

東海大學生命科學系
碩士論文

指導教授：

鄭葳 博士 Dr. Vivian Cheng

黃光裕 博士 Dr. Guang-Yuh Hwang

羊膜培養環境中內皮細胞可提升整合素表現與附著度
**Endothelial Cells Cultured on Amniotic Membrane
Up-regulate the Expression of Integrins and
Enhance Cell Adhesion**



研究生：湯為淳 Wei-Chun Tang

中華民國九十六年七月

東海大學生命科學系碩士論文

羊膜培養環境中內皮細胞可提升整合素表現與附著度
**Endothelial Cells Cultured on Amniotic Membrane
Up-regulate the Expression of Integrins and
Enhance Cell Adhesion**

研究生：湯為淳 Wei-Chun Tang

指導教授：

鄭蕙 博士 Dr. Vivian Cheng

黃光裕 博士 Dr. Guang-Yuh Hwang

中華民國九十六年七月

誌謝

首先非常的感謝在大學三年與碩士班兩年，一直協助我與照顧我的重要人物，黃光裕老師；在這五年內，不論是在生活上與學業上一直給我前進的動力。這篇論文能完成，除了黃老師，最重要的就是鄭葳鄭老師，鄭老師是我的碩士論文能夠完成的重要關鍵人物，老師不但提供這個計畫與機會給我，還有在平常實驗室生活中，教導我實驗進度的流程規劃與實驗結果的詮釋，使我在這段學習的期間內學習到很多正確的態度。在操作實驗方面，郭展延與林玉俊兩位學長，把我這個從對分子生物技術完全不懂的層次的學弟，教導我成為對於自己實驗可以完全控制與管理的境界。當然東海生命科學系神經、發育、免疫實驗室的老師與學長姐，對於一些特別的儀器的操作的指導，同時也是相當的感謝。最後，感謝對我影響最多的事物—東海大學，很高興有他的存在，讓我學習到很多道理與知識、認識到很多人，人生也因有他的存在能夠成長，對於人生往後的眼界也能提升。

誌謝	-----	1
目錄	-----	2-3
中文摘要	-----	4
英文摘要	-----	5
實驗背景	-----	6-16
心血管疾病與人工血管的需求		
全生物性的人工血管的架構		
人工血管平台基質-羊膜		
羊膜基質的內皮細胞培養環境		
基底膜與細胞受器的聯結模式		
胞外基質與細胞聯繫的重要性		
整合素 Integrins 的結構與構型		
羊膜與整合素 Integrins 與其他相似的黏著分子		
活化態 Integrins 與細胞生存訊息傳遞		
Integrins 於細胞內的分子連結情形		
實驗目的	-----	17-20
探討羊膜培養環境內皮細胞穩定度		
以人造沖刷力測試羊膜基質上內皮細胞的抵抗沖刷指數		
以反轉錄實驗探討內皮細胞在羊膜培養環境下中整合素的連結類型		
內皮細胞在羊膜培養環境下整合素與相關分子的表現量		
探討內皮細胞在羊膜培養環境下細胞表面整合素表現量		
探討內皮細胞中整合素在羊膜培養環境下參與細胞貼附行為		
探討內皮細胞中整合素在不同培養環境下參與細胞貼附行為的比例		

材料與方法 ----- 21-28

初級大動脈內皮細胞培養與動脈內皮細胞種植羊膜

核糖核酸萃取與反轉錄聚合酵素連鎖反應

以聚合酵素連鎖反應分析羊膜培養環境下 Integrins 表現量與時間點相關

機械力液態流動沖刷測試

細胞流式儀細胞表面蛋白質染色

分區收集沖刷測試下附著與非附著內皮細胞

蛋白質萃取與分析整合素異構體 $\beta 1$ 及其活化態的蛋白質表現

化學聯結法及免疫沉澱法

羊膜上內皮細胞的免疫螢光染色

實驗結果 ----- 29-33

羊膜培養環境下內皮細胞仍表現內皮細胞特定分子

羊膜培養環境內皮細胞附著能力指數

羊膜培養環境下內皮細胞整合素的表現

探討整合素參與細胞貼附行為

探討內皮細胞與羊膜連接處分子表現

討論 ----- 34-40

參考文獻 ----- 41-43

圖目 ----- 44

圖與附圖 ----- 45-55

個人資料 ----- 56-58

摘要

在心血管疾病中移植具有功能性的動脈非常迫切。在臨床上，包括冠狀動脈與周邊血管，都需要小管徑的動脈移植。自體移植與異體移植血管的生物穩定性或是相容性在使用上須符合要求，但是這樣的來源是十分有限。而在製造人工血管的過程中，內皮細胞附著在胞外基質上是必要的先決條件。在我們的研究中，將以羊膜加工以獲得可支持內皮細胞的生長平台，並以黏著指數、反轉錄聚合連鎖反應、西方點墨法、免疫共同成沉澱與共軛焦顯微鏡去研究羊膜對於內皮細胞的影響。整合素為 $\alpha\beta$ 相異二聚體之細胞底層表面受體，負責調控細胞的附著與抵抗血液的衝擊力。本實驗之目的將針對內皮細胞培養在羊膜上探討Integrin的表現與細胞黏著的影響。結果內皮細胞生長在羊膜上擁有正常內皮細胞的特色及外觀。在分子實驗的結果中，內皮細胞在羊膜上培養後，其整合素 $\beta 1$ 與活化態整合素 $\beta 1$ 的表現相對於沒生長在羊膜的內皮細胞，會有較高的蛋白質表現。細胞附著能力指數的結果，顯示黏著指數與整合素 $\beta 1$ 的表現是有正相關。

Abstract

The requirements of functional artery replacement in cardiovascular diseases are urgent. Clinically, the small-diameter arteries are the standards for vascular grafts, including coronary artery bypass and peripheral vascular vessel replacement. The biostability of autografts and heterografts is satisfactory in clinical use, but the resource of the grafts is limited. Tissue-engineered blood vessels provide a promising way to generate suitable graft. The extracellular matrix is required for the adhesion of endothelial cells (ECs). Using amniotic membrane (AM), we manufactured a cell-free extracellular matrix scaffolds to obtain supportable material for endothelial cell growth. We used adhesion index, RT-PCR, western blot, immunoprecipitation, and confocal laser scanning microscopy to study the effects of AM on the endothelial cells. Integrins known as $\alpha\beta$ -heterodimeric cell-surface basal layer receptors regulate cell adhesion and are essential for mechanotransduction of hemodynamic forces. Therefore, we investigated the effects of amniotic membrane (AM) on the expression of Integrin and EC adhesion. ECs cultured on AM exhibited normal features of the typical morphology. The molecular study of ECs cultured on AM showed a higher level of expressions in both forms of integrin $\beta 1$ (integrin $\beta 1$ and the active integrin $\beta 1$) as compared to the ECs grown on dish without AM. We also followed the functional adhesion assay to analyze cells adhesion index. These results showed that the adhesion index and integrin $\beta 1$ expression was directly related.

實驗背景

心血管疾病與人工血管需求

根據 2006 年 WHO 世界衛生組織的資料，因心臟血管疾病死亡的每年有 1200 萬人，接近每年世界人口總死亡數的 1/4，其中多半的心血管疾病迫切需要移植血管，如：冠狀動脈硬化、動脈瘤、血管病變等...；其中又以冠狀動脈疾病 (coronary artery disease) 和動脈硬化症 (atherosclerosis) (Sherer and Shoefeld, 2006) 為先進國家心臟病症的主要死因 (Lusis, 2000)。在內科手術中，使用心導管氣球擴張術與支架，將已被阻塞的血管恢復原本的管徑，使得血流順暢；另一方面，一般外科手術上所因應的方式為取自身隱靜脈，以此做出由主升動脈繞過冠狀動脈阻塞處再連接到冠狀動脈。以上兩種方式仍有動脈粥瘤破裂後導致中風、血栓、動靜脈互斥的發炎情形和數量上的限制情況發生。所以以人工方式去製造管徑小於 3.5mm 的人工血管，對於現在醫學的重要性更加的需要 (Isenberg, et al., 2006)。

架構全生物性人工血管

開發組織工程人工血管(Tissue Engineering Blood Vessel)須符合抗血栓及抗排斥與其血管本身穩定的特質，同時也必須具有一般血管的機械性及生理功能性。在一般的血管中，內皮細胞是扮演著調節血管與控制血球沾黏重要角色(De Caterina, 2000)，然而在血管內層與內皮細胞接觸的為基底膜多半為膠原蛋白第四型等聚合物(Herbst, et al., 1988)，再接下來由內向外的是重複的平滑肌細胞層與彈性纖維層，最後的是最外層有小血管與間質細胞與纖維母細胞提供血管的養分與修補的後援。所以在體外要培育出具功能性血管，最為重要的是做為整體支撐的胞外基質，且必須使得內皮細胞和平滑肌細胞可以生長與聯結在此預選基質-羊膜上。

人工血管的平台基質-羊膜

實驗中所使用的羊膜在分娩後取出(台中榮總婦產部提供)。前人的研究中，羊膜為良好的細胞生長平台，且觀察上皮細胞生長在羊膜上時，可以穩定上皮幹細胞的再增生時仍保持未分化性質；還可在創傷處理下，經由刺激上皮細胞分泌TGF- β 進而維持未發炎狀態與其餘未知的分子去刺激細胞再生作用。本計劃先將已取得豬的動脈內皮細胞放置在羊膜上做培養，以羊膜代替血管

中的胞外基質，使得內皮細胞有此胞外基質環境下生長(Martin, et al., 2002) (Morishima, et al., 2001) (Tsai, et al., 2007)。

羊膜基質的內皮細胞培養環境

內皮細胞位於血管的內層，其下層以膠原蛋白第四型為底的基質層，以此胞外基質作為內皮細胞貼附，進而抵抗血流的沖刷力，內皮細胞在血管內是以 Integrins $\alpha\beta$ -異構二聚體與 VEGFR1 與 II-同構二聚體和 hemidesmosome 做為細胞底層貼附受器，Integrins $\alpha\beta$ 為內皮細胞作為貼附的主要受器(Herbst, et al., 1988)；在前人研究中指出細胞與膠原蛋白 IV 型作專一結合的 Integrin $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$ 這些類型的 Integrins。然而在人工血管內皮細胞，須具低發炎率與不易轉化的特性，因此在本計劃中將選用羊膜(基底膜 collagen IV)作為培養內皮細胞的基質(Ruegg, et al., 2004)。在前人的研究中是以角膜幹細胞種植在羊膜上，在羊膜的培養環境下使得角膜幹細胞得以保持不分化且可持續增生(Tsai, et al., 2000)；在本研究中以羊膜培養血管內皮細胞，不但可保持內皮細胞原有的形態，也希望羊膜提供相同或更優於血管內基底膜的膠原蛋白第四型與其他胞外基質所結合的複合物之結合能力。羊膜原本有一層上皮細胞外，尚有膠原蛋白 IV 型與

Laminin 5 及 Fibronectin 的網狀組合物質，在電子顯微鏡觀察下為一有孔隙的網狀複合物(**Portmann-Lanz, et al., 2006**)；以前人的文獻中大致上可預測，內皮細胞可能藉由 Integrin $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha v\beta1$ 或更多種的 Integrins 做為內皮固定在羊膜上的分子(**Ruegg, et al., 2004**)。

基底膜與細胞受器的聯結模式

血管內皮細胞(vascular endothelial cell, VEC)生長在血管內層，內皮細胞是藉由(Vascular endothelium growth factor receptor, VEGFR)與Integrin heterodimer這兩大類的細胞貼附分子進行貼附。細胞貼附分子的結構都具有細胞外的部份(Extracellular domain)、穿越細胞膜部分(Transmembrane domain)、細胞內的部分(Intracellular domain)。其中Extracellular domain可連結細胞外的物質(Extracellular Matrix, ECM)；Transmembrane domain是帶有疏水性胺基酸序列，可穿越磷脂雙層膜結構；Intracellular domain，在Integrin和VEGFR中都可與訊息傳遞分子互相作用，且在Integrins可與在細胞內的focal adhesion molecules, FAs有交互作用的關係並且連接細胞骨架 β -actin，或是活化後的focal adhesion molecules可聚集 β -actin，可以使得細胞穩定。表現在細

胞膜上的Integrins $\alpha 1-3\beta 1$ 及 $\alpha 5-6\beta 1$ 與 $\alpha v\beta 1$ 可連結Collagen IV及Laminin 5與fibronectin (Ruegg, et al., 2004)。Integrins蛋白分子已知會提升細胞附著性，使得細胞在於任何培養環境中更具有抵抗血流沖刷力(Urbich, et al., 2002)。而生長在羊膜上的內皮細胞是否具有較強的抗血流沖刷力尚未被探討。

胞外基質與細胞聯繫的重要性

細胞存活在組織中需要與另一細胞相鄰或是與胞外基質附著或連結，當細胞不與其他細胞或是胞外基質附著與連結時，會導致細胞走向計畫性的死亡途徑，這現象稱之『失巢凋亡 anoikis』；然而連接相鄰細胞與胞外基質需要細胞表面上的受體，與其受體結合的物質 ligand 可分為可溶與不可溶於水兩類。與不可溶物質結合的受體對細胞彼此之附著相當重要。有些受體可與其他表面之類似受體結合 (Cadherins or Cell adhesion molecules, CAM)，也有一類受體和胞外基質(ECM, Extracellular Matrix)結合，可使細胞嵌合在人體內正確位置，促使細胞存活，而 Integrin 屬於後者，因此 Integrin 為胞外基質的受器 (Martin, et al., 2002)。Integrin 是由不同種類的兩兩配對方式成為有功能的分子，Integrins 是由不同次單元膜蛋白質 α 、 β 所組合而成， α 、 β

次單元各為一個蛋白質，各擁有一個穿膜區域 (Transmembrane domain) 與胞外區域 (Extracellular domain) 及胞內區域 (Intracellular domain)， α 、 β 可併成為 Integrin。其 α 、 β 次單元各有其超蛋白質家族，其中 α 次單元家族有 11 個同構異分蛋白質、 β 次單元家族有 6 個同構異份蛋白，依細胞在不同的胞外基質之需求可以組合成至少 22 種不同 Integrin 作為胞外基質的受體。它們會與胞外基質做特定且專一的鍵結，而在細胞內的部分則與多種細胞結構相關或是訊號相關的蛋白質做結合 (Hynes, 2002)。

整合素 Integrins 的結構與構型

Integrin β 1 結構上來說具有相當柔韌的 PSI (plexins, semaphorins, and integrins) domain 及與 ligand 結合的 β 1-domain 最後是聯結 β 1-domain 與 PSI domain 的 hybrid domain，在 β 1-domain 上有三個 binding site：MIDAS (metal-ion-dependent adhesion site；M)，ADMIMAS (adjacent to MIDAS, A) and LIMBS (ligand-induced metal-binding site, L)，這些 binding site 可以與不同的 ligend 做最佳的鍵結 (Humphries and Mould, 2001)；Integrin β 1 在生成過程中，肽

鏈上具有十一個N-link糖化的位點，故在內質網內的糖化作用就可加入約45 kD的糖基，所以也被稱之糖蛋白質GIIP，多半的物種Integrin $\beta 1$ 的蛋白序列是有99%的相似度，但是在西方點墨法之結果還是有所差異，其原因應是糖化的差異導致蛋白質褶疊的方式不同，進而決定不同物種的Integrins差異(Jimenez-Marin, et al., 2000)。

羊膜與整合素 Integrins 與其他相似的黏著分子的關係

在羊膜培養環境中，內皮細胞的 Integrins $\alpha 1-3\beta 1$ 及 $\alpha 5-6\beta 1$ 與 $\alpha v\beta 1$ 擔任著將內皮細胞與胞外基質(Laminin 5, collagen IV, etc) 連結與附著的角色，在先前文獻中曾報導 Integrin $\beta 1$ 對於內皮細胞附著的重要性，而在細胞底部的 VEGFR I and II 是可共同與 Integrin $\beta 1$ 在胞外基質與細胞之間作用並且相互影響；在更進一步做探討 Integrin $\beta 1$ 與 VEGFR 之間的相互作用機制，可以發現當細胞要進行血管新生的時期，在細胞底部的 VEGFR 會接受到 FGF-2(Fibroblast growth factor 2) or VEGF 這些血管新生過程必要的外界刺激因子，其中 TIMP (Tissue inhibitors metalloproteinases)可經由 Integrin $\alpha 2\beta 1$ 與其他類型的 Integrin 作為 Integrins 抑制 FGF-2 與 VEGF 等胞外刺激訊號，可迫使依

附在 intracellular domain of Integrin $\beta 1$ 上的 Protein tyrosine phosphatase 將 VEGFR intracellular domain 中的磷酸化的酪氨酸去磷酸化進而去抑制 VEGFR dependent 的血管新生機制 (Hamelers, et al., 2005) (Liebner, et al., 2006)。若是沒有 TIMP 的存在或是其它會活化 Integrins $\alpha 2\beta 1$ 與 $\alpha 3\beta 1$ 的相關因子，則此抑制機制便會消失。Integrins 有著對細胞附著與移動有相當大的關連性。自另一角度來看，細胞的连接點(contact point)多，且控制 inside-out 的訊號密集(O'Toole, et al., 1994)。那麼內皮細胞在血流沖刷之間也可以達到穩定移動的方式與能力，所以 Integrin $\beta 1$ 在個體新血管發育時，在內皮細胞的附著與移動的調節機制佔有相當重要的角色(Serini, et al., 2006)。

活化態 Integrins 與細胞生存訊息傳遞

Integrin $\beta 1$ 的活化必須與相互成對的 α subunit(1、2、3、4、5、6、V)共同活化，以物理結構上去看活化，當由剛生成的 Integrins 為不活化態，膜外區域彎曲且 ligand binding site 沒有露出，且 α 及 β subunit 的膜內區域相距很近；當有細胞內訊號藉由 FAK 與 active signals 等訊號去活化 integrin $\beta 1$ 時，Integrin $\beta 1$ 會與成對的 α subunit 間距會改為原有距離的兩倍，同時便於膜外區域的形

變(在 EM picture 中可以看出 Integrins 型態上像是舉起來一般的形變)，在這時 affinity of Integrins binding site 會因形變而靠向外邊，進而結合相對應的胞外基質(Humphries and Mould, 2001)；若是 Integrins 與對應物質結合後，Integrin β 1 可以藉由 FAK(focal adhesion kinase), Paxillin 與 Talin 去召集其他的 Integrins，當然 Integrins 並非為只有倆倆一對一對的，同種的次單元可做聚集，共用膜內的貼附分子，這樣的形式可以加強對區域性的應力抵抗性與訊號的放大與加強及持續(Hynes, 2003)。且當 Integrins 受到胞外基質的結合後，在 α subunit 為例，活化後會與 caveolin-1 交互作用並且驅使 Integrin 在 lipid raft 區域作用，另外在 β subunit 為例，活化後會與 FAK 交互作用且驅使 Integrin 與 Focal adhesion molecules 與 cytoskelton 加強作用。以上這些作用可使細胞在有 Integrin 活化的區域中，提昇細胞貼附的能力。因此當 Integrins 與外界的胞外基質結合時，所傳遞的訊號會加強細胞固著能力，對於細胞的穩定及存活有著重大的意義。而細胞是否移動，視 Integrins 與其他分子之間交互作用，在細胞膜內區域訊號是否持續與大於訊息拮抗的閾值而定(Guan, 2004)。

整合素 Integrins 細胞內的分子連結情形

細胞中直接聯結細胞與胞外基質的分子為 Integrin，連接細胞內外的訊息及結構；在細胞外 Integrin 可以與 fibronectin、fibrin(ogen)、various collagens、lamina、entactin、tenascin、thrombospondin、von Willebrand factor and vitronectin 聯結，主要是藉 RGD sequence 的組成物連結，；雖然 Integrin β 1 不可與細胞上的 ICAM 做直接性的連結，但 Integrin β 1 可藉由 fibrinogen 間接的與另一細胞上的 Integrins 做鍵結；在細胞內，Integrins 的 β 1 次單元蛋白質可以藉由 Talin 先行結合在膜內蛋白質 C 端區域，再以 Paxillin 與 Villin 序列式結合，召集與聚集細胞骨架 β -actin，使得細胞膜與細胞質之間有了一個結構上的結合與聯繫；Integrins 對於 cell signaling transduction，Integrins intracellular domain 會與 FAK (focal adhesion kinase)做直接聯結，去調控有相關 Integrins 的訊號(Parsons, 2003)。其中可與活化態的 Integrin 交互作用的分子，包括了 Caveolin-1、PIP3、PI3K、PTEN、survival related signaling，多半可以去歸納出 FAK 可以使用最快傳遞訊的路徑去影響細胞膜上的調控蛋白質與第二傳遞分子(Giancotti and Ruoslahti, 1999) (Romer, et al., 2006)。由上述可以總結出，內皮細胞要生長在任何環境中時，都需要有 Integrins 的存在與活化，在生理意義為貼附分子，在訊息傳遞中

可視為重要細胞生存的依據； Integrins 不只是單方向的訊號傳遞與單方向的結構性支持，而是雙向式的訊號傳遞，inside-out 的方式是由胞內傳達附著的訊號進一步活化 Integrins，而去結合膜外基質；而 outside-in 則為 ECM 與 Integrin 結合後，先有訊號傳遞至細胞內，此訊號會導致同類次單元區集作用與相配次單元區集作用，以加強細胞應力，當然也因為相接的 FAK signaling 活化與細胞移動的訊號做拮抗(Damsky and Ilic, 2002)。

實驗目的

探討羊膜培養環境內皮細胞穩定度

由於在本實驗中使用羊膜為內皮細胞貼附的胞外基質，必須確定內皮細胞不因外在環境的基質與在正常人體血管中基質不同，而有細胞轉型的問題存在。故先以內皮細胞蓄養在羊膜上，以內皮細胞特有分子(vWF, VE-cadherin, PECAM-1) 的抗體進行標定。以共軛焦顯微鏡(Confocal, Ziess 510)進行觀察羊膜上內皮細胞特有分子表現與細胞形態，以確定內皮細胞不因改變細胞貼附的胞外基質而有轉型的可能性。

以人造沖刷力測試羊膜基質上內皮細胞的抵抗沖刷指數

使用自製的 Chamber 裝置將培養在一般培養皿及覆有羊膜培養皿放入，使用 M-199 medium 以 12 dyne/cm² 的力量作為測試細胞貼附度的沖刷流體。沖刷完後，收集沖刷液中的細胞與收集培養皿上剩餘細胞，以 Pertac cytoflow 與 ImagePro PLUS 做細胞數量計算，最後使用統計方式去判斷羊膜為胞外基質時，對於動脈內皮細胞貼附度是否有所影響。

以反轉錄實驗探討內皮細胞在羊膜培養環境下中整合素的連結類型

鑑於前人文獻中並無內皮細胞蓄養在羊膜上的相關資料，且內皮細胞連結 Integrins 分子類型也由前人文獻中推測而來，過去曾有實驗將內皮細胞培養在 collagen I 上，發現相對應的胞外基質受器 Integrins 特定種類便會增加(Ruegg, 2004)；本實驗將內皮細胞種在覆蓋有羊膜的玻片後，以六小時與二十四小時後，取其 mRNA 再經由反轉錄，再以 Integrin β 1、Integrin β 2、Integrin β 3 及 Integrin α v 的引子去做偵測。

羊膜培養環境下整合素在內皮細胞中的分佈及其相關分子的表現量

Integrins 有活化態與非活化態兩種不同型態與結構，Integrins 在這兩種型態下，其 receptor (Integrins) 與 lineage (ECM) 之間的連結的能力有 2-4 倍之差；所以討論細胞的 Integrins 是否活化也對於細胞與胞外基質的連結力有著重要的影響；故在此用 mouse anti-Integrin β 1 active form monoclonal antibody (chemicon AB1720)、mouse anti-Integrin β 1 monoclonal antibody (BD Biosciences 5523690)、mouse anti-FAKs

monoclonal antibody (BD Biosciences 610088) 及 mouse anti-Paxillin monoclonal antibody (abcam ab3127) 西方點墨法作為驗證。也同時使用共軛焦顯微鏡觀察 Integrin $\beta 1$ 與 F-actin 或是 Caveolin-1 (Integrins signaling associated protein, 且與 Integrins 有 direct interaction) 共同有訊號的表現位置所在，是否可形成 focal adhesion 有所謂的群集聚集化在細胞底層幫助細胞貼附。

以細胞流式儀探討在羊膜培養環境內皮細胞表面整合素表現量

Integrins 為細胞底部細胞膜上的醣化穿膜性蛋白。Integrins 功能性與 hemidesmosome 一樣，都是聯結細胞內骨架與胞外基質的結構蛋白，若是 Integrins 在細胞底部膜上數量越多則細胞對胞外基質的連結則越多。故在此用 mouse anti-integrin $\beta 1$ monoclonal antibody (BD Biosciences 5523690) 與 Goat anti-mouse IgG conjugated FITC，以細胞流式儀偵測細胞表面螢光訊號，將不同處理下內皮細胞於細胞膜上的 Integrin $\beta 1$ 表現量。

探討內皮細胞中整合素在羊膜培養環境下參與細胞貼附行為

Caveolin-1 具有與活化態的 Integrin α subunit 作結合的特性，可使用免疫共同沉澱的方式，以 rabbit anti-caveolin-1 polyclonal antibody 與 mouse anti-Integrin β 1 monoclonal antibody，偵測 caveolin-1 與 Integrin β 1 在內皮細胞進行貼附行為時，是否有參與細胞貼附複合體。同時也使用免疫螢光染色去觀察在羊膜上培養的內皮細胞中，是否 caveolin-1 與 Integrin β 1 以及 F-actin 三者有所聯結與交互作用。

探討內皮細胞中整合素在羊膜培養環境下參與細胞的貼附行為

使用 mouse anti-Integrin β 1 monoclonal antibody 將內皮細胞中 Integrin β 1 與相關連結的蛋白共同免疫沉澱後，再使用 mouse anti-Integrin β 1 monoclonal antibody、mouse anti-FAKs monoclonal antibody 及 mouse anti-paxillin monoclonal antibody 使用西方點墨法作為驗證，在有無羊膜處理下 Integrin β 1 與 focal adhesion complex 的交互作用量是否有所變化。

材料與方法

一、 初級大動脈內皮細胞培養與動脈內皮細胞種植羊膜

取一般食用豬的升主動脈與腹腔大動脈，置於 1.0X PBS (1.5% penicillin, 0.5% fungizon) 清洗，再置於 M-199(Gibco, 德國)培養液中，以 4 號小鑷子將結締組織及血球清乾淨，並將其血管切開呈平面狀浸置含有 0.25%的 tyrpsin，在使用塑膠細胞刮刀將內皮細胞刮取，以 M-199 mudium 打散並且移至含適量 M-199 medium(10%FBS, 1.5% penicillin, 0.5% fungizon)的無菌培養皿(35x35 mm)中(Diglio et al., 1989)。培養液內含 10%小牛血清(Gibco, 德國)及每毫升一個單位之盤尼西林(Sigma, 美國)。將血管圈置於 37°C，二氧化碳濃度為 5%的培養箱中進行細胞培養，約每天更換一次培養液。含內皮細胞的培養液培養至第二天，動脈內皮細胞開始大量附著的結果，繼續培養至第三天將移至另一新的培養皿中，並將培養液的抗生素濃度降至一般培養的情況(10%FBS, 0.5% penicillin)，待此第一代內皮細胞養滿後，以胰蛋白酶處理將細胞自培養皿取下，放入 DMSO 中冷凍以備後續實驗用。內皮細胞可利用胰蛋白酶將細胞轉移至培養瓶中做繼代培養。實驗所採用的細胞是取自第五代到第八代的細胞。

二、 核糖核酸萃取與反轉錄聚合酵素連鎖反應

在實驗準備時，先行準備 35mm 種滿內皮細胞的培養皿，有羊膜處理組與對照組兩組。使用 TRIzol 試劑 (Invetrogen,美國) 抽取細胞 total RNA。先收集 10^6 動脈內皮細胞後，加入 1 ml TRIzol 試劑在室溫下培養 5 分鐘將細胞打破並均質，再加入 0.3 ml chloroform 搖勻，置於冰上 5 分鐘，接著在 4°C 下以 12000 xg 離心 10 分鐘，將上層液移至新的離心管並加入兩倍體積的 100% 乙醇，再以 12000 xg 離心 1 分鐘形成 RNA 沉澱物，最後將 total RNA 風乾後溶於 20 μl 無菌去離子水中。再以 total RNA 為模板利用反轉錄套組 (Qiagen,美國) 作出 cDNA。將 2 μg total RNA 加入反轉錄套組中的 RNase inhibitor、oligo d(T) primer、RT buffer、reverse transcriptase、dNTP 混合液置於 37°C 一小時而反轉錄出 cDNA。

三、 以聚合酵素連鎖反應分析羊膜培養環境下內皮細胞 Integrins 表現量

利用前述方法取得大鼠動脈內皮細胞 cDNA，以 cDNA 為模板，利用下列 primer 作 PCR 增幅出 Integrins 在種植羊膜後 6、

12、24、48、120 小時的 mRNA 表現。

Integrin β 1 primer

Forward sequence 5' AACGGAATTCAAACAGTGAG 3'

Reverse sequence 5' ATAAATTCACCCAAAGGTCC 3'

Integrin β 2 primer

Forward sequence 5' CCACGACAGTTATGAACCC 3'

Reverse sequence 5' CACCACGACAGTTATGAACC 3'

Integrin β 3 primer

Forward sequence 5' CAGTAACCTGCGGATTGG 3'

Reverse sequence 5' TAAGCTCACCCAGTAACCTGC 3'

Integrin α v primer

Forward sequence 5' CACTGAAACGAAGACCAGC 3'

Reverse sequence 5' CAGACATTGTCTTCACCACAG 3'

DNA-directed RNA polymerase II polypeptide β primer

Forward sequence 5' CCCTGACATCATCATCAAC 3'

Reverse sequence 5' CCATTTCTCCAAAACGCA 3'

四、 機械力液態流動沖刷測試

使用 Pastille pump 以 M-199 medium 為流動液體去進行沖刷 (pulse pressure=12dyne/cm²) 5x10⁶/cm² 的細胞密度於羊膜上與一般培養皿上的已蓄養二天的內皮細胞 (已確定其內皮細胞已有 PECAM-1 與 VE-cadherin 的形成完畢), 在沖刷完畢後將有羊

膜與其對照組進行 DAPI 的染色以 4X 視野下全部的截圖，將其截圖以 Image pro PLUS 4.0 進行計數。另一方面使用 Partec cytoflow 去將細胞計數，將實驗組與對照組各三重複數的數據，以 two-tails unpaired T-test 進行分析，以取得有無羊膜基質培養環境下，其內皮細胞附著能力是否有所差異。

五、 細胞流式儀偵測內皮細胞表面蛋白質染色

將細胞 trypsinization 為懸浮狀態，再將此懸浮液以 M-199 medium + 10% FBS, 5mins, 4°C 中止 trypsin 作用。離心 600g, 10mins, 4°C 將細胞沉澱；使用 1X PBS (0.25uM EDTA) 沖洗。Mouse anti-Integrin β 1 Antibody (1 : 50) 4°C, 2hrs ; FITC-Goat anti-Mouse IgG (1 : 100) 4°C, 1hr。

六、 分區收集沖刷測試下附著與非附著內皮細胞

在機械力液態流動沖刷測試中，有無羊膜依附的細胞，確實收集被沖下的細胞與刮掉依然附著在上的內皮細胞。將細胞分做四組，經由沖刷後仍貼附在羊膜上的內皮細胞與被沖刷下的內皮細胞，經由沖刷後仍貼附在培養皿上的內皮細胞與被沖刷下的內

皮細胞，將這已分四類的細胞進一步以西方點墨法做對於 Integrin $\beta 1$ 表現量的分析。

七、 萃取與分析羊膜培養環境下內皮細胞中整合素異構體 $\beta 1$ 及其活化態的蛋白質表現

配置 8%~15% 梯度十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 的系統進行蛋白質的分析。取 30ug 蛋白質加入 10 ul 的 sample buffer，於 100°C 沸水中 denature 4 分鐘，之後注入膠體的孔槽中，通以電壓 50 Volt，將樣品通過 stacking gel 後，將電壓調整成 70 Volt 繼續 2~3 小時。將 PVDF 膜剪裁至與蛋白質電泳膠同樣大小，並浸泡於轉移緩衝液 (transfer buffer) 中約 6 分鐘，另外再裁剪六片同樣大小的濾紙浸濕，待蛋白質進行電泳分離後，將蛋白質電泳膠取出，去掉 stacking gel 的部分，浸泡於轉移緩衝液中約 15 分鐘。進行轉漬前，先將兩張濾紙置於陽極板上，再依序放上 PVDF 膜、蛋白質電泳膠及另兩張濾紙，並避免氣泡產生，之後，蓋上陰極板及安全蓋，以 20 Volt 的電壓進行轉移 30 分鐘。轉移完，取出 PVDF 膜，然後再置入含 5% 脫脂奶粉的 PBST (PBS - 0.05 % Tween 20 buffer) 中，在室溫下反應一小時，去除

非專一性結合部位。接著以 PBST 緩衝溶液清洗 2 次，每次 10 分鐘，然後加入 15 ml 的老鼠抗 Integrin β 1 (1:15000 稀釋比例)或 Integrin β 1 active form 抗體(1:2000 稀釋比例)及 β -actin 抗體 (1:2000 稀釋比例)，於 4°C 下反應 16 小時後，以 PBST 緩衝溶液清洗 3 次，每次 5 分鐘。將 PVDF 膜與 HRP 接合山羊抗老鼠二級抗體 (1:15000 稀釋比例)於室溫下反應 1 小時，再經 PBST 緩衝溶液清洗 6 次，每次 10 分鐘，以 chemiluminescence 冷光試劑顯色，並在冷光影像感應系統下呈像(Fuji, Japan)。

八、 化學聯結法及免疫沉澱法

將細胞種植在羊膜上 144 小時後，以 PBS 清洗兩次後加入溶於 PBS 的 3,3'-Dithio bis-succinimidylpropionate (DSP) (250 μ M) (Sigma)在室溫下作用 1 小時，加強分子之間的結合力。接著再用 PBS 清洗兩次後將細胞刮下，並以 600 r.c.f. 將細胞離下，接著使用 Catch and Release 套組 (Upstate, 美國)中的 lysis buffer, NP-40 將細胞溶解，接著取 500 ug 的細胞萃取液加入 Integrin β 1 抗體以及 10ul 的抗體親和性受體 (套件中所附) 混合置於 4°C 一天。接著將混合液以專用管柱離心過濾，此時被抗體所抓住的相關蛋白質會停留在管柱中醣珠上，接著再加入 70 μ l

non-reduced elution buffer 並離心使結合在醣珠上之蛋白質沖下，最後利用西方點墨法分析結果。

九、 羊膜上內皮細胞的免疫螢光染色

將內皮細胞培養在以覆蓋有羊膜的載玻片上，以 M-199 medium + 10% FBS 培養五天。將細胞以冷的 4%福馬林固定 20 分鐘後，先加入含 3%白蛋白質的 PBS 緩衝液 30 分鐘，再以 PBS 清洗 5 分鐘 3 次，洗去多餘的白蛋白。接著加入老鼠抗 Integrin β 1 抗體 (1:200 稀釋比例) 與兔子抗 Caveolin-1 抗體 (1:200 稀釋比例)及 Phalloidin conjugated FITC (1:50 稀釋比例)，於室溫下反應 30 分鐘後，以 PBS 緩衝液洗 3 次，洗去多餘的初級抗體。以 1:200 的稀釋比例加入山羊抗老鼠 Cy5 螢光結合及山羊抗兔子 Rhodamine 螢光接合次級抗體，在室溫下反應半小時，以 PBS 清洗 3 次。以 Hoechst 33342 (1:10000 稀釋比例)。風乾後封片，於共軛焦螢光顯微鏡 (LSM 510, Zeiss)下鏡檢，先以波長 382 nm 為激發光源偵測 nucleus stain Dye 確定細胞位置，以波長 488 nm 為激發光源偵測 FITC 並以綠色螢光顯現，以波長 543 nm 為激發光源偵測 Rhodamine，以紅色螢光顯現，以波長 633 nm 為激發光源偵測 Cy5，以藍色螢光顯現。進行三度空間成相時，利用 Z

軸垂直做切面掃描，每一切面厚度約為 $0.2\ \mu\text{m}$ ，最後以 Zeiss LSM

Image 3.2 軟體將每一切面影像重組成為三度空間圖像。

實驗結果

一. 羊膜培養環境下內皮細胞表現內皮特定分子

羊膜上的內皮細胞可以表達內皮細胞特定標記蛋白 (Von Willebrand Factor, vWf) 於細胞質內有所表現，且以可偵測內皮細胞 cell-cell junction 的 VE-Cadherin 與 PECAM-1 的抗體使用免疫染色下，螢光訊號共同表現在 cell-cell junction 的位置。由此可得知內皮細胞蓄養在羊膜上，還維持著內皮細胞在細胞膜上與細胞質內應有的特定蛋白的表現。另一方面，確定羊膜上的內皮細胞，且沒有平滑肌細胞的干擾，故使用可偵測平滑肌細胞特定標定蛋白 α -actin 的抗體，在結果中 α -actin 的訊號並無出線，且 VE-Cadherin 與 PECAM-1 的螢光訊號可以共同表現在內皮細胞 cell-cell junction 的位置，表示在初級細胞培養中，沒有平滑肌細胞的存在(圖一)。

二. 羊膜培養環境內皮細胞附著能力指數

附著能力指數 Adhesion index，是為要探討羊膜對內皮

細胞支持力與附著能力；在結果中可得知內皮細胞培養在羊膜上，其貼附指數44.5%高於對照組(plastic dish)18.8%。在實驗過程使用羊膜做為內皮細胞貼附羊膜胞外基質上時，且經由擬態的血流沖刷力處理後，驗證了羊膜對於內皮細胞有著細胞貼附的物理性質支持。在沖刷指數下的的結果 control : AM treatment = 1.00 : 2.36(圖二)。羊膜培養環境下，內皮細胞的貼附指數是對照組的兩倍，所以當羊膜為內皮細胞的胞外基質時，可提供內皮細胞有更好的貼附環境。

三. 羊膜培養環境下內皮細胞整合素的表現

在羊膜培養環境中，內皮細胞培養在有無羊膜胞外基質的兩種環境下，經由Trizol(sigma, U.S.)萃取細胞中核糖核酸，經由反轉錄聚合連鎖反應，再使用Integrin $\beta 1$ 與 Integrin αv 與RNA polymerase II polypeptide β subunit的特定引子，進行聚合連鎖反應得到Integrin $\beta 1$ 與 Integrin αv 與RNA polymerase II的增幅片段，使用核酸電泳與EtBr偵測表現量；RNA polymerase II在此為internal control，經由比例處理與統計處理後，可得Integrin $\beta 1$ 結果 control : AM treatment= 1.00 : 1.43 ($p < 0.05$)， Integrin αv 結果control :

AM treatment= 1.00 : 2.84 ($p < 0.05$)。所以在羊膜處理環境下，Integrin $\beta 1$ 與 Integrin αv 都有較高的表現量(圖三)。西方點墨法結果total Integrin $\beta 1$ 的表現量在AM處理組對於control對照組均有統計上的顯著差異的結果，與在細胞蛋白萃取中，偵測active form Integrin $\beta 1$ 的表現量上，也有相同的結果。不過再以internal control作均質化處理後，可得total Integrin $\beta 1$ 的比較中control : AM treatment = 1.00 : 1.35 ($p < 0.05$)，與active form Integrin $\beta 1$ 的結果比較中control : AM treatment= 1.00 : 2.42 ($p < 0.05$)(圖四)。在羊膜的培養環境中，內皮細胞會表現出較為多量的成熟態與未成熟態 Integrin $\beta 1$ ，在活化態中表現量中羊膜培養環境下的內皮細胞也會有較多量的Integrin $\beta 1$ 轉型為活化態。

四. 探討內皮細胞細胞膜表面整合素表現量

Integrin $\beta 1$ 在內皮細胞表面上的表現量，可由低溫抗體染色實驗方式偵測，經由螢光顯微鏡觀察，已確定Integrin $\beta 1$ monoclonal antibody可作用在Trypsinization後的內皮細胞(圖五)。使用流式細胞儀(Partec cytoflow)偵測內皮細胞表面上的Integrin $\beta 1$ 表現量，control : AM treatment= 1.00 : 1.38

($p < 0.05$)。結果中可以確定羊膜AM實驗組的螢光訊號相較對照control組訊號強。表示羊膜實驗組的內皮細胞會有較多的mature form Integrin $\beta 1$ 表現在basal surface上，發現羊膜培養內皮細胞中Integrin $\beta 1$ 有較高的表現量(圖六,七)。

五. 探討整合素參與細胞貼附行為

以西方點墨法與細胞流式儀的結果中，難以判斷Integrin $\beta 1$ 是否有參與細胞貼附行為的表現量，以免疫共同沉澱探討Integrin $\beta 1$ 是否有與細胞參與貼附行為時的分子做結合。實驗過程中先以monoclonal anti-Integrin $\beta 1$ antibody將細胞中Integrin $\beta 1$ 共同免疫沉澱，再經由西方點墨法偵測有與Integrin $\beta 1$ 結合的focal adhesion kinase (FAK)與Paxillin (Pax, substrate of FAK)，結果中可用loading control的Integrin $\beta 1$ 表現量作均質化。FAK在表現量上control : AM treatment= 1.00 : 1.05 ($p > 0.05$)；Paxillin在表現量上control : AM treatment= 1.00 : 1.83 ($p < 0.05$) (圖八)。此Paxillin與Integrin $\beta 1$ 結合量在羊膜實驗組中統計上具有意義且高於對照組，可作為Integrin $\beta 1$ 參與細胞貼附行為的依據，也可對應在沖刷實驗中的結果，羊膜可協助內皮細胞具

有相當強度的貼附能力(圖二)。

六. 探討內皮細胞與羊膜連接處分子表現

共軛焦顯微鏡觀察中，由於當 Integrin $\beta 1$ 與 F-actin (Filament of β -actin) 共同呈現時，表示此共同表現訊號有細胞貼附複合體(contact point or focal adhesion complex)的產生與訊號共同表現(colocalization)，且因為 integrin 活化後，Integrin 構型會改變且會吸引周圍 Lipid raft 相關的分子(如：caveolin-1 與 active form integrin α subunit 會與 caveolin-1 直接結合)，所以 caveolin-1 會處於在 Integrin signaling 之中(Gaus., et al. 2006)。以細胞底層的掃描看到 Integrin $\beta 1$ 、Caveolin-1、F-actin，所以可以確定三者相連處的訊號與 F-actin 重疊處即為 Focal adhesion complex 所在處。此結果顯示，在羊膜培養環境下，內皮細胞仍有細胞貼附的行為存在(圖九)。同時使用了共同免疫沉澱，以 monoclonal Integrin $\beta 1$ antibody 與 polyclonal caveolin-1 antibody 分別進行免疫共同沉澱。以西方點墨法可確定在於兩種免疫沉澱處理下，皆可偵測到 Integrin $\beta 1$ 、caveolin-1、 β -actin，所以這三種蛋白質在於細胞中確實有做聯結(圖十)。

討論

內皮細胞標定蛋白 vWf 訊號在螢光結果中確定有所表現，且 specific endothelial cell cell-cell junction marker 的 CD144, VE-cadherin 與 CD31, PECAM-1 也於羊膜上培養的內皮細胞連結處有表現，不但確定了 cell-cell junction 的完成，與內皮細胞在羊膜培養環境中可以確切表達內皮細胞應該有的蛋白質，且沒有表達平滑肌細胞特有標定分子，表示在於初級內皮細胞培養成功。在此由於實驗物種為豬，在於抗體的選用上有了限制，故無法以更多種的動脈內皮標定分子去進行確認內皮細胞的特性。

在本實驗中最重要的目的就是要去了解羊膜對於內皮細胞的影響，所以在本實驗中特別使用一般的培養皿作為對照組，以便於消除內皮細胞本身所擁有的貼附性質與其他內生性干擾。由於培養內皮細胞在羊膜的培養環境中，且羊膜為胞外基質，所以在有關於蛋白質萃取實驗中，都會因為刮取細胞的同時，也會取到部份的羊膜。因此在西方點末法實驗流程中有定量樣本的濃度的程序，但是羊膜的干擾下會多取到胞外基質所含的蛋白質，在最後會造成在羊膜處理組中，會有發生相對於對照組 total cell lyate 少量的問題存在。故在每次的西方點墨法實驗中，都必須以 loading control 做 normalization，將所有的結果以比例的條狀

圖呈現。

Active form Integrin $\beta 1$ 實驗中，由於抗體作用在活化態時的一特殊結構，所以細胞蛋白質萃取中比須以 RIPA 直接溶解細胞與不添加 protease inhibitor 且在低溫下作用，所以在西方點墨法結果中 active form Integrin $\beta 1$ 在呈色時會有上下模糊的區域存在，這是由於 Integrin $\beta 1$ 本身具有四段的 EGF repeat，會有西方點墨法曝光圖像結果不緊密，但是其西方點墨法的曝光值結果是可以做曝光量的定量。

在分析結果中 total Integrin $\beta 1$ 的比較中雖具顯著差異，但是在羊膜的影響下，內皮細胞 Integrin $\beta 1$ 還是會有較多的表現；在 active form Integrin $\beta 1$ 的比較中最具顯著差異。以上述 Integrin $\beta 1$ 的 total 與 active form 的表現量來歸納出，在有羊膜的培養環境中，內皮細胞會表現出多量的 Integrin $\beta 1$ 與有較多的 Integrin $\beta 1$ 轉型為活化態，但是卻沒有辦法使用 active form Integrin $\beta 1$ 的抗體去進行免疫共同沉澱，這是由於抗體去偵測 Integrin $\beta 1$ 的活化態的構型，但此活化態的構型無法長時間持續維持，在細胞凋亡或是沒有細胞內活化訊號持續活化指令，所以 Integrin $\beta 1$ 構型的改變無法平衡，最後活化狀態的比例會逐漸趨近於無。

本實驗中以低溫染色法可以避免細胞發生抗體內胞飲的作用，配合可在細胞經由 trypsinization 後還可以偵測細胞表面抗原的抗體，進行染色與定量，重新檢測細胞表面，所感興趣的貼附因子在蛋白表現量，是否與西方點墨法中的結果一致。細胞流式儀實驗目的在於消除對於西方點墨法呈現結果中，internal control 的質疑，雖然在於細胞流式儀結果中，螢光訊號極為敏感，造成螢光訊號波形變異大，但是平均螢光強度的顯示下可說明羊膜處理組與對照組的差異；所以對於細胞流式儀的目的已經可以驗證細胞膜上 Integrin $\beta 1$ 螢光強度，可與西方點墨法結果中 Integrin $\beta 1$ 成熟態的分子量為 136 kD 的表現量相符合，最後依照細胞流式儀的偵測下，西方點墨法的結果判斷方式可以作為對 Integrin $\beta 1$ 表現量在於羊膜處理組與對照組的差異。

西方點墨法結果中 mature form total Integrin $\beta 1$ 的表現量在 AM 處理組中對於 control 對照組，在統計上有顯著差異的結果。在實驗中，參考細胞與抗體的調理作用；在低溫狀態中，使用 Integrin $\beta 1$ 的抗體偵測細胞膜上的 Integrin $\beta 1$ ，及使用可相對應的螢光二級抗體，在細胞流式儀的偵測下，可得平均螢光強度。在細胞流式儀偵測細胞膜上 Integrin $\beta 1$ 的表現量，其結果與西方點墨法均質化的結果相互比較後，結果中西方點墨法與低溫螢

光染色的實驗結果中，Integrin $\beta 1$ 的表現量在對照組與處理組的比例相同。

細胞貼附複合體 Cell focal adhesion complex 構型的建構，在實驗背景中提及，需要活化態的 Integrin 去召集 FAK，再經由 FAK 催化 FAs (Focal Adhesion molecules) 並且結合 cytoskeleton (β -actin) 後，才可以形成參與細胞貼附的複合體。所以在免疫共同沉澱的結果中，可依 Paxillin (FAs) 與 Integrin $\beta 1$ 結合的量在羊膜處理組中比對照組高出 1.83 倍的量，故在此可以說明在羊膜的影響下，此內皮細胞中的 Integrin $\beta 1$ 參與細胞貼附的量會提升，但是 Paxillin 在內皮細胞中蛋白質的含量是不受羊膜所影響的(data not show)。實驗結果中 FAK 與 Integrin $\beta 1$ 結合的量卻沒有像 Paxillin 與 Integrin $\beta 1$ 結合的量具有顯著差異。由文獻中指出，這是由於同種的 Integrin subunit 有相互結合的模式存在，同種的 Integrin subunit 可兩兩或是三個一起結合並且共用 FAK(Hynes, 2003)。所以 FAK 為催化 FAs 的重要蛋白質，其中與細胞骨架結合的 FAs，如：Talin、Paxillin、Villin 因為會直接與細胞骨架結合，所以在實驗中可以 FAs 與 Integrin 結合的量作為 Integrin 參與細胞貼附行為的依據。

本實驗中 Integrin $\beta 1$ 是否作用和作用強度與之活化有關，

在本實驗中無法以蛋白質結合動力學的方式去探討，但依現有的文獻中，可以說明活化的 Integrin $\beta 1$ 會與 FAK 連結後，同時 Integrin 會以 out-inside 的訊息傳遞去召集 FAs (focal adhesion molecules) Paxillin 等分子，同時間內，Integrin 會以構型改變以增加連結 ligand 的親和力，並以 FAs 開始與 F-actin 連結加強 focal adhesion 的能力。所以使用共同免疫沉澱法將 Integrin $\beta 1$ 相關蛋白沉澱，再以西方點墨法偵測 FAK 與 FAs (Paxillin, substrate of FAK)蛋白質的量，就可以得知在細胞中 integrin 參與細胞貼附複合體中的量。

就以羊膜對於內皮細胞，在於細胞貼附指數的結果與 Integrin $\beta 1$ total 與 active form 的表現量有者相同的結果，雖然在比例上難以取得完全相同的比例，由於在萃取細胞中蛋白質的流程中，無法阻止 active form Integrin $\beta 1$ 轉化為 inactive form 的趨勢，所以在西方點墨法的結果中，只能以比較的方式去查看 active form Integrin $\beta 1$ 在於不同胞外基質的情況下，表現量的比例有所不同；但是就各個結果中，予以排名上的統計方式，是以正相關的結論作為結果。

免疫螢光染色中，使用 Integrin signaling pathway 所包括的 Caveolin-1 作為 FAs (Focal Associated molecules)的指示性蛋

白(當 Integrin α subunit 處於活化狀態下，可與活化態 Integrin 結合)與 Integrin β 1 及 Phalloidin conjugated FITC(Phalloidin 可與 filament 型態的 β -actin 做聯結)，所以可在螢光結果中可以看到在凹凸不平的羊膜上，其內皮細胞中的並存訊號才為 focal adhesion 結構處，在此使用共軛焦顯微鏡去觀察 AM 實驗組細胞底層的 Focal adhesion 是否有所形成。同時，以免疫共同沉澱做雙向的測試，確實 Integrin β 1 與 Caveolin-1 互有聯結的方式存在，且可以與細胞骨架 β -actin 做聯結。(Giancotti and Ruoslahti, 1999)。

Integrin 在於活化機轉中，以 inside-out 和 outside-in 兩種方式為主，所以當細胞本身具有存活的潛力時，與細胞外有胞外基質時，細胞本身會主動增加 Integrin 的鍵結，當然外界有 Integrin 可鍵結的 motif 時，也可以經由 Integrin 活化態的改變，傳遞訊號至細胞中，說明此區域為細胞可生長區。Integrin 在於細胞貼附中所扮演的角色中定義為具有與胞外基質高親和力聯結的功能，所以本實驗以觀察內皮細胞中 Integrin β 1 的方向，去解釋內皮細胞貼附在羊膜上的能力，是有部分依靠著 Integrin β 1 所提供。若是可以處理可使 Integrin β 1 活化與去活化的藥物，再進行一次細胞貼附能力與共同免疫實驗，是否更能解釋在羊膜

培養環境中 Integrin $\beta 1$ 在於內皮細胞中所扮演的重要性；同時若是可以去觀察 cell junction 是否有所影響內皮細胞進行抵抗沖刷力，可用低密度內皮細胞種植在羊膜處理與對照的環境中，因內皮細胞在低密度狀態下，細胞之間有空隙無法有 cell-cell junction 形成，但是細胞貼附能力不會受到太多的影響，故可以去單純探討內皮細胞在是否羊膜為貼附基質下，細胞貼附能力是否有所變化；但是在本實驗中，要去探討的是內皮細胞在全滿的狀態下，羊膜胞外基質對於內皮細胞的影響，所以將來的實驗或許會針對細胞貼附與其他環境因子的影響做更深入的探討。

參考資料

- De Caterina R. (2000) Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 3(6):453-67.
- Damsky C.H., Ilic D. (2002) Integrin signaling: it's where the action is. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:594–602
- Giancotti F.G., Ruoslahti E. (1999) Integrin Signaling. *Science* 285: 1028-1032
- Diglio C.A., Grammas P., Giacomelli F., Wiener J. (1988) Rat heart-derived endothelial and smooth muscle cell cultures: isolation, cloning and characterization. *Tissue Cell.* 20(4):477-92.
- Gaus K., Le Lay S., Balasubramanian N., Schwartz M.A. (2006) Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *J. Cell Biol.* 28;174(5):725-34
- Guan Jun-Lin. (2004) Integrins,Rafts,Rac, and Rho. *Science.* 303: 773-774
- Hamelers I.H., Olivo C., Mertens A.E., Pegtel D.M., van der Kammen R.A., Sonnenberg A., Collard J.G. (2005) The Rac activator Tiam1 is required for $\alpha3\beta1$ -mediated laminin-5 deposition, cell spreading,and cell migration. *J. Cell Biol.* 171: 871–881
- Herbst T.J., McCarthy J.B., Tsilibary E.C., Furcht L.F. (1988) Differential effects of Laminin, intact type IV Collagen, and specific domains of type IV Collagen on endothelial cell adhesion and migration. *J. Cell Biol.* 106:1365-1373
- Humphries M.J., Mould A.P. (2001) An anthropomorphic Integrin. *science.* 294: 316-317

Hynes R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 20;110(6):673-87.

Hynes R.O. (2003) Changing partners. *Science* 300: 755-756

Isenberg B.C., Williams C., Tranquillo R.T. (2006). Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circ. Res.* 98:24-35

Jimenez-Marin A., Garrido J.J., de Andres-Cara D.F., Morera L., Barbancho M.J., Llanes D. (2000) Molecular cloning and characterization of the pig homologue to human CD29, the Integrin β 1 subunit. *Transplantation*. 70, 649–655

Liebner S., Cavallaro U., Dejana E. (2006) The multiple languages of endothelial cell-to-cell communication. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 1431-1438

Lusis A.J. (2000) Atherosclerosis. *Nature*. 407:233-241.

Martin K.H., Slack J.K., Boerner S.A., Martin C.C., Parsons J.T. (2002) Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science*. 296: 1652-1653

Morishima Y., Nomura A., Uchida Y., Noguchi Y., Sakamoto T., Ishii Y., Goto Y., Masuyama K., Zhang M.J., Hirano K., Mochizuki M., Ohtsuka M., Sekizawa K. (2001) Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24: 1–11.

O'Toole T.E., Katagiri Y., Faull R.J., Peter K., Tamura R., Quaranta V., Loftus J.C., Shattil S.J., Ginsberg M.H. (1994) Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol.* 124(6):1047-59.

Parsons J.T. (2003) Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* 15;116(Pt 8):1409-16.

- Portmann-Lanz C.B., Ochsenbein-Kolble N., Marquardt K., Luthi U., Zisch A., Zimmermann R. (2006) Manufacture of a cell-free amnion matrix scaffold that supports amnion cell outgrowth in vitro. *Placenta*. 28(1):6-13
- Romer L.H., Birukov K.G., Garcia J.G. (2006) Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus. *Circ. Res.* 98: 605-616
- Ruegg C., Dormond O., Mariotti A. (2004) Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1654: 51– 67
- Serini G., Valdembri D., Bussolino F. (2006) Integrins and angiogenesis: A sticky business. *Exp Cell Res.* 312: 651 – 658
- Sherer Y., Shoenfeld Y. (2006) Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2: 99-106
- Tsai R.J., Li L., Chen J. (2000). Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.* 343: 86-93
- Tsai S.H., Liu Y.W., Tang W.C., Zhou Z.W., Hwang C.Y., Hwang G.Y., Ou B.R., Hu C.P., Yang V.C., Chen J.K. (2007) Characterization of porcine arterial endothelial cells cultured on amniotic membrane, a potential matrix for vascular tissue engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357(4):984-90.
- Urbich C., Dernbach E., Reissner A., Vasa M., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2002) Shear Stress–Induced Endothelial Cell Migration Involves Integrin Signaling Via the Fibronectin Receptor Subunits $\alpha 5$ and $\beta 1$. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:69-75.

圖目

圖一、羊膜環境中內皮細胞標記蛋白質的染色

圖二、附著能力指數 **Adhesion Index**

圖三、羊膜處理組與對照組的Integrin $\beta 1$ 與Integrin αv 訊息核糖核酸表現

圖四、偵測羊膜培養環境內皮細胞中Integrin $\beta 1$ 與active form Integrin $\beta 1$ 表現量

圖五、懸浮後內皮細胞表面上的Integrin $\beta 1$ 螢光表現

圖六、內皮細胞底層表面Integrin $\beta 1$ 的表現量

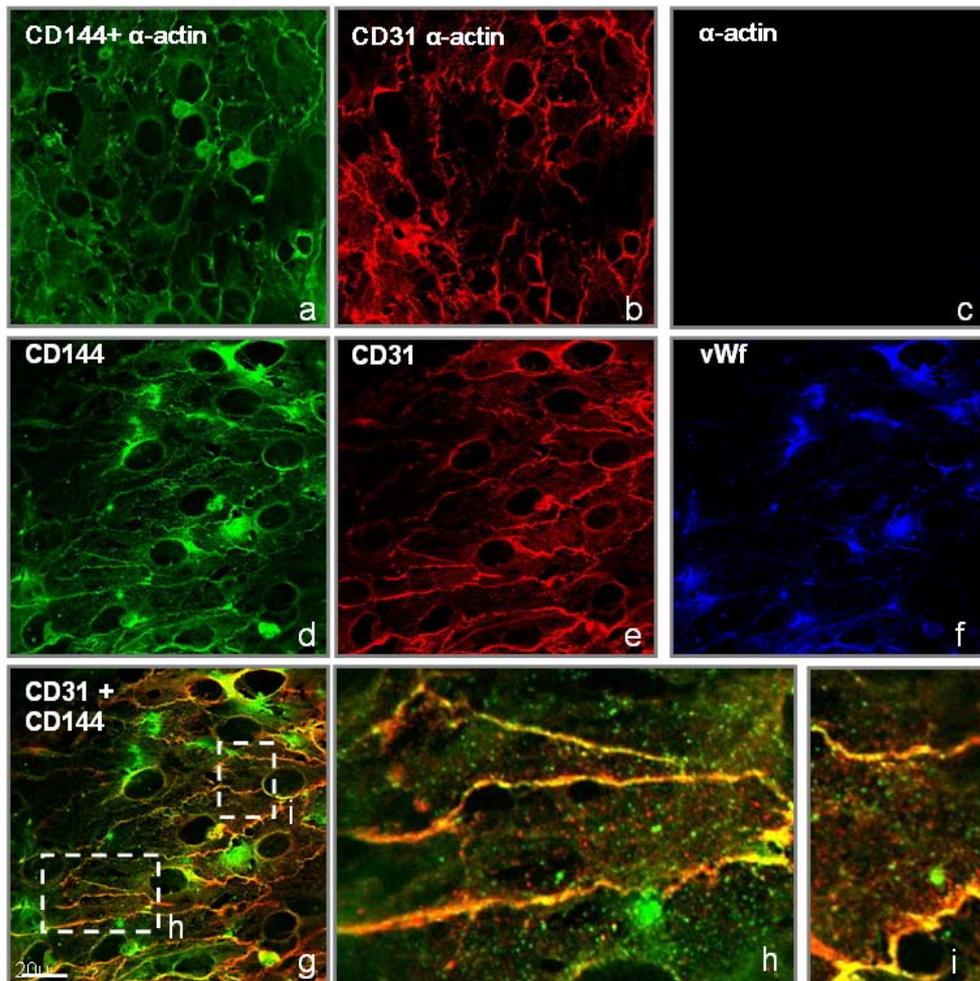
圖七、內皮細胞表面Integrin $\beta 1$ 的平均螢光強度

圖八、使用共同免疫沉澱偵測Integrin $\beta 1$ 與Focal Adhesion molecules 表現量

圖九、羊膜環境下內皮細胞Integrin $\beta 1$ 、Caveolin-1、F-actin具共同表現與分佈

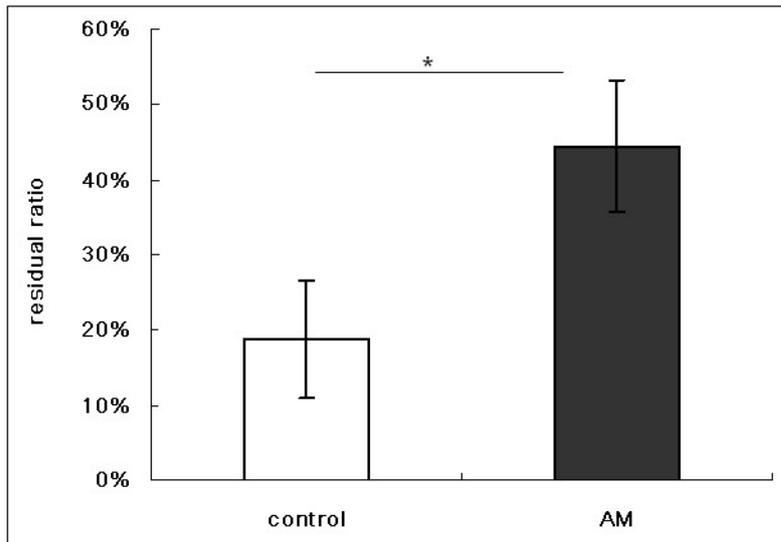
圖十、內皮細胞中於Integrin $\beta 1$ 與caveolin-1以及 β -actin三者的交互作用

附圖一、細胞沖刷裝置與切應力換算公式



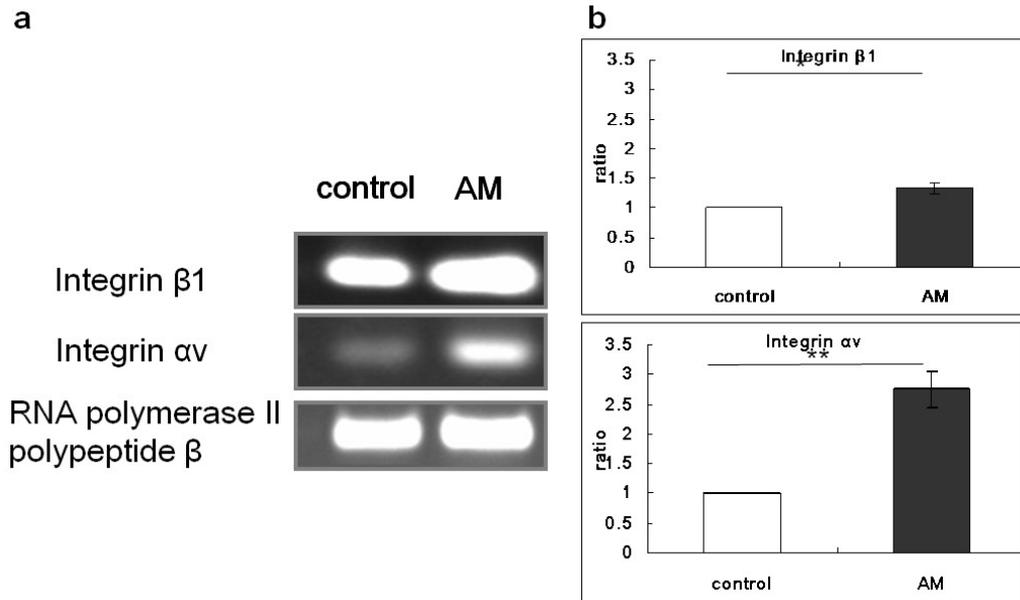
圖一、羊膜環境中內皮細胞標記蛋白質的染色

在a, b, c中為CD31+CD144+ α -actin的染色，在c中沒有平滑肌細胞的特定標定分子 α -actin的表現，表示在初級內皮細胞培養中沒有平滑肌細胞的干擾與污染。在c-i為CD31+ CD144+vWf的染色，且vWf為內皮細胞在細胞質中特有標記蛋白質。CD31 (PECAM-1)與CD144 (VE-cadherine)皆為內皮細胞細胞間特有的聯繫蛋白 cell-cell junction proteins。以上蛋白質的表現可證明內皮細胞在羊膜上蓄養後，仍有內皮細胞標定蛋白質的表現，



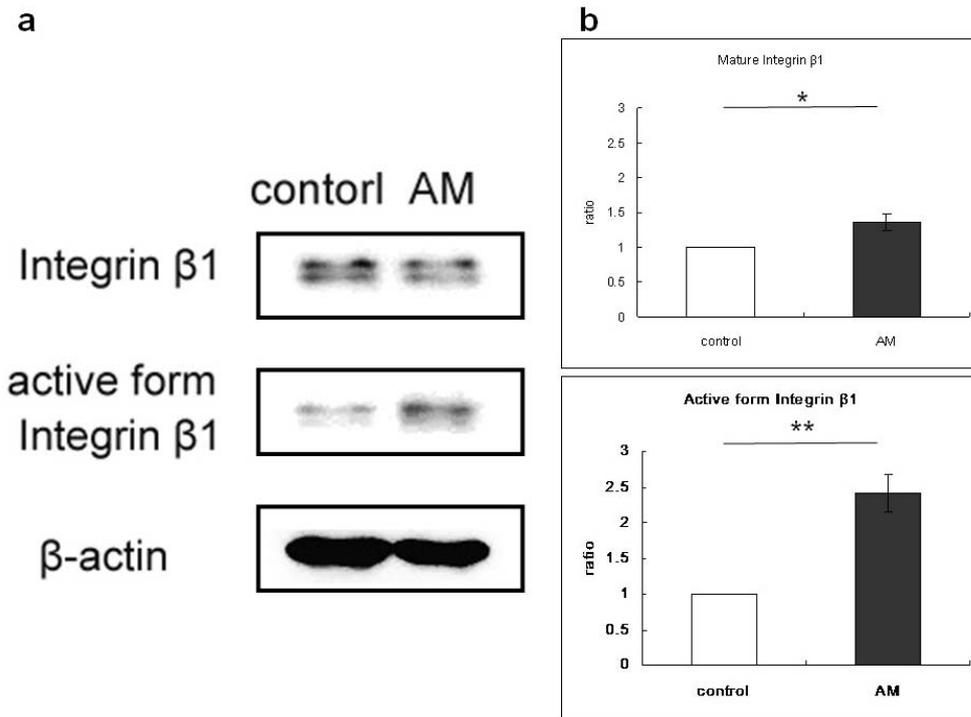
圖二、附著能力指數 Adhesion Index

圖為adhesion index統計結果，沖刷液體為M-199 medium以12 dyne/每平方公分，內皮細胞殘存率為control : AM = 18.8% : 44.5%，結果為AM實驗組高於控制組,p-value = 0.07 and 0.016。



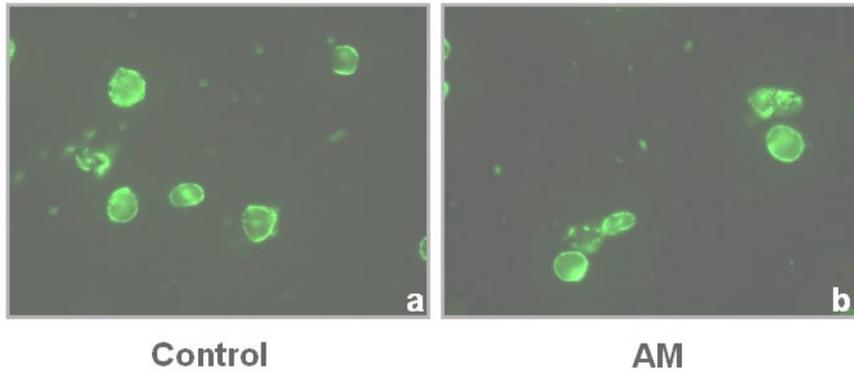
圖三、羊膜處理組與對照組的Integrin $\beta 1$ 與Integrin αv 訊息核醣核
酸表現

由上至下為Integrin $\beta 1$ (289bp)與 Integrin αv (294bp)與RNA polymerase II polypeptide β (382bp)的增幅片段(圖三a)；RNA polymerase II在此為internal control。統計圖中為Integrin $\beta 1$ 結果 control : AM treatment= 1.00 : 1.43 ($p < 0.05$)， Integrin αv 結果 control : AM treatment= 1.00 : 2.84 ($p < 0.05$) (圖三b)。



圖四、偵測羊膜培養環境內皮細胞中Integrin β1與active form Integrin β1表現量

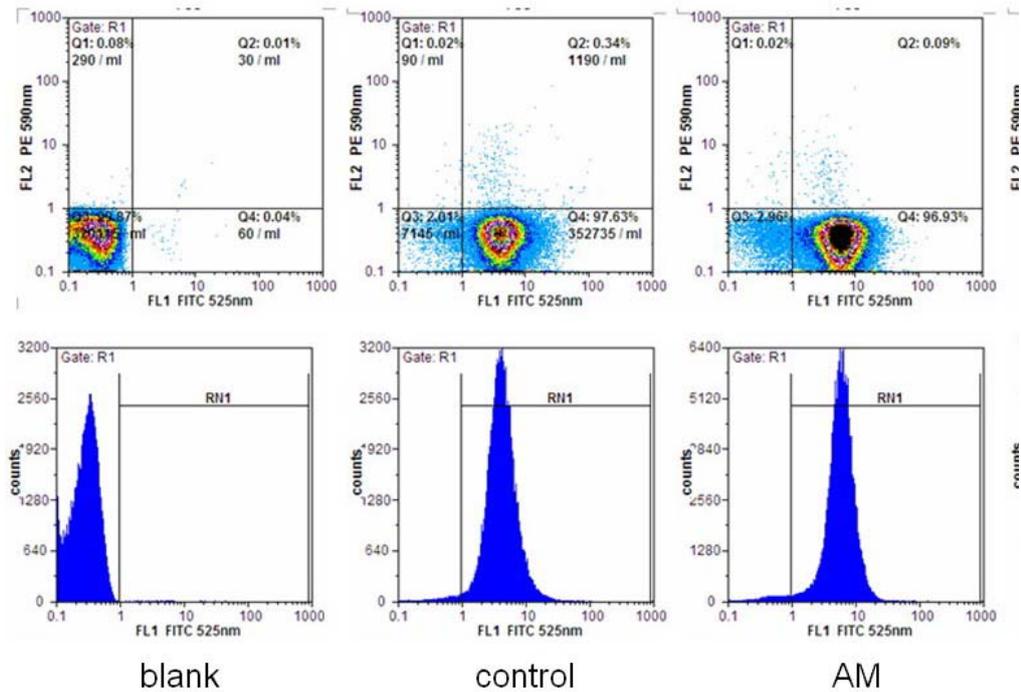
左邊由上至下分別偵測的蛋白質為Integrin β1、Integrin β1 active form與β-actin (loading control)，由左至右的內皮細胞處理為對照組 control、羊膜處理組(AM)(圖四a)；均質化與統計結果中Total Integrin β1的比較中control : AM treatment = 1.00 : 1.35($p < 0.05$)；active form Integrin β1的比較中control : AM treatment = 1.00 : 2.42($p < 0.05$)(圖四b)。



圖五、懸浮後內皮細胞表面上的Integrin β 1 螢光表現

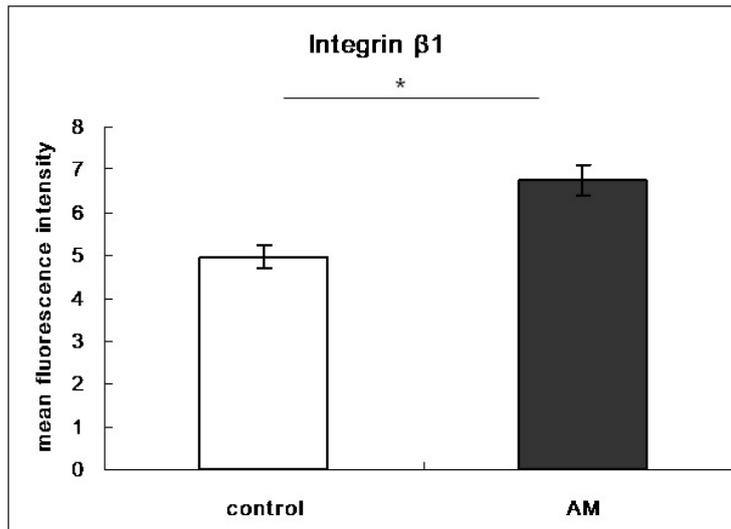
以低溫染色法將細胞膜上的Integrin β 1以螢光作標定，Integrin β 1 monoclonal antibody與trypsinization的內皮細胞進行binding, 4°C，再以FITC-Goat Anti-mouse Ab作用, 4°C，螢光量即可代表Integrin β 1表現量，使用螢光顯微鏡可以看見細胞會形成加冕現象，表示抗體只有作用在細胞膜表面。





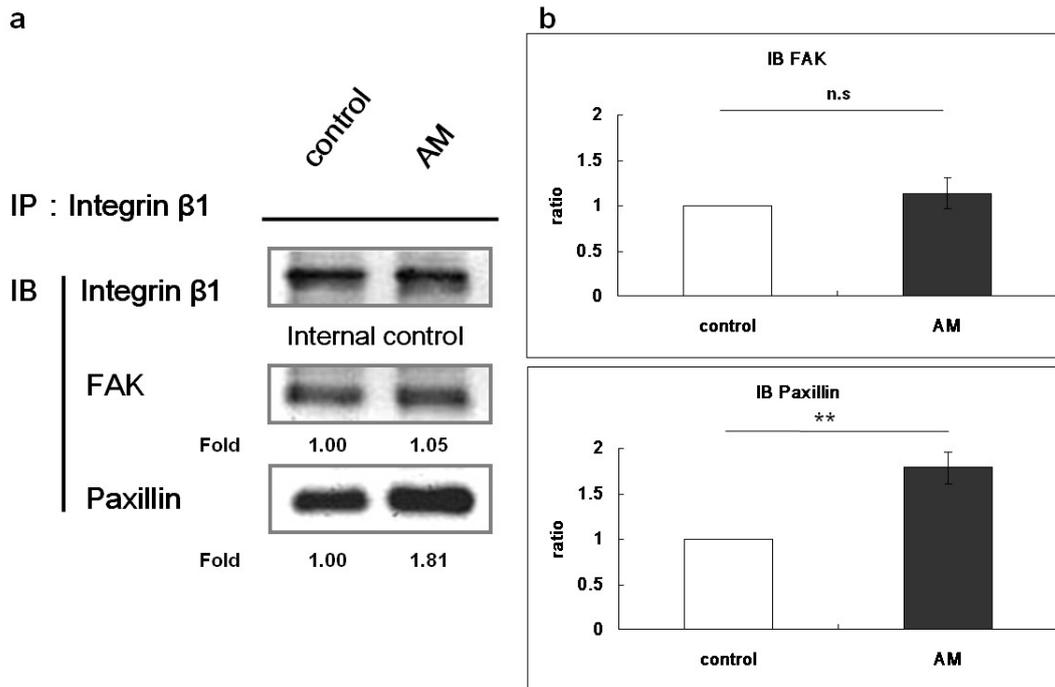
圖六、內皮細胞底層表面Integrin $\beta 1$ 的表現量

在細胞流式儀偵測到的訊號如上，由左至右分別為，black為沒有一級抗體處理、對照組control、羊膜處理組AM。Y軸為細胞數目，X軸為細胞膜上螢光強度(log計量方式)。



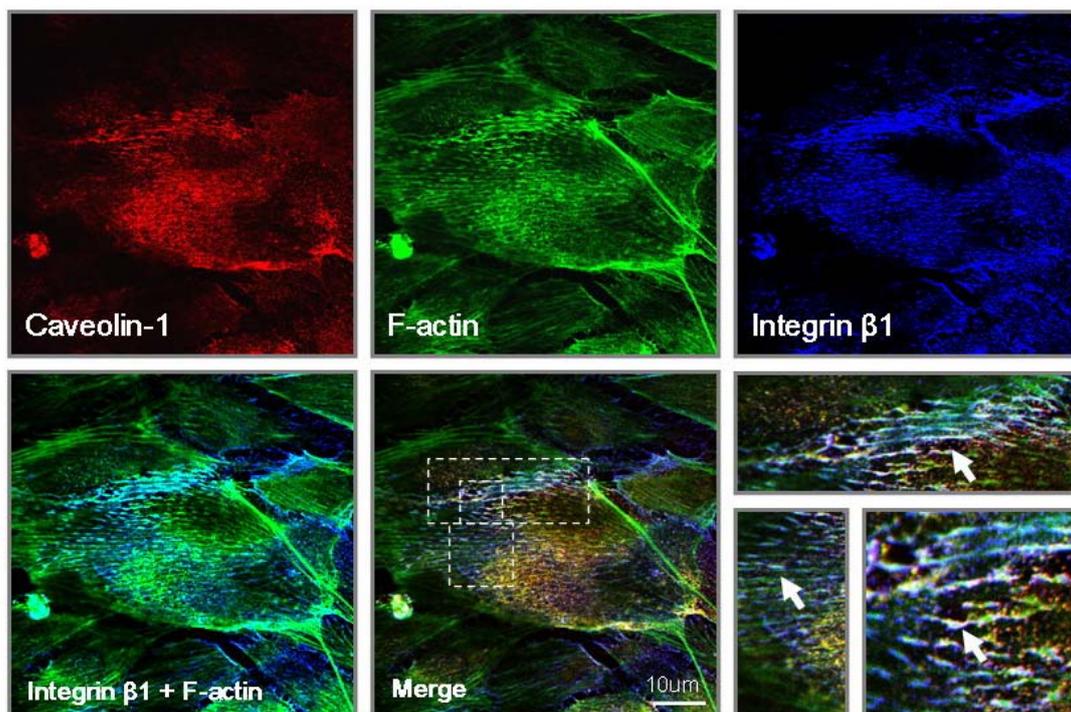
圖七、內皮細胞表面Integrin β 1的平均螢光強度

Y-axis為Mean Fluorescence Intensity (MFI)平均螢光強度，由左至右為控制組(control)羊膜處理組(AM treatment)，由表中可知在控制組MFI= 4.96, 羊膜處理下MFI= 6.73。以統計結果，可知AM處理下的內皮細胞，其細胞膜上的Integrin β 1表現量大於對照組。control : AM treatment = 1.00 : 1.38($p < 0.05$)。



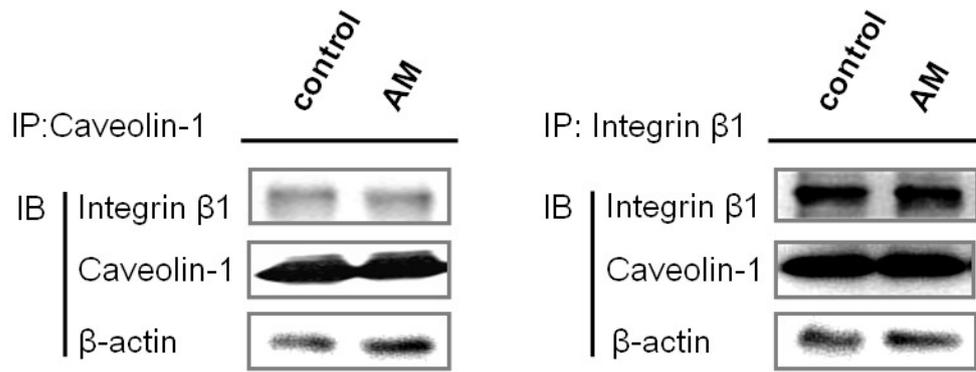
圖八、使用共同免疫沉澱偵測Integrin $\beta 1$ 與 Focal Adhesion molecules 表現量

使用 monoclonal Integrin $\beta 1$ antibody 免疫共同沉澱，再以西方點墨法偵測 Integrin $\beta 1$ 、focal adhesion kinase (FAK)、Paxillin 在對照組與羊膜處理組蛋白質的表現量(圖八a)。統計圖中以 Integrin $\beta 1$ 表現量均質化 FAK 與 Paxillin 後，FAK 在表現量上 control : AM treatment = 1.00 : 1.05 ($p > 0.05$) ; Paxillin 在表現量上 control : AM treatment = 1.00 : 1.83 ($p < 0.05$) (圖八b)。



圖九、羊膜環境下內皮細胞Integrin $\beta 1$ 、Caveolin-1、F-actin具共同表現與分佈

Cy5 signaling Integrin $\beta 1$ 、Rhodamine signaling caveolin-1、FITC conjugated phalloidin；使用confocal scanning 掃描內皮細胞底層與羊膜交界處。可發現有Integrin $\beta 1$ 、caveolin-1、F-actin三種訊號共同表現的結果。



圖十、內皮細胞中於Integrin β1與caveolin-1以及β-actin三者的交互作用

使用anti-Integrin β1 antibody與anti-caveolin-1 antibody個別進行免疫共同沉澱，以西方點墨法可確定Integrin β1可與Integrin α subunit的協助因子caveolin-1可做連結，且也可與β-actin做聯結。



Wide 3 cm
High 0.5 cm

$$\text{Shear stress} = 3\text{ml medium} \times 6 \text{ cm} / \text{sec}^2 \times 1.5\text{cm}^2 = 12\text{dyne}$$

附圖一、細胞沖刷裝置與切應力換算公式

上圖為儀器與計算公式，是依著(Urbich, 2002)的文獻所設計。

Dyne是c.g.s制的公式，意義是在單位時間內截面積中的體積變化量。

一、基本資料



姓名：湯為淳

英文名字：Tang Wei-Chun

生日：民國 70 年 9 月 29 日

住址：台灣省桃園縣楊梅鎮中山北路一段十二
巷二弄八號三樓

電話：(03)4758772、0921393845

E-mail：g942306@thu.edu.tw；

aibillton@hotmail.com

二、學歷

私立東海大學生命科學系理學學士

私立治平高級中學

桃園縣立楊梅國民中學

桃園縣立楊梅國民小學

三、系上助教經驗

生命科學系遺傳生物學助教(碩一上)

生命科學系分子生物學助教(碩一下)

生命科學系微生物學助教(碩二上)

生命科學系細胞生物學數位平台教學助理(碩二上)

四、獲獎紀錄

東海大學生物系畢業生論文海報展 優等

五、參加會議紀錄

(1)由東海大學生命科學中心所舉辦的「2002 生命科學探索
之

旅—首部曲」

(會期：2002.11.4 於東海大學舉行)

(2)東海大學生命科學系大三、四論文研討會

(會期：2003.3.29~30 及 2004.4.26~27 於台中自然科學
博

物館隔年東海波碇廳舉行)

(3)由東海大學生命科學中心所舉辦的「2004 生命科學探索
之

旅」

(會期：2004.11.2 於東海大學舉行)

**(4)THE 46TH AMERICAN SOCIETY FOR CELL
BIOLOGY ANNUAL MEETING IN WASHINGTON**

(會期：2006.12.9~13)

六、工作經歷

職稱	地點	內容	工作時間	主管或可聯絡之人
研究助理	東海大學生命科學系 分子生物學實驗室	大學專論	大二至大四	黃光裕教授
研究助理	東海大學生命科學系 細胞生物學實驗室與 分子生物學實驗室	碩士論文	碩一至碩二	鄭葳教授 黃光裕教授
數位助理	東海大學生命科學系 細胞生物學實驗室	細胞生物學 教材整理與 平台建構	碩二上	鄭葳教授

七、著作

Tsai S.H., Liu Y.W., **Tang W.C.**, Zhou Z.W., Hwang C.Y., Hwang G.Y., Ou B.R., Hu C.P., Yang V.C., Chen J.K. (2007) Characterization of porcine arterial endothelial cells cultured on amniotic membrane, a potential matrix for vascular tissue engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357(4):984-90.