

R
008.8
0451
88

中山醫學院營養科學研究所

碩士論文

Graduate institute of Nutritional Science Chung
Shan Medical and Dental Collage

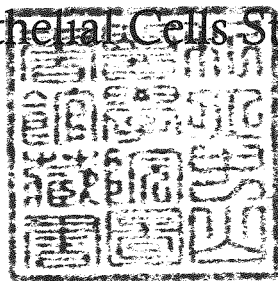
Master Thesis

指導教授:徐成金博士

Advisor: Cheng-Chin Hsu

**高濃度葡萄糖及維生素 C、E 的添加對於培養內皮細胞
(ECM)蛋白質的影響**

The Influence of ECM Protein by Adding High
Concentration Glucose and Vitamin C、E in Cultured
Endothelial Cells Study



研究生:謝惠珉

參考書恕不外借

Graduate student: Hui-Min Hsieh

中華民國八十八年七月

中山醫學院圖書館



C055140

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 營養科學研究所
_____ 組 88 學年度第 1 學期取得碩士學位之論文。

論文名稱：高濃度葡萄糖及維生素 C、E 的添加對於培養內皮細胞
(ECM)蛋白質的影響

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、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。

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式重製，或為上述目的再授權他人以各種方式重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂定讓與及授權契約書。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。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：徐成金

研究生簽名：謝惠珉 學號：R86301
(親筆正楷)

日期：民國 88 年 7 月 30 日

1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄台北市 10636 和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 江守田、王淑貞。
(本授權書諮詢電話：02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請經濟部智慧財產局修正定稿。

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，請分別在兩種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。我國博碩士論文八十二學年度以前摘要資料庫及八十四學年度以後全文資料微片目錄資料庫已上載於行政院國家科學委員科學技術資料中心網站www.stic.gov.tw，八十一學年度以後摘要資料庫已上載於教育部國家圖書館網站 www.ncl.edu.tw。

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，請勿簽署本授權書，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可授權其他法人或自然人上述的行為。

3.全國博碩士論文全文資料整合計劃的宏觀效益：

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。

研究生姓名：謝惠珉

聯絡電話：(048) 335-924

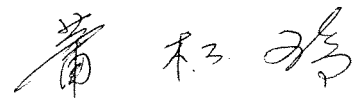
地址：彰化縣員林鎮中山南路 54-56 號

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，
經中山醫學院營養科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

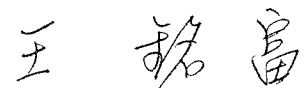
私立中山醫學院生化學系教授

蕭松瑞博士



私立靜宜大學食品營養學系教授

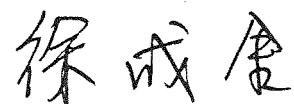
王銘富博士



私立中山醫學營養學系教授

徐成金博士

(論文指導教授)



中華民國八十八年七月三十日

學生 謝惠珉 論文題目為高濃度葡萄糖及維生素C、E的添加對於培養內皮細胞(ECM)蛋白質的影響探討，其論文已經中山醫學院營養科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: 徐 成 金 教授 簽名: 徐 成 金

中華民國八十八年七月三十日

謝

誌

當論文口試通過的時後，內心立即湧起一股無限感激的心，因為這份成就與榮耀是來自太多人的幫忙與指導，才得以完成。想想這段寫論文期間，由於父親的健康問題，使得我無法全心在實驗室完成撰寫論文工作，然而內心最衷感謝我的指導教授徐成金博士的體諒與關心，讓我產生一股勇敢的力量，順利完成論文撰寫，回想這兩年承蒙老師在課業及實驗上的教誨，生活上的精神鼓勵，讓我更是溫暖於心，在此向老師表達我心中最誠摯的謝意。論文初稿完成更承蒙蕭松瑞博士、王銘富博士撥冗審閱，指正疏漏之處提供寶貴的意見，使本論文得以更臻完整，在此謹致上最大謝意。

在實驗期間感謝本校附設醫院婦產科醫師護士們鼎力相助幫忙我收集臍帶使得實驗順利完成。並且感謝研究所上同學關懷與鼓勵、學妹們熱心的幫忙都讓我成長不少。然而最感謝我的家人，爸媽的愛支持贊助我最實際的生活環境，妹妹秀津、佩君、洪贊凱、姐姐姐夫、以及我最愛的人精神鼓勵與幫忙，才能順利完成研究的碩士學位，在我內心深處永銘感激。受之於人者太多，出之於己者太少，謹以此論獻給我愛的人以及所有愛我的人----。

謝惠珉 謹誌於

中山醫學院營養科學研究所

中華民國八十八年八月

目 錄

中文摘要	I
英文摘要	II
第壹章:緒論	1
壹、各論/1	
一、 內皮細胞	
(一) 內皮細胞	
(二) 內皮細胞的生理功能	
(三) 高濃度葡萄糖對內皮細胞的影響	
二、 纖維網狀蛋白	
(一) 纖維網狀蛋白	
(二) 纖維網狀蛋白對糖尿病疾病的探討	
三、 維生素 C	
四、 維生素 E	
(一) 維生素 C 與 E 對於細胞外間質蛋白的影響	
五、 TGF- β 的抑制作用對纖維網狀蛋白的影響	
六、 非酵素性糖化蛋白質的抑制作用對纖維網狀蛋白的影響	
貳、總結/23	
第貳章:實驗材料與方法	25
一、 內皮細胞的培養	
二、 內皮細胞的確認	
三、 內皮細胞數目之計算	

- 四、 高生理濃度葡萄糖與正常生理濃度葡萄糖添加
- 五、 維生素 C 與 E 的各別添加及共同添加
- 六、 TGF- β 抗體的添加
- 七、 AGE 抗體的添加
- 八、 細胞分析前處理
- 九、 纖維網狀蛋白濃度之測定
- 十、 總蛋白濃度之測定
- 十一、 統計分析

第參章:結果 46

- 壹、 內皮細胞之分離與確認
- 貳、 高濃度葡萄糖與正常濃度葡萄糖分別添加對內皮細胞的影響
- 參、 維生素 C 的添加對於培養之內皮細胞的影響
- 肆、 維生素 E 的添加對於培養之內皮細胞的影響
- 伍、 維生素 C 與 E 的共同添加對於培養之內皮細胞的影響
- 陸、 TGF- β 抗體及 AGE 抗體添加對於培養內皮細胞的影響
- 柒、 總結

第肆章:討論 60

附圖 65

圖 69

表95

第五章:參考文獻 98

摘要

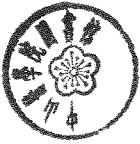
研究目的，在探討高濃度葡萄糖與抗氧化劑的維生素 C、E 的添加，對於培養的內皮細胞胞外間質(ECM)蛋白質，其纖維網狀蛋白 Fibronectin(FN)濃度的影響，並且觀察細胞內總蛋白含量的變化，進一步觀察 TGF- β 與 AGE 是否會影響到 Fibronectin 的生合成。實驗方法：將 10^5 /well 細胞培養於 24 孔 well 的 plate 中，並且分別添加 M-199+10%FCS，M-199+10%FCS+30mM 葡萄糖(高生理濃度)，M-199+10%FCS+5mM 葡萄糖(正常生理濃度)中，維生素 C(0.01mM，0.05mM)，維生素 E(0.01mM，0.05mM)各別與共同添加並且又添加 TGF- β 與 AGE 抗體(0.5ug/ml)，培養 72 小時之後以 PBS 清洗三次，利用 Lysis buffer 使細胞懸浮，超音波振盪破壞細胞，分析細胞內總蛋白含量及以 Enzyme-Linked Immunosorbance Assay(ELISA)測 Fibronectin(FN)的濃度。實驗結果顯示：高濃度葡萄糖(30mM)添加比較與正常濃度葡萄糖(5mM)的添加，不管在 5%或 10%FCS 添加於 M-199 培養液中，的確可使內皮細胞內 Fibronectin 濃度明顯的上升，而總蛋白的含量並無明顯改變，然而各別添加維生素 C 或 E(0.01mM)的確可使存在高濃度葡萄糖的細胞內 Fibronectin 濃度明顯下降，但當各別添加維生素 C 或 E(0.05mM)時，並無明顯改變高的 Fibronectin 生成量，而維生素 C 與 E 共同添加時二者有加乘作用皆明顯降低 Fibronectin 生成量，另外 TGF- β 與 AGE 抗體的確可抑制誘發 Fibronectin 生成。由以上結果得知內皮細胞存在高濃度葡萄糖環境下，可使 ECM 中 Fibronectin 生合成增加，並且隨著添加適當一定量的抗氧化劑維生素 C、E 可抑制高氧化壓力之下 TGF- β 誘發或氨基糖化產物- AGE (advanced glycation end product)生成所造成的 Fibronectin 增加，進而影響內皮細胞血管腔表面平滑程度，防止血管內纖維增生的進行，預防引起糖尿病血管病變(diabetic angiopathy)發生。

Abstract

In this study is to explore the influence of adding high concentrated glucose and antioxidant C、E to Fibronectin(FN) a ECM protein and Quantitative changed of total cellular protein. Furthermore to examine the relationship of TGF- β and AGE to biosynthesis of FN in culture study.

Methodology of experiment: 10^5 /well cells were incubated in 24 well plate. Each well contains M-199+10%FCS. M-199+10%FCS+30mM glucose (high physiological conc.) M-199+10%FCS+5mM glucose (normal physiological conc.) vitamin C (0.01mM、0.05mM) and vitamin E(0.01mM、0.05mM) were added individually and in combination plus, included TGF- β and AGE antibody (0.5ug/ml) incubation were washed three times after 72hours, cell suspensions was obtained with lysis buffer. Cell lysis under Ultrasonic vibration. ELISA determinate quantitative Analysis of total cellular protein and FN concentration. The results of experiment shows that indeed the FN was significantly increase in high glucose concentration compare to normal glucose concentration Either 5%or10%FCS were present in the culture medium. Although the total quantitative of protein did not change, but adding vitamin C or E respective can cause significantly decrease of cellular FN concentration under the situation of high glucose concentration. In Addition providing vitamin C or E (0.05mM) respective were not significantly change the FN biosynthesis but add both vitamin C and E together shows additive effect on decrease fibronectin biosynthesis within high glucose concentration. Furthermore TGF- β and AGE antibody can indeed reduce the Fibronectin biosynthesis.

For the data of results, we know that under the high glucose concentration can increase Fibronectin biosynthesis. Together with certain amount of antioxidant vitamin C and E can suppress the high oxidant pressures of TGF- β induction or AGE-production which cause increase fibronectin concentration production. And lead to affect the smoothness of ECM endothelium cell surface, decrease progression of cellularization of blood vessel eventually prevent the occurrence of diabetic angiopathy.



第一章 緒論

壹、各論

一、內皮細胞(Endothelial cell)

(一)內皮細胞(Endothelial cell)

是一種單層細胞存在血管及淋巴管腔的內面，西元 1860 年 Rechling hausen 藉著細胞染色技術的進步發現過去被稱為無結構透明膚質 (Structureless hyaline skin) 的微血管，原來是由一片片相同的細胞所構成，直到 1901 年，Waldeyer-Hartz 才將內皮細胞界定命名同時也開啟了對內皮細胞的起源，功能等方面的研究熱潮¹。

西元 1931 年 Shibuya 將大動脈(Aorta)的內皮細胞單離並且成功地培養於體外，進行觀察和研究²發現內皮細胞外形扁平，不規則細胞核隆起形成半球頂狀(dome)，細胞外圍形成許多絲狀偽足(filopodia)，此構造也稱微放射狀(microprojections)。在西元 1974 Zdanage 發現，這些絲狀偽足構造會隨環境的不同而改變形態，如內皮細胞存在 37°C~40°C 的生理食鹽水的環境中絲狀偽足的數目會增加變長，若存在 2°C 的環境中長度變短，數目減少³⁻⁴據研究推測可能與內皮細胞間訊息相互傳遞有關，然而其真正的功能尚未清楚明瞭。

內皮細胞是由血管母細胞(Angioblast)分化而來，是一種高度分化的細胞，在細胞內存有一種特殊蛋白稱為 Von Willebrand factor 由內質網

(Endoplasmic reticulum)合成，儲存在 Weibel-palade body 內，並藉由 exocytosis 的方式釋放至胞外⁵是屬於一種細胞表面的醣蛋白負責細胞黏著的功能。在實際上多以 Von willebrand factor, weibel-palade body 及 filopodia 的特徵作為辨識內皮細胞的標示物(Marker)。



由於內皮細胞直接與血液接觸，受血中各種物質的影響，因而改變血液動力學(hemodynamic forces)如:血流量或壓力變化時，首先便影響到內皮細胞，此外經由血液運輸的任何物質如荷爾蒙，血液活化物質(Vasoactive substance)及血清電解質等，均可影響到內皮細胞的狀態及構造⁶，正因為如此血液疾病，藥物代謝的實驗多是以內皮細胞為研究對象，而人體內臍靜脈內皮細胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)是最易取得，故被廣範地運用在實驗上，並且內皮細胞內含有內皮細胞生長因子(endothelial cell growth factor, ECGF)與胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的 Medium-199 培養基中作繼代培養，然而 HUVEC 的增生作用主要是取決生長刺激環境(growth-stimulating environment)的條件而定⁷，也就是 Fibronectin 覆蓋 coating 於底部之 HUVEC 移到去除 ECGF 及 coating Fibronectin 的條件下培養，大約 4-6 週 HUVEC 便生成管腔般結構，此時再以 Proteolytic enzyme 處理，並放回富含 ECGF 及 Fibronectin 的環境中，原先組織化(organization)的情形便消失，細胞逐漸恢復回原本單層生長的增殖現象(proliferation)。

(二)內皮細胞的生理功能

1. 維持血管的通透性:

腦部微血管中具有一特殊構造-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恆定⁸

2. 凝血作用調節⁹:

prothrombin(active)  fibrinogen (cross-linked)
thrombin synthesis  fibrin monomer(soluble) \rightleftharpoons fibrin gel \rightleftharpoons fibrin

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時，內皮細胞的表面(surface)會提供合成 thrombin 的模板(template)，促使 thrombin 的產生促進凝血作用的進行⁶。

3. 維持血管腔內的穩定結構¹⁰:

在正常血管腔內層的內皮細胞可藉由外來的荷爾蒙等因子刺激 NOS 活化成(Nitric oxide synthase active)促使 L-arginine \rightarrow NO(Nitric oxide)釋出 NO 進入血管平滑肌肉促使 GTP \rightarrow cyclic GMP 進而使血管擴張(Vasodilatation)維持管腔內面平滑結構，當內皮細胞結構功能改變 endothelial \rightarrow dysfunction \rightarrow platelet activation \rightarrow Thrombosis vascular acclusion 便會使血小板活化作用，加速血栓形成，導致血管閉塞作用¹¹併發如動脈粥狀硬化(Atherosclerosis)，血管炎(Vasculitis)等疾病¹²。

4. 刺激反應的調節:

內皮細胞會將所接受的訊息迅速傳進至下一層細胞，除了當接受者 (sensor) 也是傳遞者 (transducer)⁶ 並且內皮細胞也可產生調節物質以修飾並避免血管壁構造發生改變如會分泌 endothelin-1¹³ 這種具血管收縮功能的物質產生，此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。

Endothelial cell → endothelin-1 → Basement membrane smooth
Muscle → Vasoconstriction。

(三)高濃度葡萄糖對內皮細胞的影響

在許多臨床報導提出，糖尿病患長期存在高濃度葡萄糖情況之下，導致微小血管結構受損，基底膜增厚(thickness)¹⁴這些都是異常環境之下導致的不正常代謝所致。在 1980、1986 年有許多學者提出¹⁵⁻¹⁷ 尿病患高濃度葡萄糖是主要且個別地會增加毛細血管病因的危險因子，主要致病機制是改變血管內皮細胞的恒定(homeostasis)¹⁸如 Lorenzi 等人提到臍靜脈內皮細胞培養於高濃度(20mM)的葡萄糖之下減低細胞複製(replication)速度並且發現在 Go-G1 的細胞週期(cell cycle phase)會干擾 DNA 生合成¹⁹因而明顯增加 S-phase 細胞週期。產生較低的分裂指數²⁰⁻²¹進而促使細胞死亡(cell death)。

另外高濃度葡萄糖會活化 protein kinase C(PKC)系列的 kinases²²經由細胞外訊息傳遞(intracellular signaling)增加內皮細胞通過性(permeability)²³加速具毛細非灌流的微小血管細胞流失²⁴導致腎小球環間膜²⁵ (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，如糖尿病異常的代謝型態中會增加基底膜生合成，並且減低更新(Turnover)²⁶⁻²⁸。

因而向上調節(up-regulate)胞外間質成份表現。導致胞外間質的 Fibronectin 及 collagen IV 生合成增加²⁹胞外基底膜增厚,伴隨誘發 tissue plasminogen activator(tPA)合成及釋放,另外,也會增加 plasminogen activator inhibitor-I(PAI-I)mRNA levels 表現。促使 tPA 及 PAI-I 功能失調,影響纖維蛋白分解的(fibrinolysis) plasmin 產生³⁰造成內皮細胞 fibrinolytic activity 機制改變³¹另外長期存在高濃度的葡萄糖之下細胞型態也會產生異常³²⁻³³最終引起糖尿病的血管病變(diabetic angiopathy)。

二. 纖維網狀蛋白(Fibronectin)

(一) 纖維網狀蛋白(Fibronectin)

西元 1948 年 Morrison 等人從人類血液中純化出此種蛋白，當時稱它為”Cold-insoluble globulin”³⁴，之後 1970 年初 Hakomori 等學者，在研究纖維母細胞(fibroblast)膜之表面蛋白時，發現在基底膜與結締組織中，存在許多纖維狀的蛋白質，這些蛋白質可固定正常細胞的位置與結構，然而在經轉型過(transformed)的纖維母細胞膜外無此蛋白質存在，Mosesson 等人在 1975 年發現此種蛋白質的分子量為 450 ± 25 kd，主要由 2 個分子量各為 220kd 的次單位(Subunit)在靠近羧基端(Carboxy-terminated end)以分子內雙硫鍵(disulfide band)相互鍵結成雙體(dimer)見附圖一。同時也有學者指出此蛋白在細胞間質的不可溶型式(in soluble)或體液及細胞培養基中的可溶型式 soluble³⁵⁻³⁶，均通稱之為 Fibronectin (纖維網狀蛋白)而 Fibronectin 在血液中是由肝細胞所合成³⁷，羊水中則由羊膜細胞合成³⁸⁻³⁹，因此不同細胞所產生之 Fibronectin 在結構上也有差異，如 1979 年 Yamada 及 Kenned 二位學者利用 SDS-PAGE 比對細胞型與血漿型 Fibronectin 發現，細胞型 Fibronectin 有較大分子量⁴⁰。

然而西元 1988 年，Hynes 等人也發表在老鼠肝細胞中發現了三種不同 Fibronectin 的 mRAN。這三種 mRAN 都由同一基因轉錄而來，可確定 Fibronectin 的合成是經由 mRAN 的變異切割(Alternative splicing)產

生不同的 Fibronectin⁴¹ 人類 Fibronectin 的基因於第二對染色體上約有 50 個 Exon 而會發生 Alternative splicing 的位置有三，即 EIIIA. EIIIB. V³⁶，其中 EIIIA 是纖維母細胞及其它間質細胞所產生，與細胞黏著有很大的相關性；V 則存在某些 Fibronectin 分子上，據推測可能與淋巴球的結合有關⁴¹，另 EIIIB 功能目前尚未清楚。

然而依照其切割位置及 polypeptides 的結構可區分 type I· II· III· 見附圖二⁴² type I.II. 會出現在與凝血有關的蛋白，如第十二因子(Factor XII) 凝血酶原(Prothrombin)等胺基酸序列上⁴³ 纖維網狀蛋白是由單基因經不同的變異切割而形成兩個單體(subunit)每個 subunit 可分成許多不同的結合區域(Binding domain)

其中包括：①膠原蛋白結合位置②氨基酸結合位置③DNA 結合位置④細胞結合位置與⑤肝素結合位置⁴⁴。以下便依結合位置來說明生化及生理功能。

①膠原蛋白結合位置：

主要是由 type II 及少部份 Type I 的型態所構成⁴⁵的球蛋白其分子量為 50kd .PI 值為 4.1-5.3，它容易與各種型式的膠原蛋白結合形成一種巨型的網狀結構，其中又與變性膠原蛋白(Gelatin)之間，具有相當強的親和力，因此大都利用此一特性將 Fibronectin 加以分離⁴⁶，由於一般細胞表面並無膠原蛋白的接受體(receptor)，卻大都有 Fibronectin 的接受體，

因此可利用 Fibronectin 間接結合在組織間隙上，使細胞固著於一定位置，促使細胞增殖分化^{42,45}。

Fibronectin 的接受體(Integrin):

西元 1981 年 Kauden 純化出 Fibronectin 的接受體 Integrin，一個具有 140kd 的醣蛋白，隔年 Neff 在 Chiken embryom myoblaet 發現此種蛋白為可穿透過細胞膜的雙體蛋白具有 α 、 β 兩個次單位的雙體⁴⁶而構造中 α -chain 的氨基端具有很大的 extracellular domain，羧基端則只有 27-35 個氨基酸的 cyto plasmic domain，同時具有一重鏈及一輕鏈(heavy and light chain)(α IIb, α V)及一金屬結合部位(Metal binding site)，Integrin 便藉由這三個部位來避免蛋白質水解作用(proteolysis)的發生。而 β -chain 的 cytoplasmic domain 有 45 個氨基酸，位於氨基酸的 extracellular domain 則具有四個 cystine rich domain。

Integrin 對於 Fibronectin 而言並不是單一特異性的接受體，它是屬於一種家族性的接受體，到目前為止至少被發現有十二種不同的複合體(由三種不同的 β 單位與三種不同 α 單位組合而成)因此就 α 3 β 1 此型而言，除 Fibronectin 外也會與 Laminin 及膠原蛋白等結合;而 α IIb/III α β 3 也會特異結合 Fibronectin 及 fibrinogen⁴⁷⁻⁴⁹。

Fibronectin 靠著 Integrin 而能與其它 Fibronectin 分子及一些細胞間質的醣蛋白。膠原蛋白相互結合，因此由以上的敘述可知道 Integrin 這

個細胞表面接受體對於細胞間的接合，固著與生長等作用均有著重要的影響力。

氨基酸結合位置

此結合位置上的球蛋白分子量為 29kd，PI 值為 8.2-8.6 主要是以 Type I 的型態所構成⁴⁶，富含 Cystine,其氨基酸的序列包含五個雙硫鍵環(Disulfide band loop)。所包含的區域有 Fibrin binding domain 會與 Fibrin 結合，使血液凝集與 Fibronectin 結合助於組織受傷出血後的細胞黏著與再生。另外 Bacteria binding domain 可與 Staphylococcus aureus 等結合，使細胞固著於組織中而引起感染反應³⁶ 然而 Heparin binding domain 因親和力弱，生理功能並不顯著，而 Glutamine residual，可活化 X VIIa transglutaminase，使得 Fibronectin 易與膠原蛋白或菌體交互鍵結⁴⁶。

DNA 結合位置:

此球蛋白其分子差約為 30kd，主要是由 Type III 的型態構成，在低濃度之下可與 DNA 及 Heparin 結合，此結合位置可能與壞死細胞中 DNA 的清除有關³⁶，但至目前為止親和性及生理功能尚未清楚明瞭。

細胞結合位置

一個具有 120kd 的球蛋白，主要由 type III 的型態構成，早期發現此球蛋白可以促進細胞的附著(attachment)，其活性是由一分子量

12kd，及三個氨基酸所組成的 Tetrapeptide (arg-gly-ser:RGDS)所激活⁵⁰。假若利用單株抗體將此 Tetrapeptide 遮蔽，會發覺細胞黏著作用會減弱，因此便可證明此結合位置即為與細胞表面接合之 Fibronectin 結合位置。

另外，會發生變異切割的 Type V 型態上，也存在二個具 65kd 分子量的細胞結合位置，兩者是以雙硫鍵互相鍵結，會使細胞固著在一些會與 Fibronectin 結合的分子，如膠原蛋白，黏多醣(mucopoly saccharide)及細胞受傷出血後的血栓凝塊處，藉由細胞與 Fibronectin 的結合，緊密地將細胞與細胞間隙固定^{47,51}。

肝素結合位置:

在此結合位置的球蛋白主要是由 Type III 的型態構成，其位置靠近羧基端，在與膠原蛋白細胞結合位置相較之下，此結合位置與硫化程度較高的黏多醣具有最好的親和力，同時也與其它種硫化程度較低的黏多醣如 Heparan sulfate. Dermatan sulfate. Chondritin sulfate 也有良好的親和力。Fibronectin 本身有三個 Heparin 結合位置，分別對於 Divalent cation 有不同的親和性及敏感性，因此在血液細胞的接著作用上扮演相當重要的角色，如血液凝固過程及免疫反應⁴⁸⁻⁴⁹。

Fibronectin 藉由與膠原蛋白，黏多醣蛋白等具良好親和性及親和力，使細胞與細胞外間質之間的固著力增加，因而直接影響著細胞的增殖及分化，見附圖四^{46,51}。

(二)纖維網狀蛋白對糖尿病疾病探討:

高濃度(30mM)葡萄糖之下，會誘發增加 Fibronectin 的 mRNA levels，以及 Fibronectin-specific integrin receptor $\alpha 5\beta 1$ 表現³²，以及同類蛋白質 integrin subunit $\alpha 3$ 及 Fibronectin、laminine 和 collagen 的 $\alpha 3\beta 1$ 多專一 (polyspecific) 的 receptor 成份表現增加，當 Fibronectin 的接受體 Integrins 過度表現會促使改變血管內皮細胞與它的基底膜的交互作用，增加細胞與間質黏著 (adhesion)，並且影響細胞移走 (migration) 和複製 (replication)，造成糖尿病微小血管閉塞 (occlusion) 及再次血管內皮細胞修補 (reendothelialization) 過程的危險因素。

另外有學者³³提出糖尿會增加視網膜血管中 Fibronectin 的量，並且在它的 ED-A segment 改變切割模式之外會正調節它的表現。增加 Fibronectin 生合成和沉澱，改變細胞與間質作用。與視網膜病變有著機能的重要關係。

三、 維生素 C

維生素 C(ascorbic acid)在西元 1920 年，Drummond 在動物模式的實驗中發現維生素 C 為抗壞血病的因子⁵²之後 1928 年，Szent-Gyorgyi 從牛的腎上腺皮質(adrenal cortex)中分離出一種具強還原力的結晶物質⁵³，之後 King 及 Waugh 從檸檬中也分離出相同的物質，並進一步的發現到這種結晶物對天竺鼠的壞血病具有治療的功效⁵⁴。維生素 C 參與了許多生理代謝的途徑，包括膠原蛋白(collagen)的生合成，膠原蛋白在人體的總蛋白質含量中約佔 30% ，分布於皮膚、牙齒、軟骨及血管上皮組織。在生合成中脯胺酸(proline)與離胺酸(lysine)必須胺基化(hydroxylation)成羥化脯胺酸(hydroxyproline)及羥化離胺酸(hydroxylysine)來形成膠原蛋白穩定的三股螺旋(triple helix)結構，而維生素 C 扮演羥化過程重要的輔因子(cofactor)⁵⁵⁻⁵⁶維持或構成組織間隙中的重要成份。

具有強的還原力的維生素 C 亦是一種重要抗氧化劑(anti-oxidant)提供一個電子給一些過氧化物如多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid)或氧化的維生素 E 及 A 的氧化不穩定產物，將自己形成還原態來保護維生素 A、E 防止脂質過氧化現象，並可使三價的鐵離子還原成複合物，促進鐵在消化道黏膜通透率⁵⁷，增加吸收作用並且可幫助鐵從血液循環的運鐵蛋白 (transferrin)中釋放出來，維生素 C 也參與其他羥化反應的生理功能如：色胺酸(tryptophan)轉化為促進神經傳導及血管收縮的 5-羥色胺酸 (serotonin)，酪胺酸 (tyrosine)轉化成新腎上腺素 (norepinephrine)，膽固醇(Cholesterol)轉化為乳化脂肪所需的膽酸 bile acid 等⁵⁸⁻⁵⁹，其他功能尚有黏多醣蛋白合成(mucopolysaccharides)，腎上腺(adrenal gland)的合成抗發炎類固醇(anti-inflammatory steroids)的作用⁶⁰等。

維生素 C 在大部分動物免於壞血病的動物模式中發現人類 (human)，靈長類(primates)天竺鼠及魚類、鳥類，體內無法自行合成，原因是這些生物不能自體內缺乏將葡萄糖(glucose)轉化成維生素 C 的一種酵素 C-gulonolactone oxidase⁶¹⁻⁶³，因此這些不能自行合成維生素 C 的生物，均必須藉由其他外在食物攝取來避免壞血病發生^{57,64}。

維生素 C 的口服建議攝取量，成人每天 60 毫克，嬰兒 35 毫克，兒童 45-50 毫克，若低於 10 毫克，會出現壞血病的症狀。一般維生素 C 攝入後由腸胃道吸收後分布於體內各組織中，一般血漿中維生素 C 的濃度若低於每毫升 0.1 毫克則表示缺乏，若高於 0.6 毫克則顯示組織已達飽和，並且腎臟可調控維生素 C 由尿液中排出。雖然我們已經知道維生素 C 在人體內的重要功能，然而對於人類內皮細胞直接作用，影響訊息傳遞仍有許多盲點尚待釐清，並且在抗癌⁶⁵⁻⁶⁸及免疫功能作用，正值目前從事基礎研究工作人員正著手在努力研究的方向。

四. 維生素 E:

維生素 E (tocopherol)存在自然界中有多種不同的異構物如:
 α 、 β 、 γ 、 δ 、彼此間之差異是於酚類環(Phenol ring)上接的
甲基(methyl group)數目與位置,其抗氧化性活性是 $\alpha > \beta > \gamma > \delta$
⁶⁹除此以外還有一些含有酯類的維生素 E (α -tocopherol esters)如
 α -tocopherol succinate(TS)、 α -tocopherol phosphate、 α -
tocopherol nicotinate 及常用來做食物與飼料添加的 α -tocopherol
acetate(TA)等也多是屬於酯類的維生素 E。不論是何種型態的酯
類維生素 E 大多擁有相似的生物力價(Bioavailability)⁷⁰也就是說
含有酯類的維生素 E 對於脂質過氧化都可以有效的抑制,另外在
高的氧化緊迫之下,也會造成細胞中硫醇(thiol)流失,影響細胞
功能,而維生素 E 對於細胞硫醇方面,則被認為可以有效防止細
胞蛋白質硫醇的流失在 Kuo et al 1997, Wang et al 1996 等人也提
到,維生素 E 在保護細胞型態變化⁷¹⁻⁷²上並不是因為抑制了 T-
BuOOH 所造成的脂質過氧化,而是延緩了細胞膜蛋白質硫醇的流
失⁷³⁻⁷⁴並保護細胞膜上肌動蛋白的氧化傷害。在許多實驗中,維
生素 E 在細胞內的儲存能力被認為受到脂質含量,脂質氧化情形
及受到氧化攻擊的機會多寡所影響,另外在體內實驗中,維生素
E 的儲存量被認為有一定的閾值(threshold)⁷⁵,其濃度大約也以 1

個維生素分子比 500-1000 個磷脂質分子(Phospholipids)左右的比
例為極限，另外 Evarts 1974 也提到細胞膜上 1 個維生素 E 分子
可以對抗 1200 個多元不飽和脂肪酸分子，其它本身有效的抗脂
質氧化作用原因在細胞內存在有維生素 E 再生系統(regeneration)
所致，可將被氧化後的維生素 E 再生，目前被認為可還原氧化維
生素 E 的方式有透過①維生素 C⁷⁶ ②GSH⁷⁷⁻⁷⁸③其它還原劑如
NADH 或 NADPH⁷⁹⁻⁸⁰④雙電子維生素 E 氧化還原循環(two-
electron α -tocopherol redox cycle)⁸¹⁻⁸²方式，進而阻斷氧化緊迫所
造成的脂質過氧化連鎖反應，提供電子与其它活性氧分子反應，
保護細胞氧化傷害，增加細胞存活率⁸³⁻⁸⁵。是一種具抗氧化及清
除自由基能力的維生素⁸⁶。

(一) 維生素 C 與 E 對細胞外間質的影響

膠原蛋白(collagen)是細胞外間質的成分之一，可維持組織間隙的穩定結構，而維生素 C 則輔助脯胺醯基(prolyl)與離胺醯基(lysyl)與羥基酶(hydroxylases)形成羥基化作用，產生羧基的脯胺酸及離胺酸，刺激膠原蛋白基因(type I collagen)表現，增加膠原基因轉錄(transcription)活性⁸⁷⁻⁸⁸。Brenner 學者提到維生素 C 在 0.2mM 之下會刺激胞外間質成分的膠原蛋白生成，伴隨 TBARS 產物及羰基化合物(carbonyl)和醛基類化合物(malondialdehyde)產生，引起的脂質過氧化作用⁸⁹，並進一步發現這些醛基類化合物如 Acetaldehyde 是來自不飽和脂肪酸的過氧化作用產物，主要是環境中還原當量增加而生成，它是一種轉活化蛋白質(transactivation)會改變與膠原蛋白基因的鍵結作用，增加膠原合成，而這些醛基類化合物在體內實驗動物模式中發現存在心血管病灶(atherosclerotic lesions)或高血脂症之的兔子中⁹⁰。另外維生素 C 所誘發的 Acetaldehyde 也會改變細胞間質成分 Fibronectin 合成速率，影響 Fibronectin gene⁹¹ 表現，這些都促使細胞會引發不正常的功能表現，而維生素 E 是脂質過氧化作用的抑制者⁹²，它可抑制 TBARS 產物的形成及醛基類化合物的產物，相對的也可抑制維生素 C 過度誘發膠原蛋白的生合成⁹³。近年來心血

管的動脈粥狀硬化或高血脂引起的組織受損及失調性的纖維蛋白過度生成(fibrogenesis)皆與脂質的過氧化作用有相互關係，主要是藉由脂質過氧化作用的產物來誘發細胞外間質成分生成，引起不正常機制反應。

五、 Transforming growth factor- β (TGF- β)

TGF- β 是一種多功能勝肽，在哺乳動物中發現有五種類似物如：TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 、TGF- $\beta_{1.2}$ 、TGF- $\beta_{1.3}$ ，對於細胞生長、分化、黏著、移動等反應有顯著的影響，西元 1979 年 Delarco 實驗指出，TGF- β 存在於新生一轉型細胞 (neoplastically-transformed cells) 並稱為肉腫生長因子⁹⁴ (sarcoma growth factor) 而 Childs 學者在實驗中測定出血清中小板含豐富之 TGF- β ⁹⁵，進一步說明其可能在組織修復扮演重要角色。TGF- β 為一重要誘發因子⁹⁶，在細胞外間質(ECM)中對 collagen fibronectin 及細胞膜上的 integrins 具有重要表現，在 DNA 合成反應上，細胞受 TGF- β 刺激與 EGF、insulin、platelet-derived growth factor(PDGF)作用不同，研究顯示 TGF- β 在有絲分裂作用上的角色是間接的影響內生性生長因子而發生，主要是 TGF- β 會誘發細胞中訊息傳遞，刺激 PDGF 及其他生長因子表現，促使 c-fos、c-myc mRNA 增

加，引發有絲分裂⁹⁷。TGF- β 之生理作用進行都需要接到細胞膜上接受器⁹⁸，才具有活化作用，許多細胞皆具有 TGF- β 專一性的接受器，研究證實 TGF- β typeII 之接受器在調節抗生長之機制，type I 之接受器在調節細胞外間質反應，改變細胞外環境來影響細胞生理反應⁹⁹，1986 年 Ignatz 和 Massagui 研究證實 TGF- β 可誘發為血管中內皮細胞 fibronectin 和 collagen 之合成及釋放，同時 TGF- β 在調節細胞外間質的互相關係上扮演重要角色，會引起 plasminogen activator inhibitor (PAI-I) 含量，及 urokinase plasminogen activator (uPA) 活性增加，此外在酵素方面減少 collagenases 和 transin/stromelysin 之合成¹⁰⁰ 減少間質構成物的分解相對伴隨蛋白分解抑制酶的表現增加，因此在受傷傷口部位，TGF- β 促進形成囊胞組織，增加胞外間質蛋白的產生，進行血管新生作用。

六、 Advanced glycation end products (AGES)

Advanced glycation end products(AGES)是蛋白質胺基團(Amino group)與還原糖(Reducing Sugar)在長期存在之下,產生的非酵素性梅納反應(non-enzymatically)的產物,主要是梅納反應早期可逆性的 Schiff 鹼基(base)與 Amadori 產物,以穩定的共價鍵結形成的結構,具有黃棕色素(yellow-brown color)及自體免疫螢光和蛋白質交鏈鍵結的特色(cross-links),早期證實 AGE 是由幾個結構成分組成¹⁰¹⁻¹⁰⁵①FFI ②pyrraline ③AFGP ④carboxymethyl lysine ⑤pentosidine,這些結構成分扮演 ligand 的角色,可與它具有專一性的接受器(receptors)進行結合作用,然而目前未清楚是何種結構成分扮演專一性 ligand 來與 Receptor 產生結合作用。在 1989 年 Takata 等多位學者實驗證實 AGE 產物可藉由存在內皮細胞中的 Scavenger 的接受器¹⁰⁶⁻¹⁰⁹進行血管滲透性及細胞表面凝固作用的調節。

另外 1991 年 Manikkan 等多位學者也提到，在老鼠 RAW264.7 肝臟細胞株及內皮細胞發現具有分子量 90KD 及 60KD 位置的 monocytes 和 macrophage 也會與 AGE 產物上的 ligands 進行專一性鍵結¹¹⁰，當作 Scavenger 的接受器，當 AGE 產物與專一性的 Receptor 鍵結，可能伴隨蛋白質的細胞激素（cytokine）和生長因子如 PDGF 的分泌¹¹¹，引起一系列的訊息傳遞如內皮細胞中使表面凝血因子的活性及滲透性增加，或腎小球環間膜的細胞外間質蛋白質的生合成¹¹²，引起細胞功能的過度表現造成異常的血管增生。近幾年來，有被證實組織中 AGE 產物的累積是隨年紀及提高血液葡萄糖濃度而逐漸增加，因此 AGE 可能產物可能在糖尿病的併發症及老化過程所被引發。

貳、總結

一種慢性長期的血糖過高症-糖尿病，在近年來以在開發中國家中排名第十大主要死亡原因之列，最近指出糖尿病及其導致併發症發展機制是糖尿病狀態時產生的氧化壓力造成，由於糖尿病其血漿中維生素 C、E 濃度均較低，並且糖化血色素(HbA₁C)與清除自由基活性有顯著負相關因此反應抗氧化活性降低，氧化作用增加進一步造成 DNA 傷害，因此如何給予抗氧化物補充來改善氧化傷害，並且糖尿病心血管併發症發現主要是細胞與細胞間或細胞外間質組成份改變所致，然而藉由那些機制誘發促使組成份改變，皆有待本實驗進一步分析探討。

研究目的

探討高濃度葡萄糖與抗氧化劑的維生素 C、E 添加對於培養內皮細胞外間質蛋白質纖維網狀蛋白濃度影響，並且進一步觀察是否是藉由 TGF- β 或 AGE 產物的影響其 Fibronectin 生成量。

第貳章 實驗材料與方法

一. 實驗材料

(一). 化學試藥:

A. 細胞培養用藥:

- ① Trypsin、Bovine Serum Albumin(BSA)購自美國 Sigma Chemical company。
- ② NaCl、 Na_2HPO_4 、 NaHPO_4 、EDTA、等購自德國 MERCK Chemical company。
- ③ Endothelium Basal medium(EBM) 購自 Clonetics Chemical company。
- ④ Medium-199、Kanamycin sulfates、Anti-PPLO、Penicillin Streptomycin 等購自 GIBCOBRL Chemical company。
- ⑤ Fetal Calf Serum(FCS)購自 Biological Indus-Tries Kibbutz Beit Haemek Israel。
- ⑥ Gelatin 購自於 Bio-Rad

B. 一般分析用藥：

- ① 戊二醛一磷酸、檸檬酸鉛、乙醇、等購自德國 MERCK Chemical company。
- ② 鐵酸一磷酸、醋酸鈉、氧化鐵、等購自 Strem。
- ③ 環氧樹脂購自於 Epon812。
- ④ Rabbit、Anti-Human von Willbrand Factor、IgG Factor of Antiserum 等購自美國 Sigma Chemical company。
- ⑤ Serum Blocking Solution 等購自於 HISTOSTAIN-SP kit Zymed Laboratories Inc。

C. 主實驗添加用藥：

- ① Glucose、D-(+)-Glucose 購自美國 Sigma Chemical company。
- ② L-Ascorbic Acid phosphate Magnesium Salt n-Hydrate 購自日本和光純藥工業株式會社。
- ③ Water Dispersible Vitamin E 購自美國 Pharmavite pharmaceutical Corp。
- ④ TGF- β 抗體 來自蔣思澈老師提供。

D. 測定細胞數目用藥：

- ① Trypan Blue、NaOH、等購自於德國 MERCK Chemical company。
- ② Sodium Acetate(Phosphatase substrate)購自美國 Sigma Chemical company。

E. 總蛋白測定用藥：

- ① PMSF、BSA(Bovine serum Albumin)、KNa tartrate、等購自美國 Sigma Chemical company。
- ② TritonX-100、NaOH、 Na_2CO_3 、Folin-ciocalteu's phenol reagent、 CuSO_4 、購自於德國 MERCK Chemical company。
- ③ SDS 購自於 Bio-Rad。

F. 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 由本實驗室自行純化。
- ③ Goat Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase Conjugated 購自於 Bio-Rad。
- ④ Phenylene diamine (OPD)、購自美國 Sigma Chemical company。
- ⑤ Methanol、HCL、購自於德國 MERCK Chemical company。

⑥ H₂O₂ 購自島久藥品株市式會社。

(二). 實驗細胞:

由中山醫學院附設醫院大慶、中港分院產房提供的新生兒臍帶，再經本實驗處理培養的臍靜脈內皮細胞(Umbrilical cord endothelium cell)。

二. 儀器設備:

1. 無菌操作檯(Laminar flow): Nikon, Diaphot 300。
2. 二氧化碳恆溫器(CO₂ incubator): Nuair us Autoflow CO₂ Water-jacketor。
3. 超高溫滅菌釜(Auto cleave): Chin Ku Factory AS-600。
4. 離心機: Himac CR15D, Hitachi。
5. 超音波振盪器: BRANSON, 8200。
6. 細胞用超音波振盪器: Dis-rupter, KONTES(American Optical)。
7. 分光光度機: Spectrophometer 7800 Micor Ultrasonic cell。
8. 穿透式電子顯微鏡 TEM: JEM-1200E, JEDL。
9. 掃描式電子顯微鏡 SEM: JSM-T3000, FEDL。
10. 倒立式顯微鏡: HITACHI himac CR-15D。
11. 96 孔-well Immune reader: Σ960, Meiertach。

12. Immuno wash : Bio-Rad 。
13. Hemacytometer
14. 96-well Immuno plate , 24-well plate , Flash(T-25 , T-75) , 6-well plate , 13mm Thermanox 圓形膠片購自於 Nunc 。
15. Centrifuge Tube(15ml , 50ml)購自於 Falcon 。
16. SHAKER
17. Syringe filter(0.22um)購自於 Lida Pro-X 。
18. Petri dish: AlphHAPLUS 。
19. eppendorf tube
20. CPD 標準槽: Samdri-780A BRANSON-8200 。

二. 實驗方法

(一). 內皮細胞之分離培養(Endothelial cell isolation culture):

A. 內皮細胞之分離.¹¹²⁻¹¹⁴ 本實驗是以人類內皮細胞為研究對象，由於實驗需收集大量之內皮細胞就人類而言，以人類臍帶靜脈內皮細胞是最易取得且可大量收集的細胞來源，因此透過本校附設醫院產房協助代為收集剛出生新生兒的新鮮臍帶，存在於低溫(<4°C)狀態下，在 12 小時之內¹¹⁵ 提供本實驗進行。

一、材料

1. 新生兒臍帶:約十五~二十公分長，用含有 PBS 的無菌離心管收集 (<4°C)。
2. 沖洗緩衝液:滅菌處理過的 PBS buffer PH:7.4。
3. 分離緩衝液:經 0.22um syringe filter 過濾滅菌的 Trypsine buffer(0.05%Trypsin +0.02%EDTA)。
4. 腎形盤、剪刀、鑷子、止血鉗二支、十六號針頭二支、分別皆以乾熱滅菌(Auto clave-180°C)處理二小時，呈無菌狀態。
5. Petri dish 一個。
6. 無菌注射針筒：10ml 與 5ml 各一支(每組)。

二. 分離方法

- ① 將所有材料經酒精噴拭後進入無菌操作檯內(打開瓶口蓋均勻過火消毒)。
- ② 用鑷子取出在離心管中的臍帶放於腎形盤中。
- ③ 剪刀剪去止血夾過或凝血部份
- ④ 將滅菌 16 號針頭插入臍帶靜脈兩端，並以止血鉗將兩端固定。
- ⑤ 取無菌 5ml 針筒塞住一端 16 號針頭上，另一端針頭則用 10 號無菌針頭內含沖洗緩衝液 PBS buffer，注入臍帶封閉血管內，呈膨脹

狀態，用來沖洗靜脈內殘留血液，並且確認臍帶有無破損及兩端靜脈是否相通。

- ⑥ 同樣方式取一定量子力(視臍帶長度而定)分離緩衝液(Trypsin buffer)注入血管中，呈澎脹狀態，反應 15 分鐘，重覆 2 回。
- ⑦ 之後收集靜脈中溶液於 15ml 離心管中，1200rpm 離心 6 分鐘，去上清液以指尖彈散沉澱底部之細胞，重覆 2 回。

B: 內皮細胞之培養

本實驗主要是採用繼代培養之細胞作為實驗模式，主要原因是實驗所需細胞數量大，且內皮細胞很脆弱增殖初期變異性較大，因此使用繼代培養至第四代的細胞，使得較穩定且數量足夠才進行本實驗。

一. 材料

1. 0.1% getation(0.1% gelation, 0.82%Nacl 溶於 PBS buffer):過濾滅菌 0.22um filter。
2. coating gelatin 於 Flask 中 25ml Flask/5ml 或 75ml Flask/10ml。
3. 10ml 無菌針頭一枝。
4. 0.22um syringe filter 一個。
5. EBM 培養液，10%-20% FCS(Fetal calf serum)。

二.培養方法

- ① 將含有細胞 10ml 的離心管中加入含有 10% FCS 的 EBM 培養液 3ml(25ml Flask/3-5ml, 75ml Flask/7-10ml)混合均勻。
- ② 加入於已預先用 0.1% gelatin coating 過的 25ml Flask 中。
- ③ 置於 37°C, 5%CO₂ 的培養箱中進行培養, 每 3-4 天更換培養液。

(二).內皮細胞之確認(Endothelial cell identification)¹¹⁶

由於內皮細胞本身很脆弱, 且在處理過程環境因子改變甚大, 又必需避免差異過大造成實驗誤差, 因此對正常內皮細胞而言”確認”就顯得更加重要, 因此使用免疫組織染色法, 光學, 電子顯微鏡觀察, 以便了解內皮細胞狀況, 作更進一步的認識。可區分 A. 型態學的確認 B. 表面抗原的確認:

A. 型態學的確認

1. 光學顯微鏡(Photomicro scope) 之觀察:

內皮細胞具有形成管腔的特性, 因此若將培養液中 hEGF 去除會使內皮細胞由原先的增殖作用轉變為組織化的現象, 而在四到六週內內皮細胞便生成管腔結構, 此結構可藉由光學微鏡觀察。

2. 穿透式顯微鏡(Transmission Electron Microscope)-TEM:

Weibel-Palade body 是一種內皮細胞特有的微小胞器(organelle)必需藉由 TEM 才能觀察得到。

樣本處理如下:

- ① 用 Trypsin-EDTA 分離緩衝液將內皮細胞洗下。
- ② 1200rpm，6 分鐘離心去除上清液。
- ③ 加入 2.5% 戊二醛—磷酸緩衝液(4°C)固定一小時。
- ④ PBS 沖洗緩衝液，洗滌三次(10 分鐘/次)。
- ⑤ 1% 錳酸—磷酸緩衝液 PH7.4(<4°C)固定一小時。
- ⑥ PBS 沖洗緩衝液，洗滌三次(10 分鐘/次)。
- ⑦ 50、70、90、100% 之乙醇各脫水 15 分鐘。
- ⑧ 環氧樹脂將樣本包埋。
- ⑨ 45-50° 玻璃切片，樣本厚度 60-90nm，置入銅篩上。
- ⑩ <20°C 以 5% 醋酸鈾 30 分鐘及檸檬酸鉛 15 分鐘，雙重染色，便可以以 TEM 觀察樣本。

3. 掃瞄式電子顯微鏡 SEM(Scanning Electron Microscope)之觀察。

樣本處理如下：

- ① 13mm Thermanox 圖形膠片置於 6 孔培養盤底部 Gelatin coating。
- ② 內皮細胞培養在膠片，隔夜。
- ③ 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%OsO₄ 固定。
- ⑤ 採臨界點乾燥方式脫水處理：

--乙醇為中間液，注入液態二氧化碳於 CPD 標準槽，將溫度、壓力由 37°C、1072psi 調至 42°C、1300psi，緩慢排出液態二氧化碳(100psi/min)後將樣本固定於樣本座上。

- ⑥ 再經 sputter coater 於樣本表面覆蓋一層金薄膜再以 SEM 觀察。

B 表面抗原之確認

- 1.原理:利用存在 Weibel Palade body 中，且由內皮細胞內質網合成的特殊蛋白 Von Willebrand factor，被分泌至胞膜或細胞外，來作為確認內皮細胞的指標。

2. 確認方法:

- a. 內皮細胞培養於滅菌且已 Coating gelatin 之載玻片上。
- b. 載玻片置在 90x16mm 的培養盤中 37°C 5% CO₂ 24hr。
- c. 取出以清水潤洗，以 95%乙醇固定 30 秒。
- d. 0.01% PBS 清洗 3 次置保鮮盒中。
- e. 加 0.1% ml Serum Blocking solution 靜置 10 分鐘
- f. 去除 Serum Blocking solution。
- g. 加入 0.1ml 事先以 PBS 稀釋 800x 的 Rabbit Anti-Human Von Willbrand Factor IgG Fraction of Antiserum 靜置 40 分鐘。
- h. PBS 沖洗 3 次，2 分鐘/次。
- i. 加入 0.1ml Enzyme conjugated 靜置 10 分鐘。
- j. PBS 清洗 3 次，2 分鐘/次。
- k. 加入 0.1ml Enzyme conjugated 靜置 10 分鐘。
- l. 0.1ml Hematoxylin 靜置 3 分鐘再以自來水沖洗。
- m. 玻片置於 PBS 中 30 秒，以 70~90%乙酸各脫水 10 秒。
- n. 浸 Xylene 10 秒。
- o. 於玻片中央滴入 0.1ml Histomount，覆上蓋玻片。
- p. 烘箱中 45°C 烘 3 分鐘。
- q. 光學顯微鏡觀察玻片。

- r. 另一組不加 Rabbit Anti-Human Von Willbrand Factor IgG Factor Antiserum 改 Rabbit 血清添加作比較組。
- s. 觀察兩組差異性。

(三)內皮細胞數目之計算:¹¹⁷T-75 Flask 長滿之內皮細胞以 0.05% Trypsin +0.2% EDTA 的分離 Buffer 將之切下。

- ② 再以 1200g 離心 6 分鐘，去上清液並拍散底層之沉澱細胞。
- ③ 加入 5ml 培養液充份混合均勻後取出 10ml 與等量之 Trypan Blue 染劑混合進行染色。
- ④ 以 Hemacytometer 計算細胞數目。
- ⑤ 從 5ml 細胞培養液中取出 2×10^5 或 1×10^5 細胞的培養液，分別種入 24 孔培養盤中，呈現 $2 \times 10^5/\text{well}$ 或 $1 \times 10^5/\text{well}$ 細胞。

(四)高生理濃度葡萄糖與正常生理濃度葡萄糖添加:

配製 30mM 的(高生理濃度)葡萄糖添加於含 10% FCS 的 M199 培養液中。並且也配製 5mM(正常生理濃度)葡萄糖於含 10% FCS 的 M199 培養液。

A. 樣本分組:

(一) 10% FCS+M-199 組。

(二) 10% FCS+M-199+30mM Glucose 組。

(三) 10% FCS+M-199+5mM Glucose 組。

B. 方法:

① 將 10^5 /well 之內皮細胞種於 24 孔培養盤中， 37°C ，5% CO_2 條件之下培養 72 小時之後。

② 將再各別添加三組的 M-199 培養液於 24 孔培養盤中， 37°C ，5% CO_2 培養 72hr，各組樣本數為 3，之後並進行分析實驗。

(五) 維生素 C 與 E 的各別添加及共同添加：

配置維生素 C(0.01mM，0.05mM)添加於 10% FCS 的培養液中，及維生素 E(0.01mM，0.05mM)添加於 10% FCS 的培養液中。

A. 樣本分組：

(一) 10% FCS+M-199+維生素 C(0.01mM，0.05mM)組。

(二) 10% FCS+M-199+維生素 E(0.01mM，0.05mM)組。

(三) 10%FCS+M-199+ 維生素 C(0.01mM，0.05mM) + 維生素 E (0.01mM，0.05mM)組。

(四)10% FCS+M-199+30mM(5mM) Glucose+維生素 C(0.01mM,0.05mM)

組。

(五)10% FCS+M-199+30mM(5mM)Glucose +維生素 E (0.01mM ,
0.05mM)組。

(六)10% FCS+M-199+30mM(5mM)Glucose+維生素 C (0.01mM ,
0.05mM)+維生素 E (0.01mM , 0.05mM)組。

B.方法：

- ① 將 10^5 /well 之內皮細胞與預先泡好的六組 M-199 培養液共同添加於 24 孔培養盤中，培養 37°C ，5% CO_2 條件，72hr 各組樣本數為 3，之後進行分析實驗。

(六)TGF- β 抗體的添加：

TGF- β 抗體每管濃度 20ug/ml，將稀釋 40 倍使得濃度為 0.5ug/ml，
(ED=0.5ug/ml)，並且經過過濾之後再進行本實驗添加。

A. 樣本分組：

(一)10%FCS+M199+30mMGlucose (5mM)

(二)10%FCS+M199+30mMGlucose+TGF- β (0.5ug/ml)

(三)10%FCS+M199+30mMGlucose+ 維生素 C (0.05mM)+TGF- β
(0.5ug/ml)

B.方法：

- ① 將以稀釋且過濾的 TGF- β 抗體取 25ul 添加入經分組的培養液中，並共同添加於 24 孔培養盤中，培養 37°C，5% CO₂ 條件，72hr 各組樣本數為 3，之後進行分析實驗。

(七)AGE 抗體的添加：

取 mouse-antihuman AGE 抗體濃度經測定後為 162.5mg/ml，將稀釋 325 倍使得濃度為 0.5mg/ml，之後再稀釋 10³ 倍使濃度為 0.5ug/ml。

A. 樣本分組：

(一)10%FCS+M199+30mMGlucose+AGE 抗體(0.5ug/ml)。

(二)10%FCS+M199+30mMGlucose+維生素 C (0.05mM)+AGE 抗體
(0.5ug/ml)

B.方法：

將以稀釋且過濾的 AGE 抗體添加入分組的培養液中，並共同添加於 24 孔培養盤中 37°C，5% CO₂ 條件，72 小時各組樣本數為 3，之後進行分析實驗。

(八)細胞分析之前處理：

- ① 內皮細胞經培養於 24 孔培養盤中，先以 PBS 清洗 3 次之後。
- ② 加入 100ul lysis buffer(Buffer A、PMSF、1% Triton X-100、0.1%SDS)
靜置 1 分半鐘，之後分組且收集於試管中。
- ③ 添加 PBS buffer 並用刮杓輕輕將細胞刮下，連續三次並將細胞連同 Buffer 一起收集於試管中。
- ④ 在冰浴狀態下以超音波振碎器將細胞膜打破，以便進行一系列分析實驗。

(九)纖維網狀蛋白濃度之測定-酵素免疫接合吸附法(ELISA)¹¹⁸

1.原理:

利用抗原與帶有某種酵素的抗體作用後，再加上酵素作用之受質，會引起特異的化學反應，藉由受質與經酵素作用後產生的顏色變化很容易觀察其作用，稱為 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)法，此法更加方便且敏感。

2.方法:

A. 標準檢量線之繪製:

① 以本實驗室自行單離的 Human plasma Fibronectin 濃度 0.637ug/dl 為標準曲線的樣本。

② 標準檢量線濃度稀釋(假設三重覆配置):

	Human plasma Fibronectin (ul)		PBS buffer(ul)		最終體積(ul)
第一支試管	627	+	10	+	637
第二支試管	900	+	100	+	1000
第三支試管	360	+	40	+	400
第四支試管	360	+	40	+	400
第五支試管	360	+	40	+	400

③ 將第二支試管取 100ml 添加於 96 孔分析盤的第二排、第三排、五排(三重覆)。

④ 第一支試管則取 100ml 添加分析盤的第四排(三重覆)。

⑤ 第三支試管則取 100ml 添加分析盤的第六排(三重覆)。

- ⑥ 第四支試管則取 100ml 添加分析盤的第七排(三重覆)。
- ⑦ 第五支試管則取 100ml 添加分析盤的第八排(三重覆)。
- ⑧ 利用分析盤中第四五六七八排個別的三重覆，不同稀釋濃度來作為標準檢量線(Standard Curve)。
- ⑨ 再以 96 孔 ELISA reader 在波長 409nm 之下測量吸光值並將所求得數值取均值繪製成標準檢量線。

B. 各組樣本之纖維網狀蛋白濃度測定：

- A. 將 200ul 含有 0.1% Gelatin 的 PBS 分別注入材質為 Polystyrene 之 96 孔分析盤中(Immuno plate)
- B. 分析盤置於 37°C 培養箱(Incubator)隔夜，使 Gelatin 接著於盤孔中。
- C. 以 10mM PBS ，PH 7.4，清洗三次。
- D. 樣本先前處理並且與 10mM PBS 等倍稀釋，之後取 100ml 添加入分析盤中緩慢振盪 30 分鐘。
- E. 以 10mM PBS ，PH 7.4，清洗三次。

- F. 取 100ml 經 1000 倍稀釋的 Goat Anti-human fibronectin Antiserum(1° Ab)添加入分析盤中，緩慢振盪 30 分鐘。
- G. 以 10mM PBS ，PH 7.4，清洗三次。
- H. 取 100ml 經 1000 倍稀釋的 Goat Anti- rabbit IgG Horseradish peroxidase conjugated(2° Ab)添加入孔中，緩慢振盪 30 分鐘。
- I. 以 10mM PBS ，PH 7.4，清洗三次。
- J. 取 100ml 呈色劑(OPD)添加入分析盤中遮光 30 分鐘。呈色劑:A 劑—5mg O-Phenylene diamine 加 dd H₂O。(遮光) B 劑—10ul 30% H₂O₂。
- K. 取 50ul 3N HCL 中止其呈色反應。
- L. 以 ELISA Immuno reader 在 490nm 之下測其吸光值。
- M. 利用標準檢量線求得的趨勢線代入公式將各組所求之數值取平均值計算成所要的濃度。

(十)總蛋白質濃度測定¹¹⁹

1. 原理：

利用鹼處理，使蛋白質水解成氨基酸，而氨基酸上之-COOH 可與 Cu²⁺作用，並藉 Folin reagent 加以呈色，故可得知蛋白質的濃度。

2.方法：

A. 標準曲線製備

① 利用牛血清白蛋白(bovine serum albumin-BSA)作為標準曲線 0-800g/ml，為適當範圍並加入 ddH₂O，使最終濃度約為 1mg/ml。

② 標準曲線之濃度配製~

	(0mg/ml)	(10mg/ml)	(20mg/ml)	(40mg/ml)	(60mg/ml)
BSA(ul)	0	10	20	40	60
ddH ₂ O(ul)	100	90	80	60	40
最終體積(ul)	100	100	100	100	100

③ 將五枝已配製的標準曲線濃度各別添加 100ul NaOH(1N) Vortex。

④ 另外再各別添加 1ml Reagent，Reagent 包括 2% Na₂CO₃、0.5% CuSO₄、1% KNa Tartate、2ml 1N NaOH 混合均勻，每枝濃度皆在 25°C 之下，反應 10 分鐘。

⑤ 之後各別添加 1N 100ul Folin reagent 呈色，作用反應 30 分鐘。

⑥ 利用分光光度計以波長 750nm 之下測定吸光，以作為細胞中總蛋白含量的標準曲線(Standare Curve)。

B.各組樣本之總蛋白濃度測定方法：

- ① 樣本先前處理之後取 100ul 加入 1N NaOH 100ul 並混合。
- ② 再加入化學混合劑 1ml (2% Na_2CO_3 、0.5% CuSO_4 、1% KNa Tartate、2ml 1N NaOH 混合均勻)，室溫靜置 10 分鐘。
- ③ 之後各別添加 1N 100ul Folin reagent 呈色，作用反應 30 分鐘。
- ④ 利用分光光度計以波長 750nm 之下測定吸光，並以標準曲線定量各組樣本之總蛋白含量。

(十一)統計分析

資料分析係使用 SPSS 軟體中 one-way T -test 來分析，各處理組間顯著差異統計結果必須在其 P-value 值小於或等於 0.05($P \leq 0.05$)時才具差異效果，文章中所提及之數值均以平均值加減標準差 Means \pm SD 表示。

第參章 實驗結果

壹、內皮細胞之分離與確認

一、內皮細胞之分離

臍靜脈內皮細胞是由本校附設醫院所提供的臍帶，在無菌處理下，於短時間內送抵實驗室無菌分離操作，(前述分離過程)，所得初代培養(primary culture)的內皮細胞如圖(一)所見，圖(二)為一星期後細胞增殖情形。

二、內皮細胞之確認

初代培養之臍靜脈內皮細胞以 Trypsin-EDTA 洗下之後，離心並分裝(subculture)，進行繼代培養(passage culture)。繼代培養至第四代後取部份細胞進行細胞確認工作。於光學顯微鏡中所觀察到內皮細胞其外觀上呈不規則，且為單核球、平貼於底部，屬單層細胞，如圖(三)。但將培養液改以不含 hEGF 培養液時，約一個月後便可觀察到如圖(四)所示之管腔結構。另外內皮細胞的細胞核凸起呈現小丘狀，可利用掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察到細胞外圍有許多特殊絲狀結構-microprojections，如圖(五)所示。

以穿透式電子顯微鏡(TEM)可觀察到細胞特有的胞器 Weibel-Palade body，如圖(六)。除上述利用細胞外觀、結構及生理現象來確認內皮細胞外，也可利用免疫組織染色(immunohistological stain)法進行細胞確認。此法主要利用存在內皮細胞表面的一種特殊蛋白質-Von Willebrand factor，進行抗原與抗體結合染色法。結果如圖(七)本身的 von Willebrand factor 會與 Rabbit anti-human von Willebrand factor antibody 結合，經二次抗體與呈色劑添加，形成橙紅色反應。若未與抗體產生作用則內皮細胞呈現藍紫色，如圖(八)經由上述檢測可確定本實驗所分離的細胞是臍帶靜脈細胞。

貳、 高濃度葡萄糖與正常濃度葡萄糖分別添加對內皮細胞的影響

一、細胞生長情形與數目之變化

由於本實驗初步進行高濃度(30mM)葡萄糖及正常濃度(5mM)葡萄糖添加時，利用①M-199+10% FCS 及②M-199+5% FCS 培養液個別添加去觀察細胞生長情形與數目變化。

① M-199+5% FCS 培養液組：分別添加(30mM)高濃度葡萄糖及正常濃度葡萄糖(5mM)培養 72hrs(3days)之下由顯微鏡觀察細胞存在高濃度葡萄糖時細胞型態外觀略有些差異，原因可能是細胞存在高張的葡萄糖溶液中，並且培養液提供的營養生長因子不足夠提供細胞抵禦惡劣環境，造成細胞毛細管通透性改變，導致細胞型態異常。另外細胞數目觀察不管是存在高或正常生理濃度的葡萄糖培養下，與細胞培養於 10% FCS 比較皆有明顯減少的情形。

② M-199+10% FCS 培養液組：分別添加(30mM)高濃度葡萄糖培養於 72hrs(3days)之下，由顯微鏡觀察細胞型態外觀與對照組(5mM)正常濃度葡萄糖添加，並無明顯差異改變，可能原因是 10% FCS 添加的培養液，可足夠提供維持細胞短期存在高濃度葡萄糖之下侵害的影響，另外細胞數目觀察大致與正常濃度葡萄糖添加的細胞相同，並無差異性。

由以上結果，本實驗利用 M-199+10% FCS 當做基礎培養液進一步觀察細胞在此不同環境所產生的變化，並進一步探討其中的傳遞機制。

二、細胞中總蛋白量的變化

兩組不同的培養液，進行添加不同濃度葡萄糖溶液測定總蛋白，結果見表一、表二、圖九、圖十。

M-199+10% FCS 組：

進行高濃度與正常濃度葡萄糖添加，測定總蛋白在三組中並無顯著差異性其濃度約在 0.08~0.09mg/ml 的濃度之間($p > 0.05$)見表一、圖九。

M-199+5% FCS 組：發現當添加 30mM 葡萄糖培養 3 天(72hrs)時，細胞的總蛋白量明顯的降低比較與含 10%FCS 之下正常濃度葡萄糖添加的細胞。然而其本身不同生理濃度存在並無顯著差異，原因是彼此各組間濃度非常低所造成。見表二、圖十。

三、細胞中纖維網狀蛋白(Fibronectin)之變化

正常生理濃度葡萄糖及高生理濃度葡萄糖添加於 M-199+10% FCS 的培養液中觀察細胞中 Fibronectin 濃度變化如表三、圖十一發現內皮細胞存在高生理濃度葡萄糖況之下與正常生理葡萄糖存在之下 Fibronectin 有明顯上升情形。

其 Fibronectin 濃度為 $0.108375 \pm 0.045247 \text{ug/ml}$ 較控制組 M-199+10% FCS($0.077617 \pm 0.03263 \text{ug/ml}$)及對照組含 5mM 葡萄糖的添加 ($0.075869 \pm 0.033461 \text{ug/ml}$)在統計學上有顯著的差異性($P < 0.05$)。另外又觀察細胞存於 M-199+10% FCS 及 M-199+5% FCS 培養液中個別添加高濃度及正常生理濃度的葡萄糖測定其 Fibronectin 變化情形，見圖十二。結果顯示在 M-199+10% FCS 組中，添加 30mM 的葡萄糖與對照組比較可促使 Fibronectin 明顯的上升，在統計學上具有明顯的差異 ($p < 0.05$)但 M-199+5% FCS 組，本身由於細胞型態及總蛋白數目皆明顯改變或降低，可發現相對在 Fibronectin 功能上的表現也會受影響，較無 M-199+10% FCS 組在統計學上具有顯著的差異存在($p < 0.05$)，因此不採用進行本實驗進一步分析的方法。

四、細胞中纖維網狀蛋白/總蛋白比值之變化(Fibronectin/Total protein ratio)

之前結果雖已知高生理及正常生理濃度葡萄糖之添加 Fibronectin 的差異結果，但若是直接得到細胞中 Fibronectin 的變化情形，數據需在除以各組之總蛋白量作為校正，如此所得之比值將更具準確度。

各組添加葡萄糖在 M-199+10% FCS 培養液中培養 72hrs 之下，由於各組之細胞內總蛋白維持一定值，而高濃度(30mM)葡萄糖其 Fibronectin 明顯上升，因此 Fibronectin/Total protein ratio 比值也為顯著上升的趨勢與其他組在統計上有顯著差異。

參、維生素 C 的添加對培養之內皮細胞的影響

一、細胞生長情形及數目的變化

利用 M-199+10% FCS 培養液，分別添加高濃度及正常濃度葡萄糖，並且再添加維生素 C(0.01mM、0.05mM)濃度在 72hrs 培養下，細胞生長情形與對照組或控制組相似，無任何污染情形發生。

二、細胞中總蛋白(Total Protein)的變化

維生素 C (0.01 或 0.05mM)的添加於不同生理濃度的葡萄糖與對照組(無任何葡萄糖的添加的維生素 C 存在情形之下)，其各組細胞中總蛋白含量維持一定，之間並無太大差異，結果見圖十三。

三、細胞中纖維網狀蛋白 (Fibronectin) 的變化

當個別添加維生素 C(0.01mM)於高生理濃度葡萄糖之下與高濃度不添加維生素 C(0.01mM)的細胞比較明顯的降低 Fibronectin 濃度(0.0698ug/ml→0.04894ug/ml)在統計上具有顯著差異性($p < 0.05$)，並且與正常生理濃度添加 0.01mM 維生素 C 組比較(0.04894ug/ml，0.03573ug/ml)，並無顯著差異性($p > 0.05$)存在，見圖十四。另外，當添加維生素 C(0.05mM)在高生理濃度的葡萄糖之下，比較與僅添加高濃度葡萄糖下 Fibronectin 濃度並無明顯下降(0.07528ug/ml)，但是與正常生理的葡萄糖添加維生素 C (0.05mM)比較之間仍有明顯差異性($p < 0.05$)存在，見圖十五。然而不加任何葡萄糖下的維生素 C(0.01 及 0.05mM)添加，兩者對 Fibronectin 濃度影響在統計學上仍有顯著差異，結果見圖十六。

四、細胞中纖維網狀蛋白/總蛋白之比值(Fibronectin/Total protein ratio)

將維生素 C(0.01、0.05mM)的添加在高生理及正常生理存在之下細胞的 Fibronectin/Total protein 變化情形如圖十七。

0.01mM 維生素 C 添加於高生理濃度葡萄糖下細胞的 Fibronectin/Total protein 的變化明顯的下降($p < 0.05$)，但 0.05mM 維生素 C 的添加時細胞 Fibronectin/Total protein 的 ratio 並無降低現象與原來高生理濃度葡萄糖下的細胞表現相同，並無差異性存在。

肆、維生素 E 的添加對培養之內皮細胞的影響

一、細胞生長情形及數目之變化

維生素 E (0.01、0.05mM)濃度的個別添加於不同生理濃度的葡萄糖之下培養 72hrs，細胞生長與數目變化並無太大的差異，也無任何污染情形。

二、細胞中總量蛋白之變化

當添加維生素 E (0.01、0.05mM)，在高濃度與正常濃度 72hrs 培養之下，其細胞總蛋白含量之間，並無太大的差異結果見圖十八。

三、細胞中纖維網狀蛋白(Fibronectin)的變化

維生素 E (0.01、0.05mM)個別添加於高濃度及正常生理濃度或無添加任何葡萄糖下其細胞 Fibronectin 濃度變化情形如圖十九、二十、二十一。

維生素 E (0.01mM)添加組：當添加於 30mM 高生理濃度比較與僅含高生理濃度的葡萄糖下，會明顯使 Fibronectin 的濃度下降 Fibronectin 從 0.066657ug/ml 變為 0.045342ug/ml，並且與正常生理濃度的葡萄糖添加維生素 E 的影響並無太大差異存在。

維生素 E(0.05mM)添加組：當添加於 30mM 濃度的葡萄糖之下並無太大明顯使 Fibronectin 濃度下降，與 5mM 葡萄糖時添加兩者之間仍有明顯差異($p < 0.05$)。另外，僅單一添加維生素 E (0.01 或 0.05mM 濃度)二者比較仍有顯著差異性($p < 0.05$)，見圖二十一。

四、細胞中纖維網狀蛋白/總蛋白量之比值(Fibronectin/Total protein ratio)

維生素 E (0.01、0.05mM)添加於不同濃度的葡萄糖下，對細胞 Fibronectin/Total protein ratio 變化情形如圖二十二。

維生素 E(0.01mM)添加：細胞於高濃度葡萄糖添加維生素 E 其細胞中 Fibronectin/Total protein ratio 會下降，但與正常生理濃度葡萄糖添加仍具差異性($P < 0.05$)。

維生素 E(0.05mM)添加：高濃度葡萄糖(30mM)添加之下，其細胞中 Fibronectin/Total protein ratio 有與僅含高濃度葡萄糖存在的細胞比較 Fibronectin/Total protein ratio 些許下降，但與正常濃度葡萄糖添加維生素 E 比較仍具顯著差異性($P < 0.05$)。

伍、維生素 C 與 E 的共同添加對培養內皮細胞的影響

- 一、細胞生長情形及數目之變化：維生素 C(0.01、0.05mM)與維生素 E(0.01、0.05mM)共同添加於不同生理濃度的葡萄糖之下培養 72hrs，細胞生長並無任何污染情形。
- 二、細胞中總蛋白的變化：維生素 C(0.01、0.05mM)與 E (0.01、0.05mM)的個別與共同添加，在不同生理濃度的葡萄糖培養之下其細胞中總蛋白含量彼此之間並無顯著差異($p > 0.05$)見圖二十四。

三、細胞中纖維網狀蛋白(Fibronectin)的變化：不同濃度的維生素 C 與維生素 E 添加於正常及高生理濃度的葡萄糖之下變化情形，見圖二十三。

維生素 C 0.01mM+維生素 E 0.01mM 組：在高濃度(30mM)葡萄糖存在之下，與對照組及控制組(正常生理濃度)比較其細胞中 Fibronectin 濃度有降低，之間具顯著差異($p < 0.05$)。

維生素 C 0.01mM+維生素 E 0.05mM 組：細胞在(30mM)高生理濃度的葡萄糖之下，細胞中 Fibronectin 明顯降低($p < 0.05$)，與對照組及控制組間有差異性存在。

陸、TGF- β 抗體及 AGE 抗體添加培養內皮細胞的影響

一、細胞生長情形及數目變化

本實驗添加經由過濾且稀釋的 TGF- β 及 AGE antibody 其濃度為 ED50=0.5ug/ml，添加於高及正常生理濃度的葡萄糖及高濃度葡萄糖並添加維生素 C 0.05mM 中，觀察 72 小時，細胞生長情形與對照組並無太大差異，且無污染情形。

二、細胞中總蛋白之變化：

當添加 AGE 及 TGF- β 抗體在高濃度葡萄糖及含 0.05mM 維生素 C 存在之下細胞中總蛋白之間並無顯著差異存在($p > 0.05$)見圖二十六。

三、細胞中纖維網狀蛋白之變化：

TGF- β 抗體添加組：當添加於高濃度的葡萄糖的細胞存在之下，發現細胞中 Fibronectin 濃度明顯下降與對照組有顯著差異性($P < 0.05$)，另外添加於高濃度葡萄糖及 0.05mM 維生素 C 細胞的存在之下，觀察細胞中 Fibronectin 濃度也明顯的下降，與對照組有顯著差異性如圖二十五。

AGE 抗體添加組：當添加 AGE 抗體於高濃度的葡萄糖細胞存在之下發現也使細胞中 Fibronectin 顯著下降，並且在高濃度葡萄糖及 0.05mM 維生素 C 存在細胞環境中，也見此現象與對照組有顯著差異($p < 0.05$) 如圖二十五。

柒、總結

在此實驗之初期進行細胞的收集培養，由於內皮細胞本身是非常脆弱與嬌嫩，來自新生兒與母親之間的一小段臍帶，初期細胞經分離時，環境改變使得本身會產生較多功能上的變異性，因此，本實驗將分離初的內皮細胞培養至第四代，才進行主實驗的分析，初期細胞培養經過增生、複製之後分離，使之繼代培養其中不可抗拒因素的實驗步驟及臍帶不新鮮和手部的污染等，再加上實驗的樣本數大，因此本實驗所收集之臍帶的 300-400 條左右，在培養時細胞經電子顯微鏡等其他方法確認後，才可進行主實驗的分析，因此細胞型態及功能上都是健康正常的內皮細胞。

結果方面：

- 一、高濃度的葡萄糖添加在細胞中的確可使細胞中的 Fibronectin 生成量增加，但不會使細胞數目及總蛋白量受到影響。

- 二、添加維生素 C 及 E (0.01、0.05mM)於高濃度的葡萄糖環境之下的確可使細胞中 Fibronectin 的生成量明顯降低,尤其是二者共同添加,促使加乘作用,降低細胞 Fibronectin 的生成量。
- 三、細胞存在高生理濃度葡萄糖及高氧化壓力之下的確會誘發 TGF- β 的表現及 AGE 的產生,促使細胞功能表現的 Fibronectin 生成量增加,影響細胞增生及複製等的異常現象。

第四章 討論

本實驗主要分三部分進行探討：第一部份是探討高濃度的葡萄糖添加對培養之內皮細胞中 Fibronectin 濃度的影響。第二部分是添加抗氧化劑維生素 C 與 E，對於培養內皮細胞中 Fibronectin 生成量的影響，第三部分是添加 TGF- β 及 AGE 抗體觀察是否會影響到培養內皮細胞中 Fibronectin 的濃度。

本實驗主要動機是 Mara Lorenzi 等學者¹⁹於 1986 年發表指出糖尿病長期的高濃度葡萄糖暴露而導致的血糖併發症，主要是使血管內皮細胞產生型態上的異常表現，然而其中會促使內皮細胞功能表現異常的成分及機制並未進一步探討，並且文中作者發現長期暴露在高濃度的葡萄糖之下增加 DNA 的損害造成內皮細胞的毒性，其中造成此結果誘發的機制也尚未說明，而具有抗氧化劑的維生素 C 及 E，是否可促使高氧化壓力之下，捕捉自由基降低內皮細胞異常的功能表現。因此本實驗嘗試以不同生理濃度的葡萄糖添加於內皮細胞中，觀察存在細胞外間質，扮演細胞黏著增生及複製等重要功能表現的 Fibronectin 濃度變化，是否是一重要調控者的變化，同時添加對於 Fibronectin 生合成上有極密切關係的抗 TGF- β 抗血清及長期處於高濃度葡萄糖狀態下所產生的 AGE 化合物之抗血清並一併觀察是否會抑制細胞外間質

Fibronectin 的濃度，另外也進一步進行添加抗氧化劑使氧化壓力降低，是否會改變 Fibronectin 生成情形。而降低細胞功能的過度表現，免於血管的併發症產生，由實驗結果得知圖十一、十二、表三、分別添加高濃度的葡萄糖及正常濃度葡萄糖對內皮細胞中 Fibronectin 濃度的影響的確有不同的表現。當高濃度之下，會誘發內皮細胞中 Fibronectin 生成量增加而導致細胞外間質異常的增生作用。1993 年 Nishimura, F.,³² 等多位學者提到臍靜脈內皮細胞存於高濃度葡萄糖下會誘發增加 Fibronectin mRNA 表現，促使同類蛋白質 Integrin 及 Fibronectin 過度表現引起內皮細胞基底膜增厚改變細胞功能型態，促使微小管的過度增生造成血管併發症的產生，然而究竟是何者因素造成 Fibronectin 濃度的改變而引起細胞功能受損，近年來廣受被討論認為對細胞外兼具有重要調節作用的 TGF- β (Transforming growth factor- β)，在整個實驗中扮演的角色？由上述推論本實驗利用 TGF- β 抗體添加主要作用是觀察抑制 TGF- β 作用是否會改變 Fibronectin 生成量，本實驗由圖二十六發現 TGF- β 抗體添加的確使高濃度葡萄糖存在下的 Fibronectin 明顯降低，由此結果可觀察當高氧化壓力，TGF- β 的確會被誘發促使細胞外間質 Fibronectin 濃度的增加，在 1987 年 Nimmer 等多位學者提到在壓力反應之下 Glucocorticoids 會間接

誘發細胞外間質 Fibronectin 生合成¹²¹，如早期傷口癒合過程中誘發 Fibronectin 生成。另外 TGF- β 也扮演細胞外間質調控的角色¹²²，然而在纖維母細胞¹²³中 TGF- β 藉由 Fibronectin 促進者的序列(Promotor sequences)與 Fibronectin 的三個顯著接受器鍵結。來調控 Fibronectin 生成量，然而真正誘發的機制尚未清楚¹²⁴。另外也提到醛基類化合物的形成也會誘發 Fibronectin 生成量增加，並且當 TGF- β 添加更可強化 Acetaldehyde 對 Fibronectin 的生成促進作用¹²⁵ 另外圖二十六 顯示添加 AGE-抗體也會促使 Fibronectin 在高濃度葡萄糖之下生成量有所改變，更可證明培養內皮細胞存在高糖化濃度葡萄糖中的確會促使糖胺基化反應的發生，1991 年 Zenji 等多位學者發表糖尿病在動脈及血液循環中會有快速的使糖化 AGE 蓄積¹²⁶的情形，此 AGE 產物會與它專一性的接受器結合促使一系列訊息傳遞反應，如 AGEs—receptors—cytokine—growth factor 的 Cascade 反應¹¹²促使組織再次重建，以及過度增生作用導致異常反應。Kirstein.等多位學者也提到在腎小球環間膜細胞發現 AGEs 會增加 Fibronectin 產生作用和 Collage type IV mRNA 與 Peptide 的生合成¹²⁷ 主要機制是 AGE 產物的接受器 monocytes 與 macrophages 與 AGEs 結合引發如 TNF- α 、IL-1、PDGF 和 IGF-1 等生長因子的表現，使 Fibronectin

等生長因子的表現，使 Fibronectin 生合成增加¹²⁷⁻¹²⁹，但當添加抗體去對抗 AGEs 的 receptor 可即可抑制 Fibronectin 的生成量。

由圖十六、二十一可知當細胞存在高濃度葡萄糖之下，添加抗氧化劑維生素 C 與 E，的確會抑制高氧化壓力所誘發 Fibronectin 的生合成。當添加維生素 C 在 0.01mM 時會抑制高氧化環境中 Fibronectin 的生成量，而添加至 0.05mM 於體外培養的內皮細胞其細胞中 Fibronectin 生成量並無明顯降低的情形，圖十四、十五、十九、二十、相對維生素 E 添加也是如此，當抗氧作用的維生素 E 或 C、高劑量添加反而變成促氧化作用提高氧化壓力環境。Mario 等學者¹³⁰提到維生素 C 給予 0.2mM 在人類纖維母細胞中發現產生油脂過氧化作用產生醛類化合物引發膠原蛋白 mRNA 表現及 Fibronectin 生成量增加，另外添加適當抗氧化劑維生素 C 與 E 做為氧化壓力下自由基的清除者，則可抑制過氧化作用產生。

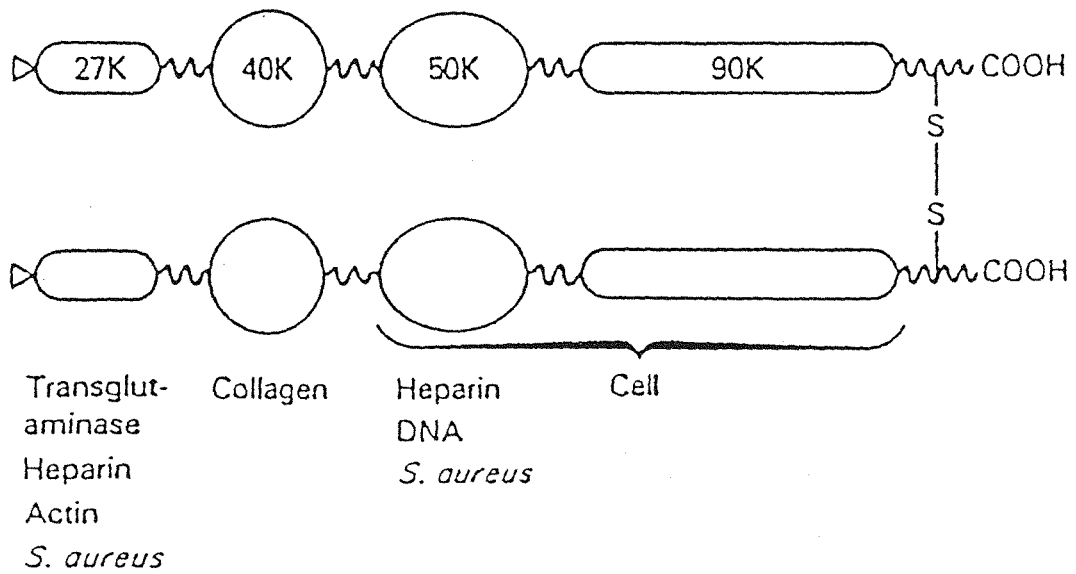
由圖二十三、二十四、共同添加可觀察本實驗共同添加會使抗氧化劑產生加乘反應，抑制 Fibronectin 的生成其主要機制是維生素 E 先提供一個電子給不穩定的分子使自己產生游離狀態，進而利用再生形態來自維生素 C 電子將游離轉成 α -Tocopherol 形態，來抑制因氧化壓力下所產生的 Free radical 促

使 ECM protein 合成增加的情形。

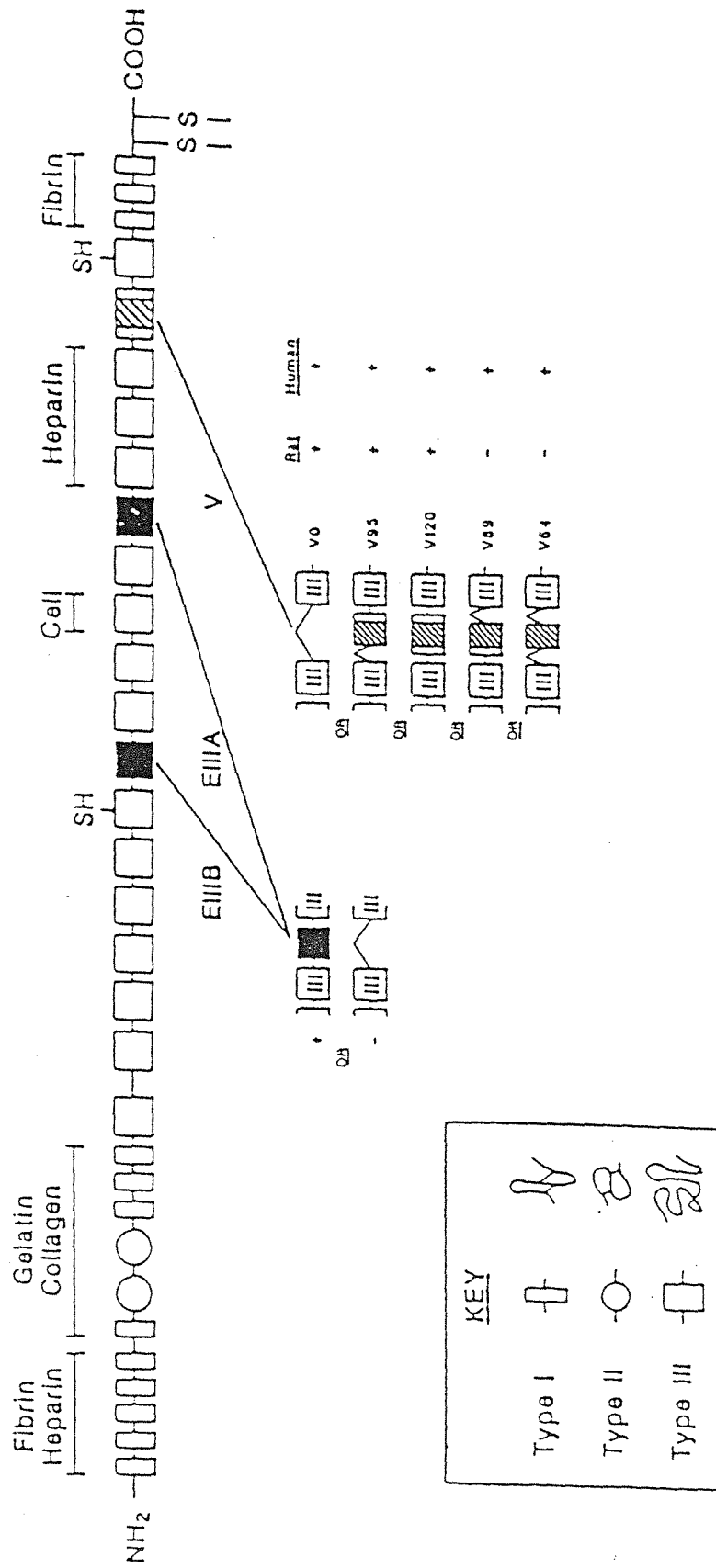
總結：

因此本實驗的一系列分析可知糖尿病患造成微小血管增生受損主要是高氧環境一些誘發生長因子(TGF- β ，AGEs)促使細胞外間質的組成份改變，增加細胞與細胞間交互作用產生異常的黏著、增生、移動、等功能，造成血管腔表面受損伴隨心血管併發症發生，然而給予適當抗氧化劑的維生素 C、E 之下，是有助於預防心血管的併發症產生，但若過度的給予則相反地形成助氧化效果，更加速高濃度葡萄糖之下的內皮細胞功能受損。

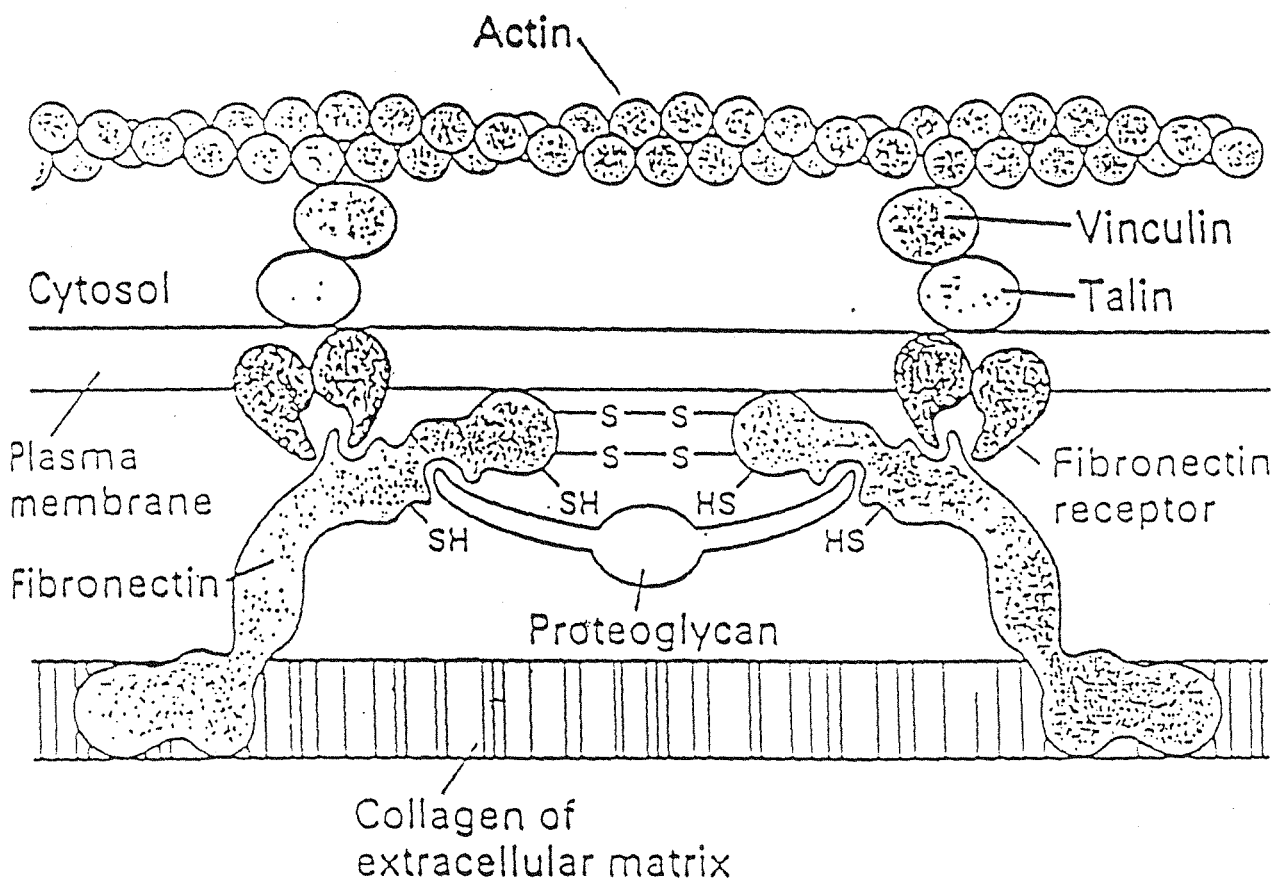
未來可進一步再探討內皮細胞存在異常環境下除 TGF- β 外，其他誘發因子如 TNF- α ，PDGF，IGF-I，等刺激作用的影響。



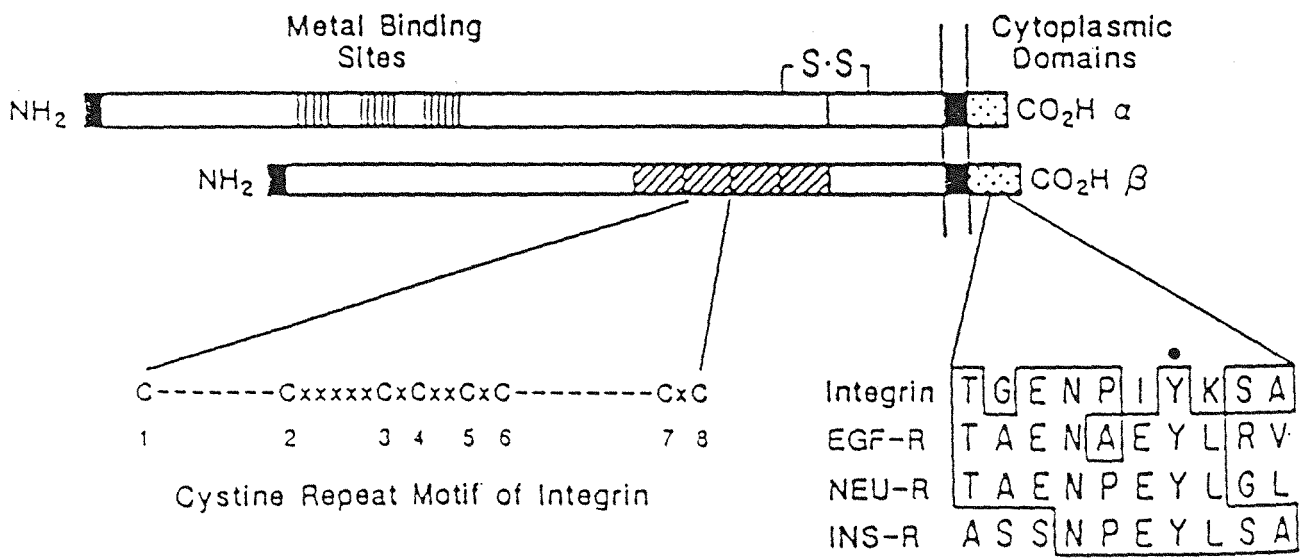
附圖一、纖維網狀蛋白之蛋白結構模型。



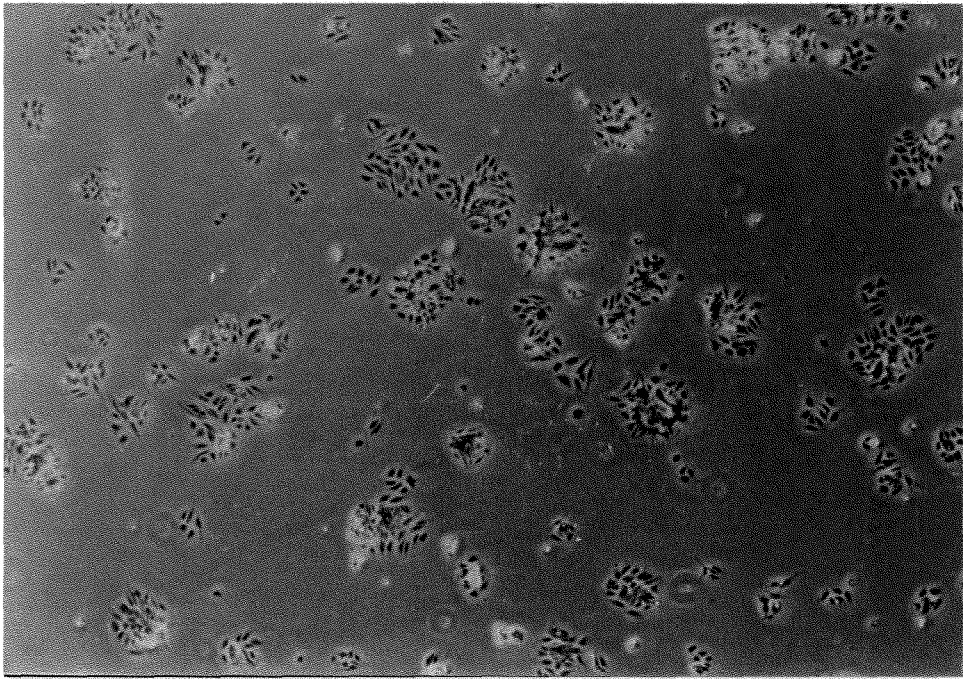
附圖二、纖維網狀蛋白之 polypeptide 結構。



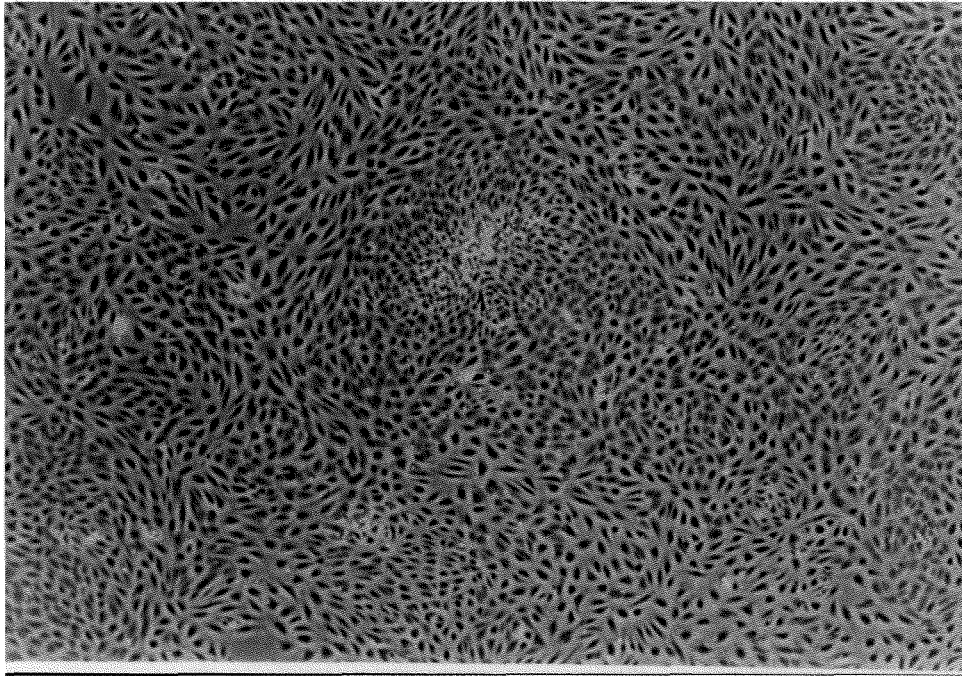
附圖三、Fibronectin與Collagen, Proteoglycan及Integrin的交互作用，將細胞固定於組織間隙上之模型。



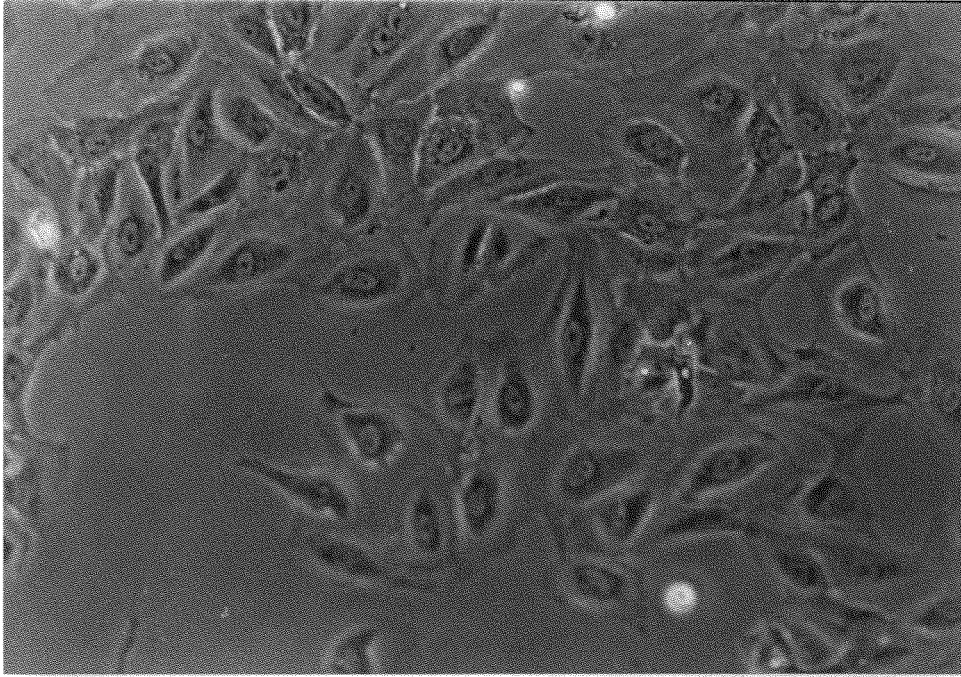
附圖四、Integrin的分子結構及其它受體相似片段amino acid sequence之比較。



圖一、初代培養 12 小時之內皮細胞

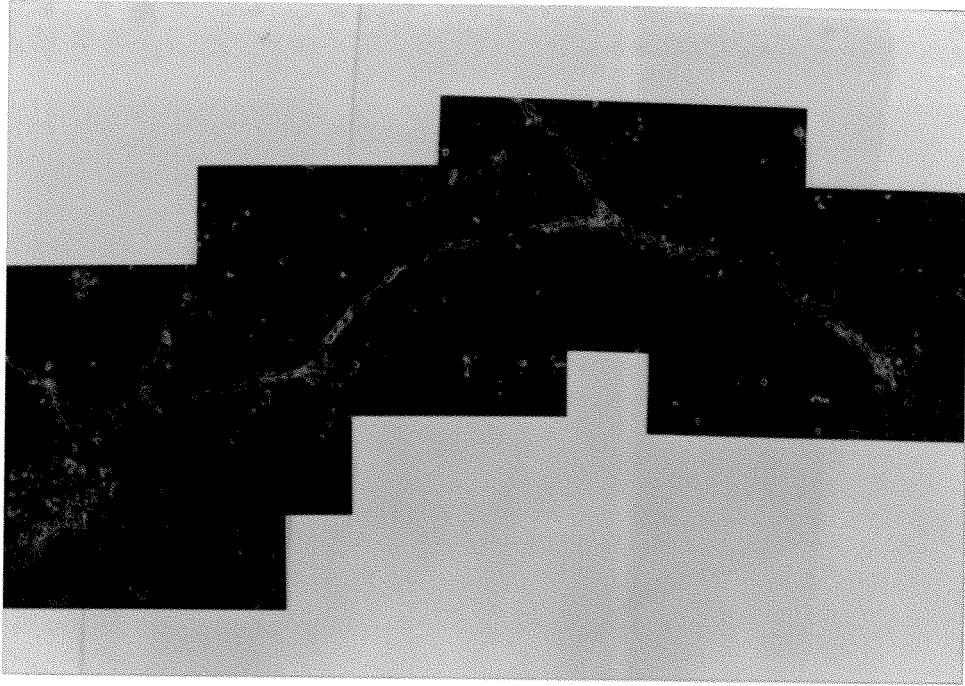


圖二、初代培養 7 天之內皮細胞

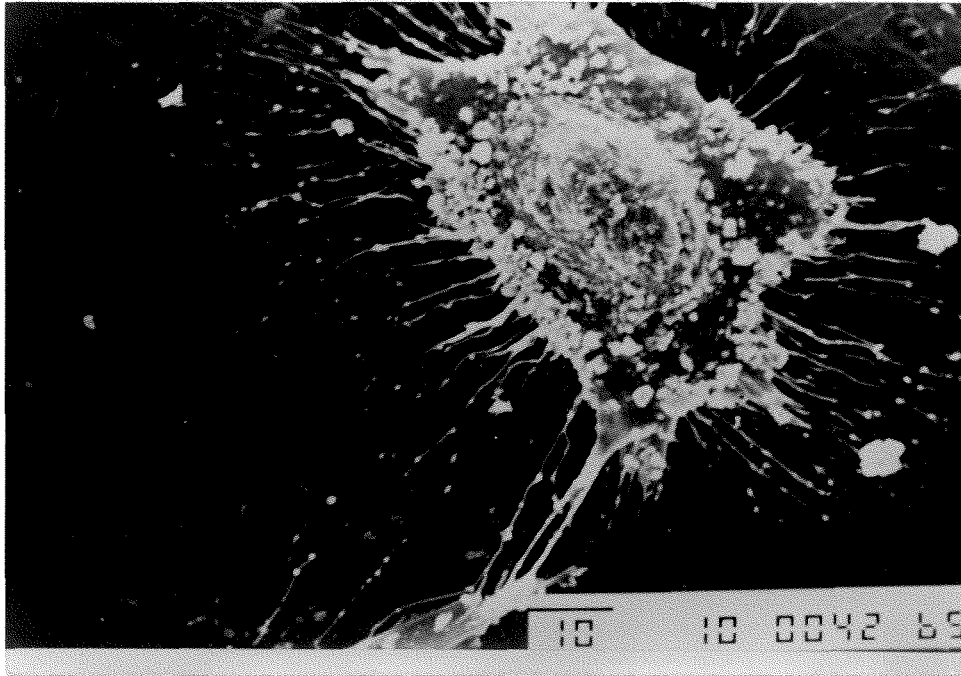


圖三、內皮細胞為單核球細胞，以平貼於培養盒底部生長。

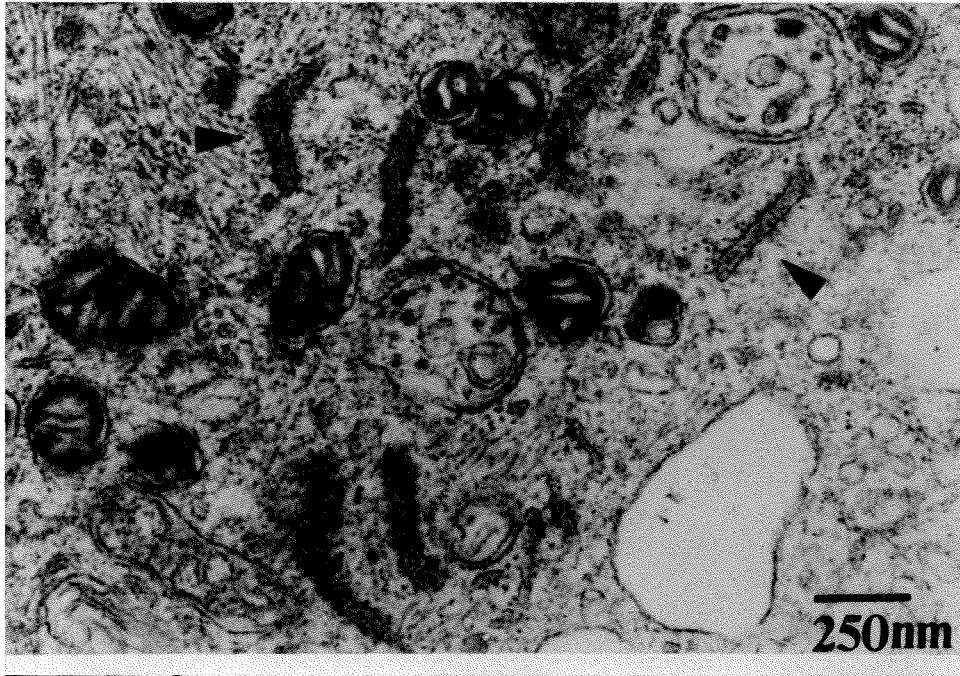
(400X)



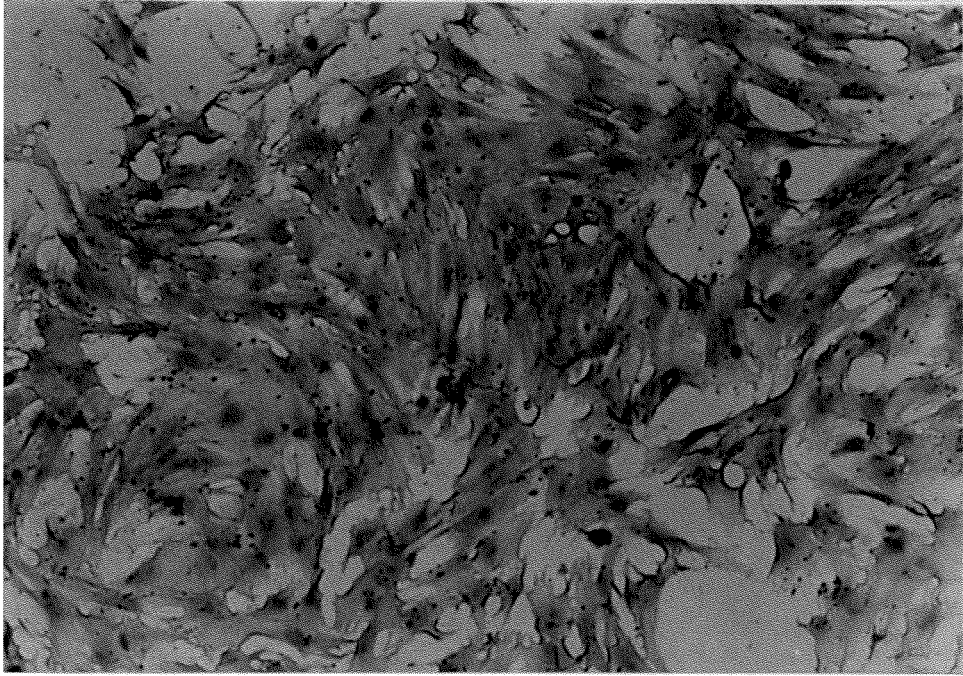
圖四、內皮細胞形成之管腔狀結構。(400x)



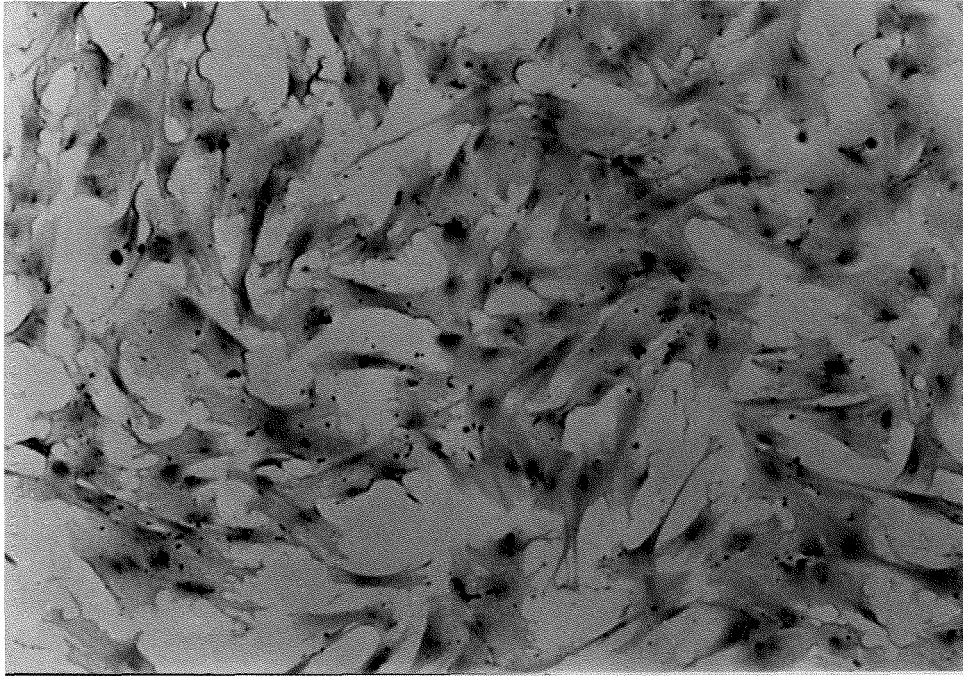
圖五、內皮細胞表面有許多 Microprojections，胞核呈小凸起狀。(SEM)



圖六、內皮細胞之 Weibel palade body(箭頭處)。(TEM)

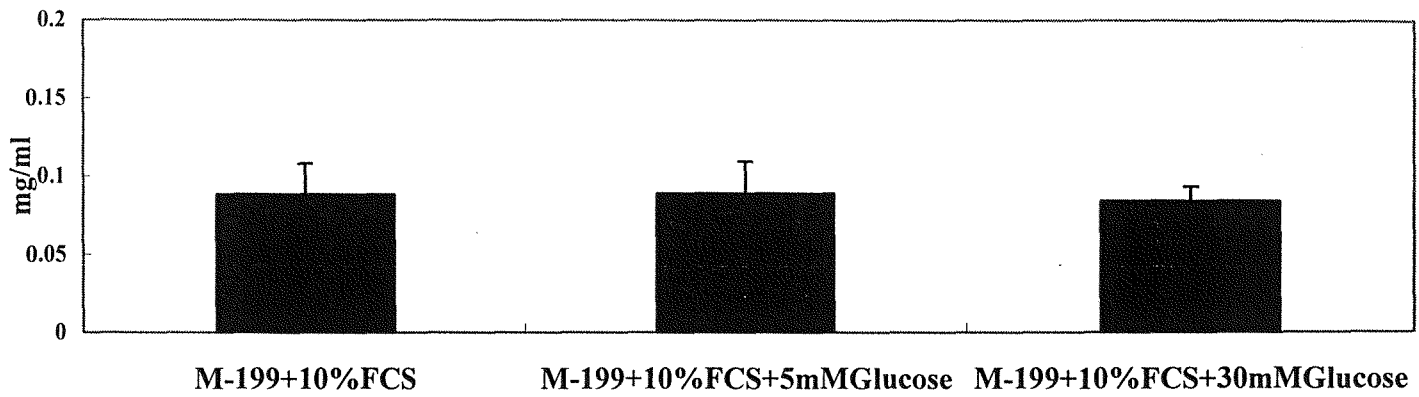


圖七、內皮細胞表面 Von Willebrand factor 之免疫染色，陽
性反應



圖八、內皮細胞表面 Von Willebrand factor 之免疫染色，陰
性反應

The Concentration of Total protein in endothelial cells after 72hrs cultured

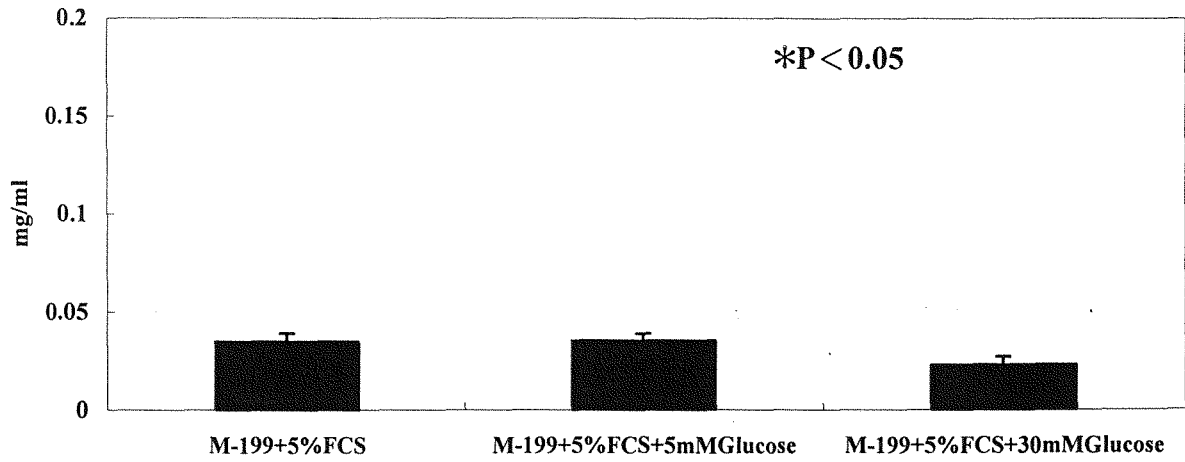


圖九 添加不同生理濃度的葡萄糖在 10%FCS 添加的培養液中
培養 72 小時各組內皮細胞總蛋白質濃度之變化。

取 10^5 內皮細胞各別培養於含 10%FCS 的 medium199 中添加 Glucose(5mM,30mM)，培養 72 小時後測定細胞所含蛋白質的濃度，結果以平均值 \pm 標準誤差表示(mean \pm SD，n=3)。

“*”與對照組比較具有顯著差異(P<0.05)。

The Concentration of Total protein in endothelial cells after 72hrs cultured

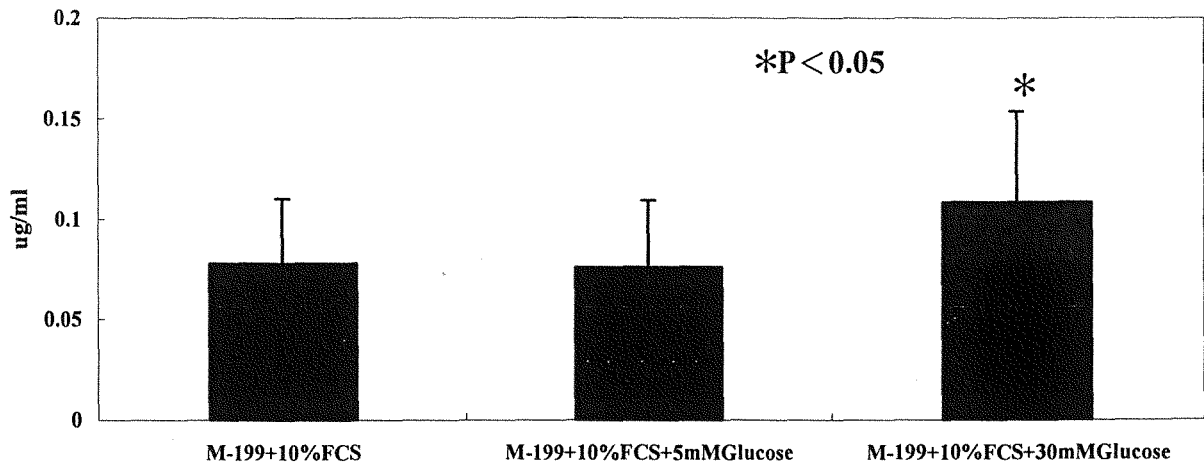


圖十 添加不同生理濃度的葡萄糖在 5%FCS 添加的培養液中
培養 72 小時各組內皮細胞總蛋白質濃度之變化。

取 10^5 內皮細胞各別培養於含 5%FCS 的 medium199 中添加 Glucose(5mM,30mM)，培養 72 小時後測定細胞所含蛋白質的濃度，結果以平均值±標準誤差表示(mean±SD，n=3)。

“*”與對照組比較具有顯著差異(P<0.05)。

The Concentration of Fibronetin in endothelial cells after 72hrs cultured

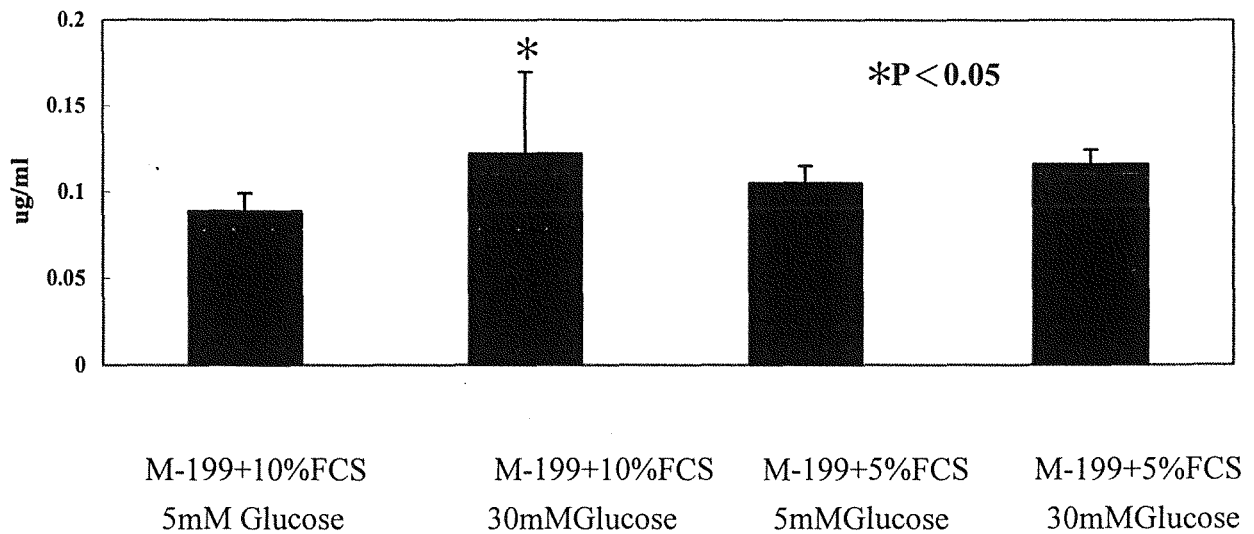


圖十一添加不同生理濃度的葡萄糖在 10%FCS 添加的培養液中培養 72 小時各組內皮細胞纖維網狀蛋白之變化。

取 10^5 內皮細胞各別培養於含 10%FCS 的 medium199 中添加 Glucose(5mM,30mM)，培養 72 小時後測定細胞所含纖維網狀蛋白的濃度，結果以平均值±標準誤差表示(mean±SD，n=3)。

“*”與對照組比較具有顯著差異($P < 0.05$)。

The Concentration of Fibronectin in endothelial cells after 72hrs cultured

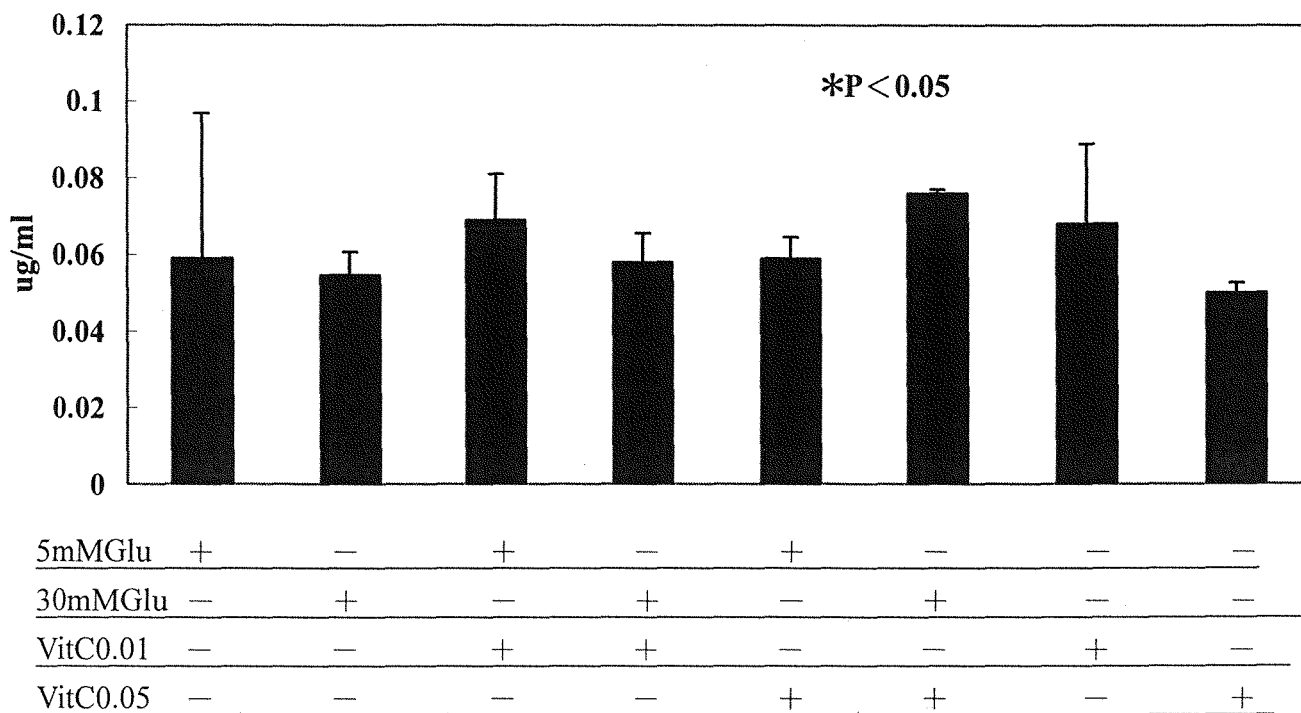


圖十二添加不同生理濃度的葡萄糖在不同 FCS 添加的培養液中培養 72 小時各組內皮細胞纖維網狀蛋白濃度之變化。

取 10^5 內皮細胞各別培養於含 10%FCS 及 5%FCS 的 medium199 中添加 Glucose(5mM,30mM)，培養 72 小時後測定細胞所含纖維網狀蛋白的濃度，結果以平均值±標準誤差表示(mean±SD，n=3)。

“*”與對照組比較具有顯著差異(P<0.05)。

The Concentration of Total protein in endothelial cells 72hrs cultured



圖十三添加不同生理濃度的葡萄糖及維生素 C 培養 72 小時後各組內皮細胞所含總蛋白質濃度之變化。

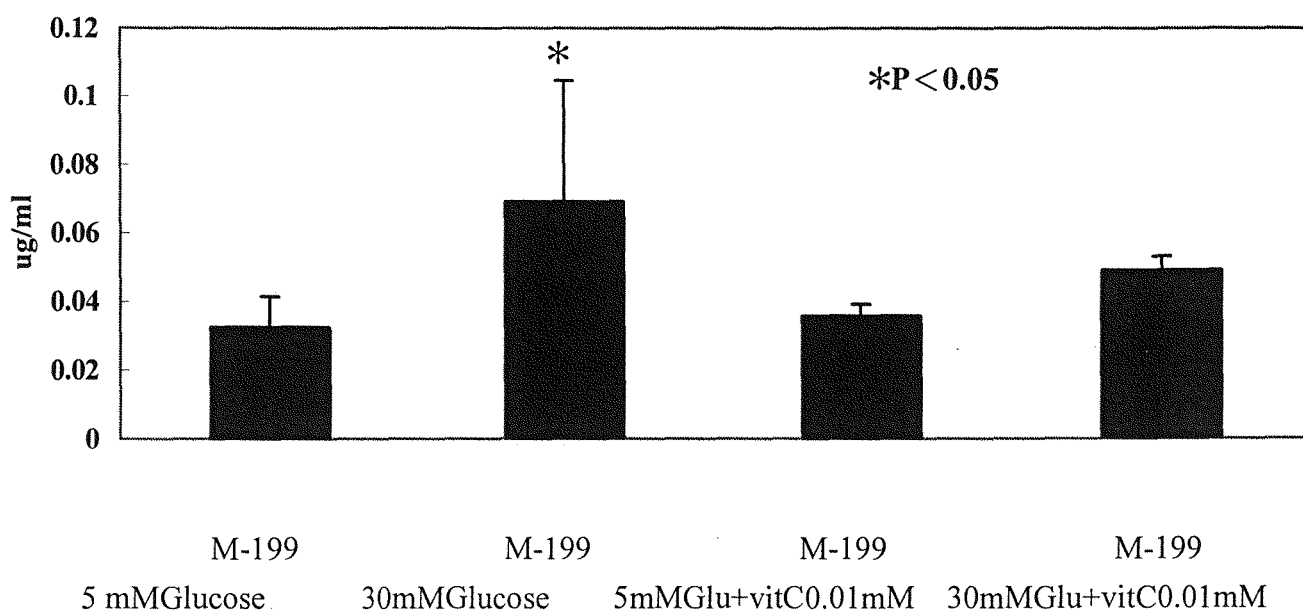
取 10^5 的內皮細胞各別培養於含 10%FCS 的 medium199 中添加 Glucose(5mM,30mM)，維生素 E(0.01mM,0.05mM)培養 72 小時後測定細胞所含蛋白質的濃度，結果以平均值± 標準誤差表示(mean± SD，n=3)。

“*” 與對照組比較具有顯著差異(p<0.05)

“+”表示有添加。

“-”表示無添加。

The Concentration of Fibronectin in endothelial cells after 72hrs cultured

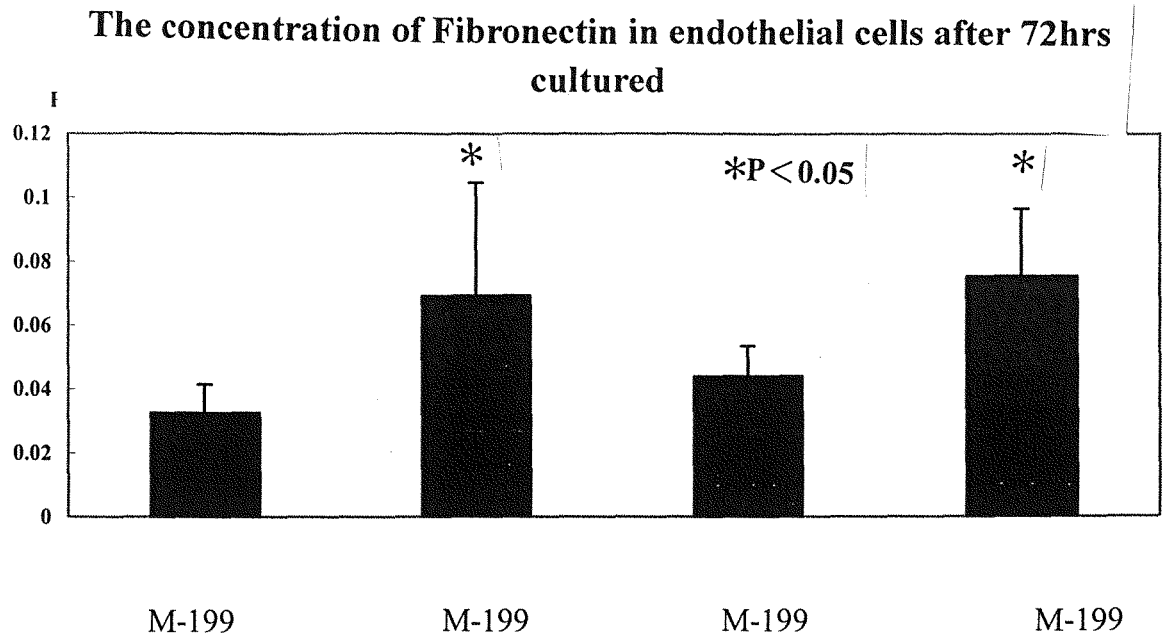


圖十四添加不同生理濃度的葡萄糖及 0.01mM 維生素 C 培養

72 小時後各組內皮細胞所含纖維網狀蛋白濃度之變化。

取 10^5 的內皮細胞各別培養於含 10%FCS 的 medium199 添加 Glucose(5mM,30mM)，維生素 C(0.01mM)培養 72 小時後測定細胞所含纖維網狀蛋白的濃度，結果以平均值±標準誤差表示(mean±SD，n=3)

“*” 與對照組比較具有顯著差異(P<0.05)。



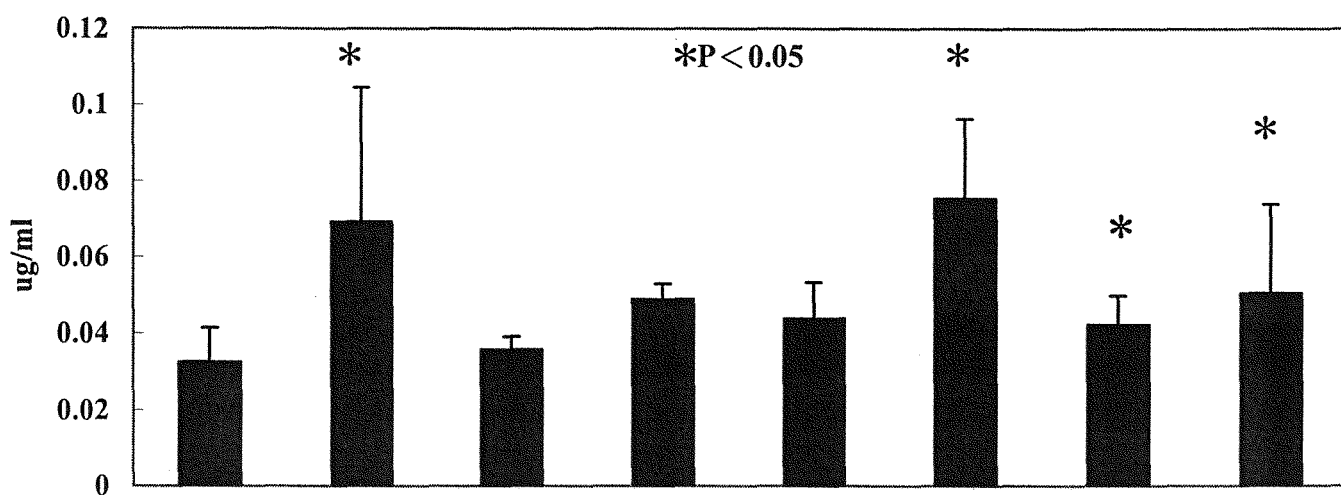
5 mM Glucose 30 mM Glucose 5 mM Glu + vitC 0.05 mM 30 mM Glu + vitC 0.05 mM

圖十五添加不同生理濃度的葡萄糖及 0.05mM 維生素 C 培養 72 小時後各組內皮細胞所含纖維網狀蛋白濃度之變化。

取 10^5 的內皮細胞各別培養於含 10%FCS 的 medium199 添加 Glucose(5mM,30mM)，維生素 C(0.05mM)培養 72 小時後測定細胞所含纖維網狀蛋白的濃度，結果以平均值±標準誤差表示(mean±SD，n=3)

“*” 與對照組比較具有顯著差異(P < 0.05)。

The Concentration of Fibronectin in endothelial cells after 72hrs cultured



5mM Glu +	-	+	-	+	-	-	-
30mM Glu -	+	-	+	-	+	-	-
VitC 0.01	-	+	+	-	-	+	-
VitC 0.05	-	-	-	+	+	-	+

圖十六添加不同生理濃度的葡萄糖及維生素 C 培養 72 小時後各組內皮細胞所含纖維網狀蛋白濃度之變化。

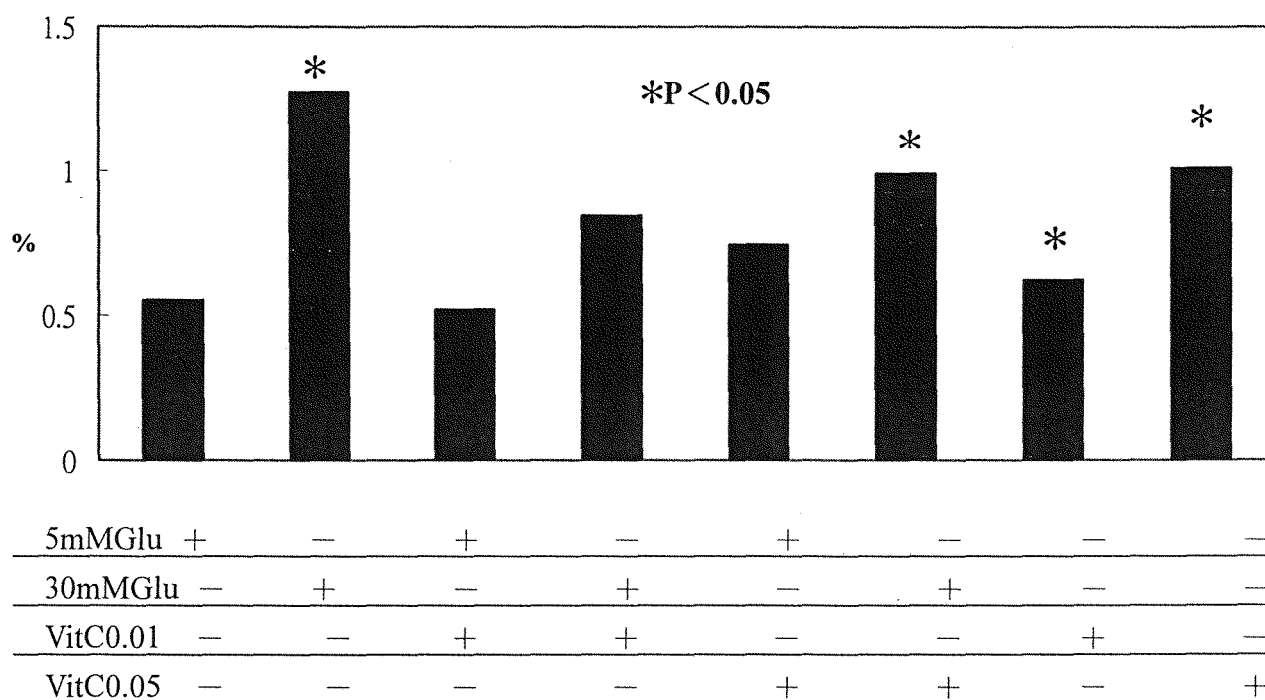
取 10^5 的細胞各別添加培養於含 10%FCS 的 medium199 中添加 Glucose(5mM,30mM)，維生素 C(0.01mM,0.05mM)培養 72 小時後測定細胞所含纖維網狀蛋白的濃度，結果以平均值±標準誤差表示(mean±SD，n=3)。

“*”與對照組比較具有顯著差異(p<0.05)。

“+”表示有添加。

“-”表示無添加。

The Concentration of Fibronectin and Total protein ratio in endothelial cells after 72hrs cultured



圖十七添加不同生理濃度的葡萄糖及維生素 C 培養 72 小時後各組內皮細胞所含纖維網狀蛋白/總蛋白質含量比值之影響。

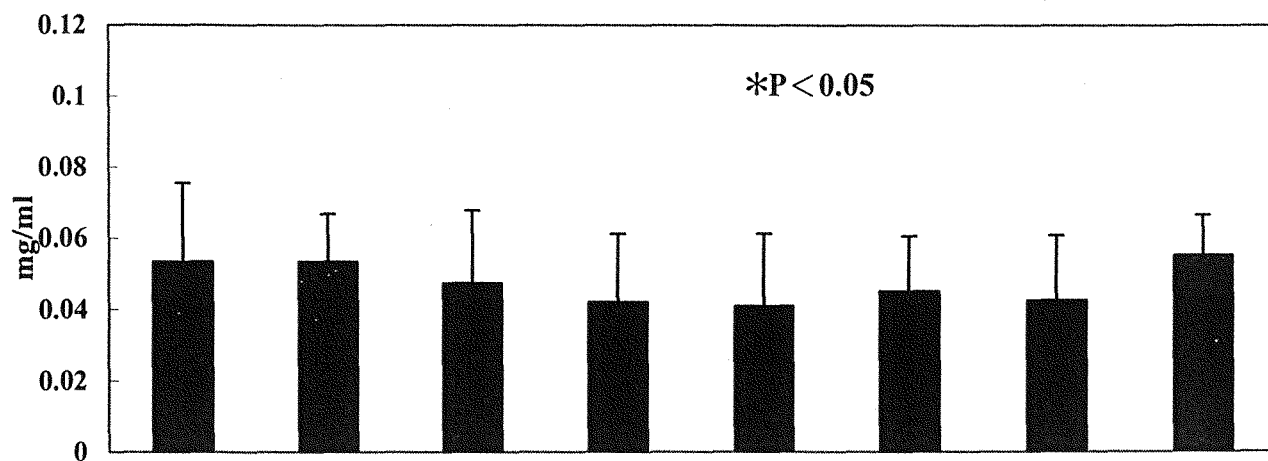
取 10^5 的內皮細胞各別培養於含 10%FCS 的 medium199 中添加 Glucose(5mM,30mM)，維生素 C(0.01m,0.05mM)培養 72 小時後測定細胞所含纖維網狀蛋白/總蛋白質含量的比值，結果以平均值 \pm 標準誤差表示(mean \pm SD，n=3)。

“*” 與對照組比較具有顯著差異(p<0.05)

“+”表示有添加。

“-”表示無添加。

The Concentration of Total prtoein in endothelial cells after 72hrs cultured



5mMGlu	+	-	+	-	+	-	-	-
30mM Glu	-	+	-	+	-	+	-	-
VitE0.01	-	-	+	+	-	-	+	-
VitE0.05	-	-	-	-	+	+	-	+

圖十八添加不同生理濃度的葡萄糖及維生素 E 培養 72 小時後各組內皮細胞所含總蛋白質濃度之變化。

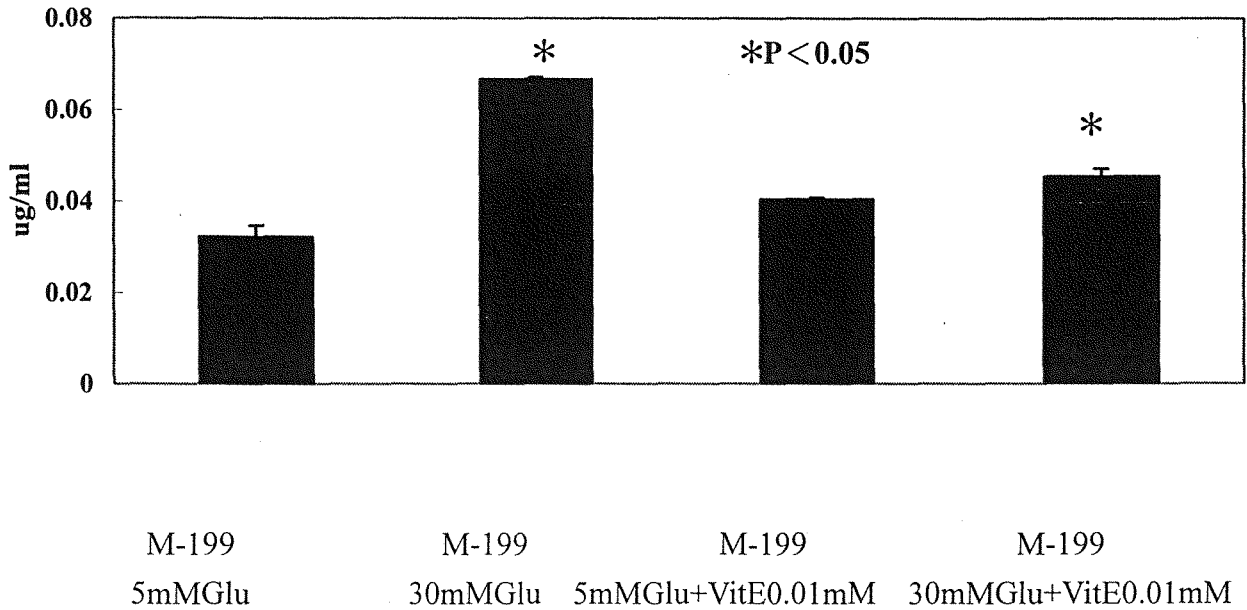
取 10^5 的內皮細胞各別培養於含 10%FCS 的 medium199 中添加 Glucose(5mM,30mM)，維生素 E(0.01mM,0.05mM)培養 72 小時後測定細胞所含蛋白質的濃度，結果以平均值± 標準誤差表示(mean± SD，n=3)。

“*” 與對照組比較具有顯著差異(p<0.05)

“+”表示有添加。

“-”表示無添加。

The Concentration of Fibronectin in endothelial cells after 72hrs cultured

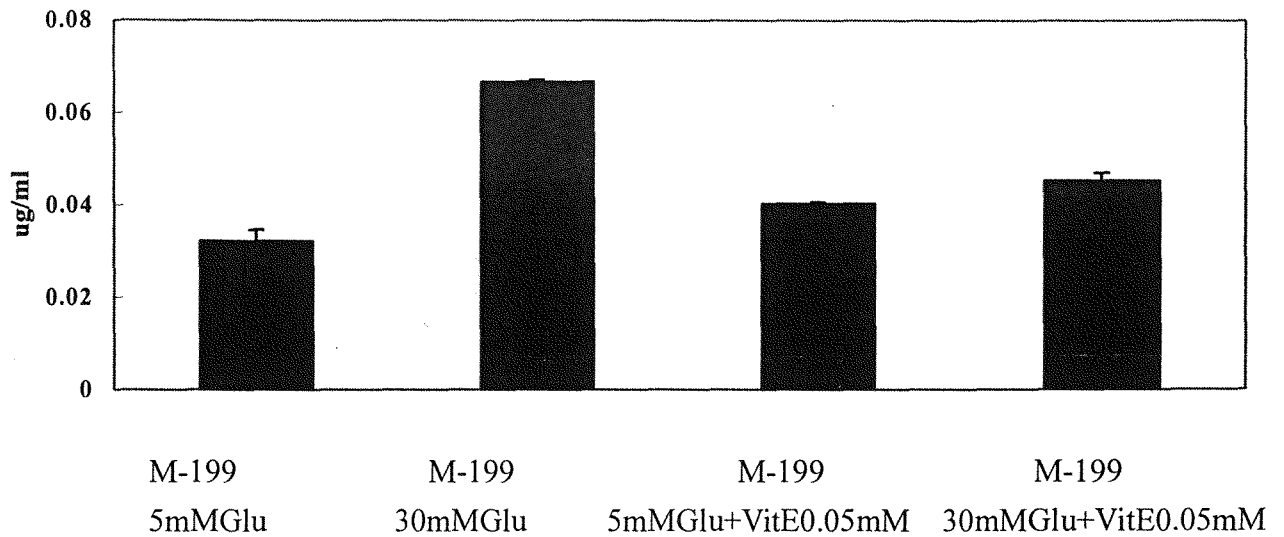


圖十九添加不同生理濃度的葡萄糖及 0.01mM 維生素 E 培養 72 小時後各組內皮細胞所含纖維網狀蛋白濃度之變化。

取 10^5 的內皮細胞各別培養於含 10%FCS 的 medium199 添加 Glucose(5mM,30mM)，維生素 E(0.01mM)培養 72 小時後測定細胞所含纖維網狀蛋白的濃度，結果以平均值±標準誤差表示(mean±SD，n=3)

“*” 與對照組比較具有顯著差異(P < 0.05)。

The Concentration of Fibronectin in endothelial cells after 72hrs cultured

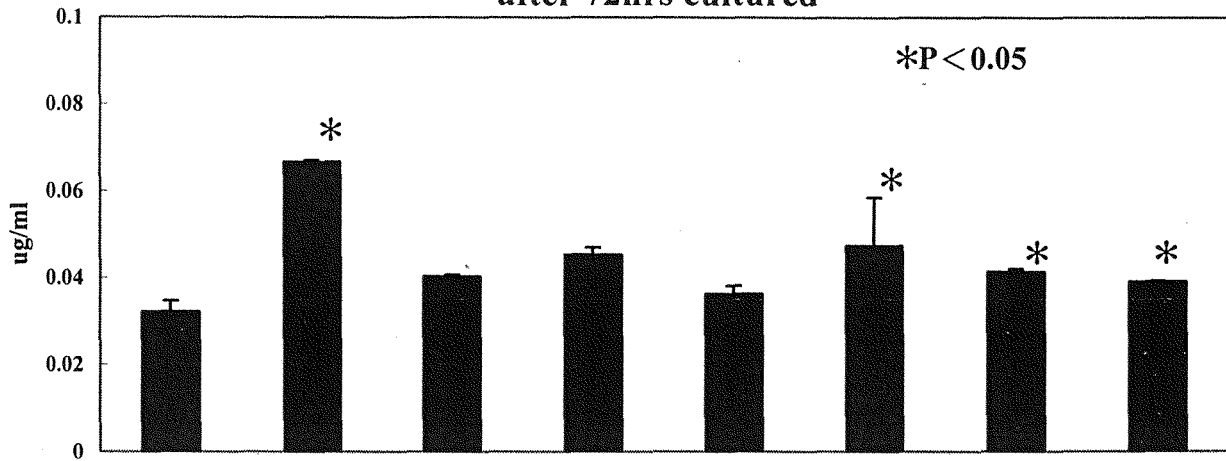


圖二十添加不同生理濃度的葡萄糖及 0.05mM 維生素 E 培養 72 小時後各組內皮細胞所含纖維網狀蛋白濃度之變化。

取 10^5 的內皮細胞各別培養於含 10%FCS 的 medium199 添加 Glucose(5mM,30mM)，維生素 E(0.05mM)培養 72 小時後測定細胞所含纖維網狀蛋白的濃度，結果以平均值±標準誤差表示(mean±SD，n=3)

“*” 與對照組比較具有顯著差異($P < 0.05$)。

The Concentration of Fibronectin in endothelial cells
after 72hrs cultured



5mMGlu	+	-	+	-	+	-	-	-
30mMGlu	-	+	-	+	-	+	-	-
VitE0.01	-	-	+	+	-	-	+	-
VitE0.05	-	-	-	-	+	+	-	+

圖二十一 添加不同生理濃度的葡萄糖及維生素E培養72小時後各組內皮細胞所含纖維網狀蛋白濃度之變化。

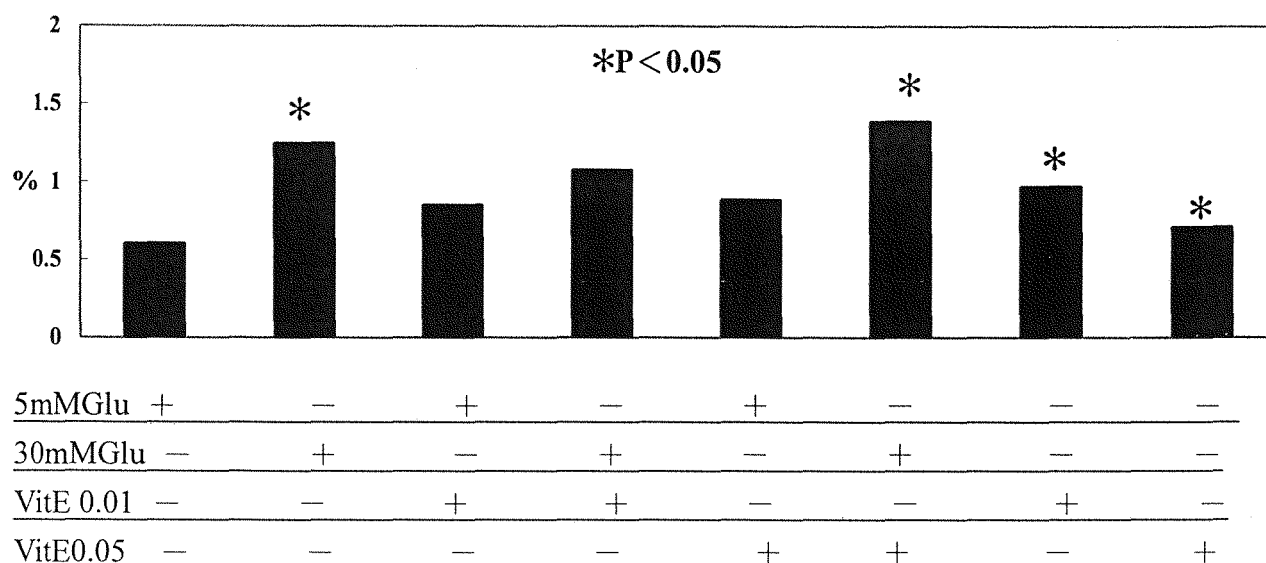
取 10^5 的細胞各別添加培養於含 10%FCS 的 medium199 中添加 Glucose(5mM,30mM)，維生素 E(0.01mM,0.05mM)培養 72 小時後測定細胞所含纖維網狀蛋白的濃度，結果以平均值±標準誤差表示(mean±SD，n=3)。

“*”與對照組比較具有顯著差異(p<0.05)。

“+”表示有添加。

“-”表示無添加。

The Concentration of Fibronectin and Total protein ratio in endothelial cells after 72 hrs cultured



圖二十二添加不同生理濃度的葡萄糖及維生素 E 培養 72 小時後各組
內皮細胞所含纖維網狀蛋白/總蛋白質含量之比值影響

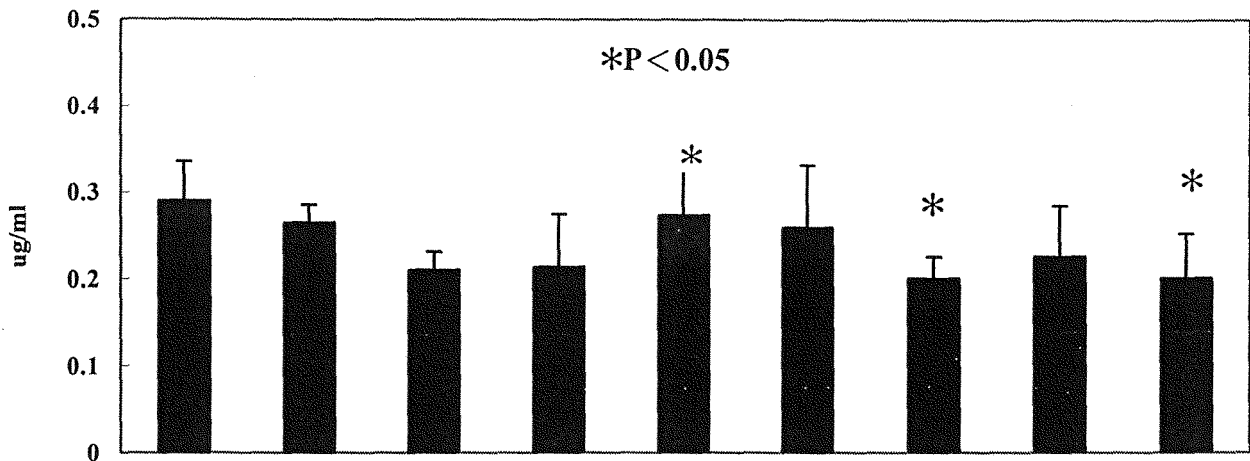
取 10^5 的內皮細胞各別培養於含 10%FCS 的 medium199 中添加 Glucose(5mM,30mM)，維生素 E 培養 72 小時後所得纖維網狀蛋白/總蛋白質含量的比值，結果以平均值± 標準誤差表示(mean± SD，n=3)。

“*” 與對照組比較具有顯著差異(p < 0.05)

“+”表示有添加。

“-”表示無添加。

**The Concentration of Fibronectin in endothelial cells after
72hrs cultured**



5mM Glu	-	-	-	+	-	+	-	+	-
30mM Glu	-	-	-	-	+	-	+	-	+
VitC 0.01	+	+	-	+	+	+	+	-	-
VitC 0.05	-	-	+	-	-	-	-	+	+
VitE 0.01	+	-	+	+	+	-	-	+	+
VitE 0.05	-	+	-	-	-	+	+	-	-

圖二十三在不同生理濃度的葡萄糖中，共同添加維生素 C 與維生素 E(0.01, 0.05mM)培養 72 小時後各組內皮細胞所含總蛋白質濃度之變化。

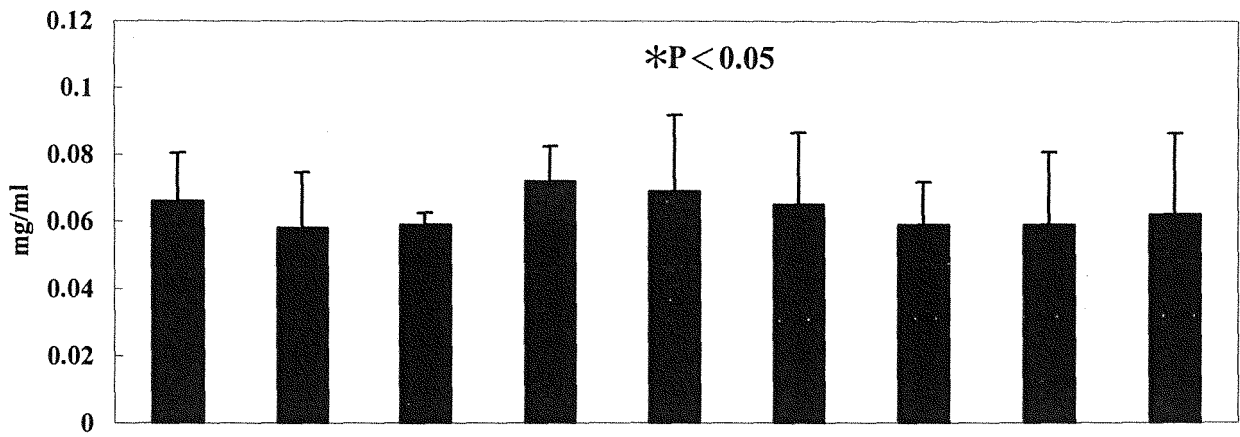
取 10^5 內皮細胞各別培養於含高生理濃度(30mM)及正常生理濃度(5mM)的葡萄糖中，共同添加維生素 C(0.01mM, 0.05mM)及維生素 E(0.01mM, 0.05mM)，培養 72 小時後測定細胞所含蛋白質的濃度。結果以平均值±標準誤差表示(mean ± SD, n=3)。

“*”與對照組比較具有顯著差異性(p < 0.05)。

“+”表示有添加。

“-”表示無添加。

**The Concentration of Total protein in endothelial cells after
72hrs cultured**



5mMGlu	-	-	-	+	-	+	-	+	-
30mMGlu	-	-	-	-	+	-	+	-	+
VitC0.01	+	+	-	+	+	+	+	-	-
VitC0.05	-	-	+	-	-	-	-	+	+
VitE0.01	+	-	+	+	+	-	-	+	+
VitE0.05	-	+	-	-	-	+	+	-	-

圖二十四在不同生理濃度的葡萄糖中，共同添加維生素 C 與維生素 E(0.01,0.05mM)培養 72 小時後各組內皮細胞所含總蛋白質濃度之變化。

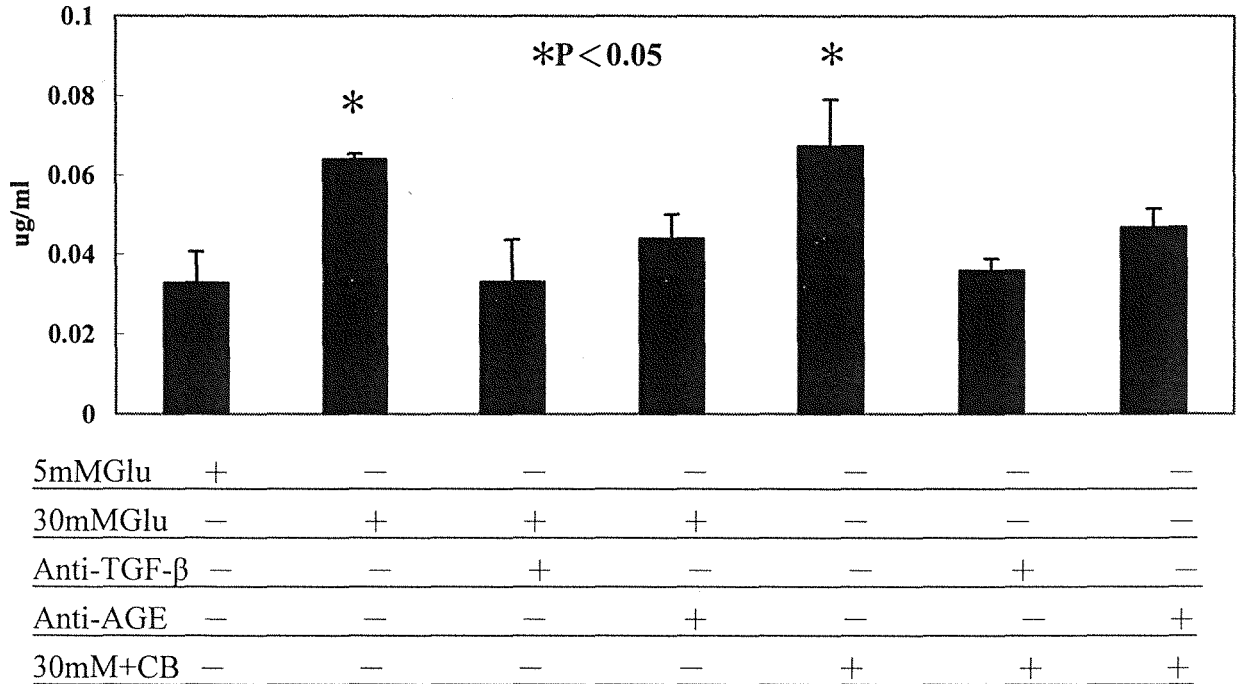
取 10^5 內皮細胞各別培養於含高生理濃度(30mM)及正常生理濃度(5mM)的葡萄糖中，共同添加維生素 C(0.01mM,0.05mM)及維生素 E(0.01mM,0.05mM)，培養 72 小時後測定細胞所含蛋白質的濃度。結果以平均值±標準誤差表示(mean ± SD, n=3)。

“*”與對照組比較具有顯著差異性(p<0.05)。

“+”表示有添加。

“-”表示無添加。

The Concentration of Fibronectin in endothelial cells after 72hrs cultured



圖二十五 TGF- β 抗體與 AGE 抗體，添加於不同生理濃度葡萄糖存在之下，培養 72 小時各組內皮細胞所含纖維網狀蛋白質濃度之變化。

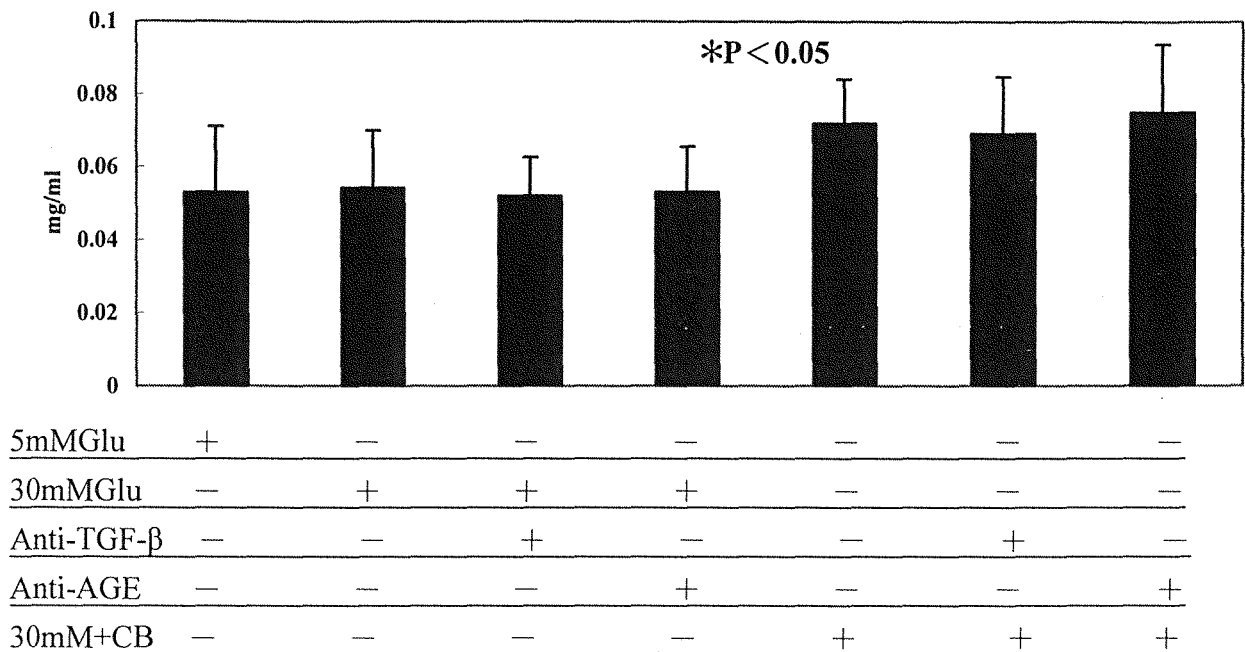
取 10^5 的內皮細胞各別培養於 TGF- β 抗體與 AGE 抗體存在的不同生理濃度葡萄糖之下，培養 72 小時後測定細胞所含纖維網狀蛋白質濃度。結果以平均值 \pm 標準誤差表示(mean \pm SD, n=3)。

“*”與對照組比較具有顯著差異性(p < 0.05)。

“+”表示有添加。

“-”表示無添加。

The Concentration of Total protein in endothelial cells after 72hrs cultured



圖二十六 TGF- β 抗體與 AGE 抗體，添加於不同生理濃度葡萄糖存在之下，培養 72 小時各組內皮細胞所含總蛋白質濃度之變化。

取 10^5 的內皮細胞各別培養於 TGF- β 抗體與 AGE 抗體存在的不同生理濃度葡萄糖之下，培養 72 小時後測定細胞所含蛋白質濃度。結果以平均值 \pm 標準誤差表示(mean \pm SD, n=3)。

“*”與對照組比較具有顯著差異性(p < 0.05)。

“+”表示有添加。

“-”表示無添加。

組別	Total Protein (mg/ml) Average \pm SD
M-199+10% FCS	0.0970 \pm 0.0527 ^a
	0.0701 \pm 0.0104 ^a
	0.1126 \pm 0.0050 ^a
	0.0726 \pm 0.0110 ^a
M-199+10%FCS+5mMGlucose)	0.0750 \pm 0.0180 ^a
	0.0733 \pm 0.0702 ^a
	0.1180 \pm 0.0131 ^a
	0.0890 \pm 0.0055 ^a
M-199+10%FCS+30mMGlucose)	0.0851 \pm 0.0170 ^a
	0.0740 \pm 0.0100 ^a
	0.0963 \pm 0.0101 ^a
	0.0816 \pm 0.0200 ^a

“a”:代表各組之間與對照組間並無顯著差異

表一、不同生理濃度之葡萄糖添加於 10%FCS 培養液中，培養 72

小時其內皮細胞中總蛋白質含量之變化。

組別	Total Protein (mg/ml) Average \pm SD
M-199+5%FCS	0.0390 \pm 0.0066 ^a
	0.0373 \pm 0.0066 ^a
	0.0320 \pm 0.0064 ^a
	0.0300 \pm 0.0072 ^a
M-199+5%FCS+5mMGlucose	0.0393 \pm 0.0047 ^a
	0.0346 \pm 0.0041 ^a
	0.0360 \pm 0.0061 ^a
	0.0306 \pm 0.0045 ^a
M-199+5%FCS+30mMGlucose	0.0173 \pm 0.0020 ^a
	0.0240 \pm 0.0111 ^a
	0.0270 \pm 0.0065 ^a
	0.0230 \pm 0.0056 ^a

“a”:代表各組之間與對照組間並無顯著差異

表二、不同生理濃度之葡萄糖添加於 5%FCS 培養液中，培養 72

小時其內皮細胞中總蛋白質含量之變化。

組別	Fibronectin (ug/ml) Average \pm SD
M-199+10%FCS	0.0993 \pm 0.0144 ^a
	0.0556 \pm 0.0107 ^a
	0.0443 \pm 0.0118 ^a
	0.1114 \pm 0.0456 ^a
M-199+10%FCS+5mMGlucose	0.0883 \pm 0.0114 ^a
	0.0413 \pm 0.0157 ^a
	0.0569 \pm 0.0157 ^a
	0.1165 \pm 0.0285 ^a
M-199+10%FCS+30mMGlucose	0.1220 \pm 0.0081 ^b
	0.0605 \pm 0.0269 ^b
	0.0856 \pm 0.0171 ^b
	0.1647 \pm 0.1036 ^b

“a”:與對照組無顯著差異

“b”:與對照組具顯著差異

表三、不同生理濃度之葡萄糖添加於 10%FCS 培養液中，培養 72

小時其內皮細胞中纖維網狀蛋白含量之變化。

第五章 參考文獻

1. Freshney, R. I., (editor)(1983) The Endothelial cell-A pluripotent control cell of the Vessel wall Karger. Scotland 42:245-260
2. Shibuya, T.(editor)(1931) On the pure Cultivation of Endothelial cell from Aorta and Their Differentiation. Kitasato Arch. Exp. Med. 9: 68-88
3. Fujita, T., Tanaka, K., Tokunaga, T. (1981) SEM Atlas of Cells and Tissues. Igaku- Shoin. 46-53
4. Edanaga, M.(editor)(1974) A Scanning Electron Microscope study on the Endothelium of The Vessels. I. Fine structure of The Endothelial surface of Aorta and some other Arteries in Normal Rabbits. Arch. Histol. Jap .37 :1-14
5. Dolark, J. M., Priestley, J. V., (1992) Electron Microscopic immunocytochemistry. Oxford Science Publication. 24
6. Zern, A., Lola, M.(1993) Extracellular matrix:Chemical,biology and pathology. New York Dekker 30:154-156
7. Engvall, E., Rouslahti, E. (1977) Regularory functions of the vascular endothelium Int. J. Cancer 20:1-5
8. Bowman, P. O., Goldstein, G. W., (1983)Glomerular basement membrane metabolism in the diabetic rat Ann. Neurol.14:396-402
9. Robert, K. Murrat Daryl K. Granner Peter A. Mayes Victor W. Rodwell(editor).Plasma protein, immunoglobulins&Blood coagulation. (Twenty-fourth edition). Harper's Biochemistry Chaper 59 p. 723
10. Kyrtg, D. H., Srur, G. Weta, K. S. Zedt, A. M.(editor)(1997) Microvascular function and haemodynamic disturbanced in diabetes mellitud and its complications. Diabetic Chaper 43. 43.3 43.2
11. Kyrtg, D. H., Srur, G. Weta, K. S. Zedt, A. M. (editor)(1997) Microvascular function and haemodynamic disturbanced in diabetes mellitud and its complications. Diabetic Chaper 43. 43.8.43.9
12. Warren, J.B.(editor)(1990)The endothelium :An introduction to current research. Wiley-Liss 119-128
13. Kyrtg, D. H., Srur, G. Weta, K. S. Zedt, A. M.(editor)(1997) Microvascular function and haemodynamic disturbanced in diabetes mellitud and its complications. Diabetic Chaper42. 42.9
14. Qsterby, R.(editor)(1983)Basement membrane morpholgh in diabetes mellitus. In Diabetes mellitus, Theory and Practice: 3rd Edition. M. Ellenberg and H. Rifkin, editors. Medical Examination Publishing Co, New Hyde Park, NY.323-341

15. West. K.M., L. J. Erdreich, and J. A. Stober.(1980). A detailed study of risk factor for retinopathy and nephropathy in diabetes. *Diabetes*.29:501-508
16. Weber, B. W. Burger, R. Hartmann, G. Hovener, R. Malchus, and V. Oberdisse. (1986)Risk factors for the development of retinopathy in children and adolescents with type I (Insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*.29:23-29
17. Nathan, D. M., D. E. Singer, J. E. Godine, C. Hodgson Harrington, and L. C. Perlmuter, (1986) Retinopathy in older type II diabetics Association with Glucose control, *Diabetes*.35:797-801
18. Enrico Cagliero, Michele Maiello, Daria Boeri, Sayon Roy, and Mara Lorenzi, (1988) Increased Expression of Basement Membrane Components in Human Endothelial cells Cultured in High Glucose, *J. Clin. Invest*, Volume82, August.735-738
19. Lorenzi, M., E. Cagliero, and S. Toledo.(1985) Glucose toxicity for human Endothelial cells in culture. *Diabetes*.34: 624-627
20. Lorenzi , M ., J . A . Nordberg , and S . Toledo . 1987. High glucose prolongs cell cycle traversal of cultured human endothelial cells . *Diabeties* , 36: 1261-1267
21. Lorenzi, M., D. F. Montisano, S. Toledo, and A. Barrieux.(1986)High glucose induces DNA damage in cultured human endothelial cells. *J. Clin Invest*.77:322-325
22. Lee, T. S., Saltsman, K. A., Ohashi, H., and king, G. L.(1989)The effects of elevated glucose concentration on cultured bovine retinal endothelial (BRE)cells *Proc. Natl.Acad, Sci. U.S.A*.86,5141-5145
23. Tamkun, J.W., Schwarzbauer, R. O., Hynes, R. O.,(1988)Early signals in the mitogenic response *Proc.Natl.Acad.U.S.A* .81:5104-5144
24. Engerman, R.L., (1967) Cell turnover of capillaries *Lab Invest* 17: 738-43
25. Steffes, M. W., sterby, R., Chavers, B., and Mauer, S. M.(1985)Studies of kindey and muscle biopsy specimens from identical twins discordent for Type-I diabetes mellitus *Diabetes* 36 :735-763
26. Cohen, M. P., Surma, M. L., and Wu, V. Y.(1987) Fibronectin, binding to glomerular basement membrane is altered in diabetes *Am. J. Physiol.* 242, F385-389
27. Poulsom, R., KurKinen, M., Prockop, D. J., and Boot-Hand ford, R. P. (1988) Immunofluorescent localization of fibronectin in the human kidney *J. Biol. Chem*.263, 10072-10076

28. Roy, S., Sala, R., Cagliero, E., and Lorenzi, M. (1990) Collagen metabolism in the retina of normal and diabetic rats *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 404-408
29. Enrico Cagliero, Timothy Roth, Sayon Roy, Michele Maiello, and Mara Lorenzi (1991) Polyantigenic expansion of basement membrane constituents in diabetic nephropathy *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 266, No. 22, Issue of August 5, 14244-14250
30. Kimura, T. (editor) (1974) Ultrastructure of capillaries in human diabetic retinopathy. *Jap. J. Ophthalmol.* 18:403-417
31. Dologov, V. V., O. E. Zaikina, M. F. Bondarenko, and V. S. Repin. (1982). Aortic endothelium of alloxan diabetic rabbits *Diabetic rabbits. Diabetologia* 22:338-343
32. Nishimura, F., Takahashi, K., Kurihara, M., (1993) Integrin overexpression induced by high glucose and by human diabetes: potential pathway to cell dysfunction in diabetic microangiopathy *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Dec. 15. 90(20):9640-4
33. Afieer, E. T. zerta, C. H. quret, T.W. (1996) Fibronectin overexpression in retinal microvessels of patients with diabetes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 37(2):258-66
34. Hynes R. O. (editor) (1990) Structure of Fibronectin Chapter 1. p15-17
35. Gimbrone, M. A. (1988) *Vascular Endothelium in Hemostasis and Thrombosis* Churchill Livingstone Inc. 209
36. Ruoslahti, E. (editor) (1988) Fibronectin and its receptor *Ann. Rev. Biochem.* 57: 375-413
37. Ruoslahti, E., Ehgrall, E. et. al (1981) Fibronectin: current concept of its structure and function collagen *Biochem.* 193:295-299
38. Hynes, R.O. (editor) (1990) Distribution of Fibronectins in vivo *Fibronectin* chapter 3 .p24-28
39. Homandberg, G. A., Erickson, J. W. (1986) Identification of a third of cell-specific alternative splicing in human fibronectin mRNA *Biochemistry* 25:6917-6925
40. Yamada, K. M., Kennedy, D. W. (1979) Quantitation of a transformation-sensitive, adhesive cell surface glycoprotein. *J. Cell Biol.* 80:492-498
41. Wayner, T.E., Skorstengaard, K. (editor) (1985) In *Hematology* ed. Mc Donagh, New York : Dekker J.5:7-30
42. Peterson, T.E., Skorstengaard K. (editor) (1985) Partial primary structure of bovine plasma In *Hematology.* ed. Mc Donagh New York .: Dekker J.5:7-30
43. Khyse-Andersen J. (1984) Cloning and analysis of the promoter region of the



human fibronectin gene *J.Biochem.Biophys.*10:203

44. Hynes, R. O.(editor)(1987)Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* .48:549-554
45. Mc Donald, J. A. (1988)Establishment of a human medulloblastoma cell line *Int. J. cancer* 20:206-212 *Ann. Rev. Cell. Biol.*4:183-207
46. Hynes,R.O.(editor)(1990)Structure of fibrinectin-fragmentation and location of binding site *Fibronectin* Chapter 6. p117-119
47. Kjellen, L., Lindahl, U. (1991) A difference between plasma and cellular fibronectins located with monoclonal antibodies *Ann. Rev. Cell. Biol.* 4 :183-207
48. Hynes, R. O., yamada, K. M.,(1982) *Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins . J . Cell. Biol.* 95:369-377
49. Ejim, O. S., Borradas, M. A., (1989) *Microcirculation, Endothelium & Lymphatics* 5(6):373-390
50. Hynes,R.O.(editor)(1990)Structure of fibronectin-fragmentation and location of binding site *Fibronectin* Chapter 6,p122-123
51. Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (editor)(1990) *Molecular Cell Biology* 2nd ed, W, H. Freeman and company, New York 903-938
52. Drummend, J.C. (1920) The Nomenclature of The So-Called Accessory Food Factors(Vitamins). *Biochem. J.* 14: 660
53. Szent-Gyorgyi. A,(1928) Observations on The function of the peroxidase system and The Chemistry of the Adrenal Cortex Description of A new Carbohydrate Dervivative. *Biochem. J.*22:1389-409
54. King, C. G. & Waugh. W. A.(1993)The Chemical nature of vitamin C. *Science* 75:375-8
55. Paul. A. S., Sert, M. T.,(editor)(1982) *Ascorbic acid: Chemistry Metabolism and Uses*, American Chemical Society, Washington D.C
56. Robinson. C. H., lowler, M. R., Chenoweth, W. L., Garwick, A. E.,(editor) (1989) *Normal and Therapeutic nutrition*,7th ed. *The Water Soluble vitamins: Ascorbic acid*.p172-177
57. Marx, J, M., Stiekema, J.(1982)Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid *Eun, J.Clin.pharmacol.*23: 355-308
58. Murray, R. K., Grannor, D. K., Mayes, D. A., Rodwell, V.W.,(editor)(1988) *Happer's Biochemistry.* 21th ed p312-317
59. Diliberto, E. J., Knoth, F. S.(1987)stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts A role for lipid peroxidation *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 498:28-52
60. Food and nutrition board: *Recommended Dietary Allowances* 9th ed. (1989)

- National Academy of Sciences-National Research Council, Washington D.C.
61. Chatterjee, I. B., Majumder, A.K., Nandi, B. K., & subramanian, N. (1975) Synthesis and some Major function of Vitamin C in Animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 258:24-47
 62. Sato, P., & Udenfriend, S. (1978) Studies on Ascorbic acid Resulated to The Genetic Basis of scury. *Horm.*36:33-52
 63. Sato, P., Roth, L. A. &Walson, D.M.,(1986) Ascorbated induction of collagen synthesis as a meana for elucidating a mechanism for quantitation control of tissue-specific function *Biochem. Med.. Biol.* 35:59-64
 64. Carpenter, K.J., (1986) *The History Scurvy and Vitamin C* Cambridge University Press. Cambridge 25:129-456
 65. Anderson, R.(1984) Dependent of the differentiated state on the cellular environment: modulation of collage synthesis in tendon cells . *Adv. Nutr. Res.* 6:19-45
 66. Wittes, R. E .(1985) collagen gene is evolutionary related to the major fibrillar-forming collagens *N. Engl. J. Med.* 316:178-79
 67. Schmidt, K. H., Steinhilber, Diet al. (1988) A specific decrease in collagen synthesis in acutely fasted , vitamin C- supplemented , guinea pig . *Int. Arch. Allergy. Apple Immuno.*85:441-45
 68. Block G.(1991)The stimulation of collagen secretion by ascorbate as a result of increase proline hydroxylation in chick embryo fibroblasts . *Am.J.Clin. Nutr.* 53:2705-825
 69. Fennema, D. H., fieff, E. M.,(1983) selection inhibition of collagen synthesis by the Ca^{2+} ionophore A 23187 in cultured human fibroblasts *J. Cell. Bio.*56:118-234
 70. Burton, G. W., and Traber, M.G.,(1990) Vitamin E: antioxidant activily biokinetics, and bioavailability, *Annu. Rev. Natr.* 10:257-382
 71. Kuo, J. H., chen, H. W., chou, R. C., R. and Lii, C.K.,(1979)Vitamin E protection of cell morphology under oxidative stress is related to cytoskeletal proteins in rat Hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 71:231-237
 72. Wang, S. T., Kuo, J. H., Chou, R. G. R. and Lii, C. K. (1996) VitaminE protection of cell morphology and protein thiols in rat hepatocytes treated with tert-butyl hydroperoxide, *Lett.*89:97-98
 73. Pascoe, G. A., and Reed., D. J (1987)Relationship between cellular calcium and vitamin E metabolism during protection against cell injury. *Arch. Biochem. Biophys* 253:287-296
 74. Takenaka, Y., Miki, M., Yasuda, H. and Mino M.(1991) The effect of α -tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols

- induced by free radicals generated in different systems. Arch. Biochem. Biophys. 285:344-350
75. Kornbrust, D. J., and Mavis, R. O. (1980) Relative susceptibility of microsomes from lung, heart liver, kidney brain and testes to lipid peroxidation: correlation with Vitamin E content Lipids 18:315-322
 76. Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H. and Gotoh, N. (1995) Interaction among vitamin C, Vitamin E, and β -Carotene. Am. J. Clin. Nutr. 62(suppl.):1322s-1326s
 77. Leedle, R. A., and Aust, S. D., (1990) The effect of glutathione on the Vitamin E requirement for inhibition of liver microsomal lipid peroxidation. Lipids 25:241-245
 78. Maiorino, M., Coassin, M., Rover, A., and Ursini, F. (1989) Microsomal lipid peroxidation: effect of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase Lipids 24:721-726
 79. Maguire, J. J., Wilson, D. S., and Packer, L. (1989) Mitochondrial electron transport-linked tocopheroxyl radical reduction. J. Biol. Chem. 264:21462-21465
 80. Maguire, J. J., Kagan, V., Ackrell, B. A. C., Serbinova, E. and Packer, L. (1992) Succinate ubiquinone reductase linked recycling of α -tocopherol in reconstituted system and mitochondria-requirement for reduced ubiquinone. Arch. Biochem. Biophys. 292:47-53
 81. Burton, G. W., and Ingold, F. U., (1986) Vitamin E: Application of the principle of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. Acc. Chem. Res. 19:194-201
 82. Liebler, D. C., Kaysen, K. L., and Kennedy, T. A., (1989) Redox cycles of Vitamin E: hydrolysis and ascorbic acid dependent reduction of 8 α -(alkyldioxy) tocopherones. Biochem. 28:9772-9777
 83. Burkart, V., Groß-Eick, A., Bellmann, K., Radons, J. and Kolb, H. (1995) suppression of nitric oxide toxicity in islet cells by α -tocopherol. Febs Lett. 364:259-263
 84. Glascott, P. A., Gilford, E. and Farber, J. L., (1992) Effect of Vitamin E on the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. Mol. Pharmacol. 41:1155-1162
 85. Mikkelsen, L., Hansen, H. S., Grønnet, N. and Dich, J., (1994) Cytoprotective effect of tocopherols in hepatocytes cultured with polyunsaturated fatty acid. Lipids 29:369-372
 86. Niki, E. (1991) Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. Am. J. Clin. Nutr. 54:1119s-1124s
 87. Peterkofsky, B., and Udenfriend, S. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.

A.53.335-342

88. Kivirikko, K. L., and Prockop, D. J. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 57,782-789
89. Mario Chojkier, Karl Hovglum, Joes Solis-Herruzo, ad David A. Brenner (1989) Stimulation of Cllagen Gene Expression by Ascorbic acid 23.568-72
90. Haberland, M. E., Fong, D., and Cheng, L. (1988) Role of procollagen mRNA levels in controlling the rate of procollagen synthesis Science 241, 215-218
Aner, F.A., Nasc, T. M.,
91. Karl P Hougglum , David A Brenner , and Mariochoikier (1991) Ascorbic acid stimulation of collage biosynthesis independent of hydroxylation 12.54-62
92. Anes, B. N., Cathcart, R., Schoiers, E., and Hochstein P. (1981) Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblasts by microtubular disruptive drug Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57.782-789
93. Granger, N. D., Hernandez, L. A., and Grishman, M. B. (1986) Dig. Dis. 18, 13-16
94. Lyons, R.M., and H. L. Moses. 1990 Transforming growth factor- β and regulation of cell proliferation. Eur. J. Biochem 187(3):467-473
95. Ozanne, B., Fulton, R. J., and Kaplan, P. L. (1980) Transforming growth factor-beta J. Cell. Physiot. 105, 163-180
96. Thorburg, W., Matrisian, L., Magun, B., Koldovsky, O. (1984) Gastrointestinal Absorption of epidermal growth factor in sucklong rate. Am. J. physiol 246:G80-85
97. Tucker, R.F., Brarium, E. L., Shipley, G. D., Ryan, R. J., and Moses, H. L. (1984) Specific binding to culture cell of 125 -I labeled transforming growth factor-type beta form human platelets. Proc. Natl. Sci. U. S. A. 81, 6757-6761
98. De Larco, J. E., and Todaro, G. J. (1978) Human trabsforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in tumor cell lines Proc. Natl. Sci. U. S. A. 75, 4001-4005
99. Sporn, M.B., Roberts, A. B., shall, J.H., Smith, J M., Ward, J.M., and sodek, J. (1983) Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kindey . biochemistry Science 219, 1329-1331
100. Overall, C., J.L. Wrana, and J.sodek. 1989. Independent regulation of collageaes, 72Kda progelatinase, and metalloendo proteinase inhibitor (TIMP) expression in human fibroblast by transforming growth factor- β . J. Biol. Chem. 204:1860-1869
101. Pongor, S., Ulrich, P.C., Bencsath, F.A., and Cerami A (1984) Aging of proteins : isolation and identification of a fluorescent chromophore form the reaction of polypeptides with glucose Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 2684-2688

102. Njoroge, F.G., Sayre, L.M., and Monnier. U. M (1987) Endocytosis and recycling of the fibronectin receptor in CHO cells. *Carbohydr. Res.* 167, 211-220
103. Farmar, J., Ulrich, P., and Cerami. A., (1988) structure and properties of the cellular receptor for transforming growth factor type beta *J. Org. Chem.* 53, 23465-2349
104. Ahmed, M. U., Thorpe. S. P., and Baynes. J.W. (1986) Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- β . Cocomitant regulation of integrins that share a common $\beta 1$ subunit *J. Biol. Chem.* 261.4889-4894
105. Sell, D. R., and Monnier, V.M., (1989) End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose- derived crosslink from aging human collagen. *J. Biol. Chem.* 264, 21597-21602
106. Takata, Y. Horiuchi, S., Araki, M., Shiga, M., Saitoh, M., and Morino, Y (1988) Ultrastructural localisation of the erythrocyte/ HepG2-type glucose transporter (GLUT-1) in cell of the blood retinal barrier *J. Biochem. Biophys. acta* 988, 18-26
107. Takata, Y. Horiuchi, S., Araki, M., Shiga, M., Saitoh, M., and Morino, Y (1988) Ultrastructural localisation of the erythrocyte/ Hep2G-type glucose transporter (GLUT-1) in the ciliary body and iris of the rat eye *J. Biol. Chem.* 263, 14819-14825
108. Vlassara, H., Brownlee, M., and Cerami, A. (1984) Accumulation of diabetic rat peripheral nerve myelin by macrophages increases with the presence of Advanced glycosylation end- products. *J. EXP. Med.* 160, 197-207
109. Vlassara, H., Brownlee, M., and Cerami, A. (1985) High-affinity receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules *Proc. Natl. Acad Sci U.S.A* 82.5588-8895
110. Zhi Yang, Zenji Makita, Yasuhiro Horii, Sharon Brunelle, Anthony Cerami, Prabodh ehaipal (1991): Two Novel Rat liver Membrane proteins that bind Advanced Glycosylation Endoproducs: Relationship to Macrophage Receptor for Glucose-Modified proteins. *J EXP. Med.* Volume 174, 515-524
111. Esposito, C., H. Gerlach, J. Brett, D. Stern, and H. Vlassara. 1989 endothelial receptor-mediated binding of glucose -modified albumin is associated with increase monmlayer permeability and modulation of xell surface coagukation properties. *J. Exp. Med.* 170: 1387
112. Skolnik, E., Z. Yang, Z. Makita, S Radoff. 1991, Human and rat mesangial cell receptors for glucose-medified protein: potential role in kidney tissueremodelling and diabetic nephropathy *J. Exp. Ned. In. Press.* 5.43-56

113. Jaffe, E. M., Nachman, R. L., Becker, C. R., (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* 52:2745-2756
114. Gimbrone, M. A., (1976) Culture of Vascular endothelium. *Prog. Hemostasis Throm.* 3:296-377
115. 陳志泰 Effect of addition of vitamin C on the concentration of fibronectin of cultured endothelial cells. 中山醫學院營養科學研究所 1995 年畢業論文 15-22
116. Weibel, O., Palade, G. E., (1964) Human Umbilical Vein Endothelial Cell. *J. Cell. Biol.* 23:101
117. Maciag, T., Fadish, J., Wilkins, L., Weinstein, R., (1982) Organizational Behavior of human umbilical vein endothelial cell. *J. Cell. Bio.* 94:511-520
118. Comolly, D. T., Knight, M. B., Feder, J., (1986) 152:136-140
119. Valler, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A., (1988) The enzyme linked immunosorbent assay. *Elowline Press* 1-125
120. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., (1955) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
121. Nimmer, D., G. Bergtrom, H. Hirano. 1987 Regulation of plasma fibronectin biosynthesis by glucocorticoids in chick hepatocyte cultures *J. Biol. Chem.* 261 :10369-10375
122. Sporn, M. B., A.A. Roberts (1986) Transforming growth factor- β : biological function and chemical structure *Science (Wash DC)* 233,532-534
123. Ignatz, R., A., T Endo and J Massague (1987). Regulation of Fibronectin and Type I collagen mRNA level by transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* 262:6443-6446
124. Cheifetz, S., B. Like and J Massague (1986) Cellular distribution of Type I and Type-II and Type-II receptors for transforming growth factor. *J. Biol. Chem.* 261:9972-9979
125. Alessandro Casini, Renata Salzano, (1994) Regulation of undulin synthesis and gene expression by TGF- β and Acetaldehyde comparison with fibronectin *biochemical and biophysical* Vol 2:1019-1025
126. Zenji makita M.D., Steven Radoff, PH.D. (1991) Advanced Glycosylation End products in Patients with Diabetic Nephropathy. 23,45-71
127. Kirstein, N., Aston, C., Hinz, R., & Vlassara, H. (1992) Normal human monocytes express insulin-like growth factor I (IGF-I) in response to matrix glycation: Role in tissue remodeling *J. Clin. Invest.* 23.156-58
128. Vlassara, H., Brownelee, M., Manogue, K. R., Dinarello, C. A. & Pasagian, A. (1988) Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in

normal tissue remodeling .Science .240,1546-1548

129. Kirstein, M., Brett, J., Radoff, S., Ogawa, S., Stern, D. & Vlassara, H. (1990). Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A 87:9010-9014
130. Mario Chojkior, Farl Houglum, Jose solis-Herruzo and David A Brenner (1989) stimulation of collagen Gene Expression by Ascorbic Acid in Culture Human fibroblasts J Biol Chemistry Vol 264.N-28 P 16957-16962