

計畫編號：DOH88-TD-1100

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

普洱茶降血脂作用之研究(2)

研究報告

執行機構：國立台灣大學 食品科技研究所

計畫主持人：孫璐西 教授

研究人員：陳念祖

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見\*\*

## 摘要

低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化修飾在早期的動脈粥狀硬化扮演重要的角色。先前研究指出，普洱茶 (PET) 所含的強抗氧化活性可清除 DPPH 自由基與抑制銅離子誘導低密度脂蛋白的氧化。本研究之目的為評估普洱茶中抗氧化活性甚高比例的甲醇抽出物 (PET-M1) 再經矽膠管柱層析所得之區分物，抗氧化與抗動脈粥狀硬化之效果。動物實驗選用具有高血膽固醇、脂蛋白易氧化與自發性動脈粥狀硬化等特徵的雄性 apoE 缺陷小鼠 (apoE-deficient mice)，以探討餵食抗氧化區分物對低密度脂蛋白氧化敏感性與動脈粥狀硬化進展之效果。本論文並以成年年輕健康男性為研究對象，探討飲用普洱茶對於低密度脂蛋白氧化敏感性之影響。

體外抗氧化活性試驗發現 PET-M1-C18 到 PET-M1-C21 等四個區分物具有清除 DPPH 自由基之良好效果， $IC_{50}$  值分別為 4.1, 2.8, 4.1 與 4.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。抑制銅離子誘導人類低密度脂蛋白氧化之  $IC_{50}$  值分別為 2.4, 2.4, 3.0 及 2.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，抗氧化效果比 probucol 強。由此推測普洱茶中具強抗氧化力的活性物質為比兒茶素類更脂溶性。動物實驗分別餵食下列各組飼料：控制組 (正常飼料添加 0.15% 膽固醇，w/w) (control 組，n=7)；0.5% DPPD 組 (控制組飼料添加 0.5% DPPD，w/w) (DPPD 組，n=8)；0.5% PET 組 (控制組飼料添加 0.5% PET-M1-C18 至 PET-M1-C21 四個區分物，w/w) (PET-1 組，n=8) 與 1.0% PET 組 (控制組飼料添加 1.0% PET-M1-C18 至 PET-M1-C21 四個區分物，w/w) (PET-2 組，n=8)。8 週餵養期後，四組動物的血清膽固醇、極低密度脂蛋白膽固醇與低密度脂蛋白膽固醇濃度均沒有統計上之差異。銅離子誘導低密度脂蛋白氧化過程的遲滯期 (lag phase)

在四組動物間亦沒有差異，PET-2 組的低密度脂蛋白生育酚含量 ( $13.4 \pm 2.2$  molecules/LDL) 則明顯低於控制組 ( $20.8 \pm 6.0$  molecules/LDL) ( $P < 0.05$ )。PET-2 組的主動脈弓動脈粥狀硬化面積顯著大於其他三組 ( $P < 0.05$ )，但以病灶面積與血管中層面積之比值來表示時則在四組動物間沒有顯著差異。顯示具有強抗氧化力的普洱茶區分物，無法降低低密度脂蛋白的氧化敏感性，且無法減緩動脈粥狀硬化之進展。人體試驗結果顯示飲用普洱茶 7 天後，遲滯期延長了 18.6% (由  $113.6 \pm 31.1$  min 延長至  $134.7 \pm 30.3$  min,  $n=16$ ) ( $P < 0.05$ )，低密度脂蛋白生育酚含量由飲用前的  $8.7 \pm 1.6$  molecules/LDL 增加到  $10.1 \pm 2.1$  molecules/LDL ( $P < 0.001$ )。

本研究可得以下結論：普洱茶茶甲醇抽出物之矽膠管柱層析區分物雖具有強抗氧化活性，但在 apoE 缺陷小鼠病理動物模式無法呈現降低低密度脂蛋白氧化敏感性與抑制動脈粥狀硬化的效果。人體飲用普洱茶後，可藉由增加低密度脂蛋白內生育酚的含量而降低低密度脂蛋白的氧化敏感性。

## Abstract

Oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) plays a key role in early pathogenesis of atherosclerosis. Previous studies have indicated that Pu-Erh-Tou tea (PET) contains strong antioxidants that scavenge DPPH free radical and inhibit  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation. In this study, the methanolic extracts of PET (PET-M1) were further fractionated by silica gel column chromatography to obtain four active fractions, PET-M1-C18 to PET-M1-C21. Male apoE-deficient mice, characterized by hypercholesterolemia, lipoprotein oxidation, and spontaneous atherosclerosis, were chosen as the pathological animal model to elucidate the effects of these fractions on LDL oxidation and atherosclerosis. The potential of PET drinking to reduce oxidative susceptibility of LDL in male healthy young adults was also elucidated.

Results showed that the four fractions, PET-M1-C18 to PET-M1-C21, exhibited strong DPPH radical scavenging activities in a dose-dependent manner. The  $\text{IC}_{50}$  values were 4.1, 2.8, 4.1 and 4.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The antioxidant activities to inhibit  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation were higher than probucol. The  $\text{IC}_{50}$  values were 2.4, 2.4, 3.0 and 2.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. These observations indicated that natural products of lower molecular polarity than those four common tea catechins in PET exhibited strong antioxidant activities. In animal study, four groups of apoE-deficient mice were fed with one of the following diets: a control diet (normal diet plus 0.15% cholesterol, w/w) (control,  $n = 7$ ), a 0.5% DPPD diet (control diet plus 0.5% DPPD, w/w) (DPPD,  $n = 8$ ), a 0.5% PET diet (control diet plus 0.5% pooled PET-M1-C18 to PET-M1-C21 fractions, w/w) (PET-1,  $n = 8$ ) and a 1.0% PET diet (control diet plus 1.0% pooled PET-M1-C18 to PET-M1-C21 fractions, w/w) (PET-2,

n = 8). After 8 week feeding, there was no significant difference in serum cholesterol, VLDL-C or LDL-C levels among four groups. The lag phases ( $T_{lag}$ , min) in  $Cu^{2+}$ -induced oxidation of LDL were also not significantly different. The content of  $\alpha$ -tocopherol in LDL from PET-2 ( $13.4 \pm 2.2$  molecules/LDL) was significantly lower than that from control ( $20.8 \pm 6.0$  molecules/LDL) ( $P < 0.05$ ). Atherosclerotic lesion, measured from aortic arch, in PET-2 group was more severe than those in other three groups ( $P < 0.05$ ). The ratios of lesion area to media area were not significantly different among four groups. These results indicated that the fractions in PET-M1, which exhibited strong antioxidant activities *in vitro*, neither reduced the oxidative susceptibility of LDL *ex vivo* nor inhibited the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice. In human study, the lag phase ( $T_{lag}$ , min) in  $Cu^{2+}$ -induced LDL oxidation was significantly prolonged by 18.6% (from  $113.6 \pm 31.1$  min to  $134.7 \pm 30.3$  min, n=16) after a 7-day PET drinking (2%) ( $P < 0.05$ ). The content of  $\alpha$ -tocopherol in LDL was increased from  $8.7 \pm 1.6$  molecules/LDL to  $10.1 \pm 2.1$  molecules/LDL ( $P < 0.001$ ).

In conclusion, the antioxidants-enriched fractions in PET, which contained less polar antioxidants than catechins, did not reduce the oxidative susceptibility of LDL *ex vivo* or reduce atherosclerosis in apoE-deficient mice. In human study, PET drinking reduced the oxidative susceptibility of LDL which is likely due to an increase of  $\alpha$ -tocopherol in LDL.

# 目錄

	頁數
壹、前言 .....	1
貳、材料與方法 .....	2
一、實驗材料	
(一)、茶葉來源 .....	2
(二)、儀器設備 .....	2
(三)、檢驗試劑與酵素套組 .....	4
(四)、分析試藥、溶劑與材料 .....	5
(五)、實驗動物與飼料 .....	7
二、實驗方法	
(一)、普洱茶茶甲醇抽出物的矽膠管柱層析 .....	10
(二)、區分物抗氧化活性之分析 .....	12
(三)、動物試驗 .....	17
(四)、實驗動物之生化與病理分析 .....	22
(五)、人體實驗 .....	28
(六)、統計分析 .....	34
參、結果 .....	35
一、普洱茶茶甲醇抽出物矽膠管柱層析 .....	35
(一)、甲醇萃取之抽出率與管柱層析之回收率 .....	35
(二)、PET-M1 區分物之矽膠薄層層析與 lovastatin 之初步鑑定 .....	35
二、區分物清除 DPPH 自由基之能力 .....	35
三、區分物抑制銅離子誘導 LDL 氧化之效果 .....	36

(一)、分離 LDL 之效果.....	36
(二)、區分物抑制銅離子誘導 LDL 氧化之 IC <sub>50</sub> 值.....	36
(三)、區分物抑制銅離子誘導 LDL 氧化之相對抑制活性 大小.....	37
四、動物實驗.....	38
(一)、動物之生長狀況、體重變化與相對肝重.....	38
(二)、血清中脂蛋白之分布情形.....	38
(三)、血清中膽固醇、三酸甘油酯與脂蛋白膽固醇濃度 之變化.....	39
(四)、銅離子誘導 LDL 氧化之遲滯期.....	39
(五)、LDL 中 $\alpha$ -tocopherol 之含量.....	40
(六)、主動脈弓血管組織型態測量結果.....	40
(七)、主動脈弓病灶面積之測定結果.....	40
(八)、主動脈弓病灶面積與中層之比值測定結果.....	41
五、人體實驗.....	41
(一)、受試者狀況.....	41
(二)、血清中脂蛋白之分布情形.....	41
(三)、血液生化值之檢測.....	42
(四)、血清中膽固醇、三酸甘油酯與脂蛋白膽固醇濃度 之變化.....	42
(五)、銅離子誘導 LDL 氧化之遲滯期.....	42
(六)、血清游離脂肪酸之分析.....	43
(七)、LDL 中 $\alpha$ -tocopherol 之含量.....	43
肆、討論.....	88
一、普洱茶之體外抗氧化作用.....	88

二、普洱沱茶區分物之離體抗氧化效果.....	89
三、人體實驗結果之探討.....	94
四、人體實驗與動物實驗的關連.....	98
伍、結論.....	100
陸、參考文獻.....	101

## 表次

表 3-1. Rodent chow diet (Purina 5010) 的化學組成.....	8
表 4-1. 普洱沱茶甲醇抽出物矽膠管柱層析區分物抑制銅離子誘導 低密度脂蛋白氧化之活性.....	45
表 4-2. 餵以不同飼料 8 週後之 apoE 缺陷小鼠體重、肝重與相對 肝重.....	46
表 4-3. ApoE 缺陷小鼠血清膽固醇與三酸甘油酯值及極低密度脂 蛋白與低密度脂蛋白膽固醇含量.....	47
表 4-4. 餵以不同飼料 8 週後之 apoE 缺陷小鼠之銅離子誘導低密度 脂蛋白氧化參數與生育酚含量.....	48
表 4-5. 普洱沱茶飲用前後血清肝功能與腎功能指數之變化.....	49
表 4-6. 綠茶飲用前後血清肝功能與腎功能指數之變化.....	50
表 4-7. 普洱沱茶飲用前後膽固醇、三酸甘油酯與游離脂肪酸在血 清、低密度脂蛋白與高密度脂蛋白的含量.....	51
表 4-8. 綠茶飲用前後膽固醇、三酸甘油酯與游離脂肪酸在血清、 低密度脂蛋白與高密度脂蛋白的含量.....	52
表 4-9. 普洱沱茶飲用前後銅離子誘導低密度脂蛋白氧化參數與生 育酚含量.....	53
表 4-10. 綠茶飲用前後銅離子誘導低密度脂蛋白氧化參數與生育 酚含量.....	54

# 圖次

圖 3-1. 普洱沱茶的包裝與外觀形態.....	9
圖 4-1. 普洱沱茶甲醇抽出物與其矽膠管柱層析區分物之矽膠薄層層析.....	55
圖 4-2. 普洱沱茶甲醇抽出物與其矽膠管柱層析區分物之矽膠薄層層析.....	56
圖 4-3. 普洱沱茶甲醇抽出物與其矽膠管柱層析區分物之矽膠薄層層析.....	57
圖 4-4. 普洱沱茶甲醇抽出物與其矽膠管柱層析區分物之矽膠薄層層析.....	58
圖 4-5. 普洱沱茶甲醇抽出物矽膠管柱層析區分物清除 DPPH 自由基的效果.....	59
圖 4-6. 血清、極低密度脂蛋白與低密度脂蛋白之電泳圖.....	60
圖 4-7. 普洱沱茶甲醇抽出物矽膠管柱層析區分物抑制銅離子誘導低密度脂蛋白氧化的效果.....	61
圖 4-8. 普洱沱茶甲醇抽出物矽膠管柱層析區分物的抑制活性曲線.....	62
圖 4-9. 普洱沱茶區分物抑制銅離子誘導低密度脂蛋白氧化活性分布圖.....	63
圖 4-10. ApoE 缺陷小鼠之外觀圖.....	64
圖 4-11. 四組動物在 8 週實驗期體重之變化.....	65
圖 4-12. ApoE 缺陷小鼠經過 8 週餵食後血清脂蛋白分布之電泳圖.....	66
圖 4-13. 控制組 apoE 缺陷小鼠的低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形.....	67

圖 4-14. 餵食 0.5% DPPD 組 apoE 缺陷小鼠的低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形.....	68
圖 4-15. 餵食 0.5% PET 組 apoE 缺陷小鼠的低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形.....	69
圖 4-16. 餵食 1.0% PET 組 apoE 缺陷小鼠的低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形.....	70
圖 4-17. 比較四組 apoE 缺陷小鼠的低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形.....	71
圖 4-18. 以 RP-HPLC 定量 apoE 缺陷小鼠低密度脂蛋白中維生素 E 含量 (代表性層析圖).....	72
圖 4-19. 銅離子誘導低密度脂蛋白氧化之遲滯期與低密度脂蛋白內維生素 E 含量之相關圖.....	74
圖 4-20. 控制組小鼠主動脈弓切片經 H&E 染色後之形態表現.....	76
圖 4-21. 0.5% DPPD 小鼠主動脈弓切片經 H&E 染色後之形態表現.....	77
圖 4-22. 0.5% PET (PET-1) 小鼠主動脈弓切片經 H&E 染色後之形態表現.....	78
圖 4-23. 1.0% PET (PET-2) 小鼠主動脈弓切片經 H&E 染色後之形態表現.....	79
圖 4-24. 經 8 週餵食後 apoE 缺陷小鼠主動脈弓之病灶面積.....	80
圖 4-25. 經 8 週餵食後 apoE 缺陷小鼠病灶面積與血管中層面積之比值.....	81
圖 4-26. 飲用普洱沱茶 7 天前後血清脂蛋白之電泳圖.....	82
圖 4-27. 普洱沱茶組飲用前低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形.....	83

圖 4-28. 普洱沱茶組經 7 天飲用後低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化 過程中共軛雙烯的生成情形 .....	84
圖 4-29. 飲用普洱沱茶 7 天後三酸甘油酯改變量與游離脂肪酸改變 量之相關圖 .....	85
圖 4-30. 以 RP-HPLC 定量人類低密度脂蛋白中維生素 E 含量... ..	86
圖 4-31. 普洱沱茶與綠茶飲用前後銅離子誘導低密度脂蛋白氧化 之遲滯期改變量與低密度脂蛋白內維生素 E 含量改變量 之相關圖 .....	87

## 縮寫表

ALT: Alanine aminotransferase

Apo E: Apolipoprotein E

AST: Aspartate aminotransferase

BHT: Butylated hydroxytoluene

BUN: Blood urea nitrogen

Cre: Creatinine

DPPD: N,N'-Diphenyl 1,4-phenylenediamine

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EC: (-)-Epicatechin

ECG: (-)-Epicatechin gallate

EGC: (-)-Epigallocatechin

EGCG: (-)-Epigallocatechin gallate

FFA: Free fatty acids

HDL: High density lipoprotein

d.d. H<sub>2</sub>O: Deionized-distilled water

IDL: Intermediate density lipoprotein

LDL: Low density lipoprotein

MM-LDL: Minimally modified low density lipoprotein

Ox-LDL: Oxidized low density lipoprotein

PBS: Phosphate buffered-saline

PET: Pu-Erh-Tou tea

PET-E1: Ethanolic extracts of Pu-Erh-Tou tea

PET-M1: Methanolic extracts of Pu-Erh-Tou tea

PUFA: Polyunsaturated fatty acids

ROS: Reactive oxygen species

RP-HPLC: Reversed-phase high performance liquid chromatography

SD: Sprague-Dawley

AN: 1-(2-Thiazolylazo)-2-naphthol

BA: Thiobarbituric acids

BARS: Thiobarbituric acid reative substance

G: Triacylglycerol

LC: Thin-layer chromatography

VLDL: Very low density lipoprotein

# 壹、前言

動脈血管硬化所造成之腦血管疾病、心臟疾病與高血壓疾病已分居民國 86 年度國內十大死因之第二、四與九位。日漸西化的飲食習慣使罹患心血管疾病 (cardiovascular disease; CVD) 者逐年上升，而生活形態之改變使人體承受之氧化性壓力亦日漸增加。許多研究指出動脈粥狀硬化與低密度脂蛋白 (LDL) 之氧化有密切之關係 (Steinberg *et al.*, 1989; Esterbauer *et al.*, 1992)，故如何藉由飲食控制或攝取抗氧化劑來預防及改善動脈粥狀硬化，便是近年來研究的趨勢。

在食品滿足了提供飽足感與色香味的需求後，其所能帶來之生理機能性便受到相當的重視。文獻中指出茶可降低血液中膽固醇與三酸甘油酯之含量，所含的活性物質並可預防動脈粥狀硬化與降低心血管疾病發生率 (Sano *et al.*, 1986; Dreosti, 1996; Serafini *et al.*, 1996)。目前對於茶的研究以流行病學為主，或是以體外實驗來證明茶之抗氧化與降血脂功效，採行動物實驗或人體實驗方面的報告較少，尤其是在體內抗動脈粥狀硬化的資料方面更缺。而茶的材料多以綠茶為主紅茶次之，對於其他種茶如普洱茶的研究相當缺乏。

先前的研究已證實普洱茶水抽出物在體外實驗中可清除自由基與抑制銅離子誘導之 LDL 氧化；在體內實驗可抑制膽固醇生合成、降低 LDL 的氧化敏感性、降低 LDL 中不飽和脂肪酸含量與增加 LDL 內生育酚的數目，而推論普洱茶具降脂與預防動脈粥狀硬化之效果。本研究乃利用 apoE 缺陷小鼠 (apoE-deficient mice) 作為病理動物模式，並以台灣成年年輕健康男性為研究對象，探討普洱茶抗氧化活性對於體內抗 LDL 氧化與抗動脈粥狀硬化之效果。

# 貳、材料與方法

## 一、實驗材料

### (一) 茶葉來源

1. 普洱沱茶：購自大陸雲南，品種為雲南大葉種，製造日期為 86 年 12 月，其外觀請參閱圖 3-1
2. 綠茶：購自台灣南投名間鄉，品種為台茶 12 號，製造日期為 86 年 11 月

### (二) 儀器設備

1. 超高速離心機 (Ultracentrifuge)  
Model XL-90 (Beckman, USA)  
Model L8-80M (Beckman, USA)  
所用轉子為 type 50 rotor 與 Ti 70.1 rotor (Beckman, USA)
2. 離心機 (Centrifuge)  
Model 5100 (Kubota, Japan)  
Model KR/702 (Kubota, Japan)
3. 1.5 mL 微量離心管離心機  
Biofuge 13 (Heraeus, Germany)
4. 高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatograph; HPLC)  
移動相輸出系統 (Solvent delivery system) : Model 1090 series II/L (Hewlett-Packard, USA)  
偵測器 (Detector) : Model 1040 series II/M, Photodiode array

detector (Hewlett-Packard, USA)

注射器 (Injector) : Model 7125 sample injector (20  $\mu$ L loop)  
(Rheodyne, USA)

管柱 (Column) : Analytical reversed-phase column:

5C<sub>18</sub>-AR, 5- $\mu$ m particle  
size, 4.6  $\times$  250 mm I.D.,  
Nacalai Tesque, Japan

Guard column : 10 C<sub>18</sub>-AR, 10- $\mu$ m particle  
size, 4.6  $\times$  50 mm I.D.,  
Nacalai Tesque, Japan

資料處理工作站 (Data processor) : HPLC Chemstation, Rev. A.  
2.0 (Hewlett-Packard,  
USA)

記錄器 (Recorder) : DeskJet 500 (Hewlett-Packard, USA)

5. 磨粉機 (Roter speed mill)

Model pulverisette 14 (Fritsch, Germany)

6. 分光光度計 (Spectrophotometer)

Model 7800 (Jasco, Japan)

Model DU 640 (Beckman, USA)

7. 軌道式恆溫培養震盪器 (Orbital incubation shaker)

Model 705R (Hortec Instruments, ROC)

8. 超音波震盪器 (Sonicator)

Model 5210 (Branson, USA)

9. 酸鹼度計 (pH meter)

Model 6071 (Jenco, ROC)

10. 微量天平

Model AE 240 (Mettler-Toledo, Switzerland)

11. 電泳槽電源供應器 (Electrophoretic power supply)

Model No 113 (Sebia, France)

12. 光學顯微照相系統 (Photomicroscopic system)

Model BH-2, (Olympus, Japan)

13. 電腦輔助影像面積分析系統 (computer-assisted morphometric planimetry)

Model LV-2 plus true color image analyzer (Winstar, Taiwan, R.O.C.)

14. 旋轉式減壓濃縮機

Model BUCHI 011 (Buchi, Switzerland)

15. 免疫酵素分析儀 (Microplate spectrophotometer)

Model Spectra MAX 250 (Molecular Devices, USA)

16. 自動乾式化學分析儀 (Auto dry chemistry analyzer)

Model SPOTCHEM SP-4410 (ARKARY, Japan)

### (三) 檢驗試劑與酵素套組

1. 膽固醇檢測試劑 (Cholesterin enzymatic CHOD-PAP method, code no. 1.14366.0001) : 購自 Merck (Darmstadt, Germany)

2. 三酸甘油酯檢測試劑 (Triglyceride, full-enzymatic colour test, GPO-PAP method, code no. 1.14354.0001) : 購自 Merck (Darmstadt, Germany)

3. 高密度脂蛋白沈澱試劑 (Precipitating reagent for CHOD-PAP method, code no. 1.14210.0001) : 購自 Merck (Darmstadt, Germany)

4. 脂蛋白電泳檢測試劑 (Lipofilm, code no. 4040-2) : 購自 Sebia  
(Issy-les-moulineaux, France)
5. 生化值酵素檢測試紙 : For SPOTCHEM SP-4410 only: GOT,  
GPT, BUN, Cre : 購自 KDK (Kyoto,  
Japan)

#### (四) 分析試藥、溶劑與材料

1. 以下購自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany) :

Acetic acid (100%)

Cholesterol standard solution (200 mg/dL)

Copper sulfate pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ )

Copper (II) nitrate trihydrate ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )

N,N'-Diphenyl 1,4-phenyldiamine (DPPD)

Entellan (for microscopy)

Eosin solution

Ethanol

Ether

Ethylendinitrilo tetra-acetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)

n-Heptane

Hydrochloric acid

Iodine

Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

2-Propanol

Propylene glycol

Sodium bromide (NaBr)

Sodium chloride (NaCl)

Sodium citrate dihydrate ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

di-Sodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

Sodium hydroxide (NaOH)

Triethanolamine

Xylene

TLC plate (silica gel 60, 20× 20-cm, 0.25-mm thickness)

Silica gel 60 (70-230 mesh)

2. 以下購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)

Cholesterol (5-Cholesten-3  $\beta$  -ol, 95%)

Margaric acid ( $\text{C}_{17:0}$ )

Mayer's hematoxylin

Poly-L-Lysine

Paraformaldehyde

Retinol acetate

( $\pm$ )-  $\alpha$  -Tocopherol

1-(2-Triazolylazo)-2-naphthol (TAN)

3. 以下購自 Aldrich 公司 (Milwaukee, USA)

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH)

Trolox

4. 以下購自 Lab-Scan 公司, HPLC 級 (Dublin, Ireland)

Acetonitrile

Chloroform

Ethyl acetate

n-Hexane (95%)

Methanol

## Tetrahydrofuran

### 5. 其他

Histoplast (pelletised paraffin wax) : 購自 Shandon 公司  
(Hampshire, England)

### (五) 實驗動物與飼料

#### 1. ApoE-deficient mice

購自美國傑克森實驗室 (The Jackson Lab., Bar Harbor,  
Maine, USA)

C57BL/6J-Apoe<sup>0/0</sup>，雄性，進口年齡 7 週大

#### 2. Purina 5010 autoclavable rodent chow diet (Purina, St. Louis, MO, USA)

飼料成份請參閱表 2-1

表 2-1. Rodent chow diet (Purina 5010) 的化學組成

Table 2-1. Chemical composition of rodent chow diet (Purina 5010)

Chemical Composition <sup>1</sup>	Nutrients <sup>2</sup>	
	Protein %	23.5
	Arginine %	1.40
	Cystine %	.34
	Glycine %	1.20
	Histidine %	.58
	Isoleucine %	1.24
	Leucine %	1.87
	Lysine %	1.42
	Methionine %	.49
	Phenylalanine %	1.08
	Tyrosine %	.64
	Threonine %	.94
	Tryptophan %	.29
	Valine %	1.22
	Fat %	6.0
	Cholesterol, ppm	275.0
	Fiber (Crude), %	4.4
	Neutral Detergent Fiber <sup>3</sup> %	14.2
	Acid Detergent Fiber <sup>4</sup> %	5.6
	Total Digestible Nutrients %	76.0
	Nitrogen-Free Extract (by difference) %	48.9
	Gross Energy, KCal/gm	4.25
	Physiological Fuel Value <sup>5</sup> , KCal/gm	3.44
	Ash %	7.2
	Calcium %	1.00
	Phosphorus %	.67
	Potassium %	.92
	Magnesium %	.22
	Sodium %	.28
	Chlorine %	.39
	Fluorine, ppm	35.0
	Iron, ppm	184.0
	Zinc, ppm	124.3
	Manganese, ppm	115.0
	Copper, ppm	19.6
	Cobalt, ppm	.44
	Iodine, ppm	.73
	Chromium, ppm	1.95
	Selenium, ppm	.20
	<b>Vitamins</b>	
	Carotene, ppm	4.5
	Menadione (added), ppm	8.8
	Thiamin, ppm	86.5
	Riboflavin, ppm	8.0
	Niacin, ppm	100.0
	Pantothenic Acid, ppm	25.4
	Choline, ppm x100	22.0
	Folic Acid, ppm	6.0
	Pyridoxine, ppm	6.0
	Biotin, ppm	.11
	B <sub>12</sub> , mcg/kg	33.0
	Vitamin A, IU/gm	44.1
	Vitamin D, IU/gm	4.4
	Vitamin E, IU/gm	66.1
	Ascorbic Acid, mg/gm	—

<sup>1</sup> Product Code

<sup>2</sup> Based on the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies, analysis will differ accordingly.

<sup>3</sup> Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.

<sup>4</sup> NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.

<sup>5</sup> ADF = approximately cellulose and lignin.

<sup>6</sup> Physiological Fuel Value (KCal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4.9, 4 KCal/gm respectively.



圖 2-1. 普洱沱茶的包裝與外觀形態

Fig. 2-1. The package and shape of Pu-Erh-Tou tea.

## 二、實驗方法

### (一)、普洱茶茶甲醇抽出物的矽膠管柱層析

#### 1. 茶粉之製備

將普洱茶先以鐵錘敲成小塊，再以高速磨粉機磨成茶粉，並經 30 mesh (孔徑大小為 0.59 mm× 0.59 mm) 的分析篩過篩，未能過篩之部份繼續進行細磨，直至大部分的茶粉皆可過篩為止。

#### 2. 溶劑萃取與減壓濃縮

取 3 L 甲醇加入 300 g 普洱茶粉，混勻後於室溫下進行 24 小時之萃取，期間並不時加以攪動。萃取液以 Whatman No. 1 濾紙進行抽氣過濾，濾液以減壓濃縮機將溶劑揮發，使最後體積縮減為 400 mL。

#### 3. 矽膠 (silica gel) 與薄層層析 (TLC) 片之前處理

取 silica gel 與 TLC 片放入烘箱中，以 110-120°C 烘烤 2-3 小時，待其冷卻後備用，使用前盡量不由烘箱中取出，以免與空氣接觸而吸收水分。

#### 4. 矽膠管柱之充填

將烘乾之矽膠加入適量的正己烷，經過適當攪拌與脫氣後，小心混勻後倒入已加少許正己烷於底部的管柱中 (80 × 7.0 cm, ID)，下方以低流速流出移動相溶劑 (mobile phase)，勿使液面低於矽膠，期間並以木塊輕敲管壁使矽膠

堆積緊密，當高度達到 20 cm 時即停止添加矽膠，再以較快之流速使矽膠因重力而堆積更緊密，當液面高度約為 2 cm 時停止流出移動相。將已經過濃縮之普洱沱茶甲醇抽出液倒入燒杯中，取烘乾之矽膠加入直至完全吸乾為止，倒出至不鏽鋼平盤上，置於抽氣櫃中使甲醇自然揮發，最後以 60 mesh (孔徑大小為 0.25 mm× 0.25 mm) 的分析篩過篩除去結塊無法崩散的矽膠或未與矽膠吸附的甲醇抽出物後備用。加入上述已吸附普洱沱茶甲醇抽出物之矽膠，方法為將矽膠小心地撒下，以不擾動兩者界面為原則，並不時加入正己烷以進行溼潤，期間下方以低速流出移動相並亦以木塊輕敲管壁使其堆積緊密，最後吸附甲醇抽出物的矽膠高度約為 15 cm。再以少許烘乾之矽膠撒在表面作為保護，高度約為 1 cm。以下表之比例配製各移動相溶劑，並以超音波震盪進行脫氣後備用。

移動相	組成與比例 (v/v)	Polarity index	用量 (L)
1	n-hexane	0	1.5
2	n-hexane : ethyl acetate = 2 : 1	1.4	1.5
3	n-hexane : ethyl acetate = 1 : 1	2.2	1.5
4	ethyl acetate	4.3	1.5
5	ethyl acetate : methanol = 1 : 1	5.5	1.5
6	methanol	6.6	1.5

依序將六種移動相加入管柱中進行溶劑沖提，流速約為 500 mL/h，每 500 mL 為一區分收集於三角瓶中，若於沖提過程中肉眼可見明顯色帶則以不定體積進行個別收集。最後

將所收集的 31 個區分進行減壓濃縮至 10 mL 左右，以 20 mL 樣品瓶盛裝保存。

5. 利用矽膠薄層層析 (silica gel thin-layer chromatography; TLC) 檢測管柱層析表現

扣除 C1-C3 三個純粹為正己烷溶離液之區分外，將剩下 28 個區分分為下列四組，分別以下列之移動相進行矽膠薄層層析。

區分物編號	移動相組成與比例 (v/v)
C4-C10	n-hexane : ethyl acetate = 2 : 1
C10-C16	n-hexane : ethyl acetate = 2 : 1
C16-C22	n-hexane : ethyl acetate = 1 : 1
C22-C31	methanol

各區分依序點至 TLC 片上，並再點一排預先溶於乙酸乙酯之 lovastatin，做為判斷區分物中是否含有  $R_f$  值類似 lovastatin 之依據。將 TLC 片小心放入展開槽中，展開至移動相到達預先作好標記之 solvent front 為止。將上述之各 TLC 片由展開槽取出於通風櫥內使溶劑自然揮發，於 366 nm 下觀察其呈色現象。再放入含碘顆粒之密閉展開槽中進行碘呈色反應，並以鉛筆圈出不同  $R_f$  所得各點之位置。

## (二) 區分物抗氧化活性之分析

### 1. 清除 DPPH 自由基之能力檢驗

以矽膠管柱層析區分物為試驗材料，參考 Blois (1958) 之方法測定評估各區分物清除 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基之能力。首先在 96 槽的微量滴定平盤 (96-well microtiterplate; Nunc, code no. 269620) 中加入 20  $\mu\text{L}$  的酒精及 30  $\mu\text{L}$  不同濃度之矽膠管柱層析區分物酒精溶液，再迅速加入 250  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{M}$  的 DPPH 酒精溶液，使最後體積成為 300  $\mu\text{L}$ 。充分混合後於室溫下靜置 90 分鐘，檢測其 517 nm 之吸光值  $A$ 。當 DPPH 自由基被清除愈多時，其吸光值會下降得愈多，利用相對於空白對照組的吸光值下降百分比，可判斷各區分物清除 DPPH 自由基能力之強弱。計算公式如下：

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_0 - A - A_B}{A_0} \times 100\%$$

$A_0$ ：不添加區分物之吸光值

$A$ ：添加區分物後之吸光值

$A_B$ ：區分物本身之吸光值

## 2. 抑制銅離子誘導之人類 LDL 過氧化反應

### (1) 以超高速離心分離 LDL

由健康與飲食正常之成年男性經隔夜禁食 (overnight fasting) 後抽取血液 100 mL，置入 37°C 水浴中靜置 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 (3000 rpm (1200 $\times$  g)、15 min) 以取得血清，小心吸取 5 mL 血清分別置入超高速離心管中，再加入 1 mL 生理食鹽水 (145

mM,  $\rho = 1.006 \text{ g/mL}$ ), 於  $4^\circ\text{C}$  下進行超高速離心 (44k rpm (152000 $\times$  g)、16 hr)。離心後吸取最上層 2 mL 呈乳白色的 VLDL 部份 ( $\rho < 1.019 \text{ g/mL}$ ), 管內剩下的部份再加入 2 mL NaBr 溶液 ( $d = 1.22 \text{ g/mL}$ ), 混勻後於  $4^\circ\text{C}$  下進行超高速離心 (44k rpm (152000 $\times$  g)、20 hr)。離心後吸取最上層 2 mL 淡黃色之 LDL 部份 ( $\rho = 1.019\text{-}1.063 \text{ g/mL}$ ), 取得之 LDL 裝入塑膠離心管中, 充氮氣後於  $4^\circ\text{C}$  下避光保存備用, 保存期不超過 1 星期。

## (2) 以電泳檢測 LDL 分離效果

利用電泳結果判斷所取得之 LDL 是否有任何 HDL 摻雜

### (a) 膠片之前處理

將已鑄膠完成之套裝 polyacrylamide gel (Sebia, France) 置入 100 mL 已稀釋 10 倍之 Lipofilm buffer 中, 於  $4^\circ\text{C}$  下靜置溼潤 2 hr。電泳進行前取出已溼潤完成之膠片, 以無纖紙小心吸乾膠片表面與樣品槽中之水分, 注意不可刮傷膠片。

### (b) 電泳

取 10  $\mu\text{L}$  serum、VLDL 與 LDL 分別與 10  $\mu\text{L}$  Sudan black dye 在室溫下進行染色 1.5 hr, 再取染色完成之樣本 4.5  $\mu\text{L}$  加入膠片之樣品槽內, 進行電泳 50 min。

操作條件：

電壓：170 V

電流：50 mA

功率：5 W

時間：50 min

電泳完成後，將電泳片浸於保存液 (acetic acid : ethylene glycol : d.d.H<sub>2</sub>O = 5:2:93, v/v/v) 中 1 hr，再將膠片置於 40-50°C 烘箱中進行乾燥，以保存夾於室溫下保存。

### (3) 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，並勿使膜內殘存空氣，放入含有欲透析之 LDL 100 倍體積之磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffered-saline; PBS) (125 mM NaCl, 5 mM phosphate, pH 7.4) 中，將瓶子裝滿緩衝液或充氮氣，於 4°C 下避光攪動，先透析 2.5 hr 後更換新的 PBS，再於 3 hr 後更換一次 PBS，共透析 16-24 小時。

### (4) 膽固醇濃度之測定 (Richmond *et al.*, 1973)

取透析完畢之 LDL，採用酵素法 (enzymatic CHOD-PAP method)，以 Merck 公司生產之 cholesterol enzymatic kit 測定膽固醇濃度。其原理為利用 cholesterol esterase 將膽固醇酯水解成膽固醇，再利用 cholesterol oxidase 氧化膽固醇以產生過氧化氫，而由 peroxidase 催化可將 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 4-aminoantipyrine 及 phenol 反應產生 quinonimine 的紅色物質以呈色。以膽固醇標準液 (200 mg/dL) 製作標準曲線，分別取 0、5、10、20、25  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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。

(5) 對 LDL 脂質過氧化之抑制作用 (Wallin *et al.*, 1993)

先以 PBS 將 LDL 稀釋成為 0.9 mg/mL，再於 96 槽的微量滴定平盤中分別加入 50  $\mu$ L LDL，對照組加入 10  $\mu$ L 的 10% 酒精溶液，實驗組分別加入 10  $\mu$ L 不同濃度之 probucol、DPPD 與各管柱層析區分物。以鋁箔紙包覆避光，於 37°C、120 rpm 之恆溫震盪器中震盪 1 hr。對照組加入 40  $\mu$ L PBS，實驗組加入 20  $\mu$ L PBS 與 20  $\mu$ L、50  $\mu$ M  $\text{Cu}^{2+}$  (本實驗採用硫酸銅水溶液)。再置入 37°C、120 rpm 之恆溫震盪器中供氧反應 2 hr 之後，各 well 分別加入 150  $\mu$ L、2 mM EDTA 以終止反應。取上述混合溶液 100  $\mu$ L，加入 900  $\mu$ L 之 2-propanol，以 12000 rpm (13600 $\times$  g) 離心 10 min。取上清液測定 234 nm 下之吸光值以偵測共軛雙烯 (conjugated diene) 之生成量，各區分物之抗氧化力以其相對於僅加  $\text{Cu}^{2+}$  該組的抑制百分率來表示。各濃度均做二重複，並以  $\text{IC}_{50}$  來比較各區分物相對於 probucol 之抗氧化力強弱。計算公式：

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A - A_c}{A_{\text{Cu}} - A_c} \times 100\%$$

$A_c$ ：未添加銅離子組之空白吸光值

$A_{Cu}$ ：僅添加銅離子組之吸光值

$A$ ：添加銅離子與區分物組之吸光值

### (三) 動物試驗

#### 1. 動物品種、分組與飼養

採用之動物為雄性 apoE 缺陷小鼠 (apoE-deficient mice) (由 C57BL/6J 品系小鼠繁衍而得)，年齡為 7 週大時引進台北榮總動物房之 SPF (specific pathogen free) 環境中，其空氣經過除菌處理，並定時以紫外線照射與酒精噴灑之方式來維持環境內之清潔。明暗控制為固定照明時數 (AM 6:00-PM 6:00)，相對溼度控制在 50-70%，溫度為由中央空調系統控制在  $20\pm 2^\circ\text{C}$ 。飲水、飼料與鼠籠均經滅菌處理，人員進出 SPF 環境均需穿戴滅菌過之無塵衣、手套與口罩，並進行手腳之酒精消毒步驟。飼料與飲水之供給採自由攝食 (*ad libitum*)，每 3-4 天更換一次，鼠籠每星期更換一次，所有更換動作均需在 SPF 環境中之無菌操作台內進行。於第 15 週時淘汰體重過輕的動物，將 31 隻隨機分成以下四組，每籠飼養 3-4 隻動物：

- (1) 控制組 (Control) (7 隻)：Rodent chow diet (Purina 5010) + 0.15% (w/w) cholesterol
- (2) DPPD 組 (DPPD) (8 隻)：控制組飼料 + 0.5% (w/w) DPPD
- (3) 0.5% PET 組 (PET-1) (8 隻)：控制組飼料 + 0.5% (w/w) 普洱茶甲醇抽出物矽膠管柱層

析區分物 (PET-M1-C18 至  
PET-M1-C21 四個區分物)

- (4) 1.0% PET 組 (PET-2) (8 隻)：控制組飼料 + 1.0% (w/w) 普洱茶甲醇抽出物矽膠管柱層析區分物 (PET-M1-C18 至 PET-M1-C21 四個區分物)

飼養期為 8 週，於第 0、4 與 8 週時分別測量動物體重，第 8 週時進行犧牲採集血液、肝臟與動脈。

## 2. 飼料之配製

將 rodent chow diet 以磨粉機磨成粉末，取適量裝入滅菌袋中滅菌後備用。將普洱茶甲醇抽出物 (PET-M1) 又經矽膠管柱層析後所獲區分物 (合併 PET-M1-C18 至 PET-M1-C21) 濃縮液均勻撒於已知重量之飼料粉末上，於通風櫥內將溶劑完全揮發，秤重以計算所加入區分物之重量與佔飼料粉末中之比例。將含區分物之飼料帶入動物房中與新鮮之已滅菌飼料粉末進行混合備用，每次飼料之配製以 3-4 天一次為原則。

## 3. LDL 之分離

動物經犧牲後 (犧牲方法見(四)-6 節所述)，由心臟採得 0.5-1.0 mL 之血液，移入不加抗凝血劑之微量離心管中，於室溫下靜置凝血。全血經 3000 rpm (1200× g) 離心 15 min 後取得約 0.3-0.5 mL 之血清，於 4°C 下保存備用。因 apoE 缺陷小鼠之血清膽固醇濃度甚高，故在取得血清後即以 145 mM

之生理食鹽水進行等體積之稀釋，並保留部份未經稀釋的血清。取同組中每兩隻小鼠之等體積稀釋血清混合置入離心管中，以 145 mM 之生理食鹽水補滿體積至 6 mL，於 4°C 下進行超高速離心 (44k rpm (152000× g)、16 hr)。離心後吸取最上層 2 mL 呈乳白色的 VLDL 部份 ( $\rho < 1.019$  g/mL)，管內剩下的部份再加入 2 mL NaBr ( $\rho = 1.22$  g/mL)，於 4°C 下進行之超高速離心 (44k rpm (152000× g)、20 hr)。離心後吸取最上層 2 mL 淡乳白色之 LDL 部份 ( $\rho = 1.019-1.063$  g/mL)，充氮氣後於 4°C 下避光保存備用，保存期不超過 1 星期。

#### 4. 測定銅離子誘導 LDL 氧化之遲滯期 (lag phase)

取 800  $\mu$ L 未透析之 LDL 加入 200  $\mu$ L、50  $\mu$ M  $\text{Cu}^{2+}$  (使最後 LDL 中之膽固醇濃度為 50  $\mu$ g/mL)，充分混勻後立即檢測在 234 nm 下吸光值隨時間之變化情形，用以表示共軛雙烯之生成量，並可由此計算出誘導 LDL 氧化之遲滯期。遲滯期之定義為氧化曲線中之擴增期 (propagation phase) 切線 (通過曲線之反曲點) 與 X 軸之截距，以  $T_{\text{lag}}$  (min) 表示之。

#### 5. 檢測 LDL 中 $\alpha$ -tocopherol 的含量

依 Bui (1994) 所建立之 HPLC 法分析 LDL 中  $\alpha$ -tocopherol 之含量。首先將 retinol acetate 溶於無水乙醇中，使終濃度成為 2.5  $\mu$ M，此溶液稱為 RES，目的為提供 HPLC 定量之內標準 (internal standard) 並使 LDL 因乙醇而變性沈澱與釋出  $\alpha$ -tocopherol。取 200  $\mu$ L 已知膽固醇濃度之 LDL，加

入 200  $\mu\text{L}$  之 RES，混勻後以 1 mL 含 0.04% BHT (w/v) 之正己烷進行萃取，劇烈震盪至少 4 min。靜置分層或以 2000 $\times$  g、5 min 之低速離心後，吸取上清液 0.5 mL 置入洗淨之 3 mL 樣品瓶中，以氮氣吹乾（若非立即分析，則須吹乾後充入氮氣，於  $-70^{\circ}\text{C}$  下避光凍藏）。分析前以 mobile phase (acetonitrile : tetrahydrofuran = 7 : 3, v/v) 100  $\mu\text{L}$  回溶，HPLC 之分析條件如下：

(1) 標準對照溶液

含 2.5  $\mu\text{M}$  retinol acetate 及 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  之  $\pm\alpha$ -tocopherol

(2) HPLC 條件

(a) 管柱：

Reversed-phase column: 5C<sub>18</sub>-AR (4.6 $\times$  250 mm, 5- $\mu\text{m}$  particle size), Nacalai, Japan

Guard column: 10C<sub>18</sub> (4.6 $\times$  50 mm, 10- $\mu\text{m}$  particle size), Nacalai, Japan

(b) 移動相：

acetonitrile : tetrahydrofuran = 7 : 3 (v/v)

(c) 偵測器：

Diode-array detector (HP 1040M series II)

(d) 檢測波長：

採用兩波長，292 nm 偵測  $\alpha$ -tocopherol，326 nm 偵測

retinol acetate

(e) 流速：1 mL/min

(f) 時間：12 min

(g) 注射體積：20  $\mu$ L

### (3) 計算公式

假設每顆 LDL 中平均有 2000 個膽固醇，且已知 LDL-cholesterol 之濃度，則所取 200  $\mu$ L 之 LDL solution 中所含有的 LDL 顆粒數為：

$$\text{LDL } (\mu \text{ mole}) = \frac{[\text{LDL-Cholesterol}] (\mu\text{g}/\mu\text{L})}{\text{Mw} (\text{Cholesterol, g/mole})} \times \frac{1 \text{ mole}}{2000 \text{ mole}} \times 200 \mu\text{L}$$

由已知濃度的  $\alpha$ -tocopherol 標準品之層析圖，配合內標準品之層析圖，可換算在萃取時樣品之損失率（由標準溶液中內標準品之波峰面積與樣品中內標準品之波峰面積兩者比例可得）。由此損失率可換算出待測樣品之層析圖中實際波峰面積，由此可推算出 200  $\mu$ L LDL 溶液中含有之  $\alpha$ -tocopherol 的分子數為：

$$\alpha\text{-tocopherol } (\mu \text{ mole}) = \frac{A}{A_0} \times \frac{[E]_0 (\mu\text{g}/\mu\text{L})}{\text{Mw} (\alpha\text{-Tocopherol, g/mole})} \times \frac{100 \mu\text{L}}{20 \mu\text{L}} \times \frac{1 \text{ mL}}{0.5 \text{ mL}} \times 20 \mu\text{L}$$

其中 A 為待測樣品的波峰面積， $A_0$  為標準品的波峰面積， $[E]_0$  為標準品之濃度。

由上述兩式可整理得每個 LDL 中所含有之  $\alpha$ -tocopherol 之分子數為：

$$\alpha\text{-tocopherol/LDL (mole)} = \frac{A}{A_0} \times \frac{[E]_0 (\mu\text{g}/\mu\text{L})}{[\text{LDL-Cholesterol}] (\mu\text{g}/\mu\text{L})} \times \frac{\text{Mw(Cholesterol, g/mole)}}{\text{Mw}(\alpha\text{-Tocopherol, g/mole})} \times 2000$$

而帶入 cholesterol 與  $\alpha$ -tocopherol 之分子量 (分別為 386.66 g/mole 與 430.7 g/mole)，整理後可得下列公式：

$$\alpha\text{-tocopherol/LDL (mole)} = 1795 \times \frac{A}{A_0} \times \frac{[E]_0 (\mu\text{g}/\mu\text{L})}{[\text{LDL-Cholesterol}] (\mu\text{g}/\mu\text{L})}$$

#### (四)實驗動物之生化與病理分析

##### 1. LDL 之分離

全血與 LDL 之獲得方式均同 (三)-3 所述。

##### 2. 利用電泳檢測小鼠脂蛋白之分布

取 10  $\mu\text{L}$  稀釋過之小鼠血清與 10  $\mu\text{L}$  Sudan Black 混合染色 1.5 hr，其餘電泳操作方法如 (二)-2 節所述。

##### 3. 膽固醇濃度之測定

分別取 10  $\mu\text{L}$  稀釋過之小鼠血清、VLDL 與 LDL 測定膽固醇濃度，測定方法如 (二)-2 節所述。

#### 4. 三酸甘油酯濃度之測定 (McGowan *et al.*, 1983)

採用酵素法 (enzymatic GPO-PAP method)，以 Merck 公司生產之 triglyceride enzymatic kit 進行。其原理為以專一性之 lipase 將三酸甘油酯水解為甘油與脂肪酸，甘油再經過 glycerol kinase 與 glycerol-3-phosphate oxidase 催化生成過氧化氫，而由 peroxidase 催化可將  $H_2O_2$  與 4-aminoantipyrine 及 2-chlorophenol 反應產生紅色物質以呈色。以三酸甘油酯標準液 (200 mg/dL) 製作標準曲線，分別取 0、5、10、20、25  $\mu$ L 加入 1 mL 反應液 (依照 triglyceride 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。取稀釋過之小鼠血清 10  $\mu$ L 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三酸甘油酯濃度。

#### 5. 主動脈之截取

- (1) 動物經 12 小時之隔夜禁食後，由腹腔注射 0.1 mL 之 pentobarbitol (45 mg/mL) 使動物安樂死，若在犧牲期間動物因未立即死亡，則以裝有乙醚溼潤之棉花之離心管覆於動物頭部使其吸入大量乙醚而死亡。
- (2) 將動物固定於手術盤上後迅速剪開腹腔與胸腔，立即以針筒進行心臟採血以收集全血。小心撥開內臟，找到腸骼動脈分支處 (iliac bifurcation)，並判斷出白色之主動脈且可與下腔靜脈及結締組織作一區別。以鈍頭鑷子小心

沿腹主動脈 (abdominal aorta) 向橫膈 (diaphragm) 方向清除覆於動脈周圍之肌肉與結締組織，並將連接於主動脈之其他動脈分支 (如腎動脈) 扯斷，處理時若有出血而影響視野，則以紗布將血液擦拭乾淨。清理至橫膈時，將貼覆於脊柱上之胸主動脈 (thoracic aorta) 朝向心臟方向與脊柱分離，直至心臟附近時停止。

(3) 以鑷子將整段動脈小心挑起，並再仔細將黏附於動脈之結締組織除去，以剪刀將動脈連同心臟與一部份肺臟剪下，並由已留下約 1 mm 長度股動脈 (femoral artery) 之腸髂動脈分支處 (iliac bifurcation) 剪斷，放入 PBS (pH = 7.4) 中待處理。

(4) 於解剖顯微鏡下以尖嘴鑷子盡量移除主動脈周圍之結締組織與動脈外膜 (adventitia)，並小心勿在處理過程中因力道過大而將動脈扯斷。將心臟往遠離動脈方向拉，使主動脈弓 (aortic arch) 盡量露出，再以剪刀剪下心臟與肺臟後，將整段全長約 3.5-4.0 cm 之主動脈 (含主動脈弓) 分成五段，其中胸主動脈與腹主動脈各分成兩段。剪下之各段主動脈迅速放於含 4% paraformaldehyde 之 PBS 溶液 (pH = 7.4) 中進行組織固定，若因犧牲時間過長而未來得及處理動脈，則需將動脈浸在 PBS 中於 4°C 下冷藏待處理。

## 6. 主動脈弓粥狀硬化面積之測定

### (1) 動脈之包埋

將各段已將結締組織清理乾淨之動脈，依序由下列步驟進行石蠟包埋 (paraffin embedding)：

目的	使用藥品	進行時間
固定 (fixation)	4% paraformaldehyde (in PBS, pH 7.4)	1.5 hr× 2
脫水 (dehydration)	50% ethanolic solution	30 min× 2
	70% ethanolic solution	30 min
	80% ethanolic solution	30 min
	95% ethanolic solution	45 min× 2
	100% ethanol	50 min, 30 min× 2
透明化 (clearing)	xylene	10-30 sec
滲入 (infiltration)	xylene : paraffin = 1 : 1, 55-60°C	30 min× 2
包埋 (embedding)	paraffin, 55-60°C	60 min× 2

最後將已充分經石蠟滲入之動脈組織放入已倒滿融熔石蠟之約 1.5 cm<sup>3</sup> 小紙盒中待其冷卻凝固後備用。

## (2) 主動脈弓之切片

將包埋主動脈弓之石蠟塊修整為梯形，固定於塑膠塊上後以組織切片機進行切片，先調整為 40  $\mu\text{m}$  之切片厚度切至動脈出現，再調整為 5  $\mu\text{m}$  之切片厚度小心進行切片。主動脈弓長度約 1-2 mm，於連續 10 片切片後間隔 100-150  $\mu\text{m}$  後進行第二段之切片，如此重複將整段主動脈弓分為 10 段而共切得 100 片切片。切片以被切面朝上之方式小心放至 40-44 $^{\circ}\text{C}$  水浴鍋中進行展片，再以先經超音波震盪清洗並沾附 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  poly-L-lysine 水溶液之玻片撈起，每塊玻片上依序撈起各段之 2-3 片切片。玻片於 37 $^{\circ}\text{C}$  烘片機中烘片 30 min，最後存於保存盒中於 4 $^{\circ}\text{C}$  下保存備用。

## (3) 切片之染色

將分為十段之主動脈弓每段切片各取一片玻片進行染色，將玻片置於玻片架後依序放入已盛裝下列溶液之染色壺中：

- (a) 脫蠟：置於 xylene 中，每次 3 min，共兩次；
- (b) 水化：分別置於 100% 酒精、80% 酒精溶液兩次與清水中，每次 3 min；
- (c) 染色：置於 Mayer's hematoxylin 中 12 sec，須嚴格控制時間，否則後續水洗時間將拉長；
- (d) 水洗：將 hematoxylin 染色後之玻片置於流動水中水洗 1.5-2 hr，時間之長短由光學顯微鏡觀察控制，須洗至細胞質部份藍紫色變淡為止；

- (e) 複染色：利用 eosin 溶液進行細胞質之染色，時間為 120-150 sec，亦由光學顯微鏡觀察來控制；
- (f) 脫水：染色完成之玻片分別快速地通過 70% 酒精溶液、95% 酒精溶液、100% 酒精溶液兩次與 xylene 兩次；
- (g) 封片：迅速吸乾殘留在玻片上的 xylene，再滴上少許之 Entellan，小心蓋上蓋玻片後待其膠體凝固即可長期保存於室溫下。

#### (4) 形態觀察

將各組染色後之主動脈弓切片於光學顯微鏡下觀察病灶 (lesion) 之形態，藉以比較四組不同處理下之動物在動脈粥狀硬化過程中是否有增進 (progression) 或回復 (regression) 之現象。

#### (5) 動脈粥狀硬化面積之估算

面積之計算為利用電腦輔助影像面積分析系統 (LV-2 computer-assisted morphometric planimetry)，計算各切片病灶面積之大小。在螢幕中抓取到由光學顯微鏡傳來之畫面後，先以標準比例尺定義螢幕中所見物體之實際長度，以  $\mu\text{m}$  表示之。再將切片置於顯微鏡下計算病灶面積。計算時須有血管中層 (media) 與病灶兩者之面積，其面積大小以數值  $\times 10^3 \mu\text{m}^2$  表示之。將各組動物可觀察到病灶之面積數值相加後，除以該組動物的總切片數，即可得到該組動物於主動脈弓之動脈粥狀硬化病灶

平均面積。

## (五) 人體實驗

本普洱茶之人體實驗目的為觀察飲用茶 7 天後對脂蛋白代謝與抗氧化能力之改變情況，以評估普洱茶的離體抗氧化效果。

### 1. 受試者之選取

受試者(n=22)年齡介於 20 歲到 30 歲 (平均年齡為  $23.1 \pm 2.2$  歲)，遴選自台灣大學與陽明大學之健康成年男性志願者。Body mass index (BMI) 介於  $20 \text{ kg/m}^2$  到  $25 \text{ kg/m}^2$  之間 (平均值為  $21.9 \pm 1.2 \text{ kg/m}^2$ )，實驗前 3 天起至實驗結束為止均未服用任何維生素補充劑與足以影響實驗之藥物。此 22 名受試者均為血糖正常者 (空腹血糖  $< 100 \text{ mg/dL}$ ) 且空腹血清膽固醇  $< 240 \text{ mg/dL}$ 、空腹血清三酸甘油酯  $< 200 \text{ mg/dL}$ ；肝功能與腎功能均為正常；受試者中未有素食、抽煙與過量飲酒習慣者，並且建議其測試前與期間之運動量相近。

受試者在實驗前 3 天即開始穩定日常之飲食習慣，並給予實驗說明與飲食建議，並利用 24 小時飲食回憶法調查個人飲食習慣。實驗期間以維持個人正常飲食習慣為原則，但禁止飲用果汁與其他茶類，禁止以大量蔬果作為一餐之內容，或其他足以影響脂蛋白代謝之飲食 (如魚油)，日常食用量之蔬果、咖啡與可樂則不被限制。實驗期間生活作息正常，未有熬夜或過度運動之情況。

## 2. 實驗設計

受試者隨機分為兩組，其中普洱茶組 (PET) 有 16 人，綠茶組 (Green tea) 有 6 人，實驗期為 7 天，分別於第 0 天與第 7 天經 12-14 小時之隔夜禁食後，於上午 9:00 抽取靜脈血 15 mL 裝於不添加抗凝劑之塑膠離心管中。實驗期間每人每天飲用 1000 mL、2% (w/v) 之普洱茶或綠茶，一天內不限時間喝完，建議於三餐飯後及白天飲用，以避免受試者有胃部不適或失眠之困擾。

## 3. 茶葉沖泡與保存方式

茶湯沖泡方式為先將 50 g 普洱茶葉或綠茶葉以紗布包覆，浸於平均溫度為 97°C 之 1000 mL 熱水 5 min (沖泡時間結束時水溫約為 91°C)，泡成 5% (w/v) 之濃茶湯，再以冷蒸餾水稀釋為 2% (w/v) 後裝於透明寶特瓶中備用。每人領取 2-3 天份之茶湯後，被要求將非當天份之茶湯存於 4°C 冰箱中且盡量避光存放，以避免光線對茶中多元酚類化合物、色素與少量脂肪酸之破壞，而使其產生酸敗之現象。

## 4. LDL 之分離製備

經 12-14 hr 之隔夜禁食後，分別在實驗第 0 天與第 7 天於上午 9:00 抽取靜脈血 15 mL，置入 37°C 水浴中靜置 1.5 hr，再置入 4°C 冰箱中靜置 1 hr。於 4°C 下進行 1200× g 之低速離心 15 min 以取得血清，小心吸取 4 mL 血清分別置入超高速離心管中，再加入 145 mM 之生理食鹽水 2 mL，使總體積到達 6 mL。其餘分離流程均同 (二)-2 節所述。

## 5. 利用電泳檢測血清脂蛋白之分布

取 10  $\mu\text{L}$  各受試樣本第 0 天與第 7 天之血清，加入 10  $\mu\text{L}$  Sudan Black 混合染色 1.5 hr，其餘電泳操作方法均同節 (二)-2 所述。

## 6. 膽固醇與三酸甘油酯濃度之測定

將各受試樣本第 0 天與第 7 天之血清與超高速離心分離取得之 LDL 各取 10  $\mu\text{L}$ ，分別測定血清總膽固醇、血清三酸甘油酯與 LDL 膽固醇之濃度，其測定方法同 (二)-2 節所述。

## 7. HDL 膽固醇濃度之測定

測定方法為採用沈澱法 (Lopes-Virella *et al.*, 1977)，並配合酵素法 (enzymatic CHOD-PAP method)，以 Merck 公司生產之 cholesterol enzymatic kit 來測定膽固醇濃度。其原理為利用沈澱劑 (phosphotungstic acid + magnesium chloride) 將含 apoB 之脂蛋白沈澱，而留在上清液的部份即為視為 HDL，再利用膽固醇檢測試劑即可測得 HDL-cholesterol。測定方法為取 200  $\mu\text{L}$  血清加上 500  $\mu\text{L}$  沈澱劑，於室溫下混合均勻並反應 10 min 後，以 10000 rpm (9440 $\times$  g) 離心 5 min，取上清液 100  $\mu\text{L}$  加入 1 mL 之膽固醇檢測試劑反應液 (依照 cholesterol kit 之說明書配製)，室溫下混勻反應 10 min，於 500 nm 檢測其吸光值。HDL-cholesterol 之濃度為吸光值乘以係數 222，以 mg/dL 表示之。

## 8. 血清中部分生化值之檢測

為確定普洱沱茶與綠茶之飲用是否會對肝功能、腎功能造成急性損傷，本實驗採用乾式酵素法，以自動乾式化學分析儀進行分析，包括測定血尿素氮 (blood urea nitrogen; BUN)、肌酐酸 (creatinine; Cre)、丙胺酸轉胺 (alanine aminotransferase; ALT; SGPT) 與天門冬胺酸轉胺 (aspartate aminotransferase; AST; SGOT)，其測定方式為取各受試者第 0 天與第 7 天約 200  $\mu\text{L}$  之血清，以儀器配備之小塑膠管盛裝，在自動吸取 3  $\mu\text{L}$  血清滴至各檢測試紙後，經過酵素反應並呈色後由吸光值之判讀，約 5 min 即可讀取各生化值之數值。

#### 9. 測定銅離子誘導 LDL 氧化之遲滯期

取 800  $\mu\text{L}$  已知膽固醇濃度未透析之 LDL 加入 200  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  (使最後石英比色管中 LDL 膽固醇濃度為 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  濃度為 10  $\mu\text{M}$ )，充分混勻後立即檢測在 234 nm 下吸光值隨時間之變化情形，用以表示共軛雙烯之生成量，並由此計算出以銅離子誘導 LDL 氧化之遲滯期，遲滯期之長短以  $T_{\text{lag}}$  (min) 表示之。由氧化曲線並可求得氧化起始點與峰值兩者間吸光值之差值，此值以  $\Delta A_{234}$  來表示，可反應出 LDL 中多元不飽和脂肪酸之含量與其易被氧化之程度。

#### 10. 血清游離脂肪酸之分析

本實驗為採用 Noma 等人(1973) 提出並經 Demacker 等人(1982) 所修飾之方法。血清中之游離脂肪酸為與白蛋白 (albumin) 所結合而運送，當  $\text{pH} = 8.9$  時脂肪酸為帶負電荷，

故易與銅離子結合，再以有機溶劑萃取後加入呈色劑，即可測定 570 nm 下之吸光值而換算出游離脂肪酸之含量。所用之試劑配方如下：

(1) 萃取液：

chloroform : n-heptane : methanol = 28 : 21 : 1 (v/v/v)

(2) 銅反應液

sodium citrate dihydrate      0.75 g

triethanolamine                6.71 g

copper (II) nitrate trihydrate   3.25 g

sodium chloride                 25 g

以上各試藥混合後再加二次水至體積為 100 mL，以 NaOH 調整 pH 至 8.9，4°C 避光儲存可保存 6 個月。

(3) 呈色劑

取 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol (TAN) 10 mg 溶於 100 mL 無水乙醇中，於室溫下避光隔夜攪拌至全溶，於 4°C 下避光儲存可保存 3-4 星期。

(4) 標準品

將 margaric acid (C<sub>17:0</sub>; 分子量 270.5 g/mole) 溶於酒精中，配成 300 µg/mL 之儲存液保存於 4°C。使用時分別取 0、10、25、50、75、100 µL 製作標準曲線，由 570 nm 樣本之吸光值配合標準曲線可換算血清內游離脂肪酸之濃度 (以 µM 表示之)。

測定方法如下所述：

取 50  $\mu\text{L}$  之血清加入玻璃試管中 (10 $\times$  130 cm)，加入 0.5 mL 之銅反應液後混勻反應 5-10 min。再小心加入 2 mL 萃取液進行萃取，加入速度不可太快以避免蛋白質過度變性而包覆住脂肪酸使其無法抽出，以震盪器強烈 vortex 六次，每次約 10-20 sec。萃取完全後以 2000-3000 rpm (約 1200 $\times$  g) 低速離心 5-10 min，取上清液 1.0 mL 加入 0.5 mL 呈色劑，混勻後反應 5 min 即可測定 570 nm 下之吸光值。

計算公式：

$$\begin{aligned}\text{濃度 } (\mu\text{M}) &= \text{標準曲線換算之含量 } (\mu\text{g}) \times 2/50 \div 270.5 \times 10^6 \\ &= \text{標準曲線換算之含量 } (\mu\text{g}) \times 147.9\end{aligned}$$

#### 11. 檢測 LDL 中 $\alpha$ -tocopherol 的含量

測定方法請詳見 (三)-5 節所述

由每個 LDL 中所含  $\alpha$ -tocopherol 的數目，可反應經過普洱茶或綠茶之飲用後，是否會對 LDL 之氧化敏感性有改變的現象。

## (六)統計分析

數據均以平均值±標準差 (mean±S.D.)來表示，動物實驗部份以 unpaired Student's t-test 之統計方法比較各組之間之差異，若任兩組間統計值 *P*-value 小於 0.05，則視為該兩組具有顯著差異。人體實驗部份以 paired Student's t-test 之統計方法比較實驗期前後樣本個別之間之差異，若 *P*-value 小於 0.05，則視為具有顯著差異。

## 參、結果

### 一、普洱茶茶甲醇抽出物矽膠管柱層析

#### (一) 甲醇萃取之抽出率與管柱層析之回收率

以甲醇進行 24 hr 萃取之萃取率為 18.0%。甲醇抽出物 (PET-M1) 進行矽膠管柱層析，依區分物之極性大小可分為 31 個區分物，區分物之總回收率 (佔乾茶粉重之比例) 為 87.9%。

#### (二) PET-M1 區分物之矽膠薄層層析與 lovastatin 之初步鑑定

共收取 31 個區分物，扣除 PET-M1-C1~PET-M1-C3 純粹為正己烷之溶液外 (可由顏色與溶離體積判斷)，將剩下之 28 個區分物分為四組 (PET-M1-C4~PET-M1-C10, PET-M1-C10~PET-M1-C16, PET-M1-C16~PET-M1-C22, PET-M1-C22~PET-M1-C31)，再利用不同之移動相進行矽膠薄層層析，層析圖譜請參閱圖 3-1、圖 3-2、圖 3-3 與圖 3-4。由  $R_f$  值判斷在 PET-M1-C16 與 PET-M1-C17 具有類似 lovastatin 之化合物，由此資料作為之後動物實驗區分物選用之依據之一。

### 二、區分物清除 DPPH 自由基之能力

將各區分物以 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之濃度進行初步之清除 DPPH 自由基之檢驗，發現僅 PET-M1-C18~PET-M1-C23 具有 50% 以上之抑制效果，故針對此六個區分進行不同濃度之檢測 (圖 3-5)。普洱茶茶甲醇抽出物 (PET-M1)、各區分物、probucol 與 DPPD 清除自由基能力，若以

IC<sub>50</sub> (具有 50%抑制能力時之濃度) 表示時, 分別為 PET-M1 (6.0 μg/mL)、PET-M1-C18 (4.1 μg/mL)、PET-M1-C19 (2.8 μg/mL)、PET-M1-C20 (4.1 μg/mL)、PET-M1-C21 (4.9 μg/mL)、PET-M1-C22 (7.5 μg/mL)、PET-M1-C23 (10.7 μg/mL)、probucol (13.6 μg/mL) 與 DPPD (5.3 μg/mL)。PET-M1-C18~PET-M1-C21 清除自由基效果約為 probucol 之 2.8-4.8 倍, 顯示此四個區分具有極強之清除自由基能力。

### 三、區分物抑制銅離子誘導 LDL 氧化之效果

#### (一) 分離 LDL 之效果

由密度梯度超高速離心所分離之 LDL, 其是否有其他脂蛋白之摻雜可由膠體電泳之檢測得知。由圖 3-6 聚丙烯醯胺膠體電泳之結果, 可知由血清 (第一、五行) 可分離出三個區帶, 由上至下分別為 HDL、LDL 與 VLDL, 而由 VLDL (第二、六行) 則可見明顯之 VLDL 區帶與顏色甚淡之 LDL 區帶, 由 LDL (第三、四、七、八行) 則僅一個 LDL 之區帶。故以此密度梯度超高速離心所分離所得之 LDL ( $\rho = 1.019-1.063 \text{ g/mL}$ ), 因沒有其他脂蛋白之摻雜, 故可用於銅離子誘導 LDL 氧化之體外實驗。

#### (二) 區分物抑制銅離子誘導 LDL 氧化之 IC<sub>50</sub> 值

將各區分物以 10 μg/mL 之濃度進行初步抑制銅離子誘導 LDL 氧化之檢測, 發現僅 PET-M1-C17~PET-M1-C25 具有 50% 以上之抑制效果, 且針對 PET-M1-C17~PET-M1-C23 等七個區分做不同濃度之檢測 (圖 3-7)。PET-M1、區分物、probucol 與

DPPD 抑制銅離子誘導 LDL 氧化之  $IC_{50}$  值分別為 PET-M1 (3.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、PET-M1-C18 (2.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、PET-M1-C19 (2.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、PET-M1-C20 (3.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、PET-M1-C21 (2.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、PET-M1-C22 (5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、PET-M1-C23 (7.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、probucol (3.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 與 DPPD (2.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。由  $IC_{50}$  值來觀察，不論在清除 DPPH 自由基與抑制銅離子誘導 LDL 氧化之效果，皆以 PET-M1-C18~PET-M1-C21 為最強，而分別以各區分物濃度為 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  在銅離子誘導 LDL 氧化之抑制百分比對管柱層析之溶離體積作圖時，可得知在不同極性大小下普洱茶區分物抗氧化能力之分布情形 (請參閱圖 3-8)。

### (三) 區分物抑制銅離子誘導 LDL 氧化之相對抑制活性大小

以 probucol 在抑制銅離子誘導 LDL 氧化中之  $IC_{50}$  值當作 1.0 時，區分物與 probucol 之相對抑制活性請參閱表一。而以各區分物之活性單位 (activity unit) 來判斷，可發現區分物佔普洱茶甲醇抽出物之抑制活性百分比依序為 PET-M1-C17 (1.4%)、PET-M1-C18 (15.8%)、PET-M1-C19 (12.3%)、PET-M1-C20 (2.5%)、PET-M1-C21 (6.2%)、PET-M1-C22 (15.6%)、PET-M1-C23 (2.1%)，其結果請參閱圖 4-9。活性單位的計算方法為以各區分物之相對抑制活性乘以區分物在甲醇抽出物中之重量，單位以 g 來表示之。

由以上清除 DPPH 自由基能力與抑制銅離子誘導 LDL 氧化能力來判斷，並由矽膠薄層層析之結果，盡量避開含有類似 lovastatin 之區分，故選擇了 PET-M1-C18~PET-M1-C21 作為在

後續之動物實驗所餵食的普洱茶區分物。

#### 四、動物實驗

##### (一) 動物之生長狀況、體重變化與相對肝重

ApoE 缺陷小鼠之外觀請參閱圖 3-10。各組動物在 8 週之飼養期內生長狀況良好，無任何動物發病或死亡。在進食狀況方面，各組動物在開始飼養之第 1 週左右進食狀況均不佳，並沒有消耗預期所應進食之飼料量，但自第 2 週起，各組動物進食情況便開始正常。

各組動物體重增加正常，8 週內體重之變化情形請參閱圖 3-11，由第零週時 control 組  $24.3 \pm 1.5$  g、DPPD 組  $24.4 \pm 2.3$  g、PET-1 (0.5% PET) 組  $24.9 \pm 2.2$  g 與 PET-2 (1.0% PET) 組  $24.5 \pm 2.3$  g 增加到第 8 週時 control 組  $27.7 \pm 2.9$  g、DPPD 組  $28.3 \pm 3.0$  g、PET-1 組  $27.0 \pm 1.8$  g 與 PET-2 組  $29.3 \pm 1.8$  g，各組之間無統計上之差異 ( $P > 0.05$ )。

由肝臟之觀察，動物之脂肪肝情況並不嚴重，而由相對肝重值顯示時 (表 3-2)，四組動物在 8 週的餵食後並沒有顯著差異 ( $P > 0.05$ )，可初步判斷餵食普洱茶區分物並不會造成動物之生理毒性。

##### (二) 血清中脂蛋白之分布情形

圖 3-12 顯示各組動物在 8 週之餵食後其血清中各脂蛋白之分布情形，由圖可知，apoE 缺陷小鼠由於無法有效將 VLDL (大

部分為  $\beta$ -VLDL 之型態) 代謝為 LDL，故在  $\rho = 1.019-1.063$  g/mL 之範圍內脂蛋白為呈現一廣泛區帶。雖然小鼠為 HDL 型態之動物，但 apoE 缺陷小鼠脂蛋白之另一特色即為 HDL 濃度低，故在 HDL 之區帶其含量甚少。由膠體電泳圖可得知各組動物在 8 週的餵食後其脂蛋白的分布並無改變。

### (三) 血清中膽固醇、三酸甘油酯與脂蛋白膽固醇濃度之變化

血清膽固醇、VLDL-cholesterol ( $\rho < 1.019$  g/mL) 與 LDL-cholesterol ( $\rho = 1.019-1.063$  g/mL) 在四組動物間經 8 週餵食後均沒有顯著差異 ( $P > 0.05$ ) (請參閱表 3-3)，而在三酸甘油酯含量方面，四組動物分別為 control ( $93.1 \pm 23.6$  mg/dL)、DPPD ( $115.7 \pm 10.9$  mg/dL)、PET-1 ( $152.2 \pm 36.0$  mg/dL) 與 PET-2 ( $158.9 \pm 29.1$  mg/dL)，DPPD 組、PET-1 組與 PET-2 組均顯著高於 control 組 ( $P < 0.05$ )，而 PET-1 組與 PET-2 組兩組之間則沒有統計上之差異 ( $P > 0.05$ )。

### (四) 銅離子誘導 LDL 氧化之遲滯期 (lag phase)

將以密度梯度超高速離心所分離取得 LDL，調整 LDL-cholesterol 濃度至  $50 \mu\text{g/mL}$ ，再以終濃度為  $10 \mu\text{M}$  之  $\text{Cu}^{2+}$  來催化氧化反應，每隔 15 min 測其在 234 nm 下之吸光值，以畫出氧化曲線而求得氧化之遲滯期 ( $T_{\text{lag}}$ , min)。各組動物經 8 週餵食後之  $T_{\text{lag}}$  分別為 control ( $159.5 \pm 77.5$  min)、DPPD ( $163.2 \pm 50.7$  min)、PET-1 ( $126.4 \pm 37.0$  min) 與 PET-2 ( $118.1 \pm 23.3$  min) (請參閱圖 3-13、3-14、3-15、3-16、3-17 與表 3-4)，四組動物之  $T_{\text{lag}}$  並沒有統計上之差異，顯示普洱茶區分物之餵食

並無法有效抑制離體實驗中銅離子誘導 LDL 的氧化。

#### (五) LDL 中 $\alpha$ -tocopherol 之含量

圖 3-18 為  $\alpha$ -tocopherol 標準品與各組動物 LDL 中  $\alpha$ -tocopherol 之 HPLC 代表性圖譜，其含量請參閱表 3-4。結果顯示：僅餵予 1.0% PET (PET-2) 組其 LDL 內  $\alpha$ -tocopherol 含量 ( $13.4 \pm 2.2$  molecule/LDL) 顯著低於 control 組 ( $20.8 \pm 6.0$  molecule/LDL) ( $P = 0.036$ )，而其他各組則和 control 組沒有統計上之差別 ( $P > 0.05$ )。再利用  $\alpha$ -tocopherol 與  $T_{lag}$  進行作圖，發現兩者有極強之相關性 ( $r = 0.84, P < 0.0001$ ) (請參閱圖 3-19)，即表示當 LDL 所含之  $\alpha$ -tocopherol 數目多時，以銅離子誘導 LDL 氧化之遲滯期便會延長。

#### (六) 主動脈弓血管組織形態測量 (morphometric) 結果

四組動物在經過 8 週不同飼料之餵食後，其動脈橫斷面可在部份動物觀察到動脈硬化病灶 (lesion) 之發生，初步觀察發現 PET-2 組之病灶面積最大，以高倍率觀察時其內部呈空泡狀 (即為泡細胞)；而其他三組雖亦有病灶之發生，但面積較小，高倍率觀察時空泡情況較少 (請參閱圖 3-20、3-21、3-22、3-23)。

#### (七) 主動脈弓病灶面積 (lesion area) 之測定結果

由於並非每隻小鼠均切得具有病灶之動脈切片，除 PET-2 組外，其他各組沒有動脈粥狀硬化表現的動物隻數分別為 control 組 1 隻、DPPD 組 3 隻與 PET-1 組 3 隻。故挑選各組具

有病灶之切片，將病灶面積相加後除以該組動物的切片總數，並計算該組動物發生病灶之切片數佔總切片數之比率，可得各組之 lesion area 與比率依序為：control 組 ( $7.0 \pm 13.2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) (26.7%)、DPPD 組 ( $4.8 \pm 12.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) (17.1%)、PET-1 組 ( $6.6 \pm 15.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) (20.0%) 與 PET-2 組 ( $13.4 \pm 22.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) (37.1%)，PET-2 組面積均顯著大於其他三組 ( $P < 0.05$ ) (請參閱圖 3-24)。

#### (八) 主動脈弓病灶面積與血管中層 (media) 之比值測定結果

將測定得到之病灶面積當作分子，血管中層面積 (media area) 當作分母，可求得一比值。各組 (lesion area/media area) ratio 依序為：control 組 ( $0.05 \pm 0.10$ )、DPPD 組 ( $0.02 \pm 0.06$ )、PET-1 組 ( $0.04 \pm 0.11$ ) 與 PET-2 組 ( $0.05 \pm 0.08$ )，各組之間沒有統計上之差異 ( $P > 0.05$ ) (請參閱圖 3-25)。

## 五、人體實驗

### (一) 受試者狀況

經過 7 天之普洱沱茶與綠茶之飲用，受試者之體重與健康狀況並無明顯改變，部份受試者表示有輕微失眠之現象發生。因飲用之濃度高，亦有受試者表示有時有心悸之情況，但這些現象應不至於嚴重影響實驗結果。

### (二) 血清中脂蛋白之分布情形

圖 3-26 顯示普洱沱茶 (PET) 組在飲用前後血清中脂蛋白

分布之情形，由圖中各區帶之顏色初步判斷，7 天之普洱茶飲用並不會造成各脂蛋白在含量上之改變，對其氧化破壞之程度 (由 LDL 之泳動位置判斷) 亦沒有影響，表示 LDL 內 apoB 之被修飾程度與脂肪酸之組成應沒有太大之更動。

### (三) 血液生化值之檢測

表 3-5 與表 3-6 為顯示普洱茶與綠茶飲用前後部份血液生化值之改變情況，包括部份肝功能 (ALT 與 AST) 與腎功能 (BUN 與 Cre) 之參數。由表可知，經過 7 天 2% 之茶飲用並不會造成以上各數值之顯著差異 ( $P>0.3$ )。

### (四) 血清中膽固醇、三酸甘油酯與脂蛋白膽固醇濃度之變化

在 7 天之飲用後，血清膽固醇、LDL 膽固醇與 HDL 膽固醇濃度不論在普洱茶或綠茶組中均沒有顯著的改變 ( $P>0.05$ ) (請參閱表 3-7 與表 3-8)，而在血清三酸甘油酯方面，飲用普洱茶或綠茶前後均未達統計上有意義的改變 ( $P>0.05$ )。

### (五) 銅離子誘導 LDL 氧化之遲滯期

圖 3-27 與圖 3-28 為顯示部份普洱茶組受試者在飲用 7 天前後，LDL 在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯之生成情形，可發現飲用 7 天後其氧化曲線的遲滯期均有延長之情形。而由實際測量遲滯期之長短則發現，普洱茶組第 0 天時為  $113.6\pm 31.1$  min，第 7 天時顯著延長為  $134.7\pm 30.3$  min ( $P = 0.011$ )，延長比率為 18.6% (請參閱表 3-9)；但綠茶組並沒有在飲用後延長遲滯期 (day 0,  $106.6\pm 20.9$  min；day 7,  $105.4\pm 15.4$  min) (請參閱表 3-10)。

再由 234 nm 下吸光值之觀察，不論普洱沱茶組或綠茶組飲用 7 天後其  $\Delta A_{234\text{nm}}$  均未達到統計上顯著之改變 ( $P = 0.13$  與  $P = 0.24$ )。

#### (六) 血清游離脂肪酸之分析

由表 3-7 與表 3-8 可得知，血清游離脂肪酸含量在普洱沱茶組第 0 天 ( $406.6 \pm 207.8 \mu\text{M}$ )、第 7 天 ( $387.9 \pm 213.8 \mu\text{M}$ ) 與綠茶組第 0 天 ( $346.4 \pm 235.6 \mu\text{M}$ )、第 7 天 ( $291.8 \pm 110.8 \mu\text{M}$ ) 都沒有統計上之差異 ( $P > 0.05$ )。禁食動物血液中之游離脂肪酸主要是來自於脂肪組織之釋放，而血液中三酸甘油酯主要是來自於肝臟包裝所釋放出之 VLDL，由兩者之相關性可反應普洱沱茶飲用後是否會對脂肪之代謝造成影響。圖 3-29 顯示飲用普洱沱茶前後血清游離脂肪酸改變量與血清三酸甘油酯改變量之相關性圖，可知在本實驗中此兩項參數，有顯著之負相關性 ( $r = -0.69$ ,  $P = 0.0029$ )，即表示在飲用普洱沱茶與綠茶 7 天後，當血液中游離脂肪酸下降時，肝臟合成 VLDL 速率即上升 (血液中三酸甘油酯主要來自於 VLDL)，顯示脂肪組織的脂解作用 (lipolysis) 可能受到抑制。

#### (七) LDL 中 $\alpha$ -tocopherol 之含量

圖 3-30 為  $\alpha$ -tocopherol 標準品與人類 LDL 中  $\alpha$ -tocopherol 之 HPLC 代表性圖譜，其含量請參閱表 3-9 與表 3-10。結果顯示：普洱沱茶組  $\alpha$ -tocopherol 含量由第 0 天的  $8.7 \pm 1.6$  molecule/LDL 顯著增加為第 7 天的  $10.1 \pm 2.1$  molecule/LDL ( $P = 0.0004$ )；綠茶組則由第 0 天的  $8.2 \pm 2.4$  molecule/LDL 顯著增加為第 7 天的

9.9±2.8 molecule/ LDL ( $P = 0.047$ )。再以第 0 天與第 7 天時  $T_{lag}$  與  $\alpha$ -tocopherol 含量之改變量作一相關性圖，請參閱圖 3-31，顯示當 LDL 中  $\alpha$ -tocopherol 之含量增加時， $\Delta T_{lag}$  便有延長時之趨勢，但兩者並沒有強烈之正相關 ( $r = 0.31, P = 0.16$ )。

表 3-1. 普洱沱茶甲醇抽出物矽膠管柱層析區分物抑制銅離子誘導低密度脂  
 蛋白氧化之活性

Table 3-1. Inhibitory activities of Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation of fractions isolated from Pu-Erh-Tou tea methanolic extracts (PET-M1) by using silica gel column chromatography.

	IC <sub>50</sub> of LDL oxidation (µg/mL)	Relative activity	Weight in PET-M1 (g)	Activity unit (g)	Percentage in total activity (%)
Probucol	3.4	1.0	-	-	-
DPPD	2.1	1.6	-	-	-
PET-M1	3.6	0.9	54.0	48.6	100.0
PET-M1-C17	4.9	0.7	1.0	0.7	1.4
PET-M1-C18	2.4	1.4	5.5	7.7	15.8
PET-M1-C19	2.4	1.4	4.3	6.0	12.3
PET-M1-C20	3.0	1.1	1.1	1.2	2.5
PET-M1-C21	2.7	1.3	2.3	3.0	6.2
PET-M1-C22	5.0	0.7	10.9	7.6	15.6
PET-M1-C23	7.0	0.5	1.9	1.0	2.1

1. PET-M1-C17 to PET-M1-C23: fractions isolated from PET-M1 by using silica gel column chromatography.
2. The relative activity of each fraction was expressed as IC<sub>50</sub> value of probucol / IC<sub>50</sub> value of compound. For a fraction exhibiting equal inhibitory activity as probucol in Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation, its relative activity was set as 1.0.
3. Activity unit was defined as the amount of material needed to cause 50% inhibition in the Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation. The value of each fraction was expressed as weight in PET-M1 × relative activity.
4. Percentage of activity was defined as the activity unit of each fraction/ activity of PET-M1 × 100

表 3-2. 餵以不同飼料 8 週後之 apoE 缺陷小鼠體重、肝重與相對肝重

Table 3-2. Body and liver weights of apoE-deficient mice after a 8 week feeding period.

	Control (n=7)	DPPD (n=8)	PET-1 (n=8)	PET-2 (n=8)
Body weight (g) After 8 weeks	27.7±2.9	28.3±3.0	27.0±1.8	29.3±1.8
Liver weight (g)	1.4±0.3	1.4±0.3	1.3±0.2	1.5±0.1
Liver wt/Body wt (g/100g)	5.1±1.0	5.0±0.5	5.0±0.4	5.0±0.1

1. Each value represents mean±S.D.

2. Data at the same row were not significantly different by using Student's t-test ( $P>0.05$ ).

3. Animals were fed for 8 weeks. Control, high cholesterol diet (0.15% cholesterol); DPPD, high cholesterol diet plus 0.5% DPPD; PET-1, high cholesterol diet plus 0.5% pooled PET-M1-C18 to PET-M1-C21; PET-2, high cholesterol diet plus 1.0% pooled PET-M1-C18 to PET-M1-C21.

表 3-3. ApoE 缺陷小鼠血清膽固醇與三酸甘油酯值及極低密度脂蛋白與低密度脂蛋白膽固醇含量

Table 3-3. Serum cholesterol and triacylglycerol levels and VLDL cholesterol, LDL cholesterol in apoE-deficient mice.

	Control (n=7)	DPPD (n=8)	PET-1 (n=8)	PET-2 (n=8)
	(mg/dL)			
Serum				
Cholesterol	726.0±194.0 <sup>a</sup>	763.2±142.6 <sup>a</sup>	761.3±53.5 <sup>a</sup>	760.8±121.3 <sup>a</sup>
Triacylglycerol	93.1±23.6 <sup>b</sup>	115.7±10.9 <sup>c</sup>	152.2±36.0 <sup>d</sup>	158.9±29.1 <sup>d</sup>
VLDL cholesterol	304.7±114.9 <sup>e</sup>	325.3±114.9 <sup>e</sup>	309.6±45.5 <sup>e</sup>	280.4±67.3 <sup>e</sup>
LDL cholesterol	287.5±58.6 <sup>f</sup>	288.4±58.6 <sup>f</sup>	286.9±24.3 <sup>f</sup>	292.8±49.5 <sup>f</sup>

1. Each value represents mean±S.D.
2. Data with the same superscripts in the same row were not significant different by Student's t-test ( $P>0.05$ ).
3. Animals were fed for 8 weeks. Control, high cholesterol diet (0.15% cholesterol); DPPD, high cholesterol diet plus 0.5% DPPD; PET-1, high cholesterol diet plus 0.5% pooled PET-M1-C18 to PET-M1-C21; PET-2, high cholesterol diet plus 1.0% pooled PET-M1-C18 to PET-M1-C21.

表 3-4. 餵以不同飼料 8 週後之 apoE 缺陷小鼠之銅離子誘導低密度脂蛋白  
氧化參數與生育酚含量

Table 3-4. Cu<sup>2+</sup>-induced parameters and  $\alpha$ -tocopherol content of LDL from apoE-deficient mice after a 8 week feeding period.

	Control (n=7)	DPPD (n=8)	PET-1 (n=8)	PET-2 (n=8)
T <sub>lag</sub> (min)	159.5±77.5 <sup>a</sup>	163.2±50.7 <sup>a</sup>	126.4±37.0 <sup>a</sup>	118.1±23.3 <sup>a</sup>
$\Delta A_{234nm}$	0.327±0.046 <sup>b</sup>	0.337±0.034 <sup>b</sup>	0.345±0.054 <sup>b</sup>	0.341±0.038 <sup>b</sup>
$\alpha$ -Tocopherol (molecule/LDL)	20.8±6.0 <sup>c</sup>	15.6±5.6 <sup>c</sup>	14.8±4.6 <sup>c</sup>	13.4±2.2 <sup>d</sup>

1. Values of each group were represented as mean±S.D.
2. T<sub>lag</sub> values were defined as the intercept of the tangent drawn to the steepest segment of the propagation phase to the horizontal axis of the Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation curve and expressed as min.
3. Data with the same superscripts in the same row were not significantly different by using Student's t-test.
4.  $\alpha$ -Tocopherol content in the PET-2 group was significantly lower than control group ( $P = 0.036$ ).
5. Animals were fed for 8 weeks. Control, high cholesterol diet (0.15% cholesterol); DPPD, high cholesterol diet plus 0.5% DPPD; PET-1, high cholesterol diet plus 0.5% pooled PET-M1-C18 to PET-M1-C21; PET-2, high cholesterol diet plus 1.0% pooled PET-M1-C18 to PET-M1-C21.

表 3-5. 普洱沱茶飲用前後血清肝功能與腎功能指數之變化

Table 3-5. Serum concentrations of ALT, AST, BUN and Cre from healthy subjects before and after Pu-Erh-Tou tea supplementation.

	PET (n=16)	
	day 0	day 7
ALT (U/L)	36.4±6.8	38.7±7.8
AST (U/L)	29.1±5.9	31.1±7.0
BUN (mg/dL)	12.8±2.5	13.1±2.2
Cre (mg/dL)	1.2±0.1	1.2±0.3

1. Each value was represented as mean±S.D.; all values were not significantly different on day 0 and day 7 by using paired Student's t-test ( $P>0.05$ ).
2. PET: 2% Pu-Erh-Tou tea hot water extracts.

表 3-6. 綠茶飲用前後血清肝功能與腎功能指數之變化

Table 3-6. Serum concentrations of ALT, AST, BUN and Cre from healthy subjects before and after green tea supplementation.

	Green tea (n=6)	
	day 0	day 7
ALT (U/L)	37.2±8.0	33.3±9.0
AST (U/L)	26.2±3.9	23.2±6.6
BUN (mg/dL)	16.8±2.9	16.0±2.0
Cre (mg/dL)	1.2±0.1	1.2±0.2

1. Each value was represented as mean±S.D.; all values were not significantly different on day 0 and day 7 by using paired Student's t-test ( $P>0.05$ ).
2. Green tea: 2% green tea hot water extracts.

表 3-7. 普洱沱茶飲用前後膽固醇、三酸甘油酯、與游離脂肪酸在血清、低密度脂蛋白與高密度脂蛋白的含量

Table 3-7. Serum total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and serum triacylglycerol levels from healthy subjects before and after Pu-Erh-Tou tea supplementation.

	PET (n=16)	
	day 0	day 7
Serum		
total cholesterol (mg/dL)	181.9±22.5	179.7±25.0
Triacylglycerol (mg/dL)	110.7±26.1	108.1±21.9
free fatty acids (μM)	406.6±207.8	387.9±213.8
LDL cholesterol (mg/dL)	98.2±16.8	96.7±17.8
HDL cholesterol (mg/dL)	48.7±9.5	49.7±7.8

1. Each value was represented as mean±S.D., all values were not significantly different at day 0 and day 7 by using paired Student's t-test ( $P>0.05$ ).
2. PET: 2% Pu-Erh-Tou tea hot water extracts.

表 3-8. 綠茶飲用前後膽固醇、三酸甘油酯、與游離脂肪酸在血清、低密度脂蛋白與高密度脂蛋白的含量

Table 3-8. Serum total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and serum triacylglycerol levels from healthy subjects before and after green tea supplementation.

	Green tea (n=6)	
	day 0	day 7
Serum		
total cholesterol (mg/dL)	172.2±22.8	171.3±23.6
Triacylglycerol (mg/dL)	108.6±32.9	128.8±38.5
free fatty acids ( $\mu$ M)	346.4±235.6	291.8±110.8
LDL cholesterol (mg/dL)	96.3±19.3	94.8±19.0
HDL cholesterol (mg/dL)	46.8±7.5	45.4±7.0

1. Each value was represented as mean±S.D; all values were not significantly different at day 0 and day 7 by using paired Student's t-test ( $P>0.05$ ).
2. Green tea: 2% green tea hot water extracts.

表 3-9. 普洱沱茶飲用前後銅離子誘導低密度脂蛋白氧化參數與生育酚含量

Table 3-9.  $\text{Cu}^{2+}$ -induced parameters and  $\alpha$ -tocopherol content of LDL from healthy subjects before and after Pu-Erh-Tou tea supplementation.

	PET (n=16)	
	day 0	day7
$T_{\text{lag}}$ (min)	113.6±31.1	134.7±30.3 <sup>a</sup>
$\Delta T_{\text{lag}}$ (min)	-	21.1±21.0
$\Delta A_{234\text{nm}}$	0.640±0.035	0.622±0.033
$\alpha$ -Tocopherol (molecule/LDL)	8.7±1.6	10.1±2.1 <sup>b</sup>

1. Values of each group were represented as mean±S.D.
2. Lag phase values ( $T_{\text{lag}}$ ) were measured by absorption at 234 nm and expressed as min.
3.  $\Delta T_{\text{lag}}$  value was presented as the value of lag phase on day 7 minus the value of lag phase on day 0.
4. Values with the a ( $P = 0.011$ ) and b ( $P = 0.0004$ ) at day 0 and day 7 were significantly different by using paired Student's t-test.

表 3-10. 綠茶飲用前後銅離子誘導低密度脂蛋白氧化參數與生育酚含量

Table 3-10. Cu<sup>2+</sup>-induced parameters and  $\alpha$ -tocopherol content of LDL from healthy subjects before and after green tea supplementation.

	Green tea (n=6)	
	day 0	day 7
T <sub>lag</sub> (min)	106.6±20.9	105.4±15.4
$\Delta$ T <sub>lag</sub> (min)	-	-1.2±24.8
$\Delta$ A <sub>234nm</sub>	0.688±0.051	0.655±0.039
$\alpha$ -Tocopherol (molecule/LDL)	8.2±2.4	9.9±2.8 <sup>a</sup>

1. Values of each group were represented as mean±S.D.
2. Lag phase values (T<sub>lag</sub>) were measured by absorption at 234 nm and expressed as min.
3.  $\Delta$  T<sub>lag</sub> value was presented as the value of lag phase on day 7 minus the value of lag phase on day 0.
4. Value with the a ( $P = 0.047$ ) at day 0 and day 7 was significantly different by using paired Student's t-test.

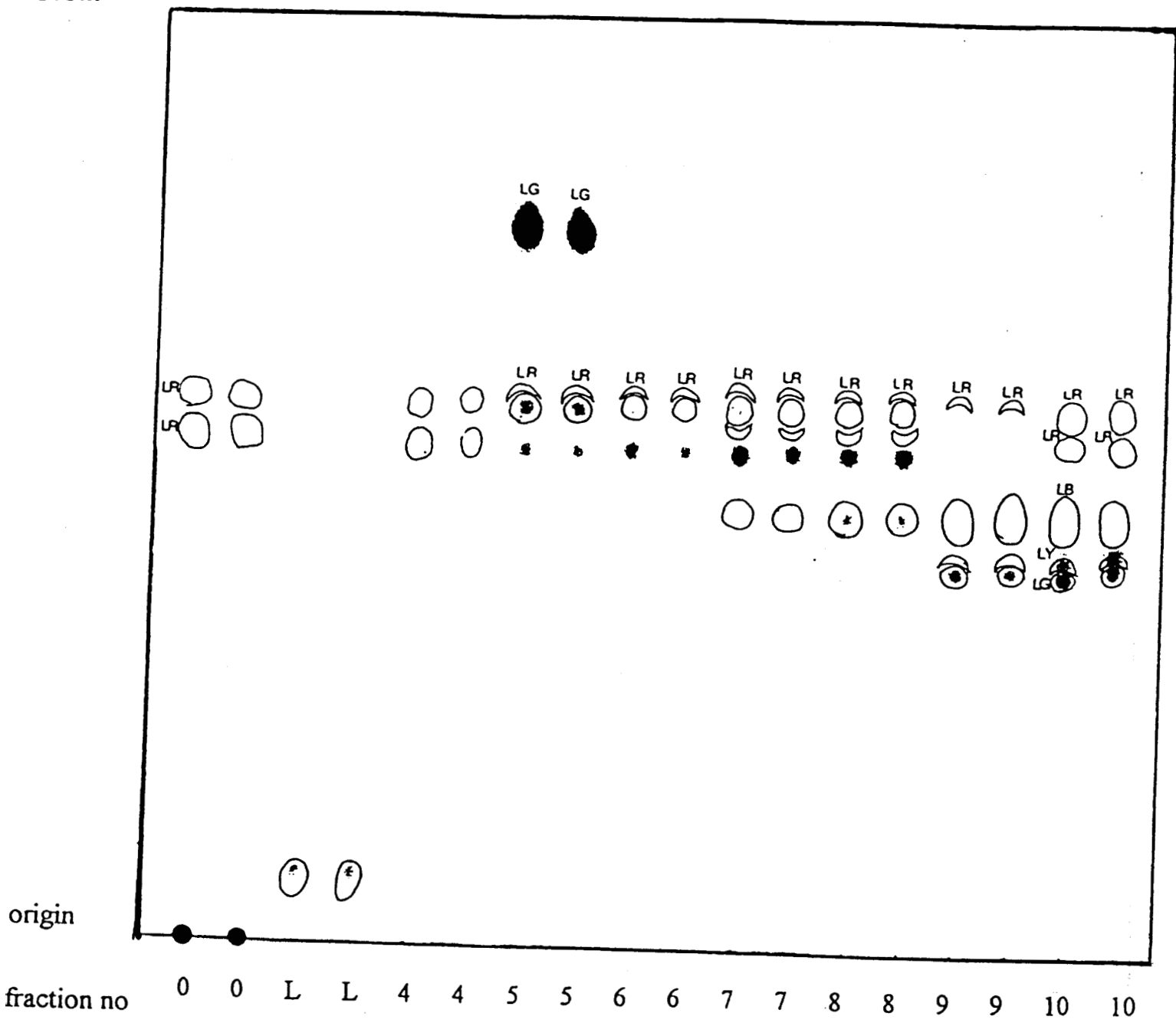


圖 4-1. 普洱沱茶甲醇抽出物與其矽膠管柱層析區分物之矽膠薄層層析

Fig. 4-1. Silica gel thin-layer chromatogram of methanolic extracts of Pu-Erh-Tou tea (PET-M1) and its fractions isolated from silica gel column chromatography. 0, PET-M1; L, lovastatin; 4-10, PET-M1-C4~PET-M1 C10. Adsorbent: silica gel 60; mobile phase: n-hexane: ethyl acetate=2: (v/v); Detection: UV (366nm) and iodine. LB, brown fluorescence; LR red fluorescence; LG, green fluorescence; LY, yellow fluorescence.

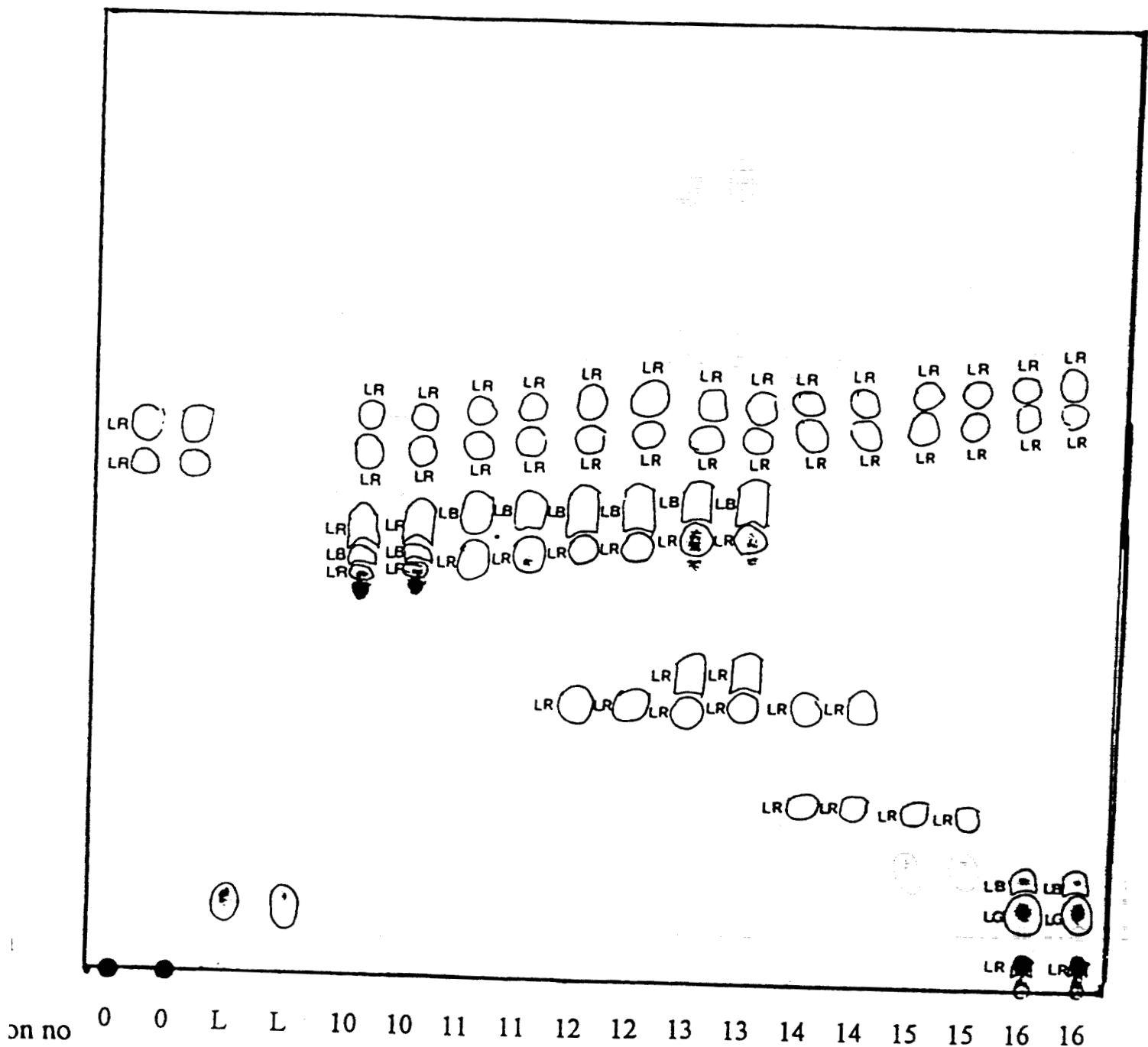


圖 4-2. 普洱沱茶甲醇抽出物與其矽膠管柱層析區分物之矽膠薄層層析

Fig. 4-2. Silica gel thin-layer chromatogram of methanolic extracts of Pu-Erh-Tou tea (PET-M1) and its fractions isolated from silica gel column chromatography. 0, PET-M1; L, lovastatin; 10-16, PET-M1-C10~PET-M1-C16. Adsorbent: silica gel 60; mobile phase: n-hexane: ethyl acetate=2:1 (v/v); Detection: UV (366nm) and iodine. LB, brown fluorescence; LR, red fluorescence; LG, green fluorescence.

Front

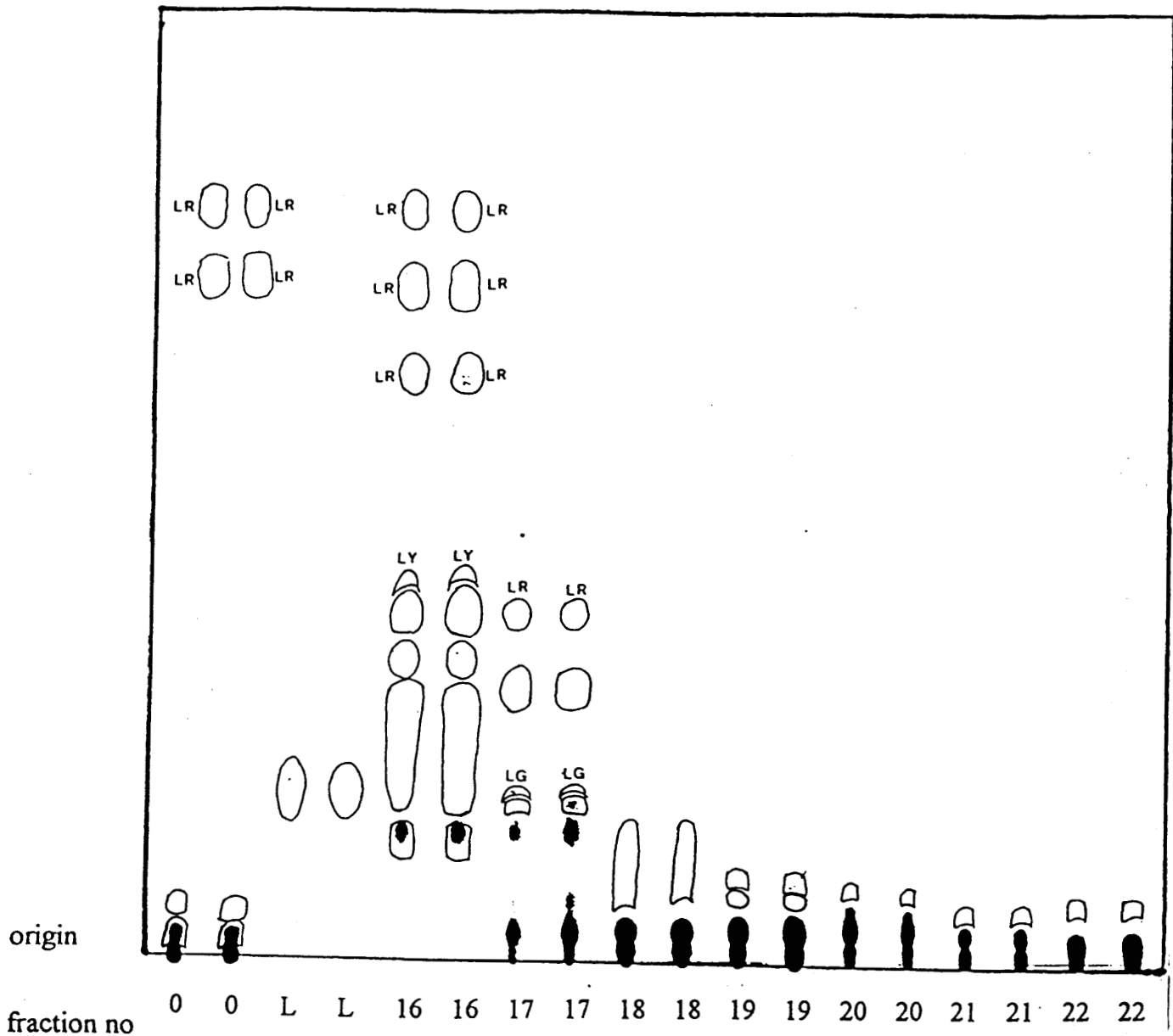


圖 4-3. 普洱沱茶甲醇抽出物與其矽膠管柱層析區分物之矽膠薄層層析

Fig. 4-3. Silica gel thin-layer chromatogram of methanolic extracts of Pu-Erh-Tou tea (PET-M1) and its fractions isolated from silica gel column chromatography. 0, PET-M1; L, lovastatin; 16-22, PET-M1-C16~PET-M1-C22. Adsorbent: silica gel 60; mobile phase: n-hexane: ethyl acetate=1:1 (v/v); Detection: UV (366nm) and iodine. LR, red fluorescence; LG, green fluorescence; LY, yellow fluorescence.

t

n

ion no 0 0 L L 22 22 23 23 24 24 25 25 26 26 27 27 28 28 29 29 30 30 31 31

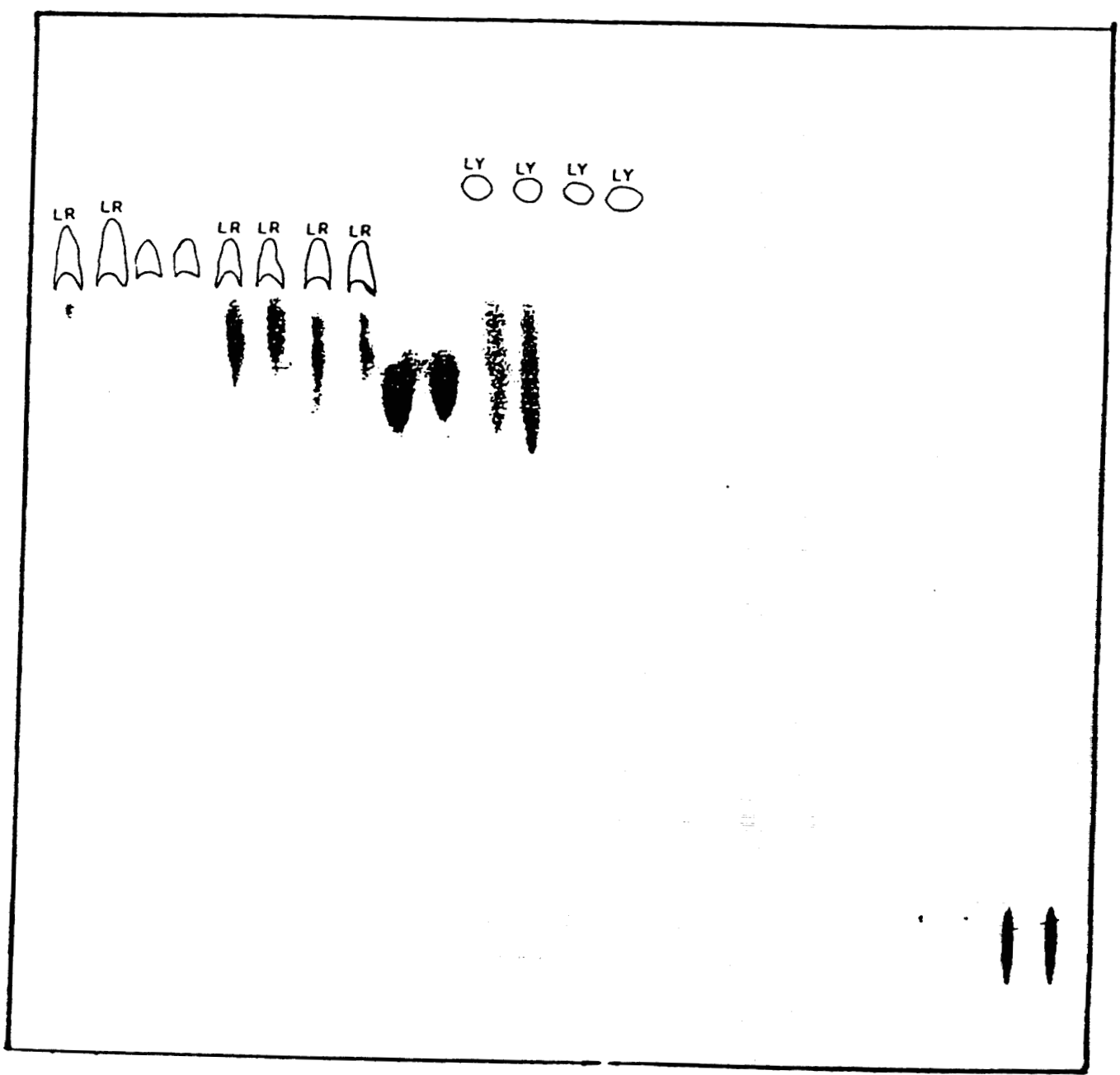


圖 4-4. 普洱沱茶甲醇抽出物與其矽膠管柱層析區分物之矽膠薄層層析

Fig. 4-4. Silica gel thin-layer chromatogram of methanolic extracts of Pu-Erh-Tou tea (PET-M1) and its fractions isolated from silica gel column chromatography. 0, PET-M1; L, lovastatin; 22-31, PET-M1-C22~PET-M1-C31. Adsorbent: silica gel 60; mobile phase: methanol; Detection: UV (366nm) and iodine. LR, red fluorescence; LY, yellow fluorescence.

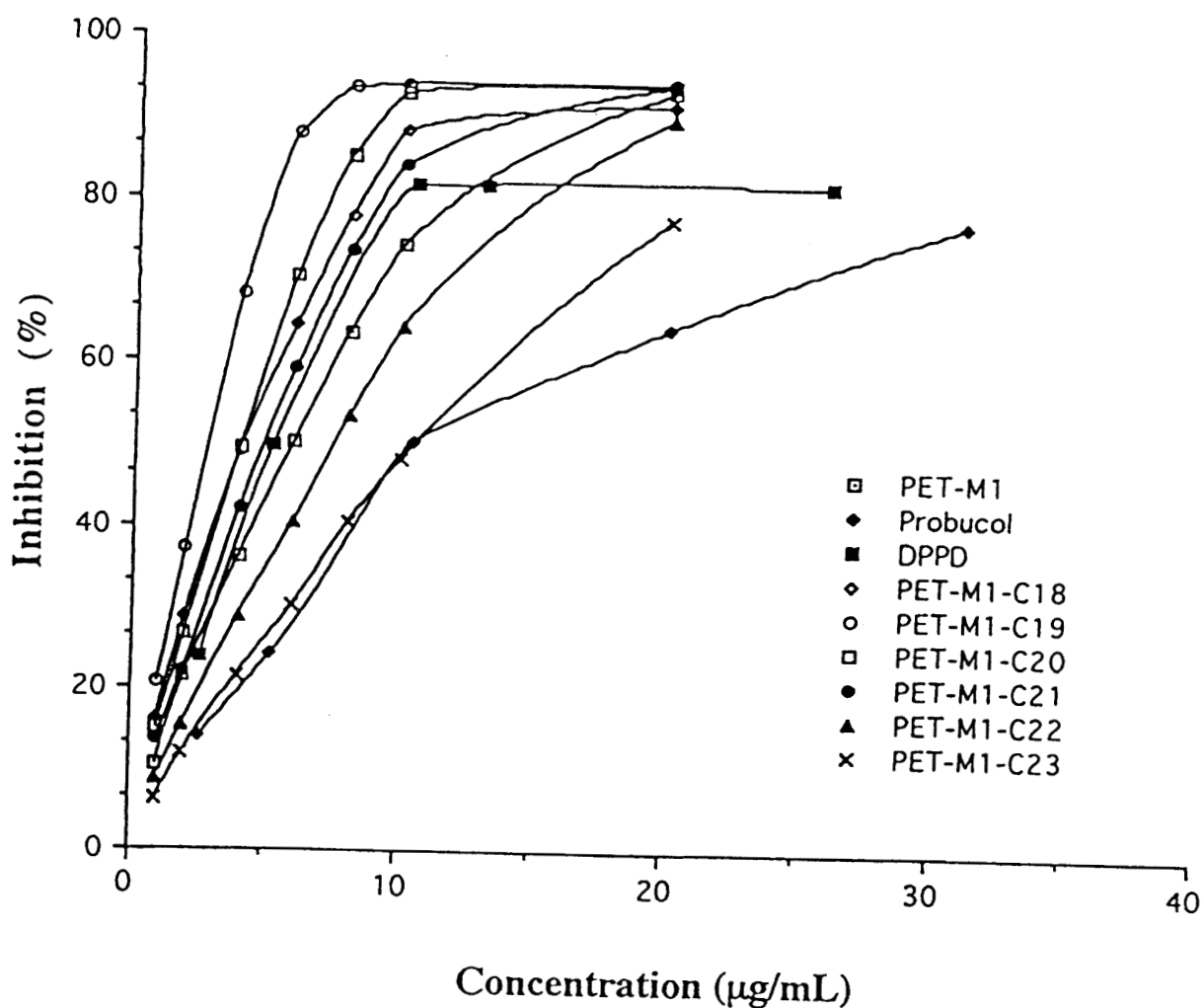


圖 4-5. 普洱沱茶甲醇抽出物矽膠管柱層析區分物清除 DPPH 自由基的效果  
 Fig. 4-5. DPPH radical scavenging activities of fractions obtained from Pu-Erh-Tou tea methanolic extracts (PET-M1) by using silica gel column chromatography.

The  $IC_{50}$  value was defined as the concentration of each compound needed to cause 50% inhibition in the DPPH scavenging system. The values were: PET-M1 (6.0  $\mu\text{g/mL}$ ), probucol (13.6  $\mu\text{g/mL}$ ), DPPD (5.3  $\mu\text{g/mL}$ ), PET-M1-C18 (4.1  $\mu\text{g/mL}$ ), PET-M1-C19 (2.8  $\mu\text{g/mL}$ ), PET-M1-C20 (4.1  $\mu\text{g/mL}$ ), PET-M1-C21 (4.9  $\mu\text{g/mL}$ ), PET-M1-C22 (7.5  $\mu\text{g/mL}$ ) and PET-M1-C23 (10.7  $\mu\text{g/mL}$ ). DPPD, N,N'-diphenyl 1,4-phenylenediamine.

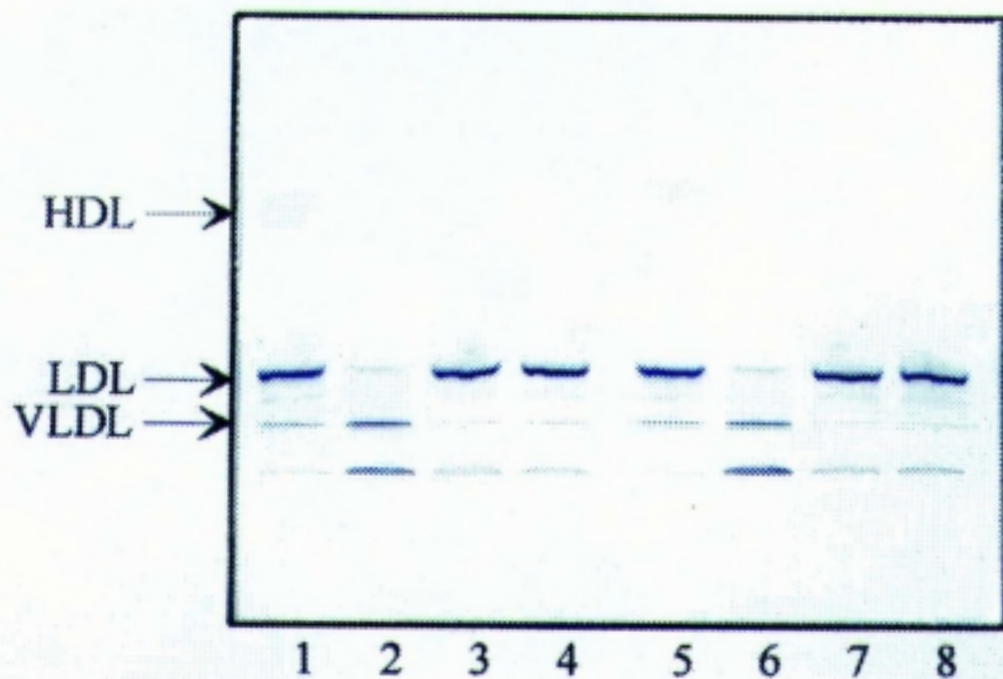


圖 3-6. 血清、極低密度脂蛋白與低密度脂蛋白之電泳圖

Fig. 3-6. The polyacrylamide gel electrophoresis of human serum, VLDL and LDL.

Lane 1&5: serum from healthy adult

Lane 2&6: human VLDL

Lane 3, 4, 7 and 8: human LDL

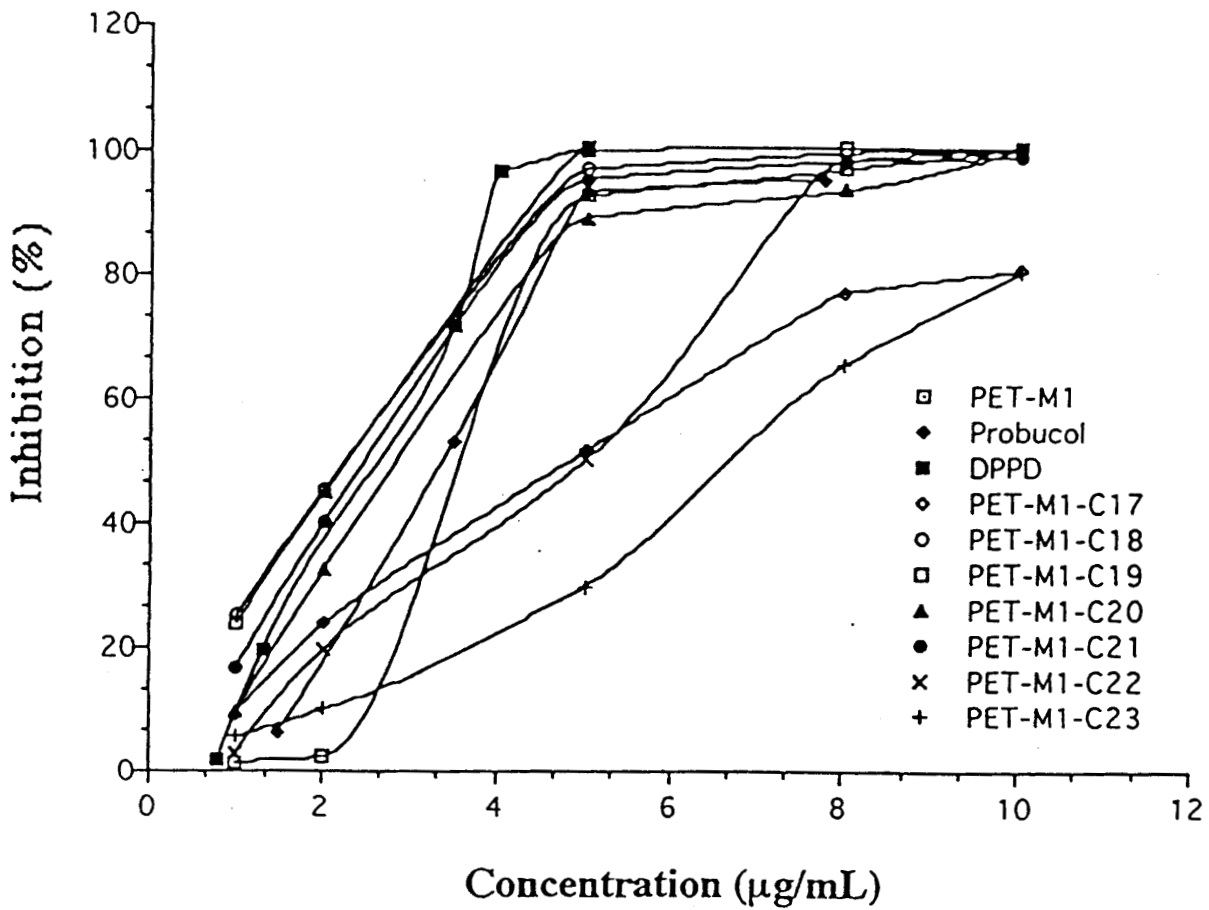


圖 4-7. 普洱沱茶甲醇抽出物矽膠管柱層析區分物抑制銅離子誘導低密度脂蛋白氧化的效果

Fig. 4-7. Inhibition of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation by fractions obtained from Pu-Erh-Tou tea methanolic extracts (PET-M1) by using silica gel column chromatography.

The  $\text{IC}_{50}$  value was defined as the concentration of each compound needed to cause 50% inhibition in the  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation. The values were: PET-M1 (3.6  $\mu\text{g/mL}$ ), probucoI (3.4  $\mu\text{g/mL}$ ), DPPD (2.1  $\mu\text{g/mL}$ ), PET-M1-C17 (4.9  $\mu\text{g/mL}$ ), PET-M1-C18 (2.4  $\mu\text{g/mL}$ ), PET-M1-C19 (2.4  $\mu\text{g/mL}$ ), PET-M1-C20 (3.0  $\mu\text{g/mL}$ ), PET-M1-C21 (2.7  $\mu\text{g/mL}$ ), PET-M1-C22 (5.0  $\mu\text{g/mL}$ ) and PET-M1-C23 (7.0  $\mu\text{g/mL}$ ). DPPD, N,N'-diphenyl 1,4-phenylenediamine.

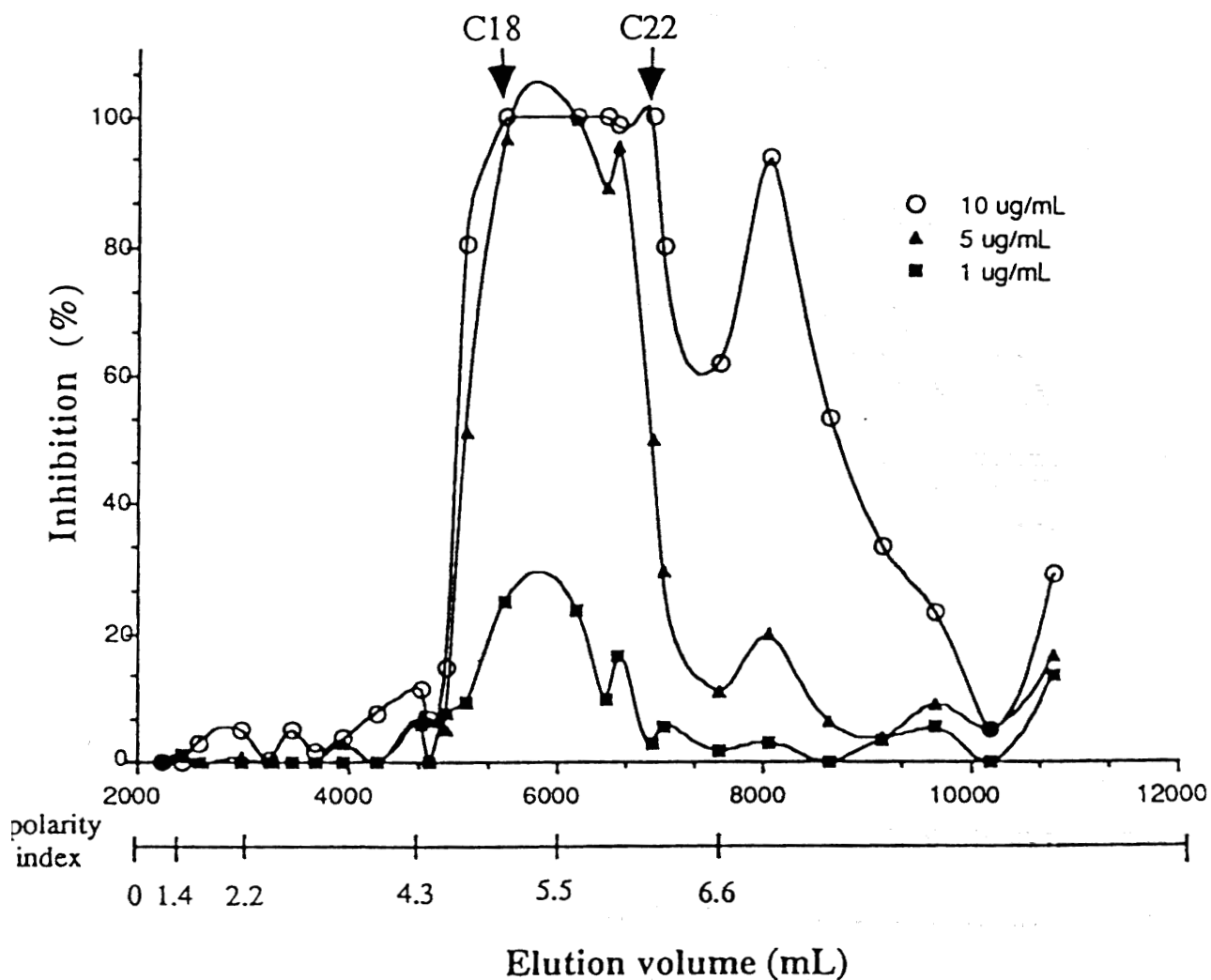


圖 4-8. 普洱沱茶甲醇抽出物矽膠管柱層析區分物的抑制活性曲線

Fig. 4-8. Inhibition of LDL oxidation by fractions of PET-M1 separated by silica gel column chromatography.

PET-M1, methanolic extract of Pu-Erh-Tou tea. Fractions were obtained by stepwise elution with n-hexane, ethyl acetate and methanol.

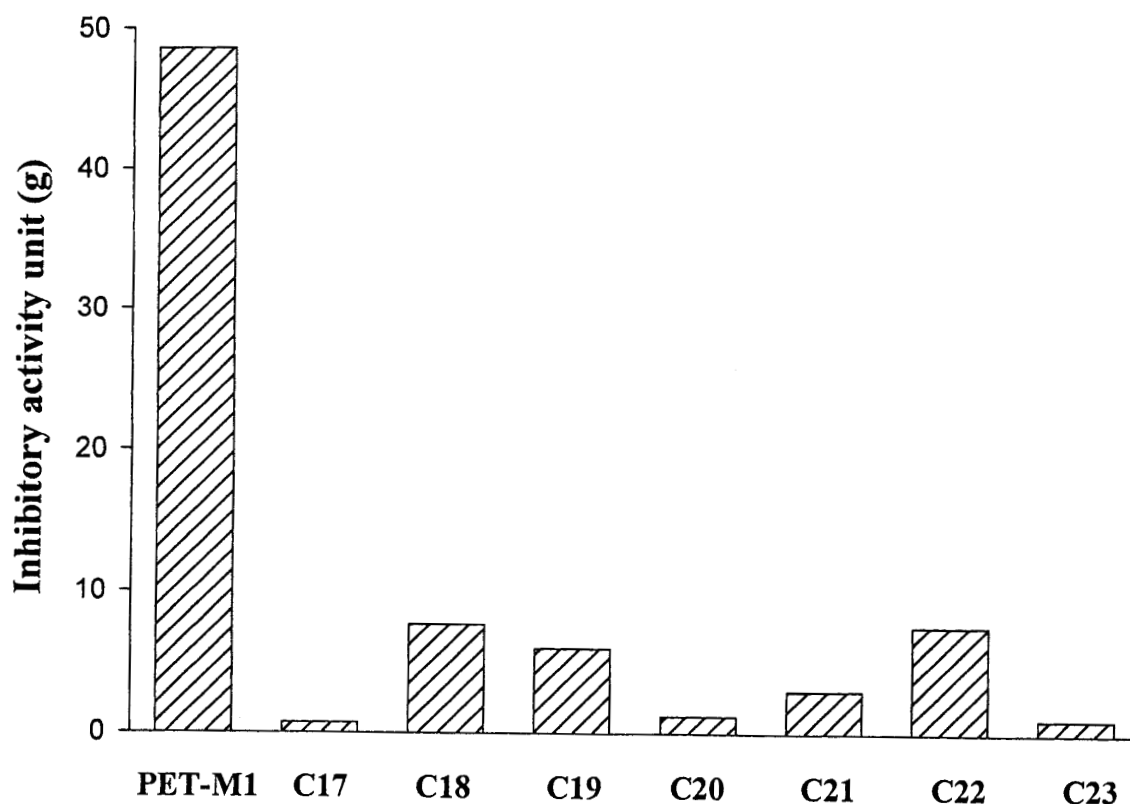


圖 3-9. 普洱沱茶區分物抑制銅離子誘導低密度脂蛋白氧化活性分布圖

Fig. 3-9. Distribution of inhibitory activities of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation by fractions PET-M1-C17 to PET-M1-C23.

The inhibitory activity unit was defined as the amount of materials needed to cause 50% inhibition in the *in vitro* assay of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation.



圖 3-10. ApoE 缺陷小鼠之外觀圖

Fig. 3-10. ApoE-deficient mice derived from C57BL/6J strain.

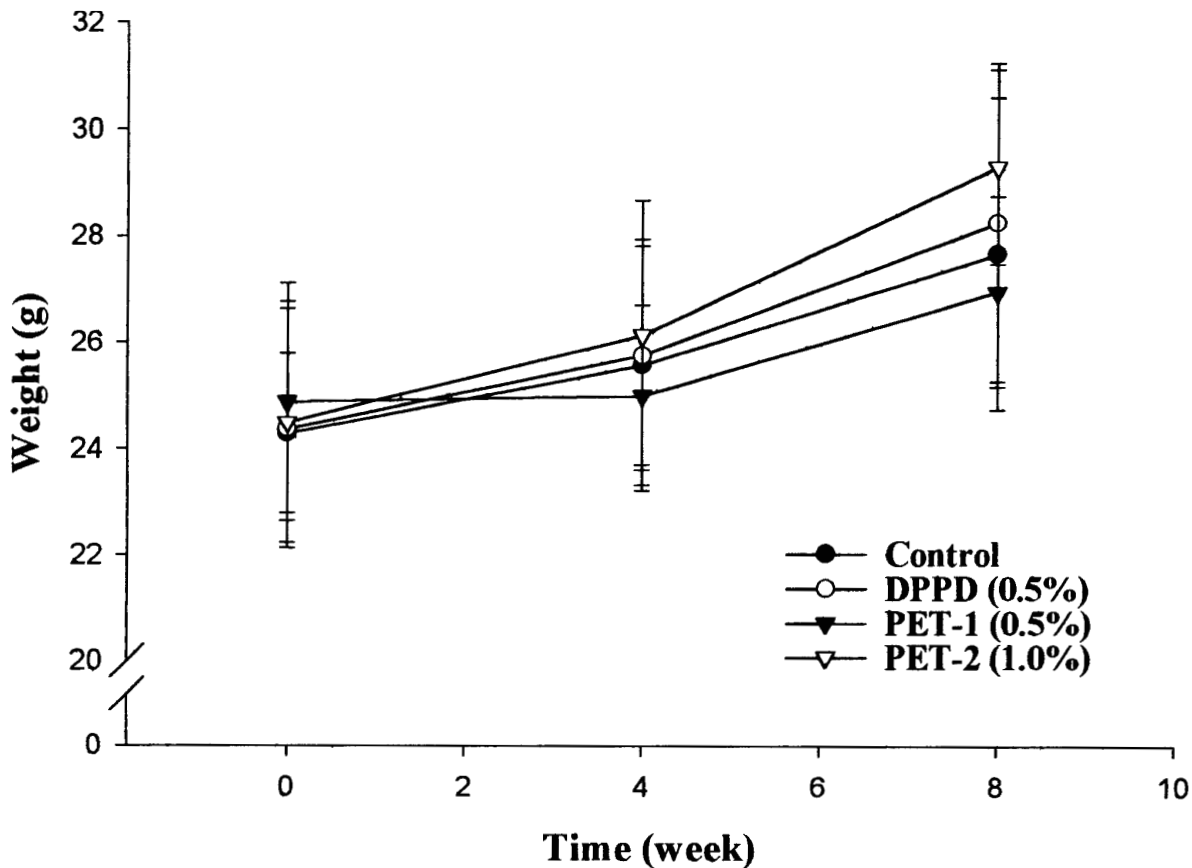


圖 3-11. 四組動物在 8 週實驗期體重之變化

Fig. 3-11. Growth curves of four animal groups in a 8 week feeding period. Body weight of control , DPPD, PET-1 and PET-2 animal groups were  $27.7 \pm 2.9$ ,  $28.3 \pm 3.0$ ,  $27.0 \pm 1.8$  and  $29.3 \pm 1.8$  g after 8 week feeding period, respectively. There were no significant differences between the groups by using Student's t-test.

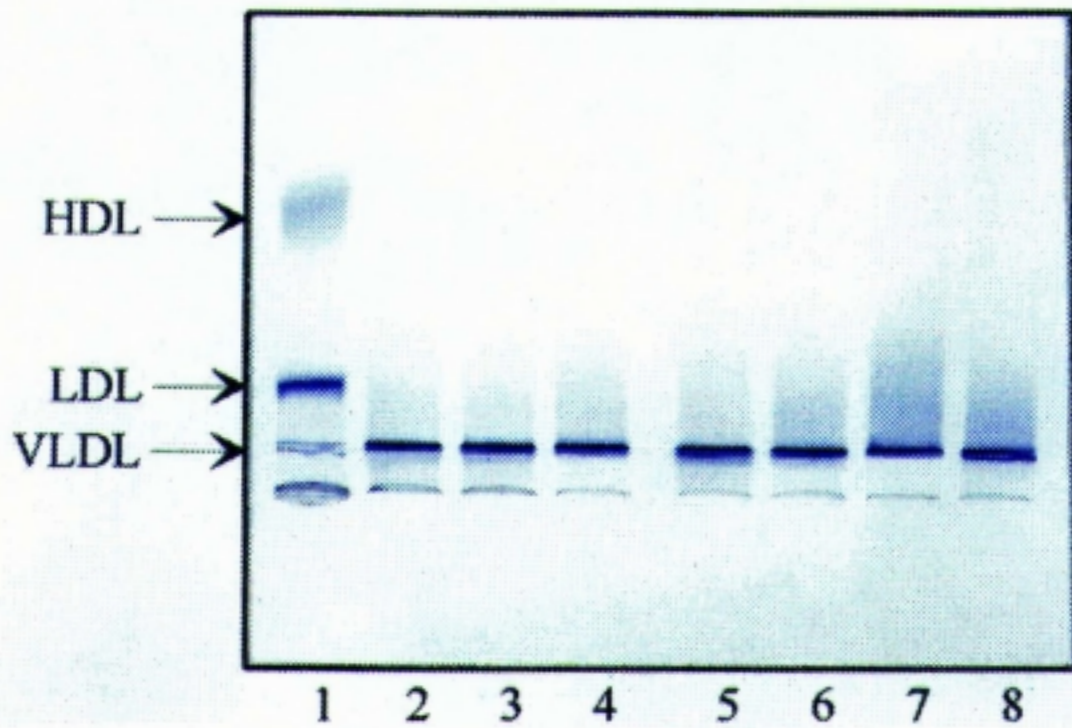


圖 3-12. ApoE 缺陷小鼠小鼠經過 8 週餵食後血清脂蛋白分布之電泳圖

Fig. 3-12. Distribution of serum lipoproteins from apoE-deficient mice after a 8 week feeding period.

Lane 1: human serum

Lane 2: CT

Lane 3&4: DPPD

Lane 5&6: PET-1

Lane 7&8: PET-2

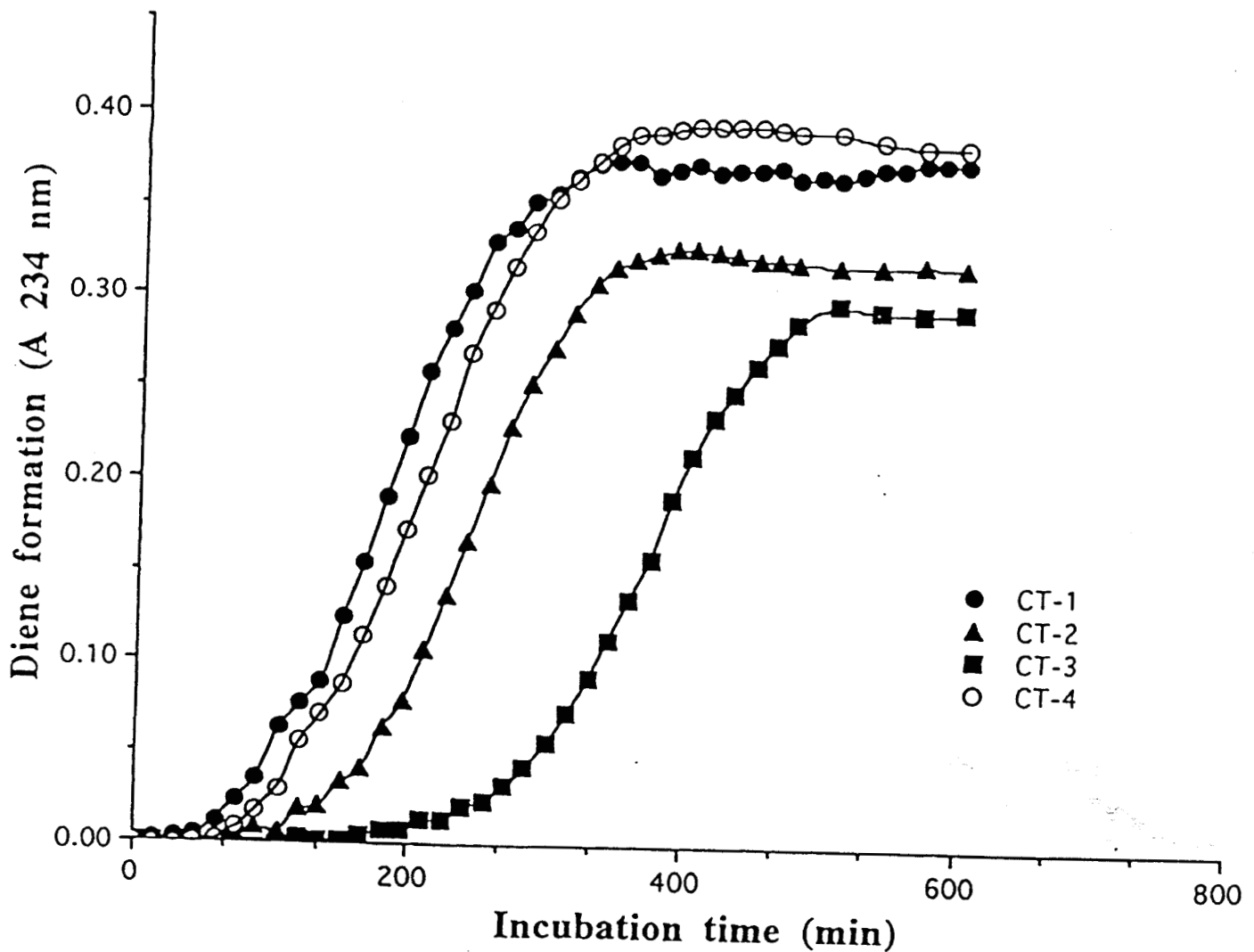


圖 4-13. 控制組 apoE 缺陷小鼠的低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形

Fig. 4-13. Time course of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced oxidation of LDL obtained from apoE-deficient mice fed with control diet.

Conjugated diene formation was measured at 234 nm. LDL ( $\rho = 1.019\text{-}1.063 \text{ g/mL}$ ) was isolated from pooled serum samples of one to two mice. The mean lag phase ( $T_{\text{lag}}$ ) was  $159.5 \pm 77.5 \text{ min}$ .

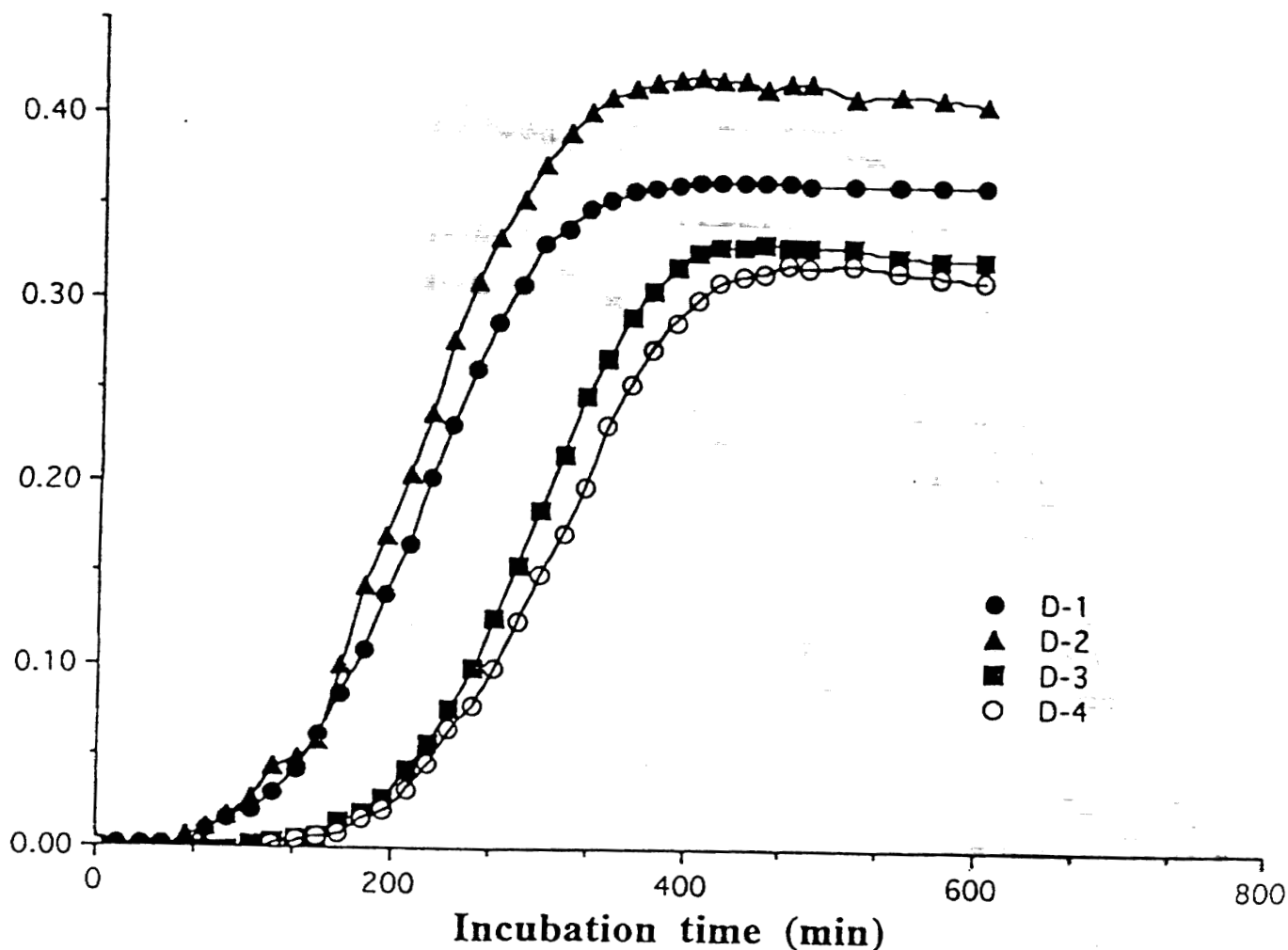


圖 4-14. 餵食 0.5% DPPD 組 apoE 缺陷小鼠的低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形

Fig. 4-14. Time course of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced oxidation of LDL obtained from apoE-deficient mice fed with 0.5% DPPD.

Conjugated diene formation was measured at 234 nm. LDL ( $\rho = 1.019\text{-}1.063 \text{ g/mL}$ ) was isolated from pooled serum samples of one to two mice. The mean lag phase ( $T_{\text{lag}}$ ) was  $163.2 \pm 50.7 \text{ min}$ .

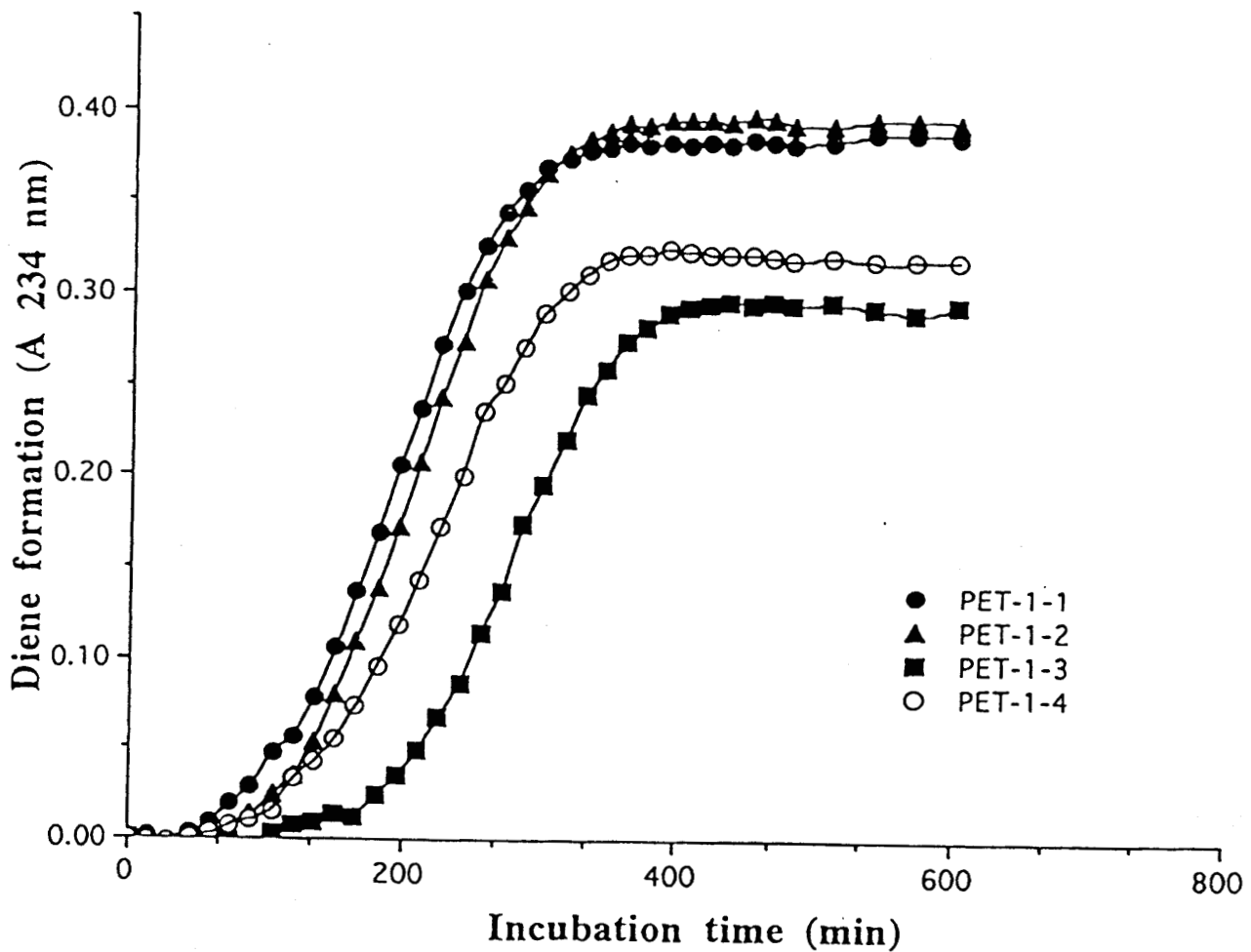


圖 4-15. 餵食 0.5% PET 組 apoE 缺陷小鼠的低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形

Fig. 4-15. Time course of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced oxidation of LDL obtained from apoE-deficient mice fed with 0.5% fractions of Pu-Erh-Tou tea.

Conjugated diene formation was measured at 234 nm. LDL ( $\rho = 1.019\text{-}1.063$  g/mL) was isolated from pooled serum samples of one to two mice. The mean lag phase ( $T_{\text{lag}}$ ) was  $126.4 \pm 37.0$  min.

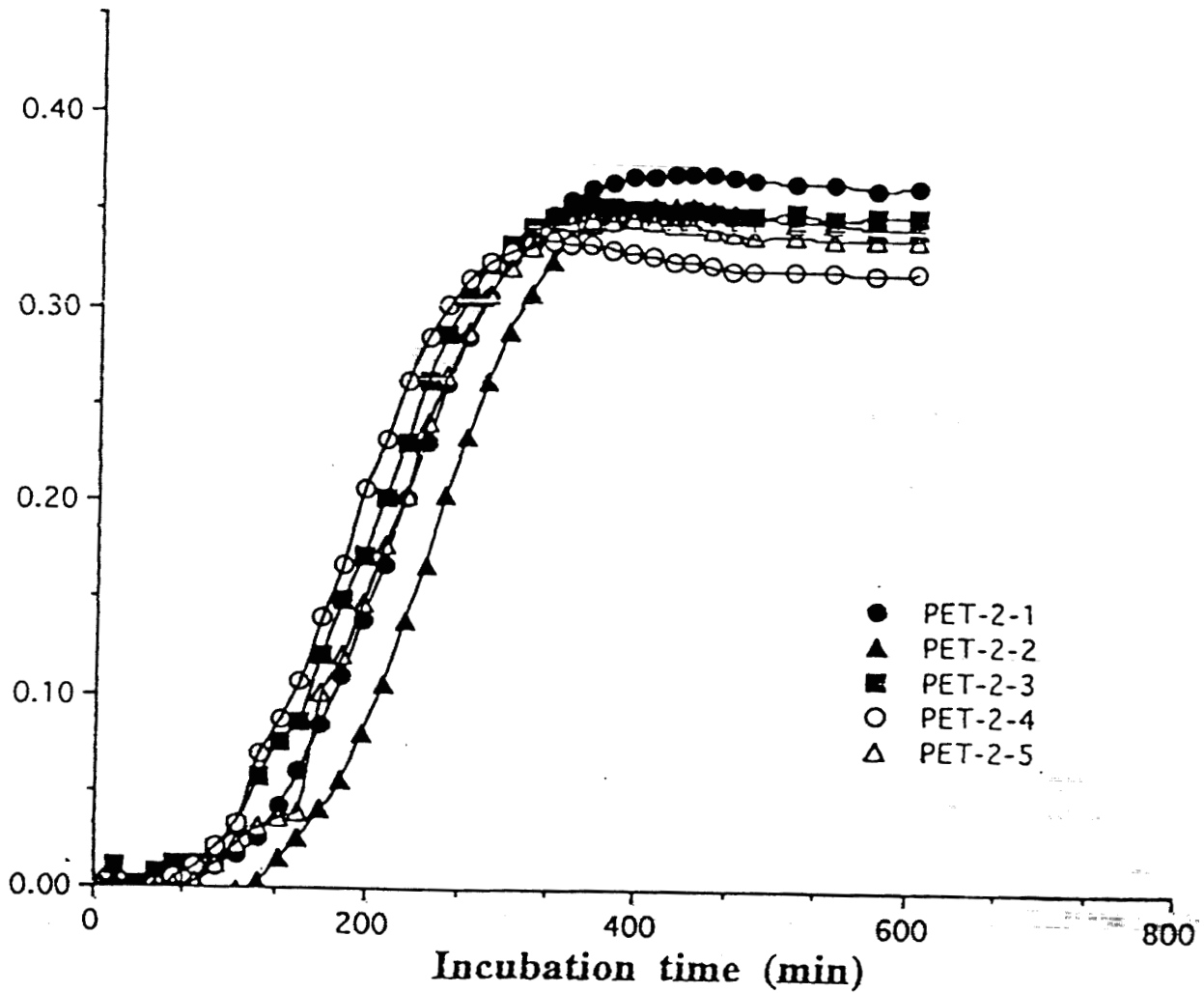


圖 4-16. 餵食 1.0% PET 組 apoE 缺陷小鼠的低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形

Fig. 4-16. Time course of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced oxidation of LDL obtained from apoE-deficient mice fed with 1.0% fractions of Pu-Erh-Tou tea.

Conjugated diene formation was measured at 234 nm. LDL ( $\rho = 1.019\text{-}1.063 \text{ g/mL}$ ) was isolated from pooled serum samples of one to two mice. The mean lag phase ( $T_{\text{lag}}$ ) was  $118.1 \pm 23.3 \text{ min}$ .

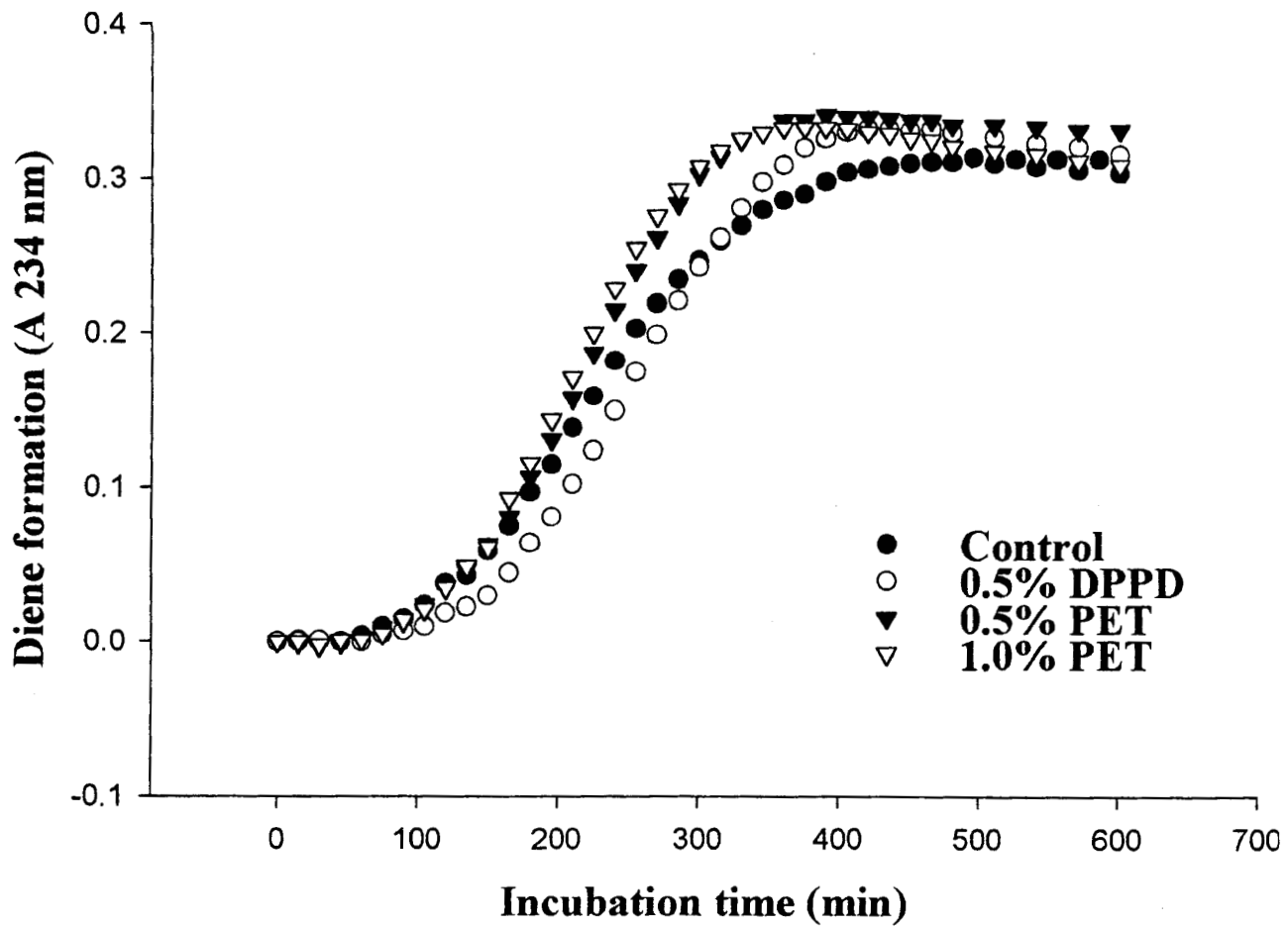


圖 3-17. 比較四組 apoE 缺陷小鼠的低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形

Fig. 3-17. Time course of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced oxidation of LDL obtained from male apoE-deficient mice fed with various diets.

Conjugated diene formation was measured at 234 nm. Lag phase ( $T_{\text{lag}}$ ) of LDL oxidation of control (n=7), 0.5% DPPD (n=8), 0.5% PET (n=8) and 1.0% PET (n=8) groups were  $159.5 \pm 77.5$ ,  $163.2 \pm 50.7$ ,  $126.4 \pm 37.0$  and  $118.1 \pm 23.3$  min, respectively. There were no significant differences between the groups by using Student's t-test ( $P > 0.05$ ).

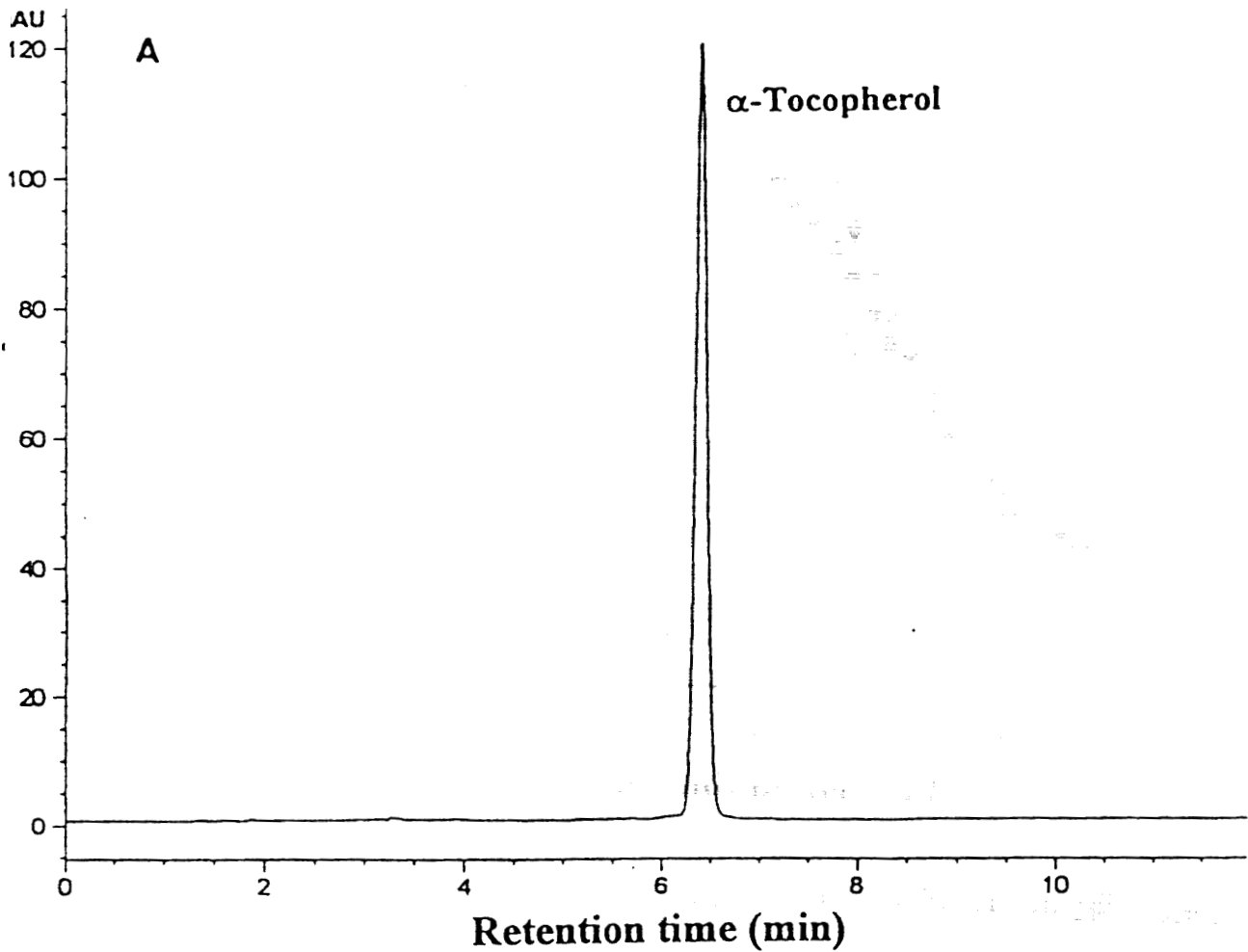


圖 4-18. 以 RP-HPLC 定量 apoE 缺陷小鼠低密度脂蛋白中維生素 E 含量 (代表性層析圖)

Fig. 4-18. Chromatograms of (A)  $\alpha$ -tocopherol standard and retinol acetate and representative chromatograms of (B) Control, (C) DPPD, (D) PET-1 and (E) PET-2 groups.

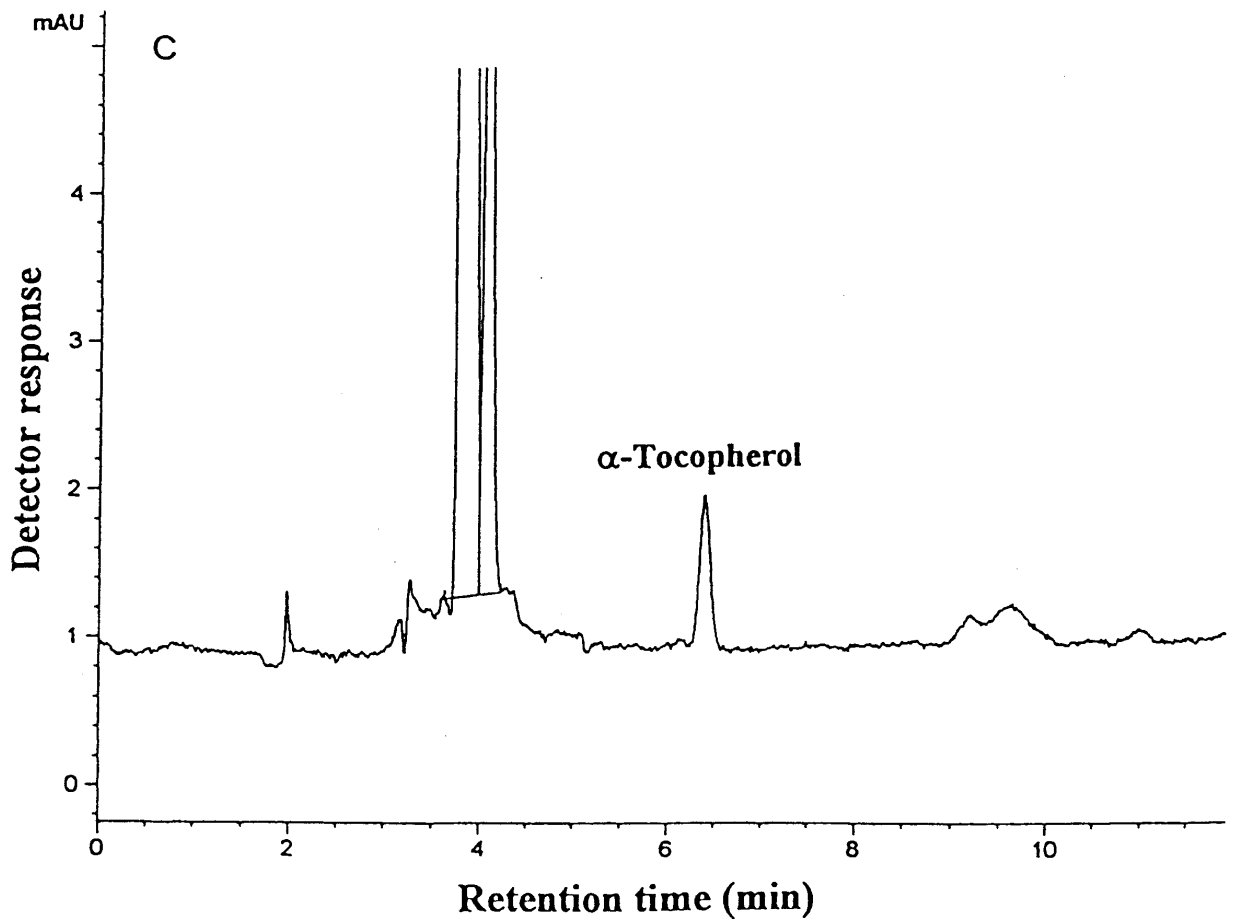
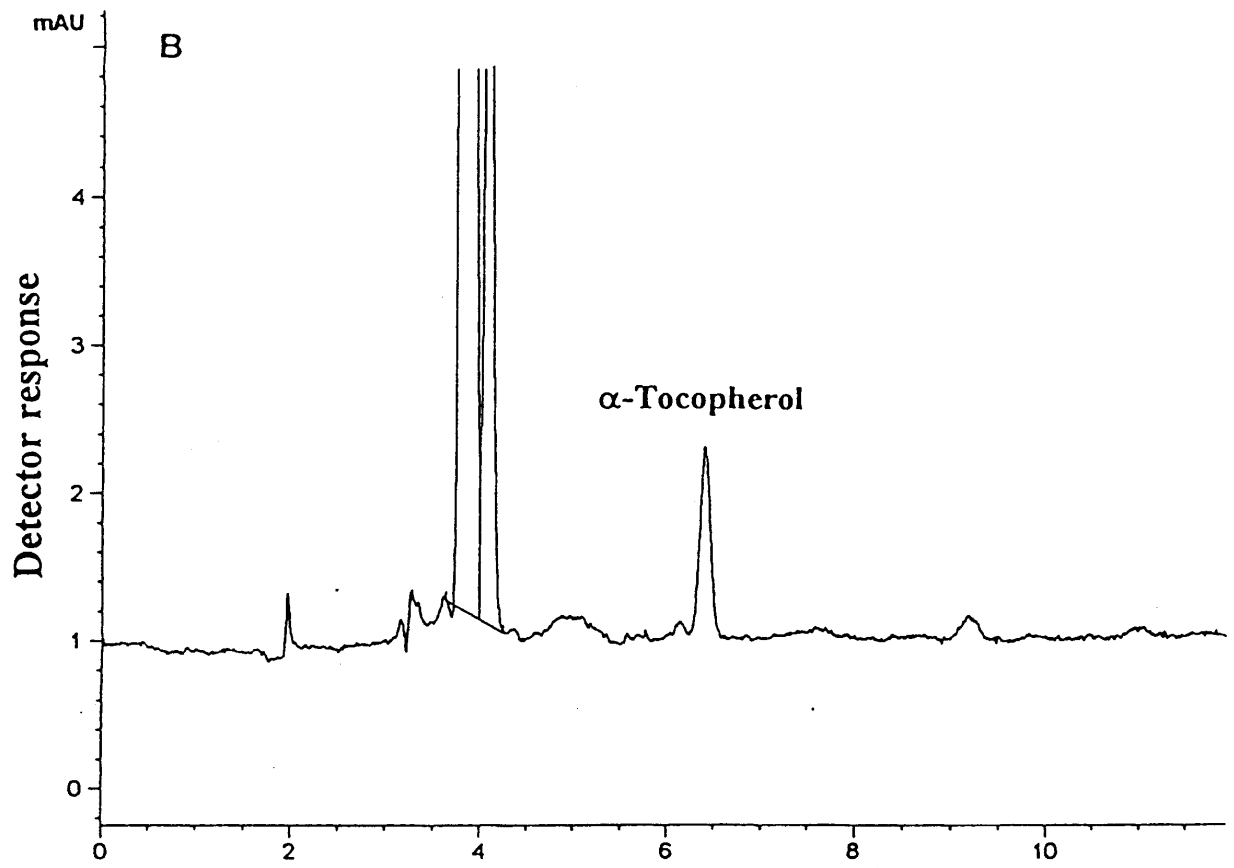


Fig. 4-18. (Continued).

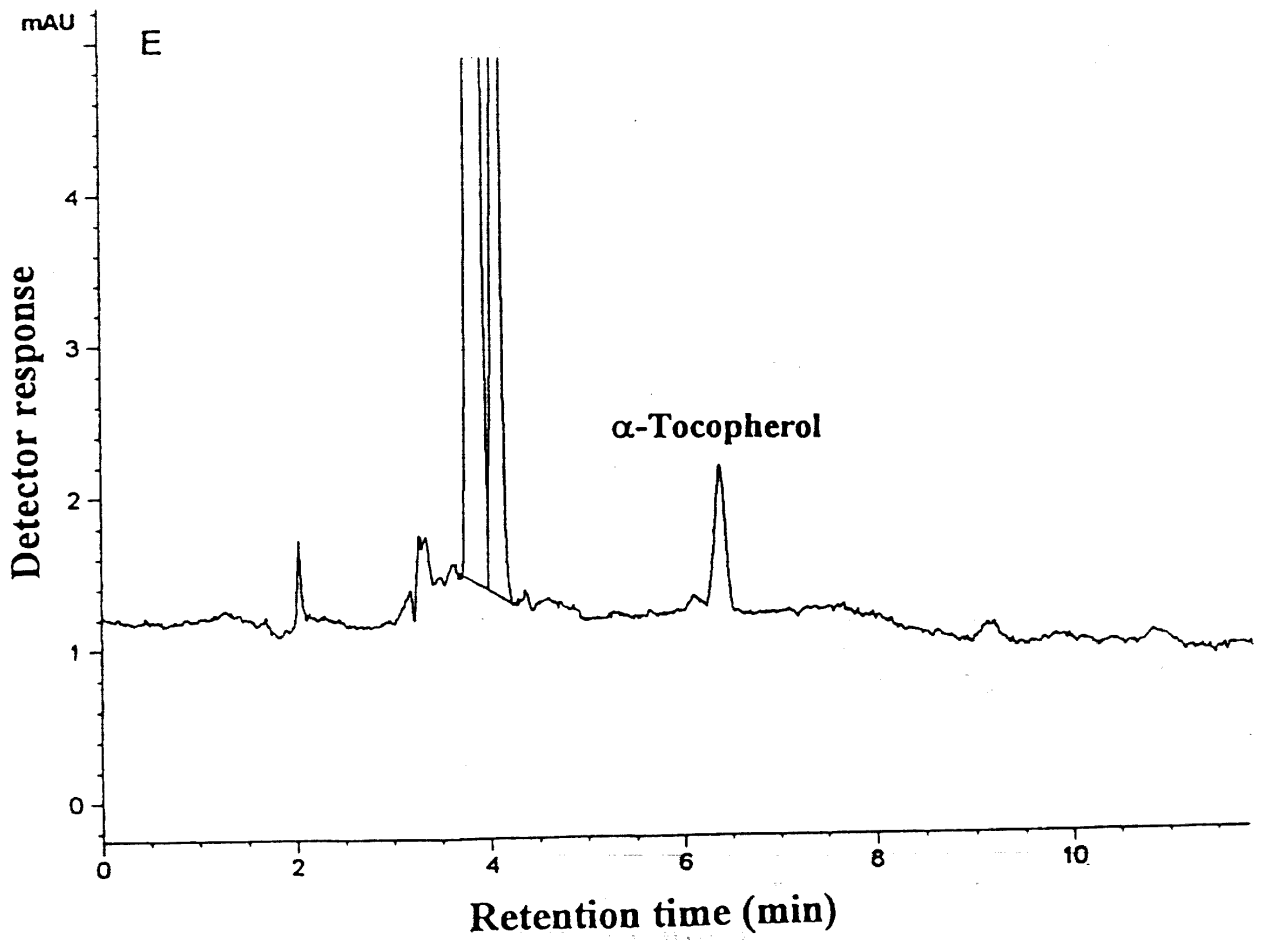
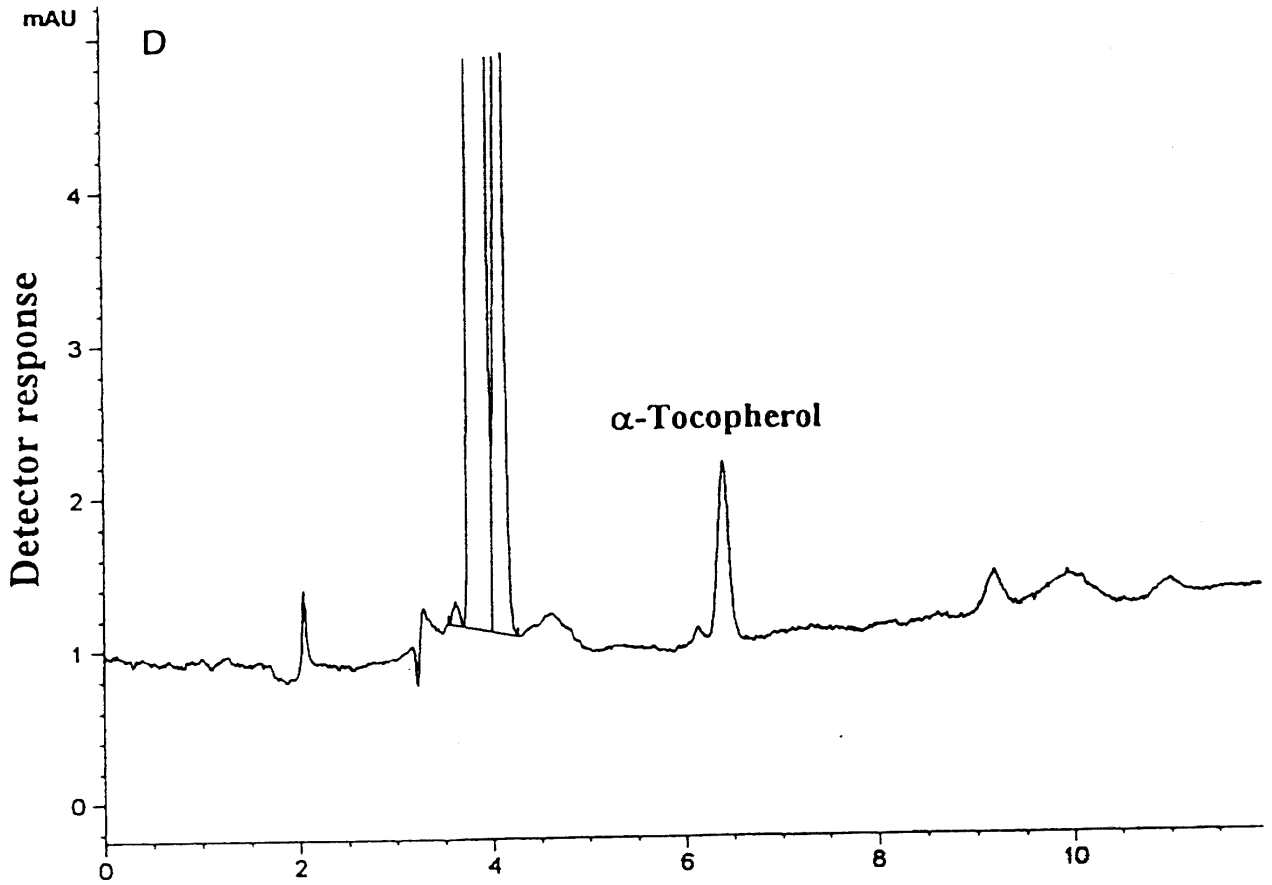


Fig. 4-18. (Continued).

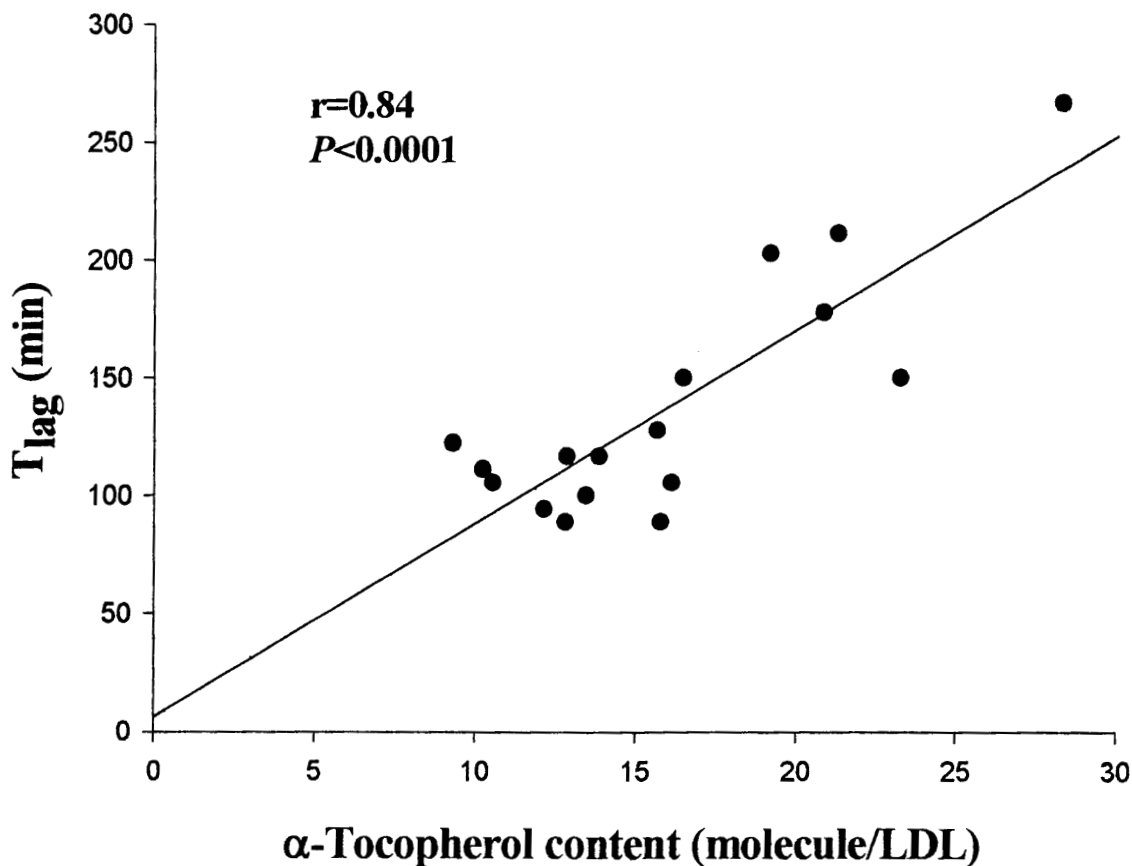


圖 3-19. 銅離子誘導低密度脂蛋白氧化之遲滯期與低密度脂蛋白內維生素 E 含量之相關圖

Fig. 3-19. Plot of lag phase ( $T_{lag}$ ) of  $Cu^{2+}$ -induced LDL oxidation in relation to  $\alpha$ -tocopherol content in LDL obtained from apoE-deficient mice fed with various diets.

The  $T_{lag}$  values were defined as the intercept of the tangent drawn to the steepest segment of the propagation phase to the horizontal axis of the  $Cu^{2+}$ -induced LDL oxidation curve and expressed as min.  $\alpha$ -Tocopherol content was determined by RP-HPLC.

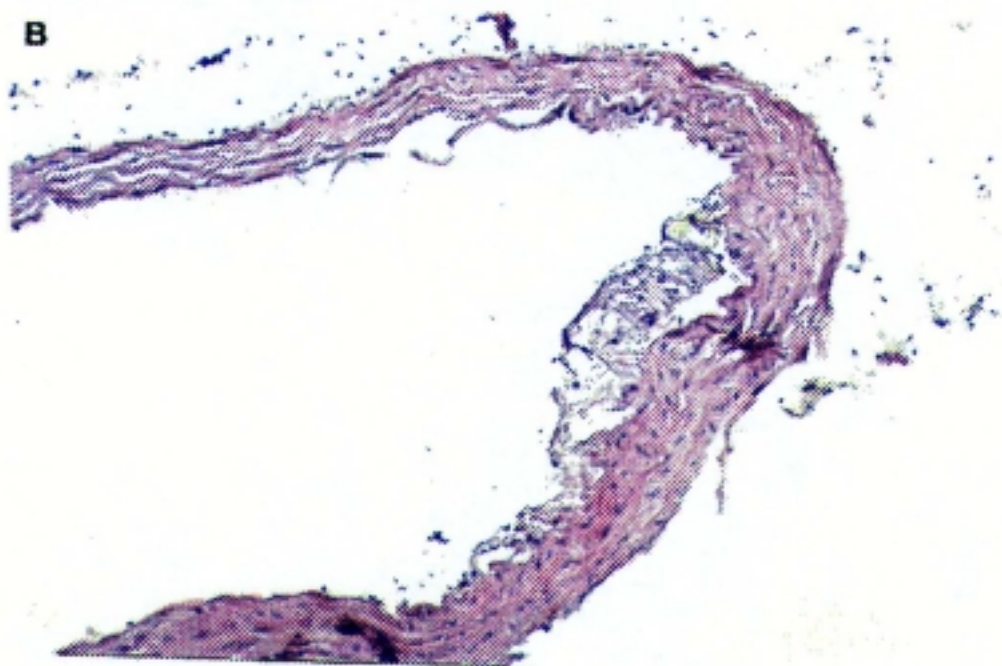


圖 3-20. 控制組小鼠主動脈弓切片經 H&E 染色後之形態表現

Fig. 3-20. Photographs of transverse sections of aortic arch obtained from apoE-deficient mice after treatment with control diet. (H&E staining, A:x 144, B:x 360)

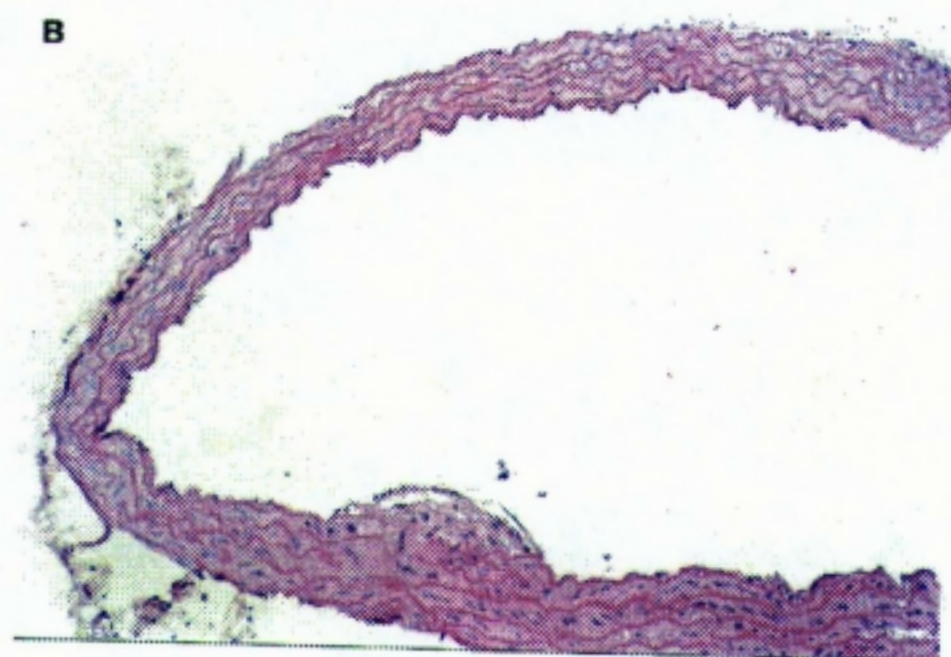
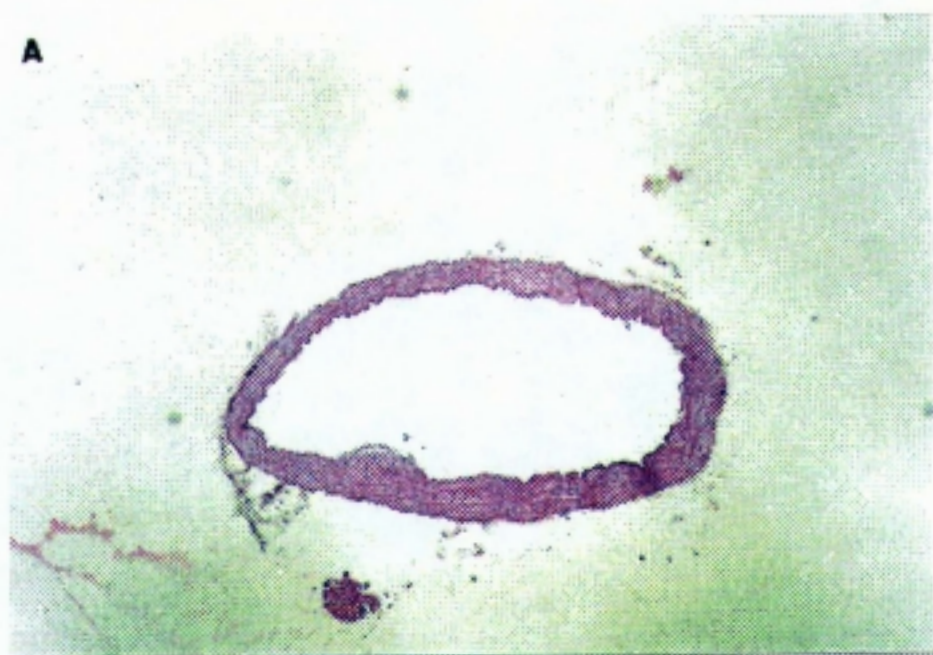


圖 3-21. 0.5% DPPD 組小鼠主動脈弓切片經 H&E 染色後之形態表現

Fig. 3-21. Photographs of transverse sections of aortic arch obtained from apoE-deficient mice after treatment with control diet plus 0.5% DPPD. (H&E staining, A:x 144, B:x 360)

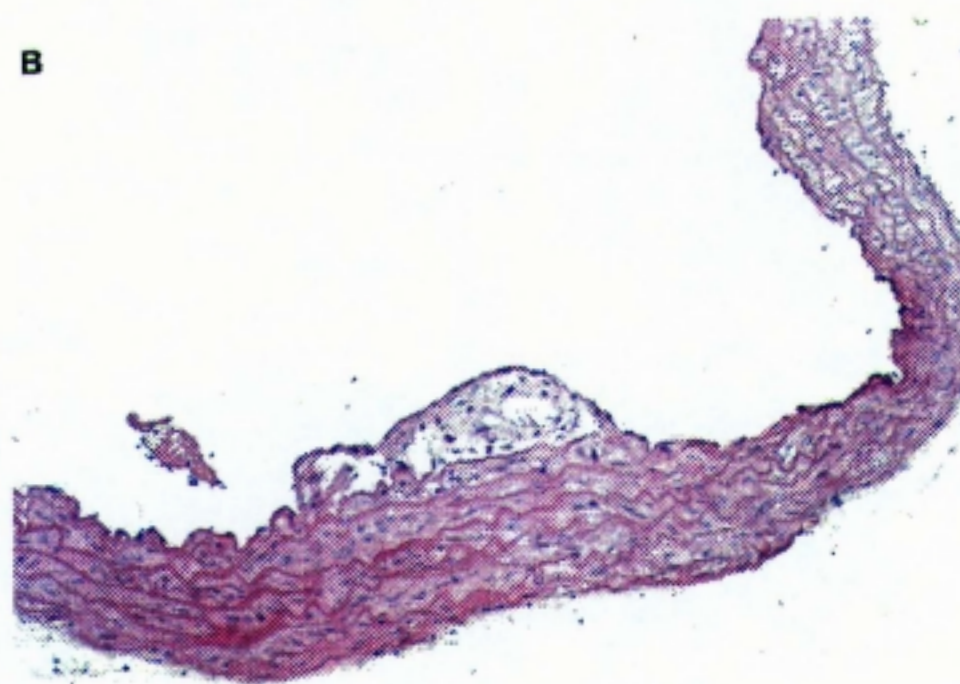


圖 3-22. 0.5% PET 組 (PET-1) 小鼠主動脈弓切片經 H&E 染色後之形態表現  
Fig. 3-22. Photographs of transverse sections of aortic arch obtained from apoE-deficient mice after treatment with control diet plus 0.5% PET. (H&E staining, A:x 144, B:x 360)

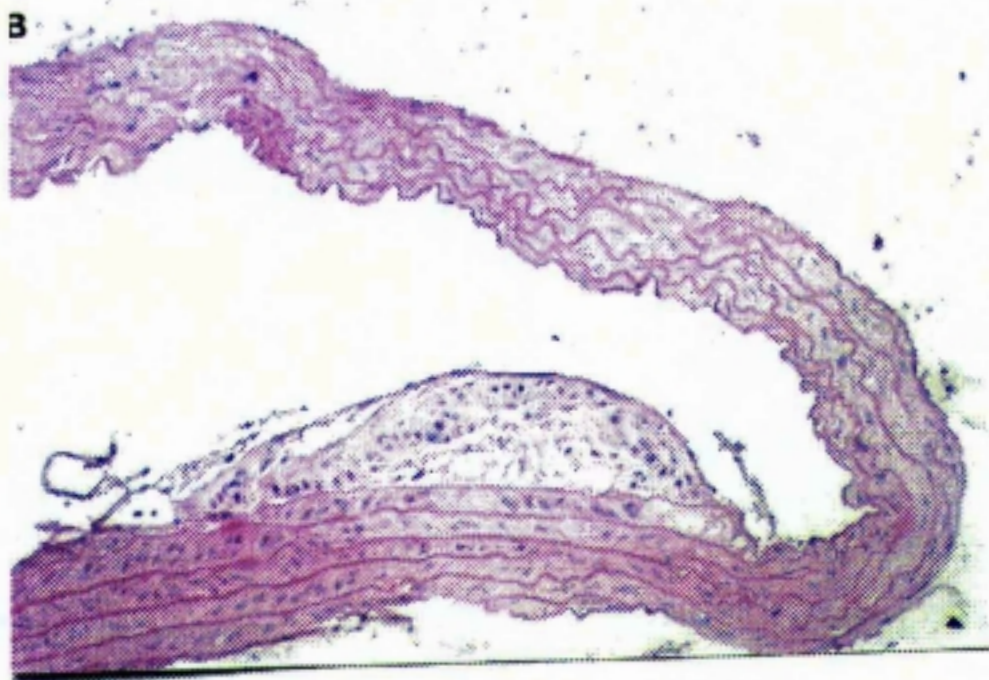


圖 3-23. 1.0% PET 組 (PET-2) 小鼠主動脈弓切片經 H&E 染色後之形態表現

Fig. 3-23. Photographs of transverse sections of aortic arch obtained from apoE-deficient mice after treatment with control diet plus 1.0% PET. (H&E staining, A:× 144, B:× 360)

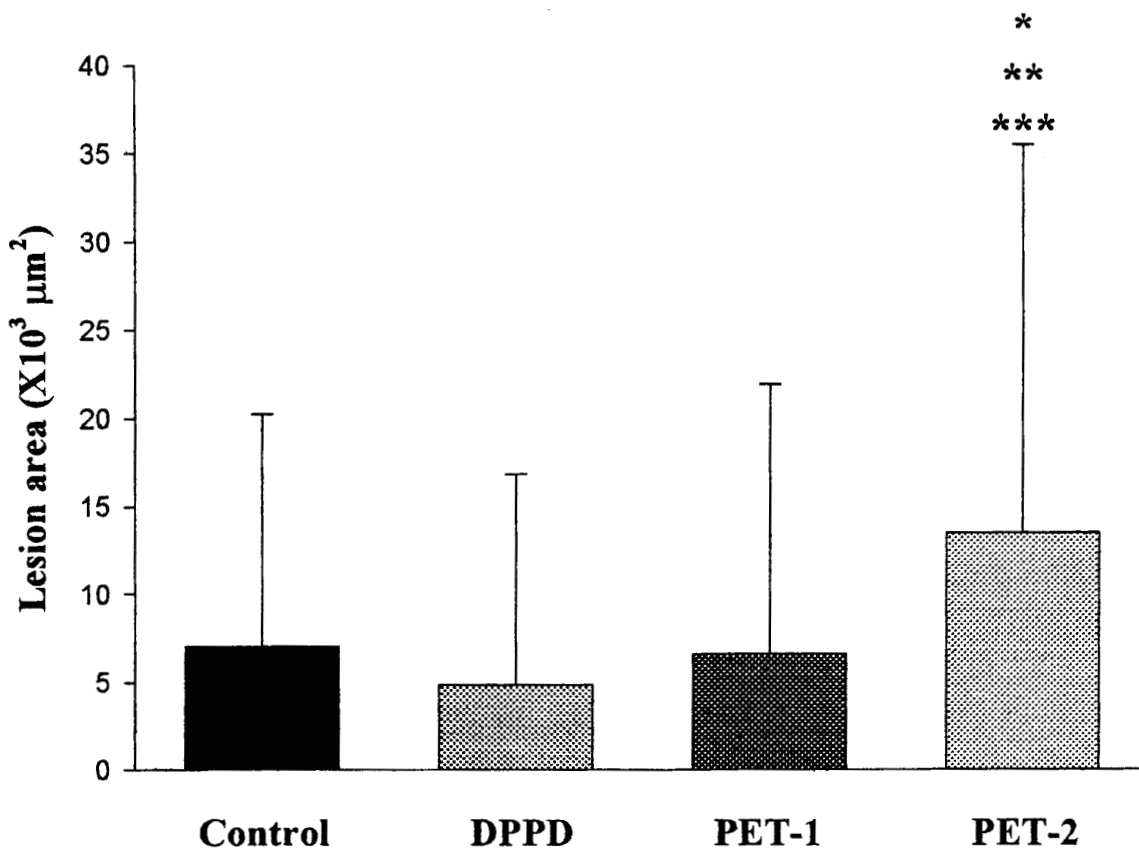


圖 3-24. 經 8 週餵食後 apoE 缺陷小鼠主動脈弓之病灶面積

Fig. 3-24. The lesion area of aortic arch in apoE-deficient mice after a 8 week feeding period.

Lesion areas expressed as mean±S.D.× 10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup> were measured in H&E-stained sections from aortic arch and calculated by computerized-LV2 image analysis system. The areas were defined as the summation of lesion areas from animals of each group over the total number of sections of each group. The results were: Control (7.0±13.2× 10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup>), DPPD (4.8±12.0× 10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup>), PET-1 (6.6±15.3× 10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup>) and PET-2 (13.4±22.0× 10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup>). \**P* = 0.04 vs control group; \*\* *P* = 0.005 vs DPPD group and \*\*\**P* = 0.03 vs PET-1 group.

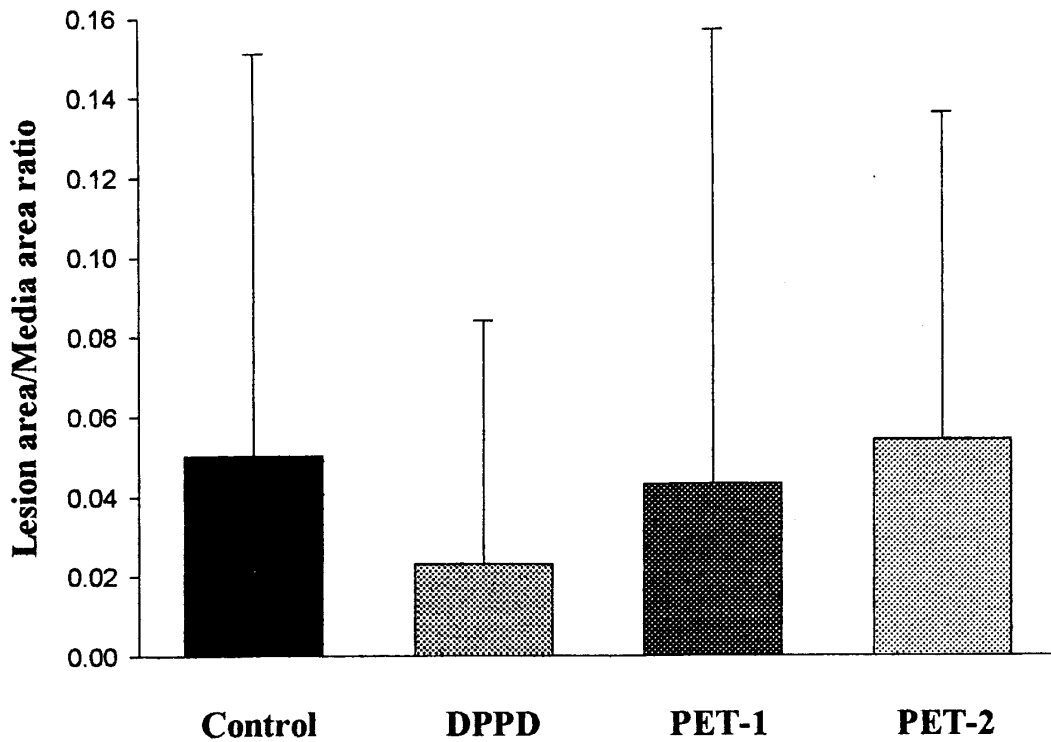


圖 3-25. 經 8 週餵食後 apoE 缺陷小鼠主動脈弓病灶面積與血管中層面積之比值

Fig. 3-25. The ratio of the lesion area to the media area of aortic arch in apoE-deficient mice after a 8 week feeding period.

The ratios of four groups were: control (0.05±0.10), DPPD (0.02±0.06), PET-1 (0.04±0.11) and PET-2 (0.05±0.08). There were no significant differences between four groups by using Student's t-test ( $P>0.05$ ).

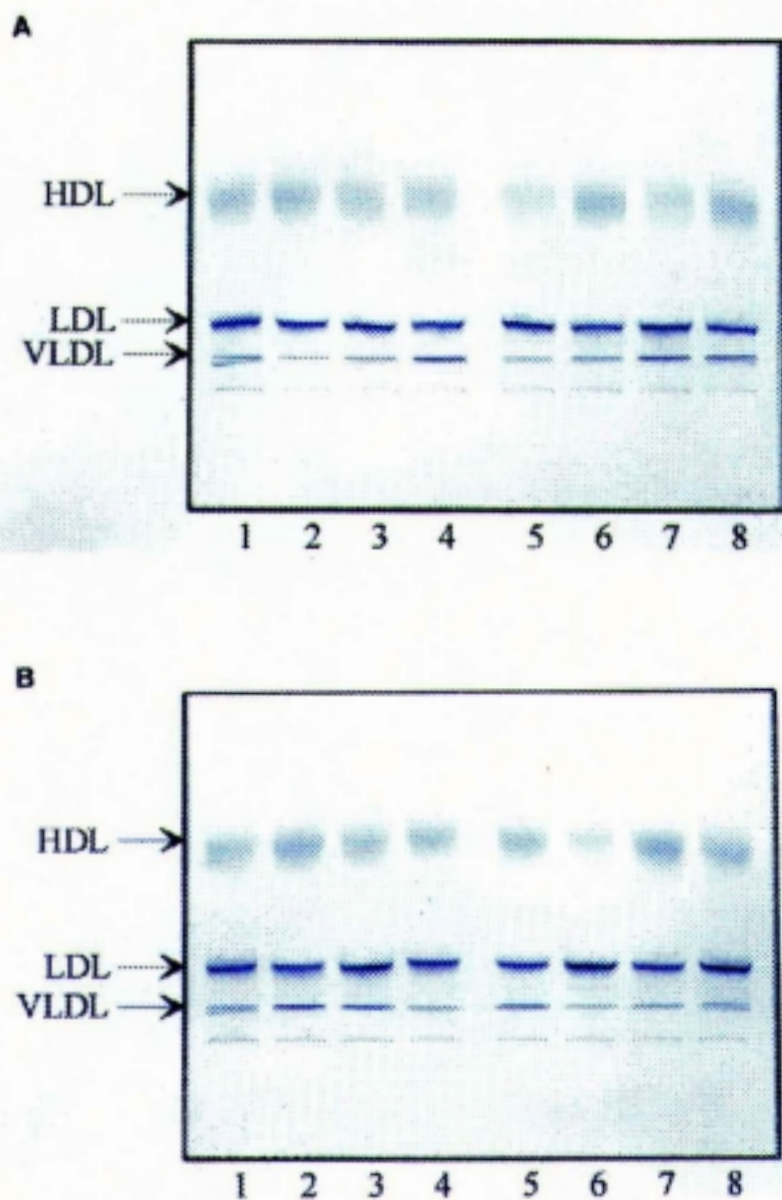


圖 3-26. 飲用普洱沱茶 7 天前後血清脂蛋白之電泳圖

Fig. 3-26. Distribution of serum lipoproteins from healthy subjects before (A) and after (B) 7 days supplementation of Pu-Erh-Tou tea.

Lane 1: human serum standard

Lane 2 to Lane 8: sera obtained from before (A) or after (B) 7 days supplementation of Pu-Erh-Tou tea

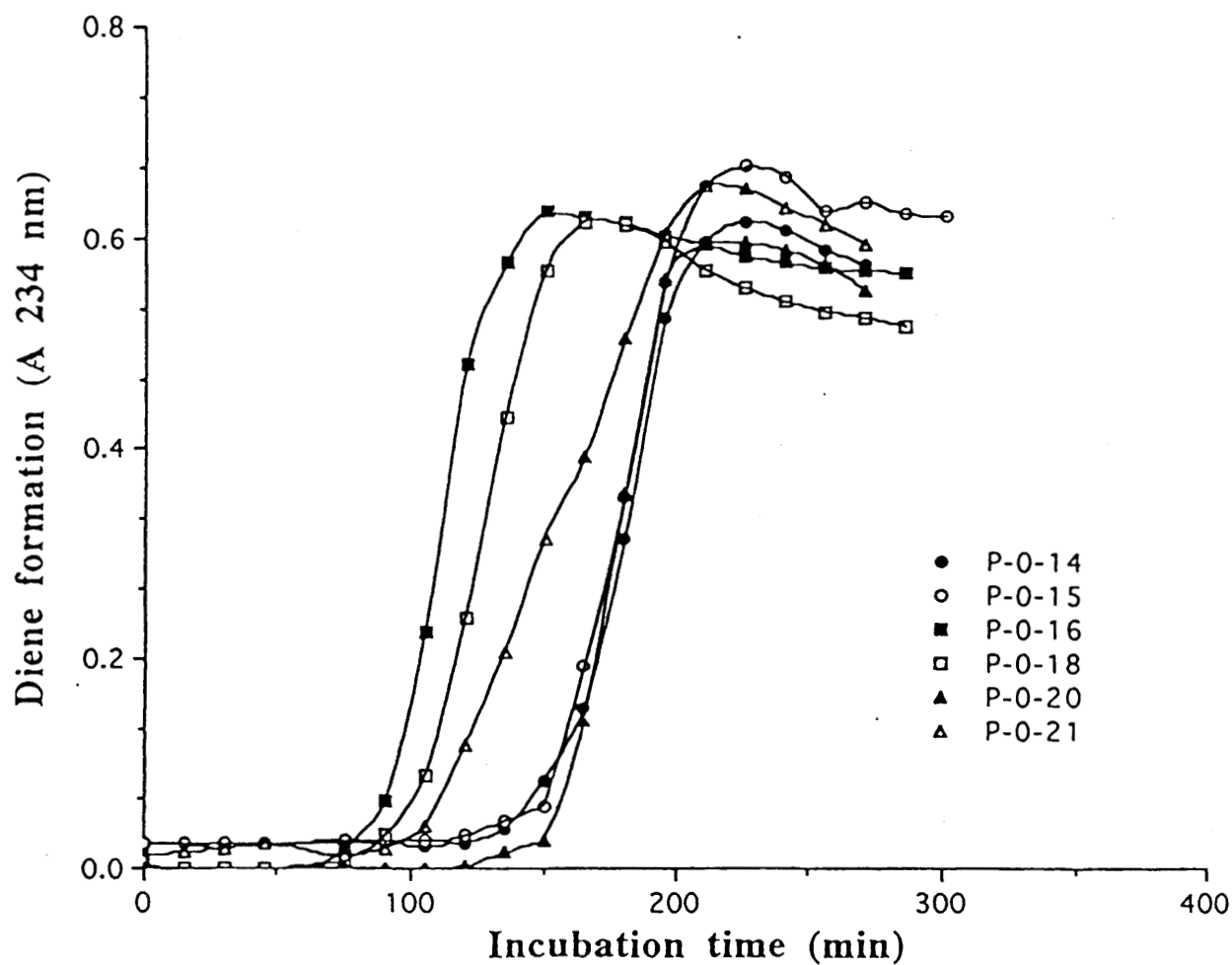


圖 4-27. 普洱沱茶組飲用前低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形

Fig. 4-27. Time course of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced oxidation of LDL obtained from healthy subjects before Pu-Erh-Tou tea supplementation. Conjugated diene formation was measured at 234 nm.

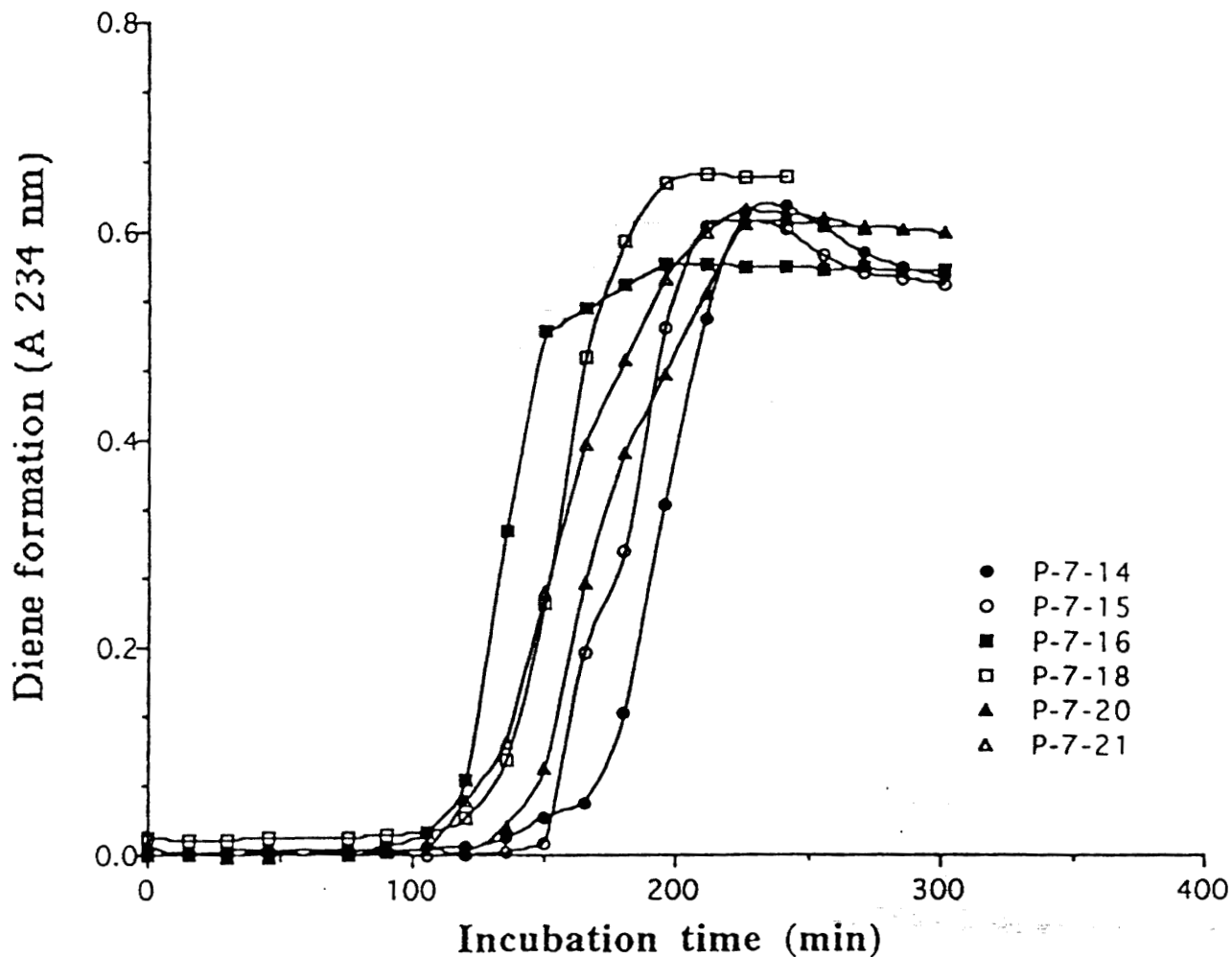


圖 4-28. 普洱沱茶組經 7 天飲用後低密度脂蛋白在銅離子誘導氧化過程中共軛雙烯的生成情形

Fig. 4-28. Time course of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced oxidation of LDL obtained from healthy subjects after 7 days Pu-Erh-Tou tea supplementation. Conjugated diene formation was measured at 234 nm.

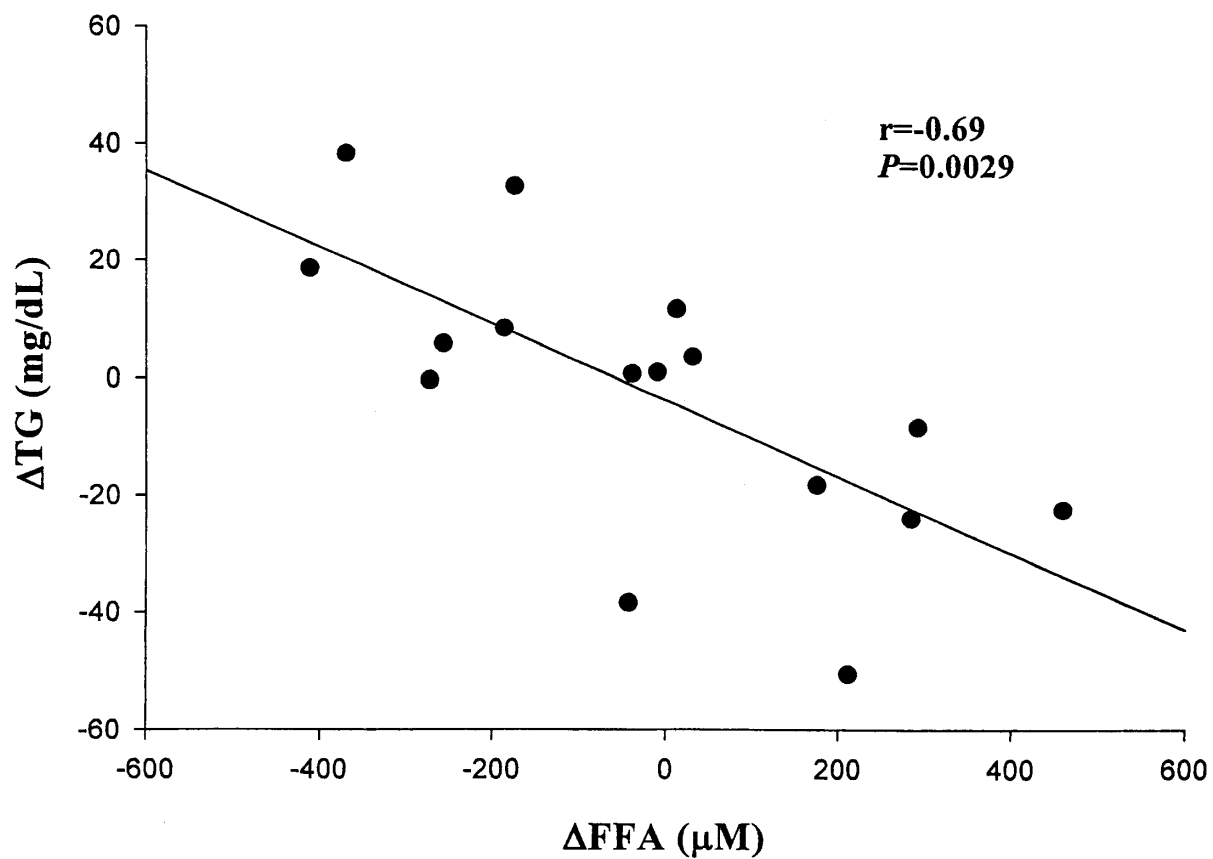


圖 3-29. 飲用普洱沱茶 7 天後三酸甘油酯改變量與游離脂肪酸改變量之相關圖

Fig. 3-29. Plot of changes in TG in relation to changes in FFA from healthy subjects after 7 days supplementation of Pu-Erh-Tou tea.

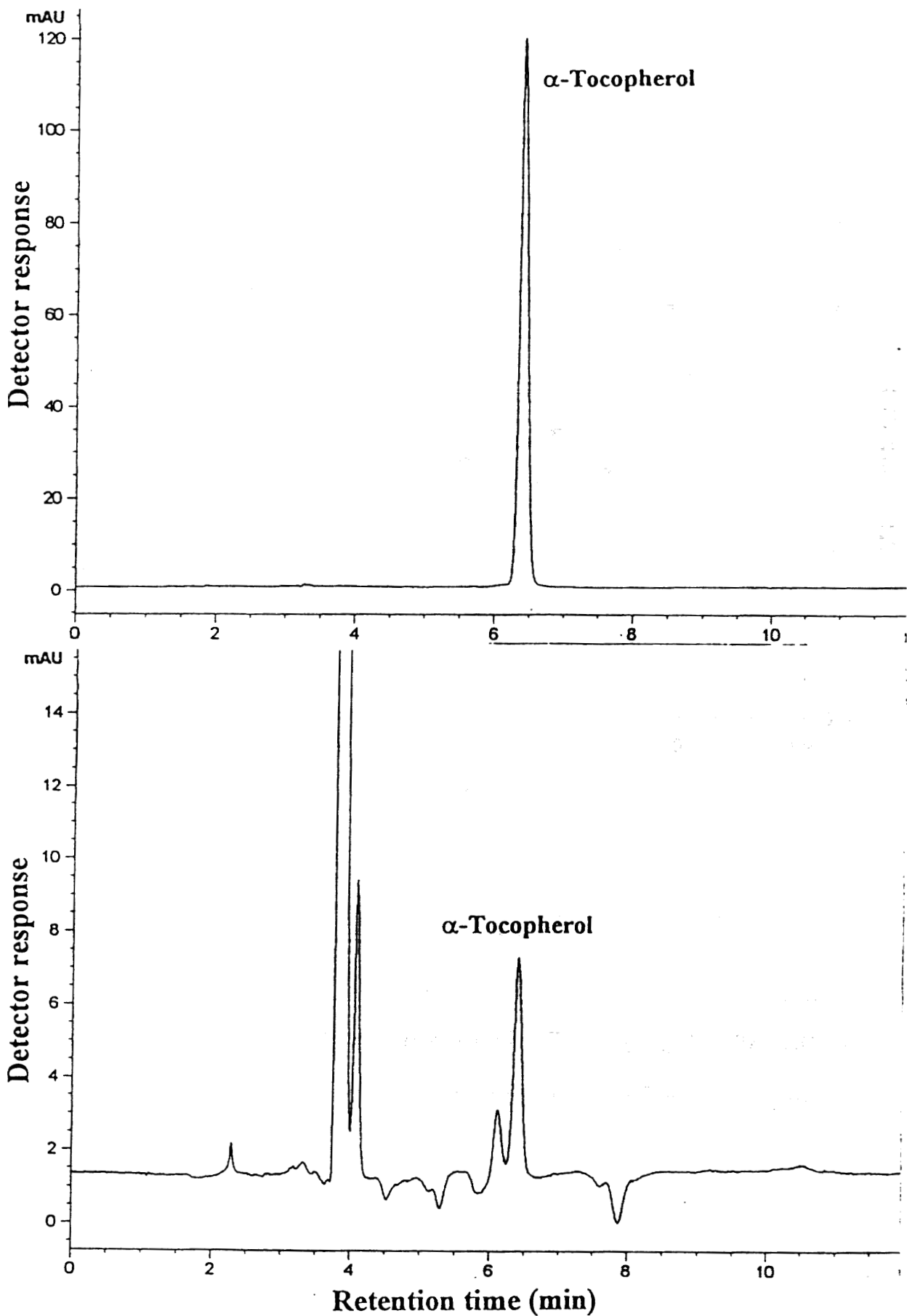


圖 4-30. 以 RP-HPLC 定量人類低密度脂蛋白中維生素 E 含量

Fig. 4-30. Chromatograms of (A)  $\alpha$ -tocopherol standard and retinol acetate and (B)  $\alpha$ -tocopherol in human LDL by RP-HPLC.

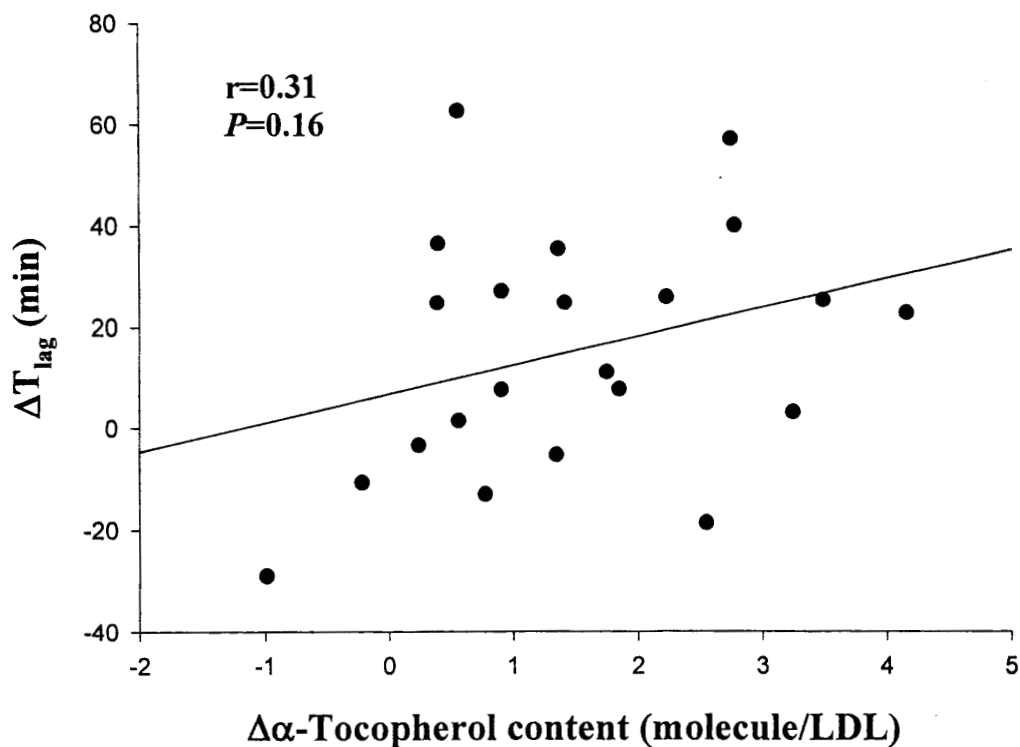


圖 3-31. 普洱沱茶與綠茶飲用前後銅離子誘導低密度脂蛋白氧化之遲滯期改變量與低密度脂蛋白內維生素 E 含量改變量之相關圖

Fig. 3-31. Plot of changes in  $T_{\text{lag}}$  of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation in relation to changes in  $\alpha$ -tocopherol content in LDL obtained from healthy subjects before and after supplementation of Pu-Erh-Tou tea and green tea.

The  $T_{\text{lag}}$  values were defined as the intercept of the tangent drawn to the steepest segment of the propagation phase to the horizontal axis of the  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation curve and expressed as min;  $\Delta T_{\text{lag}}$  was defined as the  $T_{\text{lag}}$  on day 7 minus the  $T_{\text{lag}}$  on day 0;  $\alpha$ -tocopherol content was determined by RP-HPLC;  $\Delta\alpha$ -tocopherol content was defined as the  $\alpha$ -tocopherol content on day 7 minus the  $\alpha$ -tocopherol on day 0.

## 肆、討論

### 一、普洱茶之體外抗氧化作用

在先前的研究中，已證實普洱茶溶劑萃取物在體外模式中具有強抗氧化作用，可有效清除 DPPH 自由基與抑制銅離子誘導 LDL 的氧化，且此抑制銅離子誘導之氧化作用並非來自於螯合銅離子所致 (劉張，1997)。本研究進一步將普洱茶甲醇抽物物 (PET-M1) 進行矽膠管柱層析，證實區分物亦具有強抗氧化作用，其中又以 PET-M1-C18~PET-M1-C21 之抗氧化能力最強。脂溶性抗氧化劑 (如 probucol、DPPD、BHT 等) 由於可嵌入 LDL 之磷脂質甚至進入疏水性的膽固醇酯核心中，而藉清除脂質過氧化物來保護不飽和脂肪酸免受自由基攻擊 (Parthasarathy *et al.*, 1986; Sparrow *et al.*, 1992; Bonorden and Pariza 1994)。水溶性抗氧化劑 (如維生素 C、丹參酚酸 B 等) 雖然無法進入 LDL 核心中，但可藉由在水相系統中清除自由基以保護 LDL 表面之磷脂質免受氧化或使 LDL 中內源性抗氧化劑再生而達到抗氧化之目的 (Bonorden and Pariza, 1994; Wu *et al.*, 1998)。

先前的研究中指出普洱茶乙醇抽出物 (PET-E1) 具有較強的清除自由基與抑制銅離子誘導 LDL 氧化之能力 (劉張，1997)，但以 IC<sub>50</sub> 值比較時，普洱茶甲醇抽出物 (PET-M1) 清除 DPPH 自由基能力為 PET-E1 之 0.9 倍，抑制銅離子誘導 LDL 氧化之能力為 PET-E1 之 0.8 倍，兩者已相近，並考慮大量製備時之成本問題，故本研究選擇 PET-M1 作為進一步增強抗氧化

活性之材料。由本研究之體外實驗發現，普洱茶之有效抗氧化成份其極性分布約在 polarity index 4.3-6.0 之間（見圖 3-8），PET-M1-C18~PET-M1-C21 等區分物不論在清除 DPPH 自由基或是抑制銅離子誘導 LDL 氧化之能力上均較其他區分物為強。一般認為，茶中抗氧化能力最主要是來自於兒茶素類 (Salah *et al.*, 1995; Wiseman *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1997)，而其中又以綠茶所含之兒茶素類為最多。多元酚類化合物的抗氧化作用亦被認為與其所含 gallic acid 結構的數目有關，如兒茶素類在基本結構上具有 1 個 gallic acid 之官能基，但酯化的兒茶素類 (如 EGC、EGCG) 或酯化的葉黃素 (如 theaflavin digallate) 因具有更多的 gallic acid 結構，而具有更強的抗氧化力 (Ishikawa *et al.*, 1997)。但以 EGCG 為例，普洱茶所含之 EGCG 僅約綠茶之三十分之一 (黃, 1996; Salah *et al.*, 1995; Koketsu, 1997)，故推測在本研究中區分物之強抗氧化力應是除了兒茶素類之外，尚有其他多元酚類化合物所共同造成，且極性可能與兒茶素類相當或更偏向脂溶性。

## 二、普洱茶區分物之離體抗氧化效果

### (一) 餵與動物區分物選擇之合理性

依體外抗氧化活性為指引，選擇了相對活性較高之 PET-M1-C18~PET-M1-C21 作為動物實驗所餵予之區分物，此種選擇方法為藥物開發之模式，即為選擇活性高且雜質少之區分。但由動物實驗之結果，顯示抗氧化相對活性強

之區分物並沒有在 apoE 缺陷小鼠之模式中減少 LDL 的氧化敏感性。由於動物實驗所飼與的區分物之總抗氧化活性僅為 PET-M1 之 36.8% (見表 3-1), 可能是沒有用到其他雖然相對活性不高, 但含量甚多之區分物 (如 PET-M1-C22) 所致。

## (二) 離體抗氧化效果與動脈粥狀硬化面積之探討

本實驗並沒有看到藉由餵食普洱茶區分物而影響 LDL 氧化敏感性之現象, 採用之正控制組 (DPPD 組) 也沒能呈現可延長銅離子誘導 LDL 氧化遲滯期之效果 (Tangirala *et al.*, 1995)。推究其原因, 可能是測定銅離子誘導之 LDL 氧化技術上誤差範圍過大, 且動物間之差異亦大, 造成正控制組  $T_{lag}$  亦尚不具統計差異。但藉由分析 LDL 內  $\alpha$ -tocopherol 之含量時卻發現, 各組動物  $T_{lag}$  愈長者, 其  $\alpha$ -tocopherol 含量便愈多, 兩者之間有強烈之正相關 ( $r = 0.84, P < 0.0001$ )。

由於本動物實驗餵食高膽固醇且實驗期長達 2 個月, 加上動物犧牲時年齡已有 23 週齡, 推測應已達到大量泡細胞產生或中期的病灶 (intermediate lesion) (Nakashima *et al.*, 1994)。然而並非每隻動物在所設計的切片方法中, 均可切到可由光學顯微鏡判斷之病灶, 並且在每隻 10 片切片的觀察裡, 出現病灶的比率也不高。由於以上顯示動物之間的差異過大, 雖然 PET-2 組在統計上病灶面積為顯著地大於其他三組, 但因為標準偏差過大的緣故且正控制組並沒有觀察

到抑制動脈粥狀硬化的情形，故高濃度普洱茶區分物餵食下對動脈粥狀硬化進展之實際影響仍值得探討。文獻中對於動脈硬化面積的計算除了利用切片染色外，尚有將整段動脈縱切而以脂質染色之方式來觀察 (Palinski *et al.*, 1994; Tangirala *et al.*, 1995)。本實驗亦曾取四組各一隻小鼠做整段動脈 (含主動脈弓) 之 Sudan IV 染色，但發現染色之效果不佳，沒有如文獻中範圍較廣之脂質沈積，僅在動脈分支處與主動脈弓之少數位置染上顏料，且面積極小，無法有效造成與未染面積之對比，故仍將各組剩下之小鼠採用切片之方式計算硬化面積。ApoE 缺陷小鼠之整段動脈雖然均會發生動脈粥狀硬化之現象，但最主要的發生區域仍是在血流擾動劇烈之血管分支 (如頸動脈分支、腎動脈分支)、主動脈弓彎曲部份與最主要的主動脈之瓣膜 (aortic valve) 位置 (Nakashima *et al.*, 1994)。由病灶形態觀察與比較粥狀硬化面積，仍可發現餵食 1.0% PET 組其病灶的面積較大，而在 control 組與 DPPD 組病灶所佔面積則明顯較小，這是否意味著餵食高濃度普洱茶區分物為助動脈粥狀硬化？下一節便以此探討。

### (三) 抗氧化劑在動物模式中離體抗氧化力與抗動脈粥狀硬化能力之探討

目前許多動物模式被開發成為研究抗氧化與抗動脈粥狀硬化，包括了紐西蘭大白兔 (NZW rabbits)、迷你豬 (miniature pigs) 與基因轉殖小鼠 (transgenic mice) (Bocan *et*

*al.*, 1993; Holvoet *et al.*, 1998; Smith and Breslow, 1997)。目前由 LDL 的氧化而導致動脈粥狀硬化的假說最被人所接受，故在研究之策略上多採抗氧化劑之使用以抑制 LDL 的氧化，藉此抑制動脈粥狀硬化的進展。Probucol 在體外實驗中為一優良之抗氧化劑與降脂藥物，應用在 NZW 兔與 WHHL 兔中亦得到良好之抗動脈粥狀硬化效果 (Mao *et al.*, 1991; Prasad *et al.*, 1994)，但亦有在 NZW 兔無效之報告 (Stein *et al.*, 1989)；在人類的 PQRST 臨床試驗中，亦發現無法改善高膽固醇患者之股動脈粥狀硬化 (Johansson *et al.*, 1995)；在最近的小鼠模式中，餵食 probucol 分別在 apoE 缺陷小鼠與 LDL receptor 缺陷小鼠中矛盾地助長了動脈粥狀硬化 (Zhang *et al.*, 1997; Bird, *et al.*, 1998)。在小鼠模式中 probucol 的助長動脈粥狀硬化可能是導因於降低了 HDL<sub>2b</sub> 之含量，並且由於高脂溶性的特色，嵌入了 LDL 之核心而與內源性的  $\alpha$ -tocopherol 競爭 LDL 中有限的空間而造成保護 LDL 免受氧化的第一道防線流失。

最近文獻中指出部份抗氧化劑，包括  $\alpha$ -tocopherol 與 BHT 之補充並無法降低 C57BL/6 小鼠脂肪條塊之生成，BHT 組甚至助長了更大的病灶面積，其主要原因為更動了小鼠的脂蛋白代謝，故無法單純地由抗氧化模式來證明抗氧化劑對於動脈粥狀硬化的抵抗作用 (Munday *et al.*, 1998)。由以上的例子可知，包括  $\alpha$ -tocopherol、BHT 與 probucol 等脂溶性抗氧化劑雖然在體外實驗或兔子模式中具有良好之抗氧化或抗動脈粥狀硬化作用，但在小鼠系統時，卻因為包括改變膽固醇濃度 (降低了 HDL-cholesterol) 與置換出

LDL 中原本具有之內源性抗氧化劑而導致動脈狀硬化加劇。在本動物模式中，雖然沒有觀察到脂蛋白膽固醇之代謝受到改變，但卻發現 LDL 內  $\alpha$ -tocopherol 隨著餵食區分物之濃度升高而減少。前面討論中曾提出，本動物實驗所餵食之普洱沱茶區分物其所含的活性成份推測除了兒茶素類外，尚有更為脂溶性之成份存在。但本研究仍無法證明是否這些較為脂溶性之成份取代了 LDL 中內源性的  $\alpha$ -tocopherol，以致造成 LDL 失去了內源性抗氧化劑的保護。

Hayek *et al.*, (1997) 利用 apoE 缺陷小鼠探討了紅酒、quercetin 與 catechins 之體內抗動脈粥狀硬化效果。結果發現均可有效降低動脈粥狀硬化病灶之面積與延長 LDL 氧化之遲滯期，但其中以 catechins 之效果較差。紅茶為富含 quercetin、kaempferol 等較為水溶性質之 flavonols，而普洱沱茶在發酵程度上非常接近紅茶，故理論上也應富含此類物質。兒茶素類在普洱沱茶中含量極少，故由兒茶素類來造成抗動脈粥狀硬化之可能性便較低；而 flavonols 因為偏向水溶，故推測出現在區分物內之機會亦不大。劉張 (1997) 利用普洱沱茶水萃出物餵與 SD 大白鼠，而發現可降低 LDL 之氧化敏感性且顯著延長氧化之遲滯期，由此推論，普洱沱茶區分物中抗氧化活性物質雖然在體外可表現良好之抗氧化活性，但在較偏脂溶性之情況下，反而無法在體內表現強的抗氧化效果。

### 三、人體實驗結果之探討

#### (一) 模式之合理性

本人體實驗設計主要針對 LDL 之氧化敏感性是否改變作為主軸，故在時間設計上僅以飲用 7 天來作為介入期。LDL 在血液循環中的代謝時間約為 2-3 天 (Esterbauer *et al.*, 1992)，故在 7 天茶類之飲用下已足以觀察 LDL 是否受到影響，但對於其他脂質則因代謝時間較長，並不預期觀察到明顯之變化。而由結果也發現，不論飲用普洱茶或綠茶，對於血清膽固醇、血清三酸甘油酯與脂蛋白膽固醇方面並沒有任何統計上明顯的改變。De Rijke *et al.*, (1996) 與 Carbonneau *et al.*, (1997) 均指出，在給予紅酒飲用下，LDL 膽固醇濃度與 LDL 氧化之敏感性是沒有直接相關的，由此可知，短期的抗氧化劑介入實驗對脂質代謝的影響是有限的，並無法藉由更動脂蛋白之分布而影響體內對抗氧化的表現。

#### (二) 離體之抗氧化能力

本研究發現飲用普洱茶 7 天後可顯著延長 LDL 氧化之遲滯期，並可以顯著增加 LDL 內  $\alpha$ -tocopherol 之含量，顯示具有降低 LDL 氧化敏感性之能力。本實驗採用濃度為 2% 之茶湯，此為參考過去文獻中在其他人體實驗所用之濃度而決定 (Serafini *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 1997)，但此濃度是比日常生活一般之飲茶濃度 (約 0.5-1.0%) 要來得高，

且每日攝入 20 克之茶葉量亦較其他文獻所攝入的要多。茶湯所提供的為偏水溶性之抗氧化劑，故此人體實驗可視為觀察水溶性抗氧化劑作用之動物模式。水溶性抗氧化劑無法如脂溶性抗氧化劑一般，可通過內皮細胞進入內皮下方空間，而直接針對動脈粥狀硬化病灶區域進行保護，故其在體內扮演之抗氧化角色推測是與保護 LDL 免受氧化有關。Hayek *et al.*, 1997 指出，多元酚類化合物在血液循環中可以 ether bond 與 LDL 上 apoB 進行結合，但即使如此，在以超高速離心分離 LDL 之過程中，我們並無法得知多元酚類化合物是否還可以此種特殊的蛋白質結合能力與 LDL 結合。故遲滯期的延長，究竟是與 LDL 表面鍵結了眾多多元酚類化合物有關，或是因為 LDL 中  $\alpha$ -tocopherol 數目增加，則無法由本研究明確證實。多元酚類化合物在體內之代謝極快，且量測血液中之總抗氧化力時，學者發現飲用茶後 3 小時內血液總抗氧化力並沒有增加 (Maxwell, 1996)；Tijburg *et al.* (1997) 發現在餵食高膽固醇飼料之 NZW 兔綠茶或 Vitamin E 8 週後即使讓血液中  $\alpha$ -tocopherol 之含量上升，但卻無法使得血液中總抗氧化力顯著地增加。直至目前為止，多元酚類經由消化道進入人體後，其在體內循環方式及作用位置仍未釐清，故雖然大型的流行病學報告指出日常服用富含多元酚類化合物之食品，如茶、紅酒、柑橘類等，可有效降低心血管疾病之發生率 (Hertog *et al.*, 1993 and 1995; Knekt *et al.*, 1996)，但類似本研究人體實驗之短期實驗則仍是沒有具體之定論。McAnlis *et al.*, (1998) 指出，無論是飲用紅茶後 3 小時，或是飲用 7 天後，均無法保護 LDL 免受氧化性修飾，

學者認為此現象與多元酚類化合物在體內之吸收與排泄狀況有關。攝取兒茶素類 3-6 hr 內其排出量會達到最大，且 24 hr 後血液中即不再殘留 (McAnlis *et al.*, 1998)，由此可知，若僅從多元酚類化合物可在體內清除自由基或螯合微量之過渡金屬的角度來看，這樣的抗氧化機制應不足以解釋 LDL 氧化敏感性降低的現象。因此，我們將從水溶性抗氧化劑與 LDL 之交互作用來尋找答案。

### (三) 水溶性抗氧化劑與 LDL 內源性抗氧化劑之關係

Esterbauer *et al.* (1992) 研究中發現，當以銅離子誘導 LDL 氧化時，LDL 內所含之眾多內源性抗氧化劑會逐漸消耗，而此第一道防線即為  $\alpha$ -tocopherol。本研究發現，不論在動物模式或是人體實驗，當 LDL 內  $\alpha$ -tocopherol 數目增加時，LDL 氧化的遲滯期便會延長，而在其他學者的研究方面，當額外補充維生素 E 時，亦會藉由增加 LDL 內  $\alpha$ -tocopherol 的數量而改變 LDL 的氧化敏感性 (Reaven *et al.*, 1993; Dieber-Rotheneder *et al.*, 1991)。 $\alpha$ -Tocopherol 主要是藉著血液循環中水溶性抗氧化劑之幫助而再生 (recycling)，如維生素 C、ubiquinone 等；Wu *et al.*, 1998 指出，餵食富含水溶性抗氧化劑之丹參水溶成份可顯著增加紐西蘭大白兔 LDL 中  $\alpha$ -tocopherol 之數量。而不論是普洱茶或綠茶中，維生素 C 之含量並不多，故若茶之飲用可使 LDL 內  $\alpha$ -tocopherol 獲得再生而增加數目，則推測是其他水溶性物質(當然包含多元酚類化合物) 所造成 (Tijburg *et al.*,

1997)。具類似 catechol 結構的類黃酮化合物 (如兒茶素類、quercetin) 在磷脂質雙層膜 (phospholipid bilayer) 系統中是可穩定存在與具抗氧化能力的 (Terao *et al.*, 1994)，由於類黃酮的親水性比  $\alpha$ -tocopherol 要來得高，故在磷脂質雙層膜系統中為聚集在膜的表面，其作用為清除水相中的氫氧自由基與膜中的脂質過氧化物；當面對 LDL 的系統時，更可藉由以上的抗氧化機制與保護內源性  $\alpha$ -tocopherol 而具抗氧化效果。但是當面對高度氧化的體內環境時，如 Princen *et al.*, (1998) 在抽煙族群中所作的研究中發現，飲用紅茶、綠茶或綠茶多元酚類萃出物 4 週後並無法影響脂質代謝與改變 LDL 的氧化敏感性。由此結果顯示，茶中的抗氧化物質雖可在體外有良好之抗氧化作用，但可能因體內消化吸收狀況不佳，或面對高濃度自由基環境時所能顯現的抗氧化能力不足，而導致無法觀察到與體外實驗相呼應之結果。但即使多元酚類化合物在體可表現出的抗氧化能力有限，卻可藉由與 LDL 內內源性抗氧化劑之交互作用，而達到保護 LDL 免受氧化修飾之目的。

本研究中飲用普洱沱茶可顯著增加 LDL 內  $\alpha$ -tocopherol 的含量達 16.1% (由飲用前的  $8.7 \pm 1.6$  molecules/LDL 增加到飲用後的  $10.1 \pm 2.1$  molecules/LDL)，除了由此因素直接影響了 LDL 的氧化敏感性外，文獻中亦指出綠茶中抗氧化成份可能會在動脈血管壁中聚集，藉由增加細胞內內源性抗氧化劑之含量或抑制氧化酵素 (如 lipoygenase) 的活性而減低了 LDL 的氧化程度 (Parthasarathy *et al.*, 1989)。過去許多報告亦指出了補充水溶

性抗氧化劑可使 LDL 的氧化敏感性降低，包括維生素 C (Frei, 1991; Fuller *et al.*, 1996; Harats *et al.*, 1998)、glabridin (Fuhrman *et al.*, 1997)。最近亦有報告指出補充 quercetin 與 apigenin 二週並無法改變人體內抗凝血系統的部份因子與酵素的活性 (Janssen *et al.*, 1998)，顯示動脈粥狀硬化患者可藉服用含高量多元酚類化合物而改善病徵的情況，並非由於凝血機制改變的緣故。由此可推測若藉補充含多元酚類化合物之食物 (如茶、紅酒、柑橘類) 而改變 LDL 的氧化敏感性，應可改善體內動脈粥狀硬化的進展。

#### 四、人體實驗與動物實驗的關連

在本研究中，由於動物實驗與人體實驗在改變 LDL 氧化敏感性的結果上並不一致，故似可推測偏脂溶性或偏水溶性之多元酚類化合物在抗氧化機制上之差異，進一步揭露了脂溶性抗氧化劑與水溶性抗氧化劑在使用上的問題點。脂溶性抗氧化劑由於其空間位向之緣故易與 LDL 嵌合，但可能藉此導致 LDL 內源性抗氧化劑之被取代，造成 LDL 受到氧化之機會增加；水溶性抗氧化劑由於本身在血液循環中無法長期存在，且如多元酚類化合物在體內之吸收狀況不佳，除非以長期補充之方式維持體內濃度之衡定，故較無法藉由在體外之清除自由基或螯合金屬離子之方式在體內達到抗氧化之效果，但卻可與 LDL 表面之結合，而使內源性  $\alpha$ -tocopherol 再生，達到保護 LDL 免受氧化之目的。茶中具有抗氧化活性成份物質至今仍多未明瞭，長期食用多元酚類化合物之流病調查顯示茶與降低心血管疾病發生

率之正相關性，故是否由茶中偏脂溶性之成份物質清除 LDL 中微量之過氧化物，再藉由偏水溶性之成份物質保護內源性抗氧化劑，並配合多元酚類可能具有之其他生理效應，如抑制氧化作用之酵素，而達到抗氧化與抗動脈粥狀硬化之目的，值得未來進一步之研究。

## 伍、結論

普洱茶茶甲醇抽出物之矽膠管柱層析區分物具有明顯之體外抗氧化活性，但在 apoE 缺陷小鼠病理動物模式無法降低 LDL 的氧化敏感性與抑制動脈粥狀硬化。人體實驗中經過 7 天的普洱茶飲用後，可藉由增加 LDL 內生育酚的含量而降低 LDL 的氧化敏感性。

## 陸、參考文獻

- 尤新輝. 從茶葉原料探討茶飲料的品質. 食品工業. 1992. 24 (12): 16-27.
- 林蘭砒. 普洱茶降血脂之作用。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文. 1997.
- 邵宛芳. 今昔普洱茶主要化學成份差異的研究. 茶-品質-人體健康國際學術討論會論文. 1995.
- 黃桂樞. 中國普洱茶文化研究. 中國普洱茶國際學術研討會論文集. 雲南科技出版社. 1994
- 黃惠兒. 茶葉降血脂成份之研究. 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文. 1996.
- 劉張惠泉. 普洱沱茶抑制低密度脂蛋白氧化之研究. 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文. 1997.
- Acker, S. A. B. E., Berg, D.-J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Bennekom, W. P., Vijgh, W. J. F. and Bast, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radi. Biol. Med.* 1996, 20 (3): 331-342.
- Andersson, C.-M., Hallberg, A. and Högborg, T. Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. *Advances Drug Res.* 1996, 28: 65-180.
- Armstrong, M. L. and Heistad, D. D. Animal model of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1990, 85: 15-23.
- Bird, D. A., Tangirala, R. K., Fruebis, J., Steinberg, D., Witztum, J. L. and Palinski, W. Effect of probucol on LDL oxidation and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J. Lipid Res.* 1998, 39: 1079-1090.
- Björkhem, I., Freyschuss, A., Breuer, O., Diczfalusy, U., Berblund, L. and Henriksson, P. The antioxidant butylated hydroxytoluene protects against atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb.* 1991, 11: 15-22.
- Bocan, T. M. A., Mueller, S. B., Mazur, M. J., Uhlendorf, P. D., Brown, E. Q. and Kieft, K. A. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis.* 1993, 102: 9-22.
- Bonorden, W. R. and Pariza, M. W. Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: Kotsonis, F. N., Mackey, M. and Hjelle, J. eds. *Nutritional Toxicology.* New York : Raven. 1994, 19-48.

- Braun, M., Hohlfeld, T., Kienbaum, P., Weber, A.-A., Sarbia, M. and Schror, K. Antiatherosclerotic effects of oral cicaprost in experimental hypercholesterolemia in rabbits. *Atherosclerosis*. 1993, 103: 93-105.
- Breslow, J. L. Lipoprotein metabolism and atherosclerosis susceptibility in transgenic mice. *Current Opin. Lipidol*. 1994a, 5: 175-184.
- Breslow, J. L. Insights into lipoprotein metabolism from studies transgenic mice. *Annu. Rev. Physiol*. 1994b, 56: 797-810.
- Breslow, J. L. Mouse models of atherosclerosis. *Science*. 1996, 272: 685-688.
- Breslow, J. L., Plump, A. and Dammerman, M. New mouse models of lipoprotein disorders and atherosclerosis. In: Fuster, V., Ross, R. and Topol, E. J. eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996, 363-378.
- Brown M.S. and Goldstein J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986, 232: 34-47.
- Bui, M. H. Simple determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and carotenoids (lutein, all-*trans*-lycopene,  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes) in human plasma by isocratic liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*. 1994, 654: 129-133.
- Carbonneau, M.-A., Leger, C. L., Monnier, L., Bonnet, C., Michel, F., Fouret, G., Dedieu, F. and Descomps, B.. Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein  $\text{Cu}^{2+}$ -oxidizability: possible explanation by phenolic location. *Eu. J. Cline. Nutr*. 1997, 51: 682-690.
- Catapano, A. L. Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology*. 1997, 48(1): 39-44.
- Chen, C-W and Ho, C-T. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black tea. *J. Food Lipid*. 1995, 2: 35-46.
- Davies, M. J. and Woolf, N. Atherosclerosis: what is it and why does it occur? *Br. Heart J*. 1993, 69 (suppl.): S1-S11.
- Demacker, P. N. M., Hijmans, A. G. M. and Jansen, A. P.. Enzymic and chemical-extraction determinations of free fatty acids in serum compared. *Clin. Chem*. 1982, 28: 1765-1768.
- De Rijke, Y. B., Demacker, P. N. M., Assen, N. A. Sloots, L. M. Katan, M. B. and

- Stalenhoef, A. F. H.. Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996, 63: 329-334.
- Devaraj, S., Adams-Huet, B., Fuller, C. J. and Jialal, I.. Dose-response comparison of *RRR*- $\alpha$ -tocopherol and all-racemic  $\alpha$ -tocopherol on LDL oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17: 2273-2279.
- Diaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A. and Keaney, J. F.. Antioxidant and atherosclerotic heart disease. *N. Engl. J. Med.* 1997, 337: 408-416.
- Dieber-Rotheneder, M., Puhl, H., Waeg, G., Striegl, G. and Esterbauer, H.. Effect of oral supplementation with D- $\alpha$ -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J. Lipid Res.* 1991, 32: 1325-1332.
- Dreosti, I. E. Bioactive Ingredients: Antioxidants and polyphenols in tea. *Nutri. Rev.* 1996, 54 (11): S51-S58.
- Elinder, L. S., Hådel, K., Johansson, J., Mølgaard, J., Holme, I., Olsson, A. G. and Walldius, G. Probucol treatment decreases serum concentrations of diet-derived antioxidants. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, 15: 1057-1063.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puel, H. and Jurgens, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 1992, 13: 341-390.
- Esterbauer, H., Puhl, H., Dieber, R. M., Wang, G. and Rabl, H. Effect of antioxidant on oxidative modification of LDL. *Annals Med.* 1991, 23 (5): 573-581.
- Ferns, G. A. A., Lamb, D. J. and Taylor, A.. The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus. *Atherosclerosis.* 1997, 133: 139-152.
- Finger, A., Kuhr, S. and Engelhardt, U. H. Chromatography of tea constituents. *J. Chromatogr.* 1992, 624: 293-315.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L. and Kinsella, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* 1993, 341: 1103-1104.
- Frei, B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991, 54 (Suppl.): 1113s-1118s.

- Freyschuss, A., Stiko-Rahm, A., Swedenborg, J., Henriksson, P., Björkhem, I., Berglund, L. and Nilsson, J.. Antioxidant treatment inhibits the development of intimal thickening of after balloon injury of the aorta in hypercholesterolemic rabbits. *J. Clin. Invest.* 1993, 91: 1282-1288.
- Fuhrman, B., Buch, S., Vaya, J., Belinky, P. A., Coleman, R., Hayek, T., and Aviram, M. Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: *in vitro* and *ex vivo* studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 66: 267-275.
- Fuller, C. J., Grundy, S. M., Norkus, E. P. and Jialal, I. Effect of ascorbate supplementation on low density lipoprotein oxidation in smokers. *Atherosclerosis.* 1996, 119: 139-150.
- Green, M. S. and Harari, G. Association of serum lipoproteins and health-related habits with coffee and tea consumption in free-living subjects examined in the Israeli CORDIS study. *Prev. Med.* 1992, 21: 532-545.
- Grinberg, L. N., Newmark, H., Kitrossky, N., Rahamim, E., Chevion, M. and Rachmilewitz, E. A. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. *Biolchem. Pharm.* 1997, 54: 973-978.
- Guo, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S. and Xin, W. Studies on protective mechanisms of four compounds of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1304: 210-222.
- Halevy, D., Thiery, J., Nagel, D., Arnold, S., Erdmann, E., Hofling, B., Cremer, P. and Seidel, D. Increased oxidation of LDL in patients with coronary artery disease is independent from dietary vitamins E and C. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17: 1432-1437.
- Halliwell, B.. Free radicals and antioxidants: a personal review. *Nutr. Rev.* 1994, 52 (8): 253-265.
- Halliwell, B.. Oxidation of low-density lipoprotein: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 61: 670S-677S.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: a overview. *Method Enzymol.* 1990, 186: 59-85.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. and Cross, C. E. Free radicals, antioxidants, and

- human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 1992, 119 (6): 598-620.
- Harats, D., Chevion, S., Nahir, M., Norman, Y., Sagee, O. and Berry, E. M. Citrus fruit supplementation reduces lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamins C and E in vivo. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, 67: 240-245.
- Hayatsu, H., Inada, N., and Kakutani, T. Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. *Prev. Med.* 1992, 21: 370-376.
- Hayek, T., Fuhrman, B., Vaya, J., Rosenblat, M., Belinky, P., Coleman, R., Elis, A. and Aviram, M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with oxidation and aggregation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17: 2744-2752.
- Hegele, R. A. 1996. The pathogenesis of atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 246: 21-38.
- Hennekens. C. H., Buring, J. E. and Manson, J. E. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 1996, 334: 1145-1149.
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C., Katan, M. B., and Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993, 342: 1007-1011.
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M. and Kromhout, D.. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet.* 1997a, 349: 699.
- Hertog, M. G. L. and Hollman, P. C. H.. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *European J. Clin. Nutr.* 1996, 50: 63-71.
- Hertog, M. G. L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B. S., Toshima, H., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., and Katan, M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Studies. *Arch. Intern. Med.* 1995, 155: 381-386.

- Hertog, M. G. L., Sweetnam, P. M., Fehily, A. M., Elwood, P. C. and Kromhout, D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997b, 65: 1489-1494.
- Hill, D. L. and Grubbs, C. J. Retinoids and cancer prevention. *Ann. Rev. Nutr.* 1992, 12: 161-181.
- Hixson, J. E. and the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. *Arterioscler. Thromb.* 1991, 11: 1237-1244.
- Ho, C-T., Chen, Q., Shi, H., Zhang, K-Q., and Rosen, R. T. Antioxidative effect of polyphenol extract prepares from various Chinese teas. *Prev. Med.* 1992, 21: 520-525.
- Hollman, P. C. H., Hertog, M. G. L. and Katan, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.* 1996, 57: 43-46.
- Holvoet, P., Theilmeier, G., Shivalkar, B., Flameng, W. and Collen, D. LDL hypercholesterolemia is associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18: 415-422.
- Horiuchi, K., Tajima, S., Menju, M. and Yamamoto, A. J. Structure and expression of mouse apolipoprotein E gene. *J. Biochem.* 1989, 106: 98-103.
- Ikeda, I., Imasato, Y., Sasaki, E., Nakayama, M., Nagao, H., Takeo, T., Yaybe, F. and Sugano, M. Tea catechins decrease micelle solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochem. Biophys. Acta.* 1992, 1127: 141-146.
- Imai, K., and Nakachi, K. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *BMJ.* 1995, 310: 693-696.
- Ishii, I., Ito, Y., Morisaki, N., Saito, Y. and Hirose, S. Genetic differences of lipid metabolism in macrophages from C57BL/6J and C3H/HeN mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, 15: 1189-1194.
- Ishikawa, T., Suzukawa, M., Ito, T., Yoshida, H., Ayaori, M., Nishiwaki, M., Yonemura, A., Hara, Y., and Nakamura, H. Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to

- oxidative modification. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 66: 261-266.
- Iwata, K., Inayama, T., Miwa, S., Kawaguchi, K. and Koike, G. Effect of Oolong tea on plasma lipids and lipoprotein lipase activity in young women. *J. Japan. Soc. Nutr. Food Sci.* 1991, 44 (4): 251-259.
- Jacob, R. A. and Burri, B. J. Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996, 63: 985S-990S.
- Jankun, J., Selman, S. H. and Swiercz, R. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature.* 1997, 387: 561.
- Janssen, P. L. T. M. K., Mensink, R. P., Cox, F. J. J., Harryvan, J. L., Hovenier, R., Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, 67: 255-262.
- Jialal, I. and Devaraj, S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin. Chem.* 1996, 42(4): 498-506.
- Jialal, I., Fuller, C. J. and Huet, B. A. The effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation on LDL oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, 15: 190-198.
- Jialal, I., Vega, G. L. and Grundy, S. M. Physiological levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1990, 82: 185-191.
- Johansson, J., Olsson, A.G., Bergstrand, L., Elinder, L. S., Nilsson, S., Erikson, U., Mølgaard, J., Holme, I. And Walldius, G. Lowering of HDL2b by probucol partly explains the failure of the drug to affect femoral atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia: a probucol quantitative regression Swedish trial (PQRST) report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, 15: 1049-1056.
- Kamal-Eldin, A. and Appelqvist, L. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipid* 1996, 31:671-701.
- Katan, M. B. Flavonoids and heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 65: 1542-1543.
- Kayden, H. J. and Traber, M. G. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J. Lipid Res.* 1993, 34: 343-358.

- Keidar, A., Attias, J., Smith, J., Breslow, J. L. and Hayek, T. The angiotensin-II receptor antagonist, losartan, inhibits LDL lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 1997, 236: 622-625.
- Keli, S. O., Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. and Kromhout, D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen Study. *Arch. Intern. Med.* 1996, 156: 637-642.
- Kerry, N. L. and Abbey, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis.* 1997, 135: 93-102.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A. and Maatela, J. Flavonoids intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br. Med. J.* 1996, 312: 478-481.
- Knight, J. A. Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1997, 27 (1): 11-25.
- Koketsu, M. Antioxidative activity of tea polyphenols. In: Yamamoto, T., Juneja, L. R., Chu, D.-C. and Kim, M. eds. *Chemistry and applications of green tea.* New York: CRC Press. 1997, 37-50.
- Kono, S., Shinchi, K., Ikeda, N., Yanai, F., and Imanishi, K. Green tea consumption and serum lipid profiles: a cross sectional study in Northern Kyushu. *Japan. Prev. Med.* 1992, 21: 526-531.
- Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlschutter, A. and Beisiegel, U. Antioxidant and prooxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 1996, 37: 1436-1448.
- Kreuzer, J., White, A. L., Knott, T. J., Jien, M.-L., Mehrabian, M., Scott, J., Young, S. G. and Haberland, M. E. Amino terminus of apolipoprotein B suffices to produce recognition of malondialdehyde-modified low density lipoprotein by the scavenger receptor of human monocyte-macrophages. *J. Lipid Res.* 1997, 38: 324-342.
- Larson, R. A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry.* 1988, 27 (4): 969-978.
- Lopes-Virella, M. F., Stone, P., Ellis, S. and Colwell, J. A. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin.*

- Chem. 1977, 23: 882-884.
- Luo, M., Kannar, K., Wahlqvist, M. L., and O'Brien, R. C. Inhibition of LDL oxidation by green tea extract. *Lancet*. 1997, 349: 360-361.
- Lusis, A. J. and Navab, M. Lipoprotein oxidation and gene expression in the artery wall. *Biochem. Pharm.* 1993, 46(12): 2119-2126.
- Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Brown, M. S., Ho, Y. K. and Goldstein, J. L. Cholesteryl ester synthesis in macrophages: stimulation by  $\beta$ -very low density lipoproteins from cholesterol-fed animals of several species. *J. Lipid Res.* 1980, 21: 970-980.
- Mao, S., Yates, M., Parker, R., Chi, E. and Jackson, R. Attenuation of atherosclerosis in a modified strain of hypercholesterolemic Watanabe rabbits with use of probucol analogue (MDL 29,311) that does not lower serum cholesterol. *Arterioscler. Thromb.* 1991, 11: 1266-1275.
- Maxwell, S. R. J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 1995, 49 (3): 345-361.
- Maxwell, S., Cruickshank, A. and Thorpe, G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet*. 1994, 344: 193-194.
- McAnlis, G. T., McEneny, J., Pearce, J. and Young, I. S. Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification. *Eu. J. Clin. Nutr.* 1998, 52: 202-206.
- McGowan, M. W., Artiss, J. D., Strandbergh, D. R. and Zak, B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglyceride. *Clin. Chem.* 1983, 29 (3): 538-542.
- Mehta, D., Angelini, G. D. and Byran, A. J. Experimental models of accelerated atherosclerosis syndromes. *Intern. J. Cardiol.* 1996, 56: 235-257.
- Miller, N. J., Castelluccio, C., Tijburg, L., and Rice-Evans, C. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators? *FEBS letter*. 1996, 392: 40-44.
- Mitscher, L. A., Jung, M., Shankel, D., Dou, J.-H., Steele, L. and Pillai, S. P. Chemoprotection: a review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Camellia sinensis*) and certain of its constituents. *Med. Res. Rev.* 1997, 17 (4): 327-365.
- Miura, S., Watanabe, J., Sano, M., Tomita, T., Osawa, T., Hara, Y. and Tomita, I.

- Effects of various natural antioxidants on the Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.* 1995 18(1): 1-4.
- Miura, S., Watanabe, J., Tomita, T., Sano, M. and Tomita, I. The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.* 1994, 17(12): 1567-1572.
- Moghadasian, M. H., McManus, B. M., Pritchard, P. H. and Frohlich, J. J. "Tall oil"--derived phytosterols reduce atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17: 119-126.
- Mukhtar, H., Katiyar, S. K. and Agarwal, R. Green tea and skin-anticarcinogenic effect. *J. Invest. Dermat.* 1994, 102(1): 3-7.
- Mukhtar, H., Wang, Z. Y., Katiyar, S. K., and Agarwal, R. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Prev. Med.* 1992, 21: 351-360.
- Munday, J. S., Thompson, K. G., James, K. A. C. and Manktelow, B. W. Dietary antioxidants do not reduce fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18: 114-119.
- Muramatsu, K., Fukuyo, M. and Hara, Y. Effects of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1986, 32: 623-622.
- Nagano, Y., Nakamura, T., Matsuzawa, Y., Cho, M., Ueda, Y. and Kita, T. Probucol and atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit---long-term antiatherogenic effect and effects on established plaques. *Atherosclerosis.* 1992, 92: 131-140.
- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., and Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler. Thromb.* 1994, 14: 133-140.
- Noma, A., Okabe, H. and Kita, M. A new colorimetric micro-determination of free fatty acids in serum. *Clin. Chim. Acta.* 1973, 43: 317-320.
- Okubo, S., Toda, M., Hara, Y., and Shimamura, T. Antifungal and fungicidal activities of tea extracts and catechins against *Trichophyton*. *Jpn. J. Bacteriol.* 1991, 46: 509-514.

- Ooshima, T., Minami, T. and Aono, W. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Mutans streptococci*. *Caries Res.* 1993, 27: 124-129.
- Paigen, B., Morrow, A. Molmes, P. A. Mitchell, D. and Williams, R. A. Quantitative assessment of atherosclerosis lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987, 68: 231-240.
- Paigen, B., Plump, A. S. and Rubin, E. M. The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia. *Current Opin. Lipidol.* 1994, 5: 258-264.
- Palinski, W., Ord, V. A., Plump, A. S. Breslow, J. L., Steinberg, D., and Witztum, J. L. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis: determination of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler. Thromb.* 1994, 14: 605-616.
- Palinski, W., Horkko, S., Miller, E., Steinbrecher, U. P., Powell, H. C., Curtiss, L. K. and Witztum, J. L. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 1996, 98: 800-814.
- Parthasarathy, S., Wieland, E. and Steinberg, D. A role for endothelial lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, 86: 1046-1053.
- Parthasarathy, S., Young, S. G., Witztum, J. L., Pittmann, R. C. and Steinberg, D. Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 1986, 77: 641-644.
- Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagan, J. R., Oliver, P. M. and Maeda, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992, 89: 4471-4475.
- Plump, A. S. and Breslow, J. L. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu. Rev. Nutr.* 1995, 15: 495-518.
- Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G. Rubin, E. M. and Breslow, J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous

- recombination in ES cells. *Cell*. 1992, 71: 343-353.
- Prasad, K., Kalra, J. and Lee, P. Oxygen free radicals as a mechanism of hypercholesterolemic atherosclerosis: effects of probucol. *Int. J. Angiol.* 1994, 3: 100-112.
- Princen, H. M. G., Duyvenvoorde, W., Buytenhek, R., Blonk, C., Tijburg, L. B. M., Langius, J. A. E., Meinders, A. E. and Pijl, H. No effect of consumption of green and black tea on plasma lipid and antioxidant levels and on LDL oxidation in smokers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18: 833-841.
- Puhl, H., Wang, G. and Esterbauer, H. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods in Enzymology*. 1994, 233: 425-441.
- Reaven, P. D., Khouw, A., Beltz, W. F., Parthasarathy, S. and Witztum, J. L. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by  $\beta$ -carotene. *Arterioscler. Thromb.* 1993, 13: 590-600.
- Reddick, R. L., Zhang, S. H., and Maeda, N. Atherosclerosis in mice lacking Apo E: evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler. Thromb.* 1994, 14: 141-147.
- Ree, J. H., Broek, W. J. A. A., Dahlmans, V. E. H., Groot, P. H. E., Vidgeon-Hart, M., Frants, R. R., Wieringa, B., Havekes, L. M. and Hofker, M. H. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 1994, 111: 25-37.
- Regnström, J., Nilsson, J., Tornvall, P., Landou, C. and Hamsten, A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet*. 1992, 339: 1183-1186.
- Rice-Evans, C. A. and Miller, N. J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Trans.* 1996a, 24: 790-795.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radi. Biol. Med.* 1996b, 20 (7): 933-956.
- Richmond, W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.* 1973, 19: 1350-1356.
- Rimm, E. B., Katan, M. B., Ascherio, A., Strampfer, M. J. and Willett, W. C. Relation

- between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann. Intern. Med.* 1996, 125: 384-389.
- Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G. A. and Willett, W. C. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N. Engl. J. Med.* 1993, 328: 1450-1456.
- Rosenfeld, M. E., Tsukada, T., Gown, A. M. and Ross, R. Fatty streak initiation in Watanabe heritable hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis.* 1987, 7: 9-23.
- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993, 362: 801-809.
- Ross, R. and Fuster, V. The pathogenesis of atherosclerosis. n: Fuster, V., Ross, R. and Topol, E. J. eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. Chap. 1996, 25: 441-460.
- Salah, N., Miller, N. J. Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P. and Rice-Evans, C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 322: 339-346.
- Samman, S., Brown, A. J., Beltran, C. and Singh, S. The effect of ascorbic acid on plasma lipids and oxidisability of LDL in male smokers. *Eu. J. Clin. Nutr.* 1997, 51: 472-477.
- Sano, M., Takenaka, Y., Kojima, R., Saito, S., Tomita, I., Katou, M. and Shibuya S. Effects of Pu-Erh tea on lipids metabolism in rats. *Chem. Pharm. Bull.* 1986, 34(1): 221-228.
- Sano, M., Takahashi, Y., Yoshino, K., Shimoi, K., Nakamura, Y., Tomita, I., Oguni, I. And Konomoto, H. Effect of tea (*Camellia sinensis*, L.) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: a comparison of green and black tea feeding. *Biol. Pharm. Bull.* 1995, 18 (7): 1006-1008.
- Schwartz, S. M., deBlois, D. and O'Brien, E. R. M. The intima: soil for atherosclerosis and restenosis. *Circu. Res.* 1995, 77: 445-465.
- Serafini, M., Ghiselli, A. and Ferro-Luzzi, A. *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *European J. Clin. Nutr.* 1996, 50: 28-32.
- Smith, J. D. and Breslow, J. L. The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J. Internal. Med.* 1997, 242: 99-109.

- Sparrow, C. P., Doebber, T. W., Olszewski, J., Wu, M. S., Ventre, J., Stevens, K. A. and Chao, Y.-S. Low density lipoprotein is protected from oxidation and the progression of atherosclerosis is slowed in cholesterol-fed rabbits by the antioxidant N,N'-diphenyl-phenylenediamine. *J. Clin. Invest.* 1992, 89: 1885-1891.
- Stampfer, M. J., Hennekens, C. H., Manson, J. E., Colditz, G. A., Rosmer, B. and Willett, W. C. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N. Engl. J. Med.* 1993, 328: 1444-1449.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., and Wissler, R. W. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, 15: 1512-1531.
- Stein, Y., Delplanque, B., Fesmire, J. D., Lee, D. M. and Alaupovic, P. Lack of effect of probucol on atheroma formation in cholesterol-fed rabbits kept at comparable plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis.* 1989, 75: 145-155.
- Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 1997a, 272 (34): 20963-20966.
- Steinberg, D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation.* 1997b, 95: 1062-1071.
- Steinberg, D. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis.* 1997c, 131 (suppl.): S5-S7.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. and Witztum, J. L. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 1989, 320 (14): 915-924.
- Stensvold, I., Tverdal, A., Solvoll, K., and Foss, O. P. Tea consumption, relationship to cholesterol, blood pressure and coronary artery disease mortality. *Prev. Med.* 1992, 21: 546-553.
- Stephens, N. G., Parsons, A., Schofield, P. M., Kelly, F., Cheeseman, K. and Mitchinson, M. J. Randomized controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet.* 1996, 347: 781-786.
- Stich, H. F. Teas and tea components as inhibitors of carcinogen formation in model

systems and man. *Prev. Med.* 1992, 21: 331.

- Tangirala, R. K., Casanada, F., Miller, E., Witztum, J. L., Steinberg, D., and Palinski, W. Effect of antioxidant N,N'-diphenyl-1,4-phenyldiamine (DPPD) on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995a, 15: 1625-1630.
- Tangirala, R. K., Rubin, E. M. and Palinski, W. Quantification of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J. Lipid Res.* 1995b, 36: 2320-2328.
- Terao, J., Piskula, M. and Yao, Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, 308: 278-284.
- Thomas, S. R., Neuzil, J., Mohr, D. and Stocker, R. Coantioxidants make  $\alpha$ -tocopherol an efficient antioxidant for low-density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 62 (suppl.): 1357S-1364S.
- Tijburg, L. B. M., Wiseman, S. A., Meijer, G. W. and Weststrate, J. A. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis.* 1997, 135: 37-47.
- Wang, H., Cao, G. and Prior, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45: 304-309.
- Westhuyzen, J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1997, 27 (1): 1-10.
- Wiseman, H., Plitzanopoulou, P. and O'reilly, J. Antioxidant properties of ethanolic and aqueous extracts of green tea compared to black tea. *Biochem. Soc. Trans.* 1996, 24: 390S.
- Wu, Y.-J., Hong, C.-Y., Lin, S.-J., Wu, P. and Shiao, M.-S. Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18: 481-486.
- Yamanaka, N., Oda, O., and Nagao, S. Green tea catechins such as (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin accelerate Cu<sup>2+</sup>-induced low density lipoprotein

- oxidation in propagation phase. FEBS letter. 1997, 401: 230-234.
- Yen, G-C., Chen, H-Y., and Peng H-H. Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. J. Agric. Food Chem. 1997, 45: 30-34.
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Avdievich, E., Surles, L. K., Jones, R. G., and Reynolds, J. B. Paradoxical enhancement of atherosclerosis by probucol treatment in apolipoprotein E-deficient mice. J. Clin. Invest. 1997, 99: 2858-2866.
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Burkey, B. and Maeda, N. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. J. Clin. Invest. 1994, 94: 937-945.
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A. and Mawda, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. Science. 1992, 258: 468-471.
- Zhu, B.-Q., Sievers, R. E., Sun, Y.-P., Isenberg, W. M. and Parmley, W. W. Effect of lovastatin on suppression and regression of atherosclerosis in lipid-fed rabbits. J. Cardiovas. Pharm. 1992, 19: 246-255.