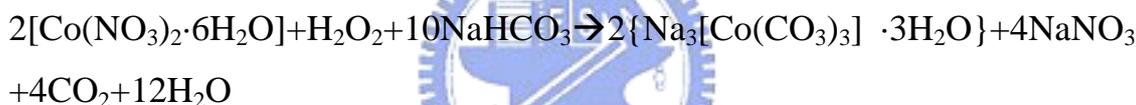


第四章 結果與討論

4.1 三價鈷溶液之備製

在 1969 年時，Aisen 利用 CoCl_2 與 transferrin 進行錯合，先形成 Co^{2+} -transferrin complex¹，再利用 H_2O_2 來氧化在 transferrin 中的 Co^{2+} ，以形成 Co^{3+} -transferrin complex。但因為直接用 H_2O_2 去氧化 Co^{2+} -transferrin 成 Co^{3+} -transferrin，可能會造成 transferrin 的傷害。He 等合成三價鈷溶液來與 transferrin 合成 Co^{3+} -transferrin²¹。故此，我採用 He 等的方法。

第一步要先合成 $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，化學反應如下：



所以先把 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution 和過量的 35% H_2O_2 混和後，緩慢加入泥狀的 NaHCO_3 solution 中，並保持整個實驗在 0°C 下進行 1 小時。顏色會由原本的磚紅色變為橄欖綠色的產物，之後，將其產物過抽氣漏斗，並用冰水沖洗 filtered 三次，然後再用 absolute alcohol 和 dry ether 洗 filtered 三次，最後利用真空幫浦抽乾多餘的水分。熔點為 93°C ，產率為 90%。

第二步再合成 Co^{3+} solution，將 $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶在 1M NaHCO_3 solution 中，並放置室溫下 2 小時，之後再用過抽氣漏斗，取 filtrate，並靜置在室溫下三天，待三天過後，再過濾一次，取 filtrate，並儲存在 4°C 中。

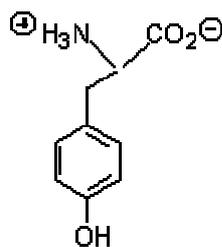
Co^{3+} solution 送清大原科所，測 ICP-mass，定 Co 的量。所測得的濃

度為 0.22mM。

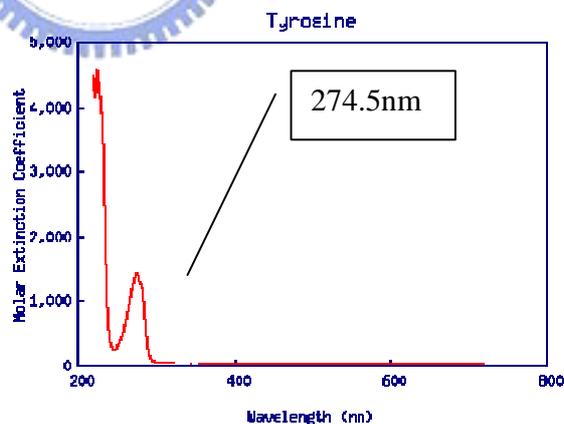
4.2 金屬與運鐵蛋白錯合之研究

不同的金屬對運鐵蛋白會有不同的平衡時間點。一般而言 apo-transferrin 可與兩個金屬離子結合，所以，首先個別將 Cr^{3+} 、 VO^{2+} 和 Co^{3+} 的金屬溶液與溶在 0.01M Tris buffer(含 0.01M NaHCO_3 ; pH=7.4) 中的 apo-transferrin 以三比一的莫耳數比比例混合之，同時並測定該混合物的 pH 值是否維持在 7.4，而所操作的環境溫度為 25°C ，所使用的機器為 UV-visible spectroscopy (HP 8453 型)，實驗方法請參照 3.2。

Apo-transferrin 的 N-lobe 和 C-lobe 是利用 Tyr、Tyr、Asp 和 His 來與金屬離子接合⁶，金屬離子剛進入 N-lobe 或 C-lobe 時，是先跟 Tyr 結合，而 Tyr 的 UV bands 位置是在 274.5nm ¹²。



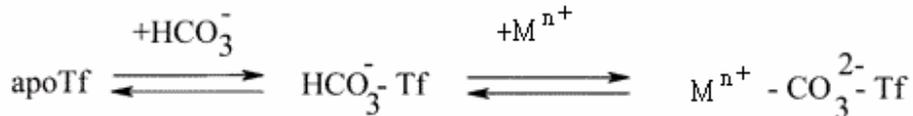
Tyrosine 的結構



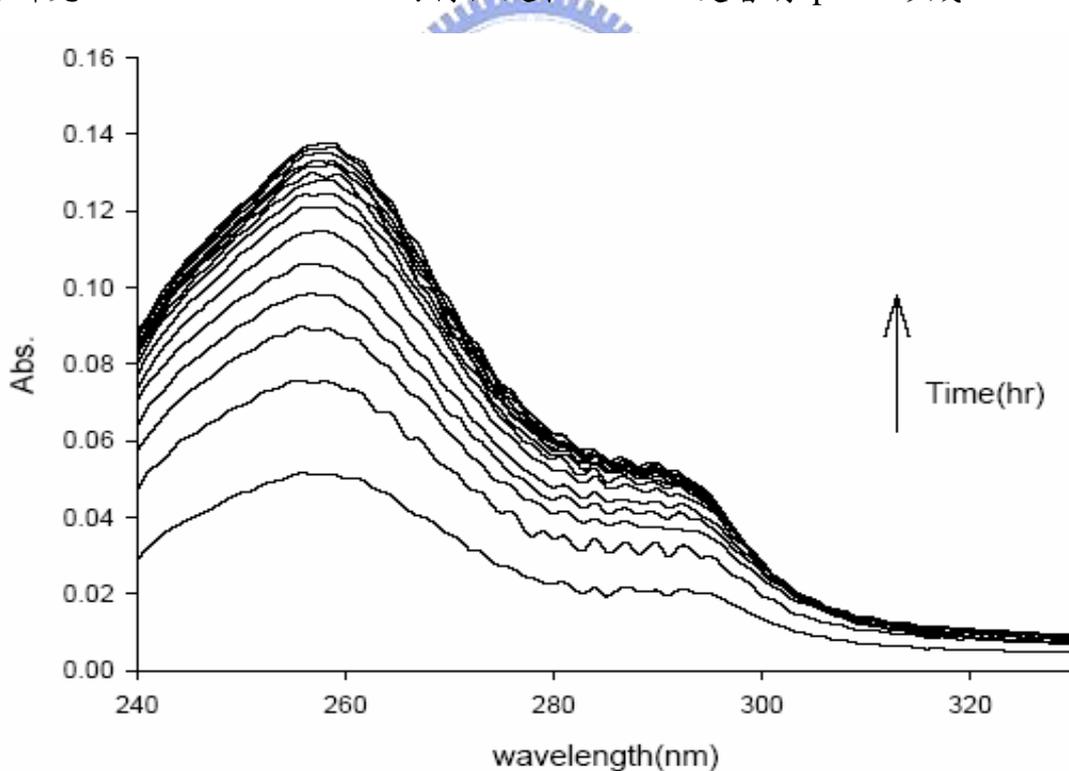
This is a graph of the molar extinction coefficient of tyrosine dissolved in water, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.

所以，若金屬離子進入 Apo-transferrin 的 N-lobe 和 C-lobe 中與 tyrosine 結合後，會使 274.5nm 的 peak 消失，而出現其他的 peak¹⁸。

且根據 Harris 等的研究¹⁹，發現碳酸根的存在會對金屬離子和運鐵蛋白之間的結合能力產生影響，所以，在金屬-運鐵蛋白錯合物形成的過程中，我們有加入適量的碳酸根以幫助金屬與運鐵蛋白之間的錯合。而碳酸根、金屬離子和運鐵蛋白的關係可見下圖^{17, 19}：



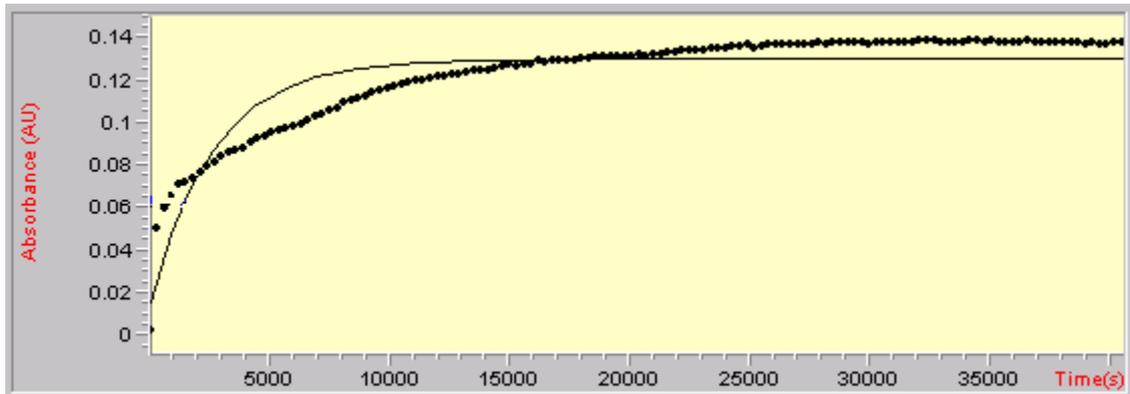
所以在 Cr^{3+} -transferrin 的實驗結果中可以看出，apo-transferrin 會因 Cr^{3+} 溶液的加入而在 260nm 和 295nm 處形成 peak，且根據 Aisen 等學者的研究³， Cr^{3+} -transferrin 的特性是在 293nm 處會有 peak 形成。



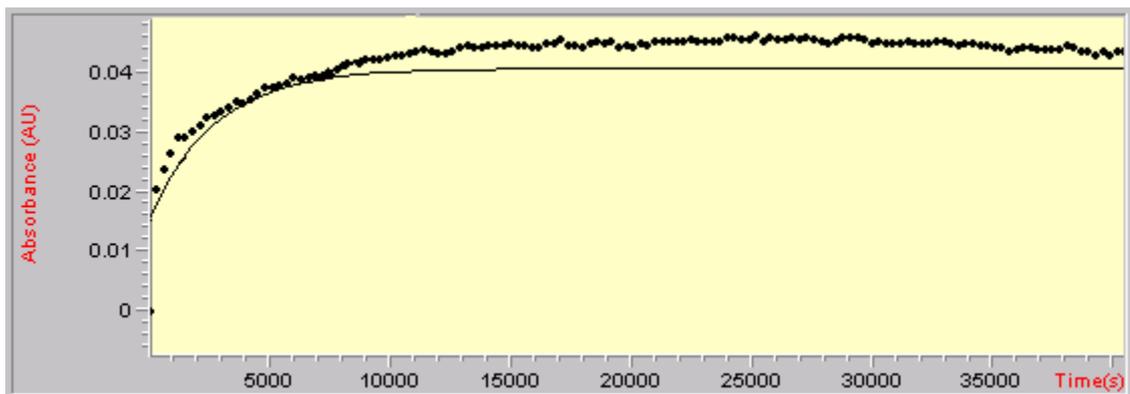
Apo-transferrin 的濃度為 1.25×10^{-5} M，溶在 0.01M Tris buffer(含 0.01M NaHCO_3 ; pH=7.4)中，pH=7.4、 25°C 。 Cr^{3+} solution 與 apo-transferrin 的莫耳數比為 3:1。

所以綜合上述的結果，我們選擇 260nm 和 295nm 測其金屬-運鐵蛋白錯合物平衡的時間

260nm

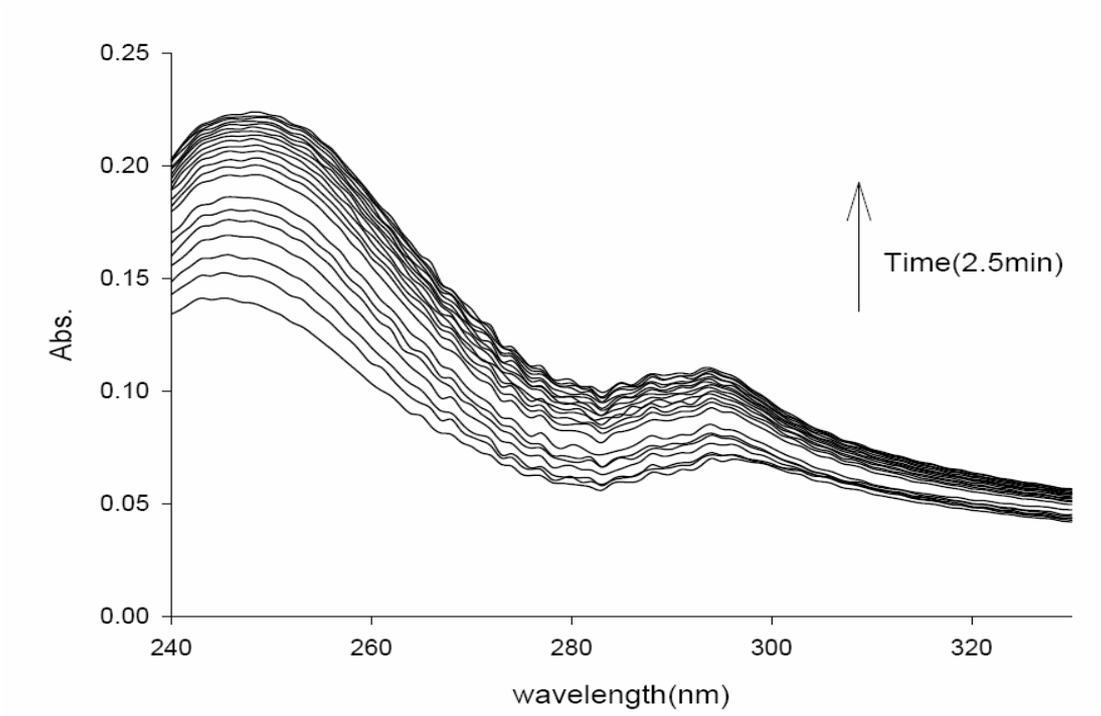


295nm



結果發現在第 4 個小時時吸收光值不再變動，且 260nm 和 295nm 處的 K_{obs} 各別為 $(3.66 \pm 0.11) \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$ 和 $(2.84 \pm 1.12) \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$ 。

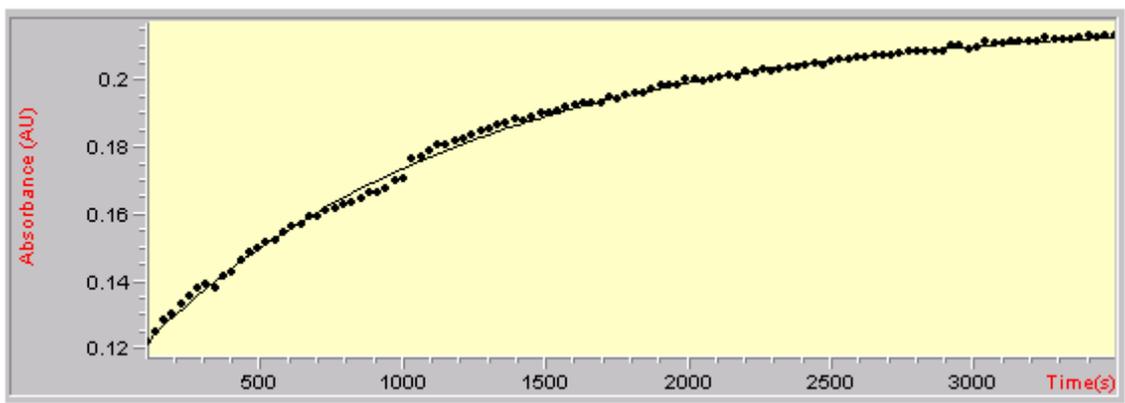
在 VO^{2+} -transferrin 的實驗結果中可以看出，apo-transferrin 會因 VO^{2+} 的加入而在 255nm 和 295nm 處形成 peak，且根據 Harris 等學者的研究²⁰， VO^{2+} -transferrin 的特性是在 255nm 和 295nm 處會有 peak 形成。



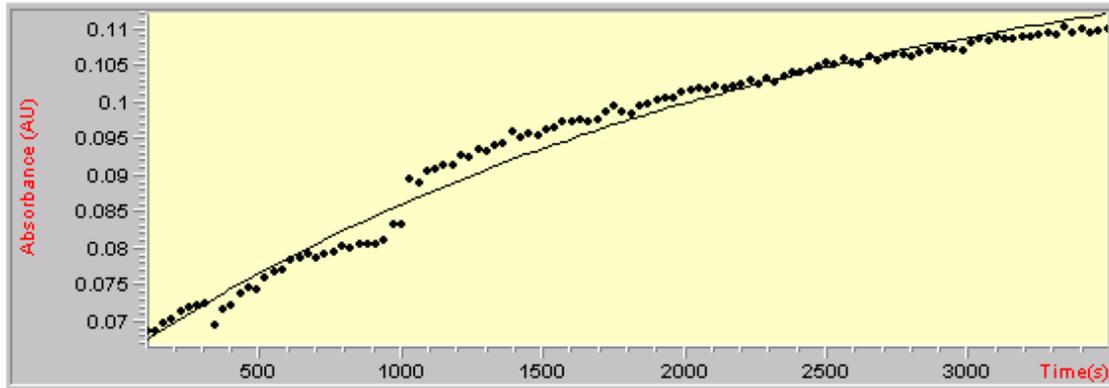
Apo-transferrin 的濃度為 1.25×10^{-5} M，溶在 0.01M Tris buffer(含 0.01M NaHCO_3 ; pH=7.4)中，pH=7.4、 25°C 。 VO^{2+} solution 與 apo-transferrin 的莫耳數比為 3:1。

所以綜合上述的結果，我們選擇 255nm 和 295nm 測其金屬-運鐵蛋白錯合物平衡的時間。

255nm

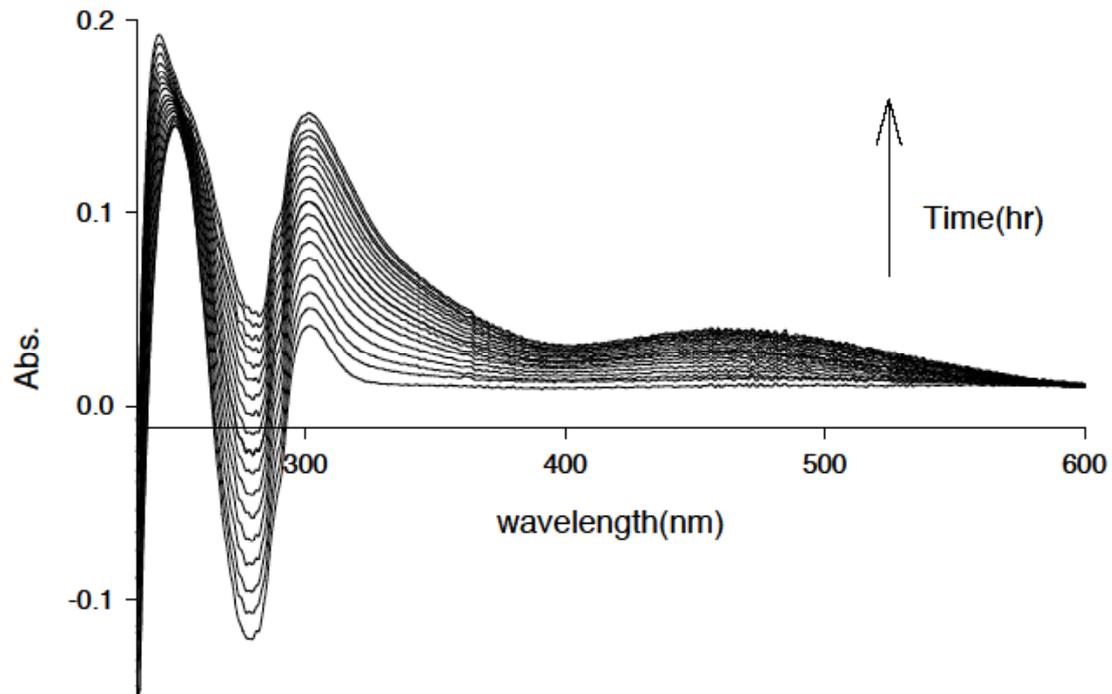


295nm



結果發現在第 50 分鐘時吸收光值不再變動，且 255nm 和 295nm 處的 K_{obs} 各別為 $(1.38 \pm 0.37) \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ 和 $(1.31 \pm 0.06) \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ 。

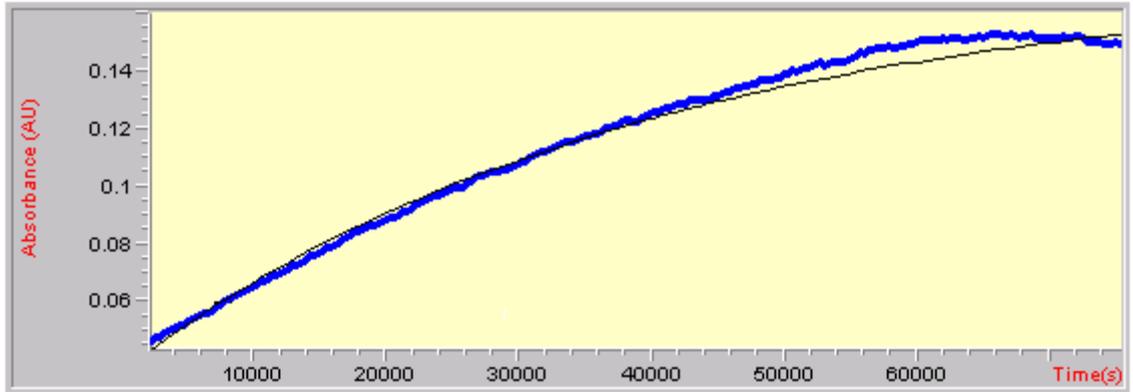
在 Co^{3+} -transferrin 的實驗結果中可以看出，apo-transferrin 會因 Co^{3+} 的加入而在 255nm、300nm 和 450nm 處形成 peak，且根據 Aisen 等學者的研究³， Co^{3+} -transferrin 的特性是在 300nm 和 405nm 處會有 peak 形成。另外根據 He 等學者的研究²¹， Co^{3+} -transferrin 的特性是在 415nm 處會有 peak 形成。



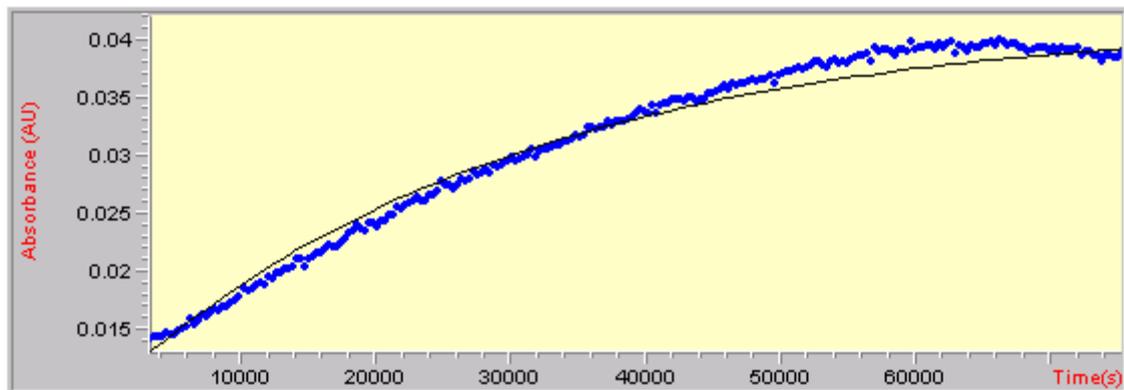
Apo-transferrin 的濃度為 1.25×10^{-5} M，溶在 0.01M Tris buffer(含 0.01M NaHCO_3 ; pH=7.4)中，pH=7.4、 25°C 。 Co^{3+} solution 與 apo-transferrin 的莫耳數比為 3:1。

所以綜合上述的結果，我們選擇 300nm 和 450nm 測其金屬-運鐵蛋白錯合物平衡時間。

300nm



450nm



結果發現在第 17 個小時時吸收光值不再變動，且 300nm 和 450nm 處的 K_{obs} 各別為 $(6.25 \pm 0.20) \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$ 和 $(5.61 \pm 0.47) \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$ 。

4.3 金屬離子在金屬-運鐵蛋白錯合物中含量之研究

將 Cr^{3+} 、 VO^{2+} 金屬溶液和三價鈷溶液以三比一的莫耳數比比例與 apo-transferrin(溶在 0.01M Tris buffer、0.01M NaHCO_3 ; PH=7.4)混合之，並同時測定該混合物的 pH 值是否維持在 7.4，而所操作的環境溫度為 25°C ，所使用的機器為 UV-visible spectroscopy (HP 8453 型)，實驗方法請參照 3.2。

待各個金屬-運鐵蛋白錯合物達到其平衡時間之後，藉由 Hi-trapTM column 將金屬-運鐵蛋白錯合物溶液中未與運鐵蛋白接合的金屬離子去除，實驗方法請參照 3.4。最後將所收集到的金屬-運鐵蛋白錯合物溶液，分別測定蛋白濃度和金屬濃度，以算其金屬離子在金屬-運鐵蛋白錯合物中之含量。結果發現， Cr^{3+} 、 VO^{2+} 和 Co^{3+} 分別與 Cr^{3+} -transferrin、 VO^{2+} -transferrin 和 Co^{3+} -transferrin 的莫耳數比為 1.7 ± 0.04 、 1.78 ± 0.02 和 2.0 ± 0.02 。

4.4 C₂C₁₂ cell 培養與分化

本實驗室所培養的 C₂C₁₂ 在一開始的型態，是 myoblast，在正常的生理狀態中，肌肉是由 myoblast 分化形成 myotube，再由 myotube 聚集而成。所以，myotube 是最接近人體肌肉型態的細胞組織。故在我所有的實驗流程所用的細胞形式均是 myotube，以求接近正常生理之狀態。

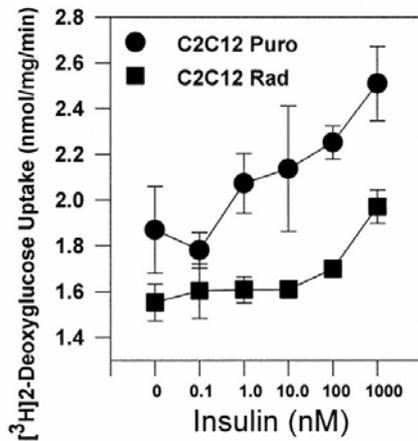
所以，C₂C₁₂ cell 的分化狀態在本實驗中是一關鍵因素，因為，myoblast 與 myotube 對 insulin 的反應並不一樣²³。而 myoblast 與 myotube 基本上可以由外觀來分辨之(圖 1)，myoblast 是呈不規則形，且在一個細胞內只可以看到一個核，而 myotube 是由 myoblast 融合而成，呈管狀。

除了外觀上的辨識，也可以利用 giemsa 染色的方法來看。由於 giemsa 是用來染細胞核和細胞質的染劑，所以，在染色之後我們可以明顯的看出細胞核(深紫色)與細胞質(淺紫色)(圖 1)。



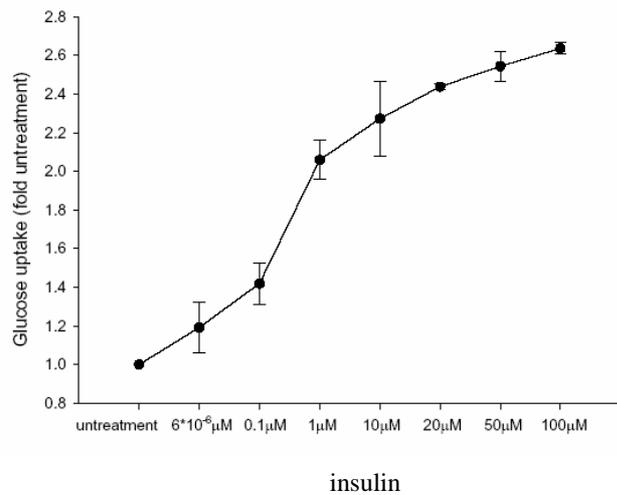
4.5 金屬離子對肌肉細胞吸收葡萄糖之研究

在前人的研究中，發現金屬離子會對肌肉細胞或是脂肪細胞吸收葡萄糖的能力有所影響^{32, 38}。在進行實驗之前，為了要確定 C₂C₁₂ 是為可用的實驗平台，所以，要確定 C₂C₁₂ 對胰島素是否有 dose-dependent 的現象。由下圖可以看出 C₂C₁₂ 對胰島素有 dose-dependent 的現象。且對照 Moyers 等的文獻²⁷ 可以發現類似的結果



Control cells (●C2C12 Puro) and Rad overexpressors (C2C12 Rad)

(Moyers JS et al.,1996)fig2(b)



本論文之實驗結果

所以，C₂C₁₂是可以作為測定 glucose uptake 的實驗平台。

一開始就先個別來看 Cr³⁺、VO²⁺和 Co³⁺對肌肉細胞的影響，方法請參照 3.8 和 3.10。

在實驗前，要先將 C₂C₁₂ myoblast 細胞分化為 myotube，並於實驗前 16 小時，將細胞培養液換為無血清的培養液。並利用不同的金屬溶液來刺激細胞對葡萄糖吸收的反應。由圖 2 可以得知，當細胞給予 Cr³⁺ 的刺激之後，相對於 no treatment 而言，均可以提高細胞對葡萄糖的吸收能力。而其中以 10μM 和 100μM 的 Cr³⁺ solution 對提高細胞吸收葡萄糖的能力最好，相較於 no treatment 而言，分別可以增加細胞吸收葡萄糖 2.21 和 2.41 倍。

當細胞給予 VO²⁺ 的刺激之後(圖 3)，相對於 no treatment 而言，均可以提高細胞對葡萄糖的吸收能力。而其中以 10μM 和 100μM 的 VO²⁺ solution 對提高細胞吸收葡萄糖的能力最好，相較於 no treatment 而言，分別可以增加細胞吸收葡萄糖 2.61 和 2.38 倍。

當細胞給予三價鈷溶液的刺激之後(圖 4)，相對於 no treatment 而

言，均可以提高細胞對葡萄糖的吸收能力。而其中以 100 μ M 的三價鈷溶液對提高細胞吸收葡萄糖的能力最好，相較於 no treatment 而言，分別可以增加細胞吸收葡萄糖 3.14 倍。但發現在給予 Co^{3+} solution 刺激 30 分鐘之後，細胞的形態上發生了變化，而且變的很容易漂浮起來。所以，100 μ M 三價鈷溶液雖然對細胞吸收葡萄糖的刺激能力是最好的，但卻會造成細胞某種程度上的傷害。

若加以比較三個金屬離子對 C_2C_{12} 吸收收葡萄糖能力的影響的話(圖 5)，可以發現，以 100 μ M 三價鈷溶液的效果是最好的，甚至三價鈷溶液在 0.1 μ M 時的就可以達到 100 μ M Cr^{3+} solution 和 100 μ M VO^{2+} solution 所能能達到的效果。所以，整體而言，三價鈷溶液對增加 C_2C_{12} 細胞的吸收葡萄糖的能力是最好的，但高濃度的三價鈷溶液會對細胞造成傷害。

在一些文獻中提到，一些降血糖的物質，若和 insulin 一起作用的話可以增強細胞吸收葡萄糖的作用³¹，所以，在此分別探究 Cr^{3+} 、 VO^{2+} 和三價鈷溶液與 insulin 一起刺激下，對 C_2C_{12} 吸收葡萄糖的影響。

以 Cr^{3+} solution 來看的話(圖 6)，發現在 0.1 μ M Cr^{3+} 的濃度下，以 1 μ M insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 4.84 倍。在 1 μ M Cr^{3+} 的濃度下，以 1 μ M insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 3.71 倍。在 10 μ M Cr^{3+} 的濃度下，以 6pM insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 2.36 倍。在 100 μ M Cr^{3+} 的濃度下，以 1 μ M insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 3.74 倍。

以 VO^{2+} solution 來看的話(圖 7)，發現在 0.1 μ M VO^{2+} 的濃度下，以

0.1 μ M insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 2.75 倍。在 1 μ M VO²⁺ 的濃度下，以 10 μ M insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 2.7 倍。在 10 μ M VO²⁺ 的濃度下，以 10 μ M insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 6.21 倍。在 100 μ M VO²⁺ 的濃度下，以 1 μ M insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 3.14 倍。

以三價鈷溶液來看的話(圖 8)，發現在 0.1 μ M 三價鈷溶液的濃度下，以 1 μ M insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 7.73 倍。在 1 μ M 三價鈷溶液的濃度下，以 10 μ M insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 4.37 倍。在 10 μ M 三價鈷溶液的濃度下，以 0.1 μ M insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 3.95 倍。在 100 μ M 三價鈷溶液的濃度下，以 6pM insulin 共同處理效果最好，相對於 no treatment 而言可增加 8.5 倍。可是在此濃度下的三價鈷溶液會使細胞型態改變，造成細胞易飄起，造成細胞的傷害。與圖 2、3 和 4 做比較的話，發現若有 insulin 的存在下確實可以增加 C₂C₁₂ 吸收葡萄糖的能力，但要搭配不同濃度的 Cr³⁺、VO²⁺ 和三價鈷溶液和 insulin 一起刺激。

若加以比較三個金屬離子與 insulin 一起對 C₂C₁₂ 吸收收葡萄糖能力的影響的話，可以發現以 100 μ M 三價鈷溶液的效果是最好的，但還是會對細胞的形態與貼附能力產生影響。

4.6 金屬-運鐵蛋白對肌肉細胞吸收葡萄糖之研究

由 4.5 的結果可知， $100\mu\text{M Co}^{3+}$ solution 對增加 C_2C_{12} 吸收收葡萄糖能力有最好的效果，但是卻會造成細胞細胞的形態的改變與傷害。所以，若以 transferrin 夾帶金屬離子的方式，是否會改善此現象。

用 metal-transferrin 來刺激 C_2C_{12} (圖 9)，發現相對於 no treatment 而言 $80\mu\text{g/ml Cr-transferrin}$ 可增加 C_2C_{12} 吸收收葡萄糖能力 4.03 倍。 $40\mu\text{g/ml VO-transferrin}$ 可增加 C_2C_{12} 吸收收葡萄糖能力 4.34 倍。 $100\mu\text{g/ml Co-transferrin}$ 可增加 C_2C_{12} 吸收收葡萄糖能力 4.97 倍。再比較圖 2、3 和 4，發現 metal 若以 transferrin 做生物性攜帶的話，效果均較單純的金屬離子來的好。而且，以 Co-transferrin 的效果最好，且以 Co-transferrin 的形式來刺激細胞的話，可以避免細胞發生形態的改變與傷害的現象。

而以 metal-transferrin 與 insulin 一起刺激 C_2C_{12} (圖 10)，發現相對於 no treatment 而言 $40\mu\text{g/ml Cr-transferrin}$ 與 $10\mu\text{M insulin}$ 一起作用下可增加 C_2C_{12} 吸收收葡萄糖能力 4.94 倍。 $40\mu\text{g/ml VO-transferrin}$ 與 $10\mu\text{M insulin}$ 一起作用下可增加 C_2C_{12} 吸收收葡萄糖能力 6.07 倍。 $40\mu\text{g/ml Co-transferrin}$ 與 $10\mu\text{M insulin}$ 一起作用下可增加 C_2C_{12} 吸收收葡萄糖能力 7.01 倍。再比較圖 6、7 和 8，以 Cr-transferrin 而言，增加 C_2C_{12} 吸收收葡萄糖能力較單純的金屬離子可以達到的效果是相似的($40\mu\text{g/ml Cr-transferrin}$ 與 $10\mu\text{M insulin}$:4.94 倍; $0.1\mu\text{M Cr}+1\mu\text{M insulin}$:4.84 倍)。以 VO-transferrin 而言，在與 insulin 一起刺激下跟單純的金屬離子與 insulin 一起刺激下，可以達到的效果是相似的($40\mu\text{g/ml VO-transferrin}$ 與 $10\mu\text{M insulin}$:6.21 倍; $10\mu\text{M Cr}+10\mu\text{M insulin}$:6.07 倍)。以 Co-transferrin 而言，較單純的金屬離子來的差一些($40\mu\text{g/ml}$

Co-transferrin 與 $10\mu\text{M}$ insulin:7.01 倍; $100\mu\text{M}$ Cr+ 6pM insulin:8.5 倍)。

