

中國醫藥大學
醫學檢驗生物技術學系碩士班

碩士論文

利用蛋白質體技術探討丹蔘酚酸 B 對
人類臍靜脈內皮細胞的影響

**Effect of Salvianolic Acid B on the
Human Umbilical Vein Endothelial
Cells : A proteomic study**

學生姓名：蘇揚迪

Yang-Di Su

中華民國 98 年 7 月

誌謝

兩年的碩士班生涯即將結束，能完成這本著作，最先要感謝的，便是我的恩師黃蕙君博士，在這兩年的求學生涯中，他總是不斷的給予鞭策與指導，在他耐心的包容與細心的指導下，才能讓我的論文順利的產生，對他的感謝真的不是用言語能形容的。其次要感謝口試委員吳介信教授與林尊湄副教授在百忙之中能抽空指導並給予寶貴的意見，讓學生在完成這本論文時，能更臻完善。

接下來要感謝的是同甘共苦的各位同窗好友，惠琳、怡菁、志殷、欣儀、卉蓉、鵬翔，我想我不會忘記在這兩年我們所一起經歷無數的歡笑與淚水。另外感謝如君，在我的碩士學習生活中幫我勉勵打氣支持我一路走下去。

要感謝的人實在太多了，感謝每位曾經幫助過我的貴人，因為有你們才能有今天的我，在此，衷心的謝謝你們。最後要感謝的是讓我在求學期間一直無後顧之憂的母親，您辛苦了。

僅以此論文獻給我最親愛的家與關心我的師長朋友，感謝你們的包容與愛護，願與你們分享這份榮耀。

中文摘要

內皮細胞具有調節血液恆定功能的作用，失衡時會導致心肌梗塞等疾病。丹參，在中藥中屬於活血化癥的藥物，被廣泛的運用在治療心血管疾病，丹參酚酸 B 屬於丹參水溶性萃取物中含量最豐富的成分之一，在以往的研究中發現丹參酚酸 B 具有提高凝血酶調節素 (thrombomodulin ; TM) 與組織型纖維蛋白溶解酶原活化劑 (Tissue plasminogen activator ; t-PA)，及纖維蛋白溶解酶原活化劑抑制劑 (Plasminogen activator inhibitor ; PAI) 表現而達到抑制凝固與促進血塊溶解作用，本論文旨在利用蛋白質體技術進一步探討丹參酚酸 B 對內皮細胞蛋白質的影響。首先根據文獻選用餵食丹參酚酸 B 後動物體內測得的濃度 0.125mg/ml 處理人類臍靜脈內皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell H ; HUVEC)，此濃度處理 12 小時不會對細胞造成毒性且能有效促進 TM 的上升，處理後萃取蛋白質進行二維電泳分析，發現有 11 個有顯著差異蛋白質點，其中有 10 個蛋白質點在丹參酚酸 B 處理後會上升、1 個蛋白質點在丹參酚酸 B 處理後下降，藉由質譜儀成功鑑定 10 個蛋白質分子，表現量上升的蛋白質有 9 個分別是 Vimentin、Protein disulfide-isomerase A3 Nucleophosmin(NPM)、Heat shock protein beta-1、Tropomyosin alpha-3 chain、UBX

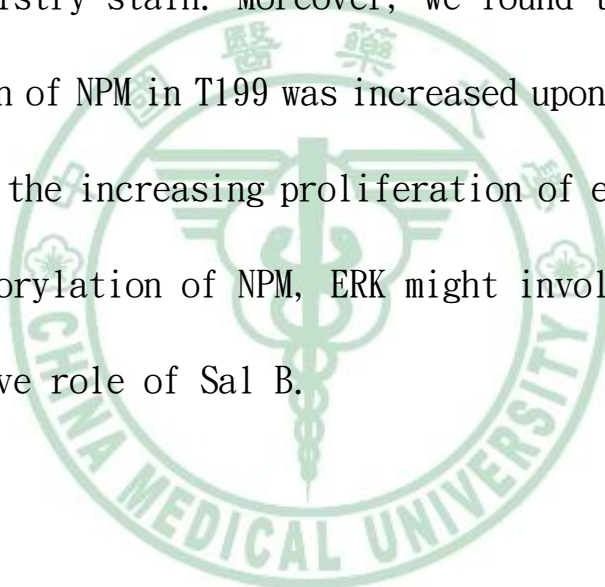
domain-containing protein 1、Alpha-enolase 及 Peroxiredoxin-2，表現量下降的則是 Caldesmon。利用西方墨點法確認其中的 NPM 的第 199 個蘇胺酸(threonine 199)磷酸化有明顯的增加。文獻中指出 NPM 的磷酸化與細胞的生長有關，因此利用 MTS 來進行增生速率的分析並發現丹參酚酸 B 具有促進 HUVEC 的增生及具有促進 ERK 磷酸化的能力。



Abstract

Endothelial cells play an important role in blood homeostasis. Dysfunction of endothelial cells will lead to vessel and heart diseases. *Salvia multiorrhizae* Bunge, a chinese medicinal herb used to promote blood circulation and remove blood stasis, is widely used to treat vessel and heart diseases in China for thousand years. Salvianolic acid B (Sal B) is one of the most abundant components in *Salvia multiorrhizae* Bunge. It was shown that Sal B could modulate hemostatic properties of human umbilical vein endothelial cell(HUVEC) by increasing thrombomodulin (TM)and tissue plasminogen activator (t-PA) concomitantly decreasing plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). In this study, we used proteomics technology to examine the cardioprotective effect of Sal B. We treated HUVEC with 0.125 mg/ml of Sal B for 12 hours. Under the concentration, Sal B increased TM expression and cell growth. By comparison two-dimensional sulfate dodecyl polyacrylamide gel(2D SDS-PAGE) protein profile in HUVEC treated with Sal B to that untreated, there were eleven differentially expression spots. Ten

spots were up regulated ,and one was down regulated after Sal B treatment, including vimentin, protein disulfide-isomerase A3, nucleophosmin(NPM), heat shock protein beta-1, tropomyosin alpha-3 chain, UBX domain-containing protein 1, alpha-enolase and peroxiredoxin-2, and the down regulated protein, caldesmon. NPM and vimentin were further validated by western blotting and immunocytochemistry stain. Moreover, we found that phosphorylation of NPM in T199 was increased upon Sal B treatment. In conclusion, the increasing proliferation of endothelial cells through phosphorylation of NPM, ERK might involved in the cardioprotective role of Sal B.



目錄

第一章 前言

第一節 研究背景

A. 血管內皮細胞	1
B. 心血管疾病	2
C. 丹參的功效	3
D. 蛋白質體學	5
第二節 研究目的	6

第二章 研究方法

第一節 研究設計

第二節 研究材料

A. 實驗儀器	8
B. 實驗藥品	9

第三節 實驗方法

A. HUVEC 細胞培養	12
B. 蛋白質萃取與定量	15
C. 西方墨點法	17
D. 蛋白質純化	19
E. 二維蛋白質電泳(2D SDS-PAGE) 與膠體染色	20
F. 影像擷取與分析	23
G. 胰蛋白酶水解	24
H. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀分析	25
I. 免疫螢光染色	26
J. 細胞生長活性分析	27
K. 細胞轉染	28
L. 數據處理與統計分析	29

第三章 研究結果

A. 丹參酚酸增加人類臍靜脈內皮細胞的 TM 表現	30
B. 蛋白質體分析 HUVEC 經丹參酚酸 B 處理與對照組	30
C. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀分析差異蛋白質點	31
D. 丹參酚酸 B 造成 vimentin 表現量上升 與 caldesmon 表現量下降	31
E. 丹參酚酸 B 造成 Nucleophosmin 磷酸化增加	32

F. 丹參酚酸 B 不影響 Nucleophosmin 蛋白質轉位·····	32
G. 丹參酚酸 B 增加人類臍靜脈內皮細胞的增生·····	33
H. 丹參酚酸 B 增進人類臍靜脈內皮細胞 ERK1/2 之磷酸化·····	33

第四章 結論與討論

A. 二維電泳膠片差異蛋白質分析·····	34
B. 差異蛋白 Nucleophosmin 表現量與磷酸化討論·····	34
C. 丹參酚酸 B 對 ERK 磷酸化的影響·····	36
D. 結論·····	36

第五章 參考書目·····	37
---------------	----



圖表目錄

表目錄

表一、丹參酚酸 B 處理與未處理之內皮細胞蛋白質二維電泳膠片分析·····	42
表二、丹參酚酸 B 處理內皮細胞之差異蛋白·····	43

圖目錄

圖一、分析丹參酚酸 B 影響 HUVEC 凝血酶調節素表現量·····	44
圖二、HUVEC 經丹參酚酸 B 處理與對照組之二維電泳膠片·····	45
圖三、MALDI-TOF/TOF 質譜分析 nucleophosmin·····	46
圖四、差異蛋白質點 nucleophosmin 在二維電泳圖譜的位置·····	47
圖五、西方墨點法分析 vimentin 表現量與 nucleophosmin 磷酸化表現·····	48
圖六、細胞免疫螢光染色分析磷酸化 nucleophosmin 的分布情形·····	50
圖七、MTS 方法分析經丹參酚酸 B 處理後 HUVEC 的增生速率·····	51
圖八、西方墨點法分析 HUVEC 經丹參酚酸 B 處理後的 ERK 的磷酸化·····	52

第一章 前言

第一節 研究背景

A. 血管內皮細胞 (Vascular Endothelial Cell)

血管內皮細胞(vascular endothelial cell)是位於血管管腔中，直接與血液接觸的細胞，在調控血管的生理與病理功能上扮演著極重要的角色。血管內皮細胞在正常的生理功能中包含調控血液與組織間的物質交換，調節血管收縮[1]、產生細胞激素[2]、調控血液凝固與抗凝固功能[3]。血管內皮細胞上具有蛋白酶活化接受器(Protease-activated receptor; PAR) 與凝血酶調節素(Thrombomodulin; TM) 兩種與調控凝固功能有關的接受器[4, 5]，蛋白酶活化接受器在受到血液中的凝血酶活化後，會藉由活化下游的 G protein 來影響內皮細胞[6-10]，當蛋白酶活化接受器被活化時具有促進凝固作用，調節內皮細胞細胞膜通透性[11]、活化血小板等功能[12]；凝血酶調節素主要參與抗凝固反應，當凝血酶調節素與凝血酶(thrombin)結合後會活化 protein C，活化型的 protein C 會水解血液中的活化型凝固因子五及八使之去活性，進而中斷的凝固反應及抑制凝血酶生成以達到抗凝效果[4, 5]。當內皮細胞功能失調也會造成心血管疾病更易發生。臨床上常見如：心肌梗塞、腦部血管栓塞...等疾病的產生，通常是由於血管內皮

細胞功能的缺損所導致[13-16]。

B. 心血管疾病

心血管疾病是國人除了癌症以外死亡率最高的疾病，在 90 年代更是占了歐美死亡原因的 50%[17]。心肌梗塞是最常見的心血管疾病，造成心肌梗塞的原因通常是由血管內皮細胞長期受到傷害所引起，當血管內皮細胞受損後會造成血管通透性的增加，血管通透性的增加使得低密度脂蛋白容易進入血管的內膜層(intima)，當低密度脂蛋白堆積在內膜層且被活性氧分子(reactive oxygen species ; ROS)氧化形成氧化態低密度脂蛋白時[18-20]，會促使周圍的平滑肌細胞的細胞趨化素(chemokines)表現增加並吸引血液中的單核球與 T 淋巴球趨近，同時血管內皮細胞受損也會影響黏著分子例如:E-selectin、Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)、vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)的表現增加[21-25]，使單核球與 T 淋巴球更容易往內膜層趨近，移行至內膜層的單核球吞噬了內膜層中堆積的脂蛋白後，則會形成所謂的泡沫細胞(foam cell)，泡沫細胞會釋放如 platelet-derived growth factor (PDGF)、transforming growth factor- β (TGF- β)等因子促使血管中皮層(media)的平滑肌細胞(smooth muscle cells)往內皮層增生，趨化至在此處的 T 淋巴球也會受到泡沫細胞所釋放的因子如

tumor necrosis factor (TNF), Interleukin-2 (IL-2)的活化而造成發炎反應，這些累積的單核球、T淋巴球與增生的平滑肌細胞會與吞噬的脂肪形成脂肪斑紋(fatty streak)沈積，若經年累月的堆積與反覆的免疫刺激，終至形成動脈粥狀硬化斑塊，當硬化斑塊的表層受到活化的巨噬細胞所分泌的 metalloproteinase 的作用使表層變薄，造成動脈粥狀硬化斑塊破裂後，則會導致血管內血小板聚集並阻塞血管，終至血流中斷造成器官損傷[14, 17, 22, 26, 27]。因此研究血管內皮細胞是心血管生物學中的重要主題之一。

C. 丹參的功效

丹參(*Salvia multiorrhizae* Bunge)源自於唇形科鼠尾草屬的多年生草本植物之乾燥根及根莖，最早記載於「神農本草經」中，[62]在本草綱目·卷十二·丹參中記載：「五參五色配五臟。故人參入脾曰黃參，沙參入肺曰白參，玄參入腎曰黑參，牡蒙入肝曰紫參，丹參入心曰赤參」[63]。丹參又別名為紫丹參、血生根、血參、紅根等；性味苦、微寒，中國大陸大部份地區均有生產，主產於遼寧、江蘇、安徽、河北、陝西、四川、湖南等地[64]。

根據文獻上記載，丹參的主要功效為活血化瘀，在神農本草經中歸於上品中藥，從古代便廣泛的用於心血管、血液類的疾病中，為治療血瘀症的主要藥物[65]，在本草綱目中，李時珍更曾

論述"一味丹參功同四物(當歸、川芎、赤芍、熟地)"的功效[63]。在現代中國大陸更將丹參、紅花、川芎、赤芍和降香製成「冠心二號方」，廣泛用於臨床上治療冠狀動脈心臟病[66]。統計上也指出，服用丹參可以有效增加心肌梗塞的病人的存活率及降低心肌梗塞的後遺症[28]。

1980 年代，大陸學者從丹參中分離純化出水溶性丹參酚酸 (salvianolic acid)，丹參酚酸 B 是丹參主要的水溶性萃取物之一 [29]，目前已知丹參酚酸 B 具有降低氧化壓力，清除細胞發炎反應時所產生的自由基[30]；促進內皮細胞凝血酶調節素與組織型纖維蛋白溶解酶原活化劑 (Tissue plasminogen activator；t-PA) 的表現，降低纖維蛋白溶解酶原活化劑抑制劑(plasminogen activator inhibitor；PAI)的表現[31]；降低內皮細胞受到腫瘤壞死因子 α (Tumor necrosis factor α ；TNF- α) 刺激後 ICAM 與 VCAM 表現量 [32]，在動物實驗中發現，丹參酚酸 B 可以抑制鈣離子通道，並舒張大白鼠的冠狀動脈[33]、降低兔子冠狀動脈受損後的再狹窄並抑制動脈的血管平滑肌增生[34]、降低兔子血液中的膽固醇[35]。總結以上的文獻可知，丹參酚酸 B 具有降低氧化壓力對血管內皮細胞傷害、增進血管內皮細胞抗凝固的活性、降低血管內皮細胞受到的免疫刺激、舒張冠狀動脈、降低血液中的膽固醇的能力，

因此丹參酚酸 B 可能是丹參具有保護心血管的主要成分之一。

D. 蛋白質體學

1995 年澳洲學者 V. Wasinger 第一次提出蛋白質體學 (proteomics) 這個名詞之後，蛋白質體學研究開始逐漸受重視，在人類基因體計畫完成後[36]，蛋白質體的研究更是蓬勃發展，生物體內一個基因在轉譯成蛋白質的過程中，可能經由不同的調控與修飾而轉譯出不同特性的蛋白質[37]，生物體內是以蛋白質做為主要進行反應的分子，因此蛋白質適合用來做為生物醫學的研究目標。以往對蛋白質研究較偏向蛋白質化學，著重蛋白質結構、功能的研究，而蛋白質體學則是以巨觀的方式來探討蛋白質的變化，強調探討系統性的行為，而不是單一組成，因此強調在短時間內大規模分析特定組織細胞內的眾多蛋白質表現[38]。蛋白質是由二十種胺基酸分子以不同數目及排序聚合而成，而每種胺基酸所帶電荷不一，因此幾乎沒有任何兩種蛋白質分子在特定酸鹼值時具有完全相同的帶電量與分子量，所以最普遍的方式是選用二維電泳將蛋白質依等電點與分子量做分離，分離完後以染色劑偵測膠片內所有蛋白質的位置，在經過影像分析軟體依據染色程度的深淺而對蛋白質的相對表現量做比較[39]，更進一步用胰蛋白酶將這些蛋白質水解成胜肽片段後，使用質譜儀來分析這些

胜肽片段的質量或由串聯質譜再將胜肽裂解成胺基酸排序來獲得分子身分，之後經由生物資訊工具來與蛋白質資料庫中的資料做比對來得知這些蛋白質的身分[40-42]，在得知這些蛋白質的身分後，更重要的是探討這些蛋白質表現量變化的意義與分子作用機轉，此為功能蛋白質體學與系統蛋白質體學[43]。透過蓬勃發展的蛋白質體學相關研究，科學家在生物醫學或藥物開發探勘有了新的契機。

第二節 研究目的

丹參在中國大陸被認為是可以治療心血管疾病的藥物，目前對於丹參酚酸現況描述之相關研究有，丹參酚酸 B 具有降低氧化壓力，減少動脈硬化與血管內皮細胞受損的能力，同時也有證據指出丹參酚酸 B 可能可以藉由增加 TM 表現促進抗凝固功能來達到保護心血管的功能，但對於丹參對血管內皮細胞是否還具有其他影響則尚未釐清，因此本論文利用蛋白質體技術系統性的分析丹參酚酸 B 對內皮細胞的影響，選用人類臍靜脈內皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells；HUVEC)作為研究目標，探討經過丹參酚酸 B 的處理後，內皮細胞的蛋白質表現的變化，進而探討這些丹參酚酸 B 反應蛋白在內皮細胞的角色。

第二章 研究方法

第一節 研究設計



第二節 研究材料

A. 實驗儀器

儀器名稱	廠牌
二氧化碳培養箱	Revco、Forma Scientific
無菌操作台	造鑫
高溫高壓滅菌器	HIRYAMA
離心機	KUBOTA、HITACHI
烘箱	Memmert
酸鹼測試儀	Mettler Toledo
恆溫水浴槽	TKS
倒立光學顯微鏡	Olympus
天平	MonoBloc
Mini gel 電泳槽	Bio-Rad
半乾式電泳轉印槽	Bio-Rad
電源供應器	Amersham Biosciences
冰箱	Revco
加熱攪拌器	Corning
震盪器	Scientific industries

二維電泳電泳槽	Amersham Biosciences
IpGphor system III	GE healthcare
MALDI-TOF/TOF MS	Burker
純水製造器	Barenstead
GE Healthcare Image Scanner III	GE Healthcare

B. 實驗藥品

藥品名稱

廠牌

heparin

Sigma

Gelatin

Mikrobiologie

Tris

Usb

Glycine

Bio-Rad

Sodium dodecyle sulfate(SDS)

Sigma

Acrylamide

Sigma

Ammonium persulfate

Sigma

N, N, N, N-Tetramethyl ethylene

Sigma

diamine(TEMED)

2-mercaptoethanol

Sigma

Acetic acid

Merck

Glycerol	Merck
Bromophenol blue	SERVA
Sodium chloride (NaCl)	Usb
Hydrochloric acid (HCl)	Merck
Methanol	Merck
脫脂奶粉	安佳
Tween 20	Sigma
ECL	Millipore
顯影劑	Kodak
定影劑	Kodak
Scientific Imaging Film	Kodak
M199 medium	Hyclone
PBS	Hyclone
Trypsin-EDTA	Hyclone
Fetal bovine serum (FBS)	Hyclone
Penicillin/Streptomycin/Neomycin solution	GIBCO
Phosphatase inhibitor cocktail I	Sigma
Phosphatase inhibitor cocktail II	Sigma



Protease inhibitor cocktail III	A.G. Scientific
DMSO	Merck
Sucrose	National diagnostics
Urea	Usb
CHAPS	CALBIOCHEM
Agrose	Amresco
Iodoacetamide (IAA)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Usb
Silvernitrate	Sigma
Sodium carbonate	Sigma
Sodium thiosulfate	Sigma
Potassium ferricyanide	Merck
Acetonitrile (ACN)	Merck
Trifluoroacetic acid (TFA)	Merck
Ammonium bicarbonate (ABC)	Sigma
Porcine Trypsin	Promega
Isopropanol	Merck
Formaldehyde (37%)	Merck
EDTA-Na ₂	J. T. Baker

第三節 實驗方法

A. HUVEC 細胞培養

本實驗中所用的 HUVEC 皆購自財團法人食品科學研究所

(一) 培養基與試劑配置

a. Medium 199 培養基/1L

M199 power (GIBCO) 9.5 g

NaHCO₃ 2.4 g

調整 pH 值至 7.4 並以 0.22 um 濾膜過濾

b. 10% FBS M199 培養基/0.5L

Medium 199 培養基 450 ml

Fetal bovine serum (Hyclone) 50 ml

Penicillin/Streptomycin/Neomycin 5 ml

L-glutamine (Hyclone) 5 ml

Heparin (Sigma) 10 KU

Endothelial cell growth supplement 15 mg

(Sigma)

c. 1% FBS M199 培養基/0.5L

Medium 199 培養基 450 ml

Fetal bovine serum (Hyclone) 4.5 ml

Penicillin/Streptomycin/Neomycin	4.5 ml
L-glutamine (Hyclone)	4.5 ml
Heparin (Sigma)	10 KU
Endothelial cell growth supplement (Sigma)	15 mg
d. <u>Only 1% FBS M199 培養基/0.5L</u>	
Medium 199 培養基	450 ml
Fetal bovine serum (Hyclone)	4.5 ml
Penicillin/Streptomycin/Neomycin	4.5 ml
e. <u>PBS/1L</u>	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	1 包
調整 pH 值至 7.4 並以 0.22 um 濾膜過濾	
f. Trypsin-EDTA	
g. <u>0.1 % gelatin</u>	
Gelatin	0.1 %
以 0.22 um 濾膜過濾	

(二) 人類臍靜脈內皮細胞培養步驟

1. 解凍細胞

自液態氮桶取出含有細胞的冷凍小管後，迅速移置 37°C 水浴，待細胞懸浮液完全溶解時，加到已經裝有 7 ml 10% M199 medium 且 coating 0.1% gelatin 的培養皿中，放置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養，12 小時後更換舊的培養基，繼續培養到細胞長滿後即可進行繼代培養。

2. 繼代培養

每兩天換一次培養基，待 HUVEC 在培養皿上長滿時，用 PBS 洗去培養液，之後加入 1 ml trypsin 反應 3~5 分鐘，待 trypsin 將細胞不再附著於培養皿後，加入兩倍體積的 10% FBS M199 medium 中和 trypsin 作用，之後將細胞懸浮液置入離心管中以 1000 r.p.m 離心 3 分鐘，按 1:3 的比例以 10% FBS M199 medium 培養在已經 coating 0.1 % gelatin 的培養皿上，置入 37°C、5% CO₂ 培養箱中，即完成繼代培養，本論文中所使用的 HUVEC 細胞繼代培養皆不超過 7 次。

B. 蛋白質萃取與定量

(一) 試劑與溶液配方

a. PBS

NaCl 137 mM

KH₂PO₄ 1.5 mM

Na₂HPO₄ 8.1 mM

KCl 2.7 mM

調整 pH 值至 7.4

b. Tris-sucrose buffer

Tris 250 mM

Sucrose 10 mM

調整 pH 值至 7.4

c. Lysis buffer

Urea 8 M

CHAP 4 %

(二) 步驟

1. 蛋白質萃取

用 1% FBS M199 培養基將 HUVEC serum starvation 12 小時

後，以 Only 1% FBS M199 培養基配置 0.125 mg/ml 濃度的丹參酚酸 B 處理 12 小時，接著用 10% FBS M199 培養基待細胞回復 24 小時後開始萃取蛋白質，用 PBS 洗去培養基，加入 1 ml trypsin 反應 3~5 分鐘，待細胞不再附著於培養皿後，加入兩倍體積的 10% FBS M199 medium 中和 trypsin 作用，之後將細胞懸浮液置入離心管中以 1000 r. p. m 離心 3 分鐘，將上清液移除，加入 1 ml 的 Tris-sucrose buffer 將細胞重新懸浮以進行清洗，之後以 1000 r. p. m 離心 3 分鐘後，把上清液去除，重複清洗兩次後，將離心管中的細胞放置 -80°C 冰箱中，24 小時後以一盤細胞加入 125 ul 的比例加入 Lysis buffer 反應 30 分鐘後，用超音波震盪器在冰上震盪 30 秒，接著以 15000 r. p. m 離心 30 分後保留上清液即為蛋白質萃取液，以 100 ul 為單位分裝置於 -80°C 保存。

2. 蛋白質定量

將萃取出來的蛋白質以超音波震盪器震盪 10 分鐘增加溶解度後，以 2D Quant. Kit (GE health) 進行定量。利用沉澱法將蛋白沉澱後加入二價銅(Cu^{2+})溶液與蛋白質反應，利用蛋白質具有將二價銅變成一價銅的特性，偵測溶液中殘餘的二價銅，與已知濃度的白蛋白標準品量測結果所繪出的標準曲線對照，內插入曲線中換算得蛋白質的濃度。

C. 西方墨點法

(一) 試劑與溶液配方

a. Running buffer

Tris	125 mM
Glycine	960 mM
SDS	0.5 %

b. SDS-PAGE gel (2 slabs/ 10 cm X 8 cm 厚度 1.5mm)

3.6 % Staking gel

Acrylamide	900 μ l
0.5M Tris-HCl pH6.8	630 μ l
DDH ₂ O	6.45 ml
10% SDS	100 μ l
10% APS	100 μ l
TEMED	10 μ l

10 % Separating gel

Acrylamide	5 ml
1.5M Tris-HCl pH8.8	5 ml
DDH ₂ O	9.7 ml
10% SDS	200 μ l

	10% APS	150 μ l
	TEMED	20 μ l
c.	<u>轉印緩衝液</u>	
	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	Methanol	20 %
d.	<u>Blocking buffer</u>	
	Non-fat milk	5 %
e.	<u>PBST</u>	
	NaCl	137 mM
	KH ₂ PO ₄	1.5 mM
	Na ₂ HPO ₄	8.1 mM
	KCl	2.7 mM
	Tween-20	0.1 %
	調整 pH 值至 7.4	

(二) 步驟

樣品先以 SDS-PAGE 分析後，準備已用甲醇去除保護膜的蛋白質轉印膜(PVDF membrane)一張與 3mm 濾紙(3M)兩張，將

SDS-PAGE 膠片、轉印膜及濾紙浸泡於轉印緩衝液中平衡 15 分鐘，依濾紙、轉印膜、SDS-PAGE 膠片、濾紙的順序疊在半乾式轉印槽 (semi-dry transfer; Bio-Rad) 上，並去除 SDS-PAGE 膠片與轉印膜間的氣泡。以 10 V 的電壓轉印 90 分鐘，蛋白質轉印完成後，取出轉印膜加入 blocking buffer 在室溫中搖晃反應 2 小時，接著加入用 PBS 稀釋成適當濃度的一級抗體，在 4°C 搖晃反應 16~18 個小時，之後以 PBST 清洗蛋白質轉印膜六次，每次 10 分鐘，完成後加入帶有 HRP (horseradish peroxidase) 的二級抗體在室溫中搖晃反應 1 小時，以 PBST 清洗蛋白質轉印膜六次，每次 10 分鐘，最後使用 ECL kit (Millipore) 呈色並觀察結果。使用 Multi Gauge V3.0 (FUJIFILM) 將結果分析量化，實驗結果以 $n \geq 3$ 、 $p < 0.05$ 作為可信依據。

D. 蛋白質純化

選用 2D clean up kit (GE healthcare) 進行蛋白質純化，利用沉澱法去除蛋白質中所含的鹽類，純化後的蛋白質樣品在進行定量後，取 100 ug 進行二維蛋白質電泳。

E. 二維蛋白質電泳(2D SDS-PAGE)與膠體染色

(一) 試劑與溶液配方

1. Running buffer

Tris	125 mM
Glycine	960 mM
SDS	0.5 %

2. 4X resolving gel buffer

Tris	1.5 M
調整 pH 值至 8.8	

3. 10% SDS-PAGE gel (2 slabs/ 18 cm X 16 cm 厚度 1.5mm)

Acrylamide	25 ml
4X resolving gel buffer	25 ml
DDH ₂ O	48.5 ml
SDS	1 ml
10% APS	500 μ l
TEMED	50 μ l

4. Rehydration buffer

UREA	8 M
CHAPS	2 %

	Bromophenol blue	0.002 %
	IPG buffer	0.05 %
5.	<u>Equilibration buffer</u>	
	Tris-HCl pH 8.8	50 mM
	Urea	6M
	Glycerol	30 %
	SDS	2 %
	Bromophenol blue	0.002 %
6.	<u>Fix solution</u>	
	Methanol	50 %
	Acetic acid	10 %
7.	<u>Sensitize solution</u>	
	Sodium Thiosulfate	0.02 %
8.	<u>Silver solution</u>	
	Silver nitrate	0.1 %
9.	<u>Developing solution</u>	
	Sodium carbonate	2 %
	Formaldehyde	0.04 %
10.	<u>Stopping solution</u>	

(二) 步驟

1. 二維蛋白質電泳

取出 100 ug 純化後的蛋白質，加入 Rehydration buffer 將調整總體積為 250 ul，用超音波震盪器震盪 10 分鐘後以 22,000g 離心 1 小時，取上清液置入等電點電泳膠體放置槽中，接著將 13 公分、pH 4-7 的等電點電泳膠條放入，將表面用礦物油覆蓋後，使用 IPGphor III (GE healthcare) 進行等電點電泳；等電點電泳條件如下：

溫度 20 °C 每條膠條最大通過電流為 100 mA

30V 12 h

500V 1 h

1000V 1 h

8000V Gradient 3 h

8000V 45000 Vh

3000V 5 h

等電點電泳完成後將膠條取出，用二次水將表面的礦物油洗淨，將膠條依序浸泡於含有 1% DDT 的 Equilibration buffer 及

2.5%IAA 的 Equilibration buffer 中各反應 15 分鐘後，將膠條洗淨放到 SDS-PAGE 的膠片上並用 1.5%的 agarose 固定，在 4°C 下以 40 mA 電泳 6 小時後，將膠片取下浸泡到 Fix solution 中，隔夜後始可進行染色

2. 膠體染色

將已固定的二維電泳膠片用 50% 甲醇清洗 2 次每次 30 分鐘後，用二次水清洗六次每次 10 分鐘，把膠片浸泡到 Sensitize solution 中一分鐘，用二次水清洗 6 次每次 1 分鐘，將膠片浸泡到 Silver solution 中 30 分鐘，用二次水清洗 6 次每次 1 分鐘，之後將膠片浸泡到已添加甲醛的 Developing solution 中呈色，待達到適當的染色深度後，將膠片移到 Stopping solution 浸泡 10 分鐘後，以二次水清洗 3 次每次 10 分鐘後，浸泡於含有 5% 醋酸的二次水中保存。

F. 影像擷取與分析

將染色完的膠片用 GE Healthcare Image Scanner III (GE healthcare) 擷取 300 dpi 的影像後，用 Melanie 5 (GE healthcare) 影像分析軟體進行比對與分析

G. 胰蛋白酶水解

(一) 試劑與溶液配方

a. Wash buffer

Acetonitrile	50%
Ammonium bicarbonate	25 mM

b. Destain solution

Sodium thiosulfate	1.5 %
Potassium ferricyanide	1 %

c. Ammonium bicarbonate buffer

Ammonium bicarbonate	25 mM
----------------------	-------

d. Trypsin 400 ng/ul

Sequencing grade modified trypsin	1 瓶
Trypsin resuspension buffer	50 ul

(二) 步驟

將微量吸管間前端剪成直徑約 1 mm 大小，用來擷取蛋白質點，擷取下來的蛋白質點用 Wash buffer 清洗兩次，每次 5 分鐘，加入 Destain solution 將蛋白質點進行脫色，脫色完後以 25 mM ABC/50% ACN 將膠體洗淨，之後用 100% ACN 將膠體進行脫水，待

膠體完全皺縮後將 ACN 吸出並風乾殘餘的 ACN，加入 10 ul 以 Ammonium bicarbonate buffer 調整至 3 ng/ul 的 Trypsin 後放置冰上 1 小時，接著移到 37°C 反應 18 小時。Trypsin 反應完成後加入 5 ul 含有 0.1% TFA 的 30% ACN 中止 Trypsin 的反應並放到超音波震盪儀中震盪 10 分鐘，收集上清液至新的微量離心管中，改用含有 0.1% TFA 的 50% ACN 重複此步驟並將上清液收集在一起，收集到的上清液即為的胜肽樣品。

H. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間式(MALDI-TOF/TOF)質譜儀分析

將萃取到的胜肽樣品風乾後以 2 ul 含有 0.1% TFA 的 50% ACN 回溶，取 0.5 ul 點在 MALDI-TOF 樣品盤(MTP Anchorchip 600/384)上，同時將 0.5 ul 質譜校正用的標準品(peptide calibration standard II)點在樣品盤上標準品的位置，待乾燥後將 0.5 ul 的 Matrix solution (1 mg CHCA 溶於 80% ACN 與 0.1% TFA)覆蓋在乾燥結晶的樣品及校正用標準品上，Matrix solution 乾燥後即可進行分析；質量偵測範圍選定 600 m/z~4000 m/z，再針對其中訊號較強的部分使用串聯質譜(MS/MS)進行胺基酸的序列分析，使用 Biotool 將得到的一次質譜與串聯質譜資料合併後選擇 Swissprot 作為蛋白質身分比對的資料庫，比對設定參數如下：

物種來源：Human

使用酵素：Trypsin

比對質量誤差(Mass tolerance)：100 ppm

容許錯誤切割位置(Miss cleavage site)：1

可能的蛋白質修飾 (Variable modification)：

Carbamidomethyl、Oxidation

I. 免疫螢光染色

(一) 試劑與溶液配方



a. PBS	
NaCl	137 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM
KCl	2.7 mM

調整 pH 值至 7.4

- b. 4% 甲醛/以 PBS 配置
- c. 0.25% triton X-100/以 PBS 配置
- d. Blocking buffer:10% FBS/以 PBS 配置
- e. 一級抗體(primary antibody)
 - 1. Rabbit anti p-NPM(Abcam)

2. Mouse anti NPM(Santa cruz)
 3. Mouse anti fibrillarin(Abcam)
- f. 二級抗體(secondary antibody)
1. FITC-conjugated goat anti mouse(Santa cruz)
 2. Alex flour-conjugated goat anti rabbit(Abcam)

(二) 染色步驟

在 10×10 mm 的玻片上種植 1×10^5 的細胞，待其完全貼附後，以 4% 的甲醛固定細胞 15 分鐘後，去除殘餘的甲醛並以 PBS 清洗 5 分鐘 6 次，之後用 0.25% 的 Triton 處理 10 分鐘，用 Blocking buffer 處理一小時後，加入一級抗體於 4°C 反應 18 小時，用 PBS 清洗 5 分鐘 3 次，加入帶有螢光標誌物的二級抗體，在室溫反應 1 小時，以 PBS 清洗 5 分鐘 3 次，重複上述步驟並加入另一種一級抗體與二級抗體，之後用 DAPI 染劑處理 30 分鐘後，最後以 PBS 清洗 5 分鐘 6 次。將蓋玻片蓋在滴有 Fluoromount-G 的玻片上，待乾燥後以共軛焦顯微鏡進行觀察。

J. 細胞生長活性分析

{MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] assay}

將 7.5×10^4 的細胞種植於 96 孔盤中，待其貼附完全後，實驗組以丹參酚酸 B 處理 12 小時，對照組則不添加藥物，藥物處理完後移除培養基，加入 100 ul MTS reagent，放置於 37°C 反應 2 小時，偵測樣品在 490 nm 下的吸光值。

K. 細胞轉染

(一) 試劑與溶液配方

- a. siNPM (Santa cruz)
- b. lipofectamide(Invitrogen)
- c. OPTI-MEM Reduced Serum Media (GIBCO)

(二) 步驟

將 HUVEC 以 7.5×10^5 種植在 6 well 的培養皿上，待其貼附完全後始可進行實驗，首先將 solution A : 1 ul 的 lipofectamide + 100 ul OPTI-medium 與 solution B : 1 ul siRNA (1 uM) + 100 ul 的 OPTI-medium，配置後反應 5 分鐘，將 solution A 與 solution B 混合反應 20 分鐘後，加入 800 ul 的 OPTI-medium 補至 1 ml，接著加入到用 OPTI-medium 清洗過的細胞中，處理 6 小時後置換成 10% FBS M199 medium。

L. 數據處理與統計分析

實驗數據皆採計三次以上的實驗結果，並以 student's t-test 來分析數值。檢測結果*表示 $p < 0.05$ ，代表處理組與對照組有顯著差異。



第三章 研究結果

A. 丹參酚酸增加人類臍靜脈內皮細胞的 TM 表現

本論文選用動物在餵食丹參酚酸 B 後體內所測得的濃度 0.125 mg/ml 作為實驗濃度[44]，利用蛋白質體技術探討丹參酚酸 B 對人類臍靜脈內皮細胞的影響前，本實驗室根據先前的文獻報導丹參酚酸 B 處理人類臍靜脈內皮細胞後可造成凝血酶調節素的表現量上升，利用西方墨點法確認 TM 的表現是否有增加作為丹參酚酸 B 加藥處理後是否有效的指標，結果如圖一所示 0.125 mg/ml 的丹參酚酸 B 處理 12 小時後，以 tubulin 作為 internal control，丹參酚酸 B 處理的 TM 蛋白表現量為對照組的 1.6 倍。

B. 蛋白質體分析 HUVEC 經丹參酚酸 B 處理與對照組

人類臍靜脈內皮細胞經過丹參酚酸 B 處理與對照組所萃取的蛋白，經過蛋白質純化後各取 100 ug，使用 13 公分 pH4~7 的等電點電泳膠條與 10 %SDS-PAGE 進行二維蛋白質電泳並用銀染色法觀察結果，以 GE Healthcare Image Scanner III 擷取影像後，使用 Melanie 5 比對影像，並人工檢視每一點影像，在丹參酚酸 B 處理後的三組蛋白質膠片上我們可分辨 654±14 個蛋白質點，膠片間的相似度為 72.8%；

對照組三組蛋白質膠片上的則有 645 ± 26 個蛋白質點，膠片間的相似程度為 75.2%(圖二、表一)。兩者的影像經過比對後，以表現差異大於二倍作為篩選基準，發現有 11 個顯著差異的蛋白質點，其中有 10 個蛋白質點在丹參酚酸 B 處理後表現量上升，1 個蛋白質點在處理後表現量下降。

C. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間式(MALDI-TOF/TOF)質譜儀分析差異蛋白質點

11 個具有顯著差異蛋白質點經過 MALDI-TOF/TOF MS 進行蛋白質身分鑑定後，10 個差異蛋白質點成功的鑑定出蛋白質身分，其中有 9 個蛋白質完成串聯質譜的鑑定，同時檢視比對膠體之 pI 與分子量位置，確定差異蛋白分子(表二)。

D. 丹參酚酸 B 造成 vimentin 表現量上升 與 caldesmon 表現量下降

用西方墨點法觀察由 MALDI-TOF/TOF MS 所鑑定出的蛋白質變化量，我們選擇 caldesmon、vimentin 與 necleophosmin 進一步對他們的變化量作確認，結果如圖五所示丹參酚酸 B 可以造成 caldesmon 下降約 0.8 倍與 vimentin 上升 1.3 倍，但 necleophosmin 的表現量卻無明顯改變。

E. 丹參酚酸 B 造成 Nucleophosmin 磷酸化增加

用西方墨點法觀察 nucleophosmin 的表現量的變化，發現 nucleophosmin 的表現量無顯著差異(圖五)，但是我們在二維電泳膠片圖譜中發現 nucleophosmin 主要的改變為等電點偏向正電的方向，表示 nucleophosmin 的負電性增加，因此懷疑 nucleophosmin 的磷酸化有上升的趨勢，我們進一步用西方墨點法觀察並確認 nucleophosmin 的在第 199 個蘇胺酸(T199)磷酸化情形，nucleophosmin 的第 199 個蘇胺酸(T199)磷酸化在經過丹參酚酸的處理後約增加 1.5 倍(圖五)。

F. 丹參酚酸 B 不影響 Nucleophosmin 蛋白質轉位

Nucleophosmin 是一種核蛋白，具有在核仁與核質間轉移的現象，根據文獻指出，nucleophosmin 的磷酸化會使 nucleophosmin 偏向座落於核質的部分，因此我們利用共軛焦顯微鏡觀察經過丹參酚酸 B 處理後人類臍靜脈內皮細胞的 nucleophosmin 是否具有核質轉位的現象，選擇 fibrillarin 作為核仁標記，由螢光免疫染色發現丹參酚酸 B 並沒有使人類臍帶靜脈內皮細胞的 nucleophosmin 具有轉位的現象，大部分 nucleophosmin 還是座落於核仁(圖六)。

G. 丹參酚酸 B 增加人類臍靜脈內皮細胞的增生

根據文獻指出，necleophosmin 的磷酸化與細胞的生長有關，因此我們進一步的觀察丹參酚酸 B 對於人類臍靜脈內皮細胞增生的影響，我們選用 MTS 試劑分析，發現人類臍靜脈內皮細胞在經過丹參酚酸 B 的處理後，細胞增生速率會提高約 1.25 倍(圖七)。

H. 丹參酚酸 B 增進人類臍靜脈內皮細胞 ERK1/2 之磷酸化

目前已有相當多的研究指出，ERK1/2 參與細胞的增生的訊號傳遞，我們發現丹參酚酸 B 具有使人類臍靜脈內皮細胞增生的能力，因此我們進一步的探討 ERK1/2 的磷酸化，結果發現人類臍靜脈內皮細胞內的 ERK1/2 磷酸化在經過丹參酚酸 B 的處理後會有約 1.3 倍的上升(圖八)。

第四章 結論與討論

A. 二維電泳膠片差異蛋白質分析

在二維電泳膠片圖譜中，比對出差異點有 11 點，差異點的蛋白表現量變化多在 2~3 倍間。觀察膠體整體的差異性沒有很大，可能與選用長時間回復有關，本實驗給予細胞較長回復時間，在 24 小時長時間的回復下，可能由於細胞本身的調適能力使得蛋白質的表現差異縮小。差異蛋白中 peroxiredoxin-2 與 protein disulfide isomerase A3 為具有調節氧化壓力的分子[45-47]，具有維持細胞氧化平衡(cell redox homeostasis)能力，在經過丹參酚酸 B 處理後表現量都增加，可用於解釋丹參酚酸 B 的抗氧化能力[30]。在 10 個差異蛋白中有將近半數的差異蛋白(caldesmon、vimentin、heat shock protein beta-1、tropomyosin alpha-3 chain)與細胞移動(cell motion)有關[48-50]，丹參酚酸 B 是否具有影響細胞移動的能力進一步的證實中。

B. 差異蛋白 Necleophosmin 表現量與磷酸化討論

Necleophosmin 基本的結構包含的三個功能區，分別是 oligomerization domain、acidic domain 與 RNA bindind domain[51]，

是一個具有多重功能的核蛋白，包括核糖體(ribosome)與核小體(nucleosome)的組裝、抑制細胞凋亡…等功能[52-54]，且具有在核仁與核質間轉移的能力，nucleophosmin 具有許多磷酸化位置，包括第四個絲胺酸(S4)、第 95 個蘇胺酸(T95)、第 199 個蘇胺酸(T199)…等，不同的磷酸化位置是由不同的激酶(kinase)所活化，且不同的磷酸化位置會影響不同的功能，例如：S4 位置主要是由 Polo-like kinase 1(PLK1)來進行磷酸化[55]，當 S4 不能磷酸化時，細胞則無法進行有絲分裂[56]，而 T199 位置的磷酸化主要是 CDK2 (Cyclin-dependent kinase 2) 來調控[57]，T199 位置磷酸化後 nucleophosmin 可執行調節 Chromosome 的複製的能力，同時會促使細胞中的 nucleophosmin 由核仁(Nucleolus)轉移到核斑(Nuclear speckles)[58]，由於 T199 的磷酸化是 CDK2 所活化，HUVEC 在經過丹參酚酸 B 處理後，第 199 的蘇胺酸(T199)的磷酸化有約 1.5 倍的增加，且 HUVEC 的增生速率增加約 1.3 倍，推論 Sal B 可能藉由活化 CDK2 及 nucleophosmin 及磷酸化來影響 HUVEC 的細胞週期的能力；在丹參酚酸 B 處理後 T199 磷酸化時並沒有觀察到 nucleophosmin 有從核仁轉移到核斑的現象，nucleophosmin 還是集中在核仁的部分，對於 nucleophosmin 的轉位機制及在細胞內所扮演的角色目前還尚未十分清楚，丹參酚酸 B 來誘導 nucleophosmin 轉位的的原因則還有

待進一步的證實。先前並無文獻指出丹參酚酸 B 具有影響 nucleophosmin T199 磷酸化的能力，nucleophosmin T199 磷酸化除了促進細胞增生以外，同時可以活化 Nuclear factor- κ B (NF- κ B)[59]，活化 NF- κ B 是否會影響 HUVEC 生長或 TM 表現也是未來將探討的主題。

C. 丹參酚酸 B 對 ERK 磷酸化的影響

ERK 是一個常見且具有促進細胞增生能力的分子[60]，在文獻中指出丹參酚酸 B 具有抑制肝臟星狀細胞的 ERK 活化及抑制細胞生長的現象[61]，由本實驗結果則發現丹參酚酸 B 則具有促進 HUVEC 的 ERK 磷酸化及促進細胞的生長，目前對於丹參酚酸 B 對於 ERK 的影響的研究是較為缺乏的，因此對於丹參酚酸 B 增加 HUVEC 的增生速率是否藉由 ERK 的磷酸化及其下游訊息路徑的活化所造成或則有待進一步的釐清。

D. 結論

在我們的研究中發現，丹參酚酸 B 可以使 10 個蛋白質的表現量發生變化，其中包括了與細胞移動、調節氧化壓力相關的蛋白質；丹參酚酸 B 促進 ERK 與 nucleophosmin T199 磷酸化，同時具有增加 HUVEC 促進細胞生長的現象。

第五章 參考文獻

1. Vanhoutte, P.M. and E.H. Tang, *Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad!* J Physiol, 2008. **586**(Pt 22): p. 5295-304.
2. Abraham, D. and M. Dashwood, *Endothelin--role in vascular disease.* Rheumatology (Oxford), 2008. **47 Suppl 5**: p. v23-4.
3. Kvietys, P.R. and D.N. Granger, *Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology.* Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 1): p. G1189-99.
4. Esmon, C.T., N.L. Esmon, and K.W. Harris, *Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation.* J Biol Chem, 1982. **257**(14): p. 7944-7.
5. Esmon, C.T. and W.G. Owen, *Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(4): p. 2249-52.
6. Grand, R.J., A.S. Turnell, and P.W. Grabham, *Cellular consequences of thrombin-receptor activation.* Biochem J, 1996. **313 (Pt 2)**: p. 353-68.
7. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
8. Macfarlane, S.R., et al., *Proteinase-activated receptors.* Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 245-82.
9. Ossovskaya, V.S. and N.W. Bunnett, *Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease.* Physiol Rev, 2004. **84**(2): p. 579-621.
10. Freedman, J.E., *Thrombin, thrombomodulin, and extracellular signal-regulated kinases regulating cellular proliferation.* Circ Res, 2001. **88**(7): p. 651-3.
11. Li, X., et al., *Role of protein kinase Czeta in thrombin-induced endothelial permeability changes: inhibition by angiopoietin-1.* Blood, 2004. **104**(6): p. 1716-24.
12. Cao, H., N. Dronadula, and G.N. Rao, *Thrombin induces expression of FGF-2 via activation of PI3K-Akt-Fra-1 signaling axis leading to DNA synthesis and motility in vascular smooth muscle cells.* Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(1): p. C172-82.
13. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis.* Am J Cardiol, 1995. **75**(6): p. 67B-70B.
14. Luscher, T.F., *The endothelium and cardiovascular disease--a complex relation.* N Engl J Med, 1994. **330**(15): p. 1081-3.
15. Lusinskas, F.W. and M.A. Gimbrone, Jr., *Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment.* Annu Rev Med, 1996. **47**: p. 413-21.

16. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall*. Circ Res, 2001. **88**(9): p. 877-87.
17. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
18. Lum, H. and K.A. Roebuck, *Oxidant stress and endothelial cell dysfunction*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(4): p. C719-41.
19. Rosenfeld, M.E., *Oxidized LDL affects multiple atherogenic cellular responses*. Circulation, 1991. **83**(6): p. 2137-40.
20. Steinberg, D. and J.L. Witztum, *Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?* Circulation, 2002. **105**(17): p. 2107-11.
21. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-101.
22. Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am Heart J, 1999. **138**(5 Pt 2): p. S419-20.
23. Shephard, R.J., et al., *Adhesion molecule expression in acute and chronic exercise*. Crit Rev Immunol, 2000. **20**(3): p. 245-66.
24. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
25. Haraldsen, G., et al., *Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells*. J Immunol, 1996. **156**(7): p. 2558-65.
26. Greaves, D.R. and K.M. Channon, *Inflammation and immune responses in atherosclerosis*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 535-41.
27. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
28. Wu, T., J. Ni, and J. Wu, *Danshen (Chinese medicinal herb) preparations for acute myocardial infarction*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(2): p. CD004465.
29. Hung, H.H., et al., *A salvianolic acid B-rich fraction of Salvia miltiorrhiza induces neointimal cell apoptosis in rabbit angioplasty model*. Histol Histopathol, 2001. **16**(1): p. 175-83.
30. Huang, Y.S. and J.T. Zhang, *[Antioxidative effect of three water-soluble components isolated from Salvia miltiorrhiza in vitro]*. Yao Xue Xue Bao, 1992. **27**(2): p. 96-100.
31. Shi, C.S., et al., *Salvianolic acid B modulates hemostasis properties of human umbilical vein endothelial cells*. Thromb Res, 2007. **119**(6): p. 769-75.
32. Chen, Y.H., et al., *Salvianolic acid B attenuates VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF-alpha-treated human aortic endothelial cells*. J Cell Biochem, 2001. **82**(3): p. 512-21.
33. Lam, F.F., et al., *Salvianolic acid B, an aqueous component of danshen (Salvia*

- miltiorrhiza*), relaxes rat coronary artery by inhibition of calcium channels. Eur J Pharmacol, 2006. **553**(1-3): p. 240-5.
34. Zhou, X.M., Z.Y. Lu, and D.W. Wang, [Experimental study of *Salvia miltiorrhiza* on prevention of restenosis after angioplasty]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 1996. **16**(8): p. 480-2.
 35. Chen, Y.L., et al., *Salvia miltiorrhiza* inhibits intimal hyperplasia and monocyte chemotactic protein-1 expression after balloon injury in cholesterol-fed rabbits. J Cell Biochem, 2001. **83**(3): p. 484-93.
 36. Collins, F.S., M. Morgan, and A. Patrinos, *The Human Genome Project: lessons from large-scale biology*. Science, 2003. **300**(5617): p. 286-90.
 37. Gygi, S.P., et al., *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 1720-30.
 38. Gevaert, K., et al., *Protein identification based on matrix assisted laser desorption/ionization-post source decay-mass spectrometry*. Electrophoresis, 2001. **22**(9): p. 1645-51.
 39. Tonge, R., et al., *Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology*. Proteomics, 2001. **1**(3): p. 377-96.
 40. Aebersold, R. and D.R. Goodlett, *Mass spectrometry in proteomics*. Chem Rev, 2001. **101**(2): p. 269-95.
 41. Rappsilber, J. and M. Mann, *What does it mean to identify a protein in proteomics?* Trends Biochem Sci, 2002. **27**(2): p. 74-8.
 42. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
 43. Tseng, H.W., et al., *Lipopolysaccharide-stimulated responses in rat aortic endothelial cells by a systems biology approach*. Proteomics, 2006. **6**(22): p. 5915-28.
 44. Zhang, J., et al., *HPLC determination and pharmacokinetic studies of salvianolic acid B in rat plasma after oral administration of Radix Salviae Miltiorrhizae extract*. Biomed Chromatogr, 2005. **19**(1): p. 15-8.
 45. Lim, Y.S., et al., *The thiol-specific antioxidant protein from human brain: gene cloning and analysis of conserved cysteine regions*. Gene, 1994. **140**(2): p. 279-84.
 46. Rabilloud, T., et al., *Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19396-401.
 47. Oshima, R., et al., *Modification of the hepatic mitochondrial proteome in response to ischemic preconditioning following ischemia-reperfusion injury of the rat liver*. Eur Surg Res, 2008. **40**(3): p. 247-55.

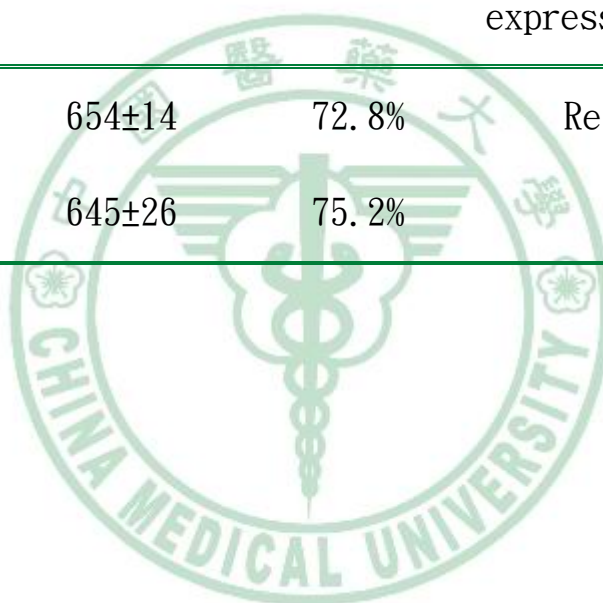
48. Strelkov, S.V., et al., *Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly*. EMBO J, 2002. **21**(6): p. 1255-66.
49. Rogers, K.R., H. Herrmann, and W.W. Franke, *Characterization of disulfide crosslink formation of human vimentin at the dimer, tetramer, and intermediate filament levels*. J Struct Biol, 1996. **117**(1): p. 55-69.
50. Rock, R.S., et al., *In vitro assays of processive myosin motors*. Methods, 2000. **22**(4): p. 373-81.
51. Okuwaki, M., *The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein*. J Biochem, 2008. **143**(4): p. 441-8.
52. Wang, W., et al., *Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 823-30.
53. Okuwaki, M., et al., *Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for in vitro replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins*. J Mol Biol, 2001. **311**(1): p. 41-55.
54. Nishimura, Y., et al., *Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization*. Biosci Biotechnol Biochem, 2002. **66**(10): p. 2239-42.
55. Zhang, H., et al., *B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35726-34.
56. Nousiainen, M., et al., *Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(14): p. 5391-6.
57. Okuwaki, M., M. Tsujimoto, and K. Nagata, *The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(6): p. 2016-30.
58. Tarapore, P., et al., *Thr199 phosphorylation targets nucleophosmin to nuclear speckles and represses pre-mRNA processing*. FEBS Lett, 2006. **580**(2): p. 399-409.
59. Dhar, S.K., et al., *Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28209-19.
60. Ramos, J.W., *The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(12): p. 2707-19.
61. Xue, D.Y., J.H. Hong, and L.M. Xu, *[Salicylic acid B inhibits MAPK signaling in activated rat hepatic stellate cells]*. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2004. **12**(8): p. 471-4.
62. 興龍編, ed. *藥物:神農本草經*. 1986, 立得: 台北市.
63. 李時珍, ed. *本草綱目*. 1993, 上海科學技術出版發行: 上海.
64. 顏正華, ed. *中藥學*. 1991, 人民衛生: 北京.

65. 陳可冀/史載祥, ed. 實用血瘀證學. 1999, 人民衛生: 北京.
66. 徐任生, ed. 丹參—生物學及其應用. 1990, 科學出版社: 北京



表一、丹參酚酸 B 處理與未處理之內皮細胞蛋白質二維電泳膠片分析

	Spot numbers	Match ratio	Differentially expressed spot numbers
Control	654±14	72.8%	Reference gel
Sal B treated	645±26	75.2%	11



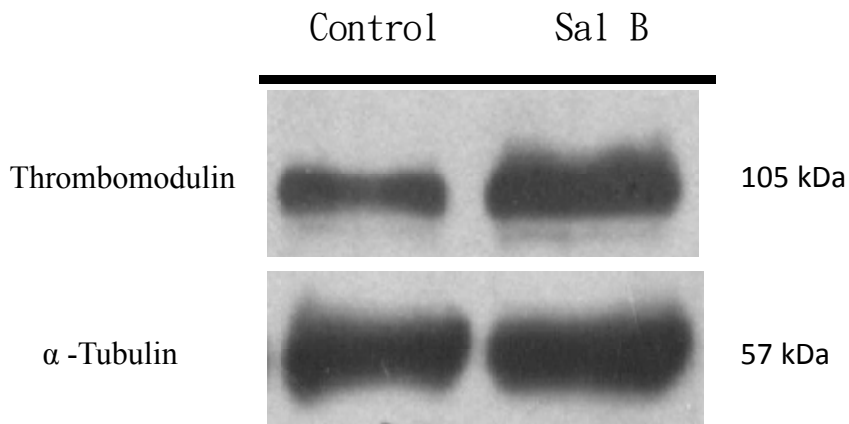
表二、丹參酚酸B處理內皮細胞之差異蛋白質

Spot no.	Protein identity	SwissProt No.	Relative spot intensity % (control, 100%)	Experimental value(theoretical values) pI/kDa	Mascot score	location	Molecular function
1	Caldesmon	Q05682	45%	5.5/93.3	81	cytoskeleton	actin binding calmodulin binding myosin binding tropomyosin binding
2	Vimentin	P08670	227%	4.9/53.7	129	Cytoplasm intermediate filament	Protein binding Structural constituent of cytoskeleton
3	T-complex protein 1 subunit beta	P78371	Only Sal B	6/57.8	223	nucleus	ATP binding unfolded protein binding
4	Protein disulfide-isomerase A3	P30401	260%	5.9/57.1	180	endoplasmic reticulum melanosome	cysteine-type endopeptidase activity phospholipase C activity protein disulfide isomerase activity
5	Nucleophosmin	P06748	Only Sal B	4.5/32.7	67	nucleolus Nucleoplasm spindle pole centrosome	NF-kappaE binding Tat protein binding histone binding transcription coactivator activity identical protein binding
6	Heat shock protein beta-1	P04792	230%	6/22.8	135	cell surface Cytoplasm Nucleus	actin binding
7	Tropomyosin alpha-3 chain	P06753	Only Sal B	4.5/32.9	85	muscle thin filament tropomyosin	ATPase binding polyubiquitin binding
8	UBX domain-containing protein 1	Q04323	316%	5.1/33.4	153	cytoplasm	
9	Alpha-enolase	P06733	237%	7.7/47.5	127	Nucleus plasma membrane	magnesium ion binding serine-type endopeptidase activity phosphopyruvate hydratase activity transcription factor activity
10	Peroxi-redoxin-2	P32119	258%	5.6/22	140	cytoplasm	thioredoxin peroxidase activity

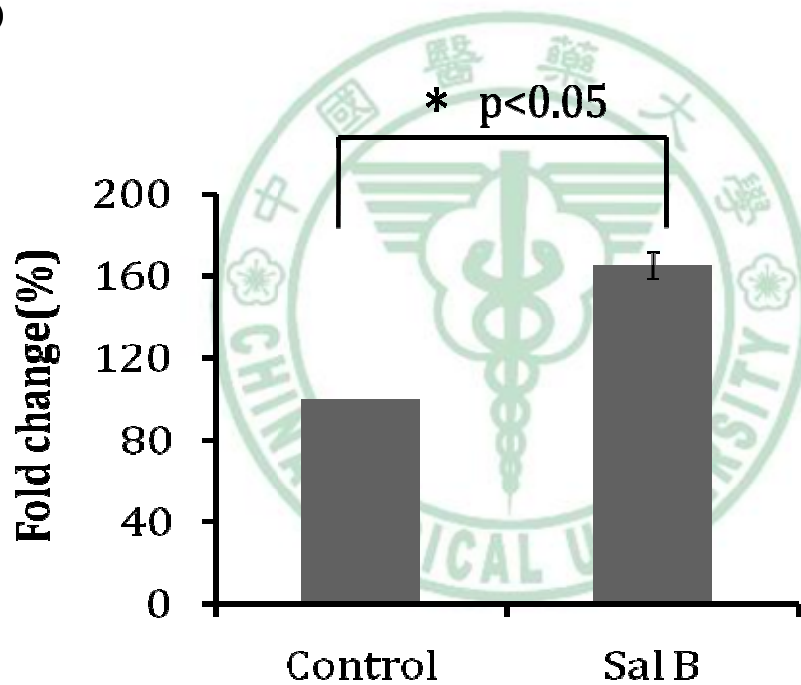
^a PMF

^b Identify confirmed by MS/MIS

(A)



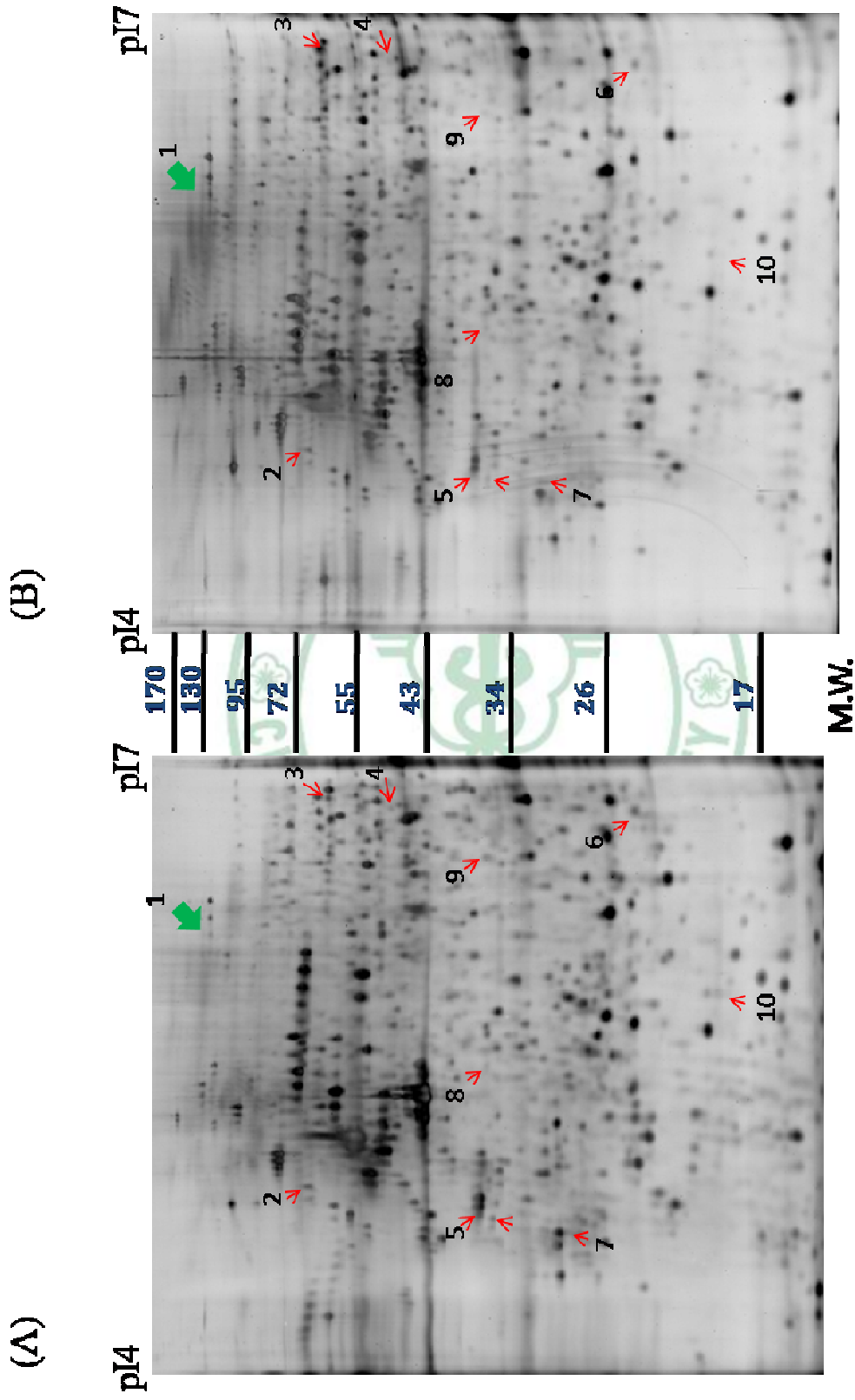
(B)



圖一、分析丹參酚酸 B 影響 HUVEC 凝血酶調節素表現量。

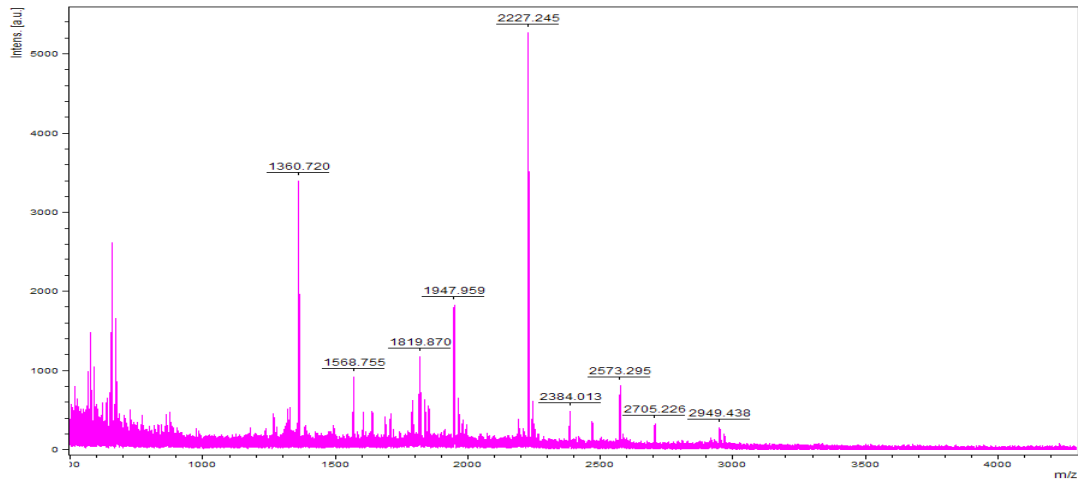
(A) 人類臍靜脈內皮細胞經 0.0125 mg/ml 丹參酚酸 B 處理 12 小時後，收集蛋白進行西方墨點法分析，以 α -tubulin 作為 internal control 分析 thrombomodulin 的表現量(B) Multi Gauge 軟體分析掃描之色帶量化 TM Sal B 處理後 TM 蛋白變化的倍數，此實驗重複三次，且 $p < 0.05$ 。

圖二、HUVEC經丹參酚酸B處理(A)與對照組(B)的二維電泳膠片圖

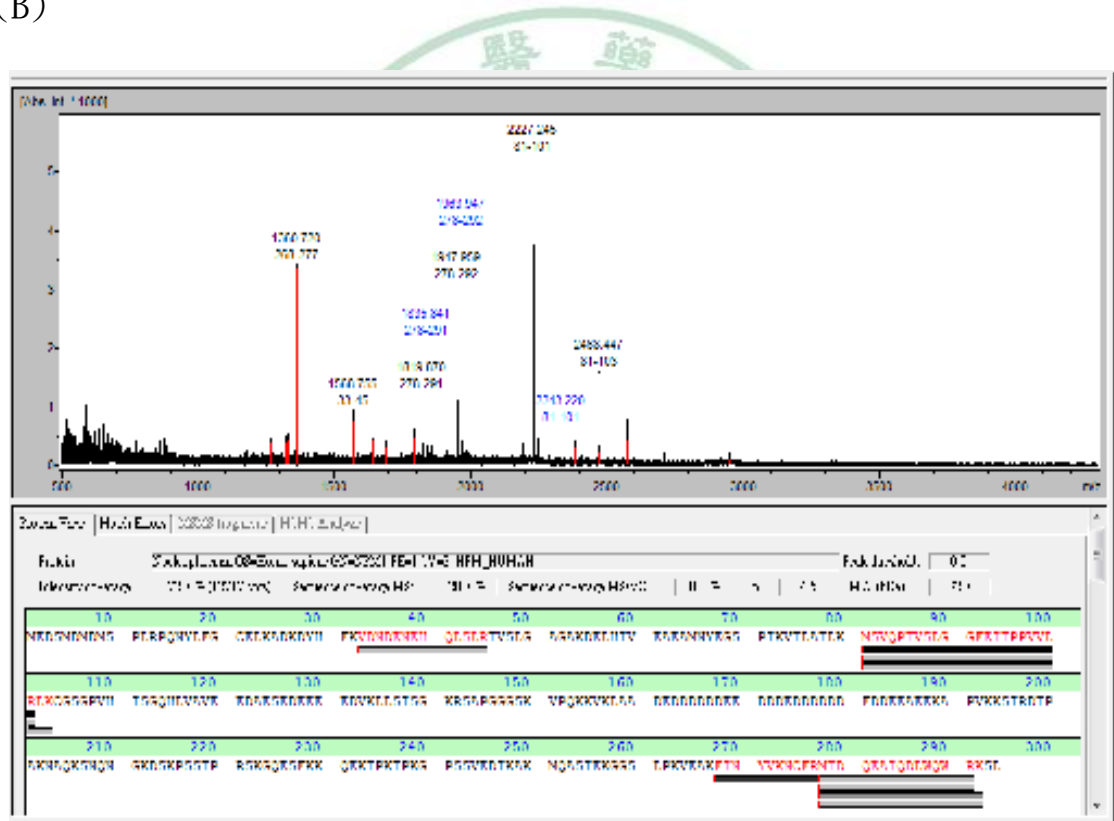


圖二、HUVEC經丹參酚酸B處理與對照組的二維電泳膠片圖及11個差異蛋白。
 (A)HUVEC經0.0125 mg/ml丹參酚酸B處理12小時的蛋白質質之二維電泳膠片圖。
 (B)HUVEC對照組的二維電泳膠片圖。
 → 表示經丹參酚酸B處理後表現量上升的蛋白質點，
 → 表示經丹參酚酸B處理後表現量下降的蛋白質點。

(A)



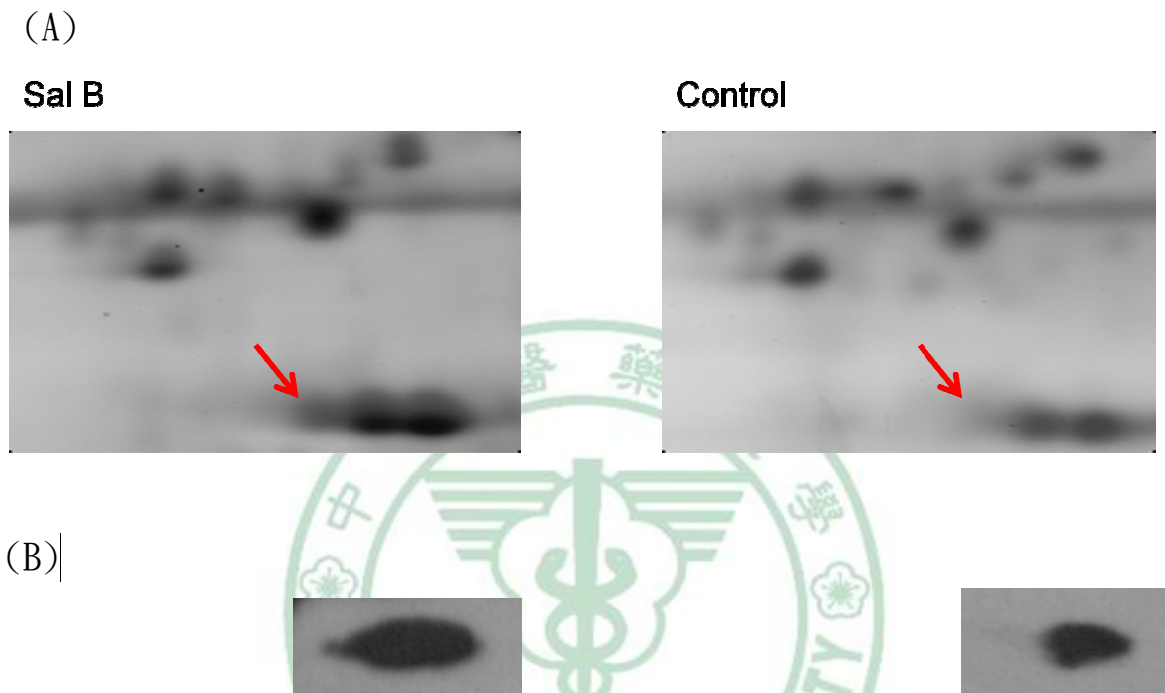
(B)



圖三、MALDI-TOF/TOF 質譜分析 nucleophosmin

(A) Peptide mass fingerprinting (PMF) 圖譜(B)共有 9 段 peptide 比

對出 nucleophosmin，Sequence coverage 為 20.7%。

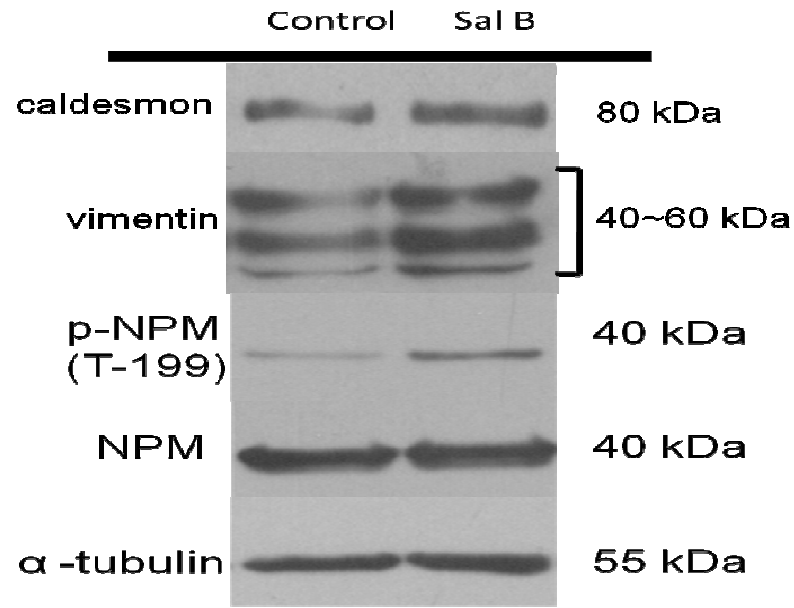


圖四、差異蛋白質點 nucleophosmin 在二維電泳圖譜的位置

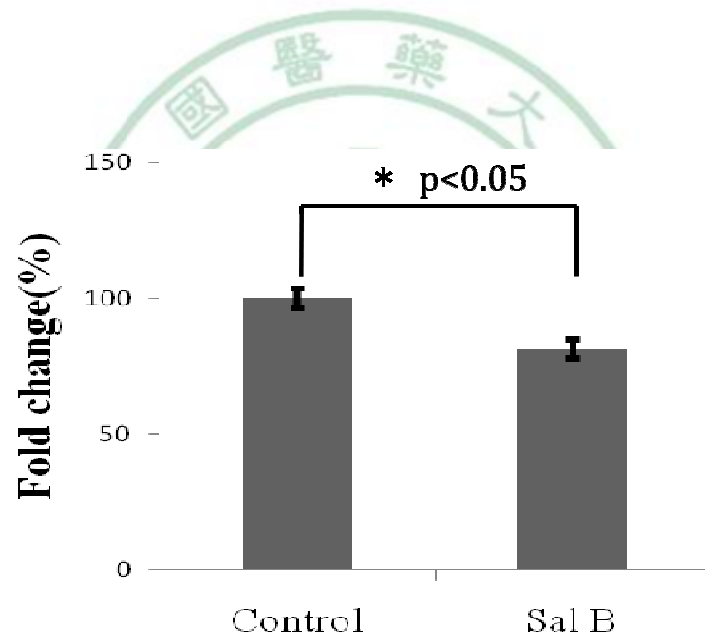
(A) 差異蛋白質 nucleophosmin 在 Sal B 與對照組之二維電泳圖譜分佈。

(B) 西方墨點法確認 nucleophosmin 在二維電泳圖譜的位置。

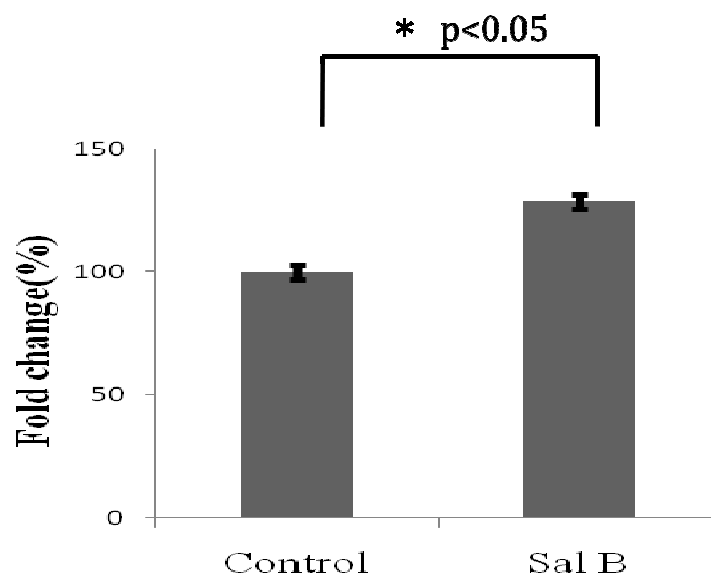
(A)



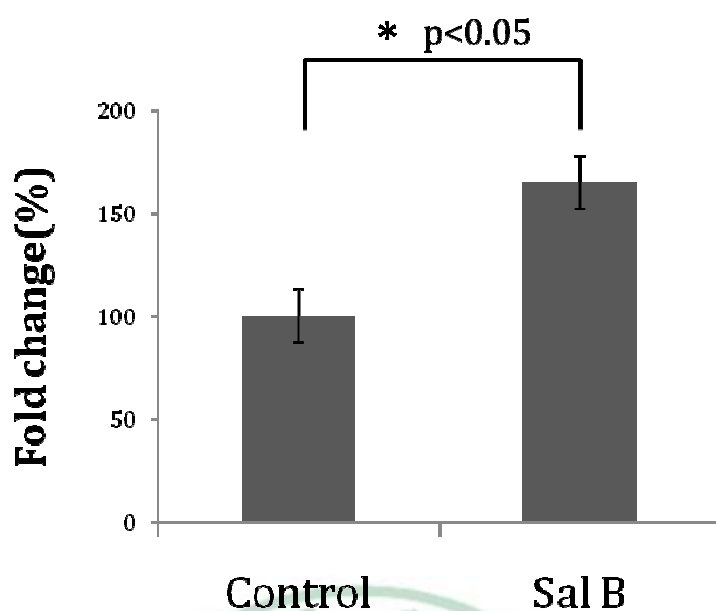
(B)



(C)



(D)



圖五、西方墨點法分析 caldesmon、vimentin 表現量與 nucleophosmin 磷酸化表現

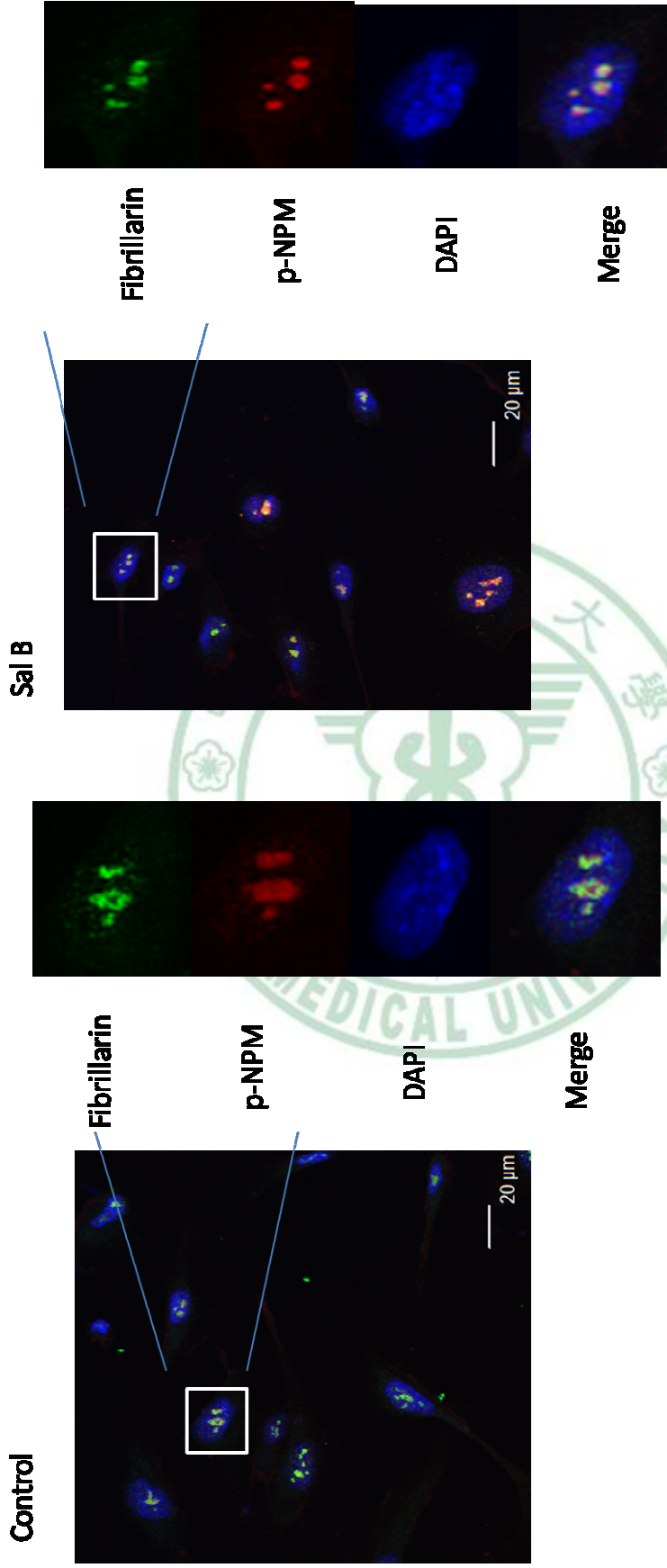
(A)HUVEC 經 0.0125 mg/ml 丹參酚酸 B 處理 12 小時後，vimentin、caldesmon、nucleophosmin 及磷酸化的 nucleophosmin 表現量的變化。

(B) 以 α -tubulin 做為 internal control，SalB 處理組對比於對照組之 caldesmon 表現量之倍數變化，實驗重複三次且 $p < 0.05$ 。(C) 以 α

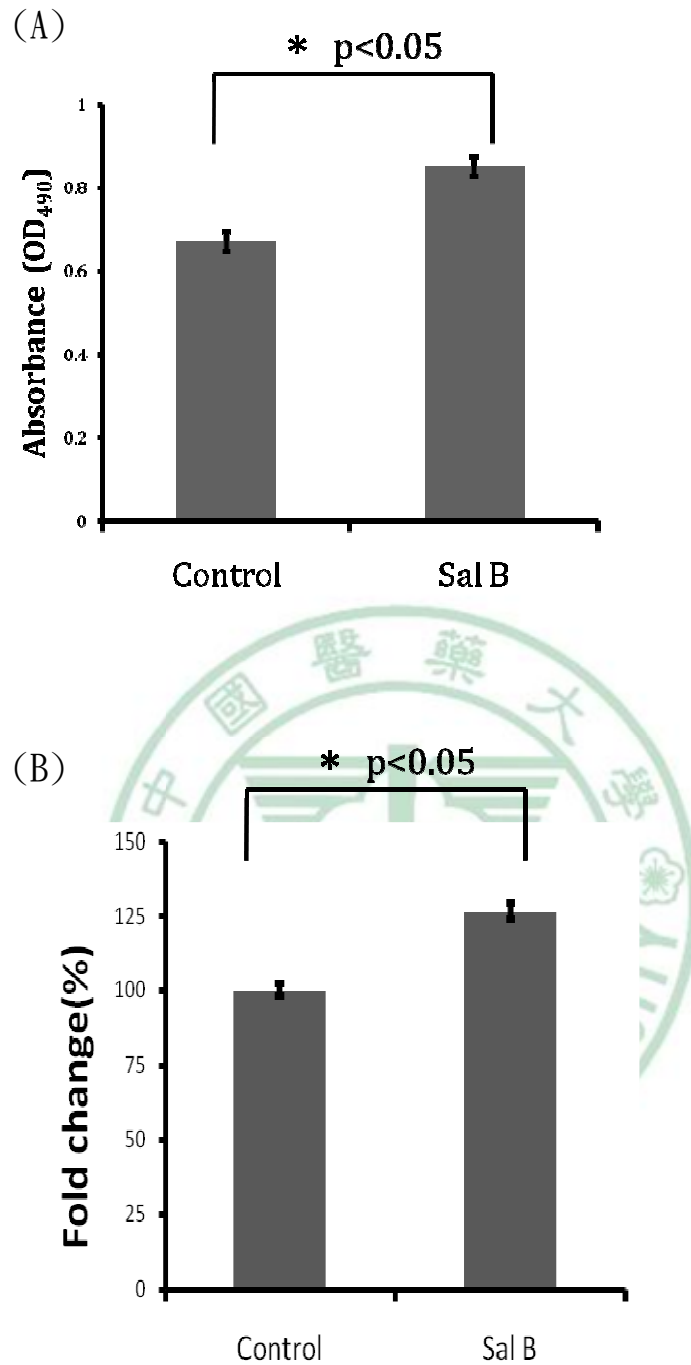
-tubulin 做為 internal control，SalB 處理組對比於對照組之 vimentin 表現量之倍數變化，實驗重複三次且 $p < 0.05$ 。(D) 以 nucleophosmin 做

為 internal control，SalB 處理組對比於對照組之 nucleophosmin 磷酸化表現量之倍數變化，此實驗重複三次且 $p < 0.05$ 。

細胞免疫螢光染色分析磷酸化nucleophosmin(NPM)的分布情形



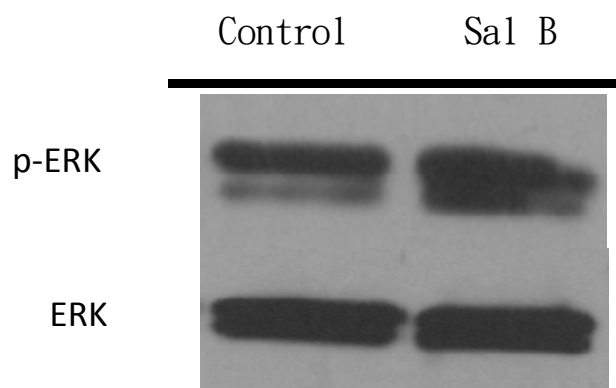
圖六、細胞免疫螢光染色分析磷酸化nucleophosmin(NPM)的分布情形
HUVEC經0.0125 mg/ml丹參酚酸B處理12小時後，進行細胞免疫螢光染色，以fibrillarlin抗體作為核仁標記，p-NPM (T199)抗體進行蛋白質分佈追蹤，DAPI則為核之染色。



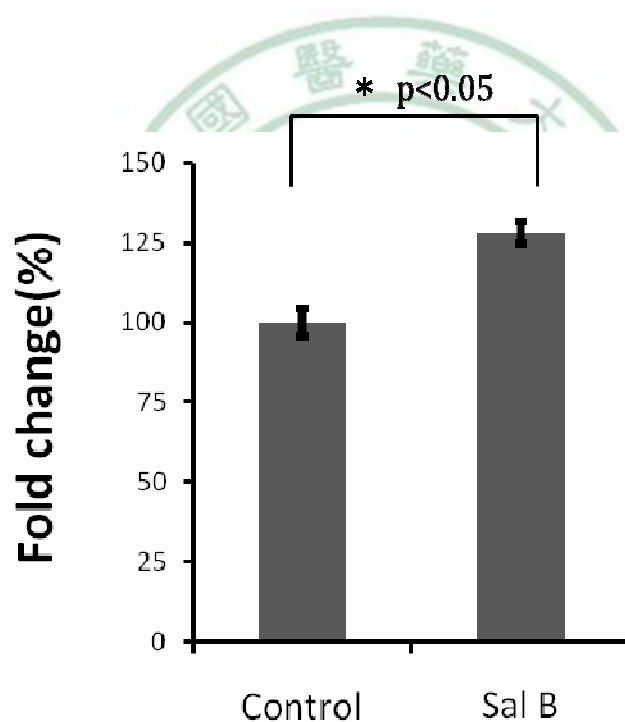
圖七、MTS 方法分析經丹參酚酸 B 處理後 HUVEC 的增生速率

HUVEC 經 0.0125 mg/ml 丹參酚酸 B 處理 12 小時後，加入 MTS 分析試劑 HUVEC 增生速率(A)測讀於 490 nm 下的吸光值。(B)以對照組作為 100% 量化 HUVEC 增生速率之變化。此實驗重複 5 次且 $p < 0.05$ 。

(A)



(B)



圖八、西方墨點法分析 HUVEC 經丹參酚酸 B 處理後的 ERK 的磷酸化

(A) 人類臍靜脈內皮細胞經 0.0125 mg/ml 丹參酚酸 B 處理 12 小時後，收取蛋白質進行西方墨點法分析，(B)以 ERK 的總量作為 internal control 量化 ERK 的磷酸化表現，Sal B 處理後的 ERK 磷酸化表現為對照組(Control) 1.25 倍，此實驗重複三次且 $p < 0.05$ 。