

## 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 (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>•2H<sub>2</sub>O)、 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(C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S•3H<sub>2</sub>O)、 Thymidine(C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)、 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(CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>
- 【 FMC 】 TRIS(Hydroxymethyl) Aminomethane ( C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> )
- 【 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<sup>®</sup> Brand、 Vitronectin

【NEN】 <sup>32</sup>P-ATP、 <sup>3</sup>H-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<sup>CIP1/WAF1</sup>、 Anti-p27<sup>KIP1</sup>、 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  $\mu$  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 NaHCO<sub>3</sub>, 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  $\mu$  m 之濾膜 (filter) 粗過濾後在無菌操作下以 0.2  $\mu$  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  $\mu$ g 內皮細胞生長補充劑 ( Endothelial cell growth supplement ) 100 IU 青黴素 ( penicillin ) 100  $\mu$ 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<sup>(115)</sup>, 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<sup>(116)</sup>。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  $1 \times 10^5$  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  $\mu$  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  $1 \times 10^5$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$ l 0.1N NaOH 將細胞解離，取 20  $\mu$ l 測其 O.D. 值，取 180  $\mu$ 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 (  $\beta$ -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  $\mu$  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  $\mu$  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  $1 \times 10^5$  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  $\mu$  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  $\mu$ g/ml propidium iodide, 0.1 mg/ml RNase)  $4 \times 10^5$  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  $\mu$  g/ml leupeptin\*、0.2 mM PMSF\*、5  $\mu$  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( $\mu$  g/ $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  M PMSF、 20  $\mu$  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  $\mu$  g ) 以 lysis buffer 調整體積到 250  $\mu$  l。蛋白質溶液加入 1~2  $\mu$  g 的 primary antibody 做結合反應, 於室溫下旋轉作用 1 小時, 再加入 30  $\mu$  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  $\mu$  M PMSF、 20  $\mu$  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  $\mu$ g protein in 250  $\mu$ 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  $\mu$ l buffer 及 15  $\mu$ l kinase reaction mixture ( 50mM Tris(pH 7.4)、10mM  $MgCl_2$ 、0.5mM DTT、5  $\mu$ M ATP、1mg/ml Histone H1、2  $\mu$ 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.<sup>(117)</sup>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  $\mu$ 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  $1 \times 10^5$  個細胞/孔的密度植入 12 孔的 Matrigel-coated wells 培養盤中 , 將內含 0、100  $\mu$  M baicalein 生長培養液處理 RHEC 細胞或已先處理 0、100  $\mu$  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  $8 \times 10^4$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $2 \times 10^5$  個細胞/孔植入含 0、1、3、10、30、100  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  g/well) fibronectin (3.5  $\mu$  g/well) laminin (3.5  $\mu$  g/well)以及 vitronectin (0.43  $\mu$  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 °C 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  $\mu$  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  $\mu$  M baicalein 處理之細胞平貼於培養盤中之情形比 10  $\mu$  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  $\mu$  M baicalein 處理之細胞型態與前所敘述者無明顯差異；100  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  M (即  $ID_{50} = 8.578 \mu$  M) (圖六)。

## 2. 時間效應之生長曲線

以 0、10、100  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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

( $^3\text{H}$ -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  $\mu\text{M}$  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<sup>WAF1/CIP1</sup>、p27<sup>KIP1</sup> 與 p16<sup>Ink4A</sup>、p15<sup>Ink4B</sup> 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<sup>WAF1/CIP1</sup> 及 p15 蛋白質表現量有增加的趨勢，在處理 baicalein 三天的 p21<sup>CIP1</sup> 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<sup>KIP1</sup> 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  $\gamma$ - $^{32}$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$ 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  $\mu$  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  $\mu$  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。