

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

探討 NO 及 Ras 在桑椹多酚, 原兒茶酸及 rutin 抑制血管病變之角色(第 3 年)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 99-2320-B-040-013-MY3
執行期間：101 年 08 月 01 日至 102 年 07 月 31 日
執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：王朝鐘

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：劉智弘
碩士班研究生-兼任助理人員：林惠婷
博士班研究生-兼任助理人員：張純華
博士班研究生-兼任助理人員：詹宗憲
博士後研究：歐靜慈

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中華民國 102 年 07 月 19 日

中文摘要： 第一年：首先分離桑椹水萃取物 (MWEs) 及其中所含之多酚化合物 (MPEs) 發現其抗氧化與抑制泡沫細胞 (foam cells) 形成的能力。除此之外；在本實驗中證實桑椹萃取物能有效抑制巨噬細胞 scavenger receptors (CD36、SR-A) 的表達，進而達到抑制泡沫細胞的形成 (圖一 A)。進一步發現桑椹萃取物會誘導過度增生狀態的 VSMC 凋謝死亡 (apoptosis)。從 western blot 的結果顯示：與凋謝死亡相關的蛋白如：p-p53、Myc、Bax、Fas、FasL、cytochrome c、caspase 3, 8, 9、MAPK family (p-SEK、p38、p-JNK、p-Jun)，在桑椹萃取物處理後的細胞中呈現增加的趨勢。相對的抗凋謝死亡的相關蛋白 Bcl-2、Mcl-1、PI3K、Akt、NF- κ B 等，表現量則都明顯下降。推測桑椹萃取物主要在於抑制 anti-apoptotic related proteins 的表達進而誘發細胞產生 apoptosis (圖一 B)。

第二年：利用較低的劑量來發現桑椹萃取物對 VSMC 細胞週期有停滯於 G1 phase 的現象。phospho- p53 (p-p53)、p27、p21、p16 表現皆有增加的情形；透過免疫沉澱法 (Immunoprecipitation) 分析得知 cyclin D1/CDK4、cyclin A、E/CDK2 及 p53/Mdm2 蛋白實際結合情形隨著萃取物處理時間增加而減少 (圖二 A)。最後證實，桑椹萃取物可藉由 iNOS 誘導血管平滑肌細胞 NO 產生並活化 AMPK，藉此機轉而誘導 VSMC 細胞週期停滯 (圖二 B)。進一步用 Zymography assay、western blot、EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) 分析，證實是桑椹萃取物透過降低 NF- κ B 轉錄活性進而降低 Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) 基因的表現；另外 FAK、RhoA、Rac-1、Cdc42、Ras 調節細胞移動與細胞骨架組裝的蛋白，其蛋白表現也受到抑制 (圖二 C)。進一步在 Ras 轉殖的一連串實驗中證實桑椹萃取物造成 Ras 蛋白的分解達到抑制 VSMC 移動及增生的能力 (圖二 D)。

第三年：在 Ras 轉殖的一連串實驗中證實，桑椹萃取物可透過 iNOS 與 AMPK 的活化造成 Ras 蛋白的分解，進而達到抑制 VSMC 移動的能力。透過 ACC 磷酸化，可消耗體內的 acetyl CoA，避免 acetyl CoA 走向 HMG-CoA reductase 的路徑進而減少 Ras post-translational 修飾作用，同樣也間接地促進 Ras 的分解。證實桑椹萃取物能有效阻斷脂質代謝路徑有關，因為這些蛋白的活性都與 post-translational 修飾作用中的 farnesylation 有關。進一步利用 Ras 轉殖誘導 VSMC 老化的模式中，證實桑椹萃取物是透過 AMPK 活化而抑制 VSMC 中 Ras 的過度表現，而達到減緩 Ras 所誘導的細胞老化。表示桑椹萃取物透過抑制 VSMC 細胞老化的現象，可以減少血管

斑塊不穩定與剝離的機會。這些結果我們也經由兔子 atherosclerosis 的模式確認。

綜合上述結果顯示，桑椹萃取物 (MWEs 與 MPEs) 同時兼具抗 LDL 氧化及抑制血管平滑肌細胞增生的作用、而在極低的劑量下就能成功的預防血管平滑肌細胞的轉移與老化。推測其具有良好保護心臟血管的功能，可作為將來自然保健產品的開發與應用。

中文關鍵詞：桑椹、多酚萃取物、動脈粥狀硬化、血管平滑肌細胞、增生與移動、Ras 蛋白

英文摘要：In this study, we evaluated two extracts, MWEs (mulberry water extracts) and MPEs (mulberry polyphenol-rich extracts), which exhibited antioxidative ability in vitro. Our results showed that low doses of MPEs were able to reduce the REM, Apo B fragmentation, and MDA formation in Cu²⁺-mediated LDL oxidation model. MWEs and MPEs also had strong ability of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging. Further, we demonstrated that mulberry extracts could inhibit the foam cell formation and inhibit the expression of the macrophages scavenger receptors (CD36, SR-A) expression induced by oxLDL (Fig.1A). Mulberry extracts showed strong potency for scavenging radical, and inhibiting the LDL oxidation and foam cell formation.

We also have demonstrated that the MWEs can effectively inhibit LDL oxidation and reduce the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. MWEs and MPEs could inhibit the migration and proliferation of ASMCs (A7r5 cells) by down regulation of Ras/PI3K/Akt pathway. MWEs and MPEs caused cell cycle arrest by inducing AMPK activation and attenuating of cyclin D/CDK and p53/Mdm2 complexes (Fig.2). At highly concentration of the extracts, MWEs and MPEs induced apoptosis by down regulation anti-apoptosis proteins strongly (Fig.1B). we also observed MWEs and MPEs could inhibit the migration and proliferation in Ras-transfected ASMCs (A7r5 cells) by down regulation of Ras-mediated PI3K/Akt/ NF- κ B and FAK/small GTPase pathways. MWEs and MPEs caused cell cycle arrest by inducing Ras-

mediated CDKI and attenuating of cyclin D/CDK and p53/Mdm2 complexes. In conclusion, MWEs and MPEs can inhibit proliferation and migration of ASMCs by decrease the transcription activity of NF- κ B, inhibit FAK/small GTPase and activate CDKI , which were mediated by Ras degradation (Fig. 2D).

Additional mechanistic studies showed that MWEs induced the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and iNOS and the inhibition of Ras via blocking farnesylation. Furthermore, the ras transfected ASMCs, MWEs reduced ras-mediated senescence. Therefore, it is suggested that the mulberry could be a healthy food to prevent individuals from atherosclerosis .

英文關鍵詞： Atherosclerosis, Vascular smooth muscle cell (VSMC), Mulberry water extracts (MWEs), Polyphenol extracts (MPEs), Ras/PI3K/Akt pathway, Apoptosis, Migration, Nitrite oxide (NO), AMPK, Senescence.

探討 NO 及 Ras 在桑椹多酚,原兒茶酸及 rutin
抑制血管病變的角色

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2320-B-040-013-MY3

執行期間：99 年 08 月 01 日至 102 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學 生化暨生物科技研究所

計畫主持人：王朝鐘

計畫參與人員：歐靜慈 李憶如 陳靜君

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

- 移地研究心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中 華 民 國 102 年 05 月

目 錄

壹、中文摘要.....	II
貳、英文摘要.....	IV
參、報告內容	
一、前言.....	1
二、研究方法.....	6
三、研究成果說明.....	11
四、研究成果討論.....	21
五、研究成果圖表.....	24
肆、參考文獻.....	49

壹、中文摘要

關鍵字：桑椹、多酚萃取物、動脈粥狀硬化、血管平滑肌細胞、增生與移動、Ras 蛋白

第一年：首先分離桑椹水萃取物 (MWEs) 及其中所含之多酚化合物 (MPEs) 發現其抗氧化與抑制泡沫細胞 (foam cells) 形成的能力。除此之外；在本實驗中證實桑椹萃取物能有效抑制巨噬細胞 scavenger receptors (CD36、SR-A) 的表達，進而達到抑制泡沫細胞的形成 (圖一 A)。進一步發現桑椹萃取物會誘導過度增生狀態的 VSMC 凋謝死亡 (apoptosis)。從 western blot 的結果顯示：與凋謝死亡相關的蛋白如：p-p53、Myc、Bax、Fas、FasL、cytochrome c、caspase 3,8,9、MAPK family (p-SEK、p38、p-JNK、p-Jun)，在桑椹萃取物處理後的細胞中呈現增加的趨勢。相對的抗凋謝死亡的相關蛋白 Bcl-2、Mcl-1、PI3K、Akt、NF- κ B 等，表現量則都明顯下降。推測桑椹萃取物主要在於抑制 anti-apoptotic related proteins 的表達進而誘發細胞產生 apoptosis (圖一 B)。

第二年：利用較低的劑量來發現桑椹萃取物對 VSMC 細胞週期有停滯於 G1 phase 的現象。phospho-p53 (p-p53)、p27、p21、p16 表現皆有增加的情形；透過免疫沉澱法 (Immunoprecipitation) 分析得知 cyclin D1/CDK4、cyclin A、E/CDK2 及 p53/Mdm2 蛋白實際結合情形隨著萃取物處理時間增加而減少 (圖二 A)。最後證實，桑椹萃取物可藉由 iNOS 誘導血管平滑肌細胞 NO 產生並活化 AMPK，藉此機轉而誘導 VSMC 細胞週期停滯 (圖二 B)。進一步用 Zymography assay、western blot、EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) 分析，證實是桑椹萃取物透過降低 NF- κ B 轉錄活性進而降低 Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) 基因的表現；另外 FAK、RhoA、Rac-1、Cdc42、Ras 調節細胞移動與細胞骨架組裝的蛋白，其蛋白表現也受到抑制 (圖二 C)。進一步在 Ras 轉殖的一連串實驗中證實桑椹萃取物造成 Ras 蛋白的分解達到抑制 VSMC 移動及增生的能力 (圖二 D)。

第三年：在 Ras 轉殖的一連串實驗中證實，桑椹萃取物可透過 iNOS 與 AMPK 的活化造成 Ras 蛋白的分解，進而達到抑制 VSMC 移動的能力。透過 ACC 磷酸化，可消耗體內的 acetyl CoA，避免 acetyl CoA 走向 HMG-CoA reductase 的路徑進而減少 Ras post-translational 修飾作用，同樣也間接地促進 Ras 的分解。證實桑椹萃取物能有效阻斷脂質代謝路徑有關，因為這些蛋白的活性都與 post-translational 修飾作用中的 farnesylation 有關。進一步利用 Ras 轉殖誘導 VSMC 老化的模式中，證實桑椹萃取物是透過 AMPK 活化而抑制 VSMC 中 Ras 的過度表現，而達到減緩 Ras 所誘導的細胞老化。表示桑椹萃取物透過抑制 VSMC 細胞老化的現象，可以減少血管斑塊不穩定與剝離的機會。這些結果我們也經由兔子

atherosclerosis 的模式確認。

綜合上述結果顯示，桑椹萃取物（MWEs 與 MPEs）同時兼具抗 LDL 氧化及抑制血管平滑肌細胞增生的作用、而在極低的劑量下就能成功的預防血管平滑肌細胞的轉移與老化。推測其具有良好保護心臟血管的功能，可作為將來自然保健產品的開發與應用。

貳、英文摘要

In this study, we evaluated two extracts, MWEs (mulberry water extracts) and MPEs (mulberry polyphenol-rich extracts), which exhibited antioxidative ability *in vitro*. Our results showed that low doses of MPEs were able to reduce the REM, Apo B fragmentation, and MDA formation in Cu^{2+} -mediated LDL oxidation model. MWEs and MPEs also had strong ability of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging. Further, we demonstrated that mulberry extracts could inhibit the foam cell formation and inhibit the expression of the macrophages scavenger receptors (CD36, SR-A) expression induced by oxLDL (Fig.1A). Mulberry extracts showed strong potency for scavenging radical, and inhibiting the LDL oxidation and foam cell formation.

We also have demonstrated that the MWEs can effectively inhibit LDL oxidation and reduce the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. MWEs and MPEs could inhibit the migration and proliferation of ASMCs (A7r5 cells) by down regulation of Ras/PI3K/Akt pathway. MWEs and MPEs caused cell cycle arrest by inducing AMPK activation and attenuating of cyclin D/CDK and p53/Mdm2 complexes (Fig.2). At highly concentration of the extracts, MWEs and MPEs induced apoptosis by down regulation anti-apoptosis proteins strongly (Fig.1B). we also observed MWEs and MPEs could inhibit the migration and proliferation in Ras-transfected ASMCs (A7r5 cells) by down regulation of Ras-mediated PI3K/Akt/ NF- κ B and FAK/small GTPase pathways. MWEs and MPEs caused cell cycle arrest by inducing Ras-mediated CDKI and attenuating of cyclin D/CDK and p53/Mdm2 complexes. In conclusion, MWEs and MPEs can inhibit proliferation and migration of ASMCs by decrease the transcription activity of NF- κ B, inhibit FAK/small GTPase and activate CDKI, which were mediated by Ras degradation (Fig.2D).

Additional mechanistic studies showed that MWEs induced the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and iNOS and the inhibition of Ras via blocking farnesylation. Furthermore, the ras transfected ASMCs, MWEs reduced ras-mediated senescence. Therefore, it is suggested that the mulberry could be a healthy food to prevent individuals from atherosclerosis.

Key words : Atherosclerosis, Vascular smooth muscle cell (VSMC), Mulberry water extracts (MWEs), Polyphenol extracts (MPEs), Ras/PI3K/Akt pathway, Apoptosis, Migration, Nitrite oxide (NO), AMPK, Senescence.

參、報告內容

一、前言

(一) 桑椹之背景介紹

桑椹為桑樹所結出來的果實，《本草經疏》記載：「桑椹，甘寒益陰而除熱，為涼血補血益陰之藥。」，自古即被用來防治頭暈、目眩、盜汗、消渴、腸燥、便秘等現象的傳統中藥材，且有鎮靜的效果(1)。桑椹含有十八種氨基酸及多種維他命，如維他命 B1、B2、C、A、D、E 和胡蘿蔔素，葡萄糖，果糖，蘋果酸以及鈣質、鐵質等，營養成份十分豐富。過去文獻已經證實桑椹中花青素 (anthocyanins) 及其他多酚類 (polyphenols) 化合物含量豐富(2-3)，且這些成分具有抗氧化、抗發炎和化學預防的特性，能夠降低心血管疾病和癌症的發生率(4-6)。雖然目前國內對桑椹的作用研究甚少，我們研究證明桑椹具有降血脂及抑制血管病變、提升肝臟排除脂肪的功能及進一步證實在細胞和動物血管有抑制血管平滑肌細胞之增生及位移。

(二) 動脈粥狀硬化的機轉 (pathogenesis)

1. 動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 的起始因子

動脈粥狀硬化的發生為一複雜且為漸進式的一種致病過程。現有的證據認為當血管內皮細胞 (endothelial cell) 受到損害或是功能不全時，造成內皮細胞對脂蛋白以及血漿中的其他組成分子的通透性增加，進而造成單核球以及內皮細胞的黏著分子 (adhesion molecules) 表現增加，顯示動脈硬化是一種長期性的發炎反應(7)。一旦血管腔 (vascular lumen) 間隙增加，LDL 就可由變大的間隙進入血管內膜(intima)當中，之後容易受到 intima 中內生性的氧化因子如: myeloperoxidase、nitric oxidaseynthase 與 15-lipoxygenase 等氧化，形成氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) (8-11)。而氧化型低密脂蛋白 (ox-LDL) 的形成將吸引巨噬細胞趨化，並加以清除 (macrophage uptake)。

脂質的過氧化作用先從 LDL 表面磷脂質的多元不飽和脂肪酸開始，然後擴增至核心脂質，因而導致多元不飽和脂肪酸、膽固醇、磷脂質的氧化修飾以及 ApoB 的分解。ox-LDL 組成包含有 oxidized phospholipids、phosphatidyl choline、modified ApoB proteins、oxidized lipids 等，這類物質具有促使血管內皮細胞 (endothelium cell) 損傷，使內皮細胞的功能失調的特性，容易造成更多循環於血液中的 LDL 進入血管內膜中，進入血管內膜的 LDL 失去血液中抗氧化劑的保護，並受到內生性因子的氧化，形成更多的 ox-LDL 導致一惡性循環(12)。ox-LDL 會促使內皮細胞表達單核球 (monocyte) 的附著分

子 (adhesion molecules) 如：VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule-1)、E-selectin、P-selectin、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 等(13-15)，而吸引 T cell 與 monocyte 黏附於內皮細胞表面，並受到來自於血管內皮細胞或 ox-LDL 所誘發表達的趨化分子 (chemotactic molecules) 如：MCP-1 (monocytechemotactic protein-1)、MCP-1 接受器 CCR-2 的作用，而轉移進入血管內膜(16-19)。

2. 泡沫細胞 (foam cell) 的生成

當單核球轉移至血管內膜後，單核球會受M-CSF (macrophage monocyte-colony-stimulating factor) 影響而分化 (differentiation) 形成巨噬細胞 (macrophage) (20)。巨噬細胞會表達吞噬ox-LDL的清除者接受器(scavenger receptors):CD36與SR-A(scavenger receptors A)而將ox-LDL吞噬到細胞體內。ox-LDL可透過活化一些細胞內的分子機制來誘導巨噬細胞吞噬ox-LDL，如：ox-LDL可活化轉錄因子PPAR γ 來促使CD36大量表達(21)，ox-LDL也可以經活化轉錄因子AP-1來促使SR-A大量表達，這些清除者接受器若表達過多則會使巨噬細胞吞噬過量的ox-LDL，而使得膽固醇、脂質堆積過多於細胞中，導致巨噬細胞改變型態，形成泡沫細胞 (foam cell)。泡沫細胞的形成是早期動脈粥狀硬化發生的主要特徵。大量的泡沫細胞聚集堆積在動脈管壁上形成脂肪斑 (fatty streak)。在動脈硬化發展的過程當中，泡沫細胞會逐漸走向細胞死亡 (apoptosis 或necrosis) (22)，當細胞死亡後，原本經吞噬而囤積於細胞內的膽固醇、脂質便會流出，並與死亡的細胞殘骸形成局部性壞死區域 (necrotic core) (23)。Necrotic core發生之後則會促使”gruel”的形成。”Gruel”為一種糜粥狀的油脂聚合物，也是形成動脈粥狀硬化斑的主因。

3. 血管平滑肌細胞的增生 (proliferation)、移動 (migration) 與免疫反應 (immunologic responses)

平滑肌細胞是構成大型血管的主要細胞。目前已知的證據顯示，在許多的心血管相關疾病的形成過程中。在病程的發展中期，巨噬細胞會與血管內膜中的 T cell 交互作用釋放大量的細胞激素 (Th1、Th2 cytokines) 而促使一連串的免疫反應 (immunologic responses) 的發生(24)，同時周圍的血管平滑肌細胞 (vascular smooth muscle cell) 及內皮細胞 (endothelium cell) 同樣也會表達生成 IL-1 (interleukin-1)、TNF (tumor necrosis factor) 等因子，而這些分子的生成會刺激血管平滑肌細胞的增生，並轉移至 intima 或 subendothelial 當中。由此可知，平滑肌細胞往血管內層的移動和增生是造成血管內層增厚的主要原因。血管平滑肌細胞轉移至 intima 後，同樣也會受 ox-LDL 影響開始表達清除者接受器 (scavenger receptor) 而吞噬 ox-LDL 形成泡沫細胞。此外，血管平滑肌細胞也會開始分泌 MMPs，改變細胞外基質的構成，促使局部區域形成”fibrous cap”，而將 gruel 覆蓋形成動脈粥狀硬化斑 (plaque)。自此病程由初期單純的脂肪斑形成轉入一個複雜的血管壁管腔損傷的階段。

(三) 血管平滑肌細胞增生與細胞週期 (cell cycle)

細胞週期中，cyclins 和 cyclin-dependent kinase (CDK) 是最重要的調控因子，其可以正向調控細胞週期(25)。細胞週期的進行會透過 3 個不同的機制來調控分別是 1. cyclin 蛋白的表現量；2. cyclin-dependent kinase (CDK) 的活性以及；3. cyclin-dependent kinase inhibitors 的抑制作用(26)。當細胞受到生長因子刺激後，一些跟細胞週期進行相關的蛋白（如：Rb、E2F、cyclin 與 CDK 等等）會被活化(27)。在 G1 早期 (early G1 phase)，cyclin D 會與 CDK4 或 CDK6 形成複合體，使 Rb 蛋白磷酸化 (prephosphorylation)，進而釋放出轉錄因子 E2F，接著，在 G1 晚期 (late G1 phase)，cyclinE/CDK2 可使 Rb 蛋白完全磷酸化 (full-phosphorylation)，進而促使細胞週期進入 S phase，此時 cyclinA/CDK2 會因而活化(28)。另外，當 Rb 蛋白磷酸化後，釋放出 free-E2F，E2F 是一轉錄因子，會與下游 S phase 之專一蛋白結合，進行轉錄作用(29)。上述三個調控細胞週期進行的機制都與細胞生長有極密切的關係。

(四) 血管平滑肌細胞之移動 (migration)

若血管發生病變，平滑肌細胞則有可能會改變成合成型的細胞，開始增生並且向血管內層遷移。這時候的平滑肌細胞特徵是收縮相關蛋白的減少，內漿質網 (endoplasmic reticulum) 及高爾基體 (Golgi body) 量增加並增加生長激素、蛋白酶與細胞外基質蛋白的分泌。

平滑肌細胞的移行是一個很複雜的過程，根據 Leeuwen 的區分法(30)，平滑肌細胞移行大約可以分成四個步驟：(a) 平滑肌細胞與細胞間的交互作用或與附著分子以及胞外間質之間的作用；(b) 細胞外蛋白質被分解，在胞外間質形成一個三度空間的通路；(c) 細胞在一受質上產生移動性；(4) 產生趨化性，可能是沿著化學趨化物質的濃度梯度移動，或者往趨化物質濃度較低的方向移動。平滑肌細胞是構成大型血管的主要細胞。目前已知的證據顯示，在許多的心血管相關疾病的形成過程中，平滑肌細胞往血管內層的移行和增生是造成血管內層增厚的主要原因之一，如動脈粥狀硬化與血管擴張術所引發的血管受傷與窄化。

(五) Ras 與脂肪酸代謝的關聯

Ras 蛋白為 small GTPase 的一種，其功能為調節細胞的生長、增殖以及分化。Ras 在細胞內發揮訊息傳導的功能，調控細胞生長之前，仍必須先依附到細胞膜內側，和細胞膜上的生長因子受體及受體旁的一些作用分子接觸並進行交互作用，啟動一系列包括了 PI3K-PKB/AKT 等下游路徑的活化，進而促使細胞成長及存活。而 Ras 必須透過 Prenylation 反應後才能順利的到達細胞膜上。

Prenylation 反應指的是透過 transferase 的催化，利用共價結合方式在某些蛋白 COOH 端附近的 cysteine 胺基酸上加 farnesyl (15 碳) 或 geranylgeranyl (20 碳) 的脂類鏈(31)。某些本身較親水性的蛋白在活化時必須適切的與細胞膜接觸、以執行其功能和完成刺激訊息的傳遞，而 Prenylation 反應則對這些親水性的蛋白提供與細胞膜接觸的親合力；這類蛋白中最常見的即是 small GTP-binding 蛋白(或稱為 small GTPases)。上述 post-translational 修飾作用 (共價結合反應)，使 Ras 家族或 Rho 家族蛋白具有細胞膜的轉位活性 (membrane translocation activity) 並且執行其專屬的功能，包括與細胞生存、增殖分裂、細胞分化、細胞附著與入侵力等的訊息傳遞路徑具有相關性。而 HMG-CoA reductase 又與 farnesyltransferase(FTase)、geranylgeranyltransferase 之間有個密不可分的關係。由於 HMG-CoA reductase 會催化 HMG-CoA 產生 mevalonate，細胞內 mevalonate 是多種物質合成的先驅物 (precursor)，例如，攸關 Ras 與 Rho 家族蛋白活化能力的 15 碳與 20 碳脂肪鏈 (isoprenoids: farnesyl pyrophosphate 與 geranylgeranyl pyrophosphate)，因此 Ras 的表現與血管平滑肌細胞內的脂質代謝有著緊密的關聯。

(六) NO 與 AMPK 與脂肪酸代謝的關係

人體中的 NOS 具有三類，主要分別表現在神經、內皮、巨噬三種細胞中。神經細胞中的 neuronal NOS (nNOS) 產生的 NO 可增強 long term potentiation，對記憶及學習具有促進作用。內皮與上皮細胞中的 endothelial NOS (eNOS) 則分泌 NO 促使周遭組織擴張，eNOS 的正常表現對小動脈之血壓調節、氣管收縮、腸胃平滑肌鬆弛都很重要。另一類可被誘導大量表現的 inducible NOS (iNOS) 則存在多種細胞中，免疫系統中的巨噬細胞可被活化而引發大量 iNOS 的表現，進而產生高量 NO，是巨噬細胞狙殺微生物及癌細胞的主要武器，因此 iNOS 的表現與免疫系統對人體的保護與防衛功能密切關連。

對循環系統而言，NO 的產生量不足可能會導致高血壓等疾病，此方面食品的相關研究也不多，目前也有一些研究指出在動脈硬化形成時，內皮細胞失去產生 NO 的能力，NO 可以透過血管平滑肌的舒張而改善高血壓外亦能抑制血管平滑肌的增生，目前知大蒜萃取物、大蒜所含的部份含硫物質與抗壞血酸可提高 eNOS 的活性而促進血管舒張，而銀杏萃取物可降低內皮細胞過量產生 NO 導致的低密度脂蛋白 (LDL) 堆積，故有益於高血壓、冠狀動脈硬化等心血管疾病。

已有文獻指出細胞內 NO 的大量產生會透過活化 AMPK 蛋白(32)進而影響 HMG-CoA reductase 的蛋白表現以及活性(33)，透過抑制 HMG-CoA reductase 活性的方式已證實能干擾細胞 Ras 以及 ERK 的活化。從這些研究當中了解 NO 牽涉的層面的確很廣，除了能抑制動脈粥狀硬化外還可能參與了細胞中脂質的代謝。近期實驗室已經發現萃取物能增加血管平滑肌細胞 NO 的釋放；因此，計畫中將進一

步的探討 NO 的增加是否會去干擾脂質代謝的路徑，進而影響血管平滑肌細胞的增生與移動。

(七) 老化與動脈粥狀硬化的關係

在動脈粥狀硬化的發生過程中，血管平滑肌細胞 (VSMC) 的增生與移動扮演了相當重要的角色，但近年來的研究發現，在動脈粥狀硬化後期所形成的斑塊 (plaque) 裡觀察到 VSMC 的生長有變緩慢的趨勢[34]。將正常血管壁與 plaque 中的 VSMC 分離出來培養，經老化染色 (β -galactosidase stain) 可以明顯的發現 plaque 中的血管平滑肌細胞有老化的現象。除此之外，也觀察到這些 VSMC 的端粒有減少的現象[34]。正常血管中 VSMC 在體外培養的狀態大約可以培養 10~20 繼代，但由 plaque 中所分離的 VSMC 只能培養 5~10 代[35]。分析人類血管的切片觀察到動脈粥狀硬化的區域裡血管中層 (intima) 中的 VSMC 有被偵測到 β -galactosidase 的活性增加，但血管中層 (media) 中的 VSMC 則沒有這樣的現象 [36]。

將這些 VSMC 取出進一步分析這些細胞的細胞週期變化，發現老化的細胞會停留在 G1 phase，並且觀察到 Rb 磷酸化與 cyclin E 的減少，而 p53、p21、p16 都有明顯的增加[34, 35, 36]。造成 VSMC 的老化有兩種方式：(1) 內生性老化 (intrinsic aging/Replicative senescence) 與 (2) 外因性老化 (extrinsic aging)。透過內生性老化 (intrinsic aging/Replicative senescence)，VSMC 經過不斷的複製之後會有端粒縮短與 uncapping 的現象，透過 p12 與 p16 的增加減少 Rb 的磷酸化進而使細胞週期停滯而產生老化。通常造成 VSMC 外因性老化 (extrinsic aging) 的原因與 UV 的照射、自由基的攻擊、DNA 的傷害或 oncogenes (Ras、Raf) 表達有關。透過這些因素會造 DNA 的受損或氧化進而活化了細胞週期的檢測機制 (ATM、ATR、CHK1、CHK2)，最後會透過 p53 的活化促使細胞邁向老化。其中 VSMC 中 oncogenes 的過量表達下，已證實會直接造成 p53 的活化加速老化的現象[35]。透過這些研究，讓我們了解在動脈粥狀硬化發展至後期，病灶中的 VSMC 會有老化的現象，而 VSMC 老化的現象會導致動脈粥狀硬化 plaque 的不穩定現象，容易造成 plaque 剝落而造成血管的堵塞與中風。

二、研究方法

(一) 傷口癒合 (Wound healing assay)

藉由 yellow tip 在培養皿中央劃出一道所謂的“傷口”，來持續觀察細胞遷移的能力，若傷口一直無法癒合，即表示細胞的遷移受到了抑制。

將A7r5 cells (5×10^5 cell/well) 培養於 6 well culture plate，當細胞密度約九分滿時以 0.5 % FBS DMEM培養 48 小時後，加入正常medium並同時加入不同劑量的MWEs及MPEs(0、0.5、1、1.5、2 mg/ml) 培養於 5 % CO₂、37 °C 的恆溫環境中，每隔一段時間 (0、24、48、72、96、120、144、168 小時) 以倒立顯微鏡觀察細胞型態與數目，鎖定傷口區域並且隨機選取 5 個視野進行拍照與細胞計數。

(二) 細胞移動性分析 (motility)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法評估細胞爬行的能力。Boyden chamber 裝置含有為一個中間有濾膜分隔的上下雙層反應槽，將細胞至於上層而下層則是放置血清做為趨化物，趨化功能正常的細胞會移動到下層而喪失趨化功能的細胞則仍停滯在上層，因此經過一段的反應時間後收集物中間的濾膜，計數有多少的細胞能夠移動到下層而觀察細胞的趨化移動是否受到影響。

首先，在lower chamber置入含有 10 % 血清的DMEM(誘導細胞爬行)，把加藥處理後的細胞以 0.05 %的trypsin-EDTA打下，並用trypan blue計算細胞濃度，然後將細胞用含有 0.5 % 血清的DMEM配置成設定的濃度 (10^6 /ml) 後，在lower chamber鋪上polycarbonate filter後，將upper chamber與lower chamber組裝在一起，取 50 μ L的細胞置於upper chamber的well中，將Boyden chamber移至培養箱中放置 8 小時，取下polycarbonate filter，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘，以Giemsa (1:20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 400 \times 顯微鏡底下每個well隨機選取 3 個視野，數 5 個well，作移動細胞數之統計。

(三) 細胞侵入性分析 (invasion)

利用 48 well Boyden chambe 的分析方法，將cellulose nitrate filters coating上 100 μ g/cm² Marix gel，在laminar flow風乾 3~5 小時 (視天氣而定)，lower chamber為含有 10 % FBS的DMEM，將細胞處理藥物 24 hr後，以 0.05 %的trypsin-EDTA打下所有細胞並用trypan blue計算細胞數，然後注入固定量的細胞 (10^6) 於upper chamber，待細胞移動 12 小時後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以Giemsa (1:20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 400 \times 顯微鏡底

下每個well隨機選取 3 個視野，數 5 個well，作移動細胞數之統計。

(四) MP-2, 9 活性分析 (Gelatin zymography)

基質金屬蛋白酵素 (Matrix metalloproteinases, 簡稱 MMPs) 是指一系列鋅依賴型的蛋白水解酵素，在正常細胞中主要是牽涉到細胞外基質的重組 (remodeling)，這個功能主要是使正常組織生長以及分化。癌症方面，主要是與癌症細胞的惡性化程度有關，牽涉到使腫瘤快速生長、侵犯，以及藉著將細胞外基質裂解而進行轉移作用。而 MMP 可根據其結構和受質不同而做進一步的細分，其中 MMP-2 和 MMP-9 被歸類為 gelatinase，能夠分解 gelatin，其主要參與細胞外基質的分解機制，而以 zymography 測定 MMP-2 和 MMP-9 的酵素活性進而了解細胞對細胞外基質分解能力。將 0.1 % gelatin-8 % SDS-PAGE 電泳膠片置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，將細胞培養後不含胎牛血的培養液與 5X 染劑均勻混和後，注入膠片中，分別以 100 V 與 140 V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，以 washing buffer 在室溫下搖晃 30 分鐘 2 次，然後加入 reaction buffer 在 37 °C 恆溫箱中反應 12~16 小時，最後反應完的膠片以 coomassie blue 染色液染色 30 分鐘，再以退色液退染，觀看結果。

(五) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT (reverse transcription)：取 4 µg 的 RNA，加入適量的 DEPC-H₂O (總體積為 33 µL)，以 70 °C 處理 5 分鐘去除 Harpin。再加入 0.25 µL (40 U/µL) RNase inhibitor，再加入 10 µL 5X RT buffer 及 4 µL (2.5 mM) dNTP，和 1 µL (50 pmole/µL) Oligo dT 及 1 µL (200 U/µL) RTase，在 42 °C 反應 1 小時之後，以 99 °C 作用 5 分鐘後保存於 4 °C。

引子合成 (Primer synthesis)：取 5 µL cDNA 加入 26 µL DEPC-H₂O，加入 primer-5' 和 primer-3' 各 5 µL，加入 (2.5 mM) dNTP 3.2 µL 及 10X PCR buffer 5 µL 最後再加入 DNA polymerase 0.5 µL (2 U/µL)，置於溫度循環機 94 °C 1 分鐘之後，annealing 溫度 1 分鐘，72 °C 2 分鐘，共 30 個循環，最後再以 72 °C 反應 20 分鐘，並於 4 °C 保存。

而各個基因的 PCR primers 序列如下：

Enzyme	Sequence 5' → 3'	size	Temp (°C)
Ras	5'- CTTGATAATCTTGTGTGGAAC-3' 5'- CCTCCCTTTACAAATTGTAC-3'	381bp	55°C
MMP-2	5'-ACACCCAGTACTCATTCCCTG-3' 5'-GTCCTGACCAAGGATATAGCC-3'	464bp	55°C
VEGF	5'-TGCACCCACGACAGAAGGGGA-3' 5'-TCACCGCCTTGGCTTGTACA-3'	475bp	60°C
GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	451bp	60°C

(六) Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

原理：蛋白質除了能跟蛋白質結合外，也能跟核酸上特殊的序列結合，如轉錄因子就是一個很好的例子。而 EMSA 是研究蛋白質與核酸結合最常使用的方法。利用一段含有欲探測序列的寡聚核苷酸探針 (oligonucleotide probe)，與含有欲測蛋白質的細胞液 (cell lysate) 共同培養一段時間後，混合物以不變性的狀態 (nondenaturing condition) 跑洋菜膠電泳，未與蛋白質形成複合體的 oligonucleotide 在膠體中移動得較快；反之，標定的與蛋白質結合的 oligonucleotide 移動得較慢，由膠體上可以看出兩者的差異。

在 pre-run 的時候，取出以萃取出好的組織核蛋白置冰上解凍，準備進行以下之處理：首先將所需的 buffer 及 DNA probe 混合 (10X binding buffer 2 μ L, 50 % glycerol 2 μ L, 100 mM MgCl₂ 1 μ L, poly dI/dC 1 μ L, Biotin-DNA probe 1 μ L, 1 % NP-40 1 μ L, Protein extract 10 μ g)，接著補 ddH₂O 達總量 20 μ L。接著置於室溫下進行 binding reaction 反應 15 分鐘後加入 loading buffer (5X dye)。以 0.5X TBE buffer 作為 running buffer 以 100 V 電泳 3 個小時。再以 Nylon membrane 進行 transfer (60 min, 100 V) 將 transfer 完成之 Nylon membrane 以 UV crosslink (1200 mJ for 2 times) 後，做 blocking 並以 Equipibration buffer 來接上 substrate，最後以 ECL 冷光 protein-DNA 交互作用的變化。

(七) 細胞骨架染色 (F-actin stain)

6-well dish 中加入細胞 5×10^4 細胞，兩天後約八分滿以不同濃度的藥物做處理。48 小時後，以 1X PBS 清洗，然後加入 10 % formalin 固定，室溫 10 分鐘後，移除固定液，以 1X PBS 清洗，之後加入 0.1 % Triton-X，室溫約 30 分鐘，移除 0.1 % Triton-X 後以 1X PBS 清洗，最後加入 500 μ g/ml phalloidin-TRITC (購自 sigma) 染色液於室溫並避光作用 30 分鐘，接著清洗乾淨，以避免染色液殘留以封片劑封片，則可置於共焦顯微鏡 (使用激發波 540-545 nm 而放射波 570-573 nm) 下觀察並拍照。另外在 500 μ g/ml phalloidin-TRITC 的染色液中加入 1 μ g/ml DAPI (4, 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate 是常用的一種與 DNA 結合的螢光染劑。可以進入細胞核內，插入雙股 DNA minor groove 中 adenine 及 thymine rich 的位置) 於螢光顯微鏡 (340/380 nm; UV) 下觀察，用以標定細胞核的位置。

(八) K-Ras 之選殖

從 -20 $^{\circ}$ C 取出 *E. coli JM109*，放至 2 ml 的 LB 培養液中，在 37 $^{\circ}$ C 隔夜培養。隔天取 1 ml 加入 100 ml (1:100) 新鮮的 LB 培養液，放在 37 $^{\circ}$ C 中，劇烈搖晃 (轉速 200 rpm) 培養至細菌之密度 O.D. 為 0.4~0.5 左右。

在 4 °C，以 4500 rpm 離心 10 分鐘，倒乾上層液，留下 pellet，每管加入 10 ml 的冰 50 mM CaCl₂ (含 10 mM Tris-HCl)，將 pellet 沖散，靜置於冰上 30 分鐘。在 4 °C，以 4500 rpm 離心 10 分鐘，倒乾上清液，加入 2 ml 的冰 CaCl₂ (含 10 mM Tris-HCl)，將 pellet 打散。如要儲存，加入滅菌過的 glycerol，使其 final 濃度為 10%，儲存在 -70 °C，如要做 transformation，即可馬上使用，此為 Competent cell 之製備。在透過膠體中 DNA 片段之純化、Vector 與 cDNA 之切割 (digestion)、接合作用 (Ligation)、轉殖 (transformation)、快速篩選法 (rapid screen)、小量及大量質體 DNA 之萃取、質體 DNA 之純化 (micro-column) 及 DNA 之定量等步驟，進而完成 K-Ras 之選殖。

(九) 轉殖 (transfection)

於 6 well 或 3.5 公分之培養皿中接種 $1\sim 3\times 10^5$ 之細胞，以完整之生長培養液培養細胞，當細胞生長至 6~8 分滿時，進行質體轉殖 (transfection) 實驗。準備兩管已滅菌之微量離心管，每一管各加入 100 μ L 不含抗生素及血清之培養液 DMEM，其中一管加入 2 μ g 之 DNA，另一管加入 5 μ L 之 LIPOFECTAMINE reagent，再將兩管混合在一起，混合均勻 (利用 tip 吸放混合至少 60 次以上，增加 DNA 與 liposome 之碰撞機率)，室溫下於無菌操作檯靜置 45 分鐘，讓 DNA 與 liposome 形成聚合體。此時先利用 2 ml 不含抗生素及血清之培養液浸潤細胞，並置入 37 °C 培養箱中培養。當 DNA 與 liposome 作用時間到時，於 DNA 混合液中加入 0.8 ml 不含抗生素及血清之培養液並輕輕混和。並吸走培養皿中不含抗生素及血清之培養液，利用剪去尖端之 1 ml tip 吸起 DNA 與 liposome 之混和液，加入培養皿中與細胞作用，進行轉殖，並將細胞置入 37 °C 培養箱中培養。Transfection 12 小時後，加入 1 ml 含 20% 血清之細胞培養液 (不含抗生素) 在放置 12 小時後，換成完整的生長培養液。Transfection 12 小時後，即可觀察結果，細胞特性之不同，而有不同之轉殖效率。

(十) 一氧化氮含量測定 (Nitrite oxide assay)

Nitrite 的濃度主要是利用 NaNO₂ 作出 Nitrite 的標準曲線，以取得溶液中的 NO/Nitrite 相對濃度。首先 1 mM NaNO₂ 以 PBS 等量稀釋成 0-500 μ M (稀釋成 10、50、100、500 μ M 等不同濃度作為 standard，加到 96 well 中，每個 well 加 100 μ L)，Griess A 及 B 等量混合形成 Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% naphthylethylenediamide dihydrochloride in water，體積 1:1)，操作前將 100 μ L/well Griess reagent 與 NaNO₂ 或上清液混合作用 10 分鐘，測定波長 550 nm 的吸光值，所得的溶液吸光值對照標準曲線可決定 Nitrite 的濃度。

(十一) 老化細胞培養

A7r5 細胞轉殖 K-ras 基因一天後，用 1000 $\mu\text{g/ml}$ G418 medium 進行篩選，在 G418 medium 中培養兩個星期，篩選過後的細胞會呈現許多聚落狀，表示由成功轉植 K-ras 的細胞所形成。將這些細胞拆下移置新 10 公分 dish，換成 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 medium 培養（約兩個星期），在 G418 medium 中篩選後（共 1 個月的時間），可以換成正常的 medium 進行培養與實驗的分析。所有做老化的實驗所用的細胞都是利用成功轉植 K-Ras 並穩定表現的細胞。

(十二) 細胞老化染色 (β -galactosidase staining)

老化的細胞會在 pH 6.0 環境下表現的 β -galactosidase 酵素，此酵素會將受質 X-gal 水解產生藍色沉澱物。實驗中將 A7r5 細胞培養於 6 孔洞培養盤中，長到五分滿時，移除培養液並以 PBS 清洗一次，加入 2 ml 的固定液（2% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde）室溫下固定 5 分鐘，再以 2 ml PBS 洗兩次，之後加入 pH 值分別為 4.0 與 6.0 的染劑溶液（40 mM citric acid, sodium phosphate pH 6.0, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 20 mg/ml X-gal），其中 pH 4.0 為 positive control，細胞與染劑 stain solution [（40 mM citric acid /sodium phosphate pH 6.0, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 20 mg/ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β d-galactopyranoside powder)] 反應於 37 $^\circ\text{C}$ 下無 CO_2 培養箱作用 12~16 小時，之後移除染劑溶液即可於顯微鏡下以 400 倍放大倍率觀察細胞，在 pH 6.0 的染液下只有老化的細胞才可以在細胞質中染成藍色。

(十三) 紐西蘭兔動脈粥狀硬化切片分析

將 30 隻 New-Zealand Rabbit 飼養 25 週，利用高膽固醇飼料（HCD diet）誘導兔子產生動脈粥狀硬化發生，同時處理 0.5% 與 1% 桑椹萃取物（MWEs）25 週後，動物禁食一夜，以 sodium pentothal（120 mg/kg）麻醉犧牲後，取出實驗動物之主動脈弓（aortic arch）部分，後浸入 10% 中性福馬林固定（neutral buffered formalin），以石蠟包埋，以 hematoxylin and eosin 染色觀察病灶。在實驗室先前的研究中，已完成桑椹萃取物抑制紐西蘭兔動脈粥狀硬化的研究，透過免疫組織染色進一步的驗證其中之機轉。

三、研究成果說明

第一年：首先分離桑椹水萃取物 (MWEs) 及其中所含之多酚化合物 (MPEs) 發現其抗氧化與抑制泡沫細胞 (foam cells) 形成的能力。除此之外，在本實驗中證實桑椹萃取物能有效抑制巨噬細胞 scavenger receptors (CD36、SR-A) 的表達，進而達到抑制泡沫細胞的形成 (圖一 A)。進一步發現桑椹萃取物會誘導過度增生狀態的 VSMC 凋謝死亡 (apoptosis)。從 western blot 的結果顯示：與凋謝死亡相關的蛋白如：p-p53、Myc、Bax、Fas、FasL、cytochrome c、caspase 3,8,9、MAPK family (p-SEK、p38、p-JNK、p-Jun)，在桑椹萃取物處理後的細胞中呈現增加的趨勢。相對的抗凋謝死亡的相關蛋白 Bcl-2、Mcl-1、PI3K、Akt、NF- κ B 等，表現量則都明顯下降。推測桑椹萃取物主要在於抑制 anti-apoptotic related proteins 的表達進而誘發細胞產生 apoptosis (圖一 B)。

第二年：利用較低的劑量來發現桑椹萃取物對 VSMC 細胞週期有停滯於 G1 phase 的現象。phospho-p53 (p-p53)、p27、p21、p16 表現皆有增加的情形；透過免疫沉澱法 (Immunoprecipitation) 分析得知 cyclin D1/CDK4、cyclin A、E/CDK2 及 p53/Mdm2 蛋白實際結合情形隨著萃取物處理時間增加而減少 (圖二 A)。最後證實，桑椹萃取物可藉由 iNOS 誘導血管平滑肌細胞 NO 產生並活化 AMPK，藉此機轉而誘導 VSMC 細胞週期停滯 (圖二 B)。進一步用 Zymography assay、western blot、EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) 分析，證實是桑椹萃取物透過降低 NF- κ B 轉錄活性進而降低 *Matrix metalloproteinases-2* (MMP-2) 基因的表現；另外 FAK、RhoA、Rac-1、Cdc42、Ras 調節細胞移動與細胞骨架組裝的蛋白，其蛋白表現也受到抑制 (圖二 C)。進一步在 Ras 轉殖的一連串實驗中證實桑椹萃取物造成 Ras 蛋白的分解達到抑制 VSMC 移動及增生的能力 (圖二 D)。

第三年：在 Ras 轉殖的一連串實驗中證實，桑椹萃取物可透過 iNOS 與 AMPK 的活化造成 Ras 蛋白的分解，進而達到抑制 VSMC 移動的能力。透過 ACC 磷酸化，可消耗體內的 acetyl CoA，避免 acetyl CoA 走向 HMG-CoA reductase 的路徑進而減少 Ras post-translational 修飾作用，同樣也間接地促進 Ras 的分解。證實桑椹萃取物能有效阻斷脂質代謝路徑有關，因為這些蛋白的活性都與 post-translational 修飾作用中的 farnesylation 有關。進一步利用 Ras 轉殖誘導 VSMC 老化的模式中，證實桑椹萃取物是透過 AMPK 活化而抑制 VSMC 中 Ras 的過度表現，而達到減緩 Ras 所誘導的細胞老化。表示桑椹萃取物透過抑制 VSMC 細胞老化的現象，可以減少血管斑塊不穩定與剝離的機會。這些結果我們也經由兔子 atherosclerosis 的模式確認。

(一) AMPK 與 NO 的表現與 Ras 蛋白分解的關係

1. AMPK 與 NO 抑制劑阻斷 MPEs 誘導 Ras 的分解

將 Ras-transfected A7r5 細胞處理了 AMPK 抑制劑、L-NAME 之後，同時將 MPEs 與 MG132 (proteasome inhibitor) 分別加入培養基中培養兩天後，收取細胞蛋白質並利用 anti-Ras antibody 進行免疫沉澱，隨後用 anti-Ras antibody 與 anti-ubiquitin antibody 的混和液進行西方墨點法分析。在分子量 21 KDa 附近可觀察到大量的 Ras 蛋白表現。當細胞在正常狀態下，A7r5 細胞是會執行 Ras 分解的機制，可以觀察到 ubiquitin 的強度頗強，但當細胞轉殖了 K-Ras 後，Ras 分解的機制便受到了抑制。細胞處理了 MPEs 0.2~0.5 mg/ml 之後，Ras 分解的機制除了恢復了外甚至更強了。但這樣強的分解機制在 Ras-transfected A7r5 細胞處理了 AMPK 抑制劑與 L-NAME 之後就消失了。其中，以處理 L-NAME 後 ubiquitin 消失得最為明顯【Figure 3B】。表示 MPEs 可能透過 NO 的分泌與 AMPK 的活化來啟動 Ras 分解的機制。

2. AMPK 與 NO 抑制劑回復 Ras 的表現量

將 Ras-transfected A7r5 細胞處理了 AMPK 抑制劑 L-NAME 之後，將 MPEs 加入培養基中培養兩天後，收取細胞蛋白質觀察 Ras、AMPK、iNOS 的表現。【Figure 4】的結果中發現，在 Ras-transfected A7r5 細胞中的 phospho-AMPK 以及 iNOS 的表現都是減少的。在 AMPK 抑制劑和 L-NAME 添加後，AMPK 磷酸化程度明顯降低，而抑制劑處理下不至於影響 iNOS 的量。重要的是，Ras 的表現量在處理了 AMPK 抑制劑和 L-NAME 後則變多了。結果可以證實，A7r5 細胞若大量表現 Ras 是可以抑制 AMPK 磷酸化與 iNOS 表現；但當加入了 MPEs 後，iNOS 的表達與 AMPK 的活化會增加，此時卻會啟動分解 Ras 的機制。

(二) Ras-transfected 下所調控的增生與移行機制在 AMPK、NOS 抑制劑處理下會有何變化？

1. p53 與 p21

將 Ras-transfected A7r5 細胞處理了 AMPK 抑制劑和 L-NAME 後，將 MPEs 加入培養基中培養兩天後，收取細胞蛋白質觀察 p53 與 p21 的變化。在 Ras-transfected 組觀察到 p53 磷酸化、p21 量減少，當 MPEs 處理細胞後 p53 磷酸化增加、p21 量增加，但在分別處理了 AMPK 抑制劑與 L-NAME 後，p53 磷酸化、p21 明顯減少。尤其是 AMPK 抑制劑處理下 p53 磷酸化抑制得相當明顯【Figure 5A】。

2. migration-related protein

在【Figure 5B】的結果中，以 ERK 磷酸化與 RhoA 恢復得最為明顯，在抑制劑處理下幾乎都快要恢復到與 Ras-transfected 組相同；Akt 磷酸化程度在抑制劑的處理後的確有增加的趨勢（與 MPEs 相

比)，但增加的趨勢並沒有 ERK 磷酸化與 RhoA 來的明顯。表示 MPEs 可能不只透過 AMPK 與 NO 的方式抑制 Akt 的活化。

(三) AMPK 與 NO 抑制劑處理 Ras-transfected A7r5 細胞下，觀察 ACC and HMG-CoA reductase 的變化

細胞在相同處理後，收集蛋白質用西方墨點法與免役沉澱法觀察 ACC 與 HMG-CoA reductase 的變化。【Figure 6A】的結果中，觀察到 ACC 蛋白的變化其實沒有明顯變化，ACC 磷酸化（下方 band 為 ACC1 次單元、上方則為 ACC2 次單元）的部分趨勢則與 AMPK 磷酸化相似，在 Ras-transfected A7r5 細胞中的 phospho-ACC2 的表現是減少的，MPEs 會增加 phospho-ACC2 的量，而在 AMPK 抑制劑、L-NAME 添加後 ACC2 磷酸化程度明顯降低。而 HMG-CoA reductase 則是在 Ras-transfected A7r5 細胞中大量表現，隨著 MPEs 的添加後 HMG-CoA reductase 的量有明顯減少，但是加入了 AMPK 抑制劑、L-NAME 後並沒有改變的趨勢。

【Figure 6B】則是利用 anti-HMG-CoA reductase antibody 進行免疫沉澱後觀察 HMG-CoA reductase Ser871 磷酸化的程度。經過 IP 之後，收取的 HMG-CoA reductase 蛋白量其實差不多，利用 anti-phosphorylated ser antibody 觀察 HMG-CoA reductase 的磷酸化程度，HMG-CoA reductase Ser 的磷酸化變化與 phospho-ACC 的趨勢相同，AMPK 抑制劑、L-NAME 添加後 Ser 的磷酸化程度就下降了，表示 MPEs 是透過 AMPK 與 NO 的路徑使 HMG-CoA reductase 磷酸化，進而抑制 HMG-CoA reductase 的活性。

透過 ACC 與 HMG-CoA reductase 的分析，除了證實 AMPK 確實有活化之外、更證實了 MPEs 可透過 NO 與 AMPK 的活化抑制 HMG-CoA reductase 的活性，當 HMG-CoA reductase 被抑制的時候就會干擾到 Ras 的送到膜上的機制。

(四) FPP與GGPP的補充下，Ras-transfected A7r5細胞中Ras、AMPK及iNOS的變化

1. FPP與GGPP的補充下Ras表現增加

將 Ras-transfected A7r5 細胞的培養基中添加了 FPP 或 GGPP 之後，將 MPEs 加入培養基中培養兩天後，收取細胞蛋白質觀察 Ras 的變化。結果發現，MPEs 的處理下可使 Ras 的蛋白表現量下降，但在培養基中添加了 FPP 之後，Ras 的蛋白表現量增加到跟 Ras-transfected 組接近。添加 GGPP 之後，Ras 的蛋白表現量也有增加，但增加的幅度不如添加 FPP 組來的明顯【Figure 7A】。接續著觀察 Ras 分解

的現象，將 FPP 或 GGPP 補充至細胞培養基後，將 MPEs 與 MG132 (proteasome inhibitor) 分別加入 Ras-transfected A7r5 細胞的培養基中培養兩天後，結果證實，在 FPP 與 GGPP 添加後，的確減少了 Ras Ubiquitination 的程度。其中以補充 FPP 組所減少的幅度為最大【Figure 7B】，推測可能在 A7r5 細胞中應該以 farnesyltransferase 所執行的 post-translational 修飾作用為主。

2. FPP 與 GGPP 的補充下不影響 AMPK 活化與 iNOS 的表現

接著觀察 AMPK 磷酸化與 iNOS 的表現，發現在添加了 FPP 之後並不會有明顯影響 iNOS 的表現，而添加 GGPP 之後 iNOS 的量有些微減少。添加了 FPP 與 GGPP 後，只會觀察到 phospho-AMPK 有些微的減少，AMPK 整體蛋白則沒有明顯的變化。整體來說在添加 FPP 與 GGPP 後，AMPK 磷酸化與 iNOS 雖然有部分的減少但並沒有明顯的變化【Figure 7A】。

3. FPP 與 GGPP 的補充下，觀察 Ras-transfected A7r5 細胞中 NO 的釋放

將 Ras-transfected A7r5 細胞的培養基中添加了 FPP 或 GGPP 之後，將 MPEs 加入培養基中培養兩天後，收取不含 phenol red 的培養基分析其中 NO 的含量。Ras-transfected 後細胞 NO 的產生很低、在 MPEs 處理下會觀察到大量 NO 的釋放；但在添加了 FPP 與 GGPP 後，只會觀察到 NO 的濃度有些微的減少，而且減少的趨勢並未達到有統計的意義【Figure 8】。表示，就算透過 FPP 與 GGPP 的添加恢復 Ras 的表現量，也只會些許的影響 MPEs 所誘導的 NO 釋放。

(五) FPP與GGPP的補充下會恢復Ras-transfected下細胞週期的運行

在【Figure 9】flow cytometry的分析結果中，轉殖Ras後會增加1.7倍的S phase、1.3倍的G2/M phase；隨著處理MPEs，S、G2/M phase增加的趨勢沒了，換得的是G0/G1 phase的增加，有G0/G1 arrest的趨勢。但透過添加FPP與GGPP至培養基後，細胞週期得以運行。在【Figure 9B】的量化結果中可明顯觀察到，添加FPP的組別S、G2/M phase增加的趨勢逐漸恢復，而添加GGPP的組別則沒有顯著的增加。細胞週期分析的結果其實與Ras蛋白的趨勢相符合，表示透過FPP的添加較能恢復Ras蛋白的表現與細胞增生的速度。

(六) 血管切片中觀察Ras、MMP-2、iNOS的變化

在高膽固醇的餵食下 (HCD diet) 的紐西蘭兔血管除了可以觀察到有血管增厚的情形外，在免疫染色的切片中也同時觀察到有Ras與MMP-2的大量表現，透過與SMC α -actin的染色比對，可發現Ras與MMP-2所高量表達的區域的確與VSMC的位置吻合【figure 10】。同樣的在伴隨餵食了MWEs 0.5 %~1.0

%後，血管增厚情形逐漸下降外，Ras與MMP-2的表現也逐漸的減少。證實了NO的濃度可影響Ras的分解；在正常餵食組中，幾乎觀察不到iNOS的表現。而在高膽固醇的餵食下所誘導的增厚intima層中，只能染上淡淡的咖啡色。當伴隨餵食了MWEs 0.5 %~1.0 %後，血管壁中intima層中開始能觀察到iNOS的表達，尤其以高濃度的1.0 %組別最為明顯。表示在動物活體實驗與先前的一連串細胞實驗發現了相同的趨勢，證實了桑椹萃取物能誘導血管壁產生iNOS進而減少了Ras的表現，進而減緩了動物動脈粥狀硬化的發生。

(七) Ras-transfected A7r5細胞中Ras、AMPK、iNOS的相互關係

透過研究結果，我們繪製成【Figure 11】的總圖，在這部分的實驗我們觀察到：1. 在Ras的轉殖下會抑制AMPK與p53的活化、降低iNOS的表達；2. 在MPEs萃取物的誘導下能透過NOS的增加、AMPK的活化，進而增加p53的活化與降低Ras的表現量；3. NOS的增加、AMPK的活化造成Ras分解之後會造成VSMC中Akt與ERK不活化、RhoA表現下降。而MPEs會透過2與3方式將細胞內Ras的表現與作用降到最低，進而達到抑制細胞增生與移動的現象。

(八) MPEs透過誘導VSMC中NO的釋放與AMPK的活化，達到促進Ras蛋白分解的機制

【Figure 12】的路徑圖，圖中說明了桑椹萃取物誘導下Ras分解的調控方式。主要分成ACC與HMG-CoA reductase兩個路徑。在我們的實驗中也證實了，當HMG-CoA reductase磷酸化增加的同時Ras的分解也隨之增加。透過ACC磷酸化的這條路徑，可消耗體內的acetyl CoA，避免acetyl CoA走向HMG-CoA reductase的路徑進而減少Ras post-translational修飾作用，同樣也間接地促進Ras的分解。證實桑椹萃取物之所以能夠有效的抑制Ras、其他small GTPase、與ERK的活化，原因與桑椹萃取物能有效阻斷脂質代謝路徑有關，因為這些蛋白的活性都與post-translational修飾作用中的farnesylation有關。

(九) K-Ras轉殖動脈平滑肌細胞後stable clone的篩選

A7r5 細胞在轉殖 K-Ras 後利用 G418 藥物(1000 $\mu\text{g/ml}$)篩選兩個星期後，細胞會呈現【Figure 13A】左下的圖片的狀況，會呈現一個一個的聚落，而且成功篩選出來的細胞在每一個 well (6-well dish) 中只有 2~4 個聚落可以成功的塞選出來，將這些細胞打下來之後培養在新的 dish，以含有 G418 藥物(100 $\mu\text{g/ml}$) 的培養基繼續培養，讓細胞長滿即可分盤進行後續的分析。

在成功篩選出這些穩定表現K-Ras的細胞後，首先來觀察細胞型態以及增生的情形，在【Figure 13B】的圖中可以觀察到成功篩選後的第二天，細胞具有紡垂狀的型態，隨著天數的增加細胞數有逐漸的增

多，但是在 8 天之後細胞型態上逐漸有改變的現象，細胞失去紡垂狀的外型，變成展的比較開而且有細胞膜有破破的感覺，在第 12 天以及第 16 天的時候開始有死亡的細胞出現。而【Figure 13C】的生長曲線圖是將這些細胞打下來，用 trypan-blue 染色後計數細胞數所得到的數據，第一個點是一開始種植細胞的數量 (2×10^5)，由這個曲線圖可以明顯的觀察到，在 8 天前 Ras-transfected A7r5 細胞都保持在增生的階段，但是在 8 天之後細胞數就開始逐漸的不生長了。

(十) K-Ras 轉殖後造成 VSMC 老化的發生

1. 老化染色的觀察

在【Figure 14】的實驗中利用 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside 進行染色，這個物質透過細胞內 β -galactosidase 代謝成藍色的物質堆積在細胞質中，用以鑑定細胞是否有老化的現象。結果發現在篩選結束後的第 2 天 Ras-transfected 細胞只有染上淡淡的藍色，一直到第 8 天的時候開始有一些細胞有明顯的藍色出現在細胞質中，這些細胞通常都不是呈現紡垂狀，呈現寬寬大大的展開狀，細胞膜有些不完整，此現象在第 12~16 天的時候變的相當的明顯，而且死亡的細胞數變的較多。

利用低劑量的桑椹萃取物 (0.005 mg/ml) 長時間的與 Ras-transfected A7r5 細胞培養，12 天後進行老化的染色分析。【Figure 15】的結果中發現 MWEs 與 MPEs 在 0.005 mg/ml 的濃度下對於細胞來說完全沒有毒性，並不會造成細胞的老化。同樣的，Ras-transfected 組則觀察到明顯的老化現象，但 Ras-transfected 細胞處理桑椹萃取物後，細胞老化的程度都大為改善，尤其是 MPEs 處理下有更顯著改善。所以後續的實驗都將以桑椹多酚 (MPEs 0.005 mg/ml) 來進行老化實驗的探討。

2. K-Ras 轉殖後造成 VSMC 老化之機轉

2-1. Ras :

首先在【Figure 16A】的結果中發現這些老化的細胞還帶有很高的 Ras mRNA；在第 12 天，不管有無處理 MPEs 的狀況下，Ras mRNA 都有些許的降低，有可能與細胞開始死亡有關。在【Figure 16 B】的結果中可以觀察到 Ras 轉殖後，細胞 Ras 的量跟 mRNA 的表現都呈現增加的相同趨勢，但在 MPEs 的處理下 Ras 蛋白量有明顯減少，幾乎降到與 vector 組差不多。

2-2. ERK 與 β -galactosidase 的表現：

過去文獻指出 Ras 造成細胞的老化過程中 ERK 的活化扮演著關鍵角色；若沒有 ERK 的活化，Ras 就不能造成 VSMC 老化[35]。【Figure 16B】的結果中發現，ERK 的確在老化的細胞中有大量的磷酸化，本身的蛋白量也在 Ras-transfected 下有些許的增加；同樣的，老化的細胞中 β -galactosidase 的表現也有

增加。在 0.005 mg/ml MPEs 處理 8~12 天之後 phospho-ERK 與 β -galactosidase 有顯著降低的趨勢。

2-3. CDK/cyclin 的結合情形：

在 Ras-transfected 造成老化的組別中，觀察到 CDK4/cyclin D、CDK2/cyclin E、CDK2/cyclin A 結合的情形較差，尤其是 CDK2/cyclin E、CDK2/cyclin A 的結合減少的最為明顯。在 Ras-transfected 組中的 CDK2 與 CDK4 蛋白表現也比其他組來的低。在 MPEs 的處理後 CDK 的表現恢復外、CDK 與 cyclin 結合的比例也恢復了【Figure 17A】。

2-4. Rb/E2F 的結合情形：

將收集的蛋白萃取液利用 Rb 的抗體進行免疫沉澱，觀察 Rb/E2F 結合情形與 Rb 磷酸化程度。在 Ras-transfected 造成老化的組別中，觀察到 Rb 磷酸化減少的相當明顯，同時也有 E2F 結合的現象，表示細胞週期確實無法進入 S phase。但 Ras-transfected A7r5 細胞在處理了 MPEs 之後，Rb 磷酸化有部分的恢復、Rb/E2F 的結合也下降了【Figure 17B】。

2-5. p53 與 CDKI 的表現：

【Figure 17C】實驗結果中發現，Ras 的大量表達會活化 p53，這是老化現象中常見的現象，但是其實在這些老化的細胞中 p53 整體的蛋白量也有明顯的增加；CDKI 之中的 p16 與 p21 的表現量與 p53 磷酸化的趨勢接近，在老化細胞當中可以觀察到明顯的增加，反觀 p27 似乎沒有受到影響。隨著 MPEs 的添加後首先觀察到 p53 磷酸化減少，p21 與 p16 的量也較 Ras-transfected 組來得低，不過可能桑椹萃取物本身會誘導細胞增加 p16 與 p21 的關係，p16 與 p21 的量還是比 vector 組高得多。透過【Figure 17】的結果，表示在 MPEs 的處理下細胞老化的狀態比 Ras-transfected 組改善很多。

(十一) VSMC 的老化與 AMPK、NO 的關聯

由於先前的實驗已經知道桑椹萃取物能夠過增加 NO 以及活化 AMPK 的路徑活化 p53 與 p21，用以抑制細胞的增生，因此接著也來觀察這些蛋白是不是也會受到影響？

1. NOS 與 AMPK

【Figure 18A】實驗結果中發現，K-Ras 造成 A7r5 細胞老化的過程中並不會增加 iNOS 的表現，AMPK 的磷酸化也只有些微的增加，但是在有萃取物的組別中都能夠觀察到 iNOS 與 phospho-AMPK 明顯的增加，表示 K-Ras 造成細胞老化與細胞週期的停滯，證實桑椹萃取物造成 VSMC 細胞週期停滯的機轉有可能透過 iNOS 與 AMPK 的路徑來干擾細胞內 Ras 的含量與活性，這需要後續的實驗進一步的分析才能釐清。

當 Ras-transfected A7r5 細胞經 G418 一個月後的篩選後，在培養基加入 0.005 mg/ml MPEs 前，加入 AMPK 抑制劑與 NOS 抑制劑 (L-NAME)，由於培養的時間為期 12 天，因此我們將以較低濃度的抑制劑添加在每兩天更換的培養基中，AMPK 抑制劑所使用的濃度為 1 μ M、L-NAME 則是 0.1 mM。【Figure 18B】結果中發現，抑制劑的處理下並無改變 iNOS 的增加、但明顯的觀察到 MPEs 所誘導的 AMPK 活化被抑制了。

2. NO 的濃度：

A7r5 細胞同【Figure 18B】的處理後，將培養基換成無 phenol red 的培養基，用以收集細胞所分泌的 NO。在【Figure 19】的結果中，得知 Ras-transfected 的老化 A7r5 細胞，本身並不會分泌 NO，反而還有略減的趨勢。在 MPEs 處理後，不管是 vector 組還是 Ras-transfected 組都觀察到大量 NO 的釋放。在添加了 AMPK 與 NOS 抑制劑後，MPEs 誘導的 NO 釋放有減少的趨勢，但只有 L-NAME 組達到有意義的下降。

3. 抑制劑處理下老化細胞的觀察

A7r5 細胞同【Figure 18B】的處理後，進行 β -galactosidase 的染色，【Figure 19】實驗結果證實，在 AMPK 抑制劑與 NOS 的抑制劑 (L-NAME) 的作用下，原本 MPEs 處理後不會產生老化的現象但受到抑制劑影響的細胞又再度出現老化。

4. 抑制劑處理下細胞週期相關蛋白的變化

A7r5 細胞同【Figure 18B】的處理後，觀察 AMPK 與 NOS 抑制劑處理後 p53 與 CDKI 的變化。【Figure 20A】的結果很明顯地觀察到 phospho-p53、p21、p16 的表現原本在 MPEs 的處理下明顯減少，而減少的趨勢在 AMPK 與 NOS 抑制劑的添加後則失去了。而 p27 的變化如同【Figure 17C】的結果，變化並不大。

5. 抑制劑處理下 Ras、ERK、 β -galactosidase 的變化

A7r5 細胞同【Figure 18B】的處理後，觀察 AMPK 與 NOS 抑制劑處理後 Ras、ERK 及 β -galactosidase 的表現量。在【Figure 21B】中首先觀察到 Ras 的量在兩個抑制劑的處理後有明顯的增加，而 phospho-ERK 及 β -galactosidase 的變化趨勢也跟 Ras 的變化一致。

透過【Figure 17-21】的研究成果，表示桑椹萃取物是透過誘導 VSMC 中 iNOS 的表達，進而產生 NO 與 AMPK 的活化，桑椹萃取物透過這個機制可抑制 Ras 所誘導的老化路徑並有效減緩 VSMC 老化的現象。

(十二) AMPK、iNOS對於老化細胞中Ras分解的影響

在第三年研究成果已證實桑椹萃取物能透過AMPK的活化造成Ras post-translational修飾作用 (Prenylation) 受阻，而促使Ras被送往分解。因此我們想進一步的觀察在老化細胞當中，MPEs是否還是能透此機轉調控Ras的分解？

1. HMG-CoA reductase的磷酸化程度

A7r5細胞同【Figure 18B】的處理後，先觀察HMG-CoA reductase的蛋白表現與磷酸化程度。【Figure 22A】的結果中，觀察到Ras-transfected組的HMG-CoA reductase量有些微的增加，MPEs處理後HMG-CoA reductase增加的更多；但在兩種抑制劑的處理後，HMG-CoA reductase增加的程度有減少的趨勢。

進一步利用免疫沉澱法來觀察 HMG-CoA reductase Ser 磷酸化的程度。經過 IP 後各組的 HMG-CoA reductase 蛋白量相當接近，但在 Ser 磷酸化的部分有明顯的變化。首先，在 Ras-transfected 組觀察到很弱的磷酸化程度，而細胞處理了 MPEs 後可觀察到明顯的磷酸化；當 MPEs 與抑制劑同時處理的條件下，Ser 磷酸化的程度卻減少到與 Ras-transfected 組差不多【Figure 22B】。

2. Ras的分解

A7r5 細胞同【Figure 18B】的處理後的第六天與第十天（在收細胞的前兩天），在培養基中加入 MG132 (proteasome inhibitor) reagent (5 μ M) 培養兩天，收取細胞蛋白質並利用 anti-Ras antibody 進行免疫沉澱分析。將免疫沉澱下來的蛋白經蛋白質電泳分離後，用 anti-Ras antibody 與 anti-ubiquitin antibody 的混合液進行西方墨點法分析。【Figure 23】顯示，在 AMPK 抑制劑與 L-NAME 的處理後，MPEs 誘導 Ras 分解的情形就會受到抑制。

3. 細胞週期分析

A7r5 細胞同【Figure 18B】的處理 12 天後，接著利用流式細胞儀觀察 Ras-transfected 後而老化的 A7r5 細胞其細胞週期的變化。從【Figure 23】的結果發現，Ras 所誘導的老化細胞中細胞週期大量的停留在 G0/G1 phase（是 vector 組的 1.4 倍）；MPEs 處理細胞後有明顯的減少，G0/G1 phase 的細胞數只有 vector 組的 1.2 倍。當細胞處理了 NOS 與 AMPK 抑制劑後，G0/G1 phase 的細胞數又會再回到接近 vector 組的 1.3~1.4 倍之間。

【Figure 22-24】的結果，證實桑椹萃取物能夠透過 NO 與 AMPK 的活化進而抑制 HMG-CoA reductase 的活性並啟動分解 Ras 的機制。透過 Ras 的分解就可以達到保護 VSMC 免於 Ras 所誘導的老化機制。

(十三) 桑椹水萃取物降低紐西蘭兔血管老化的現象

接著利用觀察血管 intima 層中 β -galactosidase 活性的表現(同細胞實驗的老化染色),在【Figure 25】的結果中,可以明顯地觀察到高膽固醇餵食組(HCD diet) intima 層中有老化的趨勢。此外,我們同時利用 α -actin 標定 VSMC 做為比對,可發現 intima 層中大量堆積 VSMC 的區域有伴隨著觀察到老化的現象。而在飼料中添加了 MWEs 0.5 % ~1.0 % 後,染上藍色的老化區域逐漸的減少,尤其在 1.0 % 的組別中, intima 層中老化的區域已經減少得相當的明顯。透過切片的分析,表示在動物實驗當中也證實了,桑椹萃取物的確具有延緩血管老化的能力。

(十四) 桑椹多酚萃取物能增加 Ras 的分解並改善 VSMC 老化現象

透過第四部分的實驗結果已證實,桑椹萃取物可以有效抑制 Ras 的大量表達,透過的機制是抑制其 post-translational 修飾作用(Prenylation),進而將細胞質中的 Ras 送往分解。MPEs 可以抑制 Ras 大量表達下所誘導的細胞老化現象,我們將這部分的實驗結果繪製成【Figure 26】的總圖,圖中說明,Ras 長時間的表達後,會透過活化 ERK、p53、p16、p21 以及 β -galactosidase 導致 VSMC 產生老化的現象。

VSMC 在過度複製與增生的狀態下,會提早進入老化的階段。在緒論中曾提到,正常且分化完全的細胞複製的次數是受到限制的,若分裂次數越多就會越容易產生老化。除此之外,當細胞過量表達 oncogene 的時候,也會造成基因的不穩定與 p53 的活化,也同樣會造成細胞的老化現象。我們證實桑椹萃取物會透過 iNOS 的表現造成 VSMC 週期的停滯及透過抑制 VSMC 中 Ras 的過度表現,而達到減緩 Ras 所誘導的細胞老化。表示桑椹萃取物透過抑制 VSMC 細胞老化的現象,可以減少血管斑塊不穩定與剝離的機會,進而減少血管堵塞的機率。已經患有動脈粥狀硬化的患者亦可透過飲用桑椹萃取物,達到保護脆弱的血管壁,進而達到預防心血管疾病與中風的發生。

四、研究成果討論

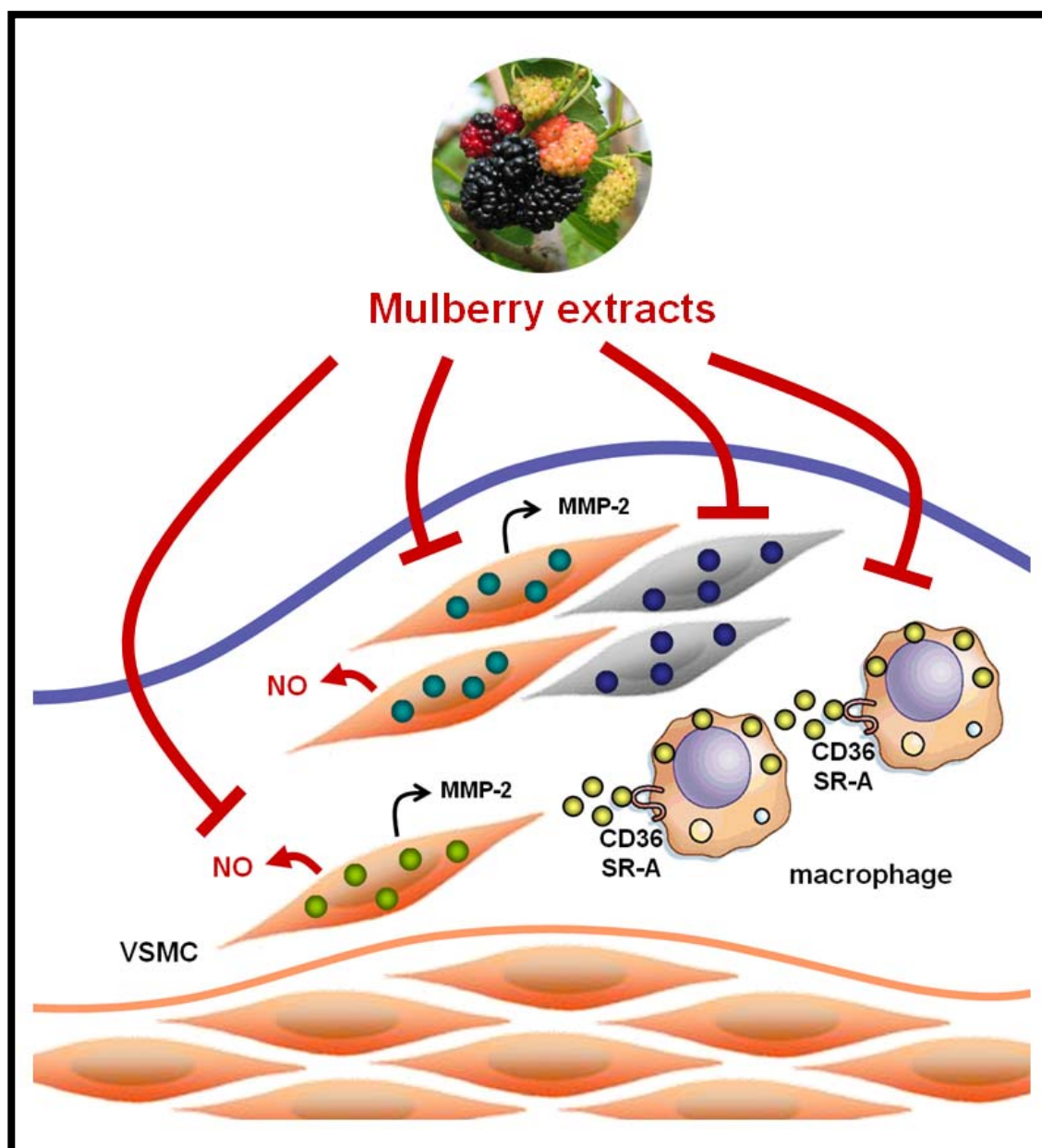


Figure 27. 桑椹萃取物抑制動脈粥狀硬化之機轉

從第一年的抗氧化實驗一直到第三年的老化研究，中間證明了桑椹萃取物具優越抗氧化活性、能抑制泡沫細胞生成、能抑制 VSMC 的增生與移動、最後能抑制 VSMC 的老化。在第一年的細胞實驗與高膽固醇餵食紐西蘭兔的血管切片結果中，已證實桑椹萃取物能透過抑制巨噬細胞表達 scavenger receptors (CD36 與 SR-A) 並抑制發炎因子 COX-2 的表達。血管切片的免疫染色結果證實了，桑椹萃取物的餵食下可能減緩血管中 VSMC 的大量表達，而因此開始了本論文對於 VSMC 一系列的探討。在第二年的實驗裡，證實桑椹萃取物能誘導 VSMC iNOS 的表達與 NO 的釋放，NO 可透過活化 AMPK 而抑制 Ras 的 post-translational 修飾作用，最後達到將 Ras 送往分解。由於這條路徑對於桑椹萃取物預防動脈粥狀硬化的能力有密切的關連，因此我們在最想觀察在高膽固醇餵食紐西蘭兔動脈粥狀硬化的過程中，桑椹萃取物是否能誘導血管壁 iNOS 的表達、以及是否能抑制 intima 中 Ras 的表現？

因此分析了之前動物實驗的血管的切片，在免疫染色切片中，我們進行了 H&E、 α -actin、PCNA、Ras、MMP-2、iNOS 的觀察，各組切片拍照的視野都屬於血管同一個區域。首先，從 H&E 與 α -actin 的染色結果可發現，在動脈粥狀硬化所增厚的 intima 層中有大量的 VSMC 出現 (α -actin 染色用以標定 VSMC 的位置)，隨著桑椹萃取物的餵食後 VSMC 出現在 intima 的情形明顯的減少。接著利用 PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) 觀察細胞增生的情形，發現正常的血管染上 PCNA 的程度極低，而動脈粥狀硬化所增厚的 intima 層卻明顯地偵測到大量 PCNA 的表現，隨著桑椹萃取物的餵食後增生的情形有明顯的減少。最後觀察血管中 Ras、MMP-2、iNOS 的表現，在 HCD diet 組可觀察到，增厚的 intima 中有明顯的 Ras、MMP-2 表現，而染上強烈咖啡色的區域比照前面的 α -actin 與 PCNA 染色，其位置都很接近而且分布相同，表示這些 Ras 與 MMP-2 應該是由 VSMC 所表達。隨著桑椹萃取物的餵食 Ras 與 MMP-2 的表現也逐漸變弱。另外在 iNOS 的部分，在正常餵食組中 iNOS 的表現很低，而在 HCD diet 組則觀察到微量的表現，但在桑椹萃取物餵食後 iNOS 的表達增加了，而且值得注意的是增加的區域都在 intima 層中，四組 media 層都沒有 iNOS 的出現，表示萃取物可以針對 VSMC remodeling 的區域進行 NO 的表達。細胞實驗所觀察到的機制，的確在動物粥狀硬化的實際過程裡也會發生。

圖 27 是整理了所有的研究結果所繪製的總圖。圖中說明桑椹萃取物可以透過幾個方式來抑制動脈粥狀硬化的發生。(1) 透過抑制巨噬細胞 CD36 與 SR-A 的表達、抑制泡沫細胞的發生，(2) 透過誘導 NO 的釋放抑制細胞移動至 intima 層，(3) 透過誘導 NO 的釋放與抑制 anti-apoptosis 蛋白達到減緩 VSMC 增生的速率，(4) 透過誘導 NO 的釋放減緩 VSMC 的老化現象與 β -galactosidase 的活性，藉此增加血管斑塊的穩定度。本輪文的研究證實桑椹水萃取物 (MWEs) 及其多酚萃取物 (MPEs) 在動脈粥狀硬化過程中，可以作為一種有效的天然藥物對抗血管硬化與血管再狹窄的發生。

本研究室已發表桑椹降低血脂，抗氧化，抑制血管病變，減少脂肪肝，抗肥胖及抑制動脈粥狀硬化之作用如下並陸續將發表多篇其醫學功能的國際期刊：(1) Food chemistry, 91, 601, 2005；(2) Journal of food science, 73, H113, 2008；(3) Journal of agricultural and food chemistry, 56, 9286, 2008；(4) Journal of agricultural and food chemistry, 57, 7605, 2009；(5) Journal of agricultural and food chemistry, 57, 9147, 2009；(6) Journal of agricultural and food chemistry, 58, 2536, 2010；(7) Journal of agricultural and food chemistry, 59, 2663, 2011；(8) Food chemistry, 129, 1703, 2011；(9) Journal of Science of food and agriculture, 91, 2740, 2011；(10) Journal of agricultural and food chemistry, 59, 1985, 2011；(11) Journal of agricultural and food chemistry, 60, 6981, 2012；(12) Food and chemical Toxicology, 50, 3086, 2012；(13) Journal of Science of food and agriculture, 2013, In press；(14) Journal of traditional chinese medicine (Review article), 2013；2. 目前已確定證實符合衛生署公佈“不易形成體脂肪”功能之評估, 包括(1) 減重；(2) 降低肝臟脂肪減少脂肪肝及肝功能指數；(3) 減少內臟周邊脂肪；(4) 降低血脂肪, 游離脂肪酸及血中酮體；(5) 不影響生理功能；3. 目前已確定桑椹具化學性、肥胖性、細菌性及酒精性引起肝損傷之護肝作用；4. 可將桑椹萃取物製備為濃縮液；5. 申請健康食品項目為：(1) 不易形成體脂肪；(2) 降低脂肪肝(餵食高脂糧食物之脂肪肝、化學性及酒精性之護肝作用)；6. 酒精性脂肪肝炎護肝作用專利申請中。

五、研究成果圖表

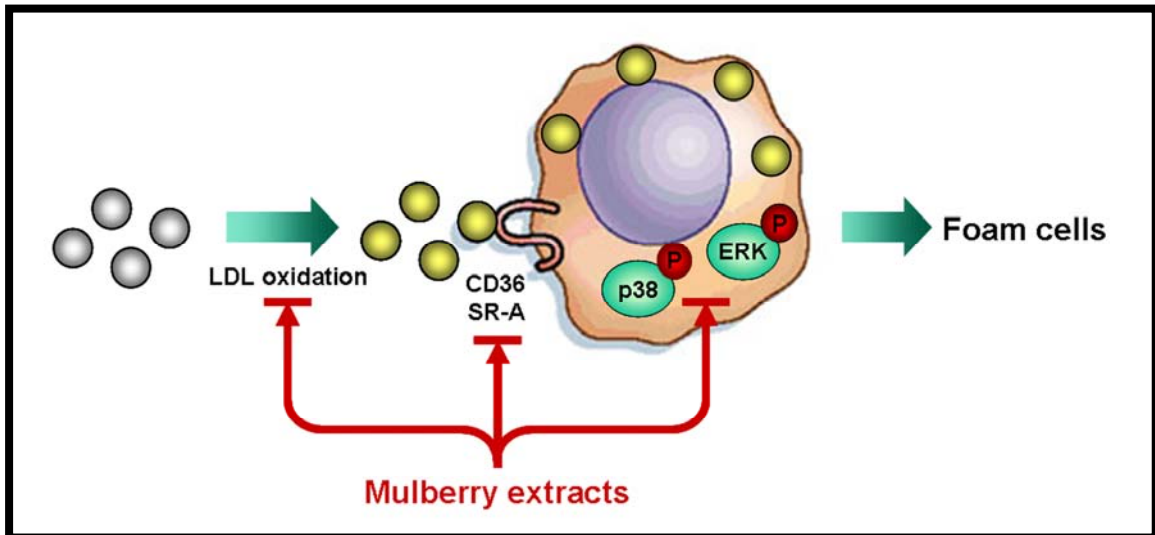


Figure 1A. Summary : MWEs and MPEs inhibited LDL oxidation and foam cell formation.

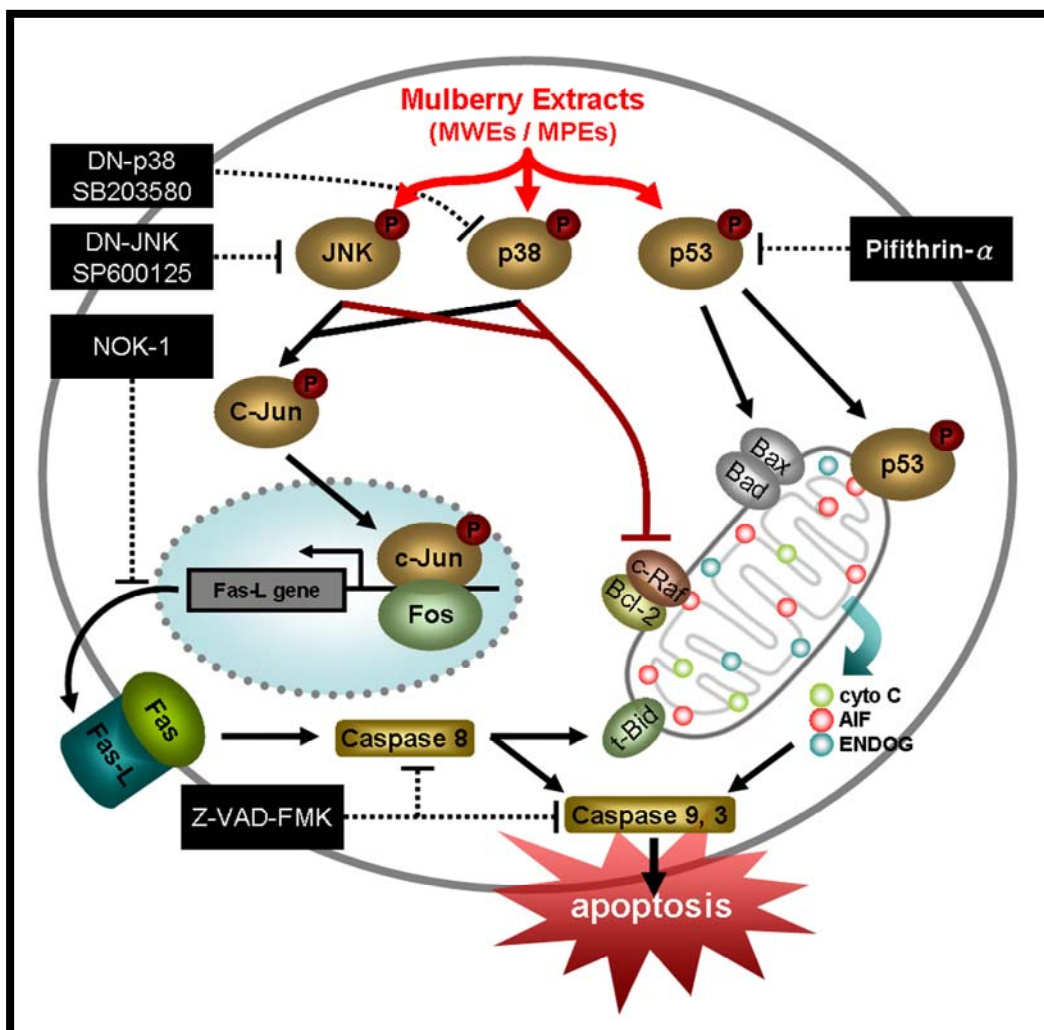


Figure 1B . Summary : MWEs and MPEs induces VSMC apoptosis.

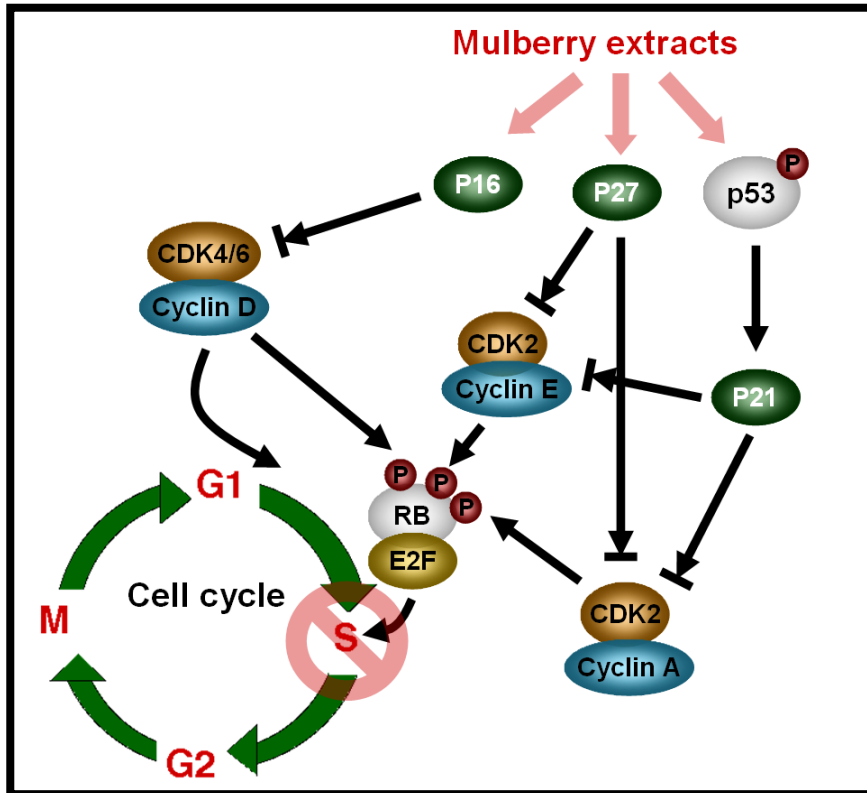


Figure 2A. Summary : MWEs and MPEs inhibits VSMC cell cycle entry.

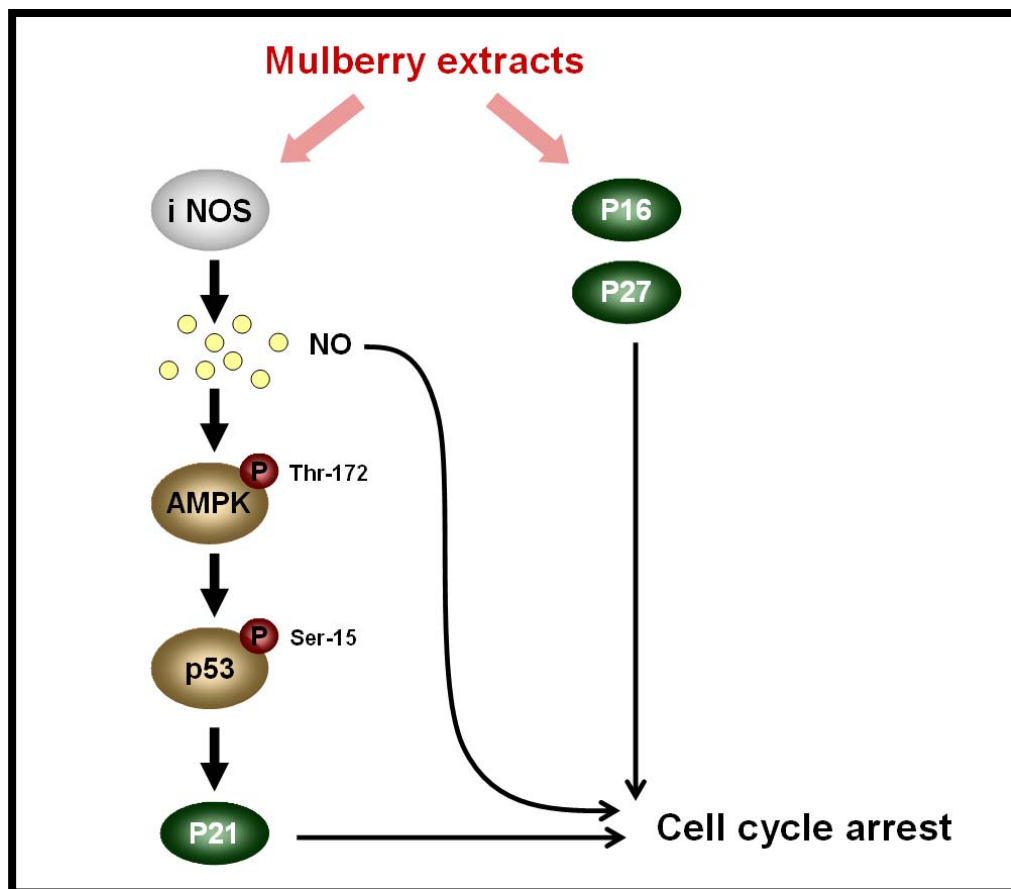


Figure 2B. Summary : MWEs and MPEs inhibits VSMC cell cycle entry caused by NO production.

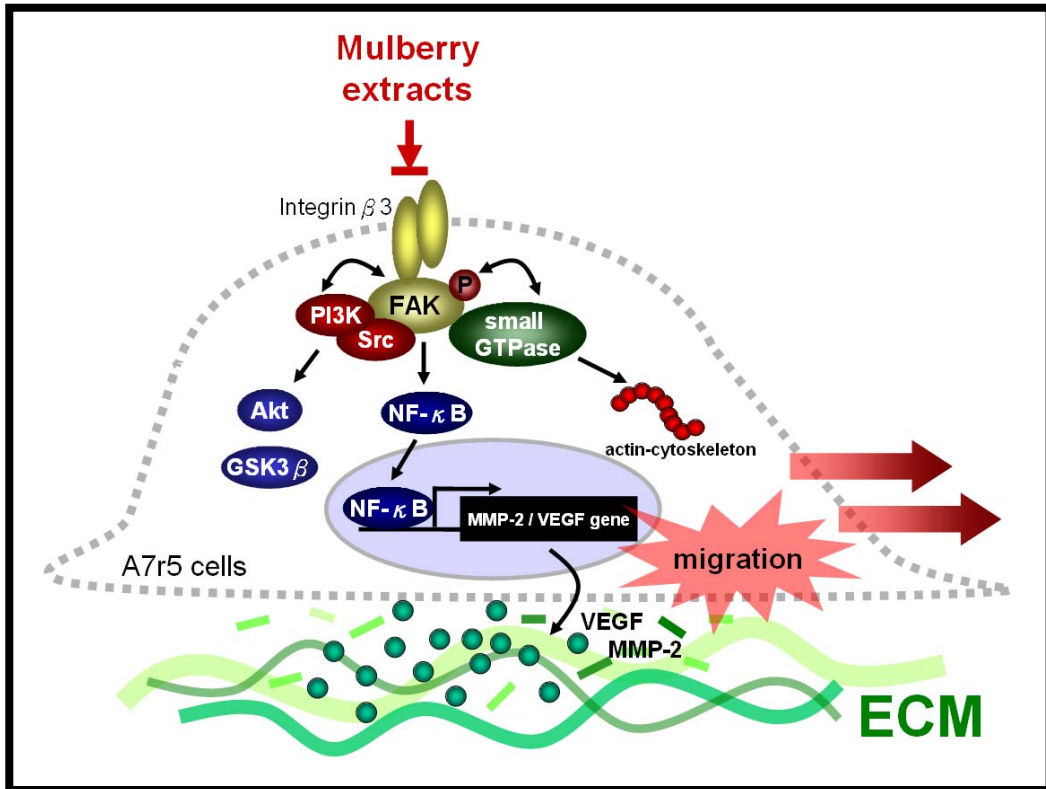


Figure 2C. Summary : MWEs and MPEs inhibits VSMC migration.

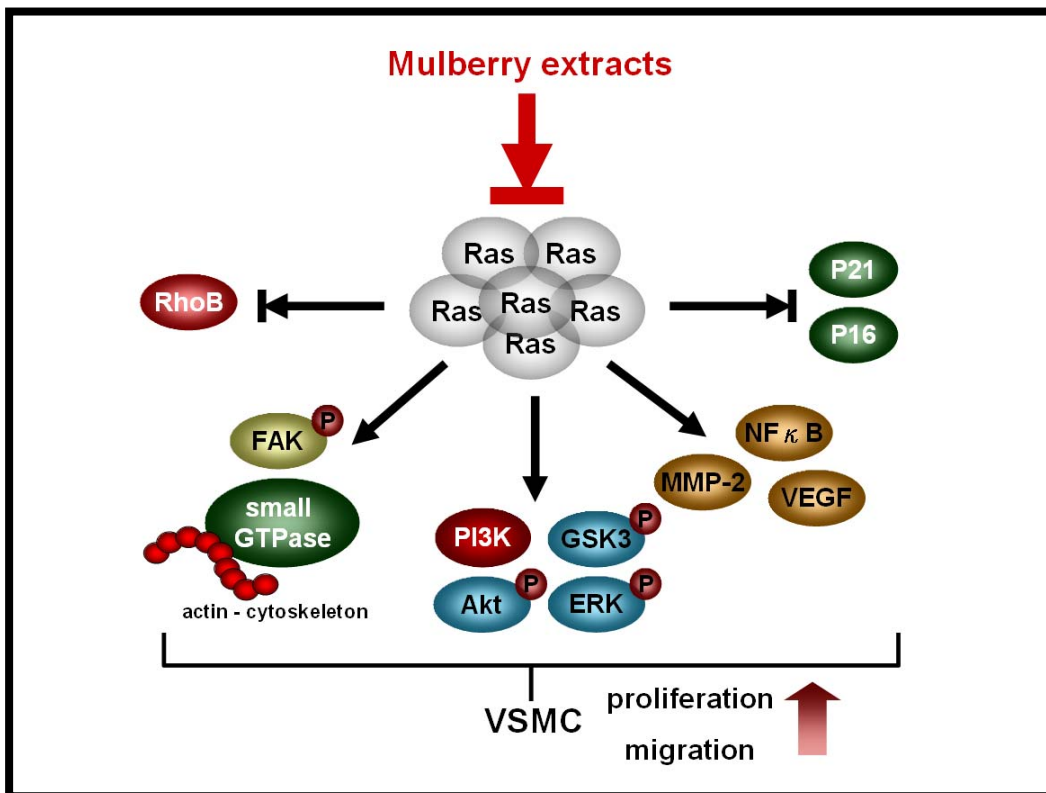
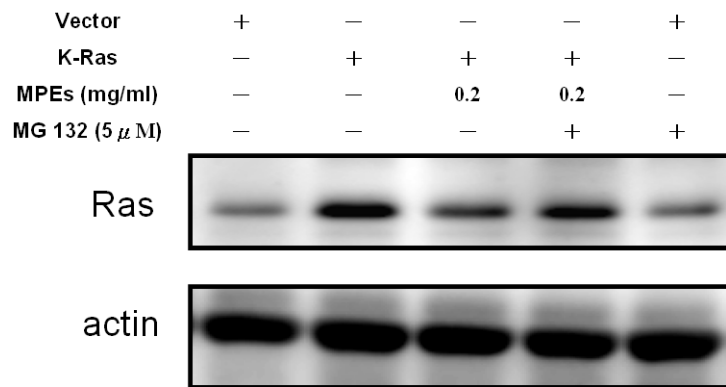


Figure 2D. Summary : MWEs and MPEs inhibit Ras-induced VSMC proliferation and migration.

(A)



(B)

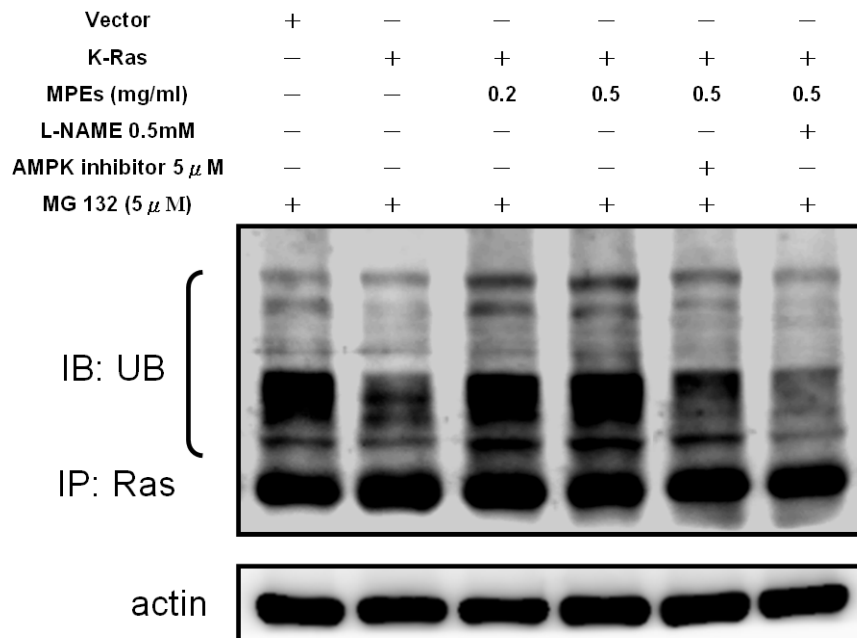


Figure 3. The inhibitors of AMPK and iNOS blocked MPEs suppressing Ras overexpression in Ras-transfected A7r5 cells. (A) A7r5 cells were pre-transfected with K-Ras gene for 12 hr and then treated with MG132 (proteasome inhibitor) and MPEs at indicated concentration for 48 hr. Cell lysates (100 μ g) were prepared and subjected to western blot analysis. Proteins were detected by anti-Ras or anti- β -actin antibodies, β -actin was used for equal loading. (B) A7r5 cells were transfected with K-Ras gene for 12 hr, then cells were pretreated with or without AMPK inhibitor (5 μ M) and L-NAME (0.5 mM). The Ras-transfected cells were treated with or without MPEs for 48 hr. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Ras antibody and then immunoblotted with anti-ubiquitin and anti-Ras antibodies. β -actin was used for equal loading.

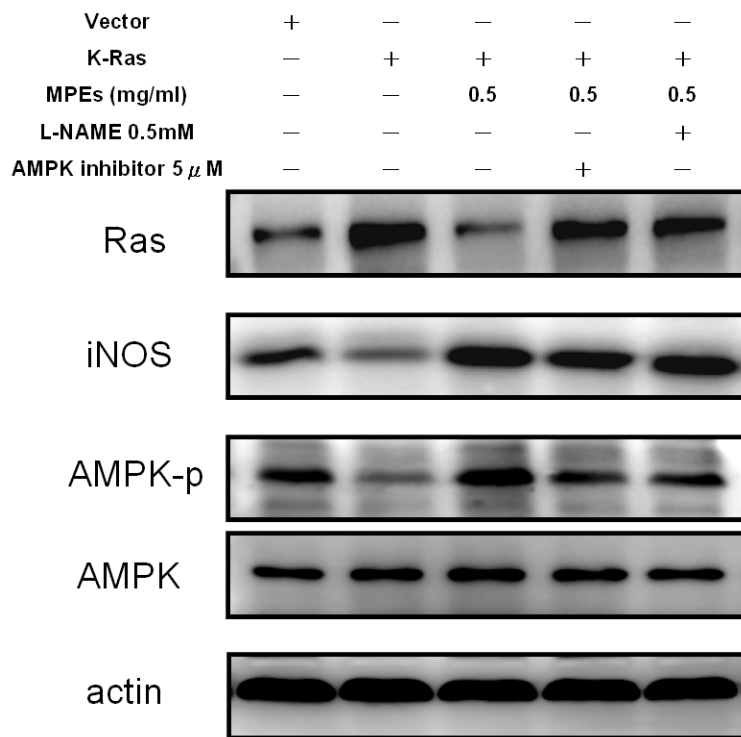
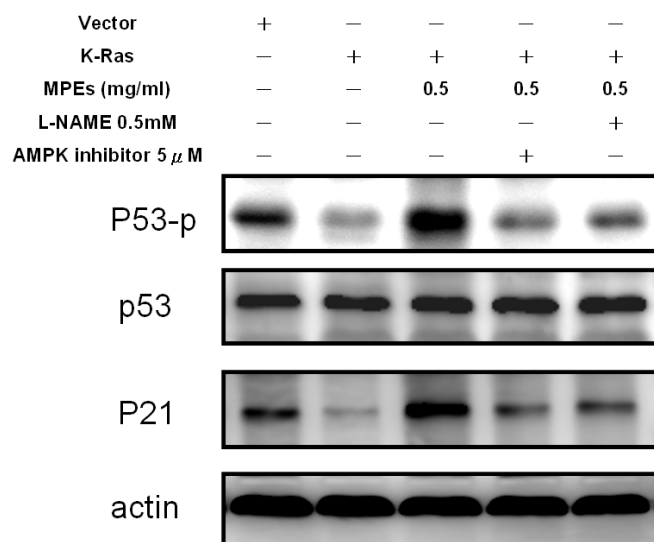


Figure 4. The inhibitors of AMPK and iNOS blocked MPEs suppressing AMPK activation in Ras-transfected A7r5 cells. A7r5 cells were transfected K-Ras gene for 12 hr, then cell were pretreated with or without AMPK inhibitor (5 μ M) and L-NAME (0.5 mM). The Ras-transfected cells were treated with or without MPEs for 48 hr. Cell lysates (100 μ g) prepared and subjected to western blot analysis. P Western blot analysis for Ras, AMPK, phospho-AMPK, and iNOS. β -actin was used for equal loading.

(A)



(B)

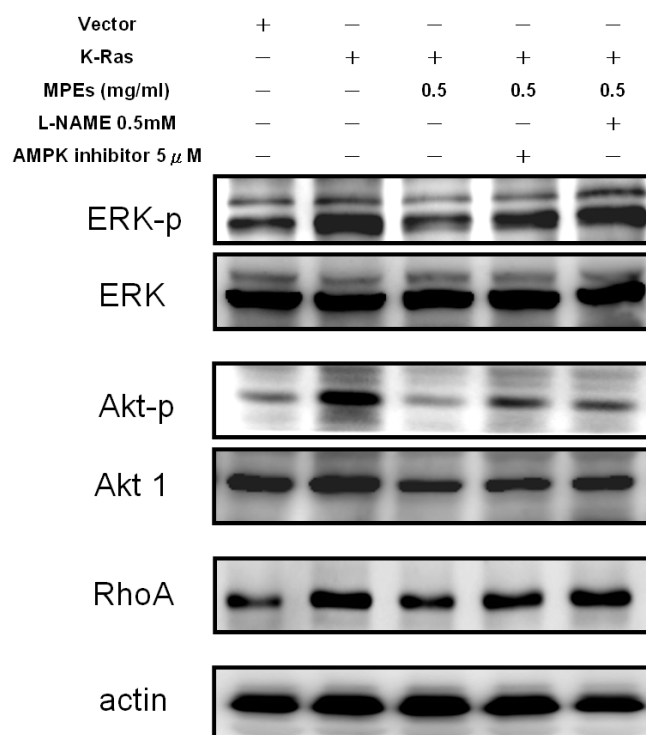
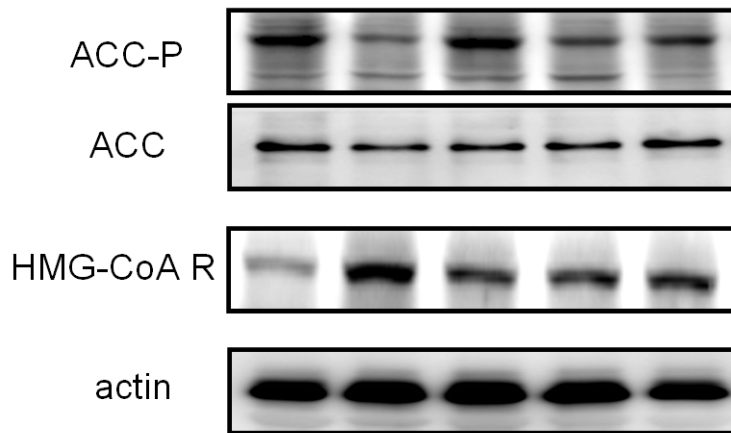


Figure 5. The inhibitors of AMPK and iNOS blocked MPEs inducing p53 phosphorylation; and blocked MPEs inhibiting migration-related protein in Ras-transfected A7r5 cells. (A) A7r5 cells were transfected K-Ras gene for 12 hr, then cell were pretreated with or without AMPK inhibitor (5 μ M) and L-NAME (0.5 mM). The Ras-transfected cells were treated with or without MPEs for 48 hr. Cell lysates (100 μ g) prepared and subjected to western blot analysis. Western blot analysis for p53, phospho-p53, and p21. β -actin was used for equal loading. **(B)** Western blot analysis for ERK, phospho-ERK, Akt, phospho-Akt, and RhoA, β -actin was used for equal loading.

(A)

Vector	+	-	-	-	-
K-Ras	-	+	+	+	+
MPEs (mg/ml)	-	-	0.5	0.5	0.5
L-NAME 0.5mM	-	-	-	-	+
AMPK inhibitor 5 μ M	-	-	-	+	-



(B)

Vector	+	-	-	-	-
K-Ras	-	+	+	+	+
MPEs (mg/ml)	-	-	0.5	0.5	0.5
L-NAME 0.5mM	-	-	-	-	+
AMPK inhibitor 5 μ M	-	-	-	+	-

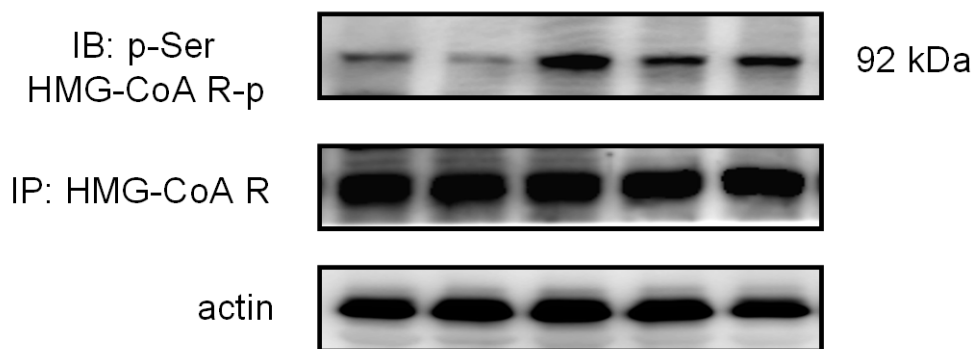
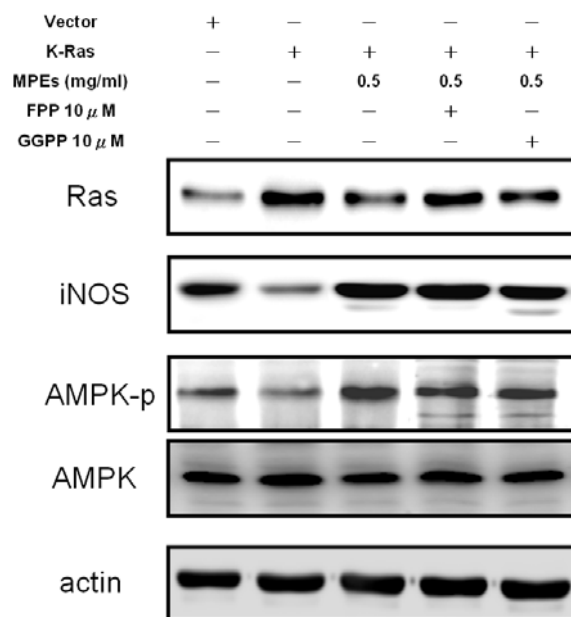


Figure 6. The inhibitors of AMPK and iNOS blocked MPEs inducing ACC and HMG-CoA reductase phosphorylation in Ras-transfected A7r5 cells. (A) A7r5 cells were transfected K-Ras gene for 12 hr, then cell were pretreated with or without AMPK inhibitor (5 μ M) and L-NAME (0.5 mM). The Ras-transfected cells were treated with or without MPEs for 48 hr. Cell lysates (100 μ g) prepared and subjected to western blot analysis. Western blot analysis for ACC, phospho-ACC, and HMG-CoA reductase. β -actin was used for equal loading. (B) Cell lysates were immunoprecipitated with anti-HMG-CoA reductase antibody and then immunoblotted with anti-phosphorylated Ser antibody. β -actin was used for equal loading.

(A)



(B)

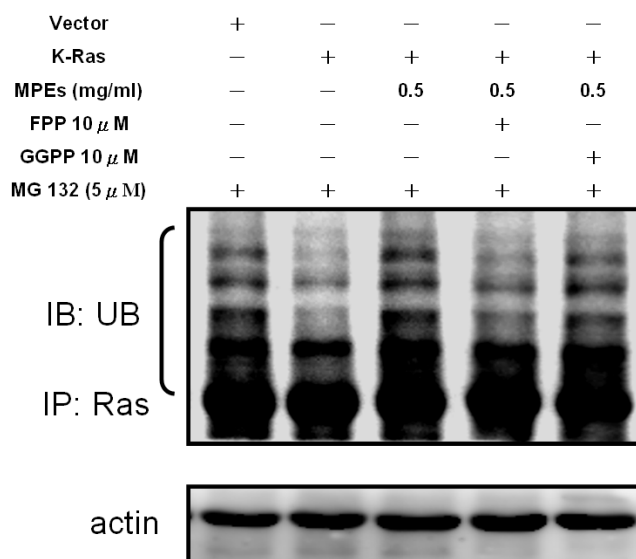


Figure 7. The FPP and GGPP blocked the affection of MPEs in Ras-transfected A7r5 cells. (A) A7r5 cells were transfected K-Ras gene for 12 hr, then cell were pretreated with or without AMPK inhibitor (5 μ M) and L-NAME (0.5 mM). The Ras-transfected cells were treated with or without MPEs for 48 hr. Cell lysates (100 μ g) prepared and subjected to western blot analysis. Western blot analysis for AMPK, phospho-AMPK, and HMG-CoA reductase. β -actin was used for equal loading. (B) Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Ras antibody, then immunoblotted with anti-ubiquitin and anti-Ras antibodies. β -actin was used for equal loading.

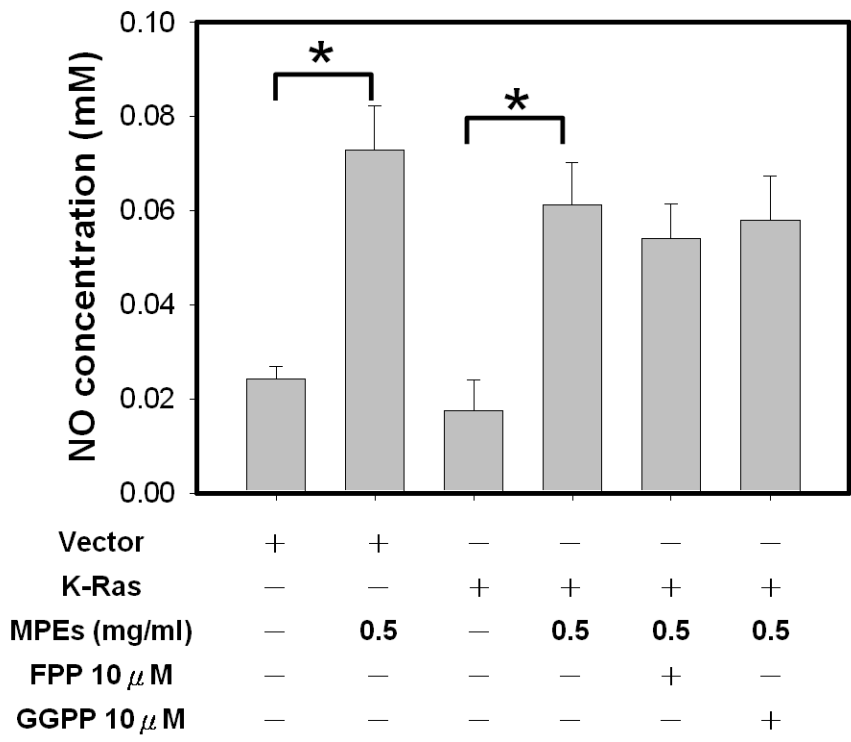
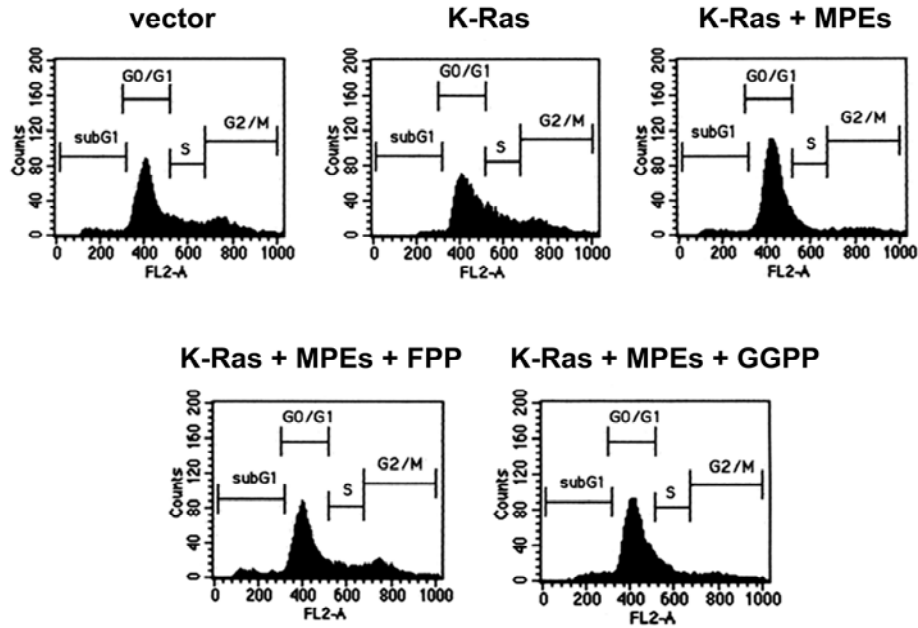


Figure 8. The FPP and GGPP did not block MPEs inducing NO production in Ras-transfected A7r5 cells. A7r5 cells were transfected K-Ras gene for 12 hr. The Ras-transfected cells were treated with or without FPP (10 μM), GGPP (10 μM), and MPEs (0.5 mg/ml) for 48 hr. After the treatment, The medium was replaced by no phenol red medium and incubation for 24 hr. The NO content of medium was analyzed by ELISA reader.

(A)



(B)

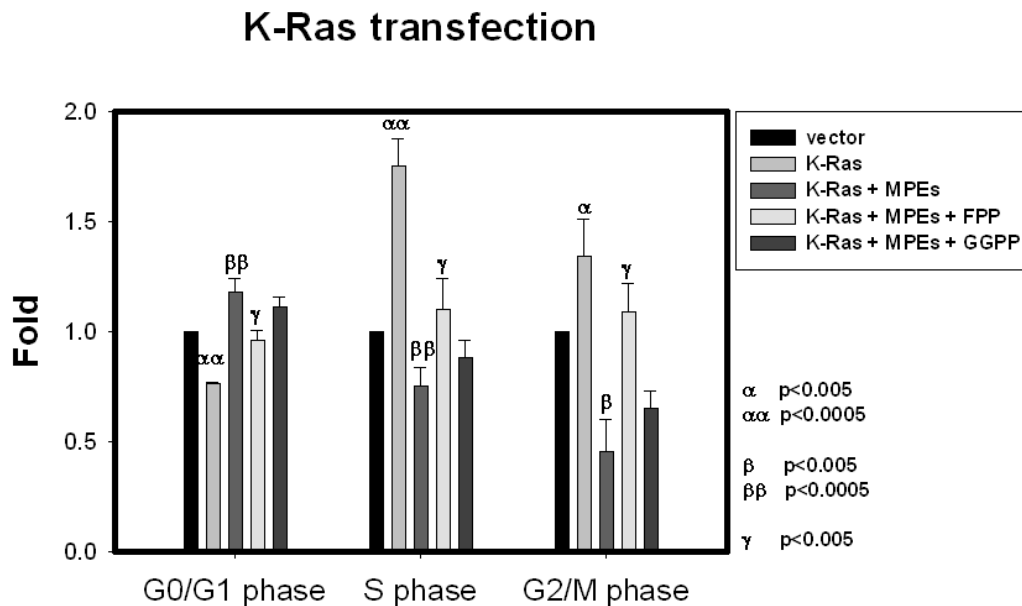


Figure 9. FPP blocked MPEs inducing cell cycle arrest on Ras-transfected A7r5 cells. After overnight attachment of cells, Pre-transfected K-Ras and pcDNA3.1 vector for 12 hr than culture in 10% FBS medium for 12 hr, then exposed to indicate MPEs (1 mg/ml) at the same time for 48 hr. PI-stained DNA histograms of A7r5 cells were analyzed by flow cytometry assay (A). Quantitative assessment of the percentage of cells in 4 phase and represent the average of three independent experiments (B) The data were means \pm SD from 3 samples for each group. α : $p < 0.005$, $\alpha\alpha$: $p < 0.0005$ compared with vector. β : $p < 0.005$, $\beta\beta$: $p < 0.0005$ compared with K-Ras only. γ : $p < 0.005$ compared with KRas+MPEs group.

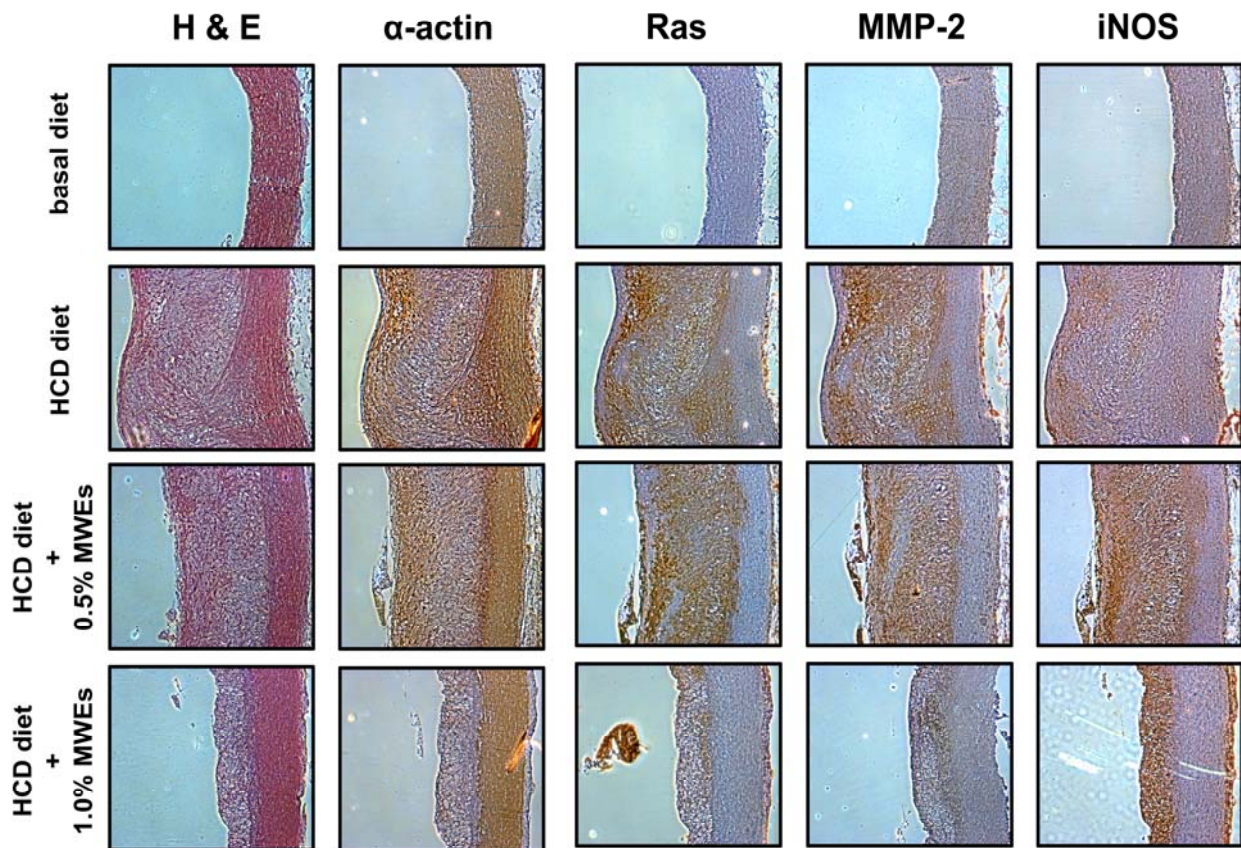


Figure 10. Histological analysis of a representative atherosclerotic lesion from HCD-fed rabbits treated for 10 weeks with MWEs 0.5% and MWE 1%. Primary antibodies used were detected with α -actin, Ras, MMP-2, and iNOS. The same group of the slices were from the same area of the artery and stained with different antibodies. Semiquantitative computer-assisted image analysis atherosclerotic lesion was performed on six randomly selected x400-magnified images of slides from individual animals.

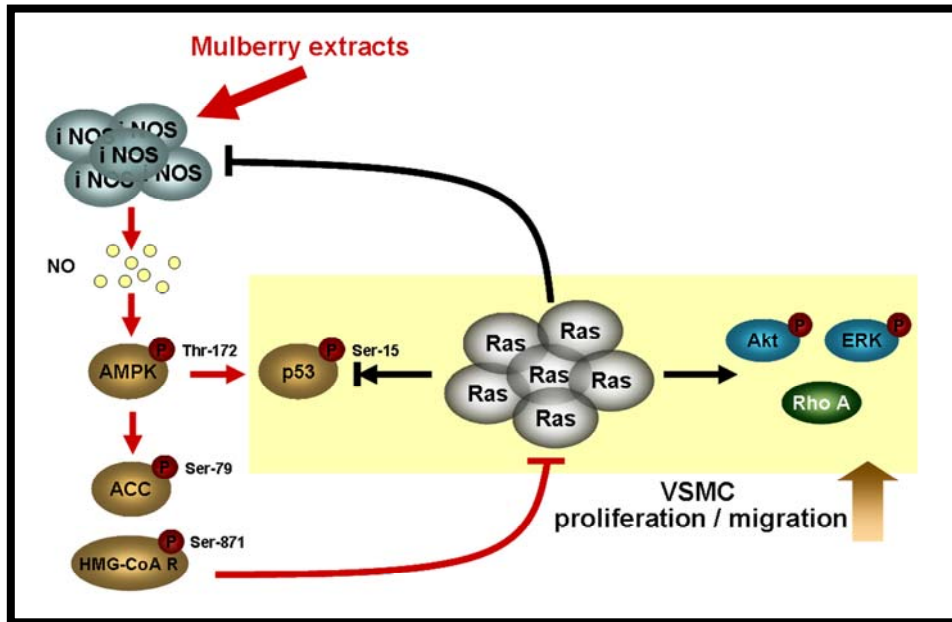


Figure 11. Ras-transfected A7r5 細胞中 Ras、AMPK、iNOS 的相互關係

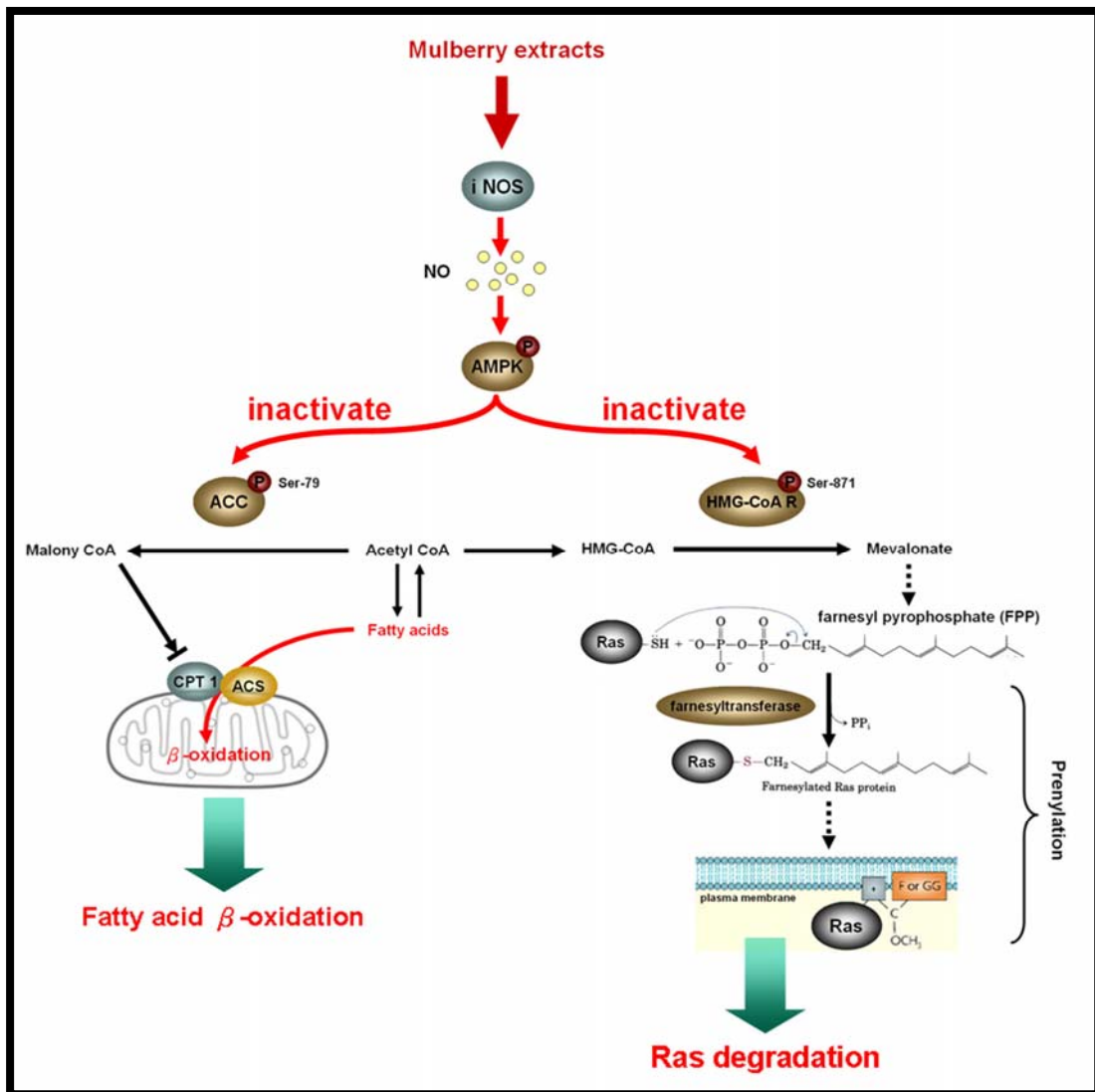


Figure 12. MPEs 透過誘導 VSMC 中 NO 的釋放與 AMPK 的活化，達到促進 Ras 蛋白分解的機制

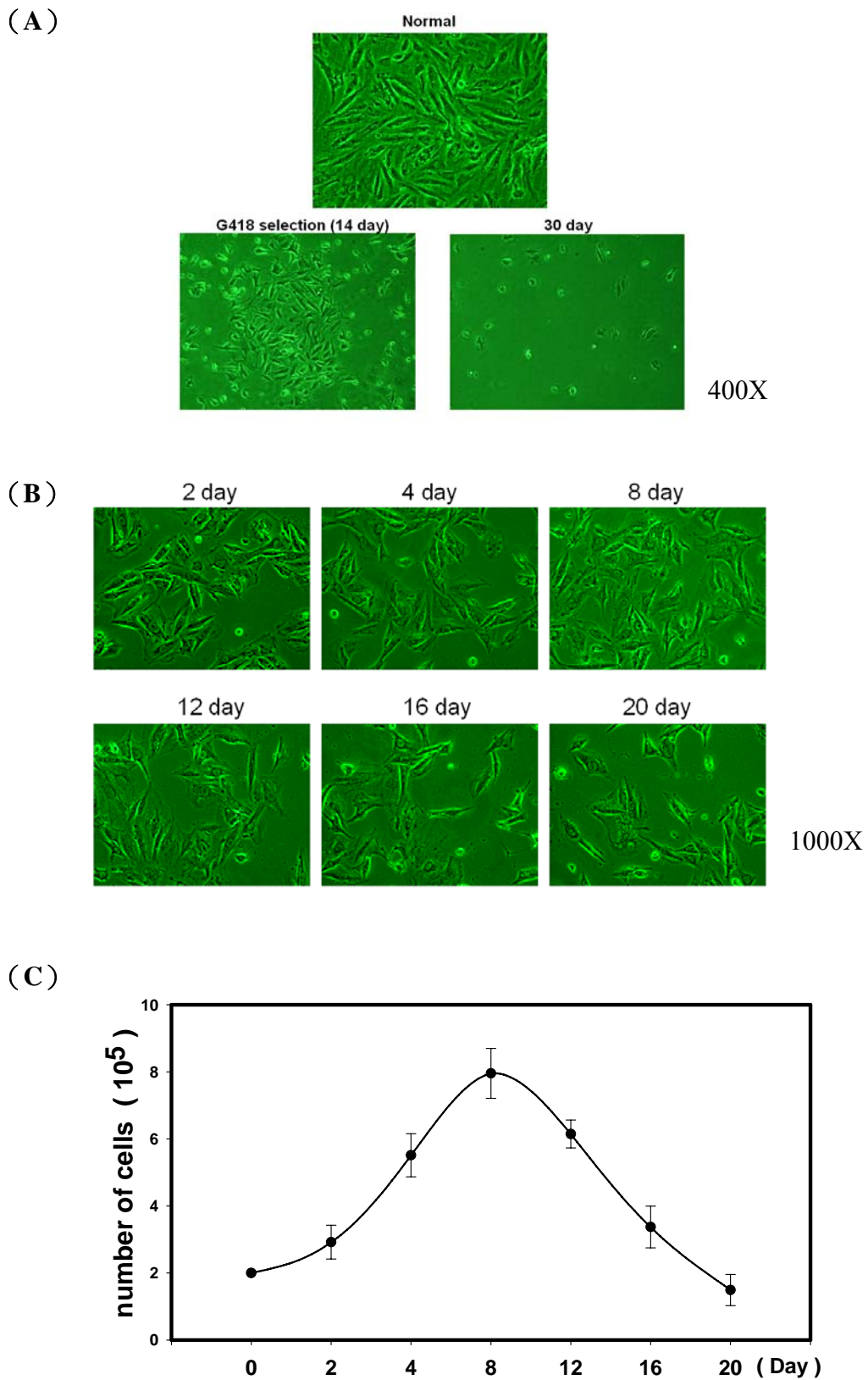


Figure 13. Effect of K-ras on cell growth of A7r5 cells. A7r5 cells was pre-transfected K-Ras for 12 hr and 1000 $\mu\text{g/ml}$ G418 medium was added to selection for 14 days. After 14 days, survival cells subsequently were maintained with 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 medium. Morphology of the cells were observation at indicated periods (A) (B). Numbers of the cells were also counted under the microscope (C).

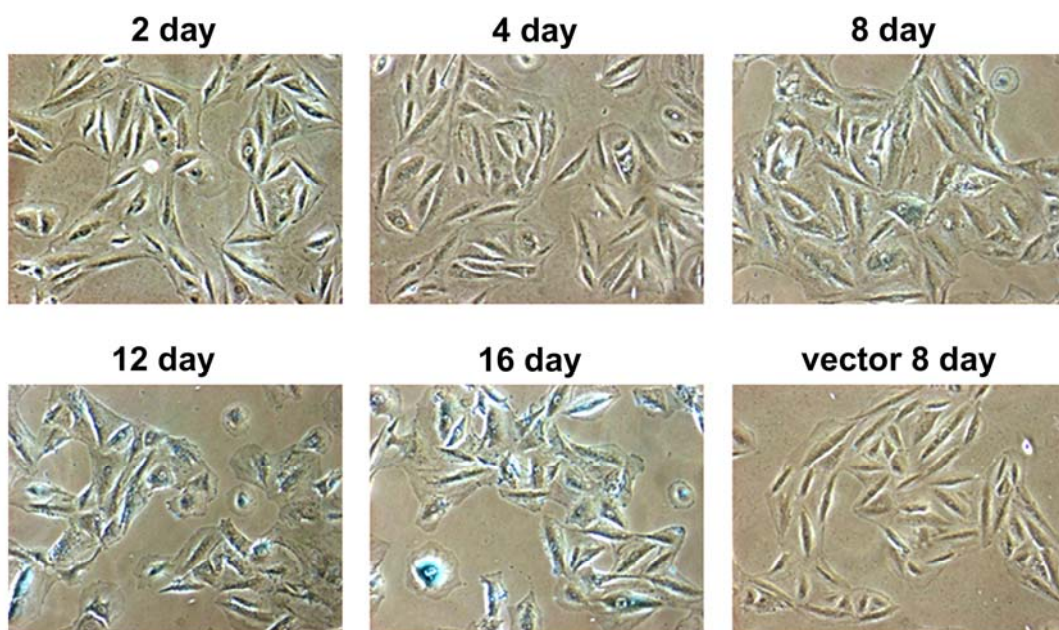


Figure 14. Effect of K-ras on the aging of A7r5 cells. A7r5 cells was pre-transfected K-Ras for 12 hr and 1000 $\mu\text{g/ml}$ G418 medium was added to selection for 14 days. Survival cells subsequently were maintained with 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 medium and the cells were seeded in 6-well plates for aging stain analysis.

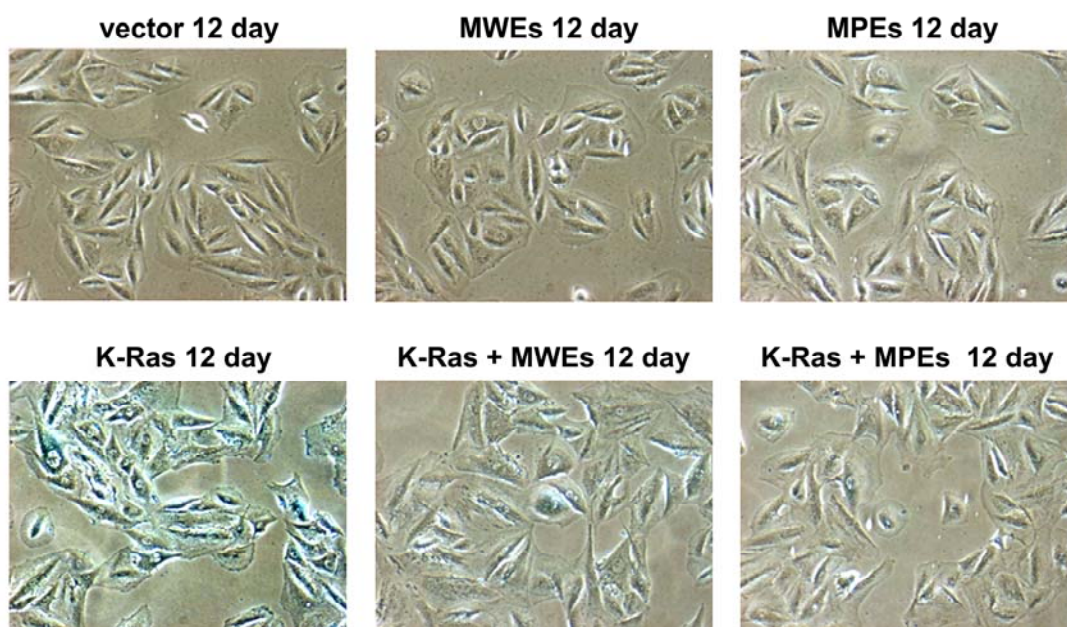
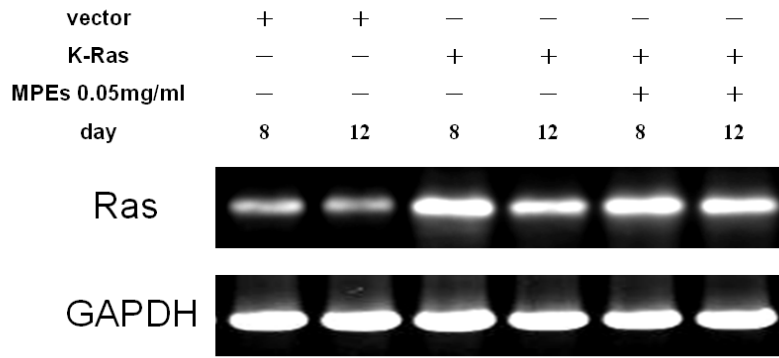


Figure 15. MWEs and MPEs blocked K-ras-induced aging of A7r5 cells. A7r5 cells was pre-transfected K-Ras for 12 hr and 1000 $\mu\text{g/ml}$ G418 medium was added to selection for 14 days. Survival cells subsequently were maintained with 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 medium and the cells were seeded in 6-well plates. Then the cells were treated with MWEs and MPEs at indicated concentration for 12 days and aging level was observed by aging stain analysis.

(A)



(B)

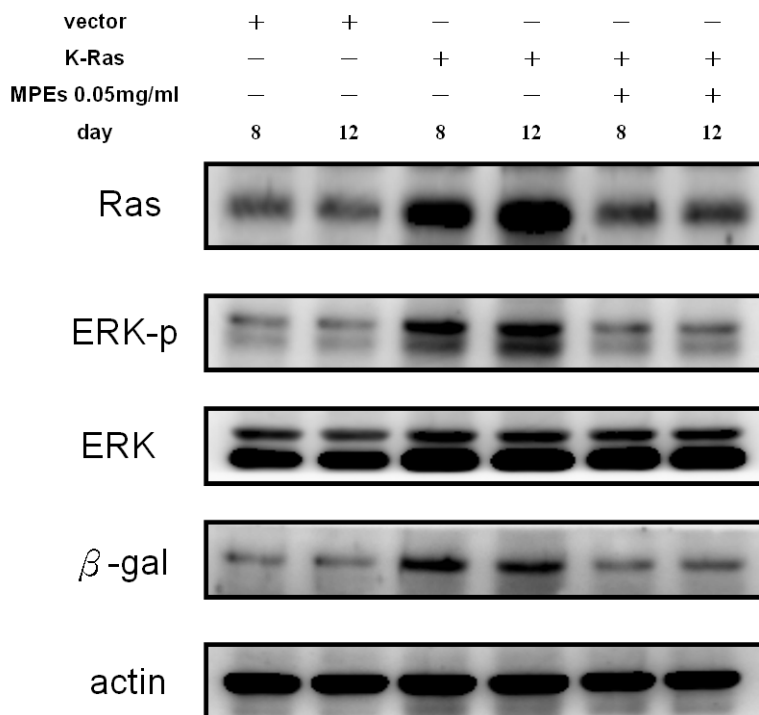


Figure 16. MPEs blocked K-ras-induced Ras and aging-related proteins (ERK and β -gal) expression in A7r5 cells. A7r5 cells was pre-transfected K-Ras for 12 hr and 1000 μ g/ml G418 medium was added to selection for 14 days. Survival cells subsequently were maintained with 100 μ g/ml G418 medium and the cells were seeded in 6-well plates. After the selection, the cells were treated with 0.05 mg/ml MPEs at indicated periods for 8~12 days. **(A)** Total RNA was extracted; Ras mRNA expressions were analyzed by RT-PCR. GAPDH served as loading control. Results are representative of at least three independent experiments. **(B)** Western blot analysis was performed with antibodies specific for Ras, phospho-ERK, ERK and β -gal. The results from representative experiments were normalized to β -actin expression.

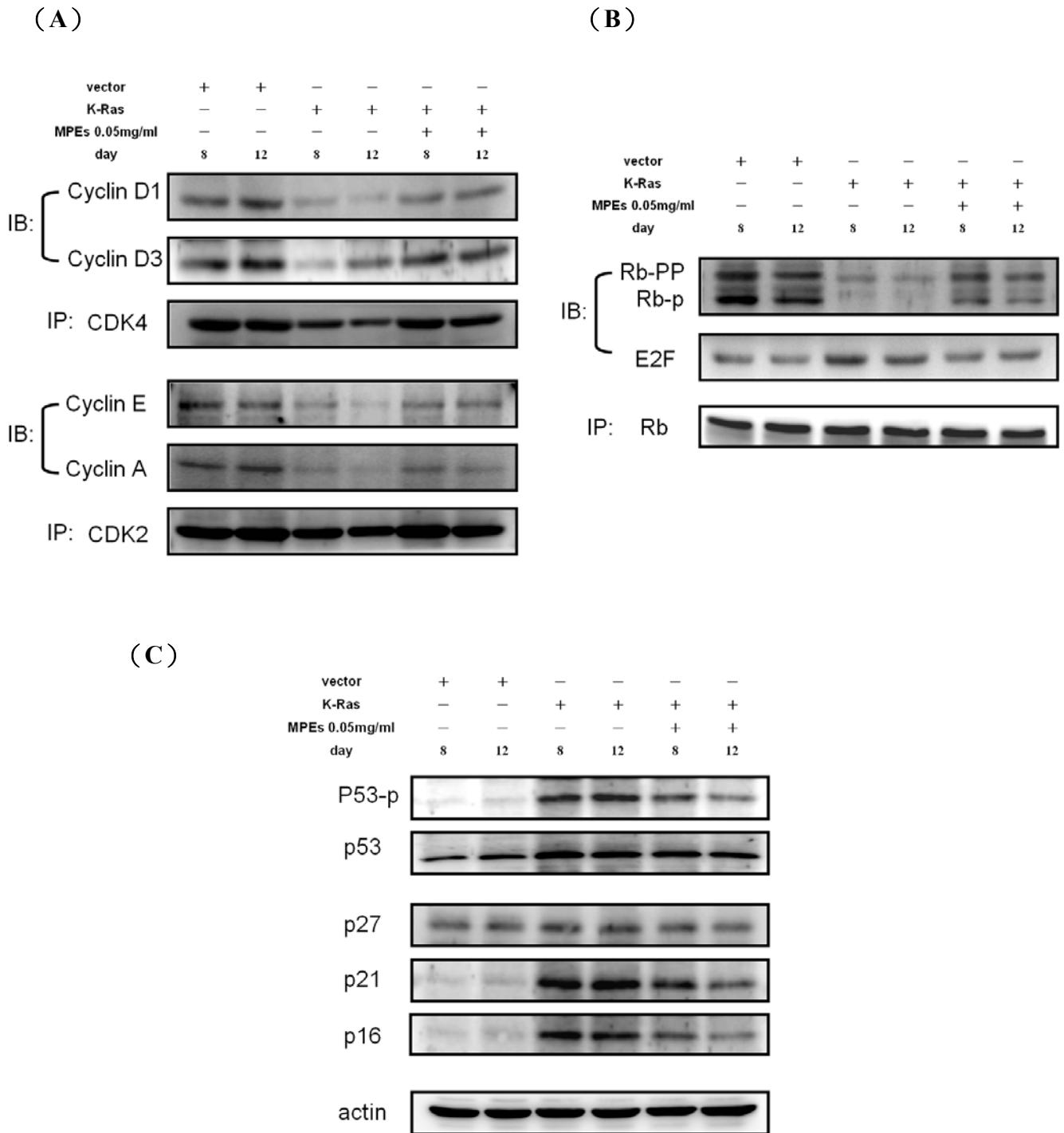
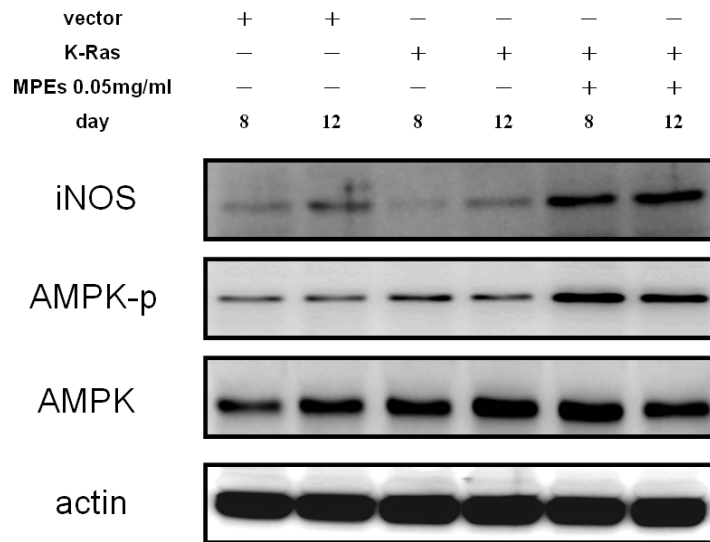


Figure 17. MPEs affected K-ras-induced the cell cycle-related proteins expression in A7r5 cells. A7r5 cells was pre-transfected K-Ras for 12 hr and 1000 $\mu\text{g/ml}$ G418 medium was added to selection for 14 days. Survival cells subsequently were maintained with 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 medium and the cells were seeded in 6-well plates. After the selection, the cells were treated with 0.05 mg/ml MPEs at indicated periods for 8~12 days. **(A)** Cell lysates were immunoprecipitated with anti-CDK4 or CDK2 and then immunoblotted with anti-cyclin D1 and anti-cyclin D3 or anti-cyclin A and anti-cyclin E. **(B)** Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Rb and then immunoblotted with anti-phospho-Rb and anti-E2F. **(C)** Phospho-p53, p53, p27, p21, and p16 protein expression was determined using a specific monoclonal antibody. β -actin was used for equal loading.

(A)



(B)

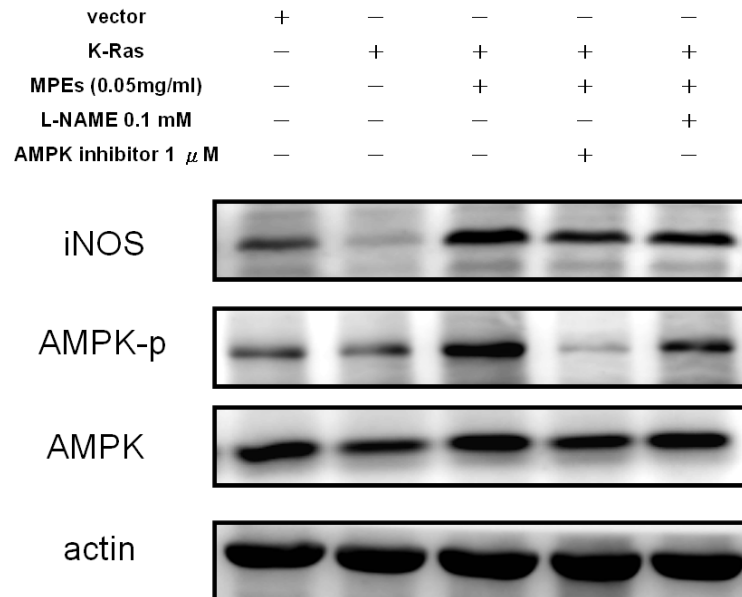


Figure 18. The inhibitors of AMPK and iNOS blocked MPEs inducing iNOS overexpression and AMPK activation in A7r5 cells. After the G418 selection, the Ras-transfected A7r5 cells were treated with 0.05 mg/ml MPEs at indicated periods. Cell extracts (100 μ g) were loaded per lane onto a SDS-polyacrylamide gel and electro-blotted onto a nitrocellulose membrane. (A) iNOS, phospho-AMPK and AMPK expression was determined using a specific monoclonal antibody. β -actin as a internal control. (B) After the selection, the cells were pretreated with or without AMPK inhibitor (1 μ M) and L-NAME (0.1 mM), then cells were treated with or without MPEs for 8~12 days. Cell lysates (100 μ g) prepared and subjected to western blot analysis. Western blot analysis for Ras, AMPK, phospho-AMPK, and iNOS. β -actin was used for equal loading.

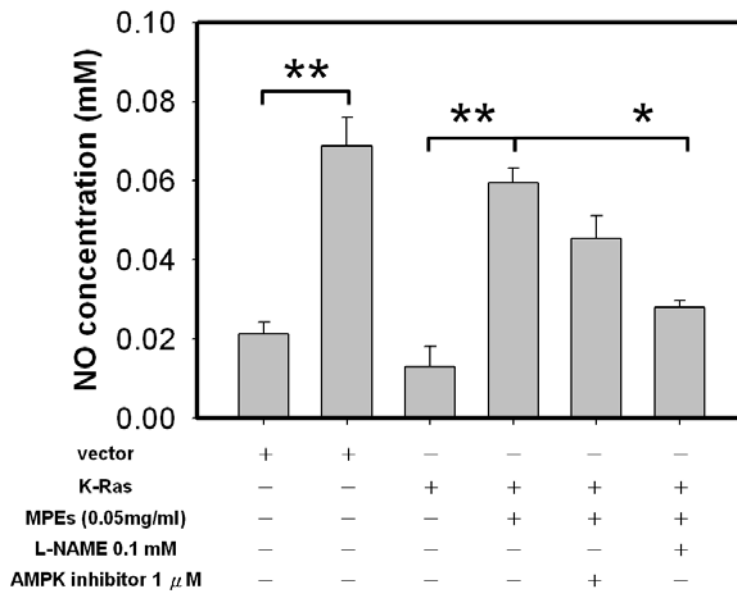


Figure 19. Effect of inhibitors blocked mulberry extracts-elevated NO production in Ras-transfected A7r5 cells. After the G418 selection, the cells were pretreated with or without AMPK inhibitor (1 μ M) and L-NAME (0.1 mM), then cells were treated with or without MPEs for 12 days. After the treatment, The medium was replaced by no phenol red medium and incubation for 24 hr. The NO content of medium was analyzed by ELISA reader.

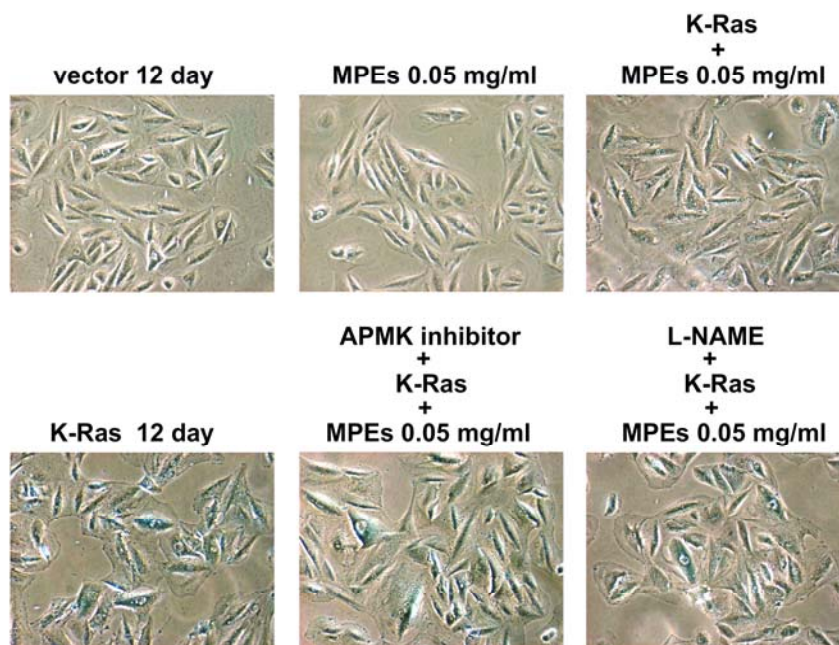
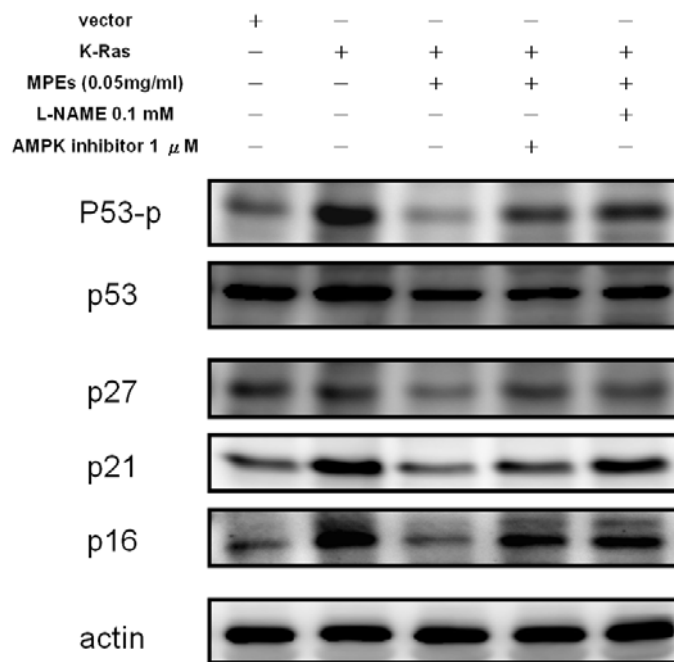


Figure 20. The inhibitors of AMPK and iNOS blocked MPEs inhibiting aging in Ras-transfected A7r5 cells. A7r5 cells was pre-transfected K-Ras for 12 hr and 1000 μ g/ml G418 medium was added to selection for 14 days. Survival cells subsequently were maintained with 100 μ g/ml G418 medium and the cells were seeded in 6-well plates. Then the cells were treated with inhibitors and MPEs at indicated concentration for 12 days and ging level was observated by aging stain analysis.

(A)



(B)

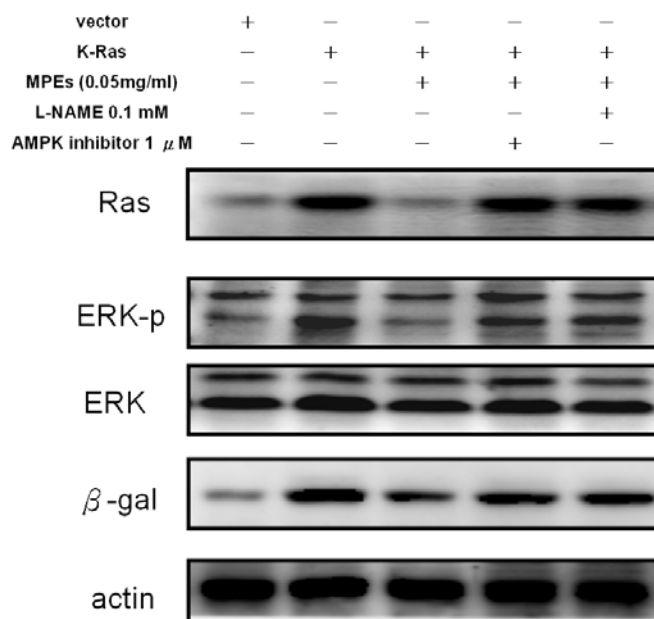
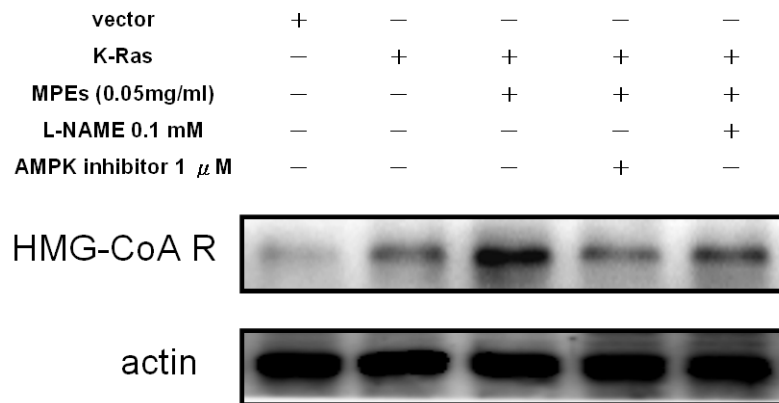


Figure 21. The inhibitors of AMPK and iNOS blocked MPEs inhibiting p53 phosphorylation and aging-related protein in Ras-transfected A7r5 cells. After the G418 selection, the cells were pretreated with or without AMPK inhibitor (1 μ M) and L-NAME (0.1 mM), then cells were treated with or without MPEs for 12 days. Cell lysates (100 μ g) prepared and subjected to western blot analysis. **(A)** Western blot analysis for p53, phospho-p53, p21, p27, and p16. β -actin was used for equal loading. **(B)** Western blot analysis for ERK, phospho-ERK and β -gal. β -actin was used for equal loading.

(A)



(B)

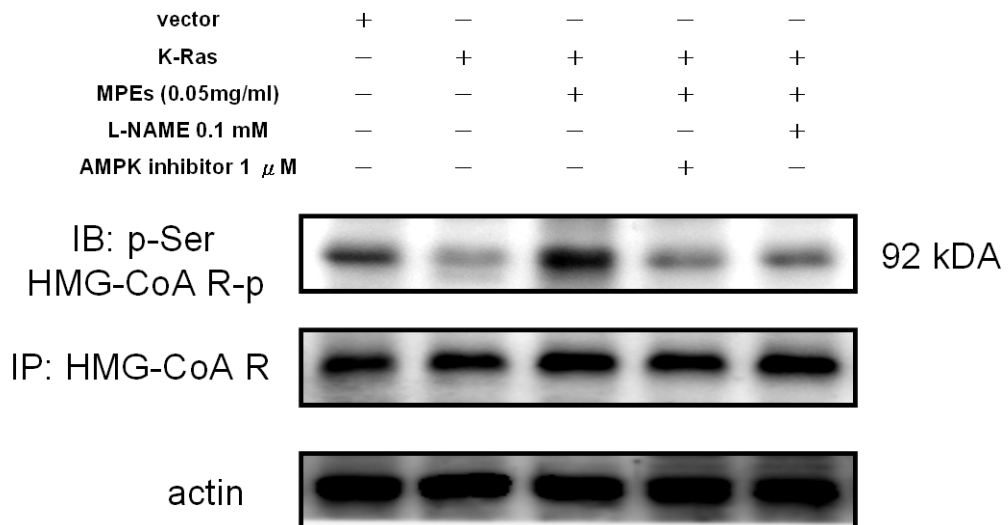


Figure 22. The inhibitors of AMPK and iNOS blocked MPEs inducing HMG-CoA reductase in Ras-transfected A7r5 cells. After the G418 selection, the cells were pretreated with or without AMPK inhibitor (1 μ M) and L-NAME (0.1 mM), then cells were treated with or without MPEs for 12 days. Cell lysates (100 μ g) prepared and subjected to western blot analysis. (A) Western blot analysis for HMG-CoA reductase. (B) Cell lysates were immunoprecipitated with anti-HMG-CoA reductase antibody and then immunoblotted with anti-phosphorylated ser antibody. β -actin was used for equal loading.

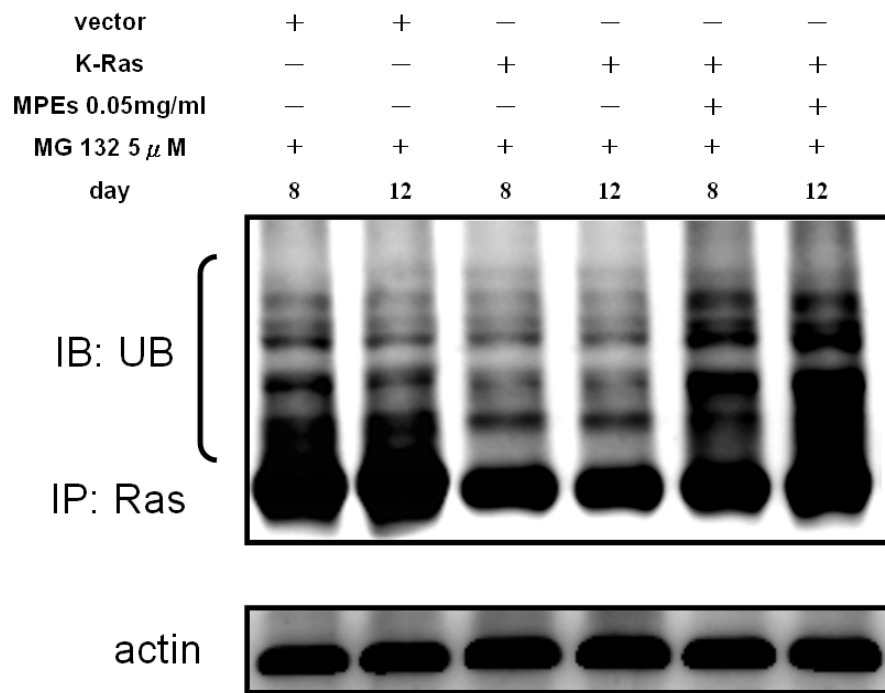


Figure 23. MPEs induced the Ras degradation in Ras-transfected A7r5 cells. After the G418 selection, cells were treated with MPEs for 12 days. The cells were pretreated with the MG132 (proteasome inhibitor) reagent on the 6th and 10th day. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Ras antibody and then immunoblotted with anti-ubiquitin and anti-Ras antibodies. β -actin was used for equal loading.

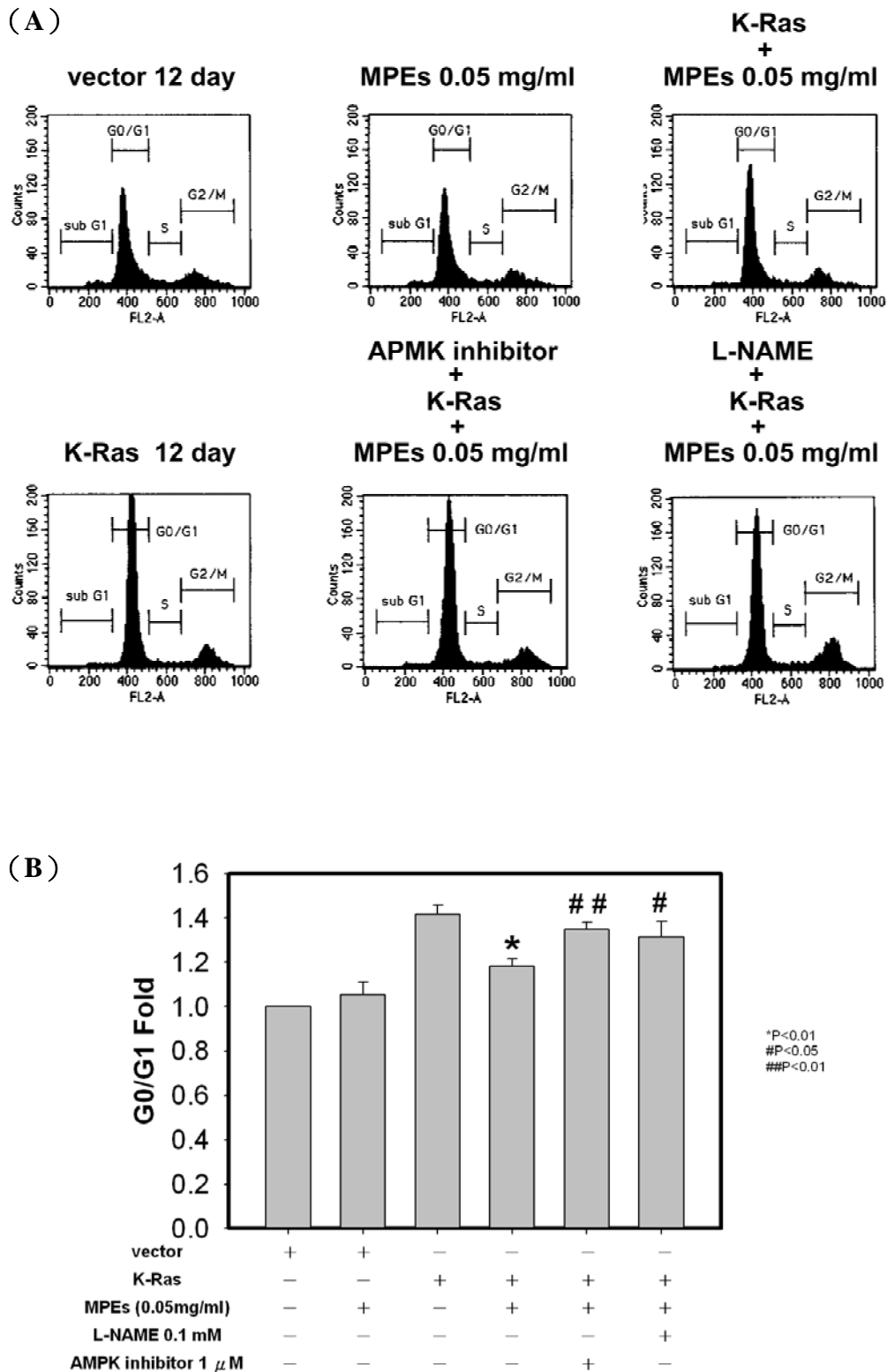


Figure 24. The inhibitors of AMPK and iNOS blocked MPEs reducing cell cycle arrest on Ras-transfected A7r5 cells. After the G418 selection, the cells were pretreated with or without AMPK inhibitor (1 μ M) and L-NAME (0.1 mM), then cells were treated with or without MPEs for 12 days. PI-stained DNA histograms of A7r5 cells were analyzed by flow cytometry assay (A). Quantitative assessment of the percentage of cells in 4 phase and represent the average of three independent experiments (B). The data were means \pm SD from 3 samples for each group. *p<0.01 compared with K-Ras only. #p<0.05, ##p<0.01 compared with K-Ras+MPEs group.

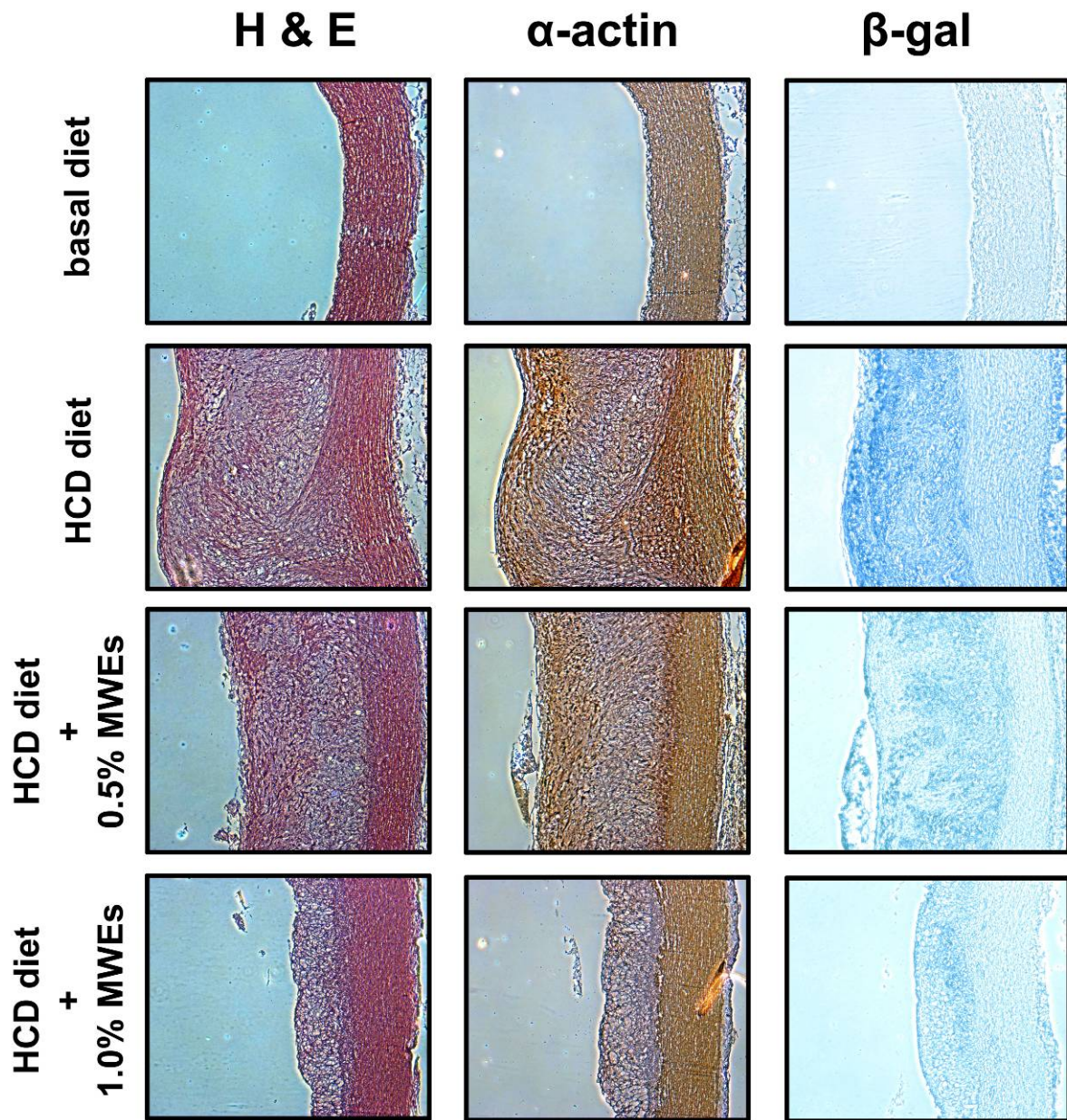


Figure 25. Histological analysis of a representative atherosclerotic lesion from HCD-fed rabbits treated for 10 weeks with MWEs 0.5% and MWE 1%. Primary antibodies used were detected with α -actin and aging level was observed by aging stain analysis. The same group of the slices were from the same area of the artery and stained with different analysis. Semiquantitative computer-assisted image analysis atherosclerotic lesion was performed on six randomly selected x400-magnified images of slides from individual animals.

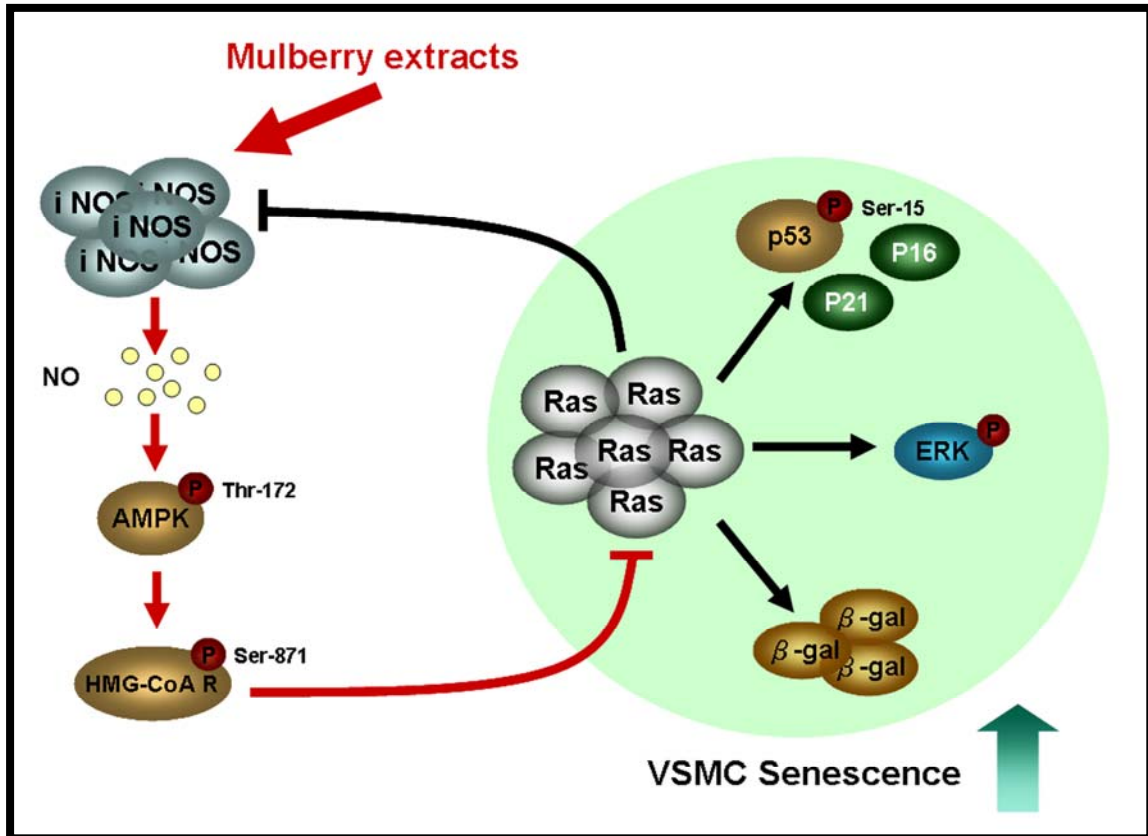


Figure 26. Summary : MPEs inhibit K-Ras-induced VSMC senescence.

肆、参考文献

1. Asano N, Yamashita T, Yasuda K, Ikeda K, Kizu H, Kameda Y, Kato A, Nash RJ, Lee HS, Ryu KS. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J Agric Food Chem.*, 49:4208-13, 2001.
2. Dugo P, Mondello L, Errante G, Zappia G, Dugo G. Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. *J Agric Food Chem.*, 49:3987-92, 2001.
3. Mitcheva M, Astroug H, Drenska D, Popov A, Kassarova M. Biochemical and morphological studies on the effects of anthocyanins and vitamin E on carbon tetrachloride induced liver injury. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 39:443-8, 1993.
4. Morse MA, Stoner GD. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis*, 14: 1737-46, 1993.
5. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.*, 52:673-751, 2000.
6. Tewari RK, Kumar P, Sharma PN. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants. *Planta*. 2006 ;223:1145-53.
7. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115-126, 1999.
8. Heinecke, J. W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis*, 141: 1-15, 1998.
9. Cyrus, T., Witztum, J. L., Rader, D. J., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M. F., and Funk, C. D. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest*, 103: 1597-1604, 1999.
10. Harats, D., Shaish, A., George, J., Mulkins, M., Kurihara, H., Levkovitz, H., and Sigal, E. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 2100-2105, 2000.
11. Knowles, J. W., Reddick, R. L., Jennette, J. C., Shesely, E. G., Smithies, O., and Maeda, N. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest*, 105: 451-458, 2000.
12. Hsieh, C. C., Yen, M. H., Yen, C. H., and Lau, Y. T. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 49: 135-145, 2001.
13. Cybulsky, M. I. and Gimbrone, M. A., Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 251: 788-791, 1991.
14. Dong, Z. M., Chapman, S. M., Brown, A. A., Frenette, P. S., Hynes, R. O., and Wagner, D. D. The

- combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 102: 145-152, 1998.
15. Collins, R. G., Velji, R., Guevara, N. V., Hicks, M. J., Chan, L., and Beaudet, A. L. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*, 191: 189-194, 2000.
 16. Han, K. H., Han, K. O., Green, S. R., and Quehenberger, O. Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res*, 40: 1053-1063, 1999.
 17. Gu, L., Okada, Y., Clinton, S. K., Gerard, C., Sukhova, G. K., Libby, P., and Rollins, B. J. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor- deficient mice. *Mol Cell*, 2: 275-281, 1998.
 18. Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C. H., Young, S. G., Rollins, B. J., and Charo, I. F. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest*, 103: 773-778, 1999.
 19. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I. F. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394: 894-897, 1998.
 20. Qiao, J. H., Tripathi, J., Mishra, N. K., Cai, Y., Tripathi, S., Wang, X. P., Imes, S., Fishbein, M. C., Clinton, S. K., Libby, P., Lusis, A. J., and Rajavashisth, T. B. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol*, 150: 1687-1699, 1997.
 21. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A., and Evans, R. M. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93: 241-252, 1998.
 22. Colles, S. M., Irwin, K. C., and Chisolm, G. M. Roles of multiple oxidized LDL lipids in cellular injury: dominance of 7 beta-hydroperoxycholesterol. *J Lipid Res*, 37: 2018-2028, 1996.
 23. Bennett, M. R. and Boyle, J. J. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 138: 3-9, 1998.
 24. Hansson, G. K. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 8: 301-311, 1997.
 25. Wang, C. J., Hsieh, Y. J., Chu, C. Y., Lin, Y. L., and Tseng, T. H. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esuletin. *Cancer Lett*, 183: 163-168, 2002.
 26. Koepp, D. M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, 97: 431-434, 1999.
 27. Hunter, T. and Pines, J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79: 573-582, 1994.
 28. Hunter, T. and Pines, J. Cyclins and cancer. *Cell*, 66: 1071-1074, 1991.
 29. Halaban, R. Melanoma cell autonomous growth: the Rb/E2F pathway. *Cancer Metastasis Rev*, 18: 333-343, 1999.

30. Leeuwen RTJ. Extracellular proteolysis and the migrating vascular smooth muscle cell. *Fibrinolysis*, 10: 59-74, 1996.
31. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20:E83-8, 2000.
32. Seabra MC, Goldstein JL, Sudhof TC, Brown MS. Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys. *J Biol Chem*, 14497-1503, 1992.
33. Almeida A, Ciudad P, Delgado-Esteban M, Fernández E, García-Nogales P, Bolaños JP. Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide: its role in glucose metabolism and neuroprotection. *J Neurosci Res*, 166-71, 2005.
34. Gorenne I, Kavurma M, Scott S, Bennett M: Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.*, 72(1): 9-17, 2006.
35. Bonin LR, Madden K, Shera K, Ihle J, Matthews C, Aziz S, Perez-Reyes N, McDougall JK, Conroy SC: Generation and characterization of human smooth muscle cell lines derived from atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 19(3): 575-587, 1999.
36. Minamino T, Yoshida T, Tateno K, Miyauchi H, Zou Y, Toko H, Komuro I: Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation*, 108(18): 2264-2269, 2003.

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/07/18

國科會補助計畫	計畫名稱：探討NO及Ras在桑椹多酚, 原兒茶酸及rutin抑制血管病變之角色		
	計畫主持人：王朝鐘		
	計畫編號：99-2320-B-040-013-MY3		學門領域：保健營養
研發成果名稱	(中文) 桑椹抽出物用於降低酒精性脂肪肝及肥胖之用途		
	(英文) Mulberry (Taiwan 19) extracts for treatment alcoholic fatty liver disease and obesity		
成果歸屬機構	中山醫學大學	發明人 (創作人)	王朝鐘
	<p>(中文) 桑椹 (Mulberry) 已被證實具有許多幫助人類健康之效益和生理活性功能。根據我們之前以細胞和動物的非酒精性研究模式證實，桑椹果實水萃取物 (MWE) 具有降血脂、抗粥狀動脈硬化及抑制體脂肪形成等之成效。本研究利用與生達公司合作製備高多酚含量MWE (0.5、1.0和2.0%) 與Lieber-DeCarli流質酒精飼料合併餵食C57BL/6J小鼠六週。結果顯示MWE能夠降低小鼠體重、調控脂質在肝臟中累積並降低血清中脂質含量、活化抗氧化酵素避免酒精誘導的氧化效應、抑制脂肪酸合成、增加脂肪酸運輸和刺激脂肪酸氧化作用。研究中證明MWE能降低肝功能指數 (AST/ALT) 及血清和肝臟中三酸甘油酯和膽固醇含量，且抑制三酸甘油酯和膽固醇合成相關蛋白表現，如固醇類調節結合蛋白 (SREBPs)、glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)、HMG-CoA reductase、脂肪酸合成酶 (FAS) 和 acetyl-CoA (ACC)。此外，顯示MWE可經由增加peroxisome proliferator activated receptor-α (PPAR-α) 表現，活化 palmitoyltransferase-1 (CPT-1) 促進脂肪酸運輸，活化microsomal triglyceride transfer protein (MTP) 促進脂肪酸氧化作用，進而對抗酒精所誘發的脂質生成作用。並能經由活化GSH (巯胱甘肽)、GSH-Px (巯胱甘肽過氧化酶)、SOD (超氧化物歧化酶) 和Catalase (過氧化氫酶) 等抗氧化性酵素，抑制酒精誘導之氧化效應。從免疫組織染色和 western blot 分析結果，也證明MWE也能抑制酒精所誘發之炎症反應。從週邊脂肪組織測量亦證實MWE可以抑制體脂肪形成。最後，我們的研究結果顯示MWE過活化 AMPK和PPAR-α 路徑抑制脂肪酸合成、增加脂肪酸運輸和刺激脂肪酸氧化作用。因此，MWE具有潛力發展為健康食品，預防酒精引發之肝損傷和肥胖。</p> <p>(英文) The present invention relates to a composition for treating alcoholic statohepatities, comprising a mulberry extract and active ingredients thereof. In addition, the present invention further relates to a composition for treating alcoholic obesity, comprising a mulberry extract and active ingredients thereof.</p>		
技術說明			
產業別	其他專業、科學及技術服務業		
技術/產品應用範圍	<p>飲酒是人類共通的行為，一般而言，長期每日80 g 酒精即會造成肝臟損傷或肥胖。酒精性肝病變可分成酒精性脂肪肝、酒精性肝炎及酒精性肝硬化。而酒精性肝病變 (alcoholic liver disease, ALD) 一直是臨床上經常發現的典型脂肪肝形成病因。酒精性肥胖亦可能導致代謝症候群。本發明利用桑椹果抽出物餵食小鼠可抑制酒精誘導之脂肪肝，降低肝臟三酸甘油酯、膽固醇及肝功能指數 (AST及ALT)，並可減低體重及內臟周邊之脂肪組織，其作用係桑椹抽出物具有抑制脂肪合成相關蛋白酵素，也增加脂肪的氧化作用。桑椹果對於抑制酒精性肥胖及脂肪肝之作用，目前尚無發現。</p>		
技術移轉可行性及預期效益	<ol style="list-style-type: none"> 1. 桑椹抽出物在製備減少酒精性脂肪肝之用途 2. 抽出物用於排除肝臟脂肪之食品 3. 抽出物用於降低酒精性肝功能指數AST及ALT增加之食品 4. 抽出物用於降低酒精性肝臟中脂肪 (包括三酸甘油酯及膽固醇) 增加，排除酒精性脂肪肝。 5. 抽出物用於降低酒精性肝臟脂質過氧化物增加。 6. 抽出物用於降低酒精性體重及體脂肪增加。 		

註：本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：王朝鐘		計畫編號：99-2320-B-040-013-MY3				計畫名稱：探討 NO 及 Ras 在槲皮素、原兒茶酸及 rutin 抑制血管病變之角色	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>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>	<p>研究成果說明桑椹萃取物可以透過幾個方式來抑制動脈粥狀硬化的發生。(1) 透過抑制巨噬細胞 CD36 與 SR-A 的表達、抑制泡沫細胞的發生，(2) 透過誘導 NO 的釋放抑制細胞移動至 intima 層，(3) 透過誘導 NO 的釋放與抑制 anti-apoptosis 蛋白達到減緩 VSMC 增生的速率，(4) 透過誘導 NO 的釋放減緩 VSMC 的老化現象與 β-galactosidase 的活性，藉此增加血管斑塊的穩定度。本輪文的研究證實桑椹水萃取物 (MWEs) 及其多酚萃取物 (MPEs) 在動脈粥狀硬化過程中，可以作為一種有效的天然藥物對抗血管硬化與血管再狹窄的發生。本研究室已發表桑椹降低血脂，抗氧化，抑制血管病變，減少脂肪肝，抗肥胖及抑制動脈粥狀硬化之作用如下並陸續將發表多篇其醫學功能的國際期刊。(1) Food chemistry, 91, 601, 2005 ; (2) Journal of food science, 73, H113, 2008 ; (3) Journal of agricultural and food chemistry, 56, 9286, 2008 ; (4) Journal of agricultural and food chemistry, 57, 7605, 2009 ; (5) Journal of agricultural and food chemistry, 57, 9147, 2009 ; (6) Journal of agricultural and food chemistry, 58, 2536, 2010 ; (7) Journal of agricultural and food chemistry, 59, 2663, 2011 ; (8) Food chemistry, 129, 1703, 2011 ; (9) Journal of Science of food and agriculture, 91, 2740, 2011 ; (10) Journal of agricultural and food chemistry, 59, 1985, 2011 ; (11) Journal of agricultural and food chemistry, 60, 6981, 2012 ; (12) Food and chemical Toxicology, 50, 3086, 2012 ; (13) Journal of Science of food and agriculture, 2013, In press ; (14) Journal of traditional chinese medicine (Review article), 2013. 目前已確定證實符合衛生署公佈“不易形成體脂肪”功能之評估，包括(1)減重；(2) 降低肝臟脂肪減少脂肪肝及肝功能指數；(3) 減少內臟周邊脂肪；(4) 降低血脂肪，游離脂肪酸及血中酮體；(5) 不影響生理功能 3. 目前已確定桑椹具化學性、肥胖性、細菌性及酒精性引起肝損傷之護肝作用 4. 可將桑椹萃取物製備為濃縮液 5. 申請健康食品項目為：(1) 不易形成體脂肪；(2) 降低脂肪肝(餵食高脂糧食物之脂肪肝、化學性及酒精性之護肝作用) 6. 酒精性脂肪肝炎護肝作用專利申請中。</p>
--	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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 100 字為限）

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）

研究成果說明桑椹萃取物可以透過幾個方式來抑制動脈粥狀硬化的發生。(1) 透過抑制巨噬細胞 CD36 與 SR-A 的表達、抑制泡沫細胞的發生，(2) 透過誘導 NO 的釋放抑制細胞移動至 intima 層，(3) 透過誘導 NO 的釋放與抑制 anti-apoptosis 蛋白達到減緩 VSMC 增生的速率，(4) 透過誘導 NO 的釋放減緩 VSMC 的老化現象與 β -galactosidase 的活性，藉此增加血管斑塊的穩定度。本論文的研究證實桑椹水萃取物 (MWEs) 及其多酚萃取物 (MPEs) 在動脈粥狀硬化過程中，可以作為一種有效的天然藥物對抗血管硬化與血管再狹窄的發生。

本研究室已發表桑椹降低血脂，抗氧化，抑制血管病變，減少脂肪肝，抗肥胖及抑制動脈粥狀硬化之作用如下並陸續將發表多篇其醫學功能的國際期刊。(1) Food chemistry, 91, 601, 2005 ; (2) Journal of food science, 73, H113, 2008 ; (3) Journal of agricultural and food chemistry, 56, 9286, 2008 ; (4) Journal of agricultural and food chemistry, 57, 7605, 2009 ; (5) Journal of agricultural and food chemistry, 57, 9147, 2009 ; (6) Journal of agricultural and food chemistry, 58, 2536, 2010 ; (7) Journal of agricultural and food chemistry, 59, 2663, 2011 ; (8) Food chemistry, 129, 1703, 2011 ; (9) Journal of Science of food and agriculture, 91, 2740, 2011 ; (10) Journal of agricultural and food chemistry, 59, 1985, 2011 ; (11) Journal of agricultural and food chemistry, 60, 6981, 2012 ; (12) Food and chemical Toxicology, 50, 3086, 2012 ; (13)

Journal of Science of food and agriculture, 2013, In press ; (14) Journal of traditional chinese medicine (Review article), 2013. 目前已確定證實符合衛生署公佈“不易形成體脂肪”功能之評估, 包括(1)減重;(2)降低肝臟脂肪減少脂肪肝及肝功能指數;(3)減少內臟周邊脂肪;(4)降低血脂肪, 游離脂肪酸及血中酮體;(5)不影響生理功能 3. 目前已確定桑椹具化學性、肥胖性、細菌性及酒精性引起肝損傷之護肝作用 4. 可將桑椹萃取物製備為濃縮液 5. 申請健康食品項目為:(1) 不易形成體脂肪;(2) 降低脂肪肝(餵食高脂糧食物之脂肪肝、化學性及酒精性之護肝作用)6. 酒精性脂肪肝炎護肝作用專利申請中。