

國立臺灣大學醫學院解剖學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

厚朴酚增加 TNF- $\alpha$  處理之內皮細胞與 Apo-E 缺乏小鼠  
動脈的 heme oxygenase-1 表現

Magnolol increases the expression of heme oxygenase-1  
in tumor necrosis factor- $\alpha$ -treated endothelial cells and  
aortas of Apo-E deficient mice

吳珮甄

Pei-Jhen Wu

指導教授：陳玉怜 博士

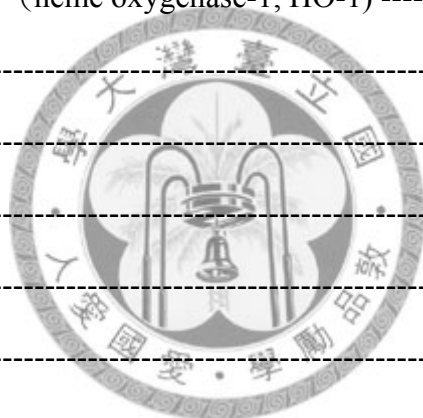
Advisor: Yuh-Lien Chen, Ph.D.

中華民國 98 年 7 月

July, 2009

# 目 錄

誌謝-----	i
中文摘要-----	ii
英文摘要-----	iii
壹、緒論-----	1
一、動脈硬化 (atherosclerosis) 與內皮細胞的關係-----	1
二、動脈硬化與腫瘤壞死因子的關係-----	3
三、動脈硬化和 mitogen activated protein kinases (MAPKs) 的關係-----	3
四、動脈硬化與轉錄因子的關係-----	4
五、血基質氧化酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) -----	4
六、厚朴酚-----	7
七、研究動機-----	9
貳、實驗材料-----	10
參、實驗方法-----	18
肆、實驗結果-----	27
伍、結論與討論-----	31
陸、附圖-----	35
柒、參考資料-----	45



## 致謝

兩年的時間似乎一下就過了，這篇論文能順利完成，首先要感謝我的指導教授- 陳玉伶老師，在這段期間在課業上及生活上給我的教導，對我的包容及鼓勵，也學習到做事應有的態度；此外，也感謝王淑美老師、姜安娜老師與陳永祥老師，給我許多寶貴的意見及想法，使我受益良多，更因為老師們的建議，讓學生的論文更加完整。

感謝實驗室的學姊-淑慧學姊、奕奕學姊，不論在實驗及待人處事方面讓我有所成長，也謝謝展榮學長在短短的時間中給我許多寶貴的建議及想法，此外也多謝郁雯學妹，每每在我實驗遇到瓶頸時帶來許多歡樂；同時也要感謝佳洳學姊、馨瑩學姊、阿美學姊及所上諸位老師及學長姐平時的照顧，及 R96 級同學的陪伴，因為有你們讓我的生活增添許多樂趣。

最後謝謝我的家人，因為你們的支持讓我能無後顧之憂的完成研究所學業，也多謝一起在台北念書或工作的好朋友們，因為有你們的陪伴讓我的生活並不孤單。

要感謝的人太多，謝謝曾經幫助過我的師長、學長姐、同學及好朋友們，還有我的家人，在此與你們共同分享這份喜悅與榮耀。

## 中文摘要

厚朴酚是從 *Magnolia officinalis* 萃取出來的化合物，長久以來被用來治療發熱、頭痛、焦慮、腹瀉及氣喘。厚朴酚已有諸多藥理應用，包括治療缺血再灌注損傷，也發現厚朴酚具有很強的抗氧化力及抗發炎的功效。血基質氧化酶-1 可以將血基質分解成一氧化碳、鐵離子及膽綠素，在細胞中有重要的抗氧化能力。血基質氧化酶藉由防止細胞凋亡保護內皮細胞，可以調節血管緊張度，抑制血管壁的發炎反應，表示血基質氧化酶-1 可能具有治療心血管疾病的潛能，所以本研究目的在於探討厚朴酚對 TNF- $\alpha$  刺激人類主動脈內皮細胞內的血基質氧化酶-1 是否有調節作用，並探討其相關訊息傳遞路徑，也以 Apo-E 缺乏小鼠模擬動脈硬化病變模式，探討厚朴酚是否能降低 TNF- $\alpha$  刺激 Apo-E 缺乏小鼠體內的氧化壓力以及對於血基質氧化酶-1 的表現是否有調控的作用。實驗結果顯示：投予 TNF- $\alpha$  可抑制人類主動脈內皮細胞中血基質氧化酶-1 的表現，而先以厚朴酚處理再投予 TNF- $\alpha$ ，則可回復受到 TNF- $\alpha$  抑制的血基質氧化酶-1 表現。實驗結果也發現 TNF- $\alpha$  刺激會增加人類主動脈內皮細胞中 ERK、JNK、p38 的磷酸化，以厚朴酚處理細胞，再用 TNF- $\alpha$  刺激，則可降低受到 TNF- $\alpha$  刺激所增加的 ERK、JNK、p38 的磷酸化。實驗進一步發現加入 PD98059 (ERK 抑制劑) 及 SP600125 (JNK 抑制劑)，再加入 TNF- $\alpha$  刺激會降低血基質氧化酶-1 的表現；而加入 SB203580 (p38 抑制劑) 處理，再以 TNF- $\alpha$  刺激後則有上升的趨勢。在轉錄因子部分：發現 TNF- $\alpha$  刺激會增加人類主動脈內皮細胞中 NF- $\kappa$ B 的表現，而先以厚朴酚處理，再以 TNF- $\alpha$  刺激則會抑制 NF- $\kappa$ B 的表現。另外以 Apo-E 缺乏小鼠動脈血管壁切片中發現，單獨以 TNF- $\alpha$  刺激組，其 ROS 的表現量有增加的現象，而先給予厚朴酚再以 TNF- $\alpha$  刺激組，ROS 的表現量有下降的趨勢，單獨給予厚朴酚組，ROS 表現量也有下降的現象。另外，在組織免疫染色部分，給予厚朴酚再受到 TNF- $\alpha$  刺激組，其血管斑塊處的血基質氧化酶-1 表現會上升。綜合上述實驗結果得知：厚朴酚會調節 TNF- $\alpha$  所抑制血基質氧化酶-1 的表現，顯示厚朴酚對動脈硬化或發炎反應的治療有很大助益。

## Abstract

Magnolol, a compound extracted from *Magnolia officinalis*, has long been used for the treatment of fever, headache, anxiety, diarrhoea, asthma, and stroke. It also exerts antithrombotic, anti-inflammatory and analgesic effects. A number of other pharmacological effects of magnolol have also been demonstrated, including prevention of ischemic-reperfusion injury, and, most importantly, strong antioxidant activity. More recently, it has been shown to effectively prevent neointimal hyperplasia in the balloon-injured aorta of cholesterol-fed rabbits. Heme oxygenase-1 (HO-1), an enzyme degrading heme to carbon monoxide, iron, and biliverdin, has been recognized as playing a crucial role in cellular defense against stressful conditions, not only related to heme release. HO-1 protects endothelial cells from apoptosis, is involved in blood-vessel relaxation regulating vascular tone, attenuates inflammatory response in the vessel wall, and participates in blood-vessel formation by means of angiogenesis and vasculogenesis. The purpose of this study was aimed to examine the effects of TNF- $\alpha$  on HO-1 expression in HAECs, and the effect of magnolol as a potential therapeutic agent, and the mechanisms involved in the effects of magnolol or TNF- $\alpha$  on HO-1 expression. In the present study, TNF- $\alpha$  treatment reduced HO-1 expression in HAECs as well as in Apo-E deficient mice. Magnolol increased the expression of HO-1 in TNF- $\alpha$ -treated HAECs. Phosphorylation studies of ERK1/2, JNK, and p38, three

subgroups of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) demonstrated that magnolol suppressed TNF- $\alpha$ -induced ERK1/2, JNK, and p38 phosphorylation. In the transcription level, magnolol suppressed TNF- $\alpha$ -treated NF- $\kappa$ B expression. In addition, magnolol effectively attenuated TNF- $\alpha$ -induced ROS production in Apo-E deficient mice. These results suggest that magnolol has a therapeutic potential in cardiovascular diseases through the upregulation of HO-1 expression.



## 壹、緒論

### 一、動脈硬化 (atherosclerosis) 與內皮細胞 (endothelial cells)的關係

近年來由於社會生活水準提高，飲食習慣西化及生活型態改變，國人罹患慢性疾病的比例也日益增加，根據衛生署公布的國人97年十大死因，心臟疾病、腦血管疾病分別居於第二、第三，這些皆屬於動脈硬化併發的相關疾病，顯示與動脈硬化相關的疾病對國人生命造成極大傷害，因此進行深入了解動脈硬化的形成機制的相關研究，以預防心血管疾病發生是刻不容緩的。

目前動脈硬化發生機制普遍認為是由於血管受損及脂蛋白 (lipoprotein) 氧化所造成。動脈硬化的病理特徵目前大致上可分為五個階段：(1) 血管內層增厚 (intimal thickening)；(2) 脂肪條 (fatty streak)；(3) 中度損害 (intermediate lesion)；(4) 纖維性斑塊 (fibrous plaque)；(5) 複雜性損害 (complicated lesion) (Ng and Hegele, 1993)。關於動脈硬化致病機轉的學說相當多，Ross 在 1973 年首次提出內皮細胞受傷後反應學說 (response to injury hypothesis)，可以解釋動脈硬化在生理及病理上的各種現象 (Ross and Glomset, 1973)。1990 年 Ross 提出動脈硬化是一種慢性發炎反應的疾病 (Ross, 1990)。血管內皮細胞位於血管壁的最內層，直接和血流接觸，是血管和血液之間的屏障。當血管中的內皮細胞受到血流機械力，如高血壓、執行氣球擴充術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)，或是受到血液中化學物質，如自由基、尼古丁，或是受到病毒、細菌、輻射、化學性傷害，及高血糖等刺激，都會造成內皮細胞功能失調 (dysfunction)，進而造成內皮細胞通透性改變。功能受損的內皮細胞會在細胞表面分泌一種黏附性的醣蛋白 (adhesive glycoprotein)，包括 E-selectin、血管細胞黏附分子 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、細胞間黏附分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 等，此類醣蛋白會和血液中的單核球 (monocyte) 及 T-淋巴球 (T-lymphocyte) 上的特殊受器結合，此外，內皮細胞通透性增加可造成大分子物質，如低密度脂蛋

白 (Steinberg et al., 1989) 可以進入內皮下空間 (subendothelial space)。低密度脂蛋白在內皮下空間會受到自由基，如超氧化物 (superoxide,  $O_2^-$ )、氫氧基 (hydroxyl radical,  $\cdot OH$ )、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 及非自由基氧化劑，如氧化氫 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )、臭氧 (ozone,  $O_3$ ) 等物質進行氧化反應，形成氧化低密度脂蛋白 (oxidized-low density lipoprotein, ox-LDL)。而 ox-LDL 會刺激內皮細胞及平滑肌細胞釋放多種趨化物質，如單核球化學趨附蛋白質-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 及轉型生長因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )，使單核球移行到內皮下空間並分化成巨噬細胞 (macrophage)，這些巨噬細胞會吞噬堆積在此處的 ox-LDL 而形成泡沫細胞 (foam cell) (Steinberg et al., 1989; Witztum and Steinberg, 1991; Holvoet and Collen, 1994)；而泡沫細胞會釋放更多的生長因子，如血小板衍生之生長因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 以及促發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokine)，如介白質-1 (interleukin-1, IL-1)、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF)(Old, 1985) 等，持續的慢性發炎反應使病灶處更加惡化。在動脈硬化過程中，血管中層的平滑肌細胞會移行到內膜層，而吞噬 ox-LDL 的巨噬細胞轉變成泡沫細胞後也堆積在內膜層，隨後泡沫細胞反覆的堆積再加上結締組織增生形成脂肪條 (fatty streak)，若動脈硬化持續發生則會產生動脈纖維性斑塊 (fibrous plaque)，進而造成動脈血管阻塞的症狀。

## 二、動脈硬化與腫瘤壞死因子 (Tumor Necrosis Factor) 的關係

細胞激素 (cytokine) 是細胞內負責訊息傳遞的一種重要分子，包括蛋白質、多肽類 (peptides) 及醣蛋白 (glycoproteins)。細胞激素是透過先天性免疫 (innate immune) 或是適應性免疫 (adaptive immune) 由免疫細胞分泌產生，可透過自泌性 (autocrine)、旁泌性 (paracrine) 或是內泌性 (endocrine) 產生作用。細胞激素包括介白質 (interleukin)、趨化素 (Hess et al., 2009)、干擾素 (interferon) 及腫瘤壞死因子等。TNF 分為兩類，TNF- $\alpha$  及 TNF- $\beta$ ，TNF- $\beta$  是由  $CD8^+$  T-淋巴球所分泌的淋巴



毒素 (lymphotoxin)，會在被病毒感染的細胞膜上打洞，使細胞死亡。

TNF- $\alpha$  在 1975 年由 Carswell 等人發現以來，便引起廣泛的研究 (Carswell et al., 1975)；目前研究發現 TNF- $\alpha$  與細胞增生、分化、凋亡、調節免疫反應及引發發炎反應有關 (Wajant et al., 2003)。TNF- $\alpha$  是一個同型三倍體 (homotrimer)，次單位分子量為 17 kDa (Zhan et al., 2003)，在其他發炎因子 (如 lipopolysaccharide、IL-1、IL-6) 刺激下，主要會由巨噬細胞分泌，其他種類細胞如內皮細胞、心肌細胞及脂肪細胞，也會產生 TNF- $\alpha$  (Aggarwal, 2000)。TNF- $\alpha$  活化可使內皮細胞通透性增加，並引起各種細胞黏附因子如 E-selectin、VCAM-1 與 ICAM-1 的表現 (Carlos et al., 1990)。TNF- $\alpha$  有兩種受器：TNFR1 與 TNFR2，其中 TNFR1 表現在大部分的細胞中，是主要的受器 (Loetscher et al., 1990)。TNF- $\alpha$  和受器結合後會活化兩個主要的轉錄因子 (transcription factor)：nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 及 activator protein-1 (AP-1)，啟動下游與發炎反應相關的基因表現 (Sakon et al., 2003)。

### 三、動脈硬化和 mitogen activated protein kinases (MAPKs) 的關係

Mitogen-activated protein kinases 是 serine/threonine 特異性蛋白激酶，當細胞受到外來刺激時，會藉由活化細胞內的激酶 (kinase) 及去磷酸酶 (phosphatase) 產生反應，例如：影響細胞基因表現 (gene expression)、有絲分裂 (mitosis)、分化 (differentiation)、細胞生存 (cell survival) 及凋亡 (apoptosis) 等 (Pearson et al., 2001)。目前已知有三條同源異構且平行的 MAPKs 訊息傳遞路徑和細胞受刺激後的反應有密切關係 (Huot et al., 1997)。這三條 MAPKs 訊息傳遞路徑分別是 (1) JNK/SAPK (stress-activated protein kinase)，(2) p38MAPK，(3) ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2)。JNK 可被上游的 Cdc42/Rac 活化，被活化後的 JNK 會活化轉錄因子 AP-1 並調節 AP-1 的功能，目前已有研究發現當內皮細胞受到生長激素或細胞激素 (如 TNF- $\alpha$ ) 刺激後，JNK 會大量活化 (Kyriakis and Avruch, 1996)，而有研究發現，加入 SP600125 (JNK 抑制劑)，會顯著增加 ROS 誘

導的細胞凋亡現象 (Torres et al., 2008)。p38 MAPK 具有四種異構體：p38 $\alpha$ 、p38 $\beta$ 、p38 $\gamma$  及 p38 $\delta$ ，當 p38 kinase subdomainVIII 上的 Tyr 被磷酸化時，p38 即被活化並進一步活化下游的轉錄因子。在 cytokine 的刺激下，p38 及 JNK 均會被活化，傳遞細胞凋亡的訊息，Kang 等學者在 2008 年提出在腫瘤細胞的細胞凋亡過程中，需要透過 ROS 使 p38 活化，啟動下游反應 (Kang and Lee, 2008)。也有研究報告指出，由粒腺體產生之 ROS 來導致細胞凋亡亦需要藉由活化 p38 (Noguchi et al., 2008)。ERK 目前已知有兩種異構體：ERK1 及 ERK2，當細胞受到生長激素、細胞素、荷爾蒙等的刺激時，ERK 會被活化，已有研究報告指出活化 ERK 會促使細胞釋放出 ROS，產生非凋亡性的細胞死亡 (Yagoda et al., 2007)，ERK 活化也會促進下游轉錄因子 NF- $\kappa$ B 以調節細胞激素的表現 (Karin, 1996)。

#### 四、動脈硬化與轉錄因子的關係

動脈硬化形成與體內氧化壓力有關，而和氧化壓力相關的轉錄因子主要 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 (Pober and Min, 2006)。這些轉錄因子通常存在於細胞質中，當細胞受到刺激時，細胞內的 protein kinase C 會磷酸化並進一步使下游轉錄因子活化，使這些轉錄因子啟動相關基因表現並轉譯出 mRNA 及蛋白質，進而調控細胞內發炎反應。先前已有研究指出利用 TNF- $\alpha$  刺激內皮細胞，會透過活化 NF- $\kappa$ B 使細胞內 ROS 及黏附因子的表現量大量增加 (Hess et al., 2009)。

#### 五、血基質氧化酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)

熱休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 在 1962 年由 Ritossa 等人發現，是由高溫環境使果蠅唾液腺細胞的染色體有蓬鬆的現象，此現象稱為熱休克反應，而所衍生的蛋白質就稱做熱休克蛋白 (RITOSSA, 1962)。在原核及真核生物中都有熱休克蛋白，從細菌到哺乳類都有表現，是維持生命所需要的蛋白質。細胞透過活化

熱休克蛋白，減少細胞內變性蛋白質的累積或修復變性的蛋白質，並增加細胞對於外界刺激的抵抗力 (Latchman, 2004)。

血基質氧化酶 (Dulak et al., 2008) 是熱休克蛋白家族的一員，也稱為壓力反應蛋白 (stress-response protein)。HO 是血基質 (heme) 代謝過程中的酵素限制酶 (rate-limiting enzyme)，可將血基質代謝成等量的鐵離子、一氧化碳以及膽綠質 (Maines, 1997)。膽綠質再藉由膽綠質還原酶轉換成膽紅素 (Kawamura et al., 2005)。HO-1 的產物具有許多生物活性，膽綠素及膽紅素之間透過膽綠素還原酶及 ROS 轉換，這兩種產物能藉由清除 ROS 的機制，產生抗氧化、抗發炎 (Sue et al., 2009)、抗凋亡 (Miralem et al., 2005) 及促進血管新生的效用 (Deramaudt et al., 1998)；鐵離子能藉由 ferritin synthesis iron ATP-ase pump，產生抗氧化、抗發炎以及抑制細胞凋亡的功能 (Ryter et al., 2006)；一氧化碳則能透過活化 p38 MAP kinase、調控鈣離子依賴型鉀離子通道 ( $\text{Ca}^{+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  channels) 或增加血管內皮細胞生長因子 (vascular endothelial growth factors) 表現量，產生抑制細胞凋亡、抑制細胞增生、抗血栓形成、抗發炎以及促進血管新生的功效 (Dulak et al., 2008)。血紅素氧化酶有兩種亞型，包含誘導型 (inducible) 的 HO-1 及本質型 (constitutive form) 的 HO-2。HO-1 是 32-kDa 的蛋白質，在哺乳類動物組織中受到血基質、重金屬或是生長因子 (例如：TGF- $\beta$ 、PDGF、VEGF) 等刺激時會大量表現 (Sikorski et al., 2004)。HO-1 主要分布在脾、肝臟、骨髓等單核巨噬系統，其中以脾臟內的 HO-1 活性最高，以因應身體內血基質代謝所需，維持基礎的生理機能。

*HO-1* 基因啟動子 (promotor) 上有許多轉錄因子共有序列結合位置 (consensus binding sites)，包括 Nrf-2、AP-1、AP-2、NF- $\kappa$ B、STAT 及 HNF-1 等 (Ryter et al., 2006)。其中 Nrf-2 (nuclear-factor-erythroid 2 related factor) 能誘導基因轉錄表現二期解毒酵素 (phase II detoxifying enzymes) 及抗氧化蛋白 (Alam et al., 1999)。2007 年 Levonen 等學者提出，利用腺病毒載體 (adenoviral delivery) 將 Nrf-2 送入血管平滑肌細胞 (Christou et al., 2005) 中，能增加多種抗氧化蛋白表現量，其

中包括 HO-1。過量表現 Nrf-2 能透過增加 HO-1 表現來抑制血管平滑肌增生，而經過血管修復術 (angioplasty) 後，過量表現 Nrf-2 能有效降低氧化壓力及血管發炎反應 (Levonen et al., 2007)。

已有報告指出 HO-1 具有抗細胞凋亡效應，過度表現 HO-1 可避免 TNF- $\alpha$  刺激所產生的纖維母細胞或內皮細胞凋亡 (Petrache et al., 2000)，HO-1 也可增加抗細胞凋亡蛋白 Bcl-1 表現，增加血管內皮細胞、血管平滑肌細胞、纖維母細胞及肝細胞對抗外來刺激引發細胞凋亡的能力 (Katori et al., 2002)。也有報告指出血基質的代謝物與 HO-1 的過度表現會直接或是間接影響發炎反應，HO-1 能透過降低內皮細胞黏附因子 (endothelial cell adhesion molecule) 與趨化因子 (chemotactic factor) 的表現影響嗜中性白血球 (Lee et al., 2001) 及單核球 (monocyte) 黏附至發炎區域 (Vachharajani et al., 2000)。由於動脈硬化被視為一種慢性發炎疾病，HO-1 被認為有保護動脈硬化產生的效果。研究報告指出，缺乏 HO-1 基因的六歲孩童，血管壁已有脂肪條及斑塊產生，血液中三酸甘油脂的比例也很高 (Yachie et al., 1999)，HO-1 受到 ox-LDL 誘導會表現在血管壁斑塊上 (Ishikawa et al., 1997; Wang et al., 1998)，HO-1 缺乏小鼠 ROS 及發炎前趨因子表現量均會增加，進而導致脂質攝取量提高與泡沫細胞生成 (Orozco et al., 2007)，同時具有 HO-1 及 ApoE 缺陷的小鼠動脈硬化病徵比單獨 ApoE 缺陷小鼠嚴重 (Perrella and Yet, 2003b)，在 2008 年 Cao 等學者提出抗氧化基因治療能降低心血管疾病發生，過量表現 HO-1 能降低心肌梗塞壞死區域、降低血壓以及抑制血管再狹化 (Cao et al., 2008)；另有報告指出增加 HO-1 的活性對於移植器官排斥反應有保護作用，在胰臟移植模式中 HO-1 能抑制透過 Fas 的細胞凋亡，保護胰島細胞 (pancreatic islet cells) (Perrella and Yet, 2003a)，而在大鼠的肝移植模式中，HO-1 能在移植早期藉由增加第二型輔助性 T 淋巴細胞依賴性細胞激素 (Th2-dependent cytokines) 如介白質-4 (interleukin-4, IL-4)、介白質-10 (interleukin-10, IL-10)，抑制干擾素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 及介白質-2 (interleukin-2, IL-2) (Ke et al., 2001) 產生，在 2009 年 Ma 等學者利用重組的

HO-1 (recombinant HO-1) 送入大鼠的冷保存心臟移植 (cold-preserved heart grafts) 的間質細胞 (parenchyma cells) 中，發現能明顯降低嗜中性白血球與巨噬細胞浸潤，也能明顯抑制再灌注損傷 (ischaemic-reperfusion injury) 後心肌細胞凋亡的現象(Ma et al., 2009)。

## 六、厚朴酚 (magnolol)

厚朴 (*Magnolia officinalis*) 始記於『神農本草經』，稱此物能「主中風傷寒，頭痛，寒熱，驚悸，氣血痹，死肌，去三蟲」，在《名醫別錄》：“主溫中，益氣，消痰下氣，治霍亂及腹痛，脹滿，胃中冷逆，胸中嘔逆不止，泄痢，淋露，除驚，去留熱，止煩滿，厚腸胃”，《本草綱目·木二·厚朴》：“其木質樸而皮厚，味辛烈而色紫赤，故有厚朴、烈、赤諸名”；又名川朴、厚皮、重皮、烈朴，性味：味苦、辛，性溫。為木蘭科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd.et Wils. 或凹葉厚朴 *Magnolia officinalis*Rehd.etWils.var.*biloba*Rehd.et Wils. 的乾燥幹皮、根皮及枝皮。前者主產於四川、湖北等地，以四川產者質量為佳，稱為“川朴”；後者主產於浙江、福建，以浙江產量較大，稱“溫朴”。4-6 月採收，根皮及枝皮剝取後直接陰乾；乾皮置沸水中微煮後，堆置陰濕處，發汗至內表面變紫褐色或棕褐色時，蒸軟，捲成筒狀，曬乾或烘乾後即可用。根據傳統文獻記載，厚朴屬於「燥濕化痰、下氣除滿」的藥材，為理氣常用藥，神農本草經列為中品。

在 2009 年由 Shen 等學者提出，由 *Magnolia officinalis* 萃取出酚類產物多達 17 種 (Shen et al., 2009)，然而，水層萃取物能藉由調控血小板衍生性生長因子 (platelet derived growth factor) 及轉型生長因子  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 抑制人類腎小球系膜細胞增生 (Lee et al., 2004)，也能抑制人類膀胱癌 5637 細胞 (human urinary bladder cancer 5637 cells) 增生及 N-Butyl-N- nitrosamine (BBN) 引起小鼠膀胱癌腫瘤細胞的增生 (Lee et al., 2009b)，而在有機萃取層中，*Magnolia officinalis* 及 4-O-methylhonokiol 對於莨菪鹼 (scopolamine) 造成記憶損

傷具有保護的作用，也能抑制乙醯膽鹼脂酶 (acetylcholinesterase, AChE) 的活性 (Lee et al., 2009c)，也有許多研究報告指出和 *Magnolia officinalis* 同屬的植物，例如：*Magnolia obovata* 會透過活化 GABA/benzodiazepine receptors complex 的氯離子 (Cl<sup>-</sup> channel) 降低焦慮的狀況 (Seo et al., 2007)，*Flos Magnoliae* 則會抑制大鼠腹膜的肥大細胞釋出組織胺 (Shen et al., 2008)。

Magnolol 及 honokiol 是 *M. officinalis* 樹皮萃取物出的酚類中主要的產物。有研究報告指出，厚朴酚具有抗氧化的功能，能抑制大鼠心臟及肝臟中的脂質過氧化作用 (Chiu et al., 1999)，厚朴酚對於乙醯氨酚引起大鼠肝臟受損也有抗氧化及保護肝臟的效用 (Chen et al., 2009)。厚朴酚具有抗血栓、抗發炎及抗氧化的效用。有研究報告指出厚朴酚能抑制血管平滑肌細胞的增生 (Chen et al., 2003)，也能抑制內皮細胞透過介白質-6 (interleukin-6) 活化 STAT3 下游基因的表現，達到抑制發炎的效果 (Chen et al., 2006)，厚朴酚也能藉由調控發炎因子降低大鼠因感染引起的腹瀉反應 (Yang et al., 2008)，也能透過抑制 IκB kinase 活性而抑制 NF-κB 活性，進而影響 NF-κB 調控的基因表現 (Tse et al., 2007a)。也有研究報告指出，厚朴酚能引起 CGTH W-2 甲狀腺癌細胞凋亡 (Huang et al., 2007)，也能透過抑制 EGFR/PI3K/Akt 訊息傳遞路徑引起人類攝護腺癌細胞凋亡 (Lee et al., 2009a)，但也有報告指出，厚朴酚具有抗腫瘤的特性是藉由使 H460 細胞因為自噬作用 (Li et al., 2007) 死亡而不是透過細胞凋亡 (apoptosis) (Li et al., 2007)。在人類膀胱癌 5637 細胞株中，厚朴酚能 TNF-α 透過活化 p38，減少基質金屬蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 表現的機制 (Lee et al., 2008)。另有報告指出，厚朴酚能藉由調控 ERK 這條訊息傳遞路徑，抑制大鼠心肌缺血再灌注損傷 (Jin et al., 2008) 以及避免餵食膽固醇的兔子氣球損傷 (balloon-injured) 後內膜增生 (Lee et al., 2001)。

## 七、研究動機

動脈硬化被視為是一種慢性發炎的疾病，血管內皮細胞在動脈硬化形成過程中扮演重要的角色。當血管內皮細胞受到細胞激素刺激時，會產生嚴重的發炎反應，而厚朴酚已被證實具有抗血栓、抗發炎的功能，因此我們想了解厚朴酚對於發炎的血管內皮細胞是否有調控的效果。本實驗利用厚朴酚進行血管內皮細胞的體外研究，探討厚朴酚對細胞激素刺激的內皮細胞內的 HO-1 是否有調節作用；此外我們也以 ApoE 缺乏小鼠模擬動脈硬化病變模式，用腹腔注射的方式給予厚朴酚，探討厚朴酚是否有治療動脈硬化的效用，以及是否能降低 ApoE 缺乏小鼠體內細胞激素所引起的氧化壓力，並探討 HO-1 是否有參與調控。



## 貳、實驗材料

### 一、儀器設備

Centrifuge model-3740 (Kubota)

DU-640 spectrophotometer (Beckman)

PowerPac basic (Bio-Rad)

Mini PROREAN 3 Cell (Bio-Rad)

Transfer cell (Bio-Rad)

ESPEC CO<sub>2</sub> incubator (Forma Scientific)

Freezer model-925 (-70°C) (Forma Scientific)

Stirrer/hot plate (Corning)

Firefox dry bath 6100 (Pantech)

ELISA reader thermo (Molecular Devices)

Hemacytometer (Bright-Line)

Laminar flow (造鑫)

Oven NDO-600SD (Eyela)

Ph meter model-320 (Corning)

Vorter-2 genie (Scientific Industries)

Water bath (Kunz)

Water bath model-830 (Hotech)

Water jacketed incubator (Forma Scientific)

X-film processor M-335 (Kodak)



### 二、實驗材料與試劑

#### 1. 動物實驗 (In vivo)



Apo-E deficient mice

Chloride hydrate

Paraformaldehyde (FERAK)

Xylene (FULLIN)

Alcohol (FULLIN)

Paraffin (Shandon)

Sucrose (Sigma)

Cryo embedding medium (O.C.T) (Thermo)

## 2. 免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry)

Hydrogen peroxide (Sigma)

Trypsin (Gibco)

Bovine serum albumin (Sigma)

Monoclonal mouse anti-human HO-1 (Stressgen)

HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Santa Cruz)

3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma)

Microscopy kaisers glyceringelatine (Merck)



## 3. 細胞培養 (Cell culture)

Human aortic endothelial cell (HAEC, Cascade Biologics)

Medium-200 (without growth supplement) (Cascade Biologics)

Low serum growth supplement (LSGS) (Cascade Biologics)

Antibiotics (Penicillin-Streptomycin-Fungizone) (Gibco)

Trypsin EDTA (TE) (Cascade biologics)

60mm、100mm TC Dish (Costor)

6、24、96 well plate (Costor)

75 T flask (Costor)

4.細胞計數法 (Cell counting):

Trypan blue (0.4%) (Gibco)

5.細胞活性分析法 (MTT assay)

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma)

6.西方轉漬法 (Western blotting)

30 % Acrylamide/bis solution (Bio-Rad)

Ammonium persulfate (Bio-Rad)

N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Bio-Rad)

10 % sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bio-Rad)

Methanol (Ferax)

Filter paper (Bio-Rad)

PVDF transfer membrane (Millipore)

Nonfat dry milk (安佳)

Chemiluminescence reagent plus (Millipore)

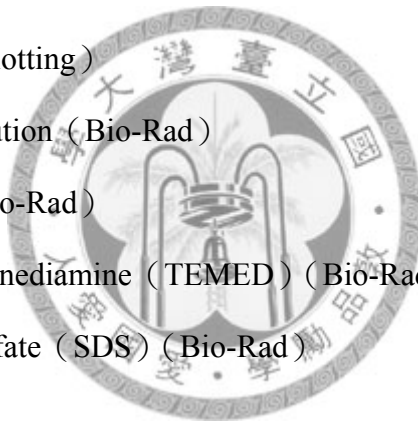
Prestained protein ladder (Fermentas)

Phenylmethylsulphony fluoride (PMSF) (Sigma)

Cell lysis buffer (10X) (Cell Signaling)

Monoclonal mouse anti-human HO-1 (Stressgen)

Monoclonal mouse anti-human  $\alpha$ -tubulin antibody (Calbiochem)



Mouse anti-human phospho-ERK1/2 antibody (Cell Signaling)

Rabbit anti-human phospho-JNK antibody (Cell Signaling)

Rabbit anti-human phospho-p38 antibody (Cell Signaling)

Rabbit anti-human total-ERK1/2 antibody (Cell Signaling)

Rabbit anti-human total-JNK antibody (Cell Signaling)

Rabbit anti-human total-p38 antibody (Cell Signaling)

HRP-conjugated goat anti-mouse IgG ( Santa Cruz )

HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG ( Santa Cruz )

X-film ( Fuji )

Parthenolide ( Sigma )

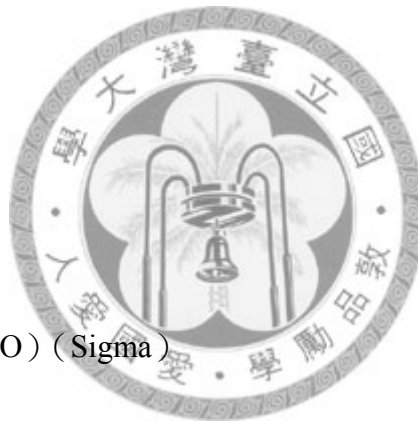
SR 11302 ( Tocris )

PD98059 ( Cashmer )

SB203580 ( Alexis )

SP600125 ( Alexis )

Dimethyl sulfoxide ( DMSO ) ( Sigma )



#### 7. 免疫細胞化學染色法 ( Immunocytochemistry staining )

FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz)

FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG (Sigma)

Triton X-100 (Sigma)

Paraformaldehyde (FERAK)

Normal goat serum (NGS)

#### 8. In situ detection of ROS by DHE fluorescence.

Dihydroethidium (DHE, Sigma)

9.凝膠遲滯分析 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

DIG gel shift kit, 2nd generation (Roche)

DIG wash and block buffer set (Roche)

NF- $\kappa$ B oligonucleotide (Promega)

AP-1 oligonucleotide (Promega)

Positive charged nylon membrane (Millipore)

10.實驗中所加之藥劑

Magnolol (Nakalai Tesque)

TNF- $\alpha$  (Calbiochem)

三、實驗用溶液配方

10X Phosphate Buffer Saline (PBS) :

NaCl : 80 g

KCl : 2g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 14.4g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 2.4g

In 1000 ml ddH<sub>2</sub>O (pH 7.0 ~ 7.2)



Lysis buffer for total protein :

150 mM NaCl

20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

1 mM EDTA

1 mM EGTA

1% TritonX-100

1 mM  $\beta$ -glycerophosphate

1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

1  $\mu$ g/ml leupetin 1 mM PMSF

2.5 mM sodium pyrophosphate

Lysis Buffer for nuclear protein :

Buffer A (pH 7.9) :

10 mM Hepes

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM KCl 1 mM DTT

1 mM PMSF

Buffer B (pH 7.9) :

Buffer A containing 0.1% TritonX-100

Buffer C (pH 7.9) :

20 mM Hepes	1.5 mM MgCl <sub>2</sub>	0.42 mM NaCl	1 mM DTT
1 mM PMSF	0.2 mM EDTA	25%(v/v) Glycerol	

10% Separating Gel :

ddH <sub>2</sub> O : 4 ml	30% acrylamide mix : 3.3 ml	1 M Tris (pH 8.8) : 2.5 ml
10% SDS : 0.1 ml	10% ammonium persulfate : 0.04 ml	
TEMED : 0.005 ml		

5% Stacking Gel :

ddH <sub>2</sub> O : 3.4 ml	30% acrylamide mix : 0.83 ml	1 M Tris (pH 6.8) : 0.63 ml
10% SDS : 0.05 ml	10% ammonium persulfate : 0.05 ml	TEMED : 0.005 ml



SDS Gel-Loading Buffer :

50 mM Tris-HCl	100 mM dithiothreitol	10% glycerol
2% SDS(electrophoresis)	0.1% bromophenol blue	

Running Buffer :

25 mM Tris-base	192 mM glycine	0.1 % SDS
-----------------	----------------	-----------

10X Tris-Buffered Saline (TBS) :

Tris-base 12.1 g	NaCl 87.6 g	In 1000 ml ddH <sub>2</sub> O (pH 7.9)
------------------	-------------	--

1X Tris-Buffered Saline/0.2% Tween 20 (TBST) :

1X TBS 0.2% (v/v) Tween-20

1X Transfer Buffer :

Tris-Base (25 mM) : 3.03 g      glycine (192 mM) : 14.41 g

methanol : 200 ml      ddH<sub>2</sub>O : 800 ml

Stripping Buffer :

62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)      2 % SDS      100 mM 2-mercaptoethanol

10X Tris-borate-EDTA(TBE) Buffer (pH 8.0) :

890 mM Tris-base      890 mM boric acid      20 mM EDTA

6% Native Polyacrylamide gel :

5X TBE : 1.4 ml      30 % acrylamide mix : 2.8 ml      ddH<sub>2</sub>O : 9.8 ml

glycerol : 0.35 ml      10 % ammonium persulfate : 0.1 ml

TEMED : 0.001 ml

10X Washing Buffer (pH 7.5) :

1 M maleic acid      1.5 M NaCl      0.3 %(v/v) Tween-20

10X Maleic acid Buffer (pH 7.5) :

1 M Maleic acid      1.5 M NaCl

10X Detection Buffer(pH 9.5) :

1 M Tris-HCl

1M NaCl

10X Blocking Stock Solution :

10% (w/v) Blocking reagent in maleic acid buffer

Hepes-modified Krebs' solution :

119 mM NaCl

20 mM HEPES

4.6 mM KCl

1 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

0.15 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5 mM NaHCO<sub>3</sub>

5.5 mM C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>

1 mM CaCl<sub>2</sub>

In 1000 ml ddH<sub>2</sub>O (pH 7.4)

Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> -free Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) :

5.36 mM KCl

137 mM NaCl

0.39 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

5.55 mM Glucose

12.5 mM HEPES

12.5 mM NaHCO<sub>3</sub>

In 1000 ml ddH<sub>2</sub>O (pH 7.4)



## 參、實驗方法

### 細胞實驗 (*in vitro*)

為了解 magnolol 是否會影響人類主動脈內皮細胞受 TNF- $\alpha$  刺激下，其 HO-1 的表現及其相關機轉，而進行下列實驗。

#### 1. 細胞培養 (Carlos et al., 1990) :

人類主動脈內皮細胞株 (human aortic endothelial cells, HAECs ; Cascade Biologic, Inc., U.S.A.)，以培養液 M200 培養，內含 2 % fetal bovine serum、1 $\mu$ g/ml hydrocortisone、10 ng/ml human epidermal growth factor、3 ng/ml basic fibroblast growth factor、10  $\mu$ g/ml heparin、100 units/ml penicillin、100 pg/ml streptomycin 及 1.25 pg/ml Fungizone (amphotericin B)。置於含有 5 % CO<sub>2</sub> 及飽和水蒸氣、37 °C 培養箱中，每三天更換一次培養液，並定期繼代培養。細胞培養至四、五代時即可進行實驗。

#### 2. 細胞活性分析法 (MTT assay) :

以 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 為受質，MTT 會被粒線體中 Succinate-tetrazolium reductase system 的 dehydrogenase 分解為 formazan，用此反應機制測定存活細胞的粒線體中 dehydrogenase 之活性，以檢定細胞存活率。

將細胞種入 96-well 培養盤中，每個 well 含 10<sup>4</sup> 個細胞，待細胞貼附後依實驗設計加入含不同濃度的 magnolol 或 TNF- $\alpha$  的 medium (100  $\mu$ l/well)，培養特定時間後，吸去 medium，加入 100  $\mu$ l 含有 0.5 mg/ml MTT 的培養液 (MTT : medium = 1 : 9)，於培養箱中反應 2 小時，隨後移除含有 MTT 的培養液，加入 100  $\mu$ l DMSO 反應 5 分鐘以溶解細胞，利用 ELISA reader 在 570/690 nm 波長下讀取吸光值，以未加藥處理組之 OD 值做為控制組，實驗組之 OD 值除以控制組之 OD 值為細胞相對存活百分比 (% of control)。



### 3. 西方墨點法 (Western blotting) :

細胞培養在 6 公分培養皿中，達到八至九分滿時，給予藥物處理適當時間後，移除培養液，用冰的 PSB 清洗兩次，將培養皿中的 PBS 完全吸除，加入適當體積的 cell lysis buffer，以刮勺將細胞刮下細胞液放入微量離心管中，置於-20℃冰箱至隔天。之後以 4 °C 環境下以 10000 g 離心 30 分鐘，並將上清液移至新的微量離心管，保存在 -20 °C 冰箱中。

#### a. 細胞蛋白質濃度測定：

取濃度 1 mg/ml 的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin ; BSA) 分別為 0、2、4、6、8  $\mu$ l，加入二次水至體積 800  $\mu$ l，再加入 200  $\mu$ l 蛋白質反應液 (Bio-Rad protein assay dye reagent)，利用分光光譜儀 (spectrophotometer) 進行測量分析，以 595 nm 波長測吸光值，製作一標準蛋白質濃度曲線。接著取 2  $\mu$ l 待測樣本，同樣加入二次水至 800  $\mu$ l，並加入 200  $\mu$ l 蛋白質呈色反應液後，利用分光光譜儀以 595 nm 波長測吸光值，以迴歸方式取得各細胞樣本之蛋白質濃度。

#### b. 電泳膠片製作：

配製 10 % separating gel 於室溫下混合均勻，注入電泳玻璃片間，靜置待其聚合反應約 30 分鐘，完全聚合後再注入 5 % stacking gel 於 separating gel 上方，並插入電泳梳 (comb)，靜置於室溫下待其聚合反應約 30 分鐘，完全聚合後移去電泳梳，裝置在電泳槽上，並加入電泳緩衝液 (running buffer)。

#### c. 蛋白質電泳 (Electrophoresis) :

將電泳膠片裝在電泳槽上，並填滿電泳緩衝液，取 25  $\mu$ g 的蛋白質，加入等體積染料，以二次水調整使每一個檢體的體積相同，用 95 °C 加熱 10 分鐘使蛋白質變性後，置於室溫下冷卻並震盪混合均勻，再將蛋白質樣本及 protein marker 注入各個電泳膠片溝槽中。先以電壓 90 伏特進行電泳，直到蛋白質樣本移至 separating gel 與 stacking gel 介面之後，將電壓升至 150 伏特，經過適當時間後停止電泳，接著進行蛋白質樣本轉印。

d. 蛋白質樣本轉印 (Electroblotting) :

取 9 cm × 6 cm 之 PVDF 膜，先以甲醇潤濕約 30 秒，再以轉印緩衝液 (transfer buffer) 浸潤以去除甲醇，連同三張濾紙放入轉印緩衝液中。使用的轉印系統為濕式轉印器 (Mini-Trans-blot-electrophoretic transfer cell, BioRad)，轉印裝置重疊順序由前到後依序為纖維墊、濾紙、PVDF 膜、含有蛋白質樣本的電泳膠、濾紙及纖維墊，過程中需注意每層接觸面中不可有氣泡存在。接著將裝置放入裝滿轉印緩衝液的轉印槽中，並在裝置後方放入冰塊，將整個轉印器半埋入冰塊中，以 350 mA 轉印 90 分鐘，轉印完成後即可取出 PVDF 膜。

e. 蛋白質樣本染色 (Immunoblotting) :

以 5 % 脫脂奶粉做為 PVDF 膜非特異性抗原 (non-specific antigen) 的阻斷劑，在室溫下作用 1 小時，隨後加入溶於 5 % 脫脂奶粉的一級抗體，在 4 °C 下作用 12 小時，接著以 TBST 沖洗 3 次，每次 5 分鐘；再加入含有二及抗體的 5 % 脫脂奶粉，於室溫下作用 1 小時，然後以 TBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘；之後加入適量的 Chemiluminescence reagent (ECL) 至 PVDF 膜上，呈色後以濾紙壓乾 PVDF 膜停止反應，並在暗房中將呈色之 PVDF 膜與 X 光片一起置於壓片匣中壓片，經適當時間後取出 X 光片並顯影。

各抗體使用濃度如下：

欲探測抗原	一級抗體	二級抗體
HO-1	Monoclonal mouse anti-human HO-1 (1:1000 稀釋) (Stressgen)	HRP-conjugated goat anti-mouse IgG(1:3000 稀釋) (Santa Cruz)
$\alpha$ -tubulin	Monoclonal mouse anti-human $\alpha$ -tubulin (1:1000 稀釋) (Calbiochem)	HRP-conjugated goat anti-mouse IgG(1:3000 稀釋) (Santa Cruz)

phospho-ERK1/2	Mouse anti-human phospho-ERK1/2 antibody(1:1000 稀釋) (Cell Signaling)	HRP-conjugated goat anti-mouse IgG(1:3000 稀釋) ( Santa Cruz )
phospho-JNK	Rabbit anti-human phospho-JNK antibody(1:1000 稀釋) (Cell Signaling)	HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG(1:3000 稀釋) ( Santa Cruz )
phospho-p38	Rabbit anti-human phospho-p38 antibody(1:1000 稀釋) (Cell Signaling)	HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG(1:3000 稀釋) ( Santa Cruz )
total-ERK1/2	Rabbit anti-human total-ERK1/2 antibody (1:1000 稀釋) (Cell Signaling)	HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG(1:3000 稀釋) ( Santa Cruz )
total-JNK	Rabbit anti-human total-JNK antibody (1:1000 稀釋) (Cell Signaling)	HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG(1:3000 稀釋) ( Santa Cruz )
total-p38	Rabbit anti-human total-p38 antibody (1:1000 稀釋) (Cell Signaling)	HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG(1:3000 稀釋) ( Santa Cruz )

f. 軟體分析：

掃描顯影完成之 X 光片，利用 GelPro 軟體進行定量分析。

4. 核蛋白萃取：

將八、九分滿的細胞給予藥物處理適當時間後，將培養液吸掉，以冰的 PBS 清洗 2 次，將培養皿中的 PBS 完全吸乾，加入 500  $\mu$ l buffer A 將細胞刮下，細胞

液收到微量離心管中，在 4 °C 下以 4000 g 離心 10 分鐘後，將上清液抽掉，再加入 100 µl buffer B，混合均勻後在 4 °C 下以 12000 g 離心 10 分鐘，再將上清液抽掉，之後視 pellet 大小加入 40 µl~70 µl 不等的 buffer C，混合均勻後放在 4 °C 冰箱 30 分鐘，隨後以 14000 g 在 4 °C 下離心 30 分鐘後，收取上清液儲存在 -80 °C，此上清液即含有核蛋白。

## 5. 凝膠遲滯分析 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) :

### a. 製作 DIG 標定的 NF-κB 探針

取 100 ng NF-κB oligonucleotide (序列 5'-ACAAGGGACTTTCGCTGGGG-ACTTTCAGG - 3'; 3'-TGTTCCCTGAAAGGCGACCCCTGAAAGGTCC-5') 以無菌二次水加至總體積 10 µl，(以下過程在冰上操作) 再加入 4 µl 5X labeling buffer，4 µl CoCl<sub>2</sub>-solution，1 µl DIG-ddUTP solution，1 µl terminal transferase，混合均勻後置於 37 °C 反應 15 分鐘。放回冰上加入 2 µl 0.2 M EDTA (pH 8.0) 終止反應，再加入 3 µl 二次水完成探針的製作 (濃度為 4 ng/µl)。

### b. 製作 DIG 標定的 AP-1 探針

取 100 ng AP-1 oligonucleotide (序列 5'- CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3'; 3'-GCGAACTACTGAGTCGGCCTT-5') 以無菌二次水加至總體積 10 µl，(以下過程在冰上操作) 再加入 4 µl 5X labeling buffer，4 µl COCl<sub>2</sub>-solution，1 µl DIG-ddUTP solution，1 µl terminal transferase，混合均勻後置於 37 °C 反應 15 分鐘。放回冰上加入 2 µl 0.2M EDTA (pH 8.0) 終止反應，再加入 3 µl 二次水完成探針的製作 (濃度為 4 ng/µl)。

### c. 轉錄因子結合反應

取 6 µg 核蛋白，加入 4 µl binding buffer、1 µl poly[d(I-C)]、1 µl poly L-lysine、2 µl 0.4ng/µl NF-κB probe、4 µl dye 補二次水到體積為 20 µl，混勻後以 6 % native polyacrylamide Gel 及 0.5 倍 TBE 緩衝液在 140 伏特下進行電泳 15 分鐘，再換成

100 伏特約 45 分鐘 (sample 跑到 gel 三分之二處)，電泳結束後轉印到 positive charged nylon membrane，用 0.5 倍 TBE 緩衝液做為轉印緩衝液，以 400 mA 轉印 60 分鐘，之後將 membrane 晾乾後放在 4 °C 過夜。隔天將 membrane 正面朝下用乾式加熱器以 120 °C 作用 30 分鐘，再照 UV 2 分鐘，以 washing buffer 清洗 2 分鐘，之後加入 1x blocking solution 30 分鐘，再加入 anti-Digoxigenin (1:10000) 30 分鐘後，以 washing buffer 清洗 15 分鐘 2 次，再換成 detection buffer 作用 5 分鐘，之後以 CSPD working solution (CSPD : detection buffer = 1 : 1000) 避光反應 10 分鐘，最後去除多餘液體，在 37°C 反應 10 分鐘後以 X 光片顯影。

#### 6. 免疫細胞化學染色法 (Immunocytochemistry staining ; ICC)

將有覆蓋 2 % gelatin 的蓋玻片置於 24-well 培養盤中，並將細胞種於蓋玻片上，每片蓋玻片上種有  $10^4$  個細胞，在細胞貼附後，加入培養液培養，之後依照實驗設計分別加入不同藥物處理。待實驗時間結束後，吸去培養液並以 PBS 清洗 2 次，再以 4 % paraformaldehyde 在室溫下固定細胞 15 分鐘，之後以 PBS 清洗 3 次，隨後在室溫下以 10 % NGS/PBS 溶液與非特异性抗原作用 1 小時，再加入一級抗體，在 4 °C 作用 12 小時，之後以 PBS 清洗 3 次，加入二級抗體，室溫下避光作用 1 小時，再以 PBS 清洗 3 次，最後用 3000 倍稀釋的 DAPI 染細胞核，在室溫下作用 15 分鐘，PBS 清洗後，以 50 % glycerol 封片。之後使用螢光顯微鏡觀察細胞影像，並使用 photoshop 軟體整合影像。

各抗體使用濃度如下：

欲探測抗原	一級抗體	二級抗體
HO-1	Polyclonal rabbit anti-human HO-1 (1:50 稀釋) (Santa Cruz)	FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG (1:200 稀釋) (Sigma)

## 8. 數據統計分析

實驗結果以 GraphPad Prismy 4 軟體進行統計分析，並使用 One-Way ANOVA 統計方式， $p < 0.05$  表示具有統計上意義差異，數據以 mean  $\pm$  SEM 表示。

### 動物實驗 (in vivo)

為了解 magnolol 是否會影響動物血管管壁在高血脂及 TNF- $\alpha$  刺激下的 HO-1 表現，因此採取下列實驗。動物為雄性 Apo-E 缺乏小鼠，在年齡二十週大時引進台大醫學院動物中心，給予 12 小時光照週期並控制溫度及濕度，並提供飲水及正常飼料。

將動物隨機分為四組：

- 控制組：每三天以腹腔注射 50  $\mu$ l DMSO
- TNF- $\alpha$  刺激組：三週後，連續三天以腹腔注射打入 10  $\mu$ g/kg 的 TNF- $\alpha$
- TNF- $\alpha$  及 magnolol 刺激組：每三天以腹腔注射 10 mg/kg magnolol，三週後再連續三天以腹腔注射打入 10  $\mu$ g/kg 的 TNF- $\alpha$
- magnolol 刺激組：每三天以腹腔注射 10 mg/kg magnolol，持續三週

### 1. 組織之處理：

將胸主動脈 (thoracic aorta) 取下後，在 PBS 中把周圍結締組織清理乾淨，並將血管洗淨後置於 4 % paraformaldehyde 中固定，三小時後將組織移到 PBS 中，並冰存於 4  $^{\circ}$ C 冰箱，隨後進行石蠟包埋。總頸動脈 (common carotid artery) 取下後以 PBS 清洗，之後置於 10 % sucrose 中，待組織下沉到底部時再置換到 30 % sucrose 中，每天更換新的 sucrose，約 3 天後組織會沉置底部，表示組織中水分已被 sucrose 置換，即可進行冷凍切片。

## 2. 石蠟包埋

依以下步驟依序進行石蠟包埋：

目的	使用藥劑	時間
脫水 (dehydration)	50 % Alcohol	5 分鐘 x 2
	75 % Alcohol	5 分鐘 x 2
	85 % Alcohol	5 分鐘 x 2
	95 % Alcohol	5 分鐘 x 3
	100 % Alcohol	5 分鐘 x 5
透明化 (clearing)	Xylene	2 分鐘
滲入 (infiltration)	paraffin : xylene = 1 : 1	30 分鐘
	55 ~ 65 °C	30 分鐘 x 2
包埋 (embedding)	paraffin, 55 ~ 65 °C	

最後將已被石蠟滲入的組織放入倒有液態石蠟的小盒中，並確認組織方向，待冷卻凝固後備用。

組織蠟塊冷卻後，將石蠟塊修飾為梯形，以切片機進行切片，切片厚度為 5  $\mu\text{m}$ 。將切面朝上，小心放入 37 °C ~ 40 °C 水浴槽中展片，之後以有覆蓋一層 poly-L-lysine (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的玻片將切片撈起，接著放置於 37 °C 烘片機乾燥，最後放在玻片盒中置於 4 °C 冰箱保存。

## 3. 免疫組織染色法 (Immunohistochemistry)：

將小鼠主動脈切片經過脫蠟、水合之後，以 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in methanol 處理 20 分鐘，去除內生性 peroxidase，之後以二次水清洗 3 次，再用 trypsin 1 mg/ml ( in 10 mM Tris buffer, pH 8.0) 在室溫下作用 4 分鐘，以二次水及 PBS 分別沖洗 2 次，於室溫下以 5 mg/ml BSA 作用 1 小時，接著以一級抗體於 37 °C 作用 1 小時，用 PBS 沖洗 3 次後，再以二級抗體於室溫下作用 90 分鐘，最後以 DAB 呈色 (0.5 mg/ml

DAB 和 0.01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1 M, pH 7.2 Tris-HCl)，封片後置於光學顯微鏡下觀察。

各抗體使用濃度如下：

欲探測抗原	一級抗體	二級抗體
HO-1	Polyclonal rabbit anti-human HO-1 (1:50 稀釋) (Santa Cruz)	HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG(1:200 稀釋) (Santa Cruz)

#### 4. 超氧自由基 (superoxide, $\cdot\text{O}_2^-$ ) 的偵測

將未固定的胸主動脈冷凍切片 (8  $\mu\text{m}$  厚) 以 HEPES-modified Krebs' 溶液清洗。Superoxide 的測量係利用其與 dihydroethidium (DHE) 作用產生的 ethidium bromide 可與 DNA 結合並產生螢光。將未固定的胸主動脈冷凍切片(8  $\mu\text{m}$  厚) 以 HEPES-modified Krebs' 溶液清洗。加入  $2 \times 10^{-6}$  M DHE 於 37 °C 中避光培養 30 分鐘，以 HEPES-modified Krebs' 溶液洗去 DHE 後，立刻以倒立螢光顯微鏡於波長 585 nm 下觀察拍照。





## 肆、實驗結果

### 細胞實驗 (*in vitro*)

以細胞活性分析法觀察 TNF- $\alpha$  對人類主動脈內皮細胞存活率的影響：

本實驗分別以 5、10、20、30、40、60、80 ng/ml 之不同濃度的 TNF- $\alpha$  處理人類主動脈內皮細胞 24 小時後，觀察 TNF- $\alpha$  對人類主動脈內皮細胞存活率的影響。結果顯示：當 TNF- $\alpha$  處理濃度高於 80 ng/ml 時，細胞活性有下降的趨勢，表示當 TNF- $\alpha$  濃度過高時，對人類主動脈內皮細胞有毒害性 (圖 1)。因此以下實驗我們選用 10 ng/ml 為細胞作用濃度。

以細胞活性分析法觀察 magnolol 對人類主動脈內皮細胞存活率的影響：

本實驗分別以 2.5、5、10、20、40、60  $\mu$ M 之不同濃度的 magnolol 處理人類主動脈內皮細胞 24 小時後，觀察 magnolol 對人類主動脈內皮細胞存活率的影響。結果顯示：當 magnolol 處理濃度高於 40  $\mu$ M 時，細胞活性有下降的趨勢，表示當 magnolol 濃度過高時，對人類主動脈內皮細胞有毒害性 (圖 2)。因此以下實驗我們選用 5  $\mu$ M 為細胞作用濃度。

探討 TNF- $\alpha$  及 magnolol 對人類主動脈內皮細胞 HO-1 的影響

本實驗目的是為了瞭解 magnolol 對於 TNF- $\alpha$  刺激之人類主動脈內皮細胞之 HO-1 的表現是否有影響。實驗設計先以 5  $\mu$ M magnolol 處理細胞 24 小時，再以 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 小時，之後以西方墨點法觀察 HO-1 表現。結果當人類主動脈內皮細胞受到 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 小時後，與未加藥組比較，其 HO-1 表現降低，以 5  $\mu$ M magnolol 處理人類主動脈內皮細胞 24 小時，再以 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 小時後，與單獨受 TNF- $\alpha$  刺激的組別比較，發現 magnolol 處理會增加由 TNF- $\alpha$  刺激人類主動脈內皮細胞 HO-1 的表現 (圖 3)。此外，利用免疫細胞化學染色法觀察人類主動脈內皮細胞 HO-1 表現量，結果顯示與西方墨點法結果相符，

magnolol 處理會增加由 TNF- $\alpha$  刺激人類主動脈內皮細胞 HO-1 於細胞質的表現 (圖 4)。

#### **探討 magnolol 對 TNF- $\alpha$ 刺激人類主動脈內皮細胞 MAPKs 蛋白質之表現影響：**

本實驗目的是為了瞭解 magnolol 對於 TNF- $\alpha$  刺激之人類主動脈內皮細胞之 MAPKs 蛋白質的表現是否有影響，因此進行下列實驗。實驗設計以 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 30 分鐘，之後以西方墨點法觀察人類主動脈內皮細胞 MAPKs (ERK 1/2、JNK、p38) 的表現。結果發現 TNF- $\alpha$  刺激後會增加人類主動脈內皮細胞 phospho-ERK 1/2、phospho-JNK、phospho-p38 的表現，而用 5  $\mu$ M magnolol 處理人類主動脈內皮細胞 24 小時後，再以 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 30 分鐘，與單獨用 TNF- $\alpha$  刺激的組別相比，結果顯示：magnolol 對人類主動脈內皮細胞受到 TNF- $\alpha$  刺激所增加的 phospho-ERK、phospho-JNK、phospho-p38 表現有抑制的效果，單以 magnolol 處理不會誘導 phospho-ERK、phospho-JNK、phospho-p38 的磷酸化 (圖 5)。

#### **探討 MAPKs 抑制劑對 TNF- $\alpha$ 刺激人類主動脈內皮細胞表現 HO-1 的影響：**

本實驗目的是為了瞭解 magnolol 影響人類主動脈內皮細胞表現 HO-1 之路徑，因此進行下列實驗。實驗設計將人類主動脈內皮細胞分別先以 30  $\mu$ M PD98059 (MEK1 抑制劑)、SP600125 (JNK 抑制劑)、SB203580 (p38 抑制劑) 處理 1 小時，再以 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 小時後，以西方墨點法觀察 HO-1 表現的情形。結果顯示人類內皮主動脈細胞先以 PD98059、SP600125、SB203580 處理再加入 TNF- $\alpha$  刺激的組別 HO-1 的表現有降低的趨勢。結果得知：TNF- $\alpha$  刺激人類主動脈內皮細胞時，會同時透過活化 ERK 1/2、JNK 及 p38 來調控 HO-1 的表現 (圖 6)。

#### **探討 magnolol 對 TNF- $\alpha$ 刺激人類主動脈內皮細胞轉錄因子之表現影響：**

本實驗目的是為了瞭解 magnolol 影響人類主動脈內皮細胞轉錄因子 NF- $\kappa$ B 及

AP-1 活化的情形，因此進行下列實驗。先以 5  $\mu$ M magnolol 處理人類主動脈內皮細胞 24 小時後，再以 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 30 分鐘後，收取核蛋白，並以凝膠遲滯分析法觀察轉錄因子 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 活化的情形。結果發現以 TNF- $\alpha$  刺激人類主動脈內皮細胞會使 NF- $\kappa$ B 活化，magnolol 對人類主動脈內皮細胞受 TNF- $\alpha$  刺激後 NF- $\kappa$ B 活化有抑制的趨勢，單以 magnolol 處理人類主動脈內皮細胞，與受 TNF- $\alpha$  刺激的組別比較，NF- $\kappa$ B 活化情形有降低的趨勢 (圖 7)。

### 動物實驗 (*in vivo*)

#### 探討 magnolol 對於 TNF- $\alpha$ 刺激 ApoE 缺乏小鼠總頸動脈中超氧化物之表現影響：

本實驗目的是為了瞭解 magnolol 對於 TNF- $\alpha$  刺激 ApoE 缺乏小鼠總頸動脈 (common carotid artery) 中，是否會影響超氧化物之表現。將不同處理組別的 ApoE 缺陷小鼠犧牲，取下總頸動脈組織進行冷凍切片，並利用 DHE staining 觀察血管壁上超氧化物的表現情形。結果顯示：和控制組相比，給予 TNF- $\alpha$  刺激組其血管壁上 DHE 的強度及分布範圍較廣泛。先給予 magnolol 三週再給予 TNF- $\alpha$  刺激組血管壁上 DHE 的強度及範圍較小，DHE 的表現集中在靠近斑塊處。而單獨給予 magnolol 組，和給予 TNF- $\alpha$  刺激組比較，單獨給予 magnolol 組之 DHE 的強度及分布範圍表現均較弱 (圖 8)。

#### 探討 magnolol 對於 TNF- $\alpha$ 刺激 ApoE 缺乏小鼠胸主動脈中超氧化物之表現影響：

本實驗目的是為了瞭解 magnolol 對於 TNF- $\alpha$  刺激 ApoE 缺乏小鼠胸主動脈 (thoracic aorta) 中，超氧化物之表現是否有影響。將不同處理組別的 ApoE 缺陷小鼠犧牲，取下胸主動脈組織進行冷凍切片，並利用 DHE staining 觀察血管壁上超氧化物的表現情形。結果顯示：和控制組相比，給予 TNF- $\alpha$  刺激的組別血管壁上 DHE 訊號強度較強且範圍較大，先給予 magnolol 三週再給予 TNF- $\alpha$  刺激組，其血管壁上 DHE 的強度及分布範圍較小，另外與單獨給予 magnolol 組，或給予 TNF- $\alpha$

刺激組相比，DHE 的強度表現較弱 (圖 9)。

#### 探討 magnolol 對於 TNF- $\alpha$ 刺激 ApoE 缺乏小鼠胸主動脈中 HO-1 之表現影響：

本實驗目的是為了瞭解 magnolol 對於 TNF- $\alpha$  刺激 ApoE 缺乏小鼠胸主動脈中，是否會影響 HO-1 之表現。將不同處理組別的 ApoE 缺陷小鼠犧牲，取下胸主動脈組織進行石蠟切片，並利用免疫組織化學染色法觀察血管壁上 HO-1 的表現情形。結果顯示：和控制組相比，給予 TNF- $\alpha$  刺激組，其斑塊處 HO-1 表現量有增加的現象，先給予 magnolol 三週再給予 TNF- $\alpha$  刺激別，斑塊處 HO-1 表現量和其他組別相比，有增加的現象。單獨給予 magnolol 組，和給予 TNF- $\alpha$  刺激組相比，單獨給予 magnolol 組其斑塊處 HO-1 的表現量有下降的趨勢 (圖 10)。



## 伍、討論與結論

在細胞實驗 (*in vitro*) 部分，本研究使用兩種藥物處理人類主動脈內皮細胞，分別是 TNF- $\alpha$  及厚朴酚。首先，實驗證明 TNF- $\alpha$  在 60 ng/ml 的濃度下對人類主動脈內皮細胞不具有毒害性，但當 TNF- $\alpha$  濃度大於 80 ng/ml 時，對於人類主動脈內皮細胞就具有毒害性。實驗證明，人類主動脈內皮細胞受 TNF- $\alpha$  刺激後會抑制 HO-1 的表現，也會增加 ERK 1/2、JNK、p38 MAP kinase 磷酸化。而先以厚朴酚處理再投予 TNF- $\alpha$ ，則可回復受到 TNF- $\alpha$  抑制的 HO-1 表現，也能降低受到 TNF- $\alpha$  刺激所增加的 ERK、JNK、p38 的磷酸化。實驗進一步發現加入 PD98059 (ERK 抑制劑) 及 SP600125 (JNK 抑制劑)，及 SB203580 (p38 抑制劑) 處理，再以 TNF- $\alpha$  刺激再加入 ERK 抑制劑及 JNK 抑制劑後會降低 HO-1 的表現，而加入 p38 抑制劑處理，再以 TNF- $\alpha$  刺激後 HO-1 則有上升的趨勢。接著進一步證明 TNF- $\alpha$  刺激人類主動脈內皮細胞會增加 NF- $\kappa$ B 的表現，而先以厚朴酚處理，可抑制以 TNF- $\alpha$  誘導之 NF- $\kappa$ B 的表現。

在動物實驗 (*in vivo*) 部分，本實驗發現 Apo-E 缺乏小鼠動脈的總頸動脈及胸主動脈血管壁切片中，單獨以 TNF- $\alpha$  刺激組，在血管平滑肌肌肉層的 ROS 表現量有增加的現象，而先給予厚朴酚再以 TNF- $\alpha$  刺激組，ROS 的表現量有下降的趨勢，單獨給予厚朴酚組，ROS 的表現量也有下降的現象。另外，在組織免疫染色部分，給予 TNF- $\alpha$  刺激組在血管斑塊處 HO-1 表現量有下降的現象，而先給予厚朴酚再以 TNF- $\alpha$  刺激組，在斑塊處 HO-1 表現量有上升的跡象。

在整個實驗過程中發現，HO-1 在細胞中的基礎表現量並不太穩定，推測可能有幾個因素會影響 HO-1 的基礎表現量，包括細胞生長環境的 pH 值以及細胞老化的狀況，有研究報告指出，平滑肌細胞在酸性環境中會透過 p38 MAP kinase 影響 HO-1 表現量，使 HO-1 的表現量上升 (Christou et al., 2005)。另外在 2000 年由 Lavrovsky 等學者提出，隨著大鼠的年紀增加，肝臟細胞內生性 HO-1 的表現量也隨之增加 (Lavrovsky et al., 2000)。以上這些因素可能都導致實驗時細胞內生性

HO-1 表現量不穩定的原因。

TNF- $\alpha$  是一個重要的發炎先驅因子，能透過 TNF- $\alpha$  受體 (TNF- $\alpha$  recetor) 將訊息傳入細胞內，活化下游胱冬肽酶 (Torres et al., 2008)、MAP kinases 或是 NF- $\kappa$ B 產生細胞凋亡、發炎反應等現象 (KOHCHI et al., 2009)。TNF- $\alpha$  刺激內皮細胞會使細胞活化，持續被活化的內皮細胞最後產生功能性障礙，形成動脈硬化初期的症狀 (Bacon et al., 2002)，而泡沫細胞也會釋放出 TNF- $\alpha$ ，在血管斑塊處 TNF- $\alpha$  表現量比其餘組織多 (Carter, 2005)，TNF- $\alpha$  會結由活化基質金屬蛋白酶使纖維帽 (fibrous cap) 裡的膠原質 (collagen) 斷裂，也會促使血管平滑肌細胞凋亡 (Boyle, 2005)，以上報告顯示 TNF- $\alpha$  已被證明與心血管疾病的成因有密切的相關性。在先前研究報告中指出，厚朴酚能夠抑制痤瘡丙酸桿菌 (*Propionibacterium acnes*, *P. acne*) 的活性，並能進一步抑制被痤瘡丙酸桿菌感染的人類單核細胞株 (human monocytic cell line, THP-1) 產生發炎前趨因子例如介白質-8 (interleukin-8) 及 TNF- $\alpha$  的能力 (Park et al., 2004)。有研究報告指出，將人類主動脈內皮細胞中的 HO-1 過量表現 (Katori et al., 2002) 能抑制氧化型低密度脂蛋白及 TNF- $\alpha$  引起的發炎反應，包括降低內皮細胞黏附因子-1 (vascular endothelial adhesion molecule-1, VCAM-1)、單核球趨化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 及巨噬細胞株系刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 的表現量，也能抑制內皮型一氧化氮合成酶 (endothelial-type NO synthase, eNOS) 的表現量，顯示 HO-1 可能可以透過抑制發炎因子降低內皮細胞活化及產生功能性障礙的狀況，具有抗動脈硬化 (antiatherogenic) 的作用 (Kawamura et al., 2005)。HO-1/CO 活化能藉由抑制巨噬細胞及平滑肌細胞釋放一氧化氮及表現顆粒型巨噬細胞株刺激因子 (granulocyte-marcophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 降低發炎反應 (Sawle et al., 2005)。在本實驗中，TNF- $\alpha$  會降低人類主動脈內皮細胞中之 HO-1 之表現量，目前此作用的機轉並不清楚，而 TNF- $\alpha$  類似的作用在過去的研究中指出，TNF- $\alpha$  會促使人類主動脈內皮細胞的胰島素接受器 (insulin receptor) 之表現量及磷酸化

程度均下降 (Aljada et al., 2002), TNF- $\alpha$  也會透過胰島素生長因子結合蛋白-3 (IGF-binding protein-3, IGFBP-3) 抑制老鼠胚胎纖維母細胞 (mouse embryonic fibroblasts) 受到 rosiglitazone 刺激產生的脂締素 (adiponectin) 轉錄, 進而影響到胰島素敏感性 (insulin sensitivity) (Zappal $\alpha$  and Rechler, 2009)。相關報導指出, TNF- $\alpha$  降低胰島素接受器表現量的機制與活化 p38 等 MAPK 有關 (Aljada et al., 2002), 而在本實驗中也發現預先處理 p38 抑制劑可回復 TNF- $\alpha$  降低 HO-1 表現量的作用, 此結果顯示 TNF- $\alpha$  降低 HO-1 表現量的作用, p38 可能參與其中。

厚朴酚能藉由抑制 MEKK-1 進而降低 NF- $\kappa$ B 活化的狀況 (Lee et al., 2005), 也能抑制人類淋巴球白血病癌細胞 (human histiocytic lymphoma, U-937) 及白血球癌母細胞 (human promyelocytic leukemia HL 60 cell) 的 I $\kappa$ B kinase 活化, 並進一步抑制 NF- $\kappa$ B 所調控的基因表現 (Tse et al., 2007), 顯示厚朴酚具有抗發炎的功效, 而在本實驗中發現, 厚朴酚能降低 TNF- $\alpha$  引起的 ERK 1/2、JNK 及 p38 磷酸化的現象, 也能夠抑制 TNF- $\alpha$  活化 NF- $\kappa$ B 的表現量, 此實驗結果和之前研究報告有相同的結論。

在前人的研究中指出, 以 DPPH ( $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) 自由基清除試驗測試厚朴酚清除自由基的能力, 發現厚朴酚具有強抗氧化力, 比  $\alpha$ -tocopherol 清除自由基的能力超過 1000 倍 (Jin et al., 2008), 而厚朴酚能藉由抗氧化能力抑制嗜中性白血球黏附的能力 (Shen et al., 1998), 顯示厚朴酚具有清除自由基的能力而有抗氧化的功效。另外先前研究也指出, TNF- $\alpha$  刺激產生 ROS 能延長 MAP kinase 活化的時間 (Sakon et al., 2003)。在本實驗中發現, 人類內皮主動脈細胞預先給予厚朴酚的組別, 能夠抑制 MAP kinase 磷酸化及 NF- $\kappa$ B 的活性, 推測可能是由於厚朴酚清除 TNF- $\alpha$  刺激產生的 ROS, 使得可能產生發炎反應的訊息不會繼續往下傳遞。在本實驗證明以 TNF- $\alpha$  刺激人類主動脈內皮細胞 90 分鐘可使 ROS 表現量大量增加, 但預先給予厚朴酚 1 小時及 24 小時並無法有清除 ROS 的作用; 但在動物實驗結果部分, ApoE 缺乏小鼠的總頸動脈及胸主動脈血管壁中, 有預先給予厚

朴酚的組別中，血管中層 ROS 的表現量和給予 TNF- $\alpha$  刺激組相比有明顯下降的跡象，推測厚朴酚需要長時間的處理，對於清除 ROS 才能具有顯著的功效。

本研究結果證實，當人類主動脈內皮細胞受到 TNF- $\alpha$  刺激時，HO-1 的表現量會下降，若有受到厚朴酚調控時，會使 HO-1 的表現有回復的現象，並透過 MAP kinase 來調控；動物實驗發現，TNF- $\alpha$  刺激會降低 HO-1 在血管壁斑塊處的表現量，而厚朴酚則會增加血管斑塊處 HO-1 的表現量，而厚朴酚同時也具有降低血管中層 ROS 表現的功效，顯示厚朴酚能調控 TNF- $\alpha$  刺激後產生的發炎現象，而達到預防及治療動脈硬化的功效。





## 陸、附圖

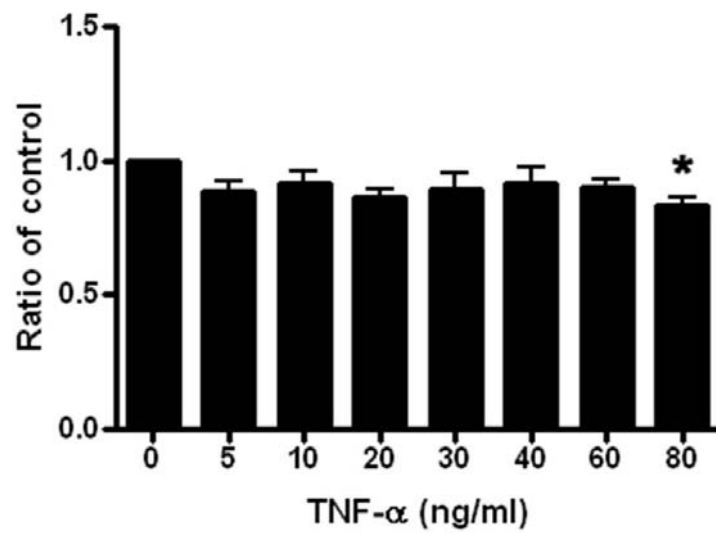


圖 1. 以細胞活性分析法觀察 TNF- $\alpha$  對人類主動脈內皮細胞存活率的影響：

本實驗分別以 5、10、20、30、40、60、80 ng/ml 之不同濃度 TNF- $\alpha$  處理人類主動脈內皮細胞 24 小時後，觀察 TNF- $\alpha$  對人類主動脈內皮細胞存活率的影響。數據以 4 次獨立實驗並以 mean  $\pm$  SEM 表示，\*  $p < 0.05$  表示與控制組比較。

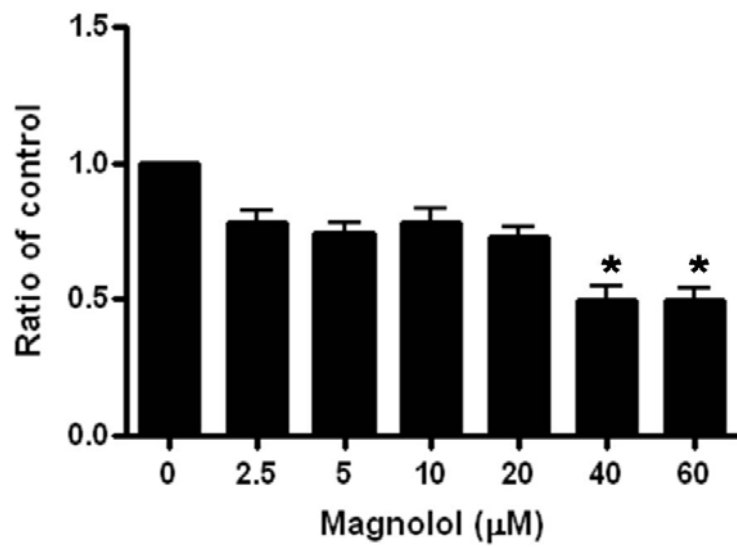


圖 2. 以細胞活性分析法觀察 magnolol 對人類主動脈內皮細胞存活率的影響：

本實驗分別以 2.5、5、10、20、40、60  $\mu\text{M}$  之不同濃度 magnolol 處理人類主動脈內皮細胞 24 小時後，觀察 magnolol 對人類主動脈內皮細胞存活率的影響。數據以 4 次獨立實驗並以  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  表示，\*  $p < 0.05$  表示與控制組比較。



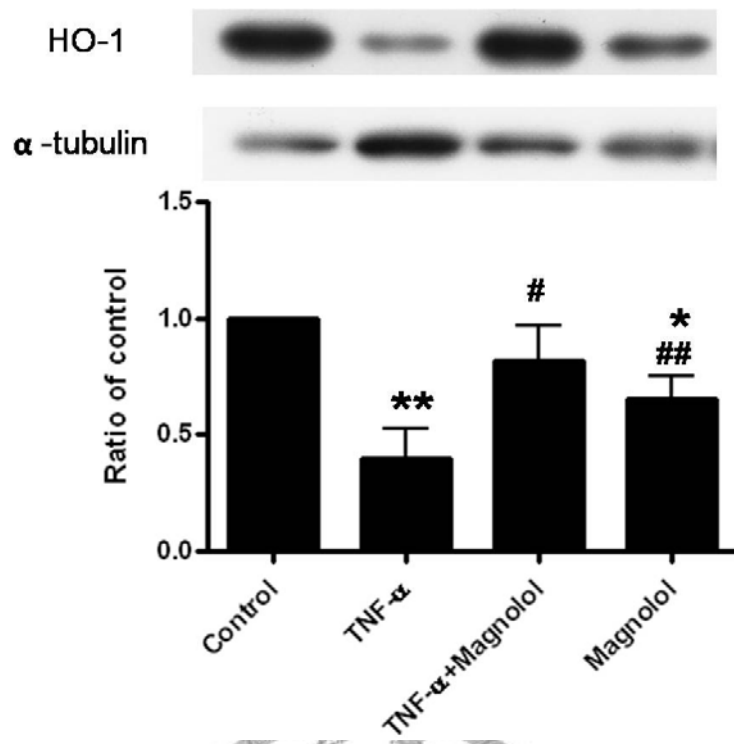


圖 3、以西方墨點法觀察 TNF- $\alpha$  及 magnolol 對人類主動脈內皮細胞 HO-1 之表現影響：

先以 5  $\mu$ M magnolol 處理 24 小時，再用 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 小時，以西方墨點法觀察細胞 HO-1 之表現。數據以 3 次獨立實驗並以 mean  $\pm$  SEM 表示，\*  $p < 0.05$ ，\*\*  $p < 0.01$  表示與控制組比較，#  $p < 0.05$ ，##  $p < 0.01$  表示和 TNF- $\alpha$  組比較。

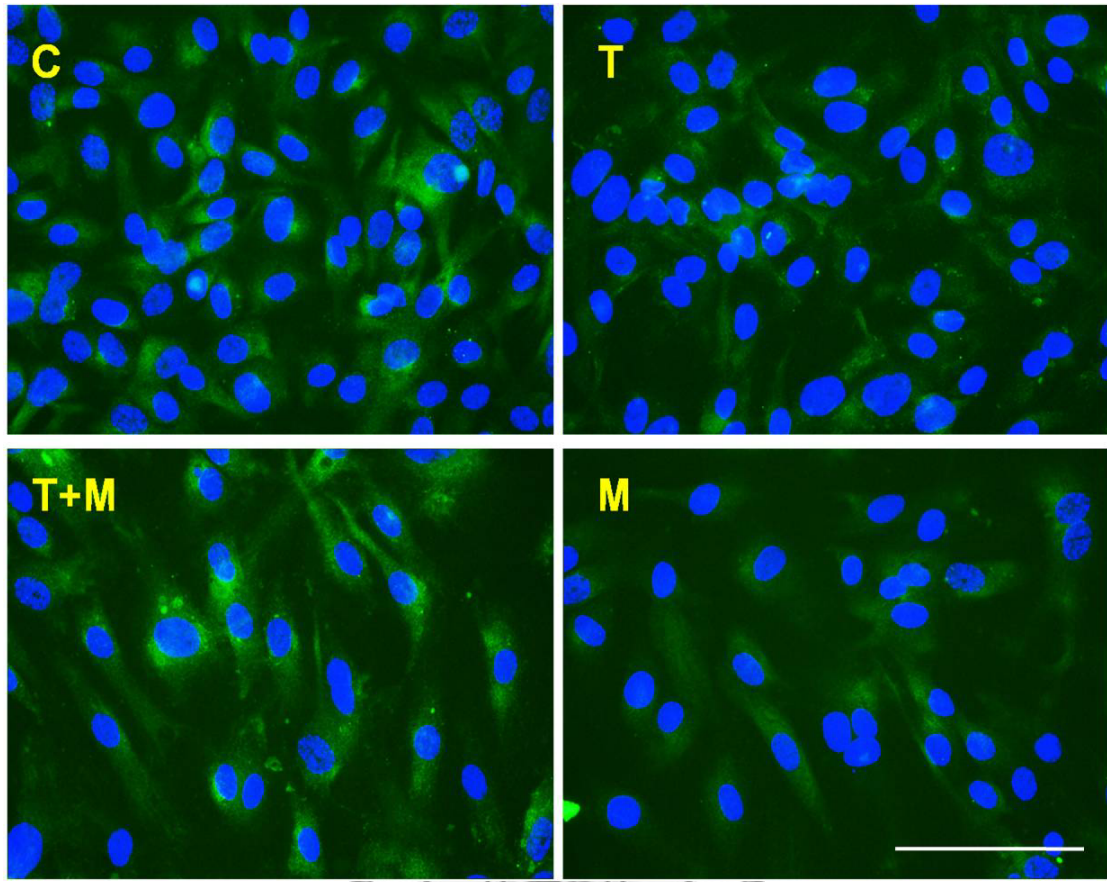


圖 4、以免疫細胞化學染色法觀察 TNF- $\alpha$  及 magnolol 對人類內皮主動脈細胞 HO-1 之影響：

先以 5  $\mu$ M magnolol 處理 24 小時，再用 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 小時，進行免疫細胞染色，以螢光顯微鏡觀察 HO-1 的表現（綠色螢光處），並使用 DAPI 染色標定細胞核位置（藍色螢光處）。（scale bar=100  $\mu$ m）

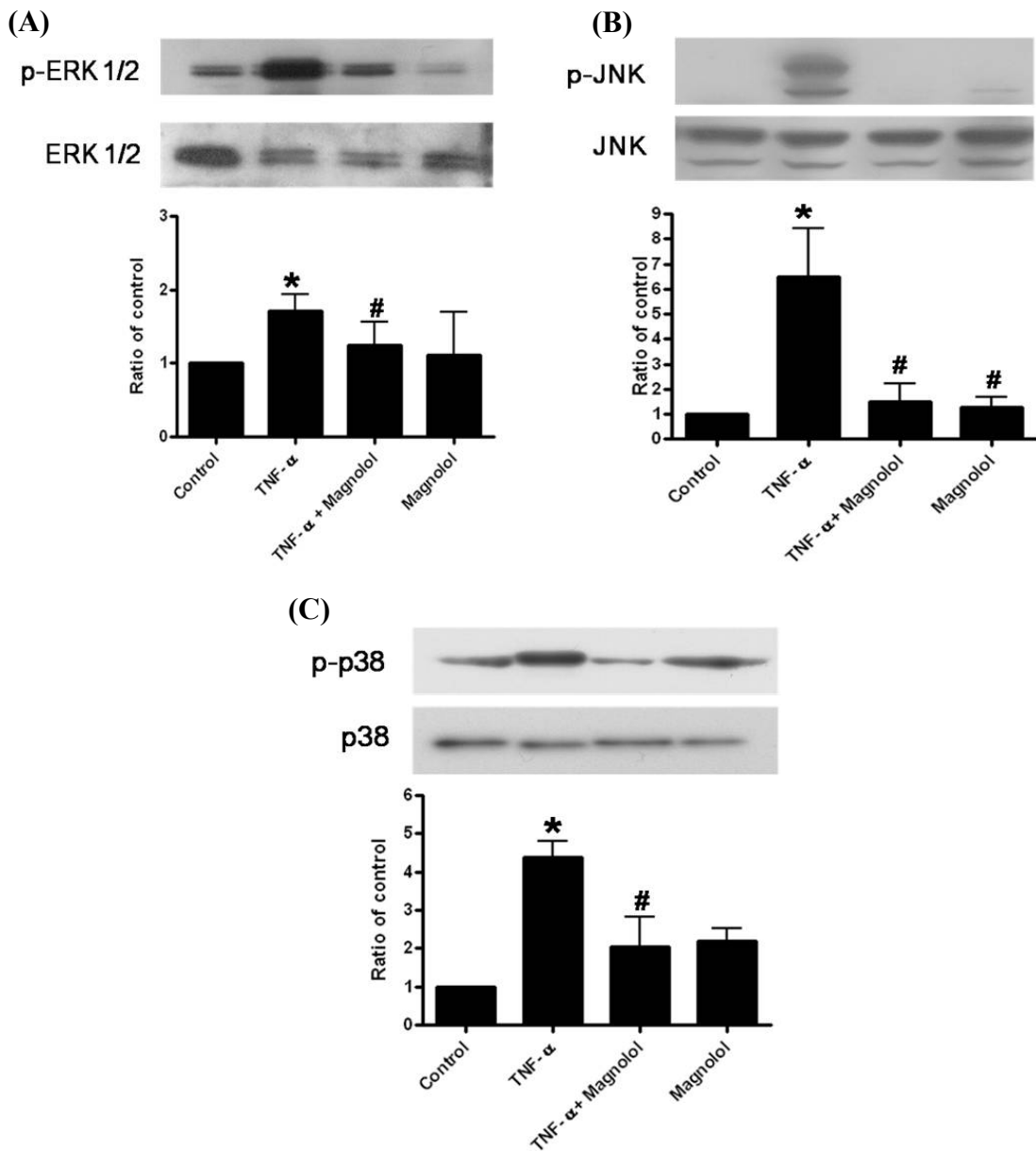


圖 5、以西方墨點法觀察 TNF- $\alpha$  及 magnolol 對人類主動脈內皮細胞 MAPKs 之表現影響：

先以 5  $\mu$ M magnolol 處理 24 小時，再用 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 30 分鐘，以西方墨點法觀察 TNF- $\alpha$  及 magnolol 對人類主動脈內皮細胞 MAPKs 蛋白質之表現。數據以 4 次獨立實驗並以 mean  $\pm$  SEM 表示，\*  $P < 0.05$  表示與控制組比較，#  $p < 0.05$  表示和 TNF- $\alpha$  組比較。

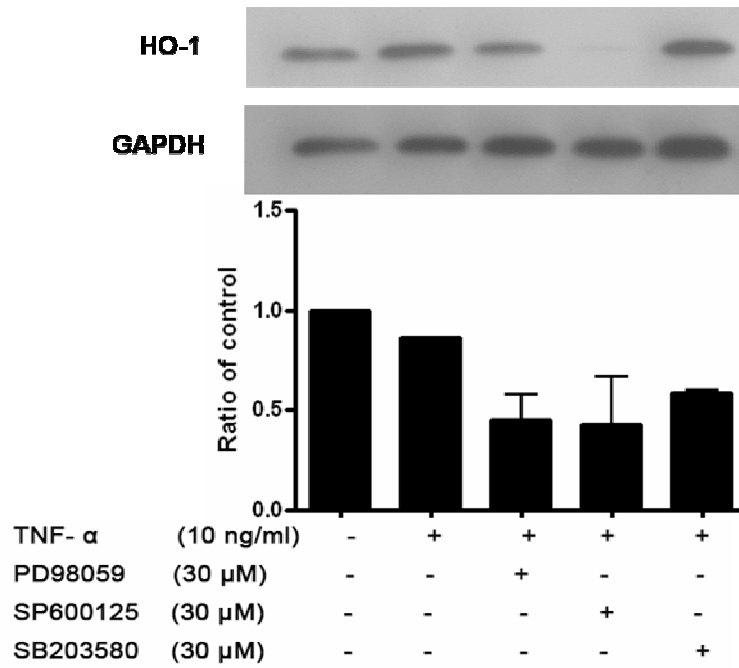


圖 6、以西方墨點法觀察 MAPKs inhibitors 及 NF- $\kappa$ B inhibitor 對於 TNF- $\alpha$  刺激人類主動脈內皮細胞 HO-1 之表現影響：

先將人類主動脈內皮細胞以 30  $\mu$ M 的先以 PD98059、SP600125 及 SB203580 處理 1 小時，再以 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 小時，以西方墨點法觀察細胞內 HO-1 之表現。

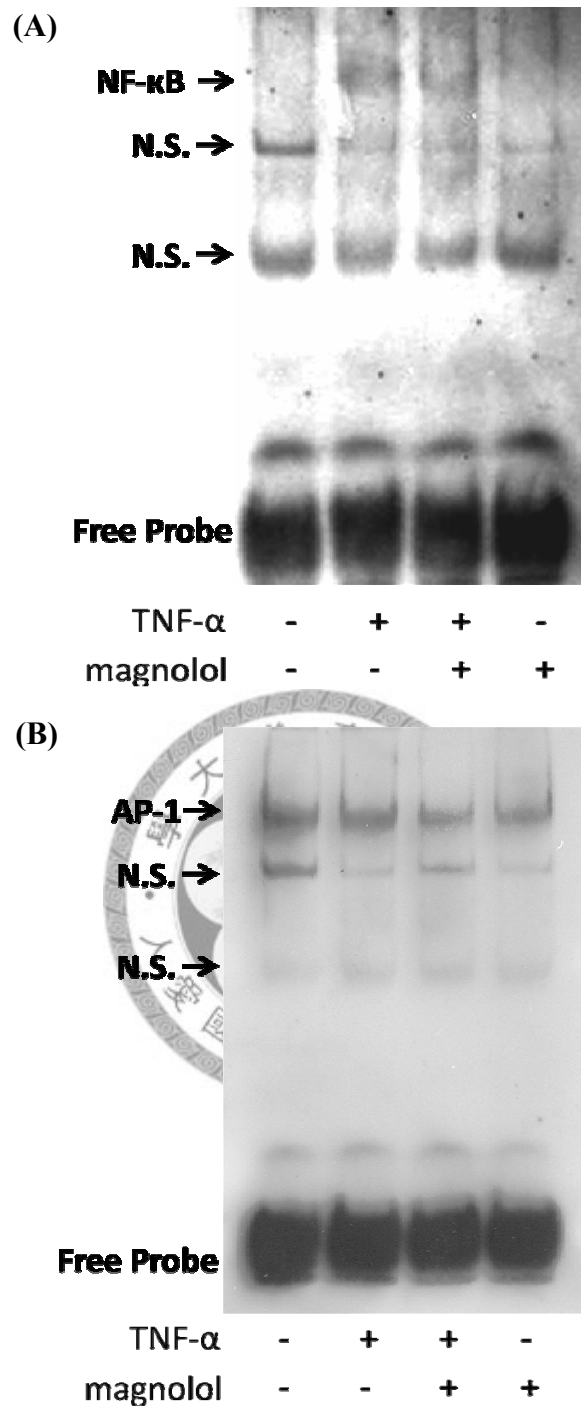


圖 7、以凝膠遲滯分析法觀察 TNF- $\alpha$  及 magnolol 對人類主動脈內皮細胞 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 之表現影響：

先以 5  $\mu$ M magnolol 處理 24 小時，再用 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 30 分鐘，以凝膠遲滯分析法觀察 TNF- $\alpha$  及 magnolol 對人類主動脈內皮細胞之 (A) NF- $\kappa$ B 及 (B) AP-1 表現。

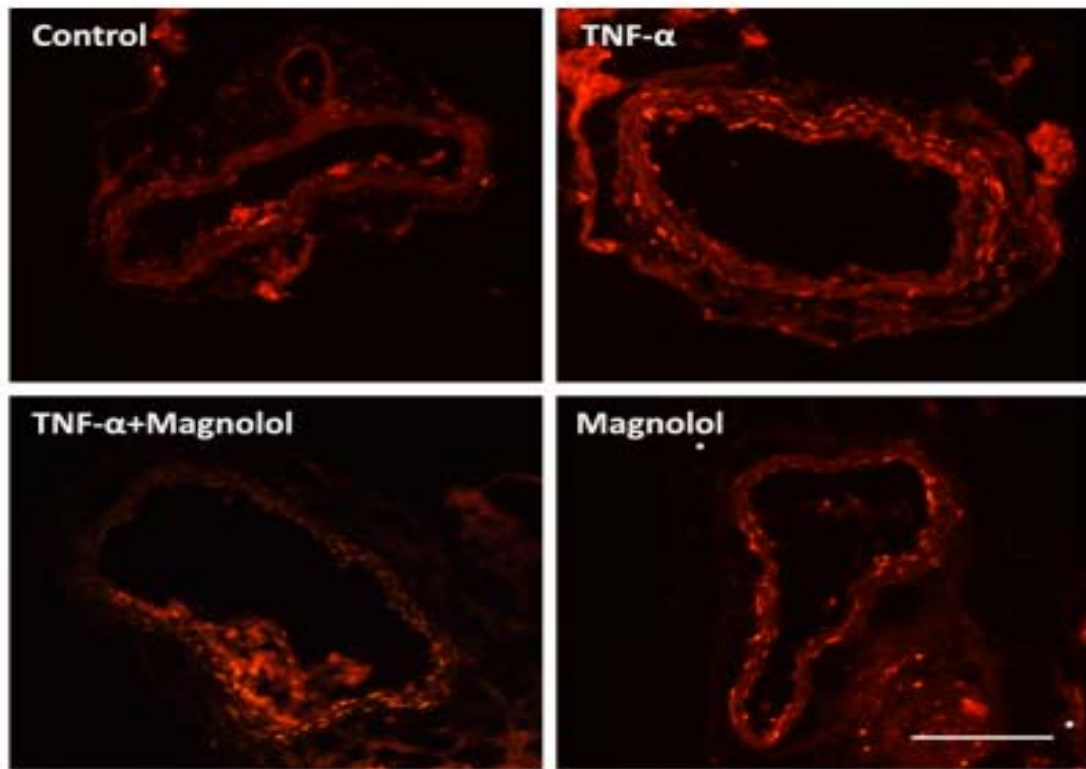


圖 8、以 DHE staining 觀察 TNF- $\alpha$  及 magnolol 對 ApoE 缺乏小鼠總頸動脈中超氧化物之表現影響：

將不同處理組別的 ApoE 缺乏小鼠犧牲，取下總頸動脈組織進行冷凍切片，並利用 DHE staining 觀察血管壁超氧化物的表現。(scale bar=100  $\mu$ m)



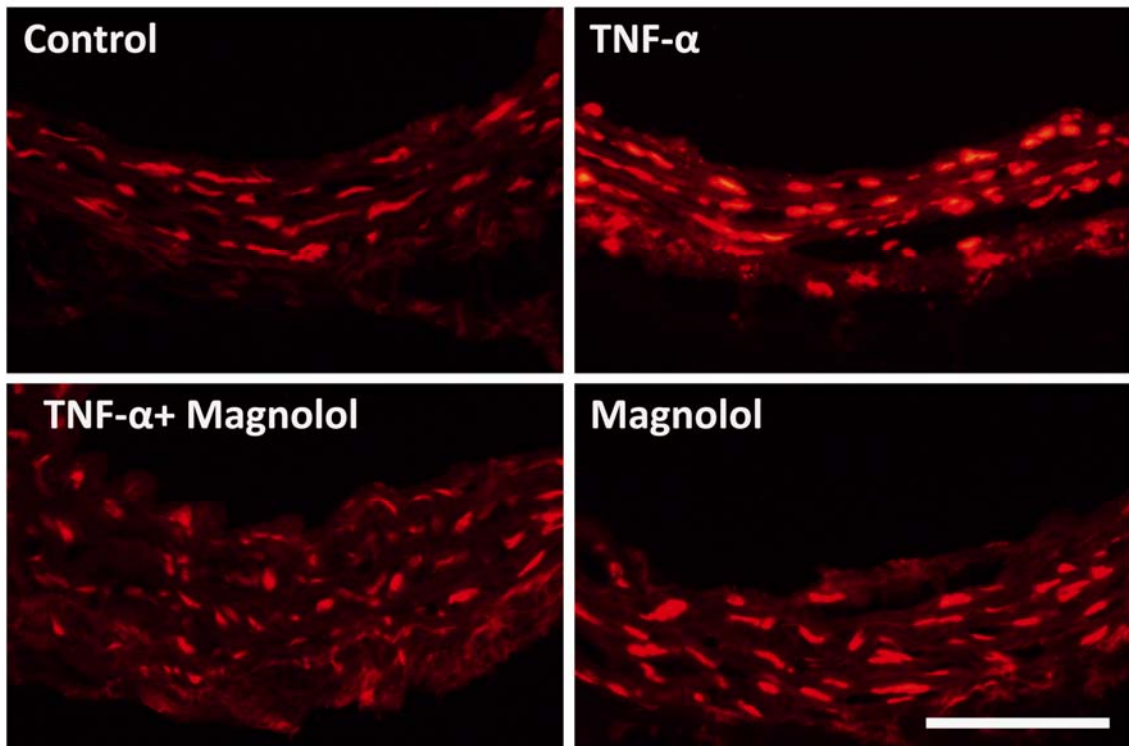


圖 9、以 DHE staining 觀察 TNF- $\alpha$  及 magnolol 對 ApoE 缺乏小鼠胸主動脈中超氧化物之表現影響：

將不同處理組別的 ApoE 缺乏小鼠犧牲，取下胸主動脈組織進行冷凍切片，並利用 DHE staining 觀察血管壁超氧化物的表現。(scale bar = 100  $\mu$ m)

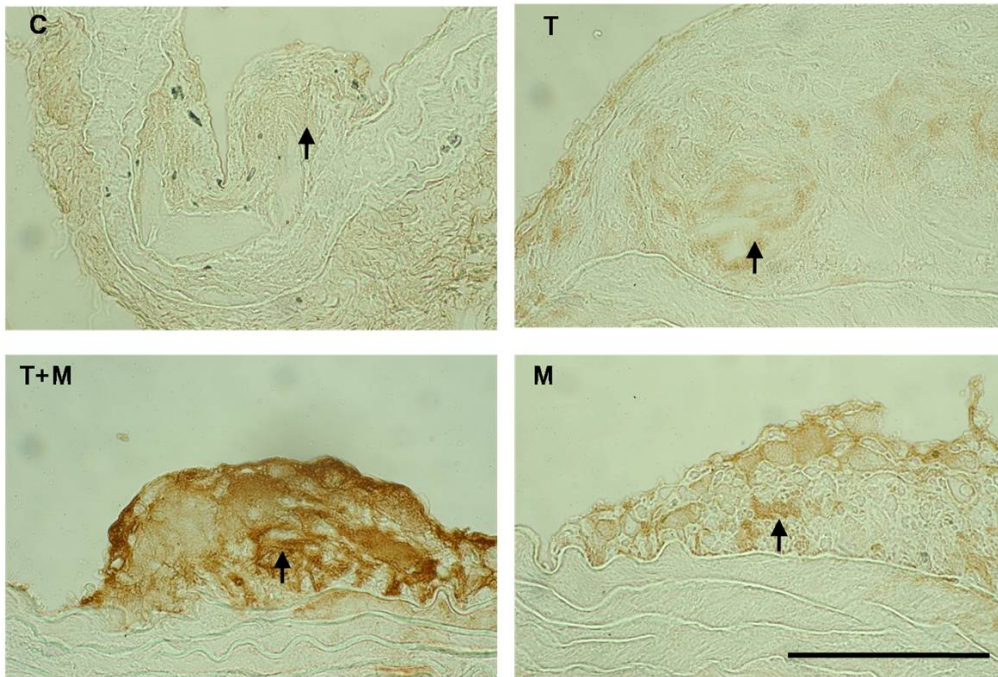


圖 10、以免疫組織化學染色法觀察 TNF- $\alpha$  及 magnolol 對 ApoE 缺乏小鼠胸主動脈中 HO-1 之表現影響：

將不同處理組別的 ApoE 缺乏小鼠犧牲，取下胸主動脈組織進行石蠟包埋切片，並利用免疫組織化學染色法觀察血管壁 HO-1 的表現。(scale bar=100  $\mu$ m)

## 柒、參考資料

- Aggarwal BB (2000) Tumour Necrosis Factors Receptor Associated Signalling Molecules and Their Role in Activation of Apoptosis, JNK and NF-KappaB. *Ann Rheum Dis* **59 Suppl 1**:i6-16.
- Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM and Cook JL (1999) Nrf2, a Cap'n'Collar Transcription Factor, Regulates Induction of the Heme Oxygenase-1 Gene. *J Biol Chem* **274**:26071-26078.
- Aljada A, Ghanim H, Assian E and Dandona P (2002) Tumor Necrosis Factor-[Alpha ] Inhibits Insulin-Induced Increase in Endothelial Nitric Oxide Synthase and Reduces Insulin Receptor Content and Phosphorylation in Human Aortic Endothelial Cells. *Metabolism* **51**:487-491.
- Bacon PA, Raza K, Banks MJ, Townend J and Kitas GD (2002) THE ROLE OF ENDOTHELIAL CELL DYSFUNCTION IN THE CARDIOVASCULAR MORTALITY OF RA. *International Reviews of Immunology* **21**:1-17.
- Boyle JJ (2005) Macrophage Activation in Atherosclerosis: Pathogenesis and Pharmacology of Plaque Rupture. *Curr Vasc Pharmacol* **3**:63-68.
- Cao J, Drummond G, Inoue K, Sodhi K, Li XY and Omura S (2008) Upregulation of

Heme Oxygenase-1 Combined With Increased Adiponectin Lowers Blood Pressure in Diabetic Spontaneously Hypertensive Rats Through a Reduction in Endothelial Cell Dysfunction, Apoptosis and Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* **9**:2388-2406.

Carlos TM, Dobrina A, Ross R and Harlan JM (1990) Multiple Receptors on Human Monocytes Are Involved in Adhesion to Cultured Human Endothelial Cells. *J Leukoc Biol* **48**:451-456.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N and Williamson B (1975) An Endotoxin-Induced Serum Factor That Causes Necrosis of Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:3666-3670.

Carter AM (2005) Inflammation, Thrombosis and Acute Coronary Syndromes. *Diabetes and Vascular Disease Research* **2**:113-121.

Chen JH, Wu CC, Hsiao G and Yen MH (2003) Magnolol Induces Apoptosis in Vascular Smooth Muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **368**:127-133.

Chen SC, Chang YL, Wang DL and Cheng JJ (2006) Herbal Remedy Magnolol Suppresses IL-6-Induced STAT3 Activation and Gene Expression in Endothelial Cells. *Br J Pharmacol* **148**:226-232.

Chen YH, Lin FY, Liu PL, Huang YT, Chiu JH, Chang YC, Man KM, Hong CY, Ho YY

and Lai MT (2009) Antioxidative and Hepatoprotective Effects of Magnolol on Acetaminophen-Induced Liver Damage in Rats. *Arch Pharm Res* **32**:221-228.

Chiu JH, Wang JC, Lui WY, Wu CW and Hong CY (1999) Effect of Magnolol on in Vitro Mitochondrial Lipid Peroxidation and Isolated Cold-Preserved Warm-Reperfused Rat Livers. *J Surg Res* **82**:11-16.

Christou H, Bailey N, Kluger MS, Mitsialis SA and Kourembanas S (2005) Extracellular Acidosis Induces Heme Oxygenase-1 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**:H2647-H2652.

Deramaudt BM, Braunstein S, Remy P and Abraham NG (1998) Gene Transfer of Human Heme Oxygenase into Coronary Endothelial Cells Potentially Promotes Angiogenesis. *J Cell Biochem* **68**:121-127.

Dulak J, Deshane J, Jozkowicz A and Agarwal A (2008) Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in Vascular Pathobiology: Focus on Angiogenesis. *Circulation* **117**:231-241.

Hess S, Methe H, Kim JO and Edelman ER (2009) NF-KappaB Activity in Endothelial Cells Is Modulated by Cell Substratum Interactions and Influences Chemokine-Mediated Adhesion of Natural Killer Cells. *Cell Transplant* **18**:261-273.

Holvoet P and Collen D (1994) Oxidized Lipoproteins in Atherosclerosis and

Thrombosis. *FASEB J* **8**:1279-1284.

Huang SH, Chen Y, Tung PY, Wu JC, Chen KH, Wu JM and Wang SM (2007)

Mechanisms for the Magnolol-Induced Cell Death of CGTH W-2 Thyroid Carcinoma Cells. *J Cell Biochem* **101**:1011-1022.

Huot J, Houle F, Marceau F and Landry J (1997) Oxidative Stress-Induced Actin

Reorganization Mediated by the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Heat Shock

Protein 27 Pathway in Vascular Endothelial Cells. *Circ Res* **80**:383-392.

Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM and Lusis AJ (1997) Induction of

Heme Oxygenase-1 Inhibits the Monocyte Transmigration Induced by Mildly Oxidized LDL. *J Clin Invest* **100**:1209-1216.

Jin YC, Kim KJ, Kim YM, Ha YM, Kim HJ, Yun UJ, Bae KH, Kim YS, Kang SS, Seo

HG, Lee JH and Chang KC (2008) Anti-Apoptotic Effect of Magnolol in Myocardial

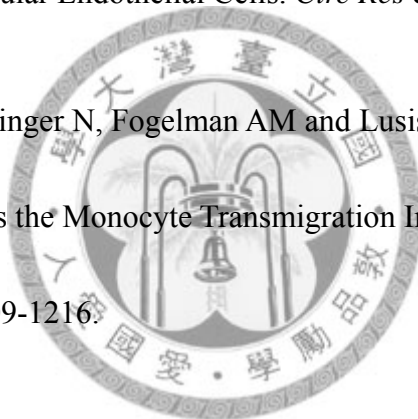
Ischemia and Reperfusion Injury Requires Extracellular Signal-Regulated Kinase1/2

Pathways in Rat in Vivo. *Exp Biol Med (Maywood)* **233**:1280-1288.

Kang YH and Lee SJ (2008) The Role of P38 MAPK and JNK in Arsenic

Trioxide-Induced Mitochondrial Cell Death in Human Cervical Cancer Cells. *J Cell*

*Physiol* **217**:23-33.



Karin M (1996) The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-Activated Protein Kinases.

*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **351**:127-134.

Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Iyer S, Southard D, Busuttil RW and

Kupiec-Weglinski JW (2002) Heme Oxygenase-1 Overexpression Protects Rat Hearts

From Cold Ischemia/Reperfusion Injury Via an Antiapoptotic Pathway. *Transplantation*

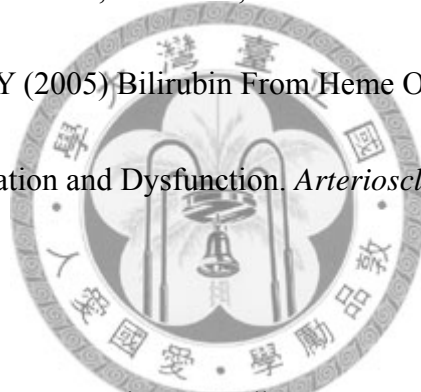
**73**:287-292.

Kawamura K, Ishikawa K, Wada Y, Kimura S, Matsumoto H, Kohro T, Itabe H,

Kodama T and Maruyama Y (2005) Bilirubin From Heme Oxygenase-1 Attenuates

Vascular Endothelial Activation and Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*

**25**:155-160.



Ke B, Shen XD, Melinek J, Gao F, Ritter T, Volk HD, Busuttil RW and

Kupiec-Weglinski JW (2001) Heme Oxygenase-1 Gene Therapy: a Novel

Immunomodulatory Approach in Liver Allograft Recipients? *Transplant Proc*

**33**:581-582.

KOHCHI CHIE, INAGAWA HIRO, NISHIZAWA TAKA and SOMA GI (2009) ROS

and Innate Immunity. *Anticancer Research* **29**:817-821.

Kyriakis JM and Avruch J (1996) Protein Kinase Cascades Activated by Stress and

Inflammatory Cytokines. *Bioessays* **18**:567-577.

Latchman DS (2004) Protective Effect of Heat Shock Proteins in the Nervous System. *Curr Neurovasc Res* **1**:21-27.

Lavrovsky Y, Song CS, Chatterjee B and Roy AK (2000) Age-Dependent Increase of Heme Oxygenase-1 Gene Expression in the Liver Mediated by NF[Kappa]B. *Mechanisms of Ageing and Development* **114**:49-60.

Lee BC, Doo HK, Lee HJ, Jin SY, Jung JH, Hong SJ, Lee SH, Kim SD, Park JK, Leem KH and Ahn SY (2004) The Inhibitory Effects of Aqueous Extract of Magnolia Officinalis on Human Mesangial Cell Proliferation by Regulation of Platelet-Derived Growth Factor-BB and Transforming Growth Factor-Beta1 Expression. *J Pharmacol Sci* **94**:81-85.

Lee DH, Szczepanski MJ and Lee YJ (2009a) Magnolol Induces Apoptosis Via Inhibiting the EGFR/PI3K/Akt Signaling Pathway in Human Prostate Cancer Cells. *J Cell Biochem* **106**:1113-1122.

Lee J, Jung E, Park J, Jung K, Lee S, Hong S, Park J, Park E, Kim J, Park S and Park D (2005) Anti-Inflammatory Effects of Magnolol and Honokiol Are Mediated Through Inhibition of the Downstream Pathway of MEKK-1 in NF-KappaB Activation Signaling.



*Planta Med* **71**:338-343.

Lee SJ, Cho YH, Park K, Kim EJ, Kang BS, Jung KH, Kim CH, Kim WJ and Moon SK (2009b) Inhibitory Effects of the Aqueous Extract of *Magnolia Officinalis* on the Responses of Human Urinary Bladder Cancer 5637 Cells in Vitro and Mouse Urinary Bladder Tumors Induced by N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl) Nitrosamine in Vivo.

*Phytother Res* **23**:20-27.

Lee SJ, Park SS, Lee US, Kim WJ and Moon SK (2008) Signaling Pathway for TNF-Alpha-Induced MMP-9 Expression: Mediation Through P38 MAP Kinase, and Inhibition by Anti-Cancer Molecule Magnolol in Human Urinary Bladder Cancer 5637 Cells. *Int Immunopharmacol* **8**:1821-1826.

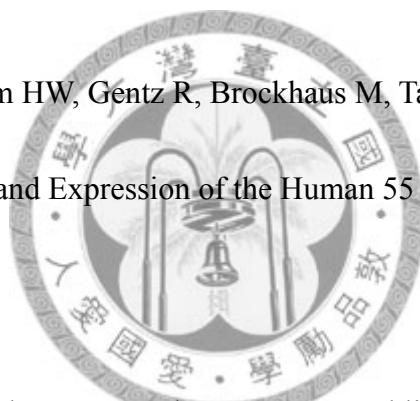
Lee YK, Yuk DY, Kim TI, Kim YH, Kim KT, Kim KH, Lee BJ, Nam SY and Hong JT (2009c) Protective Effect of the Ethanol Extract of *Magnolia Officinalis* and 4-O-Methylhonokiol on Scopolamine-Induced Memory Impairment and the Inhibition of Acetylcholinesterase Activity. *Nat Med (Tokyo)* **63**:274-282.

Lee YM, Hsiao G, Chen HR, Chen YC, Sheu JR and Yen MH (2001) Magnolol Reduces Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Via Neutrophil Inhibition in Rats. *Eur J Pharmacol* **422**:159-167.

Levonen AL, Inkala M, Heikura T, Jauhiainen S, Jyrkkanen HK, Kansanen E, Maatta K, Romppanen E, Turunen P, Rutanen J and Yla-Herttuala S (2007) Nrf2 Gene Transfer Induces Antioxidant Enzymes and Suppresses Smooth Muscle Cell Growth in Vitro and Reduces Oxidative Stress in Rabbit Aorta in Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:741-747.

Li HB, Yi X, Gao JM, Ying XX, Guan HQ and Li JC (2007) Magnolol-Induced H460 Cells Death Via Autophagy but Not Apoptosis. *Arch Pharm Res* **30**:1566-1574.

Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H and Lesslauer W (1990) Molecular Cloning and Expression of the Human 55 Kd Tumor Necrosis Factor Receptor. *Cell* **61**:351-359.



Ma J, Lau CK, Obed A, Dada A, Doenecke A, Fan ST, Schlitt HJ and Tsui TY (2009) A Cell Penetrating Heme Oxygenase Protein Protects Heart Graft Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Gene Ther* **16**:320-328.

Maines MD (1997) The Heme Oxygenase System: a Regulator of Second Messenger Gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**:517-554.

Miralem T, Hu Z, Torno MD, Lelli KM and Maines MD (2005) Small Interference RNA-Mediated Gene Silencing of Human Biliverdin Reductase, but Not That of Heme

Oxygenase-1, Attenuates Arsenite-Mediated Induction of the Oxygenase and Increases Apoptosis in 293A Kidney Cells. *J Biol Chem* **280**:17084-17092.

Ng DS and Hegele RA (1993) High-Density-Lipoprotein Cholesterol and Atherosclerosis. *CMAJ* **149**:1807-1808.

Noguchi T, Ishii K, Fukutomi H, Naguro I, Matsuzawa A, Takeda K and Ichijo H (2008) Requirement of Reactive Oxygen Species-Dependent Activation of ASK1-P38 MAPK Pathway for Extracellular ATP-Induced Apoptosis in Macrophage. *J Biol Chem* **283**:7657-7665.

Old LJ (1985) Tumor Necrosis Factor (TNF). *Science* **230**:630-632.

Orozco LD, Kapturczak MH, Barajas B, Wang X, Weinstein MM, Wong J, Deshane J, Bolisetty S, Shaposhnik Z, Shih DM, Agarwal A, Lusis AJ and Araujo JA (2007) Heme Oxygenase-1 Expression in Macrophages Plays a Beneficial Role in Atherosclerosis. *Circ Res* **100**:1703-1711.

Park J, Lee J, Jung E, Park Y, Kim K, Park B, Jung K, Park E, Kim J and Park D (2004) In Vitro Antibacterial and Anti-Inflammatory Effects of Honokiol and Magnolol Against Propionibacterium Sp. *European Journal of Pharmacology* **496**:189-195.

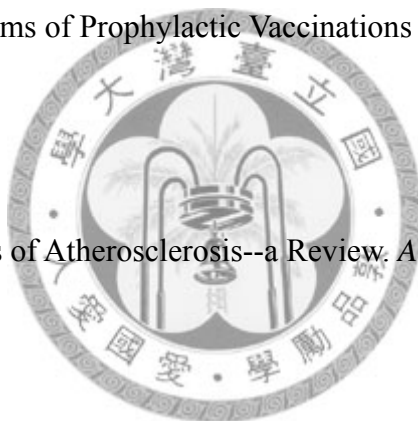
Perrella MA and Yet SF (2003) Role of Heme Oxygenase-1 in Cardiovascular Function.

*Curr Pharm Des* **9**:2479-2487.

Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW and Choi AM (2000) Heme Oxygenase-1 Inhibits TNF-Alpha-Induced Apoptosis in Cultured Fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**:L312-L319.

Pober JS and Min W (2006) Endothelial Cell Dysfunction, Injury and Death. *Handb Exp Pharmacol* 135-156.

RITOSSA P (1962) [Problems of Prophylactic Vaccinations of Infants.]. *Riv Ist Sieroter Ital* **37**:79-108.



Ross R (1990) Mechanisms of Atherosclerosis--a Review. *Adv Nephrol Necker Hosp* **19**:79-86.

Ross R and Glomset JA (1973) Atherosclerosis and the Arterial Smooth Muscle Cell: Proliferation of Smooth Muscle Is a Key Event in the Genesis of the Lesions of Atherosclerosis. *Science* **180**:1332-1339.

Ryter SW, Alam J and Choi AM (2006) Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev* **86**:583-650.

Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, Piao JH, Yagita H,

Okumura K, Doi T and Nakano H (2003) NF-KappaB Inhibits TNF-Induced Accumulation of ROS That Mediate Prolonged MAPK Activation and Necrotic Cell Death. *EMBO J* **22**:3898-3909.

Sawle P, Foresti R, Mann BE, Johnson TR, Green CJ and Motterlini R (2005) Carbon Monoxide-Releasing Molecules (CO-RMs) Attenuate the Inflammatory Response Elicited by Lipopolysaccharide in RAW264.7 Murine Macrophages. *Br J Pharmacol* **145**:800-810.

Seo JJ, Lee SH, Lee YS, Kwon BM, Ma Y, Hwang BY, Hong JT and Oh KW (2007) Anxiolytic-Like Effects of Obovatol Isolated From *Magnolia Obovata*: Involvement of GABA/Benzodiazepine Receptors Complex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**:1363-1369.



Shen CC, Ni CL, Shen YC, Huang YL, Kuo CH, Wu TS and Chen CC (2009) Phenolic Constituents From the Stem Bark of *Magnolia Officinalis*. *J Nat Prod* **72**:168-171.

Shen Y, Pang EC, Xue CC, Zhao ZZ, Lin JG and Li CG (2008) Inhibitions of Mast Cell-Derived Histamine Release by Different Flos *Magnoliae* Species in Rat Peritoneal Mast Cells. *Phytomedicine* **15**:808-814.

Shen YC, Sung YJ and Chen CF (1998) Magnolol Inhibits Mac-1

(CD11b/CD18)-Dependent Neutrophil Adhesion: Relationship With Its Antioxidant Effect. *Eur J Pharmacol* **343**:79-86.

Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N and Agarwal A (2004) The Story So Far: Molecular Regulation of the Heme Oxygenase-1 Gene in Renal Injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**:F425-F441.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC and Witztum JL (1989) Beyond Cholesterol. Modifications of Low-Density Lipoprotein That Increase Its Atherogenicity. *N Engl J Med* **320**:915-924.

Sue YM, Cheng CF, Chang CC, Chou Y, Chen CH and Juan SH (2009) Antioxidation and Anti-Inflammation by Haem Oxygenase-1 Contribute to Protection by Tetramethylpyrazine Against Gentamicin-Induced Apoptosis in Murine Renal Tubular Cells. *Nephrol Dial Transplant* **24**:769-777.

Torres F, Quintana J, Diaz JG, Carmona AJ and Estevez F (2008) Trifolin Acetate-Induced Cell Death in Human Leukemia Cells Is Dependent on Caspase-6 and Activates the MAPK Pathway. *Apoptosis* **13**:716-728.

Tse AK, Wan CK, Zhu GY, Shen XL, Cheung HY, Yang M and Fong WF (2007) Magnolol Suppresses NF-KappaB Activation and NF-KappaB Regulated Gene

Expression Through Inhibition of IkappaB Kinase Activation. *Mol Immunol*

**44**:2647-2658.

Vachharajani TJ, Work J, Issekutz AC and Granger DN (2000) Heme Oxygenase

Modulates Selectin Expression in Different Regional Vascular Beds. *Am J Physiol*

*Heart Circ Physiol* **278**:H1613-H1617.

Wajant H, Pfizenmaier K and Scheurich P (2003) Tumor Necrosis Factor Signaling. *Cell*

*Death Differ* **10**:45-65.

Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC and Chau LY (1998) Expression of Heme

Oxygenase-1 in Atherosclerotic Lesions. *Am J Pathol* **152**:711-720.

Witztum JL and Steinberg D (1991) Role of Oxidized Low Density Lipoprotein in

Atherogenesis. *J Clin Invest* **88**:1785-1792.

Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y and

Koizumi S (1999) Oxidative Stress Causes Enhanced Endothelial Cell Injury in Human

Heme Oxygenase-1 Deficiency. *J Clin Invest* **103**:129-135.

Yagoda N, von RM, Zaganjor E, Bauer AJ, Yang WS, Fridman DJ, Wolpaw AJ,

Smukste I, Peltier JM, Boniface JJ, Smith R, Lessnick SL, Sahasrabudhe S and

Stockwell BR (2007) RAS-RAF-MEK-Dependent Oxidative Cell Death Involving

Voltage-Dependent Anion Channels. *Nature* **447**:864-868.

Yang TC, Zhang SW, Sun LN, Wang H and Ren AM (2008) Magnolol Attenuates Sepsis-Induced Gastrointestinal Dysmotility in Rats by Modulating Inflammatory Mediators. *World J Gastroenterol* **14**:7353-7360.

Zappalα G and Rechler MM (2009) IGFBP-3, Hypoxia and TNF-[Alpha] Inhibit Adiponectin Transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **382**:785-789.

Zhan Y, Kim S, Izumi Y, Izumiya Y, Nakao T, Miyazaki H and Iwao H (2003) Role of JNK, P38, and ERK in Platelet-Derived Growth Factor-Induced Vascular Proliferation, Migration, and Gene Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:795-801.

