

第二章 材料與方法

一、儀器設備

1. Centrifuge model-3740 (KUBOTA)
2. DU-640 spectrophotometer (Beckman)
3. ESPEC CO₂ incubator (KUBOTA)
4. Freezer model-925 (-70°C) (Forma Scientific)
5. Stirrer/hot plate (Corning)
6. ELISA reader thermo (Molecular Decices)
7. Hemacytometer (Bright-Line)
8. Laminar flow (造鑫)
9. pH Meter Model-320(corning)
10. Sonicator (Fisher)
11. Vortex-2 Genie (Scientific Industries)
12. Water bath (Kunz)
13. Water bath model-830 (Hotech)
14. Water jacketed incubator (Forma Scientific)
15. X-film processor M-335 (Kodak)



一、實驗材料與試劑

1. 細胞培養 (cell culture)

Human aortic endothelial cell (HAEC, Cascade Biologics)

U937 monocyte-like cell line (ATCC)

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

Low serum growth supplement (LSGS) (Cascade Biologics)

RPMI 1640 medium (with L-glutamine) (Gibco)

Sodium bicarbonate (Sigma)

Antibiotics (Penicillin-Streptomycin-Fungizone) (Gibco)

Trypsin Neutralizer (TN) (Cascade Biologics)

Trypsin EDTA (TE) (Cascade Biologics)

10mm dish (corning)

6、24、96 Well Plate (Costor)

25T、75T Flask (Costor)

2. 細胞計數 (Cell counting)

Trypan Blue (Sigma)

3. 西方點墨分析法 (Western blotting)

30% Acrylamide/bis solution, 29: 1 (3.3% C) (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)

Non-fat dry milk (Sigma)

Chemiluminescence reagent plus (NEN)

Prestained protein ladder (Fermentas)

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

Cell lysis buffer (10X) (Cell Signaling)
Parthenolide (Sigma)
X-film (Fuji)
HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz)
HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Santa Cruz)
HRP-conjugated mouse anti-goat/sheep IgG (Sigma)
Goat anti-human ICAM-1 antibody (R&D)
Monoclonal mouse anti- β -actin antibody (Sigma)
Mouse anti-human phospho-ERK antibody (Cell Signaling)
Rabbit anti-human phospho-p38 antibody (Cell Signaling)
Rabbit anti-human phospho-JNK antibody (Cell Signaling)
Rabbit anti-human total-ERK antibody (Cell Signaling)
Rabbit anti-human total-p38 antibody (Cell Signaling)
Rabbit anti-human total-JNK antibody (Cell Signaling)
ERK inhibitor (PD98059) (Cashmer)
JNK inhibitor (SP600125) (Alexis)
p38 inhibitor (SB203058) (Alexis)

4. 實驗中所使用藥劑：

TNF- α (Calbiochem)
Sesamin (Cayman Chemical Co. Inc.)
Sesamol (Sigma)
Enterolactone (ENL) (Cayman Chemical Co. Inc.)
Parthenolide (Calbiochem)

5. 凝膠遲滯分析 (EMSA)

NF- κ B oligonucleotide (promega)

Positive Charged Nylon Membrane (Ken Tech)

6. 免疫螢光染色 (Immunofluorescence)

Mouse anti-human NF- κ B (p65) antibody (BD)

FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma)

TritonX-100 (Sigma)

Paraformaldehyde (PERAK)

Bovine serum albumin (Sigma)

7. 內皮細胞/單核球細胞黏附試驗 (endothelial cells/monocyte adhesion assay)

BCECF/AM (2',7',-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester) (Molecular probe)

二、 實驗用溶液配方

10X Phosphate Buffered Saline (PBS) :

NaCl : 80 g KCl : 2 g Na₂HPO₄ : 14.4 g KH₂PO₄ : 2.4 g
in 1000 ml ddH₂O (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 Na₃VO₄ 1 μ g/ml leupetin 1 mM PMSF
1 mM EGTA 1% TritonX-100 1 mM β -glycerophosphate

10% Separating Gel :

ddH₂O: 4 ml 30% acrylamide mix: 3.3 ml
1.5M Tris (pH=8.8) 10% SDS: 0.1 ml
10% ammonium persulfate: 0.1 ml TEMED: 0.004 ml

5% Stacking Gel :

ddH₂O: 3.4 ml 30% acrylamide mix: 0.83ml
1M Tris (pH=6.8) 10% SDS: 0.05 ml
10% ammonium persulfate: 0.05 ml TEMED: 0.005 ml

SDS Gel –Loading Buffer :

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

Running Buffer:

Tris: 25mM glycine:192 mM SDS: 0.1%

1X Phosphate Buffered Saline /0.1 % Tween-20 (PBS-T):

1X PBS 0.1% (v/v) Tween-20

Blocking Buffer :

5% (w/v) nonfat dry milk in 1x PBST

1x Transfer Buffer :

Tris-Base (25 mM): 3.03 g glycine (192 mM): 14.41 g
Methanol: 200 ml ddH₂O: 800 ml

Stripping Buffer:

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

Buffer A(pH 7.9):

10mM Hepes 1.5mM MgCl₂ 10Mm KCl
1.0 Mm DTT 1.0mM PMSF

Buffer B:

Buffer A containing 0.1% TritonX-100

Buffer C(pH 7.9):

20mM Hepes 1.5mM MgCl₂ 0.42Mm NaCl

1.0 Mm DTT

1.0mM PMSF

0.2 Mm EDTA

25% (v/v) Glycerol

Lysis Buffer for adhesion assay :

PBS

Ethanol (20%)

Tween 20 (0.1%)

三、 實驗方法

本研究進行的早期，先以山藥、苜蓿乙酸乙酯萃物預先處理內皮細胞 24 小時再以 10 ng/ml 的 TNF- α 刺激觀察 ICAM-1 的表現，其結果發現並未能抑制其 ICAM-1 的表現，反而有加強的效果，由此結果推論可能是山藥與苜蓿乙酸乙酯萃物為初萃物，其中的有效成分尚未純化所以並未達到預期之結果(data not shown)。在芝麻木質素 (sesamol 或 sesamin) 的部分，先前的試驗是以 10 ng/ml 的 TNF- α 刺激內皮細胞來觀察 ICAM-1 的表現，sesamol 與 sesamin 均可減少 ICAM-1 的表現，但效果並不明顯(data not shown)，隨後改以 2 ng/ml 的 TNF- α 刺激內皮細胞來觀察 ICAM-1 的表現，其結果發現均可以顯著減少 ICAM-1 的表現，所以隨後的實驗均以 2 ng/ml 的 TNF- α 作為實驗的劑量。

細胞實驗

1. 細胞培養(Cell culture):

(一) 人類主動脈內皮細胞株(human aortic endothelial cells)

人類主動脈內皮細胞株 (human aortic endothelial cells, HAECs ; 購自於Cascade Biologics, Inc., U.S.A) , 以培養液200 (Medium 200 ; 購自於Cascade Biologics, Inc., U.S.A)培養，內含 3% fetal bovine serum、1 μ g/ml hydrocortisone、10 ng/ml human epidermal growth factor、3ng/ml basic fibroblast growth factor、10 μ g /ml heparin、100 units /ml penicillin、100pg/mlstreptomycin、1.25 pg/ml Fungizone (amphotericin B) 。置於含5% CO₂ 及飽和水蒸氣的37 $^{\circ}$ C 培養箱中，每三天更換一次培養液，並定期繼代培養，細胞培養至五、六代時即可進行實驗。

(二) U937細胞株(Human premonocytic U937)

U937細胞株(購自於食品工業發展研究所菌種保存及研究中心) 培養於含有2mM L-glutamine、0.2% sodium bicarbonate 及 10% FBS 之RPMI 1640培養液中，在含有5% CO₂及飽和水蒸氣的37 $^{\circ}$ C 培養箱中培養，每三天更換一次培養液，並定期繼代培養，維持細胞濃度為每毫升有5 \times 10⁵個細胞至1 \times 10⁶個細胞。

2. 西方點墨分析法 (western blotting)

為瞭解 sesamol 或 sesamin 處理後對於 TNF- α 刺激人類主動脈內皮細胞表現 ICAM-1 的影響，所以抽取細胞蛋白質，進行西方點墨法。

a.全細胞蛋白萃取：

將九分滿的人類主動脈內皮細胞給予100 μ M sesamol或sesamin處理24小時，再以2ng/ml TNF- α 刺激細胞12小時，移除培養液，以冰的PBS 清洗兩次，隨後加入1ml PBS於培養皿中，將細胞刮下收到離心管中，於4 $^{\circ}$ C下4000rpm 離心 10分鐘，移除上清液，再加入50 μ l cell lysis buffer ，混合均勻後在4 $^{\circ}$ C下，以8000 rpm 離心60分鐘，並將上清液移至新的微量離心管中保存在-80 $^{\circ}$ C ，此上清液為含有全細胞蛋白質。

b.細胞蛋白質濃度定量：

取濃度1mg/mL之胎牛血清蛋白 (bovium serum albumin, BSA)分別取 0、2、4、8、10 μ l 加二次水至800 μ l，再加入200 μ l蛋白質呈色反應液(Bio-Rad protein assay dye reagent)，利用光譜分析儀(spectrophotometer)，於595 nm 波長下測吸光值，以製作標準蛋白質濃度曲線。接著取1 μ l 待測樣品，同樣加入二次水至800 μ l，並加入200 μ l蛋白質呈色反應液，利用光譜儀在595nm波長下測吸光值，以迴歸方式取得各細胞樣品蛋白質濃度。

c.製作SDS-PAGE:

配製10% separating gel 於室溫下聚合反應約30分鐘，待完全聚合後，再加入5% stacking gel 於室溫下聚合30分鐘，待完全聚合後去除電泳梳 (comb)，裝置在電泳槽上，並加入電泳緩衝溶液 (running buffer)。

d. 電泳：

將SDS-PAGE裝置於電泳槽，並填滿 running buffer，取25 μ g 的蛋白質，加入等體積的染料，以二次水調整使每一樣品的體積相同，95 $^{\circ}$ C加熱 10 分鐘，使蛋白質變性之後，於室溫中冷卻，再將蛋白質樣品注入各個 SDS-PAGE 溝槽中。先以電壓 60 V 進行電泳，直到蛋白質樣品移至 separating gel 和 stacking gel 介面後，將電壓提升至 120 V，經過適當時間後將電泳停止，接著進行蛋白質樣品轉漬。

e.蛋白質樣品轉漬(Electroblotting):

取適當大小的 PVDF 膜，先以 methanol 潤濕約30 秒，再以轉漬緩衝液(transfer buffer)沖洗以去除 methanol，連同兩張放入 transfer buffer 中。轉漬裝置重疊順序由正極到負極依序為濾紙、PVDF 膜、含有蛋白質樣本之 SDS-PAGE、濾紙，避免各個夾層中有氣泡存在。裝置放入轉漬槽中，以350mV轉漬1個小時，轉漬完成後取出 PVDF 膜。所用一級與二級抗體列表如下：

| 欲探測抗原 | 一級抗體 | 二級抗體 |
|----------------|---|---|
| human ICAM-1 | goat anti-human ICAM-1 antibody (1 : 1000 稀釋) | HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG (1 : 5000 稀釋) |
| β -actin | mouse monoclonal anti- β -actin (1 : 1000 稀釋) | HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1 : 3000 稀釋) |

f. 蛋白質樣品染色(immunoblotting):

PVDF膜以5%脫脂牛奶為非特異性抗原(non-specific antigen)的阻斷劑，在室溫下作用1小時，隨後加入一級抗體，於室溫下作用一小時或是 4°C 下作用24小時，之後以PBS-T 沖洗3次，每次10分鐘，再加入二級抗體於室溫下作用1小時，然後再以PBS-T 沖洗3次，每次十五分鐘之後，加入適量Chemiluminescence kit (ECL) ，呈色之後洗去受質並停止顯色。完成顯色的PVDF膜於暗房中以X光片加以顯影。將顯影完成的X光片影像擷取放入電腦中，以GelPro軟體讀取每一個band之密度加以分析與比較。

3. 內皮細胞/單核球粘附試驗(endothelial cells/monocyte adhesion assay)

為觀察細胞接受 sesamol 或 sesamin 處理後再以 TNF- α 刺激是否會影響細胞表面表現黏附分子，利用單核球黏附法分析。將人類主動

脈內皮細胞株培植於在 24 wells 培養盤中，每個 well 接種 5×10^5 個細胞，待 24 小時貼附後，以 sesamin 或 sesamol 處理 18 小時後再以 TNF- α 刺激 6 小時；在實驗進行前，先將 U937 細胞以不含 FBS 之 RPMI1640 培養液清洗 3 次，並在 RPMI1640 培養液(不含 10% FCS)中以 10mM BCECF/AM (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester) 螢光染料標記 30 分鐘，標記完成後以不含 FBS 之 RPMI1640 培養液將懸浮之標記染料洗去；將標記後之 U937 細胞放入 24 wells 培養盤中與內皮細胞在培養箱中共同培養 1 小時，每個 well 放入 10^6 個 U937 細胞，1 小時後去除懸浮未黏附的 U937 細胞，並以 PBS 沖洗 3 次後，置於螢光顯微鏡下，以 20 倍之接物鏡，觀察並拍照黏附在內皮細胞上的 U937 細胞，隨後將細胞 lysis 下來，測量其螢光強度。

4. MAPKs 活性的測定

為瞭解 sesamol 或 sesamin 處理後對於 TNF- α 刺激的內皮細胞表現 ICAM-1 的影響，是否會經由 MAPKs 的磷酸化所造成，所以抽取細胞蛋白質，進行西方點墨分析法。細胞蛋白質的萃取、蛋白質定量、電泳膠製作、蛋白質電泳、蛋白質樣本轉印與蛋白質樣本染色，均與上述「方法 3.西方點墨分析法」方法相同，進一步在各組培養液中分別加入 30 μ M 的 ERK1/2 inhibitor (PD98059)、p38 inhibitor

(SB203580)、JNK1/2 inhibitor (SP600125)觀察是否會影響 ICAM-1 的表現，用以解釋細胞受 TNF- α 刺激時 ICAM-1 的表現與何種 MAPKs 磷酸化有關係，且 sesamol 或 sesamin 是藉由何種路徑影響細胞表現 ICAM-1。所用一級與二級抗體列表如下：

| 欲探測抗原 | 一級抗體 | 二級抗體 |
|----------------------|---|---|
| human phospho-ERK1/2 | mouse anti-human phospho-ERK antibody (1 : 1000 稀釋) | HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1 : 3000 稀釋) |
| human phospho-P38 | rabbit anti-human phospho- p38 antibody (1 : 1000 稀釋) | HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1 : 3000 稀釋) |
| human phospho-JNK | rabbit anti-human phospho-JNK antibody (1 : 1000 稀釋) | HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1 : 3000 稀釋) |
| human total-ERK1/2 | rabbit anti-human total-ERK 1/2 antibody (1: 1000 稀釋) | HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1 : 3000 稀釋) |
| human total-p38 | rabbit anti-human total-p38 antibody (1 : 1000 稀釋) | HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1 : 3000 稀釋) |
| human total-JNK1/2 | rabbit anti-human total-JNK antibody (1 : 1000 稀釋) | HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1 : 3000 稀釋) |

5. NF- κ B p65 免疫化學細胞染色

將約 2×10^4 的細胞種於 coated 的 coverslip 上，以 sesamin 或 sesamol 處理 24 小時，再以 TNF- α 刺激 15 分鐘，將培養液吸掉，以

4% paraformaldehyde (PBS, pH7.4) 固定 15 分鐘，並以 cold acetone 溶液打破細胞膜，於室溫下以 5mg/mL BSA 與非特異性抗原作用一個小時；將一抗 mouse anti-human NF- κ B p65 antibody (1:100 dilute in PBS) 覆蓋於細胞表面於 37°C 作用 1 個小時，隨後以 PBS wash 3 次，然後再上二抗 FITC-conjugated goat anti-mouse Ig G 1 小時，用 PBS wash 3 次，吸乾後以 mounting medium 封片利用 fluorescent microscope 取像。

| 欲探測抗原 | 一級抗體 | 二級抗體 |
|-------|--|--|
| p65 | Mouse anti-human NF- κ B monoclonal antibody (1:100 稀釋) | FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (1:200 稀釋) |

6. 凝膠遲滯分析(Electrophoresis Mobility Shift Assay; EMSA)

細胞內核蛋白萃取

EMSA原理:

利用 Transcription factor (nuclear protein) 與 DNA binding 的原理偵測 transcription factors 的量，是以 isotope 標示的 DNA 為探針，此 DNA 上的 sequence 為某 transcription factor (如 AP-1; NF- κ B) 的 binding site，若核蛋白中有可與此段 DNA binding 的 protein 則可在蛋白質電泳中被看到，沒有與蛋白質結合的 DNA 探針因 size 小，跑得較快，

有結合蛋白質的 DNA 探針跑的慢，故稱 mobility shift，由此可判斷此 protein 是我們所要偵測的 transcription factor 並定量。

將細胞種於 10mm 培養皿中培養，約八分滿時，以 100 μ M sesamol 或 sesamin 預先處理細胞 24 小時，隨後以 TNF- α 2 ng/ml 刺激細胞 15 分鐘，再吸去培養皿中的培養液，並以冰的 PBS 沖洗細胞兩次後，加入 500 μ l 之 buffer A 溶液，並以刮杓將細胞刮下。將含有細胞的 buffer A 溶液，以 1500 g 離心 10 分鐘，移除上清液，將沈澱物加入 100 μ l 之 buffer B 溶液，混合均勻後，以 12000g 離心 10 分鐘後，移除上清液，再將沈澱物加入 70 μ l 之 buffer C 溶液，並將混合均勻後的細胞冰浴 30 分鐘，隨後以 15000g 離心 30 分鐘，將上清液移至新的微量離心管中，保存於- 80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

蛋白質定量

取濃度 1mg/mL 之胎牛血清蛋白 (bovium serum albumin, BSA) 分別取 0、2、4、8、10 μ l 加二次水至 800 μ l，再加入 200 μ l 蛋白質呈色反應(Bio-Rad protein assay dye reagent)，利用光譜分析儀 (spectrophotometer)，於 595 nm 波長下測吸光值，以製作標準蛋白質濃度曲線，在換算出樣品中蛋白質濃度，再進行電泳。

DNA 探針標定

取 100 ng NF- κ B oligonucleotide (序列：5'-AGT TGA GGG GAC TTT

CCC AGG C-3'、3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5')以無菌二次水加至總體積為 10 μ l，(以下過程在冰上操作)再加入 4 μ l 5x labeling buffer，4 μ l CoCl₂-solution，1 μ l DIG-ddUTP soluteion，1 μ l terminal transferrase，混合均勻置於 37°C 反應 15 分鐘。取出後置於冰上加入 2 μ l 0.2M EDTA (pH 8.0)終止反應，再加入 3 μ l 二次水完成探針的製作 (濃度為 4ng/ml)。

轉錄因子結合反應

其作用原理為當使用 DIG 標定時，則需借助 anti-DIG 抗體與鹼性去磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 之 conjugate，並利用鹼性去磷酸酶的酵素活性轉現雜合反應訊息。目前常用來進行鹼性去磷酸酶呈色反應的基質為 NBT (nitroblue tetrazolium) 與 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium salt)；此外，也可以選用 CSPD 或 CDP-Star 等試劑，以增加檢測敏感度。

取濃度 10 μ g 體積之核蛋白，加入適當體積的 5 倍緩衝液 (50mM pH 7.5)的 Tris-HCl、500mM NaCl、5mM DTT、5mM EDTA、20% Glycerol、2 μ g poly (dI-dC)，於 4°C 下反應 15 分鐘，加入約 3 μ l 之 DNA 探針，於室溫下反應 20 分鐘再加入適量之 6 倍的染劑，以 6% Polyacrylamide Gel 及 0.5 倍 TBE 緩衝溶液在

140 伏特電壓下進行電泳。待電泳結束後將膠片轉漬於 Positive charged nylon membrane 上，轉漬後將 membrane 晾乾，放置於 4°C 冰箱 overnight，隔天將 membrane 取出後放置於 dry bath 上以 120°C 將 membrane 烘乾，隨後照 UVB light 2 分鐘，再以 wash buffer 洗 2 分鐘後，進行 anti-DIG/AP conjugate 與 DIG-核酸探針之免疫結合反應：利用 blocking solution 於室溫下作用 30 分鐘(用來填充 membrane 上之非專一性結合部位)，之後以 Anti-DIG-AP in blocking solution 於室溫下作用 30 分鐘，再以 wash buffer 每次 15 分鐘 wash 2 次(去除多餘及非專一性結合於 membrane 的 anti-DIG-AP conjugate)，以 detection buffer 作用 5 分鐘，隨後將配好的 CSPD solution 淋在 membrane 避光 10 分鐘，置於壓片盒中進行壓片。

7. 統計分析

實驗結果以 mean±SEM 表示。實驗數據以 Sigma Stat v.8.0 軟體來進行分析，以 Student's *t* test 來進行檢定，並以 $p < 0.05$ 具有統計上的意義。