嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

整合型計畫：數種植物對細胞發炎傷害之影響
子計畫一：咖啡渣萃取物對含氮自由基造成蛋白硝化的影響

計畫類別：□個別型計畫　　■整合型計畫
計畫編號：CNFS93-01
執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

整合型總主持: 杜平惠
計畫主持人：杜平惠
協同研究人員：王柏森
計畫參與人員：陳慧茹，林姿吟，凌秀華

執行單位：嘉南藥理科技大學

中華民國　94 年　2 月　24 日

一、摘要

本研究探討咖啡渣萃取物(WERCR)對低密度脂蛋白氧化及對 peroxynitrite 引發 SVEC 內皮細胞株蛋白硝化作用之影響。咖啡渣萃取物在 0.02 - 0.1 mg/ml 可以有效減少低密度脂蛋白氧化。另外，咖啡渣萃取物不但可以捕捉一氧化氮自由基，也可以有效捕捉超氧自由基。雖然咖啡渣萃取物無法減少脂多醣(Lipopolysaccharide; LPS)對巨噬細胞株 RAW 264.7 誘發 iNOS 及 COX-2 蛋白表現，但是可以有效減少 peroxynitrite 對內皮細胞進行蛋白硝化作用，此結果與與彼等捕捉一氧化氮與超氧陰離子有關係。

關鍵詞: 咖啡渣萃取物，低密度脂蛋白氧化，蛋白硝化

The effects of water extracts of roasted coffee residue (WERER) on low-density lipoprotein oxidation and peroxynitrite-induced protein nitration in SVEC endothelium cells were investigated. At 0.02~0.1 mg/ml, WERER showed a protective role on low-density lipoprotein oxidation. Furthermore,WERER not only directly scavenged nitric oxide but also scavenged superoxide. WERER could not affect iNOS and cyclooxygenase-2 protein expression in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. On the other hand, WERER displayed obviously inhibition effects on peroxynitrite-induced protein nitration in endothelium cells.

Key words: water extracts of roasted coffee residue, low-density lipoprotein, protein nitration

二、前言

含氮自由基 （如 NO, $ONOO^-$）在體內具有生理調節與組織傷害的角色。許多研究證實體內若有過多含氮自由基之產生，其會修飾蛋白，造成蛋白硝化作用，並進而引發組織病變及加速疾病惡化，尤其是心血管病變。因此，抑制蛋白硝化被認為是避免組織傷害之重要步驟。目前已知長期給予動物使用多酚類化合物，可以預防體內蛋白硝化所造成的損傷。

咖啡是最廣泛使用的食用植物之一。過去針對咖啡因的研究相當多，但是對咖啡中的多酚類化合物的生物活性功能探討則相當少。目前已知咖啡中的多酚類化合物可以抑制含氧自由基造成的氧化傷害，及具有抗致突變作用。這些作用被認為與其所含多酚類成分（如 chlorogenic acid, caffeic acid）具抗氧化性有關。此外，本研究室也已證實咖啡渣也含有大量的多酚類化合物，且具有抗氧化特性 (1)，惟彼等對細胞蛋白硝化反應是否有正面性之影響目前仍未清楚。

有鑑於此，本研究擬以咖啡渣萃取物，探討對含氮自由基引發血管內皮細胞蛋白硝化作用的影響。

一、 結果與討論

咖啡渣萃取物抗低密度脂蛋白氧化作用

圖一為咖啡渣萃取物對銅離子誘發低密度脂蛋白氧化作用之影響。結果顯示咖啡渣萃取物對低密度脂蛋白氧化的保護作用隨濃度增加而加強，當添加濃度達 0.1mg/ml 時，咖啡渣萃取物對低密度脂蛋白氧化抑制率為 88%。若與 Trolox 相比較，則咖啡渣萃取物幾乎與 Trolox 有相等的保護作用。過去咖啡渣萃取物已經被證實具有強抗氧化能力，而圖一更顯示咖啡渣對低密度脂蛋白氧化有一定程度的正面作用。

咖啡渣萃取物捕捉一氧化氮自由基作用

圖二為咖啡渣萃取物捕捉 sodium nitroprusside 所釋放一氧化氮自由基作用。由結果可知咖啡渣萃取物在 0.001~1.0 mg/ml 對一氧化氮自由基捕捉率可達 9~70%。而 Trolox 在相同濃度下，則可捕捉一氧化氮自由基 5~89%。

咖啡渣萃取物捕捉超氧自由基作用

由圖三結果可知咖啡渣萃取物在 0.02~0.8 mg/ml 對超氧自由基捕捉率可達 9~52%。而 Trolox 在相同濃度下，則可捕捉超氧自由基 20~54%。

咖啡渣萃取物對鼠巨噬細胞 iNOS 與 COX-2 蛋白表現之影響

由圖四 A 可知咖啡渣萃取物在 0.5, 1.0 mg/ml 無法有效抑制 LPS 對巨噬細胞 RAW264.7 誘發 iNOS 及 COX-2 蛋白表現，其中單獨處理咖啡渣萃取物在 0.5, 1.0mg/ml 甚至可增加 COX-2 蛋白表現。

咖啡渣萃取物影響蛋白硝化之作用

由圖四 B 可知利用 peroxidase+ NO^-_2+ HOCl 與 peroxidase+ NO^-_2+ H_2O_2 皆可造成內皮細胞株 SVEC 蛋白的硝化修飾。進行硝化作用的蛋白主要在 97~205 kD。而 peroxidase+ NO^-_2+ H_2O_2 比 peroxidase+ NO^-_2+ HOCl 更明顯可以對內皮細胞進行硝化作用(lane 1, 2, 3)。而咖啡渣萃取物在 0.2, 0,5 mg/ml 濃度下，可以有效抑制內皮細胞進行蛋白硝化作用。

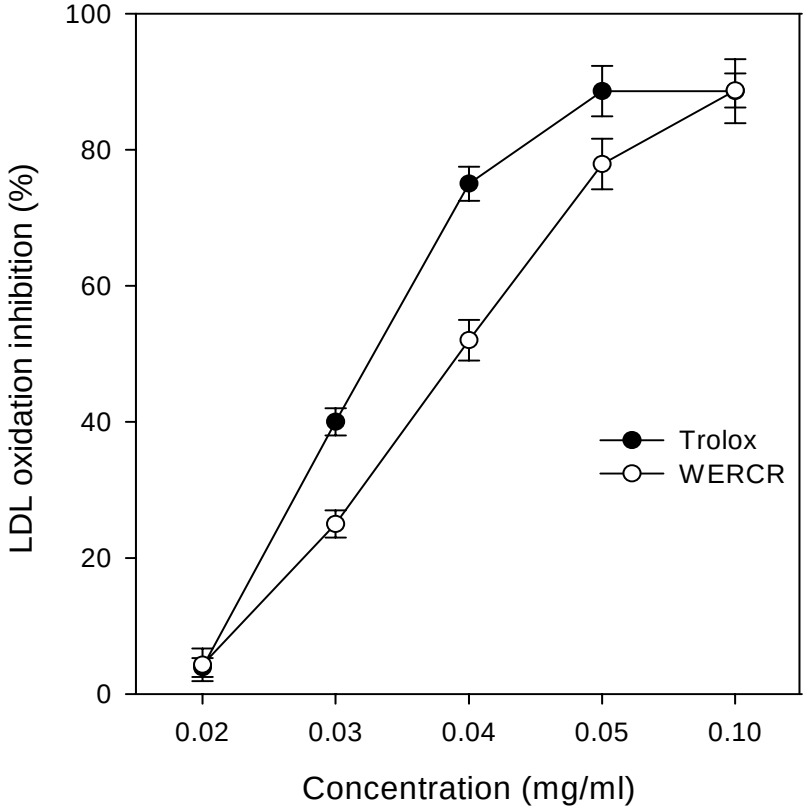
綜合上述初步結果可知咖啡渣萃取物對低密度脂蛋白氧化具有保護作用，而先前研究已知低密度脂蛋白氧化的產生，與體內大量產生一氧化氮自由基與超氧自由基有密切關係，尤其一氧化氮自由基與超氧自由基可以進一步反應生成 peroxynitrite，而 peroxynitrite 則是一強力蛋白硝化作用劑。而巨噬細胞表現 iNOS 與 COX-2 蛋白，便是體內產生一氧化氮自由基與超氧自由基之主要來源之一。因此，雖然咖啡渣萃取物的抗氧化能力可直接捕捉自由基，以避免氧化傷害，但是無法明顯抑制產生自由基的相關蛋白表現，另外，由上述結果可知，咖啡渣能抑制內皮細胞進行蛋白硝化作用，與其捕捉一氧化氮與超氧陰離子有很大關係。至於，此抑制蛋白硝化作用之成分是否與其抗氧化

成分相同仍待進一步研究證實。

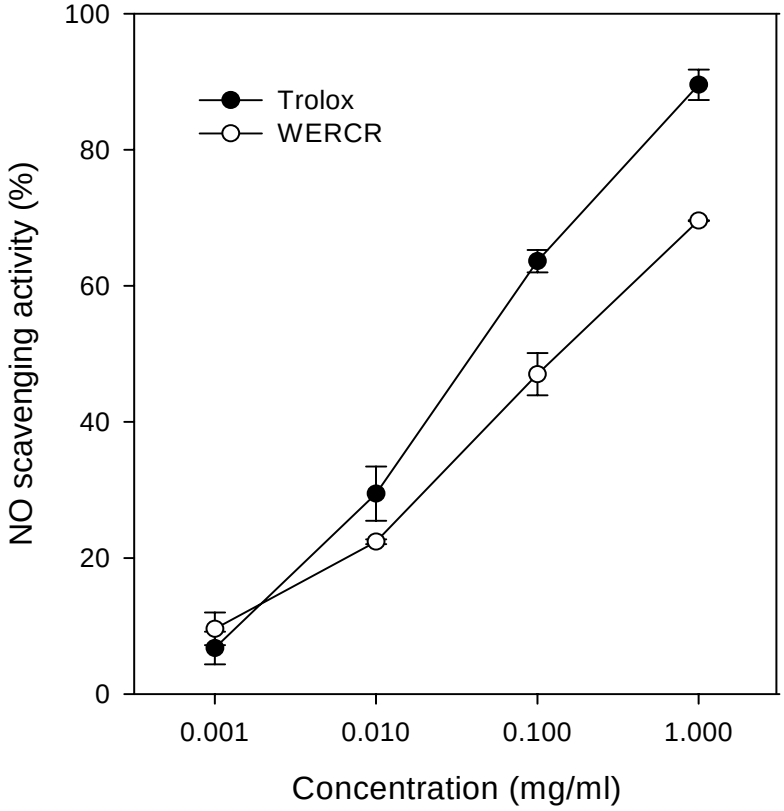
四、參考文獻

1. Yen, W.J., Wang, B.S., Chang, L.W. and Duh, P.D. (2005) Antioxidant properties of coffee residues. (accepted) *Journal of Agricultural & Food Chemistry.*

嘉南大學

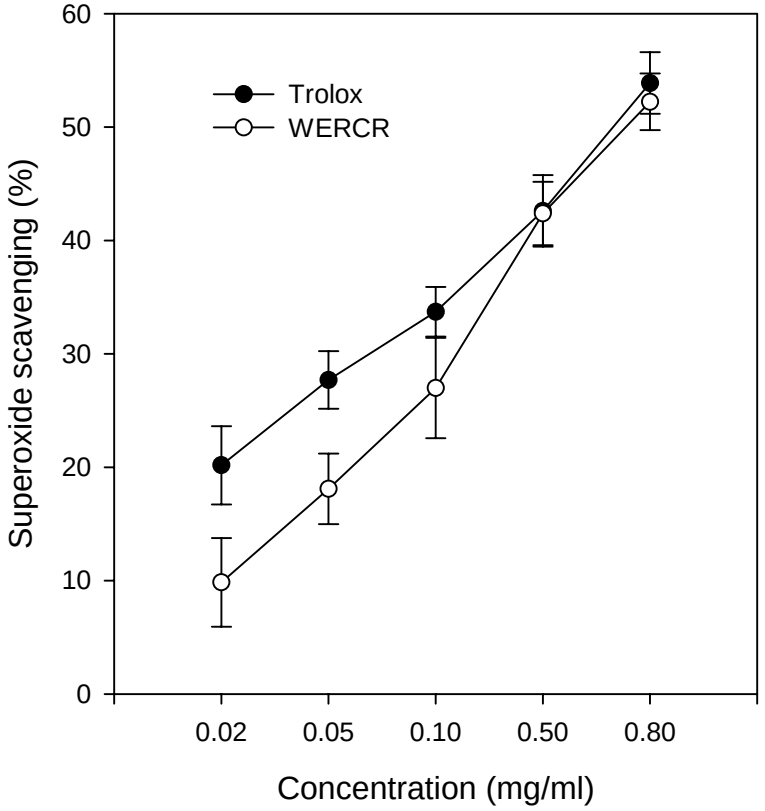


圖一 咖啡渣萃取物(WERCR) 對低密度脂蛋白氧化之影響。
Figure 1. The effect of water extract of roasted coffee residue (WERCR) on LDL oxidation.



圖二 咖啡渣萃取物(WERCR)對一氧化氮自由基之捕捉活性。

Figure 2. The scavenging activity of water extract of roasted coffee residue (WERCR) on nitric oxide.



圖三 咖啡渣萃取物(WERCR)對超氧自由基之捕捉活性。

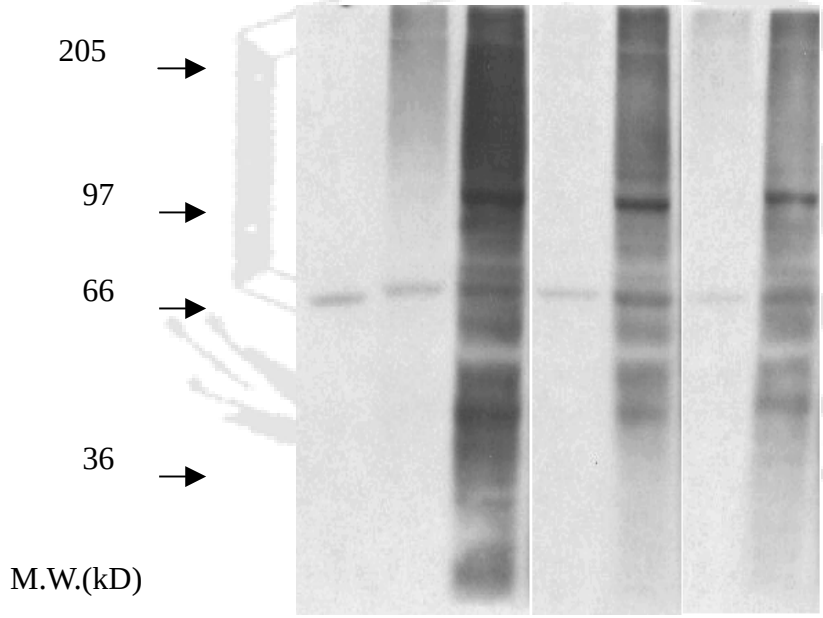
Figure 3. The scavenging activity of water extract of roasted coffee residue (WERCR) on superoxide.

A

WERCR(ug/ml)	0	500	1000	0	500	1000
LPS(200ng/ml)	-	-	-	+	+	+

B

WERCR(ug/ml)	0	0	0	200	200	500	500
peroxidase+NO^-_2+HOCl	0	+	-	+	-	+	-
peroxidase+NO^-_2+H_2O_2	0	-	+	-	+	-	+



圖四（A）咖啡渣萃取物(WERCR)對脂多醣(LPS)在巨噬細胞株 RAW 264.7 誘發 iNOS 及 COX-2 蛋白表現之影響。（B）咖啡渣萃取物(WERCR)對 peroxynitrite 在內皮細胞進行蛋白硝化作用之影響。

Figure 4. (A) The effect of water extract of roasted coffee residue (WERCR) on inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) protein expressions in LPS-stimulated macrophage RAW 264.7 cells. (B) The effect of water extract of roasted coffee residue (WERCR) on peroxynitrite-induced protein nitration in SVEC endothelium cells.