

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

探討乳鐵蛋白對於紅斑性狼瘡小鼠病理之效益與相關免疫 調控機制(第3年)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 99-2320-B-040-007-MY3
執行期間：101年08月01日至102年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系生化學科

計畫主持人：曾博修
共同主持人：徐再靜、徐再靜、徐再靜
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：許國清
碩士班研究生-兼任助理人員：陳君豪
碩士班研究生-兼任助理人員：林雨潔
碩士班研究生-兼任助理人員：王中達
碩士班研究生-兼任助理人員：高禎蔚
碩士班研究生-兼任助理人員：林承偉
碩士班研究生-兼任助理人員：陳俐初
碩士班研究生-兼任助理人員：吳俐誼
碩士班研究生-兼任助理人員：張舜智
碩士班研究生-兼任助理人員：鍾雨涵
大專生-兼任助理人員：羅皓允
大專生-兼任助理人員：翁任康
大專生-兼任助理人員：許哲維
大專生-兼任助理人員：李宗樺
大專生-兼任助理人員：柯宜君
大專生-兼任助理人員：林巾競
大專生-兼任助理人員：林佳芸
博士班研究生-兼任助理人員：蔡鈞州

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公 開 資 訊 ： 本 計 畫 涉 及 專 利 或 其 他 智 慧 財 產 權 ， 1 年 後 可 公 開 查 詢

中 華 民 國 102 年 10 月 21 日

中文摘要：近年來已發現肝臟異常為紅斑狼瘡病人的普遍狀況，包括肝臟的發炎及肝臟細胞凋亡。而膽固醇則會更加劇這些現象的嚴重性。雖然已知乳鐵蛋白為先天免疫有關之多功能蛋白，能調節多種免疫細胞，促進T及B淋巴球的成熟，提升自然殺手細胞活性，然而乳鐵蛋白在自體免疫免疫缺失之效益的研究，尤其在紅斑性狼瘡，仍缺乏有系統的研究與驗證。本研究計畫在此三年間，除驗證了乳鐵蛋白確實對於餵食高膽固醇之狼瘡小鼠有明顯的保護效果，除有效降低平均動脈壓，血清中AST、ALT、C3補體濃度及MMP活性外，乳鐵蛋白亦能提升狼瘡小鼠因膽固醇下降之CD8+T細胞及CD4+CD25+調節型T細胞，以及降低因膽固醇上升之B細胞增生。此外，我們亦驗證乳鐵蛋白能有效的降低肝臟發炎相關路徑，包括IL-6，IL-1 β 及IKK- α ，NF- κ B訊息傳遞路徑，並減緩下游之MMP9及iNOS表現。另外，乳鐵蛋白亦能減緩P53/P21及粒線體相關路徑之細胞凋亡訊息。這些結果皆驗證乳鐵蛋白能有效的減緩狼瘡及因膽固醇所加劇狼瘡之肝臟發炎及凋亡。而我們也完成了雙向電泳及蛋白質點的鑑別，挑選出因狼瘡或膽固醇而有顯著變化的蛋白質點。未來，我們將進一步分析這些蛋白質點在狼瘡之病理機轉中所扮演的角色，以找出狼瘡之治療標靶。

中文關鍵詞：紅斑性狼瘡，乳鐵蛋白，發炎，凋亡，標靶

英文摘要：Liver abnormalities such as hepatic inflammation and apoptosis have been discovered as a common phenomenon in patients with Systemic lupus erythematosus (SLE). Meanwhile, cholesterol is known to aggravate these hepatic abnormalities induced by SLE. Lactoferrin (LF), which is known as a multifunctional protein associated with innate immunity, which could modulates a variety of immune cells and stimulates the maturation of natural killer cells, lymphocytes, monocytes and macrophages. However, only little researches were performed to study the effects of LF on autoimmune disorders. In this 3-years study, we not only revealed the protective effects of LF in alleviating the average blood pressure, serum levels of AST, ALT and C3 and MMP activity but also inducing the population of CD8+T cells, CD4+CD25+ regular T cells and reduce B cell proliferation. Additionally, we also found that lactoferrin attenuates the inflammatory signaling by reducing IL-6, IL-1 β , IKK-

α , NF- κ B and iNOS. Moreover, we also found that lactoferrin could reduce the mitochondrial-dependent apoptosis associated with the expressions of P53 and P21. We further performed the IEF and identified the protein spots, which have significant expression. In the future, we will analyze the role of these proteins in pathogenesis of SLE and evaluate the possible therapeutic targets.

英文關鍵詞： Systemic lupus erythematosus (SLE), Lactoferrin (LF), Inflammation, Apoptosis, Therapeutic targets

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

探討乳鐵蛋白對於紅斑性狼瘡小鼠病理之效益與相關免疫調控機制

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2320-B-040-007-MY3

執行期間：99年 8月 1日至 102年 7月 31日

計畫主持人：曾博修

共同主持人：徐再靜

計畫參與人員：蔡鈞州，許國清，高禎蔚，林承偉，張舜智，李宗樺，
林巾競，柯宜君，王中達，林雨潔，許國清，許懷升，
羅皓允，許哲維，翁任康，陳君豪，吳俐誼，
陳俐初，鍾雨涵，林佳芸

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

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
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

執行單位：中山醫學大學醫學系生化科/所

中華民國 102年 10月 1日

中、英文摘要及關鍵詞(keywords)

摘要

近年來已發現肝臟異常為紅斑狼瘡病人的普遍狀況，包括肝臟的發炎及肝臟細胞凋亡。而膽固醇則會更加劇這些現象的嚴重性。雖然已知乳鐵蛋白為先天免疫有關之多功能蛋白，能調節多種免疫細胞，促進T及B淋巴球的成熟，提升自然殺手細胞活性，然而乳鐵蛋白在自體免疫免疫缺失之效益的研究，尤其在紅斑性狼瘡，仍缺乏有系統的研究與驗證。本研究計畫在此三年間，除驗證了乳鐵蛋白確實對於餵食高膽固醇之狼瘡小鼠有明顯的保護效果，除有效降低平均動脈壓，血清中AST、ALT、C3補體濃度及MMP活性外，乳鐵蛋白亦能提升狼瘡小鼠因膽固醇下降之CD8⁺T細胞及CD4⁺CD25⁺調節型T細胞，以及降低因膽固醇上升之B細胞增生。此外，我們亦驗證乳鐵蛋白能有效的降低肝臟發炎相關路徑，包括IL-6, IL-1 β 及IKK- α ，NF- κ B訊息傳遞路徑，並減緩下游之MMP9及iNOS表現。另外，乳鐵蛋白亦能減緩P53/P21及粒線體相關路徑之細胞凋亡訊息。這些結果皆驗證乳鐵蛋白能有效的減緩狼瘡及因膽固醇所加劇狼瘡之肝臟發炎及凋亡。而我們也完成了雙向電泳及蛋白質點的鑑別，挑選出因狼瘡或膽固醇而有顯著變化的蛋白質點。未來，我們將進一步分析這些蛋白質點在狼瘡之病理機轉中所扮演的角色，以找出狼瘡之治療標靶。

關鍵字: 紅斑性狼瘡，乳鐵蛋白，發炎，凋亡，標靶

Abstract

Liver abnormalities such as hepatic inflammation and apoptosis have been discovered as a common phenomenon in patients with Systemic lupus erythematosus (SLE). Meanwhile, cholesterol is known to aggravate these hepatic abnormalities induced by SLE. Lactoferrin (LF), which is known as a multifunctional protein associated with innate immunity, which could modulates a variety of immune cells and stimulates the maturation of natural killer cells, lymphocytes, monocytes and macrophages. However, only little researches were performed to study the effects of LF on autoimmune disorders. In this 3-years study, we not only revealed the protective effects of LF in alleviating the average blood pressure, serum levels of AST, ALT and C3 and MMP activity but also inducing the population of CD8+T cells, CD4+CD25+ regular T cells and reduce B cell proliferation. Additionally, we also found that lactoferrin attenuates the inflammatory signaling by reducing IL-6, IL-1 β , IKK- α , NF- κ B and iNOS. Moreover, we also found that lactoferrin could reduce the mitochondrial-dependent apoptosis associated with the expressions of P53 and P21. We further performed the IEF and identified the protein spots, which have significant expression. In the future, we will analyze the role of these proteins in pathogenesis of SLE and evaluate the possible therapeutic targets.

Key words: Systemic lupus erythematosus (SLE), Lactoferrin (LF), Inflammation, Apoptosis,
Therapeutic targets

報告與討論：

紅斑性狼瘡(Systemic lupus erythematosus, SLE)是與性別有關一種全身性自體免疫疾病，好發於35歲以下女性。紅斑性狼瘡會侵犯全身各個器官或組織，包括皮膚、關節、心臟、血管、肝臟、腎臟、腦部和神經系統。其病徵包括水腫、發燒、關節腫痛及發炎、脫髮、皮膚出現紅斑、脈管炎和血管梗塞，並可能造成精神病、癲癇發作、局部腦神經缺血(中風)、脊椎炎、重症肌無力、脈管炎性神經病等[1-2]。雖然紅斑性狼瘡的致病原因仍不清楚[3]，但目前許多研究相信是因為凋亡細胞的清除不全(impaired clearance of apoptotic cells)，導致自體抗原外露而造成堆積，持續引起發炎反應，造成自體免疫疾病[4-5]。在近年研究指出，全身性紅斑狼瘡病患中，肝臟異常的盛行率相當高。在一文獻指出，238個全身性紅斑狼瘡病患中，其中有39%肝腫大、6%脾腫大、24%黃疸和21%肝功能不正常[6-7]。在我們近幾年的研究也發現，高油脂高膽固醇食物會加劇狼瘡鼠的臨床病症，增加細胞凋亡及多數病灶惡化 [8-10]。另外，流行病學研究也指出，SLE，其心血管疾病(CVD)的危險因子及發生率比正常族群高出許多[11]。而小於45歲的全身性紅斑性狼瘡(SLE)的婦女，被發現比同年齡的健康婦女可能患有心肌梗塞(MI)的機率高出50倍[12]。這些現象顯示出膽固醇與紅斑性狼瘡病症之關聯性相當密切。

乳鐵蛋白(Lactoferrin)為一種與鐵緊密結合的78-80 kDa 糖蛋白，主要分佈於哺乳動物之體液中，包括母乳、唾液、眼淚及黏膜分泌液，亦可由發炎反應中活化之嗜中性白血球所釋放[12-13]。許多的研究發現，乳鐵蛋白對於免疫反應的調節非常重要，包括**維護腸胃道功能**。因為乳鐵蛋白具有與鐵強烈親和性和可逆性的胺基與梭基端，可作為人體內鐵分子供需之調節劑，減少小腸發炎症狀。在動物實驗中，餵食乳鐵蛋白的動物能有效減低因為各種病原生物所導致的系統和小腸發炎症狀及損傷 [12]。乳鐵蛋白另有**抑菌效果**。乳鐵蛋白是一種鐵離子結合性蛋白，會限制自由態鐵離子的量，因鐵離子是微生物之必須生長因子，故可限制微生物生長[13-14]。此外，乳鐵蛋白具有協同抗生素及抗病毒藥物的作用，可降低病患對藥物的使用量，並減少動物體肝臟和腎臟方面的負擔。在實驗室研究中發現，乳鐵蛋白能直接結合多種病毒，抑制其複製或毒性。另有研究指出乳鐵蛋白可以降低C型肝炎病毒增生及減緩C型肝炎病毒感染所造成之肝臟異常[15]。乳鐵蛋白在**抗癌效益方面**，能穿透動物體內，與核內染色體DNA結合，不但可用於動物體內的有害微生物防治，同時可擴大應用於癌症病患的治療和預防上。[16-19]。而**乳鐵蛋白在抗脂質氧化上**，能防止因鐵催化所引起的脂肪過氧化作用，同時也抑制超氧離子的生成，降低自由基的含量，具有預防動脈血管壁上彈性蛋白的破壞，以及降低動脈粥樣硬化和冠心病發生機率的效果[20-22]。乳鐵蛋白能直接結合多種免疫細胞，促進T及B淋巴球的成熟[13-14]，提升自然殺手細胞活性[23-24]，但詳細之調控機轉所知仍然不多。此外，口服乳鐵蛋白可降低餵食高油高膽

固醇食物大鼠肝臟及血漿中三酸甘油酯濃度，減少肝中膽固醇含量，提高血漿 HDL-膽固醇濃度。然而，對於乳鐵蛋白在自體免疫免疫缺失之效益的研究，極為少數。研究指出，長時間餵食 NZB 狼瘡小鼠乳鐵蛋白，可有效降低 Coombs' test 的陽性反應，減緩自發性貧血 [25]。另外研究也證實，在飲用水中加乳鐵蛋白長時間餵食，可有效降低實驗誘發之自體免疫腦脊髓炎 Lewis 大鼠(EAE)的症狀，降低淋巴結細胞增生，改變 Th1/Th2 細胞激素表現 [26]。然而，對於乳鐵蛋白改善自體免疫疾病的免疫調控及相關機制，卻仍不清楚，尤其在紅斑性狼瘡之部分，仍缺乏有系統的研究與驗證。

在本計畫中，我們將 NZB/W F1 狼瘡小鼠隨機分成三組，分別餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料 14 週後，將小鼠犧牲進行分析。此三組小鼠之體重只有餵食高膽固醇之小鼠從第八週起有明顯上升趨勢，從第十週起相較其他 2 組小鼠有顯著上升[圖一]，但在心跳上並無明顯差異[圖二]。而在平均動脈壓方面，餵食高膽固醇之小鼠相較其他 2 組小鼠，其平均動脈壓從第十週起顯著上升[圖三]。當小鼠犧牲後，我們偵測其血清中 C3 補體濃度，發現餵食高膽固醇小鼠 C3 補體濃度顯著下降，而餵食高膽固醇加乳鐵蛋白飼料小鼠 C3 補體濃度則有顯著回升現象[圖四]。進一步分析狼瘡之重要發炎指標，MMP 活性，發現餵食高膽固醇之小鼠其血清 MMP-9 活性明顯增加，而餵食高膽固醇加上乳鐵蛋白飼料之小鼠其血清 MMP-9 活性相較餵食高膽固醇小鼠則顯著降低[圖五]。另外偵測血清中 AST 及 ALT 發現，發現餵食高膽固醇之小鼠其血清 AST 及 ALT 活性明顯增加，而餵食高膽固醇加上乳鐵蛋白飼料之小鼠其血清 AST 及 ALT 活性相較餵食高膽固醇小鼠則顯著降低[圖六]。

秤量狼瘡小鼠脾臟重量，發現餵食高膽固醇之小鼠其脾臟重量顯著上升，而餵食高膽固醇加上乳鐵蛋白飼料之小鼠其脾臟重量相較餵食高膽固醇小鼠則有顯著下降[圖七]。此說明高膽固醇加劇狼瘡小鼠脾臟腫大之情況。另從脾臟 B 細胞總數之計算結果可顯著看出差異。在餵食高膽固醇之小鼠其脾臟 B 細胞明顯變多，而餵食高膽固醇加上乳鐵蛋白飼料之小鼠其脾臟 B 細胞相較餵食高膽固醇小鼠則顯著變少[圖八]。而在 CD8+ T 細胞的分佈上發現，餵食高膽固醇之小鼠其脾臟 CD8+ T 細胞明顯變少，而餵食高膽固醇加上乳鐵蛋白飼料之小鼠其脾臟 CD8+ T 細胞相較餵食高膽固醇小鼠則顯著增加[圖九]。相似情況也在 CD4+CD25 調節型的 T 細胞分部上則發現，餵食高膽固醇之小鼠其脾臟 CD4+CD25 調節型 T 細胞明顯變少，而餵食高膽固醇加上乳鐵蛋白飼料之小鼠其脾臟 CD4+CD25 調節型 T 細胞相較餵食高膽固醇小鼠則顯著增加[圖十]。

進一步針對 IL-1 β 進行分析後，發現餵食高膽固醇之小鼠其肝臟之 IL-1 β 蛋白質表現

量相較於餵食正常飼料之狼瘡小鼠有顯著上升。但在餵食高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠中，其肝臟之 IL-1 β 蛋白質表現量相較於餵食正常飼料及高膽固醇飼料之狼瘡小鼠皆有顯著的下降[圖十一]。而在另一個狼瘡小鼠之重要發炎因子，IL-6，的表現上，也有類似的發現[圖十二]。所以我們接著分析 IL-1 β 及 IL-6 相關的下游訊息傳遞分子，IKK- α 及 NF- κ B。結果發現到，IKK- α 及 NF- κ B 在餵食高膽固醇之小鼠肝臟表現量，相較於餵食正常飼料之狼瘡小鼠有顯著上升。但在餵食高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠中，其肝臟之 IKK- α 及 NF- κ B 蛋白質表現量相較於餵食正常飼料及高膽固醇飼料之狼瘡小鼠皆顯著的下降[圖十三][圖十四]。

這樣的訊息路徑將導致下游的發炎反應，例如 MMP-9 及 iNOS 的表現。在實驗結果中發現，iNOS 在餵食高膽固醇之小鼠肝臟表現量，相較於餵食正常飼料之狼瘡小鼠有顯著上升。但在餵食高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠中，其肝臟之 iNOS 表現量相較於餵食正常飼料及高膽固醇飼料之狼瘡小鼠皆顯著的下降[圖十五]。另外在與細胞凋亡的路徑，實驗結果發現 p53 與 p21 蛋白質在餵食高膽固醇之小鼠肝臟表現量，相較於餵食正常飼料之狼瘡小鼠有顯著上升。但在餵食高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠中，其肝臟之 p53 與 p21 蛋白質表現量相較於餵食正常飼料及高膽固醇飼料之狼瘡小鼠皆顯著的下降[圖十六][圖十七]。至於粒線體相關凋亡的訊息路徑上，由實驗結果發現，cytochrome-c，apaf-1 及 caspase-3 的活性表現，在餵食高膽固醇之小鼠肝臟表現量，相較於餵食正常飼料之狼瘡小鼠有顯著上升。但在餵食高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠中，其肝臟之 cytochrome-c，apaf-1 及 caspase-3 的活性表現相較於餵食正常飼料及高膽固醇飼料之狼瘡小鼠皆顯著的下降[圖十八][圖十九][圖二十]。

我們除驗證了乳鐵蛋白對狼瘡小鼠肝臟發炎及凋亡的效益及訊息路徑外[圖二十一]，也完成了小鼠肝臟之雙向電泳[圖二十二]，並在三組老鼠的雙向電泳膠片中，分別挑選了 30 個蛋白質點進行蛋白質身分鑑別[表一]，除了再次驗證先前乳鐵蛋白對於狼瘡的效果外，將有助於更進一步分析這些蛋白質在狼瘡之病理機轉中所扮演的角色，及找出狼瘡之治療標靶。

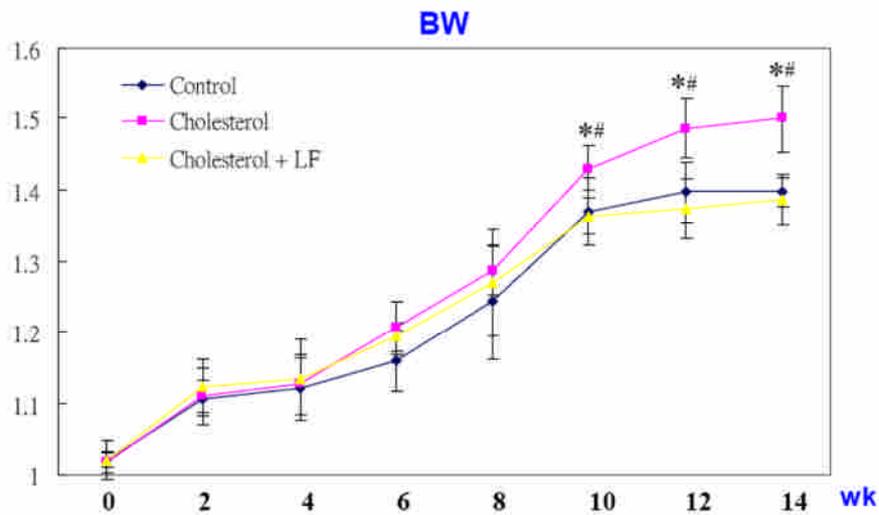
參考文獻

1. Winchester RJ. Systemic lupus erythematosus pathogenesis. In: Koopman WJ. Eds. *Arthritis and Allied Conditions*. Birmingham Alabama: William and Wilkins, 1996:1361-91.
2. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003; 56:481-90.
3. Tan, E.M. and H.G. Kunkel, Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 1966. 96(3): p. 464-71.
4. LeFeber, W.P., et al., Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J Clin Invest*, 1984. 74(4): p. 1545-51.
5. Casciola-Rosen, L.A., G. Anhalt, and A. Rosen, Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*, 1994. 179(4): p. 1317-30.
6. Herlong, 1994 H.F. Herlong, Approach to the patient with abnormal liver enzymes, *Hosp. Pract. (Off. Ed.)* 29 (1994), pp. 32-38.
7. Lu et al., 2006 M.C. Lu, K.J. Li, S.C. Hsieh, C.H. Wu and C.L. Yu, Lupus-related advanced liver involvement as the initial presentation of systemic lupus erythematosus, *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 39 (2006), pp. 471-475.
8. Hsu TC, Chiang SY, Wu JH, Tsai CC, Huang CY, Chen YC, Tzang BS. Treatment with taurine attenuates hepatic apoptosis in NZB/W F1 mice fed with a high-cholesterol diet. *J Agric Food Chem.* 2008 Oct 22;56(20):9685-91.
9. Huang CY, Hsu TC, Kuo WW, Wu SP, Lin YM, Yen CY, Wu JH, Tzang BS. Beneficial effects of taurine on cardiac abnormality in NZB/W F1 mice fed with a high-cholesterol diet. *J Agric Food Chem.* 2009 Sep 23;57(18):8635-42.
10. Tsai-Ching Hsu, Yi-Chen Chen, Chun-Chou Tsai, Jen-Huang Wu, Sin-Lun Li, Bor-Show Tzang*. (2010). Protective effects of taurine against hepatic abnormality in NZB/W F1 mice fed a hypercholesterolemic diet. *Food Chemistry* 119:62-68.
11. Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O, Amigo MC. Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases · *Autoimmunity Reviews*, Volume 5, Issue 3, March 2006, Pages 195-201.
12. Hayakawa T, Jin CX, Ko SB, Kitagawa M, Ishiguro H. Lactoferrin in gastrointestinal disease. *Intern Med.* 2009;48(15):1251-4.
13. Rodríguez-Franco DA, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont Montfort G. Antimicrobial mechanisms and potential clinical application of lactoferrin *Rev Latinoam Microbiol.* 2005 Jul-Dec;47(3-4):102-11.
14. Andrés MT, Viejo-Díaz M, Fierro JF. Human lactoferrin induces apoptosis-like cell death in *Candida albicans*: critical role of K⁺-channel-mediated K⁺ efflux. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Nov;52(11):4081-8.
15. Azzam HS, Goertz C, Fritts M, Jonas WB. Natural products and chronic hepatitis C virus. *Liver Int.* 2007 Feb;27(1):17-25.
16. Pierce A, Legrand D, Mazurier J.[Lactoferrin: a multifunctional protein] *Med Sci (Paris).* 2009 Apr;25(4):361-9.
17. West HJ. Novel targeted agents for lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2009 Mar;10 Suppl 1:S41-6.

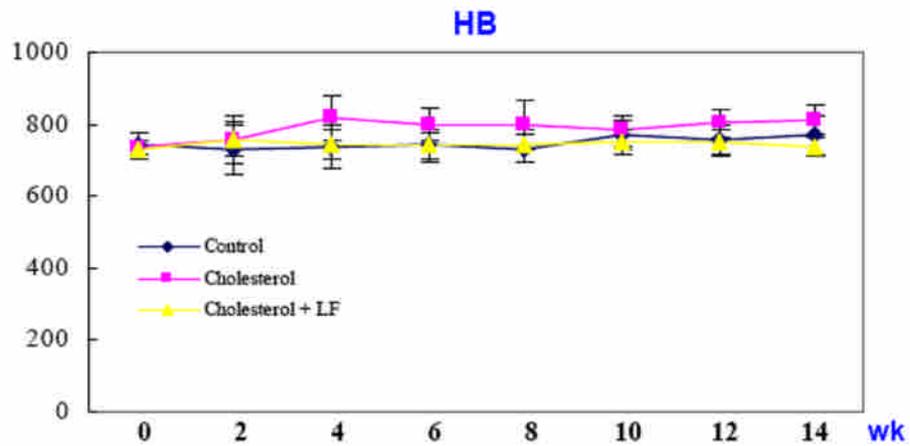
18. Rodrigues L, Teixeira J, Schmitt F, Paulsson M, Månsson HL. Lactoferrin and cancer disease prevention. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009 Mar;49(3):203-17.
19. Freiburghaus C, Janicke B, Lindmark-Månsson H, Oredsson SM, Paulsson MA. Lactoferricin treatment decreases the rate of cell proliferation of a human colon cancer cell line. *J Dairy Sci*. 2009 Jun;92(6):2477-84.
20. Paul-Eugène N, Dugas B, Kolb JP, Damais C, Braquet P, Paubert-Braquet M, Rialland JP. Immunomodulatory and anti-oxidant effects of bovine lactoferrin in man. *C R Acad Sci III*. 1993;316(2):113-9.
21. Hayashida K, Takeuchi T, Ozaki T, Shimizu H, Ando K, Miyamoto A, Harada E. Bovine lactoferrin has a nitric oxide-dependent hypotensive effect in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Feb;286(2):R359-65.
22. Piomboni P, Gambera L, Serafini F, Campanella G, Morgante G, De Leo V. Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. *Asian J Androl*. 2008 Mar;10(2):201-6.

23. Gorman C. and Isenberg D. , Atherosclerosis and lupus , *Rheumatology*, Aug 2004; 43: 943 - 945.
24. Zimecki M., Mazurier J., Spik G., Kapp J.A.: Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology*, 1995; 86: 122–127.
25. Zimecki M., Mazurier J., Machnicki M., Wieczorek Z., Montreuil J., Spik G.: Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4– CD8– murine thymocytes. *Immunol. Lett.*, 1991; 30: 119–124.
26. Hayakawa T, Jin CX, Ko SB, Kitagawa M, Ishiguro H. Lactoferrin in gastrointestinal disease. *Intern Med*. 2009;48(15):1251-4.

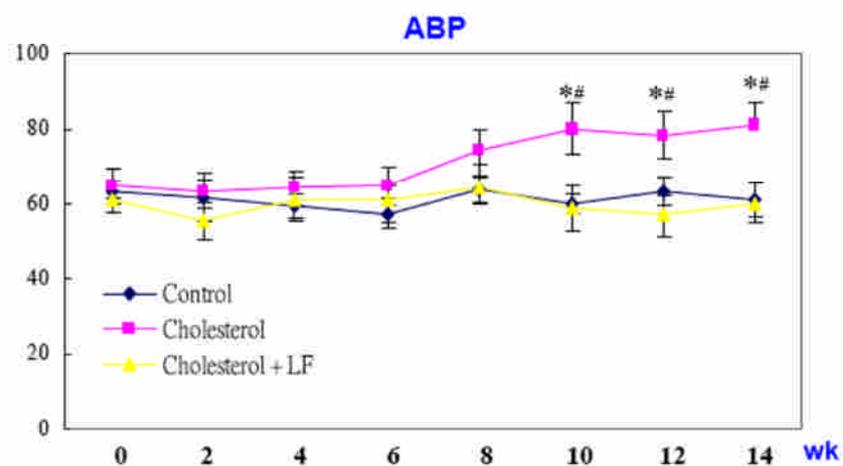
(五) 附表及附圖



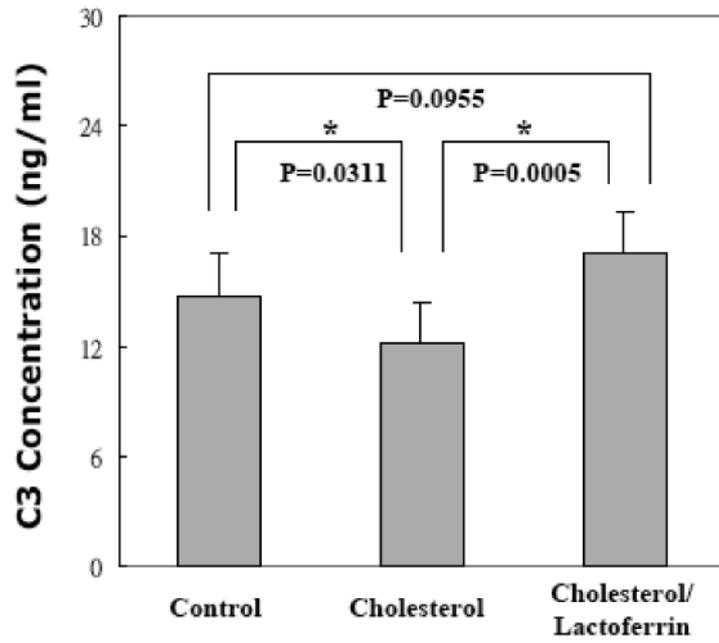
圖一、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠體重變化。



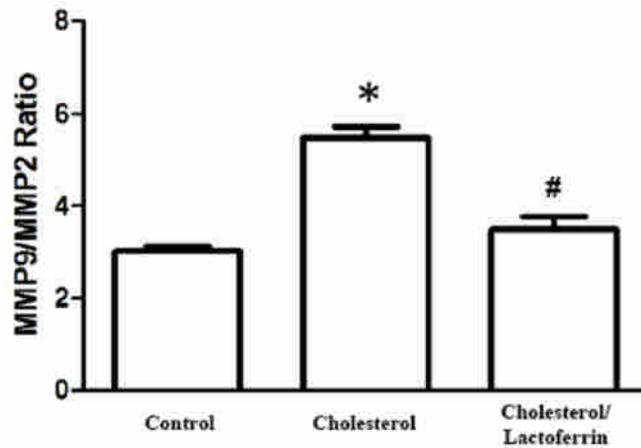
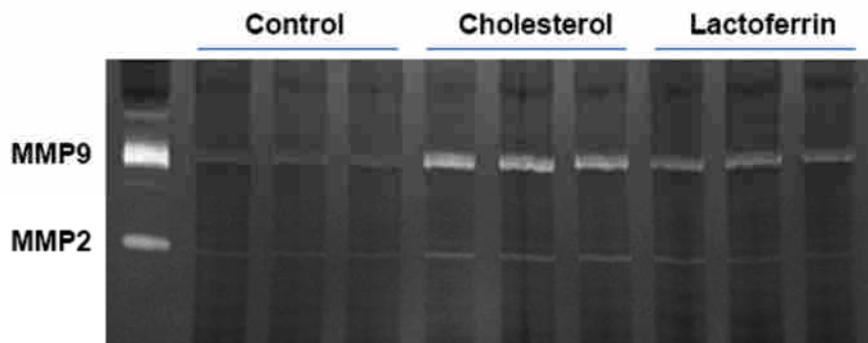
圖二、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠心跳變化。



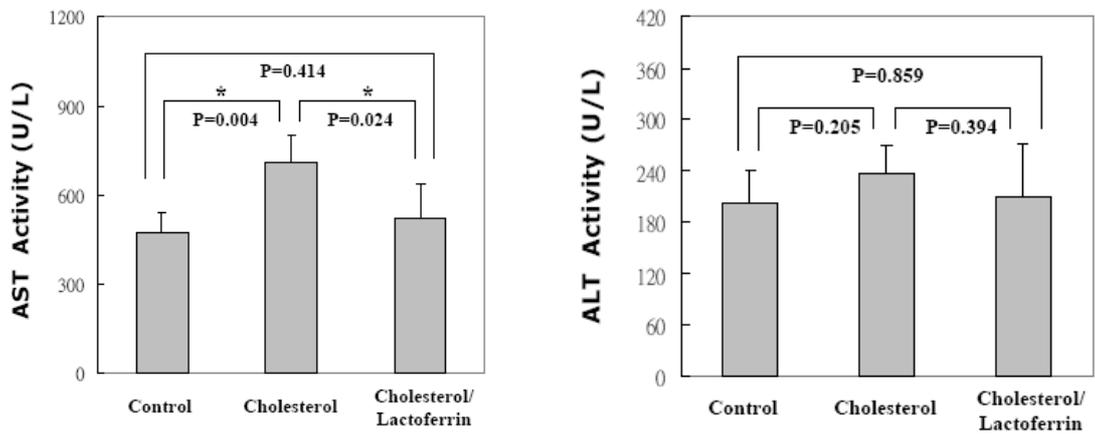
圖三、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠平均動脈壓變化。



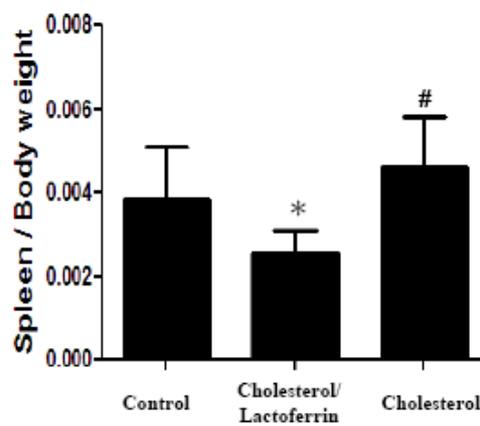
圖四、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠血清中 C3 補體濃度。



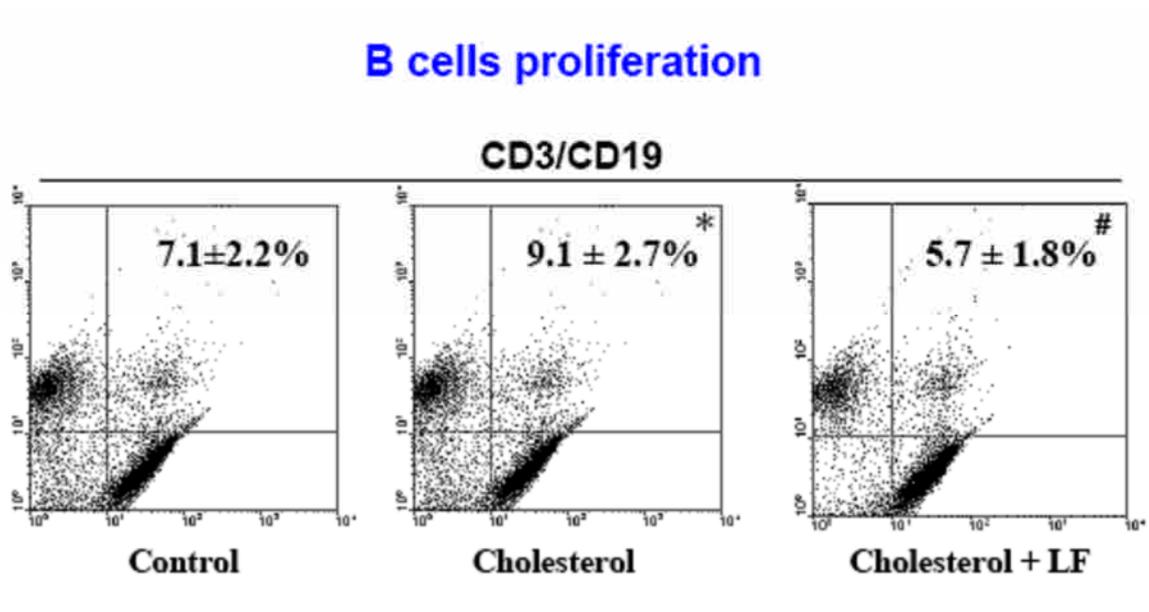
圖五、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠血清 MMP 活性。



圖六、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠血清中 AST 及 ALT 之變化。

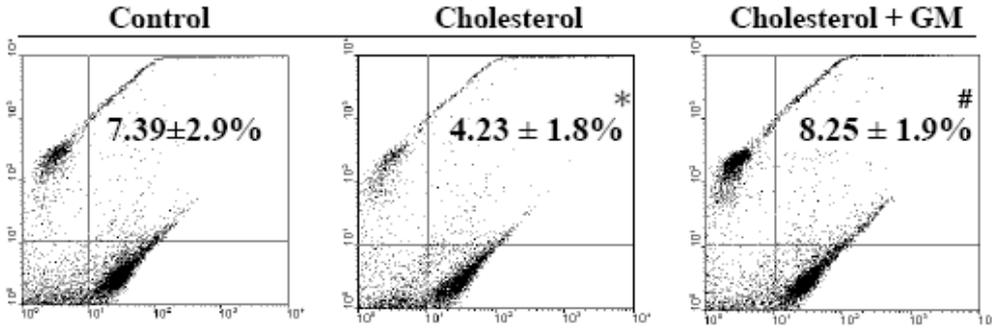


圖七、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠脾臟重量變化。



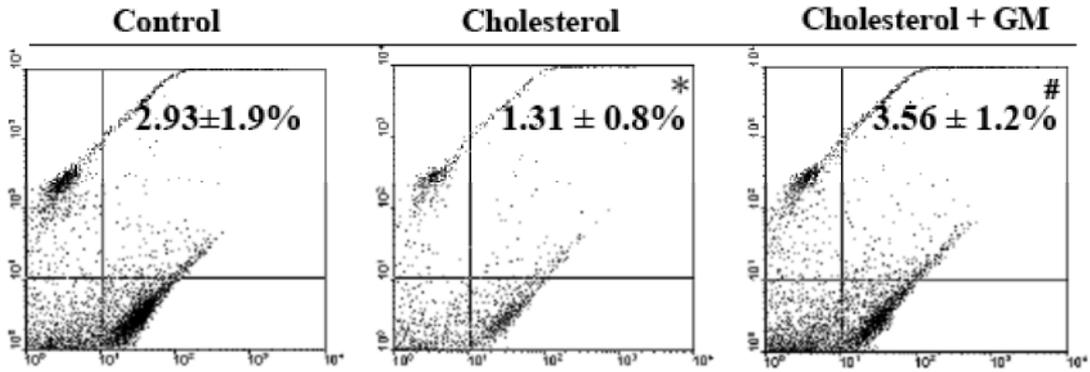
圖八、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠脾臟 B 細胞變化。

CD8+

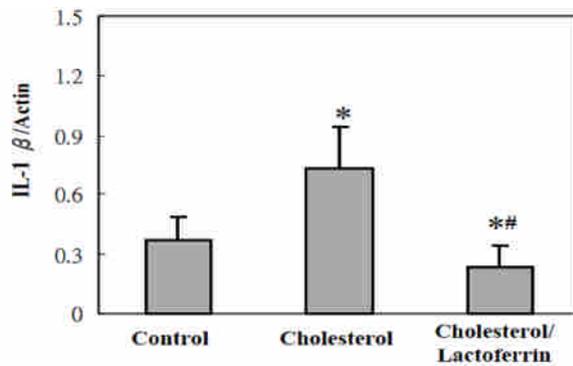
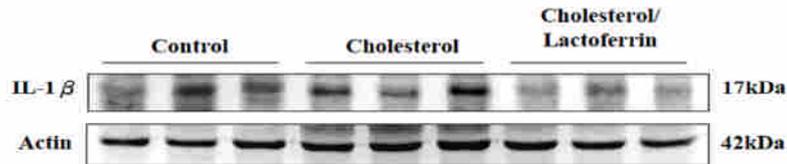


圖九、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠脾臟 CD8+ T 細胞變化。

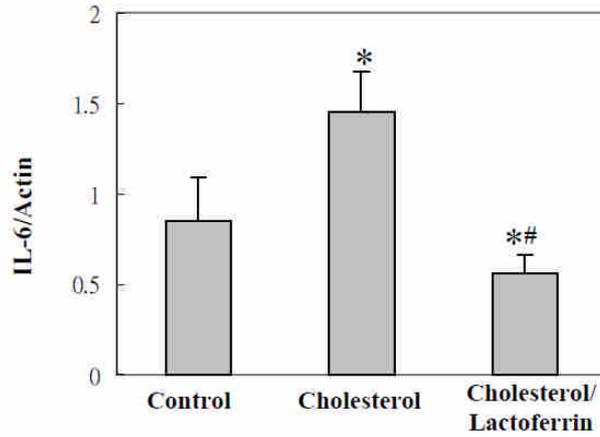
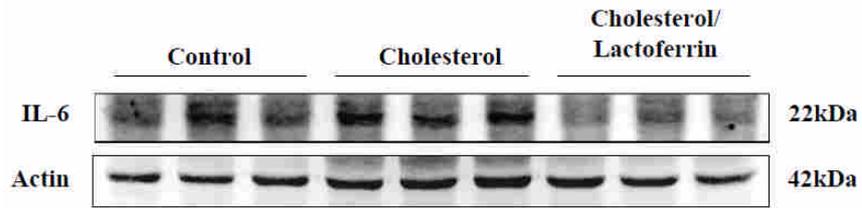
CD4+ CD25+



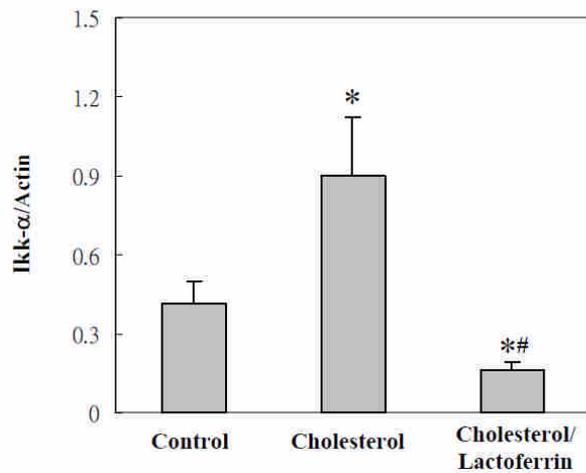
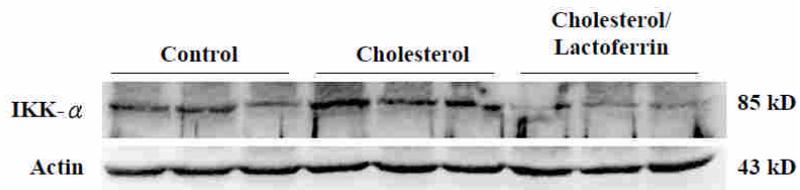
圖十、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠脾臟 CD4+CD25+ T 細胞變化。



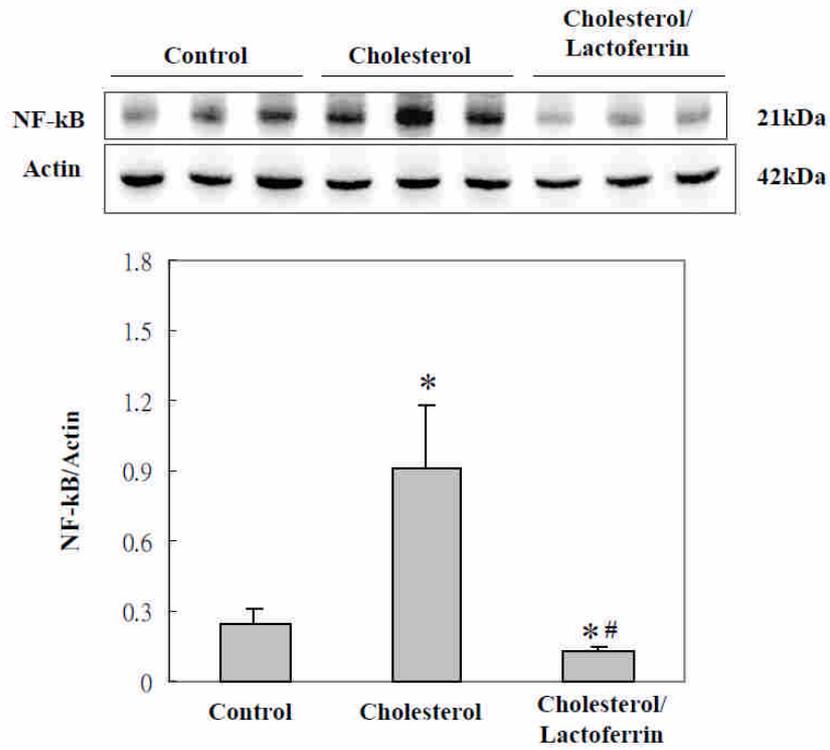
圖十一、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟 IL-1β 變化。



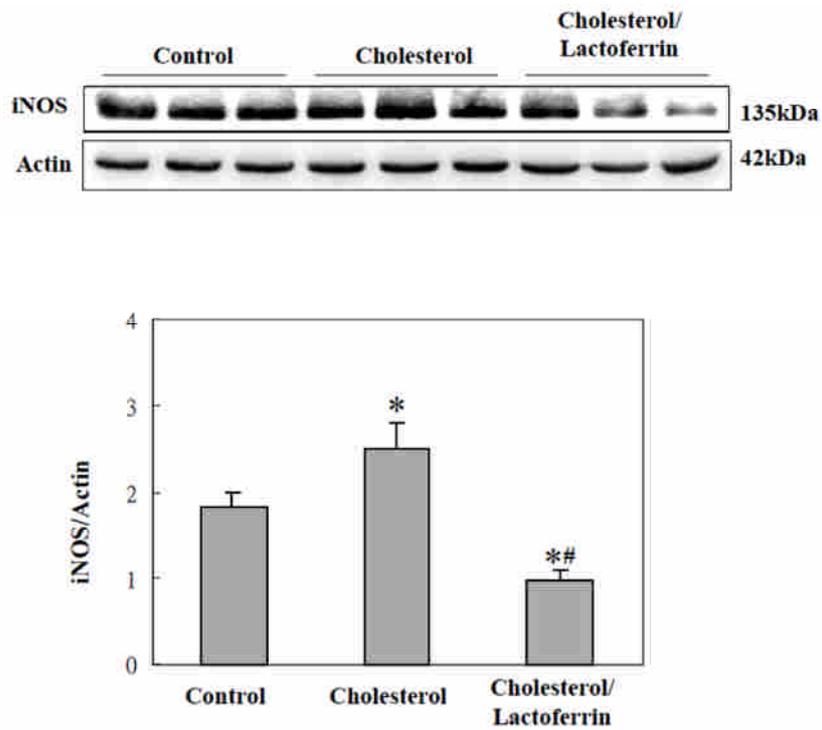
圖十二、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟 IL-6 變化。



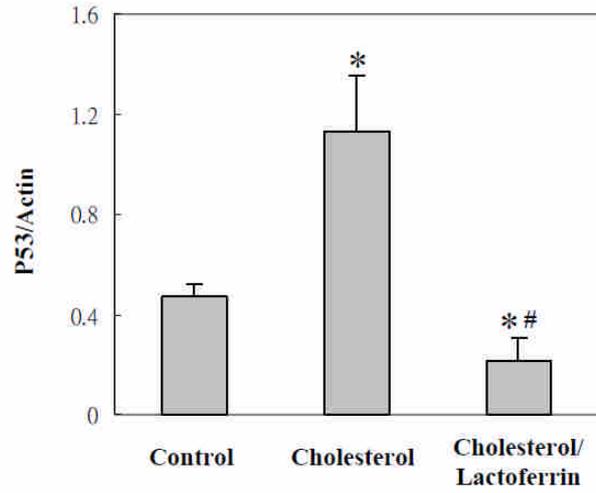
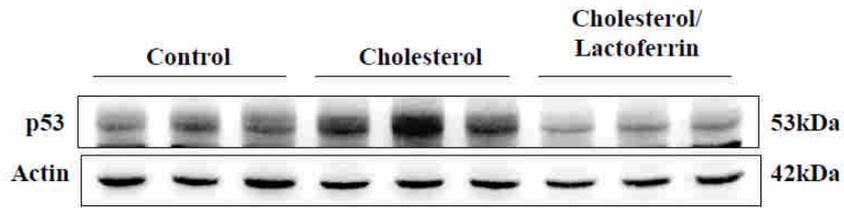
圖十三、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟 IKK α 變化。



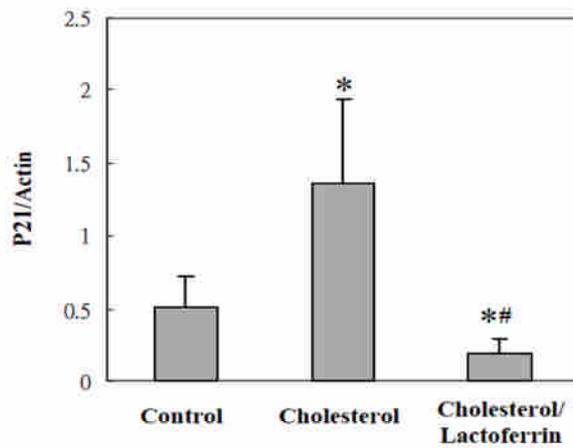
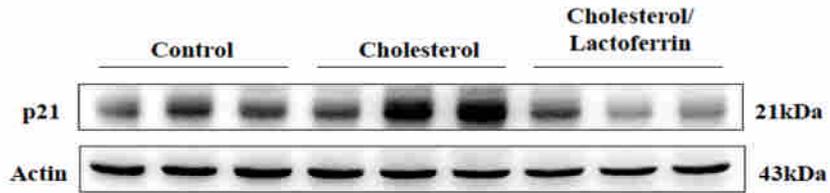
圖十四、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟 NF- κ B 變化。



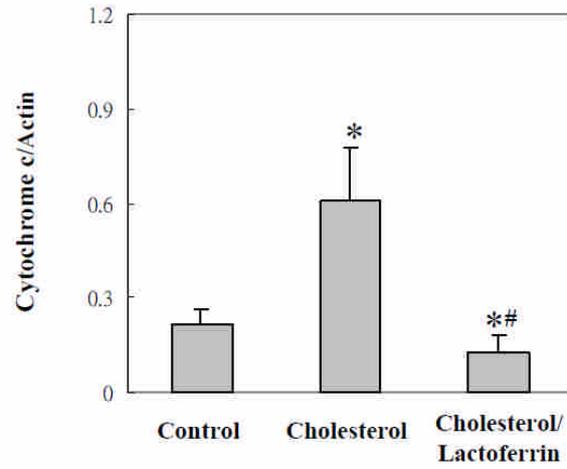
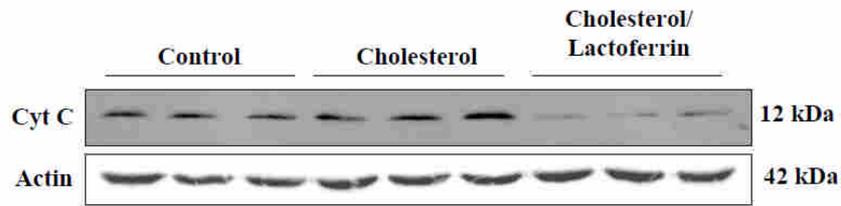
圖十五、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟 iNOS 變化。



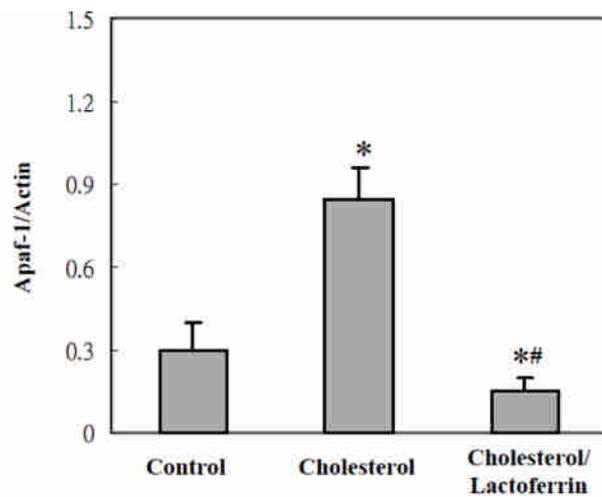
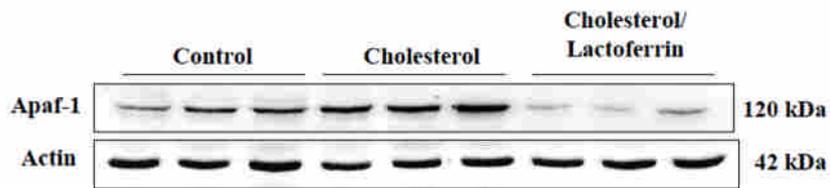
圖十六、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟 P53 變化。



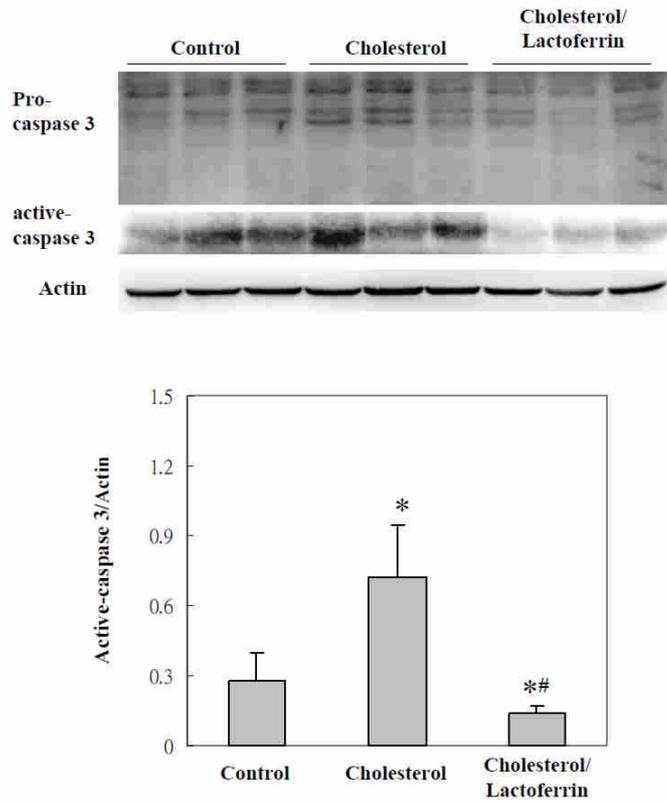
圖十七、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟 P21 變化。



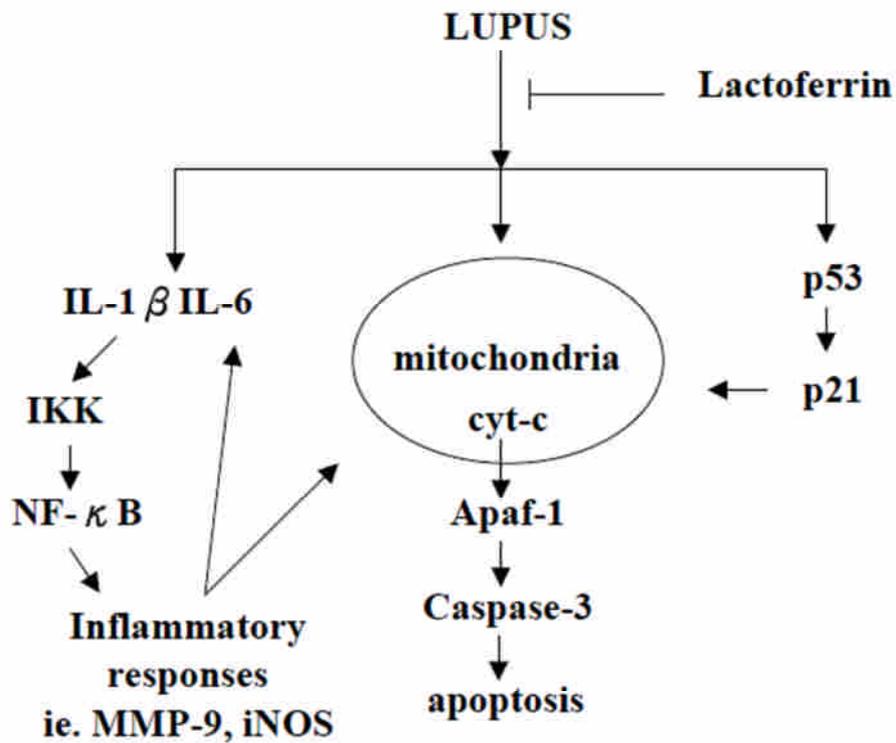
圖十八、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟 cytochrome-c 變化。



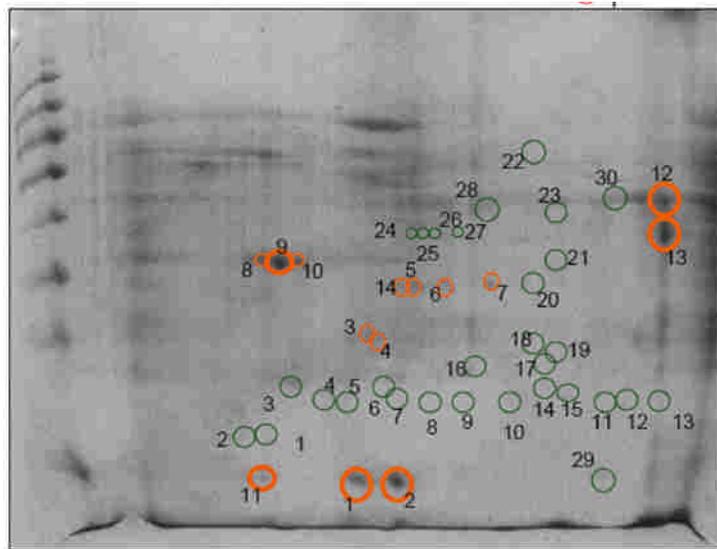
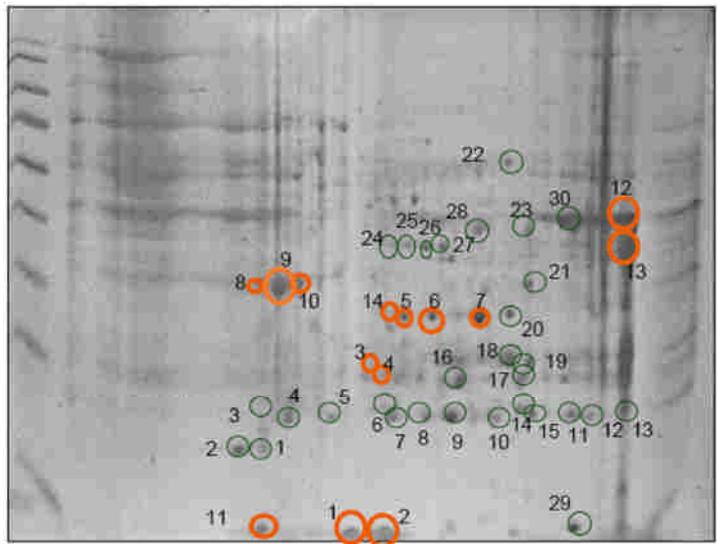
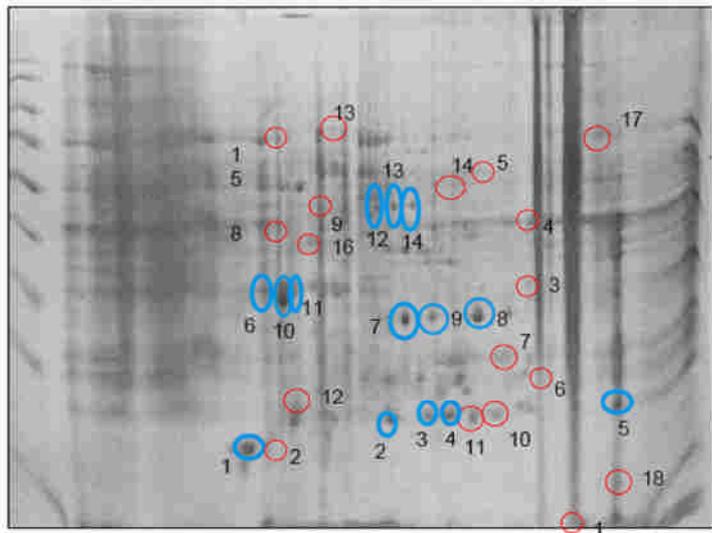
圖十九、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟 Apaf-1 變化。



圖二十、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟 caspase 3 變化。



圖二十一、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟發炎及凋亡機制圖。



圖二十二、餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟雙向電泳圖示。

表一、蛋白質點鑑定

Group Spot #	Control	Cholesterol	Lactoferrin
1	尿蛋白:SLE 患者有關	胜肽脯安基異構酵素	-
2	ATP5A1	PCDHGB5	-
3	Ttc7b	ALDOB	運輸蛋白 Sec24C 相關基因家族:與 SLE 患者有關
4	Prx-1	BHMT2	磷酸結合蛋白 1
5	ATP 合成酶	過氧化氫酵素	ATP 合成酶
6	SMP30	巯基基硫轉移酵素 mu7(Gstm7)	KRT8:與 SLE 患者有關
7	HAAO	磷酸丙糖異構酶(TPI)	-
8	ETF α	甜菜鹼(BHMT2)-同半胱胺酸 甲基轉移酶	-
9	ETF α	ATP5B	-
10	SMP30	CPS1	-
11	SMP30	CPS1	GPX1
12	ENO1	MST1R	Zfp943
13	SMP30	白蛋白	-
14	SMP30	Hbb-b1	HNRPA2B1:與 SLE 患者有關
15	正超氧化物歧化酶	白蛋白	SOD2
16	超氧化物歧化酶	溶酶體轉運調節-CHS 的致病 基因	BLVRB
17	PEBP	Zyg11a	HNRPA2B1:與 SLE 患者有關
18	PRDX5	Slfn10-ps	-
19	細胞色素 b5(Cyb5)	-	ECHS1
20	乙醯基輔酶 A 乙醯基轉移酶 1 前驅物(ACAT1)	-	ETFA
21	乙醯基輔酶 A 乙醯基轉移酶 1(ACAT1)	-	-
22	ARG1	-	-
23	P4HB	-	-
24	熱休克蛋白	-	-
25	-	-	ARG1
26	-	-	Sodh1
27	-	-	Sodh1
28	-	-	IL1RAPL1
29	-	-	-
30	-	-	ACAA2

餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加乳鐵蛋白飼料之狼瘡小鼠肝臟雙向電泳蛋白質點之身分鑑別。

(六)計畫成果自評部份，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、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。

本研究大致上皆符合本計畫預定之進度及預期達成目標。從研究結果發現，乳鐵蛋白確實對於餵食高膽固醇之狼瘡小鼠有明顯的保護效果，特別是在肝臟發炎。此外，乳鐵蛋白亦能提升狼瘡小鼠之 CD8+T 細胞及 CD4+CD25+調節型 T 細胞，更能降低 B 細胞增生，表示乳鐵蛋白對於狼瘡小鼠自體免疫現象的調控，有趨於改善的效果。在肝臟細胞凋亡方面，乳鐵蛋白能有效減緩 P53/P21 及粒線體相關路徑之細胞凋亡訊息，包括降低 cytochrome-c，apaf-1，及 caspase-3 的活性，指出乳鐵蛋白能有效減緩狼瘡及因膽固醇所加劇之肝臟凋亡。除驗證了乳鐵蛋白對狼瘡小鼠肝臟發炎及凋亡的效益及訊息路徑外，也完成了小鼠肝臟之雙向電泳，並在三組老鼠的雙向電泳膠片中，分別挑選了 30 個蛋白質點進行蛋白質身分鑑別，將有助於更進一步分析這些蛋白質在狼瘡之病理機轉中所扮演的角色，及找出狼瘡之治療標靶。目前已將上述研究結果作最後整理，正投稿至國際學術期刊。

- 乳鐵蛋白可應用於減緩狼瘡小鼠全身性發炎。
- 乳鐵蛋白可減緩狼瘡小鼠肝臟細胞凋亡。
- 乳鐵蛋白可提升狼瘡小鼠調節型 T 細胞，改善自體免疫微環境。

出席國際學術會議心得報告

計畫編號	99-2320-B-040-007-MY3 (3/3)
計畫名稱	探討乳鐵蛋白對於紅斑性狼瘡小鼠病理之效益與相關免疫調控機制
出國人員姓名 服務機關及職稱	曾博修 中山醫學大學醫學系/生化暨生技研究所(科)
會議時間地點	2012年9月5日至9月8日，英國 Glasgow
會議名稱	3rd European Congress of Immunology (ECI2012)
發表論文題目	<i>Cystamine ameliorates lupus-associated ventricular hypertrophy by modulating IL-6-mediated mitogen-activated protein kinase pathways</i>

參加會議經過與心得

非常感謝國科會的補助，讓我能夠有經費參與今年9月5日到9月8日在英國 Glasgow 所舉行的第3九屆歐洲免疫學研討會。經過了38個小時的轉機與等待，終於到達了英國的 Glasgow。雖然身體非常的疲憊，但精神上卻很開心。到達下榻旅館稍作整理後，便跳上計程車趕往會場報到。

本次大會的會場為 Glasgow 的 Scottish Exhibition and Conference Centre (SECC)，參加的人數達3000人以上，堪稱年度得盛會。而本次大會的主軸著重在免疫相關的主題上，包括先天免疫、後天免疫、免疫系統疾病、免疫調節等四大區塊，以及相多的有趣議題。使人有既入寶山怎能空手而回的感覺。當下便研究起有興趣的演講及安排聽取的次序。

經過幾天的新知洗禮，獲得了相當多的啟發與新知，尤其是在 autophagy, targeting virus-induced diseases, Rheumatoid Arthritis and Lupus, regulatory T cells 及 Micro RNA 的相關議題及演講。當然還有其他許多有趣的議題相當值得一聽。只可惜有許多有趣的場次因為時間的重疊，所以只能忍痛割愛，選取與本身研究方向較相關的主題聆聽。希望未來歐洲免疫學大會能夠將會議的期程安排的較為寬鬆，讓有興趣的學者們能夠充分的參與討論。不論如何，能有機會參加這個研討會，是個相當寶貴的經驗，而且受益斐淺，對於未來研究工作也會有莫大的鼓舞及幫助。

出席國際學術會議心得報告

計畫編號	99-2320-B-040-007-MY3 (3/3)
計畫名稱	探討乳鐵蛋白對於紅斑性狼瘡小鼠病理之效益與相關免疫調控機制
出國人員姓名 服務機關及職稱	曾博修 中山醫學大學醫學系/生化暨生技研究所(科)
會議時間地點	2012年9月5日至9月8日，英國 Glasgow
會議名稱	3rd European Congress of Immunology (ECI2012)
發表論文題目	<i>Cystamine ameliorates lupus-associated ventricular hypertrophy by modulating IL-6-mediated mitogen-activated protein kinase pathways</i>

參加會議經過與心得

非常感謝國科會的補助，讓我能夠有經費參與今年9月5日到9月8日在英國 Glasgow 所舉行的第39屆歐洲免疫學研討會。經過了38個小時的轉機與等待，終於到達了英國的 Glasgow。雖然身體非常的疲憊，但精神上卻很開心。到達下榻旅館稍作整理後，便跳上計程車趕往會場報到。

本次大會的會場為 Glasgow 的 Scottish Exhibition and Conference Centre (SECC)，參加的人數達3000人以上，堪稱年度得盛會。而本次大會的主軸著重在免疫相關的主題上，包括先天免疫、後天免疫、免疫系統疾病、免疫調節等四大區塊，以及相多的有趣議題。使人有既入寶山怎能空手而回的感覺。當下便研究起有興趣的演講及安排聽取的次序。

經過幾天的新知洗禮，獲得了相當多的啟發與新知，尤其是在 autophagy, targeting virus-induced diseases, Rheumatoid Arthritis and Lupus, regulatory T cells 及 Micro RNA 的相關議題及演講。當然還有其他許多有趣的議題相當值得一聽。只可惜有許多有趣的場次因為時間的重疊，所以只能忍痛割愛，選取與本身研究方向較相關的主題聆聽。希望未來歐洲免疫學大會能夠將會議的期程安排的較為寬鬆，讓有興趣的學者們能夠充分的參與討論。不論如何，能有機會參加這個研討會，是個相當寶貴的經驗，而且受益斐淺，對於未來研究工作也會有莫大的鼓舞及幫助。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/09/08

國科會補助計畫	計畫名稱: 探討乳鐵蛋白對於紅斑性狼瘡小鼠病理之效益與相關免疫調控機制
	計畫主持人: 曾博修
	計畫編號: 99-2320-B-040-007-MY3 學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：曾博修		計畫編號：99-2320-B-040-007-MY3					
計畫名稱：探討乳鐵蛋白對於紅斑性狼瘡小鼠病理之效益與相關免疫調控機制							
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	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力(本國籍)	碩士生	10	10	100%	人次	
		博士生	1	1	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	2	2	100%	篇	本計畫支援部份耗材完成 Hsu TC, Chiu CC, Wang YW, Tzang BS*. Effects of Cystamine on antioxidant activities and regulatory T cells in lupus-prone mice. J Cell Mol Med. 2013 Aug 2. doi: 10.1111/jcmm.12107.
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
							Hsu TC, Tsai CC, Chiu CC, Hsu JD, Tzang BS*. Exacerbating effects of human parvovirus B19 NS1 on liver fibrosis in NZB/W F1 mice. PLoS One. 2013 Jun 28; 8(6):e68393.

						<p>Tzang BS*, Hsu TC, Kao SH, Li SL. Cystamine ameliorates lupus-associated ventricular hypertrophy by modulating IL-6-mediated mitogen-activated protein kinase Pathways. Sep. 5-8, 2012. 3rd European Congress of Immunology (ECI2012), Glasgow, UK</p> <p>Bor-Show Tzang*, Tsai-Ching Hsu, Shao-Hsuan Kao, Cheng-Yi Kuo, Sin-Lun Li. November 17-19, 2011. Protective effects of cystamine against cardiac apoptosis in NZB/W F1 mice. The 5th Autoimmunity Congress Asia. Singapore.</p> <p>Tzang BS*, Hsu TC, Tsai CC, Chen YC. Aug. 22-27, 2010. Taurine attenuates hepatic abnormality and apoptosis in lupus mice. 14th International Congress Of Immunology. Kobe, Japan.</p>
	研討會論文	3	3	100%		
	專書	0	0	100%	章/本	
專利	申請中件數	0	0	100%	件	
	已獲得件數	0	0	100%		
技術移轉	件數	0	0	100%	件	

		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (外國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

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。)	洽談相關產學合作 嘗試將研究成果以保健食品角度應用到減緩狼瘡症狀						
--	-------------------------------------	--	--	--	--	--	--

	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	

國科會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）

本研究大致上皆符合本計畫預定之進度及預期達成目標。從研究結果發現，乳鐵蛋白確實對於餵食高膽固醇之狼瘡小鼠有明顯的保護效果，特別是在肝臟發炎。此外，乳鐵蛋白亦能提升狼瘡小鼠之 CD8+T 細胞及 CD4+CD25+調節型 T 細胞，更能降低 B 細胞增生，表示乳鐵蛋白對於狼瘡小鼠自體免疫現象的調控，有趨於改善的效果。在肝臟細胞凋亡方面，乳鐵蛋白能能有效減緩 P53/P21 及粒線體相關路徑之細胞凋亡訊息，包括降低 cytochrome-c, apaf-1, 及 caspase-3 的活性，指出乳鐵蛋白能能有效減緩狼瘡及因膽固醇所加劇之肝臟凋亡。除驗證了乳鐵蛋白對狼瘡小鼠肝臟發炎及凋亡的效益及訊息路徑外，也完成了小鼠肝臟之雙向電泳，並在三組老鼠的雙向電泳膠片中，分別挑選了 30 個蛋白質點進行蛋白質身分鑑別，將有助於更進一步分析這些蛋白質在狼瘡之病理機轉中所扮演的角色，及找出狼瘡之治療標靶。目前已將上述研究結果作最後整理，正投稿至國際學術期刊。