

第三章 材料與方法

第一節 細胞培養

選用人類主動脈內皮細胞株(Human aortic endothelial cells ; HAECs)。

解凍細胞株：於液態氮桶中取出冷凍管，迅速置於37°C水浴10秒鐘，旋轉瓶蓋讓管縫中之液態氮散去，再旋緊直到濃細胞液完全融解後，置入無菌操作台中備用。取一個 10 cm培養皿給予已回溫之新鮮培養液，然後吸取一 1 ml新鮮培養液慢慢滴入冷凍管，再將冷凍管中的細胞液吸出，均勻滴入培養皿中，輕輕搖晃均勻（十字搖或八字搖），最後放進培養箱待細胞完全服貼（四小時以上，但避免隔夜），以顯微鏡觀察細胞型態，並更換培養液。

更換培養液與繼代：細胞培養液內含有3% fetal bovine serum、1 g/ml hydrocortison、10ng/ml human epidermal growth factor、3ng/ml basic fibroblast growth factor、10 g/ml heparin、100units/ml penicillin、100 pg/ml streptomycin、1.25 µg/ml Fungizone，培養箱環境為37°C含5% CO₂及飽和水蒸氣，並於水盤加入抗黴劑。每兩至三天更換一次培養液，用幫浦抽吸器前端接tip延培養皿邊緣抽掉舊培養液，再注入新鮮培養液即可。大約五到七天細胞成長約八、九分滿時，需進行繼代，抽吸掉舊培養液後，以PBS洗兩次，加入1 ml TE (Trypsin/EDTA) 均勻搖晃，置入培養箱中等待3分鐘，取出培養皿加入1 ml TN (Trypsin Neutralizer solution) 中和，再注入適量的新鮮培養液，視細胞量或實驗需求而定將細胞懸浮液分成數盤或種入多孔盤中。以第五代至第九代細胞 (P5 - P9) 進行實驗。

計數細胞：取15 µl細胞懸浮液與trypan blue對半稀釋，注入血球計數盤，在顯微鏡觀察活細胞數（活細胞呈亮點，死細胞呈藍紫色），以血球計數器計算四大格細胞總數，當細胞位於格線上，統一計數下線與左線。

計算公式 細胞數/ml = (四大格總細胞數 × 2 × 10⁴) / 4

2：稀釋倍數

4：格數

10⁻⁴：每一大格之體積 = 0.1cm × 0.1cm × 0.01cm

冷凍細胞：冷凍細胞濃度至少 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 以上，將細胞懸浮液離心（1000rpm、5min）後去除上清液，注入適當的冷凍保存液（新鮮培養液含 10%DMSO），混合均勻，每管分裝 1 ml 於冷凍管中。先將冷凍管置於 4°C 、30min，移至 -20°C 、30min，再移至 -80°C 、overnight，最後置入液態氮桶中保存。

儀器設備：無菌操作台（LIAN SHEN）、培養箱（Thermo）、幫浦抽吸器（GAST）、水浴機（NEWLAB）、離心機（BackMan）、液態氮桶（International Cryogenics）、倒立顯微鏡（Nikon）。

材料與試劑：HAECs細胞株（Cascade Biologics）、培養液M200（Cascade Biologics）、LSGS（Cascade Biologics）、TE/TN（Cascade Biologics）、PSF 抗生素（GIBCO）、抗黴劑 Methyl 4-hydroxybenzoate（SIGMA）、細胞級 DMSO（SIGMA）、trypan blue（SIGMA）、液態氮（巧充）、fetal bovine serum（HyClone）。

第二節 山苦瓜樣品製備

本實驗採用之山苦瓜為花蓮縣吉安鄉農業改良廠所提供 HM2381 與 CK 品系。

一、乙酸乙酯萃取物製備（ethyl acetate extract；EAE）

取山苦瓜凍乾粉末 200g，浸泡於 4 公升乙酸乙酯，室溫下攪拌萃取 24 小時，抽器過濾後得萃取液，過濾餘剩殘渣再浸泡於 4 公升乙酸乙酯進行第二次萃取，過濾後所得萃取液與第一次萃取所得混合，於 45°C 進行減壓濃縮，得到山苦瓜乙酸乙酯萃取物。2381 品系萃取率約 10%、CK 品系萃取率 3.5%。

二、皂化與不皂化萃取物

（Saponifiable fraction；S and Non-saponifiable fraction；NS）

取山苦瓜乙酸乙酯萃取物至減壓濃縮瓶中，加入 10 倍體積的 3.6N NaOH/methanol 溶液（1：3），封上 parafilm 或蓋上蓋子後於室溫攪拌至隔夜，以減壓濃縮機進行減壓去除 methanol。接著將殘留物加入 10 倍體積的

二次水溶解，待完全溶解就轉移至分液漏斗中，加入 10 倍體積的 n-Hexane 混勻使分層。先把下層水層（即可皂化物，內含脂肪酸）收集至另一個分液漏斗中，上層再用等體積之二次水萃取一次收集下層水層，（注意上層，即不可皂化物先不要丟掉）。

合併兩次所收集的下層水層，再用等體積之乙酸乙酯(ethyl acetate)萃取一次收集下層水層。加入 10 倍體積的 6N HCl 溶液混勻進行酸化至 pH 值為 2。而後加入與水層等體積的乙酸乙酯(ethyl acetate)，混勻收集上層有機層（內含脂肪酸）至另一各分液漏斗中。下層水層再以乙酸乙酯萃取一次，合併兩次所收集的上層有機層。加入與上層有機層等體積的二次水進行水洗至少 3 次，收集上層有機層。

最後加入少量無水硫酸鈉(sodium sulfate, anhydrous)進行脫水，以濾紙過濾收集於減壓濃縮瓶，進行減壓濃縮以去除溶劑，吹氮氣，即可得皂化萃取出-水解脂肪酸，並儲存於-80°C 備用。而先前保留下來的不可皂化物水層，亦進行減壓濃縮後，並吹氮氣，儲存於-80°C 備用。2381-S 及 2381-NS 萃取率分別為 97.7% 及 2.3%；CK-S 及 CK-NS 萃取率分別為 93.5% 及 6.5%。

感謝國立台灣大學微生物與生化學研究所暨生化科技學系營養科學組黃青真教授實驗室提供場地與儀器讓我們前往製備 2381-EAE，以及徐晉學姊慷慨給予我們已製備完成之 CK-EAE 與兩品系皂化與不皂化物。

2381-EAE 溶於 DMSO，製備成 stock solution 2 mg/ml；CK-EAE、兩品系皂化物（S）溶於絕對酒精，製備成 stock solution 100 mg/ml；兩品系不皂化物（NS）溶於 DMSO，製備成 stock solution 50 mg/ml 儲存於-80°C 備用。

三、已知苦瓜之純化學成分及 PPAR α ligand 正對照藥物

CLN, 9c,11t,13t-conjugatited linolenic acid (Cayman)

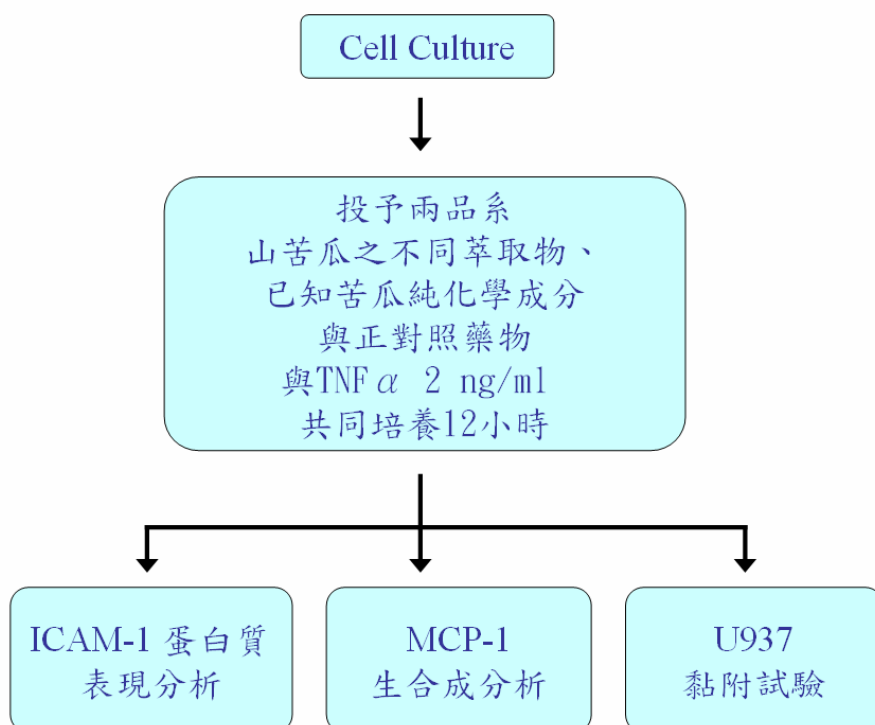
Fenofibrate (SIGMA,F6020)

capric acid (Riedel-de Haën)

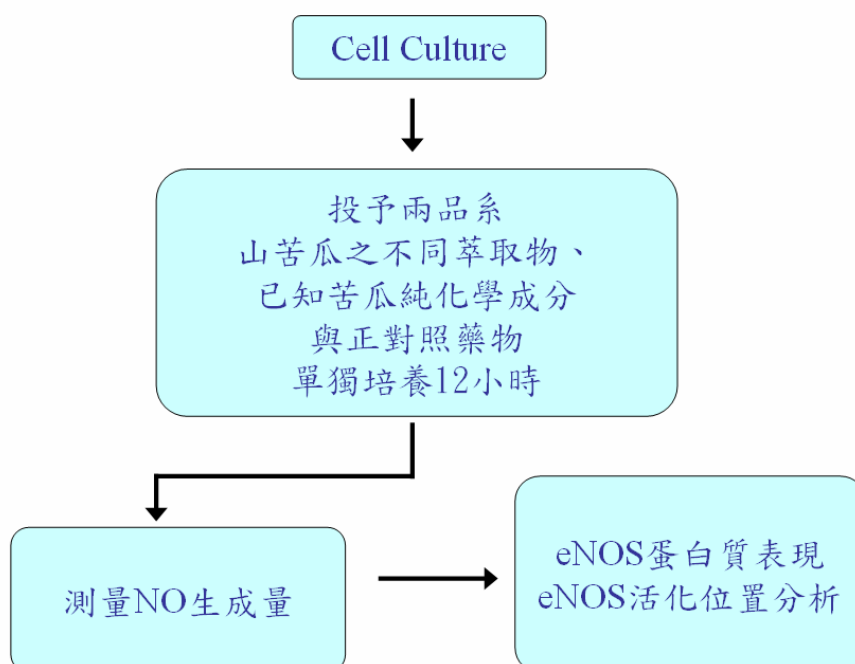
以上成分皆溶於絕對酒精中，製備成 stock solution 2 mM 儲存於-80°C 備用。

第三節 實驗設計

實驗一、



實驗二、於培養液中額外添加 NO 生成所需受質 Arginine (5mM)



第四節 MTT細胞存活率分析

以 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 為受質，測量存活細胞內粒線體中 dehydrogenase 之活性，測得細胞存活率。在 96 wells 培養盤中，每個 well 接種 2×10^4 個細胞，待 4 小時後細胞附著後，吸去培養液注入以配好不同濃度之山苦瓜萃取物或標準品，培養 12 小時後，吸去培養液再加入 55 μ l MTT 溶液 (0.5mg/ml) 於培養箱中反應 4 小時後，最後加入 100 μ l DMSO 反應 20 分鐘 (以 shaker 輕輕搖晃)，以溶解細胞，送入 ELISA reader 以 550 nm 讀取吸收光值。以僅含新鮮培養液細胞之吸光值為對照組 (100%)，再以實驗組之吸光值除以對照組之吸光值，計算出細胞之相對存活百分比。

儀器設備：ELISA reader (TELAN)、Shaker (OS701)。

材料與試劑：MTT (SIGMA)、DMSO (Riedel-de Haën)。

第五節 MCP-1 分析

以酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)，收集細胞上清液進行分析。

本實驗採市售 Human CCL2/MCP-1 kit assay (R&D Systems)，根據三明治 (sandwich) 酵素免疫分析原理測量細胞上清液 MCP-1 的濃度，此法係利用 96 孔的分析盤中已結合抗 MCP-1 的單株抗體，能專一的與 MCP-1 分子結合，再與 horseradish peroxidase conjugates anti human MCP-1 polyclonal antibody 結合，利用 horseradish peroxidase 與 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine 及 H_2O_2 反應呈色而得知樣品中 MCP-1 濃度。操作過程為：將標準品 (系列稀釋)、樣本上清液加入分析盤中，室溫反應 2 小時後，wash 三次，使未結合的樣品在清洗過程中被洗去，再加入 horseradish peroxidase conjugates anti human MCP-1 polyclonal antibody 室溫下反應 1 小時，進行 wash 三次後加入 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine 及 H_2O_2 (新鮮配置)，室溫下避光反應 20 分鐘，最後加入酸性溶液終止酵素呈色反應，於 30 分鐘內送入 ELISA reader 讀取 450 nm 吸光值，吸光值越高者表示樣品中所含 MCP-1 濃度越高，其濃度值利用標準品即可相對換算出來。

第六節 一氧化氮分析

本實驗採市售 Griess Reagent System 組 (Promega) 以 Griess Reaction 原理分析 nitrite (NO_2^-) 含量 (Ferro *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2006; Serfilippi *et al.*, 1994)。於體內，紅血球 hemoglobin 會將 nitrite (NO_2^-) 轉換為穩定的 nitrate (NO_3^-) 型式，因此測量時必須先以 nitrate reductase 轉換後始可獲得總 NO 生成量，由於本實驗為體外細胞模式，故可省略此步驟，直接測量 nitrite (NO_2^-) 即為總 NO 生成量。操作過程為：取標準品 (系列稀釋)、樣本上清液 50 μl 加入 96 孔分析盤中，注入 50 μl Sulfanilamide Solution 避光反應 10 min，再加入 50 μl NED Solution 避光反應 10 min 後，於 30 分鐘內送入 ELISA reader 讀取 540 nm 吸光值，吸光值越高者表示樣品中所含 NO 濃度越高，其濃度值利用標準品即可相對換算出來。

第七節 黏著分子 ICAM-1 分析

抽取細胞蛋白質以西方點墨法 (Western blotting) 進行分析。

一、細胞蛋白質萃取

將細胞種於 6 cm 培養皿中進行實驗後，吸去舊培養液並以 4°C 的 PBS 沖洗細胞兩次。加入 1 ml 冰 PBS 並以刮杓將細胞刮下，收集於微量離心管中，以 4000 g、4°C 離心 10 分鐘，去除上清液，接著加入 30 μl 細胞溶解液 (Lysis buffer)，在 4 °C 下靜置 1 小時待細胞充分溶解，隨後將細胞溶解液以 13000 g、4°C 離心 30 分鐘後，抽取上清液以分光光度計讀取 595 nm 吸光值測定蛋白質含量，並將上清液分裝至新的微量離心管，進行蛋白質電泳或先保存在 -80 °C 冰箱中。

Protein assay 標準曲線

濃度 (mg/ml)	0	2	4	6	8
BSA (1mg/ml)	0	2	4	6	8
DDW	800	798	796	794	792
BioRed			200		
Protein assay					

單位： λ

二、電泳膠片製作

SDS-PAGE gel 製備

10% 電泳膠片 (Separating gel)	成分	5% 電泳膠片 (Stacking gel)
4	H ₂ O ₂	3.4
3.3	30% acrylamide (BioRad)	0.83
2.5	1.5 M Tris-HCl (pH = 8.8)	-
-	1.0 M Tris-HCl (pH = 6.8)	0.63
0.1	10% SDS (SIGMA)	0.05
0.1	10% APS (SIGMA)	0.05
0.004	TEMED (SIGMA)	0.005

單位：ml

配製 Separating gel 於室溫下混合均勻，注入電泳玻片間，以二次水填滿空隙讓膠得以壓平，待完全聚合。凝結後將二次水倒掉，配製 Stacking gel 於室溫下混合均勻，注入電泳玻片間使 stacking gel 位於 separating gel 之上並插入電泳梳，待完全聚合後去除電泳梳，裝置在電泳槽中，浸泡於電泳緩衝液 (running buffer) 等待加入樣本進行電泳。

三、蛋白質電泳 (Electrophoresis)

每個槽溝欲注入 25 μ g 的蛋白質，加入等體積的染料 (5X dye)，以水調整使每一個樣本之體積相等，並置於乾熱機 95 $^{\circ}$ C 乾熱 5 分鐘，於室溫中冷卻一下，再將蛋白質樣本及 marker 注入各個電泳膠片槽溝中。先以電壓 60V 進行電泳，直到蛋白質樣本移至 separating gel 與 stacking gel 介面後，將電壓升至 120V，經適當時間，marker 展開後即停止電泳。接著進行蛋白質樣本的染色或轉印。

5X dye 製備：配置時應先加 β -mercaptoethanol 與 bromophenol blue 以免溶解不完全。儲存於 4°C，避光。

5X dye	成分
90	H ₂ O ₂
200	10% SDS (SIGMA)
500	50% glycerol
60	1.0 M Tris-HCl (pH = 6.8)
50	β -mercaptoethanol (SIGMA)
100	1% bromophenol blue (SIGMA)

單位： λ

四、蛋白質樣本轉印 (Electroblotting)

取適當大小 PVDF (nitrocellulose) 膜，先以 methanol 浸濕活化，再以電泳液 (transfer buffer) 沖洗去除 methanol，連同二張濾紙放入電泳液中。轉印裝置重疊順序由下而上依序為濾紙、PVDF 膜、含有蛋白質樣本之電泳膠片 (SDS-PAGE gel)、濾紙，注意其中不可有氣泡存在。裝置放入轉印槽中，以 350 mA 轉印一小時，轉印完成後，取出 PVDF 膜。

Transfer buffer 製備：配置時 methanol 最後加入以免溶解不完全。

Transfer buffer	成分
900 ml	H ₂ O ₂
3.03 g	Tris base
14.4 g	Glycine
100 ml	methanol

五、蛋白質樣本染色 (Immunoblotting)

PVDF 膜以 6 % 脫脂牛奶作為非特異性 (non-specific antigen) 抗原的阻斷劑，室溫下作用 1 小時。倒掉脫脂牛奶，加入一級抗體，在 4°C 下作用 overnight。接著以 PBS-T (含 0.2% Treen 20 之 PBS) 沖洗 3-5 次，每次 5 分鐘，之後加入二級抗體，室溫下作用一小時，以 PBS-T 沖洗 3-5 次，每次 5 分鐘之，再加入適量的螢光劑 Chemiluminescence reagent 至 PVDF 膜呈色 30 秒，於暗房中將 PVDF 膜與底片一起置於底片匣中壓片，於適當時間將底片取出並浸於顯影液中輕輕搖晃，待顯影完成以流動之自來水清洗底片，再置入定影液中將成果固定，最後將底片以流動之自來水清洗後，自然晾乾。顯影完成的底片影像擷取放入電腦中，以 Image J 軟體讀取每一個 band 之密度加以分析與比較。

儀器設備：Western blotting 組合 (BioRad)、Shaker (OS701)、乾熱機 (Violet BioScience)、分光光度計 (SPECTRONIC GENESYS 5)。

材料與試劑：Marker #SM0671 (進階)、cell lysis buffer 10X (Cell Signaling)、PMSF (SIGMA)、Running Biffer 10X (Bioman)、TNF- α (CYBOLAB)、PVDF 膜 (Immobilon, 伯森)、顯影劑/定影劑 (伯森)、底片 (柯達藍片)、螢光劑 (伯森)、底片匣 (柯達, 伯森)、安佳脫指奶粉 (和平超市)、BSA (SIGMA)。

第八節 eNOS 蛋白質與活化分析

抽取細胞蛋白質以西方點墨法 (Western blotting) 進行分析。原理方法同第七節。

欲測抗原	一級抗體	二級抗體
β -actin	monoclonal anti - β actin (1 : 20000 稀釋) (SIGMA : A5441)	Anti-mouse IgG (1 : 5000 稀釋) (SIGMA : A9044)
Human ICAM-1	Goat anti-Human ICAM-1 Ab (1 : 2000 稀釋) (R&D : BBA17)	Peroxidase anti-goat IgG (1 : 4000 稀釋) (VECTOR : PI-9500)
Human eNOS	Mouse anti-Human eNOS Ab (1 : 1000 稀釋) (BD : 610297)	Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-mouseIgG (1 : 3000 稀釋) (Jackson ImmunoResearch)
Human pSer ¹¹⁷⁷ eNOS	Mouse anti- Human pSer ¹¹⁷⁷ eNOS Ab (1 : 1000 稀釋) (BD : 612392)	Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-mouse IgG (1 : 3000 稀釋) (Jackson ImmunoResearch)

表3-1 預測項目之抗原/抗體一覽表

第九節 內皮細胞/單核球黏附分析

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 2×10^5 個細胞，依照研究設計分別給予不同品系之山苦瓜萃取物與TNF- α 共同培養12小時。實驗進行前，先將U937細胞以不含血清之RPMI1640培養液清洗兩次，以螢光劑(2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester; Invitrogen, 進階)：不含血清培養液 = 1：1000比例標記上螢光染料，培養40分鐘後，用PBS清洗兩次以洗去多餘螢光劑。

將HAECs用PBS清洗一次，注入已標記之U937細胞到24 wells培養盤中與內皮細胞在培養箱中共同培養一小時，每個well放入 5×10^5 個U937細胞，一小時後去除懸浮未黏附的U937細胞，並以PBS清洗兩次，最後加入1 ml lysis buffer pipeting，以螢光光度計(TEKON Technologies)讀取Ex 485/Em 530螢光強度。

第十節 山苦瓜中 CLN 含量分析

取CLN溶於己烷(系列稀釋)以畫出標準曲線、樣本先溶於絕對酒精製成濃度 $100 \mu\text{g/ml}$ ，再以己烷稀釋二倍，以分光光度計讀取270 nm吸光值，吸光值越高者表示樣品中所含CLN濃度越高，其濃度值利用標準曲線即可相對換算出來。

第十一節 統計分析

實驗結果以mean \pm SD表示。實驗數據以SPSS11.5軟體來進行分析，以nonparametric test之independent samples (Mann-Whitney U test)檢定各組差異性， $p < 0.05$ 視為具有統計上的意義。