

中國醫藥大學

醫學研究所

碩士論文

鞣花酸抑制氧化低密度脂蛋白

引發之血管平滑肌細胞增生及凋亡之作用

Ellagic acid inhibit vascular smooth muscle cell
proliferation and apoptosis induced by ox-LDL



指導教授：張文正 博士

共同指導教授：余雅美 博士

江素瑛 博士

研究生：曾瓊瑤

中華民國九十三年七月二十六日

總目錄

	頁次
中文摘要	4
英文摘要	5
圖目錄	6
表目錄	10
英文縮寫	11
第一章、序論	12
第一節、粥狀動脈形成之介紹	12
第二節、氧化修飾低密度脂蛋白與自由基的關係	15
第三節、自由基對平滑肌細胞增生之影響	18
第四節、氧化修飾低密度脂蛋白對平滑肌細胞增生之影響	18
第五節、Ellagic acid 的作用機制	21
第二章、材料與方法	24
第三章、實驗結果	40
第四章、討論	46
第五章、結論	52
第六章、序論	53
第一節、粥狀動脈形成之介紹	53

第二節、氧化修飾低密度脂蛋白與自由基的關係.....	56
第三節、自由基對平滑肌細胞增生之影響.....	59
第四節、ox-LDL 對平滑肌細胞凋亡之影響.....	59
第五節、Ellagic acid 的作用機制.....	62
第七章、材料與方法.....	65
第八章、實驗結果.....	81
第九章 討論.....	85
第十章、結論.....	92
第十一章、參考文獻.....	93

中文摘要

粥狀動脈硬化是一個包含許多功能改變的疾病。氧化低密度脂蛋白（oxidative low density lipoprotein；ox-LDL）在此疾病中扮演一個極重要的角色；許多證據證明低密度脂蛋白及氧化低密度脂蛋白皆會刺激血管平滑肌細胞增生；氧化低密度脂蛋白同時也會引起血管平滑肌細胞的凋亡。Ellagic acid（EA）是一種存在於蔬果，如：藍莓、草莓和堅果類中的酚類化合物，可能具有抗氧化、抗癌細胞增生的功能。因此本論文研究 ox-LDL 刺激平滑肌細胞增生及凋亡與 Ellagic acid 之間的相關性。

本研究使用 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-terazolium bromide（MTT）試驗及細胞計數的方式測得細胞之存活率，發現 ox-LDL 刺激引起的增生，可經由同步給予 Ellagic acid 而有所改善。流式細胞儀測定細胞週期發現，經 ox-LDL 刺激平滑肌細胞之細胞週期 S 期增加，同步給予 Ellagic acid 則可以明顯抑制增生。Ellagic acid 也可以抑制 ox-LDL 刺激所導致之平滑肌細胞蛋白質，ErK 1/2、pErK 1/2、和 PCNA 的表現增加。在凋亡方面，Ellagic acid 可以抑制細胞凋亡進行及細胞凋亡時形態的改變，亦可經抑制 caspase 的基因表現，進而改善凋亡之情形。這些結果提供食物中的抗氧化劑，可以預防粥狀動脈硬化疾病的發生。

英文摘要

In the multifunctional pathogens of atherosclerosis, oxidatively modified low density lipoprotein plays a central role in atherogenesis. Previous studies demonstrated that both native LDL and ox-LDL could stimulate the proliferation of vascular smooth muscle cells. However ox-LDL has also been shown to induce apoptosis in vascular smooth muscle cells (VSMCs). Ellagic acid, an antioxidant, is a phenolic compound presenting in fruits (raspberries, blueberries, strawberries) and walnuts. In this study, we investigated whether VSMCs proliferation and apoptosis induced by ox-LDL would be affected by ellagic acid.

Cell viability was tested by MTT test and cell count and study ox-LDL stimulated cell proliferation was inhibited by Ellagic acid. Ellagic acid suppressed the increased the percentage of cell cycle S phase induced by ox-LDL. The activitives of ErK 1/2 , pErK 1/2 and PCNA were also inhibited by ellagic acid. In apoptosis, ellagic acid also inhibited cell apoptosis and cell morphologic change. However ellagic acid suppressed expression of caspase genes could by ox-LDL. These results might significantly advance the understanding of the antioxidants implicated in the formation of atherosclerosis, and could eventually lead to the development of new dietary supplements for the prevention of atherosclerosis.

Key word: Ellagic acid, Ox-LDL, Smooth muscle cell, Proliferation, Apoptosis.

圖目錄

圖 1、粥狀動脈硬化治病機轉	99
圖 2、自由基形成機制圖	100
圖 3、MAPK 訊息傳遞途徑.....	101
圖 4、細胞週期及其控制蛋白(cell cycle and control protein)	102
圖 5、Ellagic acid 抑制平滑肌細胞增生可能機制.....	103
圖 6、Pathways of Apoposis.....	104
圖 7、Ellagic acid 抑制血管平滑肌細胞凋亡可能機制.....	105
圖 8、以 MTT 評估 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞毒性之影響	106
圖 9、以細胞計數方式評估 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞毒性 之影響.....	107
圖 10、以 MTT 方式評估低密度之蛋白刺激平滑肌細胞? 生之影響	108
圖 11、以細胞計數方式觀察不同時間點給予 Ellagic acid 對於抑 制低密度脂蛋白刺激血管平滑肌細胞增生之影響.....	109
圖 12、以 MTT 方式評估 Ellagic acid 抑制低密度之蛋白刺激平滑 肌細胞? 生之影響.....	110
圖 13 以西方墨點轉漬法觀察低密度脂蛋白對血管平滑肌細胞立即	

性早磷酸化 Erk 1/2 蛋白之影響	111
圖 14、以西方墨點轉漬法觀察 Ellagic acid 抑制低密度脂蛋白刺 激血管平滑肌細胞立即性早期磷酸化 Erk 1/2 蛋白之影響 .	112
圖 15、以西方墨點轉漬法觀察 Ellagic acid 抑制低密度脂蛋白刺 激血管平滑肌細胞 Erk 1/2 蛋白之影響	113
圖 16、以西方墨點轉漬法觀察 Ellagic acid 抑制低密度脂蛋白刺 激血管平滑肌細胞 PCNA 蛋白之表現	114
圖 17 以 MTT 方式觀察以不同濃度氧化低密度之蛋白刺激血管平滑 肌 24 小時後細胞之影響	115
圖 18、以光學顯微鏡觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之 蛋白 100 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響	116
圖 19、以 MTT 方式觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋 白 100 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響.....	117
圖 20、以細胞計數方式觀察同步給予 Ellagci acid 及氧化低密度 之蛋白 100 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響 .	118
圖 21、以西方墨點轉漬法觀察同步給予 Ellagci acid 及氧化低密 度之蛋白 100 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞之 Erk 蛋 白之影響.....	119
圖 22、以西方墨點轉漬法觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密	

度之蛋白 100 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞之早期立 即性磷酸化 ErK 蛋白之影響.....	120
圖 23、以流式細胞儀方法觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密 度之蛋白 100 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞週期之影 響.....	121
圖 24、以西方墨點轉漬法觀察同步給予 Ellagci acid 及氧化低密 度之蛋白 100 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞之 PCNA 蛋白之影響.....	122
圖 25、氧化低密度之蛋白刺激平滑肌細胞凋亡之結果.....	123
圖 26、以細胞計數方式觀察不同時間點給予 Ellagic acid 對於抑 制低密度脂蛋白刺激血管平滑肌細胞增生之影響.....	124
圖 27、以 MTT 方式觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋 白 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響.....	125
圖 28、以細胞計數方式觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度 之蛋白 300 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響.	126
圖 29、觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 300 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響.....	127
圖 30、以流式細胞儀方法觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密 度之蛋白 300 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞凋亡之影	

響.....	128
圖 31、以 Giemsa stain 方法觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化 低密度之蛋白 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞細胞 凋亡型態之影響.....	129
圖 32、同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 24 小時後對計數 Giemsa stain 凋亡之血管平滑肌細胞數.....	130
圖 33、以 MPCR 方法觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之 蛋白 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞 Caspase 基因 表現之影響.....	131

表目錄

表格 1.....	132
表格 2.....	133

英文縮寫

ErK 1/2 : Extracellular signal-regulated kinase 1/2

EA : Ellagic acid

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1

LDL : low density lipoprotein

MAPK : Mitogen activated protein kinase

ox-LDL : oxidized low density lipoprotein

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

ROS : reactive oxygen species

TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1

VSMCs : Vascular smooth muscle cells

第一章、序論

前言

任何原因引起的動脈壁增厚、變硬或失去彈性的的病理變化，我們統稱為動脈硬化（Atherosclerosis）。動脈硬化可依據其硬化方式分為：動脈粥樣硬化、動脈中層鈣化及小動脈硬化；臨床上以動脈粥樣硬化為主。粥狀動脈硬化是一種發生在大血管的疾病，是一種脂質與發炎細胞的聚積，並伴隨著平滑肌細胞（smooth muscle cell, SMC）增生與細胞外間質液分泌（extracellular matrix secretion），所引起的細胞內膜纖維變性（intimal fibrosis）。後期血管平滑肌凋亡，所引發粥狀動脈腫的破裂，栓子及血栓形成，也是導致心血管疾病及中風的主要原因。根據衛生署公佈民國九十一年十大死因，腦血管與心臟疾病僅次於惡性腫瘤之後，分居於第二及第三名，不但對個人造成生命財產上損害，亦花費許多的醫療和社會成本。所以，對於心血管疾病的預防與治療方法的改進和研發，是一個急待解決及研究的課題。

第一節、粥狀動脈形成之介紹

粥狀動脈硬化形成的機制，主要包括四個階段[1,2]，分別為(1)內皮細胞層功能不良（endothelial dysfunction）[3, 4]、(2)脂肪條的形成（fatty-streak fomation）、(3)壞死中心與纖維帽（necrotic core and Fibrous-cap）的形成及(4)不穩定的纖維斑塊（unstable fibrous

plaques)。這四個階段都是影響粥動脈硬化疾病嚴重度的重要的因數。因此以下將分別介紹各階段：

一、內皮細胞層功能不良 (endothelial dysfunction)

早期粥狀動脈硬化形成的原因，主要是因為血管分支或轉彎的地方，較易為血流速度、壓力或是所產生的擾流影響，使內皮細胞物理因素改變，發炎細胞[5]的黏著堆積而釋放出趨化因數，導致細胞通透性增加；加上血液中過多的脂蛋白(例如：低密度脂蛋白；LDL)，經由血液動力學的影響，被動的經由通透性增加的內皮細胞間隙，穿過血管內皮細胞層，而進入到血管內膜中。這些進入血管壁中的 LDL 會與結構性蛋白相黏合，且極易受到血管內皮細胞所釋放之活性氧與 12-LO (12/15lipoxygenase) 攻擊，而氧化為氧化態的低密度脂蛋白 (ox-LDL) [6]。

二、脂肪條的形成 (fatty-streak formation)

在動脈硬化的第二個階段中，被自由基攻擊的低密度脂蛋白氧化為氧化態的低密度脂蛋白 (ox-LDL)，而 ox-LDL 會刺激血管內皮細胞產生許多的黏附趨化因數，例如 MCP-1(monocyte chemotactic protein)、 ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1)，VCAM-1 (vasculuar cell adhesion molecule-1) 與 E-selectin 等，同時 ox-LDL 亦會吸引血液中的單核球細胞(monocyte)向內皮的表面黏附而進入血

管內皮細胞下層(subendothelial), 一方面分泌細胞激素 (cytokines), 如 Interlukin-1(IL-1), Interlukin-4(IL-4), interferon- γ (幹擾素- γ ; IFN- γ), Tumor Necrosis Factor (TNF)進行發炎反應[5, 7]; 另一方面則是接著受到血管內皮細胞所釋放的 M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) 分化為巨噬細胞。這些存在於血管壁中的巨噬細胞表面具有清道夫受體 (scavenger receptor), 對於 ox-LDL 具有極高的親合力, 形成一含巨噬細胞之泡沫細胞(macrophage foam cell) 也稱為”泡沫細胞”。此時平滑肌細胞會受到泡沫細胞的刺激, 穿過彈性纖維層進入內膜增生[8], 然後泡沫細胞及平滑細胞, 則由內層移位至內膜增生形成脂肪線 (Fatty-streak) [7]。

三、壞死中心及纖維帽的形成 (necrotic core and Fibrous-cap)

第三階段則由於巨噬細胞不斷的吞噬 ox-LDL, 產生大量的泡沫細胞, 極易堆積在血管壁並且死亡[9]。並藉由 Interferon 的作用, 使細胞走向凋亡, 再與其他脂質碎片形成一個壞死中心 (necrotic core)。血管壁中層膠原蛋白與平滑肌細胞過度增生, 遷移至血管內膜層形成纖維帽 (Fibrous-cap), 其功能在於隔開血管腔以及受損區域。

四、不穩定的纖維硬斑 (unstable fibrous plaques)

動脈硬化最後一個階段中, 血管壁會形成動脈硬化斑塊。動脈硬

化斑塊是由平滑肌、泡沫細胞、低密度脂蛋白及其他脂質所組成，也可以稱為粥狀動脈腫(atheroma)。此時血管的管腔會因為硬化斑塊的產生而狹窄，持續擠入活化的巨噬細胞會釋放出分解蛋白的酵素，這些酵素會分解基質，使原本覆蓋於壞死中心上的平滑肌細胞亦受到刺激進行凋亡之機制[9]。而此機制結果會導致斑塊不穩定，甚至於破裂，增加粥狀動脈疾病之嚴重度。

第二節、氧化修飾低密度脂蛋白與自由基的關係

低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 密度約 1.019-1.063g/ml (Gotto 1988)，是由大約 3000 個脂肪酸和一個脫輔基蛋白分子 (Apolipoprotein-B, Apo-B, 50 Dalton) 所構成的，平均直徑長 19-25 nm，分子量大約為 180-250 萬 Dalton 的大圓球形粒子 (Keaney 1994)，一般 LDL 被細胞攝取的路徑是經由 LDL 接受體 (LDL receptor) 進而分解代謝及應用。

而自由基是指在電子軌域中具有一個或多個不對稱的分子、原子或離子，則稱之為自由基。當一個分子有不對稱的電子圍繞在外層軌域上時，會迅速的與周圍的分子碰撞而引起化學變化，進而引起傷害 [10]。在正常情況下，自由基能保護身體免受微生物、細菌等有害物質侵害，但是當自由基過量時，情況就大不一樣，它會攻擊細胞，促使蛋白質、核? 酸、脂肪的代謝異常，細胞? 生突變而引起疾病。

體內細胞所產生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)，是一群有強氧化力的含氧分子，包括超氧化陰離子 (superoxide anion ,

02-), 過氧化自由基(hydroxyl radical, OH⁻)、以及過氧化氫(hydrogen peroxide)等[11]。自由基具不成對電子其化學活性很活潑、不穩定, 很容易去找一個電子配對, 使之穩定, 因此產生氧化還原反應[10]。生物細胞內多種氧化反應及代謝途徑都會產生具有活性的氧分子, 因此生物體常會遭受到活性氧分子之威脅。當生物體老化或環境惡劣時, 粒線體電子傳遞鍊進行不順利時, 其電子會在途中被氧分子作用形成超氧自由基[12]。若超氧自由基與過氧化氫自由基同時存在, 則會產生毒性更強的氫氧自由基。自由基包括超氧自由基(Superoxide, O₂⁻)、過氧化氫自由基(Hydrogen peroxide, H₂O₂)、氫氧自由基(Hydroxyl radical, OH⁻)、過氧化脂質(Lipid peroxide)。

氧化低密度脂蛋白的形成與由自由基引發的脂質過氧化(lipid peroxidation)有相當的關聯。脂質過氧化是一種自由基的連鎖反應(chain reaction)。這種連鎖反應是透過羥自由基(hydroxyl radical, OH⁻), 攻擊多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFAs)上的雙鍵(double bonds), 羥自由基會吸引多元不飽和脂肪酸碳原子處的氫原子, 先形成不飽和脂肪酸自由基(R[•]), 再氧化成脂過氧基(ROO[•]), 最後生成過氧化脂質(ROOH)及另一份子不飽和脂肪酸自由基(R[•]), 連鎖循環下去, 使脂質不斷氧化, 生成過氧化脂質。Jessup

et al. (1990)指出 LDL 氧化主要是經由一個自由基反應的過程[13]，其脂質被過氧化作用 (lipid peroxidation) 轉換成脂氫過氧化物，之後再被分解成不同的產物，包括 malondialdehyde (MDA) ， 4-hydroxynonenal 等[14]，脂質過氧化的產物會與 LDL 的 apolipoprotein B 作用，致使 apolipoprotein B 的結構受到改變[15]。這種受到氧化的 LDL (ox-LDL) 不再被 LDL 接受體所辨識，而與清道夫受體有極高的親合力。Rosenfeld et al. (1990)認為 lipid peroxidation 和 lipid peroxidation 的產物在導致粥狀動脈瘤之啟始作用過程中，扮演著一個重要的角色[16]。另外 ox-LDL 與 LOX-1 結合會減少內皮細胞內一氧化氮(nitric oxide, NO)的生成，增加 Superoxid 產生[17]，而高膽固醇血症(hypercholesterolaemia)會在內膜產生更多的 ox-LDL ，或在易氧化的環境下，使內皮細胞釋放出更多的超氧陰離子 (superoxide anion, O_2^-)，結果則造成在沒有明顯傷害時也可能會造成血管痙攣或收縮。Ox-LDL 會改變動脈壁的特性而造成臨床上之疾病，會刺激組織釋出凝血因數，並造成凝血 (initiate coagulation)。因為血管受傷處之週圍，會產生斑塊破裂(plaque rupture)，造成栓塞。在傷害處有許多含有 ox-LDL 之泡沫細胞。因此除了巨噬泡沫細胞之形成以外，ox-LDL 也是促成粥狀動脈硬化之因素[7]。

第三節、自由基對平滑肌細胞增生之影響

增生 (Proliferation) 和細胞凋亡 (apoptosis) 是血管平滑肌細胞 (vascular smooth muscle cells ; VSMCs) 造成粥狀動脈硬化、血管再阻塞及高血壓的兩個重要因素。Li et al. (1997) 指出不同 ROS 對 VSMCs 會有不同的影響，例如超氧陰離子會造成細胞增生； H_2O_2 會引起 apoptosis [18]。因此 ROS 會參與粥狀動脈硬化之形成，而粥狀動脈硬化在 O_2^- 及 H_2O_2 的影響下，刺激增生和引發 VSMCs 的凋亡。近年來也有許多文獻指出氧化低密度脂蛋白與細胞增生 [19]、細胞毒性 [20, 21] 及細胞凋亡 [22] 與低密度脂蛋白過氧化脂質發展過程中的脂質氧化代謝的產物有關。

第四節、氧化修飾低密度脂蛋白對平滑肌細胞增生之影響

細胞內的 MAPK (Mitogen activated protein kinase pathway) 訊息傳導路徑，在於調控正常細胞功能扮演非常重要的角色。其主要參與細胞的生長、發育、分化、發炎反應與細胞凋亡等細胞生理反應。當細胞受到外界如生長因數、細胞激素或壓力 (stress) 等的刺激下，會誘發特定訊息傳導路徑中的蛋白質磷酸化，而產生活化作用，並將一系列訊號，依序的逐漸往細胞核內傳遞，進而產生相對的細胞生理反應。Yang, et al. 等學者指出，在小狗血管平滑肌細胞給予氧化低密度脂蛋白，會活化 MAPK 中 Erk1/2 訊息傳遞路徑 [23]。另外原生 (Native) 與氧化 (oxidative) 的低密度脂蛋白 (low density lipoproteins) 會經

由氧化還原反應,間接活化 ERK1/2 MAPK 進而引起平滑肌細胞的增生[24], 楊春滿教授也在 2003 年 Lipid research 中發表的研究報告指出, 氧化低密度脂蛋白會經由 PI3-kinase/Akt 間接活化 MAPK, 導致血管平滑肌細胞的增生[25]。一般而言 MAPK 路徑傳導可被歸納為三條, 第一條是活化 Erk 1/2 為主的傳導路徑, 此路徑主要是負責和細胞生長與分化相關的作用。而第二及第三條則分別為 p38 MAPK 路徑和 SAPK/JNK 路徑, 這兩條路徑則與發炎反應和細胞凋亡有較大之關連性[26, 27]。

增生除了與MAPK訊息傳遞途徑有關係外, 也與細胞週期的進行有著密切的關係。當細胞藉由生長與分裂間, 週而復始的循環, 形成細胞週期 (cell cycle), 而細胞週期依照其時間順序可分為四期, 依序分別為G1 期、S 期、G2 期及M期, 其中S 期為DNA 合成期 (synthesis), 而M 期則為細胞有絲分裂期(mitosis)。一般狀態下細胞多長期處在G0 期或稱為靜止期。但當細胞受到外界增生性刺激因數的促進下, 細胞就會進入到細胞週期之G1期。G1期為DNA 進行合成前之準備期, 此期有一檢查點(check point)或稱為限制點(restriction point)的機制, 對於細胞是否繼續進行DNA合成或細胞有絲分裂, 做有效控管的動作。當細胞不適合進行分裂時(例如周遭生長環境不佳或細胞本身的DNA 受損等), 此機制即會終止細胞週期繼續進行。細

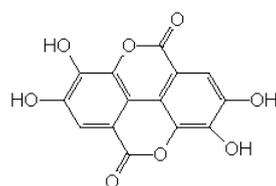
胞在通過G1 和S 期間的限制點機制後，細胞即會進行DNA 合成及接下來的有絲分裂期，使原來的細胞由一個分裂成兩個細胞而完成一次完整的細胞週期。細胞週期的進行受大兩股力量之間的調控，一股是促進細胞週期性的力量，例如來自生長因子、致癌基因 (oncogenes)、 CDKs 與Cyclins 等的作用，另一邊則來自例如抑癌基因或CDK 抑制劑之抑制細胞週期進行的作用。當促進性的力量大於抑制性的力量，則會促使細胞週期開始運轉，反之則抑制進入細胞週期。細胞週期限制點的機制主要是以Rb 蛋白質為中心，經由此蛋白質磷酸化程度來達到調控作用。正常未磷酸化狀態下的Rb 會與稱為E2F 的轉錄因數結合，當Rb 蛋白質受到活化的cyclin D/CDK4、cyclinD/CDK6 或cyclin E/CDK2 複合體等的作用而磷酸化後，會促使與Rb結合的E2F 釋放出來，緊接著E2F 會結合到與細胞週期之S 其相關的基因之特定DNA 序列上，促進這些基因的轉錄作用，進而使細胞週期由G1期進入S 期和有絲分裂期。這些促進Rb 磷酸化的cyclin/CDK複合體活性受到兩類蛋白質族群的抑制，一個為Cip/Kip 家族，另一個為Ink 4 家族，而這兩類蛋白質族群被統稱為CDK 抑制劑(CDKinhibitor; CDKI)，並分別對不同種類的cyclin/CDK 複合體進行抑制的作用[28]。其中Ink 4 家族包含有p14、 p15、 p16、 p18 和 p19 等蛋白質，Cip/Kip 家族則包含p21、 p27 和p57 等蛋白質。因

此如果為了要抑制細胞過度的增生，則可藉由提升CDK 抑制劑的活性或降低cyclin/CDK 複合體之表現量或活性，即可進一步抑制Rb蛋白質的磷酸化，使得E2F 這類促進S 期進行所需的轉錄因數無法釋放出來而發揮作用，最後達到抑制細胞增生的作用。而氧化低密度脂蛋白磷脂質結構上的lysophosphatidylcholine，藉由氧化依附性機轉，驅使平滑肌細胞進入細胞週期，合成DNA，接著導致平滑肌細胞釋放出纖維母細胞生長因子，促進平滑肌細胞增生[29, 30]。

第五節、Ellagic acid 的作用機制

近幾年來，發現許多存在於自然界的多酚類化合物（polyphenolic compounds）具有多項功能，其中包括抗氧化（antioxidants）[31, 32]、抗突變（antimutagens）、抗致癌物（anticarcinogens）及化學保護作用（chemoprevention）[33, 34]，而 Ellagic acid 就是其中一種重要的多酚類化合物。其化學結構如下：

2,3,7,8-Tetrahydroxy(1)benzopyrano(5,4,3-cde)benzopyran-5,10-dione



ellagic acid

Ellagic acid 主要存在於自然界中的蔬菜、水果，尤其以草莓、藍莓及堅果類含量最為豐富。文獻指出 Ellagic acid 抗癌方式是經由活

化 P53 及其下游 P21 進而達到抑制癌細胞的細胞週期,進而使癌細胞凋亡,達到抑制癌細胞增生之效果[35]。許多研究證明, Ellagic acid 具有抗致癌物的活化之功能[36]。 Ellagic acid 在化學保護作用 (chemoprevention) 方面: 根據 2001 Laura A. 研究報告指出在使用 NBBA 誘發 F344 rat 食道癌症形成,可藉由口服乾燥的黑莓,降低食道腫瘤形成具有化學保護作用[33]。在抗氧化方面, Ellagic acid 可降低小鼠肝臟、肺臟的 glutathione 和 glutathione reductase ,降低 NADH - and ascorbate-dependent 脂質過氧化(lipid peroxidation)[37], Hassoun 等學者指出, Ellagic acid (6mg/kg per day) 可調控抑制氧化劑 TCDD 引起胚胎及胎盤組織的毒素、氧化傷害(Toxicology) [38], 另外 Ellagic acid 也可以明顯的抑制 H₂O₂ 及 Bleomycin 所引起的 DNA 傷害[39]。

研究目的

本實驗是以體外實驗（*in vitro*）為主軸的研究，以模擬粥狀動脈硬化進行 ox-LDL 刺激平滑肌細胞增生的實驗。在這個研究中，我們使用了一種自然界蔬果中含有的多酚類化合物 Ellagic acid，並研究此多酚類化合物在以 ox-LDL 造成的平滑肌細胞增生的過程中所扮演的角色。

- 1、Ellagic acid 在以往的研究多以預防和治療癌症及抗氧化方面為主，然而卻少有關於粥狀動脈硬化方面的研究報告。因此我們針對平滑肌細胞增生與Ellagic acid之間關聯進行研究。
- 2、探討Ellagic acid 在抑制血管平滑肌細胞增生所扮演的角色是經由何種機制導致？

第二章、材料與方法

第一節、實驗材料

A 儀器

無菌操作臺 (造鑫, Taiwan)

細胞培養箱 (Nuair, USA)

細胞計數器 (Haemocytometer; Boeco, Germany)

光學顯微鏡 (Motic, Japan)

離心機 (Beckman)

酸鹼值測定計 (C831; Consort, UK)

乾浴槽 (Model 110001; 購自Boekel)

微量天平 (GR-200; A&D, Japan)

去離子水製造機 (Minipore, USA)

超高速離心機 (himac CS 120GX)

Shaker bath (BT-350; 購自YIH DER, Taiwan)

超音波震盪器 Sonicater (MISONIX, Farmingdale, NY, USA)

Power supply (Hofer, San Francisco, CA, U.S.A)

ELISA reader (ANTHOS-2020, Salzbrug, Austria)

Vortex-genie 2 (SCIENTIFIC INDUSTRIES, NY, USA)

SDS-PAGE 電泳槽套組 (Amersham, UK)

蛋白質轉漬電泳套組 (Bio-Rad, USA)

水浴槽 Water bath (TKS, Taipei, Taiwan)

流式細胞儀 (FACSCalibur, BD, USA)

影像分析儀器 (AlphaImager™ 2200,USA)

B 材料

細胞培養皿 (騰達行, Taiwan)

細胞培養盤 (騰達行, Taiwan)

PVDF 轉漬膜 (Minipore, USA)

蓋玻片 (Kimble, USA)

載玻片 (Marriefeld, Germany)

冷凍管 (騰達行, Taiwan)

微量離心管 (季勗, Taiwan)

離心管 (季勗, Taiwan)

Falcon (汎泰, Taiwan)

X-film (Kodak,USA)

Paraffin (購自 American national can)

透析膜 (Amersham,UK)

PD 10 (Amersham,UK)

C 試劑

Acrylamide/Bis (生工, Taiwan)

APS (Ammonium persulfate; USB)

Bradford reagent (BIO-RAD, Hercules,California,USA)

BSA (Bovine serum albumin) (SIGMA, ST.Louis,MO,USA)

Bromophenol blue (USB)

DMSO (Dimethyl Sulfoxide; Sigma, USA)

DTT (1,4-Dithio-D,L-threitol; GERBU, Germany)

DMEM (Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium; GIBCO, USA)

ECL kit (Amersham, UK)

Ellagic acid (Sigma, USA)

Ethanol (景明化工, Taiwan)

FBS (Fetal Bovine serum; GIBCO, USA)

Glycine (AppliChem, Germany)

Glycerol (Scharlau, Spain)

Hydrochloric acid (Merck, USA)

Methanol (景明化工, Taiwan)

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-terazolium
bromide; 購自Sigma, USA)

Paraformaldehyde (景明化工, Taiwan)

Penicillin-Streptomycin (GIBCO, USA)

PI (Propidium iodide; Sigma, USA)

Potassium dihydrogen phosphate (Merck, USA)

Potassium chloride (Scharlau, Spain)

Protein assay-Dye reagent concentrate (Bio-Rad, USA)

Protein maker (Amersham, UK)

RNase A (Sigma, USA)

RT kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A)

SDS (Sodium dodecyl sulfate; USB)

Sodium bicarbonate (Merck, USA)

Sodium chloride (Scharlau, Spain)

Sodium hydroxide (SHOWA, Japan)

Sodium pyruvate (GIBCO, USA)

TBA (2-Thiobarbituric acid; Sigma, USA)

TCA (Trichloroacetic acid; Sigma, USA)

TEMED (N,N,N',N' -Tetramethyl-ethylenediamine; Pharmacia, Sweden)

Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane; Pharmacia,Sweden)

Triton X-100 (USB)

Trysin-EDTA (GIBCO, USA)

Tween 20 (Pharmacia, Sweden)

脫脂奶粉(安佳, New Zealand)

顯影劑(Kodak, USA)

定影劑(Kodak, USA)

一級抗體：

(a). anti-PCNA (Santa Cruz, USA)

(b). anti-p-Erk1/2 (Santa Cruz, USA)

(d). anti-Erk1/2 (Santa Cruz, USA)

(e). anti-bata actin (abcam, USA)

二級抗體

anti-mouse IgG (horseradish peroxidase conjugated; Santa Cruz, USA)

anti-rabbit IgG (horseradish peroxidase conjugated; Santa Cruz, CA)

第二節、實驗方法

1、Ellagic acid 配製方法

秤取Ellagic acid 粉末30.22 mg，加入細胞培養等級之DMSO溶解，配製成 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、25 μ M、50 μ M、75 μ M、100 μ M等濃度備用。

2、低密度脂蛋白的分離

將抽出的血液樣品放入真空採血管中，於 37 水浴槽 1.5hr，置於 4 冰箱 1hr，離心（3000 rpm 4、15分鐘）後血清、血球分離，取上層血清 3 ml 加入溶液配製 0.9 % NaCl 0.7ml 離心（95000rpm 10、3.5hr、Acc：5、Dec：7），去除 VLDL 後直接取 KBr 粉劑 166.8 mg 加入 3ml 血清，離心（95000 rpm 10、3.5hr、Acc：9、Dec：7）即可得到低密度脂蛋白[24]。

3、低密度脂蛋白的氧化

取 LDL 1 mg/ml 加入 PBS (no EDTA) 及 1 mM 硫酸銅 (CuSO_4) 最終濃度為 10 μ M，37 水浴 24hr，加入 0.1ml EDTA 10mM（終止氧化）最終濃度為 1 mM，將約 2-4 ml 的 LDL 放入膜內放入裝滿 PBS (no EDTA) 透析液瓶中，於 4 冰箱中 stir，透析 24hr 更換 3 次透析液（1hr、2hr、2hr），透析 24hr 後自透析膜取出 LDL（體積約增加 0.5 ml）或使用 PD10 透析，用 0.22 μ m 過濾所得即為氧化低密

度脂蛋白 oxLDL，經由 TBAR 測得其氧化程度[24]。

4、平滑肌細胞的培養

血管平滑細胞株(購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存與研究中心，生資中心編號：60127，細胞株名稱：A10)來自胎鼠胸主動脈(the thoracic aorta of DB1X embryonic rat)，多應用於血管平滑肌(vascular smooth muscle cells; VSMCs)實驗模型。

培養基及試劑

(A) 無血清培養基：Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Powder : high glucose , L-glutamine , pyridoxine hydrochloride , 10 mg/L sodium pyruvate , 需另外加入 sodium bicarbonate 3.7g 。

(B) 胎牛血清 (Fetal bovine serum ; FBS)

血清購回後需先水浴 56 加熱 30 分鐘後使用。(一般培養使用 10% FBS、實驗進行時使用 1% FBS、同步化時使用 0% FBS)。

A. HEPES Buffer Solution (1M)使用劑量 1%

B. Streptomycin/penicilline 使用劑量 1%

C. Trypsine-EDTA 0.25% Trypsin with 1mM EDTA-4Na

培養方法

將存放血管平滑肌細胞的冷凍管從液態氮中取出後插上浮板，迅速放入 37℃ 水浴中使其快速解凍，將解凍之細胞懸浮液從冷凍管中放入

10 公分培養皿，並加入約10ml 含10%胎牛血清之培養基，混合均勻後放入細胞培養箱(37 °C、95 % O₂、5 %CO₂) 中進行培養，每二天換一次培養基。

次培養

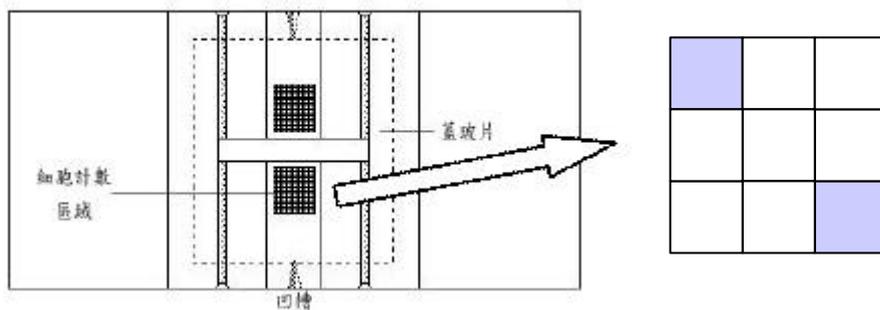
當細胞長約 9 分滿時，則進行分盤。首先將舊的培養廢液抽吸乾淨，加入 7 ml 1x PBS 緩衝液(pH:7.4) 清洗一次，加入 Trypsin- EDTA 1ml incubate 2 分鐘，加入 1 ml 10% FBS- DMEM 2 ml 中和 Trypsin-EDTA 作用,以抽吸方式將細胞沖散，將培養血液體吸換至離心管後加入 10 % FBS- DMEM 共 10 ml ，離心 1500 rpm ，5 分鐘，計算細胞數目後進行日常分盤或實驗用分盤。

冷凍細胞：使用 90 % culture medium + 10 % DMSO。

5、細胞數目計算

先將10 公分培養皿內之培養液吸去，再以約7 ml 的1x PBS 緩衝液(pH=7.4)小心清洗細胞兩次後加入約1 ml 的1x trypsin-EDTA 置入培養箱內，待2 分鐘後取出。以輕拍培養皿底部的方式將細胞完全脫離培養皿懸浮起來。加入1 ml 的培養液中和 trypsin-EDTA 活性，並用1 ml 的pipette 以緩慢來回抽吸方式將細胞打散。將打散後之細胞換到15 ml 離心管中，並加入10 ml培養液稀釋混勻。如所含細胞密度過高，則算出的數目誤差較大，需再加入更多的培養液稀釋。取出100

μl 細胞懸浮液和 $10 \mu\text{l}$ typan-blue，在 96-well 內混合均勻，共取 2 次。
 分別從混合液中各取出 $10 \mu\text{l}$ 的細胞懸浮液放在細胞計數盤 (haemocytometer) 上下兩個凹槽上，利用蓋上蓋玻片時的虹吸作用將細胞均勻平均分散於細胞計數區域。在顯微鏡下計數細胞數目(細胞顏色較亮者為存活的細胞)並算出細胞計數盤內 9 大格中 2 格(左上角及右上角區域)之活細胞總數(N 值)。N 值除上 4，再乘上 1.1 (稀釋倍數) $\times 10$ (細胞懸浮液總量) $\times 10^4$ 即可得 10 ml 細胞總數目 (cells/10ml)。



細胞計數盤與細胞計數區域放大簡圖。

6、細胞週期同步化(synchronize)

將細胞分到實驗適合之 dish 或 plates 後(例如：6cm dish 細胞數目約 3.5×10^5 cells/well)，以含 10% 胎牛血清的培養液培養細胞，並於放入培養箱前稍微搖晃使細胞分佈均勻。待 12-24 小時細胞適應環境並貼覆上 plates 穩定後吸去培養廢液，再以 1XPBS 緩衝液 (pH:7.4) 2 ml/well 小心清洗 1 次，最後加入 2 ml/well 的 0% 胎牛血清培養

液，經24小時後即完成細胞同步化步驟。

7、細胞蛋白質抽取

將培養於 6 cm dish 的細胞取出，加入 5 ml 1x PBS (pH:7.4) 沖洗 2 次，加入 500 μ l 的 lysis buffer 反應 3 分鐘，使用細胞刮杓將細胞刮下並將細胞液體收集至微量離心管放入乾浴加溫器內加溫 (95 $^{\circ}$ C、5 分鐘)，隨即放置於冰上 30 秒以上，4 $^{\circ}$ C 離心(13000 rpm 10 分鐘)，取上清液，進行蛋白質定量或冰存於-20 $^{\circ}$ C。

Lysis buffer 配製方法

組成	最終濃度	最初濃度	體積 / 重量
Tris-Hcl (PH:6.8)	6.25M	0.5M	5ml
SDS	2%	10%	8ml
DTT	50mM	0.3M	6.67ml
DDW	-	-	20.33ml
總體積			40ml

8、蛋白質定量

原理：確定蛋白質的體積濃度，並使其均一化，以利實驗之進行。

蛋白質檢量線製作：

依照下列表格進行檢量線製作

組成 \ NO	1	2	3	4	5	6
蛋白質濃度(ug/ml)	0	5	10	15	20	25
0.1mg/ml BSA (μ l)	0	50	100	150	200	250
DDW(μ l)	800	750	700	650	600	550
Baradford (μ l)	200					
總體積 (μ l)	1000					

NO. 1 為背景值

Bradford 為蛋白質染劑，有毒性，使用時需戴手套。加入染劑混合均勻後需反應 5 分鐘在測吸光值。吸光值測定時每個樣本數需 3 重複，使其數值穩定。以測定出來的標準品吸光質與蛋白質濃度畫出檢量線，並求出趨勢線方程式即 R^2 值。 R^2 值需 >0.99 以上的準確度。

使用 Excel 軟體會出蛋白質檢量線

算出趨勢線方程式，經帶入測得之吸光值(y)，則可求出蛋白質濃度($\mu\text{g/ml}$)。

樣品蛋白質濃度測定：

取 10 μl 的樣品與 790 μl 的 DDW 混合，在加入 200 μl 的 Bradford 染劑，均勻混合 5 分鐘後在 O.D 590 測定吸光值。

將樣品吸光值(y)帶入算出趨勢線方程式，則可算出樣品蛋白質濃度(x)

9、蛋白質電泳 (SDS-PAGE)

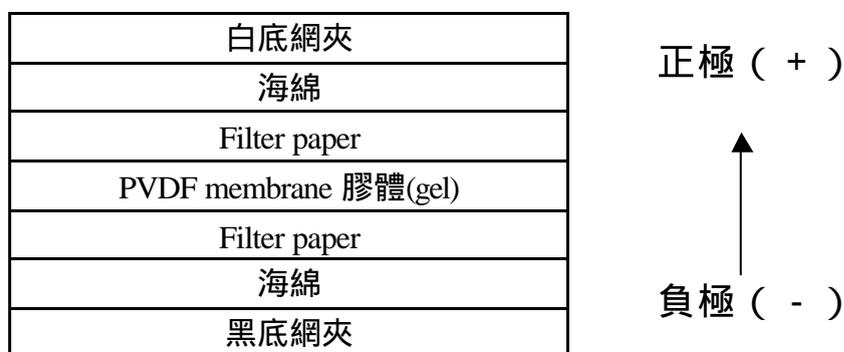
組合鑄膠檯，注入 DDW 確定無滲漏之情形，依照下列配方先配製下層膠。

組成	下層膠(10% Separation gel)		上層膠(5% Stacking gel)	
	一片量	兩片量	一片量	兩片量
DDW	4.75 ml	9.5 ml	3.04 ml	6.08 ml
1.5M Tris(PH:8.8)	2.5 ml	5.0 ml	-	-
0.5M Tris(PH:6.8)	-	-	1.25 ml	2.5ml
10% SDS	100 μl	200 μl	50 μl	100 μl
40% Acrylamide/bis(29:1)	2.5 ml	5.0 ml	610 μl	1.22 ml
10% APS	50 μl	100 μl	50 μl	100 μl
TEMED	10 μl	20 μl	6 μl	12 μl

下層膠注入造膠槽內約八分滿，剩餘的空間先用 DDW 填滿去除上面的氣泡並壓平膠之上緣，等待凝固約 30 分鐘，造上層膠，TEMED 則須等下層膠凝固後將 DDW 倒出後加入，下層膠凝固後，注入上層膠，插入 comb 等待凝固約 30 分鐘將 comb 取出後先用 DDW 清洗 well，將膠槽放入電泳槽內裝滿 Running buffer，將 loading sample 先加熱（95、5 分鐘）立即放置於冰上冷卻 30 秒以上，將 Marker（5-10 μ l）和 sample（18-24 μ l）loading 到 well 內，利用 100V 跑電泳約 2 個半小時，取出下層膠放入 0.1% Coomassie blue 進行蛋白質染色，或準備進行蛋白質轉漬至 PVDF 膜 Western Blot 步驟[40]。

10、西方墨點法（Western blot）

準備用物 - PVDF membrane 需先用 Methanol 潤濕 30 秒，將下層膠自水龍頭下取去下，並將膠體放至轉漬夾上其順序如下：



將轉漬夾合上放入 Transfer box 蓋上蓋子放置冰桶中並加滿冰塊，放入 4 冰箱內，Transfer 條件設定 100 voltage，轉印時間 1 小時，將轉印後的 PVDF membrane 放入 5% fat-free milk 室溫 blocking 1 小時，0.1% PBST 搖盪 5 分鐘，共 3 次，把 membrane 放入含有一級抗體的封口袋內，4 冰箱搖晃至隔天。接著取出 membrane 放入

0.1 % PBST 搖盪 5 分鐘，共 3 次，將 membrane 放入含有二級抗體，室溫搖盪 1 小時，取出 membrane 放入 0.1%PBST 搖盪 5 分鐘，共 3 次後進行暗房底片顯影[40]。

暗房底片顯影（壓片）

準備用物：1 ml Pipet、1 ml tip、cassete、鑷子、感光底片、剪刀、透明膠片、ECL、Developer、Fixer 將 membrane 浸泡於 ECL（比例為 1:1）混合液中約 30 秒，將 membrane（正面朝上）放置於透明膠固定好，剪適當大小的底片，進行曝光。（依 membrane 上冷光亮度決定曝光時間，數秒至 1 小時），曝光後用顯影劑及定影劑洗底片，後將底片風乾保存並進行分析[40]。

Membrane 保存

將壓片後的 membrane 以 0.1%PBST 10 分鐘 2 次，放入含 0.1%PBST 的密封袋 4 保存。（可保存 2 星期）

Commassie Blue 染色

gel 先以 DDW 清洗 15 分鐘，共 3 次，加入適當的 Commassie Blue 反應 20 分鐘，加入 destain buffer 搖盪至清楚呈現 band。

Comassie Brilliant Blue R-250 泡製方法

組成	最終濃度	最初濃度	體積 / 重量
Comassie Brilliant Blue	-	-	0.25g
Methanal	-	100%	45ml
Acetic acid	-	100%	10ml

DDW	-	-	45ml
總體積			100ml

Dstain buffer 泡製方法

組成	最終濃度	最初濃度	體積 /重量
Methanol	10%	100%	100ml
Acetic acid	-	100%	70ml
DDW	-	-	830ml
總體積			1000ml

11、 Cell count

原理

應用Trypen blue exclusion實驗計數樣品中的細胞數，因活細胞會排斥trypan blue 染劑，僅死細胞會被染成藍色，因此計數亮色的細胞數可相對得知其細胞存活率。

方法步驟

將細胞分盤至平面 24well 培養，種植細胞數約 5×10^4 /well，以 10%FBS DMEM 1ml 飼養 24 小時後，以 1 x PBS (pH:7.4) 1ml 沖洗 1 次，加入 0 % FBS-DMEM 100 ml 同步化 24 小時，以含不同濃度藥物或低密度之蛋白或氧化低密度之蛋白培養至時間點，加入 200 μ l Trypsin incubation 2 分鐘，加入 10% FBS-DMEM 800ul 並將細胞衝散均勻，取出 100 μ l 細胞懸浮液和 10 μ l typan-blue 在 96-well 內混合均勻，共取 2 次。分別從混合液中各取出 10 μ l 的細胞懸浮液放在細胞計數盤(haemocytometer)計數活細胞數。

12、 MTT assay

原理

主要是依賴粒線體中琥珀酸去氫酶的作用將 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 的 tetrazolium 轉變為藍色產物 MTT formazan。MTT 轉變僅在活細胞中進行，並堆積在細胞內，且 formazan 形成量與細胞數目呈正比，加入 10 % SDS-Hcl 溶解後，可以由波長約 590nm 知吸光測量並定量。由於細胞還原 MTT 的能力代表細胞粒線體的活性，因此可以做為細胞存活率的一個指標。【MTT 保存方法：避光，冷藏於 2 - 8 °C。】

方法步驟

將細胞分盤至平面 96 well 培養，種植細胞數約 1×10^4 /well, 以 10% FBS-DMEM 100 μ l 飼養 24 小時後，以 1 x PBS (PH:7.4) 100 μ l 沖洗 1~2 次，加入 0 % FBS-DMEM 100 μ l 同步化 24 小時，以含不同濃度藥物的 10 % FBS-DMEM 100 μ l 培養至時間點加入濃度 5 mg /ml 的 MTT 佔 DMEM 量的 1/10，培養 4 小時後再加入 100 μ l 10 % SDS-Hcl (終止反應) 隔天測吸光值 OD590 nm 、 ref 620 nm。

MTT 溶液的配製 (避光 4 °C 儲存)

組成	最終濃度	初濃度	體積/重量
MTT	5 mg/ml	--	250 mg
PBS(pH7.4)	--	--	50 ml
總體積			50 ml

Solubilization solution 配製 (室溫儲存)

組成	最終濃度	初濃度	體積/重量
SDS	10%	-	10 g
Hcl	0.01M	1M	1 ml
總體積			100 ml

13、細胞週期分析法

細胞前處理

將細胞分盤至 6 cm dish 培養，種植細胞數約 3.5×10^5 /well 10% FBS-DMEM 2 ml 飼養 24 小時，加入 1x PBS 2 ml 沖洗 1-2 次，然後加入 0% FBS- DMEM 1ml 同步化 24 小時，再以含 1% FBS-DMEM 加入實驗設計之液體共 5ml 培養至實驗時間點，以 1x PBS 5 ml 沖洗 1-2 次加入 Trypsine 500 μ l incubate 2 分鐘後加入 500 μ l 10% FBS-DMEM 以 pipet 將細胞沖洗下來，離心 (1500 rpm 【 300g】、 5 分鐘) 倒掉上清液，以 1x PBS 1 ml 加入離心管，離心 (1500 rpm 【 300g】、 5 分鐘) 倒掉上清液，以 70% 冰酒精固定細胞，以 vortex 以 shack 3 的速度一滴一滴緩慢滴入酒精 2 ml，-20 冷藏隔天[41]。

上機前細胞處理

離心(1500 rpm【 300g】 10 分鐘)倒掉上清液去除酒精，以 1xPBS 1ml 加入離心管，離心 (1500 rpm 【 300g】、 10 分鐘)，加入 PI 染劑避光，室溫下 incubater 30 分鐘，換成 FACON 專用管，進行流式細胞儀分析。

PI stain 染劑的配製

組成	最終濃度	初濃度	體積 / 重量
PI	0.4 mg/dl	2 mg/dl	5 ml
Triton	1%	5%	5 ml
RNase A	0.1 mg/ml	2 mg/ml	1.25 ml
1×PBS	-	-	13.75 ml
總體積			25 ml

14、數據分析

實驗結果以 One way ANOVA 計算分析。數據結果以 mean±SE 表示各項值。(圖中 * 表示與 1% FBS-DMEM 相比, P < 0.05; # 表示與低密度脂蛋白或氧化低密度脂蛋白組相比, P < 0.05。)

第三章、實驗結果

第一節、Ellagic acid 對血管平滑肌細胞之影響

以MTT 及細胞計數方式評估Ellagic acid 對血管平滑肌細胞毒性之影響

平滑肌細胞在經過24 小時細胞週期同步化後，在含1 %胎牛血清的刺激下，先同步給予不同濃度的Ellagic acid 處理24 小時。經由加入MTT 反應4 小時後，再加入solubilization solution，經隔夜後測定吸光值，或以Trypan blue 染色後，再以細胞計數器計算總細胞中存活的數目或結果顯示(圖8、 9)濃度時100 μ M的濃度會導致細胞的毒性；而濃度50 μ M則對細胞沒有毒性。

第二節、同步給予LDL 與 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞之影響

以MTT方式評估低LDL刺激平滑肌細胞？生之影響

平滑肌細胞在經過24小時細胞週期同步化後，在含0.1%胎牛血清的刺激下，同步給予不同濃度(20、 60、 100和200 μ g / ml) 的LDL處理24 小時，經由加入MTT 反應4 小時後，再加入solubilization solution，經隔夜後測定吸光值。由於細胞還原MTT的能力代表細胞粒線體的活性，因此可以做為細胞存活率的一個指標數目，最後換算出經不同LDL濃度處理後之細胞存活率。結果顯示(圖10)隨著濃度的增加細胞存活率呈現劑量依附性 (dose dependent)。

以細胞計數方式觀察不同時間點給予 Ellagic acid 對於抑制 LDL 刺激血管平滑肌細胞增生之影響

平滑肌細胞在經過24 小時細胞週期同步化後，在含 0.1% 胎牛血清及LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的刺激下，同步給予濃度 50 μM 的Ellagic acid；或先給予濃度50 μM 的Ellagic acid 處理24小時，再給予LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激24小時；或先給予LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激24小時，再給予濃度50 μM 的Ellagic acid 24小時。以Trypan blue 染色後再以細胞計數器計算總細胞中存活的數目。結果顯示(圖11)，同步給予LDL及Ellagic acid 組別，比較其他組別與單獨給予LDL刺激之組別，有明顯的抑制細胞存活率之表現。

以 MTT 的方式評估 LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 同步加入 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞數之影響

平滑肌細胞在經過24 小時細胞週期同步化後，在含0.1% 胎牛血清及LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的刺激下，同步給予濃度50 μM 的Ellagic acid 處理經過24 小時，經由加入MTT 反應4 小時後再加入solubilization solution，經隔夜後測定吸光值。結果顯示(圖12) 與LDL組別比較同步加入Ellagic acid 50 μM 組別有的抑制細胞數之表現但統計上無顯著差異

LDL 對血管平滑肌細胞立即性早期磷酸化 ErK 1/2 蛋白之影響

平滑肌細胞在經過 24 小時細胞週期同步化後，在含 0.1% 胎牛血清

及低密度脂蛋白 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的刺激下於不同時間點(分別為 5 10 15 20、30 分鐘)後收取細胞抽取蛋白質，以西方墨點法分析不同時間點，細胞中磷酸化 Erk1/2 的表現變化。實驗結果顯示(圖 13)細胞中的磷酸化 Erk 1/2 在 LDL 刺激後 5 分鐘後明顯表現並持續至 30 分鐘

LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 同步加入 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞立即性早期磷酸化 ErK 1/2 蛋白之影響

平滑肌細胞在經過 24 小時細胞週期同步化後，在含 0.1% 胎牛血清及 LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的刺激下同步給予 50 μM 的 Ellagic acid，處理 24 小時，以西方墨點法分析 Ellagic acid，對於細胞中磷酸化 Erk 1/2 表現變化。實驗結果顯示(圖 14)LDL 組比較，同步加入 Ellagic acid 會抑制細胞中磷酸化 Erk1/2 的表現。

LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 同步 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞 ERK 1/2 蛋白之影響

平滑肌細胞在經過 24 小時細胞週期同步化後，在含 0.1% 胎牛血清及 LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的刺激下同步給予 50 μM 的 Ellagic acid，處理 24 小時，以西方墨點法分析 Ellagic acid，對於細胞中 Erk 1/2 表現變化。實驗結果顯示(圖 15) 與 LDL 比較，同步給予 Ellagic acid 對未磷酸化 Erk1/2 並沒有抑制作用的表現。

LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 同步加入 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞 PCNA 蛋白

之影響

平滑肌細胞在經過24 小時細胞週期同步化後，在含0.1%胎牛血清及LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的刺激下同步給予50 μM 的Ellagic acid，處理24 小時，以西方墨點法分析Ellagic acid，對於細胞中PCNA表現變化。實驗結果顯示(圖 16)與LDL組比較，同步加入Ellagic acid 會抑制細胞中PCNA 的表現。

第三節、同步給予 ox-LDL 及 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞增生之影響

ox-LDL 對平滑肌細胞增生之影響

平滑肌細胞在經過 24 小時細胞週期同步化後，在含 1%胎牛血清的刺激下，同步給予不同濃度(20 60 100 200 和 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 ox-LDL，處理 24小時，加入 MTT反應 4小時後再加入 solubilization solution，經隔夜後測定吸光值。結果顯示(圖 17)在濃度 50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時細胞存活率與 1% FBS-DMEM 培養的細胞存活率明顯增加至 161% 而 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 則有顯著抑制存活率之情形約 71%。

以光學顯微鏡、MTT 及細胞計數方式評估 ox-LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 同步加入 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞數及存活率之影響

平滑肌細胞在經過24 小時細胞週期同步化後，在含1% 胎牛血清及 ox-LDL100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的刺激下，同步給予濃度50 μM 的Ellagic acid，處

理24小時，以Trypan blue 染色後再以細胞計數器計算總細胞中存活的數目，或經由加入MTT 反應4 小時後再加入solubilization solution，經隔夜後測定吸光值。結果顯示(圖18、19、20) 與ox-LDL(100 µg/ml) 組別比較同步加入Ellagic acid 50 µM 組別有明顯的抑制細胞數及存活率之表現。

Ox-LDL 100 µg/ml 同步加入 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞蛋白 Erk 1/2 蛋白之影響

平滑肌細胞在經過24 小時細胞週期同步化後，在含1%胎牛血清及ox-LDL100 µg/ml的刺激下同步給予50 µM的Ellagic acid，處理24 小時，以西方墨點法分析Ellagic acid對於細胞中Erk 1/2 表現變化。實驗結果顯示(圖21) ox-LDL(100 µg/ml)組比較，同步加入Ellagic acid 會抑制細胞中Erk1/2 的表現。

Ox-LDL100 µg/ml 同步加入 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞立即性早期磷酸化 Erk 1/2 蛋白之影響

平滑肌細胞在經過24 小時細胞週期同步化後，在含1%胎牛血清及ox-LDL100 µg/ml的刺激下同步給予50µM的Ellagic acid，處理24 小時，以西方墨點法分析Ellagic acid對於細胞中磷酸化Erk 1/2 表現變化。實驗結果顯示(圖22) 與ox-LDL (100µg/ml) 組比較，同步加入Ellagic acid會抑制細胞中磷酸化Erk1約0.52倍、Erk2約0.49倍的表現。

Ox-LDL100 µg/ml 同步加入 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞週期之影響

將血管平滑肌細胞經過 24 小時無血清培養進行細胞同步化後，置換為含 1 % 胎牛血清之培養液，並分別加入 ox-LDL 100µg /ml 及 Ellagic acid 50 µM 或加入 DMSO。於第 24 小時收集細胞，並經過細胞酒精固定和 PI 染劑染色後，以流式細胞儀進行分析不同濃度藥物處理，對血管平滑肌細胞之細胞週期 S 期比例影響變化。由結果顯示(圖 23、表一) 當給予 ox-LDL (100 µg /ml) 組別細胞週期 S 期與 1% FBS-DMEM 比較有明顯由 6.76% 增加到 15.42% ，而給予 ox-LDL (100 µg /ml) 並同步加入 Ellagic acid 組別則細胞週期 S 期則降至 9.4% 且具有統計上的意義 $P < 0.005$ 。

100 µg/ml ox-LDL 同步加入 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞 PCNA 蛋白之影響

平滑肌細胞在經過 24 小時細胞週期同步化後，在含 1% 胎牛血清及 ox-LDL 100 µg/ml 的刺激下同步給予 50 µM 的 Ellagic acid ，處理 24 小時，以西方墨點法分析 Ellagic acid 對於細胞中 PCNA 表現變化。實驗結果顯示(圖 24) 與 ox-LDL (100 µg/ml) 組，同步加入 Ellagic acid 會抑制細胞中 PCNA 的表現。

第四章、討論

本研究主要以體外 (in vitro) 實驗為主軸，模擬粥狀動脈血管疾病中血管平滑肌細胞受到 ox-LDL 刺激後所引平滑肌細胞增生與天然蔬果中具有抗氧化功能之多酚類化合物 Ellagic acid 之研究探討。

Ellagic acid 對 ox-LDL 刺激平滑肌細胞增生的影響

有許多證據指出在粥狀動脈血管疾病中 ox-LDL 所引起內膜層平滑細胞遷移及增生對於疾病嚴重度的發展是非常重要的因素[42, 43]。而文獻指出 ox-LDL 的生物活性可以引起生長因數調控基因、黏著分子表現和改變單核球及巨噬細胞的能力與平滑肌細胞的增生[7, 8, 30]。

近年研究報告對於粥狀動脈血管平滑肌細胞增生的探討我們可以發現，有許多的因素可以引起血管平滑肌的增生。如 ox-LDL 和 acetyl-LDL 引起巨噬細胞吞噬，形成泡沫細胞[44]；另有文獻指出 LDL 與 ox-LDL 可以藉由活化訊息傳遞路徑 MAPK pathway，或藉由 PI3-kinase/Akt 與 ERK1/2 之間的 cross link 引起細胞的增生及遷移[24, 30, 44, 45]；另外 ox-LDL 也可以引起細胞內生長因數，如 FGF-2 之釋放，達到刺激細胞增生。Marjorie 等學者提出，ox-LDL 刺激平滑肌細胞增生，主要是引起細胞週期蛋白質的表現。細胞週期是由許多不同的蛋白質所共同調控，包括：cyclin D1、cyclin-dependent kinase

(cdks) or PCNA 等 [46]。Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 是 DNA polymerase 輔助蛋白，主要分佈於核質，其主要扮演的角色是與 cyclin 或 cdk 及 P21 相互作用以調控細胞週期的進行並與 DNA 合成有關 [46]；而 ox-LDL 氧化產物包括 4-hydroxynonenal、lysophosphatidylcholine 也會刺激平滑肌細胞的增生 [19, 47]。

根據文獻指出自由基亦是導致平滑肌細胞增生的主要原因 [24]；而本實驗所使用的 Ellagic acid，過去主要是針對癌症與抗氧方面的領域研究，對於 Ellagic acid 在粥狀動脈硬化血管疾病的作用機制並不清楚。粥狀動脈是一個慢性發炎伴隨著自由基傷害、脂質堆積與平滑肌不正常細胞增生的血管性疾病，不正常的細胞增生就如同癌細胞一樣。而 Ellagic acid 在抗癌部分可藉由活化 p21 進而抑制癌細胞週期導致細胞凋亡 [35]，或經由抑制乙醯轉移酶活性及 Cytochrome P450 的作用預防致癌物產生及腫瘤生成 [33]。而在 TCDD 引起的胎兒毒素 (fetotoxicity) 及氧化壓力 (oxidative stress) 之下，使用 100 µg/kg 濃度的 Ellagic acid 則可有效的預防胎兒死亡 (fatal death) 和 superoxide anion 的產生 [38]。

在平滑肌細胞增生方面之實驗顯示，氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 與 MAPK 訊息傳遞路徑具相關性 [23]，並加速細胞週期的進行。本實驗在給予 Ellagic acid 後，則可以抑制細胞週期、細胞增生、Erk

磷酸化及 PCNA 的表現，表示 Ellagic acid 可以阻斷 MAPK 的訊息傳遞及細胞週期的進行。而本研究將 Ellagic acid 應用在粥狀動脈血管平滑肌細胞的增生的模型，並利用低血清的環境進行實驗。主要是血清本身含有生長因數可以促進細胞增生，若給予正常飼養濃度的血清 10% 可能無法看到顯著的細胞增生情形，而血清可能中和 EA 之作用而無法清楚釐清 EA 功能為何。在實驗中發現在 Ellagic acid 在濃度 140 μM 的時候，經 MTT 結果顯示細胞的存活率高於 1 % FBS-DMEM 組別而在濃度 50 $\mu\text{mol/l}$ 的濃度下則無明顯的差異。因此我們選擇 50 μM 為實驗的濃度，結果顯示血管平滑肌細胞在給與 100 $\mu\text{g/ml}$ 氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 處理 24 小時，會促進細胞增生，且持續磷酸化 MAPK 訊息傳遞路徑下游之 ErK 蛋白質、細胞週期的 S 期及 PCNA 蛋白質。當同步給予濃度 50 μM 的 Ellagic acid 的確可以明顯的抑制上述的表現，這意味著 Ellagic acid 的確可以藉由抑制 MAPK 訊息傳遞路徑及細胞週期進而抑制氧化低密度脂蛋白引起的平滑肌細胞增生。Ellagic acid 抑制氧化低密度脂(ox-LDL)所引起的 MAPK 訊息傳遞路徑也許是經由抑制活性氧 (ROS) 的產生及活化 P21 而達到抑制平滑肌細胞的增生；另一方面文獻也指出 cytochrome P450 會促進低密度脂蛋白的氧化[48]，Ellagic acid 則可抑制 cytochrome P450 的產生，進而達到抑制脂質的氧化。

Ellagic acid 抗氧化對平滑肌細胞增生與之討論

在本論文研究探討實驗中可以發現，ox-LDL 在不同濃度處理 24 小時候會引起血管平滑肌細胞表現出不同的結果，這也說明瞭 ox-LDL 在粥狀動脈血管疾病中所扮演的複雜角色。2000 年亦有文獻指出，內皮細胞的 ox-LDLreceptor-1 (LOX-1) 與 ox-LDL 結合後會產生 ROS，並且隨著 ox-LDL 濃度增加 ROS 的量亦會隨之增加[49]，血管平滑肌細胞亦被發現有 LOX-1 而 ox-LDL 脂質氧化產物 lysophosphatidylcholine (LPC) 會增加血管平滑肌細胞 LOX-1mRNA 的表現[50]，推測這個現象的原因可能是因為 ox-LDL 在不同濃度所產生自由基的總量不同引起不同的細胞外訊息傳遞路徑因而導致增生的結果；另一方面也可能是 ox-LDL 脂質氧化代謝產物不同或代謝產物總量的差異引起細胞毒性而導致不同的結果。

抗氧化劑具有保護身體，防止自由基形成、去除體內所產生的自由基 (freeradicals)；這些自由基是由氧氣和體內的各種物質反應而產生，會造成一連串有害的連鎖反應，而對體內組織造成各種傷害。抗氧化劑，例如：脂溶性維他命 E、水溶性維他命 C，雖然抗氧化機制不同但是對於降低氧化傷害[51-53]，及抑制血液中膽固醇含量都有顯著的成效[54]，並且可以降低並預防心血管疾病及粥狀動脈硬化疾病進展[55]。而本實驗運用不同時間點的方式，探討 Ellagic acid 抗氧

化的機制起始為何，發現同步給予24小時處理的Ellagic acid和LDL，可以明顯的抑制平滑肌細胞的增生；然而先單獨給予EA或LDL雖然有抑制細胞增生情形，但是卻不如同步給予明顯。LDL本身並不會產生ROS但是當加入細胞內時則可引細胞內ROS的產生。因此推論Ellagic acid在抑制LDL引起的細胞增生，主要是經由捕捉細胞內ROS進而抑制細胞增生。另外，本實驗所使用的Ellagic acid即是種天然抗氧化劑在50 μ M的濃度下對於LDL或ox-LDL所引起的增生實驗中，發揮了抑制細胞增生的效果，而這個濃度與2000年Chai學者提出，抗氧化劑vitamin E在50 μ M具有時抑制lyso PC所引起的平滑肌細胞增生[56]。Ellagic acid是一種蔬果中的多酚類化合物其，本身具抗氧化功能就有保護正常細胞免於不正常環境刺激下受到影響，雖然文獻[22]有指出LDL或ox-LDL會增加ROS的生成進而影響平滑肌細胞的增生，但本實驗卻欠缺ox-LDL導致自由基增加直接證據，這也是論文不足的地方，因此未來實驗的方向可朝向ox-LDL與自由基的相關實驗及Ellagic acid在抗氧化中所扮演的角色。

粥狀動脈血管疾病是高死亡率的現代文明病的一種，許多研究學者致力於研究其治病機轉，尋找可以預防或降低此疾病的發生率，而本實驗使用了存在於蔬果內的具抗氧化功能之多酚類化合物進行實驗。結果顯示 Ellagic acid 在粥狀動脈中平滑肌細胞增生具有抑制作

用，這也是本研究的主旨，對於粥狀動脈疾病的進展可以藉由日常生活中的蔬果的補充，而達到預防或降低的效果，更可以減少因服用化學合成藥物副作用所造成的更進一步的傷害。

第五章、結論

存在於自然界的多酚類化合物 Ellagic acid，可以藉由其抗氧化之功能，抑制平滑肌細胞增生。這個結果可能是經由捕捉 ROS，避免細胞外的訊息傳遞路徑的活化，或直接抑制細胞週期中蛋白質的表現，而達到抑制平滑肌細胞不正常增生（圖 5）。Ellagic acid 存在於自然界蔬果中，或許可以藉由補充蔬果而直接預防或治療粥狀動脈硬化血管疾病。

第六章、序論

前言

任何原因引起的動脈壁增厚、變硬或失去彈性的的病理變化，我們統稱為動脈硬化（Atherosclerosis）。動脈硬化可依據其硬化方式分為：動脈粥樣硬化、動脈中層鈣化及小動脈硬化；臨床上以動脈粥樣硬化為主。粥狀動脈硬化是一種發生在大血管的疾病，是一種脂質與發炎細胞的聚積，並伴隨著平滑肌細胞（smooth muscle cell, SMC）增生與細胞外間質液分泌（extracellular matrix secretion），所引起的細胞內膜纖維變性（intimal fibrosis）。後期血管平滑肌凋亡，所引發粥狀動脈腫的破裂，栓子及血栓形成，也是導致心血管疾病及中風的主要原因。根據衛生署公佈民國九十一年十大死因，腦血管與心臟疾病僅次於惡性腫瘤之後，分居於第二及第三名，不但對個人造成生命財產上損害，亦花費許多的醫療和社會成本。所以，對於心血管疾病的預防與治療方法的改進和研發，是一個急待解決及研究的課題。

第一節、粥狀動脈形成之介紹

粥狀動脈硬化形成的機制，主要包括四個階段[1,2]，分別為(1)內皮細胞層功能不良（endothelial dysfunction）[3, 4]、(2)脂肪條的形成（fatty-streak fomation）、(3)壞死中心與纖維帽（necrotic core and Fibrous-cap）的形成及(4)不穩定的纖維斑塊（unstable fibrous

plaques)。這四個階段都是影響粥動脈硬化疾病嚴重度的重要的因素。因此以下將分別介紹各階段：

一、內皮細胞層功能不良 (endothelial dysfunction)

早期粥狀動脈硬化形成的原因，主要是因為血管分支或轉彎的地方，較易為血流速度、壓力或是所產生的擾流影響，使內皮細胞物理因素改變，發炎細胞[5]的黏著堆積而釋放出趨化因數，導致細胞通透性增加；加上血液中過多的脂蛋白(例如：低密度脂蛋白；LDL)，經由血液動力學的影響，被動的經由通透性增加的內皮細胞間隙，穿過血管內皮細胞層，而進入到血管內膜中。這些進入血管壁中的 LDL 會與結構性蛋白相黏合，且極易受到血管內皮細胞所釋放之活性氧與 12-LO (12/15lipoxygenase) 攻擊，而氧化為氧化態的低密度脂蛋白 (ox-LDL) [6]。

二、脂肪條的形成 (fatty-streak formation)

在動脈硬化的第二個階段中，被自由基攻擊的低密度脂蛋白氧化為氧化態的低密度脂蛋白 (ox-LDL)，而 ox-LDL 會刺激血管內皮細胞產生許多的黏附趨化因數，例如 MCP-1(monocyte chemotactic protein)、 ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1)，VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) 與 E-selectin 等，同時 ox-LDL 亦會吸引血液中的單核球細胞(monocyte)向內皮的表面黏附而進入血

管內皮細胞下層(subendothelial), 一方面分泌細胞激素 (cytokines), 如 Interlukin-1(IL-1), Interlukin-4(IL-4), interferon- γ (幹擾素- γ ; IFN- γ), Tumor Necrosis Factor (TNF)進行發炎反應[5, 7]; 另一方面則是接著受到血管內皮細胞所釋放的 M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) 分化為巨噬細胞。這些存在於血管壁中的巨噬細胞表面具有清道夫受體 (scavenger receptor), 對於 ox-LDL 具有極高的親合力, 形成一含巨噬細胞之泡沫細胞(macrophage foam cell) 也稱為”泡沫細胞”。此時平滑肌細胞會受到泡沫細胞的刺激, 穿過彈性纖維層進入內膜增生[8], 然後泡沫細胞及平滑細胞, 則由內層移位至內膜增生形成脂肪線 (Fatty-streak) [7]。

三、壞死中心及纖維帽的形成 (necrotic core and Fibrous-cap)

第三階段則由於巨噬細胞不斷的吞噬 ox-LDL, 產生大量的泡沫細胞, 極易堆積在血管壁並且死亡[9]。並藉由 Interferon 的作用, 使細胞走向凋亡, 再與其他脂質碎片形成一個壞死中心 (necrotic core)。血管壁中層膠原蛋白與平滑肌細胞過度增生, 遷移至血管內膜層形成纖維帽 (Fibrous-cap), 其功能在於隔開血管腔以及受損區域。

四、不穩定的纖維硬斑 (unstable fibrous plaques)

動脈硬化最後一個階段中, 血管壁會形成動脈硬化斑塊。動脈硬

化斑塊是由平滑肌、泡沫細胞、低密度脂蛋白及其他脂質所組成，也可以稱為粥狀動脈腫(atheroma)。此時血管的管腔會因為硬化斑塊的產生而狹窄，持續擠入活化的巨噬細胞會釋放出分解蛋白的酵素，這些酵素會分解基質，使原本覆蓋於壞死中心上的平滑肌細胞亦受到刺激進行凋亡之機制[9]。而此機制結果會導致斑塊不穩定，甚至於破裂，增加粥狀動脈疾病之嚴重度。

第二節、氧化修飾低密度脂蛋白與自由基的關係

低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 密度約 1.019-1.063g/ml (Gotto 1988)，是由大約 3000 個脂肪酸和一個脫輔基蛋白分子 (Apolipoprotein-B, Apo-B, 50 Dalton) 所構成的，平均直徑長 19-25 nm，分子量大約為 180-250 萬 Dalton 的大圓球形粒子 (Keaney 1994)，一般 LDL 被細胞攝取的路徑是經由 LDL 接受體 (LDL receptor) 進而分解代謝及應用。

而自由基是指在電子軌域中具有一個或多個不對稱的分子、原子或離子，則稱之為自由基。當一個分子有不對稱的電子圍繞在外層軌域上時，會迅速的與周圍的分子碰撞而引起化學變化，進而引起傷害 [10]。在正常情況下，自由基能保護身體免受微生物、細菌等有害物質侵害，但是當自由基過量時，情況就大不一樣，它會攻擊細胞，促使蛋白質、核? 酸、脂肪的代謝異常，細胞? 生突變而引起疾病。

體內細胞所產生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)，是一群有強氧化力的含氧分子，包括超氧化陰離子(superoxide anion, O_2^-)，過氧

化自由基(hydroxyl radical, OH[·])、以及過氧化氫(hydrogen peroxide)等[11]。自由基具不成對電子其化學活性很活潑、不穩定，很容易去找一個電子配對，使之穩定，因此產生氧化還原反應[10]。生物細胞內多種氧化反應及代謝途徑都會產生具有活性的氧分子，因此生物體常會遭受到活性氧分子之威脅。當生物體老化或環境惡劣時，粒線體電子傳遞鍊進行不順利時，其電子會在途中被氧分子作用形成超氧自由基[12]。若超氧自由基與過氧化氫自由基同時存在，則會產生毒性更強的氫氧自由基。自由基包括超氧自由基(Superoxide, O₂^{-·})、過氧化氫自由基(Hydrogen peroxide, H₂O₂)、氫氧自由基(Hydroxyl radical, OH[·])、過氧化脂質(Lipid peroxide)。

氧化低密度脂蛋白的形成與由自由基引發的脂質過氧化 (lipid peroxidation) 有相當的關聯。脂質過氧化是一種自由基的連鎖反應 (chain reaction)。這種連鎖反應是透過羥自由基 (hydroxyl radical, OH[·])，攻擊多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFAs) 上的雙鍵(double bonds)，羥自由基會吸引多元不飽和脂肪酸碳原子處的氫原子，先形成不飽和脂肪酸自由基 (R[·])，再氧化成脂過氧基 (ROO[·])，最後生成過氧化脂質(ROOH)及另一份子不飽和脂肪酸自由基(R[·])，連鎖循環下去，使脂質不斷氧化，生成過氧化脂質。Jessup et al. (1990)指出 LDL 氧化主要是經由一個自由基反應的過程[13]，其

脂質被過氧化作用 (lipid peroxidation) 轉換成脂氫過氧化物，之後再被分解成不同的產物，包括 malondialdehyde (MDA) ， 4-hydroxynonenal 等[14]，脂質過氧化的產物會與 LDL 的 apolipoprotein B 作用，致使 apolipoprotein B 的結構受到改變[15]。這種受到氧化的 LDL (ox-LDL) 不再被 LDL 接受體所辨識，而與清道夫受體有極高的親合力。Rosenfeld et al. (1990)認為 lipid peroxidation 和 lipid peroxidation 的產物在導致粥狀動脈瘤之啟始作用過程中，扮演著一個重要的角色[16]。另外 ox-LDL 另外 ox-LDL 與 LOX-1 結合會減少內皮細胞內一氧化氮(nitric oxide, NO)的生成[17]，增加 Superoxid 產生，而高膽固醇血症(hypercholesterolaemia)會在內膜產生更多的 ox-LDL，或在易氧化的環境下，使內皮細胞釋放出更多的超氧陰離子(superoxide anion, O_2^-)，結果則造成在沒有明顯傷害時也可能會造成血管痙攣或收縮。Ox-LDL 會改變動脈壁的特性而造成臨床上之疾病，會刺激組織釋出凝血因數，並造成凝血 (initiate coagulation)。因為血管受傷處之週圍，會產生斑塊破裂(plaque rupture)，造成栓塞。在傷害處有許多含有 ox-LDL 之泡沫細胞。因此除了巨噬泡沫細胞之形成以外，ox-LDL 也是促成粥狀動脈硬化之因素[7]。

第三節、自由基對平滑肌細胞增生之影響

增生 (Proliferation) 和細胞凋亡 (apoptosis) 是血管平滑肌細胞 (vascular smooth muscle cells ; VSMCs) 造成粥狀動脈硬化、血管再阻塞及高血壓的兩個重要因素。Li et al. (1997) 指出不同 ROS 對 VSMCs 會有不同的影響，例如超氧陰離子會造成細胞增生； H_2O_2 會引起 apoptosis [18]。因此 ROS 會參與粥狀動脈硬化之形成，而粥狀動脈硬化在 O_2^- 及 H_2O_2 的影響下，刺激增生和引發 VSMCs 的凋亡。近年來也有許多文獻指出氧化低密度脂蛋白與細胞增生 [19]、細胞毒性 [20, 21] 及細胞凋亡 [22] 與低密度脂蛋白過氧化脂質發展過程中的脂質氧化代謝的產物有關。

第四節、ox-LDL 對平滑肌細胞凋亡之影響

凋亡 (Apoptosis) 是一個維持體內環境平衡，及個體生長發育的一個重要因素 [57]。當細胞要進行 Apoptosis 時，會有以下四個重要外在特徵：1. 細胞皺縮 (cell membrane shrinkage)；2. 染色質濃縮 (chromosome condensation) 聚集在核膜；3. (DNA fragmentation)；4. 凋亡小體 (apoptotic bodies) 的形成。

細胞的這些改變主要是透過一連串的訊息傳遞和活化 caspase 調控 pro- and anti-apoptosis protein。例如 Bcl-2 家族成員經由一連串的正向、負向調控後決定凋亡程式啟動與否。Apoptosis 可經由外在途徑及內再途徑所引發，外在途徑如死亡接受器 (death receptor)，

如 ; TNFR、 Fas、 Decoy receptor 和 death receptor[58, 59]。 這些 receptor 不管細胞外、 ligand 結合區域和細胞內死亡區域(cytoplasmic death domain) 都富有 cystein, 當 ligand 結合上這些接受器(receptor)及死亡區域 (death domain)後會和 adaptor protein 相互作用進而活化 caspase。 內在途徑凋亡程式啟動則可藉由 Bcl-2 protein 家族成員對於 apoptosis 的調控或經由 DNA 損傷或基因調控粒腺體釋放出 cytochrome C 進而活化 caspase [60, 61]。

Caspase 家族基因與細胞凋亡程式的進行具有相當大的關係 [62]。 不管是內在或外在途徑 , 最後都會活化 Caspase 進而產生細胞凋亡。 Caspase (aspartate-specific cystein protease) 在 apoptosis 一連串的過程中扮演起始及終結者之角色 [63]。 所謂 caspase 起始者 , 是 caspase 家族成員中的 caspase 2、 8、 9、 10 , 所扮演的角色 , 是將下游的 caspase 轉為活化型 , 並具有蛋白質分解之能力的 caspase 3、 6、 7 刺激 apoptosis 進行 [62]。 其中 Caspase 3 在細胞進行 apoptosis 的過程中是相當重要的 , 它扮演了細胞死亡過程中的劊子手。 caspase 3 是 cysteine proteases family 中重要的一員 , 它將細胞中的許多蛋白質在特定的 amino acid 上切一刀 , 使蛋白質被水解並失去功能。 在過去的研究中顯示 , 當兩個 caspase 3 被拉近以形成 dimer 時 , caspase 3 將

會自行活化，並將使細胞進行不可逆轉的 apoptosis，而導致細胞的死亡[28]。

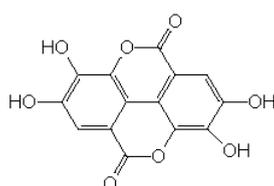
活化死亡接受器，如：TNFR 可進一步活化 JNK MAPK pathway，JNK MAPK pathway 是 MAPK 訊息傳遞路徑的其中一條，與細胞分化及凋亡較為相關，當接受死亡接受器所傳送的訊息可以經由調控基因或磷酸化方式進而調控 pro-apoptosis [63]。

許多證據指出，平滑肌細胞的凋亡參與粥狀動脈硬化的致病過程而其中包括許多因素，除了 ox-LDL 外也有訊息傳遞 MAPK pathway 的參與，如：氧化低密度脂蛋白上的 Lysophosphatidylcholine 會經由 scavenger receptors 活化 p38 MAPK 而增加 monocytes CXCR2 表現，導致人類內皮細胞的凋亡[64]。在冠狀動脈平滑肌細胞活性氧衍生系統（Reactive oxygen-generating system）活化 Nuclear factor- κ B（NF- κ B）和釋放 Tumor Necrosis Factor- α （TNF- α ）[65]。脂質產生過氧化產生的 2,4-decadiene 也會對平滑肌細胞導致細胞毒性[21]。Hsieh, et al. 2001 活性氧（ROS）則可藉由活化 caspase 進而導致平滑肌細胞凋亡[22]。而這些結果顯示，粥狀動脈硬化過程中，血管平滑肌細胞功能改變對於疾病嚴重度的之影響有極大關聯。

第五節、Ellagic acid 的作用機制

近幾年來，發現許多存在於自然界的多酚類化合物（polyphenolic compounds）具有多項功能，其中包括抗氧化（antioxidants）[31, 32]、抗突變（antimutagens）抗致癌物（anticarcinogens）及化學保護作用（chemoprevention）[33, 34]，而 Ellagic acid 就是其中一種重要的多酚類化合物。其化學結構如下：

2,3,7,8-Tetrahydroxy(1)benzopyrano(5,4,3-cde)benzopyran-5,10-dione



ellagic acid

Ellagic acid 主要存在於自然界中的蔬菜、水果，尤其以草莓、藍莓及堅果類含量最為豐富。文獻指出 Ellagic acid 抗癌方式是經由活化 P53 及其下游 P21 進而達到抑制癌細胞的細胞週期，進而使癌細胞凋亡，達到抑制癌細胞增生之效果[35]。許多研究證明，Ellagic acid 具有抗致癌物的活化之功能[36]。Ellagic acid 在化學保護作用

（chemoprevention）方面：根據 2001 Laura A. 研究報告指出在使用 NBBA 誘發 F344 rat 食道癌症形成，可藉由口服乾燥的黑莓，降低食道腫瘤形成具有化學保護作用[33]。在抗氧化方面，Ellagic acid 可降低小鼠肝臟、肺臟的 glutathione 和 glutathione reductase，降低 NADH

- and ascorbate-dependent 脂質過氧化(lipid peroxidation)[37], Hassoun 等學者指出, Ellagic acid (6mg/kg per day) 可調控抑制氧化劑 TCDD 引起胚胎及胎盤組織的毒素、氧化傷害(Toxicology)[38], 另外 Ellagic acid 也可以明顯的抑制 H₂O₂ 及 Bleomycin 所引起的 DNA 傷害[39]

研究目的

本實驗是以體外實驗（in vitro）為主軸的研究，以模擬粥狀動脈硬化，進行中ox-LDL刺激平滑肌細胞凋亡的實驗。在這個研究中，我們使用了一種自然界蔬果中含有的多酚類化合物 Ellagic acid，並研究此多酚類化合物在以ox-LDL造成的平滑肌細胞凋亡的過程中所扮演的角色。

1、Ellagic acid 在以往的研究多以預防和治療癌症及抗氧化方面為主，然而卻少有關於粥狀動脈硬化方面的研究報告，因此我們針對平滑肌細胞凋亡與Ellagic acid之間關聯進行研究。

2、探討Ellagic acid 如何抑制血管細胞凋亡情形的發生？

第七章、材料與方法

第一節、實驗材料

A 儀器

無菌操作臺 (造鑫,Taiwan)

細胞培養箱 (Nuaire, USA)

細胞計數器 (Haemocytometer; Boeco, Germany)

光學顯微鏡 (Motic, Japan)

離心機 (Beckman)

酸鹼值測定計 (C831; Consort, UK)

乾浴槽 (Model 110001; 購自Boekel)

微量天平 (GR-200; A&D, Japan)

去離子水製造機 (Minipore, USA)

超高速離心機 (himac CS 120GX)

Shaker bath (BT-350; 購自YIH DER, Taiwan)

Power supply (Hoefer,San Francisco, CA, U.S.A)

Gel Electrophoresis Apparatus (Gibco BRL, Grand Island, N.Y.,U.S.A)

ELISA reader (ANTHOS-2020,Salzbrug,Austria)

Vortex-genie 2 (SCIENTIFIC INDUSTRIES,NY,USA)

水浴槽 Water bath (TKS,Taipei,Taiwan)

流式細胞儀 (FACSCalibur,BD,USA)

聚合? 連鎖反應器 (Bio-Rad,USA)

影像分析儀器 (AlphaImagerTM 2200,USA)

B 材料

細胞培養皿 (騰達行,Taiwan)

細胞培養盤 (騰達行,Taiwan)

蓋玻片 (Kimble, USA)

載玻片 (Marriefeld, Germany)

冷凍管 (騰達行,Taiwan)

微量離心管 (季勗, Taiwan)

離心管 (季勗, Taiwan)

Falcon (汎泰,Taiwan)

Paraffin (購自 American national can)

透析膜 (Amersham,UK)

PD 10 (Amersham,UK)

C 試劑

Agarose (Gibco BRL,Grand Island,N.Y.,U.S.A.)

Bradford reagent (BIO-RAD, Hercules,California,USA)

BSA (Bovine serum albumin) (SIGMA, ST.Louis,MO,USA)

Bromophenol blue (USB)

DMSO (Dimethyl Sulfoxide; Sigma, USA)

DTT (1,4-Dithio-D,L-threitol; GERBU, Germany)

DMEM (Dulbeccco' s Modified Eagle' s Medium; GIBCO, USA)

Ellagic acid (Sigma, USA)

Ethanol (景明化工,Taiwan)

Ethidium bromide (Sigma, USA)

FBS (Fetal Bovine serum; GIBCO, USA)

Glycine (AppliChem, Germany)

Glycerol (Scharlau, Spain)

Hydrochloric acid (Merck, USA)

Methanol (景明化工, Taiwan)

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-terazolium bromide; 購自Sigma, USA)

MPCR kite (Maxim Biotech, USA)

Paraformaldehyde (景明化工, Taiwan)

Penicillin-Streptomycin (GIBCO, USA)

PI (Propidium iodide; Sigma, USA)

Potassium dihydrogen phosphate (Merck, USA)

Potassium chloride (Scharlau, Spain)

Protein assay-Dye reagent concentrate (Bio-Rad, USA)

RNase A (Sigma, USA)

RT kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A)

SDS (Sodium dodecyl sulfate; USB)

Sodium bicarbonate (Merck, USA)

Sodium chloride (Scharlau, Spain)

Sodium hydroxide (SHOWA, Japan)

Sodium pyruvate (GIBCO, USA)

TBA (2-Thiobarbituric acid; Sigma, USA)

TCA (Trichloroacetic acid; Sigma, USA)

Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane; Pharmacia,Sweden)

Triton X-100 (USB)

Trysin-EDTA (GIBCO, USA)

第二節、實驗方法

1、Ellagic acid 配製方法

秤取由蔬果提煉出之 Ellagic acid 粉末30.22mg，加入細胞培養等級 DMSO溶解，配製成 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、25 μ M、50 μ M、75 μ M、100 μ M等濃度備用。

2、低密度脂蛋白的分離

將抽出的血液樣品放入真空採血管中，於 37 浴水槽 1.5hr，置於 4 冰箱 1hr，離心（3000 rpm、4、15分鐘）後血清、血球分離，取上層血清 3 ml 加入溶液配製 0.9% NaCl 0.7ml 離心（95000 rpm、10、3.5hr、Acc：5、Dec：7），去除 VLDL 後直接取 KBr 粉劑 166.8mg 加入 3 ml 血清，離心（、95000 rpm、10、3.5hr、Acc：9、Dec：7）即可得到低密度脂蛋白。[24]

3、低密度脂蛋白的氧化

取 LDL 1mg/ml 加入 PBS（no EDTA）及 1mM 硫酸銅（CuSO₄）最終濃度為 10 μ M，37 水浴 24hr，加入 0.1ml EDTA 10mM（終止氧化）最終濃度為 1mM，將約 2-4ml 的 LDL 放入膜內放入裝滿 PBS（no EDTA）透析液瓶中，於 4 冰箱中 stir，透析 24hr 更換 3 次透析液

(1hr, 2hr, 2hr), 透析 24hr 後自透析膜取出 LDL(體積約增加 0.5ml) 或使用 PD10 透析 , 用 0.22 μ m 過濾所得即為氧化低密度脂蛋白 oxLDL , 經由 TBAR 測得其氧化程度[24]。

4、平滑肌細胞的培養

血管平滑細胞株[66] (購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存與研究中心 , 生資中心編號 : 60127 , 細胞株名稱 : A10) 來自胎鼠胸主動脈(the thoracic aorta of DB1X embryonic rat) , 多應用於血管平滑肌(vascular smooth muscle cells; VSMCs)實驗模型。

培養基及試劑

(A) 無血清培養基 : Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (DMEM) Powder : high glucose , L-glutamine , pyridoxine hydrochloride , 10 mg/L sodium pyruvate , 需另外加入 sodium bicarbonate 3.7g 。

(B) 胎牛血清 (Fetal bovine serum ; FBS)

血清購回後需先水浴 56 加熱 30 分鐘後使用。(一般培養使用 10% FBS、實驗進行使用 1% FBS、同步化時使用 0% FBS)。

D. HEPES Buffer Solution (1M)使用劑量 1%

E. Streptomycin/penicilline 使用劑量 1%

F. Trypsine-EDTA 0.25% Trypsin with 1mM EDTA-4Na

培養方法

將存放血管平滑肌細胞的冷凍管從液態氮中取出後插上浮板，迅速放入37℃水浴中使其快速解凍，將解凍之細胞懸浮液從冷凍管中放入10公分培養皿，並加入約10ml含10%胎牛血清之培養基，混合均勻後放入細胞培養箱(37℃、95% O₂、5% CO₂)中進行培養，每二天換一次培養基。

次培養

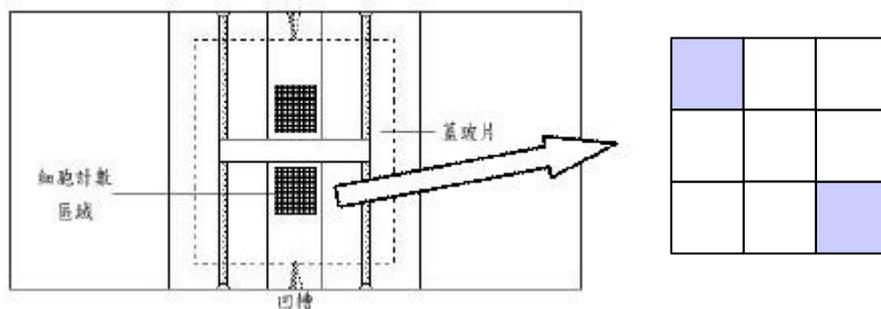
當細胞長約9分滿時，則進行分盤。首先將舊的培養廢液抽吸乾淨，加入7ml 1x PBS 緩衝液(pH:7.4)清洗一次，加入 Trypsin- EDTA 1ml incubate 2分鐘，加入 1ml 10% FBS- DMEM 2ml 中和 Trypsin-EDTA 作用,以抽吸方式將細胞沖散，將培養血液體吸換至離心管後加入 10% FBS- DMEM 共 10 ml，離心 1500 rpm，5分鐘，計算細胞數目後進行日常分盤或實驗用分盤。

冷凍細胞：使用 90% culture medium + 10% DMSO。

5、細胞數目計算

先將10公分培養皿內之培養液吸去，再以約7ml的1x PBS 緩衝液(pH=7.4)小心清洗細胞兩次後加入約1ml的1x trypsin-EDTA 置入培養箱內，待2分鐘後取出。以輕拍培養皿底部的方式將細胞完全脫離培養皿懸浮起來。加入1ml的培養液中和 trypsin-EDTA 活性，並用1ml的pipette以緩慢來回抽吸方式將細胞打散。將打散後之細胞

換到 15 ml 離心管中，並加入 10 ml 培養液稀釋混勻。如所含細胞密度過高，則算出的數目誤差較大，需再加入更多的培養液稀釋。取出 100 μ l 細胞懸浮液和 10 μ l typan-blue，在 96-well 內混合均勻，共取 2 次。分別從混合液中各取出 10 μ l 的細胞懸浮液放在細胞計數盤 (haemocytometer) 上下兩個凹槽上，利用蓋上蓋玻片時的虹吸作用將細胞均勻平均分散於細胞計數區域。在顯微鏡下計數細胞數目(細胞顏色較亮者為存活的細胞)並算出細胞計數盤內 9 大格中 2 格(左上角及右上角區域)之活細胞總數(N 值)。N 值除上 4，再乘上 1.1 (稀釋倍數) $\times 10$ (細胞懸浮液總量) $\times 10^4$ 即可得 10 ml 中的細胞總數目 (cells/10ml)。



細胞計數盤與細胞計數區域放大簡圖。

6、細胞週期同步化(synchronize)

將細胞分到實驗適合之 dish 或 plates 後(例如：6cm dish 細胞數目約 3.5×10^5 cells/ well)，以含 10% 胎牛血清的培養液培養細胞，並於放入培養箱前稍微搖晃使細胞分佈均勻。待 12-24 小時細胞適應環境

並貼覆上 plates 穩定後吸去培養廢液，再以1XPBS緩衝液（pH:7.4）2 ml/well 小心清洗1 次，最後加入2 ml/well 的0 %胎牛血清培養液，經24小時後即完成細胞同步化步驟。

7、蛋白質定量

原理：確定蛋白質的體積濃度，並使其均一化，以利實驗之進行。

蛋白質檢量線製作：

依照下列表格進行檢量線製作

組成 \ NO.	1	2	3	4	5	6
蛋白質濃度(µg/ml)	0	5	10	15	20	25
0.1mg/ml BSA (µl)	0	50	100	150	200	250
DDW(µl)	800	750	700	650	600	550
Baradford (µl)	200					
總體積 (µl)	1000					

NO. 1 為背景值

Bradford 為蛋白質染劑，有毒性，使用時需戴手套。加入染劑混合均勻後需反應 5 分鐘在測吸光值。吸光值測定時每個樣本數需 3 重複，使其數值穩定。以測定出來的標準品吸光質與蛋白質濃度畫出檢量線，並求出趨勢線方程式即 R^2 值。 R^2 值需 >0.99 以上的準確度。

使用 Excel 軟體會出蛋白質檢量線

算出趨勢線方程式，經帶入測得之吸光值(y)，則可求出蛋白質濃度(µg/ml)。

樣品蛋白質濃度測定：

取 10 μ l 的樣品與 790 μ l 的 DDW 混合，在加入 200 μ l 的 Bradford 染劑，均勻混合 5 分鐘後在 O.D 590 測定吸光值。

將樣品吸光值(y)帶入算出趨勢線方程式，則可算出樣品蛋白質濃度(x)

8、Cell count

原理

應用Trypen blue exclusion實驗計數樣品中的細胞數，因活細胞會排斥trypan blue 染劑，僅死細胞會被染成藍色，因此計數亮色的細胞數可相對得知其細胞存活率。

方法步驟

將細胞分盤至平面 24-well 培養，種植細胞數約 5×10^4 /well，以 10%FBS DMEM1ml 飼養 24 小時後，以 1x PBS (pH:7.4) 1ml 沖洗 1 次，加入 0 % FBS DMEM100ml 同步化 24 小時，以含不同濃度藥物或低密度之蛋白或氧化低密度之蛋白培養至時間點，加入 200 μ l Trypsin incubation 2 分鐘，加入 10%FBS-DMEM 800 μ l 並將細胞衝散均勻，取出 100 μ l 細胞懸浮液和 10 μ l typan-blue 在 96-well 內混合均勻，共取 2 次。分別從混合液中各取出 10 μ l 的細胞懸浮液放在細胞計數盤(haemocytometer)計數活細胞數。

9、MTT assay

原理

主要是依賴粒線體中琥珀酸去氫酶的作用將 MTT 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 的 tetrazolium 轉變為藍色產物 MTT formazan。MTT 轉變僅在活細胞中進行，並堆積在細胞內，且 formazan 形成量與細胞數目呈正比，加入 10% SDS-Hcl 溶解後，可以由波長約 590nm 知吸光測量並定量。由於細胞還原 MTT 的能力代表細胞粒線體的活性，因此可以做為細胞存活率的一個指標。【MTT 保存方法：避光，冷藏於 2-8℃。】

方法步驟

將細胞分盤至平面 96-well 培養，種植細胞數約 1×10^4 /well，以 10% FBS-DMEM 100 μ l 飼養 24 小時後，以 1x PBS (pH:7.4) 100 μ l 沖洗 1~2 次，加入 0%FBS DMEM 100 μ l 同步化 24 小時，以含不同濃度藥物的 10% FBS-DMEM 100 μ l 培養至時間點加入濃度 5 mg/ml 的 MTT 佔 DMEM 量的 1/10，培養 4 小時後再加入 100 μ l 10% SDS-Hcl (終止反應) 隔天測吸光值 OD590 nm、ref 620 nm。

MTT 溶液的配製 (避光 4℃ 儲存)

組成	最終濃度	初濃度	體積/重量
MTT	5 mg/ml	--	250 mg
PBS(pH:7.4)	--	--	50 ml
總體積			50 ml

Solubilization solution 配製 (室溫儲存)

組成	最終濃度	初濃度	體積/重量
----	------	-----	-------

SDS	10%	-	10 g
Hcl	0.01M	1M	1 ml
總體積			100 ml

10、細胞凋亡套組分析 (Annexin-V-Fluos Staining kit)

原理

早期凋亡細胞在細胞膜表面會發生改變，其中一個改變就是 phosphatidylserine (PS) 會從細胞內膜轉位置細胞外膜，而 Aexin V 是一個 Ca^{2+} -dependent phospholind-binding protein 與 phosphatidylserine 具有極高的親合力，因此可以藉由偵測 PS 的改變進而推測細胞凋亡之情形[67]。

方法步驟

首先先將藥物或氧化低密度脂蛋白處理過的細胞由保溫箱取出，接著使用 1x PBS pH：7.4 沖洗兩次加入 Trypsin-EDTA 200 μ l 放入 incubator 內 2 分鐘，以 MEDM 沖散細胞後將含細胞液體放入 15ml 離心管內離心(1500rpm, 5 分鐘), 去上清液後打散細胞並加入 1x PBS pH：7.4 1ml 離心 (1500 rpm , 5 分鐘), 去上清液後打散細胞加入 PI 及 Annexin-V 各 100 μ l, 避光室溫培養 10 15 分鐘後以流式細胞儀進行分析。

11、 TriSolution RNA 抽取

原理

使用混合 phenol guanidium thiocyanate 的 TriSolution Reagent 可從

動物組織、細胞培養將分 RNA 離出來。

材料

TriSolution(Trizol) CHCL₃(Chloroform) 2-propanol(Isopropanol)
75% ethanol (in DEPC water)、 DEPC water

Sample1 : 動物組織 (10~100 mg)

Sample2 : 細胞約 5×10^6 加入 1 ml 的 Trizol

方法步驟

取出樣品 (細胞約 5×10^6) 用 1x PBS (pH : 7.4) 清洗 2 次後加入 2 ml 1x PBS 用 Trypsi-EDTA 200 μ l , 放入保溫箱培養 1 2 分鐘 , 細胞用 1ml 10% DMEM 沖散裝於微量離心管內 , 離心 1500 rpm、 5 分鐘 , 去上清液將 pellet 彈散後加入 1x PBS 清洗 , 離心 1500 rpm、 5 分鐘 , 將 pellet 彈散後加入 1ml 的 Trizol , 置於冰上 5 分鐘 , 加入 0.4 ml CHCL₃ 搖晃均勻 , 置於冰上 15 分鐘、 4 、 離心 12000 xg 共 15 分鐘後取出微量離心管內的液體會分三層 , 取最上層的液體到另一個 1.5 ml 微量離心管加入 0.75 ml 2-propanol , 混合均勻 , 置於冰上 10 分鐘、 4 、 離心 12000 xg 共 8 分鐘去上清液加入 75% ethanol (1ml ethanol/1ml Trozol)放入離心機 12000 xg 共 5 分鐘 , 去 ethanol, 自然風乾加入 10 μ l DEPC water 放入 -80 冰箱保存。

12、反轉錄反應 - Reverse transcription

原理及目的

將所抽取的 total RNA 經反轉錄? 進行反轉錄成為 cDNA , 經反轉錄的 cDNA 較為穩定 , 易保存而且可放大 sample 數量以利實驗的進行。

方法步驟

準備 200 ul tube 加入以下溶液均勻混合

組成	體積 / 重量 (μ l)
DEPC water	8-x
10 mM MgCl ₂	1
oligodT	1
RNA	x
Total 10 μ l	

放入 Thermal-cycler 內 65 反應 5 分鐘 , 4 冷卻 1 分鐘取出 tube

加入以下溶液均勻混合

組成	體積 / 重量 (μ l)
10X RT buffer	2
25mM MgCl ₂	4
0.1M DTT	2
Rnase out	1
Total 9 μ l	

放入 Thermal-cycler 內 42 反應 2 分鐘 , 加入 Superscript II RT

(SSIIRT) 1ul 後放入 Thermal-cycler 內 42 反應 50 分鐘、70 反應

15 分鐘、4 冷卻然後加入 1ul RNase H mix , 放入 Thermal-cycler

內 37 反應 20 分鐘後 cDNA 完成 , 可冰存於 -20 或定量。

13、 DNA Condensation Examination

原理

Giemsa 為一核酸染料，當細胞凋亡時 DNA 會濃縮聚集於細胞核膜周圍、細胞核皺縮變形、而 Giemsa stain 之原理即將單一細胞固定後運用核酸染料染色，藉由光學顯微鏡觀察細胞核型態之改變進而判斷計數細胞凋亡之情形。

材料試劑

Giemsa stain 原液或稀釋 10x

2% Paraformaldehyd

0.1% Triton X-100

方法步驟

首先先將藥物或氧化低密度脂蛋白處理過的細胞由保溫箱取出，接著使用 1x PBS pH：7.4 沖洗兩次後用 2% 的 paraformaldehyde / PBS 在室溫下固定 15 20 分鐘，固定完畢的細胞使用 1x PBS pH：7.4 沖洗兩次後加入 0.1% TritonX-100 / PBS 室溫下 15 分鐘進行細胞膜打洞，接著以二次水沖洗 3 4 次後風乾，加入 Giemsa solution 震盪器上搖晃 1 小時後，以二次水清洗 3 4 次（盡量將背景洗乾淨），然後放置於光學顯微鏡 400 倍觀察其細胞核型態。

14、 Multiplex PCR (MPCR)

應用

是一個可以同時進行放大許多序列的 PCR 方法，它可同時快速且

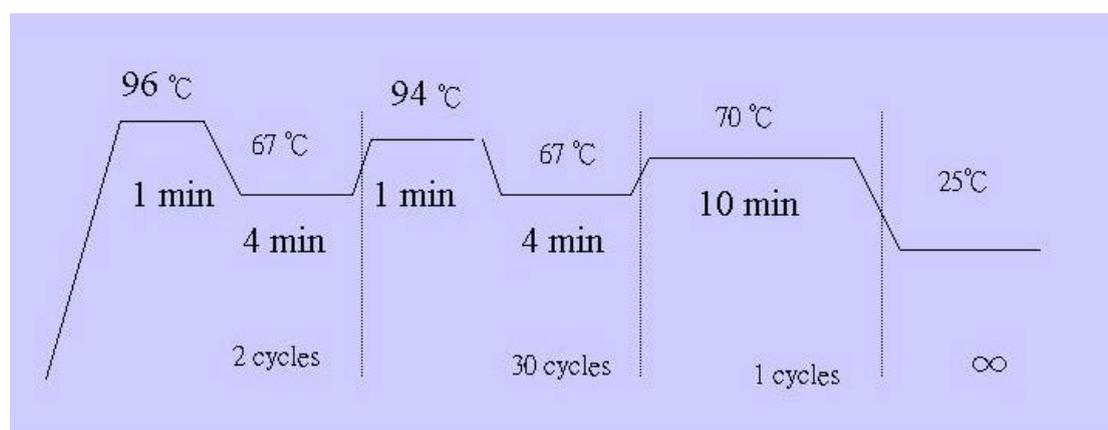
分析有興趣或許多相關的基因。

方法步驟

準備 200 μ l tube 加入以下溶液均勻混合

組成	體積 / 重量 (μ l)
2X MPCR BufferMixture	25
10X MpCR Primers	5
Taq DNA Polymerase(5u/l)	0.5
cDNA	X
MQ water	19.5-X
Total: 50 μ l	

將混合均勻之 MPCR 液體放入放入 Thermal-cycler 內設定條件：



帶膠體溫度降至 55 以下加入微量的 Ethidium bromide 並混合完全，迅速到入膠台中，並插上髮梳，靜待膠體冷卻。取 MPCR 反應產物 10 μ l，與 6X DNA dye 2 μ l 在石蠟膜上混合均勻後，緩慢注入膠體空槽中，以 100V 跑電泳 20 分鐘，待 DNA dye 至膠體 2/3 即可停止，在利用 UV 燈照相裝置拍照，觀察其產物的分子大小是否正確並分析其表現量的差異。

16、數據分析

實驗結果以 One way ANOVA 計算分析。數據結果以 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示各項值。(圖中 * 表示與 1% FBS-DMEM 相比, $P < 0.05$; # 表示與 ox-LDL 組相比, $P < 0.05$ 。)

第八章、實驗結果

第一節、Ellagic acid 對血管平滑肌細胞之影響

以MTT 及細胞計數方式評估Ellagic acid 對血管平滑肌細胞毒性之影響

平滑肌細胞在經過24 小時細胞週期同步化後，在含1 %胎牛血清的刺激下，先同步給予不同濃度的Ellagic acid，處理24 小時，加入MTT 反應4 小時後，再加入solubilization solution，經隔夜後測定吸光值，或以Trypan blue 染色後再以細胞計數器計算總細胞的數目。結果顯示(圖8)濃度時100 μM 的濃度會導致細胞的毒性，而濃度50 μM 則對細胞沒有毒性。

第二節、同步給予 ox-LDL 及 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞凋亡之影響

ox-LDL 對平滑肌細胞凋亡之影響

平滑肌細胞在經過 24 小時細胞週期同步化後，在含 1 %胎牛血清的刺激下，同步給予不同濃度(20、 60、 100、 200 和 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$) 的 ox-LDL，處理 24 小時，加入 MTT 反應 4 小時後再加入 solubilization solution，經隔夜後測定吸光值。結果顯示(圖 25)在濃度 (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 時細胞存活率與 1 % FBS-DMEM 培養的細胞存活率明顯減少至 70 %。

以細胞計數方式觀察不同時間點給予 Ellagic acid 對於抑制 ox-LDL

激血管平滑肌細胞凋亡之影響

平滑肌細胞在經過24 小時細胞週期同步化後，在含 1% 胎牛血清及 ox-LDL 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的刺激下，同步給予濃度 50 μM 的 Ellagic acid，或先給予濃度 50 μM 的 Ellagic acid 處理 24 小時再給予 ox-LDL 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激 24 小時，或先給予 ox-LDL 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激 24 小時再給予濃度 50 μM 的 Ellagic acid 24 小時，以 Trypan blue 染色後再以細胞計數器計算總細胞的數目。結果顯示(圖 26) 同步給予 ox-LDL 及 Ellagic acid 組別，比較單獨先給予 ox-LDL 或 Ellagic acid 刺激之組別有明顯的增加細胞存活率之表現。

300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氧化低密度脂蛋白同步加入 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞從活率數及之影響

平滑肌細胞在經過 24 小時細胞週期同步化後，在含 1% 胎牛血清及 ox-LDL 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的刺激下，同步給予濃度 50 μM 的 Ellagic acid 處理 24 小時，以 Trypan blue 染色後再以細胞計數器計算總細胞數目，或經由加入 MTT 反應 4 小時後再加入 solubilization solution，經隔夜後測定吸光值。結果顯示(圖 27、28、29) 與 ox-LDL (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 組別比較 同步加入 Ellagic acid 50 μM 組別有明顯的增加細胞數及存活率之表現。

300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ox-LDL 同步加入 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞凋亡之影

響

平滑肌細胞在經過24小時細胞週期同步化後，在含1%胎牛血清及ox-LDL 300 µg/ml的刺激下，同步給予濃度50 µM的Ellagic acid 處理24小時，以Annexin V及PI進行雙重染色，以流式細胞儀分析染色結果。結果顯示(圖30、表2) ox-LDL組別細胞存活率約76.3% 而染到早期凋亡指標Annexin V 為12.6%，當同步加入Ellagic acid 50 µM 組別有明顯的增加至85.7% 而早期凋亡指標Annexin V 則下降至2.1% 且統計上之意義。

300 µg/ml ox-LDL 同步加入 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞型態之影響

平滑肌細胞在經過24小時細胞週期同步化後，在含1%胎牛血清及ox-LDL 300µg/ml 的刺激下，同步給予濃度50 µM 的 Ellagic acid 處理經過24小時，以2% Paraformaldehyd 固定細胞再以 Giemsa 染色，因為當細胞凋亡時 DNA 會濃縮聚集於細胞核膜周圍、細胞核皺縮變形可藉由核酸染劑 Giemsa stain 進行染色再藉由光學顯微鏡觀察細胞核形態之改變，進而判斷計數細胞凋亡之情形。結果顯示(圖31、33) 1% FBS-DMEM 細胞凋亡比例為8.139%、ox-LDL (300 µg / ml) 組別細胞凋亡比例為36.4%且細胞核有明顯的皺縮及形態改變、同步加入 ox-LDL (300 µg / ml) 及 Ellagic acid 組別其細胞凋亡比例為

5.35% 有明顯的抑制細胞凋亡及行改變的情形。

以 MPCR 方法觀察同步給予 Ellagci acid 及 ox-LDL300 µg/ml 24 小時後對於血管平滑肌細胞 Caspase 基因表現之影響

平滑肌細胞在經過 24 小時細胞週期同步化後，在含 1% 胎牛血清及 ox-LDL 300µg/ml 的刺激下，同步給予濃度 50 µM 的 Ellagic acid 處理經過 24 小時予抽取 RNA 並將其反轉錄為 cDNA 後經 MPCR kit 觀察其 caspase 凋亡基因之表現。結果顯示 (圖 32) 與 1%FBS-DMEM 組別比較，單獨給予 ox-LDL (300µg/ml) 刺激組別會明顯的增加 Caspase 家族基因的表現，而同步加入 ox-LDL(300µg / ml) 及 Ellagic acid 組別則可明顯的抑制 Caspase 家族基因的表現與單獨給予 ox-LDL300 µg/ml 組別。

第九章 討論

本研究主要以體外 (in vitro) 實驗為主軸，模擬粥狀動脈血管疾病中血管平滑肌細胞受到氧化低密度脂蛋白刺激後所引發粥狀動脈平滑肌細胞增生與平滑肌細胞凋亡與天然蔬果中多酚類化合物 Ellagic acid 之研究探討。

Ellagic acid 對氧化低密度脂蛋白刺激平滑肌細胞凋亡的影響

本研究將 Ellagic acid 應用在粥狀動脈血管平滑肌細胞的凋亡的模型，並利用低血清的環境進行實驗，主要是少量血清可以避免血清中可能中和 Ellagic acid 之作用，無法清楚釐清 Ellagic acid 功能為何。實驗中發現 Ellagic acid 在濃度 1-40 μM 的時候，經 MTT 結果顯示，細胞的存活率高於 1% FBS-DMEM 組；而在濃度 50 μM 的濃度下則無明顯的差異，因此我們選擇 50 μM 為實驗的濃度。

在平滑肌細胞凋亡方面之實驗結果發現，血管平滑肌細胞在給與 300 $\mu\text{g/ml}$ 氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL)，處理 24 小時後，會促進細胞形態改變、細胞數減少存活率降低及凋亡基因 caspase 活化；當同步給予濃度 Ellagic acid 50 μM 則可以明顯的抑制血管平滑肌之凋亡。此結果顯示氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 引起的細胞凋亡與 caspase 家族基因具相關性；而 Ellagic acid 可以抑制 caspase 的基因表現進而抑制凋亡。

有許多證據顯示，平滑肌細胞的凋亡參與粥狀動脈硬化的疾病的進展過程[68]；凋亡的平滑肌細胞除了參與粥狀動脈斑塊的形成外，也會減少細胞外基質蛋白的分泌與合成，結果影響內膜斑塊的不穩定性，這也許就是增加了隨之而來的粥狀動脈斑塊的破裂及血栓形成的原因[69]。平滑肌細胞凋亡造成粥狀動脈硬化有許多參與因數，可能經由自由基的直接活化訊息的傳遞路徑[22, 40]、或是經由 oxLDL 上脂質氧化代謝產物如：Lysophosphatidylcholine、2,4-decadienal、7-ketocholesterol、Oxysterols[21, 70]所引起的細胞毒性，進而調控凋亡相關基因，導致細胞凋亡程式進行。細胞凋亡的程式進行可藉由外在途徑，例如：Fas/Fas ligand、死亡接受器；或內在途徑，例如，Bax/Bcl-2 粒線體釋放出 cytochrome C 等調控，最後皆會活化 caspase 3 表現進行細胞凋亡。血管平滑肌細胞凋亡參與粥狀動脈硬化行程過程即包括此二條途徑。文獻指出 Shear stress 引起血管平滑肌細胞凋亡是經由 Fas/Fas ligand 途徑[71]；Chae 等人也在 2004 年研究報告指出，Nitric oxide 也會引起大鼠血管平滑肌細胞進行凋亡，而這個機制是經由短暫的 cytochrome C，活化 caspase-3 及 Bax/Bcl-2 的表現所引起的[72]。

本論文探討濃度 300 μ g/ml 的 ox-LDL，可以明顯的經由 MTT 細胞存活率下降、細胞數減少、細胞形態改變(包括細胞皺縮、細胞質

濃縮、細胞核型態改變)，進而判斷平滑肌細胞凋亡。且更進一步確認，細胞死亡不是 necrosis 所造成，而是經由凋亡程式的啟動。因此使用流式細胞儀，偵測細胞凋亡早期變化，？細胞膜上磷脂質絲氨酸（Phosphatidyl Serine；PS）的外露；健康的細胞膜具不對稱性，磷脂質絲氨酸只存在於細胞內膜層而不外露，此不對稱性需借助 ATP 能量維持。而凋亡細胞早期變化是停止產能之作用，故而無法維持不對稱性使 PS 由內膜轉位至細胞外膜。因此可藉由此確認 ox-LDL 可驅使平滑肌細胞凋亡程式進行。更進一步探究凋亡 caspase 基因在 ox-LDL 所引起的凋亡中所扮演的角色。本研究使用 MPCR 方法進行 caspase 家族相關基因的探討；Caspase (aspartate-specific cystein protease) 家族包括 caspase 1 到 caspase 13，在 apoptosis 一連串的過程中，扮演起始及終結者之角色。所謂 caspase 起始者，是 caspase 家族成員中的 caspase 2、8、9、10；所扮演的角色，是將下游的 caspase 轉為活化型，並具有蛋白質分解之能力的 caspase 3、6、7，刺激 apoptosis 進行[62]。結果顯示氧化低密度脂蛋白會明顯的增加 caspase 2、3、6、9、8 基因的表現，而這一系列的實驗結果與先前的研究結果[22]相同也更確認氧化低密度脂與平滑肌細胞凋亡有相關性。

文獻指出自由基亦是導致平滑肌細胞凋亡的主要原因[22]。本研究將 Ellagic acid 應用在粥狀動脈血管平滑肌細胞的凋亡的模型。與

血管平滑肌細胞增生相同濃度的 Ellagic acid 50 μM 定為實驗的濃度，結果顯示濃度 50 μM 的 Ellagic acid 的確可以明顯的抑制 ox-LDL 所引起的細胞數減少，及存活率降低的情形；流式細胞儀分析結果顯示 50 μM 的 Ellagic acid 可減少細胞凋亡的早期現象，PS 由內膜轉位至細胞外膜的情形。Ellagic acid 也可以明顯抑制氧化低密度脂 (ox-LDL) 所引起的細胞型態的改變及 caspase 凋亡基因表現。另一方面文獻也指出 cytochrome P450 會促進 LDL 氧化[48]，Ellagic acid 則可抑制 cytochrome P450 的產生，進而達到抑制脂質的氧化。2000 年亦有文獻指出，內皮細胞的 ox-LDL receptor-1 (LOX-1) 與 ox-LDL 結合後會產生 ROS，並且隨著 ox-LDL 濃度增加，ROS 的量亦會隨之增加[49]。血管平滑肌細胞亦被發現有 LOX-1，而 ox-LDL 脂質氧化產物 lysophosphatidylcholine (LPC) 會增加血管平滑肌細胞 LOX-1 mRNA 的表現[50]。因此 Ellagic acid 的抗氧化能力，可能是經由直接清除 ox-LDL 所引起的活性氧 (ROS)，抑制血管平滑肌細胞的凋亡；並可藉由降低 cytochrome P450 的產生，抑制更進一步的脂質氧化及自由基反應；另外也可藉由直接減少 caspase 基因的表現，達到抑制平滑肌細胞凋亡。

Ellagic acid 抗氧化功能對平滑肌細胞凋亡討論

在本論文研究實驗中可以發現，ox-LDL 在不同濃度處理 24 小時

後會引起血管平滑肌細胞表現出不同的結果，這也說明瞭 ox-LDL 在粥狀動脈血管疾病中所扮演的複雜角色。推測這個現象的原因，可能是因為 ox-LDL 在不同濃度所產生自由基的總量不同，引起不同的細胞外訊息傳遞路徑，因而導致增生與凋亡兩種不同結果；另一方面也可能是 ox-LDL 脂質氧化代謝產物不同，或代謝產物總量的增加，引起細胞毒性而導致不同的結果。

抗氧化劑具有保護身體，防止自由基形成、去除體內所產生的自由基。這些自由基是由氧氣和體內的各種物質反應而產生，會造成一連串有害的連鎖反應，而對體內組織造成各種傷害。抗氧化劑，例如：脂溶性維他命 E 及水溶性維他命 C，雖然抗氧化機制不同，但是對於降低氧化傷害[51-53]及抑制血液中膽固醇含量都有顯著的成效[54]，並且可以降低並預防心血管疾病及粥狀動脈硬化疾病進展[55]。而本實驗運用不同時間點的方式，探討 Ellagic acid 抗氧化的機制之起始為何，發現同步給予 Ellagic acid 和 ox-LDL 與先單獨給予 Ellagic acid 24 小時，均可以明顯的抑制平滑肌細胞的凋亡；然而先單獨給予 ox-LDL 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 24 小時，則幾乎沒有抑制細胞凋亡情形。原因可能是 ox-LDL 本身就是一自由基，對於細胞除了直接造成細胞膜上多元不飽和脂肪酸氧化，亦可引細胞內 ROS 的產生進而產生，進行雙重影響。單獨給予 ox-LDL 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 24 小時可能已經對血管平滑肌細

胞造成不可逆之傷害，所以當加入 Ellagic acid 24 小時後則沒有顯著的抑制凋亡效果，另外同步給予 ox-LDL 及 EA 組，其抑制凋亡情形較先經由 Ellagic acid 處理 24 小時後再加入 ox-LDL 好。因此推論 Ellagic acid 在抑制高濃度 ox-LDL 引起的細胞凋亡，主要可能經由捕捉細胞內 ROS，或是在細胞外中和 ox-LDL，進而抑制細胞凋亡。

實驗所使用的 Ellagic acid，在 50 μ M 的濃度下，對於 ox-LDL 引發的細胞凋亡，有明顯抑制細胞凋亡的結果。Ellagic acid 是一種存在於蔬果中的多酚類化合物，其本身具有抗氧化之功能。其可能在自由基造成細胞損傷前，即扮演清除自由基之功能，保護正常細胞免於在不正常環境刺激下受到傷害。雖然文獻[22]有指出 ox-LDL 會增加 ROS 的生成，進而影響平滑肌細胞的凋亡，但本實驗卻欠缺 ox-LDL 導致自由基增加，和凋亡蛋白質表現的直接證據，這是論文不足的地方，因此未來實驗的方向可朝向 ox-LDL 與自由基的相關實驗及 Ellagic acid 在抗氧化中所扮演的角色。

粥狀動脈血管疾病是高死亡率中現代文明病的一種，許多研究學者致力於研究其治病機轉，尋找可以預防或降低此疾病的發生率。本實驗使用了蔬果內具抗氧化功能的多酚類化合物進行實驗。結果顯示 Ellagic acid 對粥狀動脈中，平滑肌細胞凋亡具保護作用。這也是本研究的主旨，對於粥狀動脈疾病的進展，希望可以藉由日常生活中的蔬

果補充，而達到預防或降低的效果，更可以減少因服用化學合成藥物副作用所造成的更進一步的傷害。

第十章、結論

存在於自然界的多酚類化合物 Ellagic acid，可以藉其抗氧化功能，達到抑制平滑肌細胞凋亡的情形。這個結果可能是經由捕捉 ROS，避免細胞外的訊息傳遞路徑的活化，或直接抑制細胞凋亡程式的啟動，而達到保護平滑肌細胞（圖 7），而 Ellagic acid 存在於自然界蔬果中，或許可以藉由補充蔬果而直接預防或治療粥狀動脈硬化血管疾病。

第十一章、參考文獻

1. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. 407(6801): p. 233-41.
2. Carpenter, K.L., et al., *Lipids and oxidised lipids in human atherosclerotic lesions at different stages of development*. Biochim Biophys Acta, 1995. 1256(2): p. 141-50.
3. Keaney, J.F., Jr., *Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction*. Mol Aspects Med, 2000. 21(4-5): p. 99-166.
4. Shimokawa, H., *Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis*. J Mol Cell Cardiol, 1999. 31(1): p. 23-37.
5. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. 420(6917): p. 868-74.
6. Xu, W., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein is required for macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein by 12/15-lipoxygenase*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. 276: p. 36454-36459.
7. Berliner, J.A., et al., *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics*. Circulation, 1995. 91(9): p. 2488-96.
8. Wang, Z., M.R. Castresana, and W.H. Newman, *Reactive oxygen and NF-kappaB in VEGF-induced migration of human vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 285(3): p. 669-74.
9. Hegyi, L., et al., *Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis*. J Pathol, 1996. 180(4): p. 423-9.
10. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 1993. 49(3): p. 481-93.
11. Scandalios, J.G., *Oxygen Stress and Superoxide Dismutases*. Plant Physiol, 1993. 101(1): p. 7-12.
12. Grundy, S.M., *The role of cholesterol management in coronary disease risk reduction in elderly patients*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1998. 27(3): p. 655-75, x.
13. Jessup, W., et al., *The role of oxidative modification and antioxidants in LDL metabolism and atherosclerosis*. Adv Exp Med Biol, 1990. 264: p. 139-42.
14. Witztum, J.L., *The oxidation hypothesis of atherosclerosis*. Lancet, 1994. 344(8925): p. 793-5.
15. Nakao, J., et al., *Triiodothyronine stimulates prostacyclin production by rat aortic smooth muscle cells in culture*. Atherosclerosis, 1981. 39(4): p. 439-45.

16. Rosenfeld, M.E., et al., *Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits*. *Arteriosclerosis*, 1990. 10(3): p. 336-49.
17. Cominacini, L., et al., *The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276: p. 13750-13755.
18. Li, P.F., R. Dietz, and R. von Harsdorf, *Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells*. *Circulation*, 1997. 96(10): p. 3602-9.
19. Negre-Salvayre, A., et al., *Oxidized LDL and 4-hydroxynonenal modulate tyrosine kinase receptor activity*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2003. 24(4-5): p. 251-61.
20. Laranjinha, J.A., L.M. Almeida, and V.M. Madeira, *Lipid peroxidation and its inhibition in low density lipoproteins: quenching of cis-parinaric acid fluorescence*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992. 297(1): p. 147-54.
21. Cabre, A., et al., *Cytotoxic effects of the lipid peroxidation product 2,4-decadienal in vascular smooth muscle cells*. *Arteriosclerosis*, 2003. 169(2): p. 245-50.
22. Hsieh, C.C., et al., *Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells*. *Cardiovascular Research*, 2001. 49(1): p. 135-45.
23. Yang, C.M., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase by oxidized low-density lipoprotein in canine cultured vascular smooth muscle cells*. *Cell Signaling*, 2000. 12(4): p. 205-14.
24. Locher, R., et al., *Native LDL induces proliferation of human vascular smooth muscle cells via redox-mediated activation of ERK 1/2 mitogen-activated protein kinases*. *Hypertension*, 2002. 39(2 Pt 2): p. 645-50.
25. Chien, M.W., et al., *OxLDL induces mitogen-activated protein kinase activation mediated via PI3-kinase/Akt in vascular smooth muscle cells*. *Journal of Lipid Research*, 2003. 44(9): p. 1667-75.
26. Nakagami, H., et al., *Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells*. *Diabetes*, 2001. 50(6): p. 1472-81.
27. Goetze, S., et al., *TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent*. *Hypertension*, 1999. 33(1 Pt 2): p. 183-9.
28. Lew, D.J. and S. Kornbluth, *Regulatory roles of cyclin dependent kinase*

- phosphorylation in cell cycle control. Curr Opin Cell Biol, 1996. 8(6): p. 795-804.*
29. Chai, Y.C., et al., *Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2. J Biol Chem, 1996. 271(30): p. 17791-7.*
 30. Chai, Y.C., et al., *Smooth muscle cell proliferation induced by oxidized LDL-borne lysophosphatidylcholine. Evidence for FGF-2 release from cells not extracellular matrix. Vascul Pharmacol, 2002. 38(4): p. 229-37.*
 31. Anderson, K.J., et al., *Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. J Nutr, 2001. 131(11): p. 2837-42.*
 32. Gopalakrishna, R. and U. Gundimeda, *Antioxidant regulation of protein kinase C in cancer prevention. J Nutr, 2002. 132(12): p. 3819S-3823S.*
 33. Kresty, L.A., et al., *Chemoprevention of esophageal tumorigenesis by dietary administration of lyophilized black raspberries. Cancer Res, 2001. 61(16): p. 6112-9.*
 34. Casto, B.C., et al., *Chemoprevention of oral cancer by black raspberries. Anticancer Res, 2002. 22(6C): p. 4005-15.*
 35. Narayanan, B.A., et al., *p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. Cancer Lett, 1999. 136(2): p. 215-21.*
 36. Casto, B.C., et al., *Chemoprevention of oral cancer by black raspberries. Anticancer Res, 2002. 22(6C): p. 4005-15.*
 37. Majid, S., et al., *Influence of ellagic acid on antioxidant defense system and lipid peroxidation in mice. Biochem Pharmacol, 1991. 42(7): p. 1441-5.*
 38. Hassoun, E.A., et al., *Modulation of TCDD-induced fetotoxicity and oxidative stress in embryonic and placental tissues of C57BL/6J mice by vitamin E succinate and ellagic acid. Toxicology, 1997. 124(1): p. 27-37.*
 39. Priyadarsini, K.I., et al., *Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. J Agric Food Chem, 2002. 50(7): p. 2200-6.*
 40. Jing, Q., et al., *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by oxidized LDL in vascular smooth muscle cells: mediation via pertussis toxin-sensitive G proteins and association with oxidized LDL-induced cytotoxicity. Circ Res, 1999. 84(7): p. 831-9.*
 41. Chapman, B., et al., *Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol., 2000. 278: p. 748-754.*
 42. Schwartz, S.M., M.A. Reidy, and E.R. O'Brien, *Assessment of factors*

- important in atherosclerotic occlusion and restenosis. Thromb Haemost*, 1995. 74(1): p. 541-51.
43. Campbell, J.H. and G.R. Campbell, *The role of smooth muscle cells in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol*, 1994. 5(5): p. 323-30.
 44. Shen, C.M., et al., *Stimulation of smooth muscle cell proliferation by ox-LDL- and acetyl LDL-induced macrophage-derived foam cells. Life Sci*, 2001. 70(4): p. 443-52.
 45. Wang, Z., M.R. Castresana, and W.H. Newman, *Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells. J Mol Cell Cardiol*, 2004. 36(1): p. 49-56.
 46. Prosperi, E., *Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. Prog Cell Cycle Res*, 1997. 3: p. 193-210.
 47. Jing, Q., et al., *Lysophosphatidylcholine activates p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in monocytic THP-1 cells, but only p38 activation is involved in its stimulated chemotaxis. Circ Res*, 2000. 87(1): p. 52-9.
 48. Aviram, M., U.M. Kent, and P.F. Hollenberg, *Microsomal cytochromes P450 catalyze the oxidation of low density lipoprotein. Atherosclerosis*, 1999. 143(2): p. 253-60.
 49. Luciano, C., et al., *Oxidized Low Density Lipoprotein (ox-LDL) Binding to ox-LDL Receptor-1 in Endothelial Cells Induces the Activation of NF-kB through an Increased Production of Intracellular Reactive Oxygen Species. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2000. 275: p. 2633-12638.
 50. Aoyama, T., et al., *LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells. FEBS Lett*, 2000. 467(2-3): p. 217-20.
 51. Cozzi, R., et al., *Ascorbic acid and b-carotene as modulators of oxidative damage. Carcinogenesis*, 1997. 18 no.1: p. 223-228.
 52. Niki, E., et al., *Inhibition of Oxidation of Methyl Linoleate in Solution by Vitamin E and Vitamin C. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 1984. 259: p. 4177-4182.
 53. Chen, X., et al., *Antioxidant Effects of Vitamins C and E Are Associated With Altered Activation of Vascular NADPH Oxidase and Superoxide Dismutase in Stroke-Prone SHR. Hypertension*, 2001. 38[part 2]: p. 606-611.
 54. Schwenke, D. and S. Behr, *Vitamin E Combined With Selenium Inhibits*

- Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Rabbits Independently of Effects on Plasma Cholesterol Concentrations. Circ Res., 1998. 83: p. 366-377.*
55. Salonen, R., K. Nyyssonen, and J. Kaikkonen, *Six-Year Effect of Combined Vitamin C and E Supplementation on Atherosclerotic Progression. Circulation., 2003. 107: p. 947-953.*
 56. CHAI, Y.-C., D.G. BINION, and G.M. CHISOLM, *Relationship of molecular structure to the mechanism of lysophospholipid-induced smooth muscle cell proliferation. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. 279: p. 1830–1838.*
 57. Steller, H., *Mechanisms and genes of cellular suicide. Science, 1995. 267(5203): p. 1445-9.*
 58. Gallaher, B.W., et al., *Apoptosis: live or die--hard work either way! Horm Metab Res, 2001. 33(9): p. 511-9.*
 59. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr Opin Cell Biol, 1999. 11(2): p. 255-60.*
 60. Kirsch, D.G., A. Doseff, and B.N. Chau, *Caspase-3-dependent Cleavage of Bcl-2 Promotes Release of Cytochrome c. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1999. 274, No. 30(Issue of July 23): p. 21155–21161.*
 61. Shugo Ueda, et al., *Redox Regulation of Caspase-3(-like) Protease Activity: Regulatory Roles of Thioredoxin and Cytochrome c. The Journal of Immunology, 1998. 161: p. 6689–6695.*
 62. Wolf, B.B. and D.R. Green, *Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. J Biol Chem, 1999. 274(29): p. 20049-52.*
 63. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J, 1997. 326 (Pt 1): p. 1-16.*
 64. Lei, Z.B., et al., *OxLDL upregulates CXCR2 expression in monocytes via scavenger receptors and activation of p38 mitogen-activated protein kinase. Cardiovasc Res, 2002. 53(2): p. 524-32.*
 65. Newman, W.H., et al., *A reactive oxygen-generating system activates nuclear factor-kappaB and releases tumor necrosis factor-alpha in coronary smooth muscle cells. J Surg Res, 1999. 85(1): p. 142-7.*
 66. Watanabe, T., et al., *Lysophosphatidylcholine is a major contributor to the synergistic effect of mildly oxidized low-density lipoprotein with endothelin-1 on vascular smooth muscle cell proliferation. J Cardiovasc Pharmacol, 2002. 39(3): p. 449-59.*
 67. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by*

- macrophages*. *J Immunol*, 1992. 148(7): p. 2207-16.
68. Isner, J.M., et al., *Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis*. *Circulation*, 1995. 91(11): p. 2703-11.
69. Davies, M.J., *Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis*. *The Paul Dudley White Lecture 1995*. *Circulation*, 1996. 94(8): p. 2013-20.
70. Hsieh, C.C., et al., *Lysophosphatidylcholine induces apoptotic and non-apoptotic death in vascular smooth muscle cells: in comparison with oxidized LDL*. *Atherosclerosis*, 2000. 151(2): p. 481-91.
71. Apenberg, S., M.A. Freyberg, and P. Friedl, *Shear stress induces apoptosis in vascular smooth muscle cells via an autocrine Fas/FasL pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 310(2): p. 355-9.
72. Chae, I.H., et al., *Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells*. *Clin Chim Acta*, 2004. 341(1-2): p. 83-91.

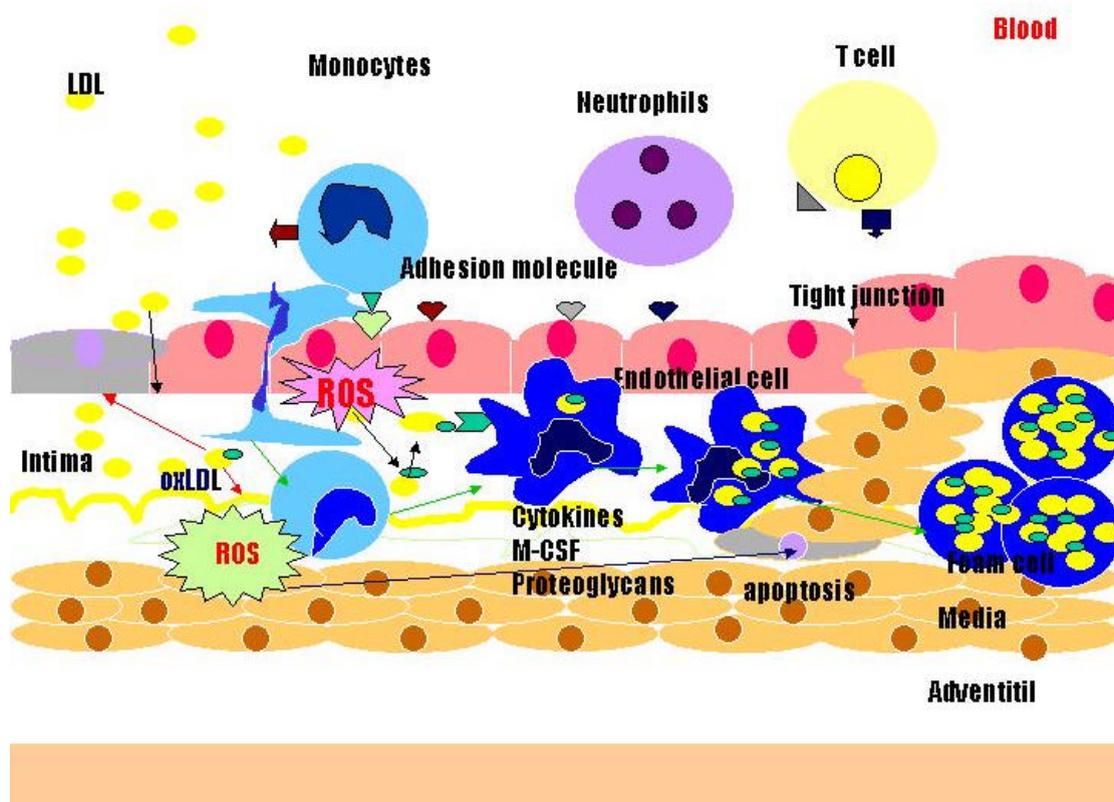


圖 1、粥狀動脈硬化治病機轉

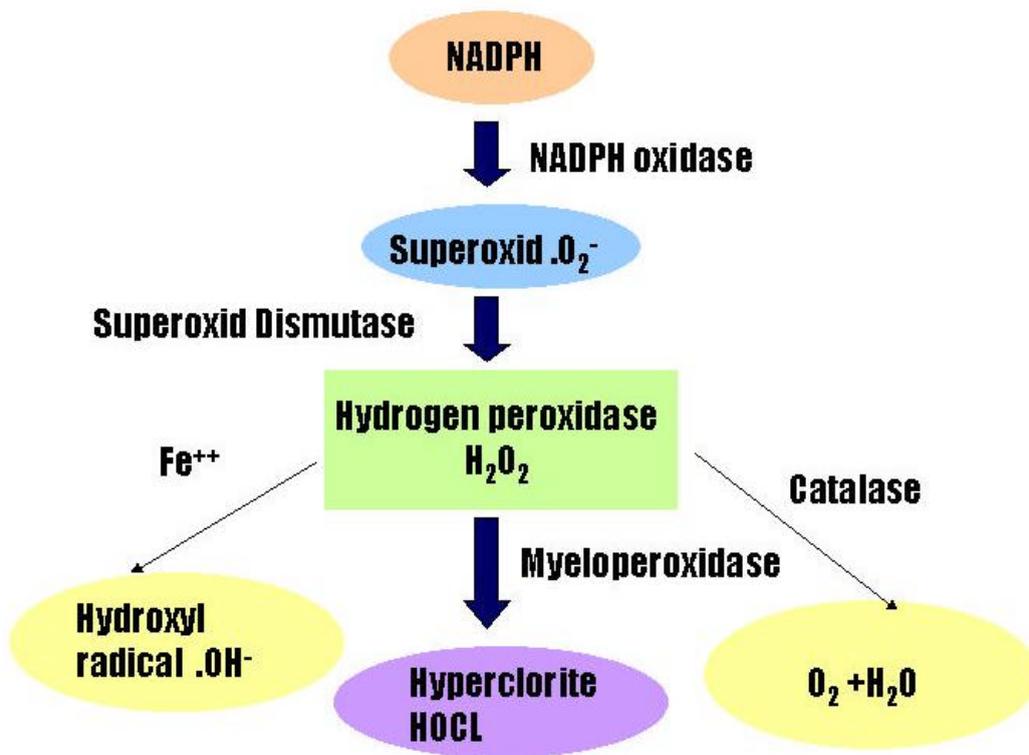


圖 2、自由基形成機制圖

MAPK signaling pathway

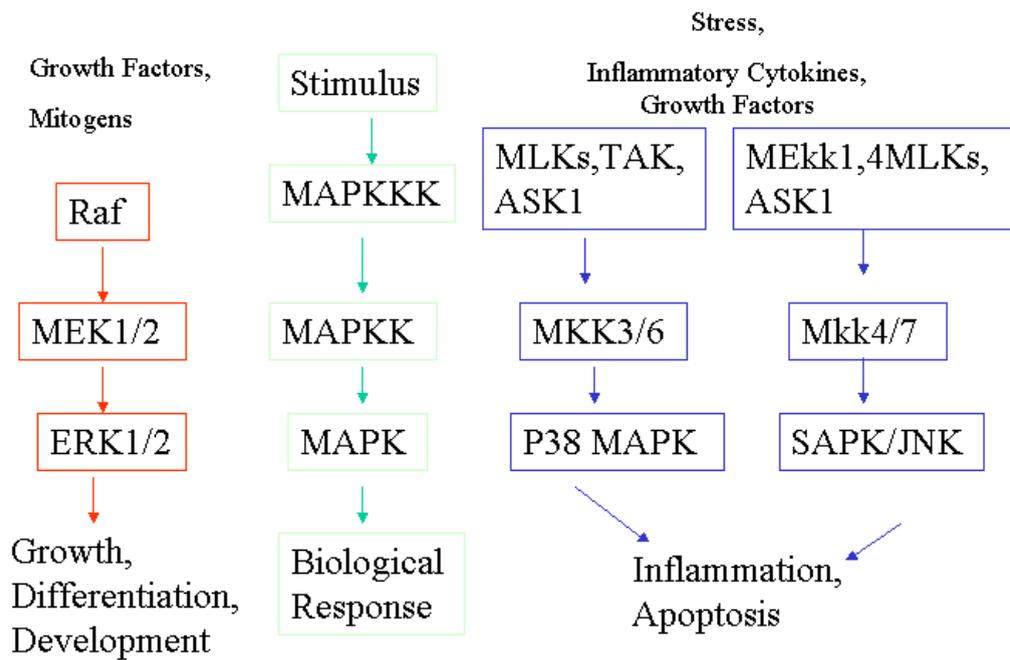


圖 3、MAPK 訊息傳遞途徑

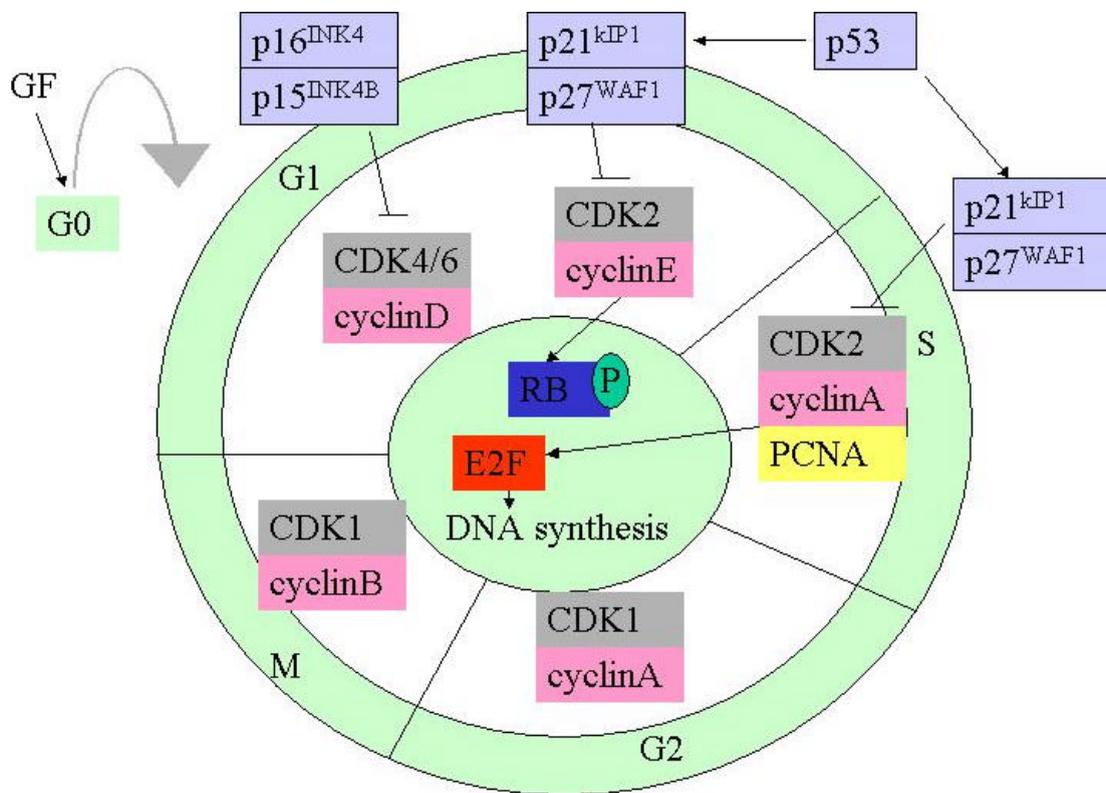


圖 4、細胞週期及其控制蛋白(cell cycle and control protein)

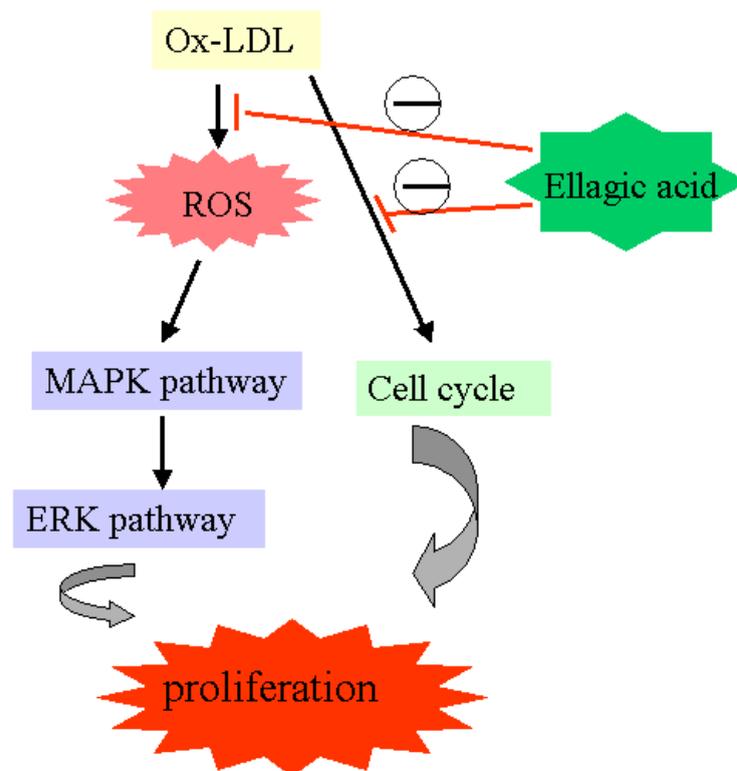


圖 5、Ellagic acid 抑制平滑肌細胞增生可能機制

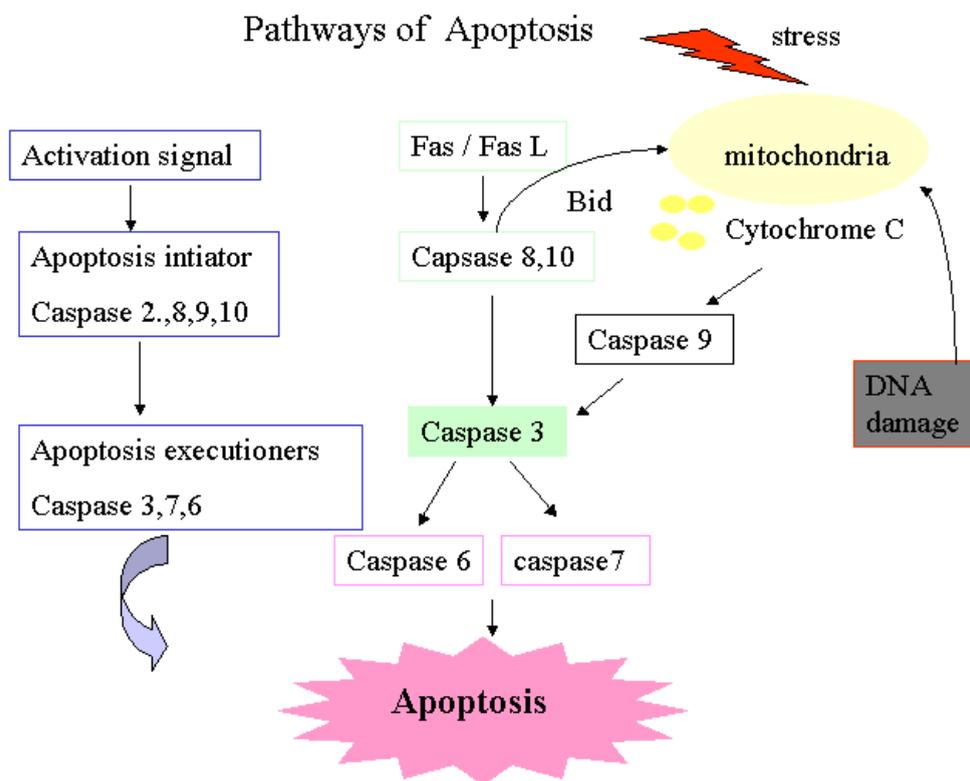


圖 6、Pathways of Apoposis

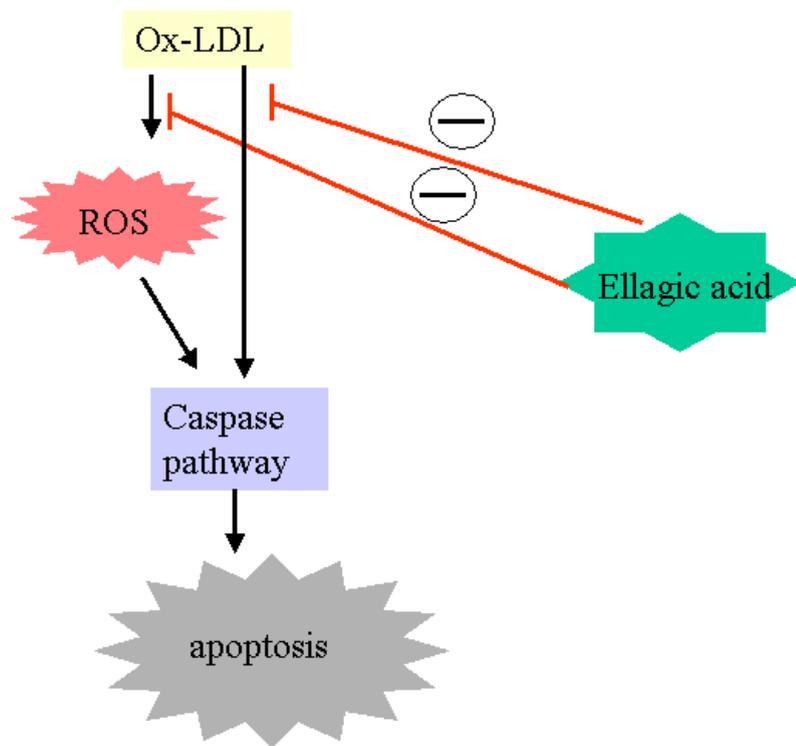


圖 7、Ellagic acid 抑制血管平滑肌細胞凋亡可能機制

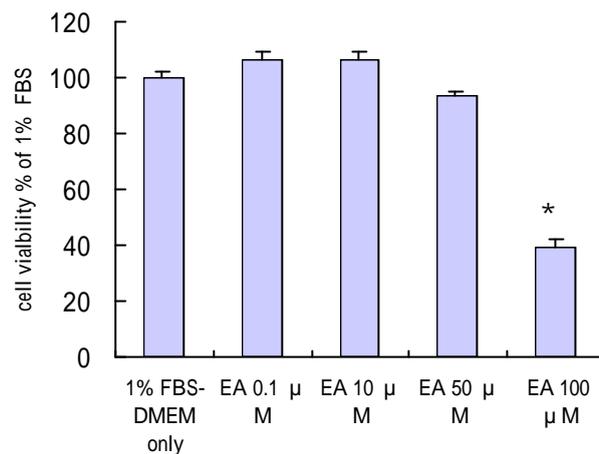


圖 8、以 MTT 評估 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞毒性之影響

* 與 1% FBS-DMEM 比較有顯著差異 $P < 0.05$

Fig.8 Cytotoxic effect of Ellagic acid on VSMCs with MTT test. VSMCs were treated with increasing concentrations (0.1–100 μM) of Ellagic acid for 24 h in the 1% FBS-DMEM. Results were from three experiments each with triplicate determinations.

* : compared with control group (1% FBS-DMEM) ; $P < 0.05$

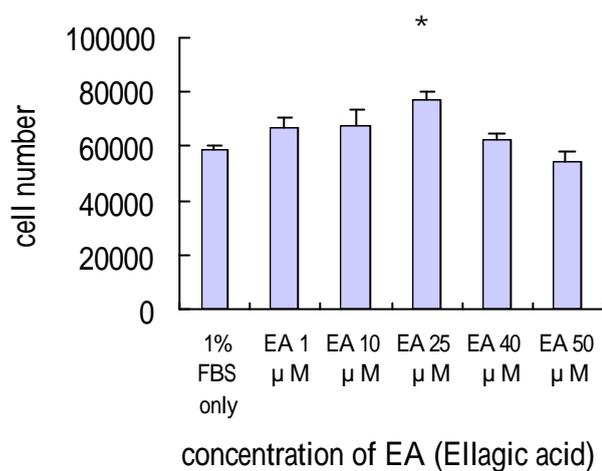


圖 9、以細胞計數方式評估 Ellagic acid 對血管平滑肌細胞毒性之影響

* 與 1 % FBS-DMEM 比較有顯著差異 $P < 0.05$

Fig.9 Cytotoxic effect of Ellagic acid on VSMCs with trypan blue exclusion test. VSMCs were treated with increasing concentrations (1 to 50 μM) of Ellagic acid for 24 h in the 1 % FBS-DMEM.

* : compared with control group (1 % FBS-DMEM) ; $P < 0.05$

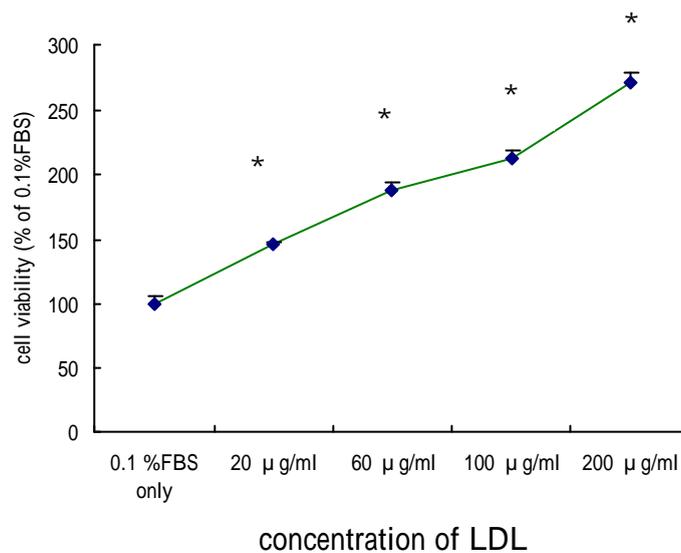


圖 10、以 MTT 方式評估低密度之蛋白刺激平滑肌細胞？生之影響

Fig.10 VSMCs proliferation stimulated by LDL by MTT test. VSMCs were treated with increasing concentrations (20–200 μg/ml) of LDL for 24 h in the 0.1 % FBS-DMEM. Results were from three experiments each with triplicate determinations.

* : compared with control group (1 % FBS-DMEM) ; $P < 0.05$

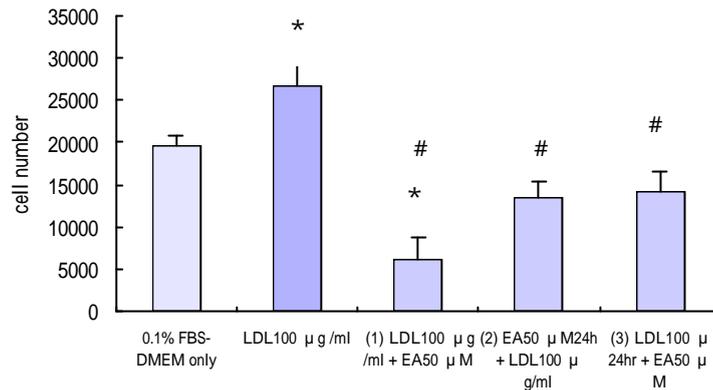


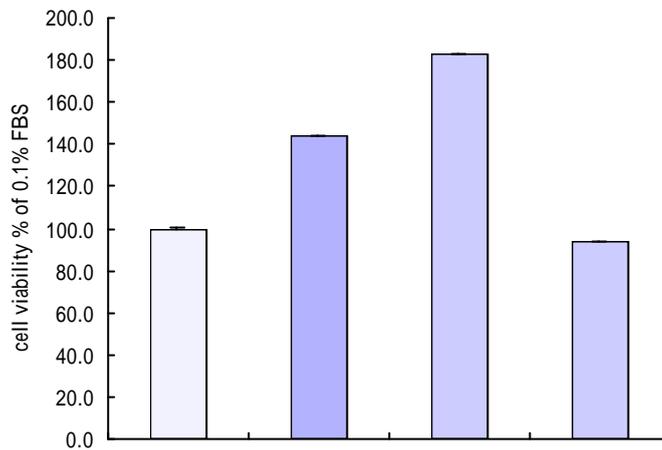
圖 11、以細胞計數方式觀察不同時間點給予 Ellagic acid 對於抑制低密度脂蛋白刺激血管平滑肌細胞增生之影響

Fig. 11 VSMCs proliferation induced by LDL inhibited by Ellagic acid . VSMCs incubated LDL 100 $\mu\text{g/ml}$ and at different time point : 1) treatment with LDL 100 $\mu\text{g/ml}$ and Ellagic acid 50 μM at same time for 24hs 2) pretreatment with Ellagic acid 50 μM for 24hs before adding LDL 100 $\mu\text{g/ml}$ 3) treatment with LDL 100 $\mu\text{g/ml}$ for 24hs then adding Ellagic acid 50 μM .

All cells were culture in the 0.1% FBS-DMEM.

* : compared with control group (0.1% FBS-DMEM) ; $P < 0.05$

: compared with LDL group ; $P < 0.05$



0.1% FBS	+	-	+	+
10% FBS	-	+	-	-
LDL 100 µg/ml	-	-	+	+
EA 50 µM	-	-	-	+

圖 12、以 MTT 方式評估 Ellagic acid 抑制低密度之蛋白刺激平滑肌細胞？生之影響

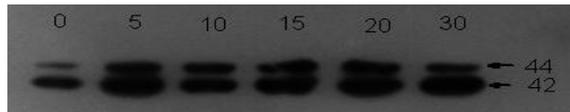
Fig.12 VSMCs proliferation stimulated by LDL inhibited by Ellagic acid . VSMCs incubated LDL 100 µg/ml with Ellagic acid 50 µM for 24h in the 0.1 % FBS-DMEM. control (0.1 % FBS-DMEM) .

* : compared with control group (1 % FBS-DMEM) ; P< 0.05

: compared with LDL group ; P< 0.05

pErK 1/2

(A)



(B)

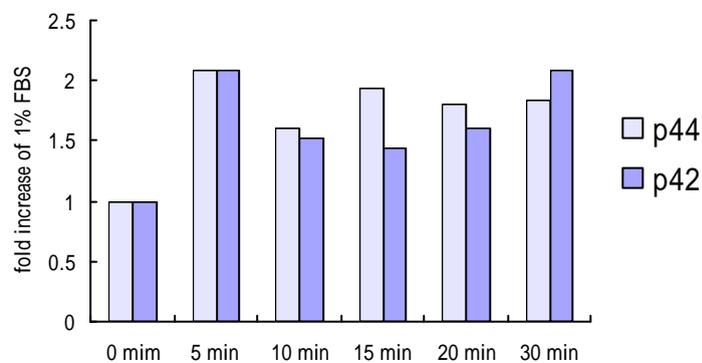


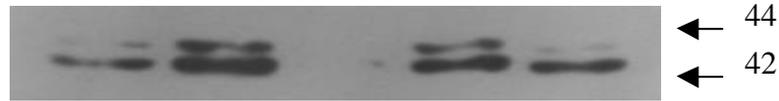
圖 13、以西方墨點轉漬法觀察低密度脂蛋白對血管平滑肌細胞立即性早磷酸化 ErK 1/2 蛋白之影響

Fig.13 LDL stimulated ErK 1/2 phosphorylation in VSMCs.

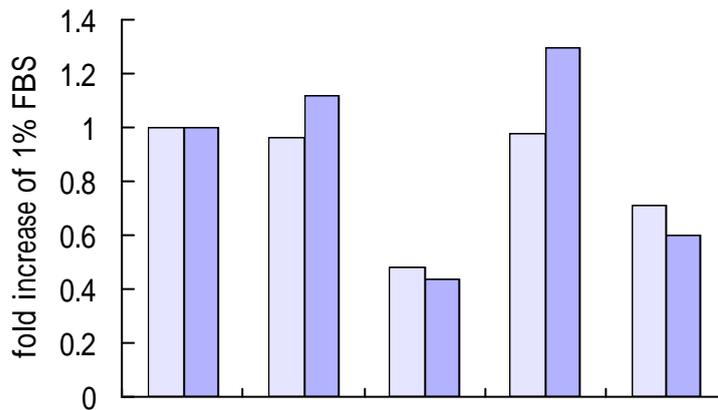
Time-dependence of LDL stimulated ErK 1/2 phosphorylation , cell were grown to confluence, made quiescent by serum-deprived for 24 h and incubated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LDL for various times (0 min to 30 min). (A) Western blot of pERK 1/2 (B) Quantification of expression by AlphamagerTM 2200.

pErK 1/2

(A)



(B)



0.1% FBS	+	-	+	+	+
10% FBS	-	+	-	-	-
LDL 100 µg/ml	-	-	-	+	+
EA 50 µM	-	-	+	-	+

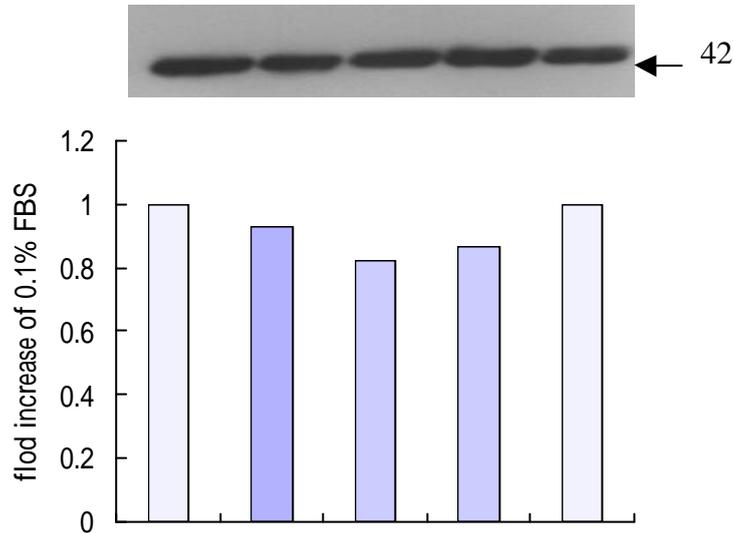
圖 14、以西方墨點轉漬法觀察 Ellagic acid 抑制低密度脂蛋白刺激血管平滑肌細胞立即性早期磷酸化 ErK 1/2 蛋白之影響

Fig.14 Effects of Ellagic acid 50 µM on ErK phosphorylation stimulated by LDL . VSMCs were incubated with 100 µg /ml LDL with or without EA for 24 h. After incubation, the cell lysates were subjected to 10 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. (A) Western blot of pErK 1/2 . (B) Quantification of expression by AlphamagerTM 2200.

ErK

(A)

(B)



0.1% FBS	+	-	+	+	+
10% FBS	-	+	-	-	-
LDL 100 μ g/ml	-	-	-	+	+
EA 50 μ M	-	-	+	-	+

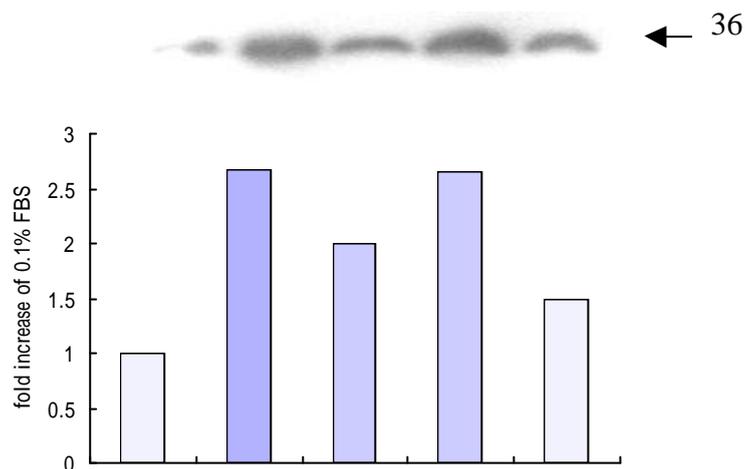
圖 15、以西方墨點轉漬法觀察 Ellagic acid 抑制低密度脂蛋白刺激血管平滑肌細胞 ErK 1/2 蛋白之影響

Fig.15 Effects of Ellagic acid 50 μ M on ErK stimulated by LDL . VSMCs were incubated with 100 μ g/ml LDL with or without Ellagic acid for 24 h. After incubation, the cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. (A)Western blot of ErK 1/2 (B) Quantification of expression by AlphamagerTM 2200.

PCNA

(A)

(B)



0.1% FBS	+	-	+	+	+
10% FBS	-	+	-	-	-
LDL 100 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	+	+
EA 50 μM	-	-	+	-	+

圖 16、以西方墨點轉漬法觀察 Ellagic acid 抑制低密度脂蛋白刺激血管平滑肌細胞 PCNA 蛋白之表現

Fig.16 Effects of Ellagic acid 50 μM on PCNA stimulated by LDL . VSMCs were incubated with 100 $\mu\text{g/ml}$ LDL with or without Ellagic acid for 24 h. After incubation, the cell lysates were subjected to 10 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. (A)Western blot of PCNA . (B) Quantification of expression by AlphamagerTM 2200.

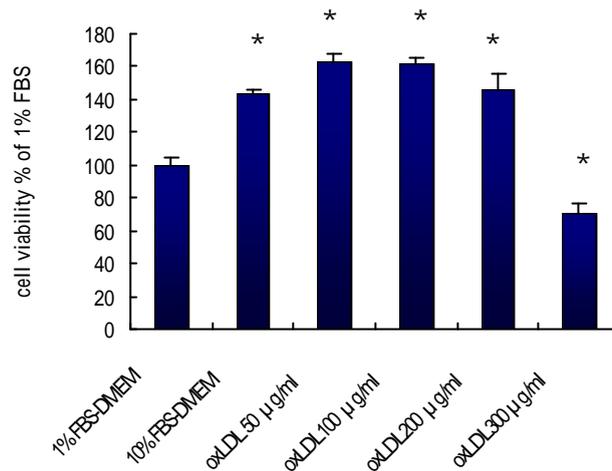
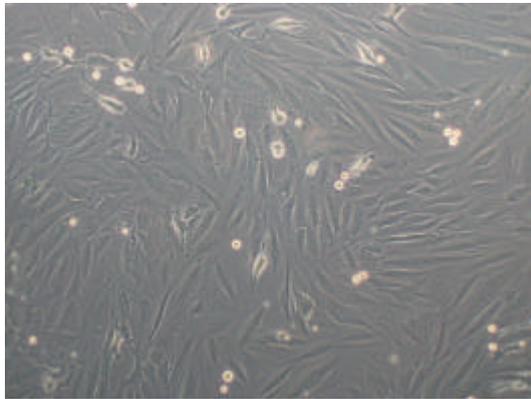


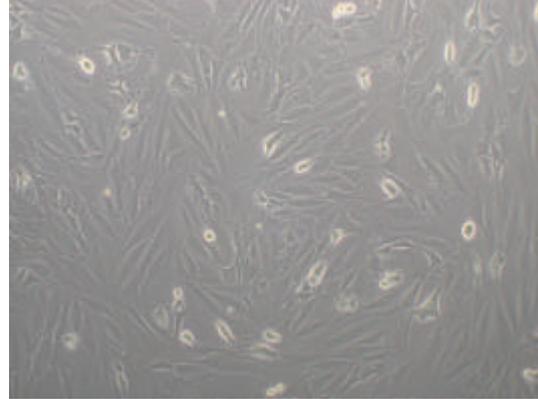
圖 17、以 MTT 方式觀察以不同濃度氧化低密度之蛋白刺激血管平滑肌 24 小時後細胞之影響

Fig.17 VSMCs proliferation stimulated by ox-LDL by MTT test. VSMCs were treated with increasing concentrations (50–300 µg /ml) of ox-LDL for 24 h in the 1 % FBS-DMEM. Results were from three experiments each with triplicate determinations.

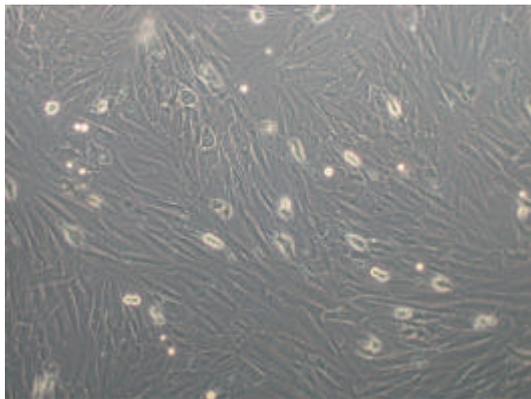
* : compared with control group (1 % FBS-DMEM) ; P< 0.05



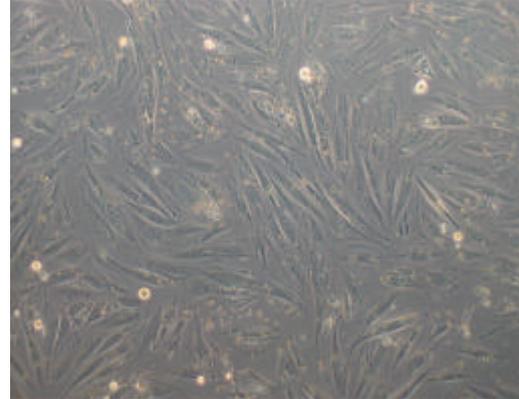
1 % FBS-DMEM



10 % FBS-DMEM



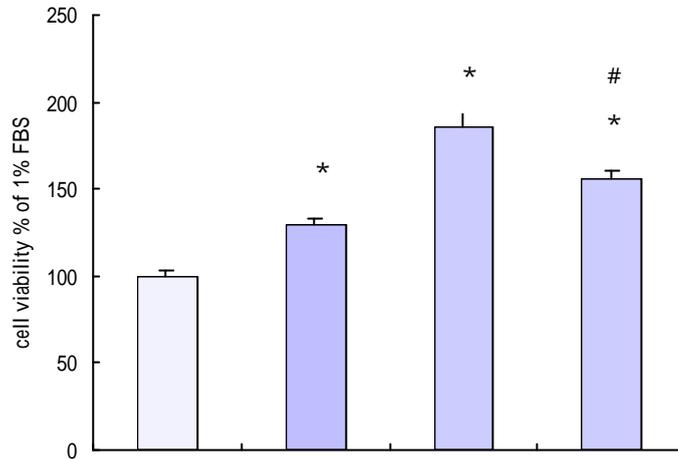
ox-LDL 100 μg/ml



ox-LDL 100 μg/ml+ EA 50 μM

圖 18、以光學顯微鏡觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之
蛋白 100 μg/ml 24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響

Fig.18 Effect of Ellagic acid treatment on ox-LDL 100 μg/ml induced cell number changes in VSMCs. VSMCs were incubated with or without 50 μM Ellagic acid in 24 well culture plates in DMEM supplemented with 1 % FBS at 37 °C for 24h.



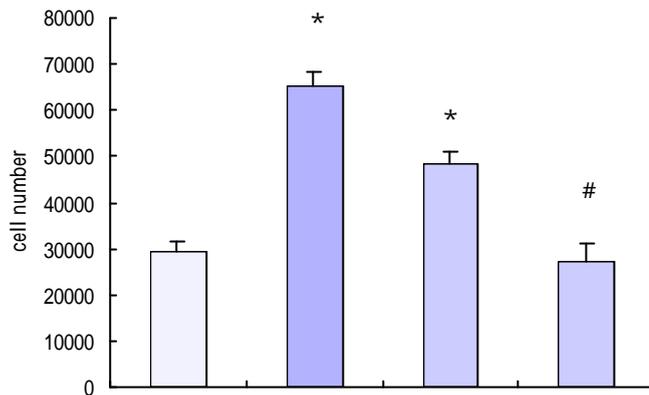
1% FBS	+	-	+	+
10% FBS	-	+	-	-
LDL 100 µg/ml	-	-	+	+
EA 50 µM	-	-	-	+

圖 19、以 MTT 方式觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白質 100 µg/ml 24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響

Fig.19 VSMCs proliferation stimulated by ox-LDL inhibited by Ellagic acid . VSMCs incubated oxLDL 100 µg/ml with Ellagic acid 50 µM for 24h in the 1 % FBS-DMEM.

* : compared with control group (1 % FBS-DMEM) ; P< 0.05

: compared with ox-LDL group ; P< 0.05



1% FBS	+	-	+	+
10% FBS	-	+	-	-
LDL 100 µg/ml	-	-	+	+
EA 50 µM	-	-	-	+

圖 20、以細胞計數方式觀察同步給予 Ellagci acid 及氧化低密度之蛋白 100 µg/ml 24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響

Fig. 20 VSMCs proliferation stimulated by ox-LDL inhibited by Ellagic acid . VSMCs incubated ox-LDL 100 µg/ml with Ellagic acid 50 µM for 24h in the 1 % FBS-DMEM.

* : compared with control group (1 % FBS-DMEM) ; P< 0.05

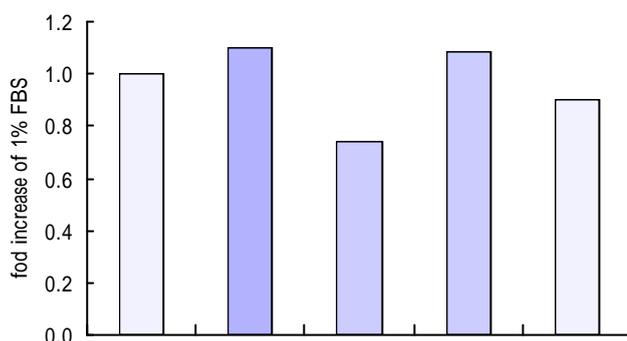
: compared with ox-LDL group ; P< 0.05

Erk

(A)



(B)



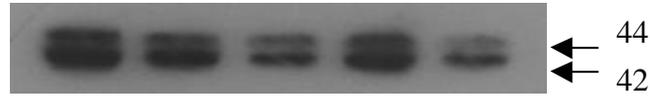
1% FBS	+	-	+	+	+
10% FBS	-	+	-	-	-
LDL 100 µg/ml	-	-	-	+	+
EA 50 µM	-	-	+	-	+

圖 21、以西方墨點轉漬法觀察同步給予 Ellagci acid 及氧化低密度之蛋白 100 µg/ml 24 小時後對於血管平滑肌細胞之 Erk 蛋白之影響

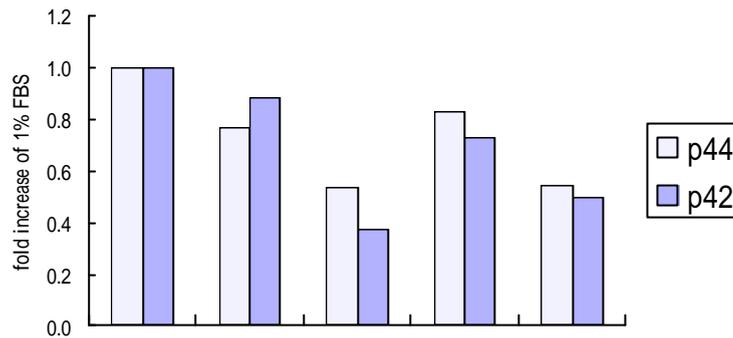
Fig.21 Effects of Ellagic acid 50 µM on Erk stimulated by ox-LDL . VSMCs were incubated with 100 µg/ml ox-LDL with or without Ellagic acid for 24 h. After incubation, the cell lysates were subjected to 10 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. (A)Western blot of Erk . (B) Quantification of expression by AlphamagerTM 2200.

pErk 1/2

(A)



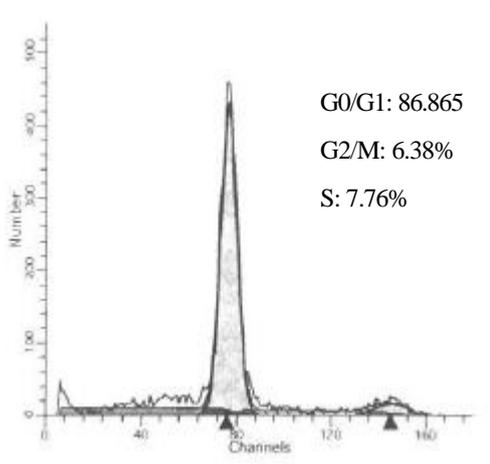
(B)



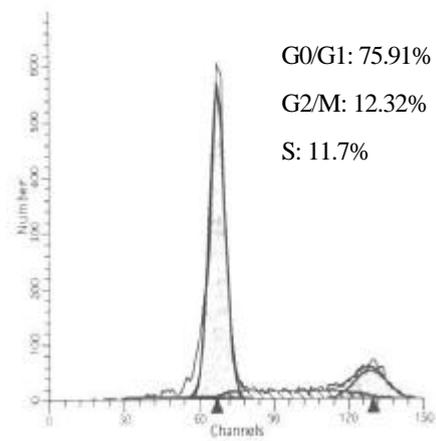
1% FBS	+	-	+	+	+
10% FBS	-	+	-	-	-
LDL 100 μg/ml	-	-	-	+	+
EA50 μM	-	-	+	-	+

圖 22、以西方墨點轉漬法觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 100 μg/ml 24 小時後對於血管平滑肌細胞之早期立即性磷酸化 Erk 蛋白之影響

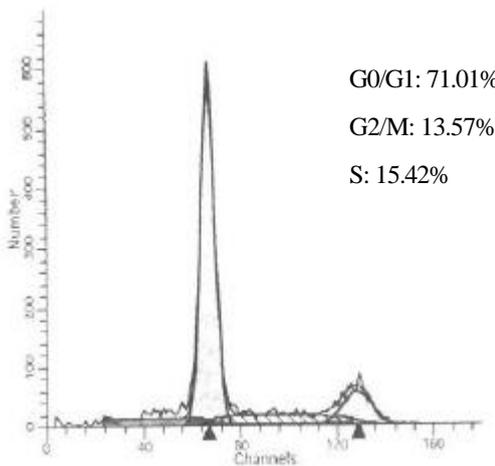
Fig.22 Effects of Ellagic acid (EA) 50 μM on pErk stimulated by ox-LDL. VSMCs were incubated with 100 μg/ml ox-LDL with or without Ellagic acid for 24 h. After incubation, the cell lysates were subjected to 10 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. (A) Western blot of pErk 1/2. (B) Quantification of expression by Alphamager™ 2200.



1% FBS-DMEM



10 % FBS-DMEM



ox-LDL 100 µg/ml

ox-LDL 100 µg/ml + EA 50 µM

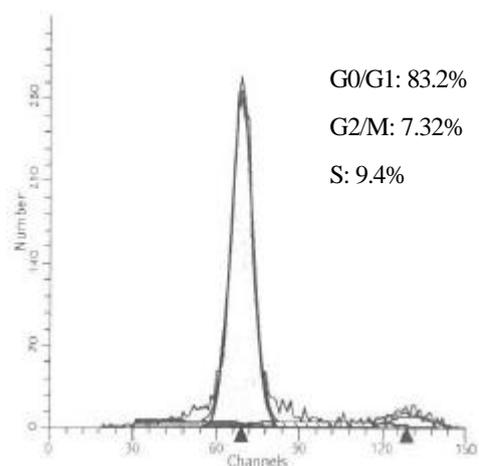
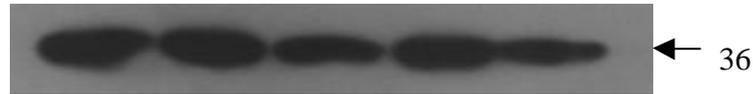


圖 23、以流式細胞儀方法觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 100 µg/ml 24 小時後對於血管平滑肌細胞週期之影響

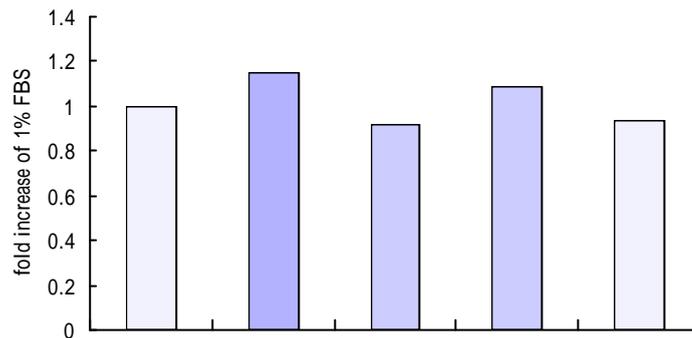
Fig.23 Cell cycle analysis on VSMCs stimulated by ox-LDL and inhibited by Ellagic acid . VSMCs incubated ox-LDL 100 µg/ml with Ellagic acid 50 µM for 24h in the 1 % FBS-DMEM.

PCNA

(A)



(B)



1% FBS	+	-	+	+	+
10% FBS	-	+	-	-	-
LDL 100 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	+	+
EA 50 μM	-	-	+	-	+

圖 24、以西方墨點轉漬法觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 100 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞之 PCNA 蛋白之影響

Fig.24 Effects of Ellagic acid 50 μM on PCNA stimulated by LDL . VSMCs were incubated with 100 $\mu\text{g/ml}$ ox-LDL with or without Ellagic acid for 24 h. After incubation, the cell lysates were subjected to 10 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. (A)Western blot of ERK . (B) Quantification of expression by AlphamagerTM 2200.

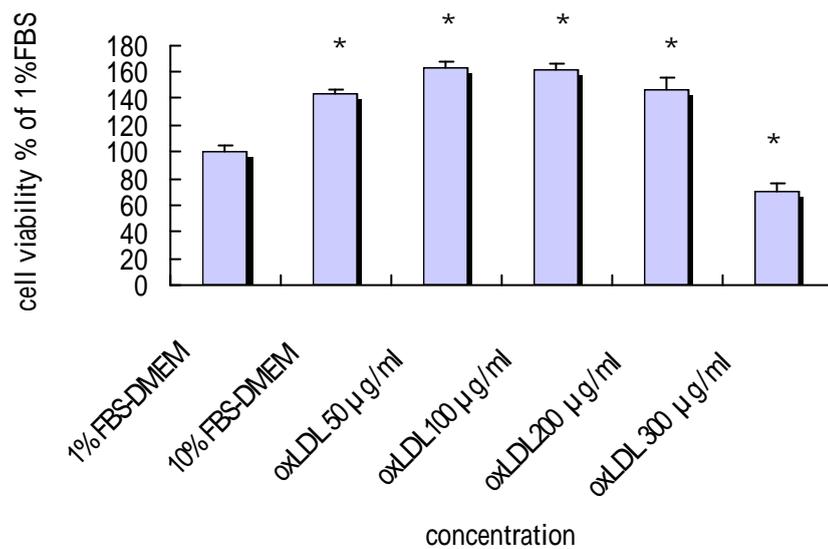


圖 25、氧化低密度之蛋白刺激平滑肌細胞凋亡之結果

Fig.25 VSMCs proliferation stimulated by ox-LDL by MTT test. VSMCs were treated with increasing concentrations (50–300 µg/ml) of ox-LDL for 24 h in the 1 % FBS-DMEM. Results were from three experiments each with triplicate determinations.

* : compared with control group (1 % FBS-DMEM) ; P< 0.05

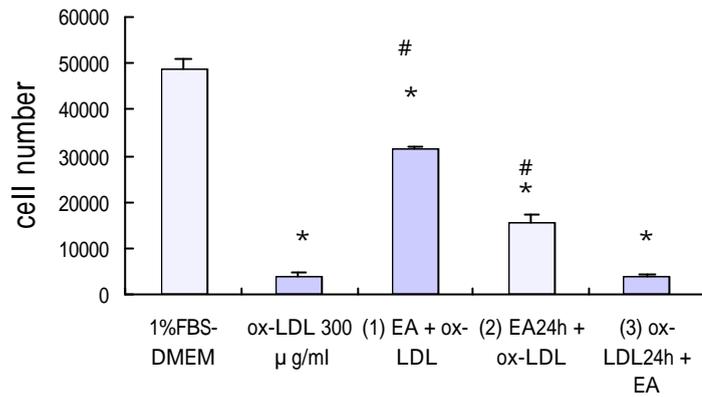


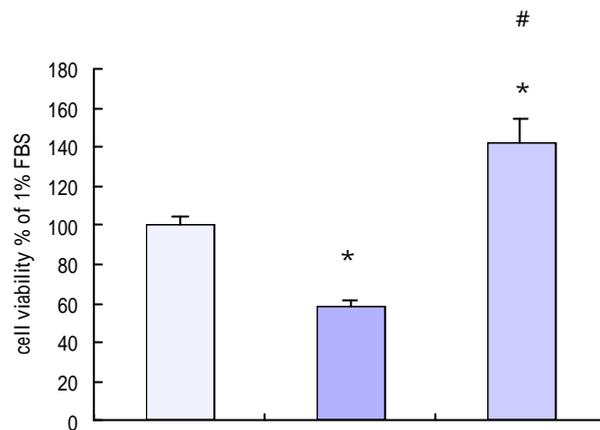
圖 26、以細胞計數方式觀察不同時間點給予 Ellagic acid 對於抑制低密度脂蛋白刺激血管平滑肌細胞增生之影響

Fig. 26 VSMCs apoptosis induced by ox-LDL inhibited by Ellagic acid . VSMCs incubated ox-LDL 300 μg/ml and at different time point : 1) treatment with ox- LDL 300 μg/ml and Ellagic acid 50 μM at same time for 24hs 2) pretreatment with Ellagic acid 50 μM for 24hs before adding ox-LDL 300 μg/ml 3) treatment with ox-LDL 300 μg/ml for 24hs then adding Ellagic acid 50 μM.

All cells were culture in the 1 % FBS-DMEM.

* : compared with control group (1% FBS-DMEM) ; P< 0.05

: compared with ox-LDL group ; P< 0.05



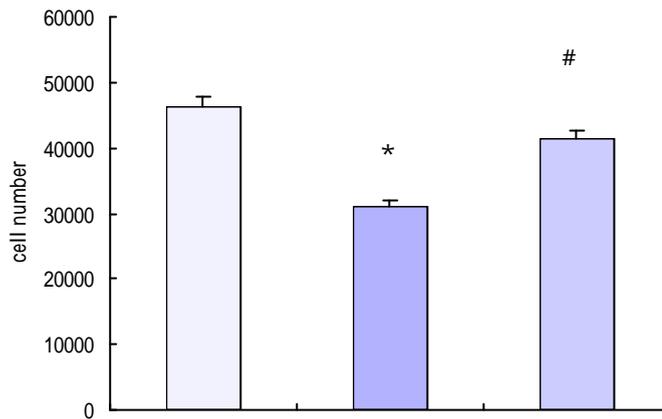
1% FBS	+	+	+
oxLDL 300 $\mu\text{g/ml}$	-	+	+
EA 50 μM	-	-	+

圖 27、以 MTT 方式觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響

Fig.27 Cytotoxic effect of s ox-LDL on VSMC and inhibited by Ellagic acid. VSMCs incubated ox-LDL 300 $\mu\text{g/ml}$ with Ellagic acid 50 μM for 24h in the 1 % FBS-DMEM.

* : compared with control group (1 % FBS-DMEM) ; $P < 0.05$

: compared with ox-LDL group ; $P < 0.05$



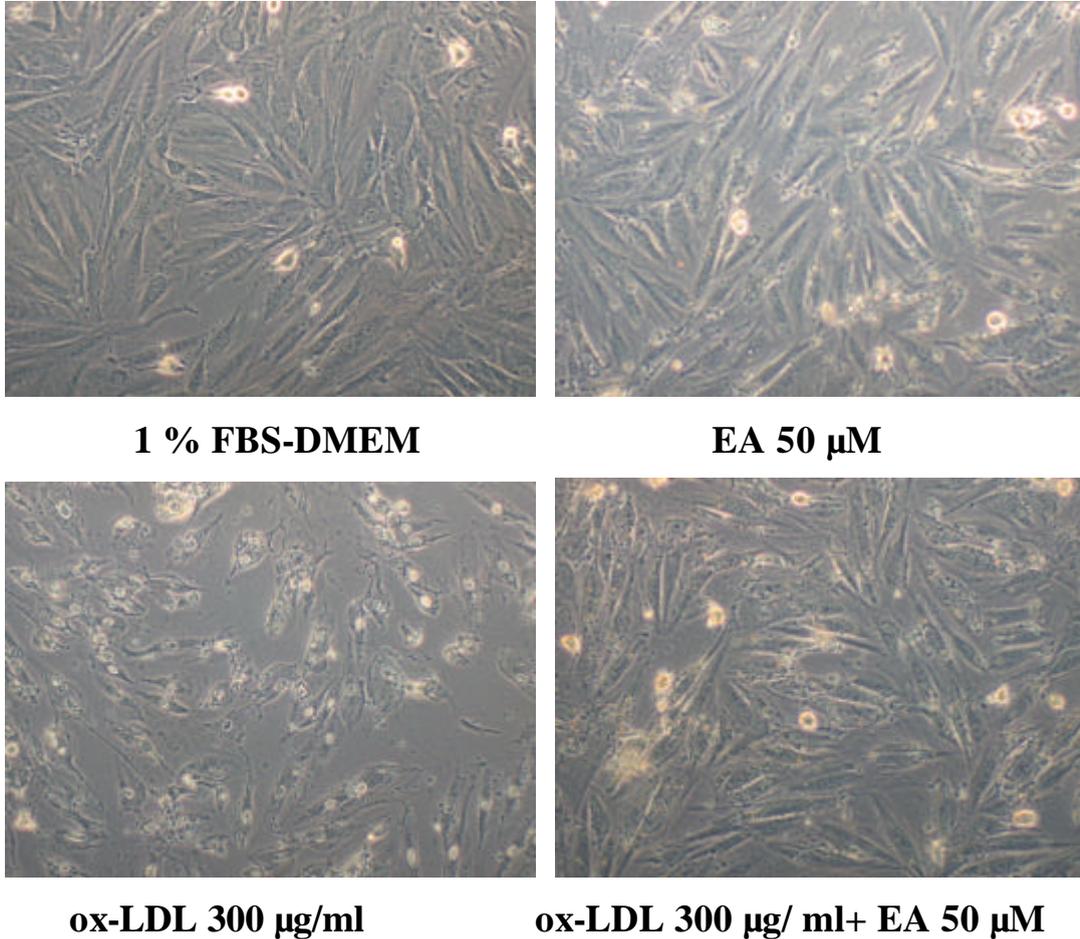
1% FBS	+	+	+
oxLDL 300 µg/ml	-	+	+
EA 50 µM	-	-	+

圖 28、以細胞計數方式觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 300 µg/ml 24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響

Fig.28 VSMCs incubated ox-LDL 300 µg/ml with Ellagic acid 50 µM for 24h in the 1 % FBS-DMEM.

* : compared with control group (1 % FBS-DMEM) ; P< 0.05

: compared with ox-LDL group ; P< 0.05



1 % FBS-DMEM

EA 50 μ M

ox-LDL 300 μ g/ml

ox-LDL 300 μ g/ml+ EA 50 μ M

圖 29 觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 300 μ g/ml
24 小時後對於血管平滑肌細胞之影響

Fig.29 Effect of Ellagic acid treatment on ox-LDL 300 μ g/ml induced morphological changes in VSMCs. VSMCs were incubated with or without 50 μ M Ellagic acid in 24 well culture plates in DMEM supplemented with 1 % FBS at 37 for 24h.

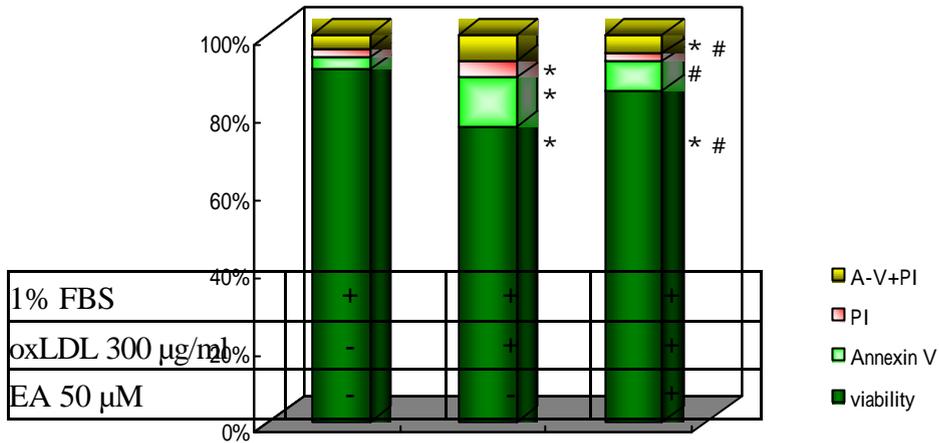


圖 30、以流式細胞儀方法觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 300 µg/ml 24 小時後對於血管平滑肌細胞凋亡之影響

Fig.30 Apoptosis and necrotic death of VSMCs were distinguished using FITC-annexin V (AV) label and propidium iodide (PI) stain VSMCs were incubated ox-LDL 300 µg/ml with Ellagic acid 50 µM for 24h in the 1 % FBS-DMEM.

* : compared with control group (1 % FBS-DMEM) ; P < 0.05

: compared with ox-LDL group ; P < 0.05

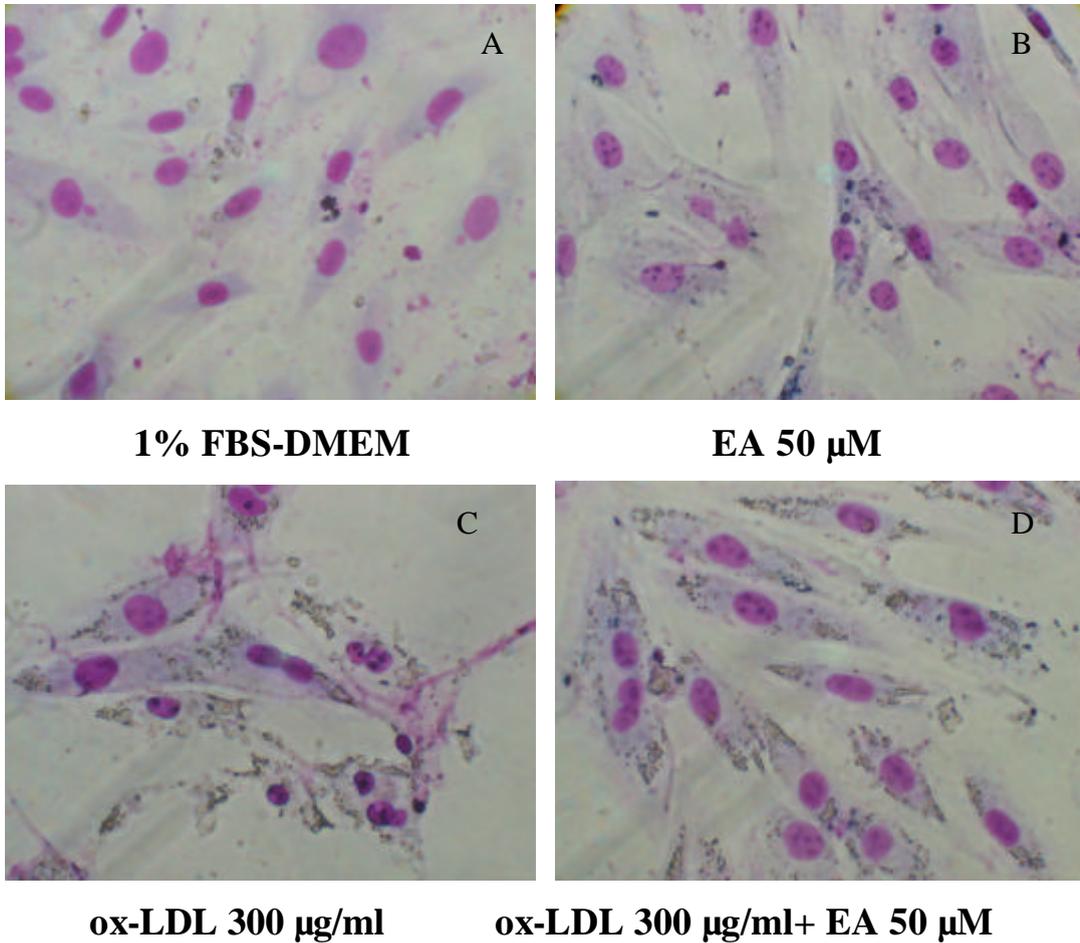
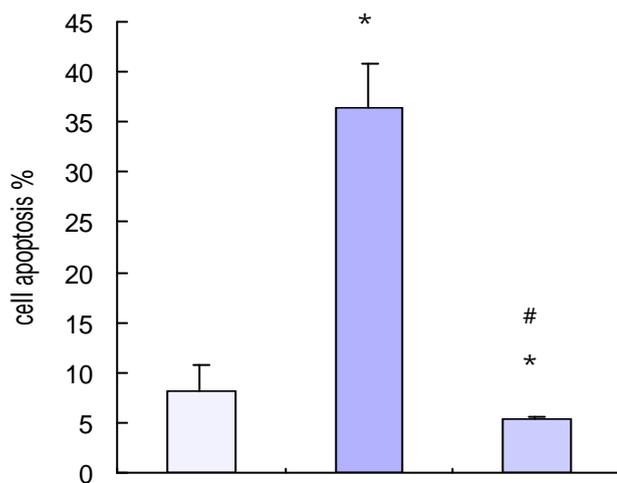


圖 31、以 Giemsa stain 方法觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 300 μ g /ml 24 小時後對於血管平滑肌細胞細胞凋亡型態之影響

Fig.31 Giemsa stain of VSMCs .VSMCs were treatment with various group A) 1 % FBS-DMEM as control B) Ellagic acid 50 μ M C) ox-LDL 300 μ g/ml D) 300 μ g/ml with Ellagic acid 50 μ M for 24h in the 1 % FBS-DMEM.



1% FBS	+	+	+
oxLDL 300 µg/ml	-	+	+
EA 50 µM	-	-	+

圖 32、同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 300 µg/ml 24 小時後對計數 Giemsa stain 凋亡之血管平滑肌細胞數

Fig.32 Giemsa stain .VSMCs were incubated ox-LDL 300 µg/ml with Ellagic acid 50 µM for 24h in the 1 % FBS-DMEM.

* : compared with control group (1 % FBS-DMEM) ; P< 0.05

: compared with ox-LDL group ; P< 0.05

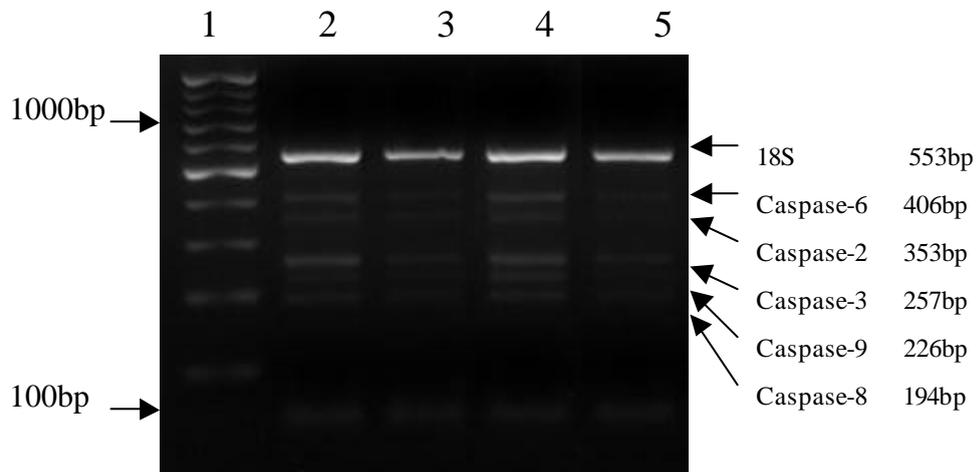


圖 33、以 MPCR 方法觀察同步給予 Ellagic acid 及氧化低密度之蛋白 300 $\mu\text{g/ml}$ 24 小時後對於血管平滑肌細胞 Caspase 基因表現之影響

Fig.33 ox-LDL 300 $\mu\text{g/ml}$ stimulated caspase gene expression in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and inhibited by Ellagic acid 50 μM . lanes1 showed DNA marker、 lanes 2 showed 1% FBS-DMEM as control、 lanes 3 showed Ellagic acid 50 μM only、 lanes 4 showed ox-LDL 300 $\mu\text{g/ml}$ only、 lanes5 showed ox-LDL 300 $\mu\text{g/ml}$ plus Ellagic acid 50 μM ; bands 1 to 6 are 18S、 caspase 6、 2、 3、 9、 8 respectively.

表格 1

Cell cycle distribution of VSMCs in various treatment

Treatment	VSMCs (%)		
	G0/G1	G2/M	S
1 % FBS DMEM only	86.86±2 ^a	6.38±1.2 ^a	6.76±1.7 ^a
10 % FBS DMEM	75.91±2.8 ^b	12.32±1.7 ^b	11.77±1.3 ^b
ox-LDL 100 µg/ml	71.01±0.9 ^b	13.57±0.5 ^b	15.42±0.5 ^c
ox-LDL µg/ml+ EA 50 µM	83.2±0.3 ^a	7.32±2.3 ^a	9.40±1.9 ^b

All values are the means ± SD

^{a-c} : Data with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$

表格 2

Apoptosis and necrotic death of VSMCs were distinguished using FITC-annexin V (AV) label and propidium iodide (PI) stain

Treatment	SMCs (%)			
	Viability	A-V	PI	A-V+PI
1 % FBS-DMEM only	91.5±2.4 ^a	2.3±0.3 ^a	3.1±1.9 ^a	3.7±1.5
ox-LDL 300 µg/ml	76.3±1.1 ^b	12.6±0.4 ^b	4.5±2.4 ^b	6.7±3.2 ^a
ox-LDL µg/ml+ EA 50 µM	85.7±1.72 ^c	2.1±0.4 ^a	7.3±2.4 ^c	5±1.0 ^a

All values are the means ± SD

^{a-c} : Data with different superscripts in the same column are significantly different at P < 0.05