

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計畫名稱：橘黴素(Citrinin)抑制巨噬細胞中脂多醣所誘發的  
\* iNOS 基因表達  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 蔡宛靜  
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-018-B  
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月  
指導教授： 劉秉慧

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 100年03月30日

# 目錄

摘要.....	2
序論	
黴素 Citrinin 的簡介 .....	3
脂多醣與發炎反應.....	4
一氧化氮 (Nitric oxide, NO) .....	5
誘發性一氧化氮合成酶.....	6
iNOS基因的調控機轉.....	6
研究目的.....	7
材料與方法	
細培養與處理.....	8
細胞存活率測試 (MTS assay) .....	8
一氧化氮釋放分析測試 (Griess assay) .....	9
全蛋白質萃取或細胞核蛋白萃取.....	9
西方點墨法(Western blot).....	10
核醣核酸萃取的反轉錄作用及半定量聚合連鎖反應.....	11
微脂粒法之基因轉殖感染.....	11
冷光酵素報導者基因試驗(Luciferase reporter gene assay)...	12
實驗結果 .....	13
討論 .....	20
未來研究方向.....	22
參考文獻.....	23
附圖 .....	27

## 摘要 (Abstract)

橘黴素(Citrinin, 簡稱 CTN)是由紅麴菌所產生的二及代謝產物。紅麴菌(*Monascus spp.*)是傳統的釀造菌株,一直受到相當的重視(Awuah and Kpodo, 1996)及利用,近年來紅麴發酵的相關產品主要以抑制膽固醇合成、含有降血壓物質預防心臟血管疾病的保健食品最引人注目,但是伴隨著紅麴菌的發酵過程往往會導致肝臟及腎臟毒性的二級代謝產物-橘黴素 Citrinin 的產生,這使得紅麴產品在安全上受到質疑。人類及牲畜如果長期攝取被黴菌毒素污染的食物或飼料的話,可能使人體的肝臟和腎臟會造成嚴重的傷害,甚至危害生命,所以,藉由了解黴菌毒素的致毒劑量及致毒機轉,將有助於我們對於食品及飼料進行進一步的安全評估,以期望維護公共食品安全及大眾健康。

我們以脂多醣(lipopolysaccharide, 簡稱 LPS)刺激老鼠白血球的單核球巨噬細胞(RAW 264.7 cells)作為免疫的機制。根據我們的初步發現,在LPS和橘黴素共同處理下不會對細胞有毒性傷害,因此在不傷害細胞的情況下以不同濃度的橘黴素處理已受到LPS刺激的RAW 264.7細胞,隨著橘黴素處理劑量的提高,LPS所誘發的nitric oxide(NO)生成量、inducible nitric oxide synthase(iNOS)的蛋白質及mRNA的表現量皆有逐漸下降的趨勢。所以我們進一步探討橘黴素是否藉由影響*iNOS*基因前端啟動子的轉錄因子結合位(transcription factor binding site)而抑制*iNOS*的基因表達,目前已知*iNOS*基因啟動子的nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)與LPS刺激並誘發的轉錄機制有關,所以在本計劃中將探討橘黴素對轉錄因子NF- $\kappa$ B的影響。為了進一步探討橘黴素對於*iNOS*基因轉錄作用之機轉,我們建構*iNOS* promoter序列的luciferase冷光報導者基因的質體進行實驗,來推論橘黴素是否能夠抑制*iNOS* promoter對於下游基因的驅動活性,進而調節下游基因的表達。

# 序論 (Introduction)

## 1. 橘黴素 Citrinin 的簡介

橘黴素 (Citrinin, 簡稱 CTN) 是一種主要由紅麴菌所產生的二級代謝物，雖然並非所有的紅麴菌種都會產生，但若不同菌種或發酵時的環境衛生條件不佳，就容易產生橘黴素，所以此橘黴素普遍存在於受黴菌污染的穀類製品中，包括玉米、小麥、大麥以及米 (Chu, 1991) (如附圖一)。在保加利亞以及丹麥所作的調查發現，市售玉米的相關產物中，橘黴素的含量相當高 (Awuah and Kpodo, 1996)。

此外，橘黴素也是伴隨著紅麴菌 (*Monascus spp.*) 發酵過程中所產生的代謝產物。紅麴菌是一種傳統的釀造菌株，一直受到相當的重視及利用，近年來紅麴發酵的相關產品主要以抑制膽固醇合成、含有降血壓物質預防心臟血管疾病的保健食品而受到注目。因為血膽固醇過高而引起的心臟血管病變 (包括中風、冠狀動脈硬化性心臟病及高血壓) 佔歐美國家總死亡率的 51% 以上，其在我國目前也佔有很大的比率 (19.2%)，遠超過糖尿病、慢性肝病及腎症候群，且有越來越嚴重的趨勢。近年來我國由於已步入工業化社會，多數人過著緊張繁忙的生活，因此心臟血管病變的死亡率有上昇的趨勢，根據衛生署的資料，2000 年的死亡人數達 23,884 人，其中尤以腦中風的死亡率最高。

1979 年遠藤教授在日本三共製藥公司的資助下，率先從分離自泰國醱酵食品的粉紅色紅麴菌 *monascus ruber* 的培養液中找到 monacolin k。其主要作用機制是能專一性的抑制膽固醇合成速率決定步驟酵素 HMG-CoA reductase (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase) 的活性，而使 mevalonic acid 無法生成，以致抑制膽固醇的合成，進而達到降低膽固醇的效果，特別是對導致動脈硬化最嚴重的低密度脂蛋白膽固醇 (low density lipoprotein cholesterol, -c) 有 LDL-c 優先降低的效果。

雖然橘黴素在抑制膽固醇及降血壓為有利的應用，但是卻在動物模式中發現一種肝腎毒性的現象，像是針對雄性大白鼠長期餵食低劑量的橘黴素，最終將會發現

有大約 70% 的大白鼠會產生腎腫瘤，而在雌性的懷孕大白鼠中，也發現到橘黴素有導致畸胎的可能性，所以由以上結果得知橘黴素在細胞上已經會造成毒性。除了細胞毒性，在長期餵食橘黴素的小白鼠中也發現到會有染色體斷裂的現象，因此橘黴素在基因上也具有相當的毒性。

現在在細胞層次及基因層次已有確切證實，但是毒性機制仍是相當複雜。不過橘黴素的毒性機制雖然複雜，但是初步已有證據顯示橘黴素可能先藉由堆積在腎臟及肝臟中的粒線體內，進而影響粒線體的電子傳遞及干擾其他相關的正常功能。(Chagas et al., 1995) (Chagas et al., 1992)

在台灣行政院衛生署食品藥物管理局規格標準中，訂食品中橘黴素橘黴素限量為 2 ppm 以下。但是目前國內外以發酵食品包裝販售之紅麴相關保健產品幾乎皆含有自 0.1 至 17 ppm 不等之橘黴素(Sabater-Vilar et al., 1999)，所以保健食品中橘黴素的毒性以及含量實為公共健康安全的隱憂之一。

而這毒素除了可以抑制蛋白合成、抑制細胞增生、引起細胞週期停滯及器官病變外，還會影響動物體的免疫功能及致癌性。因此，人類及牲畜如果長期攝取被黴菌毒素污染的食物或飼料的話，可能危害生命。就像某幾年前，發生狗集體腎衰竭事件，那時就有獸醫師懷疑，狗乾糧被橘黴素污染，才會導致悲劇。

又有文獻指出，暴露於橘黴素會抑制細胞激素 Interleukin-10，使 tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) 和 interleukin-6 (IL-6) 分泌過多，導致免疫反應的風險的增加(Johannessen et al., 2005; Johannessen et al., 2009)。由於橘黴素明確影響細胞免疫功能的機制尚未清楚，因此我們就要以此橘黴素來研究與免疫相關的功能。

## **2.脂多醣 (lipopolysaccharide, 簡稱 LPS) 與發炎反應**

Lipopolysaccharide (LPS) 為革蘭氏陰性菌外膜上的主要成份，屬於一種細菌內毒素 (endotoxin) (Ulevitch and Tobias, 1995)。LPS 主要分為 lipid A、core polysaccharide 及 O-polysaccharide side chains 三個部份 (如附圖二)，其中 O side

chains 最為重要， O-polysaccharide side chains 又稱作 O-antigen，O-antigen 在不同的菌種中會有所差異，主要是為宿主抗體最容易辨識的區域，而影響內毒素活性的部位為 lipid A，其次是 core polysaccharide (Raetz and Whitfield, 2002)

之前的研究顯示， LPS 會被巨噬細胞所辨識，在辨識後經由刺激要吞噬外來物，則會釋放出許多發炎前驅物質，如 nitric oxide (NO)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和 interleukin-6 (IL-6)...等(Kim et al., 2006)，因此當宿主受到外來細菌感染時，免疫系統可利用巨噬細胞辨識到 LPS 引發免疫反應來對抗外來物；但當 LPS 過度刺激之下，則容易引起敗血性休克 (septic shock) 或是全身性的免疫發炎疾病 (Guha and Mackman, 2001)，所以 LPS 被廣泛來研究免疫系統的相關機制。

### 3.一氧化氮 (Nitric oxide, NO)

一氧化氮(NO) 在哺乳動物體內扮演一個很重要的角色，針對宿主免疫防禦的功能方面，由於巨噬細胞受到細菌刺激時會釋放大量 NO 來擴張血管，引來更多的巨噬細胞跟發炎物質，因此 NO 可作為發炎反應的指標。另外 NO 也可調控許多生理及病理的反應，如宿主免疫防禦、神經訊息傳遞相關的功能(Korhonen et al., 2005) (Swindle and Metcalfe, 2007)。

NO 為活性自由基氣體，分子量大約為 30 Da，隸屬小分子，所以能輕易地穿過細胞膜，但由於 NO 的半衰期很短，大約 6~10 秒，故常以較穩定的亞硝酸鹽 (nitrite) 型式存在。在哺乳動物細胞會經由一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化氧化成瓜氨酸 (L-citrulline) 的過程中會生成出 NO (Geller and Billiar, 1998)。

許多研究利用發炎前驅物質 NO 為研究對象來探討 LPS 誘發發炎反應的訊息傳遞機制(如附圖三)。其中又牽扯到訊息傳遞路徑，其中以 LPS 刺激巨噬細胞來活化細胞內轉錄因子 (例如：NF- $\kappa$ B、AP-1)，進入細胞核內促進下游 nitric oxide synthase (NOS) 基因產生大量 NOS 蛋白，繼而誘發 NO 的生成(Kim et al., 2006) (Blantz and Munger, 2002; Aktan, 2004)

#### 4.誘發性一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)

一氧化氮合成酶 (iNOS) 為 NO 生成的重要酵素蛋白,接此一氧化氮合成酶根據其不同的功能性可將其分為兩類型,其中一類型包括神經細胞所含有的 neuronal NOS 和內皮細胞所調控的 endothelial NOS (Garcia-Cardena et al., 1996), 此類型 NOS 亦稱持續表現型 NOS (constitutive NOS, cNOS), 活性受到細胞內鈣離子的調控, 因此又稱為鈣離子依賴型 NOS ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS) (Stuehr and Marletta, 1985); 另外一類型的 NOS 則為誘導型 NOS (inducible NOS, iNOS), 因不受到鈣離子所調控, 亦稱之鈣離子非依賴型 NOS ( $\text{Ca}^{2+}$ -independent NOS) (Nakane et al., 1993)。持續性表現的 nNOS 及 eNOS 能產生低量的 NO 來維持細胞內基本的表現量, 作為訊息傳遞分子並調控許多生理機制, 因此低量的 NO 並不會造成細胞毒性。誘發性的 iNOS 則需要受到細胞激素及微生物產物的刺激作用, 才能產生出大量的 NO 來抑制外來細菌、寄生蟲和病毒的生長, 由於 iNOS 不會受到 NO 的負調控, 因此當 iNOS 受到誘發後, 就會持續地活化且不斷地產生 NO 直到 iNOS 被降解掉為止, 這樣的狀況若發生在不對的時間或地點時, 反而會造成細胞毒性 (Swindle and Metcalfe, 2007)

#### 5.iNOS基因的調控機轉

所以我們可得知 iNOS 基因的調控機制對細胞而言是很重要的, 調控 iNOS 基因表現主要有四個部份: 轉錄機制 (transcriptional mechanism)、轉錄後機制 (post-transcriptional mechanism)、轉譯機制 (translational mechanism) 及轉譯後機制 (post-translational mechanism)(Geller and Billiar, 1998; Kleinert et al., 2004)。目前已知有許多轉錄因子可結合的序列但在 iNOS 基因前端的啟動子上 (如附圖四), 這些正向調節的轉錄因子都跟 LPS 或細胞激素刺激並誘發的轉錄機制有關(Lin et al., 1996) (Kleinert et al., 2003)。當我們想得知 iNOS 基因的調控機轉, 就要先探討細胞內 DNA 經由轉錄作用變成 mRNA 的過程, 其中這過程的主要反應是為轉錄因子結合至 iNOS gene 的 promoter 上, 當轉錄因子結合至正確的啟動位子, 則會驅使 iNOS 基因做出 mRNA, 所以看轉錄因子是否結合到基因前端啟動子就相當的重要。

## 研究目的

### 【Aim 1】橘黴素如何抑制LPS所誘發之*iNOS*基因的表現

根據前人研究指出橘黴素會影響動物體的免疫功能的部分，進而干擾免疫的一系列反應機制。而先前的研究也指出脂多醣 (lipopolysaccharide, 簡稱 LPS) 會刺激免疫細胞產生免疫反應，活化inducible nitric oxide synthase (iNOS) 產生大量的一氧化氮Nitric oxide (NO)。因此我們以LPS刺激老鼠白血球的單核球巨噬細胞 (RAW 264.7 cells) 作為免疫防禦的模式，探討橘黴素在細胞株中是否具有抑制巨噬細胞中脂多醣所誘發的*iNOS*基因表達。

### 【Aim 2】橘黴素是否抑制*iNOS*基因前端啟動子的活性

顯示用不同濃度的橘黴素處理目前初步結果已受到 LPS 刺激的 RAW 264.7 細胞，LPS 所誘發的 NO 生成量、iNOS 的蛋白質及 mRNA 的表現量隨著橘黴素處理劑量的提高皆有逐漸下降的情形，那再接著探討橘黴素在活體內是否抑制轉錄因子 NF- $\kappa$ B 結合至 iNOS promoter，使得 iNOS 基因前端啟動子的活性受影響，並且造成下游基因的轉錄活性降低。



# 材料與方法 (Materials and Methods)

## 1.細胞株 (Cell lines)

老鼠的白血球單核球巨噬細胞 (Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line, 簡稱RAW 264.7 cells), 購自食品工業發展研究所。

## 2.細胞培養與處理 (Cell culture and treatment)

RAW 264.7 細胞培養於 DMEM、10% 胎牛血清(FBS)、1% L-Glutamine、0.1 mg/ml streptomycin、100 U/ml penicillin 中。在 incubator 的生長環境為 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 時時刻刻觀察細胞型態, 約兩天細胞會呈現生長至七、八分滿盤的現象, 此時根據實驗給予不同處理或繼代培養。依實驗之條件分為 60mm 及 35mm 得細胞培養盤中培養, 最後加入不同濃度之 LPS 與橘黴素處理。培養基、血清、抗生素及 L-Glutamate 均購自 GIBCO (Grand Island, NY)。

## 3.細胞存活率測試 (MTS assay)

MTS assay 是一種生物學上常用以測定細胞存活率或增殖作用的方法, 其主要依賴活細胞內粒線體中的琥珀酸去氫酶之作用將 MTS 之 tetrazolium 轉為藍色之產物 MTS formazan, 堆積於細胞中, 當加入 DMSO 將其溶解, 由於死細胞粒線體不含脫氫酶, 則可利用測 OD 值得知細胞還原 MTS 的能力 (formazan 形成量), 此 OD 值代表了粒線體的活性, 即活細胞數目, 故 MTS assay 可用作細胞存活率的指標。MTS assay 因為擁有快速、經濟和無放射性元素污染之問題, 常被使用為細胞存活率及巨噬細胞吞噬能力之測定。MTS assay 普遍應用於毒理中測試某些毒性化學物質對於細胞毒性強弱的方法。

將 RAW264.7 細胞培養於 96 微孔盤中, 每一微孔中分別約有  $3 \times 10^4$  顆細胞, 置於含 5% 二氧化碳之 37 °C 培養箱培養 24 小時後, 以不同濃度之 LPS 與橘黴素處理 24 個小時。待培養時間一到 24 小時, 則進行藥物終止, 於每個微孔中加入 20 $\mu$ l

的 MTS reagent (購自 Promega), 置於培養箱培養約 15 分鐘連續四次至 1 小時, 每一間段皆以吸收光波長 490nm 進行偵測 (Analyze by ELISA Reader), 藉此得知細胞存活率。

#### 4.一氧化氮釋放分析測試 (Griess assay)

一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 的半衰期很短, 約 6~10 秒, 所以當 NO 生成後會立即轉變成 nitrate, 之後 nitrate 會再經由 nitrate reductase 分解, 形成較穩定的 nitrite 型式存在, 故本實驗主要藉由分析 nitrite 濃度來表示 NO 生成的量。

將 RAW 264.7 細胞培養在 35 mm 盤中, 每一盤中約有  $1 \times 10^6$  個細胞, 放入含 5% 二氧化碳的 37 °C 培養箱中至少培養 16 個小時後, 將培養液置換成不含酚紅 (phenol red) 之 DMEM 培養液, 加入 LPS 及不同濃度之橘黴素處理 24 個小時後, 將培養液移至 1.5 ml 微量離心管後離心 (13000 rpm、4 °C、10 分鐘), 之後取 100  $\mu$ l 放入 96 微孔盤中, 以  $\text{NaNO}_2$  為濃度標準品, 在 540 nm 的波長下以 ELISA reader 先測得背景值並紀錄之, 接著加入 100  $\mu$ l 緩衝液 A+B (緩衝液 A+B 為緩衝液 A 與緩衝液 B 以 1:1 的比例混合; 緩衝液 A: 0.1% N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride, 緩衝液 B: 1% Sulfanilamide、5% Phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )) 加入後於室溫下避光作用 10 分鐘, 再測得第二個吸光值, 之後扣除背景值再做記錄, 則是 NO 的濃度。

#### 5.全蛋白質萃取 (Whole protein extraction)

將 RAW264.7 細胞株培養在 35mm 盤中, 每一盤中約有有  $6 \times 10^5$  顆細胞, 放入含 5% 二氧化碳之 37 °C 培養箱培養至少 16 小時後, 加入 LPS 及不同濃度之橘黴素處理 24 個小時後, 隨後將培養盤中之培養基移除, 以 0.01M 之 PBS 清洗兩次後, 加入 93  $\mu$ l 冰的細胞萃取緩衝液 (0.01 M PBS、5% glycerol、1 mM EDTA、1 mM DTT、1 mM PMSF、1% protein inhibitor、0.5% Triton X-100), 置於冰上作用 10 分鐘後, 將細胞連同萃取液刮除移至微量離心管中, 以混合器震盪 2 次 (5sec/次) 後離心 (13000rpm, 4°C, 20分鐘), 接著取上清液 80  $\mu$ l 加入 20  $\mu$ l 的 4 $\times$ SDS 染劑, 置於 95 °C 加熱 5 分鐘以變性蛋白, 而後放置於 -20 °C 冰箱保存。另外取上清液 3  $\mu$ l 稀釋 10 倍, 利

用Bio-Rad Protein Assay，以BSA作為標準品進行樣品的蛋白質定量。

## 6. 蛋白定量 (protein assay)

定量蛋白質濃度首先製作牛血清白蛋白 (BSA) 標準樣本之標準曲線，作為蛋白質定量的依據。取出 10  $\mu$ l 待測樣本加入 200 $\mu$ l 的 Coomassie protein assay 試劑 (Bio-Rad) 混合均勻放入 96 孔盤中，以未加蛋白質樣本的 Coomassie protein assay 試劑當作空白組，測定 595 nm 波長之吸光值，同時減去空白組的吸光值作修正，再比對標準曲線得到蛋白質濃度。

## 7. 西方點墨法 (Western blot)

取40 $\mu$ g蛋白質樣品進行10%SDS-聚丙烯醯氨凝膠 (stacking gel: 3.4ml ddH<sub>2</sub>O、830 $\mu$ l 30% poly-acrylamide (Acrylamide/Bis 29:1)、630 $\mu$ l 1 M Tris pH 6.8、50  $\mu$ l 10% SDS、50  $\mu$ l 10% APS、10  $\mu$ l TEMED; separating gel: 4ml ddH<sub>2</sub>O、3.3ml 30% poly-acrylamide (Acrylamide/Bis 29:1)、2.5 ml 1.5 M Tris, pH 8.8、100  $\mu$ l 10% SDS、100  $\mu$ l 10% APS、8  $\mu$ l TEMED;) 電泳以分離蛋白質樣品，stacking gel 以80伏特約30分鐘，separating gel以120伏特電泳約1至2小時後，置於Bio-Rad轉漬裝置中，加入轉印緩衝液 (transfer buffer: 25 mM Tris, pH 8.3、192 mM Glycine、20 % Methanol)，以100伏特電流轉漬1.5小時。將轉漬後的硝化纖維紙 (Nitrocellulose membrane; Bio-Rad)以含5 %脫脂牛奶的TPBS (10 mM PBS, pH 7.5、0.05 % Tween 20)作為阻隔緩衝液 (blocking buffer)於室溫進行阻隔作用1小時。倒出阻隔緩衝液後，接著重覆TPBS緩衝液洗5分鐘三次後，加入含一級抗體的TPBS緩衝液 (含5 %脫脂牛奶或5 % BSA，視抗體需要做選擇)於4 °C作用18小時。接著重覆以TPBS 緩衝液洗5分鐘三次後，最後加入含有二級抗體的TPBS緩衝液 (含5 %脫脂牛奶)，於室溫下搖晃1小時後，再以 TPBS緩衝液洗5分鐘三次，最後加入1:1的SuperSignal<sup>®</sup> West Pico detection kit溶液 (Luminol Enhancer solution: Stable peroxide buffer, PIERCE)，用冷光螢光測定儀 (FUJIFILM, LAS-1000)進行冷光偵測，並且以Fuji軟體進行蛋白質的量化分析。

## **8.核糖核酸萃取 (RNA extraction)**

將 RAW264.7 細胞株培養於 35mm 盤中，每盤分別含有  $5 \times 10^5$  顆細胞，置於含 5% 二氧化碳之 37°C 培養箱培養至少 24 小時後，加入 LPS 及不同濃度之橘黴素處理 24 個小時後，隨後將培養盤中之培養基移除，再利用 RNeasy® mini kits (Qiagen) 萃取整體 RNA，其中先加入 TRIzol (TRIzol 含可破壞 RNase 的特性)，接著再加入 0.2ml Chloroform，手搖微量離心管使其均勻，約 30~60sec 後室溫下靜置 5min，再經由離心 (13000rpm、4°C、15 分鐘)，取上清液並加入 isopropanol，經由靜置後再離心(離心 13000rpm、4 °C、15 分鐘)，最後加入 RNase free water，溶了之後即得整體 RNA 產物，並測 O.D.值 260 進行定量。

## **9.反轉錄作用 (Reverse transcription (RT) reaction)**

取 4 µg 的 RNA，加入 oligo-d T 與 dNTP 於 70°C 下作用 10 分鐘，使雙股的 RNA 分開，再加入以 SuperScript® III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) 進行反轉錄作用，反轉錄後的 cDNA 即可繼續進行聚合連鎖反應實驗。

## **10.半定量聚合連鎖反應 (Semi - quantitative PCR)**

取反轉錄後的 cDNA 1 µl 當作模板，分別加入 2.5 µl 的 10 X PCR buffer/MgCl<sub>2</sub>、0.5 µl 的 10 µM 正股引子、0.5 µl 的 10 µM 反股引子、0.5 µl 的 10 mM dNTP 混合物及 0.2 µl 的 2u/µl Taq polymerase II，最後加入 d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 至反應總體積為 25µl，以 PCR system 2700 (Applied Biosystems) 機器設定反應條件：94 °C 作用 5 分鐘，接著以 94 °C 進行變性作用 (denaturation) 60 秒、視引子不同之黏合 (annealing) 溫度作用 30 秒，再以 72 °C 進行延長作用 (elaongation) 90 秒，再依不同基因表現量差異將此循環重複 26-30 次不等，結束後再以 72 °C 反應 10 分鐘。待作用完成後，取 10 µl 產物跑含有溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 的 1% agarose gel，經 UV 照射後以數位影像系統分析。

## **11.微脂粒法之基因轉殖感染 (Transfection)**

將 RAW 264.7 細胞培養在 60 mm 盤中，每盤中約有  $9 \times 10^5$  顆細胞，放入含

5 % 二氧化碳的 37 °C 培養箱至少培養 16 個小時。利用 lipofectamine™ 2000將實驗室由學長所建構的質體(附圖五)送入 RAW 264.7 細胞中，首先將微脂粒與4 µg 建構的質體與 4 µg 的 β-galactosidase 質體分別與無血清 DMEM (由於血清及抗生素等會干擾transfection的進行，故於此中未添加血清及抗生素) 培養液在室溫中混合均勻，靜置5分鐘，再將微脂粒及質體混合均勻 (pipetting 40 下) 在室溫中置放20分鐘讓微脂粒將質體包裹起來，接著以含有微脂粒及質體的 DMEM 混合液取代一般培養細胞用的培養基，將細胞放入37 °C 含 5 % 二氧化碳的培養箱在沒有血清及抗生素的環境下轉殖感染 4 -6小時後，加入 10 % 的胎牛血清再進行轉殖感染約16-18小時，接著以含有 10 % 胎牛血清的 DMEM 培養基置換掉含有微脂粒及質體的培養基後以35mm盤培養細胞，再進行橘黴素及LPS的處理。

## **12.冷光報告試驗探測冷光酵素活性 (Luciferase reporter gene assay)**

冷光酵素報告者試驗之探測冷光酵素活性的原理是將冷光酵素基因建構入質體中，藉由啟動子上的轉錄因子調控後，啟動 promoter 作用，而產生冷光酵素基因，再經由轉錄、轉譯作用產生冷光酵素蛋白，之後與受質結合，則會產生冷光的反應。

我們實驗已經由基因轉殖的細胞加藥處理，待橘黴素及 LPS 作用中止後移除培養基，以 0.01 M PBS 清洗 2 次細胞培養盤後加入 luciferase assay kit (Promega) 的細胞萃取液 100 µl 後平放在室溫作用 15 分鐘，接著連同萃取液刮下細胞移至微量離心管，震盪 2 次 (5 sec/次) 後離心 (13000 rcf, 5 min, 4 °C) 將 100 µl 的上清液全部移至新的微量離心管中。取上清液 50 µl 至 1.5 ml 微量離心管，並加入 50 µl 的 2 × β-galactosidase 檢驗緩衝液 (200 mM Sodium phosphate buffer, pH 7.3、2 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM β-mercaptoethanol、1.33 mg/ml OMPG) 於 37 °C 作用 1 小時，取 80 µl 混合液到為孔盤中，在 420 nm 的波長下以 Molecular Devices Emax precision microplate reader 測得吸光值當作內部控制因子。另外取上清液的 10 µl 加至 96 微孔盤中，加入 luciferase assay kit 的酵素受質 60 µl 後，以冷光測定儀 (Applied Biosystem) 進行冷光偵測。最後以冷光值以及 β-galactosidase 值(背景值) 做比較，則得數據。

## 實驗結果 (Result)

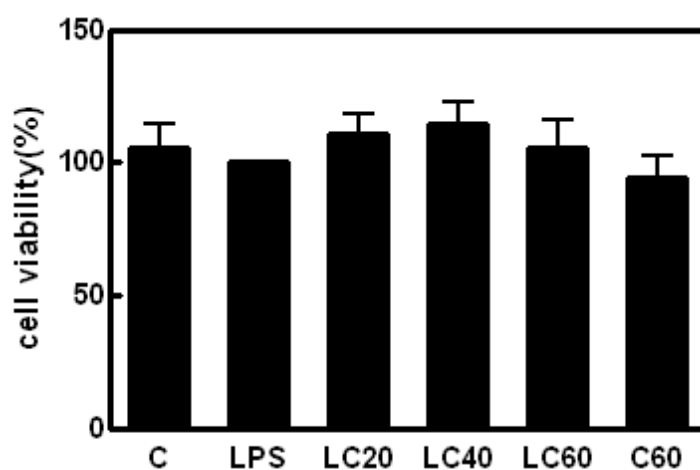
### 1.脂多醣與橘黴素對於RAW264.7 巨噬細胞存活率的影響

前人研究結果顯示橘黴素在動物實驗中會造成腎、肝毒性，所以首先要確認橘黴素是否會造成細胞毒性。我們以老鼠 RAW 264.7 巨噬細胞株作為研究對象，以 LPS 與不同濃度的橘黴素處理細胞 24 小時之後，然後利用 MTS assay 測試細胞的存活率。與對照組 (以 0.01M PBS 及 DMSO 處理) 相比較，觀察到使用 50 ng/ml LPS 與橘黴素濃度對 RAW 264.7 細胞的存活率並無明顯改變 (圖一)。由以上實驗結果證實在 RAW 264.7 細胞中，橘黴素的處理濃度在 60  $\mu$ M 以下並不會造成 RAW 264.7 細胞的細胞毒性。因此我們就可以在不影響細胞存活的情況下得之 LPS 及橘黴素在細胞內的一連串反應機制。

### 2.橘黴素抑制LPS所誘發的NO生成量

由之前研究資料顯示當 LPS 處理 RAW 264.7 細胞時，可能會引發一級訊息，刺激巨噬細胞產生發炎前驅物質 NO (Kim *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2007) ; 回推 NO 物質的上游，可知當 LPS 刺激 RAW 264.7 細胞時，會誘導大量的 iNOS 蛋白質產生，接著 iNOS 蛋白質分解催化精氨酸 (L-arginine) 變成瓜氨酸 (L-citrulline) 繼而產生大量 NO (Geller and Billiar, 1998)(Laroux *et al.*, 2001)。由細胞存活率分析實驗下我們可得知橘黴素處理並不會大幅影響細胞存活率，所以在不影響細胞死亡的情形下，進而想要探討橘黴素是否能使 LPS 所誘發的 NO 生成量受到抑制。在處理 50 ng/ml LPS 的 RAW 264.7 細胞中，再加入溶劑或不同濃度之橘黴素一起處理 24 個小時後，利用 NO assay 檢測細胞中 NO 生成的變化。我們發現 LPS 所誘發的 NO 會因為隨著橘黴素的劑量增加，而有明顯降低 NO 生成量的趨勢 (圖二)。由此結果得知在 RAW 264.7 細胞中，當橘黴素處理的濃度越高，LPS 所誘發之 NO 生成量被橘黴素抑制的現象越顯著。

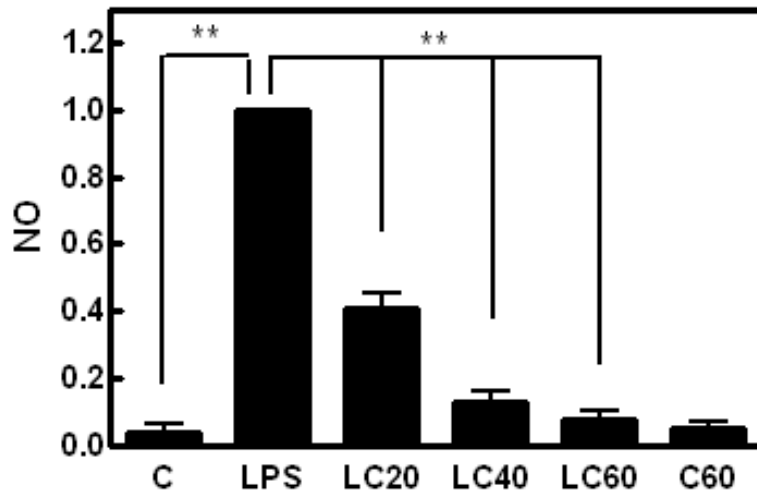
### 結果 1. 細胞存活率分析 (cell viability) 之結果



50ng/ml IPS	-	+	+	+	+	-
橘黴素 ( $\mu\text{M}$ )	-	-	20	40	60	60

圖一、將 RAW 264.7 細胞培養在 96孔盤中，培養24個小時後，在RAW 264.7細胞中，再加入溶劑或不同濃度之LPS及橘黴素(橘黴素)處理24個小時，所測得的細胞存活率，本圖以LPS為1，並且和實驗組進行相對比較。探討以MTS 的分析之後，可以發現當橘黴素的濃度增高時，細胞存活率並無受到明顯影響。

結果 2. 一氧化氮分析 (NO assay)



50ng/ml LPS	-	+	+	+	+	-
橘黴素 (μM)	-	-	20	40	60	60

圖二、將 RAW 264.7 細胞培養在 35 mm 盤中，培養 24 個小時後，在 RAW 264.7 細胞中，再加入溶劑或不同濃度之 LPS 及橘黴素(橘黴素)處理 24 個小時，接著收集不含酚紅 (phenol red)之培養液，以 Griess reagent 分析培養液中的 NO 濃度，本圖以 LPS 為 1，並且和實驗組進行相對比較。收集三次獨立實驗數據經統計分析後以 mean  $\pm$  SEM 的方式表示，\*表示與控制組相比具有顯著差異， $P < 0.05$ ；\*\* $< 0.01$ 。由以上結果得知在 RAW264.7 細胞中，當橘黴素處理的濃度越高，LPS 所誘發的 NO 生成量會有下降的趨勢



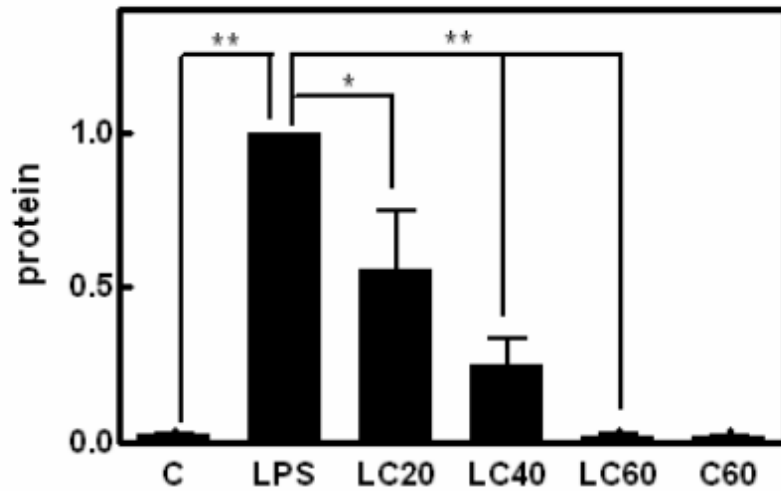
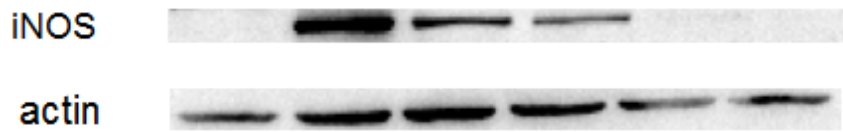
### **3.橘黴素抑制LPS所誘發的iNOS蛋白質表現量**

當我們做了橘黴素處理 LPS 所誘發的 NO 時證實了 NO 生成量確實會被抑制，而 NO 的合成主要是由 iNOS 蛋白質所調控產生，因此我們就要繼續往 NO 合成的上游探討橘黴素是否能抑制 LPS 所誘發的 iNOS 蛋白質表現量。在看 iNOS 蛋白質表現量的方面，我們以處理 50 ng/ml LPS 的 RAW 264.7 細胞中，加入溶劑或不同濃度之橘黴素一起處理 24 個小時後，接著進行萃取細胞全蛋白質將細胞的蛋白全數萃取以繼續進行西方點墨法的實驗，在西方點墨法中，使用了辨識 iNOS 及 actin 蛋白質的專一性抗體，最後以冷光螢光影像分析儀偵測之。以實驗結果來討論，我們發現 LPS 所誘發的 iNOS 蛋白質表現量會因為隨著橘黴素的劑量增加，而有明顯降低 iNOS 蛋白質生成量的趨勢(圖三)。由此結果可知在 RAW 264.7 細胞中，當橘黴素處理的濃度越高，LPS 所誘發之 iNOS 蛋白質表現量被橘黴素抑制的現象將越顯著。

### **4.橘黴素抑制LPS所誘發的iNOS mRNA表現量**

當我們做了橘黴素處理 LPS 所誘發的 iNOS 蛋白質時證實了 iNOS 蛋白質生成量確實會被抑制，因此進一步再往上游探討橘黴素對於 LPS 所誘發的 iNOS mRNA 表現量是否也有同樣的抑制效果。在看 iNOS mRNA 表現量的方面，我們以處理 LPS 50 ng/ml 的 RAW 264.7 細胞中，加入溶劑或不同濃度之橘黴素一起處理 24 個小時後，接著萃取細胞中 total RNA，因為主要要推導能進行轉譯成 iNOS 蛋白質的 RNA，因此取了 total RNA 中的 mRNA，將 mRNA 反轉錄成 cDNA 並進行 RT-PCR 分析。之後再以 iNOS 及 GAPDH (當作內部控制因子) 的 primer 進行 PCR，我們發現 LPS 所誘發的 iNOS mRNA 表現量會因為隨著橘黴素的劑量增加，而有明顯降低 iNOS mRNA 生成量的趨勢(圖四)。以上結果顯示在 RAW 264.7 細胞中，當橘黴素處理的濃度越高，LPS 所誘發之 iNOS mRNA 表現量被橘黴素抑制的現象越為顯著。

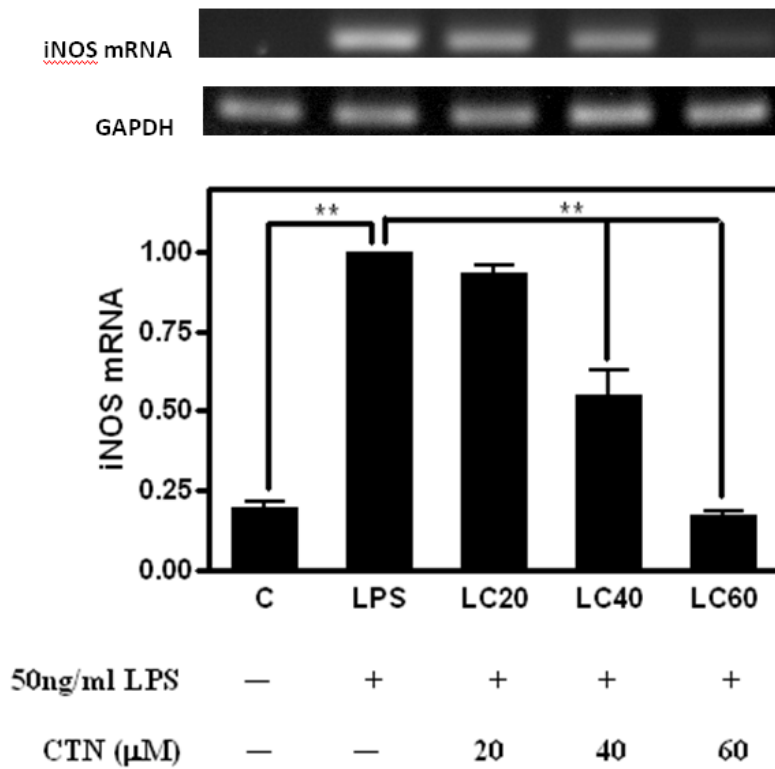
結果 3. 橘黴素抑制 LPS 所誘發的 iNOS 蛋白質表現量



50ng/ml IPS	-	+	+	+	+	-
橘黴素 (μM)	-	-	20	40	60	60

圖三、將 RAW 264.7 細胞培養在 35 mm 盤中，培養 24 個小時後，在 RAW 264.7 細胞中，再加入溶劑或不同濃度之 LPS 及橘黴素(橘黴素)處理 24 個小時，接著萃取細胞全蛋白質並且使用辨識 iNOS 或是  $\beta$ actin 蛋白質的專一性抗體進行西方墨點法， $\beta$ actin 的蛋白量在此做為內部控制組。本圖以 LPS 為 1，並且和實驗組進行相對比較。收集三次獨立實驗數據經統計分析後以 mean  $\pm$  SEM 的方式表示，\*表示與控制組相比具有顯著差異， $P < 0.05$ ；\*\* $< 0.01$ 。由以上結果得知在 RAW264.7 細胞中，當橘黴素(橘黴素)處理的濃度越高，LPS 所誘發的 iNO protein 生成量會有下降的趨勢

結果 4. 橘黴素抑制 LPS 所誘發的 iNOS mRNA 表現量



附圖四、將 RAW 264.7 細胞培養在 35 mm 盤中，培養 22 個小時後，在 RAW 264.7 細胞中，再加入溶劑或不同濃度之 LPS 及橘黴素(橘黴素)處理 24 個小時，接著以抽取出的 RNA 轉為 cDNA 並且使用辨識 iNOS 或是 GAPDH 的 primer 進行 PCR，GAPDH 的 DNA 量在此做為內部控制組。本圖以 LPS 為 1，並且和實驗組進行相對比較。收集三次獨立實驗數據經統計分析後以 mean ± SEM 的方式表示，\*表示與控制組相比具有顯著差異， $P < 0.05$ ；\*\* $< 0.01$ 。由以上結果得知在 RAW264.7 細胞中，當橘黴素處理的濃度越高，LPS 所誘發的 iNO mRNA 生成量會有下降的趨勢

## 5.橘黴素影響LPS所誘發的iNOS promoter活性

我們最後來探討橘黴素對於 iNOS 啟動子所驅動的下游基因表達是否會有明顯的抑制效果。先前的實驗中得知橘黴素能抑制 iNOS mRNA 表現量，所以我們進一步再往上游探討橘黴素對於 LPS 所誘發的 iNOS promoter 活性是否也有同樣的抑制效果，因為當有啟動子結合到正確的 promoter 啟動位上時，才能真正有效的啟動下游基因進行轉錄的動作，所以探討橘黴素影響 LPS 所誘發的 iNOS promoter 活性是個重要的目標。因此首先建構 iNOS promoter 序列及 luciferase 冷光報導者基因 (luciferase reporter gene) 的質體，並且將建構好的質體轉殖送入細胞中，在處理 1000 ng/ml LPS 的 RAW 264.7 細胞中，再加入溶劑或不同濃度之橘黴素一起處理 24 個小時後，萃取細胞內所有蛋白質進行轉錄活性的冷光強度分析，以冷光強度作為轉錄活性高低的參考值，目前仍再持續研究中。

## 討論 (Discussion)

Mycotoxin citrinin 橘黴素普遍存在於受黴菌污染的穀類製品中，包括玉米、小麥、大麥及米等(Chu, 1991)。目前橘黴素已被證實對人類和老鼠有嚴重的腎毒性和肝毒性。(Baggett and Berndt, 1984b; a) (Chagas et al., 1992)。此外，CT 腎臟細胞和纖維母細胞等細胞株在活體外的實驗中具有不同程度的細胞毒性，並且可導致腎臟腺腫瘤的生成，若針對雄性的 F334 大白鼠長期餵食低劑量的橘黴素，會導致 70% 以上的實驗鼠產生鼠類罕見的腎臟腫瘤。(Arai and Hibino, 1983)由以上結果顯示，橘黴素的毒性機制雖然仍不清楚，但已被證實橘黴素不只會造成細胞毒性，在基因層次上也具備相當的毒性。(Chang et al., 2009)

近年來，紅麴發酵的產品主要以調節血脂、預防心血管疾病的保健食品最引人注目，無論東方或西方國家都將紅麴發酵產品廣泛應用在食品工業中，但是在荷蘭的研究調查中發現，許多紅麴發酵產品的萃取物中可以檢驗到 0.2 至 17ppm 不等的橘黴素，所以紅麴保健食品中橘黴素的毒性以及含量亦為公共健康安全的隱憂之一。(Sabater-Vilar et al., 1999) 在台灣行政院衛生署食品藥物管理局規格標準中，定食品中橘黴素橘黴素限量為 2 ppm 以下。橘黴素的毒性機制雖然複雜，但是目前已有證據顯示橘黴素可能先藉由堆積在腎臟及肝臟中的粒線體內，進而影響粒線體的電子傳遞及干擾其他相關的正常功能。(Chagas et al., 1995) (Chagas et al., 1992)

而這毒素除了可以抑制蛋白合成、抑制細胞增生、引起細胞週期停滯及器官病變外，還會影響動物體的免疫功能及致癌性。因此，人類及牲畜如果長期攝取被黴菌毒素污染的食物或飼料的話，可能危害生命，所以，藉由了解黴菌毒素的致毒劑量及致毒機轉，將有助於我們對於食品及飼料進行進一步的安全評估，以期望維護公共食品安全及大眾健康。

文獻指出，暴露於橘黴素會抑制細胞激素 Interleukin-10，使 tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) 和 interleukin-6 (IL-6) 分泌過多，導致免疫反應的風險的增加 (Johannessen et al., 2009)(Johannessen et al., 2005)

因此，我們想要探討橘黴素影響動物體的免疫功能的部分，就以 LPS 刺激

RAW 264.7 細胞作為免疫防禦的模式。在免疫反應中，巨噬細胞一直扮演著重要的角色，當受到外來物（LPS）刺激時可以分泌出許多免疫前驅物質，例如本實驗中的研究對象 NO，一般正常狀況下，NO 為體內重要的訊息傳遞分子，而且可以幫助調控宿主的免疫防禦機制、神經訊息傳遞及脈管相關的功能(Korhonen et al., 2005) (Swindle and Metcalfe, 2007)，不過一旦 NO 過量表現時，反而就會造成人體的傷害並且導致許多免疫疾病。NO 為許多探討免疫機制研究中最常使用的指標之一，所以我們以 LPS 刺激老鼠的巨噬細胞 RAW 264.7，使細胞產生許多免疫前驅物質 NO，並且以此來得知橘黴素對細胞免疫部分的影響。

在不會造成 RAW 264.7 細胞毒性的橘黴素劑量範圍內，以橘黴素來研究橘黴素對發炎前驅物質 NO 生成的影響，因此以上結果可得知橘黴素的確能夠在不傷害細胞的前提下，達到抑制發炎前驅物質 NO 的生成。

LPS 誘發的 NO 生成主要是由於細胞內精氨酸被 iNOS 催化氧化成瓜氨酸的過程中產生的。我們以 24 個小時作為時間點，並且發現橘黴素能夠將 LPS 所誘發的 iNOS 蛋白量抑制（圖三）；在 iNOS mRNA 的表現量上面，我們以 iNOS 蛋白質表現的相同時間點來觀察橘黴素抑制 iNOS mRNA 的表現量，發現在橘黴素處理之下，LPS 所誘發的 iNOS mRNA 表現量被抑制了（圖四）。

既而我們再討論 iNOS 啟動子的部份，來探討橘黴素是否藉由抑制 iNOS promoter 來造成 iNOS 基因無法正常啟動轉錄成 iNOS mRNA，接著再影響下游的一連串反應機制。

## 未來研究方向 (Future work)

為了了解更深的層次，我們繼續探討 transcription level，transcription level 為細胞內 DNA 轉成 mRNA 的一個過程，這個過程需要轉錄因子結合至基因前端啟動子 (promoter) 進而驅動基因做出許多 mRNA，目前已知有許多轉錄因子可結合的序列在 iNOS 基因前端的啟動子上，如 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)，這轉錄因子跟 LPS 和細胞激素刺激並誘發的轉錄機制有關。

目前已有研究指出若把 NF- $\kappa$ B 結合區進行定點突變 (site-directed mutagenesis) 就能明顯地降低 iNOS 的表現，也有許多抑制免疫的物質透過抑制 NF- $\kappa$ B 結合至 iNOS 啟動子上的作用，來進行抑制 iNOS 表現及 NO 的生成 (Cheng et al., 2004) (Liu et al., 2006) (Oh et al., 2007)，主要是因為 LPS 會和細胞膜上的 Toll like receptor 4 (TLR4) 中的 LPS 結合蛋白結合，活化下游 I $\kappa$ B kinase，會促使 I $\kappa$ B 磷酸化，當 I $\kappa$ B 一旦磷酸化則會被蛋白酶體辨識而降解，此時 NF- $\kappa$ B 就會活化，接著結合到啟動子上，故可得知 NF- $\kappa$ B 在 iNOS 基因表現的調控機制中扮演舉足輕重的角色。

另外，常見的免疫基因除了 iNOS 基因外，還有 COX-2，COX-2 與 iNOS 相似之處在於 COX-2 也可經由 LPS 誘發而產生，iNOS 及 COX-2 兩種發炎基因共同的轉錄機制，是由轉錄因子 NF- $\kappa$ B 來調控下游發炎基因，產生大量發炎前驅物質 (Kotake et al., 1998; Kim et al., 2006) (Oh et al., 2007)，因此橘黴素很有可能透過抑制轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的活化來抑制 iNOS 及 COX-2 基因的作用，又或者是影響了其他相關的轉錄因子結合位，像是 Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) 及 Activating protein-1 (AP-1) 等等，因此本實驗專題希望能夠更完整的了解橘黴素對於發炎基因 iNOS 及 COX-2 的抑制機轉，以更明確得知及說明其中與免疫的相關反應機轉。

## 參考文獻

- Aktan, F., 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences* 75, 639-653.
- Arai, M., Hibino, T., 1983. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. *Cancer letters* 17, 281-287.
- Awuah, R.T., Kpodo, K.A., 1996. High incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxins in stored groundnut in Ghana and the use of a microbial assay to assess the inhibitory effects of plant extracts on aflatoxin synthesis. *Mycopathologia* 134, 109-114.
- Baggett, J.M., Berndt, W.O., 1984a. Interaction of potassium dichromate with the nephrotoxins, mercuric chloride and citrinin. *Toxicology* 33, 157-169.
- Baggett, J.M., Berndt, W.O., 1984b. Renal and hepatic glutathione concentrations in rats after treatment with hexachloro-1,3-butadiene and citrinin. *Archives of toxicology* 56, 46-49.
- Blantz, R.C., Munger, K., 2002. Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron* 90, 373-378.
- Chagas, G.M., Oliveira, B.M., Campello, A.P., Kluppel, M.L., 1992. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. II. Effect on respiration, enzyme activities, and membrane potential of liver mitochondria. *Cell biochemistry and function* 10, 209-216.
- Chagas, G.M., Oliveira, M.B., Campello, A.P., Kluppel, M.L., 1995. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. III. Effects on renal cortical and liver mitochondrial swelling. *Journal of applied toxicology* 15, 91-95.
- Chang, C.H., Yu, F.Y., Wang, L.T., Lin, Y.S., Liu, B.H., 2009. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. *Toxicology and applied pharmacology* 237, 281-287.
- Cheng, W.L., Lii, C.K., Chen, H.W., Lin, T.H., Liu, K.L., 2004. Contribution of conjugated linoleic acid to the suppression of inflammatory responses through the regulation of the NF-kappaB pathway. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 71-78.



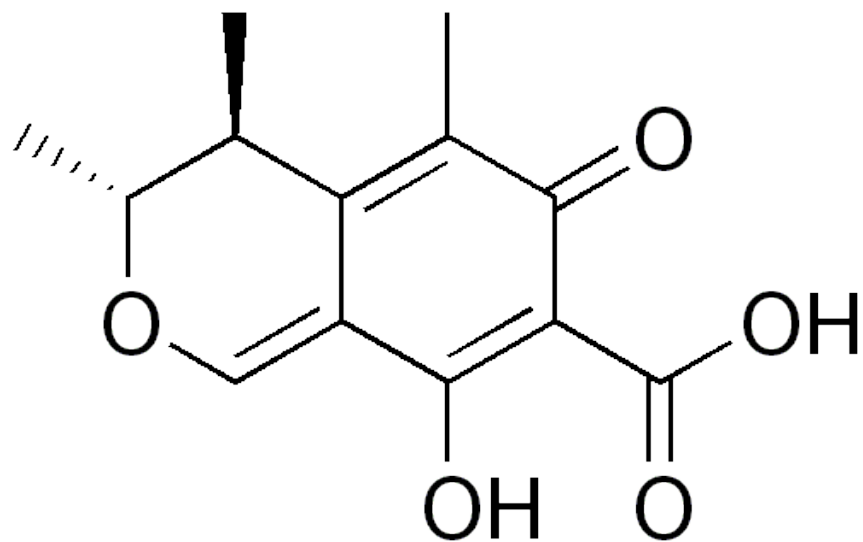
- Chu, F.S., 1991. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutation research* 259, 291-306.
- Garcia-Cardena, G., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J.E., Sessa, W.C., 1996. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 6448-6453.
- Geller, D.A., Billiar, T.R., 1998. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer metastasis reviews* 17, 7-23.
- Guha, M., Mackman, N., 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling* 13, 85-94.
- Johannessen, L., Lovik, M., Lydersen, S., Nilsen, A.M., 2009. Combined cell wall polysaccharide, mycotoxin and bacterial lipopolysaccharide exposure and inflammatory cytokine responses. *Apmis* 117, 507-517.
- Johannessen, L.N., Nilsen, A.M., Lovik, M., 2005. The mycotoxins citrinin and gliotoxin differentially affect production of the pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6, and the anti-inflammatory cytokine interleukin-10. *Clinical and experimental allergy* 35, 782-789.
- Kim, H.G., Shrestha, B., Lim, S.Y., Yoon, D.H., Chang, W.C., Shin, D.J., Han, S.K., Park, S.M., Park, J.H., Park, H.I., Sung, J.M., Jang, Y., Chung, N., Hwang, K.C., Kim, T.W., 2006. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF-kappaB through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *European journal of pharmacology* 545, 192-199.
- Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., Schwarz, P.M., 2004. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European journal of pharmacology* 500, 255-266.
- Kleinert, H., Schwarz, P.M., Forstermann, U., 2003. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biological chemistry* 384, 1343-1364.
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., Moilanen, E., 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current drug targets* 4, 471-479.

- Kotake, Y., Sang, H., Miyajima, T., Wallis, G.L., 1998. Inhibition of NF-kappaB, iNOS mRNA, COX2 mRNA, and COX catalytic activity by phenyl-N-tert-butyl nitro (PBN). *Biochimica et biophysica acta* 1448, 77-84.
- Laroux, F.S., Pavlick, K.P., Hines, I.N., Kawachi, S., Harada, H., Bharwani, S., Hoffman, J.M., Grisham, M.B., 2001. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta physiologica Scandinavica* 173, 113-118.
- Lin, A.W., Chang, C.C., McCormick, C.C., 1996. Molecular cloning and expression of an avian macrophage nitric-oxide synthase cDNA and the analysis of the genomic 5'-flanking region. *The Journal of biological chemistry* 271, 11911-11919.
- Liu, K.L., Chen, H.W., Wang, R.Y., Lei, Y.P., Sheen, L.Y., Lii, C.K., 2006. DATS reduces LPS-induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF-kappaB activation in RAW 264.7 macrophages. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 3472-3478.
- Nakane, M., Schmidt, H.H., Pollock, J.S., Forstermann, U., Murad, F., 1993. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS letters* 316, 175-180.
- Oh, P.S., Lee, S.J., Lim, K.T., 2007. Glycoprotein isolated from *Rhus verniciflua* Stokes inhibits inflammation-related protein and nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30, 111-116.
- Raetz, C.R., Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry* 71, 635-700.
- Sabater-Vilar, M., Maas, R.F., Fink-Gremmels, J., 1999. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *Mutation research* 444, 7-16.
- Stuehr, D.J., Marletta, M.A., 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 7738-7742.
- Swindle, E.J., Metcalfe, D.D., 2007. The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunological reviews* 217,

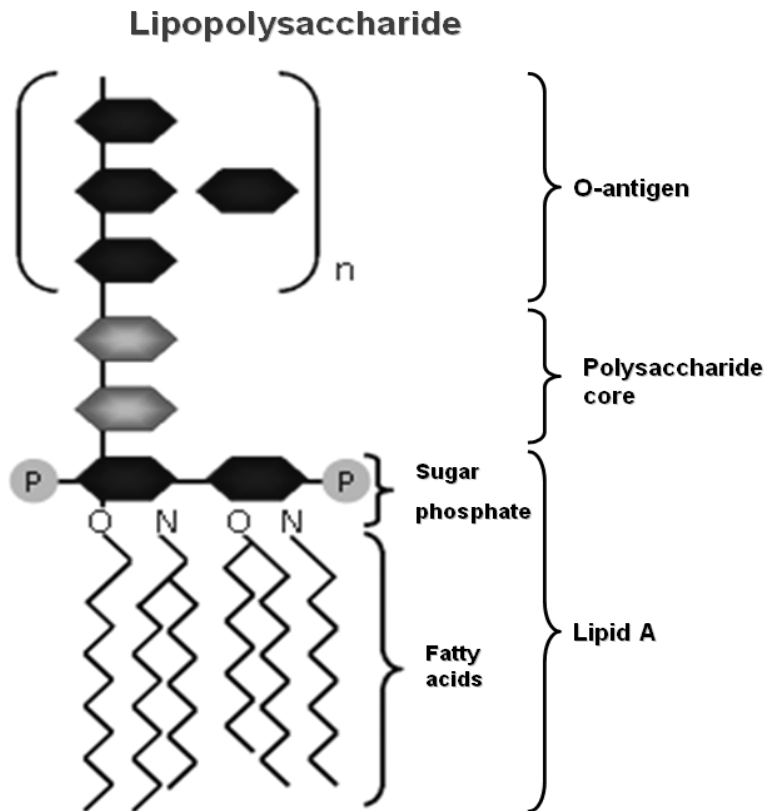
186-205.

Ulevitch, R.J., Tobias, P.S., 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annual review of immunology* 13, 437-457.

Xie, Q.W., Whisnant, R., Nathan, C., 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* 177, 1779-1784.

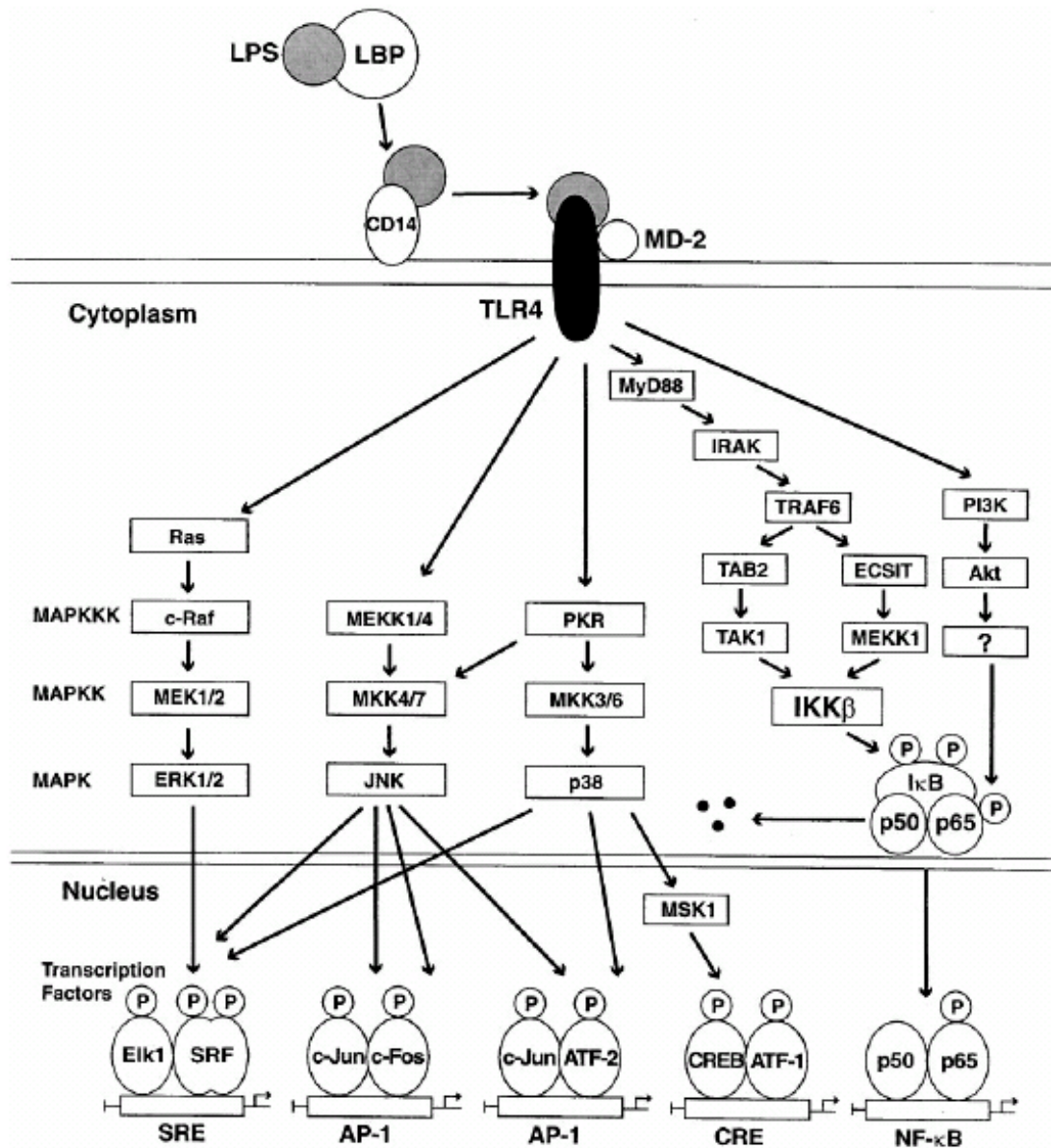


附圖一.橘黴素 (Citrinin, 橘黴素)的結構式

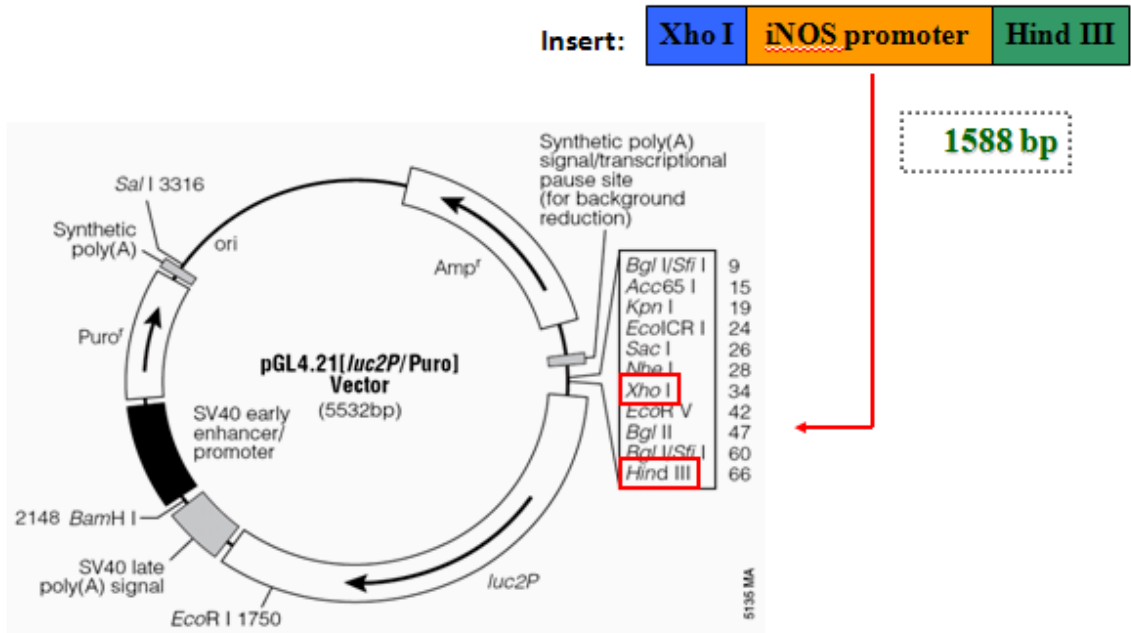


(<http://www.spectraldx.com/images/LPS.gif>)

附圖二、脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 的基本結構



附圖三、LPS 活化細胞內訊息傳遞路徑及相關轉錄因子(Guha and Mackman, 2001)



附圖四、由實驗室學長所建構的 iNOS 1588bp promoter 送入 pGL4.21 [luc2p/Puro] vector 中，其中包含冷光報導基因(Luciferase gene)。