

國立台灣大學醫學院解剖暨細胞生物學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Anatomy and Cell Biology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

補骨脂萃取物在動脈硬化中的治療效果及相關機制

The therapeutic effects and the relative mechanisms of  
psoralea fruit extract on atherosclerosis

陳昱志

Yu-Chih Chen

指導教授：王淑慧 博士

Advisor: Shu-Huei Wang, Ph.D.

中華民國 107 年 7 月

July 2018

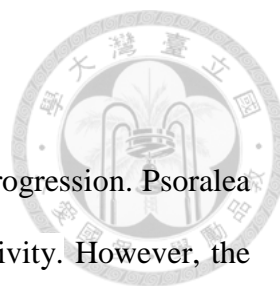
## 致謝

轉眼就要畢業了，這兩年的磨練也增進了不少，所謂一分耕耘一分收穫，相信在解剖所所學的知識及技術，都能更加成熟，在未來工作上也能學以致用。

首先要先感謝王淑慧老師，在這間實驗室學到不少實驗技術，想當初一個實驗都不會，老師也很有耐心的指導我並糾正我的錯誤。實驗路途上遇到困難時，老師期望我們能學會獨立思考與解決事情的能力，這樣不斷的練習，使我的實驗基礎非常的扎實。很感謝老師這樣不厭其煩的教導，讓我可以在此兩年有所成長。

接著我要感謝實驗室的夥伴顏鈺庭，在我實驗上有困難時，能協助我一起完成實驗，低潮時能互相勉勵，加油打氣鼓勵對方。同時也很感謝我的同學們，碩一時一起努力奮鬥困難重重的課程，碩二時能互相關心實驗進況。

最後謝謝我的家人，無限支持我的學術生涯，讓我能不斷精進自己，很謝謝你們的栽培與教導，同時也在低潮受挫時鼓勵我，辛苦你們了。期望在未來能讓我們以為我榮。



## Abstract

Chronic inflammation plays an important role in atherosclerosis progression. Psoralea fruit extract (PFE) has been reported to have anti-inflammatory activity. However, the effects of PFE on atherosclerosis and the mechanisms underlying these effects remain unknown. The aim of this study was to examine the anti-inflammatory effects of PFE on various cytokines-treated raw264.7 macrophages, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and rat aortic smooth muscle cells (RASMCs) and to identify the mechanisms responsible for these effects.

First, PFE significantly decreased foam cells formation via inhibiting Nuclear Factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) P65 in oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-treated macrophages. Second, PFE reduced TNF- $\alpha$ -induced HUVEC inflammation and permeability dysfunction by decreasing vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression via Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway. Third, PFE reduced TNF- $\alpha$ -induced RASMC inflammation by decreasing VCAM-1 expression and NF- $\kappa$ B P65 activity. And these effects were inhibited by JNK phosphorylation reduction. In addition to exerting anti-inflammatory effects, PFE also inhibited platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB)-induced RASMC migration but not proliferation *in vitro*. These effects may be mediated by reductions in PDGF-BB-induced mitochondrial fission. Moreover, PFE treatment reduced high cholesterol diet-induced atherosclerotic lesion *in vivo*. These results show that PFE may be used for the prevention and treatment of atherosclerosis.

**Key words** : Atherosclerosis, Psoralea fruit extract, Plaque, Foam cell, Mitochondrial fission, Aortic sinus



## 摘要

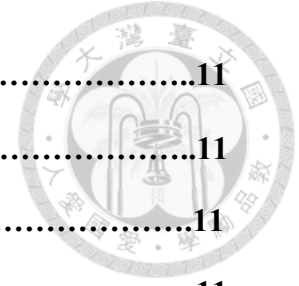
粥狀動脈硬化(Atherosclerosis)為一慢性發炎疾病，而這一連串漸進式的過程主要由巨噬細胞的活化，內皮細胞功能缺損及平滑肌細胞的發炎及大量增生導致內皮細胞內膜層大量堆積膽固醇、巨噬細胞以及間質細胞，我們簡稱斑塊，而當斑塊的不穩定度提高導致破損流入血液中所造成的堵塞，最終造成血栓、等心血管疾病之產生。Psoralea fruit extract (PFE)是由補骨脂(豆科植物)中分離出來的單萜酚，已有研究指出其萃取物具有抗菌、抗發炎等功效。所以我們想進一步探討 PFE 在慢性發炎疾病動脈硬化上的治療效果。然而，PFE 對於內皮細胞，巨噬細胞及平滑肌細胞的作用機制尚未釐清。因此本篇主要研究目的在探討PFE對於巨噬細胞、人類臍靜脈內皮細胞及平滑肌細胞於脂多醣(LPS)及腫瘤壞死因子(TNF- $\alpha$ )處理下的治療效果及其中機制為何。在本篇研究中可以看到 PFE 藉由降低 NF- $\kappa$ B 的磷酸化減少 macrophage 對 oxidized low density lipoprotein (oxLDL) 的吞噬及 foam cells(泡沫細胞)的生成。而在內皮細胞方面，PFE 具有降低血管黏附因子 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule 1)的效果，來減低血液中單核球貼附的情形。此外，PFE能抑制由 LPS 誘發之 NF- $\kappa$ B 的活化來降低核內 p65 and 的含量。而在 TNF- $\alpha$  誘發 Rat aortic Smooth Muscle Cells(RASMCs)的發炎中，PFE 亦能藉由降低血管細胞黏附因子 VCAM-1 表現量來達到抗發炎的效果，並能藉由降低 PDGF 所誘發 mitochondria fission 來抑制平滑肌移行的能力。綜合上述結果推測 PFE 具有抗發炎的功効，在未來能成為預防及治療心血管疾病的用藥。

**關鍵字：**動脈硬化、補骨脂萃取物、斑塊、泡沫細胞、粒線體分裂、動脈竇

# 目錄



致謝.....	I
Abstract.....	II
摘要.....	III
目錄.....	IV
壹、 緒論.....	1
一、 前言.....	1
二、 動脈結構.....	1
三、 動脈結構硬化形成原因.....	2
四、 內皮細胞與動脈硬化的關係.....	3
五、 巨噬細胞與動脈硬化的關係.....	3
六、 平滑肌細胞與動脈硬化的關係.....	4
七、 粒線體型態與平滑肌移行的關係.....	4
八、 動脈硬化中的訊息傳遞路徑.....	5
九、 補骨脂( <i>Psoralea corylifolia</i> L.)與心血管疾病的關聯.....	6
十、 研究動機和實驗設計.....	6
貳、 實驗材料.....	8
一、 儀器設備.....	8
二、 實驗材料.....	8
藥品.....	8
細胞培養.....	8
結晶紫染色.....	9
訊號核糖核酸.....	9
西方墨點法.....	9
細胞移行及細胞穿膜實驗.....	10



免疫細胞化學染色.....	11
Luciferase assay.....	11
BODIPY stain.....	11
Wound healing assay.....	11
流式細胞儀.....	11
MitoTracker stain.....	12
動物實驗.....	12
免疫組織染色法.....	12
ORO stain.....	12
馬森三色染劑.....	12
三、 溶液配置.....	13
參、 實驗方法.....	15
一、 細胞實驗.....	15
人類臍帶靜脈內皮細胞之初級培養.....	15
細胞株之培養.....	15
基因表現之測定.....	15
西方墨點法.....	17
免疫螢光染色.....	18
單核球黏附實驗.....	18
細胞穿膜實驗.....	19
BODIPY stain .....	19
結晶紫染色分析.....	20
細胞傷口癒合分析.....	20
流式細胞儀分析.....	21
MitoTracker stain .....	21

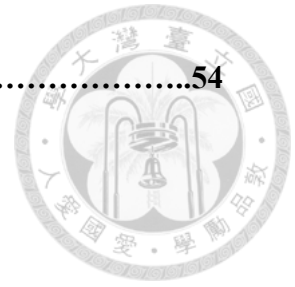


冷光報告基因檢測 .....	21
二、動物實驗.....	22
動脈硬化小鼠模式.....	22
Oil red O stain.....	22
馬森三色染劑.....	23
主動脈蛋白質檢測.....	23
主動脈單核球黏附實驗.....	23
免疫組織化學染色.....	24
數據統計分析.....	24
肆、實驗結果.....	25
一、PFE 具有抑制內皮細胞發炎的功能.....	25
二、PFE 透過抑制 JNK 磷酸化降低內皮細胞 VCAM-1 的表現量....	25
三、PFE 透過抑制 JNK 磷酸化降低單核球黏附之情形.....	26
四、PFE 有效抑制單核球移行至內膜下層的能力.....	26
五、PFE 能抑制泡沫細胞(Foam cell)形成.....	27
六、PFE 透過抑制 NF- $\kappa$ B 活化來減少 foam cell 之形成.....	27
七、PFE 無法抑制平滑肌細胞增生的功能.....	28
八、PFE 具有抑制平滑肌細胞移行的作用.....	28
九、PFE 抑制平滑肌細胞 mitochondrial fission 來減緩移行作用.....	29
十、PFE 藉由抑制 MMP 9 減少平滑肌細胞移行.....	29
十一、PFE 具有抑制平滑肌細胞發炎的功能.....	30
十二、PFE 藉由抑制 JNK 及 NF- $\kappa$ B 活化降低平滑肌細胞 VCAM-1 的表現量.....	30
十三、PFE 有效減緩 RASMC 發炎反應且抑制單核球黏附.....	31
十四、PFE 能減少動脈硬化的發生及斑塊堆積情形.....	31

十五、	PFE 能減少動脈硬化的細胞外基質堆積.....	32
十六、	PFE 能降低高膽飲食誘發動脈產生 VCAM-1 及單核球細胞黏附的作用.....	33
伍、	討論.....	34
陸、	附圖.....	37
圖一、	PFE 具有抑制內皮細胞發炎的功能.....	37
圖二、	PFE 透過抑制 JNK 磷酸化降低內皮細胞 VCAM-1 的表現量.....	38
圖三、	PFE 透過抑制 JNK 磷酸化降低單核球黏附之情形.....	39
圖四、	PFE 有效抑制單核球移行至內膜下層的能力.....	40
圖五、	PFE 能抑制泡沫細胞(Foam cell)形成.....	41
圖六、	PFE 透過抑制 NF-κB 活化來減少 foam cell 之形成.....	42
圖七、	PFE 無法抑制平滑肌細胞增生的功能.....	43
圖八、	PFE 具有抑制平滑肌細胞移行的作用.....	44
圖九、	PFE 抑制平滑肌細胞 mitochondrial fission 來減緩移行作用..	45
圖十、	PFE 藉由抑制 MMP 9 減少平滑肌細胞移行.....	46
圖十一、	PFE 具有抑制平滑肌細胞發炎的功能.....	47
圖十二、	PFE 藉由抑制 JNK 及 NF-κB 活化降低平滑肌細胞 VCAM-1 的表現量.....	48
圖十三、	PFE 有效減緩 RASMC 發炎反應且抑制單核球黏附.....	49
圖十四、	PFE 能減少動脈硬化的發生及斑塊堆積情形.....	50
圖十五、	PFE 能減少動脈硬化的細胞外基質堆積.....	51
圖十六、	PFE 能降低高膽固醇飲食誘發動脈產生 VCAM-1 及單核球細胞黏附的作用.....	52
表一、	Apo E 缺陷小鼠血清生化值檢測.....	53



柒、 參考文獻.....54



# 壹、緒論



## 一、前言

動脈硬化(Atherosclerosis)為現今社會主要的慢性疾病之一，當血液中帶有大量的刺激因子，例如：活性氧化物質(Reactive oxygen species; ROS) (1)、氧化型低密度脂蛋白(oxidized Low density lipoprotein; oxLDL)(2)及高脂肪飲食(High fat diet; HFD) (3)會影響血管內皮細胞功能性損傷，進而造成一連串嚴重且複雜的慢性發炎反應；久而久之就會造成斑塊(Plaque)的大量堆積，當這些斑塊的不穩定性的原因增加，例如：發炎細胞的數量增加、細胞外基質減少及大量細胞凋亡等，都會導致斑塊的破裂並流入血液至身體的各個地方，產生血栓(Thrombus)並阻塞血液流通。而這樣一個血栓的形成會伴隨著各種不同的心血管疾病的產生，例如：心肌梗塞(Myocardial infarction)、腦中風(Brain stroke)及周邊動脈疾病(Peripheral arterial disease; PAD)。因此在針對動脈硬化的治療，發炎是一個很重要的治療方向。

## 二、動脈結構

動脈為循環系統中負責將含氧量高的血液帶離心臟至身體各組織進行物質交換的血管，可藉其收縮及舒張功能調控血壓高低以維持循環系統的運轉。根據動脈的橫截面可將管壁結構由內而外大致分為三層：血管內層(tunica intima)、血管中層(tunica media)、血管外層(tunica adventitia)。血管內層(tunica intima)皆由平行排列的內皮細胞所組成，細胞間以 tight junction 和 gap junction 緊密相接，完整內膜可防止血液在運輸過程中物質不易黏附於管壁上，避免管壁組織受到血液中物質傷害(4)；除外，內皮細胞合成一氧化氮(Nitrogen oxide; NO)對於維持血管恆定、調控血壓、預防血管病變等等具有重要功用(5)；血管中層(tunica intima)屬於最厚的一

層結構，主要由平滑肌所組成，肌間具有大量彈性纖維(elastic lamella)及膠原纖維，血管可藉由此層平滑肌進行收縮和舒張調控血壓；血管外層(tunica adventitia)主要由疏鬆結締組織構成，存在纖維母細胞及巨噬細胞等，主要功能在於提供整個血管的穩定及養分。

### 三、動脈硬化形成原因

動脈硬化的產生在於巨噬細胞的發炎、活化；巨噬細胞源自單核球，先前文獻顯示當巨噬細胞受到外界物質刺激活化後，會經由 Toll-like receptor(TLR)來接受刺激(6)。當 TLR 與受質結合後，免疫細胞會釋放出細胞激素。巨噬細胞活化後會引發細胞激素(pro-inflammatory)、生長因子(growth factor)和其他發炎調控因子的產生(7)。當這些細胞激素及前發炎物質釋出後，會再進一步誘發巨噬細胞活化，進而加重發炎病兆的進程。而巨噬細胞活化後會開始侵害內皮細胞，使內皮細胞受損並逐漸喪失功能性(8)，此時內皮細胞會大量表現血管黏附因子(Vascular cell adhesion molecule 1；VCAM-1)及細胞間黏附因子(Intercellular adhesion molecules 1；ICAM-1)等黏附因子使單核球黏附血管壁上，當巨噬細胞不斷侵害內皮細胞使其發炎且間隙變大讓巨噬細胞得以進入血管的血管中層(tunica intima)；巨噬細胞在進入內皮細胞後會開始吞噬氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)形成 foam cell(9)並不斷的累積與結締組織增生產生脂肪斑(fatty plaque)，進一步增厚形成纖維性斑塊(fibrous plaque)(10)。而這些 foam cell 會釋放發炎因子，例如血小板衍生因子(Platelet-derived growth factor；PDGF)、介白素 1 (Interleukin-1；IL-1)、腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor- $\alpha$ ；TNF- $\alpha$ )促使平滑肌細胞發炎，進而大量增生及移行至血管內層與 fibrous plaque 間(11)，加速動脈硬化的過程，而阻塞血流順利通過。纖維帽受到血液沖刷、血管平滑肌的死亡和基質溶解酶分解細胞外基質等原

因變脆弱而破裂。破裂的纖維斑塊將暴露出組織因子，促使血栓形成，進一步引發其他的心血管疾病(12)。



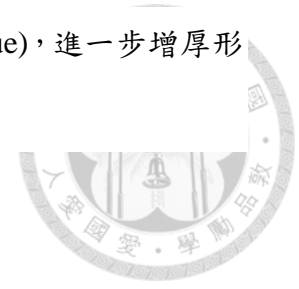
#### 四、 內皮細胞與動脈硬化的關係

內皮細胞為血管與血流間的第一道功能屏障，內皮細胞已被證實有控制纖維蛋白溶解(control of fibrinolysis)、凝血(coagulation)、血管張力(vascular tone)、生長(growth)以及免疫反應(immune response)等功能(13)。內皮細胞是血管壁動態平衡的主要調節因子，能透過釋放一氧化氮(Nitrogen oxide; NO)，前列環素(Prostaglandin I<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub>)和內皮素(Endothelin 1; ET-1)等介質，控制血管收縮，從而維持鬆弛的血管張力(14)；內皮細胞還能調節血管對血漿成分的滲透性，血小板和白血球黏附和聚集；然而內皮細胞損傷擾亂血管收縮和血管舒張之間的平衡，並引發許多促進或加劇動脈硬化(atherosclerosis)的過程；其中包括內皮細胞通透性增加，血小板聚集，白細胞黏附和細胞因子產生(15)。內皮細胞發炎所產生的黏附因子，例如：Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) 及 Intercellular adhesion molecules 1 (ICAM-1) 等的表現會造成血液中的淋巴球及單核球黏附浸潤至內皮下膜，這些反應加速了動脈硬化的病灶發展。

#### 五、 巨噬細胞與動脈硬化的關係

動脈硬化被視為一種慢性發炎狀態(16)，其中巨噬細胞的發炎反應在這個過程中扮演著重要的角色。當內皮細胞的受損導致的單核球浸潤，會受到發炎因子等細胞激素 TNF- $\alpha$  或 Lipopolysaccharides (LPS)所影響分化成巨噬細胞；其功能在於吞噬造成動脈硬化的危害因子 oxLDL。而這樣的吞噬動作會造成 Foam cell 的產生(17)，而 Foam cell 的生成會持續釋放更多因子吸引單核球的聚集堆積，不斷的惡性循環下，血管管壁上會堆積更

多的 Foam cell 並與結締組織共同形成脂肪班(fatty plaque)，進一步增厚形成纖維性斑塊(fibrous plaque)。



## 六、平滑肌細胞與動脈硬化的關係

血管平滑肌細胞 (vascular smooth muscle cells; VSMCs)在動脈硬化中主要與斑塊堆積相關；其形態、功能及細胞標誌蛋白的不同可分為收縮型 (Contractile phenotype) 和合成型(synthetic phenotype) 兩種表型。收縮型血管平滑肌細胞呈長梭型 (long shuttle type)，胞內含有許多收縮的纖維絲 (Fiber)；合成型血管平滑肌細胞呈肥大狀，胞內含有大量合成蛋白質的細胞器(18)。在正常情況下血管中層(Tunica Media)的平滑肌是處於收縮型的狀態，收縮型平滑肌的主要作用為維持血管型態的作用，透過收縮和舒張來調節血流量穩定，且增殖移行活性較低，一旦內皮細胞功能喪失甚至於死亡時，位於血管中層組織中的平滑肌細胞便會暴露於在血流的環境下，因而接觸到血液中的生長因子和激素，例如：PDGF、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 等(19)，會使原本位於血管壁中層的平滑肌由原本的收縮型轉變為合成型，開始轉變進而增生與移行，使血管壁增厚(20)，以及發炎所產生的黏附因子使單核球和巨噬細胞的貼附。因此，抑制這種平滑肌細胞的增生與發炎反應是目前被認為可以作為治療動脈硬化症的一個方向。

## 七、粒線體型態與平滑肌移行的關係

細胞中粒腺體的功能是產生能量 ATP 與細胞調節細胞代謝。所以粒線體有細胞能量工廠之稱。粒線體主要是藉由調解粒線體膜上 dynamin family proteins，如 dynamin-like protein 1(Drp1)、mitofusin (Mfn1 and Mfn2) 及 optic atrophy 1 (OPA1) 的作用，轉換粒線體型態-融合(fusion)及分裂 (fission)，表現不同的功能及能量狀態(21-23)。粒線體融合(mitochondrial

fusion)通常大量表現於呼吸及代謝功能旺盛的細胞，mitochondrial fusion 主要負責細胞內代謝物質(metabolite)及酵素(enzyme)的運送及粒線體功能相關基因的產生。當細胞感受到危害時，粒線體會藉由改變粒線體膜上 dynamin family proteins，藉此轉換粒線體型態，從 mitochondrial fusion 轉變成 mitochondrial fission 的型態，協助細胞清除受損胞器(damage organelles)，除此之外，已有報告顯示 mitochondrial fission 在細胞移行功能部分也扮演著相當重要的調控角色(24)，當平滑肌細胞受到 PDGF 刺激後，粒線體會大量呈現 mitochondrial fission，藉此促進平滑肌移行。

## 八、動脈硬化中的訊息傳遞路徑

### 1. Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)主要有三種訊息傳遞路徑，分別是 Extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPK)及 c-Jun N-terminal kinase (JNK)，磷酸化後的 MAPK 會活化更下游的一些 protein kinase、nuclear protein 或 transcription factor 等，將訊息由細胞膜傳遞到細胞核內造成一些生理反應 (25, 26)。

JNK 也被稱作 stress-activated protein kinase (SAPK)，由上游 MKK4、MKK7 kinase 活化，被活化的 JNK 會磷酸化許多細胞質底物，如細胞骨架蛋白及粒線體蛋白質，而粒線體蛋白質 Bcl-2 和 Bcl-xl 等，會引發細胞增殖、凋亡(apoptosis)、自噬(autophagy)、代謝(differentiation)和 DNA 修復(27, 28)。

ERK 為最早被發現的 MAPK protein kinase，主要功能為調節細胞週期 (cell cycle)、細胞增生(proliferation)及細胞分化(differentiation) (29, 30)，其可被內皮生長因子(vascular endothelial growth factor；VEGF)、PDGF、胰島素(insulin)、賀爾蒙(hormone)等物質磷酸化形成活化的狀態，而這些物質則是透過活化細胞膜上的 G protein-Ras 來達到調節細胞的能力(31)。

p38 是由巨噬細胞被 LPS 刺激後所發現的 protein kinase，它主要的功能為調節發炎反應，當細胞受到細胞激素、發炎因子、LPS、滲透壓力、UV light 等物質刺激時會使 p38 形成活化的狀態，使細胞走向凋亡、分化、自噬等途徑；其中發炎因子會透過 p38 MAPK pathway 活化 NF- $\kappa$ B 轉錄因子和 ATF-2 (Activating transcription factor 2)，使細胞大量表達促進發炎的細胞激素，所以在許多臨床研究中顯示，p38 抑制劑具有良好的抗發炎效果 (32)。

## 2. Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B 是參與許多細胞類型的發炎反應的主要轉錄因子，並在動脈硬化中起關鍵作用(33)；NF- $\kappa$ B 主要由兩個-subunits p50 及 p65 結合所組成的；在一般狀態下，NF- $\kappa$ B 會與 I $\kappa$ B 形成複合物(complex)，當受到刺激活化時，I $\kappa$ B 會磷酸化，與 subunits p50 及 p65 分離，磷酸化 I $\kappa$ B 會接續被降解(ubiquitination)，同時磷酸化的 p50 及 p65 會由細胞質移行進入細胞核，結合於 promoter 上促進不同發炎性蛋白質的產生，

## 九、 補骨脂 (*Psoralea corylifolia* L.) 與心血管疾病的關聯

補骨脂為一年生豆科植物，又稱破故紙，是一種廣泛在印度及中國使用的傳統草藥，其主要化學成分包括揮發油，香豆素，黃酮類，單萜烯酚，脂類化合物，樹脂及豆甾醇等(34)。許多研究顯示補骨脂萃取物 (*Psoralea* fruit extract；PFE) 具有抗菌 (Anti-bacterial)(35)、抗腫瘤 (Anti-tumor)(36)、抗氧化 (Anti-oxidant)(37)、抗炎 (Anti-inflammation)(38-40)、抗真菌 (Anti-fungal) <sup>43</sup> 和免疫調節活性 (Immunomodulatory)(41, 42)。因此藉由以上文獻報告，我們可以推測具有抗發炎特性的 PFE 可能有助於動脈硬化的治療。

## 十、 研究動機和實驗設計

動脈硬化一直是國內嚴重的慢性發炎疾病，並且衍生各種心血管疾病  
的產生。因此在動脈硬化治療上，抑制發炎反應相關的機制及藥物是目前  
發展的方向。根據研究結果顯示，PFE具有抗發炎的效果，因此本篇實驗  
欲探討PFE是否可藉有抗發炎的作用，具有預防及治療動脈硬化的潛質。

實驗設計方面，在細胞實驗，第一，針對PFE對於血管及斑塊內的組  
成細胞-內皮細胞、巨噬細胞及平滑肌細胞，在動脈硬化中已知的發炎物  
質刺激下是否具有抗發炎的效果進行探討；第二，針對PFE對於各個細胞  
在動脈硬化上的作用機轉進行探討。在探討內皮細胞功能部分，以人類臍  
帶靜脈內皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cell；HUVEC)為細胞  
模式，探討PFE對於內皮細胞發炎及單核球黏附(adhesion)及穿膜  
(transmigration)上的治療機制；在探討巨噬細胞功能部分，以RAW264.7為  
巨噬細胞模式，探討PFE對於巨噬細胞形成泡沫細胞的作用機制；在探討  
平滑肌細胞功能部分，以大鼠主動脈平滑肌細胞(Rat Aortic Smooth Muscle  
Cell；RASMC)為平滑肌細胞模式，探討PFE對於平滑肌細胞在於增生  
(proliferation)、移行(migration)與發炎(inflammation)。

在動物實驗部分，以Apo E Knockout小鼠餵食高膽固醇飼料誘發動脈硬  
化發生為動物模式，分為5組，分別為餵食15週一般飼料的控制組(CTRL)  
及餵食15週含高膽固醇飼料的餵食組(Cholesterol-Diet)、及口服餵食PFE  
組，在餵食PFE動物又分為兩組，分別是同時餵食高膽固醇飼料及PFE的  
預防組(Cholesterol-Diet /PFE)及先餵食高膽固醇飼料8週誘發動脈硬化生  
成，再接續給予PFE 7週的治療組(Cholesterol-Diet 8W/PFE 7W)。於15週  
後犧牲觀察血清中生化值含量及動脈硬化所產生之斑塊堆積及發炎的情  
形，藉此釐清PFE在動脈硬化上的功能。



## 貳、實驗材料



### 一、儀器設備

細胞培養箱(NUAIR)

生物安全操作櫃(炬安)

離心機(Labogene)

水浴槽(裕德)

桌上型震盪器(濬洋)

倒立顯微鏡(Accu-Scope)

光學顯微鏡(Leica)

螢光顯微鏡(Leica)

微波爐(National)

冷凍切片機(Leica)

即時影像培養影像紀錄系統 ASTEC CCM(ASTECC)

### 二、實驗材料 & 藥品

補骨脂粹取物(psoralea fruit extract ; PFE)製備由長庚大學提供

#### 細胞培養(cell culture)

Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose , DMEM (Gibco)

RPMI medium 1640 (Gibco)

M199 medium (Gibco)

Fetal bovine serum, FBS (Biological Industries)

Fungizols PS 抗生素(Corning)

Trypsin EDTA 10X(Gibco)  
10 cm dish (BIOFIL)  
6、12、24、48-well (BIOFIL)



### **結晶紫染色(Crystal violet stain)**

結晶紫 (The Coleman Bell Co.)  
醋酸 (Cica Reagent)

### **訊號核糖核酸(mRNA)**

Trizol (sigma)  
Isopropanol 100% (J.T.Baker)  
Glycogen (sigma)  
75% Ethanol  
DEPC 水 (sigma)  
DNase digestion kit (Promega)  
Reverse Transcription-kit (yeastern)  
2X SYBR premix (Life technologies)  
Forward Primer  
VCAM-1-QPCR-F:ATCTTCTGCTCGGCAAGTC  
 $\beta$ -Actin-QPCR-F:TGTCCACCTTCCAGCAGATGT  
Reverse Primer  
VCAM-1-QPCR-R:GTTCTGACCTACATCTGGAGTG  
 $\beta$ -Actin-QPCR-R:AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA

### **西方墨點法 (Western blot)**



Biorad protein assay dye reagent (Biorad)  
30% Acrylamide (Bionovas)  
Ammonium persulfate (Bionovas)  
Tetramethylethylenediamine, TEMED (USB coporation)  
Protein pre-stained marker (Chroma)  
PVDF transfer membrane (Millipore)  
Skim milk (安佳)  
X-ray film (Fuji)  
Chemiluminescence reagent, ECL (Millipore)  
Rabbit anti-VCAM-1 antibody (Santa Cruz)  
Rabbit anti-phospho-JNK antibody (Cell Signaling)  
Rabbit anti- JNK antibody (Cell Signaling)  
Rabbit anti-phospho-ERK antibody (Cell Signaling)  
Rabbit anti- ERK antibody (Cell Signaling)  
Rabbit anti-phospho-p38 antibody (Cell Signaling)  
Rabbit anti- p38 antibody (Cell Signaling)  
Rabbit anti-phospho-p65 antibody (GenTex)  
Rabbit anti- p65 antibody (GenTex)  
Rabbit anti-MMP9 antibody (Abcam)  
Rabbit anti-GAPDH antibody (GenTex)  
Rabbit anti- $\alpha$ -tubulin antibody (GenTex)  
Rabbit anti-phospho-Drp1 antibody (GenTex)  
Rabbit anti-Drp1 antibody (GenTex)  
Rabbit anti-IgG antibody (GenTex)

**細胞移行(Adhesion assay)及穿膜移行(Transmigration assay)**

24-well Transwell (Corning)

Crystal violet (Sigma)



### 免疫細胞化學染色

Coverslip (Deckglaser)

10% Normal horse serum, NHS

60% glycerol (Cica Reagent)

4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI (Sigma)

Anti-rabbit IgG-TRITC (Jackson Immuno Research)

Anti-rabbit IgG-FITC (Jackson Immuno Research)

Rabbit anti-VCAM-1 antibody (Santa Cruz)

Rabbit anti- p65 antibody (GenTex)

### Luciferase assay

96-well Transwell (Corning)

Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega)

Infinite® 200 PRO NanoQuant (TECAN)

### BODIPY stain

BODIPY (molecular probe)

### Wound healing assay

24-well Transwell (Corning)

### 流式細胞儀

Triton X-100 (Bionovas)

Propidium iodide, PI (Sigma)

10X RBC lysis buffer (Biolegend)



### **MitoTracker stain**

Coverslip (Deckglaser)

MitoTracker (molecular probe)

### **動物實驗**

ApoE KO mice (台大動物中心)

Pentobarbital (Sigma)

### **免疫組織化學染色**

Sodium citrate (Bionivas)

10% Normal horse serum, NHS

Rabbit anti-VCAM-1 antibody (Santa Cruz)

Rabbit anti-Iba-1 antibody (GenTex)

4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI (Sigma)

60% glycerol (Cica Reagent)

Anti-rabbit IgG-TRITC (Jackson Immuno Research)

Anti-rabbit IgG-FITC (Jackson Immuno Research)

### **ORO stain**

Oil red O (VWR Life Science)

60% isopropanol (Bionovas)

### **馬森三色染劑 (Masson trichrome stain)**

Bouin's fluid

Biebrich Scarlet/ Acid Fuchsin  
Weigert's Iron, Hematoxylin (A) & (B)  
Phosphomolybdic/Phosphotungstic Acid Solution  
Aniline Blue Solution  
Acetic Acid Solution (1%)



### 三、 溶液配置

#### **10X Phosphate buffered for saline (PBS)**

NaCl : 80 g                      KCl : 2 g                      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 14.4 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 2.4 g                      In 1000 ml ddH<sub>2</sub>O

#### **5% Stacking Gel**

ddH<sub>2</sub>O : 3.4 ml                      30% acrylamide : 0.83 ml                      1 M Tris : 0.63 ml  
10% SDS : 0.05 ml                      10% ammonium persulfate : 0.05 ml  
TEMED : 0.005 ml

#### **10% Seperating Gel**

ddH<sub>2</sub>O : 7.9 ml                      30% acrylamide : 6.7 ml                      1.5 M Tris : 5 ml  
10% SDS : 0.2 ml                      10% ammonium persulfate : 0.2 ml  
TEMED : 0.008 ml

#### **10X Running buffer for SDS-PAGE**

Tris-base : 30.3 g                      Glycine : 144 g                      SDS : 10 g  
In 1000 ml ddH<sub>2</sub>O

#### **Transfer buffer for SDS-PAGE**

Tris-base : 3.03 g  
In ddH<sub>2</sub>O total 2000 ml

Glycine : 14.4 g

Methanol : 200ml



### **10X TBST**

Tris-base : 24.2 g

NaCl : 80 g

Tween-20 : 20 ml

In ddH<sub>2</sub>O total 1000 ml(pH=7.6)

### **4% Paraformaldehyde**

Paraformaldehyde: 80 g

In PBS total 2000 ml

### **30% Sucrose**

Sucrose: 150 g

In PBS total 500 ml

### **0.1M Sodium citrate**

Sodium citrate: 14.7 g

In ddH<sub>2</sub>O total 500 ml(pH=6.0)

### **Crystal violet stain solution**

crystal violet : 0.5 g

ddH<sub>2</sub>O : 80 ml

Methnol : 20 ml

## 參、實驗方法



### 一、細胞實驗(*In vitro*)

#### 人類臍帶靜脈內皮細胞(HUVECs)之初級培養

取得人類臍帶後置於約 250 毫升的 70%酒精重複沖洗 3-4 次，將三通管其中一開口放入臍帶靜脈中，再利用豎線帶將其兩者固定，接續以 1X PBS buffer 沖洗靜脈至無血色為止。確認靜脈無損傷破洞後灌入 0.2% Collagenase I 於 37°C 作用 8 分鐘。隨後取出臍帶內經 Collagenase IV 作用分離出的靜脈內皮細胞溶液至離心管，並以冰 PBS 注入靜脈收取剩餘內皮細胞，將溶液以 500 g 離心 5 min。去除上清液後將細胞置放在含有 10% fetal bovine serum(FBS)、100 µg/ml heparin、30 µg/ml endothelial cell growth supplement 及 1% Fungizone PS 之 M199 培養液中。細胞培養於 5% CO<sub>2</sub> 及 37°C 恆溫培養箱每隔 2 天置換培養液並定期繼代培養。

#### 細胞株之培養

- 單核球(U937)：培養於含 10% FBS、1% Fungizone PS 之 RPMI1640，置於 5% CO<sub>2</sub> 及 37°C 恆溫培養箱，每隔 2 天置換培養液並定期繼代培養。
- 巨噬細胞(RAW264.7)：培養於含 10% FBS、1% Fungizols PS 之 DMEM，置於 5% CO<sub>2</sub> 及 37°C 恆溫培養箱，每隔 2 天置換培養液並定期繼代培養。
- 大鼠主動脈平滑肌細胞(RASMC)：培養於含 10% FBS、1% Fungizols PS 之 DMEM，置於 5% CO<sub>2</sub> 及 37°C 恆溫培養箱，每隔 2 天置換培養液並定期繼代培養。

#### 基因表現之測定

- 抽取細胞 RNA



依照實驗目的將 HUVEC、RASMC 分別進行不同的處理，探討 PFE 對於調控細胞中特異 mRNA 表現的情形。

1. 將細胞孔盤置於冰上，移除培養液，用 PBS wash 一次，加入 500  $\mu$ l Trizol。
2. 在冰上作用 1 分鐘，收集樣品於微量離心管中，放置室溫作用 5 分鐘。
3. 加入 50  $\mu$ l BCP 震盪 30 秒，放置室溫 3 分鐘，4 $^{\circ}$ C 離心 200 g 15 分鐘。
4. 吸取上清液至新的微量離心管中，加入 250  $\mu$ l Isopropanol (100%) 和 1  $\mu$ l Glycogen，上下倒轉微量離心管使之混和，放置室溫作用 10 分鐘。
5. 4 $^{\circ}$ C 離心 200 g，10 分鐘，去除上清液加入 1 ml 75% Ethanol 清洗 pellet。
6. 4 $^{\circ}$ C 離心 200 g，5 分鐘，清乾上清液，打開蓋子放置室溫風乾約 5 分鐘。
7. 確定 pellet 變乾呈透明狀，回溶 10  $\mu$ l DEPC 水，放到乾浴槽加熱 60 $^{\circ}$ C 10 分鐘，用分光光度計測得 RNA 濃度，樣品於-80  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

● 反轉錄 DNA

1. 取 1  $\mu$ g RNA，加入 10X RQ1 DNase buffer 1  $\mu$ l、RQ1 DNase 1  $\mu$ l，用 DEPC
2. ddH<sub>2</sub>O 將體積補至 10  $\mu$ l，放置室溫作用 10 分鐘。
3. 加入 1  $\mu$ l RQ1 stop solution，於 PCR 機器 65 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘，加入 2X RT buffer 10  $\mu$ l、50  $\mu$ M Oligo dT 0.5  $\mu$ l、50  $\mu$ M Random primer 0.5  $\mu$ l、RNA template (DNA digested) 4  $\mu$ l、DEPC ddH<sub>2</sub>O 4.1  $\mu$ l，放置 PCR 機器 65 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘。
4. 加入 0.5  $\mu$ l Reverse transcriptase、0.4  $\mu$ l RNase inhibitor，放置 PCR 機器作用，反應條件為 (1) 30 $^{\circ}$ C、10 分鐘 (2) 42 $^{\circ}$ C、60 分鐘 (3) 70 $^{\circ}$ C、15 分鐘，作用後放置-20 $^{\circ}$ C 保存。

● 即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應(Quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)

將反轉錄好的 cDNA sample 十倍稀釋作為 template，加入 2X SYBR premix 5  $\mu$ l、Forward Primer (5  $\mu$ M) 1  $\mu$ l、Reverse Primer (5  $\mu$ M) 1  $\mu$ l、DNA 3  $\mu$ l，每個 sample 要有三重複，並加到 384 孔盤中封膜，放入 qPCR 機器 (Roche

480)，設定條件為 95°C 5 分鐘接著 95°C 10 秒鐘，62°C 10 秒鐘，72°C 10 秒鐘，循環 45 次。最後 40°C 30 秒。



### 西方墨點法(Western blot)

用西方墨點法探討 PFE 對於調控細胞中特異蛋白質表現的情形。

1. 蛋白質濃度測定：取 2  $\mu$ l 待測蛋白質加入二次水至 800  $\mu$ l，並利用 1 mg/ml BSA 依相同方法配製成各種不同濃度作為標準曲線，隨後加入 200  $\mu$ l 之 Biorad protein assay dye reagent 混合均勻，以分光光度計測量 595 nm 波長之吸光值推算蛋白質濃度，依照濃度不同加入滅菌水及 5X sample buffer 使其配置成同蛋白質濃度的 1.25X sample buffer 溶液，於 95°C 加熱五分鐘，保存於 -20°C 冰箱。
2. 電泳膠片製作：根據欲觀察特異蛋白質大小配製不同濃度 separating gel，注入電泳膠片製作之玻璃片間靜置並以滅菌水覆蓋上層，凝固後去除上層滅菌水並配製 5% stacking gel 加入玻璃片間，插入齒梳待其凝固後移除，將膠片架至電泳槽上進行電泳。
3. 蛋白質電泳：電泳槽內注入電泳緩衝液(running buffer)。將 15  $\mu$ g 蛋白注入電泳膠片凹槽並同時注入 protein marker。以 80 伏特進行電泳，待蛋白質進入 separating gel 後將電壓升至 120 伏特，適當時間後停止電泳並進行轉印。
4. 蛋白質轉印：於含轉印緩衝液中將轉印夾依序放置海棉、濾紙、電泳膠片、已浸泡於甲醇活化後的 PVDF 膜，去除氣泡後再放置濾紙及海綿，蓋上轉印夾後置於轉印槽中，以 110 伏特在冰浴中轉印 1-3 小時。
5. 蛋白質抗體染色：取出 PVDF 膜，以含 5%脫脂奶粉的 TBST 溶液進行非特異性蛋白質阻斷室溫 30 分鐘，後以 TBST 清洗數次後加入預測定初級抗體於 4°C 搖晃隔夜。次日以 TBST 溶液清洗數次，加入二級抗體室溫搖晃 1 小時，再以 TBST 溶液清洗數次後加入 chemiluminescence reagent (ECL)作用，以 X

光片顯影。將顯影後特定蛋白質進行分析，以 GAPDH 或  $\alpha$ -tubulin 作為蛋白質表現量的組間控制。



### **免疫螢光染色 (Immunofluorescence staining)**

欲觀察 PFE 在 HUVEC 及 RASMC 上發炎相關蛋白表現量的影響。

1. 將細胞種於 coverslip 並置於含無血清(Serum free ; SF)之 DMEM 及 M199 溶液中 24 小時。
2. 加入不同濃度之 PFE、JNK 及 NF- $\kappa$ B 抑制劑預先處理 1 小時，隨後以 10 ng/ml TNF- $\alpha$  濃度刺激 24 小時。
3. 取出圓形蓋玻片後，以 4% paraformaldehyde 固定 15 分鐘。
4. 再以 10% NHS(Normal horse serum)進行 blocking。
5. 加入一級抗體於 4°C 冰箱隔夜。
6. 以 1X PBS buffer 清洗數次，加入含 DAPI 之二級抗體於室溫 1 小時。
7. 以 1X PBS buffer 清洗數次，利用 60% glycerol mounting medium 進行封片，以螢光顯微鏡觀察取像。

### **單核球黏附實驗(Monocyte adhesion assay)**

藉此觀察 PFE 改變 HUVEC、RASMC 黏附因子表現量，是否會影響單核球的黏附程度。

1. 將 RASMC 培養於 24 well 孔盤中使其細胞長滿至彼此接合。
2. 將細胞置於含 SF-DMEM 溶液中 24 小時。
3. 將不同濃度 PFE 預先處理 1 小時，隨後以 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 小時。
4. 刺激過程中將另培養的 U937 離心並以 SF-RPMI 培養液沖洗。
5. 離心後，於 SF-RPMI/1:1000 [stock:1  $\mu$ g/ml] BCECF-AM 溶液置於 37°C 培養箱 30 分鐘。

6. 離心後去除上清液，以 SF-RPMI 培養液沖洗再次離心。
7. 待刺激 24 小時後去除 RASMC 中的培養液。
8. 將帶有螢光之 BCECF-U937 與 RASMC 共同培養 1 小時。
9. 去除上清液，以 1X PBS 數次清洗未貼附 BCECF-U937。
10. 以螢光顯微鏡隨機取像 3 個區域，計算 BCECF-U937 貼附的數量。



### **細胞穿膜實驗(Transmigration assay)**

藉由細胞穿膜實驗檢測 PFE 是否能減少內皮細胞之功能損傷。

1. 將含有 HUVEC 的上方培養盤與分別含有不同濃度 PFE 及 SP600125 30 nM 培養液的下方培養盤預先處理 1 小時。
2. 隨後加入 TNF- $\alpha$  10 ng/ml 處理 24 小時。
3. 刺激過程中將另培養的 U937 離心。
4. 待刺激 24 小時後以滅菌棉花棒去除上方培養盤下面之 HUVEC 細胞。
5. 加入含有 U937 之 HUVEC 培養液置於 37°C 培養箱 4 小時。
6. 置於 4% paraformaldehyde 固定 15 分鐘，甩去固定液。
7. 置於 crystal violet 染劑 15 分鐘。
8. 置於 1X PBS，甩去固定液，重複數次。
9. 以棉花棒輕輕去除未移行至下方的細胞。
10. 利用倒立顯微鏡進行取像，每組拍攝 3 張影像，計算細胞數量。

### **BODIPY stain**

藉此染色法探討 PFE 對於抑制 RAW264.7 吞噬油滴的作用。

1. 將 RAW264.7 培養於含有 coverslip 之 24-well。
2. 加入不同濃度 PFE 處理 1 小時，再加入 oxLDL 25  $\mu$ g/ml 48 小時。
3. 48 小時後將帶有綠色螢光 BODIPY(1  $\mu$ g/ml)加入培養液中共同培養 1 小時。

4. 封片並拍照紀錄。
5. 利用 Image J 定量螢光強度。



### **結晶紫染色(Crystal violet stain)**

藉此染色法探討 PFE 對於抑制 RASMC 增生的作用。

1. 將 RASMC 培養於 24 well 盤後置於 SF-DMEM 培養液 24 小時。
2. 欲處理不同濃度 PFE 藥物預先處理 1 小時。
3. 將 20 ng/ml PDGF 直接加入上述組別刺激 24 小時。
4. 去除培養液以 1X PBS 清洗，加入 4% paraformaldehyde 固定 15 分鐘。
5. 去除固定液以 1X PBS 清洗，加入結晶紫溶液反應 15 分鐘。
6. 去除結晶紫溶液以 1X PBS 清洗至清洗液無色，於 37°C 烘箱烘乾。
7. 加入 200  $\mu$ l 含 acetic acid 的 50%酒精，待結晶紫完全回溶於溶液中。
8. 取 100  $\mu$ l 結晶紫溶液於 96 well 盤，以 ELISA reader 測量其 550 nm 波長之吸光值。

### **細胞傷口癒合分析(Scratch wound healing assay)**

欲探討 PFE 對於 RASMC 移行的影響。

1. 將 RASMC 培養於 24 well 盤中使其長滿至細胞彼此接合。
2. 以 200  $\mu$ l pipette tip 於每 well 孔中畫出約 400  $\mu$ m 無細胞貼附之區域。
3. 去除原培養液後以倒立顯微鏡紀錄傷口區域大小。
4. 分別加入含不同濃度 PFE 培養液。
5. 以即時細胞培養影像紀錄系統 ASTEC CCM 每十分鐘紀錄細胞移動情形，用以計算細胞移行速率。
6. 24 小時後以倒立顯微鏡紀錄同傷口區域大小，用以計算閉合面積。
7. 後續以 Metamorph offline 分析軟體計算個別細胞移動速率，每個影像計算 4

顆細胞，總共計算 25 個影像。



### **流式細胞儀分析(Flow cytometry analysis)**

探討 PFE 在 RASMC 增生過程中，對於細胞週期的影響為何。

1. 將 RASMC 培養於 6 well 盤中，置於 SF-DMEM 培養液 24 小時。
2. 給予不同濃度 PFE 預先處理 1 小時。
3. 以 20 ng/ml PDGF 濃度刺激細胞增生 24 小時。
4. 隨後收集培養液，並利用 trypsin 作用於細胞收取至培養液中。
5. 離心後去除上清液，加入 500  $\mu$ l 85%酒精固定，置於-20°C 冰箱隔夜。
6. 離心後去除酒精，加入 500  $\mu$ l 1X PBS buffer 清洗再次離心。
7. 去除上清液後，加入 250  $\mu$ l 含 2  $\mu$ g/ml RNase、0.5% Triton X-100 之 PBS
8. 溶液，37°C 作用 30 分鐘。
9. 加入 250  $\mu$ l 50  $\mu$ g/ml PI 之 PBS 於 4°C 避光作用 30 分鐘。
10. 經濾網過濾後以 FACSscan 流式細胞儀偵測，並利用 FloeJo 7.6 分析。

### **MitoTracker staining**

探討 PFE 在 RASMC 移形過程中，對於 mitochondria 型態變化為何。

1. 將 RASMC 細胞培養於含 coverslip 的 24 well。
2. 加入 PFE 處理 1 小時，再加入 PDGF 作用 6 小時。
3. 前 15 分鐘加入 MitoTracker (0.2  $\mu$ M)。
4. 封片並拍照觀察。
5. 利用 Image J 計算 mitochondria 長度。

### **冷光報告基因檢測 (Luciferase reporter assay)**

探討 PFE 在 RASMC 發炎過程中，對於 NF- $\kappa$ B 結合 promoter 的影響。

1. 將 RASMC 細胞  $5 \times 10^3$  cells/well 至 96 well 盤上。
2. 隔天使用 GenJet™ 轉染 NF- $\kappa$ B reporter plasmid 24 小時。
3. 移除培養液換成 SF- DMEM 培養液放置細胞培養箱中 24 小時。
4. 加入 PFE 處理 1 小時，再加入 TNF- $\alpha$  作用 4 小時。
5. 使用 Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) 激發冷光，最後用 Infinite® 200 PRO NanoQuant (TECAN) 偵測冷光強度。



## 二、動物實驗(*In vivo*)

### 動脈硬化小鼠模式

利用 8 周大 ApoE 基因缺陷小鼠為動物模式，餵食高膽固醇（內含 0.15% 總膽固醇）飲食誘發動脈硬化，實驗分為四組，正常飲食組 (CTRL)、餵食高膽固醇飼料（高膽固醇飲食組, Cholesterol Diet）、餵食高膽固醇飲食，並同時給予口服 PFE 組（預防組, Cholesterol Diet/PFE）、餵食 15 週高膽固醇飲食，並從 8~15 週口服 PFE 組（治療組, Cholesterol Diet 8W/PFE 7W），PFE 濃度為 20 mg/ml 配置於 25% DMSO 裡，利用口服方式給予，藉此觀察 PFE 治療動脈硬化生成的效用。15 週後將小鼠犧牲，犧牲前空腹 24 小時，抽其血清測試各種生化值，取其胸主動脈，進行各項實驗觀察。

### Oil red O stain (ORO stain)

1. 將玻片置於 37°C 加熱板隔夜，使組織緊密貼附於玻片。
2. 以二次水浸泡玻片 5 分鐘 2 次，以去除 OCT。
3. 將 ORO (0.5 g oil red O 加 100 ml isopropanol) 與二次水 3:2 稀釋並於 60°C 加熱時間 1 小時。
4. 以 ORO 覆蓋組織 10 分鐘，隨後以 60% isopropanol 退染 5 分鐘。
5. 封片並拍照紀錄。

6. 計算斑塊占了血管面積大小比例。



### 馬森三色染劑 (Masson trichrome stain)

1. 將 Trichrome Stain Kit 內附的 Weigert's A 劑和 B 劑滴在玻片上，染 5 分鐘。
2. 以 ddH<sub>2</sub>O 清洗後將 Apply Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin Solution 染 15 分鐘。
3. 以 ddH<sub>2</sub>O 清洗後將 Phosphomolybdic/Phosphotungstic 染 15 分鐘。
4. 以 ddH<sub>2</sub>O 清洗後，將 Aniline Blue Solution 染 5 分鐘。
5. ddH<sub>2</sub>O 清洗後加入 Acetic Acid Solution (1%)，直到去除背景染劑為止，脫水封片後拍照記錄。
6. 計算斑塊占了血管面積大小比例。

### 主動脈蛋白質檢測

1. 取 10 倍稀釋 RIPA 及 100 倍稀釋 protease inhibitor cocktail 加入取下的主動脈組織，並以剪刀剪碎，磨碎。
2. 離心後取其上清液測其蛋白濃度：與上述細胞實驗西方墨點法相同。

### 主動脈單核球黏附實驗

欲觀察 PEDF 改變 RASMC 黏附因子表現量是否會影響單核球的黏附程度。

1. 將 U937 細胞離心並以無血清 RPMI 培養液清洗，離心 500g 5 分鐘。
2. 加入含 1:1000 [stock:1 µg/ml] BCECF-AM (2', 7'-Bis- (2-Carboxyethyl) -5-(and-6) -Carboxyfluorescein, Acetoxymethyl Ester) 的無血清 RPMI 培養液至於 37°C 培養箱 30 分鐘。
3. 離心後去除上清液，再以無血清 RPMI 培養液清洗並再次離心，將帶有螢光之 BCECF-U937 與攤平的主動脈血管共同培養於 37°C 培養箱 1 小時。
4. 再以 1X PBS 清洗未貼附的 U937 細胞，將血管攤平置於載玻片上，用螢光顯



微鏡拍照記錄並計算帶螢光之單核球數量。



### 免疫組織化學染色(Immunohistochemistry stain)

欲觀察老鼠動脈硬化後，血管黏附因子、發炎細胞及平滑肌細胞移形相關蛋白的表現量。

1. 在餵食老鼠第 15 週將老鼠犧牲將其主動脈及周圍組織一併取下。
2. 置於 4% paraformaldehyde 固定後放入含 30% 蔗糖 1X PBS buffer 中，每天置換溶液至血管沉降。
3. 以冷凍包埋劑包埋進行冷凍切片，每片為 7  $\mu\text{m}$  厚。
4. 將玻片置於 37°C 加熱板隔夜，使組織緊密貼附於玻片。
5. 以二次水浸泡玻片 5 分鐘 2 次，以去除 OCT。
6. 0.01M sodium citrate 浸泡玻片於微波爐加熱 5 分鐘 3 次，使組織抗原呈現。
7. 以二次水浸泡玻片 5 分 1 次，降溫冷卻。
8. 將含 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  methanol 浸泡玻片 15 分鐘，以去除內生性過氧化氫酶。
9. 以二次水浸泡玻片 5 分鐘 2 次清洗。
10. 利用 liquid blocker pen 圈起組織以便後續步驟。
11. 將 5 mg/ml BSA/PBS buffer 覆蓋組織於室溫 1 小時，以去除非專一性抗原。
12. 加入一級抗體於 4°C 冰箱隔夜。
13. 以 1X PBS buffer 清洗數次，加入含 DAPI 之二級抗體於室溫 1 小時。
14. 以 1X PBS buffer 清洗數次，利用 Xylene 去除 liquid blocker。
15. 利用 60% glycerol mounting medium 進行封片，以螢光顯微鏡觀察取像。

### 數據統計分析

所有結果皆以 Mean $\pm$ SD 表示，並以 unpaired T-test 或 one-way ANOVA 分析，當 P<0.05 時視為有顯著差異。

## 肆、實驗結果



### 一、PFE 具有抑制內皮細胞發炎的功能

當血管的第一道防線內皮細胞受到刺激時，如氧化性壓力、LDL、高糖或是細胞激素(cytokine，如 TNF- $\alpha$ )作用下，會造成細胞發炎及功能性缺損，進而促使動脈硬化生成(8)。在此，為了檢測 PFE 是否具有保護內皮細胞免於危險因子作用下促使發炎及功能缺損的產生，利用 HUVEC 為內皮細胞模式進行實驗，以 TNF- $\alpha$  為刺激因子，利用 mRNA、西方墨點法及免疫螢光染色，探討 PFE 對於 TNF- $\alpha$  誘發 HUVEC 發炎的保護及抑制作用影響為何。實驗結果(圖一)顯示，不論在 mRNA(圖一 A)、蛋白質(圖一 B)及免疫螢光染色(圖一 C)上，與 CTRL 組相較下，TNF- $\alpha$  組作用下，發炎黏附因子(VCAM-1)的表現量顯著上升，與 TNF- $\alpha$  組作用相較下，1 及 5  $\mu$ M PFE 預先作用下，顯著地抑制黏附因子 VCAM-1 的表現量。結果顯示 PFE 具有抑制內皮細胞的發炎黏附蛋白的產生，進而具有抑制發炎的作用。

### 二、PFE 透過抑制 JNK 磷酸化降低內皮細胞 VCAM-1 的表現量

已有文獻報告指出 TNF- $\alpha$  會透過 MAPK signaling pathway 的活化促使內皮細胞產生發炎黏附因子蛋白 VCAM-1(43)；所以我們欲觀察 PFE 是否藉由調控 MAPK 路徑來抑制 TNF- $\alpha$  所誘發發炎黏附因子 VCAM-1 的表現。從西方墨點法(圖二 A)的結果顯示，發現在加入刺激劑 TNF- $\alpha$  後，與 CTRL 組別相比，p38、ERK 及 JNK 皆有顯著磷酸化的情形，表示 TNF- $\alpha$  會誘發 p38、ERK 及 JNK 活化；而 5  $\mu$ M PFE 預先作用下，與 TNF- $\alpha$  組相較下，只有 JNK 磷酸化有被抑制的作用，為了進一步確認 PFE 是否藉由抑制 JNK 磷酸化，進而抑制 VCAM-1 蛋白的表現量。所以進一步將 30 nM JNK 抑制劑 SP600125 預先作用一小時，利用西方墨點法(圖二 B)及免疫螢光染色(圖二 C)觀察；結果顯示，與 CTRL 組相

較，TNF- $\alpha$  組作用下，發炎黏附因子 VCAM-1 的表現量顯著上升；與 TNF- $\alpha$  組別相比，在 PFE 及 SP600125 預先處理下，VCAM-1 表現量有顯著的下降，因此我們推論 PFE 可能是透過抑制 JNK 的活化來減少黏附因子 VCAM-1 的表現量。



### 三、PFE 透過抑制 JNK 磷酸化降低單核球黏附之情形

在動脈硬化過程初期的機制中，血液中大量單核球藉由黏附至內皮細胞中所表現的黏附因子是造成動脈硬化的初步致病機轉(44)。上述結果已顯示 PFE 具有抑制 TNF- $\alpha$  所誘發 JNK 的活化來減少黏附因子 VCAM-1 的表現量，接續下來，想更進一步觀察 PFE 是否具有影響單核球與血管內皮黏附的能力。我們利用單核球貼附(monocytes adhesion assay)實驗進行觀察；根據實驗結果和統計圖(圖三 A、B)顯示，與 CTRL 組相比，經 TNF- $\alpha$  刺激組的內皮細胞有大量單核球黏附的情形，而這些大量單黏附的核球細胞，可以藉由 PFE 及 SP600125 預先作用下，有效地被降低。上述結果顯示了 PFE 具有抑制 HUVEC 黏附因子表現並降低單核球黏附的作用，而此作用可能是藉由抑制 JNK 活化路徑來執行。

### 四、PFE 有效抑制單核球移行至內膜下層的能力

在動脈硬化過程中，內皮細胞因受到發炎因子 TNF- $\alpha$  刺激下，除了誘發內皮細胞產生發炎黏附蛋白外，亦會造成內皮細胞連接(cell junction)功能受損，影響血管細胞對物質通透性的調控，所以當血液中單核球黏附於此，會因為血管內皮細胞通透性改變，黏附於內皮細胞上的單核球細胞會進一步移行穿越(transmigration)至內皮細胞下空間(subendothelial space)(45)，為了確認 PFE 對於內皮細胞是否具有保護的作用及抑制黏附性單核球細胞移行穿越的能力，所以在此利用 Transwell 進行實驗及觀察。從染色圖及統計(圖四 A、B)顯示，與 CTRL 組相比，在刺激組 TNF- $\alpha$  作用下，有大量黏附性單核球細胞移行穿越至 Transwell 的下層，而在 PFE 及 SP600125 預先作用後，單核球移行穿越的數量有顯著的減

少；根據結果顯示 PFE 可能是透過抑制 JNK 磷酸化來減少單核球移行穿越至內皮細胞下空間的作用。



## 五、PFE 能抑制泡沫細胞(Foam cell)形成

當內皮細胞受刺激致使功能缺損後，大量單核球及低密度脂蛋白會移行進入內皮細胞下空間，此時的單核球會受到細胞激素的刺激而分化成巨噬細胞，開始吞噬 oxLDL 形成 foam cell，並藉此分泌出更多的細胞激素，加速動脈硬化病程的發展(17)。由研究報告顯示，PFE 具有抗發炎的功能，所以在此，為了確認 PFE 是否可藉由抗發炎的特性，減緩巨噬細胞的活化及功能，進而降低泡沫細胞生成的功能，我們利用 BODIPY 標示細胞油滴的數量，藉此量化來觀察 foam cell 的生成量。由結果及統計圖(圖五 A、B)顯示，與控制組相較下，oxLDL 作用組有大量 foam cell 的產生，這些大量生成的 foam cells 會藉由預先處理 5  $\mu$ M PFE 而有顯著性的減少。由此結果顯示 PFE 可能具有抑制 foam cell 生成的功能。

## 六、PFE 透過抑制 NF- $\kappa$ B 活化來減少 foam cell 之行成

有文獻顯示巨噬細胞會在 LPS 的刺激誘發下，透過 NF- $\kappa$ B 的活化進而增加 oxLDL 接受器(receptor)，藉此增加巨噬細胞吞噬 oxLDL 而造成大量 foam cell 的形成(46)，因此我們觀察 PFE 是否是藉由抑制 NF- $\kappa$ B 的活化路徑來減少 foam cell 生成。首先利用免疫螢光染色及 promoter luciferase assay 探討 PFE 對於經 LPS 刺激誘發 NF- $\kappa$ B 活化及結合 promoter 的功能。從(圖六 A、B)可以發現，與 CTRL 組別相比，LPS 作用下，有促進 p65 活化及移行入核的表現；經 PFE 預先處理組的細胞，p65 活化及移行入核的表現有顯著減少的情形，在 promoter luciferase assay 中有相似的結果，根據上述結果顯示，PFE 具有抑制 LPS 刺激誘發 p65 活化及移行入核的作用。為了更進一步釐清，NF- $\kappa$ B 在 foam cell 生成的調控作用，因此我們進一步利用 BODIPY 染色標示細胞質內被吞噬的油滴，藉由 NF- $\kappa$ B 抑

制劑 parthenolide 的預先處理，觀察 NF- $\kappa$ B 活性在抑制下，是否具有減少 foam cell 產生的效果；由結果與統計圖(圖六 C、D)可以發現預先加入 20 nM parthenolide 具有與 5  $\mu$ M PFE 相同的抑制 foam cell 產生的效果。由此可知，PFE 推論可能是透過抑制 NF- $\kappa$ B 來減少 foam cell 的形成。

## 七、PFE 無法抑制平滑肌細胞增生的功能

血管平滑肌細胞的增生及移行在動脈硬化斑塊增生中扮演著極為重要的角色(47)。血管平滑肌細胞的大量增生及移行主要是因為受到血管內發炎細胞所釋出生長因子(如 PDGF)及細胞激素等的刺激，促使血管平滑肌細胞型態及功能性改變，會加速由血管中層移行至血管內膜下層並大量增生，使血管管壁不斷地增厚，最終加速了動脈硬化病灶的發展。為了確認 PFE 是否具有抑制平滑肌細胞增生的功能，在此以 RASMC 當作平滑肌細胞模式，利用 PDGF 作為細胞生長刺激劑，觀察 PFE 在其中的調控作用。利用結晶紫染色方式觀察各組細胞經藥物作用後的數量，結果(圖七 A)顯示，與控制組相較下，PDGF 作用 24 小時後，顯著增加細胞數量，而隨著不同濃度 PFE 的預先作用下，與 PDGF 組相較下，對於細胞增生並不具有任何調控的作用。同時利用西方墨點法觀察增生的表現蛋白 PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) (圖七 B)，結果也顯示 PFE 不具有調控的作用。細胞週期分析結果也顯示相同的結果(圖七 C)。由上述結果推論，PFE 不具有調控 PDGF 誘發細胞生長的功能。

## 八、PFE 具有抑制平滑肌細胞移行的作用

文獻報告指出平滑肌細胞的移行也有助於動脈硬化斑塊的生成(48)，在確認 PFE 不具有調控 PDGF 誘發細胞生長的功能後，想進一步確認 PFE 是否具有調控平滑肌細胞移行的作用，在此利用 Wound healing assay 進行觀察。結果(圖八 A、B)顯示，與 CTRL 組別相比，PDGF 組別有促進平滑肌細胞由傷口外側大量

移入傷口內的作用；與 PDGF 組相較下，PFE 處理組則有效抑制細胞移入的面積；上述的結果可能是增生或移行所造成，但我們已經得知 PFE 無法抑制增生作用，因此我們進一步利用即時細胞影像儀觀察細胞每十分鐘所移動之距離觀察 PFE 是否能抑制其移行速率。由(圖八 C)我們可以發現 PFE 組別與 PDGF-BB 組別相比，其移行的速率有減緩的趨勢。由此結果可以推論，PFE 能透過抑制平滑肌移行的能力來減少斑塊的堆積。

### 九、 PFE 抑制平滑肌細胞 mitochondrial fission 來減緩移行作用

文獻報告指出平滑肌移行的能力與粒線體的形態變化是有關聯的(49)。當 mitochondria 受到 PDGF 的刺激時，其型態會從線狀的 fusion 型態轉變成點狀的 fission 型態；因此我們利用 MitoTracker 標定粒線體的形態變化來觀察，PFE 是否能透過抑制 mitochondrial fission 來減少細胞移行。從(圖九 A、B)結果及統計圖可以發現，與 CTRL 組別相比，PDGF 作用後，粒線體型態會由線狀的 fusion 型態轉變成點狀的 fission 型態，相反的，PFE 預先處理組則能有效的抑制粒線體 fission。上述結果我們推論 PFE 可能抑制 RASMC 中 mitochondrial fission 的能力來減少細胞移行作用。

### 十、 PFE 藉由抑制 MMP 9 減少平滑肌細胞移行

平滑肌細胞與細胞外基質( Extracellular matrix ; ECM)分布於動脈中層，因此平滑肌細胞的移行會受到 ECM 的阻礙，其中發現 MMPs (matrix metalloproteinase) family protein 能調控平滑肌細胞增生、移行及存活(50)。文獻指出活化的 MMPs 在降解(degradation)及重新組合細胞外基質的分布扮演著很重要角色，並且同時刺激平滑肌細胞移行的能力(51, 52)；而平滑肌細胞的移行對於動脈硬化斑塊堆積的進展是很重要的(53)。因此我們利用 RASMC 進行實驗，將 PDGF 當作刺激劑，利用西方墨點法探討 PFE 是否能抑制 MMP9 蛋白表現，

來減少平滑肌移行的能力。實驗結果顯示，在西方墨點法(圖十一 A)上，與 CTRL 組相比，PDGF 組別能誘發 MMP 9 表現增加，而加入 PFE 5  $\mu$ M 顯著地抑制 MMP 9 的表現量;實驗結果證實了 PFE 可能具有抑制平滑肌細胞移行的作用。



#### 十一、 PFE 具有抑制平滑肌細胞發炎的功能

在動脈硬化過程中，發炎的平滑肌會大幅增加與單核球及巨噬細胞互相作用及延長發炎細胞留滯於動脈斑塊中的時間，隨著留滯及反應時間的延長，會促使更多發炎激素的產生及釋出，這些激素會更進一步刺激活化平滑肌細胞及巨噬細胞，加重動脈硬化的病程發展(54)；而 TNF- $\alpha$  在發炎的過程扮演著重要角色，因此我們利用 RASMC 進行實驗，將 TNF- $\alpha$  當作刺激劑，利用 mRNA 以及西方墨點法探討 PFE 是否能保護平滑肌細胞免於 TNF- $\alpha$  刺激所產生發炎的反應。實驗結果顯示，不論在 mRNA(圖十二 A)及蛋白質(圖十二 B)上，與 CTRL 組相比，TNF- $\alpha$  組別能誘發 VCAM-1 表現增加，而加入 PFE 1 及 5  $\mu$ M 顯著地抑制黏附因子 VCAM-1 的表現量;實驗結果證實了 PFE 可能具有抑制平滑肌細胞發炎的作用。

#### 十二、 PFE 藉由抑制 JNK 及 NF- $\kappa$ B 活化降低平滑肌細胞 VCAM-1 的表現量

有報告指出平滑肌細胞經刺激後可藉由 MAPK signaling pathway 活化，加速 VCAM-1 的表現(55)；所以我們觀察 PFE 是否透過 MAPK 路徑來抑制 VCAM-1 的表現量。從(圖十三 A)西方墨點法我們可以發現在加入刺激劑 TNF- $\alpha$  後，p38、ERK 及 JNK 皆有被活化情形，而 PFE 組別與 TNF- $\alpha$  組相比，其中的 JNK 其磷酸化程度有下降的趨勢；說明 PFE 可能是藉由抑制 JNK 磷酸化來減少 VCAM-1 的表現量。而 MAPK 的磷酸化又會刺激 NF- $\kappa$ B 的活化(56)，所以利用西方墨點法觀察 NF- $\kappa$ B 其中一個 subunit: p65 其磷酸化入核之表現，(圖十三 B)發現 PFE 能有效抑制由 TNF- $\alpha$  所誘發的入核情形。而我們從文獻中得知 NF- $\kappa$ B 的入核須

進一步與其 promoter 做結合才能有效產生下游的 target gene(57)，在此利用 promoter luciferase assay 觀察 PFE 是否有降低其結合的能力。從(圖十三 C)我們可以發現 PFE 能有效抑制由 TNF- $\alpha$  所誘發 NF- $\kappa$ B 與 promoter 結合的能力。所以進一步將 30 nM JNK 抑制劑 SP600125 及 NF- $\kappa$ B 抑制劑 20  $\mu$ M Parthenolide 加入，利用西方墨點法觀察 PFE 是否透過抑制 JNK & NF- $\kappa$ B 磷酸化來減少 VCAM-1 的表現量；從(圖十三 D)我們能觀察到在 PFE、SP600125 及 Parthenolide 組別與 TNF- $\alpha$  組別相比，能降低由 TNF- $\alpha$  所誘發產生的 VCAM-1 表現量；由此可知 PFE 能透過抑制 JNK 及 NF- $\kappa$ B 來降低 VCAM-1 表現量。

### 十三、 PFE 有效減緩 RASMC 發炎反應且抑制單核球黏附

在動脈硬化發後期，平滑肌細胞發炎會與單核球及巨噬細胞產生交互作用，惡性循環下，平滑肌細胞上的黏附因子便不斷的增加，促使單核球大量黏附(58)，加速動脈硬化的發展。因此我們欲觀察 PFE 是否具有影響單核球在血管平滑肌黏附的能力。利用單核球黏附試驗進行實驗，從結果和統計圖(圖十四 A、B)觀察到，與 CTRL 組相比可觀察到 TNF- $\alpha$  刺激組有大量單核球黏附於 RASMC 的情形，而其黏附的數量可以在 PFE、SP600125 及 Parthenolide 作用下有效地被降低。上述結果證實了 PFE 能透過抑制 JNK 及 NF- $\kappa$ B 抑制 RASMC 黏附因子表現並降低單核球黏附的作用。

### 十四、 PFE 能減少動脈硬化的發生及斑塊堆積情形

動脈硬化被視為一種慢性的發炎性疾病(59)，所以目前尋找能夠抑制發炎反應的藥物是動脈硬化治療上新的策略。依據上述細胞實驗結果顯示，PFE 藥物能抑制內皮細胞及平滑肌細胞因發炎物質刺激後誘發的發炎反應，除此之外，PFE 也具有抑制巨噬細胞吞噬 oxLDL 形成 foam cell 的作用；由上述結果顯示，PFE 有潛質作為抑制動脈硬化發生的治療物質，因此我們進一步利用 Apo E KO mice



經餵食高膽固醇飼料誘發動脈硬化發生為動物模式，藉此觀察 PFE 在動脈硬化上的治療效果。動物分為 5 組，分別為餵食 15 週一般飼料的控制組(CTRL)及餵食 15 週含高膽固醇飼料的餵食組(Cholesterol-Diet)、及口服餵食 PFE 組，在餵食 PFE 動物部分又分為兩組，分別是同時餵食高膽固醇飼料及 PFE 的預防組(Cholesterol-Diet /PFE)及先餵食高膽固醇飼料 8 週誘發動脈硬化生成，再接續給予 PFE 7 週的治療組(Cholesterol-Diet 8W/PFE 7W)。藉由觀察堆積於胸主動脈(thoracic aorta)及主動脈竇(aortic sinus)斑塊(plaque)的大小，評估對於動脈硬化的治療成效。利用 ORO 標示斑塊中的脂質堆積量來表示斑塊的大小。ORO 染色結果(圖十五 A、B)顯示，與 CTRL 組相比，餵食 cholesterol 組(cholesterol Diet)的動脈壁上有大量脂質斑塊堆積的情形；與 cholesterol 組相比，在 PFE 餵食組，不論是預防組(Cholesterol Diet /PFE)還是治療組(Cholesterol Diet 8W/PFE 7W)，皆能有效降低由 cholesterol 所導致的動脈硬化斑塊堆積情形。顯示 PFE 具有預防及治療動脈硬化發展的作用。接下來我們進一步檢測動物血清生化值(表一)，檢測項目為血糖(Glucose)、三酸甘油脂(Triglyceride)、總膽固醇(Total Cholesterol; TC)、高密度脂蛋白(High density lipoprotein; HDL)及低密度脂蛋白(Low density lipoprotein; LDL)，結果發現，與 CTRL 組相比，餵食 cholesterol 組會顯著增加血糖、三酸甘油脂、總膽固醇及低密度脂蛋白。與 cholesterol 組相比，在 PFE 餵食組，不論是預防組(Cholesterol Diet/PFE)還是治療組(Cholesterol Diet 8W/PFE 7W)，能有效降低血糖、總膽固醇及低密度脂蛋白表現量。

## 十五、 PFE 能減少動脈硬化的細胞外基質堆積

動脈硬化斑塊的堆積，主要是因為平滑肌的大量增生移行造成，而增生的平滑肌細胞，同時也會生成大量的 collagen 一同堆積於斑塊處(60, 61)。膠原纖維的含量與斑塊的穩定度也有密切的關係。因此利用 Trichrome stain 來標定 aortic sinus 中的 collagen，藉此觀察 PFE 與動脈硬化斑塊中 Collagen 含量的關係。從(圖

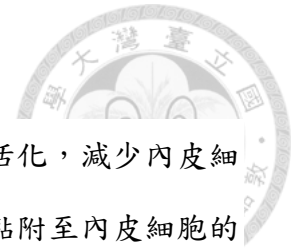
十六)發現，與 CTRL 組相比，餵食 cholesterol 組有大量 collagen 堆積的情形；與 cholesterol 組相比，而 PFE 的餵食能有效降低動脈硬化斑塊中 Collagen 堆積情形。



#### 十六、 PFE 能降低高膽飲食誘發動脈產生 VCAM-1 及單核球細胞黏附的作用

經由上述實驗顯示 PFE 能減少斑塊的堆積，已知內皮細胞發炎及單核球黏附有助於斑塊的形成堆積，因此我們想探討，PFE 是否是藉由抑制動脈內膜發炎及單核球黏附等作用，降低動脈硬化的發生。利用西方墨點法及單核球黏附實驗，觀察動脈經高膽固醇飼料餵食產生的黏附因子 VCAM-1 表現量以及單核球黏附的情形，從西方墨點法結果及統計圖(圖十七 A)顯示，與 CTRL 組相比，餵食 Cholesterol 組動脈 VCMA-1 表現量顯著提升；與餵食 Cholesterol 組相比，PFE 預防組及 PFE 治療組皆能抑制動脈 VCAM-1 的表現量；在單核球黏附實驗部分也有觀察到相似的結果(圖十七 B)。根據以上動物實驗結果，我們可以推測 PFE 能減少動脈硬化的生成。

## 伍、 討論



本篇研究發現 PFE 能針對動脈硬化中，能透過抑制 JNK 的活化，減少內皮細胞 HUVEC 黏附因子 VCAM-1 的產生，並進一步降低單核球黏附至內皮細胞的數量。接著在巨噬細胞 RAW264.7 能藉由抑制 NF- $\kappa$ B 的活化減少 foam cell 的產生，以及平滑肌細胞 RASMC 方面，PFE 能抑制 JNK 及 NF- $\kappa$ B 的活化來降低黏附因子 VCAM-1 的表現量，並減少單核球黏附的情形；同時藉由活化 Drp1 S637 磷酸化的表現來抑制 mitochondrial fission 的進行，進而降低平滑肌細胞移行的能力。

針對血管內皮細胞的研究中，我們藉由 HUVEC 為細胞模式發現 PFE 能夠透過抑制 JNK 磷酸化有效抑制發炎黏附因子的產生，進而減少單核球 U937 黏附穿膜(adhesion & transmigration)的能力。已有研究指出動脈硬化的發炎反應，會誘發細胞黏附蛋白-VCAM-1 的表現量會增加，藉此誘發更多的單核球細胞黏附，加速動脈硬化病程的發展(62)，因此針對抑制黏附因子表現來抑制動脈硬化發生是近幾年來的研究主題；在 2005 年的研究中指出補骨脂具有抑制內皮細胞上黏附因子的表現(38, 63, 64)及抑制 TNF- $\alpha$  誘發活化 MAPKs-VCAM-1 訊息傳遞路徑，來減少動脈硬化的生成(65)，上述研究結果顯示，推測本篇使用的 PFE 可能也是藉由抑制黏附因子-VCAM-1 的表現，達到降低動脈硬化病程的發展。

針對血管中巨噬細胞的研究中，我們利用 RAW264.7 作為巨噬細胞的模式，發現 PFE 能透過抑制 NF- $\kappa$ B 磷酸化來減少 foam cell 的形成。NF- $\kappa$ B 為發炎反應中重要的轉錄因子，有研究顯示抑制 NF- $\kappa$ B 表現能減少泡沫細胞(foam cell)的產生(66, 67)與本篇研究有相同的結果。整個慢性發炎過程，巨噬細胞藉由微環境的改變產生不同的型態，稱做巨噬細胞極化(Macrophage polarization)扮演著很重要

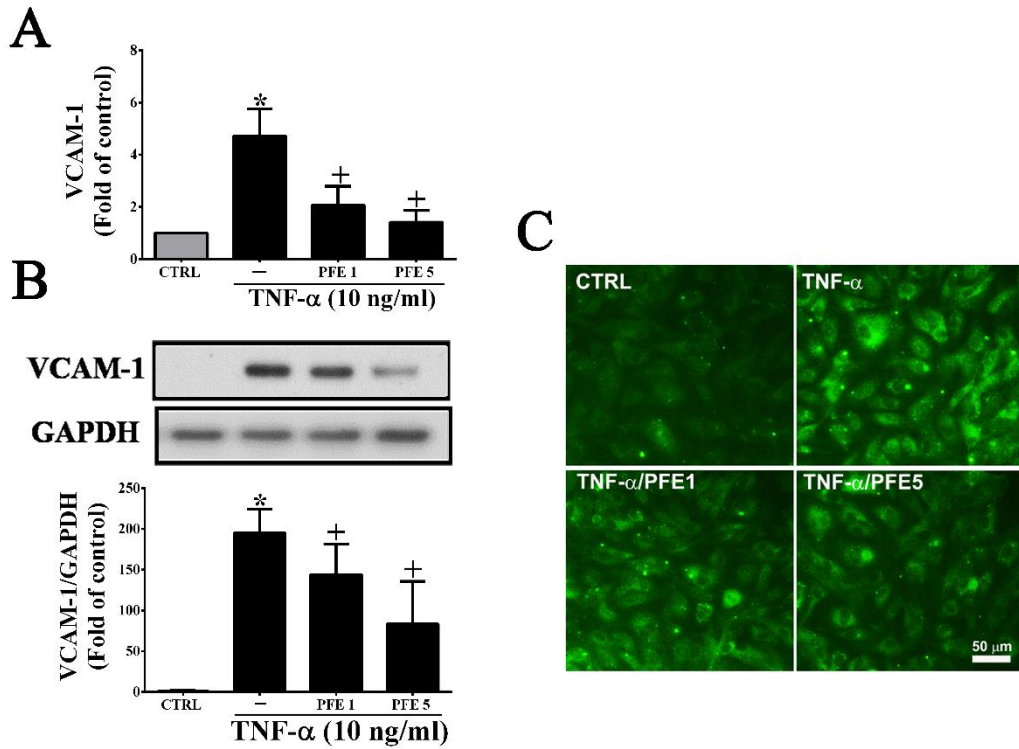
的角色(68, 69)，巨噬細胞能分化成兩種相互結抗的型態，分別為典型活化巨噬細胞(Classically activated macrophages) M1 及另類活化巨噬細胞 (Alternatively activated macrophages) M2；高含量的氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)會刺激單核球轉變成 M2 macrophage(70, 71)，並高度表現吞噬受體(scavenger receptor)，如 LOX-1、CD36 等，來吞噬 oxLDL 形成 foam cell。因此我們在未來研究中，也能進一步探討 PFE 在 macrophage polarization 中對於 foam cell formation 的相關性。

針對血管中平滑肌細胞的研究中，研究報告顯示影響平滑肌細胞移行的因素包含，細胞骨架(Cytoskeleton)調控、mitochondrial fission、細胞外基質(extracellular matrix)含量等的調控。在本篇研究中，我們利用 RASMC 做為平滑肌細胞的模式，發現 PFE 能抑制平滑肌細胞的移行能力，結果顯示 PFE 會藉由增加因 PDGF 抑制 Drp1 S637 磷酸化表現的作用，抑制 mitochondrial fission 的表現，藉此抑制平滑肌細胞因 PDGF 作用下的移行速度，進而降低動脈硬化斑塊的面積。在細胞外基質部分，已有文獻指出 MMPs family protein 在平滑肌細胞移行中扮演著及為重要的調控角色(72)，本篇研究顯示，PFE 能夠抑制平滑肌細胞移行速度之外，在經由 Trichrome staining 結果發現，餵食 PFE 能夠有效降低斑塊中結締組織膠原纖維(collagen)的含量，由上述結果推論 PFE 可能是與 MMPs 功能或是分泌生成 collagen 的功能有關。在抑制動脈硬化斑塊大小的機制部分，除了抑制平滑肌細胞移行速度之外，PFE 是否是藉由調控 MMP 及 Collagen 分泌生成功能來進行調控，這部分是接下來研究的另一個目標。

當血管內皮細胞受損後，大量發炎因子及巨噬細胞會聚集在血管中層與平滑肌細胞交互作用，造成平滑肌細胞產生發炎反應，誘發更多淋巴球、白血球的貼附<sup>(54)</sup>，如此一來，會加速及加重血管內皮細胞更嚴重的發炎及死亡。造成發炎最常見的細胞激素，如 TNF- $\alpha$ ，誘發動脈發炎黏附因子，如 VCAM-1、ICAM-1<sup>(73)</sup>、

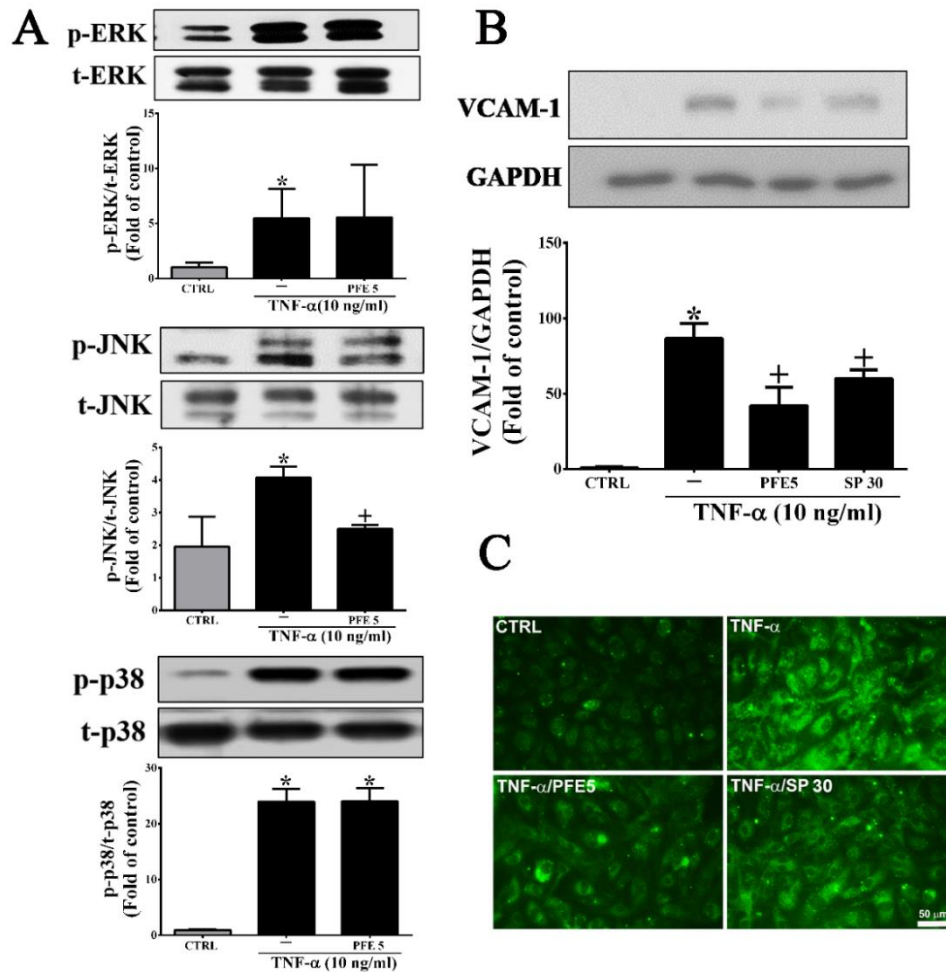
E-selectin 及 P-selectin 都會大量生成，進而加速及加重動脈硬化發生，但是本篇研究結果只有侷限於 VCAM-1 的討論，PFE 對於其他的黏附蛋白表現的調控作用，是接下來研究的另一個目標。





### 圖一、PFE 具有抑制內皮細胞發炎的功能

以 HUVEC 作為內皮細胞模式進行實驗，預先處理 1、5  $\mu$ M PFE (PFE 1; PFE 5) 1 小時，後續加入 10 ng/ml TNF- $\alpha$  處理 24 小時後。利用 qPCR(A)、西方墨點法(B) 及免疫螢光染色(C)觀察細胞黏附因子 VCAM-1 的表現量。實驗結果證實兩種濃度 PFE 皆會顯著地抑制內皮細胞產生 VCAM-1。\*P < 0.05 與 CTRL 組相比；<sup>+</sup>P < 0.05 與 TNF- $\alpha$  組相比(n=6)，數值均以 mean $\pm$ SD 表示。

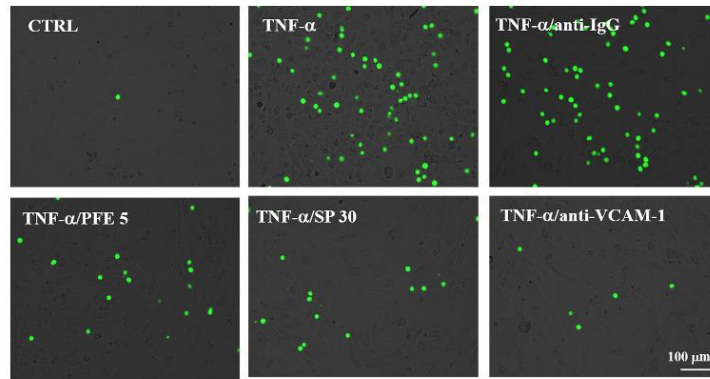


圖二、 PFE 透過抑制 JNK 磷酸化降低內皮細胞 VCAM-1 的表現量

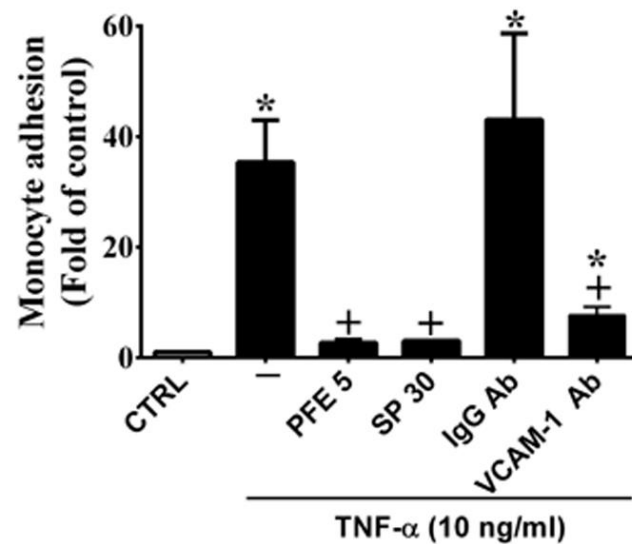
將 HUVEC 預先處理 5 μM PFE (PFE 5) 1 小時後，接續加入 10 ng/ml TNF-α 處理 15 分鐘。利用西方墨點法(A)結果顯示，TNF-α 會顯著增加 ERK、JNK 及 p38 磷酸化，而經 PFE 預先處理則有效降低 JNK 磷酸化的表現，對於 ERK 及 p38 則無抑制作用。為了檢測 PFE 是否藉由 JNK 調控 VCAM-1 蛋白表現，所以將 HUVEC 先以 30 nM JNK 抑制劑 SP600125 (SP 30) 與 5 μM PFE 預先處理 1 小時，後續加入 10 ng/ml TNF-α 處理 24 小時。同樣利用西方墨點法(B)及免疫螢光染色(C)觀察黏附因子 VCAM-1 蛋白質表現量。結果顯示 JNK 抑制劑與 PFE 具有相同抑制效果，推論 PFE 能透過抑制 JNK 磷酸化來減少發炎所產生 VCAM-1 表現。\*P < 0.05 與 CTRL 組相比；+P < 0.05 與 TNF-α 組相比(n=3)，數值均以 mean±SD 表示。



A



B

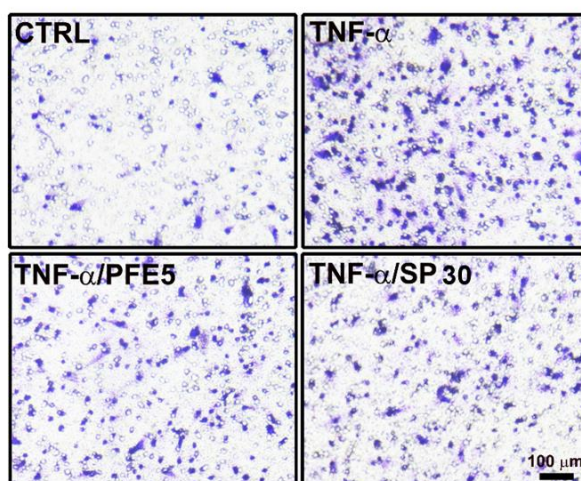


### 圖三、 PFE 對於 HUVEC 單核球黏附的影響

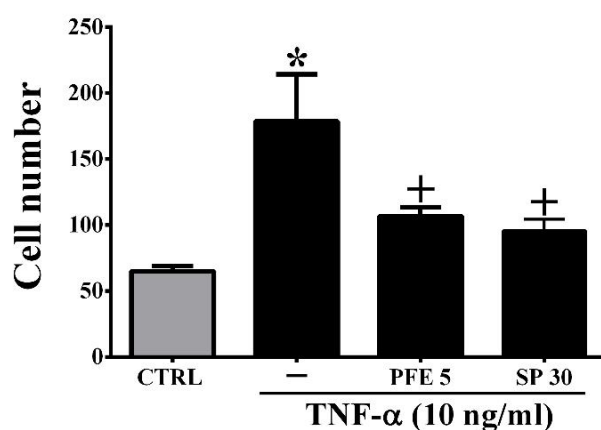
為了觀察 PFE 是否具有抑制 HUVEC 因發炎誘發單核球黏附的作用，利用單核球黏附試驗進行觀察，首先將 HUVEC 以 5  $\mu$ M PFE (PFE 5)、30 nM SP600125 (SP 30)、1  $\mu$ g/ml IgG Ab 及 1  $\mu$ g/ml VCAM-1 Ab 預先處理 1 小時，接續加入 10 ng/ml TNF- $\alpha$  處理 24 小時。將 TNF- $\alpha$  刺激後 HUVEC 與預染 30 分鐘標定螢光之單核球共同培養 1 小時並觀察黏附數量。(A、B)單核球黏附影像代表圖及數量統計圖。結果顯示，HUVEC 經 TNF- $\alpha$  誘導的黏附因子 VCAM-1 會因為 PFE 及 JNK 抑制劑預先處理而有效地降低單核球貼附於 HUVEC 的數量。\*P < 0.05 與 CTRL 組相比；+P < 0.05 與 TNF- $\alpha$  組相比(n=3)，數值均以 mean $\pm$ SD 表示。



A



B

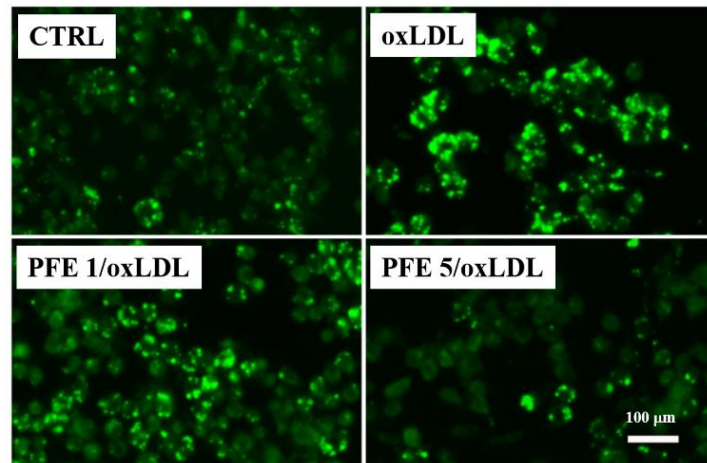


#### 圖四、PFE 有效抑制單核球移行至內皮下層的能力

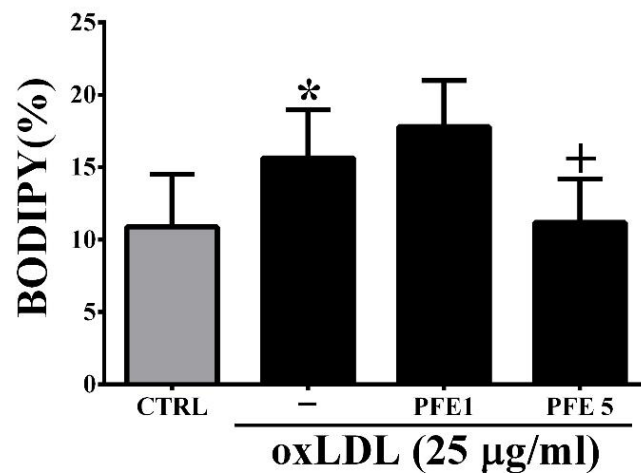
利用 Transwell 進一步觀察 PFE 是否具有抑制單核球細胞穿越(Transmigration)內皮層至內皮細胞下空間的能力及其可能的調控機制。首先以 5  $\mu$ M PFE (PFE 5) 及 30 nM SP600125 (SP 30)預先處理 HUVEC 1 小時，後續加入 10 ng/ml TNF- $\alpha$  處理 24 小時。接著加入 U937 單核球與 HUVEC 共同培養 6 小時。利用 Crystal violet 染色法計算 6 小時後細胞由上方培養盤移至下方培養盤的數量。(A) Crystal violet 細胞染色代表照片(scar bar =100  $\mu$ m)；(B)細胞數量統計圖。結果所示，PFE 及 SP600125 皆會顯著地抑制單核球移行至下方培養盤數量。實驗結果顯示 PFE 可能藉由抑制 JNK 磷酸化來減少單核球移行至內皮下空間的數量。\* $P < 0.05$  與 CTRL 組相比；+ $P < 0.05$  與 TNF- $\alpha$  組相比(n=4)，數值均以 mean $\pm$ SD 表示。



A

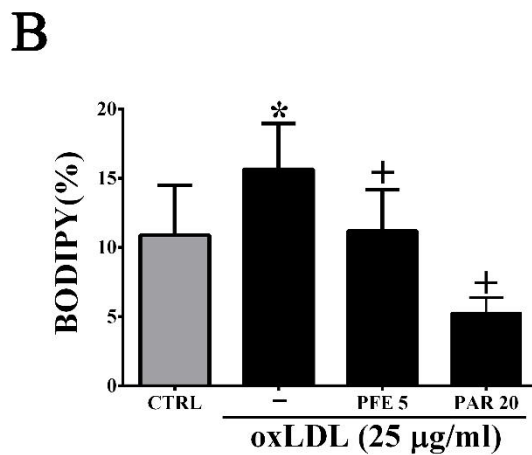
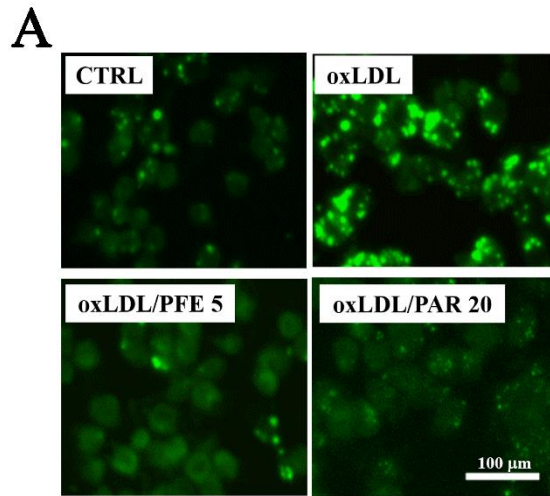


B



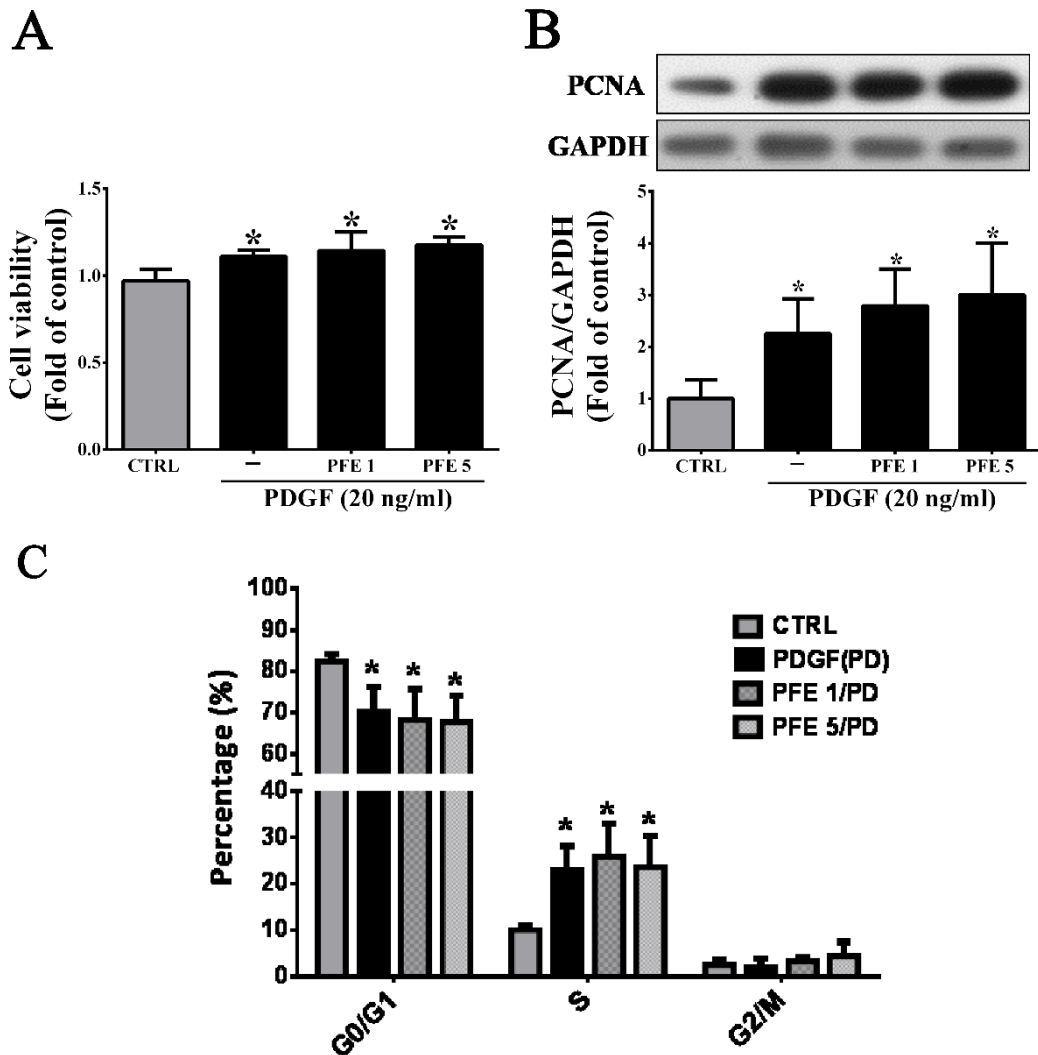
### 圖五、 PFE 能抑制泡沫細胞(Foam cell)形成

為了觀察 PFE 是否具有抑制巨噬細胞吞噬氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)形成 foam cell 的作用，以 RAW264.7 作為巨噬細胞模式，以 1、5 μM PFE (PFE 1; PFE 5)預先處理 1 小時，接續加入 25 μg/ml oxLDL 處理 48 小時。利用 BODIPY 標示油滴(綠色)，並利用 Image J 進行定量。(A、B)細胞影像代表照片(scar bar =100 μm)及統計圖。結果可發現 5 μM PFE 能有效抑制 foam cell 的形成。\*P<0.05 與 CTRL 組相比；†P<0.05 與 oxLDL 組相比(n=6)，數值均以 mean±SD 表示。



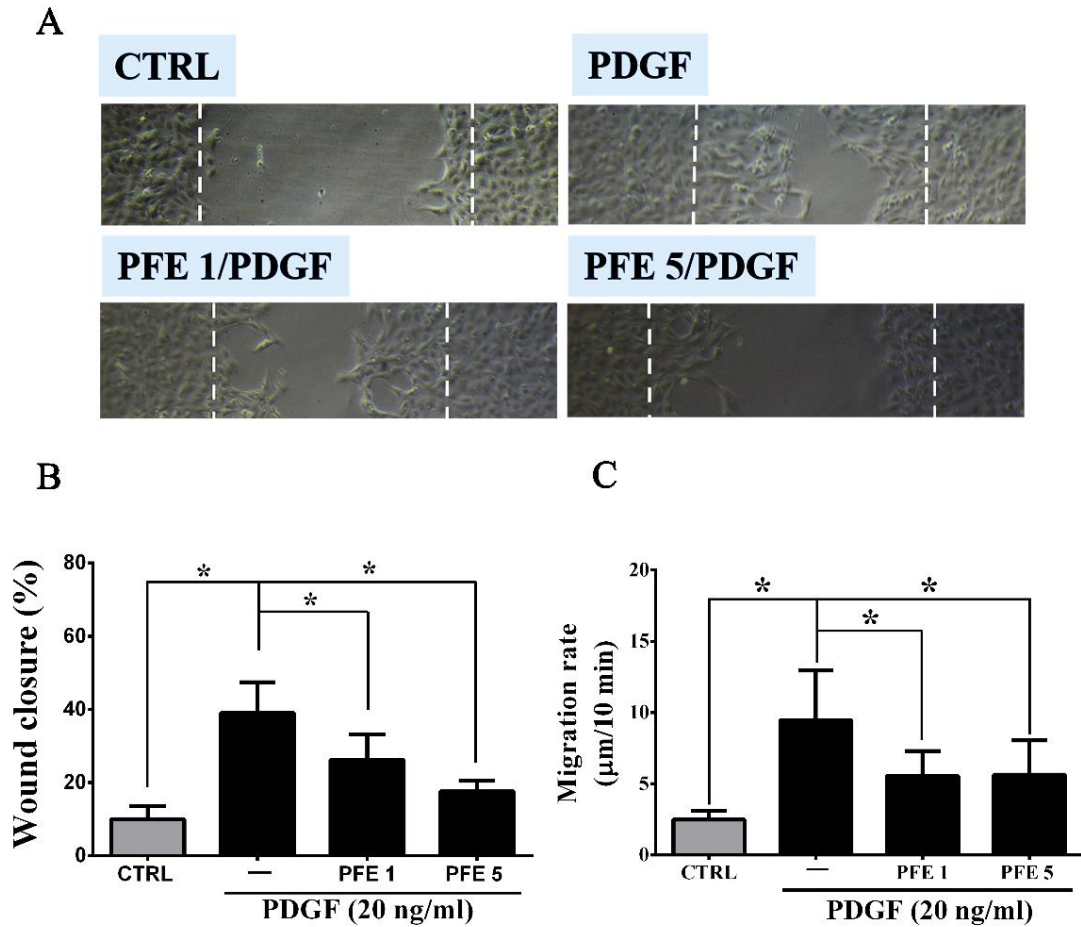
### 圖六、 PFE 透過抑制 NF-κB 活化來減少 foam cell 之形成

為了進一步探討 PFE 是否藉由 NF-κB 調控巨噬細胞吞噬 oxLDL 及 foam cell 的形成。(A、B)將 RAW264.7 利用 NF-κB 抑制劑及 oxLDL 處理 RAW264.7 來觀察 PFE 抑制 foam cell 的形成是否藉由 NF-κB 進行調控。以 5 μM PFE 及 20 μM NF-κB 抑制劑 parthenolide (PAR 20)預先處理一小時後，以 25 μg/ml oxLDL 處理 48 小時，同樣利用 BODIPY 標示油滴(綠色)，並利用 Image J 進行定量。結果顯示 PFE 可能是透過抑制 NF-κB 磷酸化來減少 foam cell 生成。\*P<0.05 與 CTRL 組相比；†P<0.05 與 oxLDL 組相比(n=4-6)數值均以 mean±SD 表示。



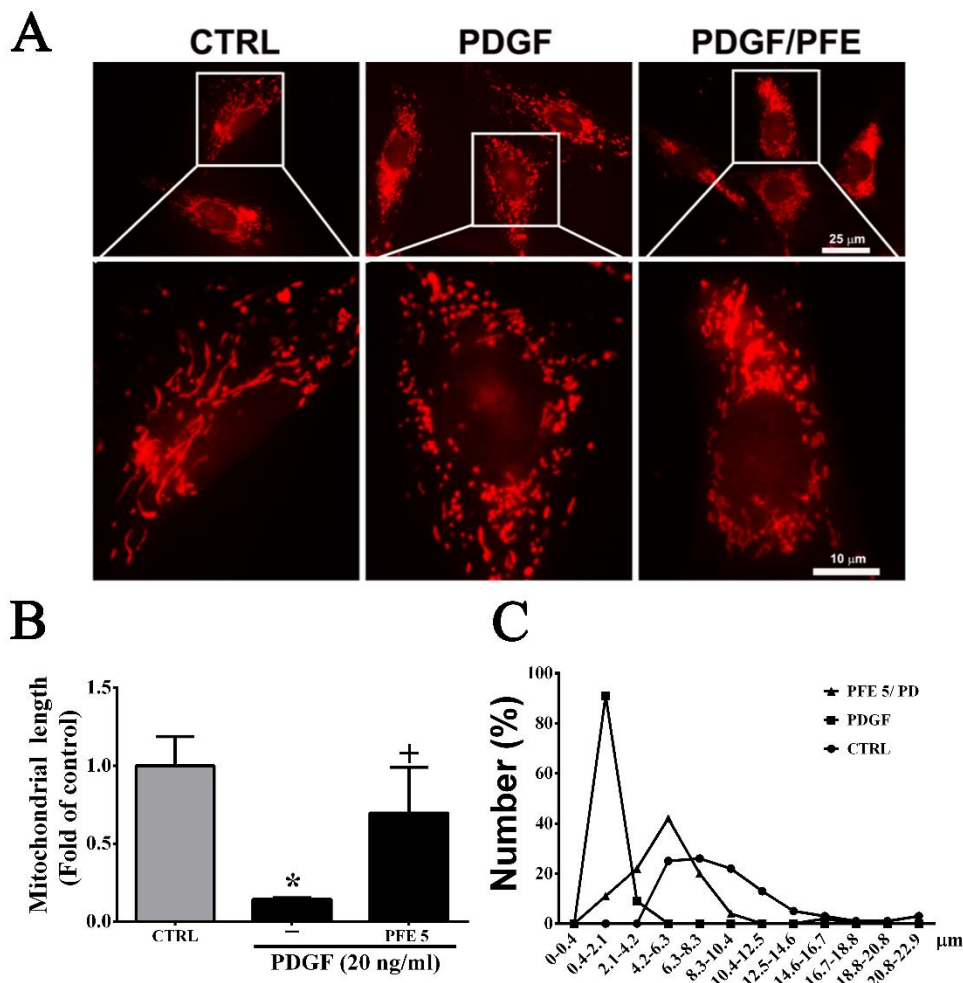
圖七、 PFE 對於平滑肌細胞增生的探討

將經 serum starvation 處理後的 RASMC 預先處理 1、5  $\mu$ M PFE (PFE 1; PFE 5) 1 小時，後續加入 20 ng/ml PDGF 處理 24 小時。以結晶紫、西方墨點法及流式細胞分析法觀察 PFE 是否能影響 PDGF 所誘導的增生作用。根據(A)結晶紫、(B)西方墨點法定量統計圖及(C)流式細胞分析結果顯示 PFE 不具有抑制 PDGF 顯著誘發 RASMC 增生的作用。\* $P < 0.05$  與 CTRL 組相比；+ $P < 0.05$  與 PDGF 組相比 (n=3-6)，數值均以 mean $\pm$ SD 表示。



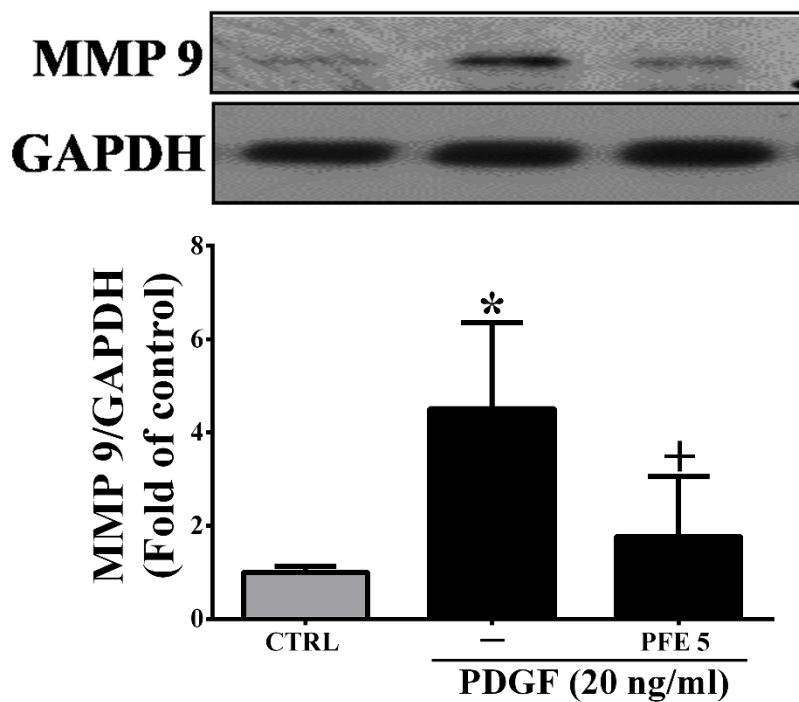
#### 圖八、 PFE 能抑制平滑肌細胞移行的能力

待 serum starvation 處理後的 RASMC 生長至相互接觸時，以 1、5  $\mu$ M PFE(PFE 1; PFE 5)預先處理 1 小時，利用 yellow tip 在細胞劃一道傷口，接續加入 20 ng/ml PDGF 處理 24 小時。拍照觀察與追蹤細胞長入傷口的面積及速率。(A)細胞細胞長入傷口的影像代表照片；(B)傷口癒合面積統計圖及(C)細胞移行速率統計圖。結果顯示 PFE 能有效抑制 PDGF 誘發細胞移入傷口內的數量及速率。 $*P < 0.05$  與 CTRL 組相比； $^+P < 0.05$  與 PDGF 組相比(n=5)，數值均以 mean $\pm$ SD 表示。



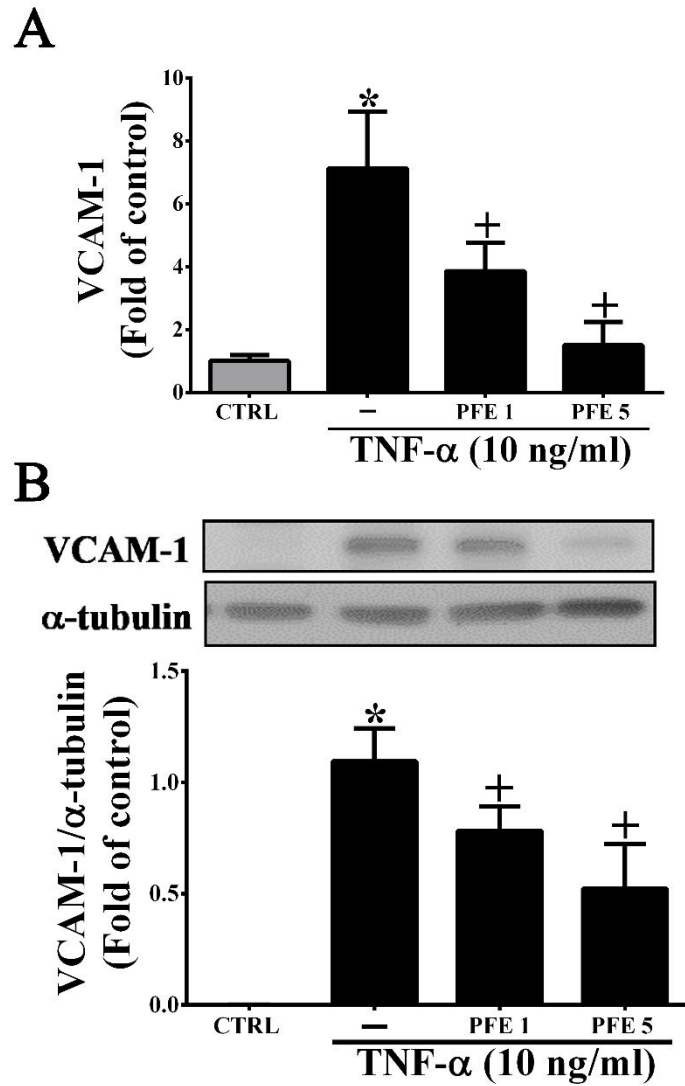
圖九、 PFE 有效抑制平滑肌細胞 mitochondrial fission 來減緩移行作用

將 serum starvation 處理後的 RASMC 預先處理 5  $\mu$ M PFE (PFE 5) 1 小時，後續加入 20 ng/ml PDGF 6 小時。利用 MitoTracker 作用 15 分鐘，觀察 mitochondria 型態變化的情形。(A)細胞影像代表照片；(B)mitochondrial length 統計圖；(C) mitochondrial length distribution。結果顯示，PFE 能減少經由 PDGF 刺激誘導的 mitochondrial fission。\*P < 0.05 與 CTRL 組相比；†P < 0.05 與 PDGF 組相比(n=4)，數值均以 mean $\pm$ SD 表示。



圖十、 PFE 藉由抑制 MMP 9 減少平滑肌細胞移行

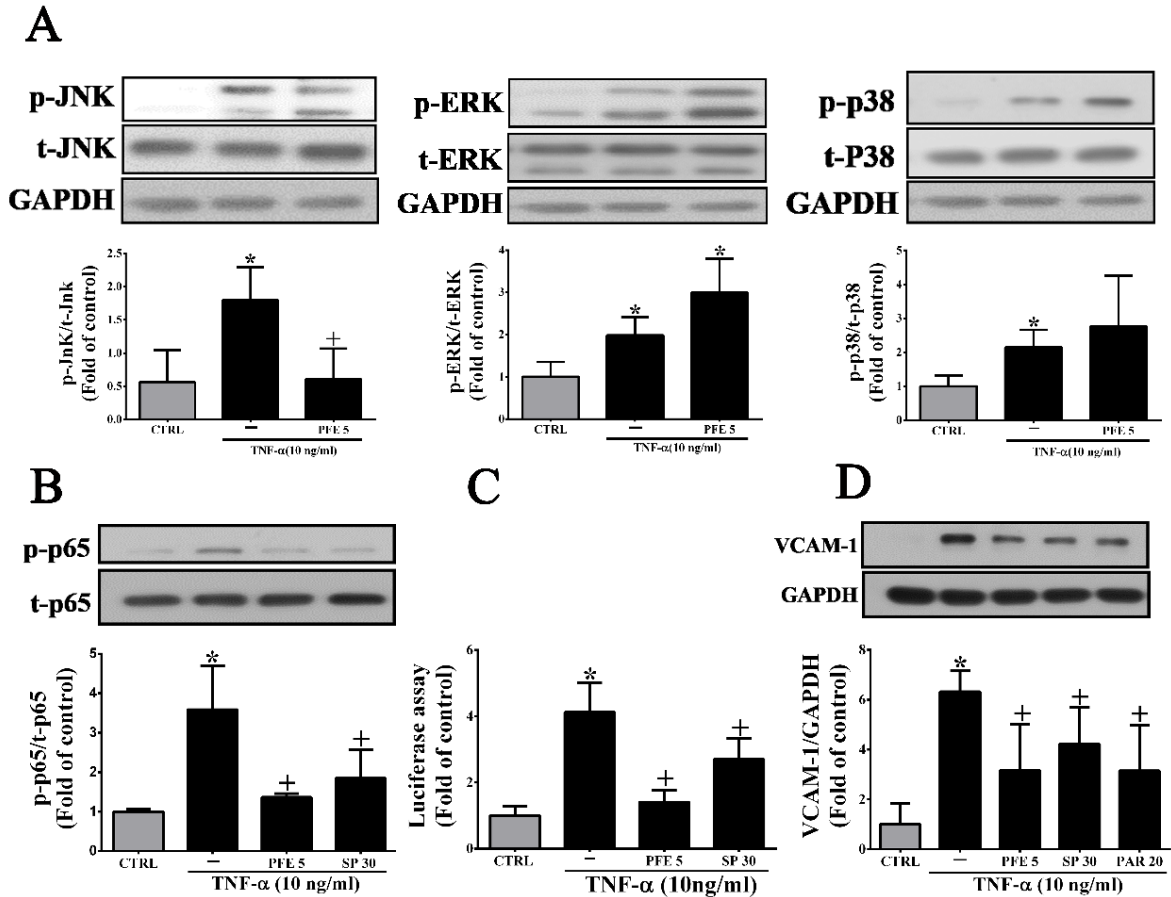
將 serum starvation 處理後的 RASMC 預先處理 5  $\mu$ M PFE 1 小時，後續加入 20 ng/ml PDGF 24 小時後。利用西方墨點法觀察 RASMC (A) MMP 9 及(B) collagen I 表現的情形。結果發現 5  $\mu$ M PFE ( PFE 5)會顯著地抑制平滑肌細胞 MMP 9 及 collagen I 的表現。證實了 PFE 藉由抑制 MMP 9 減少平滑肌細胞移行並降低 collagen I 表現。\*P <0.05 與 CTRL 組相比；+P<0.05 與 PDGF 組相比(n=4)，數值均以 mean $\pm$ SD 表示。



圖十一、 PFE 具有抑制平滑肌細胞發炎的功能

將 serum starvation 處理後的 RASMC 預先處理 1、5  $\mu$ M PFE 1 小時，後續加入 10 ng/ml TNF- $\alpha$  24 小時後。利用(A)qPCR 及(B)西方墨點法觀察 RASMC 發炎蛋白 VCAM-1 表現的情形。結果發現 1、5  $\mu$ M PFE (PFE 1; PFE 5)會顯著地抑制平滑肌細胞發炎。證實了 PFE 具有抑制細胞發炎情形。\* $P < 0.05$  與 CTRL 組相比； $\dagger P < 0.05$  與 TNF- $\alpha$  組相比(n=4)，數值均以 mean $\pm$ SD 表示。

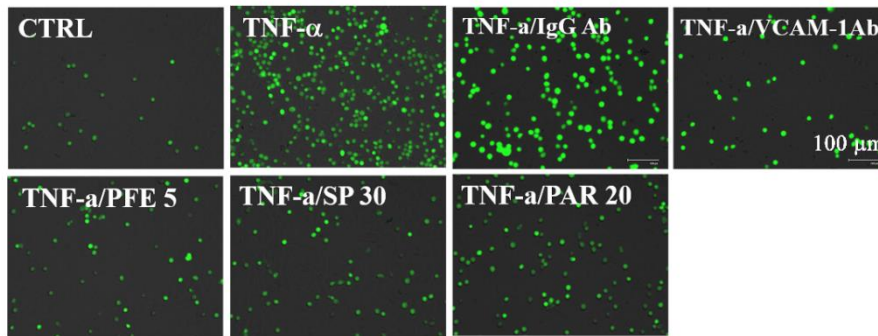




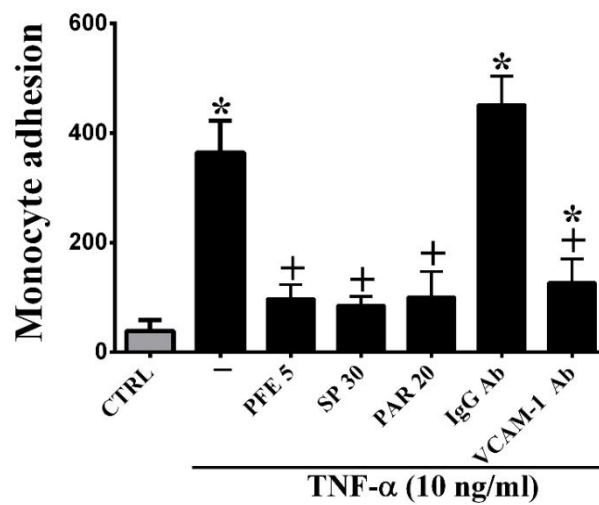
圖十二、PFE 可藉由抑制 JNK 或 NF- $\kappa$ B 磷酸化降低平滑肌細胞 VCAM-1 的表現量

將 serum starvation 處理後的 RSMC 預先處理 5  $\mu$ M PFE 1 小時，後續加入 10 ng/ml TNF- $\alpha$  處理 15 分鐘。(A) 西方墨點法結果顯示，PFE 組別有效降低 JNK 磷酸化的表現。(B) 在預先 5  $\mu$ M PFE (PFE 5) 及 30 nM SP600125 (SP 30) 處理 1 小時後，PFE 及 SP600125 能顯著抑制 10 ng/ml TNF- $\alpha$  誘發 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化的作用。(C) Reporter luciferase assay 顯示 PFE 及 SP600125 有助於抑制 NF- $\kappa$ B 與 promoter 結合的能力。(D) 西方墨點法觀察在 PFE、SP600125 及 20  $\mu$ M NF- $\kappa$ B p65 抑制劑 Parthenolide (PAR 20) 預先作用下有效抑制黏附因子 VCAM-1 蛋白表現量。結果顯示 JNK 抑制劑、NF- $\kappa$ B 抑制劑與 PFE 具有相似的抑制效果。\* $P < 0.05$  與 CTRL 組相比；+ $P < 0.05$  與 TNF- $\alpha$  組相比 (n=4)，數值均以 mean $\pm$ SD 表示。

A

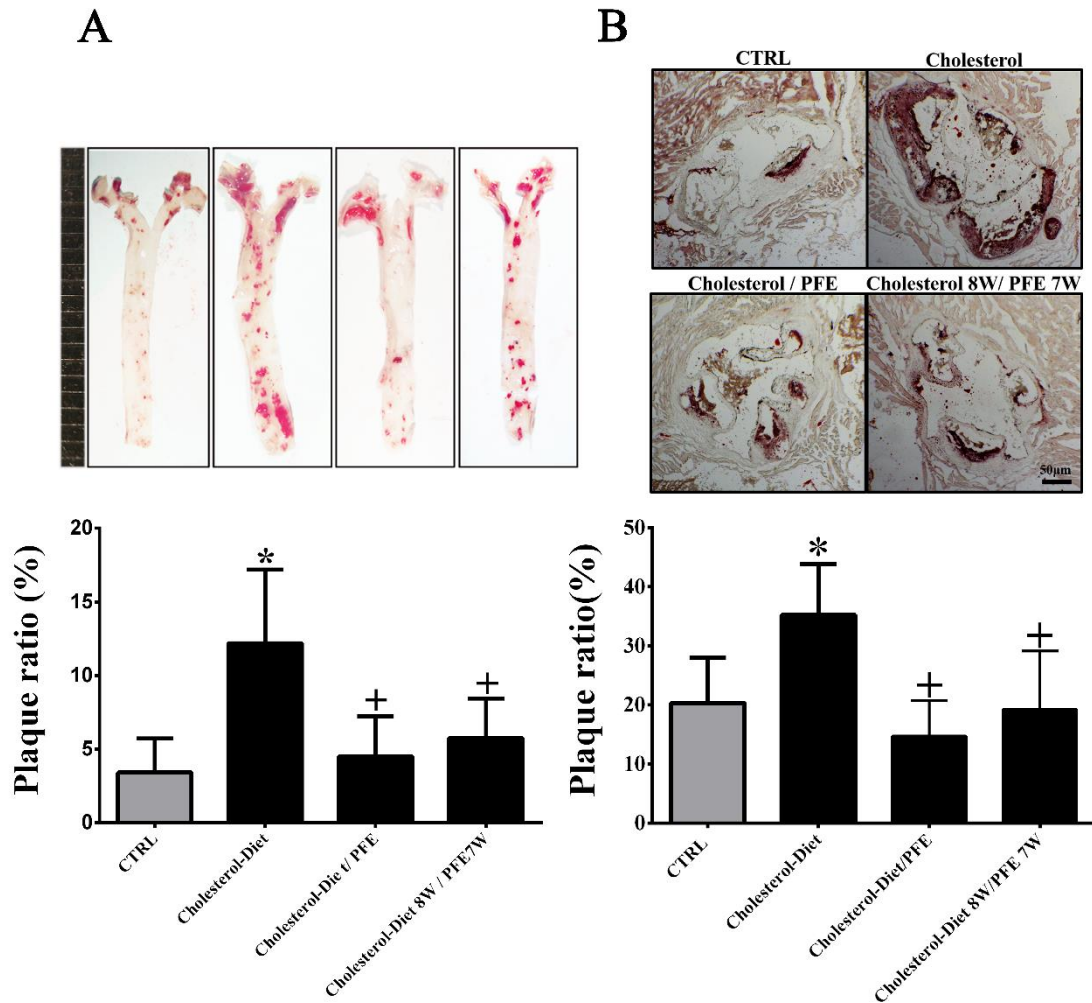


B



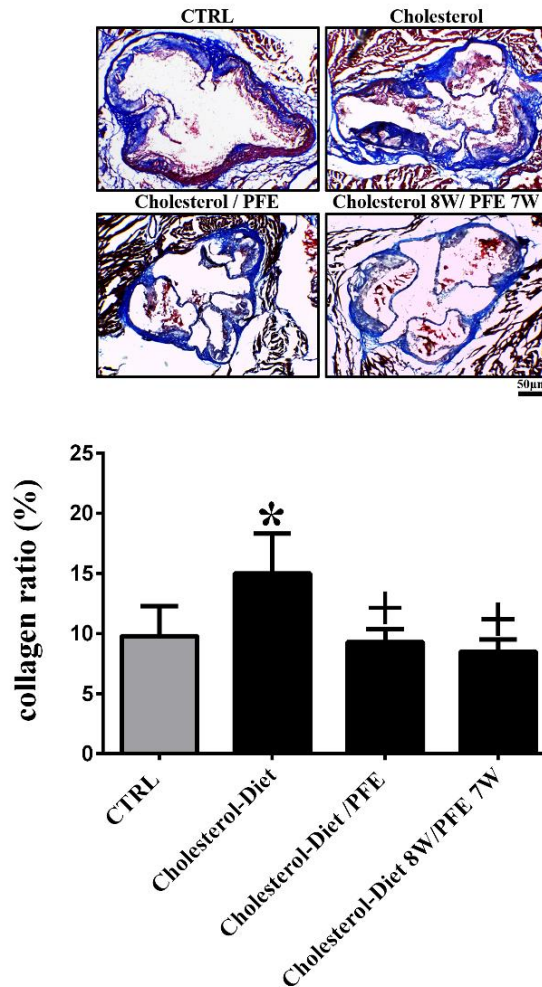
圖十三、 PFE 對於單核球黏附於平滑肌細胞的影響

將 RASMC 預先處理 5  $\mu$ M PFE (PFE 5)、30 nM SP600125 (SP 30)、20 nM Parthenolide (PAR 20)、1  $\mu$ g/ml IgG Ab 及 1  $\mu$ g/ml VCAM-1 Ab 小時，後續加入 10 ng/ml TNF- $\alpha$  處理 24 小時。接續與已標定螢光之單核球共同培養 1 小時並觀察黏附數量。(A、B)單核球黏附影像代表圖及數量統計圖。結果顯示，PFE 及 JNK 抑制劑預先處理而有效地降低單核球貼附於 RASMC 的數量。結果顯示，RASMC 經 TNF- $\alpha$  誘導的 VCAM-1 會隨著 PFE 和 JNK 及 NF- $\kappa$ B 抑制劑加入有效地降低單核球貼附於 RASMC 的細胞數量。\*P < 0.05 與 CTRL 組相比；+P < 0.05 與 TNF- $\alpha$  組相比(n=4)，數值均以 mean $\pm$ SD 表示。



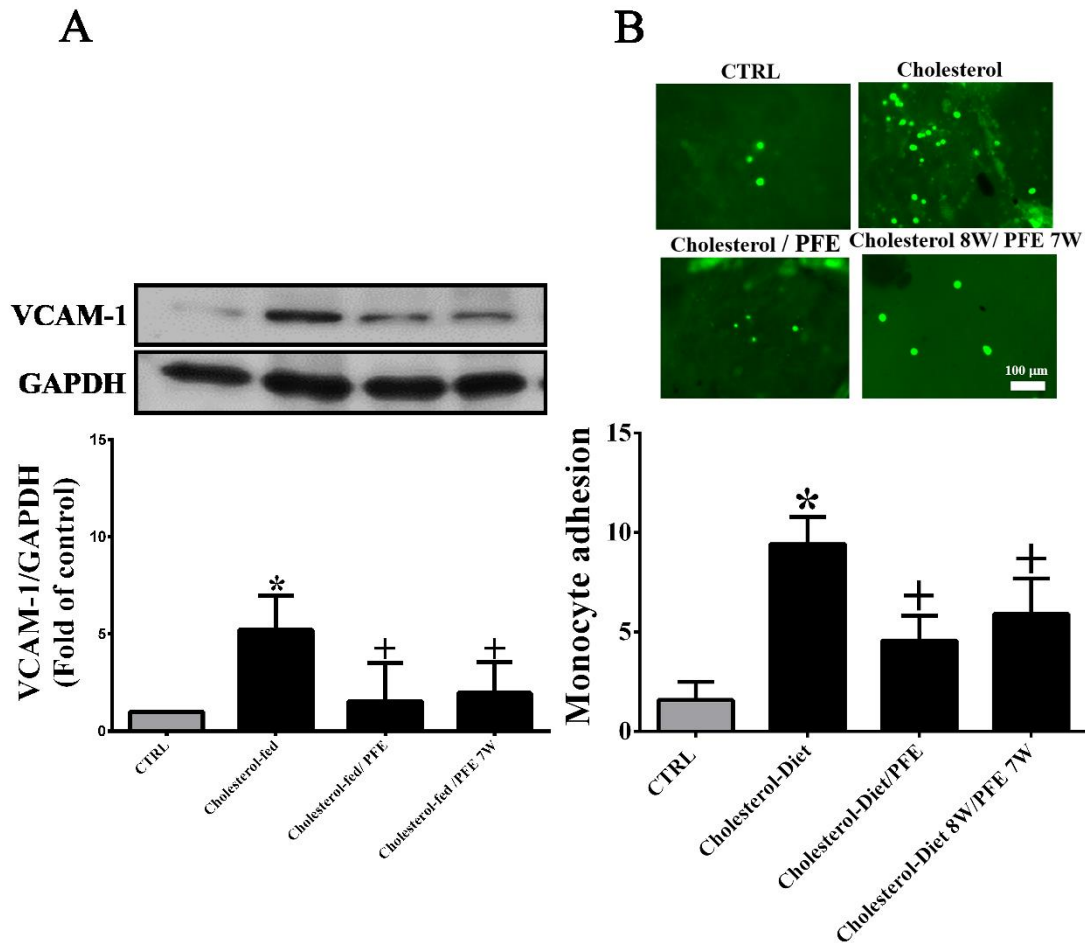
圖十四、 PFE 具有抑制動脈硬化斑塊積堆功能

將小鼠犧牲後，將主動脈及 Aortic sinus 分離並進行 ORO stain，觀察 PFE 是否具有抑制動脈硬化所產生之斑塊堆積的作用。(A)胸主動脈 ORO stain 影像代表圖片及統計圖；(B)Aortic sinus ORO stain 影像代表圖片及統計圖。結果顯示，與餵食一般飼料組(CTRL)相較下，餵食膽固醇組(Cholesterol Diet)具有顯著動脈硬化斑塊的產生及堆積；與 Cholesterol Diet 組相較下，在 PFE 餵食組部分，不論是預防(Cholesterol Diet /PFE)或治療組(Cholesterol Diet 8W/PFE 7W)都能有效抑制斑塊堆積。\*P < 0.05 與 CTRL 組相比；<sup>+</sup>P < 0.05 與 Cholesterol 組相比(n=6)，數值均以 mean±SD 表示。



圖十五、PFE 具有抑制動脈硬化細胞外基質堆積情形

利用馬森三色染色(Masson trichrome stain)，觀察 PFE 是否能減少動脈硬化所產生細胞外基質堆積情形。結果顯示，與餵食一般飼料組(CTRL)相較下，餵食膽固醇組(Cholesterol Diet)具有顯著細胞外基質堆積；與 Cholesterol Diet 組相較下，在 PFE 餵食組部分，不論是預防(Cholesterol Diet /PFE)或治療組(Cholesterol Diet 8W/PFE 7W)都能有效抑制細胞外基質堆積。\*P < 0.05 與 CTRL 組相比；+P < 0.05 與 Cholesterol 組相比(n=6)，數值均以 mean±SD 表示。



圖十六、PFE 能降低高膽固醇飲食誘發動脈產生 VCAM-1 及單核球細胞黏附的作用

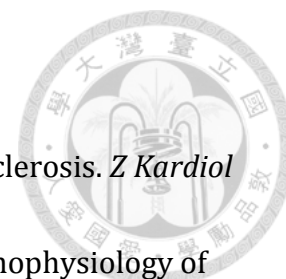
將小鼠犧牲並取出主動脈，利用西方墨點法(A)檢測黏附蛋白 VCAM-1 表現量，結果顯示，與餵食一般飼料組(CTRL)相較下，餵食膽固醇組(Cholesterol Diet)具有顯著增加 VCAM-1 表現量；與 Cholesterol Diet 組相較下，不論是預防(Cholesterol Diet /PFE)或治療組(Cholesterol Diet 8W/PFE 7W)都能有效抑制 VCAM-1 表現量。(B)藉由單核球黏附實驗，檢測單核球黏附於動脈的情形，結果顯示，單核球黏附結果與黏附蛋白 VCAM-1 表現量相似，不論是預防組(Cholesterol Diet/PFE)或治療組(Cholesterol Diet 8W/PFE 7W)都能有效減少單核球細胞黏附動脈內皮細胞表面的作用。\*P <0.05 與 CTRL 組相比；†P<0.05 與 Cholesterol 組相比(n=6-10)，數值均以 mean±SD 表示。

	CTRL	Cholesterol	Cholesterol /PFE	Cholesterol 8W/PFE 7W
Glucose(mg/dl)	212.6±10.7	288.9±14.9*	205.8±11.9†	229±7.8†
Triglyceride(mg/dl)	96.3±4.7	132.3±2.8*	119.2±6.4	120.6±2.9†
TC(mg/dl)	254±10.1	393.2±21.5*	331.8±13.1†	329.7±14.0†
HDL(mg/dl)	66.6±5.5	60.4±2.4	74.6±5.5†	84.3±6.6†
LDL(mg/dl)	188±10.9	324.4±25.2*	268.4±13.3†	245.1±16.4†

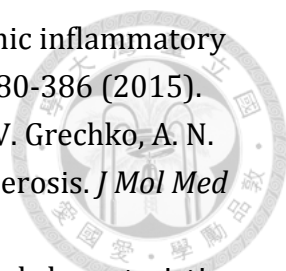
表一、 Apo E 缺陷小鼠血清生化值檢測

以 Apo E 缺陷小鼠經餵食高膽固醇飼料(Cholesterol)誘發動脈硬化發生為動物模式；將動物分為餵食一般飼料組(CTRL)、餵食高膽固醇飼料組(Cholesterol Diet)及餵食 PFE 組(cholesterol Diet/PFE or cholesterol Diet 8W/PFE 7W)，餵食 PFE 組可分為兩組，分別為預防組，同時餵食高膽固醇飼料及 PFE(cholesterolDiet /PFE)及治療組，先餵食高膽固醇飼料 8 週，再接續餵食 PFE 7 週 (cholesterol Diet 8W/PFE 7W)，在連續餵食 15 週後，犧牲小鼠、抽取禁食血，進行生化值檢測，檢測項目為血糖(Glucose)、三酸甘油脂(Triglyceride)、總膽固醇(Total Cholesterol; TC)、高密度脂蛋白(High density lipoprotein; HDL)及低密度脂蛋白(Low density lipoprotein; LDL)。\*P <0.05 與 CTRL 組相比；†P <0.05 與 Cholesterol Diet 組相比 (n=10-15)，數值均以 mean±SD 表示。

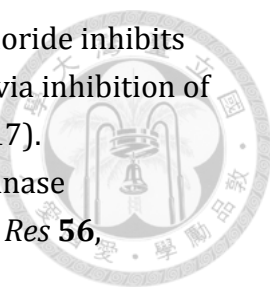
## 柒、參考文獻

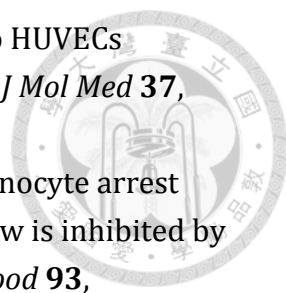


1. A. Mugge, The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Z Kardiol* **87**, 851-864 (1998).
2. N. Di Pietro, G. Formoso, A. Pandolfi, Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* **84**, 1-7 (2016).
3. Y. Zhao *et al.*, Atherosclerosis Induced by a High-Cholesterol and High-Fat Diet in the Inbred Strain of the Wuzhishan Miniature Pig. *Anim Biotechnol* **29**, 110-118 (2018).
4. G. Bazzoni, E. Dejana, Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* **84**, 869-901 (2004).
5. S. Moncada, A. Higgs, The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**, 2002-2012 (1993).
6. C. Gallego, D. Golenbock, M. A. Gomez, N. G. Saravia, Toll-like receptors participate in macrophage activation and intracellular control of Leishmania (Viannia) panamensis. *Infect Immun* **79**, 2871-2879 (2011).
7. Z. Q. Yan, G. K. Hansson, Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev* **219**, 187-203 (2007).
8. M. A. Gimbrone, Jr., G. Garcia-Cardena, Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* **118**, 620-636 (2016).
9. P. Shashkin, B. Dragulev, K. Ley, Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des* **11**, 3061-3072 (2005).
10. A. C. Newby, A. B. Zaltsman, Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* **41**, 345-360 (1999).
11. M. R. Bennett, S. Sinha, G. K. Owens, Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* **118**, 692-702 (2016).
12. A. G. Zaman, G. Helft, S. G. Worthley, J. J. Badimon, The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* **149**, 251-266 (2000).
13. V. W. van Hinsbergh, Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* **34**, 93-106 (2012).
14. C. Michiels, Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* **196**, 430-443 (2003).
15. R. Ross, Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126 (1999).

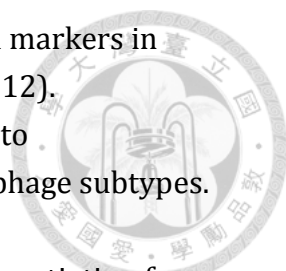
- 
16. P. Conti, Y. Shaik-Dasthagirisae, Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease mediated by mast cells. *Cent Eur J Immunol* **40**, 380-386 (2015).
  17. D. A. Chistiakov, A. A. Melnichenko, V. A. Myasoedova, A. V. Grechko, A. N. Orekhov, Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* **95**, 1153-1165 (2017).
  18. S. S. Rensen, P. A. Doevendans, G. J. van Eys, Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* **15**, 100-108 (2007).
  19. K. Peppel *et al.*, Activation of vascular smooth muscle cells by TNF and PDGF: overlapping and complementary signal transduction mechanisms. *Cardiovasc Res* **65**, 674-682 (2005).
  20. J. Thyberg, Phenotypic modulation of smooth muscle cells during formation of neointimal thickenings following vascular injury. *Histol Histopathol* **13**, 871-891 (1998).
  21. B. Westermann, Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta* **1817**, 1833-1838 (2012).
  22. S. Lee *et al.*, Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem* **282**, 22977-22983 (2007).
  23. C. R. Chang, C. Blackstone, Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci* **1201**, 34-39 (2010).
  24. C. Scheede-Bergdahl, A. Bergdahl, Adaptation of mitochondrial expression and ATP production in dedifferentiating vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* **95**, 1473-1479 (2017).
  25. R. J. Orton *et al.*, Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J* **392**, 249-261 (2005).
  26. D. K. Morrison, MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
  27. K. Sabapathy, Role of the JNK pathway in human diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* **106**, 145-169 (2012).
  28. X. Sui *et al.*, p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett* **344**, 174-179 (2014).
  29. F. Gao *et al.*, Involvement of the MEK-ERK/p38-CREB/c-fos signaling pathway in Kir channel inhibition-induced rat retinal Muller cell gliosis. *Sci Rep* **7**, 1480 (2017).



- 
30. M. Wang, Z. J. Shu, Y. Wang, W. Peng, Stachydrine hydrochloride inhibits proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells via inhibition of Akt and ERK pathways. *Am J Transl Res* **9**, 1834-1844 (2017).
31. J. Avruch *et al.*, Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* **56**, 127-155 (2001).
32. A. Cuadrado, A. R. Nebreda, Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* **429**, 403-417 (2010).
33. M. P. de Winther, E. Kanters, G. Kraal, M. H. Hofker, Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 904-914 (2005).
34. P. S. Khushboo, V. M. Jadhav, V. J. Kadam, N. S. Sathe, Psoralea corylifolia Linn.-"Kushtanashini". *Pharmacogn Rev* **4**, 69-76 (2010).
35. X. Li *et al.*, New Application of Psoralen and Angelicin on Periodontitis With Anti-bacterial, Anti-inflammatory, and Osteogenesis Effects. *Front Cell Infect Microbiol* **8**, 178 (2018).
36. Y. Wang, C. Hong, C. Zhou, D. Xu, H. B. Qu, Screening Antitumor Compounds Psoralen and Isopsoralen from Psoralea corylifolia L. Seeds. *Evid Based Complement Alternat Med* **2011**, 363052 (2011).
37. G. Xiao *et al.*, Isolation of antioxidants from Psoralea corylifolia fruits using high-speed counter-current chromatography guided by thin layer chromatography-antioxidant autographic assay. *J Chromatogr A* **1217**, 5470-5476 (2010).
38. Y. L. Hung *et al.*, Corylin protects LPS-induced sepsis and attenuates LPS-induced inflammatory response. *Sci Rep* **7**, 46299 (2017).
39. M. L. Ferrandiz *et al.*, Effect of bakuchiol on leukocyte functions and some inflammatory responses in mice. *J Pharm Pharmacol* **48**, 975-980 (1996).
40. S. Y. Choi *et al.*, Isolation and anti-inflammatory activity of Bakuchiol from Ulmus davidiana var. japonica. *J Med Food* **13**, 1019-1023 (2010).
41. S. F. Zaidi, K. Yamada, M. Kadowaki, K. Usmanghani, T. Sugiyama, Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against Helicobacter pylori. *Journal of ethnopharmacology* **121**, 286-291 (2009).
42. B. Chopra, A. K. Dhingra, K. L. Dhar, Psoralea corylifolia L. (Buguchi) - folklore to modern evidence: review. *Fitoterapia* **90**, 44-56 (2013).
43. Y. M. Kim *et al.*, Compound C independent of AMPK inhibits ICAM-1 and VCAM-1 expression in inflammatory stimulants-activated endothelial cells in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* **219**, 57-64 (2011).

- 
44. Y. Wang *et al.*, Artemisinin inhibits monocyte adhesion to HUVECs through the NF-kappaB and MAPK pathways in vitro. *Int J Mol Med* **37**, 1567-1575 (2016).
45. K. S. Weber, G. Draude, W. Erl, R. de Martin, C. Weber, Monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow is inhibited by adenovirus-mediated gene transfer of IkappaB-alpha. *Blood* **93**, 3685-3693 (1999).
46. V. Ferreira *et al.*, Macrophage-specific inhibition of NF-kappaB activation reduces foam-cell formation. *Atherosclerosis* **192**, 283-290 (2007).
47. A. Rudijanto, The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones* **39**, 86-93 (2007).
48. J. L. Johnson, Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **103**, 452-460 (2014).
49. G. Torres *et al.*, Glucagon-like peptide-1 inhibits vascular smooth muscle cell dedifferentiation through mitochondrial dynamics regulation. *Biochem Pharmacol* **104**, 52-61 (2016).
50. A. C. Newby, Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* **69**, 614-624 (2006).
51. J. Hu, P. E. Van den Steen, Q. X. Sang, G. Opdenakker, Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 480-498 (2007).
52. Z. S. Galis *et al.*, Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res* **91**, 852-859 (2002).
53. J. Kim *et al.*, The role of heat shock protein 90 in migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in the development of atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* **72**, 157-167 (2014).
54. S. Lim, S. Park, Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB Rep* **47**, 1-7 (2014).
55. J. Y. Kim *et al.*, Sulforaphane suppresses vascular adhesion molecule-1 expression in TNF-alpha-stimulated mouse vascular smooth muscle cells: involvement of the MAPK, NF-kappaB and AP-1 signaling pathways. *Vascul Pharmacol* **56**, 131-141 (2012).
56. K. W. Choi *et al.*, Inhibition of TNF-alpha-induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via

- downregulation of the MAPK, Akt and NF-kappaB signaling pathways. *Vascul Pharmacol* **53**, 273-280 (2010).
57. M. Zerfaoui *et al.*, Nuclear translocation of p65 NF-kappaB is sufficient for VCAM-1, but not ICAM-1, expression in TNF-stimulated smooth muscle cells: Differential requirement for PARP-1 expression and interaction. *Cell Signal* **20**, 186-194 (2008).
58. B. Park, J. H. Yim, H. K. Lee, B. O. Kim, S. Pyo, Ramalin inhibits VCAM-1 expression and adhesion of monocyte to vascular smooth muscle cells through MAPK and PADI4-dependent NF-kB and AP-1 pathways. *Biosci Biotechnol Biochem* **79**, 539-552 (2015).
59. E. Galkina, K. Ley, Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (\*). *Annu Rev Immunol* **27**, 165-197 (2009).
60. E. Adiguzel, P. J. Ahmad, C. Franco, M. P. Bendeck, Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. *Vasc Med* **14**, 73-89 (2009).
61. M. J. Barnes, R. W. Farndale, Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol* **34**, 513-525 (1999).
62. K. Ley, Y. Huo, VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest* **107**, 1209-1210 (2001).
63. H. M. Kwon *et al.*, Anti-inflammatory inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by flavone derivatives. *J Agric Food Chem* **53**, 5150-5157 (2005).
64. R. R. Cobb, K. A. Felts, G. C. Parry, N. Mackman, Proteasome inhibitors block VCAM-1 and ICAM-1 gene expression in endothelial cells without affecting nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. *Eur J Immunol* **26**, 839-845 (1996).
65. A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra, Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* **5**, e47 (2016).
66. Y. Wang *et al.*, NF-kB activity-dependent P-selectin involved in ox-LDL-induced foam cell formation in U937 cell. *Biochem Biophys Res Commun* **411**, 543-548 (2011).
67. A. Schwarz, G. A. Bonaterra, H. Schwarzbach, R. Kinscherf, Oxidized LDL-induced JAB1 influences NF-kappaB independent inflammatory signaling in human macrophages during foam cell formation. *J Biomed Sci* **24**, 12 (2017).
68. K. J. Moore, F. J. Sheedy, E. A. Fisher, Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* **13**, 709-721 (2013).

- 
69. J. L. Stoger *et al.*, Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* **225**, 461-468 (2012).
70. S. A. Isa *et al.*, M2 macrophages exhibit higher sensitivity to oxLDL-induced lipotoxicity than other monocyte/macrophage subtypes. *Lipids Health Dis* **10**, 229 (2011).
71. J. W. Seo, E. J. Yang, K. H. Yoo, I. H. Choi, Macrophage Differentiation from Monocytes Is Influenced by the Lipid Oxidation Degree of Low Density Lipoprotein. *Mediators Inflamm* **2015**, 235797 (2015).
72. J. L. Beaudoux, P. Giral, E. Bruckert, M. J. Foglietti, M. J. Chapman, [Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. Therapeutic aspects]. *Ann Biol Clin (Paris)* **61**, 147-158 (2003).
73. A. H. Sprague, R. A. Khalil, Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* **78**, 539-552 (2009).