

國立臺灣師範大學生命科學專業學院

生技醫藥產業碩士學位學程碩士論文

Graduate Program of Biotechnology and Pharmaceutical Industries

School of Life Science

National Taiwan Normal University

Master's Thesis

傳統中藥樟芝萃取物對棕櫚酸處理血管內皮細胞脂質

累積的緩解作用

**Alleviating effects of traditional Chinese medicine
Antrodia cinnamomea extract on lipid accumulation in
palmitic acid-treated vascular endothelial cells**

陳韋羽

Wei-Yu Chen

指導教授：吳忠信 博士

Advisor: Chung-Hsin Wu, Ph.D.

中華民國 112 年 1 月

January 2023

謝誌

光陰似箭，轉眼間已就讀 2 年的碩士班，每一天都過得很充實，最為感謝指導教授吳忠信教授教導專業的知識與技術，在我遇到瓶頸時給予指點也訓練我邏輯思考的能力，一天結束之前還會帶領我們打羽球，鼓勵我們適時的舒壓與培養興趣，我能夠在吳教授的實驗室裡學習很幸運，非常感謝吳教授！

感謝國立臺灣師範大學生命科學院沈賜川教授以及國立臺灣大學動物科學技術學系王珮華教授擔任口試委員，細心指正論文不足之處，老師們的寶貴意見使我受益良多！

感謝班級導師陳冬生老師，不僅對學生們關懷備至，傳授關於生技產業的知識，也讓學生了解產業的發展以及如何提升自己的競爭力！

感謝清隆學長、婉溱學姊、雪娥學姊、睿芝姊、珍玟學姊、麗宇學姊以及念忠對於實驗的指點與照顧，有時候自己都不明白為什麼試驗會不成功，是學長姊的教導與鼓勵讓我得以進步，非常感謝學長姊的耐心教學。

中文摘要

高脂血症是動脈粥樣硬化最主要的危險因素，過程涉及動脈粥樣硬化患者在早期時脂質於動脈內膜中的累積，而形成動脈粥樣硬化的過程中，血管內皮細胞、巨噬細胞的氧化壓力、細胞凋亡、CD36 以及 Kruppel-like factor 4(KLF4)蛋白質的表現均扮演重要角色。本研究嘗試探討牛樟芝萃取物對於動脈粥樣硬化的調節潛力，使用棕櫚酸(Palmitic acid)處理血管內皮細胞 SVEC4-10 與 RAW264.7 巨噬細胞作為高脂累積細胞模式，藉由胞外實驗(in vitro)評估牛樟芝萃取物對於高脂累積的緩解作用。本研究採用由牛樟芝萃取出的化合物，利用 HPLC 確定牛樟芝萃取物的化學指標活性成份，並用 DPPH 測定牛樟芝萃取物的自由基清除能力，再以油紅 O 染色法(Oil Red O Stain)檢視牛樟芝萃取物可否有效降低高脂累積內皮細胞 SVEC4-10 的油滴脂質累積，以酵素結合免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 檢測牛樟芝萃取物可否有效降低炎性細胞因子 TNF- α (tumor necrosis factor- α)、IL-1 β (interleukin-1 β)的表現量；利用細胞免疫螢光染色方法檢測牛樟芝萃取物是否有效降低 CD36 蛋白質表現以及增強 KLF4 蛋白質表現；利用遷移試驗(transwell migration assay)檢測牛樟芝萃取物是否增加 RAW264.7 巨噬細胞的移動能力來清除血管內皮細胞的脂質累積。本實驗結果顯示：此牛樟芝萃取物具備很好的自由基清除能力，可以顯著降低血管內皮細胞的油滴脂質累積，減少 TNF- α 、IL-1 β 以及 CD36 的表現量，但是增強 KLF4 蛋白質表現。此外，牛樟芝萃取物可以促進 RAW264.7 巨噬細胞的遷移能力。綜合上述結果，我們認為牛樟芝萃取物可以透過減少血管內皮細胞的油脂累積，抑制巨噬細胞的氧化壓力與細胞凋亡，來達到緩解高脂累積，以及調節動脈粥樣硬化的潛力。

關鍵字：高脂血症、動脈粥樣硬化、牛樟芝、血管內皮細胞、巨噬細胞、氧化壓力、細胞凋亡。

Abstract

Hyperlipidemia is the most important risk factor for atherosclerosis (AS). The process involves the accumulation of lipids in the arterial intima in the early stage of AS patients, and oxidative stress and apoptosis, and expressions of CD36 and Kruppel-like factor 4 (KLF4) proteins in vascular endothelial cells and macrophages may play important roles in AS formation. This study attempted to investigate the therapeutic potential of *Antrodia camphorata* extract (ACE) for AS patients. In this experiment, palmitic acid (Palmitic acid; PA)-treated vascular endothelial SVEC4-10 cells and RAW264.7 macrophages were used as a cell model with lipid accumulation. Then alleviation effect of ACE on lipid accumulation was evaluated by in vitro experiment. We first extracted high-purity of extract from *Antrodia camphorata*, used high performance liquid chromatography (HPLC) to determine the chemical index active components of ACE, used α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) assay to determine the free radical scavenging ability of ACE, used oil red dye staining to check whether ACE could effectively reduce oil droplet lipid accumulation in PA-treated SVEC 4-10 cells, used enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine whether ACE can effectively reduce expressions of inflammatory cytokines of TNF- α and IL-1 β of PA-treated SVEC 4-10 cells, used immunohistochemistry (IHC) staining to determine whether ACE could effectively reduce the expression of CD36 protein and enhance the expression of KLF4 protein of PA-treated SVEC 4-10 cells, and used migration assay to determine whether ACE could increase the mobility of RAW264.7 macrophages to clear hyperlipidemia SVEC4-10 cells. Our results showed that ACE has a good free radical scavenging ability, which could significantly alleviate the lipid accumulation in oil droplets, expressions of TNF- α , IL-1 β and CD36 protein, but enhance KLF4 protein expression in hyperlipidemia SVEC4-10 cells. In addition, ACE could promote the migration ability of RAW264.7 macrophages to hyperlipidemia SVEC4-10 cells. We suggested that ACE may alleviate lipid accumulation and treat AS by reducing oil droplet lipid accumulation and alleviating oxidative stress and apoptosis in vascular endothelial cells and macrophages.

Keywords: hyperlipidemia, atherosclerosis, *Antrodia camphorata*, vascular endothelial cells, macrophages, oxidative stress, apoptosis.

論文目錄

謝誌	i
中文摘要	ii
英文摘要	iii
論文目錄	iv
圖目錄	vi
第一章 緒論	1
第二章 材料與方法	5
第一節 實驗藥品與儀器	5
第二節 牛樟芝萃取物的測定	7
第三節 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼抗氧化能力測定	8
第四節 血管內皮細胞(SVEC4-10)高脂損害模式的建立	9
第五節 細胞存活率測試	10
第六節 油紅O染色	10
第七節 酵素結合免疫吸附分析法檢測細胞激素含量	11
第八節 細胞免疫螢光染色方法	12
第九節 巨噬細胞模式建立	13
第十節 細胞遷移試驗(transwell migration Assay)	13

第十一節 資料收集與統計分析	14
第三章 實驗結果	15
第一節 牛樟芝萃取物的HPLC圖譜	15
第二節 牛樟芝萃取物的抗氧化能力	16
第三節 棕櫚酸對血管內皮細胞的毒性	18
第四節 牛樟芝萃取物緩解棕櫚酸對血管內皮細胞的毒性	19
第五節 血管內皮細胞內脂質的累積	21
第六節 血管內皮細胞的發炎反應	22
第七節 KLF4與CD36的蛋白質表現	24
第八節 巨噬細胞向血管內皮細胞遷移的能力	26
第九節 巨噬細胞向血管內皮細胞遷移後的發炎反應	28
第四章 討論	29
第五章 結論	32
第六章 參考文獻	33

圖目錄

圖 1	牛樟芝萃取物的 HPLC 圖譜	15
圖 2	牛樟芝萃取物的抗氧化清除自由基能力	17
圖 3	不同濃度棕櫚酸處理血管內皮細胞的影響	18
圖 4	不同濃度牛樟芝萃取物對有無棕櫚酸處理血管內皮細胞的影響	20
圖 5	牛樟芝萃取物處理對清除血管內皮細胞中脂質累積的效果	21
圖 6	牛樟芝萃取物處理對棕櫚酸誘發內皮細胞發炎反應之影響	23
圖 7	牛樟芝萃取物處理對血管內皮細胞KLF4與CD36蛋白質表現之影響	25
圖 8	牛樟芝萃取物處理對巨噬細胞向脂質累積血管內皮細胞遷移能力的影響	27
圖 9	巨噬細胞向血管內皮細胞遷移後的發炎反應之影響	28

第一章 緒論

隨著工商社會的高度發展，人類面臨高血壓與動脈粥樣硬化(atherosclerosis)的健康問題日益加劇，動脈粥樣硬化是因為油脂累積、內膜增厚而形成粥狀斑塊，使得血管硬化、狹窄甚至阻塞的病理現象，當粥樣硬化發生在供應心臟的冠狀動脈時，可能導致心絞痛、心肌梗塞及猝死等致命疾病。高脂血症(hyperlipidemia)是動脈粥樣硬化最主要的危險因素，其中高膽固醇血症(hypercholesterolemia)是高脂血症中最常見的一種。而低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)膽固醇升高，是造成動脈粥樣硬化和冠狀動脈疾病(coronary artery disease, CAD)的主要危險因素(Shekelle et al., 1981)。高膽固醇血症、高血壓和糖尿病等心血管危險因素會增強活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)的產生，從而導致氧化壓力，這造成脂蛋白和磷脂的氧化，進而導致動脈粥樣硬化(Li et al., 2014)。脂質代謝障礙引起動脈粥樣硬化的初始原因，包括早期過程中脂質在動脈內膜中的累積。隨著病情發展，斑塊的破裂和血栓的形成都會導致血管狹窄和血管阻塞。儘管近年來心血管疾病(cardiovascular disease)的診斷和治療已經獲得很大的進展，但心血管疾病仍然是全球發病率和死亡率的主要原因(Dahlöf, 2010)。

巨噬細胞活性被認為在動脈粥樣硬化病理過程中扮演關鍵角色 (Moore and Tabas, 2011; Moore et al., 2013)，巨噬細胞被認為主要來源於循環單核細胞，這些單核細胞源自於骨髓(Serbina and Pamer, 2006)或脾臟(Robbins et al., 2012)，其被廣泛稱為單核吞噬細胞系統(mononuclear phagocyte system)。除此之外，具有高度增殖可塑性的血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)也可以轉分化為巨噬細胞(Chappell et al., 2016)，而轉錄因子 Kruppel 樣因子 4(Kruppel-like factor 4, KLF4)的活化可能是關鍵機制(Shankman et al., 2015)，因為 KLF4 是巨噬細胞活化的關鍵調節因子，與動脈粥樣硬化的形成和發展有關(Yan et al., 2008)，參與細胞增殖、細胞分化、細胞凋亡(apoptosis)和體細胞重編程的調節。KLF4 通常不在體內分化的 VSMC 中表達，當血管損傷時 KLF4 表現迅速上升(Gimbrone et al., 2000)，且在內皮細胞中已經證實 KLF4 的過度表現會誘導多種抗發炎與抗血栓形成因子的表現，包括內皮一氧化氮合酶(endothelial nitric-oxide synthase)和血栓調節蛋白(thrombomodulin) (Hamik et al., 2007)。巨噬細胞的活化在動脈粥樣硬化等慢性炎症性疾病中很重要，而腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)與白細胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)是有效的促發炎細胞因子，可以促進巨噬細胞活化，且 KLF4 已經被證明是控制巨噬細胞活化的關鍵信號通路的調節劑，可以降低 TNF- α 與 IL- 1β

誘導巨噬細胞活化的反應(Feinberg et al., 2005)。巨噬細胞在脂質調節中也具有重要作用，因為這些巨噬細胞可以吞噬脂質、死細胞和其他被視為危險信號的物質，它們會黏附於活化的血管內皮細胞(vascular endothelial cell, VEC)，再進入血管內皮下細胞空間，聚集到病變部位(Gimbrone and Garcia-Cardena, 2016)，然後巨噬細胞增殖成為晚期斑塊(Robbins et al., 2013)，這些垂死的巨噬細胞便是導致斑塊形成的核心原因(Tabas, 2010)。富含脂質的巨噬細胞是動脈粥樣硬化的主要因素(Zhang et al, 2018)，巨噬細胞在斑塊內可以吸收脂質沉積顆粒並轉化為泡沫細胞(foam cell) (Lusis, 2000)，這些泡沫細胞會進一步誘導一系列的炎症反應，使得更多的脂蛋白滯留和持續的慢性炎症(Libby et al., 2000)，粥狀斑塊中的巨噬細胞的遷移能力和胞吐死亡細胞的能力也會降低，造成無法改善炎症。巨噬細胞上的清道夫受體(scavenger receptor)，尤其是 CD36 是病變巨噬細胞轉化為泡沫細胞的主要標誌物(Kunjathoor et al., 2002)，有研究顯示病變巨噬細胞增加與心血管疾病的風險增加具相關性(Hellings et al., 2008; Merckelbach et al., 2016)。氧化低密度脂蛋白(oxLDL)會進一步誘導泡沫細胞壞死，最終導致斑塊破裂，從而引發危及生命安全的心血管疾病(Virmani et al., 2002)。這結果說明巨噬細胞依賴性炎症對動脈粥樣硬化發展具有強烈的影響。因此，

探索巨噬細胞以降低動脈粥樣硬化性心血管疾病的風險，已成為近年來的研究熱點。

牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)是一種廣泛使用於傳統醫學中的真菌，已被用來治療癌症、高血壓和肝病等疾病(Geethangili and Tzeng, 2011)。其經由化學成分研究發現其含有多醣類(polysaccharides)、三萜類化合物(Triterpenoids)等多種活性成分(Shen et al., 2003)，而三萜類是牛樟芝子實體中的主要活性成分，其中 Antcin-B 和 Antcin-H 具有抗炎、抗癌、殺蟲和保肝活性，Antcin-C 和 Antcin-H 在胞外實驗具有抗炎和抗癌活性，Antcin-K 和 EK100 則具有抗高血脂和抗糖尿病的作用(Wang et al., 2019)。本研究欲探討牛樟芝萃取物，對於動脈粥樣硬化的調節潛力。

棕櫚酸(Palmitic acid)是一種飽和脂肪酸，普遍存在於動植物油脂中，如棕櫚油、牛奶、肉類和多種植物油。攝入過多的脂肪酸會導致游離脂肪酸水平升高，進而導致代謝疾病(Lai et al., 2016)。游離脂肪酸，尤其是棕櫚酸等飽和脂肪酸，可誘導各種細胞凋亡，可能通過增加 ROS 刺激促炎細胞因子分泌來引起細胞壓力(Du et al., 2022)。在評估脂毒性的細胞實驗中，使用棕櫚酸處理細胞是目前常用的模式(Luo et al., 2012)。本研究使用棕櫚酸處理血管內皮細胞作為脂質累積細胞模式，以胞外實驗(in vitro)評估牛樟芝萃取物對於脂質累積的緩解作用。

第二章 材料與方法

本研究使用棕櫚酸處理血管內皮細胞 SVEC4-10 作為脂質累積細胞模式。

第一節 實驗藥品與儀器

一、實驗藥品與試劑

(一) Corning (New York, USA)

Transwells

(二) Genetex (Irvine, California, USA)

KLF4 (GTX101508)

(三) Gibco BRL (Grand Island, New York, USA)

high-glucose dulbecco's modified eagle medium

L-glutamine

penicillin

sodium bicarbonate

sodium pyruvate

streptomycin

trypsin

(四) HyClone (Logan, Utah, USA)

胎牛血清 (Fetal Bovine Serum)

(五) Invitrogen (Carlsbad, California, USA)

IL-1 β (88-7013)

TNF- α (88-7324)

(六) Santa Cruz Biotechnology Inc.(Dallas, Texas, USA)

CD36 (sc-7309)

(七) Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)

1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH) (D9132)

2% paraformaldehyde

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (D3286)

L-Ascorbic acid (L-AA) (A5960)

methanol (322415)

palm acid (cat: P0500)

thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)

(八) 新竹食品工業發展研究所細胞庫(FIRDI) (Hsinchu, Taiwan)

血管內皮細胞(SVEC4-10) (BCRC-60220)

巨噬細胞(RAW264.7) (BCRC-60001)

(九) 吉亞生物科技股份有限公司 (ARJIL Pharmaceuticals LLC)

(Hsinchu, Taiwan)

牛樟芝萃取物(*Antrodia camphorata* extract)

二、儀器設備

96 孔盤 (96 well) (Thermo Scientific Nunc®, Nunc AS, Copenhagen, Denmark)

培養箱 (Thermo-3130, Massachusetts, USA)

倒立式光學顯微鏡照相系統 (Leica DM-IRB; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)

微量盤分光光度計 (Microplate Spectrophotometer) (μ Quant, Biotek Instruments, Inc., Vermont, USA)

第二節 牛樟芝萃取物的測定

高效能液相層析法 (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) 是一種常用於定性和定量的分析方法，藉由分析物的分子量大小以及滯留性的強弱進行分離，其結果以層析圖或是光譜的方式呈現，可以利用層析圖中出現的峰值時間，也就是分析物的滯留時間作定性，而分析物的峰值大小作定量。

牛樟芝萃取物 (*Antrodia camphorata* extract) 是一種來自牛樟芝子實體的萃取物，由吉亞生物科技股份有限公司 (ARJIL Pharmaceuticals LLC) 提供 (編號為 AR100-DS1)。本試驗藉由 HPLC 檢測牛樟芝萃取物的化學指標活性成分之含量，其利用標準藥材之標準品的最佳吸收波長進行。本試驗委託禾百安檢驗公司進行牛樟芝萃取物活性物的化學指標

活性成分分析圖譜。

第三節 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼抗氧化能力測定

DPPH 自由基清除能力試驗是一個檢測成分是否具有抗氧化能力的方式。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 是含穩定自由基分子的深紫色結晶粉末，溶於甲醇或乙醇時會呈現藍紫色，當加入的成分具有抗氧化能力時，便會阻斷其自由基的反應，使溶液從藍紫色轉為清澈的橘黃色，而加入的成分抗氧化能力越好，溶液呈現的顏色則會越淡。

我們取 1mL，濃度 1.5 mM/mL 的 DPPH，與 9 mL 的甲醇(methanol) 混合，形成濃度 0.15 mM/mL 的 DPPH 溶液以測定牛樟芝萃取物的抗氧化能力。將 100 μ L 不同濃度的牛樟芝萃取物 (0,10, 20, 50 μ g/mL)置於 96 孔盤中，其中濃度 0 μ g/mL 即為 100 μ L 的 dd H₂O，隨後加入 100 μ L，濃度 0.15 mM/mL 的 DPPH，均質化後於室溫下避光靜置 30 分鐘，再使用微量盤分光光度計以波長 517 nm 測定其吸光值，另外也同時測定標準物 L-抗壞血酸(L-Ascorbic acid)的吸光值進行對照，標準物的濃度為 0, 10, 20, 50, 100, 200 μ g/mL，而濃度 0 μ g/mL 亦為 100 μ L 的 dd H₂O，此試驗進行三重複，並使用以下公式計算：DPPH 自由基清除率 (%)=[1-(實驗組吸光值/對照組吸光值)] \times 100% (Gyamfi et al., 1999)。

第四節 血管內皮細胞(SVEC4-10)高脂損害模式的建立

本實驗之血管內皮細胞(SV40 transformed Vascular endothelial cells ; SVEC4-10)購自新竹食品工業發展研究所細胞庫，使用 high-glucose dulbecco's modified eagle mdium 進行培養，同時補充 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum), 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.11 g/L sodium pyruvate, 4 mM L-glutamine, 100 U/ mL penicillin 及 100 µg/mL streptomycin。這些細胞培養於恆溫 37°C 及 5% CO₂ 的濕潤培養箱中，使用 0.25% 胰蛋白酶(Trypsin)消化血管內皮細胞 1 分鐘，至大部分的細胞脫落。使用 24 孔培養盤，並將所有細胞密度調整至每孔 1×10⁵ 個細胞。24 小時後，依組別添加 0.75 mM 的棕櫚酸以及牛樟芝萃取物(10, 20, 50 µg/mL)於血管內皮細胞培養 24 小時後進行試驗(Oh et al., 2018)。

此試驗共分為 4 組，分別為(1)控制組、(2)牛樟芝萃取物處理組(添加 10, 20, 50 µg/mL 的牛樟芝萃取物)、(3)棕櫚酸處理組(添加 0.75 mM/mL 的棕櫚酸)及(4)牛樟芝萃取物+棕櫚酸處理組。反應 24 小時後用磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate buffered saline, PBS)洗滌，隨後以 2% 多聚甲醛溶液(2% paraformaldehyde)固定細胞，於室溫下靜置 15 分鐘後，再用 PBS 清洗。最後以倒立式光學顯微鏡照相系統拍攝細胞型態。

第五節 細胞存活率測試

MTT 是一種可以接受氫離子的黃色化合物，可利用 MTT 試驗偵測活細胞的粒線體。在細胞粒線體中琥珀酸脫氫酶(Succinate dehydrogenase)的作用下，MTT 的四唑環(Tetrazolium)會斷裂並產生氧化還原反應形成甲臍(formazan)，其為藍紫色的結晶，再藉由二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)有機溶劑將其溶解後可得紫色液體，因甲臍的生成量與活細胞數目成正比，故顏色的深淺即可代表細胞數目的多寡，隨後震盪 10 分鐘使其均質化，再以波長 570 nm 檢測其吸光值。

本試驗將 1×10^5 cells/mL 之血管內皮細胞如第三節所述組別分組，共同培養 24 小時後，直接加入 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液隨後培養 2 小時並去除上清液，再每孔加入 100 μ L 的 DMSO，震盪 5 分鐘後測量其 570 nm 之吸光值。

第六節 油紅 O 染色

油紅 O 為脂溶性染料，能對細胞或組織中的三酸甘油脂進行染色，而對磷脂質和固醇類的染色能力較弱。

本試驗使用油紅 O (Oil Red O) 染色檢測血管內皮細胞中的脂質累積，以 2% 三聚甲醛(paraformaldehyde)於室溫固定 10-15 分鐘後，用 PBS 清洗三次後再以 ddH₂O 清洗，再以 60% 異丙醇(isopropanol)浸潤，隨後

加入 5% 的油滴紅 O (Sigma-Aldrich)，於室溫下染色細胞 15 分鐘，接著吸去上清液，再用 60% 異丙醇(isopropanol)浸潤，用 ddH₂O 清洗 2 次，最後以光學顯微鏡拍攝以觀察內皮細胞中脂質累積的狀況。

第七節 酵素結合免疫吸附分析法檢測細胞激素含量

酵素結合免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，常用於檢測特定目標蛋白質的表現量，其利用抗體與抗原專一性結合的特性，配合呈色劑反應，利用呈色深淺來定量。且此試驗只需少量樣品即可進行，敏感性高還可以同時檢測多種抗體。

本試驗使用 ELISA 檢測內皮細胞中激素的表現量，內皮細胞培養 24 小時後，收集細胞上清液。使用 96 孔盤，於每孔加入 100 μ L 碳酸鹽緩衝液(carbonate buffer)，其含有適量炎性細胞因子的純化單株抗體 TNF- α 或是 IL-1 β ，靜置於 4 $^{\circ}$ C 並過夜。隔夜之後用含有 tween 20 的 0.05% 磷酸鹽緩衝液(PBST buffer)清洗 3 次以洗去未結合的抗體，隨後每孔加入 200 μ L 的阻斷液(Blocking solution)於室溫下反應 60 分鐘，以減少非專一性的結合。接著 PBST buffer 清洗 3 次，隨後每孔加入 100 μ L 的細胞上清液及抗體標準品 TNF- α 或是 IL-1 β 。隨後 PBST buffer 清洗 4 次，每孔加入 100 μ L 連結生物素的抗細胞激素(anti-cytokine)二級抗體(secondary antibody)，於室溫下反應 60 分鐘。PBST buffer 清洗 5

次，每孔加入 100 μ L Avidin 連結之過氧化酵素(avidin-horseradish peroxidase)，於室溫下反應 30 分鐘。PBST buffer 清洗 6 次，每孔加入 100 μ L 的受質(tetramethylbenzidine)，於室溫下避光反應 20 至 30 分鐘進行反應並使其呈色，最後以 2%的 H_2SO_4 終止反應，以波長 450 至 570 nm 檢測其吸光值。

第八節 細胞免疫螢光染色方法

本試驗利用細胞免疫螢光染色方法檢測經牛樟芝萃取出物處理的內皮細胞中 CD36 蛋白質以及 KLF4 蛋白質的表現。以 2% 三聚甲醛(paraformaldehyde)於室溫下固定內皮細胞 10-15 分鐘後，用 PBS 清洗三次，再加入 0.1% TritonX-100 溶液使細胞作用 15 分鐘，接著以 PBS 清洗三次，在保濕暗盒中以 2% 牛血清白蛋白(BSA)於室溫下固定 30 分鐘以減少非專一性的結合。之後加入以 2% BSA 稀釋的 CD36 (1:200) 或 KLF4 (1:200)，靜置於 4 $^{\circ}$ C 並過夜。隔夜之後以 PBS 清洗三次，加入以 1% BSA 稀釋的二級抗體，於室溫下作用 1 小時。接下來於避光處用 PBS 清洗三次，於室溫下用 1 μ g/mL 的 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)染細胞核 10 分鐘，再以 PBS 清洗 3 次，最後使用含螢光保護劑的封片膠進行封片以降低螢光衰退，並以光學顯微鏡拍攝觀察 CD36 和 KLF4 蛋白質的表現量。

第九節 巨噬細胞模式建立

本實驗之巨噬細胞(macrophage; RAW264.7)購自新竹食品工業發展研究所細胞庫，培養方式如同血管內皮細胞(SVEC4-10)：使用 high-glucose dulbecco's modified eagle mdium 進行培養，同時補充 10% 胎牛血清(Fetal Bovine Serum)、1.5 g/L sodium bicarbonate、0.11 g/L sodium pyruvate、4 mM L-glutamine、100 U/mL penicillin 和 100 µg/mL streptomycin。這些細胞培養於恆溫 37°C 及 5 % CO₂ 的濕潤培養箱中，用刮勺收集細胞。使用 24 孔培養盤，將所有細胞密度調整至每孔 1×10^5 個細胞，至遷移試驗使用。

第十節 細胞遷移試驗(transwell migration Assay)

當生物組織發炎時，巨噬細胞會穿過血管內膜至發炎區域進行修復，本試驗利用其特性，模擬血管內壁發炎，促使巨噬細胞向內膜遷移並產生免疫反應，藉此觀察牛樟芝萃取物處理對巨噬細胞之影響。

本試驗使用 8.0 µm 孔徑的 transwell 進行細胞遷移試驗。將血管內皮細胞培養 transwell 細胞培養盤上，培養盤上有一層血管內膜，以模擬血管內壁發炎。在細胞培養盤中，加入棕櫚酸，接著添加牛樟芝萃取物處理的血管內皮細胞(下層)，將巨噬細胞標記紅色螢光並置於上層的 transwell 內，若巨噬細胞受到炎性細胞因子的吸引會從上層遷移至下

層，利用螢光顯微鏡計數培養盤內的細胞，可得知巨噬細胞遷移能力是否有差異(Hwang et al., 2021)。

將 1×10^5 cells/mL 巨噬細胞標定 1,1'-Dioctadecyl-6,6'-Di (4-Sulfophenyl)活細胞紅螢光染劑，作用 48 小時後加入 transwell 上層。將培養基中的 1×10^5 cells/mL 血管內皮細胞接種於底盤下層並依組別添加棕櫚酸和牛樟芝萃取物，於每孔盤中培養於恆溫 37°C 及 5% CO_2 的濕潤培養箱中培養 48 小時，最後於以光學顯微鏡進行拍攝觀察巨噬細胞的遷移能力。

第十一節 資料收集與統計分析

每組試驗各組最少重複三次，所有的試驗數值都是用平均值(mean values) \pm 平均值標準誤差(standard error of the mean, SEM)來表示。圖表使用 SigmaPlot 12.5 版繪製及統計分析，而統計方法則是用單因子變異數分析(One-way ANOVA)或是雙因子變異數分析(Two-way ANOVA)，再用 S-N-K 多重差距檢定(Student-Newman-Keuls multiple range test)事後檢定做分析，具有顯著差異以*表示，*為 $p < 0.05$ ，**為 $p < 0.01$ ，***為 $p < 0.001$ 。

第三章 實驗結果

第一節 牛樟芝萃取物的 HPLC 圖譜

圖 1 為牛樟芝萃取物在 220 nm 的 HPLC 圖譜。以 antcin-K 標準溶液相比，檢測出該萃取物主要的活性成分為三萜類化合物 antcin-K。另外測定牛樟芝萃取物的 antcin-K 純度，顯示此萃取物中 antcin-K 的純度大於 90%。目前研究已得知三萜類化合物是牛樟芝最重要的化學成分之一，主要功能為抑制癌細胞的生長、抑制組織胺的釋放，防止過敏、促進肝功能等作用，三萜類也具有抗發炎之功用，而 antcin-K 可調節細胞凋亡。

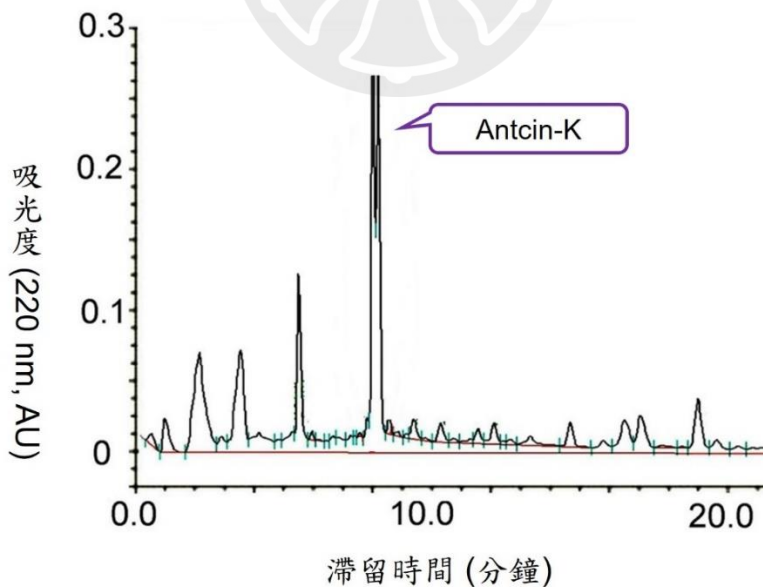


圖 1 牛樟芝萃取物的 HPLC 圖譜

於 UV 220 nm 時檢測出該萃取物主要的活性成分為三萜類化合物 antcin-K。

第二節 牛樟芝萃取物的抗氧化能力

圖 2 為牛樟芝萃取物的抗氧化清除自由基能力。圖 2A 可以觀察到不同濃度的標準品 L-抗壞血酸在與 DPPH 反應之後溶液顏色的變化，L-抗壞血酸為已知的抗氧化物，具有良好的自由基清除能力，在濃度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時溶液顏色呈現清澈黃色，藉此與牛樟芝萃取物的 DPPH 試驗進行比較。另外觀察不同濃度牛樟芝萃取物的溶液顏色，濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時溶液顏色已經明顯變淡，而濃度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時已呈現黃色。圖 2B 為 96 孔盤以波長 517nm 測定其吸光值後，計算並統計出不同濃度牛樟芝萃取物對自由基清除率變化的情形。試驗結果顯示 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛樟芝萃取物具有 96.82% 的自由基清除率，20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛樟芝萃取物具有 98.81% 的自由基清除率，50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛樟芝萃取物具有高達 99.8% 的自由基清除率，相較於控制組，均有顯著差異 ($p < 0.001$)。這些結果顯示牛樟芝萃取物具有顯著清除自由基的能力，且清除能力隨著濃度的增加而上升。

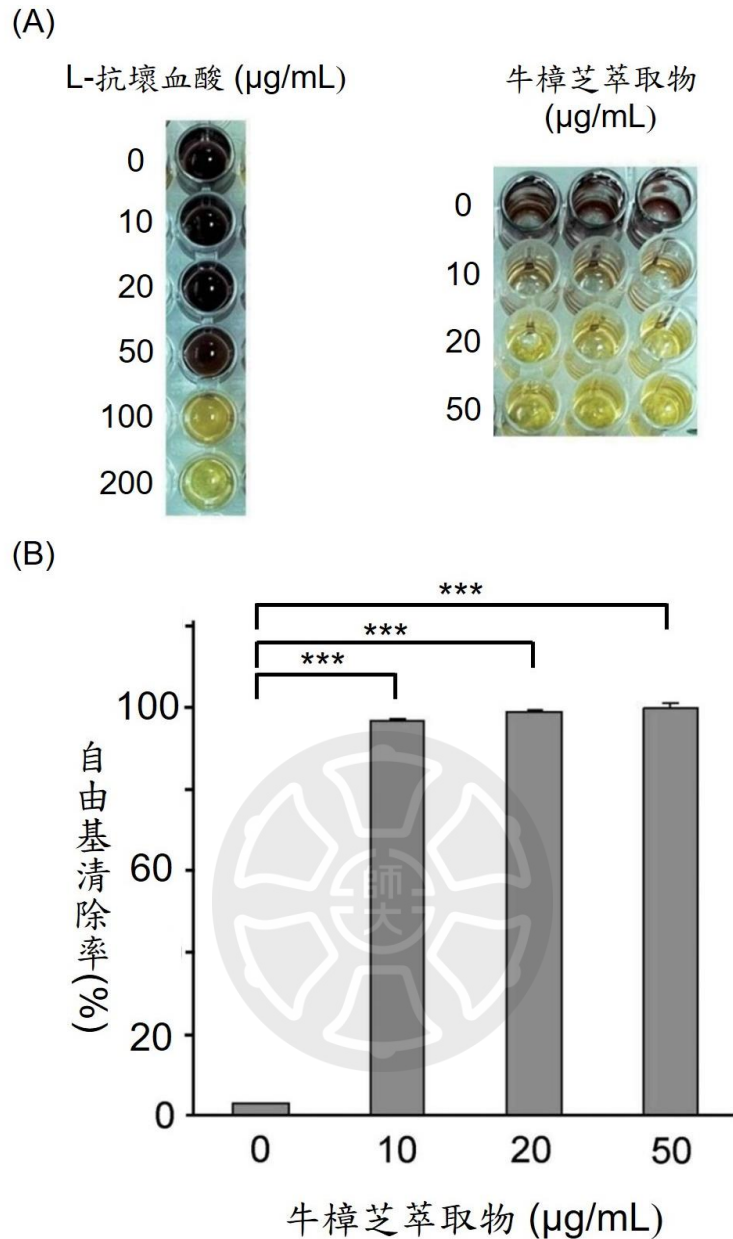


圖 2 牛樟芝萃取物的抗氧化清除自由基能力

(A) 檢測牛樟芝萃取物清除自由基的能力。同時與標準品 L-抗壞血酸進行比較。(B) 不同濃度 0, 10, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$ 牛樟芝萃取物的自由基清除率 (%)，檢測波長為 517 nm。實驗數據以 mean value \pm SEM 表示，並使用 One-way ANOVA 和 S-N-K 多重差距進行統計分析，具有顯著差異以 * 表示，*** 為 $p < 0.001$ 。

第三節 棕櫚酸對血管內皮細胞的毒性

圖 3 為不同濃度棕櫚酸處理血管內皮細胞的影響。MTT 用以檢測細胞粒線體活性，即代表活細胞數目，若溶液顏色越深表示活細胞數目越多。圖 3A 可以觀察到在棕櫚酸處理 24 小時後，隨著棕櫚酸濃度的增加，活細胞數目越少。圖 3B 為以波長 570 nm 檢測棕櫚酸處理 24 小時後的吸光值，與控制組的吸光值相比以計算出各組的細胞存活率(cell viability) (細胞存活率=處理組吸光值/控制組吸光值 × 100%)，結果顯示添加 0.75 mM/mL 棕櫚酸的細胞存活率剩下 75%，因此後續試驗以 0.75 mM/mL 棕櫚酸作為脂質累積細胞模式的添加濃度。

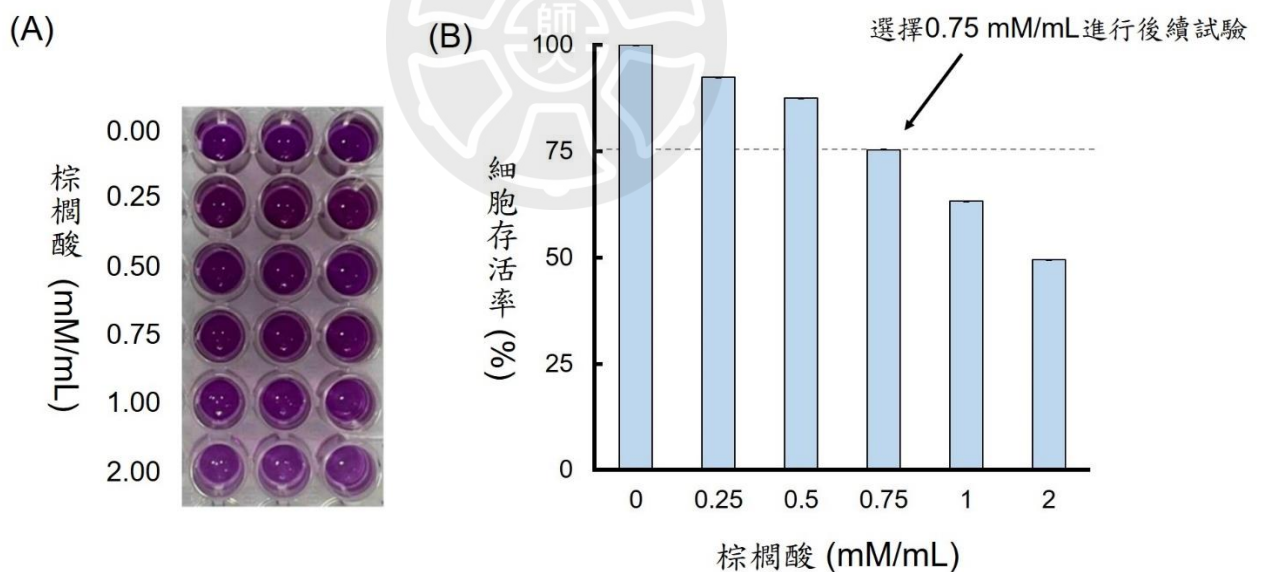


圖 3 不同濃度棕櫚酸處理血管內皮細胞的影響

(A) MTT 試驗檢測 0, 0.25, 0.75, 1.00, 2.00 mM/mL 的棕櫚酸對內皮細胞的影響。(B) 經棕櫚酸處理的 MTT 細胞存活率比較。再 0.75 mM/mL 細胞存活率僅剩 75%。實驗數據以 mean value ± SEM 表示。

第四節 牛樟芝萃取物緩解棕櫚酸對血管內皮細胞的毒性

圖 4 為不同濃度牛樟芝萃取物對有無棕櫚酸處理血管內皮細胞的影響。圖 4A 可以觀察到在沒有添加棕櫚酸處理時，單純添加牛樟芝萃取物處理對血管內皮細胞的活細胞數沒有明顯的差異，而經過 0.75 mM/mL 棕櫚酸處理之後，添加 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛樟芝萃取物的組別顏色有明顯的變淡，表示活細胞數目減少，此觀察結果與圖 3A 相符。添加牛樟芝萃取物之後，溶液的顏色有變深，即活細胞數目增加，且活細胞的數目隨著牛樟芝萃取物添加的濃度上升而增加。圖 4B 為添加不同濃度(0, 10, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 牛樟芝萃取物，有無添加棕櫚酸處理的細胞存活率(%) ($\text{cell viability} = \frac{\text{實驗組吸光值}}{\text{對照組吸光值}} \times 100\%$)，此結果顯示未添加棕櫚酸處理的組別之間並沒有顯著差異($p > 0.05$)。而在有添加棕櫚酸處理的情況下，添加 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛樟芝萃取物與添加 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛樟芝萃取物的組別相比沒有顯著差異($p > 0.05$)，而添加 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛樟芝萃取物具有顯著差異($p < 0.05$)，添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛樟芝萃取物也具有顯著差異($p < 0.01$)。而在相同濃度牛樟芝萃取物處理的情況下，有無棕櫚酸處理之間的細胞存活率比較，可以觀察到有棕櫚酸處理和沒有棕櫚酸處理的組別之間均有顯著差異($p < 0.05$)。此試驗結果表示棕櫚酸確實可以使血管內皮細胞存活率降低，而牛樟芝萃取物的添加可以緩解棕櫚酸對血管內皮細胞造成的凋亡。

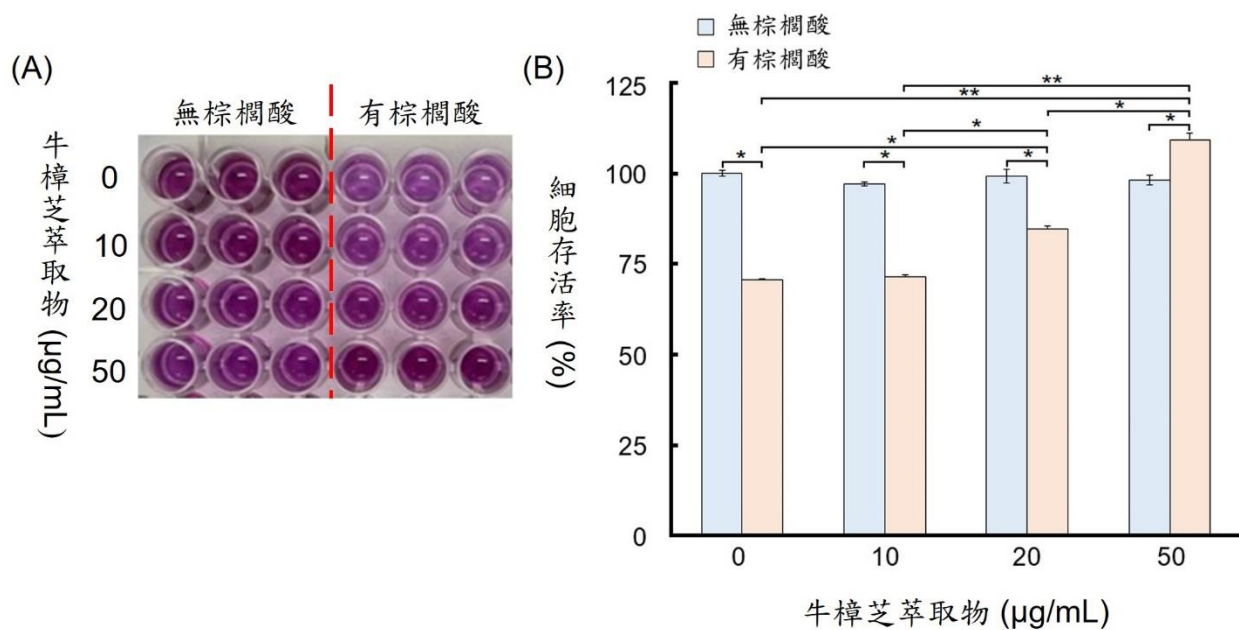


圖 4 不同濃度牛樟芝萃取物對有無棕櫚酸處理血管內皮細胞的影響

(A) MTT 試驗檢測濃度 0, 10, 20, 50 µg/mL 的牛樟芝萃取物對血管內皮細胞以及經棕櫚酸處理的血管內皮細胞之影響。(B) 濃度 0, 10, 20, 50 µg/mL 的牛樟芝萃取物對血管內皮細胞以及經棕櫚酸處理的血管內皮細胞的 MTT 細胞存活率比較。實驗數據以 mean value ± SEM 表示。並使用 Two-way ANOVA 和 S-N-K 多重差距進行統計分析。具有顯著差異以*表示，*為 $p < 0.05$ ，**為 $p < 0.01$ 。

第五節 血管內皮細胞內脂質的累積

圖 5 為牛樟芝萃取物處理對清除血管內皮細胞中脂質累積的效果。

當內皮細胞內有油滴脂質累積時會呈現紅色，累積越多則顏色越深。由此試驗結果可以觀察到，當血管內皮細胞經過棕櫚酸誘導之後，脂質會有明顯的累積，而添加牛樟芝萃取物處理之後，脂質的累積具有明顯的減少，且累積的含量隨著牛樟芝萃取物濃度的上升而減少。此結果顯示牛樟芝萃取物可以有效清除血管內皮細胞中脂質的累積，且清除能力隨著濃度的增加而上升。

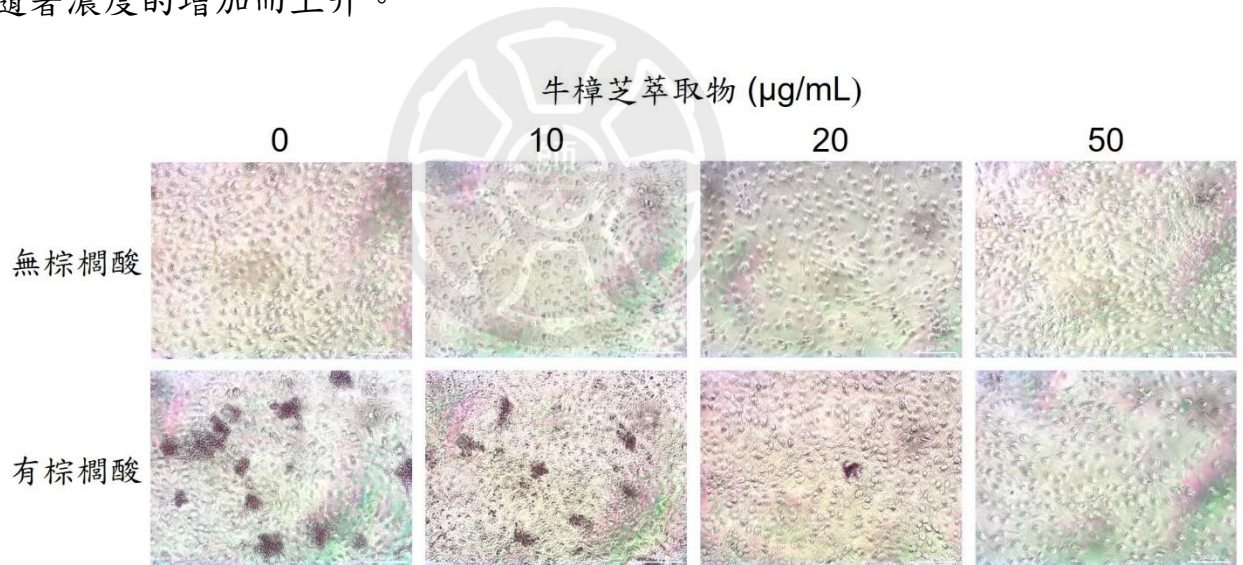


圖 5 牛樟芝萃取物處理對清除血管內皮細胞中脂質累積的效果

在倍率 20X 下觀察到牛樟芝萃取物具有明顯清除血管內皮細胞脂質累積的調節效果。

第六節 血管內皮細胞的發炎反應

圖 6 為牛樟芝萃取物對棕櫚酸誘發血管內皮細胞發炎反應之影響。

圖 6A 為牛樟芝萃取物處理對血管內皮細胞 TNF- α 的影響，其結果顯示在未經棕櫚酸處理的情況下，單純添加牛樟芝萃取物處理細胞均沒有顯著差異($p>0.05$)。而當內皮細胞經過 0.75 mM/mL 棕櫚酸處理之後，其炎性細胞因子 TNF- α 的表現量顯著上升($p<0.01$)，經過不同濃度牛樟芝萃取物處理細胞之後，TNF- α 的表現量則又顯著下降($p<0.01$)，且下降至與控制組相比無顯著差異($p>0.05$)。圖 6B 為牛樟芝萃取物處理對血管內皮細胞 IL-1 β 的影響，其結果與 TNF- α 相似，在未經棕櫚酸處理的情況下，單純添加牛樟芝萃取物處理細胞都沒有顯著差異($p>0.05$)。而當內皮細胞經過 0.75 mM/mL 棕櫚酸處理之後，其炎性細胞因子 IL-1 β 的表現量顯著上升($p<0.01$)，添加不同濃度牛樟芝萃取物調解，IL-1 β 的表現量則又顯著下降($p<0.05$)且下降至與控制組相比無顯著差異。此試驗結果顯示牛樟芝萃取物可顯著緩解棕櫚酸處理血管內皮細胞引起的發炎反應。

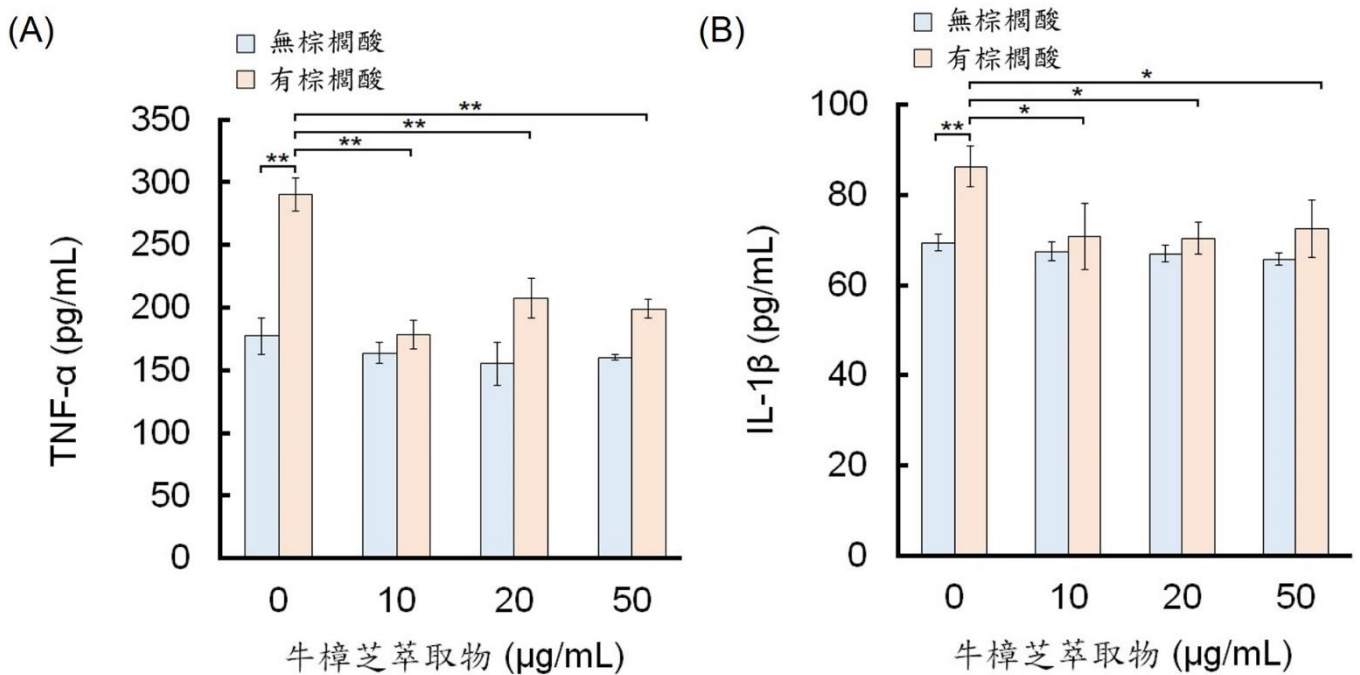
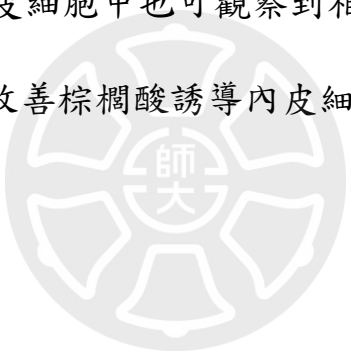


圖 6 牛樟芝萃取物處理對棕櫚酸誘發內皮細胞發炎反應之影響

(A)添加濃度 0, 10, 20, 50 μg/mL 牛樟芝萃取物對血管內皮細胞 TNF-α 的影響。(B)添加濃度 0, 10, 20, 50 μg/mL 牛樟芝萃取物對血管內皮細胞 IL-1β 的影響。實驗數據以 mean value ± SEM 表示，並使用雙因子 ANOVA 和 S-N-K 多重差距進行統計分析，具有顯著差異以*表示，*為 $p < 0.05$ ，**為 $p < 0.01$ 。

第七節 KLF4 與 CD36 的蛋白質表現

圖 7 為牛樟芝萃取物處理對血管內皮細胞 KLF4 與 CD36 蛋白質表現之影響。此試驗牛樟芝萃取物濃度選用 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。圖 7A 顯示當內皮細胞經過棕櫚酸誘導之後，其 KLF4 蛋白質的表現量明顯減少，經過牛樟芝萃取物處理之後，KLF4 蛋白質的表現量增強。圖 7B 顯示當血管內皮細胞經過棕櫚酸誘導之後，其 CD36 蛋白質的表現量會顯著增加，經過牛樟芝萃取物處理之後，CD36 蛋白質的表現量降低，且在未經過棕櫚酸誘導的內皮細胞中也可觀察到相似的結果。這些結果顯示牛樟芝萃取物可明顯改善棕櫚酸誘導內皮細胞脂質累積後 KLF4 與 CD36 的蛋白質表現量。



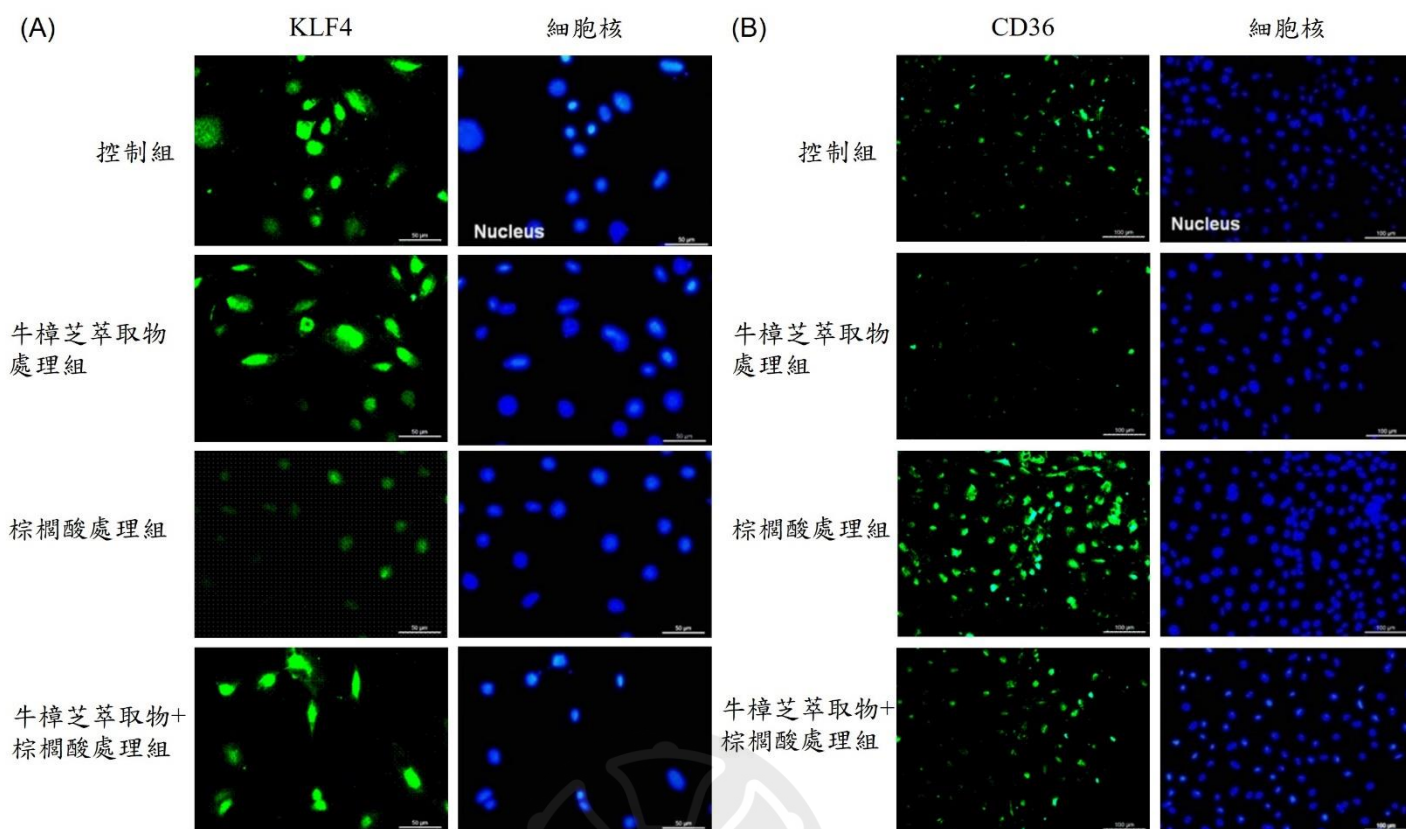


圖 7 牛樟芝萃取物處理對血管內皮細胞 KLF4 與 CD36 蛋白質表現之影響

(A)KLF4 蛋白質的表現。牛樟芝萃取物處理棕櫚酸誘導血管內皮細胞脂質累積後會增強 KLF4 蛋白質的表現(比例尺：50 μm)。(B)CD36 蛋白質的表現。牛樟芝萃取物處理棕櫚酸誘導血管內皮細胞脂質累積後會降低 CD36 蛋白質的表現(比例尺：100 μm)。

第八節 巨噬細胞向血管內皮細胞遷移的能力

圖 8 為牛樟芝萃取物處理對巨噬細胞向血管內皮細胞遷移能力的影響。此試驗牛樟芝萃取物濃度選用 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。圖 8A 為此試驗設計的示意圖，將已被標示紅色螢光的巨噬細胞置於上層的 transwell 內，若巨噬細胞受到炎性細胞因子的吸引，會穿過 transwell 遷移到下層的血管內皮細胞層，以模擬體內巨噬細胞穿過血管內膜進行免疫反應。圖 8B 觀察到當血管內皮細胞受到棕櫚酸誘發的發炎反應後，會促使巨噬細胞向血管內皮細胞遷移，而添加牛樟芝萃取物處理之後，巨噬細胞遷移的能力明顯增加。此試驗結果顯示，牛樟芝萃取物可以增進巨噬細胞的遷移能力。



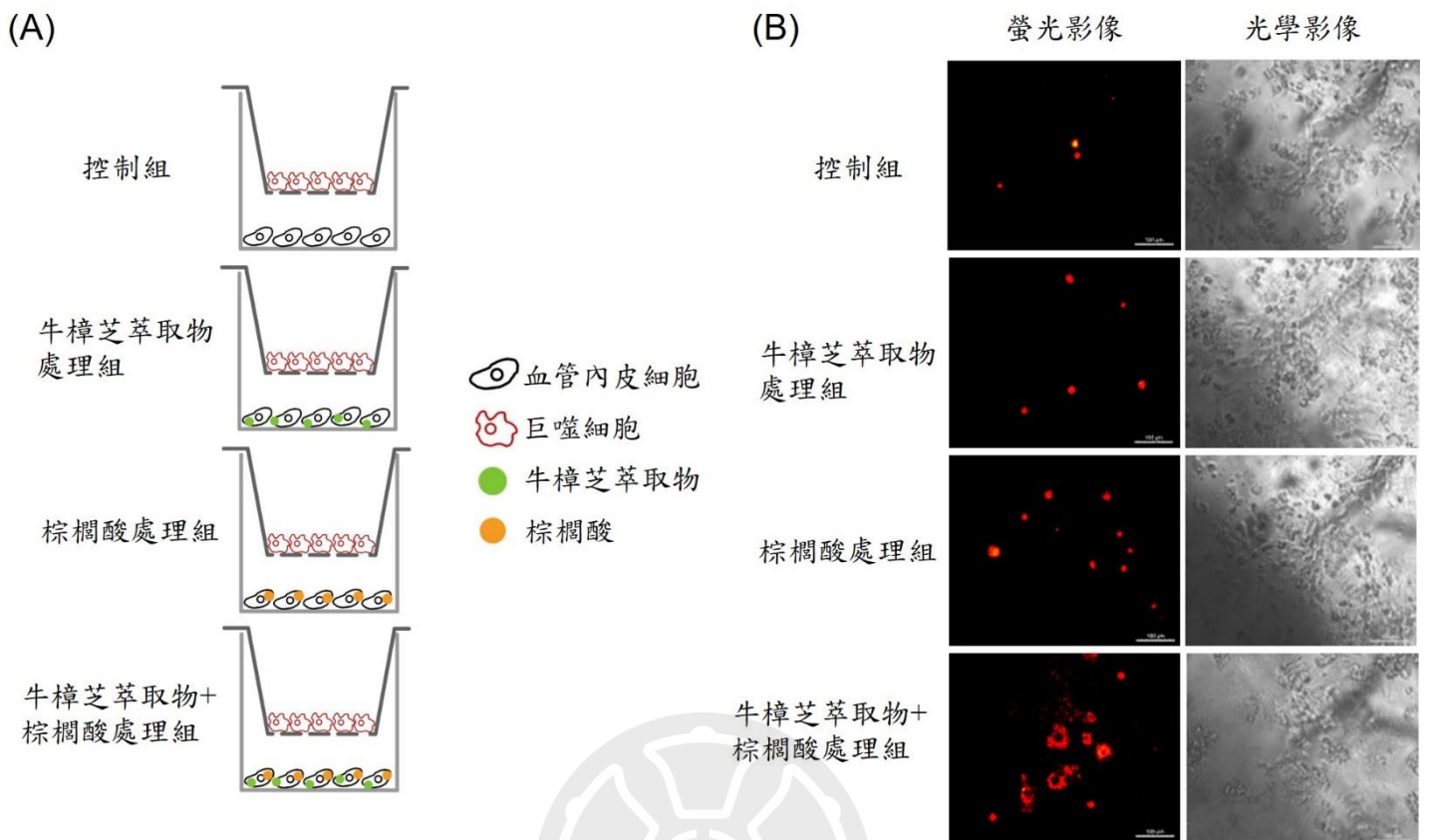


圖 8 牛樟芝萃取物處理對巨噬細胞向脂質累積血管內皮細胞遷移能力的影響

(A)利用遷移試驗偵測牛樟芝萃取物是否增加巨噬細胞的移動能力來清除及修復棕櫚酸引起發炎的模式圖。(B)當血管內皮細胞受到棕櫚酸誘發的發炎後，會促使巨噬細胞向血管內皮細胞遷移，而添加牛樟芝萃取物處理之後，巨噬細胞遷移的能力增加。

第九節 巨噬細胞向血管內皮細胞遷移後的發炎反應

圖 9 為巨噬細胞向血管內皮細胞遷移後的發炎反應之影響。圖 9A 為巨噬細胞與血管內皮細胞相互作用後的 TNF- α 表現量。結果顯示經棕櫚酸誘導發炎的血管內皮細胞之 TNF- α 表現量表現具顯著上升 ($p < 0.05$)，而經牛樟芝萃取出處理後 TNF- α 表現量表現則顯著下降 ($p < 0.05$)。圖 9B 為巨噬細胞與血管內皮細胞相互作用後的 IL-1 β 表現量。結果顯示經棕櫚酸處理之後 IL-1 β 表現量與控制組無顯著差異。此試驗結果顯示，牛樟芝萃取出物可以促使巨噬細胞清除及修復棕櫚酸引起的細胞發炎反應。

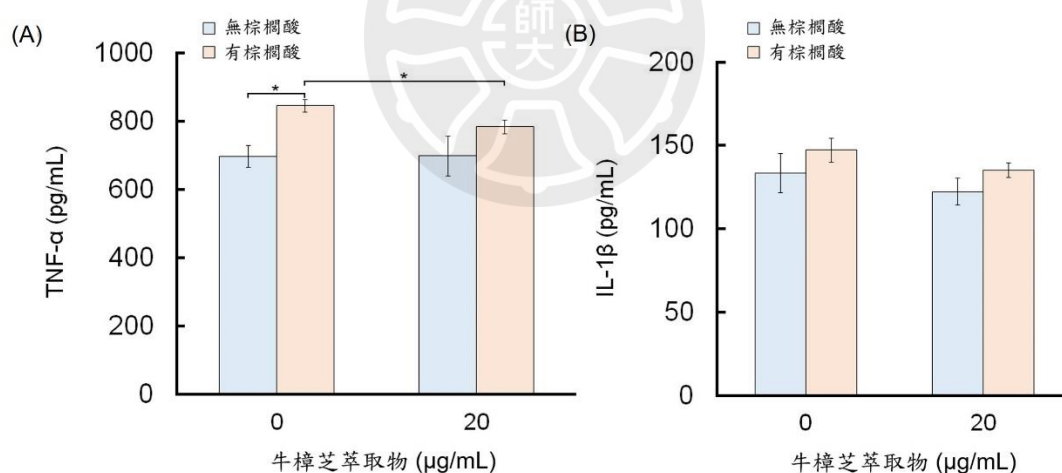


圖 9 巨噬細胞向血管內皮細胞遷移後的發炎反應之影響

(A)巨噬細胞與血管內皮細胞相互作用後的 TNF- α 表現量。(B)巨噬細胞與血管內皮細胞相互作用後的 IL-1 β 表現量。實驗數據以 mean value \pm SEM 表示，並使用 Two-way ANOVA 和 S-N-K 多重差距進行統計分析。具有顯著差異以*表示，*為 $p < 0.05$ 。

第四章 討論

台灣傳統藥用牛樟芝的提取物在細胞和臨床前研究中表現出抗炎活性，本論文主要探討傳統中藥牛樟芝萃取物對棕櫚酸處理血管內皮細胞誘發脂質累積的緩解作用，牛樟芝萃取物是一種來自牛樟芝子實體的萃取物，由吉亞生物科技股份有限公司提供，從本論文研究結果顯示牛樟芝萃取物的主要活性成分來自於 Antcin-K(圖 1)。

從本論文研究結果顯示牛樟芝萃取物具有很好的抗氧化能力(圖 2)，過去研究顯示牛樟芝的化學成分具有抗氧化的能力(Shen et al., 2006)，而三萜類化合物可顯著降低 iNOS 和 COX-2 的產生(Chen et al., 2016)，本實驗結果與兩者相似。

此外，本論文研究結果顯示棕櫚酸處理 24 小時後會誘發高脂堆積於血管內皮細胞，而牛樟芝萃取物能夠顯著緩解棕櫚酸對血管內皮細胞的細胞毒性(圖 3 及圖 4)。過去研究顯示牛樟芝萃取物對人類白血病細胞 HL-60 以及人類肝癌細胞株 Hep 3B 細胞具有顯著的細胞毒性，但對內皮細胞沒有表現出顯著的細胞毒性(Geethangili and Tzeng, 2011)。這表示牛樟芝萃取物可以保護內皮細胞受高脂毒性。

為研究牛樟芝萃取物處理是否具有減緩經由棕櫚酸誘發脂質累積的血管內皮細胞，我們以油紅 O 染色法分析油脂分布來評估。實驗結

果如圖 5 所示，牛樟芝萃取物確實具有清除內皮細胞油滴脂質累積的效果。過去研究顯示牛樟芝萃取物可減緩高脂飼料引起的脂肪細胞肥大(Kuo et al., 2016)，進而降低脂肪的累積。

從本論文研究結果顯示牛樟芝萃取物處理顯著緩解棕櫚酸對內皮細胞的發炎反應(圖 6)，本實驗發現棕櫚酸誘發內皮細胞脂質累積會明顯增加炎性細胞因子 TNF- α 以及 IL-1 β 的表現量($p < 0.01$) (圖 6)。過去研究顯示 Antcin-K 可抑制類風濕性滑膜成纖維細胞(RASFs)中促炎細胞因子的產生(Achudhan et al., 2021)，另外也有研究指出 Antcin-K 表現出抗發炎活性(Shen et al., 2007; Chen et al., 2011)。

由於巨噬細胞的活化在動脈粥樣硬化等慢性炎症性疾病中很重要，而 TNF- α 與 IL-1 β 是有效的促發炎細胞因子，可以促進巨噬細胞活化，而 KLF4 已經被證明是控制巨噬細胞活化的關鍵信號通路的調節劑，可以降低 TNF- α 與 IL-1 β 誘導巨噬細胞活化的反應(Feinberg et al., 2005)。本論文研究結果顯示棕櫚酸誘導內皮細胞脂質累積後會降低 KLF4 蛋白質的表現；而添加牛樟芝萃取物會增強棕櫚酸處理內皮細胞後 KLF4 蛋白質的表現(圖 8A)。棕櫚酸誘導內皮細胞脂質累積後會增強 CD36 蛋白質的表現；而添加牛樟芝萃取物會降低棕櫚酸處理內皮細胞後 CD36 蛋白質的表現(圖 8B)。有研究顯示具有高度增殖可塑性的血管平滑肌細胞 VSMC 可以轉分化為巨噬細胞(Chappell et al., 2016)，而 KLF4

的活化可能是關鍵機制(Shankman et al., 2015)。此外，CD36 是病變巨噬細胞轉化為泡沫細胞的主要標誌物(Kunjathoor et al., 2002)，而病變的巨噬細胞與心血管疾病的風險增加相關(Hellings et al., 2008; Merckelbach et al., 2016)。圖 8 的實驗結果棕櫚酸誘導內皮細胞脂質累積後會降低 KLF4 蛋白質的表現，說明棕櫚酸高脂累積可能會減緩血管平滑肌細胞 VSMC 轉分化為巨噬細胞，但是增加 CD36 蛋白質的表現，說明可能會增加心血管疾病的風險。而牛樟芝萃取物處理增強 KLF4 蛋白質的表現，以及降低 CD36 蛋白質的表現，則有利於降低心血管疾病的風險。

巨噬細胞主要來源於循環單核細胞，它們會穿過血管內皮細胞，再進入血管內皮下細胞空間，聚集到病變部位(Gimbrone et al., 2000)，然後巨噬細胞增殖成為晚期斑塊 (Robbins et al., 2013)，巨噬細胞在斑塊內可以吸收脂質沉積顆粒並轉化為泡沫細胞(Lusis, 2000)。這些泡沫細胞會進一步誘導一系列的炎症反應，使得更多的脂蛋白滯留和持續的慢性炎症(Libby et al., 2000)。本論文利用遷移試驗研究結果顯示牛樟芝萃取物確實可以促進巨噬細胞向棕櫚酸誘導內皮細胞脂質累積後的遷移能力(圖 8)，說明牛樟芝萃取物處理確實有利於巨噬細胞穿過黏附於活化的血管內皮細胞，有利於內皮細胞油滴脂質累積的清除，這有利於降低心血管疾病的風險。

第五章 結論

本研究嘗試探討牛樟芝萃取物牛樟芝萃取物對於動脈粥樣硬化的調節潛力，從本論文實驗結果發現牛樟芝萃取物確實具備很好的自由基清除能力，可以顯著降低棕櫚酸處理血管內皮細胞的油滴脂質累積，減少 TNF- α 、IL-1 β 以及 CD36 的表現量，但是增強 KLF4 蛋白質表現；此外，牛樟芝萃取物可以促進 RAW264.7 巨噬細胞對於脂質累積內皮細胞的遷移能力。綜合上述結果，我們認為牛樟芝萃取物可以透過減少血管內皮細胞與巨噬細胞的油滴脂質累積，抑制巨噬細胞的氧化壓力與細胞凋亡，來達到緩解脂質累積。

本研究嘗試探討牛樟芝提取物牛樟芝萃取物對於動脈粥樣硬化的調節潛力，未來希望利用高脂飲食處理的 ApoE^{-/-}小鼠作為動脈粥狀硬化動物模式，藉由動物實驗評估牛樟芝萃取物對於脂質累積以及動脈粥狀硬化的緩解作用。

第六章 參考文獻

- Achudhan, D., Liu, S. C., Lin, Y. Y., Huang, C. C., Tsai, C. H., Ko, C. Y., Chiang, I. P., Kuo, Y. H., and Tang, C. H. (2021). Antcin K inhibits TNF- α , IL-1 β and IL-8 expression in synovial fibroblasts and ameliorates cartilage degradation: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Frontiers in immunology*, *12*, 790925. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.790925>
- Chappell, J., Harman, J. L., Narasimhan, V. M., Yu, H., Foote, K., Simons, B. D., Bennett, M. R., and Jørgensen, H. F. (2016). Extensive proliferation of a subset of differentiated, yet plastic, medial vascular smooth muscle cells contributes to neointimal formation in mouse injury and atherosclerosis models. *Circulation research*, *119*(12), 1313–1323. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309799>
- Chen, Y. C., Liu, Y. L., Li, F. Y., Chang, C. I., Wang, S. Y., Lee, K. Y., Li, S. L., Chen, Y. P., Jinn, T. R., and Tzen, J. T. (2011). Antcin A, a steroid-like compound from *Antrodia camphorata*, exerts anti-inflammatory effect via mimicking glucocorticoids. *Acta pharmacologica sinica*, *32*(7), 904–911. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.36>
- Chen, Y. T., Shen, Y. C., Chang, M. C., and Lu, M. K. (2016). Precursor-feeding strategy on the triterpenoid production and anti-inflammatory activity of *Antrodia cinnamomea*. *Process biochemistry*, *51*(8), 941–949. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.001>
- Dahlöf, B. (2010). Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *The American journal of cardiology*, *105*(1 Suppl), 3A–9A. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.10.007>
- Du, Z., Lin, L., Li, Y., Sun, M., Liang, Q., Sun, Z., and Duan, J. (2022). Combined exposure to PM2.5 and high-fat diet facilitates the hepatic lipid metabolism disorders via ROS/miR-155/PPAR γ pathway. *Free radical biology and medicine*, *190*, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.07.024>
- Feinberg, M. W., Cao, Z., Wara, A. K., Lebedeva, M. A., Senbanerjee, S., and Jain, M. K. (2005). Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages. *Journal of biological chemistry*, *280*(46), 38247–38258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509378200>
- Geethangili, M., and Tzeng, Y. M. (2011). Review of pharmacological effects of *Antrodia camphorata* and its bioactive compounds. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, *2011*, 212641. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep108>
- Gimbrone, M. A., Jr, and García-Cardena, G. (2016). Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circulation research*, *118*(4), 620–636. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>
- Gimbrone, M. A., Jr, Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R., and Garcia-Cardena, G. (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Annals of the New York academy of sciences*, *902*, 230–240. <https://doi.org/10.1111/j.1749-33>

6632.2000.tb06318.x

- Gyamfi, M. A., Yonamine, M., and Aniya, Y. (1999). Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *General pharmacology: The vascular system*, 32(6), 661–667. [https://doi.org/10.1016/s0306-3623\(98\)00238-9](https://doi.org/10.1016/s0306-3623(98)00238-9)
- Hamik, A., Lin, Z., Kumar, A., Balcells, M., Sinha, S., Katz, J., Feinberg, M. W., Gerzsten, R. E., Edelman, E. R., and Jain, M. K. (2007). Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation. *Journal of biological chemistry*, 282(18), 13769–13779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700078200>
- Hellings, W. E., Moll, F. L., De Vries, J. P., Ackerstaff, R. G., Seldenrijk, K. A., Met, R., Velema, E., Derksen, W. J., De Kleijn, D. P., and Pasterkamp, G. (2008). Atherosclerotic plaque composition and occurrence of restenosis after carotid endarterectomy. *Journal of the American medical association*, 299(5), 547–554. <https://doi.org/10.1001/jama.299.5.547>
- Hwang, S. J., Song, Y. S., and Lee, H. J. (2021). Phaseolin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 cells and zebrafish. *Biomedicines*, 9(4), 420. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040420>
- Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J. S., Silverstein, R., Hoff, H. F., and Freeman, M. W. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *Journal of biological chemistry*, 277(51), 49982–49988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209649200>
- Kuo, Y. H., Lin, C. H., Shih, C. C., and Yang, C. S. (2016). Antcin K, a triterpenoid compound from *Antrodia camphorata*, displays antidiabetic and antihyperlipidemic effects via glucose transporter 4 and AMP-activated protein kinase phosphorylation in muscles. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2016, 4867092. <https://doi.org/10.1155/2016/4867092>
- Lai, C. I., Chu, Y. L., Ho, C. T., Su, Y. C., Kuo, Y. H., and Sheen, L. Y. (2016). Antcin K, an active triterpenoid from the fruiting bodies of basswood cultivated *Antrodia cinnamomea*, induces mitochondria and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in human hepatoma cells. *Journal of traditional and complementary medicine*, 6(1), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.026>
- Li, H., Horke, S., and Förstermann, U. (2014). Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 237(1), 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001>
- Libby, P., Aikawa, M., and Schönbeck, U. (2000). Cholesterol and atherosclerosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1529(1-3), 299–309. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00161-x](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00161-x)
- Luo, Y., Rana, P., and Will, Y. (2012). Palmitate increases the susceptibility of cells to

- drug-induced toxicity: an in vitro method to identify drugs with potential contraindications in patients with metabolic disease. *Toxicological sciences*, 129(2), 346–362. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs208>
- Lusis A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), 233–241. <https://doi.org/10.1038/35025203>
- Merckelbach, S., Leunissen, T., Vrijenhoek, J., Moll, F., Pasterkamp, G., and de Borst, G. J. (2016). Clinical risk factors and plaque characteristics associated with new development of contralateral stenosis in patients undergoing carotid endarterectomy. *Cerebrovascular diseases*, 42(1-2), 122–130. <https://doi.org/10.1159/000445529>
- Moore, K. J., and Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 145(3), 341–355. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.005>
- Moore, K. J., Sheedy, F. J., and Fisher, E. A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature reviews immunology*, 13(10), 709–721. <https://doi.org/10.1038/nri3520>
- Oh, S., Son, M., Lee, H. S., Kim, H. S., Jeon, Y. J., and Byun, K. (2018). Protective effect of pyrogallol-phloroglucinol-6,6-bieckol from *Ecklonia cava* on monocyte-associated vascular dysfunction. *Marine drugs*, 16(11), 441. <https://doi.org/10.3390/md16110441>
- Robbins, C. S., Chudnovskiy, A., Rauch, P. J., Figueiredo, J. L., Iwamoto, Y., Gorbatov, R., Etzrodt, M., Weber, G. F., Ueno, T., van Rooijen, N., Mulligan-Kehoe, M. J., Libby, P., Nahrendorf, M., Pittet, M. J., Weissleder, R., and Swirski, F. K. (2012). Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*, 125(2), 364–374. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.061986>
- Robbins, C. S., Hilgendorf, I., Weber, G. F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J. L., Gorbatov, R., Sukhova, G. K., Gerhardt, L. M., Smyth, D., Zavitz, C. C., Shikatani, E. A., Parsons, M., van Rooijen, N., Lin, H. Y., Husain, M., Libby, P., Nahrendorf, M., Weissleder, R., and Swirski, F. K. (2013). Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nature medicine*, 19(9), 1166–1172. <https://doi.org/10.1038/nm.3258>
- Serbina, N. V., and Pamer, E. G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology*, 7(3), 311–317. <https://doi.org/10.1038/ni1309>
- Shankman, L. S., Gomez, D., Cherepanova, O. A., Salmon, M., Alencar, G. F., Haskins, R. M., Swiatlowska, P., Newman, A. A., Greene, E. S., Straub, A. C., Isakson, B., Randolph, G. J., and Owens, G. K. (2015). KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature medicine*, 21(6), 628–637. <https://doi.org/10.1038/nm.3866>
- Shekelle, R. B., Shryock, A. M., Paul, O., Lepper, M., Stamler, J., Liu, S., and Raynor, W. J., Jr (1981). Diet, serum cholesterol, and death from coronary heart disease. The

- Western Electric study. *The new England journal of medicine*, 304(2), 65–70.
<https://doi.org/10.1056/NEJM198101083040201>
- Shen, C. C., Shen, Y. C., Wang, Y. H., Lin, L. C., Don, M. J., Liou, K. T., Wang, W. Y., Hou, Y. C., and Chang, T. T. (2006). New lanostanes and naphthoquinones isolated from *Antrodia salmonea* and their antioxidative burst activity in human leukocytes. *Planta medica*, 72(3), 199–203. <https://doi.org/10.1055/s-2005-916175>
- Shen, C. C., Wang, Y. H., Chang, T. T., Lin, L. C., Don, M. J., Hou, Y. C., Liou, K. T., Chang, S., Wang, W. Y., Ko, H. C., and Shen, Y. C. (2007). Anti-inflammatory ergostanes from the basidiomata of *Antrodia salmonea*. *Planta medica*, 73(11), 1208–1213. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981591>
- Shen, C., Kuo, Y., Huang, R., Lin, L., Don, M., Chang, T., and Chou, C.J. (2003). New Ergostane and Lanostane from *Antrodia Camphorata*. *The journal of Chinese medicine*, 14(2), 247–258.
- Tabas I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature reviews immunology*, 10(1), 36–46. <https://doi.org/10.1038/nri2675>
- Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D., and Farb, A. (2002). Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *Journal of interventional cardiology*, 15(6), 439–446. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8183.2002.tb01087.x>
- Wang, Y. J., Lee, S. C., Hsu, C. H., Kuo, Y. H., Yang, C. C., and Lin, F. J. (2019). Antcins, triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*, as new agonists for peroxisome proliferator-activated receptor α . *Journal of food and drug analysis*, 27(1), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.11.004>
- Yan, F. F., Liu, Y. F., Liu, Y., and Zhao, Y. X. (2008). KLF4: a novel target for the treatment of atherosclerosis. *Medical hypotheses*, 70(4), 845–847. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.07.031>
- Zhang, X. F., Yang, Y., Yang, X. Y., and Tong, Q. (2018). MiR-188-3p upregulation results in the inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Thrombosis research*, 171, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.09.043>