

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

微核醣核酸作為荷葉多酚及主成份沒食子酸和芸香甘抑制心臟  
血管疾病作用標的及機轉之研究(第3年)

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 104-2320-B-040-023-MY3  
執行期間：106年08月01日至107年07月31日  
執行單位：中山醫學大學生化微物免疫研究所

計畫主持人：王朝鐘

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理：鍾岱融  
博士後研究-博士後研究：洪嘉鴻

中華民國 107 年 09 月 25 日

中文摘要：在近代有關於心血管疾病的研究，顯示肥胖會較易引起動脈粥狀硬化，藉由油脂中低密度脂蛋白的氧化所引發脂質堆積和發炎現象，進而導致血管阻塞。而目前的研究方向較多是針對microRNAs (miRNAs) target對於調控心血管的生成以及疾病。過去我們研究說明了荷葉具有以下作用：改善高脂飲食所引發的動脈粥狀硬化之作用，包括荷葉萃取物降低血管平滑肌細胞增生及轉移導致動脈粥狀硬化之作用，以及荷葉多酚(NLPE)及其主成份Gallic acid(GA)抑制小鼠肥胖及脂肪肝作用等，但以荷葉對於miRNAs調控動脈粥狀硬化至今仍鮮有研究以及完整的架構，因此本實驗探討荷葉萃取物如何調控miRNAs對於心血管疾病的影響。

實驗主要利用db/db mice餵食高油脂飲食來模擬糖尿病引起心血管病灶之環境。我們在此條件下管餵GA觀察是否可抑制心血管疾病的形成，再利用MicroRNA Array來觀察心血管中miRNAs的表現，之後再利用血管內皮細胞和巨噬細胞之細胞實驗來進行驗證。在心血管免疫組織染色中，觀察到在高油脂誘導的組別Ras、RhoA和NF- $\kappa$ B表現有增加的情況，而在GA組別中顯示該蛋白表現被抑制；而在Array data分析中，本研究利用RNA22 Tool、TargetScan等網站找出新的target miRNAs，驗證是否會影響因發炎造成血管內皮細胞黏附性，以及泡沫細胞的形成。結果顯示，在內皮細胞中hsa-mir-199a-3p、hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p和hsa-mir-485-5p分別調控NF- $\kappa$ B、ICAM-1、VCAM-1和MCP-1的表現，在處理NLPE和GA後，可藉由提升miRNAs的表現來抑制其target 蛋白表現；另外在巨噬細胞方面，細胞中mmu-mir-677-5p和-499-5p分別調控SOD-1和SR-A的表現，在處理NLPE和GA後，則可藉由降低mmu-mir-677-5p表現來提升SOD-1的表現，提高mmu-mir-499-5p來降低SR-A的表現量。

根據上述結果說明，NLPE和GA具有調解血管平滑肌細胞、血管內皮細胞和巨噬細胞miRNAs表現，進而影響下游target蛋白的表現，對於因血管慢性發炎或因糖尿病所造成之心血管發炎症狀，均可抑制其血管平滑肌細胞增生和轉移，以及減緩血管內皮細胞的黏附度和泡沫細胞的形成，對於動脈粥狀硬化的預防具有顯著的能力。

中文關鍵詞：荷葉多酚、沒食子酸、動脈粥狀硬化、微核醣核酸

英文摘要：In recent studies on cardiovascular diseases, it has been shown that obesity and diabetes are more likely to cause atherosclerosis, and lipid accumulation and inflammation caused by the oxidation of low-density lipoproteins leads to blood vessel obstruction. The current research focuses on the regulation of cardiovascular production and disease by targeting microRNAs (miRNAs) targets. In the past, our lab studied *Nelumbo Nucifera* has the following effects: *Nelumbo Nucifera* extract reduces the proliferation and metastasis of vascular smooth muscle cells, and lotus leaf polyphenols (NLPE) and its main ingredient Gallic acid (GA) inhibit mouse obesity and fatty liver function. However, the regulation of atherosclerosis by miRNAs with *Nelumbo Nucifera* is still rare research and complete architecture.

The experiment mainly uses db/db mice fed high-fat diet

to simulate the environment of cardiovascular lesions caused by diabetes. We observed whether GA can inhibit the formation of cardiovascular disease under this condition. MicroRNA Arrays were then used to observe the behavior of miRNAs in the cardiovascular system and then validated using cell experiments with vascular endothelial cells and macrophages. In cardiovascular immunohistochemical staining, increased expression of Ras, RhoA, and NF- $\kappa$ B was observed in the hyperlipid-induced group, whereas in the GA group, the expression of the protein was shown to be suppressed. In the Array data analysis, the study used RNA22 Tool, TargetScan and other sites to find new target miRNAs to verify whether it affects vascular endothelial cell adhesion due to inflammation and the formation of foam cells. The results showed that hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-874-5p, hsa-mir-15a-3p, and hsa-mir-485-5p regulate NF- $\kappa$ B, ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 performance respectively. After treating NLPE and GA, its target protein expression can be inhibited by increasing the expression of miRNAs. In macrophages, mmu-mir-677-5p and mmu-mir-499-5p regulate the expression of SOD-1 and SR-A, respectively. After treatment of NLPE and GA, the performance of SOD-1 can be improved by decreasing the manifestation of mmu-mir-677-5p, and the expression of mmu-mir-499-5p can be decreased to reduce the performance of SR-A.

Based on the above results, NLPE and GA have the ability to mediate the expression of miRNAs in vascular smooth muscle cells, vascular endothelial cells, and macrophages, thereby affecting the performance of downstream target proteins. For the chronic inflammation of the blood vessels or the symptoms of cardiovascular inflammation caused by diabetes, it could inhibit the proliferation and metastasis of vascular smooth muscle cells, and slow down the adhesion of vascular endothelial cells and the formation of foam cells, which is significant for the prevention of atherosclerosis.

英文關鍵詞：miRNAs、atherosclerosis、nuciferine leaf polyphenol extracts、gallic acid

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

## 微核醣核酸作為荷葉多酚及主成份沒食子酸和芸香甘抑制 心臟血管疾病作用標的及機轉之研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2320-B-040 -023 -MY3

執行期間：2015年08月01日至2018年07月31日

執行機構及系所：中山醫學大學 生化微生物免疫所

計畫主持人：王朝鐘

共同主持人：

計畫參與人員：鍾岱融、洪嘉鴻

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 \_\_\_\_ 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，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

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，\_\_\_\_（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

中 華 民 國 107 年 7 月 28 日

## (一) 中英文摘要

### 中文摘要

在近代有關於心血管疾病的研究，顯示肥胖會較易引起動脈粥狀硬化，藉由油脂中低密度脂蛋白的氧化所引發脂質堆積和發炎現象，進而導致血管阻塞。而目前的研究方向較多是針對microRNAs (miRNAs) target對於調控心血管的生成以及疾病。過去我們研究說明了荷葉具有以下作用：改善高脂飲食所引發的動脈粥狀硬化之作用，包括荷葉萃取物降低血管平滑肌細胞增生及轉移導致動脈粥狀硬化之作用，以及荷葉多酚(NLPE)及其主成份Gallic acid(GA)抑制小鼠肥胖及脂肪肝作用等，但以荷葉對於miRNAs調控動脈粥狀硬化至今仍鮮有研究以及完整的架構，因此本實驗探討荷葉萃取物如何調控miRNAs對於心血管疾病的影響。

實驗架構主要可分為兩部分：第一部分探討miRNAs在荷葉多酚及其主成份藉由調節miRNAs調控TNF- $\alpha$ 誘導血管平滑肌細胞產生增生與轉移之角色。我們在細胞實驗中藉由加入TNF- $\alpha$ 來模擬血管發炎時的微環境。之後我們觀察藉由加入NLPE和GA後，是否可抑制因發炎造成血管平滑肌細胞增生與轉移的情況。過去許多文獻指出，miR-21、miR-143和miR-145與調控血管平滑肌細胞增生和位移有關，故第一部分針對此miRNAs以及相關target蛋白來進行研究。結果顯示，在發炎的環境下，會提升血管平滑肌細胞中miR-21表現量，其相對target蛋白PTEN表現則會被抑制；而另外miR-143、miR-145表現在細胞發炎時會有下降的情況，其target 蛋白Ras和RhoA表現則因miRNAs表現下降而有所提升，其下游增生和轉移相關表現蛋白也會有所提升。在加入NLPE和GA後，則會藉由調節miR-21、miR-143和miR-145使增生和轉移蛋白的表現量下降。

糖尿病所造成的附病變為動脈粥狀硬化的成因之一，所以第二部分主要利用db/db mice餵食高油脂飲食來模擬糖尿病引起心血管病灶之環境。我們在此條件下管餵GA觀察是否可抑制心血管疾病的形成，再利用MicroRNA Array來觀察心血管中miRNAs的表現，之後再利用血管內皮細胞和巨噬細胞之細胞實驗來進行驗證。在心血管免疫組織染色中，觀察到在高油脂誘導的組別Ras、RhoA和NF- $\kappa$ B表現有增加的情況，而在GA組別中顯示該蛋白表現被抑制；而在Array data分析中，本研究利用RNA22 Tool、TargetScan等網站找出新的target miRNAs，驗證是否會影響因發炎造成血管內皮細胞黏附性，以及泡沫細胞的形成。結果顯示，在內皮細胞中hsa-mir-199a-3p、hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p和hsa-mir-485-5p分別調控NF- $\kappa$ B、ICAM-1、VCAM-1和MCP-1的表現，在處理NLPE和GA後，可藉由提升miRNAs的表現來抑制其target 蛋白表現；另外在巨噬細胞方面，細胞中mmu-mir-677-5p和-499-5p分別調控SOD-1和SR-A的表現，在處理NLPE和GA後，則可藉由降低mmu-mir-677-5p表現來提升SOD-1的表現，提高mmu-mir-499-5p來降低SR-A的表現量。

根據上述結果說明，NLPE和GA具有調解血管平滑肌細胞、血管內皮細胞和巨噬細胞miRNAs表現，進而影響下游target蛋白的表現，對於因血管慢性發炎或因糖尿病所造成之心血管發炎症狀，均可抑制其血管平滑肌細胞增生和轉移，以及減緩血管內皮細胞的黏附度和泡沫細胞的形成，對於動脈粥狀硬化的預防具有顯著的能力。

**關鍵字:**荷葉多酚、沒食子酸、動脈粥狀硬化、微核醣核酸

## 英文摘要

In recent studies on cardiovascular diseases, it has been shown that obesity and diabetes are more likely to cause atherosclerosis, and lipid accumulation and inflammation caused by the oxidation of low-density lipoproteins leads to blood vessel obstruction. The current research focuses on the regulation of cardiovascular production and disease by targeting microRNAs (miRNAs) targets. In the past, our lab studied *Nelumbo Nucifera* has the following effects: *Nelumbo Nucifera* extract reduces the proliferation and metastasis of vascular smooth muscle cells, and *Nelumbo Nucifera* leaf polyphenols extract (NLPE) and its main ingredient Gallic acid (GA) inhibit mouse obesity and fatty liver function. However, the regulation of atherosclerosis by miRNAs with *Nelumbo Nucifera* is still rare research and complete architecture.

The experimental framework can be divided into two main parts: The first part discusses the role of miRNAs in the regulation of TNF- $\alpha$ -induced proliferation and metastasis of vascular smooth muscle cells by regulating the expression of miRNAs in lotus leaf polyphenols and their main components. We simulated the microenvironment of vascular inflammation by adding TNF- $\alpha$  in cell experiments. After that, we observed whether the proliferation and metastasis of vascular smooth muscle cells due to inflammation can be suppressed by adding NLPE and GA. In the past, many literatures pointed out that miR-21, miR-143, and miR-145 are involved in the regulation of proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. Therefore, the first part of the study focused on this miRNAs and related target proteins. The results showed that in the inflamed environment, miR-21 expression in vascular smooth muscle cells was increased, and its relative target protein PTEN expression was inhibited. In addition, the expression of miR-143 and miR-145 decreased when the cells became inflamed. The Ras and RhoA expressions of their target proteins were elevated due to the decreased expression of miRNAs. The downstream proliferation and metastasis-related expression proteins also increased. After addition of NLPE and GA, the expression of proliferative and metastatic proteins was decreased by regulating miR-21, miR-143, and miR-145.

The second part mainly uses db/db mice fed high-fat diet to simulate the environment of cardiovascular lesions caused by diabetes. We observed whether GA can inhibit the formation of cardiovascular disease under this condition. MicroRNA Arrays were then used to observe the behavior of miRNAs in the cardiovascular system and then validated using cell experiments with vascular endothelial cells and macrophages. In cardiovascular immunohistochemical staining, increased expression of Ras, RhoA, and NF- $\kappa$ B was observed in the hyperlipid-induced group, whereas in the GA group, the expression of the protein was shown to be suppressed. In the Array data analysis, the study used RNA22 Tool, TargetScan and other sites to find new target miRNAs to verify whether it affects vascular endothelial cell adhesion due to inflammation and the formation of foam cells. The results showed that hsa-mir-199a-3p, hsa-mir-874-5p, hsa-mir-15a-3p, and hsa-mir-485-5p regulate NF- $\kappa$ B, ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 performance respectively. After treating NLPE and GA, its target protein expression can be inhibited by increasing the expression of miRNAs. In macrophages, mmu-mir-677-5p and mmu-mir-499-5p regulate the expression of SOD-1 and SR-A, respectively. After treatment of NLPE and GA, the performance of SOD-1 can be improved by decreasing the manifestation of mmu-mir-677-5p, and the expression of mmu-mir-499-5p can be decreased to reduce the performance of SR-A.

Based on the above results, NLPE and GA have the ability to mediate the expression of miRNAs in vascular smooth muscle cells, vascular endothelial cells, and macrophages, thereby affecting the performance of downstream target proteins. For the chronic inflammation of the blood vessels or the

symptoms of cardiovascular inflammation caused by diabetes, it could inhibit the proliferation and metastasis of vascular smooth muscle cells, and slow down the adhesion of vascular endothelial cells and the formation of foam cells, which is significant for the prevention of atherosclerosis.

**Key words: miRNAs、atherosclerosis、nuciferine leaf polyphenol extracts、gallic acid**

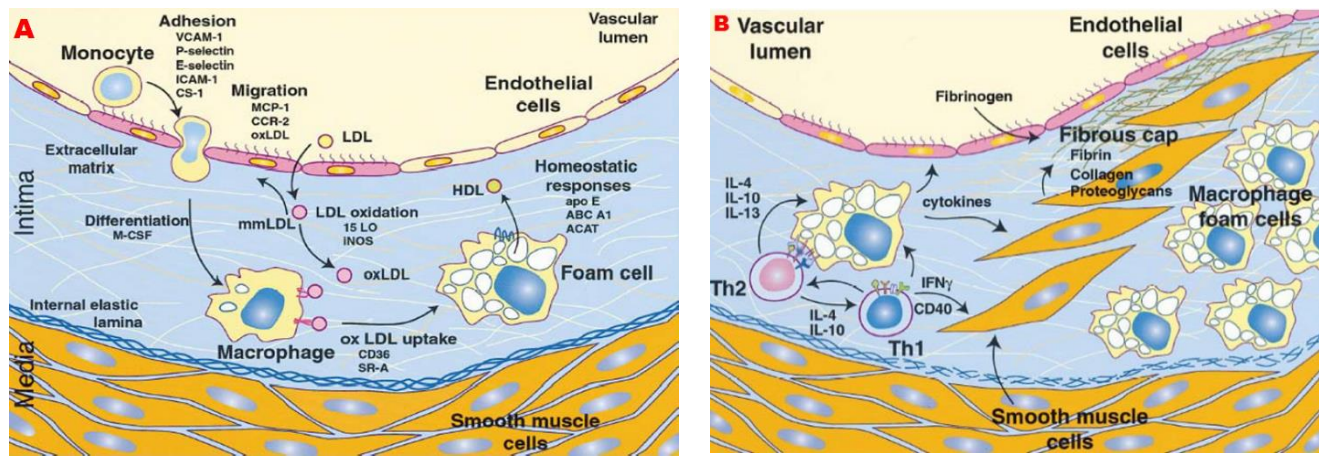
## (二) 前言及研究目的：

荷葉始載於《本草綱目》，列於果部蓴類蓮藕項下；嫩者稱荷錢，貼水者名藕荷，出水者是芰荷。《神農本草經》將蓮藕列為上品，謂其根為藕，其實為蓮，其莖葉為荷，皆指荷葉而言。荷葉含抗氧化物質類黃酮：荷葉甙(nelumboside)[62]、oligomeric procyanidins 及槲皮素、異槲皮甙[63-65]，以及維生素 C、枸橼酸、酒石酸、蘋果酸、草酸、琥珀酸、葡萄糖酸、鞣質。雖然許多研究已經證實荷葉具有良好降血脂、抗氧化及抗癌等功效，但如何藉由 miRNAs 來調控其 target 蛋白，進而影響動脈粥狀硬化，至今仍鮮有研究，所以本研究主要針對兩個部份進行：第一部分，以參考之前文獻為主軸，驗證 NLPE 和其有效成分 GA 來觀察在血管平滑肌細胞中，影響增生和轉移蛋白之 miRNAs 與其 target 蛋白的研究。第二部分，以 db/db mice 餵食高油脂飲食，模擬高油飲食糖尿病附病變之動脈粥狀硬化之環境，將心血管檢體做 MicroRNAs Array 分析後，以該分析 data 為主軸，利用 miRNAs prediction 資料庫，找出目前尚未發表新的 miRNAs，來觀察對於血管內皮細胞發炎和泡沫細胞形成之影響。由以上實驗架構建立藉由 NLPE 和 GA 影響 miRNAs 表現後，進而影響其 target 蛋白之實驗模式。

## (三) 文獻探討：

### 1. 動脈粥狀硬化的機轉

動脈粥狀硬化(atherosclerosis)為慢性的動脈疾病，為心臟病、中風等慢性疾病的主因。動脈粥狀硬化的發生既緩慢且複雜，涉及許多的細胞與分子機制，如內皮細胞 (endothelial cell) 血管平滑肌細胞 (vascular smooth muscle cells)、巨噬細胞(macrophage)、血小板(platelets)，及其他蛋白質因素(低密度脂蛋白 low-density lipoprotein, LDL)、生長因子及細胞激素。當血管內皮細胞 (endothelial cell) 受損，使血管腔 (vascular lumen) 間隙增加，使得脂蛋白可以進入血管內膜 (intima) 中並被內生性的氧化因子如：myeloperoxidase、nitric oxide synthase 與 15-lipoxygenase 等氧化後形成 oxLDL。oxLDL 會促使 endothelial cell 表達 cell adhesion molecules 如：VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule-1)、E-selectin、P-selectin、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 等，使 T cell 與單核性白血球(monocyte) 黏附於血管腔表面並促其轉移 (migration) 至血管內膜中[1-3]。當單核性白血球轉移至血管內膜後，單核性白血球會受 M-CSF (macrophage monocyte-colony-stimulating factor) 影響而分化為巨噬細胞(圖 A)[4]。巨噬細胞會表達清除者接受器 SR-A、CD36 來辨識 oxLDL，並經將 oxLDL 吞噬至細胞內，當巨噬細胞吞噬過多 oxLDL 時，會使得大量的膽固醇、脂質堆積在細胞內而形成泡沫細胞。大量的泡沫細胞聚集堆積在動脈管壁上形成脂肪斑(fatty streak)。到最後，泡沫細胞會走向 apoptosis 或 necrosis[5]，當細胞死亡後，原本經吞噬而堆積於細胞內的膽固醇、脂質會流出，而一些細胞的死亡會形成 necrotic core[6]，是形成動脈粥狀硬化的主因之一。到病程的中期巨噬細胞會與 intima 中 T cell 作用而生成 cytokines (Th1、Th2) 而促使一連串的免疫反應發生，周圍的血管平滑肌細胞 (smooth muscle cell) 及內皮細胞(endothelial cell)也會表達生成 IL-1 (interleukin-1)、TNF (tumor necrosis factor) 等因子，這些分子的生成會引起血管平滑肌細胞轉移至 intima 或 endothelial cell 中，造成血管內側發炎及增厚，與泡沫細胞內的膽固醇與脂質堆疊使得血管栓塞，引起動脈粥狀硬化的情形產生(圖 B)[7]。



1-1.

## 平滑肌細胞與動脈粥狀硬化

平滑肌細胞在動脈粥狀硬化的病程扮演著重要的角色。血管的組成大致可以分成三層：(一) 最內層 (intima) 是與血管長軸平行排列的內皮細胞 (endothelium)，細胞之間以 tight junction 和 gap junction 相接，前者構成穿越障礙，後者溝通周圍細胞。內皮下層 (sub-endothelial layer) 是少量的平滑肌細胞 (smooth muscle cell) 縱向分佈。此區尚有巨噬細胞 (macrophage) 進行免疫作用。(二) 血管中層 (media) 為三層中最厚，由層層交互排列的平滑肌細胞與彈性纖維板 (elastic lamella) 構成。(三) (adventitia) 為疏鬆結締組織 (loose connective tissue)，有纖維母細胞 (fibroblast) 分泌胞外基質，還有巨噬細胞在此。位於血管中層平滑肌細胞是大型血管中的主要細胞，用以維持血管彈性、血壓以及血流的恆定。在發育成熟的血管，平滑肌細胞呈現收縮態 (contractile phenotype) 或稱已分化態 (differentiated phenotype)[8]。在正常狀況下，血管未受到損傷，平滑肌處於收縮態，表現特定的收縮因子，如，smooth muscle-specific myosin heavy chain, smooth muscle  $\alpha$ -actin, h-caldesmon 以及 calponin。在一些血管修復術、中風以及血管繞道手術中，血管因而受到損傷，平滑肌呈現去分化態 (dedifferentiated phenotype)，且進入細胞的分裂週期，目前研究認為平滑肌表型的改變被認為是動脈硬化的主要特徵之一[9]。

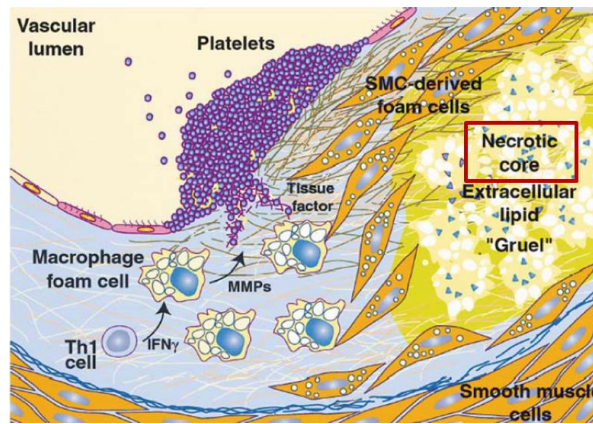
在動脈粥狀硬化的發展過程中，受到一些生長因子以及 oxLDL 所引起免疫反應的刺激，使平滑肌細胞大多呈現去分化態[10]。如此型態的平滑肌細胞具有增生以及移動的能力。開始在血管中層增生，並造成血管壁的增厚、血管腔狹小以及血管阻塞。更進一步，會往血管內層遷徙，在動脈粥狀硬化斑上面形成纖維帽。平滑肌細胞還會刺激活化的巨噬細胞分泌 interferon- $\gamma$  促使膠原蛋白的合成，穩定已形成的纖維帽。平滑肌細胞與活化的巨噬細胞也會分泌一些分解酵素如 matrix metalloproteinase，使胞外間質被分解而使纖維帽變薄，促使動脈內的硬化斑塊破裂，造成血小板活化。大量活化的血小板凝集且附著，於血管內皮損傷處形成血栓[11]。

## 1-2. 血管內皮細胞、巨噬細胞與動脈粥狀硬化

動脈粥狀硬化的初期，血管內皮細胞功能及黏附度的情況為初期血管發炎的指標。當血液中血脂濃度或氧化壓力過高時，會促使血液中發炎因子，TNF- $\alpha$ 、Nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) 以及 Interleukin-1 (IL-1) 等表現提升，進而造成血管內皮細胞表現受損使細胞間隙通透性增加[12]。而且血液中因血脂濃度過高導致 LDL 經血管內皮細胞通透至血管內時，此時被內生性的氧化因子如：myeloperoxidase、nitric oxide synthase 與 15-lipoxygenase 等氧化後形成 oxLDL。血液中的發炎因子和血管中 oxLDL 則會促使血管內皮細胞中黏附蛋白因子表現上升，像是 VCAM-1、ICAM-1、MCP-1 和 E-selectin 表現增加[13]。過去的文獻中指出，在血管內皮細胞發炎的過程中都和 NF- $\kappa$ B 表現有相當高的相關性。準確來說，在許多發炎因子中，以 NF- $\kappa$ B 對於促使血管內皮細胞最具影響性，該蛋白能有效促使血管內皮細胞動脈粥狀硬化相關因子：VCAM-1、ICAM-1、MCP-1 表現增加[14]。其中 VCAM-1 在之前文獻中指出，具有單核性白血球和淋巴細胞選擇性黏附的特性[15]。也因 VCAM-1 表現增加，促使血液中單核性白血球的黏附。當單核球轉移至血管內膜，單核球受 M-CSF 影響而分化形成巨噬



細胞(macrophage)[16]。此時巨噬細胞藉由接受器 SR-A、CD36 來辨識 oxLDL，並經將 oxLDL 吞噬至細胞內，當巨噬細胞吞噬過多 oxLDL 時，會使得大量的膽固醇、脂質堆積在細胞內而形成泡沫細胞。泡沫細胞會釋放出大量的 cytokine 促使血管內皮細胞和平滑肌細胞持續處在發炎的狀態[17]。當巨噬細胞吞噬過多 oxLDL 時，會使得大量的膽固醇、脂質堆積在細胞內而形成泡沫細胞。當大量的泡沫細胞聚集堆積在動脈管壁上形成 fatty streak，此時細胞會走向 apoptosis 或 necrosis，原本經吞噬而堆積於細胞內的膽固醇、脂質會流出，和已凋亡之血管內皮細胞、泡沫細胞和增生及轉移之血管平滑肌細胞形成 necrotic core，是形成動脈粥狀硬化的主因(如下圖)。



*Cell 104: 503-516 2001*

### 1-3. 氧化壓力與動脈粥狀硬化

造成動脈粥狀硬化的原因有很多，而氧化壓力的增加為其中一項重要因素[18, 19]。氧化壓力 (oxidative stress) 是指人體的細胞、神經、組織與器官受到氧化作用與傷害，而氧化壓力的產生可能起因於活性氧分子的增加，或抗氧化物的減少[20]。活性氧分子(Reactive Oxygen Species, ROS)的成員包括了過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、超氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、氫氧自由基(OH<sup>-</sup>)及過氧亞硝基陰離子(ONOO<sup>-</sup>)。活性氧分子具有高度生物活性，高濃度的活性氧是毒性分子，可以攻擊細胞內的大分子，如 DNA、RNA、蛋白質、脂質、醣類與酵素等，造成細胞或組織的傷害[21]。若沒有足夠的抗氧化物來清除所增加的活性氧分子以減少傷害，將引發老化、心血管疾病、癌症與神經退化等發生[22]。在嗜中性白血球或其他吞噬性的白血球中，活性氧分子為有毒的氧自由基，可以殺死外來的細菌或黴菌等感染物質[18]。除此之外，低濃度的活性氧亦可當作訊息傳遞的調節因子，能誘導細胞防禦基因的表達，以及在各種不同的細胞當中引起適應性反應。細胞內產生活

性氧分子的方式繁多，除了在粒腺體中藉由電子傳遞鏈來產生之外，細胞中也會生成活性氧分子，但目前已知血管中產生活性氧分子的主要來源為 NAD(P)H oxidase[23]。過去的研究發現 NAD(P)H oxidase

的不當活化與動脈硬化高度相關[24, 25]。當高血脂(hyper-cholesterolemia)、高血壓(hypertension)或是壓力(stress)等危險因子出現時會使得內皮細胞受到損害並且產生活性氧分子，而受到損傷的內皮細胞會活化黏著分子及趨化因子使得單核球進入血管壁，而血管壁內的平滑肌細胞及巨噬細胞會藉由 NADPH oxidase 的活化產生更多的活性氧分子使得平滑肌細胞增生並移行至血管內膜層進而促進動脈硬化發展[26]。除此之外，體內存在過多的活化氧分子，自由基 (Free radical) 的量也相對增加。低密度脂蛋白 LDL 容易被氧化形成氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)，而被穿透進入血管壁下方的巨噬細胞(Macrophages)所吞噬，形成泡沫細胞(Foam cells)，再經一連串變化而形成動脈粥狀硬化[27-29]。經由氧化壓力增加而導致的血管疾病，最近研究發現可以藉由使用抗氧化劑來減緩心血管疾病的發生。

## 2. miRNAs 與心血管疾病的關係

### 2-1. miRNAs 概述

MicroRNA (miRNA) 是在真核生物中發現一種內源性具有調控功能的 RNA，為一段長度約 20~25 核苷酸，由 DNA 轉錄而來但並不會表現成蛋白質[30]。主要功能為調節動植物的轉譯後修飾，許多疾

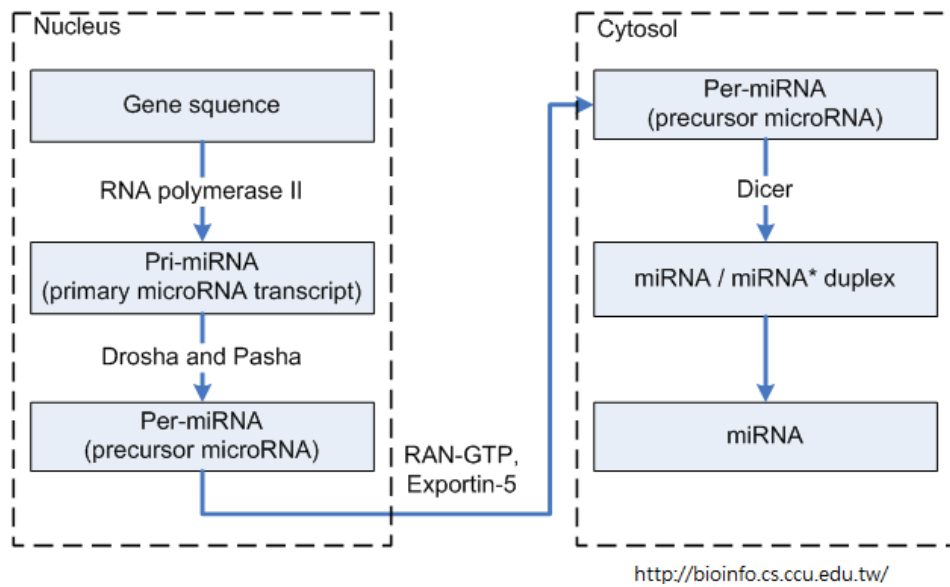
病被發現可能由這些小 RNA 分子所影響。當 miRNA 與被調控基因的 binding target site 鍵結後，會抑制其基因的表現或使其基因轉錄後的 RNA 序列斷裂。miRNA 與基因 binding target 此 site 通常在 transcrip 的 3'UTR，以 miRNA 5' 方向的第 2 到第 8 核苷酸 (seed 區域) 的鍵結。以下為 miRNA 形成之過程和作用機制[31]。

**A. miRNA 之形成:**

主要可分為細胞核和細胞核外兩階段 (如圖):

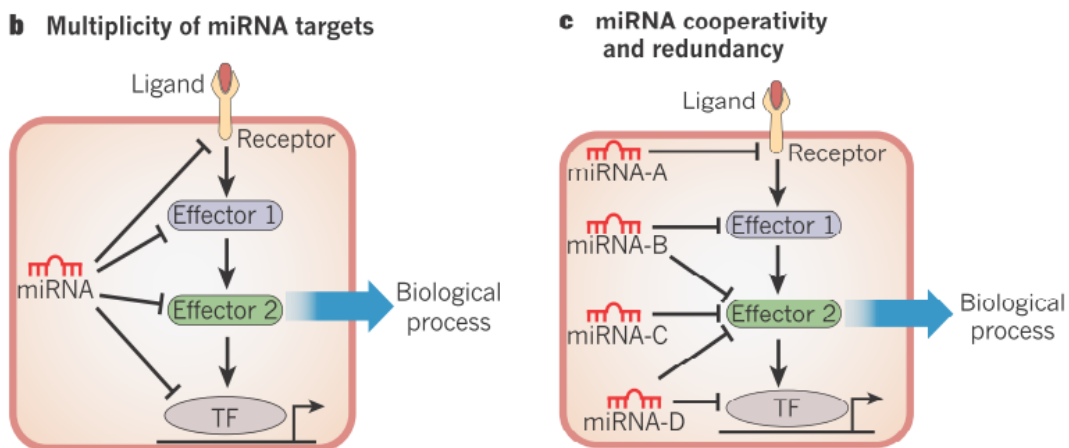
(1)細胞核階段: 從基因序列上會經由 RNA polymerase II 產生初級轉錄物 (pri-miRNA)約 100 核苷酸，其形態為 loop 狀類似髮夾。接著 pri-miRNA 經由 Drosha 及 Pasha 處理後，切掉多餘的序列，形成一個長度約 70 核苷酸的 loop 結構，此時稱為 pre-miRNA。再來 pre-miRNA 會經由 Exportin-5 輸出至細胞核外。

(2) 細胞核外階段: pre-miRNA 會經 Dicer 作用後成一個成熟的 miRNA (mature miRNA)，特徵為兩條互補的序列，而後在 miRNA 這一股會自動降解除失後，形成 microRNA。[32-34]



**B. miRNA 調控機制:**

細胞內 miRNA 的調控機制包含了由單一 miRNA 去調控多個蛋白或 miRNA 一對一調控蛋白的機制。在細胞內，單一 miRNA 可調控不同的訊息路徑蛋白，包含 ligand、receptor、effector 以及 transcription factor，而當 miRNA 鍵結在這接蛋白上的 binding target site 時，則會影響到生物體內相關的運作過程；相對的，細胞內調控 miRNA 的情形會同時存在單一調控或是一對多的調控機制，不同的 miRNAs 對於不同的細胞則會有不同的作用情形(如下圖)。

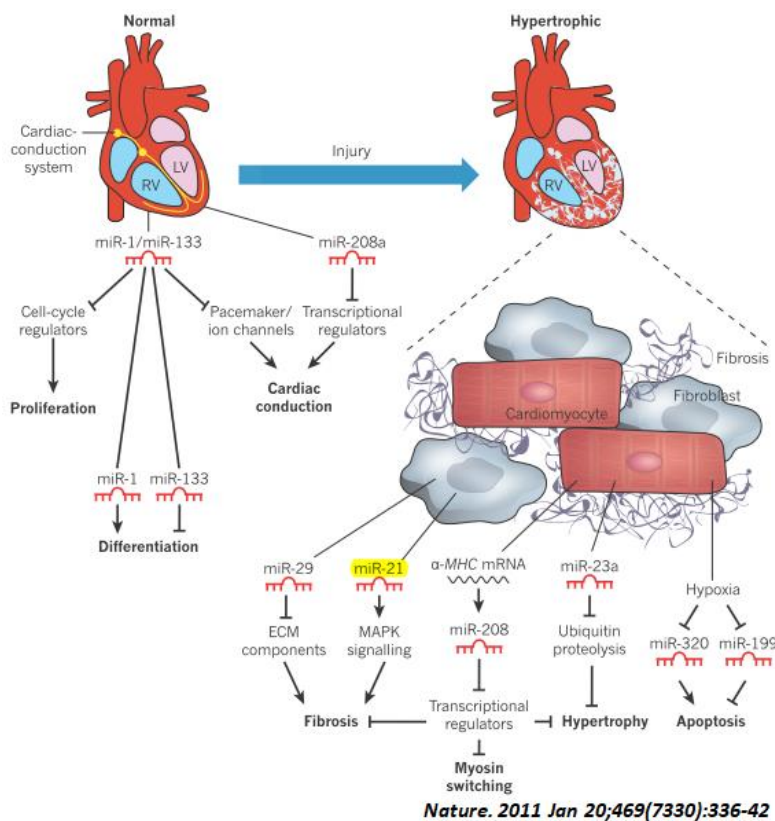


## 2-2. miRNA 對於心臟以及血管發展的機制:

miRNA 廣泛表現在各個組織和器官中，在病理上，對於疾病發生的過程有著重要的功能。在許多文獻中指出，miRNA 在一些腫瘤癌細胞組織中有表現，而針對 miRNA 來抑制癌症的研究更不在少數[35]。近年來，關於心血管疾病的研​​究逐漸將焦點集中在 microRNA (miRNA) 對於心肌細胞的調控[36]。在心血管系統中，miRNA 不僅在調控細胞的分化或發育扮演重要的角色，在心血管疾病中同樣是不可或缺的部分。根據文獻研究，miR-1 大量存在於心肌細胞中，與整個心臟的發育息息相關[37]。而與其相關的 miR-133 和 miR-1 一樣都會抑制 Cell-cycle regulators，使得心肌細胞不會過度增生[38]。而 miR-1 和 miR-133 分別會促進以及抑制心肌細胞的分化[38]。其他文獻中指出，miR-133 和 miR-208a 別會抑制離子通道和轉錄調節因子來調控心臟收縮和舒張[39, 40]。

## 2-3. miRNA 對於病變心臟的調控

一旦 miR-1, 133, 208a 的調控失常，則會造成心律不整、心室壓力過高和心室肥大等現象[41, 42]。另外在其他研究中指出，miR-29 在心肌梗塞的情況下，會抑制 ECM(extracellular matrix)，使心臟纖維化[43]; 相同的 miR-21 促進 MAPK pathway 導致心臟纖維化的發生[44]。miR-208 透過抑制 transcriptional mediator->NFATc3，造成心臟纖維化和心室肥大[45]。miR-23a 則會藉由抑制 ubiquitin proteolysis 導致心室肥大的狀況[46]。在因心室肥大和心肌梗塞的情況下，心血管會呈現缺氧的狀況，此時 miR-320 和 199 分別會促進和抑制心肌細胞的凋亡(如下圖)。



## 2-4. miRNA 對於血管細胞的調控

血管壁的組成主要是由 endothelial cells(ECs)和 smooth muscle cells(SMCs)組成，功能是形成屏障以及和鄰近組織交換氧氣和養分。當血管遭受到氧化傷害時，miRNAs 的表現會影響 ECs 和 SMCs 的增生和 migration，造成動脈粥狀硬化、血管壁增厚使血管通道狹窄造成阻塞、以及造成血管過度新生[47]。當血管病變時，miR-21 會促使 SMCs 和 ECs 增生及分化，分別使血管壁增厚和纖維化[48]。在缺氧的環境下，miR-210 和 miR-92a 分別促進或抑制缺血性血管新生的作用[49, 50]; miR-126 會經由 PI(3)K 和 MAPK pathway 促使血管新生作用，而 miR-218 encoded Slit mRNA 也會促使心血管新生。此外 miR-126 會藉由調控 ECs 來影響動脈粥狀硬化的情形[51, 52]。另外 miR-143/145 在血管受到傷害刺激時會調控 SMCs 的作用，促使 SMCs 細胞分化以及 Actin 的堆積，使血管重塑型態，改變血管收縮狀態，使得血壓升高，進而引發高血壓和動脈粥狀硬化等相關心血管疾病[53]。

### 3. 荷葉之背景介紹

#### 3-1. 植物簡介

荷葉學名 *Nelumbo nucifera Gaertner*。英文以 East Indian Lotus 稱之，簡稱 Lotus，中文亦稱「蓮」，《爾雅》中記載，是宿根性多年生水生植物。根莖肥厚橫走，外皮黃白色，節部縊縮，節上生鱗片葉及鬚根。葉伸出水面，圓盾形，直徑 25~90 公分，全緣稍呈波狀，上面暗綠色，光滑具白粉，下面淡綠色，葉柄粗大，著生於葉背中央，圓柱形，中空，高達 1~2 尺，有刺毛。主要構造包括有：蓮花、蓮蓬、蓮鬚（雄蕊）、蓮子、蓮梗、蓮葉（荷葉）、蓮藕地下莖、蓮藕節等等。蓮花即為蓮之開花部分，於花中央者蓮蓬則為蓮蓬，嵌在蓮蓬中的種子即蓮子，葉片部分則稱為荷葉，根莖肥厚即為藕，蓮藕節則是位在蓮蓬之間的結節。蓮在印度、菲律賓、中國及日本等國皆有產，但主產地在印度，台灣則由日本殖民統治時期傳入，並開始大量種植，主要分佈在嘉義白河鎮及台南市郊一帶。蓮用途多在庭園造景欣賞及供人食用，故為著名食用、藥用兼觀賞植物，經濟價值極高，蓮的經濟作物以生產蓮子、蓮藕及藕粉等加工品為主[54]。地下莖（蓮藕）與種子（蓮子）是我們常用的食品，葉片則常作為包裹的材料和中藥材入藥。荷葉為夏、秋二季採收，曬至七八成乾時，除去葉柄，折成半圓形或摺扇形，乾燥。荷葉為蓮之葉片部分，形狀大多呈橢圓形，為常用中藥。

#### 3-2. 荷葉化學成分

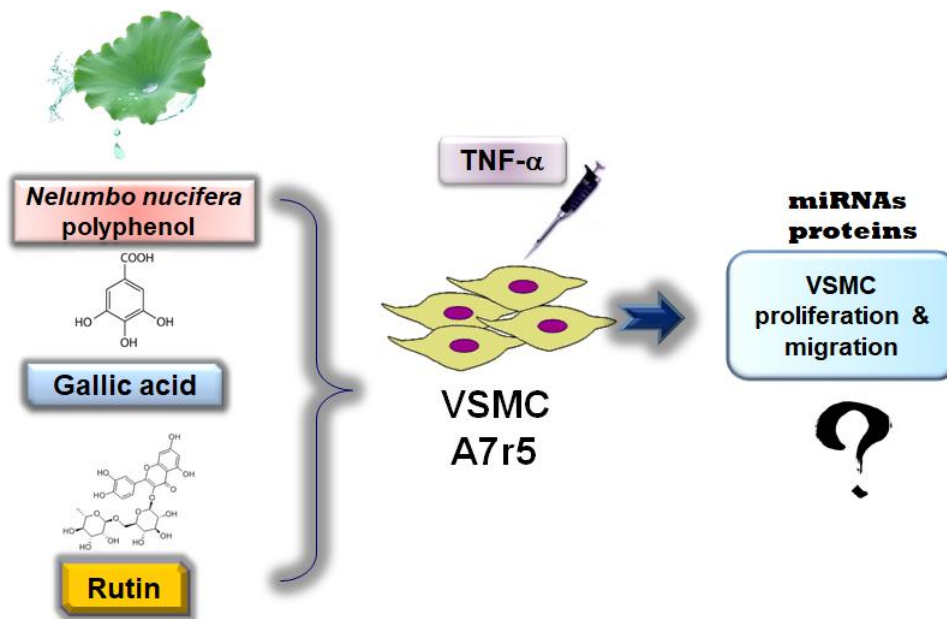
目前知道荷葉含多種生物鹼：如荷葉鹼（nuciferine）、N-去甲荷葉鹼（N-nornuciferine）、o-去甲荷葉鹼（o-nornuciferine）、牛心果鹼（anonaine）、繞袂鹼（roemerine）、亞美帕鹼（armepavine）、N-甲基衡州烏藥鹼（N-methylcoclaurine）、原荷葉鹼（pronuciferine）、鵝掌楸鹼（liriodenine）及去氧繞袂鹼（dehydroroemerine）[55]等等。荷葉也另含抗氧化物質類黃酮：荷葉苷（nelumboside）[56]、Oligomeric Procyanidins及沒石子酸Gallic acid(GA)[57]，以及維生素C、酒石酸、枸橼酸、蘋果酸、草酸、琥珀酸、葡萄糖酸、鞣質。另外，還含抗有絲分裂作用的鹼性成分[58]。

#### 3-3. 生理功效及活性

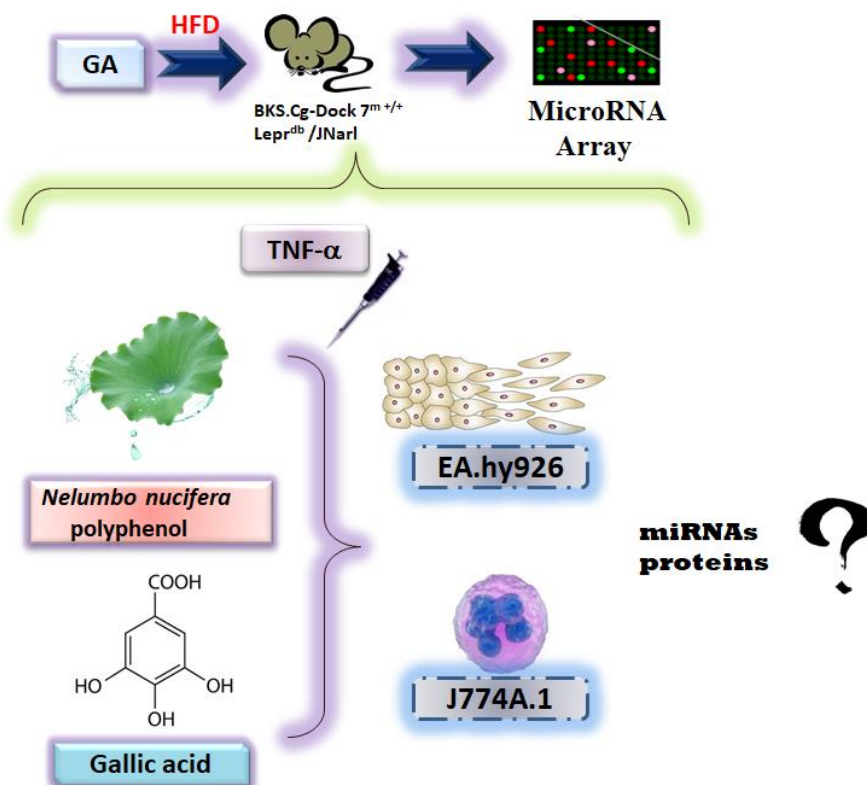
荷葉其味苦澀，性平微溫，入心、肝、脾三經，且具清解暑熱、散瘀止血之功效，主治暑溼泄瀉、水氣浮腫眩暈。荷葉始載於《本草綱目》，列於果部蓴類蓮藕項下；嫩者稱荷錢，貼水者名藕荷，出水者是芰荷。荷葉服之，令人瘦劣，單服可以消陽水浮腫之氣。《神農本草經》將蓮藕列為上品，謂其根為藕，其實為蓮，其莖葉為荷，皆指荷葉而言。而荷葉自古代唐楊貴妃飲用荷葉茶以減輕體重即著名，荷葉為常用中藥，中醫用於解「清暑利濕、升發清陽」之用，清涼解暑、止渴生津、止瀉痢、去火熱。近代臨床實驗亦多著重於荷葉對糖尿病肥胖症[59]及高血脂症的效果[60]。但近五年來，對荷葉方面研究最多的中國大陸學者則多將研究方向逐漸轉移至抗氧化領域。而過去幾年本實驗室已針對荷葉萃取物（NLE）以及多酚萃取物（NLPE）進行研究，在動物實驗方面已經證實荷葉萃取物能抑制動脈粥狀硬化發生[61]、降低血脂及排除肝脂肪堆積[57]。綜合以上得知，荷葉對於減緩糖尿病肥胖及高血脂症所帶來的附病變具有良好的功效。

(四)研究方法：

第一部分實驗架構：(第一年計畫)



第二部分實驗架構：(第二、三年計畫)



## 1-1. 荷葉多酚之製備

取 100 g 乾燥荷葉加入 300 ml 甲醇於 50°C 水浴萃取 3 小時後，過濾後收集濾液，重覆萃取 3~5 次，以減壓濃縮法乾燥，再以 500 ml 二次水回溶萃取物。之後加入 200 ml 正己烷，利用分液漏斗混合均勻兩種溶液，靜置隔夜，收集水層溶液，加入 180 ml 乙酸乙酯萃取溶於水層中的多酚成分，靜置隔夜，收集上層溶液，重覆萃取 3~5 次，利用減壓濃縮乾燥後，最後溶於 250 ml 二次水，經過真空冷凍乾燥後所得之粉末即為荷葉多酚。在各種細胞實驗之前，以此乾燥粉末溶於 50% 酒精溶液後，再經過 0.22  $\mu\text{m}$  filter 過濾除菌成為荷葉多酚萃取液(NLPE)進行後續實驗。

## 1-2. 荷葉總多酚測定

以 gallic acid(GA)和 rutin 溶液作為測定酚含量之標準品，使其最後體積為 1 ml，各加入 0.5 ml 之 2N Folin-Ciocalteu phenol reagent，以及 3 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200 g/l) 混合均勻，室溫下靜置數分鐘，再加入 5 或 10 ml 去離子水混合均勻，以 1250 $\times$ g 離心 5 分鐘，分別在波長 765 nm 及 510 nm 下測定吸光值，繪製標準迴歸曲線。荷葉多酚萃取液樣品事先稀釋，取 0.1 ml 樣品加入 0.9 ml 甲醇反應後測定吸光，依迴歸方程式計算酚含量。

## 1-3. 細胞培養(Cell culture)

本實驗所使用細胞株來自於大鼠的主動脈平滑肌細胞 (A7r5)、人類主動脈內皮細胞 EA.hy926 以及老鼠 macrophage 細胞株(J774A.1)，培養於 DMEM 培養基(含 10% fetal bovine serum (FBS), 1.0 mM sodium pyruvate, 4 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 100 units/mL penicillin, and 100 lg/mL streptomycin)，培養於 37 °C，含 5 %  $\text{CO}_2$  之培養箱，細胞密度維持在  $4\times 10^5$  ~  $1\times 10^6$ ，每週更換培養基 2~3 次。

## 1-4. 細胞活性分析(MTT assay)

活細胞會將 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 0.1 mg/mL) 代謝成藍紫色之結晶，且此結晶可溶於異丙醇，故測其吸光可得知活細胞的數目。取  $1\times 10^5$  /ml 的細胞置 24 well-plate，讓細胞貼壁後，吸乾培養液，換取新鮮的培養液，加入不同濃度的藥物，培養 24 h 後，吸乾培養液，細胞以 PBS 清洗 2 次後，換上新鮮的培養液 1 ml，加入 20  $\mu\text{l}$  MTT (25 mg/ml)。培養 3 h，移除培養液，加入 1 ml 異丙醇，均勻溶解活細胞代謝後的藍紫色結晶，離心後取上清液用波長 563nm 測吸光。

## 1-5. Migration assay (A7r5)

### 1-5-1. Wound healing assay

將 A7r5 細胞  $5\times 10^5$  種至 6 well 中 24 h 後，藉由 tip 在培養皿中劃出一道所謂的“傷口”來持續觀察細胞移動的能力。於 37 °C、5 %  $\text{CO}_2$  培養，組別分為兩大組：NLPE 和 GA 組。NLPE 組別為：Control、50 ng TNF- $\alpha$ 、50 ng TNF- $\alpha$  + 0.7 mg NLPE、50 ng TNF- $\alpha$  + 0.8 mg NLPE、50 ng TNF- $\alpha$  + 0.9 mg NLPE；GA 組別為：Control、50 ng TNF- $\alpha$ 、50 ng TNF- $\alpha$  + 50 mM/ml GA、TNF- $\alpha$  + 75 mM/ml GA、TNF- $\alpha$  + 100 mM/ml GA，並在 24 h 後將細胞以倒立顯微鏡在 400x 下觀察傷口癒合的情形，並拍照計數爬進傷口的細胞數量。

### 1-5-2. 細胞趨性分析(transwell assay)

於 transwell system 下，先將 A7r5  $1\times 10^6$  種至 10 cm dish 中，依照上述的組別進行加藥，24 h 後將細胞以 trypsin 拆下，將  $1\times 10^4$  種至 transwell 中，再放入 24 well 進行下階段試驗。在 transwell 中為 serum free medium，在 24 well 中為 10% FBS medium。經過 24 小時的反應時間後，將 transwell 以 4% paraformaldehyde 固定 1 h 至 overnight，而後去除 paraformaldehyde 後，再以 giemsa 染色，用無棉絮之棉花棒小心擦拭，最後利用倒立顯微鏡在 400X 下觀察細胞移動情形並且計數細胞能夠移動到下層數量。

## 1-6. Flow cytometric analysis

### 1-6-1. PI stain

A7r5 處理培養至 10 cm dish 中，其細胞數量為  $1\times 10^6$ ，待 24 h 更換新的培養基，分別加入 TNF- $\alpha$

以及不同濃度的 NLPE 和 GA，反應 24 h 後移除舊的培養基，以 PBS 清洗，再以 trypsin 將細胞打下，離心去除上清液，再重複的清洗及離心，將上清液去除收 pellete，將 pellete 打散加入 1 ml 70% 酒精以細胞固定，保存於-20°C。分析前先將檢體離心去除酒精，再以 PBS 清洗一次，離心後取 pellete。將 pellete 打散加入 500µl 的 PI solution (20 ug/ml propidium iodide、20 ug/ml Rnase、0.1% Triton-100) 染色 15 mins，此步驟需在避光環境進行，以 Flow cytometer (FACS) 進行分析。

### 1-6-2. Brdu stain

計數  $1 \times 10^6$  A7r5 cell 種至 10 cm dish 中，加入 10 µM BrdU 在室溫下染色 45 mins。將 BrdU 在冰上解凍，使用滅菌後的 PBS 將其稀釋為 1 mM BrdU，加入 10 µM BrdU 到每個 sample，培養細胞足夠的時間，直到細胞染上 BrdU，加入 2 mL flow cytometry staining buffer，室溫下離心 300 rpm，5 mins，丟棄上清液。接著固定細胞與利用 BrdU 在細胞內進行染色，DNase I solution 解凍，加入 flow cytometry staining buffer 到 700 µL，均勻混合，置於冰上。Resuspend the cells，加入 1 mL BrdU staining buffer，混合均勻，避光於室溫下培養 15 mins，加入 DNase I working solution 100 µL 到每個 sample，於攝氏 37°C 下避光培養 1 h，加入 2 mL flow cytometry staining buffer 沖洗細胞 2 次，離心 300 rpm，5 mins，加入 5 µL Anti-BrdU fluorochrome-conjugated Ab 到每一個 sample，混合均勻並於室溫下避光培養 20-30 mins，加入 2 mL flow cytometry staining buffer 沖洗細胞 2 次，離心 300 rpm，5 mins，利用流式細胞儀取得 data。

### 1-7. 氧化型低密度脂蛋白的製備 (LDL oxidation)

LDL 先過 PD-10 column 後，再加 10 mM CuSO<sub>4</sub> 於 37 °C 水浴槽中，一起反應 24 h，反應後再過一次 PD-10 column 即可得實驗用之 ox-LDL。而 ox-LDL 經蛋白定量將其蛋白量調整為 500 µg/ml，依實驗需求稀釋至最後反應濃度 50 µg/ml。ox-LDL 若要加入細胞反應前，須先以 0.22 µm filter 過濾除菌，避免細胞污染，並以 TBARS 法測定 ox-LDL 之氧化值達 4 以上再進行實驗。

### 1-8. Cell adhesion assay

血管內皮細胞發炎時，會增加細胞表面的黏附度。本實驗將 TNF-α (30 ng/ml) 加至 EA.hy926，同時處理不同濃度 NLPE 和 GA，24 h 之後，更換新的培養基，每組計數  $5 \times 10^4$  cell/ml，重新 seeding 到 MEM gel coating 之 24 well 中，處理 24 h，用 PBS wash 後，於顯微鏡底下觀察 cell adhesion 的情況。

### 1-9. 泡沫細胞生成試驗 (foam cell formation assay)

觀察泡沫細胞(foam cell)的形成，是以油紅染劑 (oil-Red O) 將細胞內中性脂肪染成紅色再加以觀察。J774A.1 細胞 ( $1 \times 10^5$  cell/well) 在同時處理不同濃度 NLPE 和 GA，以及事先氧化後之 ox-LDL (50 µg/mL) 24 小時後，將培養液移除，並以 PBS 清洗兩次，再以 10% para-formaldehyde 將細胞固定 1 小時。移除固定液，並以 PBS 清洗兩次，再以 50 % 異丙醇浸潤片刻，加入 60% oil-Red O 染劑覆蓋細胞，15-20 分鐘後移除染劑，以 PBS 清洗三次(15 分鐘/次)。完成上述步驟後，於光學顯微鏡下，觀察細胞內有無被染為深紅色的脂肪油滴，即為泡沫細胞。

### 1-10. 蛋白質萃取及定量

#### 1-10-1. 蛋白質萃取物製備

將加藥處理後的細胞收集好，加入細胞溶解緩衝液(RIPA buffer：150mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % deoxycholic acid, 0.1% SDS, pH7.5) 及蛋白質水解酶抑制劑(sodium orthovanadate(100mM/ml)), leupeptin(10 mM/ml) 及 PMSF(100mM/ml)，在 4°C 下震盪 4 h，再以 4°C 高速離心 13200 rpm，30 mins，吸取上清液到新的微量離心管中，儲存在-20°C，此上清液為細胞全部蛋白之萃取液。

#### 1-10-2. 蛋白質定量

利用 Coomassie brilliant blue G250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595nm 下有一較大之吸光值，以此來定量蛋白質。先以 8 mg/ml 胎牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA) 來畫標準曲線，做為蛋白質定量的依據，以不同濃度 BSA 做標準曲線，依下表比例加入試劑，混合均勻。取各濃度的 BSA 及待測樣品各 30µl 加入 1ml Coomassie blue，室溫下避光反應 10 mins，於波長 595 nm 下測定吸光值變化，最後將樣本與標準曲線對照後計算出待測物之蛋白質濃度。

## 1-11. 西方墨點法 (Western blotting)

### 1-11-1. 樣品(sample)配製

取定量之蛋白液(50  $\mu$ l)，以去離子水補至固定體積後加入五倍的 loading dye 混合均勻並以 100°C 加熱 10 mins，待加熱完將樣品置於冰上快速冷卻 5 mins 隨後以 8000 rpm 離心 5 mins 即可。

### 1-11-2. 鑄膠

將電泳玻璃洗淨後擦拭，組裝置電泳座上固定，若要分析小分子蛋白則配製 12~15% 的下層 separating gel；若要分析的是大分子蛋白就配 8~10% 的 separating gel。將配下層膠所需溶液混勻後注入玻璃片中至固定高度，加入 30% 酒精把下膠壓平，待膠凝集後將 30% 酒精倒掉並吸乾。隨後配製上層 stacking gel 並注入玻璃片中，插入電泳槽齒梳，待上膠凝後以去離子水將殘留在 well 內的上膠清洗乾淨。

### 1-11-3. SDS-PAGE

首先將電泳液(running buffer)倒入電泳槽內槽中，再把處理好之蛋白質樣品小心注入 well 中，其中一個 well 注入 protein standard marker，樣品 loading 完後持續加入新的電泳液於內槽至覆蓋整個玻璃。連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 70 伏特電壓開始進行電泳，直至樣品進行到 stacking gel 與 separating gel 的交界處後再切換成 100 伏特電壓，當色帶進行至底線時才停止電泳。

### 1-11-4. 蛋白樣本之轉漬(electrotransfer)

電泳完畢後將膠體取出，截去上層膠的部分，將膠體置於兩張經轉漬液(transfer buffer)濕潤過的濾紙上，膠體上面再放上與膠體大小相同的硝化纖維膜，再放上兩張浸濕的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在各層中的氣泡，最後用含有海棉襯墊的夾板夾緊，放入轉漬槽中，以固定 100 伏特轉漬 2 小時。

### 1-11-5. 免疫墨點法(immunoblot)

轉漬完將硝化纖維紙取出，以 5% blocking buffer 於室溫下作用 1 h。隨後將 blocking buffer 倒掉，再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 mins，換上一級抗體，置於 4°C 下作用 overnight，隔天再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 mins，接著換上二級抗體，於室溫下反應 1 h，再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 mins，最後加入 ECL 顯色，並以冷光儀偵測。

## 1-12. RNA 抽取(Isolation of RNA)

計數  $1 \times 10^6$  A7r5 cell 種至 10 cm dish 中，經加入 TNF- $\alpha$  以及不同濃度的 NLPE 和 GA，反應 24 h 後移除舊的培養基，以 PBS 清洗後，加入 400  $\mu$ L water/mL NucleoZOL reagent (Macherey-Nagel) 10 mins 後拆下，而後劇烈搖晃 15 s，放置室溫下 10 mins 反應，之後離心 12,000 g 10~15 mins。接著小心吸取上清液 300  $\mu$ L，加入 1 mL 100% isopropanol /mL，使之沉澱 10 mins(室溫中)至 overnight(放置-20°C)，之後離心 12,000 g 10~15 mins，底下白色沉澱物為 RNA。之後用 500  $\mu$ L 75% ethanol wash，離心 4000-8000g 1~3 mins 兩次，去除上清液後，加入 DEPC 水 40  $\mu$ L，56°C 10 mins 後，稀釋 250 倍，以波長 260/280 nm 測其吸光計算 ratio 值，理想 ratio 值為 1.8~2.0。

## 1-13. 反轉錄 cDNA

使用 TaqMan® SmallRNA Assays 試劑盒 (Applied biosystems) 進行 cDNA 的逆轉錄。每 15- $\mu$ L RT 反應使用 RNA 濃度為 1~10 ng。每個 RT 混合物與 RNA 以下列比例進行調配：7  $\mu$ L RT master mix (100mM dNTPs (with dTTP) 0.15  $\mu$ L、MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/ $\mu$ L 1  $\mu$ L、10X Reverse Transcription Buffer 1.50  $\mu$ L、RNase Inhibitor, 20 U/ $\mu$ L 0.19  $\mu$ L and Nuclease-free water 4.16  $\mu$ L)、5  $\mu$ L total RNA (1 to 10 ng per reaction) and 3  $\mu$ L of 5X RT primer (2.5  $\mu$ M)。全部加至 tube 後 spin down，放置冰上 5 mins 後，以下列條件進行反轉錄：

Step	Time	Temperature
Hold	30 minutes	16 °C
Hold	30 minutes	42 °C
Hold	5 minutes	85 °C
Hold	$\infty$	4



反應完後，放置-20°C 進行保存。

### 1-14. miRNA SYBR Green I assay protocol

本實驗使用 2×LightCycler FastStart SYBR Green I master mix (Roche Diagnostics)來進行 Real time PCR 實驗。整體 PCR 混合物如下：6 μL nuclease-free water、10 μL SYBR Green I master mix、1 μL forward primer (10 μM)、1 μL reverse primer (10 μM)。Primer 序列如下：

rno-miR-21-5p	miRNA sequence	5'uagcuuaucaucagacugauguuga3'	PTEN
	RT primer	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACTcaaca	
	Forward primer	cgctgaTAGCTTATCAGACTGA (Tm:55.99)	
rno-miR-143-3p	miRNA sequence	ugagaugaagcacuguagcuca	RAS
	RT primer	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACTgagct	
	Forward primer	gaacgTGAGATGAAGCACTGT (Tm:56.37)	
rno-miR-145-5p	miRNA sequence	guccaguuuuccaggaaucucu	RhoA
	RT primer	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACTcaggat	
	Forward primer	atGTCCAGTTTTCCAGGA (Tm:56.34)	
hsa-miR-199a-3p	miRNA sequence	acaguagucugcacauugguua	NFKB1
	RT primer	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACTaacca	
	Forward primer	tgcgACAGTAGTCTGCACAT (56.37)	
hsa-miR-874-5p	miRNA sequence	5'cggccccacgcaccagguuaga3'	ICAM1
	RT primer	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACTcttac	
	Forward primer	GCCCCACGCACCAG (57.21)	
hsa-miR-15a-3p	miRNA sequence	5'caggccauauugugcugccuca3'	VCAM1
	RT primer	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACTgaggc	
	Forward primer	aacCAGGCCATATTGTGCT (56.49)	
hsa-miR-485-5p	miRNA sequence	5'agaggcuggccgugaugaauuc3'	CCL2 (MC)
	RT primer	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACTgaaattc	
	Forward primer	AGAGGCTGGCCGTGAT (55.92)	
mmu-miR-499-5p	miRNA sequence	uuuagacuugcagugauguuu	SR-A
	RT primer	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACTaaacat	
	Forward primer	cgcgTTAAGACTTGCAGTGA(Tm:56)	
mmu-mir-677-5p	miRNA sequence	uucagugaugauuagcuucuga	SOD-1
	RT primer	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACTcagaa	
	Forward primer	gcgcgTTCAGTGATGATTAG (Tm:56.7)	
		Universal Reverse primer:gtcgagggtccgaggt (Tm:56.14)	

### 1-15. Anti-miRNAs transfection

本實驗使用 AllBio Custom RNA 系統來進行 Cell transfection。開始將 Serum-free Culture medium 或 HBS buffer (pH7.4 150mM NaCl, 20mM HEPES)加至無菌 1.5 mL eppendorf 中，之後再加入 anti-miRs 5~50 pmol 混合均勻；接著拿另一管無菌 1.5 mL eppendorf，同樣加入 Serum-free medium or HBS buffer，再將 T-Pro NTR II Transfection Reagent 1~5μl 加入，再將兩管混合均勻後，放置室溫下 15 mins。之後再加入到細胞中，而實驗細胞數為  $1 \times 10^6$ ，再依照各個細胞不同條件，加入適當濃度的 T-Pro NTR II Transfection 和 anti-miRs 後，在 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator 中放置 18-48 h，之後再以 western 觀察細胞 tranfection 的情形。

### 1-16. 動物實驗模式

動物實驗方面以高油脂膽固醇飲食誘導小鼠形成動脈粥狀硬化之模式，使用 6 週之 BKS.Cg-Dock 7<sup>m +/+</sup> Lepr<sup>db</sup> /JNarl 品系小鼠給予高膽固醇飲食誘導後，再以管餵的方式餵食 GA (8mg/kg)，而後觀察其體重、內臟脂肪重、心血管組織病理切片觀察以及進行 Mouse&Rat miRNA OneArray 實驗以檢測給予誘導 db/db 老鼠是否有隨著給予 GA 回復至正常表現。高油脂飼料配方如下圖，組別可分為四組：control

組、db/db 組、db/db+HFD 組、db/db+HFD+GA 組，每組各三隻，GA 組別每日管餵(8 mg/kg)。所有實驗動物最後於第八週結束時秤重後全部犧牲，採取周邊脂肪、內臟脂肪、心血管及主動脈弓的部分。心血管部分，放置在 RNA 保存液中，並保存在-80°C，之後用於 Mouse&Rat miRNA OneArray 實驗。主動脈弓部分，則固定於 10%的中性福馬林 (formaline) 液中，石蠟包封切片後來進行組織免疫染色病理學觀察。

### 1-17. 免疫組織染色 (Immunocytochemistry)

利用組織免疫染色法觀察病理現象，實驗方法如下：

1. 烤片：將空白片置於烘箱中 (60°C、30 mins)，使臘溶解。
2. 脫臘：Xylene (第一缸) 5 mins → Xylene (第二缸) 5 mins → Xylene (第三缸) 5 mins。
3. 回水：100 %酒精 5 mins → 95 %酒精 5 mins → 75 %酒精 5 mins ddH<sub>2</sub>O 5 mins。
4. 用檸檬酸鈉緩衝溶液 (0.01 M, pH 6.0) 中煮沸 10 mins。
5. PBS-T 沖洗：用滴管吸取 PBS-T 沿載玻片沖洗 3 次。
6. Block：Hydrogen Peroxide Block，室溫下 10 mins。
7. PBS-T 沖洗：用滴管吸取 PBS-T 沿載玻片沖洗 3 次。
8. Ultra V Block：室溫下 5 mins。
9. PBS-T 沖洗：用滴管吸取 PBS-T 沿載玻片沖洗 3 次。
10. 一級抗體 (primary antibody)：利用 TBS 稀釋抗體，並須完全覆蓋檢體，37°C、1 h。
11. PBS-T 沖洗：用滴管吸取 PBS-T 沿載玻片沖洗 3 次。
12. 二級抗體 (secondary antibody)；完全覆蓋檢體，室溫、10 mins。
13. PBS-T 沖洗：用滴管吸取 PBS-T 沿載玻片沖洗 3 次。
14. 呈色：加入呈色劑 DAB (1 ml buffered substrate+1 drop DAB)。
15. PBS-T 沖洗：用滴管吸取 PBS-T 沿載玻片沖洗 3 次。
16. 染色：蘇木紫 (hematoxylin) 染色 3 mins。
17. 脫水：75 %酒精 5 mins → 95 %酒精 5 mins → 100 %酒精 5 mins → Xylene (第三缸) 5 mins → Xylene (第二缸) 5 mins → Xylene (第一缸) 5 mins。
18. 封片：利用封片膠將蓋玻片覆蓋於組織上，以便保存。

### 1-18. Microarray Analysis

將 total RNA 取 2 µg，用 ULSTM Labeling Kit (Kreatech Diagnostics, The Netherlands) 進行螢光標的。藉由 NanoSep 100K (Pall Corporation, USA) 將 miRNAs 進行標的後，透過 OneArray® Hybridization Chamber 與含有 Phalanx hybridization buffer 在 Mouse miRNA OneArray® 進行雜交。在 16 小時雜交後，洗去非特異性 binding target。使用 DNA 微陣列掃描儀 (Model 4000B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 掃描載玻片。再通過 GenePix 4.1 軟體 (Molecular Devices) 分析每個斑點的 Cy5 螢光強度。每個 sample 在測試時進行二重複，以減少 error 值的產生。接著利用 R language 分析每個樣品的訊號強度。同時將每個探針進行三重複測試，將數值取平均數後，再計算 mean ± SD 值。而樣本差異性使用 Student T test 計算出 P 值，當 P 值小於 0.05 時即表示兩樣本在統計學上具有明顯差異。

### 1-19. 統計分析方法

本研究使用 SigmaPlot 10 來進行數據處理、分析及繪圖，每個實驗至少進行三次。實驗結果數據統計之表示方式為平均值±標準誤差(mean ± SD)。而樣本差異性使用 Student T test 計算出 P 值，當 P 值小於 0.05 時即表示兩樣本在統計學上具有明顯差異。

## (五)結果與討論：

### 第一部分：NLPE 和 GA 調控 miRNAs 抑制血管平滑肌細胞增生和轉移

#### 1. 老鼠體重和脂肪數據

Db/db 老鼠餵食期間每週測量體重以及紀錄體重變化量，為期 8 週。在體重方面，HFD 組別體重與 control 組相比體重有明顯增加的趨勢，而在餵食 GA 之後，體重會有明顯下降的情況(Fig. 1)。在肝重、腸系膜以及副睪脂肪的觀察中，可以看到在 HFD 組別脂肪含量明顯要比 control 組多，而在餵食 GA 組別脂肪含量會隨著劑量的增加逐漸減少(Table. 1)。

#### 2. NLPE 和 GA 對心血管內 NF- $\kappa$ B、Ras 和 RhoA 的影響

在第一部分細胞實驗中，已經驗證 NLPE 和 GA 對於血管平滑肌細胞因發炎導致增生和轉移的情況有明顯抑制的效果，接下來在動物實驗方面就來觀察在 IHC 染色中，相關發炎蛋白的表現是否也具有有一致性。而在之前的文獻中指出，NF- $\kappa$ B 在血管內皮細胞發炎的初期，會調控下游 VCAM-1、ICAM-1 和 MCP-1 的表現，所以在 IHC 主要觀察 NF- $\kappa$ B、Ras 和 RhoA 的表現情況。由圖中可以發現，在 db/db+HFD 的組別，NF- $\kappa$ B、Ras 和 RhoA 相較於 control 和 db/db 組別，表現均有明顯的增加。而在管餵 GA 的組別，相關蛋白的表現均會受到抑制的情況(Fig. 2)。

#### 3. NLPE 和 GA 對心血管中 miRNAs 的分析

在觀察完血管中 NF- $\kappa$ B、Ras 和 RhoA 表現後，接著針對心血管中 miRNAs 表現，利用 Mouse&Rat miRNA OneArray 進行觀察。由於數據過於龐大（共 401 組數據），故針對 db/db+HFD 組與 db/db+HFD+GA 組來進行比較後，在對照網路上 data base，找出與血管內皮細胞和巨噬細胞相關 target 之新的 miRNAs(Fig. 3)。

#### 4. HPLC Assay for NLPE.

由高速液相層析儀分析試驗結果顯示出荷葉多酚萃取物具有 18 項可知多酚類成分(Table. 2)。圖中 1, gallic acid (GA)  $22.35 \pm 0.15\%$ ; 2, protocatechuic acid (PCA)  $7.97 \pm 0.23\%$ ; 3, catechin (C)  $2.38 \pm 0.11\%$ ; 4, gallic acid gallate (GCG)  $5.14 \pm 0.31\%$ ; 5, caffeic acid (CA); 6, epicatechin (EC)  $0.65 \pm 0.07\%$ ; 7, p-coumaric acid (p-CA)  $8.22 \pm 0.19\%$ ; 8, rutin (R)  $36.53 \pm 0.28\%$ ; 9, ferulic acid (FA); 10, gossypin (G); 11, hesperetin (H); 12, resveratrol (RV); 13, quercetin (Q)  $4.03 \pm 0.05\%$ ; 14, naringenin (N); 15, hydroxyflavin (F10H)。

#### 5. NLPE、GA and rutin 對血管平滑肌細胞之毒性測試

將老鼠血管平滑肌細胞 A7r5 加入不同劑量的 NLPE、GA 和 rutin 培養 24 小時後，利用 MTT 之細胞毒性測試法觀察細胞存活的情形。結果顯示，經過 24 小時，推算出 NLPE IC50 為  $1.672 \text{ mg/mL}$ ; gallic acid IC50 為  $231.324 \mu\text{M}$ ；而加入 rutin 則不會對細胞造成顯著的影響。但須篩選出 NLPE、GA 和 rutin 對於細胞生長之無顯著影響的濃度，排除 NLPE 及其有效成分影響細胞生長之因素，以進行細胞移動與侵襲之試驗分析(Fig. 4A-4C)，其中觀察到 rutin 並不會影響細胞增生或凋亡的情況，故往後實驗主要以 NLPE 和 GA 為實驗主軸。

#### 6. NLPE、GA 對血管平滑肌細胞移動能力之影響

動脈粥狀硬化的過程中，因發炎引起血管平滑肌細胞的位移是造成血栓形成的主因之一。首先，利用傷口癒合試驗(wound-healing assay) 測試 NLPE 和有效成分對 A7r5 細胞之移動能力情形。結果發現：A7r5 細胞暴露在  $50 \text{ ng/ml TNF-}\alpha$  下，細胞會有明顯移動的現象，在加入濃度  $0.7、0.8、0.9 \text{ mg/ml}$  之 NLPE，GA  $50、75、100 \mu\text{M}$ ，24 小時後，實驗結果發現細胞在  $0.7 \text{ mg/mL}$  NLPE 處理下可達約抑制  $58.4\%$  之傷口癒合，提高濃度至  $0.9 \text{ mg/mL}$  則傷口癒合抑制作用約  $73.2\%$ 。同樣的將細胞處理 GA 24 小時之後，實驗結果指出 GA 在濃度  $50$  與  $100 \mu\text{M}$  約分別抑制  $68.3\%$  及  $79.1\%$  之傷口癒合。兩種藥物抑制結果呈現 dose-dependent(Fig. 5A)。

另外利用 transwell assay 驗證 NLPE 和 GA 確實能影響 A7r5 細胞之移動能力。結果發現細胞在  $0.7$  與  $0.9 \text{ mg/mL}$  NLPE 處理下細胞移動情形分別可達超過  $29.3\%$  與  $69.7\%$  被抑制；將細胞處理 GA 24 小時

之後，實驗結果指出 GA 在濃度 50 與 100  $\mu\text{M}$  約分別抑制 52.2% 及 77.4%，且皆呈現濃度依賴性(Fig. 5B)。

## 7. NLPE、GA 對血管平滑肌細胞增生之影響

在過去文獻指出，當血管產生發炎反應會促使血管平滑肌細胞增生，是造成血栓形成的原因之一 [7]。在細胞增生的過程中，cell cycle 中 S phase (synthesis phase-DNA and centrosomes replicated) 比例會明顯提高。在本實驗中，利用流式細胞儀(Flow cytometry)觀察 NLPE 和有效成分對 A7r5 細胞之增生能力情形。結果發現，加入 50 ng TNF- $\alpha$  後，cell cycle S phase 增加 20.3%，G0/G1 減少 23.4%。當細胞暴露在濃度 0.7、0.8、0.9 mg/ml 之 NLPE，GA 50、75、100  $\mu\text{M}$ ，經過 24 小時 cell cycle S phase 在 NLPE 組別顯示隨著濃度分別減少 3%、12%、15.3%，G0/G1 增加 13.6%、22.8%；GA 組別 cell cycle S phase 減少 4.9%、15.8% 及 17%，G0/G1 增加 1.9%、16.2%、17.1%，均顯示濃度依賴性(Fig. 6A)。

另外再從 BrdU 染色來看 DNA 合成的情況。在本實驗中，利用流式細胞儀(Flow cytometry)染 BrdU 觀察 NLPE 和 GA 對 A7r5 細胞之增生能力情形。結果發現，加入 50 ng TNF- $\alpha$  後，DNA 合成率會增加 192.32% 和 195.34%。當細胞暴露在濃度 0.7、0.8、0.9 mg/ml 之 NLPE，GA 50、75、100  $\mu\text{M}$ ，經過 24 小時 DNA 合成率分別會被抑制與 control 組類似的表現情況(Fig. 6B)，結果顯示 NLPE 和 GA 均抑制 A7r5 細胞增生，但不會影響細胞存活率。

## 8. NLPE、GA 對血管平滑肌細胞增生之機制探討

前面結果得知 NLPE 和其有效成分能抑制因發炎所造成血管平滑肌細胞增生的現象，因此近一步用 qPCR 和 Western blot 來分析其機制。首先我們觀察發炎情況和相關發炎蛋白 RAS、KSR2、iNOS、NF- $\kappa\text{B}$  表現，文獻指出 RAS 和 NF- $\kappa\text{B}$  的表現會調節血管平滑肌細胞增生的過程，而 KSR2 會抑制 RAS 的表現，減緩因發炎引起細胞增生的情況。另外 iNOS 的表現會促使 NO 的合成來降低血管平滑肌細胞增生的情況 [8]。根據實驗結果，在隨著 NLPE 和 GA 濃度上升，可降低由 TNF- $\alpha$  誘導 NF- $\kappa\text{B}$  表現，同時也增加了 KSR2 和 iNOS 的表現 (Fig. 7)。而在過去的研究中指出 RAS 和 PI3K/Akt/ERK1/2 pathway 在發炎情況下的表現會促使細胞進行增生。實驗結果中顯示，在處理不同濃度的 NLPE 和 GA 後，RAS 和 PI3K/Akt/ERK1/2 pathway 表現會有抑制的情況，且呈現劑量依賴性(dose-dependent)的趨勢。在過去文獻中指 miR-21 能藉由抑制 PTEN 來促進 Akt/ERK1/2 的表現 [9]，miR-143 能有效降低 RAS 和下游蛋白 Akt、PI3K 的活性表現 [10]。於是我們觀察在以 TNF- $\alpha$  誘導的情況下加入 NLPE 和 GA 後 miR-21 和 miR-143 的表現，發現在加入 TNF- $\alpha$  和不同劑量 NLPE 和 GA 後，miR-21 在加入 TNF- $\alpha$  時表現量會明顯提高，在處理 NLPE 和 GA 後，表現量會隨著濃度降低，且 miR-21 調控 PTEN、Akt/ERK1/2 分別會有抑制或加強的現象；而 miR-143 在 TNF- $\alpha$  誘導的情況下呈現下降的趨勢，而在加入不同濃度 NLPE 與 GA 後則有回復的現象，且 miR-143 調控之 RAS 和下游蛋白 Akt、PI3K 表現均被抑制(Fig. 8)。這些實驗數據證實了 NLPE 與 GA 藉由調控 KSR2、iNOS 與 NF- $\kappa\text{B}$  降低血管平滑肌細胞發炎導致增生的現象，且進一步證實 miR-21 和 miR-143 可影響 PTEN、RAS、PI3K/Akt/ERK1/2 來減緩發炎增生的情況。

## 9. NLPE、GA 對血管平滑肌細胞轉移機制探討

在過去研究中有針對 miR-145 調控 Rho GTPase protein 和 Src 影響細胞骨架蛋白的構成，使細胞結構鬆散產生空隙，進而造成細胞轉移 [24]。在本實驗中發現 TNF- $\alpha$  會增加 RhoA、Rac1、CDC42 和 Src，降低 miR-145 表現，經處理不同濃度 NLPE 和 GA 後，可觀察 RhoA、Rac1、CDC42 和 Src 表現降低，提高 miR-145，且呈現劑量依賴性(Fig. 9)。這些實驗數據證實了 NLPE 及 GA 會透過影響 miR-145 調節細胞骨架蛋白 RhoA、Rac1 和 CDC42 的表現，減緩細胞因發炎位移的情況。

利用 anti-miRs 驗證 NLPE 和 GA 藉由影響 miRNAs 調控增生和轉移蛋白表現

由前面結果得知，NLPE 和 GA 能抑制因發炎所造成血管平滑肌細胞增生和轉移的現象，因此近一步以 anti-miRs 抑制 miRNAs 表現後，用 Western blot 來分析其反證機制。由結果可以得知，在 transfect anti-miR-21 後，PTEN 表現有回復的趨勢，同時再加入 100  $\mu\text{M}$  GA 後，PTEN 表現會有加成的表現，得知 GA 可有效調控 miR-21 的表現來增加 PTEN 的表現。而在 transfect anti-miR-143、anti-miR-145 後，RAS 和 RhoA 表現均有增加的趨勢。而在處理 GA 之後，RAS 和 RhoA 會有些許被抑制的情況，因此可得知 GA 可藉由調控 miR-143、145 來減少 RAS 和 RhoA 的表現量(Fig. 10)。

## 第二部分：NLPE 和 GA 調控 miRNAs 抑制血管內皮細胞黏附度和泡沫細胞形成之機制

### 10. NLPE 和 GA 對血管內皮細胞和巨噬細胞之毒性測試

將老鼠血管內皮細胞 EA.hy926 加入不同劑量的 NLPE 和 gallic acid 培養 24 h 後，利用 MTT 之細胞毒性測試法觀察細胞存活的情形。結果顯示，經過 24 h，推算出 EA.hy926 NLPE IC<sub>50</sub> 為 1.43 mg/mL；GA IC<sub>50</sub> 分別為 93.23  $\mu$ M。但須篩選出 NLPE 和 GA 對於細胞生長之無顯著影響的濃度，排除 NLPE 及 GA 影響細胞生長之因素，以進行細胞黏附度分析(Fig. 12)。

### 11. NLPE、GA 對血管內皮細胞黏附度之影響

動脈粥狀硬化的過程中，因發炎引起血管內皮細胞的黏附度增加是造成血栓形成的主因之一。利用細胞黏附度實驗(adhesion assay) 測試 NLPE 和 GA 對 EA.hy926 細胞之黏附能力情形。結果發現：EA.hy926 細胞暴露在 30 ng/ml TNF- $\alpha$  下，細胞黏附度會有增加的現象，在加入濃度 0.2、0.4、0.6 mg/ml 之 NLPE，GA 20、40、60  $\mu$ M，24 小時後，實驗結果發現細胞在 0.4 mg/mL NLPE 處理下可達約抑制 45.47% 之細胞黏附情形，提高濃度至 0.6 mg/mL 則細胞黏附抑制作用約 67.01%。同樣的將細胞處理 GA 24 小時之後，實驗結果指出 GA 在濃度 40 與 60  $\mu$ M/ml 約分別抑制 30.29%及 29.89%之細胞黏附。兩種藥物抑制結果呈現 dose-dependent(Fig. 13)。

### 12. NLPE、GA 對血管內皮細胞發炎黏附機制探討

前面結果得知 NLPE 和其有效成分能抑制因發炎所造成血管內皮細胞黏附的現象，因此近一步用 Western blot、qPCR 和 Luciferase assay 來分析其機制。首先我們觀察發炎情況和相關蛋白 NF- $\kappa$ B、VCAM-1、ICAM-1 和 MCP-1 的表現，文獻指出 NF- $\kappa$ B、VCAM-1、ICAM-1 和 MCP-1 表現會增加血管內皮細胞的黏附性[8]。而根據 RNA22 tools、MIRSYSTEM 以及 TargetScan 網站上預測新的 miRNA target 與其相關蛋白 NF- $\kappa$ B、VCAM-1、ICAM-1 和 MCP-1 的表現，從中挑選出、hsa-mir-199a-3p、hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p 以及 hsa-mir-485-5p 來觀察(Fig. 14)。一開始我們針對其上游蛋白 NF- $\kappa$ B 和其相對應之 hsa-mir-199a-3p，利用 Western blot、qPCR 和 Luciferase assay 來觀察。於是我們實驗在以 TNF- $\alpha$  誘導 hsa-mir-199a-3p 有下降的趨勢，其 target 蛋白 NF- $\kappa$ B 表現量則會增加；而在加入 NLPE 和 GA 後，hsa-mir-199a-3p 表現會有回復的情況，同時使 NF- $\kappa$ B 的表現下降。接著進一步利用 Luciferase assay 觀察 hsa-mir-199a-3p 是否 target 到 NF- $\kappa$ B 3' UTR 的位置。結果顯示，在 transfect anti-miR-199 後，其 NF- $\kappa$ B luciferase 表現會有上升的情況，在 Western blot 也有類似的情形，證明 hsa-mir-199a-3p 確實 target 到 NF- $\kappa$ B 3' UTR 的位置上(Fig. 15)。接著加入 NLPE 和 GA 後觀察 hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p 以及 hsa-mir-485-5p 與其 target 蛋白的表現，發現在加入 TNF- $\alpha$  後，hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p 以及 hsa-mir-485-5p 表現量會明顯降低，在處理 NLPE 和 GA 後，表現量會隨著濃度提高，且 hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p 以及 hsa-mir-485-5p 調控 VCAM-1、ICAM-1、MCP-1 會有被抑制的現象(Fig. 16)。這些實驗數據證實了 NLPE 與 GA 藉由調控 hsa-mir-199a-3p、hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p 以及 hsa-mir-485-5p 來影響其 target 蛋白出 NF- $\kappa$ B、VCAM-1、ICAM-1 和 MCP-1 降低血管內皮細胞發炎導致細胞黏附增加的現象。

### 13. NLPE 和 GA 對血管巨噬細胞之毒性測試

將巨噬細胞 J774.A1 加入不同劑量的 NLPE 和 GA 培養 24 h 後，利用 MTT 之細胞毒性測試法觀察細胞存活的情形。結果顯示，經過 24 h，推算出 J774.A1 NLPE IC<sub>50</sub> 為 0.97mg/mL；GA IC<sub>50</sub> 分別為 174.34  $\mu$ M。但須篩選出 NLPE 和 GA 對於細胞生長之無顯著影響的濃度，排除 NLPE 及 GA 影響細胞生長之因素，以進行油脂攝取氧化情形分析(Fig. 17)。

### 14. NLPE、GA 對血管巨噬細胞 J774.A1 oxLDL 堆積之影響

動脈粥狀硬化時，血管內的巨噬細胞會吞噬 oxLDL 形成 foam cell，而 foam cell 會釋放出 cytokine 和堆疊在血管壁中造成血栓的產生。由 Fig. 5 證實 NLPE、gallic acid 具有抑制 J774.A1 細胞 oxLDL 堆積能力。由實驗結果發現處理 50 ng/ml TNF- $\alpha$  後，oxLDL 堆積表現量增加，而在加入 NLPE 0.2、0.4、0.6 mg/mL，oxLDL 的堆積分別受到 10.25%、23.12%及 39.25%的抑制；而處理 GA 20、40、60  $\mu$ M/ml，oxLDL 的堆積分別受到 5.23%、15.25%及 27.25%的抑制，且皆呈現濃度依賴性(Fig. 18)。

## 15. NLPE、GA 對血管巨噬細胞吞噬 oxLDL 之機制探討

在本研究中著重在探討巨噬細胞吞噬 oxLDL 的機制，在過去實驗室文獻中發現 oxLDL 會誘導 SR-A，降低 SOD-1 的表現，經處理不同濃度 NLPE 和 GA 後，可觀察 SR-A 表現降低，SOD-1 的表現量提高，藉由 SOD-1 清除 oxLDL 的功能來減少巨噬細胞上 SR-A 吞噬 oxLDL 的表現且呈現劑量依賴性。而根據 microRna.org 和 TargetScan 挑選出 mmu-mir-499-5p 和 mmu-mir-677-5p 分別觀察對於 target SR-A 和 SOD-1 的表現(Fig. 19)。而在經過 oxLDL 的誘導後，mmu-mir-499-5p 表現會明顯降低，在加入 NLPE 和 GA 後 mmu-mir-499-5p 表現會提高，進而降低 SR-A 表現；另外經過 oxLDL 的誘導後，mmu-mir-677-5p 表現會提高，在加入 NLPE 和 GA 後表現會明顯降低，進而提高 SOD-1 表現，以上都有劑量依賴性(Fig. 20)。這些實驗數據證實了 NLPE 及 GA 會透過影響 mmu-mir-499-5p 和 mmu-mir-677-5p 調節 SR-A 和 SOD-1 的表現，減緩泡沫細胞形成發炎和凋亡的情況。

### (六)討論

動脈粥狀硬化為慢性發炎疾病，由於早期並無明顯的病徵，通常都是在病發時才會有所察覺，因此科學家極力在預防動脈粥狀硬化形成為主要研究的目標[66]。歷經多年的研究，對於這一複雜病理過程已有了更深入的認識。發現並證實與動脈粥狀硬化相關基因成為當前機制研究的熱點，因為這些基因及其產物可能成為預防血栓形成或是患者預後的重要指標；因此研發並且探討天然萃取物對於血管抗發炎作用之影響，實為目前研究發展之重要方向。

在動脈粥狀硬化形成的過程中，因發炎反應使血管壁中 TNF- $\alpha$  活化造成 vascular smooth muscle cell migration 和 proliferation，因此在本實驗中主要以 TNF- $\alpha$  誘導來模擬血管發炎的情況[67]。在以 A7r5 血管平滑肌細胞研究模式下，發現 NLPE 和 GA 可減緩 TNF- $\alpha$  誘導的發炎反應，同時調控因發炎所導致細胞增生和位移的現象。先前文獻指出，當血管平滑肌細胞處於發炎反應時，cell cycle 中 S phase 有增加的趨勢，同時也影響 RAS、PTEN、PI3K/Akt/ERK1/2 pathway，和 miR-21 和 miR-143 的調控，促使細胞增生。另一方面實驗也指出 miR-145 藉由調控 Rho GTPase protein 來影響血管平滑肌細胞發炎時位移的情況[68]。而本實驗中發現，rutin 在劑量 100  $\mu$ M~1000  $\mu$ M 並不會影響細胞增生和轉移的情況，因此在本篇實驗後續並無繼續針對 rutin 做更進一步的探討。另外在血管內皮細胞方面，過去文獻中指出 NF- $\kappa$ B 會調節下游 VCAM-1、ICAM-1、MCP-1 的表現[69]，造成血管黏附度增加，促使血液中 monocyte 和血小板大量聚集在血管壁上[70]。而當血管內皮細胞發炎或處在高血脂時，會造成內皮細胞之間通透性增加，使單核球進入到血管中分化成 macrophage，此時 macrophage 會吞噬進入到血管中的 oxLDL，進而形成 foam cell，而當 foam 釋放出 cytokine 造成血管持續發炎時，一方面血管內皮細胞會因為發炎導致黏附度增加而後導致凋亡的情況，而在血管內，血管平滑肌細胞會不斷的增生和轉移，泡沫細胞持續的堆積、凋亡，再加上血液中血小板和纖維蛋白不斷的堆積黏附，以上種種原因就造成了血管栓篩，導致動脈粥狀硬化。

過去文獻中指出，miR-21 會與結直腸癌細胞中 Pcd4 的 3' UTR 結合造成轉移和侵襲的情況[71]。另一項研究說明 miR-21 作為致癌基因，調節乳腺癌細胞中 bcl-2 等基因造成腫瘤生長[72]。miR-145 會抑制 RhoA/ROCK1 pathway 減少 U87 膠質瘤細胞轉移的情形，此外在血管分化的過程中，miR-145 在其中扮演重要的角色[73, 74]。而 miR-143 和 miR-145 在血管中扮演調解血壓和血管重塑的作用[74]。而在之前指出，miR-21 可以藉由降低 PTEN 的表現來促使血管平滑肌細胞的增生；另一方面，miR-143 可藉由與 RAS 3' UTR 結合後，使 RAS 表現被抑制[75]。miR-145 在最近的文獻中指出，可和 RhoA 3' UTR 結合後抑制 RhoA 表現，減少細胞骨架的 remodeling，進而降低轉移的機率[76]。基於以上文獻參考，第一部分實驗設計上就以 miR-21、miR-143 和 miR-145 為實驗主架構，再利用 NLPE 和 GA 觀察是否可以藉由影響 miRNAs 的表現來抑制或增加下游 target proteins 的表現，進而去減少平滑肌細胞因發炎導致過度增生和轉移的情況，減緩動脈粥狀硬化發生的機率。而實驗結果也首次證實，NLPE 和 GA 確實可以影響血管平滑肌細胞中 miR-21、miR-143 和 miR-145 表現進而去影響下游 target 蛋白 PTEN、RAS 和 RhoA 的表現，降低動脈粥狀硬化發生的機率。

而在第二部分的實驗中，主要開始以動物實驗中模擬因糖尿病所造成之心血管疾病之附病變，將心血管組織去做 Microarray Analysis 後，從中找出與血管內皮細胞和巨噬細胞中 NF- $\kappa$ B、VCAM-1、ICAM-1、MCP-1、SR-A 和 SOD-1 對應之新的 miRNAs。而一開始，先針對以上這些蛋白，利用網路上 miRNAs targeting 相關的 data base，像是 RNA22 Tools、TargetScan、MYRSYSTEM 及 microRNA.org 等網站，進行交叉比對，找出在 array data 中與上列 target 蛋白相對應知 miRNAs。之後再利用 realtime PCR，先行測試是否有內生性 miRNAs 表現後，再利用 luciferase assay 來觀察 hsa-mir-199a-3p 是否會 binding 在 transcription factor NF- $\kappa$ B 3' UTR 位置上。結果顯示，在加入 anti-miR-199a-3p 後，NF- $\kappa$ B luciferase 表現確實會有增加的情況，間接證實 NF- $\kappa$ B 會 binding 在 NF- $\kappa$ B 3' UTR 位置上。此外在處理 NLPE 和 GA 之後，可影響血管內皮細胞黏附相關蛋白以及泡沫細胞相關蛋白的表現，在血管內皮細胞中，可藉由 hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p 以及 hsa-mir-485-5p 調控 VCAM-1、ICAM-1、MCP-1 之表現；在泡沫細胞方面，在加入 NLPE 和 GA 後 mmu-mir-499-5p 表現會提高，進而降低 SR-A 表現；另外經過 oxLDL 的誘導後，mmu-mir-677-5p 表現會提高，在加入 NLPE 和 GA 後表現會明顯降低，進而提高 SOD-1 表現。由以上結果可以得到證實，在內皮細胞發炎以及泡沫細胞形成的情況下，加入 NLPE 和 GA 確實可藉由調節 miRNAs 的表現來影響其相關 target 蛋白的表現。

在實驗室之前的研究中，指出荷葉萃取物能有效降低脂肪肝、血脂、及降低因肥胖所導致之動脈粥狀硬化的情況[77-79]。在本次研究中，特別針對糖尿病附病變造成之心血管疾病來作為研究的主軸。有別於之前的實驗模式，本實驗除了往 miRNAs 調控 target 蛋白來影響動脈粥狀硬化外，特別將 db/db mice 主動脈弓之部分去做 MicroRNA Array 分析，再參考網路上各個有關於 miRNAs target prediction 之大數據資料庫，找出目前還未發表之 miRNAs，來建構本次實驗之主要架構。實驗中也發現，除了按照之前的實驗模式，驗證了 NLPE 和 GA 能調節 miR-21、143、145 來影響 PTEN、RAS 和 RhoA 的表現，再第二部分的實驗中，除了以 db/db+HFD mice 動物實驗模式模擬糖尿病引起之心血管發炎的情況外，更利用大數據資料庫，與 MicroRNA Array data 做比對，找出新的與相關發炎蛋白之 target miRNAs，也利用 luciferase assay 證明 hsa-mir-199a-3p 確實可 target 到 NF- $\kappa$ B 3' UTR 的位置，抑制 NF- $\kappa$ B 的表現。在本實驗中已建立以現有之 MicroRNA Array data 搭配大數據資料庫，找出與相關蛋白表現之新的 miRNAs，往後實驗延伸，可繼續針對其他 miRNAs 或相關 target 蛋白之影響或是相關表現之驗證，同時也可將此實驗模式引用到其他有關於 miRNAs 之觀察表現上，往後更可以應用在人體試驗檢測上，利用精準醫學的觀點，來找出影響相關疾病或癌症蛋白表現之 miRNAs，做為一個新的研究方向及目標。

以上實驗目前為止雖然找到了許多新的 miRNAs 對應其相關動脈粥狀硬化之相關蛋白的表現，但其在許多方面仍需再補強，像是在血管內皮細胞和泡沫細胞方面，對於其相關機制的反證，未來仍須再 transfect anti-miRs 來進行實驗驗證。像是在血管內皮細胞方面，在發炎的情況下，血管黏附度增加，此情形僅限於在血管初期發炎的情況，到後期血管內皮細胞會逐漸走向凋亡，這在往後實驗中仍需補充的部分。在秉持同樣的實驗模式下，在血管內皮細胞凋亡的部分相信可以找到其他新的 miRNAs 以及其相對應之 target 蛋白，而近一步證實 NLPE 和 GA 在血管內皮細胞凋亡的情況下也能藉由調控 miRNAs 來達到抑制內皮細胞凋亡的效果。

## (七)参考文献

1. Han, K.H., et al., *Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia: differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function*. Journal of lipid research, 1999. **40**(6): p. 1053-1063.
2. Gu, L., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. Molecular cell, 1998. **2**(2): p. 275-281.
3. Gosling, J., et al., *MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B*. The Journal of clinical investigation, 1999. **103**(6): p. 773-778.
4. Colles, S.M., K.C. Irwin, and G.M. Chisolm, *Roles of multiple oxidized LDL lipids in cellular injury: dominance of 7 beta-hydroperoxycholesterol*. Journal of lipid research, 1996. **37**(9): p. 2018-2028.
5. Bennett, M.R., et al., *Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques*. Circulation research, 1998. **82**(6): p. 704-712.
6. Cai, J., et al., *In vivo quantitative measurement of intact fibrous cap and lipid-rich necrotic core size in atherosclerotic carotid plaque: comparison of high-resolution, contrast-enhanced magnetic resonance imaging and histology*. Circulation, 2005. **112**(22): p. 3437-3444.
7. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis: the road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-516.
8. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells*. The Journal of clinical investigation, 1989. **83**(5): p. 1774-1777.
9. Thyberg, J., et al., *Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1990. **10**(6): p. 966-990.
10. Björkerud, B. and S. Björkerud, *Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1996. **16**(3): p. 416-424.
11. Ross, R., *Cell biology of atherosclerosis*. Annual review of physiology, 1995. **57**(1): p. 791-804.
12. Yoshizumi, M., et al., *Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life*. Circulation research, 1993. **73**(1): p. 205-209.
13. Khan, B.V., et al., *Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells*. The Journal of clinical investigation, 1995. **95**(3): p. 1262-1270.
14. Kumar, A., S. Dhawan, and B.B. Aggarwal, *Emodin (3-methyl-1, 6, 8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF- $\kappa$ B activation, I $\kappa$ B degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells*. Oncogene, 1998. **17**(7): p. 913.
15. Schmidt, A.M., et al., *Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes*. The Journal of clinical investigation, 1995. **96**(3): p. 1395-1403.
16. Sawano, A., et al., *Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans*. Blood, 2001. **97**(3): p. 785-791.
17. Tontonoz, P., et al., *PPAR $\gamma$  promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL*. Cell, 1998. **93**(2): p. 241-252.
18. Singh, U. and I. Jialal, *Oxidative stress and atherosclerosis*. Pathophysiology, 2006. **13**(3): p. 129-142.
19. Schulze, P.C. and R.T. Lee, *Oxidative stress and atherosclerosis*. Current atherosclerosis reports, 2005.



- 7(3): p. 242-248.
20. Kunitomo, M., *Oxidative stress and atherosclerosis*. Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 2007. **127**(12): p. 1997-2014.
  21. Wu, L.L., et al., *Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics*. Clinica chimica acta, 2004. **339**(1-2): p. 1-9.
  22. Matsuda, M. and I. Shimomura, *Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer*. Obesity research & clinical practice, 2013. **7**(5): p. e330-e341.
  23. Harrison, D., et al., *Role of oxidative stress in atherosclerosis*. The American journal of cardiology, 2003. **91**(3): p. 7-11.
  24. Drummond, G.R., et al., *Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets*. Nature reviews Drug discovery, 2011. **10**(6): p. 453.
  25. Li, H., S. Horke, and U. Förstermann, *Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2014. **237**(1): p. 208-219.
  26. Madamanchi, N.R., A. Vendrov, and M.S. Runge, *Oxidative stress and vascular disease*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2005. **25**(1): p. 29-38.
  27. Fuhrman, B., N. Volkova, and M. Aviram, *Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase*. Atherosclerosis, 2002. **161**(2): p. 307-316.
  28. Alexander, R.W., *Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective*. Hypertension, 1995. **25**(2): p. 155-161.
  29. Rozenberg, O., et al., *Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **34**(6): p. 774-784.
  30. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 642-655.
  31. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-216.
  32. Valencia-Sanchez, M.A., et al., *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. Genes & development, 2006. **20**(5): p. 515-524.
  33. Doench, J.G., C.P. Petersen, and P.A. Sharp, *siRNAs can function as miRNAs*. Genes & development, 2003. **17**(4): p. 438-442.
  34. Brodersen, P., et al., *Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs*. Science, 2008. **320**(5880): p. 1185-1190.
  35. Visone, R. and C.M. Croce, *MiRNAs and cancer*. The American journal of pathology, 2009. **174**(4): p. 1131-1138.
  36. Tatsuguchi, M., et al., *Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2007. **42**(6): p. 1137-1141.
  37. Tang, Y., et al., *MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2*. International heart journal, 2009. **50**(3): p. 377-387.
  38. Xu, C., et al., *The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes*. Journal of cell science, 2007.

- 120**(17): p. 3045-3052.
39. Boštjančič, E., et al., *MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction*. *Cardiology*, 2010. **115**(3): p. 163-169.
  40. Oliveira-Carvalho, V., V.O. Carvalho, and E.A. Bocchi, *The emerging role of miR-208a in the heart*. *DNA and cell biology*, 2013. **32**(1): p. 8-12.
  41. Yang, B., et al., *The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2*. *Nature medicine*, 2007. **13**(4): p. 486.
  42. Luo, X., et al., *Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart*. *The Journal of biological chemistry*, 2011. **286**(32): p. 28656.
  43. Van Rooij, E., et al., *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(35): p. 13027-13032.
  44. Thum, T., et al., *MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts*. *Nature*, 2008. **456**(7224): p. 980.
  45. Molkenin, J.D., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy*. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 215-228.
  46. Lin, Z., et al., *miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**(29): p. 12103-12108.
  47. Ji, R., et al., *MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation*. *Circulation research*, 2007. **100**(11): p. 1579-1588.
  48. Adam, O., et al., *Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis*. *Basic research in cardiology*, 2012. **107**(5): p. 278.
  49. Bonauer, A., et al., *MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice*. *Science*, 2009. **324**(5935): p. 1710-1713.
  50. van Solingen, C., et al., *Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis*. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2009. **13**(8a): p. 1577-1585.
  51. Zernecke, A., et al., *Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection*. *Sci. Signal.*, 2009. **2**(100): p. ra81-ra81.
  52. Harris, T.A., et al., *MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(5): p. 1516-1521.
  53. Elia, L., et al., *The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease*. *Cell death and differentiation*, 2009. **16**(12): p. 1590.
  54. Paudel, K.R. and N. Panth, *Phytochemical profile and biological activity of Nelumbo nucifera*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. **2015**.
  55. Kashiwada, Y., et al., *Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of Nelumbo nucifera, and structure-activity correlations with related alkaloids*. *Bioorg Med Chem*, 2005. **13**(2): p. 443-8.
  56. Ishida, H., et al., *Studies on the antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VIII. On the antihemorrhagic principle in nelumbins receptaculum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1988. **36**(11): p. 4585-7.
  57. Wu, C.-H., et al., *Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a*

- Nelumbo nucifera* leaf flavonoid-rich extract in mice. Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(11): p. 7075-7081.
58. Liu, C.P., et al., *The extracts from Nelumbo Nucifera suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells*. Life Sci, 2004. **75**(6): p. 699-716.
59. Ono, Y., et al., *Anti-obesity effect of Nelumbo nucifera leaves extract in mice and rats*. J Ethnopharmacol, 2006. **106**(2): p. 238-44.
60. 許臘英, 毛維倫, 江向東, 聶朝輝, 劉運苟, 劉秀英, 葉澤秀, *荷葉降血脂的開發研究*. 湖北中醫雜誌, 1996. **4**: p. 42-43.
61. Ho, H.-H., et al., *Extract from the leaf of nucifera reduced the development of atherosclerosis via inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. Food and chemical toxicology, 2010. **48**(1): p. 159-168.
62. ISHIDA, H., et al., *Studies on the antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VIII. On the antihemorrhagic principle in Nelumbins Receptaculum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1988. **36**(11): p. 4585-4587.
63. Ling, Z.-Q., B.-J. Xie, and E.-L. Yang, *Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of Nelumbo nucifera Gaertn*. Journal of agricultural and food chemistry, 2005. **53**(7): p. 2441-2445.
64. Rai, S., et al., *Antioxidant activity of Nelumbo nucifera (sacred lotus) seeds*. Journal of ethnopharmacology, 2006. **104**(3): p. 322-327.
65. Liu, C.-P., et al., *The extracts from Nelumbo nucifera suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells*. Life sciences, 2004. **75**(6): p. 699-716.
66. Winter, P.M., et al., *Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with  $\alpha\beta 3$ -integrin-targeted nanoparticles*. Circulation, 2003. **108**(18): p. 2270-2274.
67. Brånén, L., et al., *Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2004. **24**(11): p. 2137-2142.
68. Wan, X., et al., *ROCK1, a novel target of miR-145, promotes glioma cell invasion*. Molecular medicine reports, 2014. **9**(5): p. 1877-1882.
69. O'Neill, L.A. and C. Kaltschmidt, *NF- $\kappa$ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function*. Trends in neurosciences, 1997. **20**(6): p. 252-258.
70. Weyrich, A.S., et al., *Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion. Signal integration and NF- $\kappa$ B translocation*. The Journal of clinical investigation, 1995. **95**(5): p. 2297-2303.
71. Asangani, I.A., et al., *MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer*. Oncogene, 2008. **27**(15): p. 2128.
72. Si, M., et al., *miR-21-mediated tumor growth*. Oncogene, 2007. **26**(19): p. 2799.
73. Lu, Y., et al., *MiR-145 reduces ADAM17 expression and inhibits in vitro migration and invasion of glioma cells*. Oncology reports, 2013. **29**(1): p. 67-72.
74. Xin, M., et al., *MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury*. Genes & development, 2009.
75. Yu, X. and Z. Li, *MicroRNAs regulate vascular smooth muscle cell functions in atherosclerosis*. International journal of molecular medicine, 2014. **34**(4): p. 923-933.

76. Qiu, T., et al., *MiR-145, miR-133a and miR-133b inhibit proliferation, migration, invasion and cell cycle progression via targeting transcription factor Sp1 in gastric cancer*. FEBS letters, 2014. **588**(7): p. 1168-1177.
77. Tang, C.-C., et al., *Polyphenol-rich extract of Nelumbo nucifera leaves inhibits alcohol-induced steatohepatitis via reducing hepatic lipid accumulation and anti-inflammation in C57BL/6J mice*. Food & function, 2014. **5**(4): p. 678-687.
78. Ou, T.-T., et al., *Gallic acid attenuates oleic acid-induced proliferation of vascular smooth muscle cell through regulation of AMPK-eNOS-FAS signaling*. Current medicinal chemistry, 2013. **20**(31): p. 3944-3953.
79. LEE, H.J., et al., *Water extracts from Nelumbo nucifera leaf reduced plasma lipids and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits*. Journal of food biochemistry, 2010. **34**(4): p. 779-795.

(八) 實驗成果附圖

第一部分(第一年計畫)：NLPE 和 GA 調控 miRNAs 抑制血管平滑肌細胞增生和轉移

Figure. 1.

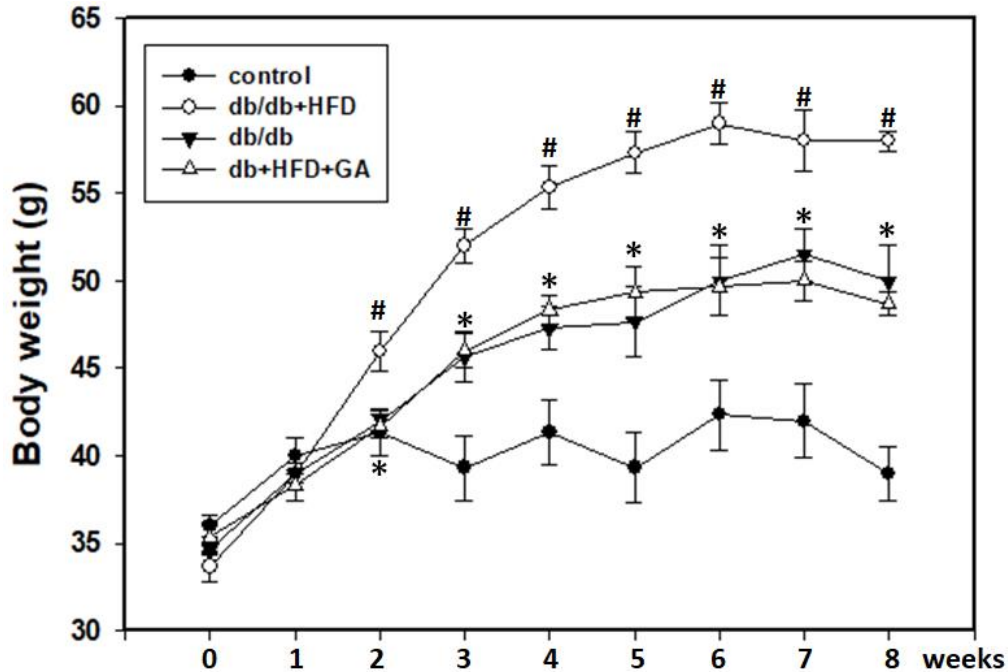


Figure.1 The effect of GA in db/db+HFD group decrease the body weight significant. The data is presented as means  $\pm$  SDs from 3 db/db mice per group. Mean values with different letters in each testing parameter were significantly different ( $p < 0.05$ ).

#,  $p < 0.05$ , HFD compare with Control

\*,  $p < 0.05$ , GA compare with HFD

**Table. 1****Treatment of GA can reduce mesenteric fat and epididymis fat.**

$\varnothing$	ND $\varnothing$	db/db $\varnothing$	db+HFD $\varnothing$	db+HFD+GA $\varnothing$
Liver weight (g) $\varnothing$	1.3 $\pm$ 0.2 $\varnothing$	2.27 $\pm$ 0.07 $\varnothing$	4.75 $\pm$ 0.26 $\varnothing$ <sup>#</sup>	4.69 $\pm$ 0.26 $\varnothing$
Kidney weight (g) $\varnothing$	0.46 $\pm$ 0.02 $\varnothing$	0.41 $\pm$ 0.01 $\varnothing$	0.44 $\pm$ 0.01 $\varnothing$	0.43 $\pm$ 0.02 $\varnothing$
Mesenteric fat (g) $\varnothing$	0.18 $\pm$ 0.02 $\varnothing$	0.51 $\pm$ 0.15 $\varnothing$	1.67 $\pm$ 0.09 $\varnothing$ <sup>#</sup>	1.21 $\pm$ 0.15 $\varnothing$ <sup>*</sup>
Kidney fat (g) $\varnothing$	0.03 $\pm$ 0 $\varnothing$	0.92 $\pm$ 0.13 $\varnothing$	0.97 $\pm$ 0.15 $\varnothing$	0.82 $\pm$ 0.27 $\varnothing$
Epididymal fat (g) $\varnothing$	0.36 $\pm$ 0.25 $\varnothing$	1.99 $\pm$ 0.36 $\varnothing$	2.64 $\pm$ 0.61 $\varnothing$ <sup>#</sup>	1.67 $\pm$ 0.3 $\varnothing$ <sup>*</sup>

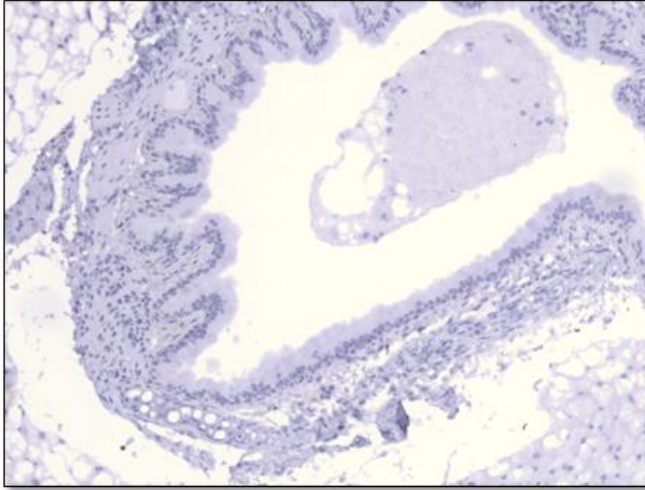
\*, P < 0.05, compared with db/db+HFD group.

#, P < 0.05, compared with normal group.

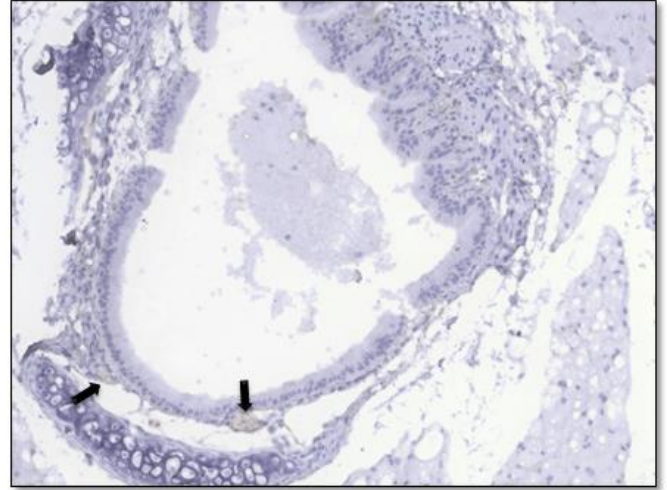
Figure. 2.

**NF- $\kappa$ B**

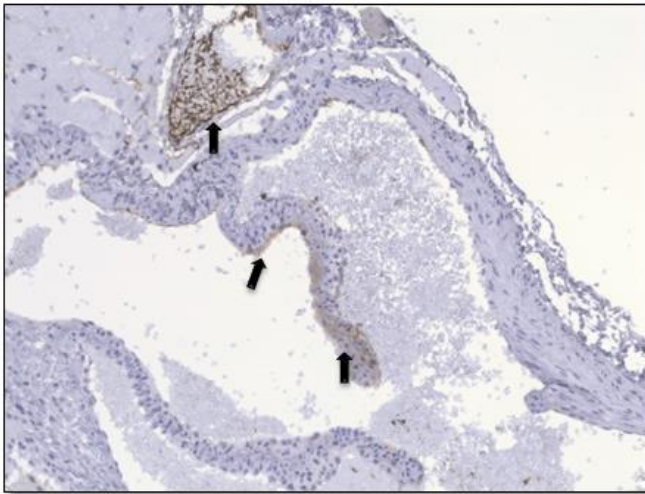
**control**



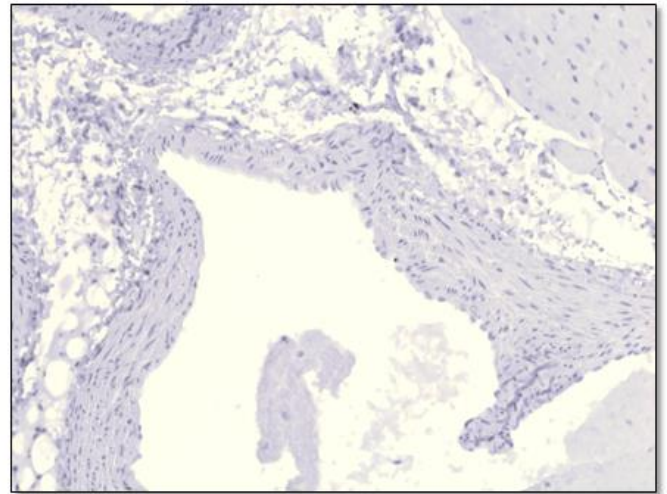
**db/db**



**db/db+HFD**

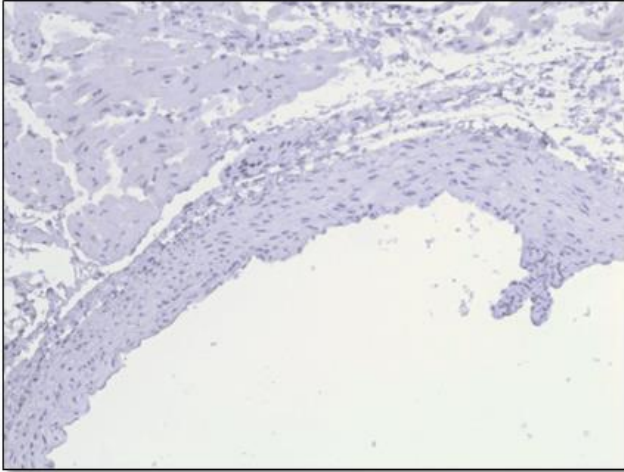


**db/db+HFD+GA**

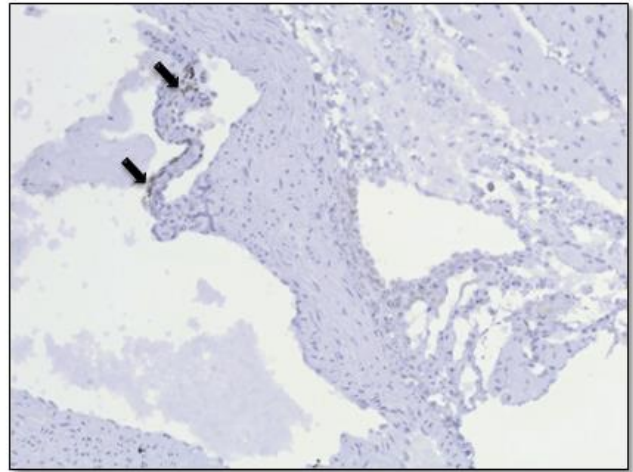


# RAS

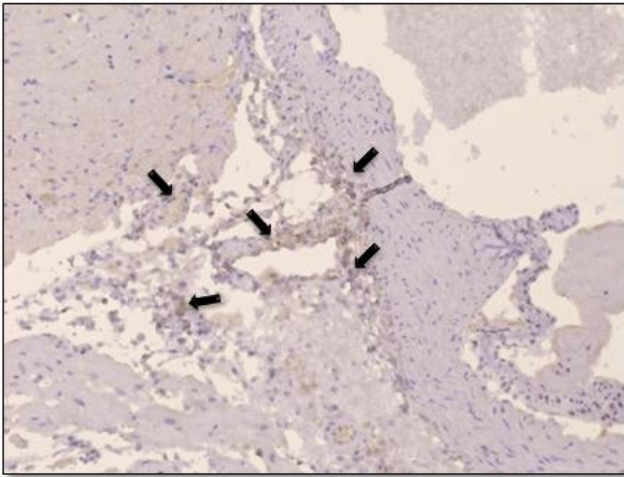
**control**



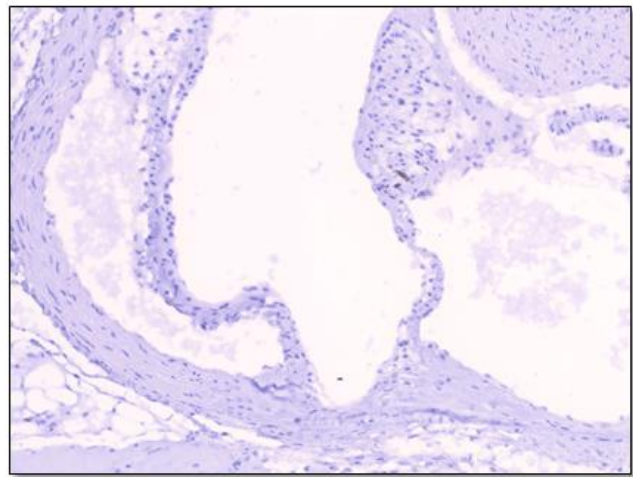
**db/db**



**db/db+HFD**

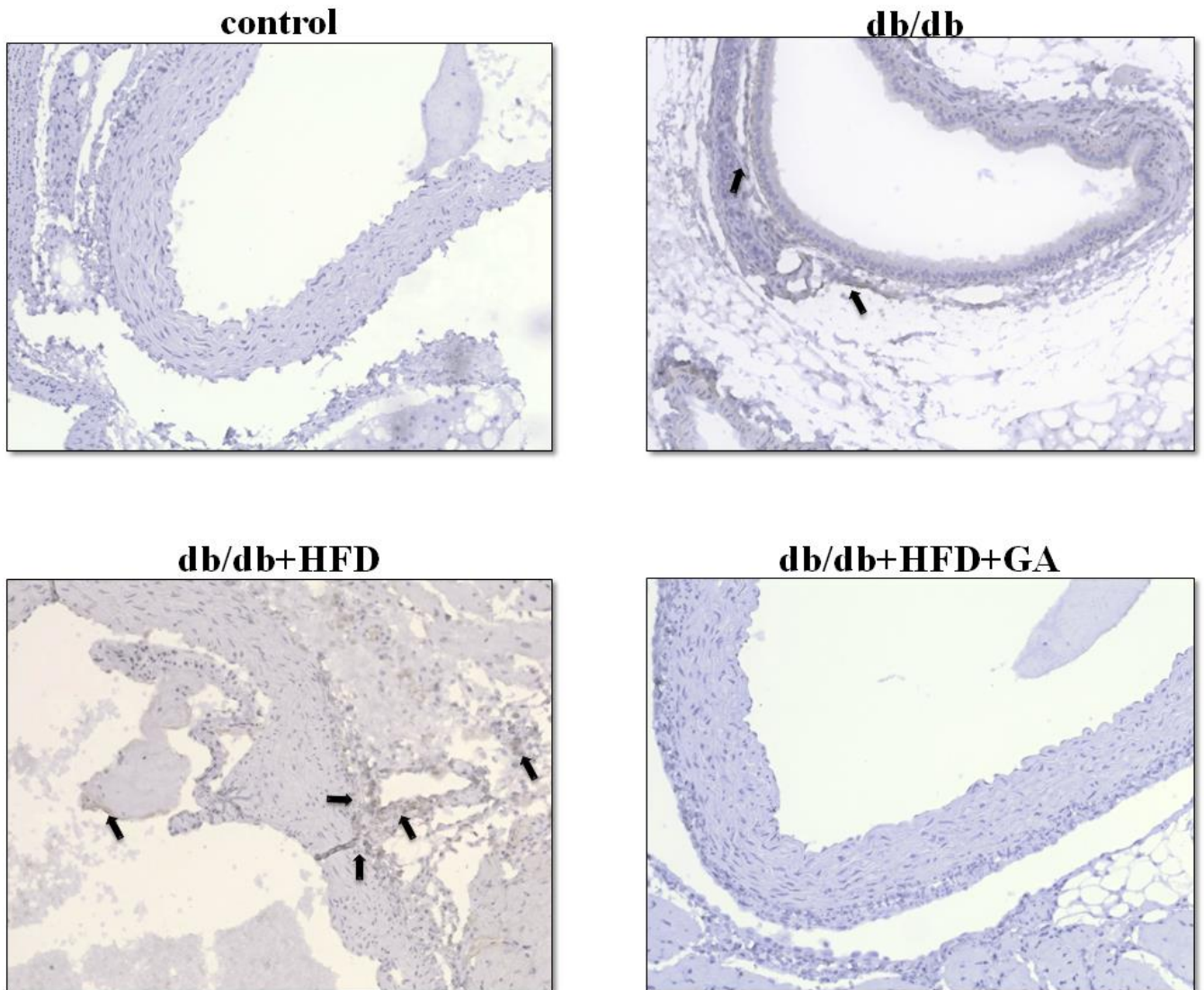


**db/db+HFD+GA**





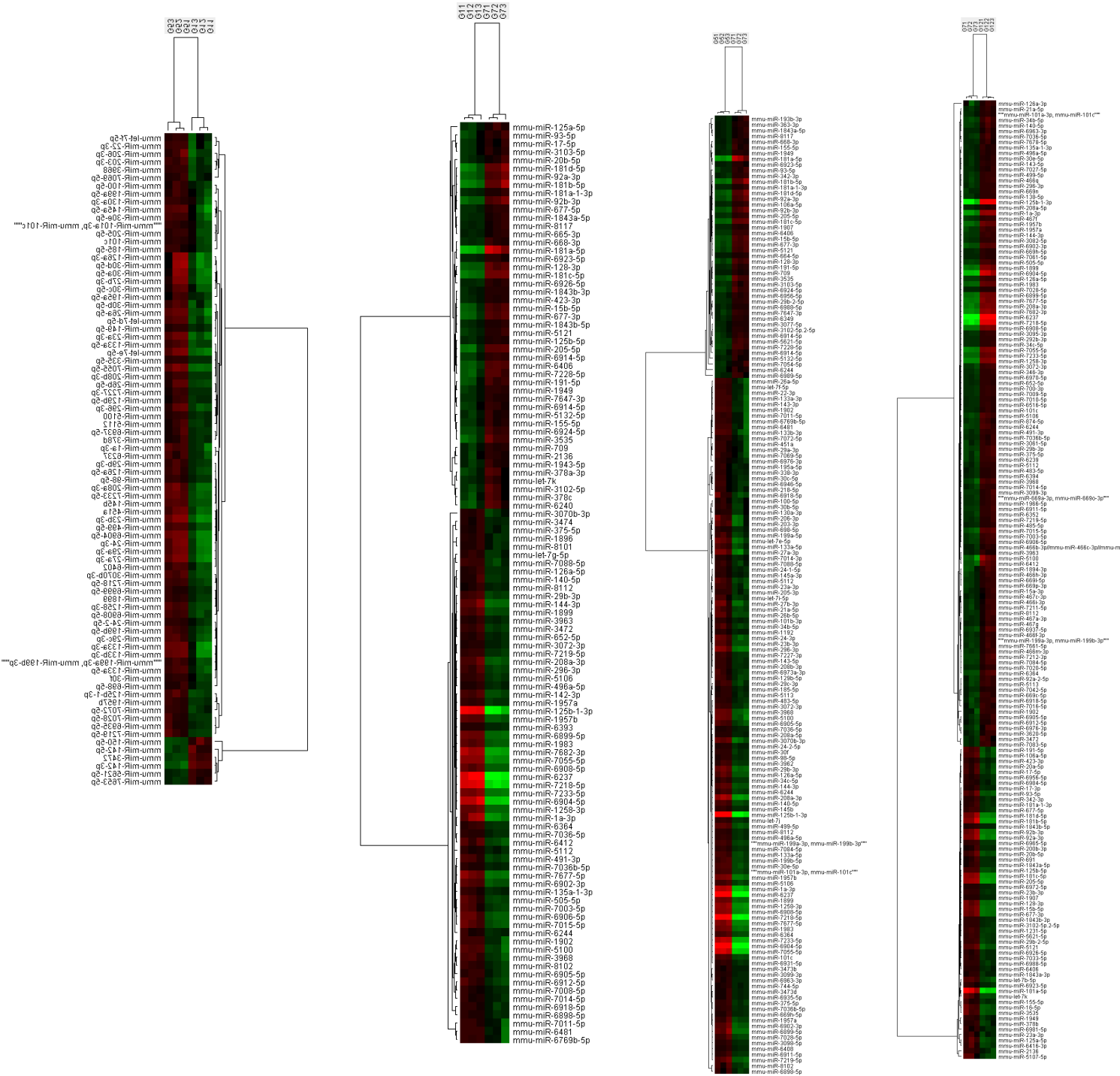
# RhoA



**Figure 2. GA decreased the expression of NF- $\kappa$ B 、 Ras and RhoA in db/db+HFD-induced mice.**

Aortic arch slices were embedded in paraffin, and measured the NF- $\kappa$ B 、 Ras and RhoA by IHC staining. Representative aortic arch showed NF- $\kappa$ B 、 Ras and RhoA overexpression was observed in HFD group as compared with control group and the treatment group. Black arrow indicated the location of NF- $\kappa$ B 、 Ras and RhoA expression.

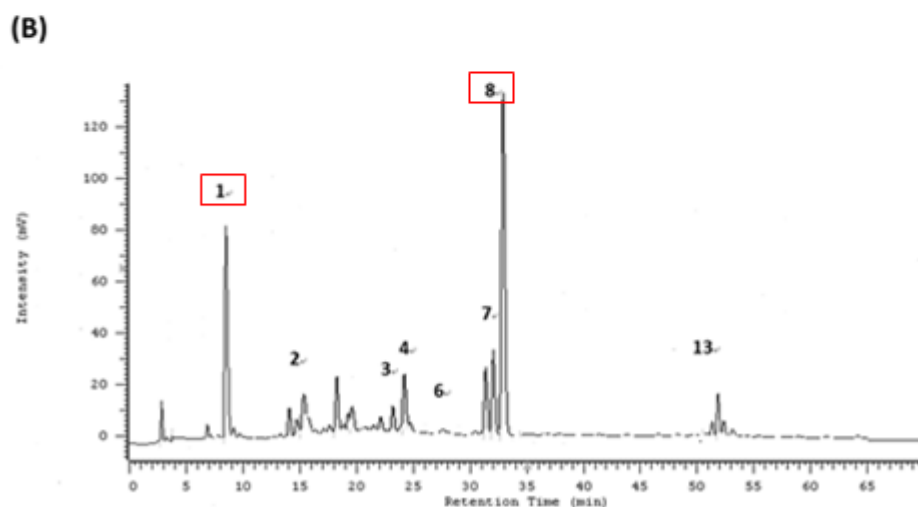
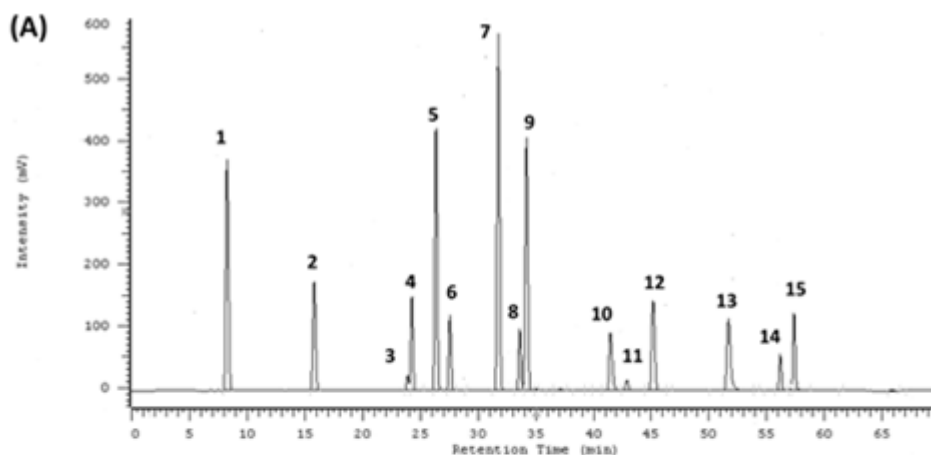
**Figure 3.**



**Figure 3. The MicroRNA array data was obtained from aortic arch.**

There are 401 data in MicroRNA array analysis. Worksheet "Differential Data\_comparison(U)" - lists all differentially expressed transcripts (up-regulated) with p-value(Differentially expressed) < 0.05 and log2 ratios  $\geq 0.585$  ; (down-regulated) with p-value(Differentially expressed) < 0.05 and log2 ratios  $\leq -0.585$ .

**Table 2: Composition of *Nelumbo Nucifer.* extract.**



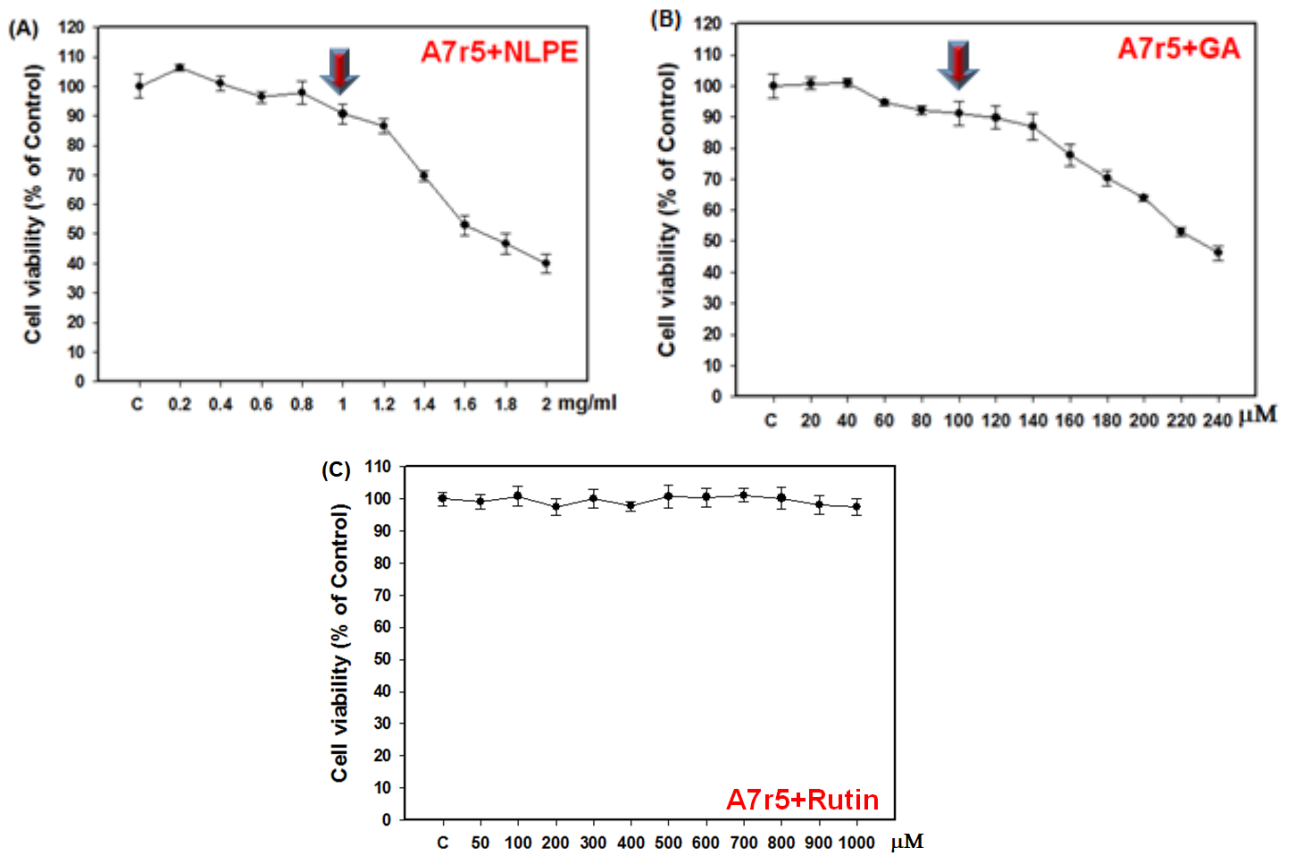
**Table 1. Composition of the Phenolic Compounds of NLPE by HPLC Analysis**

Peak no.	Assigned identity	Retention time (min)	%
1	GA	8.34	22.35 ± 0.15
2	PCA	15.87	7.97 ± 0.23
3	C	23.49	2.38 ± 0.11
4	GCG	24.32	5.14 ± 0.31
6	EC	27.63	0.65 ± 0.07
7	p-CA	31.87	8.22 ± 0.19
8	R	33.71	36.53 ± 0.28
13	Q	51.97	4.03 ± 0.05

**Table 2. The HPLC chromatogram of NLPE.** (A) HPLC chromatogram of fifteen kinds of standard polyphenols. Peaks: 1, gallic acid (GA); 2, protocatechuic acid (PCA); 3, catechin (C); 4, gallocatechin gallate (GCG); 5, caffeic acid (CA); 6, epicatechin (EC); 7, p-coumaric acid (p-CA); 8, rutin

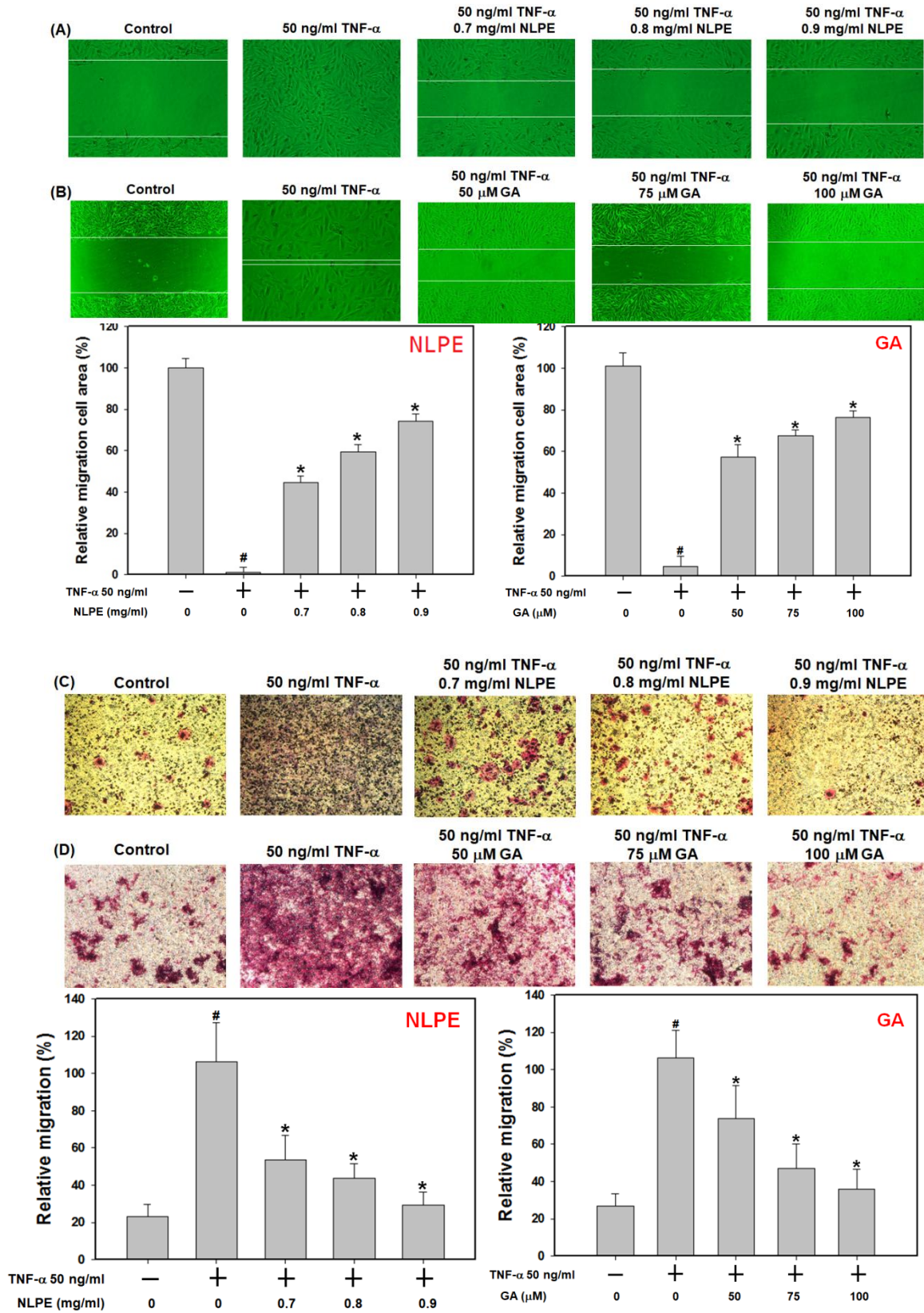
(R); 9, ferulic acid (FA); 10, gossypin (G); 11, hesperetin (H); 12, resveratrol (RV); 13, quercetin (Q); 14, naringenin (N); 15, hydroxyflavin (FIOH). (B) HPLC chromatogram of free polyphenols from NLE.

**Figure 4.**



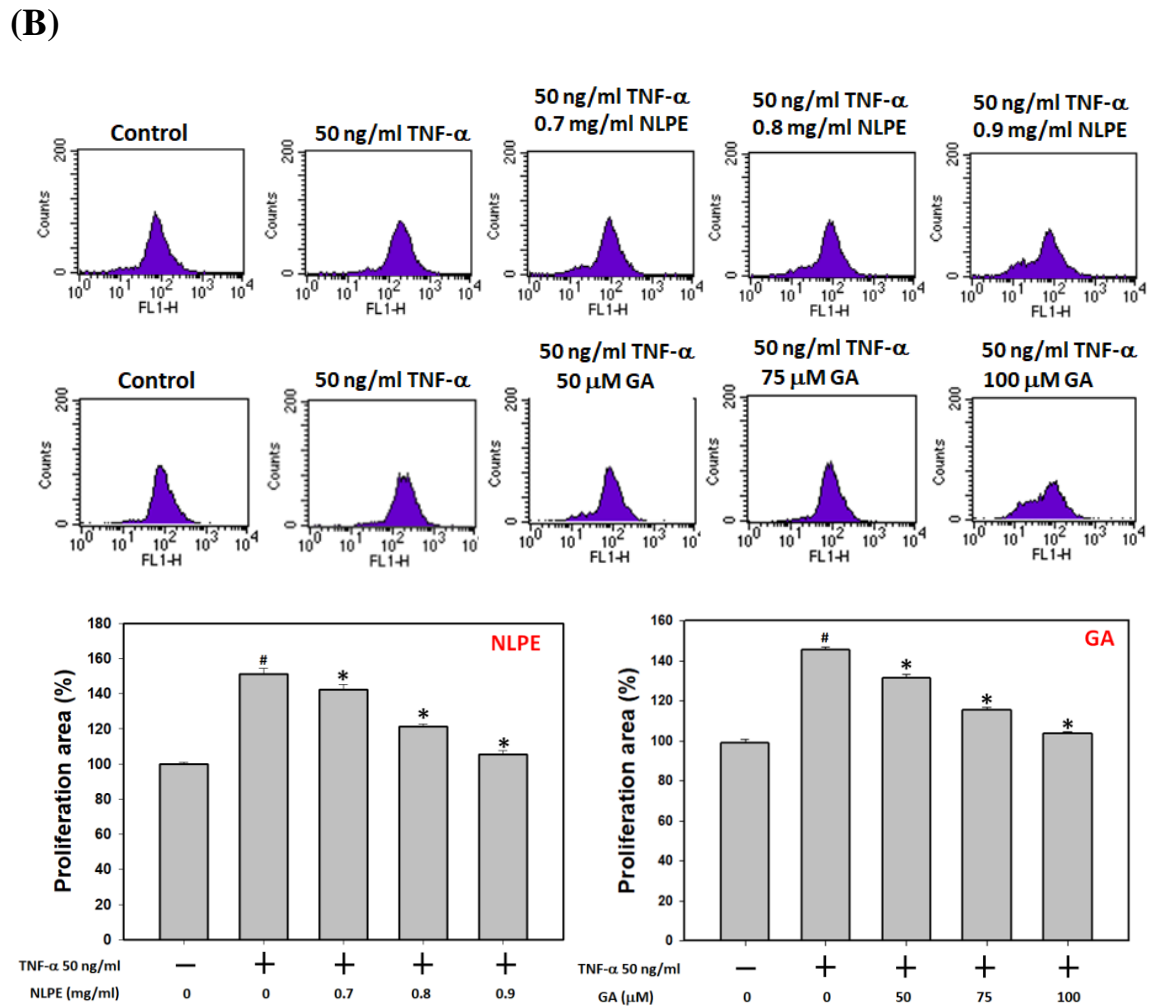
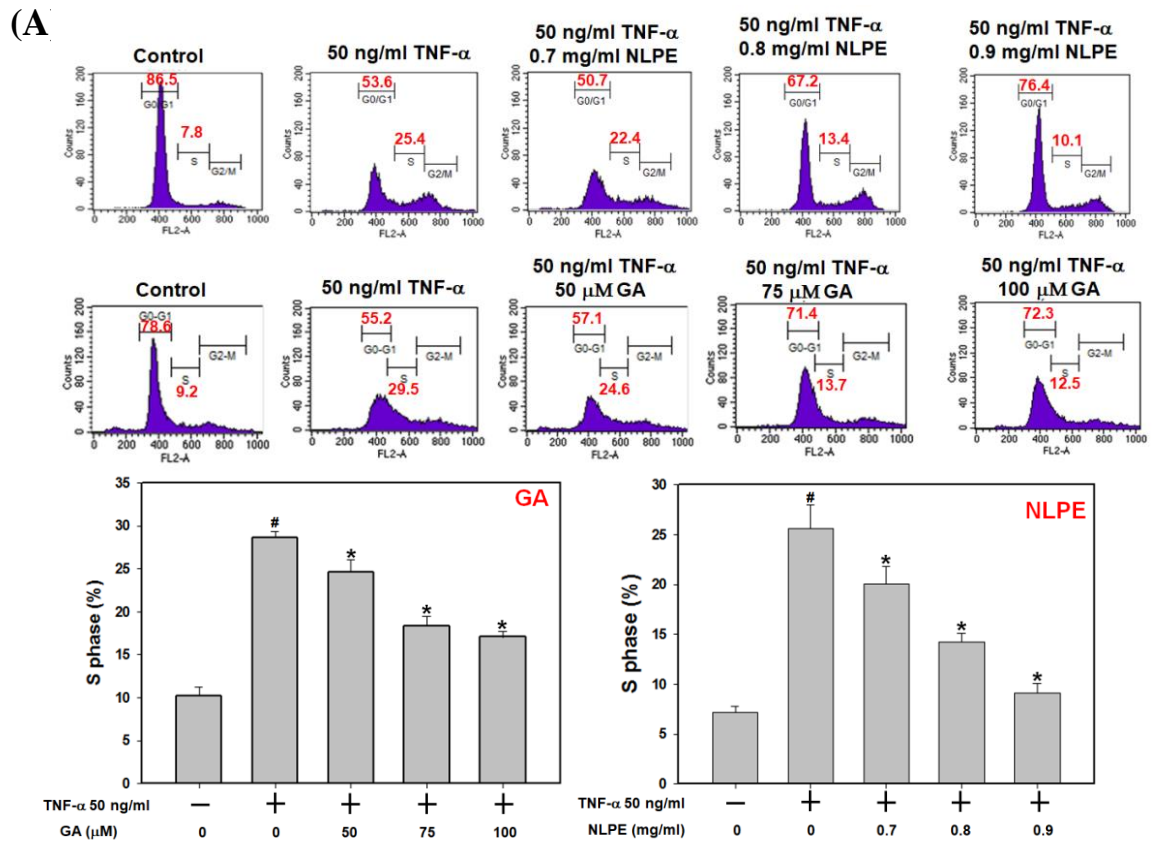
**Figure 4. Cytotoxic effects of NLPE and GA on A7r5 cells.** (A) A7r5 cells were treated with various concentrations of NLPE (B) GA (C) rutin as indicated. Cell viability was determined by MTT assay. The results were presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

**Figure 5.**



**Figure 5. NLPE and GA inhibited migration of A7r5 cells.** (A) and (B), The cells were treated with TNF- $\alpha$  50 ng/ml · NLPE (0.7, 0.8, 0.9 mg/ml) and GA (50, 75, 100  $\mu$ M) and use 200 ml tip to make the Wound wire for 48 hr. (C) and (D) The A7r5 cells were pretreated in the same condition or vehicle for 24 hr. Then the cells seeded onto the Transwell inserts ( $1 \times 10^4$  cells per well) with 8  $\mu$ m micro-porous membrane. and incubated for 24 hr. The cells that migrated to the lower surface were fixed and stained. The stained cells were photographed and counted from five random areas under microscopic examination. The data represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments. # $p < 0.05$ , compared with control. \* $p < 0.05$  compared with TNF- $\alpha$  group.

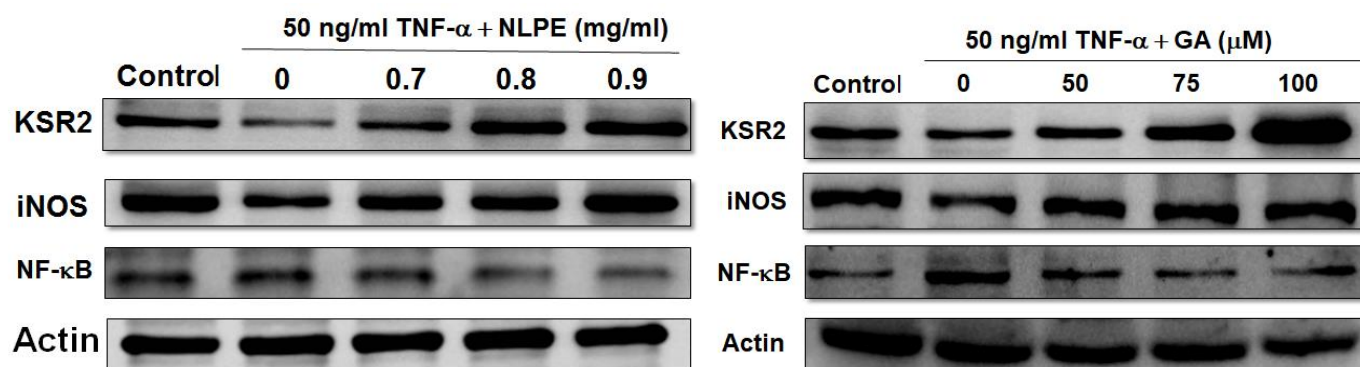
**Figure 6.**





**Figure 6. Effect of NLPE and GA-treated cell cycle phase alteration in A7r5 cells.** (A) Cultured cells were treated with or without TNF- $\alpha$  50 ng/ml · NLPE (0.7, 0.8, 0.9 mg/ml) and GA (50, 75, 100  $\mu$ M) for 24 hr. After treatment, the cells were trypsinized and then subjected to flow cytometric analysis to determine the effect of NLPE and GA repress inflammation situation on cell cycle distribution. Quantitative assessment of the percentage of A7r5 cells in S phase, as indicated by propidium iodide (PI) and (B) Bromodeoxyuridine (5-bromo-2' -deoxyuridine , BrdU) represent the average of three independent experiments . #p < 0.05, compared with control. \*p < 0.05 compared with TNF- $\alpha$  group.

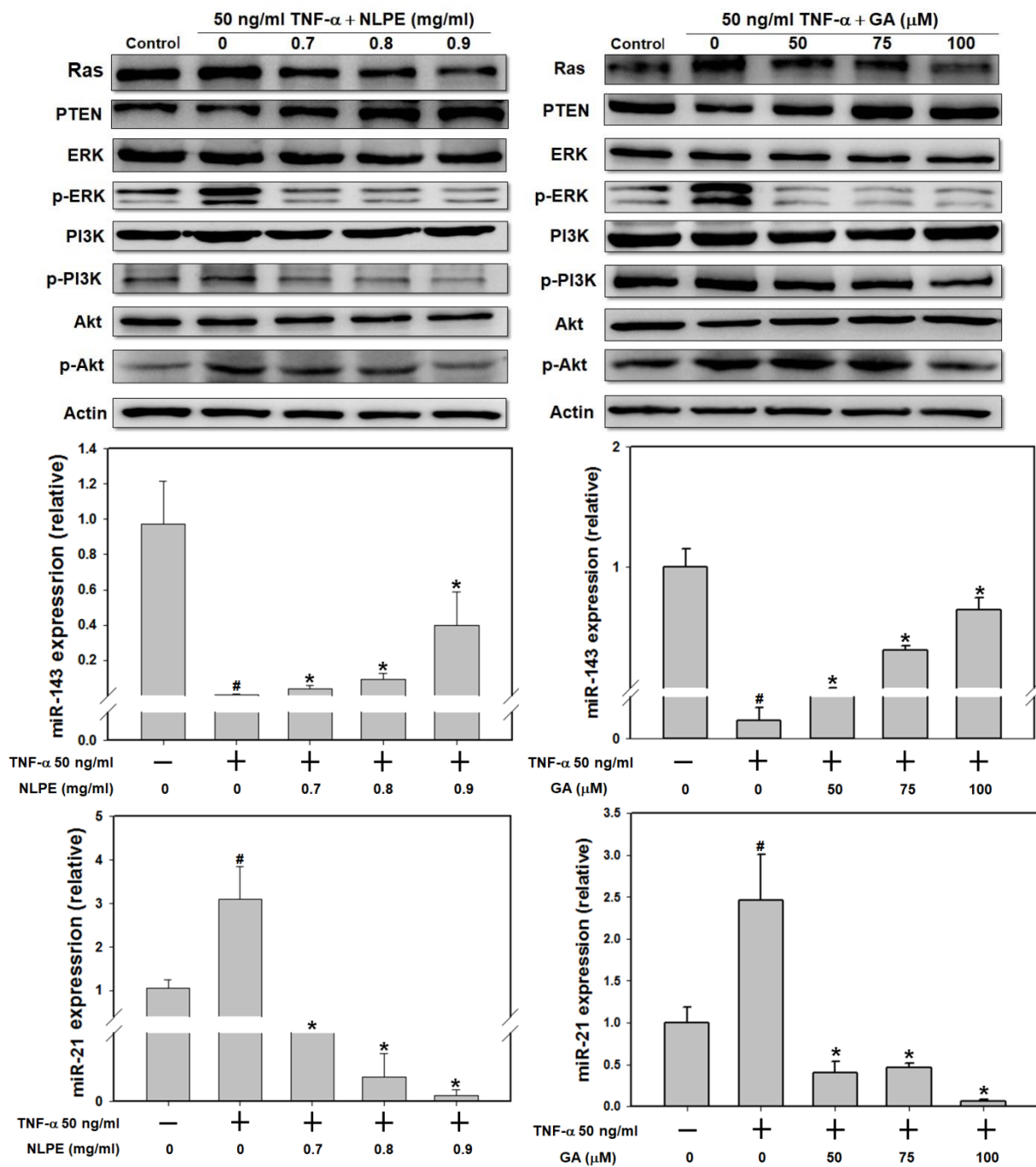
**Figure. 7.**



**Figure 7. Immunoblot analysis of the expression of inflammation protein in A7r5 treated TNF-α , NLPE and GA .**

A7r5 treated were treated with or without TNF-α 50 ng/ml and NLPE (0.7, 0.8, 0.9 mg/ml) and GA (50, 75, 100 μM).The cell lysates prepared and subjected to western blot analysis.

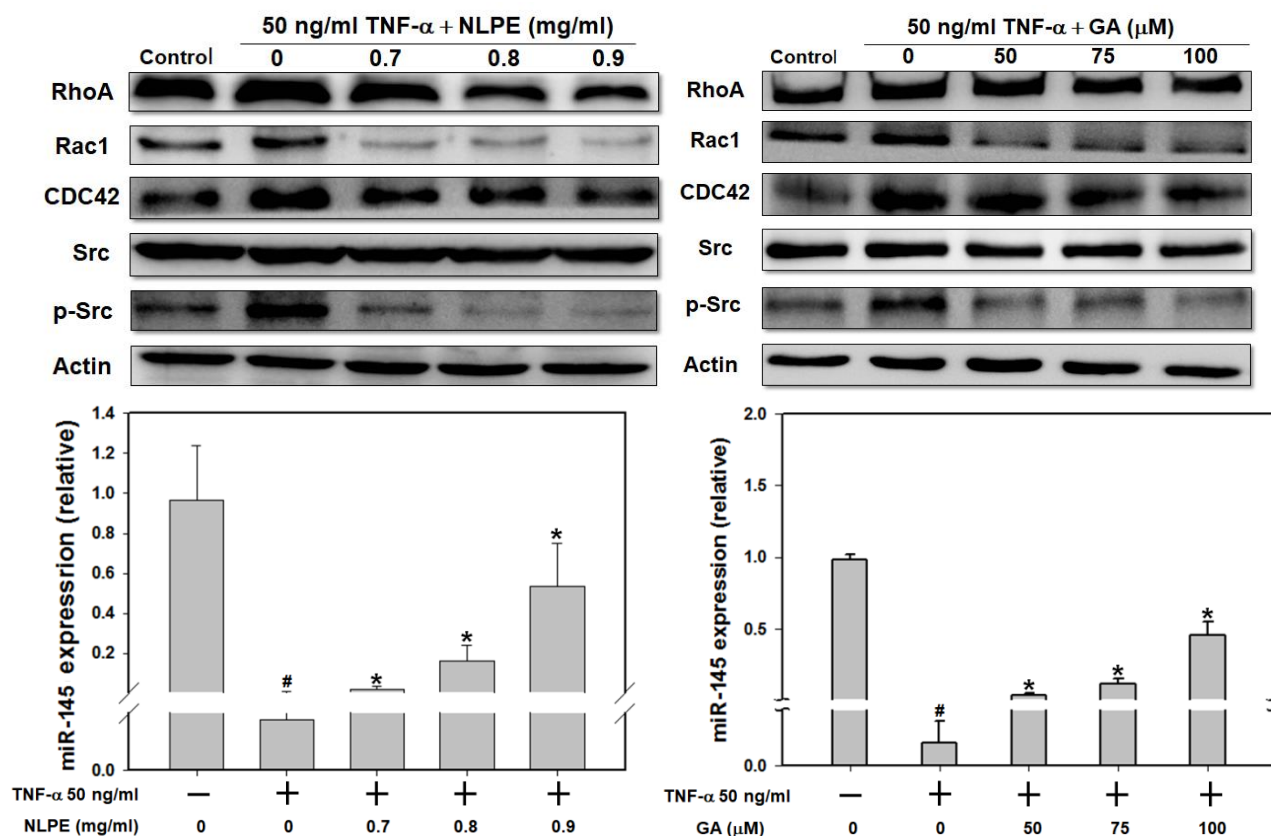
**Figure 8.**



**Figure 8. Immunoblot and realtime PCR analysis of the expression of proliferation miRNAs and protein in A7r5 treated TNF- $\alpha$  , NLPE and GA .**

A7r5 treated were treated with TNF- $\alpha$  50 ng/ml and NLPE (0.7, 0.8, 0.9 mg/ml) and GA (50, 75, 100  $\mu$ M).The cell lysates prepared and subjected to western blot analysis and realtime PCR. Quantitative by the  $\Delta\Delta$  CT method of A7r5 cells in miR-21 and miR-143 expresstion, represent the average of three independent experiments . #p < 0.05, compared with control. \*p < 0.05 compared with TNF- $\alpha$  group.

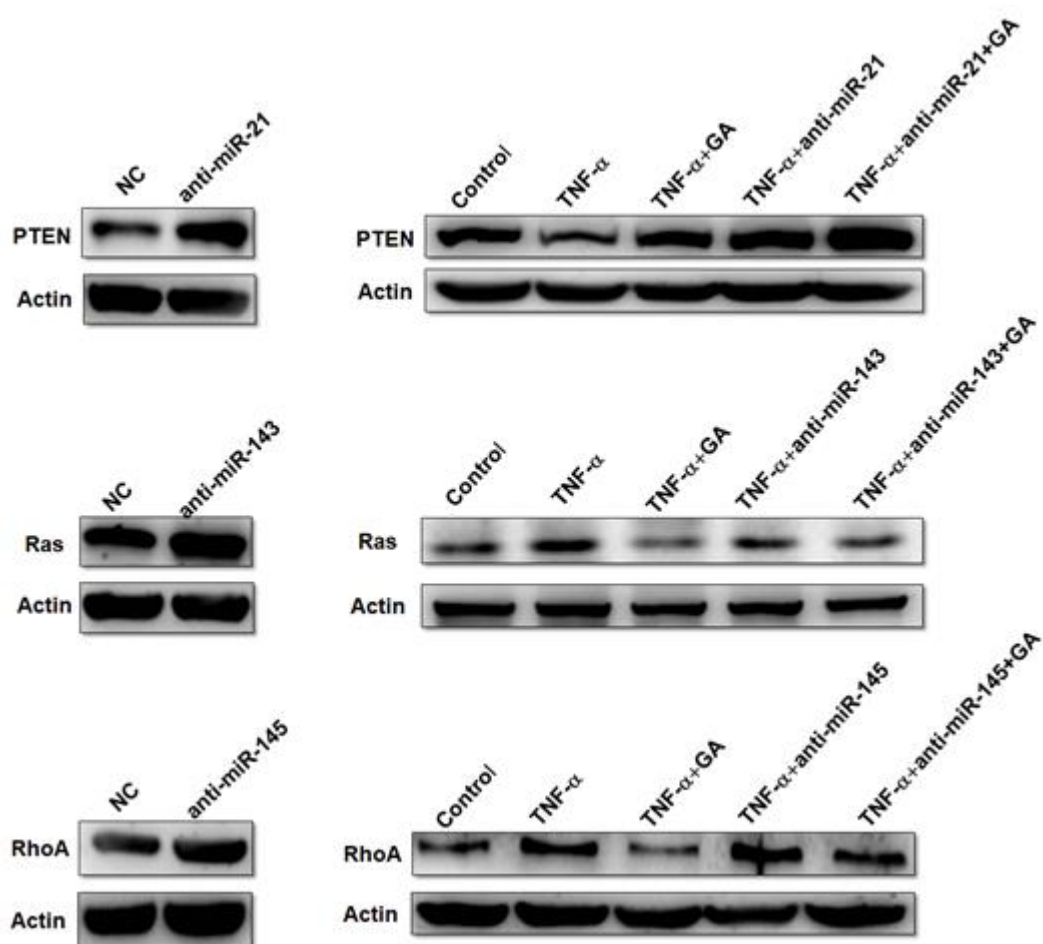
**Figure 9.**



**Figure 9. Immunoblot and realtime PCR analysis of the expression of migration miRNAs and protein in A7r5 treated TNF- $\alpha$  , NLPE and GA .**

A7r5 treated were treated with TNF- $\alpha$  50 ng/ml and NLPE (0.7, 0.8, 0.9 mg/ml) and GA (50, 75, 100  $\mu$ M).The cell lysates prepared and subjected to western blot analysis and realtime PCR. Quantitative by the  $\Delta\Delta$  CT method of A7r5 cells in miR-145 expression, represent the average of three independent experiments . # $p < 0.05$ , compared with control. \* $p < 0.05$  compared with TNF- $\alpha$  group.

**Figure 10.**



**Figure 10. Transfect anti-miRs to prove mir-21, 143, 145 and target protein on A7r5 cells.** A7r5 cells were with or without TNF- $\alpha$  50 ng/ml, transfect pSIMIR, Nuciferine leaf polyphenol extracts (0.7, 0.8, 0.9 mg/ml) and gallic acid (50, 75, 100  $\mu$ M) for 24 hr.

Figure 11.

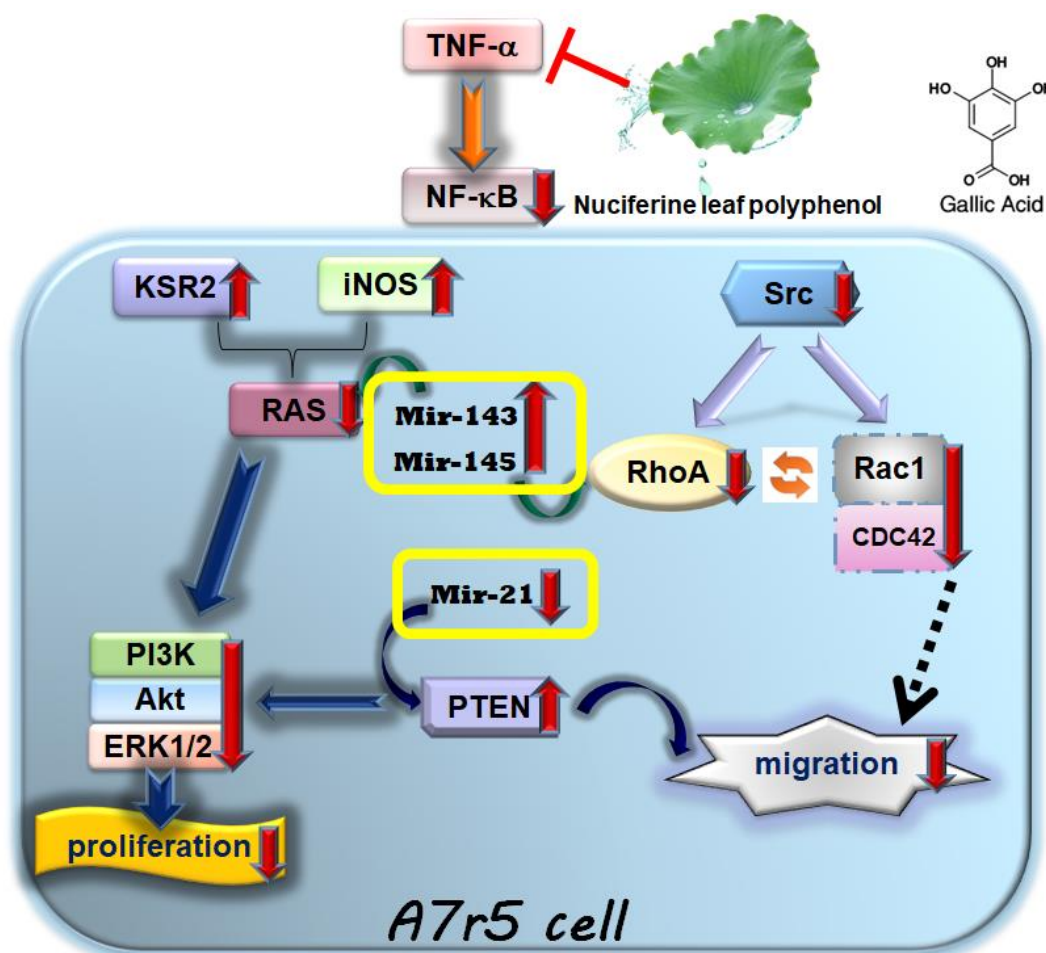


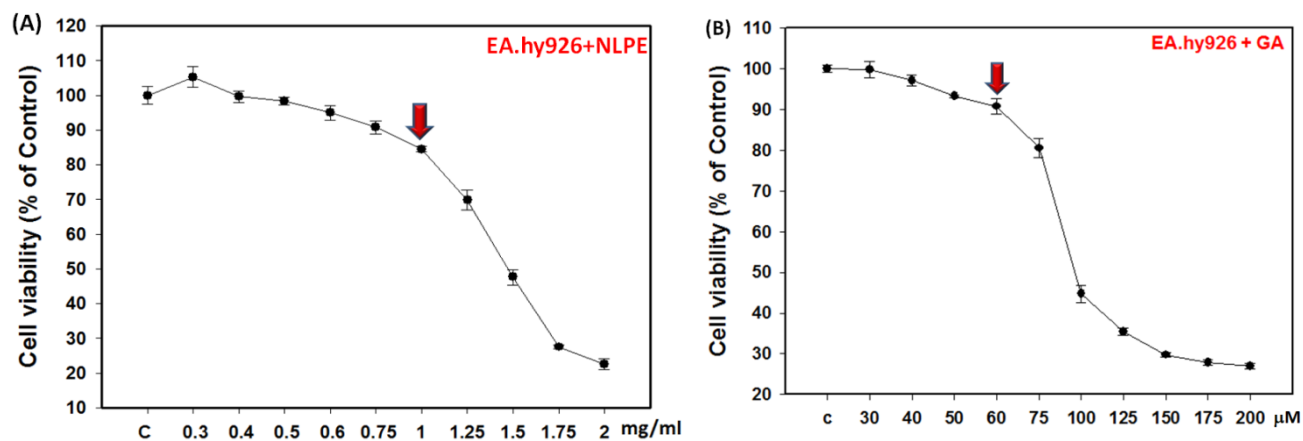
Figure 11. NLPE and GA reduced vascular smooth muscle cell proliferation and migration via targeting miR-21, miR-143, and miR-145.

NLPE and GA reduced Ras and RhoA signaling by increasing miR-143 and miR-145 and increasing the expression of PTEN signaling by reducing miR-21.

## 第二部分(第二、三年計畫): NLPE 和 GA 調控 miRNAs 抑制血管內皮

### 細胞黏附度和泡沫細胞形成之機制

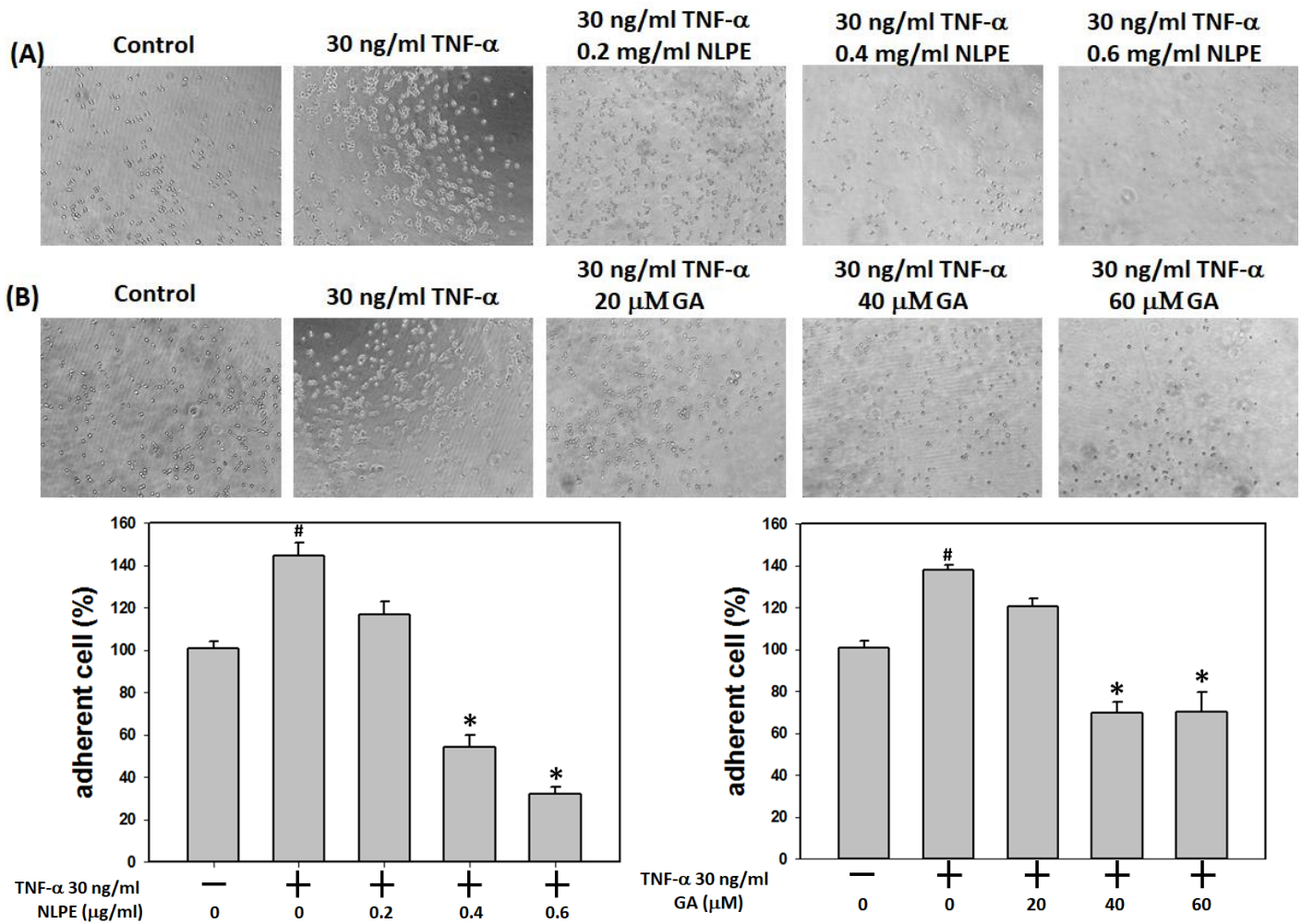
Figure. 12.



**Figure. 12. Cytotoxic effects of NLPE and GA on EA.hy926 cells.** (A) EA.hy926 cells were treated with various concentrations of NLPE (B) GA as indicated. Cell viability was determined by MTT assay. The results were presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.



**Figure. 13.**



**Figure. 13. NLPE and GA inhibited adhesion of EA.hy926 cells.**

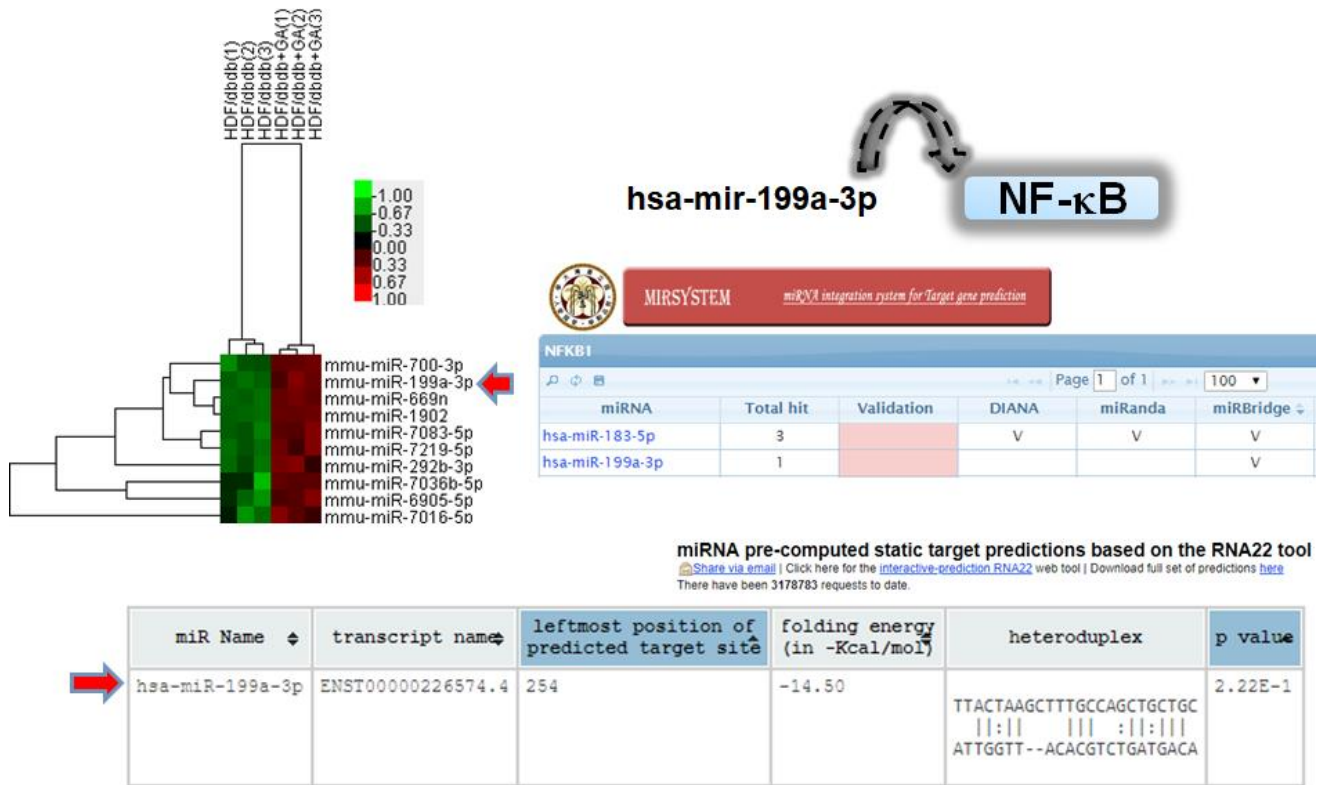
The cells were treated with TNF- $\alpha$  30 ng/ml · NLPE (0.2, 0.4, 0.6 mg/ml) and GA (20, 40, 60  $\mu$ M) and use MEM gel in adhesion assay for 24 hr. Then the cells seeded onto the gel ( $5 \times 10^4$  cells per well) and incubated for 24 hr.

The results were presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

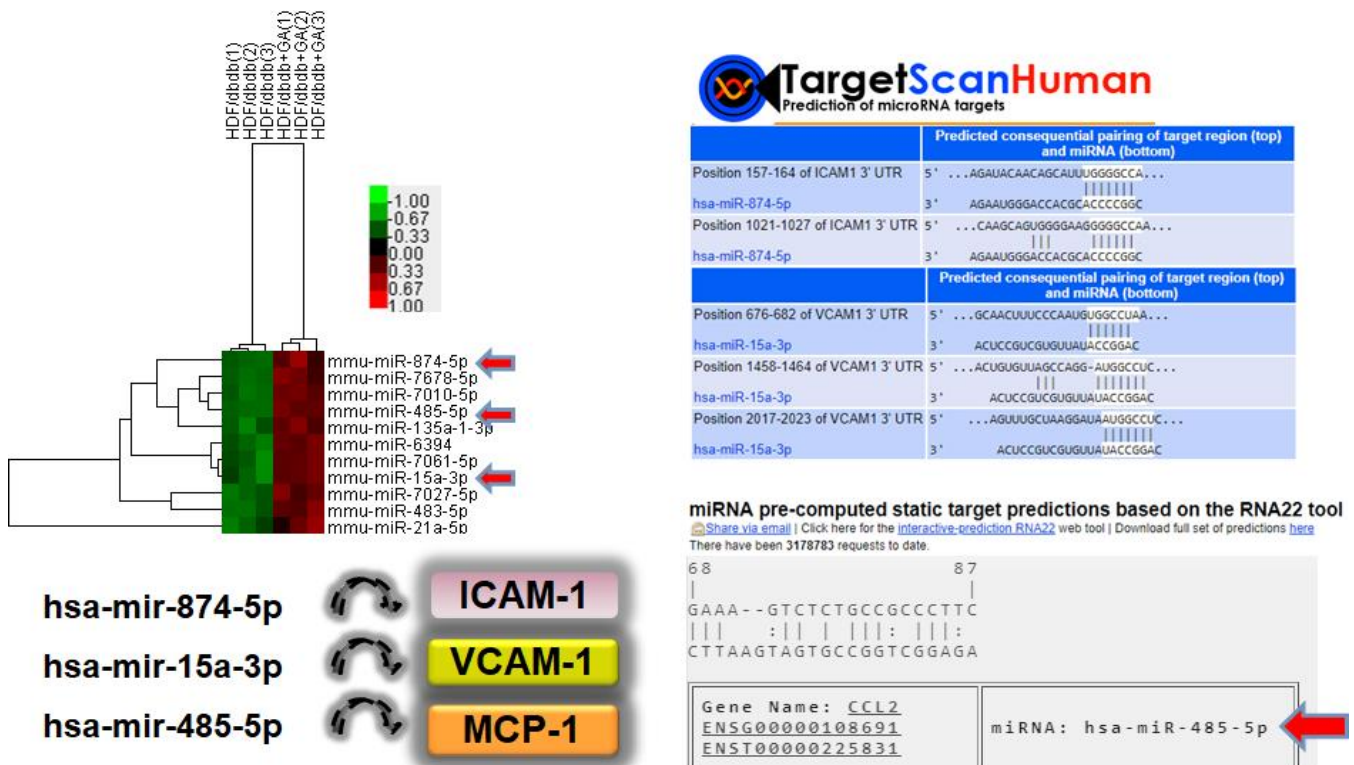
# $p < 0.05$ , compared with control. \* $p < 0.05$  compared with TNF- $\alpha$  group.

**Figure 14.**

(A)



(B)



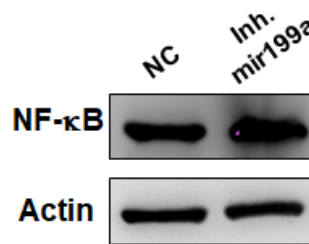
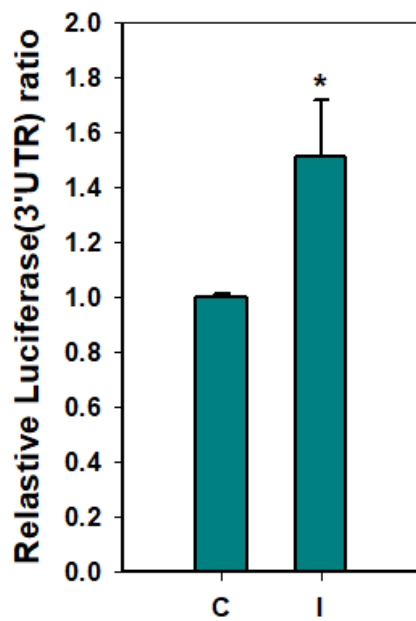
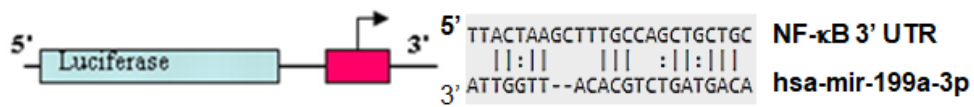
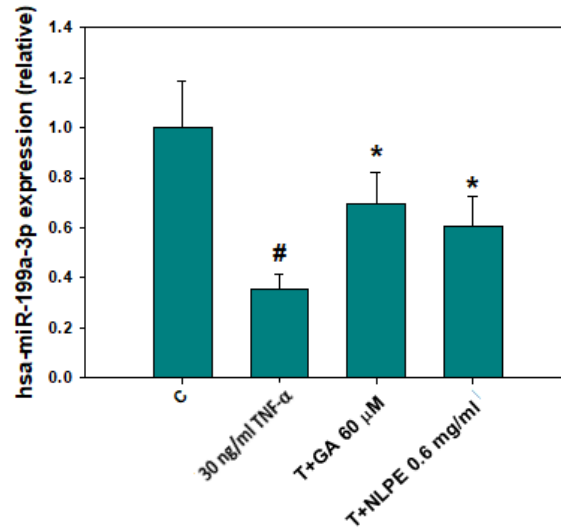
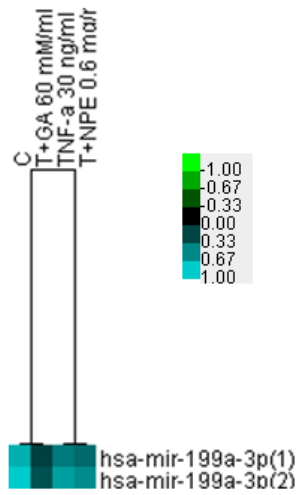
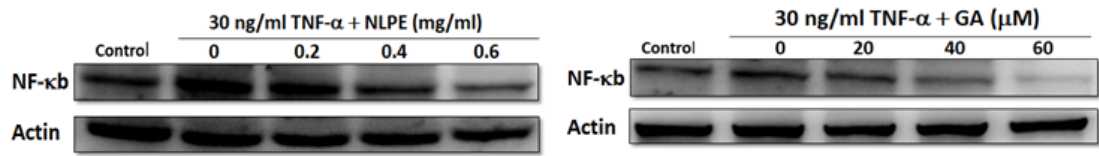
**Figure. 14. To find out the novelty miRNAs related toNF- $\kappa$ B 、**

**ICAM-1 、 VCAM-1 、 MCP-1 and microarray from big data database.**

(A)Find the miRNAs which is related with NF- $\kappa$ B and microarrays data from MIRSYSTEM and RNA22 tool. (B)Find the miRNAs which is related with ICAM-1 、 VCAM-1 and MCP-1 and microarrays data from TargetScan and RNA22 tool.

**Figure. 15.**

(A)



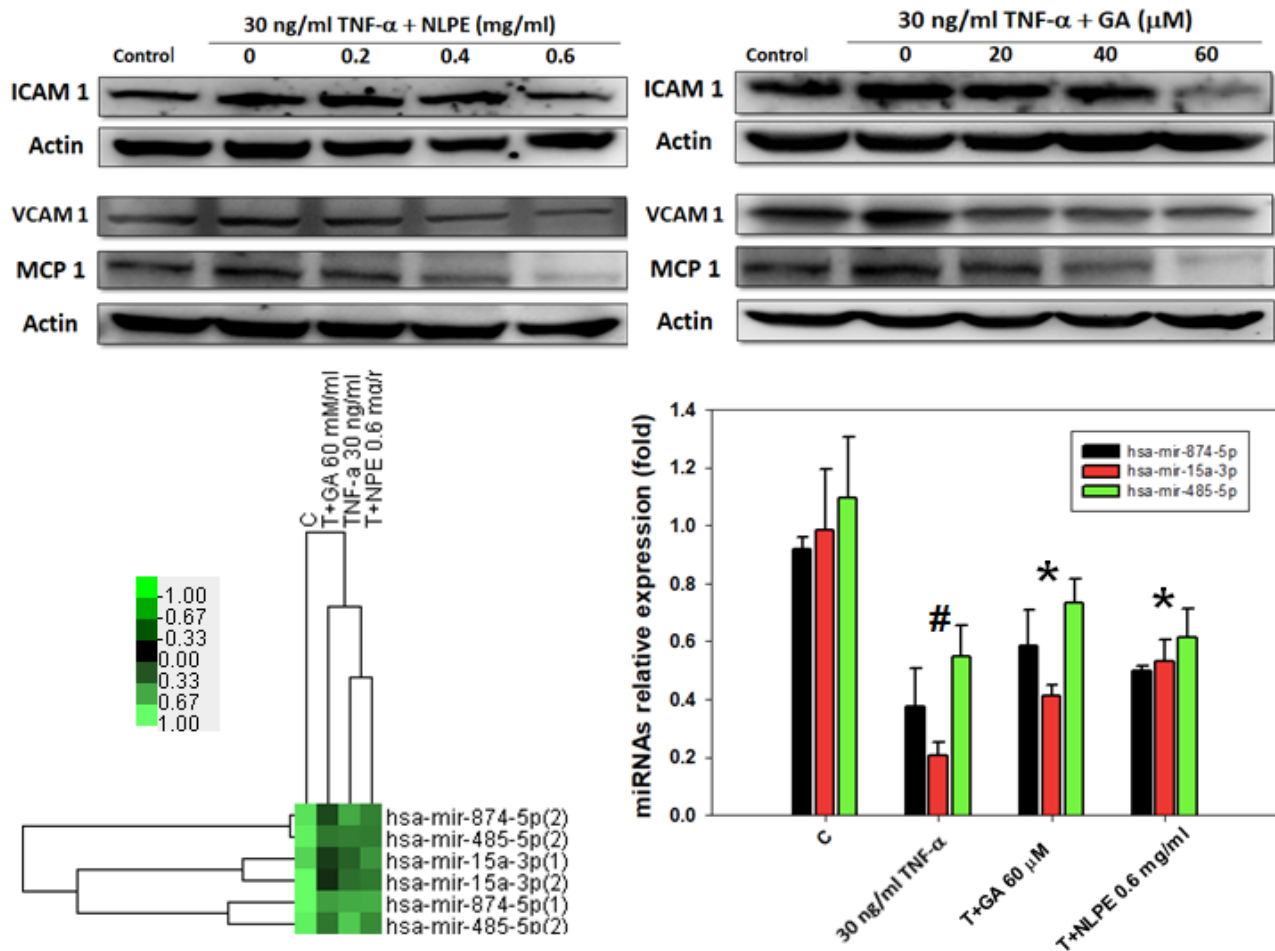
**Figure.15. NLPE and GA effect has-miR-199-3p and targeting protein NF- $\kappa$ B expression.**

(A) The EA.hy926 cells were treated with various concentration of NLPE or GA for 24 h. Western blot analysis NF- $\kappa$ B expression Real-time PCR analysis relative microRNA was done with hsa-miR-199-3p (B) Luciferase assay analysis the targeting between has-miR-199-3p and NF- $\kappa$ B. The results were presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

(A)# $p < 0.05$ , compared with control. \* $p < 0.05$  compared with TNF- $\alpha$  group.

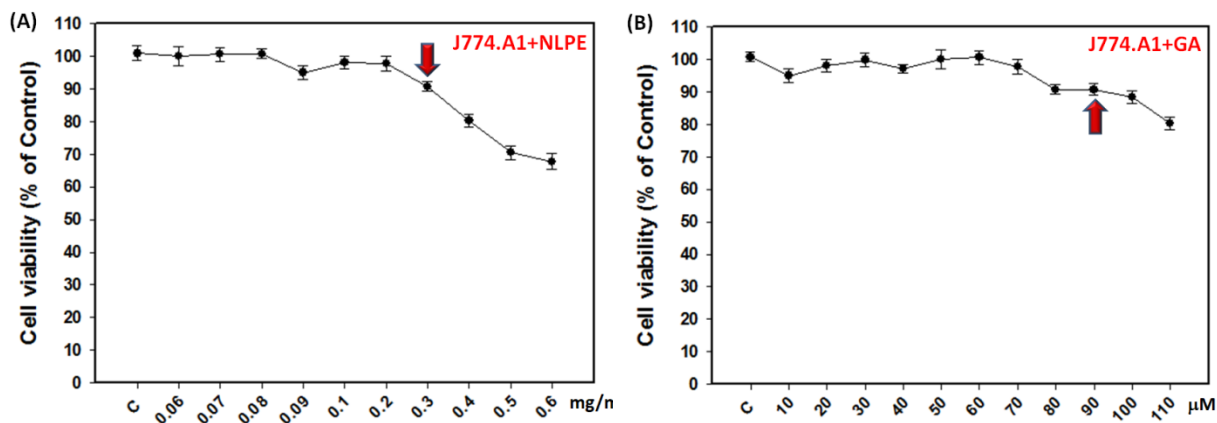
(B) \* $p < 0.05$ , compared with control.

**Figure. 16.**



**Figure.16. NLPE and GA effect has-miR-15a-3p, -485-5p, 874-5p and targeting protein expression.** The EA.hy926 cells were treated with various concentration of NLPE or GA for 24 h. Western blot analysis ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 expression. Real-time PCR analysis relative microRNA was done with has-miR-15a-3p, -485-5p, 874-5p. The results were presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. # $p < 0.05$ , compared with control. \* $p < 0.05$  compared with TNF- $\alpha$  group.

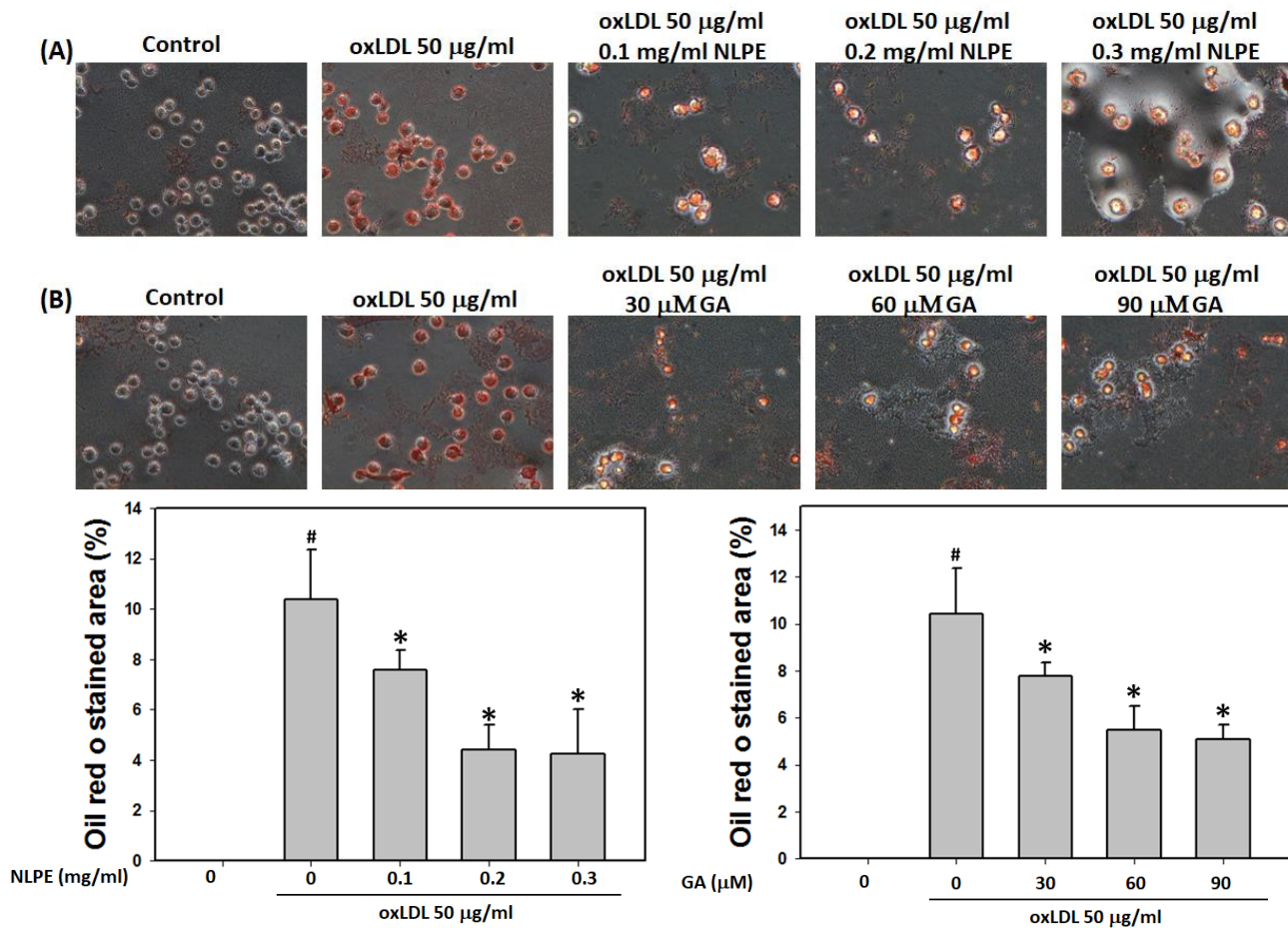
**Figure. 17.**



**Figure. 17. Cytotoxic effects of NLPE and GA on J774.A1 cell. (A)**

J774.A1 cells were treated with various concentrations of NLPE (B) GA as indicated. Cell viability was determined by MTT assay. The results were presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

**Figure. 18.**



**Figure. 18. NLPE and GA inhibited foam cell formation of J744A.1 cells.** The cells were treated with oxLDL 50 μg/ml、NLPE (0.1, 0.2, 0.3 mg/ml) and GA (30, 60, 90 μM) and use oil red assay for 24 hr. The results were presented as mean ± SD of three independent experiments. # $p < 0.05$ , compared with control. \* $p < 0.05$  compared with oxLDL group.



Figure. 19.

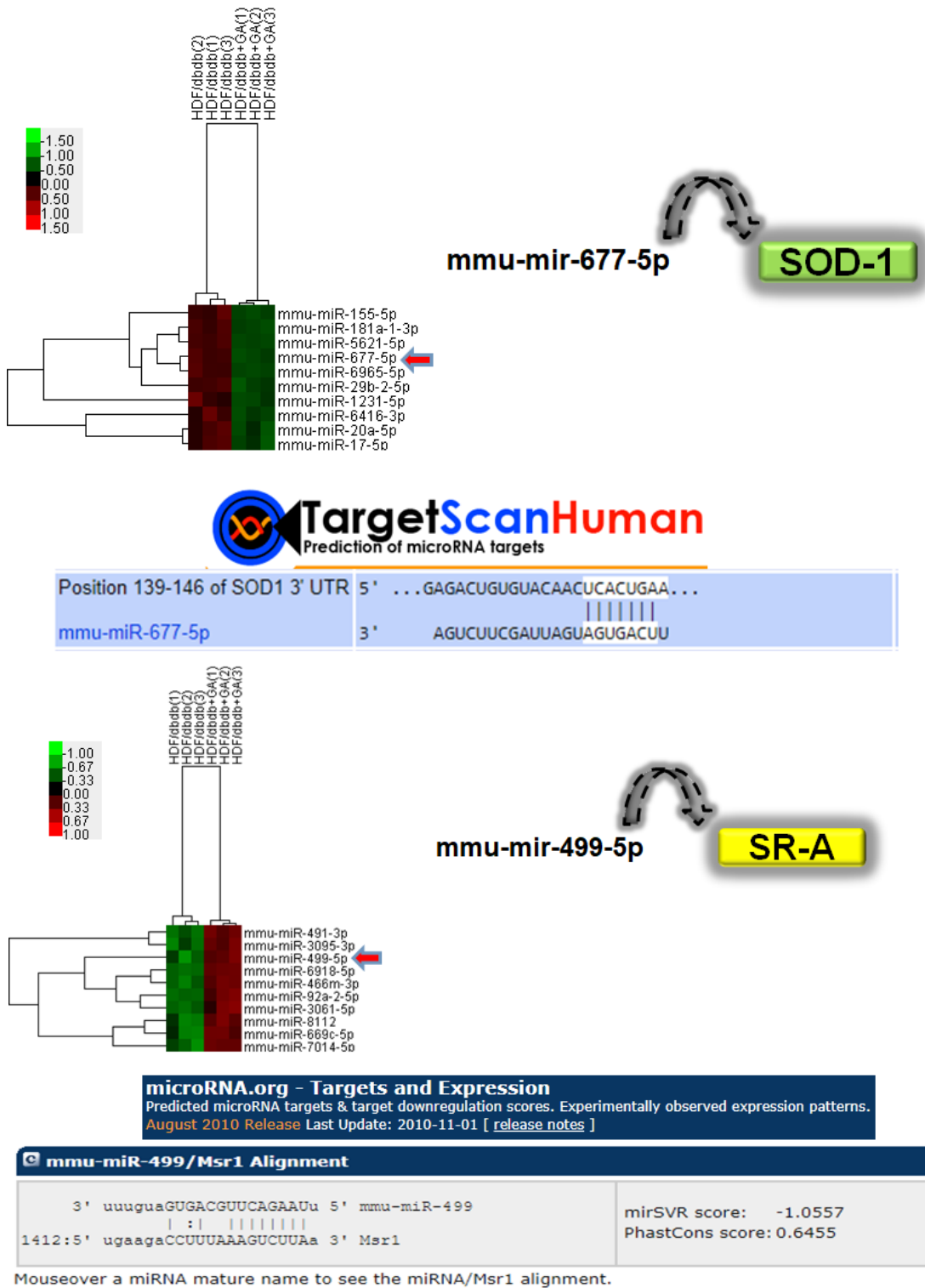
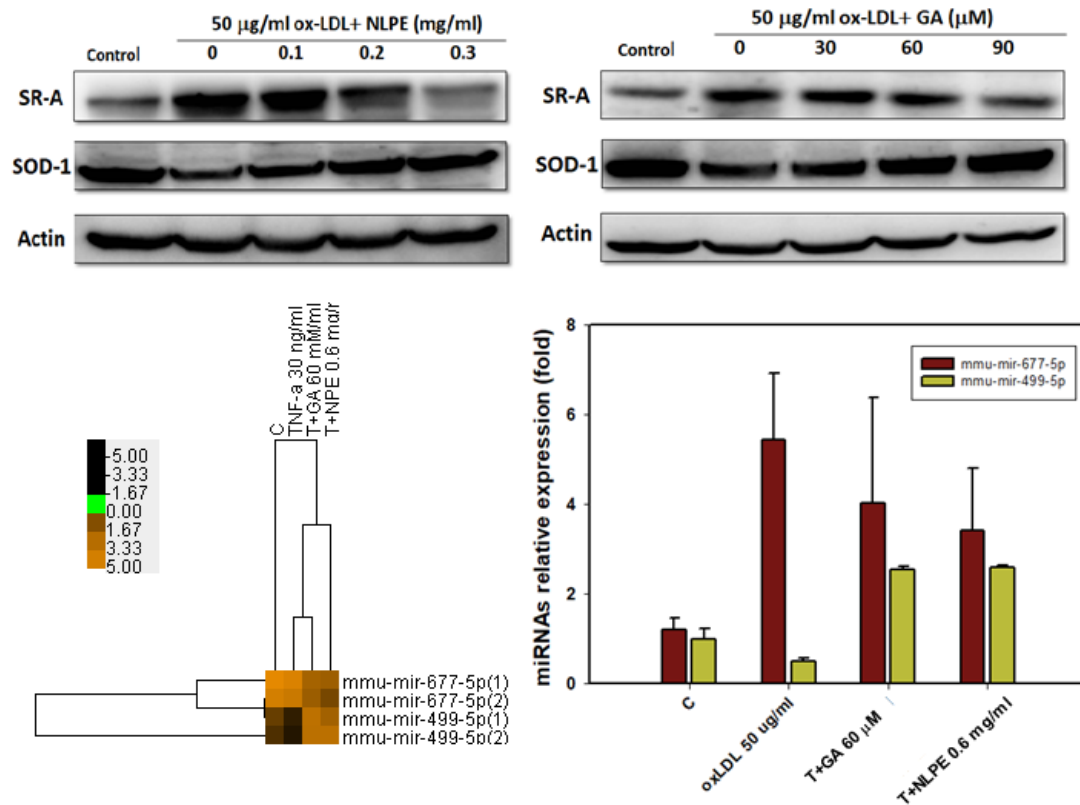


Figure. 19. To find out the novelty miRNAs related to SOD-1、SR-A and microarray from big data database.

Find the miRNAs which is related with SOD-1、SR-A and microarrays data from TargetScan and microRNA.org.

**Figure. 20.**



**Figure. 20. NLPE and GA effect mmu-mir-677-5p, mmu-mir-499-5p and targeting protein expression.**

The J744A.1 cells were treated with various concentration of NLPE or GA for 24 h. Western blot analysis SOD-A and SR-A expression. Real-time PCR analysis relative microRNA was done with mmu-mir-677-5p and mmu-mir-499-5p.

Figure. 21.

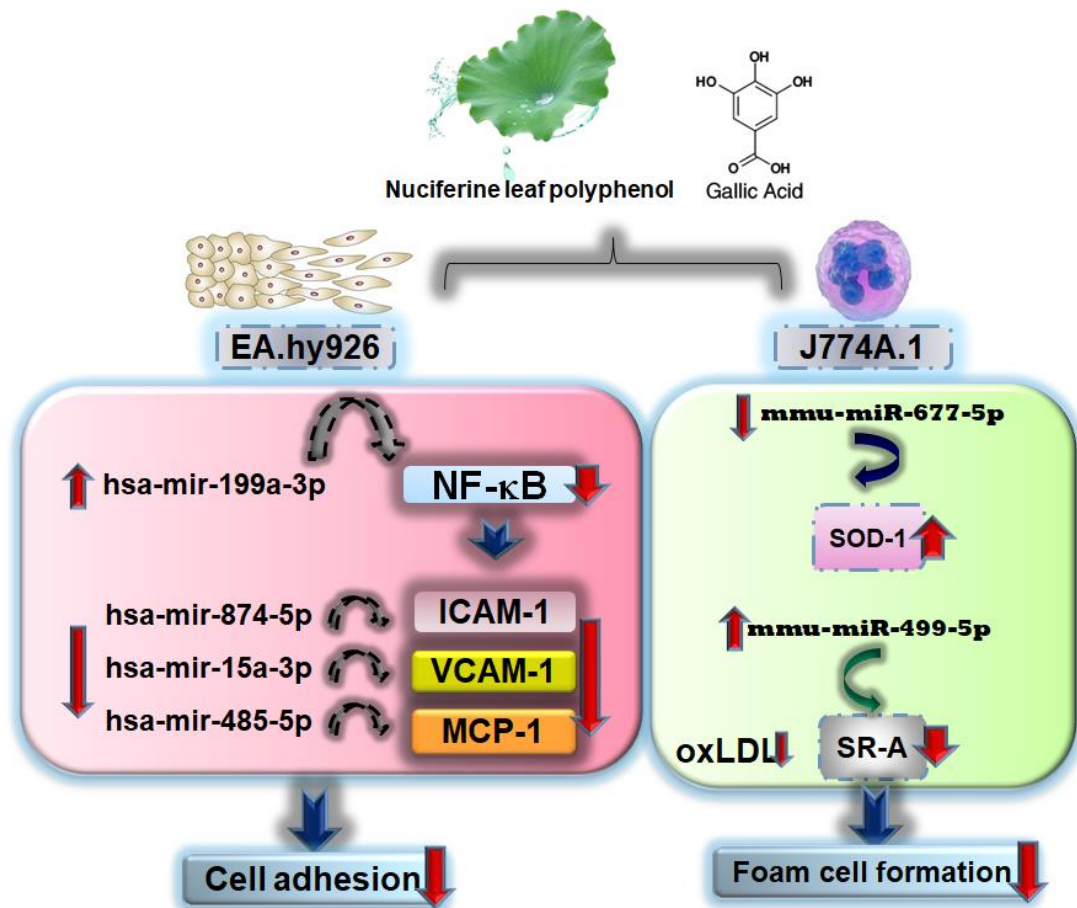
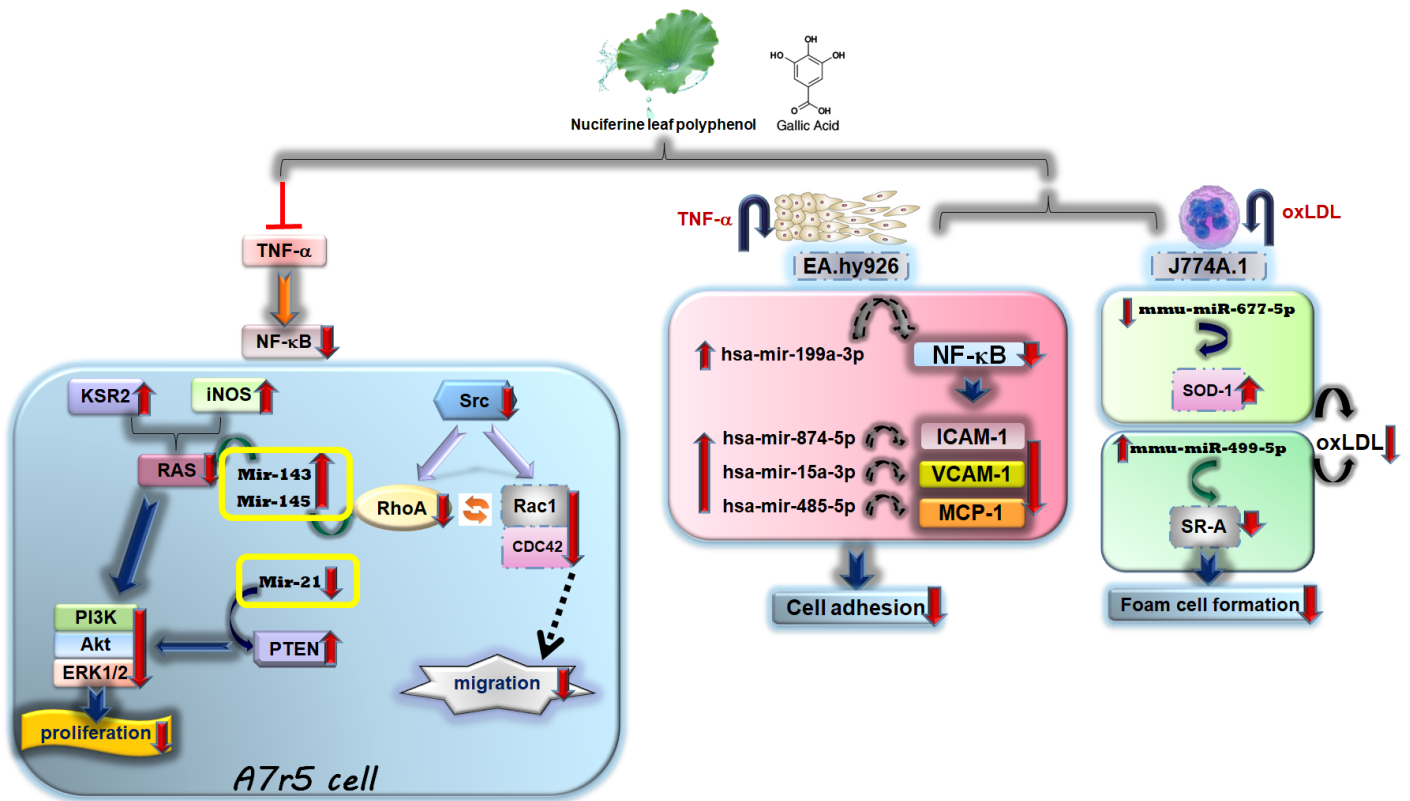


Figure. 21. NLPE and GA reduced vascular endothelial cell adhesion and foam cell formation via targeting hsa-mir-199a-3p、hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p、hsa-mir-485-5p and mmu-mir-499-5p、mmu-mir-677-5p

NLPE and GA reduced NF-κB、VCAM-1、ICAM-1、MCP-1 and SR-A signaling by increasing hsa-mir-199a-3p、hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p、hsa-mir-485-5p、mmu-miR-499-5p and increasing the expression of SOD-1 signaling by reducing mmu-miR-677-5p.

# Summary



NLPE and GA reduced vascular smooth muscle cell proliferation、 migration、 vascular endothelial cell adhesion and foam cell formation via regulating miRNAs.

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：王朝鐘			計畫編號：104-2320-B-040-023-MY3				
計畫名稱：微核醣核酸作為荷葉多酚及主成份沒食子酸和芸香甘抑制心臟血管疾病作用標的及機轉之研究							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇	2017JACBS	
		研討會論文		1			
		專書		0	本		
		專書論文		0	章		
		技術報告		0	篇		
		其他		0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	專利第I530293
				已獲得	1		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		2	篇	1. (2017, Apr). Environmental Toxicology. (Accepted). 2. (2016, May). Journal of Ethnopharmacology , 188:111-122.
			研討會論文		0		
			專書		0	本	
專書論文			0	章			
技術報告			0	篇			
其他			0	篇			
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			

		著作權	0		
		品種權	0		
		其他	0		
	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	1	人次	本計畫之細胞實驗，Western blotting分析
		碩士生	1		本計畫之動物實驗，IHC、Western blotting分析
		博士生	1		本計畫之動物及細胞實驗，miRNA 分析
		博士後研究員	1		本計畫之動物及細胞實驗，miRNA 分析
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)		<p>利用db/db mice餵食高油脂飲食來模擬糖尿病引起心血管病灶之環境。我們在此條件下管餵GA觀察是否可抑制心血管疾病的形成，再利用MicroRNA Array來觀察心血管中miRNAs的表現，之後再利用血管內皮細胞和巨噬細胞之細胞實驗來進行驗證。結果顯示，在內皮細胞中hsa-mir-199a-3p、hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p和hsa-mir-485-5p分別調控NF-<math>\kappa</math>B、ICAM-1、VCAM-1和MCP-1的表現，在處理NLPE和GA後，可藉由提升miRNAs的表現來抑制其target 蛋白表現；另外在巨噬細胞方面，細胞中mmu-mir-677-5p和-499-5p分別調控SOD-1和SR-A的表現，在處理NLPE和GA後，則可藉由降低mmu-mir-677-5p表現來提升SOD-1的表現，提高mmu-mir-499-5p來降低SR-A的表現量。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 可發展荷葉作為抑制心血管疾病的預防或治療產品</li> <li>2. 農產經濟加值</li> <li>3. 找出以miRNA 為荷葉多酚或Gallic acid之治療target</li> <li>4. 已獲得專利第I530293</li> </ol>			

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以200字為限）

1. 發明專利第I530293

2. (2017, Apr). Environmental Toxicology. (Accepted).

3. (2016, May). Journal of Ethnopharmacology, 188:111-122.

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

利用db/db mice餵食高油脂飲食來模擬糖尿病引起心血管病灶之環境。我們在此條件下管餵GA觀察是否可抑制心血管疾病的形成，再利用MicroRNA Array來觀察心血管中miRNAs的表現，之後再利用血管內皮細胞和巨噬細胞之細胞實驗來進行驗證。結果顯示，在內皮細胞中hsa-mir-199a-3p、hsa-mir-874-5p、hsa-mir-15a-3p和hsa-mir-485-5p分別調控NF- $\kappa$ B、ICAM-1、VCAM-1和MCP-1的表現，在處理NLPE和GA後，可藉由提升miRNAs的表現來抑制其target 蛋白表現；另外在巨噬細胞方面，細胞中mmu-mir-677-5p和-499-5p分別調控SOD-1和SR-A的表現，在處理NLPE和GA後，則可藉由降低mmu-mir-677-5p表現來提升SOD-1的表現，提高mmu-mir-499-5p來降低SR-A的表現量。

1. 可發展荷葉作為抑制心血管疾病的預防或治療產品

2. 農產經濟加值

3. 找出以miRNA 為荷葉多酚或Gallic acid之治療target

4. 已獲得專利第I530293

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關行政院農業委員會

<sup>2</sup>  
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

說明：(以150字為限)

1. 可發展荷葉作為抑制心血管疾病的預防或治療產品
2. 農產經濟增值
3. 找出以miRNA 為荷葉多酚或Galleic acid之治療target
4. 已獲得專利第I530293