

目 錄

目錄	1
圖次	2
符號與縮寫	3
中文摘要	5
第一章 前言	7
第二章 實驗材料	24
第三章 實驗方法	28
第四章 實驗結果 (含圖)	38
第五章 討論	52
第六章 參考文獻	57
英文摘要	70



圖 次

- 圖 1. Sources of reactive oxygen species produced endogenously by the vessel wall and key metabolic pathways for these species
- 圖 2. Redox regulation of signal transduction components
- 圖 3. Signal transduction pathways for the mitogen-activated protein kinases (MAPK)
- 圖 4. Model for mechanical stress initiated-signal transductions in VSMCs
- 圖 5. Death receptor signaling
- 圖 6. Salvianolic acid B 和 Magnolol 對血清引起平滑肌細胞DNA合成的影響
- 圖 7. Salvianolic acid B 及 Magnolol 對平滑肌細胞 PCNA 表達程度的影響
- 圖 8. Salvianolic acid B 及 Magnolol 對平滑肌細胞 RIP 表達程度的影響
- 圖 9. Salvianolic acid B 及 Magnolol 對平滑肌細胞 Caspase-3 表達程度的影響
- 圖 10. Salvianolic acid B 對 NF- κ B promoter 活性的影響
- 圖 11. Salvianolic acid B 及 Magnolol 在大鼠血清中之抗氧化能力

符號與縮寫

AP-1 : activator protein-1

BHT : butylated hydroxytoluene

BrdU : 5-Bromo-2'-deoxyuridine

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

DEPC : diethylpyrocarbonate

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

DMSO : dimethylsulfoxide

DTT : Dithiothreitol

EGF : epidermal growth factor

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

FBS : fetal bovine serum

FGF : fibroblast growth factor

HPLC : high performance liquid chromatography

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule type 1

IGF : insulin-like growth factor

MAPK : mitogen activated protein kinase

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MDA : malondialdehyde

MOPS : 4-morpholinepropanesulfonic acid

NF- κ B : nuclear factor- κ B

NO : nitric oxide

PBS : phosphate buffer saline

PCNA : proliferating cell nuclear antigen

PDGF : platelet-derived growth factor

PTCA : percutaneous transluminal coronary angioplasty

RIP : Receptor Interacting Protein

ROS : reactive oxygen species

SAPK : stress-activated protein kinase

SOD : superoxide dismutase

TBA : 2-thiobarbituric acid

TCA : trichloroacetic acid

TEMED : N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylenediamine

TGF- β 1 : transforming growth factor β 1

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1

中文摘要

根據衛生署統計心臟疾病是國人十大死因之一，其中冠狀動脈阻塞佔了大部份。目前對於冠狀動脈阻塞的治療大多施以血管擴張術 (angioplasty) 或血管繞道手術 (surgical bypass grafting)，近年發展的經皮穿腔冠狀動脈血管成形術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 及支架置入方法可以不經開心手術即可達到治療的效果，對冠狀動脈治療助益頗多。在美國一年有約 40 萬件的血管擴張術病例，而這些病例中約 30~50% 在六個月後會發生血管再阻塞現象而必須再次接受血管擴張術，在國內比例則更高。這對病患及其家屬造成很大的心理及經濟上的負擔。其中平滑肌細胞不正常的增生是造成再阻塞現象的主因之一。

因此我們利用傳統中藥丹參萃取物 salvianolic acid B 及厚朴萃取物 magnolol 對大鼠胸主動脈平滑肌細胞進行 in vitro 的實驗。在細胞增生實驗的結果看來 0.05mg/ml 的 magnolol 對 PCNA 的表達及 DNA 合成有抑制的作用；而 salvianolic acid B 則無效果。不過二者對 RB 和 FAK 沒有影響。在探討藥物是否引起細胞凋亡的實驗中，western blot 的結果顯示 salvianolic acid B 和 magnolol 明顯的引發 RIP 及 caspase-3 的表達。另外，0.1mg/ml salvianolic acid B 能抑制 NF- κ B promoter 的活性。在抗氧化實驗中，salvianolic acid B 和 magnolol

明顯的減少大鼠血清中 MDA 的產生。

根據這些結果，我們認為 salvianolic acid B 和 magnolol 對平滑肌細胞的增生趨勢有抑制作用。salvianolic acid B 可能經由抑制 NF- κ B 引起細胞凋亡。Magnolol 則是抑制細胞進入細胞週期中的 S 期。

第一章 前言

第一節 經皮穿腔冠狀動脈血管成形術(Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty)

冠狀動脈是環繞在心臟上的營養血管，它提供心臟收縮或舒張時所需要的氧氣及營養分，假如膽固醇等脂肪物質在冠狀動脈內壁積聚成為粥狀斑，則血管會造成狹窄硬化或阻塞而引起心絞痛、呼吸急促等心臟缺氧之症狀，如此即稱為冠狀動脈疾病 (coronary artery disease, CAD) 又稱為冠心病。CAD 的臨床特徵就是，當人在大量運動時會產生心肌缺氧、心絞痛、EKG 異常及心肌灌注掃描有缺影(defect)的現象。心臟是個需要大量氧氣供應的器官，如果血流不順暢，心臟無法正常運轉，心臟的肌肉就會很難正常工作，最後導致心絞痛、心肌梗塞等心臟病症狀。急性心肌梗塞是冠狀動脈疾病的一種臨床表現，冠狀動脈因為血栓栓塞，導致心肌細胞缺乏血液供應而缺氧、甚至壞死。對於急性心肌梗塞的治療，最首要的目標是使梗塞的冠狀動脈能儘速重新獲得血液灌注(reperfusion)。早期心肌梗塞，若未能及時搶救，死亡率高達 30%以上，1980 年代使用血栓溶解劑用於急性心肌梗塞後，死亡率可降至 10%左右。現今採用緊急冠狀動脈氣球擴張術來治療急性心肌梗塞之病人，這個方法是在病患心肌梗塞發作 12 小時以內，利用緊急心導管手術施行冠狀動脈氣球擴張術，立即打通梗

塞的血管，建立足夠的冠狀動脈血流。以氣球擴張術緊急施術搶通血管，合併使用血管支架，死亡率更降到 5%。所以這項手術已超越以往 80 年代之血栓溶解治療，成為一安全而有效之治療方式。因此緊急冠狀動脈氣球擴張術及冠狀動脈支架置放術已成為治療急性心肌梗塞病人的新趨勢。

根據衛生署統計心臟疾病是國人十大死因之一，其中冠狀動脈阻塞佔了大部份。目前對於冠狀動脈阻塞的治療大多施以血管擴張術 (angioplasty) 或血管繞道手術 (surgical bypass grafting)，近年發展的經皮穿腔冠狀動脈血管成形術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 及支架 (stent) 置入方法可以不經開心手術即可達到治療的效果，對冠狀動脈治療助益頗多。在美國一年有約 40 萬件的血管擴張術病例，而這些病例中約 30~50% 在六個月後會發生血管再阻塞現象而必須再次接受血管擴張術[1~3]，在國內比例則更高。這對病患及其家屬造成很大的心理及經濟上的負擔。過去二十年許多藥物 [例如：血小板抑制劑 (antiplatelet)、血栓抑制劑 (antithrombotic)、抗凝血劑 (anticoagulant)...] 及技術上對治療血管再阻塞的努力均無很好的效果。直到 1995 年經皮穿透血管擴張術後之血管內支架置入 (endovascular stenting) 的方法才使動脈再阻塞的治療有了進展，但其仍有 20% 的再阻塞機率。

這是由於當氣球擴張後給予血管內壁外力而造成血管內壁受損，導致局部發炎或出血因而使血液基質、單核巨噬細胞 (mononuclear macrophage) 及淋巴球 (lymphocyte) 在此累積；另外，血管逐漸產生組織重組 (remodeling) [4~7]，細胞外間質 (extracellular matrix) 的形成 [8,9] 以及血小板附著與聚集在血管受傷的位置 [10~12] 並且開始活化，導致多種對血管有不同作用的物質與調節因子的分泌 [13]，進而活化平滑肌細胞和巨噬細胞表達出數種激素、生長因子，或其他基因產物等，造成對管壁平滑肌細胞的刺激而使之遷移 (migration) 及增殖 (proliferation)，如此過度的反應使血管內膜 (intima) 增厚因而造成血管再次狹窄。

第二節 血管再阻塞 (restenosis) 的病理學

血管再阻塞發生的早期 (數小時至數天) 與血栓形成及血管再彈縮回 (recoil) 有關；大部分的病例中顯示血管再阻塞後期主要由細胞外間質及炎性細胞的刺激下造成纖維組織細胞的增生 [14]。在大鼠的動物模式中，當頸動脈受氣球擴張破壞後 24 至 72 小時內可觀察到血管中層的平滑肌細胞開始進行 DNA 合成 [15,16]，接著穿過內部纖維層而構成新生的內膜，這些在內膜新生的細胞開始增生且在細胞外間質處產生大量的膠原蛋白。仔細探究其形成之機轉可歸納成下面

幾點原因：

一、內膜損傷：手術過程中造成的內膜損傷導致不同程度的內皮剝落，使形成血栓的下內皮曝露，接著造成該處發炎[17~20]而使得單核巨噬細胞及淋巴球浸滲（infiltration）到該處。同時由於血管壁的破裂造成出血，使血小板釋出多種 cytokines，其中一種 cytokine 是血小板衍生的生長因子（platelet-derived growth factor, PDGF），是一種很強的化學性趨化物質（chemoattractant），促使 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)表現，使得更多的單核細胞及巨噬細胞聚集，形成一個信號增幅的迴路，巨噬細胞本身也會釋放 cytokines、metalloproteinases 和 growth factors，如此持續對血管壁平滑肌細胞的激發與刺激而造成其遷移與增殖。如此在傷口該處便有血液基質的聚集反應、血管組織的聚集反應，及彼此間的相互作用，而造成血管肌內膜細胞增生（myointima cellular hyperplasia），進而形成血管再阻塞的發生。

因此，內皮受傷害的程度對於血管的修復來說是個很重要的決定因子。舉例來說，受過損傷的動脈中部分剩餘的內皮細胞可緩和細胞增生並減少新生內膜的增殖[20,21]；Nugent et al. [22]在豬及牛的頸動脈損傷模式中將內皮細胞移植至血管後發現可以減少新生內膜增厚，顯示內皮細胞在血管生理中的鄰近調控（paracrine）調節中是個

關鍵的角色。而且增生中或受損的內皮細胞所釋放出的 peptides 及 proteoglycans 能刺激平滑肌細胞生長[23~26]。相反地，靜止生長中的內皮細胞藉由活化 transforming growth factor (TGF-) 及釋放具抑制生長功能的 heparan sulfate proteoglycans [27,28]，提供一個防止血栓形成的屏障來隔絕血清中致分裂原 (mitogen) 和化學性趨化物質對平滑肌細胞產生刺激，進而抑制平滑肌細胞遷移和增生。

二、發炎反應：在 PTCA 後可以觀察到一些 adhesion receptors 會大量表現，使得單核球和嗜中性白血球開始聚集的現象。有研究指出對有冠狀動脈硬化斑的病患施行氣球擴張術後，嗜中性白血球的 Mac-1 (CD11b)和血小板上 the activated fibrinogen receptor (LIBS1)表現增加 [29]。發炎反應及新生內膜形成的程度和血管損傷程度也十分地有關係，因為單位受損面積上的單核球數目和動脈內膜的增長有線性上的關係[30,31]。此外，藉由 Mac-1 (CD11b/CD18)-deficient 小鼠以及給予兔子抗 Mac-1 單株抗體[32,33]，皆能減少新生內膜增厚來看，發炎反應在內膜受損後由白血球媒介的再阻塞中扮演著相當重要的角色。

另一方面，也有學者在施行過 PTCA 的病人身上發現在急性期的代表物質 c-reactive protein [34]，這是一種當體內有急性炎症、細菌感染、組織的破壞、惡性腫瘤時很快就出現而治癒時又很快就消失的

蛋白（急性期反應蛋白 acute phase reactant）。由這些發現得知，再阻塞的病理進程中很明顯地受炎性細胞活化的影響。

三、氧化壓力：氧化壓力在血管受損後引發的反應中所扮演的調節角色目前仍沒有很深入地探討，所以其機轉不是十分清楚。PTCA的過程中當氣球撐開時會造成短暫的缺血，而氣球洩氣後血液就再灌流回來，這樣的情形下一些與自由基（free radicals）侵害有關的局部缺血性損害（ischemic damage）及氧化性傷害就有可能發生。以 reactive oxygen species (ROS) 為例，在一個早期針對施行氣球擴張術後的研究中發現，在以氣球擴張破壞犬的冠狀動脈前給予 superoxide dismutase (SOD) 能完全避免早期的血管收縮及大塊狀血栓的形成 [35]；Catalase, deferoxamine 和 dimethylthiourea 則沒有這樣的效用，推測或許只有剛開始產生的過氧化物參與反應。Nunes et al. [36,37] 以氣球破壞豬的冠狀動脈 14 天後發現有 O_2^- 產生，在手術前後給予抗氧化劑 Vitamins C、E 可明顯地使 O_2^- 下降，並改善血管管腔狹窄及血管壁結構，證明在血管組織重組中還原過程的角色。文獻指出其他的抗氧化劑如 Probucol, butylated hydroxytoluene (BHT) 在餵食高膽固醇並施行氣球擴張術的兔子或豬的實驗中，均能減少新生內膜（neointima）的增厚 [38~42]，其中 Probucol 更進一步的證實能降低 PDGF A chain、mitogen activated protein kinase（MAPK）及 Protein

C-kinase 的基因，對於平滑肌細胞的增生亦有明顯的抑制作用 [41,42]。此外，在臨床試驗上，Probucol 對於減少 restenosis 的發生的確有不錯的效果；相反地，multivitamins 則沒有作用[43~50]。

在血管內膜受傷害後所產生的氧自由基可視為第二訊息傳遞者：譬如增加血管平滑肌細胞 DNA 合成以及原致癌基因 (pro-oncogene) c-myc 和 c-fos mRNA 的表達[51]；給予抗氧化劑後能降低人類內皮細胞上附著分子 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 的表達[52]。

至於誘發早期過氧化物的產生，到底是機械性外力刺激下 (Arbault et,al. 以超微電極刺激纖維母細胞能活化 NADPH oxidase 產生 H_2O_2 [53]。)，或是和誘發 ROS 產生的生長因子相關的訊息傳遞分子如 Extracellular signal-regulated kinase (ERKs) 和 p38MAPK 所觸發 [54~57]，仍有待進一步的研究。

另一方面，因應氧化壓力產生的反應是多樣性的，以氧化還原進程中的訊息傳遞分子來講，多數受到 thiol-disulfide 氧化還原化學反應或易氧化還原的過渡金屬來調控。目前將焦點放在血管受損後氧化還原啟動的訊息傳遞這方面研究並不多。Souza 等人指出，在以氣球損傷的血管中早期被活化的轉錄因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 能以 NADPH oxidase 抑制劑 - diphenylene iodonium 來降低其表達量

[58]；兔子的動脈損傷模式中，給予 Probucol 能抑制 MAP kinase 和 protein-C kinase 活化[42]；Pollman 等人提出經氣球破壞的血管所引發的細胞凋亡（apoptosis）現象和氧化還原有很大的關係，如 stress-activated protein kinase (SAPK)在血管受損後有數倍的表現[59]。見圖 1,2,3。

四、動脈外膜損傷：在血管中層受損後 3 天內，動脈外膜呈現細胞過度增生（hyperplasia）的狀態，富含 vimentin 的纖維母細胞會逐漸轉變成含 vimentin 及 α -SM actin 的肌纖維母細胞，在受損後 7~14 天達到最高峰[60]。而這樣的細胞轉變和一些生物活性有關，包括促進膠原合成[61~63]及組織的收縮功能，參與疤痕的形成[64,65]。肌纖維母細胞表現出收縮性細胞骨架蛋白(特別是 α -SM actin)，被視為是組織重組中膠原間質膠的特徵[66]。此外，動物實驗及血管內超音波的結果中得知，包括動脈外膜損傷的緊縮性血管組織重組對於非支架放入式冠狀動脈擴張處置後的血管管腔狹窄形成的相關性較新生內膜形成來的大[4,7,67~69]。

五、血栓：內皮細胞剝落後使得血管下表皮層的新生血栓成分曝露出來，接著促進血小板附著、活化、聚集及血栓形成。首先，在施行氣球擴張術後內皮細胞剝落處形成單層血小板；相反地，在動脈放入支架造成深部傷害的支撐處則是形成厚且富含血小板的壁內血栓。

被活化的血小板一旦聚集會產生一些刺激血管平滑肌細胞的致分裂原，包含PDGF、 fibroblast growth factor (FGF)、 epidermal growth factor (EGF)、 insulin-like growth factor (IGF) 和 TGF- β 1 [70,71]。IGF和TGF- β 1具調節細胞外間質的產生及組織重組的功能[72]。Bilder G et al. 給豬餵食 active PDGF-receptor tyrosine kinase 抑制劑 --RPR101511A，結果能減少PTCA後的內膜增生並維持較大的血管管腔[73]；此外，臨床上給病人cilostazol這種抗凝血劑，初步結果看來能避免血管再狹窄的情形出現[74,75]。由此可推測，血小板聚集和致分裂原參與平滑肌細胞遷移和增生以及細胞外間質的產生。

凝血酵素(thrombin)能活化血液循環中的血小板，趨化單核球細胞並直接刺激血管平滑肌細胞增生[76~78]。在兔子施行氣球擴張術後局部或全身給予低分子量的 heparin 可刺激並抑制平滑肌細胞增生[79]。但是臨床試驗上全身給予 heparin 或凝血酵素抑制劑對於血管再阻塞並無改善效果[80~84]。

六、新生內膜增生：由於血管平滑肌細胞不正常的增生和遷移以及細胞外間質大量地產生，最終導致新生內膜增生[85]。血管修復期中的細胞增生及再阻塞現象，主要是因應血管受到損傷之後引起的一連串反應，如之前所述的發炎、血小板活化以及血栓。而且這段期間可以觀察到中層血管平滑肌細胞遷移至內膜、細胞增生、細胞外間質

沉澱和血管組織重組[71]。一些複雜且多出的細胞內部訊息,如 cAMP, protein kinase C, protein kinase A 和 calcium 與能活化上述基因表現的致分裂原和 cytokines 及促使血管平滑肌細胞進入增生狀態的細胞週期 (cell cycle) 有關[86]。Synthetic phenotype 的血管平滑肌細胞和纖維母細胞主要含有 chondroitin sulfate 和 dermatan sulfate proteoglycans ; 但在組織重組的進程中, 這些 proteoglycans 會轉變成大型且纖維化的第一型膠原 (type collagen) 及彈力蛋白 (elastin) [71]。

血管平滑肌細胞的增生會因為在受損部位的內皮細胞再生長回來、一氧化氮 (NO) 的抗增生作用以及 heparin 對這些已活化的平滑肌細胞作用下而停止[87]。從動物模式中得知在氣球破壞後的第 21 至 56 天間內皮會產生新生現象 (re-endothelialization); 但在人體上, 根據一項對冠狀動脈置入支架後的解剖研究指出, 內皮新生至少需要 3 個月[9,88]。

在兔子模式中以氣球破壞並去除內皮新生造成再狹窄的情況下, 局部給予 L-arginine 能促使血管平滑肌細胞產生一氧化氮合成? (nitric oxide synthase) 來合成一氧化氮, 而局部一氧化氮的增加使得單核球的結合能力降低, 也會促使巨噬細胞凋亡 [89]。這一點可以解釋局部給予 L-arginine 為何能在施行氣球擴張術後抑制損傷的形

成。這也凸顯出前面所提的內皮剝落和正常內皮細胞鄰近調控功能喪失二者對新生內膜增生及再阻塞形成的重要性。

第三節 血管平滑肌細胞受機械性壓力所引起的訊息傳遞

機械性外力對不同組織中細胞的形態及功能的影響是不容忽視的，尤其是心血管系統。血管平滑肌細胞的增生對於動脈粥狀硬化、氣球擴張術後引起的再阻塞的形成均有關係，其中機械性外力是主要的因素。

正常的成人動脈平滑肌細胞是能收縮的，並且不易被能刺激細胞遷移和增生的生長因子或生長調節物質影響[70]。當機械性外力的刺激出現時，原本存在於正常動脈壁中的收縮性蛋白質開始逐步地減少，如 smooth muscle myosin heavy chain isoforms (α -actin、h-caldesmon、calponin)；而本來主要存在於胎兒血管壁的 non-muscle myosin heavy chain 則在被活化的血管平滑肌細胞中表達[70,84,90]，結果產生顯著的結構重組。因此，這些細胞開始喪失收縮的功能，增加蛋白質的分泌作用；另一方面，動脈中層平滑肌細胞受到機械性壓力影響下引發自主調控(autocrine)及鄰近調控，使得對生長因子的反應增加，進而刺激使動脈中層平滑肌細胞肥大(hypertrophy)或動脈壁上的內膜增生(intimal hyperplasia) [70,91,92]。

血管平滑肌細胞到底如何感受到細胞外的機械性訊息並將此訊息傳遞至細胞核中，最後造成基因表現上的變化，是一個很重要的課題。近幾年的研究中證實，機械性壓力能很快的引起 PDGF receptor 的磷酸化[93] 以及 integrin $\alpha v\beta 3$ receptor [94,95]、stretch-activated cation channels [100] 及 G proteins 的活化[96~99]，最後都會造成 MAPK cascades 的活化[101~107]。因此，當細胞感受到機械性外力時，protein kinase C 和 MAPKs 會被活化，導致 *c-fos* 和 *c-jun* gene [108]表現增加，同時促使轉錄因子 AP-1 對 DNA 的結合能力增加 [109]。見圖4。

第四節 丹參的藥理作用

丹參，始載於《本經》。為唇形科植物丹參 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的乾燥根及根莖。主產於安徽、山西、河北、四川、江蘇等地。別名赤參、紫丹參。《本草綱目·卷十二·丹參》：“五參五色配五臟，故人參入脾曰黃參，沙參入肺曰白參，玄參入腎曰黑參，牡蒙入肝曰紫參，丹參入心曰赤參。”臨床處方時，則以丹參色紫紅而常用紫丹參名。性味：苦，微寒。

功效	主治
----	----

活血化癥	月經不調；血滯經閉；產後腹痛；心腹痛；跌打損傷。
涼血消癰	溫病熱入營血；瘡癰腫毒
養血安神	心悸；失眠

丹參活血化癥作用較佳，神農本草經列為上品，古代廣泛用於心血管、血液類之疾病。如《本草正義》所言：“丹參，專入血分，其供在於活血行血，內之達臟腑而化癥滯，外之利關節而通脈絡。”說明丹參活血化癥的適應範圍很廣泛，能用於各科瘀血阻滯病證。過去數十年，中國大陸對丹參做了許多現代化的研究，尤以純化脂溶性的「丹參酮」，發現其明顯的抗血小板凝集作用，隨後將丹參、紅花、川芎、赤芍和降香製成「冠心二號方」，廣泛用於臨床上治療冠狀動脈心臟病，久為海內外心血管中藥研究者所熟知。1980年代，大陸學者從丹參根部分離純化水溶性多酚類萃取物 - 丹參酸(Salvianolic acid)，後經北京中國醫學科學院藥物研究所劉耕陶教授等人，發現丹參酸在肝細胞有明顯的抗氧化作用。

成分：丹參主含丹參酮(tanshinone) ??? A、? B，異丹參酮 (isotanshinone) ???，隱丹參酮 (dryptotanshinone)、異隱丹參酮 (isocryptotanshinone)、羥基丹參酮 (hydroxytanshinone) ? A、丹參新酮 (miltirone)、左旋二氫丹參酮 (dihydrotanshinone) ?? 丹

參酚 (salviol) 等。此外，尚有原兒茶醛、原兒茶酸、乳酸、維生素 E 等。

【現代藥理】

- (1) 對心臟及冠狀血管的影響：丹參注射液能增加狗冠狀血流量 60 %，降低冠狀循環阻力。丹參素對離體豬冠狀動脈有擴張並增加血流的作用，心肌收縮力先抑制後增強，心率有一定程度減慢。但丹參酮 A 磺酸鈉，原兒茶醛顯著收縮豬冠狀動脈。丹參可減輕缺血再灌注的心肌損傷，並增加 SOD 及 GSH-Px 的活性有效清除缺血再灌注產生的氧自由基。
- (2) 對心肌缺血及心肌梗塞的影響：丹參酮能明顯抑制心肌壞死導致的嗜中性白血球溶小體釋放、吞噬和黏附，減少血清及心肌 MDA，升高心肌 SOD 的活性，抑制白血球向心肌缺血區的浸潤及心肌中 PGE₂ 的合成。由此可知，丹參酮有防治心肌梗死的作用。用丹參治療心肌梗塞的狗，可見到梗塞區壞死心肌清除較快，巨噬細胞活躍，纖維母細胞分化和膠原纖維形成較明顯，肉芽形成較成熟，說明丹參調節組織的修復與再生。
- (3) 對血液流變性的影響：丹參注射液有增加紅血球電泳率、降低血小板黏附性、降低血球壓積、抑制血小板凝集、抑制血栓形成等作用。降低冠心病患者的血漿粘滯性作用。丹參對老年大鼠能降

低全血比粘度纖維蛋白源及增加紅血球電泳時間。

- (4) 改善微循環作用：丹參有加快微循環血流速度，增加毛細血管網而改善冠心病病人的外周微循環。
- (5) 降血脂及抗動脈粥樣硬化，提高耐缺氧：對動脈粥狀硬化的家兔，可降低血和肝中的三酸甘油酯。在細胞模型中丹參素具有降低細胞內膽固醇合成及抗脂蛋白氧化作用，氧化脂蛋白中的MDA 明顯減少，氧化脂蛋白對細胞的毒性作用明顯減弱。
- (6) 抗菌作用：高濃度丹參煎劑的體外實驗對綠膿、大腸、傷寒、痢疾桿菌均有抑菌作用。
- (7) 鎮靜、鎮痛作用：丹參素靜脈注射對大小鼠、狗均產生明顯的鎮靜作用。使狗腦電波型由低波轉變為高慢波。
- (8) 丹參注射液及其多種水溶成分（原兒茶醛、丹參素、Sod A 等），顯著抑制肝臟脂質過氧化。其機制可能為透過自由基的清除作用 [110~112]。

第五節 厚朴的藥理作用

厚朴，始載於《本經》。為木蘭科(Magnoliaceae)落葉喬木植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd . et Wils . 或凹葉厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd . et Wils . var *blioba* Rehd . et Wils . 的樹皮、根皮或枝皮。生

長於四川、湖北、湖南、浙江、陝西、貴州。以四川、湖北所產質量最佳。其性狀為卷成單筒狀或雙筒狀，長約 35cm，厚約 2~5cm，表面灰暗棕色，外表粗糙不平為鱗片狀，質堅硬，折斷面不平整，成纖維狀，氣芳香，味苦澀。《本草綱目·卷三十五·厚朴》云：“其木質朴而皮厚，味辛烈而色紫赤，故有厚朴、烈、赤諸名。”依本草備要解析所述，其性味為苦辛溫，具有厚腸胃，行結水，破宿血的功能。

【功效主治】

功效	主治
行氣、消積	脾胃氣滯證；積滯
行氣燥濕	濕阻中焦證；泄瀉
下氣、消痰平喘	咳嗽氣喘

厚朴味辛行散，疏利氣機，為行氣除脹要藥，凡脾胃氣滯，脘腹脹滿者宜用之。

成分：含揮發油約 1%，油中主要成分為厚朴酚、異厚朴酚、四氫厚朴酚。另有一種水溶性生物鹼，稱厚朴鹼。

【現代藥理】

- (1) 本品煎劑在試管中，對金黃色葡萄球菌有很強的抑制作用。
- (2) 厚朴鹼和厚朴酚有鬆弛骨骼肌作用。
- (3) 厚朴酚對實驗性胃潰瘍有防治作用，並對組織胺所致十二指腸

痙攣有一定的抑制作用。

(4) 厚朴鹼和厚朴花有降壓作用[113]。

在粥狀動脈的形成過程中，大量的脂肪尤其是氧化的脂肪酸，正常時就會進入平滑肌層，有高膽固醇的人可能會因為平滑肌細胞受到改變或傷害促使平滑肌增生，所有這些不正常的情形皆被認為與脂質的過氧化有關，而氧化還原最主要的場所是在粒線體。有研究指出 magnolol 及 honokiol (厚朴成分中兩種最主要的抗氧化成分) 能保護大白鼠心臟的粒線體以防止脂質過氧化，抑制缺血再灌注引起的心室心律不整並增加一氧化氮合成，對於 Mac-1 及 neutrophil 附著也有抑制作用，這些都可能和 magnolol 的抗氧化作用有關[114~119]；magnolol 及 honokiol 尚具有防止血小板聚集的作用[120,121]，就前面提到血小板聚集會促進平滑肌增生。所以厚朴可能對因氣球擴張所造成新生內膜增生的抑制作用及分子機轉，是本篇論文的研究重點之一。

第二章 材料

1. 40% Acrylamide/Bis (MDBio)
2. Agarose (Sigma)
3. Ammonium persulfate (APS) (USB)
4. Ampicillin (sodium salt) (USB)
5. Anti-Human p27 kip 1 (Upstate)
6. Anti-mouse IgG (horseradish peroxidase conjugated) (Pierce)
7. Anti-p21 (NeoMarkers)
8. Anti-PCNA (Upstate)
9. Apoptosis sampler kit (BD)
10. Bradford
11. Bromophenol blue (USB)
12. BSA (Sigma)
13. Cell proliferation ELISA kit (Boehringer Mannheim)
14. Chloroform (Showa)
15. Chloralhydrate (Merck)
16. Cupric sulfate (anhydrous) (Sigma)
17. DEPC
18. Developer (Kodak)
19. DMEM (Biochrom)

20. DMRIE-C Reagent (GIBCO)
21. DMSO (Sigma)
22. DTT
23. ECL (Amersham)
24. Ethidium bromide (USB)
25. 99.8% ethanol (NASA)
26. FBS (Biowest)
27. Fixer (Kodak)
28. Glycerol (USB)
29. Glycine (USB)
30. Haemocytometer (Boeco)
31. Heparin (ammonium salt) (Sigma)
32. Hydrogen peroxide (Showa)
33. Iron (II) sulfate heptahydrate (Showa)
34. Luciferase assay system (Promega)
35. Methanol (TEDIA)
36. Methyl-[³H] thymidine (PerkinElmer)
37. MOPS (USB)
38. NF B promoter
39. Paraformaldehyde (Merck)

40. Phenol (Merck)
41. Pentobarbital (榮民製藥)
42. penicillin/streptomycin (GIBCO)
43. Ponceu S (Sigma)
44. Potassium dihydrogen phosphate (Merck)
45. PVDF membrane (Millipore)
46. Sodium acetate (USB)
47. Sodium chloride (Merck)
48. Sodium dihydrogen phosphate (Merck)
49. Sodium dodecyl sulfate (USB)
50. Sodium hydrogen carbonate (Merck)
51. Sodium hydroxide (島久)
52. Sodium Pyruvate (Biochrom)
53. TBA (Sigma)
54. TCA (Sigma)
55. TEMED (Pharmacia)
56. Tri Reagent (Molecular research center)
57. Tris-base (GERBU)
58. Trypan blue
59. Trypsin (GIBCO)

60. Tween 20 (USB)

61. Urethane (Sigma)

第三章 實驗方法

1. 厚朴抽取物的製備

將木蘭科(*Magnoliaceae*)植物 *Magnolia officinalis* REHD. et WIL 之乾燥根皮溶於 methanol, 經迴流萃取, 過濾, 濃縮, 再以 chloroform 溶解, 以 chloroform 可溶部分以水萃取, 再取 chloroform 溶解以 n-hexane 萃取, 將 n-hexane 層經濃縮, 再結晶即可得厚朴之抽取物。經由本方法所抽取的抽取物大部分為厚朴中之 magnolol (經 TLC 定性的結果得知 90% 為 magnolol)。

2. 血管平滑肌細胞的培養

將含有 10% FBS 的 DMEM 培養基 (含 3.7g/l NaHCO₃, 4.5g/l D-Glucose, 1.028g/l N-Acetyl L-alanyl-L-glutamine, 1% Na-Pyruvate, 100 units/ml penicillin G 及 100 ug/ml streptomycin sulfate) 在 37 之水浴恆溫槽中加溫。將儲存在液態氮中大鼠主動脈平滑肌細胞 (購自食品工業發展研究所, Cell no.:60127, 代號 A10) 取出後迅速放入 37 之水浴恆溫槽中快速解凍(自液態氮容器中取出冷凍管, 檢查蓋子是否旋緊, 由於熱脹冷縮過程, 此時蓋子易鬆掉), 以避免冰晶傷害細胞(細胞活化後, 需立刻培養, 儘速放入培養基, 需數日或繼代一至二代, 細胞生長及特性表現才會恢復)。以 70%酒精棉花擦拭冷凍管外部, 移入無菌操作台內, 以 1 ml pipette 將解凍之細胞懸浮液

吸出加入有培養基之離心管中(10 倍以上稀釋), 混合均勻, 離心 1,200 rpm, 5 分鐘, 移去上清液, 加入新鮮培養基, 混合均勻, 放入 10 公分培養皿中, 在 37 的細胞培養箱 (95% O₂, 5% CO₂) 中培養, 每二天換一次培養基。當細胞長滿後, 以 9 吋滴管接抽氣幫浦移除培養皿中的培養基, 用 10 ml pipette 吸取 10 ml 1X PBS 至培養皿中並稍微搖晃後再以 9 吋滴管抽去, 重複此步驟二次以維持培養皿中為中性環境, 接著以 1 ml pipette 吸取 1 ml trypsin (吸取的量以蓋過培養皿表面為原則) 加到培養皿中, 再放入細胞培養箱 5 分鐘, 之後加入 2 ml 培養基中和 trypsin 並以 1 ml pipette 來回沖刷培養皿上的細胞, 盡量使細胞呈單顆懸浮, 將細胞懸浮液吸到 100ml 血清瓶後補加培養基至 10 ml, 以 haemocytometer 計算細胞數 (細節將在下文敘述)。

注意事項: laminar flow 使用前先讓其抽氣運轉 10 分鐘, 再以 70% 酒精擦拭桌面。所有進入 laminar flow 的物品均需先噴灑 70% 酒精, 有蓋容器旋開瓶蓋前先過火。培養基若使用量小, 則盡量置於室溫下回溫, 以避免 pH 值變化。

3. 利用 haemocytometer 來計數細胞數目

在細胞要做實驗前, 先取出 100 ul 細胞懸浮液至薄壁微量管, 再加入 100 ul trypan blue (0.06% K₂HPO₄, 0.8% NaCl, 0.4% trypan blue) 充分混合後取出 10 ul 加到 haemocytometer, 在顯微鏡放大 100

倍下以計數器計算在 haemocytometer 九大格中的左上，左下，右上，右下及中間格的細胞數總合，除以 5（等於每一大格的平均細胞數），再乘以 10^4 （haemocytometer 中的一大格體積是 1×10^{-4} ml），再乘以 2（因為之前加入 trypan blue 使得細胞數為原先的二分之一），則可得到原本細胞懸浮液中 1 ml 所含的細胞數。

4. 利用 [^3H]thymidine incorporation assays 來測定血管平滑肌細胞的生長週期

將 96 well 培養盤的每一個 well 種 5×10^3 細胞，放入細胞培養箱中培養 24 小時，換上 200 μl 0.5% FBS 的 DMEM 培養基繼續培養 24 小時作同步化（Synchronisation）的動作。之後分別在第 0, 24, 30, 36 小時換成 200 μl 15% FBS 的 DMEM (n=8) 培養 48 小時，第 44 小時加入 2.5 $\mu\text{Ci/ml}$ methyl- [^3H] thymidine 繼續培養 4 小時，接著利用細胞收集器將細胞沖碎並轉至尼龍膜上並將膜置於抽氣中的 laminar flow 中隔夜，最後將膜部分撕下放入含 4 ml scintillation 溶液的計數小管中，最後把計數小管放入機器判讀。

5. 西方墨漬法（Western blot）

將 3.5×10^5 的平滑肌細胞種至 6 well 培養盤的每一個 well，再以培養基補至最終體積為 2 ml，放入細胞培養箱培養 24 小時後取出，

抽去培養基且每一個 well 以 2 ml PBS 洗一次，換上 0.5% FBS 的 DMEM 培養基繼續培養 27 小時作同步化。接著開始給藥，positive control 為 15% FBS 之 DMEM，negative control 為 0.5% FBS 之 DMEM，丹參提取物 Salvianolic acid B 給予劑量為 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1 mg/ml，厚朴提取物 Magnolol 給予劑量為 0.001mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.05 mg/ml (n = 3)；接著在細胞培養箱中培養 24 小時。最後，每一個 well 以 2 ml 1×PBS 洗一次並加入 100ul SDS sample buffer (2% SDS, 50mM DTT, 62.5mM Tris-HCl, pH6.8) 萃取蛋白質，接著將培養盤放在冰上以刮勺將細胞刮下吸至薄壁微量管，把薄壁微量管置入乾浴器中以 95℃ 加熱 5 分鐘(此時原本黏稠的細胞萃取液會變的不黏稠)。測量蛋白質濃度的步驟如下：先將分光光度計電源打開暖機 30 分鐘，設定波長為 540nm。取 6 個薄壁微量管分別標示 0,5,10,15,20,25 並個別加入二次水，Bradford, Bovine serum albumin (BSA)，如下表所示：

	二次水	Bradford	BSA
0	800 ul	200 ul	0 ul
5	750 ul	200 ul	50 ul
10	700 ul	200 ul	100 ul
15	650 ul	200 ul	150 ul
20	600 ul	200 ul	200 ul
25	550 ul	200 ul	250 ul

待反應 5 分鐘後，依 0~25 的次序分別放入分光光度計中測吸光值，

以製作 standard curve , 其 R-squared 值在 0.980~0.999 之間。再取薄壁微量管製作待測樣本: 10ul sample + 200ul Bradford + 790ul 二次水 , 同樣地等反應 5 分鐘後放入分光光度計中測吸光值 , 再以 standard curve 所求出的方程式換算出樣本蛋白質濃度。

接著製作 SDS-PAGE , 配方如下 :

	下層膠	上層膠
ddH ₂ O	9.5 ml	6.08 ml
1.5M Tris, pH8.8	5.0 ml	
0.5M Tris, pH6.8		2.5 ml
10% SDS	200 ul	100 ul
40% Acrylamide/bis	5.0 ml	1.22 ml
10% APS	100 ul	100 ul
TEMED	20 ul	12 ul

待膠體完全硬後 , 靜置 30 分鐘 , 之後以 150V 預跑 30~60 分鐘 , 再來將在 95 中加熱 5 分鐘的變性樣本蛋白質及蛋白質分子量標誌劑注入至電泳槽中 , 以 100V 進行電泳。然後將電泳膠體上的蛋白質以 90~100V 的電壓且在 4 的環境下轉印一小時至 PVDF 轉漬膜上 (PVDF 轉漬膜使用前先用甲醇浸泡 1 分鐘 , 再泡入 transfer buffer); 接著將轉漬膜泡入 5%低脂牛奶 (5g 牛奶及 0.1ml Tween-20 溶於 100ml PBS) 室溫下搖一小時 ; 用 0.1% PBST 緩衝液 (1ml Tween-20

溶於 1L PBS) 每 5 分鐘洗一次，共洗三次；將轉漬膜放入有一級抗體的封口袋中在 4℃ 搖一夜（此實驗中所用的抗體有 PCNA 1:1000, RIP 1:1000, Caspase-3 1:1000, Bcl-2 1:500, Bad 1:500, PARP 1:500, Fas-ligand 1:1000, TRADD 1:250, p27 1:1000, p21 1:1000, p53 1:1000）；同樣再以 0.1% PBST 緩衝液每 5 分鐘洗一次，共洗三次，將轉漬膜放入有二級抗體（peroxidase-conjugated anti-mouse IgG）的封口袋中在室溫下搖一小時，以 0.1% PBST 緩衝液每 5 分鐘洗一次，共洗三次；在暗房中將轉漬膜和 ECL 呈色劑反應一分鐘，用感光底片紀錄訊號；最後用柯達的分析墨漬軟體分析。

6. 評估丹參提取物對 NF- κ B promoter 轉殖至血管平滑肌細胞的表現

採用 Gibco 的 DMRIE-C 試劑（屬於微脂體）將 3.5×10^5 的平滑肌細胞種至 6 well 培養盤的每一個 well，培養 15 小時。準備 12 管薄壁微量管，6 管包含 4ul DMRIE-C + 500ul 無血清培養基，另外 6 管包含 1ug NF- κ B promoter-Luciferase Construct + 500ul 無血清培養基，將不同的二管混合作用 20~30 分鐘成 lipid-DNA 複合物。移去培養盤中的培養基，加入剛才的 lipid-DNA 複合物培養 6 小時後移去，再換成 10% FBS 培養基繼續培養至隔天。接著給予丹參提取物 Salvianolic acid B，給予劑量為 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1 mg/ml，postive control 為 15% FBS 的培養基，培養 24 小時。萃取細胞的蛋

白質並以分光光度計定量出濃度（方法與西方墨漬法相同）。取 5ml 透明小管先加入 30ug 的蛋白質，再以 PBS 補體積至 20ul（置於冰上），上冷光分析儀前才加入 50ul luciferase reagent（每一管加入 luciferase reagent 與上機的時間間隔盡量一致）來測定 luciferase 表現量。

7. 利用 cell proliferation ELISA (BrdU) kit 來分析丹參及厚朴提取物對血管平滑肌細胞 DNA 合成的影響

本實驗是採用 Boehringer Mannheim 的 cell proliferation ELISA kit。首先，在 96 well 培養盤上的每一個 well 種 1×10^4 的平滑肌細胞並培養 15 小時。移去培養基後用 $1 \times$ PBS 洗一遍，加入 0.5% FBS 的培養基，繼續培養 30 小時。移去培養基後開始給藥：postive control 為 15% FBS 的培養基，negative control 為 0.5% FBS 的培養基，丹參提取物 Salvianolic acid B 給予劑量為 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1 mg/ml, 厚朴提取物 Magnolol 給予劑量為 0.001mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.05 mg/ml（每一個 well 均含有 100ul 培養基），培養 20 小時後，接著加入 10ul/well 的 BrdU（10uM）再培養 4 小時。移去培養基後加入 200ul/well FixDenat，在室溫下靜置 30 分鐘。移去 FixDenat 後加入 100 ul/well anti-BrdU-POD，在室溫下靜置 90 分鐘。移去

anti-BrdU-POD 後用 200 ul/well 的洗滌液洗 3 次。最後加入 100 ul/well substrate 後每隔 3 秒加入 25ul/well 1M H₂SO₄。將培養盤放在酵素免疫分析測讀儀上以 450nm 的波長判讀。

8. 利用測量 Malondialdehyde (MDA) 來評估丹參及厚朴提取物對血管大鼠血清的抗氧化能力

用 23 號針從大鼠尾動脈抽取約 3ml 血液，以 13000rpm 離心 15 分鐘將血清分離出。控制組取 15ul 的二次水 + 10ul 血清 + 10ul 10 mM CuSO₄ (總體積為 50ul, 「Cu²⁺」 = 2~3 mM); 實驗組則加 10ul 的丹參提取物 Salvianolic acid B 最終濃度為 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1 mg/ml, 厚朴提取物 Magnolol 最終濃度為 0.001mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.05 mg/ml, 再加入 5ul 二次水和 10ul 血清以及 10ul 10 mM CuSO₄。將樣本充分混合後放入 37 的水浴恆溫槽中 4 小時; 加入 350ul 20% TCA, 混合; 接著加入 350ul 0.67% TBA(溶於 0.05N NaOH), 混合; 將樣本放入 69 的水浴恆溫槽中 30 分鐘, 最後以 10000 rpm 離心 2.5 分鐘。每個樣本取 200ul 上清液加到 96 well 培養盤中, 將培養盤放在酵素免疫分析測讀儀上以 540nm 的波長判讀。

9. 氣球擴張破壞大白鼠總頸動脈血管的實驗模式

本實驗模式是用 350~450g 品系為 SD 的大白鼠（購自國科會）來做氣球擴張術。先由腹腔注射 3.6% chloral hydrate (1ml/100g) 麻醉大白鼠，將大白鼠腹面朝上並用麻繩綁住四肢將大白鼠固定在解剖板上，頭部套上裝有乙醚的 50c.c.離心管維持麻醉，擦拭少許優碘在大白鼠頸部，用大剪刀沿大白鼠頸部中間將其胸部到下顎的皮剪開，用鑷子將大白鼠頸部左側皮膜及一些結締組織剝離乾淨即可見左總頸動脈，將總頸動脈及內頸動脈和外頸動脈所在位置的結締組織剝離乾淨之後，將外頸動脈用縫線綁死結（距總頸動脈及內、外頸動脈交會處往頭部方向約 1.5 公分），將內頸動脈用縫線綁活結（距總頸動脈及內、外頸動脈交會處約 0.5 公分），用縫線繞過總頸動脈並用止血鉗夾住縫線以斷絕血流（距總頸動脈及內、外頸動脈交會處往尾部方向約 5 公分），用眼剪將外頸動脈剪個小洞（距綁死結處約 0.2 公分）並稍微放血以確定有剪破血管，將 Forgaty 2F 導管自上述的小洞插入並往總頸動脈處平推約 3 公分，打入約 1.3~1.5 大氣壓的氣體使氣球撐大，然後來回三次破壞總頸動脈的血管壁，最後將氣球導管洩氣並抽出，用 1ml 注射筒前接細軟管打入 heparin，在小洞與三叉處中間綁死結，鬆開總頸動脈與內頸動脈的縫線，I.M 給予 Ampicillin，將頸部剪開部分以縫線縫合回去，滴少許優碘後將大白鼠放回籠中待其甦醒即完成。

10. 統計方法

數據表示採用 $\text{mean} \pm \text{S.E}$ ，數據統計分析採用 student-t test，當 $P < 0.05$ 時，該實驗數據有統計學上的差異。

第四章 實驗結果

第一節 Salvianolic acid B 和 Magnolol 對血清刺激下平滑肌細胞

DNA 合成的影響

平滑肌細胞在經過 30 小時同步化後，在 15% 血清的刺激下給予 salvianolic acid B 和 magnolol 作用 24 小時，並在收細胞前 4 小時加入 BrdU。結果如圖 6 所示，salvianolic acid B 對 DNA 合成的抑制沒有影響；而 0.01 mg/ml magnolol 有些許抑制作用 ($P < 0.05$)，0.05 mg/ml magnolol 則是十分顯著地對平滑肌細胞 DNA 合成有抑制作用 ($P < 0.01$)。

第二節 Salvianolic acid B 和 Magnolol 對血清刺激下平滑肌細胞

PCNA 表達的影響

平滑肌細胞在經過 27 小時同步化後，在 15% 血清的刺激下給予 salvianolic acid B 和 magnolol 作用 24 小時，從我們 western blot 的結果看來，如圖 7 所示，只有 0.05 mg/ml magnolol ($P < 0.01$) 能抑制 PCNA 的表達，salvianolic acid B 完全沒有影響，這一點和圖 6 的結果類似。

第三節 Salvianolic acid B 和 Magnolol 對血清刺激下平滑肌細胞

RIP 表達的影響

平滑肌細胞在經過 27 小時同步化後，在 15% 血清的刺激下給予 salvianolic acid B 和 magnolol 作用 24 小時，從我們 western blot 的結果看來，如圖 8 所示，salvianolic acid B 和 magnolol 能引起 RIP 的表達，而且均呈劑量依附關係，不過仍以 magnolol 中 0.01 mg/ml ($P < 0.05$) 及 0.05 mg/ml ($P < 0.01$) 這兩種劑量最明顯。

第四節 Salvianolic acid B 和 Magnolol 對血清刺激下平滑肌細胞 Caspase-3 表達的影響

平滑肌細胞在經過 27 小時同步化後，在 15% 血清的刺激下給予 salvianolic acid B 和 magnolol 作用 24 小時，從我們 western blot 的結果看來，如圖 9 所示，0.01mg/ml salvianolic acid B ($P < 0.05$) 和 magnolol 的三種劑量都能引起 Caspase-3 的表達，不過仍以 magnolol 中 0.01 mg/ml ($P < 0.05$) 及 0.05 mg/ml ($P < 0.01$) 這兩種劑量最明顯。

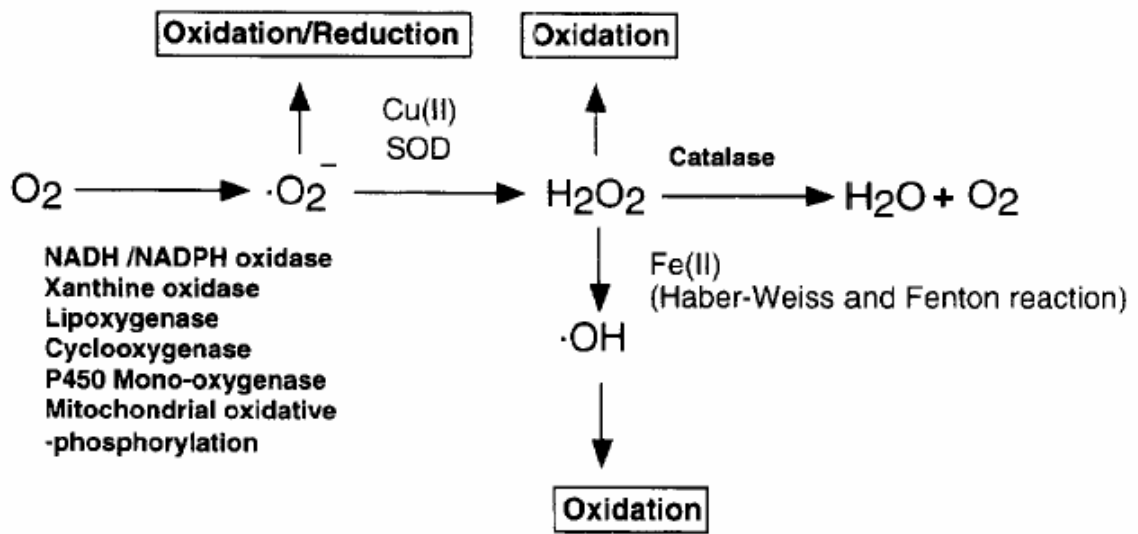
第五節 Salvianolic acid B 對轉殖至血清刺激下平滑肌細胞的 NF- κ B promoter 的活性影響

以 liposome 的方式將 NF- κ B promoter-Luciferase Construct 轉殖至平滑肌細胞中，在 15% 血清的刺激下給予 salvianolic acid B 作用 24 小時後萃取蛋白質，測定 luciferase 表現量。結果如圖 10 所示，以 0.01mg/ml salvianolic acid B ($P < 0.01$) 對 NF- κ B promoter 活性具明顯

的抑制作用。

第六節 Salvianolic acid B 和 Magnolol 在大鼠血清中的抗氧化能力

在從血液中分離出的大鼠血清中加入 2mM CuSO₄及 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml Salvianolic acid B 或 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.05mg/ml Magnolol, 作用 4 小時後再加入 TBA 和 TCA 產生 MDA。從酵素免疫分析測讀儀測出 0.01mg/ml salvianolic acid B (P<0.01) 及 0.05mg/ml magnolol(P<0.01) 均能顯著的減少大鼠血清中 MDA 的產生，而且有劑量依附關係，不過以 0.01mg/ml salvianolic acid B 效果最好。



1.

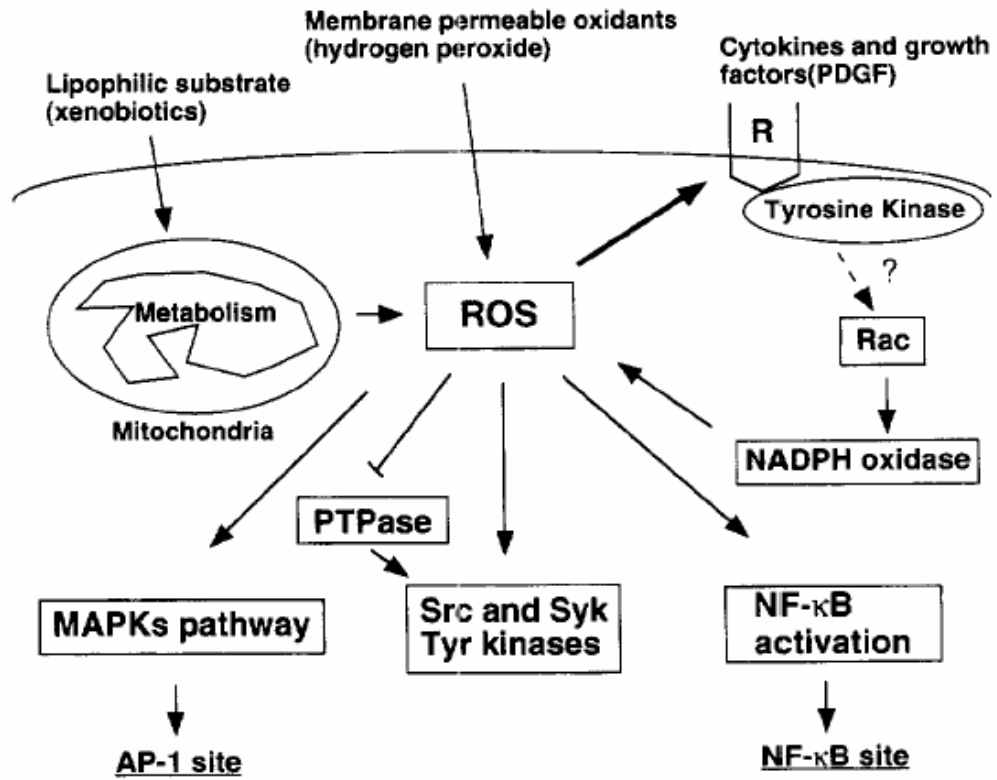


圖 2.

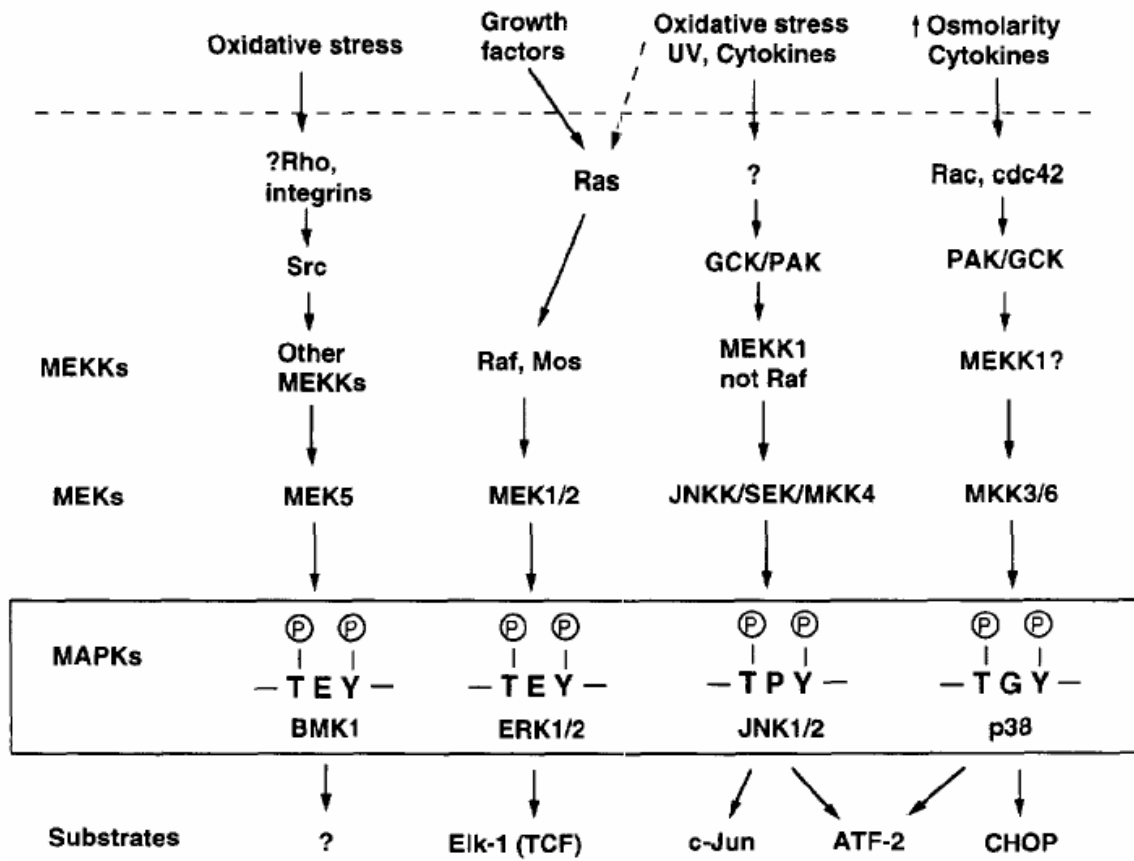


圖 3.

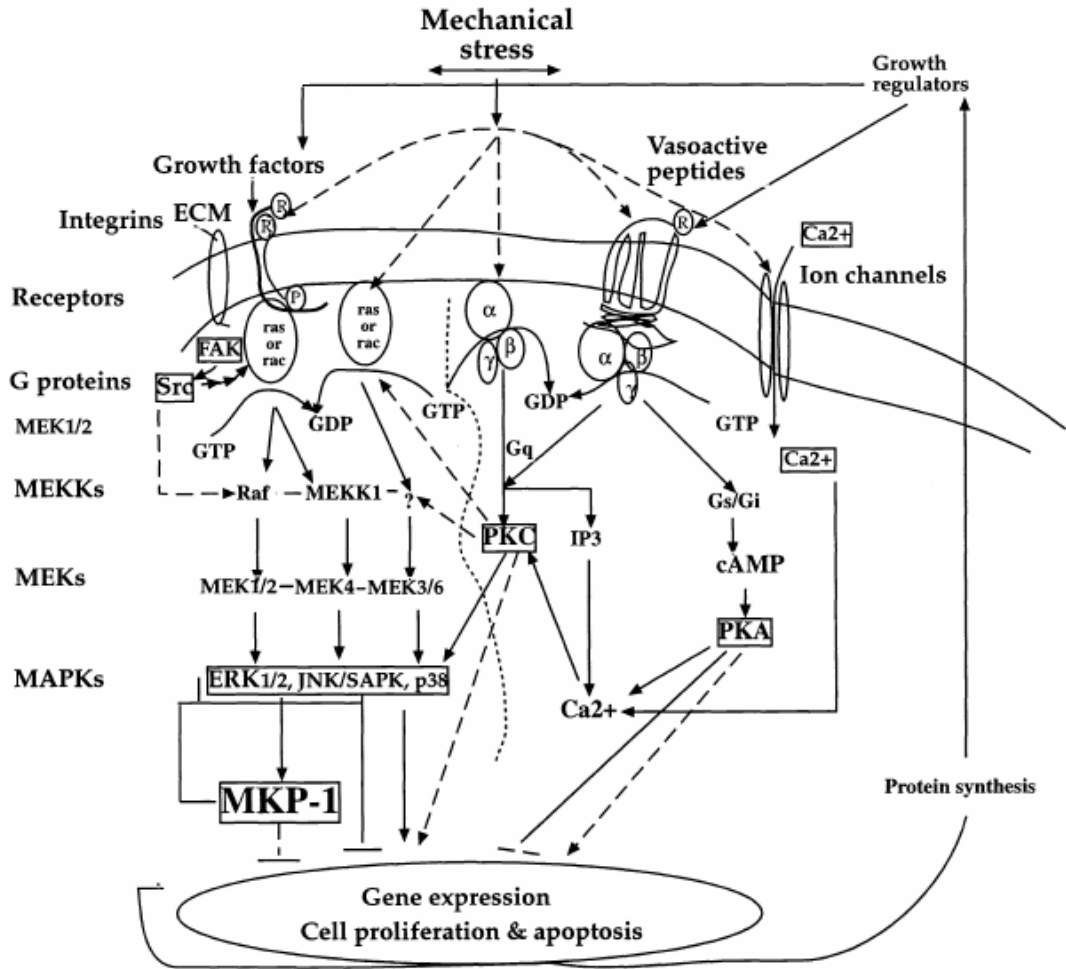


圖4. Model for mechanical stress initiated-signal transductions in VSMCs.

Death Receptor Signaling

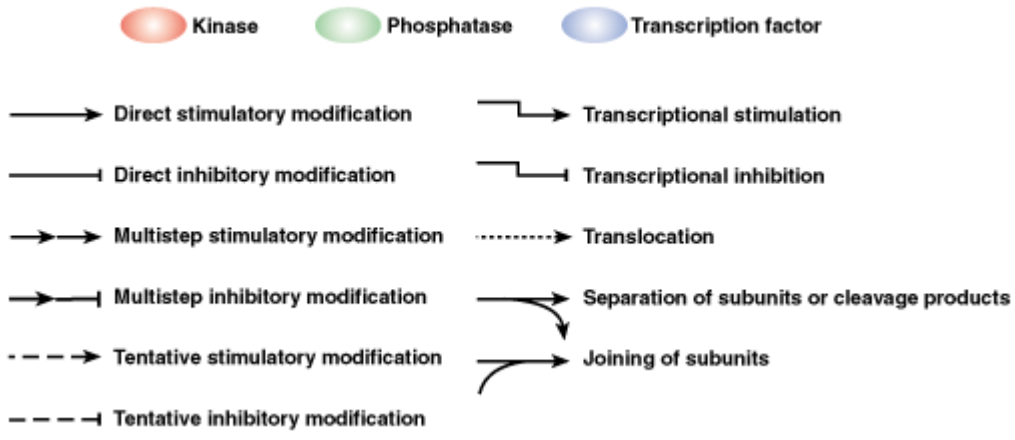
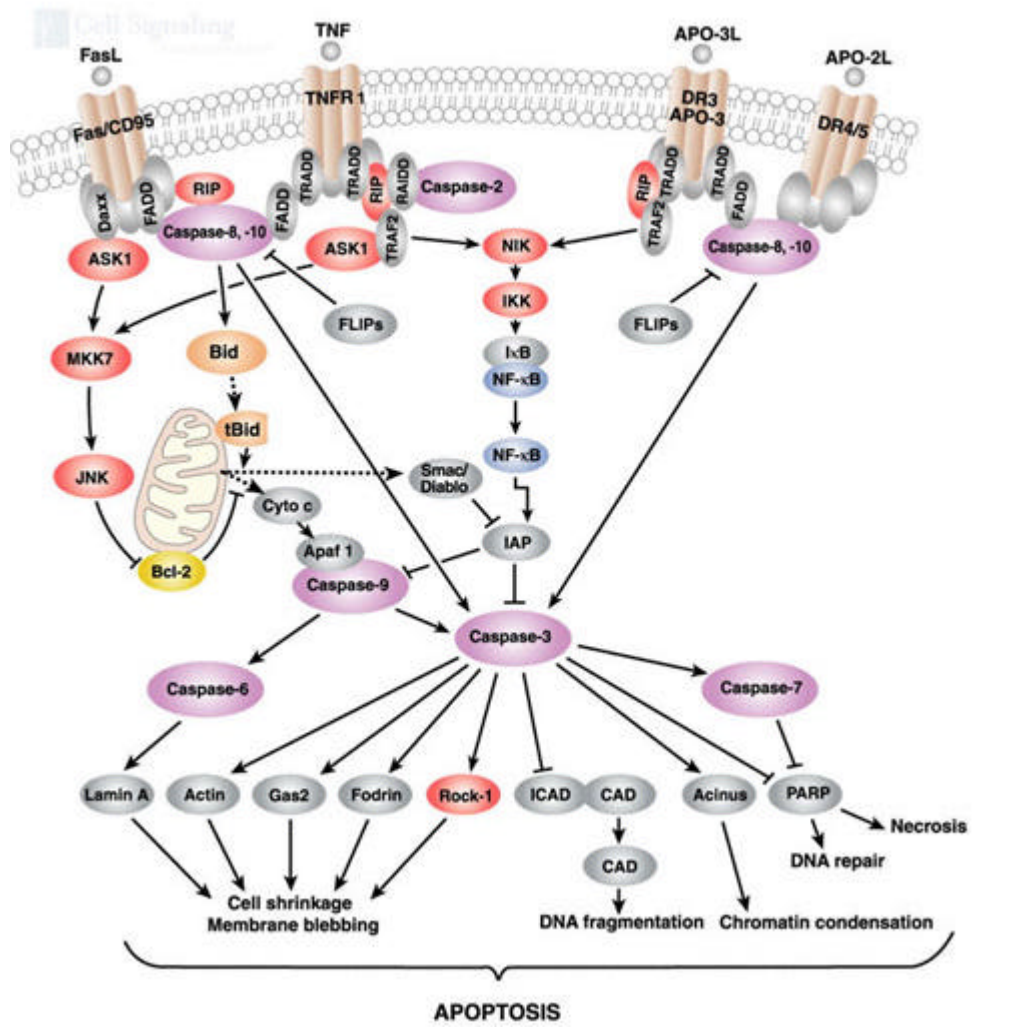


圖 5.

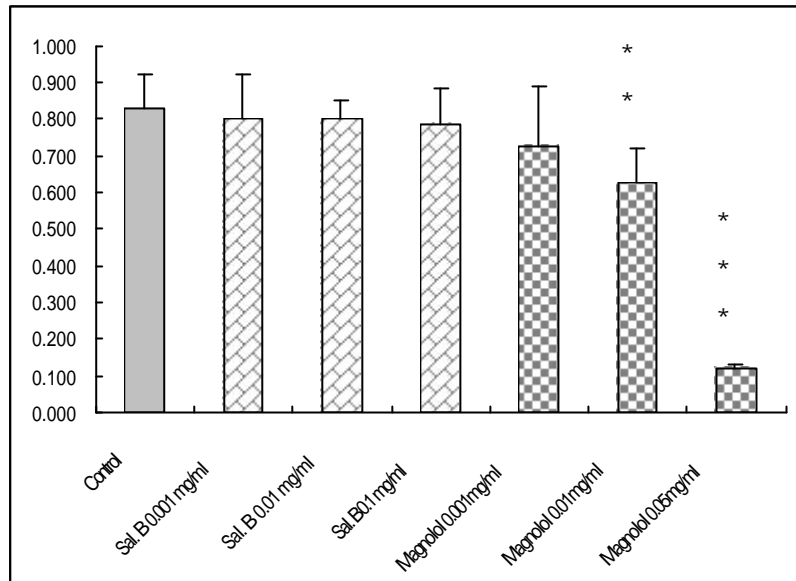


圖 6. Salvianolic acid B 和 Magnolol 對血清引起平滑肌細胞 DNA 合成的影響。所有平滑肌細胞都培養在含 15% 血清的 DMEM 中，給藥組加入 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml Salvianolic acid B 及 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.05mg/ml Magnolol, 藥物作用時間 30 小時。與 15% 血清 control group 比較起來只有 0.05mg/ml Magnolol 對 BrdU incorporation 有明顯的抑制作用。

** P < 0.01, *** P < 0.001 versus control group

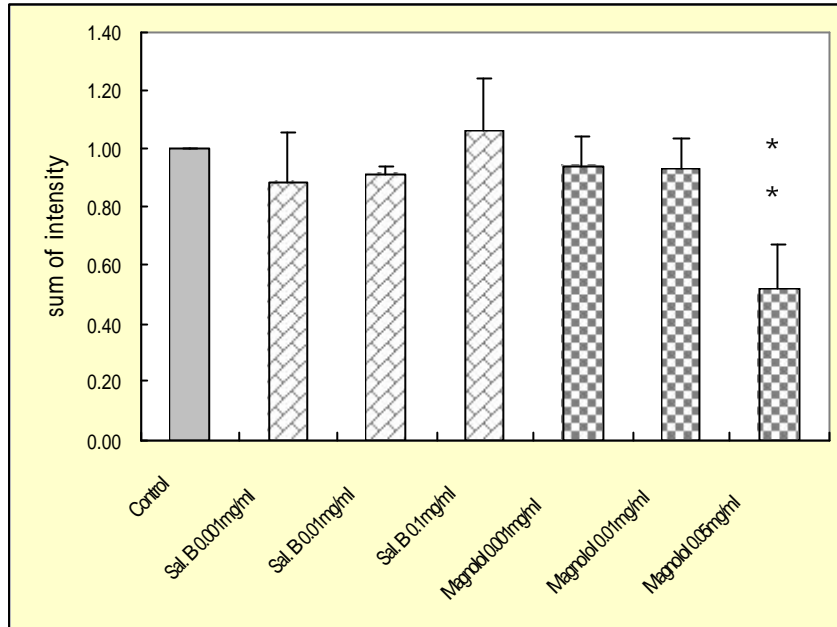


圖 7. Salvianolic acid B 及 Magnolol 對平滑肌細胞 PCNA 表達程度的影響。所有平滑肌細胞都培養在含 15% 血清的 DMEM 中，給藥組加入 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml Salvianolic acid B 及 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.05mg/ml Magnolol，藥物作用時間 24 小時。與 15% 血清 control group 比較起來只有 0.05mg/ml Magnolol 有降低 PCNA 表達的趨勢。 ** P < 0.01 versus control group

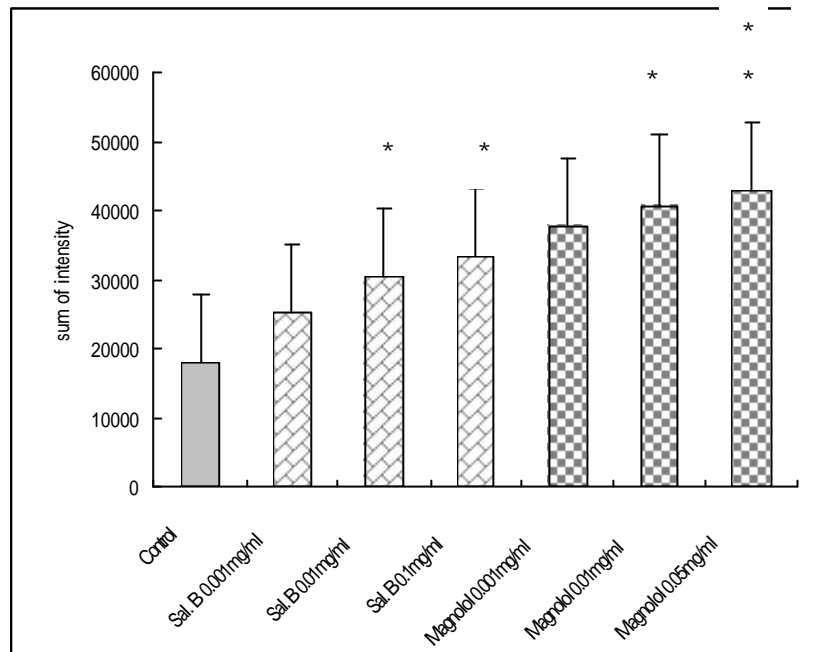


圖 8. Salvianolic acid B 及 Magnolol 對平滑肌細胞 RIP 表達程度的影響。所有平滑肌細胞都培養在含 15% 血清的 DMEM 中，給藥組加入 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml Salvianolic acid B 及 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.05mg/ml Magnolol，藥物作用時間 24 小時。Salvianolic acid B 及 Magnolol 與 15% serum control 比較起來 RIP 的表達均有增加，不過以 0.05mg/ml Magnolol 增加最多。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control group

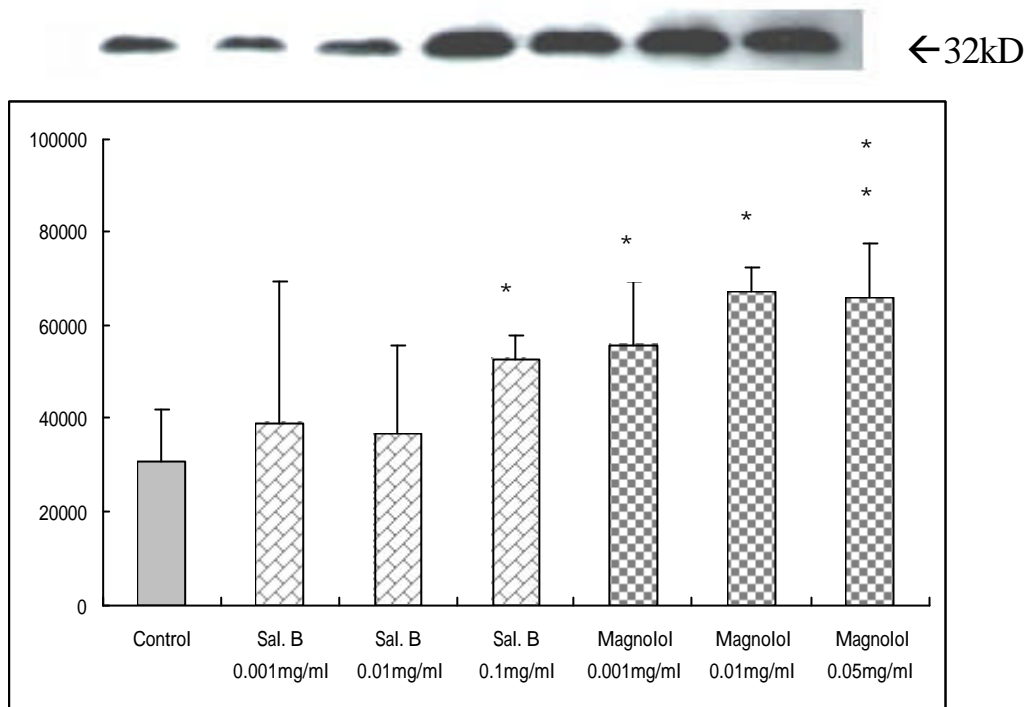


圖 9. Salvianolic acid B 及 Magnolol 對平滑肌細胞 Caspase-3 表達程度的影響。所有平滑肌細胞都培養在含 15% 血清的 DMEM 中，給藥組加入 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml Salvianolic acid B 及 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.05mg/ml Magnolol, 藥物作用時間 24 小時。Salvianolic acid B 及 Magnolol 與 15% serum control 比較起來 Caspase-3 的表達均有增加，不過以 0.05mg/ml Magnolol 增加最多。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control group

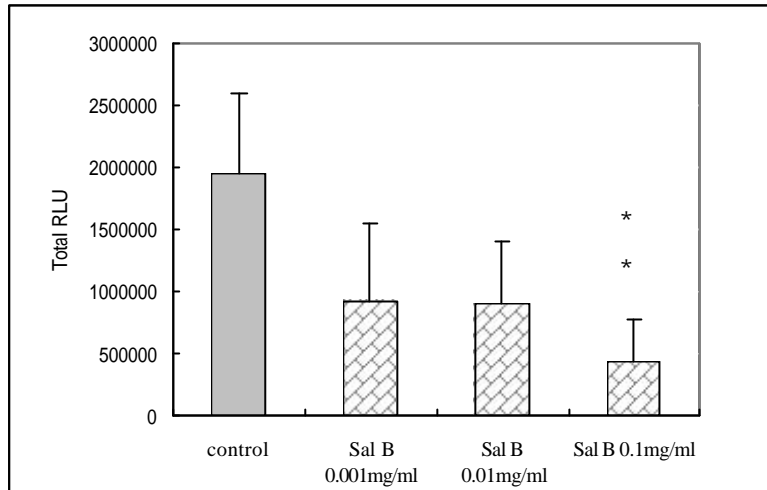


圖 10. Salvianolic acid B 對 NF- κ B promoter 活性的影響。在平滑肌細胞中加入 NF- κ B promoter-Luciferase Construct 和 liposome 結合物作 transient transfection 後，經培養 24 小時再加入 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml Salvianolic acid B，藥物作用時間 24 小時後萃取蛋白質。將 30ug 蛋白質和 luciferase substrate 混合後測定 luciferase 表現量。結果以 0.1mg/ml Salvianolic acid B 對 NF- κ B promoter 活性具明顯的抑制作用。

** P < 0.01 versus control group

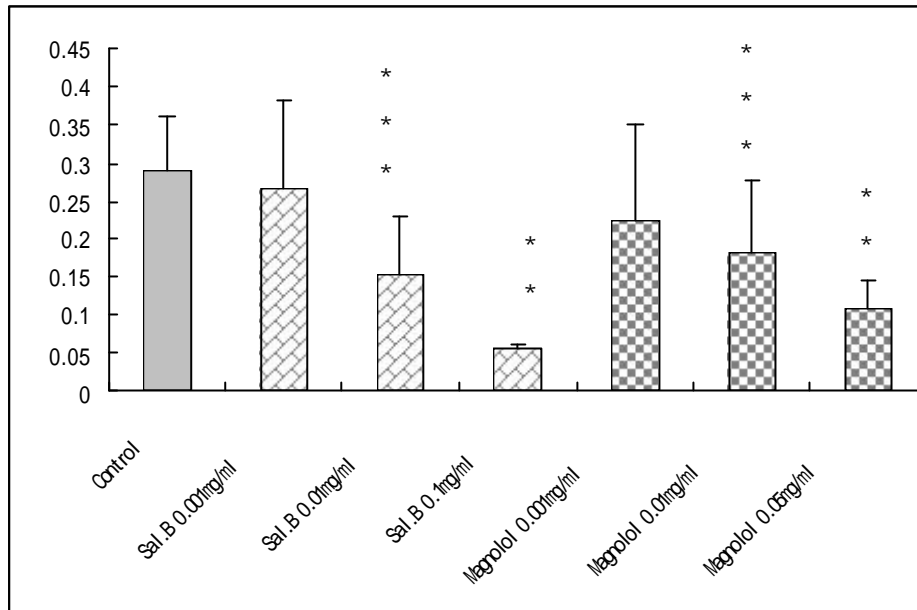


圖 11. Salvianolic acid B 及 Magnolol 在大鼠血清中之抗氧化能力。在大鼠血清中加入 2mM CuSO₄ 及 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.1mg/ml Salvianolic acid B 或 0.001mg/ml, 0.01mg/ml, 0.05mg/ml Magnolol , 作用 4 小時後再加入 TBA 和 TCA 產生 MDA。 Salvianolic acid B 及 Magnolol 均能顯著的減少大鼠血清中 MDA 的產生 , 而且有劑量依附關係。

P < 0.01, * P < 0.001 versus control group

第五章 討論

在前言中提到對於急性心肌梗塞的冠狀動脈疾病，在施行經皮穿腔冠狀動脈血管成形術(PTCA)的介入性療法後，能對病患的症狀、運動量以及生活品質作大幅度的改善。近年來台灣從事 PTCA 的醫院數，心臟科專家數，以及病例數都快速增加，但是 PTCA 在動脈再狹窄（約 30~50%）以及病人術後需進一步處置的機會仍然無法下降到令人滿意的程度。因此尋找能降低內膜增生的治療方法是全球醫學界共同努力的目標。

我們選用丹參萃取物 salvianolic acid B 以及厚朴萃取物 magnolol 來作為研究的藥物，主要是由於丹參本身活血化瘀的效用在中國傳統醫學中對於冠心病的治療有相當重要的地位，現代的藥理研究也證實其效果（參照前言第四節）；而 salvianolic acid B 具有抗脂質氧化並清除自由基的能力[122,123]，此外能降低人的主動脈內皮細胞上的 VCAM-1 和 ICAM-1 的表達[124]，所以選用來探討對氣球擴張後動脈再狹窄的影響。厚朴則是有文獻指出 magnolol 藉其抗氧化的能力減少大白鼠粒線體的脂質過氧化[116]，對於 neutrophil 在細胞外間質的附著也具有抑制效果，此外還能抑制心肌經缺血再灌流後所造成的心室心律不整來保護心肌[116,117,119]；而從本實驗室蔡百榮學長的研究結果得知厚朴的確能減少內膜增生的幅度，因此我們繼續探討

magnolol 對於減少內膜增生的分子機轉及途徑。

血管平滑肌細胞不正常的過度增生現象是氣球擴張術後產生 restenosis 的主要形成原因之一。首先就 salvianolic acid B 及 magnolol 在 in vitro 中對血清刺激下的平滑肌細胞增生現象是否會產生抑制作用來探討。我們利用 PCNA 這個核蛋白來作為觀察指標：因為 PCNA 是 DNA polymerase δ 的輔助因子，幫助 DNA polymerase δ 和 DNA 結合並促進 DNA 複製時的 DNA 合成；PCNA 的表達量在細胞週期中的 S 期達到最高峰，而且在其他時期不易偵測[125~128]；另一方面，我們使用 Cell proliferation ELISA kit，偵測和細胞 DNA 合成時所需 Thymidine 結構相近的 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 的含量，其目的和 PCNA 一樣都是用來觀察藥物對 DNA 合成的影響。最近的研究中指出 magnolol 能抑制 COLO-205 和 Hep-G2 這兩種癌細胞的 DNA 合成[129]。從我們的結果中得知高劑量的 magnolol (0.05 mg/ml) 對於抑制血清刺激下的平滑肌細胞 DNA 合成同樣有明顯的效果，而 salvianolic acid B 則完全沒有影響。

前面提到由於血管平滑肌細胞不正常的增生是氣球擴張術後產生 restenosis 的主要原因之一，所選擇的治療藥物除了直接抑制細胞的 DNA 合成之外，還可以從誘引細胞進行 apoptosis 使 restenosis 的進程中細胞數目維持恆定的方向著手。從一些研究指出 magnolol 在

COLO-205 和 Hep-G2 這兩株癌細胞中會增加 p21, caspase-3, caspase-8, caspase-9 這些蛋白質的表達並抑制 bcl-2, 促使 cytochrome c 從粒線體轉移到細胞質液中, 增加細胞質液中游離態 Ca^{2+} , 表示 magnolol 會引起細胞進行 apoptosis[130]。而 salvianolic acid B 同樣有研究指出在餵食膽固醇混合水溶性丹參萃取物的兔子施行氣球擴張術後進行 apoptosis 的細胞數目比正常組和餵食膽固醇組施行氣球擴張術增加許多並伴隨著 p53 的表達, 內膜新生增厚面積也明顯減少[131]。由我們從平滑肌細胞作有關 apoptosis 的相關蛋白質表達上得知, 在血清刺激下的平滑肌細胞給予 salvianolic acid B 和 magnolol 比起單純只有血清刺激下的平滑肌細胞均能明顯地增加 receptor-interacting protein (RIP) 及 caspase-3 的表達 (見圖 5), 但這只是在蛋白質層面上, 仍需要從別的 apoptosis 特徵來求証。

NF- κ B 是一種與 DNA 結合的轉錄因子, 分為 p50 和 p65 這兩種次單元之蛋白質複合物; 在調節免疫及發炎反應、胚胎及細胞分化之發育連繫、細胞凋亡、細胞週期及腫瘤生成 (oncogenesis) 上扮演重要的角色。已有研究指出 NF- κ B 在施行氣球擴張術後會開始活化, 而且當以抑制劑減弱 NF- κ B/Rel 的活性及抑制 NF- κ B promoter transactivation 可有效減少血管平滑肌細胞增生並且預防新生內膜形成[132,133]; 在由 TNF- α 引起的血管平滑肌細胞遷移的實驗中, 去

除 NF- κ B 的活性可減弱 TNF- α 引起的血管平滑肌細胞遷移作用 [134]；另外一項研究指出，由 NO 引起的細胞凋亡與 protein kinase C signaling 及 NF- κ B 結合活性的減少有關[135]。從這些研究中得知 NF- κ B 對於 restenosis 的形成相當重要。由我們 Luciferase assay 的結果看來，高劑量的 salvianolic acid B(0.1 mg/ml)對於 NF- κ B promoter 的活性有十分顯著的抑制作用，由此可推測 salvianolic acid B 可能經由減少 NF- κ B 的表達促使細胞進行 apoptosis，見圖 5。

氧化低密度脂蛋白(Oxidatively modified LDL,ox-LDL)是動脈硬化形成和氣球擴張術後血管再狹窄的主要致病因素之一。最重要的是它被巨噬細胞的吸入是無控制性的，它的細胞毒性，和它的趨化性。細胞或無細胞系統的 LDL 氧化主要是經由一個自由基過程 [136~139]，在此，LDL 的 polyunsaturated fatty acid (PUFAs) 會被脂質過氧化作用(lipid peroxidation)轉換成脂氫過氧化物，然後再被分解成不同的產物，包括活躍的乙醛如 malondialdehyde (MDA)，4-hydroxynonenal (4-HNE)，hexanal 和很多其它的。多方面的研究提議出這些 lipid peroxidation 在 LDL 粒子內所產生的產物會和 Apo-B 氨基酸基作共價鍵的結合；例如離氨酸(lysine)基的 ϵ -氨基 groups，藉以產生使 Apo-B 對巨噬細胞清道夫接受器 (macrophage scavenger receptors) 有高度親和力的修飾[138,139]接而形成泡沫細胞，同時

oxLDL 和其產物也會吸引血液中的單核球和血管中層的平滑肌細胞進入血管內皮下空間。Ox-LDL 的細胞毒性也有可能由乙醛 lipid peroxidation 的產物傳達到某一些程度 [138]。HNE, 2-alkenal, 和 2,4-alkadienals 在 mmol 的濃度下對內皮細胞有細胞毒性 [140]。因此從血管內膜的 ox-LDL 擴散出來的乙醛會導至血管系統內皮細胞之破壞, 而加速動脈硬化病變或血管再阻塞病變的形成。這些發現, 和 ox-LDL, 以及 MDA 和 HNE 修飾 LDL 出現在粥狀動脈硬化病灶的發現 [141~143], 指出 lipid peroxidation 和乙醛性 lipid peroxidation 的產物在致粥瘤性啟始作用過程中 (包括刺激平滑肌細胞增生) 扮演著一個重要的角色 [144]; 血清中的 MDA-LDL 對於氧化壓力來說可當作是測量指標, 而且在一項臨床研究中, MDA 在病患施行 PTCA 將氣球洩氣後 60 秒會明顯增加 [145]。另一方面, ox-lipoprotein-A 也被證實能引起內皮細胞中 PDGF-B 的表達 [146]。在前言中提到在血管內膜受傷害後所產生的氧自由基可視為第二訊息傳遞者: 譬如增加血管平滑肌細胞 DNA 合成以及原致癌基因 c-myc 和 c-fos mRNA 的表達。基於上面的理由, 我們加入和細胞實驗中相同濃度的 magnolol 和 salvianolic acid B 至含 2mM CuSO₄ 的大鼠血清中觀察是否對血清中 MDA 的產生發揮抑制作用, 結果發現二者都能顯著地降低 MDA 的形成, 而且呈 dose-dependent manner。

第六章 參考文獻

- [1] Faxon DP.(1993) Restenosis after angioplasty: what have we learned from clinical trail? *Cardiol Rev* 1:209-217.
- [2] Kuntz R.E., Baim D.S.(1993) Defining coronary restenosis: newer clinical and angiographic paradigms. *Circulation* 88:1310-1323.
- [3] Serruys P.W., Foley D.P., (1993) Kirkeeide R.L.,King S.B. Restenosis revisited: insights provided by quantitative coronary angioplasty. *Am Heart J* 126:1243-1267. Editorial.
- [4] MJ Post, C Borst, and RE Kuntz. (1994) The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. *Circulation* 89:2816-2821.
- [5] Antoine Lafont, Luis A. Guzman, Patrick L. Whitlow, Marlene Goormastic, J. Fredrick Cornhill, and Guy M. Chisolm. (1995) Restenosis After Experimental Angioplasty : Intimal, Medial, and Adventitial Changes Associated With Constrictive Remodeling. *Circ Res* 76:996-1002.
- [6] Yi Shi, Marc Pieniek, Ali Fard, James O'Brien, John D. Mannion, and Andrew Zalewski. (1996) Adventitial Remodeling After Coronary Arterial Injury. *Circulation* 93:340-348.
- [7] Henning Rud Andersen, Michael Mæng, Martin Thorwest, and Erling Falk. (1996) Remodeling Rather Than Neointimal Formation Explains Luminal Narrowing After Deep Vessel Wall Injury : Insights From a Porcine Coronary (Re)stenosis Model. *Circulation* 93:1716-724.
- [8] Schwartz RS. Edwards WD. Huber KC. Antoniades LC. Bailey KR. Camrud AR. Jorgenson MA. Holmes DR Jr. (1993) Coronary restenosis : prospects for solution and new perspectives from a porcine model. *Mayo Clinic Proceedings*. 68:54-62.
- [9] Carter AJ. Laird JR. Farb A. Kufs W. Wortham DC. Virmani R. (1994) Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model. *J Am Coll Cardiol* 24:1398-405.
- [10] Lam JY. Chesebro JH. Steele PM. Dewanjee MK. Badimon L. Fuster V. (1986) Deep arterial injury during experimental angioplasty: relation to a positive indium-111-labeled platelet scintigram, quantitative platelet deposition and mural thrombosis. *J Am Coll*

Cardiol 8:1380-6.

- [11] Ip JH, Fuster V, Israel D, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. The role of platelets, thrombin and hyperplasia in restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1991;17(6 Suppl B):77B-88B
- [12] Meyer BJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Falk E, Badimon L, Michael AD, Chesebro JH, Fuster V, Badimon JJ. Local delivery of r-hirudin by a double-balloon perfusion catheter prevents mural thrombosis and minimizes platelet deposition after angioplasty. *Circulation* 1994;90:2474-80.
- [13] Crowley ST, Ray CJ, Nawaz D, Majack RA, Horwitz LD. Multiple growth factors are released from mechanically injured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995;269(5 Pt 2):H1641-7,
- [14] Ward Casscells, MD Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis *Circulation* 86;3:723-9
- [15] Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev* 1990;70:177-209.
- [16] Clowes AW, Reidy MA *J Vasc Surg* 1991;13:885-891.
- [17] Austin GE, Ratliff NB, Hollman J, Tabei S, Phillips DF. Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1985; 6:369 –375.
- [18] Uchida Y, Hasegawa K, Kawamura K, Shibuya I. Angioscopic observation of the coronary luminal changes induced by percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1989;117:769 –776.
- [19] Block PC. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty—anatomic and pathophysiological mechanisms: strategies for prevention. *Circulation* 1990;81:IV2–IV4.
- [20] Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 1999;99:44 –52.
- [21] Rogers C, Parikh S, Seifert P, Edelman ER. Endogenous cell seeding: remnant endothelium after stenting enhances vascular repair. *Circulation* 1996; 94:2909 –2914.
- [22] Nugent HM, Rogers C, Edelman ER. Endothelial implants inhibit intimal hyperplasia after porcine angioplasty. *Circ Res*

- 1999;84:384–391.
- [23] Gajdusek C, Carbon S, Ross R, Nawroth P, Stern D. Activation of coagulation releases endothelial cell mitogens. *J Cell Biol* 1986;103:419-428.
- [24] Koo EWY, Gotlieb AI *Lab Invest* 1991;64:743-750.
- [25] Wight TN *Arteriosclerosis* 1989;9:1-20.
- [26] Dzau VJ, Gibbons GH *Hypertension* 1991;18:15-21.
- [27] Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. An activated form of transforming growth factor β is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4544-4548.
- [28] Herman IM, Castellot JJ Jr *Arteriosclerosis* 1987;7:463 - 469.
- [29] Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schomig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing an-gioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:819–824.
- [30] Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neoin-timal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:224–230.
- [31] Rogers C, Welt FG, Karnovsky MJ, Edelman ER. Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits: coupled inhibitory effects of heparin. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1996;16:1312–1318.
- [32] Rogers C, Edelman ER, Simon DI. A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10134–10139.
- [33] Simon DI, Chen Z, Seifert P, Edelman E, Ballantyne CM, Rogers C. Markedly reduced neointimal thickening in Mac-1 (CD11b/CD18)-deficient mice after carotid artery dilation and endothelial denudation (abstract). *Circulation* 1998;98:I-238.
- [34] Buffon A, Liuzzo G, Biasucci LM, Pasqualetti P, Ramazzotti V, Rebuzzi AG, Crea F, Maseri A. Preprocedural serum levels of C-reactive protein predict early complications and late restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1512–1521.
- [35] Laurindo FRM, da Luz PL, Uint L et al. Evidence for superoxide radical-dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact

- dogs. *Circulation* 1991;83:1705–1715.
- [36] Nunes GL, Sgoutas DS, Redden RA et al. Combinations of vitamins C and E alters the response to coronary balloon injury in the pig. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:156–165.
- [37] Nunes GL, Robinson K, Kalynych A et al. Vitamins C and E inhibit O₂ production in pig coronary arteries. *Circulation* 1997;89:3593 - 3601.
- [38] Ferns GA, Forster L, Stewart-Lee A et al. Probucol inhibits neointimal thickening and macrophage accumulation after balloon injury in the cholesterol-fed rabbit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:11312–11316.
- [39] Freyschuss A, Stiko RA, Swedenborg J et al. Antioxidant treatment inhibits the development of intimal thickening after balloon injury of the aorta in hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest* 1993;91:1282–1288.
- [40] Schneider JE, Berk BC, Gravanis MB et al. Probucol decreases neointimal formation in a swine model of coronary artery balloon injury. A possible role for antioxidants in restenosis. *Circulation* 1993;88:627–628.
- [41] Miyauchi K, Aikawa M, Tani T et al. Effect of probucol on smooth muscle cell proliferation and dedifferentiation after vascular injury in rabbits: possible role of PDGF. *Cardiovasc Drugs Ther* 1998;12:251–260.
- [42] Tanaka K, Hayashi K, Shingu T et al. Probucol inhibits neointimal formation in carotid arteries of normocholesterolemic rabbits and the proliferation of cultured rabbit vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Drugs Ther* 1998;12:19–28.
- [43] Tardif JC, Cote G, Lesperance J et al. Probucol and multivitamins in the prevention of reestenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1997;337:365–372.
- [44] Lee YJ, Daida H, Yokoi H et al. Effectiveness of probucol in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Jpn Heart J* 1996;37:327–332.
- [45] Setsuda M, Inden M, Hiraoka N et al. Probucol therapy in the prevention of restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Clin Ther* 1993;15:374–382.
- [46] Yokoi H, Daida H, Kuwabara Y et al. Effectiveness of an

- anti-oxidant in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: the Probucol Angioplasty Restenosis Trial. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:855–862.
- [47] Watanabe K, Sekiya M, Ikeda S, Miyagawa M, Hashida H. Preventive effects of probucol on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1996;132:23–29.
- [48] O'Keefe Jr. JH, Stone GW, McCallister Jr. BD et al. Lovastatin plus probucol for prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1996;77:649–652.
- [49] Sekiya M, Funada J, Watanabe K, Miyagawa M, Akutsu H. Effects of probucol and cilostazol alone and in combination on frequency of post-stenting restenosis. *Am J Cardiol* 1998;82:144–147.
- [50] Rodes J, Cote G, Lesperance J et al. Prevention of restenosis after angioplasty in small coronary arteries with probucol. *Circulation* 1998;97:429–436.
- [51] Rao, G. N.; Berk, B. C. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ. Res.* 1992;**70**:593–599.
- [52] Marui, N.; Offermann, N. K.; Swerlick, R.; Kunsch, C.; Rosen, A.; Ahmad, M.; Alexander, R. W.; Medford, R. M. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1993;**92**:1866–1874.
- [53] Arbault S, Pantano P, Sojic N et al. Activation of the NADPH oxidase in human fibroblasts by intrusion of a single cell with an ultramicroelectrode. *Carcinogenesis* 1997;18:569–574.
- [54] Abe JI, Berk BC. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 1998;8:59–63.
- [55] Susuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 1997;22:269–285.
- [56] Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene expression. *FASEB J* 1996;10:709–720.
- [57] Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999;85:753–766.
- [58] Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, et al. Vascular oxidant stress early after balloon injury. Evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. *Free Radic Biol Med* 2000;in press.

- [59] Pollman MJ, Hall JL, Gibbons GH. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. *Circ Res* 1999;84:113–121.
- [60] Yi Shi, Marc Pieniek, Ali Fard, James O'Brien, John D. Mannion, and Andrew Zalewski Adventitial Remodeling After Coronary Arterial Injury. *Circulation* 1996;93: 340-348
- [61] Hogeman B, Gillessen A, Bocker W, Rauterberg J, Domschke W. Myofibroblast-like cells produce mRNA for type I and III procollagens in chronic active hepatitis. *Scand J Gastroenterol.* 1993;28:591-594.
- [62] Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis: a combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol.* 1994;145:114-125.
- [63] Kirk TZ, Mark ME, Chua CC, Chua BH, Mayes MD. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J Biol Chem.* 1995;270:3423-3428.
- [64] Darby I, Skalli O, Gabbiani G. α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest.* 1990;63:21-29.
- [65] Sappino AP, Schrürch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulation. *Lab Invest.* 1990;63:144-161.
- [66] Arora PD, McCulloch CAG. Dependence of collagen remodelling on α -smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1994;159:161-175.
- [67] Lafont A, Libby P. The smooth muscle cell: sinner or saint in restenosis and the acute coronary syndromes? *J Am Coll Cardiol* 1998;32:283–285.
- [68] Kakuta T, Currier JW, Haudenschild CC, Ryan TJ, Faxon DP. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation* 1994;89: 2809–2815.
- [69] Mintz GS, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Popma JJ, Leon MB. Contribution of inadequate arterial remodeling to the development of focal coronary artery stenoses: an intravascular ultrasound study.

- Circulation* 1997;95:1791–1798.
- [70] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
- [71] Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:758 –769.
- [72] Chen JK, Hoshi H, McKeehan WL. Transforming growth factor type beta specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5287–5291.
- [73] Bilder G, Wentz T, Leadley R, Amin D, Byan L, O'Conner B, Needle S, Galczynski H, Bostwick J, Kasiewski C, et al. Restenosis following angioplasty in the swine coronary artery is inhibited by an orally active PDGF-receptor tyrosine kinase inhibitor, RPR101511A. *Circulation* 1999;99:3292–3299.
- [74] Yamasaki M, Hara K, Ikari Y, Kobayashi N, Kozuma K, Ohmoto Y, Oh-Hashi Y, Ako J, Nakajima H, Chiku N, et al. Effects of cilostazol on late lumen loss after Palmaz-Schatz stent implantation. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1998;44:387–391.
- [75] Tsuchikane E, Fukuhara A, Kobayashi T, Kirino M, Yamasaki K, Kobayashi T, Izumi M, Otsuji S, Tateyama H, Sakurai M, Awata N. Impact of cilostazol on restenosis after percutaneous coronary balloon angioplasty. *Circulation* 1999; 100:21–26.
- [76] Bar-Shavit R, Kahn A, Wilner GD, Fenton JW II. Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin. *Science* 1983;220:728 –731.
- [77] McNamara CA, Sarembock IJ, Gimple LW, Fenton JW II, Coughlin SR, Owens GK. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest* 1993;91:94 –98.
- [78] Bar-Shavit R, Benezra M, Eldor A, Hy-Am E, Fenton JW II, Wilner GD, Vlodaysky I. Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action. *Cell Regul* 1990;1:453– 463.
- [79] Oberhoff M, Novak S, Herdeg C, Baumbach A, Kranzhofer A, Bohnet A, Horch B, Hanke H, Haase KK, Karsch KR. Local and systemic delivery of low molecular weight heparin stimulates the reendothelialization after balloon angioplasty. *Cardiovasc Res*

- 1998;38:751–762.
- [80] Ellis SG, Roubin GS, Wilentz J, Douglas JS Jr, King SB II. Effect of 18- to 24-hour heparin administration for prevention of restenosis after uncomplicated coronary angioplasty. *Am Heart J* 1989;117:777–782.
- [81] Gimple LW, Herrmann HC, Winniford M, Mammen E. Usefulness of subcutaneous low molecular weight heparin (ardeparin) for reduction of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1999;83: 1524–1529.
- [82] Serruys PW, Herrman JP, Simon R, Rutsch W, Bode C, Laarman GJ, van Dijk R, van den Bos AA, Umans VA, Fox KA, for the Helvetica Investigators. A comparison of hirudin with heparin in the prevention of restenosis after coronary angioplasty: Helvetica Investigators. *N Engl J Med* 1995;333:757–763.
- [83] Burchenal JE, Marks DS, Tift Mann J, Schweiger MJ, Rothman MT, Ganz P, Adelman B, Bittl JA. Effect of direct thrombin inhibition with Bivalirudin (Hirulog) on restenosis after coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1998;82:511–515.
- [84] Sobue K, Hayashi K, Nishida W. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. *Mol Cell Biochem* 1999;190:105-18.
- [85] Austin GE, Ratliff NB, Hollman J, Tabei S, Phillips DF. Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1985; 6:369 –375.
- [86] Indolfi C, Avvedimento EV, Di Lorenzo E, Esposito G, Rapacciuolo A, Giuliano P, Grieco D, Cavuto L, Stingone AM, Ciullo I, Condorelli G, Chiariello M. Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat Med* 1997;3:775–779.
- [87] Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *LabInvest* 1983;49:327–333.
- [88] Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, Barmeyer J, Muller KM. Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:157–163.
- [89] Niebauer J, Schwarzacher SP, Hayase M, Wang B, Kernoff RS,

- Cooke JP, Yeung AC. Local L-arginine delivery after balloon angioplasty reduces monocyte binding and induces apoptosis. *Circulation* 1999;100:1830–1835.
- [90] Aikawa M, Sakomura Y, Ueda M, Kimura K, Manabe I, Ishiwata S, et al. Redifferentiation of Smooth Muscle Cells After Coronary Angioplasty Determined via Myosin Heavy Chain Expression. *Circulation* 1997;96:82–90.
- [91] Reidy MA. *Thromb Haemost* 1993;70:172–6.
- [92] Meyrick B, Reid L. *Clin Chest Med* 1983;4:199–217.
- [93] Chaohong Li, Qingbo Xu. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cellular Signaling* 2000;12:435-445.
- [94] Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, Cadherins, immunoglobulin-cell cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998;50:197–263.
- [95] Eliceiri BP, Cheresch DA. The role of α_v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999;103:1227–30.
- [96] Gudi S, Nolan JP, Frangos JA. Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2515–9.
- [97] Ishida T, Takahashi M, Corson MA, Berk BC. *Ann NY Acad Sci* 1997;811:12–23; discussion 23–4.
- [98] Gudi SR, Lee AA, Clark CB, Frangos JA. Equibiaxial strain and strain rate stimulate early activation of G proteins in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 1998;274:C1424–8.
- [99] Gudi SR, Clark CB, Frangos JA. Fluid Flow Rapidly Activates G Proteins in Human Endothelial Cells: Involvement of G Proteins in Mechanochemical Signal Transduction. *Circ Res* 1996;79:834–9.
- [100] Marrero MB, Paxton WG, Schieffer B, Ling BN, Bernstein KE. Angiotensin II Signalling Events Mediated by Tyrosine Phosphorylation. *Cell Signal* 1996;8:21–6.
- [101] Cano E, Mahadevan LC. Paravel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 1995;20:1117 - 22.
- [102] Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71:435–78.

- [103] Schlaepfer DD, Broome MA, Hunter T. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol* 1997;17:1702–13.
- [104] Guan JL. *Matrix Biol* 1997;16:195–200.
- [105] Li C, Hu Y, Sturm G, Wick G, Xu Q. **Ras/Rac-Dependent Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinases in Smooth Muscle Cells Stimulated by Cyclic Strain Stress.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:e1–e9.
- [106] Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Nagai R, Aikawa R, et al. Role of Ion Channels and Exchangers in Mechanical Stretch-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circ Res* 1998;82:430–7.
- [107] Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Signalling Pathways for Cardiac Hypertrophy. *Cell Signal* 1998;10:693–8.
- [108] Hazzalin CA, Cano E, Cuenda A, Barratt MJ, Cohen P, Mahdevan LC. *Curr Biol* 1996;6:1028–31.
- [109] Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA. *Arteriosclerosis* 1990;10:966 - 990.
- [110] 顏正華：中藥學（下），知音出版社，551-556，1991。
- [111] 立得中醫研究室編著：活血化癥的研究，立得出版社，417-425，1992。
- [112] 陳可冀、史載祥主編：實用血癥証學，120-129，1999。
- [113] 顏正華：中藥學（上），知音出版社，320-323，1991。
- [114] Haraguchi H, Ishikawa H, Shirataki N, Fukuda A. **Antiperoxidative activity of neolignans from Magnolia obovata.** *Journal of Pharmacy & Pharmacology.* 1997;49(2):209-12.
- [115] Lo YC, Teng CM, Chen CF, Chen CC, Hong CY. **Magnolol and honokiol isolated from Magnolia officinalis protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation.** *Biochemical Pharmacology.* 1994 ;47(3):549-53.
- [116] Hong CY, Huang SS, Tsai SK. **Magnolol reduces infarct size and suppresses ventricular arrhythmia in rats subjected to coronary**

- ligation. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*. 1996;23(8):660-4.
- [117] Lee YM. Hsiao G. Chen HR. Chen YC. Sheu JR. Yen MH. Magnolol reduces myocardial ischemia/reperfusion injury via neutrophil inhibition in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2001;422(1-3):159-67.
- [118] Tsai SK. Huang CH. Huang SS. Hung LM. Hong CY. Antiarrhythmic effect of magnolol and honokiol during acute phase of coronary occlusion in anesthetized rats: influence of L-NAME and aspirin. *Pharmacology*. 1999; 59(5):227-33.
- [119] Shen YC. Sung YJ. Chen CF. Magnolol inhibits Mac-1 (CD11b/CD18)-dependent neutrophil adhesion: relationship with its antioxidant effect. *European Journal of Pharmacology*. 1998;343(1):79-86.
- [120] Teng CM. Chen CC. Ko FN. Lee LG. Huang TF. Chen YP. Hsu HY. Two antiplatelet agents from *Magnolia officinalis*. *Thrombosis Research*. 1988 ; 50(6):757-65.
- [121] Teng CM. Ko FN. Wang JP. Lin CN. Wu TS. Chen CC. Huang TF. Antihaemostatic and antithrombotic effect of some antiplatelet agents isolated from Chinese herbs. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*. 1991;43(9):667-9.
- [122] Huang YS. Zhang JT. [Antioxidative effect of three water-soluble components isolated from *Salvia miltiorrhiza* in vitro]. *Yao Hsueh Hsueh Pao - Acta Pharmaceutica Sinica*. 1992;27(2):96-100.
- [123] Chen YH. Du GH. Zhang JT. Salvianolic acid B protects brain against injuries caused by ischemia-reperfusion in rats. *Chung-Kuo Yao Li Hsueh Pao - Acta Pharmacologica Sinica*. 2000;21(5):463-6
- [124] Chen YH. Lin SJ. Ku HH. Shiao MS. Lin FY. Chen JW. Chen YL. Salvianolic acid B attenuates VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF-alpha-treated human aortic endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2001; 82(3):512-21.
- [125] Amin,N.S. and Holm,C. (1996) *In vivo* analysis reveals that the interdomain region of the yeast proliferating cell nuclear antigen is important for DNA replication and DNA repair. *Genetics* 144, 479–493.
- [126] Jo´nsson,Z.O. and Hu¨bscher,U. (1997) Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *BioEssays* 19, 967–975.

- [127] Stillman, B. (1988) Initiation of eukaryotic DNA replication *in vitro*. *BioEssays*;9, 56–60.
- [128] Jonsson ZO. Hindges R. Hubscher U. (1998) Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *EMBO Journal*. 17(8):2412-25.
- [129] Lin SY. Liu JD. Chang HC. Yeh SD. Lin CH. Lee WS. (2002) Magnolol suppresses proliferation of cultured human colon and liver cancer cells by inhibiting DNA synthesis and activating apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 84(3):532-44.
- [130] Lin SY. Chang YT. Liu JD. Yu CH. Ho YS. Lee YH. Lee WS. (2001) Molecular mechanisms of apoptosis induced by magnolol in colon and liver cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*. 32(2):73-83.
- [131] Hung HH. Chen YL. Lin SJ. Yang SP. Shih CC. Shiao MS. (2001) Chang CH. A salvianolic acid B-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza* induces neointimal cell apoptosis in rabbit angioplasty model. *Histology & Histopathology*. 16(1):175-83.
- [132] Breuss JM. Cejna M. Bergmeister H. Kadl A. Baumgartl G. Steurer S. Xu Z. Koshelnick Y. Lipp J. De Martin R. Losert U. Lammer J. Binder BR. (2002) Activation of nuclear factor-kappa B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. *Circulation*. 105(5):633-8.
- [133] Bellas RE. Lee JS. Sonenshein GE. (1995) Expression of a constitutive NF-kappa B-like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*. 96(5):2521-7.
- [134] Ibe W. Bartels W. Lindemann S. Grosser T. Buerke M. Boissel JP. Meyer J. Darius H. (2001) Involvement of PKC and NF-kappa B in nitric oxide induced apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. *Cellular Physiology & Biochemistry*. 11(5):231-40.
- [135] Ibe W. Bartels W. Lindemann S. Grosser T. Buerke M. Boissel JP. Meyer J. Darius H. (2001) Involvement of PKC and NF-kappa B in nitric oxide induced apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. *Cellular Physiology & Biochemistry*. 11(5):231-40.
- [136] Esterbauer, H., Rotheneder, M., Waeg, G., Striedl, G., and Juergens, G. (1990) biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoproteins. *Chem. Res. Toxicol.* 3: 77-92.
- [137] Bedwell, S., Dean, R. T., and Jessup, W. (1989) The action of

- defined oxygen-centred free radical on human low-density lipoprotein. *Biochem. J.* 262; 707-712.
- [138] Juergens, G., Hoff, H. F., Chisolm, G. M., and Esterbauer, H. (1987) Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation-characterization and pathophysiological implications. *Chem. Phys. Lipids* 45: 315-336.
- [139] Steinbrecher, U. P. (1987) Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatisation of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J. Biol. chem.* 2603-3608.
- [140] Kaneko, T., Kaji, K., and Matsuo, M. (1988) Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells. 62: 13B-19B.
- [141] Haberland, M. E., Fong, D., and Cheng, L. (1988) malondialdehyd altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 241 :215-218.
- [142] Rosenfeld, M. E., Palinski, W., Yla-Herttuala, S., Butler, S., and Witztum, J. L. (1990) Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein b in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis* 10: 336-349.
- [143] Palinski, W., Rosenfeld, M. E., Yla-Herttuala, S., Gurtner, G. C., Socher, S.S., Butler, S. W., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Steinberg, D., and Witztum, J. L. (1989) Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1372-13776.
- [144] Shen CM. Mao SJ. Huang GS. Yang PC. Chu RM. (2001) **Stimulation of smooth muscle cell proliferation by ox-LDL- and acetyl LDL-induced macrophage-derived foam cells.** *Life Sciences.* 70(4):443-52.
- [145] Roberts MJ. Young IS. Trouton TG. Trimble ER. Khan MM. Webb SW. Wilson CM. Patterson GC. Adgey AA. (1990) **Transient release of lipid peroxides after coronary artery balloon angioplasty.** *Lancet.* 336(8708):143-5.
- [146] Zhao SP. Xu DY. (2000) **Oxidized lipoprotein(a) increases the expression of platelet-derived growth factor-B in human umbilical vein endothelial cells.** *Clinica Chimica Acta.* 296(1-2):121-33.

The Inhibitory Effects of Salvianolic acid B and Magnolol on Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation

Ho-Chih Chen

Institute of Medical Science, China Medical Collage

Abstract

There are approximately 250,000 people suffered from restenosis 6 months after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) every year in the USA. One of the pathological mechanisms of restenosis has been attributed to abnormal proliferation of vascular smooth muscle cells. The aim of our study was to investigate the effect of Salvianolic B and Magnolol to inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and the mechanisms underlying the action of Salvianolic B and Magnolol. A10 cells, rat aortic smooth muscle cells, was used in this study to clarify these issues. From the in vitro result of western blot using antibody against PCNA and BrdU incorporation assay, we observed that 0.05mg/ml Magnolol significantly inhibit the proliferation of rat aortic smooth muscle cells. Whereas Magnolol demonstrated the inhibitory effects on BrdU incorporation in a dose-dependent manner; Salvianolic B did not show innibitory effect of vascular smooth muscle cells proliferation. In our study, we also evaluate the proteins that related to RIP and caspase-3 can be affected by Salvianolic B and Magnolol. It was found that the protein level of RIP and caspase-3 was significantly induced by Salvianolic B and Magnolol. On the other hand, Salvianolic B could inhibit the activity of NF- κ B promoter. These results suggest that

the proliferation of SMC can be regulated by Salvianolic B and Magnolol. Although PCNA protein level can be affected by Magnolol, but we did not observe significant effect of Magnolol on P27 and RB protein expression level.