

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 名 稱	： 探討漆黃素經由減少氧化壓力之大鼠心肌缺血再灌流傷害的保護作用
------------	----------------------------------

執行計畫學生：黃婉婷

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-048-B

研究期間：108年07月01日至109年02月28日止，計8個月

指導教授：黃相碩

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系藥理學科

中華民國 109年03月31日

## 一、研究計畫內容：

### (一) 摘要

缺血性心臟病 (Ischemic heart disease) 發生後，疏通血管恢復血流反而會造成心肌缺血再灌流傷害 (ischemia-reperfusion injury, I/R injury)，而活性氧化物質和自由基與心肌缺血再灌流時的損傷有密切的關聯。漆黃素 (Fisetin; 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) 是一種具有生物活性的黃酮類分子，並廣泛存在蔬菜水果中。許多研究指出，漆黃素是一種具有前瞻性的新興抗氧化物，當其穿過細胞膜時，能夠和多種的氧化還原訊號傳遞路徑進行交互作用。

本計畫利用大鼠心肌缺血再灌流損傷作為動物模式，我們是將 Sprague-Dawley (SD) 大白鼠之左冠狀動脈前降支結紮造成缺血 1 小時，接著再進行 3 小時再灌流來模擬心肌缺血再灌流的傷害，並在缺血前 15 分鐘預處理漆黃素，觀察投予漆黃素是否能降低心肌缺血再灌流造成的傷害，並進一步探討其作用機轉。利用 Evens blue 以及 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色觀察心肌梗塞體積，並分析血漿中的乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、I 型肌鈣蛋白 (Troponin I) 以及肌酸磷酸酵素 (creatine phosphokinase, CPK) 之活性來評估漆黃素是否能夠減少細胞損傷的程度，結果顯示漆黃素可有效改善心律不整、心肌細胞壞死體積以及細胞損傷的程度。

接著我們進一步利用西方墨點法分析心肌組織特定蛋白表現量，發現相較於控制組 (control group)，治療組 (Fisetin-treated group) 中一氧化氮合酶 (endothelial NOS/eNOS) 的表現量有顯著的提升，推測漆黃素是藉由影響 eNOS 來調控其相關分子路徑以達到心臟保護作用對抗心肌缺血在灌流損傷。

### (二) 研究動機與研究問題

#### 1. 研究動機

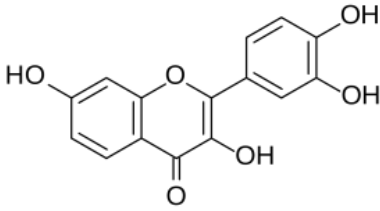
根據 WHO 世界衛生組織的統計資料，缺血性心臟病是世界十大死因之首，也是國人十大死因的第二位。心肌梗塞的發生是因為冠狀動脈部分或完全阻塞，使得血液供給減少，導致心肌缺氧而壞死。因血管堵塞而造成心肌梗塞時，需即時疏通阻塞的血管，以避免心肌細胞的死亡。但是當血液再灌流進入原本的缺氧區域時，會對心肌細胞造成二次的傷害，稱為缺血再灌流損傷 (ischemia-reperfusion injury, I/R injury)。當心肌缺血時，組織的缺氧導致代謝中間物和活性氧化物質 (ROS) 的產生，包含超氧化物、過氧化氫和羥基自由基等等[1]。活性氧化物質會增加細胞內鈣離子濃度，引起 pH 值變化，並伴隨了 ATP 和一氧化氮 (NO) 的消耗，最終胞器被破壞而導致細胞壞死[2]。

漆黃素，Fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) (圖一)，是一種具有生物活性的黃酮類分子，常見於草莓、蘋果、柿子、葡萄、洋蔥、小黃瓜等蔬菜水果中，含量介於 2-160 $\mu$ g/g [3]。先前之研究顯示漆黃素具有抗氧化以及抗發炎的功能，能和多種的氧化還原訊號傳遞路徑進行交互作用[4]。過去研究指出漆黃素能夠改善糖尿病誘導之心肌損傷和心臟肥大中的氧化壓力、發炎以及細胞凋亡[5]。在活體實驗中，漆黃素也藉由抑制 RAGE/NF- $\kappa$ B 路徑相關的氧化壓力、發炎和細胞凋亡，減少了異丙基腎上腺素誘導之心肌缺血傷害 (isoproterenol-induced cardiac ischemic injury) [6]。近期更有離體模式顯示漆黃素可維護心臟粒線體功能，減少缺血再灌流傷害[7]。這些研究都顯示漆黃素的抗氧化作用在保護心臟組織及功能中可能扮演重要的角色。

然而，目前對於漆黃素在保護心臟缺血再灌流傷害的機轉研究尚未完整，因此本計畫希望

藉由活體動物模式探討漆黃素是否能藉由其抗氧化的特性，抑制活性氧化物質的產生，進而減少大鼠心肌缺血再灌流的損傷。

【圖一】漆黃素之結構式



## 2. 研究問題

- A. 觀察漆黃素是否具有降低心肌缺血再灌流損傷的效果
- B. 探討漆黃素是否透過減少氧化傷害達到心臟保護的效果
- C. 分析漆黃素造成心臟保護作用之機轉

## (三) 文獻回顧與探討

### 1. 冠心病:

心臟血管疾病已成為物質文明進步下的重要產物，不管是在已開發國家、開發中國家，我們均可觀察到心血管疾病扮演威脅各國民眾生命的重要角色。根據我國衛生署的統計資料顯示，最近二十年國人十大死亡原因中，心臟病在排序上一路從第四位逐步竄升，從西元 2007 年起已經站穩第二位置。在西元 2008 年因心臟疾病而死亡者已達 15,762 人，佔總死亡人數的 11.1%；僅次於惡性腫瘤的 38,913 人及 27.3%。而在先進國家中，以美國為例，心血管疾病更是長期佔據主要死亡原因之首位。以西元 2005 年為例，從該國之 NCHS (National Center for Health Statistics) 以及 NHLBI (National Heart, Lung and Blood Institute) 的統計資料可知，該年在美國死於心血管疾病者有 864,000 人，遠遠超過死於癌症的 559,000 人，其他疾病則更難望其向背。由上述的代表性資料，我們不難理解，這是世界各國普遍存在的狀況；它代表的意義不僅僅是造成許多生命的消逝，因為罹病所帶來的相關問題，比如說醫療費用的支出 (2007 年我國民眾因心臟病住院醫療費用總支出為新台幣 11,090,276 元，依然僅次於惡性腫瘤的 17,093,219 元)、罹病後續問題的處置以及疾病的防治等都將會是影響家庭、社會以及國家的議題及帶來可能的負擔。

在各種心臟血管疾病中，以冠狀動脈心臟病最受人矚目。此類疾病簡稱冠心病，亦可稱為缺血性心臟病 (Ischemic Heart Disease, IHD) 或冠狀動脈疾病 (Coronary Artery Disease, CAD)；這類疾病之所以受矚目，不僅有高盛行率、高發生率和高死亡率，還常造成併發症如心臟衰竭、心律不整等。以我國的資料為例，在西元 2007 年國人因缺血性心臟病 (6,505) 及急性心肌梗塞 (3,502) 死亡者共有 10,067 人，佔該年度因心臟病死亡人數 13,003 人之 77.4%。而美國在西元 2004 年 NHLBI 的報告中指出有 51.8% 的心血管疾病死因為冠狀動脈心臟病；有 78.9% 的心臟病患者其死因為冠狀動脈心臟病及急性心肌梗塞 [8]

## 2. 缺血再灌流:

當血管堵塞而造成心肌梗塞時，會藉由臨床處置來疏通阻塞的血管，以避免心肌細胞的死亡。但是當血液再灌流進入原本的缺氧區域時，會對心肌細胞造成二次的傷害，稱為缺血再灌流損傷 (ischemia-reperfusion injury, I/R injury)。

缺血再灌流損傷為一種缺血後恢復了血流和組織氧合所進一步表現出的異常組織反應，目前成為基礎和臨床研究的重點已有 40 多年的歷史。

在缺血再灌流損傷的機制中，可分為兩期 [9]

### A. 缺血期 (Ischaemia phase)

冠狀動脈阻塞會中斷血液供應，引起氧氣和營養物質的缺乏，同時減少代謝廢物的排除。缺氧會導致氧化磷酸化的減少，使 ATP 的製造受限，導致能量耗盡。在缺血期，心肌細胞迅速耗盡肝醣，依靠乳酸發酵（無氧呼吸）來保持 ATP 濃度，最終乳酸堆積導致細胞質酸化。累積的  $H^+$  通過  $Na^+-H^+$  幫浦從細胞中排出。由此產生的細胞內  $Na^+$  堆積減少了跨膜  $Na^+$  梯度，從而降低了  $Na^+-Ca^{2+}$  幫浦排出細胞內  $Ca^{2+}$  的能力，造成  $Ca^{2+}$  過載。此外，由於 ATP 耗盡， $Na^+-K^+-ATP$  酶和  $Ca^{2+}-ATP$  酶等離子幫浦活性降低，加劇  $Ca^{2+}$  和  $Na^+$  的沉積。在沒有再灌流的情況下，細胞在  $Na^+$  和代謝廢物的累積下逐漸膨脹、細胞質和粒線體中  $Ca^{2+}$  濃度的升高以及細胞凋亡和壞死的路徑被活化，最終造成細胞死亡。因此，缺血的持續時間、嚴重程度和再灌流的成功是決定心肌損傷的關鍵因素。

### B. 再灌流階段 (Reperfusion phase)

缺血期後的心肌再灌流對於減少梗塞體積和保持肌肉收縮功能至關重要。臨床上，藉由抗血小板、抗血栓治療、經皮冠狀動脈介入或冠狀動脈繞道手術來恢復冠狀動脈血流，進而減少缺血期。矛盾的是，受影響區域的再灌流會引發第二波損傷，誘導周圍存活的心肌細胞死亡。再灌流引起的心肌損傷會伴隨心律不整，心肌功能喪失，內皮功能障礙和微細血管阻塞（由於毛細血管損傷而無法再灌流缺血區域）和致死性心肌損傷。現今已經出現了幾種假設來解釋再灌流後的心肌損傷，包括減少細胞內的三磷酸腺苷 adenosine triphosphate (ATP)、氫離子的累積、鈣離子超過細胞所能負荷，以及產生了活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS)。

### C. 活性氧物質於缺血再灌流損傷的角色

再灌流時，由於黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase)、NADPH 氧化酶的活化和粒線體呼吸鏈非偶聯蛋白 (uncoupling protein, UCP) 的參與，產生了活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS)。活性氧物質的產生主要是由於內皮細胞中黃嘌呤氧化酶的活化、心肌細胞中粒線體電子傳遞鏈的反應以及 NADPH 氧化酶活化在發炎細胞中 [10]。當活性氧物質的產生與體內的抗氧化系統之間處於不平衡狀態時，這樣的氧化壓力造成抗氧化系統無法負荷 [11]，使得活性氧物質包含過氧化氫 ( $H_2O_2$ )、超氧自由基陰離子、羥基自由基 ( $OH\cdot$ ) 和過氧亞硝酸根陰離子 ( $ONOO^-$ ) 都會隨著再灌流的時間而增加 [12]。由於脂質過氧化，也可能會造成 DNA 和蛋白質的氧化以及細胞膜損傷。活性氧物質不僅可以透過直接修飾有機分子來發揮作用，也參與調節許多基因的表現 [13]。總結來說，氧化壓力、活性氧物質和發炎反應的關係密不可分，以上的現象也都和活性氧物質的產生息息相關 [14]。

### 3. 漆黃素:

漆黃素是一種類黃酮化合物 (flavonoids) 廣泛地存在各種水果和蔬菜。漆黃素的生物功能包括：抗氧化作用、抗發炎作用、抗增生作用、細胞凋亡及對抗癌細胞轉移。在一些研究中證明了漆黃素對許多疾病的影響，過去針對黃酮類分子或漆黃素及相關功能的研究如下:

- A. Dong B.等人研究後證實漆黃素能夠抑制活性氧誘導之心臟肥大。在心肌細胞中，可以發現活性氧物質的減少，同時也發現漆黃素能增加抗氧化基因的表達:包含過氧化氫酶 (Catalase)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase) 和血紅素氧化酶-1 (Heme oxygenase 1) [15]
- B. Karthi Shanmugam 等人利用 Langendorff 分離心臟灌流系統進行研究，結果發現當動物用漆黃素預處理時，它顯著減弱缺血再灌流誘導的心肌組織損傷，降低粒線體、溶小體和微粒的氧化壓力，並且恢復粒線體的結構和功能。在機轉方面，已經透過生化測定 (biochemical assay) 和分子對接研究 (molecular docking studies) 證實漆黃素的心臟保護作用是由抑制糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ , Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) 調控[7]。
- C. Paul Co.等人提出黃酮類分子因其特殊結構，而具有抑制黃嘌呤氧化酶和清除超氧化物的能力。C-5 和 C-7 上的羥基以及 C-2 和 C-3 之間的雙鍵使其具備黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase) 的高抑制活性，另一方面，環 B 中 C-3'上的羥基和 C3 上的羥基使其具備超氧化物 (superoxide) 的高清除活性。實驗方法為測量黃酮類衍生物的 IC50 (Inhibitory concentration) 數值 (抑制 50% xanthine oxidase 時的濃度及降低 50% supeoxide 時的濃度)，過程中，使用分光光度計測量黃嘌呤氧化酶催化後的產物尿酸，用亞硝酸鹽法 (nitrite method) 測量超氧化物的量。最後再用線性迴歸分析，實驗結果根據抑制黃嘌呤氧化酶和清除超氧化物的影響，黃酮類化合物可分為六組，其中漆黃素被歸在 Category C，為具有額外超氧化合物活性的黃嘌呤氧化酶抑制劑 [16]

## (四) 研究方法與步驟

### 1. 動物:

實驗遵從 US National Institutes of Health (NIH Publication No.85-23, revised 1996) 出版的規章 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals。動物來源為樂思科實驗動物中心提供的雄性 Sprague-Dawley (SD) 大白鼠 (250-350g)。動物飼養條件為室溫控制於  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相對濕度  $55\pm 5\%$ 、自動光照控制 (12 小時白晝, 12 小時黑夜), 並提供動物自來水及標準大鼠飼料, 讓其自由進食及飲水。

### 2. 手術步驟:

首先利用 Urethane ( $1.25\text{g/kg}$ ) 腹腔注射麻醉老鼠並置於手術台上, 插氣管接上小型嚙齒動物呼吸器 (131 型, NEMI, 美國), 呼吸器須對室內空氣進行聯通, 輸出量為  $10\text{ml/kg}$ , 速度為 60 次/分鐘, 以維持正常的  $\text{PO}_2$ ,  $\text{PCO}_2$  和 pH 參數 (血氣分析儀, GEM-5300 ILCO, USA)。接著先將雙側的迷走神經剪斷, 使用 PE-50 (Polyethylene catheters) 接頸動脈以即時監測血壓、心率及標準的 Lead-I ECG, 用 Statham P23 XL 傳導器把連接到四肢的銀電極傳回並顯示在 Gould RS-3400 生理記錄儀上 (Gould, Cleveland, OH, USA), 另一側則以 PE-50 接頸靜脈以利後續注射 DMSO 或藥物 (Fisetin)。透過左胸廓切開術切斷第四、五根肋骨, 打開左側胸部, 以 6/0 縫線繞過左冠狀動脈之左前降支, 注射 DMSO 或藥物後, 靜待 15 分鐘使藥物分布。使用 Portex P-270 套管形成的小塑料圈套穿過結紮線並與心臟接觸, 然後透過收緊結紮線來閉塞冠狀動脈一小時, 觀察缺血的動脈壓降低和 ECG 變化 (R 波變大和 ST 段抬高增加) 來驗證冠狀動脈的成功結紮。一小時後, 通過放鬆施加於結紮線的張力來達到再灌注三小時。最後採集老鼠血液並離心取上層血漿。隨後取出心臟以 Evans blue 染色確認其缺血區域。染色後的心臟水平切整為  $0.2\text{mm}$  厚度切片, 接著再使用 TTC 染色半小時以標定心肌梗塞區域, 再以福馬林將心臟切片固定, 48 小時後將標本掃描並分別秤重心臟缺血及梗塞的區域。

### 3. 評估心律不整

根據 Lambeth Convention [11] 倡導的診斷標準評估心室異常之電訊號活動。在缺血再灌注期間和之前, 使用波形分析軟件 (AcqKnowledge, Biopac System, Goleta, CA, USA) 在電腦上同時記錄心跳, 平均動脈壓和心電圖變化, 計算存活的大鼠和最終死亡的大鼠之心室過速的發生率和持續時間, 包括心室性心搏過速 (VT) 和心室纖維顫動 (VF)。在具有不可逆 VF 的大鼠中, 記錄 VF 的持續時間直至血壓 (BP) 低於  $15\text{mmHg}$ 。

### 4. 測量心肌缺血壞死的體積

只有在冠狀動脈缺血 1 小時和再灌注 3 小時後存活的大鼠才被納入梗塞區的評估。利用 Walker 等 [12] 方法測定大鼠心臟中缺血區和壞死區的大小。在實驗結束時, 再次阻斷冠狀動脈, 並用  $2.0\text{ml}$  3% Evans Blue 染色以標定缺血區域 (Occlusion zone)。然後切除心臟並取出心房。將心室組織切成  $2\text{-mm}$  切片, 並在 tetrazolium dye (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 2% (Sigma, USA), 在生理鹽水中) 和溫度  $37^{\circ}\text{C}$  下的黑暗中浸潤 30 分鐘。然後將切片置於 10% 福馬林中 48 小時, 之後分別將壞死的 (白色) 組織及缺血的 (紅色加白色) 組織並秤重。梗塞區域重量相對於心室及缺血區域重量以百分比表示 (IZ/OZ% 以及 IZ/V%)。

## 5. 檢驗血漿內的酵素 LDH、CPK 和 Troponin I

在實驗最後，透過測量血漿中的乳酸脫氫酶(LDH)，肌酸酐激酶(CPK)和肌鈣蛋白(TnI)濃度來評估體內心臟損傷。簡而言之，在治療結束時，從頸動脈收集血液並以 3000 r.p.m. 離心 10 分鐘以分離血漿，再使用市售測定試劑測量血漿中的 LDH 和 CPK 活性以及 Troponin-I 濃度來評估心肌細胞損傷。

## 6. 西方墨點法

將心肌 IR 損傷的大鼠心臟在含有蛋白酶抑制劑混合物 (Sigma, USA) 的 T-PER 組織蛋白質提取試劑 (Thermo Scientific, USA) 中均質。將均質液在 4°C 下以 12,000 rpm 離心 10 分鐘。將檢體與等體積的緩衝液 (62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v/v) 甘油, 2% SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol 和 0.05% (w/v) bromophenol blue) 混合並在 95°C 加熱 5 分鐘。混合物定量後取 10 $\mu$ g 進行 SDS-PAGE 並以恆定電流電泳、轉漬到 PVDF 膜上，再用 5% (w / v) 脫脂牛奶作為阻隔劑 (Blocking buffer) 在室溫下降低非專一性的結合 1 小時。將膜與一抗在 37°C 反應 1 小時，再以 PBST 洗滌三次。加入與 HRP 結合的二抗 (1:10,000 稀釋)，然後用以 PBST 洗滌三次。利用冷光呈色劑 (Amersham, UK) 顯影檢測反應蛋白。最後，透過光密度掃描定量特异性免疫反應條帶的密度。一級抗體方面，使用 GAPDH 作為 internal control，並選擇 Akt、PI3K、Bax、eNOS 等蛋白，進行漆黃素參與抗氧化及抗發炎路徑的分析。

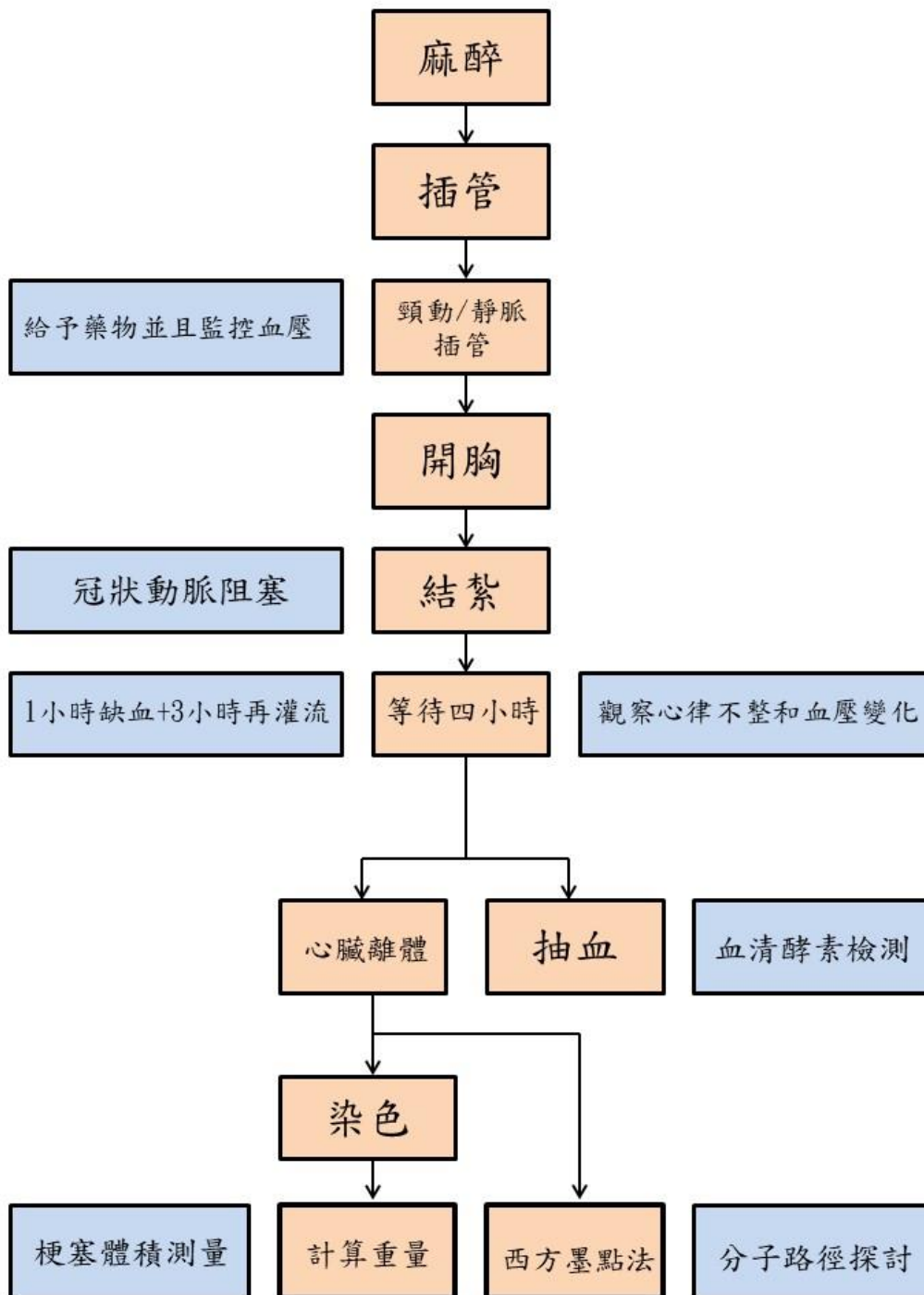
## 7. 免疫組織化學染色法

大鼠心臟分別在 10% 中性福爾馬林緩衝液中固定 24 小時，接著依序在乙醇 (50%，75%，95% 和 100%) 中脫水，並在二甲苯中澄清，最後在 55°C 的石蠟中包埋 24 小時。下一步，將相對較厚的切片 (5 $\mu$ m) 置於載玻片中脫蠟，隨後，在甲醇中將切片用 3% 的雙氧水浸泡 10 分鐘以去活化任何內源性過氧化酶。接著將切片在室溫下用 3% BSA 封閉 1 小時，隨後在 37 °C 和 1% BSA 環境中，使用 1:50 稀釋的 anti-rabbit MPO polyclonal antibody 培養 1 小時。以上步驟結束後用 PBS 洗滌 3 次，在 37 °C 和 1% BSA 條件下，使用 1:100 稀釋的 HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG 培養後再次用 PBS 洗滌 3 次。最後，將切片在室溫下，利用 3,3'-diaminobenzidine (0.3 mg/ml) in 100 mM Tris (pH 7.5) containing 0.3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ml 培養 3 分鐘。再次以 PBS 洗滌 3 次後，將切片鑲嵌至 50% 甘油中以光學顯微鏡檢查。

## 8. 統計分析

所有結果的表示法為平均值 (mean)  $\pm$  平均值的標準誤差 (SEM)。統計方法使用 T 檢定 (T-test) 評估血壓、心跳、心律不整的持續時間和發生率以及梗塞體積之間的組間差異。用卡方檢定分析 VT、VF 和死亡率的百分比發生率的差異。P < 0.05 被認為具有統計學意義。

9. 研究流程圖



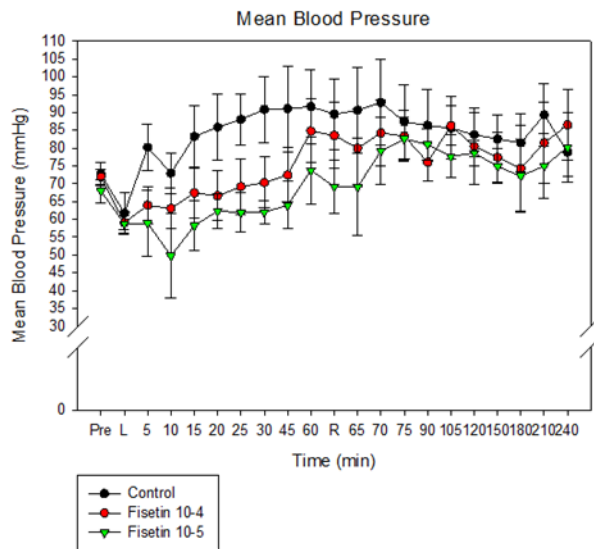


## (五) 結果

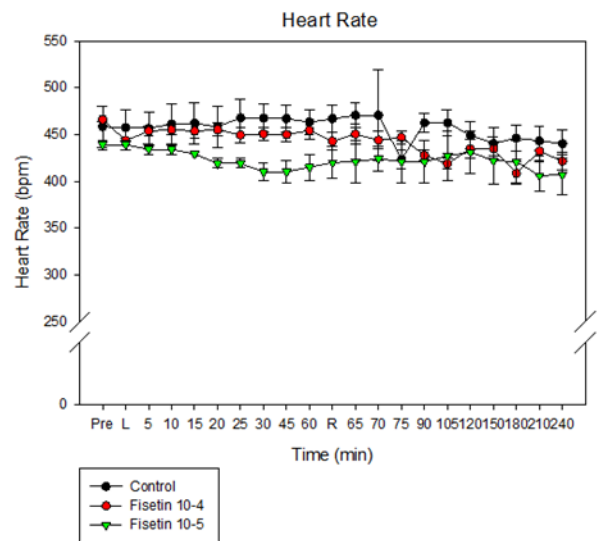
### 1. 評估漆黃素在大鼠遭受心肌缺血再灌注損傷對於平均血壓及心跳速率的影響

在實驗過程中，我們在大鼠的頸動脈插管以量測血壓，紀錄心跳及平均血壓的時間是在 ligation 前 5 分鐘、ligation、ligation 後第 5、10、15、20、25、30、45、60 分鐘，reperfusion、reperfusion 後第 5、10、15、30、45、60、90、120、150、180 分鐘。血壓及心跳經過統計後並無顯著差異，代表實驗過程對控制組、給予漆黃素  $10^{-4}$  g/kg 組及給予  $10^{-5}$  g/kg 三組大鼠的血液動力學影響並無顯著差別。(圖二、圖三)

【圖二】平均血壓值



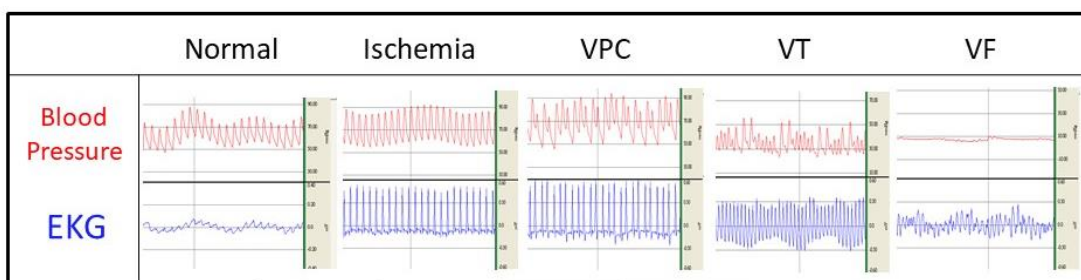
【圖三】心跳速率



### 2. 評估漆黃素在大鼠遭受心肌缺血再灌注損傷對於心律不整及死亡率的影響

在開胸之後，將大鼠接上 ECG 導極，使用波形分析軟件 (AcqKnowledge, Biopac System, Goleta, CA, USA) 在電腦上同時記錄心跳、平均動脈壓和心電圖變化(圖四)，計算存活的大鼠和最終死亡的大鼠之心律不整的發生率和持續時間，包括心室過早收縮(VPC)、心室纖維顫動 (VF) 和心室性心搏過速 (VT)。結果顯示 VPC 的發生次數和頻率在控制組及不同濃度的治療組中都沒有顯著差異。此外，給予漆黃素  $10^{-4}$  g/kg 與控制組相比可以顯著下降心室纖維顫動 (VF) 的持續時間，也能促使 VF 發生率有下降的趨勢。除此之外，投予漆黃素  $10^{-4}$  g/kg 能減少心室性心搏過速 (VT) 的趨勢。最後同時觀察到，治療組中的死亡率和控制組相比有下降的趨勢(表一)

【圖四】平均動脈壓與心電圖變化



【表一】漆黃素對心律不整的影響

g/kg	N	VPC		VT		VF		Mortality (%)
		Incidence (%)	Count (number)	Incidence (%)	Duration (sec)	Incidence (%)	Duration (sec)	
control	6	100	530.16±416.7	100	31.48±8.7	83	48.39±15.4	67
Fisetin 10 <sup>-5</sup>	4	100	664.33±34.12	100	8.36±4.3	0	0±0	0
Fisetin 10 <sup>-4</sup>	6	100	292.33±138.1	50	15.65±4.3	33	8.18±7.0*	0

Note: VPC, ventricular premature contraction; VT, ventricular tachycardia; VF, ventricular fibrillation.  
Control is DMSO 10<sup>-5</sup>. n = number of experiments ; values for duration of arrhythmias are shown as the mean ± SEM.  
\*p < 0.05, as compared to control group

### 3. 評估漆黃素在大鼠遭受心肌缺血再灌注損傷對於心肌梗塞體積的影響

在缺血再灌注損傷後，利用 Evans blue 標定缺血區域並用 TTC 染色評估壞死的組織，經過秤重壞死組織及缺血區域之後，經過統計得到的結果顯示，OZ/VW%在各組中皆沒有顯著差異，表示在術中所造成的心肌缺血區域具有一致性，而且缺血區 (occlusion zone, OZ) 和整體心室 (Ventricle, V) 的比例上 (IZ/OZ%以及 IZ/V%)，有達到統計差異，顯示了漆黃素 10<sup>-4</sup> g/kg 能有效減少心肌梗塞的體積 (infarct zone, IZ) (表二)。

【表二】漆黃素對心室缺血、梗塞體積的作用

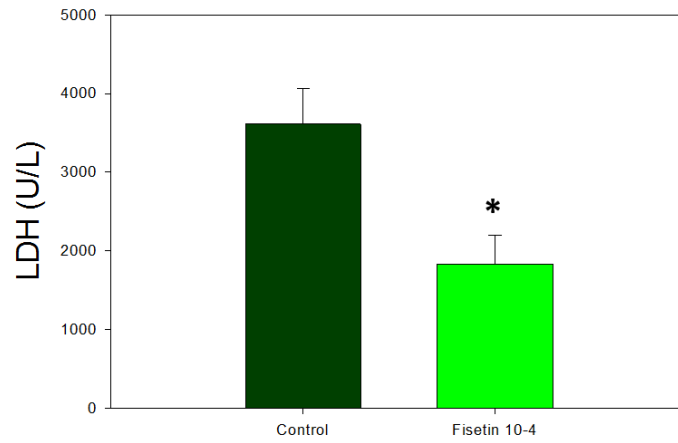
g/kg	Control	Fisetin 10 <sup>-5</sup>	Fisetin 10 <sup>-4</sup>
N	6	3	6
Ventricle weight(g)	0.92±0.15	0.85±0.04	0.88±0.05
Occluded zone(g)	0.46±0.07	0.47±0.04	0.48±0.03
Infarct zone(g)	0.20±0.05	0.18±0.04	0.11±0.03**
OZ/VW(%)	50.27±4.81	55.03±1.52	55.02±1.43
IZ/OZ(%)	42.58±7.24	37.34±6.75	22.84±7.26**
IZ/VW(%)	21.38±4.21	20.6±4.13	2.53±3.87*

IZ=Infarct Zone ; OZ=Occluded zone ; VW=Ventricle Weight  
\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, as compared to control group.

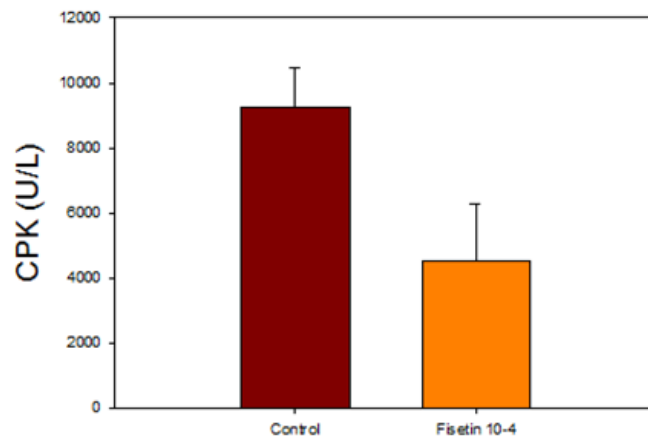
### 4. 評估漆黃素在大鼠心肌缺血再灌注損傷的模式中對於細胞損傷的影響

在分離大鼠心臟前，我們透過測量血漿中的乳酸脫氫酶 (LDH)，肌酸酐激酶 (CPK) 和肌鈣蛋白 (Troponin I) 濃度來評估細胞損傷的程度。根據統計結果顯示，漆黃素 10<sup>-4</sup> g/kg 組別血漿中的 LDH 相較於控制組呈現顯著的下降，同時 CPK、Troponin I 亦有下降的趨勢 (圖五、六、七)。

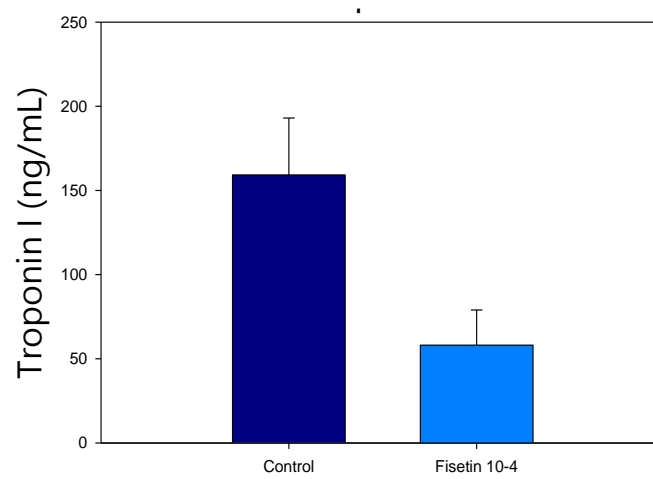
【圖五】血漿 LDH 數值



【圖六】血漿 CPK 數值



【圖七】血漿 Troponin I 數值

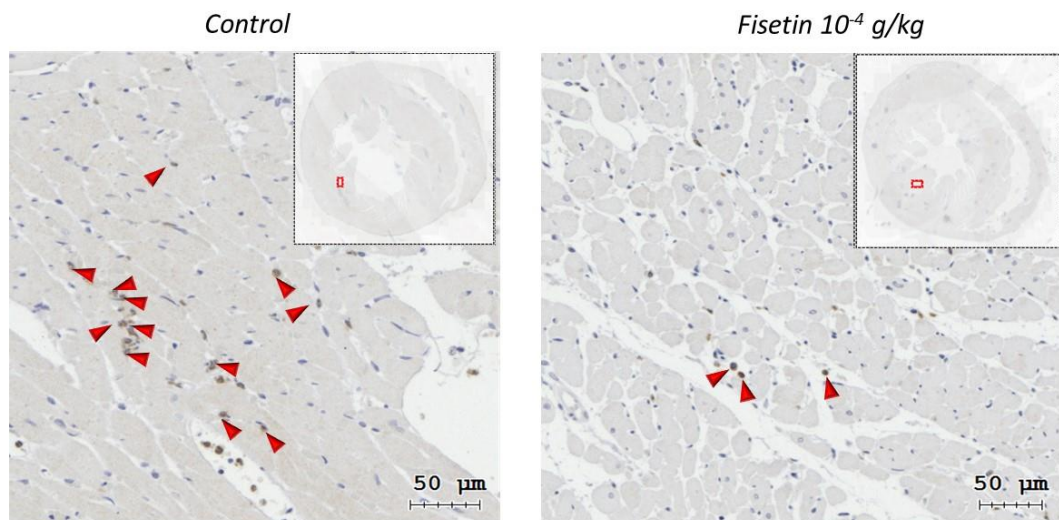


\*p<0.05, as compared to control group

## 6. 評估漆黃素在大鼠心肌缺血再灌注損傷模式中對於發炎細胞浸潤程度的影響

免疫組織化學染色法(immunohistochemistry, IHC)中，利用 myeloperoxidase (MPO)標定心臟組織中白血球浸潤(neutrophil infiltration, 紅色三角形標示處)的程度，結果顯示相較於控制組，治療組的心臟組織中 MPO 的表現量有減少的現象，代表漆黃素能夠減緩心肌細胞中的發炎反應，進而減少了細胞的受損程度和梗塞區域。(圖八)

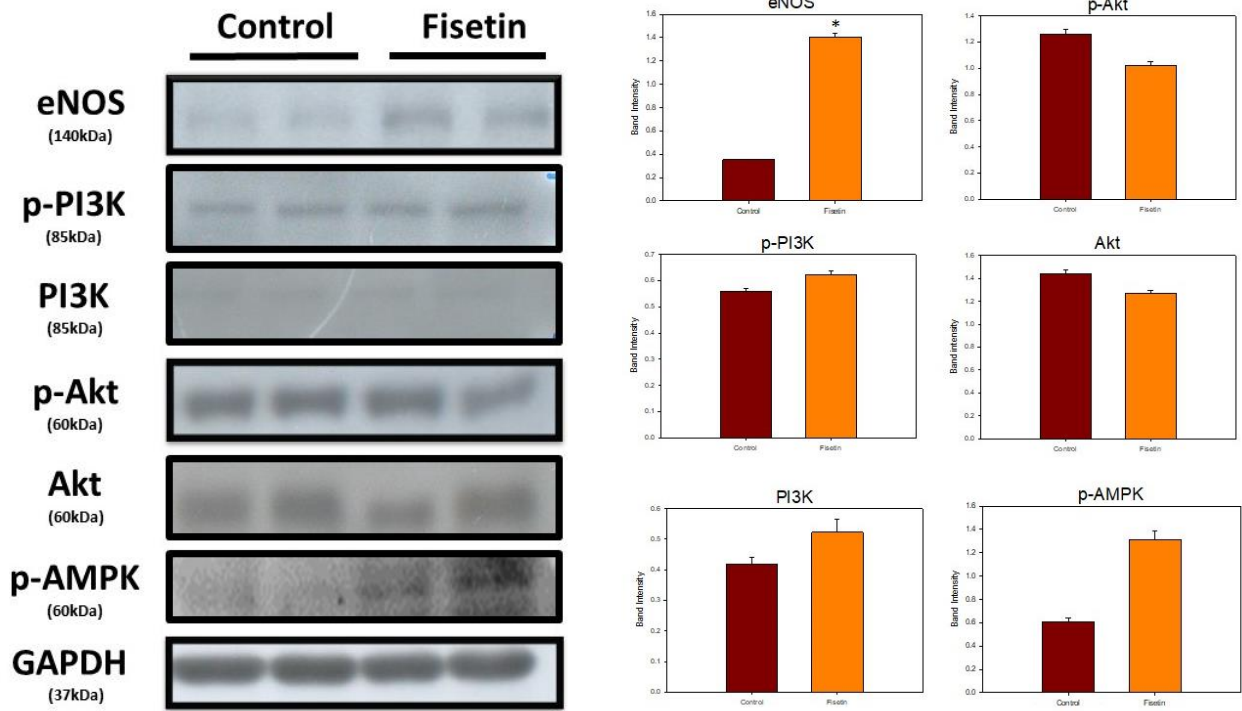
【圖八】免疫組織化學染色法細胞浸潤比較



## 7. 評估漆黃素在大鼠心肌缺血再灌注損傷模式中對於特定蛋白質表現量的影響

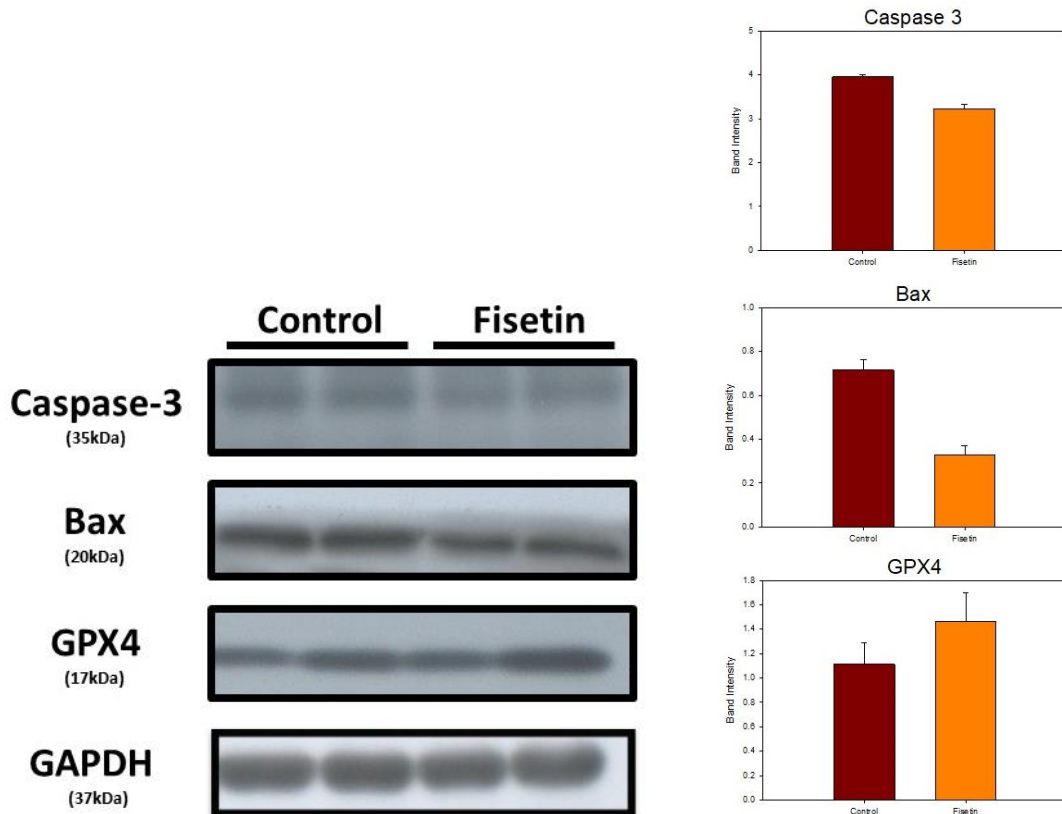
西方墨點法的結果顯示，給予漆黃素  $10^{-4}$  g/kg 相較於控制組能顯著增加 eNOS 的蛋白表現量，因此我們進一步分析漆黃素上調 eNOS 的訊息傳遞路徑。過去文獻認為主要調控 eNOS 的訊息傳遞路徑為 PI3K/Akt pathway 及 AMPK pathway，所以我們決定從 PI3K/Akt 及 AMPK 的訊號路徑著手探討，結果顯示，給予漆黃素  $10^{-4}$  g/kg 相較於控制組 p-PI3K 及 PI3K 蛋白表現量有上升的趨勢但未達統計差異，p-Akt 及 Akt 蛋白表現量則是有下降的趨勢但未達統計差異，而 p-AMPK 蛋白的表現量有上升的趨勢，但統計也無顯著差異 (圖九)。另一方面，我們想評估漆黃素是否降低心肌缺血再灌流損傷造成的細胞凋亡 (apoptosis) 及鐵依賴性細胞死亡 (ferroptosis)，結果發現，給予漆黃素  $10^{-4}$  g/kg 相較於控制組能降低 Bax 及 Caspase-3 的蛋白表現量，能增加 GPX4 的蛋白表現量，但都未達統計顯著差異。(圖十)。

【圖九】西方墨點法之訊號傳遞相關蛋白表現量結果及量化圖



\*p<0.05, as compared to control group

【圖十】西方墨點法之細胞凋亡相關蛋白表現量及量化圖



## (六) 討論

根據以上結果，我們發現在大鼠心肌缺血再灌流損傷的模式中，給予大鼠漆黃素  $10^{-4}$  g/kg 能夠有效降低心肌缺血再灌流損傷造成的心律不整，細胞損傷程度及心肌梗塞的體積，也能夠降低心肌缺血再灌流損傷引起的死亡率及發炎細胞浸潤的情況；此外，我們認為漆黃素可能透過調控與 eNOS 相關的訊息傳遞路徑達到心臟保護作用對抗心肌缺血在灌流損傷。

Naeimi, A.F. et al. 提到漆黃素可以跟許多氧化還原反應行交互作用，如 Nrf2, MAPK, NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt pathway，所以我們從 PI3K/Akt 的訊號路徑著手，如圖九結果顯示，漆黃素給藥組及控制組相比，PI3K 及 p-PI3K 的表現量有增加的趨勢，Akt, 及 p-Akt 的表現量有下降的趨勢，但是 eNOS 在給藥組的表現量卻顯著增加，因為 PI3K 和 Akt 的趨勢不太一致，所以我們推測漆黃素可能不是透過 PI3K/Akt 的路徑去活化 eNOS，而是經由其他調控 eNOS 相關的訊號傳遞路徑達到心臟保護作用在 Fulton, D. et al., Dimmeler, S. et al., Chen Z. P. et al., Nagata D. et al. 這四篇文獻中得知 eNOS residue 1177 同時是 Akt 及 AMPK 的受質[17、18、19、20]，因此除了探討 PI3K/Akt pathway 之外，我們也針對 AMPK 蛋白來做探討。AMPK 是一種壓力活化型蛋白，會因缺氧或是因 ATP 減少而被活化，其能活化下游 eNOS 使 Nitric oxide(NO) 產生，NO 能藉由影響粒線體的 MPTP 通道蛋白達到心臟保護的作用。

從 Althunibat, O.Y. et al. 的研究結果發現漆黃素對於糖尿病心臟病變具有降低細胞凋亡的功能，所以我們也決定來探討漆黃素在細胞凋亡路徑上的影響，由圖十的結果看到漆黃素給藥組的 Bax 及 caspase-3 蛋白表現量相較於控制組有下降的趨勢，推測漆黃素可能具有降低細胞凋亡的藥理活性，另外與控制組相比，漆黃素能增加 GPX4 蛋白的表現量，推測漆黃素可能也會減少鐵依賴性死亡(ferroptosis)。雖然目前的結果無法釐清 fisetin 是透過 PI3K/AKT pathway. AMPK pathway 或是其他訊息傳遞路徑來活化 eNOS，但未來我們會持續努力釐清 fisetin 活化 eNOS 來保護心臟對抗心肌缺血再灌注損傷的訊息傳遞路徑。

## (七) 計畫結果自評

這八個月的大專生研究計畫並沒有如預期般地順利，過程中我們遇到了許多困難與挑戰，像是在動物實驗過程中，剛執行完開胸老鼠便突然血壓降低休克，又出現心律不整而死亡，或是因為深度拿捏過深，在做冠狀動脈 ligation 時心臟過度出血，最終實驗失敗；而在生化實驗方面，剛開始學西方點墨法時，常因製備 gel 漏加原料或是記錯劑量而重新開始、因為 transfer 過久導致僅剩少量的蛋白存留在 PVDF 膜上、電泳過程中分子量低的蛋白容易跳海、也曾遇到某些蛋白特別 overexpression 或是 underexpression 而影響 band 判讀...等等問題，經過反覆的修正實驗過程、調整 gel 濃度及重新配置抗體，最終才得以呈現我們預期的成果。另外，我們也會去查詢探討漆黃素藥物機轉相關的文獻，但是西方點墨法結果顯示的分子機制卻和文獻中提到的有所差異，像是我們想探討漆黃素對細胞凋亡路徑的影響，因此選定了 Bax、caspase 3、cleaved-caspase 3、Bcl<sub>2</sub> 的蛋白，但是除了 Bax 其他蛋白的表現量在西方墨點法的結果卻沒有 band 表現，這也讓我十分困惑開始懷疑自己實驗的設計。這些零零總總的問題對我來說都是一個學習，不管是動物實驗或是生化實驗，每一步驟都要謹慎，因為只要一有差錯全部的實驗便會功虧一簣！雖然每次遇到實驗的障礙時都覺得十分受挫，但這也成為我進步的養分，使我往後在做實驗時每一步驟都嚴格要求自己小心執行並重複確認！

## (八) 研究心得報告

首先，要先感謝教授讓我有機會參加大專生研究計畫，也感謝科技部願意支持這個計畫的執行，起初聽到計畫有通過時讓我非常驚訝也十分興奮，希望能好好把握這八個月的時間努力做好實驗!! 雖然一邊在醫院實習一邊回實驗室跑 western 有時真的會忙到連吃飯的時間都沒有，甚至好幾個周末都是在實驗室度過的，但是每次看到 8 小時動物實驗過後收集到的 data，以及跑完三天 western blot 後 band 出現在底片上就充滿了滿滿的感動，謝謝一路上與我討論實驗數據、擬定實驗計畫的指導教授，也謝謝實驗室的學長姐及與我一起執行計畫的好夥伴能夠在我遇到問題時不厭其煩的替我解答，給我很多建議並且分享他們過去的經驗!

老實說，每次遇到不如預期的結果真的好幾度想要放棄，也有遇到提不起勁的時候，但是內心仍有一個聲音激勵著自己要保持追根究柢的精神，無論如何都要找到問題的解答，在追求真理的過程中不能輕易放棄，學長姐也鼓勵我就算實驗結果和其他人做的未必相同，這說不定是另一個新的發現，所以要相信自己所做的成果，漸漸地，我也發現自己其實非常享受做實驗時心無旁騖的氛圍，慢慢地從實驗中找到成就感!

八個月的時間過得非常快，在準備結報的過程中整理著自己的數據，細數著自己的成果，不知不覺也湧上一份感動，雖然因為中間遇到一些瓶頸，讓我沒有達到原本預定的目標進度，但相信這個大專生計畫對我來說不是終點，距離實驗的目標還有一大段路要繼續努力，希望能找出漆黃素產生保護作用的最低有效濃度以及加入對氧化壓力 NO 的觀察，並提供未來臨床醫療及保健食品新的研究方向!

## (九) 參考文獻

1. Moris, D., Spartalis, M., Spartalis, E., Karachaliou, G.-S., Karaolani, G.I., Tsourouflis, G., Tsilimigras, D.I., Tzatzaki, E., and Theocharis, S. (2017). The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Annals of Translational Medicine* 5, 326-326.
2. Li, X., Liu, M., Sun, R., Zeng, Y., Chen, S., and Zhang, P. (2016). Protective approaches against myocardial ischemia reperfusion injury. *Experimental and therapeutic medicine* 12, 3823-3829.
3. Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., Kinae, N. (2000). Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr.* 130, 2243-2250.
4. Naeimi, A.F., Alizadeh, M. (2017). Antioxidant properties of the flavonoid Fisetin: An updated review of in vivo and in vitro studies. *Trends in Food Science & Technology* 70, 34-44
5. Althunibat, O.Y., Al Hroob, A.M., Abukhalil, M.H., Germoush, M.O., Bin-Jumah, M., and Mahmoud, A.M. (2019). Fisetin ameliorates oxidative stress, inflammation and apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Life sciences* 222.
6. Garg, S., Malhotra, R.K., Khan, S.I., Sarkar, S., Susrutha, P.N., Singh, V., Goyal, S., Nag, T.C., Ray, R., Bhatia, J., et al. (2018). Fisetin attenuates isoproterenol-induced cardiac ischemic injury in vivo by suppressing RAGE/NF-kappaB mediated oxidative stress, apoptosis and inflammation. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 56, 147-155.
7. Shanmugam, K., Ravindran, S., Kurian, G.A., and Rajesh, M. (2018). Fisetin Confers

Cardioprotection against Myocardial Ischemia Reperfusion Injury by Suppressing Mitochondrial Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction and Inhibiting Glycogen Synthase Kinase 3beta Activity. *Oxid Med Cell Longev* 2018, 9173436.

8. 謝棟漢, 2009, 高齡者急性冠心症之特性與預後分析, 國立成功大學老年學研究所碩士論文
9. Altamirano, F., Wang, ZV., Hill, JA. (2015)  
Cardioprotection in ischaemia–reperfusion injury: novel mechanisms and clinical translation. *The journal of Physiology*, 593(17), 3773–3788.
10. Chamiec T, Herbaczyńska-Cedro K, Ceremużyński L. (1996)  
Effects of antioxidant vitamins C and E on signal-averaged electrocardiogram in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 77: 237-241
11. Juránek I, Bezek S. (2005) Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury? *Gen Physiol Biophys*, 24: 263-278
12. Eaton P, Clements-Jewery H. (2008) Peroxynitrite: in vivo cardioprotectant or arrhythmogen? *Br J Pharmacol*, 155: 972-973
13. Kim YH, Lim DS, Lee JH, Shim WJ, Ro YM, Park GH, Becker KG, Cho-Chung YS, Kim MK. (2003) Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp Mol Med*, 35: 336-349
14. Pavlović D, Đorđević V, Kocić G. A.(2002)“cross-talk” between oxidative stress and REDOX cell signaling. *Med Biol*, 9: 131-137
15. Dong B., Liu C., Xue R., Wang Y., Sun Y., Liang Z., Fan W., Jiang J., Zhao J., Su Q., Dai G., Dong Y., Huang H.(2018) Fisetin inhibits cardiac hypertrophy by suppressing oxidative stress. *The journal of nutritional biochemistry* 62, 221-229
16. Paul, C., Ying, L., Calomme M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V. (1998). Structure-Activity relationship and classification of Flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61(1), 71-76
17. Chen, Z. P., Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L. A., Power, D. A., Ortiz de Montellano, P. R., and Kemp, B. E. (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Letters* 443, 285–289
18. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W. C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597–601
19. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A. Z. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601–605
20. Nagata D, Mogi M, Walsh K.(2003) AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress. *J Biol Chem* 278, 31000–31006.