

臺灣二〇〇四年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學科

作品名稱：STATIN 類降血脂藥物對血管平滑肌細胞之作用

得獎獎項：儲備作品

學 校：臺北市立第一女子高級中學

作 者：謝佩芬、林桂卉

作者簡介



雖然過去曾做過幾次的科展，但以這一次感覺收穫最多。因爲一年多來花了很多時間在了解這一深奧研究題目之背景，意義，實際操作複雜的實驗方法及學習如何整理及分析結果。此外，實驗的過程中在經歷失敗後才真正體會到科學家堅毅研究精神的可貴。我們這一年來學到許多珍貴的實驗技巧及經驗，收穫之豐是我始料未及的。因有指導老師嘔心瀝血的指導，及在學長姐親切，風趣，又不厭其煩的教導下，使我們一點點的研究成果得以呈現，在此由衷感謝他們。

STATIN 類降血脂藥物對血管平滑肌細胞之作用

壹、摘要

一、中文摘要

動脈硬化是個致病率和致死率相當高的慢性發炎疾病，為台灣十大死因之一。在病理過程中血中濃度過高的膽固醇為動脈硬化的一大危險因子，其會誘發一連串的發炎反應驅使血管壁內皮細胞功能喪失，血壓上升，平滑肌細胞增生等。Statin 是臨床上十分有效的降血脂藥物，雖然其作用機制已知在於抑制膽固醇合成酵素 HMG-CoA reductase 而有降血脂功效，但近年來探討 statin 在抗發炎方面的作用也漸受重視。nitric oxide synthase (NOS) 代謝產物如 nitric oxide (NO)，cyclooxygenase (COX) 代謝產物如 prostaglandin (PGE₂、PGI₂)，及 heme oxygenase-1 (HO-1) 代謝產物如 carbon monoxide (CO)，均有文獻指出可以改善血流，而可能在動脈硬化上扮演保護角色。相反的，matrix metalloproteinase (MMP) 的表現會誘使更多的免疫細胞浸潤到血管壁，並增加動脈硬化斑破裂，引起栓塞和中風的發生。在此實驗中，我們利用培養的大鼠主動脈血管平滑肌細胞作為研究材料，發現了 statin (lovastatin、pravastatin、atorvastatin、fluvastatin) 具有一些和降血脂無關的直接保護血管壁能力。包括會增加 interleukin-1 β (IL-1 β) 所誘導 iNOS 蛋白的表現及 NO 的產生；statin 本身會增加 COX-2 和 HO-1 蛋白的表現及 PGE₂ 和 PGI₂ 的產生，及抑制 MMP-2 和 MMP-9 蛋白活性的表現。此外分析調控 iNOS 基因轉錄最為關鍵的基因轉錄因子 NF- κ B，發現適量的 statin 會增加 IL-1 β 活化 NF- κ B 的作用。值得一提的是雖然適量 NO 有維持血管恆定的功能，過量時則會造成血壓過低休克的現象，這就是細菌感染後因內毒素 lipopolysaccharide (LPS) 作用引發敗血性休克的主要原因之一。為更進一步釐清 statin 是否會影響受細菌感染病人的生命危險，我們也探討 statin 對 LPS 作用的影響。結果發現 statin 反而會抑制 LPS 誘導大量 iNOS 蛋白的表現，NO 的產生及 NF- κ B 的活化。這些新的實驗結果提供更多證據支持 statin 可以藉由維持血管舒張，減緩血管壁的發炎反應，穩定動脈硬化斑的作用，以有效控制動脈硬化各個病程的進展。這發現能讓我們更透徹明白 statin 的作用，且對將來研發 statin 在心血管疾病方面新的臨床治療用途是有所助益的。

二、英文摘要

The 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors, statins, are potent inhibitors of cholesterol synthesis and have wide therapeutic use in cardiovascular diseases. Recent evidence, however, suggests that the beneficial effects of statins may extend beyond their action on serum cholesterol levels. In this study, we investigated the effects of lovastatin, pravastatin, atorvastatin, and fluvastatin on cultured rat vascular smooth muscle cells. We found statins can inhibit LPS-induced iNOS expression and NO production, while they can potentiate IL-1 β -elicited responses. Moreover, statins themselves can stimulate COX-2 expression, PGE₂, PGI₂ formation, and HO-1 induction. In contrast, statins can inhibit basal and IL-1 β -induced enzyme activities of MMP-9 and MMP-2. In studying the activity of NF- κ B, which plays an important role for iNOS gene induction, we found that statin can increase IL-1 β -induced NF- κ B activity, while inhibit that induced by LPS. All these results suggest that stimulation of iNOS expression in the presence of IL-1 β , together with the increased COX-2 and HO-1 expression might contribute to the beneficial effects of statins in atherosclerotic process in terms of vasodilation and inhibition of smooth muscle cell proliferation. The inhibition of MMP activity might enhance plaque stability and reduce the development of atherosclerosis. All these results strengthen the pleiotropic actions of statins in anti-inflammation and anti-atherosclerosis.

貳、內文

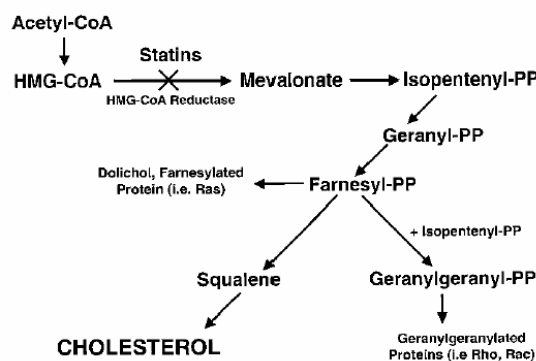
一、研究動機與目的

1、降血脂藥物 STATIN 與動脈硬化

動脈硬化是個致病率和致死率相當高的疾病，為台灣十大死因之一，其併發症也是西方社會最常見的死因，但是其致病因目前尚未十分明確。在臨床及病理觀察顯示，血中膽固醇過高為動脈硬化的一大危險因子，因為當血中低密度脂蛋白 (LDL) 過多的時候，便會受氧化，被巨噬細胞吞噬而沉積在血管壁上，降低血管的彈性，造成所謂的硬化，因此目前便是以降血脂藥物來治療動脈硬化。近年來發現，動脈硬化其實是個慢性發炎疾病。在血管受到傷害、血脂堆積的時候，血管表面會表現出 ICAM、VCAM 等附著因子，並且會釋放 MCP-1、TNF- α 等化學趨向物質，吸引單核球進入血管壁，並使平滑肌細胞增生等等一連串的發炎反應 (Glass & Witztum., 2001)。

Statin 是目前臨床上十分有效的降血脂藥物，其機制在於抑制了膽固醇合成酵素 --- 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA reductase)，因而能有效降低血中膽固醇及低密度脂蛋白。但是在臨床觀察中發現，約有半數的動脈硬化的病人血脂含量正常，且臨床研究和統計顯示，statin 降低心血管疾病致病和致死率的能力，和其降低血中脂肪的能力並沒有絕對正相關性，反而指出 statin 可以直接作用在血管壁上來達到保護心血管的作用 (Laufs & Liao, 2000; McFarlane et al., 2002; Werner et al., 2002)。

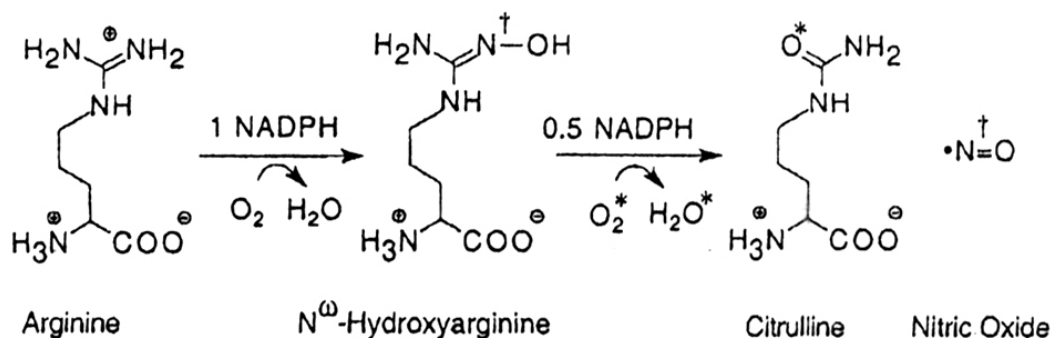
在近年的研究中指出，動脈硬化的進程是一連串的發炎反應，因此有越來越多實驗在探討 statin 在抗發炎方面的作用。目前所發現的一些抗發炎方面的作用機制主要是因 statin 減少細胞中 small G proteins (如 Ras, Rac, Rho, Cdc42) 的訊息傳遞功能。Small G proteins 的活性除需要與 GTP 結合外，還需要與 farnesyl pyrophosphate (FPP) 或 geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) 產生化學結合反應，即所謂的 isoprenylation，才能使這些負責多種細胞功能的重要蛋白轉移至細胞膜上發揮調節的作用，例如可經引發訊息傳遞路徑，活化基因轉錄因子，而啟動基因轉錄的調節作用。因為 statin 是臨床上廣用且深具抗發炎效果的一類藥物，將來或許還有臨床上的其他運用價值，因此其在血管的相關作用值得深入探討。



2、iNOS 與發炎反應的關係

一氧化氮 nitric oxide (NO) 是一種具有多種生物活性的自由基，可由 nitric oxide synthase (NOS) 的催化而產生。NOS 一共有三種亞型，其中 type II NOS，又稱作 inducible NOS (iNOS)，它在平常的細胞中並沒有表現，只有在受到發炎等刺激下才會被誘發出來，使細胞內的 L-arginine 轉化為 NO，釋放到細胞外 (Moncada et al., 1991; Nathan, 1997)。許多血管中的細胞，例如巨噬細胞、平滑肌細胞和纖維母細胞等，在

受到發炎細胞激素的刺激都會表現出 iNOS，所以當動脈硬化的時候，在動脈硬化斑的部位都可以測到大量的 iNOS 表現。雖然 iNOS 對於動脈硬化究竟是利還是弊，目前有許多的爭議，但是在動物實驗中可以看出，適當濃度的 NO 對於血管是有正面助益的。在正常的血管中，內皮細胞藉由 eNOS 產生適量 NO 來保護血管，包括抑制血小板凝集、抑制白血球黏著到血管壁，放鬆血管張力避免血壓升過等 (Lloyd-Jones & Bloch, 1996)。但在動脈硬化發生處，內皮細胞會因受傷害而剝落或者喪失原有保護血管壁的能力，因此平滑肌細胞藉由 iNOS 所產生的 NO 可以代償 eNOS 的作用，使得血管舒張，抑制血管平滑肌細胞增生、血小板附著及 LDL 的氧化，而且可以看到原本增厚的血管壁有漸漸復原的趨勢。雖然 NO 如上述有保護的角色，但實際上它的作用是一刀的兩面，其在不同的病理狀態下有時反而是一有害的分子。舉例來說，因革蘭氏細菌感染產生敗血症時，細菌細胞膜上的組成，內毒素 lipopolysaccharide (LPS)，即會誘發 iNOS 大量表現，產生大量的 NO 而導致血管舒張、血壓下降、休克及多重器官衰竭。因此同樣一種分子所扮演的角色是保護性還是傷害性，會因其釋放量的高低及在不同病理狀況下而呈現不同的作用。除 LPS 外，iNOS 的表現也受細胞激素的調節。例如在動脈硬化處常釋放之細胞激素-interleukin-1 β (IL-1 β) 就具有刺激血管平滑肌細胞表現 iNOS 的作用。由 T 淋巴球細胞釋放的 interferon- γ (IFN- γ) 在發炎反應過程中也扮演一個重要角色，因為它可以加強 LPS 誘發許多發炎媒介物質的基因表現，iNOS 即是其中一例。

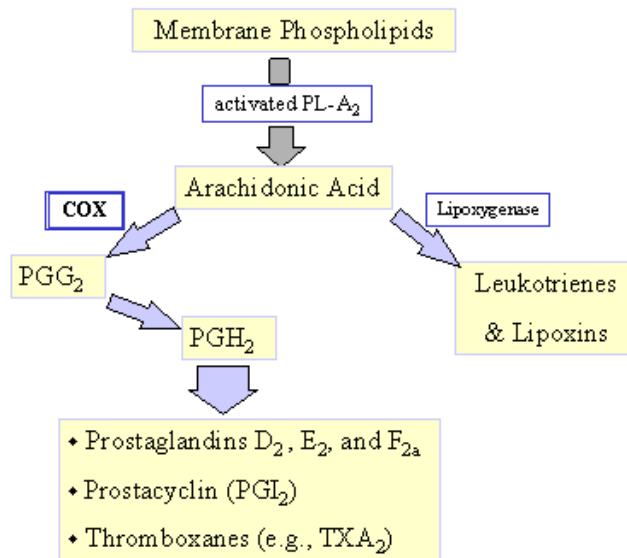


在一些 cofactors (如 NADPH, FAD, FMN) 及氧氣的共同存在下，NOS 酵素會催化 L-arginine 轉變成 NO 及 citrulline。不穩定的 NO 很快會氧化成穩定的產物亞硝酸 (nitrite) 或硝酸 (nitrate)。

在啟動 iNOS 基因轉錄的 promoter 上可以受到 nuclear factor- κ B (NF- κ B)、AP-1、C/EBP、ATF/CREB 和 STAT1 等轉錄因子的調控，其中，NF- κ B 受到廣泛的研究，已經確定 NF- κ B 在 LPS 和 IL-1 β 刺激 iNOS 表現的訊息傳遞途徑上，扮演重要不可或缺的角色 (Hecher et al., 1999)。老鼠的 iNOS promoter 上共有三個 NF- κ B binding sites，分別位於 (-965 to -956 bp)、(-901 to -892) 和 (-107 to -98) 的位置。當血管平滑肌受到 LPS 或是 IL-1 β 的刺激，就會使原本連結在 NF- κ B 上的抑制蛋白 I κ B 被蛋白激酶 (protein kinase) 磷酸化而被 proteasome 辨識分解掉，因此位在細胞質的 NF- κ B 便可以進入細胞核，而和 iNOS 上的 NF- κ B binding site 結合，而啟動 iNOS 基因的轉錄。

3、COX-2 與發炎反應的關係

當血管局部發炎的時候，也會大量表現另一種酵素 cyclooxygenase-2 (COX-2)。COX 還有一個亞型 (isoform)---COX-1。一般 COX-2 是在發炎反應發生時才被誘導出的 (Needleman & Isakson, 1997)，而 COX-1 則平時就存在於細胞中，用來調控各項生理功能，例如維持腎臟血流、保護胃壁、控制分娩和血小板活化等。COX 酵素會催化細胞膜上被 phospholipase A₂ (PLA₂) 分解釋放的脂肪酸 arachidonic acid 將其代謝為 prostaglandin (PG) 和 thromboxane (TX)。

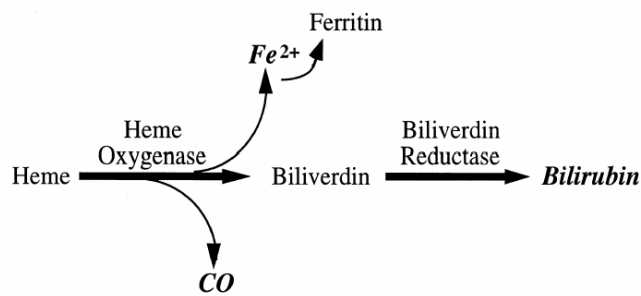


由血管內皮細胞和血管平滑肌細胞分泌的 prostaglandins，具有促使血管舒張、抑制血管平滑肌細胞增生的能力。血管內皮細胞釋放以 PGI₂ 為主，而它扮演維持血液恆定 (hemostasis) 的角色。在動脈受到傷害時，血管就會釋放 PGI₂，可惜此量不足以達到抑制平滑肌細胞增生的效果。Thromboxane A₂ (TXA₂) 主要是由血小板中的 COX-1 所生成，它能引發血小板凝集和血管收縮，PGI₂ 會平衡 TXA₂ 的作用，以維持彼此之間對血管張力及血小板功能的恆定。血管平滑肌細胞則會產生 PGI₂，PGE₂ 及 TXA₂。在許多動脈硬化的實驗動物模式及臨床結果均顯示 COX-2 在動脈硬化斑有高度表現。一般認為血管平滑肌所表現的 COX-2 應是藉由 PGE₂ 和 PGI₂ 的作用去阻止平滑肌細胞的增生及收縮，因而有減緩動脈硬化的病程及嚴重性。

4、HO-1 與發炎反應的關係

Heme oxygenase-1 (HO-1) 是一種細胞當受不同氧化壓力 (oxidative stress) 刺激時，例如體溫上升，熱休克，內毒素休克，紫外線照射，細胞中過氧化氫增加，重金屬中毒，發炎性細胞激素增加等，會被誘導的基因。主要功能是去保護細胞降低細胞在氧化壓力狀況下受到的傷害。HO-1 會將老化紅血球分解後釋出的血紅素 (heme) 分解轉變為一氧化碳 (CO)、膽紅素 (bilirubin) 和二價亞鐵，具有抗發炎、血管放鬆和抑制血管增生的能力。CO 可以調控單核球及巨噬細胞的發炎反應，因此可以抑制發炎反應的起始，被認為是 HO-1 主要的保護效果來源; bilirubin 是一個強力的抗氧化劑，而二價亞鐵則可以和自由基 O₂⁻ 或 H₂O₂ 作用經 Fenton 反應而產

生 OH 自由基 (Otterbein et al., 2003)。



5、HO-1，MMP 與發炎反應的關係

基質的金屬蛋白酵素 (Matrix metalloproteinase, 簡稱 MMP) 是負責分解細胞胞外基質的一類酵素。當動脈硬化發生時，巨噬細胞和平滑肌細胞會分泌 MMP 分解細胞胞外基質，使平滑肌細胞得以大量潛移 (migration) 及增生。此外，MMP 可能與血管斑塊不穩定有關，因為有症狀動脈硬化斑塊其 MMP 活性顯著增加，因而增加動脈硬化斑破裂、硬化斑內容物釋出的機會 (Glass & Witztum, 2001; Galis & Khatri, 2002)。

6、目的

鑒於 iNOS, COX-2 會隨動脈硬化發生而在動脈硬化斑增加表現，HO-1 具有保護作用，及 MMP 的活化對動脈硬化有不良影響，因此我們十分好奇是否 statin 會影響這四種蛋白在血管平滑肌細胞的表現，而達到進一步保護血管的效果。此外對由 IL-1 β 及 LPS 活化 NF- κ B 的影響也將一起探討。在實驗中，我們使用了人類和老鼠的平滑肌細胞當作實驗材料，比較四種 statins，分別是 lovastatin、fluvastatin、pravastatin 和 atorvastatin 的反應，希望藉由此研究更加了解 statin 的抗發炎作用機制。研究目標有下列四點：

- 5-1、Statin 對 IL-1 β 及 LPS 誘發產生 NO 釋放，iNOS 表現及 NF- κ B 活化的影響。
- 5-2、Statin 對 COX-2 表現及 PGE₂、PGI₂ 和 TXA₂ 釋放的影響。
- 5-3、Statin 對 HO-1 表現的影響。
- 5-4、Statin 對 MMP 活性的影響。

二、研究方法

1、材料

培養液 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、盤尼西林與鏈黴素 (Penicillin-Streptomycin)、胎牛血清 (fetal bovine serum)、phosphate buffered saline (PBS) 購自 Gibco BRL (Grand Island, NY)，培養液 M231 購自 Cascade Biologics。Rabbit polyclonal against iNOS 抗體購自 Transduction Laboratories (Lexington, KY)。Rabbit polyclonal against HO-1 抗體購自 Stressgen (Canada, BC)。Goat polyclonal against COX-2 抗體購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。IFN- γ 和 IL-1 β 購自 R&D (Minneapolis, MN)。Horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit 和 anti-mouse 抗體、enhanced chemiluminescence (ECL) 測定溶劑購自 Amersham Biosciences (Piscataway, NY)。PGE₂、PGI₂ 和 TXB₂ EIA kits 購自 Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI)。Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 所需材料購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)。LPS 以及其它藥品則購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。

2、方法

2-1、細胞培養及免疫螢光染色

大鼠血管平滑肌細胞是取自 Wistar rat 的主動脈。以併用麻醉藥及斷頸法犧牲大鼠後，打開胸腔沿著脊柱取下主動脈，用 PBS 把其中的凝血塊沖出。之後在無菌操作條件下移去黏附在血管上的肌肉和結締組織，再用 0.05% collagenase 和 5 mM 的 dithiothreitol (DTT) 溶液沖洗之。最後將血管剪成約 1 mm 高的環，直立放在裝有 1 ml 含有 10% 胎牛血清及抗生素 (100 U/ml penicillin 及 100 μ g/ml streptomycin) DMEM 的六孔培養盤中，每兩天換一次培養液，直到細胞爬滿整個 well，再移到 75T flask；人類的血管平滑肌細胞 (購自 Cascade, Canada)，則養在 M231 培養液中。兩種細胞都放置於 5% CO₂，37°C 培養箱中培養。當鑑定大鼠血管平滑肌細胞之純度時是在玻片上種好細胞，以 10% 福馬林固定，再用 PBS 進行 blocking。加入 α -actin 抗體處理 15 分鐘，用 PBS 清洗 3 次，再加入二級抗體和 Hoechst 33328。用 PBS 清洗 3 次後，封片固定，再用螢光顯微鏡觀察之。

2-2、Nitrite 產量之測定

Nitrite 的產量可做為 iNOS 活性的指標。將細胞培養在 24-well plates 中，直到細胞長滿後，換成 500 μ l 新鮮培養液，加入 IFN- γ 、LPS、IL-1 β 和不同濃度的 statin，24 小時後收集細胞培養液然後測量 nitrite 含量。Nitrite 測定是取 100 μ l 培養液加入 100 μ l 的 Griess reagent (1% sulfanilamide 及 0.1% naphthylethylenediamide 溶於 5% phosphoric acid)，用 microplate reader 測定 nitrite 含量，其吸收波長為 550 nm (A_{550 nm})。而 nitrite 之標準濃度曲線圖則用不同濃度 sodium nitrite (X 軸) 泡在培養液中當做標準液，求得 A_{550 nm} 吸光值 (Y 軸)。樣品之 nitrite 含量是將其 A_{550 nm} 值以內插法方式求出濃度。

2-3、細胞抽取物之製備

將細胞培養在 12-well dish 中，分別加藥反應適當時間之後，將培養液吸走，以冰冷的 PBS 清洗兩次然後置於冰上終止反應，加入適量的 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH7.5; 125 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1 mM MgCl₂; 1 mM PMSF; 25 mM β -glycerophosphate; 50 mM NaF; 100 μ M sodium orthovanadate; 10 μ g/ml leupeptin; 10 μ g/ml aprotinin)，將細胞完全收集至離心管，靜置 30 分鐘，以 14,000 rpm，4°C 離心 30 分鐘，取上清液即為細胞抽取物。

2-4、SDS-PAGE 及西方點墨法 (蛋白質轉印)

利用 Bradford 方法測定蛋白質的含量，取一定量的蛋白質，加入 5X Laemmli buffer (最終濃度組成爲 1% (v/v) glycerol; 2% SDS; 5% β -mercaptoethanol; 0.00125% bromophenol blue; 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8)，在 100°C 下煮 5 分鐘。依 Laemmli (1970) 的方法，利用 SDS-PAGE 電泳分離蛋白質。電泳完畢後，利用半乾式石墨電極板 (Multiphor II NovaBlot Unit, Amersham Biosciences) 進行轉印。首先裁好 6 張與蛋白膠同樣大小之濾紙 (Whatman Co.) 及一張 nitrocellular paper，蛋白膠同樣以 transfer buffer (0.39 M glycine; 0.48 M Tris-HCl, pH 7.4; 0.375 % SDS) 潤溼，依 3 張濾紙、nitrocellular paper、蛋白膠、3 張濾紙順序由正極向負極方向層疊，小心避免產生氣泡，並趕走氣泡，架設好轉印設備，以固定電流 (蛋白膠片長 x 寬 x 0.8 毫安培/cm²) 1~2 小時作轉印，可以 Amido Black (Sigma Co.) 溶液檢驗轉印效率，並作標記。

2-5、免疫染色法

將轉印上蛋白質之 nitrocellular paper 浸泡於 blocking 溶液 (含有 5% 脫脂奶粉) 中，室溫下輕輕搖晃 1 小時，以含有 0.5 % Tween 20 之 Tris-base saline (TBS) 洗去 blocking 溶液 (5 分鐘)，泡入以適量 TBST 溶液 1:1000 稀釋之特定抗體，室溫下作用 90 分鐘，使抗體和特定蛋白質結合。接著以 TBST 清洗 3 次 (每次 10 分鐘)，再泡入含有結合酵素之 1:2000 稀釋第二抗體的 TBST 溶液中，使之與第一抗體結合，同樣作用 90 分鐘，以 TBST 清洗 3 次後，加入 ECLTM 溶液 (Amersham Biosciences) 以 X 光片偵測特定蛋白質的表現。

2.6、酵素免疫偵測法

將細胞培養在 12-well dish 中，分別加藥反應 24 小時之後收集培養液，利用 Cayman 的 PGE₂、PGI₂ 和 TXB₂ 之 EIA kits 依廠商的步驟操作。

2-7、Zymography

將細胞培養在沒有血清的培養液中兩天，之後加藥處理 24 小時。收取其上清液加入 native protein assay buffer，以含 1% gelatin 的 SDS-PAGE 進行電泳以分離蛋白質。電泳結束後，以 2.5% Triton X-100 於室溫下洗滌兩次，每次十分鐘。隨後，再把膠片置於催化溶液中反應 10-18 小時。再以 Colloidal Brilliant Blue 將膠片呈色，並用 10% 醋酸作去色處理。之後清洗封片即可。

2-8、轉形作用(transformation) 和質體純化

將勝任細胞 (去細胞壁的大腸桿菌) 和含有 NF- κ B binding site DNA 的質體 (plasmid) --- pGL2-ELAM-Luc (κ B-Luc) 均勻混合, 使得質體可以結合到勝任細胞表面。再利用 heat shock 的方法, 因為加熱會導致細胞膜流動性增加的原理, 使質體順利進入到勝任細胞中。待反應 30 分鐘後, 將菌液塗在含有抗生素 ampicillin 的 agar plate 上, 即可培養出含有 pGL2-ELAM-Luc 的大腸桿菌。因為 pGL2-ELAM-Luc 中含有對 ampicillin 具有抗藥性的 DNA 片段, 因此可以成功在含有 ampicillin 的 agar plate 上長出來的菌, 變是轉形成功的菌株。第二天, 挑出成功轉形的菌, 在 LB 培養液中大量培養。接著, 我們利用 Quantagen 的 plasmid extraction kits 純化出大腸桿菌中的 pGL2-ELAM-Luc (κ B-Luc)。

2-9、細胞轉染 (transfection) 和報告基因試驗 (reporter gene assay)

利用 Promega 公司的 TransFast transfectionTM reagent 來進行 transfection, 把質體送入血管平滑肌細胞中。首先將 TransFast 和 pGL2-ELAM-Luc 及 β -galactosidase expression vector (pCR31lacZ; Pharmacia, Sweden) 一起依廠商的步驟混合, 再到前一天已經種好 5×10^5 cells/well 的 12 well plate 中, 在 37°C 的條件和細胞反應 1 小時, 再將每一個 well 加入 1 ml 的 DMEM, 置入培養箱中培養。第二天再移去 well 中的溶液, 更換成新鮮的 DMEM, 之後加藥處理細胞。六小時後, 將 medium 移除並用 PBS 清洗一次, 然後加入 50 μ l 的 reporter lysis buffer (Promega) 將細胞刮下來。離心 13000 rpm 30 秒後, 取 5 μ l 的上清液到黑色閉光的 96-well plate 中, 之後每個 well 都加入 50 μ l 的 luciferase substrate (Promega), 利用冷光讀盤儀測定其 luciferase 的活性。而所得到的 luciferase activity 的值, 會用 β -galactosidase 的表現量作為標準化的依據。

2-10、細胞核萃取物的製備和 NF- κ B DNA binding activity

將細胞種在 1.5 ml 的試管中, 加藥反應適當時間後, 以 2000 rpm 離心 3 分鐘, 吸去上清液, 然後以 PBS 清洗細胞。接著將細胞混合在 30 μ l buffer A (10 mM HEPES, pH7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT and 0.2 mM PMSF), 震盪 15 秒, 靜置冰上反應 10 分鐘, 2000 rpm 離心 2 分鐘, 底部 pellet 重新混合在 buffer C 中 (20 mM HEPES, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF), 靜置冰上反應 30 分鐘, 14000 rpm 離心 2 分鐘, 收集上清液即為細胞核萃取物。之後, 取 2 μ g 的細胞核萃取物以 NF- κ B DNA binding assay kits (TransAM NF κ B, Active Motif) 的廠商步驟來測定其和 DNA 結合的能力。

2-11、MTT 測定

將細胞養在 96-well plate 中, 待細胞長滿後, 加入 5 mg/ml 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5 -diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) solution 培養一小時, 此時粒線體中琥珀酸去氫酶會將 MTT 之 tetrazolium 轉為藍色之產物 MTT formazan,

並堆積在細胞內，且 formazan 形成量與粒線體去氫酶活性呈正比。之後吸乾上清液，加入 DMSO 溶解 MTT formazan，再測定吸光值($OD_{550}-OD_{630}$)。因為 MTT 的測定值代表粒線體的活性，因此可間接作為細胞存活率的指標。

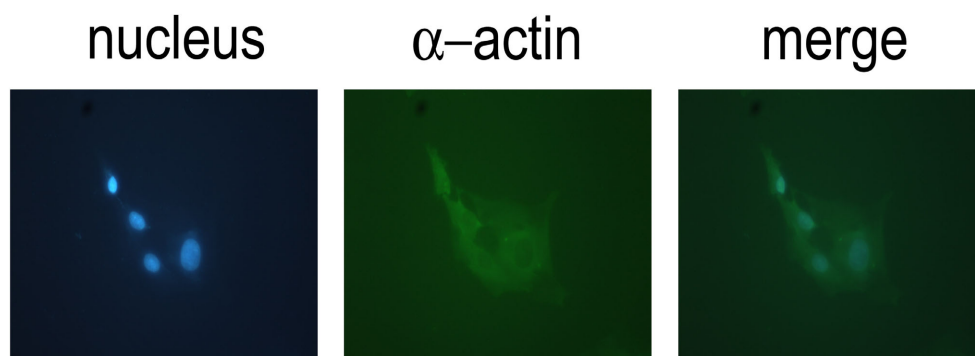
2-12、資料分析

所有資料皆以平均值±標準誤差 (mean ± S.E.M.) 表示，統計資料以 Student's t-test 分析是否為有意義差異，* $p < 0.05$ 為有顯著差異。

三、研究結果與討論

1、血管平滑肌細胞型態及純度鑑定

實驗中所使用的血管平滑肌細胞，因為是初級細胞培養，為了解我們所得到的細胞中，是否為血管平滑肌細胞或是雜有其他的細胞，我們利用血管平滑肌細胞特有的 marker， α -actin，來鑑定初級細胞的型態和純度。我們同時也使用 hoechst 33328 來染細胞核。從螢光顯微鏡的圖中可以清楚的看見，被 hoechst 33328 染到的細胞核呈現出藍色，而 α -actin 則呈現出綠色，將兩張圖合併在一起，可以發現幾乎所有的細胞都含有 α -actin。在本次實驗用的多批細胞中，每一批的純度都大於 98%。



綠色的部分是染血管平滑肌細胞特有的 marker-- α -actin (圖中)，藍色的部分是染細胞核(圖左)，而圖右則是前兩圖的合併。這張圖都是相同的細胞。可清楚看出幾乎所有的細胞都是血管平滑肌細胞。

2、Statin 抑制 LPS 所促進的 NO 及 iNOS 生成，但是會促進 IL-1 β 所誘發的 NO 及 iNOS 生成

首先先確定 LPS、IL-1 β 和 IFN- γ 促進動脈平滑肌細胞生成 NO 的能力。利用 Griess reaction，測量培養液中 nitrite 的含量來代表細胞釋放 NO 的能力，結果發現 (圖 1)，LPS (10 μ g/ml) 處理 24 小時後有明顯 nitrite 的產生。相較於 LPS 產生的 3.5 倍刺激 nitrite 產生作用，IL-1 β (10 ng/ml) 之反應較弱，約只增加 2.3 倍。IFN- γ 本身並不會誘使血管平滑肌細胞產生 nitrite，但是當 IFN- γ 和 LPS 合用時卻有加成性的促進效果。此時，nitrite 的生成量可達 9 倍之多。結果顯示 IFN- γ 並不會去影響 IL-1 β 的 nitrite 產生量。

Statin 本身不會促使平滑肌細胞產生 nitrite，但是前處理 statin 30 分鐘，再給予 LPS (10 μ g/ml)，發現平滑肌細胞的 nitrite 生成會受到抑制。從圖 2A 中發現，不同的 statin 對 LPS 所誘發的抑制效果不同，其中，pravastatin 幾乎沒有抑制的能力，其餘 statin 的抑制能力則為：fluvastatin > lovastatin > atorvastatin。不論各種 statin 的抑制能力如何，都具有濃度正相關性 (dose-dependent) 的抑制作用，在 30 μ M 時效果最為顯著。fluvastatin 在 30 μ M 的濃度下可以將 nitrite 的釋放降低為對照組的

30%。當 LPS 和 IFN- γ 合併使用時，亦可同樣看到 statin 抑制 nitrite 的結果 (圖 2B)。在上述這些藥物的處理狀況下，經 MTT assay 證實並不會影響血管平滑肌細胞的存活率(結果未列出)。

同樣是 NO 的促進劑，IL-1 β 和 statin 合用時反而有相反的結果 (圖 3A) 在 IL-1 β 的刺激下，statin 反而會促進 NO 的表現。前處理 statin 30 分鐘，使 IL-1 β 誘發的 NO 生成更為增加，而且濃度越高效果越明顯。在四種 statin 中，促進的效果依舊是 fluvastatin > lovastatin > atorvastatin > pravastatin，雖然 pravastatin 也對 IL-1 β 有促進的效果，但是要在高濃度 (100 μ M) 下才有效果。而上述實驗，同樣經 MTT assay 證實 statin 在測試濃度下不會影響平滑肌細胞存活率。此外，statin 加強 IL-1 β 促使 NO 釋放的作用在 IFN- γ 合用時仍然存在 (圖 3B)。

利用 Western blot 測定 iNOS 蛋白表現量也可看到 (圖 4)，以 LPS、IL-1 β 刺激所表現的 iNOS，分別會受到 lovastatin 及 fluvastatin 的抑制或促進。IFN- γ 合併使用時，可增加 LPS 所誘導的 iNOS 蛋白表現，而此時 lovastatin 及 fluvastatin 對 iNOS 的抑制作用仍然存在。

接著在基因轉錄的實驗，藉由細胞轉染和 DNA binding activity 可以發現，在 NF- κ B 轉錄因子的活性上依然可見 statin 對於 LPS 和 IL-1 β 的訊息傳遞有相反的調控。在這部分的實驗，我們選用之前實驗證實效果最強的 fluvastatin 來做代表。首先在細胞轉染測定 κ B 報導基因活性實驗中，當我們以 LPS 或是 IL-1 β 來活化 κ B-Luc 的時候，fluvastatin 可以分別抑制及促進 κ B-Luc 的表現 (圖 5A)；而在 DNA binding activity 的實驗，我們發現 LPS 在加藥處理 1 小時後，對於 NF- κ B DNA binding activity 的促進效果最強，之後在加藥處理 3 小時後其能力略有減低。IL-1 β 對於 NF- κ B DNA binding activity 的促進效果則維持到 3 小時。但不論作用時間為 1 小時或 3 小時，fluvastatin 依舊保有上述的特性，會抑制 LPS 所促發的 NF- κ B DNA binding activity，但增加 IL-1 β 所促進的 NF- κ B DNA binding activity (圖 5B)。綜合以上的實驗發現，statins 會以不同作用方式，分別去抑制或促進 LPS、IL-1 β 所誘導的 NO 表現，是因為 statins 會對這兩種刺激物活化的 NF- κ B DNA binding activity 和轉錄的能力有相反的作用所致。

3、Statin 會促進 COX-2 及其產物的表現

在大鼠的血管平滑肌細胞實驗中發現，單獨給予 statin 可促使血管平滑肌細胞產生大量的 PGE₂ (圖 6A)。四種 statin 的作用以 fluvastatin 的效果最為顯著，為 fluvastatin > lovastatin > atorvastatin > pravastatin。大鼠的血管平滑肌細胞亦可分泌 PGI₂，而 lovastatin 及 fluvastatin 一樣可以增加 PGI₂ 的釋放，且增加倍數與 PGE₂ 相當 (圖 6B)。與 LPS 及 IL-1 β 所刺激產生的 PGE₂ 及 PGI₂ 比較可看出 fluvastatin 的作用更為顯著。

利用 Western blot 測定 COX-2 蛋白表現量可看到 10 μ M 或 30 μ M lovastatin，fluvastatin，atorvastatin 可促進 COX-2 的表現量增加，且有濃度正相關性的特性 (圖 6C)。但 pravastatin 在 100 μ M 濃度則無此作用。Statin 刺激 COX-2 的表現作用和其促進 prostaglandins 釋放的實驗結果相符合。此外，lovastatin (30 μ M) 在加藥 3 小時後便可以看到 COX-2 的表現增加，約在 18 小時達到最大反應。

我們也在人的血管平滑肌細胞以 30 μ M lovastatin 及 fluvastatin 測試對 PGE₂ , PGI₂ 及 TXB₂ (為 TXA₂ 的穩定代謝物) 的釋放作用。結果顯示在此細胞以增加 PGI₂ 的釋放量最為顯著, PGE₂ 次之, 而 TXB₂ 無明顯的釋放 (圖 7), 由此可見不同 prostaglandin 及 thromboxane 種類及其釋放量可能和動物物種不同而有所差別。

4、Statin 誘使大鼠及人類平滑肌細胞產生 HO-1

在大鼠的實驗中發現 (圖 8, 上圖), 30 μ M lovastatin 會誘使血管平滑肌細胞表現 HO-1, 且在 6 小時達到最大反應, 然後隨時間稍有減少。同樣的, 我們在人類的血管平滑肌細胞中也發現處理 lovastatin, fluvastatin 24 小時會促進 HO-1 表現 (圖 8, 下圖)。

5、Statin 會抑制 MMP-2 及 MMP-9 的活性

從 zymography 實驗發現, 30 μ M lovastatin 會抑制大鼠血管平滑肌細胞本身 MMP-9 和 MMP-2 的活性 (圖 9)。在利用細胞激素 IL-1 β 刺激下, 大鼠血管平滑肌細胞所增加 MMP-2 及 MMP-9 的活性也會受到 lovastatin 的抑制。

6、討論

因為 statin 會抑制膽固醇的生成, 具有良好的降血脂的作用, 而且副作用相較於其他降血脂藥物為低, 所以在冠心病、動脈硬化等和高血脂有關的疾病中, statins 都是臨床上倚重的藥物。Statin 降膽固醇的效果和劑量有關, 適當劑量可降低總膽固醇及 LDL 膽固醇達 25-35%, 另外可適當增加血中 HDL 濃度。最近的臨床試驗已證明, 不論有冠狀動脈疾病的病人血中膽固醇有或沒有上升, statins 可降低他們發生缺血性腦中風的機率將近 30%。Statin 具有抗粥狀動脈硬化及抗血栓形成的特性, 可能是這類藥物可降低腦血管疾病的藥理基礎。此外, 研究顯示 statin 穩定粥狀動脈硬化斑塊的機轉也是多方面的, 其中包含降低巨噬細胞活化, 減少 foam cell 的形成, 降低 tissue factors 的表現, 降低 cytokine 釋放, 以及抑制平滑肌細胞增生和活化等作用。除了減少動脈硬化斑塊之大小外, statin 尚可減緩其破裂、出血、及血栓產生之機會。也有報導指出, statin 具有抗血小板凝集和促進血栓溶解等作用, 因此可降低血栓之傾向。

平滑肌細胞在動脈硬化上扮演了相當重要的角色, 其增殖、移行、inflammatory factors 和 collagens 的釋放, 都加速了動脈硬化及其他新血管疾病的病程, 因此我們很有興趣的來探討 statin 對於平滑肌細胞的影響, 希望能因此更加了解 statins 在治療上的機轉。

在此篇實驗中, 我們發現 statin 具有直接調控血管表現 NO、prostaglandins、HO-1 和 matrix metalloproteinase 的作用。

在正常的血管中, 內皮細胞會表現 eNOS 而釋放 NO 使血管得以舒張, 但是在動脈硬化發生的部位, 該處血管的內皮細胞會受到損傷、甚至剝落, 如此 eNOS 的保護作用就不見了, 使得動脈收縮而血壓上升, 此外, 也會使血小板活化易形成

血管栓塞 (thrombosis)，而且會引發發炎反應並且釋放細胞激素，例如IL-1 β ，吸引免疫細胞黏附到血管上並且浸潤血管壁、促使平滑肌細胞增生及潛移。在我們的實驗中發現，當血管平滑肌細胞在受到細胞激素IL-1 β 的刺激下， statin 會大量增加IL-1 β 所誘發的 iNOS 表現，使血管平滑肌細胞可以放出更多NO，以取代eNOS 的角色來保護血管。這個結果顯示， statin 可以避免血管在受到傷害時過度收縮而血壓上升、抑制血小板的凝集和減少白血球黏附到血管上的機會而避免動脈硬化斑的形成。

當血管受到細菌感染時，例如敗血症，血管會受到細菌內毒素 LPS 的刺激，而使血管壁釋放過量的 NO，引發血壓降低及正常組織細胞死亡，甚至會發生敗血性休克及多重器官衰竭。有趣的是 statin 對 LPS 誘導的 NO 反應不同於 IL-1 β 是抑制的效果。因為在敗血症的情況下 LPS 已因產生大量的 NO 而導致休克，此時病人血壓過低，因此降低 NO合成對休克的病人是必要的治療對策。本篇實驗發現， statin可對 LPS 所誘發血管平滑肌細胞產生過量 NO 的情形具有抑制的效果，因此 statin 可以降低血管受到感染時嚴重發炎反應的傷害，避免全身性發炎反應的產生。由對這兩種不同刺激物誘發 iNOS/NO 反應相反的結果，更加印證 statin 確實對不同心血管的疾病是有助益的。在我們的實驗中也證實 statin 對於 LPS 和 IL-1 β 的訊息傳遞途徑的影響可能是不同的，因為 statin 會藉由抑制 NF- κ B 和 DNA binding activity 及轉錄活性來抑制 LPS誘發過量 NO 產生; 反之 statin 會協同 IL-1 β 產生適量 NO以達到舒張血壓及維持血液恆定的功效。 Statin 具有調節血管中，NO供需平衡的能力，因此將來我們希望能夠更進一步探討 statin 對 LPS 和 IL-1 β 訊息傳遞途徑中分子作用機轉上的差別，能讓我們更透徹明白 statin 多元性的作用，提供 statin 作為將來朝向新臨床運用的開發。

statin也會促使血管平滑肌細胞表現 COX-2，使其釋放 prostaglandins，例如在大鼠的平滑肌細胞以 statin 處理時會增加 PGI₂ 及 PGE₂ 釋放，而人的平滑肌細胞則釋放 PGI₂ 較為顯著。雖然因物種不同而釋放出不同程度的prostaglandin，但是它們相同的作用都是去維持調控血管的張力，並且抑制血管平滑肌細胞的增生，所以可以避免血管的狹窄化，保持血流通暢。由於 statin 不改變 TXA₂ 釋放，因此應有利於血管放鬆。

在HO-1-/-的老鼠中發現，其動脈硬化的病程會加速進行，觀察這些老鼠發現其血管內膜增生 (neointima) 現象較正常老鼠明顯，使血管容易阻塞而引發血管疾病。而在人類的動脈硬化斑，當初期病程的時候，巨噬細胞和內皮細胞會大量表現HO-1，而在病程晚期時則是大量表現在 foam cells 和血管平滑肌細胞上。此外，在大量氧化低密度脂蛋白的地方，也伴隨會有 HO-1 的大量產生。因為 HO-1也可以減緩低密度脂蛋白氧化的程度，因此一般認為 HO-1在動脈硬化發生時扮演了重要的保護角色。此外，HO-1對於動脈硬化還有許多助益，它會藉由 bilirubin 和 biliverdin 來抑制單核球移行到血管壁，和抑制白血球貼附到血管壁 (Ishikawa & Maruyama, 2001)。HO-1在臨床上確實有抑制動脈硬化產生的意義和功效。而我們的實驗中第一個發現不論是大鼠或是人類的平滑肌細胞 statin 都會促使平滑肌細胞表現 HO-1，因此推測藉由 HO-1 表現應參與 statin 減緩血管壁在受到傷害時所產生的發炎反應，抑制平滑肌細胞的增生，及減緩動脈硬化病程的作用機制之

中。

在動脈硬化晚期的時候，浸潤到血管壁的巨噬細胞會分泌出 MMP，誘使更多的免疫細胞浸潤到血管壁，並且會使平滑肌細胞潛移形成 neointima，使血管壁組織型態改變 (remodeling)。在動脈硬化斑的部分，MMP 會分解斑塊外由纖維結締組織所構成的屏障，使動脈硬化斑中的低密度脂蛋白等活性分子釋出到血管中，而產生進一步的凝血反應，如此血管中有小血塊的存在，而容易引起栓塞和中風的發生。目前，對於動脈硬化晚期的病人，新的臨床治療方針也轉向維持動脈硬化斑的穩定，而非簡單的想去減少阻塞的情況，因為這樣反而可能造成動脈硬化斑的不穩定而剝落，形成小血栓而造成腦中風。本次實驗也發現 statin 對於 MMP 有抑制的效果，可以減緩動脈硬化晚期病程的惡化，因此 statin 在穩定動脈硬化斑的方面也是相當具有潛力的藥物。

從上述實驗結果可以發現，statin 可以有效控制動脈硬化各個病程的進展，維持血管的平衡狀態，並且可以減緩血管壁的發炎反應，以改善心血管疾病的病情，降低其病發的發生及致死率。因此，statin 在臨床治療上可以成為心血管疾病的一大利器。動脈硬化如同其他的心血管疾病一樣，都是由種種複雜的病因所致，而且大部分的患者都沒有明確的主因，因此他們的治療方法只能從緩和症狀下手。Statin 除了降血中脂肪的功能外，還有調節 NO、prostaglandins、HO-1 和 MMP 釋放等多重功效，可以有效且全方位的治療像動脈硬化這類的疾病。同時，我們實驗得知不同的 statin 對不同的病因效力不同，因此將來是否我們也可依病人的病情不同，而可予適當的 statin? 這是一個值得繼續探討的問題。例如，對於血脂正常但局部發炎情況嚴重的病人，我們可以選擇使用降血脂能力低但抗發炎能力強的 fluvastatin，而可以達到個人化給藥的設計。但是對於 statin 的機制和其訊息傳遞的調控尚需更進一步的認識和研究，以期可以更好、更確實的使用 statins 來治療心血管疾病，並且可以利用 statin 的知識來開發更安全有效的新藥。

四、結論與應用

心血管疾病一直名列國人的十大死因，是致病率高且併發症複雜的疾病，因此在臨床治療上一直是相當棘手的問題。這次實驗所評估的藥物，statin，是膽固醇生成酵素 HMG-CoA reductase 的抑制劑，因而可以降低血中膽固醇，減少動脈病變發生的機率。NO，PGE₂ 及 PGI₂ 均有文獻指出可以改善血流，在此篇實驗中，我們發現了 statin 一些和降血脂無關的保護血管能力，包括了 NO、prostaglandins、HO-1 和 matrix metalloproteinase 的調控。這些新的發現相信應貢獻於抗發炎、血管舒張、抑制血管平滑肌細胞增生和穩定動脈硬化斑的作用。同時此篇實驗對將來研發 statin 在心血管疾病方面新的臨床治療用途是有所助益的，例如最近 statin 在缺血性中風病人的臨床試驗就極受重視。

五、參考文獻

- Galis, Z.S. and Khatri, J.J. (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.* 90: 251-262.
- Glass, C.K. and Witztum, J.L. (2001) Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 104: 503-516.
- Hecker, M., Cattaruzza, M. and Wadreas, A.H. (1999) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gen. Pharmacol.* 32: 9-16.
- Ishikawa, K and Maruyama, Y. (2001) Heme oxygenase as an intrinsic defense system in vascular wall: implication against atherogenesis. *J. Ather. Thromb.* 8: 63-70.
- Laufs, U. and Liao, J.K. (2000) Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends in Cardiovascular Medicine* 10: 143-148.
- Lloyd-Jones, D.M. and Bloch, K.D. (1996) The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu. Rev. Med.* 47: 365-375.
- McFarlane, S.I., Muniyappa, R., Francisco, R., Sowers, J.R. (2002) Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond, *J. Clin. Endo. Meta.* 87: 1451-1458.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142.
- Nathan C. (1997) Inducible nitric oxide synthesis: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* 100: 2417-2423.
- Needleman, P. and Isakson, P.C. (1997) The discovery and function of COX-2, *J. Rheumatol.* 24 (suppl 49): 6-8.
- Otterbein, L.E., Soares, M.P., Yamashita, K. and Bach, F.H. (2003) Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 24: 449-455.
- Werner, N., Nickenig, G. and Laufs, U. (2002) Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res. Cardiol.* 97: 105-116.

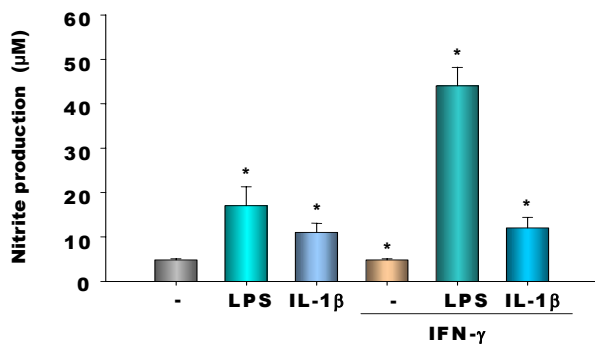


圖1. 以 LPS (10 µg/ml), IL-1β (10 ng/ml) 或和 IFN-γ (10 ng/ml) 合用，處理大鼠血管平滑肌細胞 24 小時，刺激血管平滑肌細胞產生 nitrite。

*表示 nitrite 釋放與對照組相較在統計上有有意義的差別。

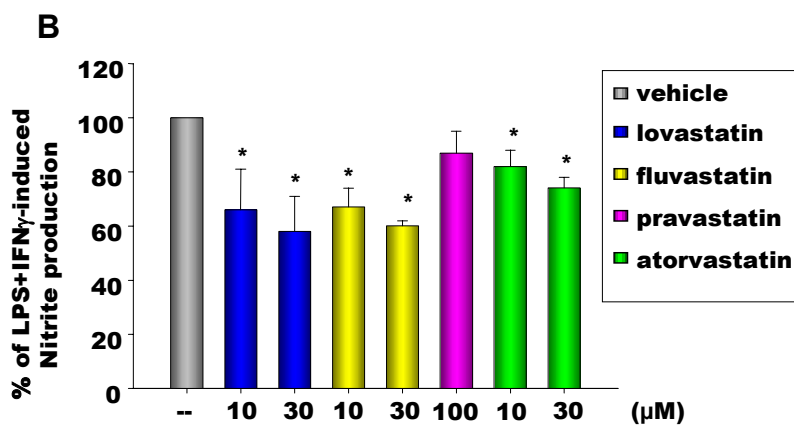
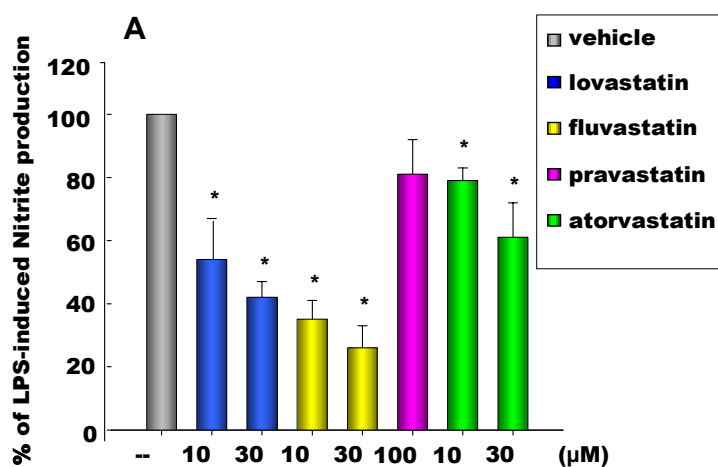


圖2. 將大鼠血管平滑肌細胞前處理 statin 30 分鐘，再給予 LPS (10 µg/ml) 和 IFN-γ (10 ng/ml) 24 小時，看不同 statin 抑制 LPS/ IFN-γ 所誘發細胞釋放 nitrite 能力的影響。

*表示 nitrite 釋放與對照組 (vehicle 處理組) 相較在統計上有有意義的差別。

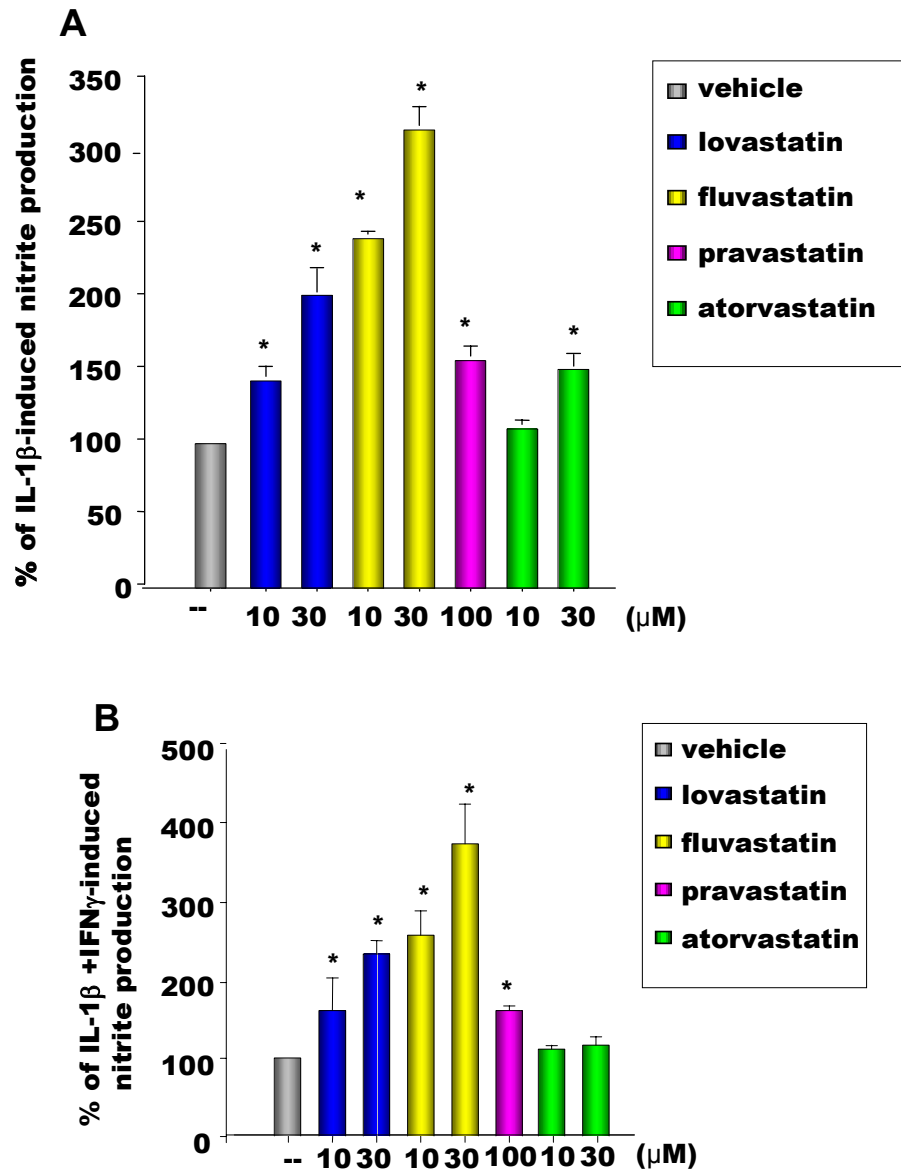


圖3. 將大鼠血管平滑肌細胞前處理 statin 30 分鐘，再給予 IL-1 β (10 ng/ml) 和 IFN- γ (10 ng/ml) 24 小時，看不同 statin 對 IL-1 β / IFN- γ 所誘發細胞釋放 nitrite 能力的影響。

*表示 nitrite 釋放與對照組 (vehicle 處理組) 相較在統計上有意義的差別。

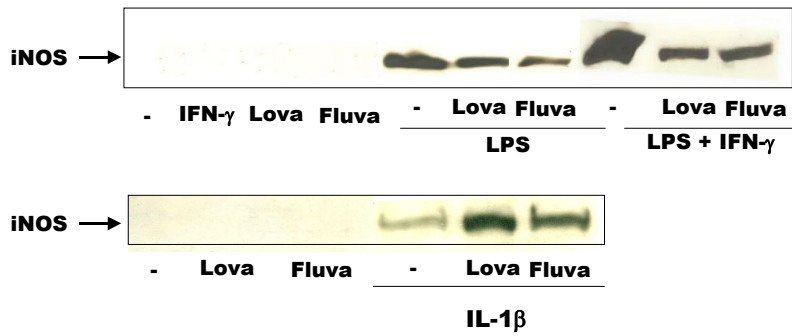


圖4. 以 LPS (10 μ g/ml) , IL-1 β (10 ng/ml) , IFN- γ (10 ng/ml) , lovastatin (30 μ M) 或 fluvastatin (30 μ M) 處理大鼠血管平滑肌細胞 24小時，再以西方點墨法偵測 iNOS 的表現量。本圖代表經重複三次實驗後類似的結果。

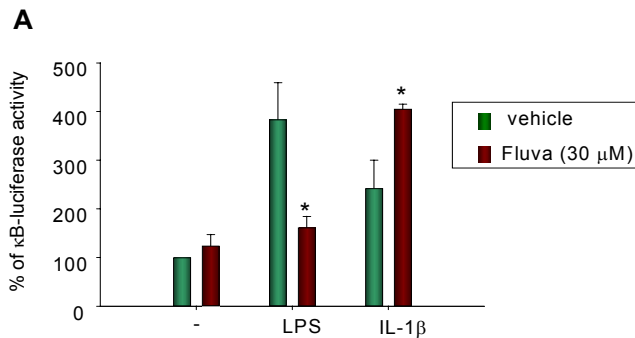


圖5A. 將已轉染 κ B-Luc 載體之大鼠平滑肌細胞前處理 fluvastatin 30分鐘後，給予 LPS (10 μ g/ml) 或 IL-1 β (10 ng/ml) 刺激 6 小時，再以 κ B-Luc activity / β -galactosidase expression 來表示 NF- κ B 促進轉錄的能力。*表示 fluvastatin 在統計上有有意義的影響 LPS 或 IL-1 β 促進 NF- κ B 轉錄的能力。

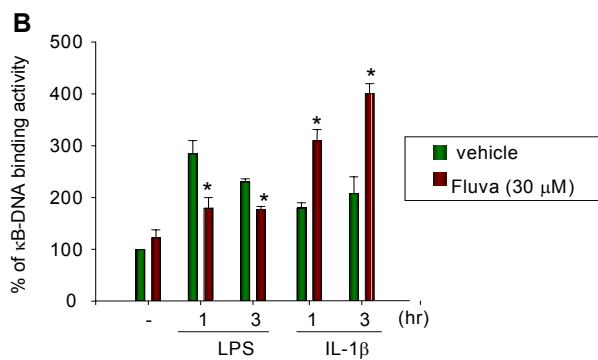


圖5B. 將大鼠平滑肌細胞前處理 fluvastatin 30 分鐘,再給予 LPS (10 μ g/ml) 或 IL-1 β (10 ng/ml) 刺激1、3小時，再以NF- κ B DNA binding assay kit 來測定 NF- κ B 對DNA結合的能力。*表示 fluvastatin 在統計上有有意義的影響 LPS 或 IL-1 β 促進 NF- κ B 轉錄的能力。

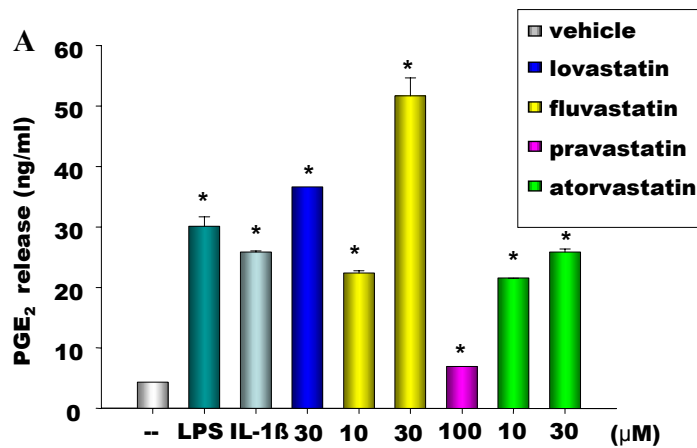


圖6A. 以 LPS (10 μ g/ml), IL-1 β (10 ng/ml) 或 statin 分別處理大鼠血管平滑肌細胞 24 小時, 再以 EIA 偵測 PGE₂ 的釋放量。*表示 PGE₂ 釋放與對照組 (vehicle 處理組) 相較在統計上有有意義的差別。

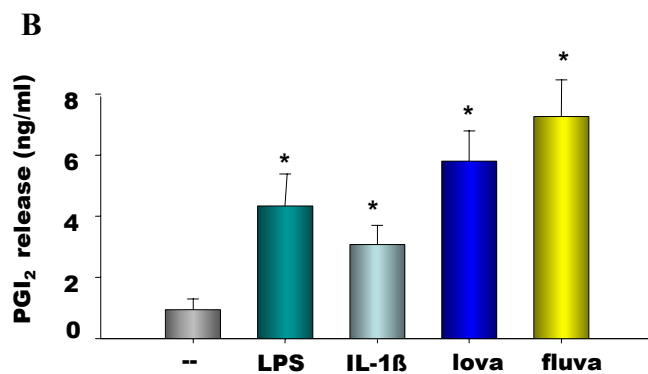


圖6B. 以 LPS (10 μ g/ml), IL-1 β (10 ng/ml), lovastatin (30 μ M) 或 fluvastatin (30 μ M) 分別處理大鼠血管平滑肌細胞 24 小時, 再以 EIA 偵測 PGI₂ 的釋放量。

*表示 PGI₂ 釋放與對照組 (vehicle 處理組) 相較在統計上有有意義的差別。

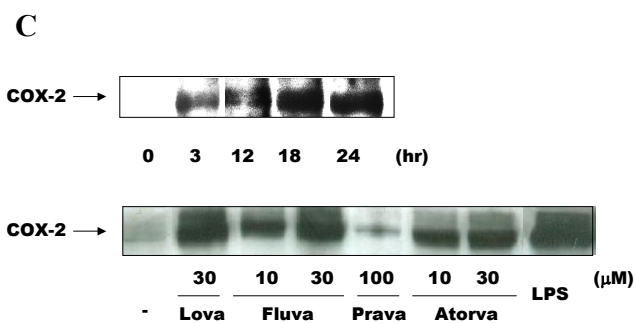


圖6C. 上圖是將大鼠血管平滑肌細胞處理 lovastatin (30 μ M) 不同時間後測定所產生 COX-2 的表現量; 下圖是不同 statin 和 LPS (10 μ g/ml) 處理大鼠血管平滑肌細胞 24 小時後測定 COX-2 的表現。本圖代表經重複三次實驗後類似的結果。

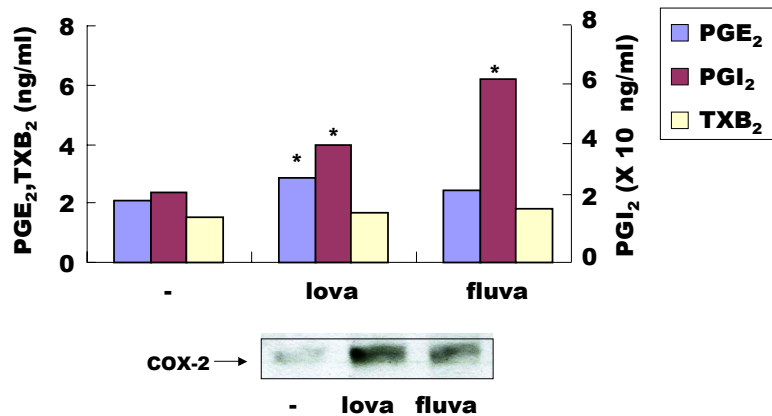


圖7. 上圖是人類血管平滑肌細胞分別處理 lovastatin (30 μ M) 和 fluvastatin (30 μ M) 24 小時後測定所產生 PGE₂，TXB₂ 和 PGI₂ 的表現量; 下圖則是 COX-2 的表現量，代表經重複三次實驗後類似的結果。

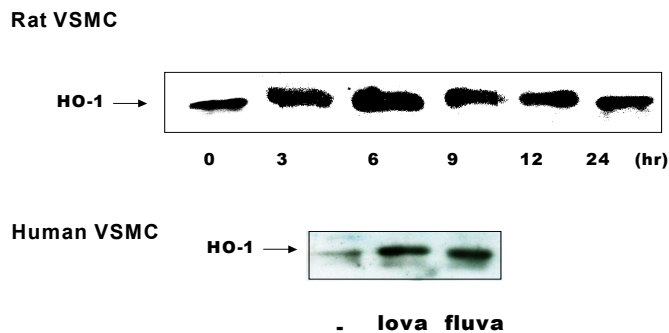


圖8. 上圖是將大鼠血管平滑肌細胞處理 lovastatin (30 μ M) 不同時間後測定所產生 HO-1 的表現量; 下圖是人類血管平滑肌細胞分別處理 lovastatin (30 μ M) 和 fluvastatin (30 μ M) 24 小時後測定所產生 HO-1 的表現量。本圖代表經重複三次實驗後類似的結果。

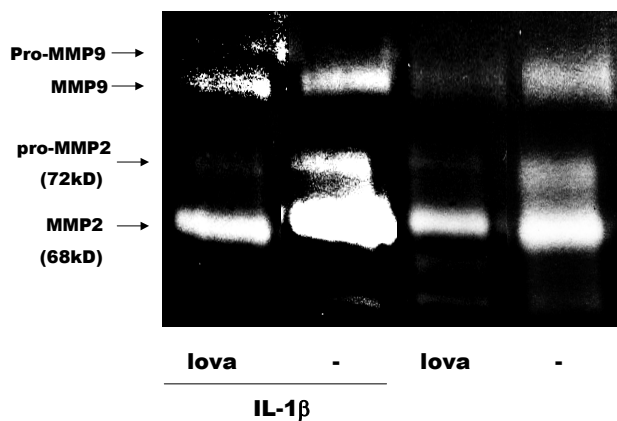


圖9. 以 lovastatin (30 μ M) 單獨加藥或和 IL-1 β 合用 24 小時來刺激大鼠血管平滑肌細胞，觀察其對 MMP-2 及 MMP-9 的活性影響。本圖代表經重複三次實驗後類似的結果。

評語及建議事項

1. 本著作研究 STATIN 類藥物對血管平滑肌細胞之作用，包括 NITRITE 之產生及其對 PGE2、TXB2、MMP2 的影響。
2. 本著作證實 STATIN 有降血壓外，也有抗發炎作用，本著作具創見性。
3. 著作之結果，對 Internal Center 應提出。