

## 第三章 材料與方法

### 一、實驗材料

#### 1. 實驗動物:

由國科會購入週齡約 8-10 週，體重約為 25-30 g 的 C57BL/6 公鼠飼養於台中榮總教研部動物室，光照與黑暗各為 12 小時週期，飲水及飼料 (Lab diet) 均不加以限制。

#### 2. 中藥製備

三七浸膏由復旦藥廠提供，500 g 生藥製成 52.61 g 浸膏，以 250 ml ddH<sub>2</sub>O 充分溶解。取 25 ml 溶液，以 1500 rpm 速度離心 20 分鐘，取上清液部分，以 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾，濾液進行冷凍乾燥，得 2.808 g 之藥粉 (500g 生藥製得 28.08 g 試藥)，以此藥粉製備巨噬細胞實驗中所需的試藥濃度 (10  $\mu$ g-100  $\mu$ g/ml)。以下將三七浸膏簡寫成 PN。

#### 3. 材料與藥品:

RPMI 1640, fetal calf serum (FCS), penicillin/streptomycin, glutamine (GIBCO), Hanks' balance salt solution (HBSS), LPS (E. coli 011-B4 sigma), Bleocin (NIPPON KAYAKU), MTT (tetrazolium salt), ELISA SET (IL-1  $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  Pharmingen), Ether.

## 二、實驗方法與步驟

### 1. 小鼠肺巨噬細胞的分離及培養

取 C57BL/6 小鼠 6 隻，CO<sub>2</sub> 處死後固定於解剖盤上，分別從頸部剪開胸骨，露出氣管及胸腔，在氣管上端(會厭下方)剪一小洞，插入導管並用線固定，導管另一端接 1 ml 針筒，每次以 1 ml HBSS 緩慢灌入肺臟，並輕輕按摩肺葉，吸出沖洗液，重覆以上沖洗動作 6 次，合併 6 隻小鼠的肺沖洗液 (BALF) 以 1500 rpm 離心 15 分鐘，加入 0.2% saline 將 RBC lysis 再以 1.6% saline 調回成等張溶液 (isotonic)，離心後倒去上清，沉澱部份以 RPMI 1640 (10%FCS, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin) 懸浮，於 Counting Chamber 中計算細胞數並調整種於 12 孔盤中每孔的細胞數為  $1 \times 10^5$  /ml，37°C 培養 2 小時。另取 0.5 ml 此細胞懸液作 Cytospin，玻片以 Lius' Stain 染色後顯微鏡觀察計數，>90% 為巨噬細胞。

2 小時後吸掉上層未附壁細胞，並以培養液沖洗 3 次，每孔加 1 ml 新的細培養液 (with or without LPS 10  $\mu$ g/ml)，於 37°C (95% air and 5%CO<sub>2</sub>) 培養 24 小時。

24 小時後收上層培養液，15000 rpm 離心 20 分鐘，上清液以 0.22  $\mu$ m 濾網過濾，-70°C 貯存待測各種細胞素。

## 2. 偵測中藥對小鼠巨噬細胞的活性影響

本實驗為測定中藥對於被 LPS 激活的肺巨噬細胞是否有影響，或產生功能上的變化。因此從巨噬細胞的存活率(MTT Assay) 及 cytokines 的變化二項試驗方式來評估。由肺沖洗液得到的肺泡巨噬細胞以  $2 \times 10^6$ /ml 培養於 24-well 培養盤中， $37^\circ\text{C}$  培養 2 小時後以 HBSS 清洗 2 次，吸去未貼附之細胞，附著之細胞即為肺巨噬細胞。

實驗依對照組及 LPS 刺激組( $1 \mu\text{g/ml}$ )，不同劑量之三七 PN (Panax Notogenseng)等分組，每組各以三重複進行，細胞加藥處理後於培養箱中培養 24 小時，收集上清液並保存於 $-70^\circ\text{C}$  備用。

(1) MTT assay: 培養盤隨即以 HBSS 清洗，測量細胞粒腺體內膜去氫酶之活性。盤內細胞以 serum-free RPMI 1640 沖洗 3 次後，每孔加入 200  $\mu\text{l}$  相同液體及  $10 \mu\text{l}$  MTT ( $5\text{mg/ml}$ )， $37^\circ\text{C}$  培養 1 小時，吸掉上清液，加 DMSO  $100 \mu\text{l}$  溶解結晶並呈色，於 96 well 盤，ELISA reader 波長 550 nm 下測定吸光值。(吸光值低者表示細胞活性低) 比較各組之細胞活性有無差異。

(2) Cytokines 測量--ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay):

96 孔盤以  $200 \mu\text{l}$  capture antibody coating overnight ( $4^\circ\text{C}$ )，用 wash buffer (0.05% Tween in PBS, PH 7.0)洗三次，加入  $100 \mu\text{l}$  blocking

solution (assay diluent )，置於室溫下一小時，wash buffer 洗三次，加入 100  $\mu$ l 之檢體，置於室溫下二小時，wash buffer 洗五次，加入二次抗體，置於室溫下一小時，wash buffer 洗七次 (最後一次沖洗需浸泡 30 秒)，加入 100  $\mu$ l TMB (tetramethylbenzidine) 呈色劑，置於室溫下(避光)30 分鐘，樣品漸呈藍色，加入 50  $\mu$ l stop solution (2N  $H_3PO_4$ )顏色變成黃色，以 ELISA READER 450 nm 下測吸光值 (OD value)再以標準曲線換算 cytokine 之濃度。

### 3.C57BL/6 小鼠肺纖維化動物模式之建立

(1) Bleomycin (BL)以無菌注射用生理食鹽水配成 1 mg/ml 溶液備用。小鼠分成對照組 7, 14, 21, 28 天組及 Bleomycin7, 14, 21, 28 天處理組共 8 組，每組 3 隻，以乙醚麻醉後稱重，每隻小鼠以 0.3 u/100g 單一劑量(約為 75  $\mu$ l)經由氣管投藥，並於給藥後第 7, 14, 21, 28 天處死，觀察看肺纖維化情形。

#### (2) 三七餵食 Bleomycin 誘發肺纖維化小鼠預試驗:

8 週齡實驗小鼠分成 4 組，每組 6 隻，氣管投以 3 mg/kg 的 Bleomycin，中藥處理組在第二天起餵食不同量的三七粉末，第 7, 14, 21 天處死取肺臟，注入 10% formaldehyde 固定，埋蠟，切片，染色。

#### (3) ELISA 評估 cytokine 變化:

根據上述肺纖維化動物實驗，將 C57BL/6 小鼠分成對照組，

Bleomycin 處理組，BA 7, BA 14, BA 21 及 BD 14, BD 21 共 11 組，每組 6 隻，於給藥(三七粉末 0.5mg/kg)後第 7, 14, 21 天，分別以 CO<sub>2</sub> 處死，固定於解剖盤上，分別從頸部剪開胸骨，露出氣管及胸腔，在氣管上端(會厭下方)剪一小洞插入導管並用線固定，導管另一端接 1 ml 針筒，每次以 1 ml HBSS 緩慢灌入肺臟，並輕輕按摩肺葉，吸出沖洗液，重覆以上沖洗動作 3 次，收集每隻小鼠的肺沖洗液，以 200  $\mu$ l capture antibody coating overnight (4°C)，用 wash buffer (0.05% Tween in PBS , PH 7.0)洗三次，加入 100  $\mu$ l blocking solution (assay diluent)，置於室溫下一小時，wash buffer 洗三次，加入 100  $\mu$ l 之檢體，置於室溫下二小時，wash buffer 洗五次，加入二次抗體，置於室溫下一小時，wash buffer 洗七次(最後一次沖洗需浸泡 30 秒)，加入 100  $\mu$ l TMB (tetramethylbenzidine)呈色劑，置於室溫下(避光)30 分鐘，樣品漸呈藍色，加入 50  $\mu$ l stop solution (2N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)顏色變成黃色，以 ELISA READER 450 nm 下測吸光值 (OD value)再以標準曲線換算 cytokine 之濃度。

#### (4) 組織染色評估肺纖維化:

根據上述肺纖維化實驗方法，將 C57BL/6 小鼠分成 11 組，每組 6 隻，於給藥後第 7, 14, 21 天，CO<sub>2</sub> 處死，1 ml 福馬林由氣管灌入固定內部並泡於福馬林中。隔天取出肺組織修片，前處理，埋

蠟，切片(厚度  $5\mu\text{m}$ )，脫蠟 Hematoxylin and Sirius Red 染色，顯微鏡下觀察肺纖維化程度。