

國立交通大學

生化工程研究所

碩士論文

滲透壓和 Aurintricarboxylic Acid

對中國倉鼠卵巢細胞生理之影響



**Effects of Osmolarity and Aurintricarboxylic Acid
on Chinese Hamster Ovary Cells Physiology**

研究生：許郁婷

指導教授：曾慶平 博士

中華民國九十四年二月

滲透壓和 Aurintricarboxylic Acid 對中國倉鼠卵巢細胞生理之影響

Effects of Osmolarity and Aurintricarboxylic Acid on Chinese Hamster Ovary
Cells Physiology

研究生：許郁婷

Student : Yu-Ting Hsu

指導教授：曾慶平 博士

Advisor : Dr. Ching-Ping Tseng

國立交通大學

生化工程研究所



Submitted to Institute of Biochemical Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

in

Biochemical Engineering

Feb. 2005

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十四年二月

中文摘要

葡萄糖是哺乳動物細胞重要的碳源，提供細胞生長、合成、進行生化反應能量，為了解葡萄糖造成之滲透壓對於 Chinese hamster ovary (CHO) K1 cell 生長影響，本論文於 MEM 培養基分別添加 9 g/L 葡萄糖或 9 g/L 山梨醇濃度提高培養基之滲透壓來培養細胞，結果發現滲透壓會影響細胞生長速率，山梨醇造成細胞生長速率延緩具有顯著差異 ($P < 0.05$)，顯示高滲透壓會延緩細胞生長。西方墨點實驗結果顯示高滲透壓在第 1 小時可引起 CHO K1 cell p38 MAPK 磷酸化，及在第 1、15 及 30 小時，引起 p42 MAPK 活化，並推測高滲透壓造成細胞週期延緩可能與 p38 MAPK 活化有關。

在探討 Aurintricarboxylic acid (ATA) 濃度對 CHO β -gal serum free (SF) cell 造成細胞貼附(adhesion)與細胞間交互作用(aggregation)改變方面，發現低濃度(30 ppm) ATA 可促使部分 CHO β -gal SF cell 由懸浮貼附至培養皿成梭狀，高濃度(100 ppm) ATA 可影響 CHO β -gal SF cell 由懸浮聚集變成不聚集狀態。以免疫螢光染色法分別偵測細胞 cadherin 與 integrin β 1 表現情形，實驗結果發現 ATA 濃度不會影響 cadherin 表現，但 CHO β -gal SF cell integrin β 1 表現會隨著 ATA 濃度增加而增加且具有顯著差異 ($P < 0.05$)，不同濃度 ATA 引起細胞貼附至培養皿或變成不聚集狀態，其機制可能是經由 integrin 表現而調控造成。

Abstract

Glucose is an essential carbon source for cell growth and biochemical synthesis in mammalian cells. To study the effects of glucose on Chinese hamster ovary (CHO) K1 cell, extra 9g/L glucose or 9 g/L sorbitol were added to MEM medium to increase osmotic stress. The results showed cell growth rate decreased with hyperosmotic stress, while sorbitol had a strong effect on reducing CHO K1 cell number ($P < 0.05$). Hyperosmotic stress induced p38 MAPK phosphorylation at the first hour, and also activated p42 MAPK at first, fifteenth, thirtieth hour. It suggested that the cell growth rate decreased might be caused by p38 MAPK activation.

Aurintricarboxylic acid (ATA) effects on cell morphology and cell-cell interaction were examined. We found that 30 ppm ATA caused CHO β -gal serum free (SF) cell to adhere, but 100 ppm ATA affected CHO β -gal SF cell aggregation and resulted in non-aggregation. Cadherin and integrin β 1 expression of CHO β -gal SF cell were detected by immuno-fluorescence. The results showed cadherin expression was unaffected by ATA concentration, whereas low ATA concentration (30 ppm) stimulated integrin expression ($P < 0.05$) and high ATA concentration (100 ppm) induced integrin overexpression ($P < 0.05$). The stimulation of adhesion and inhibition of aggregation may be regulated by integrin mediated signal pathways.

誌謝

兩年雖只是飛鴻雪泥，然而對我卻是影響深遠，謝謝曾慶平老師耐心教導和訓練，讓我在實驗與生活上受益良多，並感謝林志生老師和徐祖安老師及黃效民博士細心指導論文與口試提供寶貴意見，在此致上最誠摯的謝意。

實驗室生活只有忙碌可言，每每實驗不順利時，總有鐘達、育甄、校賢、國領、煜沛、宗益、慧貞學長姐的幫忙；在課業上，也多虧岳賢、靜雪、慧君、惠文、巧璇的相互扶持；而翊維、愛雁、冀冬、繼元、智彬、威志、雅華的陪伴，謝謝你們，讓我擁有許多特別與瘋狂的回憶。

一路走來，始終有喬雯、秀鈴、柏吟、慧君、慶芳、諺雅、立琇、惠萍的精神陪伴，我們的友情從未因空間或時間而改變，不論我遇到什麼困難，謝謝你們總是義無反顧的伸出手，在我沮喪時，拍落我身上的灰雨，為我重拾星光，你們亦是我生命裡的貴人，這兩年幸而有你們陪伴我渡過家中的風雨。感謝親愛的家人們在不常回家時，輪流派代表來新竹探望我，雖然你們無法體會實驗室生活是怎麼一回事，但仍給我永無止盡的關愛與動力！研究所兩年，家中經歷生老病死還有許多風雨，尤其是姐姐生病，雖然還有漫漫長路，但這些事都讓我更堅強與勇敢，也讓我學會以樂觀的態度去面對和處理，亦更能體會家人間愛與支持的重要，並格外珍惜！！ And dear Claire, I am so appreciative that you are always on my side.

兩年的研究生活，雖曾挫折、沮喪與無奈，終於渡過，當我驀然回首，發現已經飛渡千山！！

目錄

壹. 研究緣起與目的.....	1
1.1 研究緣起.....	1
1.2 研究目的.....	3
貳. 序論.....	4
2.1 哺乳動物細胞之應用.....	4
2.2 葡萄糖對動物細胞之影響.....	5
2.3 滲透壓對動物細胞之影響.....	6
2.4 MAPK 訊息傳遞途徑.....	6
2.5 高滲透壓環境與 p38 MAPK 關係.....	9
2.6 ATA 對動物細胞影響.....	10
2.7 ATA 與血清培養基之開發.....	10
2.8 細胞貼附與細胞聚集.....	11
參. 材料、設備與方法.....	13
3.1 實驗材料.....	13
3.1.1 細胞株.....	13
3.1.2 藥品試劑.....	13
3.1.3 藥品配方.....	16
3.2 實驗設備.....	19
3.3 實驗分析軟體.....	19
3.4 實驗方法.....	20
3.4.1 細胞培養.....	20
3.4.2 高低滲透壓處理.....	20
3.4.3 滲透壓測量.....	21
3.4.4 細胞比生長速率計算.....	21
3.4.5 細胞蛋白質萃取.....	23
3.4.6 蛋白質濃度測定.....	23
3.4.7 蛋白質凝膠電泳法.....	24

3.4.8 西方墨點法.....	25
3.4.9 免疫螢光染色法.....	26
肆. 結果.....	28
4.1 培養基滲透壓與 CHO K1 cell 生長關係.....	28
4.2 滲透壓對 CHO K1 cell p38 MAPK 之影響.....	29
4.3 滲透壓對 CHO K1 cell p42 MAPK 之影響.....	29
4.4 ATA 濃度與 CHO β -gal SF cell 生長關係.....	30
4.5 ATA 濃度對細胞型態(adhesion 與 aggregation)之影響.....	31
4.6 ATA 濃度對 CHO β -gal SF cell cadherin 表現影響.....	32
4.7 ATA 濃度對 CHO β -gal SF cell integrin β 1 表現影響.....	33
伍. 討論.....	35
5.1 培養基滲透壓與 CHO K1 cell 生長關係.....	35
5.2 滲透壓與 CHO K1 cell p38 MAPK 表現關係.....	36
5.3 滲透壓與 CHO K1 cell p42 MAPK 表現關係.....	38
5.4 ATA 對 CHO β -gal SF cell 生長之影響.....	38
5.5 ATA 對 CHO β -gal SF cell 型態之影響.....	39
論文圖表.....	42
陸. 參考文獻.....	55
柒. 附表.....	60
捌. 附圖.....	61

圖目錄

圖一. 培養時間與培養基滲透壓之關係.....	42
圖二. 培養基滲透壓與 CHO K1 cell 生長關係.....	43
圖三. 滲透壓與 CHO K1 cell p38 MAPK 表現關係.....	44
圖四. 滲透壓與 CHO K1 cell p42 MAPK 表現關係.....	45
圖五. ATA 濃度與 CHO β -gal SF cell 生長關係.....	46
圖六. ATA 濃度對 CHO β -gal SF cell 細胞型態之影響.....	47
圖七. ATA 濃度對 CHO β -gal SF cell cadherin 表現影響.....	49
圖八. ATA 濃度對 CHO β -gal SF cell integrin β 1 表現影響.....	52



附圖表目錄

附表一. 已知 integrin 之次分子組成.....	60
附圖一. 葡萄糖活化 p42 MAPK 之訊息途徑.....	61
附圖二. 哺乳動物細胞 MAPK 訊息途徑.....	62
附圖三. Aurintricarboxylic acid 結構.....	63
附圖四. Cadherin 結構及其訊息途徑.....	64
附圖五. 葡萄糖結構式與山梨醇結構式.....	65
附圖六. Integrin 影響細胞貼附之訊息途徑.....	66



縮寫表

ATF	: Activating transcription factor
ATA	: Aurintricarboxylic acid
CHO	: Chinese hamster ovary
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
ECM	: Extra cellular molecule
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EPO	: Erythropoietin
ERK	: Extracellular signal regulated protein kinase
FBS	: Fetal bovine serum
GADD	: Growth arrest and DNA damage
HOG	: High osmolarity glycerol
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
Lino-BSA	: Linoleic acid bovine serum albumin
MAPK	: Mitogen activated protein kinase
MEKK	: Mitogen-activated protein/ERK kinase kinase
MKKK	: MAPK kinase kinase
MKKKK	: MAPK kinase kinase kinase
MLK	: mixed lineage kinase
Na₃VO₄	: Sodium orthovanadate
NaF	: Sodium fluoride
PBS	: Phosphate buffer saline
PKA	: cAMP-activated protein kinase
PMSF	: Phenyl methyl sulfonyl fluoride

SAPK : Stress-activated protein kinase

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SITE : Selenium, insulin, transferrin, ethanolamine

tPA : Tissue plasminogen activator

UV : Ultraviolet



壹. 研究緣起與目的

1.1 研究緣起

由於利用哺乳動物細胞生產醫療用蛋白具有高經濟價值，為選殖高表現量細胞株，因此探討大量培養的生產條件、細胞生長與代謝生理，及開發無血清培養基以降低成本和減少污染逐漸成為研究重點。

目前許多文獻探討哺乳動物細胞生產重組蛋白之產率、代謝活性與培養條件的關係，發現葡萄糖對哺乳動物細胞代謝、生長及蛋白質產率扮演重要角色[Dowd et al., 2001; Ryu et al., 2001]。本實驗室先前研究探討在培養基添加高濃度葡萄糖，對 CHO K1 cell 能量代謝和 cAMP 含量的影響及酵素調節間相互關係，發現高葡萄糖可導致細胞的葡萄糖消耗速率增加、cAMP 含量增加、乳酸堆積速率上升及細胞生長速率減緩 [陳建龍, 1999]。探討 cAMP 對 MAPK 之調控，發現 cAMP 含量受高葡萄糖濃度影響增加，並經由 cAMP dependent protein kinase (PKA) 活化 p42 MAPK，其訊息途徑如附圖一所示，但高葡萄糖卻延長細胞增生時間，使得 CHO K1 cell 生長速率變慢[俞銘誠, 2001]。

另外在黃效民博士開發無血清培養基過程中，研究發現無血清培養基添加 ATA 可以引起 CHO β -gal SF (serum free) cell 生長速率增加；低濃度(15 ppm) ATA 使懸浮聚集 CHO β -gal SF cell 產生形態(morphology)變化而貼附(adhesion)到培養皿，高濃度(50 ppm) ATA 改變細胞間交互作用(aggregation)，使懸浮聚集細胞變成懸浮不聚集狀態(non-aggregation) [Liu et al., 2001a]。



1.2 研究目的

為進一步了解葡萄糖和 ATA 對於 CHO cell 影響之分子機制，本論文分別進行研究，第一部分目的在了解高葡萄糖濃度造成細胞生長速率延遲的原因，探討滲透壓對 CHO K1 cell 之 p38 MAPK 和 p42 MAPK 活性影響與細胞生長關係。第二部分在了解 ATA 造成 CHO β -gal SF cell 細胞型態(adhesion)與細胞間交互作用(aggregation)改變原因，探討不同 ATA 濃度對細胞表面之 integrin 和 cadherin 表現影響。透過了解哺乳動物細胞的反應機制，有助於工業發展工程細胞株，並建立更符合經濟成本的生產技術。



貳. 序論

2.1 哺乳動物細胞之應用

最早自 1950 年代起使用哺乳動物細胞培養技術來生產小兒麻痺疫苗，此後以遺傳工程重組技術改造哺乳動物細胞生產醫療用重組蛋白，如組織型血纖維溶原活化因子(tissue plasminogen activator, tPA)、紅血球增生素(erythropoietin, EPO)等。近年來利用哺乳動物細胞表現重組蛋白與單株抗體，不但具有安全性及節省時間，也減少動物活體消耗和降低生產成本，使得哺乳動物細胞成為生產醫療用重組蛋白的最佳來源。目前美國食品藥物管理局(Food Drug Administration, FDA)核准生產醫療用蛋白的哺乳動物細胞表現系統包含中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell, CHO cell)、幼倉鼠腎細胞(Baby hamster kidney cell, BHK cell)、SP2/0 和 NS0 (murine myeloma lines)細胞株。

CHO cell 自 1957 年被分離出來[Puck et al., 1958]，由於具有以下優點：1. 生長快速，具高轉染效率(transfection efficiency)，可以正確和大量表現被送入細胞的蛋白質；2. 能進行複雜的轉譯後修飾與醣化修飾作用；3. 可以馴化至無血清培養狀態；4. 可以貼附或懸浮培養。因此有越來越多醫療用蛋白以 CHO cell 生產，如 EPO、tPA、第八凝血因子(FVIII)、第九凝血因子(FIX)、tumor necrosis factor

(TNF)，其活性與天然的蛋白相似；干擾素 β 或 GM-CSF 具有 N-或 O-醣基化，其生物活性較大腸桿菌製造之蛋白高。在美國 FDA 核可生物產物(biological license approvals)中，有許多重組蛋白質和單株抗體是以 CHO cell 生產，由此可知 CHO cell 在基因工程生產的應用價值[Walsh, 2003]。

2.2 葡萄糖對動物細胞之影響

葡萄糖是細胞中最主要的碳源，提供細胞生長、合成、進行生化反應能量，在動物體中，飲食攝入的醣類大部分轉變成葡萄糖被吸收，隨著血液循環系統運送至全身細胞，供給細胞能量來源。對於血液中過多的葡萄糖，一般正常人可分泌胰島素調節葡萄糖吸收，降低血糖，但糖尿病患者因為胰島素功能缺乏，造成無法正常吸收葡萄糖導致血糖濃度過高，過多的葡萄糖造成糖尿病患者細胞利用葡萄糖時產生大量自由基(free radicals)而使血管肌肉細胞受傷、壞死。在醫學研究方面，利用高葡萄糖來探討葡萄糖吸收、細胞損害、細胞修復與訊息傳遞等機制，以了解葡萄糖對細胞生理的影響[Efanova et al., 1998; Srivastava, 2002]。其次在生化工程應用方面，培養表現重組蛋白或抗體的哺乳動物細胞時，以添加葡萄糖方式促進 tPA 重組蛋白或抗體產量[Lee et al., 2003; Ryu et al., 2001; Walsh, 2003]。

2.3 滲透壓對動物細胞之影響

大部分細胞對於滲透壓非常敏感，當細胞外環境滲透壓增加時，細胞失去水分及細胞表面產生皺縮現象，並引起調控高滲透壓之訊息傳遞，如細胞內甘油分子聚集以增加細胞內物質濃度，因應高滲透壓環境。細胞外滲透壓降低時，造成細胞內離子濃度不平衡，也會引起訊息反應調控細胞內離子濃度，使細胞適應低滲透壓環境。高低滲透壓皆會影響細胞生理，導致 cell cycle arrest 或細胞凋亡 (apoptosis)，移除高滲透壓或低滲透壓環境，細胞可從 cell cycle arrest 回復至正常生理狀態，一旦細胞啟動凋亡機制，滲透壓對於細胞作用便無法回復，細胞只有走向死亡一途[de Nadal et al., 2002; Tao et al., 2002]。近年研究發現，以高滲透壓環境培養生產重組蛋白之哺乳動物細胞，可使 cell cycle arrest，並促進重組蛋白產量[Takagi et al., 2001]。

2.4 MAPK 訊息傳遞途徑

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 為絲胺酸/酞胺酸蛋白激活酶 (ser/thr protein kinases)，MAPKs 會受到環境中多種因子如生長因子、荷爾蒙、壓

力影響，藉此調控細胞內基因表現、細胞增生(proliferation)與分化(differentiation)及細胞凋亡等；當細胞接受外來刺激時，Ras/Rho 家族中 small GTP-binding protein 活化最上游 MAPK kinase kinases (MKKKs)，MKKKs 活化引起下游 MAPK kinases (MKKs)磷酸化後，MKKs 接著活化下游 MAPKs，MAPKs 進而調控細胞核內基因表現與反應及活化其他蛋白如：phospholipases、transcription factors、cytoskeletal proteins。MAPK 可分成三大類：extracellular signal regulated protein kinases (ERKs)、c-Jun N-terminal kinases (JNKs)及 p38 MAPK。

ERKs family中的ERK1/2 (p44/p42 MAPK)目前研究較為廣泛，當細胞受到生長因子或血清刺激時，ERK1/2 藉由磷酸化方式活化下游多樣受質(multiple substrates)或引起細胞核內其他轉錄反應，刺激細胞增生、分化及生長。ERK1 和 ERK2 胺基酸序列有 83%相似度，與cell cycle調控有關，cell cycle分為四期：first gap phase (G_1), DNA synthesis phase (S), second gap phase (G_2), mitosis phase (M)，ERK1/2 參與 G_1 phase至S phase和 G_2 phase至M phases之調控[Hulleman et al., 1999; Pages et al., 1993; Roux et al., 2004]。

JNKs 和 p38 MAPK 屬於 stress-activated protein kinases (SAPKs)，會被不同的環境壓力活化，如：熱休克(heat shock)、滲透壓(osmotic stress)、pro-inflammatory cytokines、離子化放射線(ionizing radiation)及 ultraviolet (UV) radiation 等。JNKs

主要會受 cytokines、UV radiation 及 DNA-damage agents 活化，JNKs 活化後形成雙體結構，從細胞質通過核膜轉位(translocate)到細胞核內，並活化下游 activator protein-1 (AP-1)或 nuclear transcription factors (NTF) ，如：activating transcription factor-2 (ATF-2)、Myc、p53、MAP-kinase activating death domain-containing protein (MADD) 等，引起細胞凋亡或發炎反應 (inflammation) 或癌症生成 (tumourigenesis)。p38 MAPK 主要被環境中的滲透壓、熱休克、氧化壓力(oxidative stresses)等活化，p38 MAPK 活化下游 ATF-2、heat shock protein (HSP)、cAMP regulatory element binding protein (CREB)等蛋白，調控細胞 motility、或染色體結構(chromatin remodeling)，使細胞啟動修復機制或進行 cell cycle arrest 或細胞凋亡 [de Nadal et al., 2002; Johnson et al., 2002; Roux et al., 2004] 。



MAPK families 有其獨立訊息傳遞途徑，彼此之間亦有 cross talk 的現象，受到訊息刺激時間、刺激強度、細胞種類、受器種類等影響，訊息作用程度也不相同，如滲透壓引起MKKKs 中 mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKKs) 和 mixed lineage kinases (MLKs) 及其下游 MKKs 活化。MKKs 分別活化下游之 MAPKs，其中 MEK1 和 MEK2 活化 ERKs，MKK3 和 MKK6 會活化 p38 MAPK，而 JNKs 可被 MKK4 和 MKK7 活化。 ERKs、p38 MAPK 及 JNKs 活化又分別影響其下游基因表現，調控細胞生理反應。如附圖二所示[Cowan et al., 2003; Kultz et al., 1998b] 。

2.5 高滲透壓環境(hyperosmotic stress) 與 p38 MAPK 關係

以酵母菌為例，滲透壓影響細胞內多種訊息傳遞途徑，細胞骨架重組 (cytoskeletal reorganization)、細胞壁 dynamics 改變、影響細胞內代謝 (metabolic adjustments) 及 cell cycle arrest 等，目前以 MAPK high osmolarity glycerol 1 (HOG1) 訊息途徑之研究較為詳盡，HOG1 為 SAPK，可受到 cAMP-activated protein kinase (PKA) 活化後，調控下游基因表現來因應高滲透壓環境，使酵母菌可以生存 [de Nadal et al., 2002]。



研究發現高濃度葡萄糖造成之高滲透壓環境會影響哺乳動物細胞 MAPK 訊息調控，如 17 mM 葡萄糖濃度引起 pancreatic β -cell DNA 片段化與細胞凋亡現象 [Efanova et al., 1998]，22 mM 葡萄糖濃度造成 osteoblast p38 MAPK 與 ERK1/2 (p44/p42) 活化；在不同細胞內，高滲透壓使 p38 MAPK 快速磷酸化、JNK 磷酸化時間延長、ERK 活化。目前滲透壓活化 ERK 機制仍有待探討，p38 MAPK 會活化下游 ATF-2，進而影響細胞核內的轉錄作用，導致細胞週期停滯或細胞凋亡 [Galvez et al., 2003; Kultz et al., 1998a; Li et al., 2001; Nagata et al., 1999; Zayzafoon et al., 2002]。

2.6 Aurintricarboxylic acid (ATA)對動物細胞影響

Aurintricarboxylic acid (ATA)於 1892 年首先被合成出來，其分子量為 442 Da，ATA為一triphenylmethane 紅色染劑，可溶於dimethylsulfoxide (DMSO)，其結構如附圖三所示，研究發現ATA對細胞毒性低(LD₅₀: 9 g/kg, oral in rat) ，且無法穿透細胞膜，經由與細胞膜上受器作用而影響到細胞內的訊息傳遞與細胞生理。醫學研究顯示：ATA可抑制nuclease [Glasspool-Malone et al., 2002]與topoisomerase II [Benchokroun et al., 1995]活性，促進細胞增生[Andrew et al., 1999]和抑制細胞凋亡 [Cho et al., 2004] ，也會抑制血小板聚集 [Waissbluth et al., 2002] ；近來研究亦發現ATA對病毒也有抑制作用，如抑制HIV [Cushman et al., 1992] 和SARS virus [He et al., 2004] 活性。



2.7 ATA 與無血清培養基之開發

在培養哺乳動物細胞製程方面，由於體外培養細胞通常會加入 5-20%動物血清，血清具有營養與緩衝的功能，可促進細胞生長，但血清可能造成下列問題：

1. 血清批次間品質不易控制，可能帶有不確定的感染物質，如傳染疾病的狂牛病普恩蛋白(prion)或病毒；
2. 血清價格昂貴，增加培養細胞的成本；
3. 干擾下游蛋白質回收與純化。為了降低血清培養基成本和減少可能之污染及易於回收純化蛋

白，許多藥廠積極開發無血清培養基，其中ATA也有相關研究，ATA可被用來取代transferrin，促進 Fe^{2+} 運輸 [Bertheussen, 1991]，ATA對於無血清培養CHO cell有類似insulin促進細胞生長之功能 [Liu et al., 2001a]。

目前在黃效民博士研究中發現無血清狀態培養 CHO β -gal SF cell (CHO β -gal serum free) cell 時，低濃度 ATA (15 ppm)會引起 CHO β -gal SF cell 增生，並使得原本部分懸浮 CHO β -gal SF cell 產生形態(morphology)改變，貼附到培養皿上。高濃度 ATA (50 ppm)雖無明顯促進 CHO β -gal SF cell 增生現象，但會影響 CHO β -gal SF cell 間細胞交互作用(cell-cell interaction)，造成細胞由聚集(aggregation)變成不聚集(non-aggregation)狀態 [Liu et al., 2001a]，此現象是本實驗探討目標之一。



2.8 細胞貼附(adhesion)與細胞聚集(aggregation)

目前已知細胞膜上 cadherins 與細胞 aggregation 有關。Cadherins 為 Ca^{2+} -dependent transmembrane glycoproteins，由一extracellular domain與高重複性 cytoplasmic domain組成。細胞與細胞之間aggregation作用透過extracellular domain與相鄰細胞 extracellular domain以homo-type方式連結形成附著分子，[Koch et al.,

2004]; cytoplasmic domain與catenin [Wheelock et al., 2003]或actin cytoskeleton [Yap et al., 2003]結合(如附圖四)，調控細胞與細胞間交互作用及cytoskeletal networks之訊息途徑，影響細胞生長、分化及轉型(transformation)。

Integrins 是細胞貼附(adhesion)最主要的細胞膜表面蛋白質，adhesion 是細胞貼附到細胞以外之基質(extra-cellular matrix)。Integrins 為細胞 adhesion receptors，由 α 和 β 兩種 subunits 組成之 transmembrane proteins，目前發現 16 種 α subunits 和 8 種 β subunits 組成達 22 種 integrins (如附表一) [Kreis et al., 1999]。Integrins 以 hetero-type 方式和細胞膜上其他細胞附著分子(extra cellular molecule, ECM)結合，讓細胞貼附到基質上[Rosenberger et al., 2004]，調控與 integrin-dependent adhesion 有關之生長、分化及基因表現等之生理。

參. 材料、設備及方法

3.1 實驗材料

3.1.1 細胞株

中國倉鼠卵巢細胞株由食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC) 黃效民博士提供，CHO (Chinese hamster ovary) K1 cell BCRC 編號為 60006，CHO β -gal SF (serum free) cell BCRC 編號為 60377 [Liu et al., 2001b]。



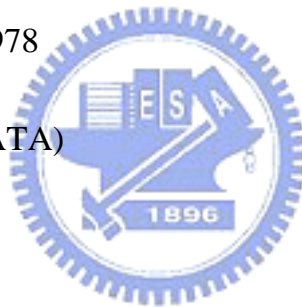
3.1.2 藥品試劑

ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham pharmacia
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham pharmacia
PVDF membrane	Amersham pharmacia
30% Acryamide/Bis Solution	Bio-Rad
Ammonium persulfate	Bio-Rad

Protein assay dye	Bio-Rad
TEMED	Bio-Rad
10X Cell lysis buffer	Cell Signaling
Biotinylated protein ladder detection pack	Cell Signaling
phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) antibody #9211	Cell signaling
p38 MAPK antibody #9212	Cell signaling
p38 and phospho-p38 cell control extract #9213	Cell signaling
phosphor-p44/p42 MAPK (Thr202/Tyr204) antibody #9101	Cell signaling
Actin antibody	Chemicon
Goat anti mouse IgG HRP conjugated polyclonal antibody	Chemicon
Goat anti rabbit IgG HRP conjugated polyclonal antibody	Chemicon
Skim milk	Difico
D-MEM/F-12	GIBCO
D- phosphate buffer saline (PBS)	GIBCO
Fetal bovine serum (FBS)	GIBCO
Minimum essential medium (MEM)	GIBCO
Penicillin/streptomycin	GIBCO



Sodium bicarbonate	GIBCO
Trypsin-EDTA	GIBCO
Trypan blue stain	GIBCO
Kodak Biomax MR film	Kodak
Acetic acid	Merck
Ethanol	Merck
Methanol	Merck
Cadherin antibody sc-10733	Santa Cruz
Integrin β 1 antibody sc-8978	Santa Cruz
Aurintricarboxylic acid (ATA)	Sigma
Gelatin	Sigma
Lino-acid BSA	Sigma
Meat peptone	Sigma
Paraformalhyde	Sigma
SITE	Sigma
TRITC-conjugated 2° antibody	Sigma



3.1.3 藥品配方

Cell lysis buffer (RIPA buffer)

Tris-HCl , pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1%
Sodiumdesoxycholate	1%
Sodium dodecylsulfate (SDS)	0.1%
Ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA)	1 mM
Sodium fluoride (NaF)	100 mM
Benzamidine	1 mM
Phenylmethane sulphonylfluoride (PMSF)	1 mM
Sodium orthovanadate (Na_3VO_4)	1 mM

SDS-PAGE running buffer

Tris-base	5 mM
Glycine	50 mM
SDS	0.01%

5X SDS loading dye

Tris-HCl	300 mM
SDS	10%
Bromophenol blue	0.13%
Glycerol	50%
2-mercaptoethanol	25%


12% resolving gel

Acrylamide	12%
Tris (pH 8.8)	375 mM
SDS	0.1%
Ammonium persulfate	0.1%
TEMED	0.04%



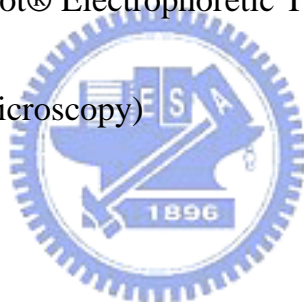
5% stacking gel

Acrylamide	5%
Tris (pH 6.8)	125 mM
SDS	0.1%
Ammonium persulfate	0.1%

TEMED		0.1%
1X PBS pH 7.4		
NaCl		137 mM
Na ₂ HPO ₄		10 mM
KCl		2.7 mM
KH ₂ PO ₄		1.8 mM
Transfer buffer		
Glycine		39 mM
Tris base		48 mM
SDS		0.04%
Methonal		20%
Blocking solution		
Skim milk		5%
Tween 20		0.02%
in PBS		

3.2 實驗設備

二氧化碳細胞培養箱	Nuarie
倒立顯微鏡	Leica
分光光度計(Spectrophotometer)	Perkin elmer
蛋白質電泳槽 (Hofer SE 520 mighty small mini-vertical unit)	Amersham pharmacia
轉漬電泳槽 (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell)	Bio-Rad
共軛焦顯微鏡 (Confocal microscopy)	Olympus
滲透壓分析儀(Osmometer)	Wescor




3.3 實驗分析軟體

Zero-Dscan Version 1.1	Scanalytics
Fluoview FV500 Version 4.3	Olympus

3.4 實驗方法

3.4.1 細胞培養

CHO K1 cell 培養於添加 10% FBS 與 0.22% 碳酸氫鈉之 MEM 培養基，置於 37°C、5% 二氧化碳及飽和濕度恆溫培養箱。當細胞佈滿培養皿時，以 37°C PBS 清洗後，trypsin-EDTA 處理約 1~2 分鐘，加入 MEM 培養基將聚集細胞打散，以適當比例分盤繼代培養。



CHO β -gal SF cell 培養於添加 0.15% 碳酸氫鈉、0.25% SITE、0.24% Meat peptone、0.09% lino-acid BSA 之 D-MEM/F-12 培養基，置於 37°C、5% 二氧化碳及飽和濕度培養箱。繼代培養時，收集細胞至 15 ml 離心管，以 pipet 將聚集細胞打散，以 1/5 比例 4 天繼代培養一次。

3.4.2 高低滲透壓處理

取 1×10^6 CHO K1 cell 至 10 cm 培養皿，待細胞貼附，將培養基換成添加 9 g/L 葡萄糖或 9 g/L 山梨醇之高滲透壓培養基處理，分別於處理 1 小時、15 小時及 30

小時，萃取細胞蛋白質。

3.4.3 滲透壓測量

取一定體積(20 μ l)之 MEM 培養基、高葡萄糖培養基及山梨醇培養基滴至濾紙上，將濾紙放入滲透壓分析儀測量各培養基滲透壓。

3.4.4 細胞比生長速率(specific growth rate)計算



批式培養細胞時，對數生長期的細胞數會隨著時間成對數增加，以下列公式表示細胞生長速率(單位時間細胞數量變化)

$$r_n = dx/dt \text{ ----- (1)}$$

r_n ：細胞生長速率

x ：細胞濃度

t ：時間

比生長速率(μ)為一個細胞的平均生長速率

$$\mu = r_n/x$$

$$\mu x = dx/dt \text{ ----- (2)}$$

對(2)式兩邊積分

$$\int_{t_0}^t \mu dx = \int_{x_0}^x dx/x \text{ ----- (3)}$$

t_0 : 起始時間

x_0 : 時間 t_0 時之細胞濃度



整理(3)可得

$$\mu (t - t_0) = \ln (dx/x_0)$$

$$\mu = (1/dt) \times \ln (dx/x_0) \text{ ----- (4)}$$

$$dt = t - t_0$$

由(4)式可得到 μ 值(細胞比生長速率)

3.4.5 細胞蛋白質萃取

培養皿置於冰上，在冰上移除培養基，以 4°C PBS 清洗培養基後，加入 80 μ l RIPA buffer，用細胞刮刀(scraper)刮下細胞後移至 1.5 ml 微量離心管。用針筒抽取將細胞膜打破，在 4°C，13000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液至新的 1.5 ml 微量離心管，放到 -80°C 冰箱保存。

3.4.6 蛋白質濃度測定



蛋白質標準曲線測定

利用Bradford於 1976 年發表蛋白質定量之原理，利用Coomassie Brilliant Blue G-250 與蛋白質結合的特性，G-250 與蛋白質結合後顏色由紅色轉變成藍色，此偵測 595 nm波長(OD₅₉₅)之吸收。此方法優點為靈敏，可偵測到ng蛋白質量，G-250 與蛋白質結合反應所需的時間短(約 2 分鐘)，G-250-蛋白質複合物(complex)在溶液中可維持長約 1 小時的時間。

以Bio-Rad protein assay kit進行蛋白質濃度測定。取 1.35 mg/ml bovine serum albumin (BSA)作為標準液，用二次水稀釋 10 倍，依 10、20、40、60、80、100 μ l體積取至微量離心管，分別加入 790、780、760、740、720、700 μ l二次水，再加入 200 μ l protein assay dye，使其總體積為 1000 μ l。以分光光度計 (spectrophotometer) 測量不同濃度BSA標準液的OD₅₉₅吸光值，作出濃度與吸光值關係的曲線及公式。

樣品蛋白濃度測定

取 5 μ l細胞蛋白質萃取液加入含有 200 μ l 染劑及 795 μ l二次水的微量離心管中，測量蛋白質液OD₅₉₅吸光值，將吸光值帶入公式中，換算出細胞萃取液蛋白質濃度。



3.4.7 蛋白質凝膠電泳法

配製下層 12% resolving gel，室溫靜置 1 小時，膠凝後再配置上層 5% stacking gel，室溫靜置 30 分鐘，膠凝固後移至 SDS 電泳槽，加入 SDS-PAGE running buffer。取 40 μ l 細胞萃取液與 10 μ l 5X SDS loading dye 混勻，於 100°C 水中加熱 5 分鐘，再置於冰上。依定量結果，取 marker 與等量濃度(50 μ g)蛋白

loading，以 80 伏特電壓進行電泳 5 小時。

3.4.8 西方墨點法

預先浸泡 PVDF membrane 於甲醇 15 分鐘，再移至 transfer buffer 浸泡 15 分鐘，預先浸泡 3M filter paper 於 transfer buffer 15 分鐘。電泳完成後，取下電泳膠，依 3M filter paper、gel、PVDF membrane、3M filter paper 負極至正極次序裝置到 gel holder cassette 中，放入轉漬電泳槽，以 200 毫安培電流 4°C 進行轉漬 2.5 小時。完成後取出 PVDF membrane，帶有蛋白的面朝上放入盒裡，加入 blocking solution，於室溫搖晃 1 小時，以 PBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘，再加入一級抗體 (1:1000)，4°C 搖晃隔夜，PBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘，接著加入二級抗體 (1:1000)，室溫搖晃 1 小時，PBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘。清洗完畢，加入 ECL 溶液作用 1 分鐘，把 PVDF membrane 放到壓片裝置中，以 Kodak 底片進行適度時間壓片，觀察實驗結果。以 Zero-Dscan 軟體將底片上 band 選取定量，計算 band intensity，將蛋白表現數值化。

3.4.9 免疫螢光染色法

懸浮細胞染色法

取 1×10^5 /ml CHO β -gal SF cell 於培養皿，分別加入 30 ppm 或 100 ppm ATA 培養 3 天，收取細胞至 15 ml 離心管，1000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液，以 PBS 清洗 2 次，加入 1 ml 4% paraformaldehyde 固定細胞，並於 4°C 隔夜，PBS 清洗後加入 1 ml 5% acetic acid/95% ethanol，於 -20°C 將細胞膜打洞 1 小時，PBS 清洗 2 次，加入 5% FBS/PBS blocking 30 分鐘，再加入 cadherin 或 integrin β 1 抗體 (1:100) 於 4°C 作用 5 小時後，PBS 清洗 2 次，加入 TRITC-conjugated 二級抗體 (1:800) 於 37°C 反應 1 小時，PBS 清洗 2 次，取細胞至載玻片上，以共軛焦顯微鏡觀察染色情形，並以 Fluoview 程式進行螢光染色定量分析。

貼附細胞染色法

將蓋玻片放置培養皿內，以 0.1% gelatin solution 於 37°C coating 1 小時，移除 gelatin solution，待蓋玻片變乾後，取 1×10^5 /ml CHO β -gal SF cell 於培養皿，加入 30 ppm ATA 培養 3 天。進行染色前，移除培養基，以 PBS 清洗 2 次，加入 1 ml 4% paraformaldehyde 固定細胞，並於 4°C 隔夜，PBS 清洗後加入 1 ml 5% acetic acid/95% ethanol，於 -20°C 將細胞膜打洞 15 分鐘，PBS 清洗 2 次，加入 5% FBS/PBS blocking 30 分鐘，再加入 cadherin 或 integrin β 1 抗體 (1:100) 於 4°C 作用 5 小時

後，PBS 清洗 2 次，加入TRITC-conjugated 二級抗體(1:800)於 37°C 反應 1 小時，
PBS 清洗 2 次，取出蓋玻片放至載玻片上，以共軛焦顯微鏡觀察染色情形，並以
Fluoview程式進行螢光染色定量分析。



肆. 結果

4.1 培養基滲透壓與CHO K1 cell生長關係

為了解高葡萄糖造成之滲透壓是否影響 CHO K1 cell 生長，在含有 10% 血清 MEM 培養基中分別添加 9 g/L 葡萄糖或 9 g/L 山梨醇以提高培養基滲透壓。由於山梨醇為一相似葡萄糖結構之分子(如附圖五)，細胞無法代謝利用山梨醇，在 MEM 培養基添加 9 g/L 山梨醇做為高滲透壓環境之調節。細胞培養於 MEM 培養基、高葡萄糖培養基及山梨醇培養基，分別在第 15 小時、30 小時、45 小時測量培養基滲透壓，並計算個別之細胞濃度。



隨著培養時間延長，發現高葡萄糖培養基滲透壓和山梨醇培養基滲透壓在第 15 小時、30 小時及 45 小時後，仍維持在高滲透壓狀態(350 mosmol/kg 以上)，MEM 培養基維持在低滲透壓(330 mosmol/kg) (圖一)。計算細胞比生長速率，以代表細胞的生長速度，比生長速率高，表示細胞生長快，比較細胞生長情形發現(圖二 A 與 B)，MEM 培養基之細胞生長速率最快，比生長速率為 1.36 ± 0.06 /天。高葡萄糖培養基次之，比生長速率為 1.22 ± 0.11 /天，山梨醇培養基最慢，比生長速率為 1.18 ± 0.04 /天，統計結果山梨醇培養基生長速率 *P* value 小於 0.05，有顯著差異，高滲透壓環境下，細胞生長比較慢，顯示培養基之滲透壓會

影響細胞生長速率。

4.2 滲透壓對 CHO K1 cell p38 MAPK 之影響

過去研究發現培養環境中滲透壓升高時，MAPK families 中的 p38 MAPK 會受到滲透壓影響，進而調控基因表現與細胞生理[Igarashi et al., 1998]，我們分析不同滲透壓培養基(MEM 培養基、高葡萄糖培養基及山梨醇培養基)對於 CHO K1 cell p38 MAPK 蛋白質活化之影響，以西方墨點法分別比較第 1、15 及 30 小時細胞內 p38 MAPK 活性(圖三 A)，利用 ZERO-Dscan 程式分析底片結果，將磷酸化 p38 MAPK 與未磷酸化 p38 MAPK 表現量數值化，並將磷酸化 p38 MAPK 與未磷酸化 p38 MAPK 作一相對比較(圖三 B)。相較於 MEM 培養基，結果顯示在培養第 1 小時，高葡萄糖培養基和山梨醇培養基之 p38 MAPK 有活化，第 15 與 30 小時，不同滲透壓培養基之 p38 MAPK 活化並無明顯改變。

4.3 滲透壓對 CHO K1 cell p42 MAPK 之影響

實驗室先前研究發現提高培養基葡萄糖含量時，會引起 p42 MAPK (ERK2)

磷酸化，其他研究亦顯示高滲透壓環境會促進 p42 MAPK 活化[Nagata et al., 1999]，因此，我們進一步探討不同滲透壓培養基 (MEM 培養基、高葡萄糖培養基及山梨醇培養基)對細胞 p42 MAPK 蛋白質活化的影響，以西方墨點法分別比較第 1、15 及 30 小時細胞內 p42 MAPK 活性(圖四 A)，利用 ZERO-Dscan 程式分析底片結果，將磷酸化 p42 MAPK 與未磷酸化 p42 MAPK 表現量數值化，並將磷酸化 p42 MAPK 與未磷酸化 p42 MAPK 作一相對比較(圖四 B)。結果顯示高葡萄糖培養基和山梨醇培養基在第 1、15 及 30 小時，皆會引起 p42 MAPK 蛋白活化。高葡萄糖培養基和山梨醇培養基之 p42 MAPK 第 1 小時活化程度較 MEM 培養基 p42 MAPK 活化高 3 倍，第 15 小時比 MEM 培養基 p42 MAPK 活化高 2 倍。此外，在第 30 小時，相較於 MEM 與高葡萄糖培養基，山梨醇培養基可活化 p42 MAPK 達 2 倍。結果顯示高滲透壓培養基會活化 p42 MAPK。

4.4 ATA 濃度與 CHO β -gal SF cell 生長關係

研究顯示 DMSO [Fiore et al., 1999]與 ATA [Andrew et al., 1999]都有促進細胞增生功用。DMSO 為 ATA 的溶劑，因此在探討 ATA 對於 CHO β -gal SF cell 的影響，於 DMEM/F12 培養基中添加 30 ppm DMSO 作為對照組，及分別添加 30 ppm ATA 或 100 ppm ATA 比較 CHO β -gal SF cell 生長情形(圖五 A)。結果顯示

DMEM/F12 培養基比生長速率為 0.81 ± 0.01 /天，加入 30 ppm DMSO 培養基細胞比生長速率為 0.95 ± 0.01 /天，添加 30 ppm ATA 培養基細胞比生長速率為 1.02 ± 0.15 /天，100 ppm ATA 培養基細胞比生長速率為 0.74 ± 0.09 /天(圖五 B)。結果發現添加 30 ppm DMSO 與 30 ppm ATA 培養基都會促進細胞生長，而 100 ppm 高濃度 ATA 細胞生長速率較 DMEM/F12 培養基細胞生長速率低，顯示高濃度 ATA 不會促進細胞生長。

4.5 ATA 濃度對細胞型態(adhesion 與 aggregation)之影響



過去研究發現無血清狀態培養 CHO β -gal SF cell 時，加入低濃度 ATA(15 ppm)引起部分懸浮培養的 CHO β -gal SF cell 貼附到培養皿。高濃度 ATA(50 ppm)影響懸浮聚集 CHO β -gal SF cell 的狀態，造成細胞懸浮不聚集的現象[Liu et al., 2001a]。為了解 ATA 對細胞型態造成之影響，我們利用懸浮聚集 CHO β -gal SF cell 來觀察，control 組(沒有添加 DMSO 與 ATA)，細胞為懸浮聚集成葡萄串狀(圖六 A)，添加 30 ppm DMSO，細胞仍為懸浮聚集狀態(圖六 B)，當添加 30 ppm ATA 培養時，部分細胞由懸浮聚集狀態貼附到培養皿上成梭狀(圖六 C)，加入 100 ppm ATA 培養時，細胞由懸浮聚集改變成懸浮不聚集狀態(圖六 D)，因此不同濃度 ATA 培養基會對細胞型態造成改變。

4.6 ATA 濃度對 CHO β -gal SF cell cadherin 表現影響

由於 ATA 無法穿透細胞膜，因此在探討 ATA 造成細胞型態改變時，以偵測與調控細胞型態有關的細胞膜蛋白表現，了解 ATA 影響細胞型態改變之機制。Cadherins 為 transmembrane glycoproteins，以 homo-type 方式與相鄰細胞 cadherin 連結形成附著分子，讓細胞與細胞之間 aggregation [Koch et al., 2004]。

我們以免疫螢光染色方法偵測細胞膜蛋白質 cadherin 表現情形，圖七 a、d、g、j、m、p 為 confocal 顯微鏡可見光照相結果，b、e、h、k、n、q 為螢光染色結果，c、f、i、l、o、r 為可見光與螢光染色重疊結果。結果顯示未添加 ATA 與添加 30 ppm ATA 及添加 100 ppm ATA 時，CHO β -gal SF cell cadherin 皆有表現 (圖七 c、h、k、n、q)。

以 Fluoview 軟體對於細胞螢光染色結果定量，將 cadherin 表現強度數值化，發現 control 組(DMEM/F12 培養基中未添加 DMSO 或 ATA)，懸浮聚集細胞 cadherin 表現量強度為” 1011 \pm 54” (圖七 e); 添加 DMSO，懸浮聚集細胞 cadherin 表現量強度為” 917 \pm 36” (圖七 h); 添加 30 ppm ATA，懸浮聚集細胞 cadherin 表現量強度為” 879 \pm 170” (圖七 k)，貼附細胞 cadherin 表現量強度為” 602 \pm 160

” (圖七 n); 添加 100 ppm ATA, 懸浮不聚集細胞 cadherin 表現量強度為” 954 ± 28

” (圖七 q); 定量結果顯示不同 ATA 濃度不影響 cadherin 表現。

4.7 ATA 濃度對 CHO β -gal SF cell integrin β 1 表現影響

Integrins 為 transmembrane proteins, 由 α 和 β 兩種 subunits 組成, 以 hetero-type 方式和細胞膜上其他細胞附著的分子(extra cellular molecule)結合, 與細胞貼附有關[Rosenberger et al., 2004], 藉由偵測 integrin β 1 表現了解 ATA 對細胞型態改變之影響。



Integrin β 1 是 CHO cell 表現最多的 integrin subunit, 以免疫螢光染色方法偵測 CHO β -gal SF cell integrin β 1 表現, 圖八 a、d、g、j、m 為 confocal 顯微鏡可見光照相結果, b、e、h、k、n 為螢光染色結果, c、f、i、l、o 為可見光與螢光染色重疊結果。發現 control 組, 懸浮聚集細胞不表現 integrin β 1 (圖八 b), 添加 DMSO 亦不引起 integrin β 1 表現(圖八 e), 當加入 30 ppm ATA 與 100 ppm ATA, 皆會引起 integrin β 1 活化(圖八 h、k、n)。

以 Fluoview 軟體對於細胞螢光染色結果定量，將 integrin $\beta 1$ 表現強度數值化，定量結果顯示 30 ppm ATA 引起 integrin $\beta 1$ 表現，使得部分細胞由懸浮聚集而貼附至培養皿，懸浮細胞 integrin $\beta 1$ 表現強度為” 162 ± 21 ” (圖八 h)，貼附細胞 integrin $\beta 1$ 表現強度為” 756 ± 7 ” (圖八 k) ($P < 0.05$)，100 ppm ATA 會引起 integrin 更強表現，integrin $\beta 1$ 表現強度為” 1505 ± 27 ” (圖八 n)，細胞由懸浮聚集變成懸浮不聚集狀態($P < 0.05$)，此結果顯示不同 ATA 濃度會引起 integrin $\beta 1$ 表現增加，並可能是造成細胞形態之主要原因。



伍. 討論

5.1 培養基滲透壓與 CHO K1 cell 生長關係

葡萄糖是能量來源與碳源，其濃度變化會影響細胞的生理狀態，CHO cell 為目前最廣泛用來製造醫療用重組蛋白之細胞株，本實驗室先前研究探討高濃度葡萄糖培養基，對於CHO K1 cell細胞生長、能量代謝、cAMP含量和酵素調節間相互關係，發現葡萄糖濃度增加，導致細胞內cAMP含量上升，經由下游之PKA活化，使得PKA下游p42 MAPK活性增加；而細胞增生時間受葡萄糖濃度影響延長，使得CHO K1 cell生長速率變慢[陳建龍, 1999; 俞銘誠, 2001]。目前在生化工程方面，研究發現高滲透壓會使CHO cell停留在G₀ phase或G₁/S或G₂/M phase，停留在G₀ phase可促進重組蛋白產量，因此利用高滲透壓培養環境增加重組蛋白產量以降低生產成本 [Lee et al., 2003; Ryu et al., 2001; Walsh, 2003]。

本實驗以批次方式培養 CHO K1 cell 探討高滲透壓培養基對於細胞生長之影響。由於山梨醇為一相似葡萄糖結構之分子，細胞無法代謝利用山梨醇，在 MEM 培養基添加 9 g/L 山梨醇做為高滲透壓環境之調節。經過 15、30 及 45 小時之培養，發現高滲透壓培養基仍維持高滲透壓狀態，低滲透壓維持低滲透壓(圖一)。高滲透壓影響 CHO K1 cell 生長，其比生長速率由 1.36 ± 0.06 /天減緩為 $1.22 \pm$

0.11 /天(高葡萄糖培養基)與 1.18 ± 0.04 /天(山梨醇培養基)(圖二 B)，統計結果山梨醇培養基生長速率 P value 小於 0.05，有顯著差異，由實驗結果可推測細胞生長速率減緩受到培養基滲透壓影響。

5.2 滲透壓與 CHO K1 cell p38 MAPK 表現關係

由滲透壓對細胞生長影響結果得知，細胞受到高滲透壓影響而延緩生長，相關文獻指出：當細胞受到高滲透壓刺激時，會進行一連串訊息調控以適應高滲透壓環境，滲透壓大小與作用時間皆會引起p38 MAPK含量增加及刺激p38 MAPK活化，顯示p38 MAPK與滲透壓調控有關 [Igarashi et al., 1998]。高滲透壓可經由cAMP活化PKA而活化p38 MAPK[Mao et al., 2003]，p38 MAPK可活化下游轉錄因子或熱休克蛋白，如ATF-2 被p38 MAPK磷酸化後，影響其下游tumor necrosis factor- α 、cyclin A或*c-jun*基因表現，調控細胞cell cycle arrest，使細胞停留在G₀或G₁或G₂ phase或細胞凋亡 [Cowan et al., 2003; Kultz et al., 1998b; de Nadal et al., 2002; Tao et al., 2002]。不同細胞株對於環境滲透壓耐受力不同，研究發現 17 mM 葡萄糖濃度即會造成pancreatic β -cell DNA片段化和細胞凋亡[Efanova et al., 1998]，22 mM 葡萄糖濃度可活化osteoblast p38 MAPK [Zayzafoon et al., 2002]，550 mosmol/kg滲透壓引起inner medullary epithelial cell p38 MAPK活化，p38

MAPK引起G₂/M checkpoint活化並使細胞cell cycle arrest [Dmitrieva et al., 2002]。

細胞內growth arrest and DNA damage(GADD)蛋白會受到高滲透壓、UV或DNA傷害刺激而活化，引起細胞週期延緩，顯示培養環境之滲透壓對於細胞生長造成極重要影響 [Kultz et al., 1998a; Takahashi et al., 2001]。

本實驗分別添加額外 9 g/L 葡萄糖或 9 g/L 山梨醇以提高培養基之滲透壓，高葡萄糖培養基含 10 g/L 葡萄糖，其濃度為 55 mM 葡萄糖，山梨醇培養基含有 1 g/L 葡萄糖與 9 g/L 山梨醇，其濃度為 55 mM 醣類，CHO K1 cell 經過第 1、15、30 小時培養，分析細胞 p38 MAPK 磷酸化(圖三)，西方墨點結果顯示在培養第 1 小時，高葡萄糖和山梨醇培養基活化 p38 MAPK，第 15 與 30 小時，不同滲透壓培養基之 p38 MAPK 活化並無明顯改變。研究發現 p38 MAPK 受到高滲透壓刺激時，在數分鐘即快速磷酸化，我們亦在高滲透壓培養第 1 小時偵測到 p38 MAPK 活化，長時間 15 與 30 小時未偵測到明顯改變，推測 p38 MAPK 於第 1 小時活化後，可能調控下游 ATF-2 或 GADD 或與細胞週期相關蛋白之表現，導致細胞生長速率減緩[Kultz et al., 1998a]。

5.3 滲透壓與 CHO K1 cell p42 MAPK 表現關係

研究發現p44/p42 MAPK可被血清、胰島素或葡萄糖等生長因子活化[Han et al., 2004]，促進細胞增生與生長[Pages et al., 1993]，在mid G₁ phase，磷酸化p42 MAPK會由細胞質轉位到細胞核內，使細胞周期進入S phase [Hulleman et al., 1999]。除生長因子外，研究亦發現UV可磷酸化receptor tyrosine kinases而引起p44/p42 MAPK活化[Coffer et al., 1995]；高滲透壓可能具有insulin-mimic作用，經由活化細胞膜上insulin receptor引起p44/p42 MAPK活化；但在insulin receptor mutant細胞或其他細胞中，高滲透壓仍可引起p44/p42 MAPK活化 [Szaszi et al., 1997; Ouwen et al., 2001]。本實驗探討滲透壓對p42 MAPK蛋白磷酸化之影響(圖四)，發現在第 1、15 及 30 小時，高葡萄糖培養基與山梨純培養基皆可促進p42 MAPK活化，亦顯示高滲透壓會活化p42 MAPK，可能是高滲透壓活化MKKKs中MEKKs或MLKs，藉由訊息cross talk而引起p42 MAPK活化[Cowan et al., 2003]，但此現象之機制仍是有待探討。

5.4 ATA 對 CHO β -gal SF cell 生長之影響

由於 ATA 對於細胞低毒性，在醫學方面有廣泛的研究，如可促進細胞增生與

抑制細胞凋亡[Andrew et al., 1999]。先前研究發現低濃度(15 ppm) ATA 可引起懸浮培養 CHO β -gal SF cell 產生形態改變貼附到培養皿，高濃度(50 ppm) ATA 影響細胞聚集，造成細胞懸浮不聚集現象[Liu et al., 2001a]。實驗在 DMEM/F12 無血清培養基中添加低濃度(30 ppm) ATA，亦可看到 ATA 促進 CHO β -gal SF cell 生長之現象，但高濃度(100 ppm) ATA 不會促進細胞生長(圖五)。我們有興趣的是 ATA 可改變細胞型態，添加 30 ppm DMSO 不會改變細胞型態(圖六 B)，30 ppm ATA 使部份懸浮細胞改變型態而變成貼附狀態(圖六 C)，100 ppm ATA 可造成細胞由聚集變成不聚集之現象(圖六 D)。



5.5 ATA 對 CHO β -gal SF cell 細胞型態之影響

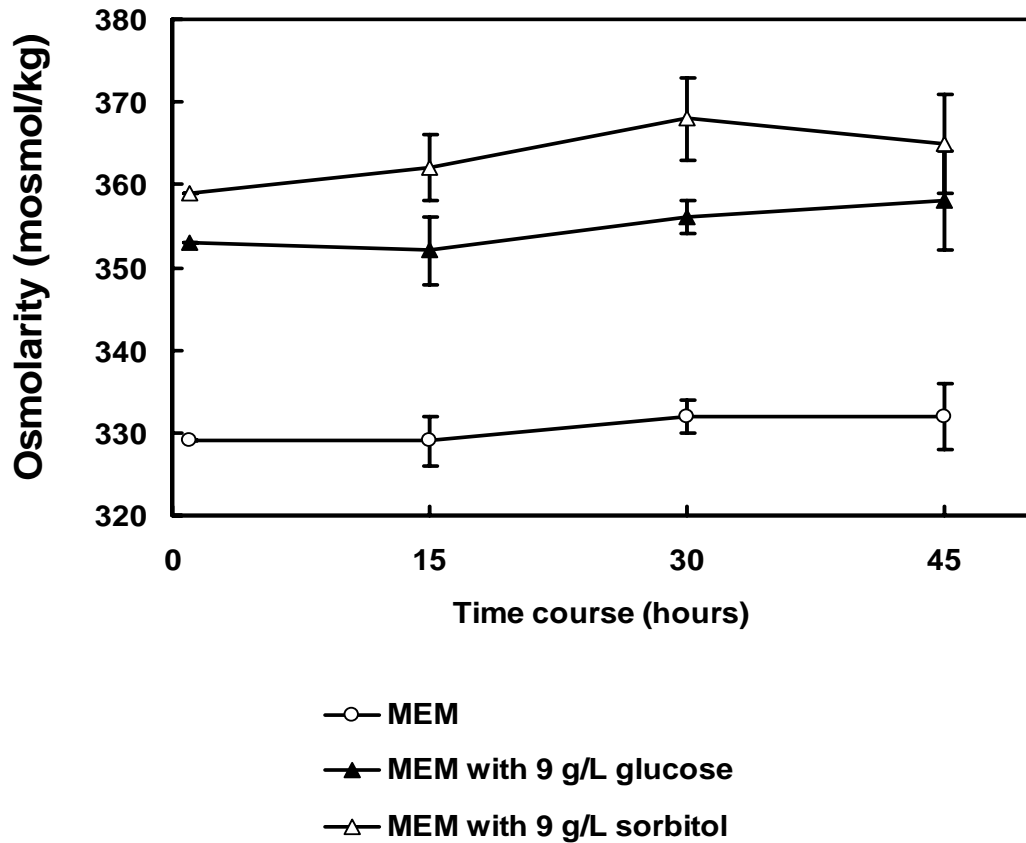
ATA 為無法穿透細胞膜之分子，因此分別偵測位於細胞膜上的 cadherin 和 integrin 表現，以探討 ATA 濃度對細胞造成型態(adhesion 與 aggregation)改變之機制。Cadherin 與 aggregation 有關，讓細胞與細胞間相連與交互作用，integrin 與 adhesion 有關，可和 extra cellular molecule 結合使細胞貼附[Grodzki et al., 2003; Koch et al., 2004; Patel et al., 2003; Schlippe et al., 2000]。圖七 e、h、k、n、q 為 cadherin 免疫螢光染色結果，CHO β -gal SF cell 皆有 cadherin 表現，顯示 ATA 濃度不影響 cadherin 表現。在 integrin 方面，發現 ATA 可引起 integrin 表現(圖八

h、k、n)，integrin 表現程度受到 ATA 濃度影響，30 ppm ATA 使 CHO β -gal SF cell 貼附，其 integrin β 1 表現較懸浮細胞強($P < 0.05$)。100 ppm ATA 可造成細胞由聚集狀態變成不聚集，偵測 integrin β 1 表現，發現其 integrin β 1 表現(圖八 n)較貼附細胞(圖八 k)強($P < 0.05$)，定量結果亦顯示 100 ppm ATA 引起 integrin β 1 過度表現(overexpression)，顯示 ATA 濃度會影響 integrin β 1 表現，高濃度 ATA 導致細胞由聚集變成不聚集狀態，可能是經由 integrin 所調控。

Integrins 是 adhesion 最主要的角色，可藉由 hetero-type 方式和細胞膜上其他 extra cellular molecule (ECM) 結合，讓細胞貼附到基質上[Rosenberger et al., 2004]。Integrins 也可藉由 homo-type 方式和其他 integrins 結合，造成細胞之間 aggregation 的情形[Khyrul et al., 2004]。Integrin cytoplasmic domain 可與 calpain 或 integrin-linked kinase (ILK) 結合，進而調控下游 actin cytoskeleton 影響細胞貼附與細胞間交互作用(如附圖六所示)，影響細胞生長與分化。研究發現 ILK 過度表現可引起 cyclin D1、Cdk4、cyclin E-associated kinase 活化，及引起 Cdk inhibitors p21 和 p27 表現，並導致細胞從貼附狀態變成懸浮狀態生長[Radeva et al., 1997]。ILK 過度表現也會抑制 ECM fibronectin polymerization 與 motility [Hannigan et al., 1996; Khyrul et al., 2004]，及抑制細胞內 actin organization，造成 cell spreading 改變與抑制細胞 adhesion，影響細胞生長 [Etienne-Manneville et al., 2002]。細胞經由 integrin 與 ECM 作用，調控細胞 shape、motility，刺激細胞生長、分化及基因表

現，因此推測高濃度(100 ppm) ATA 引起 CHO β -gal SF cell integrin β 1 過度表現時，也可能促進 ILK 過度表現而抑制細胞間 ECM 如 fibronectin 之作用，進而影響聚集細胞變成不聚集狀態。

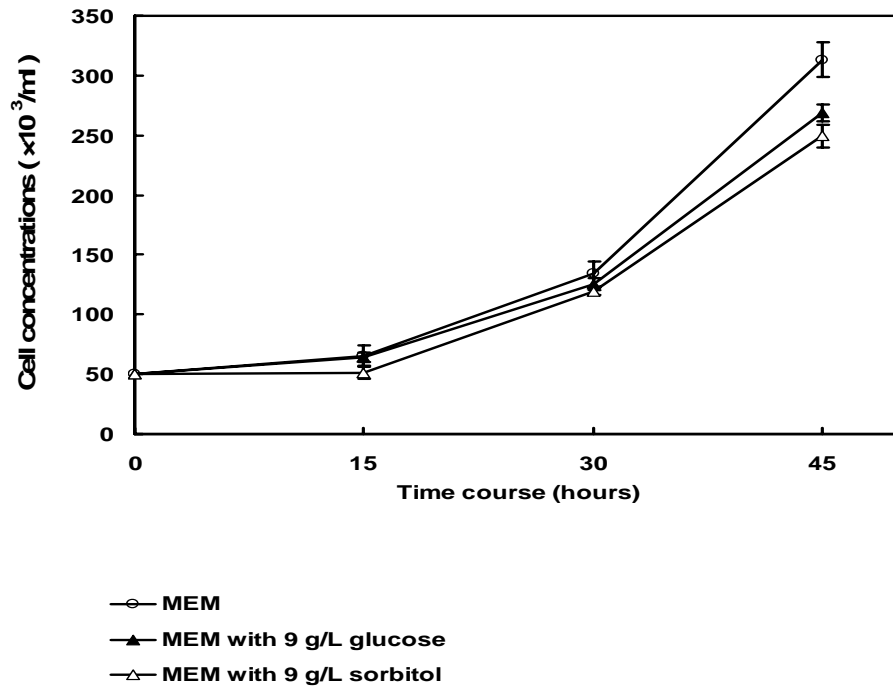




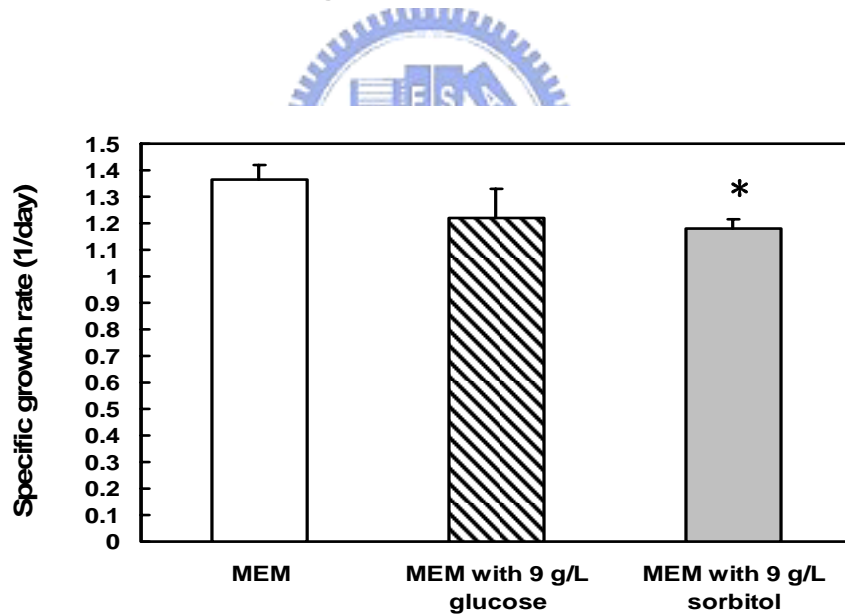
圖一. 培養時間與培養基滲透壓之關係

收取各培養時間點培養基測量滲透壓，在不同時間下測得高葡萄糖培養基和山梨醇培養基仍維持高滲透壓趨勢(滲透壓 350 mosmol/kg 以上)。MEM 培養基維持低滲透壓趨勢(滲透壓 330 mosmol/kg)。

(A)



(B)

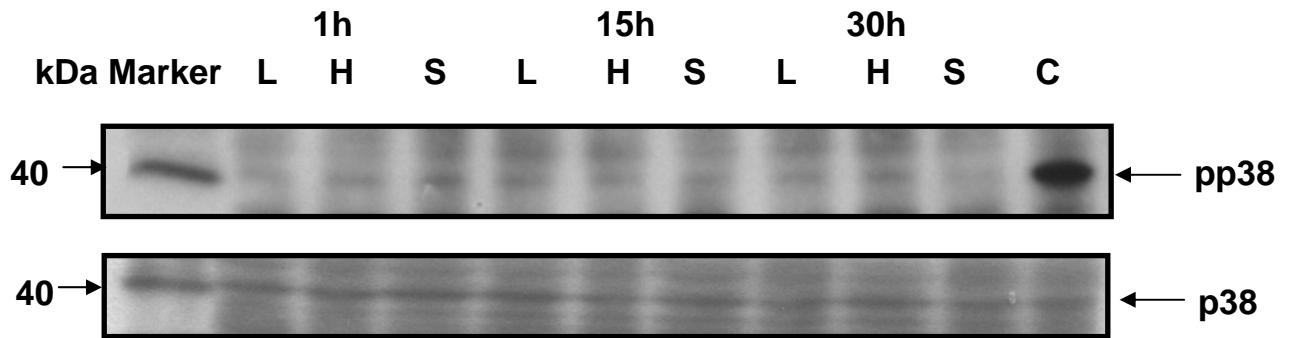


* $P < 0.05$

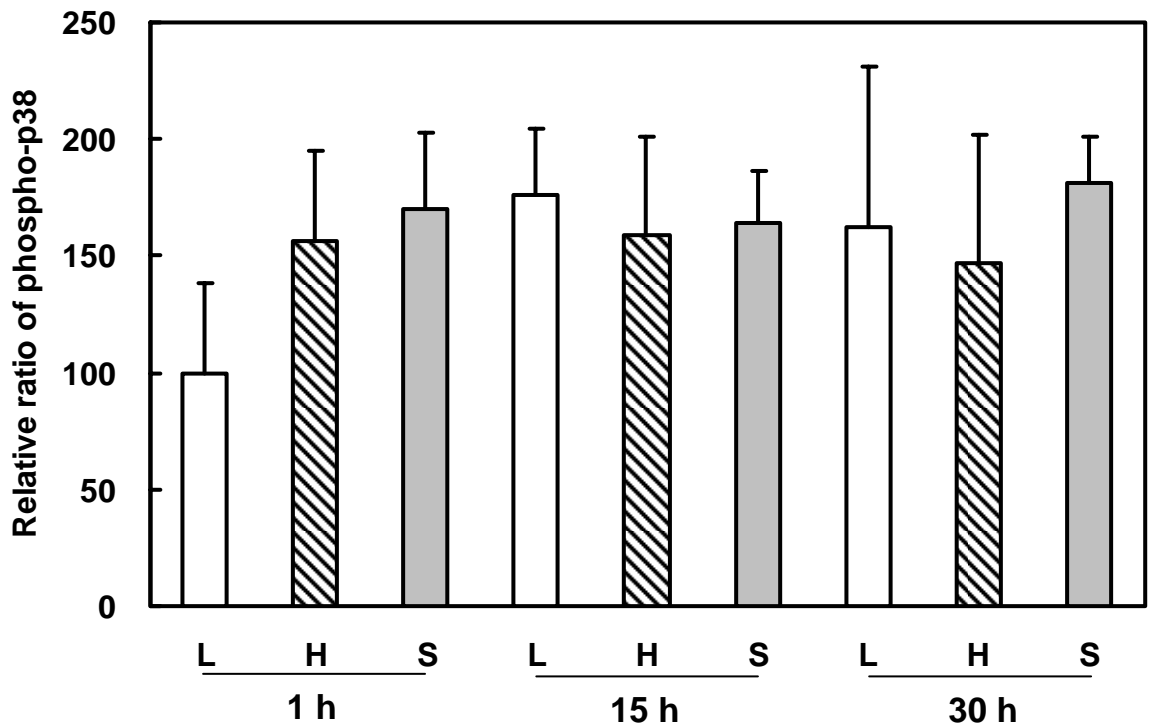
圖二. 培養基滲透壓與 CHO K1 cell 生長關係

(A)細胞生長 (B)細胞比生長速率。細胞生長以 MEM 培養基最快，高葡萄糖培養基次之，山梨醇培養基最慢。計算比生長速率 MEM 培養基為 $1.36 \pm 0.06/\text{天}$ ，高葡萄糖培養基為 $1.22 \pm 0.11/\text{天}$ ，山梨醇培養基為 $1.18 \pm 0.04/\text{天}$ 。山梨醇培養基比生長速率有顯著差異，顯示培養基之滲透壓會影響細胞生長。

(A)



(B)

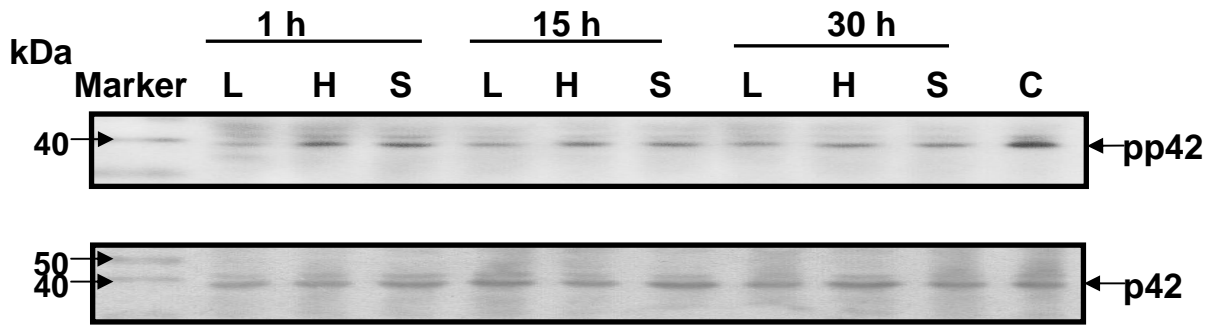


L : MEM H : MEM with 9 g/L glucose S : MEM with 9 g/L sorbitol
C : Control

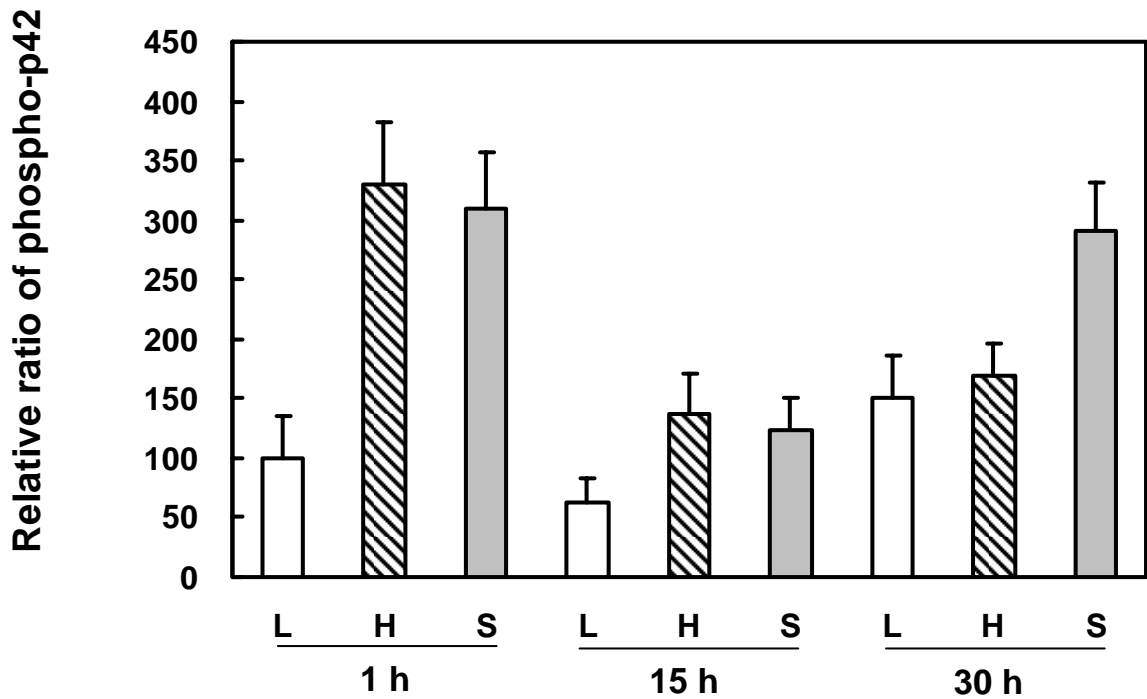
圖三. 滲透壓與 CHO K1 cell p38 MAPK 表現關係

(A) p38 MAPK 西方轉漬電泳圖 (B) ZERO-Dscan 程式分析 p38 MAPK 相對表現量。在不同滲透壓培養環境中，第 1 小時，高葡萄糖和山梨醇培養基之高滲透壓環境可引起 p38 MAPK 活化，第 15 和 30 小時，p38 MAPK 活化沒有明顯改變。

(A)



(B)

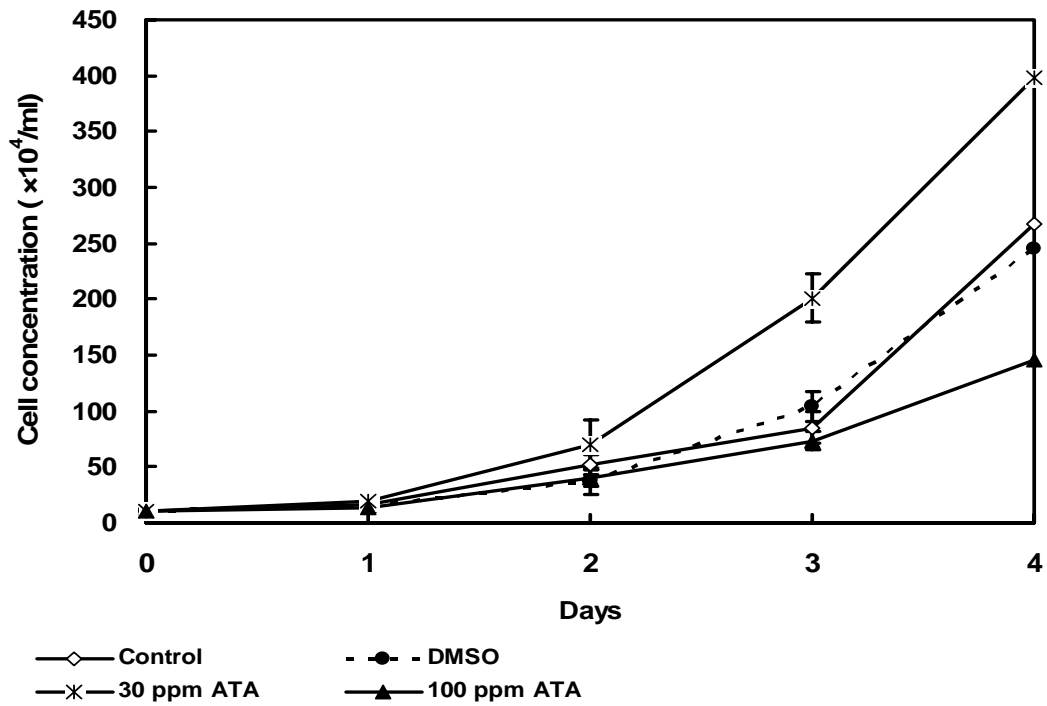


L : MEM H : MEM with 9 g/L glucose S : MEM with 9 g/L sorbitol
C : Control

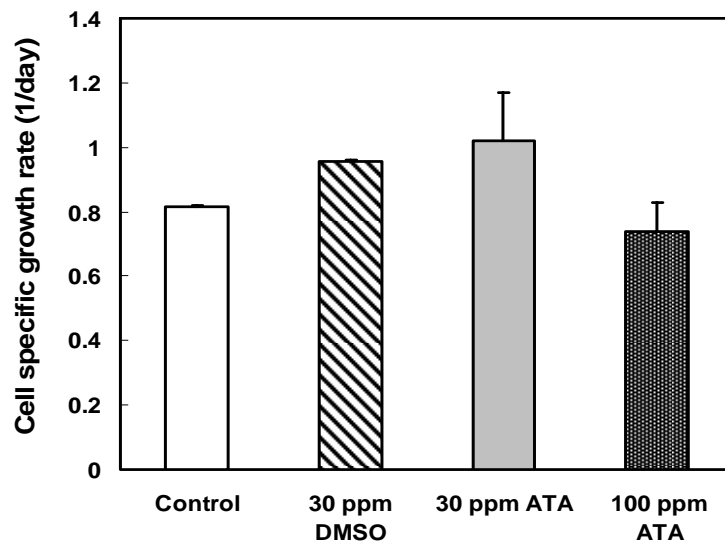
圖四. 滲透壓與 CHO K1 cell p42 MAPK 表現關係

(A) p42 MAPK 西方轉漬電泳圖 (B) ZERO-Dscan 程式分析 p42 MAPK 相對表現量。相較於 MEM 培養基，在第 1 小時高葡萄糖與山梨醇培養基會引起 p42 MAPK 3 倍活化，第 15 小時及第 30 小時，高葡萄糖和山梨醇培養基可引起 p42 MAPK 2 倍活化，結果顯示葡萄糖和高滲透壓會活化 p42 MAPK。

(A)



(B)

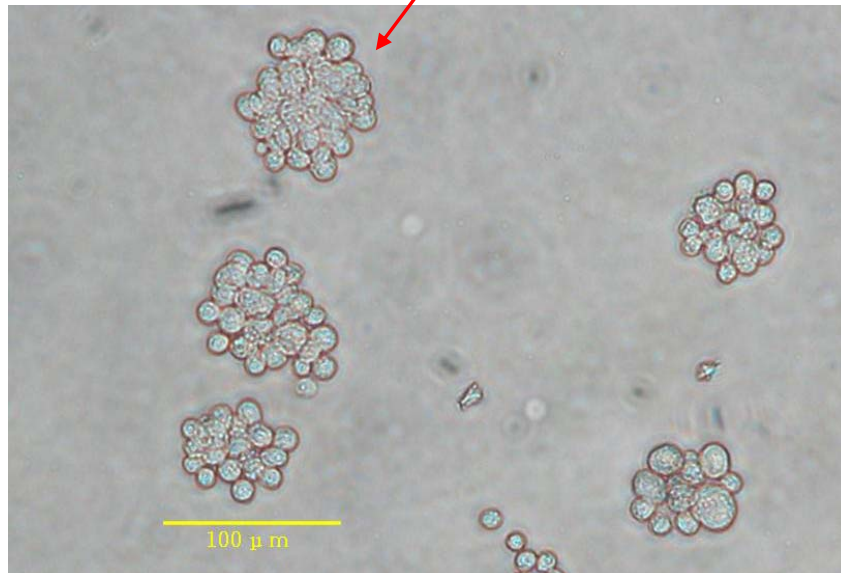


圖五. ATA 濃度與 CHO β -gal SF cell 生長關係

(A)細胞生長速率 (B)細胞比生長速率。DMEM/F12 培養基(control)添加 30 ppm ATA 會促進細胞生長，100 ppm ATA 不會促進細胞生長。Control 組比生長速率為 0.81 ± 0.01 /天，添加 30 ppm DMSO 比生長速率為 0.95 ± 0.01 /天，30 ppm ATA 比生長速率為 1.02 ± 0.15 /天，100 ppm ATA 比生長速率為 0.74 ± 0.09 /天。

A. Control (DMEM/F12)

aggregation



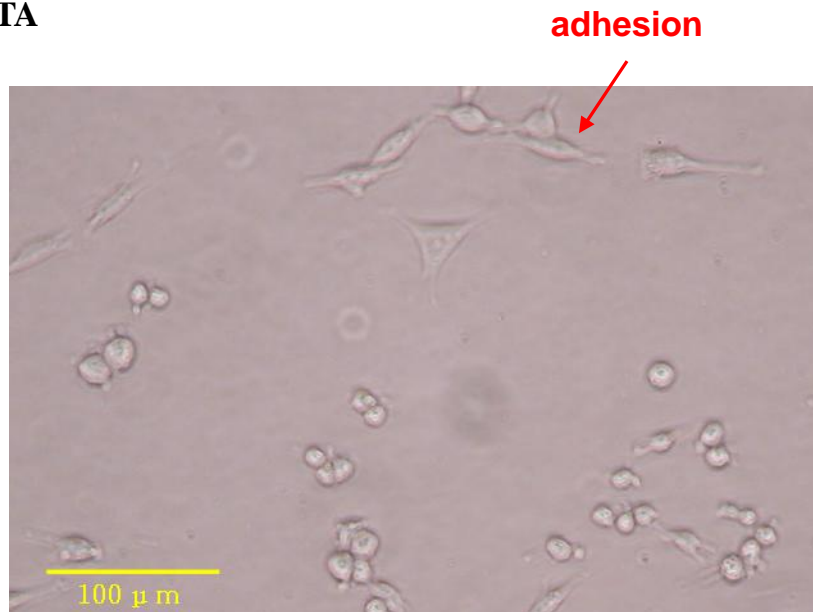
B. 30 ppm DMSO



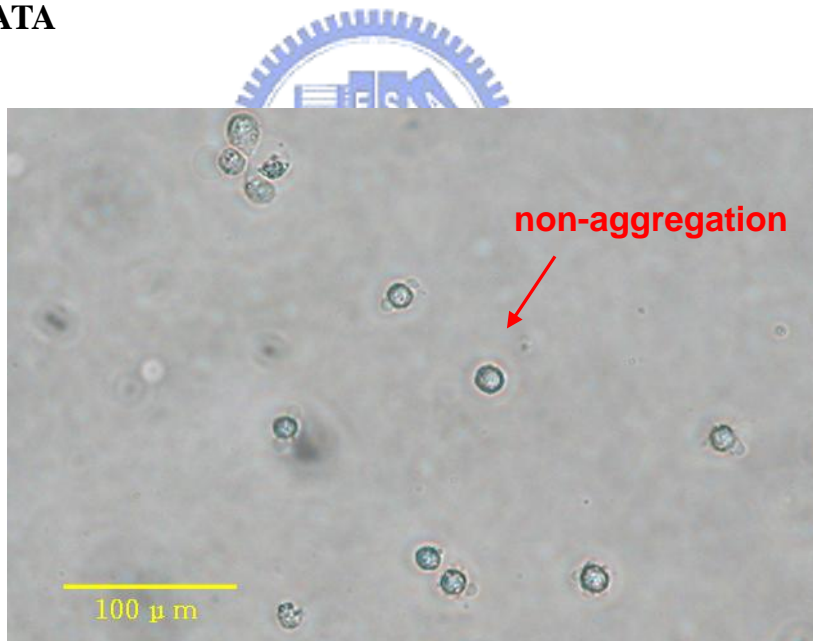
aggregation



C. 30 ppm ATA



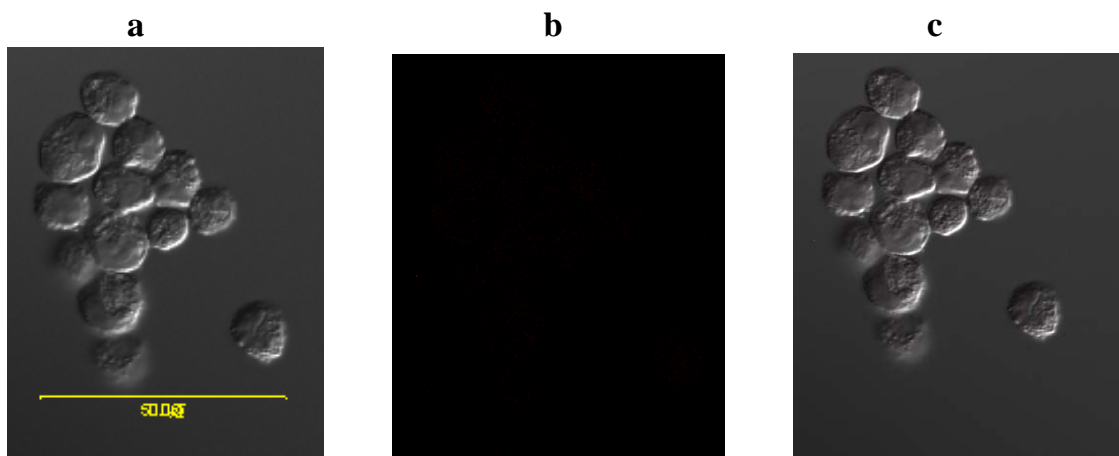
D. 100 ppm ATA



圖六. ATA 對 CHO β -gal SF cell 細胞型態之影響

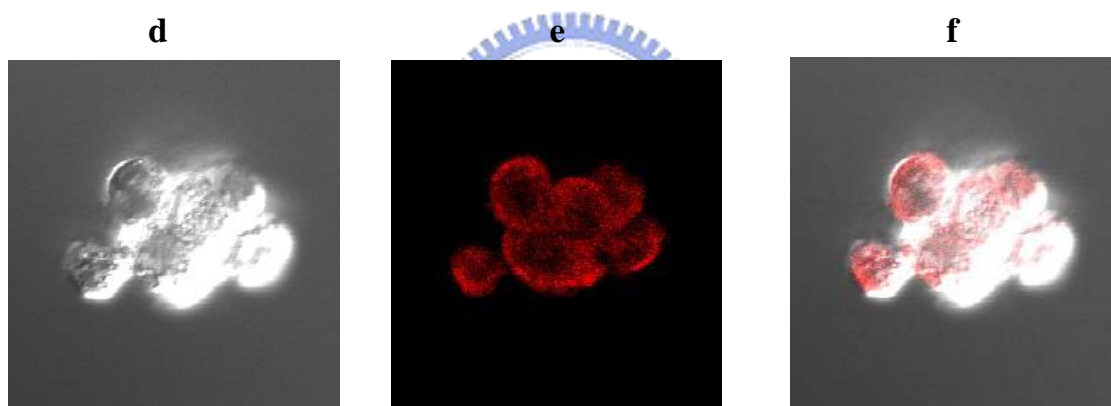
(A)Control (DMEM/F12 培養基) CHO β -gal SF cell 懸浮聚集型態 (B)添加 30 ppm DMSO，細胞懸浮聚集的型態 (C)添加 30 ppm ATA，部分細胞為懸浮聚集，部分細胞貼附至培養皿成梭狀之型態 (D)添加 100 ppm ATA，細胞懸浮不聚集的型態。

A. Negative control

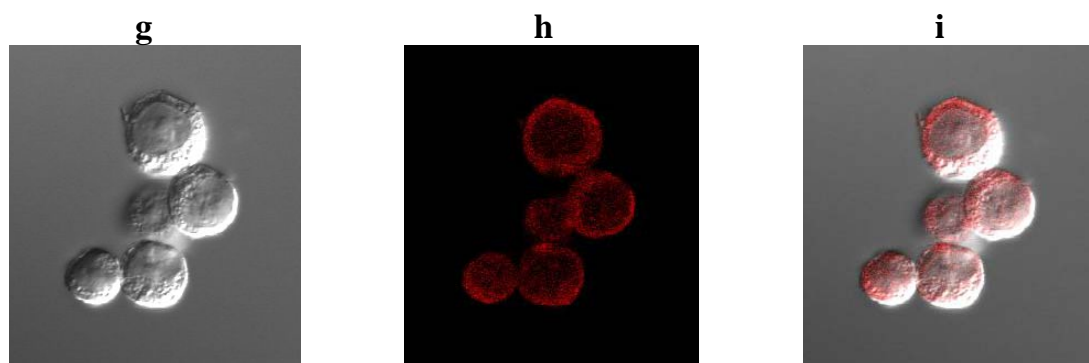


(比例尺圖示 50 μm)

B. Control (suspension)

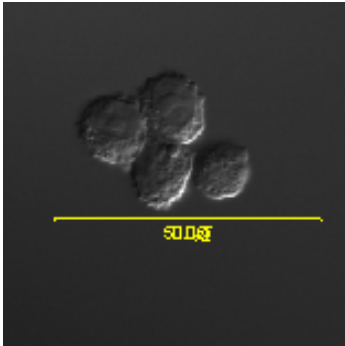


C. DMSO (suspension)

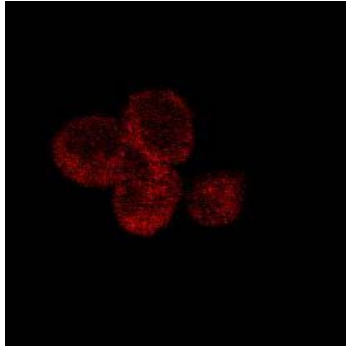


D. 30 ppm ATA (suspension)

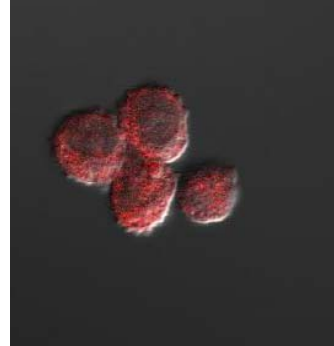
j



k



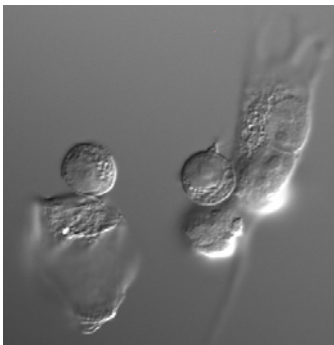
l



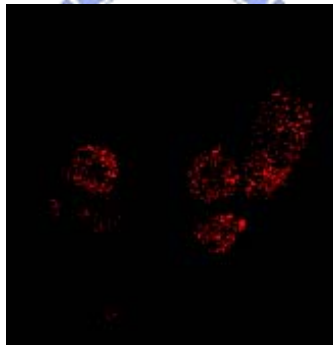
(比例尺圖示 50 μ m)

E. 30 ppm ATA (adhesion)

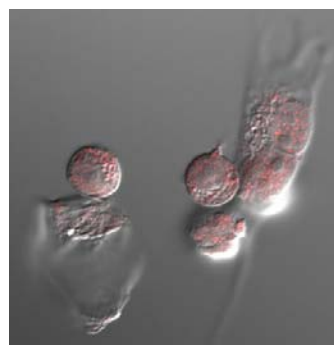
m



n

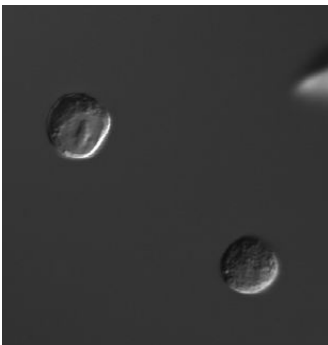


o

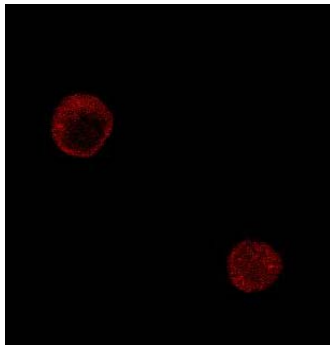


F. 100 ppm ATA (suspension)

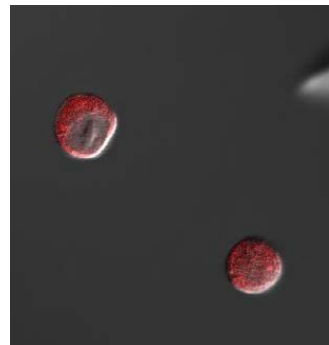
p



q



r

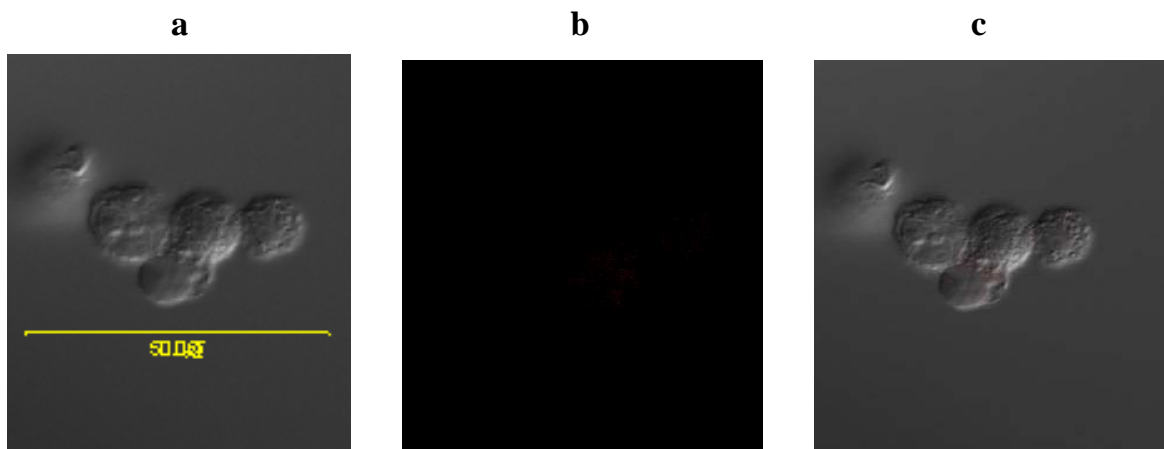


Cadherin 表現程度	Suspension	Adhesion
control	1011 ± 54	-
30 ppm DMSO	917 ± 36	-
30 ppm ATA	879 ± 170	602 ± 160
100 ppm ATA	954 ± 28	-

圖七. ATA 濃度對 CHO β -gal SF cell cadherin 表現影響

(A)未加入一級 cadherin 抗體 negative control (B)加入 cadherin 抗體之 control (DMEM/F12)，細胞懸浮聚集的型態 (C)添加 30 ppm DMSO，細胞懸浮聚集的型態 (D)添加 30 ppm ATA，細胞懸浮聚集的型態 (E)添加 30 ppm ATA，細胞貼附的型態 (F)添加 100 ppm ATA，細胞懸浮不聚集的型態。a、d、g、j、m、p 圖為 confocal 顯微鏡可見光照相結果。b、e、h、k、n、q 為螢光染色結果。c、f、i、l、o、r 為可見光與螢光染色重疊結果。以 Fluoview 軟體對於細胞螢光染色結果定量，將 cadherin 表現強度數值化如上表所示，定量結果顯示不同 ATA 濃度不影響 cadherin 表現。

A. Control (suspension)

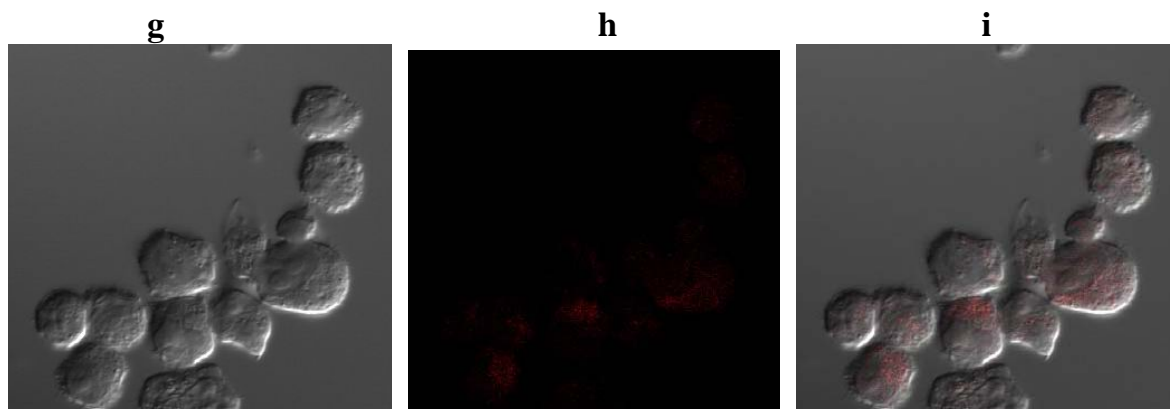


(比例尺圖示 50 μ m)

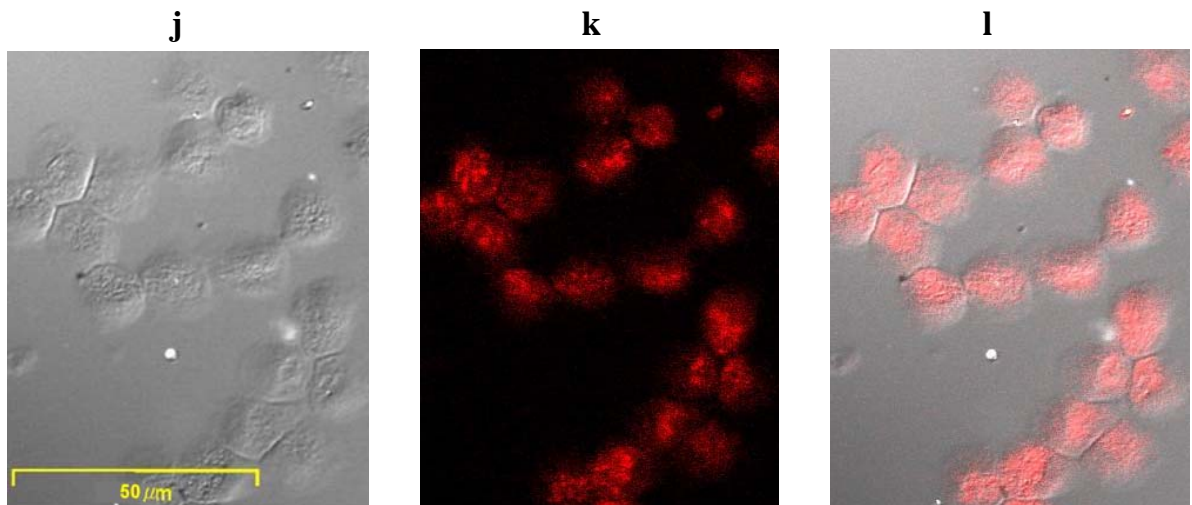
B. DMSO (suspension)



C. 30 ppm ATA (suspension)

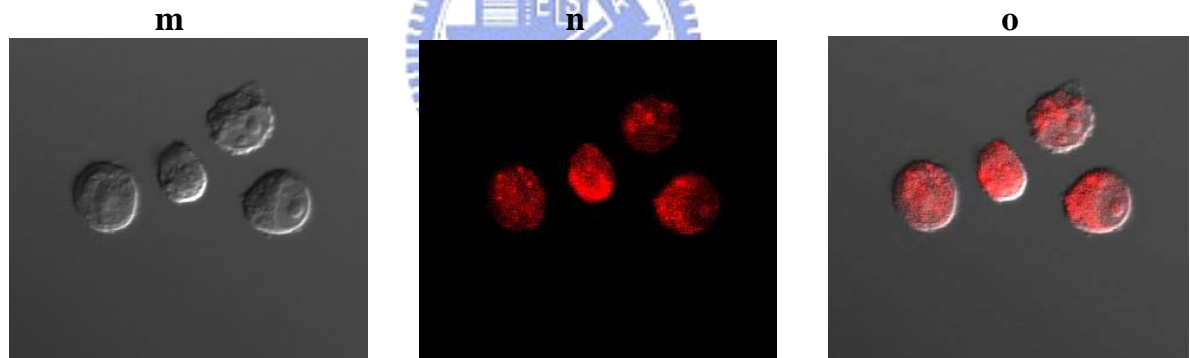


D. 30 ppm ATA (adhesion)



(比例尺圖示 50 μm)

E. 100 ppm ATA (suspension)



Integrin 表現程度	Suspension	Adhesion
control	ND	-
30 ppm DMSO	ND	-
30 ppm ATA	162 ± 21	756 ± 7 *
100 ppm ATA	1505 ± 27 *	-

ND : no data

* $P < 0.05$

圖八. ATA 濃度對 CHO β -gal SF cell integrin β 1 表現影響

(A) Control (DMEM/F12)，細胞懸浮聚集的型態 (B) 添加 30 ppm DMSO，細胞懸浮聚集的型態 (C) 添加 30 ppm ATA，細胞懸浮聚集的型態 (D) 添加 30 ppm ATA，細胞貼附的型態 (E) 添加 100 ppm ATA，細胞懸浮不聚集的型態。a、d、g、j、m 圖為 confocal 顯微鏡可見光照相結果，b、e、h、k、n 為螢光染色結果，c、f、i、l、o 為可見光與螢光染色重疊結果。以 Fluoview 軟體對於細胞螢光染色結果定量，將 integrin β 1 表現強度數值化如上表所示，定量結果顯示 30 ppm ATA 引起 integrin β 1 活化，懸浮細胞 integrin β 1 表現為強度為 162 ± 21 (圖八 h)，部分細胞由懸浮聚集而貼附至培養皿，貼附至培養皿細胞 integrin β 1 表現為 756 ± 7 (圖八 k)，100 ppm ATA 會引起 integrin β 1 更強活化，integrin β 1 表現程度為 1505 ± 27 (圖八 n)，細胞由懸浮聚集變成懸浮不聚集狀態。統計結果顯示 30 ppm ATA 引起貼附細胞 integrin β 1 表現， $P < 0.05$ ，100 ppm ATA 引起 integrin β 1 表現， $P < 0.05$ ，具有顯著差異。

陸. 參考文獻

- Andrew DJ, Hay AW, Evans SW. (1999): Aurintricarboxylic acid inhibits apoptosis and supports proliferation in a haemopoietic growth-factor dependent myeloid cell line. *Immunopharmacology* 41:1-10.
- Benchokroun Y, Couprie J, Larsen AK. (1995): Aurintricarboxylic acid, a putative inhibitor of apoptosis, is a potent inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in Chinese hamster fibrosarcoma cells. *Biochem Pharmacol* 49:305-13.
- Bertheussen K. (1991): US. Patent 5,045,454.
- Cho H, Lee DY, Shrestha S, Shim YS, Kim KC, Kim MK, Lee KH, Won J, Kang JS. (2004): Aurintricarboxylic acid translocates across the plasma membrane, inhibits protein tyrosine phosphatase and prevents apoptosis in PC12 cells. *Mol Cells* 18:46-52.
- Coffer PJ, Burgering BM, Peppelenbosch MP, Bos JL, Kruijer W. (1995): UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene* 11:561-9.
- Cowan KJ, Storey KB. (2003): Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* 206:1107-15.
- Cushman M, Sherman P. (1992): Inhibition of HIV-1 integration protein by aurintricarboxylic acid monomers, monomer analogs, and polymer fractions. *Biochem Biophys Res Commun* 185:85-90.
- de Nadal E AP, Posas F. (2002): Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* 3:735-40.
- Dmitrieva NI, Bulavin DV, Fornace AJ, Burg MB. (2002): Rapid activation of G₂/M checkpoint after hypertonic stress in renal inner medullary epithelial (IME) cells is protective and requires p38 kinase. *PNAS* 99:184-9.
- Dowd JE, Kowk E, Piret JM. (2001): Glucose-based optimization of CHO-cell perfusion cultures. *Biotechnol Bioeng* 75:252-6.
- Efanova IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B, Kohler M, Efendic S, Orrenius S, Berggren PO. (1998): Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 273:33501-7.

- Etienne-Manneville S, Hall A (2002): Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-35.
- Fiore M, Degrassi F. (1999): Dimethyl sulfoxide restores contact inhibition-induced growth arrest and inhibits cell density-dependent apoptosis in hamster cells. *Exp Cell Res* 251:102-10.
- Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, Lavandero S. (2003): Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis: differential effects of sorbitol and mannitol. *J Biol Chem* 278:38484-94.
- Glasspool-Malone J, Steenland PR, McDonald RJ, Sanchez RA, Watts TL, Zabner J, Malone RW. (2002): DNA transfection of macaque and murine respiratory tissue is greatly enhanced by use of a nuclease inhibitor. *J Gene Med* 4:323-32.
- Grodzki AC, Pastor MV, Sousa JF, Oliver C, Jamur MC. (2003): Differential expression of integrin subunits on adherent and nonadherent mast cells. *Braz J Med Biol Res* 36:1101-9.
- Han YS, Bang OS, Jin EJ, Park JH, Sonn JK, Kang SS. (2004): High dose of glucose promotes chondrogenesis via PKC α and MAPK signaling pathways in chick mesenchymal cells. *Cell Tissue Res* 318:571-8.
- Hannigan GE, Leueng-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S. (1996): Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379:91-6.
- He R, Adonov A, Traykova-Adonova M, Cao J, Cutts T, Grudesky E, Deschambaul Y, Berry J, Drebot M, Li X. (2004): Potent and selective inhibition of SARS coronavirus replication by aurantricarboxylic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 320:1199-203.
- Hulleman E, Bijvelt JJ, Verkleij AJ, Verrips CT, Boonstra J. (1999): Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase p42MAPK during the ongoing cell cycle. *J Cell Physiol* 180:325-33.
- Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, Ishii H, Jiang ZY, Yamauchi T, Kuboki K, Meier M, Rhodes CJ, King GL. (1999): Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. *J Clin Invest* 103:185-95.

- Johnson GL, Lapadat R. (2002): Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-2.
- Khyrul WA, LaLonde DP, Brown MC, Levinson H, Turner CE. (2004): The integrin-linked kinase regulates cell morphology and motility in a rho-associated kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 279:54131-9.
- Koch AW, Manzur KL, Shan W. (2004): Structure-based models of cadherin-mediated cell adhesion: the evolution continues. *Cell Mol Life Sci* 61:1884-95.
- Kreis T, Vale R. (1999): Extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. 198-9.
- Kultz D, Madhany S, Burg MB. (1998a): Hyperosmolality causes growth arrest of murine kidney cells. *J Biol Chem* 273:13645-51.
- Kultz D, Burg M. (1998b): Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades. *J Exp Biol* 201:3015-21.
- Lee MS, Kim KW, Kim YH, Lee GM. (2003): Proteome analysis of antibody-expressing CHO cells in response to hyperosmotic pressure. *Biotechnol Prog* 19:1734-41.
- Li H, Wicks WD. (2001): Retinoblastoma protein interacts with ATF2 and JNK/p38 in stimulating the transforming growth factor-beta2 promoter. *Arch Biochem Biophys* 394:1-12.
- Liu CC, Chu IM, Hwang SM. (2001a): Aurintricarboxylic acid exerts insulin-like growth stimulating effects on Chinese hamster ovary cells under serum-free conditions. *J Biosci Bioeng* 91:576-80.
- Liu CC, Hwang SM. (2001b): Reference recombinant Chinese hamster ovary cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 37:633-4.
- Mao X, Bravo IG, Cheng H, Alonso A. (2004): Multiple independent kinase cascades are targeted by hyperosmotic stress but only one activates stress kinase p38. *Exp Cell Res* 292:304-11.
- Nagata Y, Todokoro K. (1999): Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis. *Blood* 94:853-63.

- Ouwens DM, Gomes de Mesquita DS, Dekker J, Maassen JA. (2001): Hyperosmotic stress activates the insulin receptor in CHO cells. *Biochim Biophys Acta* 1540:97-106.
- Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard J, Meloche S, Pouyssegur J. (1993): Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *PNAS* 90:8319-23.
- Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honig B, Shapiro L. (2003): Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* 13:690-8.
- Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A. (1958): Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal. *J Exp Med* 108:945-56.
- Radeva G, Petrocelli T, Behrend E, Leung-Hagesteijn C, Filmus J, Slingerland J, Dedhar S. (1997): Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression. *J Biol Chem* 272:13937-44.
- Rosenberger G, Gal A, Kutsche K. (2004): alpha PIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading. *Biol Chem* 280:6879-89.
- Roux PP, Blenis J. (2004): ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320-44.
- Ryu JS, Lee MS, Lee GM. (2001): Effects of cloned gene dosage on the response of recombinant CHO cells to hyperosmotic pressure in regard to cell growth and antibody production. *Biotechnol Prog* 17:993-9.
- Schlippe M, Marshall JF, Perry P, Stone M, Zhu AJ, Hart IR. (2000): Functional interaction between E-cadherin and alpha5-containing integrins in carcinoma cells. *J Cell Sci* 113:425-37.
- Shaw A, Xu Q. (2003): Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update. *Curr Vasc Pharmacol* 1:45-58.
- Srivastava AK. (2002): High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (review). *Int J Mol Med* 9:85-9.

- Szaszi K, Buday L, Kapus A. (1997): Shrinkage-induced protein tyrosine phosphorylation in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 272:16670-8.
- Takagi M, Moriyama T, Yoshida T. (2001): Effects of shifts up and down in osmotic pressure on production of tissue plasminogen activator by Chinese hamster ovary cells in suspension. *J Biosci Bioeng* 91:509-14.
- Takahashi S, Saito S, Ohtani N, Sakai T. (2001): Involvement of the Oct-1 regulatory element of the gadd45 promoter in the p53-independent response to ultraviolet irradiation. *Cancer Res* 61:1187-95.
- Tao GZ, Rott LS, Lowe AW, Omary MB. (2002): Hyposmotic stress induces cell growth arrest via proteasome activation and cyclin/cyclin-dependent kinase degradation. *J Biol Chem* 277:19295-303.
- Waissbluth A, Ghigliotti G, Abendschein DR, Eisenberg PR, Schwartz D. (2002): Aurintricarboxylic acid attenuates intimal thickening after balloon injury of the rabbit aorta. *Thromb Haemost* 88:668-72.
- Walsh G. (2003): Biopharmaceutical benchmarks--2003. *Nat Biotechnol* 21:865-70.
- Wheelock MJ, Johnson KR. (2003): Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* 15:509-14.
- Yap AS, Kovacs EM. (2003): Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol* 160:11-6.
- Zayzafoon M, Botolin S, McCabe LR. (2002): P38 and activating transcription factor-2 involvement in osteoblast osmotic response to elevated extracellular glucose. *J Biol Chem* 277:37212-8.
- 俞銘誠 (2001): 探討葡萄糖濃度對中國大倉鼠卵巢細胞增生之研究，國立交通大學碩士論文。
- 陳建龍 (1999): 葡萄糖濃度對中國大倉鼠卵巢細胞生長速率、能量狀態與代謝影響之研究，國立交通大學碩士論文。

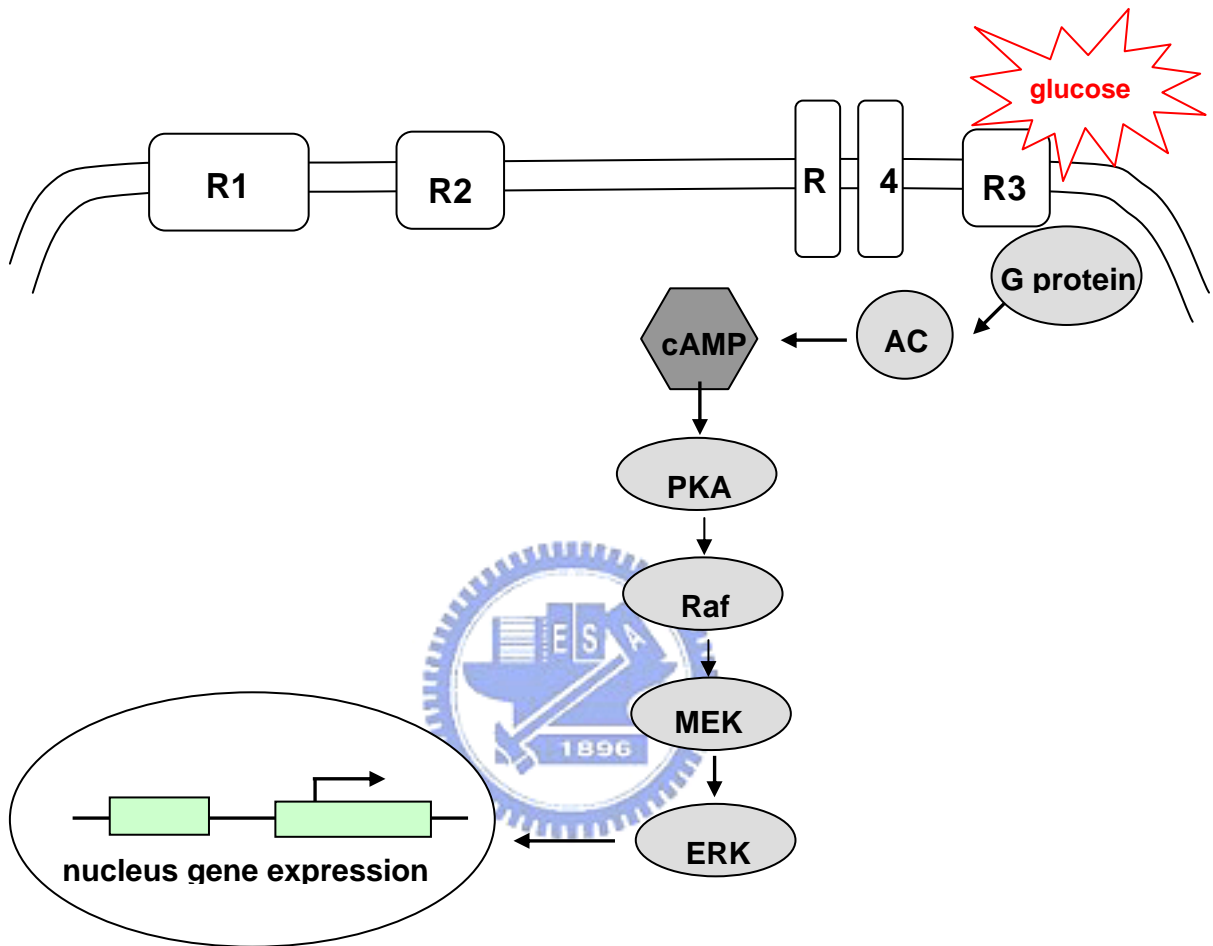
柒. 附表

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$
$\alpha 1$	yes							
$\alpha 2$	yes							
$\alpha 3$	yes							
$\alpha 4$	yes						yes	
$\alpha 5$	yes							
$\alpha 6$	yes			yes				
$\alpha 7$	yes							
$\alpha 8$	yes							
$\alpha 9$								
αD		yes						
αE							yes	
αL		yes						
αM		yes						
αV	yes		yes		yes	yes		yes
αX		yes						
αIIb			yes					

Kreis et al., 1999

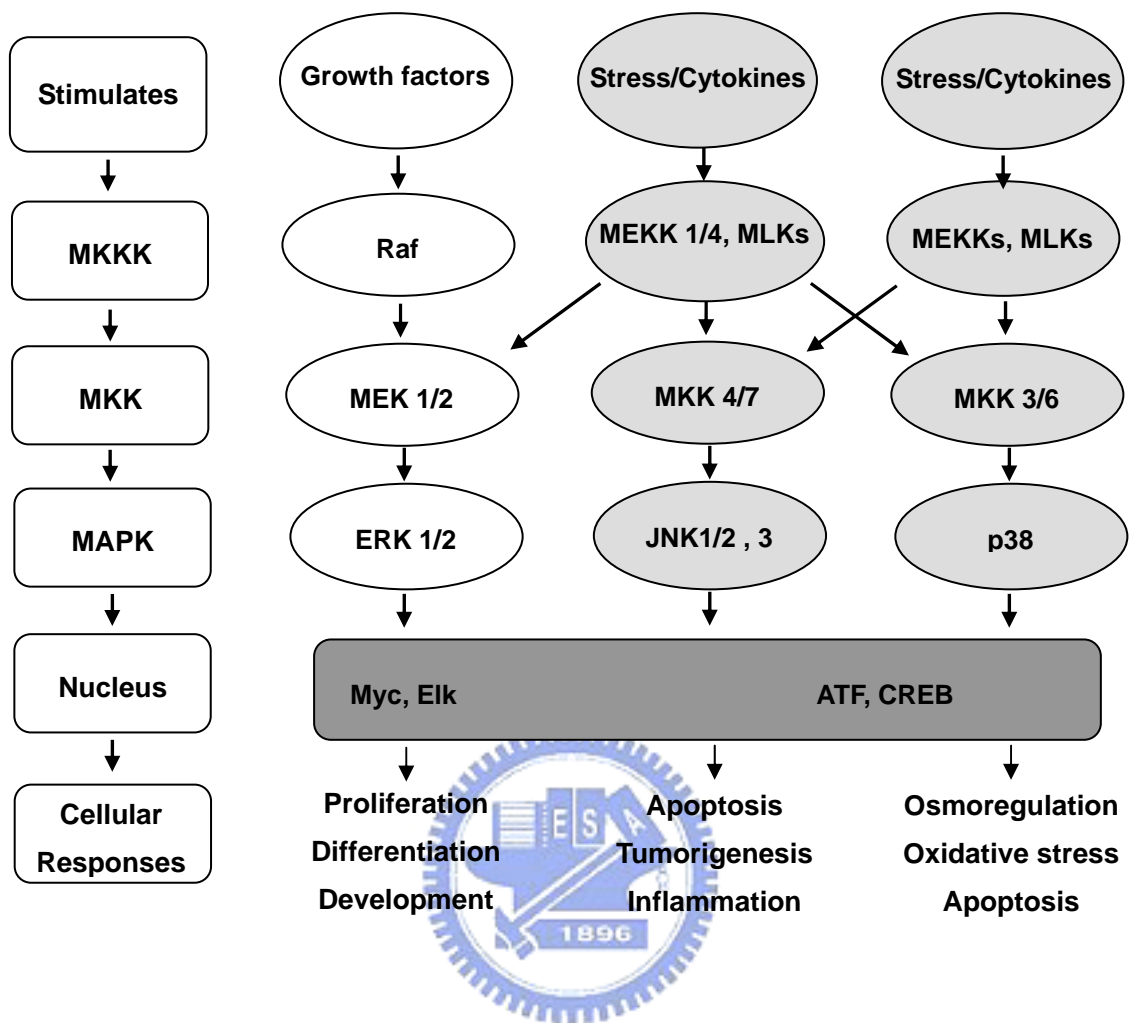
附表一. 已知 *integrin* 之次分子組成

捌. 附圖



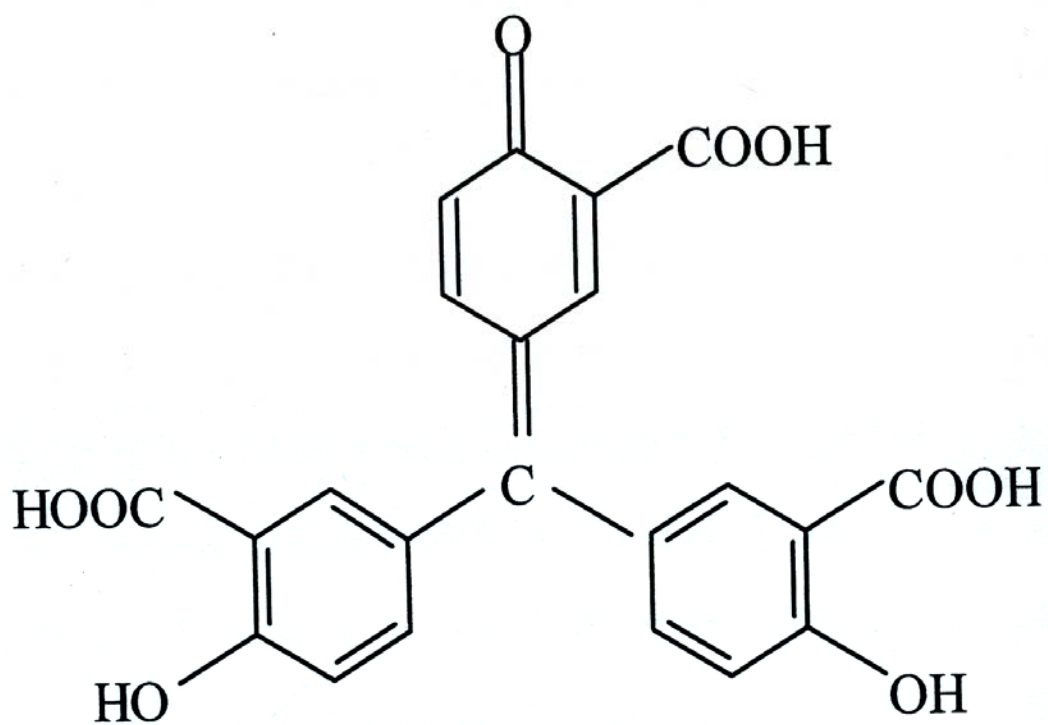
Shaw A et al., 2003

附圖一. 葡萄糖活化 p42 MAPK 之訊息途徑

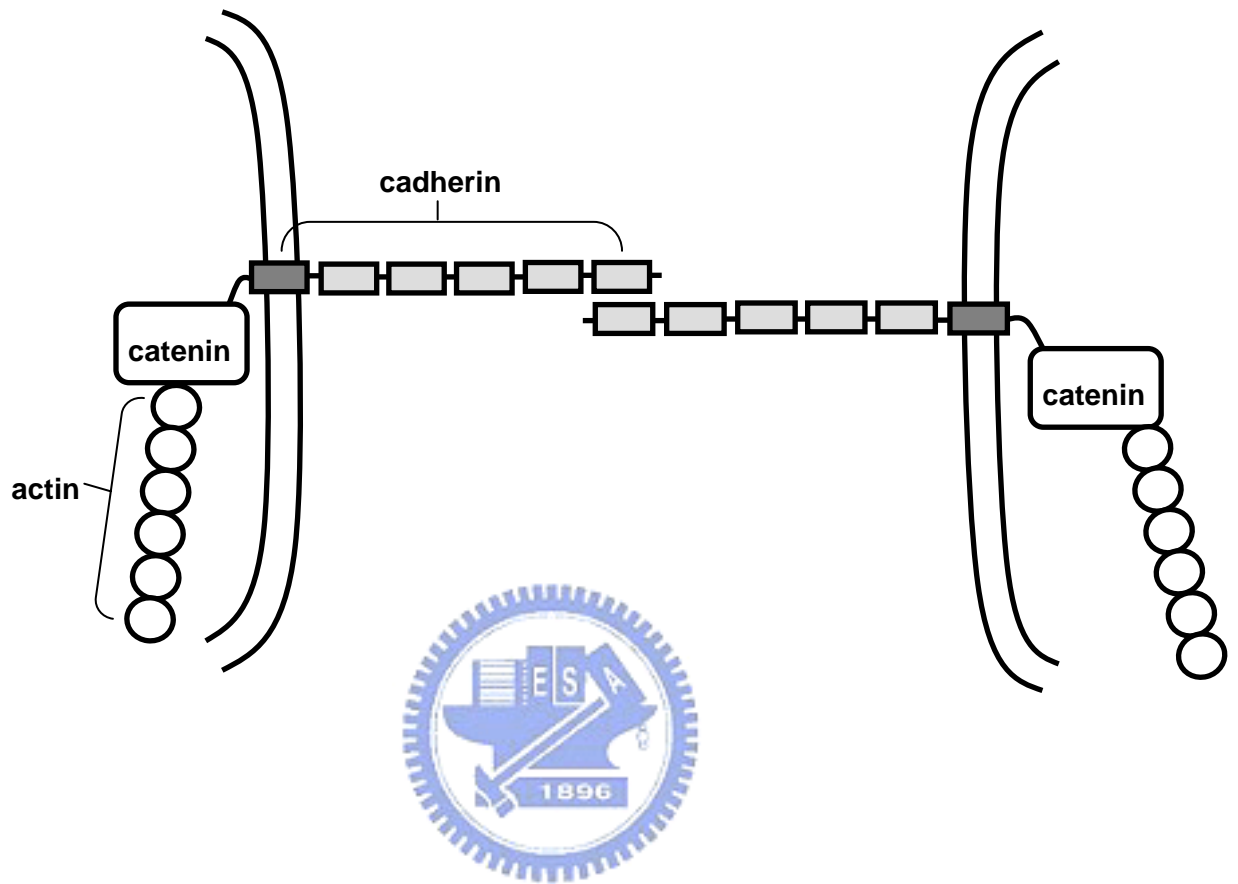


Cowan et al., 2003

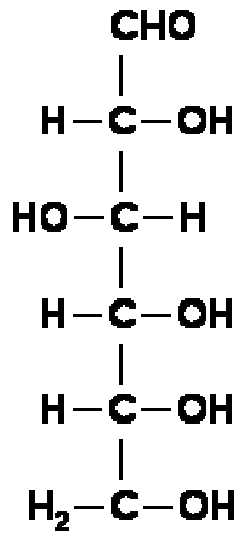
附圖二. 哺乳動物細胞 MAPK 訊息途徑



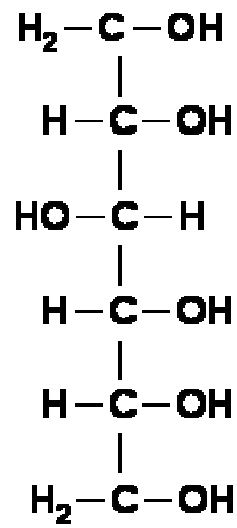
附圖三. Aurintricarboxylic acid 結構



附圖四. Cadherin 結構及其訊息途徑



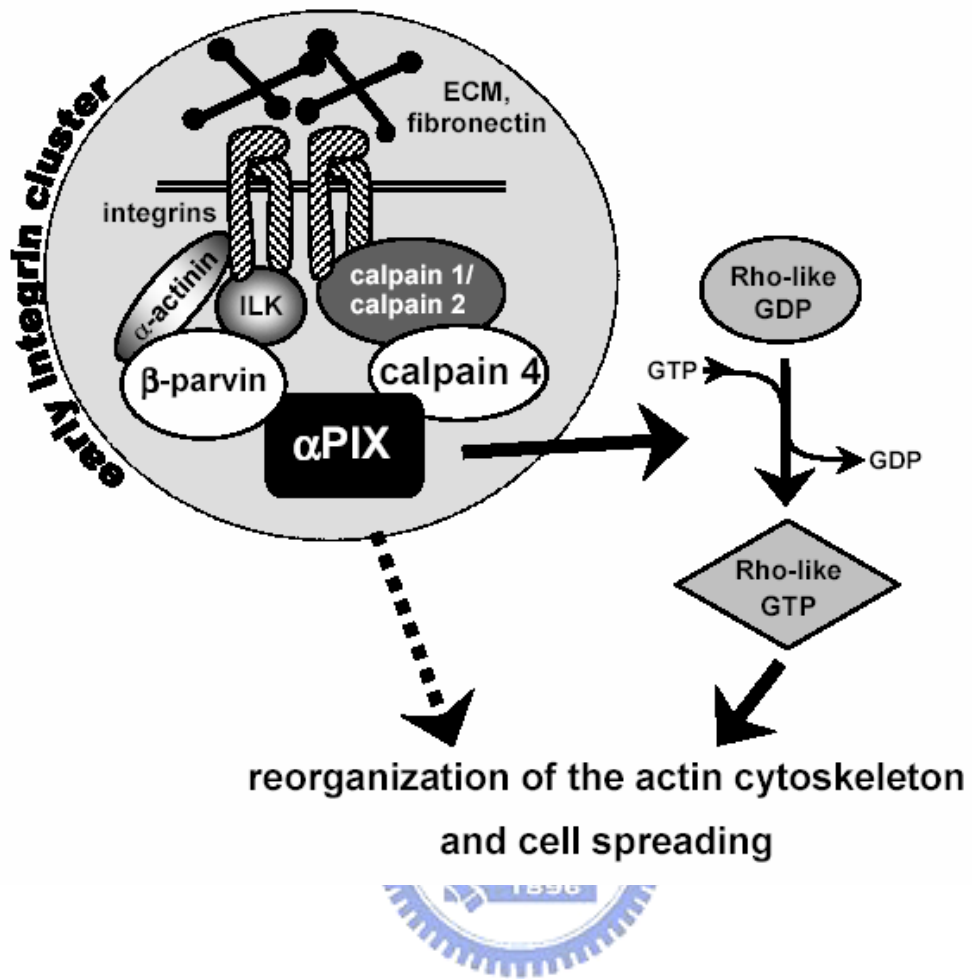
A. Glucose



B. Sorbitol

附圖五. (A)葡萄糖結構式 (B)山梨醇結構式





Rosenberger G et al., 2004

附圖六. Integrin 影響細胞貼附之訊息途徑