

私立東海大學生物學研究所
碩士論文

指導教授：鄭 葳 博士

Vie Cheng, Ph.D.

高承亨 博士

Chen-Hung Kao, Ph.D.

高血糖症對低密度脂蛋白在大白鼠動脈內皮細胞

通透路徑的影響

Effects of hyperglycemia on the transport pathways of
low-density lipoprotein across the aortic endothelia in rats

研究生：李士享

Shih-Hsiang Lee

中華民國九十年六月

酵 素 連 結 免 疫 附 著	
法.....	13

動物實驗.....	18
十一、定量分析.....	20
結果.....	21
高血糖症大白鼠的確認.....	21

膠體金粒子與低密度脂蛋白複合體之製備.....	22
五、免 疫 沈 澱 法.....	22
六、光 學 顯 微 鏡 的 觀 察.....	23
七、電 子 顯 微 鏡 觀 察.....	23
討 論.....	27
參 考 文 獻.....	33
表 目 錄.....	40
圖 目 錄.....	

動脈內皮的通透路徑的影響。實驗結果發現：STZ 注射後 4 個月的大白鼠，其血糖濃度及糖化血紅素明顯較對照組增加。而高血糖大白鼠的動脈內皮對於 Evans blue 染劑的通透性明顯高於對照組。高血糖的動脈血管內皮及基膜在超微結構上有明顯的改變。許多低密度脂蛋白-金粒子複合物出現於分枝區內皮細胞的小胞囊中及內皮下層;但在未分枝區，低密度脂蛋白-金粒子複合物只出現於內皮細胞的小胞囊中。統計結果顯示，在血管分枝區，低密度脂蛋白-金粒子複合物指出現於內皮細胞的小胞囊中。高血糖大白鼠內皮細胞中，含低密度脂蛋白-金粒子複合物的小胞囊體積密度顯著高於對照組 ($p<0.005$)，內皮下層的低密度脂蛋白-金粒子複合物的分佈亦顯著增加 ($p<0.005$)；而在血管未分枝區，高血糖大白鼠與對照組的內皮細胞中，含低密度脂蛋白-金粒子複合物的小胞囊體積密度並無明顯差異。在高血糖的影響下，血管分枝區中無任何型式的內皮連接結構及開啟式的細胞接合間隙均增加，而緊密式的連接結構減少；並且許多低密度脂蛋白-金粒子複合物出現於開啟式的接合間隙中。而在血管未分枝區，無任何型式的內皮連接結構細胞接合間隙均增加，緊密式的連接結構減少。由本實驗結果，顯示低密度脂蛋白在高血糖症大白鼠內皮細胞的主要通透路徑為小胞囊以及細胞間開啟式的接合間隙。在高血糖症下，動脈內皮細胞分枝區對低密度

脂蛋白通透性明顯增加，極可能是糖尿病引發動脈粥瘤發生初期的一個重要因素。

英文摘要

Chronic hyperglycemia is a common feature of all forms of diabetes mellitus and may contribute greatly to the increase in the incidence of atherosclerosis. Yet, the mechanisms of atherosclerosis due to hyperglycemia have not been well studied. In this study, we use Evans blue to study the permeability of arterial endothelium in the streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic rats. We also use colloidal gold-labeled

LDL to investigate *in situ* the transport pathways of LDL in the aortic intima of hyperglycemic rats. After 3 months into the experiment, the concentration of blood glucose and hemoglobin glycation were increased significantly in the STZ-injected animals compared with controls. The light microscopic observations indicated that the permeability of Evans blue to the aortic endothelium of hyperglycemic rats was greater than control rats. The electron microscopic observations showed that hyperglycemia generated the morphological changes in the intima. Numerous LDL-gold conjugates were revealed in the endothelium and the subendothelial layer at the branched regions of the aortic arch. The conjugates were only found in the endothelial cells but not in the subendothelial layer at the unbranched regions. Quantitative data indicated that the volume densities of plasmalemmal vesicles containing LDL-gold labelings in the branched regions of hyperglycemic rats were higher than those in the control rats ($p < 0.005$). The incidence of labelings in the subendothelial layer was also increased in the hyperglycemic rats as compared with those in the control rats ($p < 0.005$). Whereas in the unbranched regions, the volume densities showed no marked difference between hyperglycemic rats and the control rats. The frequencies of junctionless complexes were increased and the tight junctions were decreased respectively in both branched regions and unbranched regions of hyperglycemic rats. The frequency of open

junctions was significantly increased in the branched regions after hyperglycemia, and the LDL-gold conjugates were present within most of the open junctions. From these results, we conclude that the major visible routes for transport of LDL across aortic endothelium are plasmalemmal vesicles as well as the open junctions in the hyperglycemic rats. The permeability changes in the branched regions of aortic endothelium to LDL after hyperglycemia may be an initial event in diabetes-related atherosclerosis.

前言

糖尿病主要是因為蛋白質、脂質及碳水化合物代謝失調所引起的疾病，而常伴隨著眼球視網膜、腎臟及神經系統的病變（1, 2, 3）。在臨床報導上指出，糖尿病的患者，不分性別，其心血管疾病的發生率皆高於未患糖尿病者（4, 5, 6）。其致病機制可能是因脂蛋白的修飾、凝血功能失衡、纖維代謝失常、氧化壓力增加及內皮功能失調，進而導致氧化態低密度脂蛋白（low-density lipoprotein, LDL）對

內皮通透性的增加，內皮下平滑肌增生，巨噬細胞變為泡沫細胞 (7)，最後造成動脈硬化斑的生成 (8, 9, 10)。

糖尿病的主要特徵為高血糖 (hyperglycemia)，臨床發現，在糖化產物存在下，將導致糖尿病患者腎臟基質膜有異常增厚的現象 (11)。血液中長期糖份過高會增加循環系統及組織中蛋白質的糖化程度，糖化化合物會產生脫水及氧化反應，最後產生糖化產物 (advanced glycation end products, AGEs)，進而可能藉由影響訊息傳遞過程及促進組織的糖化，而影響組織中蛋白質的功能，而成為糖尿病衍生病變的主要原因 (12, 13, 14)。離體的研究指出，腎臟基質膜增厚現象主要是高糖環境下，細胞外基質 (extracellular matrix) 大量表現的結果 (15)；體外培養實驗顯示，若將動脈內皮培養在高糖環境下，動脈內皮細胞形態及活性將會產生異常 (16)。將人類臍靜脈內皮細胞與糖化的低密度脂蛋白一同培養，同樣發現內皮中纖維蛋白溶 原抑制劑 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 的表現量增加，而組織纖維蛋白溶 原活化劑 (tissue plasminogen activator, tPA-1) 的表現量降低 (8, 9, 17)。動物實驗亦指出，猴子在誘發慢性高血糖症六個月後，股動脈及腸動脈的血管內膜 (intima) 明顯增厚，可發現低密度脂蛋白大量堆積在股動脈中 (18)。除此之外，最

近的文獻亦指出大白兔與大白鼠在誘發糖尿病之後，發現乳糜微粒（chylomicron）留滯於大動脈的血管內膜中（19）。糖化產物對於動脈硬化的潛在影響已被廣泛研究，離體的實驗指出，將動脈內皮細胞培養於膠原蛋白上，並加入糖尿病患者的紅血球處理後，可發現白蛋白（albumin）容易穿透動脈內皮及膠原蛋白至下層，若再以液態糖化產物接受器（soluble receptor to AGE, s-RAGE）處理，則白蛋白穿透動脈內皮及膠原蛋白的量減少（20）。活體的實驗亦指出，將白蛋白經由血管注入大白鼠體內循環，可發現白蛋白大量堆積於微血管壁內，同樣的以糖化產物的抗體或接受器處理，則白蛋白於微血管壁內的堆積減少（21）。但是對於在受到糖化產物的影響下動脈內皮細胞對低密度脂蛋白的通透性，仍尚未探討。

引起動脈硬化的啟始因子是因為動脈內皮細胞因為氧化態低密度脂蛋白、一氧化碳、病毒、血流動力因子等之影響，導致內皮通透性增加，血液中低密度脂蛋白因內皮通透性的改變易穿透內皮層進入內皮下層堆積；當動脈內皮下層內的脂蛋白發生氧化後，易被巨噬細胞吞噬而形成泡沫細胞（foam cell）(7)，內皮細胞及巨噬細胞會分泌各種生長因子、造成平滑肌增生、移行，最後造成動脈內壁增厚形成動脈粥狀硬化斑（22）。

血管的內皮細胞是血液與組織之間的屏障，可防止大分子及血球任意通透至血管下層。而大分子可藉由二種方式通過血管內皮，一為過胞飲作用（transcytosis），一為經由相鄰內皮細胞之間的連接結構（cell junction）通過。細胞間的連接結構包含有緊密式（tight junction）、縫隙式（gap junction）、無任何連接結構的型式（junctionless complex）及開啟式（open junction）等四種型式。其中開啟式連接結構的空隙距離大於 25 nm，只出現在血管的分枝區及經過高膽固醇飼料餵食的血管分枝及未分枝區（23）。過去發現大白鼠動脈內皮的連接結構會隨著年齡與高膽固醇餵食有關，進而極可能改變內皮細胞的通透性。此外，在大白鼠動脈分枝區，內皮細胞的連接結構亦會受到血流動力因子的影響，造成通透性的改變（23, 24, 25）。

目前在活體中，高血糖是否會引起動脈內皮層通透性的改變尚未有文獻報導。內皮的通透性是否因為在長期高血糖的情況下發生改變，最後導致低密度脂蛋白易進入血管下層而引發粥瘤形成，是非常值得探討的問題。本實驗以大白鼠為實驗材料，以 streptozotocin（STZ）引發高血糖後，以電子顯微鏡探討慢性高血糖症對於動脈管

壁內皮層結構及細胞間連接結構的改變；同時以 Evans blue 染劑觀察其通透性。再以低密度脂蛋白-膠體金粒子複合體，來觀察並以型態定量法分析其在高血糖及正常大白鼠的動脈分枝區及未分枝區中分佈的情形及通透路徑，以瞭解高血糖症對動脈內皮通透性的影響。

實驗材料及方法

一、大白鼠高血糖症的誘發

將年齡 8 週大的 Sprague-Dawley 雄性大白鼠約 30 隻分為兩組，每組 15 隻動物，餵食正常飼料（福壽牌老鼠飼料，內含蛋白質 23.5 % 以上，脂肪 4.5 % 以上，組織纖維 6.0 % 以下，灰分 9.0 % 以下，水分 12.0 % 以下），將動物飼養於溫度為 25 ± 1 ，濕度為 55-65 % ，12 小時光照，12 小時黑暗的動物房中。

誘發高血糖症之前，將大白鼠停止餵食二天後，一組以 streptozotocin (STZ)(Sigma) 單一劑量腹腔注射，使用劑量為 65 mg/kg b.w. (每毫克 STZ 溶於 4 ml 的 0.024 M, pH 4.5 citrate 中)，另一組以 citrate buffer 單一劑量腹腔注射 (26, 27, 28)。每週自大白鼠尾部尖端靜脈抽血 1 ml，使用己糖激 法 (hexokinase method) 測量血糖量，以己糖激 催化己糖及 ATP 等基質，生成葡萄糖-6-磷酸 (glucose-6-phosphate) 及 ADP，在 NADH 存在下，經葡萄糖-6-磷酸作用產生 NADPH，NADPH 再還原 nitro-blue tetrazolium (NBT) 形成藍紫色 formazan，以 490 nm 比色測量血液葡萄糖量，當血糖高於 350 mg/dl 則確定誘發高血糖症；另由晰霸檢驗中心 (台中，台灣)，以高效液相層析法 (high-performance liquid chromatography, HPLC)，經 Bio-Rex 70 陽離子交換樹脂及 400 psi 壓力，使用 HLC-723 GHb II 儀器分離各種糖化血紅素 (Hemoglobin A_{1C}, HbA_{1C}) (29)，高血糖動物之血紅素約在 6.5%。

二、血漿低密度脂蛋白的純化

將新鮮人類血漿以二次去離子水 (1.00 mg/ml) 調整密度到 VLDL、IDL 與 LDL、HDL 的區隔密度 (1.02 mg/ml)，經 16 小時超

高速離心 (55,000 rpm, 70 Ti rotor, Beckman) , 移去上層分離出的 VLDL、IDL 溶液。將下層含有 LDL、HDL 的溶液以 NaBr (1.25 mg/ml) 調整密度到 LDL 與 HDL 的區隔密度 (1.06 mg/ml) , 經 16 小時超高速離心 (55,000 rpm, 70 Ti rotor, Beckman) , 保留上層含有 LDL 的溶液。此溶液以二次去離子水 (1.00 mg/ml) 調整密度至 LDL 可完全沈澱的密度 (1.005 mg/ml) , 經 16 小時超高速離心 (55,000 rpm, 70 Ti rotor, Beckman) 。將離心所得之 LDL , 以磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4, 4) 進行透析 (30) 。

三、酵素連結免疫附著法

為了確保純化脂蛋白的過程後，低密度脂蛋白仍保持其抗原性，因此以酵素連結免疫附著法來確定其抗原性。先將稀釋比例為 (1 : 3 · 10³、1 : 10⁴、1 : 3 · 10⁴、1 : 10⁵、1 : 3 · 10⁵、1 : 10⁶) 的低密度脂蛋白利用 coating buffer (10 mM Sodium carbonate: Na₂CO₃, pH 9.6) 將其附著在 polyvinyl plates (Immulon II, Dynatech Lab. Inc.) , 放置在 4 下 12 小時。以 PBS-T 緩衝溶液 (PBS 含 0.05 % Tween-20) 沖洗 plate 4 次，然後加入含有 3 % 胎牛血清 (BSA) 的 PBS-T 緩衝溶液

200 μ l 在室溫下反應 30 分鐘做非專一性聯結。再以 PBS-T 緩衝溶液沖洗 plate 2 次，洗去多餘的胎牛血清，之後加入稀釋比例為 1 : 1000 的一級抗體（白兔抗人類低密度脂蛋白之血清 3.4 mg/ml）100 μ l，在室溫下反應 30 分鐘。經過 PBS-T 緩衝溶液沖洗 plate 4 次，加入稀釋比例為 1 : 2000 的二級抗體（抗白兔血清）200 μ l，在室溫下反應 30 分鐘。再以 PBS-T 緩衝溶液沖洗 plate 4 次，二級抗體因接有顯色（horseradish peroxidase, HRP），所以加上受質（O-Phenylenediamine, OPD）會有顯色現象，將其放至 ELISA 讀取儀中，讀取其 490 nm 波長。

四、低密度脂蛋白之電泳分析

利用 12 % 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳（sodium dodecylsulfate poly acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）的系統，進行脂蛋白電泳分析。配置厚度 1.5 mm 7×8 cm discontinuous acrylamide gel，gel 分為上下層，下層的 running gel 含 6 % acrylamide，上層的 stacking gel 則含 5 % acrylamide。配置完成的膠體裝置在電泳槽內，加入電泳緩衝液（running buffer: 25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 3.47 mM SDS）。將 1 mg/ml 的低密度脂蛋白 1 μ l 加入 1 μ l 的

sample buffer (1 % SDS, 5 % mercaptoethanol, 20 % glycerol, 0.1 % BPB: Bromo-phenol-blue, 50 mM Tris-HCl pH 6.8), 於 100 沸水中 denature 5 分鐘。將蛋白質總量為 1 μ g 的低密度脂蛋白及標準蛋白質分子量的 protein marker (High range, Bio-Rad) 依序注入膠體孔槽中, 通以電壓 50 V, 待樣品通過 stacking gel 後, 將電壓調整為 70 V 繼續 4.5-5 小時。

五、西方點墨法

將 PVDF membrane (Millipore) 剪裁至與蛋白質電泳膠同樣大小, 浸泡於甲醇 (100 % methanol) 15 秒, 以二次水清洗 2 分鐘, 再浸泡於第二型陽離子緩衝溶液 (Anode buffer II: 25 mM Tris, 10% methanol, pH 10.4) 至少 5 分鐘。再剪裁 6 張同樣大小的濾紙, 2 張浸泡於第一型陽離子緩衝溶液 (Anode buffer I: 0.3 M Tris, 10 % methanol, pH 10.4), 1 張浸泡於 Anode buffer II, 3 張浸泡於陰離子緩衝溶液 (Cathode buffer: 25 mM Tris, 40 mM glycine, 10 % methanol)。待脂蛋白進行電泳分離後, 將電泳膠取出並切除 stacking gel。進行轉移時, 將浸於 Anode buffer I 的 2 張濾紙置於陽極板上, 再依序放上浸於 Anode buffer II 的 1 張濾紙、PVDF membrane、電泳膠及浸於 Cathode buffer 的 3 張濾紙, 注意避免氣泡產生。之後蓋上

陰極板及安全蓋，以 20 V 的電壓進行 30 分鐘轉移。取出 PVDF membrane 浸泡於含 5 % 脫脂奶粉的 TBS-0.05 % Tween 20 緩衝溶液 50 ml，在室溫下反應 1 小時，將未被蛋白質結合的部位覆蓋住。之後以 TBS-0.05 % Tween 20 緩衝溶液清洗 2 次，每次 5 分鐘。加入 1:7500 的一級抗體（白兔抗人類低密度脂蛋白之血清 3.4 mg/ml）15 ml，在室溫下反應 1 小時，之後以 TBS-0.05 % Tween 20 緩衝溶液清洗 3 次，一次 15 分鐘，二次 5 分鐘。加入 1:10000 的二級抗體（山羊抗白兔之血清）15 ml。再以 TBS-0.05 % Tween 20 緩衝溶液清洗 5 次，一次 15 分鐘，四次 5 分鐘。二級抗體因接有顯色（horseradish peroxidase, HRP），在暗房內加入 ECL + Plus 測試試劑於室溫下反應，而後將試劑吸乾，將膜置於片夾中進行底片感光。

六、膠體金粒子的製備

將 solution A（1 ml 1 % HAuCl_4 , 79 ml distills water）和 solution B（4 ml 1 % tri-sodium citrate \cdot 2 H_2O , 1 ml 1 % tannic acid, 1 ml 25 mM K_2CO_3 , 14 ml distilled water）分別加熱到 60 °C，然後迅速將 solution B 加到 solution A 中，快速攪拌使兩種溶液充分反應，之後加熱至沸騰。膠體金粒子溶液為紅棕色透明液體，此種製備法所做的金粒子大小為 6-10 nm。

七、膠體金粒子與低密度脂蛋白之結合

低密度脂蛋白先以磷酸緩衝溶液透析至 pH 5.5，再將 5 ml 膠體金粒子溶液加入 0.5 ml 低密度脂蛋白 (2 mg/ml)，將兩者混和液上下震盪並搖晃混合均勻，而後在 4℃ 下靜置 30 分鐘。反應後的低密度脂蛋白-膠體金粒子複合體，經超高速離心 30 分鐘 (20,000 rpm, 70 Ti rotor, Beckman) 將未與低密度脂蛋白結合的金粒子去除。之後以 pH 7.4 磷酸緩衝溶液將沈澱在底部的低密度脂蛋白-膠體金粒子複合體沖散，並且通過 0.22 μ m 孔徑的過濾器 (Millipore)，確定無凝集的現象，若有凝集的現象，再以超音波震盪器將聚集的脂蛋白打散 (31, 32)。

八、陰染法

為了要確定低密度脂蛋白的確與膠體金粒子的結合程度，以陰染法在電子顯微鏡下觀察低密度脂蛋白-膠體金粒子複合體。將低密度脂蛋白-膠體金粒子溶液滴在附有膜的銅網上，10 分鐘將低密度脂蛋白-膠體金粒子溶液用濾紙吸乾。之後滴上 1 % phosphotungstic acid 10 分鐘後，用濾紙吸乾並靜置 30 分鐘。

九、免疫沈澱法

為了確定低密度脂蛋白與膠體金粒子結合的過程中，所做的處理是否會影響低密度脂蛋白的抗原性，因此以免疫沈澱法來確定低密度脂蛋白的抗原性依然存在。將煮沸的 0.8 % agarose gel 置於培養皿內冷卻，厚度約 0.5 公分。在膠上分別挖出和中間孔洞等距（0.8 公分）的 6 個孔洞（直徑為 0.5 公分），中間孔洞加滿低密度脂蛋白抗體（3.4 mg/ml），周圍 6 孔洞分別加入低密度脂蛋白（2 mg/ml）、低密度脂蛋白（0.4 mg/ml）、低密度脂蛋白-膠體金粒子溶液、高密度脂蛋白（2 mg/ml）、胎牛血清蛋白（2 mg/ml）。放置於 4 冰箱中，大約 7 天可觀察到免疫沈澱線。

十、動物實驗

1. 在動物處於高血糖下 3-4 個月後，以確定糖化血紅素已達顯著增加（33, 34）。每組取 5 隻老鼠，經腹腔注射巴比妥鹽（Nembutal: Abbott Labs: 1 ml/Kg body wt.）麻醉後，將左側股靜脈以矽膠管 PE-10 插管並注入 Evans blue（0.06 mg/g body wt. 溶於 0.1 ml PBS），使 Evans blue 進入體循環（22, 35, 36）。30 分鐘後以 18 號針插入左心室，剪開右心耳，並同時以 4 含氧磷酸緩衝液以每分鐘 25 ml 之速度灌流約 10 分鐘洗淨血液；再以新鮮配製的 4

的 4 % 聚甲醛固定液以相同方式灌流固定約 10 分鐘。將胸腔大動脈、動脈弧取下，將血管縱切攤平，照相。

2. 在動物處於高血糖下 3-4 個月後，每組取 3 隻老鼠，經腹腔注射巴比妥鹽（Nembutal: Abbott Labs: 1 ml/Kg body wt.）麻醉後，以 19 號針插入左心室，剪開胸腔大動脈遠端，並同時以 37 °C 含氧磷酸緩衝液（PBS 中含 0.25 % 葡萄糖、1 mM 氯化鈣）以每分鐘 25 ml 之速度灌流約 3 分鐘，待血液洗清。而後將胸腔大動脈遠端及左心室插上矽膠管，並連接於蠕動馬達形成一人為的循環迴路（23）。將低密度脂蛋白-膠體金粒子溶液自左心室注入，以每分鐘 1.5 ml 循環約 10 分鐘後，先以 37 °C 含氧磷酸緩衝液（PBS 中含 0.25 % 葡萄糖、1 mM 氯化鈣）以同樣灌流方式清除未被吸收的低密度脂蛋白-膠體金粒子複合體，最後以新鮮配製的 4 % 的 Karnovsky 固定液（4 % 聚甲醛、5 % 戊二醛溶於 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4）灌流固定約 10 分鐘。將胸腔大動脈、動脈弧取下，將血管橫切成 20-30 個 $1 \times 1 \times 2 \text{ mm}^3$ 的圓盤組織塊，浸入 4 % 新鮮的 Karnovsky 固定液。次日，再以 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4) 置換 3 次，每次 15 分鐘，接著以 1 % 四氧化鉻 (OsO_4) 後固定 90 分鐘，再以 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) 清

洗 3 次，每次 15 分鐘。接著依序以 50 %、75 %、95 % 的乙醇脫水及 100 % 乙醇置換三次。接著依序以 25 %、50 %、75 % 氧化丙烯(1,2-propylene oxide) 置換 15 分鐘，100% 氧化丙烯置換三次。接著依序以環形樹脂 (Epon 812) 依序以 25 % 1 小時、50 % 4 小時、75 % 8 小時及 100 % 12 小時置換，最後將血管圈移至新鮮環形樹脂 (Epon 812) 中，在 40 及 60 分別作用 18 及 24 小時。

環形樹脂包埋後的血管圈組織以超薄切片機 (Reichert, Austria) 切成 0.6 μ m 厚片及 80 nm 薄片，厚片以 1 % Toluidine blue 染色後，以光學顯微鏡觀察；薄片先後以飽和醋酸鈾 (uranyl acetate) 及 0.4 % 檸檬酸鉛 (lead citrate) 雙重染色 30 分鐘及 10 分鐘，以穿透式顯微鏡 (Hitachi H-600) 觀察照相。

十一、定量分析

定量分析取自實驗組及對照組兩組，各有 3 隻動物，每隻動物約有 20 個組織塊，隨機取出 3 個組織塊作超薄切片，薄片分別收放於銅網上。銅網在電子顯微鏡觀察下，隨機選取一片薄片，以 30000 倍照 10 張相片，每隻動物約有 30 張照片，兩組動物總共照約 180

張照片，最後的放大倍率為 90000 倍。量化金粒子與低密度脂蛋白在內皮細胞及內皮下層之分佈。內皮下層之分佈以每單位面積所含低密度脂蛋白-金粒子的數目 (gold particles / μm^2) 表示 (37) ; 內皮中小胞囊的體積密度 (V_V) , 依公式 $V_V = P_i / P_t$ 統計 , 其中 P_i 為含有金粒子-低密度脂蛋白且被方格點覆蓋的小胞囊 , P_t 為內皮細胞被方格點覆蓋的點數和 , 依型態定量分析法予以統計分析 (22, 23, 24, 38) ; 兩組動物動脈內皮細胞之連接結構之型式予以計算並量化。結果以 Student's *t*-test 予以分析。

結果

一、高血糖症大白鼠的確認

在未做任何處理前，大白鼠血糖濃度 (blood glucose) 約在 90 mg/dl , 而糖化血紅素 (HbA_{1c}) 約在 5 % 。經過 STZ 單一劑量注射後的實驗組，一個星期內血糖濃度即上升到 475-675 mg/dl , 成為高血糖狀態。大白鼠經過 STZ 注射後的 4 個月期間，高血糖值持續維持在 450-600 mg/dl 之間 (圖 1) ; 糖化血紅素隨誘發時間明顯增加，

由 5.7 % 升至 7.0 % ($P < 0.05$) (圖 2)。

二、酵素連結免疫附著法

經過酵素連結免疫附著法 (ELISA) 分析後，純化出的低密度脂蛋白與其抗體之間有很高的專一性存在；而在兩組對照組，高密度脂蛋白 (HDL) 及胎牛血清蛋白 (BSA) 與低密度脂蛋白抗體之間並無專一性存在 (圖 3)。表示純化脂蛋白的過程後，低密度脂蛋白仍保持其抗原性。

三、西方點墨法

純化血漿分離出的低密度脂蛋白，以西方點墨法 (western blotting) 分析其正確性。純化的低密度脂蛋白進行電泳分析後，轉移至 PVDF membrane 上，再用抗人類低密度脂蛋白多株抗體 (polyclonal antibody) 檢測。西方點墨法的結果，發現低密度脂蛋白主要脂蛋白元為 Apo B-100 ($MW = 350 \text{ KD}$) (圖 4)。

四、膠體金粒子與低密度脂蛋白複合體之製備

由檸檬酸-單寧酸法製成直徑約 15 nm 的膠體金粒子與低密度脂蛋白結合後，經由陰染及電子顯微鏡鏡檢：發現膠體金粒子大部分都與低密度脂蛋白接合，並無游離的金粒子存在（圖 5a）。

五、免疫沈澱法

低密度脂蛋白與膠體金粒子結合後，經過免疫沈澱法分析，顯示低密度脂蛋白-膠體金粒子複合體仍然與其抗體有專一性存在。所以表示當低密度脂蛋白與膠體金粒子結合後，仍然保有其抗原性（圖 5b）。

六、光學顯微鏡的觀察

對照組的 5 隻大白鼠，在其動脈弧及胸腔大動脈上 Evans blue 染劑堆積的程度並不高，尤其是 CR-I、CR-II 兩隻大白鼠的血管壁（圖 6a）。

高血糖的 5 隻大白鼠，在其動脈弧及胸腔大動脈上 Evans blue 染劑堆積的程度明顯增加，可發現在動脈弧上堆積的程度多於胸腔動脈，尤其是 HR-II、HR-III 兩隻大白鼠為最多（圖 6b）。

七、電子顯微鏡觀察

1. 形態結構上的變化

未經 STZ 誘發高血糖症的大白鼠動脈血管，其內皮細胞排列緊密整齊，其內有細胞小胞囊，內皮下結締組織 (subendothelial layer) 及平滑肌層之結構正常 (圖 7a, b)。大分子主要藉由二種方式通過血管內皮，一為藉由小胞囊進行過胞飲作用，一為經由相鄰內皮細胞間的接合間隙通過。這三種細胞接合間隙的結構，包含緊密式連接結構，為兩細胞膜間緊密相連的結構 (圖 8a)，大分子極難通過；縫隙式連接結構，主要為相鄰兩細胞間訊息傳遞的通道 (圖 8b)；無任何連接結構的型式，寬度小於 25 nm，是大分子通過內皮細胞的主要路徑之一 (圖 8c)。

大白鼠以 STZ 誘發高血糖症 4 個月後，多半在分枝區域的動脈血管內皮細胞明顯變薄、破碎、脫落 (圖 9a, b)，而且可觀察到內皮細胞下層有類似糖蛋白物質的堆積而向血管腔 (lumen) 隆起 (圖 9c)。內皮細胞變薄，平滑肌細胞有向上推擠的現象 (圖 9d)。此外，在高血糖大白鼠血管分枝區內皮亦觀察到開啟式連接結構的

存在，間隙寬度約在 30-400 nm 之間，可使大分子物質極容易透過內皮至內皮下層（圖 10a, b）。過去研究顯示，此結構只出現在大動脈血管的分枝區及經過高膽固醇飼料餵食的未分枝區及分枝區（23）。

2. 低密度脂蛋白-膠體金粒子在內皮細胞及內皮下層之分佈及 統計分析

在正常血糖的大白鼠的動脈管壁，可發現低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物藉由內胞飲作用進入內皮細胞的小胞囊中，以過胞飲的方式穿越動脈內皮細胞（圖 11a, b）。經統計分析發現，在高血糖 4 個月影響下，血管分枝區的內皮細胞含低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物胞小囊的體積密度（ V_v ）明顯增高，由對照組的 0.012 增加至 0.042 ($p < 0.005$)；而在血管未分枝區，內皮細胞含低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物胞小囊的體積密度在兩組間並無明顯差異（表 2）。

此外，在高血糖 4 個月的影響下，大白鼠動脈內皮下層觀察到許多低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物（圖 12）。統計分析顯示，血管分枝區的內皮下層含低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物，由每平方微米 0.009 個增加至 0.141 個 ($p < 0.005$)（表 3）；而在未分枝區，極少

有複合物出現。由以上結果顯示，高血糖環境可明顯增加大白鼠動脈內皮細胞對於 LDL 的通透性。低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物，出現在內皮細胞損傷剝落區（圖 13）及開啟式連接結構（圖 14）；但是在無任何連接結構的型式及其他的連接結構中，並無發現低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物的存在。

為了瞭解膠體金粒子本身是否亦會被動脈內皮吸收；因此，我們只以膠體金粒子進行動物實驗，結果在組織中並未發現有金粒子的存在，顯示出內皮細胞並不會吸收未與低密度脂蛋白結合之金粒子（圖 15）。

3. 內皮細胞連接結構的變化及統計分析

經統計分析，血管分枝區的內皮細胞間各種連接結構出現的頻率，在高血糖 4 個月影響下，緊密式連接結構較對照組出現頻率減少（13 % vs 43 %）。無任何連接結構的型式及開啟式連接結構出現頻率皆較對照組明顯增加（28 % vs 17 %；21 % vs 0 %）。縫隙式連接結構的出現頻率在兩組間並無顯著改變（圖 16）。

而在血管未分枝區的內皮細胞間各種連接結構出現的頻率，在高血糖 4 個月影響下，緊密式連接結構較對照組出現頻率減少 (25.56 % vs 44.44 %)。無任何連接結構的型式出現頻率較對照組增加 (27.78 % vs 10 %)。縫隙式連接結構的出現頻率在兩組間並無顯著改變。而開啟式連接結構也出現於未分枝區，唯數量極少 (圖 17)。

討論

經由 STZ 誘發的動物，其動脈內皮層結構及生理特性的改變，主要是長久處於高血糖下造成，並不是經由藥物毒性的影響所造成。過去文獻指出，在相同時間以相同劑量 STZ 給予 apo E 基因剔除小白鼠，其中約有 5 % 基因剔除鼠無法產生高血糖症；這些動物與未給予藥物處理的 apo E 基因剔除小白鼠比較，兩者所產生的動

脈硬化現象並無不同，也就是 STZ 本身的毒性並不會直接造成血管的傷害 (39, 40)。此外，STZ 誘發高血糖症大白鼠，其動脈管壁內的神經細胞會大量產生 substance P 而影響血管系統的生理，若以胰島素藥物處理，藉由血糖降低，substance P 亦會顯著減少，表示 STZ 本身的毒性並不會影響血管的生理 (41)。

以 STZ 引發高血糖的機轉，主要是 STZ 破壞胰臟中產生胰島素的細胞，以達到血糖升高的目的 (42)。STZ 會以其結構上似糖的部分，經由細胞膜上的低親和性第二型糖類運輸蛋白 (low affinity glucose transporter, GLUT2) 選擇性的進入細胞，造成細胞的死亡 (43)。以 STZ 處理的小白鼠，除血糖升高外，血液及肝臟中的三酸甘油酯 (triglyceride) 及膽固醇 (cholesterol) 含量並不會改變 (45)；同樣以 STZ 處理的猴子，同樣發現血液中的三酸甘油酯及膽固醇含量不會改變 (18)。

以 STZ 誘發五個月的動物，除有嚴重的高血糖症外，也會造成嚴重的腎病變，包含腎小球區 (glomerular zone) 擴大了 50 %、基底膜增厚等末期絲球體硬化 (glomerularaclerosis) 現象 (3, 33)。本實驗大白鼠的糖化血紅素數值，約在誘發後三個月到達約 7.0 %，臨床

糖尿病患者之糖化血紅素數值，平均值大約為 7.5 % (34)。因此，選擇以高血糖症為期三至四個月的大白鼠做為實驗材料。由表 1 中的數據顯示誘發高血糖症大白鼠，血糖濃度、糖化血紅素及飲水量均明顯高於控制組大白鼠 (Glucose: $P < 0.001$ 、HbA_{1c} $P < 0.05$ 、Drinking water: $P < 0.001$)。臨床報告顯示，糖化血紅素量可當作糖化產物增加的指標 (29)。因此當糖化血紅素增加時，亦代表在血液中非酵素性糖化作用造成糖化產物的增加。

高膽固醇血症 (hypercholesterolemia)、血流動力因子 (hemodynamic factors) 及老化等因素，會造成動脈內皮通透性的改變，最後造成低密度脂蛋白穿越並且堆積於血管內皮下層 (22, 23, 24)；但是高血糖對於動脈內皮通透性的影響仍不清楚。為了瞭解動脈內皮細胞，長期處於高血糖的環境，是否將導致通透性的改變，進而促進動脈粥瘤的形成，本實驗利用 Evans blue 染劑做為追蹤劑，在光學下觀察染劑在高糖的動脈血管壁中堆積程度較正常組為高，顯示動脈內皮細胞通透性會因血糖過高而增加。Evans blue 染劑主要會與血液中的白蛋白 (albumin) 結合，因此實驗上所觀察到血管壁上染劑的堆積程度，可視為大分子白蛋白在血管壁通透性的指標 (35, 36)。具較高的血糖濃度與較高糖化血紅素的動物，Evans blue

染劑堆積於血管壁的程度也隨之增高，例如高血糖大白鼠 HR-III 的個體其血糖濃度 (Glucose: 589.2 ± 23.1) 及糖化血紅素 (HbA_{1c}: 7.1 ± 0.3) 較其他隻動物高，而 Evans blue 染劑堆積於血管壁的程度亦最高。該結果顯示當大白鼠處於高血糖下，確實會造成動脈內皮細胞對白蛋白通透性的改變。過去離體實驗指出，將動脈內皮培養於膠原蛋白上，再加入糖尿病患者的紅血球處理，發現白蛋白會容易穿透內皮細胞及膠原蛋白。活體的實驗亦指出，將白蛋白注入糖尿病大白鼠的血管循環一小時，發現白蛋白可大量堆積於微血管壁中 (20, 21)。

由 Evans blue 染劑的實驗，得知動脈內皮通透性的增加，應與內皮結構的改變有關 (35, 36)。過去文獻曾報導，低密度脂蛋白可能受到糖化產物影響而變性，造成氧化壓力 (oxidative stress) 增加，藉由引發血小板活化因子 (platelet activating factor) 生成、抑制前列腺素 (prostaglandin I₂) 合成，進而導致內皮受傷甚至瓦解 (8)，並且在高血糖下，會造成內皮細胞的修復能力下降 (2)。我們的實驗中發現在高血糖影響下，動脈內皮細胞在分枝區明顯變薄，而且部分地區有破碎及剝落的現象 (圖 9)。

大分子在內皮通透性，以結構的角度而言可有二種通透方式：

一為過胞飲作用 (transcytosis)，即血液中大分子經由細胞小胞囊攜帶進入內皮細胞，進而傳送至內皮細胞下層。一為經由相鄰內皮細胞之間的連接結構 (cell junction) 通過。內皮細胞的四種連接結構：緊密式、縫隙式、無任何連接結構型式及開啟式，其中細胞間隙在長期高血糖影響下會改變其出現頻率進而影響細胞的通透性。

緊密式連接結構通常不利於大分子的通過 (45)。實驗中發現，高血糖影響下會導致緊密式連接結構減少，極可能增加動脈內皮的通透性，但是機轉並不清楚。縫隙式連接結構主要是細胞與細胞之間小分子或離子的通道。本實驗發現，縫隙式連接結構並不會受到高血糖影響而有所增減。無任何連接結構的型式其細胞與細胞的間隙距離大約為 25 nm，可使大分子較容易由管腔通透至內皮下層；實驗結果顯示，在高血糖影響下該型式的連接結構明顯的增加，但 LDL 因其直徑大約為 15-20 nm，故不易由這種結構進入細胞。此外開啟式連接結構，由於其細胞間的空隙大於 25 nm，約在 30-400 nm 之間，因而更易使大分子進入內皮下層。過去研究顯示隨著年齡與長久高膽固醇餵食，大白鼠動脈內皮的無任何連接結構的型式及開啟式連接結構會明顯增加，增加大分子如 LDL 在內皮細胞的通透性 (22, 23, 24)。在高血糖影響下，我們也發現此結構在分枝區會明顯的增加。

這可能是高血糖造成內皮細胞的生理異常 (16), 導致細胞容易死亡而剝落 (2, 8); 亦可能是血液中大量增加的糖化產物, 使得內皮細胞間的接合蛋白或細胞下層的基質膜被糖化 (14) 導致細胞間連接結構的鬆散, 因而促進開啟式連接結構的增加。我們過去的研究發現, 在正常飼料餵食的大白鼠, 低密度脂蛋白主要以過胞飲方式穿越動脈內皮細胞。而在餵食高膽固醇飼料後, 開啟式的連接結構增加, 促使血液中的低密度脂蛋白易於進入內皮細胞下層 (23)。本實驗結果顯示, 以 STZ 誘發高血糖症大白鼠 4 個月後, 在血管分枝區發現低密度脂蛋白除了利用過胞飲作用, 亦可經由開啟式連接結構穿越內皮細胞。

過去文獻指出, 血流動力因子會影響動脈弧分枝區內皮細胞的連接結構及生理特性 (24, 25), 在高血糖症的老鼠動物模式中, 動脈產生傷害的區域主要是動脈竇, 少部分位於血管分枝區 (6, 39)。本實驗發現, Evans blue 染劑主要堆積於高血糖動物的動脈弧分枝區, 並且動脈弧分枝區其內皮小包囊中所含的低密度脂蛋白較對照組多, 而在未分枝區中並無差異。此外在兩組動物中, 動脈未分枝區的內皮下層均沒有發現低密度脂蛋白金粒子複合物的存在。顯示在高血糖下, 大白鼠動脈血管主要產生損傷的區域為動脈弧分枝

區，並且低密度脂蛋白主要是藉由開啟式連接結構穿透並堆積於血管壁中。

過去有文獻指出，以不同的同位素標定乳糜微粒代謝物及低密度脂蛋白混合物，經由耳靜脈注入高血糖症大白兔或頸靜脈注入高血糖症大白鼠進行體內循環，結果發現兩種動物內皮及內皮下層皆含有大量的乳糜微粒代謝物，但是低密度脂蛋白的含量在高血糖組及對照組並無差異，因此推論在高血糖下，主要會造成動脈粥瘤形成的原因是乳糜微粒代謝物滯留於內皮下層所造成（19）。由本實驗結果可以得知，動脈內皮的超微結構確實會受到高血糖的影響，因而造成大分子如低密度脂蛋白易於穿越內皮並堆積於血管壁中，很可能因此導致膽固醇堆積而促進動脈粥瘤生成。

參考文獻

1. Anthony S., W. David, R. James, E. Delia, N. Marcel, W. Fred, Y. Albert, and T. Tai-Lan. 1994. Human endothelial cells are defective in diabetic vascular disease. *J. Surg. Res.* 57: 647-653.
2. Sowers, J. R., and M. Epstein. 1995. Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease, and nephropathy: An update.

Hypertension 26: 869-879.

3. Friedman E. A. 1999. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 22(suppl. 2): B65-B71.
4. Pyorala K. 1990. Diabetes and coronary artery disease: what a coincidence? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16(suppl. 9): S8-S14.
5. Tsao P. S., J. Niebanor, R. Buitrago, P. S. Lin, B. Y. Wang, J. P. Cooke, Y. D. I. Chen, and G. M. Reaven. 1998. Interaction of diabetes and hypertension on determinants of endothelial adhesiveness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 947-953.
6. Vischer U. M. 1999. Hyperglycemia and the pathogenesis of atherosclerosis: lessons from murine models. *Euro. J. Endocrinol.* 140: 1-3.
7. Jessup W., and L. Kritharides. 2000. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 473-481.
8. Calles-Escandon J., E. Garcia-Rubi, S. Mirza, and A. Mortensen. 1999. Type 2 diabetes: one disease, multiple cardiovascular risk factors. *Coronary Artery Dis.* 10: 23-30.
9. Hayden J. M., and P. D. Reaven. 2000. Cardiovascular disease in diabetes mellitus type 2: a potential role for novel cardiovascular risk factors. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 519-528.

10. Ross R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective of the 1990s. *Nature*. 362: 801-809.
11. Berg T. J., H. J. Bangstad, P. A. Torjesen, R. Qsterby, R. Bucala, and K. F. Hanssen. 1997. Advanced glycation end products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 46: 661-665.
12. Cerami A., H. Vlassara, and M. Brownlee. 1987. Glucose and aging. *Sci. Am.* 256: 90-96.
13. Cerami A., H. Vlassara, and M. Brownlee. 1988. Role of advanced glycosylation products in complications of diabetes. *Diabetes Care* 11(suppl. 1): B73-B79.
14. Brownlee M. 1994. Glycation and diabetic complication. *Diabetes* 43: 836-841.
15. Wahab N. A., K. Harper, and M. Mason. 1996. Expression of extracellular matrix molecules in human mesangial cells in response to prolonged hyperglycaemia. *Biochem. J.* 316: 985-992.
16. Salameh A., M. Zinn, and S. Dhein. 1997. High D-glucose induces alterations of endothelial cell structure in a cell-culture model. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 30: 182-190.
17. Zhang J., S. Ren, D. Sun, and G. X. Shen. 1998. Influence of glycation on LDL-induced generation of fibrinolytic regulators in

- vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 1140-1148.
18. Litwak K. N., W. T. Cefalu, and J. D. Wagner. 1998. Chronic hyperglycemia increases arterial low-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis in cynomolgus monkeys. *Metabolism* 147: 947-954.
 19. Proctor S.D., C. K. Pabla, and J. C. L. Mamo. 2000. Arterial intimal retention of pro-atherogenic lipoproteins in insulin deficient rabbits and rats. *Atherosclerosis* 149: 315-322.
 20. Wautier J. L., C. Zoukourian, O. Chappey, M. P. Wautier, P. J. Guillausseau, R. Cao, O. Hori, D. Stern, and A. M. Schmidt. 1996. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. *J. Clin. Invest.* 97: 238-243.
 21. Bonnardel-Phu E., J. L. Wautier, A. M. Schmidt, C. Avila, and E. Vicaud. 1999. Acute modulation of albumin microvascular leakage by advanced glycation end products in microcirculation of diabetic rats in vivo. *Diabetes* 48: 2052-2058.
 22. Grundy S. M. 1995. Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease. *Clin. Chem.* 41: 139-146.
 23. Kao C. H., J. K. Chen, and V. C. Yang. 1994. Ultrastructure and permeability of endothelial cells in branched regions of rat arteries.

- Atherosclerosis 105: 47-55.
24. Kao C. H., J. K. Chen, J. S. Kuo, and V. C. Yang. 1995. Visualization of the transport pathways of low density lipoproteins across the endothelial cells in the branched regions of rat arteries. Atherosclerosis 116: 27-41.
25. Lee W. C., W. T. Chao, and V. C. Yang. 2001. Effects of high-cholesterol diet on the interendothelial clefts and the associated junctional complexes in rat aorta. Atherosclerosis. 155: 307-312.
26. Way K. J., and J. J. Reid. 1995. Effect of diabetes and elevated glucose on nitric oxide-mediated neurotransmission in rat anococcygeus muscle. Br. J. Pharmacol. 115: 409-414.
27. Tanaka Y., H. Shimizu, N. Sato, M. Mori, and Y. Shimomura. 1995. Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozocin. Pharmacology 50: 69-73.
28. Janicki, P. K., J. L. Horn, G. Singh, V. E. Janson, W. T. Franks, and J.J. Franks. 1995. Reduced anesthetic requirements, diminished brain plasma membrane phospholipid methylation in diabetic rats: effects of insulin. Life Sci. 56: 357-364.
29. Makita Z., H. Vlassara, E. Rayfield, K. Cartwright, E. Friedman, R. Rodby, A. Cerami, and R. Bucala. 1992. Hemoglobin-AGE: a circulating marker of advanced glycosylation. Science 258: 651-653.

30. Havel R. J., H. A. Eder, and J. H. Bradgon. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* 34: 1345-1352.
31. Handley D. A., C. M. Arbeeny, L. D. Witte, and S. Chien. 1981. Colloidal gold-low density lipoprotein conjugates as membrane receptor probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 368-373.
32. Nistor A., and M. Simionescu. 1986. Uptake of low density lipoproteins by the hamster lung: interactions with capillary endothelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134: 1266-1278.
33. Singh R., A. Barden, T. Mori, and L. Beilin. 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44: 129-146.
34. Inouye M., T. Mio, and K. Sumino. 1999. Glycated hemoglobin and lipid peroxidation in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism* 48: 205-209.
35. Gerrity R. G., M. Richardson, J. B. Somer, F. P. Bell, and C. J. Schwartz. 1977. Endothelial cell morphology in areas of *in vivo* Evans blue uptake in the aorta of young pigs. *Am. J. Pathol.* 89: 313-334.
36. Zimmerman M., and J. McGeachie. 1986. Quantitation of the relationship between aortic endothelial intercellular cleft morphology and permeability to albumin. *Atherosclerosis* 59: 277-282.
37. Yang V. C., T. Y. Lee, G. Y. Hwang, C. H. Kao, and J. K. Chen.

1999. Immunolocalization of high-density lipoproteins in arterial walls of rats. *Atherosclerosis* 142: 269-277.
38. Yang V. V., P. J. O'Morchoe, and C. C. C. O'Morchoe. 1981. Transport of protein across lymphatic endothelium in the rat kidney. *Microvasc. Res.* 21: 75-91.
39. Park L., K. G. Ramam, K. J. Lee, Y. Lu, L. J. Ferran, W. S. Chow, D. Stern, and A. M. Schmidt. 1999. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat. Med.* 4: 1025-1031
40. Schmidt A. M., S. D. Yan, J. L. Wautier, and D. Stern. 1999. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ. Res.* 84: 489-497.
41. Markle R. A., and D. K. Walker. 1996. Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on substance P of the rat arterial wall. *Life Sci.* 58: 1123-1129
42. Like A. A., and A. A. Rossini. 1976. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: a new model of diabetes mellitus. *Science* 193: 415-417.
43. Elsner M., B. Guldbakke, M. Tiedge, R. Munday, and S. Lenzen. 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic

beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43: 1528-1533

44. Kunjathoor V. V., D. L. Wilson, and R. C. LeBoeuf. 1996. Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Clin. Invest.* 97: 1767-1773.
45. Chen Y. L., K. M. Jan, H. S. Lin, S. Chien. 1997. Relationship between endothelial cell turnover and permeability to horseradish peroxidase. *Atherosclerosis* 133: 7-14.

表目錄

表 1. The blood glucose level and hemoglobin glycation (HbA_{1C}) in hyperglycemic and control rats.....43

表 2. Mean volume densities V_v ($\mu m^3 / \mu m^3$) for endothelial plasmalemmal vesicles that contain LDL-colloidal gold particles at 4 months after STZ

treatment.....44

表 3. The distribution of LDL-colloidal gold particles in subendothelial layer of control and hyperglycemic rats.....45

圖目錄

圖 1. 血 糖 濃 度 變 化

圖.....46

圖 2. 血紅素糖化程度變化圖.....46

圖 3. 酵 素 聯 結 免 疫 附 著 法 結

圖 14. 高血糖的大白鼠的動脈管壁。內皮開啟式連接結構中的低密度脂蛋白 - 膠體金粒子複合物.....	59
圖 15. 膠體金粒子動物實驗結果.....	60
圖 16. 動脈分枝區內皮細胞間連接結構出現頻率的比較.....	61
圖 17. 動脈未分枝區內皮細胞間連接結構出現頻率的比較.....	62

表 1. The blood glucose level and hemoglobin glycation (HbA_{1C}) in hyperglycemic and control rats.

Rats (n = 11)	Control	Hyperglycemia
Glucose (mg/dl)	88.6 ± 2.87	502.5 ± 14.94 ^{***}
HbA _{1C} (%)	5.3 ± 0.05	7.0 ± 0.07 [*]
Drinking water (ml/day)	69.8 ± 6.01	264.0 ± 15.80 ^{***}

mean ± S.E. ^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.001$

表 2. Mean volume densities V_v ($\mu\text{ m}^3 / \mu\text{ m}^3$) for endothelial plasmalemmal vesicles that contain LDL-colloidal gold particles at 4 months after STZ treatment.

Rats (n=3)	V_v ($\mu\text{ m}^3 / \mu\text{ m}^3$)	
	Control	Hyperglycemia
Thoracic aorta		
Aortic arch regions	0.012 \pm 0.0006	0.042 \pm 0.0025 ^{***}
Unbranched regions	0.020 \pm 0.0049	0.029 \pm 0.0050

mean \pm S.E. ^{***} $P < 0.005$

表 3. The distribution of LDL-colloidal gold particles in subendothelial layer of control and hyperglycemic rats.

Rats (n=3)	gold particles / μm^2	
	Control	Hyperglycemia
Aortic arch regions		
Subendothelial layer	0.009 \pm 0.0011	0.141 \pm 0.0076 ^{***}

mean \pm S.E. ^{***} $P < 0.005$

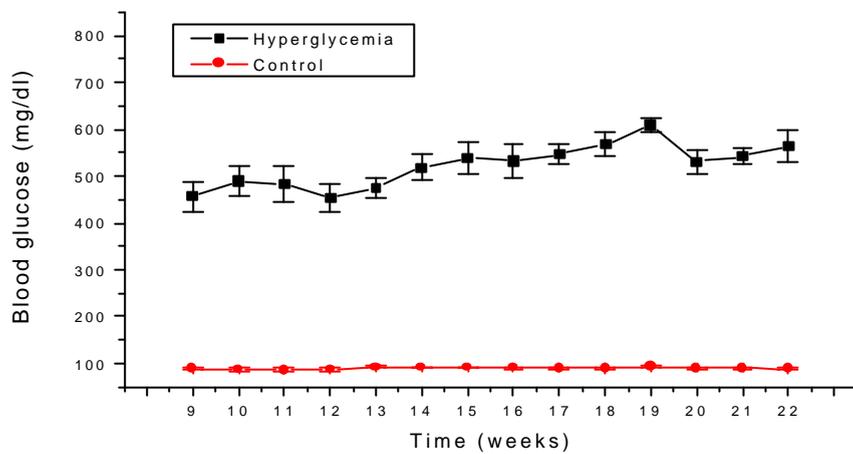


圖 1. 血糖濃度變化圖。經過 STZ 單一劑量注射後的一個星期內即上升到 450 mg/dl，成為高血糖狀態。大白鼠經過 STZ 注射後的 4 個月期間，高血糖值持續維持在 450-600 mg/dl 之間 (n=11)。而未經注射 STZ 的對照組 (n=11)，則一直維持 50 mg/dl 左右穩定的血糖值。

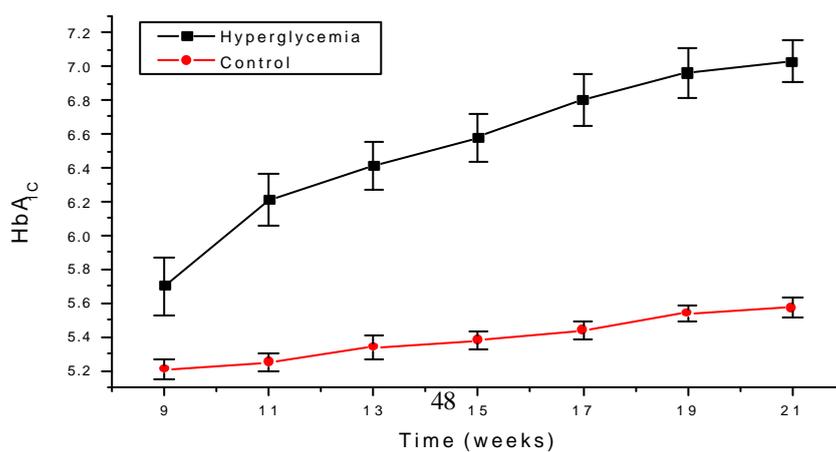


圖 2. 血紅素糖化程度變化圖。實驗組 (n=11) 注射 STZ 後 4 個月內，可發現血漿糖化程度逐漸由 5.7 % 增加至 7 %，對照組 (n=11) 則一直維持在 5-5.5 % 糖化程度。

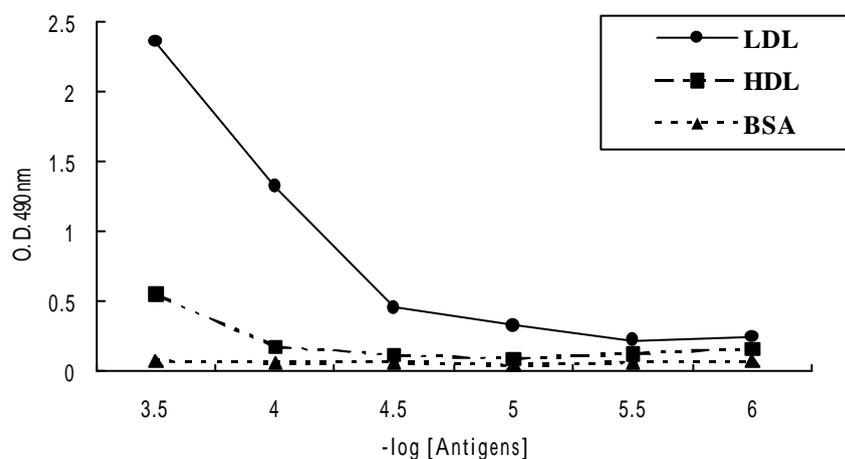


圖 3. 利用酵素聯結免疫附著法 (ELISA) 檢測純化之低密度脂蛋白 (LDL) 及胎牛血清白蛋白 (BSA)、高密度脂蛋白 (HDL) 與低密度脂蛋白抗體反應之結果。抗體的蛋白質總量為 340 ng，橫座標為抗原稀釋的濃度，3.5 為 $1:3 \cdot 10^3$ 倍稀釋，4 為 $1:10^4$ 倍稀釋，以此

類推。縱座標軸是在 490 nm 波常下所測得的吸光值。

圖 4. 以西方點墨法檢測純化的低密度脂蛋白之結果。純化的低密度脂蛋白進行 12 % SDS-PAGE 電泳分析後，轉移至 PVDF 膜上，先以抗人類低密度脂蛋白多株抗體作用 1 小時，再以 HRP-抗白兔血清作用，最後 PVDF 膜以 ECL + Plus 測試劑於室溫下反應，並進行底

片感光。箭頭標示處為低密度脂蛋白主要脂蛋白元 Apo B-100 (MW = 350 KD)。

圖 5. (a) 以 1 % phosphotungstic acid 陰染低密度脂蛋白與膠體金粒子結合之電子顯微鏡鏡檢圖 (Bar=0.05 μ m); (b) 以免疫沈澱法鑑定人類低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物的活性。將低密度脂蛋白抗人類免疫球蛋白 (anti-human LDL-IgG) 置於 0.8 % agarose gel 中央孔

洞、低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物 LDL-gold (1, 2)、低密度脂蛋白 LDL (4, 5)、胎牛血清蛋白 BSA (3)及高密度脂蛋白 HDL (6)，分別置於周圍孔洞中。結果發現低密度脂蛋白與金粒子的混合物有紅棕色免疫沈澱線形成，顯示低密度脂蛋白與膠體金粒子結合後，仍然保有其抗原性。



圖 6. 血管縱切剖面光學照相圖。(a) 對照組及 (b) 實驗組。 5 條動脈弧及主動脈 (I, II, III, IV, V) 縱切打開血管，朝上為內皮層，藍色區域為 Evans blue 染劑堆積於血管壁的区域，尤以動脈弧區為最多，乾淨區域為無 Evans blue 染劑堆積於血管壁的区域。 HR: hyperglycemic rat 高血糖大白鼠； CR: control rat 對照組大白鼠 (Bar=1.5 cm)。

圖 7. 正常對照組大白鼠動脈管壁組織。(a) 低倍數 (b) 高倍數電子顯微鏡圖。顯示內皮細胞排列緊密整齊，內皮下結締組織及平滑肌層之結構正常。L: luman 管腔、E: endothelium 內皮、SL: subendothelial layer 內皮下層、SM: smooth muscle 平滑肌、EM: extracellular matrix 細胞外基質、N: nucleus 細胞核 (Bar, a=1.25 μ m, b=1 μ m)。

圖 8. 大白鼠動脈內皮細胞間的連接結構。(a) 帶狀式緊密式連接結構 (箭號所指); (b) 縫隙式連接結構 (箭號所指); (c) 無任何連接結構型式 (箭號所指)。L: luman 管腔、E: endothelium 內皮、SL: subendothelial layer 內皮下層、N: nucleus 細胞核、G: golgi body 高基氏體、V: plasmalemmal vesicles 小胞囊 (Bar=0.15 μ m)。

圖 9. 高血糖大白鼠動脈管壁組織電子顯微鏡圖。(a) 內皮細胞有斷裂現象 (箭號所指) ; (b) 內皮細胞明顯變薄、破碎 (箭號所指) (Bar, a=1.25 μ m, b=1 μ m)。

圖 9. 高血糖大白鼠動脈管壁組織電子顯微鏡圖。(c) 內皮細胞下層有類似糖蛋白質的堆積 (箭號所指) 而向血管腔隆起 ; (d) 內皮細胞變薄 , 平滑肌細胞有向上推擠的現象。L: luman 管腔、E: endothelium 內皮、SL: subendothelial layer 內皮下層、SM: smooth muscle 平滑肌、EM: extracellular matrix 細胞外基質、D: debris 碎片、N: nucleus 細胞核 (Bar, c=1.25 μ m, d=1 μ m)。

圖 10. 大白鼠動脈內皮細胞間的開啟式連接結構。(a) 寬度為 250 nm ; (b) 寬度為 166 nm。L: luman 管腔、E: endothelium 內皮、SL: subendothelial layer 內皮下層、V: plasmalemmal vesicles 小胞囊 (Bar=0.15 μ m)。

圖 11. (a) (b) 低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物出現於內皮細胞的小
胞囊中 (箭號所指)。L: luman 管腔、E: endothelium 內皮、SL:
subendothelial layer 內皮下層 (Bar=0.15 μ m)。

圖 12. 高血糖的大白鼠動脈內皮及內皮下層具有低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物的存在。L: luman 管腔、E: endothelium 內皮、SL: subendothelial layer 內皮下層 (Bar=0.15 μ m)。

圖 13. 高血糖的大白鼠動脈管壁。可發現低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物，位於細胞間的碎片及內皮下層（箭號所指）。L: luman 管腔、E: endothelium 內皮、SL: subendothelial layer 內皮下層、D: debris 碎片（Bar=0.15 μ m）。

圖 14. 高血糖的大白鼠的動脈管壁。低密度脂蛋白-膠體金粒子複合物，經由內皮開啟式連接結構進入內皮下層（箭號所指）。L: luman 管腔、E: endothelium 內皮、SL: subendothelial layer 內皮下層（Bar=0.15 μ m）。

圖 15. 以膠體金粒子進行動物實驗，在組織中並未發現有金粒子的存在。L: luman 管腔、E: endothelium 內皮、SL: subendothelial layer 內皮下層、N: nucleus 細胞核、Mt: mitochondria 粒線體 (Bar=0.15 μ m)。

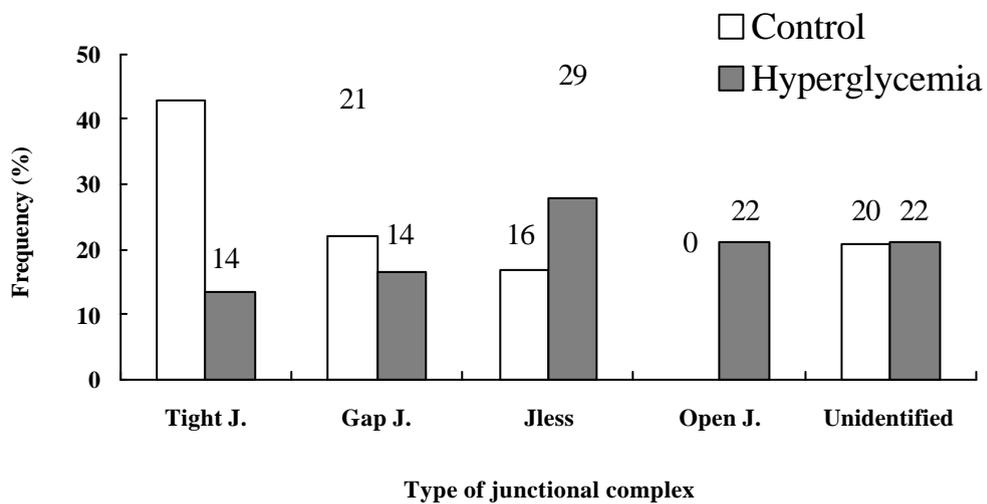


圖 16. 對照組 (n=3) 與高血糖組大白鼠 (n=3) 動脈分枝區內皮細胞間的連接結構出現頻率的比較。圖形上的數字代表所觀察到的個數。

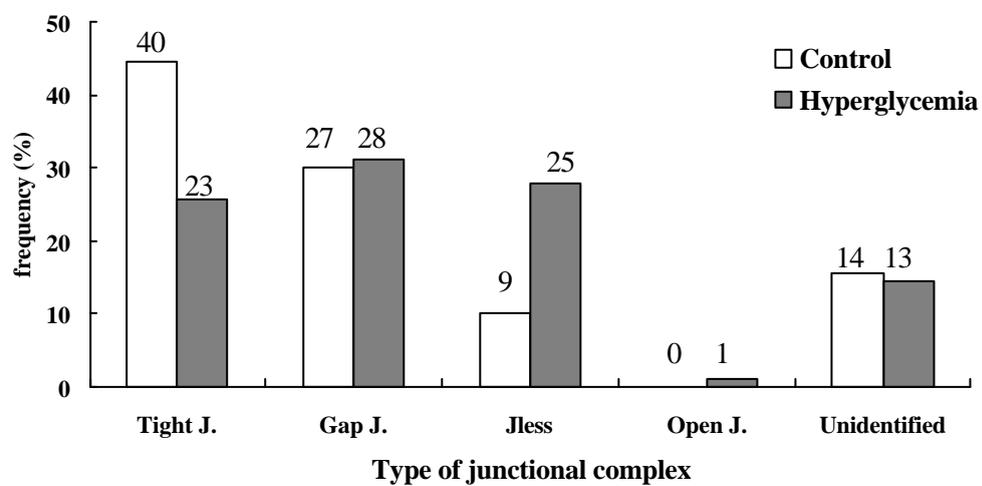


圖17. 對照組 (n=3) 與高血糖組大白鼠 (n=3) 動脈未分枝區內皮細胞間的連接結構出現頻率的比較。圖形上的數字代表所觀察到的個數。

個人基本資料：

姓名：李士享 性別：男 出生日期：66年2月27日

籍貫：台灣南投

戶籍：南投縣草屯鎮和興街8-1號

學歷：

私立東海大學生物學研究所甲組碩士

私立東海大學生物學系學士

私立立人高級中學

經歷：

私立東海大學生物學系普通生物學實驗助教

私立東海大學生物學系演化學實驗助教

私立東海大學生物學系細胞學實驗室助理

第十六屆生物醫學聯合學術年會論文壁報展示

Microscopy & Microanalysis 2001 論文壁報展示

致謝

本論文的完成首先要感謝鄭葳老師及高承亨老師的共同指導，在這兩年的時間除了給予實驗上的協助，鄭葳老師同時也改變了我的生活態度、人生觀及價值觀。此外亦感謝林惠真老師對於論文內容及格式詳細的指證。

在實驗進行期間，承蒙實驗室趙偉廷、劉于鵬兩位學長及慧怡、茹玉、玉葳的協助；此外，對於朝俊、智翔、瑞芬等在同一休息室奮鬥夥伴的幫助以及雯琦在精神上的鼓勵，使我得以度過這兩年的

實驗室生活，在此致上十二萬分的感謝。

最後感謝父母的栽培及關懷，體諒我的生活作息，使我在生活上無後顧之憂，僅以此論文獻給我的家人。