

東海大學生命科學系  
博士學位論文

Mechanistic Study of Caffeic Acid Phenyl Ester on the Proliferation,  
Migration, and Apoptosis of Arterial Smooth Muscle Cells

蜂膠成份咖啡酸苯乙酯對動脈血管平滑肌細胞  
增生、移行與凋亡的機制

指導教授

鄭 葳 教 授

Vivian Cheng, PhD

丁 紀 台 副 教 授

Chih-Tai Ting, MD & PhD

研究生：何鴻鋆

Hung-Chin Ho

日期： 九十九年六月

# 目錄

	頁數
目錄	2- 9
中文摘要	10-11
英文摘要	12-14
一、前言	
I. 動脈粥瘤硬化的病理機轉與治療	15-17
II. 經皮冠狀動脈介入性治療後血管再狹窄	17-19
III. 咖啡酸苯乙酯( Caffeic Acid Phenyl Ester, CAPE ) 的生理功能	19-20
IV. 血管損傷後再狹窄的動物實驗模組	20-21
V. 血小板生長因子( platelet-derived growth factor )	21-22
二、研究目的	23
三、實驗方法	
I. 血管損傷後再狹窄的動物實驗模組	24
A. 滲入性血管整型球囊導管 - Infiltrator®	24
B. 髂動脈損傷動物實驗模組與局部藥劑注射	25
C. 組織切片染色與量化分析	25-26
II. 咖啡酸苯乙酯對血管平滑肌細胞的體外實驗	26

A. 細胞培養	26
B. 細胞增生試驗	27
C. 細胞移行試驗：細胞培養層劃縫痕癒合試驗	27
D. 流式細胞分析儀細胞週期試驗	27-28
E. 對細胞信號傳遞的影響：西方點墨法分析	28-29
F. 細胞凋亡檢測：去氧核糖核酸斷裂分析 ( DNA fragmentation analysis )	29
G. 細胞凋亡檢測：末端去氧核苷酸轉移酶介導生 物素末端缺痕標記法( TUNNEL staining )	29-30
H. 細胞凋亡檢測：血管平滑肌細胞細胞質與粒線 體內 cytochrome c 分析	30-31
I. 對 caspase cascade 的影響：西方點墨法分析	31

#### 四、實驗結果

I. 動物實驗	32
A. 咖啡酸苯乙酯減少球囊損傷兔子髂動脈內皮 增厚	32
II. 咖啡酸苯乙酯對血管平滑肌細胞的體外實驗	32
A. 30 $\mu$ M咖啡酸苯乙酯抑制血管平滑肌細胞增 生	32

B. 咖啡酸苯乙酯抑制血管平滑肌細胞移行	33
C. 咖啡酸苯乙酯使血管平滑肌細胞停滯在細胞週期 S phase	33
D. 單獨使用咖啡酸苯乙酯無法促使血管平滑肌細胞凋亡	33-34
E. 咖啡酸苯乙酯減少細胞週期基因 PCNA、Cyclin E、CDK2 和 Cyclin A 的表現	34
F. 咖啡酸苯乙酯減少信號傳遞路徑分子 AKT、MEK 與 ERK 的磷酸化	34
G. 同時添加 BB 型血小板生長因子咖啡酸苯乙酯仍能抑制血管平滑肌細胞增生	35
H. 同時添加 BB 型血小板生長因子咖啡酸苯乙酯仍能抑制血管平滑肌細胞移行	35
I. 同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞有凋亡現象	35
J. 同時添加 BB 型血小板生長因子咖啡酸苯乙酯也減少信號傳遞路徑分子 AKT、MEK 與 ERK 的磷酸化	36
K. 同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯	37

乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞粒線體內 cytochrome c 的釋出增加	37-38
L. 同時添加BB型血小板生長因子與咖啡酸苯乙 酯活化冠狀動脈平滑肌細胞抗凋亡分子 Bad 受抑制而促凋亡分子 Bax 與 caspases 被活化	
五、討論	38-44
六、結論	45
七、圖	
圖一、 咖啡酸苯乙酯減少球囊損傷兔子髂動脈內皮增 厚:兔子髂動脈橫切面。	46-47
圖二、 兔子髂動脈橫切面量化分析四組血管壁內皮層 增厚面積百分比	48
圖三、 咖啡酸苯乙脂抑制人類冠狀動脈平滑肌細胞增 生。	49
圖四、 咖啡酸苯乙脂抑制人類冠狀動脈平滑肌細胞移 行。	50
圖五、 咖啡酸苯乙脂抑制血管平滑肌細胞移行	51

圖六、	咖啡酸苯乙酯使人類冠狀動脈平滑肌細胞停滯 在細胞週期 S 期	52
圖七、	咖啡酸苯乙酯使人類冠狀動脈平滑肌細胞停滯 在細胞週期 S 期。細胞在各週期所佔百分比計算 結果。	53
圖八、	去氧核糖核酸斷裂檢驗顯示單獨使用咖啡酸苯 乙酯無法促使人類冠狀動脈平滑肌細胞凋亡。	54
圖九、	TUNEL 試驗顯示單獨使用咖啡酸苯乙酯無法促 使人類冠狀動脈平滑肌細胞凋亡。	55
圖十、	咖啡酸苯乙酯減少細胞週期基因 PCNA、Cyclin E、CDK2 和 Cyclin A 的表現。	56
圖十一、	咖啡酸苯乙酯減少細胞週期基因 PCNA、Cyclin E、CDK2 和 Cyclin A 的表現。各蛋白表現量化 結果。。	57
圖十二、	咖啡酸苯乙酯減少信號傳遞路徑分子 AKT、 MEK 與 ERK 的磷酸化。	58-59
圖十三、	咖啡酸苯乙酯抑制 AKT1、MEK1/2 與 ERK1/2 磷 酸化表現。各檢測蛋白量化結果。	59
圖十四、	BB 型血小板生長因子誘發人類冠狀動脈平滑肌	60

細胞增生。

- 圖十五、 同時添加 BB 型血小板生長因子，咖啡酸苯乙酯  
仍能抑制血管平滑肌細胞增生。 61
- 圖十六、 同時添加 BB 型血小板生長因子，咖啡酸苯乙酯  
仍能抑制血管平滑肌細胞移行 62
- 圖十七、 同時添加 BB 型血小板生長因子，咖啡酸苯乙酯  
仍能抑制血管平滑肌細胞移行。量化資料。 63
- 圖十八、 同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯  
的冠狀動脈平滑肌細胞有凋亡現象。 64
- 圖十九、 去氧核糖核酸斷裂化驗顯示同時添加 BB 型血小  
板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌 65  
細胞有凋亡現象。
- 圖二十、 TUNEL 試驗確定同時添加 BB 型血小板生長因子  
與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞有凋亡 66-67  
現象。
- 圖二十一、 同時添加 BB 型血小板生長因子，咖啡酸苯乙脂  
也減少信號傳遞路徑分子 AKT、 MEK 與 ERK 68-69  
的磷酸化。
- 圖二十二、 同時添加 BB 型血小板生長因子，咖啡酸苯乙脂 69

也減少信號傳遞路徑分子 AKT、 MEK 與 ERK 的磷酸化。各蛋白及其磷酸化蛋白量化平均結果。

圖二十三、 同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞粒線體內 cytochrome c 的釋出增加。 70

圖二十四、 同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞粒線體內 cytochrome c 的釋出增加。量化分析。 71

圖二十五、 同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯活化冠狀動脈平滑肌細胞抗凋亡分子 Bad 受抑制而促凋亡分子 Bax 與 caspases 被活化。 72

圖二十六、 同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯活化冠狀動脈平滑肌細胞抗凋亡分子 Bad 受抑制而促凋亡分子 Bax 與 caspases 被活化。免疫點墨分析量化結果。 73

## 八、附圖

附圖一、 動脈粥狀硬化內皮功能異常發展階段 74



附圖二、	經皮冠狀動脈介入性治療再狹窄的機制	75
附圖三、	再狹窄新生內膜與原生血管粥瘤組織病理比較	76
附圖四、	經皮冠狀動脈介入性治療血管內壁損傷後，血管 細胞層面血管修復變化時程。	77
附圖五、	再狹窄的機轉	78-79
附圖六、	咖啡酸苯乙酯化學式	80
附圖七、	Infiltrator <sup>®</sup> 導管運送系統	81
附圖八、	Infiltrator <sup>®</sup> 局部投予藥劑送到血管壁	82
附圖九、	在血小板生長因子刺激下咖啡酸苯乙酯對血管 平滑肌細胞細胞週期的影響	83
九、附表		
附表一、	人類經皮冠狀動脈介入性治療血管內壁損傷 後，血管細胞層面血管修復變化時程。	84
十、參考文獻		
85-92		
十一、個人資料表/ Curriculum Vitae		
93-97		

## 摘 要

心血管疾病是主要十大死因之一。經皮介入性治療(俗稱心導管手術治療)已被接受為主要冠狀動脈疾病的治療，但術後再狹窄仍然是重要的研究議題。經皮介入性治療術後影響再狹窄的反應包括急性發炎細胞侵潤、平滑肌增生凋亡、移行及血管內皮再生。如塗藥性支架等在病灶局部給予藥物處理的方式，為目前研究解決再狹窄的方向。因咖啡酸苯乙酯(蜂膠主要活性成分)曾被報導有抗發炎、抗增生與抗癌的效用，故在我們研究中以高血脂兔子髂動脈損傷實驗模型，分析評估血管內局部注射咖啡酸苯乙酯對受損血管內膜增生的效果。以冠狀動脈平滑肌細胞培養，評估咖啡酸苯乙酯抑制增生與抑制移行的效果及其可能機轉。更進一步模擬經皮介入性治療狀況，在冠狀動脈平滑肌細胞培養加入咖啡酸苯乙酯處理時，同時加入血小板生長因子，觀察冠狀動脈平滑肌細胞反應的改變及評估其可能機轉。實驗結果顯示咖啡酸苯乙酯能緩解受氣球損傷的兔子動脈內膜增生。與局部注射生食鹽水組( $98.3 \pm 0.41\%$ )相比，局部注射咖啡酸苯乙酯組的兔子動脈內膜增生顯著下降到  $55.0 \pm 0.12\%$ 。不論是否添加血小板生長因子，咖啡酸苯乙酯有顯著抑制冠狀動脈血管平滑肌細胞增生與移行現象。流式細胞儀檢查呈現咖啡酸苯乙酯增加動脈血管平滑肌細胞積聚在 S 期。咖啡酸苯乙酯也會抑制 cyclin A、cyclin E、CDK2 和 PCNA 的表現，而且下調磷酸活化 AKT1、MEK 1/2、ERK

1/2 信號分子。但單以咖啡酸苯乙酯未能引發冠狀動脈血管平滑肌細胞凋亡。在添加血小板生長因子後，以 sub-G1 細胞的存在、去氧核糖核酸斷裂分析、TUNEL 檢測與細胞粒線體內 cytochrome c 釋出等檢驗確定有細胞凋亡現象。咖啡酸苯乙酯引發細胞凋亡是藉由線粒體凋亡路徑。整個行動伴隨活化細胞內 caspase-3 與 caspase-9， Bcl-2 下調和 Bax 上調。但 caspase 8 並沒被咖啡酸苯乙酯活化。表示 Fas 或其配體 FasL 未涉及咖啡酸苯乙酯引發的凋亡過程。由本研究結果推知，臨床上咖啡酸苯乙酯可在治療冠狀動脈時做為減少血管再狹窄的輔助治療。未來應進一步在動物實驗探討咖啡酸苯乙酯對動脈平滑肌細胞的功效。

## Abstract

The percutaneous coronary intervention is the major therapeutic strategy for the coronary artery disease. However, restenosis after percutaneous coronary intervention still challenges both vascular biologist and interventional cardiologist. The major events after percutaneous coronary intervention include infiltration of leukocytes, the proliferation and migration of smooth muscle cells, apoptosis of smooth muscle cells, and re-endothelialization. Local delivery of therapeutic agents, such as drug eluting stent, is one of the tools to decrease restenosis. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), the active component of propolis, has several biological properties, such as antioxidation, anti-inflammation, anti-proliferation, and anti-neoplasia. In this study, we investigated the effects of caffeic acid phenethyl ester in vitro on the human coronary smooth muscle cells and in vivo with the rabbit iliac injury model using a local delivery system. The in vivo study, the effects of perivascular infused caffeic acid phenethyl ester on the neointimal hyperplasia of rabbits after balloon injury was analyzed. The results demonstrated that caffeic acid phenethyl ester was able to regress the intima thickening of the iliac artery in rabbits after balloon injury. The intima

thickening decreased significantly to  $55.0 \pm 0.12$  % in the group after local caffeic acid phenethyl ester infusion compared to the group after saline infusion ( $98.3 \pm 0.41$  %). The effects of caffeic acid phenethyl ester on the proliferation and migration were evaluated in the cultured arterial smooth muscle cells with or without platelet-derived growth factor (PDGF) stimulation. The results showed that caffeic acid phenethyl ester displayed a strong inhibitory effect on the growth and migration. Western blotting demonstrated that caffeic acid phenethyl ester inhibited activation of AKT, MEK, and ERK signaling molecules. Flow cytometry analysis showed that the cells accumulated in the S phase but no apoptosis was observed after caffeic acid phenethyl ester treatment. However, after the stimulation with platelet-derived growth factor, the cells accumulated at the sub-G1 phase and cell apoptosis was observed. Caffeic acid phenethyl ester triggered the release of cytochrome c from mitochondria to cytosol, up-regulated pro-apoptotic gene, Bax, and down-regulated anti-apoptotic gene, Bcl-2. Up-regulations of caspase-9 and caspase-3 indicated that caffeic acid phenethyl ester precipitated mitochondrion-dependent apoptotic signaling pathway. This study provides the information that, in the clinical implications, caffeic acid phenethyl ester might be used as an adjuvant therapy to decrease the neointimal thickening of the artery after percutaneous coronary intervention. Further

evaluation of in vivo efficiency of caffeic acid phenethyl ester on vascular smooth muscle cells in animal injury models should be investigated.

## 一、前言

### I. 動脈粥瘤硬化的病理機轉與治療

動脈粥狀硬化(atherosclerosis)，又稱動脈硬化血管疾病(arteriosclerotic vascular disease)，是動脈血管壁發炎反應造成的症候群。主要因血管內壁累積過多的低密度脂蛋白(low-density lipoproteins)引起發炎反應，促使巨噬白血球(macrophage)積聚後膽固醇等油脂物質堆積，高密度脂蛋白(high-density lipoproteins)又未能及時移除這些油脂物質。血管內壁被膽固醇等油脂物質堆積增厚，形成脂斑(atheromatous plaque)造成血管腔狹窄進而使得組織器官血流灌注不足(Libby, et al., 2002)。因影響器官不同引起多種疾病，其中冠狀動脈疾病、腦血管疾病及周邊動脈血管疾病是目前直接或間接造成人類死亡前十大死因之一。

動脈粥狀硬化自十幾歲開始形成，到四十餘歲都可能沒有症狀(附圖一)。最終病變呈現分兩大類：第一類形成脂斑，可能隨時間脂斑慢慢增厚造成血管內腔狹窄，血管內腔狹窄到一定程度會影響病灶後面血流量不足，使得組織器官血流灌注不足而引發症狀。也可能因脂斑不穩定破裂，引發急性血栓，加速血管腔狹窄，造成像心肌梗塞或腦中風等急性致命性重症(Dzau, et al., 2002)。假如梗塞影響組織不大，未造成臨床症狀，病患未必會求診治療。但在反覆脂斑破裂與修復惡性循環下，血管狹窄速度比一般穩定脂斑快，所

以在相對較低年齡層即有缺血性症狀徵象(Maseri & Fuster, 2003)。第二類則為血管瘤(aneurysm)，當動脈粥狀硬化病變影響到血管中膜(tunica media)時血管內腔反而異常擴張，形成動脈瘤。後者相對罕見，約佔動脈硬化血管疾病4.9%。在臨床風險因子與五年存活率分析，與第一類沒有顯著差別(Swaye, et al., 1983)。所以臨床上治療研究探討以第一類動脈硬化血管疾病為主，也就是治療或預防血管狹窄與改善組織器官血流灌注。本論文研究範圍以心臟血管疾病，即冠狀動脈疾病，為臨床考量對象所設定的研究。

在冠狀動脈疾病治療，首先強調非藥物性治療的風險因素控制，包括戒煙、健康飲食習慣與規律有氧運動。進而藥物治療，包括阿斯匹林(aspirin)、冠狀動脈血管擴張劑與風險疾病控制(抗高血壓藥物、血糖控制藥物與HMG-CoA 還原酶抑制劑等降血脂藥物)(The Allhat Officers And Coordinators For The Allhat Collaborative Research Group, 2002; Strandberg, et al., 1997; Nissen, et al., 2006; Downs, et al., 1998; Sever, et al., 2005)。若症狀無法適當控制或非侵入性檢查呈現心肌缺氧徵象，則應進一步侵入性治療，改善心肌缺氧，以避免急性致命發作或慢性缺血性心肌病變造成心衰竭。目前認定有效侵入性治療包括經皮冠狀動脈介入性治療(percutaneous coronary intervention, 舊稱經皮冠狀動脈整型術 percutaneous coronary angioplasty)與冠狀動脈繞道手術(coronary artery bypass surgery)。在本體治療與輔助治療同時都持續快速研發進步下，兩種治療策略在長期存活率上沒有顯著差異。但經



皮冠狀動脈介入性治療在術後照護、併發症、住院日數與術後恢復時間等優勢下，經皮冠狀動脈介入性治療在治療冠狀動脈疾病比重逐年增加。

## II. 經皮冠狀動脈介入性治療後血管再狹窄

經皮冠狀動脈介入性治療雖提供比外科冠狀動脈繞道手術更簡單與讓患者更能接受的治療。但六個月內高達 30%至 60%的再狹窄(restenosis)率，一直困擾介入性心血管治療的醫師。所謂再狹窄即為原已擴張開的血管內腔再度狹窄，進而再度影響病灶之後血流供應。定義上，血管內徑減少 50%以上即需要進一步再執行經皮冠狀動脈介入性治療(Hamid, 2007)。隨介入性治療器材進步，在治療技術上已不僅將血管內脂斑擴張、擠壓或磨除。更希望病灶處施予治療後能減緩、甚至沒有再狹窄的發生。

經皮冠狀動脈介入性治療是經由週邊動脈(橈動脈或股動脈)置入血管鞘管，做為導線與導管進出管道。在 X 光透視導引下，將特別設計的冠狀動脈導管心端開口安置到欲治療病灶冠狀動脈的開口。經由冠狀動脈導管，將導線送入欲治療病灶冠狀動脈。待導線過病灶後，將球囊導管的球囊送到病灶定位，進行擴張治療。將狹窄病灶擴張的機制有三：擠壓、撕裂與外推脂斑。相對於病灶擴張機制，局部病灶血管被處理後，也有造成再狹窄的機轉：急性期，由動脈中膜平滑肌細胞與彈性纖維回縮(recoil)。血管修復重塑

(remodeling)過程中，血管壁皺縮使得血管再縮窄。亞急期，血管修復過程中中膜平滑肌細胞增生、移行到內皮下層並促使細胞外間質(extra-cellular matrix)增加，造成血管新生內膜增生(neo-intimal hyperplasia)，使得血管再狹窄(附圖二)。再狹窄所造成的新生內膜(neointima)病灶與原生血管粥瘤不同，前者主要由平滑肌細胞及細胞外基質(matrix)組成(附圖三A)；而後者主由脂肪構成(附圖三B)。1993年血管內支架的發明，支架的強力支撐解決了急性期血管回縮的問題。但支架層仍是外來物，會刺激血管修復期的免疫反應，造成新生內膜增生，使得再狹窄的問題無明顯改善。所以要解決新生內膜增生的問題，須從抑制血管內壁損傷後平滑肌細胞的增生及移行來解決。經皮冠狀動脈介入性治療球囊導管氣球擴張血管內壁，造成血管內壁損傷，隨即引起血小板黏附與聚集，啟動發炎反應。發炎細胞開始浸潤與活化，釋出生長激素(特別是血小板衍生生長因子 platelet-derived growth factor, PDGF)與 cytokines，造成血管中膜平滑肌細胞增生與刺激細胞產生細胞外基質。於第二天開始，這些增生的平滑肌細胞開始往血管內皮移行。部分未移行的平滑肌細胞進行自然凋亡(apoptosis)。第四天開始，移行到血管內皮的平滑肌細胞進一步增生，同時內皮細胞也開始修復血管內皮。在一般狀況下於第十四天完成內皮修復(附圖四、附圖五)(Ferns & Avades, 2000; Liu, et al., 1989; Angelini, et al., 2002)。在人類，該高峰期發生於經皮冠狀動脈介入性治療前三十天(附表一)。

由上述經皮冠狀動脈介入性治療，血管內壁損傷後血管修復血管細胞變化得知：主要影響再狹窄的病理變化在急性期白血球侵潤(acute leukocyte infiltration)、平滑肌細胞增生(proliferation)、平滑肌細胞自然凋亡(apoptosis)、平滑肌細胞移行(migration)與內皮修補完整(re-endothelialization)。也就是說若能抑制急性期白血球侵潤、減少平滑肌細胞增生、促使過度增生的平滑肌細胞自然凋亡、抑制平滑肌細胞移行與加速內皮修補完整，即可能減少再狹窄。過去曾將增生的平滑肌細胞視為異常增生的腫瘤細胞治療，從而發展出放射近距離治療(radiation brachytherapy)。近年來，更有局部注射導管與塗藥性支架(drug-eluting stent)的研發(Lau & Sigwart, 1995; Fattori & Piva, 2003)，目前上市塗藥性支架所負載藥物以 Sirolimus 類與 Paclitaxel 兩類有抗癌與免疫調節功能的藥劑為主(Stone, et al., 2007)。但目前塗藥性支架仍為未臻完善(Jeremias & Kirtane, 2008)，所以尋求適當可運用於塗藥性支架之藥物或輔助治療為目前熱門的研究方向。

### III. 咖啡酸苯乙酯(Caffeic Acid Phenyl Ester, CAPE)的生理功能

蜂膠是蜜蜂從特定植物的樹芽和樹皮(主要是針葉樹)，所採集樹脂狀物質，再和蜂蠟及花粉混合而成。蜜蜂將蜂膠用來修補固定蜂巢，並將蜂膠當作增強蜂群免疫力的物質來抵抗外來病源。蜂膠活性成份約 10%，其中咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenyl ester, CAPE) 於 1988 年首次發表為蜂膠的主要

活性成分(Grunberger, et al., 1998)。咖啡酸苯乙酯是咖啡酸(Caffeic acid)的衍生物，結構與黃酮(flavonoids)相近。分子式為  $C_{17}H_{16}O_4$ ，分子量為 284 g/mol。(附圖六)。

咖啡酸苯乙酯曾有報導對腫瘤細胞，如大腸直腸腫瘤、白血病、大腸癌肝臟轉移與神經膠質瘤(Wang, et al., 2005; Kuo, et al., 2006a, 2006b; Li, et al., 2005; Jaganathan & Mandal, 2009; Borrelli, et al., 2002a; Nagaoka, et al., 2003; Chung, et al., 2004)，有效抑制增生能力。咖啡酸苯乙酯抗氧化的活性在不同活體外生理系統也被證實(Maffia, et al., 2002; Maga & Hubscher, 2003)。咖啡酸苯乙酯能抑制 cyclooxygenase 與 nuclear transcription factor kappa-B (NF- $\kappa$ B)活性(Moreno, et al., 2007; Nakatania, et al., 2003; Roy, et al., 2002; Orban, et al., 2000)，這是咖啡酸苯乙酯抗發炎(Roy, et al., 2002; Moreno, et al., 2007; Borrelli, et al., 2002b; Mirzoeva, et al., 1996; Orban, et al., 2000)與在不同癌細胞株引發自然凋亡(Shuchman, 2006; Sudina, et al., 1993)的重要機制。因咖啡酸苯乙酯這些效用與前述減少再狹窄機轉相近，故可能可以為運用於塗藥性支架的藥物或輔助治療。

#### IV. 血管損傷後再狹窄的動物實驗模組

口服咖啡酸苯乙酯曾報導在自發性高血壓大鼠動物模組可抑制平滑肌細胞增生(Li, et al., 2005)。但在大鼠動物實驗發現口服高劑量咖啡酸會引發

胃乳頭狀瘤(stomach papillomas)，在同一試驗中也發現只有在高劑量咖啡酸時才能顯著性地抑制大腸腫瘤的生長。可是即使在膳食低濃度下，酚類化合物也有造成胃腺癌的加成或協同性致癌效應(Hirose, et al., 1998)。之後研究認為可能是大鼠腸道內細菌改變咖啡酸的代謝物形成所造成(Peppercorn & Goldman, 1972; Gonthier, et al., 2003)。所以在臨床應用要避免此潛在副作用，則須考慮以像塗藥性支架血管內局部投與的方式。相對在動物實驗上，欲使實驗較單純化及可行性考慮，則利用局部投與系統(local delivery device)。近年來滲入性血管整型球囊導管(infiltrator angioplasty balloon catheter)的發明，可以在傳統血管整型術氣球擴張後將藥劑直接注射到血管壁(Barath, et al., 1997; Takahashi, et al., 2007)。

## V. 血小板生長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)

在細胞培養下與實際經皮冠狀動脈介入性治療的環境仍有差距。在再狹窄發生過程中，促使血管平滑肌細胞再進入細胞週期快速增生、移行、同時增加抗細胞凋亡的能力可能來自聚集的血小板與發炎細胞釋出的生長因子與細胞因子(cytokines)。在這些促使血管平滑肌細胞快速增生、移行的生長因子中，又以BB型血小板生長因子擁有最強使細胞分裂及引起發炎反應的能力(Bornfeldt, et al., 1995)。血小板生長因子能活化多個信號傳遞路徑，包括 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 路徑

及 phosphatidylinositol 3-kinase/ serine-threonine protein kinase Akt (又名 protein kinase B)(PI3k/AKT)路徑(Cospedal, et al., 1999)。在動物實驗也報導過增加血小板衍生長因子會致使新生內皮增厚(neointimal thickening)(Jawien, et al., 1992)。為模擬實際經皮冠狀動脈介入性治療後，血管因血流營養改善但加劇出現發炎反應的環境，我們除了評估單純咖啡酸苯乙酯對血管平滑肌細胞的影響外，也檢視咖啡酸苯乙酯在同時培養基中添加血小板生長因子後對血管平滑肌細胞的影響及可能機制改變。

## 二、研究目的

本研究將測試咖啡酸苯乙酯是否具有抑制人類冠狀動脈平滑肌細胞增生和移行的效果，並進一步的探討其作用機制。藉以評估咖啡酸苯乙酯未來是否可運用於塗藥性支架或其輔助治療，來降低經皮冠狀動脈介入性治療後所引起的血管再狹窄發生率。

### 三、實驗方法

#### I. 血管損傷後再狹窄的動物實驗模組

##### A. 滲入性血管整型球囊導管 - Infiltrator<sup>®</sup>

於本研究，我們所使用的局部投與系統滲入性血管整型球囊導管是 Infiltrator<sup>®</sup> ( Boston Scientific Corporation, Boston, MA, U.S.A.)( Liu, 2004; Yang, 2003) (附圖七)。Infiltrator<sup>®</sup>結構上可分為兩部分：傳統血管擴張用球囊與藥劑輸送系統InjectorStrip<sup>®</sup>。在Infiltrator<sup>®</sup>近操作端有兩個注射口，一為注射治療藥劑用，一為調節水劑控制遠端病灶區球囊撐開與回收。在Infiltrator遠(貼近病灶區)端，除一般用來擴張脂斑病灶15毫米長的球囊上縱向有三條長約10.7毫米聚氨脂材質的InjectorStrip<sup>®</sup>，是注射藥劑的特殊設計。在InjectorStrip<sup>®</sup>上有一排0.25毫米高的鍍製圓椎狀注射孔(InjectorPort<sup>®</sup>)，注射孔內有管腔連到InjectorStrip<sup>®</sup>內輸液腔道，可連到近端操作部分注射治療藥劑用的注射口。導管為單軌式導管，共有三個管腔：第一個管腔讓導線穿過，導管球囊可沿著導線到血管內欲治療病灶部位。第二個管腔讓治療藥劑由近操作端注射口送到注射孔。第三個管腔讓水劑由近操作端調控注射口到遠端球囊內，可將球囊撐開讓InjectorPort<sup>®</sup>貼到血管壁，順利把藥劑送到血管壁內，然後收回球囊。導管直徑為4.2 French，長132公分。



## B. 髂動脈損傷動物實驗模組與局部藥劑注射

本研究使用動物是自畜養場購買的新紐西蘭雄白兔，體重3.0~3.5公斤。先接受2%高膽固醇飼料飼養八週。於第九週依是否有血管內壁損傷與局部注射藥劑分成四組，接受實驗處置：兔子經由耳靜脈注射Ketamine (40 mg/kg) 與xylocaine (5 mg/kg)麻醉，由右腹股溝處分離出股動脈後，以18 G針頭穿刺股動脈，將0.018-inch 導線引入股動脈並送入主動脈。沿著導線將3.0mm×20 mm球囊導管推進距離股動脈穿刺口6公分處(球囊約略位於腹主動脈分叉為髂動脈部位)，再將球囊撐開至8 bars壓力，後往股動脈穿刺口回拉造成髂動脈內壁損傷，如此往返三次。局部注射藥劑組在經球囊導管造成髂動脈內壁損傷後，再置入Infiltrator<sup>®</sup>。Infiltrator<sup>®</sup>沿著導線推進離股動脈穿刺口6公分處，將球囊撐開到6 bars的壓力，讓注射孔貼附到血管內壁，然後以0.013 ml/sec速度緩慢將0.4 ml生理食鹽水或0.4 ml 100 μM 咖啡酸苯乙酯注射到髂動脈內壁。注射完畢後，將Infiltrator<sup>®</sup>回拉1 cm，再重覆上述注射步驟三次。而後移除Infiltrator<sup>®</sup>並將股動脈結紮後，用4號絲線將傷口縫合。所有兔子於接受處置三週後犧牲，取出髂動脈進行組織切片染色並分析與量化數據。

## C. 組織切片染色與量化分析

取下的髂動脈標本先以 phosphate buffered saline (PBS)調製的 4% paraformaldehyde 固定兩小時。依序脫水並以石蠟包埋，自近心端到遠心端

每隔 120  $\mu\text{m}$  切成 6  $\mu\text{m}$  厚的橫切面。將 50 到 60 個切面做蘇木精與曙紅染色 (haematoxylin and eosin staining)，在低倍光學顯微鏡下觀察病變區域並每一切片攝取 3 至 5 張相片後，以影像分析系統 (Image Gauge, Fuji Film, Tokyo, Japan) 做定量分析。狹窄程度計算公式如下：

狹窄程度(%)=

$$(\text{彈力層內面積}-\text{血管內腔面積})/(\text{中膜內面積}-\text{血管內腔面積}) \times 100\%$$

## II. 咖啡酸苯乙酯對血管平滑肌細胞的體外實驗

利用人類冠狀動脈平滑肌細胞(human coronary artery smooth muscle cells, HCSMCs；PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany)培養，檢視咖啡酸苯乙酯對細胞的影響及探討可能機轉。

### A. 細胞培養

人類冠狀動脈平滑肌細胞以Medium 199 (GIBCO, New York, U.S.A.)加 10%牛胎血清(fetal bovine serum)與penicillin-streptomycin (50 U/ml, Sigma, St. Louis, MO)在含5%  $\text{CO}_2$  培養器內37  $^{\circ}\text{C}$ 下培養，每兩天換一次培養基，實驗中所用的細胞代數為第3代至第9代。

## B. 細胞增生試驗

人類冠狀動脈平滑肌細胞分播到6孔塑膠培養皿中培養，每孔分播最初濃度為 $1 \times 10^5$ 細胞/ml。待細胞在培養皿中培養至60-70%滿，以phosphate buffer saline清洗兩次後，再於培養基中添加設定濃度的實驗藥劑處理後分別培養。於預定時段將細胞以trypan blue染色後，於倒立顯微鏡下計數。數據以六次實驗、三重複所得平均值 $\pm$  SD呈現。

## C. 細胞移行試驗：細胞培養層劃縫痕癒合試驗

人類冠狀動脈平滑肌細胞以 $1 \times 10^5$ 細胞/ml的濃度分播到6-cm培養皿中，培養至長滿。在投以咖啡酸苯乙酯前4小時，添加4  $\mu$ M cytosine  $\beta$ -Darabinofuranoside (Ara-C, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)防止平滑肌細胞增生影響細胞移行評量。然後平滑肌細胞以phosphate buffer saline清洗兩次，再於培養基中添加設定濃度的實驗藥劑。而後以吸量管尖端在培養皿中的細胞層劃井字形縫，縫寬約400  $\mu$ m，選取並標示五個觀察區，於不同時間點，以位相差顯微鏡觀察細胞移行與照相。進而計算移行細胞數，取得平均數做統計分析。所有試驗都是至少六次實驗、三重複。

## D. 流式細胞分析儀細胞週期試驗

細胞濃度調整到 $1 \times 10^5$ 細胞/ml後，在含設定濃度的咖啡酸苯乙酯的培養

基中培養。於預定時段以胰蛋白酶處理後，取得細胞懸浮液離心。再將細胞沉澱以phosphate buffer saline清洗後，以70%乙醇固定置於4°C下隔夜。第二天以phosphate buffer saline清洗後，放在40 µg/ml propidium iodide ((Molecular Probes, Eugene, Oregon, U.S.A.) 與100 µg/ml DNase-free RNase A混合液中，於37°C暗室內靜置一小時。再用高速流式細胞分析儀(Partec GmbH, Münster, Germany)分析DNA成份。以Cell-FIT軟體(Becton Dickinson Instruments)分析細胞在細胞週期各階段所占的百分比。本實驗至少三重覆。

#### **E. 對細胞信號傳遞的影響:西方點墨法分析**

以西方點墨法分析探討咖啡酸苯乙酯對人類冠狀動脈平滑肌細胞訊號傳遞的影響。50 µg蛋白以12% SDS-PAGE分離後，電轉到聚偏氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride membrane)。用小鼠抗人類增殖細胞核抗體 (proliferating-cell nuclear antibody, PCNA) (1:5000, v/v)、小鼠抗人類cyclin E、小鼠抗人類CDK2 (1:1000, v/v)、小鼠抗人類cyclin A (1:1000, v/v)、白兔抗人類AKT1 (1:1000, v/v)、白兔抗人類磷酸化AKT1(1:1000, v/v)、白兔抗人類ERK1/2 (1:1000, v/v)、小鼠抗人類磷酸化ERK1/2(1:1000, v/v)，小鼠抗人類MEK1/2 (1:1000, v/v)、白兔抗人類磷酸化MEK1/2 (1:1000, v/v) (Abcam, MA, U.S.A.)等抗體，再加上結合horseradish peroxidase(HRP)的山羊抗白兔IgG (1:5000, v/v) (Zymed, South San Francisco, CA, U.S.A.)或山羊抗小鼠 IgG

(1:5000, v/v) (Zymed, South San Francisco, CA, U.S.A.)探測墨點。經含0.5% Tween-20的PBS清洗後，過氧化酶(oxidase)活性以強化的化合光 (chemiluminescence) (PerkinElmer Life Science, Boston, MA, U.S.A.)檢測。為求內部比對，在同一片膜上也以測  $\beta$ -actin (1:10000, v/v)的單株抗體 (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)檢測。反應帶強度以影像量化系統(Fuji, Tokyo, Japan)分析。

#### **F. 細胞凋亡檢測:去氧核糖核酸斷裂分析(DNA fragmentation analysis)**

人類冠狀動脈平滑肌細胞在含設定濃度的咖啡酸苯乙酯的培養基中培養。於預定時段以胰蛋白酶處理後，取得細胞懸浮液離心。再將細胞沉澱以 phosphate buffer saline 成為細胞懸浮液後，加入 proteinase K 溶液與 binding solution (Tissue & Cell Genomic kit, GeneMark, Taiwan)使細胞溶解。70°C 水浴 10 分鐘。加入乙醇充分混合後高速離心 1 分鐘。將沉澱再加 binding solution 離心 1 分鐘後以 phosphate buffer saline 清洗。以 Elution solution 洗提去氧核糖核酸。將去氧核糖核酸在含 0.1  $\mu$ g/mL 溴化乙錠 (ethidium bromide)的 1.8% 瓊脂糖凝膠 (agarose gel)中跑電泳分離。

#### **G. 細胞凋亡檢測:末端去氧核糖核苷酸轉移酶介導生物素末端缺痕標記法**

**(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated [dUTP] biotin nick-end**

## labeling (TUNEL) staining)

將平滑肌細胞培養在六孔培養皿裡的蓋玻片上。培養液中添加設定濃度的咖啡酸苯乙酯培養。於預定時段將細胞置於冰上(4°C)，以冷 0.3% Triton-X-100 -PBS 洗三遍後，在室溫下用 2% paraformaldehyde 固定 30 分鐘。固定完成後，再以冷 0.3% Triton-X-100-PBS 洗三遍。在 37 °C 濕潤暗室裡將上述帶細胞的蓋玻片置入 TUNEL 反應混合劑中培養 60 分鐘，然後以冷 0.3% Triton-X-100-PBS 洗三遍。最後以 4', 6' diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色後，在共聚焦顯微鏡(LSM 510 confocal microscope, Zeiss, Germany)下檢視。在 400 倍下，每一蓋玻片上隨機取六區計算染上 TUNEL 的細胞(TUNEL-positive cells)與總細胞數，並進一步計算染上 TUNEL 細胞所占百分比分析。

## H. 細胞凋亡檢測:血管平滑肌細胞細胞質與粒線體內 cytochrome c 分析

平滑肌細胞經咖啡酸苯乙酯處理 48 小時後離心再收集，再以 1x Cytosol Extraction Buffer (BioVision, Mountain View, CA, U.S.A.) 加入 Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo, Rockford, IL, U.S.A.) 4°C 下處理 10 分鐘，均化後在 4°C 下以 700× g 離心 10 分鐘移除沉澱。懸浮液再於 4°C 下以 10,000x g 離心 30 分鐘，分離細胞溶質(懸浮液)與粒線體(沉澱物)。最後粒線體沉澱物再以含 Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo, Rockford, IL, U.S.A.) 的 Mitochondrial Extraction Buffer Mix (BioVision, Mountain View, CA, U.S.A.) 處

理後，漩渦式搖混 10 秒成粒線體懸浮液，保存於負 80°C 準備進一步分析。以 prohibitin 做為粒線體標記及以免疫點墨法驗證細胞溶質與粒線體分層的純度。自每一抽取物取 50 µg 蛋白以西方點墨法量化分析 cytochrome c。以測光密度儀檢測細胞溶質中與全部 cytochrome c 的含量比。

### I. 對caspase cascade的影響:西方點墨法分析

以西方點墨法分析探討對平滑肌細胞細胞凋亡訊號傳遞的影響。50 µg 蛋白以12% SDS-PAGE分離後，電轉到聚偏氟乙烯膜。用小鼠抗人類caspase-8 (1:1000, v/v)、白兔抗人類caspase-9、白兔抗人類caspase-3 (Cell Signaling Technology, Boston, USA)等抗體，再加上結合HRP的山羊抗白兔IgG (1: 5000, v/v) (Zymed, South San Francisco, CA, U.S.A.) 或結合HRP山羊抗小鼠IgG (1:5000, v/v) (Zymed, South San Francisco, CA, U.S.A.) 探測墨點。經含0.5% Tween-20的PBS清洗後，過氧化酶(oxidase)活性用強化的化合光 (Perkin Elmer Life Science, Boston, MA, U.S.A.)檢測。為求內部比對，在同一片膜上也以測β-actin (1:10000, v/v)的單株抗體 (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)檢測。反應帶強度以影像量化系統(Fuji, Tokyo, Japan)分析。

## 四、實驗結果

### I. 動物實驗:

#### A. 咖啡酸苯乙酯減少球囊損傷兔子髂動脈內皮增厚

在服用高膽固醇飲食但未接受球囊損傷的兔子髂動脈，可觀察到內皮有增生現象 (圖一A)。服用高膽固醇飼料的兔子髂動脈接受球囊損傷，血管壁內皮增厚現象更明顯 (圖一B)，而經由Infiltrator<sup>®</sup>局部注射生理食鹽水的兔子髂動脈血管壁內皮增厚最為嚴重(圖一C)。但是經由Infiltrator<sup>®</sup>局部注射咖啡酸苯乙酯組的兔子髂動脈血管壁，內皮增厚顯著減少(圖一D)。前述各組血管壁內皮增厚百分比分別依序為 $48.2 \pm 2.89\%$ ,  $70.0 \pm 1.29\%$ ,  $98.3 \pm 0.41\%$ 及 $55.0 \pm 0.12\%$  (圖二)。

### II. 咖啡酸苯乙酯對血管平滑肌細胞的體外實驗

#### A. 30 $\mu$ M咖啡酸苯乙酯抑制血管平滑肌細胞增生

以trypan blue測定法顯示咖啡酸苯乙酯對細胞生長有抑制效果(圖三)。經24小時培養，對照組細胞數增加約2.5倍；而細胞經咖啡酸苯乙酯處理後，細胞生長抑制隨咖啡酸苯乙酯濃度增加而增加。在高劑量(90  $\mu$ M)咖啡酸苯乙酯處理24小時，呈現細胞毒性。而在30  $\mu$ M咖啡酸苯乙酯處理6到24小時後，細胞數目沒有下降，顯示在30 $\mu$ M劑量下咖啡酸苯乙酯為細胞增生抑制。故我們以30  $\mu$ M的劑量評估咖啡酸苯乙酯對細胞移行與探討機制的實驗。



## B. 咖啡酸苯乙酯抑制血管平滑肌細胞移行

以細胞培養層劃縫痕癒合試驗評估咖啡酸苯乙酯對人類冠狀動脈平滑肌細胞移行影響。在不同時間點照相分析細胞在劃開縫間移行狀況。數據顯示沒有咖啡酸苯乙酯處理的細胞移行數量在6小時之後顯著增加；但經30  $\mu\text{M}$  咖啡酸苯乙酯處理的細胞移行被抑制狀況，隨時間增加而增加（圖四、圖五）。

## C. 咖啡酸苯乙酯使血管平滑肌細胞停滯在細胞週期 S phase

以30  $\mu\text{M}$ 咖啡酸苯乙酯處理人類冠狀動脈平滑肌細胞12、24、48和72小時，評估咖啡酸苯乙酯對細胞週期的影響。以流式細胞分選儀分析經處理的細胞，在細胞週期各階段分佈狀況。分析結果顯示，經咖啡酸苯乙酯處理48和72小時後，在S phase的細胞百分比顯著增加，而在G2/M phase與G0/G1 phase的細胞顯著下降（圖六、圖七），顯示咖啡酸苯乙酯將細胞停滯在細胞週期S phase。

## D. 單獨使用咖啡酸苯乙酯無法促使血管平滑肌細胞凋亡

為評估單獨使用咖啡酸苯乙酯是否能造成動脈血管平滑肌細胞凋亡，我們以去氧核糖核酸斷裂化驗與末端去氧核苷酸轉移酶介導生物素末端缺痕標記法(TUNEL)測定檢測動脈血管平滑肌細胞凋亡程度。經與不同濃度(0、3、10、30、90  $\mu\text{M}$ )的咖啡酸苯乙酯培養12與24小時。沒有去氧核糖核酸

斷裂現象(圖八)。咖啡酸苯乙酯處理組也沒有染上 TUNEL 的細胞(圖九)。在兩項檢測中，單獨使用咖啡酸苯乙酯處理都沒測到細胞凋亡現象。

#### **E. 咖啡酸苯乙酯減少細胞週期基因PCNA、Cyclin E、CDK2和Cyclin A的表現**

為瞭解咖啡酸苯乙酯對細胞週期相關基因的影響，我們以西方點墨法測定PCNA (PCNA是G1 phase晚期細胞增生的標誌)、Cyclin E、CDK2和Cyclin A的表現。我們發現在咖啡酸苯乙酯處理12至72小時，PCNA表現量下降，同時與未經咖啡酸苯乙酯處理的對照組相比，CDK2、Cyclin E與Cyclin A表現量顯著下降(圖十)。各蛋白表現量化結果如圖十一。

#### **F. 咖啡酸苯乙酯減少信號傳遞路徑分子AKT、MEK與ERK的磷酸化**

為研究咖啡酸苯乙酯對人類冠狀動脈細胞造成變化所涉及的相關信號傳遞分子，我們檢測細胞中磷酸化AKT1、MEK1/2與ERK1/2的表現量。結果發現咖啡酸苯乙酯處理後細胞中磷酸化的AKT1、MEK1/2與ERK1/2量減少，顯示咖啡酸苯乙酯抑制人類冠狀動脈細胞增生與移行可能與減少AKT及MEK信號傳遞調控分子有關 (圖十二)。各檢測蛋白及其磷酸活化量化結果如圖十三所示。

#### **G. 同時添加BB型血小板生長因子咖啡酸苯乙酯仍能抑制血管平滑肌細胞增生**

添加 BB 型血小板生長因子後，以 trypan blue 測定法測量咖啡酸苯乙酯對人類冠狀動脈平滑肌細胞增生的改變。結果發現：添加血小板生長因子 BB 型(12.5 ng/ml、25 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml)但未給咖啡酸苯乙酯的血管平滑肌細胞，分別培養 6、12、24、48 小時，細胞數隨血小板生長因子 BB 型劑量或培養時間增加而增加(圖十四)。但添加 25 ng/ml PDGF-BB 下，咖啡酸苯乙酯仍能抑制平滑肌細胞的增生(圖十五)。

#### **H. 同時添加BB型血小板生長因子咖啡酸苯乙酯仍能抑制血管平滑肌細胞移行**

添加 BB 型血小板生長因子後，同樣以細胞培養層劃縫痕癒合試驗評估咖啡酸苯乙酯對血管平滑肌細胞移行影響。結果顯示沒有咖啡酸苯乙酯處理的細胞移行細胞數量在 12 小時之後有顯著增加。但同時添加 BB 型血小板生長因子，在 10、30、90  $\mu$ M 咖啡酸苯乙酯處理組，血管平滑肌細胞移行仍明顯的被抑制 (圖十六、圖十七)。

#### **I. 同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞有凋亡現象**

為確定咖啡酸苯乙酯在添加 BB 型血小板生長因子後的血管平滑肌細胞是否有凋亡現象，我們以流式細胞分選儀與去氧核糖核酸斷裂化驗檢測。流式細胞分選儀結果顯示，在添加 BB 型血小板生長因子後，瀕臨凋亡的 sub-G1

phase 細胞(pro-apoptotic cells)經 30 與 90  $\mu\text{M}$  咖啡酸苯乙酯處理 72 小時後聚集顯著增加(圖十八)。去氧核糖核酸斷裂化驗檢測也發現有去氧核糖核酸斷裂存在(圖十九)。由上述結果支持咖啡酸苯乙酯在 BB 型血小板生長因子共同培養下，血管平滑肌細胞有凋亡現象。TUNEL 試驗也顯示細胞凋亡現象：在未添加咖啡酸苯乙酯或低劑量(10  $\mu\text{M}$ )咖啡酸苯乙酯處理組，極少有染上 TUNEL 細胞；而經 30  $\mu\text{M}$  與 90  $\mu\text{M}$  咖啡酸苯乙酯處理組染上 TUNEL 細胞百分比顯著增加，分別為  $42 \pm 3\%$  與  $64 \pm 2\%$  (圖二十)。

#### **J. 同時添加 BB 型血小板生長因子咖啡酸苯乙酯也減少信號傳遞路徑分子 AKT、MEK 與 ERK 的磷酸化**

為探討咖啡酸苯乙酯，在添加 BB 型血小板生長因子後，在影響人類冠狀動脈平滑肌細胞增生與移行所涉及的信號傳遞路徑是否改變，我們也檢測細胞中 AKT1、MEK1/2 與 ERK1/2 磷酸化的表現量。結果發現在不同劑量的咖啡酸苯乙酯處理 24、48 與 72 小時後，細胞中 AKT1、MEK1/2 與 ERK1/2 磷酸化仍顯著減少。所以在 BB 型血小板生長因子共同處理下，咖啡酸苯乙酯抑制人類冠狀動脈平滑肌細胞增生與移行仍與 AKT 及 MEK 信號傳遞路徑調控有關(圖二十一)。各蛋白及其磷酸活化量化平均結果如圖二十二所示。

#### **K. 同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞粒線體內 cytochrome c 的釋出增加**

粒線體內 cytochrome c 的釋出被報導是細胞凋亡的起始徵象(Liu, et al., 1996)與啟動 effector caspases 有關(Scorrano, 2009)。為探討同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞凋亡機制，我們檢測 cytochrome c 在細胞粒線體內與細胞溶質區的分佈情形。免疫點墨分析顯現隨咖啡酸苯乙酯劑量增加，細胞溶質 cytochrome c 由大約 25%增加到 90% (圖二十三、圖二十四)。本結果支持同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞 cytochrome c 由粒線體釋出增加。

#### **L. 同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯活化冠狀動脈平滑肌細胞抗凋亡分子 Bad 受抑制而促凋亡分子 Bax 與 caspases 被活化**

平滑肌細胞粒線體外膜的完整主要由 Bcl-2 家族蛋白調控(Adams & Cory, 2007; Green & Kroemer, 2004; Saelens, et al., 2004)，故進一步探討同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯是否影響冠狀動脈平滑肌細胞裡 Bcl-2 家族蛋白在粒線體膜上的變化。免疫點墨分析結果顯示與未接受咖啡酸苯乙酯處理對照組相比，在添加 BB 型血小板生長因子後經 10、30 與 90  $\mu$ M 咖啡酸苯乙酯處理 48 小時，冠狀動脈平滑肌細胞促凋亡分子 Bax 表現顯著上升，而抗凋亡分子 Bad 明顯下降(圖二十五)。此外 Caspase-9 與 Caspase-3 量顯著增加，但 caspase 8 表現量不變。各蛋白表現之量化結果如圖二十六所示。

#### **五、討論**

經皮冠狀動脈介入性治療是目前認定為冠狀動脈疾病標準治療方法。為解決術後再狹窄的問題，由早期發明了血管內支架解決機械式問題。但因支架本身持續對血管壁的應力問題，加重經皮冠狀動脈介入性治療執行時引發的發炎修復機制導致血管內膜增生造成再狹窄的問題。塗藥性支架即以支架為載體，將抑制血管新生內膜增生的適當藥劑送到血管內病灶區。但在研究尋找適當藥劑時，若以支架為載體，一方面無適當廠商配合無法執行，另一方面支架本身會影響血管新生內膜增生，無法適切評估所給予藥劑效果。所以不考慮以支架為載體。在既往研究血管介入性治療術後再狹窄的動物模式，有以口服方式給予藥劑。但因口服吸收與代謝變異影響，造成動物實驗使用藥劑的劑量過高，不符合實際臨床應用。所以本研究動物實驗部分採取直接於處理部位局部注射的注射系統，提供精準有效的藥量來評估藥效。常用血管動物實驗模組有三種：小鼠頸動脈、兔子頸動脈與髂動脈以及豬冠狀動脈。有類似研究就是以小鼠頸動脈為研究標的，但小鼠頸動脈平滑肌層只有單層，對氣球損傷反應較緩，易造成低估病灶內膜增生程度，與臨床差距較大，加上沒有那麼小口徑的局部注射系統，所以不予考慮。豬雖然在結構上最相近於人類臨床，但在成本考量下不予採用。故在與臨床近似且可應用後述局部注射系統考量下，以兔子髂動脈氣球損傷為動物實驗模式。在本研究所採用的局部注射系統為 Infiltrator<sup>®</sup> (Boston Scientific Corporation, Boston, MA, U.S.A.)。局部注射系統依注入系統設計有三大類(Yang, 2003)，另兩類

以擴散為原理如 Dispatch<sup>®</sup> balloon (Scimed Inc)與 Crescendo<sup>®</sup> balloon ( Cordis Corp)。在本實驗室已證實 Infiltrator<sup>®</sup>是一個有效的局部注射系統，能夠以較小劑量且避免全身性毒性或不良效應。因兼具血管擴張與局部注射效果，在沒造成血管內膜增厚、損傷與血栓形成下，將欲局部投予藥劑送到血管壁 (附圖八)。在咖啡酸苯乙酯對血管損傷後再狹窄的動物實驗中，為模擬心血管患者病況，兔子經高膽固醇飼料餵食後成為血管粥瘤高危險群，再以氣球擴張損傷血管內皮。所以在服用高膽固醇飲食但未接受球囊損傷的兔子髂動脈，可觀察到血管內膜有血管粥瘤形成現象 (圖一 A)。服用高膽固醇飼料的兔子髂動脈接受球囊損傷，血管壁內膜增厚則為新生內膜增生造成 (圖一 B)。而經局部注射生理食鹽水的兔子髂動脈血管壁內膜增厚最為嚴重(圖一 C)，是因為除機械性氣球擴張損傷後，局部注射生理食鹽水加重刺激發炎修復反應。同樣機械性氣球擴張損傷與局部注射藥劑，局部注射咖啡酸苯乙酯的兔子髂動脈血管壁，在咖啡酸苯乙酯抑制發炎與細胞增生等作用下，內膜增厚顯著減少。與單純只有餵食高膽固醇飼料對照組的兔子相當(圖一 D)。在動物實驗，確定咖啡酸苯乙酯可以減少受損血管內膜增厚造成狹窄。但因初期實驗設計未周全，未儲留適當檢體就組織化學分析提供進一步研究咖啡酸苯乙酯減少受損血管內膜增厚是直接造成組織細胞壞死或是細胞凋亡等機制。但因 Infiltrator<sup>®</sup>已停產而其它可取得的局部注射系統只能短暫增加注入區血管內藥劑濃度，未能於血管組織維持治療濃度，所以我們以體外細胞培

養試驗探討咖啡酸苯乙酯對人類冠狀動脈平滑肌細胞的影響與可能機制。

之前咖啡酸苯乙酯被證明具有抑制增生、抗氧化、抗發炎與引發細胞凋亡等作用多是在癌細胞細胞株作的的研究。在像本研究所用的人類冠狀動脈平滑肌細胞這類原生細胞培養的作用仍不清楚。在本研究中，不論是否添加BB型血小板生長因子，咖啡酸苯乙酯都能有效地抑制人類冠狀動脈平滑肌細胞的增生與移行。但我們觀察到欲達到相當增生或移行抑制效果，有添加BB型血小板生長因子的組別所需咖啡酸苯乙酯的劑量(10  $\mu$ M) (圖十三、圖十五)比沒添加BB型血小板生長因子的組別所需咖啡酸苯乙酯的劑量(30  $\mu$ M) (圖三、圖五)低。然而沒添加BB型血小板生長因子的組別，咖啡酸苯乙酯抑制平滑肌細胞增生不是原先預期的因為細胞凋亡增加(圖七、圖八)。為了進一步探討咖啡酸苯乙酯對人類冠狀動脈平滑肌細胞抗增生與抑制移行的機制，進行流式細胞儀分析。該分析結果為沒添加BB型血小板生長因子的組別，咖啡酸苯乙酯抑制平滑肌細胞增生主要是在細胞週期S期的平滑肌細胞積聚增加。相對在我們研究中，以30  $\mu$ M咖啡酸苯乙酯處理平滑肌細胞24小時後尚未有明顯影響，先前Kuo et al.在C6膠質瘤細胞的實驗，在濃度 25  $\mu$ M和50  $\mu$ M的咖啡酸苯乙酯培養24小時後，C6膠質瘤細胞阻滯在G0/G1期 (Kuo, et al., 2006a)。所以在我們實驗中發現，在相對高劑量的咖啡酸苯乙酯會造成平滑肌細胞被阻滯細胞週期G/S期，進而呈現冠狀動脈平滑肌細胞增生被抑制。



雖然在細胞培養時，經咖啡酸苯乙酯處理6小時即有細胞生長抑制的情形，但在流式細胞儀檢測則須咖啡酸苯乙酯處理48小時才有明顯細胞週期阻滯呈現。這時間差的原因是，本研究中開始時的細胞分散在細胞週期內不同期段，需要咖啡酸苯乙酯處理時間積累才呈現在S期的細胞積聚。一些其他研究也顯示須經處理24至48小時後，才有細胞週期分布改變發生。曾嘗試以無血清或低血清的培養基達到細胞同步，但可能因增加培養環境壓力，反加重細胞壞死死亡。而且與臨床狀況血管阻塞舒解後，病灶區血流與營養狀況不符，所以未採用無血清或低血清的培養基培養方式。

西方點墨法顯現咖啡酸苯乙酯不僅抑制cyclin A、cyclin E、CDK2和PCNA的表現，而且下調磷酸活化AKT1、MEK 1/2、ERK 1/2信號分子。ERK 1/2曾被證實為血管平滑肌細胞從收縮表現型(contractile phenotype)轉變為合成表現型(synthetic phenotype)過程中佔有重要的作用(Roy, et al., 2002)。MEK與ERK則為調控細胞增生和細胞移行的重要的信號分子。此外，PI3K的下游AKT是控制細胞存活生長因子的重要分子。平滑肌細胞的增生和移行增加是造成新內膜增生的關鍵。目前的研究呈現咖啡酸苯乙酯大幅下調AKT 1，MEK1 / 2和ERK1 / 2磷酸活化，進而可能抑制血管平滑肌細胞增生和移行。

從西方墨點法的數據，經咖啡酸苯乙酯處理後減少的磷酸化蛋白量遠多於總蛋白減少的量。我們推測，下降的磷酸化信號蛋白並不完全來自減少的

總蛋白，但這個問題仍需要進一步研究。下調平滑肌細胞凋亡曾被報導是血管內膜病變的關鍵因素 (Wang, et al., 2007)。但是，在我們僅給予咖啡酸苯乙酯處理的細胞培養研究發現，即使給90  $\mu$ M咖啡酸苯乙酯仍沒有動脈平滑肌細胞凋亡現象。然而先前在人類白血病HL-60細胞株和大腸腫瘤SW480細胞株細胞培養研究，咖啡酸苯乙酯能誘導細胞凋亡(Wang, et al.,2005)。所以咖啡酸苯乙酯在抑制培養細胞生長機轉可能會隨細胞類型而有所不同。但也可能細胞株細胞增生能力較人類冠狀動脈平滑肌細胞強，況且與實際臨床經皮冠狀動脈氣球擴張術後局部環境相比，在僅給予咖啡酸苯乙酯處理的細胞培養研究缺乏血管損傷後受損內皮細胞、巨噬細胞和血小板所釋放能促進平滑肌細胞增殖和遷移各種生長因子，特別是血小板生長因子。血小板生長因子能影響細胞增生與定向移行、激活多種訊號路徑、促進細胞存活，並抑制內在細胞凋亡路徑(Bonni, et al., 1999)。所以在本研究最後部分，我們模擬經皮冠狀動脈氣球擴張術後環境:添加血小板生長因子的人類冠狀動脈平滑肌細胞培養中，評估咖啡酸苯乙酯對平滑肌細胞的生長、移行和凋亡的影響。

BB型血小板生長因子刺激人類冠狀動脈平滑肌細胞被認為與PI3K/Akt路徑和細胞外信號調節激酶(ERK)信號傳遞路徑上調有關(Li & Brooks, 1999)。去磷酸化的ERK/MAPK信號分子誘發細胞凋亡。在添加BB型血小板生長因子的研究中，我們發現咖啡酸苯乙酯有效抑制平滑肌細胞的增生與移行。同時，磷酸活化的MEK和磷酸活化的ERK隨

咖啡酸苯乙酯處理的時間或劑量相關線性地下降。

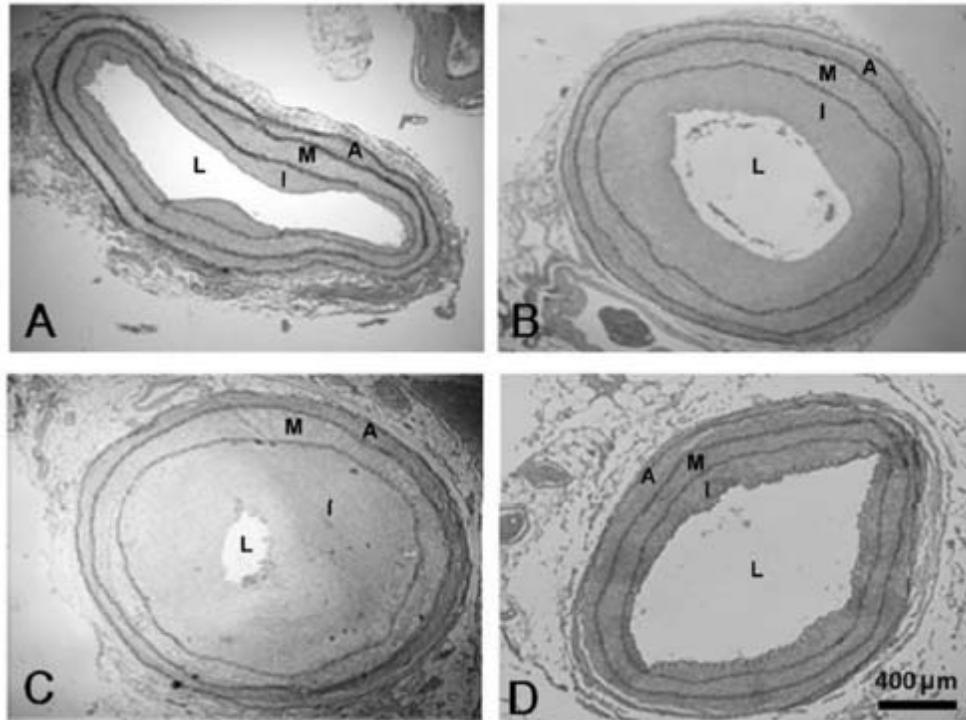
動脈平滑肌細胞通常停留在細胞週期 G0 期，保持在休眠非增殖的狀態。在血管經氣球損傷後，它們重新進入細胞週期，進而可檢測到 cyclin A、cyclin E、CDK2 和增殖細胞核抗原 (PCNA) 蛋白的表現，以及 CDK2 激酶活性(Walker, et al.,1986)。經在添加 BB 型血小板生長因子後，除了在僅給予咖啡酸苯乙酯處理有下降的 cyclin A、cyclin E、CDK2 和 PCNA 之外，cyclin D1、cyclin B1、CDK4 和 Cdk1 也下降(附圖九)。所以在添加 BB 型血小板生長因子後，咖啡酸苯乙酯對人類冠狀動脈平滑肌細胞抗增生與抑制移行的機制有可能改變。因此進一步執行流式細胞儀分析評估，結果在 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯共同處理後，有細胞凋亡指標 sub G1 期細胞聚集。針對細胞凋亡檢測的去氧核糖核酸斷裂分析及 TUNNEL 檢測也觀察同樣細胞凋亡的陽性反應 (圖十九、圖二十)。在第二部分的研究發現，動脈平滑肌細胞沒有 BB 型血小板生長因子共同處理下，咖啡酸苯乙酯使平滑肌細胞阻滯在細胞週期 S 期，沒有細胞凋亡的現象。先前也有研究報導，細胞來自受損血管平滑肌細胞和未受損動脈在細胞培養中有不同的生長特性( Walker, et al., 1986 )。Kim et al 在纖維原始細胞(NRK)細胞株研究發現，在人體平常血小板生長因子濃度 50 ng/ml 下，當有細胞週期進行停滯時(特別是在 G1/S 期)，血小板生長因子會啟動細胞凋亡機制( Kim, et al., 1995 )。因此雖然血小板生長

因子可促進動脈平滑肌細胞，但咖啡酸苯乙酯將動脈平滑肌細胞停滯在 S 期，反而助長血小板生長因子會啟動細胞凋亡機制。可能藉由抑制蛋白激酶信號轉導，進而啟動 caspase 路徑，更有效地抑制細胞增生、移行與誘發細胞凋亡。

已知血小板生長因子能啟動細胞信號傳遞分子刺激細胞增生，並抑制 bcl-2 和 Bim 之間的相互作用，進而 bcl-2 和 Bax 蛋白抑制細胞凋亡( Harada, et al., 2004 )。在我們針對動脈平滑肌細胞在添加血小板生長因子後細胞凋亡增加的研究，發現平滑肌細胞在添加血小板生長因子後，咖啡酸苯乙酯經由依賴粒線體凋亡路徑( mitochondria- dependent apoptotic pathway )引發細胞凋亡。整個行動伴隨活化細胞內 caspase-3 與 caspase-9，下調 Bcl-2 和上調 Bax。但 caspase 8 並沒被活化。也就是說，咖啡酸苯乙酯造成動脈平滑肌細胞凋亡沒有涉及死亡接受器 Fas 或它的配體 FasL。之前在人類白血病 HL-60 細胞株和小鼠表皮細胞株 C1 41 細胞研究，咖啡酸苯乙酯分別在 6  $\mu\text{g/ml}$  和 20  $\mu\text{g/ml}$  即可引發細胞凋亡( Chen, et al., 2001; Nomura, et al., 2001 )。與先前在單以咖啡酸苯乙酯停滯平滑肌細胞細胞週期類似狀況，相對於癌細胞株細胞，原生人類冠狀動脈平滑肌細胞需要較高劑量的咖啡酸苯乙酯讓平滑肌細胞細胞週期停在 G1/S 期後，才能讓添加的血小板生長因子啟動細胞凋亡機制。

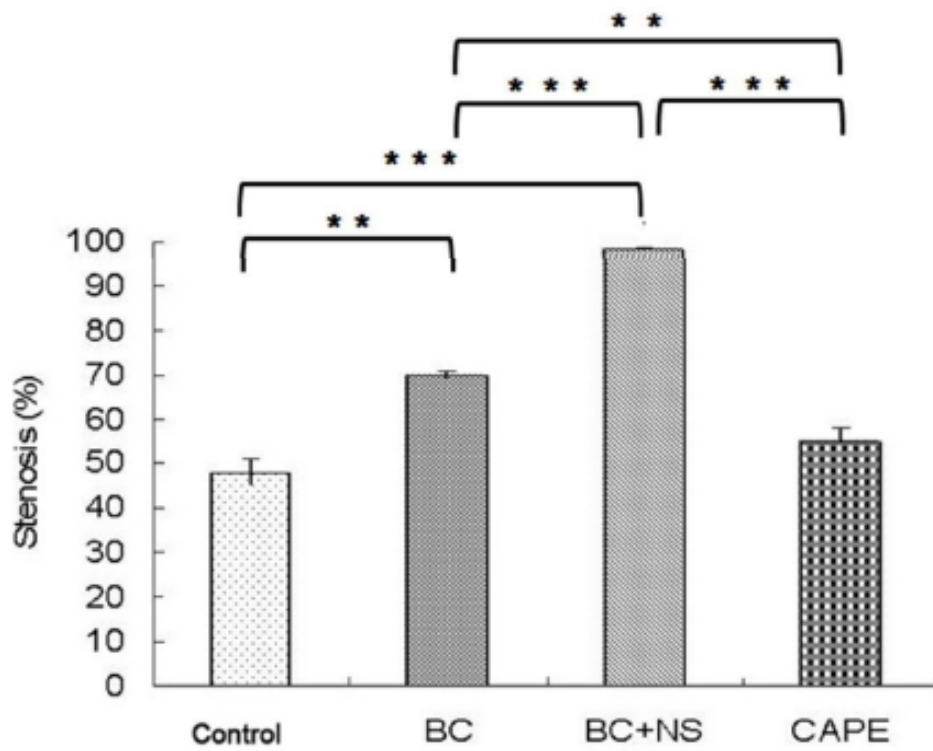
## 六、結論

在我們研究中，咖啡酸苯乙酯確定能減少高血脂兔子髂動脈經氣球損傷後動脈內膜的增生。雖然沒有直接證據，但由細胞培養試驗，氣球損傷後動脈內膜增生的漸少可能與抑制冠狀動脈血管平滑肌細胞增生與移行。其中可能機轉來自抑制 cyclin A、cyclin E、CDK2 和 PCNA 的表現，並下調磷酸活化 AKT1、MEK 1/2、ERK 1/2 信號分子。但單以咖啡酸苯乙酯只能抑制平滑肌細胞的細胞週期進行，將血管平滑肌細胞積聚在 S 期，因細胞培養環境限制，終至細胞壞死(necrosis)，而不是後續發炎反應較少的細胞凋亡。在模擬經皮冠狀動脈介入治療環境添加血小板生長因子後，動脈血管平滑肌細胞的細胞週期停滯在 sub-G1 期，讓血小板生長因子啟動經由線粒體凋亡路徑引發的細胞凋亡。雖然相對其它腫瘤細胞株，咖啡酸苯乙酯在人類冠狀動脈平滑肌細胞須要更高劑量。但臨床上，咖啡酸苯乙酯應可作為經皮冠狀動脈介入治療後防止再狹窄的輔助治療。因在一般健康民眾體內沒有足量生長因子存在下，咖啡酸苯乙酯無法促成後續發炎反應較少的細胞凋亡現象，所以不建議在健康民眾做為保健食品服用。至於是否有不穩定粥瘤(vulnerable plaque)高危險族群患者的確切效果，則需進一步有適當局部注射系統與動物模組進行研究。



圖一、咖啡酸苯乙酯減少球囊損傷兔子髂動脈內皮增厚。十二隻3.0~3.5公斤重新紐西蘭白兔分成四組，接受八週2%高膽固醇飼料飼養後，第一組(A)未接受球囊損傷髂動脈內壁、第二組(B)接受球囊損傷髂動脈內壁、第三組(C)接受球囊損傷髂動脈內壁且經Infiltrator®局部注射生理食鹽水、第四組(D)接受球囊損傷髂動脈內壁且經Infiltrator®局部注射咖啡酸苯乙脂。兔子經由耳靜脈注射ketamine (40 mg/kg)與xylocaine (5 mg/kg)麻醉，由右腹股溝處分離出股動脈後，以18 G針頭穿刺股動脈，將0.018-inch導線引入股動脈並送入主動脈。沿著導線將3.0×20 mm球囊導管推進離股動脈穿刺口6公分處(即球囊位在主動脈分叉的髂動脈部位)，再將球囊撐開至8 bars壓力後回拉近股動脈穿刺口造成髂動脈內壁損傷，如此往返三次。第三組與第四組在球囊導管造成髂動脈內壁損傷後，Infiltrator®沿

著導線推進離股動脈穿刺口6公分處，將球囊撐開到6 bars的壓力，讓注射孔貼附到血管內壁，然後將0.4 ml生理食鹽水(第三組)或0.4 ml 100  $\mu$ M CAPE(第四組)以0.013 ml/sec速度緩慢注入到髂動脈內壁。注射完畢後，將Infiltrator®回拉1 cm，再重覆上述注射步驟三次。而後移除Infiltrator®並將股動脈結紮後，用4號絲線將傷口縫合。所有兔子於處置三週後犧牲，取出髂動脈進行組織切片染色並分析與量化數據。兔子髂動脈橫切面圖:(A)未接受球囊損傷兔子、(B)僅接受球囊損傷兔子、(C)接受球囊損傷與局部注射生理食鹽水兔子、與(D)接受球囊損傷(BC)與局部注射咖啡酸苯乙脂(CAPE)兔子。服用高膽固醇飼料但未接受球囊損傷的兔子髂動脈，可觀察到有部分內皮增生(A)；經球囊損傷，血管壁內皮增生更明顯(B)；接受球囊損傷與局部注射生理食鹽水(NS)後，有嚴重血管壁內皮增生(C)；但經局部注射咖啡酸苯乙脂組的兔子髂動脈血管壁內皮增厚顯著減少(D)。 L: lumen, I: intima, M: media, A: adventitia, Bar: 400  $\mu$ m.

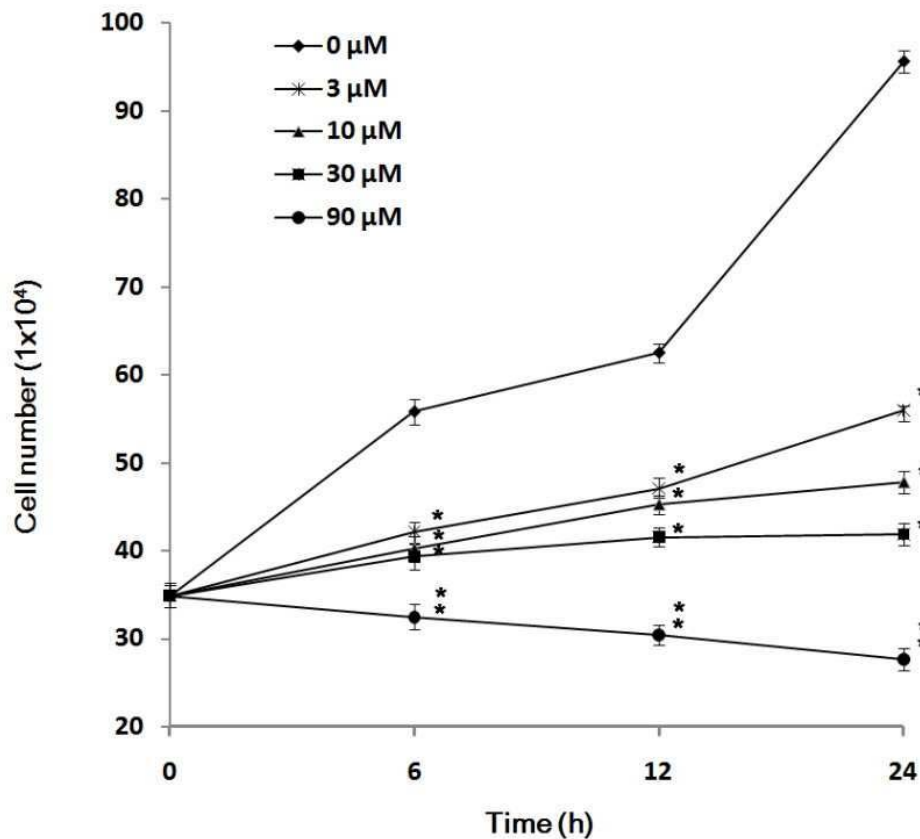


圖二、 兔子髂動脈橫切面量化分析四組血管壁內皮層增厚面積百分比

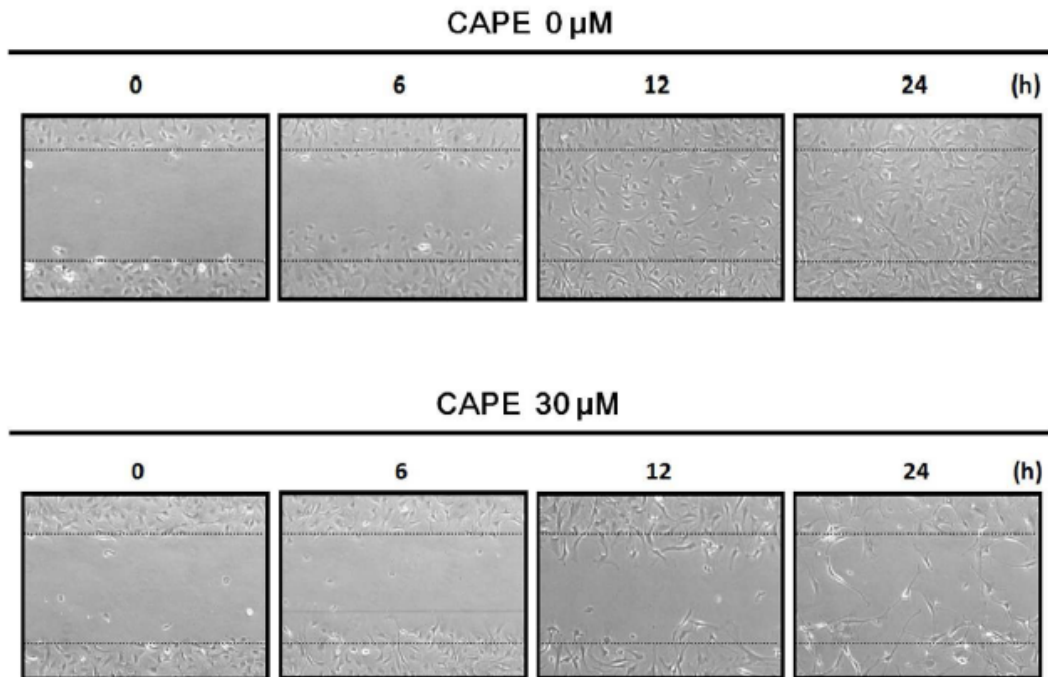
分別為48.0 ± 2.89%, 70.0 ± 1.29%, 98.3 ± 0.41%與55.0 ± 0.12 %。

\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

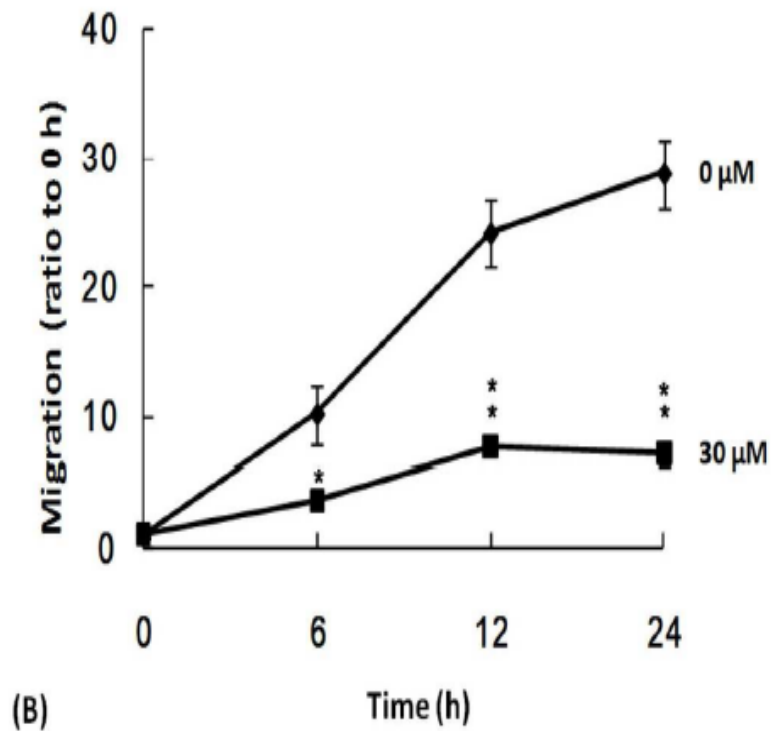




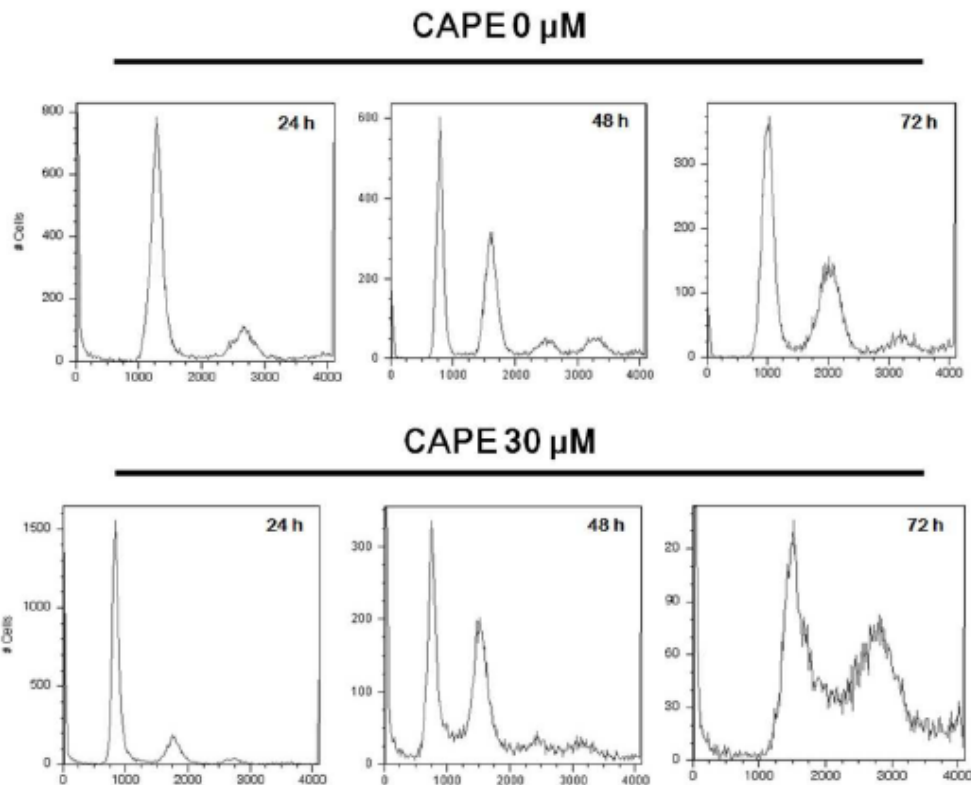
圖三、咖啡酸苯乙脂抑制人類冠狀動脈平滑肌細胞(HCSMCs)增生。人類冠狀動脈平滑肌細胞分播在6孔塑膠培養皿中培養，每孔分播最始密度為 $1 \times 10^5$ 細胞。待細胞在培養皿中培養至60-70%滿，以phosphate buffer saline清洗兩次後，再於培養基中添加不同濃度(0, 3, 10, 30, 90  $\mu\text{M}$ )的咖啡酸苯乙酯分別培養0, 6, 12, 與24小時。然後細胞以trypan blue 染色後於倒立顯微鏡下計數。數據以六次實驗三重複所得平均值 $\pm$ SD呈現。以trypan blue測定法計算存活細胞數目。數據表示為三次實驗平均值 $\pm$ 標準差。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  (與未加藥對照組比較)。



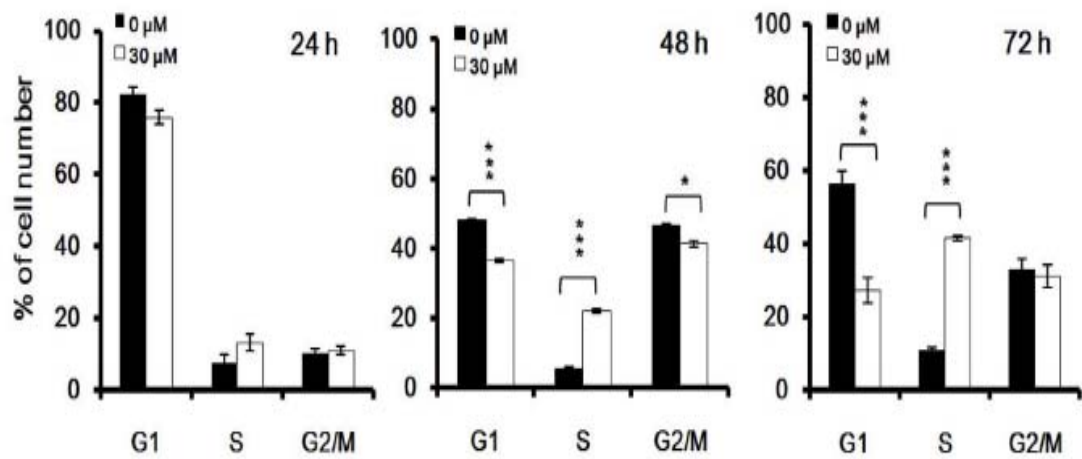
圖四、咖啡酸苯乙脂抑制人類冠狀動脈平滑肌細胞移行。人類冠狀動脈平滑肌細胞以 $1 \times 10^5$ 細胞/ml的密度分播到培養皿中至長滿。在投以咖啡酸苯乙酯前4小時，添加 $4 \mu\text{M}$  cytosine  $\beta$ -Darabinofuranoside (Ara-C) 以防止平滑肌細胞增生。平滑肌細胞以PBS清洗兩次，再於培養基中添加不同濃度(0、3、10、30、90  $\mu\text{M}$ ) 的咖啡酸苯乙酯，分別培養0、6、12與24小時。而後以吸量管尖端在培養皿中的細胞層劃井字形縫，縫寬約 $400 \mu\text{m}$ ，選取並標示五個觀察區於6、12和24小時以位相差顯微鏡觀察細胞移行與照相，在沒有咖啡酸苯乙脂處理下，平滑肌細胞在6小時之後移行細胞數量顯著增加。細胞移行在咖啡酸苯乙脂處理6到24小時後受到顯著抑制。所有試驗都是至少六次實驗三重複。



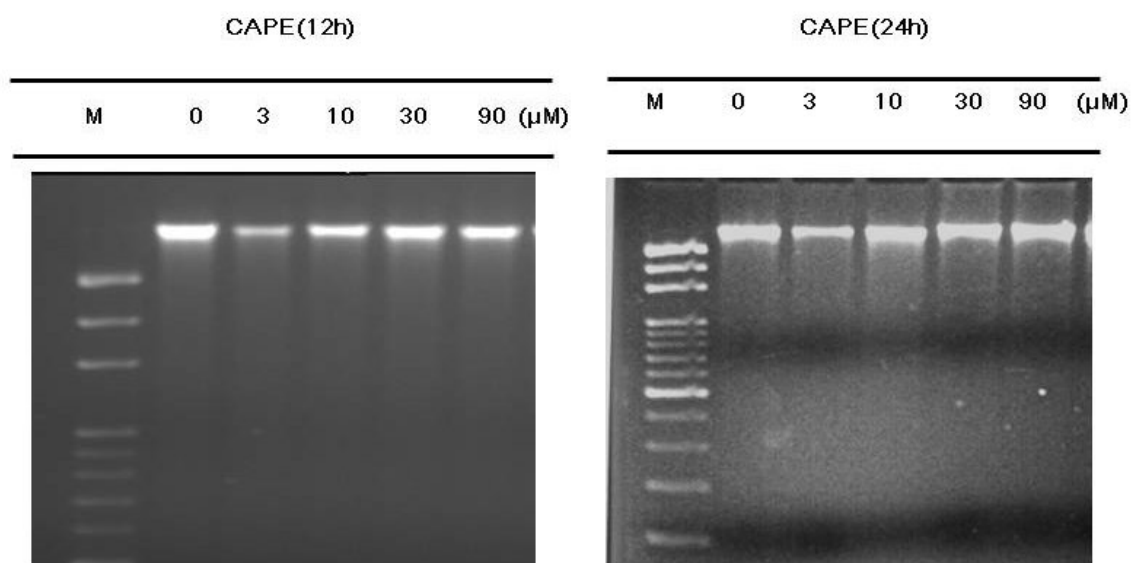
圖五、咖啡酸苯乙脂抑制血管平滑肌細胞移行。以細胞培養層劃縫痕癒合試驗評估移行影響。在30 μM咖啡酸苯乙脂處理6、12、和24小時後評量平滑肌細胞移行狀況。量化數據顯示在沒有咖啡酸苯乙脂處理下，平滑肌細胞在6小時之後移行細胞數量顯著增加。細胞移行在咖啡酸苯乙脂處理6到24小時後受到顯著抑制。\*p<0.05, \*\*p<0.01 (與未加藥對照組比較)。



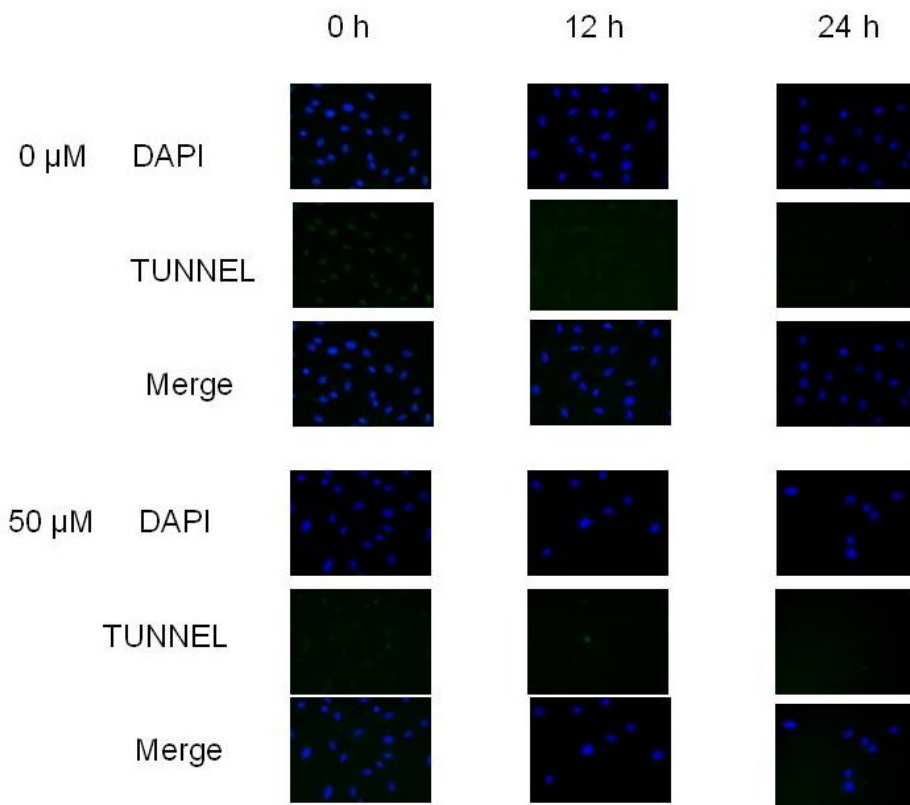
圖六、咖啡酸苯乙酯使人類冠狀動脈平滑肌細胞停滯在細胞週期S期。細胞濃度調整到 $1 \times 10^5$ 細胞/ml 然後給予 $30 \mu\text{g/ml}$ 咖啡酸苯乙酯培養24、48與72小時。細胞經胰蛋白酶處理後，取細胞懸浮液離心。將沉澱的細胞以PBS清洗，以70%乙醇固定後置於 $4^\circ\text{C}$ 下隔夜。再以PBS清洗後置放在 $40 \mu\text{g/ml}$  propidium iodide與 $100 \mu\text{g/ml}$  DNase-free RNase A中在 $37^\circ\text{C}$ 暗室內靜置一小時。再用高速流式細胞分析儀分析去氧核糖核酸成份成份。結果顯示經咖啡酸苯乙脂處理48和72小時後，在S phase的細胞增加，G1與G2 phase的細胞下降。本實驗至少三重覆。



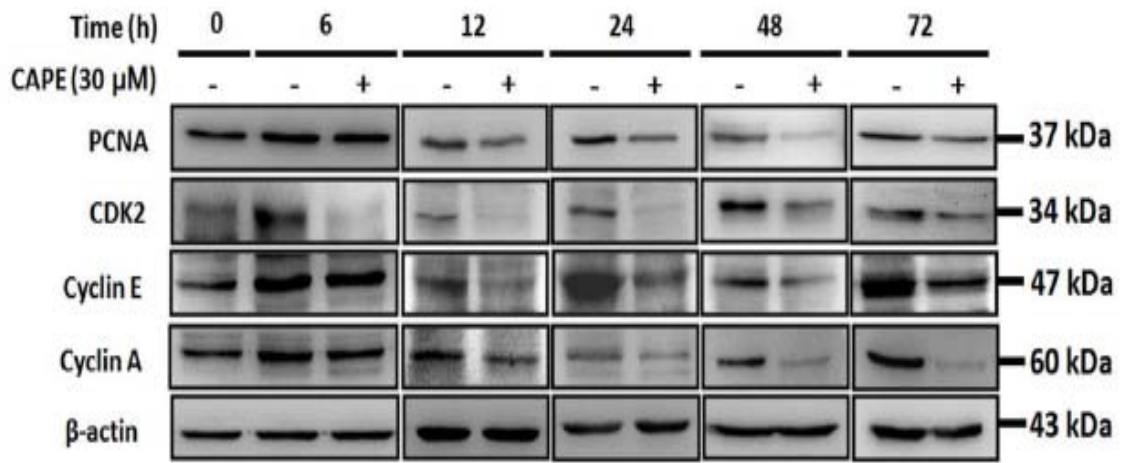
圖七、咖啡酸苯乙酯使人類冠狀動脈平滑肌細胞停滯在細胞週期S期。以 Cell-FIT 軟體(Becton Dickinson Instruments)分析細胞在細胞週期各階段所佔百分比。數據顯示咖啡酸苯乙脂抑制細胞週期進行，使細胞停滯在S期。 \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  (與未加藥對照組比較)。



圖八、去氧核糖核酸斷裂檢驗顯示單獨使用咖啡酸苯乙酯無法促使人類冠狀動脈平滑肌細胞凋亡。人類冠狀動脈平滑肌細胞與不同濃度(0、3、10、30、90  $\mu\text{M}$ )的咖啡酸苯乙酯培養 12、24 小時。細胞收集後以 PBS 清洗，接著以 Tissue & Cell Genomic kit (GeneMark, Taiwan)按廠商使用手冊方法操作分析。斷裂的去氧核糖核酸在含 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溴化乙錠 (ethidium bromide)的 1.8% 瓊脂糖凝膠中跑電泳分離。沒有發現有去氧核糖核酸斷裂現象。

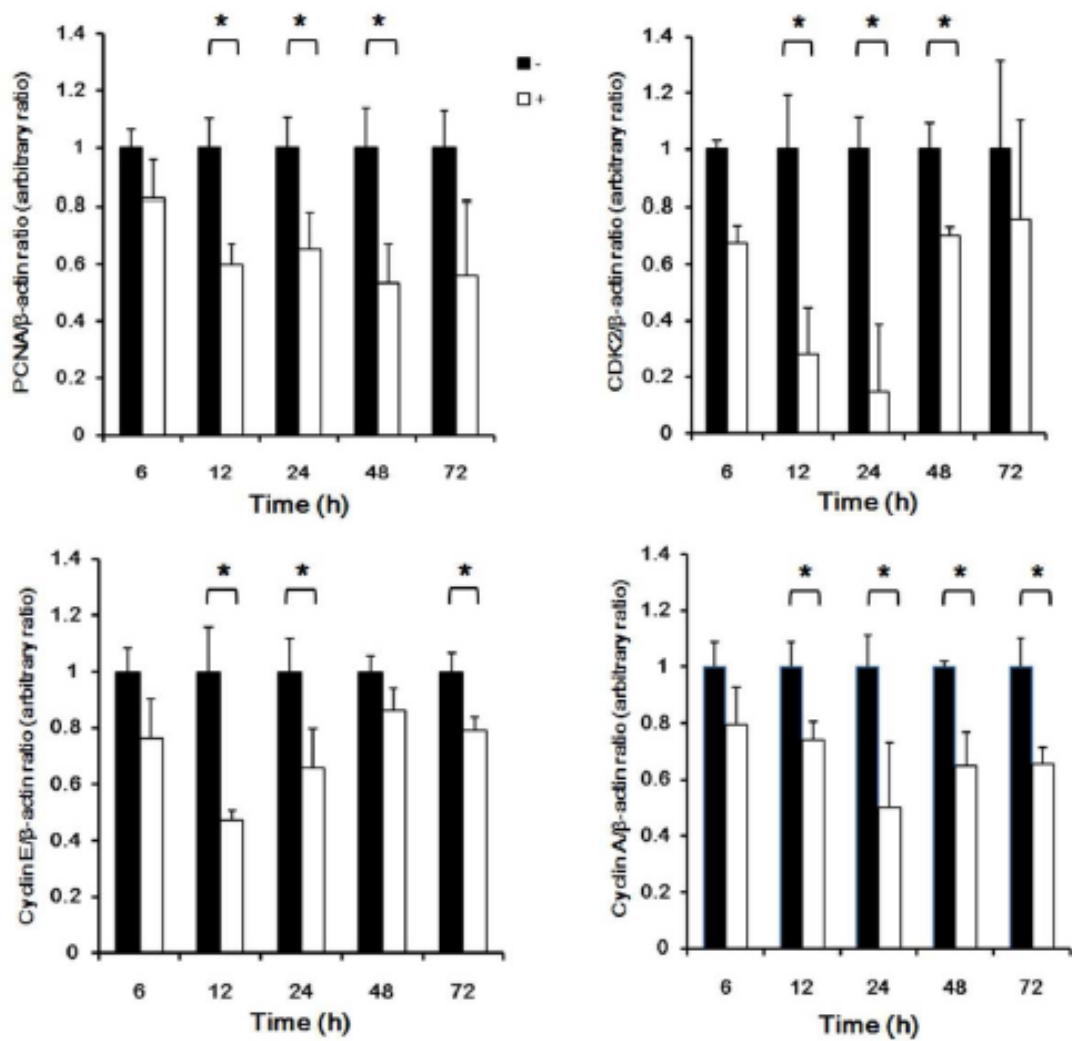


圖九、TUNEL 試驗顯示單獨使用咖啡酸苯乙酯無法促使人類冠狀動脈平滑肌細胞凋亡。將平滑肌細胞培養在六孔培養皿裡的蓋玻片上。培養液中添加 0、50  $\mu$ M 的咖啡酸苯乙酯培養 12、24 小時。然後將細胞置於冰上(4°C)，以冷 0.3% Triton-X-100-PBS 洗三遍後，在室溫下用 2% paraformaldehyde 固定 30 分鐘。再以冷 0.3% Triton-X-100-PBS 洗三遍。在 37 °C 濕潤暗室裡將上述帶細胞的蓋玻片置入 TUNEL 反應混合劑中培養 60 分鐘。之後以冷 0.3% Triton-X-100-PBS 洗三遍。最後以 4', 6' diamidino- 2-phenylindole (DAPI) 染色後，在共聚焦顯微鏡下檢視。在 400 倍下每一蓋玻片上隨機取六區計算染上 TUNEL 細胞與總細胞數。咖啡酸苯乙酯處理組沒有發現染上 TUNEL 的細胞。

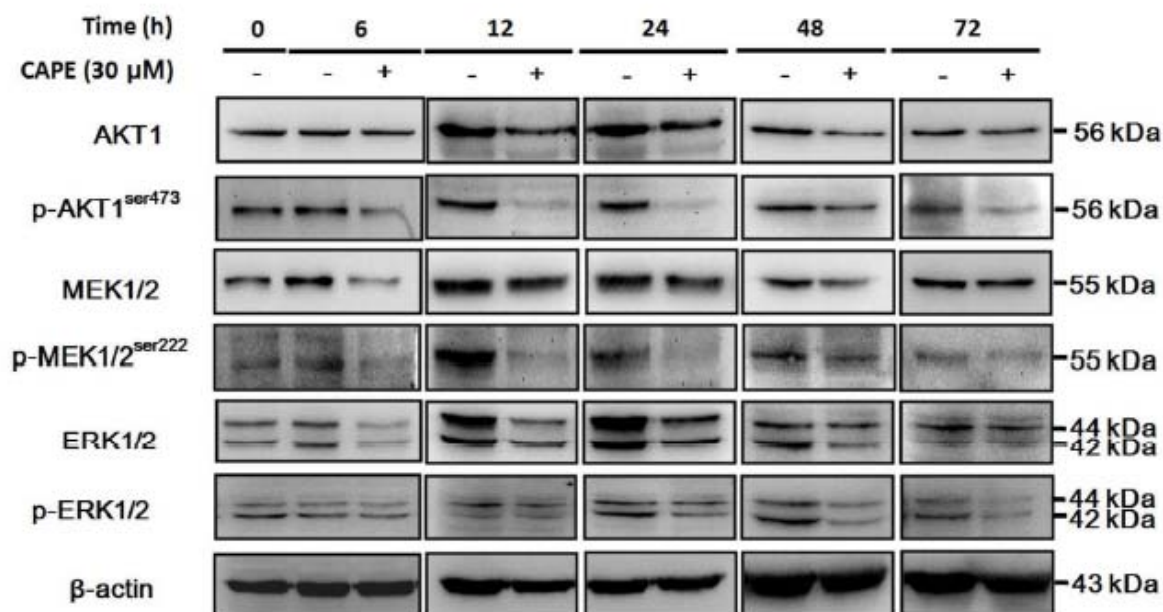


圖十、咖啡酸苯乙酯減少細胞週期基因PCNA、Cyclin E、CDK2和Cyclin A的表現。30  $\mu$ M咖啡酸苯乙脂處理12至72小時後，PCNA、Cyclin E、CDK2與Cyclin A表現下降。



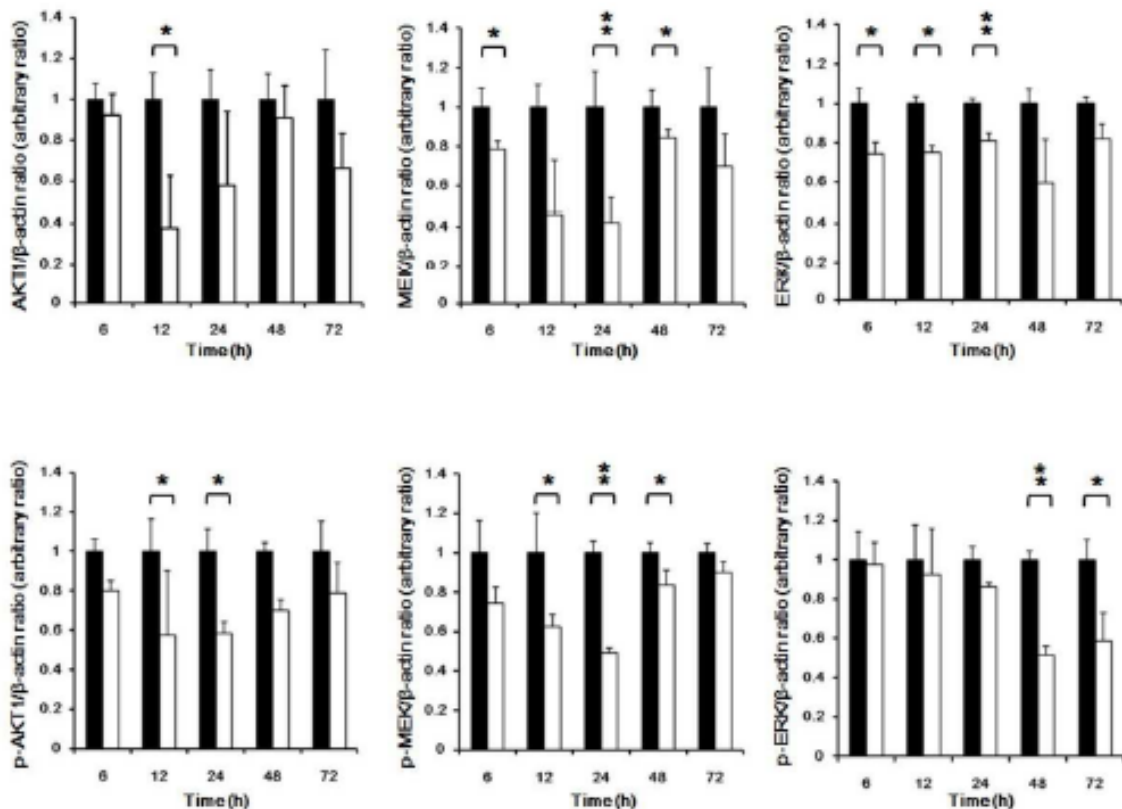


圖十一、咖啡酸苯乙酯減少細胞週期基因PCNA、Cyclin E、CDK2和Cyclin A的表現。30  $\mu$ M咖啡酸苯乙脂處理12至72小時後各蛋白表現量化結果。PCNA、Cyclin E、CDK2與Cyclin A表現下降。 $*p < 0.05$  (與未加藥對照組比較)。

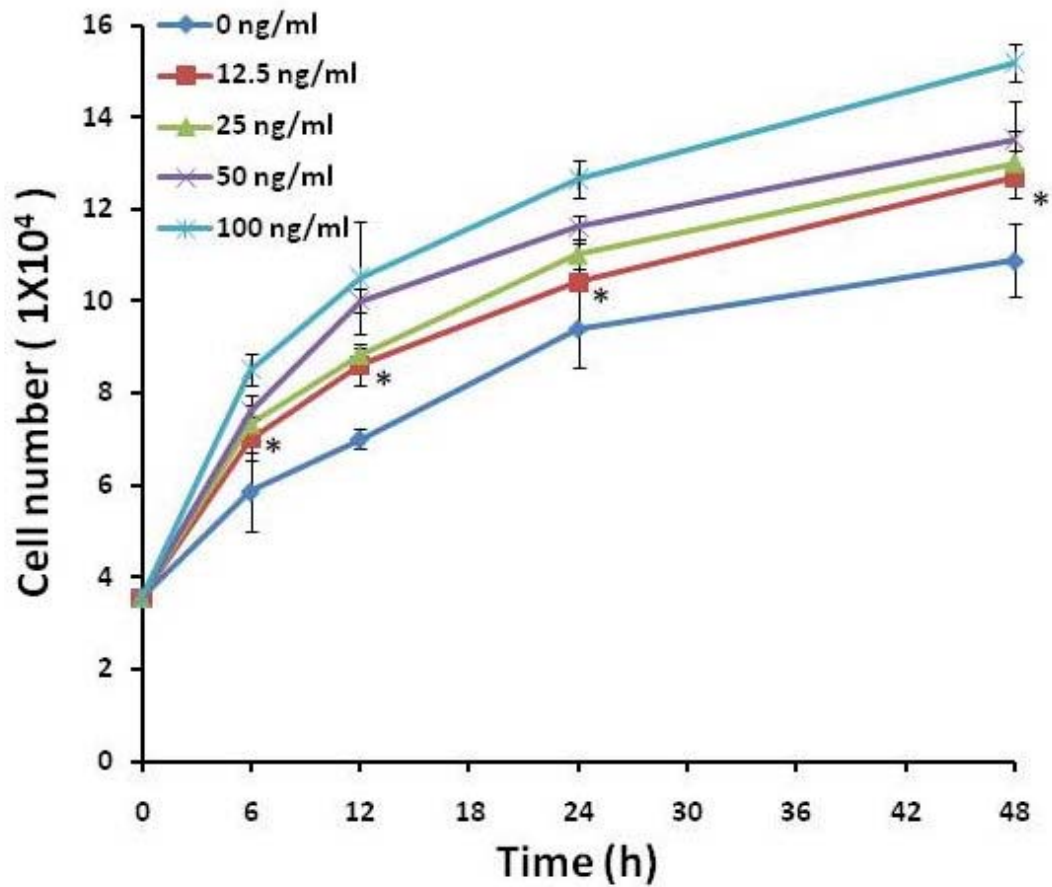


圖十二、咖啡酸苯乙酯減少信號傳遞路徑分子AKT、MEK與ERK的磷酸化。以西方點墨法分析探討咖啡酸苯乙酯對人類冠狀動脈平滑肌細胞訊號傳遞的影響，50 μg蛋白以12% SDS-PAGE分離後，電轉到聚偏氟乙烯膜。用小鼠抗人類增殖細胞核抗體(PCNA) (1:5000, v/v)、小鼠抗人類cyclin E、小鼠抗人類CDK2 (1:1000, v/v)、小鼠抗人類cyclin A (1:1000, v/v)、白兔抗人類AKT1 (1:1000, v/v)、白兔抗人類磷酸化AKT1(1:1000, v/v)、白兔抗人類ERK1/2 (1:1000, v/v)、小鼠抗人類磷酸化ERK1/2 (1:1000, v/v)、小鼠抗人類MEK1/2 (1:1000, v/v)、白兔抗人類磷酸化MEK1/2 (1:1000, v/v) (Abcam, MA, U.S.A.)等抗體，再加上結合horseradish peroxidase(HRP)的山羊抗白兔IgG (1: 5000, v/v) (Zymed, South San Francisco, CA, U.S.A.) 或山羊抗小鼠 IgG (1:5000, v/v) (Zymed, South San

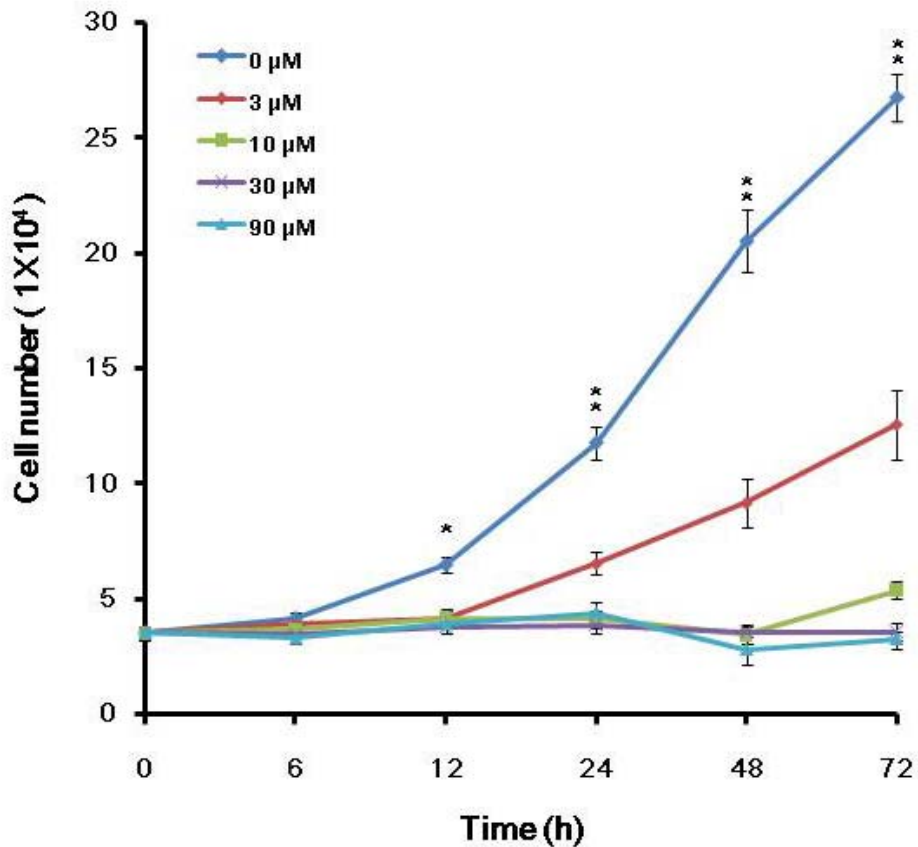
Francisco, CA, U.S.A.) 探測墨點。經含0.5% Tween-20的PBS清洗後，過氧化酶(oxidase)活性以強化的化合光(chemiluminescence) (PerkinElmer Life Science, Boston, MA, U.S.A.)評量。為求內部比對，在同一片膜上也以測 $\beta$ -actin (1:10000, v/v)的單株抗體 (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 檢測。反應帶強度以影像量化系統(Fuji, Tokyo, Japan)分析。以30  $\mu$ M咖啡酸苯乙脂處理後，細胞的AKT1、MEK1/2與ERK1/2總量與磷酸化表現量下降。



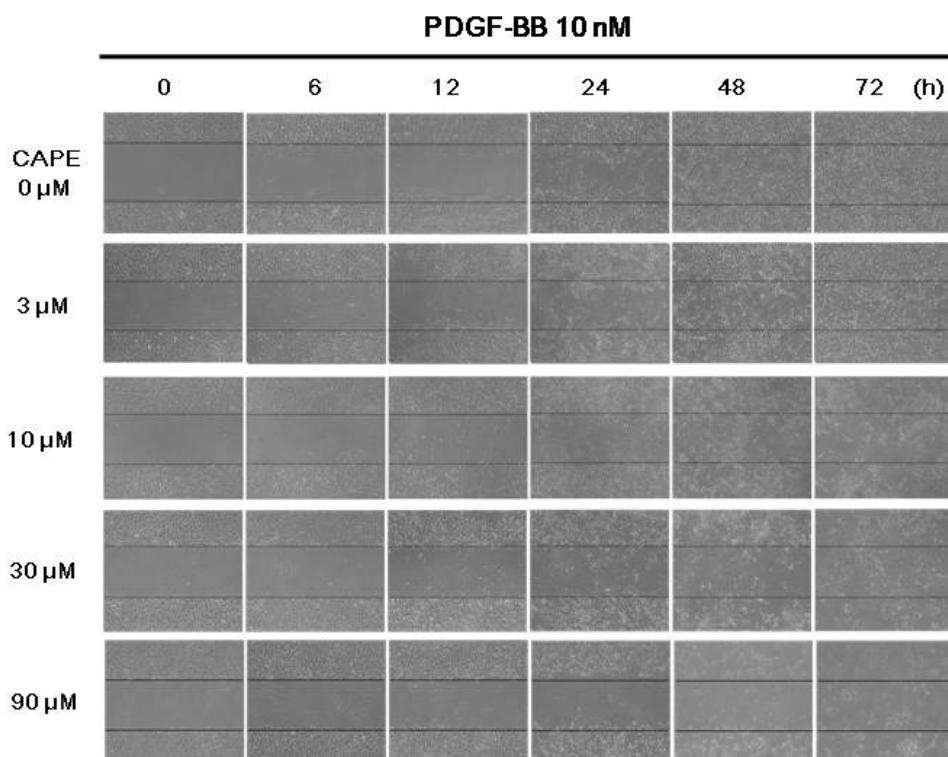
圖十三、咖啡酸苯乙脂抑制AKT1、MEK1/2與ERK1/2磷酸化表現。各檢測蛋白量化結果。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (與未加藥對照組比較)。



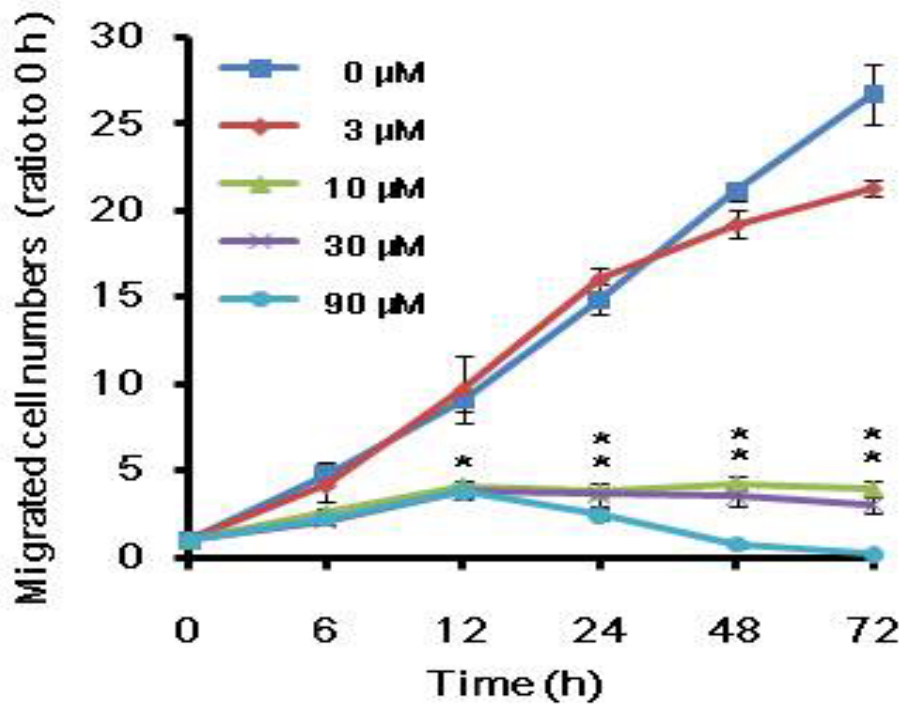
圖十四、BB型血小板生長因子(PDGF-BB)誘發人類冠狀動脈平滑肌細胞增生。細胞分別以12.5 ng/ml、25 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml PDGF-BB處理培養6、12、24、48小時，存活細胞則以trypan blue測定法檢定計算。BB型血小板生長因子有隨劑量增加，誘發人類冠狀動脈平滑肌細胞增生。數據表示為三次實驗平均值±標準差。\* $p < 0.05$  (與PDGF-BB對照組比較)。



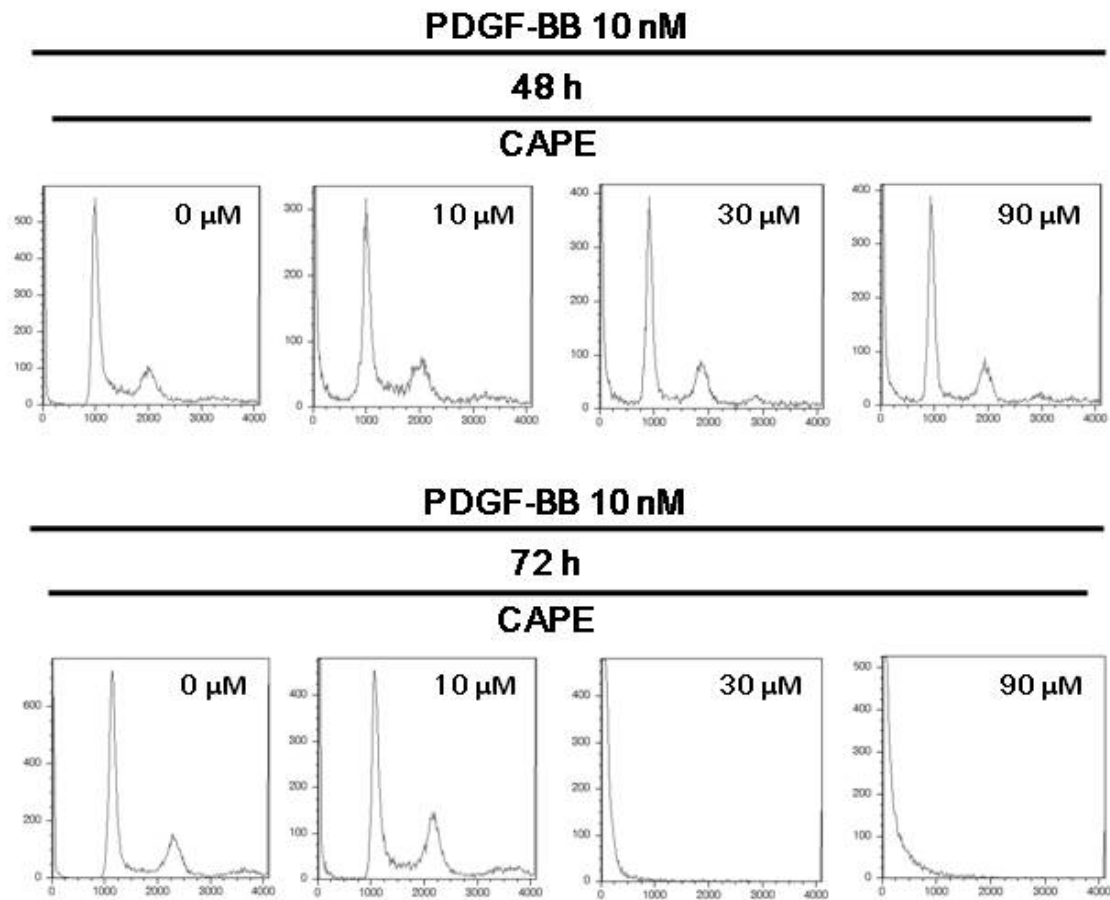
圖十五、同時添加BB型血小板生長因子，咖啡酸苯乙酯仍能抑制血管平滑肌細胞增生。人類冠狀動脈平滑肌細胞分播在6孔塑膠培養，每孔密度為 $1 \times 10^5$ 細胞。處理咖啡酸苯乙酯前，先讓細胞在培養基中長至60-70%滿，以PBS清洗兩次，先決定適當PDGF-BB濃度(25 ng/ml)後，加入血小板生長因子促進細胞增生。在加入PDGF-BB後隨即於血漿培養基分別添加0、3、10、30、90  $\mu\text{M}$ 的咖啡酸苯乙酯分別培養0、6、12與24小時。存活細胞以trypan blue測定法檢定計算。數據以六次實驗三重複所得平均值 $\pm$ 標準差。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ (與未加藥對照組比較)。



圖十六、同時添加BB型血小板生長因子，咖啡酸苯乙酯仍能抑制血管平滑肌細胞移行。以細胞培養層劃縫痕癒合試驗評量細胞移行能力。以 $1 \times 10^5$  細胞/ml的濃度分播到培養皿到單層長滿。在投與咖啡酸苯乙酯前4小時，添加Ara-C到最終濃度 $4 \mu$ M 防止平滑肌細胞增生。平滑肌細胞以PBS洗兩次，加入 $25 \text{ ng/ml}$  血小板生長因子後隨即分別添加 $0$ 、 $3$ 、 $10$ 、 $30$ 、 $90 \mu$ M咖啡酸苯乙酯分別培養 $0$ 、 $6$ 、 $12$ 、 $24$ 、 $48$ 、 $72$ 小時。然後用吸量管尖端在培養皿單層細胞層劃井字形縫，縫寬約 $400 \mu$ m。選取並標示五個觀察區於不同時間點，以位相差顯微鏡觀察細胞移行與照相。計算移行細胞數並登錄計算平均。試驗結果由至少六次實驗三重複之平均。

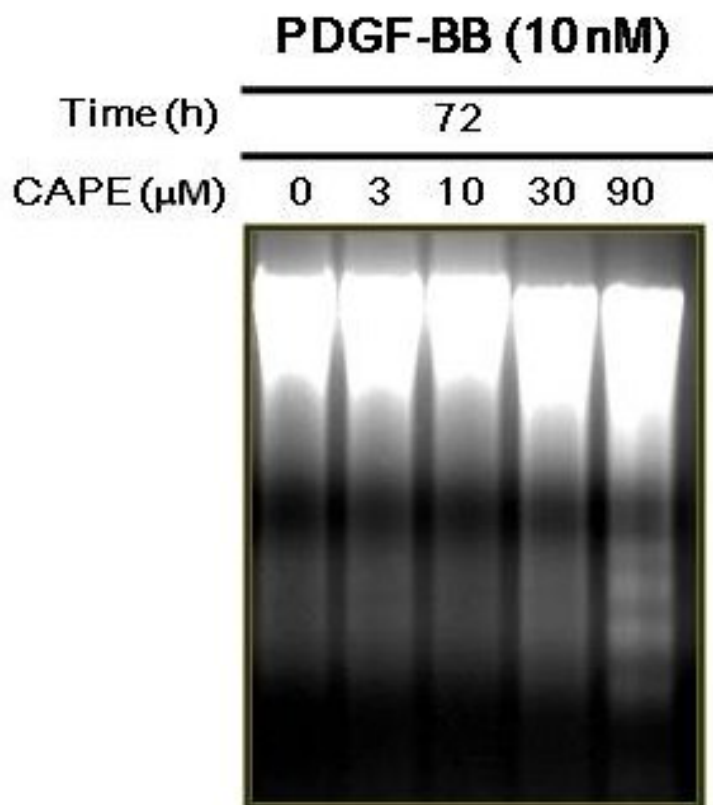


圖十七、同時添加BB型血小板生長因子，咖啡酸苯乙酯仍能抑制血管平滑肌細胞移行。量化資料顯示經10 μM以上劑量的咖啡酸苯乙酯處理細胞移行能力顯著被抑制。\*p<0.05, \*\*p<0.01(與對照組比較)。

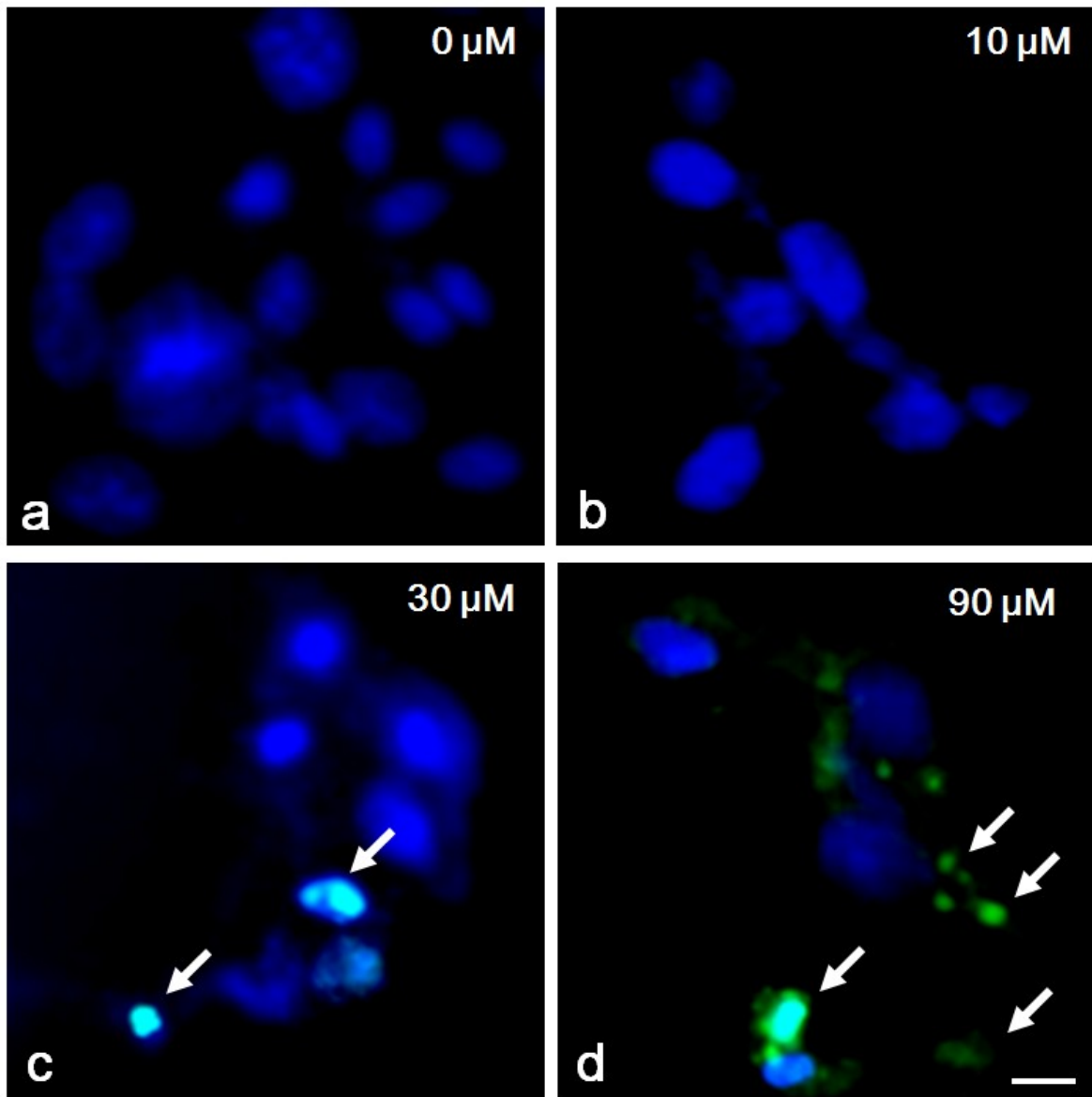


圖十八、同時添加BB型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞有凋亡現象。細胞濃度調整到 $1 \times 10^5$  cells/ml 然後給予25 ng/ml PDGF-BB與0、3、10、30、90 $\mu$ M咖啡酸苯乙酯培養48與72小時。細胞經胰蛋白酶處理後，取細胞懸浮液離心。將細胞沉澱以PBS洗後用70%乙醇固定後置於4°C下隔夜。再以PBS清洗後放在40  $\mu$ g/ml propidium iodide與100  $\mu$ g/ml DNase-free RNase A在37°C暗室內靜置一小時。再用高速流式細胞分選儀分析DNA成分。經30或90  $\mu$ M咖啡酸苯乙脂處理72小時後有sub-G1高峰。本實驗共進行六重覆。



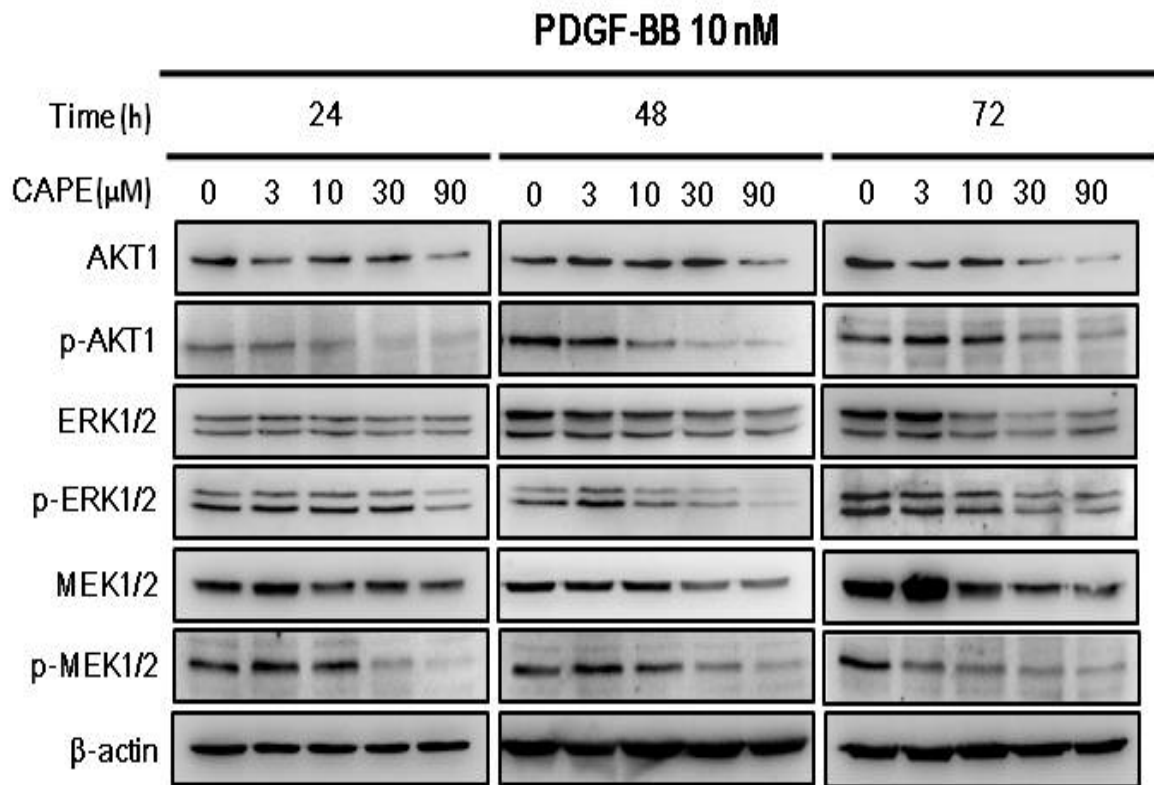


圖十九、去氧核糖核酸斷裂化驗顯示同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞有凋亡現象。平滑肌細胞給予 25 ng/ml PDGF-BB 與 0, 3, 10, 30, 90  $\mu$ M 咖啡酸苯乙酯培養 72 小時。細胞收集後以 PBS 清洗，接著以 Tissue & Cell Genomic kit (GeneMark, Taiwan) 分析。斷裂的去氧核糖核酸在含 0.1  $\mu$ g/mL 溴化乙錠 1.8% 瓊脂糖凝膠 (agarose gel) 中跑電泳分離。經 30 或 90  $\mu$ M 咖啡酸苯乙酯處理 72 小時後也發現去氧核糖核酸斷裂情形，顯示細胞凋亡存在。



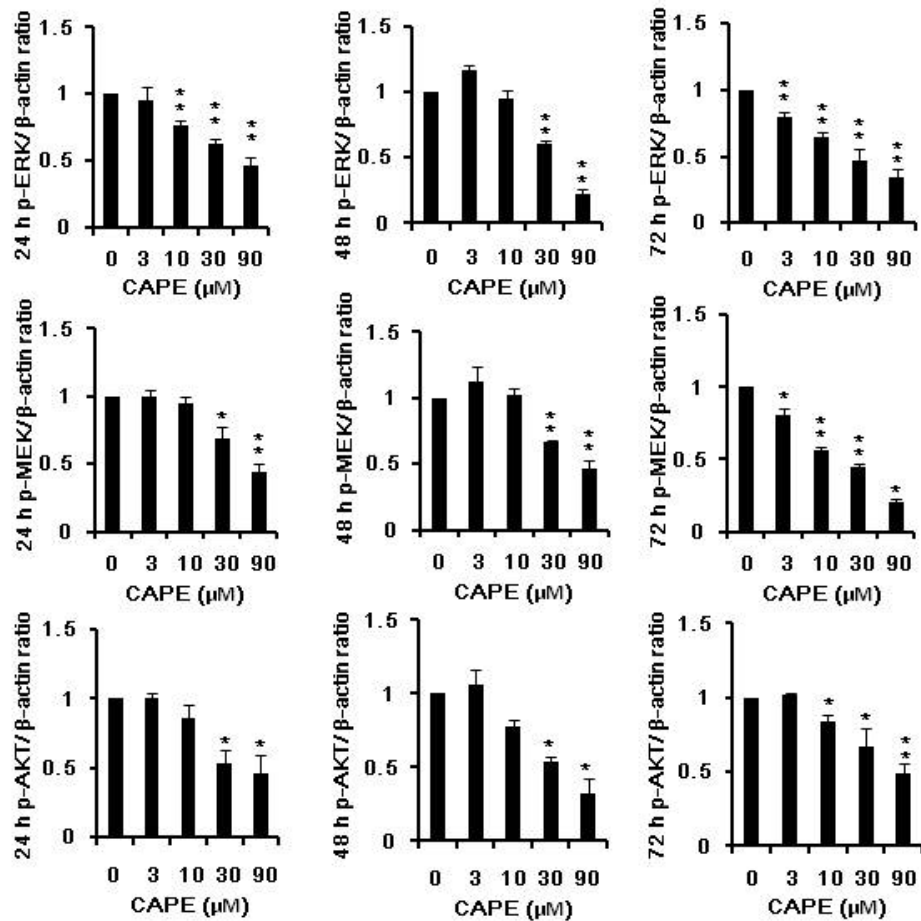
圖二十、TUNEL 試驗確定同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞有凋亡現象。將平滑肌細胞培養在六孔培養皿裡的蓋玻片上。培養液中添加 25 ng/ml PDGF-BB 及分別為 0、10、30、90  $\mu\text{M}$  的咖啡酸苯乙酯培養 72 小時。然後將細胞置於冰上( $4^{\circ}\text{C}$ )，以冷 0.3% Triton-X-100-PBS 洗三遍後，在室溫下用 2% paraformaldehyde 固定 30 分鐘。固定完成後，再以冷 0.3% Triton-X-100-PBS 洗三遍。在  $37^{\circ}\text{C}$  濕潤

暗室裡將上述帶細胞的蓋玻片置入 TUNEL 反應混合劑中培養 60 分鐘。之後以冷 0.3% Triton-X-100-PBS 洗三遍。最後以 4', 6' diamidino- 2-phenylindole (DAPI) 染色後，在共聚焦顯微鏡(LSM 510 confocal microscope, Zeiss, Germany)下檢視。在 400 倍下每一蓋玻片上隨機取六區計算染上 TUNEL 細胞與總細胞數，並進一步計算染上 TUNEL 細胞所占百分比分析。在未添加咖啡酸苯乙酯(a)或低劑量(10  $\mu$ M)咖啡酸苯乙酯(b)處理組，極少有染上 TUNEL 細胞。而經 30  $\mu$ M(c)與 90  $\mu$ M(d)咖啡酸苯乙酯處理組染上 TUNEL 細胞百分比顯著增加。

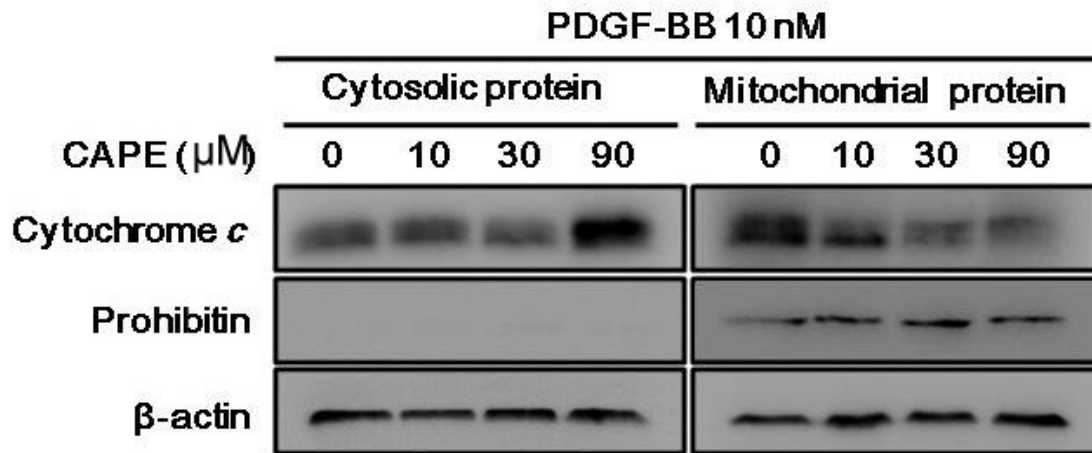


圖二十一、同時添加 BB 型血小板生長因子，咖啡酸苯乙脂也減少信號傳遞路徑分子 AKT、MEK 與 ERK 的磷酸化。以西方點墨法分析咖啡酸苯乙酯經添加血小板生長因子後對平滑肌細胞訊號傳遞的影響，50  $\mu$ g 蛋白以 12% SDS-PAGE 分離後，電轉到聚偏氟乙烯膜。用白兔抗人類 AKT1 (1:1000, v/v)、白兔抗人類磷酸化 AKT1(1:1000, v/v)、白兔抗人類 ERK1/2 (1:1000, v/v)、小鼠抗人類 MEK1/2 (1:1000, v/v) (Abcam, MA, U.S.A.) 等抗體，再加上結合 HRP 的山羊抗白兔 IgG (1: 5000, v/v) (Zymed, South San Francisco, CA, U.S.A.) 或結合 HRP 山羊抗小鼠 IgG (1:5000, v/v) (Zymed, South San Francisco, CA, U.S.A.) 探測墨點。經含 0.5% Tween-20 的 PBS 清洗後，過氧化酶(oxidase)活性用強化的化合光(chemiluminescence)

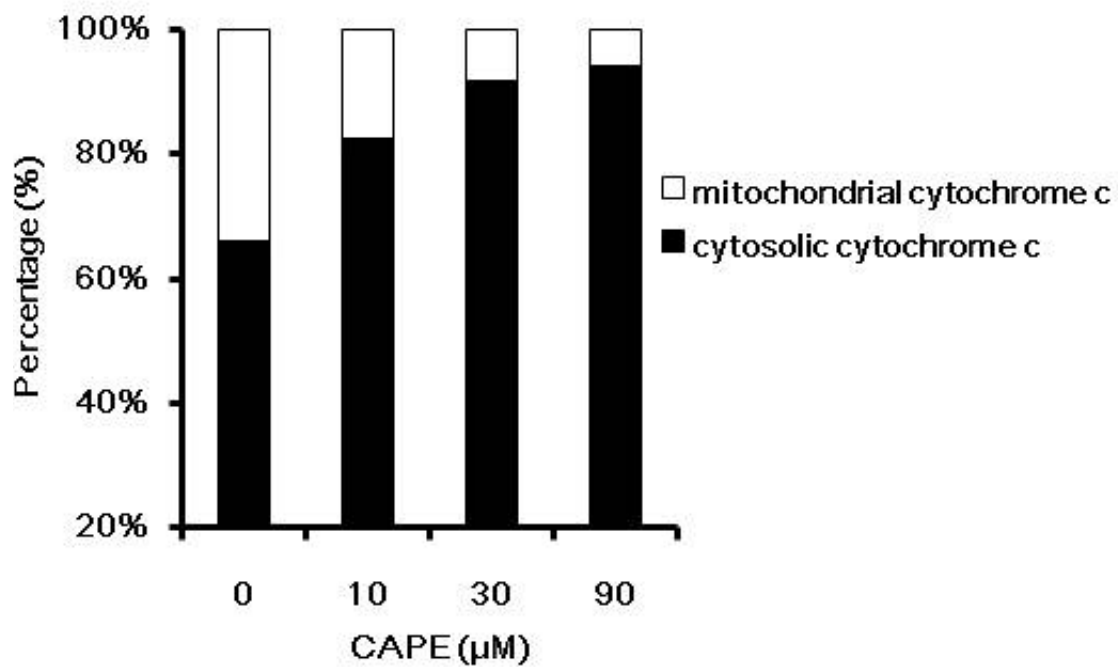
(PerkinElmer Life Science, Boston, MA, U.S.A.) 評量。為求內部比對，在同一片膜上也以測  $\beta$ -actin (1:10000, v/v) 的單株抗體 (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 檢測。反應帶強度以影像量化系統 (Fuji, Tokyo, Japan) 分析。結果發現在不同劑量的咖啡酸苯乙脂處理 24、48 與 72 小時後細胞中磷酸化 AKT1、MEK1/2 與 ERK1/2 量減少。



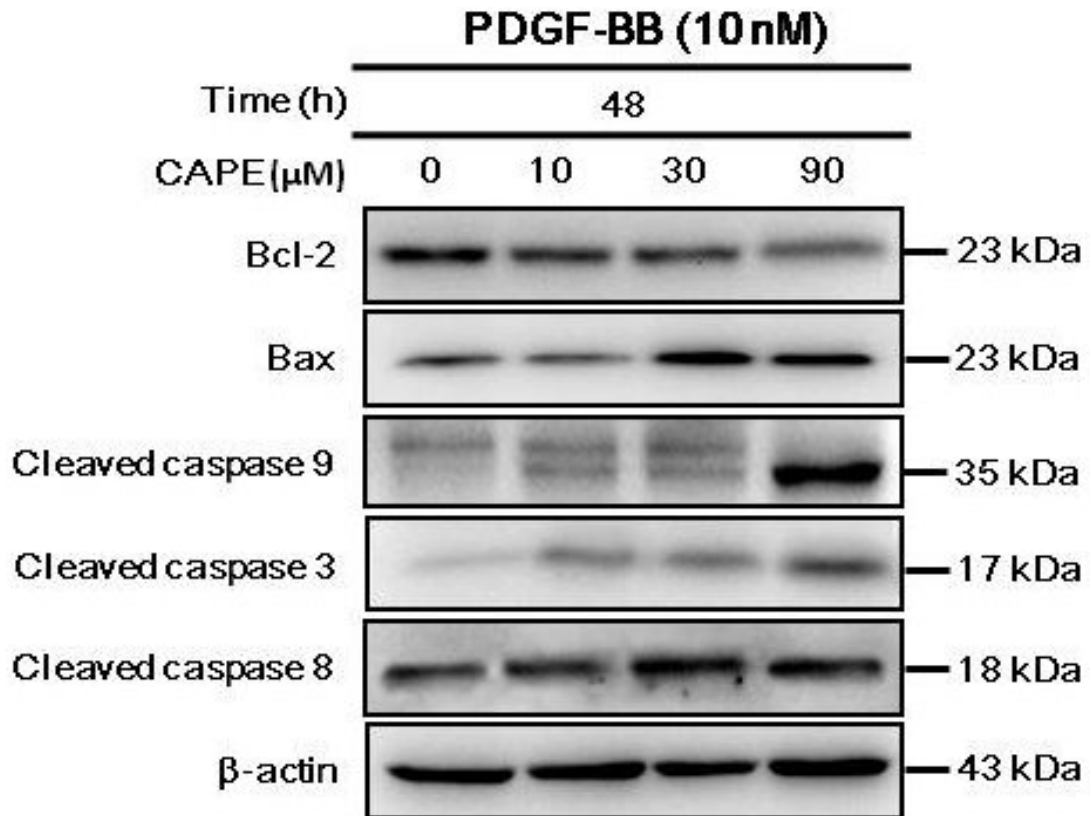
圖二十二、同時添加 BB 型血小板生長因子，咖啡酸苯乙脂也減少信號傳遞路徑分子 AKT、MEK 與 ERK 的磷酸化。各蛋白及其磷酸化蛋白量化平均結果。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (與對照組比較)。



圖二十三、同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞粒線體內 cytochrome c 的釋出增加。平滑肌細胞經咖啡酸苯乙酯處理 48 小時後離心收集。以 1x Cytosol Extraction Buffer 加入 Protease Inhibitor Cocktail Kit 4°C 下 10 分鐘，均化後在 4°C 下以 700× g 離心 10 分鐘移除沉澱。懸浮液再於 4°C 下以 10,000× g 離心 30 分鐘以分離細胞溶質(懸浮液)與粒線體(沉澱物)。最後粒線體沉澱物再以含 Protease Inhibitor Cocktail Kit 的 Mitochondrial Extraction Buffer Mix 處理後，漩渦式搖混 10 秒成粒線體懸浮液，保存於 -80°C 中待分析。自每一抽取物取 50  $\mu\text{g}$  蛋白以西方點墨法量化分析 cytochrome c。以測光密度儀檢測細胞溶質中與全部 cytochrome c 的含量比。免疫點墨資料顯示咖啡酸苯乙酯增加細胞溶質 cytochrome c 量，而粒線體內 cytochrome c 量減少。粒線體與細胞溶質蛋白萃取純度以粒線體標誌 prohibitin 確定。

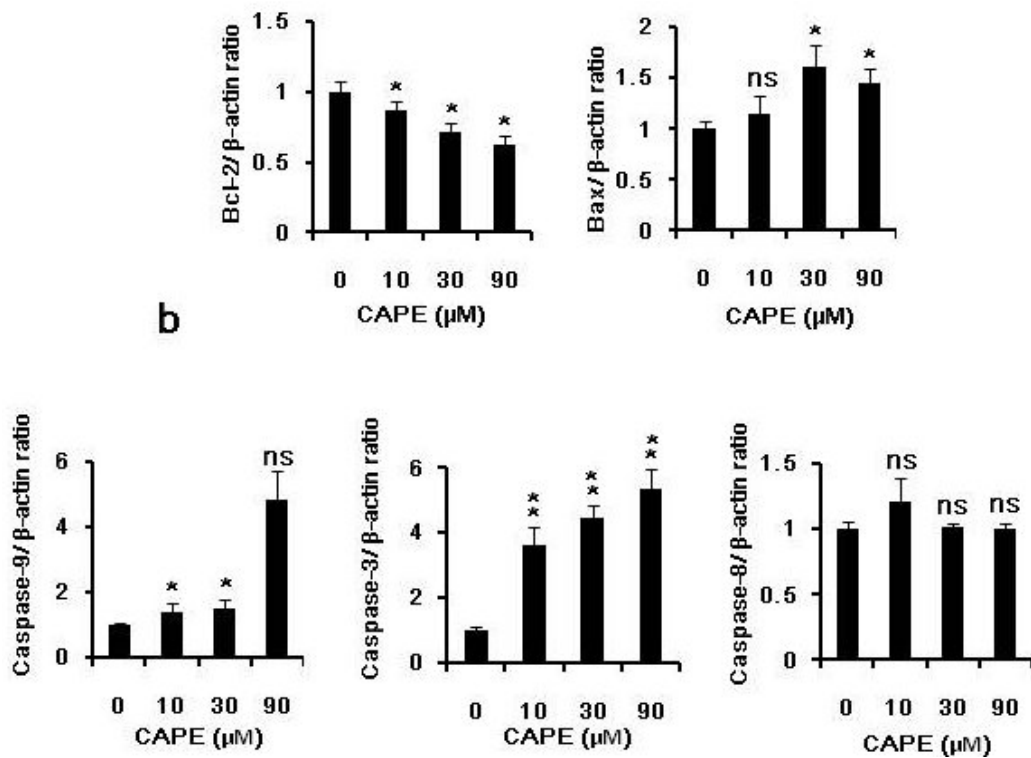


圖二十四、同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯的冠狀動脈平滑肌細胞粒線體內 cytochrome c 的釋出增加。量化分析顯示隨咖啡酸苯乙酯劑量增加 cytochrome c 由大約 25% 增加到 90%。



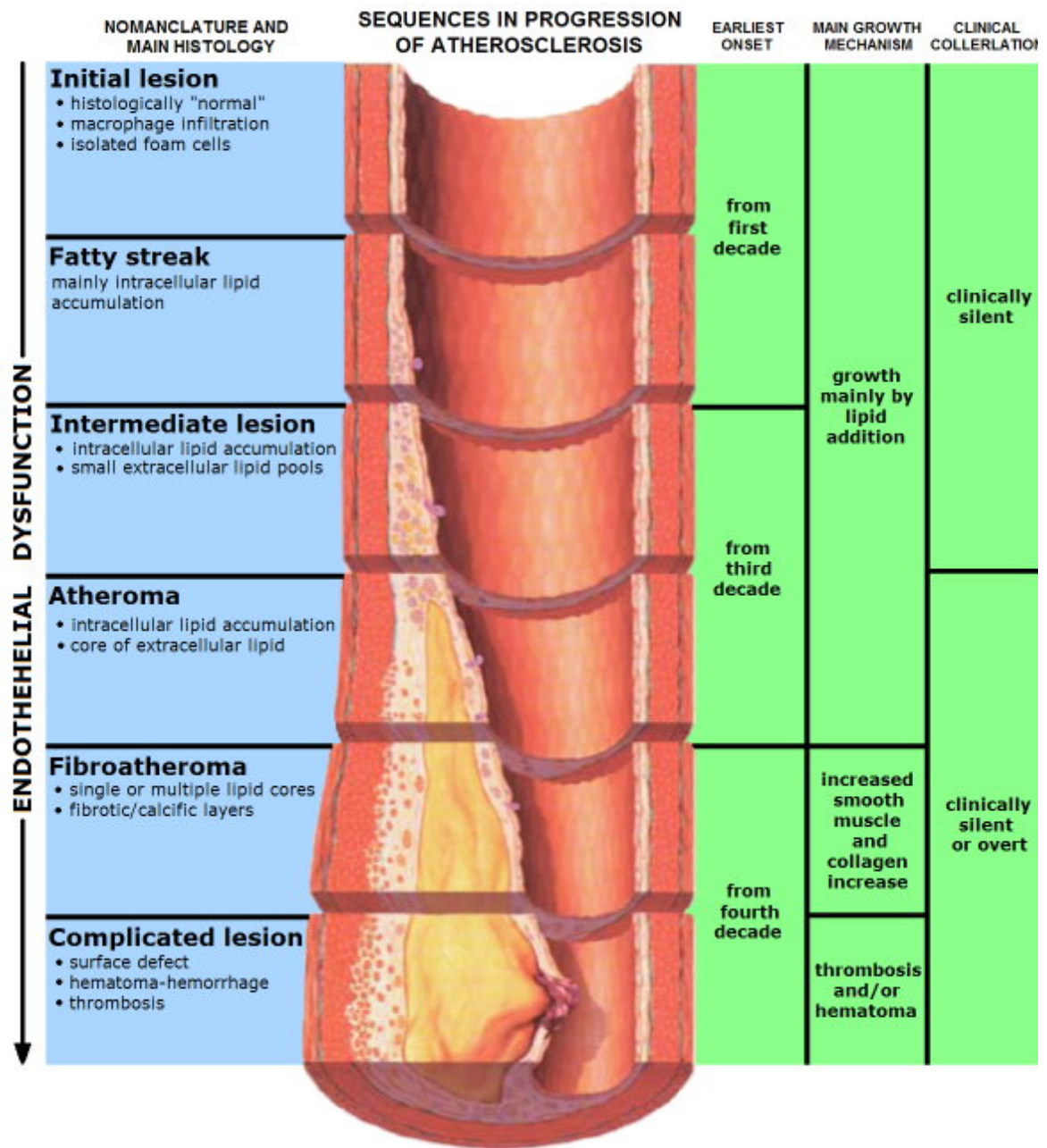
圖二十五、同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯活化冠狀動脈平滑肌細胞抗凋亡分子 Bad 受抑制而促凋亡分子 Bax 與 caspases 被活化。50  $\mu$ g 蛋白以 12% SDS-PAGE 分離後，電轉到聚偏氟乙烯膜。用小鼠抗人類 caspase-8 (1:1000, v/v)、白兔抗人類 caspase-9、白兔抗人類 caspase-3 等抗體，再加上結合 HRP 的山羊抗白兔 IgG (1:5000, v/v) 或結合 HRP 山羊抗小鼠 IgG (1:5000, v/v) 探測墨點。經含 0.5% Tween-20 的 PBS 清洗後，過氧化酶活性用強化的化合光評量。反應帶強度以影像量化系統(Fuji, Tokyo, Japan)分析。咖啡酸苯乙酯對 Bcl-2 家族蛋白抗凋亡作用與 caspase 活化影響的免疫點墨分析。



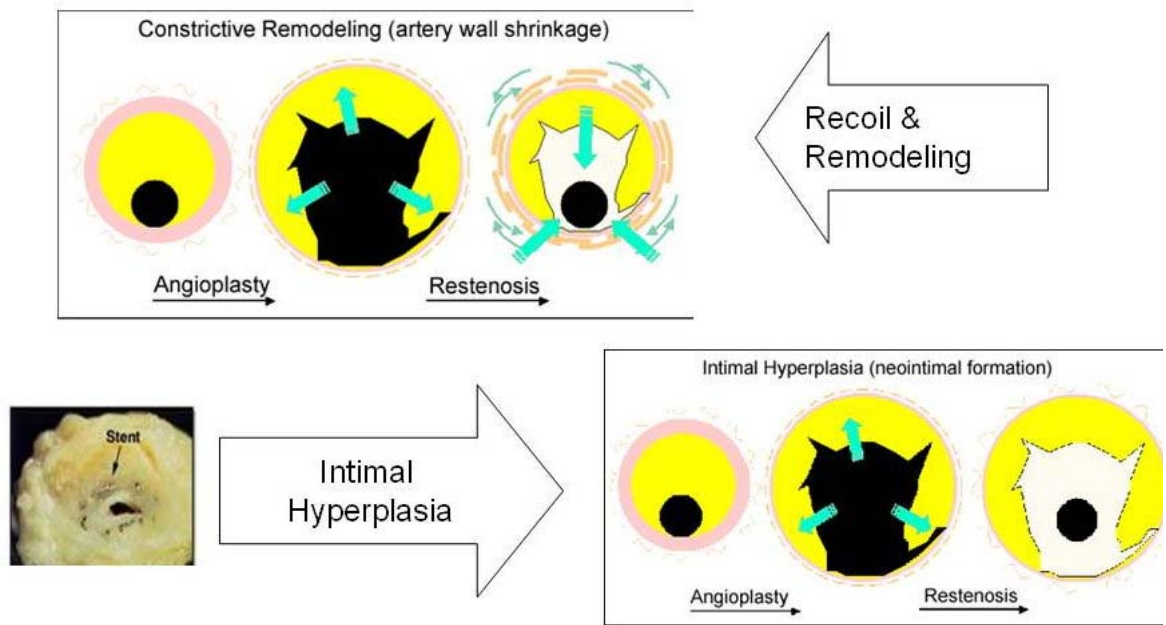


圖二十六、同時添加 BB 型血小板生長因子與咖啡酸苯乙酯活化冠狀動脈平滑肌細胞抗凋亡分子 Bad 受抑制而促凋亡分子 Bax 與 caspases 被活化。與未接受咖啡酸苯乙脂處理對照組相比，經 10、30 與 90 μM 咖啡酸苯乙脂處理 48 小時後抗凋亡分子 Bad 表現下降而促凋亡分子 Bax 表現上升。經 10、30 與 90 μM 咖啡酸苯乙脂處理 48 小時後，細胞 cleaved caspase-9 與 cleaved caspase-3 量顯著增加。但 caspase 8 量不變。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ (與對照組比較)。

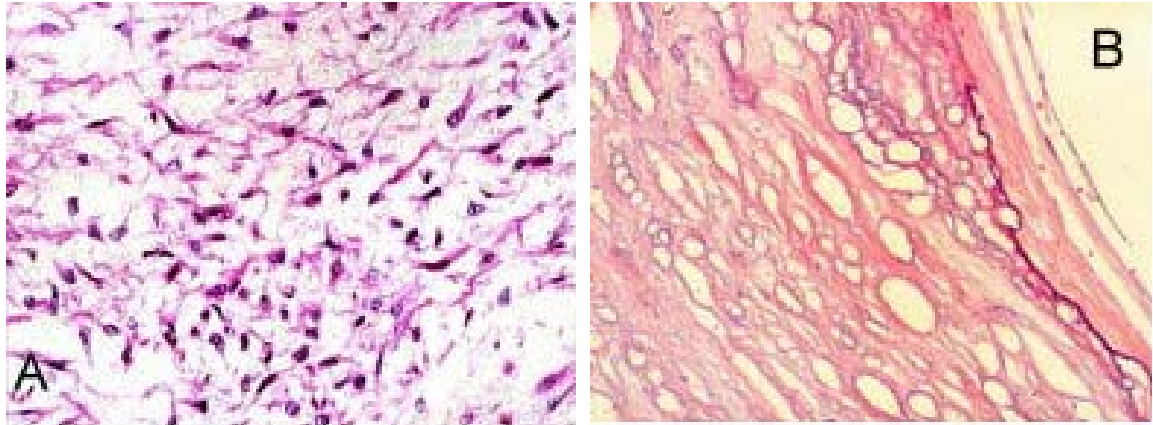
八、附圖：



附圖一、動脈粥狀硬化內皮功能異常發展階段(摘錄自 en.wikipedia)

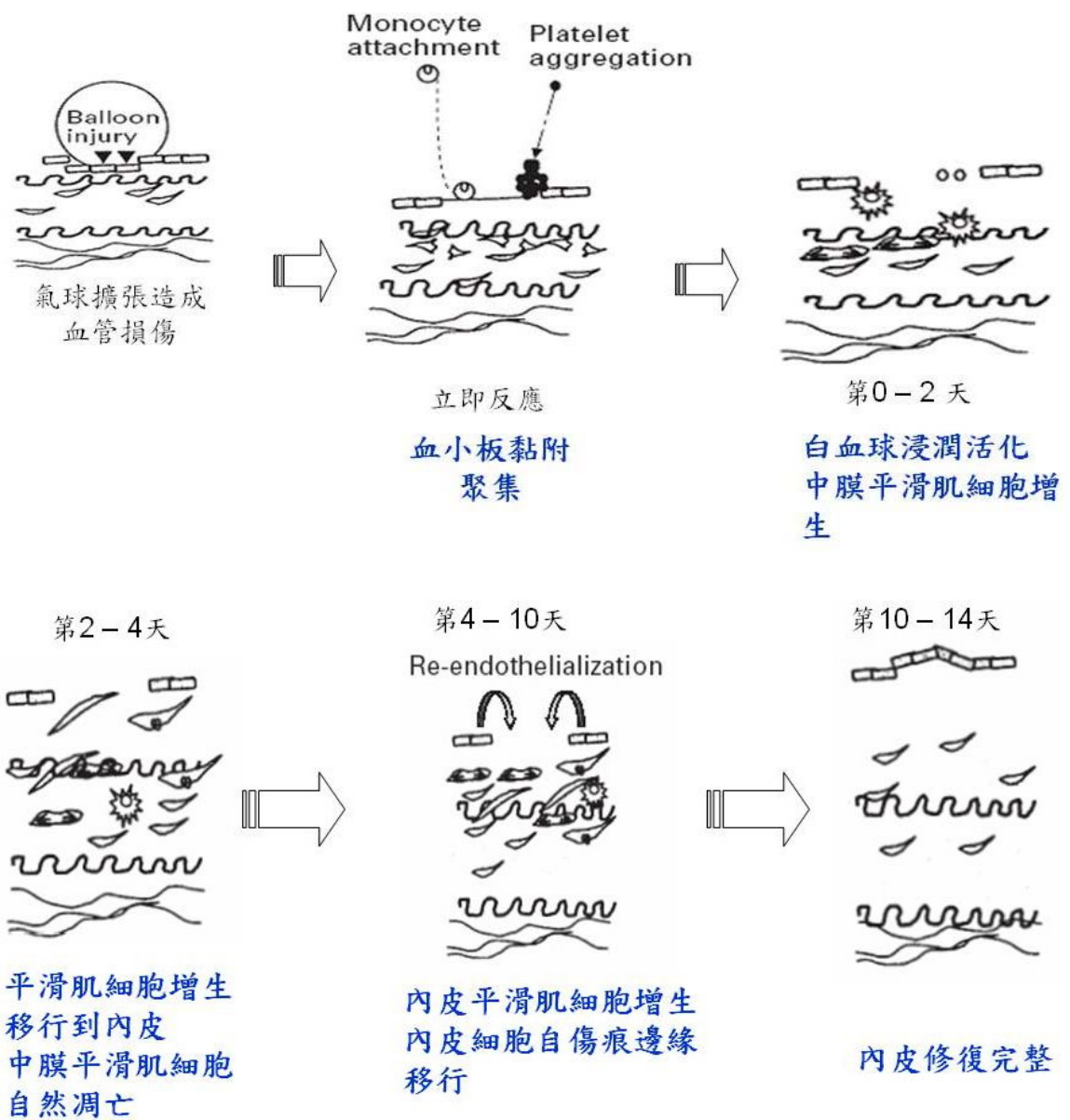


附圖二、經皮冠狀動脈介入性治療再狹窄的機制



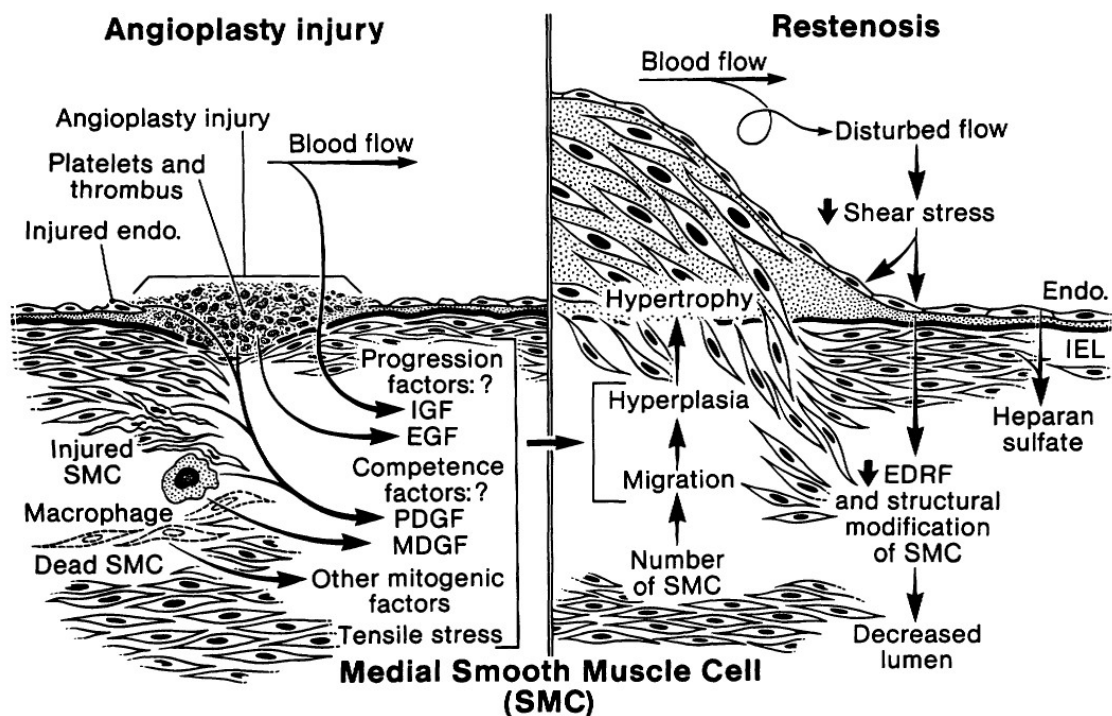
附圖三、再狹窄新生內膜與原生血管粥瘤組織病理比較 A. 再狹窄新生內膜(Neointima)大部分是平滑肌細胞與細胞外基質. B. 原生血管粥瘤(Plaque)大部分由脂肪組成如膽固醇、油脂等。

(取自 Boston Scientific Corp taxustraining.com web site)



附圖四、經皮冠狀動脈介入性治療血管內壁損傷後，血管細胞層面血管修復變化時程。

修改自 GAA Fern and TY Avade, 2000

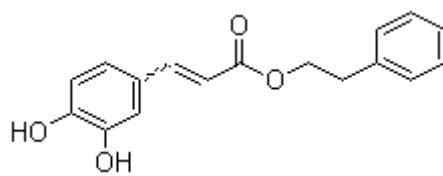


附圖五、再狹窄的機轉:

血管內壁受氣球損傷後，除了血小板立即釋出血小板生長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)，受損血管內皮、平滑肌細胞與巨噬細胞也釋出PDGF或類似PDGF的分子。PDGF能使細胞進入細胞週期。血小板與血漿提供細胞完成細胞週期的成份，也可能有其他促使細胞分裂的因子。這些生長因子是主要刺激平滑肌細胞增生。若有足夠活化的平滑肌細胞移行增生來增加內皮層平滑肌細胞的量與產生細胞外間質，進而行成再狹窄病灶。除外，若血管內血流不正常降低切應力(shear stress)，則不僅增加內皮增生，同時引起血管壁結構變化減少血管內徑。endo:內皮細胞(endothelial cells); IEL:內彈力層

( internal elastic lamina); IGF:類胰島素生長因子(insulin-like growth factor); EGF:表皮生長因子( epidermal growth factor); MDGF: 巨噬細胞生長因子(Macrophage-derived growth factor)

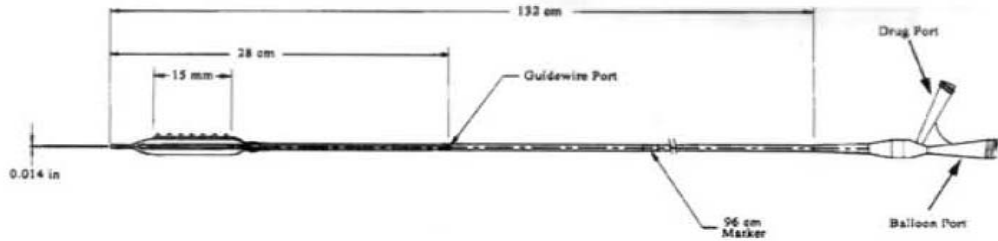
Liu et al., Circulation Vol 79, No 6, June 1989



附圖六、咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenyl ester, CAPE)化學式



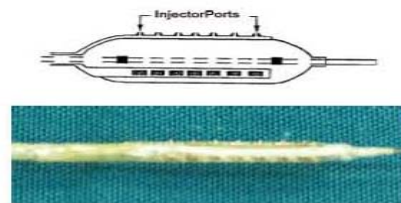
### A. Infiltrator® Monorail



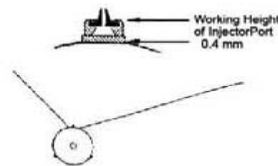
### B. Proximal end of Infiltrator



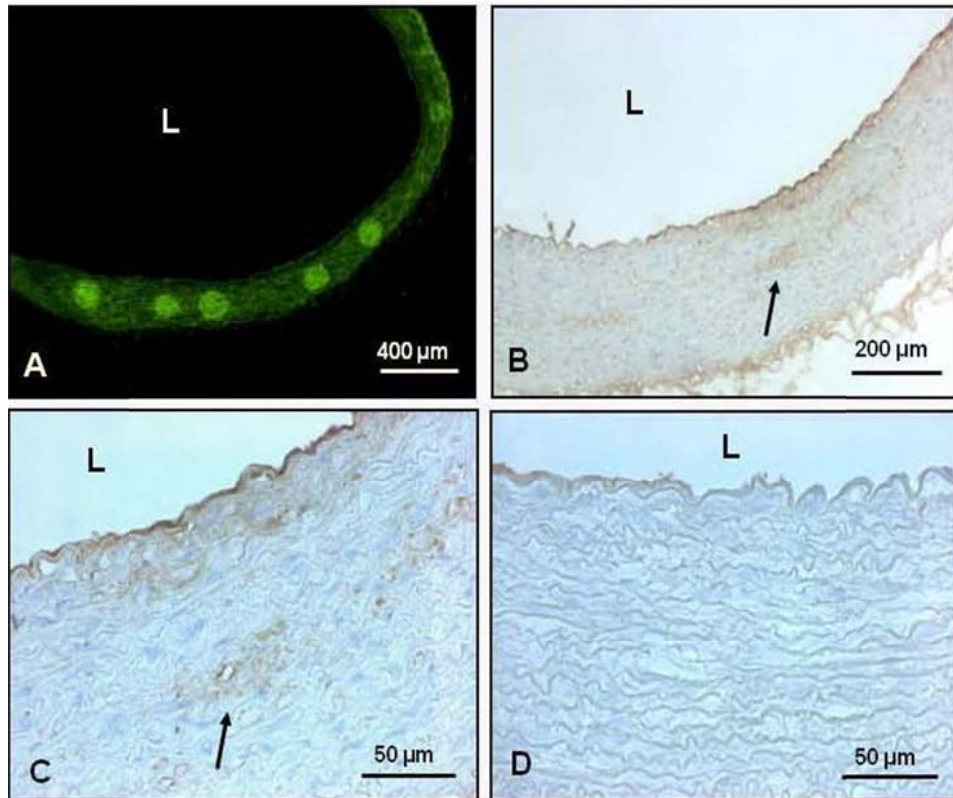
### C. Distal end of Infiltrator



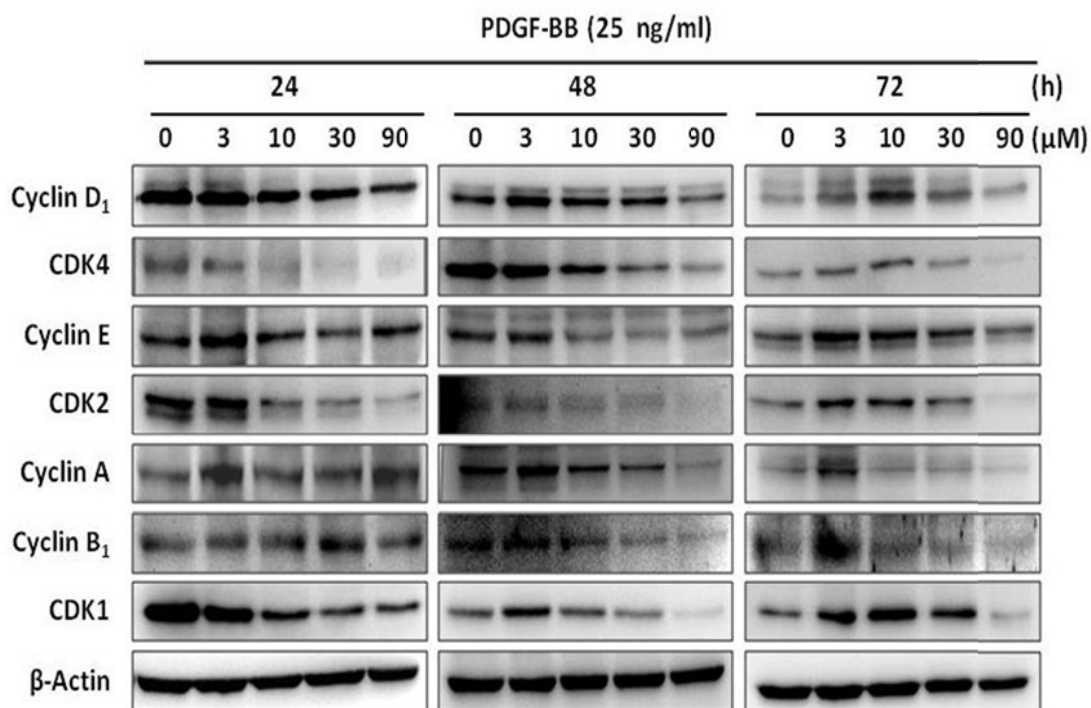
### D. InjectorPort®



附圖七. Infiltrator®導管運送系統. (A)本裝置包括兩部分:傳統血管擴張整型球囊與藥劑輸送系統. (B) Infiltrator®近端包括兩個注射口 一為注射藥劑用一為控制球囊撐開與回收. (C) Infiltrator®遠端包括一個15毫米長帶有三條注射藥劑 InjectorStrips®的球囊。在 InjectorStrips®這聚氨脂成分條狀結構上有0.25毫米高的鍍製圓錐狀注射孔 InjectorPort® (D) 內接於輸液輸送腔沿附於 InjectorStrip®



附圖八、(A)以 Infiltrator<sup>®</sup>局部注射綠色螢光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)到血管壁。(B)免疫組織化學顯微鏡圖顯示經 IABC 注射兩週後血管壁內 caveolin-1-myc (→) 的表現。血管壁內注射區在動脈內皮與中層反應產物所在位置(→)。(C).血管壁內注射區在動脈內皮與中層反應產物所在位置(→)的放大圖。(D)在沒注射部位對照圖。L: 血管腔(lumen)



附圖九、在血小板生長因子(PDGF)刺激下咖啡酸苯乙酯對血管平滑肌細胞週期的影響。經 PDGF-BB 刺激後平滑肌細胞的 cyclin A、cyclin E、cyclin D<sub>1</sub>、cyclin B<sub>1</sub>、CDK2、CDK4 和 Cdk1 的表現下降。

九、附表：

	0-2 天	2-4 天	4-10 天	10-14 天	2-4 週
血小板凝集					
發炎細胞					
平滑肌細胞增生					
平滑肌細胞移行					
細胞外間質					
內皮修復					

附表一、人類經皮冠狀動脈介入性治療血管內壁損傷後，血管細胞層

面血管修復變化時程。再狹窄發生在六個月內，然而決定性的因素  
在前三十天內產生

十、參考文獻：

- Adams J.M., Cory S. (2007) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 19:488-496.
- Angelini A., Visona A., Calabrese F., Pettenazzo E., Yacoub A., Valente M., Bonandini E.M., Jori G., Pagnan A., Thiene G. (2002). Time course of apoptosis and proliferation in vascular smooth muscle cells after balloon angioplasty. *Basic Appl. Myol.* 12(1):33-42
- Barath P., Popov A., Dillehay G.L., Matos G., McKiernan T.(1997) Infiltrator Angioplasty Balloon Catheter: a device for combined angioplasty and intramural site-specific treatment. *Cathet Cardiovasc Diagn* 41: 333-41
- Bonni A., Brunet A., West A.E., Datta S.R., Takasu M.A., Greenberg M.E. (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358-1362.
- Bornfeldt K.E., Raines E.W., Graves L.M., Skinner M.P., Krebs E.G., Ross R.(1995). Platelet-derived Growth Factor: Distinct signal transduction pathways associated with migration versus proliferation. *Annals New York Acad Sci* 12:416-430.
- Borrelli F., Izzo A.A., Di Carlo G., Maffia P., Russo A., Maiello F.M., Capasso F., Mascolo N.(2002a) Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia* 73 Suppl 1:S38-43
- Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A (2002b). Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 73 suppl 1:S53-63

- Cospedal R., Abedi H., Zachary I. (1999) Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) regulation of migration and focal adhesion kinase phosphorylation in rabbit aortic vascular smooth muscle cells: roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinases. *Cardiovasc Res* 41:708-721
- Chen Y.J., Shiao M.S., Hsu M.L., Tsai T.H., Wang S.Y. (2001) Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *J Agric Food Chem* 49:5615-5619.
- Chung T.W., Moon S.K., Chang Y.C., et al. (November 2004). "Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism". *FASEB J.* 18 (14): 1670–81.
- Downs J.R., Clearfield M., Weis S., et al. (May 1998). Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 279 (20): 1615–22.
- Dzau V.J., Braun-Dullaeus R.C., Sedding D.G. (2002) Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nature Medicine* 8: 1249 - 1256
- Fattori R., Piva T. (2003). Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet* 361:247-9
- Ferns G.A.A., Avades T.Y. (2000). The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. *Int. J. Exp. Path.* 81: 63-88
- Gonthier M.P., Verny M.A., Besson C., Rémésy C., Scalbert A. (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the

- gut microflora in rats. *Journal of Nutrition* 133 (6): 1853–1859
- Green D.R., Kroemer G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.
- Grunberger D., Banerjee R., Eisinger K., Oltz E.M., Efros L., Caldwell M., Estevez V., Nakanishi K.(1998) Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis *Experientia* 15;44(3):230-2
- Hamid H. (2007). "Miracle Stents-a future without restenosis". *MJM McGill Journal of Medicine* July 10: 105–111.
- Harada H., Quearry B., Ruiz-Vela A., Korsmeyer S.J. (2004) Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates Bim, inhibiting its association with Bax and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci* 101:15313-15317.
- Hirose M., Takesada Y., Tanaka H., Tamano S., Kato T., Shirai T..(1998). Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 19 (1): 207–212.
- Jaganathan S.K., Mandal M.(2009) Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review.*J Biomed Biotechnol* 1-13.
- Jawien A., Bowen-Pope D.F., Lindner V., Schwartz S.M., Clowes A.W.(1992). Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 89:507–511.
- Jeremias A., Kirtane A.(2008) Balancing efficacy and safety of drug-eluting stents in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Ann*

Intern Med. 5;148(3):234-8

Kim HR, Upadhyay S, Li G, Palmer KC, Deuel TF., (1995) Platelet-derived growth factor induces apoptosis in growth-arrested murine fibroblasts.

Proc Natl Acad Sci U S A. 92(21):9500-4.

Kuo H.C., Kuo W.H., Lee Y.J., Lin W.L., Chou F.P. and Tseng T.H. (2006a),

Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 234: 199-208.

Kuo H.C., Kuo W.H., Lee Y.J., Wang C.J. and Tseng T.H. (2006b),

Enhancement of caffeic acid phenethyl ester on alltrans retinoic acid-induced differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216: 80-88.

Lau KW, Sigwart U. (1995) Restenosis – an accelerated arteriopathy:

pathophysiology, preventive strategies and research horizons. In: Edelman ER (eds) *Molecular interventions and local drug delivery*, pp 2-4 WB Saunders company Ltd

Li J.M., Brooks G. (1999) Cell cycle regulatory molecules (cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors) and the cardiovascular system; potential targets for therapy. *Eur Heart J* 20:406-420

Li P.G., Xu J.W., Ikeda K., Kobayakawa A., Kayano Y., Mitani T., Ikami T. and Yamori Y. (2005), Caffeic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 28: 369-377.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. (2002). *Inflammation and Atherosclerosis.* *Circulation.* 105:1135-1143

Liu M.W., Roubin G.S., King S.B., 3d. (1989) Restenosis after coronary



angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation* 79; 1374-1387

Liu M.,(2004). The effect of local alcohol delivery in reducing intimal hyperplasia induced by vascular injury and the clinical implications. *Vasc. Dis. Prev.* 1: 33-40.

Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-157.

Maffia P., Ianaro A., Pisano B., Borrelli F., Capasso F.,Pinto A. and Ialenti A.(2002), Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester in a rat model of vascular injury. *Br. J.Pharmacol.* 136: 353-360.

Maga G. and Hubscher U., (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell. Sci.* 116: 3051-3060.

Maseri A., Fuster V. (2003). "Is there a vulnerable plaque?". *Circulation* 107 (16): 2068–71.

Mirzoeva OK, Calder PC (December 1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 55 (6): 441–9

Moreno R., Fernandez C., Sanchez-Recalde A., Galeote G., Calvo L., Alfonso F., Hernandez R., Sanchez-Aquino R.,Angiolillo D.J., Villarreal S., Macaya C. and Lopez-Sendon J.L.(2007), Clinical impact of in-stent late loss after drug-eluting coronary stent implantation. *Eur. Heart J.* 28: 1583-1591.

Nagaoka T., Banskota A.H., Tezuka Y., Harimaya Y.,Koizumi K., Saiki I. and Kadota S.(2003), Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester

- analogues on experimental lung metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells. *Biol.Pharm. Bull.*26: 638-641.
- Nakatania M., Takeyamab Y., Shibataa M., Yorozyua M., Suzukia H., Kobaa S. and Katagiri T.(2003), Mechanisms of restenosis after coronary intervention difference between plain old balloon angioplasty and stenting. *Cardiovasc. Pathol.* 12: 40–48.
- Nissen S.E., Nicholls S.J., Sipahi I., et al. (2006). Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* 295 (13): 1556–65.
- Nomura M., Kaji A., Ma W., Miyamoto K., Dong Z. (2001) Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester. *Mol Carcinog* 31:83-89.
- Orban Z, Mitsiades N, Burke TR, Tsokos M, Chrousos GP (2000). Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation". *Neuroimmunomodulation* 7 (2): 99–105.
- Peppercorn M.A. and Goldman P. (1972). Caffeic acid metabolism by gnotobiotic rats and their intestinal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69 (6): 1413–1415.
- Roy J., Tran P.K., Religa P., Kazi M., Henderson B.,Lundmark K. and Hedin U.(2002), Fibronectin promotes cell cycle entry in smooth muscle cells in primary culture. *Exp. Cell. Res.* 273: 169-177.
- Saelens X., Festjens N., Vande Walle L., van Gurp M., van Loo G., Vandenameele P. (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23:2861-2874.

- Scorrano L. (2009) Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1875-1883.
- Sever P.S., Poulter N.R., Dahlöf B., et al. (2005). Reduction in cardiovascular events with atorvastatin in 2,532 patients with type 2 diabetes: Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--lipid-lowering arm (ASCOT-LLA). *Diabetes Care* 28 (5): 1151–7.
- Stone G.W., Moses J.W., Ellis S.G., Schofer J., Dawkins K.D., Morice M.C., Antonio Colombo A., Schampaert E., Grube E., Kirtane A.J., Cutlip D.E., Fahy M., Pocock S.J., Mehran R., Leon M.B.. (2007). Safety and efficacy of Sirolimus and Paclitaxel-eluting coronary stents. *N. Engl. J. Med.* 356 (10): 998-1008
- Shuchman M.(2006). Trading restenosis for thrombosis? New questions about drug eluting stents. *N. Engl. J. Med.* 355: 1949-1952.
- Strandberg T.E., Lehto S., Pyörälä K., Kesäniemi A., Oksa H. (1997). Cholesterol lowering after participation in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) in Finland. *European Heart Journal* 18 (18(11)): 1725–1727.
- Sudina G.F., Mirzoeva O.K., Pushkareva M.A., Korshunova G.A., Sumbatyan N.V. and Varfolomeev S.D.(1993), Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS. Lett.* 329: 21-24.
- Swaye P.S., Fisher L.D., Litwin P., Vignola P.A., Judkins M.P., Kemp H.G., Mudd J.G., Gosselin A.J., (1983) Aneurysmal coronary artery disease. *Circulation*, Vol 67, 134-138
- Takahashi H., Letourneur D., Grainger D.W. (2007) Delivery of large biopharmaceuticals from cardiovascular stents: a review.

Biomacromolecules 8:3281-93.

The Allhat Officers And Coordinators For The Allhat Collaborative Research Group, (2002). "Major outcomes in moderately hypercholesterolemic, hypertensive patients randomized to pravastatin vs usual care: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT-LLT)". JAMA 288 (23): 2998–3007.

Walker L.N., Bowen-Pope D.F., Ross R., Reidy M.A. (1986) Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. Proc Natl Acad Sci 83:7311-7315.

Wang A.B., Li H.L., Zhang R., She Z.G., Chen H.Z., Huang Y., Liu D.P. and Liang C.C.,(2007) A20 attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and migration through blocking PI3k/Akt signaling in vitro and in vivo. J. Biomed. Sci. 14: 357-371.

Wang D., Xiang D.B., He Y.J., Li Z.P., Wu X.H., Mou J.H., Xiao H.L. and Zhang QH.,(2005) Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro. World J. Gastroenterol. 11: 4008-4012.

Yang X., Imaging of vascular gene therapy. Radiology. 2003, 228: 36-49.

## 十一、個人資料表/ Curriculum Vitae

中文姓名: 何 鴻 鑿

英文姓名: Ho, Hung-Chin

出生日期: 1962 年 7 月 1 日

聯絡地址: 台中市西屯區中港路三段 160 號

聯絡電話: (公).04-2323592525 ext 3124 (宅).04-23277358

E-mail: [hohycv@gmail.com](mailto:hohycv@gmail.com)

學歷:

國立陽明大學醫學系學士(1981-1988)

東海大學生命科學系博士生 (2003-2010)

論文著述

A)期刊論文何鴻鑿 ( Hung-Yun Ho, Hung-Chin Ho)

1. Ho HC, Chang HC, Ting CT, Kuo CY, Yang VC. Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation, migration, and induces apoptosis in human coronary smooth muscle cells after platelet-derived growth factor

stimulation. 2010 (submitted)

2. Ho HC, Lin YC, Kuo CY , Ting CT, Lin WW, Yang VC: Delivery of caveolin-1 gene into arterial walls of rabbits via an infiltrator angioplasty balloon catheter. *Tunghai Science* 2010, March Vol. 12: 1-14
3. Chung CM, Wang RY, Chen JW, Fann CS, Leu HB, Ho HY, Ting CT, Lin TH, Sheu SH, Tsai WC, Chen JH, Jong YS, Lin SJ, Chen YT, Pan WH. A genome-wide association study identifies new loci for ACE activity: potential implications for response to ACE inhibitor. *Pharmacogenomics J.* 2010 Jan 12. [Epub ahead of print]
4. Ho HC, Hsu SL, Ting CT, Kuo CY, Yang VC: Caffeic acid phenethyl ester inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using a local delivery system. *Cell Mol Biol* 2009;55:OL1161-7.
5. Yang HC, Liang YJ, Wu YL, Chung CM, Chiang KM, Ho HY, Ting CT, Lin TH, Sheu SH, Tsai WC, Chen JH, Leu HB, Yin WH, Chiu TY, Chen CI, Fann CS, Wu JY, Lin TN, Lin SJ, Chen YT, Chen JW, Pan WH. Genome-wide association study of young-onset hypertension in the Han Chinese population of Taiwan. *PLoS One.* 2009;4(5):e5459. Epub 2009 May 7
6. Lin WW, Fu YC, Jan SL, Wang KY, Ho HC, Lin FY, Ting CT, Chen YT. Immediate change in pulmonary venous flow pattern after deployment of

- occluder device for atrial septal defect. *Echocardiography*. 2009  
Apr;26(4):452-8.
7. Lin WW, Lin YC, Chang TY, Tsai SH, Ho HC, Chen YT, Yang VC.  
Caveolin-1 expression is associated with plaque formation in  
hypercholesterolemic rabbits. *J Histochem Cytochem*. 2006  
Aug;54(8):897-904
8. Ho TC, Ting CT, Liu TJ, Liang KW, Ho HY, Hsueh CW, Wang KY, Lin  
WW, Lee WL Percutaneous coronary revascularization improves the  
prognosis of patients with cardiogenic shock in acute coronary syndrome:  
a chronological study *International Journal of Cardiology*. 2003  
Jun;89(2-3):135-43
9. Lee WL. Chin CS. Lai CJ. Ho HY. Ting CT. Successful resuscitation of  
patient with massive coronary air embolism occluding two vessels during  
coronary angiography--a case report. *Angiology*. 52(2):155-9, 2001 Feb.
10. Chang KS. Wang KY. Yao YW. Huang JL. Lee WL. Ho HY. Hsueh CW.  
Huang DS. Chen YT. Ting CT. Catheter -induced coronary spasm--a view  
of mechanical factors and experience with selective left coronary  
arteriography. *Chung Hua i Hsueh Tsa Chih - Chinese Medical Journal*.  
63(2):107-12, 2000 Feb.
11. Liang KW. Huang JL. Kao CH. Hsueh CW. Ho HY. Lee WL. Wang KY.

- Huang DS. Chen YT. Ting CT. Significantly higher levels of oxidized LDL autoantibody in coronary artery disease patients. *Chung Hua i Hsueh Tsa Chih - Chinese Medical Journal*. 63(2):101-6, 2000 Feb.
12. Pu SY. Huang JL. Chen CK. Ho HY. Lee WL. Hwang DS. Chen YT. Ting CT. Prediction of right ventricular infarction from standard surface ECG in patients with inferior myocardial infarction. *Chung Hua i Hsueh Tsa Chih - Chinese Medical Journal*. 61(5):253-9, 1998 May.
13. Hsueh CW. Lee WL. Chen CK. Ho HY. Chen CP. Huang JL. Huang DS. Chen YT. Ting CT. Dopamine and dobutamine have different effects on heart rate variability in patients with congestive heart failure. *Chung Hua i Hsueh Tsa Chih - Chinese Medical Journal*. 61(4):199-209, 1998 Apr.
14. Wang SP, Chen W, Ko YL, Hsieh IC, Chen JJ, Liu CP, Wu CJ, Ho HY, Lee KW, Chen PH, Young MS, Chern CI, Tsai LM, Fang CC, Yang SP, Chen ZC, Hung JS, Hsia CP, Ko CC and the 15<sup>th</sup> Interventional Committee of Taiwan Society of Cardiology The First Multicenter Coronary Registration in Taiwan *Acta Cardiologica Sinica*, Vol 14, No. 4, pp 160-169
15. Wang KY. St John Sutton M. Ho HY. Ting CT. Congenital sinus of



Valsalva aneurysm: a multiplane transesophageal echocardiographic experience. Journal of the American Society of Echocardiography. 10(9):956-63, 1997 Nov -Dec.

16. Ho HY. Wang KY. Ting CT. Left atrial appendage flow velocity and spontaneous echo contrast in patients with rheumatic mitral stenosis: a multiplane transesophageal echocardiographic study. Chung Hua i Hsueh Tsa Chih - Chinese Medical Journal. 56(6):380-5, 1995 Dec.

(B)研討會論文

1. Hung-Chin Ho, Ming W Liu, Chronic Coronary Total Occlusion - a Revisit with Current Hydrophilic Guidewire(Presented at the 51th American Scientific Session of American College of Cardiology, March 18, 2002)
2. Ramchandra S. Veerapaneni, Ming W. Liu, HungChin Ho, Cutting Balloon Limits Plaque Shift in Bifurcation Lesions (Presented at the 51th American Scientific Session of American College of Cardiology, March 17, 2002)