

第一章 文獻探討

一、各論

(一)內皮細胞(Endothelial cell)

西元 1661 年, Malpighi 從青蛙的肺臟及腸繫膜上發現了微血管的存在, 證實了 Harvey 所提出的血液循環(blood circulation)理論。到了 1860 年, 由於細胞染色技術的進步, Recklinghausen 發現了過去被稱為無結構透明膚質(structureless hydline skin)的微血管, 竟然是由一片片相同的細胞所構成。之後直到 1901 年, Waldeyer、Hartz 才將內皮細胞界定為血管及淋巴管腔內面存在的單層細胞, 也同時開啟了對內皮細胞的起源、功能等方面的研究熱潮⁽¹⁾。

內皮細胞是由血管母細胞(Angioblast)分化而來, 是一種高度分化性的細胞。其外形扁平不規則, 細胞核隆起成半球形的小丘(Dome), 細胞外圍有許多絲狀偽足(Filopodia)或稱微放射狀(Microprojections)。Zdanaga 等人於 1974 年發現, 將內皮細胞培養於 37-40 的生理食鹽水中, 絲狀偽足會增長、增加; 若培養於 20 的生理食鹽水時, 則長度變短、數目減少⁽²⁾。雖然其功能至今仍不清楚, 但推測與內皮細胞間訊息傳遞有關。此外, 內皮細胞含有一種特殊的蛋白質 - von Willebrand factor, 存在於細胞表面, 與細胞黏著有關, 由內質網合成後儲存在特有的胞器 - Weibel-Palade body 內, 並以 Exocytosis 的方式釋放至胞外。所以, 目前多以 von Willebrand factor、Weibel-Palade body 及 Filopodia 等特徵來做為內皮細胞的標示物(Marker)。

由於內皮細胞直接與血液接觸, 受血中各種物質的影響, 所以目前在血管疾病、藥物相關實驗方面, 多以內皮細胞為研究對象。而人體內分布眾多的內皮細胞中, 以臍靜脈內皮細胞(human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)最易取得, 所以被廣泛運用在實驗上。內皮細胞可在含有胎牛血清(Fetal bovin Serum; FBS)及內皮細胞生長因子(Endothelial cell growth factor; ECGF)的 M-199 培養基中作繼代培養。若除去 ECGF 和之前覆蓋於底部的 Fibronectin 或 Gelatin, 4-6 週後, 便會生成管腔般的結構。當以 Proteolytic enzyme 處理後再放回富含生長因子

環境中，此組織化(Organization)過程則會消失，取而代之的是恢復原本單層生長的增生現象(Proliferation)。且因受血中各物質影響，易改變血液動力學(Hemodynamic forces)，例如：血流量、血壓改變，或經由血液輸送的各式物質如：電解質、荷爾蒙、血液活化物質(Vasoactive substance)等，均會影響內皮細胞的狀態及結構。近年來逐漸發現內皮細胞，在許多代謝過程及生理反應中扮演了重要的角色。包括：

1.維持血管的通透性：

腦部微血管中的特殊構造 血腦障壁(Blood-Brain Barrier；BBB)，由內皮細胞與星狀細胞(Astrocyte)構成，具有特異的通透性，腦神經細胞藉此通透性以維持衡定⁽³⁾。

2.維持血管腔內的穩定結構：

正常血管腔內層的內皮細胞可藉由外來的荷爾蒙等刺激，使 Nitric Oxide Synthase(NOS)活化，促使 L-Arginine 合成 Nitric Oxide(NO)，使血管平滑肌中 GTP 形成 cycle GMP 而使血管擴張(Vasodilatation)，維持了管腔內面的平滑結構；當內皮細胞結構功能改變時，會加速血小板活化作用，血栓形成加速，導致血管閉塞作用。併發如動脈粥狀硬化(Atherosclerosis)、血管炎(Vasculitis)等疾病⁽⁴⁾。

3.凝血作用的調節：

當血液中 Thrombin 合成受阻或 Prothrombin 無法被活化，使得正常凝血發生變異，此時內皮細胞表面會提供合成 Thrombin 的模板(Template)，促使 Thrombin 的產生而促進凝血作用的進行。

4.刺激反應的調節：

內皮細胞會將所接受的訊息傳遞至下一層細胞，除了當接受者(Sensor)也是傳遞者(Transducer)，且會分泌調節物質 Endothelin-1 來修飾血管壁構造所發生的改變，這種具血管收縮功能的物質，除了使血管收縮外，對於腦部血管壓力的狀態及區域性的代謝血流量均具調控作用⁽⁵⁾。

最近內皮細胞與免疫系統間交互作用的機轉，例如：紅斑性狼瘡(Systemic lupus erythematosus)等的關係也陸續被提出。期望對內皮細胞有更深度的探討，設法找出治療方向，以降低心血管疾病、惡性腫瘤等對人類所造成的威脅。

(二)狗腎上皮細胞(Madin-Darby canine kidney ; MDCK)

實驗證實腎上皮細胞暴露在氧化環境下，會使體內氧化和抗氧化的平衡系統失調和自由基的產生增加，誘導了脂質過氧化作用和細胞的死亡⁽⁶⁾。由於上皮細胞具有阻礙、分泌和運輸功能，像是與細胞內交互作用、細胞膜偏極化⁽⁷⁾、合成或修飾基底膜等，另在細胞死亡上和增生作用上也扮演重要角色。

上皮細胞易被氧化傷害，使細胞穩定性改變而導致疾病的發生。一般上皮細胞的程式凋零(Apoptosis)和氧化壓力、細胞增生、與細胞外或鄰近細胞的附著⁽⁸⁾有關。在一些組織如肺臟、腎臟和腸胃道均不斷的暴露在內生性和外生性的 reactive oxygen species(ROS)的環境下，飲食中給予補充抗氧化劑如維生素 C、E，可增加體內抗氧化防禦系統⁽⁹⁾，可能因此維持了細胞的恆定性。以腎上皮細胞來說，細胞的近端腎小管較遠端腎小管和收集管更易受自由基的影響，給予自由基清除者 Catalase 和超氧歧化 (Superoxide dismutase ; SOD)，則具保護作用⁽⁶⁾。

MDCK 細胞株(Cell line)被廣泛的應用在以上皮細胞為主的實驗上，藉由胞外間質蛋白(ECM)而具有附著作用。在 1992 年⁽¹⁰⁾曾有學者將 Laminin(胞外間質蛋白的一種)以 Laminin 抗體阻斷其生成，觀察細胞發現 MDCK 仍具延展及附著能力，由此可知狗腎上皮細胞的血漿膜表面具有多種間質蛋白接受器(Receptor),如:Fibronectin、Collagen、Laminin 等 Receptor 存在。

在 1994 年時，Christine H 等學者提出上皮細胞似乎調控著內皮細胞的 Apoptosis⁽¹¹⁾，許多細胞會產生內生性因子如：糖皮質類固醇(Glucocorticoids)、腫瘤生長因子(Tumor Necrosis Factor- ; TNF-)等激素，由於細胞與細胞間的交互作用可能在 Apoptosis 的調節上具有重要的地位。當 TNF- 分泌增加時，會誘導內皮細胞的死亡⁽¹²⁾，所以在上皮細胞與內皮細胞間存在的關係，在於上皮細胞會分泌熱穩定性佳的 peptides 類，對於 TNF 誘導內皮細胞的 Apoptosis 則具有保護性的作用。

(三)纖維網狀蛋白(Fibronectin)

Fibronectin 為一醣蛋白(Glycoprotein)，在細胞移動、附著上具有重要的功能，且參與了許多生理作用，包括：致癌基因的轉型(Oncogenic transformation)、凝血(Hemostasis)、溶血(Thrombosis)、吞噬(Phagocytosis)等。在細胞間質中，則可與 Collagen、Glycoaminoglycons、Proteoglycans 和 Fibrinogen 結合⁽¹³⁻¹⁵⁾。在 1948 年時，Morrison 等人從人類血漿中純化出纖維網狀蛋白，當時稱為 cold-insoluble globulin⁽¹⁶⁾。到了 70 年代初期，Hakomori 等學者發現，轉型(Transformed)過的纖維母細胞(Fibroblast)之膜蛋白中明顯的少了某種蛋白質，此種蛋白發現存在於基底膜與結締組織中，具有固定正常細胞的位置與結構；另在動物實驗也發現，罹患癌症的動物，此蛋白質的濃度比控制組低了許多。之後，進一步證實了這種蛋白質就是 cold-insoluble globulin⁽¹⁷⁾，後來有學者提出此在細胞黏著(Adhesion)上扮演重要角色的蛋白，不論是存在於細胞間質的不溶型式(Insoluble form)或是體液及細胞培養基中的可溶型式(Soluble)，均統稱為纖維網狀蛋白(Fibronectin)⁽¹⁸⁾。

纖維網狀蛋白的分子量為 450 ± 25 Kd，由兩個分子量各為 220 Kd 的次單位(Subunit)，在靠近 基端(Carboxyl-terminal end)的位置以分子內雙硫鍵(Disulfide bond)互相鍵結而成一個雙體(dimer)，存在於細胞間質(Extracellular matrix)、胚層結構 (Embryonic structure) 結締組織及大部分的體液中，例如:羊水的血液中⁽¹⁹⁾。

存在不同部位的纖維網狀蛋白，利用 SDS-PAGE 分析後，會發現在結構及數量上略有差異性，將血漿中由肝細胞合成的血漿型纖維網狀蛋白及纖維母細胞合成的細胞型纖維網狀蛋白分析後，得知血漿型纖維網狀蛋白具有較小的分子量。

至 80 年代後期，纖維網狀蛋白的 cDNA 和胺基酸定序陸續地被發現⁽²⁰⁻²¹⁾，在不同物種間具有很多的相似性(Homology)。依切割位置和多的結構，可區分為 Type 、 、 三種型式，Type 、 出現在與凝血有關的蛋白(Prothrombin)、第十二因子(Factor)等

胺基酸序列上⁽²²⁾。而後 Hynes 等學者的實驗發現在大白鼠肝細胞中，有三種不同纖維網狀蛋白的 mRNA，這些不同的 mRNA 皆由同一基因轉錄出來的，因此證實了纖維網狀蛋白的合成可經由 mRNA 的變異切割 (Alternative splicing) 產生不同的纖維網狀蛋白分子。所以這意味了不同的組織細胞可利用單一個纖維網狀蛋白的基因，利用變異切割產生不同型態及分子量的纖維網狀蛋白。人類纖維網狀蛋白的基因在第二對染色體上約有 50 個 Exon，會發生變異切割的位置有三，即 E A、E B、

(見附圖一)。E A 是由纖維母細胞及其他間質細胞所產生，與細胞黏著有很大的相關性；E B 的功能目前仍不清楚；則推測與淋巴球的結合有關。由上述得知，經過變異切割的作用後，纖維網狀蛋白的次單位 (Subunit) 會有許多不同的結合區域 (Binding domain) (見附圖二)，包括：①細胞結合區域；②膠原蛋白結合區域；③DNA 結合區域；④胺基酸結合區域；⑤Heparin 結合區域等，使纖維網狀蛋白能與其他分子結合，進而發現了許多生化特性及生理功能。以下簡單介紹各結合部位：

①細胞結合區域：此位置的球蛋白分子量約為 120Kd，主要是由 Type 的型態所構成，上有一段是由三個胺基酸 Arg -Gly-Asp 組成的 Tetrapeptide 所激活，可與細胞表面上纖維網狀蛋白的接受體 (Receptor) 結合。另外在變異切割的 Type 型態上，也存在二個分子量為 65Kd 的細胞結合位置，以雙硫鍵相互鍵結，再藉由組織間隙中的黏多醣 (Mucopolysaccharide)、膠原蛋白及細胞受傷出血後的凝塊處，使細胞和 Fibronectin 分子結合，緊密的將細胞與細胞間固定⁽²³⁻²⁴⁾。

②膠原蛋白結合區域：此位置的球蛋白可以蛋白酵素切出，主要是由 Type 和少部分的 Type 構成，分子量為 50Kd，易與各種型式的膠原蛋白結合形成網狀結構，其中又與動物膠 (Gelatin) 間具有很強的親和力。一般細胞表面並無膠原蛋白接受體 (Receptor)，但大都具有 Fibronectin 接受體，因此可利用具有與 Fibronectin 結合的特性，增進細胞的附著，促使細胞的增殖與分化⁽²⁵⁾。

③DNA 結合區域：位於膠原蛋白結合位置之後，主要是由 Type

的型態構成，分子量為 30Kd。在低鹽濃度下此一部分會與 DNA 及 Heparin 結合，至目前為止其生理功能仍尚未明瞭，只知道與壞死細胞的 DNA 清除有關。

④胺基酸結合區域：此位置的球蛋白分子量為 29Kd，是由 Type 的型態所構成，富含 Cystine，包含五個雙硫鍵環(Disulfide bond loop)。可分別與 Fibrin、Heparin、Bacteria 結合，與 Fibrin binding domain 結合，促使受傷出血後的組織其細胞再生與黏著；與 Heparin binding domain 結合，因親和力較弱，所以生理功能並不明顯；另外 Bacteria binding domain 可與 Staphylococcus aureus 等結合，使細胞附著於組織中而引起感染反應⁽²⁶⁾。

⑤Heparin 結合區域：此位置的球蛋白是由 Type 的型態構成，靠近縮基端，與硫化程度高的黏多醣具有最好的親和力，其他像 Heparin sulfate、Dermatan sulfate、Chondritin sulfate 等硫化程度較低的黏多醣也有良好的親和性。Fibronectin 本身有三個肝素結合位置，敏感性和結合力都不同，在血液中細胞的接著作用上具有重要的影響力，例如：免疫功能、血液凝固等⁽²⁷⁻²⁹⁾。

(四)一氧化氮(Nitric Oxide ; NO)

早在 1916 年，Mitchell 等學者首先發現在哺乳類動物細胞會產生含氮氧化物。到 1980 早期，則更進一步證實哺乳類動物的細胞本身就具有合成 NO 的能力，且經內毒素(Endotoxin)處理後會增加其生成而開始受到重視。NO 是許多不同組織和細胞的代謝產物，在生理、病理和生化代謝上扮演重要角色，具有調節血管張力、心肌收縮力、抑制血小板凝集反應及吸附作用、維持內皮細胞的完整及通透性、調節血管細胞的增生等，同時與免疫功能也有密切關係。

NO 在生物體內的合成(Nitric Oxide Synthase ; NOS)，是以 L-Arginine、 O_2 及 NADPH 為原料，並在 FAD、FMN 及 tetrahydrobiopterin (BH4-biopterin)等輔因子(Cofactor)共同參與作用下，將前驅物質轉化成 NO 及 L-citrulline。目前將 NOS 同工(isoenzyme)分為兩種型態⁽³⁰⁾：結構型(Constitutive ; cNOS)及誘導型(Inducible ; iNOS)，cNOS 主要有二種，一為存在血管內皮細胞者為 eNOS 或 NOS₃，另在神經細胞則為 nNOS 或 NOS₁。誘導型一氧化氮合成 (iNOS 或 NOS₂)，現已知在巨噬細胞、淋巴細胞等中發現，於正常情況下並不表現，但在細菌內毒素如黏多醣(Lipopolysaccharide ; LPS)，細胞激素(Cytokines)如腫瘤壞死因子(Tumor Necrosis Factor- α ; TNF- α)、干擾素(Interferon- γ ; IFN- γ)等刺激下可大量表現，釋放出 NO 的量較 cNOS 高出 1000 倍。iNOS 主要是協調免疫系統反應，對癌細胞及外來細菌或病原體具毒殺作用。

NO 是自由基氣體，具有不成對電子，活性很高。在生物體內會與氧分子(O_2)、超氧陰離子(O_2^-)、金屬離子作用形成有毒氧化物 peroxynitrite($ONOO^-$)、金屬亞硝基(Metalnitrosyl)等氧化還原產物⁽³¹⁾。由於可溶於水或脂中，藉擴散作用可自由穿透細胞膜，為訊息傳遞的重要物質。半衰期很短僅 2~6 秒，所以血中 NO 會很快轉換成安定代謝產物亞硝酸鹽(Nitrite ; NO_2^-)和硝酸鹽(Nitrate ; NO_3^-)。因此一般評估 NO 產生量皆以測量 NO_2^- 及 NO_3^- 濃度為指標。

有研究發現多項生理因素或物質直接會影響血管內皮細胞 NO 產生

的量，包括血管張力、剪應力(Shear stress)、氧分壓、內皮細胞變形等皆是重要因素。而糖尿病病患長期處於高葡萄糖濃度下，則會造成內皮細胞型態、恆定性⁽³²⁾改變，導致微血管結構改變、基底膜增厚；另也有超氧歧化 活性降低和 NO 清除者(Scavenger)能力下降的現象，且在氧化壓力的環境下，也會使自由基的生成增加⁽³³⁾。此時可藉由補充抗氧化劑如維生素 C、維生素 E 等來達到清除體內自由基的目的⁽³⁴⁾。

(五)維生素 C (Vitamin C)

維生素 C，又稱抗壞血酸(Ascorbic acid)，早在 50 多年前就被發現具有治療壞血病(Scurvy)的功能，會因光、熱、鹼、銅及鐵的存在下而加速氧化，在酸性環境及溫度低處，氧化程度則會減緩。幾乎所有的高等植物及部分的動物皆可自行利用葡萄糖合成維生素 C，但有少數的動物，例如：人類、天竺鼠等。因體內缺少了 L-gulonolactone oxidase，而無法將葡萄糖轉變成維生素 C，因此必須藉由飲食中獲得，像是柑橘、草莓、綠葉蔬菜等，皆含有高量的維生素 C，而肉類、蛋、乳製品則含量很少⁽³⁵⁾。

維生素 C 參與了許多生理代謝途徑，包括膠原蛋白、神經傳導物、荷爾蒙等的合成，及膽固醇轉換成膽酸的過程⁽³⁶⁾。膠原蛋白是細胞間質的重要成份，佔人體總蛋白質含量的 30%，分佈在皮膚、軟骨、牙齒及血管上皮等組織中。而維生素 C 在膠原蛋白的合成上，扮演著重要的角色。在合成的過程中，脯胺酸(Proline)和離胺酸(Lysine)經過氫化作用(Hydroxylation)後，形成 脯胺酸(Hydroxyproline)和 離胺酸(Hydroxylysine)，構成膠原蛋白穩定的三股螺旋結構(Triple helix)。因此維生素 C 為氫化作用中重要的輔因子(Cofactor)。

維生素 C 具有很強的還原能力，可提供二個電子給過氧化物，為一重要的抗氧化劑(Antioxidant)，對於多元不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid；PUFA)、維生素 E 及維生素 A，皆具有保護作用，且可將氧化的維生素 E 和維生素 A 再還原，防止脂質過氧化現象。另也具有將三價鐵離子還原，促進其在消化道黏膜中的通透率。

維生素 C 的建議攝取量成人每天 60 毫克，嬰兒 35 毫克，兒童 45-50 毫克，懷孕及授乳期增加至 70-90 毫克。若低於 10 毫克，會有壞血病的症狀出現；大於 1 克，會出現噁心、腹瀉；大於 3 克，則有腎結石、酸鹼不平衡的情形產生。攝入體內的維生素 C，由腸胃道吸收後分布至體內各組織，在正常情況下，腎臟會調控維生素 C 在體內的含量，當含量過多時會利用尿液排出體外。

(六)維生素 E (Vitamin E)

生育醇(tocopherol)為維生素 E 的一種型態，具有多種不同的異構物，自然界存在有 8 種，包括： α 、 β 、 γ 、 δ 等，具有抗氧化及抗不孕的特性。其抗氧化活性為 $\alpha > \beta > \gamma$ ，抗不孕作用則相反，彼此間的差異性是酚類環上接的甲基(methyl group)數目與位置不同。飲食中植物油 ex：大豆油、玉米油等皆為良好來源。

維生素 E 本身的抗氧化特性，具有降低細胞膜的氧化傷害、維持紅血球、神經細胞、免疫細胞的完整性⁽³⁵⁾、預防脂質過氧化，調節由脂質氧化酵素(Lipoxygenase)及環氧化酵素(Cyclooxygenase)起始的花生四稀酸(Arachidonic acid)代謝。在 1996 年有學者提出，維生素 E 在保護細胞

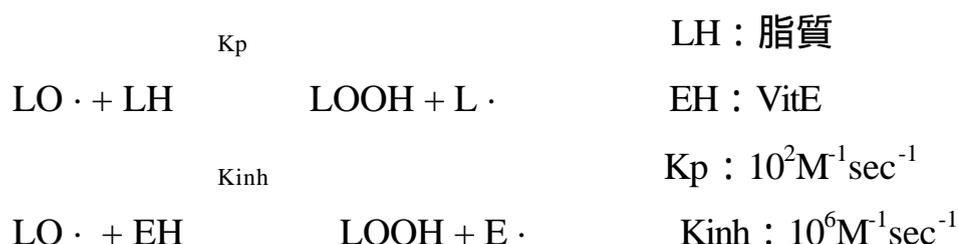
型態的變化上，是因為具有延緩細胞膜蛋白質硫醇的流失，而非抑制了 tert-butyl hydroperoxide 造成的脂質過氧化作用⁽³⁷⁾。在 1997 年, Jyh-Huang Kuo 等人證實在氧化壓力情況下，會造成細胞中硫醇(thiol)流失，而影響細胞的功能，因此，維生素 E 對於在細胞硫醇方面，被認為可有效保護防止細胞蛋白質硫醇的流失⁽³⁸⁾。因此不論在生化或化學方面的實驗上均證實維生素 E 具有高度的抗氧化特性，可藉由細胞質中的水溶性抗氧化劑，例如：VitC、 穀胱(Glutathion)將氧化的 VitE 再度還原利用。

維生素 E 是親脂性自由基的清除者(Lipophilic radical scavenging)，可提供本身的 Phenolic hydrogen 給氧自由基，而抑制氧化作用的起始⁽³⁹⁾。當維生素 E 與脂質過氧化自由基(free radical)反應時，脂質的氫過氧化物(Hydroperoxide; LO₂ ·)會和維生素 E 自由基一起生成，化學反應式為：



LOOH 也許會被鐵離子作用形成 Alkoxy1 自由基, 比過氧化(Peroxy1) 自由基更易進行氧化反應，但在體內脂質的氫過氧化物會由多種過氧化酵素快速分解。而金屬離子主要是與蛋白質螯合，所以，由金屬離子和氫過氧化物作用而產生的自由基就相當微量了。

接著，維生素 E 會阻止氧化鏈反應的進行，減少氫过氧化物的含量。在脂質過氧化反應中，過氧化自由基扮演氧化鏈的攜帶者(Carrier)，因此，維生素 E 須在過氧化自由基攻擊脂質分子前將它清除。以下的二個競爭反應取決於個別受質(Substrate)，組織均質液中的速率常數(K_p、K_{inh})和維生素 E 的濃度。



因此，當 $[LH] / [EH]$ 的比例為 1000 時，則表示約有 90% 的過氧化自由基會被維生素 E 清除。維生素 E 自由基($E\cdot$)可藉維生素 C 及硫醇所提供的電子再還原成 α -Tocopherylquinone，繼續清除自由基。另一方面，維生素 E 自由基會攻擊脂質氫過氧化物和脂質本身以奪取氫，而分別形成過氧自由基、氫自由基，繼而再起始其他氧化反應。這樣一來，維生素 E 擔任的就是促氧化劑(Prooxidant)⁽⁴⁰⁾ 了。

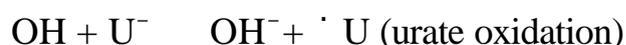
(七)尿酸(Uric acid)

1981 年有學者指出尿酸可取代或增加維生素 C 在人體內的抗氧化能力⁽⁴¹⁾，當靈長類動物體內血清尿酸濃度較高($300\ \mu\text{mol/L}$)時，可以補償低維生素 C 情形下所造成抗氧化能力降低的狀況。血漿中尿酸含量在不同個體間的範圍很廣($50\sim 900\ \mu\text{M}$)，且男性平均值高於女性，此含量比其他非酵素性抗氧化物如：維生素 C、E、穀胱胱(Glutathione)⁽⁴²⁾ 等更高。

尿酸為單陰離子(Monoanion)結構，是由黃漂(Xanthine Oxidoreductase；XO)分解普林(Purine)中腺漂呤(Adenine)和鳥糞漂呤(Guanine)所得之代謝終產物。XO 利用 NAD^+ 作為電子接受者，將黃漂呤去氫(Xanthine Dehydrogenase；XDH)轉換成 XO 型式，而把還原價轉給氧分子。以人類和高等靈長動物而言，XO 代謝 Adenine 及 Guanine

之終產物是尿酸；在大多數哺乳動物，代謝之終產物則是尿囊素 (Allantoin)及尿素(Urea)。因此一般哺乳類動物血漿中尿酸的含量約為人類的 10%，甚至更低⁽⁴³⁾。此差異是因為人類的尿酸氧化 (Urate Oxidase) 基因不表現，所以無法將尿酸轉換成尿囊素⁽⁴⁴⁾。

不論是維生素 C 或尿酸都可作為單電子氧自由基的還原劑。曾有研究指出，尿酸與維生素 C 作為抗氧化劑時，彼此間有一定程度的交互作用，二這之間的氧化還原交替能力分別為 0.26V 及 0.015V⁽⁴⁵⁾，正因為彼此相對的氧化還原互替能力，所以維生素 C 可幫助尿酸還原⁽⁴⁶⁾，下面反應式表示尿酸、維生素 C 清除自由基的反應：



然而在某些實驗上並不支持血漿中尿酸與心血管疾病有直接病理、生理的相關性。甚至有報告證實，尿酸是造成動脈粥狀硬化和冠狀動脈心臟病的一個危險因子⁽⁴⁷⁾。雖然如此，尿酸的抗氧化作用仍熱絡被討論著。在哺乳類或一般靈長類的血漿濃度與年齡成正相關。由於細胞的老化隨時在發生，且一些疾病如：癌症、心血管病變等，部份是因氧化作用及自由基產生所導致，所以尿酸的抗氧化功能也就越顯重要了。

(八)糖化終產物(Advanced Glycosylation End Products ; AGEs)

糖尿病(Diabetic Mellitus)有胰島素(IDDM)和非胰島素依賴型(NIDDM)二種型式，在臺灣地區，大部分為非胰島素依賴型，約占 96.5 %。早期臨床生化學上發現，糖尿病病患長期的高血糖情形，可能是造成併發症發展的主因，而引起病患死亡的主要原因皆是因併發症的產生所致，包括了：糖尿病大、小血管病變、糖尿病神經性病變。其中大血管病變如：粥狀動脈硬化(Atherosclerosis)、腦中風(Cerebrovascular accident);小血管病變如：視網膜病變(Retinopathy)、腎病變(Nephropathy)等。

長期的血糖控制不良會促使醣類上的醛基、酮基與蛋白質的胺基進行非酵素性的梅納反應(Nonenzymatically maillard reaction)而產生一蛋白質，即糖化終產物。此反應的起始步驟是蛋白質胺基團上的一個 或胺基酸和還原糖(Reducting Sugar)縮合成 Schiff Base，再經形成

Amadori 及 Ketoamine ，最後經一連串的反應形成不可逆的終產物 AGEs。

早期的實驗證實 AGEs 是由幾個結構成分所組成⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾：FFI、Pyrraline、AFGP、Carboxymethyl lysine、Pentosidine，皆扮演 ligand 的角色，可與它具有專一性的接受器(Receptor)結合而改變細胞的功能。例如：①AGEs 與巨噬細胞上的 AGEs receptor 結合後會誘發 TNF、IL-1 及 IGF-1 的製造，這些細胞激素則會進一步的促進不同細胞及膠原蛋白的生長與合成。②當 AGEs 結合上內皮細胞的 AGEs receptor 後會增加細胞的氧化壓力，導致內皮細胞的滲透性、凝血活性增加。

AGEs 會堆積在一些生命週期長的組織蛋白，如基底膜膠原蛋白、水晶體等的上面，進行自氧化產生自由基，造成細胞組織的傷害。在糖尿病動物模型中可證實 AGEs 的合成與血糖濃度的高低、罹病時間的長短呈正相關。而 AGEs 的形成則會促使血管基底膜增厚及血管的閉塞。

蛋白質和 DNA 等一些細胞內的大分子，會因與糖類的作用而影響了原有的生理功能。在 *in vitro* 的實驗中發現，AGEs 會使 DNA 雙股斷裂、鹼修飾(Base modification)及移位(Transcription)，所以 AGEs 可能藉此而影響了基因的轉譯作用(Transcription)。另外在糖尿病患者紅血球中，糖化血色素對氧的親和力遠較正常血紅素高，可能是造成組織中氧釋放能力較低的原因。而紅血球中 SOD(Superoxide dismutase)的糖化也與抗氧化能力的降低有很密切的相關性。

(九)血管內皮生長因子(Vascular Endothelial Growth Factor ; VEGF)

VEGF 為一分泌性醣蛋白，在非還原狀態下分子量約 46kD，還原狀態下約 23kD⁽⁵¹⁾，在熱和酸的環境下很穩定，能促進由人類臍靜脈⁽⁵²⁾、胎兒主動脈、腎上腺皮質等分離出的血管內皮細胞之生長，在 *in vivo* 具有誘發血管新生(Angiogenesis)作用⁽⁵³⁾，也是內皮細胞生長、修復和分裂所必須。

糖尿病病患由於長期的血糖控制不良，會有許多合併症出現，如：視網膜病變、腎臟病變等。在 2000 年有學者指出在糖尿病所引發的視網膜增殖性病變，有新生血管生成的情形，偵測 VEGF 濃度發現的確較正常成人有明顯上升，因此推測與 DM 視網膜病變具有相關性，且罹患時間的長短和 AGE 含量均是重要影響因子⁽⁵⁴⁾。在 DM 性腎病發展過程中，大鼠的腎小球環間膜細胞由於長期處於高葡萄糖下，會增加 VEGF mRNA 表現和蛋白質量，造成新血管形成和增加內皮細胞通透率，似乎與 PKC Kinase 的反應路徑有關，由此可知 VEGF 在糖尿病併發症的過程上扮演重要的角色，可能調節了腎絲球過濾率和蛋白尿的排出⁽⁵⁵⁾。

由於腫瘤生長和轉移需藉由血管的新生來進行，在 Gunningham 等人的實驗中指出，VEGF 家族包括(VEGF-B、VEGF-C)可結合至 tyrosine kinase receptor 而調控了血管生成作用，且癌細胞能向上調節血管生成因子接受器(Receptor)，因而有血管及淋巴管的生成現象⁽⁵⁶⁾。Deng 等學者則提出在喉癌發展的過程中，血管內皮生長因子和其 receptor(flt-1)則扮演了重要的角色。給予抗 VEGF 及抗 receptor 之抗體，利用免疫組織染色觀察癌細胞和內皮細胞均發現 VEGF 和 flt-1 有表現且抑制了癌細胞生長，證實了喉癌細胞會分泌 VEGF 及有血管增生因子結合位置存在⁽⁵⁷⁾。

在今年有實驗證實⁽⁵⁸⁾糖尿病母親所生下的嬰兒，可能帶有先天心血管系統方面的障礙，進而影響了嬰兒死亡率，有趣的是這可能與某些基因(包括 VEGF 及 VEGF receptor)突變和高葡萄糖的環境有關，且 VEGF level 也可被葡萄糖濃度多寡所調控。綜合上述所知，血管內皮因子在 Angiogenesis 和癌症的發展過程中，的確佔據了極重要的地位。

(十)、CD-36

CD-36 又稱 Thrombospondin receptor 或醣蛋白，分子量約 88-90kD，分布在血小板、人類臍靜脈內皮細胞、血管細胞等中，CD-36 在許多基質(Matrix)蛋白如：Collagen、Thrombospondin(TSP)上扮演一個接受器的角色。TSP 具有多種生理作用⁽⁵⁹⁾，包括調節細胞附著、血小板凝集、細胞增生、血管新生作用、腫瘤轉移等功能，此蛋白質和其 receptor(CD-36)間的反應調控了某些病理、生理學上的發病過程。

有許多研究已指出糖尿病造成的纖維網狀蛋白含量增加，可能有血管新生作用的情形發生；且在癌細胞的生長和轉移(Metastasis)，也需藉由血管的生成來達到目的。在 94 年有研究證實⁽⁶⁰⁾ 癌細胞的細胞膜表面確實有腫瘤細胞附著區域，例如：Thrombospondin receptor，此接受器考慮當作一個新的腫瘤指標，它位於膜上的濃度與腫瘤細胞侵害的程度和轉移有直接的相關性。

曾經以 B-Cell 血管淋巴癌的實驗也發現 CD-36 可能辨認著腫瘤細胞的擴張，比較 B-Cell 淋巴癌和正常細胞，發現 CD-36 的濃度高出好幾倍，因此較高的 CD-36 表現是否間接增加癌症的轉移，需要再更進一步的證實⁽⁶¹⁾。

另外，CD-36 蛋白質含量上升，可能會加速了脂肪酸的運送，或者在訊息反應上刺激酵素的催化作用，促進花生四烯酸(Arachidonic acid)轉化至其他代謝路徑，而間接提高了停經後婦女罹患乳癌的機率⁽⁶²⁾。

Plasmodium falciparum 附著至內皮細胞也需藉由 TSP receptor(CD-36)的參與，且證實了 CD-36 與 Tyrosine kinase 如：Fyn、Lyn 和 Yes 有著密切的關聯。CD-36 更影響許多體內的生理作用，但有關 CD-36 方面的研究仍嫌不足，有待再進一步的研究。

二、研究目的

本實驗欲探討高葡萄糖壓力下，對內皮細胞胞外間質蛋白、NO 含量和細胞死亡所造成的影響，藉由添加 AGE 抗體阻斷氧化產物 AGEs 產生，觀察這些影響是否由 AGEs 所引起，且抗氧化劑的添加，是否可將上述的改變予以逆轉。

第二章 材料與方法

一、 實驗材料

(一)化學試藥：

A. 細胞培養用藥：

- ①Endothelium Basal Medium(EBM)購於 Clonetics Chemical company
- ② Trypin 購於 Sigma Chemical company
- ③Medium-199、 Kanamycin sulfate、 Anti-PPLO、 Penicillin Streptomycin 等購於 Gibcobl Chemical company
- ④Fetal Bovine Serum(FBS)購於 Biological Indus-Tries Kibbutz Beit Haemek Israel
- ⑤Gelatin 購於 Bio-Rad
- ⑥NaCl、 Na₂HPO₄、 NaHPO₄、 EDTA 購於 MERCK Chemical company

B.主實驗用藥：

- ①D-(+)-Glucose 購於 Sigma Chemical company
- ②L-Ascorbic acid phosphate Magnesium Salt n-Hydrate 購於日本和光純藥工業株式會社
- ③Water Dispersible Vitamin E 購自於 Pharmavite pharmaceutical Corp.
- ④Trypan Blue 等購於 MERCK Chemical company

C.總蛋白測定用藥：

- ①BSA(Bovine Serum Albumin)、 KNa tartrate 購於 Sigma Chemical company
- ②NaOH、 Na₂CO₃、 CuSO₄、 Folin-ciocalteu's phenol regant 購於 MERCK Chemical company

B. 纖維網狀蛋白測定用藥：

- ① Human plasma Fibronectin 由本實驗室自行單離
- ② Rabbit Anti-Human Fibronectin Antiserum 由本實驗室自行製作並測其抗體價之效率(1:1000)
- ③ Goat Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase Conjugated 購於 Bio-Rad
- ④ Phenylene diamine(OPD) 購於 Sigma Chemical company
- ⑤ HCL 購於 MERCK Chemical company
- ⑥ H₂O₂ 購於島久藥品株式會社

E. 一氧化氮測定分析：

利用 Boehringer Mannheim 的 Nitrite/Nitrate Kit 分析

- ① Potassium phosphate buffer、NADPH、Nitrate reductase
- ② 呈色劑 sulfanilamide、N- (1-naphthyl) -ethlenedia

F. LDH 測定分析：

利用 TaKaRa 的 LDH Cytotoxicity Detection Kit 分析

- ① Diaphorase/NAD⁺、Iodotetrozolum chloride (INT) sodium lactate

G. LPS(Lipopolysaccharide)：

來自於 Salmonella typhimurium , 購於 Difco laboratories, INC.

二、實驗方法

(一)內皮細胞之分離與培養

A. 人類臍靜脈內皮細胞(Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)之初代培養(primary culture)

1. 材料

- ① 胎兒臍帶：約 10~15cm , 用含有 PBS 的無菌離心管收集(<4)
- ② 沖洗緩衝液：以 Autoclave 滅菌過的 Phosphate saline buffer PBS ; 10mM Na₂HPO₄+0.14M NaCl+0.01M NaH₂PO₄ , pH7.4)
- ③ 分離緩衝液：0.05% Trypsin 及 0.02% EDTA 的 PBS , 以 0.02 ì m syringe fliter 過濾滅菌

- ④腎形盤、剪刀、鑷子、止血鉗二支、十六號針頭二支，以乾熱滅菌(Autoclave) 180 滅菌二小時
- ⑤T-25 flask：預先以 0.1 % gelatin coating
- ⑥5ml 與 10ml 無菌注射針筒各一支

2.方法

本實驗以人類臍靜脈內皮細胞為研究對象，經由中山醫學院附設醫院產房協助收集之新生兒臍帶，於產後 12 小時內取得並進行本實驗之研究

- ①將所有材料經過 75 % 的酒精噴拭消毒後，置於無菌操作臺內
- ②用鑷子取出離心管中的臍帶放於腎形盤中，以剪刀剪去止血夾夾過或凝血部分
- ③將十六號平頭針頭插入臍帶靜脈兩端，以止血鉗將兩端固定
- ④以注射針筒注入約 100ml 沖洗緩衝液，沖洗靜脈內殘留之血液，並確認臍帶之完整與相通
- ⑤將臍帶內沖洗緩衝液倒出，視臍帶長度而定注入分離緩衝液 (Trypsin)，使靜脈呈膨脹狀態，於室溫下作用 15 分鐘
- ⑥收集靜脈內的分離緩衝液，以 1200rpm (Himac CR15D, Hitachi) 離心 6 分鐘後，去除上清液，拍散離心管底部的沉澱細胞
- ⑦重覆⑤ ⑥之步驟後，取出拍散之細胞置於 3ml 內含有 10 % FBS 的 EBM 培養液中，以 T-25 flask (Flaon)盛裝，在 37 °C、5 % CO₂ 之環境下培養，每 3~4 天更新約 1/2 的培養液

B. 人類臍靜脈內皮細胞之繼代培養(passage culture)

1.材料

- ①沖洗緩衝液：以 Autoclave 滅菌過的 PBS (pH7.4)
- ②分離緩衝液：含 0.05 % Trypsin 及 0.02 % EDTA 的 PBS，以 0.2 μ m syringe filter 過濾滅菌
- ③T-75 flask：預先以 0.1 % gelatin coating

2.方法

- ①待 T-25 flask 內之細胞長滿後，以沖洗緩衝液潤濕、倒出
- ②注入約 3ml 的 Trypsin，輕輕搖晃盒身
- ③收集後，以 1200rpm 離心 6 分鐘，拍散離心管底部細胞
- ④重覆②、③步驟，取出拍散之細胞置於 10ml 內含有 10 % FCS 的 EBM 培養液中，以 T-75 flask (Flaon)盛裝，在 37 °C、5 % CO₂ 之環境下培養

(二)內皮細胞之確認

A. 型態學之確認

1.光學顯微鏡(Photomicroscope)之觀察：

由於形成管腔是內皮細胞具有的特性，因此若將培養液中 EGF 移除，會使內皮細胞由原先的增殖作用轉變為組織化現象，而在四到六週內形成管腔結構，此可於光學顯微鏡下進行觀察。

2.穿透式電子顯微鏡(Transmission electron microscope; TEM)之觀察：

Weibel-Palade body 是內皮細胞所特有的一種微小胞器 (Organelle)，可藉由 TEM 觀察得到。

樣本處理分析：

- ①繼代培養之內皮細胞以 Trypsin 洗下，1200rpm，離心 6 分鐘後去除上清液
- ②加入 2.5 % 戊二醛—磷酸緩衝液，於 4 °C 下固定一小時
- ③以磷酸緩衝液沖洗三次，每次 10 分鐘
- ④加入 1 % 鉬酸—磷酸緩衝液(pH 7.4)，於 4 °C 下固定一小時
- ⑤以磷酸緩衝液沖洗三次，每次 2 分鐘
- ⑥將 50、70、90、100 % 之乙醇各脫水 15 分鐘
- ⑦以環氧樹脂將樣本包埋
- ⑧以 45~50 ° 玻璃刀切片，樣本厚度約 60~90nm，置入銅篩上
- ⑨以 5 % 醋酸鈾 30 分鐘和檸檬酸鉛 15 分鐘，在 20 °C 下作雙重

染色，即可以 TEM 觀察

3. 掃描式電子顯微鏡(Scanning electron microscope; SEM) 觀察:

樣本處理方式：

- ① 13 mm Thermanox (Nunc) 圓形膠片置於六孔培養盤底部，並以 gelatin coating
- ② 將內皮細胞培養於膠片上，放置隔夜
- ③ 以清水沖洗數次，超音波振盪作表面處理
- ④ 清水潤洗數次後，以 1.5 % O_sO_4 固定
- ⑤ 採臨界點乾燥法(Critical point drying ; CPD)脫水處理：
乙醇為中間液，注入液態 CO_2 於 CPD 樣本槽，將溫度、壓力由 37 、 1072psi 調至 42 、 1300psi，之後緩慢排出氣態 CO_2 ，將樣本固定於樣本座上
- ⑥ 利用 Sputter coater 在樣本表面覆蓋一層金膜，以 SEM 觀察

B. 表面抗原之確認

內皮細胞中的內質網可合成一種特殊蛋白 Von Willebrand factor，儲存在 Weibel-Palade body 中，會被分泌至細胞膜上或胞外，因此可用來做為確認內皮細胞的指標。

1. 確認方法

- ① 將內皮細胞培養於已滅菌且預先以 gelatin coating 的載玻片上
- ② 置於 90x16mm 的培養盤中，於 37 、 5 % CO_2 下培養 24 小時，取出，以清水潤洗後，以 95 % 乙醇固定 30 秒
- ③ 0.01 % PBS 清洗 3 次，加入 0.1ml serum blocking solution 靜置 10 分鐘
- ④ 倒去 serum blocking solution，加入 0.1ml 以 PBS 稀釋 800 倍的 Rabbit Anti-Human Von Willbrand Factor IgG Fraction of Antiserum (Sigma)，靜置 40 分鐘，以 PBS 沖洗 3 次，每次 2 分鐘

- ⑤加入 0.1ml Biotinylated second antibody , 靜置 10 分鐘 , 以 PBS 沖洗 3 次 , 每次 2 分鐘
- ⑥加入 0.1ml Enzyme conjugated , 靜置 10 分鐘 , 以 PBS 沖洗 3 次 , 每次 2 分鐘
- ⑦加入 0.1ml Substrate-chromogen mixture , 5 分鐘後 , 以蒸餾水沖洗
- ⑧加入 0.1ml Hematoxylin 靜置 3 分鐘 , 以自來水沖洗
- ⑨玻片置於 PBS 中約 30 秒 , 在以 70~90 % 乙醇各脫水 10 秒 , 浸入 Xylene 10 秒 , 滴入 0.1ml Histomount 在玻片中央 , 覆上蓋玻片 , 放入 45 °C 烘箱中烘 3 分鐘 , 以光學顯微鏡觀察
- ⑩另取一組不加 Rabbit Anti-Human Von Willbrand Factor IgG Fraction of Antiserum (Sigma) , 改以一般兔子血清添加作為比較組 , 以相同步驟處理後觀察兩組之差異性

(三) 狗腎上皮細胞之分離與培養

- ①將狗腎上皮細胞株(Madin-Darby canine kidney ; MDCK)放於 37 °C 水浴槽中快速解凍 , 輕搖冷凍管使其在 1 分鐘內全部融化
- ②放入含有 10ml DMEM(Dulbecco's modified minimal essential) 的 75-flask 中 , 於 37 °C 、 5 % CO₂ 下培養

(四)內皮細胞/狗腎上皮細胞數目之計算

- ①長滿 T-75 flask 之內皮細胞/狗腎上皮細胞以 0.05 % Trypsin+0.02 % EDTA/ 0.25 % Trypsin+10mM EDTA 分離緩衝液切下
- ②以 1200rpm , 離心 6 分鐘後 , 去除上清液並拍散底部沉澱細胞
- ③加入 4ml 培養液充分混合均勻 , 取出 10 μ l 與等量之 Trypan blue 染劑混合
- ④以 Hemacytometer 計算細胞數目

⑤從 4ml 培養液中取出 2×10^5 細胞培養液，分別種入 24 孔盤中 (Nunc)，使呈現 2×10^5 細胞/well

(五) 維生素 C、E 及尿酸(uric acid)在高葡萄糖壓力下，對於人類臍靜脈內皮細胞/狗腎上皮細胞的影響

A 實驗組別：

以 M-199 medium/DMEM+ 10 % FBS 後，加入不同濃度 (0、5、10、30mM) 的 D-glucose 為基本培養液，再分別添加：

- 1.高濃度維生素 C 0.05mM。
2. 高濃度維生素 E 0.05mM。(Vitamin E by Pharmavite Pharmaceutical Corp., Water Dispersible. 400IU)
- 3.高濃度維生素 C 0.05mM + 高濃度維生素 E 0.05mM。
- 4.尿酸 (3, 5, 10 mg/dl)

B. 方法

- ①將 2×10^5 細胞平均分配至 24 孔培養盤中(Nunc), 使呈現 2×10^5 細胞/well
- ②分別加入上述各實驗條件，每組樣本數為 3，在 37、5 % CO₂ 下培養 72 小時
- ③移除 medium，以 PBS 清洗三次
- ④加入 100 μ l Lysis buffer (buffer A、PMSF、1 % Triton-X、0.1 % SDS)和 300 μ l PBS，靜置一分鐘，刮下細胞並收集
- ⑤在冰浴下以超音波振盪機將細胞膜打破，之後進行總蛋白、纖維網狀蛋白(Fibronectin)、一氧化氮(NO)、LDH 的分析

C.內毒素(LPS)誘發 NO 之實驗組別

分別添加 LPS 0、0.5、1、2、3 μ g/ml，至含有 2×10^5 /well 細胞中，於 37、5 % CO₂ 下培養 72 小時後，進行 NO 及 LDH 之分析。

(六)AGE 抗體的添加

mouse-antihuman AGE 抗體的濃度經測定後為 162.5mg/ml, 稀釋 325 倍使濃度為 0.5mg/ml, 之後再稀釋 10^3 倍, 使終濃度成為 0.5 μ g/ml

A. 實驗組別

以 M-199 medium/DMEM + 10 % FBS 後, 加入不同濃度 (0、5、10、30mM) 的 D-glucose 為基本培養液, 再分別添加:

1. 高濃度維生素 C 0.05mM + AGE 抗體
2. 高濃度維生素 E 0.05mM + AGE 抗體 (Vitamin E by Pharmavite Pharmaceutical Corp., Water Dispersible. 400IU)
3. 高濃度維生素 C 0.05mM + 高濃度維生素 E 0.05mM + AGE 抗體
4. 尿酸 (3, 5, 10 mg/dl) + AGE 抗體

B. 方法

- ① 將 2×10^5 細胞平均分配至 24 孔培養盤中 (Nunc), 使呈現 2×10^5 細胞/well
- ② 分別加入上述各實驗條件, 每組樣本數為 3, 在 37 °C、5 % CO_2 下培養 72 小時
- ③ 移除 medium, 以 PBS 清洗三次
- ④ 加入 100 μ l Lysis buffer (buffer A、PMSF、1 % Triton-X、0.1 % SDS) 和 300 μ l PBS, 靜置一分鐘, 刮下細胞並收集
- ⑤ 在冰浴下以超音波振盪機將細胞膜打破, 之後進行總蛋白、纖維網狀蛋白 (Fibronectin)、一氧化氮 (NO)、LDH 的分析

(七) 分析方法

A. 總蛋白測定

- ① 取 100 μ l 樣本, 加入 100 μ l 1N NaOH 並混合
- ② 加入 1 ml (2 % Na_2CO_3 、0.5 % $CuSO_4$ 、1 % KNa tartate, 2ml NaOH) 混合後, 靜置 10 分鐘

- ③加入 100 μ l 1N Folin reagent 混合，靜置 30 分鐘
- ④以 750 nm 波長測吸光
- ⑤利用已知濃度的牛血清白蛋白(Bovine serum albumin ; BSA) 作出標準曲線，定量各樣本之濃度

B. 纖維網狀蛋白(Fibronectin)濃度之測定

Fibronectin 濃度以酵素接合免疫吸附法 (ELISA) 測定

- ①96 孔盤(Nunc)中，先以 200 μ l 0.1 % gelatin coating，於 37 $^{\circ}$ C 下，放置隔夜
- ②去除 gelatin，以 PBS 清洗 3 次
- ③取 100 μ l 樣本注入 well 中，室溫下緩慢搖晃 30 分鐘
- ④去除樣本，以 PBS 清洗 3 次
- ⑤一次抗體(Rabbit anti-human fibronectin antiserum)以 PBS 稀釋 1000 倍，取 100 μ l 注入 well 中，室溫下緩慢搖晃 30 分鐘
- ⑥去除抗體，以 PBS 清洗 3 次
- ⑦二次抗體 (Goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated)以 PBS 稀釋 10000 倍，取 100 μ l 注入 well 中，室溫下緩慢搖晃 30 分
- ⑧去除抗體，以 PBS 清洗 3 次
- ⑨取 100 μ l 呈色劑(5mg O-Phenylene diamine + 10ml citrate buffer + 10 μ l 30 % H₂O₂) 注入 well 中，室溫下緩慢搖晃 30 分鐘
- ⑩取 50 μ l 終止劑(3N HCl) 注入 well 中，以 ELISA reader 在波長 490nm 下測吸光值

C. 一氧化氮(NO)之測定

1. Nitrite (NO₂)

- ①取 50 μ l 樣本 + 27 μ l 二次水注入 96-well 中，混勻
- ②30 分鐘後以 540 nm 波長測吸光 (A1)
- ③加入呈色劑 25 μ l sulfanilamide + 25 μ l N- (1-naphthyl)

-ethlenedia，混勻並遮光

- ④反應 10 分鐘後，測吸光值 (A2)。將 A1 和 A2 帶入公式，即 NO₂ 之吸光值。並作出標準曲線，定量各樣本之濃度

2.Total NO (NO₂+NO₃)

- ①取 50 μ l 樣本 + 25 μ l NADPH + 2 μ l nitrate reductase 注入 96-well 中，混勻
- ②30 分鐘後以 540nm 波長測吸光 (A1)
- ③加入呈色劑 25 μ l sulfanilamide + 25 μ l N- (1-naphthyl) -ethlenedia，混勻並遮光
- ④反應 10 分鐘後測吸光值 (A2)。將 A1 和 A2 帶入公式，即 Total NO 之吸光值。並作出標準曲線，定量各樣本之濃度
- ⑤將 NO₂ 除以 total NO 之吸光值計算出濃度

D.LDH 之測定

- ①取 100 μ l 樣本至 96-well 中，加入 100 μ l diaphorase/NAD⁺、iodotetrozolium chloride (INT) 和 sodium lactate 的混合溶液，混合並遮光
- ②30 分鐘後以波長 490 nm 測吸光

三、統計分析

實驗數據以 SAS 軟體進行分析，以平均值加減標準差(Mean \pm Standard Error)表示，各處理組之間在 P-value 值 \leq 0.05 時才具顯著差異。

第三章 實驗結果

一、內皮細胞

(一)、分離與確認

1.內皮細胞之分離

由本校附設醫院產房提供之嬰兒臍帶，在無菌處理下儘速以無菌操作分離出靜脈內皮細胞。圖一(a)為內皮細胞初代培養 12 小時之情形，圖一(b)為內皮細胞一星期後增殖之情形。

2.內皮細胞之確認

初代培養之臍靜脈內皮細胞以 Trypsin-EDTA 洗下，離心、分裝後，進行繼代培養(Passage culture)，至第 4-5 代時取出部份細胞作確認工作。於光學顯微鏡下觀察到細胞的外觀呈不規則、單核、平貼於盒底，屬單層細胞。以不含 hEGF 的培養液培養後，約一個月後可觀察到管腔狀結構。利用電子顯微鏡可看到內皮細胞的細胞核突起呈現小丘狀，且外圍有許多絲狀結構，為 Microprojections。內部則可看到特有的胞器 Weibel-Palade body。除了利用上述細胞外觀、結構、生理現象等，來確認內皮細胞外，也可利用免疫組織染色法(Immunohistological stain)確認。在內皮細胞表面有種特殊蛋白 von Willebrand factor，會與 Rabbit Anti-human von Willebrand factor 一次抗體結合，經二次抗體與呈色劑作用後，出現橙紅色；若未與抗體作用則為藍紫色。

經由不同方法確認所分離出的為內皮細胞後，即可進行一系列的實驗分析。

(二)、纖維網狀蛋白

1.不同葡萄糖濃度的添加對內皮細胞中纖維網狀蛋白的影響

本實驗以 4 種葡萄糖濃度(0 5 10 30mM)和 10 % FBS 添加於 M-199 中做為培養液，分別代表控制組、模擬正常血漿葡萄糖濃度(90mg/dl)、糖尿病臨界點(180mg/dl)、嚴重高血糖(540mg/dl)。在 72 小時培養後，

分析各組總蛋白及纖維網狀蛋白含量的變化。

結果顯示不同濃度葡萄糖的添加，對細胞內總蛋白含量無顯著差異(圖二， $p > 0.05$)。為了呈現客觀的實驗結果，各組纖維網狀蛋白濃度皆以個別總蛋白作校正，以下各結果均以纖維網狀蛋白/總蛋白的比值表示。由圖三可知，從正常葡萄糖濃度(5mM)起，隨著葡萄糖濃度增加，纖維網狀蛋白的含量呈現遞增狀態。

2. 維生素 C 的添加對內皮細胞中纖維網狀蛋白的影響

以 M-199+10 % FBS 培養液分別添加 0、5、10、30mM 葡萄糖，再添加 0.05mM 維生素 C 於內皮細胞中，培養 72 小時後分析總蛋白及纖維網狀蛋白含量的變化。

結果顯示維生素 C 的添加，對細胞內總蛋白含量無顯著差異(圖二， $p > 0.05$)。由圖三得知在正常生理葡萄糖濃度下(5mM)，纖維網狀蛋白濃度下降；隨著葡萄糖濃度增加(10、30mM)，維生素 C 對纖維網狀蛋白的刺激呈現遞增狀態。以纖維網狀蛋白/總蛋白的比值表示，在正常葡萄糖濃度下，0.05mM 維生素 C 對內皮細胞中纖維網狀蛋白含量的影響有顯著差異($p < 0.05$)。

3. 維生素 E 的添加對內皮細胞中纖維網狀蛋白的影響

以 M-199+10 % FBS 培養液分別添加 0、5、10、30mM 葡萄糖，再添加 0.05mM 維生素 E 於內皮細胞中，培養 72 小時後分析總蛋白及纖維網狀蛋白含量的變化。

結果顯示維生素 E 的添加，對細胞內總蛋白含量無顯著差異(圖二， $p > 0.05$)。由圖三得知在葡萄糖濃度(5mM)情況下，纖維網狀蛋白濃度下降；隨著葡萄糖濃度增加(10、30mM)，維生素 E 對纖維網狀蛋白的刺激呈現遞增狀態。若與未添加維生素 E 的控制組比較，在不同濃度的葡萄糖環境下，對於內皮細胞中纖維網狀蛋白的含量並無顯著差異性($p > 0.05$)

4. 共同添加維生素 C、E 對內皮細胞中纖維網狀蛋白的影響

以 M-199+10 % FBS 培養液分別添加 0、5、10、30mM 葡萄糖，再

添加 0.05mM 維生素 C 和 0.05mM 維生素 E 於內皮細胞中，培養 72 小時後分析總蛋白及纖維網狀蛋白含量的變化。

結果顯示維生素 C、E 的添加，對不同葡萄糖濃度下之細胞內總蛋白含量無顯著差異(圖二， $p > 0.05$)。在圖三中，正常生理葡萄糖濃度下(5mM)，纖維網狀蛋白濃度下降；隨著葡萄糖濃度增加，維生素 C、E 對纖維網狀蛋白的刺激呈現遞增狀態。而在葡萄糖濃度為 5、10、30mM 時，對內皮細胞中纖維網狀蛋白含量的影響有顯著差異。若與未添加維生素 C、E 的各組比較，對纖維網狀蛋白的合成具有抑制作用。

5.尿酸的添加對內皮細胞中纖維網狀蛋白的影響

以 M-199+10 % FBS 培養液分別添加 0、5、10、30mM 葡萄糖，再分別添加不同濃度的尿酸(3、5、10mg/dl；分別代表正常生理濃度、略高濃度、已達痛風濃度)於內皮細胞中，培養 72 小時後分析總蛋白及纖維網狀蛋白含量的變化。

在總蛋白濃度方面，各濃度尿酸添加於各不同葡萄糖濃度下，對細胞的影響無顯著差異(圖二， $p > 0.05$)。圖四結果顯示在正常生理葡萄糖濃度下(5mM)，任何濃度尿酸對纖維網狀蛋白的刺激均降低；隨著葡萄糖濃度增加(10、30mM)，對纖維網狀蛋白的刺激呈現遞增狀態。若與未添加尿酸的控制組比較，添加尿酸後纖維網狀蛋白的含量則明顯降低。尿酸濃度在 10mg/dl 時，抑制作用最明顯，呈現 Dose-dependent 的趨勢。

6.添加 AGE 抗體後，對於添加了維生素 C、E 之內皮細胞中纖維網狀蛋白含量的影響

由圖五結果得知，隨著葡萄糖濃度上升，纖維網狀蛋白產量呈遞增趨勢。不論在任何葡萄糖濃度下，各別加入維生素 C、維生素 E 與共同加入維生素 C、E 的組別，其纖維網狀蛋白含量與未添加的控制組比較，均明顯降低，在統計上具有明顯差異性(Data not show, $P < 0.05$)。

7.添加 AGE 抗體後，對於添加不同濃度尿酸之內皮細胞中纖維網狀蛋白含量的影響

由圖五得知，添加不同濃度的尿酸與未添加尿酸的控制組比較，內

皮細胞中纖維網狀蛋白含量明顯降低，尤其是尿酸濃度為 10mg/dl 時，纖維網狀蛋白產量大為減少，具有統計上的差異(Data not show, $p < 0.05$)。

(三)LPS(Lipopolysaccharide)

1.不同濃度 LPS 的添加對於內皮細胞中 NO 之影響

由於內皮細胞所釋放的 NO 非常微量，因此藉由添加 LPS 誘發內皮細胞釋出一氧化氮，來觀察利用 NO kit 是否適用於偵測內皮細胞中一氧化氮的含量。

由圖六結果得知，此 kit 適用於內皮細胞的 NO 測定，當 LPS 濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 時，NO 的釋出量達最大。隨著 LPS 濃度增加，NO 含量有漸減的趨勢，與控制組比較無顯著差異($p > 0.05$)。

2.不同濃度 LPS 的添加對於內皮細胞死亡之影響

添加 LPS 於內皮細胞中觀察細胞死亡(LDH 釋出量)的情形。

在圖六可觀察到 LPS 濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 時，LDH 釋出量最大(即細胞死亡數最多)，之後隨著 LPS 濃度增加，細胞死亡情形並無明顯差異($p > 0.05$)。

(四)NO

1.不同葡萄糖濃度的添加對於內皮細胞中 NO 之影響

以四種葡萄糖濃度(0、5、10、30mM；分別代表控制組、正常血漿葡萄糖濃度(90mg/dl)、糖尿病臨界點(180g/dl)、嚴重高血糖(540mg/dl))的 M-199+10 % FBS 培養液添加於內皮細胞中，於 72 小時培養後，分析 NO 含量的變化。為了使實驗結果更加客觀，所有 NO 值皆除以總蛋白量後，以 $\text{NO}_2/\text{total NO}$ 之比值表示。

圖九結果顯示在正常生理葡萄糖濃度(5mM)下，NO 的產量最高，隨著葡萄糖濃度增加，內皮細胞中 NO 的含量有下降的現象，但無明顯差異性($p > 0.05$)。

2.添加維生素 C 對內皮細胞中 NO 的影響

以 M-199+10 % FBS 培養液分別添加 0、5、10、30mM 葡萄糖，再

添加 0.05mM 維生素 C，培養 72 小時後，分析內皮細胞中 NO 含量的變化。

由圖九顯示，葡萄糖濃度(10、30mM)時，NO 含量有較少的趨勢，與控制組比較無顯著差異($p > 0.05$)。若與未添加維生素 C 的各組比較，添加維生素 C 後，NO 的含量有下降，但仍無顯著差異($p > 0.05$)。

3. 添加維生素 E 對內皮細胞中 NO 的影響

以 M-199+10 % FBS 培養液分別添加 0、5、10、30mM 葡萄糖，再添加 0.05mM 維生素 E，培養 72 小時後，分析內皮細胞中 NO 含量的變化。

結果顯示，在葡萄糖濃度 5mM 時，對 NO 的刺激達最高，隨著葡萄糖濃度增加，NO 的含量呈現遞減趨勢。若與未添加維生素 E 之控制組比較，添加維生素 E 後，NO 含量有下降，但無明顯差異性(圖九， $p > 0.05$)。

4. 維生素 C、E 的共同添加對內皮細胞中 NO 的影響

以 M-199+10 % FBS 培養液分別添加 0、5、10、30mM 葡萄糖，再添加 0.05mM 維生素 C 和 0.05mM 維生素 E，培養 72 小時後，分析內皮細胞中 NO 含量的變化。

圖九結果顯示，在葡萄糖濃度為 5、10、30mM 時，維生素 C、E 共同添加對內皮細胞中 NO 的含量有顯著差異($p < 0.05$)。若與未添加維生素 C、E 的控制組比較，NO 含量有明顯降低(Data not show)。

5. 尿酸的添加對於內皮細胞中 NO 的影響

以 M-199+10 % FBS 培養液分別添加 0、5、10、30mM 葡萄糖，再分別加入不同濃度的尿酸(3、5、10mg/dl；分別代表正常生理濃度、略高濃度、已達痛風濃度)於內皮細胞中，培養 72 小時後，分析 NO 含量的變化。

如圖十所示，在葡萄糖濃度 5mM 時，三種不同尿酸濃度的添加，NO 含量均有明顯差異($p < 0.05$)；而於葡萄糖濃度 10mM 時，添加了 3mg/dl(正常濃度)、5mg/dl(略高濃度)之尿酸，NO 含量有明顯下降($p <$

0.05)。若與未添加尿酸的各組比較，尿酸濃度在正常情況下(3mg/dl)，有顯著差異(Data not show)。

6. 添加 AGE 抗體後，對於添加了維生素 C、E 之內皮細胞中 NO 含量的影響

結果顯示在不同葡萄糖濃度下添加 AGE 抗體，對 NO 含量並無明顯差異。個別添加維生素 C、維生素 E 和維生素 C、E 共同添加的組別，與未添加的控制組比較，NO 含量有降低現象 (圖十)。

7. 添加 AGE 抗體後，對於添加不同濃度尿酸內皮細胞中 NO 含量的影響

由圖十結果得知，添加不同濃度尿酸對於各不同葡萄糖濃度下，內皮細胞中 NO 含量變化無顯著差異；與未添加尿酸的控制組比較，仍無差異性存在($p > 0.05$)。

(五)LDH

1. 不同葡萄糖濃度的添加對內皮細胞死亡的影響

LDH(Lactate dehydrogenase)存在大部分細胞的細胞質，在細胞死亡或細胞膜受損時，LDH 會釋放至培養液中，因此可作為細胞死亡的指標

結果顯示：在正常生理葡萄糖濃度下(5mM)，LDH 值最低，隨著葡萄糖濃度增加，LDH 有上升趨勢，即內皮細胞死亡情形增加；與對照組比較無顯著差異(圖十一， $p > 0.05$)。

2. 添加維生素 C 對內皮細胞死亡的影響

在圖十一結果顯示，葡萄糖濃度 5mM 時，細胞死亡情形有顯著差異($p < 0.05$)；與未添加維生素 C 的控制組比較，則有下降的現象。

3. 添加維生素 E 對內皮細胞死亡的影響

在圖十一結果顯示，在模擬糖尿病情況下(10mM)，細胞死亡情形下降；在正常生理濃度(5mM)和嚴重高血糖(30mM)時，死亡情形則無變化。

4. 維生素 C、E 的共同添加對內皮細胞死亡的影響

在圖十一結果顯示，共同添加維生素 C、E 時，在葡萄糖濃度 5mM 情況下，有明顯差異($p < 0.05$)。與未添加維生素 C、E 的各組比較，內

皮細胞死亡情形有降低的現象。

5.尿酸的添加對於內皮細胞死亡的影響

在圖十二得知，添加不同濃度尿酸於不同葡萄糖濃度下，細胞死亡情形皆下降，在添加尿酸 3mg/dl 時，有顯著差異($p < 0.05$)。與未添加尿酸的控制組比較，死亡情況均有降低的現象。

6.添加 AGE 抗體後，對於添加維生素 C、E 內皮細胞死亡的影響

由圖十三得知，隨著葡萄糖濃度上升，單獨添加維生素 C、E 和共同添加的組別中，其 LDH 釋出量也隨之增加。若與未添加抗氧化劑的各組比較，在葡萄糖濃度 5mM 和 30mM 時，添加了抗氧化劑維生素 C、E 的組別，細胞死亡的情形有降低的現象。

7.添加 AGE 抗體後，對於添加不同濃度尿酸內皮細胞死亡的影響

由圖十三結果得知，不同濃度尿酸(3、5、10mg/dl)添加在各葡萄糖濃度下，並無顯著差異($p > 0.05$)。若與未添加尿酸的控制組比較，葡萄糖濃度為 30mM 時，有延緩死亡的情形。

二、狗腎上皮細胞(MDCK)

(一)、纖維網狀蛋白

1.不同葡萄糖濃度的添加對 MDCK 中纖維網狀蛋白的影響

本實驗以 4 種葡萄糖濃度(0 5 10 30mM)和 10 % FBS 添加於 DMEM 中做為培養液，分別代表控制組、模擬正常血漿葡萄糖濃度(90mg/dl)、糖尿病臨界點(180mg/dl)、嚴重高血糖(540mg/dl)。在 72 小時培養後，分析各組總蛋白及纖維網狀蛋白含量的變化。

結果顯示不同濃度葡萄糖的添加，對細胞內總蛋白含量無顯著差異(圖十四， $p > 0.05$)。為了呈現客觀的實驗結果，各組纖維網狀蛋白濃度皆以個別總蛋白作校正，以下各結果均以纖維網狀蛋白/總蛋白的比值表示。由圖十五可知，從正常葡萄糖濃度(5mM)起，隨著葡萄糖濃度增加，纖維網狀蛋白的含量呈現遞增狀態。

2.維生素 C 的添加對 MDCK 中纖維網狀蛋白的影響

結果顯示維生素 C 的添加，對細胞內總蛋白含量無顯著差異(圖十

四， $p > 0.05$)。由圖十五得知在正常生理葡萄糖濃度下(5mM)，纖維網狀蛋白濃度下降；隨著葡萄糖濃度增加(10mM)，維生素 C 對纖維網狀蛋白的刺激呈現遞增狀態。以纖維網狀蛋白/總蛋白的比值表示，在正常葡萄糖濃度下，0.05mM 維生素 C 對 MDCK 中纖維網狀蛋白含量的影響有顯著差異($p < 0.05$)。

3. 維生素 E 的添加對 MDCK 中纖維網狀蛋白的影響

結果顯示維生素 E 的添加，對細胞內總蛋白含量無顯著差異(圖十四， $p > 0.05$)。由圖十五得知在葡萄糖濃度(5mM)情況下，纖維網狀蛋白濃度下降；隨著葡萄糖濃度增加(10、30mM)，維生素 E 對纖維網狀蛋白的刺激呈現遞增狀態。若與未添加維生素 E 的控制組比較，在不同濃度的葡萄糖環境下，對於 MDCK 中纖維網狀蛋白的含量並無顯著差異性($p > 0.05$)

4. 共同添加維生素 C、E 對 MDCK 中纖維網狀蛋白的影響

結果顯示維生素 C、E 的添加，對不同葡萄糖濃度下之細胞內總蛋白含量無顯著差異(圖十四， $p > 0.05$)。在圖十五中，與未添加維生素 C、E 的各組比較，對纖維網狀蛋白的合成具有抑制作用。

5. 尿酸的添加對 MDCK 中纖維網狀蛋白的影響

在總蛋白濃度方面，各濃度尿酸添加於各不同葡萄糖濃度下，對細胞的影響無顯著差異(圖十四， $p > 0.05$)。圖十六結果顯示在正常生理葡萄糖濃度下(5mM)，任何濃度尿酸對纖維網狀蛋白的刺激均降低；隨著葡萄糖濃度增加(10、30mM)，對纖維網狀蛋白的刺激呈現遞增狀態。若與未添加尿酸的控制組比較，添加尿酸後纖維網狀蛋白的含量則明顯降低(Data not show， $P < 0.05$)。

6. 添加 AGE 抗體後，對於添加了維生素 C、E 之 MDCK 中纖維網狀蛋白含量的影響

由圖十七結果得知，隨著葡萄糖濃度上升，纖維網狀蛋白產量呈遞增趨勢。不論在任何葡萄糖濃度下，各別加入維生素 C、維生素 E 與共同加入維生素 C、E 的組別，其纖維網狀蛋白含量與未添加的控制組比

較，均有減少的現象。

7.添加 AGE 抗體後，對於添加不同濃度尿酸之 MDCK 中纖維網狀蛋白含量的影響

由圖十七得知，添加不同濃度的尿酸與未添加尿酸的控制組比較，MDCK 中纖維網狀蛋白含量明顯降低，具有統計上的差異(Data not show, $p < 0.05$)。

(二)NO

1.不同葡萄糖濃度的添加對於 MDCK 中 NO 之影響

為了使實驗結果更加客觀，所有 NO 值皆除以總蛋白量後，以 $\text{NO}_2/\text{total NO}$ 之比值表示。

圖十八結果顯示在正常生理葡萄糖濃度(5mM)下，NO 的產量最高，隨著葡萄糖濃度增加，MDCK 中 NO 的含量有下降的現象，但無明顯差異性($p > 0.05$)。

2.添加維生素 C 對 MDCK 中 NO 的影響

由圖十八顯示，葡萄糖濃度(10、30mM)時，NO 含量有較少的趨勢，與控制組比較無顯著差異($p > 0.05$)。若與未添加維生素 C 的各組比較，添加維生素 C 後，NO 的含量有下降，但仍無顯著差異($p > 0.05$)。

3.添加維生素 E 對 MDCK 中 NO 的影響

結果顯示，在各葡萄糖濃度下，維生素 E 的添加對 NO 的變化不大。若與未添加維生素 E 之控制組比較，添加維生素 E 後，NO 含量有下降，但無明顯差異性(圖十八, $p > 0.05$)。

4.維生素 C、E 的共同添加對 MDCK 中 NO 的影響

圖十八結果顯示，在葡萄糖濃度為 10、30mM 時，維生素 C、E 共同添加對腎上皮細胞中 NO 的含量有顯著差異($p < 0.05$)。若與未添加維生素 C、E 的控制組比較，NO 含量有明顯降低(Data not show)。

5.尿酸的添加對於 MDCK 中 NO 的影響

如圖十九所示，在葡萄糖濃度(5、10、30mM)下，三種不同尿酸濃度的添加，NO 的釋出量有下降；若與未添加尿酸的各組比較，添加尿

酸的組別 NO 含量有顯著差異(Data not show)。

6. 添加 AGE 抗體後，對於添加了維生素 C、E 之 MDCK 中 NO 含量的影響

結果顯示在不同葡萄糖濃度下添加 AGE 抗體，對 NO 含量並無明顯差異。個別添加維生素 C、維生素 E 和維生素 C、E 共同添加的組別，與未添加的控制組比較，NO 含量有降低現象 (圖二十)。

7. 添加 AGE 抗體後，對於添加不同濃度尿酸 MDCK 中 NO 含量的影響

由圖二十結果得知，添加不同濃度尿酸對於各不同葡萄糖濃度下，內皮細胞中 NO 含量變化無顯著差異；與未添加尿酸的控制組比較，仍無差異性存在($p > 0.05$)。

(三)LDH

1. 不同葡萄糖濃度的添加對 MDCK 死亡的影響

LDH(Lactate dehydrogenase)存在大部分細胞的細胞質，在細胞死亡或細胞膜受損時，LDH 會釋放至培養液中，因此可作為細胞死亡的指標

結果顯示：在正常生理葡萄糖濃度下(5mM)，LDH 值最低，隨著葡萄糖濃度增加，LDH 有上升趨勢，即內皮細胞死亡情形增加；與對照組比較無顯著差異(圖二十一， $p > 0.05$)。

2. 添加維生素 C 對 MDCK 死亡的影響

在圖二十一結果顯示，葡萄糖濃度 5mM 時，細胞死亡情形有顯著差異($p < 0.05$)；與未添加維生素 C 的控制組比較，則有下降的現象。

3. 添加維生素 E 對 MDCK 死亡的影響

在圖二十一結果顯示，未添加維生素 E 的控制組和添加維生素 E 的組別比較，死亡情形有降低現象。

4. 維生素 C、E 的共同添加對 MDCK 死亡的影響

在圖二十一結果顯示，共同添加維生素 C、E 時，在葡萄糖濃度 5 和 10mM 情況下，有明顯差異($p < 0.05$)。與未添加維生素 C、E 的各組

比較，MDCK 死亡情形有降低的現象。

5.尿酸的添加對於 MDCK 死亡的影響

在圖二十二得知，添加不同濃度尿酸於不同葡萄糖濃度下，細胞死亡情形皆下降。與未添加尿酸的控制組比較，死亡情況均有降低的現象。

6.添加 AGE 抗體後，對於添加維生素 C、E 後 MDCK 死亡的影響

由圖二十三得知，隨著葡萄糖濃度上升，單獨添加維生素 C、E 和共同添加的組別中，其 LDH 釋出量也隨之增加。若與未添加抗氧化劑的各組比較，在葡萄糖濃度 5、10、30mM 時，添加了抗氧化劑維生素 C、E 的組別，細胞死亡的情形有降低的現象。

7.添加 AGE 抗體後，對於添加不同濃度尿酸 MDCK 死亡的影響

由圖二十三結果得知，不同濃度尿酸(3、5、10mg/dl)添加在各葡萄糖濃度下，並無顯著差異($p > 0.05$)。若與未添加尿酸的控制組比較，葡萄糖濃度為 10 和 30mM 時，有延緩死亡的情形。

三、總結

(一)內皮細胞

1.隨著葡萄糖濃度增加，內皮細胞中纖維網狀蛋白的含量和細胞死亡(LDH 釋出量)呈現遞增現象，但 NO 含量呈現遞減的情形。

2.各別添加 0.05mM 維生素 C、E 或共同添加，均會降低不同葡萄糖濃度(0、5、10、30mM)下，纖維網狀蛋白、NO 和 LDH 的含量。

3.不同濃度尿酸(3、5、10mg/dl)的添加，均使內皮細胞中纖維網狀蛋白、NO 和 LDH 含量下降。

4.添加 AGE 抗體在各葡萄糖濃度下，分別加入 0.05mM 維生素 C、E 和尿酸(3、5、10mg/dl)，其纖維網狀蛋白含量皆有降低的現象。

(二)狗腎上皮細胞

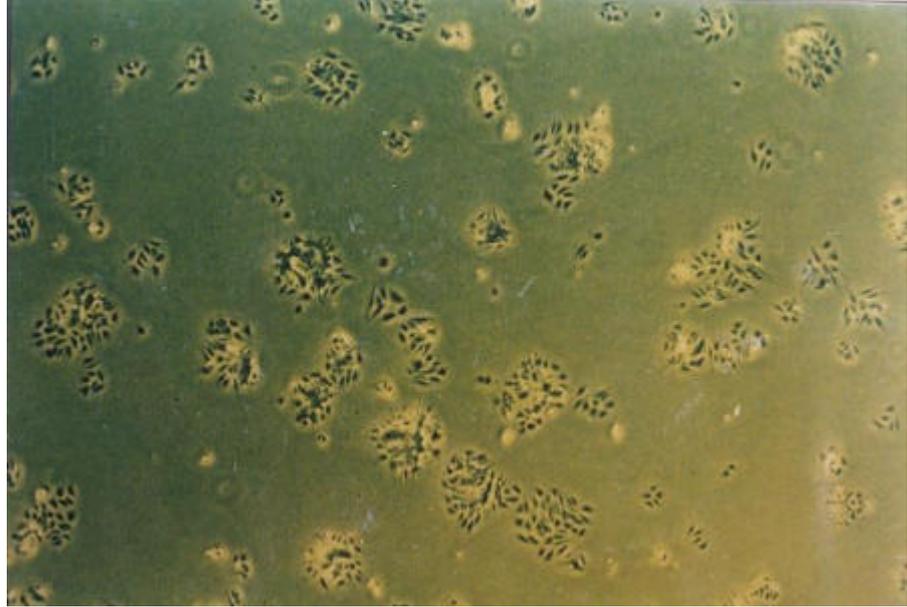
1.隨著葡萄糖濃度增加，MDCK 中纖維網狀蛋白、NO 和 LDH 量呈現遞增的現象。

2.各別添加 0.05mM 維生素 C、E 或共同添加，均會降低不同葡萄糖濃度(0、5、10、30mM)下，纖維網狀蛋白、NO 和 LDH 的含量。

3.不同濃度尿酸(3、5、10mg/dl)的添加，均使內皮細胞中纖維網狀蛋白、NO 和 LDH(細胞死亡)降低。

4.添加 AGE 抗體在各葡萄糖濃度下，分別加入 0.05mM 維生素 C、E 和尿酸(3、5、10mg/dl)，其纖維網狀蛋白、NO 和 LDH 含量均有降低的趨勢。

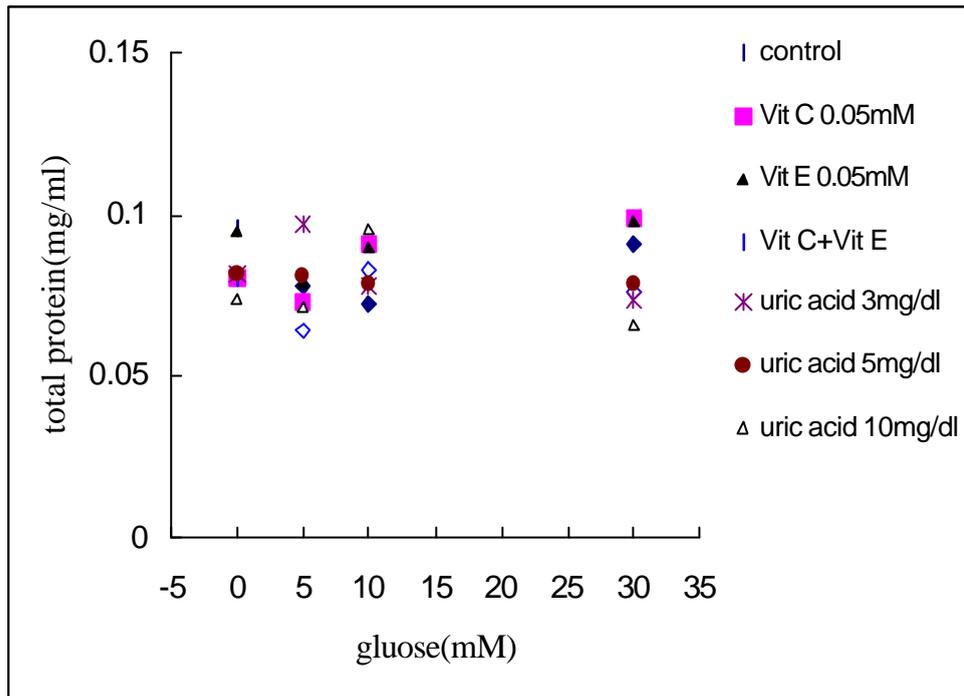
(a)



(b)



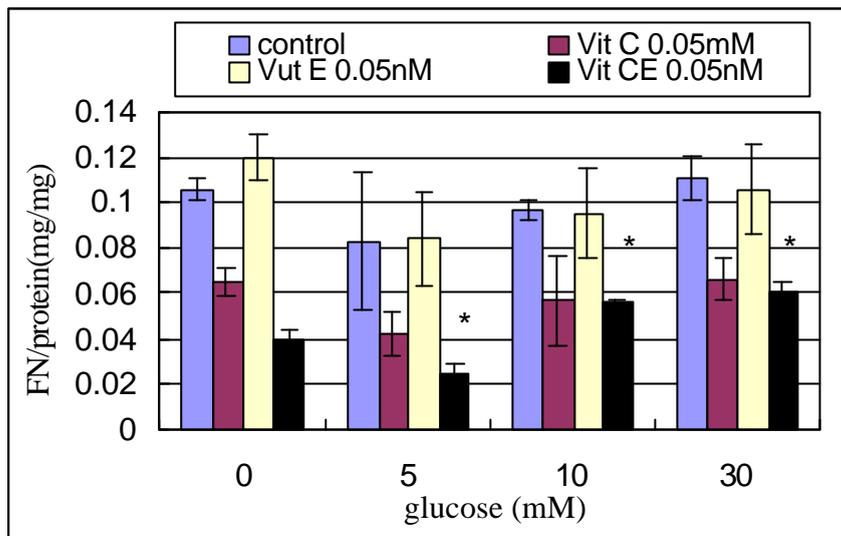
圖一 (a)初帶培養12小時之人類臍靜脈內皮細胞



圖二 不同實驗條件對於人類臍靜脈內皮細胞總蛋白的影響

fig.2 The effect of glucose 、 0.05mM vitamin C、 E and uric acid on the total protein of HUVEC

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10 % FBS 的 medium 199中(分別添加 0、 5、 10、 30 mM葡萄糖、 0.05 mM維生素C 、 0.05 mM維生素E 、 3、 5、 10 mg/dl 尿酸) ， 培養72小時後測定每組細胞所含總蛋白的濃度 ， 結果以平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm SD ， n=3)

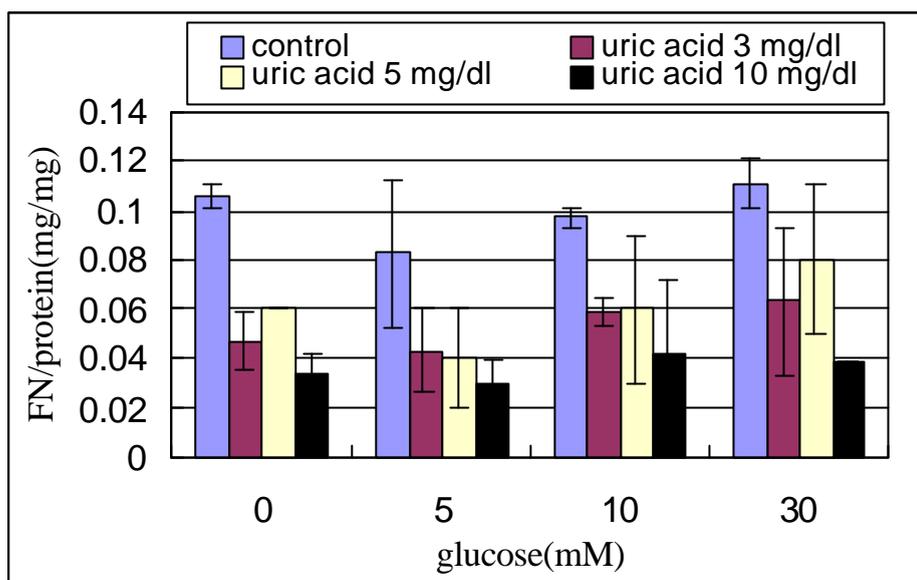


圖三 添加維生素C、E在各葡萄糖濃度下，對於內皮細胞中纖維網狀蛋白的影響

Fig.3 The effect of glucose、 vitamin C、 E on the fibronectin of HUVEC

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10 % FBS 的 medium 199中(分別添加 0 5 10 30 mM葡萄糖、 0.05 mM維生素C、 E) , 培養72小時後測定每組細胞所含蛋白質和纖維網狀蛋白的濃度 , 結果以每毫克蛋白質中所含纖維網狀蛋白的平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm SD , n=3)

“*” 與控制組比較具有顯著差異($p < 0.05$)



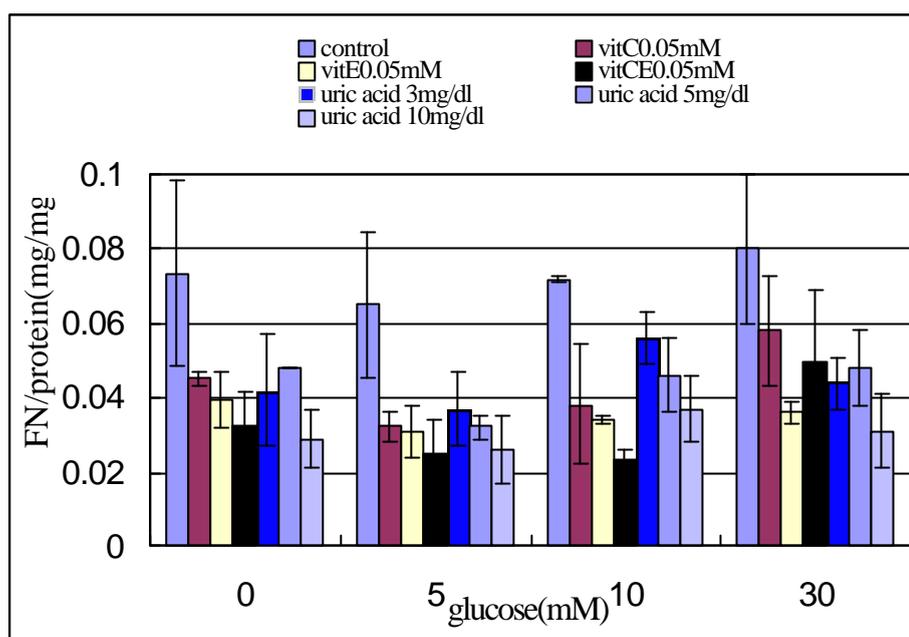
圖四 添加不同濃度尿酸在各葡萄糖濃度下，對於內皮細胞中纖維網狀蛋白的影響

fig.4 The effect of glucose and uric acid on the fibronectin of HUVEC

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10% FBS 的 medium 199中 (分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、3、5、10mg/dl 尿酸) , 培養72小時後測定每組細胞所含蛋白質和纖維網狀蛋白的濃度, 結果以每毫克蛋白質中所含纖維網狀蛋白的平均值 \pm 標準差表示 (mean

\pm

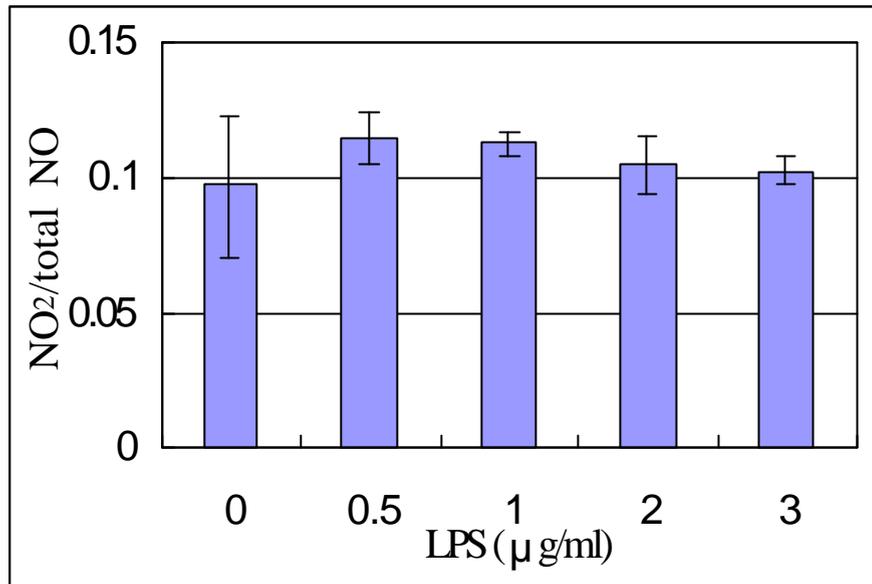
SD, n=3)



圖五 添加維生素C、E、尿酸於各葡萄糖濃度下，加入AGE 抗體
對於內皮細胞中纖維網狀蛋白的影響

Fig.5 The effect of glucose、 vitamin C、 E、 uric acid and AGE
anti-body on the fibronectin of HUVEC

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10% FBS 的 medium 199中(分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、3、5、10mg/dl 尿酸 和 AGE抗體)， 培養 72小時後測定每組細胞所含蛋白質和纖維網狀蛋白的濃度，結果以 每毫克蛋白質中所含纖維網狀蛋白的平均值 \pm 標準差表示(mean \pm SD , n=3)

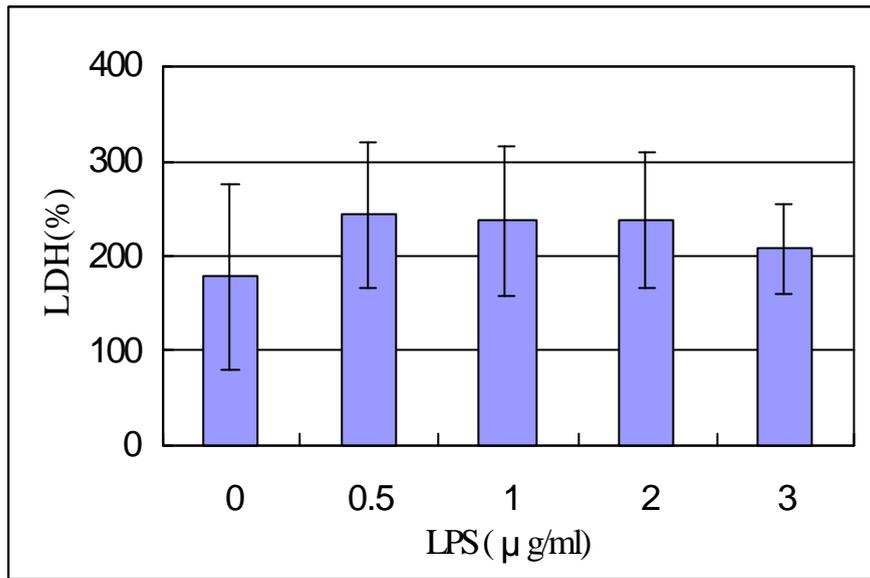


圖六 添加內毒素(LPS) , 對於誘發內皮細胞NO產生的情形

Fig.6 The effect of LPS on the nitric oxide of HUVEC

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10% FBS 的 medium 199中

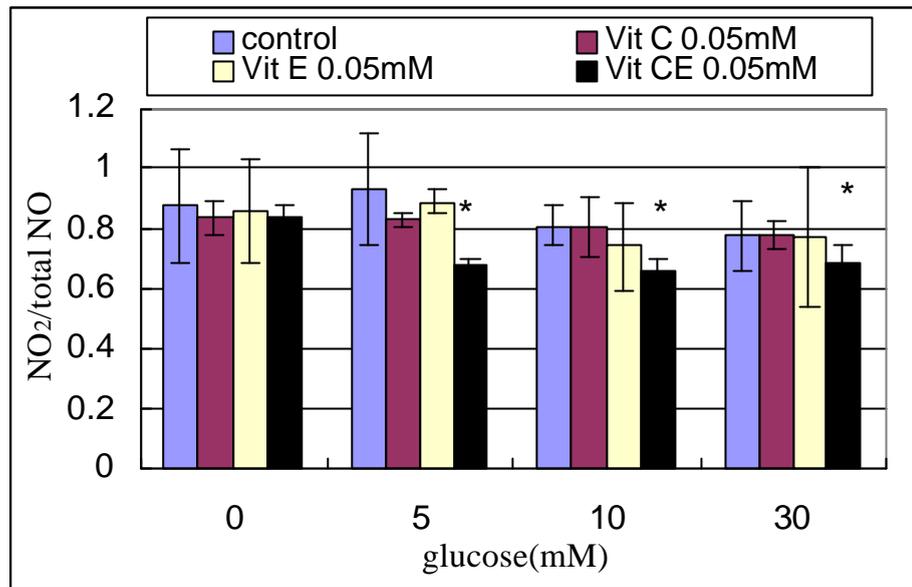
(分別添加 0、0.5、1、2、3 μ g/ml LPS) , 培養 72小時後測定每組細胞培養液中NO的濃度 , 結果以每毫克蛋白質中所含 total NO/NO₂的平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm SD , n=3)



圖七 內毒素(LPS)的添加，對於內皮細胞死亡的情形

Fig.7 The effect of LPS on death of HUVEC

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10 % FBS 的 medium 199 中(分別添加 0、0.5、1、2、3 $\mu\text{g/ml}$ LPS)，培養 72小時後測定每組細胞培養液中LDH的濃度，結果以每毫克蛋白質中所含LDH的平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm SD , n=3)

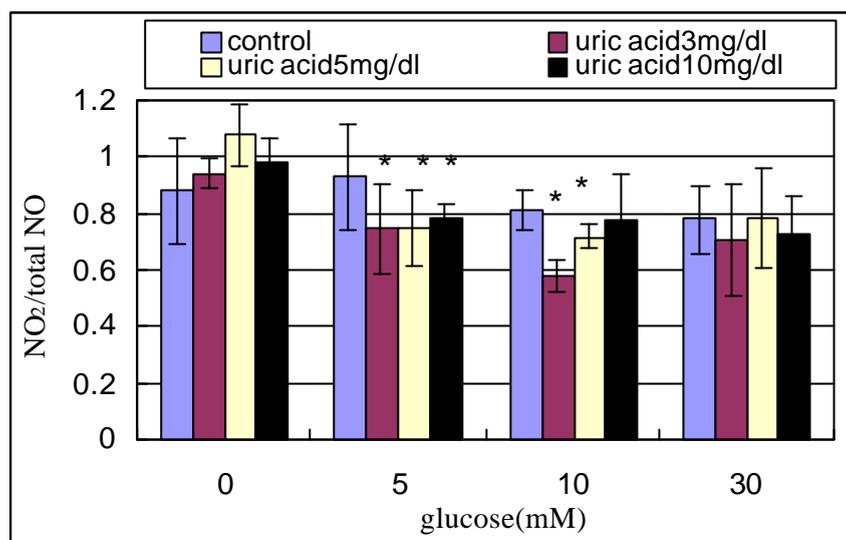


圖八 添加維生素C、E於各葡萄糖濃度下，觀察內皮細胞中NO的變化

Fig.8 The effect of glucose, vitamin C, E on the nitric oxide of HUVEC

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10% FBS 的 medium 199中 (分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、0.05 mM維生素C、E) , 培養72小時後測定每組細胞培養液中NO的濃度 , 結果以每毫克蛋白質中所含 total NO/NO₂的平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm SD , n=3)

“*” 與控制組比較具有顯著差異(p < 0.05)

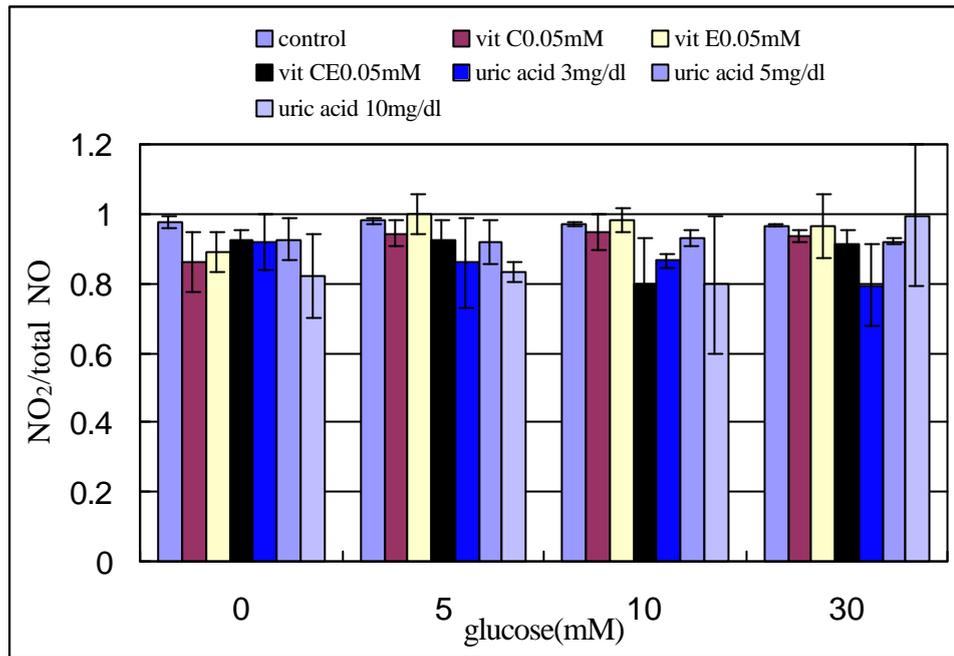


圖九 添加不同濃度尿酸於各葡萄糖濃度下，觀察內皮細胞中NO的變化

fig.9 The effect of glucose and uric acid on the nitric oxide of HUVEC

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10% FBS 的 medium 199中(分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、3、5、10mg/dl 尿酸)，培養72小時後測定每組細胞培養液中NO的濃度，結果以每毫克蛋白質中所含total NO/NO₂的平均值 ± 標準差表示 (mean ± SD, n=3)

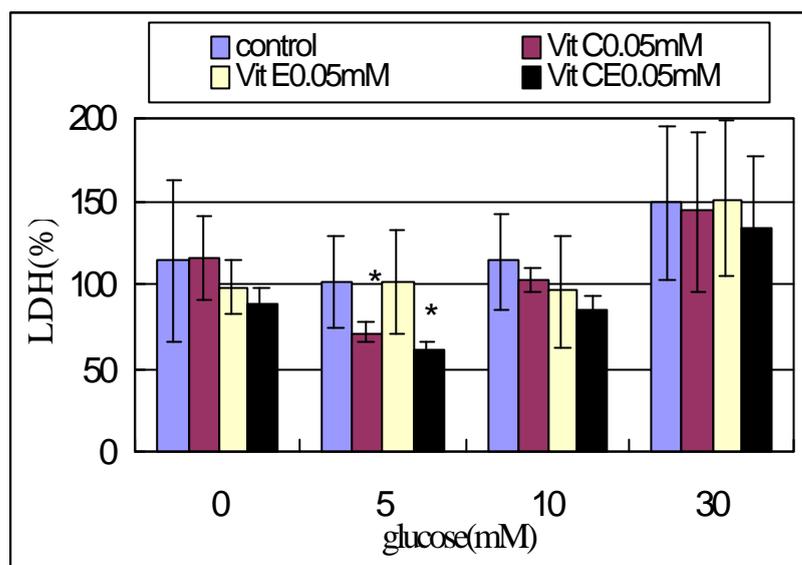
“*” 與控制組比較具有顯著差異(p < 0.05)



圖十 添加維生素C、E、尿酸於各葡萄糖濃度下，加入AGE抗體對於內皮細胞中NO的影響

Fig.10 The effect of glucose, vitamin C, E, uric acid and AGE anti-body on the nitric oxide of HUVEC

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10% FBS 的 medium 199 中(分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、0.05 mM維生素C、E, 3、5、10mg/dl 尿酸 和AGE抗體), 培養 72小時後測定每組細胞培養液中NO的濃度, 結果以每毫克蛋白質中所含total NO/NO₂的平均值 \pm 標準差表示(mean \pm SD, n=3)

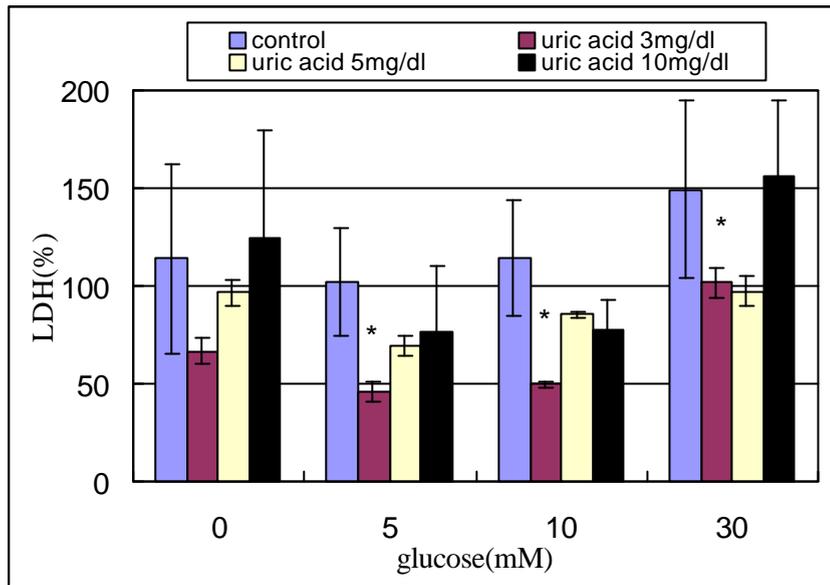


圖十一 添加維生素C、E於各葡萄糖濃度下，觀察內皮細胞死亡的情形

Fig.11 The effect of glucose、vitamin C、E on death of HUVEC

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10% FBS 的 medium 199 中(分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、0.05 mM維生素C、E)，培養 72小時後測定每組細胞培養液中LDH的濃度，結果以每毫克蛋白質中所含LDH的平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm SD, n=3)

“*” 與控制組比較具有顯著差異($p < 0.05$)

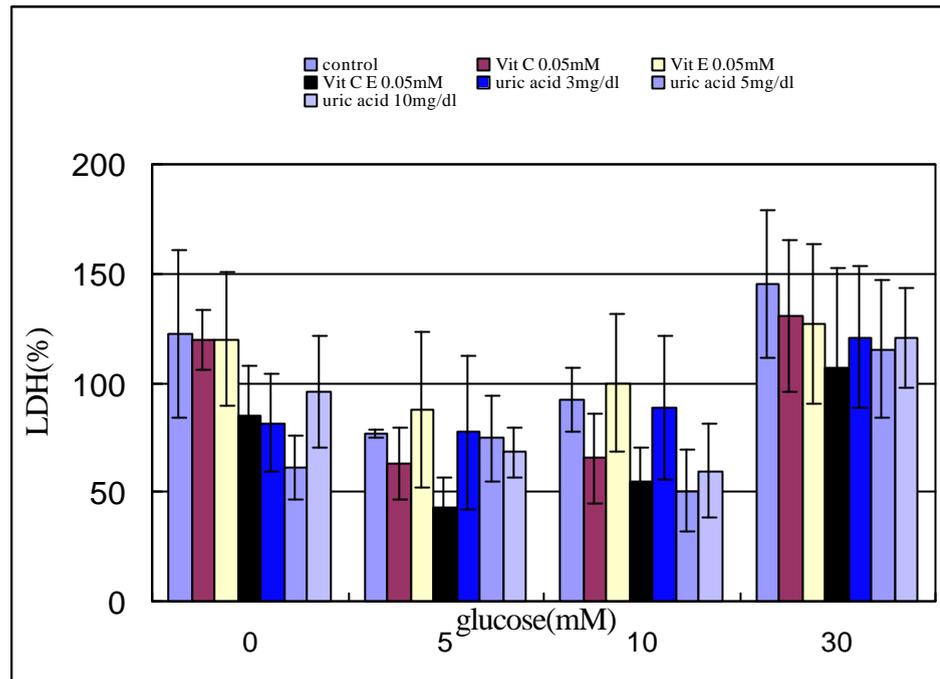


圖十二 添加不同濃度尿酸於各葡萄糖濃度下，觀察內皮細胞死亡的情形

fig.12 The effect of glucose and uric acid on death of HUVEC

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10% FBS 的 medium 199 中 (分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、3、5、10mg/dl 尿酸)，培養 72小時後測定每組細胞培養液中LDH的濃度，結果以每毫克蛋白質中所含LDH的平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm SD, n=3)

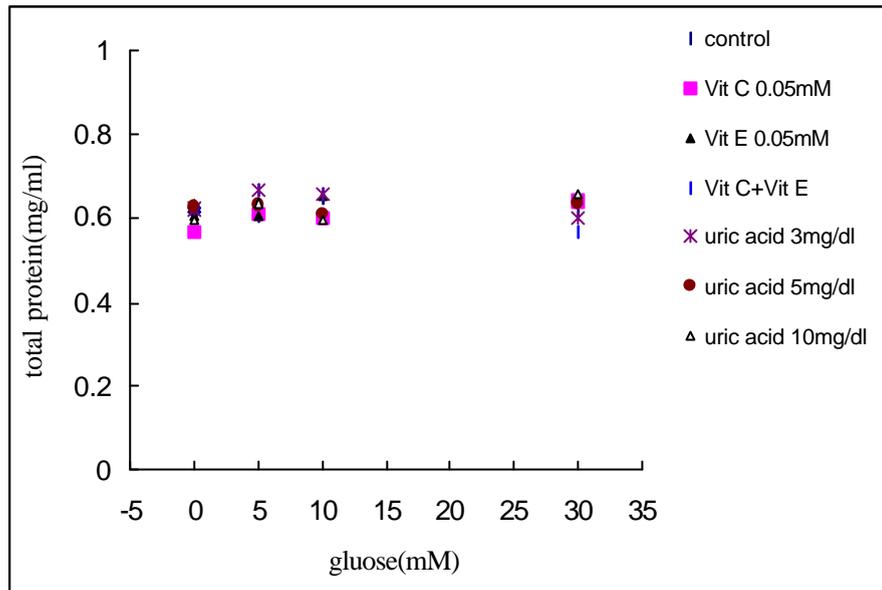
“*” 與控制組比較具有顯著差異($p < 0.05$)



圖十三 添加維生素C、E、尿酸於各葡萄糖濃度下，加入AGE 抗體觀察內皮細胞死亡的情形

fig.13 The effect of glucose、 vitamin C、 E、 uric acid and AGE antibody on death of HUVEC

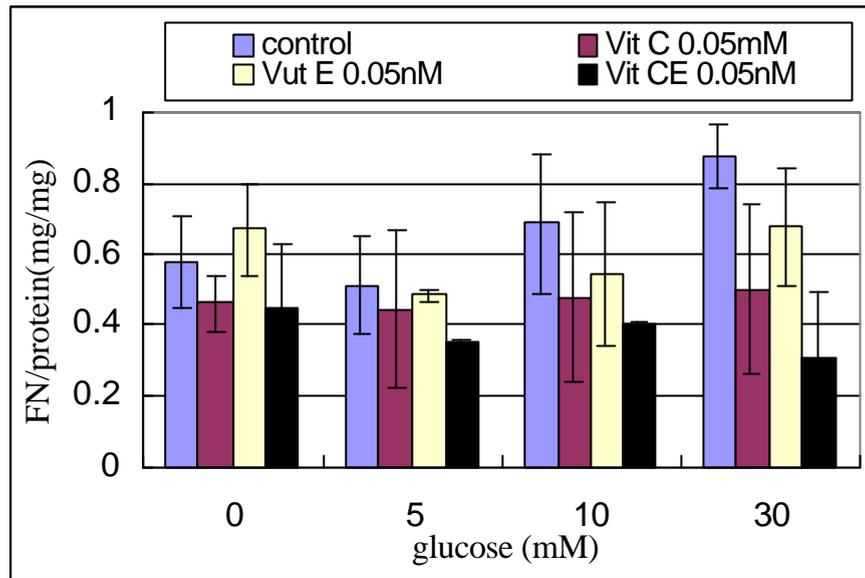
取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10% FBS 的 medium 199 中(分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、0.05 mM維生素C、E、3、5、10mg/dl 尿酸 和AGE抗體)，培養 72小時後測定每組細胞培養液中 LDH的濃度，結果以每毫克蛋白質中所含LDH的平均值 \pm 標準差表示(mean \pm SD, n=3)



圖十四 不同實驗條件對於狗腎上皮細胞總蛋白的影響

Fig.14 The effect of glucose、0.05mM vitamin C、E and uric acid on the total protein of MDCK

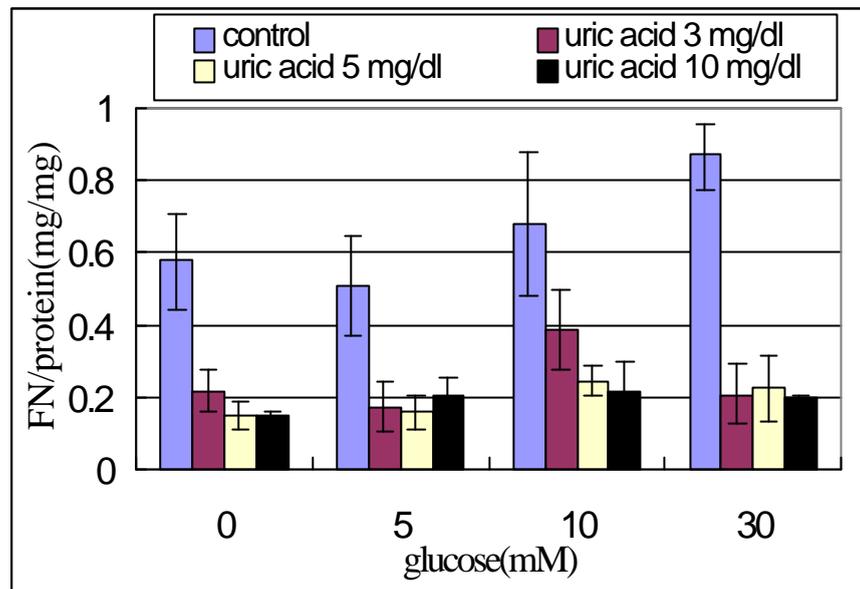
取 2×10^5 的狗腎上皮細胞培養於10 % FBS 的 DMEM中(分別添加0、5、10、30mM葡萄糖，0.05mM維生素C，0.05mM維生素E，3、5、10mg/dl 尿酸)，培養72小時後測定每組細胞所含總蛋白的濃度，結果以平均值 \pm 標準差表示(mean \pm SD，n=3)



圖十五 添加維生素C、E在各葡萄糖濃度下，對於狗腎上皮細胞中
纖維網狀蛋白的影響

Fig.15 The effect of glucose、 vitamin C、 E on the fibronectin
of MDCK

取 2×10^5 的狗腎上皮細胞培養於10 % FBS的DMEM中(分別添加0、5、10、30 mM葡萄糖、0.05 mM維生素C、E)，培養72小時後測定每組細胞所含蛋白質和纖維網狀蛋白的濃度，結果以每毫克蛋白質中所含纖維網狀蛋白的平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm SD, n=3)



圖十六 添加不同濃度尿酸在各葡萄糖濃度下，對於狗腎上皮細胞中纖維網狀蛋白的影響

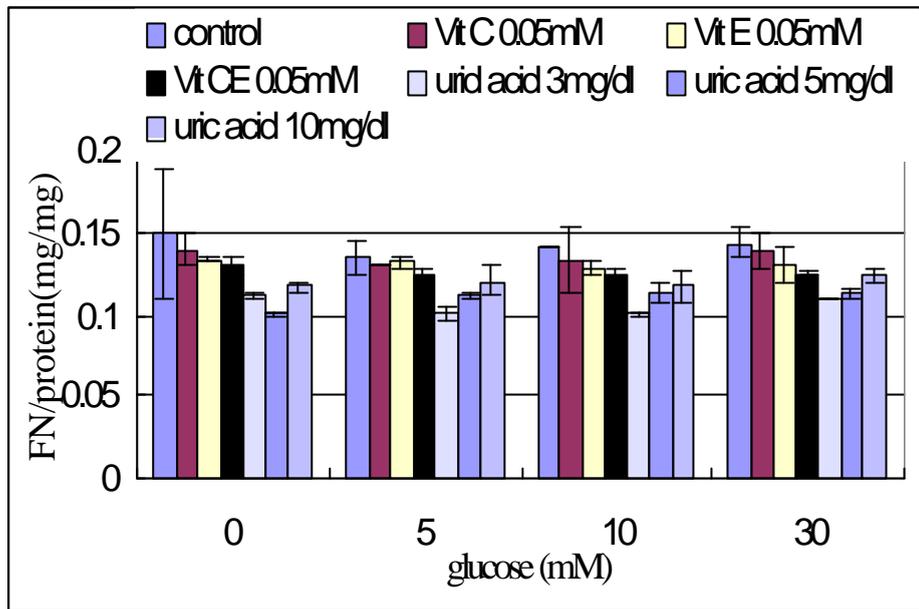
Fig.16 The effect of glucose and uric acid on the fibronectin of MDCK

取 2×10^5 的狗腎上皮細胞培養於10% FBS 的 DMEM中(分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、3、5、10mg/dl 尿酸)，培養 72 小時後測定每組細胞所含蛋白質和纖維網狀蛋白的濃度，結果以每毫克蛋白質中所含纖維網狀蛋白的平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm

S

D

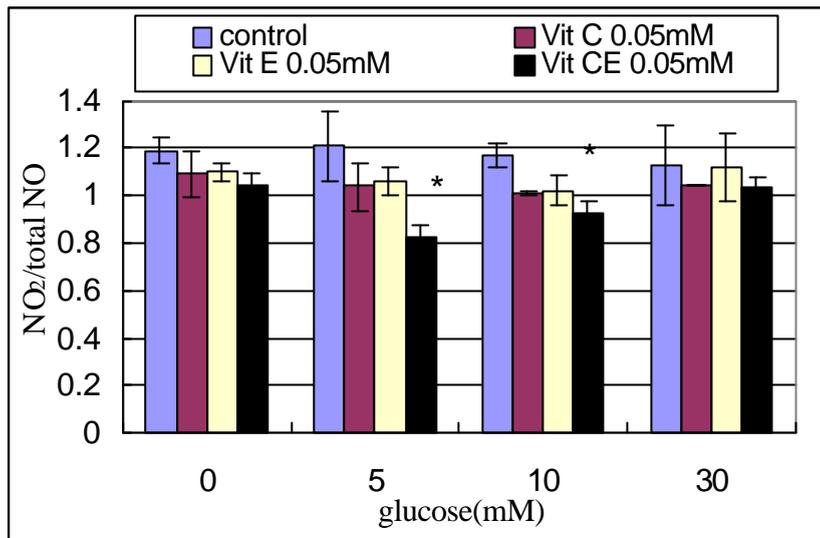
,



圖十七 添加維生素C、E、尿酸於各葡萄糖濃度下，加入AGE 抗體
對於狗腎上皮細胞中纖維網狀蛋白的影響

fig.17 The effect of glucose、vitamin C、E、 uric acid and
AGE antibody on the fibronectin of MDCK

取 2×10^5 的狗腎上皮細胞培養於10 % FBS的DMEM中(分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、3、5、10mg/dl 尿酸 和AGE抗體)，
培養 72小時後測定每組細胞所含蛋白質和纖維網狀蛋白的濃度，
結果以 每毫克蛋白質中所含纖維網狀蛋白的平均值 \pm 標準差表示
(mean \pm SD , n=3)

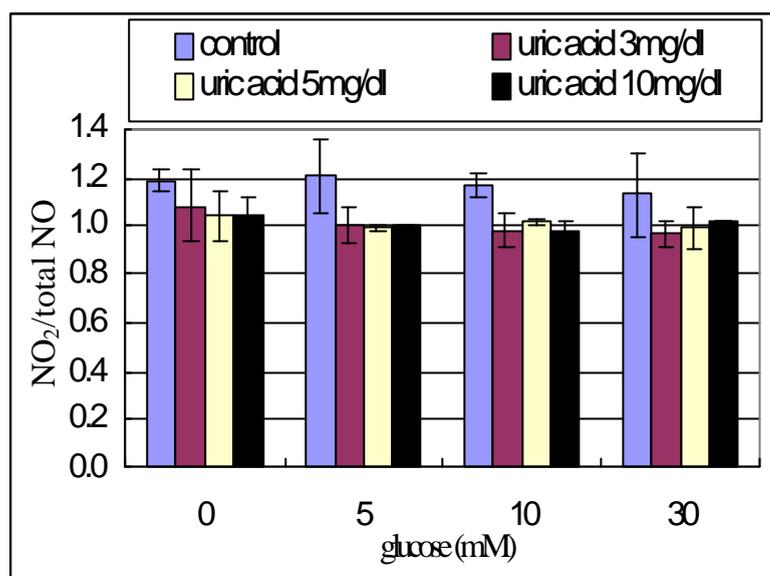


圖十八 添加維生素C、E於各葡萄糖濃度下，對於狗腎上皮細胞中NO的影響

Fig.18 The effect of glucose, vitamin C, E on the nitric oxide of MDCK

取 2×10^5 的狗腎上皮細胞培養於10 % FBS的DMEM中 (分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、0.05 mM維生素C、E) , 培養 72小時後測定每組細胞培養液中NO的濃度 , 結果以每毫克蛋白質中所含 total NO/NO₂的平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm SD , n=3)

“*” 與控制組比較具有顯著差異(p < 0.05)

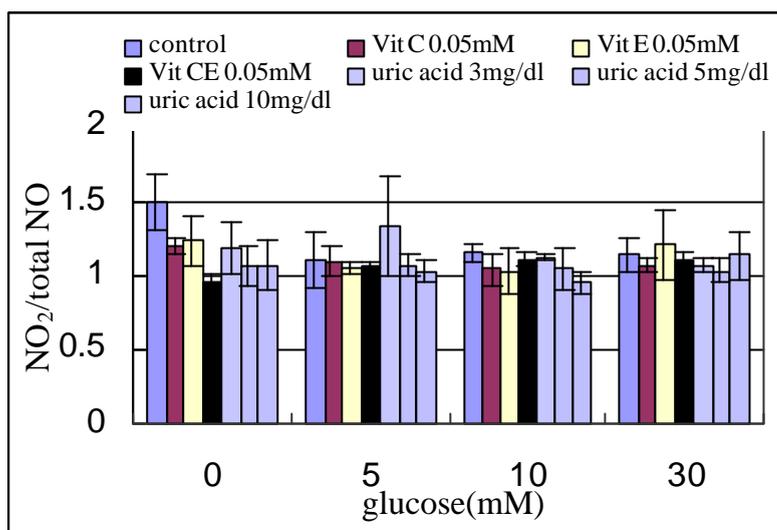


圖十九 添加不同濃度尿酸在各葡萄糖濃度下，對於狗腎上皮細胞中NO的影響

Fig.19 The effect of glucose and uric acid on the nitric oxide of MDCK

取 2×10^5 的狗腎上皮細胞培養於10% FBS的DMEM中

(分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、3、5、10mg/dl 尿酸)，培養72小時後測定每組細胞培養液中NO的濃度，結果以每毫克蛋白質中所含total NO/NO₂的平均值 ± 標準差表示 (mean ± SD, n=3)



圖二十 添加維生素C、E、尿酸於各葡萄糖濃度下，加入AGE 抗體
對於狗腎上皮細胞中NO的影響

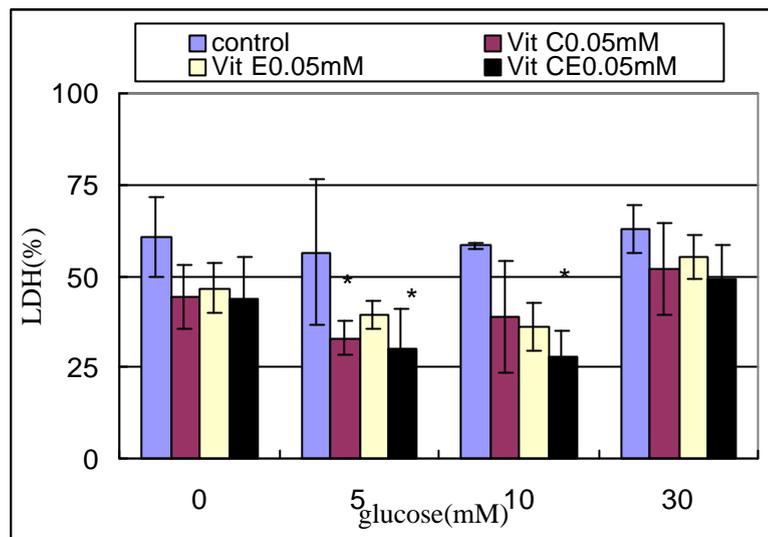
Fig.20 The effect of glucose、 vitamin C、 E、 uric acid and
AGE antibody on the nitric oxide of MDCK

取 2×10^5 的狗腎上皮細胞培養於10 % FBS的DMEM中(分別添加 0、 5、
10、 30 mM葡萄糖、 0.05 mM維生素C、 E , 3、 5、 10mg/dl

尿酸 和AGE抗體) , 培養 72小時後測定每組細胞培養液中NO的度 ,

結果以每毫克蛋白質中所含total NO/NO₂的平均值 \pm 標準差表示

(mean \pm SD , n=3)

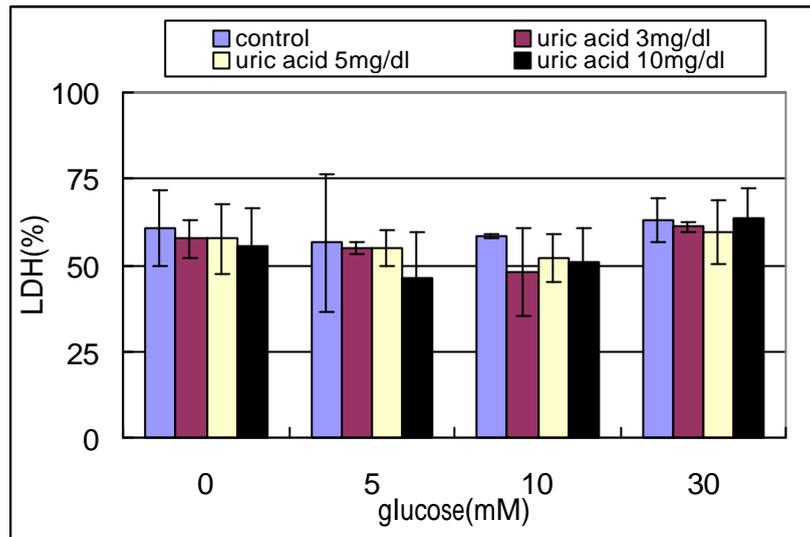


圖二十一 添加維生素C、E於各葡萄糖濃度下，觀察狗腎上皮細胞死亡的情形

Fig.21 The effect of glucose、vitamin C、E on death of MDCK

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10% FBS 的DMEM中(分別添加 0、5、10、30 mM葡萄糖、0.05 mM維生素C、E) , 培養 72小時後測定每組細胞培養液中LDH的濃度，結果以每毫克蛋白質中所含LDH的平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm SD , n=3)

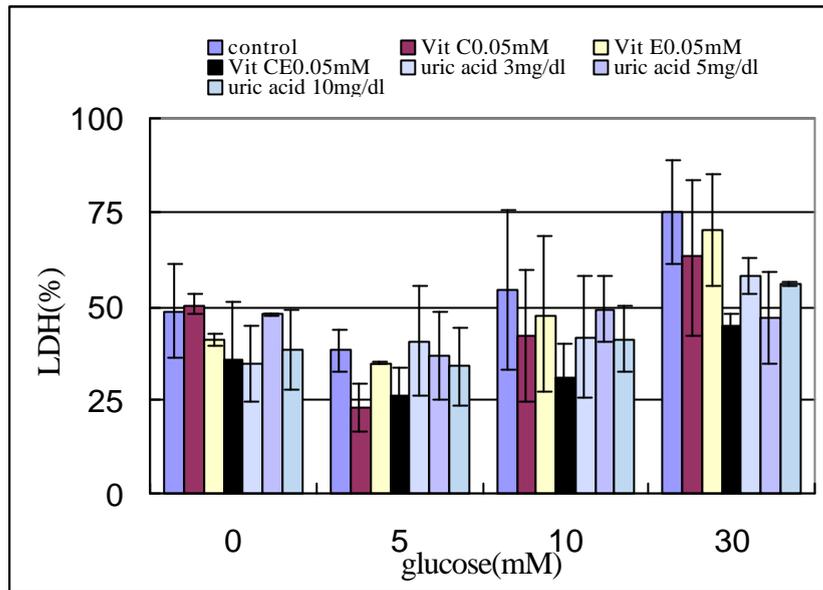
“*” 與控制組比較具有顯著差異(p < 0.05)



圖二十二 添加不同濃度尿酸於各葡萄糖濃度下，觀察狗腎上皮細胞死亡的情形

Fig.22 The effect of glucose and uric acid on death of MDCK

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於10% FBS 的 DMEM 中 (分別添加 0、5、10、30 mM 葡萄糖、3、5、10mg/dl 尿酸)，培養 72 小時後測定每組細胞培養液中 LDH 的濃度，結果以每毫克蛋白質中所含 LDH 的平均值 \pm 標準差表示 (mean \pm SD, n=3)



圖二十三 添加維生素C、E、尿酸於各葡萄糖濃度下，加入AGE 抗體觀察內皮細胞死亡的情形

Fig.23 The effect of glucose、 vitamin C、 E、 uric acid and AGE antibody on death of MDCK

取 2×10^5 的臍帶靜脈內皮細胞培養於 10 % FBS 的 DMEM 中(分別添加 0、5、10、30 mM 葡萄糖、0.05 mM 維生素C、E、3、5、10mg/dl 尿酸和AGE抗體)，培養 72小時後測定每組細胞培養液中 LDH的濃度，結果以每毫克蛋白質中所含LDH的平均值 \pm 標準差表示(mean \pm SD, n=3)

第四章 討論

本實驗分三部分來探討：第一部分為高濃度和正常生理葡萄糖濃度的添加，對培養人類臍帶靜脈內皮細胞中纖維網狀蛋白、自由基和細胞傷害的影響，且是否在抗氧化劑的存在下，具有減輕上述的情況。第二部分以狗腎上皮細胞為研究對象，觀察高濃度和正常生理葡萄糖濃度的環境下，其纖維網狀蛋白、NO 和 LDH 釋出量（細胞死亡）的影響，也藉由添加抗氧化劑觀察是否有減輕上述的影響。第三部分是添加 AGE 抗體來觀察是否會影響到內皮細胞和 MDCK 中胞外間質蛋白、NO 和 LDH 產生情形。

糖尿病無論是 NIDDM 或 IDDM，均是因為高血糖的血管內浸漬，造成血管內病變，使血管內皮細胞產生型態上的異常表現⁽⁶³⁾，導致了動脈粥狀硬化、腎血管病變等疾病的產生。因此內皮細胞在糖尿病慢性併發症的病理上佔了極重要的角色。

由本實驗結果發現，隨著葡萄糖濃度增加，內皮細胞中纖維網狀蛋白呈現遞增情形。纖維網狀蛋白是胞外間質蛋白的一種，參與了細胞的接著、延展等動作，當量增加時，會影響了內皮細胞與平滑肌細胞間的互動，而可能產生新微血管形成的情形發生，即所謂的血管新生作用（Angiogenesis）。曾有許多研究指出，纖維母細胞⁽⁶⁴⁾、外皮細胞⁽⁶⁵⁾、腎小球環間膜細胞⁽⁶⁶⁾培養在高濃度葡萄糖下會使纖維網狀蛋白含量增加，而在本實驗中以人類臍靜脈內皮細胞和狗腎上皮細胞為研究對象，也證實高濃度的環境下，纖維網狀蛋白的確有增生的現象。糖尿病的發展有許多併發症發生，如：糖尿病腎病變、尿毒症等。腎臟病變通常是

不可逆性的（即不能恢復）；內皮細胞在高血糖情況下，細胞代謝會迅速改變以調適高濃度葡萄糖，在這一階段中，若血糖回復正常，則所造成的改變也可回復（即可逆性）。而高葡萄糖下所活化 Protein kinase C（PKC）系列的 Kinase⁽⁶⁷⁾，經由細胞外訊息傳遞增加了內皮細胞的通透性⁽⁶⁸⁾和加速非灌流的微小血管細胞流失，導致腎小球環間膜⁽⁶⁹⁾（Mesangial expansion）擴張，促使胞外間質組成份在生合成中產生定性及定量的改變。因此本實驗結果發現，內皮細胞及狗腎上皮細胞在高葡萄糖濃度下，皆有纖維網狀蛋白上升的現象，且狗腎上皮細胞中纖維網狀蛋白的增生較內皮細胞快速。由此可知，在糖尿病異常的代謝型態中，會增加基底膜生成且減低更新速率⁽⁷⁰⁻⁷¹⁾，因而向上調節（up-regulate）胞外間質蛋白 Fibronectin 和 Collagen 生合成增加⁽⁷²⁾，最終引起糖尿病的血管病變。

長期處於高葡萄糖環境下，會伴隨著超氧陰離子和 NO 產量上升的情形⁽⁷³⁾，然而由本實驗結果發現，內皮細胞和狗腎上皮細胞在模擬正常生理葡萄糖濃度（5mM）時，NO 的產量最高；然而，隨著葡萄糖濃度增加，NO 產量則下降。由於一氧化氮被認為是自由基中的一種，但它卻會因產量的多寡、作用的組織器官不同，而引起許多有利有弊的生理作用。NO 又稱為血管舒張因子，具有維持血管擴張或緊縮的作用。曾有實驗證實，Insulin 在內皮細上具有調節內皮一氧化氮合成（eNOS）的表現，藉由活化 PI-3 激 的活性調控著血管的張力，當在糖尿病的情況下，會抑制 PI-3 激 的活性和降低 eNOS 表現，導致內皮損傷和某些疾病的發展⁽⁷⁴⁾。且葡萄糖濃度增加，也使醛類還原（Aldose reductase）活性上升，導致 NADPH 耗盡⁽⁷⁵⁾，NADPH 為 L-arginine 合成一氧化氮

所需物質之一，也因此造成 NO 產量下降。另外在糖尿病大鼠身上發現糖尿病初期，腎臟產生的 NO 有降低的情形，由於腎細胞具有一氧化氮合成（包括 eNOS 和 nNOS）存在，研究發現腎臟中 NO 的含量降低與 nNOS 的活性減弱有關，但 eNOS 的活性並無改變⁽⁷⁶⁾。

LDH 的釋出量與細胞損傷有顯著相關性，在本實驗結果發現，隨著葡萄糖濃度增加，細胞死亡的情形也隨著增加。在糖尿病病患通常有抗氧化防禦能力低下的情形發生，曾有實驗指出在糖尿病兔子的內皮細胞上發現抗氧化酵素 SOD 及 Glutathione Peroxidase 的活性明顯偏低⁽⁷⁷⁾。且超氧陰離子為訊息傳遞的媒介，刺激 TNF- α 的產生⁽⁷⁸⁾，而誘導了內皮細胞的死亡。在高葡萄糖濃度下，也會使細胞複製速率降低、干擾 DNA 合成、細胞分裂下降，也是造成細胞死亡的原因之一。

長期罹患糖尿病的病患，經由非酵素褐變會產生一種葡萄糖和蛋白質的衍生產物—AGEs，會累積在生命週期較長的組織蛋白上⁽⁷⁹⁾。AGEs 的生成會促使血管滲透性上升、蛋白質和脂蛋白沉降、增加 ECM 和 NO 的不活化⁽⁸⁰⁾。為了進一步觀察 AGE 與胞外間質蛋白、一氧化氮和細胞損傷的關係，在本實驗中以抗體的添加阻斷 AGEs 的生成，結果發現纖維網狀蛋白含量降低且細胞死亡情形也有延緩的現象，且 NO 含量上升。在內皮細胞等細胞膜表面具有 AGE 接受器，當 AGE 蛋白與接受器結合後，刺激活性氧自由基產生，進而增加脂過氧化物 Malondialdehyde (MDA) 的產量，且活化參與許多傷害基因起始的轉譯因子如：NF- κ B，而影響細胞的訊息傳遞作用⁽⁸¹⁾。在 2000 年曾有研究證實⁽⁸²⁾ 在內皮細胞中 AGEs 的生成會促進 DNA 的降解 (degradation) 和內皮細胞的損傷，使 eNOS 的表現降低。因此 AGEs 的合成似乎與纖維網狀蛋白和 NO

之間有著密切的關聯。

非酵素性的抗氧化劑包括維生素 A、C、E，含硫物質如：Urate、Glutathione、Methionine 等。在本實驗中採用水溶性的維生素 C、脂溶性維生素 E 和在抗氧化功能上仍具爭議性的尿酸作為測試對象。維生素 E (α-tocopherol) 可降低高葡萄糖下腎小球環間膜細胞中，由 PKC 刺激 TGF-β 所產生的間質蛋白如：Fibronectin⁽⁸³⁾ 和膠原蛋白。這與本實驗所得到的結果一致，無論是在內皮細胞或狗腎上皮細胞，維生素 E 的添加的確降低了纖維網狀蛋白的含量 (圖三、十五)。而 Gally 等學者曾指出維生素 C、超氧歧化酶 (Superoxide dismutase)、Catalase 的補充，均會降低 eNOS 的活性，進而降低 NO 釋出量。且維生素 C 和維生素 E 可對抗氧化壓力下，對細胞所造成的傷害，降低脂質游離基 (lipoxy radicals) 形成⁽⁸⁴⁻⁸⁵⁾、保護粒腺體酵素的活性、降低了細胞 Apoptosis 和 LDH 的釋出⁽⁸⁶⁾，與本實驗的結果相符 (圖八、十八、十一、二十二)。而在尿酸的添加，也得到相似的結果。

正常成年人血中尿酸值為 3~7mg/dl，當血清中尿酸達飽和濃度 (大於 7mg/dl) 時，會形成尿酸鹽結晶，積存在關節、指頭末端，造成發炎產生激烈的疼痛；除此之外，且還會沉澱在腎臟中，進一步引起炎症，造成腎臟及輸卵管結石，另外像：惡性淋巴腫瘤、酵素異常、溶血性貧血等疾病也容易發生。實驗以 3、5、10mg/dl 分別代表正常生理濃度、略高濃度、已達痛風 (Gout) 濃度，添加於 HUVEC 和 MDCK 中，發現均有使纖維網狀蛋白和一氧化氮含量降低的現象；3、5mg/dl 的尿酸則具有降低細胞死亡的情形。尿酸為 peroxynitrite 的清除者，在以 LPS 所誘發的大鼠身上給予每天每公斤 100mg 尿酸具有與 peroxynitrite 結合

的能力，在多發性硬化症（Multiple sclerosis）的病患中，血清尿酸濃度較正常人為低，因此痛風（高尿酸血症）的患者罹患多發性硬化症的機率降低，可能由於尿酸具有保護作用⁽⁸⁷⁾。在體液中有水溶性抗氧化劑尿酸的存在，新生兒的臍帶血液中發現 uric acid 濃度介於 50~990 $\mu\text{mol/l}$ ，隨著年齡增加有降低的趨勢。且在氧化壓力下所造成出生嬰兒罹患慢性肺疾病（Chronic lung disease），也可藉由抗氧化劑尿酸的添加保護呼吸道而降低罹患率⁽⁸⁸⁾。尿酸在以往多是著重於新血管疾病和痛風上，少有將之定位在抗氧化功能上，雖然其抗氧化功能類似維生素 C，但對於高葡萄糖下在內皮細胞和狗腎上皮細胞的影響仍不清楚。

實驗證實，血管內皮生長因子(VEGF)和 CD-36 對誘發 Angiogenesis 及 cancer cell 的轉移有密切關係。由於高葡萄糖下所造成的胞外間質蛋白含量增多，影響內皮細胞和平滑肌細胞間的互動而有微血管新生的情形；在腫瘤細胞發展的過程中，亦需藉由 Angiogenesis 來獲取更多的營養，以達到增生和轉移的目的，因此，訊息傳導(signal transduction)物質如：VEGF、CD-36 等扮演著重要的角色。曾有實驗指出在糖尿病的高葡萄糖環境下，會提高 VEGF 的含量，且可與 tyrosine kinase receptor 結合調控血管生成作用，且某些癌細胞能向上調節 VEGF receptor，如此一來，VEGF 與 receptor 結合機會增多，可能誘導 PKC kinase 活化，而促使許多機轉的進行，進而使血管形成，幫助了癌細胞的生長及蔓延。目前對一氧化氮與腫瘤細胞的關係仍不清楚，許多學者提出 NO 會對腫瘤細胞有刺激或抑制作用，在癌細胞中 NO 的產生並不會改變 VEGF mRNA level，但是 peroxynitrite 的產生卻會增加 VEGF mRNA 表現。CD-36 在 94 年的研究指出，可考慮當做一個新的腫瘤指標，因它位於細胞膜上的濃度與腫瘤細胞未來侵害的程度和轉移有直接的相關

性，或許較高的 CD-36 表現是否間接提昇癌症的轉移，與 VEGF 一樣都需更進一步的證實。

在本實驗發現高葡萄糖情況下，內皮細胞和狗腎上皮細胞中給予抗氧化劑的添加，均造成 Fibronectin、NO 和 LDH 釋出量（細胞死亡）降低，尤其是維生素 C 和 E 共同添加時具有加乘作用，所發揮的抗氧化效果更大。另一方面，添加了抗氧化劑後，降低了 HUVEC 及 MDCK 中 Fibronectin 的含量，亦可能造成 Angiogenesis 的情形下降，這兩者之間的相互關係則是需要再更進一步研究與探討。

結論

在高葡萄糖的情況下，的確會造成內皮細胞胞外間質蛋白 Fibronectin 含量增加，當加入 AGE 抗體阻斷 AGEs 生成時，纖維網狀蛋白含量有下降的現象，由此可見內皮細胞中纖維網狀蛋白的含量是受 AGEs 所調控。由於血漿中纖維網狀蛋白可作為糖尿病病人內皮細胞失調的一個指標，推測高葡萄糖下，內皮細胞的纖維網狀蛋白已因細胞受損而被釋放至胞外。在高葡萄糖濃度的壓力下所引發的氧化傷害，造成自由基 NO 的產生和細胞死亡(LDH 釋出)，均可藉由添加維生素 C、E 或尿酸等抗氧化劑，而達到減緩的效果，除了具有保護細胞膜表面的作用，也降低了內皮細胞損傷的情形。因此，糖尿病患者長期處於高葡萄糖環境下，所引發的氧化傷害，會使血管細胞增生造成併發症，且可以藉由添加抗氧化物質，來達到延緩血管基底膜增殖的效果，進而降低血管內病變的情況。

參考文獻

1. Freshney, R.I. The endothelial cell-a pluripotent control cell of the vessel wall. *Karger. Scotland.* 42: 245-260(1983)
2. Fujita, T., Tanake, K., Tokunaga, T. SEM atlas of cells and tissues. *Igaku-Shoin.* 46-52(1981)
3. Bowman, P.O., Goldstein, G.W. Glomerular basement membrane metabolism in the diabetic rat. *Ann. Neurol.* 14: 396-402(1983)
4. Warren, J.B. The endothelium: an introduction to current research. *Wiley-Liss* 119-128(1990)
5. Kyrtg, D.H., Srur,G., Weta, K.S. Zedt, A.M. Microvascular function and haemodynamic disturbanded in diabetes mellitus and its complication. *Diabetic Chaper*42.42,9(1997)
6. Thamilselvan, S., Byer, K.J., Hackett, R.L., Khan, S.R. Free radical scavengers, catalase and superoxide dismutase provide protection from oxalate-associated injury to LLC-PK1 and MDCK cells. *Journal of Urology.* 164(1): 224-9(2000)
7. Rodriguez-Boulan, E. and Nelson, W.J. Morphogenesis of the polarized epithelial phenotype. *Science* 245: 718-725(1989)
8. Frisch, S.M., Vuori, K., Ruoslahti, E. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol.* 134: 793-799(1996)
9. Frei, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med.* 97:5s-13s(1995)
10. Salas, P.J., Ponce, M.I., Brignoni, M., Rodriguez, M.L. Attachment of Madin-Darby canine kidney cells to extracellular matrix: role of a laminin binding protein related to the 37/67 kDa laminin receptor in the development of plasma membrane polarization. *Biology of the Cell.* 75(3):197-210(1992)
11. Christine, H. and Wendt, V.A. Alveolar epithelial cells regulate the induction of endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol.* 267: C893-900(1994)
12. Adamson, I.Y.R. and Bowden, D.H. Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair. *Am J Pathol.* 137: 385-392(1990)

13. Engvall, E. and Rouslahti, E. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer*. 20: 1-5(1977)
14. Stathakis, N.E. and Mosesson, M.W. Interactions among heparin, cold-insoluble globulin, and fibrinogen in formation of the heparinprecipitable fraction of plasma. *J Clin Invest*. 60: 855-865(1977)
15. Perkins, M.E., Ji, T.H. and Hynes, R.O. Cross-linking of fibronectin to sulfated proteoglycans at the cell surface. *Cell* 16: 941-952(1979)
16. Morrison, P.R., Edsall, J.T. and Miller, S.G. *J Biol Chem*. 245, 5728-5736(1948)
17. Gahmberg, C.G. and Hakomri, S. Altered growth behavior of malignant cells associated with changes in externally labeled glycoprotein and glycolipid. *Proc Natl Acad Sci.USA*. 70: 3329-3333(1973)
18. Ruoslahti, E. Structure and biology of proteoglycans. *Ann Rev Cell Biochem*. 4: 229-255(1988)
19. Mosher, D.F. Fibronectin progress in hemostatis and thrombosis. 5: 111-151(1980)
20. Kornbligyy, A.R. and Umzawa, K. Primary structure of human fibronectin : differentia; splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J*. 4: 1755-1759(1985)
21. Skorstengaard, K. and Jensen, M.S. Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *Eur J Biochem*. 161: 441-453(1986)
22. Patel, R.S. and Hynes, R.O. Organization of the fibronectin gene provide evidence for exon shuffling during evolution. *EMBO J*. 6: 2565-2572(1987)
23. Kjellen, L., Lindahl, U. A difference between plasma and cellular fibronectin located with monoclonal antibodies. *Ann Rev Cell Biol*. 4: 183-207(1991)
24. Sarnell, J., Lidish, H., Baltimore, D. *Molecular cell biology* 2nd ed, W,H. Freeman and company, New York 903-938(1990)
25. Peterson, T.E., Skorstengaard K. Partial primary structure of bovion

- plasma in hematology. Mc Donagh New.York.:Dekker J. 5: 7-30(1985)
26. Ruoslahti, E. and Piersbacher, M.D.: Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell*. 44: 517-518(1986)
 27. Hynes, R.O., Yamada, K.M. Fibronectin: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol*. 95: 369-77(1982)
 28. Ejim, O.S., Borradas, M.A. Microcirculation. Endothelium & lymphatics. 5(6): 373-90(1989)
 29. Kjellen, L., Lindahl, U. A difference between plasma and cellular fibronectins located with monoclonal antibodies. *Ann Rev Cell Biol*. 4: 183-207(1991)
 30. Forstermann, U., Schmidt, HHW., Pollock, J.S., Sheng, H. Isoforms of nitric oxide synthase characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*. 42: 1849-57(1991)
 31. Stamler, J.S. Lipton, S. and Singel, D.S. NO comments. *Nature* 367: 28(1994)
 32. Dolgov, V.V., Zalilina, O.E., Bondarrenko, K.F. and Repin, V.S. Aortic endothelium of alloxan diabetic rabbits: a quantitative study using scanning electron microscopy. *Diabetologia*. 22: 338-343(1982)
 33. Galley, H.F., Walker, B.E., Howdle, P.D. Regulation of nitric oxide synthase activity in cultured human endothelial cells: effect of antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*. 21(1): 97-101(1996)
 34. Laight, D.W., Carrier, M.J., Anggard, E.E. Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovascular Research*. 47(3): 457-64(2000)
 35. Smolin & Grosvenor. *Nutrition Science & Applications*. P301-302, p267
 36. Uchida, L., Nomura, Y. Effect of vitamin C depletion on serum cholesterol and lipoprotein levels in ODS(od/od) rats unable to synthesize ascorbic acid. *J Nutr*. 120: 1140-1147(1990)
 37. Shih-Tsung, Wang., Jyh-Huang, Kuo., Rong-Ghi, R. *Toxicology letters*. 89: 91-98(1996)
 38. Lii, C.K., Hung, C.N. Protein thiol modifications of human red blood

- cells treated with tbutyl hydroperoxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1336(2): 147-56(1997)
- 39.Niki, E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids*. 44: 227-253(1987)
- 40.Terao, J. and Matsushita, S. Limitations of the method using peroxidase activity of hemoglobin for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*. 21: 792-795(1986)
- 41.Jovanovic, S.V. and Simic, M.G. One-electron redox potentials of purines and pyrimidines. *J Phys Chem*. 90: 974-978(1986)
- 42.Ames, S.N., Cathcart, R., Shewiers, E. and Hochstein, P. Uric acid provide an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A*. 78: 6858-6862(1981)
- 43.Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford. Clarendon Press(1989)
- 44.Lee, C.C., Wu, X., Gibbs, R.A., Muzny, D.M. and Caskey, T. Generation of cDNA probes directed by amino acid sequence: cloning of urate oxidase. *Scienc*. 239: 1288-1291(1988)
- 45.Maples, K.R. and Mason, R.P. Free radical metabolite of uric acid. *J Biol Chem*. 263: 1709-1712(1988)
- 46.Kaur, H. and Halliwell, B. Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chem Biol Interact*. 73: 235-247(1990)
- 47.Motojima, K. and Goto, S. A human genomic sequence highly homologous to the 3'-untranslated region of rat uricase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*.155: 1266-1270(1988)
- 48.Pongor, S., Ulrich, P.C., Bencsath, F.A. and Cerami, A. Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A*. 81: 2684-2688(1984)
- 49.Njoroge, F.G., Sayre, L.M. and Monnier, U.M. Endocytosis and recycling of the fibronectin receptor in CHO cells. *Carbohydr Res*. 167:

211-220(1987)

50. Farmar, J., Ulrich, P., and Cerami, A. Structure and properties of the cellular receptor for transforming growth factor type beta. *J Org Chem.* 53: 23465-23469(1988)
51. Ferrara, N., Henzel, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 161(2): 851-8(1989)
52. Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L., Leung, D.W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Reviews.* 13(1): 18-32(1992)
53. Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 246(4935): 1306-9(1989)
54. Endo, H., Naito, T., Asahara, T., Kajima, M. Cytokines in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy --vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are elevated in proliferative diabetic retinopathy. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 104(10): 711-6(2000)
55. Kim, N.H., Jung, H.H., Cha, D.R., Choi, D.S. Expression of vascular endothelial growth factor in response to high glucose in rat mesangial cells. *Journal of Endocrinology.* 165(3): 617-24(2000)
56. Gunningham, S.P., et al. Vascular endothelial growth factor-B and vascular endothelial growth factor-C expression in renal cell carcinomas: regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. *Cancer Research.* 61(7): 3206-11(2001)
57. Deng, Z., Huang, W., Jin, Y. The influence of vascular endothelial growth factor and its receptor on the growth of laryngeal cancer cell. *J Clin Otor.* 12(8): 358-61(1998)
58. Pinter, E., Haigh, J., Nagy, A., Madri, J.A. Hyperglycemia-induced vasculopathy in the murine conceptus is mediated via reductions of VEGF-A expression and VEGF receptor activation. *Am J Pathol.* 158(4): 1199-206(2001)
59. Imamura, N., Ota, H., Abe, K. Expression of the thrombospondin

- receptor(CD-36) on the cell surface in megakaryoblastic and promegakaryocytic leukemias: increment of the receptor by megakaryocyte differentiation in vitro. *American Journal of Hematology*. 45(2): 181-4(1994)
- 60.Suchard, S.J., Mansfield, P.J., Dixit, V.M. Modulation of thrombospondin receptor expression during HL-60 cell differentiation. *Journal of Immunology*. 152(2): 877-88(1994)
- 61.Suchard, S.J., Boxer, L.A., Dixit, V.M. Activation of human neutrophils increases thrombospondin receptor expression. *Journal of Immunology*. 147(2): 651-9(1991)
- 62.Abbadia, Z., Vericel, E., Mathevet, P., Bertin, N. Fatty acid composition and CD-36 expression in breast adipose tissue of premenopausal and postmenopausal women. *Anticancer Research*. 17(2A): 1217-21(1997)
- 63.Lorenzi, M., Montisano, D., Toledo, S., Barrieux, A. High glucose induces DNA damage in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*. 77: 322-325(1986)
- 64.Benazzoug, Y., Borchiellini, C., Labat-Robert, J., Robert, L. and Kern, P. Effect of high glucose concentrations on the expression of collagens and fibronectin by fibroblasts in culture. *Exp Gerontol*. 33:445-455(1998)
- 65.Mandarino, L.J., Sundarraj, N., Finlayson, J. and Hassell, H.R. Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res*. 57:609-621(1993)
- 66.Oh, J.H., Ha, H., Yu, M.R. and Lee, H.B. Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor-beta 1 and fibronectin synthesis. *Kidney Int*. 54: 1872-1878(1998)
- 67.Lee, T.S., Saltsman, K.A., Ohashi, H. and King, G.L. The effects of elevated glucose concentration on cultured bovine retinal endothelial (BEB) cells. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 86: 5141-5145(1989)
- 68.Tamkun, J.W., Schwarzbauer, R.O., Hynes, R.O. Early signals in the mitogenic response. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 81: 5104-5144(1988)
- 69.Steffes, M.W., Sterby, R., Chavers, B. and Mauer, S.M. Studies of kidney and muscle biopsy specimens from identical twins discordant for Type-1 diabetes mellitus. *Diabetes*. 36:735-763(1985)

70. Cohen, M. P., Surma, M. L. and Wu, V.Y. Fibronectin, binding to glomerular basement membrane is altered in diabetes. *Am J Physiol.* 242: F385-389(1987)
71. Poulson, R., Kurkinen, M., Prockop, D.J. and Boot-Hand, R.P. Immunofluorescent localization of fibronectin in the human kidney. *J Biol Chem.* 263: 10072-10076(1988)
72. Enrio, C., Timothy, R., Sayon, R., Michele, M. and Mara, L. Polyantigenic expansion of basement membrane constituents in diabetic nephropathy. *J Biol Chem.* 266(22): 14244-14250(1983)
73. Cosentino, F., Hishikawa, K., Katusic, Z.S. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 96(1): 25-8(1997)
74. Kuboki, K., Jiang, Z.Y., Takahara, N., Ha, S.W., Igarashi, M. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation.* 101(6): 676-81(2000)
75. Tesfamariam, B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 16(3): 383-91(1994)
76. Keynan, S., Hirshberg, B., Levin-Iaina, N., Wexler, I.D., Dagan, R., Reinhartz, H. Renal nitric oxide production during the early phase of experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 58(2): 740-7(2000)
77. Tagami, S., Yoshida, K. and Shimada, M. Antioxidant enzyme status of aortic endothelial cells in alloxan-induced diabetic rabbits. *Diabetes.* 40: 221A(1991)
78. Bursch, W., Oberhammer, F. and Schulte-Harmann, R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci.* 13: 245-251(1992)
79. Farkas, J., Menzel, E.J. Proteins lose their nitric oxide stabilizing function after advanced glycosylation. *Biochim Biophys Acta.* 1245(3): 305-10 (1995)
80. Bucala, R., Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *American Journal of Kidney Diseases.* 26(6):

875-88(1995)

81. Yan, S.D., Schmidt, A.M., Anderson, G.M. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 269: 9889-9897(1994)
82. Rogas, A., Romay, S., Gonzalez, D. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products. *Circ Res.* 86(3): E50-4.(2000)
83. Studer, R.K., Craven, P.A. and Derubertis, F.R. Antioxidant inhibition of protein kinase C-signaled increases in transforming growth factor-beta in mesangial cell. *Metabolism.* 46:918-925(1997)
84. Princen, H.M., Buytengek, R. Supplementation with low doses of vitamin E protects LDL from lipid peroxidation in men and women. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 15:325-333(1995)
85. Todd, S., Woodward, M., Bolton-Smith, C. An investigation of the relationship between antioxidant vitamin intake and coronary heart disease in men and women using discriminant analysis. *J Clin Epidemiol.* 48: 297-305(1995)
86. Harumi, J., Sining, S., Munetaka, M. and David, H. Cell density and antioxidant vitamins determine the effects of hyperoxia on proliferation and death of MDCK epithelial cells. *Nutrition and Cancer.* 28(2): 115-124(1997)
87. Hooper, D.C., Spitsin, S., Kean, R.B., Champion, J.M. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *PNAS. U.S.A.* 95(2): 675-80(1998)
88. Schrod, L., Neugaus, T., Speer, C.P., Girschick, H. Possible role of uric acid as an antioxidant in premature infants. *Biology of the Neonate.* 72(2): 102-11(1997)