

# 總目錄

	頁次
中文摘要.....	4
英文摘要.....	5
圖目錄.....	6
表目錄.....	10
第一章、前言序論.....	11
第一節、粥狀動脈硬化的成因.....	11
第二節、正常血管內壁構造.....	11
第三節、粥狀動脈形成之介紹.....	12
第四節、自由基與粥狀動脈硬化形成關係.....	16
第五節、體內抗氧化系統與粥狀動脈硬化之相關性.....	18
第六節、細胞凋亡，增生與動脈硬化關係.....	20
第七節、厚朴藥理作用與心血管疾病影響.....	23
第八節、運動訓練與心血管疾病影響.....	26
第二章、實驗目的.....	39

<b>第三章、材料與方法</b> .....	<b>40</b>
第一節、實驗材料 .....	40
第二節、實驗方法 .....	45
<b>第四章、實驗結果</b> .....	<b>58</b>
第一節、兔子生長情況影響 .....	58
第二節、血液生化值的影響 .....	58
第三節、比目魚肌檸檬酸合成酵素及心臟重量的影響 .....	60
第四節、血液中氧化傷害指標-MDA 的影響 .....	60
第五節、胸主動脈中氧化傷害指標-自由基的影響 .....	61
第六節、兔子胸主動脈抗氧化因子 (SOD-1) 表現量的影響 ...	62
第七節、胸主動脈黏著因子 (P-selectin, VCAM-1) 的影響 ..	62
第八節、胸主動脈增生因子-PCNA 的影響 .....	63
第九節、胸主動脈增生路徑 (MAPK pathway) 各因子 (Raf-1、Mek-1、 p-Erk) 之蛋白質的影響 .....	63
第十節、胸主動脈凋亡路徑 (Caspase pathway) 各因子 (Bcl <sub>2</sub> 、 Bax、Bad、Fas ligand、Cap8、Cap3) 之蛋白質的影響 .....	64
第十一節、胸主動脈脂肪癥塊沈積結果的影響 .....	65
第十二節、胸主動脈血管內膜增厚結果的影 .....	65

第五章、討論.....	93
第六章、結論.....	105
第七章、參考文獻.....	107

## 中文摘要

動脈硬化是一種中度慢性發炎反應的心臟血管重要疾病，在許多國家會造成高死亡率與致病率，其主要的的原因與高油高脂飲食及坐式生活形態有關。

厚朴是一種中國草藥，具抗發炎、抑制脂質氧化功能。中度運動訓練則可降低活性氧分子產生及增加抗氧化效應，且具有降低心血管疾病危險因子能力，進而可以降低動脈硬化形成。

本文主要利用雄性紐西蘭大白兔 24 隻，隨機分成 3 組，分別餵食正常、高油脂高膽固醇及加入 10%厚朴粗粹物飲食，此 3 組並再區分為運動組及非運動組。運動組則是於跑步機上，給予 0.88 公里/小時，60 分/天，5 天/週的運動強度。探討是否能藉由中度運動訓練及再加入厚朴粗萃物餵食之後，能對動脈硬化病程有所改善。

結果發現在經過高膽固醇餵食之後有下列影響：血液脂質、脂質氧化酵素指標、脂質沈積會明顯增加，則在給予厚朴組及運動組別有所下降。另外，在胸主動脈的黏著因子、增生因子及凋亡因子表現在上述組別一樣有減少，檸檬酸合成酵素則在運動組別有增加。

本實驗初步證實，在給予運動訓練及厚朴粗粹取物之後，可具有抗氧化及降低血脂能力，並可藉此來達到部分抑制及減緩粥狀動脈硬化病徵效果。

### **關鍵字:**

粥狀動脈硬化、厚朴、運動訓練、氧化壓力、自由基、細胞凋亡、細胞增生

## 英文摘要

Atherosclerosis is a chronic inflammatory vascular disease, leading of mortality and morbidity in many countries. High-fat and sedentary lifestyle play important roles in the formation of atherosclerotic lesions.

*Magnolia officinalis* is a Chinese herb drug wich have anti-inflammatory and anti-lipid oxidative effect. Chronic exercise training has bean reported that can reduce the production of ROS and enhance the anti-oxidative effect which lead to slow to the process of atherosclerosis.

Twenty-four male New Zealand white rabbits were assigned randomly into three dietary groups for 8 weeks .The normal group was fed regular rabbit chew, and the cholesterol group was fed a high fat and cholesterol diet. The *Magnolia officinalis* group as fed the same diet as the cholesterol group plus as the addition of 10% *Magnolia officinalis* . Each dietary group was then divided into two groups with or without exercise training.Those in exercise training groups run on a treadmill at 0.88 Km/h for up to 60 min/day, 5 days/wk for the same period of time as the dirt feeding.

Our data demonstrated that plasma lipids, oxidative stress, vessel lipid deposition and intima thickness were significantly decreased in the *Magnolia officinalis* group as compared to cholesterol group as well as all exercise groups as compares to their non-exercise groups.

Moreover, the expression of adhesion molecules, proliferation factors and apoptosis factors in the thoracic aorta were also markedly decreased after exercise training and *Magnolia officinalis* treatment. Citrate syntheses levels were also increase in the exercise group to demonstrate the effect of exercise training.

This study to show that the role of exercise training and *Magnolia officinalis* may contribute the anti-oxidative and hypolipedemic effect which there can prevent the formation of atherosclerosis

### **Key word:**

Atherosclerosis, *Magnolia officinalis*, Exercise training, Oxidative stress, Free radical, Apoptosis, proliferation

## 圖目錄

圖一：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子血液中氧化傷害指標-MDA (malondialdehyde)的影響.....	70
圖二：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈中氧化傷害指標-自由基 (Free radical) 的影響.....	71
圖三：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈抗氧化因子(SOD-1)蛋白質表現量的影響.....	72
圖四：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈黏著因子(P-selectin)的影響.....	73
圖五：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈黏著因子(VCAM-1)的影響.....	74
圖六：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈增生因子-PCNA 的影響.....	75

圖七：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈增生  
路徑 (MAPK pathway) 因子-Raf-1 之蛋白質的影響 .....76

圖八：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈增生  
路徑 (MAPK pathway) 因子-Mek-1 之蛋白質的影響 .....77

圖九：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈增生  
路徑 (MAPK pathway) 因子-p-Erk1/2 之蛋白質的影響.....78

圖十：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈凋亡  
路徑 (Caspase pathway) - (粒腺體路徑) Bcl-2 之蛋白質的影響  
.....79

圖十一：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈凋  
亡路徑 (Caspase pathway) - (粒腺體路徑) -Bax 之蛋白質的影響  
.....80

圖十二：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈凋  
亡路徑 (Caspase pathway) - (粒腺體路徑) Bad 之蛋白質的影響  
.....81

圖十三：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈凋 亡路徑 (Caspase pathway) -(Fas 路徑)-Fas ligand 之蛋白質的影 響.....	82
圖十四：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈凋 亡路徑 (Caspase pathway) -(Fas 路徑)- Cap8 之蛋白質的影響 .....	83
圖十五：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈凋 亡路徑 (Caspase pathway) -(Fas 路徑)- Cap3 之蛋白質的影響 .....	84
圖十六：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈脂肪 塊沈積結果的影響.....	85
圖十七：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈血管 內膜增厚結果的影響.....	86
圖十八：自由基形成及抗氧化酵素機制圖.....	87



圖十九：MAPK 訊息傳遞途徑.....88

圖二十：細胞凋亡訊息傳遞途徑圖.....89

圖二十一：厚朴結構式圖.....90

圖二十二：運動訓練模式圖.....91

圖二十三：運動訓練及厚朴對增生、凋亡路徑及抗氧化效應影響的可能機制圖.....92

## 表目錄

表格一：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子生長情況影響 .....	66
表格二：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子血液生化值的 影響.....	67
表格三：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子比目魚肌檸檬 酸合成酵素及心臟重量的影響.....	69

## 第一章、前言及序論

### 第一節. 粥狀動脈硬化的成因

動脈硬化是一種慢性發炎反應的疾病，其主要的的原因與高油高脂飲食及坐式生活形態有關，特別好發在中大型的血管管腔，當體內低密度脂蛋白膽固醇濃度過高時則會增加發生的危險率(1,2)，相關的危險因子包括：

- (1) 高血脂 (hypercholesterolemia)：其所產生之氧化態 LDL 可造成內皮細胞的損傷(3,4)。
- (2) 自由基(free radical)：因抽煙、高血壓、糖尿病所產生的氧化壓力(3)。
- (3) 脂質代謝異常：一些脂蛋白接受器產生異常，例如：apolipoprotein E 與 LDL receptor 以致無法順利代謝掉多餘的脂質，而產生高血脂症(5)。

### 第二節. 正常血管內壁構造

正常血管內壁構造簡略可分為下列四層(6)

一.內皮細胞層(endothelial cells)：

內皮細胞層是可以提供血液與血管接觸良好屏障(7)，防止血液中不

正常物質滲入到血管內，並且具有抗凝血、調節血管舒鬆及放鬆張力功能(8)，除此之外，也容易受到特定細胞激素的刺激，而表現一些黏著因子(adhesion molecular)。

二.血管壁內層(intima): 包含膠原纖維及彈性纖維

三.血管壁中層(media): 包含平滑肌細胞(smooth muscle cells, SMC)。

四.血管壁外層(adventitia): 包含結締組織(connective tissue)。

### 第三節、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(9)，分別為[1]內皮細胞層功能不良(endothelial dysfunction)(10,11)。[2]脂肪條的形成(fatty-streak formation)。[3]壞死中心與纖維帽(necrotic core and Fibrous-cap)的形成。[4]不穩定的纖維斑塊(unstable fibrous plaques)。

#### 一、內皮細胞層功能不良

粥狀動脈硬化形成的原因之一，是因為血管分支或環彎處，較易為血流速度(Sheer stress)、壓力或是所產生的擾流影響，使內皮細胞物理因素改變，發炎細胞的黏著堆積而釋放出趨化因子(chemoattractant)(12)，導致細胞通透性增加。且當內皮細胞功能失調的時候，也會促使內皮細胞對脂蛋白的通透性增加，會使一些白血球黏著分子(leukocyte adhesion molecules)及內皮細胞黏著分子(endothelial

adhesion molecules)分泌增加，並會讓 LDL 容易進入內皮細胞層，穿過血管內皮細胞層，而進入到血管內膜中。LDL 密度約 1.019-1.063g/ml，是由大約 3000 個脂肪酸所構成的，平均直徑長 19-25 nm，分子量大約為 1800-2500KDa 的大圓球形粒子，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。當 LDL 遭受到體內活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 及與 (12-LO) 攻擊時，就會轉變成氧化態 LDL(oxidation LDL)，oxLDL 會促使內皮細胞分泌化學趨化因子促使單核球(monocytes)進入內皮細胞層並轉生成吞噬細胞(macrophage)去清除 ox LDL，而形成一包覆體-泡沫細胞(foam cells)(13)。

## 二、脂肪條的形成 (Fatty-streak formation)

(ox-LDL) 會刺激血管內皮細胞產生許多的黏著因子，例如 MCP-1 (monocyte chemotactic protein)、ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1)，VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)、P-selectin 及 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)，interfiron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )，Tumor Necrosis Factor (TNF) 進行發炎反應 (12,14)；並且接著受到血管內皮細胞所釋放的 M-CSF (marophage

colony-stimulating factor) 刺激而分化為巨噬細胞。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」，會刺激平滑肌細胞，穿過彈性纖維層進入內膜增生(15)，然後泡沫細胞及平滑細胞，則由內層移位至內膜而增生形成脂肪條 (Fatty-streak) (16)。

三、壞死中心及纖維帽的形成，並形成複雜的發炎反應部位。(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(17)，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)，在此區會有大量白血球、脂質、凋亡壞死細胞堆積，並會使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)。

四、不穩定的纖維硬斑 (unstable fibrous plaques)

在最後一個階段，血管壁會形成動脈硬化斑塊，是由平滑肌、泡沫細胞、低密度脂蛋白及其他脂質所組成，在這些壞死核心區 (necrotic core) 組織若產生鈣化，則會產生動脈硬化斑塊 (plaque)，亦稱為粥狀動脈腫 (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質的酵素，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(18)。而此些機制結果會導致斑塊不穩定，甚至於破裂，而造成血管阻塞及血栓的形成，降低血管對神經傳導物質及舒張反應因子的感受性，影響心臟血流輸出量，甚至會造成缺血性心臟病、血管痙攣(vasospasm)、心肌梗塞(myocardial infarctions)。

在動脈硬化病徵形成之初，除了會減少血管局部血流供應之外，另外也會降低血管的舒張反應(19)，一般認為可能與一氧化氮(nitric oxide, NO)及內皮細胞一氧化氮合成酵素減少(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)有關(20,21)。

NO的產生機制為，當有協同劑(agonist)作用到內皮細胞上面的receptor時，會促使內皮細胞內鈣離子增加，或是促使細胞外鈣離子 influx，鈣離子會與攜鈣蛋白(calmodulin)結合，活化一氧化氮合成酵素(NOS)，再加上一些輔因子(FMN / FAD、NADPH)，而可將精氨酸(L-arginine)代謝產生一氧化氮 NO 跟 L-citrulline (22)，之後 NO 會擴散至平滑肌細胞，活化 soluble guanylate cyclase，使 GTP 轉生成 cGMP，再活化平滑肌細胞 cGMP-dependent protein kinase，使平滑肌細胞的肌凝蛋白輕鏈去磷酸化，造成血管舒張，另外也會使平滑肌鉀離子 efflux，而產生過極化

(hyperpolarization)，造成血管舒張現象。NO 在人體內可被視為是一種抗粥狀動脈硬化因子 (anti-atherosclerotic factor)，可減少超氧化物的產生、抑制單核白血球的黏著、抑制平滑肌的增生、抑制血小板的黏著和凝聚、抑制 (LDL) 的氧化，也可以使血管鬆弛，降低血壓 (23)。

#### 第四節：自由基與粥狀動脈硬化形成關係

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。當細胞中氧分子接受一個外來電子時變還原成形成超氧自由基，接下來會形成一連串反應形成一氧自由基系統 (24,25)。

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，會攻擊細胞，促使蛋白質、核甘酸、脂肪的代謝異常。例如：

[1] 攻擊 DNA：破化其雙股結構，造成 DNA damage。

[2] 破壞正常細胞膜：自由基會攻擊細胞膜上的多元不飽和脂肪酸，使之產生氧化作用，並破壞其雙層磷脂質結構 (26)。

[3] 促使 LDL 形成 ox LDL：ox LDL 的形成與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 $\cdot$ ) 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 $\cdot$ )，再氧化成脂過氧基 (ROO $\cdot$ )，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 $\cdot$ )，連鎖循環下去，使脂質不斷氧化，生成過氧化脂質，並會加速泡沫細胞生成，而使血管產生粥狀動脈硬化早期徵狀。

### 自由基之種類

體內細胞所產生的活性氧，是一群具有強氧化能力的含氧分子，包括超氧化陰離子 (superoxide anion, O $_2^{\cdot-}$ )，過氧化自由基 (hydroxyl radical,  $\cdot$ OH)、以及過氧化氫 (hydrogen peroxide)。當生物體老化或環境惡劣的時候，粒線體電子傳遞鏈會遭受阻礙，其電子會在途中與氧分子作用形成超氧自由基(27,28)。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。自由基有下面幾種：

1、超氧化陰離子：而 O $_2^{\cdot-}$  為最早產生的自由基，半衰期非常短暫，

較少直接對生物體造成直接傷害，但超氧自由基會引發連鎖反應產生其他自由基，進而對生物體造成嚴重傷害。

2、過氧化氫 (Hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ): 為一非常安定物質，容易通過細胞膜，與體內的微量金屬 (鐵或銅) 離子發生 Fenton 反應，而形成殺菌力非常強的氫氧自由基。但在體內時間過長，分解出的氫氧自由基越多，破壞心臟冠狀動脈或動脈細胞，或產生過氧化脂質，而降低心臟心肌的功能。

3、氫氧自由基 (Hydroxyl radical,  $\cdot OH$ ): 其主要來源有二: [1]  $\cdot O_2^-$  與  $H_2O_2$  經過鐵離子催化後產生的 [2]  $H_2O_2$  經過其他過渡性金屬離子依賴性的 Fenton reaction 反應而產生。主要會造成脂質過氧化進而破壞細胞，並會與醣類、氨基酸、磷脂質、核糖體等反應，造成嚴重傷害，特別也會和 DNA 中的 purine 及 pyrimide 作用，造成細胞突變或死亡。

4、過氧化脂質 (Lipid peroxide): 最多量的自由基反應物，過氧化脂質可再斷裂為其他自由基，形成有害的醛類，如脂質的代謝物 malondialdehyde (MDA) 等。而過氧化脂質也會直接影響蛋白質或核酸，進而造成細胞變性及死亡 (29)。

### 第五節：體內抗氧化系統與粥狀動脈硬化之相關性。

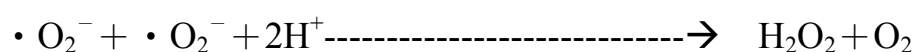
導致這些動脈受損最初是因脂蛋白的氧化，造成細胞死亡，其機制可能是經由細胞凋亡 (apoptosis) 或細胞壞死 (necrosis)，或是細胞本體

之毒素 (toxin) 所引起的傷害。而一般體內會有二大防禦機轉，區分為酵素性及非酵素性，來對抗氧化傷害。當體內抗氧化酵素增加時，可以有效減少自由基或脂質氧化產物，如：可抑制 MDA 產生，減少 LDL 受到自由基破壞，使 ox-LDL 減少，進而改善粥狀動脈硬化情形。

人體中的酵素性抗氧化物 primary antioxidant enzymes 主要有三種(Fig 18)：分別為(1) SOD (Superoxide dismutase), (2) CAT (catalase) 及(3) GPx (glutathioneperoxidase)。抗氧化劑分為兩類：[1]預防性抗氧化劑，可減低連鎖反應引發階段性的速率。包括：catalase 和其他的抗氧化酵素，可以分解 ROOH。

(2)斷鏈性抗氧化劑，斷鏈性抗氧化劑通常指酚類(phenols)或芳香胺類(aromatic amines)。在活體內，主要的斷鏈性抗氧化物有超氧化物歧化酵素(superoxide dismutase, SOD)、胱甘肽過氧化酵素(glutathione peroxidase)、過氧化氫 catalase，它會干擾連鎖反應。

SOD 是唯一以  $\cdot O_2^-$  為受質的酵素，主要作用適用於催化超氧自由基之 dismutation 反應，將  $\cdot O_2^-$ ，轉換成  $O_2$  及  $H_2O_2$ ，反應式如下，生物體抗氧化防禦機轉之第一道防線 (30)。



SOD 會存在細胞內幾個不同部位中，可分三類：

[1]細胞質內的超氧化雙酵素(CuZn-SOD)，各帶有一當量的  $Cu^{2+}$ 和

Zn<sup>2+</sup>。

[2]粒線體中的超氧化雙酵素(Mn-SOD)，帶 Mn<sup>2+</sup>。

[3]細胞外的超氧化雙酵素(EC-SOD)，由四個相似的次單位所組成，各帶有兩單量的 Cu<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>。

Glutathione peroxidase (GSH-Px)可以將還原態的 Glutathione (GSH)氧化成氧化態的 Glutathione (GSSH)，並且將一個過氧化氫，還原成兩個水分子，因此 GPx 為生物體抗氧化防禦機轉之第二道防線。

caralase：由血質素(heme)與四個相同次單元所構成，因可將 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>轉化成氧氣。

glutathione reductive form(GSH)：為非酵素性抗氧化物，帶有一SH 基的 triple peptide，是人體內主要的可溶性抗氧化物質，在肝細胞中負責解毒的功能，並可作為 GPx 的受質，分解過氧化氫，而且可與 vitamin E 協同保護細胞膜避免受自由基的傷害。

## 第六節：細胞凋亡，增生與動脈硬化關係

增生、增殖 (Proliferation) 和細胞凋亡 (apoptosis) 是血管平滑肌細胞 (VSMCs) 造成粥狀動脈硬化、血管再阻塞及高血壓的兩個重要因子(Fig : 19, 20)。不同氧自由基會對 VSMCs 產生不同的影

響，例如超氧陰離子會造成細胞增生； $H_2O_2$  會引起 apoptosis (31)。因此 ROS 會參與粥狀動脈硬化之形成，刺激 proliferation 和引發 VSMCs 的 apoptosis。ox LDL 與細胞增生(32)、細胞毒性及細胞凋亡與 ox LDL 過氧化脂質發展過程中的脂質氧化代謝的產物有關(33, 34)。

在生理意義而言，細胞凋亡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，在胚胎發育的過程、免疫的調節、以及生物體恆定的維持中，細胞凋亡扮演著重要的角色，生物個體可藉細胞凋亡主動去除受傷、老化，以維持生物體的發育與細胞恆定，所以又稱為計畫性的細胞死亡(programmed cell death)。在細胞凋亡過程中，有多種 caspase 因子表現會誘導細胞引發細胞凋亡。細胞凋亡會有下列特徵：染色體濃縮(chromatin condensation)、DNA 斷裂成片段狀態(DNA fragmentation)、細胞重建、核型態改變、細胞萎縮(cell shrinkage)、形成許多的凋亡小體(apoptotic bodies) (35)。

細胞凋亡相關的基因包括 Fas、Fas ligand (FasL)、RIP、FADD... 等。FasL 在粥狀動脈硬化患者內皮中有過度表達之情形 (36)。其中 Fas 又稱 Apo-1 或 CD95，與 TNF-receptor 為同一家族。當粥狀動脈斑塊形成時，體內 FasL 會大量表現，而 FasL 與 Fas 結合後，會進入細胞膜而活化 pro-caspase-8，pro-caspase-8 不具活性，當其被活

化後，會轉變成具活性 caspase-8，進而刺激 pro-caspase-3 變成 caspase-3，隨即進入細胞核促使細胞進行細胞凋亡。

另外，參與細胞凋亡與增生相關的路徑為，MAPK (Mitogen activated protein kinase pathway) 訊息傳導路徑，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子、細胞激素或壓力等的刺激下，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，依序往細胞核內傳遞，進而產生相對的細胞生理反應。在原生 (native) 與氧化的 LDL 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增生 (37)。MAPK 路徑傳導可區分為三條：[1] 活化 Raf、MEK 1/2、Erk 1/2 及磷酸化 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。[2] 當受一些壓力性刺激，例如：TNF- $\alpha$ 、IL-1 刺激時，便會活化 TAK、MKK，最後活化活化 p38 MAPK 路徑。[3] 受到 UV 照射，或是滲透壓力驟變時，會活化 MEKK1, 4、MKK4/7，最終活化 SAPK/JNK1, 2, 3 路徑，這兩條路徑則與分化、發炎反應和細胞凋亡有較大之關連性 (38, 39)。

## 第七節：厚朴藥理作用與心血管疾病影響。

厚朴 (*Magnolia officinalis*) 學名為川厚朴，為木蘭科 (*Magnoliaceae*) 落葉喬木植物，又稱厚朴或凹葉厚朴，生長於四川、湖北、湖南、浙江、陝西、貴州。在本草綱目及本草經書記載，其性味苦、辛、溫，功效包括行氣消積、下氣消痰平喘，主治胃脾氣滯症、咳嗽氣喘。其主要化學成分有：厚朴酚、異厚朴酚、四氫厚朴酚、少量的木蘭劍毒鹼、水溶性厚朴鹼及揮發油。在藥理作用方面：厚朴酚、木蘭劍毒鹼、厚朴鹼具有鬆弛橫紋肌的作用，厚朴鹼及厚朴花均有降壓的作用；其煎劑具有廣效殺菌作用，例如：抗金黃色葡萄球菌、痢疾桿菌及常見的致病真菌 (40)。

厚朴最主要的 2 種成分：為 Magnolol 及 Honokiol (45, 47) (Fig: 21)。被鑑定出與抗發炎 (anti-inflammatory) 與抗氧化傷害有關，也常被應用來治療發燒、頭痛、焦慮、痢疾氣喘及休克，並具有抗血栓症、抗發炎與止痛、抑制 neutrophil 黏著 (41)。另外 Magnolol 在抑制脂質氧化效果比  $\alpha$ -tocopherol 高 1000 倍，並具有抗脂質氧化 (anti-lipid peroxidation)、抗心律不整 (anti-arrhythmia)、抗發炎反應 (anti-inflammatory)、止痛效應 (analgesic effects)、抗氣喘 (anti-asthmatic)、抗菌功效 (anti-microbial effects)、抗血小板活化 (anti-platelet activity)、血管皮滑肌放鬆效應

(vascular smooth muscle relaxation effect)、抗黃嘌呤氧化酶 (anti-xanthine oxidase) 作用，還可以清除 hydroxyl radicals 此類的自由基，並且抑制經過 UV 照射引起的生物性突變 (UV-induced mutation)。且發現在 *in vitro* 實驗的人類動脈內皮細胞株給予 5  $\mu$  M magnolol，可以有效降低 TNF  $\alpha$  所誘發之 NF- $\kappa$ B 轉錄情形及 VCAM-1 表現，在 *in vivo* 實驗，先以 2% 高膽固醇飼料誘發兔子高膽固醇血症，並再給予 IP 注射 magnolol (1  $\mu$ g/Kg body weight)，6 週之後，也同樣發現有相同效應 (42)。

厚朴可降低大白鼠血液中 GOT、GPT 活性，可與自由基作用，抑制脂質氧化，其抑制 MDA 產生能力比  $\alpha$ -tocopherol 高出 340 倍，也比其有效抑制氧氣過度消耗高達 470 倍 (43)。除此之外，厚朴具有清除自由基及提高抗氧化酵素作用 (44, 45)，可抑制 Cu<sup>2+</sup>-induced LDL-oxidation (44)，其也是強效抗氧化劑，可以抑制自由基的產生。厚朴酚對大白鼠心肌缺血再灌注損傷可抑制超氧、過氧化氫自由基產生 (46, 47)，體內的超氧與過氧自由基會誘導 MCP-1 表現，MCP-1 是 chemotactic factor，而當 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、INF- $\gamma$ 、endotoxin 存在時，MCP-1 表現會升高，厚朴酚可以抑制 MCP-1 表現，保護 SOD 與 catalase 而加強 ROS 清除效果，因此可以抑制白血球黏附及 ROS 累積 (46)。厚朴酚影響 Mac-1 表現也可能透過抑制其他路徑，例如：



protein kinase K、phospholipase A<sub>2</sub>、prostaglandin D<sub>2</sub>、thromboxane B<sub>2</sub>。其厚朴酚抑制超氧自由基的能力可能也與 NO 有關，其可維持內皮細胞 NO 產量，避免超氧自由基與 NO 交互作用，並延長與放大 NO 對血管內皮的保護效果(47)。

## 第八節：運動訓練與心血管疾病影響。

### 一. 運動訓練與動脈硬化之影響

動脈硬化通常在已發展國家常引起高死亡率，其原因可能與久坐的生活形態與高油脂飲食有關（48），動脈硬化危險因子與內皮細胞功能失調有關(vascular dysfunction)，例如：單核球黏著及侵入、平滑肌細胞的增生及遷移、血小板的活化及細胞內間質的形成有關(49)。

而在體內主要有 3 條路徑引起內皮細胞舒張反應：NO、prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>)及 endothelium-derived relaxing factor (EDRF)，其中以 NO 與內皮細胞功能最直接的相關。人體中的 NOS 具有三類異構物，主要分別表現在神經、內皮、巨噬三種細胞中，分類如下：

1.神經細胞中的 neuronal NOS (nNOS) 產生的 NO 可增強 long term potentiation，對記憶及學習具有促進作用。

2.內皮與上皮細胞中的 endothelial NOS (eNOS) 則分泌 NO，促使周遭組織擴張，eNOS 的正常表現對小動脈之血壓調節、氣管收縮、腸胃平滑肌鬆弛都很重要。

3.可被誘導大量表現的 inducible NOS (iNOS) 則存在多種細胞中，免疫系統中的巨噬細胞可被活化而引發大量 iNOS 的表現，進而產生高量 NO，是巨噬細胞狙殺微生物及癌細胞的主要武器，因 iNOS 表現與免疫系統對人體的保護與防衛功能關連密切。

在過去文獻指出，經過運動訓練之後，乙醯膽鹼所引發的血管舒張反應是透過 NO 的產生及 eNOS 基因表現的增加 (50,51,52)，而且 NO 及 eNOS 確實具有降低動脈硬化形成的效果 (53)，但是在人類動脈硬化損傷區域及高血脂飲食動物模式身上，則會產生大量 iNOS 的表現 (54,55)，並且在早期病徵時會伴隨一些黏著因子產生，例如：P-selectin,vascular cell adhesion molecule- 1(VCAM-1),intercellular adhesion molecule-1,monocyte chemo attractant protein-1 (MCP-1) (56-58)。iNOS (inducible nitric oxide synthase)在免疫方面扮演重要的角色，因為當外來物質進入人體後，白血球與其他免疫細胞的 iNOS 會立即大量被活化並釋放出大量的 NO (nitric oxide)，NO 因具有未成對電子而為自由基(free radical)的形式，可去攻擊這些外來物質，以達到免疫反應的效果。此外，iNOS 為動脈硬化的過程中參與的角色之一，過去研究發現 iNOS 在動脈硬化的血管的表現會增加(59)，可能與動脈硬化伴隨著發炎反應的產生有關，而運動訓練可以增加血管 NO 產量以及 eNOS 的表現(60,12)。有學者提出，iNOS 的表現不正常增加與動脈硬化形成屬正相關，以注射的方式將 iNOS 抑制劑注入同時以高膽固醇飼料餵食之大白兔體內，發現動脈硬化的形成有減緩的趨勢(61)。nitric oxide (NO)可被視為一種內生性抗動脈硬化因子(62-66)，其具有鬆弛平滑肌細胞、抑制血小板的黏著及聚集、抑制單核球黏著及遷移、降低超氧

離子的產生、抑制 LDL 的氧化作用，及抑制平滑肌細胞增生跟遷移 (67)。NO 並且會壓制一些 oxidant-responsive genes，例如：monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 及 vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) (68-71)。

有氧運動 (aerobic exercise) 是指需要長時間能量消耗的運動，其能量主要由 TCA cycle 產生，無氧運動 (anaerobic exercise) 則是短時間高強度運動，其能量消耗需主要經過 ATP-CP system 及乳酸系統 lactic acid system (醣酵解系統 glycolysis) 產生。在運動時心血管系統會增加心搏量、心率，進而增加心輸出量，且當心搏量增加時，也會使靜脈回血與心收縮力上升，因體溫上升及代謝物堆積，造成血管舒張，降低全身血管總阻力，使平均血壓上升，在體內血流量方面，則會增加骨骼肌、心肌、皮膚血流量，並降低肝、腎、腸胃道血流量。

運動有可能可以作為一種非藥理性的心血管疾病治療方式。之前的研究報告顯示，運動可以降低血液中總膽固醇含量、低密度脂蛋白含量，且會增加血管內皮細胞功能跟血管舒張反應，規律的運動可以降低糖尿病、肥胖、動脈粥狀硬化的發生率及一些心血管的疾病 (72-74)，並改善動脈疾病病人血管內皮細胞的功能 (75-77)，也可以增加冠狀動脈血流量及血管運輸能力 (78-80)，並會改變血流及氧氣代謝，以減緩冠狀動脈血管的抗性 (81-83)。由此得知，藉由運動訓練

可以促進血管內皮細胞的功能。運動如何對抗動脈粥狀硬化的保護作用，其背後的調控機轉仍不甚清楚。但在過去以不同的動物品系進行運動訓練模式中皆可以發現運動對心血管保護的效應。

## 二.運動訓練對 NO 釋放之影響

在正常及高血壓動物模式，皆可以發現經過運動訓練之後，可以增加 NO 的釋放及血管舒張功能 (84-86)、可以有效提高血液中 HDL 及降低 LDL 產生 (87-89)，也會降低某些產生粥狀動脈硬化的 cytokines(例如：IL-1  $\alpha$  , TNF-  $\alpha$  , TNF),並會增加保護性的 cytokines(例如：IL-4, transforming growth factor  $\beta$  1) (90)，並在兔子的股動脈發現運動還可以降低脂質沈積及增加血管舒張效應 (91)，而中度運動訓練是已知可以增加內皮細胞 eNOS 表現 (92,93)，並是藉由增加血流壓力 (shear stress) 而使 eNOS 反應性增加 (94)。當血流壓力增加時除了可以增加 NOS 生合成及影響抗動脈硬化因子之外，也會增加 SOD (95) 及 prostacyclin 的釋放 (96,97)。豬在經過運動訓練之後，肺動脈以乙醯膽鹼刺激內皮細胞血管舒張因子 NO 的產量會明顯增加 (98)，在運動訓練之後的狗，其冠狀動脈 NO 及 eNOS 基因表現會明顯增加。在增加豬及狗的內皮細胞舒張反應同時，也可以去調節 NOS 及 endothelial cell nitric oxide synthase 產生 (ecNOS) (99)。

### 三.運動訓練對葡萄糖耐受性及氧化壓力之影響

在 Zucker rat (fa/fa) 中度或是急速運動訓練，可以增加肌肉氧化耐受性及調節肌肉對胰島素的阻抗性 (insulin resistance)，及增加第二型糖尿病病人之葡萄糖忍受度 (100)。GSH 可經由運動訓練之後增加，而提升對清除超氧自由基及過氧化氫的能力 (101,102)。過去在肝臟及骨骼肌也發現，運動之後可以減緩氧化壓力及胰島素阻抗性 (103,104)。並在 Zucker rat 經過 7 天/週，每天 1 小時，8 週運動訓練之後可以增加 SOD 的表現(105)。且雖然有文獻指出，運動訓練並非全然有益處，可能會因有氧代謝，使組織產生自由基及 ROS，並會重整細胞分子、DNA、細胞膜脂質、蛋白質而產生細胞傷害，但一般認為在 60-80% 最大耗氧量 (maximal oxygen uptake) 是對糖尿病病患最適合的運動強度 (106,107)。

由 Streptozotocin (STZ) 所誘發的第二型糖尿病老鼠 (Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats)，經過運動訓練之後，同樣的也具有增加乙醯膽鹼所引發的血管舒張反應，並以 indomethacine 及 L-NNA 測試得知其與運動訓練所引起機制與 NO 產量的增加呈現正向關係，並有降低總膽固醇、三酸甘油酯及腹部總脂肪重量的效果，及減少胰島素的耐受性，且則對 TGF- $\beta_1$  此會大量表現在動脈硬化損傷部位的發炎因子，其 mRNA 含量在運動訓練 25 週之後，則會些許降低(108)。

運動訓練也發現會影響胰島素訊息，因為胰島素可以刺激 GLUT4 在骨骼肌肉細胞的 translocate，促使骨骼肌肉細胞對於葡萄糖的運輸及吸收。然而過去許多文獻發現，單次的劇烈運動，短時間內造成的 GLUT4 在骨骼肌肉細胞的 translocate，屬於非胰島素依賴的現象(109)，但若經過運動後在 16 小時之內，持續維持葡萄糖運輸的能力是因為增加了胰島素對於葡萄糖運輸中，訊息傳遞因子的蛋白質量改變，例如 IRS1 和 IRS2。其二者是骨骼肌肉細胞中，胰島素訊息傳導的重要因子，過去研究指出，給大鼠長期的耐力運動訓練(5 次/週，9 週)，運動訓練後 48 小時，insulin receptor 和 IRS1 的 mRNA 有增加的現象(110)。這是最早提出耐力型的運動訓練，在基因的層面以及 insulin receptor 之外的影響。但是，短期的耐力運動訓練(6 小時/天，9 天)，運動完後 16 個小時，老鼠肌肉 IRS1 蛋白質表現量不變但是 IRS2 蛋白質表現量上升，但是 IRS1 或 IRS2 引發的 PI3K 活性都有上升，而且，運動五天後 16 個小時測量發現，IRS1 表現下降，IRS2 表現和對照組不運動的老鼠相當，雖然 IRS1 表現下降，但是 IRS1 引發的 PI3K 活性還是上升，IRS2 的活性則沒有改變。其 IRS1 表現下降，但是下游 PI3K 活性卻上升，可能是一種負相回饋的機制。雖然目前對於運動直接對胰島素訊息傳導路徑的影響，仍所知有限，但是普遍認為運動訓練可以讓 IRS1 更有效率的傳遞胰島素訊息(111,112)。

#### 四.運動訓練對鈣離子-NO 前趨因子之影響

且不論在中度運動訓練或是及單次急性運動之後，對於調節內皮細胞的功能及張力皆有正向的反應(113-118)。在經過急性運動之後，可增加使血管舒張反應上升，並調節  $M_3$  muscarinic receptors 及  $\alpha_2$ -adrenergic receptors 的數目與親和力，相同的也會增加內皮細胞上鈣離子含量(119-121)，而體內 eNOS 是 calcium-dependent 調節的酵素(122,123)，因此內皮細胞內鈣離子濃度在調節血管張力及 NO 的釋放上應扮演重要的角色(124)。一般細胞內鈣離子來源有二處，一為細胞外鈣離子流入，另一為細胞內鈣離子儲存槽(在肌細胞為 sarcoplasmic reticulum；其他細胞為 endoplasmic reticulum)。NO 的釋放需要鈣離子濃度的增加，其與鈣離子結合蛋白(calmodulin)結合之後，會造成由細胞膜轉移至細胞質內，將精胺酸代謝產生 NO，再擴散至平滑肌細胞，活化 soluble guanylate cyclase，使 GTP 轉變成 c-GMP，c-GMP 在平滑肌細胞內會活化 cGMP-dependent Kinase，而後經由其他酵素作用使平滑肌細胞之 myosin light chain 去磷酸化，而產生血管舒張現象。c-GMP 也可能活化平滑肌細胞上的  $Ca^{2+}$ -pump，使平滑肌細胞的鈣離子往外運輸，平滑肌內鈣離子濃度降低而使血管舒張。而 NO 也會刺激平滑肌上鉀離子通道( $K^+$ -channel)，使鉀離子往細胞外流，產生細胞膜過極化(hyperpolarization)，而導致對膜電位敏



感的鈣離子通道關閉，使得細胞內鈣離子濃度降低而產生血管舒張現象(125)。

在單次急性運動中，以大白鼠為例，在單次急性運動之後，取下胸主動脈血管，以 Pluronic F127 及 Fura-2-AM 螢光染色，血管固定於平行流體室中 (flow chamber)，於螢光顯微鏡下觀察血管舒張與鈣離子訊號的表現，以 340 nm 及 380 nm 波長去激發，觀測在 510 nm 之下內皮細胞鈣離子的反應，先以苯甲麻黃素( $5 \times 10^{-7} \text{M}$ )先收縮後，再給予不同濃度乙醯膽鹼 ( $10^{-8} \text{M} \sim 10^{-6} \text{M}$ ) 誘發血管舒張及內皮細胞內鈣離子上升的反應，並用無鈣溶液 ( $\text{Ca}^{2+}$  free solution) 及陽離子螯和劑 (gadolinium- $\text{Gd}^{3+}$ -mechanosensitive cationic channel blocker) 去探討鈣離子增加路徑。最後給予細胞內鈣離子含量數據做校正值，給予 ionomycin 使內皮細胞的細胞膜產生離子通道後，加入 EGTA 去螯合胞內鈣離子得到最大 380nm 放射光 ( $\lambda_{2 \text{ max}}$ ) 與最小比值 ( $R_{\text{min}}$ )、外加給  $\text{CaCl}_2$  得到最大飽和鈣離子及 340 nm 放射光、 $\text{MnCl}_2$  則與細胞內 Fura-2-AM 結合使之失去螢光而得到背景值。最後帶入公式  $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)] B$ ，即可得知鈣離子上升量及血管舒張收縮百分比。其研究發現急性運動後使乙醯膽鹼所引發的胸主動脈血管舒張反應會與鈣離子有線性反應關係 (logarithmically fitted curves)，且鈣離子 influx 的含量會與 NO 的釋放增加有直接相關性(126)。

## 五.運動訓練對抗氧化壓力之影響

運動訓練在 apoE 缺失的小鼠對心血管抗氧化效應有正向保護效果，在 apolipoprotein E-deficient mice 經過 12 週中度運動訓練後，其會增加跑步距離、檸檬酸合成酵素含量及後肢腓腸肌 eNOS 含量，並有效降低心臟脂質沈積(127)。

當血管產生氧化壓力的時候，可能會造成內皮細胞功能失調，但中度有氧運動訓練卻可以改善其症狀，並可以使豬胸主動脈內皮細胞 (aortic endothelial cells, AEC) 降低氧化壓力傷害。在動脈硬化初期可能會產生一些 Superoxide 超氧化物，其又稱 reactive oxygen species (ROS)，是在血管內藉由 NAD(P)H oxidase; xanthine oxidase 產生的產物(128-130)，除了會造成 NO 合成減少之外，並會伴隨著內皮細胞失去功能，而增加心血管疾病 (131,132)，當產生氧化壓力時可能會造成蛋白質、脂質、DNA 氧化傷害，而其中也會產生過氧硝酸 (peroxynitrite)而去氮化蛋白質中殘餘的酪胺酸(tyrosine residues)，並造成細胞及分子間的功能失調，且 peroxynitrite 會產生超氧陰離子 superoxide anion (133-135)，而對 NO 產量有所破壞。上述氧化壓力效應都可以藉由 Cu/Zn-dependent superoxide dismutase (SOD)-1 去除血管中的  $\cdot O_2$  而增加由乙醯膽鹼所引發血管舒張反應 (136)，並具有抗氧化效應，進而降低心血管疾病危險因子 (137,138)。一般抗氧化酵素一

共有分成 3 種類型：Cu/Zn-dependent isoforms：SOD-1 存在 cytosol 及 nucleus，SOD-3 存在 extracellular matrix，另外有 Mn dependent isoforms：SOD-2 存在 mitochondria 中。另外抗氧化分子還有 catalase 及 glutathione peroxidase (GPx). 這些抗氧化分子可以調控氧化壓力及保護內皮細胞功能及 NO 的產生，當若 SOD 系統受損時，則會對 NO 的合成有所影響 (139,140)。在基因治療時，若給予 SOD 或是 SOD-1 共軛蛋白則可以放大 NO 所產生的抗氧化效應 (141)。過去對於運動所產生的抗氧化效應，會增加總 SOD 含量，也有文獻指出，運動訓練，可增加小鼠胸主動脈 SOD-3 活性 (142)。

運動在豬的冠狀動脈可以增加內皮細胞引發的舒張反應 (143)，在狗 (144) 與人類的周邊血管亦有相同效應 (145)，其可能與增加 NO 的合成及生化活性有關，並在運動後可能藉由增加 SOD 含量進而促進 NO 活性 (146)。在使用雌性約克夏迷你豬 (Yucatan miniature pig) 在經過 12 週中度運動訓練 (40-50% 最大耗氧量) 下，則發現會促進胸主動脈內皮細胞內抗氧化劑及抗氧化酵素增加，並且會降低氧化壓力，在運動組的胸主動脈內皮細胞發現其 SOD-1 會明顯增加，但是在其他的抗氧化酵素 (SOD-2, catalase) 則沒有明顯變化。運動組也會降低 NAD(P)H 氧化酵素的前基質酵素 p67<sup>phox</sup> 含量，且會減緩脂質氧化代謝產物 MDA 及與細胞不正常增生有關的因子-磷酸化

ERK-1/2 的生成。至於在 e NOS、nitrotyrosine、heme oxygenase-1 protein 則沒有明顯變化(147)。另外文獻也指出，經過 16-20 週運動訓練之後的雄性約克夏豬，其心臟冠狀動脈 SOD-1 mRNA 會大量增加，而可以去控管超氧自由基產生，並延長 NO 生成的時間 (half-life)，增加內皮細胞所引發的舒張反應、冠狀動脈血流量，但在 SOD-2、catalase、p67<sup>phox</sup> protein 則沒有改變(148)。

#### 六.運動訓練對血管舒張反應、NO 釋放量、黏著因子之影響

在探討高膽固醇飲食誘發動脈硬化與運動之間的相關性，文獻發現給予兔子在經過2%高膽固醇飲食餵食8週，誘發紐西蘭大白兔動脈硬化，發現會增加血液中總膽固醇、LDL含量，取其胸主動脈之後，發現確實會增加脂質沈積及在intimal有增厚的情況，並以免疫染色的方式發現會增加一些黏著因子 (P-selectin, VCAM-1, MCP-1) 及iNOS 的表現，除此之外，會降低乙醯膽鹼所誘發的血管舒張反應，但是在經過中度運動訓練持續漸進，由10-60分鐘，速度0.88 km/h 每週5天，經過8週之後，卻會有效降低上述病徵及改善血管功能效應。

並藉由給予 N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester ( L-NAME )、indomethacin、tetraethylammonium chloride ( TEA ) 等舒張因子抑制劑，去探討運動所引起的血管舒張反應路徑為何，文獻發現運動所引起的血管舒張反應路徑可能是透過產生 No 及 endothelium-derived

hyperpolarization factor (EDHF) 所致(149)。

上述運動對心血管的正向效影響，還具有時間依賴效應，紐西蘭大白兔給予 2% 高膽固醇食物，經過 2,4,6 週運動訓練，(0.88 公里/小時，最多至 40 分/天, 5 天/週)，取出胸主動脈 (thoracic aortas) 經過用 L-NAME (NO 抑制劑)、TEA (EDHF 抑制劑) 處理，經過 2 週高膽固醇餵食之後，血液總膽固醇、LDL 確實會明顯增加，並且會降低乙醯膽鹼所引起的血管舒張反應，而此現象在運動組有所減緩，並且有可能是因為與增加一氧化氮及 EDHF 有關，除此之外，發現在第 4 及 6 週時，運動確實會降低一些脂質沈積，並會降低黏著因子 P-selectin, VCAM-1, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)，及 iNOS 表現，運動訓練對於降低動脈硬化的形成，有時間依賴性效應。並在早期 2 週時就可以減緩內皮細胞失去功能，更在 4.6 週時可以有效降低發炎因子的產生。上述正向效應會隨著運動訓練週數增加而有所提升(150)。

同樣的誘發模式，紐西蘭大白兔給予 2% 高膽固醇飲食，經過 8 週 0.88 公里/小時運動訓練之後，分離出兔子股動脈血管段，將其 mounted 在一個流體力室 flow chamber，再給予 PE-precontracted 以及 acetylcholine (ACh) 利用倒立式顯微鏡去測試血管舒張反應，並同時測

定內細胞鈣離子含量，在高膽固醇兔子股動脈身上發現：會增加血液總膽固醇、LDL 含量，及脂質沈積、intimal 增厚。發現高膽固醇組細胞內鈣離子含量會減少，且運動訓練所造成的乙醯膽鹼誘發血管舒張反應及內皮細胞內鈣離子增加，可能與 NO 有相關。在運動組鈣離子含量並不會脫離鈣離子與舒張反應的關係曲線，但是在少量的鈣離子參與即可造成血管舒張。因此得知，運動後可藉由鈣離子上升而引發血管舒張反應增加(151)。

## 第二章、實驗目的

本實驗主要利用紐西蘭大白兔，餵食 8 週高膽固醇飲食誘發動脈硬化現象，另外，探討是否能藉由中度運動訓練及在加入厚朴粗粹物餵食之後能改善動脈硬化的病徵，並減少黏著因子、內皮細胞不正常的增生與凋亡情形的產生，以及提升抗氧化能力。並探討在運動及同時給予厚朴中藥粗粹物之後，是否對上述效應，有加乘的功效，藉以達到增加抗氧化能力，預防高血脂的產生，減緩粥狀動脈硬化所造成的傷害。主要觀察的方向如下：

- (1) 血脂濃度的改變。
- (2) 抗氧化活性能力。
- (3) 運動後檸檬酸合成酵素之改變。
- (4) 各種黏著因子、一氧化氮合成酵素含量。
- (5) 細胞增生、凋亡機制之機轉、細胞修復系統基因表現量影響。
- (6) 引起血管增生、凋亡機制，是經由何種路徑所引發上述機轉。

### 第三章、實驗材料與方法

#### 第一節：實驗材料

##### A. 儀器

Rotary vacuum evaporator N-11(EYELA, Tokyo, Japan)

冷浸/熱浸槽

自由基分析儀 Chemiluminescence CLD-110 (Chemiluminescence, TOHOKU, Kawasaki, Japan)

均質機 Polytron PT3100(POLYTRON,Luzernerstrasse)

水浴槽 Water bath(TKS, Taipei, Taiwan)

離心機 (Beckman)

酸鹼值測定計 (C831; Consort, UK)

乾浴槽 (Model 110001; 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; YIH DER, Taiwan)

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

ELISA reader ( ANTHOS-2020,Salzbrug,Austria )

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 )

影像分析儀器 ( AlphaImager™ 2200, USA )

自由基分析儀 Chemiluminescence CLD-100 ( TOHOKU, Kawasaki, Japan )

## **B 材料**

PVDF 轉漬膜 (Minipore, USA)

蓋玻片 (Kimble, USA)

載玻片 (Marriefeld, Germany)

離心管 (季勗, Taiwan)

X-film ( Kodak,USA)

## **C 試劑**

Acrylamide/Bis (生工, Taichung, Taiwan)

APS (Ammonium persulfate; USB)

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

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

ECL kit (Amersham, UK)

Ethanol (景明化工, Taichung, Taiwan )

Glycine (AppliChem, Germany)

Glycerol (Scharlau, Spain)

Hydrochloric acid (Merck, USA)

Methanol (景明化工, Taichung, Taiwan)

Paraformaldehyde (景明化工, Taichung, Taiwan)

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

Protein maker (Amersham, UK)

SDS (Sodium dodecyl sulfate; USB)

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)

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). abti-SOD-1(Santa Cruz, California, USA)
- (b) anti-P-selectin(Santa Cruz, California, USA)
- (c) anti-VCAM (Santa Cruz, California, USA)
- (d) anti-Raf-1 (Santa Cruz, California, USA)
- (e) anti-MEK-1 (Santa Cruz, California, USA)
- (f) anti-p-Erk(Santa Cruz, California, USA)
- (g) anti-p-Erk(Santa Cruz, California, USA)
- (h) anti-p-Erk(Santa Cruz, California, USA)
- (i) anti-Bcl2(Santa Cruz, California, USA)
- (j) anti-Bax(Santa Cruz, California, USA)
- (k) anti-Bad(Santa Cruz, California, USA)
- (l) anti-FasL(BD Biosciences, USA)
- (m) anti-Cap8(Santa Cruz, California, USA)
- (n) anti-Cap3(Santa Cruz, California ,USA)
- (o). anti-bata actin (abcam, USA)
- (p) anti-eNOS(R& D, USA)
- (q) anti-XRCC1(BD Biosciences, USA)

## 二級抗體

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

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

膽固醇：(Sigma, ST.Louis, MO, USA)

玉米油或大豆油（台糖, Kaohsiung, Taiwan）

厚朴生藥(*Magnolia officinalis*, 欣隆, Taichung, Taiwan)

厚朴標準品：Magnolol standard 建弘; Honokiol standard 建弘, Taipei, Taiwan)

99.98% Methanol(TEDIA, Fairfield, Ohio, USA)

實驗兔飼料（福壽，Shalu, Taichung, Taiwan）

Lucigemin（SIGMA, ST.Louis, MO, USA）

TBHP(t-Butyl hydroperoxide)（SIGMA, ST.Louis, MO, USA）

MDA 標準品(Malonaldehyde Bis)（SIGMA, ST.Louis, MO, USA）

CuSO<sub>4</sub>(USB, Ohio, USA)

DTNB(2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoic acid, Merck Darstadt, Germany)

OAA（Oxalacetic acid, Merck Darstadt, Germany）

Sudan IV（SIGMA, ST.Louis, MO, USA）

## 第二節.實驗方法

### 1.動物飼養

本實驗動物購自台灣省家畜衛生試驗所之純種紐西蘭大白兔(New Zealand white rabbit)，兔子約 4-6 週大，體重約 1.5~2 公斤。飼養於中國醫藥大學實驗動物中心，入室之後，先予秤重並標記，並給一週熟悉環境。並隨機分組，飼養於各 12 小時光照與黑暗環境，室溫維持在  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，每天餵食 150 g 飼料，飲水則不限制。將兔子隨機分成 6 組，一共 3 批，共計 18 隻 ( $n=3$ )。分組方式如下：

第一組：餵食 normal diet (Normal diet：N 組)

第二組：餵食 normal diet+運動訓練組 (Normal diet+exercise：NE 組)

第三組：餵食 0.5%/高膽固醇及 10%/高脂的飼料 (high cholesterol diet 組：H 組)

第四組：餵食 0.5%高膽固醇及 10%高脂的飼料+運動訓練組 (high cholesterol diet+exercise：HE 組)

第五組：餵食 0.5%高膽固醇及 10%高脂的飼料+1%厚朴粗萃物組 (high cholesterol diet+ *Magnolia officinalis* extract：HM 組) 第六組：餵食 0.5%高膽固醇及 10%高脂的飼料+1%厚朴粗萃物組+運動訓練組 (high cholesterol diet+ *Magnolia officinalis* extract+ exercise：HME 組)

## 2.誘發高血脂動物模式

兔子由第一週開始餵食含 0.5%高膽固醇及 10%高脂的飼料，餵食 8 週，以此方式誘導動物形成粥狀動脈硬化病徵。高膽固醇飼料配置：先秤取飼料，利用 95%乙醇或是二次水，均勻淋在兔子飼料上，並以烘箱 60°C 乾燥 4-6 小時，讓 95%乙醇揮發。以小火加熱不含膽固醇的玉米油，其含量為總飼料量 10%，再加入含總備製飼料量 0.5%膽固醇，使其完全溶解於玉米油中，最後倒入飼料，快速拌炒均勻冷卻後，於 4°C 保存備用。

## 3.動物運動訓練模式

第一週，每隻兔子先於水平式跑步機上放置 10 分鐘，以熟悉環境之後，跑步 5 分鐘。一週後隨機將兔子分成 6 組，其中運動組訓練方式為中度運動訓練-耐力型 (endurance-type)，強度約 60~70% $V_{O_{2max}}$ ，速度 0.88km/hr (Chen and Li, 1993)，一週訓練 5 天，連續 8 週，以每週增加 10 分鐘，直至第八週增加至 60 分，其中控制組仍每天都放在跑步機上 10 分鐘，以求控制動物在相同環境之下(Fig：22)。

#### 4. 中藥製備

厚朴生藥 20 Kg 切片打碎成絲狀物之後，用 99.98% 甲醇 (TEDIA, Fairfield, USA) 當溶媒，先冷浸 3 天，經抽氣過濾掉其中雜質之後，其液體再以減壓濃縮機 50 °C 620-640 mmHg 穩定無突沸，抽出部分甲醇之後，再調高至 680 mmHg，除去殘存甲醇及部分水分，殘留中藥再以 50 °C 熱浸 3 天，並重複上述步驟，即可得到膏狀粗粹物，並凍存於 -20 °C，粗抽物生產量為 20 Kg 生藥約可得到 4 公斤粗抽物。粗抽物先烘乾秤重，算出其中含水率約為 10%，再將粗抽物經過 HPLC 管柱層析法與標準品 (Magnolol standard、Honokiol standard) 比對之後，確定抽出物確實含有有效成分。

使用儀器：美國 LabAlliance 公司，Model Series III，pump/UV620，UV/VIS Detector。

層析管柱：INERTSIL 5 ods-2 4.6\*150mm

移動相：50% Acetonitrile，0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O

流速：1.0 ml/min

波長：280 nm

1. 標準品 (Magnolol standard、Honokiol standard)：秤取 Magnolol standard 3.7mg、Honokiol standard 1.9mg，加入甲醇 7 ml 溶解後，加水至 10 ml，過濾備用，並注入量為 20 μl。

2. 厚朴冷粹粗粹物：秤取冷粹樣品 0.2443 g，加入甲醇 35 ml 溶解後，加水至 50 ml，過濾備用。並注入量為 20  $\mu$ l。

3. 厚朴熱粹粗粹物：秤取冷粹樣品 0.1851 g，加入甲醇 35 ml 溶解後，加水至 50 ml，過濾備用，注入量為 20  $\mu$ l。

給藥方法：利用 95%酒精或是二次水當溶媒，溶解中藥粗粹物，均勻淋在兔子飼料上，並以烘箱 60°C 乾燥 4-6 小時，讓 95%EtOH 揮發。以小火加熱不含膽固醇的玉米油，其含量為總飼料量 10%，再加入含總備製飼料量 0.5%膽固醇，使其完全溶解於玉米油中，關火使油溫下降約 55°C~60°，最後倒入已含中藥粗粹物的飼料，快速拌炒均勻冷卻後，於 4°C 保存備用。

## 5. 血脂測量

犧牲前兔子先禁食 24 小時，犧牲時由胸主動脈取出約 20cc 血液，冰上靜置 20 分鐘，待血液凝固之後，於 4°C 離心 15 分鐘後，取出上清液，凍存於-80°C。測量血液中之總膽固醇、三酸甘油酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、麩氨酸草酸轉胺酵素、丙氨酸丙酮酸轉胺酵素。



## 6. 兔子血管中之超氧自由基含量測量

在動物犧牲取組織之時，先分切成小塊之後，於-80°C 冰箱保存。實驗時切取約 1 公分血管組織，加入 0.5cc Tris-sucrose buffer，利用均質機在低溫之下均質，將均質液於 4°C、4000g 離心 30 分鐘，取出上清液，避光放置於冰上。之後取出上清液 200  $\mu$ l 加入 Luminol 100  $\mu$ l，於 37°C 培養 10 分鐘，放入自由基分析儀內，先測定 100 秒，再加入 TBHP100  $\mu$ l 激發組織自由基產生，再測定 1000 秒，即可得知組織自由基數值，再做蛋白質定量，即可得到『自由基相對值』= 自由基數值/每毫克蛋白質含量。

## 7 血清 MDA(malondialdehyde)含量測量

動物犧牲後，抽出血液靜置，等待凝血後離心(4°C 13,000 rpm、10 分鐘)。取出上清液即為血清(serum)，取血清 25  $\mu$ l 加入 2.5  $\mu$ l 60Mm CuSO<sub>4</sub>及 22.5  $\mu$ l 二次水，混合均勻後避光放置於 37°C 水浴槽促氧化 4 小時。再加入 0.35ml 20%TCA 及 0.35ml 0.67%TBA 來呈色及沈澱蛋白質，混合均勻後，避光放置於 67°C 水浴槽促氧化 30 分鐘，使脂質產生氧化反應，最後再離心(室溫 10000 rpm、3 分鐘)，取出上清液，以 450 nm 波長測量吸光值。利用不同濃度 MDA 標準品求出線性方程式，帶入線性方程式，即可求出 MDA 濃度。

## 8.檸檬酸合成酵素測定 (citrate synthase activity)

犧牲兔子後，取下後肢比目魚肌 (soleus muscle)，以 PBS 清洗乾淨之後凍存於 $-80^{\circ}\text{C}$ 。測定時秤取 0.1g 淨重，並加入 5 倍體積 0.1M Tris buffer 及 0.1% Triton X-100 混合液，在低溫下以均質機將組織磨碎，於 $4^{\circ}\text{C}$  離心 15 分鐘後，取出上清液冰存於 $4^{\circ}\text{C}$ 。測量時依序加入 DD 水、DTNB、acetyl Co-A、上清液，混合均勻之後加到石英管並放入光譜儀中，先測量 10 分鐘，待數值穩定之後，加入 OAA，並記錄其數值，反應 5 分鐘之後，記錄最後一點數值，再帶入公式換算出絕對數值，以求得 soleus muscle citrate synthase activity (單位： $\mu\text{ mol/min/g wet weight}$ )

公式：『(反應終點數值-加入 OAA 反應量數值) \*20\* (6 倍肌肉體積  $\mu\text{l}$ )』 /肌肉克數/5

## 9.Sudan IV 蘇丹四號染色

Sudan IV 是種嗜脂性染料，會與脂肪結合而產生紅色，利用此方法可以檢測出血管內皮上 plaque 的存在與否，及評估血管壁脂質沈積情形。兔子犧牲之後，取出胸主動脈血管，先以 PBS 沖洗之後，清除周圍外膜及多餘脂肪組織，縱向剪開，放入 2% Sudan IV 溶液內染色 5 分，再放入 100%、90%、80%、70%、60%、50% Methanol 內退染，

再以 PBS 沖洗，最後以攤平固定在玻片上，照相存檔。以 Image pro plus 軟體分析。

公式： $(\text{動脈硬化癥塊面積} / \text{血管總面積}) * 100\%$

## 10. HE 蘇木紫-伊紅染色(Hematoxylin / Eosin staining)

可利用此法觀察到 intimal thickness 情形。血管段先以 4% 中性副福馬林 (paraformaldehyde) 固定隔夜之後，以石蠟脫水包埋固定組織，再做矢狀切片，血管段依序以 xylene、乙醇 (脫水 100% → 95% → 85% → 75%)、二次水清洗，泡入 Hematoxylin 染劑數分、二次水清洗，再與 eosin 作用數分，重複乙醇 (回水 85% → 95% → 100% → 100%)、xylene，最後並以 glycerol gelatin 封片膠及蓋玻片進行封片，以保持顏色構型完整，再於顯微鏡下觀察，照相存檔。以 Image pro plus 軟體分析。

公式： $(\text{內膜增厚面積 intimal thickness area} / \text{管腔面積 lumen area}) * 100\%$

## 11. 血管蛋白質抽取

取胸主動脈約 1\*1 公分，加入 500  $\mu$ l Lysis buffer，利用均質機將血管均質，用 sonicator 將細胞震破，來回三次，並在 4°C 離心 (13000 rpm、

10 分鐘)，取上清液，進行蛋白質定量或冰存於-20°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)	6.25 M	0.5 M	5 ml
SDS	2 %	10 %	8 ml
DTT	50 mM	0.3 M	6.67 ml
DDW	—	—	20.33 ml
總體積			40ml

12.蛋白質定量

為了確定蛋白質的體積濃度，並使其均一化，蛋白質檢量線製作：

依照下列表格進行檢量線製作

**A.加入試劑**

蛋白質濃度(ug/ml)	DDW(μl)	0.1mg/ml BSA (μl)	Baradford (μl)	總體積 (μl)
0	800	0	200	1000
5	750	50	200	1000
10	700	100	200	1000
15	650	150	200	1000
20	600	200	200	1000
25	550	250	200	1000
Sample	DDW (ul)	Sample	Bradford (ul)	總體積 (μl)
	790	10ul	200	1000

先將 ELISA reader 暖機 30 分鐘。依序加入以上藥劑，分別做出 0~25  $\mu\text{g/ml}$  的標準品後，混合均勻避光靜置反應 5 min，每個濃度各取 200  $\mu\text{l}$  放 96 well plate 中，利用 590 nm 波長測定吸光值。吸光值測定時每個樣本數需 3 重複。用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。R<sup>2</sup> 值需達 >0.99。使用 Excel 軟體繪製出蛋白質檢量線，算出趨勢線方程式，帶入測得之吸光值(y)，則可求出蛋白質濃度( $\mu\text{g/ml}$ )。

### 13.蛋白質電泳 (SDS-PAGE)

依照下列配方先配製下層膠。

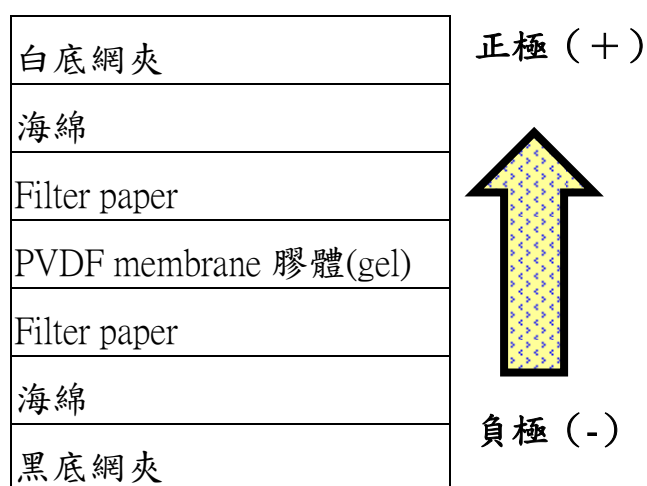
組成	下層膠(10%Separation gel)		上層膠(5% Stacking gel)	
	一片量	兩片量	一片量	兩片量
DDW	4.75 ml	9.5 ml	3.04 ml	6.08 ml
1.5M Tris(PH:8.8)	2.5 ml	5.0 ml	—	—
0.5M Tris(PH:6.8)	—	—	1.25 ml	2.5ml
10%SDS	100 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
40%Acrylamide/bis(29:1)	2.5 ml	5.0 ml	610 $\mu\text{l}$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

先把下層膠注入造膠檯內至海綿處，剩餘的空間以酒精滿去除上面的氣泡並壓平膠之上緣，等待凝固約 30 分鐘，倒掉酒精之後，加入上層膠，插入 comb 待凝固約 30 分鐘，將 comb 取出後先用 DDW 清洗 well，將膠檯放入電泳槽內裝滿 Running buffer。

loading sample 備製，先加熱（95°C、5 分鐘）立即放置於冰上冷卻 30 秒以上，將 Marker（6  $\mu$ l）和 sample（18~24  $\mu$ l）loading 到 well 內，開始進行電泳實驗。電流如下：利用 100V 跑電泳約 40 分、120V 跑 30 分、150V 跑 20 分，直至 Marker 色帶均勻延展開來。之後準備進行蛋白質轉漬至 PVDF 膜，取出轉漬過後的下層膠可放入 0.1 % Commassie blue 進行蛋白質染色。

#### 14. 西方墨點法（Western blot）

將跑完的 SDS-PAGE 下層膠取下，進行轉漬。PVDF membrane 則需先用 Methanol 浸潤 30 秒使膜上孔洞張開以利蛋白質轉漬。轉漬設備組裝膠體放至轉漬夾順序如下：



將轉漬夾緊密組裝完畢，放入 Transfer box，內部注滿 Transfer buffer

蓋上蓋子，放置冰桶中，以維持 4°C 低溫環境。電流設定 100 voltage、1 小時。將轉漬後的 PVDF membrane 放入 5 % fat-free milk 室溫 blocking 1 小時，0.1 % PBST 清洗 10 分鐘，共 3 次。把 membrane 放入含有一級抗體的封口袋內，4°C 冰箱反應隔夜。取出 membrane 放入 0.1 % PBST 清洗 10 分鐘，共 3 次，將 membrane 放入含有二級抗體封口袋中，室溫作用 1 小時，取出 membrane 放入 0.1% PBST 清洗 10 分鐘，共 3 次，即可進行暗房底片顯影，測定蛋白質表現。

暗房底片顯影：先將 ECL 混合液二者作用 1 分鐘，再把 membrane 放入 ECL 混合液中約 3 分鐘，夾起 membrane 放置於透明交片上固定好，覆蓋上底片，緊閉卡匣來進行曝光。曝光後用顯影劑、清水、定影劑、清水來沖片，之後將底片晾乾保存，再以統計軟體進行分析其蛋白質密度。

**Ponceau S 染色：**轉漬後的 PVDF membrane 可以 Ponceau S 染色 20 分鐘，再以 DDW 慢慢水洗直到 band 出現。

**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°C 保存。

**Commassie Blue 染色：**可以用來測知轉漬效果，gel 先以 DDW 清洗

15 分鐘，加入 Comassie Blue 反應 20 分鐘，加入 destain buffer 搖盪  
 隔夜，並用清水清洗至清楚呈現 band 後，予以 80°C、120 分烘乾。

**\*Ponceau S 染劑配製如下：**

0.5g Ponceau S 加 1 ml 冰醋酸(glacial acetic acid)，最後加 DDW 到體積  
 100ml。

**\*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	—	—	0.25 g
Methanal	—	100 %	45 ml
Acetic acid	—	100 %	10 ml
DDW	—	—	45 ml
總體積			100 ml

**\*Dstain buffer 泡製方法**

組成	最終濃度	最初濃度	體積 / 重量
Methanol	10 %	100 %	100 ml
Acetic acid	—	100 %	70 ml
二次水	—	—	830 ml
總體積			1000 ml

**14.統計分析：**



實驗結果以 unpaired Student *t*-test 計算分析。數據結果以 mean ± S.D.表示各項數值。\*表示 P<0.05，即有顯著性差異。西方墨點法各蛋白質含量計算：(蛋白質表現密度 /  $\beta$ -actin 表現密度)

#### 第四章、實驗結果

## 第一部份：各組之間生長狀況、血液生化值的改變。

### 第一節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子生長情況影響 (Table 1)

在體重方面，經過 8 週飼養之後，因各組之間攝食狀況良好，體重及飼料效率無明顯變化，顯示各組間是處在相同的環境照顧，且生長健康情況一致。雖然餵食高膽固醇組別體重略微上升，但並無統計上差異。

### 第二節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子血液生化值的影響 (Table 2-1, 2-2)

1. 在血液低密度脂蛋白 (LDL) 方面 (Table 2-1)：正常飲食的對照組與運動組之間比較並無差異，在經過 8 週餵食高膽固醇後，其血液中 LDL 明顯增加至  $792 \pm 110 \text{mg/dl}$ ，但是相同組別在經過運動訓練之後，則可有效下降至  $470 \pm 19 \text{dl}$ ，在經過厚朴給藥及運動訓練後甚至能下降至  $358 \pm 24 \text{dl}$ ，可見同時給厚朴及運動訓練，確實對降血脂有正向促進效果。
2. 在血液 HDL 方面 (Table 2-1)：高膽固醇組及高膽固醇加厚朴餵食組皆高於其相對運動組。
3. 在血液 TG (Table 2-1)：高膽處醇組上升至  $271 \pm 34 \text{mg/dL}$ ，明顯比

其他組別高，並與經高膽固醇餵食後加上運動組別  $137\pm 17$  mg/dL 比較有顯著性差異。

4. 在血液 TC, Total cholesterol (Table 2-1)：觀察到與血液中 LDL 含量類似效應，正常飲食的對照組與運動組之間比較並無差異，在經過八週餵食高膽固醇後，其血液中 TC 明顯增加至  $1366\pm 66$ mg/dl，但是相同組別在經過運動訓練之後，則可有效下降至  $1061\pm 79$ /dl，在經過厚朴給藥及運動訓練後甚至能下降至  $299\pm 54$ /dl，可見同時給厚朴及運動訓練，確實對減少血中總膽固醇含量有正向促進效果。

5. 在血液 GOT (Table 2-2)：

正常飲食的對照組與運動組之間比較並無差異，在經過八週餵食高膽固醇後，其血液中 GOT 明顯增加至  $258\pm 52$  mg/dl，但是相同組別在經過運動訓練之後，則可有效下降至  $63\pm 35$ dl，在經過厚朴給藥後下降至  $174\pm 25$ /dl，給予厚朴及運動訓練後甚至能下降至  $55\pm 22$ /dl。

6. 在血液 GPT (Table 2-2)：

正常飲食的對照組與運動組之間比較並無差異，在經過八週餵食高膽固醇後，其血液中 GPT 明顯增加至  $189\pm 5$ mg/dL，但是相同組別在經

過運動訓練之後，則可有效下降至  $67\pm 7/dL$ ，在經過厚朴給藥後下降至  $113\pm 15/dL$ ，給予厚朴及運動訓練後甚至能下降至  $31\pm 11/dL$ 。

由血液 GOT、GPT 結果顯示，在經過 8 週高膽固醇餵食之後，可能會引發血中發炎反應，此不正常發炎反應可藉由給於中藥厚朴及運動而有所改善。

### 第二部份：各組之間運動訓練成效變化情形。

第三節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子比目魚肌檸檬酸合成酵素 (citrate synthase activity) 及心臟重量的影響 (Table 3)

比較在不運動組別與給予運動後組別，其後肢比目魚肌 (soleus muscle) 中檸檬酸合成酵素活性，發現在運動組檸檬酸合成酵素活性皆比其對照組高，顯示確實達到運動訓練效果。除此之外，每組之間心臟克數/體重比值，並無明顯差異，顯示其中度運動訓練模式對動物體是緩和無害。

### 第三部份：各組之間抗氧化能力比較情形。

第四節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子血液中氧化傷害指標-MDA(malondialdehyde)的影響 (Fig1)

正常飲食的對照組與運動組之間比較並無差異，在經過八週餵食高膽

固醇後，其血清中 MDA 含量明顯增加至  $164 \pm 10 \eta \text{ mol/ml}$ ，但是相同組別在經過運動訓練之後，則可有效下降至  $87 \pm 7 \eta \text{ mol/ml}$ ，在經過厚朴給藥後，下降至  $69 \pm 7 \eta \text{ mol/ml}$ ，在給於厚朴及及運動訓練後甚至能下降至  $43 \pm 2 \eta \text{ mol/ml}$ ，可見給予運動訓練確實可以降低血清中氧化傷害，並同時給厚朴及運動訓練，確實對抗氧化有正向促進效果。

#### **第五節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈中氧化傷害指標-自由基的影響(Fig2)**

正常飲食運動組自由基含量  $164 \pm 24 \text{ FR count /mg protein}$  比對照組低，在經過八週餵食高膽固醇後，其胸主動脈中自由基含量明顯上升至  $838 \pm 50 \text{ FR count /mg protein}$ ，但是相同組別在經過運動訓練之後，則可有效下降至  $522 \pm 53 \text{ FR count /mg protein}$ ，在經過厚朴給藥後，下降至  $487 \pm 58 \text{ FR count /mg protein}$ ，在給於厚朴及及運動訓練後甚至能下降至  $385 \pm 13 \text{ FR ount /mg protein}$ ，可見給予運動訓練確實可以降低胸主動脈中氧化傷害，並同時給厚朴及運動訓練，確實對抗氧化能力有正向促進效果。

#### **第四部份：西方墨點法-比較抗氧化因子 SOD-1 蛋白質表現情形。**

## 第六節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈抗氧化因子（SOD-1）蛋白質表現量的影響（Fig 3）

以西方墨點法去觀測胸主動脈各蛋白質含量表現，在抗氧化因子（SOD-1）表現量，給予正常飲食的運動組  $35317 \pm 779$  明顯比其對照組高，有統計上差異。但在餵食高膽固醇加上運動後，SOD-1 表現量只比高膽固醇組些許增加。在同時給予厚朴及運動組別，其 SOD-1 含量  $22876 \pm 2879$  則比單純給予厚朴組顯著為高。

## 第五部份：西方墨點法-比較黏著因子蛋白質表現情形。

### 第七節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈黏著因子（P-selectin，VCAM-1）的影響（Fig4,5）

1. 在黏著因子 P-selectin 含量：其中以餵食高膽固醇組含量最高  $103286 \pm 4274$ ，且在各運動組之間，都顯著比其對照組為低。
2. 在黏著因子 VCAM-1 含量：其中以餵食高膽固醇組含量最高，經過高膽固醇餵食及運動訓練後則顯著下降，統計上有明顯差異。在其他各運動組之間，亦可以看出比其對照組顯著降低。

## 第六部份：西方墨點法-比較增生因子，增生路徑各蛋白質表現情形。

## 第八節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈增生因子-PCNA 的影響 (Fig6)

在增生因子-PCNA 含量，其中以餵食高膽固醇組含量最高，但在餵食高膽固醇加上運動後即顯著下降。在其他各組及給予運動組之間，則無明顯差異。

## 第九節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈增生路徑 (MAPK pathway) 各因子 (Raf-1、Mek-1、p-Erk) 之蛋白質的影響 (Fig 7-Fig 9)

1. 在 Raf-1：是增生路徑 (MAPK pathway) 最上游與 mitogens、生長因子有關的蛋白質，正常飲食的對照組較運動組高、高膽固醇組較高膽固醇加運動組顯著為高。在中藥組，不論給予運動與否，都無顯著差異。

2. 在 Mek-1：只有高膽固醇餵食後，其蛋白質含量有明顯的增高，並在經過運動之後顯著下降。在其他各組之間，則無顯著差異。

3. 在 p-Erk：在各組之間相比較，則都無顯著差異。

## 第七部份：西方墨點法-比較，凋亡路徑 (粒腺體路徑) 凋亡因子各

### 蛋白質表現情形。

第十節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈凋亡路徑（Capase pathway）各因子（Bcl<sub>2</sub>、Bax、Bad、Fas ligand、Cap8、Cap3）之蛋白質的影響（Fig 10-Fig 15）

1. Bcl<sub>2</sub>：在各組之間相比較，則都無顯著差異。
2. Bax：高膽固醇餵食後，其 Bax 含量較其餘各組高。
3. Bad：高膽固醇餵食後，其 Bad 含量較其餘各組高。

### 第八部份：西方墨點法-比較，凋亡路徑（Fas 路徑）凋亡因子各蛋白質表現情形。

1. FasL：高膽固醇餵食後，其 FasL 含量較其餘各組高。在其餘各組之間相比較，則都無顯著差異。
2. Cap8：高膽固醇餵食後，其 Cap8 含量較其餘各組高。在其餘各組之間相比較，則都無顯著差異。
3. Cap3：高膽固醇餵食後，其 Cap3 含量較其餘各組高，並在經過運動之後顯著下降。在其他各組之間，則無顯著差異。

### 第九部份：高膽固醇對胸主動脈上脂質沈積型態改變情形。



### 第十一節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈脂肪癥塊沈積結果的影響 (Fig 16)

血管段縱向剪開，並以 Sudan IV 染色後發現，給予正常飲食的對照組與運動組的胸動脈血管段上皆無紅色脂肪癥塊。其統計結果，高膽固醇餵食後，其脂肪堆積含量較其餘各組高，尤其在血管段分支處更為明顯，但在經過運動之後顯著下降。

### 第十二節：高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子胸主動脈血管內膜增厚結果的影響 (Fig 17)

血管段做矢狀切片後，以 HE 染色後發現，給予正常飲食的對照組與運動組的胸動脈血管段上皆無看到 intimal thickness 情形。

其統計結果，高膽固醇餵食後，其內膜增厚較其餘各組高，但在經過運動之後顯著下降。

### 8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子生長情況影響 (體

重，進食狀況，飼料效率)

	Body weight(Kg)	△Body weight(Kg)	Food intake(g) / day	Food efficiency(%)
N	3.27±0.31	1.6±0.30	128.51±7.45	3.97±0.50
NE	2.93±0.31	1.3±0.29	113.31±12.09	3.91±0.12
H	3.60±0.30	2.0±0.10	124.22±18.66	3.47±0.57
HE	2.93±0.08	1.4±0.18	99.93±16.77	3.40±0.50
HM	3.43±0.23	2.0±0.15	126.97±20.00	3.69±0.50
HME	2.92±0.36	1.5±0.06	102.58±14.44	3.53±0.46

**Table 1:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on body weight, food intake and food efficiency of rabbits for 8 weeks.

All data are means± S.D.

\*P<0.05, NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子血液生化值的影響

Table2-1:LDL、HDL、TG、TC(mg/dl)

	LDL	HDL	TG	TC
N	11.46±5.63	15.37±8.88	107.05±52.07	51.36±21.37
NE	15.12±7.97	20.30±4.37	77.92±25.31	53.77 ±6.16
H	792.83±110.27	169.63±26.20	270.93±24.18	1366.37±66.03
	*	*	*	*
HE	470.34±19.05	134.41±23.72	137.32±17.40	1061.56±79.69
HM	614.22±21.70	176.88±5.63	122.25±37.11	1132.45±94.31
	*	*		*

**Table 2-1.** Serum TG and TC; LDL-C; and HDL-C levels from rabbits fed with high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract for 8 weeks

All data are means± S.D.

\*P<0.05, NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

(TG, triacylglycerol; TC, total cholesterol; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein.)

GOT(Glutamic Oxaloacetic acid Transaminase),GPT(Glutamic

Pyruvic acid Transaminase)(mg/dl)

	GOT	GPT
N	63.70±35.82	51.46± 13.93
NE	50.63±33.22	62.31±8.39
H	258.83±52.90	189.68 ± 5.03
HE	63.70±35.82 *	67.92 ±7.00 *
HM	174.85±25.10	113.39 ± 15.77
HME	55.00±22.54 *	31.27 ±11.33 *

**Table 2-2.** Serum GPT and GPT levels from rabbits fed with high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract for 8 weeks.

All data are means± S.D.

\*P<0.05, NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

( GOT, glutamate oxaloacetate transaminase; GPT, glutamate pyruvate transaminase )

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子比目魚肌檸檬酸合

成酵素 (citrate synthase activity) 及心臟重量的影響

	Citrate synthase ( $\mu$ mol / min / g / wet protein )	Heart weight/Body weight (%)
N	1.08±0.02	0.23±0.01
NE	1.38±0.06 <sup>*</sup>	0.26±0.03
H	1.09±0.05	0.25±0.04
HE	1.40±0.04 <sup>*</sup>	0.28±0.06
HM	1.14±0.01	0.23±0.02
HME	1.39±0.01 <sup>*</sup>	0.26±0.03

**Table 3 :** The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on citrate synthase level in the soleus muscle and heart weight of rabbits for 8 weeks.

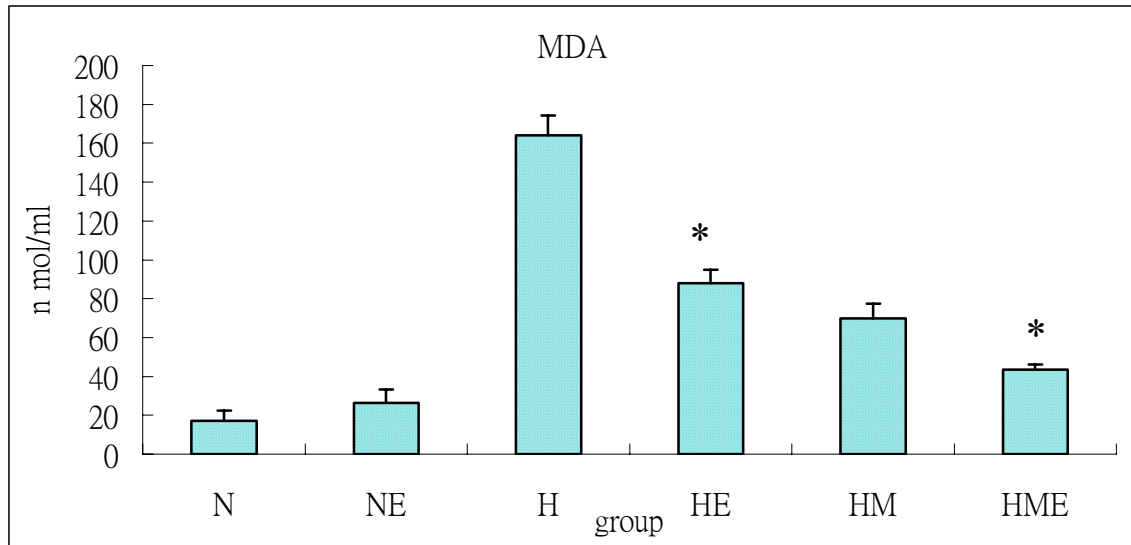
All data are means± S.D.

\*P<0.05, NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子血液中氧化傷害

## 指標-MDA 的影響



**Fig 1 :** The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on MDA(malondialdehyde) level in the blood of rabbits for 8 weeks.

All data are means  $\pm$  S.D.

\*P<0.05, NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈中氧化

## 傷害指標-自由基 (Free radical) 的影響

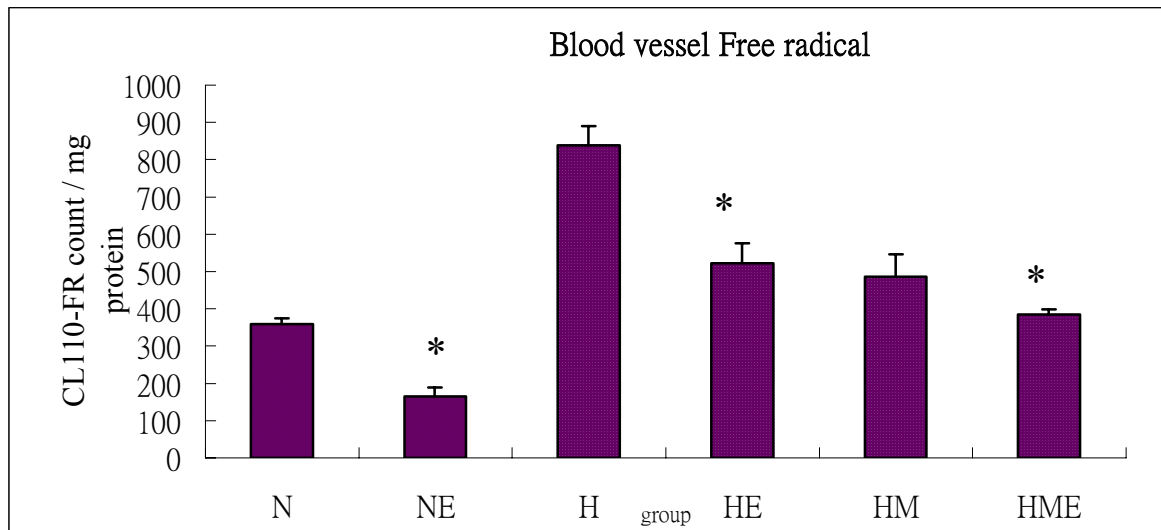


Fig 2 : The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on oxidative impaired index- free radical on thoracic aortae of rabbits for 8 weeks.

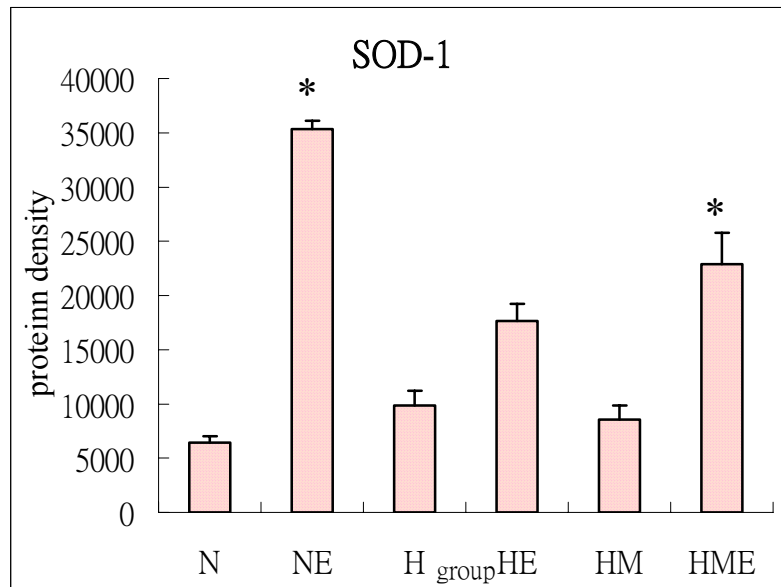
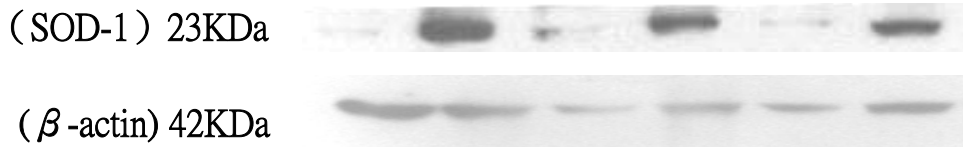
All data are means  $\pm$  S.D.

\* $P < 0.05$ , NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈抗氧化

### 因子 (SOD-1) 蛋白質表現量的影響



**Fig 3:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of antioxidative factor (SOD-1) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

All data are means  $\pm$  S.D.

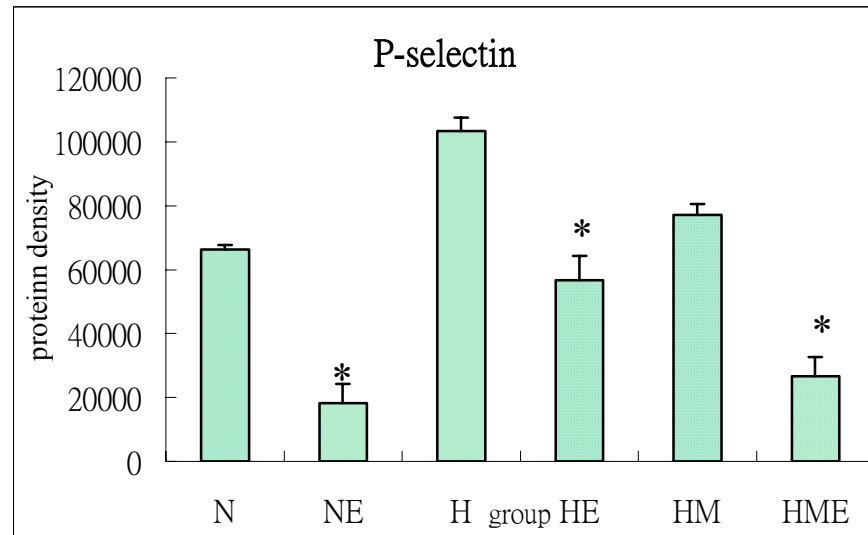
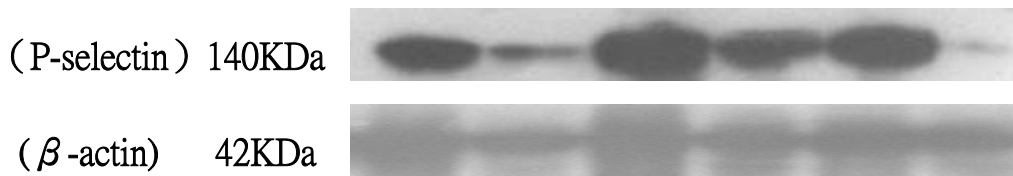
\* $P < 0.05$ , NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

( $n=3$ , abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈黏著因



### 子 (P-selectin) 的影響



**Fig 4:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of adhesion molecule (P-selectin) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

All data are means  $\pm$  S.D.

\* $P < 0.05$ , NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

( $n=3$ , abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

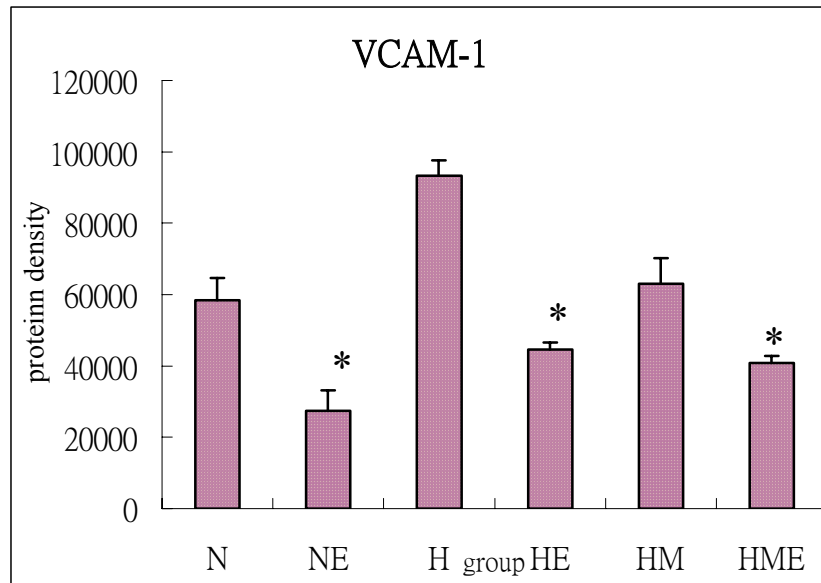
### 8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈黏著

## 因子 (VCAM-1) 的影響

(VCAM-1) 100KDa



( $\beta$ -actin) 42KDa



**Fig 5:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of adhesion molecule (VCAM-1) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

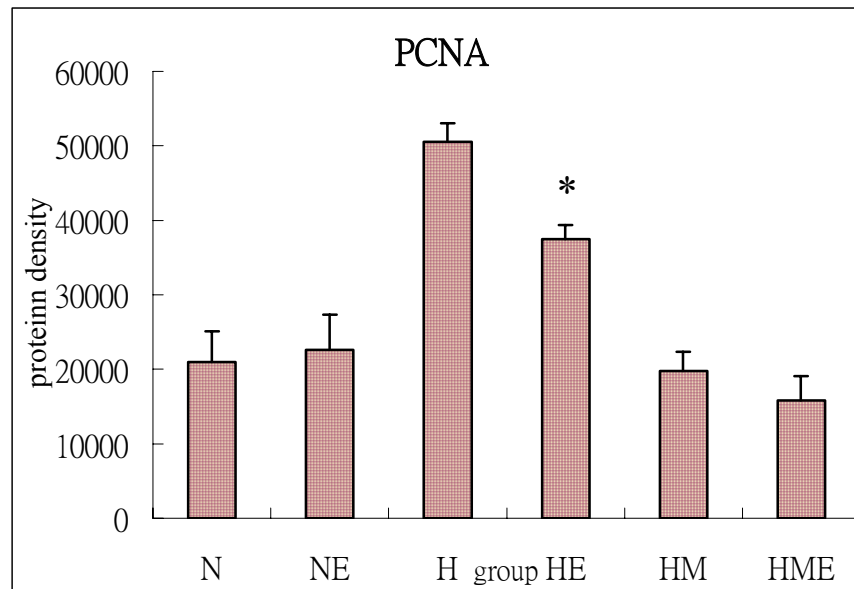
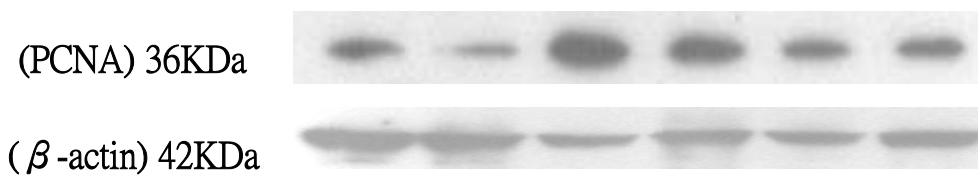
All data are means  $\pm$  S.D.

\* $P < 0.05$ , NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

( $n=3$ , abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈增生因

### 子-PCNA 的影響



**Fig 6:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of growth factor(PCNA) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

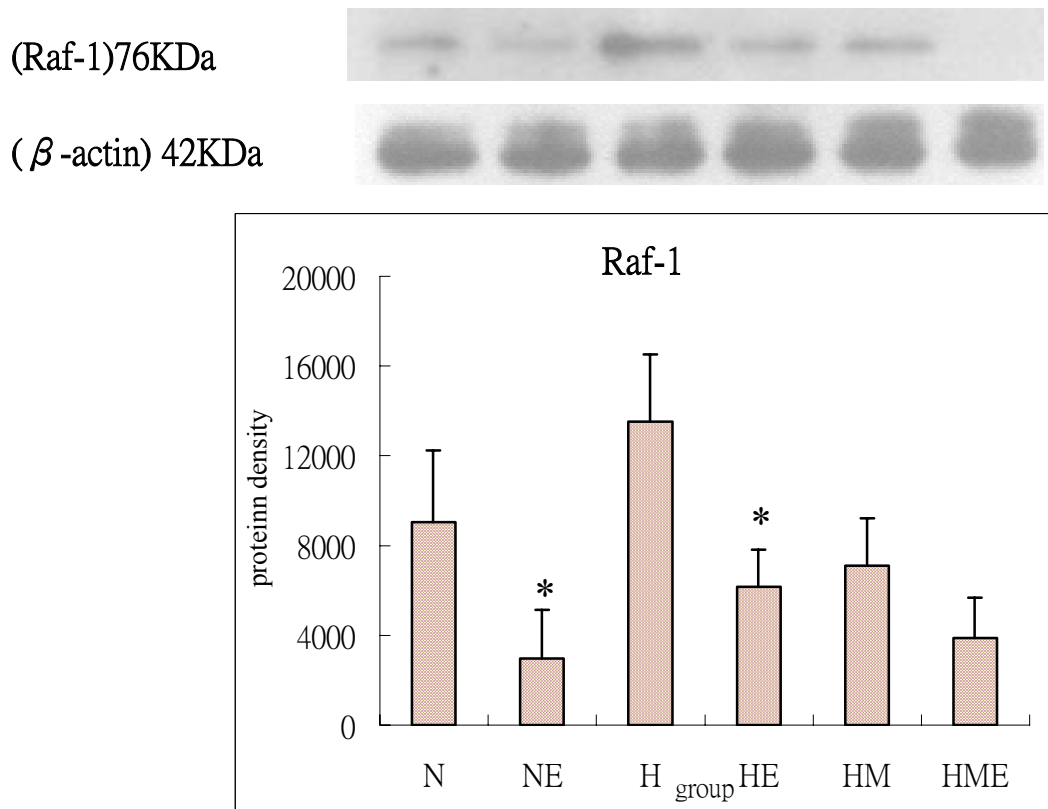
All data are means  $\pm$  S.D.

\* $P < 0.05$ , NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

( $n=3$ , abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

### 8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈增生路

徑 (MAPK pathway) 因子-Raf-1 之蛋白質的影響



**Fig 7:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of growth factor(Raf-1) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

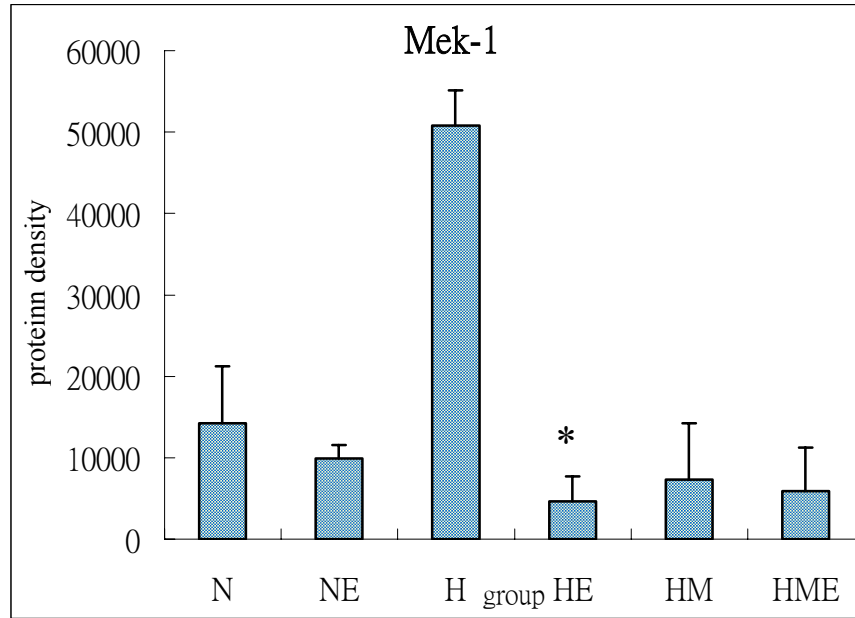
All data are means± S.D.

\*P<0.05, NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3,abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈增生路

徑 (MAPK pathway) 因子-Mek-1 之蛋白質的影響



**Fig 8:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of growth factor (Mek-1) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

All data are means  $\pm$  S.D.

\* $P < 0.05$ , NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

( $n=3$ , abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

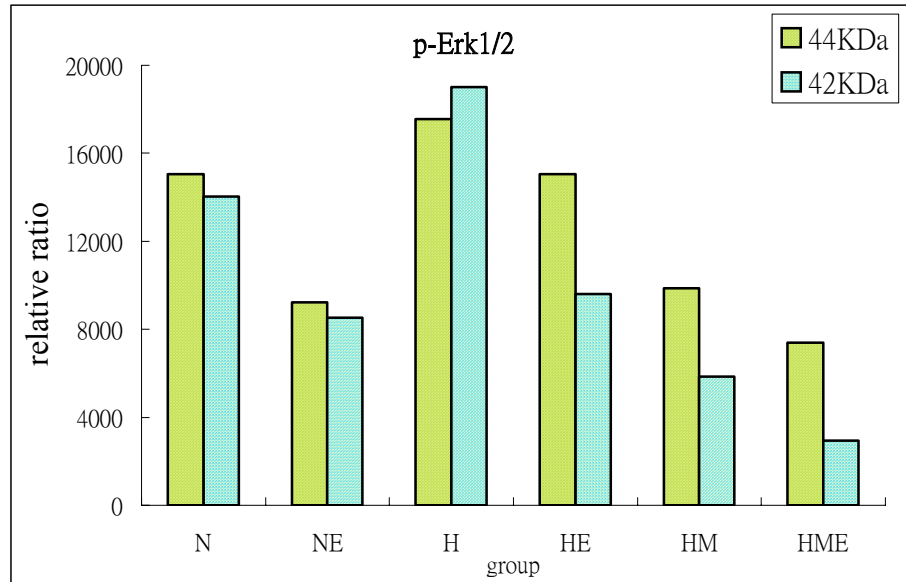
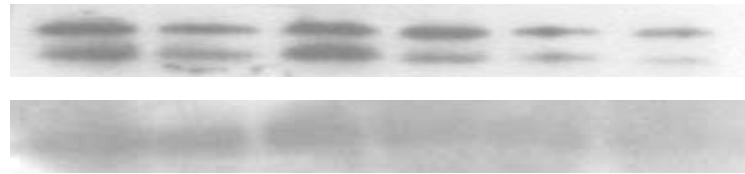
8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈增生路

徑 (MAPK pathway) 因子-p-Erk1/2 之蛋白質的影響

(p-Erk) 44KDa

(p-Erk) 42KDa

( $\beta$ -actin) 42KDa



**Fig 9:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of growth factor (p-Erk) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

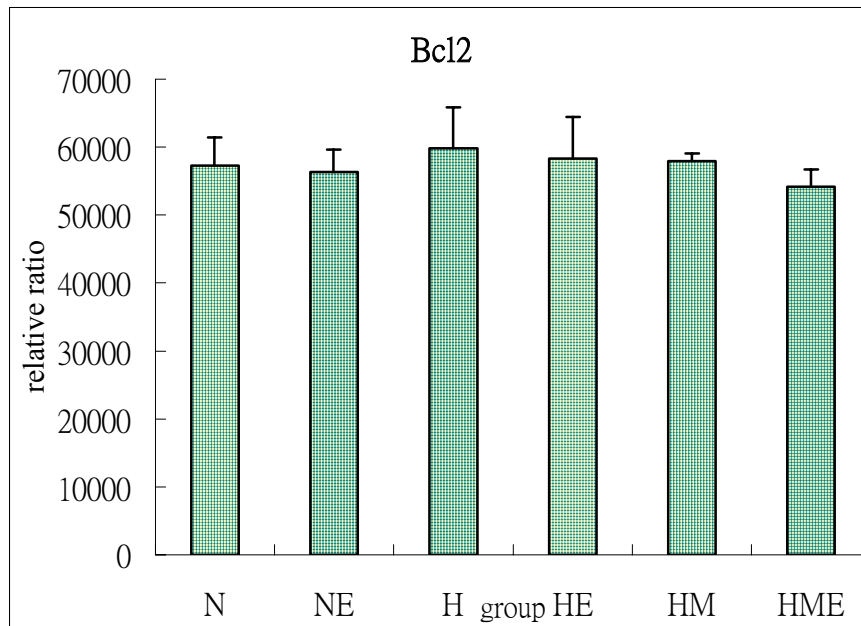
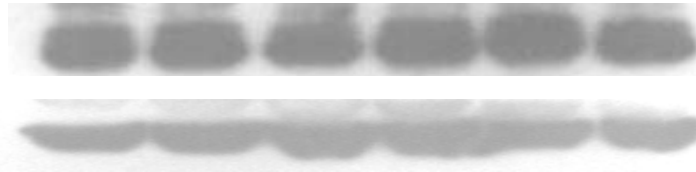
(n=1, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈凋亡路

徑 (Capase pathway) - (粒腺體路徑) Bcl-2 之蛋白質的影響

(Bcl-2) 26KDa

( $\beta$ -actin) 42KDa

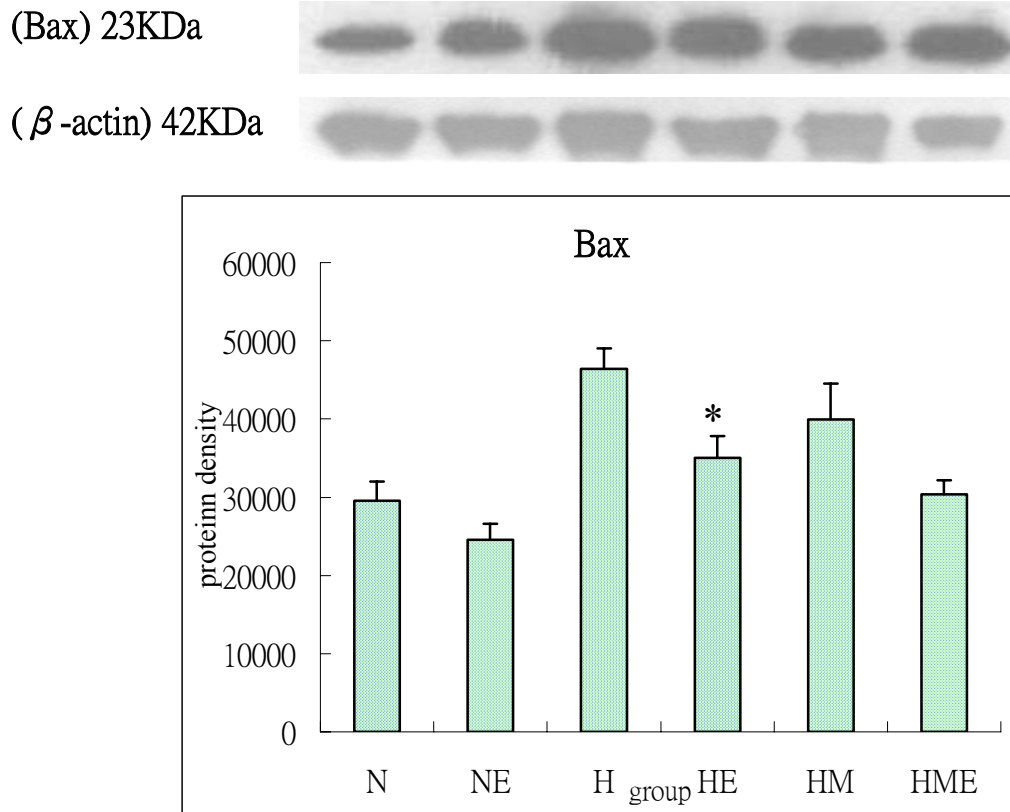


**Fig 10:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of apoptosis factor (Bcl-2) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

(n=2, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈凋亡路

徑 (Capase pathway) - (粒腺體路徑) -Bax 之蛋白質的影響



**Fig 11:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of apoptosis factor (Bax) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

All data are means $\pm$  S.D.

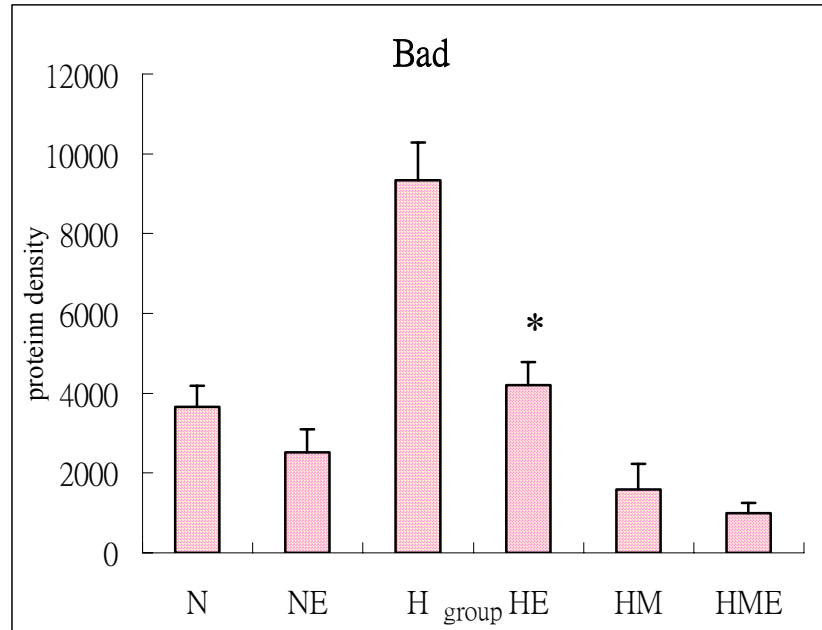
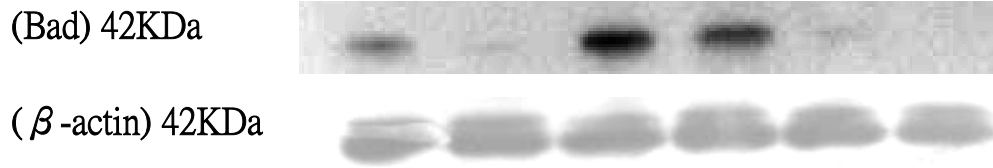
\*P<0.05, NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈凋亡路



徑 (Capase pathway) - (粒腺體路徑) Bad 之蛋白質的影響



**Fig 12:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of apoptosis factor (Bad) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

All data are means $\pm$  S.D.

\*P<0.05, NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

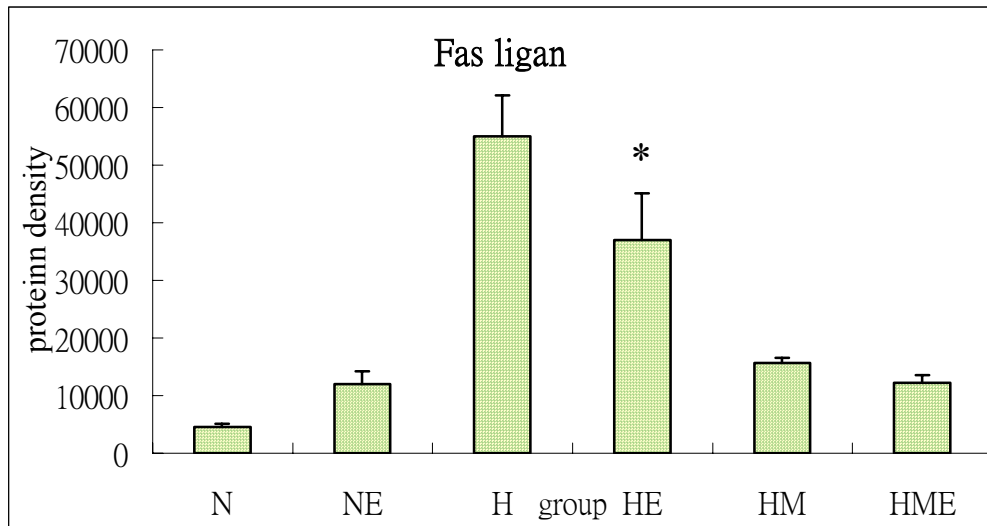
(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈凋亡路

徑 (Capase pathway) -(Fas 路徑)-Fas ligan 之蛋白質的影響

(Fas ligan) 40KDa

( $\beta$ -actin) 42KDa



**Fig 13:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of apoptosis factor (Fas-ligan) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

All data are means  $\pm$  S.D.

\* $P < 0.05$ , NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

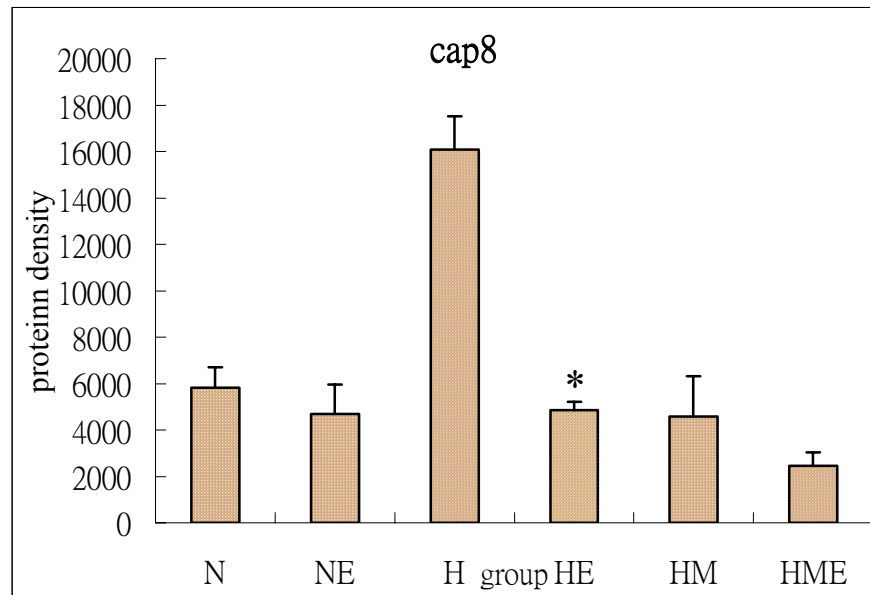
(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈凋亡路

徑 (Capase pathway) -(Fas 路徑)- Cap8 之蛋白質的影響

( Cap8) 21KDa

( $\beta$ -actin) 42KDa



**Fig 14:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of apoptosis factor (Cap8) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

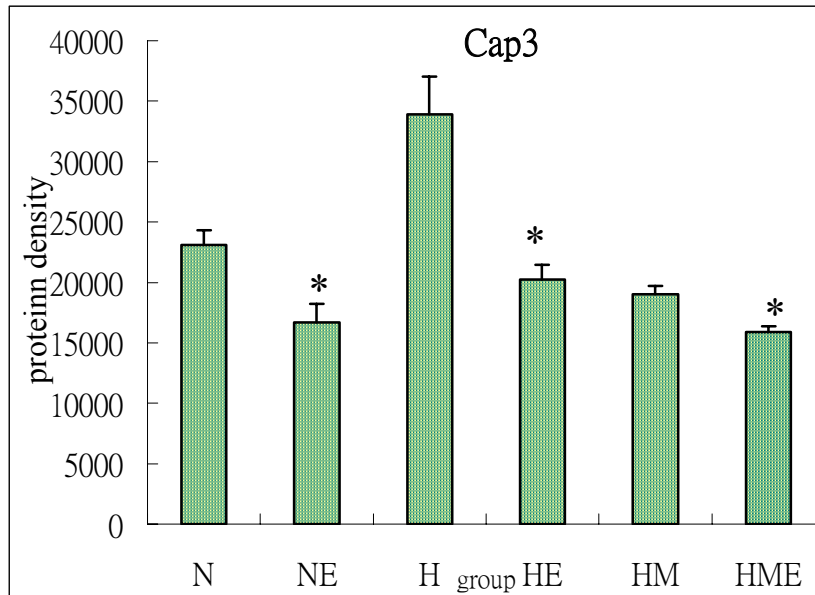
All data are means $\pm$  S.D.

\*P<0.05, NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈凋亡路

徑 (Capase pathway) -(Fas 路徑)- Cap3 之蛋白質的影響



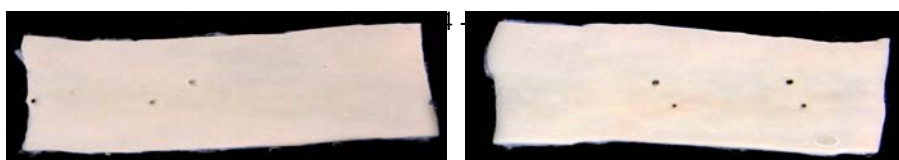
**Fig 15:**The effect of high cholesterol diet, exercise training and *Magnolia officinalis* extract treatment on protein expression of apoptosis factor (Cap3) of rabbits thoracic aortae for 8 weeks.

All data are means  $\pm$  S.D.

\*P<0.05, NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脂肪癥塊



## 沈積結果的影響

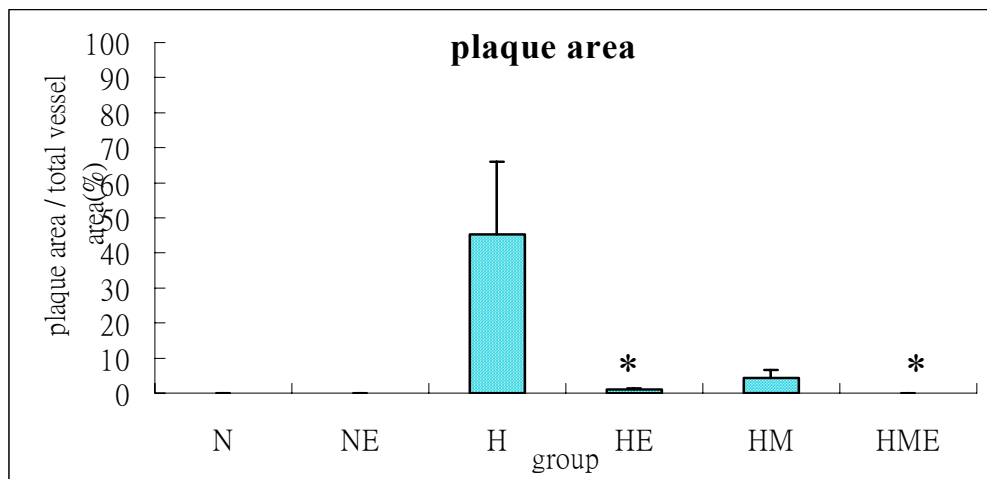


Fig 16 : The extent of the development of lipid lesions-rabbits after feeding of *Magnolia officinalis* extract and exercise training.

(original magnification 1X, one of three).

All data are means  $\pm$  S.D.

\* $P < 0.05$ , NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3, abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

8 週高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗萃物對兔子胸主動脈血管內



膜增厚結果的影響 (10X\*4X)

L : Lumen, I: intima, M : media

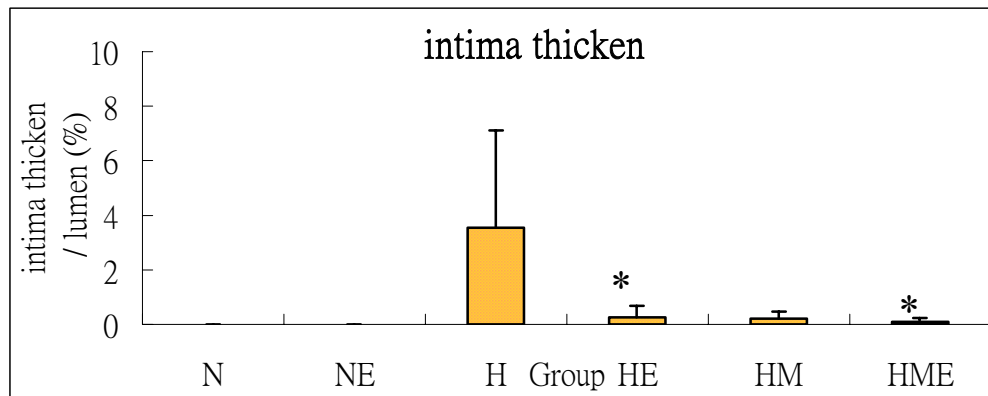


Fig17 : Explement of hematoxylin-eosin of rabbits thoracic aortae.The plaque areas were indicated by arrows.

All data are means± S.D.

\*P<0.05, NE vs. N, HE vs. H; HME vs. HM

(n=3,abbreviation: N:normal; NE:normal diet with exercise, H:high cholesterol diet; HE: high cholesterol diet with exercise, HM: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract ; HME: high cholesterol diet with *Magnolia officinalis* extract and exercise)

Fig 18 : 自由基形成及抗氧化酵素機制圖

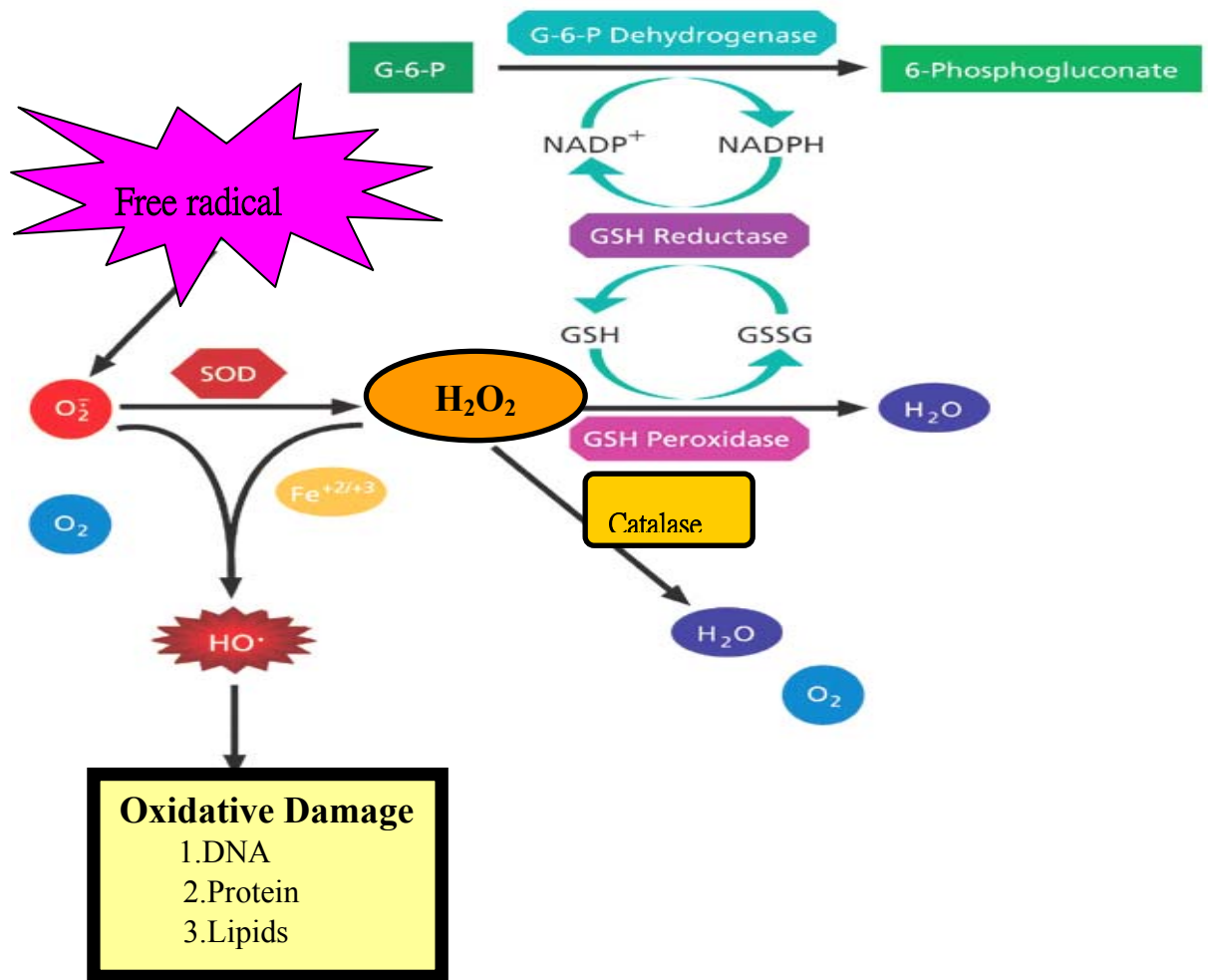


Fig 19 : MAPK 訊息傳遞途徑

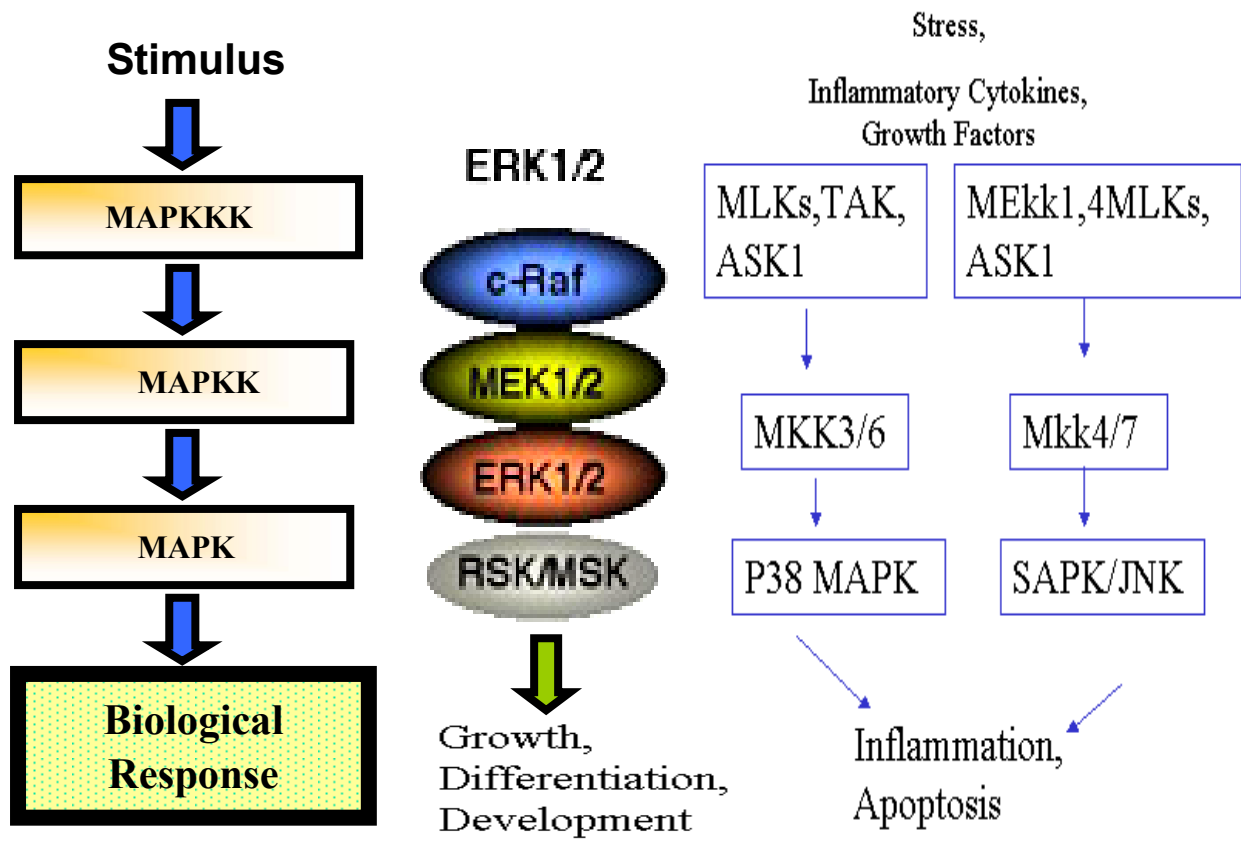


Fig 20 : 細胞凋亡訊息傳遞途徑



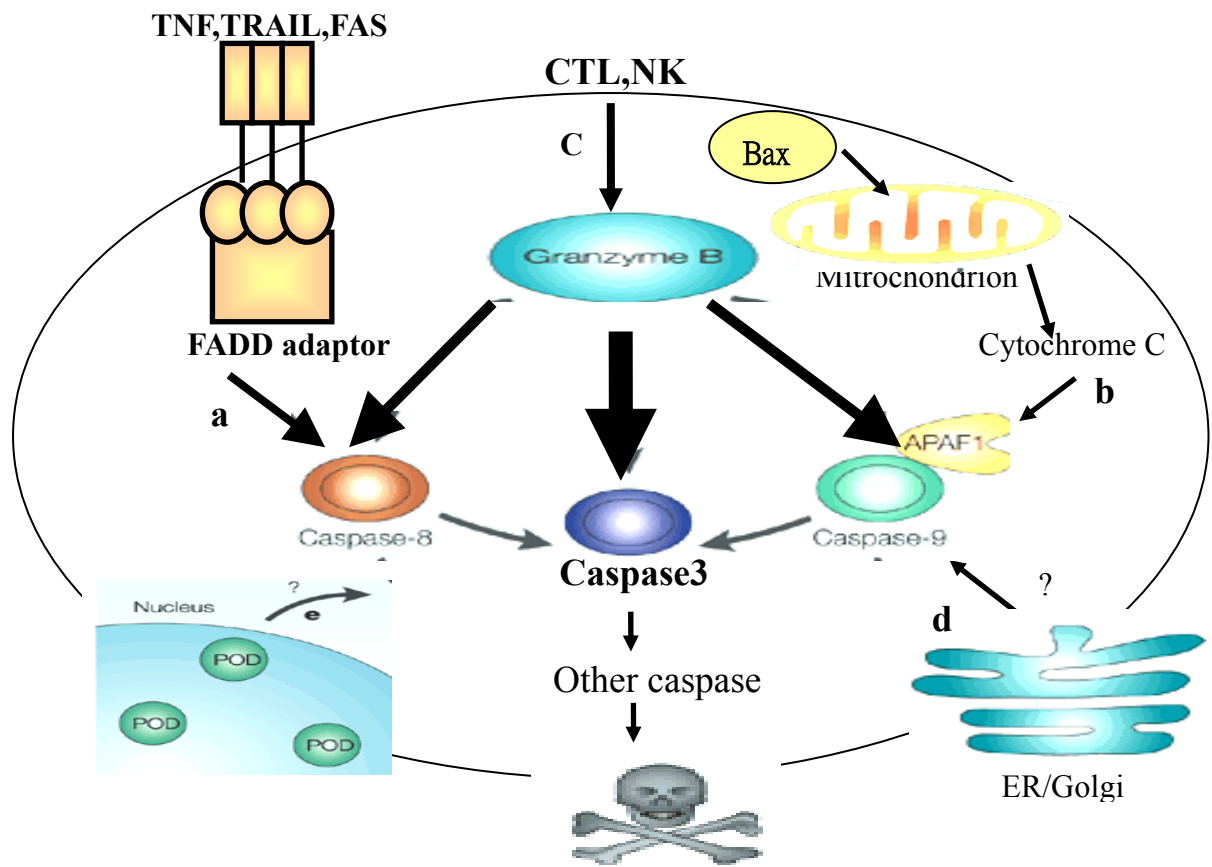


Fig 21 : 厚朴結構式圖

厚朴主要有 2 種成分：為 Magnolol 及 Honokiol。

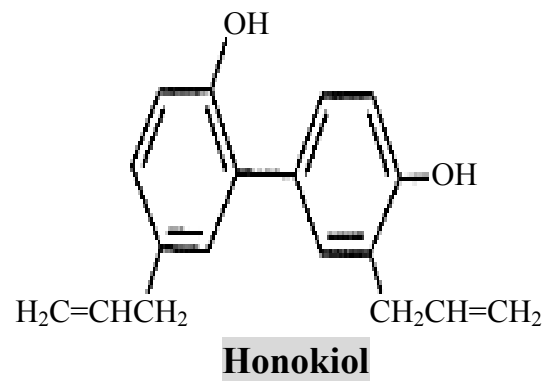
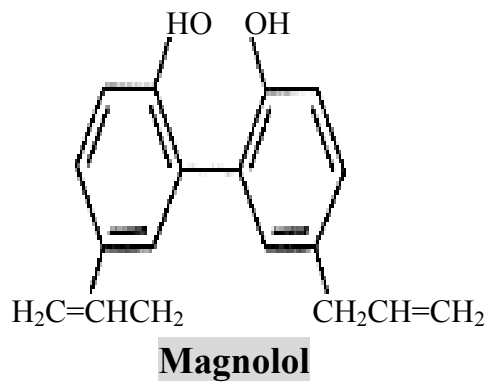


Fig 22：運動訓練模式圖

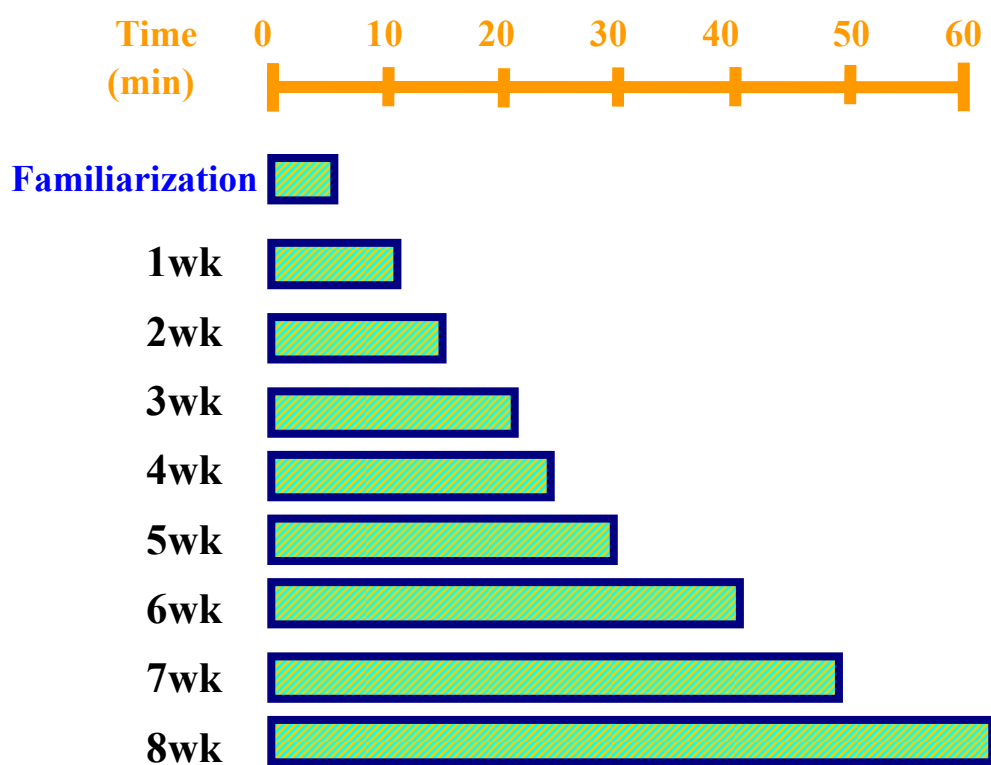
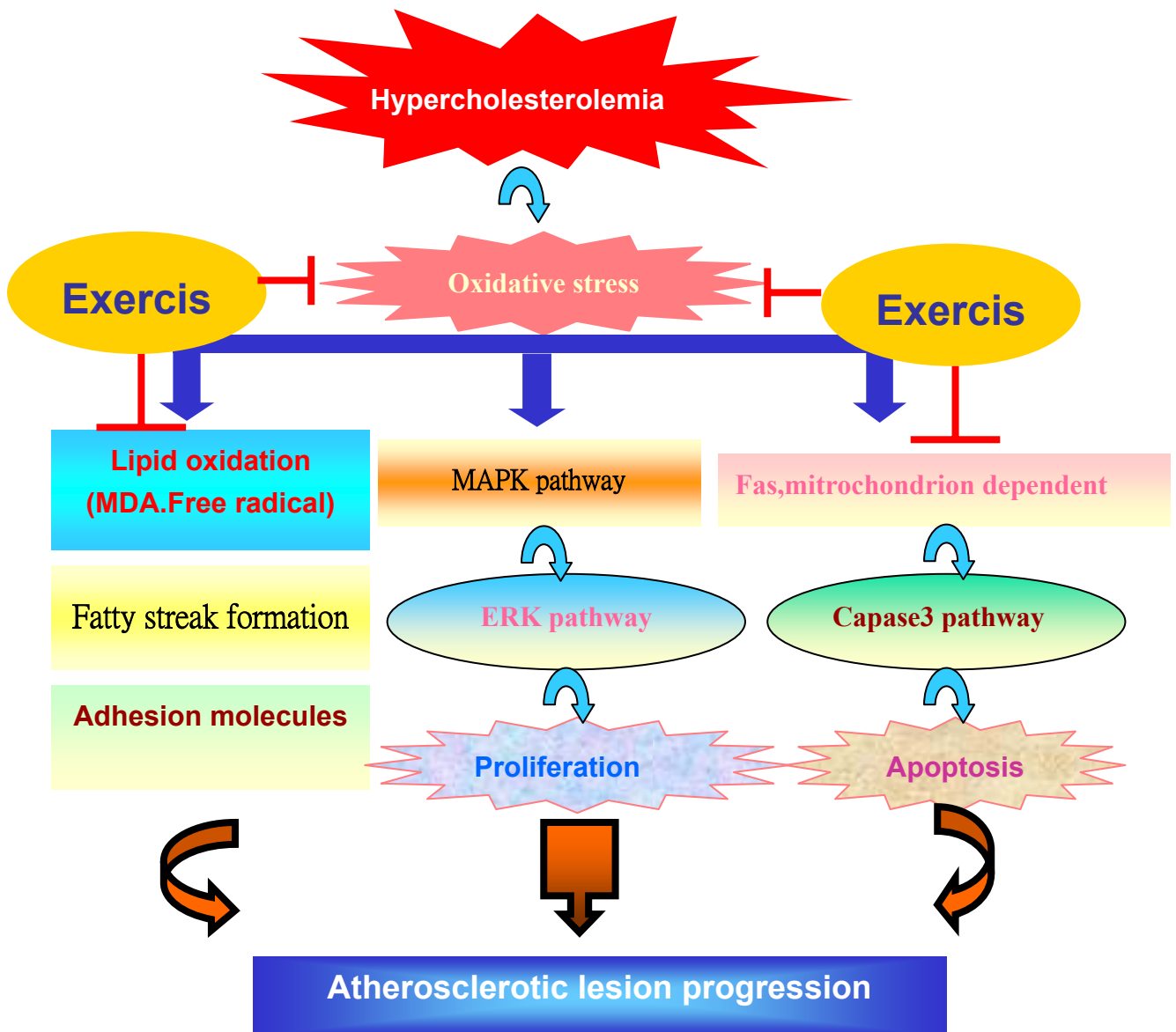


Fig 23：運動訓練及厚朴對增生、凋亡路徑及抗氧化效應影響的可能

機制



第五章、討論

### **第一部份：各組之間生長狀況、血液生化值的改變。**

在體重方面，經過 8 週飼養之後，因各組之間攝食狀況良好，體重及飼料效率無明顯變化，顯示各組間是處在相同的環境照顧，且生長健康情況一致。雖然餵食高膽固醇組別體重略微上升，但並無統計上差異 (Table 1)。

高膽固醇餵食、運動訓練及厚朴粗粹物對兔子血液生化值的影響 (Table 2) 方面，在 LDL、TC、TC、GOT、GPT：正常飲食的對照組與運動組之間比較並無差異，在經過八週餵食高膽固醇後，其血液中上述生化值會明顯增加，但是相同組別在經過運動訓練之後，則可有效下降，上述效應在經過厚朴給藥及運動訓練後甚至能下降更多，可見同時給厚朴及運動訓練，確實對減少血中致高膽固醇血症的危險因子，證實之前的研究報告顯示，規律運動可以降低血液中總膽固醇含量、低密度脂蛋白含量，且會增加血管內皮細胞功能跟血管舒張反應，降低糖尿病、肥胖、動脈粥狀硬化的發生率及一些心血管的疾病 (72-74)。且由 GOT、GPT 結果顯示，在經過八週高膽固醇餵食之後，可能會引發血中發炎反應，此不正常發炎反應可藉由給於中藥厚朴及運動而有所改善。與過去研究發現之結果符合 (43)，厚朴可降低大白鼠血液中 GOT、GPT 含量。

### **第二部份：各組之間運動訓練成效變化情形。**

在運動組檸檬酸合成酵素活性皆比其對照組高，顯示確實達到運動訓練效果。除此之外，每組之間心臟克數/體重比值，並無明顯差異，顯示其中度運動訓練模式對動物體是緩和無害，並不會造成動物體心臟負荷過大，而有心肌心室肥大(hypertrophy)情況發生。

文獻指出 apolipoprotein E-deficient mice 經過 12 週中度運動訓練後，發現其會增加跑步距離、檸檬酸合成酵素含量 (127)，在大白兔經過 8 週中度運動訓練後，一樣可藉由測量檸檬酸合成酵素來證實運動訓練效果 (149)。

### **第三部份：各組之間抗氧化能力比較情形。**

正常飲食的對照組與運動組之間比較並無差異，在經過 8 週餵食高膽固醇後，其血清中 MDA 含量明顯增加，但是相同組別在經過運動訓練之後，則可有效下降，在經過厚朴給藥及給於厚朴及及運動訓練後下降程度更多，可見給予運動訓練確實可以降低血清中氧化傷害。

正常飲食運動組自由基含量比對照組低，在經過八週餵食高膽固醇後，其胸主動脈中自由基含量明顯上升至  $838 \pm 50$  FR count /mg protein，但是相同組別在經過運動訓練之後，則可有效下降，在經過厚朴給藥後、在給於厚朴及及運動訓練後甚至能下降至  $385 \pm 13$  FR out /mg protein，可見給予運動訓練確實可以降低胸主動脈中氧化傷

害，並同時給厚朴及運動訓練，確實對抗氧化能力有正向促進效果 (Fig2)。

#### 第四部份：西方墨點法-比較抗氧化因子 SOD-1 蛋白質表現情形。

在抗氧化酵素 SOD-1 表現量，給予正常飲食的運動組顯著比其對照組高。由以上結果可以得知，經過高膽固醇餵食之後，會增加血液及組織間的氧化傷害，且當產生氧化壓力時，就會促使體內 LDL 轉變成 ox LDL，oxLDL 會促使內皮細胞分泌化學趨化因子促使單核球進入內皮細胞層，並轉生成吞噬細胞(macrophage)，去清除 ox LDL，而形成一包覆體-泡沫細胞(foam cells)。

在一般抗氧化因子有區分為：酵素性抗氧化因子 Mn-SOD, GPx 及非酵素性抗氧化因子 GSH。GSH 可經由運動訓練之後增加，而提升對清除超氧自由基及過氧化氫的能力 (101,102)。過去在肝臟及骨骼肌 (skeletal muscle) 也發現，運動之後可以減緩氧化壓力及胰島素抗性 (insulin resistance) (103,104)。在 Zucker rat 經過每週 7 天，每天 1 小時，8 週運動訓練之後可以增加抗氧化壓力的表現(105)。

在豬隻實驗中，當血管產生氧化壓力的時候，可能會造成內皮細胞功能失調。但中度有氧運動訓練卻可以改善其症狀。因為在動脈硬化初期可能會產生一些藉由 NAD(P)H oxidase 及 xanthine oxidase 產生

的 ROS 產物 (128-130)，除了會造成 NO 合成減少之外，並會伴隨著內皮細胞失去功能，而增加心血管疾病 (131,132)。當氧化壓力升高時可能會造成蛋白質、脂質、DNA 氧化傷害，而其中也會產生過氧硝酸(peroxynitrite)而去氮化蛋白質中殘餘的酪胺酸(tyrosine residues)，並造成細胞及分子間的功能失調，且 peroxynitrite 會產生超氧陰離子 (144-146)，而減少 NO 產量。上述氧化壓力效應都可以藉由 SOD-1 去除血管中的  $O_2^-$  而增加由乙醯膽鹼所引發血管舒張反應 (136)，並具有抗氧化效應，進而降低心血管疾病危險因子 (137,138)。

SOD 一共有分成 3 種類型，SOD-1 (Cu/Zn-dependent isoforms)，存在 cytosol 及 nucleus；SOD-2 (Mn dependent isoforms) 存在粒腺體 mitochondria；SOD-3 (Cu/Zn-dependent isoforms) 存在 extracellular matrix，另外抗氧化酵素還有 catalase 及 GPx，這些抗氧化分子可以調控氧化壓力及保護內皮細胞功能及 NO 的產生，當 SOD 系統受損時，則會減少 NO 的合成 (139,140)。運動所產生的抗氧化效應，經過規律運動之後，骨骼肌會增加總 SOD 含量，也有文獻指出，運動訓練之後，在小鼠胸主動脈 SOD-3 活性增加 (142)。

SOD-1 是個剪力敏感的基因產物 (shear stress-sensitive gene product) (152)，運動訓練時可以增加局部血流供應或是剪應力，由於會增加血



液流動進而會增加心輸出量而使胸主動脈內皮細胞的 SOD-1 表現增加。運動時除了會改變局部 ROS 產生量、催動 SOD-1 基因產生，也可能會與其他的轉錄因子有關，例如：specificity factor 1、activator protein-1、nuclear factor- KB (NF-kB) 都有可能引起瀑階效應(cascade effect) (153)。

另外雌性約克迷你豬 (Yucatan miniature pig) 經過 12 週的中度運動訓練後 (40-50%最大氧消耗量)，會對胸主動脈內皮細胞的抗氧化效應有正向促進的效果，並且會降低氧化壓力。在運動組的胸主動脈內皮細胞發現其 SOD-1 及 Cu/Zn SOD 會明顯增加。但是在其他的抗氧化酵素 (SOD-2, catalase)則沒有明顯變化。運動組也會降低促氧化酵素 (prooxidant enzyme) NAD(P)H oxidase 的前基質酵素 p67<sup>phox</sup> 含量，且會減緩脂質氧化代謝產物 MDA 及細胞不正常增生有關的因子-磷酸化 ERK-1/2 的生成(147)。經過 16-20 週運動訓練之後的雄性約克豬，其心臟冠狀動脈以 SOD-1 mRNA 會顯著增加，因此會對超氧自由基具抑制的效果(148)。

#### **第五部份：西方墨點法-比較黏著因子蛋白質表現情形。**

在黏著因子 P-selectin、VCAM-1 含量，以餵食高膽固醇組含量最高，

且在各運動組之間，都可以看出比其對照組有顯著降低。在動脈硬化形成之初，會促使內皮細胞對脂蛋白的通透性增加，會使一些白血球黏著分子及內皮細胞黏著分子分泌增加，並會讓 ox LDL 容易進入內皮細胞層，穿過血管內皮細胞層，而進入到血管內膜中。因此可藉由觀察黏著因子的增加來評斷內皮細胞受損狀況。動脈硬化早期時，血管內皮細胞產生許多的黏著因子，例如 MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, P-selectin 及 E-selectin 等。但若在 *in vitro* 實驗的人類動脈內皮細胞株，給予 magnolol，可以有效降低 TNF  $\alpha$  所誘發 NF- $\kappa$ B 轉錄情形及 VCAM-1 表現。在 *in vivo* 實驗中，先以 2% 高膽固醇飼料誘發兔子高膽固醇血症，並再給予 IP 注射 magnolol (1  $\mu$ g/Kg body weight)，6 週之後，也同樣發現有相同的效應 (42)。

在探討高膽固醇飲食誘發動脈硬化與運動之間的相關性，也有文獻發現，在給予兔子 2% 高膽固醇飲食，餵食 8 週後，誘發紐西蘭大白兔動脈硬化，並以免疫染色的方式發現會增加一些黏著因子 (P-selectin, VCAM-1, MCP-1) 及 iNOS 的表現。但是在經過中度運動訓練，由 10 分鐘增加至 60 分鐘，速度 0.88 km/h 每週 5 天，經過 8 週之後，會有效降低上述黏著因子及改善血管功能效應 (149)。

#### **第六部份：西方墨點法-比較增生因子，增生路徑各蛋白質表現情形。**

PCNA 含量，以餵食高膽固醇組含量最高。本實驗結果初步證實，

誘發高膽固醇血症所引發動脈硬化病徵，會引起細胞不正常的增生，並透過 MAPK pathway，有效活化 Raf、MEK 1/2 增生因子，最後導向 Erk 1/2 及磷酸化 Erk 1/2 的增生路徑。而過去文獻中發現運動會降低細胞不正常增生有關的因子-磷酸化 ERK-1/2 的生成 (147)。由上述結果亦發現，這些細胞不正常的增生可以透過運動訓練並給予厚朴粗萃取物之後，而有所改善。

#### 第七部份：西方墨點法-比較，凋亡路徑（粒腺體路徑）凋亡因子各蛋白質表現情形。

在凋亡路徑（Capase pathway）中，屬於粒腺體路徑的 Bcl2：在各組之間相比較，則都無顯著差異。但在 Bax：高膽固醇餵食後，其蛋白質含量些許升高，但在高膽固醇餵食加上運動後，則會顯著下降。Bad：與 Bax 有相同效應。(Fig10-Fig12)

Bcl-2 與 Bax 二者是 homologous protein，在細胞生存與死亡之間扮演一個平衡的角色，Bcl-2 可以延長細胞生存，但 Bax 則會引發細胞凋亡。Bcl-2 為抗細胞凋亡族群（Anti-apoptotic members），Bcl-2 gene 也會抑制早期細胞凋亡，包括 Bcl-xL、Bcl-w 及 Mcl-1，可以抑制 Bax 及其他促凋亡蛋白（pro-apoptotic proteins）滲入細胞膜及有效阻礙可以避免 intracellular 釋放出 cytochrome c。Bcl-2 可抑制 cytochrome c 由粒

腺體細胞膜釋放進入到 cytosolic space (154,155)，當 cytochrome c 釋放進入 mitochondria 時，即可使粒腺體細胞膜去極化並活化一連串細胞凋亡機制，例如：染色質濃縮(chromatin condensation)、DNA 片斷化(DNA fragmentation)。除此之外，Bcl-2 也可能會去改變 Apaf-1 結構，Apaf-1 有促進 procaspase-9 聚集的作用(156,157)，當誘發 caspase-9 因子時，則會啟動 caspase-3 及其他細胞凋亡分子。當活化這些 caspases 及 endonuclease 分子時，可能會造成細胞分解 (cellular disintegration)，Bcl-2 除了可以與 Apaf-1 結合外也會使其他接應蛋白 (adapter protein) 失去活性，而避免細胞凋亡產生(158)。在細胞凋亡下游機制 (Downstream)，如果抑制 caspases 及 cysteine proteinases 則可有效阻斷細胞凋亡情形發生(159)。

Magnolol 對細胞凋亡有正向保護作用，在 WI/R (warm ischemia-reperfusion) 老鼠身上發現，給予 Magnolol 能夠延長缺血性再灌留之老鼠肝臟的容忍度達 2 小時之久，且會降低凋亡細胞的產生；並且給予 Magnolol 後 2 小時，在 DNA 片段 (DNA ladder) 並無明顯表現；RT-PCR 結果也發現，在給予 Magnolol 後，可以大量增加 anti-apoptotic Bcl-xL 基因及些許 Bcl-2 基因表現、降低 pro-apoptotic Bcl-xS 表現量，而對 WI/R 老鼠肝臟細胞損傷對有正向保護的效果(160)。

但是也在一些文獻中發現，在蒼鼠心臟組織，雖沒有 Bcl-2 表現，但卻可以發現 pro-apoptosis 因子 (Bax、Bad、CPP-32) 的存在 (162)。另外在餵食高膽固醇的兔子其血管癥塊上卻沒有測到 Bcl-2 的表現 (163)。

#### 第八部份：西方墨點法-比較，凋亡路徑 (Fas 路徑) 凋亡因子各蛋白質表現情形。

在凋亡路徑 (Capase pathway) 中，屬於 Fas 路徑的 FasL、Capase8 及 Capase3：高膽固醇餵食後，其蛋白質含量明顯升高。其運動組、厚朴組、厚朴組與其運動組比較，在運動後的組別都有減少凋亡系統因子含量 (Fig13-Fig15)。

細胞凋亡 (apoptosis) 機制可以控制細胞程序性死亡，藉此可以調節細胞質量。細胞凋亡 包括二種 路徑，一：當 cellular 遭受壓力時，透過粒腺體釋放 cytochrome c，之後 cytochrome c 會接和在 CED-4 同族體 Apaf-1 上 (CED-4 homolog Apaf-1)，並幫助其結合在 pro-caspase-9 而造成細胞溶解 (proteolytic) 程序性進行，進而活化 pro-caspase9、pro-caspase-3，而產生一連串 caspase activation 的瀑階效應，而使細胞凋亡產生 (163)。二. 在細胞凋亡上游機制 (upper stream)，首先由活化 NF $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) 進而影響 TNF- $\alpha$ ，並透過 Fas/Fas ligand

(FasL)程序性進行細胞凋亡 (164) 。Fas-APO1 是一個 45KDa 大小的 transmembrane protein，與 TNF (tumor necrotis factor) 及 NGF 接受器 (nerve growth factor receptor) 同屬一個 superfamily。FasL，一種細胞表面分子蛋白，歸屬在 tumor necrosis factor 家族，當其與 Fas 結合上形成複合體時，及轉變成活化 caspases 路徑的上游機轉，可先活化 caspases 路徑 downstream effector 的 caspase-8 (165)，其也可以連接其他路徑的分子，例如：Bid。Bid 是一個 15-kDa 大小的蛋白質，可遷移至粒腺體及釋放 cytochrome c，主要藉由 caspase-8 而引發細胞凋亡 (166,167)。另外在動脈硬化受損部位，利用免疫螢光染色去觀察 Fas/APO1 表現，及用 TUNEL assay 觀察 DNA fragmentation 表現，可發現大量 Fas/APO1 表現，並且在纖維化癥塊 (fibroys plaque) 會有 DNA 斷裂 (DNA fragmentation) 情形的表現(168)。

**第九部份：高膽固醇對胸主動脈上脂質沈積型態改變情形。**

在脂肪癥塊沈積結果發現，把血管段縱向剪開，並以 Sudan IV 染色後觀察到，在餵食高膽固醇組別，明顯看到紅色脂肪癥塊堆積，尤其在血管段分支處更為明顯，但是加上運動後，其含量則明顯減少。在厚朴組及其運動組別，同樣的脂肪癥塊沈積現象則有減低的趨勢 (Fig15)。在血管內膜增厚結果，則將血管段做矢狀切片後，染以 HE stain 後發現，在餵食高膽固醇組別，明顯看到血管內膜處有脂質堆積，但是加上運動後，其含量則明顯減少。在厚朴組及其運動組別，同樣的血管內膜處有脂質堆積現象則有減低的趨勢。(Fig16)

在探討高膽固醇飲食誘發動脈硬化與運動之間的相關性，文獻發現，給予兔子 2% 高膽固醇飲食餵食 8 週後，誘發紐西蘭大白兔動脈硬化，發現會增加血液中總膽固醇、LDL 含量之外，其胸主動脈中亦發現，發現確實會增加脂質沈積及在 intimal 有增厚的情況(149)。上述運動對心血管的正向效影響，還具有時間依賴效應性，紐西蘭大白兔給予 2% 高膽固醇飲，經過 2, 4, 或 6 週. 0.88 km/h ，最多至每天 40 min, 每週 5 day，發現在第 4 及 6 週時，運動確實會降低一些脂質沈積。早在 2 週時，就可以減緩內皮細胞失去功能，更在 4 及 6 週時有效降低發炎因子的產生。上述正向效應會隨著運動訓練週數增加而有所提升 (150)。同樣的誘發模式，紐西蘭大白兔給予 2% 高膽固醇飲食，經過八週 0.88 公里/ 小時之運動訓練，在高膽固醇兔子股動脈

上發現：增加血液總膽固醇、LDL 含量，及脂質沈積、血管內膜增厚，且其病徵都會隨運動訓練效果增加而趨減緩(151)。運動訓練在 apolipoprotein E 缺失的小鼠方面也有正向的效果，經過 12 週中度運動訓練後，會增加跑步距離、檸檬酸合成酵素含量及後肢腓腸肌肉 eNOS 含量，並有效降低心臟脂質沈積(138)。

## 第六章、結論



經過八週高油高膽固醇飲食誘發紐西蘭大白兔高膽固醇血症之後，去探討高膽固醇餵食組、運動訓練組及厚朴粗萃物餵食組之間對高膽固醇血症相互關係的影響。兔子在經過八週飼養之後體重、生長情況影響及飼料效率無明顯變化，但在血液生化值方面，則會大量增 LDL、TG、TC、GOT、GPT 含量。同時也會增加一些脂質氧化酵素指標，例如：血清中的 MDA 及胸主動脈自由基含量，但是相同組別在經過運動訓練之後，則可有效下降。厚朴給藥及運動訓練也具有相同下降效應。更進一步以西方墨點法探討在胸主動脈抗氧化蛋白酵素 SOD-1 表現情形，發現在膽固醇餵食之後會明顯降低，但在運動組可明顯增加抗氧化因子。以上結果證實給予中藥厚朴及運動訓練，對減少血中血脂質含量、血液及組織間氧化傷害有正向保護效果。

運動組的檸檬酸合成酵素活性皆比其對照組高，顯示確實達到運動訓練效果，每組之間心臟克數/體重比值並無明顯差異，顯示中度運動訓練模式對動物體是緩和無害。

胸主動脈的黏著因子 (P-selectin, VCAM-1)、增生因子 (PCNA) 於高膽固醇組有明顯增加，其不正常的增生可能與 MAPK pathway 增生路徑有關。使細胞生長因子產量不正常及過度增生及分化。

凋亡路徑方面，分別探討二大凋亡路徑中凋亡因子各蛋白質表現情形，一為：粒腺體凋亡路徑，透過粒腺體釋放 cytochrome c，並引

發下游反應，則高膽固醇組 Bax, Bad 顯著上升。另一路徑為：Fas ligand 凋亡路徑，其上游因子 FasL、Cap8、Cap3 在高膽固醇組皆有顯著上升。顯示在經過高膽固醇餵食之後，其所引發的不正常凋亡現象，是由粒腺體及 Fas / Fas ligand 凋亡路徑所共同參與，引發 caspase activation 的細胞凋亡路徑。但經過 8 週中度運動訓練，發現上述病態可以獲得明顯地減輕，並且在給予厚朴及給予厚朴加上運動的組別，也更有顯著降低不正常凋亡及增生的現象。

型態學方面，餵食高膽固醇組的胸主動脈，明顯看到紅色脂肪癥塊堆積，intimal 處有脂質堆積，上述病徵在運動組別及給藥厚朴組顯著降低。

由上述各項實驗初步證實，紐西蘭大白兔在經過 8 週 0.5% 高膽固醇及 10% 高脂飲食餵食之後，確實會增加血液脂質氧化、自由基及粥狀動脈硬化危險因子的產生，另外會使血管內皮細胞及平滑肌細胞產生不正常增生及凋亡，也伴隨血管病態脂肪癥塊堆積及血管管腔內膜狹窄情形。但經過 8 週中度運動訓練，上述病態可以獲得明顯地減輕，並且在給予厚朴及給予厚朴加上運動的組別，也有明顯的加乘效果。因此可以藉由中度有氧運動訓練及給予厚朴加強抗氧化及降低血脂能力，來達到部分抑制及減緩粥狀動脈硬化病徵的產生(Fig:23)。

## 第七章、參考文獻

1. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis : implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis*, 1998; 141: 1-15
2. Steinberg D. Studies on the Mechanism of Action of Probucol. *Am J Cardiol*, 1986; 57: 16H-21H.
3. Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res*. 1996; 33:181-94.
4. Oparil S, Oberman A. Nontraditional cardiovascular risk factors. *Am J Med Sci*. 1999; 317:193-207.
5. Hiltunen TP, Luoma JS, Nikkari T, Yla-Herttuala S. Expression of LDL receptor,VLDL receptor,LDL receptor-related protein, and Scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions. *Circulation*. 1998 ; 97:1079-86.
6. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*, 2000; 407:233-241.
7. Jaffe EA. Physiologic functions of normal endothelial Cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;454:279-91.
8. Pearson JD. Normal endothelial cell function. *Lupus*. 2000;9: 183-188.
9. Carpenter KL, Taylor SE, van der Veen C, Williamson BK, Ballantine JA, Mitchinson MJ. Lipids and oxidised lipids in human atherosclerotic lesions at different stages of development. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1256:141-50.
10. Keaney JF Jr. Jr., Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med*. 2000;21:99-166.
11. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:23-37.
12. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
13. Xu W, Takahashi Y, Sakashita T, Iwasaki T, Hattori H, Yoshimoto T. Low density lipoprotein receptor-related protein is required for macrophage-mediated

- oxidation of low density lipoprotein by 12/15-lipoxygenase. *J Biol Chem.* 2001;276:36454-9.
14. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 1995;91:2488-96.
  15. Wang Z, Castresana MR, Newman WH. Newman, Reactive oxygen and NF-kappaB in VEGF-induced migration of human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285:669-74.
  16. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 1995;91:2488-96.
  17. Hegyi L, Skepper JN, Cary NR, Mitchinson MJ. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J Pathol.* 1996;180:423-9.
  18. 19 Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 1997;96:3602-9.
  19. 20 Jeremy RW, McCarron H, Sullivan D. Effects of dietary
  20. L-arginine on atherosclerosis and endothelium-dependent vasodilatation in the hypercholesterolemic rabbit. *Circulation.* 1996;94:498-506.
  21. Maxwell AJ, Tsao PS, Cooke JP. Modulation of the nitric oxide synthase pathway in atherosclerosis. *Exp Physiol.* 1998;83:573-84.
  22. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation.* 1998;97:2494-8.
  23. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis

- toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation*. 1991;83:652-60.
24. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995;38:87-104.
  25. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002 ;18:872-9.
  26. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978; 201:875-80.
  27. Haraguchi H, Ishikawa H, Shirataki N, Fukuda A. Antiperoxidative Activity Of Neolignans from *Magnolia obovata*. *J Pharm Pharmacol*. 1997;49:209-12.
  28. Scandalios JG. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol*. 1993;101:7-12.
  29. Grundy SM. The role of cholesterol management in coronary disease risk reduction in elderly patients. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1998;27:655-75.
  30. Bosch-Morell F, Sanz A, Diaz-Llopis M, Romero FJ. Lipid peroxidation products in human subretinal fluid. *Free Radic Biol Med*. 1996;20:899-903.
  31. Gaeta LM, Tozzi G, Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of health pediatric subjects. *Clin Chim Acta*. 2002;322:117-20.
  32. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 1997; 96:3602-9.
  33. Negre-Salvayre A, Vieira O, Escargueil-Blanc I, Salvayre R. Oxidized LDL and 4-hydroxynonenal modulate tyrosine kinase receptor activity. *Mol Aspects Med*. 2003;24:251-61.
  34. Laranjinha JA, Almeida LM, Madeira VM. Lipid peroxidation and its inhibition in low density lipoproteins: quenching of cis-parinaric acid fluorescence. *Arch*

- Biochem Biophys. 1992;297:147-54.
35. Cabre A, Girona J, Vallve JC, Heras M, Masana L. Cytotoxic effects of the lipid peroxidation product 2,4- decadienal in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2003;169:245-50.
  36. Bennett MR, Boyle JJ. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1998;138:3-9.
  37. Schneider DB, Vassalli G, Wen S, Driscoll RM, Sassani AB, DeYoung MB, Linnemann R, Virmani R, Dichek DA. Expression of Fas Ligand in arteries of hypercholesterolemic rabbits accelerates atherosclerotic lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:298-308.
  38. Locher R, Brandes RP, Vetter W, Barton M. Native LDL induces proliferation of human vascular smooth muscle cells via redox-mediated activation of ERK 1/2 mitogen-activated protein kinases. *Hypertension*. 2002;39:645-50.
  39. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Yoshimura SI, Taniyama Y, Aoki M, Matsubara H, Kim S, Kaneda Y, Ogihara T. 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;50:1472-81.
  40. Goetze S, Xi XP, Kawano Y, Kawano H, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. *Hypertension*. 1999;33:183-9.
  41. 中藥學（上），顏正華，知音出版社 p320-323
  42. Teng CM, Ko FN, Wang JP, Lin CN, Wu TS, Chen CC, Huang TF. Antihaemostatic and antithrombotic effect of some antiplatelet agents isolated from Chinese herbs. *J Pharm Pharmacol*. 1991;43:667-9.

43. Chen YH, Lin SJ, Chen JW, Ku HH, Chen YL. Magnolol attenuates VCAM-1 expression in vitro in TNF-alpha-treated human aortic endothelial cells and in vivo in the aorta of cholesterol-fed rabbits. *Br J Pharmacol.* 2002;135:37-47.
44. Chiu JH, Wang JC, Lui WY, Wu CW, Hong CY. Effect of Magnolol on in Vitro Mitochondrial Lipid Peroxidation and Isolated Cold- Preserved Warm-Reperfused Rat Livers. *J Surg Res.* 1999;82:11-6.
45. Chen YL, Lin KF, Shiao MS, Chen YT, Hong CY, Lin SJ. Magnolol, a potent antioxidant from *Magnolia officinalis*, attenuates intimal thickening and MCP-1 expression after balloon injury of the aorta in cholesterol-fed rabbits. *Basic Res Cardiol.* 2001;96:353-63.
46. Chiu JH, Ho CT, Wei YH, Lui WY, Hong CY. In vitro and in vivo protective effect of honokiol on rat liver from peroxidative injury. *Life Sci.* 1997;61:1961-71.
47. Shen UC, Sung YJ. Magnolol inhibits Mac- 1 ( CD 11b/CD 18 ) dependent neutrophil adhesion : Relationship with its antioxidant effect. *European Journal of Pharmacology.* 1998; 343: 79–86
48. Lee YM, Hsiao G, Chen HR, Chen YC, Sheu JR, Yen MH..Magnolol reduces myocardial ischemia reperfusion injury via neutrophil inhibition in rats. *Eur J Pharmacol.* 2001;422:159-67.
56. Franklin BA, Kahn JK. Delayed progression or regression of coronary atherosclerosis with intensive risk factor modification: effects of diet, drugs, and exercise. *Sports Med.* 1996;22:306-20.
49. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-9.

50. Chen Hi H, Chiang IP, Jen CJ. Exercise training increases acetylcholine-stimulated endothelium-derived nitric oxide release in spontaneously hypertensive rats. *J Biomed Sci.* 1996;3:454-460.
51. Yang AL, Tsai SJ, Jiang MJ, Jen CJ, Chen HI. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta. *J Biomed Sci.* 2002 ;9:149-55.
52. Woodman CR, Muller JM, Laughlin MH, Price EM. Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise-trained pigs. *Am J Physiol.* 1997;273:H2575-9.
53. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation.* 1998 30;97:2494-8.
54. Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM. Inducible nitric oxide synthase is present within humantherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest.* 1996 Jul;75:77-85.
55. Behr D, Rupin A, Fabiani JN, Verbeuren TJ. Distribution and prevalence of inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic vessels of long-term cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 1999;142:335-44.
56. Dong ZM, Brown AA, Wagner DD. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in apo-E deficient mice. *Circulation.* 2000;101::2290-5.
57. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res.* 1999;85:199-207.



58. Ikeda U, Matsui K, Murakami Y, Shimada K. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *Clin Cardiol.* 2002;25:143-7.
59. Ikeda U, Maeda Y, Shimada K. Inducible nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Clin Cardiol.* 1998;21:473-6.
60. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res.* 1994;74:349-53.
61. Behr-Roussel D, Rupin A, Simonet S, Bonhomme E, Coumailleau S, Cordi A, Serkiz B, Fabiani JN, Verbeuren TJ. Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation.* 2000;102:1033-8.
62. Niebauer J, Dulak J, Chan JR, Tsao PS, Cooke JP. Gene transfer of nitric oxide synthase: effects on endothelial biology. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:1201-7.
63. Niebauer J, Schwarzacher SP, Hayase M, Wang B, Kernoff RS, Cooke JP, Yeung AC. Local L-arginine delivery after balloon angioplasty reduces monocyte binding and induces apoptosis. *Circulation.* 1999;100:1830-5.
64. Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, Butcher EC, Cooke JP. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation.* 1994;89:2176-82.
65. Wolf A, Zalpour C, Theilmeyer G, Wang BY, Ma A, Anderson B, Tsao PS, Cooke JP. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Cardiol.* 1997 ;29:479-85.
66. Yao SK, Ober JC, Krishnaswami A, Ferguson JJ, Anderson HV, Golino P, Buja LM, Willerson JT. Endogenous nitric oxide protects against platelet aggregation

- and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries. *Circulation*. 1992;86:1302-9.
67. Boger RH, Bode-Boger SM, Frolich JC. The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis*. 1996 Nov 15;127:1-11.
  68. Gimbrone MA Jr, Resnick N, Nagel T, Khachigian LM, Collins T, Topper JN. Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;811:1-10.
  69. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994;94:885-91.
  70. Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, and Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation*. 1996 ;94:1682-9.
  71. Tsao PS, Wang B, Buitrago R, Shyy JY, and Cooke JP. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation*. 1997;96:934-40.
  72. Haskell WL, Alderman EL, Fair JM, Maron DJ, Mackey SF, Superko HR, Williams PT, Johnstone IM, Champagne MA, Krauss RM, Farquhar JW. Effects of intensive multiple risk factor reduction on coronary atherosclerosis and clinical cardiac events in men and women with coronary artery disease. The Stanford Coronary Risk Intervention Project (SCRIP). *Circulation*. 1994;89:975-90.
  73. Niebauer J, Hambrecht R, Velich T, Hauer K, Marburger C, Kalberer B, Weiss C, von Hodenberg E, Schlierf G, Schuler G, Zimmermann R, Kubler W. Attenuated progression of coronary artery disease after 6 years of multifactorial risk intervention: role of physical exercise. *Circulation*. 1997;96:2534-41.

74. Ornish D, Brown SE, Scherwitz LW, Billings JH, Armstrong WT, Ports TA, McLanahan SM, Kirkeeide RL, Brand RJ, Gould KL. Can lifestyle changes reverse coronary heart disease? *Lancet*. 1990 ;336:129-33.
75. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis : implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis*. 1998; 141: 1-15.
76. Steinberg D. Studies on the Mechanism of Action of Probucol. *Am J Cardiol*. 1986;57:16H-21H.
77. Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res*. 1996;33:181-94.
78. Laughlin MH. Effects of exercise training on coronary transport capacity. *J Appl Physiol*. 1985;58:468-76.
79. Laughlin MH, Tomanek RJ. Myocardial capillarity and maximal capillary diffusion capacity in exercise-trained dogs. *J Appl Physiol*. 1987;63:1481-6.
80. Overholser KA, Laughlin MH, Bhatte MJ. Exercise training-induced increase in coronary transport capacity. *Med Sci Sports Exerc*. 1994;26:1239-44.
81. Bassenge E, Huckstorf C. Endothelium-mediated control of the coronary circulation. *Acta Cardiol*. 1991;46:419-24.
82. Laughlin MH, Overholser KA, and Bhatte MJ. Exercise training increases coronary transport reserve in miniature swine. *J Appl Physiol*, 1989; 67: 1140-1149.
83. Oltman CL, Parker JL, Adams HR, and Laughlin MH. Effects of exercise training on vasomotor reactivity of porcine coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1992; 263: H372-H382.

84. Chen Hi H, Chiang IP, Jen CJ. Exercise Training Increases Acetylcholine-Stimulated Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Biomed Sci.* 1996;3:454-460.
85. Chen HI, Li HT. Physical conditioning can modulate endothelium-dependent vasorelaxation in rabbits. *Arterioscler. Thromb.* 1993; 13: 852–856.
86. Delp MD, McAllister RM, Laughlin MH. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *J Appl Physiol.*1993;75: 1354–1363.
87. Hardman AE. Exercise in the prevention of atherosclerotic, metabolic and hypertensive diseases: a review. *J Sports Sci.* 1996;14: 201–218.
88. Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, Ahotupa M, Reduced oxidized LDL levels after a 10-month exercise program. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1998; 30: 1496–1501.
89. Kingwell BK, Tran B, Cameron JD, Jennings JL, Dart AM. Enhanced vasodilation to acetylcholine in athletes is associated with lower plasma cholesterol. *Am J Physiol.* 1996;270: H2008–H2013.
90. Smith JK, Dykes R, Douglas JE, Krishnaswamy G, Berk S. Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *JAMA.* 1999;281:1722-7.
91. Jen CJ, Chan HP, Chen HI. Chronic exercise improves endothelial calcium signaling and vasodilatation in hypercholesterolemic rabbit femoral artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1219-24.
92. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res.* 1994;74:349-53.

93. Wang J, Wolin MS, Hintze TH. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circ Res.* 1993;73:829-38.
94. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol.* 1995;269:C1371-8.
95. Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM, Harrison DG. Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res.* 1996 ;79:32-7.
96. Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science.* 1985 22;227:1477-9.
97. Koller A, Huang A, Sun D, Kaley G. Exercise training augments flow-dependent dilation in rat skeletal muscle arterioles. Role of endothelial nitric oxide and prostaglandins. *Circ Res.* 1995;76:544-50.
98. Johnson LR, Parker JL, Laughlin MH. Chronic exercise training improves ACh-induced vasorelaxation in pulmonary arteries of pigs. *J Appl Physiol.* 2000 ;88:443-51.
99. Muller JM, Myers PR, Laughlin MH. Vasodilator responses of coronary resistance arteries of exercise-trained pigs. *Circulation.* 1994 ;89:2308-14.
100. Henriksen EJ. Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol.* 2002;93:788-96.
101. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112.
102. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci.* 2000 ;57:1825-35.
103. Rossetti L, Giaccari A, Barzilai N, Howard K, Sebel G, Hu M. Mechanism by which hyperglycemia inhibits hepatic glucose production in conscious rats.

- Implications for the pathophysiology of fasting hyperglycemia in diabetes. *J Clin Invest.* 1993 ;92:1126-34.
104. Henriksen EJ, Saengsirisuwan V. Exercise training and antioxidants: Relief from oxidative stress and insulin resistance. *Exerc Sport Sci. Rev.* 2003; 31: 79–84.
105. Chang SP, Chen YH, Chang WC, Liu IM, Cheng JT. Increase of anti-oxidation by exercise in the liver of obese Zucker rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004 ; 31: 506-11.
106. Skjelbakken T, Valen G, Vaage J. Perfusing isolated rat hearts with hydrogen peroxide: An experimental model of cardiac dysfunction caused by reactive oxygen species. *Scand J Clin Lab Invest.* 1996; 56: 431–9.
107. Smith SH, Kramer MF, Reis I, Bishop SP, Ingwall JS. Regional changes in creatine kinase and myocyte size in hypertensive and nonhypertensive cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 1990; 67: 1334–44.
108. Minami A, Ishimura N, Harada N, Sakamoto S, Niwa Y, Nakaya Y. Exercise training improves acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in type 2 diabetic rats, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Atherosclerosis.* 2002;162: 85-92.
109. Douen AG. Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1990; 265: 13427-13430.
110. Kristiansen S, Hargreaves M, Richter EA. Exercise-induced increase in glucose transport, GLUT-4, and VAMP-2 in plasma membrane from human muscle. *Am J Physiol.* 1996 ;270:E197-201.
111. Kim Y, Inoue T, Nakajima R, Nakae K, Tamura T, Tokuyama K, Suzuki M. Effects of endurance training on gene expression of insulin signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;210:766-73.

112. Zierath JR. Invited review: Exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2002 ;93:773-81.
113. Chen HI, and Chiang IP., Chronic exercise decreases adrenergic agonist-induced vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1996;271: H977-H983.
114. Chen HI, Chiang IP, Jen CJ. Exercise training increases acetylcholine-stimulated endothelium-derived nitric oxide release in spontaneously hypertensive rats. *J Biomed Sci.* 1996; 3: 454-460.
115. Chen HI, Jen CJ, Chang WC. Effects of exercise training on the biosynthesis of prostacyclin and thromboxane in rats. *Acta Physiol Scand.* 1993;147: 109-115.
116. Chen HI, Li HT. Physical conditioning can modulate endothelium-dependent vasorelaxation in rabbits. *Arterioscler Thromb.* 1993; 13: 852-856.
117. Chen HI, Li HT, Chen CC. Physical conditioning decreases norepinephrine-induced vasoconstriction in rabbits: possible roles of norepinephrine-evoked endothelium-derived relaxing factor. *Circulation.* 1994; 90: 970-975.
118. Cheng, LJ, Yang CC, Hsu LY, Lin MT, Jen CJ, Chen HI. Acute exercise enhances receptor-mediated endothelium-dependent vasodilation by receptor upregulation. *J Biomed Sci.* 1999;6: 22-27.
119. Muller JM, Davis MJ, Kuo L, Chilian WM. Changes in coronary endothelial cell  $Ca^{2+}$  concentration during shear stress- and agonist-induced vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1999; 276: H1706-H1714.
120. Carter TD, Ogden D. Acetylcholine-stimulated changes of membrane potential and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration recorded in endothelial cells in situ in the isolated rat aorta. *Pflügers Arch.* 1994; 428: 476-484.

121. Usachev YM, Marchenko SM, Sage SO. Cytosolic calcium concentration in resting and stimulated endothelium of excised intact rat aorta. *J Physiol (Lond)*. 1995; 489: 309-317.
122. Kruse HJ, Grunberg B, Siess W, Weber PC. Formation of biologically active autacoids is regulated by calcium influx in endothelial cells. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 1821-1828.
123. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994;78: 915-918.
124. Huang TY, Chen HI, Liu CY, Jen CJ. Endothelial  $[Ca^{2+}]_i$  is an integrating signal for the vascular tone in rat aortae. *BMC Physiology*. 2001; 1: 5.
125. Boulanger CM, Vanhoutte PM. G proteins and endothelium-dependent relaxations. *Journal of Vascular Research*. 1997.; 34: 175-85.
126. Jen CJ, Chan HP, Chen HI. Acute exercise enhances vasorelaxation by modulating endothelial calcium signaling in rat aortas. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 ;282:H977-82.
127. Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, Wang D, Tsao PS, Cooke JP. NOS inhibition accelerates atherogenesis: reversal by exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H535-40.
128. Berdeaux A, Ghaleh B, Dubois-Rande JL, Vigue B, Drieu La Rochelle C, Hittinger L, Giudicelli JF. Role of vascular endothelium in exercise-induced dilation of large epicardial coronary arteries in conscious dogs. *Circulation*. 1994 ;89:2799-808.
129. Boger RH, Bode-Boger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Bohme M, Nafe R, Mugge A, Frolich JC. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation*. 1997;96:1282-90.



130. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest.* 1992 ;90:1116-21.
131. Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, and Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb.* 1994; 4: 753–759.
132. Chan JR, Boger RH, Bode-Boger SM, Tangphao O, Tsao PS, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 ;20:1040-6.
133. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 1995;369:131-5.
134. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986; 320: 454-456.
135. McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RMJ, Whittle BJR, and Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J.* 1989; 261: 293-296.
136. Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Harrison DG. Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1991; 260: C219-C225.
137. Miller FJ, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res.* 1998;82: 1298-130.

138. Omar HA, Cherry PD, Mortelliti MP, Burke-Wolin T, Wolin MS. Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and -independent nitrovasodilator relaxation. *Circ Res.* 1991; 69: 601-608.
139. Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, Tsao PS, Kosek J, Bernstein D, Cooke JP., Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1999; 276: H1346–H1354.
140. Resnick N and Gimbrone MA Jr. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J.* 1995;9: 874–882.
141. Haskell WL, Sims C, Myll J, Bortz WM, St. Goar FG, Alderman EL., Coronary artery size and dilating capacity in ultra-distance runners. *Circulation.* 1993; 87: 1076–1082.
142. Candipan RC, Wang B-y, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP. Regression or progression: dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996. 16: 44–50.
143. Niebauer J, Hambrecht R, Velich T, Hauer K, Marburger C, Kälberer B, Weiss C, von Hodenberg E, Schlierf G, Schuler G, Zimmermann R, Kübler W. Attenuated progression of coronary artery disease after 6 years of multifactorial risk intervention: role of physical exercise. *Circulation.* 1997; 96: 2534–2541.
144. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, and Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res.* 1994;74: 349–353.
145. Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL., Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science.* 1985; 227: 1477–1479.
146. Candipan RC, Wang B-y, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP. Regression or progression: dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16: 44–50.

147. Rush JW, Turk JR, Laughlin MH. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 ;284:H1378-87.
148. Rush JW, Laughlin MH, Woodman CR, Price EM. SOD-1 expression in pig coronary arterioles is increased by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H2068-76.
149. Yang AL, Chen HI. Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis.* 2003; 169: 11-17.
150. Yang AL, Jen CJ, Chen HI. Effects of high-cholesterol diet and parallel exercise training on the vascular function of rabbit aortas: a time course study. *J Appl Physiol.* 2003;95:1194-200.
151. Jen CJ, Chan HP, Chen HI. Chronic Exercise Improves Endothelial Calcium Signaling and Vasodilatation in Hypercholesterolemic Rabbit Femoral Artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1219-24.
152. Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000; 342: 454–460.
153. Bath PMW, Hassall DG, Gladwin AM, Palmer RMJ, Martin JF., Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11: 254–260.
154. Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J. Clin. Invest.* 1994;93: 424.
155. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281:1322-6.
156. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X.

- Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997;275:1129-32.
157. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997;275:1132-6.
158. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*. 1999 ;107:489-506.
159. Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation*. 1999 15;68:89-96.
160. [Jawan B](#), [Goto S](#), [Pan TL](#), [Lai CY](#), [Luk HN](#), [Eng HL](#), [Lin YC](#), [Chen YS](#), [Lan KM](#), [Hsieh SW](#), [Wang CC](#), [Cheng YF](#), [Chen CL](#). The protective mechanism of magnolol, a Chinese herb drug, against warm ischemia-reperfusion injury of rat liver. *J Surg Res*. 2003 ;110: 378-82.
161. Bach FH, Ferran C, Hechenleitner P, Mark W, Koyamada N, Miyatake T, Winkler H, Badrichani A, Candinas D, Hancock WW. Accommodation of vascularized xenograft: expression of 'protective genes' by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nat Med*. 1997;3: 196–204.
162. Kockx MM, De Meyer GRY, Buysens N, Knaapen MWM, Bult H, Herman AG. Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ Res*. 1998; 83: 378–87.
163. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91:479-89.
164. Hatano E, Bradham CA, Stark A, Iimuro Y, Lemasters JJ, Brenner DA. The

- mitochondrial permeability transition augments Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes. *J Biol Chem.* 2000;275:11814-23.
165. Faubion WA, Gores GJ. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology.* 1999;29:1-4.
166. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am. J. Med.* 2000; 108: 567.
167. Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, Goldberg M, Allen T, Barber MJ, Green DR, Newmeyer DD. The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J Cell Biol.* 1999;147:809-22.
168. Cai W, Devaux B, Schaper W, Schaper J. The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 1997 ;131:177-86.