

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

碩士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

National Taiwan University

Master Thesis

以體外 Caco-2 細胞模式系統探討龍眼花中

proanthocyanidin A2 及 epicatechin 之生物可利用率以

及其抗發炎與抗氧化效果

Transport and absorption of proanthocyanidin A2 and
epicatechin from longan flower in Caco-2 cell monolayer
model and the anti-inflammatory as well as antioxidant
effects

黃蔚婷

Wei-Ting Huang

指導教授：孫璐西 博士

Advisor: Lucy Sun Hwang, Ph. D.

中華民國九十八年七月

July, 2009

國立台灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

以體外 Caco-2 細胞模式系統探討龍眼花中

proanthocyanidin A2 及 epicatechin 之生物可利用率以及其抗發炎與

抗氧化效果

Transport and absorption of proanthocyanidin A2 and epicatechin from
longan flower in Caco-2 cell monolayer model and the anti-inflammatory
as well as antioxidant effects

本論文係 黃蔚婷君 (學號 R96641008) 在國立台灣大學食品科技研究所完成之碩士學位論文，於民國 98 年 7 月 13 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：



林志城 博士 元培科技大學生物技術研究所 教授兼所長



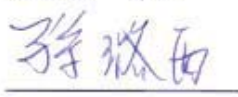
潘敏雄 博士 國立高雄海洋科技大學水產食品科學系 教授



蕭寧馨 博士 國立台灣大學微生物與生化學研究所 教授



何其儻 博士 國立台灣大學食品科技研究所 講座教授



孫璐西 博士 國立台灣大學食品科技研究所 教授 (本論文指導教授)

所長 _____ 葉安義 教授



摘要

許多研究發現多酚類物質的攝取能增加身體內抵抗氧化壓力的能力，而在眾多的多酚類物質中，原花青素及兒茶素被認為是較有效的自由基清除劑。本實驗室之前的研究發現，龍眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 花水萃出物及甲醇萃出物皆具有良好的抗氧化效果，其主要的活性物質為 proanthocyanidin A2 (PA2) 及 (-)-epicatechin (EC)。然而目前對於 PA2 之生物可利用率的研究仍十分有限。

本研究利用 Caco-2 細胞單層膜之模式系統探討 PA2 及 EC 在模擬人類腸道系統之吸收情形，藉以評估其生物可利用率。實驗中發現 PA2 相當不穩定，PA2 經細胞實驗後，以 HPLC 分析發現會產生 3 個不同滯留時間的波峰，以 MS 及 NMR 鑑定出除 PA2 外，另兩個波峰為 PA2 的同分異構物 epicatechin-(4 β →8:2 β →O→7)-*ent*-catechin, (PA4); epicatechin-(4 β →6;2 β →O→7)-*ent*-catechin, (PA5)。此外由於龍眼花中的 PA2 及 EC 並非單獨存在，故本實驗以不同莫爾比或重量比的 PA2:EC (2:1)、(1:1)、(1:2) 和 PA2 及 EC 在龍眼花中天然存在的比例 (1:3.3)，4 個混合組；以及 PA2、EC、PA4 及 PA5，4 個純物質組，進一步探討 PA2 及 EC 以及由 PA2 產生的同分異構物的生物可利用率、抗氧化及抗發炎功效。

Caco-2 細胞單層膜通透試驗結果發現 PA2 能被腸黏膜細胞所吸收進入 trans-well 下層，且隨著時間的增加，通透至下層的 PA2 量也就越趨增加；然而 EC 則完全不能通過細胞單層膜，這是由於 Caco-2 細胞上有對 EC 高專一性的外吐蛋白所致。另外，PA4 通透率 ($P_{app} = 11.45 \pm 5.02 \times 10^{-6}$ cm/s) 遠高於 PA2 ($P_{app} = 4.72 \pm 0.42 \times 10^{-6}$ cm/s) 為其 2.4 倍，推測是因為 PA4 的 catechin 部位促進了 PA4 的吸收。然而 PA5 ($P_{app} = 2.51 \pm 0.21 \times 10^{-6}$ cm/s) 卻沒有如同 PA4 有這麼好的通透率，其可能的原因仍須進一步探究。在各不同比例 PA2:EC 混合組中，發現 EC 對於 PA2 的吸收有干擾作用，造成 PA2 的通透率減少，各混合組 PA2 的通透率均約為 1.5×10^{-6} cm/s 左右，而 EC 仍無法被吸收。

在抗發炎實驗中則發現 PA2 與其同分異構物及 EC 均有抑制 lipopolysaccharide (LPS) 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 的效果，其中又以 PA2 的抑制效果最好；PA2 的同分異構物 (PA4 及 PA5) 則效果較差；另外，PA2:EC 混合組中的效果，則隨著 EC 所佔比例的增加而降低，推測可能的原因

在於 EC 較不能被細胞吸收所致。

在抗氧化試驗中發現，EC 於各種體外抗氧化試驗中均有較佳的效果；然而在細胞抗氧化試驗 (cell antioxidant activity assay) 則發現，PA2 的效果遠優於 EC，可能由於 EC 較不能被細胞吸收所致。



Abstract

Epidemiological studies have shown that dietary flavonoids may contribute to the prevention of oxidative damage in our body. Among different flavonoids, proanthocyanidins have received quite significant interest due to their observed health benefits. Previous study in our laboratory indicated that the water and methanol extracts of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flower had good antioxidative activity, and proanthocyanidin A2 (PA2) and (-)-epicatechin (EC) were found to be the major active compounds.

PA2 is a very unstable compound, it could easily be transformed to its isomers epicatechin-(4 β →8;2 β →O→7)-*ent*-catechin (PA4) and epicatechin-(4 β →6;2 β →O→7)- *ent*-catechin (PA5) in cell culture medium. PA2 and EC are present together in longan flower, so the objective of this study was to use the 4 pure compounds PA2, EC, PA4 and PA5 and also 4 compounds mixtures with different molar or weight ratios of PA2 and EC (2:1), (1:1), (1:2) and nature existence condition (1:3.3), to test their bioavailability, anti-inflammatory and anti-oxidant effects.

The Caco-2 cells model has been used to test the bioavailability. Caco-2 cells are derived from human adenocarcinoma and will differentiate into polarized enterocyte-like monolayers, acting similarly to human intestinal epithelial cells. Caco-2 cell monolayer system has provided a useful model to evaluate intestinal transepithelial transport and accumulation of pure phytochemicals. Results of this study showed that PA2 could be absorbed and transported to basolateral side with the apparent permeability coefficient (P_{app}) of $4.72 \pm 0.42 \times 10^{-6}$ cm/s but EC could not be transported to basolateral side. On the other hand, PA4 can be absorbed and transport to basolateral side with the $P_{app} = 11.45 \pm 5.02 \times 10^{-6}$ cm/s which was even higher than PA2, it may be due to the presence of catechin in the lower unit of the molecule. Nevertheless, PA5 ($P_{app} = 2.51 \pm 0.21 \times 10^{-6}$ cm/s) did not possess good permeability as PA4, the reason needs further investigation. As for the mixtures groups, it was found that the permeability of PA2 was interfered by the presence of EC and EC still could not be absorbed by Caco-2 cell.

Inhibition of LPS-induced NO production in RAW264.7 cell was used as anti-inflammatory assay model. PA2 showed good ability in inhibiting NO formation but PA2 isomers did not show as good effects. Compared to PA2, EC was found to be

less effective. As for the mixtures groups, the anti-inflammatory effect was better when EC was in lower ratio in the mixture.

In the chemical based *in vitro* antioxidant assays (DPPH, ORAC) EC had better antioxidant activity than PA2. However, in the cell based antioxidant assay (CAA), the effect of PA2 was far better than EC. The mixture group also has this similarity: when the EC was present more in the ratio, the chemical based *in vitro* antioxidant effect was better but the cell based antioxidant effect was worse. This may be because EC can not be absorbed by cells.



目錄

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
目錄.....	V
圖次.....	X
表次.....	XIII
壹、前言.....	1
貳、文獻整理.....	2
第一節、體外模式之生物可利用率.....	2
一、Caco-2 細胞簡介.....	2
二、Caco-2 cell 單層膜之模擬動物腸道試驗.....	4
三、Caco-2 cell 單層膜完整性及通透率.....	4
第二節、發炎.....	7
一、發炎簡介.....	7
二、巨噬細胞 (Macrophage).....	7
三、一氧化氮(NO).....	8
四、環氧化酵素 Cyclooxygenase (COX).....	10
五、脂多醣體 Lipopolysaccharide (LPS).....	10
第三節、氧化壓力.....	12
一、自由基.....	12
二、氧化壓力的主要來源.....	14
三、氧化壓力的測定.....	15
四、抗氧化物質.....	17
第四節、材料介紹.....	19
一、龍眼花.....	19
二、原花青素(Proanthocyanidins).....	21
三、兒茶素.....	22

參、研究目的與實驗架構.....	25
第一節、研究目的	25
第二節、實驗架構	26
肆、材料與方法.....	27
第一節、實驗材料與儀器設備	27
一、實驗材料.....	27
二、實驗細胞株.....	27
三、化學藥品與試劑.....	27
(一)、化學藥品	27
(二)、溶劑.....	29
(三)、層析材料.....	29
四、細胞培養溶液.....	30
五、西方墨點法.....	30
六、儀器設備.....	31
(一)、一般儀器設備	31
(二)、化學分析儀器設備.....	31
(三)、細胞實驗儀器設備.....	32
(四)、實驗耗材.....	33
七、實驗各種溶液配方.....	33
第二節、實驗方法	37
一、Proanthocyanidin A2 及其 isomer 之分離純化.....	37
(一) 龍眼花 80%丙酮萃取物之製備.....	37
(二) 龍眼花 80%丙酮萃取物之溶劑區分萃取.....	37
(三) Amberlite XAD-7 resin 管柱層析	37
(四) Sephadex LH-20 管柱層析.....	38
(五) Proanthocyanidin A2 同分異構物之純化.....	39
(六) 高效能液相層析儀 (HPLC) 分析條件	39
(七) 質譜分析	40
二、Proanthocyanidin A2 及 epicatechin 之穩定性分析	40

(一) 樣品配製	40
(二) 於細胞通透試驗環境中樣品之穩定性分析	40
(三) 於細胞抗發炎試驗環境中 PA2 之穩定性分析	41
(四) 於細胞抗氧化試驗環境中 PA2 之穩定性分析	41
三、以 CACO-2 細胞模式探討通透率及吸收率	41
(一) 細胞培養	41
(二) 細胞繼代培養	41
(三) Transwell insert 培養	42
(四) 單層細胞膜完整性測試	42
(五) Caco-2 細胞單層膜通透率試驗	42
(六) 各樣品經 Caco-2 細胞單層通透試驗後之分佈	43
四、以 RAW 264.7 探討樣品之抗發炎效果	44
(一) 化學 NO (Nitric oxide) 整合能力測定	44
(二) 樣品抑制 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞 NO 生成測定	44
(三) iNOS、COX-2 蛋白質表現分析	46
五、抗氧化實驗	48
(一) 抑制銅離子誘導人類 LDL 氧化反應試驗	48
(二) 清除 DPPH 自由基活性測定	49
(三) 氧自由基吸收能力之測驗 (Oxygen radical absorbance capacity, ORAC)	50
(四) 細胞抗氧化能力測定 (Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay)	50
第三節、統計分析	51
伍、結果與討論	53
一、Proanthocyanidin A2 及其 isomer 之分離純化	53
(一) 龍眼花 80% 丙酮萃取物	53
(二) 龍眼花 80% 丙酮萃取物之溶劑區分萃取	53
(三) 龍眼花丙酮粗萃物乙酸乙酯層之 amberlite XAD-7 resin 管柱層析	53
(四) 龍眼花 LF-A-EA-XADII 之 Sephadex LH-20 管柱層析	54
(五) Proanthocyanidin A2 同分異構物之純化	57

二、Proanthocyanidin A2 及 Epicatechin 之穩定性分析.....	63
(一) PA2 於細胞單層膜通透試驗之穩定性分析.....	63
(二) PA2 於細胞抗發炎試驗之穩定性分析.....	68
(三) PA2 於細胞抗氧化試驗之穩定性分析.....	74
三、以 Caco-2 細胞模式探討通透率及吸收率.....	79
(一) Caco-2 細胞存活率分析-MTT assay.....	79
(二) 以 Caco-2 細胞模式探討待測樣品的吸收率.....	81
1.以 Caco-2 細胞模式探討 EC 的吸收率.....	83
2 以 Caco-2 細胞模式探討 PA2 的吸收率.....	85
3. 以 Caco-2 細胞模式探討 PA4 的吸收率.....	88
4 以 Caco-2 細胞模式探討 PA5 的吸收率.....	91
5 以 Caco-2 細胞模式探討 PA2:EC(2:1)、(1:1)、(1:2)、(1:3.3) 的吸收率.....	93
四、抗發炎實驗.....	96
(一) NO (Nitric oxide) 螯合能力測定.....	96
(二). 抑制以 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 之抗發炎效果.....	98
1 RAW 264.7 細胞存活率分析-MTT assay.....	98
2 抑制以 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 之抗發炎效果.....	100
(三). iNOS、COX-2 蛋白質表現分析.....	102
五、抗氧化實驗.....	103
(一) DPPH 自由基清除能力.....	103
(二) 氧自由基吸收能力之測驗 (Oxygen radical absorbance capacity, ORAC).....	105
(三) 抑制銅離子誘導人類 LDL 氧化反應試驗.....	108
(四) 細胞抗氧化模式.....	110
1 細胞存活率分析-MTT assay.....	110
2 細胞抗氧化能力測定 (Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay)...	112
陸、結論.....	122
1. 穩定性試驗.....	122

柒、參考文獻..... 124

捌、附錄..... 130



圖次

圖 2-1、Caco-2 細胞單層膜所表現的轉運蛋白及酵素.....	3
圖 2-2、Caco-2 細胞單層膜通透試驗與人體吸收率關係圖.....	5
圖 2-3、Trans-well 示意圖.....	6
圖 2-4、透膜電阻儀.....	6
圖 2-5、nNOS 及 eNOS 作用示意圖.....	9
圖 2-6、LPS 結構.....	11
圖 2-7、抗氧化系統金字塔圖.....	18
圖 2-8、龍眼花中有效抗氧化成分.....	20
圖 2-9、外吐蛋白抑制劑對 EC 通透 Caco-2 細胞單層膜的影響.....	23
圖 5-1、龍眼花丙酮粗萃物乙酸乙酯層之 amberlite XAD-7 resin 管柱層析 後各次區分之薄層層析圖.....	54
圖 5-2、龍眼花丙酮粗萃物乙酸乙酯層 amberlite XAD-7 resin-II 之 LH-20 管柱層析後各次區分之薄層層析圖.....	55
圖 5-3、PA4、PA2、PA5 之高效能液相層析圖.....	57
圖 5-4、Proanthocyanidin A2 之質譜圖 (ESI-MS/MS).....	58
圖 5-5、PA4 之質譜圖 (ESI-MS/MS).....	59
圖 5-6、PA5 之質譜圖 (ESI-MS/MS).....	60
圖 5-7、PA2 轉變成的同分異構物.....	61
圖 5-8、不同濃度 PA2 於 HBSS 於轉變成 PA2、PA4 及 PA5 隨時間點變 化的情形.....	63
圖 5-9、PA2 (50 ug/mL)於 HBSS 及 Caco-2 cell 中，PA2、PA4 及 PA5 隨 時間變化情形.....	64
圖 5-10、不同比例之 PA2, EC 於 Caco-2 細胞及 HBSS 中 EC, PA2 及 PA4 之隨時間變化情形.....	66
圖 5-11、不同濃度 PA2 於 b-DMEM 中轉變成 PA2、PA4 及 PA5 隨時間 點變化的情形.....	68
圖 5-12、PA2 (50 µg/mL) 於 b-DMEM 及 RAW 264.7 細胞存在下中， PA2、PA4 及 PA5 隨時間之變化情形.....	69

圖 5-13、不同濃度之 PA2 (50 µg/mL)於 b-DMEM 中有 RAW 264.7 細胞及 LPS 存在下 PA4, PA2 及 PA5 隨時間變化的情況.....	70
圖 5-14、PA2 (50 µg/mL) 於 sf-WME 中轉變成 PA2、PA4 及 PA5 隨時間變化的情形.....	73
圖 5-15、不同濃度之 PA2 於 b-WME 於在有 Hep G2 細胞存在下，PA2、PA4 及 PA5 隨時間變化的情形.....	75
圖 5-16、Caco-2 細胞在顯微鏡下形態.....	79
圖 5-17、各樣品對 Caco-2 細胞存活率之影響.....	79
圖 5-18、EC 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層 2 hr 之 HPLC 層析圖.....	83
圖 5-19、PA2 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層於不同時間點之 HPLC 層析圖.....	86
圖 5-20、PA4 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層於不同時間點之 HPLC 層析圖.....	89
圖 5-21、PA5 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層於不同時間點之 HPLC 層析圖.....	91
圖 5-22、不同比例之 PA2 及 EC 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層於反應 2 hr 之 HPLC 層析圖.....	94
圖 5-23、各樣品對 NO 螯合力之濃度效應.....	96
圖 5-24、RAW264.7 巨噬細胞在顯微鏡下形態.....	98
圖 5-25、各樣品對 RAW 264.7 巨噬細胞存活率之影響.....	98
圖 5-26、各樣品對抑制 LPS 刺激 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 之影響..	100
圖 5-27、PA2 及 EC 對 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 iNOS 及 COX-2 蛋白的影響.....	101
圖 5-28、各樣品對 DPPH 自由基清除之濃度效應.....	103
圖 5-29、Trolox 於 ORAC 試驗中相對螢光強度隨時間之變化及其標準曲線.....	105

圖 5-30、各樣品於 ORAC 試驗中相對螢光強度隨時間之變化.....	106
圖 5-31、各樣品對延緩銅離子誘導人類 LDL 氧化之效果.....	108
圖 5-32、Hep G2 細胞株在顯微鏡下形態.....	110
圖 5-33、各樣品對 Hep G2 細胞存活率之影響.....	110
圖 5-34、細胞抗氧化實驗原理.....	112
圖 5-35、細胞抗氧化實驗中各樣品之相對螢光強度隨時間的變化.....	114
圖 5-36、細胞抗氧化實驗中各樣品抑制自由基誘導螢光物質之濃度效應.....	116
圖 5-37、細胞抗氧化實驗中各樣品抑制自由基誘導螢光物質之 EC ₅₀	118
附圖 1、PA4 之氫核磁共振光譜圖.....	130
附圖 2、PA4 之碳核磁共振光譜圖.....	130
附圖 3、PA4 之二維 COSY 核磁共振光譜圖.....	131
附圖 4、PA4 之二維 HSQC 核磁共振光譜圖.....	131
附圖 5、PA4 之二維 HMBC 核磁共振光譜圖.....	132
附圖 6、PA4 之二維 NOESY 核磁共振光譜圖.....	132
附圖 7、PA5 之氫核磁共振光譜圖.....	133
附圖 8、PA5 之碳核磁共振光譜圖.....	133
附圖 9、PA5 之二維 COSY 核磁共振光譜圖.....	134
附圖 10、PA5 之二維 HSQC 核磁共振光譜圖.....	134
附圖 11、PA5 之二維 HMBC 核磁共振光譜圖.....	135
附圖 12、PA5 之二維 NOESY 核磁共振光譜圖.....	135

表次

表 2-1、自然界常見的自由基.....	13
表 2-2、常見的抗氧化試驗.....	14
表 2-3、人體中的抗氧化系統.....	17
表 5-1、龍眼花 80%丙酮萃出物經 EA 萃取之回收率.....	53
表 5-2、龍眼花丙酮粗萃物乙酸乙酯層之 amberlite XAD-7 resin 管柱層析 之沖提比例、體積及其次區分層回收率.....	54
表 5-3、龍眼花 LF-A-EA-XADII 之 Sephadex LH-20 管柱層析之沖提體 積及其次區分層回收率.....	55
表 5-4、在 b-DMEM 中有無 RAW 264.7 細胞或 SOD 情況下處理不同樣 品 24 hr 下 PA2 及 EC 之變化情況.....	72
表 5-5、不同濃度的 PA2 在不同培養液中 PA4 及 PA5 變化量的時間點	77
表 5-6、PA2、EC、PA4、PA5 之檢量線.....	81
表 5-7、EC 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層 2 hr 之吸 收量及分佈百分比.....	83
表 5-8、PA2 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層於不同時 間點之吸收量及分佈百分比.....	85
表 5-9、PA4 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層於不同時 間點分佈百分比之變化量.....	88
表 5-10、PA5 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層於不同 時間點分佈百分比之變化量.....	91
表 5-11、不同比例之 PA2 及 EC 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及 單層膜下層於反應 2 hr 之吸收量及分佈百.....	93
表 5-12、各樣品螯合 SNP 產生 NO 之 EC ₅₀	96
表 5-13、各樣品清除抑制 LPS 刺激 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 之 EC ₅₀	100
表 5-14、各樣品之抗氧化性測試結果.....	120

壹、前言

許多研究指出，自由基與活性氧物質對於細胞產生損害，並造成許多疾病的產生，如癌症及老化等。而慢性發炎反應，會促使胞內酵素、核酸、蛋白質等受到傷害而使細胞失去正常功能。因此，除了體內所具有的抗氧化物質，多補充體外的抗氧化物質更能幫助減少氧化壓力的傷害。

近年來，國民知識水準提高，健康飲食的概念成為飲食的主流，富含抗氧化物質的食品，如蔬果、紅酒、茶等成為時下的新寵。龍眼果實為台灣夏季盛產的水果之一，其香甜可口而深受國人喜愛。雄性龍眼花為授粉予雌花後之廢棄物。龍眼花在傳統醫學上用以治療白帶、腎臟病等功效。

本研究室曾以多種體外抗氧化試驗分析龍眼花水草物的抗氧化能力，發現龍眼花水草物不僅在各項試驗中表現優異，亦具有良好的還原力，能有效延緩低密度脂蛋白氧化等能力 (沈，2005)。另外，亦有文獻指出龍眼花水草物具有抗發炎效果 (Ho, et al., 2007)。進一步探討龍眼花之抗氧化活性成分，經管柱層析法分離純化，並以 IR、MS、UV-Vis 與 NMR 等光譜分析，鑑定出兩個主要抗氧化成分為(-)-epicatechin (EC) 與 proanthocyanidin A2 (PA2)，兩者皆能有效延緩低密度脂蛋白氧化的情形(謝，2006)。然而，目前對於原花青素 (proanthocyanidin) 之生物利用率的研究十分有限，且多為 Type B 型之原花青素，而非龍眼花中 Type A 型原花青素。此二種原花青素之化學結構不同，對於吸收代謝可能差異很大。龍眼花之 PA2 在各式體外試驗中具有優異之生理功效，然而，在生物體內是否能被消化吸收，是值得探討的課題。故本實驗的研究主軸為體外模擬腸胃道之細胞模式探討 PA2 及 EC 之生物可利用率、抗發炎及抗氧化的效果。

貳、文獻整理

第一節、體外模式之生物可利用率

Caco-2 cell

Caco-2 cell 在形態、表現的蛋白質及酵素都相當類似人類的小腸，也由於此細胞的培養相當簡單方便，故近年來 Caco-2 cell 單層膜模式廣泛被用來探討物質在人類小腸中通透性與其生物可利用率的工具。

一、Caco-2 細胞簡介

Caco-2 細胞為來自人類結腸癌的細胞株，為貼附型的細胞，Caco-2 cell 可在適當的體外培養條件下形成緊密的連結，並分化出腸腔側、頂端絨毛、腸壁側 (tight junction)、底端基底面並能表現出刷狀緣酶，分化完全的 Caco-2 cell 可形成相當密集的絨毛以及細胞間的緊密連結。Caco-2 cell 的 tight junction 間隙約 4.5Å，略小於人類小腸的 8-13 Å (Chirayath et al., 1998)。Caco-2 cell 不僅在外在形態類似於人類的腸道細胞，在人類腸道中常見的刷狀緣酵素中，Caco-2 cell 可表現出其中包括麥芽糖酶、蔗糖酶、蛋白酶、鹼性磷酸酶、organic solute transporters (OST α/β) 等等 (Hilger et al., 1990)。另外，Caco-2 cell 亦可表現出正常腸道所表現的轉運蛋白，例如 H⁺/ di-tripeptide transporter (PEPT1) (Saito et al., 1997)、multi-drug resistant protein (MRP) (Hunter et al., 1993)、apical Na⁺-dependent bile acid transporter (ASBT) (Hidalgo et al., 1990)、organic anion-transporting polypeptide 2B1 (OATP-2B1) (Sai et al., 2006)、monocarboxylic acid transporter 1 (MCT1) (Tamai et al., 1995)、organic cation/ carnitine transporter (OCTN2) (Elimrani et al., 2003)、multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)、breast cancer resistance protein (BCRP) (Xia et al., 2005) 等 (圖 2-1)。故 Caco-2 cell 單層膜模式具備了大多數表現於人類小腸的酵素及運輸蛋白，但由於 Caco-2 cell 為癌細胞，故這些酵素以及轉運蛋白的表現量較一般正常的腸道細胞為高。

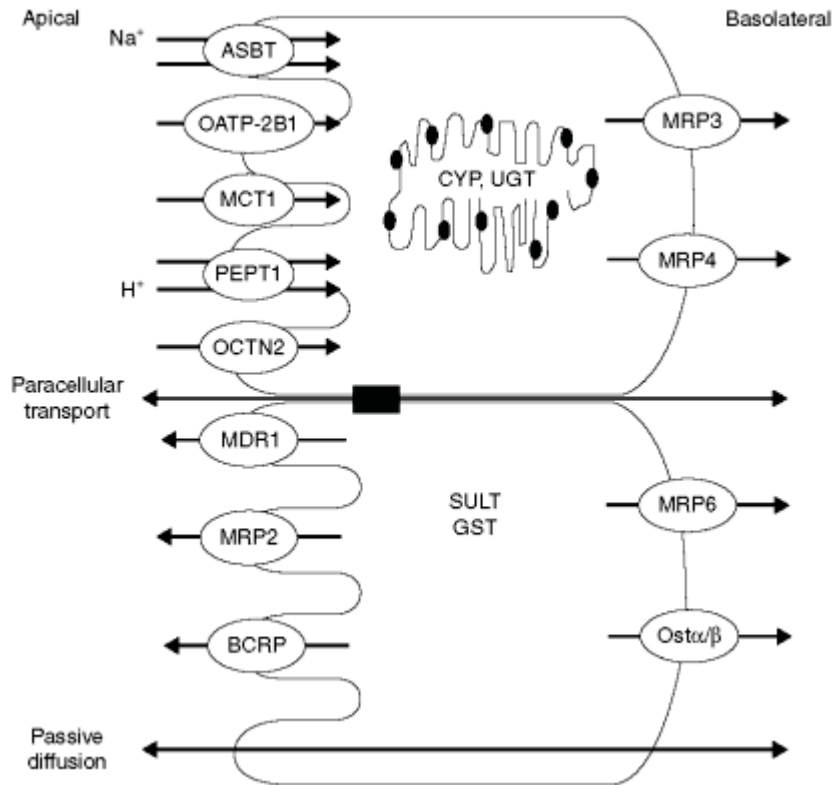


圖 2-1、Caco-2 cell 單層膜所表現的轉運蛋白及酵素

Figure 2-1. Drug transporters and metabolic enzymes present in the Caco-2 cell monolayer.

ASBT: apical Na^+ -dependent bile acid transporter

OATP-2B1: organic anion-transporting polypeptide 2B1

MCT1: monocarboxylic acid transporter 1

PEPT1: H^+ -di-tripeptide transporter 1

OCTN2: organic cation/ carnitine transporter

MDR1: multidrug resistance protein1 (or P glycoprotein, P-gp)

MRP2/3/4/6: multidrug resistance-associated protein 2/3/4/6

BCRP: breast cancer resistance protein

OST α/β : organic solute transporters

(Sun, et al, 2008)

二、Caco-2 cell 單層膜之模擬動物腸道試驗

研究指出親脂性物質 (testosterone 及 salicylic acid) 及以主動運輸進行吸收的葡萄糖有較高的通透率，而親水性物質 (hippurate 及 salicylate anion) 則通透速率較低，其結果與動物實驗的結果相同 (Hilger et al., 1990)。另外，藥物在 Caco-2 cell 模式與人類腸道的吸收情況也是相當類似，文獻指出在 35 種藥物的測試中，Caco-2 單層膜模式與人類腸道有相同的吸收情況，相關係數高達 0.95 (圖 2-2)。由此證明 Caco-2 單層膜模式能有效的模擬動物腸道吸收藥物的情況 (Yee et al., 1997)。

Caco-2 cell 單層膜上層所表現的轉運蛋白，如 P-gp, MRP2 及 BCRP 等則會專一性的限制某些物質的吸收，它們會將經由 tight junction 進入細胞的物質吐出，又稱為外流幫浦 (efflux pump)。欲預測待測物質是否被能被腸道吸收前，須先了解待測物是否為外流幫浦的受質，或待測物是否為外流幫浦的抑制因子，可藉由待測物以 Caco-2 cell 單層膜模式進行雙向通透來得知。由於這些轉運蛋白只表現在 Caco-2 cell 單層膜上層，故若 Caco-2 cell 對於待測物沒有任何蛋白或酵素的影響，則由上往下或由下往上的通透率應相等 ($P_{app,A \rightarrow B} = P_{app,B \rightarrow A}$)；若待測物的吸收受到細胞上層外流幫浦的影響，則分泌現象 ($B \rightarrow A$) 會增加而吸收現象 ($A \rightarrow B$) 會被抑制，而造成雙向的通透率不對等 ($P_{app,A \rightarrow B} \neq P_{app,B \rightarrow A}$)。

三、Caco-2 cell 單層膜完整性及通透率

Caco-2 cell 其外在形態與內在酵素均被證實能有效的模擬人類腸道細胞後，利用 transwell 的方法來探討藥物通過 Caco-2 cell 單層膜來預測藥物在動物體吸收的情況，transwell 可分為上層的 apical chamber，底部為一層聚碳脂膜與下層做分隔，下層則稱為 basolateral chamber (圖 2-3)。將 Caco-2 cell 種在聚碳脂膜上，等待約 21 天，待細胞完全分化且緊密連結後，開始進行實驗。完全分化的細胞應如圖 2-3 所示，有方向性、絨毛朝上，且細胞緊密連結。並以公式計算通透率 (Hilger et al., 1990)。

$$P_{app} = dC/dt \times V / (A \times C_0)$$

P_{app} 的單位為 cm/s，其中 dC/dt 為接受側 (receiving side) 隨時間而改變的濃度，單位為 $\mu M/s$ ； V 為接受側的體積，單位為 cm^3 ； A 為聚碳脂膜的表面積，

單位為 cm^2 ； C_0 為待測物在給予側的初始濃度，單位為 μM 。

藉由透膜電阻儀，TEER (Transepithelial Electric Resistance) (圖 2-4)，來監測細胞在 transwell 上的完整性。透膜電阻儀是目前最被廣為接受且非侵入式的監測方法 (Deprez et al., 2001)，它是利用感應器的兩端分別置於 apical 及 basolateral chamber，偵測細胞單層膜兩側的電阻值，進而推測細胞膜的完整，一般 TEER 值大於 $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 才能確保細胞單層膜的完整，再進行實驗。(Deprez et al., 2001)

由於 Caco-2 cell 容易取得且方便培養的特性，目前已被廣為被當作探討藥物通透性以及生物可利用率的體外模式。

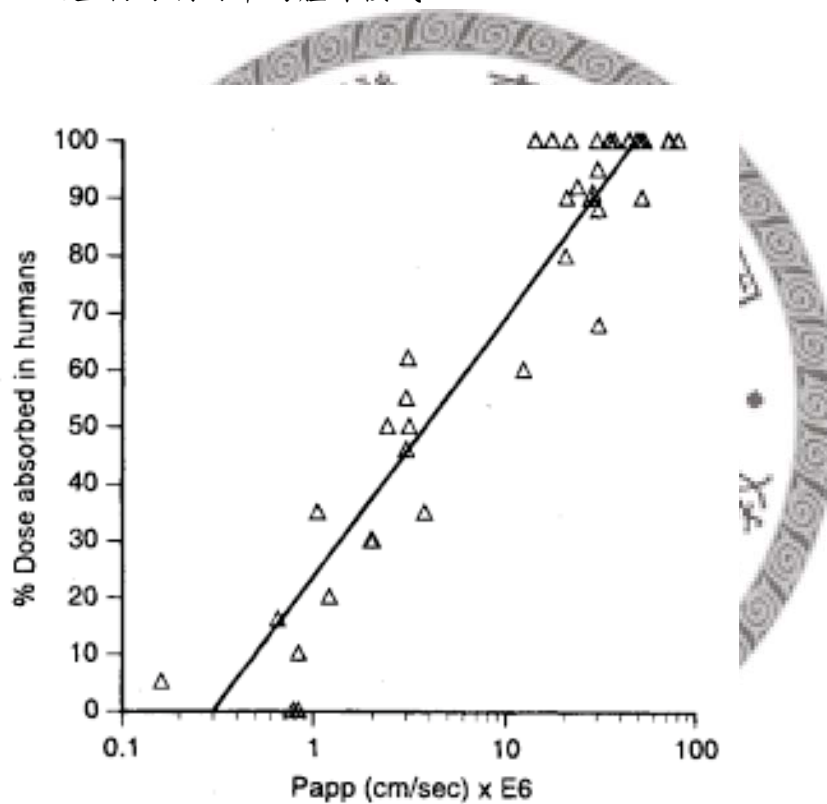


圖 2-2、Caco-2 cell 單層膜通透試驗與人體吸收率關係圖

Figure 2-2 Correlation between % dose absorbed *in vivo* in human versus Papp across Caco-2 cell monolayers treat with $10\mu\text{M}$ CP-Y. ($R=0.95$, $n=35$)

(Yee *et al.*, 1997)

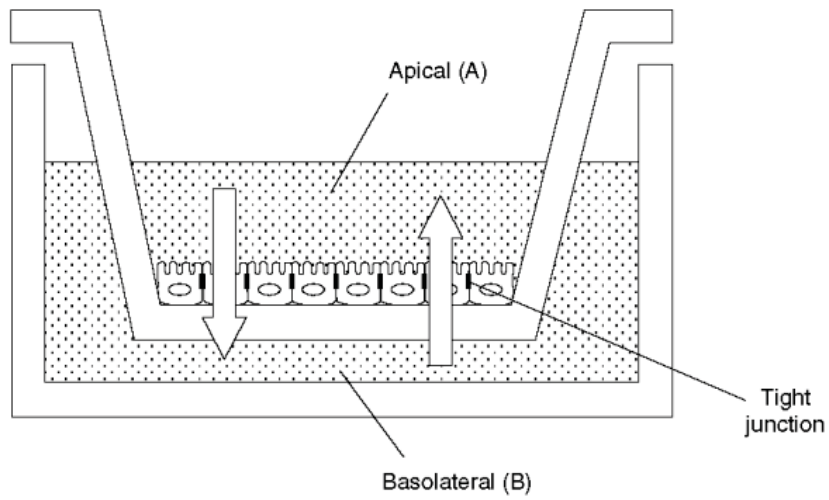


圖 2-3、Trans-well 示意圖
Figure 2-3 Diagram of Trans-well

(Sun, *et al*, 2008)



圖 2-4、透模電阻儀

Figure 2-4 Transepithelial Electric Resistance measurement.

(www.pharmaceutical-int.com)

第二節、發炎

一、發炎簡介

發炎是動物體內對受傷組織所反應的一種保護行為，其原因是由於組織的受傷而促使巨細胞 (Mast cell)、血小板及嗜鹼性細胞 (basophil) 分泌組織胺 (histamin)。組織胺會增加血管的通透性，能使患處的血流供應增加，並且促使白血球及一些細胞激素快速穿過血管壁到達受損部位，加速病原菌的清除，並修補或更新受損組織。動物體內適量的發炎反應，可活化免疫細胞快速穿過血管壁清除入侵的外來物、避免傷害的擴大並修補或更新受損組織，是人體內防禦系統中對抗細菌性感染的重要防線。然而，過於急性且劇烈的發炎反應會使正常組織受到影響，如血管過度舒張、組織壞死等 (Serban et al., 2002)。發炎時，活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS) 會產生高量的一氧化氮 (NO) 來抵抗外來病原菌。一般會造成紅、腫、痛、熱等症狀。然而，太過劇烈的發炎反應則會造成細胞內蛋白質、核酸及脂質的損壞而誘導一些不良的細胞反應。

二、巨噬細胞 (Macrophage)

巨噬細胞是一大類細胞的通稱，在身體不同組織會有不同的名稱，如在肝臟中的庫氏細胞 (kupffer cell)、組織中的巨噬細胞 (Macrophage)、骨骼中的蝕骨細胞 (osteoclast)、腦中的微膠細胞 (microglia) 及淋巴組織的樹突狀細胞 (dendritic cell) 等 (Celada et al., 1994)。巨噬細胞為動物體內的重要的免疫成員，扮演著驅動免疫反應的角色。巨噬細胞從單核球衍生而來，發育成熟後停留在組織裡，當組織受傷或外來物入侵時，巨噬細胞會進行吞噬作用，並且將抗原呈現給免疫細胞，啟動一系列的免疫反應 (Morrissette et al., 1999)。

當巨噬細胞受到刺激活化時會分泌許多物質參與免疫反應，包含一些細胞激素 (cytokine) 及化學激素 (chemokines) 來調控免疫反應，並擴大感染組織部位的發炎反應，然而同時也會產生許多具有細胞毒性的物質，例如 NO、O₂、溶酶體酵素 (lysosomal enzyme)、花生四烯酸 (arachidonic acid)、前列腺素 (PGE₂) 等來抵抗外來物質的入侵，故在急性與慢性發炎上具有相當重要的角色。另外，亦有研究指出可藉由巨噬細胞產生大量的 NO 以達到對抗外來病原菌以及抑制腫瘤生長的能力，故巨噬細胞為人體免疫系統中重要的屏障之一然

而長期或持續而嚴重的發炎反應所產生的自由基 (free radical) 及活性氧物質，也會引起正常細胞受損，甚至會造成 DNA 的突變 (Ghosh et al., 1990)。

三、一氧化氮(NO)

自由基的種類有很多種，包含一氧化氮、氫氧基、超氧自由基等，而一氧化氮被認為在發炎反應中扮演相當重要的地位。一氧化氮是含有一個未配對電子的自由基，十分不安定，生命週期很短，半衰期約 3-5 秒，很快就會氧化成亞硝酸鹽 (nitrite, NO_2^-) 和硝酸鹽 (nitrate, NO_3^-)。NO 在正常作用下具有很好的生理功能，調控許多細胞與組織的功能，包括內生性血管擴張、抑制血小板凝集、參與免疫反應、神經傳導因子及訊號傳遞 (Liaudet et al., 2000)。

一氧化氮的生成主要由活化一氧化氮合成酵素 (nitric oxide synthases, NOS)，將細胞內 L-精胺酸 (L-arginine) 轉變成為 L-瓜胺酸 (L-citrulline) 及 NO 自由基的釋放 (Marletta et al., 1989)。

細胞內 NOS 主要分為三類：

- (1) nNOS (neuronal NOS)：主要存在於腦部與周邊神經細胞，參與神經傳導。
- (2) eNOS (endothelial NOS)：存在於血管內皮細胞，與血壓調節有關。
- (3) iNOS (inducible NOS)：平時並不表現。

其中 nNOS 與 eNOS 又合稱為結構性 NOS (constitutive NOS, cNOS)。cNOS，活性受到鈣離子濃度的調控，在神經與內皮細胞產生固定量之 NO，是維持體內正常運作的重要訊息傳遞因子 (Lyons et al., 1992)。NO 會促使 GDP 轉變為 cGMP 而進行一連串的生理反應，包括血管擴張、子宮平滑肌鬆弛及抑制血小板凝集等作用。iNOS 平常在體內並不會表現，當特定細胞，如巨噬細胞、白血球、抗原呈現細胞及自然殺手細胞 (Nature Killer cell) 等受到內毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 或細胞激素如 IL-1、TNF- α 等刺激而誘發其表現 (Nicholas et al., 2007)。iNOS 的表現通常伴隨著發炎反應，然而其過量的表現被會造成血管過度舒張、細胞損傷、DNA 受損、腫瘤的形成等 (Mombada et al., 1991)。(圖 2-5)

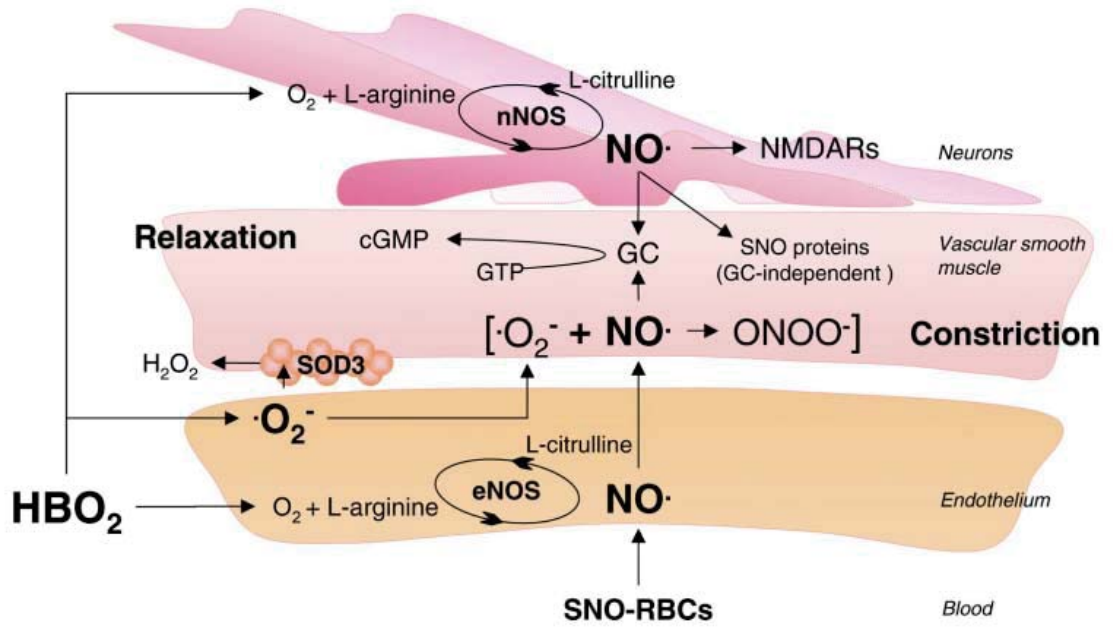


圖 2-5、nNOS 及 eNOS 作用示意圖

Figure 2-5. The mechanism of nNOS and eNOS

(Allen, *et al*, 2009)



四、環氧化酵素 Cyclooxygenase (COX)

環氧化酵素 Cyclooxygenase (COX)是在生物體內合成重要生物調節物 Prostanoids 的主要調節酵素。Prostanoids 包含前列環素 (Prostacyclin, PGI₂)、前列腺素 (prostaglandins, PG) 及血栓素 (thromboxane A₂, TXA₂)。一般傳統的止痛藥，如阿斯匹靈 (Aspirin)、非類固醇消炎劑 (NSAID) 主要作用機轉是抑制 COX 的產生來減輕疼痛及發炎現象。

目前發現 COX 有 COX-1 與 COX-2 兩種型式。兩者功能相仿，在生化反應裡都能將花生四烯酸 (arachidonic acid) 轉變成前列腺素 (prostaglandin H₂)，且具有類似的胺基酸序列及結構，但在體內的分佈及作用則有差異。COX-1 普遍存在於哺乳類動物細胞中，包括腎臟、胃、血管平滑肌、血小板等，為常態表現型蛋白質，在體內負責正常的生理功能。促使體內產生前列腺素以維持腸胃道黏膜的完整性及維持腎血流，另外也存在於血小板中以調節 thromboxane A₂ (TXA₂) 的產生。TXA₂ 是一種血小板活化物質，會促使血小板凝集而產生血栓。COX-2 的表現則與 COX-1 作用相反，COX-2 平常不會表現於細胞中，只有在已活化的巨噬細胞或與發炎相關細胞收到刺激時才會表現。COX-2 會促使前列環素的生成，進而誘導發炎反應而導致疼痛、腫脹及不適感，另外 PGI₂ 也是會調控血管擴張、抑制血小板凝集及神經生長等的生理功能 (Parente, et al., 2003)。然而，也有研究報告指出，COX-2 的過度表現會造成血管生成因子大量的分泌，同時也會造成血管上皮細胞從膠原基底膜 (collagen matrix) 轉移至其他部位，而間接造成腫瘤的生成及轉移 (Tsujii, et al., 1998)。

一般的止痛藥的作用會同時抑制 COX-1 和 COX-2。當 COX-2 被抑制時，會使 PGI₂ 減少而產生消炎止痛的作用，但亦會促使血小板的凝集，而 COX-1 被抑制時，則會破壞腸胃道黏膜的完整性及影響腎血流，而導致腸胃不適等副作用，且會抑制血小板的凝集而較易出血。

五、脂多醣體 Lipopolysaccharide (LPS)

脂質多醣體 (LPS)，發現自革蘭氏陰性細菌細胞壁，為所有革蘭氏陰性菌外膜上所共有的醣酯質成分，為一種內毒素，最早是由霍亂弧菌所分離出。LPS 是由 lipid A、核心多糖 (core polysaccharide) 和 O 抗原等三個構造單位所構成。(圖 2-6) lipid A 是 LPS 的必要成分，也是細菌活化所必須。lipid A 由兩個

葡萄糖胺、脂肪酸及磷酸所組成，是 LPS 內毒素的活性中心，根據研究顯示 lipid A 是造成 LPS 誘發生物反應的主因。所有革蘭氏陰性腸內菌 lipid A 的基本結構均相似。核心多糖是多醣體的分支，它由 9 到 12 個糖分子所構成。大部分的核心區是構成 LPS 所必需的，對細菌的存活也很重要。O 抗原則是一長線狀由 50 到 100 個重複糖單位所構成，每個單位含 4 到 7 個糖分子。O 抗原附著在核心並由細菌延伸出來，可用於鑑別細菌的血型。

當動物體內遭受外來病原菌入侵時，LPS 會先與 LPS binding protein (LBP) 結合形成附合物，在與巨噬細胞膜上的 LPS receptor (CD14 或 Toll-like receptors) 結合；另外，亦有報告指出，LPS 可直接與可溶性 CD14 結合而引起巨噬細胞釋出大量 NO 或其他細胞激素如 tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interferon- γ (IFN- γ)、脂質代謝產物 (PGE₂) 及一氧化氮 (nitric oxide; NO) 等，進而誘導一連串的免疫反應，以抵抗外來微生物的侵襲 (Finberg et al., 2004)。

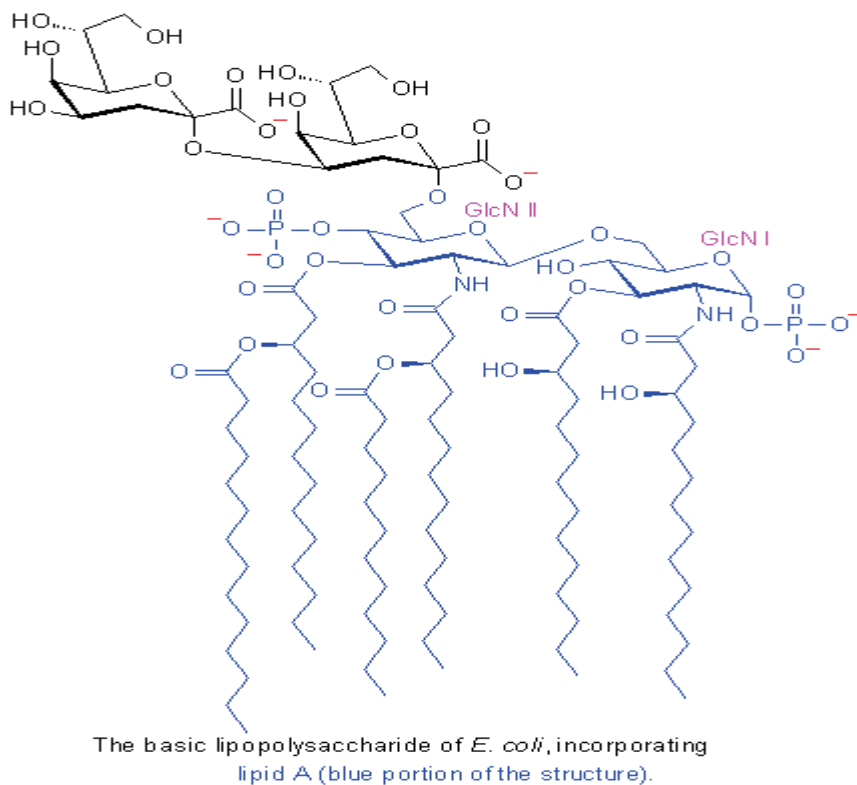


圖 2-6、LPS 結構

Figure 2-6 Structure of LPS

第三節、氧化壓力

一、自由基

自由基 (Free radical)，是指具有高能量的原子團，性質極不穩定，帶有單一或奇數不配對電子，可獨立存在的物質，由於電子必須成雙成對，才能使物質處於安定狀態，這些高能量而不穩定的原子團，有高度的反應性，會搶其它物質的電子來結合，使其它物質氧化，而被搶走電子的物質其性質及功能亦被破壞，自己本身也成為自由基 (表 2-1)。生物系統中典型的自由基來源包含活性氧屬 (ROS) 或活性氮屬 (reactive nitrogen species, RNS)，由於生物體內產生能量、代謝物質及對抗外來病原菌等需求下所產生。然而，在身體抗氧化能力較不足的情況下，身體就會承受較大的氧化壓力 (Oxidant stress)。身體中短暫的氧化壓力是能被接受的，若身體長期在高氧化壓力下，則容易造成疾病的產生，包含心血管疾病、癌症、神經系統及內分泌系統失調等。因此氧化及抗氧化力的平衡是建構一個健康個體所需要的。



表 2-1、自然界常見的自由基

Table 2-1. Some of the main reactive species divided according to the nature of the substance.

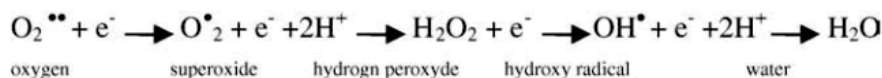
Free radicals	Formula	Nonradicals	Formula
<i>Reactive oxygen species</i>			
Oxygen	$O_2^{\bullet a}$	Singlet oxygen	$\Delta o \Sigma O_2^b$
Superoxide	$O_2^{\bullet- a}$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Hydroxyl	$OH^{\bullet a}$	Ozone	O_3
Hydroperoxil	$HO_2^{\bullet a}$	Hypochlorous acid	$HOCl$
Peroxyl	RO_2^{\bullet}	Hypobromous acid	$HOBr$
Alcoxyl	RO^{\bullet}	Organic peroxides	$ROOH$
Carbonate	$CO_3^{\bullet-}$	Peroxynitrite	$ONOO^-$
Carbon dioxide	$CO_2^{\bullet-}$	Peroxynitrous acid	$ONOOH$
<i>Reactive chlorine species</i>			
Atomic chlorine	Cl^{\bullet}	Hypochloric acid	$HOCl$
		Nitryl chloride	NO_2Cl
		Chloramines	
		Chlorine gas	Cl_2
<i>Reactive nitrogen species</i>			
Nitric oxide	NO^{\bullet}	Nitrous acid	HNO_2
Nitrogen dioxide	NO_2^{\bullet}	Peroxynitrite	$ONOO^-$
		Peroxynitrous acid	$ONOOH$
		Alchyl peroxynitrite	$ROONO$
		Nitryl chloride	NO_2Cl
^a Intermediate step of the transformation (quenching) of O_2 into H_2O . ^b Generated by sun radiation.			

(Coenelli, *et al*, 2009)

二、氧化壓力的主要來源

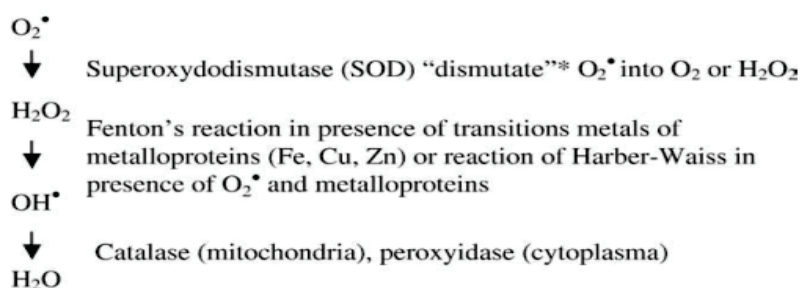
氧化壓力的造成是由於過多的氧化作用或抗氧化作用的缺少所造成，身體所承受的氧化壓力需要藉由酵素系統及非酵素系統來達到良好的調控。一般有三種產生氧化壓力的途徑：能量途徑、反應途徑、代謝途徑。

- (1) 能量途徑 (energetic pathway)：能量途徑與 ATP 的產生有關，需要依賴酵素的的存在才能形成，例如經由粒腺體的電子傳遞鏈，將氧分子轉化成 superoxide anion radicals (O_2^-) 並轉移到細胞質中，再藉由過渡金屬 (Cu^{2+} 、 Fe^{2+}) 轉化成高反應活性的 hydroxyl radicals ($\cdot OH$)。而一般來說，成人每日需 2100 kcal 來維持一天基本所需的能量，約需 300 mol ATP (1 ATP= 7 cal)，且需 100 mol 氧分子來製造這些 ATP，但是約有至少 1% 氧分子逃脫製造能量的反應成為活性氧物質。當 100 mol 氧分子用來製造 300 mol ATP，從氧分子 (O_2) 變成水分子 (H_2O) 的過程中，至少會產生 3 mol 的活性氧物質。



(Coenelli, *et al*, 2009)

由上述反應式中可看出，從氧分子 (O_2) 變成水分子 (H_2O) 的過程中，有 4 個電子 (e^-) 參與其中，每一個步驟都會產生活性氧物質。在正常的狀況下，這些活性氧物質會快速的藉由酵素系統及非酵素系統所除去。



(Coenelli *et al.*, 2009)

- (2) 反應途徑 (reactive pathway)：又稱為氧化爆炸 (oxidative burst)。由於外來微生物、氧化脂蛋白等的刺激，造成反應細胞 (巨噬細胞、白血球) 經由細胞

表面的菸鹼胺腺嘌呤二核酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶產生大量的過氧化氫 (H_2O_2)。

- (3) 代謝途徑 (metabolic pathway)：有許多代謝反應都會產生 $O_2^{\cdot -}$ 。最普遍的是從花生四烯酸 (arachidonic acid) 轉變成前列腺素 (prostaglandin H_2) 及從正腎上腺素 (norepinephrine) 轉變成多巴胺 (dopamine) 時產生 (Cornelli et al., 2009)。

三、氧化壓力的測定

大約有 100 種以上的氧化壓力測定方法，大致上分為四種類別 (Cornelli et al., 2009) (表 2-2)：

- 甲、 偵測被氧化壓力氧化的受試物。此種測試法常用檢測於血液及尿液樣品。如 TBARS 等。
- 乙、 利用能抓住氧化壓力的化學物質，藉由偵測化學物質的電子自旋共振 (Electron Spin Resonance) 的改變來檢測氧化壓力的大小。由於此測試有潛在的毒性，故僅用於體外測試。
- 丙、 藉由接觸氧化壓力能呈現螢光或冷光的物質來偵測氧化壓力的大小。可用活體外的測試。例如 TRAP (Total peroxy radical trapping) 等。
- 丁、 偵測樣品中的抗氧化能力得知，例如 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)、ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)、DPPH 等。

表 2-2 常見的抗氧化試驗

Table 2-2 Some of the most common test under use for the determination of oxidative stress and the relative category from class 1 to 4.

Method	Type of substance that is determined	class	Ref.
DNA	Deoxyribonucleic acid	1	(Dizdaroglu, et al, 2002)
SPC	Serum protein carbonyls	1	(Chevion, et al, 2000)
LHP	Lipids hydroperoxides d-ROMs test	1	(Cesarone, et al, 1999)
TBARS	Thiobarbituric acid reacting substances	1	(Schimke, et al, 1986)
LNO2	Nitrolinoleate	1	(Lima, et al, 2002)
MDA	Malondialdehyde	1	(Liu, et al, 1997)
4-HNE	4-Hydroxynonenal	1	(Lang, et al, 1985)
IsoPs	F2/D2/E2 isoprostanes	1	(Montuschi, et al, 2004)
F neuroPs	F3/F4 isoprostanes	1	(Montine, et al, 2003)
H2O2	Hydrogenperoxide	1	(Varma, et al, 1990)
BH	Breath hydrocarbons	2	(Knutson, et al, 2000)
ONOO	Peroxynitrite	2	(Radi, et al, 2001)
PTN	Alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrone	2	(Clermont, et al, 2002)
AHS	Aromatic hydroxylation of salicylate	3	(Ingelman-Sundberg, et al, 1991)
TRAP	Total peroxyl radical scavenging antioxidant capacity	4	(Aejmelaeus, et al, 1997)
TOSCA	Total oxyradical scavenging capacity assay	4	(Winston, et al, 1998)
UA	Uric acid	4	(Moison, et al, 1997)
UAM	Uric acid metabolite allantoin	4	(Mikami, et al, 2000)
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity	4	(Miller, et al, 1993)
FRAP	Ferric reducing ability	4	(Benzie, et al, 1996)
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity	4	(Cao, et al, 1999)
DMPD	<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -phenylenediamine	4	(Schleiser, et al, 2002)
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl	4	(Schleiser, et al, 2002)
TRX	Thioredoxine and glutaredoxine	4	(Nakamura, et al, 1998)

TRAP, total peroxyl radical trapping; FRAP, ferric-reducing ability test.

(Cornelli et al., 2009)



四、抗氧化物質

若在 ATP 合成的過程中會產生 1 mol 的活性氧物質，假設由 α -生育酚 (α -tocopherol) 為唯一的抗氧化物質，則每天需要 431 克的 α -生育酚才能清除這些活性氧物質，然而 431 克 α -生育酚遠遠超過一天人體所攝取的量。這個現象表示，動物體為平衡體內的氧化壓力，需發展出更多元複雜的抗氧化系統，另外，根據身體的不同部位也需有不同的抗氧化系統，由於不同的組織結構對氧化壓力的承受度也不同 (表 2-3)(Cornelli et al., 2009)。

表 2-3、人體中的抗氧化系統

Table 2-3. Some of the compounds that are part of the antioxidant network in humans.

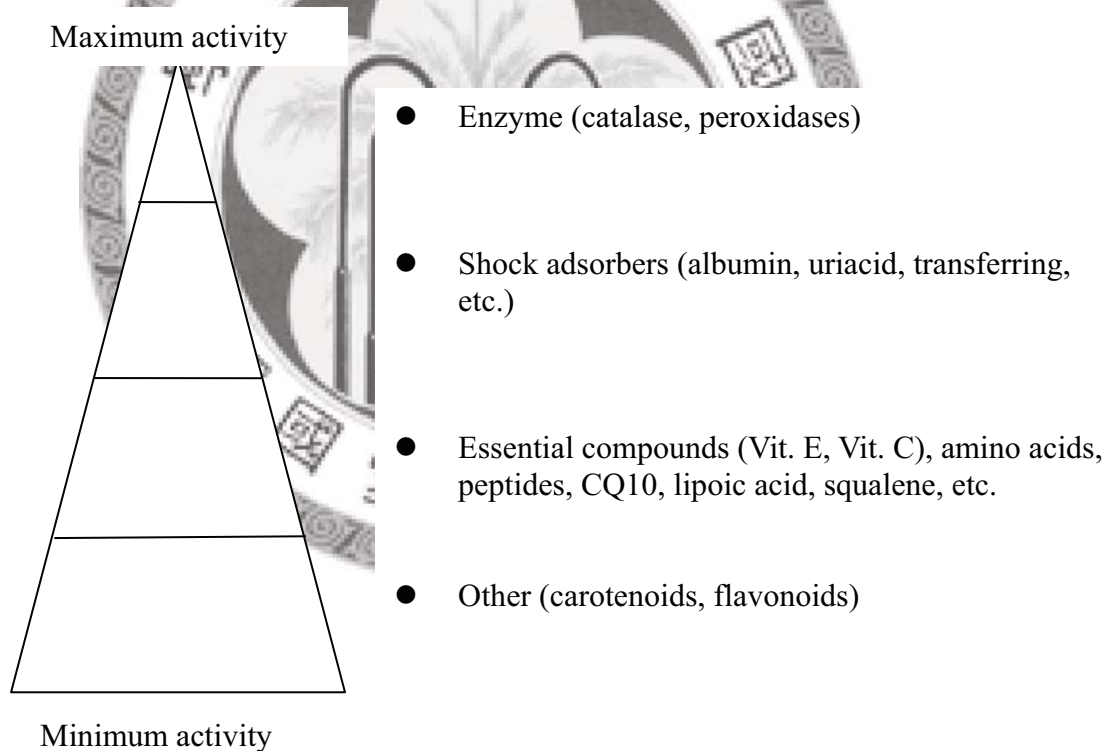
Function/ structure	Type of product
Vitamins	Retinol, vitamin E, vitamin C, nicotinamide, riboflavin, niacin
Fats and lipids	ω -3, ω -6, squalene
Amino acids and thiols	Taurine, L-arginine, histidine, glycine, cysteine; glutamine, methionine, N-acetyl cysteine, S-adenosyl-L-methionine
Peptides	Carnosine, γ -glutamyl cysteinyl glycine (GSH)
Proteins and enzymes	Albumin, thioredoxin, lactoferrin, transferrin, bilirubin, ceruloplasmin, superoxidodismutase, catalase, peroxidase, metallothionein
Plant-derived products	Polyphenols (derivatives of hydroxycinnamic acid, hydroxybenzoic acid, flavonols ^a , flavones ^a , anthocyanidins ^a , flavanols ^a , isoflavones ^a , flavanones ^a , stilbenes, lignans), glucosynolates, carotenoids (α , β , γ , δ -carotene, lycopene, lutein, zeaxanthin, canthaxanthin), phytic acid, allicin
Minerals	Zinc, iron, copper, selenium, chromium
Metabolites	Uric acid, lipoic acid

^a Within the class known also as flavonoids.

(Cornelli et al., 2009)

依據抗氧化物質的潛力可將其分為四個階層(圖 2-7)：

1. 最具抗氧化力的為內生性的抗氧化酵素系統，在體內氧化壓力增加時可被誘導而表現，例如過氧化酶 (peroxidases)、觸媒 (catalase)等。
2. 第二層的抗氧化物質為”迅速清除者”，例如白蛋白 (albumin)、運鐵蛋白 (transferrin)及尿酸 (uric acid)，它們存在血液與組織中，不像內生性的抗氧化系統，因為它們不會因為氧化壓力的增加而被誘發其表現。
3. 第三層為基礎抗氧化物質，例如維他命、微量金屬 (trace metal)、胺基酸以及一些製造複雜分子的中間產物。(例如：合成膽固醇的過程中會產生鯊鯊烯 (squalene)；輔酵素 Q10 (coenzyme Q10) 為細胞色素 (cytochromes) 的成分。)
4. 第四層也是最大的一層，由各種天然物所構成，例如紅蘿蔔素及多酚類物質等。



(*Nutr. Sci. News* 1998;3:352-354)

圖 2-7、抗氧化系統金字塔圖

Figure 2-7 Antioxidant hierarchy

第四節、材料介紹

一、龍眼花

1. 龍眼簡介

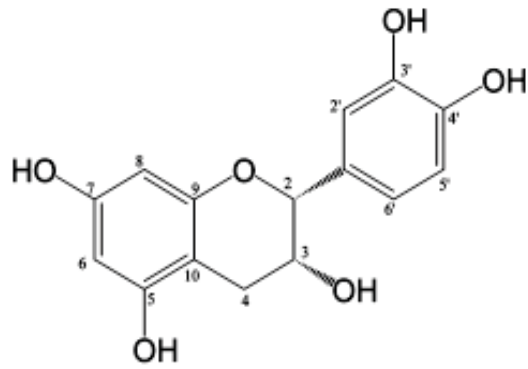
龍眼，學名為 *Dimocarpus longan* Lour.，屬於無患子科 (Sapindaceae) 龍眼屬 (*Dimocarpus*) 之植物。而龍眼花為龍眼樹之花。龍眼屬植物為亞熱帶植物，廣泛生長於中國四川、雲南、廣西、廣東、福建等華南諸省以及、台灣、東南亞等地。本屬植物為常綠喬木，樹齡可達 60~70 年，樹高 5~10 米。葉互生，為偶數羽狀複葉，長橢圓形，基部傾斜。常綠喬木，樹皮棕褐色，粗糙，莖上部多分枝。雙數羽狀複葉互生，小葉 2~6 對，近對生或互生的長橢圓形葉，邊全緣或波狀，上葉面有光澤的暗綠色，下葉面則粉綠。春夏間開黃白色小花，圓錐花序頂生或腋生，有銹色星狀柔毛，為雜性同株，一花軸上有兩性花，每穗小花極多，發育充分者可達 3000 朵以上。

龍眼果實為台灣夏末盛產果實之一，別名有桂圓、福圓、牛眼、圓眼、羊眼果樹、寶圓、益智、亞荔枝、木彈等，其營養豐富甜度高，且含有許多礦物質、維生素及蛋白質，在營養與醫藥上極富價值，並且是良好的蜜源植物。龍眼花於開花時，其蜜腺分泌蜜汁甚多，是良好的蜂蜜來源，而龍眼蜜亦被公認為蜂蜜中的極品 (顏，1994)。在中國傳統用藥中，龍眼花多用來治療白帶、糖尿病及腎臟病 (顧，1967)。

2. 龍眼花成分與功效

龍眼花中含有許多抗氧化物質包括類黃酮、多酚類 (polyphenol)、沒食子酸 (gallic acid)、單寧酸 (tannin) 及原花青素 (proanthocyanidin)。(沈，2005)在龍眼花萃出物抗氧化性研究中發現其具有良好的抗氧化效果，在各種體外抗氧化試驗中，包括 DPPH 清除自由基能力、總抗氧化能力 (TEAC)、氧自由基吸收能力 (ORAC)、均展現較佳抗氧化活性，並且可顯著的延緩以銅離子誘導 LDL 低密度脂蛋白的氧化情況。謝 (2006) 進一步以管柱層析出龍眼花中有效的抗氧化物質，並以 NMR、MASS 和 IR 做鑑定，確認出其有效成分分別為 proanthocyanidin A2 及(-)-Epicatechin (圖 2-8)。

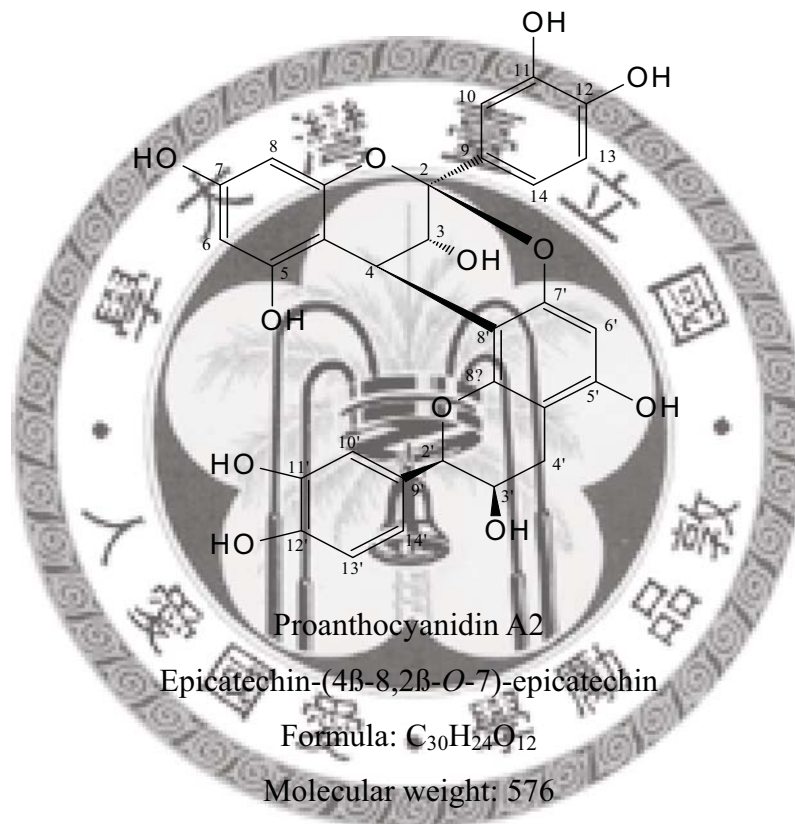
(a)



Formula: $C_{15}H_{14}O_6$

Molecular weight: 290.3

(b)



Proanthocyanidin A2

Epicatechin-(4β→8;2β→O→7)-epicatechin

Formula: $C_{30}H_{24}O_{12}$

Molecular weight: 576

圖 2-8、龍眼花中之有效抗氧化成分

Figure 2-8. The active antioxidative components in Longan flower

(a). (-)-Epicatechin

(b). Proanthocyanidin A2 (epicatechin-(4β→8;2β→O→7)- epicatechin)

二、原花青素(Proanthocyanidins)

1. 簡介

為花青素的前驅物，經酸醇加熱水解後會產生紅色色素，即為植物中之花青素。主要存在於自然界的某些植物的葉、種子、花中。其中食物來源為茶、紅酒、巧克力；水果來源為葡萄、蘋果、漿果類都含有豐富的原花青素。

2. 結構

原花青素以 flavan-3-ol (catechin) 為單體，經聚合成為縮合單寧，原花青素有為多種形式，分別為 A、B 及 C types 等。在各單體間，於 C2-O-C7 以醚鍵為鍵結，並於 C4-C8 或 C4-C6 之間形成鍵結者，稱為 A type proanthocyanidin；於兩個單體間，以 C4-C8 或 C4-C6 間形成鍵結者，稱為 B type；三個以上的單體，以 C4-C8 或 C4-C6 間形成鍵結者為 C type。本研究從龍眼花所純化出來的原花青素為雙聚體的 A type proanthocyanidin。

3. 生理功效

原花青素已被證實有許多生理功效，尤其有顯著的抗氧化功效，包含 DPPH[·] (Hatano et al., 2002)、O₂^{·-} (Facino et al., 1994)、HO[·] (Shahat et al., 2002) 自由基清除能力；抗過氧化酶 (Moini et al., 2002) 並延緩低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化作用 (Osakabe et al., 2002)。在體外研究中發現原花青素有抗病毒 (De Bruyne et al., 1999)、抗細菌 (Howell et al., 1998)、抗發炎 (Sen et al., 2001)、抗癌 (Ray et al., 1999) 等功效。在體內實驗中也被證實，葡萄籽中富含原花青素的萃取物，對於自由基清除的能力以及降低組織氧化傷害的能力優於維生素 C、維生素 E、β-胡蘿蔔素甚至是 trolox (Bagchi et al., 2002)。

然而，由於原花青素的分子量較大，故其生物可利用率並不好，而容易停留在小腸黏膜層上。研究發現由於原花青素會停留在小腸黏膜層，有助於保護小腸黏膜對抗食物中的有害物質。酒精雖被確認為造成咽喉癌以及食道癌之危險因子，然而流行病學研究發現，若飲用紅酒量占其全部飲酒量之 1/3 者，能顯著的減少罹患咽喉癌以及食道癌的機會。另外，由於高分子量的原花青素是很強的過氧化基清除者，在消化道中有助於保護脂質、蛋白質及碳水化合物免於消化時的氧化傷害 (Gronbaek et al., 1998)。

三、兒茶素

1. 簡介

流行病學發現，越來越多的研究顯示每日攝取一些多酚類物質有助於減少罹患冠狀動脈硬化以及心血管疾病的風險 (Knekt et al., 2002)。

茶葉依據其發酵程度分成三種：非發酵茶 (綠茶)、半發酵茶 (烏龍茶) 以及全發酵茶 (紅茶)。茶是少數含有高量的多酚類物質的食材。一般而言，新鮮綠茶以乾重計含有高達 36% 的多酚類物質，而綠茶中主要的多酚類物質為兒茶素。兒茶素主要有四種：epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG) 以及 epicatechin (EC)，也是茶中最主要的抗氧化成分。

2. 生理功效

兒茶素在體內外實驗中，均被證實有許多生理功效。許多文獻指出綠茶萃出物能藉清除自由基以及抑制癌細胞生長因子的傳送 (Katiyar et al, 1996)，達到抗癌 (Katiyar et al, 1996)、抗氧化 (Young et al, 2002) 以及延緩低密度脂蛋白 (LDL) 和極低密度脂蛋白 (VLDL) 氧化作用 (Vinsin et al., 1995) 的功效；另外，在體外試驗中也發現，兒茶素在腸道中能藉抑制葡萄糖運輸蛋白的作用，達到減少糖類吸收進而維持血糖的平衡，對於糖尿病患者有很大的幫助 (Shimizu et al, 2000)。然而，在光氧化 (photooxidative) 的狀況下，綠茶萃出物可能會產生促氧化性，這是由於葉綠素是一種光敏感性物質的關係 (Wanasundara et al., 1998)。

(-)-Epicatechin 屬於 catechin (flavan-3-ol) 家族的一個酚類物質，存在綠茶、紅酒、巧克力及多種水果中 (Arts et al, 2000)。EC 除有抗氧化的效果外，它亦能藉由抑制 NF- κ B 與 DNA 的結合達到抗癌及抗發炎的功效 (Mackenzie et al, 2006)。

3. 生物可利用率

以 Caco-2 單層膜通透模式探討(-)-Epicatechin 及(+)-Catechin 的吸收情況，結果發現(-)-Epicatechin 的吸收有強烈的方向性 (圖 2-9)，basolateral chamber 往 apical chamber 方向的通透率遠大於 apical chamber 往 basolateral chamber 的通透率。但若是給予 MRP 抑制劑 (MK-571) 後，則 apical chamber 往 basolateral chamber 的通透率顯著的大於 control 組的通透率。Vaidyanathan (2001) 推測這

是由於外吐蛋白 MRP 對 EC 有高度專一性所導致。(+) -Catechin 方面，Deprez (2001) 則指出(+) -Catechin 於 Caco-2 單層膜通透模式下有很好的通透率。故不同構形的兒茶素，其生物可利用率可能大不相同。

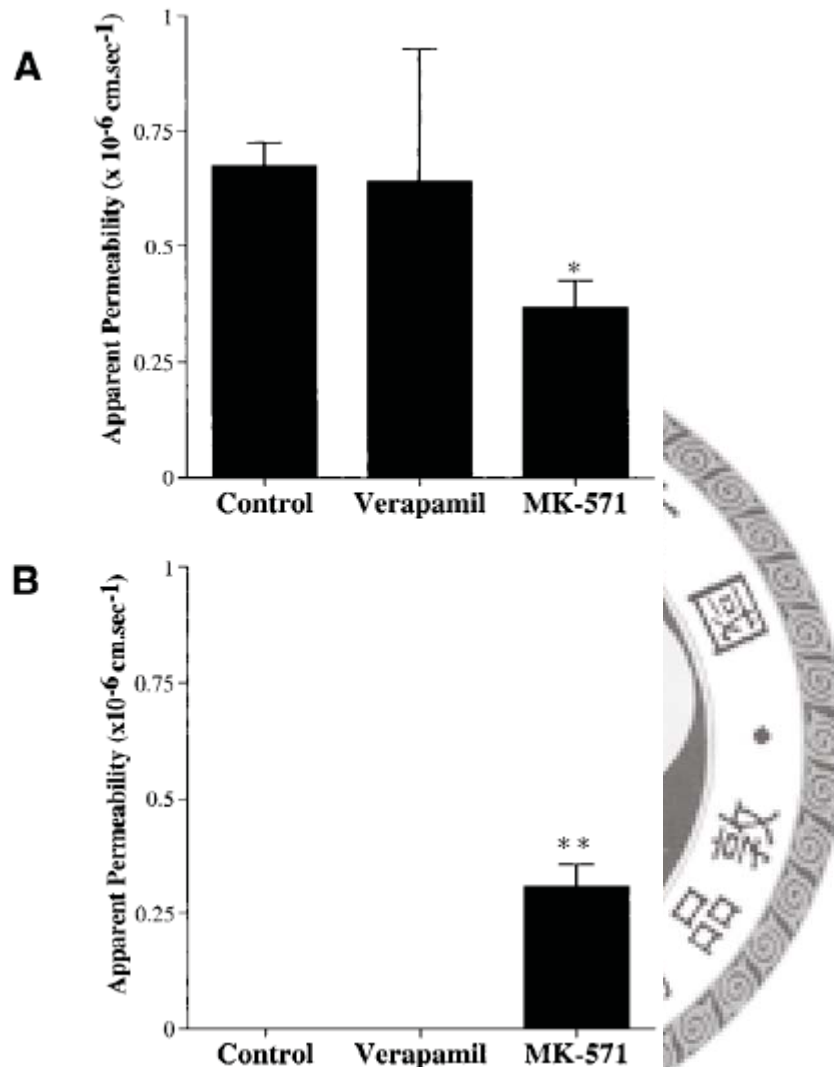


圖 2-9、外吐蛋白抑制劑對 EC 通透 Caco-2 細胞單層膜的影響

Figure 2-9. EC transport in Caco-2 cells in the presence of transport inhibitors. 50 mM EC \pm inhibitors were loaded on (A) the basolateral side or (B) the apical side. Samples were collected for analysis after 3 h. Values are mean \pm SEM (n 4 5–7). (*), significantly lower than control ($P < 0.01$); (**), significantly higher than control ($P < 0.01$). [Verapamil]: 50 mM, [MK-571]: 50 mM

(Vaidyanathan et al. 2001)

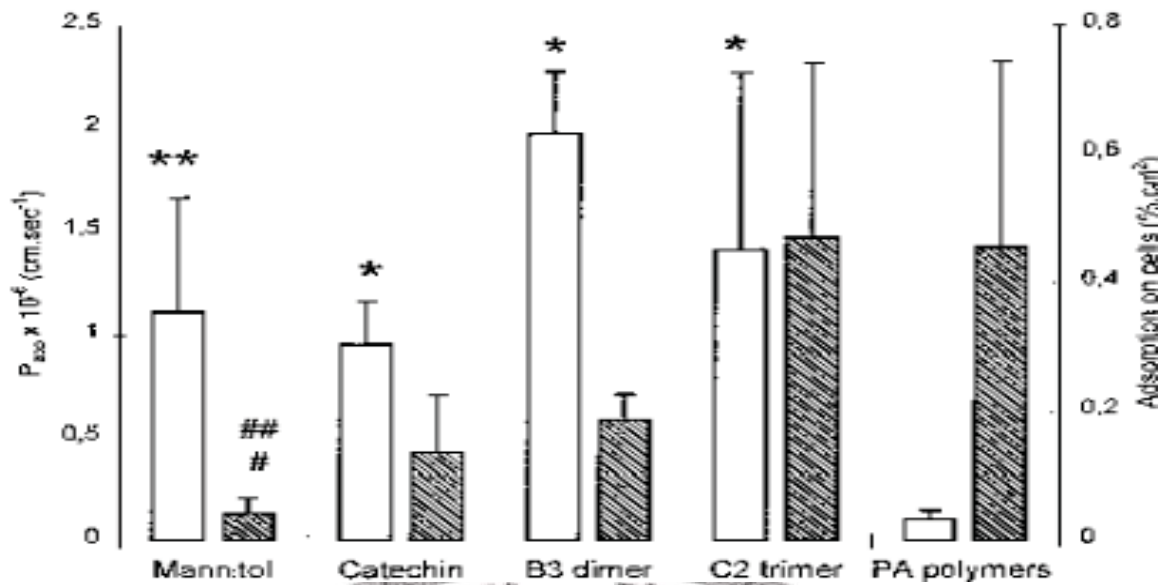


圖 2-10、Caco-2 細胞單層膜對 PAs, (+)-catechin, and mannitol 的吸收率及通透率
 Figure 2-10. Apical to basolateral permeabilities through Caco-2 cell monolayers (empty columns) and adsorption on cells (gray columns) of PAs, (+)-catechin, and mannitol (means \pm SD). * p, 0.05 versus permeability of PA polymers; ** p, 0.005 versus permeability of PA polymers; # p, 0.05 versus adsorption of PA polymers; ## p, 0.005 versus adsorption of C2 trimer.

(Deprez, et al.,2001)

參、 研究目的與實驗架構

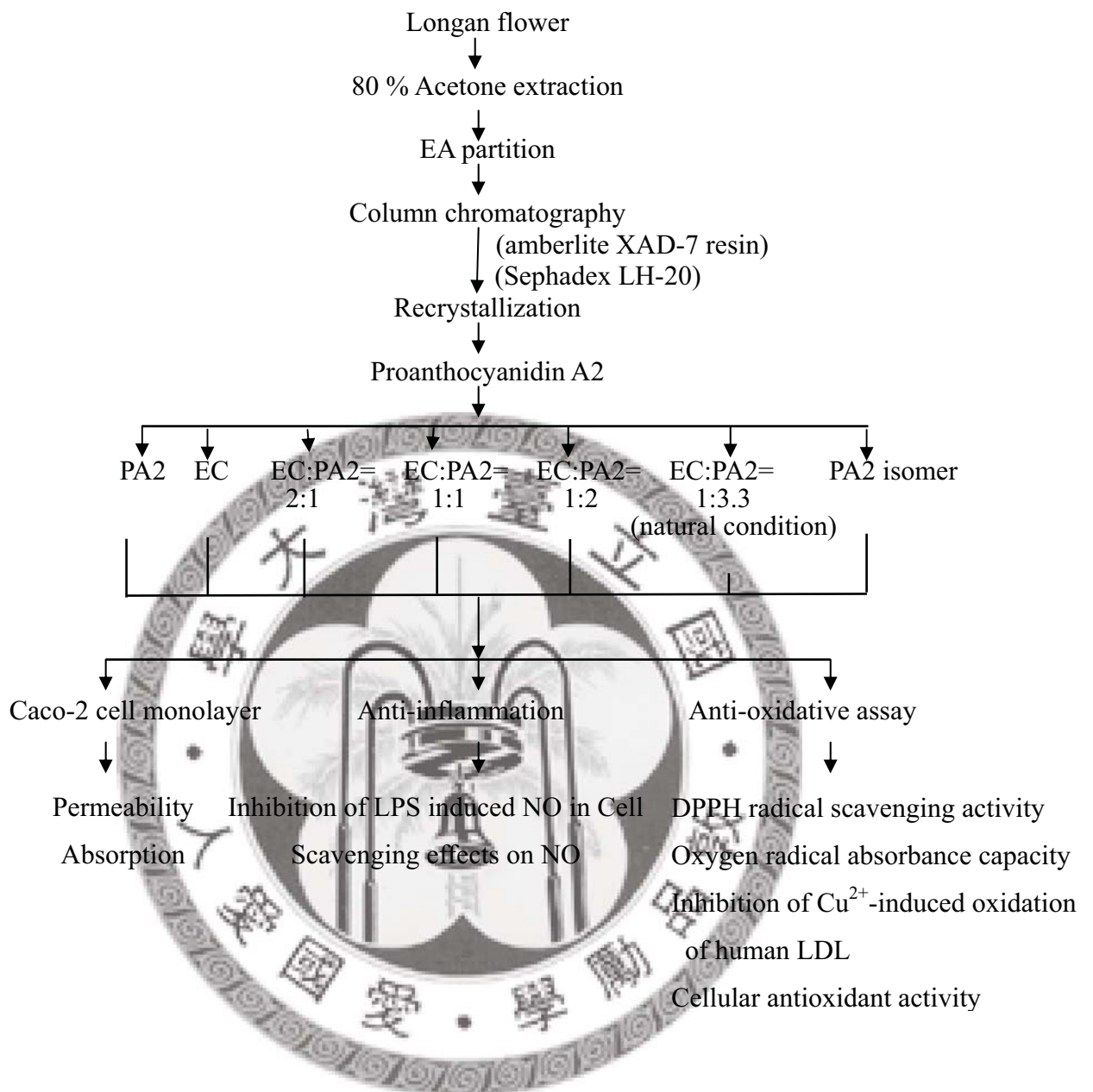
第一節、研究目的

本實驗室之前的研究發現，龍眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 花水萃出物及甲醇萃出物皆具有良好的抗氧化效果 (謝, 2006) 及抗發炎效果 (Ho et al., 2007)。其主要的活性物質為 proanthocyanidin A2 (PA2) 及 (-)-epicatechin (EC)。

然而目前對於 PA2 之生物可利用率則是較少被探討。且由於龍眼花中的 PA2 及 EC 並非單獨存在，故本實驗以不同比例的 PA2:EC (2:1)、(1:1)、(1:2) 和自然狀態中 PA2 及 EC 在龍眼花中存在的比例 (1:3.3) (謝, 2006)，4 個混合組；以及 PA2、EC、PA4 及 PA5，4 個純物質組，進一步探討 PA2 及 EC 以及由 PA2 產生的同分異構物的生物可利用率、抗氧化及抗發炎功效。



第二節、實驗架構



PA : Proanthocyanidin A2

EC : (-)-Epicatechin

肆、材料與方法

第一節、實驗材料與儀器設備

一、實驗材料

本實驗樣品為龍眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 雄花之曬乾物，為 2007 年 4 月所生產，由台灣台南縣南化鄉農會所提供。

二、實驗細胞株

- (1) 人類大腸癌細胞株 (Human colon adenocarcinoma cell line, Caco-2)。本實驗使用之細胞代數控制在 15-25 代之間。
- (2) 小鼠腹腔巨噬細胞腫瘤細胞 RAW 264.7 細胞。
- (3) 人類肝癌細胞 (Hep G2, Hepatocellular carcinoma, human)，本實驗使用之細胞代數控制於 15-35 代之間。

各細胞株均購自食品工業研究所，其原始來源為美國細胞培養暨儲存中心 (American Type Culture Collection, ATCC) (Rockville, MD, USA)。

三、化學藥品與試劑

(一)、化學藥品

1. 下列產品購自美國 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)

Ammonium persulfate：試藥級，純度 99%。

2,2'-Azobis(2-methylpropio-amide) dihydrochloride (ABAP)：試藥級，純度 97%。

Bovine serum albumin：純度 96%。

(+)-Catechin：純度 98%。

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)：試藥級，純度 98%

2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)：試藥級，純度 97%

(-)-Epicatechin：純度 98%。

Epigallocatechin gallate : 純度 98% 。
Flavone : 純度 98% 。
Fluorescein sodium salt (FSS) : 純度 98% 。
Glycerol : 純度 99% 。
Hydrocortisone solution : 細胞培養級 , 純度 98% 。
Lipopolysaccharide (LPS) : (O26 : B7)
Sodium orthoranadate : 純度 90% 。
Superoxide dismutase (SOD) : 細胞培養級 。
Tween- 20 : 純度 90%
Triton X-100 : 純度 90%

2. 下列產品購自 E. Merk 公司 (Darmstadt, Germany) , 皆為試藥級

Acrylamide : 純度 99.5%
Copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) : 純度 99% 。
Potassium chloride (KCl) : 純度 99.5% 。
Sodium bicarbonate (NaHCO_3) : 純度 99% 。
Sodium chloride (NaCl) : 純度 99.5% 。
di-Sodium hydrogen phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) : 純度 99.5% 。
Sodium dodecyl sulfate (SDS) : 純度 99% 。
Sodium pyrophosphate ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) : 純度 99.5% 。

3. 其他

Copper (II) sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) : 純度 97.5% , 購自林純藥株式會社 (Osaka, Japan)
EDTA : 試藥級 , 純度 99.5% , 購自林純藥株式會社 (Osaka, Japan) 。
EGTA : 試藥級 , 純度 99.5% , 購自林純藥株式會社 (Osaka, Japan) 。
 β -glycerophosphate : 試藥級 , 購自 Koch-Light Laboratories 公司 (NY, USA) 。
Glycine : 試藥級 , 純度 99% , 購自石津製藥株式會社 (Osaka, Japan) 。
2-mercaptoethanol : 試藥級 , 純度 99% , 購自 Biochemical 公司 (NY, USA) 。
Naphthylethylenediamine dihydrochloride : 試藥級 , 純度 98% , 購自 Riedel de Haën 公司 (Germany) 。
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) : 試藥級 , 純度 99.7% , 購自 J.T.Baker

(USA)。

Sodium fluoride: 試藥級, 純度 99%, 購自 Nihon Shiyaku 公司 (Osaka, Japan)。

Sodium nitroprusside (SNP) ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$) : 純度 98%, 購自 Riedel de Haën 公司 (Seelze, Germany)。

Sodium pyrophosphate ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) : 試藥級, 純度 98%, 購自 Nacalai Tesque 公司 (Kyoto, Japan)。

Sulfanilamide ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) : 純度 98%, 購自 Riedel de Haën 公司 (Seelze, Germany)。

Tris : 試藥級, 純度 99.8%, 購自 Amresco 公司 (NY, USA)。

(二)、溶劑

Acetone : 試藥級, 純度 95%, 購自 Mallinckrodt Baker 公司 (New Jersey, USA)

Acetic acid : 純度 99.5%, 購自 Riedel de Haën 公司 (Germany)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) : 純度 99%, 購自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany)

Ethyl acetate : 試藥級, 純度 99.5%, 購自 Mallinckrodt Baker 公司 (New Jersey, USA)

Ethyl alcohol : 試藥級, 純度 95%, 購自 Mallinckrodt Baker 公司 (New Jersey, USA)

Formic acid : 純度 99.5%, 購自 林純藥株式會社 (Osaka, Japan)。

Methyl alcohol : 試藥級, 純度 99.8%, 購自 Mallinckrodt Baker 公司 (New Jersey, USA)

Methyl alcohol, anhydrous : 層析級, 純度 99.9%, 購自 Mallinckrodt Baker 公司 (Phillipsburg, New Jersey, USA)

Toluene : 試藥級, 純度 95%, 購自 Mallinckrodt Baker 公司 (New Jersey, USA)

(三)、層析材料

Amberlite XAD-7 resin, 購自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany)

Sephadex LH-20, 購自 Amersham Pharmacia Biotech AB 公司 (Buckinghamshire, UK)

TLC aluminium sheets Silica gel 60 F₂₅₄，購自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany)

四、細胞培養溶液

細胞培養液產品均購自美國 Gibico 公司 (Grand Island, NY, USA)

Antibiotic-antimycotic solution (AA) (cat. 15240-062)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (cat.12800-058)

Fetal bovine albumin (FBS) (cat.26140)

Hank's balanced salt solutions (HBSS) (cat.14175)

Hepes (cat. 15630)

L-Glutamin (cat.21051)

MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA) (cat.11140)

Trypsin-EDTA (cat. 25200)

Williams' Medium E (WME) (cat. 12551)

五、西方墨點法

3M filter paper：購自 Whatman 公司 (Madistone, England)

PVDF membrane (cat. IPVH00010, pore size 0.45 μ m)：購自 Millipore 公司 (Billerica, Massachusetts, USA)。

Enhanced chemiluminescence reagent kit (ECL)：購自 Perkin Elmer 公司 (Waltham, Massachusetts, USA)。

Prestained Protein Ladder (cat.SM0671)：購自 Fermentas Life Sciences 公司 (NY USA)。

Primary antibody：

Mouse anti-iNOS/NOS type II (cat. 610328)：購自 BD Transduction LaboratoriesTM (Lexington, KY,USA)。

Mouse anti-Cox-2 (cat.619203)：購自 BD Transduction LaboratoriesTM (Lexington, KY,USA)。

Mouse anti- β actin(cat. MAB1501)：購自 Chemicon 公司 (Temecula, CA,USA)。

Secondary antibody：

HRP Goat anti-Mouse IgG (cat.554002)：購自 BD Pharmingen™ (CA USA)。

底片：購自 Fujinomiya 公司(Shizuoka, Japan)。

六、儀器設備

(一)、一般儀器設備

分析天平 (Analytical balance)：Model 1712，Sartorius 製造 (Goettingen, Germany)

離心式真空濃縮機 (Centrifugal vacuum concentrator)：Model SCV100H, Savant 公司製造 (Farmingdale, NY, USA)。

冷凍乾燥機 (Freeze dry system with purge valve)：Model SFD-25，長融實業公司製造 (Taipei, Taiwan)。

多功能全光譜分析儀 (Multi-detection microplate reader)：Synergy HT，BIO-TEC 公司製造 (Atlanta, GA, USA)。

酸鹼度計 (pH meter)：Model SevenEasy，Mettler Toledo 公司製造 (Flawil, Switzerland)。

恆溫振盪水浴槽 (Shaking water)：Model 905, Hotech 公司製造 (Taipei, Taiwan)。

減壓濃縮機 (Rotary evaporator)：Model RE111，Buchi 公司製造 (Flawil, Switzerland)。

(二)、化學分析儀器設備

高效能液相層析系統 (HPLC system)

自動注射裝置：Model S5200，Schambeck SFD 公司製造 (Bad Honnef, Germany)。

管柱保溫裝置 (Column oven)：Model EOC-1，立行公司製造 (Taipei, Taiwan)。

溶媒除泡裝置 (Degasser)：Model L-7610，Hitachi 公司製造 (Toyko, Japan)。

層析幫浦 (Chromatographic pump)：Model PU-2080，Jasco 公司製造 (Toyko, Japan)。

紫外線偵測器(UV-Vis dector)：Model L-7420，Hitachi 公司製造 (Toyko,

Japan)。

層析信號積分軟體 (Chromatographic data system) : SISC chromatogram data system 軟體，購自訊華公司 (Taipei, Taiwan)。

逆向碳 18 分離管柱 (Reversed-phase column) :

Analytic column-Waters Atlantis[®] T3 C18 (4.6mm × 150mm, 3μm particle size), Waters 公司製造 (Milford, Massachusetts, USA)。

Preparative column-Waters Atlantis[®] T3 C18 (19 × 150mm, 5μm particle size), Waters 公司製造 (Milford, Massachusetts, USA)。

結構鑑定相關儀器設備 :

液相層析串聯質譜儀 (Liquid chromatography tandem mass spectrometer, LC-MS/MS) : LXQ Linear Ion Trap Mass Spectrometer, Thermo Scientific 公司製造 (Waktham, Massachusetts, USA)。

高磁場核磁共振儀 (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer) : Bruker Avance-500MHz FT-NMR, Bruker 公司製造 (Rheinstetten, Germany)。

(三)、細胞實驗儀器設備

二氧化碳培養箱 (CO₂ incubator) : Model 310, Thermo Forma 公司製造 (Mariette, Ohio, USA)。

離心機 (Centrifuge) : Model 2100, KUBOTA 公司製造 (Tokyo, Japan)。

倒立式光學顯微鏡 (Inverted Microscope) : Model TE300, Nikon 公司製造 (Kanagawa, Japan)。

生物安全操作台 (Larminar flow) : Model TBH-420, 炬安儀器公司 (Taipei, Taiwan)。

單鍵式計數器 (Manual Counter) : 購自 Milky 公司 (Taipei, Taiwan)。

細胞電阻測定儀 (Millicell-RES voltohmmeter) : 購自 Millipore 公司 (Bradford, MA, USA)。

八爪微量分注器 (Multiple pipetman) : Model P200, Brand 公司製造。

血球計數盤 (Neubauer improved bright-line heamocytometer) : Neubauer 公司製造 (Marienfeld, Germany)。

微量分注器 (Pipetman) : Model P20, P200, P1000, Gilson 公司製造

(Middletown, WI, USA)。

電動吸管輔助器 (Pipet-Aid)：Model Portable XP，Drummond 公司製造 (Broomall, PA, USA)。

電泳膠體製備器 (Dual gel caster)：Model SE245，Hofer 公司製造 (CA, USA)。

小型蛋白質電泳槽 (mini-vertical gel electrophoresis unit)：Model SE260，Hofer 公司製造 (CA, USA)。

電泳電源提供器 (Electrophoresis power supply)：Model 250-90，Thermo 公司製造 (Milford, MA, USA)。

直立式電泳轉漬槽 (Tank transfer unit)：Model TE22，Hofer 公司製造 (CA, USA)。

(四)、實驗耗材

96 well 透明盤：cat.167008，Nunc 公司製造 (Roskilde, Denmark)。

96 well 黑盤：cat.137101，Nunc 公司製造 (Roskilde, Denmark)。

離心管 (15mL、50 mL)：Nunc 公司製造 (Roskilde, Denmark)。

Polycarbonate membrane transwell insert：cat.3401 (12 well, membrane pore size 0.4 μ m, diameter 12mm, polycarbonate membrane)，Corning Costar 公司製造 (Cambridge, MA, USA)。

培養皿：Nunc 公司製造 (Roskilde, Denmark)。

無菌過濾膜 (0.45 μ m)：購自 Millipore 公司 (Brdford, MA, USA)。

七、實驗各種溶液配方

(一) Phosphate-buffer saline (PBS)

Ingredients	mM	g/L
NaCl	136.9	8.0
KCl	2.7	0.2
KH ₂ PO ₄	1.5	0.2
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	8.0	1.43

將上述藥品配於 1L 去離子水中，攪拌至完全溶解，過濾後 (Whatman No.1) 即為 1 倍之 PBS，分裝於血清瓶中，以滅菌釜於 121°C 滅菌 20 min，

於室溫下冷卻後，保存於 4°C 冰箱備用。

(二) Basal DMEM (b-DMEM)

將 DMEM 粉末 (避光貯存於 2-8°C) 加入裝有 950 mL 的室溫去離子水及攪拌子的乾淨燒杯中。攪拌至溶解加入 3.7 g/mL NaHCO₃，以 1 N NaOH 或 1 N HCl 調整至 pH 7.2，並以去離子水將溶液以定量到 1 L。在 Laminar flow 中以除菌過濾杯過濾，並分裝至已滅菌的 500 mL 血清瓶中每 450 mL 分裝一瓶，保存於 4°C 冰箱備用。

(三) Complete DMEM (c-DMEM)

在 Laminar flow 中將 50 mL FBS、5 mL AA 及 5 mL NEAA 加入 450 mL b-DMEM 中，混勻後保存於 4°C 冰箱備用。

(四) Serum free-Williams' Medium E (sf- WME)

於 500 mL WME 中加入 2 mM L-glutamin 後以 0.22 μm 濾膜過濾，再加入 5mL Hepes 即完成 SF- WME，保存於 4°C 冰箱備用。

(五) Complete Williams' Medium E (c-WME)

SF-WME 中加入 5% FBS、0.05 μg/mL hydrocortisone、5 μg/mL insulin、1% AA 保存於 4°C 冰箱備用。

(六) MTT 溶液

將黃色 MTT 粉末溶於 PBS 中配製成 1 mg/mL 之溶液，在 Laminar flow 中以 0.22 μm 濾膜過濾，避光保存於 4°C 冰箱備用。

(七) 西方墨點法之溶液

(1) Gold lysis buffer (蛋白質萃取液) 250mL

20 mM Tris-HCl, pH 7.9	0.6057 g
10% Glycerol	25 g
1% Triton X-100	2.5 g
1 mM Sodium pyrophosphate (Na ₄ P ₂ O ₇)	0.064238 g
137 mM NaCl	2.003288 g
5 mM EDTA	0.3653 g

1 mM EGTA	0.095088 g
10 mM NaF	0.104975 g
100 μ M β -glycerophosphate	0.00054 g

取上述配好之 Gold lysis buffer 50ml 加入

1 mM NaVO_4 、1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin 、1 mM PMSF

(2) Sample buffer 配好後 100°C 10 min 備用 10 mL

350 mM Tris-HCl (pH 6.8)	3.5 mL
30 % 2-mercaptoethanol	3 mL
12% sodium dodecyl sulfate (SDS)	1.2 g
35% glycerol	3.5 mL
0.02% bromophenol blue	2 mg

(3) Tris-glycin electrophoresis buffer (5x SDS-PAGE running buffer)

25 mM Tris	15.1 g
250 mM glycine	95 g
0.1% SDS	50 mL (10%SDS)

in 1L ddhH₂O

(4) Transfer buffer (5x) 1L

25 mM Tris-HCl (pH 8.9)	15g	Transfer buffer stock solution
192 mM glycine	72g	
ddhH ₂ O	1 L	
Transfer buffer (5x)	1 L	Transfer buffer working solution
ddH ₂ O	3 L	
methanol	1L	

(5) Blocking solution

20 mM Tris-HCl pH 7.4	0.24 g
125 mM NaCl	0.7 g
0.2% Tween 20	0.2 mL
1% bovine serum albumin or (4% non-fat dry milk)	1 g
0.1% sodium azide	0.1 g

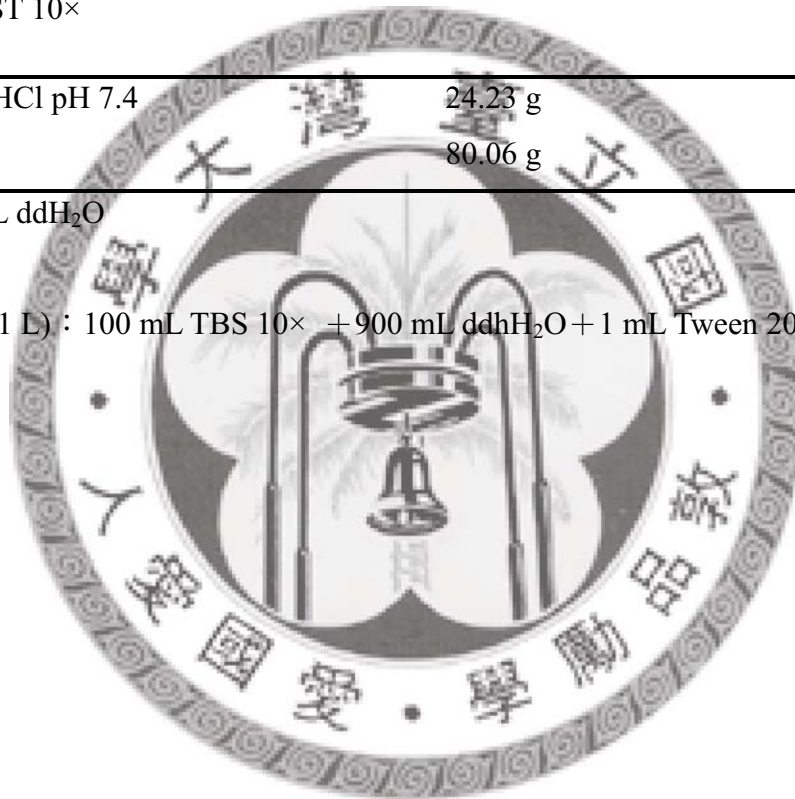
in 1 L PBS

(6) TBST 10×

Tris-HCl pH 7.4	24.23 g
NaCl	80.06 g

in 1 L ddH₂O

TBST (1 L) : 100 mL TBS 10× + 900 mL ddH₂O + 1 mL Tween 20



第二節、實驗方法

一、Proanthocyanidin A2 及其 isomer 之分離純化

(一) 龍眼花 80%丙酮萃取物之製備

龍眼花 (3 kg) 加入 10 L 80%丙酮，置於室溫下靜置萃取，並每日以不銹鋼棒攪拌數次以提升萃取效果。浸泡兩天後以 Whatman No.1 濾紙過濾，萃殘物再加入 10 L 80%丙酮進行第二次萃取，反覆上述步驟 3 次，濾液以 TLC 點片確認目標物是否全數萃出 (TLC 點片條件如後述)。合併濾液以減壓濃縮去除溶劑後，剩餘水分則以冷凍乾燥機去除，即得龍眼花丙酮萃出物 (LF-A)，並保存於 -20°C 冰箱備用。

(二) 龍眼花 80%丙酮萃取物之溶劑區分萃取

龍眼花丙酮萃出物 150 g 溶解於 1.5 L 去離子水後，加入與水同體積之乙酸乙酯 (1.5 L) 於分液漏斗中搖晃後靜置，待分層後收集乙酸乙酯層，剩餘之水層再以同體積之乙酸乙酯重複萃取，反覆萃取 4 次。合併各乙酸乙酯層，經減壓濃縮去除溶劑即得乙酸乙酯區分物 (LF-A-EA)，保存於 -20 °C 冰箱備用。以進行 amberlite XAD-7 resin 管柱層析。

(三) Amberlite XAD-7 resin 管柱層析

由乙酸乙酯區分萃取所製備之次區分物 (龍眼花丙酮粗萃取之乙酸乙酯區分層，LF-A-EA)，進一步以 amberlite XAD-7 resin 管柱予以純化。

1. 管柱充填

先將棉花塞入玻璃管柱底部 (直徑 4 cm，管柱長 55 cm)，將 amberlite XAD-7 resin 浸潤於 25 % 甲醇中，攪拌膠體使其懸浮，迅速將膠體充填至玻璃管柱中，並打開旋轉閥，使沖提液 (25% 甲醇) 流下，並拍打管壁使 resin 填充緊實，再以 25 % 甲醇流洗 2 倍管柱體積以完成管柱充填。

2. 樣品注入

使 25 % 甲醇流洗液降至膠體頂端即停止流洗。將樣品 (25 g LF-A-EA fraction) 溶於少許甲醇中，以玻璃滴管緩緩將樣品加入膠體頂端，打開旋轉

閥，待樣品完全進入 resin 後，將 25 % 甲醇小心加入管柱中進行沖提。

3. 沖提條件

依極性由小到大配置移動向：

25 % 甲醇	1 L
40% 甲醇	1 L
55% 甲醇	1.5 L
70% 甲醇	1.5 L
100% 甲醇	1 L
Acetone:H ₂ O	2 L

沖提時溶劑未加壓，靠重力自然通過管柱，流速約 16 mL/min。以三角錐形瓶收集沖提液。以薄層層析分析各收集瓶，將含有目標樣品的收集瓶集合起來，以減壓濃縮至少量後，將濃縮物轉入已秤重之 20 mL 樣品瓶中，最後以離心式濃縮機抽乾溶劑並秤量瓶重，扣掉原本空瓶重即可得到此區分層之乾物重量。

4. 薄層層析法 (Thin layer chromatography, TLC)

將 amberlite XAD-7 resin 管柱層析所得到之各瓶次區分層進行薄層層析，分析條件如下：

- (1) TLC 片：Silica gel 60 F₂₅₄
- (2) 展開液：Eathyl Acetate：Toluene：Formic acid=6：3：1 (voulmn ratio)
- (3) 呈色方法：以溶劑展開後的 TLC 片，快速浸於顯影劑中 (Anisaldehyde sulphuric acid reagent)。配製方法：於 0.5 mL Anisaldehyde 中依序加入 10 mL 冰醋酸、85 mL 甲醇及 5 mL 濃硫酸)。

稍微瀝乾後置於加熱板上烘烤，直到 TLC 片上的明顯點出現為止。

(四) Sephadex LH-20 管柱層析

由 amberlite XAD-7 resin 管柱製備之次區分層 (LF-A-EA-XADII)，進一步以 Sephadex LH-20 管柱予以純化。

1 管柱填充

先將棉花塞入玻璃管柱底部 (直徑 4 cm，管柱長 55 cm)，將 Sephadex LH-20 浸潤於乙醇中，攪拌膠體使其懸浮，迅速將膠體充填至玻璃管柱中，並打開旋轉閥，使充提液 (乙醇) 流下，待其膠體自然沉降於穩定高度，並以乙醇流洗 2 倍管柱體積以完成管柱充填。

2 樣品注入

使流洗液降至膠體頂端即停止流洗。將樣品 (10 g LF-A-EA-XADII) 溶於少許甲醇：乙醇 (1:1, v/v) 中，以玻璃滴管緩緩將樣品加入膠體頂端，打開旋轉閥，待樣品完全進入膠體後，將乙醇小心加入管柱中進行沖提。

3 沖提條件

沖提液為乙醇，流速約 4 mL/min，每瓶收集 50 mL 沖提液，以 TLC 點片分析，檢視各區分所含之成分，將含有 proanthocyanidin A2 者合併，再經減壓濃縮抽乾溶劑，可得到區分層粉末。

4 以再結晶法得到 proanthocyanidin A2

取 TLC 片上顯示 proanthocyanidin A2 含量較多之次區分層，每 0.15 g 次區分層，以 1 mL 甲醇溶解後加入 3 mL 去離子水，略加溫 (60°C) 後靜置 16 hr，以抽氣過濾法將結晶洗下，以少許水清洗結晶並以冰甲醇 (-80°C) 將結晶上雜質洗去，將結晶收集到已秤重之 20 mL 樣品瓶中，最後以離心式濃縮機抽乾溶劑並秤量瓶重，扣掉原本空瓶重即可得到 proanthocyanidin A2 重量，並以高效能液相層析儀 (HPLC) 分析 proanthocyanidin A2 純度。

(五) Proanthocyanidin A2 同分異構物之純化

在 37°C，200 mL 純水中加入 300 mg NaHCO₃ 完全溶解後，加入 200 mg proanthocyanidin A2 (溶於 2 mL DMSO)，置於 37°C 水浴槽 2 hr 後，以乙酸乙酯萃取 3 次 (3×200 mL) 後，於氮氣下吹乾並回溶於甲醇中，以 HPLC 進行分析，並以製備型管柱收集目標物。

(六) 高效能液相層析儀 (HPLC) 分析條件

分離管柱：Waters Atlantis T3 (4.6 × 150 mm, 5 μm)

沖提液 A：含 0.5 % acetic acid 之層析用水

沖提液 B：層析用甲醇

沖提條件：

時間(min)	沖提液 A	沖提液 B
0~6	80 %	20 %
6~25	65 %	35 %
25~35	5 %	95 %

流速為 0.8 mL/min，檢測波長：280 nm，注射量：20 μ L。

(七) 質譜分析

將 HPLC 分離出來之 proanthocyanidin A2 及其 isomer 收集下來，用 infusion 的方法注入質譜儀，進行 ESI-MS 之分析，以獲得分子量資訊。檢測條件為：source voltage 4.5 kV，spray current 0.03 μ A，sheath gas flow rate 30 arb，capillary voltage-20V，capillary temperature 200 $^{\circ}$ C。

二、Proanthocyanidin A2 及 epicatechin 之穩定性分析

各實驗所使用之細胞以及該細胞所使用之培養液：

實驗	細胞	培養液
通透試驗	Caco-2 cell	HBSS
抗發炎試驗	RAW 264.7 cell	b-DMEM
抗氧化試驗	Hep G2 cell	sf-WME

(一) 樣品配製

將各所需樣品溶於 DMSO 中 (mg/mL) 配製成 stock，進實驗時以細胞培養液稀釋 (各樣品最終 DMSO 濃度 < 0.5%)。

(二) 於細胞通透試驗環境中樣品之穩定性分析

培養液組：於 24 well plate 中加入以 HBSS 之樣品 (各樣品最終 DMSO 濃度 < 0.05%) 置於 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO_2 的恆溫培養箱中後，於各時間點取出樣品液，以乙酸乙酯萃取 2 次後，於氮氣下吹乾並回溶於甲醇中，以 HPLC 進行分析。

有 Caco-2 細胞共同培養組：於 24 well plate 中加入以 c-DMEM 稀釋之細胞液 1 mL，細胞濃度為 1×10^6 cell/well。置於 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO_2 的恆溫培養箱中培養 24 hr 後，移除培養液，以 PBS 清洗一次後加入以 HBSS 稀釋樣品 (各樣品最終 DMSO 濃度 < 0.05%)，置於 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO_2 的恆溫培養箱中，於各時間點取出培養液，以乙酸乙酯萃取 2 次後，於氮氣下吹乾並回溶於甲醇中，以 HPLC 進行分析。

(三) 於細胞抗發炎試驗環境中 PA2 之穩定性分析

培養液組：於 24 well plate 中加入以 b-DMEM 之樣品 (各樣品最終 DMSO 濃度<0.05%) 置於 37°C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中後，於各時間點取出樣品液，分析方法如同前段所述。

有 RAW 264.7 細胞共同培養組：於 24 well plate 中加入以 c-DMEM 稀釋之細胞液 1 mL，細胞濃度為 1×10^6 cell/well。置於 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中培養 24 hr 後，移除培養液，以 PBS 清洗一次後加入以 b-DMEM 稀釋樣品 (各樣品最終 DMSO 濃度<0.05%) 或添加 SOD (superoxide dismutase) 10 U/mL，置於 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中，於各時間點取出培養液，分析方法如同前段所述。

(四) 於細胞抗氧化試驗環境中 PA2 之穩定性分析

培養液組：於 24 well plate 中加入以 sf-WME 之樣品 (各樣品最終 DMSO 濃度<0.05%) 置於 37°C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中後，於各時間點取出樣品液，分析方法如同前段所述。

有 Hep G2 細胞共同培養組：於 24 well plate 中加入以 c-WME 稀釋之細胞液 1 mL，細胞濃度為 1×10^6 cell/well。置於 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中培養 24 hr 後，移除培養液，以 PBS 清洗一次後加入以 sf-WME 稀釋樣品 (各樣品最終 DMSO 濃度<0.05%)，置於 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中，於各時間點取出培養液，分析方法如同前段所述。

三、以 Caco-2 細胞模式探討通透率及吸收率

(一) 細胞培養

Caco-2 細胞置於 DMEM 含 10 % FBS、10,000 U/mL penicillin、10 mg/mL streptomycin、5 mg/mL amphotericin 的培養基中，於 10 cm 培養皿中培養，置於 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中。每兩天更換一次培養液，約 4~5 天後細胞可長至八分滿，此時即需進行繼代培養。

(二) 細胞繼代培養

當細胞長至八分滿時，移除舊培養液，以 5 mL PBS 清洗細胞兩次。加入 1 mL

Trypsin-EDTA，輕搖培養皿以覆蓋所有細胞，置於 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中 5 min，使細胞脫離底盤。取出培養皿，以 4 mL c-DMEM 培養液充分打散後，置入 15 mL 離心管中離心 (1000rpm, 5 min)，移除上清液後，加入 3 mL c-DMEM 充分打散細胞。細胞液經錐藍氏液稀釋 16 倍後，以血球計數板計數，最後以 2×10^6 cell/plate (10cm 培養皿) 之細胞密度進行細胞培養。

(三) Transwell insert 培養

為使細胞貼附情形良好，取新的 Transwell insert 在使用前 2 hr，須先加入 c-DMEM 培養液濕潤半透膜，在上層加入 0.5 mL 及在下層加入 1.5 mL，於 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中培養。移除上下層培養液後，在上層加入 Caco-2 細胞液 0.5 mL，密度為 5×10^5 cell/cm²；下層加入 c-DMEM 培養液 1.5 mL，於 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中培養，每 2 天更換上下層培養液。Caco-2 細胞單層膜培養模式如圖 2-3。

(四) 單層細胞膜完整性測試

Caco-2 細胞在 transwell insert 中培養 21 天左右，細胞應已形成完整的單層膜 (monolayer)。以 Millicell-ERS (Millipore corp., Bedford, MA, USA) 測量 Caco-2 細胞單層膜之 transepithelial electrical resistance (TEER) 電阻值。測量前一晚先將感應器置於培養液中，放入 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中。偵測前先以 70 % 酒精消毒，將感應器之短邊伸入 transwell insert 中；長邊伸入下層培養盤中，確定感應器完全浸入培養液中，在按下儀器上 measure button 開始偵測，待數值穩定後計錄之。當 TEER 數值大於 $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 即表示已形成完整的單層膜。(Deprez, et al., 2001)

(五) Caco-2 細胞單層膜通透率試驗

當 Caco-2 細胞培養 21 天以上，TEER 數值大於 $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ，形成完整單層膜，並且可表現小腸細胞特性。本實驗參考 Hilger 等人(1990)、Boyer 等人(2004) 及 Yi 等人(2006) 之方法並加以修改。當 Caco-2 細胞培養 21 天後，將 transwell insert 上下層培養液吸出，以 PBS 清洗 3 次後，上層加入待測樣品 0.5 mL (以含 25 mM HEPES 之 HBSS 稀釋樣品，溶劑最終濃度 < 0.02%)，下層加入含 25 mM

Hepes 之 HBSS 1.5mL，再放回 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中作用。於實驗設計之各時間點，分別取出上下層溶液，以含 0.5 % 醋酸之乙酸乙酯萃取 2 次後，以離心式真空濃縮機將萃取液抽乾，回溶於甲醇後以前述之 HPLC 方法 (p. 39) 分析各樣品在接受層(receiving side)及給予層(donor side)中之含量，並以下式計算。接受層溶液為樣品被吸收的部分，給予層溶液則代表未被吸收仍停留在單層膜上方者。

通透率計算 (Apparent Permeability coefficient, P_{app}) :

$$P_{app} = \frac{dC}{dt} \times \frac{V}{(A \times C_0)}$$

P_{app} 的單位為 cm/s，其中 dC/dt 為接受側隨時間而改變的濃度 (μM/s)；V 為接受側的體積 (cm³)；A 為聚碳脂膜的表面積 (cm²，本實驗所選用者為 1.12 cm²)；C₀ 為待測物在給予側的初始濃度 (μM) (Artursson et al., 1991)。

(六) 各樣品經 Caco-2 細胞單層通透試驗後之分佈

各樣品經 Caco-2 細胞單層通透試驗後之分佈的分析方法參考 Hilger 等人 (1990)、Boyer 等人 (2004) 及 Yi 等人 (2006) 之方法並加以修改。樣品於單層膜上下層之分析方法同通透率試驗。樣品於細胞層部分之分析方法如下：於實驗設計之各時間點，分別吸取上下層溶液後，以 HBSS 清洗細胞單層膜 3 次，將單層膜取下後置於含有 1 mL 甲醇的 eppendorf 中，以超音波震盪 15 min，離心 (2000g, 5 min) 後收集上層液。細胞部分重複萃取，再加入甲醇 1 mL，振盪 1 min，離心 (2000g, 5 min) 後收集上層液。此過程重複 2 次。合併上層液後以離心式真空濃縮機移除溶劑，最後以 0.5 mL 甲醇回溶後以 HPLC 進行定量分析，HPLC 分析條件見 P.35。

分佈計算：各層分佈 (%) = (樣品在該層的濃度) / (起始加入在提供測的樣品濃度) %

四、以 RAW 264.7 探討樣品之抗發炎效果

(一) 化學 NO (Nitric oxide) 整合能力測定

1. 試驗樣品配製

將各樣品溶於甲醇中配製成 stock (mg/mL)，進實驗時以甲醇將各樣品稀釋至所需濃度。

2. 化學 NO (Nitric oxide) 整合能力測定

本試驗參考 Ho (2007) 等人之方法加以修改。取 4 mL 不同濃度之樣品與 1 mL SNP 溶液 (25 mM sodium nitroprusside in PBS buffer) 混合後於 37°C 下反應 150 min。取 0.3 mL 反應液添加 0.3 ml Griess reagent (1% sulfanilamide 溶於 5% 磷酸溶液及 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride 溶於水中) 反應 10 min 後，測定其於波長 550 nm 下之吸光值，代入標準曲線以求得 NO 生成量。而亞硝酸鹽的標準濃度曲線則使用不同濃度之 sodium nitrite 以去離子水稀釋做為標準液，與 Griess reagent 反應後製得。

(二) 樣品抑制 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞 NO 生成測定

1. 細胞培養與繼代

小鼠 RAW 264.7 巨噬細胞置於 c-DMEM 含 10% 胎牛血清 (fetal bovine albumin, FCS)，10,000 U/mL penicillin，10 mg/mL streptomycin，0.025 mg/mL amphotericin 的培養液中，於 10 cm 培養皿中培養，並於 37°C、含 5% CO₂ 的恆溫培養箱中培養。當細胞長至 8-9 分滿時，移除培養基中培養液並以 PBS 沿皿壁加入沖洗後，輕拍培養皿使細胞脫落培養皿底部，以新鮮培養液打散細胞，約稀釋 6 倍進行繼代培養或進行實驗。

2. 細胞存活率分析-MTT assay

本實驗參考 Mosmann 等(1983)的作法並加以修改。

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl (MTT) 是一種水溶性的 tetrazolium salt，溶解於 PBS 緩衝液中，形成淡黃色的溶液。MTT 會被細胞粒線體中的琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase) 作用，切斷 MTT 結構上的 tetrazolium ring，而轉變成紫色水不溶性的 formazan 結晶物質。當紫色結晶形成後，加入 DMSO 將之

溶解，MTT formazan 的生成量可藉由 570 nm 吸光值測得。故當細胞存活數越多則粒腺體的呼吸作用越旺盛，而其琥珀酸去氫酶的活性也越好，生成 formazan 的量也越多，則有較高的吸光值。以此比較實驗組與對照組的吸光值，則可代表細胞存活情形。

RAW 264.7 細胞於 10 cm 培養皿生長達八、九分滿時，進行繼代培養，以 trypan blue 色素排除法計數細胞濃度後種入 96 孔盤(1×10^6 cell/mL, 200 μ L/well c-DMEM)，培養 24 hr 後移去舊的培養基，以 100 μ L PBS 緩衝液清洗每孔一次，加入以 b-DMEM 培養液配置的適當樣品濃度 (加入 100 μ L/well)，培養 24 hr 後移去舊的樣品培養液，以 100 μ L PBS 緩衝液清洗每孔一次，加入以 PBS 配置的 MTT 溶液 (1 mg/mL) 100 μ L 作用 15 min，移除 MTT 溶液後，再加入 100 μ L DMSO 以溶解細胞，測其 570 nm 下吸光值。以不添加樣品之 b-DMEM 之組別作為對照，計算可得細胞存活率 (cell viability)。

計算公式如下：

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \%$$

A_s ：加樣品之 A_{570} 值

A_c ：不加樣品之 A_{570} 值

A_b ：空白試驗之 A_{570} 值

3. 樣品配製

將各所需樣品溶於 DMSO 中配製成 stock (mg/mL)，進實驗時以 b-DMEM 稀釋 (各樣品最終 DMSO 濃度 < 0.05%)。

4. Nitrite 測定

亞硝酸鹽的濃度可做為細胞內 iNOS 活性的指標。參考 Kim 等(1995)的作法，將 RAW 264.7 以 6×10^4 cell/well 之濃度置於 96-well 靜置 24 hr。移除舊培養液，以 PBS 洗三次後，加入以 b-DMEM 稀釋各濃度樣品及大腸桿菌脂多醣體 (LPS) (最終濃度 1 μ g/mL)，反應 24 hr。取 100 μ L/well 細胞培養液於 96-well plate 中以 1:1 (v/v) 加入 100 μ L 的 Griess reagent，避光反應 10 min 後，用 ELISA reader 測定亞硝酸鹽的含量，其吸收波長為 550 nm。而亞硝酸鹽的標準濃度曲線則使用不同濃度之 sodium nitrite 以 b-DMEM 稀釋做為標準液。並且以下公式計算樣品抑制細胞內亞硝酸鹽產生的效果。抑制率 = $(\text{NO}_{\text{LPS}} - \text{NO}_{\text{sample+LPS}}) / (\text{NO}_{\text{LPS}} -$

$\text{NO}_{\text{control}} \times 100\%$ ，其中 NO_{LPS} 為細胞只給予 LPS 所產生的 NO 量； $\text{NO}_{\text{control}}$ 為細胞未給予 LPS 所產生的 NO 量； $\text{NO}_{\text{sample}+\text{LPS}}$ 為細胞只給予 LPS 及樣品所產生的 NO 量。

(三) iNOS、COX-2 蛋白質表現分析

1. 細胞蛋白質萃取

將 RAW 264.7 以 1×10^6 cell/mL 的濃度取 5 mL 種於 6 cm dish 於 37°C 、含 5% CO_2 的恆溫培養箱中靜置 24 hr。移除培養液並以 PBS 清洗 2 次後，以 b-DMEM 稀釋樣品至總體積 5 mL (最終 DMSO 含量 $<0.05\%$) 於 37°C 、含 5% CO_2 的恆溫培養箱中處理 24 hr 在含有培養液的情況下，刮下所有的細胞並加入 1 mL PBS 將殘留的細胞洗下，全部收集置入 15 mL 離心管中離心 (3000 rpm, 10 min, 4°C)，移除上清液，沉澱以 1 mL PBS 使細胞懸浮後，轉置於 1.5 mL 離心管後離心 (3500 rpm, 5 min, 4°C)，移除上清液後所得到的細胞沉澱加入適量 lysis buffer (buffer 置於冰上)，於冰上反應 1 hr，期間每 10 min vortex 一次，離心 (12000 rpm 30 min 4°C) 後所得到的上層液即為細胞蛋白質之萃取液，於 -20°C 備用。

2. 蛋白質定量

取 2 μL 蛋白質萃取液樣品加入 1 mL Bio-Rad protein assay dye reagent 避光反應 15 min。取 100 μL 於 96 well 盤中，以 ELISA reader 於波長 595 nm 下測其吸光值。以不同濃度之 BSA (2mg/mL) 做為標準取線，換算 40 μg 蛋白所需體積，分裝於 1.5 mL 離心管置於 -20°C 備用。

3. 西方墨點法

(1) 住膠

acrylamide mix (total 40% ,cross-linking 3.3 %)	
acrylamide	38.68 g
Bis (<i>N,N'</i> -methylene-bis(acrylamide))	1.32 g
加純水至總體積	100 mL

Resolving Gel for Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (15 mL)

Components/gel vol.	10 %
H ₂ O	7.15
40% acrylamide mix	3.75
1.5M Tris (pH 8.8)	3.8
10% SDS	0.15
10% APS	0.15
TEMED	0.006

5% Stacking Gels for Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Components/gel vol.	5 mL
H ₂ O	3.6
40% acrylamide mix	0.63
1.5M Tris (pH 6.8)	0.63
10% SDS	0.05
10% (APS)	0.05 最後加!
TEMED	0.005

(2) 電泳

配製電泳膠後，將電泳片裝置在電泳槽中，並填滿電泳緩衝液。取 40 μg 蛋白加入 5 倍 SDS protein sample buffer 經 100°C 加熱 10 min 處理後，冰浴備用。將蛋白質樣品住入各 well 中，進行電泳分析。以 150 V 40 mA 進行蛋白質分離。電泳分析結束後，進行轉印。

(3) 轉印

取適當大小 PVDF membrane (PVDF membrane 先以甲醇進泡 min，再以純水清洗)，操作時依序將 3M paper、PVDF membrane、SDS-PAGE gel、3M paper 由下往上重疊排放，以玻璃棒輕壓以趕除氣泡，染後將之放入轉印槽中，於 4°C 中以 400 mA 轉印約 2 min。

(4) 免液墨點法

轉印好蛋白質的 PVDF membrane 先置於 blocking solution 中，於室溫下震

盪 1 hr，將一次抗體稀釋液加入 PVDF membrane 中，使其均勻的覆蓋於 membrane 上，於 4°C 冰箱中震盪 12 hr。取出後再以適量的 TPBS 清洗 3 次，每次 10 min。依不同的一次抗體，加入特異作用的二次抗體稀釋液，於室溫下反應 1 hr。反應後再以適量的 TPBS 清洗 3 次，每次 10 min。由於所使用的二次抗體上連結的是 horse-radish peroxidase，故使用 Enhanced- chemiluminescence (ECL) 酵素系統偵測訊息反應。將 ECL 溶液以 1:1 (v/v) 混合，並將 PVDF 浸潤於混合好之 ECL 溶液中，反應 5 min，後用兩張透明投影片將轉印紙夾住置於底片夾中，使用 Kodak BioMax light film 壓片，洗片後即可觀察到某一特定蛋白質含量的變化。

五、抗氧化實驗

(一) 抑制銅離子誘導人類 LDL 氧化反應試驗

以超高速離心分離 LDL

本實驗參考 Puhl 等人(1994) 的做法並加以修改。健康與飲食正常之成年男性經隔夜禁食 (overnight fasting) 後抽取血液，置入 37°C 烘箱中靜置 1.5 hr，再置入 4°C 冰箱中靜置 1 hr。於 4°C 下進行低速離心 ($1370\times g$) 15 min 以取得血清。吸取血清置入超高速離心管中，再加入生理食鹽水(145 mM= 1.006 g/mL)，於 4°C 下進行超高速離心($208,592\times g$)16 hr。離心後吸取最上層 10 mL 呈乳白色的 VLDL+HDL 部份 (< 1.019 g/mL)。管內剩下的部份再加入 NaBr 溶液 (1.22 g/mL) 將密度調整成 1.063 g/mL，混勻後於 4°C 下進行超高速離心 ($208,592\times g$) 20 hr。離心後吸取最上層 6 mL 淡黃色之 LDL 部份 (1.019-1.063 g/mL)。取得之 LDL 裝入塑膠離心管中，充氮氣後於 4°C 下避光保存備用，保存不超過 1 星期。

LDL 透析

將適量 LDL 放入透析膜內，兩端以棉線綁緊並以透析夾固定，將透析膜放入磷酸鹽緩衝溶液 (125 mM NaCl, 5 mM phosphate, pH 7.4) 中進行透析，透析液使用體積為欲透析 LDL 之 100 倍，於 4°C 下避光攪動，並分別於 2.5 hr、5.5 hr、8.5 hr 時後更換新的透析液，共透析 16-24 hr。

膽固醇濃度之測定

取透析完畢之 LDL，採用酵素法 (enzymatic CHOD-PAP method)，以

cholesterol enzymatic 測定膽固醇濃度。以膽固醇標準液 (200 mg/dL) 製作標準曲線，分別取 0、5、10、20、25 μL 加入 1 mL 反應液 (依照 cholesterol kit 之說明書配製) 中，混合均勻後室溫下靜置 10 min，測定 500 nm 下之吸光值，並作成校正曲線。取透析後之 LDL 10 μL 加入 1 mL 反應液，由其 500 nm 下之吸光值配合校正曲線可換算得膽固醇濃度。進行抑制銅離子誘導人類 LDL 氧化反應試驗時，LDL 濃度以所含之膽固醇代表之，故製作膽固醇標準曲線換算所需要之 LDL 體積。

樣品對延緩銅離子誘導 LDL 脂質過氧化作用之測定

96 孔石英孔盤每孔分別依序加入 130 μL PBS buffer、10 μL 樣品溶液 (以 10% 乙醇配製成 2.5 或 5 ppm)、100 μL LDL (以 PBS 稀釋至 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，其濃度以所含之膽固醇代表之) 與 10 μL 硫酸銅水溶液 (以去離子水配置成 125 μM)，偵測 234 nm 下吸光，每 15 min 偵測一次，於 30°C 下連續偵測 14 hr。正控制組為 Trolox (以 10% 乙醇稀釋至最終處理濃度為 1 及 0.5 ppm)，空白組為不加樣品，只有銅離子與 LDL 處理。

(二) 清除 DPPH 自由基活性測定

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate) 帶有一未配對電子，呈深紫色，是一種穩定的自由基，不易衰竭。DPPH 於波長 520 nm 下有最高的光值。若當 DPPH 接受一電子或氫自由基時，其原有的深紫色會變淺，於波長 520 nm 下所測得的吸光值會降低，表示樣品清除 DPPH 自由基的能力越強。本實驗參考 Shimada 等人(1992) 及 Espin 等人(2000) 的方法。於 96 well plate 中加入 50 μL 以甲醇液配製成之不同的濃度樣品及正控制組 (catechin)，並快速加入 250 μL 75 mM DPPH 甲醇液，混勻後於室溫下避光反應 90 min，測其 520 nm 下吸光值。利用相對於空白組對照的吸光值下降百分比，可判斷各樣品清除 DPPH 自由基能力的強弱，計算公式如下：

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \frac{Ab - (A - As)}{Ab} \%$$

樣品於各濃度下之清除率可做一濃度對清除率曲線，而樣品清除率達 50% 之有效濃度稱為 EC_{50} 。

(三) 氧自由基吸收能力之測驗 (Oxygen radical absorbance capacity, ORAC)

本實驗參考 Prior 等 (2003) 之方法並加以修飾。200 μL 反應液中各含 50 μL 之 75 mM 磷酸緩衝溶液 ($\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$)、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之樣品、192 nM fluorescein 與 16 mM AAPH。其中 75 mM 磷酸緩衝溶液 ($\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) 配製方法：分別配製 75 mM 之 K_2HPO_4 與 KH_2PO_4 ，兩者以 76:51 (v/v) 比例混合成 pH 7.0 之緩衝溶液。AAPH 與螢光物質 (fluorescein) 均溶於磷酸緩衝溶液，樣品則溶於 1% 甲醇水溶液。將此 200 μL 反應液進行螢光測定，設定螢光檢測的激發光波長 (excitation wavelength, EX) 為 485 nm，放射光波長 (emission wavelength, EM) 為 528 nm，每 5 min 測一次，共測 180 min。Fluorescein 與自由基反應後，其螢光強度隨反應時間增加而逐漸衰退。樣品於各時間點的螢光強度對於起始時之螢光強度稱為該時間點之相對螢光強度 (relative fluorescence intensity)。將各樣品相對螢光強度對時間作圖所得之曲線下面積 (AUC) 扣除空白組之 AUC，可得各樣品之淨螢光衰退面積 (net AUC)。以各濃度 Trolox 之 net AUC 對其濃度做出標準曲線，將各樣品之 net AUC 代入可得相對 Trolox 之濃度。

計算公式如下：
$$\text{AUC} = (0.5 + f_5/f_4 + f_6/f_5 + \dots + f_i/f_{i-1}) \times \text{CT}$$

AUC : area under the curve

f_4 = initial fluorescence reading at cycle

f_i = fluorescence reading at cycle i

CT : cycle time in minutes

$\text{Net AUC} = \text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}$

(四) 細胞抗氧化能力測定 (Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay)

1. 人類肝細胞 Hep G2 培養條件

將 Hep G2 細胞置於 c-WME medium 培養基中，於 10 cm 培養皿中培養，並置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 的恆溫培養箱中培養。每兩天更換一次培養液，約 4~5 天後細胞可長至八分滿，此時即需進行繼代培養。

2. 繼代培養

當細胞長至八分滿時，移除舊培養液，以 5 mL PBS 清洗細胞兩次。加入 1 mL Trypsin-EDTA，輕搖培養皿以覆蓋所有細胞，置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 的恆溫培

養箱中 5 min，使細胞脫離底盤。取出培養皿，以 4 mL c-WME medium 培養液充分打散後，置入 15 mL 離心管中離心 (1000 rpm, 5 min)，移除上清液後，加入 3 mL c-WME medium 充分打散細胞。細胞液經錐藍氏液稀釋 16 倍後，以血球計數板計數，最後以 2×10^6 cell/plate (10 cm 培養皿) 之細胞密度進行細胞培養。

3. 細胞抗氧化能力測定 (Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay)

本實驗參考 Wolfe 等人，將人類肝炎細胞 Hep G2 種入黑色 96 well plate (2×10^4 cell/well 100 μ L/well c-WME)，置於 37 °C、含 5% CO₂ 的恆溫培養箱中培養 24 hr 待細胞貼附後，移除培養液並以 PBS 清洗。並配製含有 sf-WME、2.5 mM DCFH-DA 螢光染劑、10 unit/mL SOD (superoxide dismutase) 及各濃度樣品之 antioxidant treatment medium (溶劑最終濃度 $\leq 0.05\%$)；控制組則不加樣品處理，每個處理濃度均為三重複。將 antioxidant treatment medium 加入黑色 96 well plate 中 100 μ L/well 後，置於 37 °C、含 5% CO₂ 的恆溫培養箱中共同培養 1 hr 後，移除 antioxidant treatment medium 後加入之自由基 40 mM ABAP (以 HBSS 稀釋)，接著以 37°C、激發光波長 (EX) 為 485 nm，放射光波長 (EM) 為 528 nm 之條件進行螢光偵測，每 5 min 偵測一次，進行 1 hr。將各樣品螢光強度對時間作圖所得之曲線下面積 (AUC) 扣除空白組之 AUC 可得各樣品之淨螢光釋放面積 (net AUC)，將樣品之 net AUC 與控制組之 net AUC 代入下列公式計算：

$$\text{CAA unit} = 100 - \left(\frac{\int \text{SA}}{\int \text{CA}} \right) \times 100$$

$\int \text{SA}$ ：樣品組於反應時間內之積分面積

$\int \text{CA}$ ：控制組於反應時間內之積分面積

f_a ：樣品處理效應，即 CAA unit

f_u ：空白試驗效應，即 1 - CAA unit

$f(x)$ ： f_a/f_u 相對於對數濃度作圖所得之漸近線公式

EC₅₀：抑制 50% 自由基氧化所需樣品濃度

第三節、統計分析

實驗數據結果均以平均值 \pm 標準差 (Mean \pm SD) 表示。實驗數據分析由 SAS 9.1 (Statistical analysis system) 套裝軟體進行單因子變異數分析 (one way

ANOVA)。利用鄧氏新多變域測驗法 (Duncan's new multiple range test) 進行均值之比較。 p -value 小於 0.05 則視為有顯著差異。



伍、結果與討論

一、Proanthocyanidin A2 及其 isomer 之分離純化

(一) 龍眼花 80%丙酮萃取物

本研究室之前的研究指出，以熱水及甲醇萃取龍眼花所得萃出率分別為 37.42 %及 40.11 % (沈，2005；謝，2006)，且均具有良好的抗氧化活性。為進一步提升萃出率，於前一年度研究中，改以 80% 丙酮於室溫下靜置萃取，所得之萃出率為 51.56 %，相較於甲醇萃取方式高出許多。故本實驗改以 80 %丙酮於室溫下靜置萃取，所得之萃出率為 36 % (LF-A)，究其原因可能是龍眼花受季節及降雨量影響造成組成分有所不同以及萃取次數較少有關。

(二) 龍眼花 80 % 丙酮萃取物之溶劑區分萃取

Liquid-liquid partition 主要是根據分配原理，樣品中各成分於兩相溶劑中之分配係數不同因而達到極性區分的效果。表 5-1 為各區分層之收率，結果水層 (LF-A-W) 之收率最高，為 56.73 %，表示龍眼花 80 % 丙酮萃取物含有大量高極性物質，易溶於水層，且該層易吸濕且黏稠，推測是由於水層中含有一些醣類物質。此外，乙酸乙酯層 (LF-A-EA) 萃出率為 30.76 %。萃取時發現 partition 的過程中會產生水及乙酸乙酯皆不可溶之乳化層約 10.45 %。由於本實驗室先前試驗已確定龍眼花中提供抗氧化能力之主要成分 PA2 分佈於 EA 層，因此選擇 EA 層 (LF-A-EA) 進一步進行管柱區分。

(三) 龍眼花丙酮粗萃物乙酸乙酯層之 amberlite XAD-7 resin 管柱層析

本實驗將龍眼花丙酮萃取物之乙酸乙酯區分層 (LF-A-EA) 回溶於少量甲醇中，使之完全溶解至完全無沉澱物後，以 amberlite XAD-7 resin 進行管柱層析。以去離子水 (H) 與甲醇(M) 為沖提溶劑，配合薄層層析法 (TLC) 檢視各收集瓶所含之成分，將具有相似成分之物質合併後可得 3 個次區分層。各沖提溶劑比例、體積及其次區分層收率如表 5-2。由 TLC 點片結果 (圖 5-1) 可知龍眼花之有效成分 PA2 可在 H:M (45:55) ~ (30:70) 沖提液下被沖提出，得到含 PA2 之次

區分層 (LF-A-EA-XADII)，回收率為 50.19%。

(四) 龍眼花 LF-A-EA-XADII 之 Sephadex LH-20 管柱層析

因 LF-A-EA-XADII 含有 PA2，故進一步以 Sephadex LH-20 進行管柱層析。以乙醇沖提管柱配合薄層層析法 (TLC) 檢視各收集瓶所含之成分，將具有相似成分之物質合併後可得 6 個次區分層。各沖提比例、體積及其次區分層回收率如表 5-3，TLC 點片結果如圖 5-2。於流洗 1900 mL 後即可得到含有 PA2 之次區分，將含有 PA2 之次區分層 (LF-A-EA-XADII-LHB, C, D, E) 的回收率為 30.54 %。進一步以再結晶法純化 PA2，並將純化所得成分以 HPLC 及 MS 確定 PA2 的純度。HPLC 結果如圖 5-3 (c)；MS/MS 結果如圖 5-4：575 (M-1)，449 (M-2)，423 (M-3)，285 (M-4)。由分析結果發現，LF-A-EA-XADII-LHB, C, D, E 中約含有 26% PA2，將其經過換算可得知於每克龍眼花中約含有 PA2 1.2 mg。

表 5-1、龍眼花 80% 丙酮萃出物經 EA 區分萃取之收率

Table 5-1. The yield of EA partition of longan flower 80% acetone extract.

	Ethyl acetate fraction	Water fraction	Emulsion	Total
80% acetone extract	30.76%	56.73%	10.45%	97.94%

表 5-2、龍眼花丙酮粗萃物乙酸乙酯層之 amberlite XAD-7 resin 管柱層析之沖提溶劑比例、體積及其次區分層收率

Table 5-2. The yield rate of different sub-fractions from LF-A-EA after amberlite XAD-7 resin column chromatography.

Fraction	H ₂ O:MeOH	Volume (mL)	Yield (%)
I	75 : 25	1000 (no.1)	28.11%
	60 : 40	1000 (no.2)	
	45 : 55	300 (no.3~5)	
II	45 : 55	1200 (no.6~13)	50.19%
	30 : 70	1150 (no.14~20)	
III	30 : 70	450 (no.21)	18.60%
	0 : 100	1000	
Total			96.90%

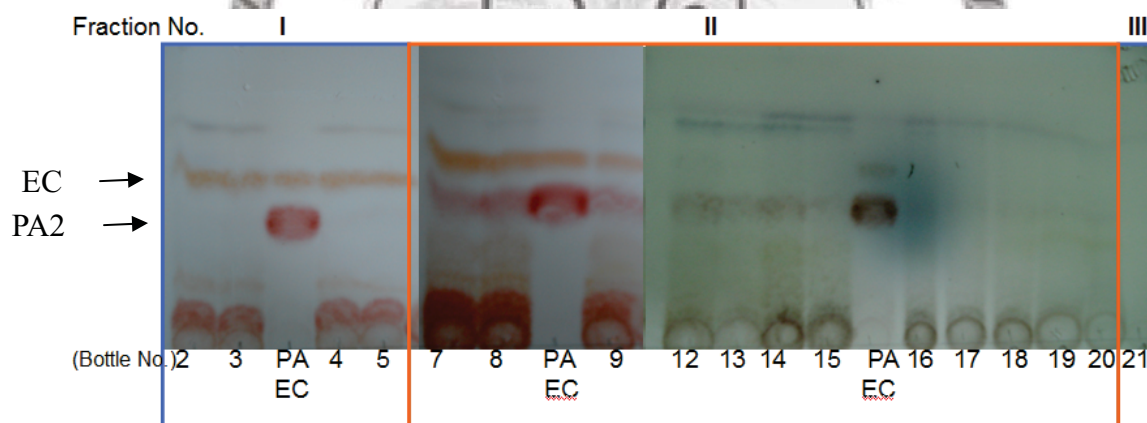


圖 5-1、龍眼花丙酮粗萃物乙酸乙酯層之 amberlite XAD-7 resin 管柱層析後各次區分之薄層層析圖¹

Figure 5-1. Thin layer chromatogram of different sub-fractions from LF-A-EA after amberlite XAD-7 resin column chromatography,

¹TLC condition : listed in materials and methods (p.38)

表 5-3、龍眼花 LF-A-EA-XAD-II 之 Sephadex LH-20 管柱層析之沖提溶劑體積及其區分層回收率

Table 5-3. The yield rate of different sub-fractions from LF-A-EA-XAD-II after Sephadex LH-20 column chromatography.

Fraction	Volume (mL)	Yield (%)
A	1900 (no.1~9)	19.6
B,E	150 (no.10,21,22)	2.27
C	200 (no.11~14)	4.67
D	300 (no.15~20)	23.6
F	(no.23~)	58.7
total		87.6

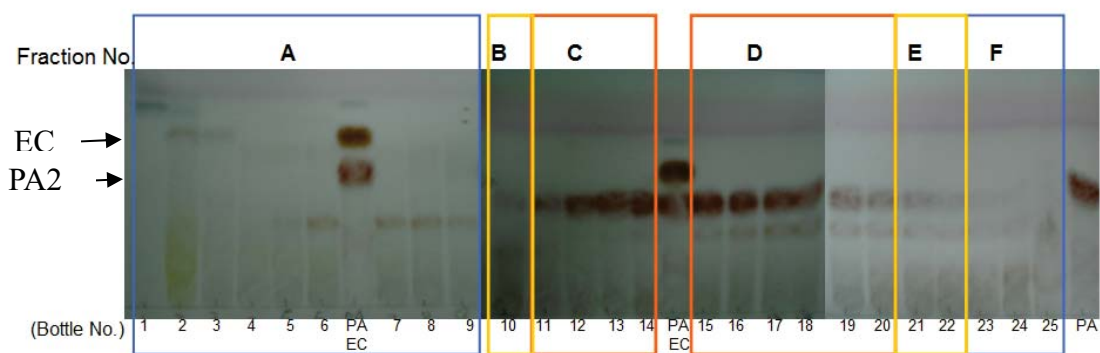


圖 5-2、龍眼花丙酮粗萃物乙酸乙酯層 amberlite XAD-7 resin-II 之 LH-20 管柱層析後各次區分之薄層層析圖¹

Figure 5-2. Thin layer chromatogram of different sub-fractions from LF-A-EA-XAD-II after Sephadex LH-20 column chromatography,

¹TLC condition : listed in materials and methods (p.38)

(五) Proanthocyanidin A2 同分異構物之純化

由於 PA2 置於不同細胞培養液進行實驗後，以 HPLC 分析，發現 PA2 會產生 3 個不同 retention time (R.T.) 的波峰。其中 Peak 2 (R.T.=18.5 min) 為 PA2，故進一步進行 Peak 1 (R.T.=13 min) 及 PA5 (R.T.=20 min) 波峰的結構分析與鑑定。以 HPLC 管柱分別收集目標物 (圖 5-3)，接著以 MS/MS 進行分子量及結構的初步分析。由圖 5-4; 圖 5-5; 圖 5-6 可發現，peak 1 及 peak 3 與 PA2 有相同的分子量與斷裂碎片 (575 (M-1), 449 (M-2), 423 (M-3), 285 (M-4))，推測應是 PA2 的同分異構物。進一步將 peak 1 及 peak 3 純化並以 NMR 進行結構分析，結果如附圖 1~12，與文獻 (Hümmer, et al., 2008) 比對後確認 peak 1 為 PA4 epicatechin-(4 β →8;2 β →O→7)-*ent*-catechin；peak 3 為 epicatechin-(4 β →6;2 β →O→7)-*ent*-catechin (以下以 PA5 做簡稱)。結構如圖 5-7。
(PA4 及 PA5 之結構鑑定由本實驗室之博士後研究員 Dr. A. Kumaran 進行)



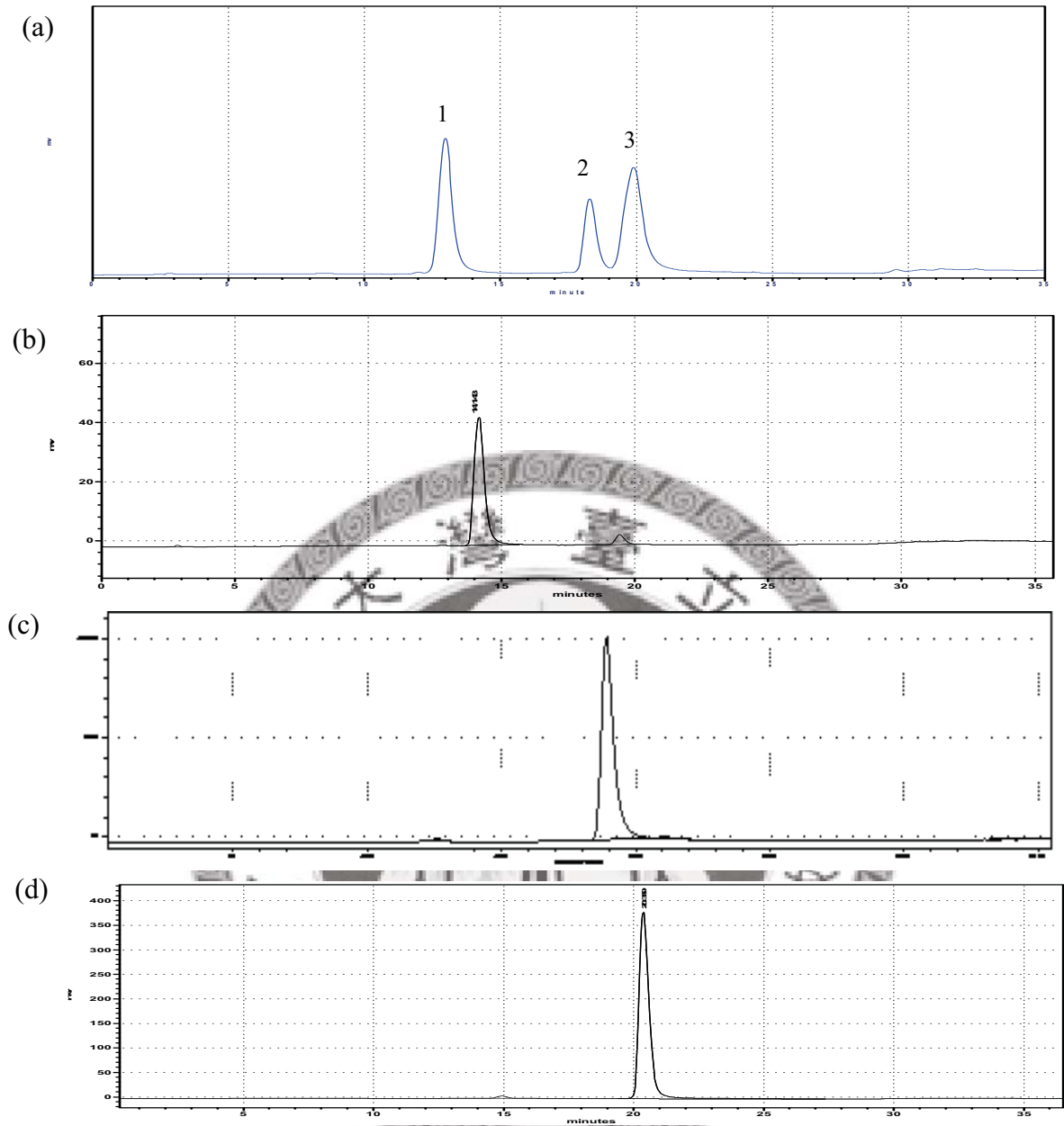


圖 5-3、PA4、PA2、PA5 之高效能液相層析圖

Figure 5-3. HPLC chromatogram of PA4, PA2, PA5

(a) PA2 (1 mM) 於 HBSS 中反應 2 hr

(b) 純化之 PA4

(c) 純化之 PA2

(d) 純化之 PA5

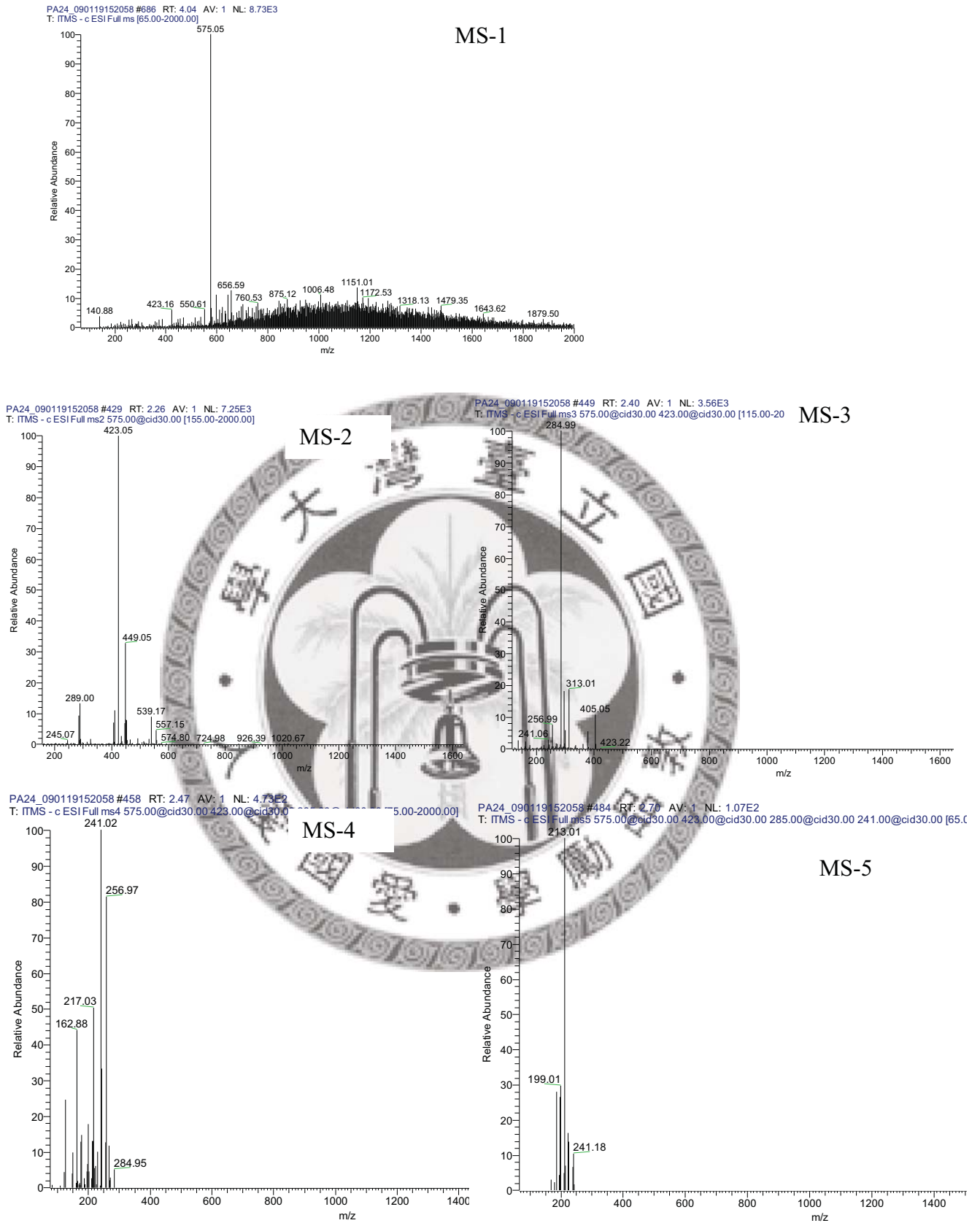
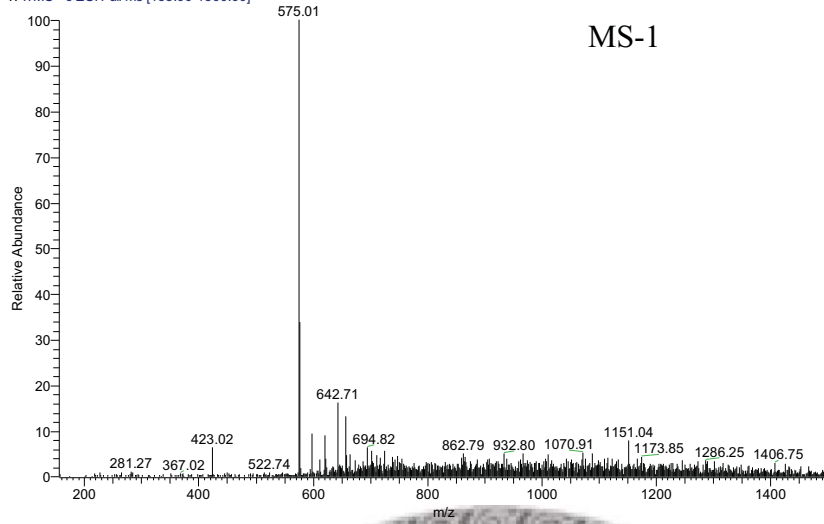


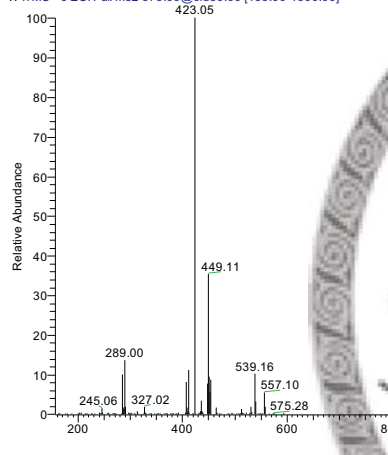
圖 5-4、Proanthocyanidin A2 之質譜圖 (ESI-MS/MS)

Figure 5-4. ESI⁻MS/MS spectrum of proanthocyanidin A2

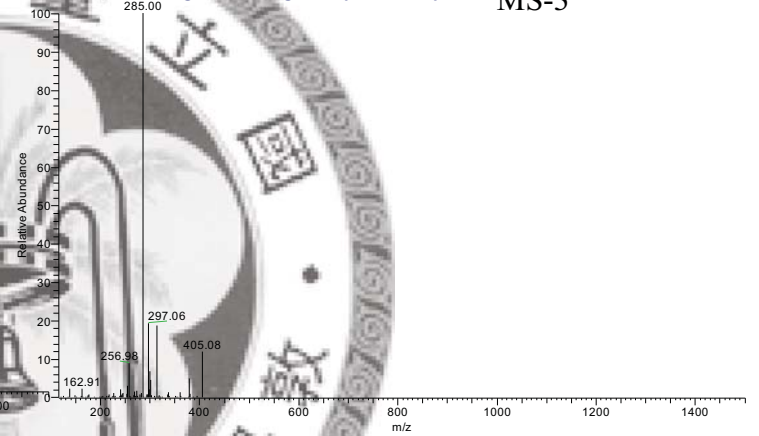
PA17_090119152058 #308 RT: 0.90 AV: 1 NL: 5.99E3
 T: ITMS - c ESI Full ms [155.00-1500.00]



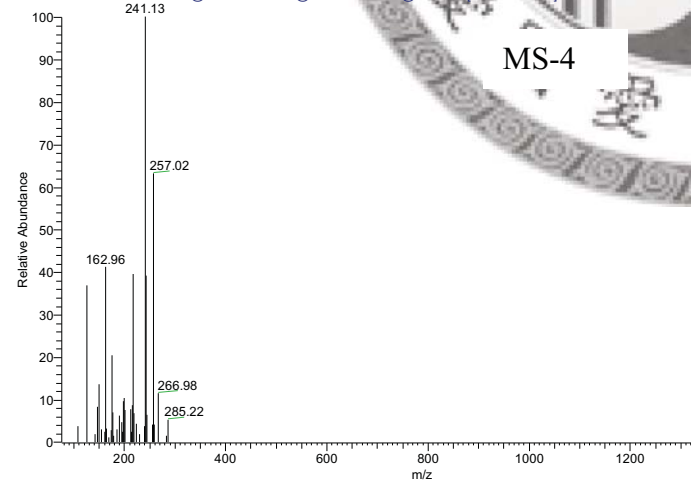
PA17_090119152058 #335 RT: 1.05 AV: 1 NL: 3.94E3
 T: ITMS - c ESI Full ms2 575.00@cid30.00 [155.00-1500.00]



PA17_090119152058 #360 RT: 1.22 AV: 1 NL: 2.13E3
 T: ITMS - c ESI Full ms3 575.00@cid30.00 423.00@cid30.00 [115.00-1500.00]



PA17_090119152058 #374 RT: 1.33 AV: 1 NL: 2.88E2
 T: ITMS - c ESI Full ms4 575.00@cid30.00 423.00@cid30.00 285.00@cid30.00 175.00-1500.00]



PA17_090119152058 #403 RT: 1.57 AV: 1 NL: 2.85E1
 T: ITMS - c ESI Full ms5 575.00@cid30.00 423.00@cid30.00 285.00@cid30.00 241.00@cid30.00 [65.00-1500.00]

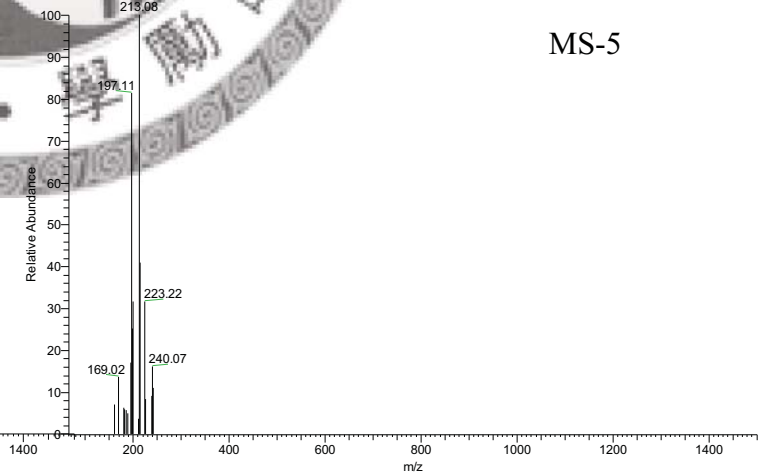


圖 5-5、PA4 之質譜圖 (ESI-MS/MS)
 Figure 5-5. ESI-MS/MS spectrum of PA4

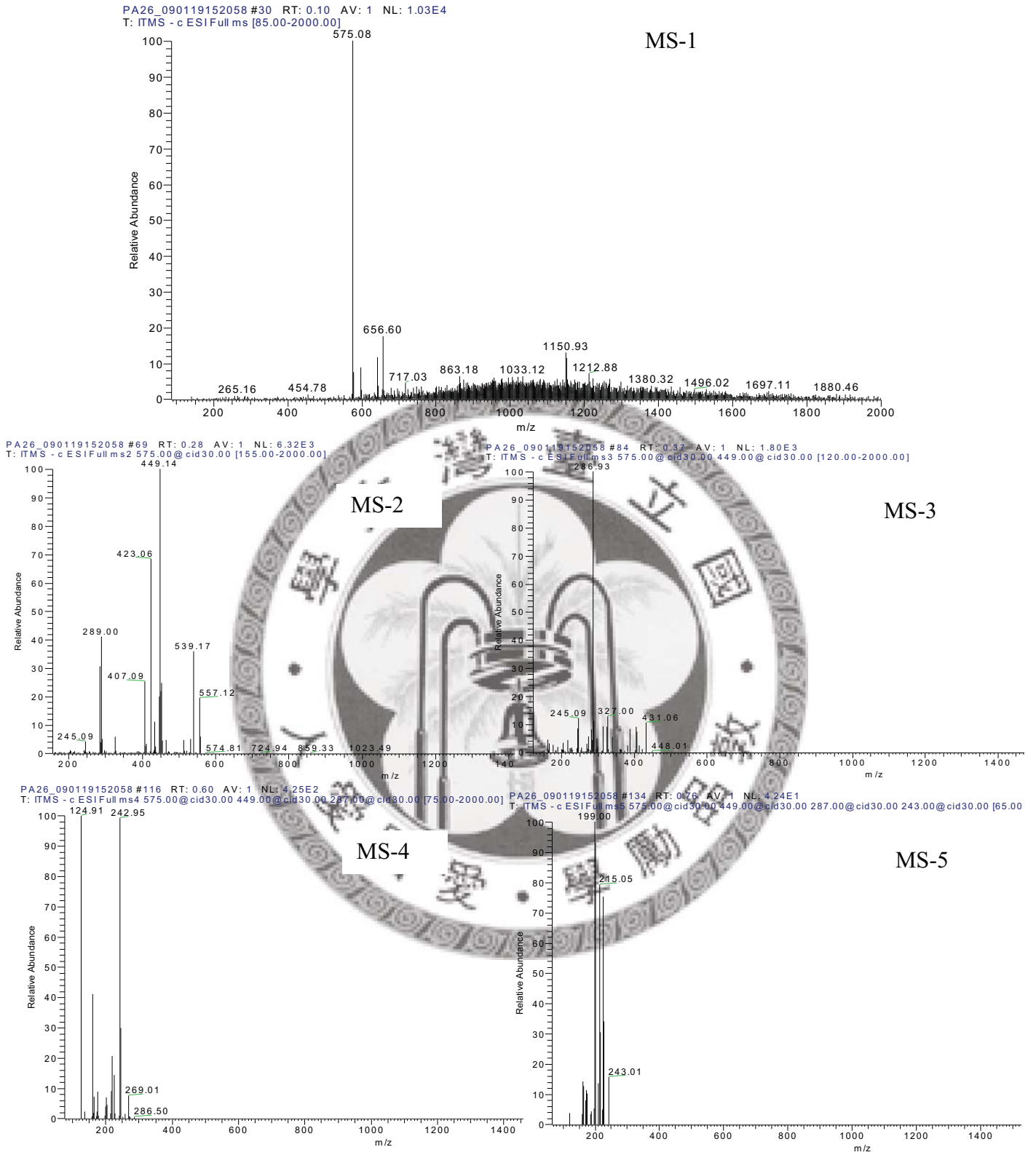


圖 5-6、PA5 之質譜圖 (ESI-MS/MS)
 Figure 5-6. ESI-MS/MS spectrum of PA5

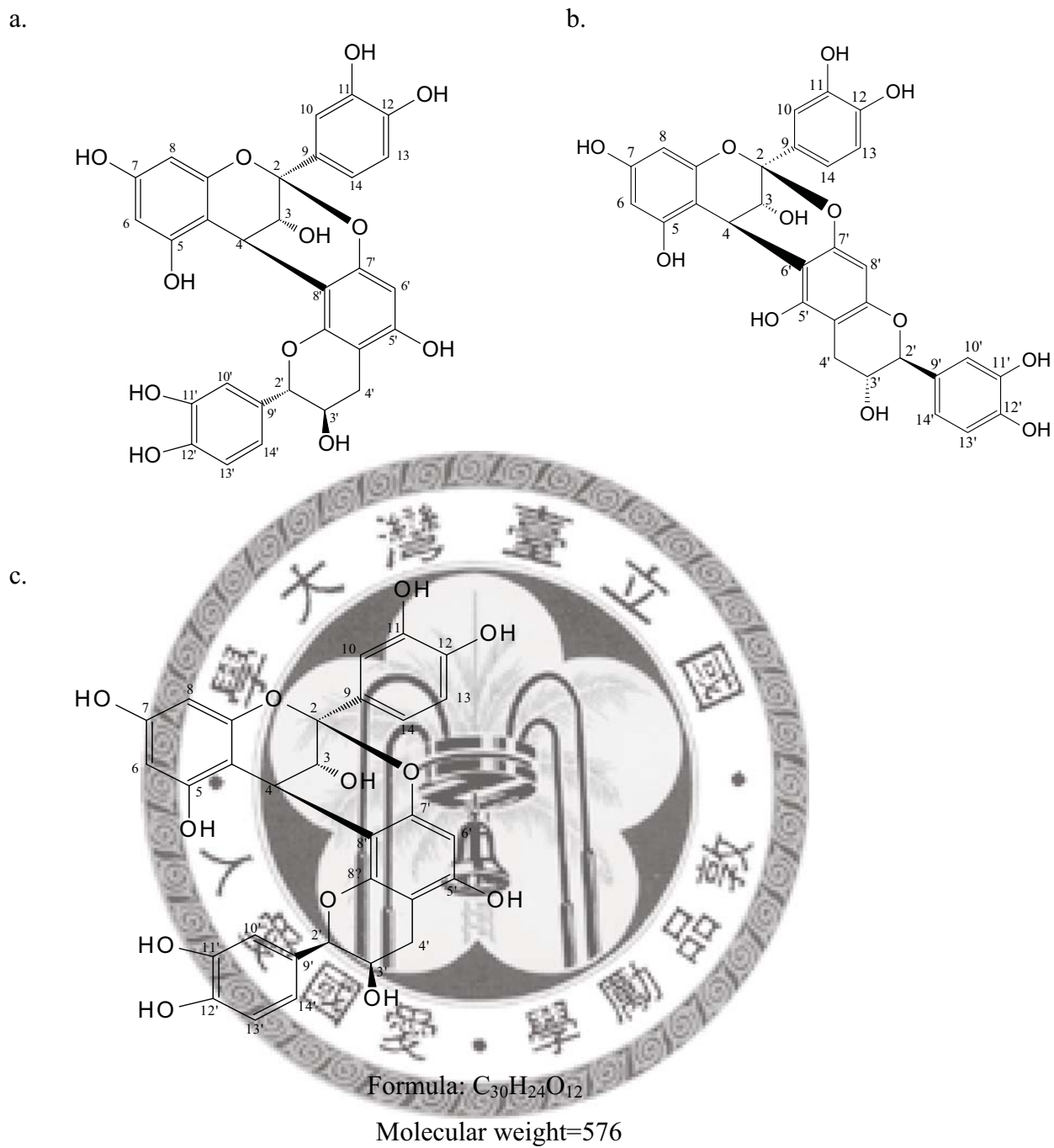


圖 5-7、PA2 及其同分異構物

Figure 5-7. PA2 and its isomers

a. Proanthocyanidin A4 (epicatechin-(4 β →8;2 β →O→7)-*ent*-catechin)

b. PA5 (epicatechin-(4 β →6;2 β →O→7)-*ent*-catechin)

c. PA2 (epicatechin-(4 β →8;2 β →O→7)-epicatechin)

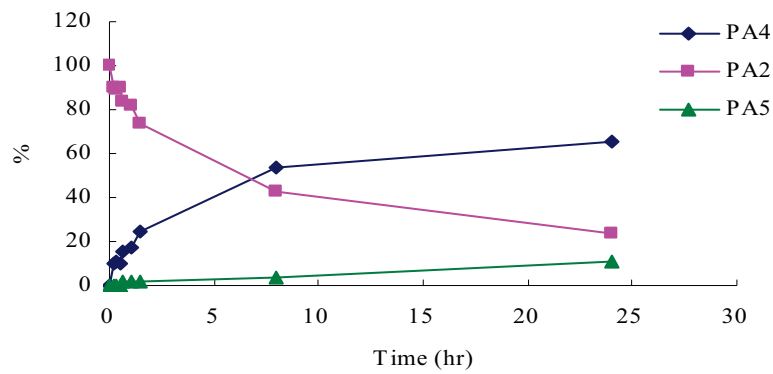
二、Proanthocyanidin A2 及 Epicatechin 之穩定性分析

由預實驗中發現，PA2 (1mM) 於 HBSS (通透試驗之細胞培養液) 中反應 2 hr 後經 HPLC 分析，發現除了 PA2 之波峰外，另出現了兩個不同滯留時間的波峰。進一步以 MS/MS 及 NMR 分析後發現其為 PA2 的同分異構物 (PA4、PA5)(圖 5-7)。故在進行各細胞實驗前，先探討 PA2 置於各細胞實驗所需培養液中隨時間轉變的情形。

(一) PA2 於細胞單層膜通透試驗之穩定性分析

細胞單層膜通透試驗所使用的細胞為 Caco-2 細胞，所使用的培養液為 HBSS，故探討 PA2 於 HBSS 中轉變成 PA4 及 PA5 隨時間變化的情形。圖 5-8(a) 為 PA2 起始濃度為 50 $\mu\text{g/mL}$ 於 HBSS 中隨時間的變化的結果。PA2 很緩慢的轉變成 PA4 及 PA5，並且在反應 7 hr 後，PA4 的量在 HBSS 培養液中的量與 PA2 量相當，之後 PA4 量緩緩增加至反應 24 hr 後其生成量約佔總量的 60%；PA5 在培養液中的量則是更緩慢的增加，至反應 24 hr 後 PA5 的量也不曾與 PA2 或 PA4 的量相當，其生成量僅約佔總量的 10%。圖 5-8(b) 為 PA2 起始濃度為 576 $\mu\text{g/mL}$ (1 mM) 於 HBSS 中隨時間變化的結果。此濃度亦為進行 PA2 細胞通透試驗中所選用的濃度。起始濃度為 576 $\mu\text{g/mL}$ 與起始濃度為 50 $\mu\text{g/mL}$ 相比，PA2 變成 PA4 及 PA5 的速度較快些。於反應 30 min 後，PA4 的量在 HBSS 培養液中的量與 PA2 量相當，之後 PA4 量持續增加至反應 1hr 達高峰，接著 PA4 量緩緩減少至反應 8 hr，此時 PA4 的生成量約佔總量的 30%；PA5 在培養液中的量則是漸漸增加，至 3.3 hr 後 PA5 的量在 HBSS 培養液中的量與 PA4 量相當並持續增加至反應 8 hr，此時 PA5 的生成量約佔總量的 55%。

(a)



(b)

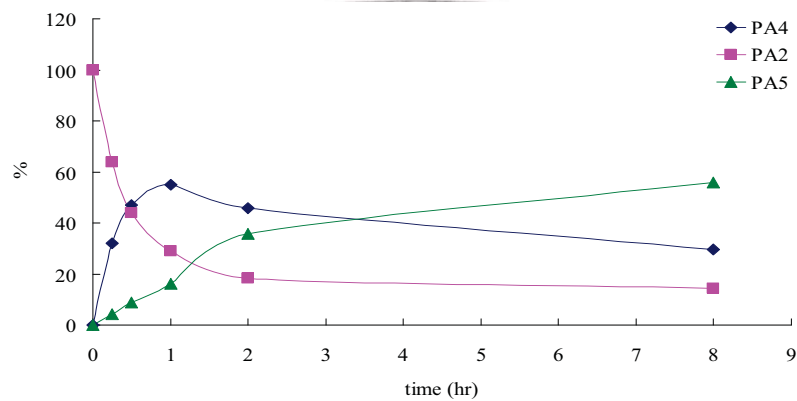


圖 5-8、不同濃度 PA2 於 HBSS 於轉變成 PA2、PA4 及 PA5 隨時間點變化的情形

Figure 5-8. The conversion of PA2 into its isomers in HBSS with various concentration at different time point.

(a) PA2 起始濃度為 50 µg/mL

(b) PA2 起始濃度為 (1mM) 576 µg/mL

進一步探討當 PA2 在 HBSS 中有 Caco-2 細胞情況下隨時間變化的情形。圖 5-9 為 PA2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 於 HBSS 中且有 Caco-2 細胞存在下隨時間變化的結果。PA2 更緩慢的轉變成 PA4 及 PA5，並且在反應 12.5 hr 後，PA4 的量在 HBSS 培養液中的量與 PA2 量相當。之後 PA4 量緩緩增加至反應 30 hr 後約佔總量的 60%；PA5 在培養液中的量則是非常緩慢的增加，至反應 30 hr 後 PA5 的量也不曾與 PA2 或 PA4 的量相當，僅生成量約佔總量的 5%。

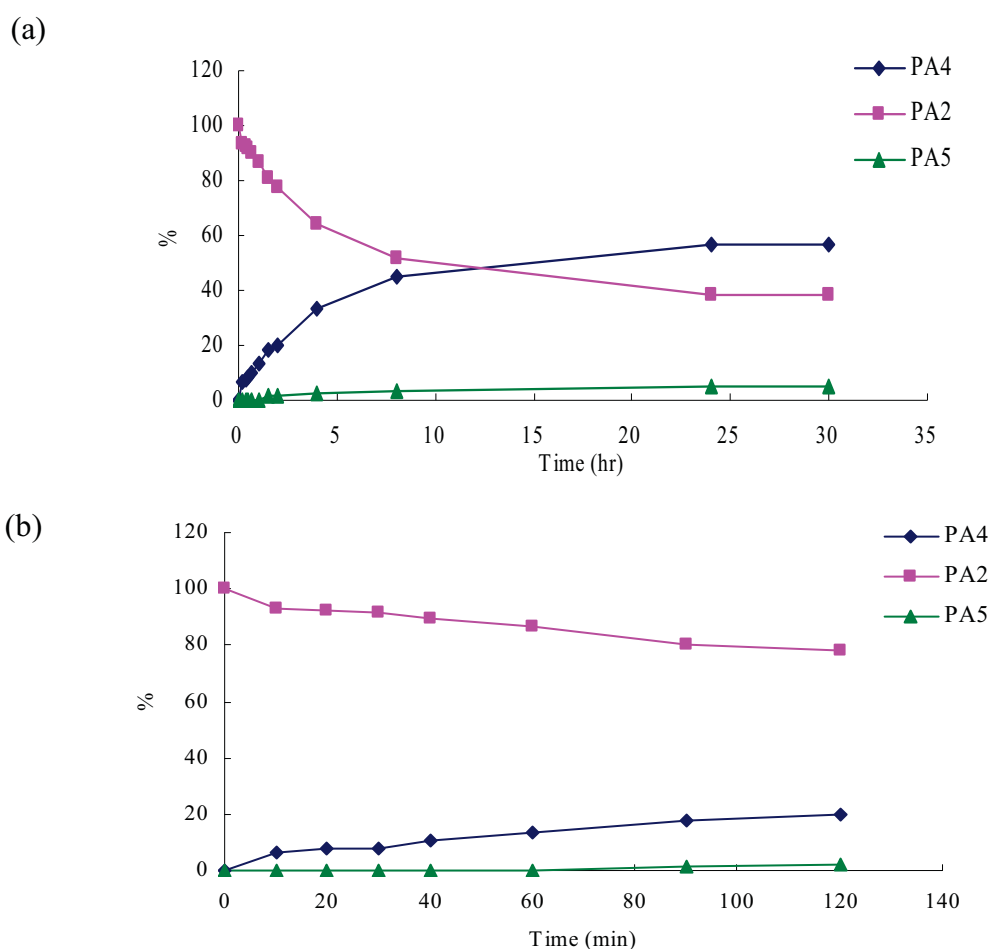


圖 5-9、PA2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)於 HBSS 及 Caco-2 cell 中，PA2、PA4 及 PA5 隨時間變化情形

Figure 5-9. The conversion of PA2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) into its isomers in HBSS with Caco-2 cell at different time point.

(a) 橫軸座標為小時 (hr)

(b) 橫軸座標為分鐘 (min)

本論文也將以 PA2 及 EC (2:1)、(1:1)、(1:2) 的比例進行細胞單層膜通透試驗，故探討 PA2 及 EC 以 (2:1)、(1:1)、(1:2) 的比例在 HBSS 中有 Caco-2 細胞情況下，二者隨時間變化的情形。圖 5-10 為 PA2 及 EC 以 (2:1)、(1:1)、(1:2) 的比例在 HBSS 中，於有 Caco-2 細胞情況下隨時間變化的結果。發現 PA2 隨著混合物中所佔比例之提高，而減少得越快導致 PA4 的生成的速率也越快。在 PA2:EC 各混合物組反應 3 hr 後，PA2:EC (2:1) 組的 PA4 增加 34%；PA2:EC (1:1) 組的 PA4 增加 26% 而 PA2:EC (1:2) 組的 PA4 則僅增加 13%。而 EC 則是在各混合物比例組經反應 3 hr 後均沒有明顯的變化。



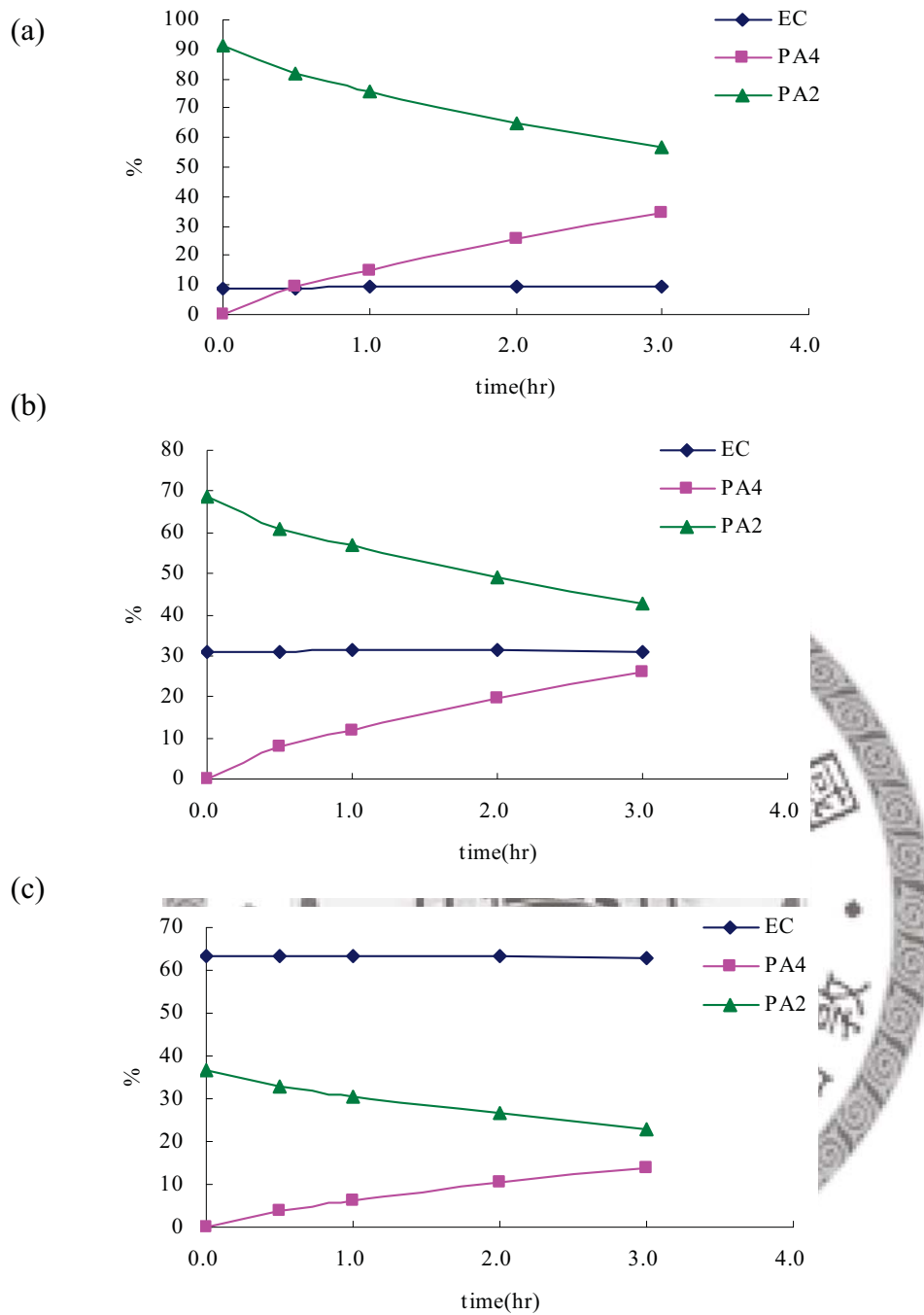


圖 5-10、不同比例之 PA2, EC 於 Caco-2 細胞及 HBSS 中 EC, PA2 及 PA4 之隨時間變化情形

Figure 5-10. The conversion of PA2 into its isomers in HBSS with Caco-2 cell at different ratio of PA2 and EC mixture by time.

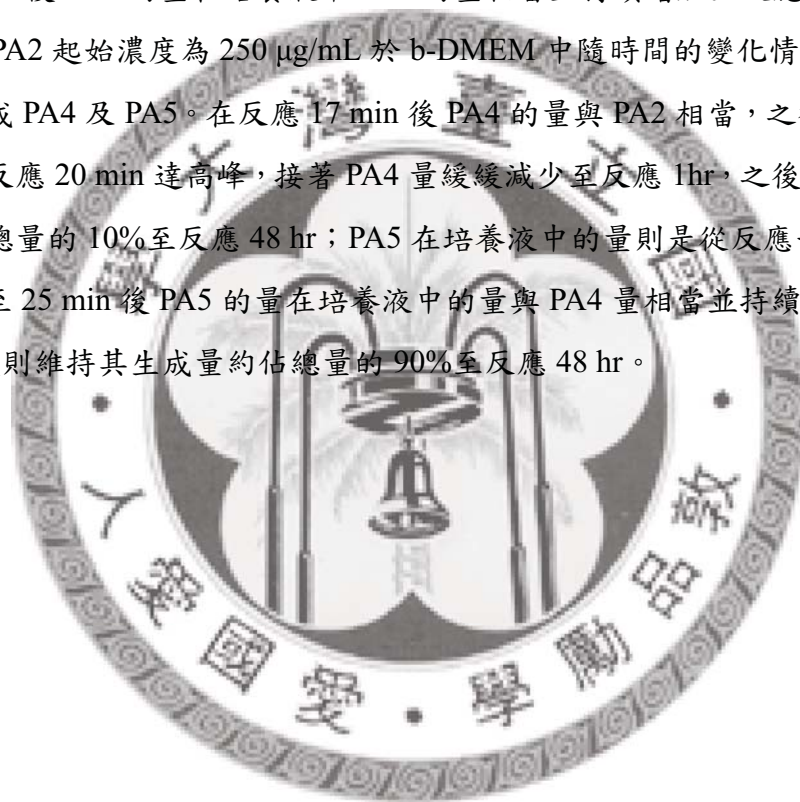
(a) PA2:EC (2:1) (400 μ M:200 μ M)

(b) PA2:EC (1:1) (200 μ M:200 μ M)

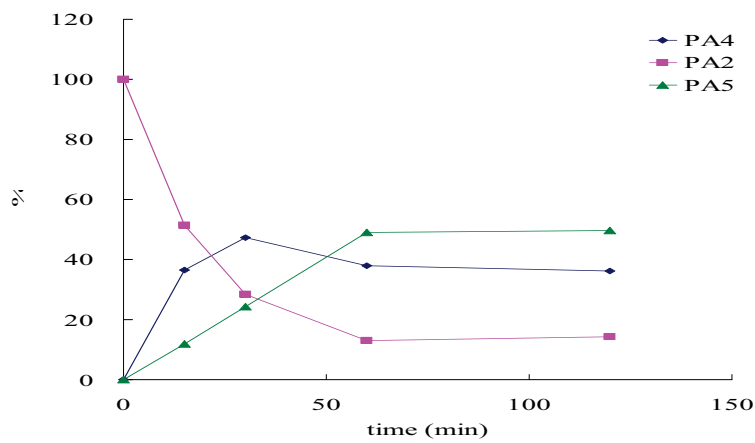
(c) PA2:EC (1:2) (200 μ M:400 μ M)

(二) PA2 於細胞抗發炎試驗之穩定性分析

由於利用 RAW 264.7 細胞探討樣品抗發炎效果之實驗所使用的培養液為 b-DMEM，故探討 PA2 於 b-DMEM 中轉變成 PA2、PA4 及 PA5 隨時間變化的情形。圖 5-11(a)為 PA2 起始濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 於 b-DMEM 中的隨時間變化的結果。PA2 很快的轉變成 PA4 及 PA5，並且在反應 25 min 後，PA4 的量在培養液中的量與 PA2 量相當，之後 PA4 量持續增加至反應 30 min，接著 PA4 量緩緩減少至反應 48 hr 後幾乎消失；PA5 在培養液中的量則是從反應一開始就快速增加，至反應 55 min 後 PA5 的量在培養液中 PA4 的量相當並持續增加至反應 48 hr。圖 5-11(b)為 PA2 起始濃度為 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 於 b-DMEM 中隨時間的變化情形。PA2 更快的轉變成 PA4 及 PA5。在反應 17 min 後 PA4 的量與 PA2 相當，之後 PA4 量持續增加至反應 20 min 達高峰，接著 PA4 量緩緩減少至反應 1hr，之後則維持其生成量約佔總量的 10%至反應 48 hr；PA5 在培養液中的量則是從反應一開始就漸漸增加，至 25 min 後 PA5 的量在培養液中的量與 PA4 量相當並持續增加至反應 1 hr，之後則維持其生成量約佔總量的 90%至反應 48 hr。



(a)



(b)

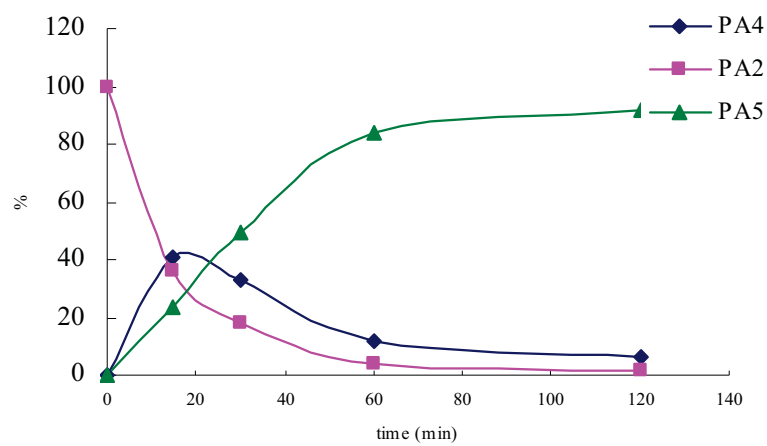


圖 5-11、不同濃度 PA2 於 b-DMEM 中轉變成 PA2、PA4 及 PA5 隨時間點變化的情形

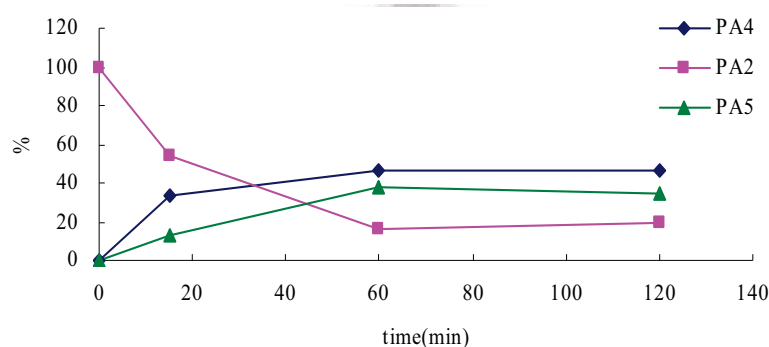
Figure 5-11. The conversion of PA2 into its isomers in b-DMEM with various concentration at different time point.

(a) PA2 起始濃度為 50 µg/mL

(b) PA2 起始濃度為 250 µg/mL

進一步探討當 PA2 在有 RAW 264.7 細胞情況下隨時間變化的情形。圖 5-12 為 PA2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 於 b-DMEM 中且有 RAW 264.7 細胞存在下隨時間變化的結果。在有細胞存在下，PA2 轉變成 PA4 及 PA5 速度較緩，在反應 35 min 後，PA4 在培養液中的量與 PA2 相當，之後 PA4 量持續增加至反應 1 hr 達高峰，接著 PA4 量緩緩減少至反應 48 hr，之後則維持其生成量約佔總量的 30% 至反應 48 hr。PA5 在培養液中的量則是從反應之初就漸漸增加，至 6 hr 後量在培養液中的量與 PA4 量相當並持續增加至反應 8 hr，之後則維持其生成量約佔總量的 60% 至反應 48 hr。

(a)



(b)

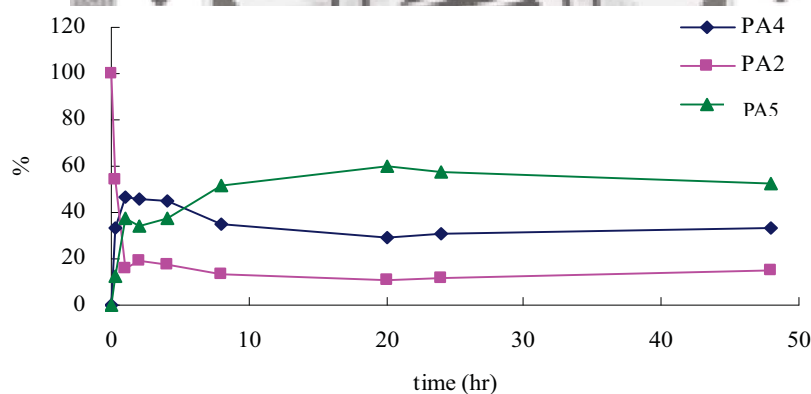


圖 5-12、PA2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 於 b-DMEM 及 RAW 264.7 細胞存在下中，PA2、PA4 及 PA5 隨時間之變化情形

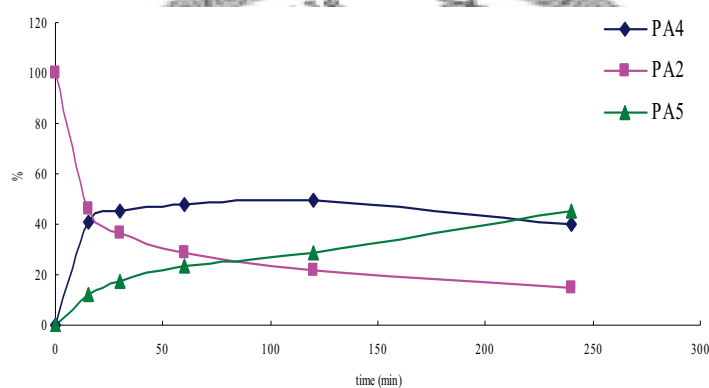
Figure 5-12. The conversion of PA2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) into its isomers in b-DMEM with RAW 264.7 cell at different time point.

(a) 橫軸單位：分鐘 (min)

(b) 橫軸單位：小時 (hr)

由於進行細胞抗發炎實驗時, PA2 是在 LPS 刺激 RAW 264.7 細胞產生 NO 的狀態下存在, 故進一步探討 PA2 在 b-DMEM 培養液中, LPS 刺激 RAW 264.7 細胞情況下隨時間變化的情形。圖 5-13 為 PA2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 在 b-DMEM 培養液中, 有 LPS 刺激 RAW 264.7 細胞情況下隨時間變化的結果。PA2 轉變成 PA4 的速度與沒有給予 LPS 組相似: 在反應 20 min 後, PA4 在培養液中的量與 PA2 相當, 之後 PA4 量持續增加至反應 2 hr 達高峰, 接著 PA4 量緩緩減少至反應 8 hr, 之後則維持其生成量約佔總量的 20% 至反應 30 hr。PA5 在培養液中的量則是從反應一開始就漸漸增加, 至 4 hr 後量在 b-DMEM 培養液中的量與 PA4 量相當並持續增加至反應 8 hr, 之後則維持其生成量約佔總量的 65% 至反應 30 hr。

(a)



(b)

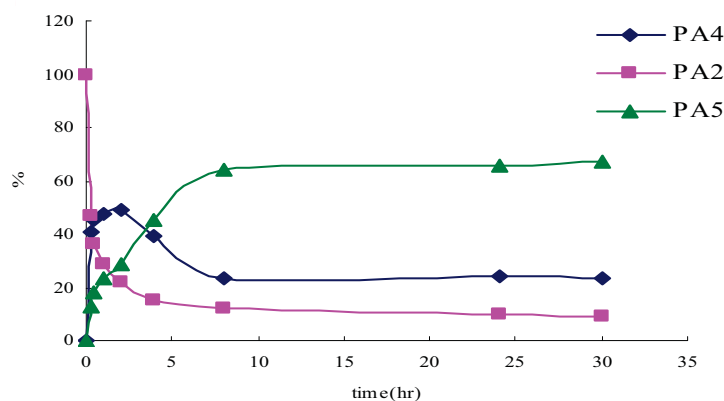


圖 5-13、不同濃度之 PA2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)於 b-DMEM 中有 RAW 264.7 細胞及 LPS 存在下 PA4, PA2 及 PA5 隨時間變化的情況

Figure 5-13. The conversion of PA2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) into its isomers in b-DMEM with RAW 264.7 cell containing LPS at different time point.

(a) 橫軸座標為：分鐘 (min)

(b) 橫軸座標為：小時 (hr)

另外也進一步探討以 EC 及 PA2:EC (2:1)、(1:1)、(1:2) 的比例進行細胞抗發炎試驗中各樣品變化的情形，表 5-4 為 EC、PA2、PA2:EC 以(2:1)、(1:1)、(1:2) 的比例在 b-DMEM 中有無 RAW 264.7 細胞或 SOD (superoxide dismutase)環境下處理 24 hr 後，PA2 及 EC 變化的結果。在只有 b-DMEM 存在的情況下，隨著 PA2 所佔的比例約高，PA4 及 PA5 生成的量就約多而 PA2 最終的存留量則越少；EC 也會轉變成 catechin，各組均有 40~60%的 catechin 產生。在有 b-DMEM 及 RAW 264.7 細胞存在下，PA2 轉變成 PA4 及 PA5 的量較少，PA2 最終的存留量增加 10~20%；EC 也會轉變成 catechin 的量亦較少，catechin 的產生量減少了 30~40%。

SOD 是常見的抗氧化酵素，能清除超氧化物，保護細胞免受氧化損傷。Sang 等人 (2005) 建議使用多酚類物質進行細胞實驗時，可添加 SOD 幫助穩定多酚類物質的變化。故也進一步探討在 b-DMEM 中有 RAW 264.7 細胞及 SOD 環境下處理 24 hr 後 PA2 及 EC 變化的結果。結果發現 SOD 沒有明顯穩定 PA2 及 EC 的效果，推測 PA2 及 EC 轉變成其 isomer 的原因可能不是因為氧化壓力所造成。



表 5-4、在 b-DMEM 中有無 RAW 264.7 細胞或 SOD 情況下處理不同樣品 24 hr 下 PA2 及 EC 之變化情況

Table 5-4. The stability of PA2 and EC in b-DMEM with or without RAW 264.7 and SOD after 24 hr.

Treatment	Condition			% of each compound				
	b-DMEM	RAW 264.7	SOD	catechin	EC	PA4	PA2	PA5
PA	+	+	+			30.62	11.97	57.42
	+	+	-			42.47	17.70	39.82
	+	-	-			9.97	2.99	87.04
EC	+	+	+	6.82	93.18			
	+	+	-	9.18	90.82			
	+	-	-	37.36	62.64			
PA2:EC (2:1) ¹	+	+	+	9.45	90.55	38.88	18.62	42.50
	+	+	-	9.80	90.20	40.10	17.54	42.36
	+	-	-	47.99	52.01	14.74	5.17	80.09
PA2:EC (1:1) ²	+	+	+	7.53	92.47	38.58	23.58	37.84
	+	+	-	8.45	91.55	40.27	18.87	40.85
	+	-	-	37.23	62.77	17.15	5.78	77.07
PA2:EC (1:2) ³	+	+	+	6.97	93.03	37.61	28.40	33.99
	+	+	-	10.48	89.52	31.37	23.84	44.79
	+	-	-	57.11	42.89	12.56	3.62	83.82

¹ 起始濃度 PA2:EC (2:1) (66.6 µg/mL; 33.3 µg/mL)

² 起始濃度 PA2:EC (1:1) (50 µg/mL; 50 µg/mL)

³ 起始濃度 PA2:EC (1:2) (33.3 µg/mL; 66.6 µg/mL)

(三) PA2 於細胞抗氧化試驗之穩定性分析

細胞抗氧化試驗所使用的細胞為 Hep G2 細胞，所使用的培養液為 sf-WME，故探討 PA2 於 sf-WME 中轉變成 PA4 及 PA5 隨時間變化的情形。圖 5-14 為 PA2 起始濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 於 sf-WME 中隨時間變化的結果。PA2 很快的轉變成 PA4 及 PA5，並且在反應 72 min 後，PA4 的量在 sf-WME 培養液中的量與 PA2 量相當，之後 PA4 量緩緩增加至反應 4 hr 後達高峰，接著 PA4 量緩緩減少至反應 24 hr，之後則維持其生成量約佔總量的 30% 至反應 30 hr；PA5 在培養液中的量則是緩慢的增加，至反應 16 hr 後 PA5 的量才與 PA4 的量相當，並持續增加至反應 24 hr，之後則維持其生成量約佔總量的 55% 至反應 30 hr。

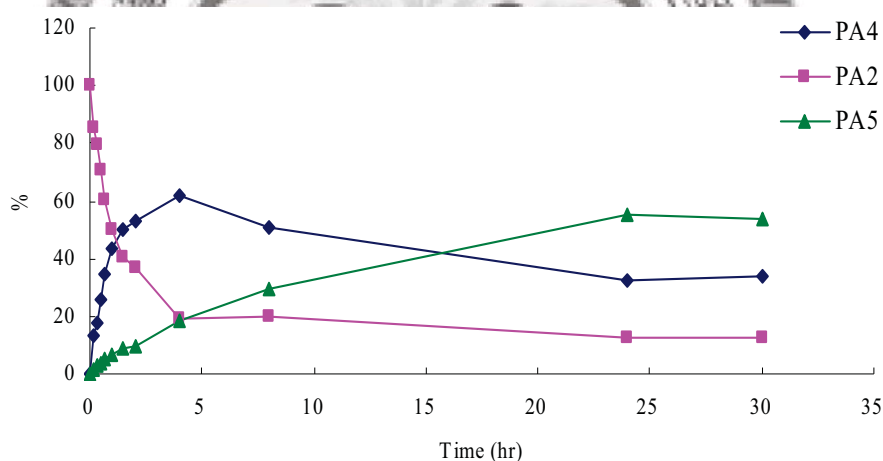
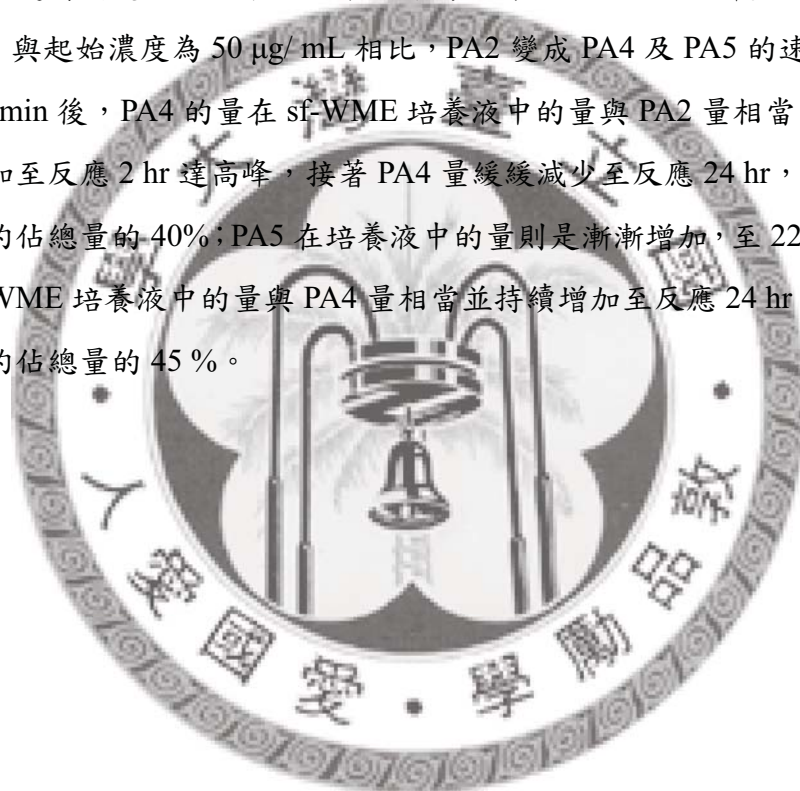


圖 5-14、PA2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 於 sf-WME 中轉變成 PA2、PA4 及 PA5 隨時間變化的情形

Figure 5-14. The conversion of PA2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) into its isomers in sf-WME at different time point.

進一步探討當 PA2 在 sf-WME 中有 Hep G2 細胞情況下隨時間變化的情形。圖 5-15(a) 為 PA2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 於 sf-WME 中且有 Hep G2 細胞存在下隨時間變化的結果。PA2 更緩慢的轉變成 PA4 及 PA5，並且在反應 95 min 後，PA4 的量在 sf-WME 培養液中的量與 PA2 量相當，之後 PA4 量持續增加至反應 4 hr 達高峰，接著 PA4 量緩緩減少至反應 30 hr 時 PA4 的生成量約佔總量的 35%；PA5 在培養液中的量則是緩慢的增加，至反應 22 hr 後 PA5 的量才與 PA4 的量相當，並持續增加至反應 30 hr，此時其生成量約佔總量的 50%。

圖 5-15 (b) 為 PA2 起始濃度為 173 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (300 μM) 於 sf-WME 在有 Hep G2 細胞情況下隨時間變化的結果。此濃度亦為進行 PA2 於細胞抗氧化試驗中所使用的濃度。與起始濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相比，PA2 變成 PA4 及 PA5 的速度較快些。於反應 88 min 後，PA4 的量在 sf-WME 培養液中的量與 PA2 量相當，之後 PA4 量持續增加至反應 2 hr 達高峰，接著 PA4 量緩緩減少至反應 24 hr，此時 PA4 的生成量約佔總量的 40%；PA5 在培養液中的量則是漸漸增加，至 22.5 hr 後 PA5 的量在 b-WME 培養液中的量與 PA4 量相當並持續增加至反應 24 hr，此時 PA5 的生成量約佔總量的 45%。



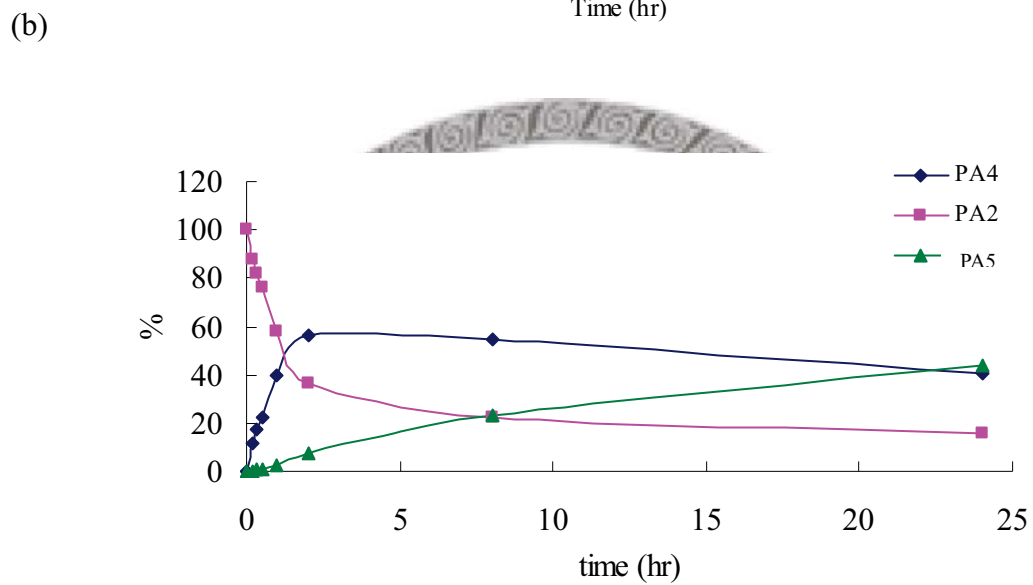
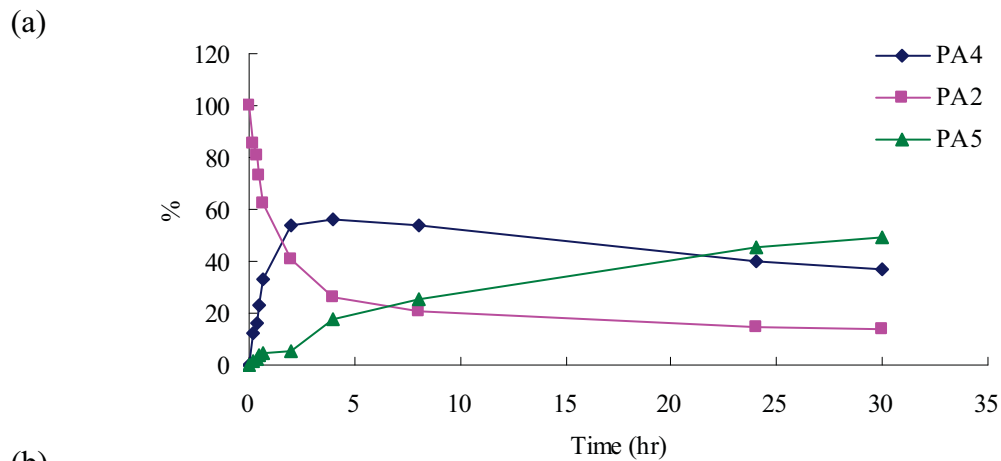


圖 5-15、不同濃度之 PA2 於 sf-WME 於在有 Hep G2 細胞存在下，PA2、PA4 及 PA5 隨時間變化的情形

Figure 5-15. The conversion of PA2 into its isomers in sf-WME with Hep G2 cell under various concentrations by time.

(a) PA2 起始濃度為 50 µg/mL

(b) PA2 起始濃度為 173 µg/mL (300 µM)

綜觀以上實驗結果可得到以下結論：

1. PA2 於各細胞培養液中均會轉變成 PA4 及 PA5。
2. PA4 生成的速度較 PA5 快，PA4 漸增加至高峰後又緩緩減少。
3. PA5 雖生成速度較 PA4 慢，但持續穩定的增加而達到一恆定狀態。
4. PA2 經反應 24 hr 後，PA2、PA4 及 PA5 會達到恆定狀態而不再進一步變化。

由以上實驗結果可整理出表 5-5。推測各培養液中所含的 NaHCO_3 可能是導致 PA2 轉變成其同分異構物 PA4 及 PA5 的重要化合物。隨著培養液中所含 NaHCO_3 的越高 (b-DMEM>sf-WME>HBSS) 則 PA2 就越快的轉變成 PA4 及 PA5 (isomer 生成速度：b-DMEM>sf-WME>HBSS)。另外，PA2 在培養液中的起始濃度也與 PA4 及 PA5 的生成速度有關，PA2 的起始濃度越高則越快的轉變成 PA4 及 PA5。而細胞的存在則可有效的延緩 PA4 及 PA5 生成的量與速度。



表 5-5、不同濃度的 PA2 在不同培養液中 PA4 及 PA5 變化量的時間點

Figure 5-5. The time point at which PA4 or PA5 become major isomer during conversion.

	b-DMEM		sf-WME		HBSS	
	NaHCO ₃ (in medium)	3700 mg/L	2200 mg/L	350 mg/L	50 mg/L	576 mg/L (1 mM)
Without cell	PA2	50 mg/L	173 mg/L (300 µM)	50 mg/L	50 mg/L	576 mg/L (1 mM)
	LPS	— ³	—	—	—	—
	PA4 ¹	25 min	17 min	72 min (1.2 hr)	420 min (7 hr)	30 min
	PA5 ²	55 min	25 min	960 min (16 hr)	>1800 min	200 min (3.3 hr)
With cell	PA4 ¹	35 min	20 min	95 min (1.6 hr)	750 min (12.5 hr)	—
	PA5 ²	360 min (6 hr)	230 min (3.8 hr)	1320 min (22 hr)	>1800 min	—

¹ 為 PA4 生成量與 PA2 在培養液中含量相當的時間點

² 為 PA5 生成量與 PA4 在培養液中含量相當的時間點

³ 未添加 LPS

⁴ 添加 LPS

三、以 Caco-2 細胞模式探討通透率及吸收率

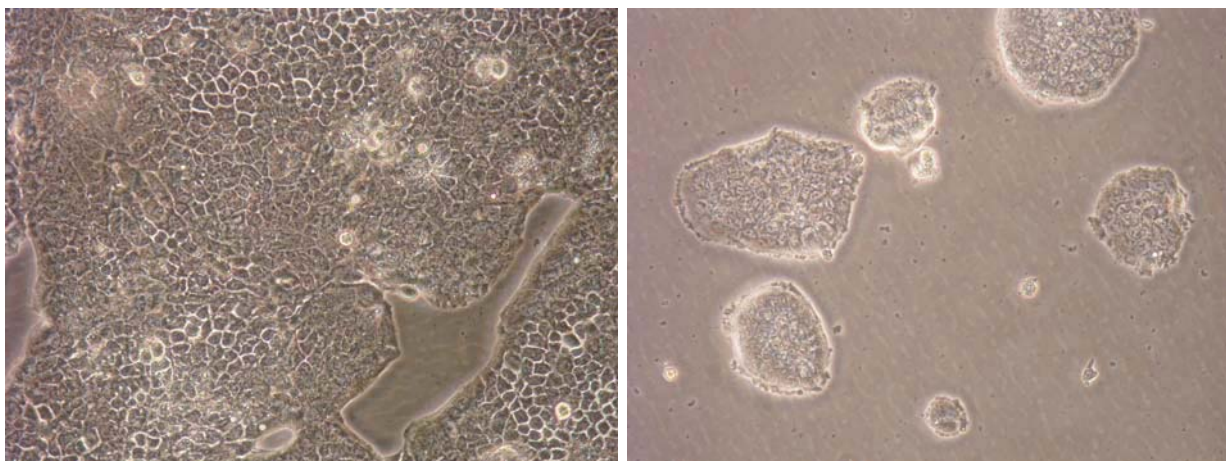
謝 (2006) 之研究指出，龍眼花的 PA2 及 EC 具有很好的抗氧化能力，但其優異的抗氧化效果若能被人體所吸收利用，才能對於人體產生真正的功效。

目前對於原花青素之生物可利用率的研究仍十分有限。由穩定性實驗結果發現 PA2 很容易轉變成其同分異構物 (PA4 及 PA5)；另外，由於龍眼花中的 PA2 及 EC 也並非單獨存在，故以不同比例的 PA2:EC (2:1)、(1:1)、(1:2)、(1:3.3) (為 PA2 及 EC 在龍眼花中天然存在的比例) (謝，2006) 等，4 個混合組；PA2、EC、PA4 及 PA5，4 個純物質組，進一步探討 PA2 及 EC 以及由 PA2 產生的同分異構物於生物可利用率、抗氧化及抗發炎試驗中，是否可以產生協同作用，幫助彼此的功效。

(一) Caco-2 細胞存活率分析-MTT assay

Caco-2 細胞為來自人類結腸癌的細胞株，為貼附型的細胞，Caco-2 cell 可在適當的體外培養條件下形成緊密的連結。圖 5-16。

為了解試驗樣品是否會有細胞毒性，本實驗先探討不同樣品對 Caco-2 細胞存活率之影響，結果如圖 5-17。各樣品濃度範圍為 100~400 μM ；PA2 由於參考 Deprez 等人(2003)的研究結果，所使用的濃度範圍為 500~1000 μM 。各樣品皆溶於 0.05% DMSO，各樣品在測試的濃度範圍時存活率均大於 80%，因此後續通透實驗之樣品濃度將參考毒性實驗之結果，試驗濃度對 Caco-2 細胞不具毒性。



High density (200X)

Low density (200X)

圖 5-16、Caco-2 細胞在顯微鏡下形態

Figure 5-16. Microscopic morphology of Caco-2 cell line

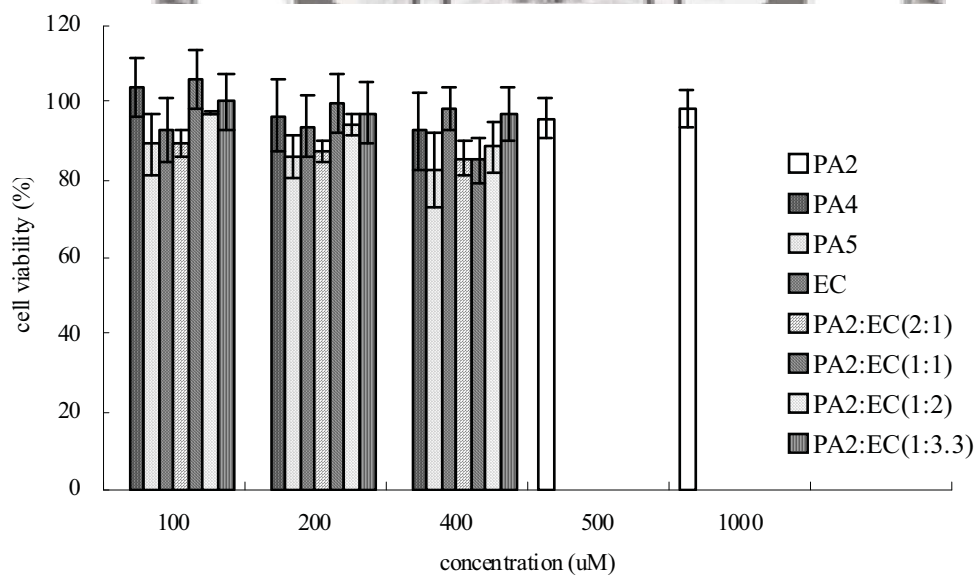


圖 5-17、各樣品對 Caco-2 細胞存活率之影響

Figure 5-17. Toxicity of different samples on Caco-2 cell.

(二) 以 Caco-2 細胞模式探討待測樣品的吸收率

由於 Caco-2 細胞模式具有方便、快速、不需犧牲動物且所需樣品較少等優點，此模式被廣泛應用於預測化合物於動物腸胃道中細胞吸收情況的方法。Caco-2 細胞置於 c-DMEM 含 10% FBS、10,000 U/mL penicillin、10 mg/mL streptomycin、0.025 mg/mL amphotericin 的培養基中，於 10 cm 培養皿中培養，並於 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中培養。每 2 天更換一次培養液，約 4~5 天後細胞可長至八分滿，此時需要進行繼代培養。

在 Trans-well 培養部分，本研究參考大多數文獻上關於吸收率試驗所使用之規格，選用孔徑大小 0.4 μm，膜材質為聚碳脂膜 (polycarbonate)，並考量樣品之使用量及操作便利性，選擇 12 well 之培養盤。此外於細胞培養代數部分，若使用代數過多之細胞，可能會因為老化而影響其生長型態，因此本實驗參考 Hilger 等人(1990)、Yi 等人(2006)及 Boyer 等人(2004)之方法加以修改，選用 25-35 之細胞進行實驗。種入 5×10^5 cells/mL 密度的細胞、培養 21 天左右。並參考 Deprez 等人(2003)之做法，藉由透膜電阻儀，TEER (Transepithelial Electric Resistance)，來監測細胞在 trans-well 上的完整性。TEER 值部分，本研究訂為 $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。

Caco-2 細胞以 5×10^5 cells/cm² 之密度接種於 insert 中，上層 (apical side) 以及下層 (basolateral side) 皆加入 c-DMEM 培養液，於 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱中培養，每 2 天更換一次培養液，更換上層培養液時需格外小心，應由聚碳脂膜底部與側壁交界處吸除，較不易破壞細胞單層膜之形成。培養期間定期測量 Caco-2 細胞單層膜之 transepithelial electrical resistance (TEER) 數值，此數值越高代表細胞單層膜構造越緻密。隨著培養天數增加，TEER 值亦增加。正常情況下，培養時間增加一周，TEER 值約可增加 100Ω，培養 21 日左右可達 $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 左右。此時屬於完全分化階段，能表現小腸細胞的特性，細胞間緊密連結形成 tight junction，使物質無法從細胞間隙通過，必須由細胞膜攝入。

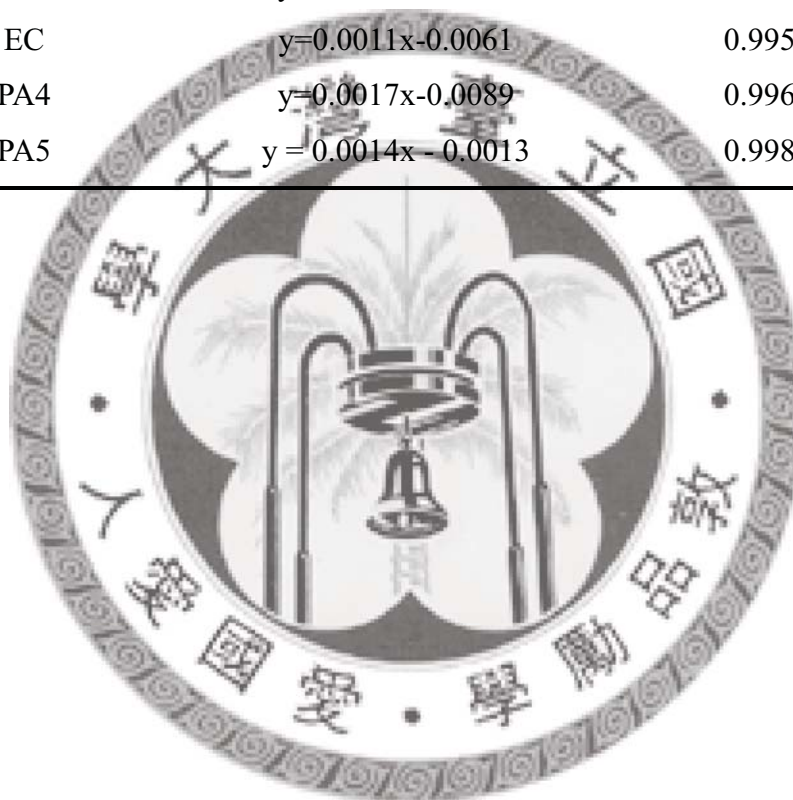
確認細胞膜 TEER 值皆大於 $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 後，進行吸收率實驗。移除培養液 (c-DMEM) 後，以 PBS 分別清洗上下層 2 次，加入 PA2 以 HBSS (含 25mM HEPES) 稀釋至 1mM 取 0.5mL 注入上層，並於下層加入 1.5mL HBSS (含 25mM HEPES)，放入 37 °C、含 5 % CO₂ 的恆溫培養箱內進行試驗。於各設計時間點取出上下層培養液及細胞層，以 HPLC 分析 Caco-2 細胞吸收的情況。

為確立此分析方法的精確性，將 PA2、EC、PA4、PA5 標準品加入 flavon (最終濃度為 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 為內標稀釋成 25~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度，在以上述 HPLC 方法所分析得到檢量線如表 5-6。以檢量線進行樣品濃度定量時，選擇 S/N (signal/noise) >7 的波峰，故各數值均大於 HPLC 偵測極限。

表 5-6、PA2、EC、PA4、PA5 之檢量線

Table 5-6. The standard curve of PA2、EC、PA4、PA5

Sample	Standard curve	r^2
PA2	$y=0.0019x-0.0263$	0.9861
EC	$y=0.0011x-0.0061$	0.9955
PA4	$y=0.0017x-0.0089$	0.9963
PA5	$y=0.0014x-0.0013$	0.9984



1. 以 Caco-2 細胞模式探討 EC 的吸收率

表 5-7 為 EC 與 transwell 作用 2 hr 後，在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層之吸收量及分佈百分比；圖 5-19 為其 HPLC 層析圖。本次實驗的結果可發現，若將 EC 置於細胞單層膜上層，則 2 hr 後 EC 完全無法在單層膜下層被偵測到；反之，若將 EC 置於單層膜下層則 2 hr 後約有 0.95% 的 EC 進入到單層膜上層，通透速率 (Apparent Permeability coefficient, Papp) 為 $0.62 \pm 0.11 \times 10^{-6}$ cm/s，此結果符合 Vaidyanathan 等人(2001)之 $Papp = 0.65 \pm 0.1 \times 10^{-6}$ cm/s。

Vaidyanathan 等人(2001)推測，由於 Caco-2 細胞單層膜上層有對 EC 專一性非常高的外吐蛋白 (MRP, Multiple drug resistant protein) 所致，因為若給予 MRP 抑制劑則能讓 EC 通過 Caco-2 細胞單層到單層膜下層 (圖 2-7)。

另外在細胞單層膜的部分，無論 EC 置於細胞單層膜上層或下層，2 hr 後約有 1~2% 的 EC 進入細胞層當中，但推測由於細胞內的外吐蛋白會很快的將進入細胞當中的 EC 外吐回細胞膜上層，故置於細胞單層膜上層的 EC 即使能被細胞所吸收，仍無法通過細胞層進入到細胞單層膜下層。



表 5-7、EC 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞及單層膜下層 2hr 之吸收量及分佈百分比

Table 5-7. Distribution of EC in apical side, cell monolayer and basolateral side after 2hr transport experiment in Caco-2 cell monolayer modal.

	μg (%)	Apical	Cell monolayer	Basolateral	Total	$\text{Papp} \cdot 10^{-6}$ (cm/sec)
EC	A-B (7.26 μg)	5.42 \pm 0.05 (74.68)	0.14 \pm 0.02 (1.96)	0.00 (0)	5.56 \pm 0.07 (76.64)	–
	B-A (21.8 μg)	0.07 \pm 0.5 (0.95)	0.10 \pm 0.07 (0.92)	6.60 \pm 0.69 (91.49)	6.77 \pm 0.48 (93.36)	0.62 \pm 0.11

AP \rightarrow BL: apical to basolateral transport; BL \rightarrow AP: basolateral to apical transport.
Data expressed as mean \pm SD (n=3, at each point)

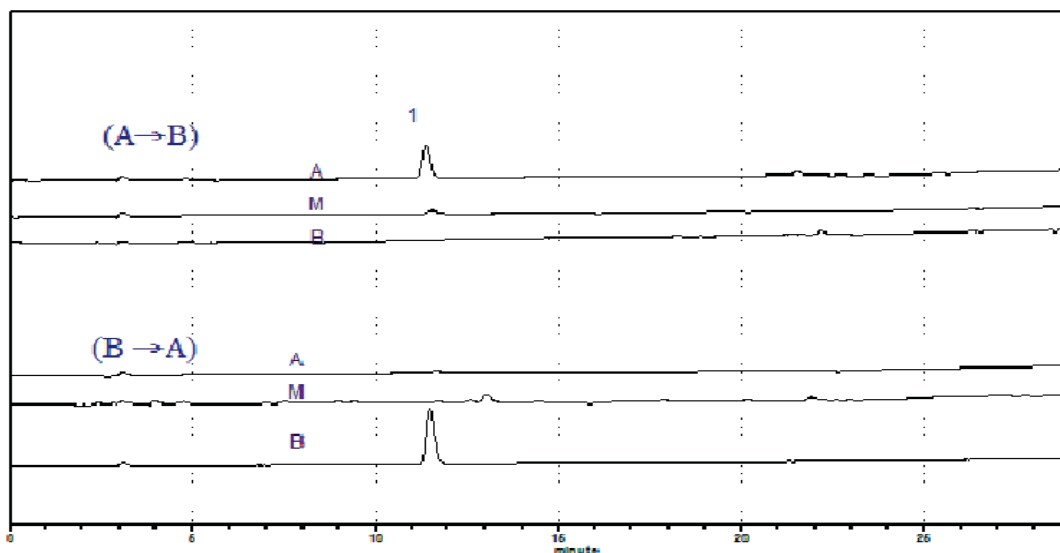


圖 5-18、EC 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞及單層膜下層 2 hr 之 HPLC 層析圖

Figure 5-18. HPLC chromatogram of EC in apical side, cell monolayer and basolateral side after 2 hr transport experiment in Caco-2 cell monolayer modal.

Peak 1:EC

I.S.: Internal standard

A: apical side

M: cell monolayer

B: basolateral side

2 以 Caco-2 細胞模式探討 PA2 的吸收率

表 5-8 為不同時間點下 PA2 (1 mM) 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層之吸收量及分佈百分比。圖 5-19 為試驗之 HPLC 層析圖。可發現 10 min 內在細胞單層膜上層就有 4% 的 PA2 轉變成為 PA4 的形式，且隨著時間的增加，細胞單層膜上層就有越多的 PA2 轉變成為 PA4。至反應 3 hr 後，上層約有 7% 的 PA2 轉變成為 PA4。在單層膜方面，於 10 min 內有 0.79% 的 PA2 被細胞所吸收，在細胞層被偵測到。反應 30 min 發現約有 0.64% 的 PA2 被細胞所吸收，且有 0.14% 的 PA2 轉變成為 PA4 的形式，然而隨著試驗時間的增加，PA2 存於細胞層的量並沒有明顯的增加，而是維持在 0.4-0.8%，這是因為 Caco-2 細胞吸收 PA2 後會將之釋放於單層膜下層，而不會囤積在細胞內所致。PA2 與細胞培養 1 hr 後約有 4.6% 的 PA2 可藉由 Caco-2 細胞吸收而釋放至單層膜下層，並且約有 0.95% 的 PA2 在下層轉變成為 PA4，並且隨著試驗時間的增加，單層膜下層 PA2 的量也就越多，試驗 3 hr 後有 12% 之 PA2 進入單層膜下層。

另計算 PA2 之通透速率 (P_{app}) 為 $4.72 \pm 0.42 \times 10^{-6}$ cm/s。根據 Yee 等 (1997) 指出，化合物之通透速率與口服吸收速率呈正相關，若 P_{app} 大於 3×10^{-6} cm/s 則表示其口服吸收率佳。由此實驗結果可知 PA2 為吸收率佳之化合物。

表 5-8、PA2 在 Caco-2 細胞單層膜上層、細胞膜中及下層於不同時間點之吸收量及分佈百分比

Table 5-8. Distribution of PA2 in apical side, cell monolayer and basolateral side at different time point after transport experiment in Caco-2 cell monolayer model.

Time	Apical			Cell monolayer			Basolateral			Total
	PA4	PA2	PA2	PA4	PA2	PA2	PA4	PA2	PA2	
0 min			576 (100)							576 (100)
10 min	23.57±0.16 (4.09±0.03)	547.09±26.28 (94.98±4.56)		N.D.	4.54±3.21 (0.79±0.13)*		N.D.	N.D.	N.D.	573.37 (99.54)
30 min	27.12±6.03 (4.71±1.05)	478.25±59.41 (83.03±10.31)		0.79±0.27 (0.14±0.05)*	3.69±2.37 (0.64±0.41)*		N.D.	N.D.	N.D.	509.53 (88.46)
1 h	31.65±7.19 (5.49±1.25)	477.24±82.08 (82.85±14.25)		1.09±0.06 (0.08±0.01)**	4.04±0.76 (0.70±0.13)**		5.84±1.49 (0.95±0.26)**	26.60±6.30 (4.63±1.09)**		545.53 (94.71)
1.5 h	36.76±2.44 (6.38±0.42)	386.96±13.48 (68.34±1.95)		1.28±0.47 (0.22±0.01)**	3.61±0.89 (0.63±0.16)*		14.44±0.82 (2.51±0.14)**	45.12±1.75 (7.83±0.30)**		494.84 (85.91)
2 h	35.48±4.57 (6.16±0.79)	348.86±13.48 (60.57±2.34)		1.55±0.17 (0.27±0.03)**	4.37±0.89 (0.76±0.16)*		22.18±4.09 (3.85±0.71)**	65.74±14.40 (11.41±2.5)**		478.17 (83.02)
3 h	34.17±4.35 (5.93±0.76)	286.85±23.13 (49.80±4.02)		1.33±0.35 (0.23±0.06)**	2.74±0.73 (0.47±0.13)**		35.08±3.42 (6.09±0.59)**	71.75±12.01 (12.46±2.09)**		431.91 (74.98)

Data expressed as mean ± SD (n=3, at each point) N.D.: not detectable.

* p-value <0.05 、 ** p-value <0.01 compared to 0 min by Student's t-test.

Papp = 4.72 ± 0.42 * 10⁻⁶ (cm/s)

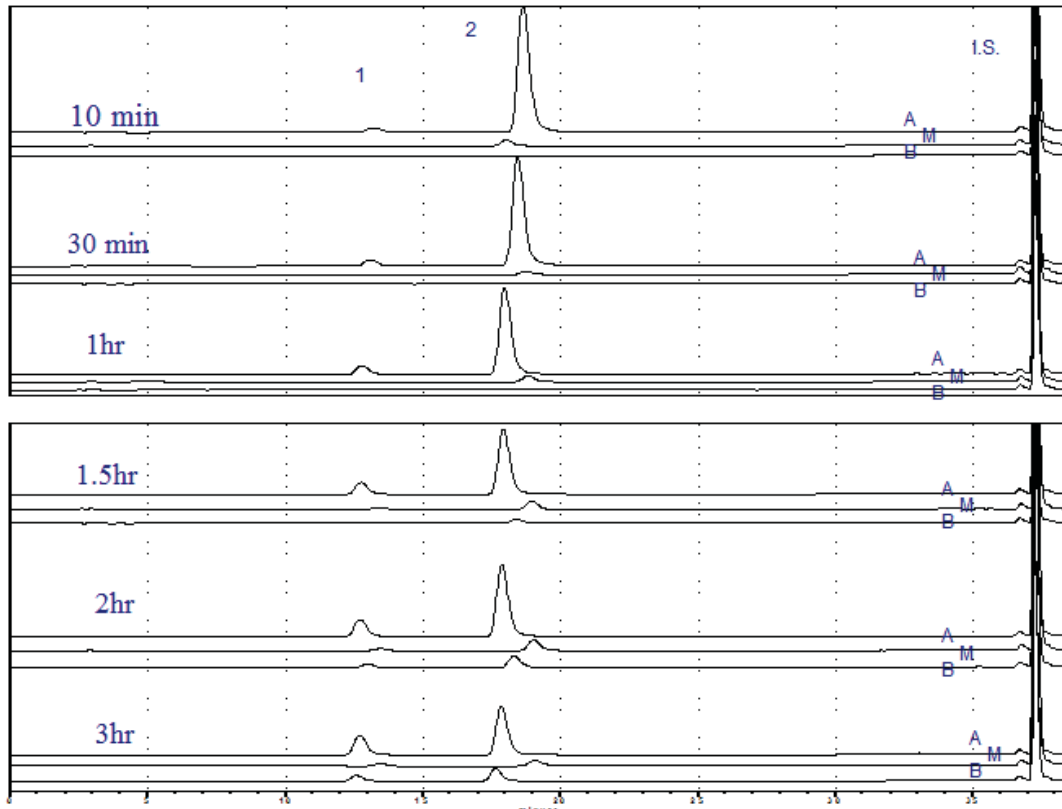


圖 5-19、PA2 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞及單層膜下層於不同時間點之 HPLC 層析圖。

Figure 5-19. HPLC chromatogram of permeability of PA2 through Caco-2 cell monolayer at different time points.

Peak 1: PA4 ; Peak 2: PA2

I.S.: Internal standard

A: apical side

M: cell monolayer

B: basolateral side

3. 以 Caco-2 細胞模式探討 PA4 的吸收率

表 5-9 為不同時間點下 PA4 (200 μ M) 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層之吸收量及分佈百分比；圖 5-20 為其 HPLC 層析圖。可發現 30min 內在細胞單層膜上層就有 6% 的 PA4 被細胞所吸收而於細胞層被偵測到，然而隨著試驗時間的增加，PA4 存於細胞層的量並沒有明顯的增加，而是維持在 6~8%，這是因為 Caco-2 細胞吸收 PA4 後會將之釋放於單層膜下層，而不會囤積在細胞內所致。另外，在細胞單層膜下的部分，可發現在 30 min 內就有約 3% 的 PA4 通過細胞層進入單層膜下層而被偵測到，且隨著試驗時間的增加，PA4 在單層膜下層的量也越多。值得注意的是，於反應 3hr 後，PA4 在單層膜下層的量幾乎與單層膜上層的量相同。

另計算 PA4 之通透速率 (P_{app}) 為 $11.45 \pm 5.02 \times 10^{-6}$ cm/s。其通透速率比 PA2 ($4.72 \pm 0.42 \times 10^{-6}$ cm/s) 高，根據 Deprez 等(2001)實驗結果 (圖 5-21)，catechin 比 EC 更容易被 Caco-2 細胞所吸收，而 PA4 為 catechin 與 EC 組合而成，推測可能是 PA4 的 catechin 部分促進了 PA4 的吸收。



表 5-9、PA4 在 Caco-2 細胞單層膜上層、細胞膜中及下層於不同時間點分佈百分比之變化量

Table 5-9. Distribution of PA4 in apical side, monolayer side and basolateral side at different time point after transport experiment in Caco-2 cell monolayer model

$\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ (%)	Apical	Cell embrane	Basolateral	Total
Time	PA4	PA4	PA4	
0 min	200 (100)			200 (100)
30 min	221.3 \pm 12.23 (110.65 \pm 6.11)	12.14 \pm 1.61** (6.07 \pm 0.80)	6.73 \pm 0.44** (3.37 \pm 0.22)	240.18 \pm 13.60 (120.09 \pm 6.80)
1 h	194.29 \pm 11.99 (97.14 \pm 5.99)	13.66 \pm 2.43** (6.83 \pm 1.22)	12.99 \pm 7.07** (6.49 \pm 3.54)	220.94 \pm 10.79 (110.47 \pm 5.39)
2 h	159.25 \pm 3.18 (79.62 \pm 1.59)	13.10 \pm 3.10** (6.55 \pm 1.55)	25.61 \pm 7.77** (12.80 \pm 3.89)	197.95 \pm 8.51 (98.98 \pm 4.26)
3 h	66.45 \pm 19.09 (33.22 \pm 9.54)	16.34 \pm 3.09** (8.17 \pm 1.54)	65.45 \pm 15.71** (36.13 \pm 10.99)	148.2 \pm 18.75 (77.52 \pm 8.62)

Data expressed as mean \pm SD (n=3, at each point)

* p-value <0.05、** p-value <0.01 compared to 0 min by Student's t-test.

$P_{app} \cdot 10^{-6} = 11.45 \pm 5.02$ (cm/s)



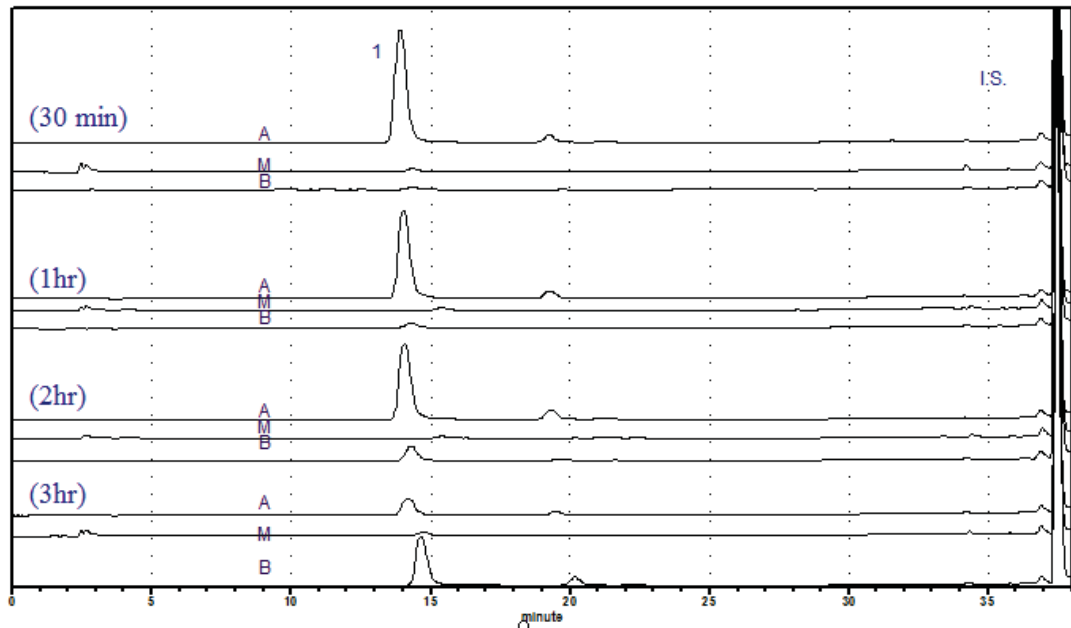


圖 5-20、PA4 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞及單層膜下層於不同時間點之 HPLC 層析圖。Peak 1: PA4

Figure 5-20. HPLC chromatogram of permeability of PA4 through Caco-2 cell monolayer at different time points. Peak 1: PA4

I.S.: Internal standard
 A: apical side
 M: cell monolayer
 B: basolateral side



4 以 Caco-2 細胞模式探討 PA5 的吸收率

表 5-10 為不同時間點下 PA5 (200 μM) 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層之吸收量及分佈百分比；圖 5-21 為其 HPLC 層析圖。可發現 30 min 內在細胞單層膜上層就有約 2% 的 PA5 被細胞所吸收而於細胞層被偵測到，然而隨著試驗時間的增加，PA5 存於細胞層的量並沒有明顯的增加，而仍是維持在 2%。另外，在細胞單層膜下的部分，可發現在 30 min 內就有約 1.5% 的 PA5 通過細胞層進入單層膜下層而被偵測到，且隨著試驗時間的增加，PA5 在單層膜下層的量也越多，於反應 3 hr 後，約 6% 的 PA5 進入單層膜下層。

另計算 PA5 之通透速率 (P_{app}) 為 $2.51 \pm 0.21 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ 。其通透速率比 PA2 ($P_{\text{app}} = 4.72 \pm 0.42 \times 10^{-6} \text{cm/s}$) 及 PA4 ($P_{\text{app}} = 11.4 \pm 5.02 \times 10^{-6} \text{cm/s}$) 低。根據 Deprez 等 (2001) 實驗結果，catechin 比 epicatechin 更容易被 Caco-2 細胞所吸收，而 PA5 亦為 catechin 與 epicatechin 組合而成，然而通透率卻比 PA4 低許多，可能的原因仍須做進一步的探討。



表 5-10、PA5 在 Caco-2 細胞單層膜上層、細胞膜中及下層於不同時間點分佈百分比之變化量

Table 5-10. Distribution of PA5 in apical side, monolayer side and basolateral side at different time point after transport experiment in Caco-2 cell monolayer model

Time	$\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ (%)	Apical	Cell monolayer	Basolateral	Total
		PA5	PA5	PA5	
0		200 (100)			200 (100)
30 min		175.22±16.93 (87.61±8.46)	4.01±0.49** (2.03±0.24)	3.30±0.83** (1.65±0.41)	182.58±17.45 (91.29±8.73)
3 h		148.17±5.78 (74.09±2.89)	4.20±0.54** (2.10±0.27)	12.15±1.02** (6.07±0.51)	164.52±6.83 (82.26±3.41)

Data expressed as mean \pm SD (n=3, at each point)

* p-value <0.05、** p-value <0.01 compared to 0 min by Student's t-test.

$P_{app} = 2.51 \pm 0.21 \cdot 10^{-6}$ (cm/s)

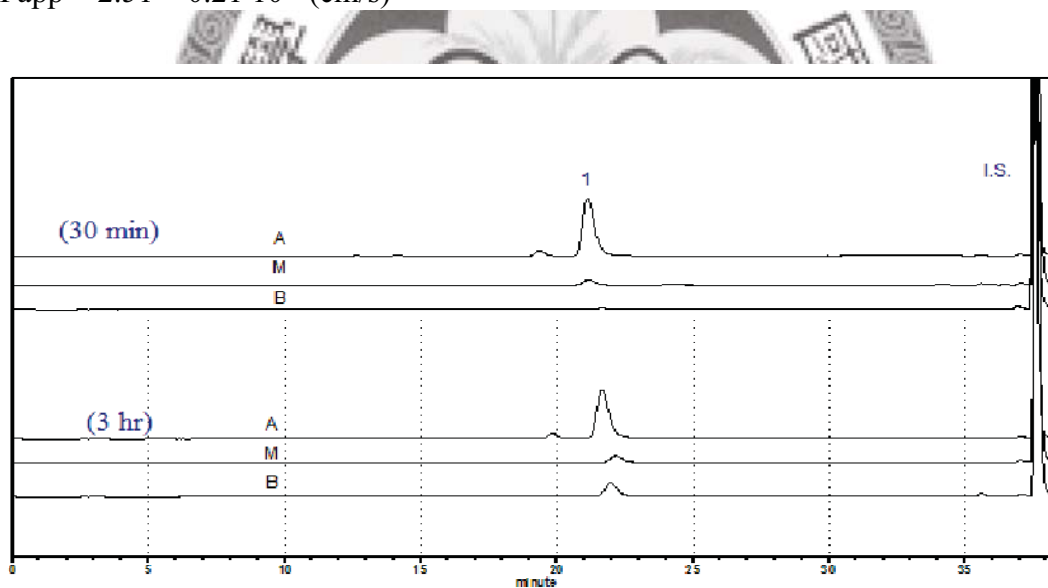


圖 5-21、PA5 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層於不同時間點之 HPLC 層析圖。

Table 5-21. HPLC chromatogram of PA5 in apical side, monolayer side and basolateral side at different time point after transport experiment in Caco-2 cell monolayer model.

Peak 1: PA5

I.S.: Internal standard

A: apical side

M: cell monolayer

B: basolateral side

5 以 Caco-2 細胞模式探討 PA2:EC(2:1)、(1:1)、(1:2)、(1:3.3) 的吸收率

表 5-11 為 PA2:EC (2:1)、(1:1)、(1:2)、(1:3.3)在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層反應 2 hr 之吸收量及分佈百分比；圖 5-22 為其 HPLC 圖。可發現各比例下在細胞單層膜上層均有約 25 %之 PA2 轉變為 PA4。在細胞單層膜層在各比例下均有約 0.02~0.1 %之 PA2 及 PA4 滯留於細胞中；EC 則無法被偵測到。另外，在細胞單層膜下的部分，可發現約有 2.5%PA2 通過細胞單層膜層而進入細胞單層膜下層，但是無論各種比例下的 EC 仍然無法通過細胞單層膜層而進入細胞單層膜下層。

另計算不同比例 PA2 及 EC 之通透速率 (P_{app}) EC : PA2 (1:2) 為 $1.42 \pm 0.01 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; EC:PA2 (1:1) 為 $1.29 \pm 0.66 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; EC:PA2 (2:1) 為 $1.52 \pm 0.31 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; EC:PA2 (3.3:1) = $1.63 \pm 0.02 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 。各通透速率均比僅有 PA2 ($P_{app} = 4.72 \pm 0.42 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) 低。推測是因為 EC 覆蓋住 Caco-2 細胞單層膜上可吸收 PA2 的通道，導致以不同比例 PA2 及 EC 進行通透試驗時，PA2 的通透率均降低。



表 5-11、不同比例之 PA2 及 EC 在 Caco-2 細胞單層膜上層、細胞膜中及下層於反應 2hr 之吸收量及分佈百分比
 Table 5-11. Distribution of different concentration of PA2 and EC in apical side, monolayer and basolateral side after 2hr by Caco-2 cell monolayer model.

Time (hr)	Apical			Cell monolayer			Basolateral			Total				
	EC	PA2	$\mu\text{g/mL} \pm \text{SD} (\%)$	EC	PA4	PA2	EC	PA4	PA2	EC	PA			
0	200 μM (58.06 $\mu\text{g/ml}$)	400 μM (230.4 $\mu\text{g/ml}$)		58.06 (100)		230.4 (100)								
2				50.07 \pm 4.20 (86.24 \pm 3.52)	55.74 \pm 12.09 (24.19 \pm 0.53)	121.83 \pm 17.32 (52.88 \pm 1.64)	N.D.	0.04 \pm 0.00 (0.02 \pm 0.00) ^d	0.11 \pm 0.00 (0.05 \pm 0.0) ^e	N.D.	1.79 \pm 0.01 (0.77 \pm 0.01) ^b	5.29 \pm 0.02 (2.30 \pm 0.02) ^e	50.07 \pm 4.20 (86.24 \pm 3.52)	184.80 \pm 29.34 (80.21 \pm 2.66)
0	200 μM (58.06 $\mu\text{g/ml}$)	200 μM (115.2 $\mu\text{g/ml}$)		58.06 (100)		115.2 (100)								
2				45.29 \pm 3.00 (78.00 \pm 5.17)	24.91 \pm 2.10 (21.62 \pm 1.82)	72.57 \pm 6.87 (62.99 \pm 5.96)	N.D.	0.08 \pm 0.01 (0.07 \pm 0.01) ^d	0.11 \pm 0.02 (0.09 \pm 0.01) ^e	N.D.	1.32 \pm 0.53 (1.15 \pm 0.46) ^a	3.29 \pm 1.22 (2.07 \pm 0.56) ^e	45.29 \pm 3.00 (78.00 \pm 5.17)	101.37 \pm 7.91 (87.98 \pm 6.86)
0	400 μM (116.12 $\mu\text{g/ml}$)	200 μM (115.2 $\mu\text{g/ml}$)		116.12 (100)		115.2 (100)								
2				105.56 \pm 19.01 (90.91 \pm 16.37)	28.62 \pm 5.67 (24.85 \pm 4.92)	78.49 \pm 14.12 (68.13 \pm 12.25)	N.D.	0.09 \pm 0.02 (0.08 \pm 0.01) ^d	0.17 \pm 0.00 (0.14 \pm 0.00) ^e	N.D.	1.82 \pm 0.47 (1.60 \pm 0.41) ^a	2.83 \pm 0.58 (2.46 \pm 0.50) ^e	105.56 \pm 19.01 (90.91 \pm 16.37)	112.2 \pm 19.28 (97.26 \pm 17.73)
0	660 μM (191.6 $\mu\text{g/ml}$)	200 μM (115.2 $\mu\text{g/ml}$)		191.6 (100)		115.2 (100)								
2				162.92 \pm 6.75 (85.03 \pm 3.5)	26.94 \pm 23.39 (23.38 \pm 0.53)	56.36 \pm 1.88 (48.92 \pm 92)	N.D.	0.03 \pm 0.00 (0.03 \pm 0.00) ^d	0.11 \pm 0.00 (0.09 \pm 0.00) ^e	N.D.	1.79 \pm 0.01 (1.56 \pm 0.01) ^a	2.30 \pm 0.02 (2.62 \pm 0.02) ^e	166.68 \pm 2.59 (85.03 \pm 3.5)	88.14 \pm 3.07 (76.6 \pm 2.66)

Data expressed as mean \pm SD (n=3, at each point); N.D.=Not Detectable.
 Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.
 The Papp of EC:PA2 (200 μM :400 μM) = $1.42 \pm 0.01 * 10^{-6}$ cm/s
 EC:PA2 (200 μM :200 μM) = $1.29 \pm 0.66 * 10^{-6}$ cm/s
 EC:PA2 (400 μM :200 μM) = $1.52 \pm 0.31 * 10^{-6}$ cm/s
 EC:PA2 (660 μM :200 μM) = $1.63 \pm 0.02 * 10^{-6}$ cm/s

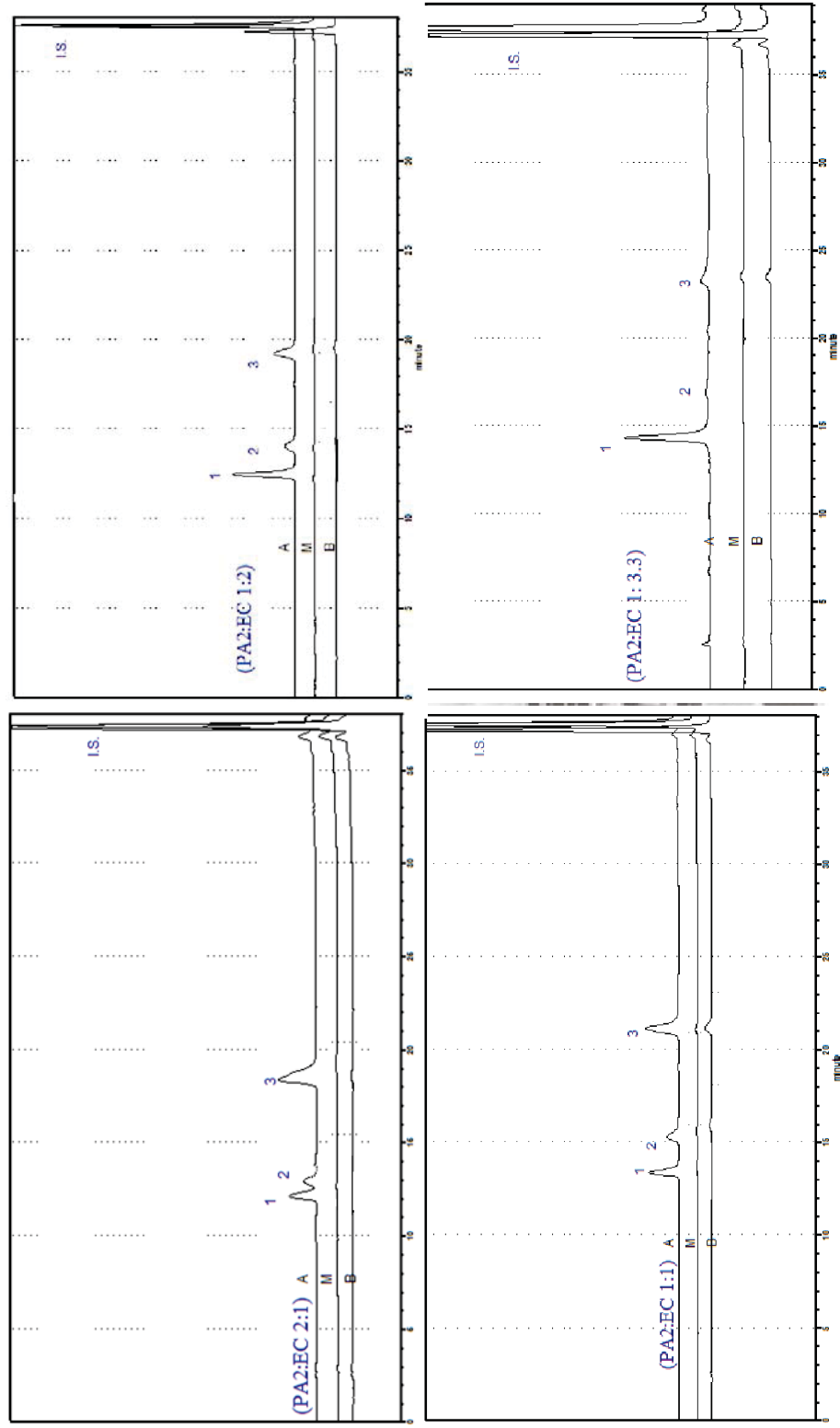


圖 5-22、不同比例之 PA2 及 EC 在細胞單層膜上層、Caco-2 細胞內及單層膜下層於反應 2hr 之 HPLC 層析圖

Table 5-22. HPLC chromatogram of different concentration of PA2 and EC in apical side, intracellular side and basolateral side after 2hr by Caco-2 cell monolayer model. Peak 1: EC; Peak 2:PA2; Peak 3: PA4 I.S.: Internal standard

A: apical side

M: cell monolayer

B: basolateral side

四、抗發炎實驗

(一) NO (Nitric oxide) 螫合能力測定

為釐清樣品抑制 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 的能力，是藉由清除 RAW 264.7 巨噬細胞產生的 NO，又或是藉由基因層次所調控，故進行化學螫合 NO 能力的試驗，探討樣品抑制 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 的能力，是否是藉由清除 RAW 264.7 巨噬細胞產生的 NO 所造成。SNP (sodium nitroprusside) 為一種紅色結晶，於水中在氧氣及光線的刺激下會氧化產生 NO，與樣品反應 150 min 後，取出反應液與 Griess reagent 進行呈色反應，在波長 550 nm 偵測其吸光值。利用相對於空白組的吸光值下降百分比，可換算出不同濃度樣品對於 SNP 所產生 NO 的螫合率，並換算 50% 螫合率所需要的樣品濃度表示樣品之清除 NO 能力。

本實驗所使用樣品的 NO 螫合力結果如圖 5-23，整理如表 5-12。正控制組 EGCG 之 NO 螫合力 EC_{50} 值為 32.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與 Ho 等人(2007) 的實驗結果 EC_{50} 值 $29.6 \pm 6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 十分接近。各純物質樣品組間以 EC 之 NO 螫合力最佳，其 EC_{50} 值為 $51.1 \pm 9.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；PA2 及其 isomer 的 NO 清除力均較差，但其中以 PA5 的 NO 螫合力較好， EC_{50} 值為 $159.2 \pm 28.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；而 PA2 及 PA4 之 NO 螫合力均大於 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，幾乎不具有清除化學來源 NO 的能力。在 PA2 及 EC 不同比例之混合組發現，隨 EC 所佔的比例越高則其 NO 螫合力越好，此結果與純物質樣品組的結果相符。

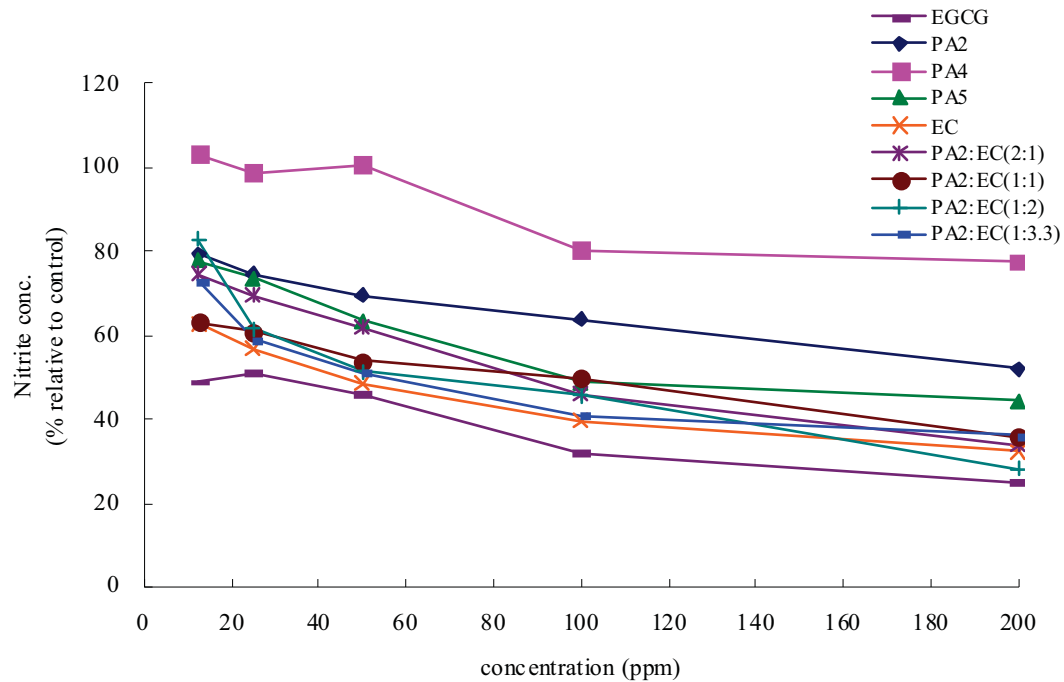


圖 5-23、各樣品對 NO 螯合力之濃度效應

Figure 5-23. NO scavenging effects of different samples.

表 5-12、各樣品螯合 SNP 產生 NO 之 EC₅₀

Table 5-12. EC₅₀ of different samples scavenging NO production by SNP.

	EC ₅₀	
	μg/mL	μM
EGCG	32.6±6 ^d	
PA2	>200	>347.2
PA4	>200	>347.2
PA5	159.2±28.4 ^a	276.4
EC	51.1±9.7 ^{cd}	175.7
PA2:EC(2:1)	100.6±3.4 ^b	PA2 116.4, EC 115.5
PA2:EC(1:1)	87.1±9.9 ^b	PA2 75.6, EC 150
PA2:EC(1:2)	64.5±3.4 ^c	PA2 37.3, EC 148.1
PA2:EC(1:3.3)	59.1±5.3 ^c	PA2 23.9, EC 156.2.1

Each value represents mean ± SD from three different experiments (each experiment was conducted in triplicate).

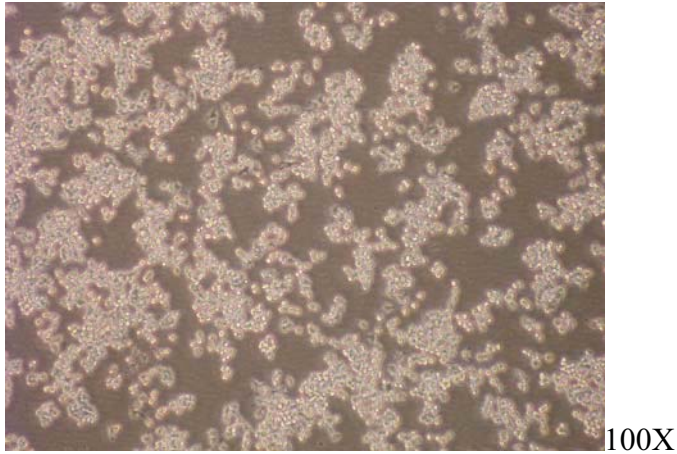
Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

(二). 抑制以 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 之抗發炎效果

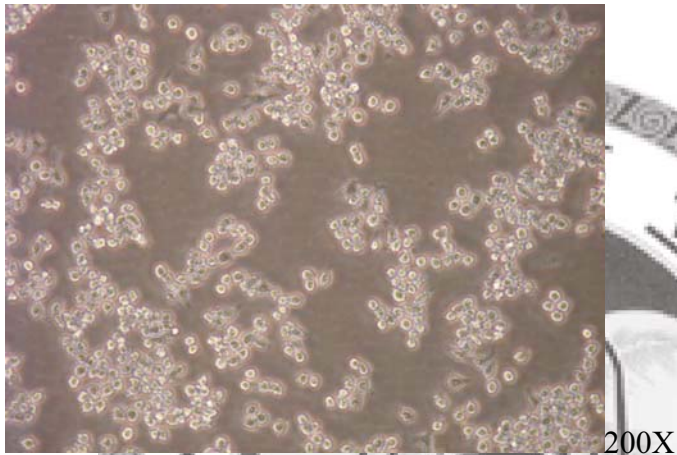
1 RAW 264.7 細胞存活率分析-MTT assay

圖 5-24 為 RAW 264.7 於 10 cm 培養皿的生長型態。為了解試驗樣品是否會有細胞毒性，本實驗先探討不同樣品對 RAW 264.7 細胞存活率之影響。樣品濃度範圍為 3.125~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。各樣品皆溶於 0.05 % DMSO，實驗結果如圖 5-25，各樣品在低於 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度時皆沒有毒性，因此後續抗發炎實驗之樣品濃度將參考毒性實驗之結果，試驗濃度對 RAW 264.7 細胞不具毒性。





100X



200X

圖 5-24、RAW264.7 巨噬細胞在顯微鏡下形態

Figure 5-24. Microscopic morphology of RAW264.7 macrophage cell line

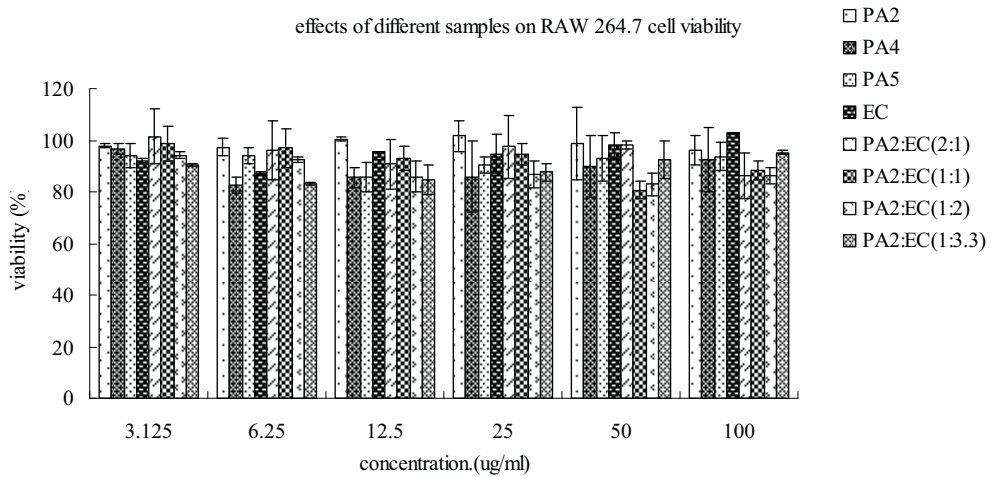


圖 5-25、各樣品對 RAW 264.7 巨噬細胞存活率之影響

Figure 5-25. Toxicity of different samples on RAW 264.7 macrophage cell.

2 抑制以 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 之抗發炎效果

NO 的半衰期相當短，但可快速轉變成穩定的 nitrite 或 nitrate。小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 細胞經不同濃度的樣品及 LPS 處理後，反應 24 hr，待巨噬細胞充分被 LPS 刺激產生 NO，收集細胞的上層液與 Griess reagent 反應後，利用波長 550 nm 偵測其吸光值。結果如圖 5-26 所示，在空白組 (未處理樣品及 LPS) 偵測的吸光值相當低，而控制組 (單獨處理 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS) 所測得的吸光值約為空白組的 11 倍。

當 RAW 264.7 細胞分別處理不同濃度的樣品及 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 24 hr 後可發現，抑制結果皆呈現濃度效應的現象。對照組 resveratrol 之 EC_{50} 值為 5.8 μM ，略優於 Cho 等人(2002) 的文獻數據 (17 μM) 表示此系統成功的誘導 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO，並可有藉由正控制組有效的抑制 NO 的產生。另外將由表 5-13 可看出，各純物質樣品若由莫爾濃度評估其抗發炎效果以 PA2 的效果最佳， EC_{50} 值為 39.1 μM ；PA4 及 PA5 為 PA2 的 isomer， EC_{50} 值分別為 76.0 μM 及 52.1 μM ，其抗發炎效果較 PA2 為差。EC 的抗發炎能力則居於 PA4 及 PA5 之間， EC_{50} 值為 58.2 μM ，4 種純物質之抗發炎能力均達 $p < 0.05$ 之顯著性。在 PA2 及 EC 不同比例之混合組可發現，隨 EC 所佔的比例越高則其抗發炎能力越差。由 Caco-2 cell 單層膜通透實驗的結果，推測是由於 EC 較難以被細胞吸收利用所導致。

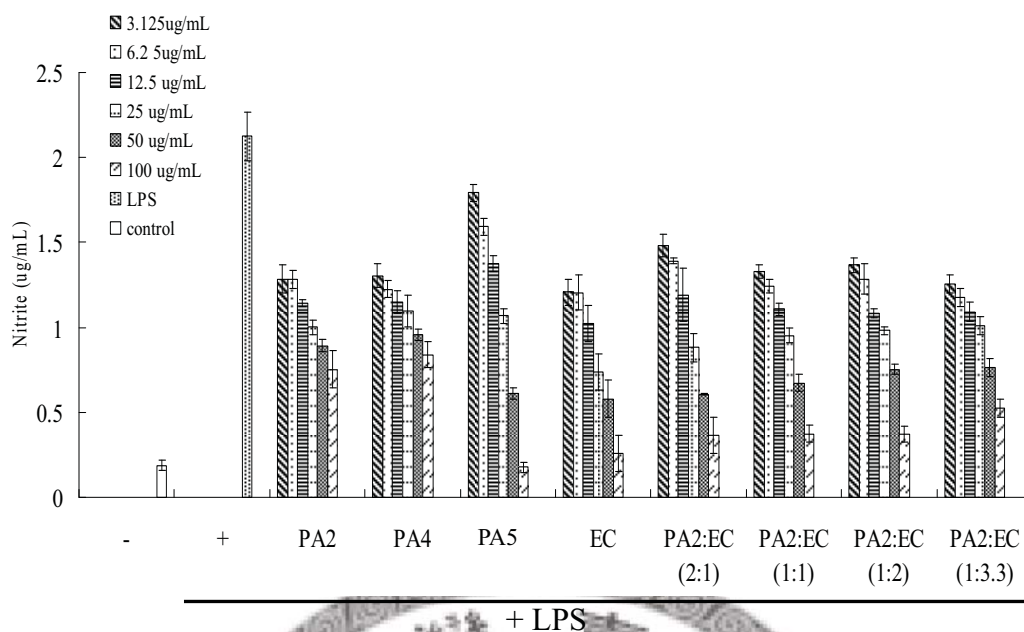


圖 5-26、各樣品對抑制 LPS 刺激 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 之影響

Figure 5-26. Effect of different samples on LPS- induced NO production in RAW 264.7 macrophage.

表 5-13、各樣品清除抑制 LPS 刺激 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 之 EC₅₀

Table 5-13. EC₅₀ of different samples in inhibition of LPS- induced NO production in RAW 264.7 macrophage.

	NO inhibition ability EC ₅₀	
	μM	μg/mL
Resveratrol	5.8	1.33 ± 0.25 ^g
PA2	39.1	22.5 ± 1.56 ^{cd}
PA4	76	43.8 ± 6.87 ^a
PA5	52.1	30.3 ± 3.2 ^b
EC	58.2	16.9 ± 2.43 ^f
PA2:EC=2:1	PA2 20.8; EC 20.7	18.1 ± 1.34 ^f
PA2:EC=1:1	PA2 16.4; EC 32.6	18.9 ± 3.6 ^f
PA2:EC=1:2	PA2 12.2; EC 48.2	21.04 ± 2.31 ^{de}
PA2:EC=1:3.3	PA2 10.5; EC 68.9	26.37 ± 4.67 ^c

Each value represents mean ± SD from three different experiments (each experiment was conducted in triplicate).

Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

(三). iNOS、COX-2 蛋白質表現分析

進一步探討樣品抑制 LPS 誘發 RAW 264.7 細胞所產生之 iNOS 及 COX-2 蛋白質的表現。在正常的生理條件下，NO 並不會大量產生。然而當巨噬細胞受到細菌或微生物入侵後，因受到脂多醣體 (LPS) 或細胞激素的刺激而誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO。

由 Western blotting 結果顯示 (圖 5-27)，僅使用 LPS 處理細胞 24 hr 後，iNOS 及 COX-2 蛋白質的條帶明顯變粗，顯示 LPS 能有效誘導 iNOS 及 COX-2 蛋白質的表現。PA2 處理組 (含 PA2 最終濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 LPS 最終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 則 iNOS 及 COX-2 蛋白質的條帶明顯變減少，顯示 PA2 能有效抑制 iNOS 及 COX-2 蛋白質的表現。在 EC 處理組 (含 EC 最終濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 LPS 最終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 則發現 iNOS 及 COX-2 蛋白質的條帶有減少的現象。比較 PA2 及 EC 處理組的效果可以發現，PA2 處理組抑制 iNOS 及 COX-2 蛋白質表現的效果較 EC 處理組來得好。

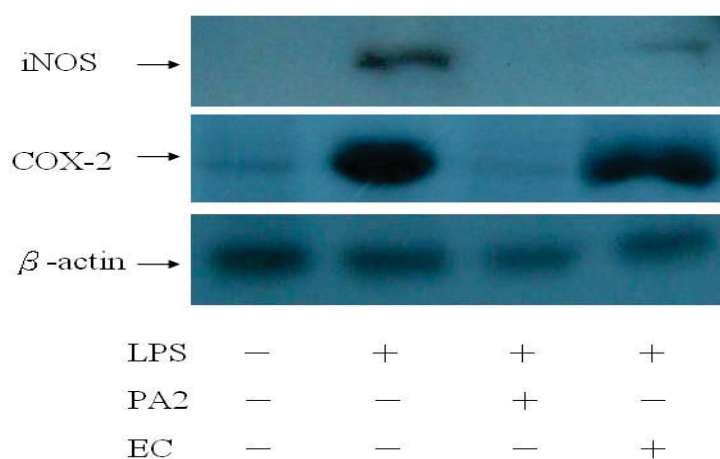


圖 5-27、PA2 及 EC 對 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 iNOS 及 COX-2 蛋白的影響

Figure 5-27. Effects of PA2 and EC on LPS-induced iNOS and COX-2 protein expression in RAW 264.7 cells.

LPS 最終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

PA2 最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

EC 最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

五、抗氧化實驗

(一) DPPH 自由基清除能力

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate) 帶有一未配對電子是一種穩定的自由基，且於波長 520 nm 下有最高的光值。若當 DPPH 接受一電子或氫自由基時，其原有的深紫色會變淺，於波長 520 nm 下所測得的吸光值會降低，表示樣品具有清除 DPPH 自由基的能力。利用相對於空白組對照的吸光值下降百分比，可換算出不同濃度樣品對於 DPPH 自由基的清除率，一般以達到 DPPH 50%清除率所需要的樣品濃度表式樣品之抗氧化能力。

本實驗所使用樣品的 DPPH 自由基清除結果如圖 5-28，整理如表 5-14。本實驗正控制組為 catechin，DPPH 自由基清除能力 EC_{50} 值為 $3.3 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ 與謝 (2006) catechin 的結果 $EC_{50} 3.07 \pm 0.37 \mu\text{g/mL}$ 接近。將 $EC_{50} (\mu\text{g/mL})$ 結果換算為莫爾濃度(Mole ratio) 發現，以 PA2 效果最好 (EC_{50} 值 $6.85 \mu\text{M}$)，其次為 EC (EC_{50} 值 $8.9 \mu\text{M}$)，PA2 的 isomer PA4 (EC_{50} 值 $9.9 \mu\text{M}$) 及 PA5 (EC_{50} 值 $9.2 \mu\text{M}$) 的效果為最差，且 2 個 isomer 間 DPPH 自由基清除能力未達 $p < 0.05$ 之顯著性。在 PA2 及 EC 不同比例之混合組可發現，隨 EC 所佔的比例越高則其自由基清除能力越差的趨勢，但各混合組之間並未達 $p < 0.05$ 之顯著性。

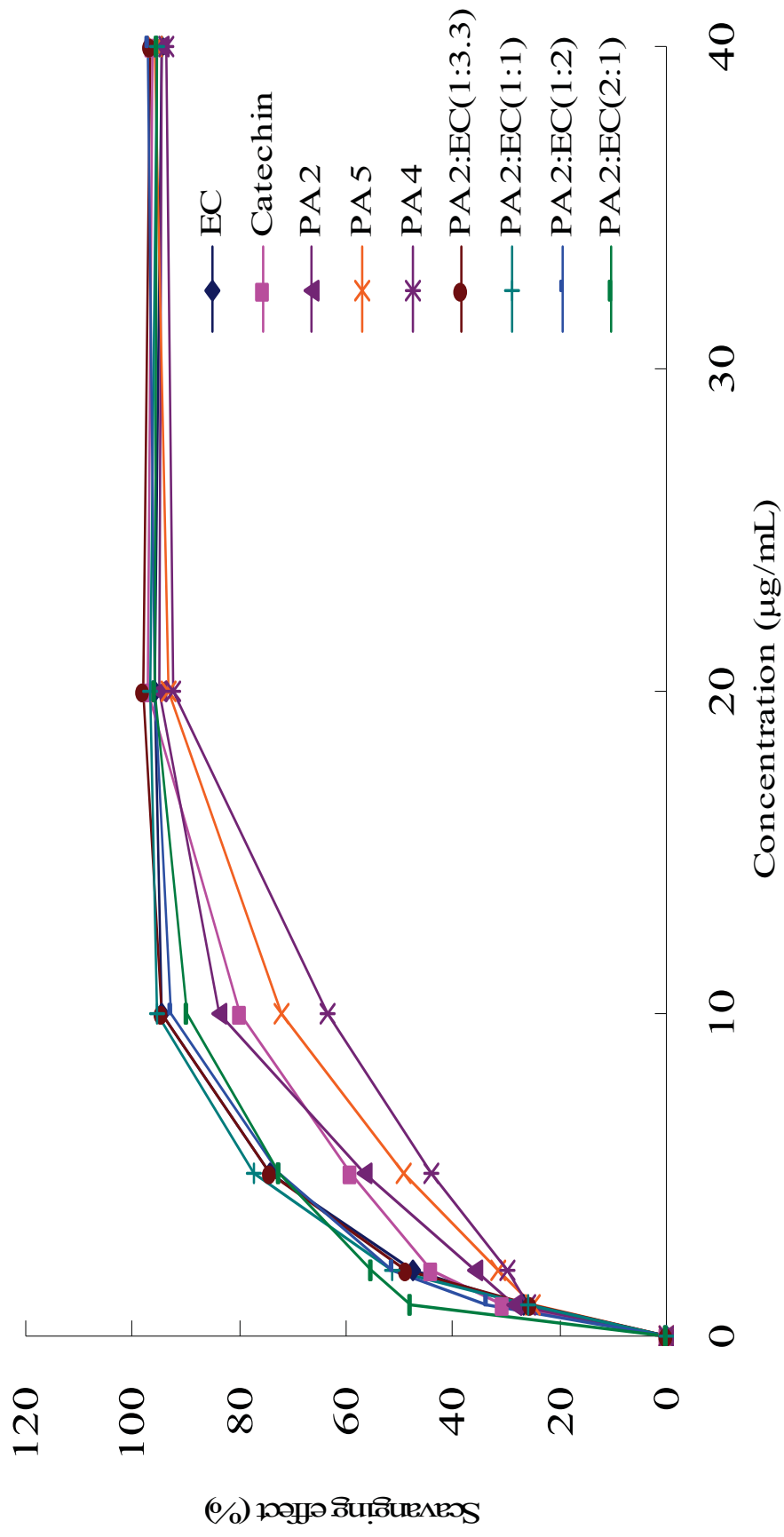


圖 5-28、各樣品對 DPPH 自由基清除之濃度效應

Figure 5-28. DPPH free radical scavenging effects of different samples.

(二) 氧自由基吸收能力之測驗 (Oxygen radical absorbance capacity, ORAC)

以 ORAC assay 再次確認各樣品的抗氧化效果，ORAC 於植物性與生物性樣品之抗氧化性檢測應用十分廣泛 (Prior, et al.,2000)。

ORAC 是使用 fluorescein (FL) 作為螢光 probe，AAPH 做為自由基之誘發劑，於水中分解並與氧分子反應後生成過氧化自由基，進而氧化 FL 使螢光減弱，因此本實驗為以測定樣品提供氫原子能力為基礎的實驗 (Prior, et al.,2000)。若樣品可以保護 FL 免於遭受自由基之攻擊，螢光衰退的時間即較長。本實驗以 Trolox 作為標準品，由圖 5-29 中可看出，當 Trolox 之濃度越高，螢光衰退所需的時間越長，扣除空白組後 net AUC 越大。由 Trolox 濃度對 net AUC 可做出一標準曲線，將樣品之 net AUC 經內插換算後即可求出 ORAC 值，本實驗中 ORAC 值的定義是樣品在 1 mg/mL 濃度下為多少 mM 之 Trolox equivalent，此值越高，樣品之抗氧化能力越強。

本實驗所使用樣品的 ORAC 氧自由基吸收能力結果如圖 5-30，正控制組參考謝 (2006) ascorbic acid 的 ORAC 氧自由基吸收能力之 Trolox equivalent 為 2.71 ± 0.22 mM 與本實驗結果 2.43 ± 0.23 mM 接近。在純物質樣品組發現 PA4 有最好的氧自由基吸收能力，Trolox equivalent 為 24.54 ± 0.56 mM；其次為 EC，Trolox equivalent 為 18.76 ± 0.22 mM；PA2 及 PA5，的氧自由基吸收能力在純物質組中效果較差，Trolox equivalent 分別為 16.9 ± 1.00 mM 及 16.51 ± 0.76 mM，與 PA4 及 EC 達 $p < 0.05$ 之顯著性。在 PA2 及 EC 不同比例之混合組可發現，隨 EC 所佔的比例越高則其自由基吸收能力越好，且在混合比例 PA2:EC (1:2) 及 (1:3.3) 組中有最好的氧自由基吸收能力，與混合比例 PA2:EC (2:1) 及 (1:1) 組間達 $p < 0.05$ 之顯著性。

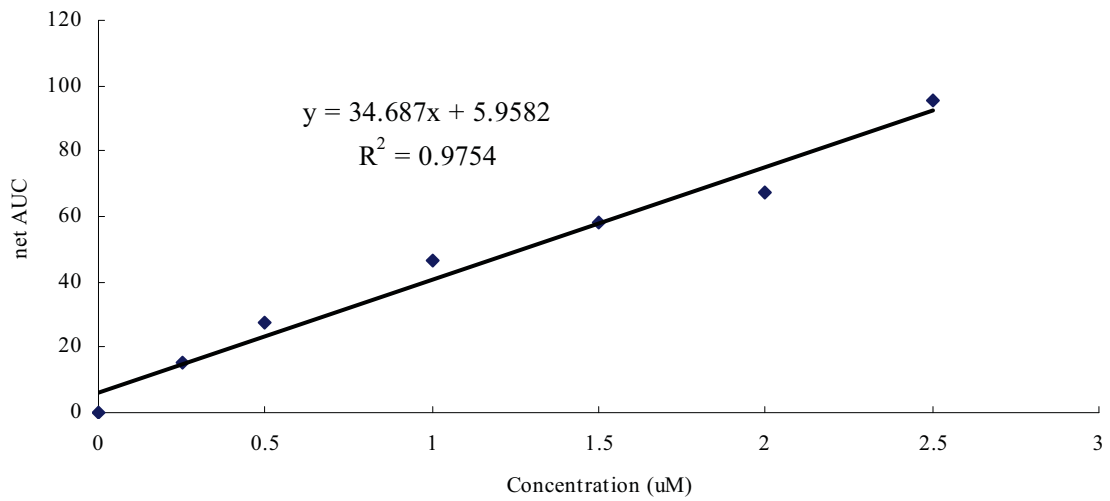
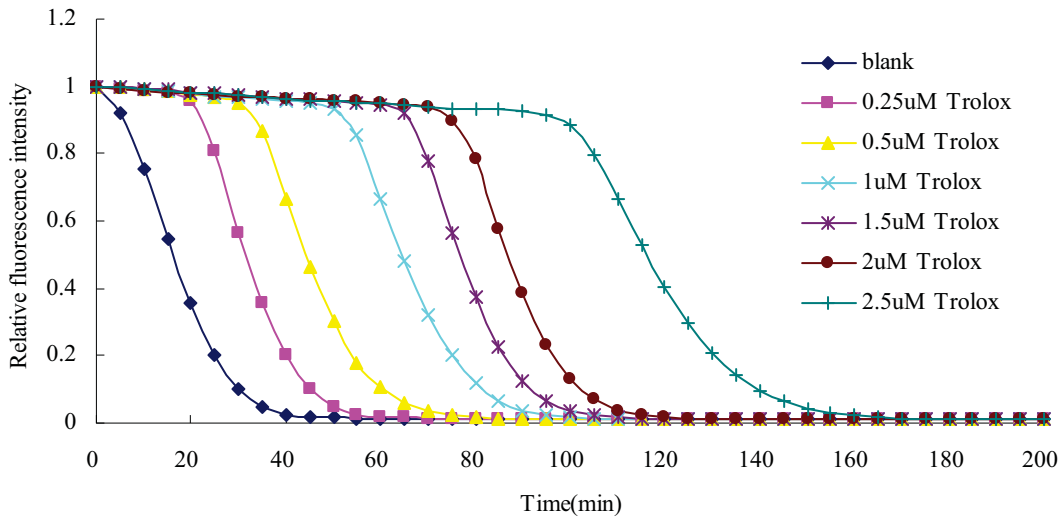


圖 5-29、Trolox 於 ORAC 試驗中相對螢光強度隨時間之變化及其標準曲線

Figure 5-29. The changes of relative fluorescence intensity of Trolox with time in the ORAC assay and standard curve of Trolox

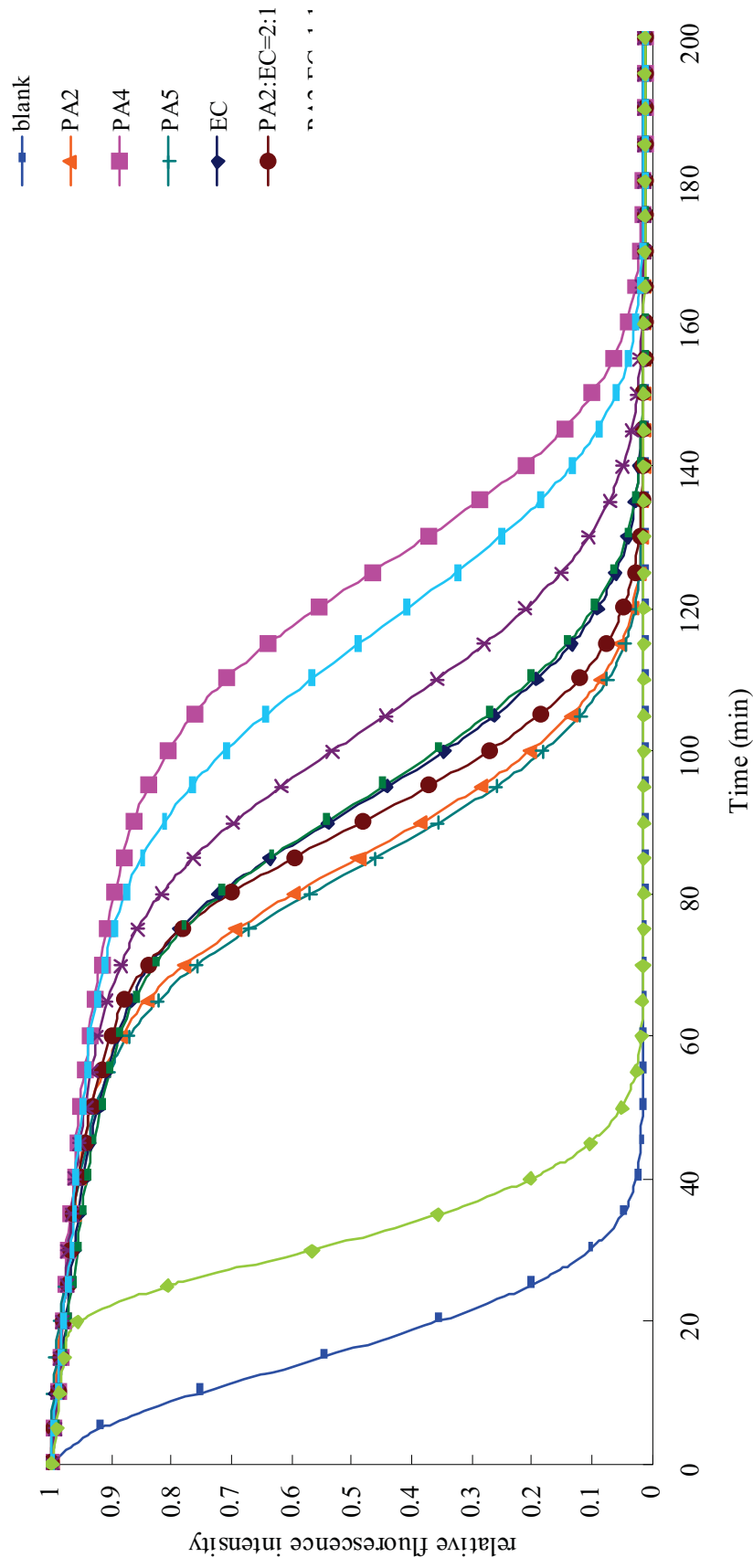


圖 5-30 各樣品於 ORAC 試驗中相對螢光強度隨時間之變化

Figure 5-30. The changes of relative fluorescence intensity of different samples with time in the ORAC assay.

(三) 抑制銅離子誘導人類 LDL 氧化反應試驗

圖 5-31 為各樣品之銅離子誘導人類 LDL 氧化之效果。本實驗之空白組為僅添加銅離子的 LDL，其氧化遲滯期(T_{lag})為 61 ± 7.5 min，正控制組為與樣品相同濃度的 Trolox ($0.5 \mu\text{g/mL}$)。各樣品的氧化遲滯期與 Trolox 相較，結果列於表 5-14， ΔT_{lag} 為樣品與對照組氧化遲滯期之差。各樣品除 PA5 外均有比正控制組 trolox 有更好延緩 LDL 氧化的能力。在純物質樣品組中 PA5 (T_{lag} 為 182 ± 38.77 min)對延緩 LDL 的氧化能力與正控制組 Trolox (T_{lag} 為 224 ± 16.3 min) 之間未達 $p < 0.05$ 之顯著性；其他的樣品 PA2、PA4 及 EC 之延緩 LDL 氧化的能力 (T_{lag} 分別為 351 ± 43.45 min、 327 ± 55.16 min 及 376 ± 64.10 min) 均明顯優於正控制組 Trolox，達 $p < 0.05$ 之顯著性。在 PA2 及 EC 不同比例之混合組發現，各組延緩 LDL 氧化的能力均明顯優於正控制組 Trolox，達 $p < 0.05$ 之顯著性，其中又以 PA2:EC(1:2) 混合組有最好的延緩 LDL 氧化能力，但各混合組的效果均介於 EC 及 PA2 的效果之間，顯示 EC 及 PA2 的混合並沒有顯著的相乘效果。



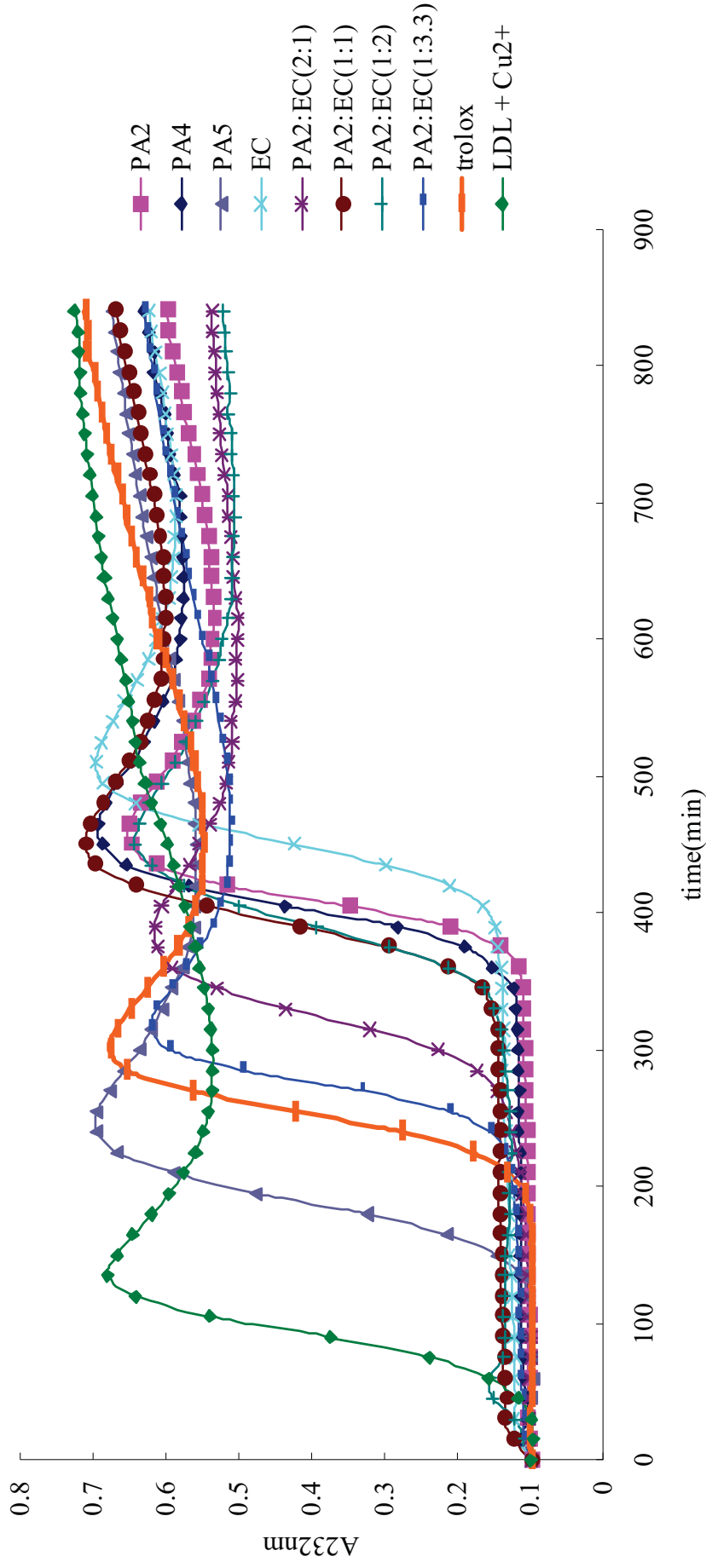


圖 5-31、各樣品對延緩銅離子誘導人類 LDL 氧化之效果

Figure 5-31. The inhibition of Cu²⁺-induced oxidation of human LDL by different samples

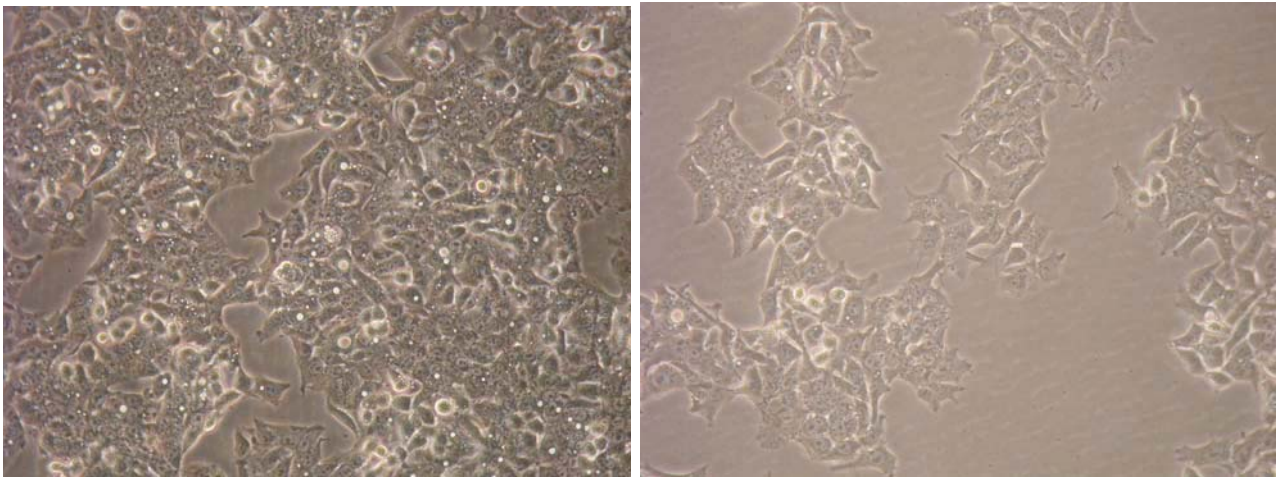
(四) 細胞抗氧化模式

在目前已建立的各式化學性抗氧化試驗中，雖然不同實驗可透過不同的作用機制表現待測物的抗氧化能力，然而這些實驗並未考慮到生物系統內複雜的生理機制，例如生物可利用率、生物吸收、代謝及各種酵素作用的影響；同時也未考慮到生物體內實際存在的氧化物種類、遭受氧化壓力攻擊之受質以及抗氧化物質在生物環境內的狀態等。然而，此類屬於初步篩選的實驗項目若使用動物為模式進行，其費用成本及時間成本可能過高。因此 Wolfe 等人(2007) 的研究以細胞模式進行待測物之抗氧化能力檢測，不但可提供合理的費用與時間成本，相較於化學性實驗，也較符合生物體系統內各項生理實際情形 (Wolfe and Liu, 2007)。本論文架構中的細胞抗氧化實驗參考 Wolfe 等人(2007) 的研究，以 Hep G2 細胞株為模式進行實驗。

Hep G2 (Hepatocellular carcinoma, human) 是一名 15 歲的高加索男性的肝臟組織中分離出的一株已分化完全的人類肝臟細胞。Hep G2 屬於肝母細胞瘤 (hepatoblastoma)，人為培養時以貼附型方式生長，並形成紡錘狀形態，如圖 5-32。

1 細胞存活率分析-MTT assay

為了解試驗樣品是否會有細胞毒性，本實驗先探討不同樣品對 Hep G2 細胞存活率之影響，結果如圖 5-33。樣品濃度範圍為 12.5~300 μM 。各樣品皆溶於 0.5% DMSO，各樣品在低於 300 μM 之濃度時皆沒有毒性，因此後續細胞抗氧化實驗之樣品濃度將參考毒性實驗之結果，試驗濃度對 Hep G2 細胞不具毒性。



High density (100X)

Low density (100X)

圖 5-32、Hep G2 細胞株在顯微鏡下形態

Figure 5-32. Microscopic morphology of Hep G2 cell line.

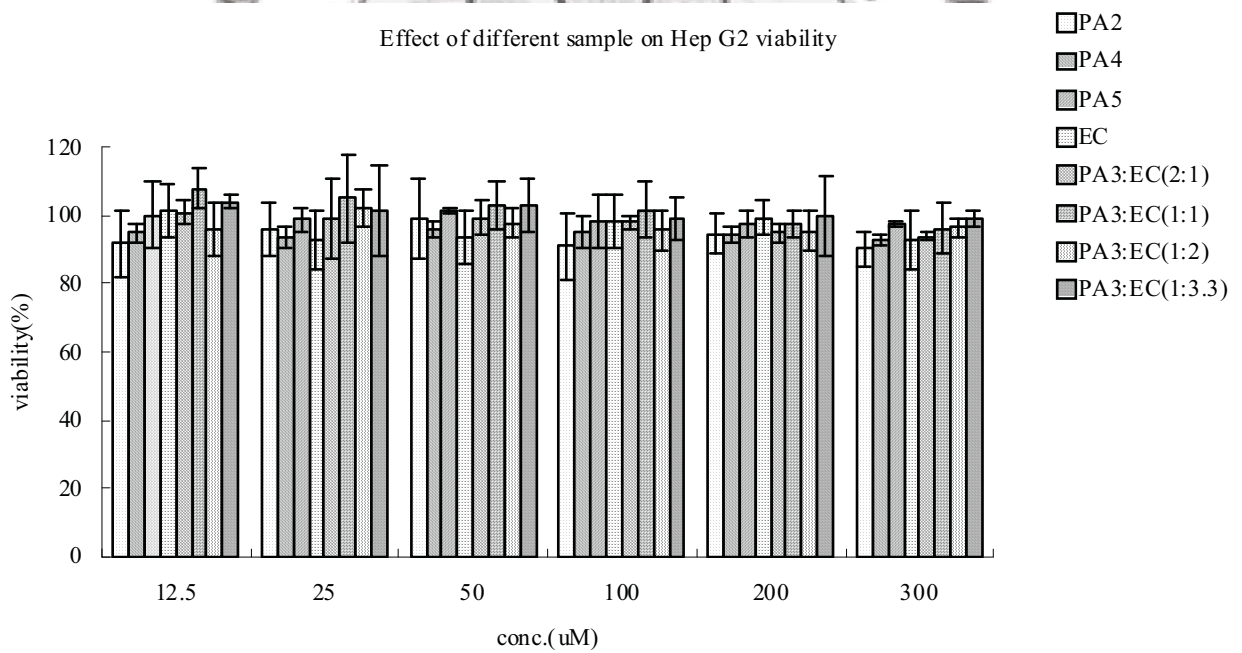


圖 5-33、各樣品對 Hep G2 細胞存活率之影響

Figure 5-33. Toxicity of different samples on Hep G2 cell

2 細胞抗氧化能力測定 (Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay)

細胞抗氧化實驗作用原理如圖 5-34。實驗過程中，先將各濃度之待測樣品及螢光染劑的前驅物 (DCFH-DA, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) 與細胞共同培養 1 hr，這段期間內待測物可能會附在細胞膜外或通過細胞膜進入到細胞內；而 DCFH-DA 為脂溶性物質，非常容易進入細胞內，進而被細胞內的酵素作用而脫去 diacetate 形成極性較強的 DCFH，而被留在細胞內。接著移除待測樣品及螢光染劑前驅物的反應液後，將自由基 ABAP 加入與細胞作用，ABAP 會在細胞外快速生成過氧化自由基，或進入細胞內氧化 DCFH 使其產生可表現螢光的 DCF，此時若先前處理的待測物具有抗氧化活性，便可在細胞外清除自由基或避免 DCHF 受到自由基的攻擊，進而降低螢光物質的生成量。因此，抗氧化能力的測定便藉由偵測 DCF 螢光強度的表現量，再加以換算出各待測物之各濃度間的相對的抗氧化能力 (Wolfe and Liu, 2007)。



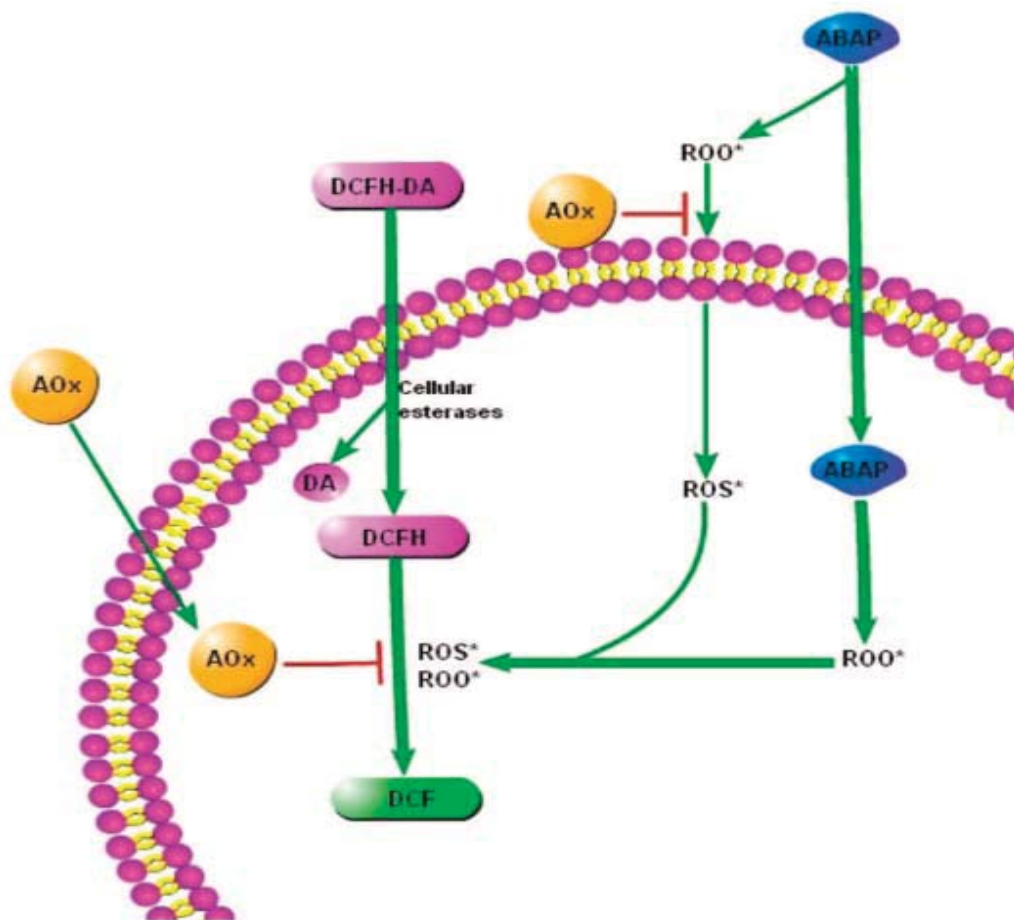


圖 5-34、細胞抗氧化實驗原理

Figure 5-34. Method and proposed principle of the cellular antioxidant activity (CAA) assay. Cells were pretreated with antioxidant compounds and DCFH-DA. The antioxidants bound to the cell membrane and/or passed through the membrane to enter the cell. DCFH-DA diffused into the cell where cellular esterases cleaved the diacetate moiety to form the more polar DCFH, which was trapped within the cell. Cells were treated with ABAP, which was able to diffuse into cells. ABAP spontaneously decomposed to form peroxy radicals. These peroxy radicals attacked the cell membrane to produce more radicals and oxidized the intracellular DCFH to the fluorescent DCF. Antioxidants prevented oxidation of DCFH and membrane lipids and reduced the formation of DCF.

(Wolfe and Liu, 2007)

實驗所得之數據為待測物之各濃度組在 1 hr 內的螢光強度變化曲線，如圖 5-35，將曲線下面積扣除空白組之曲線下面積後進行計算，與控制組之數據一同帶入公式 ($CAA\ unit = 100 - (\int SA / \int CA) \times 100$) 內計算出各待測物不同之 CAA unit，如數據圖 5-36。由於 CAA units 曲線圖非線性關係，因此需將 CAA unit 值取 log 值換算得數據圖 5-37。圖中 Y 軸之 f_a 為 CAA units， f_u 為 100 扣除 CAA unit 所得的值。將 y 值為 0 帶入圖中各數據之線性回歸方程式，計算出待測物之 EC_{50} 之濃度，各樣品與正控制組之 EC_{50} 如表 5-14。實驗結果包含 8 個樣品以及正控制組 EGCG，正控制組的選擇為參考 Wolfe 等人 (2007) 的研究結果。

結果顯示，正控制組 EGCG 之 EC_{50} 值為 $10.44 \pm 1.45 \mu M$ ，略優於 Wolfe 等人 (2007) 的文獻數據 ($14.0 \pm 1.0 \mu M$)。8 個樣品組中以 PA2 的效果最佳， EC_{50} 為 $58.75 \pm 6.43 \mu M$ ；PA4 及 PA5 為 PA2 的 isomer，其效果與 PA2 類似，未達 $p < 0.05$ 之顯著性。EC 在此試驗中的抗氧化能力最差， EC_{50} 值為 $309 \pm 10.9 \mu M$ ，此結果符合 Wolfe 等人 (2007) 的研究結果。由 Caco-2 cell 單層膜通透實驗的結果，推測是由於 EC 較難以被細胞吸收利用所導致。在 PA2 及 EC 不同比例之混合組可發現，隨 EC 所佔的比例越高則其抗氧化能力越差，但綜觀而言，各混合物組之 EC_{50} 值均較接近 PA2 的 EC_{50} 值，亦可能是由於 EC 較難以被細胞吸收利用所導致。

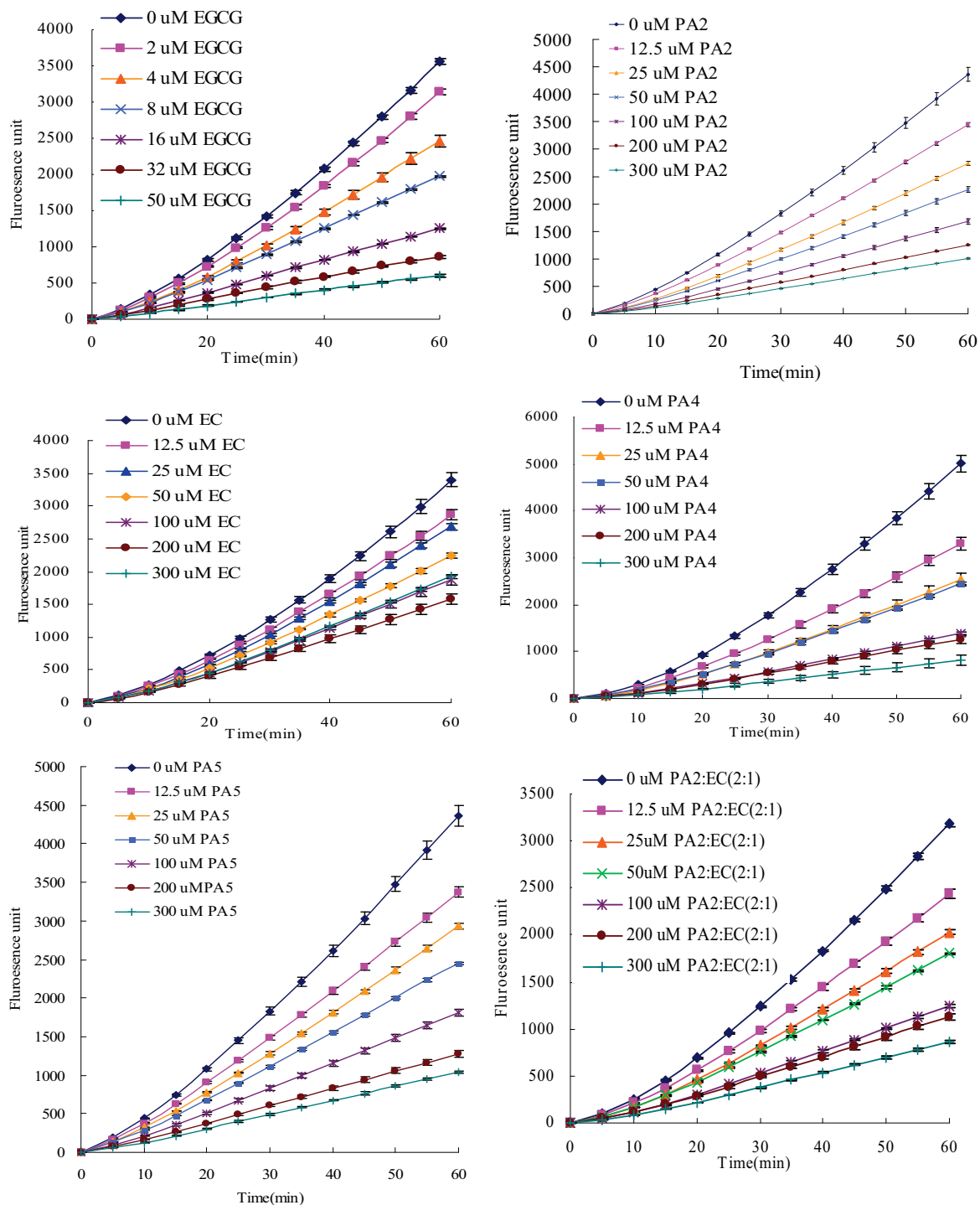


圖 5-35、細胞抗氧化實驗中各樣品之相對螢光強度隨時間的變化

Figure 5-35. Peroxyl radical-induced oxidation of DCFH to DCF in HepG2 cells and the inhibition of oxidation by EGCG, PA2, EC, PA4, PA5, PA2:EC (2:1), PA2:EC (1:1), PA2:EC (1:2), PA2:EC (1:3.3). The curves shown in each graph are from a single experiment (mean \pm SD, n=3).

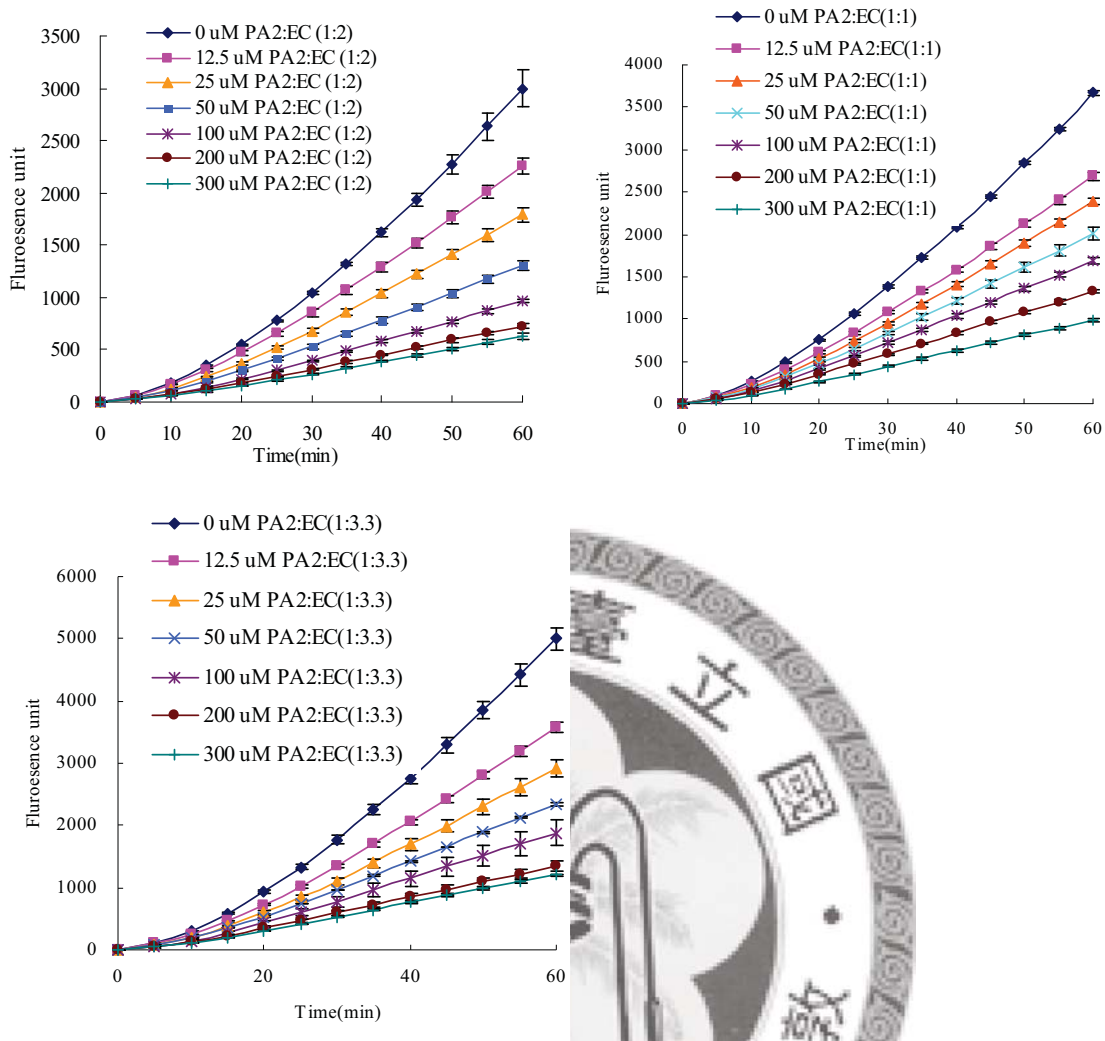


圖 5-35、細胞抗氧化實驗中各樣品之相對螢光強度隨時間的變化(續)

Figure 5-35. Peroxyl radical-induced oxidation of DCFH to DCF in HepG2 cells and the inhibition of oxidation by EGCG, PA2, EC, PA4, PA5, PA2:EC (2:1), PA2:EC (1:1), PA2:EC (1:2), PA2:EC (1:3.3). The curves shown in each graph are from a single experiment (mean \pm SD, n=3). (Continue)

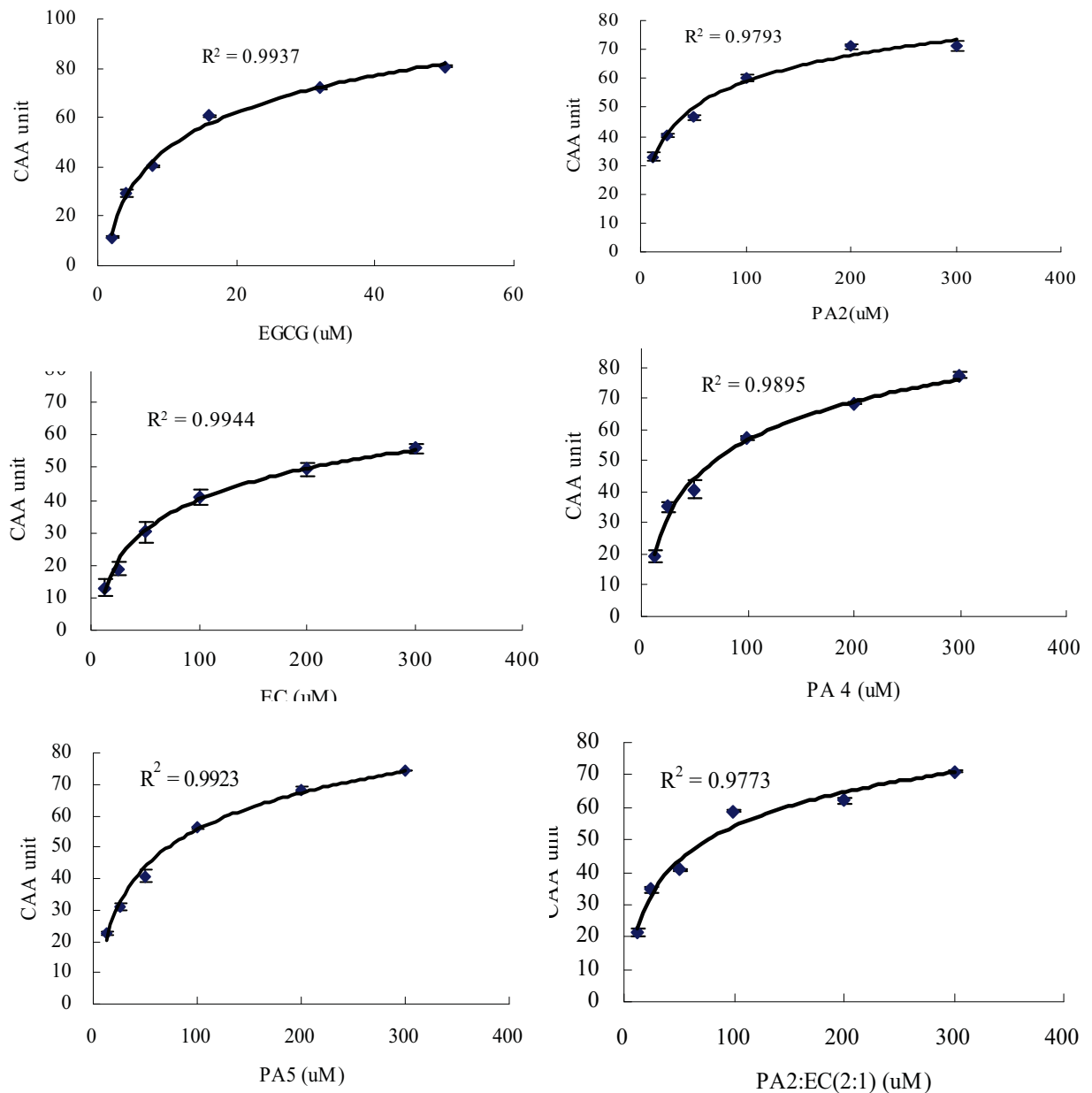


圖 5-36、細胞抗氧化實驗中各樣品抑制自由基誘導螢光物質之濃度效應

Figure 5-36. Dose–response curves for inhibition of peroxyl radical-induced DCFH oxidation by EGCG, PA2, EC, PA4, PA5, PA2:EC (2:1), PA2:EC (1:1), PA2:EC (1:2), PA2:EC (1:3.3). The curves shown are each from a single experiment (mean \pm SD, n=3).

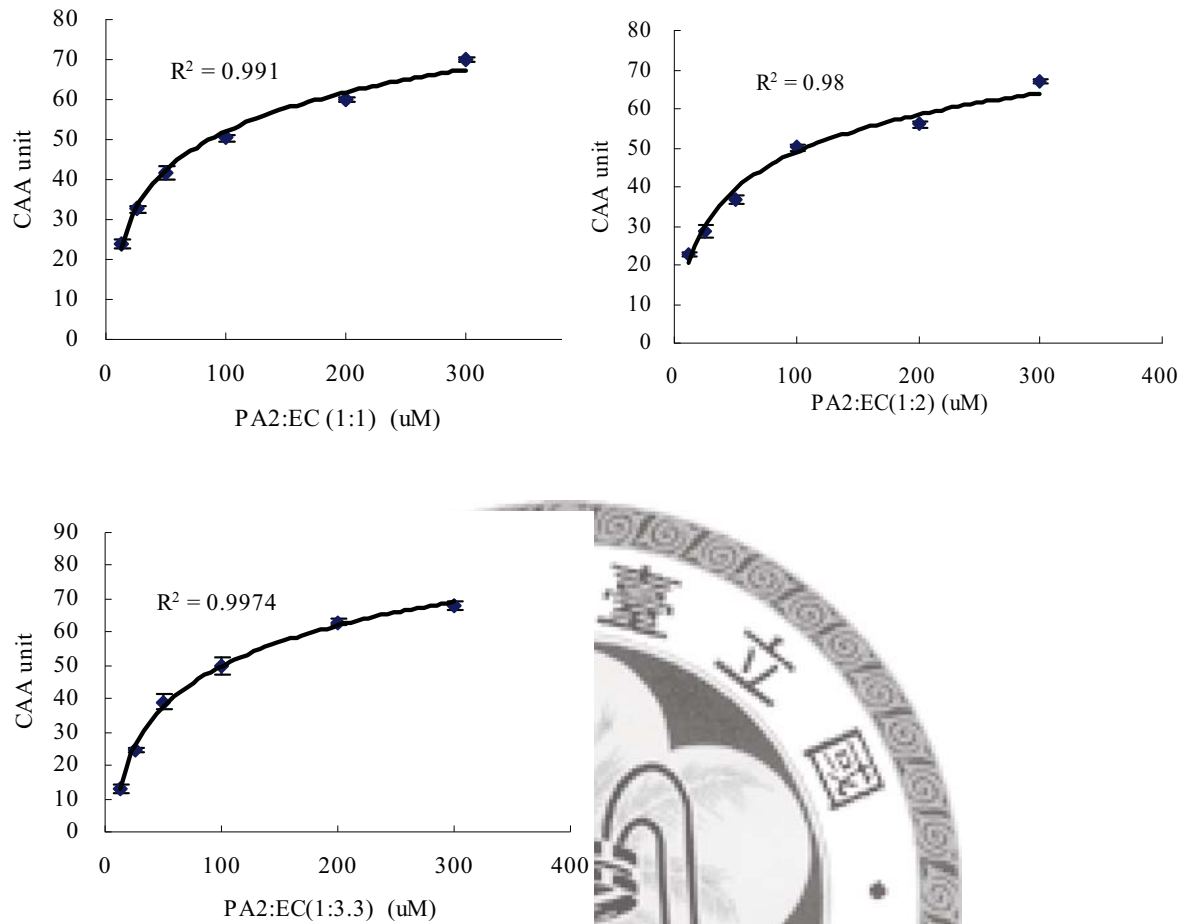


圖 5-36、細胞抗氧化實驗中各樣品抑制自由基誘導螢光物質之濃度效應 (續)

Figure 5-36. Dose-response curves for inhibition of peroxy radical-induced DCFH oxidation by EGCG, PA2, EC, PA4, PA5, PA2:EC (2:1), PA2:EC (1:1), PA2:EC (1:2), PA2:EC (1:3.3). The curves shown are each from a single experiment (mean \pm SD, n=3).(Continue)

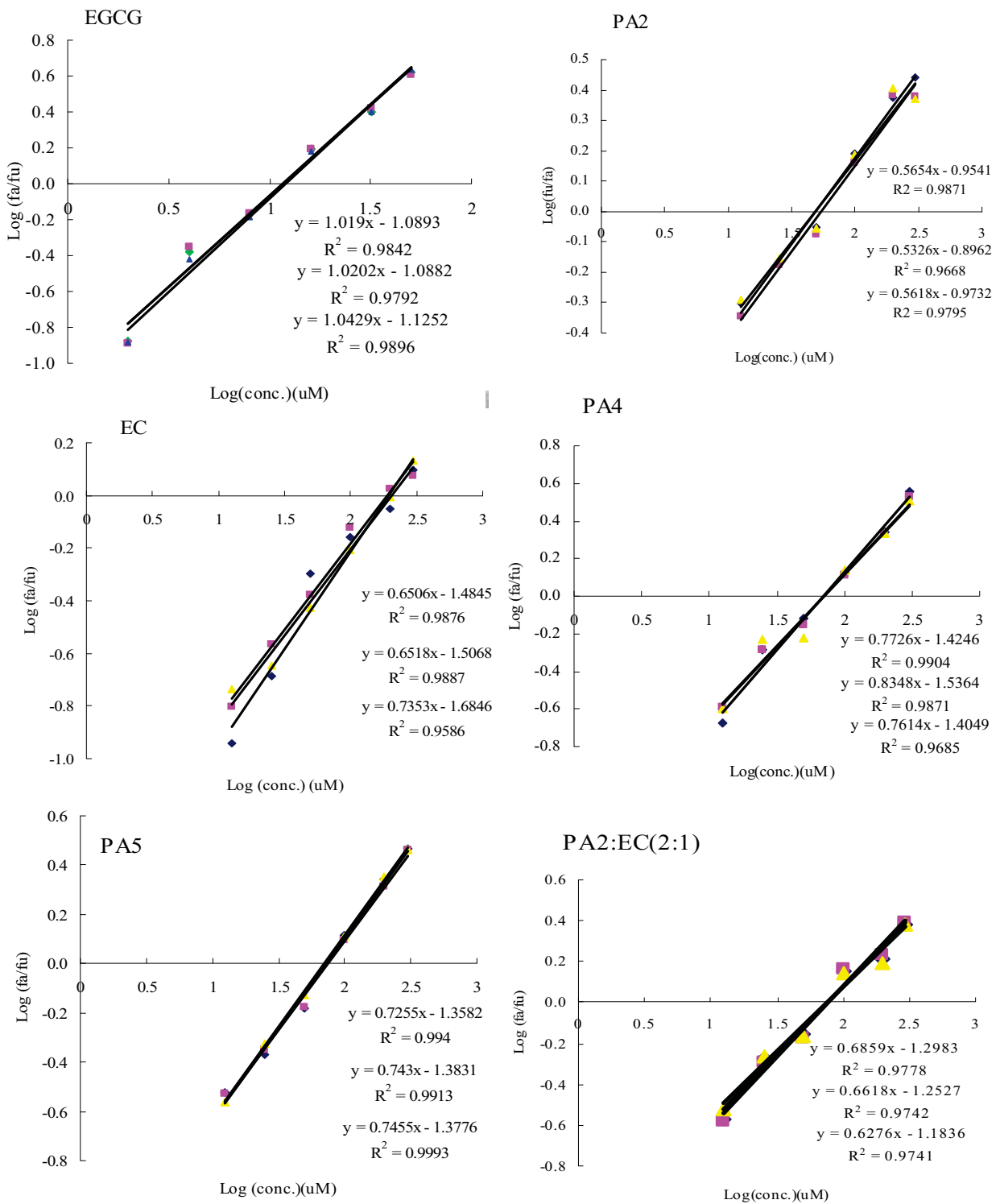


圖 5-37、細胞抗氧化實驗中各樣品抑制自由基誘導螢光物質之 EC₅₀

Figure 5-37. Median effect plots for inhibition of peroxy radical-induced DCFH oxidation by EGCG, PA2, EC, PA4, PA5, PA2:EC (2:1), PA2:EC (1:1), PA2:EC (1:2), PA2:EC (1:3.3). The curves shown are from a single experiment (n=3).

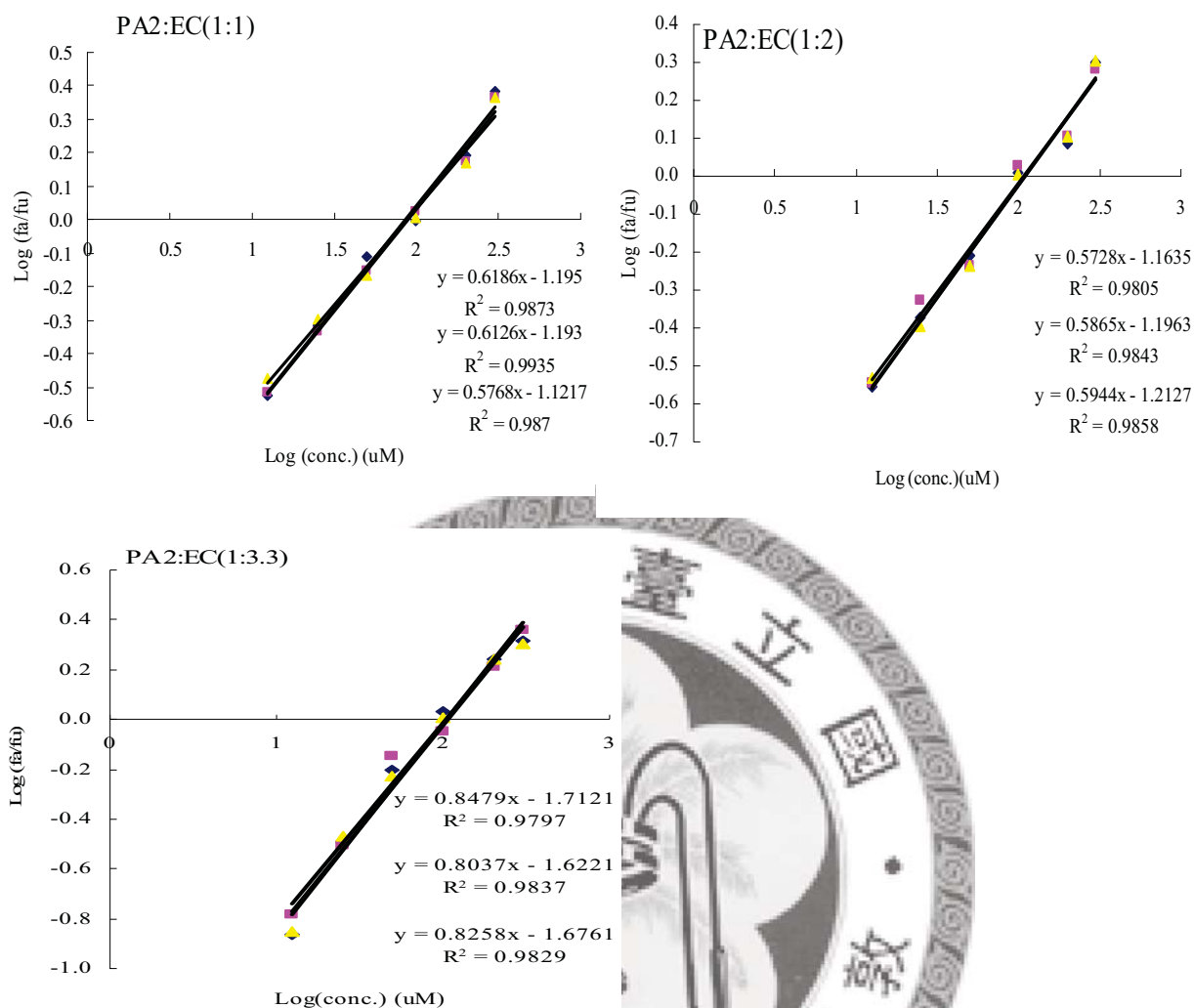


圖 5-37、細胞抗氧化實驗中各樣品抑制自由基誘導螢光物質之 EC_{50} (續)

Figure 5-37. Median effect plots for inhibition of peroxy radical-induced DCFH oxidation by EGCG, PA2, EC, PA4, PA5, PA2:EC (2:1), PA2:EC (1:1), PA2:EC (1:2), PA2:EC (1:3.3). The curves shown are from a single experiment (n=3). (Continue)

表 5-14、各樣品之抗氧化性測試結果

Table 5-14、The results of different antioxidative assays by different samples.

Sample	The inhibition of Cu ²⁺ -induced oxidation of human LDL ¹			DPPH scavenging effect		ORAC assay		CAA assay	
	T _{lag} (min)	Rel potency of ΔT_{lag}	EC ₅₀ (μ g/mL)	EC ₅₀ (μ M)	Trolox equivalent (mM)	EC ₅₀ (μ M)	CV (%)		
PA2	351±43.45 ^a	1.57	3.95±0.21 ^b	~6.85	16.9±1.00 ^d	58.75±6.43 ^d	9.95		
PA4	327±55.16 ^{ab}	1.46	5.7±0.71 ^a	~9.9	24.54±0.56 ^a	67.25±6.7 ^{cd}	6.06		
PA5	182±38.77 ^d	0.81	5.3±0.28 ^a	~9.2	16.51±0.76 ^e	64.73±8.76 ^{cd}	7.54		
EC	376±64.10 ^a	1.68	2.61±0.13 ^{cd}	~8.9	18.76±0.22 ^c	309±10.9 ^a	5.84		
PA2:EC 2:1	280±35.28 ^{bc}	1.25	1.4±0.14 ^e	~PA2=1.62, EC=1.61	18.10±0.9 ^{cd}	65.67±6.36 ^{cd}	9.69		
PA2:EC 1:1	282±23.41 ^{bc}	1.26	2.45±0.14 ^d	~PA2=2.13, EC=4.22	18.76±0.99 ^c	81.9±12.66 ^c	8.45		
PA2:EC 1:2	286±36.25 ^{bc}	1.28	2.55±0.35 ^d	~PA2=1.48, EC=5.86	21.54±0.85 ^b	103.87±7.8 ^b	7.49		
PA2:EC 1:3.3	247±30.66 ^{cd}	1.10	2.5±0.28 ^d	~PA2=1.01, EC=6.61	24.28±0.63 ^a	105.93±3.46 ^b	3.27		
Trolox	224±13.28 ^{cd}	1	—	—	—	—	—		
Catechin	—	—	3.3±0.14b ^c	—	—	—	—		
Ascorbic acid	—	—	—	—	2.43±0.23 ^f	—	—		
ECGC	—	—	—	—	—	10.44±1.45	13.89		

Each value represents mean ± SD from three different experiments (each experiment was conducted in triplicate).

Data in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$

¹. The concentration of all samples was 0.5 μ g/mL.

陸、結論

1. 穩定性試驗

- (1) PA2 為相當不穩定的物質，於細胞培養液中容易轉換成其同分異構物 (PA4、PA5)。
- (2) 培養液中鹽類 (特別是 NaHCO_3) 含量越高，則 PA2 轉變成其同分異構物的速度就越快。
- (3) PA2 本身在溶液中的濃度越高，則 PA2 轉變成其同分異構物的速度就越快。
- (4) 有細胞存在的情形下，則會延緩 PA4、PA5 的生成，使 PA2 較穩定。推測可能的原因是，PA2 會在有細胞存在下能與細胞膜表面的蛋白，或細胞所產生的蛋白做接觸，而保護 PA2。

2. Caco-2 細胞單層膜通透性試驗

- (1) EC 完全不能被 Caco-2 細胞所吸收，此結論符合 Vaidyanathan 等人 (2001) 的結果，推測是由於 Caco-2 細胞單層膜上層具有對 EC 高專一性的外吐蛋白所致。
- (2) PA2 則能被 Caco-2 細胞所吸收；PA4 的吸收效果比 PA2 更好，由 Deprez 等人 (2001) 的研究結果，推測可能是 PA4 結構上有 catechin 所致；然而 PA5 結構上亦有 catechin，但吸收效果卻不如 PA4 及 PA2，推測可能是由於 PA4 的鍵結位置與 PA2 相同，且構型較 PA2 更直，故有較好的吸收效果；而 PA5 的鍵結位置與 PA2 不同，造成 PA5 的構型與 PA2 及 PA4 有很大的差異，然而導致 PA5 吸收較差的可能原因，仍需做進一步的探討。
- (3) PA2 及 EC 不同比例之混合組部分，EC 仍然無法通過單層膜；而 PA2 的通透率也因 EC 的存在而受到影響，通透率有明顯的減少。

3. 抗發炎實驗

- (1) EC 於化學藥劑所產生的 NO 實驗中，能有效的清除 NO；然而，在抑制 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞所產生的 NO 的抗發炎試驗中，則發現 EC 效果卻不如 PA2。進一步探討調控 NO 產生的 iNOS 及 COX-2 蛋白質的表現量，發現 PA2 及 EC 處理組的效果可以發現，PA2 處理組抑制 iNOS 及 COX-2 蛋白質表現的效果較 EC 處理組來得好。樣品抑制 NO 表現的可能原因有 1. 清除細胞產生的 NO 2. 細胞能產生 iNOS 及 COX-2 蛋白，但樣品干擾 iNOS 及 COX-2

蛋白的作用 3. 於基因層次抑制 iNOS 及 COX-2 的產生。在 Caco-2 細胞單層膜模式中，PA2 能被細胞吸收進入細胞內，然而 EC 卻無法被細胞所吸收。因此 PA2 在細胞試驗中有較好的效果，推測是由於 PA2 能被細胞吸收進入細胞內的關係，然而不同細胞株對 PA2 的吸收能力不全然相同，實際的吸收情況需針對 RAW 264.7 細胞株，進一步探討 PA2 進入此細胞的情形。

(2) PA2 的同分異構物 PA4 及 PA5，則發現此兩樣品無論是在螯合化學藥劑所產生 NO 的試驗或是在抑制 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞所產生的 NO 的抗發炎試驗，表現均較 PA2 為差。

(3) PA2 及 EC 不同比例之混合組部分，於螯合化學藥劑所產生的 NO 實驗中，亦可發現隨著 EC 所佔的比例越高，則螯合化學藥劑所產生 NO 的效果則越好；然而在抑制 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞所產生的 NO 的抗發炎試驗中，則隨著 EC 所佔的比例越高，抑制 NO 產生的能力越差。

4. 抗氧化試驗

(1) EC 的效果在體外抗氧化試驗 (DPPH, ORAC) 中，表現均較 PA2 好；然而，在細胞抗氧化 (CAA) 試驗部分，EC 的效果卻遠不如 PA2。由於在 Caco-2 細胞單層膜通透模式中，發現 PA2 能被細胞吸收進入細胞內，而 EC 卻無法被細胞所吸收。因此 PA2 在細胞抗氧化試驗中有較好的效果，推測是由於 PA2 能被細胞吸收進入細胞內的關係，然而不同細胞株對 PA2 的吸收能力不全然相同，實際的吸收情況需針對 Hep G2 細胞株，進一步探討此細胞對 PA2 的吸收情形。

(2) PA4 在體外氧自由基吸收能力 (ORAC) 試驗中，展現優異的氧自由基吸收效果，是 8 個測試樣品中效果最好的；在延緩銅離子誘導低密度脂蛋白氧化的試驗中亦展現良好的延緩效果，其效果與 PA2 與 EC 的效果相當；然而在 DPPH 自由基清除試驗中則效果較差。在細胞抗氧化 (CAA) 試驗部分 PA4 亦有良好的效果，其效果與 PA2 相當。

(3) PA2 及 EC 不同比例之混合組部分，發現在體外抗氧化試驗中隨 EC 所佔的比例越高則其抗氧化能力越差；然而在細胞抗氧化試驗部分，結果則隨著 EC 所佔的比例越高，抑制 NO 產生的能力越差。

柒、參考文獻

- 顏昌瑞。1994。龍眼。認識高品質台灣水果。財團法人豐年社。台北，台灣。69-72。
- 顧文霞。1967。中藥之研究。國立台灣大學醫學院藥學系研究報告。328。
- 沈宜蓁。2005。龍眼花萃取物抗氧化活性之探討。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- 謝孟潔。2006。龍眼花抗氧化成分之研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- Aejmelaeus, R. T. Holm, P. Kaukine, U. Age-related changes in the peroxy radical scavenging capacity of human plasma. *Free Radic Biol Me.*, **1997**, *23*, 69-75.
- Allen, B.W.; Demchenko, I. T.; Piantadosi, C.A. Two faces of nitric oxide: implications for cellular mechanisms of oxygen toxicity. *J Appl Physiol.* **2009**, *106*, 662-667.
- Arts, I. C.; van De Putte, B.; Hollman, P. C. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1752-1757.
- Artursson, P. and Karlsson, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *175*, 880-885.
- Bagchi, D.; Bagchi, M.; Stohs, S.J. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *J. Alcohol. Drug Edu.* **2001**, *957*, 260-270.
- Benzie, I. F.; Strain, J. J. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* **1996**, *239*, 70-76.
- Boyer, J.; Brown, D. and Liu, R.H. Uptake of quercetin and quercetin 3-glucoside from whole onion and apple peel extracts by Caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7172-7179.
- Cao, G.; Prior, R. L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 50-62.
- Celada, A. and Nathan, C. Macrophage activation revisited. *Immunol. Today.* **1994**, *15*, 100-102.
- Cesarone, M. R.; Belcaro, G.; Carratelli, M. A simple test to monitor oxidative stress. *Int. Angiol.* **1999**, *18*, 127-30.
- Chevion, M.; Berenshtein, E.; Stadtman, E. R. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic. Res.* **2000**, *33*, S99-S108.
- Chirayath, M.V.; Gajdzik, L.; Hulla, W. Vitamin D increase tight-junction conductance and paracellular Ca²⁺ transport in Caco-2 cell cultures. *Am. J. Physiol.* **1998**, *274*, 389-396.
- Cho, D.I., Koo, N.Y., Chung, W. J., Kim, T.S., Ryu, S. Y., Im S. Y. and Kim K. M. Effects of resveratrol-related hydroxystilbenes on the nitric oxide production in macrophage cells: structural requirements and mechanism of action. *Life Sci.* **2002**, *71*, 2071-2082.
- Clermont, G.; Vergely, C.; Jazayeri, S. Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass. *2002, Anesthesiology*, *96*, 80-87.
- Cornelli, U. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol*, **2009**, *27*, 175-194.
- Deprez, S.; Mila, I.; Huneau, J.F.; Tome, D., and Scalbert, A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial caco-2 cells. *Antioxid. Redox. Signal.*, **2001**, *3*, 957-967.

- De Bruyne, T. ; Pieters, L.; Witvrouw, M.; De Clercq, E.; Vanden Berghe, D.; Vlietinck, A.J. Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols. *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 954-958.
- Dirsch, V. M.; Stuppner, H.; Vollmar, A. M. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? *Planta Med.* **1998**, *64*, 423-426.
- Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M. Rodriguex, H.. Free radical induced damage to DNA: mechanism and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *32*, 1102-15.
- Duffy, S.J.; Vita, J.A.; Holbrook, M.; Swerdloff, P.L.; Keaney, J.F. Effect of acute and chronic tea consumption on platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc.* **2001**, *21*, 1084-1089.
- Elimrani, I.; Lahjouji, K.; Seidman, E. Expression and localization of organic cation/carnitine transporter(OCTN2) in Caco-2 cell. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2003**, *284*, G863-871.
- Espin, J.C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H.J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using , 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 648-656.
- Facino, R.M.; Carini, M.; Aldini, G.; Bombardelli, E.; Morazzoni, P.; Morelli, R. Free-radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from vitis-vinifera - a mechanism for their capillary protective action. *Arzneimittelforschung.* **1994**, *44*, 592-601.
- Finberg, R.W.; Re, F.; Popova, L.; Golenbock, D.T.; Kurt-Jones, E.A. Cell activation by Toll-like receptors: role of LBP and CD14. *J. Endotoxin. Res.* **2004**, *10*, 413-418.
- Ghosh, S. and Baltimore, D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature.* **1990**, *344*, 678-682.
- Gronbaek, M.; Becker, U.; Johansen, D.; Tonnesen, H.; Jensen, G.; Sorensen, T. I. A. Population based cohort study of the association between alcohol intake and cancer of the upper digestive tract. *J. Br. Med.* **1998**, *317*, 844-847.
- Hatano, T.; Miyatake, H.; Natsume, M.; Osakabe, N. Takizawa, T.; Ito, H.; Yoshida, T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant elects. *Phytochemistry.* **2002**, *59*, 749-758.
- Hidalgo, I.J.; Borchardt, R.T. Transport of bile acid in human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1990**, *1035*, 97-103.
- Hilgers, A.R.; Conradi, R.A. and Burton, P.S. Caco-2 cell monolayer as modal for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 902-901.
- Howell, A.B., Vorsa, N., Der Marderosian, A., Foo, L.Y. Inhibition of the adherence of P-fimbriated Escherichia coli to uro-epithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 1085-1086.
- Ho, S.C., Hwang, L.S., Shen, Y.J., Lin, C.C. Suppressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from longan (dimocarpus longan lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10664-10670.
- Hümmer, W., Schreier, P. Analysis of proanthocyanidins. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 1381-1398.
- Hunter, J.; Jepson, M.A.; Tsuruo, T. Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 14991-14997.
- Ingelman-Sundberg, M.; Kaur, H.; Terelius, Y. Hydroxylation of salicylate by

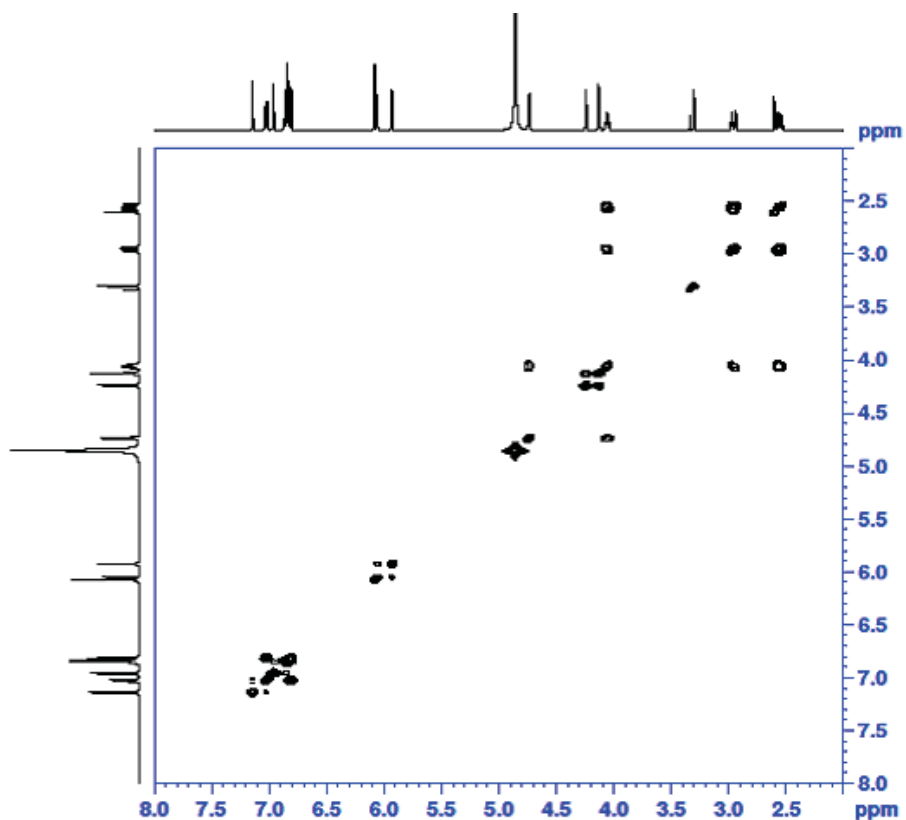
- microsomal fraction and cytochrome P-450. Lack of production of 2,3-dihydroxybenzoate unless hydroxyl radical formation is permitted. *J. Biochem.* **1991**, *276*, 753-757.
- Katiyar, S.K.; Mukhtar, H., Tea in chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies. *Int. J. Oncol.* **1996**, *8*, 221-238.
- Kim, H.; Lee, H. S.; Chang, K. T.; Ko, T. H.; Baek, K. J.; Kwon, N. S. Chloromethyl ketones block induction of nitric oxide synthase in murine macrophages by preventing activation of nuclear factor- κ B. *J. Immunol.* **1995**, *154*, 4741-4748.
- Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Järvinen, R. Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A., Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2002**, *76*, 560-568.
- Knutson, M. D.; Handelman, G. J.; Viteri, F. E. Methods for measuring ethane and pentane in expired air from rats and humans. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 514-519.
- Lang, J.; Celotto, C.; Esterbauer, H. Quantitative determination of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 369-378.
- Liaudet, L.; Soriano, F.G.; Szabo, C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit. Care. Med.* **2000**, *28*, N37-N52.
- Lima, E.S.; Di Mascio, P.; Rubbo, H.; Abdalla, D.S. Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. *Biochemistry* **2002**, *41*, 10717-10722.
- Liu, J.; Yeo, H. C.; Doniger, S. J.; Ames, B. N. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Annal. Biochem.* **1997**, *245*, 161-166.
- Lyons, C.R.; Orloff, G.J. Cunningham, J.M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 6370-6374.
- Mackenzie, G. G.; Oteiza, P. I. Modulation of transcription factor NF- κ B in Hodgkin's lymphoma cell lines: Effect of (-)-epicatechin. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 1086-1094.
- Marletta, M.A. Nitric oxid: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 488-492.
- Mikami, T.; Tomita, S.; Qu, G.J. Is allantoin in serum and urine a useful indicator of exercise-induced oxidative stress in humans? *Free Radic. Res. Med.* **2000**, *32*, 235-244.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application on monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407-412.
- Moini, H., Guo, Q.O., Packer, L. J. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase inhibition by the procyanidin-rich french maritime pine bark extract, Pycnogenol(R): A protein binding effect. *Agric. Food Chem.* **2002**, *505*, 141-149.
- Moison, R. M.; de Baufort, A. J.; Haasnoot, A. A. Uric acid and ascorbic acid redox ratio in plasma and tracheal aspirate of preterm babies with acute and chronic lung disease. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *23*, 226-234.
- Moncada, S.; Palmer, R.M.; Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 109-142.
- Montine, T.J.; Quinn, J.F.; Milatovic, D. Peripheral F2-isoprostanes and F-4 isoprostanes are not increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **2003**, *53*,

- 175-179.
- Montuschi, P.; Barnes, P. J.; Roberts, L. J. Isoprostanes markers and mediators of oxidative stress. *FASEB*, **2004**, *18*, 1791-1800.
- Morrisette, N.; Gold, E.; Aderem, A. The macrophage- a cell for all seasons. *Trends Cell Biol.* **1999**, *9*, 199-201.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- Nakamura, H.; Vaage, J., Valev. Measurement of plasma glutaredoxin and thioredoxin in healthy volunteers and during open heart surgery. *Free Radic. Biol Med.* **1998**, *24*, 1176-1186.
- Nicholas, C.; Batra, S.; Vargo, M. A.; Voss, O. H.; Gavrilin, M. A.; Wewers, M. D.; Guttridge, D. C.; Grotewold, E.; Doseff, A. I. Apigenin blocks lipopolysaccharide- induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF- κ B through the suppression of p65 phosphorylation. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 7121-7127.
- Osakabe, N.; Yasuda, A.; Natsume M.; Takizawa, T.; Terao, J.; Kondo, K. Catechins and their oligomers linked by C4- \rightarrow C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation in vitro. *Exp. Biol. Med.* **2002**, *227*, 51-56.
- Parente, L. and Perretti, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 153-159.
- Puhl, H.; Waeg, G.; Esterbauer, H. Method to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods Enzymol.* **1994**, *233*, 425-441.
- Radi, R.; Peluffo, G.; Alvarez, M.N. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 463-468.
- Ray, S.D.; Kumar, M.A.; Bagchi, D. A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases in vivo Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *369*, 42-58.
- Prior, R.L.; Cao, G.H. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 950-956.
- Prior, R.L.; Hong, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assay for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3273-3279.
- Sai, Y.; Kaneko, Y.; Ito, S., Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B to apical uptake of estrone-3 sulfate by human intestinal Caco-2 cells. *Drug. Meta.b Dispos.* **2006**, *34*, 1423-1431.
- Saito, H.; Motohashi, H.; Mukai, M.; Inui, K. Cloning and characterization of a pH-sensing regulatory factor that modulates transport activity of the human H⁺/di-tripeptide transporter, PEPT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *237*, 577-582.
- Sang, S.; Lee, M.J.; Ho, C.T.; Yang, C.S. Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9478-9484.
- Schimke, I.; Kah, P.E.; Romaniuk, P.; Papias, B. Concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum following myocardial infarction. *Klin Wochenschr* **1986**, *64*, 1237-1239.

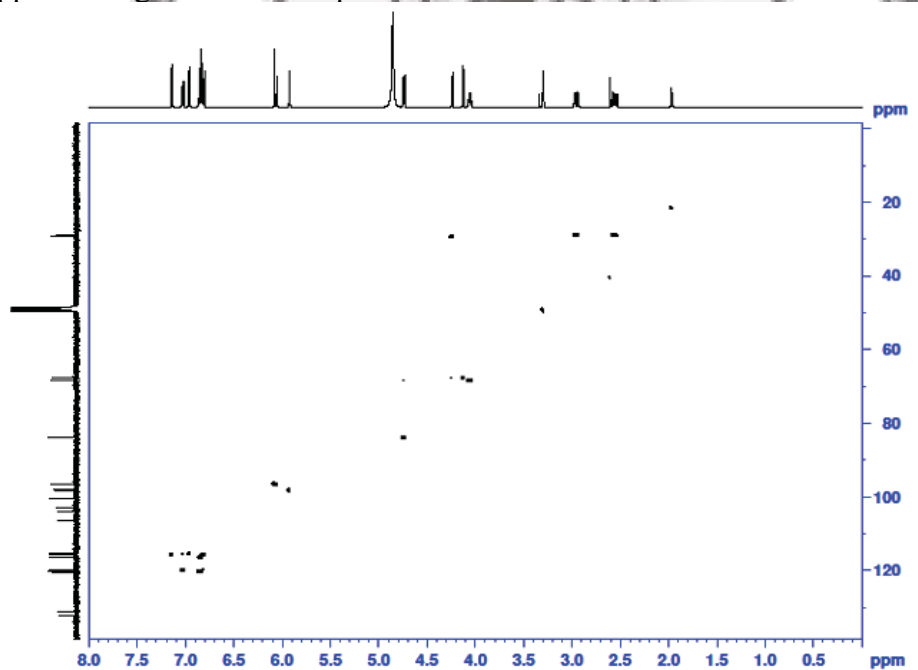
- Schleiser, K.; Harwat, M.; Bohm, V.; Bitsch, R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic. Res.* **2002**, *36*, 177-187.
- Sen, C.K.; Bagchi, D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Mol. Cell Biochem.* **2001**, *216*, 1-7.
- Serban, M.; Ghiea, V.; Pasarica, D. Oxidative aggression in atherosclerosis associated to degenerative psychoorganic disturbances. *Rom. J. Intern. Med.* **2002**, *40*, 117-123.
- Shahat, A.A.; Cos, P.; De Bruyne, T.; Apers, S.; Hammouda, F.M.; Ismail, S.I.; Azzam, S.; Claeys, M.; Goovaerts, E.; Pieters, L.; Vanden Berghe, D.; Vlietinck, A.J. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Planta Med.* **2002**, *68*, 539-541.
- Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K. and Nakaura, T. Antioxidant properties of xanthan on the autoxidative of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 945-948.
- Shimizu, M.; Kobayashi, Y.; Suzuki, M.; Satsu, H.; Miyamoto, Y. Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins. *Biofactors.* **2000**, *13*, 61-65.
- Sun, H.; Chow, E.C.; Liu, S.; Du, Y.; Pang, S.D. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitation. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 395-411.
- Tamai, I.; Takanaga, H.; Maeda, H. Participation of a proton-cotransporter, MCT1, in the intestinal transport of monocarboxylic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *214*, 482-489.
- Tsuji, M.; Kawano, S.; Tsuji, S.; Sawaoka, H.; Hori, M.; DuBois, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* **1998**, *93*, 705-716.
- Varma, S.D.; Devamanoharan, P.S. Excretion of hydrogen peroxide in human urine. *Free Radic. Res. Commun.* **1990**, *8*, 73-78.
- Vinson, J.A.; Dabbagh, Y.A.; Serry, M.M.; Jang, J.H. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in-vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2800-2802.
- Vaidyanathan, J.B.; Walle, T. Transport and metabolism of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2. *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1420-1425.
- Wanasundara, U. N.; Shahidi, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chem.* **1998**, *63*, 335-342.
- Winston, G. W.; Regoli, F.; Dugas, A.J. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 480-493.
- Wolfe, K.L.; Liu, R.H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8896-8907.
- Xia, C.Q.; Liu, N.; Yang, D. Expression localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells. *Drug. Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 637-643.
- Yee, S. In vitro permeability across caco-2 cell can predict in vivo absorption in man- fact or myth. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 763-766.
- Yi, W.; Akoh, C.C.; Fischer, J. and Krewer, G. Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by Caco-2 human intestinal cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5651-5658.
- Young, J.F.; Dragsted, L.O.; Haraldsdottir, J.; Daneshvar, B.; Kall, M.A.; Loft, S.

Nilsson, L.; Nielsen, S.E.; Mayer, B.; Skibsted, L.H.; Huynh-Ba, T.; Hermetter, A.; Sandstrom, B., Green tea extract only affects markers of oxidative status postprandially: lasting antioxidant effect of flavonoid. free diet. *Br. J. Nutr.* **2002**, *87*, 343–355.

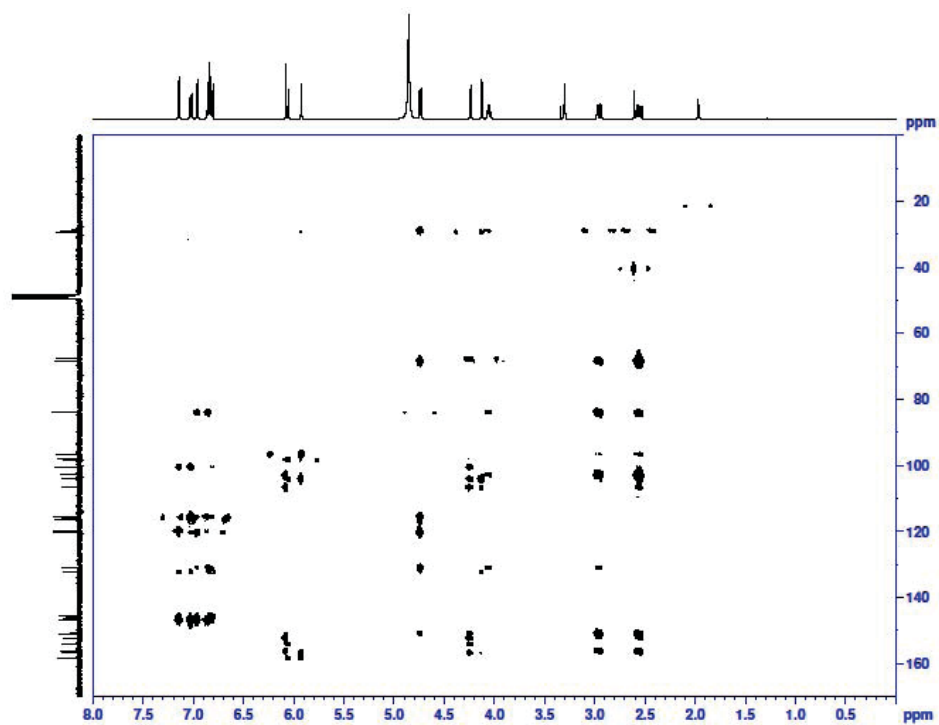




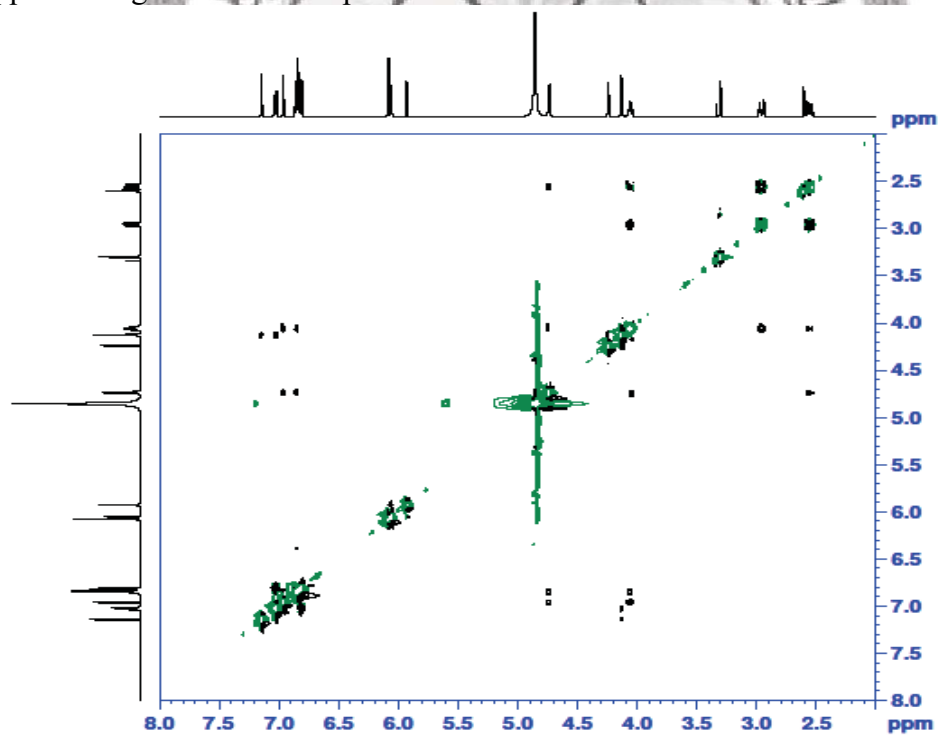
附圖 3、PA4 之二維 COSY 核磁共振光譜圖
Appendix Figure. 3 COSY spectrum of PA4



附圖 4、PA4 之二維 HSQC 核磁共振光譜圖
Appendix Figure 4. HSQC spectrum of PA4



附圖 5、PA4 之二維 HMBC 核磁共振光譜圖
 Appendix Figure 5. HMBC spectrum of PA4



附圖 6、PA4 之二維 NOESY 核磁共振光譜圖
 Appendix Figure 6. NOESY spectrum of PA4

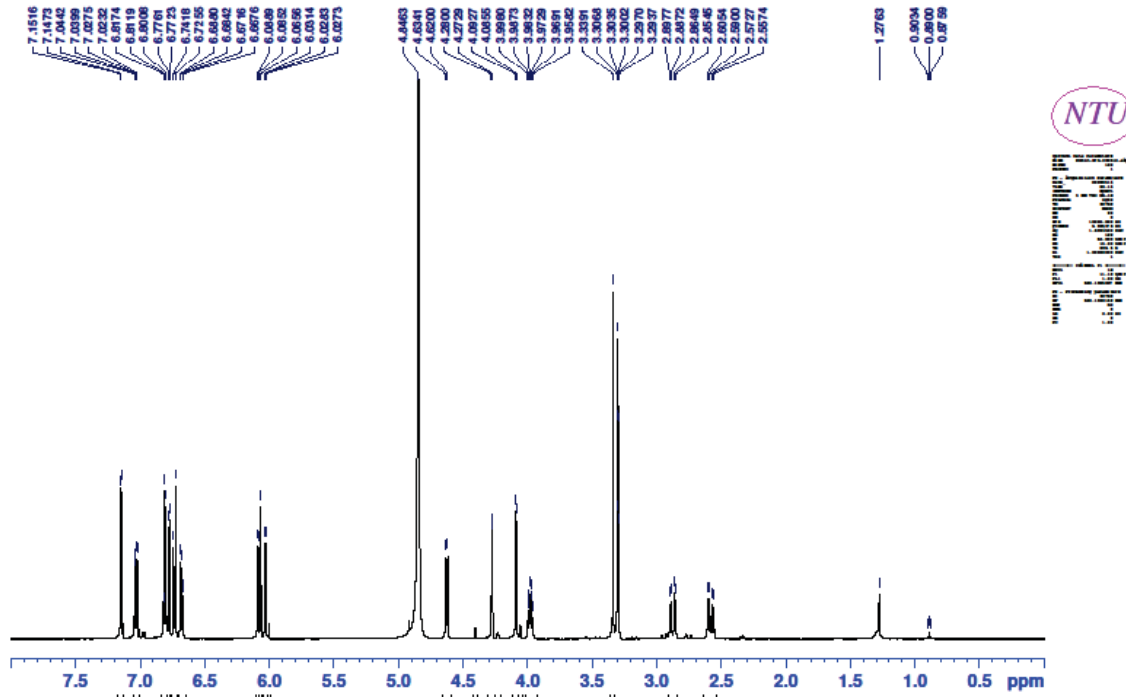
PA4 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜 (附圖 1) : Methanol- d_4 , 500MHz, δ : ppm

2.55	dd, $J=16.3, 8.7$ Hz, 1H	H-4'eq
2.95	dd, $J=16.3, 5.3$ Hz, 1H	H-4'ax
4.05	m, 1H	H-3'
4.12	d, $J=3.5$ Hz 1H	H-3
4.24	d, $J=3.4$ Hz 1H	H-4
4.73	d, $J=7.8$ Hz 1H	H-2'
5.92	d, $J=2.3$ Hz 1H	H-6
6.05	d, $J=2.3$ Hz 1H	H-8
6.07	s, 1H	H-6'
6.81	d, $J=8.3$ Hz 1H	H-13
6.83	d, $J=8.5$ Hz 1H	H-13'
6.86	dd, $J=8.2, 1.7$ Hz, 1H	H-14'
6.95	d, $J=1.5$ Hz 1H	H-10'
7.02	dd, $J=8.3, 2.1$ Hz, 1H	H-14
7.14	d, $J=2.1$ Hz 1H	H-10

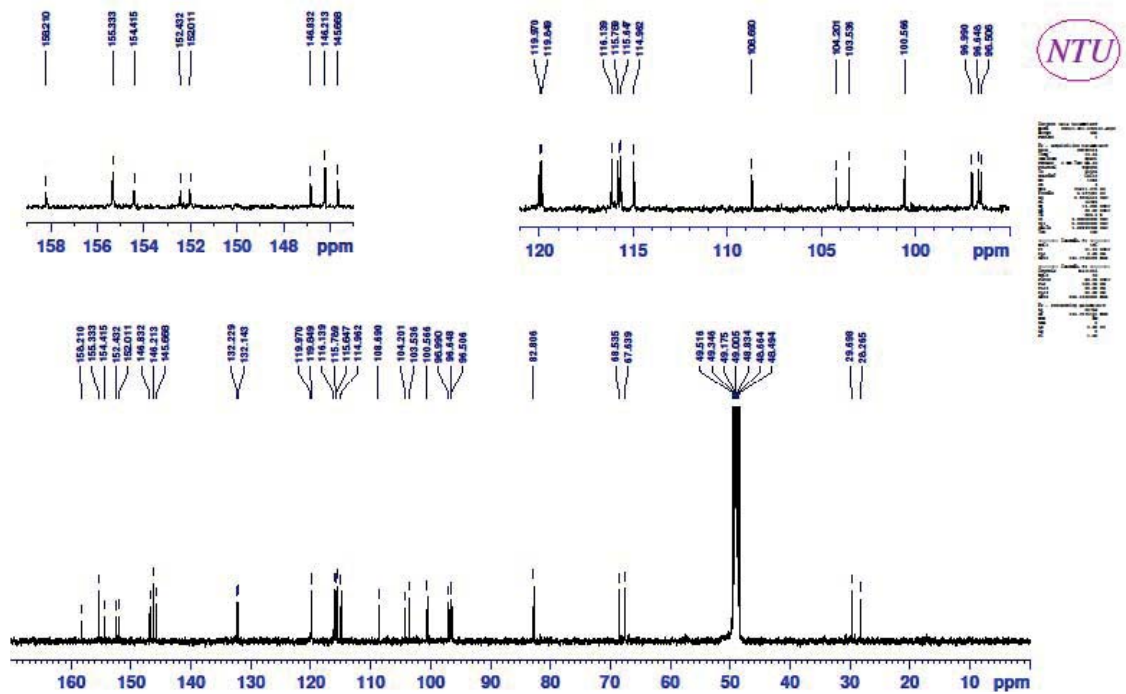
PA4 之 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜 (附圖 2) : Methanol- d_4 , 500MHz, δ : ppm

Position	δC	Position	δC
2	100.4	2'	83.9
3	67.6	3'	68.4
4	29.2	4'	28.8
4a	104.1	4a'	102.8
5	156.7	5'	156.2
6	98.2	6'	96.6
7	158.2	7'	152.2
8	96.5	8'	106.6
8a	154.1	8a'	150.8
9	132.2	9'	130.9
10	115.7	10'	115.4
11	145.7	11'	146.4
12	146.8	12'	146.7
13	115.6	13'	116.4
14	119.9	14'	120.3

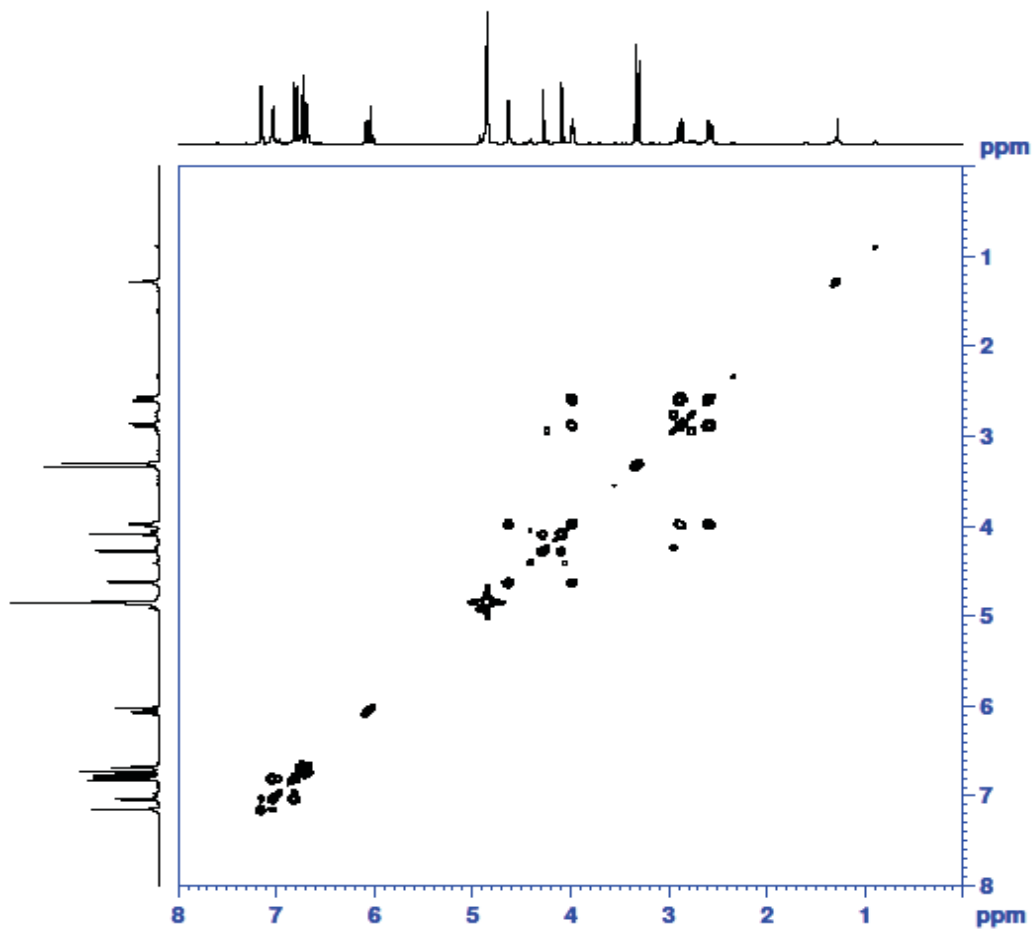
(由 Dr. A. Kumaran 提供)



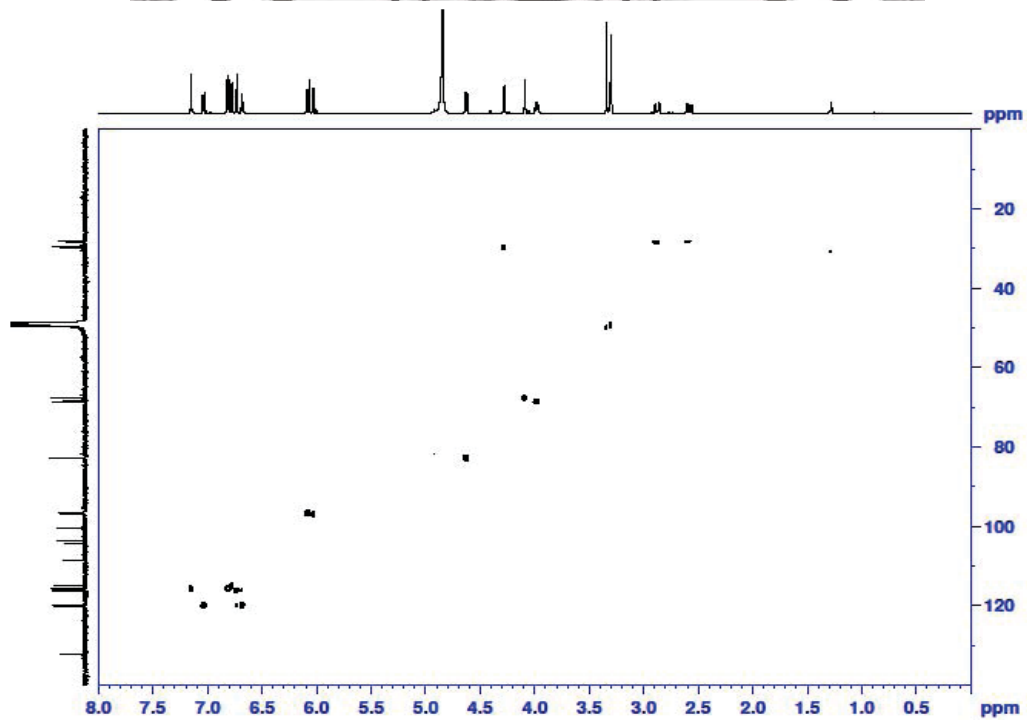
附圖 7、PA5 之氫核磁共振光譜圖
Appendix Figure 7. ^1H -NMR spectrum of PA5



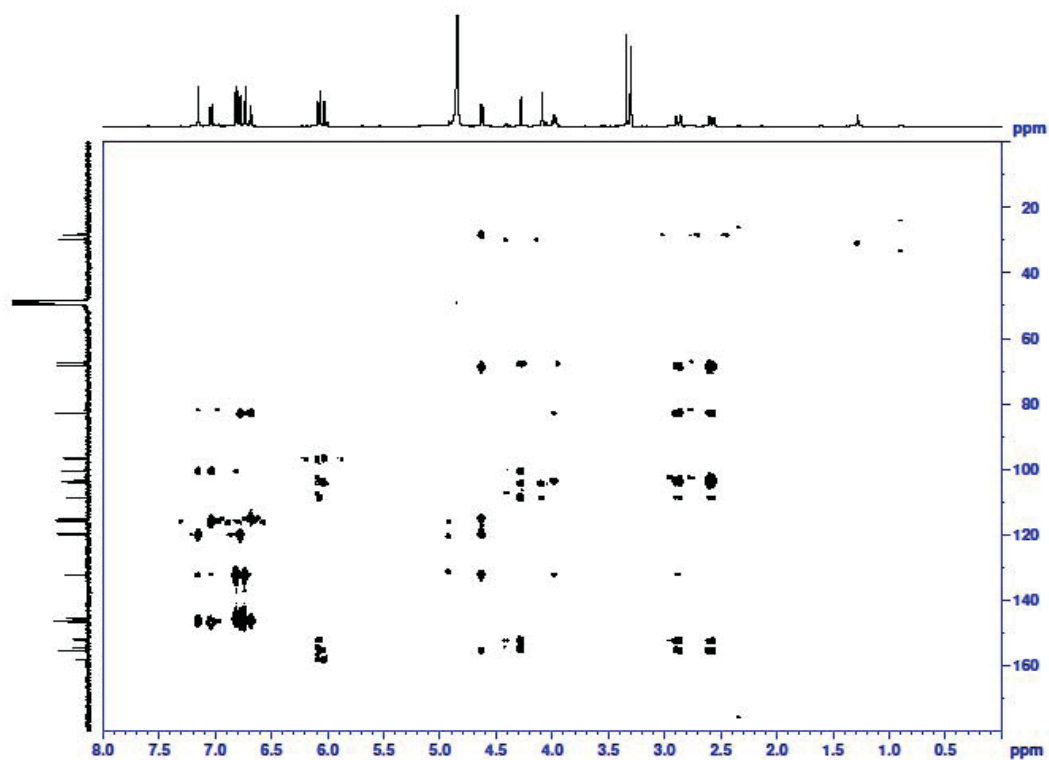
附圖 8、PA5 之碳核磁共振光譜圖
Appendix Figure 8. ^{13}C -NMR spectrum of PA5



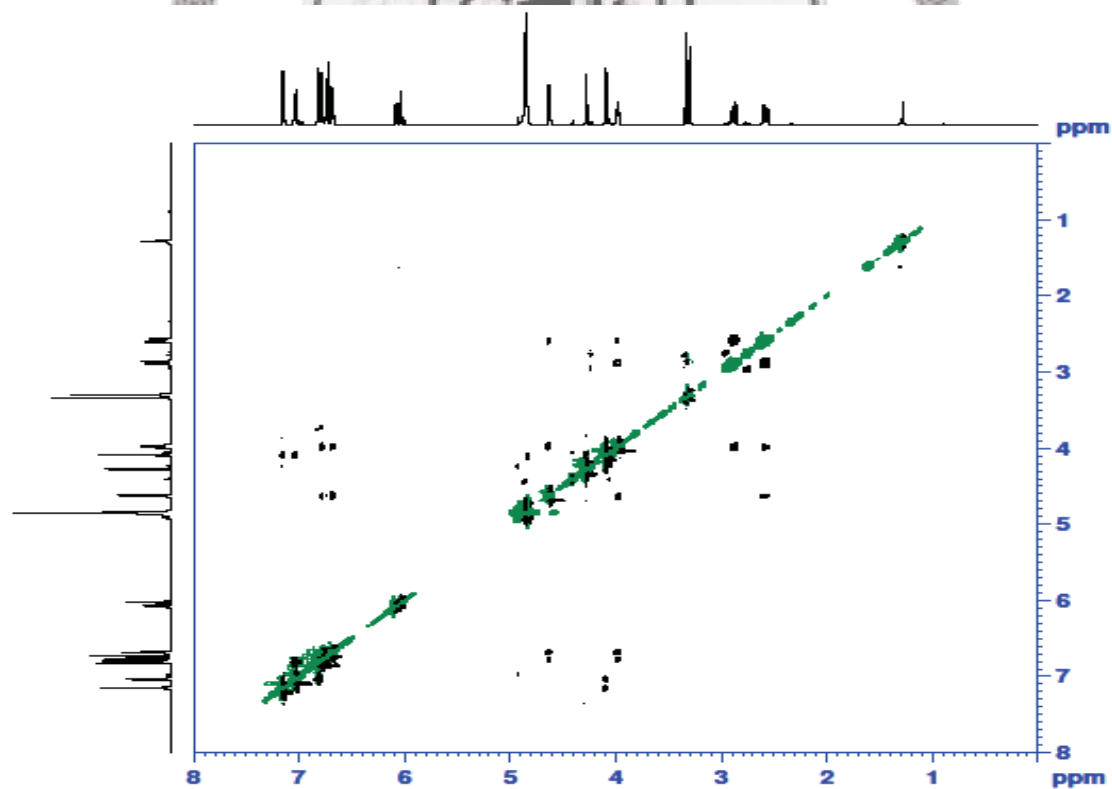
附圖 9、PA5 之二維 COSY 核磁共振光譜圖
 Appendix Figure 9. COSY spectrum of PA5



附圖 10、PA5 之二維 HSQC 核磁共振光譜圖
 Appendix Figure10. HSQC spectrum of PA5



附圖 11、PA5 之二維 HMBC 核磁共振光譜圖
Appendix Figure 11. HMBC spectrum of PA5



附圖 12、PA5 之二維 NOESY 核磁共振光譜圖
Appendix Figure 12. NOESY spectrum of PA5

Peak3 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜 (附圖 7) : Methanol- d_4 , 500MHz, δ : ppm

2.58	dd, $J=16.3, 7.7$ Hz, 1H	H-4'eq
2.87	dd, $J=16.3, 5.2$ Hz, 1H	H-4'ax
3.98	m, 1H	H-3'
4.09	d, $J=3.6$ Hz 1H	H-3
4.28	d, $J=3.5$ Hz 1H	H-4
4.63	d, $J=7.0$ Hz 1H	H-2'
6.02	d, $J=2.0$ Hz 1H	H-6
6.08	d, $J=1.8$ Hz 1H	H-8
6.06	s, 1H	H-6'
6.81	d, $J=8.3$ Hz 1H	H-13
6.73	d, $J=8.1$ Hz 1H	H-13'
6.68	dd, $J=2.8, 8.2$ Hz, 1H	H-14'
6.77	d, $J=1.7$ Hz 1H	H-10'
7.03	dd, $J=8.3, 2.1$ Hz, 1H	H-14
7.15	d, $J=2.1$ Hz 1H	H-10

Peak3 之 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜 (附圖 8) : Methanol- d_4 , 500MHz, δ : ppm

Position	δC	Position	δC
2	100.5	2'	83.8
3	67.6	3'	68.5
4	29.6	4'	28.2
4a	104.2	4a'	103.5
5	155.3	5'	155.3
6	98.9	6'	96.6
7	158.2	7'	152.0
8	96.5	8'	108.6
8a	154.4	8a'	152.4
9	132.2	9'	132.1
10	115.7	10'	114.5
11	145.6	11'	146.2
12	146.8	12'	146.2
13	115.6	13'	116.1
14	119.9	14'	119.8

(由 Dr. A. Kumaran 提供)