

第三章 實驗部分

第一節 實驗材料

一、實驗材料

1. 實驗藥劑

本研究使用的黃芩素 (baicalein) 是由 中國醫藥研究所 蔡東湖 博士提供。

2. 中藥材

黃芩於 民國八十八年四月，由 私立中國醫藥學院醫院中藥局 謝雲忠藥師，獲得完整黃芩根部，作為切片與組織鏡檢之材料。

3. 細胞株來源

本論文實驗所使用之細胞為初代培養之 Sprague-Dawley 老鼠心臟內皮細胞 (rat heart endothelial cell , 簡稱 RHEC) , 老鼠由 台中榮民總醫院動物中心 提供。

二、試劑種類及來源

【 Pharmacia biotwch 】 Acrylamide($\text{CH}_2\text{:CHCONH}_2$)、 Ammonium persulphate(APS)、 Protein A Sepharose

- 【 BIO-RAD 】 Bis(N,N' -methylene-bis-arcylamide) 、
N,N,N' ,N' -Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- 【 MERCK 】 EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈•2H₂O)、 Potassium chloride (KCl)、
Sodium hydroxide (NaOH)、 Dimethylsulfoxide (DMSO)、 Sodium
dodecyl sulfate (SDS)、 Methanol、 NaCl、 HCl、 2-Mercaptoethanol
(2-ME)、 Ethanol、 Formalin、 Ortho-phosphoric acid 85% (HPLC grade)
- 【 SIGMA 】 EGTA(Ethylene glycol-bis tetraacetic acid)、 Methylene
blue(C₁₆H₁₈ClN₃S•3H₂O)、 Thymidine(C₁₀H₁₄N₂O₅)、 Trypsin(1 : 250)
Triton X-100、 Acridine Orange、 propidium iodide (PI)、 EGTA、
Dithiothreitol (DTT)、 Leupeptin、 ATP、 endothelial cell growth
supplement (ECGS) 、 Laminin 、
MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide or
methylthiotetrazole)
- 【 FLUKA 】 Paraformaldehyde(CH₂O)_n
- 【 FMC 】 TRIS(Hydroxymethyl) Aminomethane (C₄H₁₁NO₃)
- 【 榮民製藥 】 Penicillin、 Streptomycin
- 【 Amersham 】 ECL detection Kits
- 【 BM(Boehringer Mannheim) 】 Histone H1、 Ribonuclease(RNase)、
Fibronectin
- 【 BioVentures 】 BioMarker

【Gibco】Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、Fetal Bovine Serum (FBS)、Trypsin

【Collaborative Biomedical product】Matrigel[®] Brand、Vitronectin

【NEN】³²P-ATP、³H-thymidine

【Mallinckrodt Baker】Acetonitrile (HPLC grade)、methanol (HPLC grade)

【Transduction Laboratory and Oncogene Science and Santa Cruz】

Anti-Cdc2、Anti-Cdk2、Anti-Cdk3、Anti-Cdk4、Anti-cyclin D1、

Anti-cyclin D2、Anti-cyclin D3、Anti-cyclin B、Anti-cyclin E、

Anti-cyclin A、Anti-p21^{CIP1/WAF1}、Anti-p27^{KIP1}、Anti-p53、Anti-RB

(pRb) Anti-Rb2 (p130) 等 Antibodies。

第二節 實驗方法

一、Baicalein 純度之檢測

精秤 Baicalein 粉劑 0.01 mg, 溶於 10c.c. Methanol 中後, 使用 0.22 μ M 之濾膜細過濾後, 置於棕色瓶中避光 4 貯存。

使用高效相層析儀 (HPLC) ; 幫浦 PU-980 Intelligent HPLC Pump, 紫外光偵測器 UV-970 Intelligent UV/Vis Detector, 記錄器 Computer, 自動注射器 AS-950 Intelligent Sampler, 層析管柱 VERCODAK Inertsil 5 ODS-2 4.6 \times 150 mm; 並以移動相: 0.05% 磷酸與氰甲烷(60:40), 流速: 1 ml/min, 檢測波長: 276 nm 作為分析的條件。

二、細胞培養液與藥劑之配製

1. 細胞培養液之配製

Dulbecco's Modified Eagle Medium powder (DMEM, Gibco), 以 10g 先溶於約 900 ml Milli-Q 去離子水中, 加入 3.7g 的 NaHCO₃, 再用 HCl 調整 pH=7.0~7.2 後以 Milli-Q 去離子水添加足量體積至 1 公升, 使用 0.45 μ m 之濾膜 (filter) 粗過濾後在無菌操作下以 0.2 μ m 之濾膜細過濾, 貯存於 4 備用。

2.完全培養液 (Complete Medium)

每毫升 DMEM 培養基添加 75 μ g 內皮細胞生長補充劑 (Endothelial cell growth supplement) 100 IU 青黴素 (penicillin) 100 μ g 鏈黴素 (streptomycin), 並加入 15% 胎牛血清 (Fetal bovine serum , FBS)

除了無內皮細胞生長補充劑 (Endothelial cell growth supplement) 以外, 其他成分與完全培養液相同, 可作為維持細胞正常生長之培養液, 稱之為生長培養液。

3.黃芩素元藥劑 (baicalein)

精秤 baicalein 粉劑 27.023 mg, 溶於 DMSO (dimethyl-sulfoxide) 中, 配成 0.1 M 的濃度分裝儲存於 -20 備用。

4.老鼠心臟內皮細胞培養方法

老鼠心臟內皮細胞 (rat heart endothelial cell , 簡稱 RHEC) 的分離是依照 Richards(1986)等的實驗方法⁽¹¹⁵⁾, 並經由 李鳳琴博士使用 Von Willebrand factor 的免疫螢光染色 (Immunofluorescence staining with Von Willebrand factor antibody) 確認⁽¹¹⁶⁾。首先, 將 6 個取自 1 天大的新生老鼠心臟, 用 phosphate buffered salines (PBS) 清洗, 然

後剪碎，此組織以 0.125% 的胰蛋白酶 (trypsin) 完全的消化 (trypsinization) 而所獲得之細胞 (包含心肌細胞 (myocardial cell) 及內皮細胞) 置於 10 ml 之內皮細胞完全培養液中，收集細胞並傾去上清液，沈降之細胞再分散到內皮細胞完全培養液中，將內皮細胞植入培養盤中培養於含有 5% 二氧化碳，37 °C 的恆溫箱中，讓細胞貼附 90 分鐘後，移去培養液，用 PBS 洗去沒吸附細胞 (大部分為心肌細胞 (myocardial cell)，因為其吸附需 24 小時之久)，再加入完全培養液，將細胞置於含有 5% 二氧化碳，37 °C 恆溫箱中繼續培養。

細胞的次培養 (subculture) 則以 0.125% 胰蛋白酶將細胞於培養皿中打散，再分植到新的培養皿中，並以無內皮細胞生長補充劑之培養液培養。而用於實驗的內皮細胞主要是取自於第二、三次的次培養 (second、third passage) 細胞。

三、細胞生長的測定 (cell proliferation assay)

細胞經 TEG 處理後，以生長培養液調成 1×10^5 個細胞/well 的密度植入 12 孔的培養盤中 (Falcon)，每孔含有 1 ml 培養液，讓細胞貼附 16 至 18 小時後，分別以內含 0、1、5、10、20、40、80、100 μ M baicalein 的生長培養液培養於含有 5% 二氧化碳，37 °C 的恆溫箱中。每二天重新更新含有藥劑之培養液，重複處理至少三次，每

處理 3~6 重複，每天取出一盤，以血球計數器 (hemocytometer) 輔佐以 Trypen blue 染色方法計算各孔內的細胞數，以各處理組的平均數作生長曲線圖，並取生長對數值來求生長抑制率。

四、細胞型態之探討 (cell morphology observation)

老鼠心臟內皮細胞植於 12 孔培養盤中，再以不同濃度之 baicalein 處理後，以 Olympus IX 70 倒立顯微鏡觀察、拍照記錄細胞型態之變化。

五、DNA 與蛋白質合成實驗 (DNA and Protein synthesis assay)

利用 DNA synthesis assay，可測定 baicalein 對老鼠內皮細胞去氧核糖核酸合成之影響。細胞先以生長培養液調成 1×10^5 個細胞/well 的密度植入 12 孔的培養盤中，細胞貼附 16 至 18 小時後，以內含 0、10、100 μ M baicalein 生長培養液處理之。經 baicalein 處理，並隔一天重新更新含有藥劑之培養液之細胞分別在 3、5 天後，做合成實驗檢測。首先，細胞以磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗兩次，再用不含胎牛血清之 DMEM 清洗 1 次，各加入 0.6 μ Ci/ml 氚標幟胸腺嘧啶 (3 H-Thymidine)，於 37 繼續培養 1 小時後，吸除培養液，並以磷酸緩衝液清洗兩次，加入 1 ml/well 固定液 (50%

methanol、10% acetic acid) 固定細胞 10 分鐘，以磷酸緩衝液清洗，加入 10% TCA solution (trichloroacetic acid) 洗兩次，再用磷酸緩衝液清洗吸乾，加入 200 μ l 0.1N NaOH 將細胞解離，取 20 μ l 測其 O.D. 值，取 180 μ l 加入增光劑中，放置隔夜讓其混合均勻後，利用貝他計測儀 (β -counter) 來偵測放射性強度。此每一濃度同時檢測六次，取其平均值作為結果之判定。

六、細胞內分子之螢光染色 (intracellular fluorescence staining)

1. A.O. 細胞內分子螢光染色

RHEC 細胞分別以不處理與處理 100 μ M baicalein 三天與五天，PBS 清洗一至二次，加入 2% paraformaldehyde 固定 30 分鐘，PBS 清洗兩次，加入 0.1% Triton X-100/in PBS，使細胞膜產生孔隙得以讓染劑進入。30 分鐘後以 PBS 清洗，再以螢光染劑 acridine orange 置至於黑暗中染色 1 小時，再用 PBS 清洗過多之染劑後。於螢光顯微鏡下觀察、照相記錄細胞之變化。

2. DAPI 細胞內分子螢光染色

RHEC 細胞分別以不處理與處理 100 μ M baicalein 三天與五天，PBS 清洗一至二次，加入 2% paraformaldehyde 固定 RHEC 30 分鐘，

PBS 清洗兩次，加入 0.1% Triton X-100/in PBS 使細胞膜產生孔隙得以讓染劑進入。30 分鐘後以 PBS 清洗，再以螢光染劑 4',6-Diamidino-2-phenylindole 置至於黑暗中染色 1 小時，再用 PBS 清洗過多之染劑後。於螢光顯微鏡下觀察、照相記錄細胞內核之變化。

七、細胞回復能力之測定

細胞先以生長培養液調成 1×10^5 個細胞/well 的密度植入 12 孔的培養盤中，待細胞貼附 16 至 18 小時後，以內涵 100 μ M baicalein 生長培養液處理之。經 baicalein 處理之細胞分別在處理不同時間後換回不含 baicalein 之生長培養液，並隔一天重新更新含有藥劑之培養液，繼續培養細胞至五天後。以血球計數器 (hemocytometer) 計算細胞數，以不處理 Baicalein 的對照組細胞數為 100% 計算各處理時間的細胞存活比例。

八、細胞週期之分析 (cell cycle distribution analysis)

1. 收取細胞

細胞先以 PBS 清洗，經 TEG 處理將貼附在培養皿的細胞收集到 15 ml 離心管，加入 10 ml PBS 與細胞混合均勻後離心 2000 rpm 5 分

鐘，倒掉上清液並加入冷的 70% EtOH/PBS 置於冰上 30 分鐘。以血球計數器 (hemocytometer) 計算細胞數，將細胞稀釋成 10^6 個細胞 /tube。

2. 核酸染色

使用 2000 rpm 4 5 分鐘離心後，倒掉上清液並加入 PI solution (40 μ g/ml propidium iodide, 0.1 mg/ml RNase) 4×10^5 cells/1 ml PI/tube，混合均勻後，置於 37 溫箱中 30 分鐘。離心 5000 rpm 3 分鐘，沈積下來的細胞加適量 PBS 使之懸浮其中，將細胞懸浮液通過 19 號針頭到 5 ml 分析管中，置於冰上直到以細胞分析儀 (flow cytometer, FACScan; Becton-Dickinson Instruments) 分析，並以 Cell-FIT 軟體分析之。

九、蛋白質之定性及定量分析

1. 蛋白質之萃取 (protein extraction)

細胞以 PBS 洗過 2 次後刮下，4 1200 rpm 離心 3~5 分鐘，倒掉上清液並以棉籤拭乾 eppendorf tube 邊緣。用手指清彈 eppendorf tube 將細胞稍加打散後加入適量的溶解液 (RIPA buffer: 50 mM Tris(pH 7.4)、150 mM NaCl、1% NP-40、0.25% sodium deoxycholate、

5 mM EDTA、1 mM EGTA、5% 2-mercaptoethanol*、5 μ g/ml leupeptin*、0.2 mM PMSF*、5 μ g/ml aprotinin*、1 mM sodium orthovanadate*、1 mM NaF>(*add before use)) 混合均勻，置於冰上作用 20~30 分鐘，接著以超高速離心機 55,000 rpm 4 30 分鐘，收集上清液，以 Bradford 方法測量蛋白質溶液在波長 595 nm 下的吸光值，換算成蛋白質濃度(μ g/ μ l) (以一系列已知濃度的 BSA 做成之 standard curve 換算蛋白質的濃度) 取定量的蛋白質分裝於 eppendorf tube 置於 -80 備用。

2. 聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE electrophoresis assay)

配製 1.5 mm 厚度的 discontinuous acrylamide gel，gel 分上下兩層，上層稱 stacking gel 含有 4% acrylamide，下層為 separating gel 其 acrylamide 的百分比視分析的蛋白質分子量而定。配置完成之膠體裝置於電泳槽內，注入電泳緩衝液 (running buffer：25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS)。蛋白質樣品回溫後，加入 4 \times protein loading dye(8% SDS、0.04% serva blue R-250、40% glycerol、200 mM Tris(pH 6.8)、10% 2-mercaptoethanol)，於 100 沸水中變性 10~15 分鐘，冰浴冷卻後快速離心，將各樣品及標示標準分子量的 Multimarker(3~4 μ l/lane)依序注入膠體的孔槽中。通以電壓 80 伏特，

等待樣品通過 stacking gel 後，將電壓調整為 100 伏特，電泳 2.5~3.5 小時。

3. 西方轉漬法 (western blot)

將 PVDF membrane(Millipore)浸於 methanol 數秒後，以 Milli-Q 水浸濕，與裁好的濾紙同 PVDF membrane 一起浸泡於 transfer buffer (pH 9.0~9.4、 50 mM Tris、 40 mM glycine、 0.375% SDS、 20% methanol)，電泳膠去掉 stacking gel 部分，並裁成適當大小後亦浸於 transfer buffer 中。轉印石墨板(Pharmacia)之正極板以 transfer buffer 潤濕後，依序重疊平鋪上 4 張濾紙，PVDF membrane，膠體，再 4 張濾紙，最後蓋上負極石墨板設定電流後開始轉漬，經 1 小時 10 分鐘後取出 PVDF membrane 以 5% 脫脂奶粉 (in TBST) 做空白處填充 (blocking)，室溫下搖晃 20~30 分鐘。以 TBST (1000 ml TBST containing 24.22g Tris、 87.75 g NaCl、 10ml tween 20) 清洗 5 分鐘 2 次，加入一級抗體 (primary antibody) 4 下作用一夜，再以 TBST 清洗 10 分鐘 3 次。加入二級抗體 (secondary antibody ; anti-mouse IgG; 1:12500) 室溫下作用 1 小時，經 TBST 清洗後進行 ECI(enhanced chemi-luminescence) 反應。PVDF membrane 裝於透明塑膠袋內置於片夾中，在暗房操作以 X-ray film (Kodak) 感光，沖洗。

4. 免疫沉澱法 (immunoprecipitation)

細胞以溶解液 (lysis buffer : 50 mM Tris(pH 7.4)、 0.5% NP-40、 1 mM EDTA、 0.5% Triton X-100、 50 μ M PMSF、 20 μ g/ml leupeptin、 1 mM sodium orthovanadate、 1 mM NaF) , 按照萃取蛋白質的步驟收集細胞蛋白質後, 取定量蛋白質 (250~300 μ g) 以 lysis buffer 調整體積到 250 μ l。蛋白質溶液加入 1~2 μ g 的 primary antibody 做結合反應, 於室溫下旋轉作用 1 小時, 再加入 30 μ l Protein A Sepharose 室溫下旋轉作用 1 小時, 或 4 旋轉作用一夜, 混合液以 5000 rpm 4 離心 10 分鐘, 吸掉上清液後沈澱下來的珠狀顆粒, 以 buffer (20mM Tris(pH 7.4)、 0.5M NaCl) 清洗 3 次, buffer (20mM Tris(pH 7.4)、 0.5M DTT、 20 μ M PMSF、 20 μ g/ml leupeptine) 清洗 1 次, 每次清洗後以 7,000~10,000 rpm 室溫下離心 3 分鐘, 吸掉上清液, 最後加入適量的 lysis buffer 及 4 \times protein loading dye 混合均勻, 置於 100 沸水中變性 10~15 分鐘, 使與 protein A Sepharose 結合的蛋白質釋出, 經冰浴冷卻與快速離心, 將樣品注入 SDS-PAGE gel 的孔槽進行電泳分析。

5. Cdk 激酶活性分析 (kinase activity assay)

定量的蛋白質 (300 μ g protein in 250 μ l lysis buffer) 經免疫沈澱反應並以 buffer 、 buffer 清洗並離心後，吸掉上清液，加入 10 μ l buffer 及 15 μ l kinase reaction mixture (50mM Tris(pH 7.4)、10mM $MgCl_2$ 、0.5mM DTT、5 μ M ATP、1mg/ml Histone H1、2 μ Ci 32 P ATP) 在 37 作用 15 分鐘 快速離心後，取等量樣品注入 12.5% SDS-PAGE gel 進行蛋白質電泳，約 3~4 小時後取下電泳膠，將蛋白質轉印到 PVDF membrane，membrane 裝入透明塑膠袋內置於壓片夾中，於暗房操作以 X-ray film(Kodak)直接感光，沖洗。

十、細胞移位之分析 (Cell migration Assay)

本實驗依照 Hämmerle et al.⁽¹¹⁷⁾的操作方法，將細胞以生長培養液調成 10^6 個細胞/孔的密度植入 6 孔的培養盤中，每孔含有 5ml 培養液，讓細胞貼附 16~18 小時後，細胞已經長滿全盤；並用刮勺刮出平行線，用 PBS 清洗兩次，然後分別以內含 0、10、100 μ M baicalein 的生長培養液培養於含有 5% 二氧化碳，37 的恆溫箱中。24 小時後，以 Olympus IX 70 倒立顯微鏡觀察、拍照記錄細胞移位之能力。重複處理三次的獨立實驗並統計。

十一、血管生成之離體試驗 (Angiogenesis Assay)

十二孔盤的細胞培養盤事先加入 0.5ml 的 Matrigel , 放置於 37 經過一小時使之凝固形成一層薄膜 , 再加入 0.5ml 的生長培養液 RHEC 細胞經 TEG 處理後 , 以生長培養液調成 1×10^5 個細胞/孔的密度植入 12 孔的 Matrigel-coated wells 培養盤中 , 將內含 0、100 μ M baicalein 生長培養液處理 RHEC 細胞或已先處理 0、100 μ M baicalein 三天之細胞 , 培養於含有 5% 二氧化碳 , 37 的恆溫箱中。培養一段時間 , 將上清液吸除並將 RHEC 細胞固定、染色、照相。

十二、內皮細胞骨架蛋白 actin 之變化

為探討 baicalein 處理改變內皮細胞之外形同時是否對細胞內骨架蛋白 actin 的分佈與變化也造成影響。本試驗將生長培養液調成 8×10^4 個細胞/well 的密度植入 12 孔的培養盤中 , 每孔含有 1ml 培養液 , 讓細胞貼附 16~18 小時後 , 分別以內含 0、100 μ M baicalein 生長培養液培養於含有 5% 二氧化碳 , 37 的恆溫箱中 , 每兩天重新更新含有藥劑之培養液。細胞使用 2% Paraformaldehyde 固定 , 用 PBS 清洗三次 , 用 0.1% Triton X-100 + 1% FBS 處理細胞 , 再用 PBS 清洗三次 , 於二、三、四、五天輔佐以 1~2 U/ml rhodamin phalloidin 作 actin staining , 於室溫下 30 分鐘 , 再用 1 : 9 PBS/Glycerol 封片 , 並於螢光顯微鏡下觀察 , 並記錄細胞內 actin 分佈之變化。

十三、內皮細胞之吸附能力試驗(in vitro adhesion assay)

將處理 100 μ M baicalein 以及未處理之內皮細胞，培養三天後，將細胞以生長培養液調成 10^5 個細胞/孔的密度植入 12 孔的培養盤中，待細胞貼附 0.5、2、4、6、24 小時，用適量 PBS 清洗兩次，洗去尚未吸附之細胞，以血球計數器(hemocytometer)計算細胞數目，並且在 2、4、6、24 小時拍照。重複處理三次，每次 3~4 次重複，所得之數求其平均值做圖。

另外，將未處理之內皮細胞 2×10^5 個細胞/孔植入含 0、1、3、10、30、100 μ M baicalein 之生長培養液的 12 孔培養盤中，待細胞貼附 2、4、8、24 小時，用適量 PBS 清洗兩次，洗去尚未吸附之細胞，以血球計數器(hemocytometer)計算細胞數，所得之數求其平均值做圖。

十四、內皮細胞在不同 ECM 之吸附能力試驗

將處理 100 μ M baicalein 三天及未處理之內皮細胞，以生長培養液調成 10^5 個細胞/孔的密度植入預先 coating 了 collagen (1.14 μ g/well) fibronectin (3.5 μ g/well) laminin (3.5 μ g/well)以及 vitronectin (0.43 μ g/well)的 12 孔盤的培養盤中，在 coating 過程中，除 vitronectin

於實驗前兩小時操作外 collagen、fibronectin、laminin 都於實驗前一天事先處理完成，儲於 4 冰箱中。待細胞貼附 1、2、4、8、16、24 小時後，用適量 PBS 清洗兩次，吸去尚未吸附之細胞，以 MTT 及血球計數器計算吸光值與細胞數目，並在 1、2、4、8、16、24 小時時拍照。重複處理三次，每次三重複，所得之數值求其平均值做圖。

所使用之 MTT 為 0.5mg/ml 並加入 1ml 的 PBS 中，靜置一小時後將 MTT solution 吸出，以 PBS 清洗後加入 DMSO 將由粒線體內膜之琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase) 還原成的藍紫色結晶物 formazan 溶出。將檢品置於 96 well plate 中，以 ELISA reader 測量在波長 550nm 下之吸光值。由被還原所獲得之顏色深淺代表細胞存活情況，反應顏色深者代表細胞活性強或存活細胞較多，反之若樣品顏色淺者代表細胞活性差或存活細胞數目少。存活率 (%) 之評估是以控制組 1 小時之吸光值為 100%。

十五、統計分析

實驗結果以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 表示，使用 Student's t-test 來決定控制組與實驗組之間的差異。當 $p < 0.05$ 時，顯示統計上具顯著差異。

第四章 結 果

一、 Baicalein 之高效相層析

本實驗所使用之 Baicalein 由中藥黃芩萃取純化所得(圖一),由於此化合物之結構易由 HO 環化而呈現 quinone 的綠色物質(圖二),在探討此化合物是否為單一成分,使用 HPLC 來檢測。經由數據與其圖譜得知(圖三),我們所使用的 Baicalein 純度很高,沒有其他化合物的干擾。

二、 Baicalein 對內皮細胞型態之影響

1. 處理 Baicalein 時內皮細胞型態之變化

以倒立顯微鏡觀察細胞培養於 baicalein 時,細胞型態之變化,結果發現在處理第三天後,控制組的細胞明顯增殖,其細胞盤根錯結在一起,並且已經有網絡形成,甚少漂浮死亡之細胞(圖四);反觀 10 μ M baicalein 細胞貼附在培養皿內較少增生,明顯的平貼狀,細胞各個單獨的兩兩相連,細胞間隙間偶而有少數形狀較小之增生細胞。少數的細胞存在兩個核,漂浮之細胞也很少;但 100 μ M baicalein 處理之細胞平貼於培養盤中之情形比 10 μ M 處理者更明顯,細胞變大,細胞平貼的分際可明確的加以區分,少數的細胞有兩個核的存

在，漂浮之細胞較多一些，小顆粒的碎屑或殘骸與小胞體也有增加。第五天後，控制組細胞已經長滿培養盤，細胞形狀明顯的比第三天的細胞小；10 μ M baicalein 處理之細胞型態與前所敘述者無明顯差異；100 μ M baicalein 處理組，細胞分布更加的稀疏，多數的細胞有兩個以上的核，小顆粒的碎屑或殘骸與小胞體有增加。

2. DAPI 細胞核螢光染色

細胞於培養狀態下分別以不處理與處理 100 μ M baicalein 於三天與五天之後以螢光染劑 4',6-Diamindino-2-phenylindole 染色，並於螢光顯微鏡下觀察、照相。結果顯示不處理 baicalein 的控制組在三天、五天時，細胞核都是完整均勻，並可以見到細胞分裂增殖的情形；而處理 baicalein 的細胞核變大或同一細胞內有多個核存在（圖五）。

三、 Baicalein 可抑制內皮細胞之生長

1. 劑量效應之生長曲線

以每孔 10^5 個細胞/孔的密度植入 12 孔的培養盤中(Falcon 12-well plate)，每孔含有 1ml 培養液，讓細胞貼附 16 至 18 小時後，分別以內含 0、100 μ M baicalein 處理初代培養之老鼠心臟內皮細胞。第五天時以血球計數器(hemocytometer)計算細胞數，每處理做四重覆，

每試驗至少重覆三次。培養於 5% 二氧化碳，37 的恆溫箱中。試驗結果之分析是以各處理之平均值做成生長曲線；再取生長對數期計算生長抑制率 (growth inhibition)。由 (圖六) 之結果顯示，在 1 及 5 μ M 低濃度的處理狀態下，baicalein 對內皮細胞的生長之抑制率為 10~25 %。當細胞培養在 10 μ M baicalein，細胞生長明顯的受抑制，其細胞生長抑制達 60 %，當 baicalein 處理濃度高達 100 μ M 時，細胞生長抑制率為 80 %。由實驗之結果可以計算出 baicalein 抑制 50% 內皮細胞生長之濃度為 8.578 μ M (即 ID₅₀ = 8.578 μ M) (圖六)。

2. 時間效應之生長曲線

以 0、10、100 μ M baicalein 處理老鼠心臟內皮細胞，培養於 5% 二氧化碳，37 的恆溫箱中。每日定時以血球計數器 (hemocytometer) 計算細胞數，每處理做四重覆，每試驗至少重覆三次。試驗結果之分析是以各處理之平均值做成生長曲線。如圖七所示，培養在正常培養液中之細胞生長曲線持續上升，但處理 baicalein 之細胞生長曲線圖維持水平，細胞並沒有明顯的增生或減少的趨勢，此結果顯示 baicalein 處理時會造成內皮細胞生長停滯。

3. 血清效應之生長曲線

為探討血清中存在的分子是否會影響 baicalein 對內皮細胞生長抑制之作用，分別在無血清或含 2% 與 15% 血清的培養液中，加入 0、1、5、10、20、40、80、100 μ M baicalein 處理初代培養之老鼠心臟內皮細胞，培養於 5% 二氧化碳，37 的恆溫箱中。第五天時以血球計數器 (hemocytometer) 計算細胞數，每處理做四重覆，每試驗至少重覆三次。如圖八所示，培養在含 2% 血清培養液中之內皮細胞，其生長受抑制較少，即使在 100 μ M 的高濃度 baicalein 存在時，僅有 50% 生長抑制率。但培養在 15% 血清培養液中之內皮細胞，100 μ M baicalein 抑制細胞生長率達 70~80 %。Baicalein 與不含血清之培養液混合時，有黑褐色沉澱析出。此結果顯示，血清中有某些成分可以協助增強 baicalein 抑制內皮細胞生長之生物效應。

四、內皮細胞對 baicalein 處理之耐受力

經由前述的實驗結果，可得知 baicalein 可抑制 RHEC 細胞的生長，但是究竟處理 baicalein 後多少時間方才造成 RHEC 細胞的生長抑制，並不得知。回復試驗即是為了要瞭解並確認 baicalein 造成 RHEC 細胞生長抑制的時間效應。以內含 100 μ M baicalein 生長培養液處理之，分別在 1、2、3、4、5 天後換回不含 baicalein 之生長培養液，繼續培養

細胞到達五天之後。以血球計數器 (hemocytometer) 計算細胞數，以不處理 baicalein 的細胞數為 100% 計算各處理時間的細胞數之比值。結果發現施藥一天之處理組，其第五天之細胞數目為對照組之 77.5% (圖九)，施藥二天之處理組，其第五天細胞數僅為對照組之 52%；連續處理四天後只有 29%，第五天為 28%。此結果顯示連續處理 baicalein 四天後再培養於 baicalein 培養液中一天的 RHEC 細胞，其生長受到 baicalein 之抑制可達 70%。此結果與連續五天 baicalein 處理，RHEC 生長抑制率 80% 相差不大。以上結果顯示 baicalein 對 RHEC 細胞生長抑制的效果在處理 baicalein 一天以後即有明顯之效應，且隨處理時間之增長而抑制效應增加。

五、Baicalein 對內皮細胞週期分佈之影響

1. 細胞週期分析

為了探討 baicalein 造成 RHEC 細胞生長抑制的過程，是否與細胞週期的調控有關，我們分別以 0、10、100 μ M baicalein 處理 RHEC 細胞三天與五天後，以 propidium iodide (PI) 染色後，再以流式細胞分析儀 (flow cytometer, FACScan) 分析 RHEC 細胞週期之變化。結果發現三天控制組之細胞週期 G0/G1 phase 68.5%、S phase 22.9%、G2/M phase 8.6% (圖十)；經 10 μ M baicalein 處理三天後之

細胞週期分布 G0/G1 phase 為 76.2%、S phase 為 14.2%、G2/M phase 為 15.1% ;而 100 μ M baicalein 處理之細胞週期變化 G0/G1 phase 為 75%、S phase 為 4.3%、G2/M phase 為 20.6%。但培養五天之細胞其週期分布 G0/G1 phase 76.9%、S phase 9.5%、G2/M phase 13.6% ;但處理 10 μ M baicalein 之細胞週期 G0/G1 phase 為 80.3%、S phase 為 4.6%、G2/M phase 為 15.1% ;處理 100 μ M baicalein 之細胞週期 G0/G1 phase 為 75.6%、S phase 為 4.1%、G2/M phase 為 20.2%。此結果顯示 baicalein 處理後之 RHEC , 其細胞週期的分佈有明顯的改變 ;經過三天或五天 baicalein 處理之細胞 , 其 G1 與 G2/M phase 的比例顯著增加 , S phase 比例相對的減少。結果顯示 baicalein 處理可使 RHEC 細胞停滯於 G1 與 G2/M phase , 使細胞生長受抑制。這也意味著在 RHEC 細胞處理 baicalein 後造成生長停滯的過程中 , 可能伴隨著細胞週期調節分子的變化。

2. Baicalein 可抑制 RHEC 細胞 DNA 的合成

由前述實驗可知 Baicalein 會誘導 RHEC 細胞的生長抑制 , 使細胞週期停滯在 G1 及 G2/M 期 , 明顯的降低 S 期的細胞。為進一步確認 baicalein 對 DNA 合成作用之影響 , 將細胞培養於 0、10、100 μ M 的濃度下 , 3 天與 5 天後 , 將細胞培養在含有氙標幟胸腺嘧啶

(^3H -Thymidine) 的培養液中，進行 DNA 合成試驗。圖十一之結果顯示，baicalein 可以有效的抑制內皮細胞的 DNA 的合成，且抑制 DNA 合成的效果與 baicalein 的濃度與處理時間成正比。經由數據得知，處理 baicalein 三天或五天後之細胞，其 DNA 合成之抑制效果可達 60~80 %。

六、 Baicalein 誘導內皮細胞生長抑制的過程中對細胞週期調節分子之影響

細胞週期的進行受到許多不同的分子調控，這些分子包括細胞週期調節蛋白 (cyclin)、細胞週期激酶 (cyclin-dependent kinases；簡稱 Cdk) 及細胞週期激酶抑制分子 (CDK inhibitors；簡稱 CKIs) 及其他腫瘤抑制分子 (tumour-suppressors) 如 p53、pRb 等之調控。在本實驗中，我們就分別對會影響 G0/G1 phase、S phase、G2/M phase 的分子表現進行蛋白質定性及定量分析。

1. Baicalein 處理對細胞週期激酶蛋白質表現量(cyclin-dependent kinases) 之影響

RHEC 細胞培養於生長培養液中，處理 0、10、100 μM baicalein 三天與五天後，分別收集細胞、萃取蛋白質進行 SDS-PAGE 蛋白質

電泳分析，經西方轉漬法 ECL 反應之後，個別分析 Cdk1、Cdk2、Cdk3、Cdk4 蛋白質之表現（圖十二）。結果顯示經 baicalein 處理三天、五天後 Cdk1 與 Cdk2 之蛋白質表現量，與控制組有明顯差異，都為減少之趨勢。Cdk3 及 Cdk4 蛋白之表現在對照組及 baicalein 處理組間並無明顯差異。

在 RHEC 細胞內 Cdks 分子在 baicalein 處理之下雖然有程度不等的表現，但這些蛋白質量的變化是否與這類分子的激□活性有關，則有待進行激□活性之測定。

2. Baicalein 處理對細胞週期調節蛋白（cyclin）表現量之影響

RHEC 細胞經由上述相同的方式處理後，萃取蛋白質進行 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析。並且個別探討分析 cyclin A、cyclin B、cyclin D1、cyclin D2、cyclin D3、cyclin E 等分子蛋白質的表現。結果顯示經 baicalein 處理三天、五天後，細胞內 cyclin D2、cyclin A 之表現量，與控制組比較有明顯差異，為減少之趨勢。反之，baicalein 之處理可增加 cyclin E 蛋白之表現。而 cyclin B 蛋白之表現，增加之趨勢並不顯著。但處理組與控制組之 cyclin D1、cyclin D3 蛋白表現量無明顯差異（圖十三）。

cyclin A 及 cyclin D2 分子在 baicalein 處理之下雖然有表現程度

上之差異，但這些表現量上之差異是否會影響與這類分子相關的激
□活性，則有待進行激□活性之測定。

3. Baicalein 對 p53 及 pRb (retinoblastoma gene) 蛋白質之影響

腫瘤抑制分子 p53 及 pRb 同為調控細胞生長的重要分子，未受磷酸化的 pRb 會與轉錄因子 (transcription factors ; Tfs) E2F 緊密結合，當活化的 Cdk 將 pRb 過磷酸化後，Rb 會將 E2F 釋出，活化了 S 期所需的基因。而 p53 腫瘤抑制因子在細胞中 DNA 受損時，細胞內的 p53 量會增加，導致細胞停滯在 G1 和 G2 時期進行修復，當細胞修復完全後 p53 量會減少，此時細胞就再進入細胞生長週期。若細胞尚未修復完全就進入生長週期，則細胞會進行凋亡 (apoptosis)。在腫瘤細胞中，p53 的活性增加會促使細胞進入凋亡；Mutant p53 會使細胞不會有 p53-dependent growth arrest，進而複製突變之 DNA，進行細胞的增生。此外，p53 增加也會促進下游分子 p21 的增加，抑制細胞生長週期的進行。我們探討對 pRb 分子中的兩個亞型 pRb1、pRb2 在處理 baicalein 後的表現。結果顯示 pRb1 在處理或不處理 baicalein 之間並未有明顯的變化；但在處理 baicalein 後，細胞內之磷酸化的 pRb2 之表現比對照組多，且於第三天表現較明顯。p53 經 baicalein 處理三天、五天後，細胞內之表現量與控制組比較有明顯增

加之趨勢 (圖十四)。

4. Baicalein 對細胞週期激酶抑制分子 (Cdk inhibitors) 蛋白質表現之影響

同上以 RHEC 細胞經由相同的方式處理後，萃取蛋白質進行 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析。分析 CKIs 分子 p21^{WAF1/CIP1}、p27^{KIP1} 與 p16^{Ink4A}、p15^{Ink4B} 的細胞週期激酶抑制蛋白分子。結果顯示處理 baicalein 之細胞其 p21^{WAF1/CIP1} 及 p15 蛋白質表現量有增加的趨勢，在處理 baicalein 三天的 p21^{CIP1} 分子增加量比第五天的大。但 baicalein 處理對 RHEC 細胞之細胞週期激酶抑制蛋白 p27^{KIP1} 及 p16 分子之表現則並未有顯著之變化 (圖十四)。

我們也探討凋亡相關基因蛋白的表現，如圖十五所示，baicalein 對於 Bcl-2、Bad、GADD 的蛋白質量並沒有明顯的影響。

七、Baicalein 改變細胞週期激酶 Cdk 之活性

由前述之試驗結果，得知 baicalein 處理對 Cdk1、Cdk2、cyclin A、cyclin D1 等分子在蛋白質之表現有明顯抑制之作用，但僅由蛋白質表現量之改變與否，並不能證明這些蛋白質激酶是否在功能上也有顯著之變化。所以為了檢定 baicalein 對 Cdk 與 cyclins 活性之影響，我們

使用免疫沈澱 (Immunoprecipitation) 分離出個別的蛋白質分別與可磷酸化的受質 Histone H1 及放射線標定之 γ - 32 P-ATP 進行磷酸化反應，並由 Histone H1 被磷酸化的程度，經由放射線的強弱得知。結果顯示在處理 baicalein 五天後，Cdk1、Cdk2、cyclin A、cyclin D1 等分子活性降低 (圖十六)。

八、Baicalein 對內皮細胞移位能力之分析

在 in vitro 的模式下，研究內皮細胞在 0、10、100 μ M 等不同濃度 baicalein 存在時細胞移位能力的變化。細胞移位區域以 0.23 mm \times 0.3 mm 作為其刮出的斷面計數，使用印有方格的透明膠片覆蓋在相對相片上的斷面面積格數，以求出細胞所佔的比值，並以百分比平均值與標準偏差來表示。由數據得知，baicalein 對內皮細胞移位的影響呈劑量效應。在處理 24 小時後，對照組在刮傷區已長出許多細胞，傷痕已不易區分；10 μ M baicalein 處理的濃度下，移位生長的細胞較少，僅有控制組的 $78 \pm 2.3\%$ ，而在 100 μ M baicalein 處理的濃度下，細胞的密度明顯比控制組稀疏僅為對照組的 $26.7 \pm 6.4\%$ ，其移位能力明顯下降 (圖十七)。

九、Baicalein 影響血管生成之離體試驗分析 (In vitro

Angiogenesis Assay)

探討內皮細胞在生長培養液內含 0、100 μ M baicalein 的情況下對血管生成的影響。圖十八所示，在控制組 4 小時，細胞經由移位方式慢慢開始聚集；12 小時已經聚集成一小叢塊；到了 24 小時後，小叢塊細胞已聯合成一大叢塊，處理 100 μ M baicalein 之 RHEC，在 4 小時培養之細胞外形沒有太大變化；至 12 小時後細胞才慢慢聚集；而在 24 小時後形成絲狀體並不結實的小叢聚集形狀；非常的鬆散雜亂。預處理 100 μ M baicalein 3 天之 RHEC，在 4 小時細胞彼此連結形成小網絡；單獨散生的細胞數目變少，24 小時後，形成結實的緊密聚集並且分佈管腔均勻，在 DAPI 染細胞核的螢光觀察下，發現細胞緊密聚集排列成圓形桶狀的分佈（圖十九）。

由前述之結果，得知其 baicalein 在高濃度下會抑制細胞的生長，使血管形成減緩，但是在預先處理 baicalein 3 天後再進行血管生成實驗，並沒有減緩形成，且發現預先處理 baicalein 之內皮細胞所形成血管的情形十分明顯。

十、Baicalein 對內皮細胞吸附能力影響之分析

1. 內皮細胞在培養盤上之吸附能力

由離體血管新生試驗之結果，我們認為 baicalein 可能影響到內皮細

胞與 ECM 之吸附分子，導致內皮細胞在 Matrigel 上形成類似微血管之管狀結構。因此我們以預處理或同時處理及不處理 baicalein 之 RHEC 細胞進行細胞吸附力之實驗，由圖廿(B)之結果顯示預處理 baicalein 三天之 RHEC 細胞其吸附力較未處理之 RHEC 細胞明顯增強。Matrigel 為胞外間質的混合物，為探討處理 baicalein 促進新血管之增生是否經由胞外間質及其細胞膜上的受體作用所致。我們接著探討 baicalein 處理是否會影響胞外間質與細胞間之吸附能力，將 RHEC 細胞植入 12 孔盤並加入 0、100 μ M 濃度之 baicalein 分別處理 2、4、8 及 24 小時，處理結束後計算吸附於培養盤孔之細胞數。如圖廿(A)所示，處理後兩小時對照組及 baicalein 處理組間，細胞吸附能力無明顯差異。處理後 4 及 8 小時內皮細胞吸附能力受到 baicalein 處理之影響而降低，但是 24 小時後處理組及對照組之吸附能力又沒有統計上之差異。

2. 預處理 Baicalein 之內皮細胞對不同 ECM 附著能力之分析

由以上的實驗我們得知，在預先處理 baicalein 之內皮細胞其附著能力的確有增加的趨勢，進一步我們想瞭解經由 baicalein 處理過後所影響之附著分子，對於那種 ECM 分子的附著能力有較大之影響。結果發現在 MTT 數值上，在控制組對預先處理 baicalein 內皮細胞其附著能力與上述使用血球計數器實驗相符，都比控制組來得高。如圖廿一所示，

預處理 baicalein 之 RHEC 細胞對 collagen 與 fibronectin 之吸附能力變化與對照組比較其變化不及 laminin 與 vitronectin 來得大，此結果表示處理 baicalein 後 RHEC 細胞表面的 laminin 與 vitronectin receptor 可能增加，而促進了細胞與 laminin、vitronectin 之吸附能力。

十一、細胞內肌動蛋白 (actin) 之變化

由前述試驗結果得知,以 baicalein 前處理後之內皮細胞其形成血管的能力，較不處理之內皮細胞顯著增強。最近許多前人之研究結果顯示細胞內 actin 蛋白之分布及形狀變化，可導致許多不同之生物反應。為進一步探討，baicalein 處理增加內皮細胞吸附能力，是否與細胞內 actin 的變化有關。本試驗將 RHEC 細胞處理 100 μ M baicalein 分別於 2、3、4 及 5 天，追蹤觀察細胞內 actin 分子之分布及變化。結果如圖廿二所示，控制組的 actin fiber 均勻的分佈在細胞內部，有其規律性、分佈緊密、均勻的構成細胞的骨架，在顯微鏡下觀察是以細胞核為起點，向四周延伸出去，並在細胞質內形成網狀結構。反觀在 100 μ M baicalein 處理時，第二天就可觀察到細胞內 actin 明顯的聚集，並且沿著細胞膜在細胞周圍形成一圈，而在圈中的 actin 排列稀疏，且有部分較短的結構出現，處理第三、四天後，細胞內部的 actin 排列更稀疏，部分 actin 已經形成縱貫稀疏且互相平行的條紋；第五天後，細胞內部

的 actin 排列更稀疏，actin 形成的縱貫稀疏條紋有缺口出現。