

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 *
* : 蓮蓬萃取物抑制血管平滑肌細胞過度增生之研究 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生：黃貞榕

學生計畫編號：NSC 102-2815-C-040-051-B

研究期間：102年07月01日至103年02月28日止，計8個月

指導教授：陳璟賢

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學營養學系（所）

中華民國

103年03月17日

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* 計畫 *
* : 蓮蓬萃取物抑制血管平滑肌細胞過度增生之研究 *
* 名稱 *

執行計畫學生：黃貞榕

學生計畫編號：NSC 102-2815-C-040-051-B

研究期間：102年7月1日至103年2月底止，計8個月

指導教授：陳璟賢

處理方式(請勾選)：☐立即公開查詢

☐涉及專利或其他智慧財產權，☐一年☒二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學 營養學系

中華民國 103 年 03 月 14 日

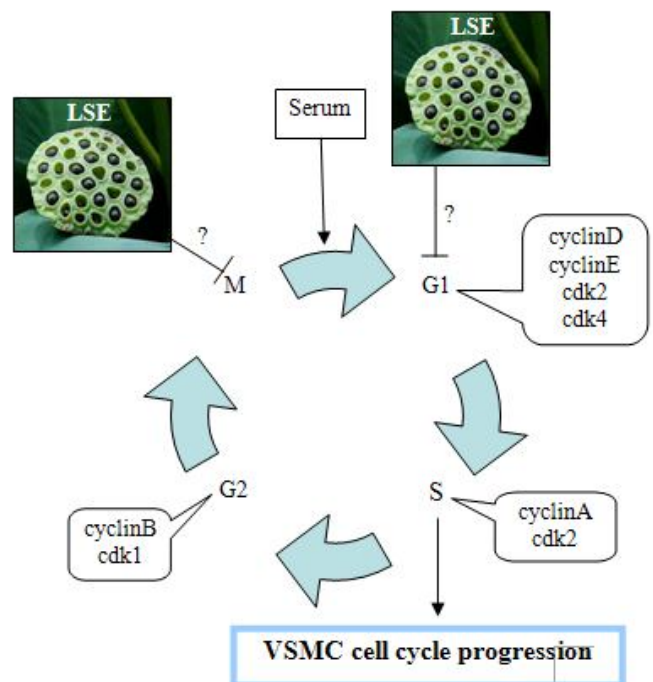
(一) 摘要

100 年國人十大死因統計出爐：心臟和腦血管疾病位居第二和第三名，而動脈粥狀硬化(atherosclerosis)是造成心（腦）血管疾病致死的主因。然動脈粥狀硬化的作用機制和組織細胞相當複雜，因此目前對動脈硬化仍未有良好的治療方式和藥物。蓮蓬(lotus seedpod)為蓮的花托，已知其中含有原花青素(procyanidins)成份，先前的研究顯示此原花青素具有抗氧化以及修復心肌細胞等功效，因此本計劃擬探討蓮蓬萃取物(lotus seedpod extract, LSE)抗血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)過度增生(proliferation)之研究。首先透過動物實驗，確認 LSE 在活體中抗動脈粥狀硬化的效應，根據血管免疫組織染色分析顯示 LSE 可以抑制 VSMC 的移動及增生。接著藉由細胞生長曲線和細胞增生試驗結果得知 LSE 處理 VSMC (A7r5 細胞)作用 48 小時的 IC50 (half maximal inhibitory concentration)約為 10-25 $\mu\text{g/ml}$ 。再以流式細胞儀(flow cytometry)分析經過 LSE 處理後的 A7r5 細胞生長週期分布情形，確認 LSE 促進其生長週期停滯在 G0/G1 期(G0/G1 arrest)。並以西方點墨法來分析細胞週期抑制蛋白如 p53、p21、p27 的表現量，顯示 LSE 可以抑制 A7r5 細胞週期之分子調控。最後透過免疫沉澱(Immunoprecipitation, IP)分析經 LSE 處理後之細胞週期調控蛋白複合體之間交互作用的表現，包含細胞週期素(cyclin)和細胞週期素依賴激酶(cyclin-dependent kinase, cdk)、以及轉錄因子 E2F 和 Rb。總結，LSE 可藉由調控細胞週期以抑制 VSMC 增生作用，顯示蓮蓬具有抗動脈粥狀硬化之潛力。

Keywords: 動脈粥狀硬化，蓮蓬萃取物，血管平滑肌細胞，過度增生，細胞週期停滯

(二) 研究動機與研究問題

隨著經濟的發展，國人的飲食習慣越趨近於高鹽、高糖、高油脂、高膽固醇等的方式，所以罹患動脈粥狀的患者越來越多。由於動脈硬化過程非常複雜，因此至今為止在醫學上沒有良好的實驗模式可以模擬動脈硬化的病灶及分子機轉。在過去的研究中指出，食用富含多酚(polyphenols)的蔬菜、水果能夠有效



的降低罹患心血管疾病的風險[1]。植物蓮的經濟價值很高，幾乎所有部位皆能食用，且已知蓮蓬(蓮房)中含多酚成份，所以本計畫擬探討的萃取物就是來自蓮蓬。先前研究指出蓮蓬中的功能性化學成份具有抗氧化以及修復心肌細胞效用[2]，因此本計畫擬針對蓮蓬萃取物探討其對於血管平滑肌細胞過度增生之抑制作用。

(三) 文獻回顧與探討

1. 蓮蓬 (lotus seedpod)

蓮(學名：Nelumbo nucifera)是蓮科蓮屬多年生草本挺水植物，原產於中國，在台灣主要分布於台南縣白河鎮。開花後結果「蓮蓬」，呈倒錐形，有小孔 20-30 個，每孔內含果實 1 枚；堅果呈橢圓形，果皮革質，堅硬，熟時黑褐色。種子呈橢圓形，種皮紅色或白色。蓮花的花、種子、嫩葉和根莖都可以食用。蓮的不同部分也用在傳統東亞的草藥中，蓮子、蓮子心、蓮葉、雄蕊、蓮蓬都可以入藥。蓮蓬是荷花的蓮房，曬乾取出種子的蓮蓬，可以熬湯加冰糖喝，味苦性溫濕，具散瘀之功效。研究指出蓮蓬含有豐富的原花青素(procyanidins) [3]，過去的研究顯示，從蓮萃取出的原花青素(procyanidins extracted with acetone-water from lotus seedpod, LSPCs)具有強烈的抗輻射活性，可以保護肝臟、防止放射病、減少輻射誘發的死亡率[4]，並且能夠減少因心肌受損造成缺血的傷害[2]，藉由清除氧自由基和刺激抗氧化酶活性的能力，可以改善小鼠的認知功能障礙和氧化損傷[5]。原花青素可以抑制低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, oxLDL)和氧化低密度脂蛋白受體(lectin-like oxidized LDL receptor-1, LOX-1)的結合，在飼以高脂肪飲食的高血壓大鼠中，長期服用低聚原花青素後，可以防止脂質堆積在血管壁上，保護血管的彈性[6]。綜觀以上蓮蓬萃取物的功能，可以推測蓮蓬可能具有動脈粥狀硬化化學預防及治療的功效。

2. 動脈粥狀硬化(atherosclerosis)

100 年國人十大死因統計出爐，心臟和腦血管疾病位居第二和第三名，而動脈粥狀硬化是造成心(腦)血管疾病致死的主因。動脈粥狀硬化是因動脈內皮細胞被刺激後，歷經一連串發炎、增厚、變硬，最終逐漸阻塞動脈的過程。動脈粥狀硬化是好發於動脈的慢性發炎疾病，最終導致心臟病及中風。動脈粥狀硬化的機制仍不明朗，目前最被廣泛接受的理論是受傷後的發炎反應。高膽固醇症是引起動脈內皮細胞損傷的主要因子之一，但並非唯一的因子。其他原因包括：病毒與細菌感染、高血脂、高血

糖、高同半胱氨酸血症、因肥胖造成的脂肪組織堆積、毒素刺激如抽菸、酗酒及環境毒物，都可能導致內皮細胞的受損。透過高血脂症對血管的侵害模式可以窺見動脈粥狀硬化的病理機轉。當血管內皮細胞損傷後，會造成脂蛋白及其他物質滲透機會升高，脂蛋白進入血管內膜後會被內生性氧化因子如：一氧化氮生成酶與 15-脂質氧化酶 [7]等氧化後形成氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)，低密度脂蛋白氧化後具有細胞毒性，會啟動血管內皮的發炎反應，造成內皮吸附因子表達[8]，因而吸引循環單核球細胞至發炎處，並穿過內皮細胞至血管內層內後，變成巨噬細胞，巨噬細胞在粥狀硬化的過程中會合成脂蛋白分解酶(lipoprotein lipase)和釋出腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor alpha, TNF- α)[9][10]，而巨噬細胞會吞噬氧化的 LDL 並形成泡沫細胞，泡沫細胞死亡時釋出脂質，產生所謂的脂質核心。脂質核心會被由彈力蛋白和膠原蛋白組成的纖維帽所包圍，體內藉此試圖癒合這個損傷，因而形成動脈粥狀硬化斑塊。因 LDL 不斷地累積，在內皮層造成的硬化斑塊持續成長，使得動脈的外層彈性膜膨脹，讓血管能在不正常的管腔中維持正常的血流。但隨著硬化塊持續增長，動脈無法再向外膨脹時，硬化斑塊會開始向內腔突起，此時硬化斑塊通常會超過血管管徑的 40%。在某些情況下，如壓力等因素，可能會導致硬化斑塊破裂。此時，脂質核心會接觸到血液，引發血液凝固而形成血栓或血塊，進一步造成動脈部份或完全阻塞，進而引發心血管疾病。過去有研究顯示，在動脈硬化過程中血管平滑肌細胞有 DNA 的損傷和活化 DNA 修復的反應，可以調控其細胞週期停滯或引發細胞凋亡或細胞衰老[11]，亦證實血管平滑肌細胞在動脈粥狀硬化病灶中佔有重要的角色。

3. 血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)

血管平滑肌是指存在於血管壁且組成血管壁主要部分的特定類型平滑肌。血管平滑肌的收縮或鬆弛同時會改變血管的體積以及局部的血壓，此一機制負責將體內的血液重新分配到體內其他需要血液的區域中（即需氧量突然增加的區域）。因此血管平滑肌的主要功能就是調節體內血管的管徑。過度的血管收縮將會導致高血壓，然而例如休克中出現的過度血管舒張會導致低血壓。血管平滑肌細胞在增殖狀態下，主要表現為細胞胞漿內蛋白質的變化。例如，胎兒期及培養細胞的增殖期平滑肌細胞含有廣泛豐富的肌絲，表現為蛋白質合成和胞外基質分泌旺盛，這時稱之為合成型細胞。反之，成人機體動脈中膜平滑肌細胞稱為收縮型細胞。在許多病理情況下，血管平滑肌細胞型態會轉變為合成型，在此情況下細胞開始增生與發炎，收縮型結構蛋白(例如

SM α -actin)表現量增加，分泌酵素分解細胞間基質，平滑肌細胞轉移至內皮細胞處，造成血管壁增厚且逐漸阻塞，這個過程稱為表型轉化[12]。之前研究指出，細胞發炎因子和細胞生長因子的增多，如：胰島素生長因子(insulinlike growth factor, IGF)、上皮生長因子(epidermal growth factor, EGF)、血小板源生長因子(platelet derived growth factor, PDGF)、血管內皮細胞生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF3)、白細胞介素(interleukin, IL)、IFN- α (interferon, IFN)等[13]，透過刺激信號傳遞路徑調節某些基因表達增多，而使 VSMC 的增殖失控，引起血管壁一系列的病理改變，終將導致動脈粥狀硬化的發生。

4. 細胞週期(cell cycle)

細胞週期是由一連串的步驟所組合成，它可以使細胞生長，然後分裂為兩個子細胞。細胞週期可以分為四個階段：G0/G1、S、G2 及 M。G1 和 G2 期是細胞生長期；S 期是細胞將細胞核內的染色體複製的時期；M 期是細胞進行有絲分裂或減數分裂的時期。細胞週期主要受到細胞週期素(cyclin)、細胞週期素依賴激酶(cyclin-dependent kinase, cdk)以及細胞週期蛋白依賴性激酶抑制因子(cdk inhibitor, CDKI)所調控。

4.1. 細胞週期素(cyclin)

週期素代表著這些蛋白質的表現量會隨著細胞週期的進行而有所變化，進而確認週期素是扮演細胞週期調控的角色。依照目前的認知，就如同細胞週期 G1 期→S 期→G2 期→M 期的進行，在 G1 期大量表現的週期素 D(cyclin D)漸漸的由週期素 E(cyclin E)取代，而之後的變化則是 cyclin E→cyclin A→cyclin B。除了週期素決定細胞何時進入下一個週期以外，細胞週期檢查點則是扮演監督者的角色，只要細胞尚未做好複製到分裂的準備，檢查點就會活化，一方面停滯週期蛋白的功能，另一方面則可以爭取更多準備的時間。無論是週期素或檢查點功能發生異常[14]，那細胞往往在 M 期時無法順利進行分裂過程而走向細胞凋亡，只有極少數的細胞會沒有進入細胞凋亡，而最後演化成癌細胞。主要細胞週期素有：cyclin A, cyclin B, cyclin D 及 cyclin E。在 G1 期→S 期調控蛋白為細胞週期蛋白 D(cyclin D)以及細胞週期蛋白 E(cyclin E)，S 期→G2 期調控蛋白為細胞週期蛋白 A(cyclin A)，G2 期→M 期調控蛋白為細胞週期蛋白 B(cyclin B)。

4.2. 細胞週期素依賴激酶(cyclin-dependent kinase, cdk)

此種激酶需要在有 cyclin 時才能作用，cyclin 和 cdk 會形成複合體的結構[15]，結

合後，cdk 會改變構型，使活化位(active site)暴露，並催化 ATP 上的一個磷酸根接到受質蛋白上，使受質蛋白磷酸化，cdk 複合體則因失去活性而被分解。細胞週期蛋白依賴型激酶扮演催化次單元(catalytic subunit)，而細胞週期蛋白則屬調節次單元(regulatory subunit)。主要細胞週期素依賴激酶有：在 G2 期→M 期與 cyclin B 作用的 cdk1，在 G1 期與 cyclin D 作用的 cdk4 及 cdk6；在 G1 期→S 期與 cyclin E 作用的 cdk2；S 期與 cyclin A 作用的 cdk2。

4.3. 細胞週期蛋白依賴性激酶抑制因子(cdk inhibitor, CDKI)

CDKI 依照結構不同大致分成兩個族群：Cip/Kip 及 INK4。Cip/Kip 種類的若過度表現會抑制細胞週期，它們會和多種 cdk、cdk 複合物、cyclin A, cyclin E, cyclin D 有相互反應。此種 CDKI 主要抑制 G1 期有活性的 cyclin。主要的例子有 p53→p21、p21、p27、p57。INK4 種類的 CDKI 有四個重複的 ankyrin，它們會和 cdk4、cdk6、cyclin(或兩者)或 cyclin D 形成複合體。此種 CDKI 主要在 S 期細胞增殖時表現最明顯，主要的例子有 p15、p16。p15、p16 的基因常在癌細胞中被發現缺失或是突變，所以都可能和異常的細胞增殖及腫瘤的抑制有關[16]。過去的研究發現，腫瘤抑制基因及原致癌基因，這些都與細胞週期有關。抑癌基因(tumorsuppressorgenes，又稱 antioncogenes)的蛋白質產物，通常是作用在細胞週期中的合成前期與合成期這兩個階段之間，調控細胞週期的促動酶，發揮停滯細胞週期的功能，以遏阻過度亢進的細胞增生與癌瘤的形成。當原致癌基因受損時，會使細胞失控生長。此時便需要抑癌基因的作用。例如，p53，p53 在 DNA 受到損害、細胞不正常時會大量出現，進而阻擋 cdk 和 cyclin 複合體的作用，使細胞週期無法進行，這樣就不會形成癌細胞[17]；如果損害很嚴重，p53 可進行有計畫的細胞自我毀滅，也就是細胞凋亡(apoptosis)。在本文中將探討在 VSMC 異常增生的研究，提出 LSE 可能造成細胞週期停止在 G0/G1 期或 G2/M 期。

(四) 研究方法及步驟

1. 蓮蓬水萃取物(LSE)製備及成份分析

1.1. LSE 製備

秤取乾燥的蓮蓬 100 g，加入 6 L distilled water，以 100°C 煮 2 小時，待冷卻後過濾，將濾液進行冷凍乾燥，得其粉末即為蓮蓬粗萃取物，最後進行冷凍乾燥為粉末。

1.2. 測總多酚含量(Folin & Ciocalteu method)

先配置標準品 GA(10 mg/25ml MeOH)，分別取 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 ml 之後加入 MeOH 將體積補至 1ml；另配製待測樣品，以 1000 倍稀釋，並加入 MeOH 將體積補至 1ml。隨後加入 0.5ml 2N Folin & Ciocalteu mix，再加入 3 ml 20% Na₂CO₃ 靜置室溫 15 分鐘，再加入 5 ml 之 ddH₂O 以 1250g 離心五分鐘，再以分光光度儀 725 nm 測 OD 值，畫出標準曲線。對照樣品吸光值，進一步推算出樣品總多酚含量。

1.3. 測總黃酮量(Jia method)

先配置標準品 rutin(8.8 mg/25ml MeOH)，分別取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0ml 之後加入 30%EtOH 補足體積至 10ml，另配製待測樣品，以 1000 倍稀釋，並加入 EtOH 將體積補至 10ml。隨後加入 0.3 ml 1M NaNO₃ 混合均勻，並靜置室溫 6 分鐘後，再加入 0.3 ml 1M AlNO₃ 混合均勻，並靜置 6 分鐘。最後加入 4ml 之 4%NaOH 以及補 0.4ml ddH₂O 放置 15 分鐘後，再以分光光度儀 510 nm 測 OD 值，畫出標準曲線。對照樣品吸光值，進一步推算出樣品總多酚含量。

1.4. 測花青素含量(Fuleki & Francis mothod)

將樣品進行稀釋 1000 倍後，分別取 2ml 至兩管離心管中，以酸鹼 Buffer 調 pH 值，使一管 pH 為 1.0，另一管為 pH 4.5。兩份稀釋液分別以分光光度儀在 520nm 進行吸光測試，得 A1(pH 為 1.0)與 A2(pH 為 4.5)，再以下列公式計算 sample 中所含總花青素毫克數。

$$\frac{|A1-A2| \times F \times MW}{\epsilon}$$

MW：花青素分子量以 delphinidin-3-diglycoside 之分子量 518.5 計算

F：稀釋倍數

ε：花青素之莫耳吸光係數(Molecular extinction coefficient)，以 delphinidin-3-diglycoside 在含 0.1%鹽酸的甲醇溶液之吸光係數 ε 值 301.6 計算。

2. 動物實驗

2.1. 動物實驗設計及分組

本實驗模式分組概述如下：(a)正常飼料餵食組、(b)高脂肪餵食組 (high fat diet, HFD)、(c) HFD + 0.5% LSE、(d) HFD + 1.0% LSE，一般組以 normal diet 餵食，2~4 組以 HFD：89.8% chow，10% coconut oil 及 0.2% 膽固醇，實驗過程中定期記錄動物飲食以及體重的變化，並登記動物死亡的數目。飼養 25 週後可誘導產生高脂血症，動物禁食一夜後犧牲，犧牲後收集血液分析血脂肪，包括總膽固醇、三酸甘油脂、

HDL、LDL，另一部份取肝組織測定其肝內總脂質膽固醇及 LDL 之濃度（上述各項記錄和分析試驗屬於實驗室學長姐實驗部分）。犧牲後，取出實驗動物之主動脈弓（aortic arch）部份，後浸入 10% 中性福馬林固定（neutral buffered formalin），以石蠟包埋，以 hematoxylin and eosin 染色（H&E stain）以及免疫組織染色等試驗觀察病灶。

1.2. H&E stain

組織以 Formol-Alcohol(formalin: acetic acid: 70% alcohol = 1:1:20)固定 24 小時，接著以序列酒精（50%、70%、80%、90%、100%）脫水，然後將組織泡入 xylene 24 小時，接著置於 58°C 環境中，首先用 paraffin: xylene = 1:1 浸潤組織 24 小時，再用 paraffin: xylene = 2:1 浸潤組織 24 小時，然後用 paraffin 浸潤組織 24 小時 2 次，將組織置於包埋盒中，加入融化的石蠟，然後將包埋盒置於 -20°C 冰箱冷卻後去除模子，接著將包埋好的組織切片，切片厚度約 5 μm ，將切片放入 38°C 水中使其完全伸展，然後將切片置於玻片中央使其自然風乾。

將組織切片脫蠟(經 100% xylene 5-10 min、100% xylene 5-10 min、100% alcohol 1 min、100% alcohol 1 min、95% alcohol 1 min、95% alcohol 1 min、90% alcohol 1 min、80% alcohol 1 min、dd-H₂O 1 min)，浸潤 hematoxylin 10-15 min，dd-H₂O 洗 30 sec-1 min，用 1% 鹽酸酒精分化 30 秒，流水沖洗 15 min 以上，加入 1% eosin 3-5 min，脫水（90% alcohol 1 min、95% alcohol 1 min、95% alcohol 1 min、95% alcohol 1 min、100% alcohol 1 min、100% alcohol 1 min、100% xylene 2 min、100% xylene 2 min、100% xylene 2 min），將玻片上 xylene 稍微晾乾但不可完全乾燥太久，可將封片膠滴於蓋玻片上，再將玻片蓋上後直立，讓多餘的膠用擦手紙自然吸掉。

2.3. 免疫組織化學染色(Immunohistochemistry, IHC)

將組織切片脫蠟(經 100% xylene 3 min、100% xylene 3 min、100% alcohol 3 min、95% alcohol 3 min、75% alcohol 3 min、dd-H₂O 3 min、0.15M PBS wash 3 次，每次 3 min)，然後用 3% H₂O₂/methanol 反應 10 分鐘，接著將玻片放入不透光保濕盒中，加入 100 μl 0.1% 的 trypsin（只要覆蓋過標本即可），在 37°C 搖擺器上搖晃（約 20rpm）反應 10 分鐘，然後以 0.15M PBS wash 3 次，每次 3 min，將玻片放入不透光保濕盒中，加入 100 μl 3% 的 BSA（只要覆蓋過標本即可），在 37°C 搖擺器上搖晃（約 20rpm）反應 1 小時，然後以 0.15M PBS wash 3 次，每次 3 min，將玻片放入不透光保濕盒中，加入 100 μl Antibody 1 diluted in 1% BSA（只要覆蓋過標本即可），在 37°C 搖擺器上搖

晃(約 20rpm)反應 1 小時或 4°C overnight, 然後以 0.15M PBS wash 3 次, 每次 3 min, 將玻片放入不透光保濕盒中, 加入 100 μ l Antibody 2 diluted in 1%BSA (只要覆蓋過標本即可), 在 37°C 搖擺器上搖晃(約 20rpm)反應 1 小時或 4°C overnight, 然後以 0.15M PBS wash 3 次, 每次 3 min, 將玻片放入不透光保濕盒中, 加入 100 μ l HRP-streptavidin solution (reagent 2, 只要覆蓋過標本即可), 在 37°C 搖擺器上搖晃(約 20rpm)反應 10 分鐘, 然後以 0.15M PBS wash 3 次, 每次 3 min, 將玻片放入不透光保濕盒中, 加入 A、B、C 各一滴(reagent 3)/ml (DAB 呈色), 在室溫以手輕輕搖晃至切片呈黃褐色即可取出玻片, 以 dd-H₂O wash 3 min, 將玻片放入不透光保濕盒中, 加入 Hematoxylin (reagent 4, 只要覆蓋過標本即可), 在 37°C 搖擺器上搖晃(約 20rpm)反應 30 秒, 然後以 0.15M PBS wash 3 min, 再用 dd-H₂O wash 3 次, 每次 3 min, 接著將組織切片脫水(經 75% alcohol 3 min、95% alcohol 3 min、100% alcohol 3 min、100% xylene 3 min), 將玻片上 xylene 稍微晾乾但不可完全乾燥太久, 可將封片膠滴於蓋玻片上, 再將玻片蓋上後直立, 讓多餘的膠用擦手紙自然吸掉。(reagent 2-4 為 Zymed 的 Histostain Kits)

3. 細胞培養(cell culture)

3.1. 細胞培養:

大鼠主動脈平滑肌 A7r5 細胞以 DMEM 培養液培養, 其 DMEM 培養液內含有 10% FBS、1% sodium pyruvate、0.22% sodium bicarbonate、2% L-glutamine、1% penicillin/streptomycin, 將細胞放置於 5% CO₂之 37°C 無菌恆溫培養箱中培養, 每 2~3 天固定更換一次新鮮的 DMEM 培養液, 細胞株約隔 4~5 天作繼代分盤培養。

3.2. 細胞繼代培養:

移除舊的培養液, 接著加入 5~10 ml 的 Phosphate Buffer Saline(PBS, 0.02% KCl、0.02% KH₂PO₄、0.8% NaCl 以及 0.216% Na₂HPO₄)清洗, 之後將 PBS 移除, 再加入 1~2 ml 的一倍 trypsin, 搖晃使 trypsin 均勻覆蓋培養皿, 之後置於 37°C 無菌恆溫培養箱中 5 分鐘, 使 trypsin 作用讓細胞脫離培養皿, 接著用手輕輕拍打培養皿側邊幫助細胞脫離培養皿, 接著以 5~10 ml 培養液沖刷細胞, 沖完後吸出到 15 ml 離心管中(培養液中的血清可以抑制 trypsin 作用), 以 1000 rpm 離心五分鐘使細胞分離出來, 移除上清液後加入新的培養液 5~10 ml, 用 pipette 反覆吸吐打散細胞, 使細胞均勻散布於培養液中, 之後再分別加到新的培養皿中做培養。

3.3. 細胞加藥處理:

細胞以 0.5%胎牛血清(FBS)之培養液作用 48 小時後，目的使細胞長期處於飢餓狀況，然後用 PBS 清洗，再加入含 10% FBS 之 DMEM 培養液，用來模擬血管平滑肌細胞異常增生的生長環境，並以不同濃度的 LSE(0、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$)處理細胞並反應 0、24、48、72 小時。

4. 細胞生長曲線分析(Cell growth assay)

培養 A7r5 細胞於 75 T Flask 數代。細胞計數後，在 6 well plate 種入細胞，等待細胞貼附(24 小時)。將 medium 換成含 0.5%胎牛血清(FBS)之 medium 進行 Starvation 48 小時後，移除舊的 medium 然後用 PBS 清洗，再加入正常 DMEM medium 並以不同濃度的 LSE(0、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$)處理細胞並反應 0、24、48、72 小時。接著每個 well 用 1 ml 的一倍 Trypsin，置於 37°C 無菌恆溫培養箱中 5 分鐘，使細胞脫離 6 well plate，再用 1 ml 的 PBS 沖刷細胞。用 1:1 稀釋的方式取 20 μl 的細胞液再加入 20 μl 的 trypan blue 置於 eppendorf 中混合均勻，再將混合均勻的細胞液 loading 到 cell counting chamber 中，然後就開始細胞計數。

5. 細胞增生試驗(BrdU assay)

培養 A7r5 細胞於 75 T Flask 數代。細胞計數後，將細胞種在 96 well plate，每個 well 種 5000 至 7000 顆細胞，並等待細胞貼附(24 小時)。將 medium 換成含 0.5%胎牛血清(FBS)之 medium 進行 Starvation 48 小時後，移除舊的 medium 然後用 PBS 清洗，接著換置含有 BrdU Label 及 10%FBS 之細胞培養液並以不同濃度的 LSE(0、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$)處理細胞並反應 48 小時。去除舊的培養液，在每個 well 中加入 200 μl Fixative Denaturing Buffer，室溫靜置 30 分鐘。去除 Fixative Denaturing Buffer，加入 100 μl 稀釋後的 Anti-BrdU Antibody Buffer，室溫靜置 60 分鐘。去除 Anti-BrdU Antibody Buffer，再以一倍的 Wash Buffer 潤洗三次，去除 Wash Buffer。加入 100 μl 稀釋後之 Reconstituted Conjugate Buffer，室溫靜置 30 分鐘。去除 Reconstituted Conjugate Buffer，再以一倍的 Wash Buffer 潤洗三次，去除 Wash Buffer，再以二次水潤洗一次並去除二次水。加入 100 μl Substrate Solution，室溫靜置並且避光 15 分鐘。(不須去除 Substrate Solution) 加入 100 μl Stop Solution，室溫靜置並且避光 15 分鐘。在 450 及 540 nm 波長下以 ELISA reader 讀取吸光值，並將波長 450 nm 之吸光值減去 540 nm 之吸光值則為實驗數據。

6. 流式細胞儀(Flow Cytometric analysis, FCM)

培養 A7r5 細胞於 75 T Flask 數代。細胞計數後，在 10 公分 Dish 種入細胞，並等

待細胞貼附(24 小時)。將 medium 換成含 0.5% 胎牛血清(FBS)之 medium 進行 Starvation 48 小時後。移除舊的 medium 然後用 PBS 清洗，再加入正常 DMEM medium 並以不同濃度的 LSE(0、5、10、25、50、100 μ g/ml)處理細胞並反應 48 小時。接著以適量的胰蛋白酶 Trypsin 將細胞打下來接著以 5~10 ml 培養液沖刷細胞，沖完後吸出到 15 ml 離心管中，以 1000 rpm 離心 5 分鐘並去除上清液。將細胞以冰冷的 PBS buffer 沖散接著拿去離心 1000 rpm，5 分鐘，並去除上清液。以剩下的上清液將細胞打散(要確定全部打散)。加入 1 ml 70% 冰冷的酒精並且輕輕的 mix 均勻(70% 酒精可讓細胞不發生凝集的現象)使細胞固定，再把處理過的細胞液放置於 -20 $^{\circ}$ C 反應一小時。將細胞液以 1000rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，再以剩下的液體打散細胞。加入 1 ml PBS buffer 混合均勻後離心，再去除上清液，重複數次，清洗細胞。接著加入 1 ml PI/Triton X-100 (終濃度 PI=20 μ g/ml, Triton-X 100=0.1%, RNase A=0.2 mg/ml)，均勻打散細胞，避光染色至少 30 分鐘。以流式細胞儀分析其細胞週期變化

7. 西方點墨分析法(Western blotting)

7.1. 萃蛋白和定量蛋白

在 10 cm dish 種入細胞，並等待細胞貼附(24 小時)。Starvation 48 小時後，以不同濃度的 LSE(0、10、25、50 μ g/ml)處理細胞並反應 48 小時或是以 LSE 25 μ g/ml 處理細胞並反應 0、24、48 小時。接著以適量的 trypsin 將細胞打下來並收細胞液。以 PBS 沖洗，加入 RIPA buffer(150 mM NaCl、1%NP-40、0.5% Deoxycholic acid、0.1%SDS、50 mM Tris-base，pH7.5 內含 1 mM sodium orthovanadate、100 μ g PMSF、170 μ g/ml leupeptin)，用均質機磨碎細胞。接著在 4 $^{\circ}$ C 下以 10000g 離心 10 min，取蛋白液以 BCA kit 測定其吸光值定量蛋白濃度。

7.2. Western blot

BCA kit 測定的上清液吸光值定量蛋白濃度，將蛋白濃度調整到一致，以二次水補至固定體積，並且加入 Loading Dye，將 Sample 放到乾熱器上以 100 $^{\circ}$ C 變性 10 分鐘。將處理好的 Sample loading 到配好的 10% 聚丙烯醯胺凝膠(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)進行電泳，以 70V 電泳約三小時。Transfer 的夾子將黑色的那一面朝下，以「三明治法」依序將海綿，濾紙(兩片)，10% 聚丙烯醯胺凝膠，硝化纖維膜，濾紙(兩片)，海綿，置於夾子內夾好，再將夾子放置於 Transfer tank 中，膠片以 100V Transfer 兩小時轉印到硝化纖維膜上。將硝化纖維膜浸泡在 5% 的脫脂牛奶中 1 小時並以 TBS+Tween 清洗三次，每次 10 分鐘。以一抗反應 overnight(12 小時)，再以

TBS+Tween 清洗三次，每次 10 分鐘，換成對應之二抗(兔子或是老鼠)反應一小時後，將處理好的硝化纖維膜用 ECL 溶液覆蓋再使用冷光儀拍攝，最後再以分析軟體透過亮度的不同分辨各種蛋白表現量的多寡。

8. 免疫沉澱(Immunoprecipitation, IP)

培養 A7r5 細胞於 10 公分 Dish，Starvation 48 小時後，以不同濃度的 LSE(0、10、25、50 $\mu\text{g/ml}$)處理細胞並反應 48 小時或是以 LSE 25 $\mu\text{g/ml}$ 處理細胞並反應 0、24、48 小時。接著以適量的胰蛋白酶 Trypsin 將細胞打下來並收細胞液。以 PBS 沖洗，加入 RIPA buffer(150 mM NaCl、1%NP-40、0.5% Deoxycholic acid、0.1%SDS、50 mM Tris-base, pH7.5 內含 1mM sodium orthovanadate、100 μg PMSF、170 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin)，用均質機磨碎細胞。接著在 4°C 下以 10000 g 離心 10 分鐘，取蛋白液以 BCA kit 測定其吸光值定量蛋白濃度。

取 500 μg 的蛋白加入 3 μl 的蛋白抗體置於 eppendorf 中，將 eppendorf 放在 4°C incubate 搖晃 1.5 小時。接著加入 35 μl 的 bead 然後在 4°C incubate 搖晃 4 小時。接著離心 4°C 10000rpm, 5 min，去除上清液。以 500 μl 之 RIPA wash(用手指輕彈 Mix)。再次離心 4°C 10000rpm, 5min，去除上清液並且重複此步驟至少三次。加入 35 μl 之 2X Sample Dye 並將 eppendorf 加上防爆蓋，在 100°C 加熱器上加熱 3 min 再將 eppendorf 置於冰上冷卻 5 min。接著 4°C 離心 10000rpm, 5 min，離心完成後取藍色上清液置於新的 eppendorf 中。

將處理好的 Sample loading 到配好的 10%聚丙烯醯胺凝膠(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)進行電泳，以 70V 電泳約三小時。Transfer 的夾子將黑色的那一面朝下，以「三明治法」依序將海綿，濾紙(兩片)，10%聚丙烯醯胺凝膠，硝化纖維膜，濾紙(兩片)，海綿，置於夾子內夾好，再將夾子放置於 Transfer tank 中，膠片以 100V Transfer 兩小時轉印到硝化纖維膜上。將硝化纖維膜浸泡在 5%的脫脂牛奶中 1 小時並以 TBS+Tween 清洗三次，每次 10 分鐘。以一抗反應 overnight(12 小時)，再以 TBS+Tween 清洗三次，每次 10 分鐘，換成對應之二抗(兔子或是老鼠)反應一小時後，將處理好的硝化纖維膜用 ECL 溶液覆蓋再使用冷光儀拍攝，最後再以分析軟體透過亮度的不同分辨各種蛋白表現量的多寡。

9. 統計分析

數據以 Sigma Plot 軟體分析，mean \pm SD 表示。利用 t-test-Unpaired 來評估統計差異。p < 0.05 表示具有顯著意義。

(五) 結果與討論

1. 蓮蓬水萃取物LSE中total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)佔其 $29.6 \pm 9.0\%$ ，total flavonoid (Jia method)佔其 $85.7 \pm 3.2\%$ ，total anthocyanin (Fuleki and Francis method)佔其 $6.3 \pm 2.8\%$ (data not shown)。上述成分定量分析確認LSE為富含類黃酮之物質。
2. 首先，探討LSE在動物實驗中抗動脈硬化的成效。將實驗大白兔分成4個組別（正常飼料餵食組、高脂肪餵食組(high fat diet, HFD)、HFD + 0.5% LSE、HFD + 1.0% LSE）。Fig. 1藉由H&E stain和IHC觀察兔子血管的變化，其中sm- α -actin是一種重要骨架蛋白，可用於判斷是否為血管平滑肌遷移的指標。其在HFD組中大量表現，顯示血管平滑肌細胞處於異常遷移表現。此外，ki67是細胞增生蛋白，同樣在高脂飲食組中大量表現，但是在低劑量和高劑量LSE組表現量下降，顯示in vivo模式中，LSE可以抑制血管平滑肌細胞的移動及增生。
3. 過去在我們實驗室的研究結果已顯示：LSE具有抑制血管平滑肌A7r5細胞異常遷移之作用，本研究進一步探討A7r5細胞處理LSE後，在細胞過度生長方面有何影響？A7r5細胞以0.5% FBS之培養液作用48小時後，再加入含10% FBS之 DMEM 培養液，用來模擬血管平滑肌細胞異常增生的生長環境，接著處理不同濃度的LSE(0、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$)，並反應0、24、48、72小時，然後利用細胞生長曲線分析。結果顯示LSE反應48小時之IC₅₀約為10-25 $\mu\text{g/ml}$ ，證實LSE對A7r5細胞具有抑制細胞生長的作用(Fig. 2)。接續，A7r5細胞在相同處理條件下並反應48小時，利用BrdU assay分析LSE對於A7r5細胞增生的影響。Fig. 3顯示處理LSE濃度為25-100 $\mu\text{g/ml}$ 時，A7r5細胞增生現象有隨之減少的趨勢。Figs. 2-3證實：隨著LSE濃度的增加，LSE濃度 $>25 \mu\text{g/ml}$ 具有抑制A7r5細胞增生的能力。
4. A7r5細胞在同樣處理條件下，使用流式細胞儀進行分析細胞在各個生長週期的分佈情形。Fig. 4顯示與control相比，隨著LSE濃度的增加，subG1期和G0/G1期隨之增加，進一步推論LSE促進A7r5細胞停滯在G0/G1期(G0/G1 arrest)，後續將著重在G0/G1期調控蛋白表現之分析及分子機制探討。
5. 分別收取A7r5細胞有無處理LSE (25 $\mu\text{g/ml}$)反應0、24和48小時之蛋白樣本，利用西方點墨法分析LSE在不同時間作用下，其對於A7r5細胞週期調控蛋白的影響。從Fig. 5A可以顯示和不加藥（無處理LSE）的組別相比，經LSE處理48小時後之細胞內PCNA、E2F、p-Rb表現量皆明顯減少；Fig. 5B則可以看出隨著LSE處理時間的增加，p53表現量隨之增加，以及p53下游調控蛋白p27和p21的表現情形也受

到LSE在24小時的促進作用，作用到48小時則漸趨於無變化。推論LSE藉由促進p53、p27和p21等CDKI之表現，後續影響G1期進入S期之轉錄因子E2F和Rb之調控。

6. 另外，再以西方點墨法分析處理不同濃度的LSE(0、10、25、50 $\mu\text{g/ml}$)反應48小時後之蛋白表現情形。從Fig. 6A可以確認隨著LSE濃度的增加抑制細胞週期G0/G1期調控蛋白PCNA、E2F、p-Rb表現亦趨於顯著。在CDKI蛋白表現方面，A7r5細胞處理LSE濃度10和25 $\mu\text{g/ml}$ 反應48小時後之p53、p27和p21的表現量增加之情形；然而，當處理高劑量LSE (50 $\mu\text{g/ml}$)之細胞內p27、p21、p16的表現量反倒有下降表現，可能與LSE促進細胞走向p53導致細胞凋亡路徑(p53-mediated apoptosis)有關(Fig. 6B)。
7. 許多蛋白複合體參與在細胞週期的調控當中，接著利用免疫沉澱法觀察LSE對A7r5細胞週期中各種cyclins與cdks，以及Rb與E2F之association的影響。Fig. 7A結果顯示：LSE濃度>25 $\mu\text{g/ml}$ 對於cyclin E/cdk2複合體表現造成抑制作用，而對於cyclin A/cdk2之結合表現影響較不顯著；LSE也能夠明顯抑制cyclin D1/cdk4結合的表現(Fig. 7B)。此外，Rb與E2F之association則明顯受到LSE的促進作用(Fig. 7C)。
8. 本計劃首先透過動物實驗確認LSE在活體的效應，根據後續血管免疫組織染色分析顯示LSE可以抑制VSMC的移動及增生。接著藉由細胞生長曲線和細胞增生試驗結果得知LSE處理VSMC(A7r5細胞)作用48小時的IC₅₀約為10-25 $\mu\text{g/ml}$ 。再以流式細胞儀分析經過LSE處理後的A7r5細胞，確認LSE促進生長週期停滯在G0/G1期。並以西方點墨法來以及免疫沉澱法分析細胞週期調控蛋白，結果發現LSE會增加p53磷酸化表現，以及活化CDKI (p21和p27)；LSE並且抑制E2F和p-Rb的表現，以及cyclin E/cdk2和cyclin D1/cdk4的結合，導致Rb/E2F的結合增加，最後促使細胞週期停滯(Fig. 8)。總結上述，LSE可藉由調控細胞週期以抑制VSMC增生之作用，也希望未來此計劃結果對於動脈硬化相關化學預防之研究能有所裨益，並且增加蓮蓬的經濟價值。

(六) 參考文獻

1. Kishimoto Y, Tani M, Kondo K. Pleiotropic preventive effects of dietary polyphenols in cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67:532-5.
2. Zhang XH, Zhang B, Gong PL, Zeng FD. Protective effect of procyanidins from the seedpod of the lotus on myocardial ischemia and reperfusion injury in rat. *Yao Xue Xue Bao.* 2004;39:401-5.
3. Xiao JS, Xie BJ, Cao YP, Wu H, Sun ZD, Xiao D. Characterization of oligomeric procyanidins and identification of quercetin glucuronide from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seedpod. *J Agric Food Chem.* 2012;60:2825-9.
4. Duan Y, Zhang H, Xie B, Yan Y, Li J, Xu F, Qin Y. Whole body radioprotective activity of an acetone-water extract from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. seedpod. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:3374-84.
5. Gong Y, Liu L, Xie B, Liao Y, Yang E, Sun Z. Ameliorative effects of lotus seedpod
6. proanthocyanidins on cognitive deficits and oxidative damage in senescence-accelerated mice. *Behav Brain Res.* 2008;194:100-7.
7. Nishizuka T, Fujita Y, Sato Y, Nakano A, Kakino A, Ohshima S, Kanda T, Yoshimoto R, Sawamura T. Procyanidins are potent inhibitors of LOX-1: a new player in the French Paradox. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2011;87:104-13.
8. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998;2:275-81.
9. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894-7.
10. Sartippour MR, Renier G. Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes role of peripheral factors. *Diabetes.* 2000;49:597-602.
11. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med.* 1997;337:408-16.
12. Gorenne I, Kumar S, Gray K, Figg N, Yu H, Mercer J, Bennett M. Vascular smooth muscle cell sirtuin 1 protects against DNA damage and inhibits atherosclerosis.

Circulation. 2013;127:386-96.

13. Lavigne MC, Ramwell PW, Clarke R. Growth and phenotypic characterization of porcine coronary artery smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1999;35:136-43.
14. 秦旭平, 廖端芳, 李元建血管平滑肌细胞增殖及其调控中國動脈硬化雜誌 2001 年第 9 卷第五期
15. Dayaram T, Lemoine FJ, Donehower LA, Marriott SJ. Activation of WIP1 phosphatase by HTLV-1 Tax mitigates the cellular response to DNA damage. *PLoS One.* 2013;8:e55989.
16. Harper JW, Adams PD. Cyclin-dependent kinases. *Chem. Rev.* 2001;101:2511-2526.
17. Fujiwara-Igarashi A, Goto-Koshino Y, Mochizuki H, Maeda S, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Simultaneous inactivation of the p16, p15 and p14 genes encoding cyclin-dependent kinase inhibitors in canine T-lymphoid tumor cells. *J Vet Med Sci.* 2013;75:733-42.
18. Wei L, Lin J, Wu G, Xu W, Li H, Hong Z, Peng J. *Scutellaria barbata* D. Don induces G1/S arrest via modulation of p53 and Akt pathways in human colon carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2013;29:1623-8.

Figure 1

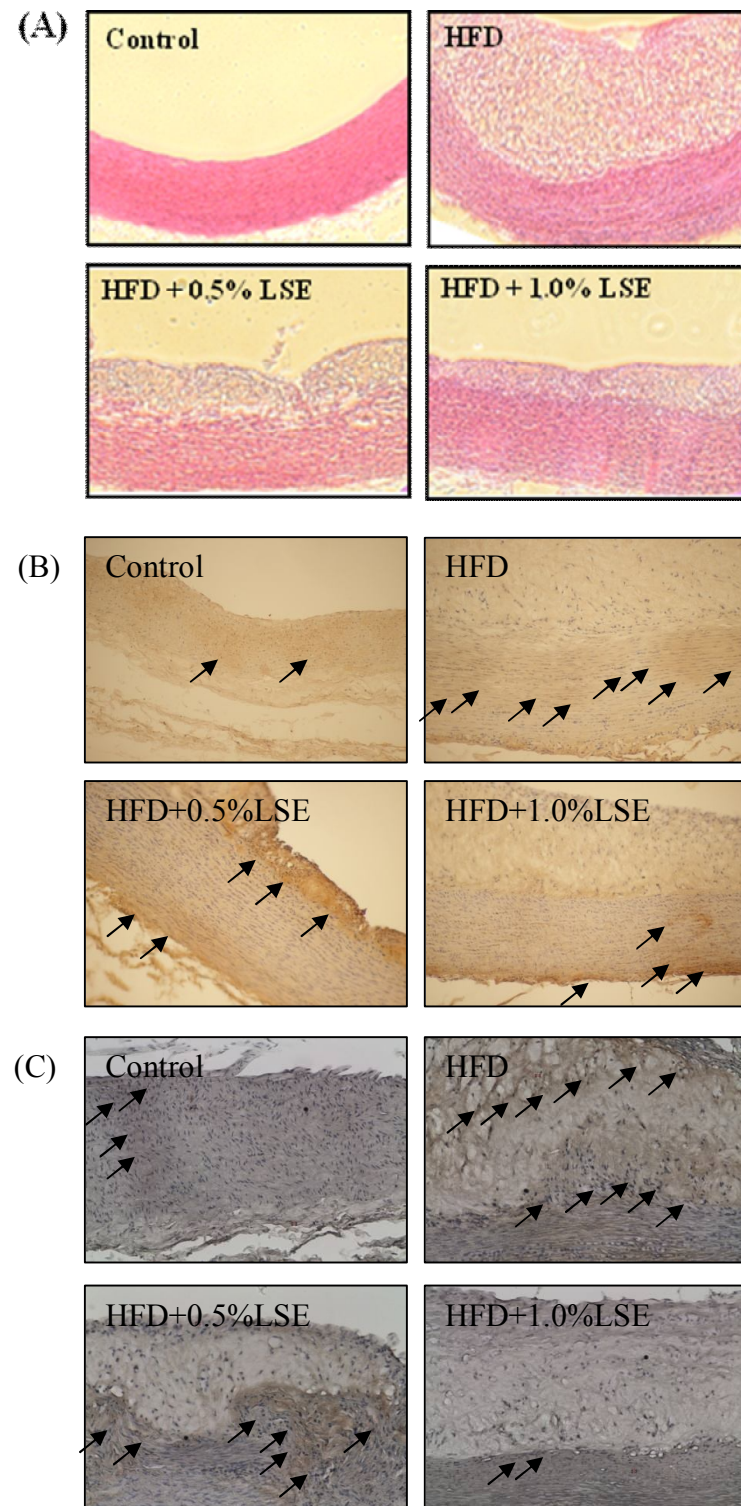


Fig. 1. (a)正常飼料餵食組、(b)高脂肪餵食組 (high fat diet, HFD)、(c) HFD + 0.5% LSE、(d) HFD + 1.0% LSE，一般組以 normal diet 餵食，2~4 組以 HFD：89.8% chow，10% coconut oil 及 0.2% 膽固醇。(A) H&E stain；(B) IHC 染 sm- α -actin；(C) IHC 染 ki67。

Figure 2

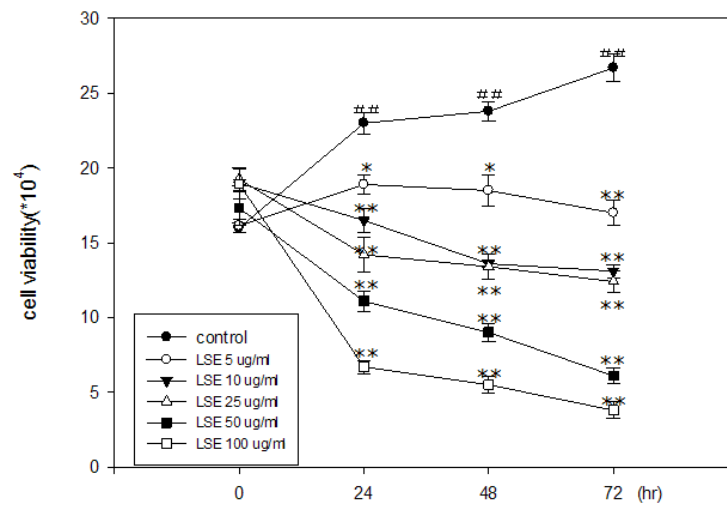


Fig. 2. LSE 對 A7r5 細胞存活能力之影響。A7r5 細胞以 0.5% FBS 之培養液作用 48 小時後，再加入含 10% FBS 之培養液，同時給予 LSE (0、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$) 分別處理 0、24、48、72 小時。由細胞生長曲線分析細胞存活能力。[#] $p < 0.001$ compared with the 0-h of control. ^{*} $p < 0.01$ ，^{**} $p < 0.001$ compared the control group for the indicated time.

Figure 3

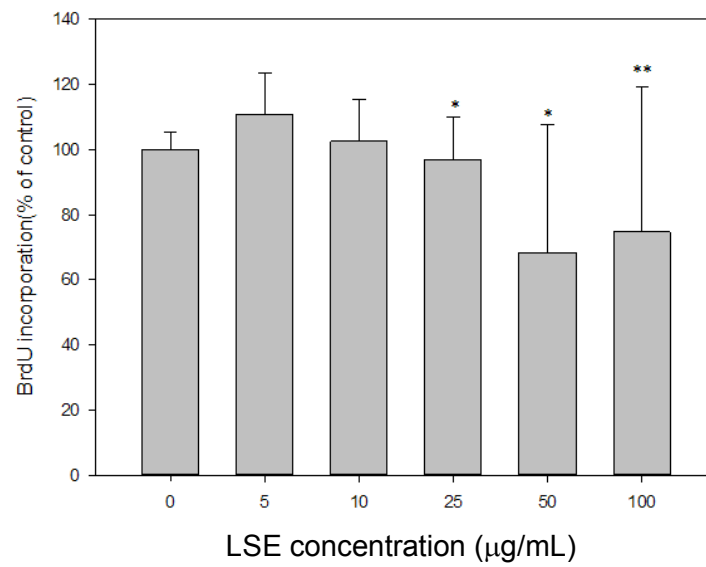


Fig. 3. LSE 對 A7r5 細胞增生能力之影響。A7r5 細胞以 0.5% FBS 之培養液作用 48 小時後，再加入含 10% FBS 之培養液，同時給予 LSE (0、5、10、25、50、100 μg/ml)處理 48 小時。由細胞增生試驗分析細胞增生的能力。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ compared with control.

Figure 4

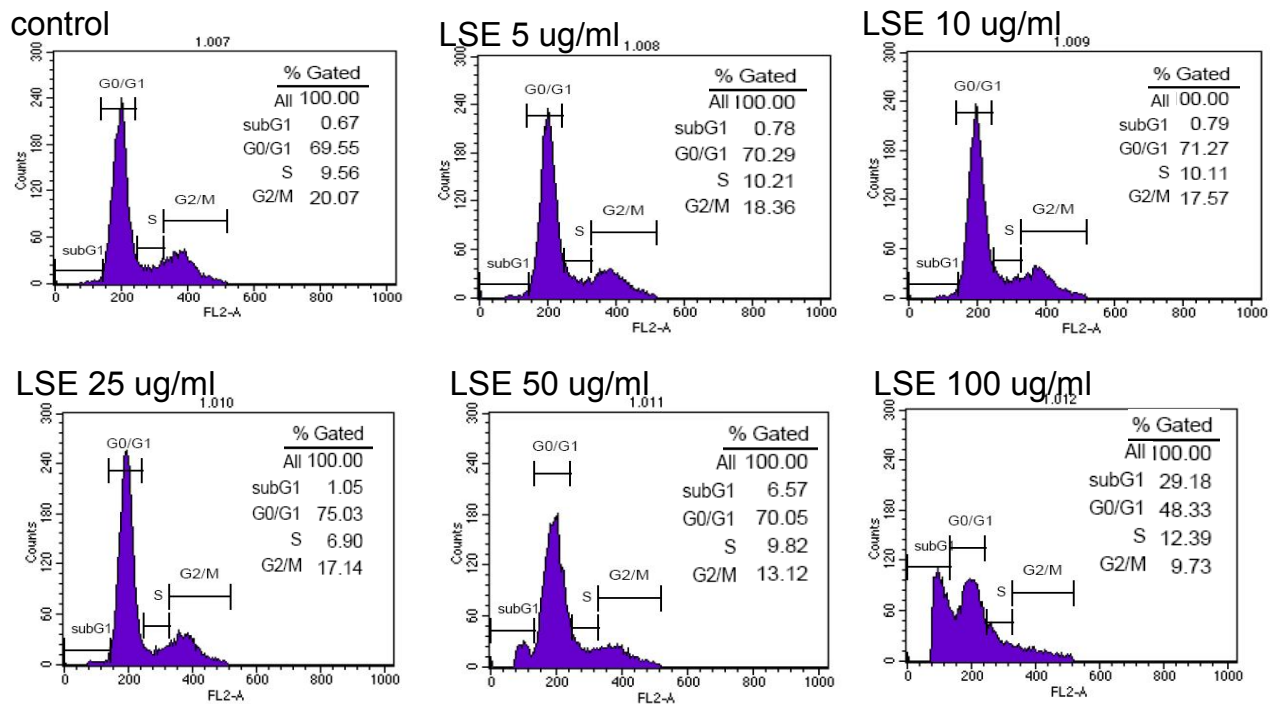


Fig. 4. LSE 對 A7r5 細胞週期之影響。A7r5 細胞以 0.5% FBS 之培養液作用 48 小時後，再加入含 10% FBS 之培養液，同時給予 LSE (0、5、10、25、50、100 µg/ml)處理 48 小時。由流式細胞儀分析細胞週期。

Figure 5

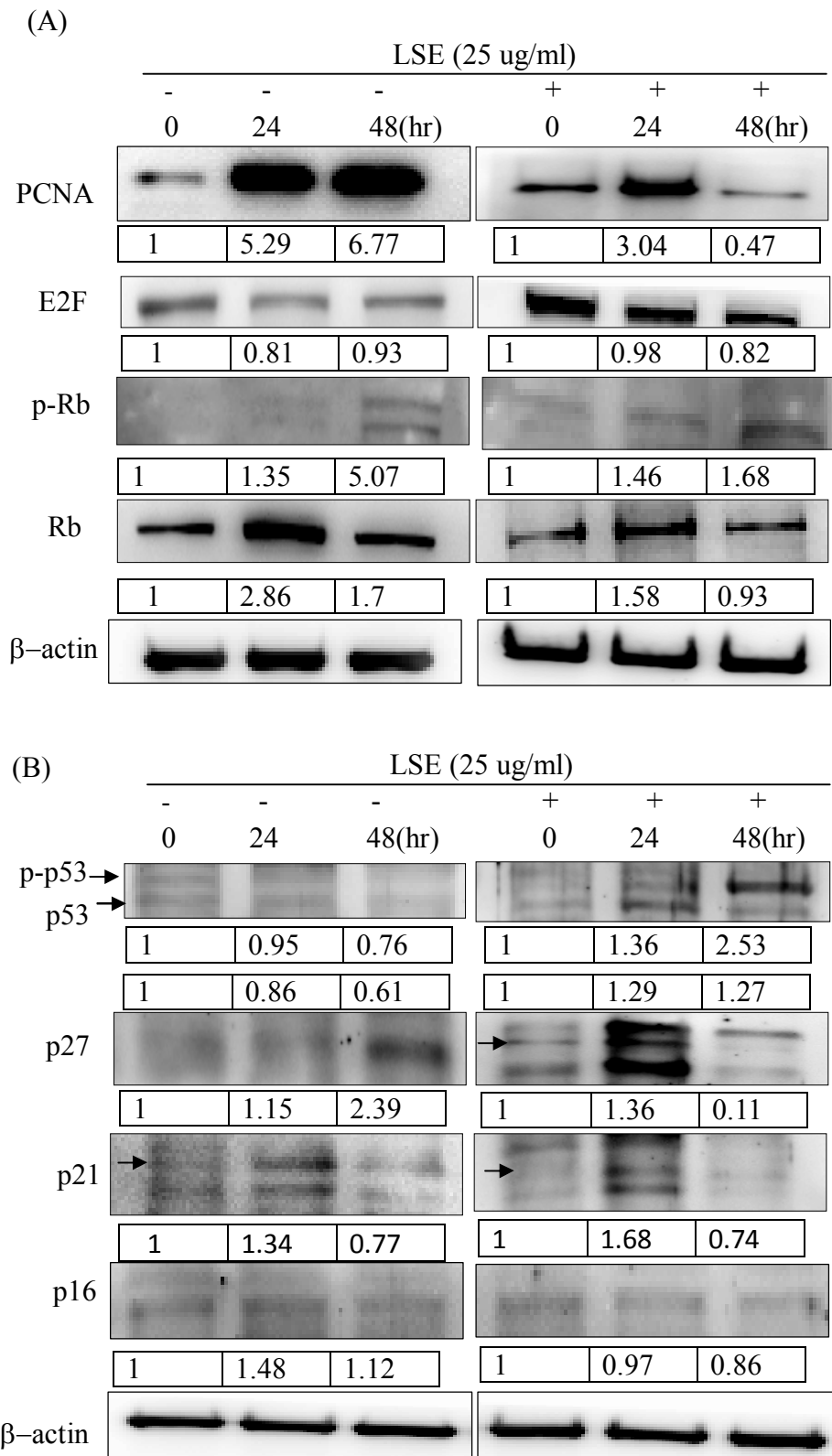


Fig. 5. LSE 對 A7r5 細胞週期調控蛋白 CDKI 表現量之影響。A7r5 細胞以 0.5% FBS 之培養液作用 48 小時後，加入含 10% FBS 之培養液培養 0、24、48 小時，或加入含 10% FBS 之培養液，同時給予 LSE 25 μ g/ml 處理 0、24、48 小時。經由西方點墨法分析其蛋白表現量。 β -actin 作為 internal control。

Figure 6

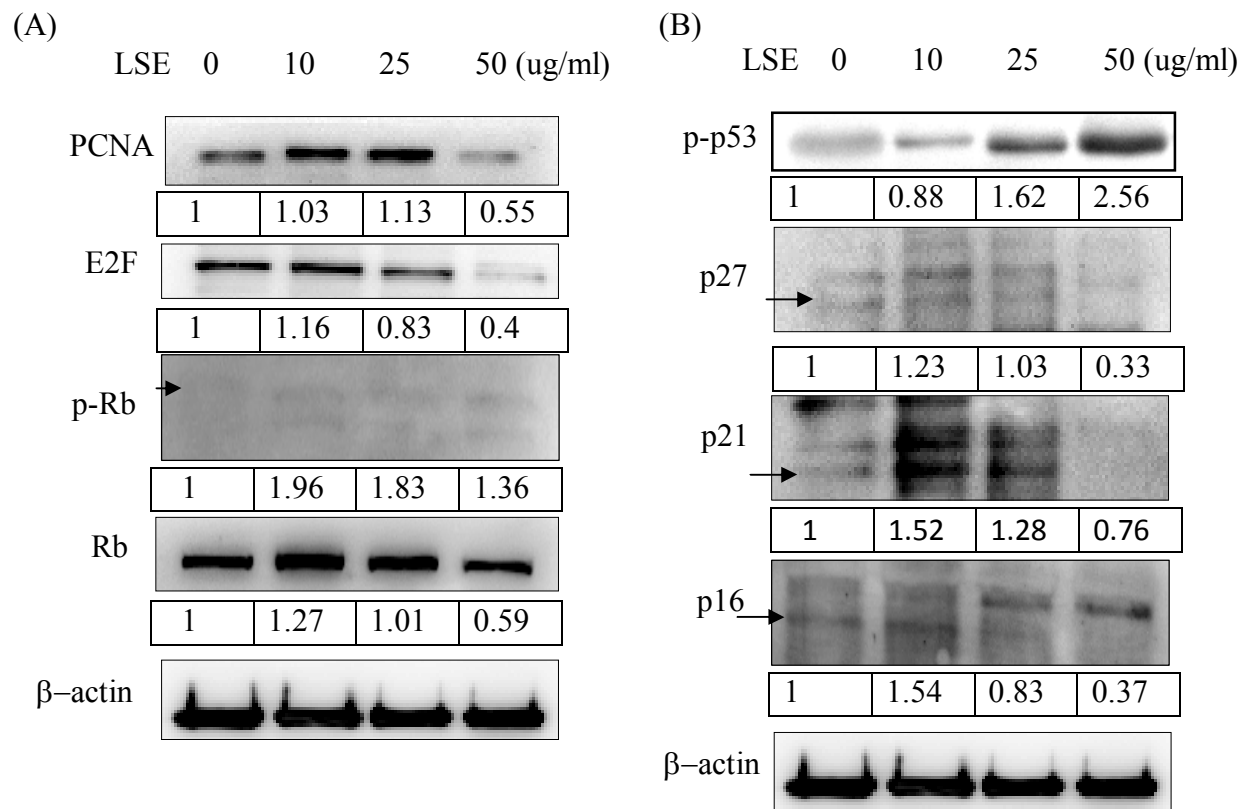


Fig. 6. LSE 對 A7r5 細胞週期調控蛋白 CDKI 表現量之影響。A7r5 細胞以 0.5% FBS 之培養液作用 48 小時後，加入含 10% FBS 之培養液，同時給予 LSE 0、10、25、50 μ g/ml 處理 48 小時。經由西方點墨法分析其蛋白表現量。 β -actin 作為 internal control。

Figure 7

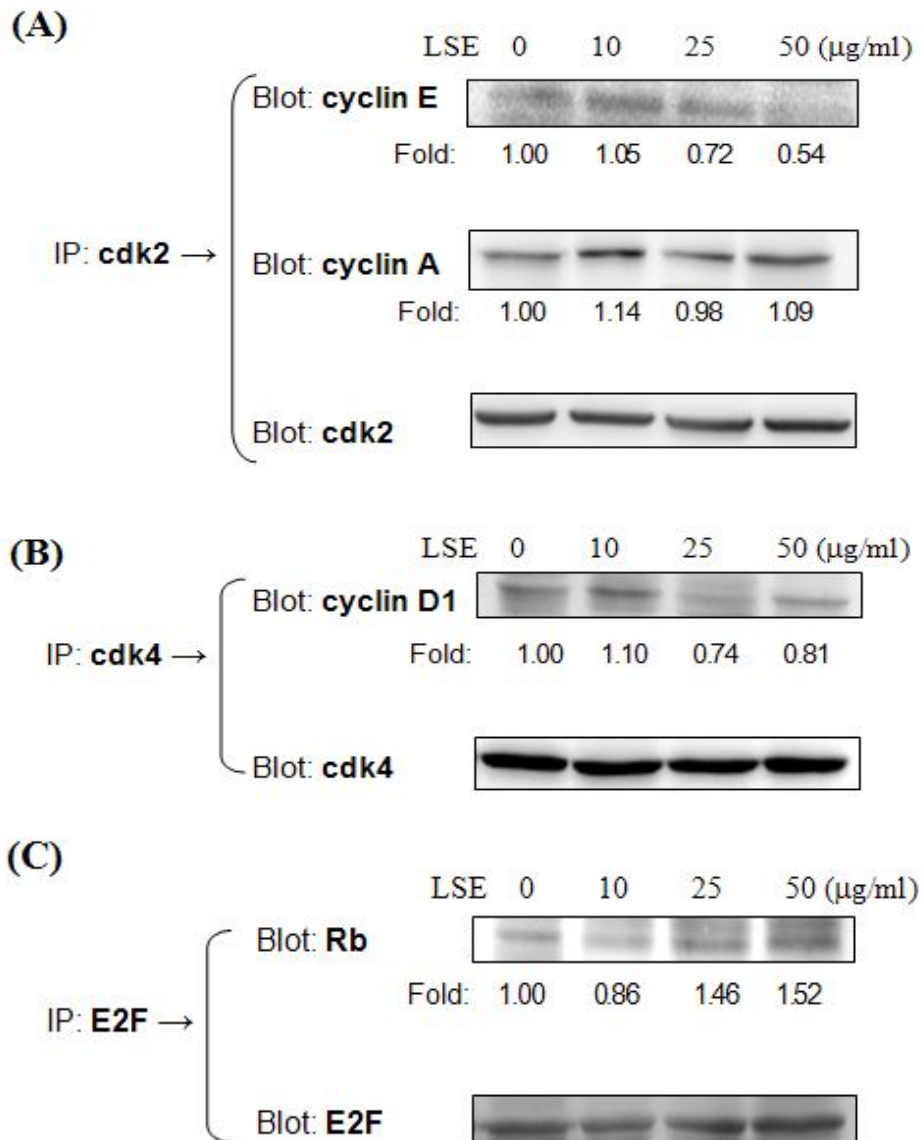


Fig. 7. Effect of LSE on the serum-induced the expressions of cell cycle-related protein complexes in A7r5 cells. Serum-starved A7r5 cells (48 h; 0.5% FBS) were stimulated with 10% FBS-supplemented DMEM in the absence or presence of various concentrations (10, 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$) of LSE for 24 h, after which cells were harvested and analyzed for the expressions of (A) cyclin E or cyclin A/cdk2, (B) cyclin D1/cdk4, and (C) Rb/E2F. The cell extracts were immunoprecipitated with cdk2, cdk4, or E2F. The precipitated complexes were examined for immunoblotting using cyclin E, cyclin A, cyclin D1 or Rb antibody. Results are representative of at least three independent experiments.

Figure 8

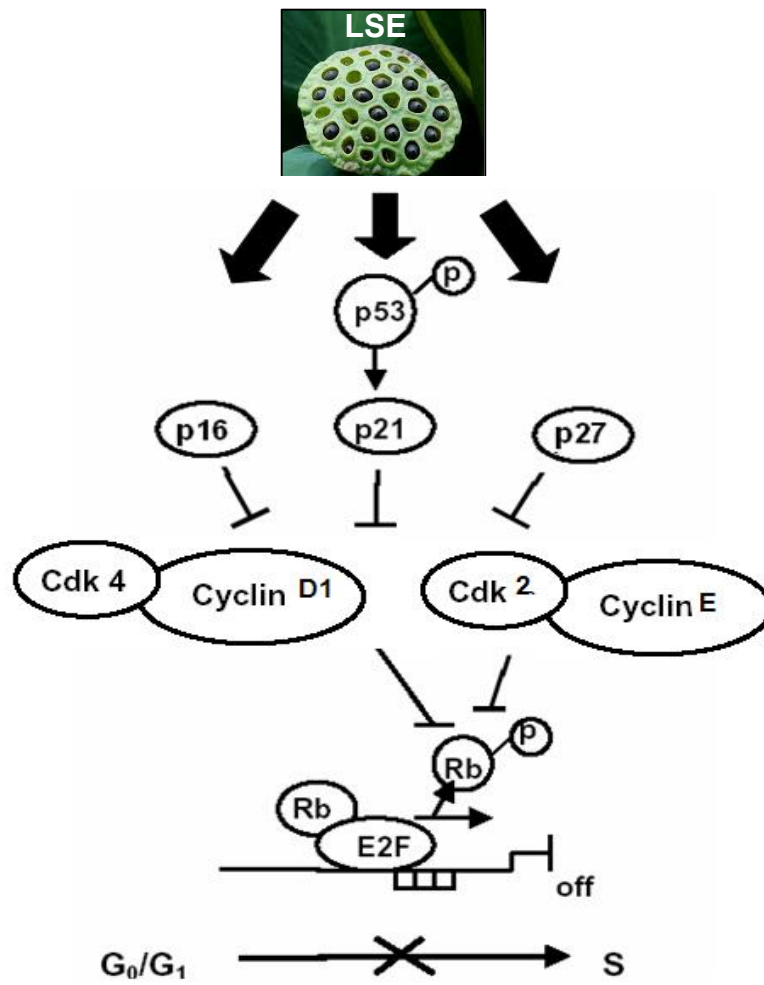


Fig. 8. 蓮蓬水萃取物 LSE 可增加 p53 磷酸化及 CDKI (例如: p21 和 p27) 的蛋白表現，進而促使細胞週期 G₀/G₁ 停滯，以抑制由血清所誘導血管平滑肌細胞異常增生的現象。