並滅菌使用。

#### C 儀器：

Vortex genie 2 (BOHEMIA, N.Y., USA)

超高速離心機 (Himac CS100FX, HITACHI, Japan)

#### D 步驟：

整個實驗流程分為三天。第一天將 2 mL 血清置入 3 PC 管，加入 0.7 mL 的 0.9 % NaCl 混合均勻，放入超高速離心機，在 10 °C 以 100,000 rpm (Acc.: 5, Dec.: 7) 離心 3.5 小時，取出 3 PC 管，棄置最上層 0.7 mL 的上清液且充氮氣，保存於 -20 °C 冰箱。第二天，從冰箱取出 3 PC 管，在室溫下解凍或用手緊握加速其溶解，再重複第一天的所有步驟，同樣

保存於-20 °C 冰箱。第三天，取出 3 PC 管，在室溫下解凍後，於各管加入 166.8 mg 的 KBr 調整液體的濃度梯度，用 Vortex genie 2 將 KBr 混合至完全溶解，放入超高速離心機，在 10 °C 以 100,000 rpm (Acc.: 9, Dec.: 7) 離心 3.5 小時，小心吸取最上層 0.6 mL 的上清液，充氮氣保存於 4 °C 冰箱。全程需避光進行。

#### < 十四 > 蛋白質定量 (protein assay)

##### A 試劑：

Bradford reagent (BioRad, CA, USA)

BSA (Bovine serum albumin) (Sigma, MO, USA)

##### B 儀器：

Vortex genie 2 (BOHEMIA, N.Y., USA)

ELISA plate reader ( $\mu$  QUANT, Bio-Tek, USA)

##### C 步驟：

以二次水稀釋 0.1 mg/mL 的 BSA 作出不同濃度的檢量線，取 10  $\mu$ L 的樣品加 790  $\mu$ L 二次水，接著加入 200  $\mu$ L 的 Bradford reagent 混合均勻，室溫靜置 10 分鐘後，每管抽 200  $\mu$ L 放入 96 well，接著利用 ELISA plate reader 測量 590 nm 的吸光值。做出檢量線，用檢量線回推 sample

中蛋白質的濃度，以 mg/mL 表示。

### < 十五 > LDL 之脂質過氧化遲滯期測試 (Lag time of LDL)

#### A 試劑：

CuSO<sub>4</sub> (Sigma, MO, USA)

KCl (SHOWA, Tokyo, Japan)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (SHOWA, Tokyo, Japan)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (SHOWA, Tokyo, Japan)

#### B 藥劑泡製：

PBS ( Phosphate buffer saline)：秤取 9.35 g 的 NaCl、0.2 g 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.38 g 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>· 7 H<sub>2</sub>O，加入二次水泡成 1 L，混合均勻後，調整其 pH 為 7.4，可依情況滅菌使用。

#### C 儀器：

往復式震盪恆溫水浴機 (Reciprocal shaking baths, TKS, Taiwan)

Micro centrifuge II (The Griffin Group , USA)

紫外光分光光譜儀 (DU-640 spectrophotometer, Beckman Coulter, USA)

紫外光分光光譜儀 (DU-800 spectrophotometer, Beckman Coulter,

USA)

D 步驟：

蛋白質定量 LDL 的濃度，限定最終 LDL 濃度為 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ， $\text{CuSO}_4$  最終濃度為 5  $\mu\text{M}$ ，最後用 PBS 來補剩餘的體積至 1 mL，混合均勻後，放入 37 °C 的水浴 10 分鐘。取出後，將所有的液體利用 Micro centrifuge 將所有液體 spin down，接著將所有液體移入石英管，放入分光光譜儀中，以 37 °C 測量 234 nm 的吸光值，每 15 分鐘為間隔測量一次，共 1200 分鐘。

< 十六 > 組織均質 (Homogenize)

A 藥劑：

Tris-Sucross (Sigma, MO, USA)

B 藥劑泡製

Tris-Sucross buffer：秤取 3.152 g 的 Tris-HCl、85.575 g 的 Sucross、0.3722 g 的 EDTA，加入二次水泡製成 1 L，準備使用。

C 儀器：

微量天秤 (CP224S, Sartorius, Germany)

T25 Basic 刀片式高速均質乳化機 (T25 Basic, IKA, Germany)

離心機 (5415R centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany)

D 步驟：

刀片式均質探頭、夾子、剪刀...等所有器械，皆須滅菌過後才能使用。從-80 °C取出樣品，秤取 100 mg 兔子主動脈，剪碎後加入 1.1 mL Tris-HCl buffer，接著放於冰上以均質機高速 (20000 rpm/min) 均質磨碎，均質 3 分鐘後，吸取均質液至容量 1 mL 的 eppendorf 中，接著以 4000 g 在 4 °C 離心半個小時，小心抽取上清液，立刻進行下一實驗步驟或充氮氣隔天始用。

< 十七 > 組織自由基測試 (Luminol-CL levels of thoracic aorta)

A 試劑：

Luminol (Sigma, MO, USA)

TBHP (tert- Butyl hydroperoxide, Aldrich, USA)

B 藥品泡製：

Luminol：秤取 0.0025 g 的 Luminol 加入 500 mL 的二次水，包上鋁箔紙避光儲存於 4 °C 冰箱。

C 儀器：

超微弱化學發光儀 CLA-110 chemiluminescence (Chemiluminescence)

TOHOKU, Kawasaki, Japan )

D 步驟：

取以 Tris-HCl buffer 均質的上清液 400  $\mu$ L 加入 200  $\mu$ L luminol，上下倒置混合均勻，避光靜置於室溫，培養 15 分鐘，放入超微弱化學發光儀設定 37  $^{\circ}$ C、17 分鐘；實驗開始後，到 100 秒時，加入 100  $\mu$ L TBHP 盡量混合均勻，測量 Total CL count。以蛋白質定量樣本中蛋白質的濃度，將 Total CL count 除以蛋白質的濃度，以 CL count /mg protein 來表示。整個實驗需全程避光。

< 十八 > 分離兔子主動脈 total RNA ( Isolation thoracic aorta of total RNA )

A 試劑：

Trizol reagent ( Invitrogen, CA, USA )

Chloroform ( BDH, Poole, England )

Isopropanol ( Sigma, MO, USA )

DEPC ( Sigma, MO, USA )

95% Ethanol ( 景明化工, Taichung, Taiwan )

B 藥劑泡製：

DEPC-treat water：加入 100  $\mu\text{L}$  的 DEPC 原液至 1 L 的二次水 (DDW)，調製成 0.01 % (v/v) 的濃度，並隔夜滅菌後使用。

#### C 儀器：

微量天秤 (CP224S, Sartorius, Germany)

T25 Basic 刀片式高速均質乳化機 (T25 Basic, IKA, Germany)

離心機 (5415R centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany)

#### D 步驟：

刀片式均質探頭、夾子、剪刀...等所有器械，皆須滅菌過後才能使用，或用 DEPC 水浸泡隔夜，以防止 RNA 分解。刀片式探頭裝上均質機後，須以依序以酒精、二次水，重複洗兩遍以上，最後再以二次水沖洗、擦乾備用。

從  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  取出樣品，秤取 100 mg 兔子主動脈，剪碎後加入 1.5 mL Trizol，接著放於冰上以均質機高速 (20000 rpm/min) 均質磨碎，以維持低溫狀態，均質 3 分鐘後，吸取均質液至 2 mL eppendorf 中，並靜置於冰上 5 分鐘；接著，各管加入 0.4 mL 氯仿，手搖晃混合 15 秒後，靜置於冰上 10 分鐘，再用 12000 g 在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  離心 15 分鐘，小心吸取 800  $\mu\text{L}$  澄清透明的上清液至另一 2 mL 的 eppendorf 中；加入 950  $\mu\text{L}$  isopropanol 上下倒置混合均勻，靜置於冰上 10 分鐘，再以 12000 g 在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  離心 10

分鐘；倒掉上清液留下底部白色的沉澱物，加入 1.5 mL 75 % DEPC 酒精使白色沉澱物溶解，放置 4 °C 冰箱隔夜。利用 7500 g 在 4 °C 離心 5 分鐘，倒掉上清液留下沉澱物，使 75 % DEPC 酒精盡量蒸發，再加入 10~20  $\mu$ L DEPC 水將沉澱物溶解，保存於-80 °C 冰箱。

### < 十九 > Total RNA 定量 (Quantification of total RNA)

#### A 試劑：

DEPC (Sigma, MO, USA)

#### B 藥劑泡製：

DEPC-treat water：加入 100  $\mu$ L 的 DEPC 原液至 1L 的二次水 (DDW)，調製成 0.01 % (v/v) 的濃度，並隔夜滅菌後使用。

#### C 儀器：

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

#### D 步驟：

分離完 Total RNA，立即取 1  $\mu$ L 分離出來的 Total RNA 加入 999  $\mu$ L 混合均勻，並以 1000  $\mu$ L DEPC 水做為 Blank，測量在 260 nm、280 nm 的吸光值。核酸在波長 260 nm 有最大吸收波，所以 OD 260 可間接用來偵測核酸的量。蛋白質在波長 280 nm 有最大吸收波，所以 OD 280 可間

接用來偵測蛋白質的量。OD 260/OD 280 為 Total RNA 的純度，比值要 1.8~2.0 以上較純。各管 OD 260 先扣掉 Blank 的吸光值後，Total RNA 濃度的算法如下：(RNA 濃度：1 OD 吸光值 = 40  $\mu\text{g/mL}$ )

$$\text{Net total RNA 濃度 } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD 260 吸光值} \times 40$$

### < 二十 > 反轉錄 (Reverse transcription)

#### A 試劑：

Reverse Transcription kit (Invitrogen, CA, USA)

#### B 儀器：

Thermal cycler PCR machine (iCycler, BioRad, USA)

Micro centrifuge II (The Griffin Group, USA)

#### C 步驟：

設定 total RNA 為 4.2  $\mu\text{g/管}$ ，則取適量的 sample RNA，用滅菌過的二次水來補足不足的體積，加入 Oligo (dT)、10 mM dNTP，用 pipement 抽吸均勻，放入 PCR machine 在 65  $^{\circ}\text{C}$  下反應 5 分鐘，冷卻於 4  $^{\circ}\text{C}$ ；接著加入 10X RT buffer、25 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1 M DTT、RNase OUT<sup>TM</sup> Recombinant RNase Inhibitor 混合均勻後，放入 PCR machine 在 42  $^{\circ}\text{C}$  下反應 2 分鐘，冷卻於 4  $^{\circ}\text{C}$ ；接著加入 SuperScript<sup>TM</sup> II RT 放入 PCR

machine 在 42 °C 下反應 50 分鐘，在 70 °C 下反應 15 分鐘，冷卻於 4 °C；接著加入 RNase H 放入 PCR machine 在 37 °C 下反應 20 分鐘，冷卻於 4 °C。反轉錄後的產物，放在-20 °C 冰箱保存。

### < 二十一 > 即時定量聚合酶鏈反應 (Real-time PCR)

#### A 試劑：

SYBR Green supermix (BioRad, CA, USA)

VCAM-1 Primer (Invitrogen, Taichung, Taiwan)

MCP-1 Primer (Blossom, Taichung, Taiwan)

TNF- $\alpha$  Primer (GeneMark, Bio Basic, Taichung, Taiwan)

TNF- $\beta$  Primer (Genemed synthesis, South San Francisco, CA, USA)

$\beta$ -actin Primer (Genemed synthesis, South San Francisco, CA, USA)

#### B 儀器：

Thermal cycler PCR machine (iCycler, BioRad, USA)

Real-time machine (iCycler, BioRad, USA)

Micro centrifuge II (The Griffin Group, USA)

#### C 步驟：

200  $\mu$ L 的 thin-wall PCR tube、tips 和二次水皆需經過滅菌。操作台

先噴酒精，以去除其他核酸或序列不必要的干擾，並且帶手套操作一切的實驗。

從-20 °C 冰箱取出 cDNA、各種基因的 sense 和 anti-sense primer 在室溫下解凍，而 SYBR Green supermix 則需要避光解凍。SYBR Green supermix 含有特殊螢光染劑可以和雙股螺旋結合（600bp 以下適用）。所有實驗盡量在維持在 4 °C。除了 cDNA 外，將所需的所有試劑含：sense 和 anti-sense primer、滅菌過的二次水和 SYBR Green supermix，用 pipement 抽吸均勻，因為是非常微量的實驗，所以必須用 micro centriphuge 將殘留於管壁的試劑都離下來，不可有液體或氣泡殘留於管壁。接著取適量加入 200  $\mu$ L 的 thin-wall PCR tube，再加入 cDNA 同樣用 pipement 抽吸均勻，接著用 micro centriphuge 將殘留於管壁的試劑都離心下來後放入 thermal cycler. 設定溫度、時間和 cycle 數，先用 95 °C，hotstart 3 分鐘，以 95 °C 進行 denature，使雙股 DNA 模版分開，接著不同的基因有不同的溫度條件如下：

VCAM-1 : (50X) 60.1 °C，1 分鐘；72.0 °C，50 秒

MCP-1 : (40X) 60.1 °C，1 分鐘；72.0 °C，50 秒

TNF- $\alpha$  : (40X) 60.1 °C，1 分鐘；72.0 °C，50 秒

TNF- $\beta$  : (40X) 63 °C，1 分鐘；72.0 °C，50 秒

跑完以上的步驟後，收集此時的吸光值，當雙股螺旋 DNA 放出的螢光超過儀器設定偵測閾值的 cycle 數，稱為 Ct 值 (threshold cycle)。Ct 值越大表示此基因的 mRNA 表現較弱；反之，Ct 值越小表示此基因的 mRNA 表現較強；接著再經過 95 °C，1 分鐘的過程；接著，以 55 °C，1 分鐘後，跑 melting curve 並收集此時的吸光值。

跑 melting curve 的方式如下：從 55 °C 開始，以每一個 cycle 增加 0.5 °C 的方式增加至 95 °C。melting curve 除了可以用來判斷 PCR 的產物是否具有專一性，且可判斷整個實驗過程沒有污染物產生，也沒有 primer dimer 的產生，因為產物不專一則最大波峰不只一個，會產生高低起伏如鋸齒狀的曲線，且波峰與波谷差異大。當所有的 melting curve 之最大波峰的尖端都指向同一溫度時，通常大於 80 °C 以上，且波峰的 peak 較尖、波峰橫跨距離較小時，代表此實驗結果沒有污染，且沒有 primer dimer 的產生；所以我們可以用 Ct 值來算出 target gene mRNA 的表現量。本實驗以  $\beta$ -actin 作為 housekeeping gene。mRNA 的表現量以  $\Delta$ Ct 來表示，Ct 值計算法如下：

D 計算方式：

$$\Delta\text{Ct} = \text{target gene Ct} - \text{housekeeping gene Ct}$$

表 3-1 即時定量聚合酶鏈鎖反應引子序列表

Name	Sequence	Length
Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)	(F) GAACACTCTTACCTGTGCACAGC	567
	(R) CCATCCTCATAGCAATTAAGGTGAG	
Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	(F) GTCTCTGCAACGCTTCTGTGCCTG	369
	(R) CAATGAAGTAGTAGTAGAGGGTGT	
Tumor necrosis factor - $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	(F) CCTCTCATCCTCCTCTAGCT	150
	(R) TGCAGGCCTACACCACCAT	
Tumor necrosis factor- $\beta$ (TNF- $\beta$ )	(F) CTCCGCCACGGCTTCTC	81
	(R) AACCACCTGCGAGTACACGAA	
$\beta$ -actin	(F) GCCGGGACCTGACAGACTAC	74
	(R) CCTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	

註：簡寫 (F) 表示 Forward sequence；(R) 表示 Reverse sequence

## < 二十二 > 統計與分析

所有數據以平均值±標準誤 (means ± S.E.M) 來表示，control 組與 normal 組兩組間差異以 one-way ANOVA 來分析，使用統計軟體 SAS 9.1，多項變異數分析中的鄧肯氏最小顯著差異法 (Duncan's multiple range test) 來判別各組間之差異，在  $p < 0.05$  時具有顯著差異性。



## 第五章 結果

### 第一節 Probucol 和綠原酸的抗氧化能力

在 probucol 和綠原酸進行抗氧化力的體外試驗中，由表 4-1 可觀察到 probucol 於  $12.52 \pm 0.46 \mu\text{M}$  即可抑制 50 % 的 LDL 氧化作用，且綠原酸於更低的劑量 ( $7.95 \pm 0.19 \mu\text{M}$ )，亦可達到同樣的效果。在抑制 DPPH 自由基的體外試驗中，也發現： probucol 於  $1.45 \pm 0.05 \text{ mM}$  可以抑制 DPPH 自由基的產生，而綠原酸於  $0.85 \pm 0.02 \text{ mM}$  時，也達到同樣的抑制效果。接著，再以 TEAC 方法，將 probucol 和綠原酸和脂溶性的維生素 E—trolox 的抗氧化力相比較，發現 probucol 的總抗氧化能力是  $2.38 \pm 0.54$ ，綠原酸總抗氧化能力是  $1.72 \pm 0.19$ 。綜合以上三個實驗，顯示： probucol 和綠原酸在體外試驗中具有抗氧化力。

### 第二節 實驗期間各組生長狀況的觀察

實驗期間，我們給予每天 100 g 的飼料，並紀錄兔子每天的攝食情形，且從零週開始測量每週的體重變化。由表 4-2 所示，進入實驗的兔子體重大約為 2.2~2.4 公斤，實驗八週結束後的體重約為 2.8~3.2 公斤，經統計之後並無顯著差異性；食物攝取量在各組間也沒有顯著的差異

(統計資料未列表)。表示各實驗組的兔子是在控制良好的情況下正常生長，且攝食情況良好。

### 第三節 血液生化值的影響

進入實驗期的兔子於零週、四週，藉由耳靜脈採血的方式，取出全血並分離出血清，分別測量血清中的總膽固醇 (total cholesterol, TC)、三酸甘油酯 (triglyceride, TG)；實驗八週犧牲所得的血清，另外測量 LDL-C 和 HDL-C。由圖 4-1 和圖 4-2 所示，攝取高油高膽固醇飲食的三個組別，其血清中的總膽固醇和三酸甘油酯皆隨時間增長而有上升的現象，且於第八週時具有顯著性差異；我們發現，綠原酸組的三酸甘油酯零週相較於四週有上升的現象；在八週的時候卻又有下降的趨勢，但三個時間點相比較之下，並沒有達到顯著性差異。由以上的折線圖表示：高油高膽固醇飲食確實會提高血清中—總膽固醇和三酸甘油酯的濃度，而添加綠原酸則和 probucol 一樣，可能具有降低血清總膽固醇和三酸甘油酯的效果。

在餵食不同飲食八週後，可由表 4-3 發現，正常組的血清膽固醇為  $1.58 \pm 0.21$  mmol/mL，以高油高膽固醇餵食的控制組血清之總膽固醇高達  $15.86 \pm 0.28$  mmol/mL；而 probucol 組 ( $13.77 \pm 0.67$  mmol/mL) 和 CA 組

( $14.22 \pm 0.53$  mmol/mL) 則顯著地較控制組低。表示綠原酸和降膽固醇藥物—probuco1 有相同的降膽固醇的效果。

控制組的低密度脂蛋白-膽固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) 經過八週的實驗期後，升高為  $14.11 \pm 0.38$  mmol/mL，而 probuco1 組 ( $12.73 \pm 0.66$  mmol/mL) 和 CA 組 ( $13.14 \pm 0.54$  mmol/mL) 則顯著得較控制組低 ( $p < 0.05$ )；推測綠原酸不但和 probuco1 一樣可以降低血清膽固醇，也具有降低 LDL-C 的效果。

由表 4-3 發現三酸甘油酯經過八週實驗期後，控制組的 TG 上升至  $1.41 \pm 0.14$  mmol/mL，明顯比正常組 ( $0.76 \pm 0.23$  mmol/mL) 高；但高油高膽固醇飲食添加 0.1% (w/w) probuco1 或綠原酸後，probuco1 組 ( $0.82 \pm 0.28$  mmol/mL) 或 CA 組 ( $0.77 \pm 0.09$  mmol/mL) 的三酸甘油酯則顯著地降低。

表 4-3 顯示血清中的高密度脂蛋白-膽固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) 方面，在有攝食高油高膽固醇的所有組別，包含：控制組、probuco1 組和 CA 組都比正常組高。

#### 第四節 綠原酸對抗氧化指標：血清脂質過氧化物 MDA、LDL 過氧化 遲滯期的影響

犧牲後採全血進行血清分離，並進一步分離出 LDL，使用  $\text{CuSO}_4$  促進 LDL 發生脂質過氧化的情形，利用動力學的方式來監測脂質過氧化遲滯期的發生。遲滯期的時間愈長，代表延緩脂質過氧化作用的效果愈好。由表 4-3 所示，正常組和 probucol 組的遲滯期分別為  $688.47 \pm 35.54$  分鐘和  $657.00 \pm 44.3$  分鐘，而綠原酸組的遲滯期（ $412.13 \pm 47.48$  分鐘）較前兩組短，但明顯比控制組  $200.87 \pm 21.13$  分鐘長（ $p < 0.05$ ）。表示高油高膽固醇的飲食狀態下，額外補充綠原酸，仍然具有延緩由  $\text{CuSO}_4$  誘發 LDL 脂質過氧化的情形發生。

以  $\text{CuSO}_4$  促使血清脂質過氧化發生，進而用分光光度計來測量血清中脂質過氧化物 MDA 的產生。MDA 濃度越高代表脂質過氧化的情形越嚴重。由表 4-3 所示，控制組的 MDA 濃度明顯比各組高（ $p < 0.05$ ），CA 組則和 probucol 組一樣，可以降低高油高膽固醇飲食所產生的 MDA。顯示綠原酸可以降低由  $\text{CuSO}_4$  所誘發的脂質過氧化作用。

## 第五節 綠原酸對血管 Luminol-CL 的影響

紐西蘭大白兔於飼養八週時進行犧牲，同時立即採取胸主動脈，在經過均質處理後，用超微弱化學發光儀偵測胸主動脈自由基的產生，當 Luminol-CL 越多代表自由基產生量越多。由圖 4-3 所示，若單純給予高油高膽固醇飲食，會使胸主動脈的 Luminol-CL 明顯增高；然而，高油高膽固醇飲食添加 0.1% (w/w) 的綠原酸，則可以明顯抑制胸主動脈自由基的產生，其結果與 probucol 組類似，並且都到達統計上的顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

## 第六節 綠原酸對發炎性基因：腫瘤壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、腫瘤壞死因子- $\beta$ (TNF- $\beta$ ) mRNA 表現量的影響

八週犧牲兔子時，取出的胸主動脈經過一連串的处理，包括：秤重、均質、萃取 RNA，並將萃取出來的 RNA 進行反轉錄作用，獲得 cDNA 後，進行即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR)，可立即觀測兔子胸主動脈基因的 mRNA 表現。當 cDNA 複製的循環數 (cycle threshold)，超過 iCycler iQ™ real-time PCR 儀器內建閾值時，此複製的循環數稱 Ct 值。本實驗以  $\beta$ -actin 作為 housekeeping gene。 $\Delta$ Ct (目標 gene -  $\beta$ -actin) 代

表各目標基因和 housekeeping gene 之 Ct 值的差， $\Delta$ Ct 愈小代表基因的表現量愈大。由圖 4-4 所示，給予八週的高油高膽固醇飲食，會誘發兔子胸主動脈腫瘤壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的 mRNA 過度表現 ( $p < 0.05$ )；然而，添加了綠原酸或 probucol，則可以明顯抑制胸主動脈 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表現 ( $p < 0.05$ )。

由圖 4-5 所示，腫瘤壞死因子- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) mRNA 的表現和 VCAM-1、TNF- $\alpha$  有相同的趨勢；控制組胸主動脈 TNF- $\beta$  mRNA 的表現量明顯比其他組高 ( $p < 0.05$ )；然而，高油高膽固醇飲食添加了綠原酸或 probucol 後，綠原酸組和 probucol 組都可以降低胸主動脈 TNF- $\beta$  mRNA 的表現 ( $p < 0.05$ )。

圖 4-6 和圖 4-8 分別是 TNF- $\alpha$  和 TNF- $\beta$  的同步定量曲線圖，曲線上升代表 TNF- $\alpha$  和 TNF- $\beta$  的基因表現量超過儀器內建偵測螢光的閾值，螢光值的量化圖如圖 4-4 和圖 4-5 所示。圖 4-7 和圖 4-9 分別是 TNF- $\alpha$  和 TNF- $\beta$  的熔點溫度曲線圖，除了最大波峰代表聚合酶鏈鎖反應後的產物外，沒有其餘小波峰，代表實驗操作未受其餘核酸物質污染，也沒有 primer dimer 產生，且實驗產物皆具有專一性。

## 第七節 綠原酸對血管黏附因子 (VCAM-1)、單核球趨化因子

### (MCP-1) mRNA 表現量的影響

同樣用 real-time PCR 觀察兔子胸主動脈基因的 mRNA 表現。由圖 4-10 所示，高油高膽固醇飲食的控制組相較於正常組，會誘發兔子胸主動脈 VCAM-1 的 mRNA 過度表現 ( $p < 0.05$ )；然而，添加了綠原酸或 probucol，則可以明顯抑制胸主動脈 VCAM-1 的 mRNA 表現 ( $p < 0.05$ )。

在單核球趨化因子 (MCP-1) 的 mRNA 表現上，由圖 4-11 所示，其結果也和 VCAM-1 類似，控制組胸主動脈 MCP-1 的 mRNA 表現量較正常組高 ( $p < 0.05$ )；在添加了綠原酸或 probucol 後，則可以降低胸主動脈 MCP-1 的 mRNA 表現；綠原酸組 ( $\Delta Ct: 6.6$ ) 或 probucol 組 ( $\Delta Ct: 6.9$ ) 的 mRNA 表現量雖然比正常組 ( $\Delta Ct: 7.7$ ) 高，但沒有達到顯著的差異性。

圖 4-12 和圖 4-14 分別是 VCAM-1 和 MCP-1 的同步定量曲線圖，曲線上升代表 VCAM-1 和 MCP-1 的基因表現量超過儀器內建偵測螢光的閾值，螢光值的量化圖如圖 4-10 和圖 4-11 所示。圖 4-13 和圖 4-15 分別是 VCAM-1 和 MCP-1 的熔點溫度曲線圖，除了最大波峰代表聚合酶鏈鎖反應後的產物外，沒有其餘小波峰，代表實驗操作未受其餘核酸

物質污染，也沒有 primer dimer 產生，且實驗產物皆具有專一性。

## 第八節 觀察兔子主動脈弓形態學改變之組織切片圖

圖 4-16 和圖 4-17 是給予八週不同實驗飲食兔子之 40 倍和 200 倍放大倍率下，主動脈弓蘇木紫-伊紅染色切片圖。由圖 4-16 所示：橫切面觀察兔子血管，發現除了攝取高油高膽固醇飲食的控制組有內膜增厚與脂肪條產生的情況，其餘 probucol 組和綠原酸組都和正常組的血管形態類似。使用 200 倍率的顯微鏡來觀察，圖 4-17 中每張圖片的上方較空白處是血管腔，圖片上的縮寫” I “則代表內膜的位置，” M “則是血管中層，” A “是血管的外層。正常組沒有內膜增厚的情形，而從控制組的切片圖 4-17 (C) 可以明顯看到不規則型態的內皮細胞和泡沫細胞累積，此為動脈粥狀硬化初期之血管內膜增厚的情形，也代表著血管壁脂肪條的形成。反觀，CA 組圖 4-17 (CA) 和 probucol 組由圖 4-17 (P) 類似，沒有內膜增厚的情形，其型態學的表徵和正常組差不多。由圖 4-18 可以觀察到，若以控制組內膜增厚情形為 100 %，則 CA 組和 probucol 組內膜增厚情形分別為 10.1 %和 9.7 %，表示額外添加綠原酸和 probucol 具有抑制兔子主動脈弓內膜增厚和脂肪條沉積的形成。

表 4-1 綠原酸和 probucol 的抗氧化能力

Table 4-1 Antioxidative abilities of chlorogenic acid and probucol *in vitro*.

	Inhibition of LDL oxidation ( IC <sub>50</sub> , μM)	DPPH radicals scavenging ability ( IC <sub>50</sub> , mM )	TEAC
Probucol	12.52±0.46 <sup>a</sup>	1.45±0.05 <sup>a</sup>	2.38±0.54
CA	7.95±0.19 <sup>b</sup>	0.85±0.02 <sup>b</sup>	1.72±0.19

TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity ; CA : chlorogenic acid. IC<sub>50</sub> values were obtained from the concentration response curve. All values are the means ± S.E.M. <sup>a-b</sup> Data with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

表 4-2 紐西蘭大白兔體重紀錄表

Table 4-2 Body weight in New Zealand White rabbits

	N	C	P	CA
Number of rabbits	6	6	6	6
Initial <sup>1</sup> BW (kg)	2.22±0.10	2.42±0.10	2.42±0.10	2.38±0.10
Final BW (kg)	2.83±0.08	3.17±0.17	3.12±0.15	3.22±0.13

All values are the means  $\pm$  S.E.M. In the normal group (N), rabbits were fed rabbit chow; in the control group (C), rabbits were fed rabbit chow plus 10 % soy oil and 0.5 % cholesterol; in the chlorogenic acid group (CA) and in the probucol group (P), rabbits were fed the same diet as control group plus 0.1 % chlorogenic acid or 0.1 % probucol, respectively. (<sup>1</sup>BW = body weight )

表 4-3 八週紐西蘭大白兔血液生化值與脂質過氧化指標和 LDL 遲滯期

**Table 4-3 Serum total cholesterol (TC), LDL-C (LDL-Cholesterol), HDL-C (HDL-Cholesterol), TG (Triglyceride), malondialdehyde (MDA) and LDL-Conjugated diene lag phase (lag time) levels from rabbits fed with experimental diet for 8 weeks.**

	N	C	P	CA
<b>Serum</b>				
TC (mmol/L)	1.58±0.21 <sup>c</sup>	15.86±0.28 <sup>a</sup>	13.77±0.67 <sup>b</sup>	14.22±0.53 <sup>b</sup>
LDL-C (mmol/L)	0.68±0.14 <sup>c</sup>	14.11±0.38 <sup>a</sup>	12.73±0.66 <sup>b</sup>	13.14±0.54 <sup>b</sup>
HDL-C (mmol/L)	0.85±0.03 <sup>b</sup>	1.08±0.05 <sup>a</sup>	1.00±0.06 <sup>ab</sup>	1.04±0.08 <sup>a</sup>
TG (mmol/L)	0.76±0.23 <sup>b</sup>	1.41±0.14 <sup>a</sup>	0.82±0.28 <sup>b</sup>	0.77±0.09 <sup>b</sup>
<b>TBARS</b>				
(MDA nmol/mL)	0.35±0.05 <sup>c</sup>	1.37±0.10 <sup>a</sup>	0.58±0.05 <sup>b</sup>	0.39±0.04 <sup>c</sup>
<b>LDL</b>				
lag time (min)	688.47±35.54 <sup>a</sup>	200.87±21.13 <sup>c</sup>	657.00±44.3 <sup>a</sup>	412.13±47.48 <sup>b</sup>

All values are the means ± S.E.M. In the normal group (N), rabbits were fed rabbit chow; in the control group (C), rabbits were fed rabbit chow plus 10 % soy oil and 0.5 % cholesterol; in the chlorogenic acid group (CA) and in the probucol group (P), rabbits were fed the same diet as control group plus 0.1 % chlorogenic acid or 0.1 % probucol, respectively. <sup>a-c</sup> Data with different superscripts in the same row are significantly different at  $p < 0.05$ .

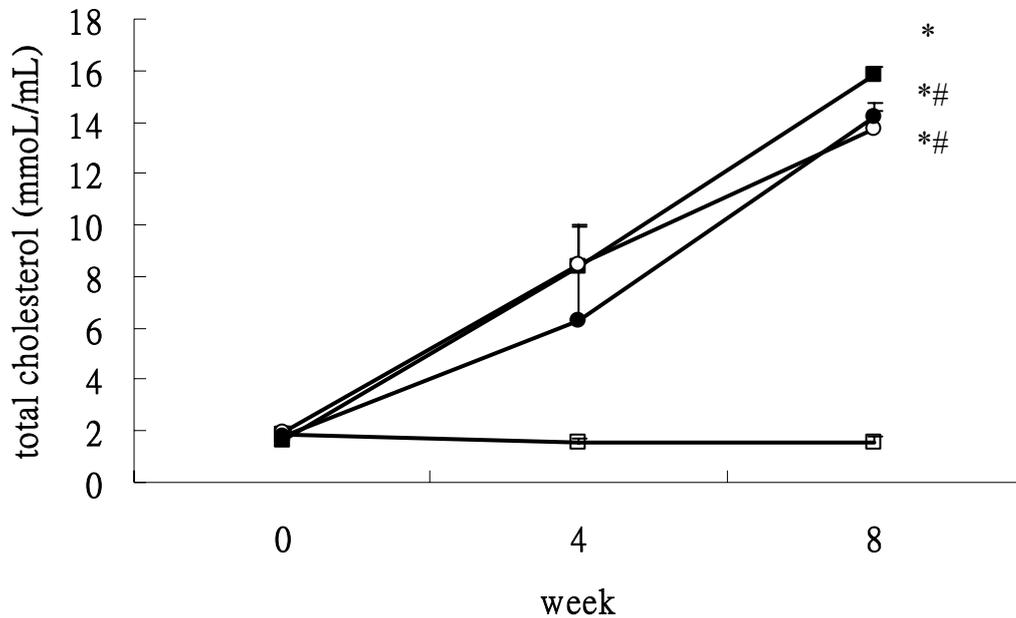


圖 4-1 血清總膽固醇於實驗期間零週、四週、八週的變化圖

Fig 4-1 Plasma cholesterol levels versus time in rabbits fed various diets.

All values are the means  $\pm$  S.E.M. In the normal group (□), rabbits were fed rabbit chow; in the control group (■), rabbits were fed rabbit chow plus 10 % soy oil and 0.5 % cholesterol; in the chlorogenic acid group (●) and in the probucol group (○), rabbits were fed the same diet as control group plus 0.1 % chlorogenic acid or 0.1 % probucol, respectively. \*  $p < 0.05$ , vs. normal group; #  $p < 0.05$ , vs. control group.

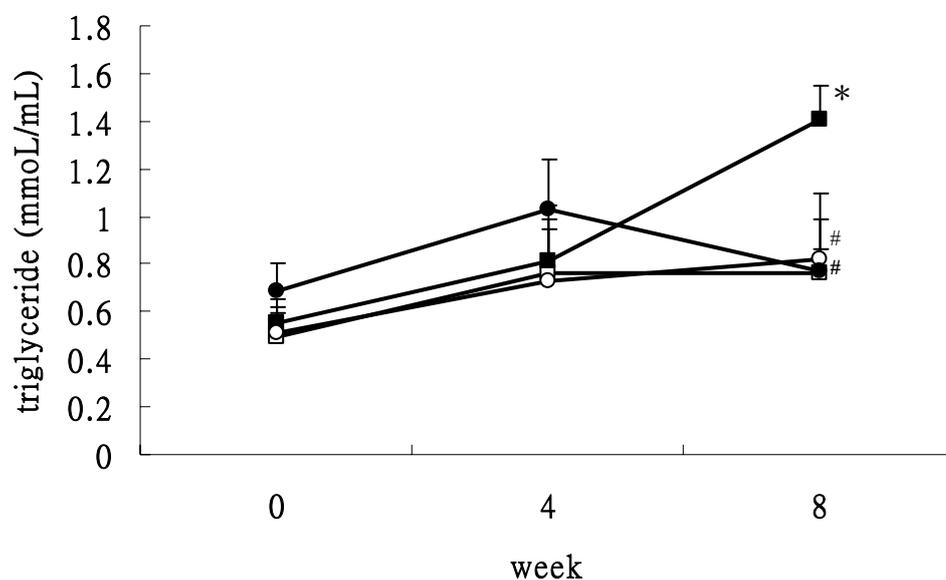


圖 4-2 血清三酸甘油酯於實驗期間零週、四週、八週的變化圖

**Fig 4-2 Plasma triglyceride levels versus time in rabbits fed various diets.**

All values are the means  $\pm$  S.E.M. In the normal group (□), rabbits were fed rabbit chow; in the control group (■), rabbits were fed rabbit chow plus 10 % soy oil and 0.5 % cholesterol; in the chlorogenic acid group (●) and in the probucol group (○), rabbits were fed the same diet as control group plus 0.1 % chlorogenic acid or 0.1 % probucol, respectively. \*  $p < 0.05$ , vs. normal group; #  $p < 0.05$ , vs. control group.

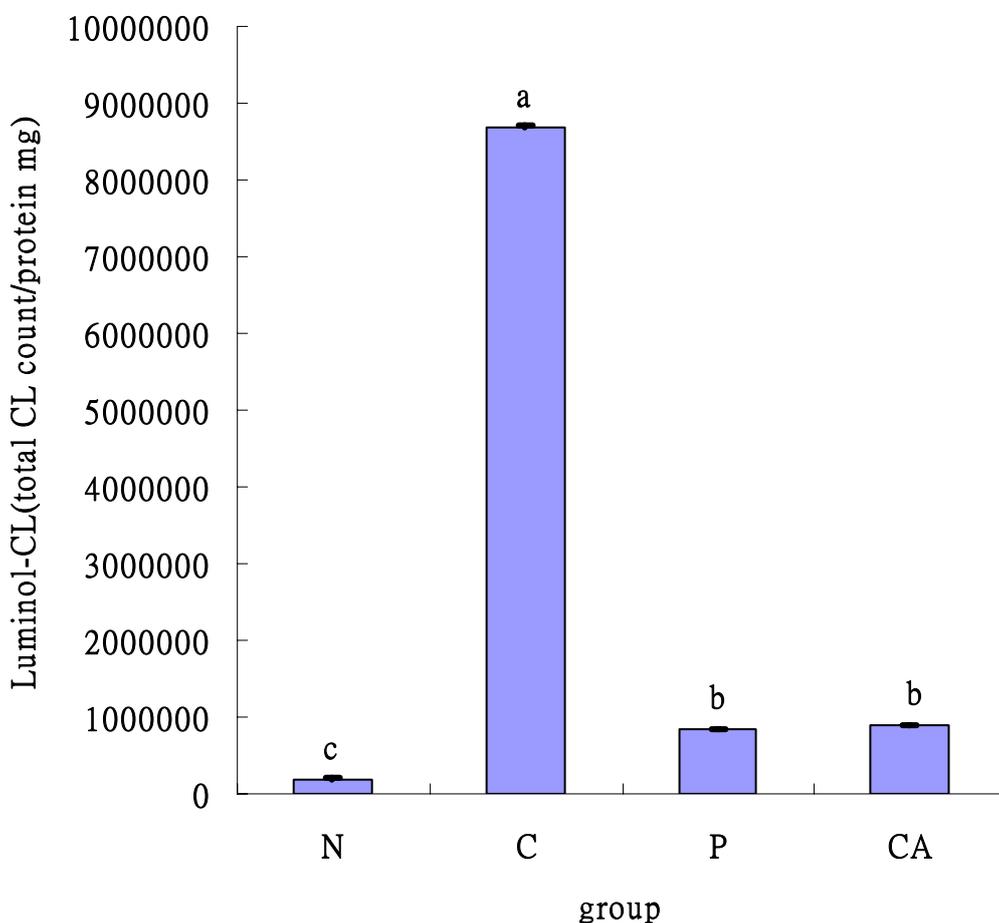


圖 4-3 八週兔子胸主動脈 Luminol-CL 圖

**Fig 4-3 Luminol-CL of rabbits fed an experimental diet for 8 week.**

All values are the means  $\pm$  S.E.M. In the normal group (N), rabbits were fed rabbit chow; in the control group (C), rabbits were fed rabbit chow plus 10 % soy oil and 0.5 % cholesterol; in the chlorogenic acid group (CA) and in the probucol group (P), rabbits were fed the same diet as control group plus 0.1 % chlorogenic acid or 0.1 % probucol, respectively. <sup>a-b</sup> Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

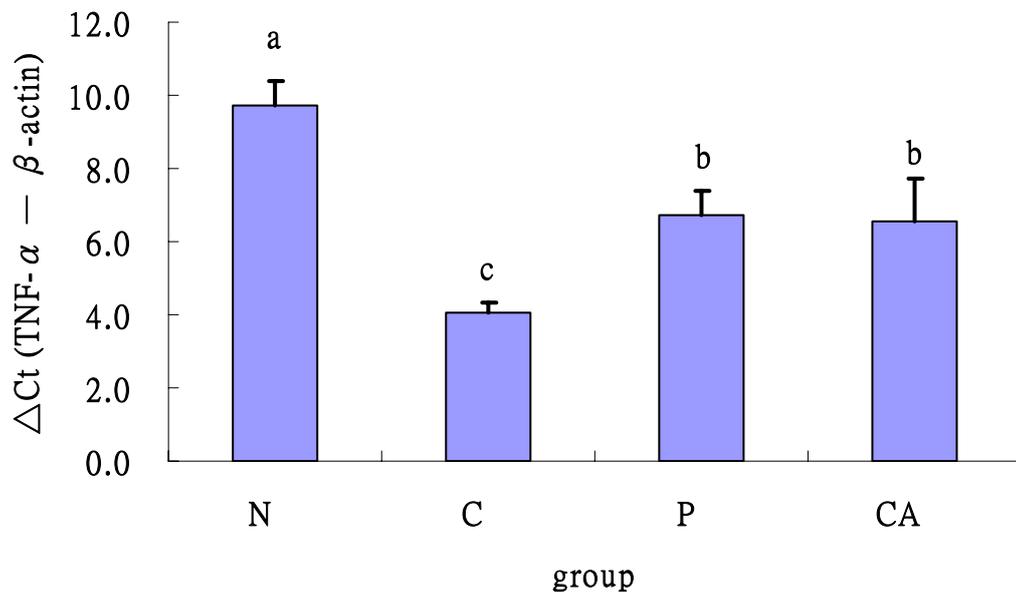


圖 4-4 綠原酸對兔子胸主動脈腫瘤壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mRNA 表現量的影響

**Fig 4-4 Thoracic aorta mRNA expression of TNF- $\alpha$  from rabbit fed an experimental diet for 8 weeks.**

cDNA from individual rabbits were placed in separate well and analyzed by iCycler iQ<sup>TM</sup> real-time PCR.  $\Delta Ct$  (gene -  $\beta$ -actin) represents the difference in cycle threshold (Ct) between the expression of the individual gene of interest and the housekeeping gene  $\beta$ -actin. Each unit of  $\Delta Ct$  (gene -  $\beta$ -actin) represents a 2-fold decrease in mRNA of genes. The fewer the  $\Delta Ct$  (gene -  $\beta$ -actin), the more the number of starting copies of a gene (mRNA). All values are means  $\pm$  S.E.M. <sup>a-c</sup> Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

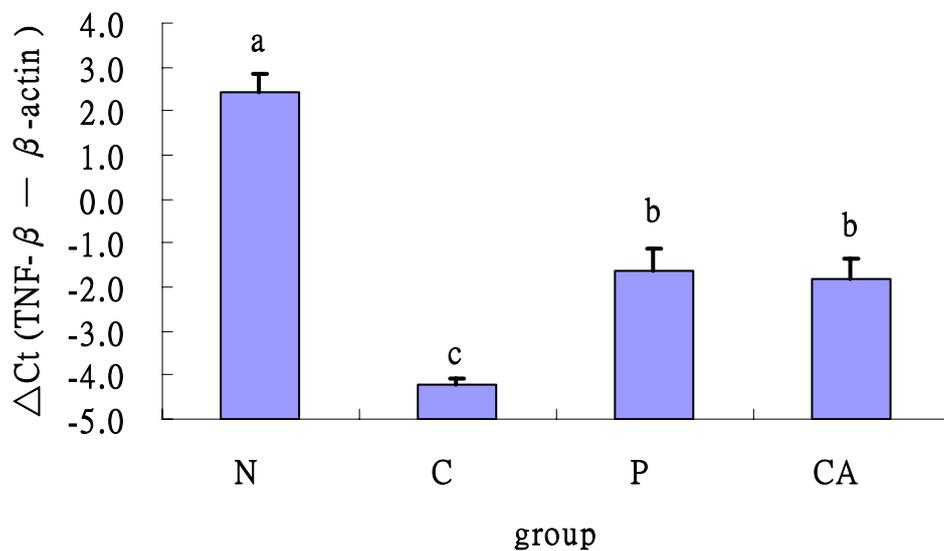
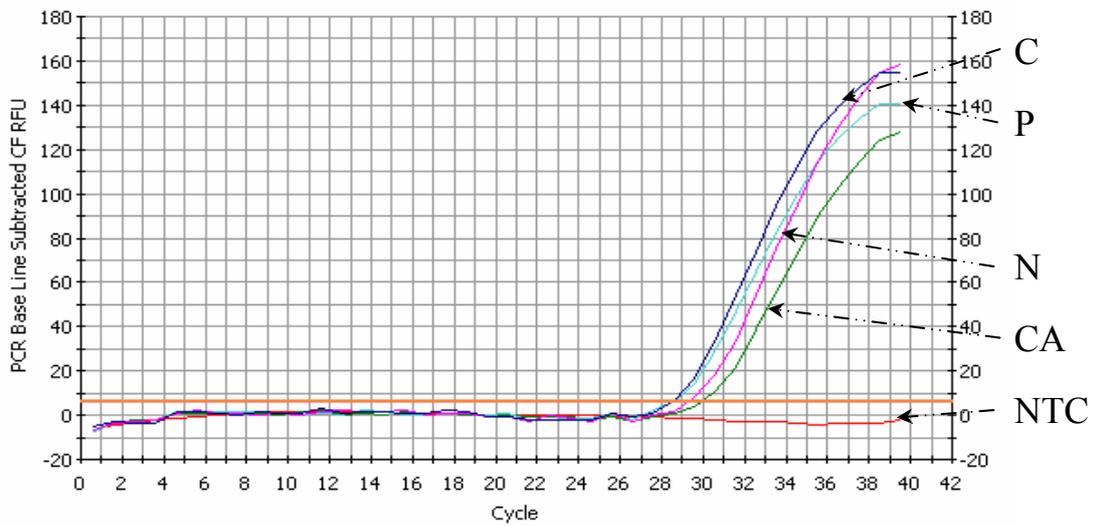


圖 4-5 綠原酸對兔子胸主動脈腫瘤壞死因子- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) mRNA 表現量的影響

**Fig 4-5 Thoracic aorta mRNA expression of TNF- $\beta$  from rabbit fed an experimental diet for 8 weeks.**

cDNA from individual rabbits were placed in separate well and analyzed by iCycler iQ<sup>TM</sup> real-time PCR.  $\Delta Ct$  (gene -  $\beta$ -actin) represents the difference in cycle threshold (Ct) between the expression of the individual gene of interest and the housekeeping gene  $\beta$ -actin. Each unit of  $\Delta Ct$  (gene -  $\beta$ -actin) represents a 2-fold decrease in mRNA of genes. The more negative the  $\Delta Ct$  (gene -  $\beta$ -actin), the more the number of starting copies of a gene (mRNA). All values are means  $\pm$  S.E.M. <sup>a-c</sup> Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

(TNF- $\alpha$ )



( $\beta$ -actin)

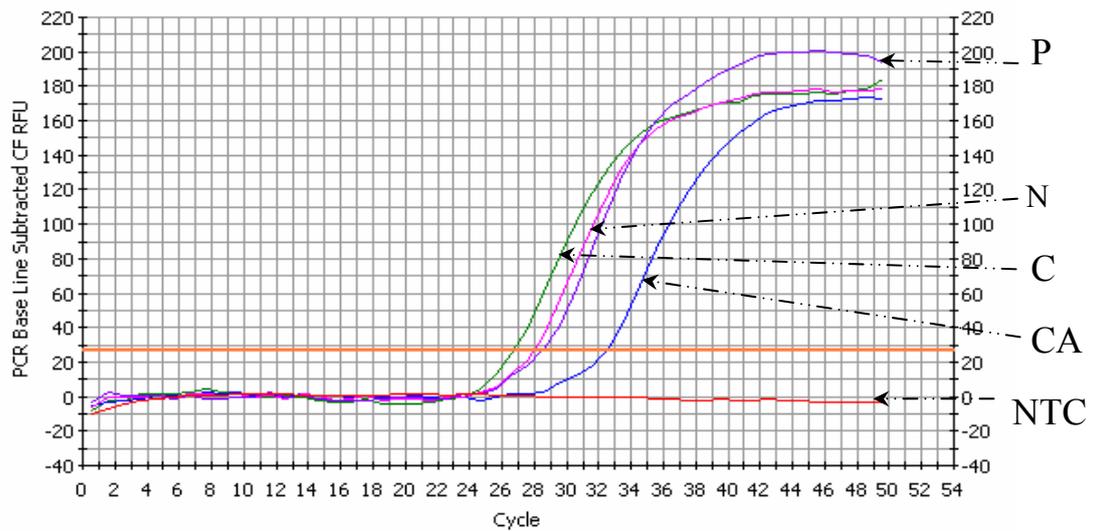
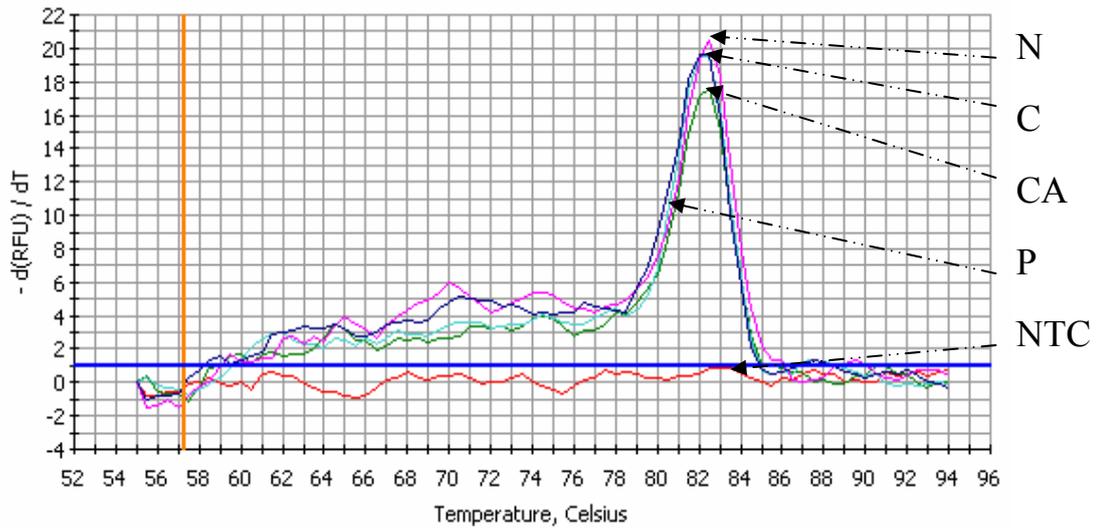


圖 4-6 腫瘤壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的同步定量曲線圖

Fig 4-6 PCR amplification cycle graph of TNF- $\alpha$ .

(Normal group (N); Control group (C); Probuocol group (P); Chlorogenic acid group (CA) ; No template control group (NTC))

(TNF- $\alpha$ )



( $\beta$ -actin)

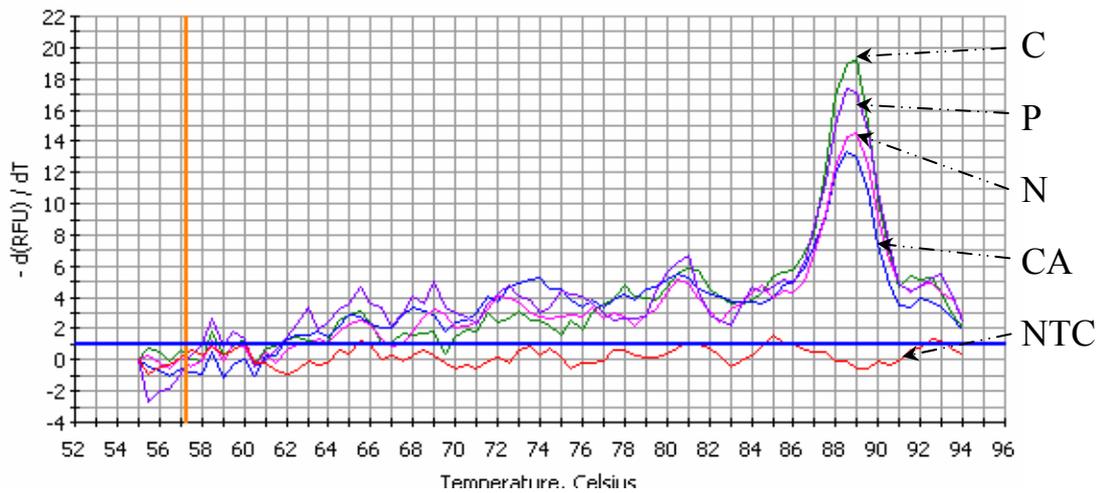
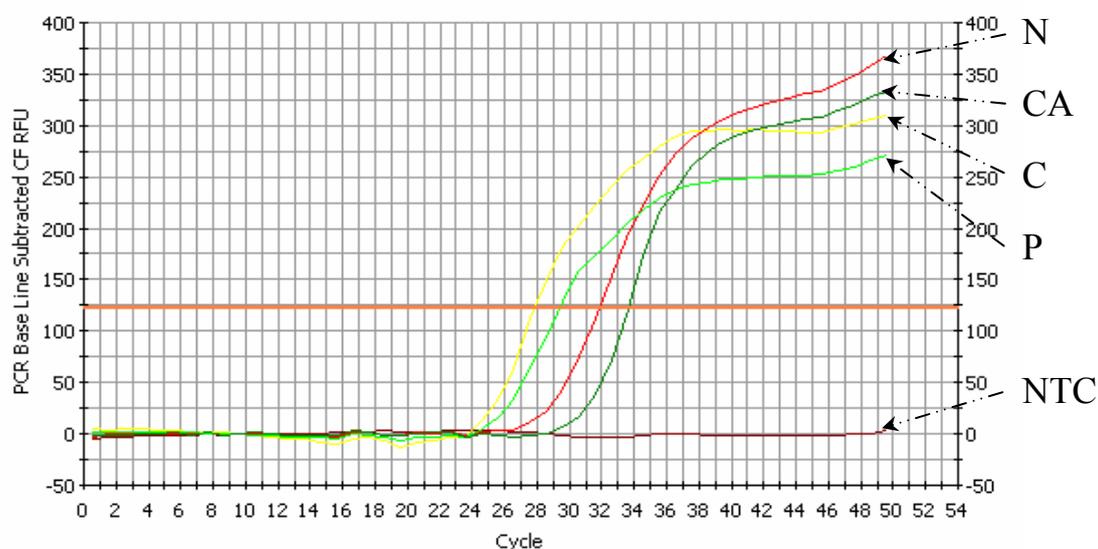


圖 4-7 腫瘤壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的熔點溫度曲線圖

Fig 4-7 Melting curve graph of TNF- $\alpha$ .

(Normal group (N); Control group (C); ProbucoI group (P); Chlorogenic acid group (CA) ; No template control group (NTC))

### (TNF- $\beta$ )



### ( $\beta$ -actin)

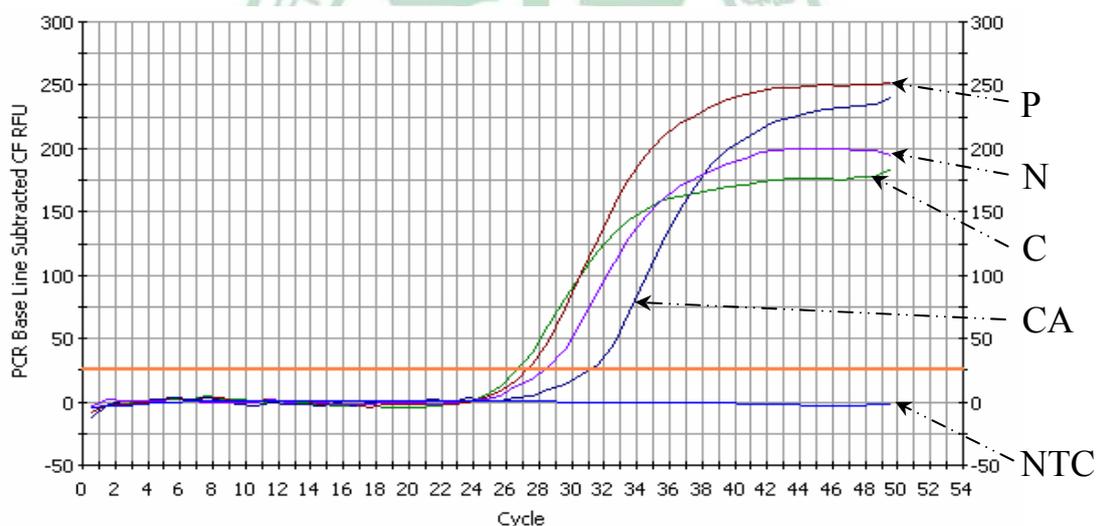
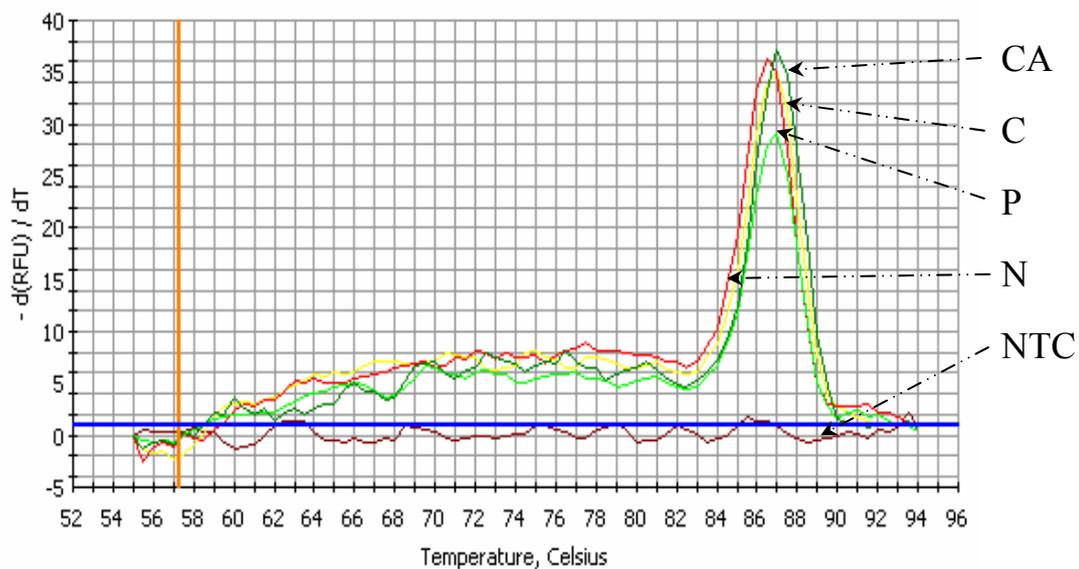


圖 4-8 腫瘤壞死因子- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) 的同步定量曲線圖

Fig 4-8 PCR amplification cycle graph of TNF- $\beta$

(Normal group (N); Control group (C); Probuocol group (P); Chlorogenic acid group (CA) ; No template control group (NTC))

(TNF- $\beta$ )



( $\beta$ -actin)

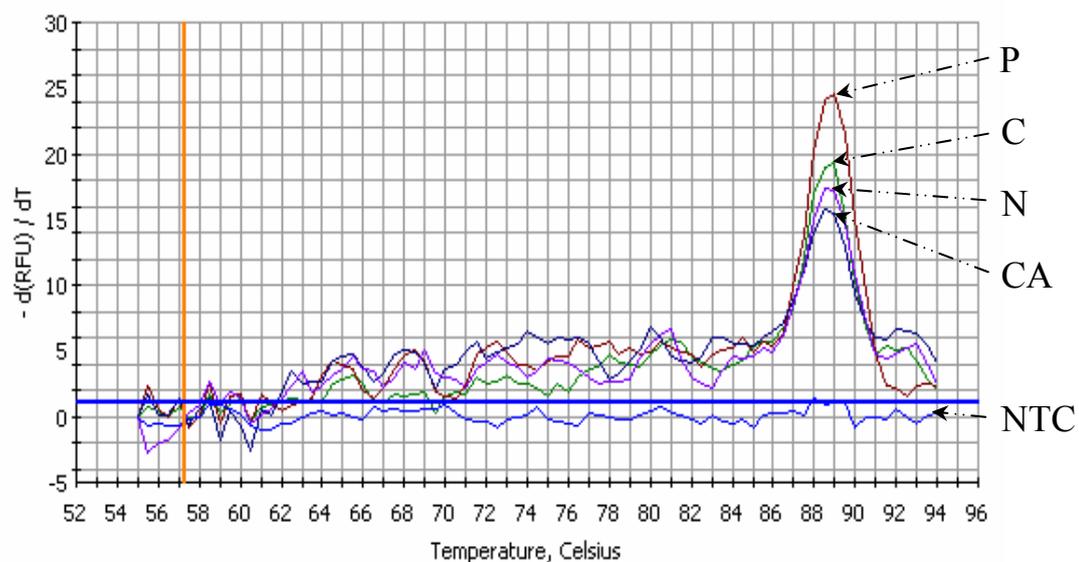


圖 4-9 腫瘤壞死因子- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) 的熔點溫度曲線圖

Fig 4-9 Melting curve graph of TNF- $\beta$ .

(Normal group (N); Control group (C); Probucol group (P); Chlorogenic acid group (CA) ; No template control group (NTC))

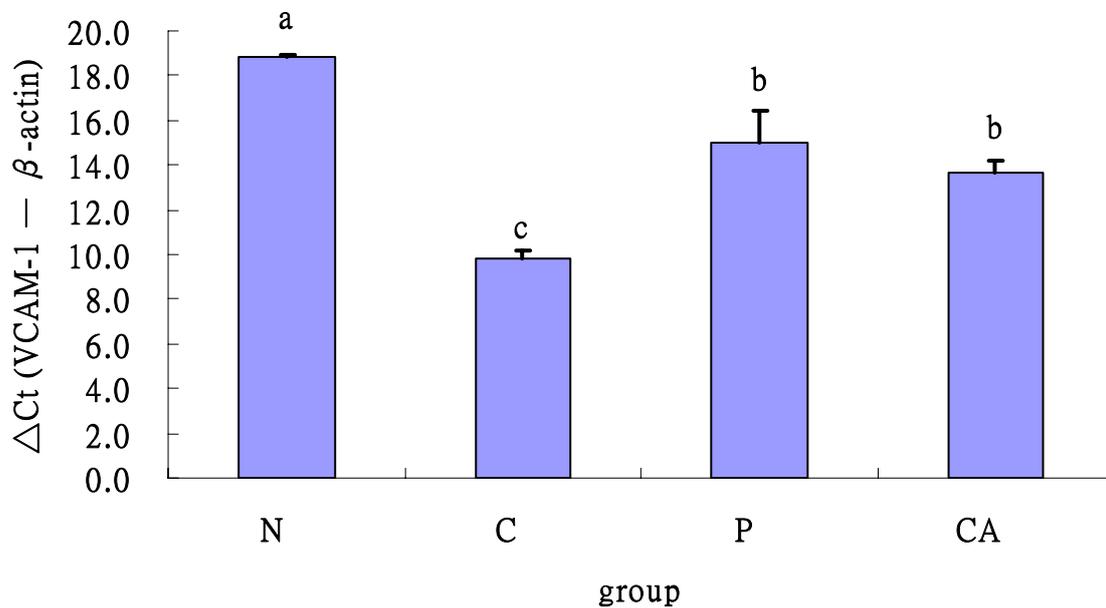


圖 4-10 綠原酸對兔子胸主動脈血管細胞黏附因子 (VCAM-1) mRNA 表現量的影響

**Fig 4-10 Thoracic aorta mRNA expression of VCAM-1 from rabbit fed an experimental diet for 8 weeks.**

cDNA from individual rabbits were placed in separate well and analyzed by iCycler iQ™ real-time PCR.  $\Delta\text{Ct}$  (gene -  $\beta$ -actin) represents the difference in cycle threshold (Ct) between the expression of the individual gene of interest and the housekeeping gene  $\beta$ -actin. Each unit of  $\Delta\text{Ct}$  (gene -  $\beta$ -actin) represents a 2-fold decrease in mRNA of genes. The fewer the  $\Delta\text{Ct}$  (gene -  $\beta$ -actin), the more the number of starting copies of a gene (mRNA).

All values are means  $\pm$  S.E.M. <sup>a-c</sup> Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

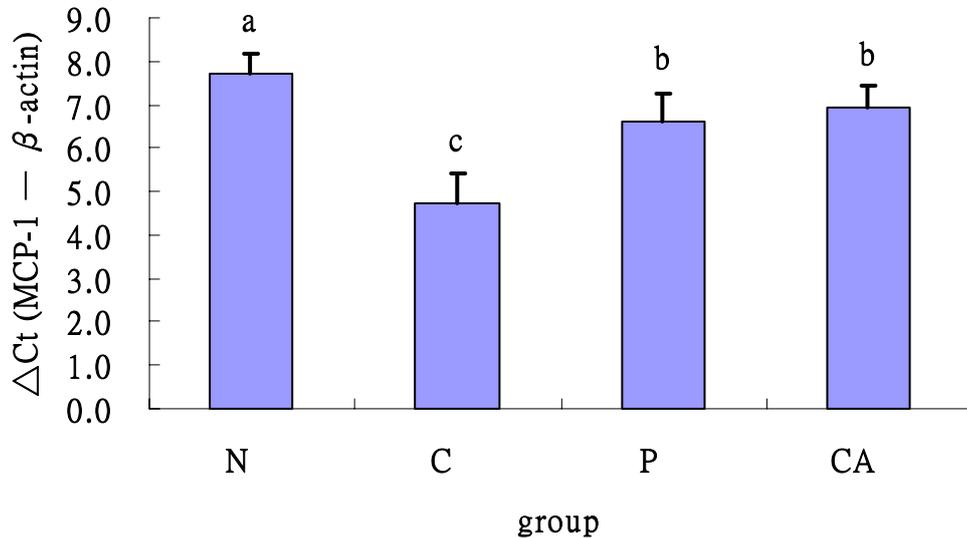


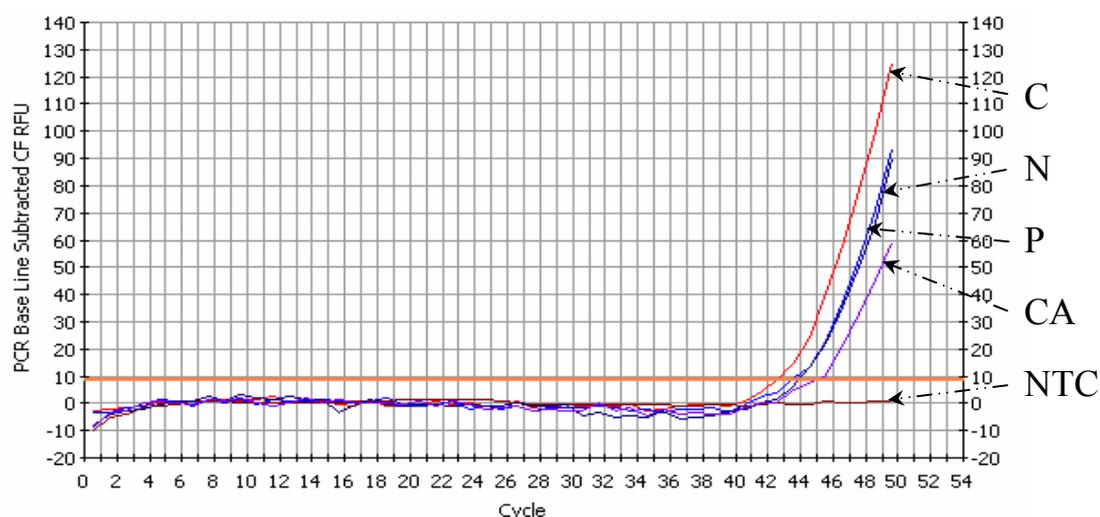
圖 4-11 綠原酸對兔子胸主動脈單核球黏附因子 (MCP-1) mRNA 表現量的影響

Fig 4-11 Thoracic aorta mRNA expression of MCP-1 from rabbit fed an experimental diet for 8 weeks.

cDNA from individual rabbits were placed in separate well and analyzed by iCycler iQ™ real-time PCR.  $\Delta\text{Ct}$  (gene -  $\beta$ -actin) represents the difference in cycle threshold (Ct) between the expression of the individual gene of interest and the housekeeping gene  $\beta$ -actin. Each unit of  $\Delta\text{Ct}$  (gene -  $\beta$ -actin) represents a 2-fold decrease in mRNA of genes. The fewer the  $\Delta\text{Ct}$  (gene -  $\beta$ -actin), the more the number of starting copies of a gene (mRNA).

All values are means  $\pm$  S.E.M. <sup>a-b</sup> Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

### (VCAM-1)



### ( $\beta$ -actin)

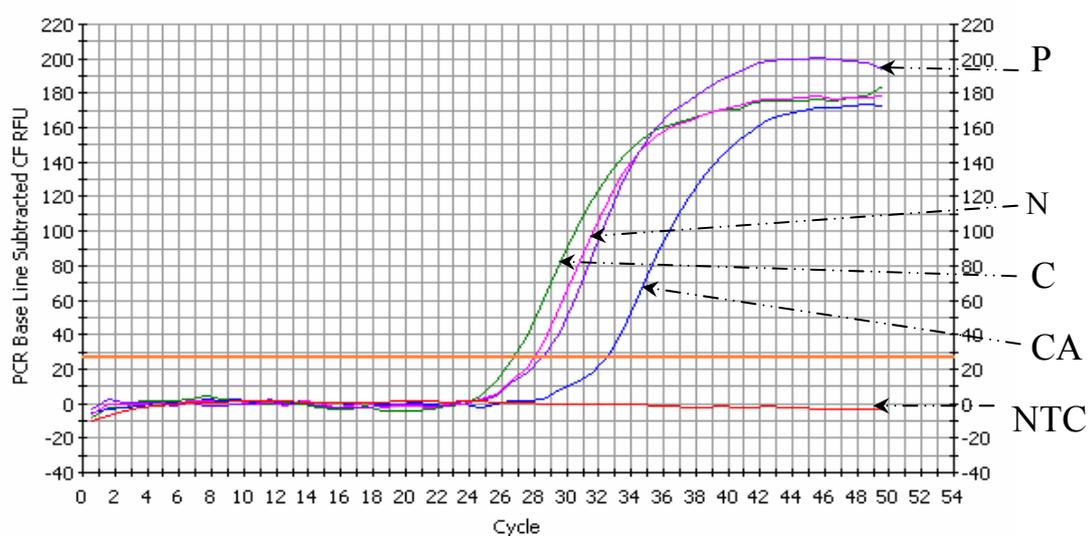
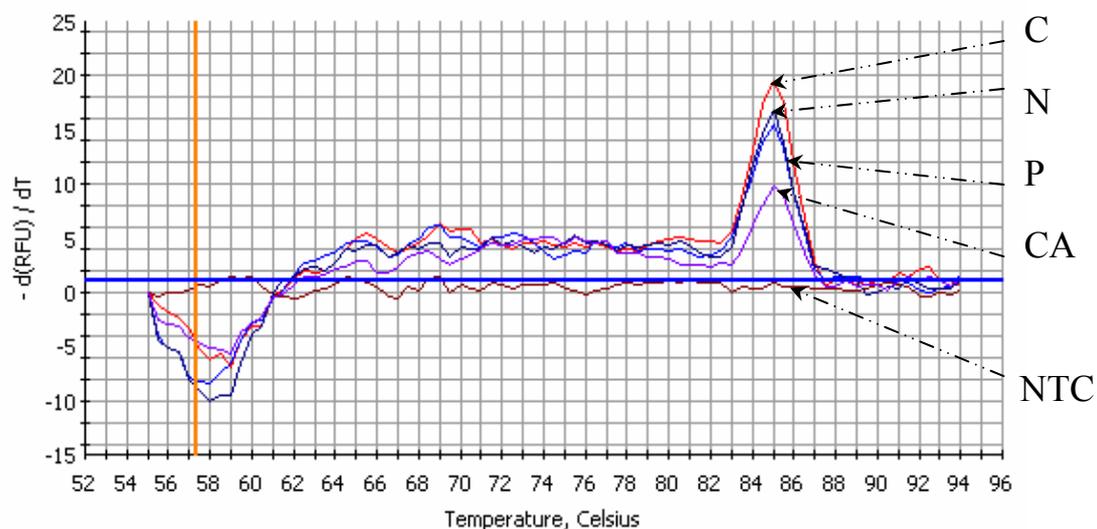


圖 4-12 血管細胞黏附因子-1 (VCAM-1) 的同步定量曲線圖

Fig 4-12 PCR amplification cycle graph of VCAM-1.

(Normal group (N); Control group (C); Probucol group (P); Chlorogenic acid group (CA) ; No template control group (NTC))

### (VCAM-1)



### ( $\beta$ -actin)

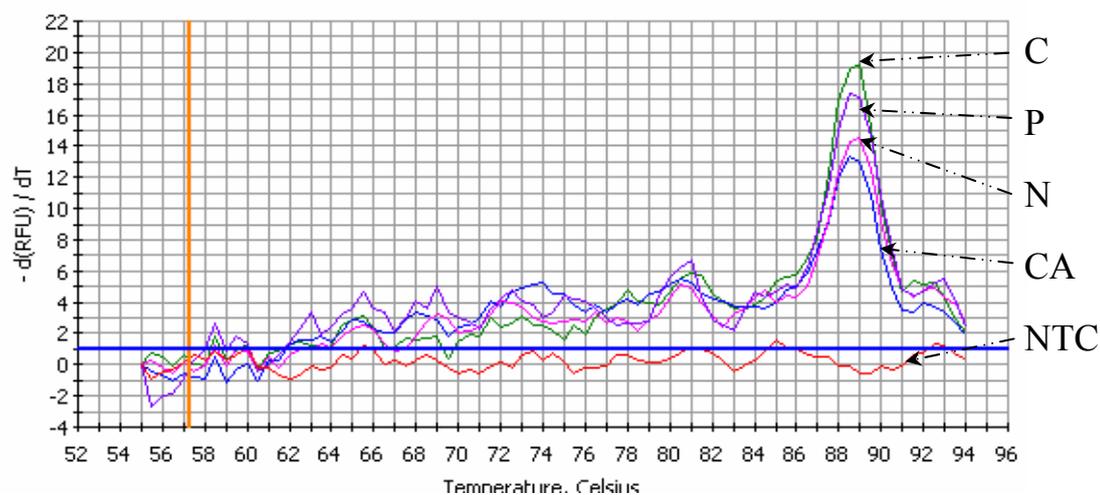
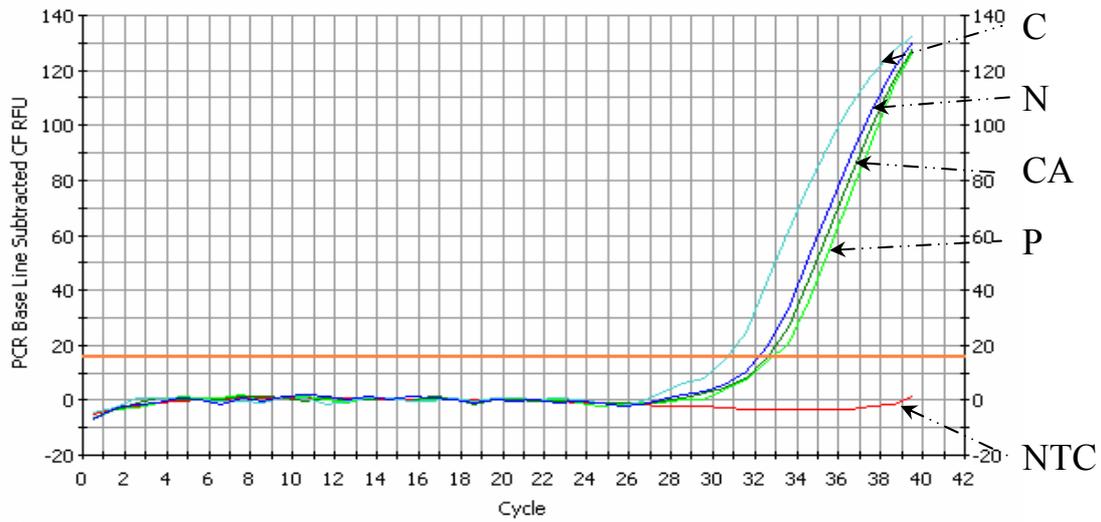


圖 4-13 血管細胞黏附因子-1 (VCAM-1) 的熔點溫度曲線圖

Fig 4-13 Melting curve graph of VCAM-1.

(Normal group (N); Control group (C); Probuocol group (P); Chlorogenic acid group (CA) ; No template control group (NTC))

(MCP-1)



( $\beta$ -actin)

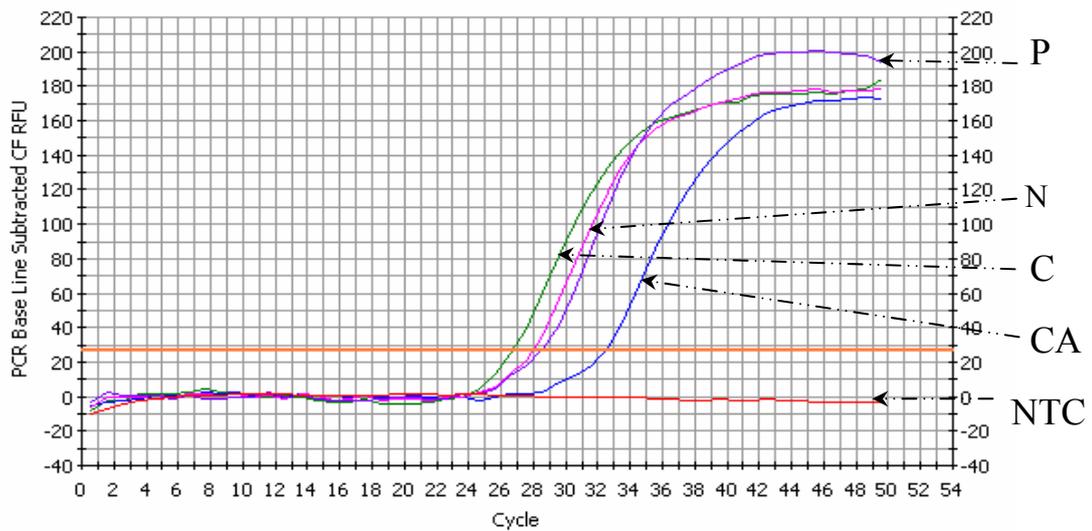
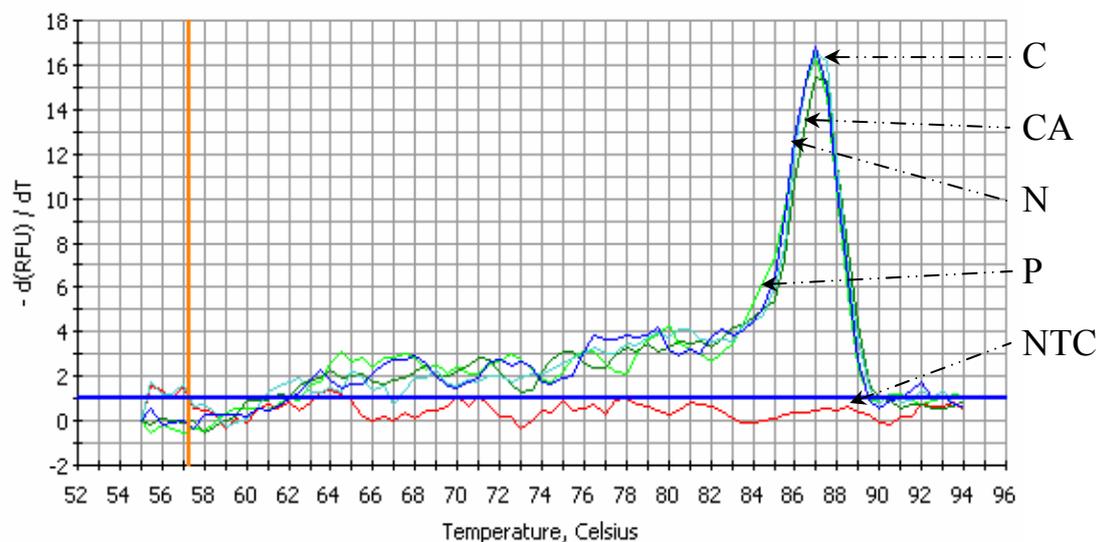


圖 4-14 單核球趨化因子-1 (MCP-1) 的同步定量曲線圖

Fig 4-14 PCR amplification cycle graph of MCP-1.

(Normal group (N); Control group (C); Probucol group (P); Chlorogenic acid group (CA) ; No template control group (NTC))

(MCP-1)



( $\beta$ -actin)

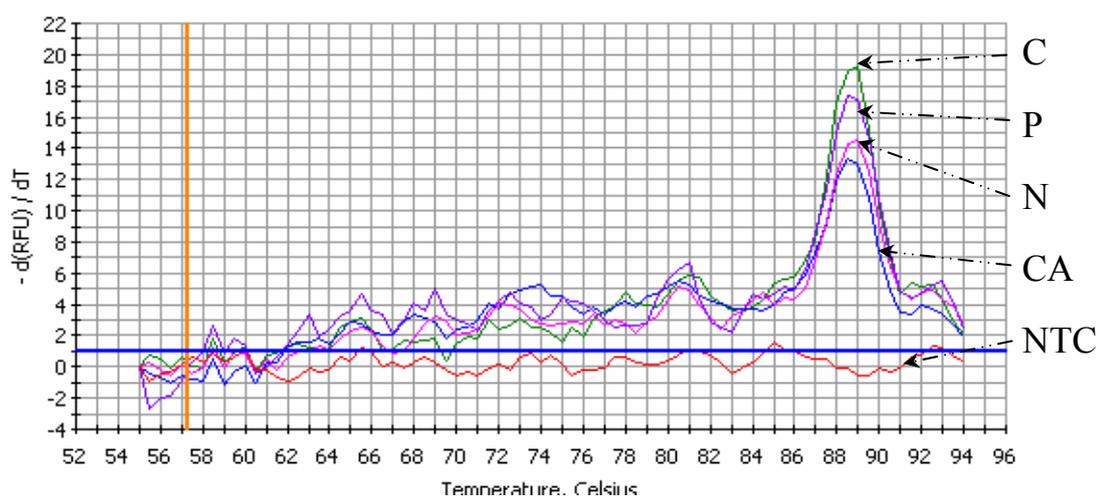


圖 4-15 單核球趨化因子-1 (MCP-1) 的熔點溫度曲線圖

Fig 4-15 Melting curve graph of MCP-1.

(Normal group (N); Control group (C); Probucol group (P); Chlorogenic acid group (CA) ; No template control group (NTC))

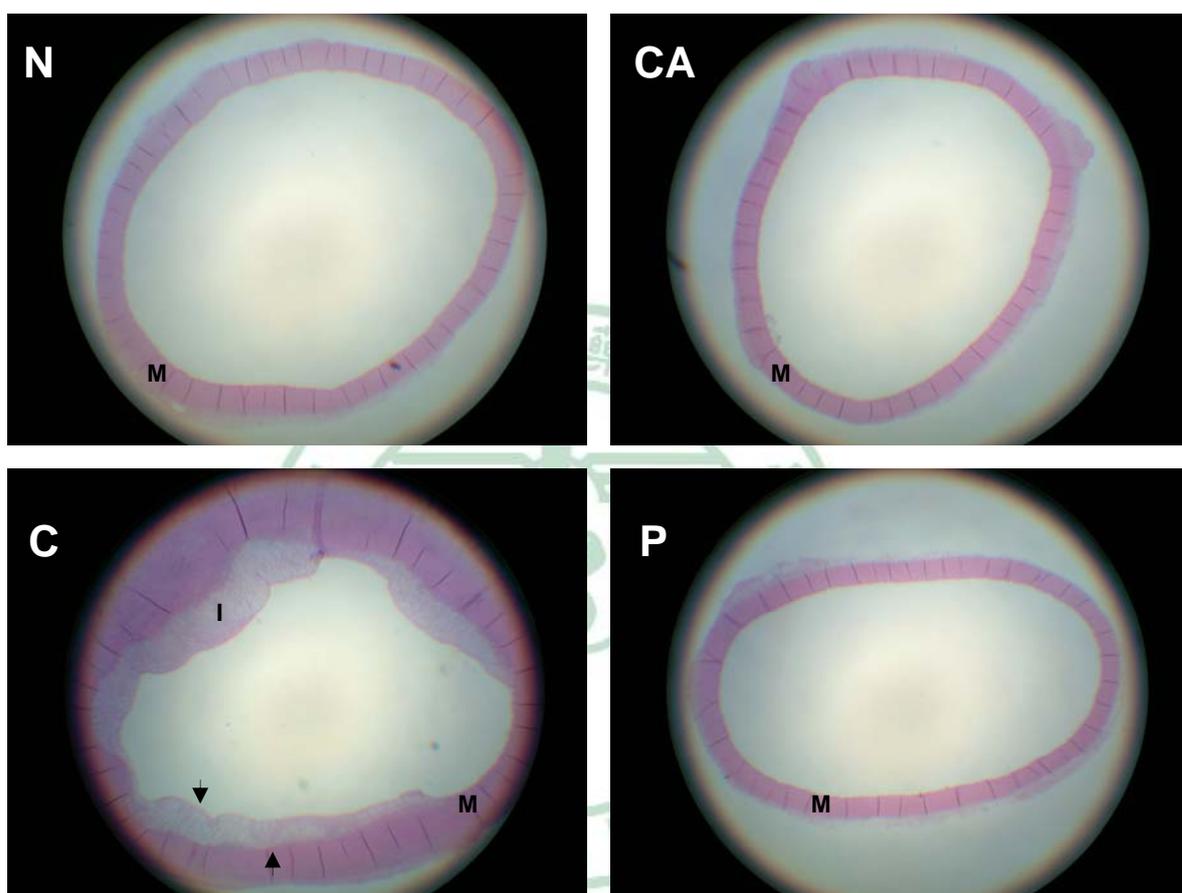


圖 4-16 紐西蘭大白兔主動脈弓組織切片圖（倍率：40 倍）

**Fig 4-16 Representative micrographs of lesion area of aorta arch stained with hematoxylin and eosin in rabbits fed an experimental diet for 8 week. Original magnification: 40X. (Between two arrow was the intima of thoracic aorta ; I : intima ; M : media ; Normal group (N) ; Control group (C) ; Probucol group (P) ; Chlorogenic acid group (CA))**

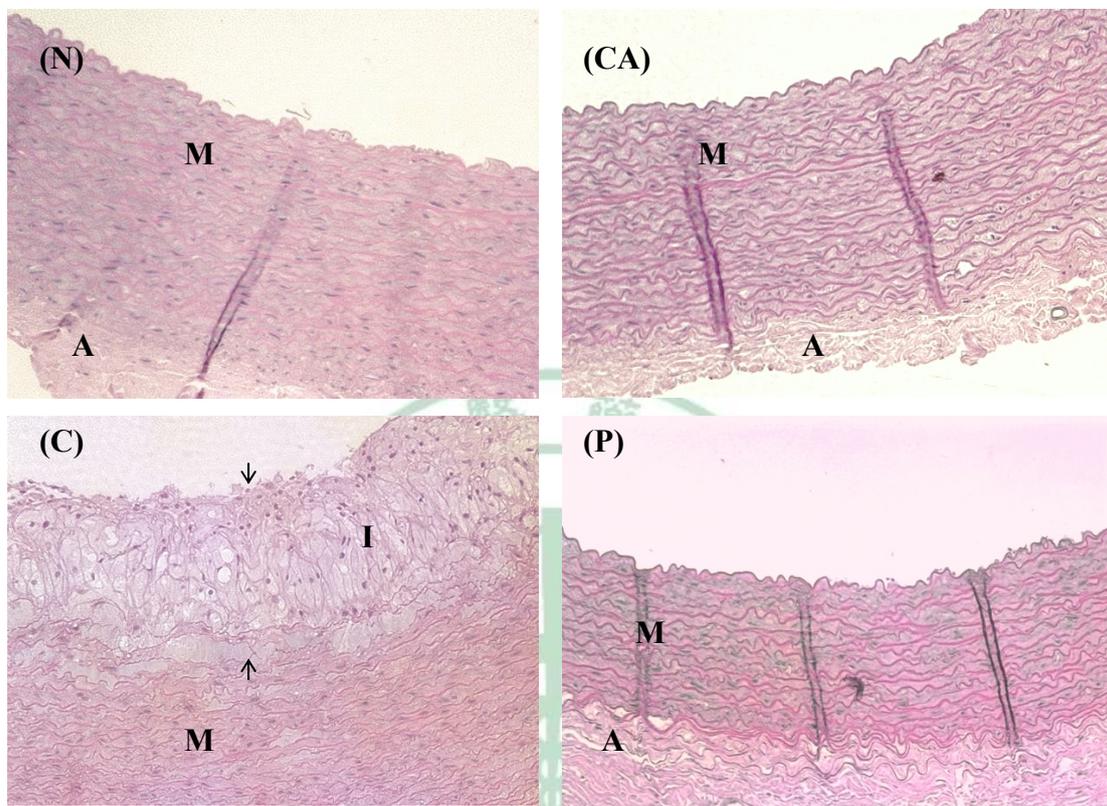


圖 4-17 紐西蘭大白兔動主脈弓組織切片圖 (倍率：200 倍)

**Fig 4-17 Representative micrographs of lesion area of aorta arch stained with hematoxylin and eosin in rabbits fed an experimental diet for 8 week.**

Original magnification: 200X. ( I : intima ; M : media ; A : adventitia ; Normal group (N) ; Control group (C) ; Probucol group (P) ; Chlorogenic acid group (CA))

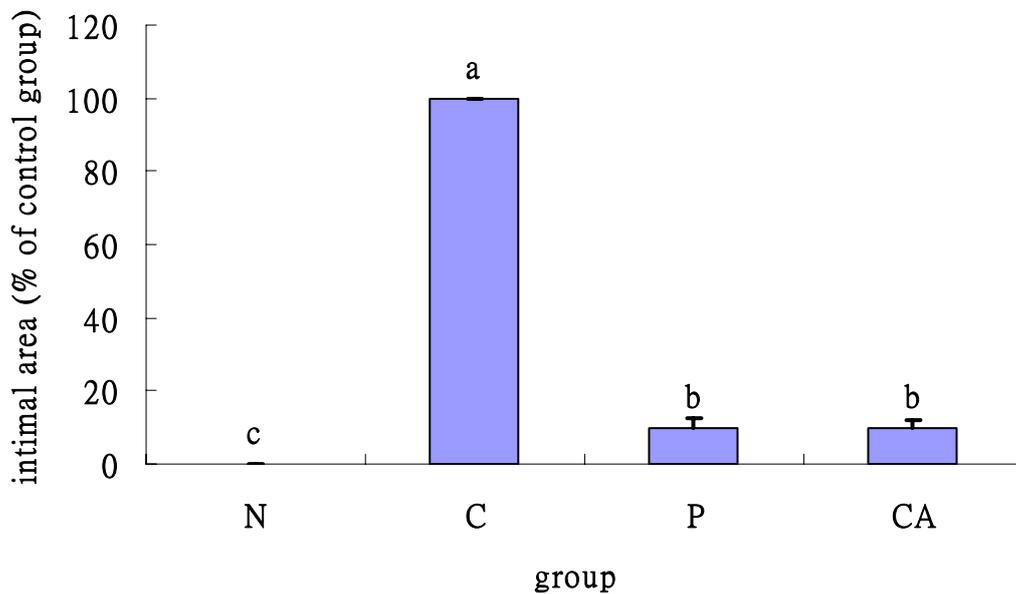


圖 4-18 綠原酸對紐西蘭大白兔動主脈弓內膜增厚的影響

Fig 4-18 Aorta arch intimal thickening of rabbit fed an experimental diet for 8 weeks.

All values are means  $\pm$  S.E.M. Normal group (N); Control group (C);

Probucol group (P); Chlorogenic acid group (CA). <sup>a-c</sup> Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

## 第六結 討論

### 第一節 動脈粥狀硬化誘發模式與飲食劑量探討

高油高膽固醇飲食被認為可以誘發紐西蘭大白兔高脂血症，給予紐西蘭大白兔 10 % 的大豆油【118】和 0.5 % 的膽固醇【119】飼養十二週後，脂肪條的形成則高達 90 %，且都有高血脂症的情形發生【120】；所以本實驗也使用以上的劑量來誘發紐西蘭大白兔高血脂症與動脈粥狀硬化的發生。

Lee et al. (2001) 給予 SD 大鼠 1 % 的膽固醇和 5 % 的玉米油誘發其高血脂症，並且額外添加 0.1 % (w/w) 的桂皮酸衍生物—3,4-di (OH)-cinnamate 或 3,4-dihydroxy-hydrocinnamate，發現以上兩組都可以降低肝臟中膽固醇和三酸甘油酯的量，且 0.1 % (w/w) 的 3,4-dihydroxy-cinnamate 組也可以顯著地降低血漿膽固醇的含量【121】。Fruebis et al.

(1999) 給予紐西蘭大白兔 0.5 % 的高膽固醇飲食，並添加 100 mg/100 g diet 的維生素 E 後，可以顯著降低兔子胸主動 VCAM-1 的表現，且降低動脈粥狀硬化的生成【122】。在 TEAC 實驗發現，綠原酸的抗氧化力較 trolox 佳，因此，本實驗亦選用同樣劑量 100 mg/100 g diet 的多酚類—綠原酸 (chlorogenic acid, CA)，期望綠原酸可以如抗氧化劑維生素 E，

具有抑制動脈粥狀硬化生成的效果。

## 第二節 餵食高油高膽固醇飲食和添加綠原酸對血液生化值的影響

先前的研究顯示，血漿中有過高的膽固醇、抽菸、糖尿病、高血壓，以及發炎因子的產生都是動脈粥狀硬化的危險因子【123】。由於 0 週與 4 週時，抽血較困難導致血液量不足，所以只測總膽固醇和三酸甘油酯。由圖 4-1 與圖 4-2 發現，隨著高油高膽固醇飲食會造成血清總膽固醇和三酸甘油酯的升高，至於綠原酸究竟能在何時達到顯著抑制血脂的效果，則可能需要更大量的動物進行 0、2、4、6、8 週採血，以免兔子經過採血後生病而導致實驗控制不良。

由表 4-3 顯示，控制組的血漿脂質明顯比正常組高，表示餵食八週高油高膽固醇飲食可以誘發高血脂症的產生。在給予高油高膽固醇飲食並添加 probucol 和綠原酸後，血清膽固醇、LDL-C 與三酸甘油酯都有降低的情形，且具顯著地差異。本研究的結果，與綠原酸可以降低 (fa/fa) Zucker 大鼠血漿中膽固醇、三酸甘油酯的濃度類似【83】。在 HDL-C 的部份，則發現攝食高油高膽固醇飲食組別的 HDL-C 都較正常組高；由於飲食攝取的脂肪酸和膽固醇必需透過脂蛋白來運送，因此推測實驗中給予高油高膽固醇飲食的組別，提供較多的膽固醇，所以體內相對的也

產生較多的脂蛋白來運載，因此 HDL 的濃度也較正常組的高。

先前研究顯示，以 Hamster 為模式的實驗中，發現無論是給予紅酒、去酒精紅酒（酒精含量為原來的一半）或葡萄汁，都會顯著地降低 23.5~39.6 % 血漿總膽固醇，和降低 13.3~46.4 % LDL-C 的濃度，也會降低 23.5~39.6 % HDL-C 的濃度，但不會降低三酸甘油酯；在降低血脂質效果的部份，紅酒的效果比葡萄汁較好【124】。另一研究以高油高膽固醇飲食誘發紐西蘭大白兔高脂血症的模式，於飲水中補充綠茶、紅茶、維生素 E（200 mg/kg diet）和  $\beta$ -carotene（20 mg/kg diet），經過八週飼養期後，四組抗氧化劑的補充皆不影響血清膽固醇【125】。而本研究中給予綠原酸的補充除了具有降低高油高膽固醇飲食所誘發的總膽固醇（10.4 %）和 LDL-C（6.9 %）的升高（ $p < 0.05$ ），更可以降低 45.4 % 的三酸甘油酯產生，且不會降低 HDL-C。若和先前研究中的紅酒多酚類與抗氧化劑相比較【124, 125】，綠原酸具有降血脂的效果，且以降低三酸甘油酯之效果最顯著。

膽固醇酯轉移酶（cholesteryl ester transfer protein, CETP）是一種血漿脂質轉移蛋白（plasma lipid transfer proteins），血漿脂質轉移蛋白非常類似（analogous）細胞脂質轉移蛋白（cellular lipid transfer proteins），皆可以幫助血漿中的膽固醇酯由高濃度轉移至低濃度的細胞或器官，亦

可幫助三酸甘油酯的轉移。在低膽固醇飲食，且 LDL 接受器和 CETP 表現量正常的狀態下，活化的 CETP (CEPT 無過度表現) 會促進 HDL-C 中的膽固醇酯進入 VLDL 和乳糜微粒，而此情形通常發生於脂肪組織、肌肉組織、心臟之脂解作用時，進而促進膽固醇酯進入肝臟【86】。在高油高膽固醇飲食之下，CEPT 會過度表現而增加了 HDL-C 中的膽固醇酯和三酸甘油酯進入 VLDL，並且會影響體內其他脂質代謝途徑如：增加 ApoB 的過度產生，而高膽固醇飲食也會降低肝臟 LDL 接受器的表現，導致血漿中有較多富含膽固醇酯的 VLDL、LDL 與乳糜微粒囤積。人體中 CETP 分布最多的器官包含：肝臟、脾臟、脂肪細胞和肌肉細胞，小腸、腎上腺、腎臟和心臟則較少量【86,126】。當胰島素隨進食而分泌時，肝臟和血漿中的 CETP 會增加，但脂肪細胞和肌肉細胞的 CETP 表現量會降低，促使血液中的膽固醇和三酸甘油酯進入脂肪細胞和肌肉細胞，反之亦然【126】。Adlouni et al. (2000) 的研究指出， probucol 可以透過降低血漿中 CETP 的分解作用與提高 CETP 的合成，而使血漿中 CETP 的活性增加，進而促進 HDL-C 中膽固醇酯和三酸甘油酯的釋放，進而降低了 HDL-C 的密度而降低 HDL-C；且 probucol 也可以增加血漿中 lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) 的活性，促進血漿脂蛋白中膽固醇與三酸甘油酯運送到身體其他組織利用或到脂肪組織貯存，達

到降血脂的功效【93】。

另外，肝臟的 HMG-CoA reductase 亦是調控膽固醇代謝的主要酵素，降低 HMG-CoA reductase 的活性，則可降低膽固醇生合成。柚皮苷 (naringin) 可以藉由降低紐西蘭大白兔和大鼠肝臟 HMG-CoA reductase 的活性，降低血清和肝臟中膽固醇的含量【117,127】。針對綠原酸是否可藉由以上機制或其他機制達到降血脂的功能，則有待進一步探討。

### 第三節 綠原酸和 probucol 的抗氧化作用

在進行動物試驗前，本研究先以體外試驗來測量綠原酸與 probucol 的抗氧化能力。由於研究 oxLDL 在動脈粥狀硬化扮演著重要的角色，因此本試驗以 CuSO<sub>4</sub> 誘發 LDL 氧化的方式，觀察綠原酸與 probucol 抑制 LDL 氧化的情形，並計算出 IC<sub>50</sub> 的濃度，濃度越低代表抗 LDL 氧化能力越強。先前研究用同樣的方法測定一些純化物 (pure compounds) 與香桃木葉 (*Myrtus communis* L) 中黃酮醇糖苷化合物 (flavonol glycosides) 的抗氧化力，發現純化物的抗氧化力程度，如下：

3,5-di-O-galloyl-quinic acid > 芸香苷 (rutin) > 楊梅苷 (myricitrin) > 沒食子酸 (gallic acid)；然而，無論是酒精萃取物或水與酒精共同萃取物的香桃木葉黃酮醇糖苷化合物如：quercetin glycosides、myricitrin

glycosides、galloyl-quinic derivatives，於低劑量（0.001~1.23  $\mu\text{M}$ ）就可達到抑制 50 % LDL 氧化的濃度，此篇作者推測芸香苷因為其結構含有 catecholic ring-B，所以比楊梅苷的 pyrogallolic group 更具有抗氧化活性；而 quercetin glycosides 可能因為擁有 catecholic ring-B，其抑制 LDL 氧化的情形也比 myricitrin glycosides 還有效【128】。同樣的，Neudorffer et al.(2004)的研究發現，4-氫氧基桂皮酸乙酯衍生物(4-hydroxycinnamic ethyl ester derivatives)，大部分的 4-氫氧基桂皮酸乙酯衍生物約在 2~15 M 就可達到抑制 50 % LDL 氧化的濃度【129】；若與本篇研究綠原酸濃度 7.9  $\mu\text{M}$  比較，有較高  $\text{IC}_{50}$  的濃度之原因，為此試驗所使用的 LDL 濃度是本研究的 8 倍，所以達到抑制 LDL 氧化 50 % 的濃度也相對提高。

在 TEAC 的部份，先前研究發現，加熱或未加熱的胡桃萃取物之 TEAC 為 1.1~1.46，而其中純化出的多酚類如：鞣花酸 (ellagic acid) 加沒食子酸 (gallic acid) 一兩種酚酸、單元酚類化合物 (monomeric phenolics) 與兒茶素的 TEAC 分別為：3.12、2.61 和 2.51【130】，而本研究中由於 TEAC 實驗方法中，使用的 ABTS 自由基濃度較高，所以綠原酸和 probucol 的總抗氧化力分別為 1.7 與 2.38。研究也指出，4-氫氧基桂皮酸乙酯衍生物，依據衍生物的不同，去氫二聚體結構 (dehydrodimer) 的衍生物比單體 (monomer) 衍生物擁有較高的抗氧

化力；推測原因，可能是因為 4-氫氧基桂皮酸乙酯衍生物在捕捉 ABTS 自由基後，形成穩定共振結構的關係；另外，去氫二聚體衍生物的芳香環上擁有較多的電子，亦可提供較穩定的共振結構，所以 TEAC 之抗氧化力較高【129】。雖然，本實驗中的綠原酸也是氫氧基桂皮酸的衍生物，但不是乙酯類衍生物，綠原酸的化學結構較類似 catecholic ring-B，所以其抗氧化的特性可能與 catechin 較類似。

許多的多酚類被認為可以捕捉 DPPH 自由基。人體試驗裡，給予四週的松樹皮萃取物，發現可以降低血脂質與捕抓血漿 DPPH 自由基的能力；進一步分析松樹皮萃取物成分，發現萃取物中具有酚酸物質（桂皮酸（cinnamic acid）衍生物），但沒有類黃酮（flavonoids）物質【131】。在歐洲和亞洲飲食常用的紅糖（cane brown sugar），也具有抑制 DPPH 和 ABTS 自由基產生的能力，分析紅糖中的成分，發現酚酸的含量約佔總酚類的 50% 左右，為每公斤紅糖含 400~4000  $\mu\text{g}$  不等的酚類物質；且紅糖濃度 10 g/L，即可達到 48.4% 抑制 ABTS 自由基的產生【132】。研究發現，葡萄柚具有捕捉 DPPH 自由基的功能，紅葡萄柚比金黃葡萄有效，且葡萄柚皮比果肉效果更好；且發現無論是葡萄柚皮或果肉，其中的酚酸含量都比類黃酮多，包含：阿魏酸（ferulic acid）、芥子酸（sinapic acid）、香豆酸（*p*-coumaric acid）、咖啡酸（caffeic acid）【133】，以上這

些酚酸除芥子酸外，皆為綠原酸在吸收消化後的代謝產物，若葡萄柚中酚酸具有良好的抗氧化能力，則兔子涉入綠原酸後，綠原酸的代謝產物可能也具有良好的抗氧化能力。

本實驗結果也與先前酚類化合物的研究結果類似，推測綠原酸和其他的酚類物質一樣，不但具有抑制 LDL 氧化的作用，且可以捕捉 ABTS 和 DPPH 自由基而具有抗氧化能力。

#### 第四節 綠原酸對抗氧化指標：MDA 和 LDL 氧化遲滯期之影響

LDL 經過氧化修飾作用，進而形成氧化態的 LDL (oxLDL)。這種修飾的作用可能發生於血漿或血管內膜內之 LDL，oxLDL 會被巨噬細胞和內皮細胞上的接受器或傾倒夫接受器捕捉 (scavenger receptor)，辨認吞嚥而形成泡沫細胞【134】。因此，若能降低 LDL 的氧化作用，便能降低巨噬細胞的吞嚥作用而降低泡沫細胞的形成。

脂質過氧化作用之過程分為遲滯期、激增期 (propagation phase) 和平原期。在激增期所產生的共軛雙烯在波長 234nm 可測得，藉由測量共軛雙烯的生成，可以了解脂質過氧化作用激增期的情形，沿著激增期的曲線做切線而求得 lag time。之前研究顯示，Hamster 為模式的實驗中，發現無論是給予紅酒、去酒精紅酒 (酒精含量為原來的一半) 或葡萄汁，

都可以顯著地延長由銅離子所誘發 LDL 之 lag time，且葡萄汁的效果是紅酒或去酒精紅酒的兩倍【124】。給予高脂血症兔子 0.1% 維生素 E 和 0.075% 的 probucol 皆可以顯著地延長 LDL 的 lag time，約為高膽固醇組的 4.4 倍，而補充高劑量 (0.5%) 的 probucol 則可延長 7.5 倍以上的 lag time【122】；而本實驗中，給予 0.1% 的綠原酸和 probucol 分別可以延長遲滯期為控制組的 2.1 倍與 3.3 倍，且 probucol 的效果明顯比綠原酸好，此與體外試驗：抑制 LDL 氧化結果不一致的原因，有可能是因為攝入的綠原酸和 probucol 經過體內消化吸收後，產生的代謝產物之抗氧化能力不同造成的影響。若本實驗與 Fruebis et al. (1999) 相比較，其實驗飼養期為 81 天，且實驗飲食只單純以 0.5% 的膽固醇進行高血脂症的誘發，然而本實驗的實驗期為 56 天且誘發飲食劑量為 0.5% 的膽固醇加上 10% 的大豆油，推測可能因為本研究的實驗期較短且血脂質較高，所以綠原酸和 probucol 延緩 LDL 遲滯期的成效沒有先前實驗好【122】。亦有研究顯示，以高油高膽固醇飲食誘發紐西蘭大白兔高脂血症的模式，經過補充維生素 E、 $\beta$ -carotene、綠茶和紅茶十三週後，可以延長 LDL 的 lag time，但只有紅茶和維生素 E 達到顯著性差異；且紅茶和綠茶組血中維生素 E 和  $\beta$ -carotene 的濃度都較高。推測可能的原因有：第一，因為綠茶和紅茶中都含有 quercetin、catechin 等多酚類，這些水溶

性物質可能不會像脂溶性抗氧化物，如：維生素 E 直接融入

(incorporated) LDL 顆粒中，但可能會與過氧化物競爭結合 Apo B 而降低 LDL 的氧化修飾作用；第二，紅茶和綠茶可能增加了 LDL 內脂溶性抗氧化物的濃度【125】。與本實驗對照，綠原酸和富含於紅茶、綠茶與紅酒裡的物質都為多酚類，所以補充綠原酸可能藉由增加 LDL 內抗氧化劑的含量，也可能藉由與 LDL 的 Apo B 結合，而使 LDL 脂質過氧化的遲滯期增長。

脂質過氧化的過程最終會產生醛、酮類的終產物即丙二醛 (malondialdehyde, MDA)【65】。當 MDA 產量越多，就表示脂質過氧化作用越嚴重。另外，在觀察補充富含多酚類食品降低 Wistar 大鼠脂質過氧化情形的實驗中發現，每天補充 3 g/kg diet 的草莓粉、可可粉和李子粉，可以顯著下降高膽固醇血症大鼠肝臟和血清中 MDA 的濃度，其中以李子粉組下降最多。推測可能是因為草莓中富含花青素 (anthocyanidins) 和黃酮醇類 (flavonols) 物質，而可可粉亦富含黃烷醇 (flavanols) 和原花青素 (procyanidins)【135】；而令人感到興趣的是本研究所使用的綠原酸屬於氫氧基桂皮酸，與此實驗中李子粉所富含的特殊成分—氫氧基桂皮酸 (hydroxycinnamic acids)【135】相同，因此補充綠原酸和 probucol 可降低由高油高膽固醇飲食所誘發的血漿 MDA 濃度升高，分

別為 71.6 %與 57.7 %。

本實驗的結果也和先前許多酚類的研究有類似的結果【124,125,135】。因此，推測綠原酸降低 LDL 的氧化作用，可能有以下幾種機制：

(1) 降低脂質過氧化作用的產生；(2) 延緩 LDL 內  $\alpha$ -tocopherol 因氧化作用而消耗；(3) 再生已被氧化的  $\alpha$ -tocopherol【125】；(4) 螯合金屬離子，因而可降低血清脂質過氧化的情形【124】。

#### 第五節 綠原酸對血管中 Luminol-chemiluminescence (CL) 的影響

Luminol 是一種會發出冷光的化學物質，可和過氧化氫 ( $H_2O_2$ ) 結合。 $H_2O_2$  是超氧陰離子的代謝產物，而  $H_2O_2$  在過度金屬存在之下會經過 Fenton reaction 產生氫氧自由基 ( $OH\cdot$ )；所以，偵測  $H_2O_2$  可以代表活性氧屬 (reactive oxygen species, ROS) 的產生。利用超微弱化學發光儀 (chemiluminescence) 來測量 luminol 所放出的冷光，冷光愈強代表活性氧屬的產生愈多。

先前研究顯示，補充 50 mg/kg 維生素 E 和 1% probucol 可以顯著地降低胸主動脈 ROS 的產生，進而降低動脈粥狀硬化的發展【137】，此結果與本實驗類似，且本實驗使用 0.1 % probucol 發現可以顯著降低由高油高膽固醇飲食所誘發兔子胸主動脈 90 % ROS 的產生，且綠原酸和

probucol 抑制效果相當。Heinle et al. (2002) 利用同樣的方式，觀察兔子胸主動脈內膜 (intima) 之組成與氧化壓力的相關性，發現：動脈內的巨噬細胞、oxLDL 與 ROS 的量，隨著動脈粥狀硬化的發展而逐漸增加；高油高膽固醇兔子的胸主動脈 luminol-CL 的產量明顯比正常組高，且 ROS 主要是由巨噬細胞和平滑肌細胞所產生【136】

#### 第六節 綠原酸對 TNF- $\alpha$ 和 TNF- $\beta$ mRNA 表現量的影響

正常的血管內皮細胞擁有抗發炎、抗栓塞和調控血管舒張的特性，以維持血液正常流動。但在促動脈粥狀硬化因子 (proatherogenic factors) 如：TNF、IL-1 $\beta$ 、高血脂症存在時，內皮就會失去原有的特性而導致內皮功能不良。促動脈粥狀硬化因子中，除了會降低 NO $\cdot$  進而導致血管舒張異常外，也會活化促進發炎反應的轉錄因子如：NF- $\kappa$ B 的活化，而導致細胞激素如：TNF 和細胞黏附因子如：VCAM-1，以及趨化因子如：MCP-1 的大量產生【138】。所以，動脈粥狀硬化也被認為是一種「慢性的發炎性疾病」；若能抑制前發炎細胞激素如：TNF 的產生。則可以降低發炎反應，進而降低動脈粥狀硬化的發展【1】。

先前紐西蘭大白兔給予高油高膽固醇飲食，其血液中的 TNF- $\alpha$  明顯比正常組高，Zhao et al. (2005) 和 Madej et al. (1998) 認為循環血液中

的 TNF- $\alpha$  濃度和血清總膽固醇、LDL-C 具相關性，血清總膽固醇較高則 TNF- $\alpha$  濃度亦增加，所以高膽固醇血症會造成全身性的發炎性反應【139,140】；且先前研究顯示，給予 atorvastatin（一種降膽固醇藥），可以降低血清中 TNF- $\alpha$  的濃度，更可以抑制脂肪細胞和脂肪組織 TNF- $\alpha$  之 mRNA 的表現【139】。先前研究觀察 ApoE 缺乏且 TNF- $\alpha$  基因剔除小鼠（ApoE-Leiden TNF- $\alpha^{-/-}$  mice）和 ApoE 缺乏小鼠（ApoE-Leiden TNF- $\alpha^{+/+}$  mice）攝取誘發動脈粥狀硬化的飲食後，TNF- $\alpha$  基因剔除的 ApoE 缺乏小鼠可以顯著地下降動脈粥狀硬化損傷約 30%【26】。另一研究顯示，TNF- $\beta$  基因缺乏小鼠（TNF- $\beta^{-/-}$  mice）相較於野生型小鼠（wild-type），TNF- $\beta$  基因剔除小鼠可以下降約 62% 的動脈粥狀硬化損傷，但 TNF- $\alpha$  基因剔除小鼠（TNF- $\alpha^{-/-}$  mice）降低動脈粥狀硬化損傷的情形並沒有達到顯著性差異【100】。造成結果不一致的原因，可能是因為實驗使用的小鼠種類不同如：ApoE 基因缺乏，以及不同的飲食劑量與實驗期所造成的影響。但可以確定的是，無論是缺乏 TNF- $\alpha$  基因或 TNF- $\beta$  基因都可以降低動脈粥狀硬化的產生【141】，推測綠原酸可能是藉由降低 TNF- $\alpha$  或 TNF- $\beta$  基因表現，而達到降低動脈粥狀硬化的發展。

## 第七節 綠原酸對血管黏附因子 (VCAM-1) 和單核球趨化因子

### (MCP-1) mRNA 表現量的影響

高血脂症會引發發炎反應，而導致初期動脈粥狀硬化的形成【139,140】。此時，泡沫細胞會分泌細胞激素如：IL-1、TNF- $\alpha$  以及自由基去刺激血管內皮細胞產生血管黏附因子如：VCAM-1【2】，而會吸引循環血液中的單核球黏附到血管內皮上；而且內皮細胞也會分泌 MCP-1，對黏附在血管內皮的單核球產生趨化作用，進而移位至血管壁內，單核球進一步會分化形成巨噬細胞；因此，「巨噬細胞源源不絕進入血管壁，且繼續吞噬氧化 LDL」的這個過程，便導致動脈粥狀硬化初期脂肪條的形成。所以若能抑制血管黏附因子和單核球趨化因子的產生，則可以抑制動脈粥狀硬化初期的發展【116】。

先前研究顯示，給予高血脂症紐西蘭大白兔八週的維生素 A 衍生物—crocetin，可藉由降低轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的活化，而降低胸主動脈 VCAM-1 的表現【142】；另一研究顯示，補充 0.1% 的維生素 E 和 0.075% 與 0.5% 的 probucol 都可以顯著地下降—動脈弓 VCAM-1 的 mRNA 和蛋白質表現【122】；且柑橘類水果中的類黃酮—柚皮苷 (naringin) 和柚皮素 (naringenin)，也可以抑制 VCAM-1 和 MCP-1 的表現【117】；此

與本研究中觀察到，綠原酸可以顯著地降低紐西蘭白兔主動脈 VCAM-1 和 MCP-1 的 mRNA 表現結果一致；然而在活體試驗中，綠原酸是否能藉由降低轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的活化，而達到抑制 VCAM-1 和 MCP-1 的表現，則需要再進一步的探討。

#### 第八節 綠原酸對兔子主動脈弓形態學改變之影響

先前研究顯示高血脂症紐西蘭白兔，給予八週的維生素 A 衍生物—crocetin，除了降低主動脈 VCAM-1 的表現和 NF- $\kappa$ B 的活化外，且由 HE 血管染色切片圖發現，高油組的動脈弓明顯有動脈粥狀硬化斑塊的沉積，而給予 crocetin 的組別，則明顯降低斑塊的形成【142】。Ling et al. (2001) 同樣以 0.5 % (w/w) 高膽固醇飲食誘發紐西蘭大白兔高血脂症，發現補充十週的紫米 (black rice) 或紅米 (red rice)，可以降低 50 % 動脈粥狀硬化斑塊的產生，推測是因為顏色米 (color rice) 中含有維生素 E 的關係【143】；且另一篇研究證實，降低 TNF- $\alpha$  可以降低 30 % 動脈粥狀硬化損傷的產生【26】。且柑橘類水果中的類黃酮—柚皮苷 (naringin) 和柚皮素 (naringenin)，因為能抑制 VCAM-1 和 MCP-1 的表現而降低單核球黏附到內皮細胞，也降低胸主動脈巨噬細胞的累積，進而降低動脈粥狀硬化斑塊的沉積【117】。所以由本研究圖 4-16、圖 4-17 以及圖

4-18 的內膜增後量化圖發現，我們可以更直接看到，綠原酸可以顯著地降低內膜增厚約 90%，其效果和 probucol 差不多，所以綠原酸可能也和其他抗氧化劑一樣，透過降低氧化壓力，進而降低 TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$  的產生而抑制 VCAM-1 和 MCP-1 的表現，達到降低血管內膜增厚與脂肪條堆積的效果。

### 第九節 以補充 probucol 作為本研究正控制組之原因

降血脂藥 probucol 在 1970s 年代早期，以具有降低血膽固醇之功效問世。早期，在家族性高血脂症的患者身上進行機制性研究，發現 probucol 並非調控細胞的 LDL receptor 而可能有其他的調控機轉【86】。後來的研究證實，probucol 可以降低肝臟 HMG CoA reductase 與血漿膽固醇酯轉移蛋白（CETP）的活性【93,126】，進而增加血漿膽固醇酯和三酸甘油酯運輸至週邊組織，而達到降血脂的效果【93】。

有研究發現 probucol 不但會降血脂，也可以抑制動脈粥狀硬化斑塊的產生【137】。Carew et al. (1987) 給予 Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits (WHHL rabbits) lovastatin 和 probucol 兩種降血脂藥，發現 probucol 降低動脈粥狀硬化損傷產生的效果較 lovastatin 佳【144】。

愈來愈多的研究指出抗氧化物如：維生素 C、E，藉由其抗氧化作

用，如：降低 LDL 的氧化作用，而可以降低動脈粥狀硬化的發展【145】。

所以，針對 probucol 是否具有抗氧化作用方面的相關研究也漸漸展開。

可能的機制如下：

- (1) Probucol 的結構具有捕捉自由基的能力：BHT (butylated hydroxytoluene) 是一種親脂性且具有抗氧化活性的抗氧化劑；而 probucol 的結構是藉由 sulfur-carbon-sulfur 的方式連接兩個 BHT。Probucol 可以捕捉微粒體內過氧自由基 (peroxyl radical)，其抗氧化力可和  $\alpha$ -tocopherol 相提並論【146】。因為 probucol 可以透過兩個 phenolic group 的結構，捕捉過氧化自由基，而達到抑制 LDL 脂質過氧化作用的發生【137】。
- (2) Probucol 與體內其他抗氧化劑的協同作用：體內水溶性的抗氧化劑如：抗壞血酸 (ascorbate)，可藉由還原脂溶性抗氧化劑如： $\alpha$ -tocopherol，而對預防 LDL 的過氧化作用扮演重要角色【122】。研究也指出，給予 probucol 的 WHHL 兔子血中 tocopherol 的濃度較控制組高，推測 probucol 可和其他的抗氧化劑，以協同作用的方式作用在 LDL，進而調控 LDL 的氧化作用【122】。細胞試驗發現，probucol 抑制由硫酸銅誘

發的 LDL 氧化之效果比維生素 E 好 5-6 倍【85,147】。

- (3) 抑制前發炎細胞激素產生：前發炎細胞激素在動脈粥狀硬化發展扮演重要角色。probucol 可以抑制巨噬細胞分泌發炎因子 IL-1【92】，且同時降低體內氧化壓力，而具有抑制動脈粥狀硬化發展的功效【85】。
- (4) Probucol 影響 LDL 的結構：McLean 和 Hagaman (1989) 認為 probucol 可以保護 LDL 表面的完整性，避免 LDL 的 lysine 基團被氧化修飾，所以可以降低 LDL 和巨噬細胞上清道夫接受器的親和性，而降低 LDL 被巨噬細胞所吞噬形成泡沫細胞【148】。

另外，probucol 也可以藉由增強泡沫細胞的移除作用，降低胸主動脈膽固醇的沉積作用，也具有干擾巨噬細胞吞噬泡沫細胞的能力。綜合以上，包含降血脂、抑制損傷產生、抗氧化作用【145】和降低前發炎細胞激素產生等種種因素，證明 probucol 可以有效降低動脈粥狀硬化的發展【85】。因此本篇研究以 probucol 作為正控制組，來與綠原酸補充組作比較。

## 第十節 綠原酸的吸收、消化代謝與其衍生物之探討

飲食中大部分的酚酸大多和醣類、奎寧酸...等物質，以酯化的形式結合存在。由於人類飲食中富含綠原酸，先前研究指出蘋果中含有 62~395 mg/kg，西洋梨含有 60~280 mg/kg【154】，藍莓含有 0.5~2 g/kg 覆盆莓酒含有 50 mg/L【155】，甘藍菜中含有 6~120 mg/kg【158】，另外在咖啡中含有 500~800 mg/L【152】，另外在番茄、萱草、紅茶中也有偵測到，但並沒有相關定量的研究，所以綠原酸的生物利用性也漸漸被探討【149】。

先前的研究指出，給予綠原酸飲食後，綠原酸會水解成咖啡酸和奎寧酸，因此人類或大鼠的血漿中會增加咖啡酸的濃度，這表示綠原酸會被腸胃道有效吸收至體內【149,150】。先前研究顯示，給予大鼠 0.25% (w/w) 的綠原酸飲食，並針對綠原酸在腸道的穩定性、吸收部位，以及吸收形式進行探討。結果顯示，完整形式（未被消化液分解）的綠原酸在胃部被吸收；進食一個半小時後，綠原酸和咖啡酸就可以在血漿和尿液中測得，顯示綠原酸在九十分鐘內就可以被腸胃道消化吸收【151】。給予受試者每天 2.8 mmol 的綠原酸，24 小時以迴腸造口術收集迴腸分泌液，測出綠原酸的吸收率為 33%；並將綠原酸通過胃液、

十二指腸液、迴腸液來培養，發覺綠原酸不會被以上的胃腸液所分解；且在尿液中測到的綠原酸都非常微量或測不到，顯示綠原酸能以完整的化學結構形式被吸收【73】。綠原酸除了可以穩定通過 pH2 的胃酸進入小腸外，剩餘的綠原酸會被分布於小腸黏液細胞和腸腔內的酯解酶（esterase）分解【152】，有 15-32 % 的綠原酸在盲腸會被微生物菌叢水解成芳香族酸（aromatic acid）【151】或被大腸的微生物菌叢分解。但目前並沒有研究特別針對兔子的吸收進行探討。兔子實驗劑量約為人類劑量的三倍(2.9 倍)，所以將本實驗兔子攝食綠原酸的劑量 40 mg/kg bw (body weight)換算人類攝食劑量為 13 mg/kg bw，則體重 50kg 的人每日攝取約 650 mg 綠原酸可能可以達到降血脂與預防動脈粥狀硬化產生的效果。

綠原酸被分解後的芳香族酸，如：咖啡酸、阿魏酸、香豆素【152】等被認為有其特殊的功能，以下針對綠原酸的代謝衍生物進行說明。

#### < 一 > 咖啡酸 (caffeic acid)

咖啡酸 (3,4-dihydroxycinnamic acid; caffeic acid) 是氫氧基桂皮酸的一員，是綠原酸分解後的產物。咖啡酸廣泛的存在於蔬果中如：梨 (pear)【153】、葡萄柚【133】、葡萄【154】、萵苣 (lettuce)、菊萵苣

(endive)、菊苣 (chicory)【155】、鳳梨、奇異果【156】與番茄【157】都有。其中，在萵苣、菊萵苣、菊苣中之咖啡酸會分別和奎寧酸、蘋果酸 (malic acid) 與酒石酸 (tartaric acid) 結合，以結合形式存在蔬菜中，含量分別為：50~120 mg/kg、200~500 mg/kg、20 mg/kg【158】；葡萄汁所含的咖啡酸約為 10~430 mg/L【154】。體外試驗中，認為咖啡酸是具有抗氧化性的物質，可以抑制 LDL 的氧化作用【159】咖啡酸可以透過腸道吸收作用而存在血液中，在體外試驗裡可以抑制 LDL 的氧化作用，且可能具有預防心血管疾病的功能【73,149】。咖啡酸也具有調控膽汁分泌、血小板凝集、血管通透性的能力，且可與  $\alpha$ -腎上腺素接受器 ( $\alpha$ -adrenoreceptor) 結合。因為咖啡酸含有兒茶酚 (catechol group) 的結構，可以藉由提供氫氧基而抑制 5-脂氧酶的活性，進而間接調控白三烯素 (Leukotriene) 的生合成。因此，咖啡酸具有抑制脂氧酶酵素活性、血小板凝集的能力，所以可能可以用來做為對抗過敏與發炎相關疾病的藥物成分之一【160】。

## < 二 > 阿魏酸 (ferulic acid)

阿魏酸也是綠原酸分解後的下流代謝產物，在葡萄柚皮、葡萄柚果肉【133】、蕃茄【157】、柳橙、葡萄汁【154】、萼菜 (leeks)、甘藍菜

(cabbage)、芽甘藍(Brussels sprouts)、菠菜(spinach)【158】、燕麥(oat)、大麥麩(barley bran)和黑麥(Rye (*Secale cereale* L.))中都可發現【155,161】。韮菜含量較低，阿魏酸含量僅 12 mg/kg；而在菠菜中，阿魏酸會和花青素(anthocyanidins)以複合物的型態存在，含量約 15 mg/kg【158】。柳橙汁的含量大約介於 50~160 mg/L【155】，番茄中的含量為 20~70 mg/kg【157】；其中，以大麥麩 50 mg/kg 和燕麥 200~300 mg/kg 含量最多【161,155】。飲食中的抗氧化物可以保護人體，避免人類因為體內自由基過高而產生的傷害，進而導致疾病發生；而攝取黑麥可以抑制大鼠攝護腺癌的生成。黑麥中最多的酚酸就是阿魏酸，含量約為 1000 µg/g【162】。阿魏酸具有抑制 LDL 的氧化作用，可能是因為其捕捉自由基後，會形成穩定的共振結構存在，所以可以抑制脂質過氧化作用的連鎖反應【163】。

### < 三 >香豆素 (coumaric acid)

香豆素 (coumaric acid) 亦是綠原酸分解後的下流代謝產物，在蘋果、梨 (pear)【153】、葡萄柚【133】、柳橙【155】、葡萄【154】、鳳梨、奇異果【156】、甘藍菜、菠菜【158】、蕃茄【157,155】中都可以發現。蘋果中的香豆素會和奎寧酸結合，以 *p*-coumaroylquinic acid 的形式存

在，含量為 40 mg/kg【154】；而蕃茄中的含量大約為 15~50 mg/kg【157】；在葡萄【154】和菠菜中，都是以與酒石酸結合的型態存在，在菠菜中的含量較多，可達 200 mg/kg，與蘋果酸結合的型態則有 25~30 mg/kg【158】。

血小板的凝集會增加動脈粥狀硬化的發展，而較高 cAMP 可以抑制血小板的凝集【164】。研究指出，香豆素與多巴胺 (dopamine) 結合所形成的 N-coumaroyldopamine，可以透過  $\beta$ -腎上腺素接受器 ( $\beta$ -adrenoreceptor) 提高血小板 cAMP 的產量，進而抑制血小板的凝集【164,165】。另外， $\beta$ -腎上腺素接受器 ( $\beta$ -adrenoreceptor) 會參與人體生理許多的生物作用，如：心肌的收縮、心跳調控。若阻斷腎上腺素與  $\beta$ -adrenoreceptor 的結合，可以減緩心跳及放鬆心肌。因為 N-coumaroyldopamine 結構很類似  $\beta$ -腎上腺素接受器的拮抗物，所以 N-coumaroyldopamine 和  $\beta$ -腎上腺素接受器結合後，是否具有進一步調整心肌收縮和心跳功能，則需未來深入研究【165】。

## 第十一節 未來研究發展

本研究針對綠原酸對高血脂症兔子氧化壓力與發炎相關基因之影響進行探討，亦觀察到綠原酸具有降血脂的效果，尤以降低血清中三酸甘油酯最為顯著，未來可針對綠原酸如何降低血脂之機制進行探討：

(1) 是否可以藉由降低肝臟 HMG CoA reductase 活性而達到抑制膽固醇合成。(2) 是否可提高 HDL 上 LCAT 的活性，透過 LCAT 而將週邊組織如：平滑肌細胞上的游離膽固醇酯化成膽固醇酯，藉由 HDL 攜帶至肝臟而降低血清膽固醇的濃度。(3) 是否可提升肝臟 LDL receptor 蛋白質表現與活性增加，促進血漿中脂蛋白如：VLDL、LDL 與其相結合而降低血漿 LDL-C 與總膽固醇的濃度。

攝入的綠原酸除了部分可經過胃直接吸收，透過消化吸收後亦會形成代謝產物如：咖啡酸、阿魏酸、香豆素等。而綠原酸在體內所呈現的抗氧化力究竟是何種代謝產物造成的，則可能可以一方面藉由體外試驗測量咖啡酸、阿魏酸、香豆素的抗氧化能力，或以 HPLC 分析體內代謝產物含量，則可能可以得知體內最具影響力的代謝產物；另一方面，亦可將不同代謝產物進行動物實驗，以組織切片的方式觀察動脈粥狀硬化情形。

在發炎反應之細胞訊息傳遞部份，若能針對血管進行萃取核蛋白，測量轉錄因子如：NF- $\kappa$ B 或 AP-1，以及其上游調控激酶 IKK 活性，則可了解綠原酸是否可藉由發炎反應轉錄因子之調控，而達到降低發炎相關基因的表現。並可依本研究所測量之發炎相關基因進行西方點墨法，觀察其蛋白質表現量。如此，便可深入了解綠原酸調控降血脂、發炎反應之作用機轉。



## 第七章 結論

由本研究結果證實：

- (1) 體外試驗顯示，綠原酸捕捉 DPPH 自由基以及抑制 LDL 氧化作用較 probucol 佳，綠原酸的總抗氧化能力與 probucol 相當。
- (2) 餵食 8 週高油高膽固醇飲食會引起兔子高脂血症，增加血清 MDA 與血管 luminol-CL 的產量，與縮短 LDL 的 lag time，並且會誘發胸主動脈 TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、VCAM-1 和 MCP-1 之 mRNA 的過度表現，且導致動脈弓之內膜增厚與脂肪條沉積。
- (3) 額外補充 0.1 % 的綠原酸可以顯著地降低血清總膽固醇、LDL-C 與三酸甘油酯的濃度，降低血清 MDA 與血管 luminol-CL 的產量，以及延長 LDL 的 lag time，並且會降低胸主動脈 TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、VCAM-1 和 MCP-1 之 mRNA 的表現，且降低動脈弓之內膜增厚與脂肪條沉積的情形。

綜合以上結果，綠原酸可能是藉由降低高脂血症兔子血清脂質、氧化壓力，以及降低胸主動脈 TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$  之 mRNA 表現，進而降低胸主動脈 VCAM-1 與 MCP-1 之 mRNA 表現，因此降低氧化壓力導致的發炎反應，達到降低初期動脈粥狀硬化的發展。

## 第八章 參考文獻

- 【1】Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241
- 【2】Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126
- 【3】Orlandi A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, and Spagnoli. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: Implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006;in press
- 【4】Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, and Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997;100:2680-2690
- 【5】Merhi-Soussi F, Kwak BR, Magne D, Chadjichristos C, Berti M, Pelli G, James RW, Mach F, and Gabay C. Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2005;66:583-593
- 【6】Dong C, Yoon W, and Goldschmidt-Clermont PJ. DNA methylation and atherosclerosis. *J Nutr*. 2002;132:2406S-2409S
- 【7】Rizzo M and Berneis K. Lipid triad or atherogenic lipoprotein

phenotype: a role in cardiovascular prevention? J Atheroscler Thromb. 2005;12:237-239

【8】Rizzo M and Beneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular prevention. Eur J Intern Med. 2006;17:77-80

【9】Berneis K and Rizzo M. LDL size: does it matter? Swiss Med Wkly. 2004;134:720-724

【10】Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Mussel DP, and da Cruz IB. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. Genet Mol Res. 2005;4:691-703

【11】Zhao GF, Seng JJ, Zhang H, and She MP. Effects of oxidized low density lipoprotein on the growth of human artery smooth muscle cells. Chin Med J Engl. 2005;118:1973-1978.

【12】Berliner JA and Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherosclerosis. Free Radic Biol Med. 1996;20:707-727

【13】Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D, Suh J, Frei B, Mudge GH, Selwyn AP, and Ganz P. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: A randomized trial. Lancet. 2000;359:1108-1113

【14】Chen CC, Liu LK, Hsu JD, Huang HP, Yang MY, and Wang CJ. *Mulberry* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Food Chemistry. 2005;91:601-607

【15】 Sands WA and Palmer TM. Adenosine receptors and the control of endothelial cell function in inflammatory disease. *Immunol Lett.* 2005; 101:1-11

【16】 Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, and Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989;321:1196-1197

【17】 Ross R and Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med.* 1976;295:369-377

【18】 De Backer TL, De Buyzere M, Segers P, Carlier S, De Sutter J, Van de Wiele C, and De Backer G. The role of whole blood viscosity in premature coronary artery disease in women. *Atherosclerosis.* 2002;165:367-373.

【19】 Järvisalo MJ, Lehtimäki T, and Raitakari OT. Determinants of arterial nitrate-mediated dilatation in children: role of oxidized low-density lipoprotein, endothelial function, and carotid intima-media thickness. *Circulation.* 2004;109:2885-2889

【20】 Jialal I, Devaraj S, and Venugopal SK. C-reactive protein: risk marker or mediator in atherosclerosis? *Hypertension.* 2004;44:6-11

【21】 Verrier ED and Boyle EM Jr. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:915-922

【22】 Blann A, Morris J, and McCollum C. Soluble L-selectin in peripheral arterial disease: relationship with soluble E-selectin and soluble P-selectin.

Atherosclerosis. 1996;126:227-231

**【23】** Tabata T, Mine S, Kawahara C, Okada Y, and Tanaka Y. Monocyte chemoattractant protein-1 induces scavenger receptor expression and monocyte differentiation into foam cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305:380-385

**【24】** Libby P. What happens inside an atherosclerotic plaque? *Int Congr Ser.* 2004;1262:253-256

**【25】** Raines EW, Koyama H, and Carragher NO. The extracellular matrix dynamically regulates smooth muscle cell responsiveness to PDGF. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;902:39-52

**【26】** Boesten LS, Zadelaar AS, van Nieuwkoop A, Gijbels MJ, de Winther MP, Havekes LM, van Vlijmen BJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes atherosclerotic lesion progression in APOE\*3-Leiden transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 2005;66:179-185

**【27】** Houtkamp MA, van Der Wal AC, de Boer OJ, van Der Loos CM, de Boer PA, Moorman AF, and Becker AE. Interleukin-15 expression in atherosclerotic plaques: an alternative pathway for T-cell activation in atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1208-1213

**【28】** Shannon MF, Himes SR and Coles LS. GM-CSF and IL-2 share common control mechanisms in response to costimulatory signals in T cells. *J Leukoc Biol.* 1995;57:767-773

**【29】** Yanni AE, Yatzidis HA, Kavantzias NG, Agapitos EV, Perrea DN, and

Karayannacos PE. Dietary L-aspartate and L-glutamate inhibit fatty streak initiation in cholesterol-fed rabbit. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2003;13:80-86

【30】 Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL, and Silverstein RL. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood.* 1996;87:2020-2028

【31】 Vohra RS, Murphy JE, Walker JH, Ponnambalam S, and Homer-Vanniasinkam S. Atherosclerosis and the lectin-like oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor. *Trends Cardiovasc Med.* 2006;16:60-64

【32】 Dollery CM and Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res.* 2006;69:625-635

【33】 Harvey EJ and Ramji DP. Interferon- $\gamma$  and atherosclerosis: Pro- or anti-atherogenic? *Cardiovasc Res.* 2005;69:11-20

【34】 Rakesh K and Agrawal DK. Cytokines and growth factors involved in apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Int Immunopharmacol.* 2005;5:1487-1506

【35】 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-1695

【36】 Kowalska MA, Tuszynski GP, and Capuzzi DM. Plasma lipoproteins mediate platelet adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;172:113-118

【37】 Corash L, Andersen J, Poindexter BJ, and Schaefer EJ. Platelet function and survival in patients with severe hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*. 1981;1:443-448

【38】 Carvalho AC, Colman RW, Lees RS. Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med*. 1974;290:434-438

【39】 Zhao B. Role of lipoproteins in platelet activation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996;7:270-273

【40】 Rosenson RS. Antiatherothrombotic effects of nicotinic acid. *Atherosclerosis*. 2003;171:87-96

【41】 Thannickal VJ and Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:L1005-1028

【42】 Hool LC. Reactive oxygen species in cardiac signaling: from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33:146-151

【43】 Paky A, Michael JR, Burke-Wolin TM, Wolin MS, and Gurtner GH. Endogenous production of superoxide by rabbit lungs: effects of hypoxia or metabolic inhibitors. *J Appl Physiol*. 1993;74: 2868- 2874

【44】 vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, and Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 1998;273:18092-18098

【45】 Beyer W, Imlay J, and Fridovich I. Superoxide dismutases. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol.* 1991;40:221-253

【46】 Moreno JJ and Mitjavila MT. The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review). *J Nutr Biochem.* 2003;14:182-195

【47】 Oshino N, Chance B, Sies H, Bucher T. The role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. *Arch Biochem Biophys.* 1973; 154: 117-131

【48】 Antunes F and Cadenas E. Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* 2000;475:121-126

【49】 Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1430-1442

【50】 Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, and Mazur M. Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1-40

【51】 White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, et al. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:1044- 1048

【52】 Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, and Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:10045-10048

【 53 】 Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4:110-115

【 54 】 Schultz D and Harrison DG. Quest for fire: seeking the source of pathogenic oxygen radicals in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1412-1413

【 55 】 Mehta JL, Rasouli N, Sinha AK, and Molavi B. Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:794-803

【 56 】 Spiteller G. The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: A new theory on atherogenesis. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49:999-1013

【 57 】 Montine TJ and Morrow JD. Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2005;166:1283-1289

【 58 】 Tanriverdi H, Evrengul H, Kuru O, Tanriverdi S, Selecı D, Enlı Y, Kaftan HA, and Kilic M. Cigarette smoking induced oxidative stress may impair endothelial function and coronary blood flow in angiographically normal coronary arteries. *Circ J.* 2006;70:593-599

【 59 】 Elahi MM, and Matata BM. Free radicals in blood: evolving concepts in the mechanism of ischemic heart disease. *Arch Biochem Biophys* 2006;450:78-88

【 60 】 Jay D, Hitomi H, and Griending KK. Oxidative stress and diabetic

cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med.* 2006;40: 183-192

【61】 Conde de la Rosa L, Schoemaker MH, Vrenken TE, Buist-Homan M, Havinga R, Jansen PL, and Moshage H. Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. *J Hepatol.* 2006;44:918-929

【62】 Meyer JW and Schmitt ME. A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett.* 2000;21:1-4

【63】 Matata BM and Galiñanes M. Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa B DNA binding activity. *J Biol Chem.* 2002;277:2330-2335

【64】 Packer L and Catherine RE. Flavonoids in health and disease. 1998;10:253-257

【65】 Schwenke DC. Antioxidants and atherogenesis. *J Nutr Biochem.* 1998;9:424-445

【66】 Nakajima K, Nakano T, and Tanaka A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta.* 2006;367:36-47

【67】 Haberland ME, Fogelman AM, and Edwards PA. Specificity of receptor-mediated recognition of malondialdehyde-modified low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79:1712-1719

【68】 Jackson RL and Thomas CE. Lipid hydroperoxide involvement in copper-dependent and independent oxidation of low density lipoproteins. 1991;256:1182-1188

【69】 Stocker R and Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381-1478

【70】 Stavric B. Role of chemopreventers in human diet. *Clin Biochem.* 1994;27:319-332

【71】 Williamson G, Day AJ, Plumb GW, and Couteau D. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem Soc Trans.* 2000;28:16-22

【72】 Kaliora AC, Dedoussis GV and Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2006;187:1-17

【73】 Hynes MJ and O'Coinceanainn M. The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *J Inorg Biochem.* 2004;98:1457-1464

【74】 Olthof MR, Hollman PC, and Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr.* 2001;131:66-71

【75】 Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, and Katan MB. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr.* 2003;133:1806- 1814

【76】 Clifford MN, Wu W, and Kuhnert N. The chlorogenic acids of

*Hemerocallis*. Food Chemistry. 2006;95:574-578

【77】 de Sotillo DR, Hadley M, and Holm ET. Phenolics in aqueous potato peel extract: extraction, identification and degradation. J Food Sci 1994;59:649-651

【78】 de Sotillo DR, Hadley M, and Holm ET. Potato peel waste: stability and antioxidant activity of a freeze-dried extract. J Food Sci 1994;59:1031-1033

【79】 de Sotillo DR, Hadley M, and Wolf-Hall C. Potato peel extract a nonmutagenic antioxidant with potential antimicrobial activity. J Food Sci. 1998;63:907-910

【80】 Yoshimoto M, Yahara S, Okuno S, Islam MS, Ishiguro K, Yamakawa O. Antimutagenicity of mono-, di-, and tricaffeoylquinic acid derivatives isolated from sweetpotato (*Ipomoea batatas L.*) leaf. Biosci Biotechnol Biochem. 2002;66:2336-2341

【81】 Santos MD, Martins PR, Santos PA, Bortocan R, Iamamoto Y, and Lopes NP. Oxidative metabolism of 5-o-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), a bioactive natural product, by metalloporphyrin and rat liver mitochondria. Eur J Pharm Sci. 2005;26:26-70

【82】 Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qain Y, Castranova V, and Ding M. Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. J Biol Chem. 2005;280:27888-27895

【83】 Rodriguez de Sotillo DV and Hadley M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats. *J Nutr Biochem*. 2002;13:717-726

【84】 Rodriguez de Sotillo DV, Hadley M, and Sotillo JE. Insulin receptor exon 11<sup>+/-</sup> is expressed in Zucker (*fa/fa*) rats, and chlorogenic acid modifies their plasma insulin and liver protein and DNA. *J Nutr Biochem* 2006;17:63-71

【85】 Miceli N, Taviano MF, Giuffrida D, Trovato A, Tzakou O, and Galati EM. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth. *J Ethnopharmacol*. 2005;97:261-266

【86】 Kuzuya M and Kuzuya F. Probucol as an antioxidant and antiatherogenic drug. *Free Radic Biol Med*. 1993;14:66-67

【87】 Ferns GAA, Forster L, Stewart-Lee A, Nourooz-Zadeh J, and Ånggård EE. Probucol inhibits mononuclear cell adhesion to vascular endothelium in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis*. 1993;100:171-181

【88】 Witting PK, Wu BJ, Raftery M, Southwell-Keely P, and Stocker R. Probucol protects against hypochlorite-induced endothelial dysfunction: identification of a novel pathway of probucol oxidation to a biologically active intermediate. *J Biol Chem*. 2005;280:15612-15618

【89】 Hodis HN, Hashimoto S, Mack WJ, and Sevanian A. Probucol reduces oxysterol formation in hypertensive rabbits. *Hypertension*. 2000; 36:436-441

【90】 Choy K, Beck K, Png FY, Wu BJ, Leichtweis SB, Thomas SR, Hou JY,

Croft KD, Mori TA, and Stocker R. Processes involved in the site-specific effect of probucol on atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1684-1690

**【91】** Braun A, Zhang S, Miettinen HE, Ebrahim S, Holm TM, Vasile E, Post MJ, Yoerger DM, Picard MH, Krieger JL, Andrews NC, and Simons M. Probucol prevents early coronary heart disease and death in the high-density lipoprotein receptor SR-B1/apolipoprotein E double knockout mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:7283-7288

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

**【93】** Adlouni A, El Messal M, Saile R, Parra H, Fruchart J, and Ghalim N. Probucol promotes reverse cholesterol transport in heterozygous familial hypercholesterolemia. Effects on apolipoprotein AI-containing lipoprotein particles. *Atherosclerosis.* 2000;152:433-440

**【94】** Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O, and Amigo MC. Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2006;5:195-201

**【95】** Yla-Herttuala S. Oxidized LDL and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;874:134-137

**【96】** Ouaz F, Li M, and Beg AA. A critical role for the RelA subunit of

nuclear factor kappaB in regulation of multiple immune-response genes and in Fas-induced cell death. *J Exp Med.* 1999;189:999-1004

【97】 Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, and Jongeneel CV. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med.* 1990; 171:35-47

【98】 Kappor M, Nomiya T, Bruemmer D, Kojima F, and Crofford LJ. Growth factors and cytokines: emphasis on their role in wound healing and atherosclerosis. *Curr Anaesth Crit Care.* 2006;in press

【99】 Andreotti F, Porto I, Crea F, and Maseri A. Inflammatory gene polymorphisms and ischaemic heart disease: review of population association studies. *Heart.* 2002;87:107-112

【100】 Schreyer SA, Vick CM, and LeBoeuf RC. Loss of Lymphotoxin- $\alpha$  but Not Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Reduces Atherosclerosis in Mice. *J Biol Chem.* 2002;277:12364-12368

【101】 Porto I, Leone AM, Crea F, and Andreotti F. Inflammation, genetics, and ischemic heart disease: focus on the major histocompatibility complex (MHC) genes. *Cytokine.* 2005;29:187-196

【102】 Braun J, Marz W, Winkelmann BR, Donner H, Henning Usadel K, and Badenhop K. Tumour necrosis factor beta alleles and hyperinsulinaemia in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest.* 1998;28(7):538-542

【103】 Hong JH, Choi JH , Oh SR, Lee HK, Park JH, Lee KY, Kim JJ, Jeong TS, and Oh GT. Inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa*. FEBS Lett. 2001;495: 142-147.

【104】 Gearing AJ and Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. Immunol Today. 1993;14:506-512

【105】 Blankenberg S, Barbaux S and Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. Atherosclerosis. 2003;170:191-203.

【106】 Parissis JT, Venetsanou KF, Mentzikof DG, Kalantzi MV, Georgopoulou MV, Chrisopoulos N, and Karas SM. Plasma levels of soluble cellular adhesion molecules in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1. Eur J Intern Med. 2001;12:350-356

【107】 DeSouza CA, Dengel DR, Macko RF, Cox K, and Seals DR. Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. Am J Hypertens. 1997;10:1335-1341

【108】 Lupattelli G, Lombardini R, Schillaci G, Giuffetti G, Marchesi S, Siepi D, and Mannarina E. Flow-mediated vasoactivity and circulating adhesion molecules in hypertriglyceridemia : Association with small, dense LDL cholesterol particles. American Heart J. 2000;140:521-526

【109】 Price DT and Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. Am J Med. 1999;107:85-97

【110】 Wu JT and Wu LL. Linking inflammation and atherogenesis :

Soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. *Clinica Chimica Acta*. 2006;366:74-80

【111】 Foster CA. VCAM-1/ $\alpha$ 4-integrin adhesion pathway: Therapeutic target for allergic inflammatory disorder. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98:S270-277

【112】 Bobryshev YV. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*. 2006;37:208-222

【113】 Boisvert WA. Modulation of atherogenesis by chemokines. *TCM*. 2004;14:161-165

【114】 Ballantyne CM and Nambi V. Markers of inflammation and their clinical significance. *Atheroscler Suppl*. 2005;6:21-29

【115】 Dwarakanath RS, Sahar S, Reddy MA, Castanotto D, Rossi JJ, and Natarajan R. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by the oxidized lipid 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid, in vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappa B (NF $\kappa$ B). *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36:585-595

【116】 Pervin S, Singh R, Rosenfeld ME, Navab M, Chaudhuri G, and Nathan L. Estradiol suppresses MCP-1 expression in vivo implications for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1575-1582

【117】 Lee CH, Jeong TS, Choi YK, Hyun BH, Oh GT, Kim EH, Kim JR, Han JI, and Bok SH. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, narigin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1

in high cholesterol-fed rabbits. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;284:681-688

【118】 Buja LM, Kita T, Goldstein JL, Watanabe Y, and Brown MS. Atherosclerosis in the WHHL Rabbit: an animal model of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1983; 3:87-101

【119】 Lapenna D, Pierdomenico SD, Ciofani G, Giamberardino MA, and Cuccurullo F. Aortic glutathione metabolic status: time-dependent alterations in fat-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 2004; 173:19-25

【120】 Yu YM, Wu CH, Tseng YH, Tsai CE, and Chang WC. Antioxidative and hypolipidemic effects of barley leaf essence in a rabbit model of atherosclerosis. *Jpn J Pharmacol.* 2002; 89:142-148

【121】 Lee JS, Choi MS, Jeon SM, Jeong TS, Park YB, Lee MK, and Bok SH. Lipid-lowering and antioxidative activities of 3,4-di (OH)-cinnamate and 3,4-di (OH)-hydrocinnamate in cholesterol-fed rats. *Clin Chim Acta.* 2001; 314:221-229

【122】 Fruebis J, Silvestre M, Shelton D, Napoli C, and Palinski W. Inhibition of VCAM-1 expression in the arterial wall is shared by structurally different antioxidants that reduce early atherosclerosis in NZW rabbits. *J Lipid Res.* 1999; 40:1958-1966

【123】 Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:C7-12

【124】 Vinson JA, Teufel K, and Wu N. Red wine, dealcoholized red wine,

and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*. 2001;156:67-72

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

【126】 Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*. 1993;34:1255-1274

【127】 Lee SH, Park YB, Bae KH, Bok SH, Kwon YK, Lee ES, and Choi MS. Cholesterol-Lowering Activity of Naringenin via Inhibition of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase and Acyl Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase in Rats. *J Nutr*. 1999;129:1182-1185

【128】 Romani A, Coinu R, Carta S, Pinelli P, Galardi C, Vincieri FF, and Franconi F. Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. *Free Radic Res*. 2004;38:97-103

【129】 Neudörffer A, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Fleury MB, and Largeton M. 4-hydroxycinnamic ethyl ester derivatives and related dehydrodimers: Relationship between oxidation potential and protective effects against oxidation of low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem*. 2004;52:2084-2091

【130】 Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, and Steinberg FM. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL

oxidation. *J Nutr.* 2001;131:2837-2842

【131】 Mursu J, Voutilanen S, Nurmi T, Helleranta M, Rissanen TH, Nurmi A, Kaikkinen J, Porkkala-Sarataho E, Nyyssönen K, Virtanen JK, Salonen R, and Salonen JT. Polyphenol-rich phloem enhances the resistance of total serum lipids to oxidation in men. *J Agric Food Chem.* 2005;53:3017-3022

【132】 Payet B, Shum Cheong Sing A, and Smadja J. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: Determination of their polyphenolic and volatile constituents. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:10074-10079

【133】 Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Drzewiecki J, Jastrzebski Z, Tapia MS, Katrich E, and Trakhtenberg S. Red Star Ruby (Sunrise) and blond qualities of Jaffa grapefruits and their influence on plasma lipid levels and plasma antioxidant activity in rats fed with cholesterol-containing and cholesterol-free diets. *Life Sci.* 2005;77:2384-2397

【134】 Kaliora AC, Dedoussis GV, and Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2006; 187:1-17

【135】 Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, and Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B.*

2005;827:76-82

**【136】** Heinle H, Brehme U, Friedemann G, Frey JC, Wolf AT, Kelber O, Weiser D, Schmahl FW, Lang F, and Schneider W. Intimal plaque development and oxidative stress in cholesterol-induced atherosclerosis in New Zealand rabbits. *Acta Physiol Scand.* 2002;176:101-107: abstract

**【137】** Haklar G, Sirikci O, Ozer NK, and Yalcin AS. Measurement of reactive oxygen species by chemiluminescence in diet-induced atherosclerosis: protective roles of vitamin E and probucol on different radical species. *Int J Clin Lab Res.* 1998;28:122-126: abstract

**【138】** Tiong AY and Brieger D. Inflammation and coronary artery disease. *Am Heart J.* 2005;150:11-18

**【139】** Zhao SP, Wu ZH, Wu J, Hong SC, and Deng P. Effect of atorvastatin on tumor necrosis factor  $\alpha$  serum concentration and mRNA expression of adipose in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46: 185-189

**【140】** Madej A, Okopien B, Kowalski J, Zielinski M, Wysocki J, Szygula B, Kalina Z, and Herman ZS. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1998;36:345-359

**【141】** de Winther MP, Kanters E, Kraal G, and Hofker MH. Nuclear factor-kappaB signaling in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25: 904-914

【142】 Zheng S, Qian Z, Tang F, and Sheng L. Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Pharmacol.* 2005; 70:1192-1199

【143】 Ling WH, Cheng QX, Ma J and Wang T. Red and black rice decrease atherosclerotic plaque formation and increase antioxidant status in rabbits. *J Nutr.* 2001;131:1421-1426

【144】 Carew TE, Schwenke DC, and Steinberg D. Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84(21):7725-9

【145】 Schwenke DC and Behr SR. Vitamin E combined with selenium inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits independently of effects on plasma cholesterol concentrations. *Circ Res.* 1998;83:366-377

【146】 Kalyanaraman B, Darley-Usmar VM, Wood J, Joseph J, and Parthasarathy S. Synergistic interaction between the probucol phenoxyl radical and ascorbic acid in inhibiting the oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1992;267(10):6789-6795

【147】 Clevidence BA and Lehmann J. Alpha- and gamma-tocopherol levels in lipoproteins fractionated by affinity chromatography. *Lipids.*

1989;24(2):137-40.

**【148】** McLean LR and Hagaman KA. Effect of probucol on the physical properties of low-density lipoproteins oxidized by copper. *Biochemistry*. 1989;28(1):321-7:abstract

**【149】** Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, and Terao J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem*. 2000;48:5496-5500

**【150】** Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Remesy C, and Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr*. 2003;133:1853-1859

**【151】** Lafay S, Gil-Izquierdo A, Manach C, Morand C, Besson C, and Scalbert A. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rat. *J Nutr*. 2006;136:1192-1197

**【152】** Nardini M, Cirillo E, Natella F, and Scaccini C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J Agric Food Chem*. 2002;50:5735-5741

**【153】** Tanriöven D and Ekşi A. Phenolic compounds in pear juice from different cultivars. *Food Chemistry*. 2005;93:89-93

**【154】** Spanos GA and Wrolstad RE. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage. A review. 1992;40:1478-1487

**【155】** Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature,

occurrence and dietary burden. J Agric Food Chem. 1999;79:362-372

【156】 Dawes HM and Keene JB. Phenolic Composition of Kiwifruit Juice. J Agric Food Chem. 1999;47:2398-2403

【157】Malmberg AG and Theander O. Determination of chlorogenic acid in potato tubers. J Agric Food Chem. 1985;33: 549-551

【158】 Winter M and Herrmann K. Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. J Agric Food Chem. 1986;34:616-620

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

【160】 Camarasa J, Escubedo E, and Adzet T. Pharmacokinetics of caffeic acid in rats by high-performance liquid chromatography method. J Pharm Biomed Anal. 1988;6(5):503-510

【161】 Huang HM, Johanning GL, and O'Dell BL. Phenolic acid content of food plants and possible nutritional implications. J Agric Food Chem. 1986; 34:48-51

【162】Andreasen MF, Christensen LP, Meyer AS, and Hansen A. Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 Rye (*Secale cereale L.*) Varieties. J Agric Food Chem. 2000; 48:2837-2842

【163】 Adam A, Crespy V, Levrat-Verny MA, Leenhardt F, Leuillet M,

Demigne C, and Remesy C. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver rats. *J Nutr.* 2002;132:1962-1968

【164】Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, and Keen CL. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:30-35

【165】Park JB. N-Coumaroyldopamine and N-caffeoyldopamine increase cAMP via beta 2-adrenoceptors in myelocytic U937 cells. *FASEB J.* 2005;19:497-502

【166】Diaz M, Frei B, Vita JA, and Keaney JF Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med.* 1997;337:408-416

