

## 透明質酸與硫酸軟骨素對於活體血管新生作用的影響

指導教授：鄭葳、陳君侃 教授  
作者：吳漢傑、周耀民、王愛淳

### 前言

血管新生作用(angiogenesis)是指在胚胎發育過程中及在一些正常或病理的狀況下出已建立的微血管長出微血管芽的新生血管過程(1,4)。血管新生作用受到許多生長因子如 a/bFGFs、TGF- $\alpha/\beta$ 、EGF 的調控(5)。在正常的生理作用下，如傷口癒合、生殖過程，血管新生作用都是必要的細胞生理作用(10)。然而許多的疾病，如腫瘤形成，也同樣有血管新生作用發生。腫瘤的生長必須不斷的誘發新微血管網的形成，以維持腫瘤的生長，並且得以進入循環系統以轉移至身體其他部份的組織(7)。

血管新生作用的進行，是血管壁內皮細胞受到生長因子的刺激活化後，分泌酵素使基底膜(Basement membrane)分解，內皮細胞得以侵入細胞外基質中，進行遷移、增殖、與分化；重新組成具有管腔的構造，最後形成新的微血管網。

血管新生作用開始時，先脫離基底膜而進入細胞外基質中(2)。細胞在外基質中的移動及再重組是需要沿著基底膜爬行，並且在移動的過程中需要蛋白質分解酵素來分解基底膜以除去內皮

細胞間的障礙(14)。許多文獻研究指出細胞外基質的組成對於血管新生作用時的內皮細胞有極重要得影響(2)。外基質中的成份如膠原蛋白(Collagen)、海帶氨酸(Laminin)、纖維黏連蛋白(Fibronectin)等，可促使內皮細胞附著外基質表面而誘發血管新生作用的進行(8)。而外基質中的含水分子，胺基多醣類，與內皮細胞進行交互作用而促使內皮細胞型態改變(14)。在血管芽的形成過程中，細胞外基質中不同結構及組成是由於內皮細胞分泌酵素分解原來存在的基底膜，並合成新的類醣蛋白(Glycoprotein)、蛋白多醣類(Proteoglycan)及膠原蛋白，組成新微血管之細胞外基質。因此內皮細胞對於在血管形成中環繞在自己周圍的細胞外基質成份扮演著調控的角色。而在內皮細胞周圍的細胞外基質的改變，也是調控不同時期新微血管的形成、組織結構改變，以及內皮細胞在移動、增生時，其型態特徵及功能、行為的重要調控因素(1,6)。

透明質酸為包覆在更新、重組、及復原的組織中分裂與移動細胞的細胞外基質主要成份。透明質酸可能對於細胞附著、移動、及連接佔有相當重要的角色。正常胚胎發育過程中，透明質酸對於胚胎血管位置的分布有決定性的影響，而透明質酸對於細胞的作用可能來自 1.親水的特性 2.細胞表面的交互作用(3,11,15)。透明質酸同時也影響

表皮細胞 (Epidermal Cell) 的分化 (Differentiation)，減低透明質酸的濃度可能減緩表皮細胞的更生，並加速老化過程 (12)。傷口復原過程中，通常會伴隨著血管新生作用的發生。而在傷口真皮層有膠原蛋白沉澱時，在其中發現有豐富的透明質酸存在。而由離體的實驗得知，纖維母細胞可因生長因子刺激而分泌透明質酸。但在正常組織中和發炎傷口的結締組織中，透明質酸卻有著濃度和分子大小不同之差異。

在傷口復原時，傷口組織中的生長因子和不同的細胞外基質將共同誘導新血管的生成及癒傷組織的建立，進而加速了傷口的復原。另外由離體的實驗報告指出，透明質酸可直接誘導或抑制血管新生作用，且在內皮細胞表面發現了透明質酸的特殊接受器 (CD44H) (13)，且已知透明質酸對內皮細胞的分裂及遷移、以及其血管新生作用可能有一定之效應。

硫酸軟骨素亦為細胞外基質中主要成份之一，常與透明質酸結合。目前有關於硫酸軟骨素的報告多偏向於神經突觸生長方向之調控，對於血管新生作用之報告極少。而在一些離體的實驗報告中指出，硫酸軟骨素對於血管新生作用並無促進或是抑制的作用。

由文獻的回顧得知，胺基多醣類為脊椎動物中重要的結構物質，主要是形成皮膚與結締組織連接的細胞外基質。硫酸軟骨素

與透明質酸屬聚多醣類具有儲存酵素的功能 (9)。細胞外基質的蛋白質、生長因子、酵素與細胞，都具有與胺基多醣鏈結的位置所以胺基多醣與生長因子、酵素及細胞表面的結合有關，國內外有關胺基多醣與血管新生作用的機制，目前所知很少，卻具有研究的價值，如硫酸軟骨素或透明質酸是否在腫瘤調控血管新生作用中扮演重要角色。因此我們的實驗將以活體模式觀察硫酸軟骨素與透明質酸在血管新生作用中對內皮細胞的效應。

## 實驗材料與方法

下面方法為一次實驗所需步驟，共處理十五隻大白鼠。

### 石蠟切片包埋法

#### 消毒器具

將解剖刀、鑷子、解剖剪、止血鉗、持針器及開創器等解剖器材以鐵盤裝盛，用錫箔包覆鐵盤，再以鐵盤置於高溫高壓滅菌釜中，密封後以 121 的高溫及 1.1Kg/cm<sup>2</sup> 的高壓進行消毒殺菌十五分鐘，待溫度降至室溫時取出。縫合用角釘與棉線則浸於 70% 的酒精中消毒備用。

#### 製作海綿圓片

將整塊 5mm 厚的聚乙烯海綿片 (Polyester Sponge) 剪成 30 個直徑 1.1 cm 的圓形海綿片。以 autoclave 消毒 30 個圓形海綿片，10 個一組分為三組處理，分別浸於生理食鹽水 (PBS)，及濃度為 (3mg/ml) 硫酸軟骨素與透明質酸中。

## 移植手術

取 30 隻 13 個月齡的雄性 S.D. 大白鼠，標定為三種處理，一為對照組、兩為實驗組，分別稱其重量，以 (1ml/kg) 的比例劑量抽取適量的 Pentobarbital，對大白鼠施予腹腔注射，將其麻醉。待麻醉生效後，先以 70% 的酒精擦拭老鼠背部欲剃除背毛的部份，再小心仔細地將背毛予以剃除。將老鼠固定後，置於無菌操作台上進行手術，以 70% 酒精塗抹裸露的鼠背後，用解剖刀割開 1 公分長的傷口，把止血鉗伸入傷口內將皮下組織層分離。用鑷子夾取圓形海綿片，吸去多餘的液體後植入老鼠的皮下，一隻老鼠植入同一處理的兩塊圓形海綿片，一塊置於傷口前端的皮下，另一塊則置於傷口後端的皮下。對照組的老鼠植入含 PBS 的圓形海綿片；而實驗組的老鼠則分別植入含有硫酸軟骨素與透明質酸的圓形海綿片。將海綿植入之後，用持針器持角針縫合傷口，縫合後於傷口處以優碘擦拭消毒，避免發炎感染。手術後將老鼠腹部向下，四肢平伸置於鋪有墊料的籠內，待其麻醉退了以後，給予老鼠正常照料。14 天後再次進行手術，取出海綿。

## 配置固定液

取 3% Formaldehyde 加上 PBS 製成固定液，置於冰箱中備用。

## 取出海綿

14 天後再次將老鼠麻醉，以解剖刀把上次的傷口劃開，取出圓形海綿組織塊置於固定液中過

夜，以徹底固定組織，取出海綿片的老鼠過量麻醉致死。隔天取出海綿組織塊，將每一塊海綿平均切成四塊扇形組織塊，再以 PBS 浸洗海綿組織塊 3 次，每次十五分鐘，去除固定液。

## 石蠟包埋

加入酒精進行脫水，每隔 30 分鐘換藥一次，酒精濃度依序為 50%、70%、80%、90%、95% 到 100%。接下來每隔十五分鐘，依次以下列三種比例 (3:1、1:1、1:3) 之酒精、二甲苯 (xylene) 混合液進行換藥，再置換成 100% 的二甲苯。接著將裝有海綿組織塊的小瓶子放入約 63°C 的烘箱中，每隔 4 小時，依次以下列兩種比例 (1:1、1:3) 之二甲苯、石蠟 (Paraffin) 混合液進行換藥，再置換成 100% 的石蠟，之後靜置於烘箱中。兩個禮拜後取出海綿組織塊，以石蠟包埋製成組織蠟塊。

## 切片染色

把組織蠟塊固定於切片機上，切成 7 $\mu$ m 的切片，以 50°C 的溫水展片後，平置於塗有蛋白膠的載玻片上風乾，平均每片載玻片上有 10 片切片，每個組織蠟塊切滿 5 片載玻片。切片完成後，將載玻片放入 100% 的二甲苯脫石蠟，接下來每隔 5 分鐘依序置換下列不同濃度 (100%、95%、90%、80%、70%、50%) 的酒精，然後用 Hematoxylin 染色 5 分鐘，取出後用蒸餾水浸泡 5 分鐘洗去多餘的染劑，接著放入 Eosin 中染色 20~30 秒，取出後再用蒸餾水浸泡 5 分鐘洗去多餘的染劑。再次進行

脫水。最後將載玻片放入 100%的二甲苯中 2 次，每次 5 分鐘，結束後用封片膠封片，再將玻片放置於通風處，靜待封片膠乾。

#### 照相計數

將玻片置於顯微鏡下以 400 倍觀察，並且在癒傷組織的部份三次隨機照相，沖洗成 4x6 相片，然後以油性筆圈畫血管。計數時，使用方格透明膠片覆蓋相片，先計算整張相片所佔面積格數，計算血管部份所佔面積，以求出血管所佔的比值。接著利用附有相機的解剖顯微倒掉 PBS，對整個切片照相，計算癒傷組織在整個切片中所佔的比例。再將先前求出的血管所佔比值乘上癒傷組織所佔的比值，得到整個切片的血管密度。

#### 放射線注射法

##### 配製放射劑

取  $20\lambda^{125}\text{I}$  放射劑之 Stock Solution 測其放射強度，將放射強度稀釋至每  $20\lambda$  放射強度為  $4 \times 10^6$ 。CPM(Count Per Minute)。

##### $^{125}\text{I}$ 股靜脈注射

18 天後將老鼠再次麻醉，將老鼠腹面朝上，四肢以膠帶固定，以酒精消毒老鼠後大腿內側，以手術刀畫開約 1cm 的傷口，挑出股靜脈用尼龍繩分別在注射點的上下端打結，下端綁緊，上端放鬆以便  $^{125}\text{I}$  進入循環系統。將  $^{125}\text{I}$  緩緩注入老鼠體內，注射劑量為每一百克注射 0.05ml，再將上端尼龍繩綁緊，以防止放射劑回流；靜置 30min 後取出海綿。

##### 取出海綿

以解剖刀把上次移植手術的傷口割開，取出圓形海綿組織塊將每一塊海綿平均切成二塊扇形組織塊，置於固定液中，徹底固定組織，取出海綿片的老鼠注入過量麻醉劑致死。將海綿置於加瑪計數器中讀取放射強度。

#### 統計方法

把從每一切片中獲得的三個數據相加，取其平均值作基本數值。取得所有數值後，計算出各處理組的平均值、標準偏差與自由度。以 ANOVA 進行測試，判斷是否接受假說。

#### 結果

實驗結果，在石蠟切片方面:Figure 1a,b 分別為 HA 與 CS 處理之海綿於 400 倍下所得的相片，由圖中可以看血管在癒傷組織的分佈，紅色為紅血球、暗紫色為纖維母細胞。而 Figure 1c,d 則是將 HA 及 CS 處理之海綿石蠟切片在解剖顯微鏡下 2.5 倍的相片，圖中海綿外圍的部份便是癒傷組織。另外為由 Figure 2 得知，CS 和 HA 處理過的海綿，其血管所佔癒傷組織面積的比例在統計上顯著高於對照組，顯示 CS 和 HA 會增加癒傷組織中血管的密度；在 Figure 3 中以 CS 和 HA 處理過的海綿其癒傷組織面積佔整片海綿面積的比例，在統計上顯著高於對照組，由此得知 CS 和 HA 會增加整塊海綿中癒傷組織的體積；由前兩個面積比例之數據相乘而得海綿片中所含血管之密度經統計分析後得知(Figure 4)，經過

CS 和 HA 處理後確實會增加整塊海綿中血管的密度，因此我們結論：CS 和 HA 會促進血管新生的作用。

在放射線注射方面：植入海綿 18 天經 CS 處理過的海綿其放射強度和對照組沒有顯著差異；而 HA 處理過的海綿其放射強度顯著高於對照組(Fig.5)。由此可知在 18 天的處理下 HA 對血管新生作用有明顯的促進效果。以此與石蠟切片結果作比較可發現在不同天數處理，CS、HA 對於血管新生作用有不同的效果，因此我們必須探討 CS、HA 對於血管新生作用是否具有時效性。

為再造一步了解 CS 和 HA 在整個血管新生過程中影響的程度與時間的相關性，我們以  $^{125}\text{I}$  放射線注射的方法來進行實驗。將含有 CS 和 HA 的海綿植入老鼠體內分別於 7、14、21 天之後取出海綿做放射線注射測定。該結果顯示：CS 和 HA 處理過的海綿 14 天的血管新生作用效果最好；而 21 天處理之後取出的海綿其放射強度明顯下降(Fig.5)。對於 21 天 HA 和 CS 處理的海綿其放射強度下降的原因推測認為是海綿中血管密度下降，造成之原因是血管退縮，因為生物體在利用能量上都希望能作最有效的利用，在癒傷組織形成之初須要大量血管提供大量能量以供修補之需，而癒傷完全之後，已結束修補的工作，也就不需要大量的血管存在，故血管退化以減少不必要的能量浪費。另外也有可能是因為癒傷完

全後，已不需大量血流以提供能量，但是其血管密度沒變，血管不退縮，而是由微血管上的括約肌(Precapillary Sphincters)藉自動關閉來減少血量所造成的結果。

為了確定哪一個是造成 21 天處理之海綿放射強度下降之原因，進一步對 21 天處理之後取出的海綿進行石蠟切片觀察，並照相計數，與 14 天處理之海綿石蠟切片結果做比較(Fig.6)。該結果顯示：經 14 天處理之後的海綿，其血管密度顯著高於 21 天處理之海綿。故 21 天處理之後的海綿放射強度下降之因，在於海綿中血管密度下降，也就是血管退縮造成的結果。

## 討論

結果顯示出 HA 具促進血管新生的作用，在機制上推測是由於內皮細胞上 CD44 receptor 和 HA 之間的交互關係所造成的結果。在其他文獻中有證實短鏈 HA 具有促進血管新生的作用，而長鏈 HA 不具促進之作用，和我們所得的結果不同，推測原因在於他們處理長鏈 HA 的時間並未長達 14 天之久，而我們的實驗時間有 7 天及長達 14 天的處理，在結果中可明顯的看出 7 天處理的海綿在各組間並無明顯的差異，而實驗時間長達 14 天以 HA 和 CS 處理的海綿其放射強度顯著高於對照組，故推測在這期間，一些內皮細胞、纖維母細胞分泌 HA 分解酵素，隨著時間將 HA 逐漸分解成短

鏈，進而達到促進血管新生的目的。故可確定的是組織在癒傷時需要血管新生，而血管新生的促進最初必須有出HA的分泌幫助內皮細胞的移動、分裂。另外CS同樣具有促進血管新生作用。

而在14天處理之後的18、21天處理，不管是放射線注射測定或石蠟切片計數，海綿血管密度不再增加，推測是HA和CS被代謝掉，不再有促進血管新生的作用，而血管密度除了不再增加外有逐漸下降，血管退縮現象，且各組處理間無顯著差異，故推測不管任何處理，只要癒傷完全了，血管密度就會回復到正常生理狀況下的密度，以減少不必要的能量浪費。而HA、CS和PBS不同處理的結果，只是造成促進血管新生作用的程度不同。

另外本實驗室曾以離體(in vitro)細胞培養實驗找出CS和HA在3mg/ml的濃度下血管新生的作用最佳，但此濃度遠遠超過於活體的生理濃度為避免會對血管新生產生負迴饋作用，因此我們將劑量減半來測其對血管新生程度的影響。結果顯示3mg/ml的劑量對血管新生並不會造成負迴饋。因而以此濃度進行實驗。

#### 參考文獻

1. Diaz-Flores L., R. Gutierrez, and H. Varela, 1994, Angiogenesis Update, *Histol Histopath*, 9:807-843.
2. Dvorak, F. H. V. S. Harvey, P. Estrella, L. F. Brown, and A. M. Dvorak, 1987, Fibrin containing gels induce angiogenesis, *Lab. Invest.*, 57:673-686.
3. Feinberg R. N., and D. C. Beebe, 1987, Hyaluronate in Vasculogenesis, *Science*, 220:1177-1179.
4. Folkman J., 1986, Angiogenesis: What Makes Blood Vessels Grow, *Am. Physiol. Soc.*, 1:199-201.
5. Folkman J. and Y. Shing., 1992, Angiogenesis, *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934.
6. Fridman R. Y. Alon, F. Doljanski, Z. Fuks, and I. Vlodavsky, 1985, Cell Interaction with the Extracellular Matrices Produced by Endothelial Cells and Fibroblasts, *Exp. Cell Res.*, 158:461-476.
7. Montesano, R., J. D. Vassalli, A. Baird, F. Guillemin, and L. Orci., 1986, Basic Fibroblast Growth Factor Induces Angiogenesis in vitro, *Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:7297-7301.
8. Pepper, M. S., J. D. Vassalli, L. Orci, and R. Montesano, 1993, Biphasic Effect of Transforming Growth Factor- $\beta$  1 on in vitro Angiogenesis, *Exp. Cell Res.*, 204:356-363.
9. Priceton, N. J. and G.

- Berlin, 1993, Sulfated Polysaccharides in Inflammation, *J. Lav. Clin. Med.*, 121:201-202.
10. Risau, W., H. Drexler, H. Zerwes, H. Schnurch, U. Albercht, and R. Hallmann, 1991, *Molecular Mechanisms in Cellular Growth and Differentiation*, Oxford University Press, New York, 207.
11. Rooney P., and S. Kumar, 1993, Inverse Relationship Between Hyaluronan and Collagens in Development and Angiogenesis, *Differentiation*, 54:1-9.
12. Sattar A., P. Rooney, S. Kumar, D. Pye, D. C. West, I. Scott, and P. Ledger, 1994, Application of Angiogenic Oligosaccharides of Hyaluronan Increases Blood Vessel Numbers in Rat Skin, *J. Invest. Dermatol.*, 130:576-579.
13. Thomas, L., H. R. Byers, J. Vink, and I. Stamenkovic, 1992, CD44H Regulates Cell Migration on Hyaluronate-coated Substrate, 118:971-977.
14. Wang, D. Y., C. H. Kao, V. C. Yang, and J. K. Chen, 1994, Glycosaminoglycans Enhance Phorbol Ester-induced Proteolytic Activity and Angiogenesis in vitro, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 30A:777-782.
15. West D. C., I. N. Hampson, F. AronId, and S. Kumar, 1985, Angiogenesis Induced by Degradation Products of Hyaluronic Acid, *Science*, 228:1324-1346.



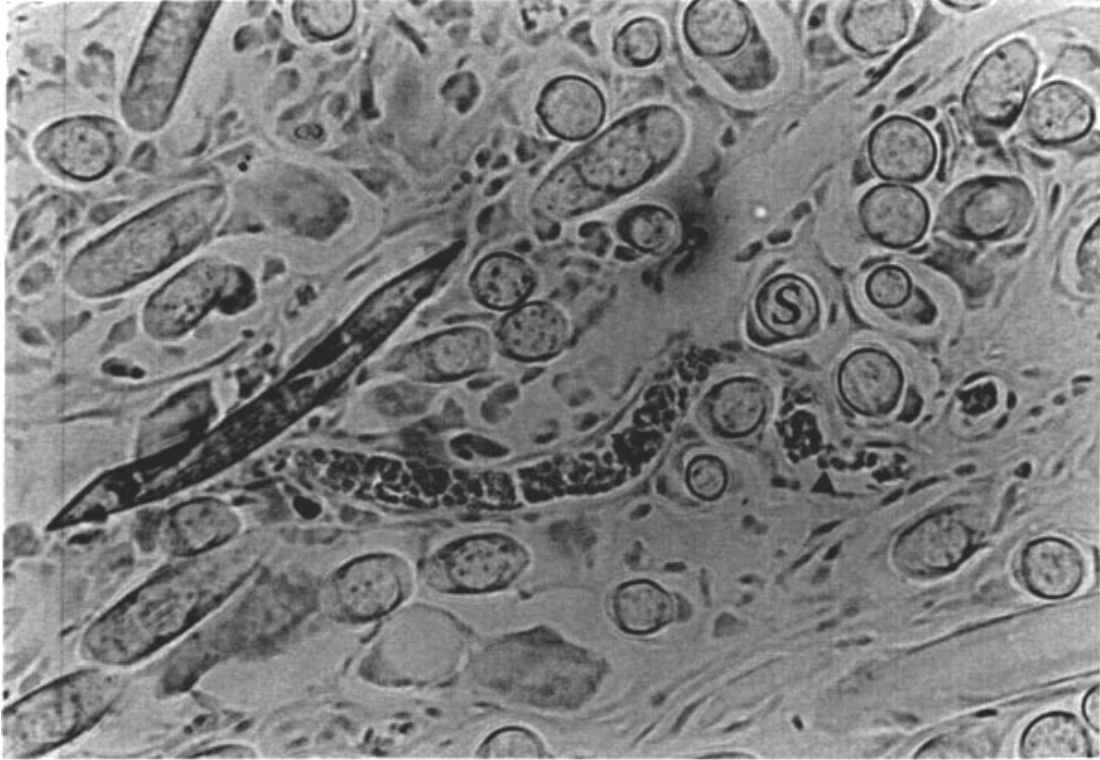


Fig.1a 經 HA 處理過 14 天的海綿其癒傷組織中血管分布的情形其中 V 為血管、S 為海綿纖維、箭頭所指為紅血球(400×)

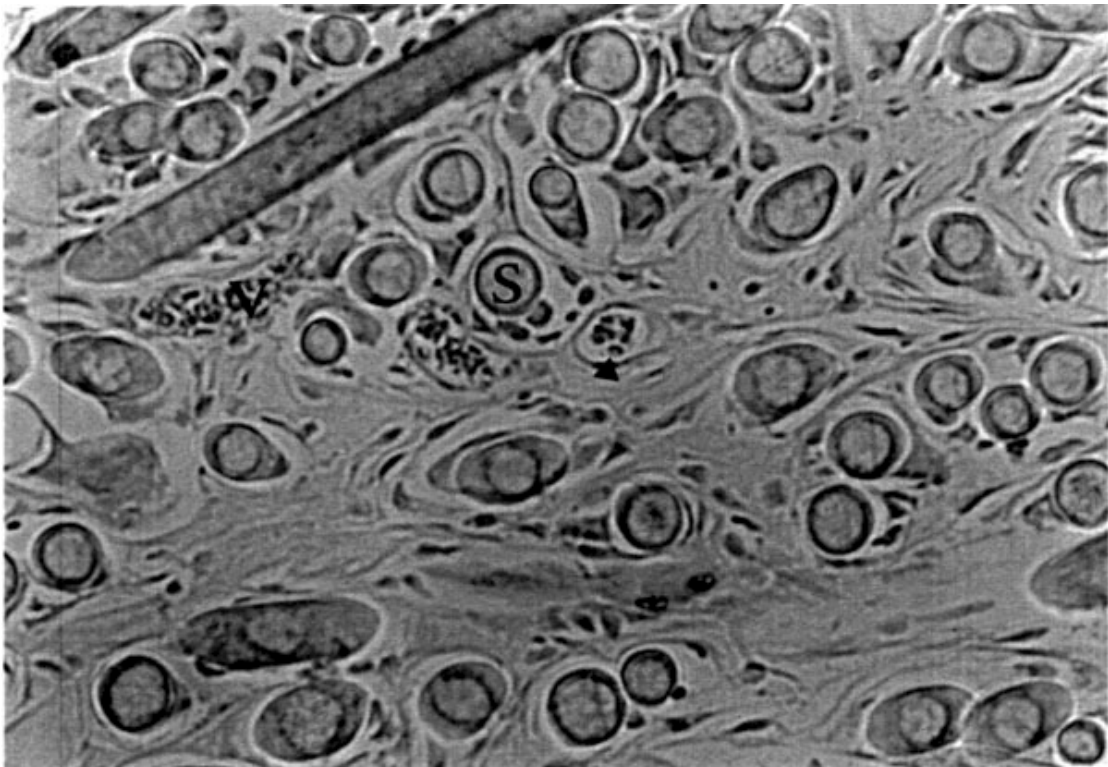


Fig.1b 經 CS 處理過 14 天的海綿其癒傷組織中血管分布的情形其中 V 為血管、S 為海綿纖維、箭頭所指為紅血球(400×)



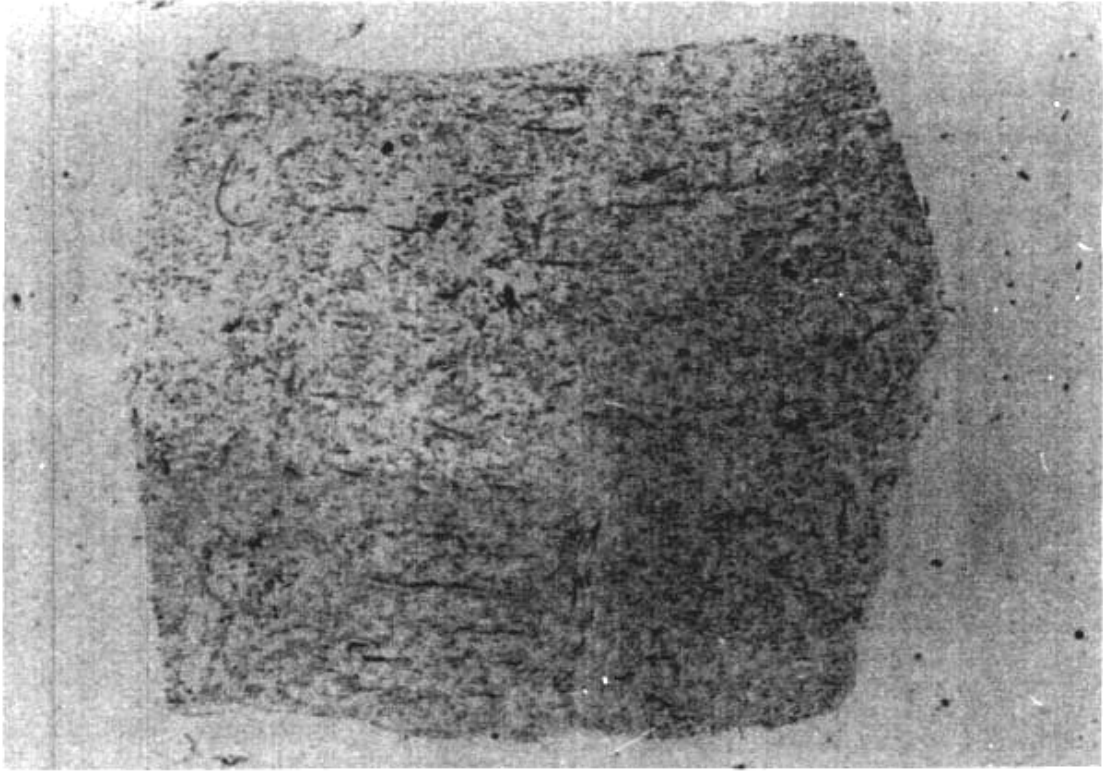


Fig.1c 經 HA 處理過 14 天的海綿其癒傷組織面積佔整片海綿面積的比例，海綿外圍顏色較深者為癒傷組織(2.5×)

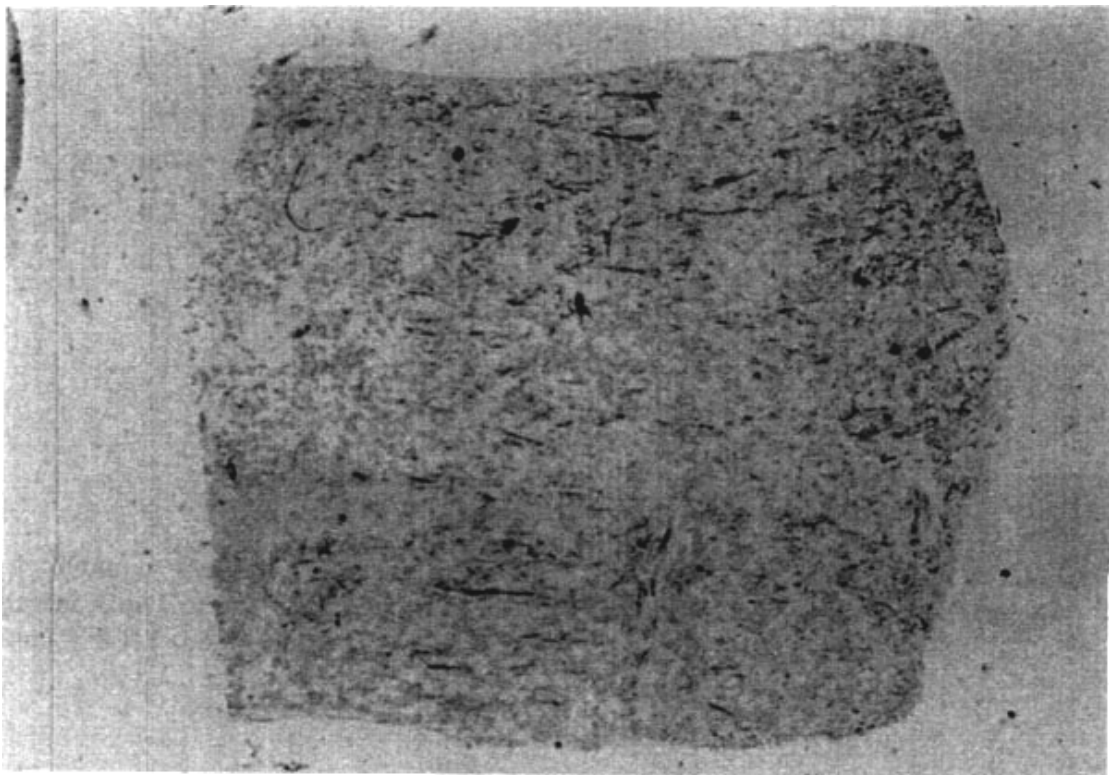


Fig.1c 經 CS 處理過 14 天的海綿其癒傷組織面積佔整片海綿面積的比例，海綿外圍顏色較深者為癒傷組織(2.5×)

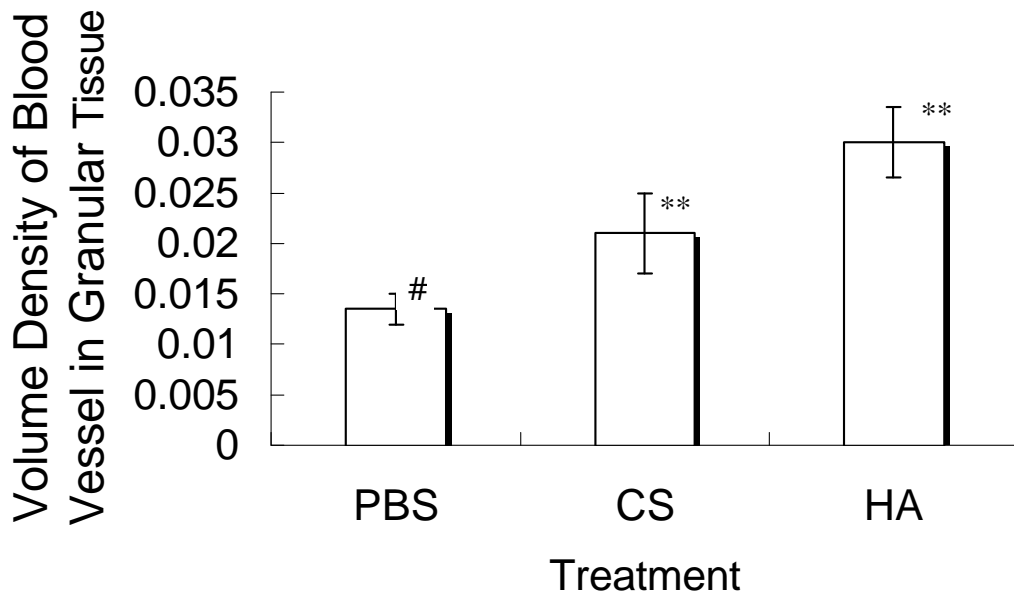


Fig.2 Volume density of blood vessels in granular tissue after 14 days treatment. Con:Control, CS:Chondroitin sulfate (3mg/ml), HA:Hyaluronic acid (3mg/ml). # Mean±S.E. (sponge number=8-10), \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

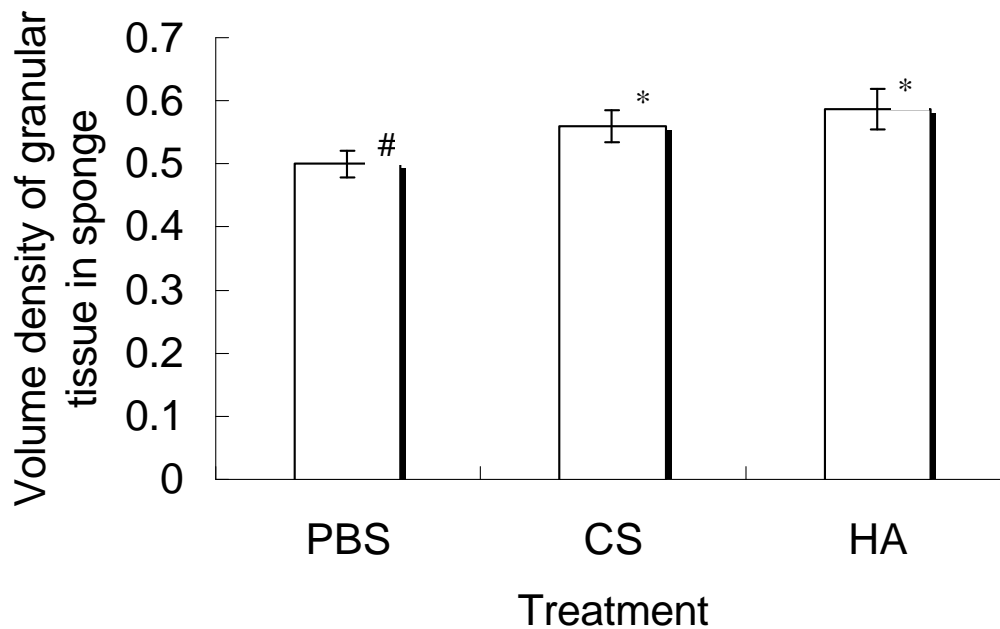


Fig.3 Volume density of granular tissue in polyester sponge after 14 days treatment. Con:Control, CS:Chondroitin sulfate (3mg/ml), HA:Hyaluronic acid (3mg/ml). # Mean±S.E. (sponge number=8-10), \*P<0.05,

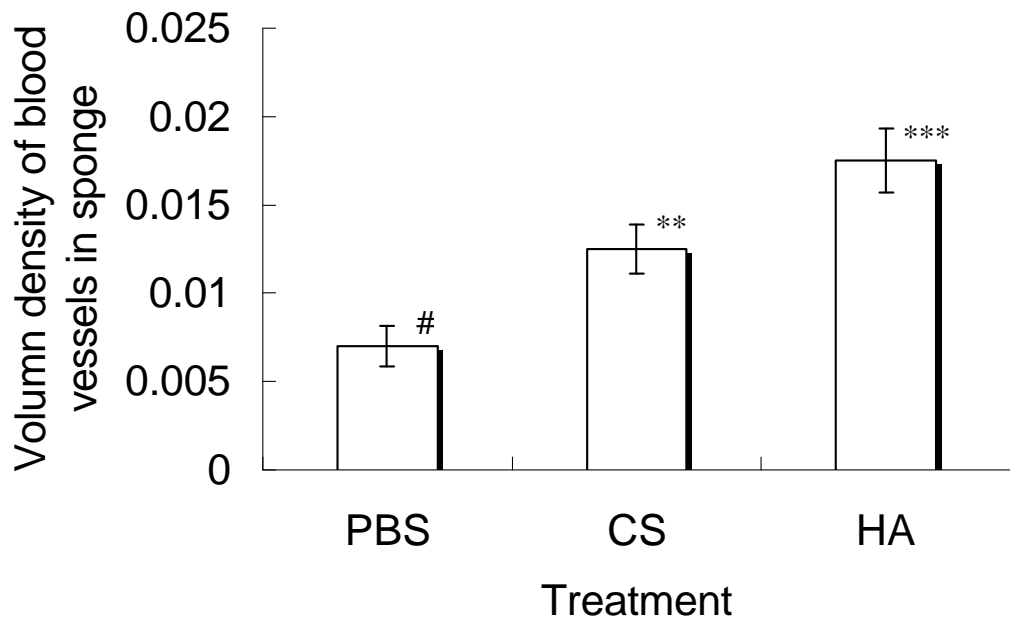


Fig.4 Volume density of blood vessels in polyester sponge after 14 days treatment. Con:Control, CS:Chondroitin sulfate (3mg/ml), HA:Hyaluronic acid (3mg/ml). # Mean±S.E. (sponge number=8-10), \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

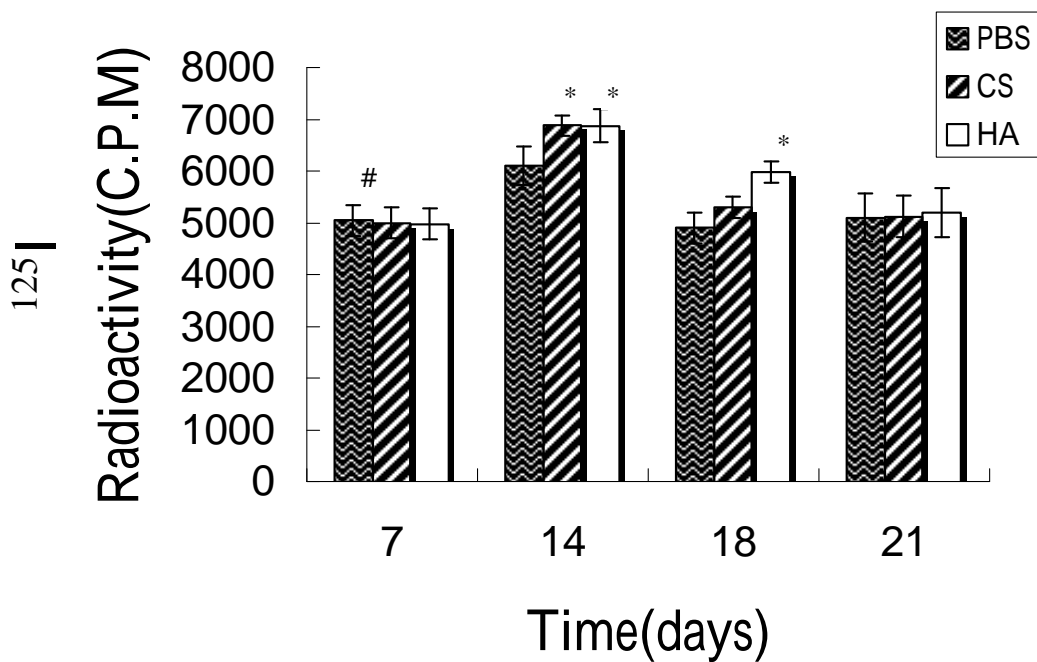


Fig.5 Radioactivity of <sup>125</sup>I-acetyl tyrosine in polyester sponge after 7,14,18,21 days treatment. The 125I-acetyl tyrosine was injected into fewur vein and circulated for 30 min. Con:Control, CS:Chondroitin sulfate (3mg/ml), HA:Hvaluronic acid (3ma/ml). # Mean+S.E. (sponae number=6-10). \*P<0.05

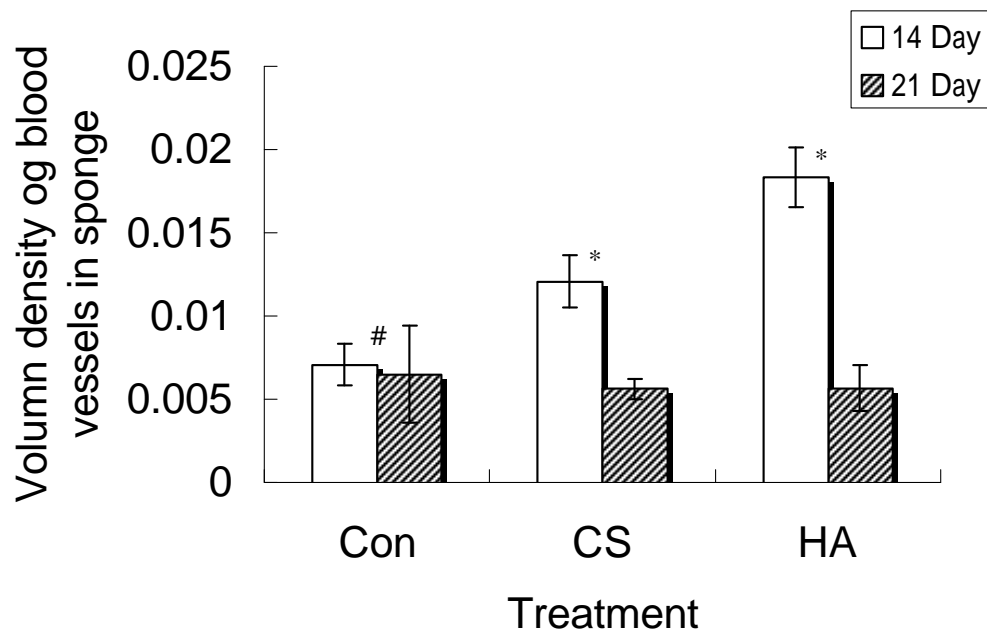


Fig.6 Volume density of blood vessels in polyester sponge after 14,21 days treatment. Con:Control, CS:Chondroitin sulfate (3mg/ml), HA:Hyaluronic acid (3mg/ml). #Mean±S.E. (sponge number=8-10), \*P<0.05, \*\*P<0.01