

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

腐植酸造成血栓/血液凝固或動脈硬化及機制之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-039-015-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥大學營養學系

計畫主持人：楊新玲

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

步驟：

一、HA 誘導 LDL 聚集作用的分析

(1) 改變 HA 濃度

先將分光光度計開機且將溫度控制在 37 ，石英管內加入 140 mM NaCl 之 PBS 及不同濃度的 HA 混合後加入 200 μ g/ml protein LDL(此時總體積為 1ml) ，蓋上蓋子及封 parafilm 測 OD_{680nm} ，每隔 5min 測一次 。

(2) 改變 PBS 之 NaCl 濃度

先將分光光度計開機且將溫度控制在 37 ，石英管內加入不同濃度的 NaCl 之 PBS 及不同濃度的 HA 混合後加入 200 μ g/ml protein LDL(此時總體積為 1ml) ，蓋上蓋子及封 parafilm 測 OD_{680nm} ，每隔 5min 測一次。

(3) 添加砷

先將分光光度計開機且將溫度控制在 37 ，石英管內加入 140 mM NaCl 之 PBS 及 20 μ g/ml HA 和不同濃度砷混和液後加入 200 μ g/ml protein LDL (此時總體積為 1ml) ，蓋上蓋子及封 parafilm 測 OD_{680nm} ，每隔 5min 測一次 。

二、負染法觀察 AgLDL 的分子大小

140 mM NaCl 之 PBS 分別加入 10、20 μ g/ml HA 及 200 μ g/ml protein LDL 混合後，分別在 37 反應 10min 及 40min ，反應結束後取 7.5 μ l sample 滴在 formvar 的銅網上，5 min 後，用濾紙將過多的 sample 吸走，再加入 10 μ l 的染劑 (10 % phosphotungstic acid)，分別在 30 及 60 秒時用濾紙將染劑吸乾，放入乾燥箱 60 分鐘後，在穿透式電子顯微鏡下觀察。

結果：

一、HA 誘導 LDL 聚集作用的分析

HA 會誘導 LDL 聚集作用 (aggregation) ，利用波長 680nm 偵測 AgLDL 的程度，其吸光值越高則表示 aggregation 程度越嚴重。由圖 1 及 2 可以知道隨著 HA 的濃度增加 LDL aggregation 的程度也逐漸增加，在反應大約 30 分鐘時已達到飽和，其最高值可達到 1.4 (20 ug/ml HA)。改變 PBS 之 NaCl 濃度，對 LDL aggregation 程度的影響，NaCl 在水溶液中會解離為 Na^+ 、 Cl^- ， Na^+ 會和 HA 之 COO^- 結合，由圖 3 及 4 可以知道隨著 NaCl 濃度增加其吸光值逐漸下降。添加 As^{5+} 也是有同樣的結果，由圖 5 及 6 可知隨著 As^{5+} 的濃度增加其吸光值逐漸下降，其下降的最低值與未經 HA 處理的 LDL 相似。

二、負染法觀察聚集 LDL (AgLDL) 的分子大小

利用負染法觀察 AgLDL 的分子大小，選擇其中 200 個 LDL 分子測量他的直徑。n-LDL 平均直徑大約為 22.4nm，經 HA 處理的 LDL 直徑隨著反應時間的增加而增加，反應 10 分鐘及 40 分鐘的 AgLDL 分子平均直徑分別為 22.66nm 25.27nm，其中反應 40 分鐘的 AgLDL 分子最大為 100nm。由圖 7 可知隨著作用時間增加 LDL 分子直徑在 20~29nm 的數量逐漸減少，而大於 30 nm 的分子數量逐漸增加增加。

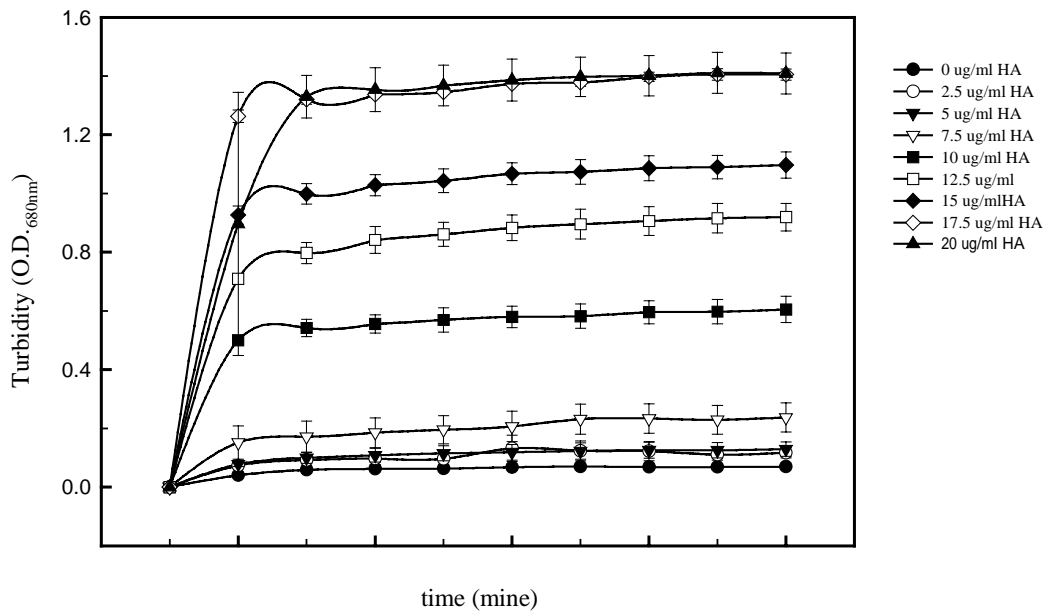


Fig.1.The aggregation of LDL (200 ug/ml) induced by HA as a function of time monitored by the turbidity measurement at 680 nm at 37 °C.

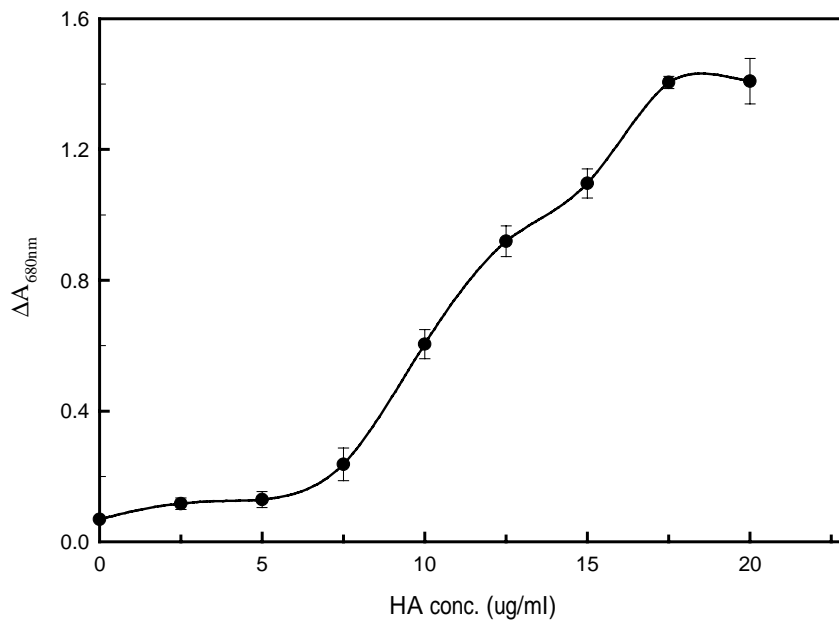


Fig.2.Graph showing the dependence of turbidity change (ΔA_{680nm}) as a function of concentration of HA. The concentration of LDL was 200 ug/ml.

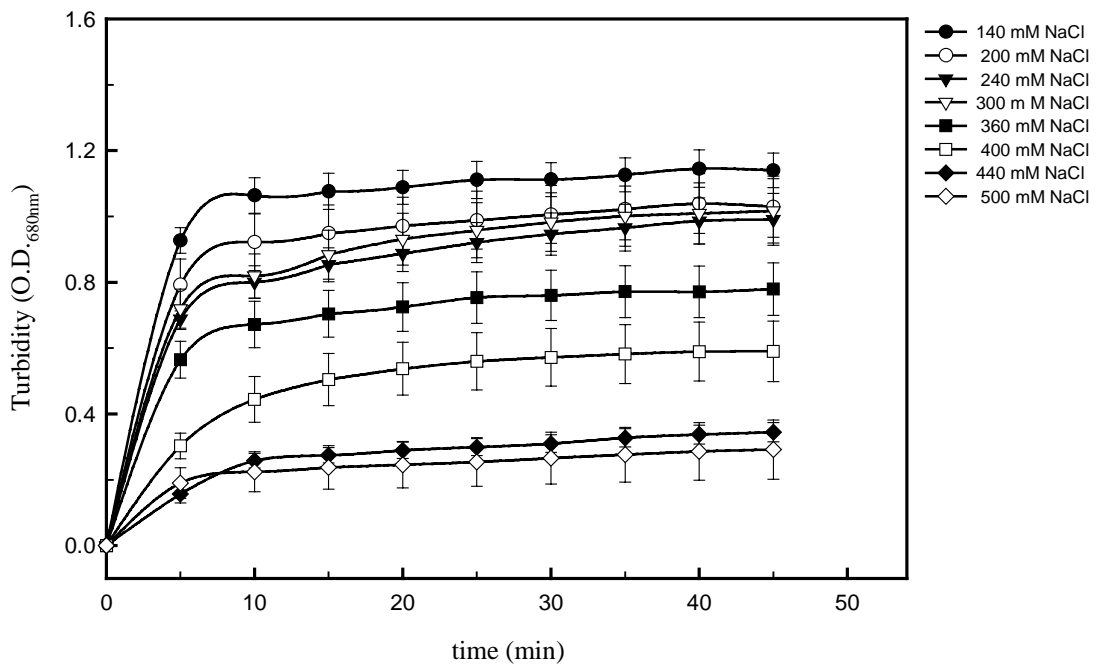


Fig.3.The aggregation of LDL (200 ug/ml) induced by HA (20 ug/ml) as a function of time at different concentrations of NaCl monitored by the turbidity measurement at 680 nm at 37 .

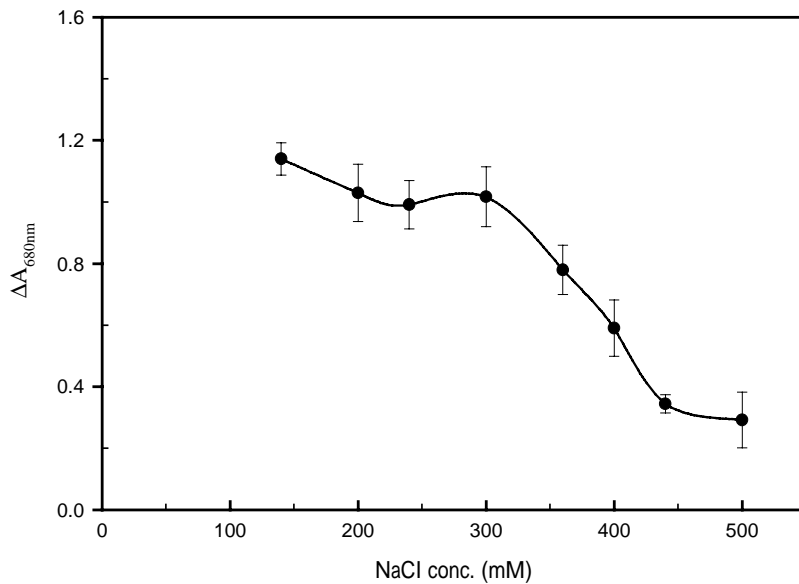


Fig.4.Graph showing the dependence of turbidity change (O.D. 680 nm) as a function of concentration of NaCl . The concentration of LDL and HA was 200 ug/ml and 20 ug/ml.

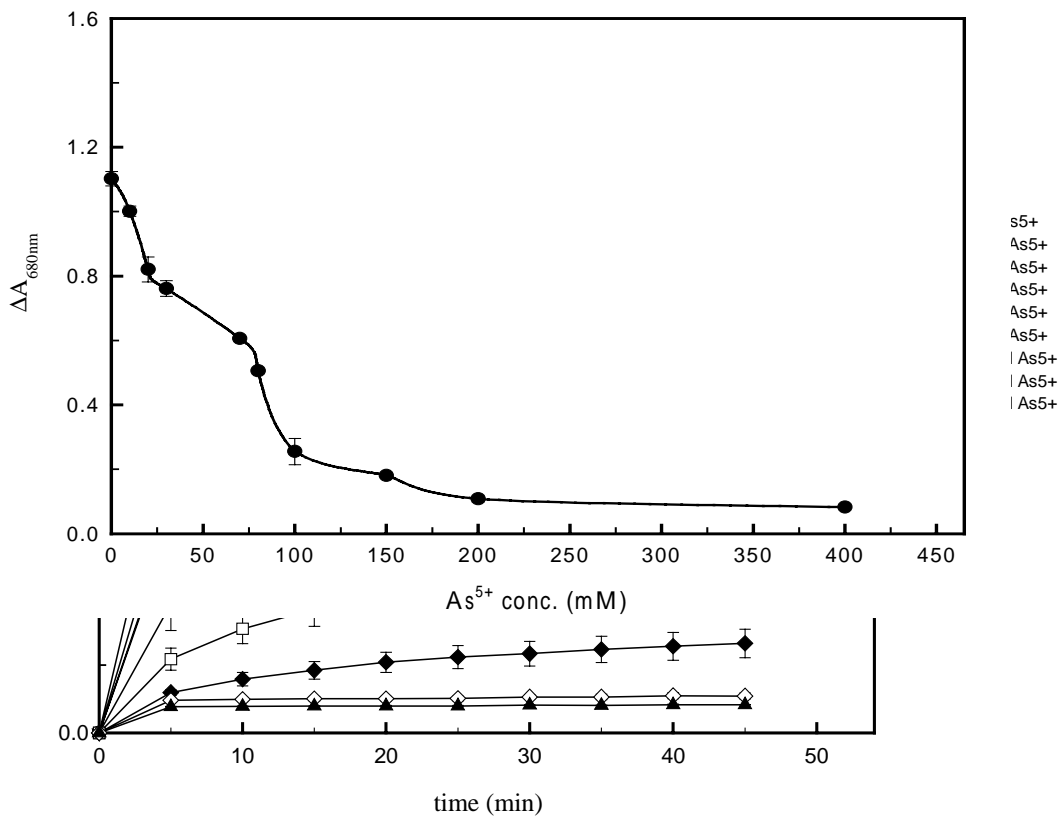
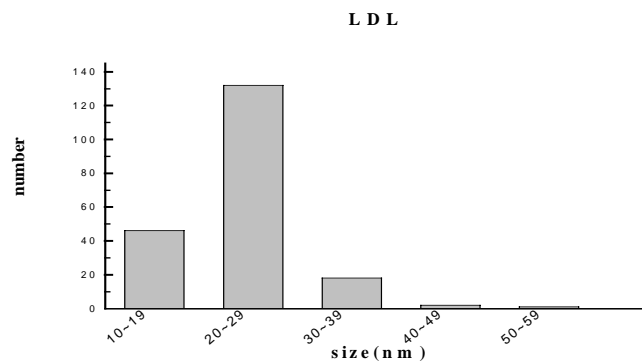


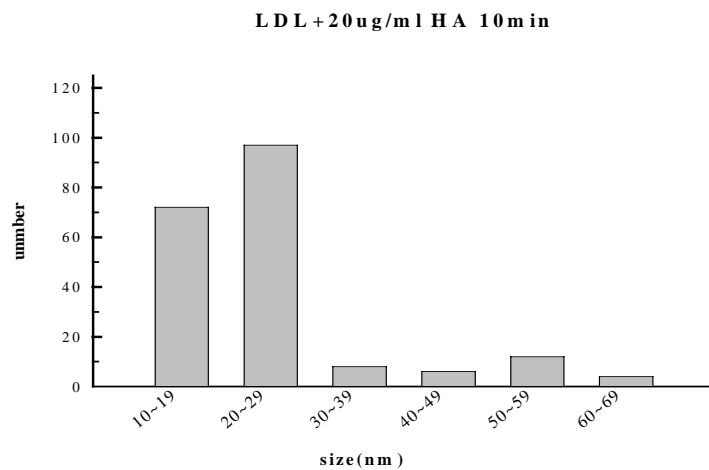
Fig.5. The aggregation of LDL (200 ug/ml) induced by HA (20 ug/ml) as a function of time at different concentrations of As^{5+} monitored by the turbidity measurement at 680 nm at 37 °C.

Fig.6. Graph showing the dependence of turbidity change (O.D. 680 nm) as a function of concentration of As^{5+} . The concentration of LDL and HA was 200 ug/ml and 20 ug/ml.

(A)



(B)



(C)

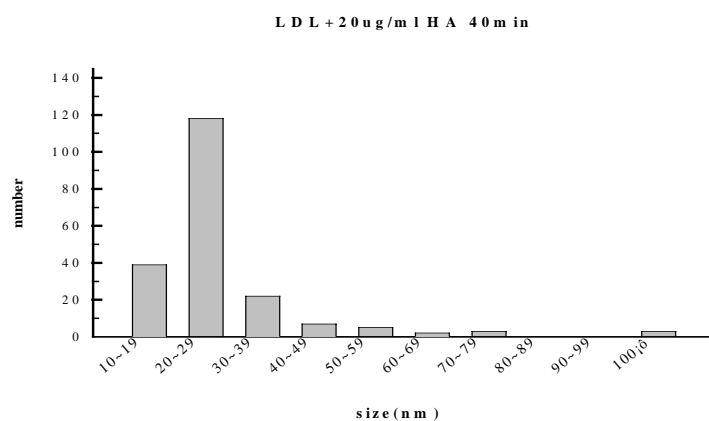


Fig.7. Electron microscopic analysis of HA treated LDL particles. LDL (200ug protein/ml) was incubated at 37 for 10 min and 40 min with 20ug/ml HA. The LDL particles were examined by electron microscopy after negative staining, and size distributions of the negatively stained particles were determined.(A) native LDL; (B) HA treat LDL incubator 10min; (c) HA treat LDL incubator40min.