

R
008.8
1214

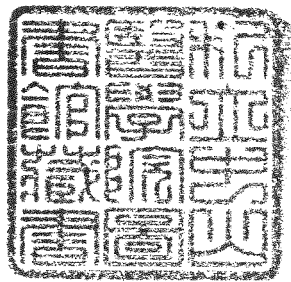
私立中山醫學院醫學研究所碩士論文

MASTER THESIS INSTITUTE OF MEDICINE
CHUNG SHAN MEDICAL AND DENTAL COLLEGE

指導教授：李天翎 博士 (Dr. Tien-Ling Lee Ph D)

建立一個類似血管的體外模型並用以研究
快速惡化型牙周病人之嗜中性白血球的運動能力

The Establishment of An In Vitro Model System Mimicking
The Luminal Faces of Vascular Vessels and Its
Application For Studying Neutrophils Locomotion of
Rapidly Progressive Periodontitis Patients



研究生：孫翠蓮 (Tsuei-Lian Suen)

中華民國 八十六年六月
(Jun. 1997)

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C046106

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 醫學研究所
_____ 組 85 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 建立一個類似血管的體外模型並用以研究快速惡化型牙周病人之嗜中性白血球的運動能力

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 李天翎

研究生簽名: 孫翠蓮 學號: R84122
(親筆正楷)

日期: 民國 86 年 7 月 3 日

- 備註: 1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予 U M I 公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10% 的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第 5 項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話: (02)7377746 江守田、王淑貞
地址: 台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名: 孫翠蓮 聯絡電話: (08)7369220

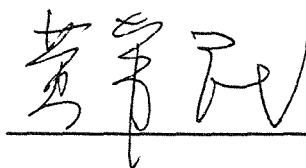
地址: 屏東市海豐街 17 號

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

長庚醫學院解剖科主任

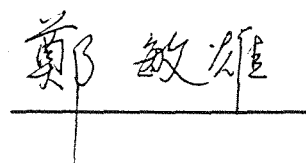
黃華民 教授



A handwritten signature in black ink, appearing to read '黃華民', written above a horizontal line.

中山醫學院解剖科主任

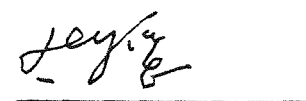
鄭敏雄 副教授



A handwritten signature in black ink, appearing to read '鄭敏雄', written above a horizontal line.

中山醫學院牙科研究所
(論文指導教授)

李天翎 副教授



A handwritten signature in black ink, appearing to read '李天翎', written above a horizontal line.

學生孫翠蓮論文題目為建立一個類似血管的體外模型
並用以研究快速惡化型牙周病人之嗜中性白血球的運
動能力，其論文已經中山醫學院醫學研究所碩士論文
考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核
閱後無誤。

指導教授：李天翎 博士 簽名：

中華民國八十六年六月

致謝

漫長的求學生涯即將在此告一段落，最辛苦的莫過於這二年的研究生涯，所幸受到許多人的幫忙與鼓勵，心中滿懷無限謝意與感激。感謝我的指導教授李天翎副教授給予我這麼好的訓練和學習機會，平日不辭辛勞地諄諄教誨，使我在學識和待人處事方面獲益良多。此外，極為感謝長庚醫學院解剖科主任黃華民教授及本校解剖科主任鄭敏雄副教授在百忙之中對本論文內容所提出的建議及文字上的斧正，使本研究更趨完善。再則要謝謝電顯室廖克剛教授及師母楊明鈴老師這二年的支持與協助及諄諄教誨，還有我可愛的同學好友：艾麗、建洲、孟訓、玫伶、瓊慧、在實驗上及生活上的相互支持，另外，感謝建洲同學幻燈片製作、論文的幫忙校稿及照片的沖洗；親愛的學長姐：陳銘衡學長、楊麗秋學姐、彭瓊琿學姐、張育超學長、王梅林學姐、蔡金秋學姐、歐威志學長、在實驗上鼓勵，尤其感謝楊麗秋學姐總說：「下大雨去醫院拿臍帶不方便，我開車載你去拿」，謝謝妳；親愛的毒理所學弟妹：雅文、玉怡、剛瑋、秀仁、元衍、星光、在論文上及實驗上的幫助，謝謝雅文、玉怡、剛瑋輕輕問一聲「學姐，須不須要我幫忙打電腦」；親愛的電顯室學弟們：偉廉、穎謙、凱介、喜南、給我的鼓勵；親愛的醫三學妹：桂琴，在我難過、無助時的鼓勵以及論文上的幫忙，日常生活的關心問候；親愛的大學同學：微瓊、陪我趕論文至清晨，陪我度過最難挨的一刻，給我歡笑；親愛的秀鈴、楊大哥、阿妙學姐、孟琴姐、怡靜老師的關心、幫助，親愛的學妹秀美在口試時的幫忙，感謝妳；感謝你們讓我的研究所生涯充滿歡樂、溫馨，謝謝你們，以及謝謝你們總會說：「須要幫忙時通知我」。

最感謝的是我的父母親、伯母、哥哥們、妹妹、和室友千瑩陪我度過這悲喜與共的日子，謝謝千瑩在學業上、生活上、精神上相互幫忙，讓我不孤單，總給我一種黑暗中有我的感受，最後謹將此論文獻給我敬愛的父母，親愛的家人及所有關愛我的人。

目 錄

目次	頁碼
中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 序論	1
第二章 材料與方法	10
壹、實驗設計及方法流程圖	10
貳、實驗方法	11
一、細胞培養	11
二、免疫螢光染色法	17
三、電子顯微鏡處理	21
第三章 結果	23
第四章 討論	34
圖片	38
參考資料 (reference)	51
附錄一	57
附錄二	59
附錄三	64
附圖一	65
附圖二	66
附圖三	67

中文摘要

嗜中性白血球在發炎組織中，由受傷產生趨化物以吸引白血球從流動血液中穿過血管進入受傷組織，這是一個非常快速的過程，而為研究這種特殊的運動能力或其表面黏著分子與內皮細胞之間的相互關係，或整個穿透機制，各種體外模型均紛紛被建立著，這些模型大部份是採用 micropore filter 讓內皮細胞或人類羊膜細胞生長在這 filter 上形成一完整細胞層後再置入嗜中性白血球以研究其特性，近年來，有人開始利用第一類型膠原蛋白基墊這個系統來研究嗜中性白血球，但均未完全類似體內系統，故我們針對前人所建立的第一類型膠原蛋白基墊作改進，並成功建立了一個類似體內環境的體外模型，其優點具有：(a)為三度立體空間，可供細胞任意移動，不受平面空間的阻礙；(b)在立體膠原蛋白內含有纖維母細胞，則類似人體組織；(c)內皮細胞長成完整一層細胞層則類似血管壁；(d)可在 5 小時內快速形成細胞間連接處複合體(intercellular junctional complexes)，不必培養 7 天或 21 天，可大幅縮短實驗時間；(e)整個系統採用活體染色來觀察嗜中性白血球移動的情形，可避免使用放射線來標記。

本實驗成功的建立了類似體內血管壁的體外模型，並進一步應用它來探討牙周病患者的嗜中性白血球與正常人的嗜中性白血球，在黏附及穿透此一人工血管壁上是否有所差異，我們初步的結果顯示，在用趨化物 fMLP 處理活化嗜中性白血球之後，病人的白血球的黏附程度較低，不超過 30%，而正常人則大於 38%，另外，發現病人同時使用 fMLP 刺激及 PMA 刺激後其移動的結

果差距甚大，使用 PMA 刺激則移動百分比為 50%以上，故推測病患本身的細胞骨架並未有任何缺失而可能是嗜中性白血球表面趨化物 fMLP 接受器有了缺陷，以致無法將訊號有效傳入細胞骨架，使 actin 快速從 G-actin 變成 F-actin 而致使趨化性降低。

ABSTRACT

The extravasation of leukocytes is a rapid yet extremely complicated cellular process involving interactions between blood cells and vascular endothelial cells; shearing force generated by blood flow etc. And the molecular dissection of such a sophisticated process has had making leopard jump through only the latest decade. It has been generally accepted that a host of cell adhesion molecules and their corresponding ligands are held responsible for most, if not all, of the interactions involved. Most of all, due to the dynamic, reactive, and rapidity nature, it renders studies of the process of transeendothelial migration relatively difficult using either in vivo or in vitro systems. Our purpose of this study was twofold. First, we aimed to establish an in vitro model system that mimics the in vivo conditions for endothelial cells growth as closely as possible. The model consists of both physical cues (a three-dimensional lattice of hydrated collagen gels) and chemical cues (live, untreated fibroblasts embedded in the lattice as they grow in dermis) for inducing the differentiation of endothelial cells isolated from human umbilical cord vein.

After the fibroblast-populated, 3-D co-culture system was achieved successfully, we proceeded to our second purpose, that is, to test the applicability of the model we developed. Neutrophils purified from both normal healthy volunteers and patients of rapidly progressed periodontitis were collected for conducting both adhesion and migration assays using the in vitro model we developed. Moreover, differences in adhesiveness and through and into the collagen lattices were observed and compared by taking advantages

of the noninvasive optical sectioning and 3-D reconstruction of the confocal microscope. In summary, we have successfully set up an in vitro model system mimicking the luminal surface of blood vessels by the formation of a confluent monolayer of endothelial cells on top of a pre-formed, fibroblast-populated, 3-dimensional hydrated collagen gel.

第一章

序論

(INTRODUCTION)

血管內皮(vascular endothelium)是一種單層鱗狀上皮細胞，它的 luminal (apical) 表面面對血液，而它的 abluminal (basal) 表面面對人體的組織 (William et al., 1986)。血管內皮細胞其重要的功能之一是控制溶質及一些小分子通過血管壁，例如：各種養分、荷爾蒙(hormones)、脂蛋白質(lipoproteins)、白血球及其它一些分子，這些必須先通過血管壁才可到達組織。

嗜中性白血球(polymorphonuclear leukocytes)進出血管是一種正常的生理現象，據估計每天平均約有 10^9 的嗜中性白血球細胞進出血管系統與組織間隙之間(Jeffery et al., 1987)。

在意外傷害、手術、拔牙或分娩時組織的完整性受到破壞時，此一現象更加速倍增的發生，這是由於這些受傷的組織產生了趨化性物質，從快速流動的血液中，選擇性的吸引嗜中性白血球吸附到血管內壁上，然後穿透管壁層進入受傷組織內，以擔負起吞噬細菌、清除異物和細胞殘骸的任務，是以嗜中性白血球為發炎反應中的第一道防線。

研究這些交換機制的一些簡單且與體內環境較類似的體外模型，仍然有限，一個理想的體外模型最好具有與體內內皮細胞相類似的通透性，以及須分化形成 intercellular junctions。

1991 年 Von Andrian 等人提出了白血球與內皮細胞黏著的分子模型，其可分成四個步驟，每個步驟均透過白血球與內皮細胞之表面上的細胞黏著分子(Cell Adhesion Molecules)與其特異性的接合物(Ligands)之間的交互作用來完成，首先是滾動的單核球對發炎的內皮細胞之接觸，這部分是由 selectins 來調節，即為白血球黏著接受器，其可分成三種其中一種即為 selectin 其可鍵結碳水化合物，selectins 可分成 L-selectin、P-selectin、及 E-selectin。白血球上的 selectin 與內皮細胞上的碳水化合物接受器作用來調節滾動的情形，接著單核球上的 integrin $\alpha 4\beta 1$ (所謂的 integrin 為細胞膜上穿膜蛋白的一類其參予細胞對細胞外間質的黏著，它是由二種穿膜 (transmembrane) 醣蛋白 (glycoprotein) 次單元結構稱為 α 及 β 非共價性的鍵結) 為內皮細胞上的黏著分子 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, Deisher et al., 1991) 所吸引，之後單核球利用 $\beta 2$ integrin 黏著其 ligand (即為任何分子其鍵結在某一蛋白質上特殊的位子或其他分子稱之為 ligand)，而藉此在 luminal 內皮細胞表面上伸展，這個 ligand 目前推測是 ICAM-1 (intercellular adhesion molecules-1)，最後當單核球伸展開來後，開始移動到 intercellular junctions 浸潤 (diapedesis) 在內皮細胞的 intercellular junction (Francis et al., 1994)。

嗜中性白血球穿過血管的內皮層，是一個非常快速的過程，顯

見嗜中性白血球是一種運動能力極高的細胞，對於其由血液循環進入細胞或組織的間質內聚集的過程，牽涉到的許多因子都已經有詳盡的研究報告，但對於白血球的運動能力尤其是負責決定其運動能力的胞內微絲(microfilament)系統之結構及動態變化，在此一過程中所扮演的角色，了解仍有限。

傳統研究細胞移動的方法是採用內皮細胞培養在覆有(coat)蛋白質的圓形玻片上或培養皿上(附圖一)、除此之外，還有纖維凝塊，最近更有立體膠原基墊的開發及應用，這是提供細胞一個類似體內生理的環境其可用來測試細胞浸潤纖維及膠原基質的能力 (Brown et al.,1982)。

1982年 Frederick 等人指出膠原蛋白基墊其重要的一個特徵則為三度立體空間，細胞在基墊內比在平面空間更不受限制，為研究細胞移動的好模型。

1984年 Martha 等人將羊膜固定在鐵氟龍環上，再將胎牛微血管內皮細胞培養在羊膜上直到其形成完整單層細胞(附圖二)，可利用這個模型來研究液體、微小分子、及其它細胞通過這內皮細胞障壁的情形。

1987年 Martha 等人採用1984年發展完成的體外模型來研究嗜中性白血球通過的情形，將 fMLP(10^{-7} M-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)放在羊膜下層，做為一種趨化物，則嗜中性白血球可通過之比例為 $29 \pm 12\%$ ，嗜中性白血球的移動是快速的，在2分鐘時間開始黏著，10分鐘則開始穿透內皮細胞。

1988年 Nicholas et al 描述人類單核球細胞及內皮細胞之間的關係，人類臍帶靜脈內皮細胞生長在立體膠原蛋白基墊上，其

可促進細胞間結合處(intercellular junction)的發展，這些內皮細胞邊緣則可以硝酸銀染色來染出，並可以發現單核球有近乎專一性的黏著在這邊緣處，且移動進入內皮細胞的底部，而沒有破壞這內皮細胞層的完整性。

1993年 Gamble 等人描述在 PMA (phorbol myristate acetate) 存在下，人類內皮細胞在第一型膠原蛋白上可形成網狀的微血管構造，並發現若使用抗 $\alpha 2\beta 1$ 的抗體則內皮細胞保持圓形，且無法在膠原蛋白上生長。

1994年 Villaschi 等人指出在傷口修復期間纖維母細胞及內皮細胞之間的相互作用會調節肉芽組織(granulation tissue)的形成，故作者發展了一個將微血管與纖維母細胞共同培養在膠原蛋白基墊上，發現纖維母細胞可促進血管新生而這新生的血管其又可促進纖維母細胞在形態及功能上轉形為 myofibroblasts。

1996年 Vernon 等人利用內皮細胞培養在第一類型的立體膠原蛋白基墊的收縮反應，以它來觀察內皮細胞收縮與血管生成的潛在相關性，作者發現經由內皮細胞所誘導第一類型的立體膠原蛋白基墊收縮的情形，可因不同的調節者而有不同的反應，例如:bFGF (basic-fibroblast-growth-factor)，其為著名的血管生成調節者。

基於以上這些年來關於內皮細胞在立體膠原上的各種研究似乎無一個體外模型是完全類似血管壁的構造，故本實驗的主要目的便是研究出一個更類似體內環境的體外模型並運用它來觀察嗜中性白血球的移動，我們利用第一型 (type I) 膠原蛋白

(collagen)與正常的纖維母細胞混合在一起培養，以形成類似體內的結締組織之後，經 24 小時後，將人類臍帶靜脈血管內壁細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC)，培養在這膠原纖維聚合成的基底層上使長成一連續完整的細胞層，再以掃描式電子顯微鏡 (SEM)及免疫螢光染色方法確定其為一完無斷隙裂縫之細胞層(附圖三)。

本實驗成功建立的模型，其優點為 (a)三度立體空間可供細胞移動，不受任何阻礙，(b)多元聚合後的第一型膠原蛋白，可形成一個三度空間立體纖維基墊，而包皮來的纖維母細胞則均勻地散佈生長在此一纖維基墊之內，其優點是基墊的纖維部份，除了可提供一個基墊，供 HUVEC 附著外，亦可因其組成份子為細胞外間質的主要成份，即第一型的膠原蛋白，可以誘發 HUVEC 之細胞黏著分子(Cell Adhesion Molecules)的表現，並因而決定 HUVEC 的細胞極性(Polarity)。另外的一個與人不同之處，乃是我們採用活的未經處理過的纖維母細胞來共同培養，既未用 UV 光照射，亦未經抗生素處理，是以可保持對外界培養環境的改變，產生及時的反應，如分泌適當的細胞激動素(Cytokines)。同時整個基墊會因著纖維母細胞的運動而產生收縮及張力，則類似人體組織，(c)內皮細胞長成完整一層細胞層，則類似血管壁，(d)內皮細胞可在 5 小時內快速形成 intercellular junction，不必培養 7 天或 21 天，可縮短實驗時間，保持細胞的活性，這個體外模型的成功建立除了可研究嗜中性白血球運動能力外，亦可以研究穿透之整個過程及某一特別步驟之活化與調控機制，及所牽涉到之各種因子或因子與因子間之相互作用，及因子失調所引起

之疾病等，除此之外還可用來研究癌生物學，因有證據顯示細胞-細胞外間質的交互作用對癌的形成及發展具有決定性的影響。

本實驗利用這個模型來探討白血球的運動能力，及其胞內微絲系統(Actin-containing Microfilament System)之結構及動態變化，在白血球穿透血管壁過程中的重要性，現今已知至少有22種發炎性疾病或症候群，其患者會有功能性失調的白血球，而伴隨各主症出現的共同症狀之一則是牙周病 (Hart et al.,1994)。

牙周病可主要可分為二種型態:(一)為牙齦炎 (二)是牙周炎。

牙齦炎(Gingivitis)是由牙菌斑 (dental plaque)引起的一種炎性反應，牙菌斑是細菌的堆積，這些細菌可放出酵素 (enzyme)來破壞上皮及其附近的組織，牙菌斑也是提供其它細菌生長的環境，這些細菌亦可因其成份而引起複雜的組織病變 (歐陽玲., 中華牙周醫誌 1:1-8,1996)。牙齦炎不治療，有可能會演變成有牙周結締組織及齒槽骨破壞等的牙周炎。

牙周炎 (periodontitis), 是一種牙齒之支持結締組織 (包括牙周韌帶、齒槽骨、牙骨質) 的病變，一般來說，牙周炎之前會有牙齦炎，這些堆積的牙菌斑若不清除，則有可能會造成牙齦漸與患齒剝離，而造成間隙 (gaps)或囊袋(pockets)，此時牙齦造成紅腫且易流血，而這些在囊袋的細菌所產生的毒素可經不同的生物效應 (biological effect)來破壞牙齒的支持結締軟組織及齒槽骨，這牙周炎根據發病年齡層惡化速度及病變部位之

大小又可分為:

局部青少年型(Localized Juvenile Periodontitis , LJP) ,
局部後青少年型(Localized Postjuvenile Periodontitis , LPJP)
全口青少年型(Generalized Juvenile Periodontitis , GJP)及
全口後青少年型(Generalized Postjuvenile Periodontitis , GPJP)
等四種。1989年 Astemborski 等人指出其中病變擴及全口的牙
周病,更因其惡化速度極快,甚至在牙菌斑或結石等誘因尚未
大量形成之前,即可造成病人極大的痛苦及傷害,故又稱之為
快速惡化型 (Rapidly Progressive Periodontitis , RPP) (Suzuki et
al., 1988)。

大多數牙周病患者的嗜中性白血球皆發生一或多種之官能
失調 (dysfunction) , 如趨化性 (chemotaxis) , 運動能力
(locomotion) , 黏著性 (adhesiveness) 及吞噬能力 (phagocytosis)
等方面, 均已有許多的研究證實要比正常人的白血球遜色許多
(Charon et al., 1985; Genco et al., 1992)。由於這些特性都是直接
影響到嗜中性白血球穿透血管內壁之能力的因子, 是以研究牙
周病患者血液中的這些病人本身產生的功能失調之白血球, 並
以之與正常人之白血球相比較, 應可增進對白血球穿透血管內
壁之機制的了解, 尤其是對於微細纖維絲所扮演的角色到目前
為止仍缺乏深入的研究。多數報告指出嗜中性白血球細胞膜上
糖蛋白 (glycoprotein) 的缺乏及其臨床症狀則包含了重復性發
炎, 在感染區缺乏膿的形成 (lack of pus formation despite
neutrocytosis) , 漸進性的牙周炎 (progressive periodontitis) , 損害
傷口癒合的能力 (Beaty et al., 1984) , 約有百分之七十五或以

上的牙周炎患者有嗜中性白血球趨化性不正常，其主要原因為細胞表面之趨化因子之分子 (chemi-attractant molecules)接受器比正常人減少，研究較透澈者為 fMLP(formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)的接受器，即是著名的 formylmethionyl peptide receptor (FPR)。這個 FPR 為穿膜的醣蛋白(glycoprotein),其分子量約 32kd，沒有醣化(unglycosylated)且可鍵結從細菌而來的 formylated hydrophobic peptides。

嗜中性白血球受了 N-formyl -met-leu-phe (fMLP)這種趨化物刺激後會造成細胞骨架中的 actin 產生聚合作用 (polymerization) 短暫的波動及細胞在瞬間改變形狀從圓形到極化現象 (Model et al., 1996)，即是其細胞骨架 actin 快速從單體 (monomeric)之 G-actin 轉成絲狀 (filamentous)之 F-actin 的結果之一，表示細胞正在作移動中(Wallace et al., 1984;Howard et al.,1985)。由 fMLP 刺激的嗜中性白血球其結果導致細胞內鈣離子濃度的增加，但已經經由證實 G-actin/F-actin 在未經刺激的嗜中性白血球中，其平衡狀態部份與鈣離子控制機轉相關，然而一些參與細胞移動的重要變化或是構造，例如 actin 的聚合作用 (polymerization)及分佈情形，細胞膜的縐褶 (membrane ruffling) 及細胞極化情形與這鈣離子是不相關的 (Zaffran et al., 1993)，有關於牙周病患者嗜中性白血球趨化性 (chemotaxis)的研究，均停留在運用 1987 年 Martha 等人發展完成的體外模型系統，但這並非一個類似體內的環境，不過這已是比更早前的系統要好一些，早期的系統如前所述為在圓形玻片上覆上一層膠原蛋白，用此來觀察嗜中性白血球的移動，但這種系統為平面空間，在

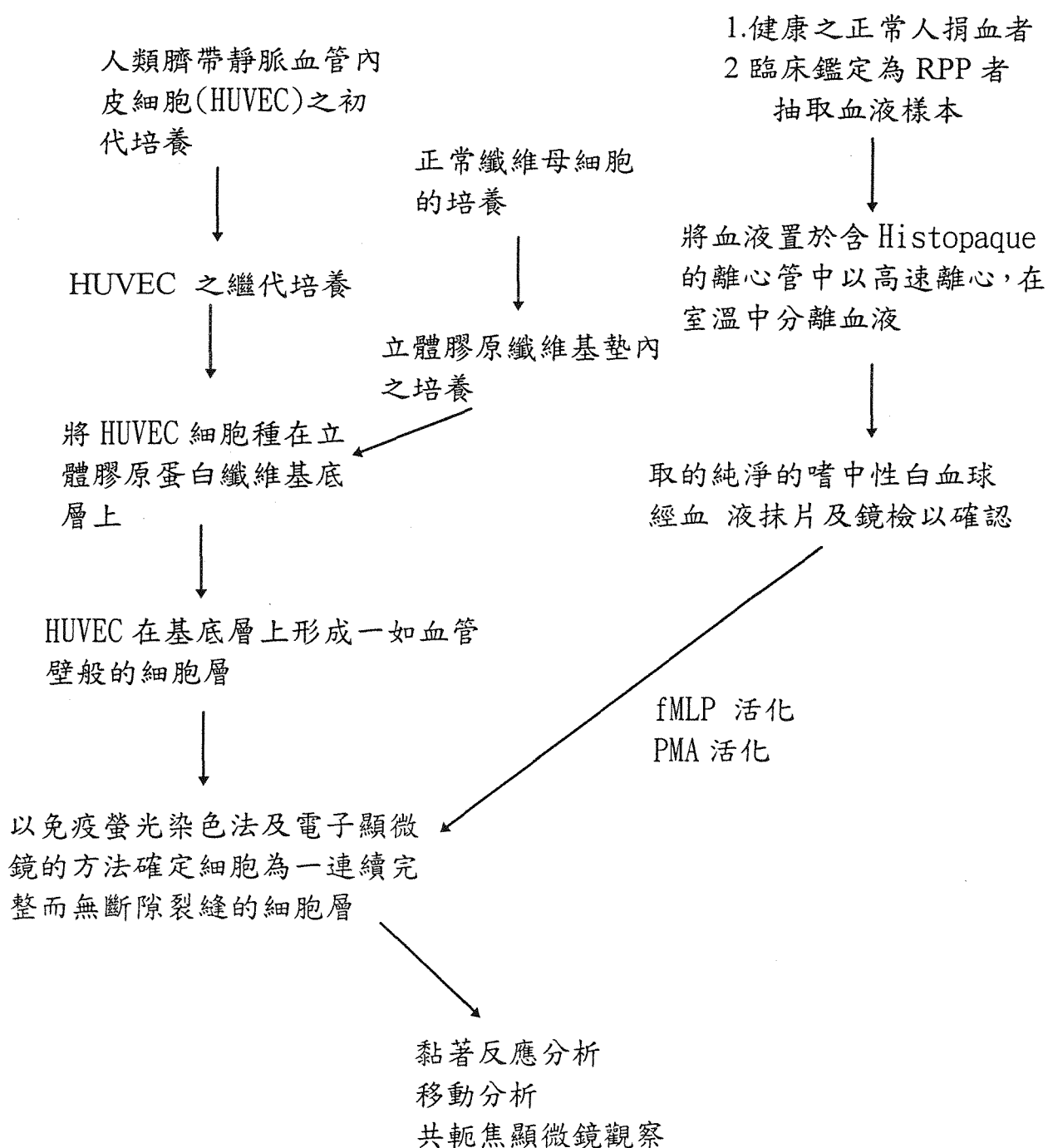
移動及穿透上阻力甚大，現今本實驗室成功的建立一個類似體內環境且為三度立體空間的模型，阻力降低，又內皮細胞形成完整的細胞層只花費 5 個小時的時間，且採用活體染色 (Zhang et al., 1992) ， tetramethylrhodamine 做活體染色，使其在螢光照射下，能放出橘紅色螢光，這技術的優點是細胞是存活著且處理方便不須利用放射線來得知其穿透的情形，實為以後研究嗜中性白血球運動能力之一大進步。

第二章

材料與方法

(MATERIALS AND METHODS)

壹、實驗設計及方法流程圖：





貳、實驗方法：

一、細胞的培養

(1)、臍帶內皮細胞的初代培養之建立及繼代培養：

從人類臍帶靜脈分離出內皮細胞來的方法係根據 1973 年 Jaffe 等人發表的。

首先，新鮮的臍帶收集在 cord buffer 中(0.14M NaCl ， 0.004M KCl ，另加 0.001M phosphate buffer ， 0.01M glucose ， pH7.4)，這新鮮的臍帶須在手術剪下後 8 小時內處理，所收集的細胞才可以快速生長，若超過 8 小時則細胞不易生長，平均長滿一盤 25cm² 大小的培養瓶須二個禮拜。

臍帶內有二條動脈及一條靜脈，靜脈口徑較大，容易分辨，於靜脈內放入 hepes buffer 清洗數次直到將血液及凝塊完全洗乾淨，再將臍帶兩端用棉線紮緊放入 cord buffer 內含有 0.2% collagenase(CLS2 ， Worthington biochem 、 co ， Freehold ， NJ) 在 37 °C 9 分鐘，這 0.2% collagenase 所放入的量係依據靜脈的長度來決定，時間切勿超過 9 分鐘，否則易洗出其它細胞出來，之後再將這 collagenase 懸浮液收集起來離心 1500 rpm 5 分鐘，然後將細胞團塊再打散於 EGM(endothelial growth medium ， Clonetics)培養液中，放入先前已經覆上一層

0.2% gelatin 的培養瓶在 37 °C 作用 30 分鐘，以 EGM 培養液來培養 HUVEC 放在 37 °C、含 5% CO₂ 及相對濕度 95% 的培養箱中，EGM 其內容添加物含有 3.0mg/ml bovine brain extract，1mg/ml hydrocortisone，50mg/ml gentamycin sulfate，50µg/ml amphotericin，2% fetal bovine serum，及 10µg/ml recombinant human(Endothelial Growth Factor)。為避免污染，須在培養箱適應生長 24 小時後，用含有 1% 抗生素的 HEPES buffer 來洗，以洗去未黏附的細胞及細胞殘骸等懸浮的雜質再放 5cc 的 EGM 來培養，等長滿整個 T-25 的培養皿後再以 0.25% trypsin/1mM EDTA(Gibco)，於 37 °C 作用 1 分鐘來拆細胞，準備供下一個實驗而用。

(2)、正常的纖維母細胞的培養：

正常的纖維母細胞的來源是來自新生兒的包皮組織，這纖維母細胞培養在 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM，GIBCO)中其內含有 10% 胎牛血清及 1% 的抗生素，長滿的纖維母細胞再以 0.25% trypsin/1mM EDTA 來拆並作繼代培養。

(3)、立體膠原基墊培養(cultivation in 3-dimensional collagen lattices)

每份基墊由 0.5 c.c 膠原基質溶液製成。

以 20 個基墊為例，所須膠原基質溶液總體積共 10 c.c 其組成比例如下：

0.1 N	NaOH	0.625 c.c
10 ×	MEM	0.625 c.c
DMEM		2.75 c.c
Vitrogen 100		5 c.c

細胞懸浮液 (cell suspension) 1 c.c 內含之細胞為纖維母細胞(fibroblast)數目為 5×10^4 cells/gel。

取 15 c.c 離心管。配製膠原溶液(collagen solution) 時先加入 0.1N NaOH、10 × MEM 及 DMEM，再加入 Vitrogen 100，搖動離心管，使內容物先充分混合，最後加入 cell suspension，搖勻之後即可分裝於 24 well plate 的每個槽，每個基墊之體積為 500 μ l，培養一個晚上後即可作下一個實驗。

(4)、單層 HUVEC 細胞生長在含有纖維母細胞之膠原基墊之上的共同培養系統(co-culture of HUVEC monolayer on top of fibroblast-populated collagen gels)

將 5×10^5 的 HUVEC 細胞種在前一天即準備好的立體膠原纖維上約 3 個小時即可形成一完整的單層細胞，平均每個小時用顯微鏡觀察，直到以肉眼看到完全無斷隙裂縫後再以免疫螢光染色法及 SEM 加以確定 HUVEC 細胞是否已經長成一連續完整的細胞層。

同理將 5×10^5 的 HUVEC 種在已覆上一層 PBS 內含有 1% gelatin 的圓形蓋玻片上(coverglass)，以作為對照組，此圓形蓋玻片的準備是先將 coverglass 經火烤無菌後放入 24 well plate 內，再加入 0.5c.c 的 1% gelatin 覆蓋，培養在 37°C 、5% CO_2 30 分鐘後再將 25cm^2 內已長滿的 HUVEC 拆下來種在 coverglass 上，平均每個小時用顯微鏡觀察，直到肉眼見無斷隙裂縫的型態後，再以免疫螢光染色法加以確定是否為一連續完整而無縫隙的細胞層。

(5)、嗜中性白血球的分離：

將 10c. c 針筒以 heparin 潤濕，再抽取正常人的血液 10c. c 及病人血液 10c. c。

取 15c. c 的離心管，以 Histo paque 密度分別為 1.077、1.119 來將嗜中性白血球分離出來，1.077 可以將單核球分離出來，1.119 則是可將嗜中性白血球分離出來。

首先在 15c. c 的離心管中，先放密度 1119 的 Histopaque (Sigma) 4ml，再放 1.077 的 Histopaque (Sigma) 4ml，動作須輕柔勿將這二種混合，接著加入血液 3ml 再以 3000rpm 離心 30 分鐘，可見二層白色一圈的白血球，上面一層屬於單核球可棄之，取下面屬於嗜中性白血球的那一層，取的時候勿將單核球與嗜中性白血球混合，取出的嗜中性白血球再用 $1 \times$ PBS 來清洗，目的是將那些少數的紅血球溶解，離心二次每次 10 分鐘 1500rpm，上清液丟棄，沉澱物即為所須的嗜中性白血球。

(6)、嗜中性白血球的純度鑑定：

利用 Liu's stain 方法來鑑定，首先先做血液抹片，在空氣中乾燥後再滴上 Liu's A 溶液，須完全覆上玻片 30 秒之後，再以 Liu's B 溶液覆在 Liu's A 上，90 秒鐘後，再以水輕輕沖洗，等乾燥後即可在光學顯微鏡下觀察。

(7)、嗜中性白血球經 fMLP 的活化：

嗜中性白血球取 1×10^6 ，加入 10^{-7} mM fMLP (Michael et al., 1996)，再加入 $1 \mu\text{l}$ 的 cell tracker Orange CMTMR (5-(and-6)-((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine) 10mM 稀釋 500X， 37°C 反應 10 分鐘。

(8)、嗜中性白血球經 PMA 的活化：

嗜中性白血球取 1×10^6 ，加入 100nM PMA，再加入 $1 \mu\text{l}$ 的 cell tracker(同上)， 37°C 反應 10 分鐘。

二、免疫螢光染色法(Immunofluorescence):

(1)、 von Willebrand factor 的免疫螢光染色法:

將 5×10^5 人類臍帶靜脈內壁細胞(HUVEC)種在直徑 13mm 之圓形蓋玻片上(coverglass)，經 24 小時培養後，再以 $1 \times$ PBS 輕柔的沖洗 2 次，放入零下 -20°C 的 methanol 1 c.c. 後，在室溫下固定 5 分鐘作用，再用 $1 \times$ PBS 輕柔沖洗 2 次接著加入 1% BSA 於室溫下作用 30 分鐘，藉以除去非專一性的接受器，之後使用 anti-human von Willebrand factor 初級抗體使其於 37°C 下作用 1 小時，再以 PBS 沖洗乾淨，接著放入二級抗體與螢光產色劑 Rhodamine 共價結合之 anti-mouse 免疫球蛋白作用 1 小時，再用去離子水清洗即可封片以表面螢光顯微鏡觀察。

(2)、WGA 與 β -actin 的免疫螢光染色法：

將完整的單層細胞先以 $1 \times$ PBS 輕輕沖洗 2 次，須十分輕柔，否則易將 HUVEC 沖掉，再以 4% paraformaldehyde 固定 10 分鐘。

4% paraformaldehyde 其成份如下：

16% paraformaldehyde 為 2.5ml，

$10 \times$ PBS 為 1ml，再加入二次去離子水至 10ml。

固定完後再加 $1 \times$ PBS 將 4% paraformaldehyde 沖洗乾淨，加入 WGA-FITC(Wheat Germ Agglutinin-FITC)約染 30-40 分鐘，再以 PBS 沖洗三次每次 5 分鐘，最後以去離子水洗再封片即可用螢光顯微鏡觀察同理將 5×10^5 的 HUVEC 種在已覆上一層 PBS 內含有 1% gelatin 的圓形蓋玻片上(coverglass)，以作為對照組，此圓形蓋玻片的準備是先將 coverglass 經火烤無菌後放入 24 well plate 內，再加入 0.5c.c 的 1% gelatin 覆蓋，培養在 37°C 、5% CO_2 30 分鐘後再將 25cm^2 內已長滿的 HUVEC 拆下來種在 coverglass 上，平均每個小時用顯微鏡觀察，直到肉眼見無斷隙裂縫的型態後，再以免疫螢光染色法加以確定是否為一連續完整而無縫隙的細胞層同理將 5×10^5 的 HUVEC 種在已覆上一層 PBS 內含有 1% gelatin 的圓形蓋玻片上(coverglass)，以作為對照組，此圓形蓋玻片的準備是先將 coverglass 經火烤無菌後放入 24 well plate 內，再加入 0.5c.c 的 1% gelatin 覆蓋，培養在 37°C 、

5% CO₂ 30 分鐘後再將 25cm² 內已長滿的 HUVEC 拆下來種在 coverglass 上，平均每個小時用顯微鏡觀察，直到肉眼見無斷隙裂縫的型態後，再以免疫螢光染色法加以確定是否為一連續完整而無縫隙的細胞層。

另外一組則是將已長成完整的單層細胞的 HUVEC 先以 PBS 輕輕沖洗 2 次，動作須輕柔勿將細胞沖掉，之後以 -20 °C methanol 固定 5 分鐘，再輕柔的把它沖洗掉，接著加入 1 % BSA(bovine serum albumin) 於室溫下作用 30 分鐘藉以除去非專一性的接受器，之後使用 anti-mouse β -actin 一級抗體，使其於 37 °C 下作用 1 小時，再以 PBS 沖洗乾淨，二級抗體則使用與 Anti-mouse IgG-FITC ，於 37 °C 下作用 1 小時，最後以 PBS 沖洗、水洗、封片，置於顯微鏡下觀察。

(3)、黏著反應分析：

將已經活化的嗜中性白血球置入已形成完整的細胞層上，分別為 5 分鐘，10 分鐘，15 分鐘，然後以溫的 RPMI 1640 來清洗三次(Kitayama et al, 1994)，動作須輕柔，之後將洗出的細胞取 15 μ l 放入細胞計數器上，在螢光顯微鏡下計算細胞數目，其公式如下：

$$\frac{\text{細胞總數}-\text{洗出的細胞數}}{\text{細胞總數}} \times 100\% = \text{黏著比例}$$

細胞總數是表示純化出來的嗜中性白血球經活化後在螢光顯微鏡底下所數出來的數目

(4)、移動穿入(migration)的分析：

嗜中性白血球經黏著分析的 RPMI 1640 清洗過後，再以 4 $^{\circ}$ C 的 PBS 輕柔的洗三次(Kitayama et al, 1994)，這個方法可以除去黏著在內皮細胞表面上的嗜中性白血球，但不會除去生長在膠原蛋白上的內皮細胞，最後在螢光顯微鏡上計算所清洗出來的細胞數目，即可知移動的比率。

$$\frac{\text{黏著在內皮細胞上被
細胞總數}-4^{\circ}\text{C 的 PBS 洗出的數目}}{\text{細胞總數}} \times 100\% = \text{移動比例}$$

三、電子顯微鏡處理：

(1)、TOTO 處理以供掃描式電子顯微鏡觀察：

首先將第一型膠原蛋白基墊上長滿的內皮細胞固定在新鮮的固定液體內，其成份為 2% glutaraldehyde，4% paraformaldehyde 及 1% tannic acid 溶在 0.1M cacodylate buffer 及 0.1M sucrose，在 37°C 下固定 30 分鐘，固定完後以 0.1M cacodylate buffer 及 0.1M sucrose，沖洗數次，之後將固定好的細胞放在 0.1M cacodylate buffer 及 0.1M sucrose 其內含有 1% osmium tetroxide，於室溫下 1 小時，之後以去離子水沖洗三次，再將新鮮配製的 1% thiocarbohydrazide 置入細胞內 15 分鐘，再用去離子水完全沖洗乾淨，再放入 1% osmium tetroxide 15 分鐘，之後再用去離子水完全沖洗乾淨，再放 1% thiocarbohydrazide 15 分鐘，再用去離子水完全清洗乾淨，然後進入脫水的步驟，分別用 30%，30%，50%，50%，70%，70%，90%，90%，95%，95%，及 100% 的酒精來脫水，每一步驟為 5 分鐘，最後置入 100% 的酒精二次，每次 10 分鐘，然後將細胞浸入 HMDS 及酒精以 1:1 混合的液體中 5 分鐘，在浸入 HMDS(hexamethyldisilazane)及酒精 2:1 混合的液體中 5 分鐘，最後完全浸入純的 HMDS(hexamethyldisilazane)

中，最後將樣本取出乾燥即可置於掃描式電子顯微鏡中觀察。

第三章

結果

(RESULT)

一、人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)的鑑定

首先我們須確定從人類臍帶靜脈取出的為正確的血管內皮細胞。內皮細胞在生長初期，其形態是像鵝卵石(Cobblestone)般的形狀，一團團分別聚集生長呈群落狀，可由相位差顯微鏡觀察到這種形態出現，如圖(1A)。接著更進一步確定其為內皮細胞，則利用內皮細胞具有 Weibel-Palade bodies 的顆粒性構造，其內含有一種內皮細胞所特有的蛋白質，稱 von Willebrand Factor(vWF)。利用抗 vWF 之初級抗體，配合間接式免疫螢光染色法，可將 vWF 的形狀及分佈，以特異性的螢光顆粒標示出來，如圖(1B)。圖(1C)乃是與圖(1B)相同的區域，但是用位相差顯微鏡觀察的情形。另外，在高倍鏡下觀察免疫螢光呈陽性反應的顆粒，大部份是分布在環核的富 ER-Golgi 區，另外在細胞質內，也有少數看似懸空分佈的 vWF(+)顆粒，如圖(1D)，這些結果足以證明我們採集到的確實是內皮細胞(HUVEC)，但同時也證明我們用 0.2% collagenase 來分離 HUVEC 的條件和步驟也是正確且能重複的(reproducible)。

二、內含纖維母細胞之立體膠原蛋白基墊中細胞的製備

首先須確定纖維母細胞是很均勻地生長在膠原基墊中間，而不是集中在膠原基墊之上層或下層，因纖維母細胞在膠原基墊上層其型態與在膠原蛋白中是一樣的為紡錘形，如圖(2A)。故為避免纖維母細胞生長於上層則在配製完膠原溶液時不須先預熱 (prewarm) 5 分鐘，直接置入 24-well plate 中，則細胞會沉降在中層或下層，在下層則細胞形態為完全伸展開來，與在培養皿中的形態是完全一樣的，如果細胞是完全存在於下層則這個膠原蛋白丟棄之。

纖維母細胞生長在普通平面空間的培養皿，是完全伸展開來的，與在立體膠原蛋白上的型態是不同的，如圖(2B)。

確定膠原蛋白基墊可使用則將內皮細胞置於其上培養，我們在相位差顯微鏡下觀察是否有異於內皮細胞形態的細胞出現，沒有的話則表示纖維母細胞確定存在於下層，如圖(2C)。為確定須要多少內皮細胞才可以在缺乏促進內皮細胞生長的蛋白質(fibronectin)情形下快速形成細胞單層就像圖(2C)一樣，故我們進行一連串的細胞滴定測試，發現只有在 5×10^5 以上才可以快速形成細胞單層，數目不足，即細胞未超過 5×10^5 ，則無論培養多少天也將只能形成網狀，如圖(2D)。

三、完整單層細胞的鑑定

我們為確知是否形成完整的細胞單層，若形成細胞單層無任何斷隙裂縫，則可運用它來進行嗜中性白血球的研究，此部份的鑑定運用免疫螢光染色法及掃描式電子顯微鏡來鑑定。

在免疫螢光染色方面則分別利用 WGA，及 β -actin 來比較細胞生長在圓形玻片上及立體膠原蛋白上形成細胞單層的情形，我們發現若生長在圓型玻片上則形成完整的細胞單層須要比較久的時間，如圖(3A)為細胞生長在圓形玻片上二天的形態，以 WGA 來染色可見仍有裂隙存在于細胞單層之間，圖(3B)為細胞生長在圓形玻片上二天的形態，以 β -actin 來染色可見細胞與細胞接連處仍有縫隙存在，非完整的單層細胞。但是若我們以第一類型膠原蛋白基墊上則可快速形成細胞單層，如圖(3C)則為細胞生長在膠原蛋白基墊上 5 個小時後來染色可見完整的細胞連接處(intercellular junction)。圖(3D)則為與圖(3C)相對應的螢光相位差顯微鏡所觀察到的圖形無論在螢光或相位差下的觀察均相同，故由此可見若利用平面空間來培養內皮細胞以形成完整單層細胞，是不佳的選擇，而最佳的選擇則是利用立體膠原蛋白基墊來培養內皮細胞以形成完整單層細胞。

另外一部分則利用掃描式電子顯微鏡來更確定膠原蛋白上的細胞層為完整無裂隙的，在圖(3E)及(3F)上我們可見裂縫，但其裂縫點是可接合的，表示這裂縫原來並不存在，乃是因

為在樣本製備過程中產生的 Artifact，故我們以此點來說明其完整性，另外則是展現其完整性，無任何斷裂處，我們更加證明這個立體膠原基墊類似血管壁的模型之完整性。

四、嗜中性白血球的鑑定

在前面我們已經完整建立一個類似血管表面的模型，故為了證明我們這個系統的研究及運用價值，我們利用它來從事嗜中性白血球移動形態的研究，目前對於嗜中性白血球趨化性缺陷研究最多者應算是在牙周病病人身上，故我們利用這個建立完整的血管壁系統來初步證實其可運用性及對病人嗜中性白血球作一初步的探討，傳統的嗜中性白血球分離方法約須花費 2 小時，這對於研究白血球之移動情形可能會有些誤差，且又經多次更換液體及離心，這對於研究它的一些運動或是吞噬作用或其他一些活性可能較不佳，目前我們利用密度 1.077 及 1.119 的二種 histopaque 來分離出嗜中性白血球，只須經過一次離心即可獲得嗜中性白血球，為確定我們所分離出來的嗜中性白血球其純度十分高，故在未分離前先做血液抹片，圖 (4A) 為未經分離血球的步驟之血液抹片，在光學顯微鏡下觀察，圖片上有紅血球、多核球，另外為了說明這些紫色確實為白血球，則我們放大倍數來看，可見多核且細胞質內有均勻的顆粒，為嗜中性白血球，而淡綠色為紅血球，而在經過我們離心後，以 Liu's stain 來觀察是否為嗜中性白血球，在高倍光學顯微鏡底下，我們可清楚看見多核且顆粒均勻，為嗜中性白血球，圖(4B)。

五、正常人的嗜中性白血球在 fMLP 刺激下的運動能力

已知牙周病特別是快速惡化之類型，其嗜中性白血球細胞膜上有 fMLP 接受器的缺陷而影響其趨化(chemotaxis)能力，故我們可利用這個特性來對於這個血管壁作一測試，視其是否適合來研究白血球。首先我們先作正常人的反應，我們可發現在 5 分鐘內即有黏著反應發生，且這些黏著的嗜中性白血球幾乎全部都有穿透行為，正常人嗜中性白血球受 fMLP 刺激後，在內皮細胞上 10 分鐘時移動達最高點而在十五分鐘時則略下降，基本上這些血球通透百分比約在 35% 以上，如圖(5A)，而另外我們使用螢光顯微鏡來觀察其通透的情形，因為我們將嗜中性白血球標示活體染劑，其在波長 543 nm 激發下會發出紅色螢光，故我們可藉此來觀察活的白血球細胞在整個通過程中之行為，圖(5B)是在內皮細胞表面，我們可清楚看見內皮細胞的型態，另外可見較亮部分為嗜中性白血球，但其亮度似乎較暗些，故我們調整焦距(在同一視野下)，使可以觀察到較內層，我們發現那些變暗的嗜中性白血球在膠原基墊的內層，其螢光的亮度變亮，表示其大部份已穿透過內皮細胞表面，而進入內皮細胞與內皮細胞之間，另外我們可見內皮細胞表面與內皮細胞底部螢光部份差很多，以此來判斷嗜中性白血球是位於內皮細胞表面間或是已穿透過細胞層，利用這一點我們觀察 10 分鐘的移動情形，發現幾乎嗜中性白血球均已穿透，在上層無法明顯觀察到嗜中性白血球存在於表面的情形，且穿透過的數目相當多，在仔細觀察下

可見其有偽足型態出現,圖(5C) ,而一些活動力強的細胞則進入較深層我們可見其與纖維母細胞位於同一層,這一點不但證明我們的系統為二種細胞共同培養同時亦證明我們的血管壁模型確實適合應用在研究發炎反應中的白血球之特性,圖(5D) ,同樣的圖(5E)亦是嗜中性白血球在內皮細胞上 10 分鐘後的圖形,我們可見長形的為纖維母細胞其位於膠原基墊內,而圓形有偽足出現者則為嗜中性白血球,由這一張圖我們更加確定嗜中性白血球,在受刺激後確實可在這系統中進行穿透,並非只是在內皮細胞底部,而在 15 分鐘後的觀察亦同培養 10 分中的樣本一樣有大量細胞穿透,如圖(5F)及(5G)。

另外,我們為了更精細確定嗜中性白血球通透的情形,故採用共軛焦顯微鏡來觀察,共軛焦顯微鏡其優點為可作光學性連續切面(optical section),切面的旋轉,及 3-D 立體圖形,深淺度的標示及其它許多特性,因可清楚觀察每一層面型態,無論在 X, Y, 或 Z 軸上, 所以我們利用這些特性來更進一步分析,以補普通螢光顯微鏡之不足。

我們經由共軛焦顯微鏡已知由 HUVEC 所形成的整個細胞單層厚度為 $45\mu\text{m}$,以此作為一基準點,因為我們在嗜中性白血球內放入活體染劑,其在波長 543nm 的激發下可見紅色螢光,故我們利用這一特性來作觀察,先前我們提出嗜中性白血球在 5 分鐘下即有穿透的情形,但是是否整個穿透過內皮細胞層?另外我們可利用共軛焦顯微鏡可展現深淺度的功能,以觀察各個嗜中性白血球運動的情形,我們可用顏色來

區分在一清楚焦距下，嗜中性白血球仍有不同深度的穿透，如圖(5H)為 $45\mu\text{m}$ ，綠色為 $22\mu\text{m}$ ，紅色則為基準點，我們可見嗜中性白血球最遠可通過內皮細胞層，如箭頭所示，接著我們對置於內皮細胞上 10 分鐘的嗜中性白血球作一連續切片，我們可見雖然只切到 $27\mu\text{m}$ 但可發現其亮度仍是十分強，故其通透深度比 5 分鐘深，另外我們亦可見在一視野下，嗜中性白血球數目遠比 5 分鐘多圖(5I)，再則我們利用其可旋轉的特性換個角度來證明其穿透，我們選擇一連串切面之其中一張來作旋轉，在旋轉 180 度後可見背面，這亦可顯示其有穿透情形，如圖(5J)，同樣的在同一樣本中，我們可見有些嗜中性白血球可穿透至 $95\mu\text{m}$ 的深度，我們可見圖(5K)在 $45\mu\text{m}$ - $65\mu\text{m}$ 時，在右下方有亮點產生，直到 $95\mu\text{m}$ 仍可見，故其可穿透的深度應可大於 $95\mu\text{m}$ 而膠原基墊之深層內。

六、牙周病患者的嗜中性白血球在 fMLP 刺激下的運動能力

接著我們利用牙周病快速惡化類型患者的嗜中性白血球，因其 fMLP 接受器有缺陷導致趨化性能力下降，我們利用這個血管模型來觀察其是否有趨化能力下降的情形出現故我們先以 fMLP 刺激後，再放入立體膠原蛋白基墊上，發現其黏著及通透的百分比，確實比正常人下降許多，約 30% 以下，可見圖(5A)，與正常人相互比較之下確實有差異，利用這個模型我們更證實了前人的說法，但為何這個接受器的缺陷則會造成趨化性下降？是否因為其本身的細胞骨架即有缺陷以致於訊號雖然傳給了 actin，但仍舊無法促使 actin 進行聚合作用(polymerization)，故趨化性下降？另外一點，是否因為其接受器無法有效傳遞訊號給某些與細胞骨架連結的穿膜蛋白，而致細胞骨架無法完全收到 fMLP 所傳遞的訊號，故趨化性下降？

七、牙周病患者的嗜中性白血球在 PMA(phorbol myristate acetate)刺激下的運動能力

為證實前面所提及的二種可能因素,故我們採用 PMA 來刺激前一次同一病人的嗜中性白血球, PMA 與 fMLP 一樣是趨化物, 據前人研究其同樣會影響嗜中性白血球細胞膜上的補體接受器 CR3 (complement receptor 3), 我們使用 PMA 來刺激嗜中性白血球,若趨化性仍舊低, 則有可能細胞骨架本身即有缺陷,於是我們先以 PMA 刺激十分鐘後再放入內皮細胞層上, 分別觀察 5 分鐘, 10 分鐘, 15 分鐘的移動情形, 見圖(7A)我們發現嗜中性白血球的通透百分比遠大於 50%以上 (light box), 雖然我們的樣本數只有一個, 因為這種病人太少,但這結果與 fMLP 的結果(dark box)差距十分大, 我們認為它仍有意義, 因為它是同一病患的嗜中性白血球, 另外我們在螢光顯微鏡底下觀察其穿透的情形, 發現其大部分停留在內皮細胞間, 較無法以螢光顯微鏡來表達, 故我們採用共軛焦顯微鏡來觀察, 我們可見嗜中性白血球位於細胞連結處, 最亮者為嗜中性白血球, 細胞較暗且大者為內皮細胞, 整個內皮細胞厚度約 45um, 故我們只要看嗜中性白血球亮度約在多少 um, 即可得知其所在位置, 圖(7A)的結果告訴我們, 嗜中性白血球之趨化性下降可能原因是接受器缺陷而無法完全傳遞訊號給細胞骨架, 以致於病患者其嗜中性白血球無法進行快速的 actin 聚合作用, 又這一整個訊號傳遞過程是 fMLP 自己本身連結細胞骨架或是與細胞膜上的某一穿膜蛋

白有相互作用，而傳遞訊號給 actin 使其進行聚合作用？前人提及 fMLP 與 PMA 均會影響 CR3，所以是否因為 fMLP 接受器的缺陷而無法與 CR3 有正常的作用，故無法傳遞完整訊號給 actin？

另外關於它的穿透能力我們亦採用共軛焦顯微鏡來觀察，在圖(7B)我們可明顯見到嗜中性白血球位於內皮細胞與內皮細胞之間，但是卻不見其極化的形態，故我們接著作一連續 Z 軸切面以觀察穿透情形，在圖(7C)我們可見在 48 μ m 時嗜中性白血球已呈現模糊，故其大部份應存在於內皮細胞之間。

第四章

討論

(DISCUSSION)

本實驗有鑑於歷年來基礎醫學或是在牙科方面研究有關類似血管體外模型的建立仍是不多，且非完全類似體內環境，故本實驗針對前人所做的體外模型加以改善而成功的建立一個類似血管壁的環境。這個體外系統在各方面均有重大改善，第一、在內皮細胞培養方面，傳統的方法較易導致纖維母細胞的夾雜生長(Prudence et al.,1993)，不易分離，且培養時間一長則內皮細胞即為纖維母細胞所代，我們經一連串測試發現(a)從臍帶靜脈內取出內皮細胞時(Barbieri et al.,1981)，collagenase 放在靜脈管壁內的時間十分重要，作用時間別超過9分鐘，否則易將纖維母細胞或血管平滑肌細胞一併洗出。(b)在做繼代培養拆細胞時，可用 trypsin 在 37°C，5% CO₂ 環境中作用1分鐘後即立即停止 Trypsin 作用，而那些纖維母細胞則是須要2分鐘以上。第二、則是在立體膠原蛋白基墊內培養纖維母細胞，這與前人發展的體外系統不同，且更類似體內環境(Brown et al.,1982;Frederick et al., 1982;Martha et al., 1984;Linda et al., 1986;Martha et al., 1987;Nicholas et al., 1988)。第三、內皮細胞在形成細胞連接處(intercellular junction)方面，前人均為培養長時間，才可形成完整細胞層，有報告指出在立體膠原蛋白基墊上內皮細胞在2個小時可見 cadherins 出現，

其為細胞與細胞之間黏著結合(adherens junctions)分子(Ayalon et al., 1994) , 而我們的內皮細胞在 5 個小時內可形成細胞結合處(intercellular junction) , 比 1988 年 Nicholas 等人指出內皮細胞培養須 7 天至 10 天才可形成完整的細胞單層, 在時間上我們明顯加快, 在此可節省實驗時間, 且 Nicholas 等人在他們系統內有覆上一層 fibronectin , 其為細胞外間質的一種蛋白, 可促進內皮細胞生長(Donald et al., 1990; Hynes et al., 1987; Ruoslahti and Pierschbacher et al., 1987) , 但我們系統無覆上一層 fibronectin 故在數目上須限制在 5×10^5 cell/ml 以上, 若小於這個數目則在形態上形成網狀無法形成完整的單層細胞, 其原因可能在無覆上一層促進內皮細胞生長的 fibronectin , 雖然我們的第一型立體膠原蛋白適合內皮細胞生長, 因膠原蛋白雖然可以與內皮細胞上 $\alpha 2\beta 1$ integrin 相鍵結(Kristin et al., 1993) , 但卻不會促進內皮細胞的生長, 故須在數目上限制, 而我們相信一旦我們能在膠原蛋白上覆上一層 fibronectin , 則形成 intercellular junctions 將會更快速度。

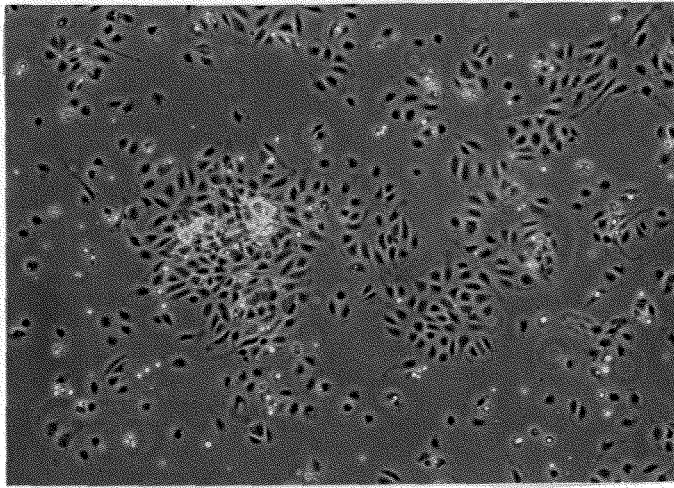
第四、在分離嗜中性白血球上則是採用密度 1.077 及 1.119 的 histopaque 可快速分離出嗜中性白血球出來約 40 分鐘即可完成, 不須耗廢時間來分離出嗜中性白血球, 而影響它的活動力, 減少實驗的誤差因離開體內時間很短, 故其運動能力可能與在體內時差距不大, 我們用此系統來研究嗜中性白血球的運動情形, 發現我們的數值, 嗜中性白血球通過數目為大於 38%, 與 1987 Marth 等人指出嗜中性白血球通過數目為 $29 \pm 12\%$, 這與我們實驗結果有差距, Martha 等人利用羊膜作為基底層供內皮細胞生長其上, 在這部份與我們建立的系統即有差距, 且在嗜中性白血球分

離過程時間，我們耗費時間短，故運動能力應與體內相差極小，故這亦可證明我們的模型具有極高的應用價值。第五、在整個系統採用活體染色，是一重大突破，可避免因要研究白血球的運動能力而採用放射線同位素來標記(Brown et al., 1982)，且觀察方便直接可運用螢光顯微鏡來觀察，這個模型與歷年來研究的各種體外第一類型膠原蛋白基墊類似，但在各方面均有重大改進，可運用它來研究各種白血球與細胞間質或各種發炎因子之間的相互作用，另外，從許多文獻報告中指出白血球穿透血管內皮層的過程和惡性腫瘤細胞在二次轉移(metastasis)中，由血管浸潤出來，進入附近組織之過程至少在形態的變化有很多相似之處例如；白血球和癌細胞都可以把血管壁上相接壤的內皮細胞向兩側推開，以製造出彼等穿過管壁的通路:但是有些已經穿出血管的白血球，卻就此停留在內皮細胞與結締組織之間的基底膜(basement membrane)上(Lee et al., 1988)而未繼續侵入到細胞間質內。因此建立了這個系統，或許可加以應用來增進我們對惡性腫瘤細胞的浸潤及二次轉移的了解。

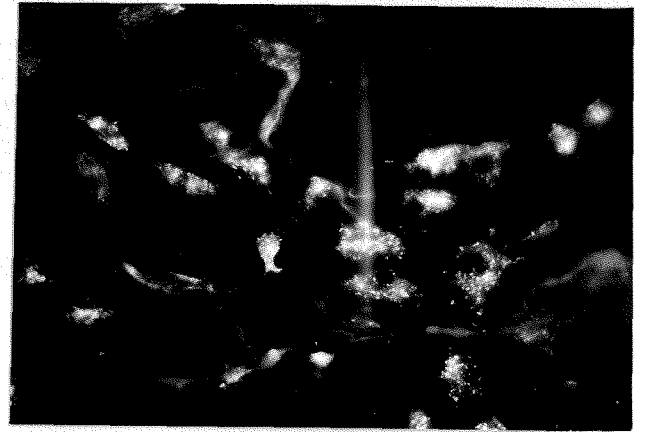
為了測試這個模型的實用性，我們以趨化性缺陷的嗜中性白血球來測試這個血管壁，所以利用 fMLP 及 PMA 來處理嗜中性白血球，在 fMLP 處理上;發現嗜中性白血球放在內皮細胞上 5 分鐘即有穿透行為，10 分鐘時數目達最高點，而 15 分鐘後數目比率略下降，通透比率大於 38%，在 PMA 處理上:發現 15 分鐘通過數目比放置 5 分鐘或 10 分鐘還多，似乎有漸增加趨勢，通透比率大於 50%，由這二點我們推測牙周病病人其細胞骨架應正常，可能為訊號無法傳遞給細胞骨架以致 actin polymerization 無法順利進行，另外

1988年Nicholas等人提出嗜中性白血球在2分鐘開始黏著，在10分鐘內穿透內皮細胞，而我們實驗結果為5分鐘即有穿透行為，可能的解釋則是我們所建立的系統較類似體內環境，另外一方面則有可能是嗜中性白血球活性問題，因我們分離時間短暫，所以與在體內時活動能力相似。經由以上的測試證實這個模型實用性極高，值得應用於研究嗜中性白血球的移動型態。

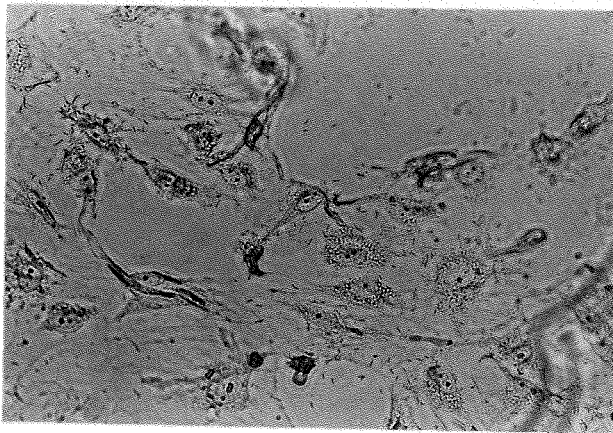
最後，我們這一整個實驗過程阻礙十分多，首先第一類型膠原蛋白基墊的建立，內皮細胞十分難取得，由醫院提供的臍帶常因超過8個小時，而無法使用，再則因剪臍帶過程已非無菌，故感染率甚高，常常已長滿後卻污染了，又或者是在初代培養後的第二天即污染，另一方面則是膠原基墊會產生收縮反應 (Vernon et al., 1996)，往往在形成完整單層細胞層即收縮，第二道須克服的難題則是牙周病患者的血液取得，無法與內皮細胞長滿一盤的時間配合，常遇到有病人卻無內皮細胞或是有細胞卻無病人的情況，若能克服第二道難題相信這一個系統未來發展更完全後，理論上可應用來檢查鑑定牙周病患者。



A



B

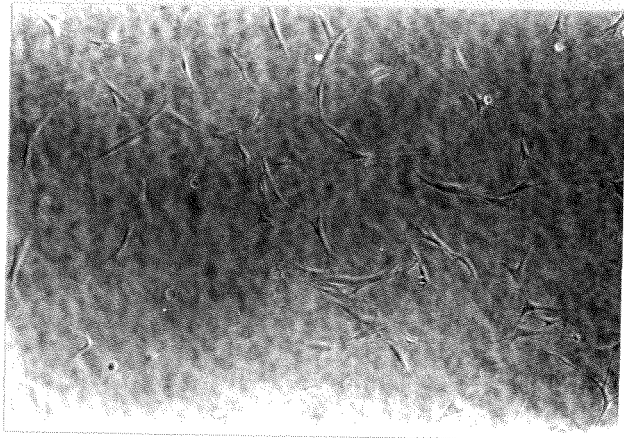


C

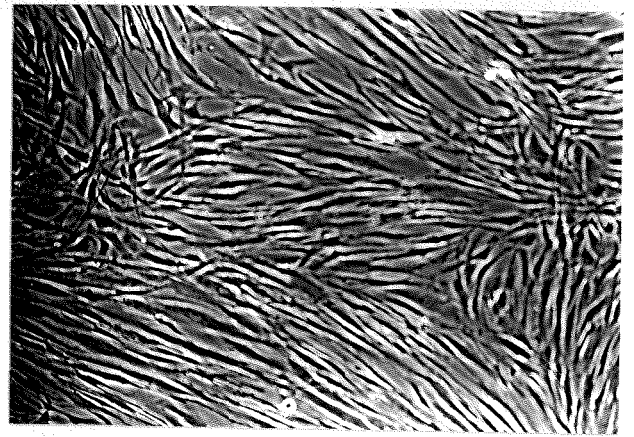


D

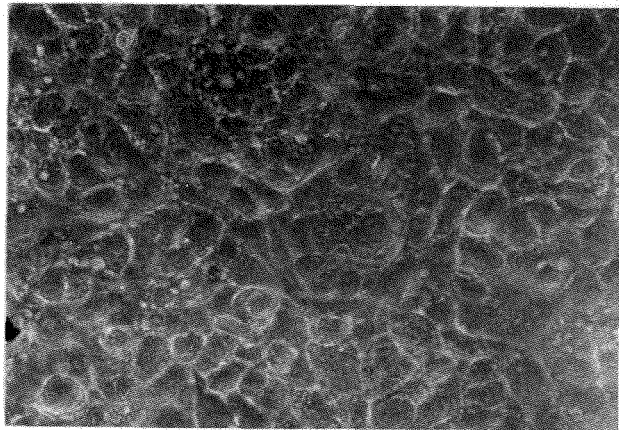
圖 1. (A) 為在相位差顯微鏡底下的觀察，可見其型態是像石頭般分成一小團，一小團聚集在一起生長，這是內皮細胞生長的特殊型態。(B) 為螢光染色的圖片，用抗 von Willebrand factor 的抗體作為一級抗體，二級抗體為 anti mouse-rhodamine，經波長 543 nm 的螢光激活後，若有 von Willebrand factor 則可見紅色的反應，圖上一點一點的亮點即為 von Willebrand factor 此張圖片為 von Willebrand factor 存在於 ER-Golgi 區域。(C) 為細胞生長在圓形玻片上直到長滿，約生長了三天，細胞數目約 1×10^6 ，經過螢光染色後在相位差顯微鏡底下的形態與圖(1B)為一對照。(D) 則為 von Willebrand factor 被釋放到細胞間質或細胞膜上。



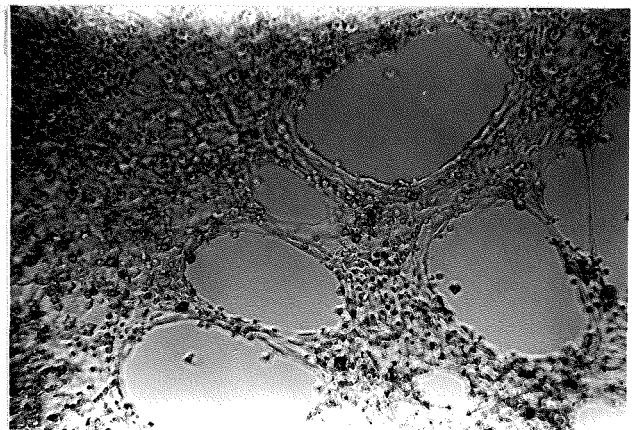
A



B

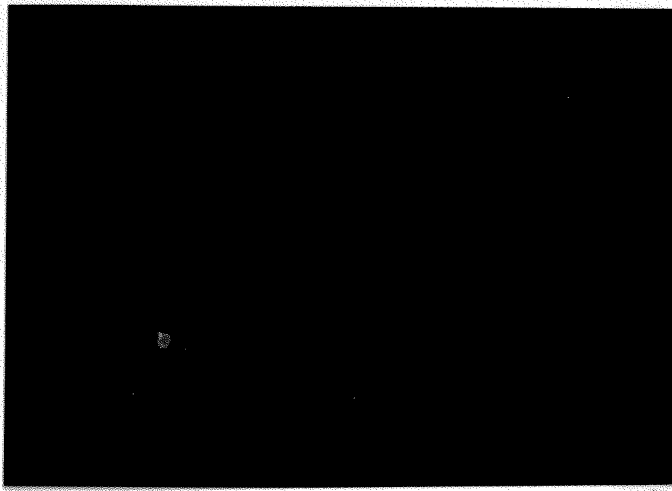


C

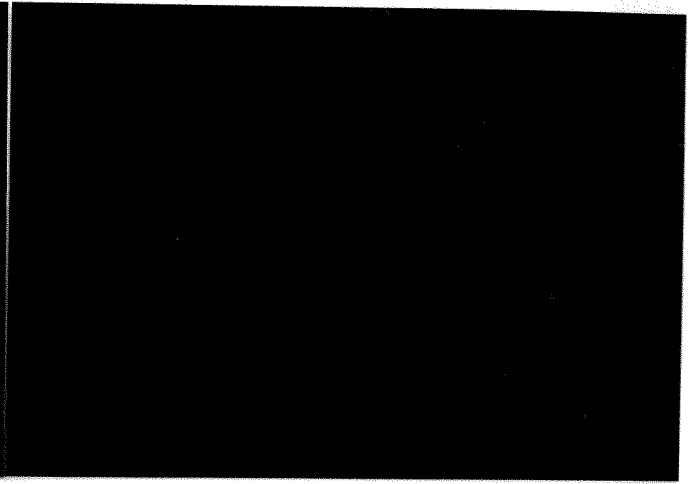


D

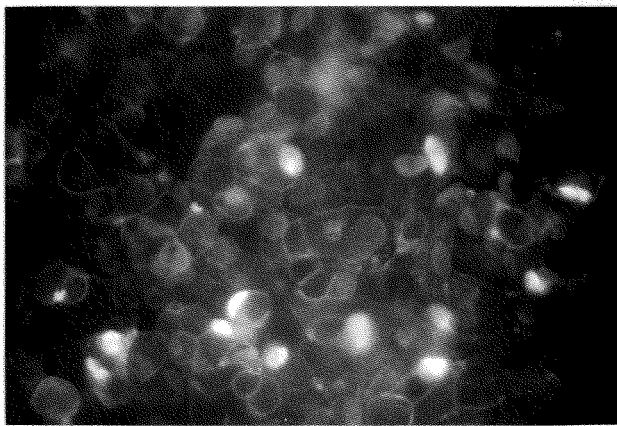
圖 2. (A)為纖維母細胞生長在立體膠原蛋白內的形態，為一紡錘形。(B)為纖維母細胞生長在培養皿上的情形，其形狀為向兩極拉長完全伸展開來，若纖維母細胞沉降在立體膠原下層則型態與在培養皿上相同。(C)為內皮細胞生長在立體膠原蛋白上的型態，可明顯見其形狀與纖維母細胞之差異。故可在相位差顯微鏡底下快速判斷，纖維母細胞是否存在於上層。(D)為當細胞數目不足內皮細胞不會生長成一完整連續的細胞單層(monolayer)，取而代之的是由細胞結成索狀(cell cords)，繼而形成細胞網(network of cells)，一旦長成細胞網，則網眼處始終會保持細胞的淨空(void of cells)，不會形成網狀，不會因培養時間長而形成完整細胞層。



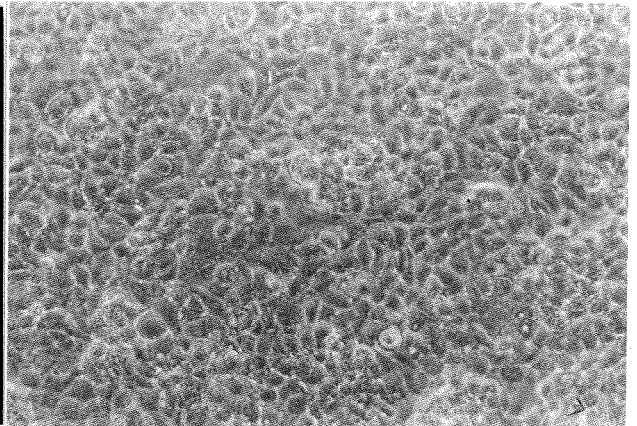
A



B



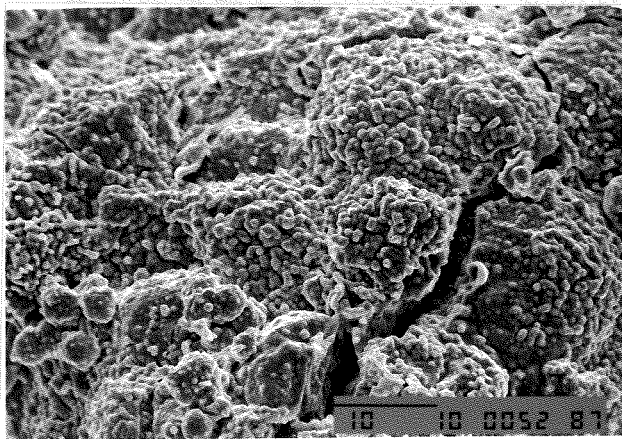
C



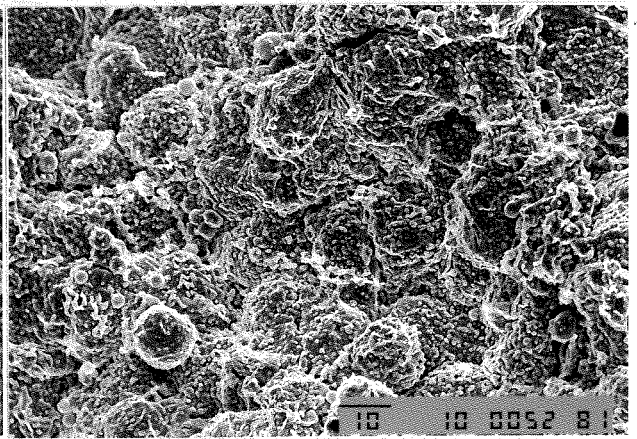
D

· 液體於一處，懸浮物內自亮氣 (C) 懸立於其主體的母細胞 (A) 之圖

示常是細胞內自亮氣 (D) 懸立於其主體的母細胞 (B)



E



F

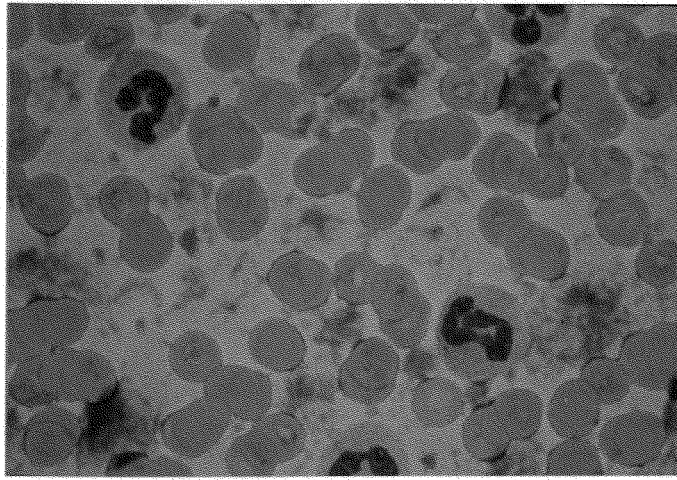
圖中 E、F 之 SEM 顯示其表面之粗糙度

其粗糙度之不同

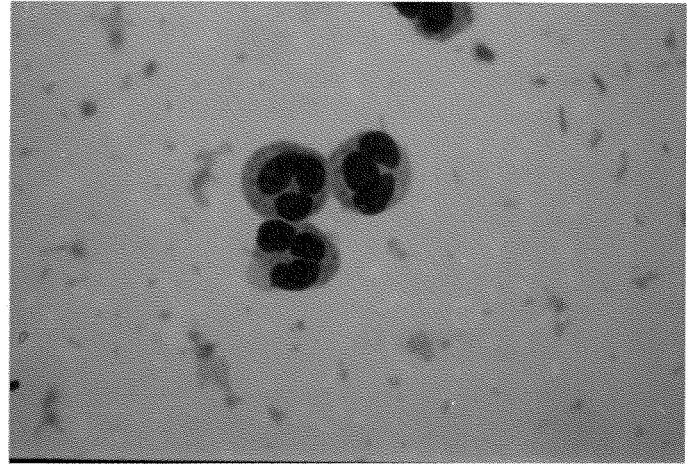
圖 3. (A)為細胞生長在圓形玻片上，數目為 1×10^6 ，經過二天的培養後來染 WGA，其可鍵結碳水化合物，我們可見仍有裂隙存在，放大倍數為 200 倍。(B)為細胞生長圓形玻片上，數目為 1×10^6 ，經過二天的培養後，以免疫螢光染色來觀察，一級抗體為抗 β -actin，二級抗體為 anti-mouse -Ig-G-FITC，利用波長 488 nm 照射下，可見綠色螢光，我們在圖片上仍可見許多縫隙，非完整細胞層，放大倍數為 400 倍。

(C)內皮細胞生長在第一類型膠原蛋白上的免疫螢光染色，利用 WGA 來染細胞連結處，我們可清楚看見細胞邊緣，放大倍數為 200 倍。

(D)則是與(C)相互對照的相位差顯微鏡所觀察的圖形，我們可清楚看見細胞為一完整的連續細胞層，放大倍數為 200 倍。(E) (F)為在掃描式電子顯微鏡(SEM)底下的圖形，是為內皮細胞生長在第一型膠原蛋白上的情形，我們可清楚觀察到一完整的細胞層。



A



B

圖 4.(A)為未分離前的血液抹片，淡色的為紅血球，可見圖片上含有
多核球，放大倍數為 400 倍。(B)為分離後的嗜中性白血球抹片，可
見其明顯的針狀顆粒，以及多核的型態，放大倍數為 400 倍。

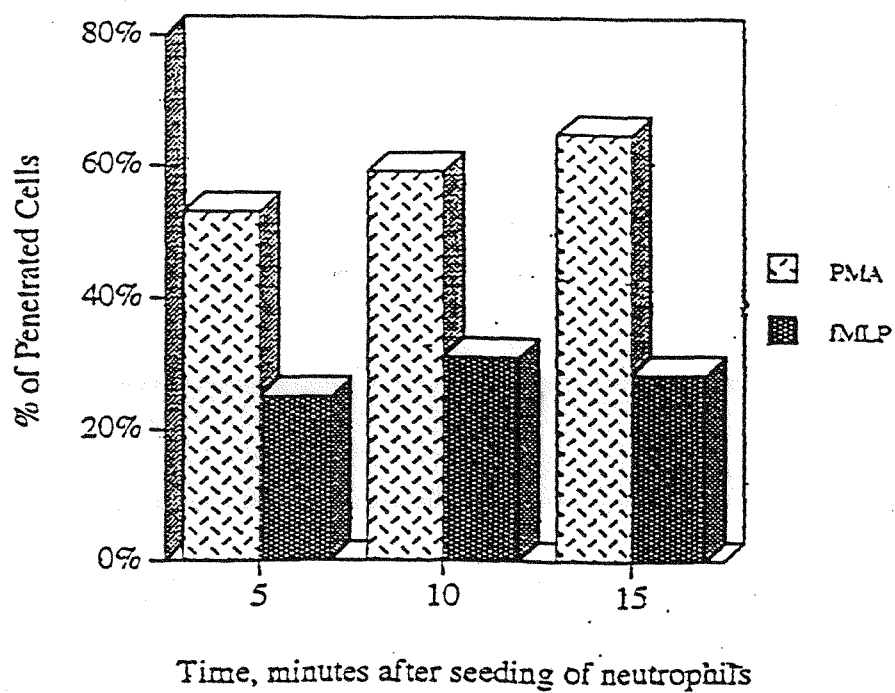
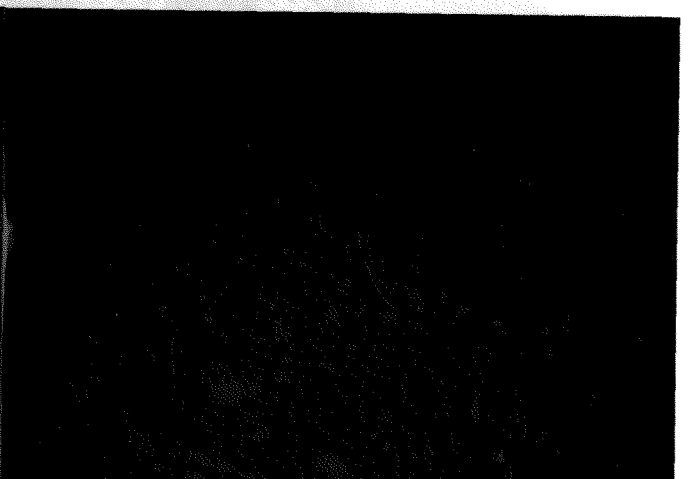
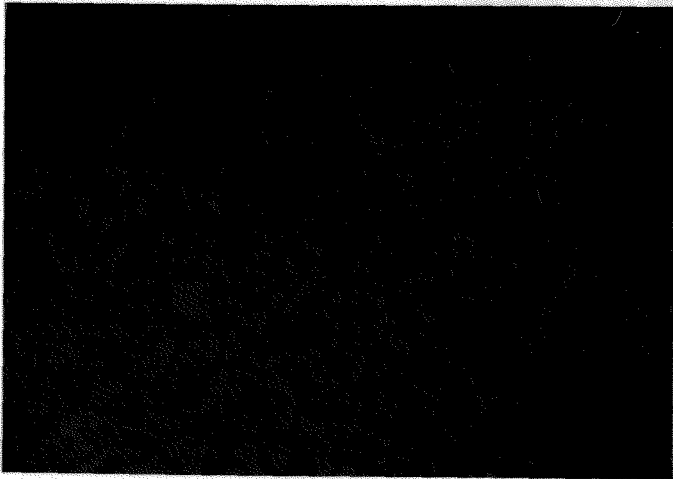


圖 5.(A)正常人和病人的嗜中性白血球在 fMLP 刺激下的運動能力之比較



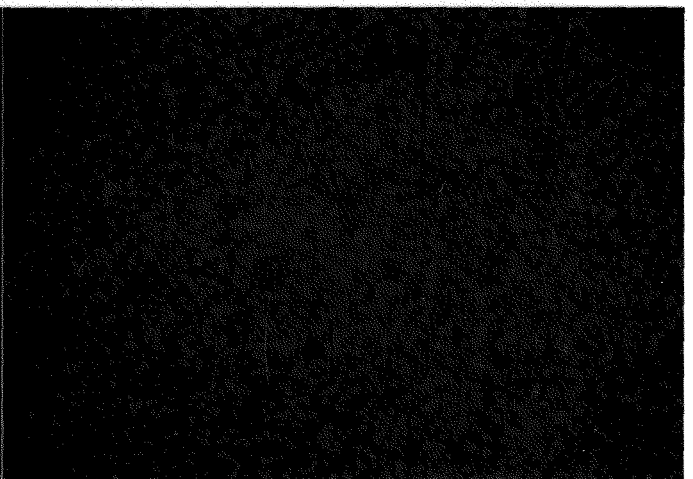
B

G



D

E



F

G

圖 5.(B)為嗜中性白血球經 fMLP 刺激後，置於內皮細胞上 5 分鐘的穿透情形，這是一張在螢光顯微鏡下內皮細胞表面的嗜中性白血球黏著的圖形，我們可見箭頭處細胞亮度漸弱，相對的在(C)則可見細胞亮度提高許多，此表示白血球可以通透過內皮層，即嗜中性白血球在 5 分鐘即有穿透能力。(D)為嗜中性白血球經 fMLP 刺激後，置於內皮細胞上 10 分鐘的穿透情形，這張圖是顯示嗜中性白血球大量通透過內皮細胞層，數目遠比 5 分鐘的時候多。(E)同(D)，我們已知纖維母細胞存在於膠原蛋白內層，由圖我們可看見嗜中性白血球與纖維母細胞處於同一層，這更加證明嗜中性白血球穿透的能力，這一張的立體膠原的深度比(C)更深，原始放大倍數為 100 倍，波長為 543 nm。(F)及(G)則是嗜中性白血球經 fMLP 刺激後，置於內皮細胞上 15 分鐘的情形，我們可見通透過的數目與 10 分鐘的情形十分類似，但實際上通透過的數目，10 分鐘者約比 15 分鐘多，原始放大倍數為 100 倍，螢光波長 543nm。

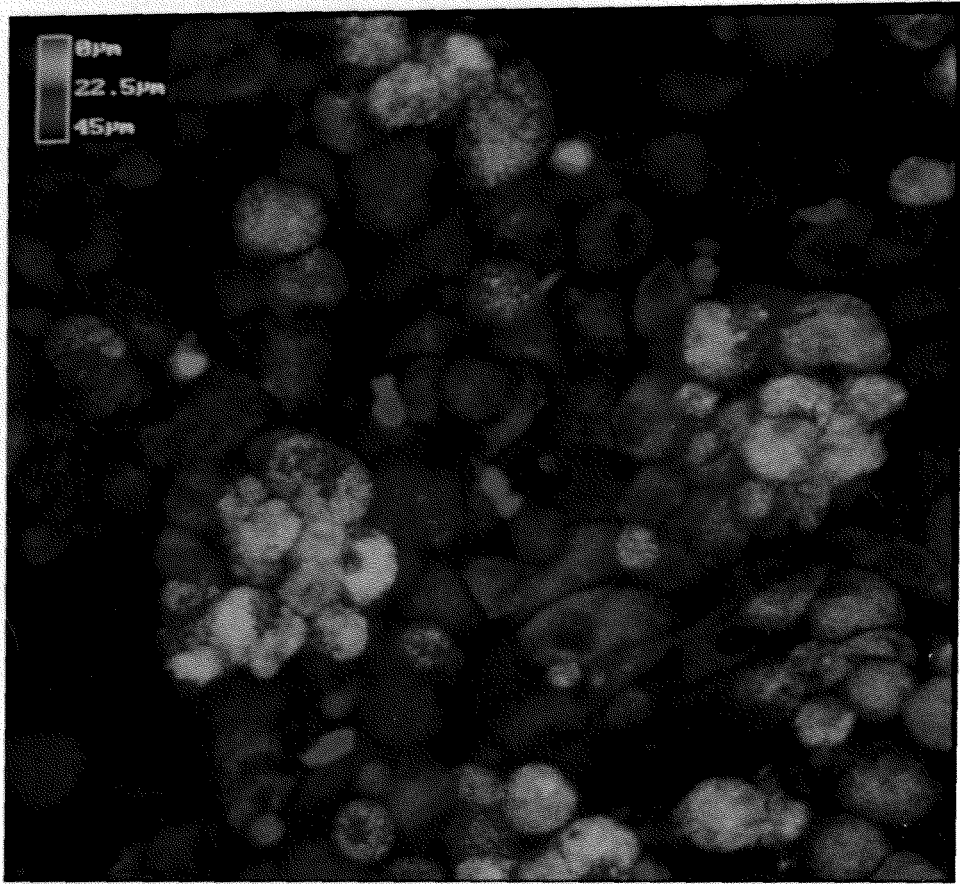


圖 5.(H)為在同一焦距下所看到嗜中性白血球之不同深度的表現，其為經 fMLP 活化後，置於內皮細胞上 10 分鐘，背景為內皮細胞，箭頭處為嗜中性白血球進入到最深 45 μ m。

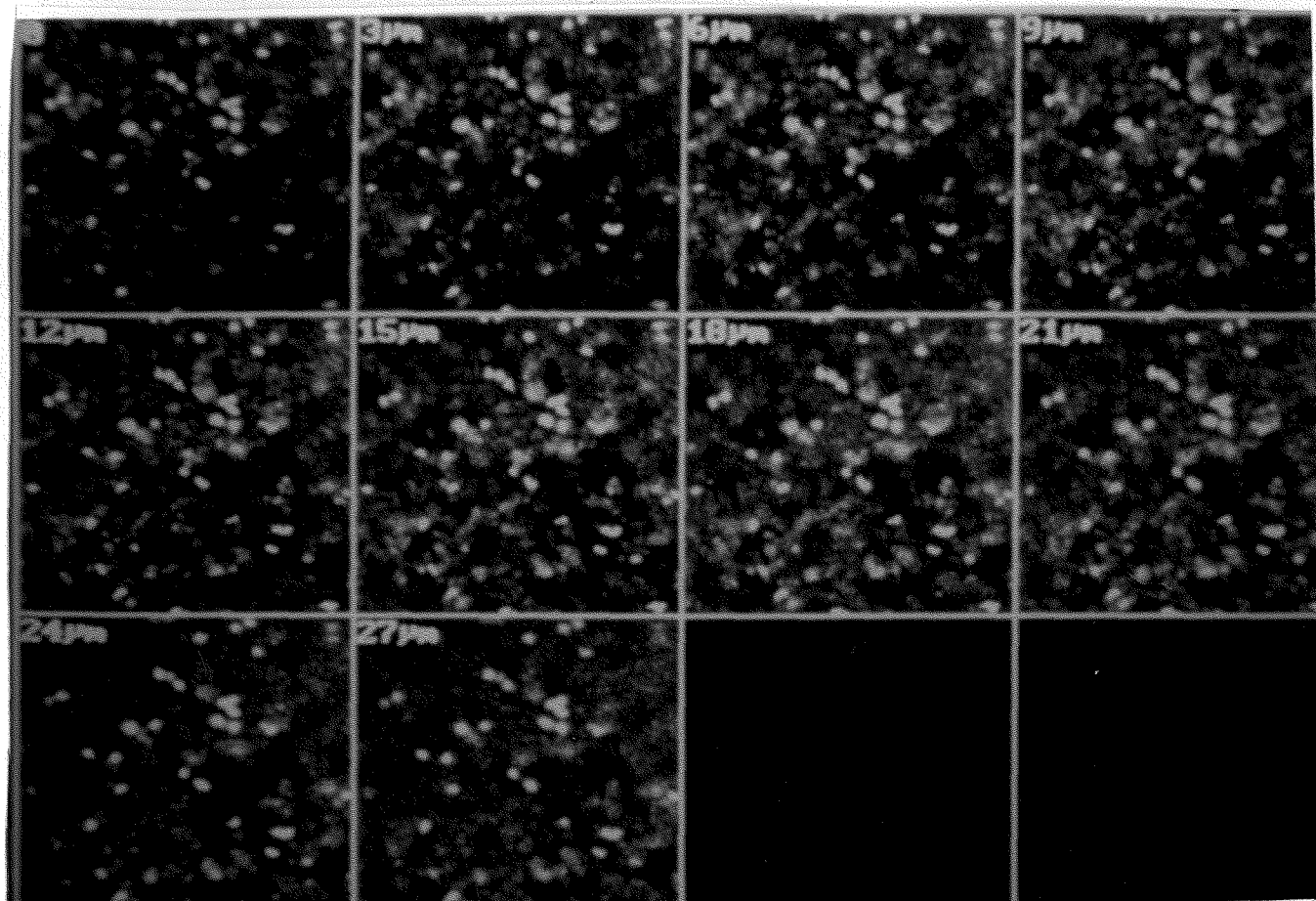


圖 5 (I) 為嗜中性白血球經 fMLP 活化後，置於內皮細胞上層 10 分鐘，在 Z 軸上作連續切面，深度為 27 μm ，每一切面 3 μm ，亮點為嗜中性白血球，背景為內皮細胞。

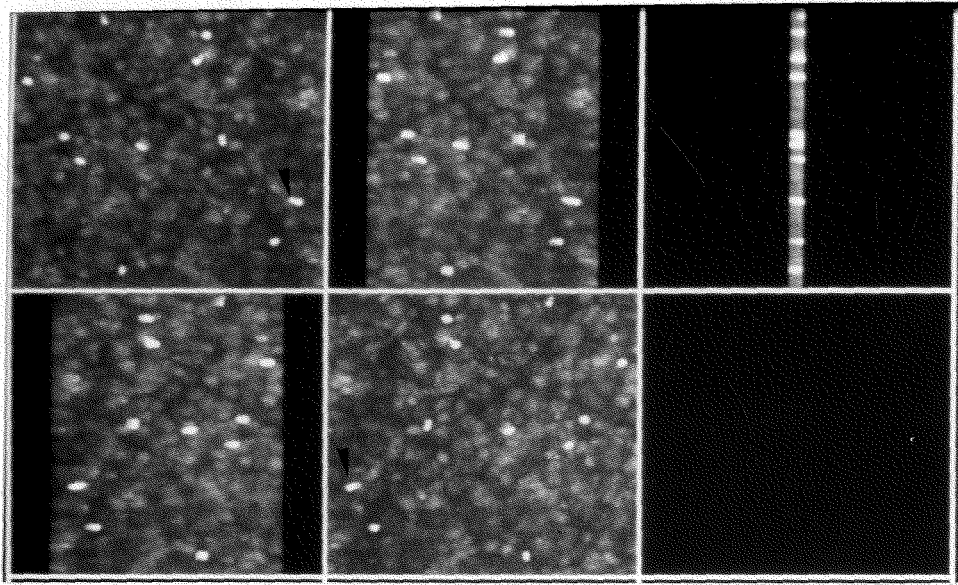


圖 5.(J)為同一切面作旋轉，嗜中性白血球經 fMLP 活化後，置於內皮細胞上 10 分鐘，亮點為嗜中性白血球，背景為內皮細胞，經旋轉後可見相對位置如箭頭指示。

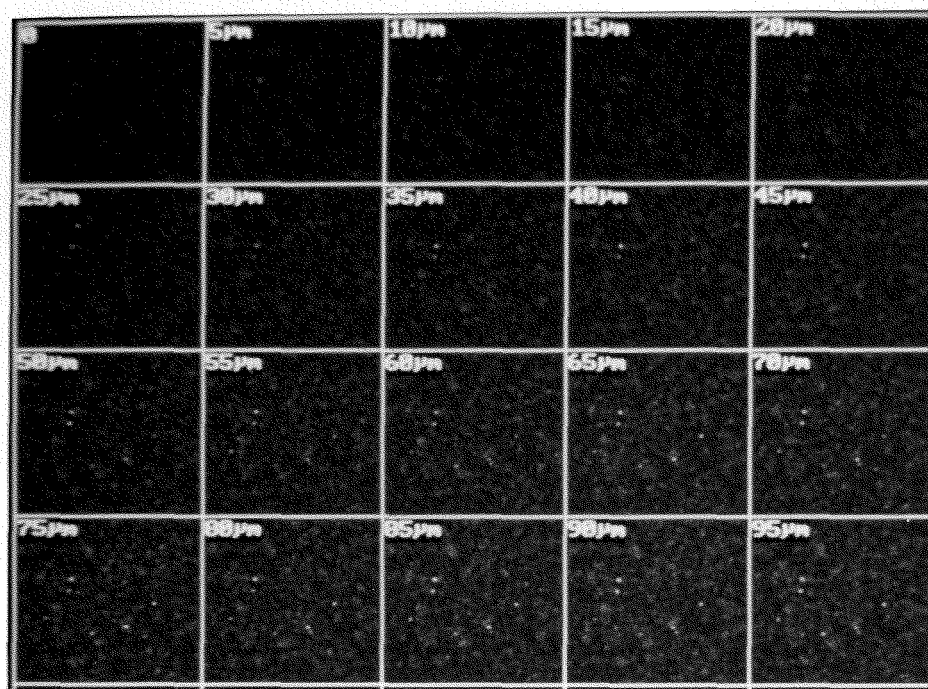


圖 5.(K)為嗜中性白血球經 fMLP 活化後，置於內皮細胞上層 10 分鐘在 Z 軸上作連續切面，深度為 95 μm ，每一切面為 5 μm ，亮點為嗜中性白血球，背景為內皮細胞，可見在 45 μm 後，右下方有亮點漸漸出現，到 95 μm 時，亮點仍舊清晰。

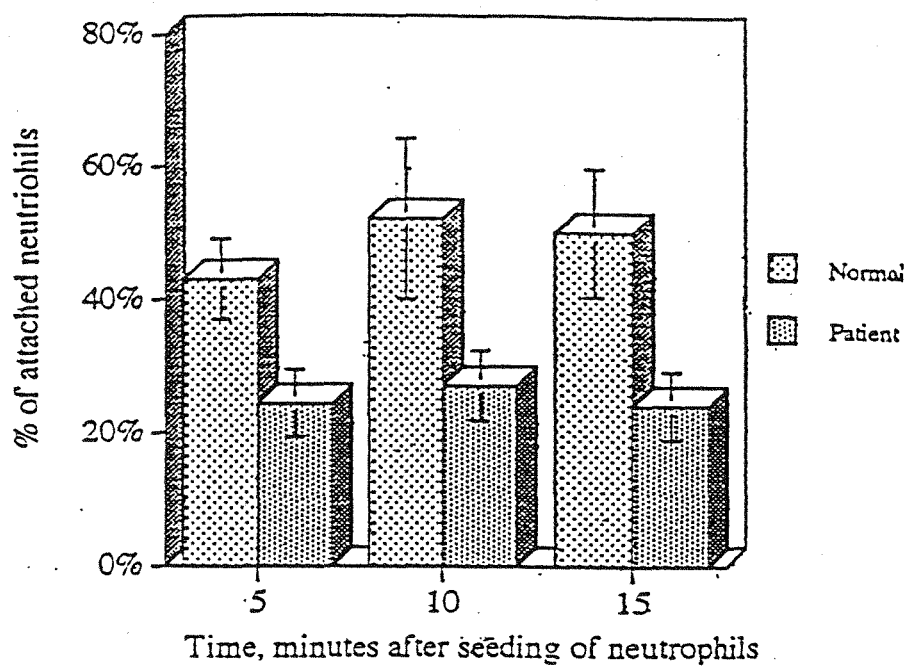


圖 7.(A) 牙周病患者的嗜中性白血球在 PMA 和 fMLP 刺激下的運動能力

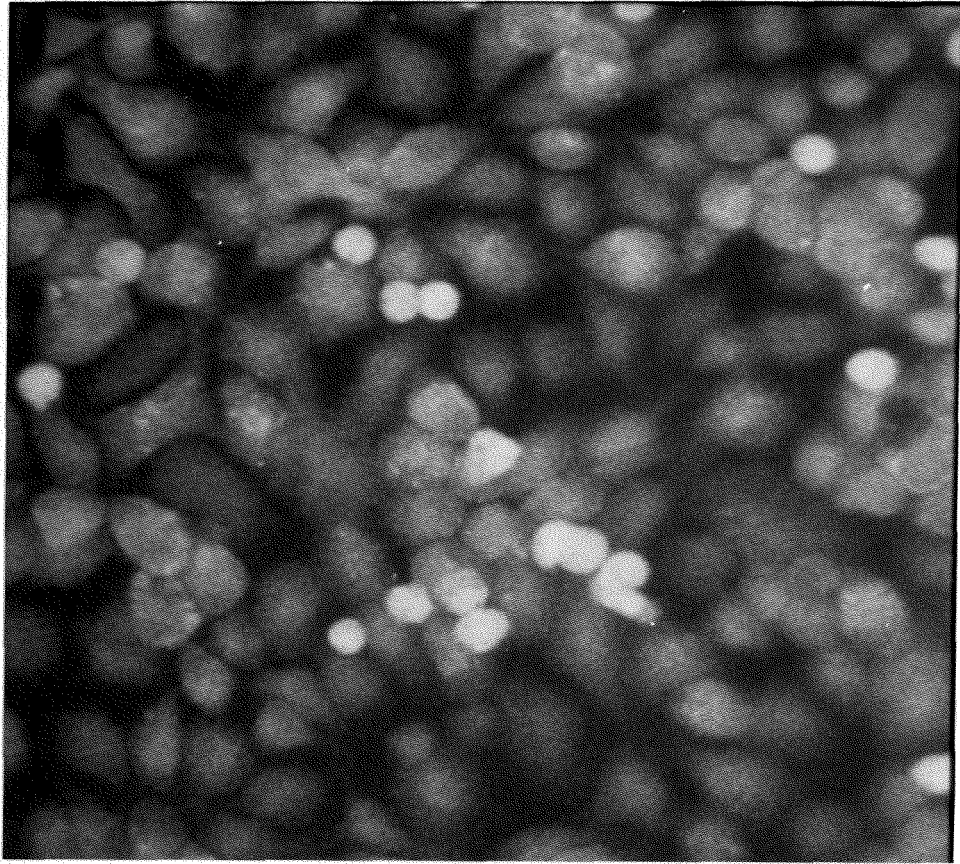


圖 7.(B)為嗜中性白血球經 PMA 活化 10 分鐘後，置於內皮細胞上層 10 分鐘，可見嗜中性白血球存在於內皮細胞與內皮細胞之間，且無極化現象出現，最亮點為嗜中性白血球，背景為內皮細胞。

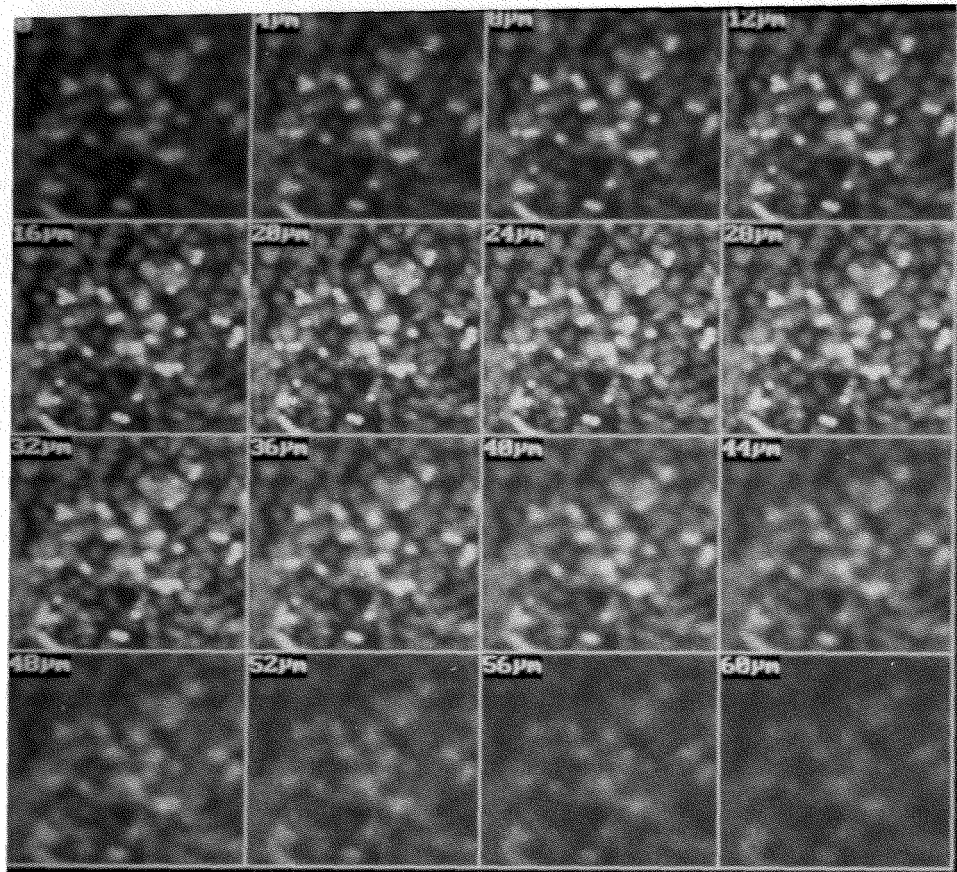


圖 7.(C)為嗜中性白血球經 PMA 活化 10 分鐘後，置於內皮細胞上層 10 分鐘，在 Z 軸作連續切面，我們可見其最深應可穿透至 48 μm 。

REFERENCES:

- Ayalon Oran, Helena Sabanai, Maria-Gracia Lampugnani, Elisabetta Dejana, and Benjamin Geiger. Spatial and Temporal Relationships between Cadherins and PECAM-1 in Cell-Cell Junctions of Human Endothelial Cells. *The Journal of Cell Biology*. 126: 247-258; 1994.
- Barbieri, B., G. Balconi, E. Dejana, and M.B. Donati. 1981. Evidence that vascular endothelial cells can induce the retraction of fibrin clots. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 168: 204-207; 1981.
- Beatty, P. G., Harlan, J. M., Rosen, H., Hansen, J. Q.A., Ochs, H. D., Price, T. H., Taylor, R. F., and Klebanoff, S. J., Absence of monoclonal-antibody-defined protein complex in a boy with abnormal leukocyte function. *Lancet*. : 535-537; 1984.
- Berger, M., O'Shea, J., Cross, A.S., Folks, T.M., Chused, T.M., Brown, E.J., and Frank, M.M. Human neutrophils increase expression of C3b receptors as well as C3b receptors upon activation. *J. Clin. Invest.* 74: 1566-1571; 1984.
- Berger, M., Birx, D.L., Eetzler, E.M., O'Shea, J. J., Brown, E.J., and Cross, A.S., Calcium requirements for increased complement receptor expression during neutrophil activation. *J Immunol.* 135:1342-1348; 1985.
- Brown, F. A., Neutrophil granulocytes : adhesion and locomotion on collagen substrate and in collagen matrices. *J. Cell. Science.* 58: 455-467; 1982.
- Buyon, J. P., Slade, S. G., Reibman, J., Abramson, S. B., Constitutive and induced phosphorylation of the α - and β -chains of the CD11/CD18 leukocyte integrin family. Relationship to adhesion-dependent function. *J. Immunol.*, 144:191-197;1990.
- Charon J. A, Mergenhagen S. E and Gallin J. I Gingivitis and oral ulceration in patients with neutrophil dysfunction. *Journal of Oral*

Pathology. 14:150-155; 1985.

Chatila, T. A., Geha, R. S., and Arnaout, M. A., Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules, *J. Cell.Biol.*109:3435-3444; 1989.

Donald E. Ingber, Deepanwita Prusty, John V. Frangioni, Edward J. Cragoe, Jr., Claude Lechene, and Martin Alexander Schwartz, Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*. 110: 1803-1811; 1990.

Francis W. Luscinikas and Jack Lawler. Integrins as dynamic regulators of vascular function.. *FASEB*. 8: 929-938; 1994.

Frederick Grinnell. Migration of human neutrophils in Hydrated collagen lattices. *J. Cell. Science*. 58: 95-108;1982.

Gamble, J. R., Matthias, L. J., Meyer, G., Kaur, P., Russ, G., Faull, R., Berndt, M.C., and Vadas, M.A. Regulation of in vitro capillary tube formation by anti-integrin antibodies. *J. Cell Biol.* 121: 931-943; 1993.

Genco, R.J. Host responses in periodontal diseases. *J. Periodont*. 63: 338-355;1992.

Gordon, D. L., Rice, J. L., and McDonald, P. J., Regulation of human neutrophil type 3 complement receptor (iC3b receptor) expression during phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Immunology*, 67:460-465 (1989)Philips, M. R.,Buyon, J. P., Winchester, R., Weissmann, G., and Abramson, S. B., Up-regulation of the iC3b receptor (CR3) is neither necessary nor sufficient to promote neutrophil aggregation. *J. Clin. Invest*. 82: 495-501; 1988 .

Henrik, S. Complement Receptors in Neutrophils. *Critical Reviews in Immunology*. 15 (2): 107-131; 1995.

Howard, Y. N. and Oresajo, C. The kinetics of chemotactic peptide induced change in F-actin content, F-actin distribution and shape of human neutrophils. *J. cell Biol.* 101: 1078-1085; 1985.

Hynes, R.O. Integrins: a family of cell surface receptor. *Cell.* 48:549-554; 1987.

Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. and Minick, C. R.. Culture of human endothelial cell derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52:2745-2756;1973.

Jeffrey, I., Weitz, A.J., Huang, S.L., Landman, E-M. Fibrinogenolysis by chemoattractant-stimulated neutrophils occurs in the presence of physiologic concentrations of antiproteases. *J. Exp. Med.* 166:1836-1850; 1987.

Kitayama, Hirokazu Nagawa, Hiroshi Yasuhara, Nelson Tsuno, Wataru Kimura, Yoichi Shibata, Tetsuichiro Muto. Suppressive Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on Transendothelial Emigration of CD4(+) T-Lymphocyte. *Cancer Research.* 54: 4729-4733; 1994.

Kishimoto, T.K., Carson, R.S., Corbi, A.L., Dustin, M.L., Staunton, D.E., and Springer, T.A. Cloning subunit of the beta leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell.* 48 :681-690; 1987.

Kristin A. Venstrom and Louis F. Reichardt, Extracellular Matrix 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptor in the nervous system. *FASEB J.* 7: 996-1003; 1993.

Lee, T.-L., Yang, M.-L., and Bell, P.B., Jr. Interaction of B16 malignant melanoma tumor cells with the murine mesentery in vitro. *Cancer Res.* 48: 5296-5301; 1988.

Martha B. Furie, EVA B. Crumer, Beth L. Nappstek, and Samudl C. Silverstein. Cultured endothelial cell monolayers that restrict the

transendothelial passage of Macromolecules and Electrical current. *The Journal of Cell Virology*. 98: 1033-1041; 1984.

Martha B. furie, Veth L. Nappstek and Samuel C, Silverstein. Migration of neutrophil across monolayers of cultured microvascular endothelial cells : an in vitro model of leukocyte extravasation. *Journal of Cell Science*. 88: 161-175; 1987.

Michael A. Model and Geneva M. Omann, Cell Polarization as a Possible Mechanism of Response Termination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 224: 516-521; 1996.

Miller. L. J., Bainton, D. F., Borregaard, N., and Springer, T., Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150 , 95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J. Clin. Invest.* 80:535-544 ;1987.

Nicholas A. Pawlocoski, Gilla Kaplan , Eleanor Abraham, and Zanvil A. Cohn. The selective binding and transmigration of monocytes through the junctional complexes of human endothelium. *J. Exp. Med.* 168:1865-1882 ;1988.

Ng-Sikorski, K., Andersson, R., Patarroyo, M., and Andersson, T., Calcium signaling capacity of CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. *Exp. Cell Res.* 195:504-508 ;1991.

O'Shea, J.J. ,Brown, E.J. ,Seligmann, B.E., Metcalf, J.A. Frank, M.M. , and Gallin, J.I. ,Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. *J. Immunol.* 134: 2580-2587 ;1985.

Petty, H. R., Francis, J. W., Todd, R. F., Petrequin, P., and Boxer, L. A., Neutrophil C3bi receptors :formation of membrane clusters during cell triggering requires intracellular granules. *J. Cell. Physiol.* 133:235-242; 1987.

- Prudence A. E. Sxott and Roy Bicknell, The isolation and culture of microvascular endothelium. *Journal of Cell Science*.105: 269-273; 1993.
- Suzuki, J.B. Diagonosis and classification of the periodontal disease. *Brals, M., ed. Dental Clinics in North america*.:195-216. WB Saunders; 1988.
- Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D., New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238:491-497;1987.
- Sanchez, M.F., Nagy, J. A., Robbins, E., Simon, P., and Springer, T. A. Ahuman leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150, 95 molecule. *J. Exp. Med.* 158:1785-1803; 1983
- Todd, R. F.,III, Arnaout, M. A., Rosin, R. E., Crowley, C. A., Peters, W. A., and Babor, B. M., Subcellular localization of the large subunit of Mo 1 (Mo 1 l ; formerly gp 110), a surface glycoprotein associated with neutrophil adhesion. *J Clin.Invest.*74:1280-1290;1984.
- Vernon , R. B, Sage, E, G. Contraction of fibrillar type I collagen by endothelial cells : a study in vitro. *Journal of cellular Biochemistry.* 60 (2) :185-87; 1996.
- Villaschi, S., Nicosia, R. F., Paracrine interrations between fibroblasts and endothelial cells in a serum-free coculture model. Modulation of angiogenesis and collagen gel contraction. *Laboratory Investigation* 71 (2):291-299; 1994.
- Von andrian, U.H., J. D. Chambers, L. M. McEvoy, R. F. bargatze, K. E. Arfors, and E. C. Butcher. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interation in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte β 2 integrins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7538

1991.

Wallacl, P. J., Westo, R. P., Packman, C, H. and Lichtman, M, A,
Chemotactic peptide-induced changes in neutrophil actin
conformation. *J. Cell Biol.* 99: 1060-1065; 1984.

William A. Muller and Michael A. Gimbrome, Jr, Plasmalemmal
proteins of cultured vascular endothelial cells exhibit amocal-basal
polarity: analysis by surface-selective iodination. *The Journal of
Cell Biology.* 103: 2389-2402; 1986.

Yona Zaffran, Hubert Lepidi , Pierre Bongrand, Jean-Louis Mege and
Christian Capo, F-actin content and spatial distribution in resting
and chemoattractant stimulated human polymorphonuclear
leucocytes : which role for intracellular free calcium? *Journal of
Cell Science.* 105: 675-684; 1993.

Zhang, Y.-Z. New thiol-reactive cell tracers. *Bioprobes* 15:15-20; 1992.

歐陽玲, 中華牙周醫誌: 1: 21-30; 1996.

附錄一：儀器設備

儀器設備	廠牌
1. 電動電子顯示天秤	AB 104
2. PH meter	Backman
3. phase contrast microscope	Nikon
4. Immunofluorence microscope	NICON/DIA PHOT 3000 ZEISS/AXIOPHOT
5. Incubator	NAPCO/5410
6. Laminar Flow	HOLTEN/HB2448
7. Water Bath	DS LAB/DSB-1000 BARNSTEA0/THERMOLYNE 17600
8. Vortex	SCIENTIFIC INDUSTRIES/VORTEX- GENIZ 2
9. centrifuge	KUBOTA/2010 DENVER INSTRUMENT/IWAKI
10. camera	NIKON/F-601 ZEISS/45 60 70 01
11. shaker	HYBAID/HB-SHK 1
12. pipetame	GILSON
13. pipet-aid	DRUMMOND
14. 本生燈 Burner	

15. 真空烘箱 vaccum Oven	
16. 磁式電動攪拌器	
17. 可丟棄滅菌過濾器	Nalgen Company
18. 可丟棄滅菌注射筒過濾器 Disposable membrane filter 100ml	
19. 共軛焦顯微鏡	CLSM-410
20. 掃描式電子顯微鏡	JSM-T300

附錄二：藥品及配製方法

1. DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)Solution GIBCO-BRL per liter (with dd-H₂O)
DMEM powder 1PK NaHCO₃ 3.7g/L adjust pH value to 7.2
sterilized by filtration through a 0.2μm filter
2. PSA(Pen-Strep-Ampho-Sol.)Biological Industries
Penicillin: 1000 units/ml, Sterptomycin: 10mg/ml, Amphotericin B:0.025mg/ml
3. FBS(Fetal bovine Serum) Biological Industries
4. 10% CDMEM
PSA 1ml, FBS 10ml, DMEM 89ml
5. Trysine/EDTA:GIBCO-BRL
0.25% Trypsin, 1mM EDTA
6. Vitrogen 100:Collagen Corporation
Collagen Concentration: 3.0 mg/ml
7. MEM(Minimum Essential Medium):GIBCO-BRL per liter (with dd-H₂O)
MEM powder 1pk, NaHCO₃ 2.2g/l adjust the pH value to 7.2
sterilized by filtration through a 0.2μm filter

8. DPBS(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) Solution:GIBCO-BRL per liter
DPBS powder 1pk

9. Medium 199:GIBCO-BRL per liter Solution
Medium 199 powder 1pk, NaHCO_3 3.7g/L adjust pH value to 7.2
sterilized by filtration through a $0.2\mu\text{m}$ filter

10. RPMI Medium 1640:GIBCO-BRL per liter Solution
RPMI Medium 1640 powder 1pk, NaHCO_3 2.2g/L adjust the pH
value to 7.2 sterilized by filtration through a $0.2\mu\text{m}$ filter

11. EBM(Endothelial Cell Basal Medium) Solution: Clonetics

12. Gelatin Solution
Gelatin type A 2g, DPBS 100ml

13. Hepes Buffer
NaCl 8g, KCl 0.3g, HEPES 2.3g, G-Glucose 2g per 1 liter,
pH:7.55

14. CORD Buffer
NaCl 8.26g, KCl 0.3g, DPBS 1pk, Glucose 1.98g per liter, pH:7.4

15. Collagenase in CORD Buffer
Collagenase type 2.02g, CORD Buffer 100ml, pH:7.4

16. Wash HUVEC Buffer

Hepes Buffer 99ml, PSA 1ml

17. Histopaque 1077

Sigma

18. Histopaque 1119

Sigma

19. Frozen Medium

FBS 10ml, Dimethylsulfoxide 10ml, DMEM 80ml

20. Transfer Buffer

25mM Tris, 192mM Glycine 20% Methenol, pH:8.3

21. Blocking Solution

TBS 100ml, Tween 0.2%, BSA(Bovine Serum Albumin)-V 1%

22. Methenol

Merck

23. Alkaline phosphatase Developer Kit

AP Development Buffer 9.8ml, Reagent A 0.1ml, Reagent B
0.1ml

24. Bis/Acrylamide Solution

Acrylamide 30.0g/100ml, BIS 0.8g/ml

25. 0.75M Tris-Base Solution

Tris-Base 9.08g/100ml, pH:8.8

26. 0.5 M Tris-Base Solution

Tris-Base 6.05g/100ml, pH:6.8

27. 4X Sample Buffer

Tris-Base 1.52g, SDS 4.0g, Glycerol 20ml, mercaptoethanol 10ml, Bromophenol Blue 0.02g, DTT 3.08g dilute to a final volume of 200ml with deionized water, Aliquot and freeze

28. Coomassie Blue Stain Solution

Methanol 5 Parts, H₂O 4 Parts, Acetic Acid 1 Part, Coomassie Brilliant Blue R final concentration 0.025%

29. Destaining Solution

Methanol 5 Parts, H₂O 4 Parts, Acetic Acid 1 Part

30. 1% BSA Solution

Bovine Serum Albumin 1g, PBS 100ml

31. Fixative Solution

Methanol 200ml, Acetic Acid 40ml, Fixative Enhancer Concentrate 40ml, H₂O 120ml

32. Development Solution

H₂O 35ml, Silver Complex 5ml, Reduction Moderator Solution 5 ml, Image Development Accelerator Solution 50ml

33. Stop Solution

Acetic Acid 5ml, H₂O 95ml

34. Cell Extraction Buffer

1% Triton-X-100, 1% Sodium Deoxycholate in 0.05M Tris Buffer pH:7.5

35. 10X Elctrode Buffer

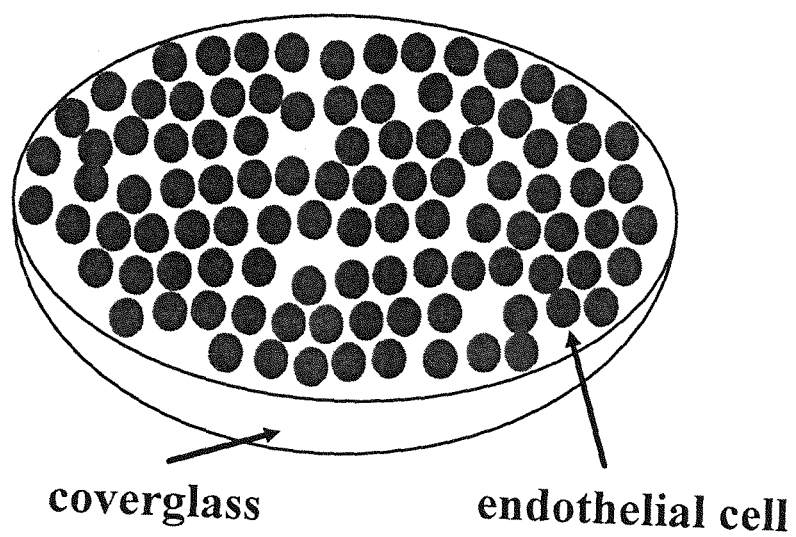
Tris Base 30.3g, SDS 10g, Glycine 144g dilute to 1X concentrate with dd- H₂O

附錄三：免疫螢光染色的配製方法

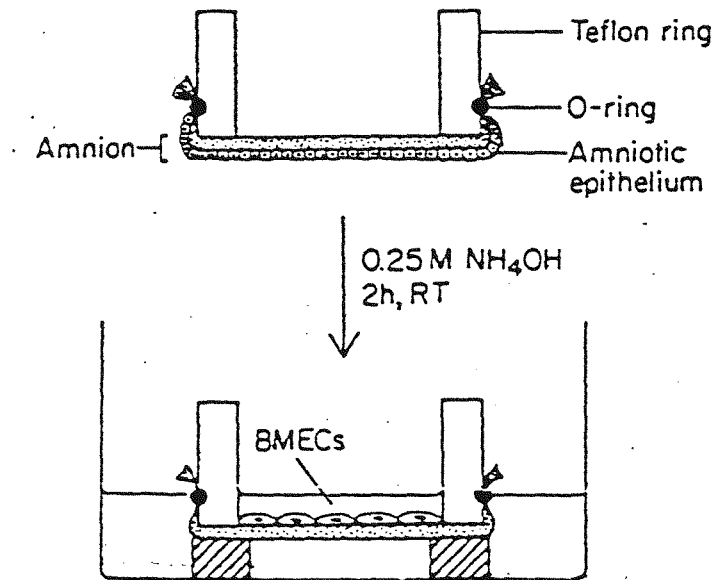
primary abtibody	host animal	Ig class	R/A dilute	Cat NO.	出產公司
Anti- Actin β	mouse ascites	IgG1	1:500	A 5441	sigma
Anti- Human von Willebran -d Factor	rabbit	IgG	1:200	F3520	sigma

secondary abtibody	host animal	Ig class	R/A dilute	Cat NO.	出產公司
Anti- mouse- FITC	Goat	IgG	1:80	F-4018	sigma
Anti- mouse- TRITC	Goat	IgG	1:200	T-7782	sigma

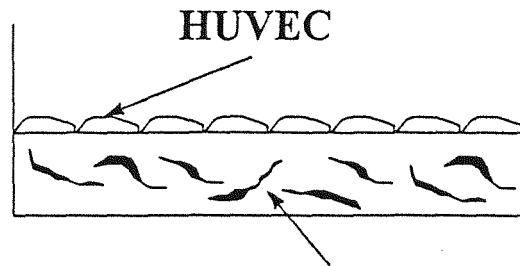
附圖一：傳統方法



附圖二：Martha 的體外模型



附圖三： 建立一個較完整的血管壁模型



physical Cues: type I collagen gel and fibroblast

Chemical Cues: Live fibroblasts