

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

## 研究 TG2, RAP1GDS1 和 AHR 在發炎之角色

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：NSC 102-2314-B-040-015-  
執行期間：102年08月01日至103年07月31日  
執行單位：中山醫學大學微生物免疫研究所

計畫主持人：蔡嘉哲  
共同主持人：林嬪嬪  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：方毓翔

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 103 年 11 月 04 日

中文摘要：近年來研究第二型轉麩胺酶(Transglutaminase 2)與疾病的關係越來越密切，包括，在自體免疫疾病之角色，例如紅斑性狼瘡(SLE)和麩質過敏症(celiac disease)，癌症，如乳癌(Breast cancer)和前列腺癌(Prostate cancer)，血液凝聚 Factor XIII 疾病有關，神經性疾病，如 Huntington' s disease 和慢性腎炎。TG2 具有轉麩胺酶活性能聚合(cross-linking)蛋白質受質的穀胺醯胺(glytamine)和離胺酸(lysine)殘基，具有 G 蛋白的功能，也可與細胞外基質的 integrin 和 fibronectin 作用。過去我們研究結果顯示，TG2 會促進細胞凋亡，此機轉是透過一種 guanidine nucleotide exchange factor (RAP1GDS1 或 GDS1)之聚合而調節內質網和粒線體的鈣離子變化產生，而吞噬凋亡細胞產生之 Retinoid acid，會促使凋亡的胸腺細胞有 TG2 之表現。這些結果顯示 TG2 透過 GDS1，而使內質網鈣離子進入粒線體而產生凋亡，而 retinoid acid 也幫助吞噬凋亡細胞之功能，這些研究更讓我們了解 TG2 在自體免疫疾病致病機轉之角色，我們將再進一步研究 GDS1 蛋白在發炎之角色，並研究 TG2、GDS1 和細胞激素(cytokines)產生的關係。另外，多環芳香烴受器(Aryl Hydrocarbon Receptor, Ahr)已知與抽菸、類風濕性關節炎(Rheumatoid arthritis, RA)與肺癌之產生有關係，我們將進一步研究 Ahr 與 TG2 及 GDS1 在自體免疫疾病及特定關節炎如痛風或退化性關節炎等之關係。

中文關鍵詞：第二型轉麩胺酶；自體免疫疾病；細胞凋亡；多環芳香烴受器；痛風；退化性關節炎；類風濕性關節炎

英文摘要：Tissue or type 2 transglutaminase (TG2, EC 2.3.2.13) has been implicated in multiple disease states, including autoimmune disease (SLE, celiac disease); Cancers (Breast cancer and prostate cancer), neurodegenerated disease (Alzheimer' s disease,

Huntington' s disease) and Renal disease. It is a multifunctional enzyme belonging to the transglutaminase family. It catalyses Ca<sup>2+</sup> dependent reaction and results in the post-translational modification of proteins at the level of glutamine and lysine residues. It acts as a GTP-binding protein (G 脉 h) in transmembrane signaling and a cell surface adhesion mediator as well. Recently, we found TG2 might contribute to apoptosis by acting as a Ca<sup>2+</sup> sensor in the mitochondria to amplify ER-Derived Ca<sup>2+</sup> signal via cross-linking RAPIGDS1. We also found that Retinoids produced by macrophages engulfing apoptotic cells contribute to the appearance of TG2 in apoptotic thymocytes. These results indicated a more general role of TG2 in the regulation of Calcium homeostasis, efferocytosis and the pathogenesis in autoimmune diseases. We will further to study the role of TG2 and RAPIGDS1 in inflammation process and cytokine production. Since it has been reported that the association of Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) and pathogenesis of diseases, including Rheumatoid arthritis (RA) and lung cancer, we will investigate the relationship between Ahr, TG2 and RAPIGDS1 in autoimmune disease and other arthritis such as gout and osteoarthritis (OA).

英文關鍵詞： type 2 transglutaminase ; autoimmune disease ; Aryl hydrocarbon receptor ; Rheumatoid arthritis ; gout ; osteoarthritis

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  期末  
報告

研究 TG2, RAP1GDS1 和 AHR 在發炎之角色

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 103-2314-B-040-013

執行期間：2012 年 08 月 01 日至 2013 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學微生物免疫所

計畫主持人：蔡嘉哲

共同主持人：林嬪嬪

計畫參與人員：謝雨帆

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- 赴國外出差或研習心得報告
- 赴大陸地區出差或研習心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

中 華 民 國 104 年 10 月 10 日

## 中文摘要

本研究欲探討 TG2 在細胞凋亡與疾病致病機轉的相關性和重要性，TG2 參與吞噬凋亡細胞的作用機轉，以及細胞激素變化及機轉路徑。

在痛風病人的關節液及滑膜當中發現 TG2 表現量增加。MSU crystal 刺激 RAW 264.7 細胞株之後 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 和 TG2 之 mRNA 及蛋白產生皆增加。在 TG2 遭抑制之 TG2-siRNA RAW 264.7 細胞株及 TG2 KO MEF 細胞株中，IL-1 $\beta$  的 mRNA 和細胞激素表現量提高且 TGF- $\beta$ 1 的 mRNA 和細胞激素表現量降低。說明 TG2 參與 TGF- $\beta$ 1 之分泌。相反地，在 TG2 o/e RAW 264.7 細胞株中，MSU crystal 所誘發之 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  之 mRNA 表現量會較野生型 RAW 264.7 細胞株減少；而 TGF- $\beta$ 1 的 mRNA 表現會提高。而 TG2 在 MSU crystal 誘發發炎之訊號路徑上，結果顯示 TG2 過度表達降低 JAK2 之磷酸化，而透過小干擾 RNA 抑制 TG2 結果剛好相反。最後，在 TG2 之轉錄因子 MTA1 以小干擾 RNA 抑制時，細胞激素 IL-1 $\beta$  與 TNF- $\alpha$  表現量提高且 TGF- $\beta$ 1 的表現量降低。以外加合成之 TG2 蛋白則可扭轉小干擾 RNA 抑制 MTA1 此一結果。

在研究 TG2 參與細胞凋亡機制之探討方面，我們利用人類急性淋巴瘤細胞株 (Jurkat cell) 轉染野生型和突變型 TG2 質體，建立穩定的條件式表達系統 (Tet-on system) 細胞株，其中，突變型是不具有轉麩胺酶活性的 TG2。細胞凋亡過程中，TG2 如何調控粒線體參與死亡的機制及與鈣離子之間的關係仍不清楚，因此，我們的研究在於了解 TG2 的功能是如何參與 T 細胞的凋亡以及與參與凋亡過程的分子之間的關係。

在研究 TG2 參與吞噬凋亡細胞方面，我們以分子生物技術構築全長之 TG2 之 DNA，轉染老鼠巨噬細胞株 (RAW264.7) 表達系統，穩定表達全長 TG2 蛋白質，並藉由加入 mifepristone 誘導調節蛋白質的表現，觀察 TG2 是否增進或是抑制吞噬能力。初步結果證實，大量表達 TG2 的巨噬細胞能促進吞噬凋亡細胞。細胞激素的變化方面，加入的凋亡細胞會促進 IL-10、TGF-、SOCS3、TNF 及 IL-1 的分泌，而大量表達的 TG2/RAW 264.7 與加入的凋亡細胞反應後，其結果產生 IL-10、TGF-、SOCS3 及 IL-6 的分泌降低，實驗尚待進一步的分析確認證實。TG2 分子於 RAW264.7 的分佈位置，經由免疫螢光分析法觀察到人類之 TG2 主要位於細胞核膜及細胞質。當將凋亡細胞與經 mifepristone 誘導產生大量 TG2 的 RAW 264.7 的細胞株共同培養時，以免疫螢光分析結果發現，TG2/RAW 264.7 的細胞株之 TG2 會由細胞質移動至細胞外及細胞膜。未來我們將進一步去分析，吞噬時與 TG2 分子作用的相關性的蛋白質。

關鍵詞 第二型轉麩胺酶、自體免疫疾病、細胞凋亡、吞噬作用

## 英文摘要

Type 2 transglutaminase (TG2) is a multifunctional protein, which catalyzes  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein modifications, acts as a G protein in transmembrane signaling and as a cell surface adhesion mediator. Tg2 has been proven to colocalize with mitochondria and involves apoptosis, but how it affects  $\text{Ca}^{2+}$  in mitochondria during apoptosis is unknown. The purpose of the study was to investigate the role of TG2 in apoptosis of T cell and macrophage of efferocytosis.

TG2 expression was up-regulated in the synovium tissue and SFMCs from patient with GA. The level of IL-1, TNF-, TGF-1 and TG2 were consistently increased in MSU crystals-stimulated RAW 264.7 cells. The absence of TG2 resulted in increased IL-1 and TNF- but reduced TGF-1 production in MSU crystal-stimulated RAW264.7 and TG2 null MEF cells. TG2 is needed for the production of TGF-1. On the contrary, TG2 overexpression dramatically suppressed IL-1 and TNF- but significantly enhanced TGF-1. Meanwhile, MSU crystals induced phosphorylation of JAK2 was decreased in TG2 overexpression cells and TG2 knockout caused overactivation of JAK2. While studying the impact of MTA1 status on MSU crystal-induced inflammation, we found that si-MTA1 impairs the basal as well as the MSU crystal-induced expression of TG2 and TGF-1 but increased IL-1 and TNF-. In contrast, recombinant TG2 reversed the effect of MTA1 knockdown on MSU crystal-induced inflammation.

Jurkat cells were transfected with human wild type TG2 (wtTG2) and mutant TG2 (TG2C277S), which is the cross-linking mutant by replacement of catalytic Cys<sup>277</sup> by Ser in a doxycycline (Dox) inducible Tet-on system (JK-Tet-On cells). These data revealed that both overexpression of wtTG2 and mutant TG2 in Jurkat cells could induced T cell apoptosis. Because overexpression of wtTG2 induced more cell death than that of mutant TG2, the transamidation activity of TG2 may play a role in TG2-induced apoptosis. Overexpression of TG2 colocalizes with mitochondria and induces apoptosis with mitochondrial calcium accumulation.

To research macrophage engulfing apoptotic cells, we construct full length human TG2 DNA which was transfect into RAW264.7 to expression. This system can stable expressed TG2 protein with mifepristone. We don't know whether TG2 can enhance or inhibit capacity of phagocytosis. In previous data, overexpression of TG2

can facilitate apoptotic cells engulfment. In cytokine analysis, macrophage after the ingestion of apoptotic cells can release IL-1、IL-6、IL-10、SOCS3 and TNF-secretion. When TG2/RAW264.7 were pretreated with apoptotic cells, the cytokines which involved TGF-、SOCS3 were decreased. To localization of TG2, TG2 is localized predominantly in the cytoplasm by immunology fluorescence assay. Apoptotic cells were added into overexpression of TG2 which migrated from cytosol into extracellular site.

**Key word: Type II transglutaminase, autoimmune disease, apoptosis and phagocytosis**

## (一) 前言

細胞凋亡是一種細胞內驅動自殺的方式,是一種生命的基本現象(1),在發育過程中調控生物體器官形成過程,能維持免疫的耐受性,當細胞受到感染、DNA 發生突變或損傷時,細胞凋亡能調控組織更新、清除無用、衰老或病變的細胞,能維持生物體內細胞數目的恆定,控制細胞生長與死亡之間的平衡,因此是一個非常重要的生理現象(2)。倘若此機制出現問題時,會造成疾病的發生。受損的細胞無法進行凋亡,產生不正常的修復或突變,會導致細胞癌化形成腫瘤;當人類免疫系統發生教育錯誤,無法辨識自我或非自我的細胞存活,或者死亡的細胞未能及時被清除,將會導致自體免疫疾病(3)。

## (二) 研究目的

本研究目的主要在說明 TG2 在細胞凋亡與疾病致病機轉的相關性和重要性, TG2 參與吞噬凋亡細胞的作用機轉, 以及細胞激素變化及機轉路徑。

## (三) 文獻探討

### 第二型轉麩胺酶

文獻報導指出, 第二型轉麩胺酶為轉麩胺酶家族中的一員, 分子量約為 80 kDa 左右, 廣泛地分布於生物體內的各個組織(4)。TG2 主要分布於細胞質中, 部分 TG2 分布於細胞核或細胞膜上, 或是透過尚未清楚的機制分泌到細胞外。TG2 是一個具多重功能的酵素(5), 參與多項細胞的重要功能, 如細胞分化、細胞凋亡(6)、細胞移動、發炎反應、傷口癒合及吞噬能力等等(7)。

### 第二型轉麩胺酶與細胞凋亡

TG2 被認為是參與細胞凋亡過程和凋亡小體形成的潛在因子(8), 在細胞凋亡的過程中會大量誘導 TG2 蛋白質和酵素活性的表現(5, 9)。在誘導肝臟(liver)或是胸腺(thymus)產生細胞凋亡的過程中被發現會大量誘導活化 TG2 蛋白質和酵素活性產生, 進而形成高度聚合的蛋白質聚合體(cross-linked protein polymers)(10, 11)。在 MRL $lpr/lpr$  老鼠(一種紅斑性狼瘡的動物模式)的淋巴組織堆積了大量不具有酵素活性的 TG2 蛋白質, 可能與調控凋亡機制失常而導致自體免疫疾病產生有關(12-14)。在 TG2 $^{-/-}$ 基因剔除(knock out)老鼠的研究中, 誘導 TG2 $^{-/-}$ 老鼠的胸腺或肝臟產生細胞凋亡後, 這些凋亡細胞被清除的速度有減緩的

情形，同時伴隨著肝臟產生嚴重的發炎反應；而以正常巨噬細胞吞噬凋亡 TG2<sup>-/-</sup>紅血球的速度也比清除正常凋亡紅血球來的緩慢(15)。這些結果皆說明 TG2 在細胞凋亡與疾病致病機轉的相關性和重要性。

#### 第二型轉麩胺酶與吞噬作用

吞噬作用(phagocytosis)在正常人體內是一種抵抗外來病原菌的防衛機制，同時也是一種維持體內細胞恆定的機制，巨噬細胞(macrophage)在清除凋亡小體的過程扮演重要的角色(14)，在吞噬過程中，除了要在細胞活化的狀態下，同時，還需要接受體(receptor)和 Ligand 之間的辨識，啟動下游的訊息傳遞進而進行吞噬作用(16-19)，進而釋放出抗發炎的細胞激素，例如 IL-10、TGF- $\beta$  和 PGE<sub>2</sub>，以抑制發炎反應產生，還有其他 pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ 、GM-CSF、IL-12、IL-1 及 IL-18 的抑制作用參與其中(17)，其中，TGF- $\beta$  在整個吞噬過程中，由活化的巨噬細胞中釋出，並可能與 TG2 的調控相關，影響吞噬作用(15)。在 TG2 缺陷的小鼠模式中發現，會有自體抗體的產生和腎絲球腎炎這些類似 SLE 的症狀，同時，伴隨有 TGF- $\beta$  和吞噬能力低下的現象(15)；而 TG2 也參與 monocyte 分化為 macrophage 的過程，macrophage 表面的 TG2 與其 adhesion 和 migration 有關(20, 21)。

#### (四) 研究方法

藉由基因重組技術，構築全長 cDNA 之 TG2 分別於 Tetracyclin inducible gene expression system (簡稱 Tet system)和 GeneSwitch (Invitrogene)的表達系統，於 T 細胞和巨噬細胞中大量表達 TG2 蛋白質。進而探討 TG2 分子在 T 細胞凋亡過程的機制以及在吞噬細胞清除行為中所扮演的角色、對吞噬能力的影響、細胞激素的變化影響、有哪些相關性的蛋白質參與作用，藉以進一步探討與自體免疫疾病是否有相關。

#### (五) 結果與討論

確立在痛風病患中 Transglutaminase 2 (TG2)之表現

首先檢測因痛風發炎所浸潤之關節滑膜腔液單核球(SFMCs)中 TG2 之表現。在痛風病患之 SFMCs 中可以利用反轉錄聚合酶反應(RT-PCR)偵測到 TG2 mRNA 之大量表現；而在類風濕性關節炎(Rheumatoid arthritis, RA)與正常之周邊血單核球(Peripheral blood mononuclear cell, PBMCs)則無檢測到 TG2 mRNA 之表現(圖一)。另外利用免疫組織化學分析偵測在痛風病患與退化性關節炎(osteoarthritis, OA)病患之滑膜組織中 TG2 的表現，所偵測到的 TG2 皆出現

在成骨細胞。在痛風病患之滑膜組織所偵測到之 TG2 表現較強；而退化性關節炎中 TG2 表現較痛風之滑膜組織較弱，而在健康的人體取出之鼻軟骨組織並無 TG2 表現（圖二）。以上實驗說明了痛風病患會有顯著的 TG2 蛋白之表現。另外，我們也分別使用一般正常人身上取出之 PBMCs 與在體外生成和激活的人類單核細胞源性巨噬細胞（monocyte-derived macrophage, MDMs），分別以 MSU crystal 刺激後已 RT-PCR 分析其 TG2 mRNA 表現，結果顯示 TG2 mRNA 可在體外被 MSU crystal 所誘發並增加（圖三）。

#### 單鈉尿酸結晶 (MSU crystal) 對細胞激素之影響

在痛風發作時，MSU crystal 所引起之發炎反應中會刺激免疫細胞產生促發炎細胞激素及抗發炎細胞激素。在此發炎過程中免疫細胞，如：巨噬細胞在吞噬 MSU crystal 後會透過 NLRP3 inflammasome，接著切割 caspase-1，促使發炎激素 IL-1 $\beta$  釋放到細胞外而連帶使其他細胞激素產生，如 TNF- $\alpha$  等而引起發炎反應及腫脹等現象；另外也會引起嗜中性白血球的浸潤。在先前的文獻指出，在 MSU crystal 所引起的發炎反應中，TG2 會正向調控凋亡細胞的清除，致使巨噬細胞產生抗發炎性細胞激素以減緩發炎。基於上述原因，我們選擇老鼠巨噬細胞株 RAW264.7 cells 確認 MSU crystal 對於細胞株之 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  與 TG2 之 mRNA 表現量是否有影響。首先使用 RAW264.7 cells 加入不同劑量之 MSU crystal 刺激四小時後蒐集細胞之 total RNA 利用 RT-PCR 來分析 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  與 TG2 之 mRNA 變化之情形（圖四）。我們發現無論是 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  與 TG2 之 mRNA 都會受到 MSU crystal 刺激而上升，並且有 dose-dependent 的趨勢。另外 MSU crystal 刺激 RAW264.7 cells 予指定的時間後，蒐集細胞溶胞液以西方墨點法分析 TG2 蛋白之表現量（圖五），在 MSU crystal 刺激之後，TG2 蛋白質表現量也會上升，並且有劑量依存性與時間依存性的趨勢；MSU crystal 刺激 12 至 48 小時後蒐集細胞培養上清液以分析 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  與 TGF- $\beta$ 1 細胞分泌變化量（圖五），在 MSU crystal 刺激後，IL-1 $\beta$  和 TGF- $\beta$  的分泌量在 MSU crystal 刺激後會上升，IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白分泌量在 36 小時到達高峰，而 TGF- $\beta$  在 12 小時分泌量已達到最高。

#### 確立 TG2 對於痛風發炎之影響

在先前之文獻指出，在 MSU crystal 所引起的發炎反應中，TG2 會影響凋亡細胞的清除 [25]。我們接著確認，在此發炎中，TG2 是否會參與調控細胞激素的表現。首先利用 MSU crystal 刺激 TG2 o/e RAW264.7 cells 與 empty vector RAW264.7 cells 來比較 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  與 TG2 之 mRNA 表現量是否有變化。首先將 TG2-siRNA 轉染至 RAW264.7 四十八小時，接著用 MSU crystal 刺激 TG2-siRNA RAW264.7 四小時之後蒐集細胞之 RNA 以分析 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  與 TGF- $\beta$ 1 之 mRNA 變化量。結果顯示，在 TG2-siRNA RAW264.7 中，IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  之 mRNA 表現量上升而 TGF- $\beta$ 1 其 mRNA 表現量下降（圖六）。而在蛋白質轉譯生成

方面，小干擾 RNA 條控之 TG2 表達降低連帶使 TGF- $\beta$ 1 分泌下降，但發炎性細胞激素 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  卻上升(圖七)。相反地，MSU crystal 刺激 TG2 o/e 之 RAW264.7 cells 與控制組 RAW264.7 cells 四小時後蒐集細胞之 RNA 利用 RT-PCR 來分析 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  與 TGF- $\beta$  之 mRNA 變化量。結果發現，在 TG2 o/e RAW264.7 cells 中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  之 mRNA 表現量較控制組 RAW264.7 cells 下降；而 TGF- $\beta$  之 mRNA 表現量較控制組 RAW264.7 cells 上升(圖八)。在蛋白質轉譯生成方面，TG2 表達系統造成之 TG2 表現上升連帶使 TGF- $\beta$ 1 分泌提高，但發炎性細胞激素 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  卻降梯(圖九)。

最後利用 TG2 缺失之 TG2 KO MEF cells 來觀察 IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  與 TG2 之 mRNA 表現量是否有改變。利用不同劑量 MSU crystal 刺激 WT MEF cells 與 TG2 KO-MEF cells 四小時後蒐集細胞之 RNA 利用 RT-PCR 來分析 IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  與 TG2 之 mRNA 變化量以及使用 ELISA 觀測 IL-1 $\beta$  與 TGF- $\beta$  之激素轉譯層級在 MSU crystal 處理由 0-48 小時之差異(圖十)；實驗結果顯示，在 TG2 缺失的細胞中，IL-1 $\beta$  之 mRNA 表現量或蛋白表現量都比正常表現 TG2 之細胞要高；而 TGF- $\beta$  之 mRNA 表現量或蛋白表現量都比 WT MEF cells 降低會受到 MSU crystal 刺激而上升。由上述實驗結果得知，TG2 可緩解由 MSU crystal 所引起之發炎反應，其機制可能為 TG2 正向調控的 TGF- $\beta$  可透過其抑制發炎性細胞激素 IL-1 $\beta$  以達到減緩發炎之結果。

### TG2 於巨噬細胞中的角色

GeneSwitch 系統是藉由加入 mifepristone 誘導真核細胞表現蛋白質的系統，其含有調節的載體及誘導表達載體所組成，我們將全長 TG2 的 cDNA 構築於誘導表現的載體，將調節載體及誘導表現載體一同轉入於 RAW264.7 的細胞株，經由雙抗生素(zeocin, hygromycin B)篩選穩定轉染的細胞株(stable cell lines)，已獲得的穩定細胞株，經由不同濃度的 mifepristone (10<sup>-7</sup>–10<sup>-10</sup>M)測試誘導 TG2 蛋白質的表達，不同濃度的 mifepristone 皆可誘導 TG2 的表達，除了較高濃度的 mifepristone (10<sup>-7</sup> M)<sup>2</sup> 對細胞有毒性影響。固定的濃度下，於不同時間點測試 TG2 蛋白質的表達，隨著時間點的增加(0 hr–5 days)，TG2 蛋白質表達量增加，相較於控制組並未偵測到人類的 TG2 蛋白質，經由西方墨點法分析確認。更進一步想去確認 TG2 分子於 RAW264.7 的分佈位置及表達，經由免疫螢光分析法確認人類之 TG2 主要位於細胞核膜及細胞質。分析經誘導大量表達的 TG2 是否會促進巨噬細胞的吞噬能力，培養人類角質細胞(HaCaT)經 UV 的照射處理，為置備凋亡細胞來源，將凋亡細胞加入經 mifepristone 誘導產生大量 TG2 的 RAW 264.7 的細胞株，以免疫螢光分析，TG2/RAW 264.7 的細胞株之 TG2 會由細胞質移動至細胞外及細胞膜。經不同的時間點分析吞噬能力，TG2 / RAW 264.7 經 1 hr-2 hrs-4 hrs-6 hrs 反應其結果為 21%-24%-52%-47%，相較於控制組載

體為 6%-12%-22%-25%，而未轉染的對照組為 3%-7%-22%-14%，初步的結果證實，大量表達的 TG2 能促進巨噬細胞的吞噬能力，實驗還須進一步證實吞噬能力的影響。

分析在大量表達 TG2 蛋白質的巨噬細胞吞噬凋亡細胞之細胞激素的變化，經收集四小時反應後的細胞，萃取 total RNA 及 RT-PCR 的進行，初步結果分析得知，加入的凋亡細胞會促進 IL-10、TGF- $\beta$ 、SOCS3、TNF $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  的分泌，而大量表達的 TG2/RAW 264.7 與加入的凋亡細胞反應後，其結果產生 IL-10、TGF- $\beta$ 、SOCS3 及 IL-6 的分泌降低，實驗尚待進一步的分析確認證實，以及增加不同時間點的確證分析，以確認 TG2 分子所參與的角色，導致細胞激素分泌的增加或降低的機轉路徑。

文獻報導指出，TG2 分子能增進吞噬能力，吞噬能力的增強是否 TG2 的多重功能中之其中的促進粘連的作用加強。因此，進而想更得知是否牽涉蛋白質與蛋白質間的作用影響，連結巨噬細胞與凋亡細胞作用。在 TG2 的全長分子中的四個 Domain 中，其中某個 Domain 是否主要負責與蛋白質連結，吞噬能力的增強是否其他的相關性蛋白質的表現也增加，後續的實驗分析還須進一步的研究釐清。

### TG2 於 T 細胞中的角色

大量誘導 TG2 會造成細胞產生凋亡的情形 (圖六)，其中，野生型的 TG2 細胞株的死亡情形比不具轉麩胺酶活性的突變型細胞株嚴重 (圖七)。細胞凋亡是經由粒線體引發細胞凋亡路徑，伴隨著產生粒線體膜電位下降的現象 (圖八)。此外，我們發現 TG2 會轉位至粒線體，同時伴隨著大量粒線體鈣離子堆積 (圖九)。

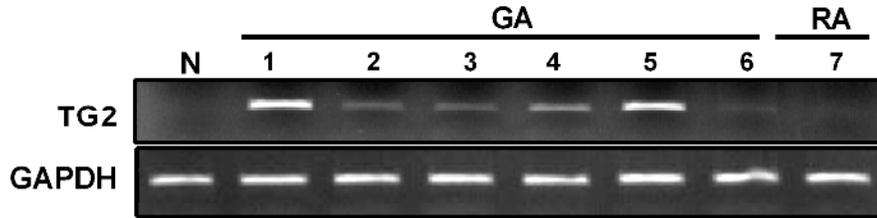
在我們的研究中發現，無論過度表現野生型或不具蛋白聚合活性的突變型 TG2 皆會造成 T 細胞的凋亡現象，特別是野生型的 TG2 的死亡比率比突變型嚴重，由於轉麩胺酶活性是兩株細胞之間的差異，因此，我們認為轉麩胺酶活性參與了部分過度表現 TG2 所造成的細胞凋亡現象。由我們的實驗中顯示了轉麩胺酶活性能參與細胞凋亡的過程，可能與調控鈣離子累積於粒線體有關，我們推測粒線體鈣離子的大量堆積可能與野生型 TG2 粒線體的轉麩胺酶活性上升有關，進一步的造成野生型和突變型 TG2 細胞株死亡有所差異。

### (六) 參考文獻

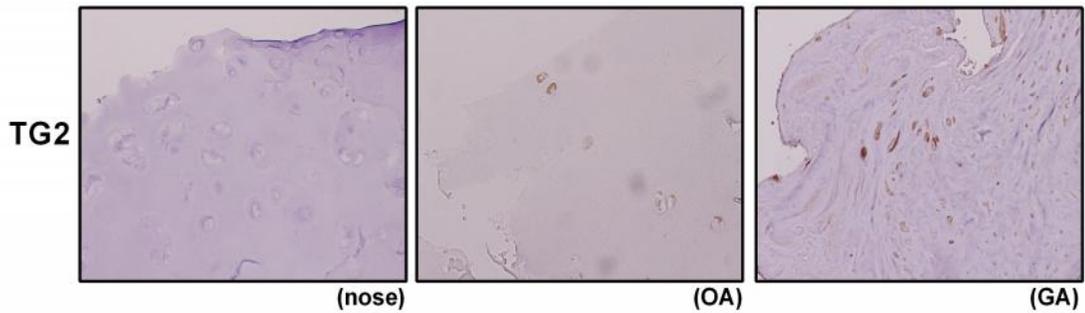
1. Fesus, L., P. J. Davies, and M. Piacentini. 1991. *Eur J Cell Biol* 56:170-177.
2. Williams, G. T. 1991. *Cell* 65:1097-1098.
3. Bursch, W., F. Oberhammer, and R. Schulte-Hermann. 1992. *Trends Pharmacol*

- Sci* 13:245-251.
4. Folk, J. E. 1980. *Annu Rev Biochem* 49:517-531.
  5. Melino, G., and M. Piacentini. 1998. *FEBS letters* 430:59-63.
  6. Autuori, F., M. G. Farrace, S. Oliverio, L. Piredda, and M. Piacentini. 1998. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 62:129-136.
  7. Fesus, L., and M. Piacentini. 2002. *Trends Biochem Sci* 27:534-539.
  8. Fesus, L., and Z. Szondy. 2005. *FEBS letters* 579:3297-3302.
  9. Szegezdi, E., Z. Szondy, L. Nagy, Z. Nemes, R. R. Friis, P. J. Davies, and L. Fesus. 2000.. *Cell Death Differ* 7:1225-1233.
  10. Piacentini, M., F. Autuori, L. Dini, M. G. Farrace, L. Ghibelli, L. Piredda, and L. Fesus. 1991. *Cell Tissue Res* 263:227-235.
  11. Szondy, Z., P. Molnar, Z. Nemes, M. Boyiadzis, N. Kedei, R. Toth, and L. Fesus. 1997. *FEBS letters* 404:307-313.
  12. Piredda, L., A. Amendola, V. Colizzi, P. J. Davies, M. G. Farrace, M. Fraziano, V. Gentile, I. Uray, M. Piacentini, and L. Fesus. 1997. *Cell Death Differ* 4:463-472.
  13. White, S., and A. Rosen. 2003. *Curr Opin Rheumatol* 15:557-562.
  14. Tanaka, M., and Y. Miyake. 2007. *Curr Med Chem* 14:2892-2897.
  15. Szondy, Z., Z. Sarang, P. Molnar, T. Nemeth, M. Piacentini, P. G. Mastroberardino, L. Falasca, D. Aeschlimann, J. Kovacs, I. Kiss, E. Szegezdi, G. Lakos, E. Rajnavolgyi, P. J. Birckbichler, G. Melino, and L. Fesus. 2003.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7812-7817.
  16. Herrmann, M., R. E. Voll, O. M. Zoller, M. Hagenhofer, B. B. Ponner, and J. R. Kalden. 1998. *Arthritis Rheum* 41:1241-1250.
  17. Utz, P. J., T. J. Gensler, and P. Anderson. 2000. *Arthritis Res* 2:101-114.
  18. Liu, C. C., J. S. Navratil, J. M. Sabatine, and J. M. Ahearn. 2004. *Curr Dir Autoimmun* 7:49-86.
  19. Mevorach, D. 2003. *Clin Rev Allergy Immunol* 25:49-60.
  20. De Vivo, G., A. Martin, T. Trotta, and V. Gentile. 2008. *Inflamm Allergy Drug Targets* 7:24-29.
  21. Lorand, L., and R. M. Graham. 2003. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:140-156.

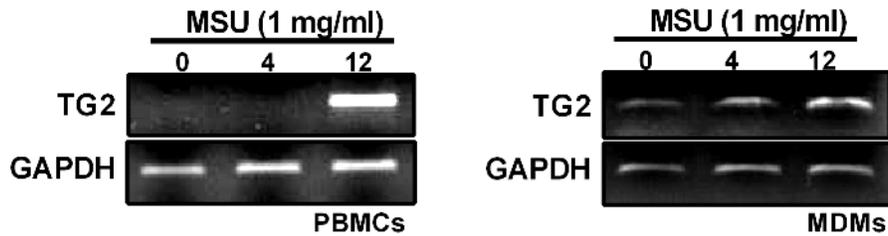
(七) 圖



圖一、TG2 mRNA 在痛風病患之滑膜腔液單核球 (Synovial fluid mononuclear cells ; SFMCs) 中明顯增加。分離出痛風或類風濕性關節炎病患之滑膜腔液單核球與正常人周邊血單核球 (peripheral blood mononuclear cells ; PBMCs) 後，利用 RT-PCR 分析不同檢體中 TG2 mRNA 之表現量。N: 正常人周邊血單核球 GA: 痛風病患之滑膜腔液單核球 RA: 類風濕性關節炎病患之滑膜腔液單核球

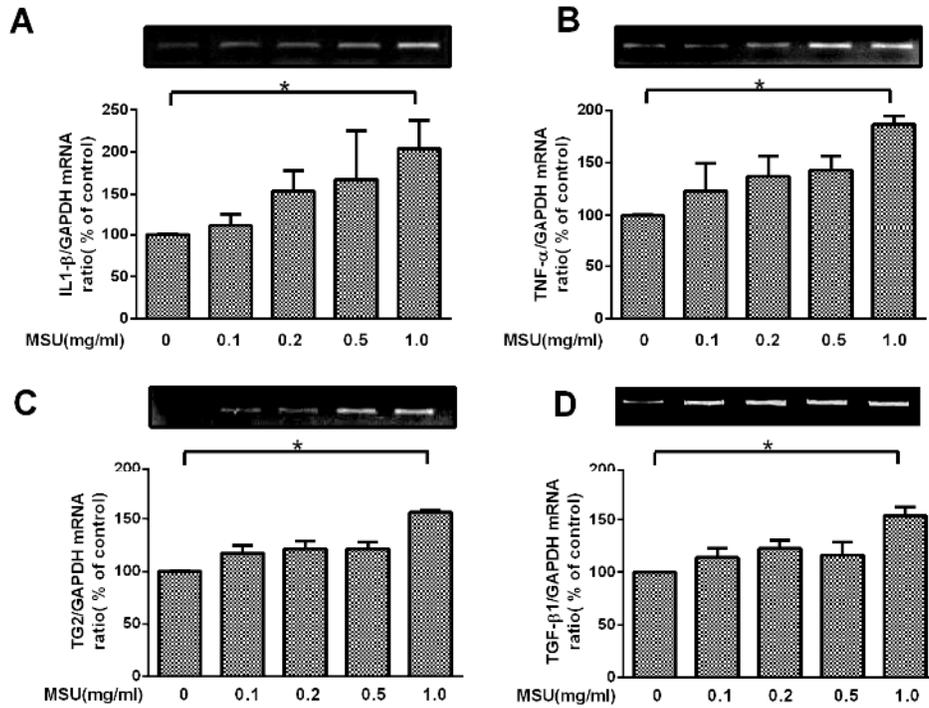


圖二、TG2 在痛風病人之滑膜組織 (synovial tissue ; ST) 中大量增加。利用 immunohistochemistry 偵測 TG2 蛋白在痛風病患與退化性關節炎滑膜組織 (synovial tissue ; ST) 與正常人之鼻軟骨 (nose cartilage) 中的表現。

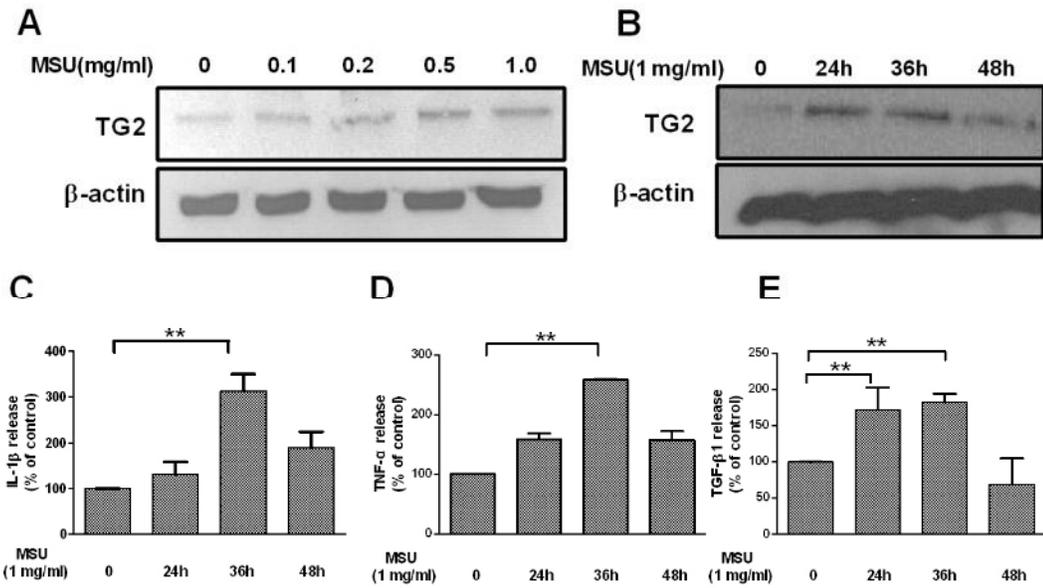


圖三、MSU crystal 在體外誘發 TG2 mRNA 表現。正常人周邊血單核球 (PBMCs) 與人類單核細胞源性巨噬細胞 (MDMs) 由 MSU crystal 1.0 mg/ml 處理 0-12 小

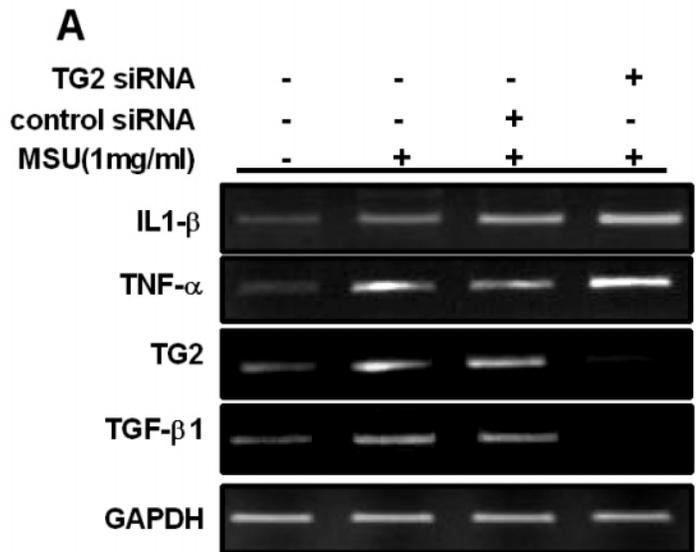
時，以 RT-PCR 分析不同檢體中 TG2 mRNA 之表現量。

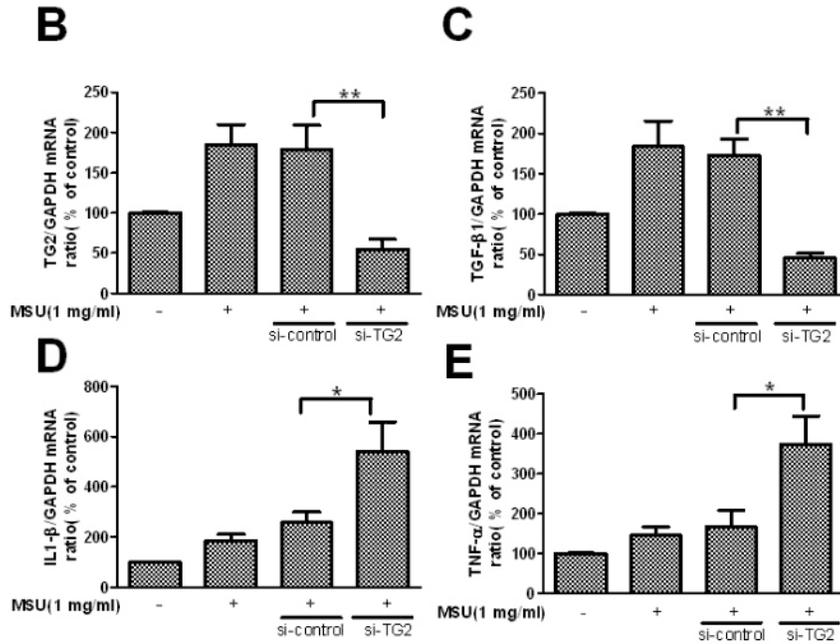


圖四、MSU crystal 刺激可增加細胞產生發炎相關細胞激素與 TG2 之 mRNA 表現。加入 MSU crystal (0.1-1.0mg/ml)刺激 RAW264.7 細胞 4 小時後，利用 RT-PCR 分析 IL-1 (A)，TNF- (B)、TG2 (C)與 TGF- 1 (D)之 mRNA 表現量。圖中數據為三重複以上之實驗結果以平均值 $\pm$ SEM 表示。\*號代表實驗組與控制組經比較後有統計上之意義 (\*,  $p < 0.05$ )。

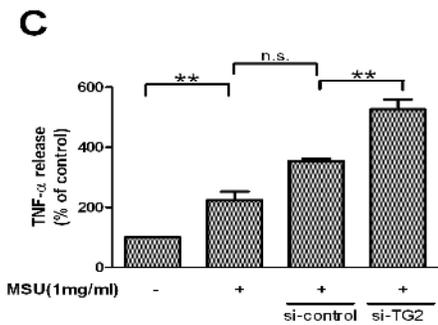
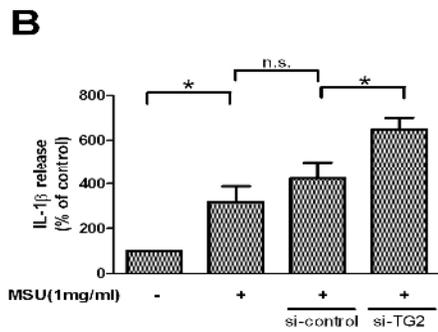
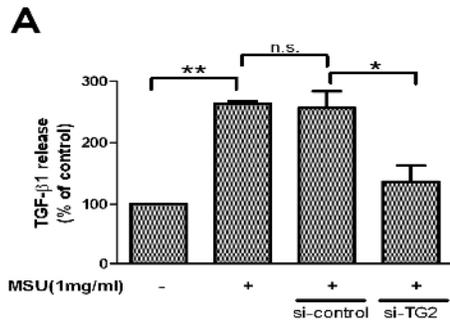


圖五、MSU crystal 刺激可增加細胞產生 TG2 之蛋白表現與細胞激素生成。(A) 加入 MSU crystal (0.1-1.0mg/ml)刺激 RAW264.7 細胞 24 小時後，利用西方墨點法分析 RAW264.7 細胞產生 TG2 之蛋白表現量。(B) MSU crystal (1.0mg/ml)刺激 RAW264.7 細胞於不同時間點後以西方墨點法分析 RAW264.7 細胞產生 TG2 之蛋白表現量以及使用酵素免疫分析法觀察 IL-1 (C)、TNF- (D)與 TGF- 1 (E) 之分泌情形。圖中數據為三重複以上之實驗結果以平均值±SEM 表示。\*號代表實驗組與控制組經比較後有統計上之意義 (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ )。

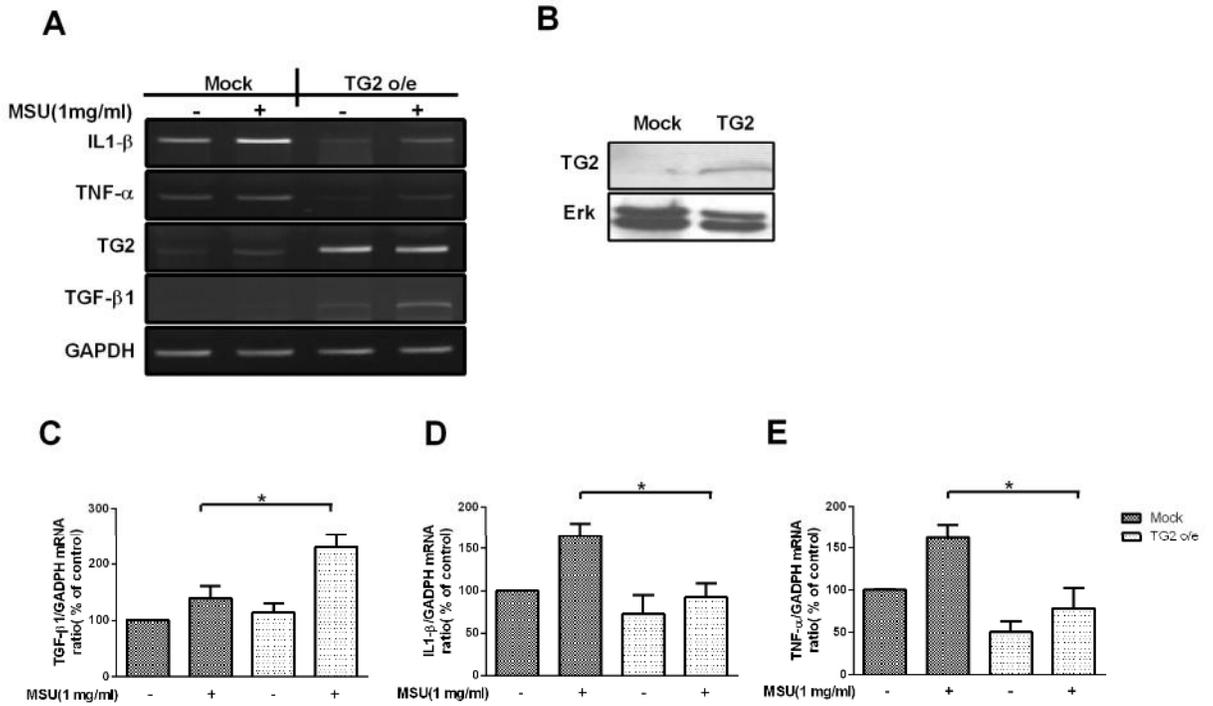




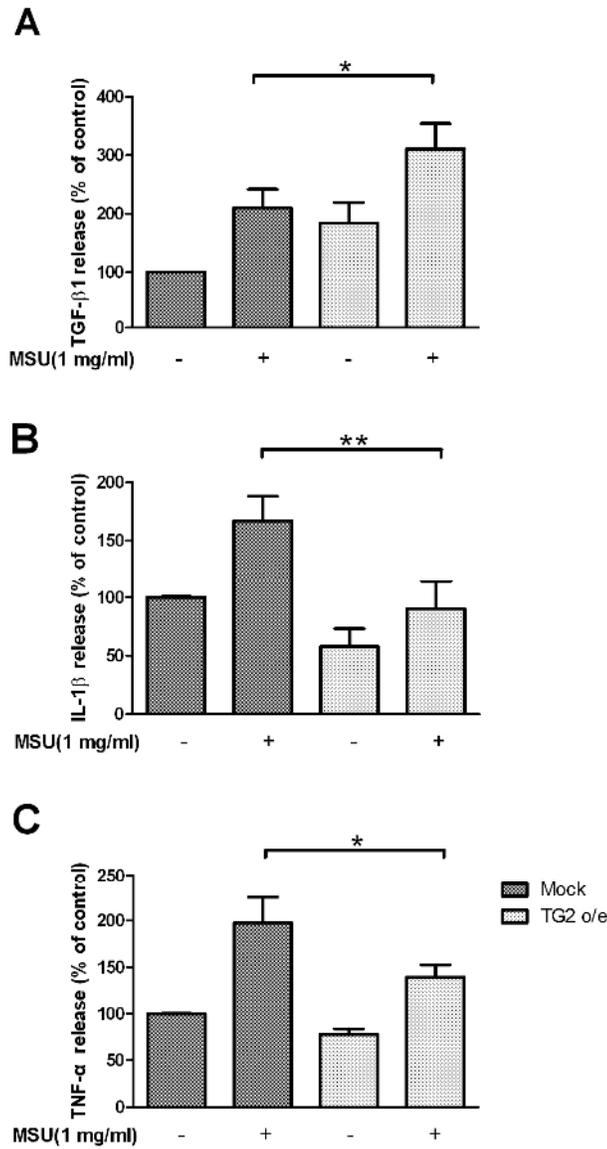
圖六、TG2 knockdown 加強 MSU crystal 所誘發之發炎性細胞激素之 mRNA。使用 TG2-siRNA 轉染至 RAW264.7 cells 48 小時，接著用 MSU crystal 刺激 4 小時之後蒐集細胞之 RNA 以 RT-PCR 分析 IL-1、TNF-、TG2 與 TGF- 1 之 mRNA 變化量(A)。TG2 (B)、TGF- (C)、IL-1 (D) 與 TNF- (E) 之 mRNA 變化之量化圖。圖中數據為三重複以上之實驗結果以平均值±SEM 表示。\*號代表實驗組與控制組經比較後有統計上之意義 (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ )。



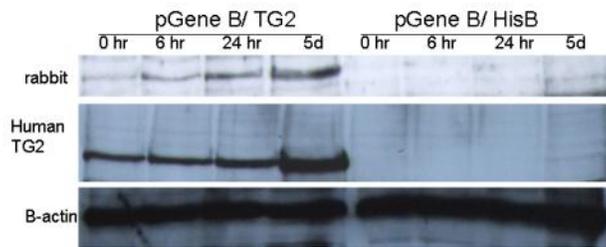
圖七、TG2 knockdown 加強 MSU crystal 所誘發之發炎性細胞激素分泌。使用 TG2-siRNA 轉染至 RAW264.7 cells 48 小時，接著用 MSU crystal 刺激 24 小時之後蒐集細胞之培養液。使用酵素免疫分析法觀察 TGF- 1 (A)、IL-1 (B) 與 TNF- (C)之分泌情形。圖中數據為三重複以上之實驗結果以平均值±SEM 表示。\*號代表實驗組與控制組經比較後有統計上之意義 (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , n.s., 無顯著差異)。



圖八、TG2 overexpression (o/e)可降低 MSU crystal 所誘發之發炎性細胞激素其 mRNA。使用 TG2 或是控制組 empty vector (mock)轉染至 RAW264.7 cells，接著用 MSU crystal 刺激 4 小時之後蒐集細胞之 RNA 以 RT-PCR 分析 IL-1、TNF-、TG2 與 TGF- 1 之 mRNA 變化量(A)。TG2 蛋白在轉染之後以西方墨點法觀察其表現量 (B)。TGF- (C)、IL-1 (D) 與 TNF- (E) 之 mRNA 變化之量化圖。圖中數據為三重複以上之實驗結果以平均值±SEM 表示。\*號代表實驗組與控制組經比較後有統計上之意義 (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ )。



圖九、TG2 overexpression (o/e)可降低 MSU crystal 所誘發之發炎性細胞激素之分泌。使用 TG2 或是控制組 empty vector (mock)轉染至 RAW264.7 cells，接著用 MSU crystal 刺激 24 小時之後蒐集細胞之培養液。使用酵素免疫分析法觀察 TGF- $\beta$ 1 (A)、IL-1 $\beta$  (B) 與 TNF- $\alpha$  (C)之分泌情形。圖中數據為三重複以上之實驗結果以平均值 $\pm$ SEM 表示。\*號代表實驗組與控制組經比較後有統計上之意義 (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , n.s., 無顯著差異)。

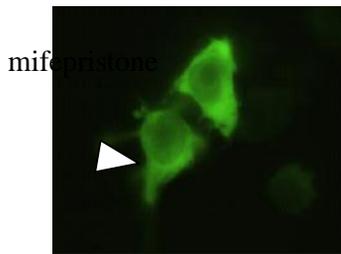


圖十 TG2 於 RAW264.7 細胞株之蛋白質表現量。經加入 mifepristone( $10^{-9}$ M)分別誘導不同時間點，pGeneB/TG2:含有全長人類的 TG2 的基因，pGene B/HisB:不包含 TG2 基因之載體控制組。



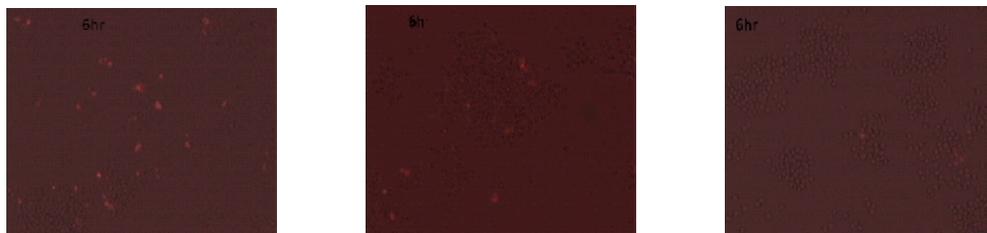
pGene B/TG2/RAW264.7      pGene B/HisB/RAW264.7      RAW264.7

圖十一.免疫螢光法確認 TG2 的表現。pGene B TG2/RAW264.7 細胞株及 pGene B/HisB/RAW264.7 細胞株分別加入 mifepristone 誘導 24 小時後，以 anti-human TG2 分別加入反應 24 小時，之後 再加入 anti-mouse IgG-FITC 反應 2 個小時，於顯微鏡下拍照呈現。



圖十二.pGene B/TG2/RAW264.7 細胞株經

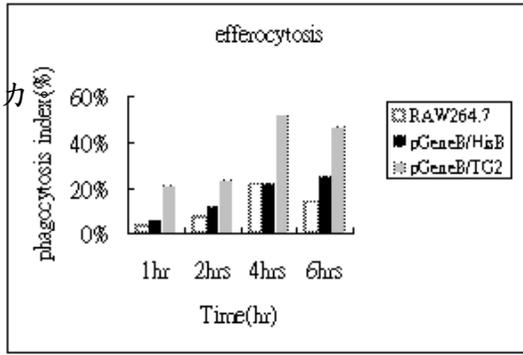
誘導，加入人類角質細胞(HaCaT)經 UV 的照射處理的凋亡細胞反應 24 小時，anti-human TG2 加入反應 24 小時，之後 再加入 anti-mouse IgG-FITC 反應 2 個小時，於顯微鏡下拍照。箭頭所指處為細胞外之 TG2。



pGeneB/TG2/RAW264.7      pGeneB/HisB/RAW264.7      RAW264.7

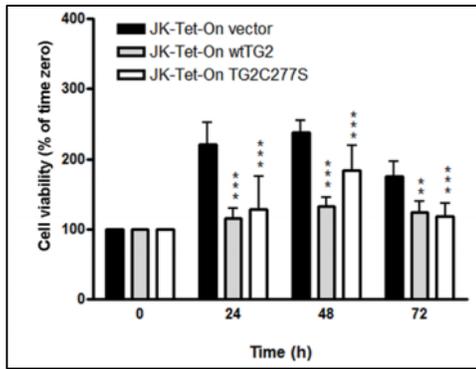
圖十三. 吞噬能力的分析。pGene B TG2/RAW264.7 細胞株及 pGene B/HisB/RAW264.7 細胞株分別加入 mifepristone 誘導 24 小時後，加入人類角質

細胞(HaCaT)經 UV 的照射處理的凋亡細胞反應 6 個小時，於顯微鏡下拍照分析。

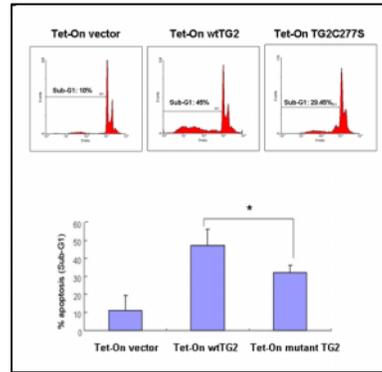


圖十四. 不同的時間點分析吞噬能力

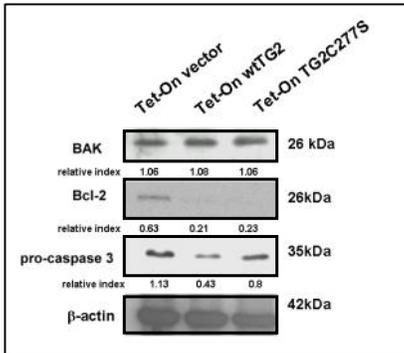
TG2 / RAW 264.7 經 1 hr-2 hrs- 4 rs-6 hrs 反應結果為 1%-24%-52%-47%，相較於控制組載體 6%-12% -22%-25%，而未轉染的對照組為 3%-7%-22%-14%。



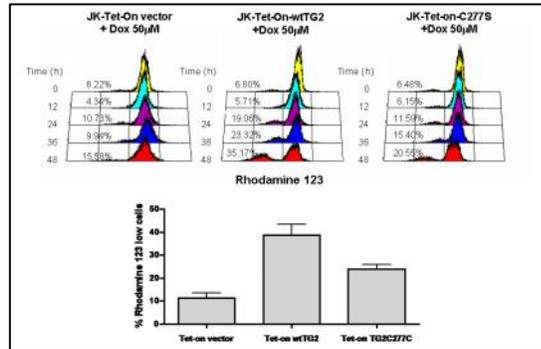
圖十五、過度表達 TG2 蛋白質造成細胞存活的死亡情形比不具率下降。株嚴重。



圖十六、野生型的 TG2 細胞株轉麩胺酶活性的突變型細胞株



圖十七、細胞凋亡是經由粒線體引發細胞凋亡路徑，伴隨著產生粒線體膜電位下降的現象。



## 科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：103年5月2日

計畫編號	MOST 102-2314-B-040-015-		
計畫名稱	研究 TG2, RAPIGDS1 和 AHR 在發炎之角色		
出國人員姓名	蔡嘉哲	服務機構及職稱	中山醫學大學微生物免疫所
會議時間	103年04月26日至103年04月30日	會議地點	San Diego Convention Center
會議名稱	(中文)2014 實驗生物年會 (英文) Experimental Biology 2014		
發表題目	(中文)大豆苷醇增強 TG2 之表現與 Rac1 之活性增強吞噬作用 (英文) Daidzein enhance efferocytosis via transflutaminase 2 and augmentation of Rac1 activity		

## 一、參加會議經過

本人參加於 2014 年 4 月 26 日至 4 月 30 日在美國 San Diego 舉行的 2014 實驗生物年會，並發表論文題目為 Daidzein enhance efferocytosis via transflutaminase 2 and augmentation of Rac1 activity。會議期間，美國營養學會 (ASN) 理事並約見討論台灣與美過之合作問題，參加本次會議本人收益良多。

## 二、與會心得

首先，我參加一場由哈佛大學 Charles Serham 教授之演講，他的演講是有關 Human Nutrition 及 Metabolism，其題目為 Novel-pro-resolving N-3 mediators and mechanism in inflammation。他的演講強調 SPMS (Specialigand pro-resolving chemical

mediators) 之重要性，過度的發炎會造成人體的傷害，人類如何控制過度的發炎成為重要之人體之自然生理機轉，過去了解的自然的抑制發炎有透過抑制 Enzyme 或抑制 Pro-inflammatory receptors，例如 Selection cyclooxygenase inhibitors 或 anti-TNF- $\alpha$  等。①SOC ②TGF- $\beta$ 、IL-10 等 ③Efferocytosis。

Serham 指出第四種 SPMS 可抑制發炎反應，造成 Self-limited inflammation 而恢復正常生理，所以是利用 endogenous agonist 緩和發炎反應，此為自然的發炎緩和方式，值得進一步研究。SPMS 包括 Lipoxin、Resolvins、Protectin 及 Maresins 等四種，SPMS 是從 Fatty acids 製造的，SPMS 不僅抑制發炎反應且可刺激 Resolution，所以 Resolution 是一種 programmed event，SPMS 可刺激體內細菌之吞噬而縮短細菌感染之時程，且可延長老鼠存活時間，且 Lipoxin 及 resolvin 可加強 Efferocytosis，Efferocytosis 是身體巨大細胞吞噬凋亡之細胞之現象，Efferocytosis 可減低發炎反應。目前，SPMS 已在臨床試驗階段，將來有可能成為治療發炎疾病之利器，其中 Resolvin E 可抑制白血球 (PMN) 之浸潤，可預防牙周病 (Periodontitis Disease) 之預防，此類藥物皆為 Lipid mediator 與目前生物製劑不同，對治療發炎疾病之藥物副作用，將可大幅度減少，是另一革命性的發現。

另一精采演講是由 USDA 教授 Sean Adams，題目為 Metabolic health host-derived and xeno-metabolite profile 強調 microbiome 對人體健康及代謝之相關性，正常人體內約有一兆的微生物，比人體內的細胞多十倍多，這些體內微生物功能有①營養②抵抗新的感染③加強人體抵抗力，所以這些 microbiota (微生物社區) 對人體健康有影響，尤其影響人體代謝改變人體 microbiota 會造成乾癬、過敏疾病及青春 (Acne) 等疾病，而氣喘病病人的 bacteroid fragilis 及 Clostridium coccoidin 等微生物有改變，肥

胖小孩有較少的腸內微生物 *Bifidobacterium* 及較高的 *Stachylococcus aureus*，結論是改變飲食內容會影響人體之代謝，飲食與微生物 有關，此演講讓我們了解人體 microbiome 對免疫功能之重要性，尤其目前牙周病之微生物 *P. gingivalis* 與類風濕性關節炎之致病機轉有關，更值得我重視 microbiome 之重要性。

美國營養學會之年會是一高水準的醫學會議，收穫良多，對將來之研究有極大的幫助。

### 三、發表論文全文或摘要

Clearance of apoptotic cells, termed "efferocytosis", is the mechanism required to prevent secondary necrosis and release of proinflammatory cytokines.

Defective efferocytosis is cumulatively regarded as one of mechanisms in the development of autoimmune and chronic inflammatory diseases. Our previous finding showed that ethanolic extract from *Glycyrrhiza tomentosa* Hayata (GTH) can enhance mouse macrophage RAW264.7 efferocytosis (clearance of apoptotic cells).

We have demonstrated that the major components of GTH are daidzein, catechin, epicatechin and naringin. Here, we explore the potential of each component in modulating efferocytic capability. For this, RAW264.7 cells were cultured with CFDA-stained apoptotic cells and assayed by flow cytometry. We found that daidzein is the main component of GTH, and it can enhance RAW264.7 efferocytosis dose-dependently. Moreover, the enhance effect of daidzein on macrophage efferocytic capability is accompanied by increased transglutaminase 2 (TG2) at both mRNA and protein levels. TG2 knockdown attenuated daidzein increased macrophage efferocytic capability. After treatment with daidzein, increased

phosphorylation was observed in Erk, but not in p38 and JNK. Finally, we report that after daidzein treatment, Rac1 activity was markedly increased and the mitochondrial membrane potential was decreased, which may contribute to efferocytosis. Taken together, these data suggest that enhancement of macrophage efferocytic capability by daidzein treatment was mainly through up-regulation of TG2 expression and Rac1 activity. Daidzein may have the therapeutical potential in the treatment of inflammatory diseases.

# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2014/11/03

科技部補助計畫	計畫名稱: 研究TG2, RAPIGDS1和AHR在發炎之角色
	計畫主持人: 蔡嘉哲
	計畫編號: 102-2314-B-040-015- 學門領域: 血液科腫瘤科風濕免疫及感染
無研發成果推廣資料	

102 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：蔡嘉哲		計畫編號：102-2314-B-040-015-					
計畫名稱：研究 TG2, RAP1GDS1 和 AHR 在發炎之角色							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	0%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	0%		
		研討會論文	0	0	0%		
		專書	0	0	0%		
	專利	申請中件數	0	0	0%	件	
		已獲得件數	0	0	0%		
	技術移轉	件數	0	0	0%	件	
		權利金	0	0	0%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	1	1	100%	人次	
		博士生	0	0	0%		
博士後研究員		0	0	0%			
專任助理		0	0	0%			
國外	論文著作	期刊論文	3	3	50%	篇	Daidzein enhances efferocytosis via transglutaminase 2 and augmentation of Rac1 activity. Mol Immunol. 2014 Aug ; 60(2):135-42. Transglutaminase 2 contributes to apoptosis induction in Jurkat T cells by modulating Ca <sup>2+</sup> homeostasis via cross-linking RAP1GDS1

							self-limitation of monosodium urate crystal-induced inflammation by upregulating the levels of active transforming growth factor- $\beta$ 1 leading to inhibition of Janus kinase-2 signaling” submitted to arthritis research & therapy (revised)
		研究報告/技術報告	0	0	0%		
		研討會論文	0	0	0%		
		專書	0	0	0%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	0%	件	
		已獲得件數	0	0	0%		
	技術移轉	件數	0	0	0%	件	
		權利金	0	0	0%	千元	
	參與計畫人力 (外國籍)	碩士生	0	0	0%	人次	
		博士生	0	0	0%		
		博士後研究員	0	0	0%		
		專任助理	0	0	0%		

其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)	無						
--	---	--	--	--	--	--	--

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科教處計畫加填項目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	



# 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

## 1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

## 2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

## 3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

實驗中觀察到了芳香烴受器在巨噬細胞中依然對於多環芳香烴化合物的刺激會有活化反應，並可以看到下游基因有穩定表現的情形，這與先前研究指出 AHR 的活化大多在於其他免疫細胞有所不同，先前研究提到 AHR 在類風濕性關節炎所扮演的角色，在類風濕性關節炎的滑膜細胞中可以觀察到受到 PAH 刺激下 IL-1B、IL-6 以及 IL-8 這類的細胞激素以及細胞趨化因子會有表現上升的情形，或許我們可以進一步去觀察是否在巨噬細胞會有所影響，而這些細胞激素表現的上升是否也是導致 NF- $\kappa$ B 活化路徑的活化而影響了第二型轉麩胺酶的表現，這也是可以進一步去做研究探討。

另外先前文獻也指出吸菸對於引發類風濕性關節炎的風險性，抽菸會影響 Th17 細胞分化以及 AHR 功能活化，而這一連串的反應機制可能對類風濕性關節炎有致病性影響，在研究中指出 RA 患者的滑膜組織有高度 AHR 的表現量相較於健康成人，而這當中也指出有抽菸的人有高度 AHR 以及 CYP1A1 的表現，相關研究也指出抽菸對於類風濕性關節炎的致病是有關連性的。而在我們實驗中，我們使用 TCDD 藥物處理，比照抽菸後香菸裡的 PAH 物質進入體內影響身體第二道防線細胞巨噬細胞，由我們實驗可以觀察到巨噬細胞受到 PAH 刺激後 AHR 的活化有可能對於巨噬細胞功能病變並影響吞噬作

用或是吞噬細胞相關的自體免疫疾病。

先前研究指出 AHR 屬於 basic helix-loop-helix- Per-ARNT-Sim (PAS) 轉錄因子包括 Period (Per)、 AhR nuclear translocator (ARNT)、以及 single minded (Sim)，能調節 hypoxia, circadian rhythm, 以及細胞分化與凋亡，而 AHR 的 promoter 擁有多處轉錄起始位子包含豐富的 GC 區域，而非 TATA 或 CCAAT boxes。AHR 近年來也被認為對於免疫反應是很重要的角色，當 AHR 受到環境毒物因子活化後影響免疫疾病也漸漸被重視，而先前研究顯示使用 AHR 在 T 細胞下對於腸道免疫疾病中是非常重要的角色，但相關分子機制卻還不是非常清楚。而研究中顯示在人類樹突細胞中使用內毒素(LPS)做為病毒感染活化 NF- $\kappa$ B 路徑可以提高 PAH 中 TCDD 的能力使得 AHR 的活化也能發生，而在 MEF 細胞中將 RelA(屬 NF- $\kappa$ B subunit)剔除掉後以 LPS 做誘導則可以看到對比於正常 MEF 細胞中以 LPS 誘導後 AHR 表現下降的情形，這也說明了 AHR 活化以及 RelA 之間的相關性，而從我們的研究中使用巨噬細胞也可以觀察到當 LPS 去刺激下 AHR 下游因子 CYP1A1 有表現上升的情形，這也說明了 AHR 的活化不只會被 PAH 刺激，在巨噬細胞中當 NF- $\kappa$ B 路徑活化也有可能刺激 AHR 活化，而由我們實驗看到第二型轉麩胺酶受到 PAH 刺激後對於控制組也有上升的情形，這也說明 PAH 活化 AHR 路徑可能影響 NF- $\kappa$ B 路徑。

總結所有結果，在我們研究當中發現 AHR 在巨噬細胞中也會有功能性的，與其他研究說明 AHR 沒有特異性相比或許在於巨噬細胞所影響的疾病中 AHR 也可以做為一個標靶 Receptor，對於像是巨噬細胞所引起的吞噬功能做進一步的研究，而 AHR 的活化是否對於巨噬細胞的功能會有所影響，這些都能最為未來的研究並且進一步了解自體免疫疾病與 AHR 之間的相關性。