

## 第三章 材料與方法

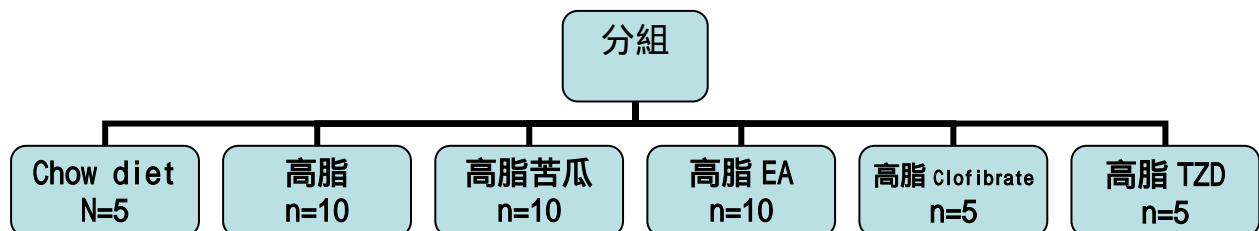
### 第一節 實驗(一)

#### 一、實驗設計 (流程圖)

45 隻 11 週齡 C57BL/6J apo E knockout 雄性小鼠

適應期 7 週

依體重隨機分成 6 組



93.9.22 開始給予實驗飼料餵養 18 週

分別於 94.1/25.26.27.31.2/1 五日每日犧牲 9 隻

組織包埋切片、血清黏著、發炎因子分析

## 二、實驗器材與藥品

### 1. 儀器設備與耗材

離心機	Backman X-22R
定量吸管(Pipette)	Gilson , Nichiryo
石蠟切片機	Leica RM2025
水浴展片機	Fisher, Tissue Prep™
烘片機	Kunz
顯微鏡	Olympus Model-ck30
生化免疫分析儀 (ELISA Reader)	1. Dynatech Laboratories: MRX 2. Vie-tek instruments inc. , ELX-800 ; filter: 450nm
免疫分析盤洗滌機 (Microplate strip washer)	ELP-40
八爪定量吸管 (Multichannel Pipette)	Gilson , 8x200 µ l
Silanized Slides	DAKO <sup>R</sup> , U.S.A

### 2. 藥品與試劑

組織包埋、切片與染色	
paraformaldehyde	sigma
Xylene	sigma
absolute alcohol	sigma
paraffin	KENDALL , U.S.A
Hematoxylin	Thermo Sandon , U.S.A
Eosin Y alcoholic	Thermo Sandon , U.S.A
封片膠	Merck KGaA
血清黏著、發炎因子分析	
Mouse ICAM-1 Immunoassay kit	Quantikine <sup>R</sup> , 美國 R&D 公司
Mouse VCAM-1 Immunoassay kit	Quantikine <sup>R</sup> , 美國 R&D 公司
Mouse IL-1 Immunoassay kit	Quantikine <sup>R</sup> , 美國 R&D 公司
Mouse IL-6 Immunoassay kit	Quantikine <sup>R</sup> , 美國 R&D 公司
Mouse TNF- Immunoassay kit	Quantikine <sup>R</sup> , 美國 R&D 公司

### 三、實驗材料與方法

#### 1. 實驗材料

##### (1) 山苦瓜凍乾粉末

本實驗所使用之山苦瓜由花蓮縣吉安鄉農業改良場提供，三種雜交品系(農友三苦瓜、花蓮一號、WB15)共約 300 公斤，全果直接送至彰化達群公司，洗淨後進行冷凍乾燥，得到 17.6 公斤凍乾粉末，產率為 5.9%。山苦瓜經成分分析，各成分所佔百分比如下：澱粉 39.28%、可溶性糖 8.65%、纖維 38.2%、蛋白質 4.51%、灰分 6.7%、脂質 2.66%。

##### (2) 山苦瓜乙酸乙酯萃取物

乙酸乙酯萃取物統一由台大生化科技系委託食品工業發展研究所進行處理與萃取，取山苦瓜凍乾粉末 5 公斤浸泡於 150 公升乙酸乙酯，室溫下攪拌萃取 24 小時，再將萃取液於 60 進行減壓濃縮，得到山苦瓜乙酸乙酯萃取物 250 克，萃取率約 5%。(謝婉郁，2005)

##### (3) 實驗飼料

飼料的基本組成參考 AIN-76(American Institute of Nutrition,1997) 配方作修正，將玉米澱粉(Samyang Genex Corp,Seoul,Korea)和蔗糖(台糖精緻細砂)的比例改成 1:1，其他成分包含酪蛋白(ICN Biomed)、甲硫胺酸(Sigma,USA)、纖維素(JRS.Vitacel,German)、AIN-76 礦物質混和物(ICN Biomed)、AIN-76 維生素混和物(ICN Biomed)、膽鹼(Sigma)、膽固醇(Hanawa,Japan)、紅花子油(台糖紅花子油)、奶油(安佳無水奶油)，另外分別添加山苦瓜凍乾粉

末、山苦瓜乙酸乙酯萃取物、Clofibrate(Fluka)、TZD(Avandia)。依山苦瓜成分分析結果，當飼料中給予 5 %山苦瓜粉末，將依成分比例取代飼料中 starch (-2.9%)、cellulose(-2.1%)；而使用山苦瓜乙酸乙酯萃物 1%則取代 1% butter；此外，也調整高脂飼料 protein, mineral, vitamin, cellulose 之 nutrition density，使其同於低脂飼料(chow diet)，各組飼料組成與營養成分百份比如表 3-1-1。

依表 3-1-1 之配方將粉狀材料混和均勻後，依配方比例拌入新鮮紅花子油和微波融化之奶油(Clofibrate 先依配方比例拌入紅花子油與奶油中)，將所有飼料攪拌混和均勻，經過兩次過篩後以雙層封口袋密封裝妥，加水攪拌均勻捏成長方形餅乾狀，置於烘箱烘乾，烘乾後之飼料置於-20 冷凍保存，以供日後動物飼養實驗之用。

實驗分成以下六組：

- (1) chow diet 組：使用 MF18 商業錠狀飼料。
- (2) 高脂組：含 20% 油脂。
- (3) 高脂苦瓜組：含 20% 油脂 + 5% 山苦瓜凍乾粉末。
- (4) 高脂乙酸乙酯萃物組：含 20% 油脂 + 1% 乙酸乙酯萃物。
- (5) 高脂 Clofibrate 組：含 20% 油脂 + 0.5% Clofibrate。
- (6) 高脂 TZD 組：含 20% 油脂 + 0.00123% TZD(rosiglitazone)。

表 3-1-1：各組飼料組成與營養成分百分比（%）

組別	高脂	山苦瓜	EA	Clofibrate	TZD
casein	23.5	23.5	23.5	23.5	23.5
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
corn starch	22.4	19.5	22.4	22.4	22.4
sucrose	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4
cellulose	5.9	3.8	5.9	5.9	5.9
butter	19	19	18	19	19
safflower oil <sup>1</sup>	1	1	1	1	1
AIN-76 mineral mixture <sup>2</sup>	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
AIN-76 vitamin mixture <sup>2</sup>	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
cholesterol	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
山苦瓜凍乾粉末	-	5	-	-	-
山苦瓜乙酸乙酯萃物	-	-	1	-	-
Clofibrate 藥物 <sup>4</sup>	-	-	-	0.5	-
TZD 藥物 <sup>3</sup>	-	-	-	-	0.00123
Total calorie(kcal/100g)	454.4	454.4	454.4	454.4	454.4
Calorie density(kcal/g)	4.544	4.544	4.544	4.544	4.544
CHO calorie/calorie (%)	39%	39%	39%	39%	39%
protein calorie/calorie (%)	21%	21%	21%	21%	21%
Fat calorie/calorie (%)	40%	40%	40%	40%	40%

1. 飼料中的必須脂肪酸需佔總熱量的 1-2%，此必須脂肪酸主要由紅花子油來供應。

2. The composition of AIN-76 mineral mixture and AIN-76 vitamin mixture is as described in J. Nutr. 107:1340-1348(1997)

3. TZD : Avandia™ Smithkline Beecham, 添加 0.00123% TZD 藥物依照 1mg/kg 人類劑量可換算成 12.3mg/kg 小鼠劑量, 將 TZD 人類劑量 0.133mg/kg 換算成小鼠劑量 1.64mg/kg, 再以 30g 體重小鼠每日約攝取 4g 飼料推得 0.00123%。

4. Clofibrate : Fluka, 添加 0.5% clofibrate 藥物劑量參考趙氏(趙哲毅, 2003)給予 Wistar 大鼠 0.5% clofibrate 較未添加組可顯著降低血脂。

## 2. 實驗動物

自成功大學實驗動物中心購買 11 週齡的 C57BL/6J apo E knockout 的雄性小鼠 45 隻，依序先以 MF18 商業錠狀飼料、依 Ain76 粉末調整成玉米澱粉與蔗糖 1 : 1 的一般配方飼養適應 7 週，依體重隨機分成 6 組，六組分別為 chow diet、高脂、高脂苦瓜、高脂 EA、高脂 clofibrate、高脂 TZD，其中高脂 clofibrate、高脂 TZD 做為正對照組，chow diet、高脂 clofibrate、高脂 TZD 每組各 5 隻，高脂、高脂苦瓜、高脂 EA 則各組各 10 隻。

## 3. 動物飼養

飼養期間，每日光照 12 小時，黑暗 12 小時，使用 IVC cage(5 隻/籠)，每週更換高溫高壓滅菌籠 2 次，飼料及水自由攝取，飼料攝取量每週紀錄 2 次，體重每週紀錄 1 次，直至動物犧牲為止。

## 4. 藥品配製

### [配製 10X PBS 與 1X PBS(pH=7.4)]

使用藥品：

NaCl (MW=58.44)	85g(1.45M)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MW=136)	1.4g(0.001M)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (MW=178)	5.6g(0.03M)

方法：

以上藥品加入滅菌水(或 ddH<sub>2</sub>O)至 1000ml，使用 stir 使完全溶解後，調整 pH 值至 7.4(利用 4M HCl 或 4M NaOH 調整)即為 10X PBS。

取 100ml 10X PBS 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000ml，調整 pH 值至 7.4 即為 1X PBS。

### [配製 4% paraformaldehyde in PBS]

使用藥品：

95-100% paraformaldehyde

1X PBS

方法：

取 20g paraformaldehyde 粉末加入 1X PBS 至 500ml，隔水加熱並使用 stir 使其完全溶解。

## 5. 動物犧牲與樣本收集

動物經禁食隔夜後，使用乙醚昏迷後，使用不含抗凝血劑之毛細管進行眼窩採血至無法再取血為止，然後再用針筒進行體外心臟採集血液，一隻老鼠約可採集 1.5-2c.c. 全血，血液採集完畢，以 CO<sub>2</sub> 確保老鼠完全死亡，從腹部剖開至胸，以鑷子將腹主動脈(abdominal aorta)及胸主動脈(thoracic aorta)與周圍之脂肪與結締組織分離，接者以鑷子小心將整段動脈挑起，並除去黏附在動脈上的脂肪與結締組織，以剪刀將動脈連同部分心臟取下，放入含 PBS 之滅菌拋棄式培養皿中，盡量移除動脈周圍之結締組織，隨後將胸主動脈與腹主動脈分成兩段，胸主動脈放入含 4% 福馬林(paraformaldehyde)之 PBS 固定液中進行固定 3 小時，腹主動脈則以液態氮冷凍之。

## 6. 樣本前處理及儲存

血液前處理

採集的血液置於 eppendoff 中，4 °C 下靜置一段時間，待血液凝固後，在 4 °C、1800g 條件下離心 10 分鐘，取上清液，可獲得約 0.75-1c.c

之血清，將血清分裝，保存於-70 冰箱，以待分析。

## 7. 組織包埋

將經固定液固定完之心臟血管從左右頸動脈分支之動脈弓處分開（如圖 3-1-1 雙鍵頭），將兩段組織分別置於裝有新鮮的 PBS 的標本瓶 1 小時後(30 鐘更換一次),再更換新的 PBS 保存於 4 至進行石蠟包埋(paraffin embedding)，包埋過程如表 3-1-2。

圖 3-1-1 動脈位置圖 取自(Nakashima et al., 1994)

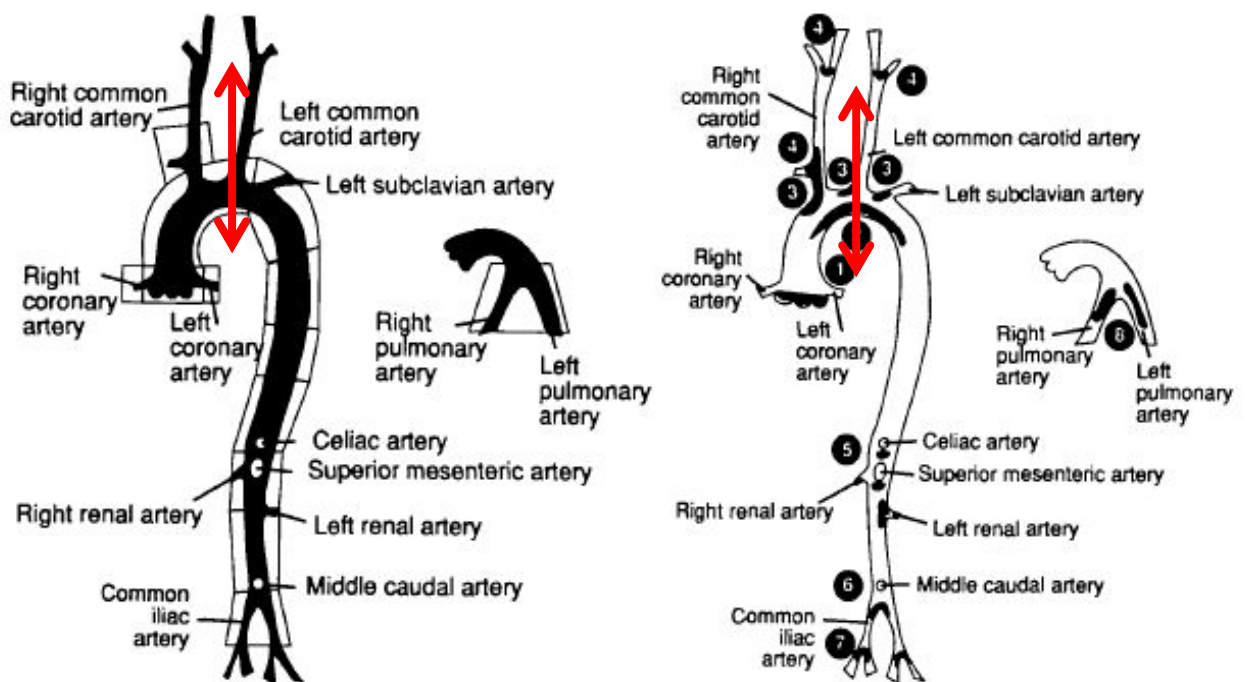




表 3-1-2 石蠟包埋流程

目的	使用藥品	時間
脫水 (dehydration)	50 % alcohol	30 分鐘x2
	70 % alcohol	30 分鐘
	80 % alcohol	30 分鐘
	95 % alcohol	30 分鐘x2
	absolute alcohol	50 分鐘
	absolute alcohol	30 分鐘x2
組織透明化 (clearing)	xylene	45 分鐘
	xylene	45 分鐘
滲入 (infiltration)	Xylene : paraffin = 1 : 1	30 分鐘x2
	56-60	
包埋 (embedding)	Paraffin	含心臟組織 2 小時x2
	56-60	血管組織 1 小時x2

最後將經過充分石蠟滲入的組織放入已含熔溶的石蠟小紙盒中，待冷卻凝固形成蠟塊，即可切片。

## 8. 組織切片

將包埋好的石蠟塊修為梯型並固定於包埋盒座上，以切片機進行切片，含心臟和動脈弓前段之組織以 7  $\mu\text{m}$  厚度、動脈弓後段血管組織以 5  $\mu\text{m}$  厚度進行切片，將切出的片子，小心放入 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴槽進行展片，每 10 片收取 1 片置於上有 poly-L-lysine 之玻片上，接著置於 37  $^{\circ}\text{C}$  烘片機中乾燥，最後放於保存盒中備用。

## 9. 組織染色與拍照計算

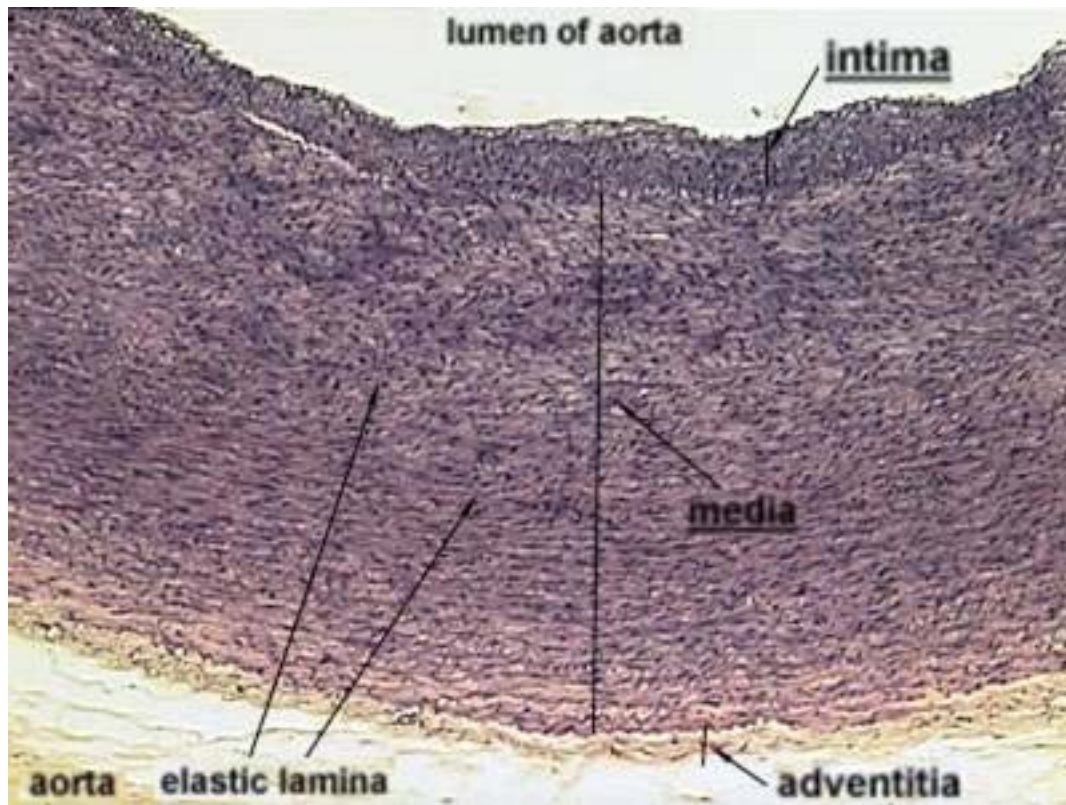
本實驗採用 Mayrt's Hematoxylin & Eosin stain 方法，將保存之切片進行蘇木精-伊紅染色 (Hematoxylin & Eosin stain)，染色過程如表 3-1-3。

表 3-1-3 蘇木精-伊紅染色流程

目的	使用藥品	時間
脫蠟	xylene	3 分鐘
	Xylene	3 分鐘
組織再水化 ( rehydration )	100% alcohol	3 分鐘
	85% alcohol	3 分鐘
	85% alcohol	3 分鐘
	H <sub>2</sub> O	3 分鐘
染色	Hematoxylin	2 分鐘
	流水沖洗	25 分鐘
	Eosin	15 秒
	流水沖洗	3 分鐘
組織脫水 ( dehydration )	75 % alcohol	5 秒
	85 % alcohol	5 秒
	95 % alcohol	5 秒
	100 % alcohol	5 秒
	xylene	1.5 分鐘
	xylene	1.5 分鐘
封片	以 xylene 專用膠封片	

接著，將已製作好的動脈組織切片，利用光學顯微鏡連接電腦影像分析系統 Image-pro plus 2.0 軟體(Olympus Model-ck30)拍照並計算動脈組織橫切面之新生內層及中層面積比率 Intima/Media Ratio (如附圖 3-3-2)，再進行統計比較之。

圖 3-1-2 動脈血管壁 取自台大醫學院解剖學科組織學圖譜



## 10. 血清黏著、發炎因子分析

### ICAM-1

本實驗採定量三明治原理的酵素免疫分析(quantitative sandwich enzyme immunoassay)(Quantikine<sup>®</sup>)測量血液中 sICAM-1 濃度。此分析中 96 孔分析盤中已結合小鼠 anti-sICAM-1 之單株抗體，血液中的 sICAM-1 會與分析盤中的單株抗體結合。室溫反應 2 小時後，未結合的物質會在清洗過程中洗去，另外再加入能與 sICAM-1 結合的單株抗體酵素結合體，室溫反應 2 小時後，未結合的抗體酵素結合體會清洗過程中洗去，接著加入酵素受體呈色，避光反應 30 分鐘後，最後以終止液終止酵素呈色反應，於波長 450nm 下測其吸光值。當血液中的 sICAM-1 越多時，則抗體酵素結合體經由血液 sICAM-1 與分析盤中 anti-sICAM-1 單株抗體之結合數目會

增加，此時酵素標定反應物呈色會越深，即呈色與血液中 sICAM-1 含量成正比。

### VCAM-1

本實驗採定量三明治原理的酵素免疫分析(quantitative sandwich enzyme immunoassay)(Quantikine<sup>®</sup>)測量血液中 sVCAM-1 濃度。此分析中 96 孔分析盤中已結合小鼠 anti-sVCAM-1 之單株抗體，血液中的 sVCAM-1 會與分析盤中的單株抗體結合。室溫反應 3 小時後，未結合的物質會在清洗過程中洗去，另外再加入能與 sVCAM-1 結合的抗體酵素結合體，室溫反應 1 小時後，未結合的單株抗體酵素結合體會在清洗過程中洗去，接著加入酵素受體呈色，避光反應 30 分鐘後，最後以終止液終止酵素呈色反應，於波長 450nm 下測其吸光值。當血液中的 sVCAM-1 越多時，則抗體酵素結合體經由血液 sVCAM-1 與分析盤中 anti-sVCAM-1 單株抗體之結合數目會增加，此時酵素標定反應物呈色會越深，即呈色與血液中 sVCAM-1 含量成正比。

### IL-1

本實驗採定量三明治原理的酵素免疫分析(quantitative sandwich enzyme immunoassay)(Quantikine<sup>®</sup>)測量血液中 IL-1 濃度。此分析中 96 孔分析盤中已結合小鼠 anti-IL-1 之多株抗體，血液中的 IL-1 會與分析盤中的多株抗體結合。室溫反應 2 小時後，未結合的物質會在清洗過程中洗去，另外再加入能與 IL-1 結合的多株抗體酵素結合體，室溫反應 2 小時後，未結合的抗體酵素結合體會在清洗過程中洗去，接著加入酵素受體呈色，避光反應 30 分鐘後，最後以終止液終止酵素呈色反應，於波長 450nm 下測其吸光值。當血液中的 IL-1 越多時，則抗體酵素結合體經由

血液 IL-1 與分析盤中 anti-IL-1 多株抗體之結合數目會增加，此時酵素標定反應物呈色會越深，即呈色與血液中 IL-1 含量成正比。

### IL-6

本實驗採定量三明治原理的酵素免疫分析(quantitative sandwich enzyme immunoassay)(Quantikine<sup>®</sup>)測量血液中 IL-6 濃度。此分析中 96 孔分析盤中已結合小鼠 anti-IL-6 之單株抗體，血液中的 IL-6 會與分析盤中的單株抗體結合。室溫反應 2 小時後，未結合的物質會在清洗過程中洗去，另外再加入能與 IL-6 結合的多株抗體酵素結合體，室溫反應 2 小時後，未結合的抗體酵素結合體會在清洗過程中洗去，接著加入酵素受體呈色，避光反應 30 分鐘後，最後以終止液終止酵素呈色反應，於波長 450nm 下測其吸光值。當血液中的 IL-6 越多時，則抗體酵素結合體經由血液 IL-6 與分析盤中 anti-IL-6 單株抗體之結合數目會增加，此時酵素標定反應物呈色會越深，即呈色與血液中 IL-1 含量成正比。

### TNF-

本實驗採定量三明治原理的酵素免疫分析(quantitative sandwich enzyme immunoassay)(Quantikine<sup>®</sup>)測量血液中 TNF- 濃度。此分析中 96 孔分析盤中已結合小鼠 anti-TNF- 之多株抗體，血液中的 TNF- 會與分析盤中的多株抗體結合。室溫反應 2 小時後，未結合的物質會在清洗過程中洗去，另外再加入能與 TNF- 結合的多株抗體酵素結合體，室溫反應 2 小時後，未結合的抗體酵素結合體會在清洗過程中洗去，接著加入酵素受體呈色，避光反應 30 分鐘後，最後以終止液終止酵素呈色反應，於波長 450nm 下測其吸光值。當血液中的 TNF- 越多時，則抗體酵素結合體經由血液 TNF- 與分析盤中 TNF- 多株抗體之結合數目會增加，此時酵素標

定反應物呈色會越深，即呈色與血液中 TNF- 含量成正比。

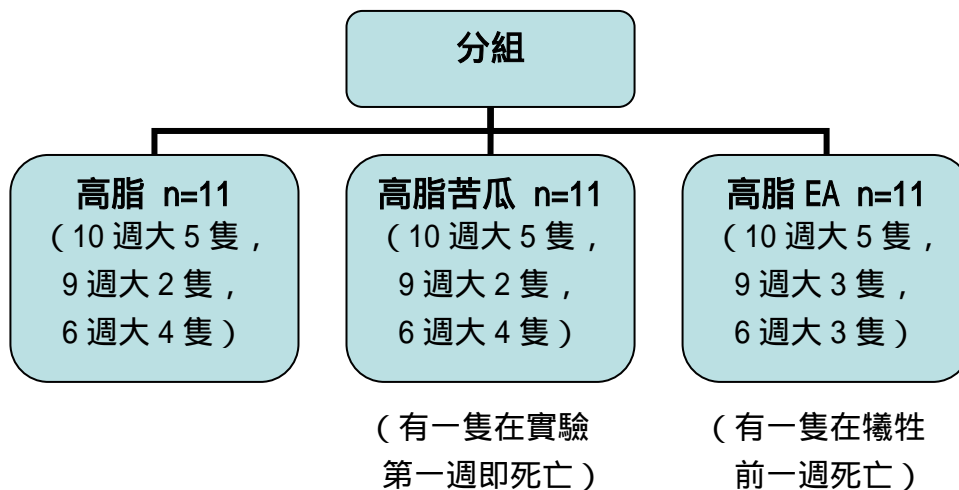
## 第二節 實驗(二)

### 一、實驗設計

15 隻 9 週、7 隻 8 週、11 隻 5 週齡 C57BL/6J apo E knockout 雄性小鼠

適應期 1 週

依年齡、體重隨機分成 3 組



95.2.13 開始給予實驗飼料餵養 8 週

95.4/3.4 於進行 Flow 分析

分別於 95.4/13.15.16 三日每日分別犧牲 9、11、11 隻

血管縱切、血清 8-iso-PGF<sub>2</sub>、發炎因子分析

## 二、實驗器材與藥品

### 1. 儀器設備與耗材

減壓濃縮機	EYELA
水浴機	PAMCHUM
真空控制器	PAMCHUM VC7600
離心機	Backman X-22R
定量吸管(Pipette)	Gilson , Nichiryo
照相系統	Olympus
生化免疫分析儀 (ELISA Reader)	1. Dynatech Laboratories:MRX 2. Vie-tek instruments inc. , ELX-800 ; filter:450nm
免疫分析盤洗滌機 (Microplate strip washer)	ELP-40
八爪定量吸管 (Multichannel Pipette)	Gilson , 8x200 $\mu$ l
流式細胞儀	BD

### 2. 藥品與試劑

血管縱切與脂肪染色	
paraformaldehyde	sigma
isopropanol	sigma
Oil red-O	sigma
白血球黏著分子、血清發炎因子分析	
FITC anti-mouse CD11b	eBioscience
PE anti-mouse CD18	eBioscience
Mouse IL-6 Immunoassay kit	Quantikine <sup>R</sup> , 美國 R&D 公司
Mouse TNF- Immunoassay kit	Quantikine <sup>R</sup> , 美國 R&D 公司
血清 8-iso-PGF <sub>2</sub> 分析	
Direct 8-iso-PGF <sub>2</sub> Enzyme Immunoassay kit	Correlate-EIA <sup>TM</sup> , Assay Designs

### 三、實驗材料與方法

#### 1. 實驗材料

##### (1) 山苦瓜凍乾粉末

本實驗所使用之山苦瓜由花蓮縣吉安鄉農業改良場提供，品系 HM2381，全果直接送至彰化達群公司，洗淨後進行冷凍乾燥。山苦瓜經成分分析，各成分所佔百分比如下：澱粉 11.92%、可溶性纖維 5.64%、不可溶性纖維 48.87%、蛋白質 16.3%、灰分 7.44%、脂質 2.91%。

##### (2) 山苦瓜乙酸乙酯萃取物

乙酸乙酯萃取物取山苦瓜凍乾粉末 600g 浸泡於 12 公升乙酸乙酯，室溫下攪拌萃取 24 小時，再將萃取液於 60 進行減壓濃縮，過濾完之粉末再浸泡於減壓濃縮後收集之乾淨乙酸乙酯中，室溫下攪拌萃取 24 小時，再一次將萃取液於 60 進行減壓濃縮，最後得到山苦瓜乙酸乙酯萃取物 66.25 克，萃取率約 11%。

##### (3) 實驗飼料

飼料的基本組成與實驗(一)相同，請參見實驗一。

實驗分成以下三組：

- (1) 高脂組：含 20% 油脂。
- (2) 高脂苦瓜組：含 20% 油脂 + 5% 山苦瓜凍乾粉末。
- (3) 高脂乙酸乙酯萃取物組：含 20% 油脂 + 1% 乙酸乙酯萃取物。



表 3-2-1：各組飼料組成與營養成分百分比（%）

Table 3-2-1 Composition of test diets (%)

組別	高脂	高脂苦瓜	高脂 EA
casein	23.5	23.5	23.5
DL-methionine	0.3	0.3	0.3
corn starch	22.4	19.5	22.4
sucrose	22.4	22.4	22.4
cellulose	5.9	3.8	5.9
butter	19	19	18
safflower oil <sup>1</sup>	1	1	1
AIN-76 mineral mixture <sup>2</sup>	4.1	4.1	4.1
AIN-76 vitamin mixture <sup>2</sup>	1.2	1.2	1.2
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
cholesterol	0.15	0.15	0.15
山苦瓜凍乾粉末	-	5	-
山苦瓜乙酸乙酯萃物	-	-	1
Total calorie(kcal/100g)	454.4	454.4	454.4
Calorie density(kcal/g)	4.544	4.544	4.544
CHO calorie/calorie (%)	39%	39%	39%
protein calorie/calorie (%)	21%	21%	21%
Fat calorie/calorie (%)	40%	40%	40%

1. 飼料中的必須脂肪酸需佔總熱量的 1-2%，此必須脂肪酸主要由紅花子油來供應。

2. The composition of AIN-76 mineral mixture and AIN-76 vitamin mixture is as described in J. Nutr. 107:1340-1348(1997)

## 2. 實驗動物

自成功大學實驗動物中心購買 15 隻 9 週、7 隻 8 週、11 隻 5 週齡的 C57BL/6J apo E knockout 的雄性小鼠共 33 隻，先以 MF18 商業錠狀飼料適應 1 週，依體重、年齡分成三組，三組分別為高脂、高脂苦瓜、高脂 EA，每組 11 隻。

## 3. 動物飼養

與實驗(一)相同，請參見實驗一。在實驗第一週高脂苦瓜組有一隻老鼠不明原因死亡，在犧牲前一週高脂 EA 組有一隻老鼠因為牙齒咬合不正，無法進食而死亡。

## 4. 藥品配製

### [Oil red-0]

使用藥品：

Oil red-0      250mg

Isopropanol    100ml

方法：

將 Oil red-0 粉末加入 Isopropanol mix 均勻後，置於 56 °C 水浴機加熱 1 小時後取出，待冷卻後過濾之。

## 5. 動物犧牲與樣本收集

與實驗(一)相同，請參見實驗一。

## 6. 樣本前處理及儲存

### 血液前處理

採集的血液置於 eppendoff 中，4 °C 下靜置一段時間，待血液凝固後，在 4 °C、1800g 條件下離心 10 分鐘，取上清液，可獲得約 0.75-1c.c 之血清，將血清分裝，欲進行 8-iso-PGF<sub>2</sub> 分析之樣本 170ul 加入 4.25ul 2mg/ml BHT 充入氮氣密封，分裝之血清保存於-70 °C 冰箱，以待分析。

## 7. 白血球黏著分子 Mac-1(CD11b/CD18)分析

由於 Mac-1 是由兩個次單位 α<sub>1</sub>(CD11b) 和 β<sub>2</sub>(CD18) 構成，CD11b 與 CD18 兩個次單位均非 Mac-1 的專一次單位，如 CD18 次單位也是構成 LFA-1 的其中一個次單位，故需分別以會與 CD11b 結合的抗體和會與 CD18 結合的抗體染色，同時被兩種抗體雙染色者才可代表 Mac-1。眼窩採血收集 100-200 μl 全血置於 3ml EDTA 採血管備用，各組選取一隻老鼠血液分別取出 50、50、100ul 全血各 3 管，分別加入 450 μl、450 μl、900 μl ddwater，放置 12-15 秒使紅血球破裂，再加入 50 μl、50 μl、100 μl 10XPBS 以 2000rpm 離心，快速倒掉上清液，再加入 1ml 1XPBS，再次以 2000rpm 離心 10 分鐘，快速倒掉上清液，再加入 1ml 1XPBS 輕拍散細胞，管子包上鋁箔紙分別加入已稀釋好的 FITC anti-mouse CD11b 5ul、PE anti-mouse CD18 5ul、FITC anti-mouse CD11b 10ul 及 PE anti-mouse CD18 10ul (eBioscience) 置於 4 °C 冰箱培養 30 分鐘後，取出上流式細胞儀調整條件設定；其餘樣本分別取出 100ul 全血分別加入 900 μl ddwater，放置 12-15 秒使紅血球破裂，再加入 100 μl 10XPBS 以 2000rpm 離心，快速倒掉上清液，再加入 1ml 1XPBS，再次以 2000rpm 離心 10 分鐘，快速倒掉上清液，再加入 1ml 1XPBS 輕拍散細胞，管子包上鋁箔紙分別加入已稀釋好

的 FITC anti-mouse CD11b 10ul 及 PE anti-mouse CD18 10ul , 4 下培養 30 分鐘後取出上流式細胞儀(BD)分析。

### 8. 血清 8-iso-PGF<sub>2</sub> 分析

本實驗採定量競爭型免疫分析(competitive immunoassay)(Correlate-EIA™)測量血液中 8-iso-PGF<sub>2</sub> 濃度。此分析中 96 孔分析盤中已結合抗兔 IgG 之多株抗體，當血液中的 8-iso-PGF<sub>2</sub> 與另外加入已知量的抗原酵素結合體(8-iso-PGF<sub>2</sub> alkaline phosphatase)一起加入分析盤中會相互競爭與有限的多株抗體結合，當血中的抗原多時，則抗原酵素結合體與多株 8-iso-PGF<sub>2</sub> 抗體結合數目會減少，此時酵素標定反應物呈色越低，表示血中抗原 8-iso-PGF<sub>2</sub> 的量越多，最後以終止液終止酵素呈色反應，於波長 405nm 下測其吸光值。

### 9. 血管縱切與脂肪堆積染色

將取下之主動脈弓(aortic arch)及胸主動脈(thoracic aorta)旁的脂肪組織剔除乾淨後，以含 4% 福馬林(paraformaldehyde)之 PBS 固定液進行固定，更換兩次後處理隔夜，接著以 PBS 清洗後，浸泡於 50% isopropanol 10 分鐘，再以配置好的 Oil red-O(5mg/ml in isopropanol)染色 2 分鐘，再以 50% isopropanol 退染 1 分鐘，最後置於 PBS 內保存。經由 Oil-red-O 染色後，從血管腹面縱向剪開後，脂肪會呈現深紅色斑點，接著以照相系統(Olympus)進行拍照，最後使用 ImageJ 軟體(NIH 網站提供)分析主動脈前 1 公分長度脂肪堆積面積與血管面積的比率。

## 10. 血清發炎因子

與實驗(一)相同，請參見實驗一。

### 第三節 統計方法

實驗一實驗結果以平均值±標準誤 (mean±SEM) 表示。統計之數據先確認為常態分佈，若非常態分佈，則先進行數值轉換，再以 one-way ANOVA 來檢定各組獨立樣本其組間之差異。統計分析以 SPSS 軟體執行。

實驗二實驗結果以平均值±標準誤 (mean±SEM) 表示。統計之數據先分析出生變項與各項結果的相關性，若有相關性則以共變數分析(ANCOVA) 來檢定各組獨立樣本其組間之差異；若無則以 one-way ANOVA 來檢定各組獨立樣本其組間之差異。統計分析以 SPSS 軟體執行。