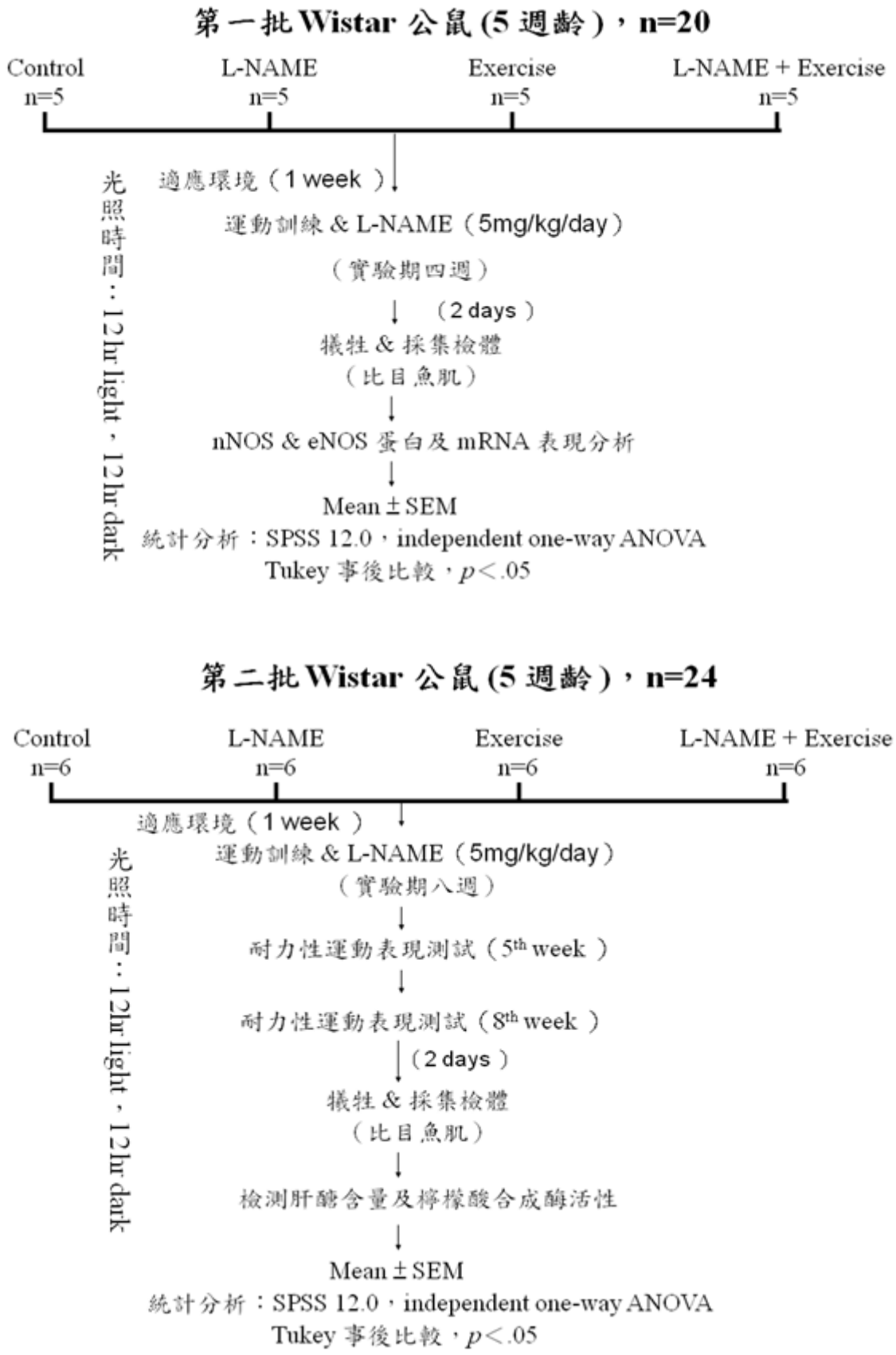
第參章 實驗方法

一、實驗設計

以 Wistar 品系 5 週齡大鼠（N=44）為實驗對象，並購自國立台灣大學實驗動物中心，飼養於花蓮國立東華大學動物中心。大鼠飼養條件為光照控制 12：12 hr light-dark，不限制其飲食，食物、飲用水與飼養環境依照一般標準，實驗的前一週為適應期。為配合運動訓練方便，光照開始於 21:00 pm (大鼠睡眠時間)，黑暗開始於 9:00 am (大鼠活動時間)，大鼠運動訓練時間為 10:00~12:00 am。

實驗大鼠分兩批進行，第一批大鼠（每組 n=5）實驗處理 4 週後犧牲，以進行蛋白及 mRNA 表現分析。第二批大鼠（每組 n=6）實驗處理八週後犧牲，實驗期間於每週六、日 6:00 開始記錄大鼠尾壓。尾壓量測時以尾壓計(UR-5000, Japan)紀錄，先將大鼠置於 36℃ 保溫箱內約 8 分鐘使其平靜再移入尾壓計內固定其尾巴，待大鼠平靜後讀取數值，並紀錄其平均動脈壓，且第二批各組大鼠在第 8 週耐力運動表現測試後兩天即進行解剖，解剖前以麻醉劑 (25% urethane)先行麻醉後，並開始採集檢體（比目魚肌），並立即以液態氮冷凍後放入 -80℃ 冰箱保存，其中各組大鼠在犧牲前皆不限制其飲食，詳細流程請見實驗流程圖（圖一）。


第一批 Wistar 公鼠 (5 週齡)，n=20
Control
n=5
L-NAME
n=5
Exercise
n=5
L-NAME + Exercise
n=5
光照時間：12 hr light，12 hr dark
適應環境（1 week）
運動訓練 & L-NAME（5mg/kg/day）
（實驗期四週）
（2 days）
犧牲 & 採集檢體
（比目魚肌）
nNOS & eNOS 蛋白及 mRNA 表現分析
Mean ± SEM
統計分析：SPSS 12.0，independent one-way ANOVA
Tukey 事後比較，p < .05
第二批 Wistar 公鼠 (5 週齡)，n=24
Control
n=6
L-NAME
n=6
Exercise
n=6
L-NAME + Exercise
n=6
光照時間：12hr light，12hr dark
適應環境（1 week）
運動訓練 & L-NAME（5mg/kg/day）
（實驗期八週）
耐力性運動表現測試（5th week）
耐力性運動表現測試（8th week）
（2 days）
犧牲 & 採集檢體
（比目魚肌）
檢測肝醣含量及檸檬酸合成酶活性
Mean ± SEM
統計分析：SPSS 12.0，independent one-way ANOVA
Tukey 事後比較，p < .05

圖一、實驗流程圖

二、動物耐力性運動訓練及給藥模式

本研究的耐力性運動訓練模式及 L-NAME 的處理方式皆參考並修改自 Husain （2003）的研究，L-NAME 組及 L-NAME + Exercise 組為了確保每隻大鼠都確實服用 L-NAME，需以餵管伸入食道進行給藥動作，為使 L-NAME 對大鼠無高血壓的負作用，將餵食的劑量減低至 5 mg/kg，此劑量在前導研究中也發現對大鼠尾動脈壓尚無顯著影響(Lin & Su, 2004)。L-NAME + Exercise 在每次運動訓練前 1 小時給予 L-NAME，L-NAME 餵食頻率為一週 5 天，每天 1 次。

耐力性運動訓練以動物原地跑步機進行，對象為 Exercise 組及 L-NAME + Exercise 組，實驗前一週，讓所有大鼠先以 12m/min (133 rpm) 持續跑 15 分鐘，以適應動物原地跑步機。第一批實驗大鼠耐力性運動訓練分為四個階段：（1）第 1 週以 15 m/min (166 rpm) 進行 18 min，（2）第 2 週以 18 m/min (200 rpm) 進行 30 min，（3）第 3 週以 21 m/min (233 rpm) 進行 45 min，（4）第 4 週以 24 m/min (266 rpm)進行 60 min。第二批實驗大鼠耐力性運動訓練則為下列四個階段:（1）第 1 和 2 週以 15 m/min (166 rpm) 進行 18 min，（2）第 3 和 4 週以 18 m/min (200 rpm) 進行 30 min，（3）第 5 和 6 週以 21 m/min (233 rpm) 進行 45 min，（4）第 7 和 8 週以 24 m/min (266 rpm)進行 60 min。

三、蛋白表現分析-西方轉漬法（western blotting）

將檢體與 lysis buffer (25 mM Tris-HCI, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % SDS,1 mM PMSF, 1x proteinase inhibitiors cocktail) 混勻，再加入適當體積 lysis buffer 以組織均質機在冰上進行研磨。將均質液於 4℃ 離心 12,000 xg 10 分鐘。小心收集上清液，並進行蛋白質定量。取 80~100 µl 的均質液與 5x sample buffer (625 mM Tris, pH6.8, 10% SDS, 25% glycerol, 0.015% bromophenol blue, 5% β-mercaptoethanol)，於 100 ℃ 下反應 3 分鐘。以 10% acrylamide gel 進行電泳，電泳槽條件先以 40 V 進行電泳 30 分鐘 ，而後以 100 V 進行 70 分鐘 。轉漬法以 semi-dry transfer 方式，以 PVDF membrance 在 2.5 (mAmph/cm^2)的強度下進行約 1 小時。 semi-dry transfer 結束後，將 membrane 浸泡於 blocking buffer(5% non-fat dry milk)在室溫混合器（shaker）上反應 1 小時 。 blocking 結束，以 TTBS 清洗 membrane，程序為 5 min、10 min、15 min 。再將 membrane 與 1^o Ab (eNOS、nNOS 以 TTBS 內含 2% non-fat dry milk, 0.02% sodium azide 配製，比例為 1:1000~1:5000) 於 4 ℃ 與 membrane 反應至少 8 小時。反應後再重複一遍 washing 步驟，將 membrane 與 2^o Ab (以 TTBS 中含有 0.5% non-fat dry milk 配製，比例為 1:2500)於室溫混合器上反應 1 小時。重覆相同清洗步驟後以 ECL western blotting analysis kit 定量 membrane 上 chemiluminescent 的訊號，最後以分析軟體（Glyko Bandscan 5.1）分析其訊號。

四、mRNA 表現分析-反轉錄連鎖聚合反應

（一）RNA 萃取

取肌肉組織約20 mg 或血管約1.2 cm 置入研磨管中加入200 µl Trizol 試劑（Invitrogen）以組織研磨機（Glas-Col，USA）進行均質化後，以12000 g 於4º C 之下離心10 分鐘，再移除沉澱物。加入50 µl 四氯化碳 (chloroform) 後Vortex 15 秒，室溫靜置10 分鐘，再以12000 g 於4º C 之下離心15 分鐘，取出透明上清液（約80 µL）加入125 µl 異丙醇 (isopropanol) 混勻。冰上靜置30 分鐘後，以12000 g 於4º C 之下離心15 分鐘，將沉澱物以1 ml 75% 酒精清洗。同樣條件離心後得到半透明膠狀沉殿物(RNA)，以20 µl DEPC 水溶解，RNA 的濃度測量以OD 260 nm 決定。以上所有處理組織的器具都必須經由高溫高壓滅菌或抗 RNA 分解 (RNAase) 處理。

（二）反轉錄聚合酶鏈鎖反應，以PCR 反應器進行以下三步驟：

1.反轉錄反應：

檢體取1 µg mRNA 加入10 µL dNTP Mix 及1 µL 0.5 µg oligo(dT) 12-18 後，以95℃ 處理 5 分鐘後立即降溫至4℃。之後再加入 MMLV Reverse Transcriptase kit（M6125H，Epicentre）的 5 µl 10X MMLV RT Buffer、 5 µL 100 mM DTT 及 0.5 µL MMLV RT（ 10U ），而每管亦加入 0.5 µL 20U human placental RNAse inhibitor，最後將總體積以 DEPC 水調整成50 µL

後依序以37℃反應60分鐘，70℃反應15分鐘後保存於4℃。

2.聚合酶鏈鎖反應：

每管樣本取3 μL 之 cDNA 再加入12.5 μL GoTaq Green Master Mix（GoTaq® Green Master Mix M7122， Promega）、7.5 μL DEPC 水，再加入1 μL forward primers 及1 μL reverse primers，primer 合成序列參考自Hung 等（2004）及 Alderman 等（2000），反應條件為95℃ 3 分鐘，然後再以95℃ 反應 1 分鐘、60℃反應1 分鐘、72℃ 反應1 分鐘作30 次循環，最後再以72℃維持15 min 終結反應。

nNOS forward primers: 5’-TTCCGAAGCTTCTGGCAACAGCGACAATTT-3’
nNOS reverse primers: 5’-AGATCTAAGGCGGTTGGTCACTTC-3’，465 bp
eNOS forward primers: 5’-TGGGCAGCATCACCTACGA-3’
eNOS reverse primers: 5’-TCCCGAGCATCAAATACCT-3’，373 bp
GADPH forward primers：5’-TGTCAGCAATGCATCCTGCA-3’
GADPH reverse primers：5’-CTGTTGAAGTCACAGGAGAC -3’，425 bp

3. DNA 電泳

配製2 % agarose gel，電泳液為 TBE (45 mM Tris-borate; 1 mM EDTA, pH 8.0)，以50 volt 進行 DNA 電泳分離。gel 再以 ethidium bromide (EtBr) 染色，並於 UV 燈之下觀察訊號後以數位相機（Nikon，Japan）保存紀錄其訊號。每個樣本以分析軟體（Glyko Bandscan 5.1）分析其訊號後皆以 GAPDH 對其 eNOS 及 nNOS 進行標準化，再進行統計分析。

五、檸檬酸合成酶活性分析

（一）上清液萃取

10 公克肌肉添加 homogenization buffer 30 μL、100 mM PMSF 1μL 和 protease inhibitor cocktail 1μL 在研磨管中研磨，再加入 homogenization buffer 10μL，將混合溶液以 4℃ 及 12000 rpm 離心 5 分鐘後取出上清液。

（二）蛋白質定量

取上清液 2 μL 並加入 homogenization buffer 8μL、Dc protein assay reagent A 25 μL 及 Dc protein assay reagent B 200 μL，室溫下反應 15 min 後，用分比色計以 OD 700 nm 的光波長測量。

（三）檸檬酸合成酶活性測定

取上清液 2.5 μL 加入 100 mM PMSF 1 μL 、 protease inhibitor cocktail 1 μL、 homogenization buffer 22.5 μL 、 1 mM DTNB 50 μL 和 dd H_2O 385 μL ，再放到恆溫箱中以 30℃ 反應 3 min 後以 OD 412 nm 做 blank，加入 1 mM acetyl-CoA 15 μL 與 10 mM oxaloacetate 25 μL ，再放入恆溫箱 以 30℃ 反應 3 min，以分光比色計於 OD 412 nm 測量。所得數據與預做的標準曲線比對即可換算為活性單位。

六、肝醣測定

（一）標準曲線製作

取10 mg 的肝醣溶於2 mL 的dd H2O(濃度為5 μg /μL)。分別取出0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg 的肝醣溶液(即2 μL、4 μL、6 μL、8 μL、10 μL)，並加入 dd H2O至200 μL。將上述溶液: 5% phenol(9g phenol, 171 mL dd H2O) : 95 ~ 97% 的硫酸以1:1:5 的比例快速混合。將此溶液置於 30 ℃ 的恆溫箱中15 分鐘 ，再以分光比色計於光波長 490 nm 測定吸光值並製做標準曲線。

（二）肝醣定量

取出組織約為10 mg 左右放置於試管內，並加入 0.5 mL 30% KOH (18 g potassium hydroxide, 60 ml dd H2O)至沸水中約10 ~ 15分鐘。組織一溶解就取出試管置於冰上 30 分鐘 。加入試管內的溶液之 1.1 ~ 1.2 倍體積的95% ethanol，以加速沉澱。以 800 x g 離心 30 分鐘 ，吸出上清液後，將沉澱的肝醣溶於200 μL 的 dd H2O。製做混合溶液，將上述溶液:5% phenol :95 ~ 97%的硫酸以1:1:5 的比例快速混合，將此混合溶液置於30℃的恆溫箱中 15 分鐘 。最後以分光比色計於光波長 490 nm 測吸光值配合標準曲線定量。

七、耐力運動表現測試及檢體採集

第二批大鼠在第 5 週及第 8 週時進行耐力運動表現測試，耐力性運動表現測試方式分為 2 個階段，第一階段：速度為 5 m/min 維持 10min、第二階段：速度 15 m/min 到大鼠出現疲憊狀態為止，疲憊狀態的判定以大鼠在第一階段後，在人為介入之運動測試下，達 3 次停滯次數即判定為疲憊狀態，而停留在跑道末端每 3 秒既判斷為 1 次停滯。

八、統計方法

使用 SPSS 12.0 以單因子獨立樣本變異數分析(independent one-way ANOVA)檢定，並以 Tukey 做事後比較，統計水準至少達 $p < .05$ 的影響水準，所有測量數據皆以平均數 ± 標準誤表示。