

不同礦物質組成之深層海水濃縮液對心血管疾病改善應用之探討研究

潘俊旭¹、曹書萍²、吳介信^{1,*}

¹ 臺北醫學大學 藥學系

² 臺北醫學大學 生技醫療產業研發博士學位學程

氣球擴張術 (balloon angioplasty ; BA) 是一項運用於治療急性動脈阻塞 (例如心肌梗塞) 的心臟內科手術，但卻有高比例的患者術後產生血管再阻塞 (restenosis) 的併發症¹⁻⁴。血管再阻塞是血管壁受損後的異常修復現象，其成因可歸納為血管內膜增生 (intimal hyperplasia) 和結構性重整 (remodeling)⁵⁻⁸。其中，以血管內膜增生的成因為多數學者所採納。而血管平滑肌細胞的過度增生與遷移在其中扮演最重要的病理角色⁹⁻¹⁰，因此成為開發預防藥物或保健食品的潛在評估標的。

海洋資源豐富，而深層海水相關的產品開發應用更是目前熱門的研發方向。除已廣泛的被應用於農漁業養殖、化妝品、飲料業外，在保健產品和藥物的開發亦深具市場潛力和經濟價值。海水富含多種有機或礦物質成分，其中又以鎂離子的保健功效最被眾所熟知和研究關注。眾多研究亦顯示，鎂離子具有減少罹患多種疾病 (例如高血壓、動脈粥狀硬化症、心肌梗塞、糖尿病和癌症) 的潛力。而研究也證實鎂離子具有抑制人類冠狀動脈平滑肌細胞增生的功效，其作用機制牽涉包括細胞內生長因子及其接受器和下游分子傳遞途徑，以及細胞週期和細胞凋亡等眾多分子在內的基因調控¹¹。這結果更支持了鎂離子在抑制血管內膜增生的應用潛力。同樣地，飲用深層海水也被指出提供多種心血管保護的功效與作用，包括預防高血脂、動脈粥狀硬化和高血壓，以及抑制血管內膜增生等功效¹²⁻¹⁴。

近期，我們針對不同礦物質組成之深層海水濃縮液(DSC)進行了一系列活性評估，以瞭解除了鎂離子外，深層海水中是否存在其他具備心血管保護的活性成分，以及不同產品製程對活性的影響。在細胞增生實驗(MTT assay)中，發現深層海水的酒精萃取液(DSC-DOM)對抑制血管平滑肌細胞增生的效果最顯著，比正對照組(氧化鎂; $MgCl_2$)效果更佳。而包括高鎂無鈣濃縮液(DSC-DeCa)、高鈣高鎂濃縮液(DSC-HiCa)和減壓濃縮液(DSC-RP)在內的其他組別，其抑制效果與正對照組相當(圖 1)。而經進一步分析不同 DSC 對細胞週期的調控影響指出， $MgCl_2$ 主要是造成細胞生長抑制(停滯於 G0/G1 期)，並稍具細胞凋亡(Sub-G1 比例增加)作用。而 DSC-DeCa 則主要導致細胞凋亡，但有部分促細胞停滯的效果。DSC-HiCa 只有促進細胞凋亡的能力。而 DSC-RP 和 DSC-DOM 則同時具備抑制細胞生長和促進細胞凋亡的能力(圖 2)。另一方面，細胞遷移分析法(wound healing assay)的實驗中，則顯示 $MgCl_2$ 和所有 DSC 產品皆具有顯著抑制細胞遷移的類似功效(圖 3)。而在與細胞增生或遷移相關之分子途徑(PI3K-AKT、ERK1/2-MAPK 和 AMPK)的調控影響方面(圖 4)， $MgCl_2$ 和不同 DSC (除 DSC-DOM 組外) 皆可顯著抑制血清所活化的 ERK1/2-MAPK 分子途徑，以及促使 AMPK 活化。而活化 AMPK 的效果，又以 DSC-HiCa 和 DSC-RP 的作用突出。但 DSC-DOM 在測試的濃度下，對所有評估的分子皆無明顯的調控效果。我們也利用大鼠頸動脈氣球擴張術的活體評估模式來評估不同 DSC 預防血管內膜增生的效果(圖 5)。組織病理學的分析中，負對照組(RO 和 EtOH 組；溶媒組) 的血管內膜增生的嚴重性指標(ratio of neointima-to-media area ; N/M ratio) 做為比較的基準。而投與 $MgCl_2$ 、DSC-DeCa 或 DSC-HiCa 後，其 N/M ratio 有較 RO 組減少的趨勢。而 DSC-RP 組則似乎沒有顯著抑制效果。然而，投與 DSC-DOM 後，其 N/M ratio 較 EtOH 組也有降低的趨勢，且其 N/M ratio 也是所有 DSC 組別中最小者。

綜合我們近期的實驗成果顯示，雖然不同 DSC 產品對於抑制血管平滑肌細胞增生與遷移的能力相近。但若進一步探討不同 DSC 產品對細胞生長或細胞週期相關分子的調控差異，則會發現其調控機制或作用強度並不相同。這些差異顯示製程參數的改變(例如溫度或脫鹽方法)確實會影響 DSC 的心血管保護作用，而其中可能原因包括無機離子或有機物活性成分的比例變化或熱失活。綜合相關實驗數據，以投與 DSC-DOM 的抑制效果最為顯著，也深具做為血管支架藥物開發的應用價值。然而，目前其化學組成與作用機制尚未清楚，是未來仍需進一步探討的研究方向。

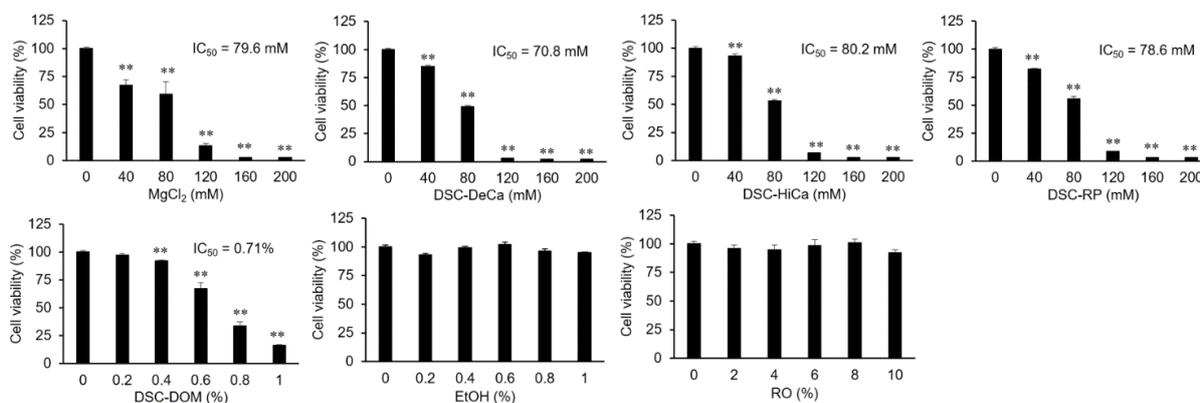


圖 1、海洋深層水濃縮液產品對於抑制血管平滑肌細胞的生長的功效分析。細胞經 DSC 處理 24 小時後進行分析。**代表與未處理組 (0 mM) 間有統計差異。DSC 組別劑量以鎂離子做為濃度計算基準，而 DSC-DOM 組以酒精含量為計算基準。

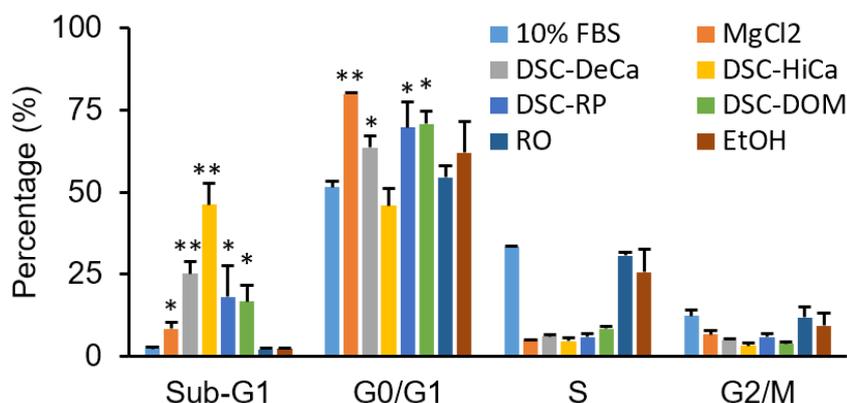


圖 2、海洋深層水濃縮液產品對於調控血管平滑肌細胞之細胞週期影響。細胞經 DSC 處理 18 小時後進行細胞週期分析。*和**代表與對照組間(RO 或 EtOH 組)有統計差異。

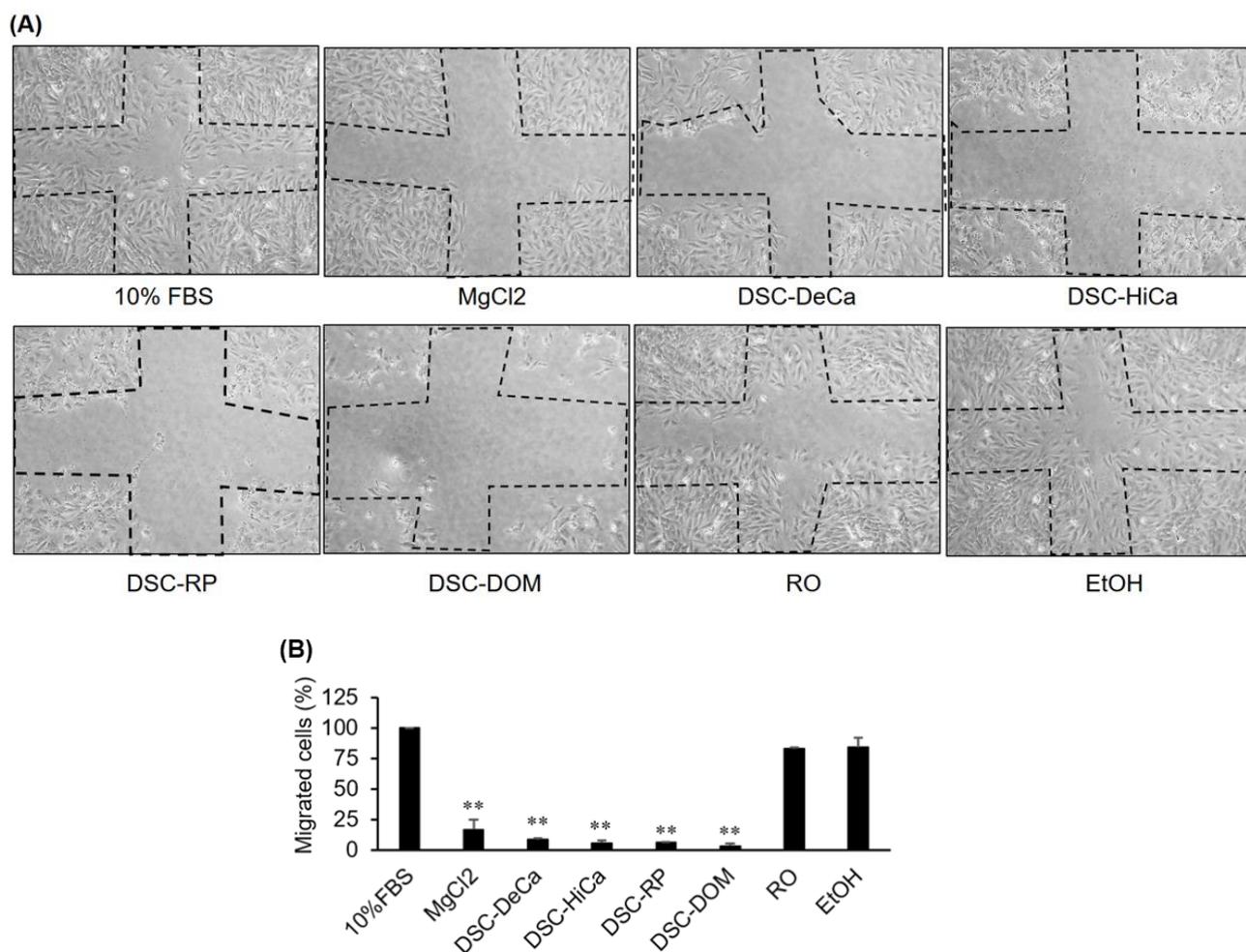


圖 3、海洋深層水濃縮液產品對於抑制血管平滑肌細胞的遷移的功效分析。(A)經過 18 小時後，細胞遷移狀況的影像。虛線內的區域表實驗起始點(0 小時)刮除細胞的範圍。(B)經計算虛線內細胞總數，再統計各組別的細胞相對遷移數目。**代表與溶劑組(RO 或 EtOH) 比具統計上差異。所有 DSC 組別的劑量皆為 80 mM，而 DSC-DOM 則為 1%的濃度。

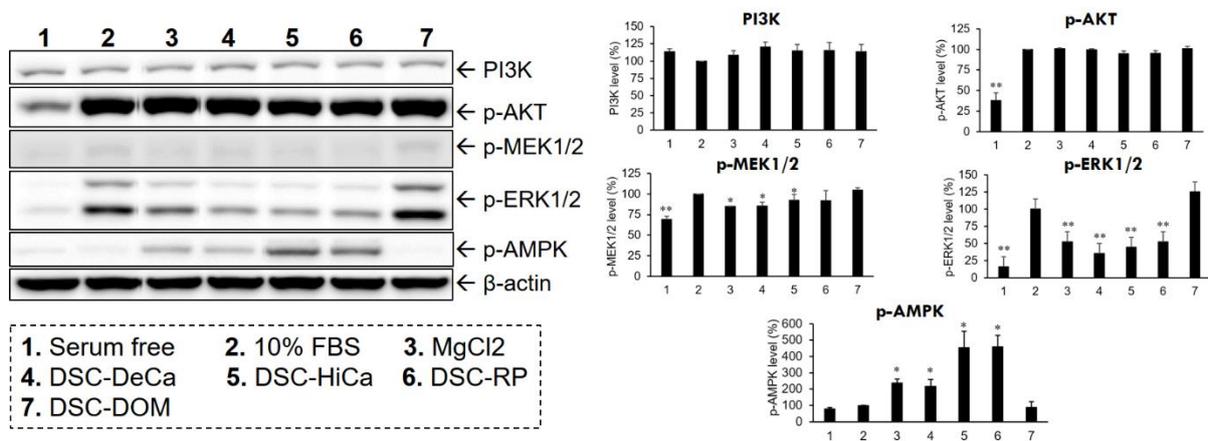
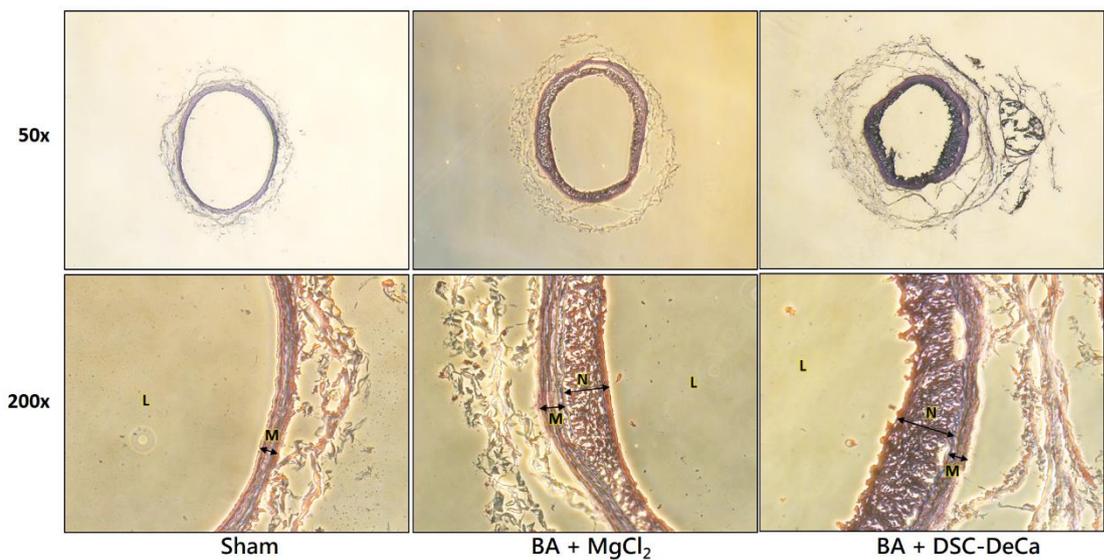


圖 4、海洋深層水濃縮液產品對於細胞增生或遷移相關之分子途徑的調控。細胞經 DSC 處理 15 分鐘後進行分析。*和**代表與對照組 (10% FBS 組) 間有統計差異。



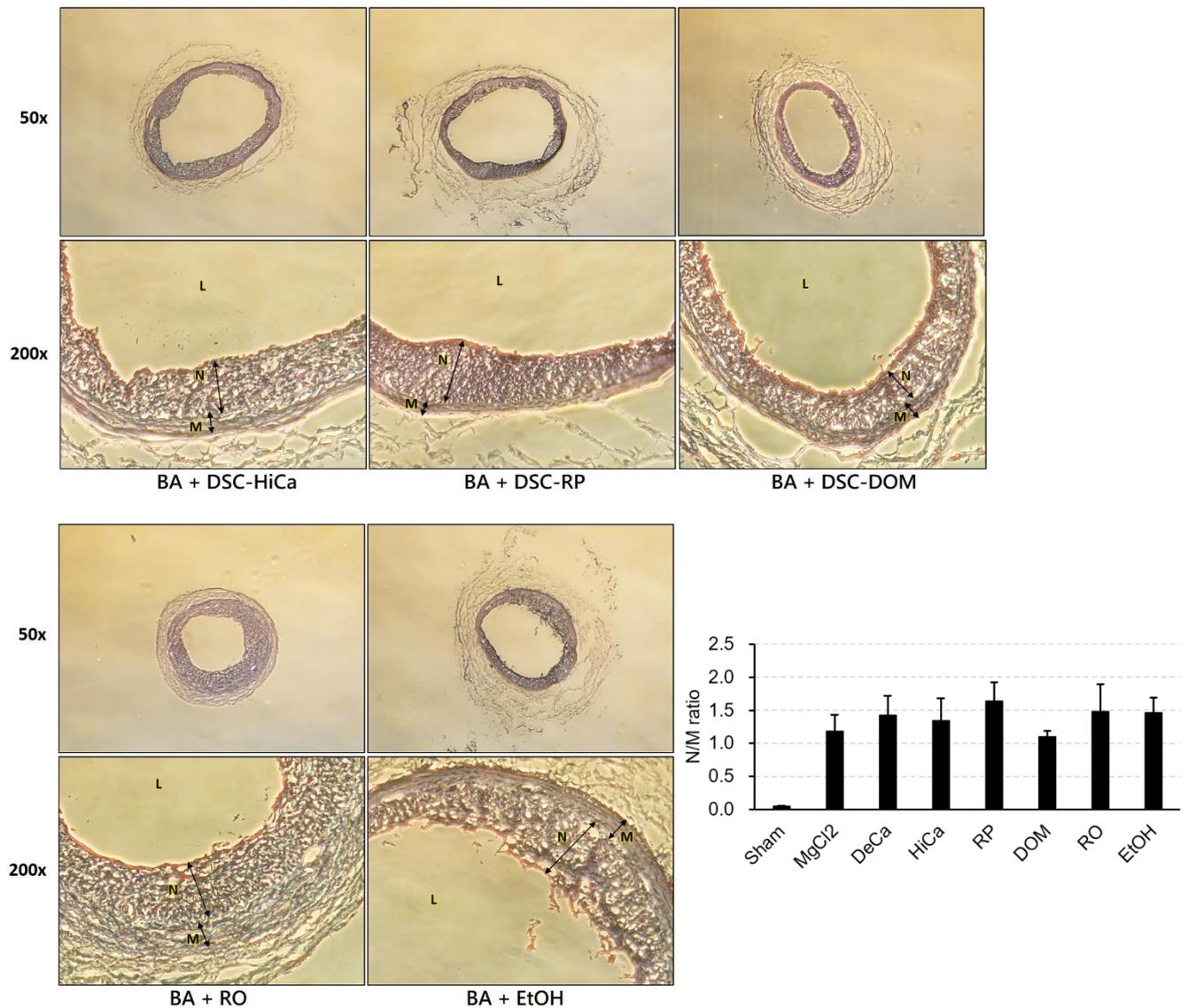


圖 5、大鼠頸動脈組織切片病理學分析。字母 L、M 和 N 代表血管腔 (lumen)、血管中層 (media layer) 和新生內膜層 (neointima layer)。

參考文獻

1. Bell et al., (1992) Initial and long-term outcome of 354 patients after coronary balloon angioplasty of total coronary artery occlusions. *Circulation*. 85(3): 1003-11.
2. Gruentzig et al., (1987) Long-term follow-up after percutaneous transluminal

- coronary angioplasty. The early Zurich experience. *N Engl J Med.* 316(18): 1127-32.
3. Leimgruber et al, (1986) Restenosis after successful coronary angioplasty in patients with single-vessel disease. *Circulation.* 73(4): 710-7.
 4. Sturek et al., (2002) New tools for prevention of restenosis could decrease the "oculo-stento" reflex. *Cardiovasc.* 53(2): 292-3.
 5. Post et al., (1994) The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. *Circulation.* 89(6): 2816-21.
 6. Lafont et al., (1995) Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res.* 76(6): 996-1002.
 7. Shi et al., (1996) Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *Circulation.* 93(2): 340-8.
 8. Andersen et al., (1996) Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury: insights from a porcine coronary (re)stenosis model. *Circulation.* 93(9): 1716-24.
 9. Clowes et al., (1986) Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. IV. Heparin inhibits rat smooth muscle mitogenesis and migration. *Circ Res.* 58(6): 839-45.
 10. Ross (1997), Cellular and molecular studies of atherogenesis. *Atherosclerosis.*

131(Suppl): S3-4.

11. Sternberg et al., (2012) Magnesium used in bioabsorbable stents controls smooth muscle cell proliferation and stimulates endothelial cells in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 100(1): 41-50.
12. Yoshioka et al., (2003) Pharmacological activity of deep-sea water: examination of hyperlipemia prevention and medical treatment effect. *Biol Pharm Bull.* 26(11): 1552-9.
13. Miyamura et al., (2004) Difference between deep seawater and surface seawater in the preventive effect of atherosclerosis. *Biol Pharm Bull.* 27(11): 1784-7.
14. Li et al., (2014) Deep sea water prevents balloon angioplasty-induced hyperplasia through MMP-2: an in vitro and in vivo study. *PLoS One.* 9(5): e96927.