

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

探討牛磺酸對紅斑性狼瘡之免疫機制影響與相關訊息路徑
(第3年)

研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2320-B-040-025-MY3
執行期間：98年08月01日至99年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系生物化學科

計畫主持人：曾博修
共同主持人：徐再靜
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：楊玉綉；
碩士班研究生-兼任助理人員：陳木林
碩士班研究生-兼任助理人員：黃柏豫
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

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：本計畫可公開查詢

中華民國 99 年 10 月 05 日

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

探討牛磺酸對紅斑性狼瘡之免疫機制影響與相關訊息路徑 (3/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC96-2320-B-040-025 MY3

執行期間：96年8月1日至99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：陳木林，黃柏豫，林雨潔，王中達，楊玉琇

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

中華民國 99年 9月 15日

中、英文摘要及關鍵詞(keywords)

摘要

近年來，有許多文獻指出全身性紅斑性狼瘡病人肝臟代謝上及心臟的異常，並認為是自體反應產生的重要源頭，尤其在自體抗原的暴露及自體抗體的產生。所以這些現象被是狼瘡重要的致病機轉，且與狼瘡疾病的嚴重程度有關。因牛磺酸已知可以清除血脂、預防脂質氧化、保護因氧化而導致組織傷害的器官，所以本計畫利用 NZB/W F1 作為實驗動物模式，探討牛磺酸在全身性紅斑性狼瘡小鼠之肝臟及心臟的保護效益。

我們第一年的實驗結果顯示，牛磺酸可降低餵食高膽固醇狼瘡小鼠生理上之異常，包括狼瘡小鼠平均血壓、酯質儲存，血清三酸甘油酯，ALT 及 ALT 數值。而利用西方墨點法發現在狼瘡小鼠血清及肝臟中 C 反應蛋白表現也具有下降的情形。這些結果指出，牛磺酸能有效降低因膽固醇誘發的一些發炎現象，對狼瘡小鼠 NZB/W F1 肝臟達到保護的作用。

在第二年的實驗中，我們更深入探討牛磺酸保護狼瘡小鼠肝臟凋亡的分子機制。本年度的研究結果發現，牛磺酸可降低餵食高膽固醇狼瘡小鼠肝臟接受器相關及粒腺體相關的肝細胞凋亡，包括 Fas，活化型 Caspase-8，活化型 Caspase-9, Apaf-1, Bax, Bad, 及 Cytochrome C 蛋白質的表現量。而與凋亡相拮抗的 BCL-2 蛋白質，則顯著上升。此外，牛磺酸能顯著提升 MAPK 路徑中三個主要路徑的蛋白質，磷酸化 AKT, P65, 及 ERK 1/2 蛋白質的表現，促進肝臟細胞存活訊息。

在第三年的實驗結果中，我們分析了牛磺酸對狼瘡小鼠心臟的保護效益，發現牛磺酸可降低狼瘡小鼠心臟之 FAS-依賴型、粒線體-依賴型凋亡及纖維化訊息。此外，更能提升 IGFR 依賴型的存活訊息。這些實驗結果驗證了牛磺酸對於狼瘡小鼠肝臟及心臟凋亡減緩的效果，並相對提高存活訊息的表現，相信在未来可考慮應用在狼瘡病患之保健，甚至治療方面。

關鍵字: 凋亡，紅斑性狼瘡，牛磺酸，肝臟，心臟

Abstract

Various studies have indicated the hepatic and cardiac abnormalities in pathogenesis and disease activity of SLE patients. Since taurine has been demonstrated to decrease serum lipid and protect various tissues from oxidant injury, this study intends to use NZB/W F1 mice as experimental model to investigate the effect of taurine in SLE and cholesterol-induced hepatic abnormality in SLE.

Our experimental results of first year indicated the effects of taurine in decreasing average blood pressure, lipid deposit, total glycerol, serum AST and ALT. Additionally, significantly decreased serum CRP and hepatic CRP was also observed. These findings strongly suggest the beneficial effects of taurine on hepatic protection in NZB/W F1 mice that were fed with high cholesterol diets.

In the second year, we further investigated the protective effects and mechanism of taurine on hepatic apoptosis in NZB/W F1 mice. Our experimental results revealed that the Fas and mitochondrial dependent apoptotic molecules, including Fas, activated caspase-8 and caspase-9, apaf-1, Bax, Bad and Cytochrome C, were significantly reduced in livers of mice fed with high-cholesterol/taurine diet. In contrast, significantly increased BCL-2 expression and various survival signaling components such as phosphorylated AKT, P65 and ERK 1/2, were founded in livers of mice fed with high-cholesterol/taurine diet.

In the third year, the protective mechanism of taurine on cardiac apoptosis and hypertrophy are investigated. The Fas and mitochondrial dependent cardiac apoptosis and cardiac fibrosis were reduced significantly in mice that were treated with high-cholesterol/taurine diet. Meanwhile, cardiac IGF1R survival signaling was significantly induced in mice that were treated with high-cholesterol/taurine diet. These findings provide clues and evidences for taurine in improving the living quality or treatments for SLE patients.

Key words: Apoptosis, Systemic lupus erythematosus (SLE), Taurine, Liver, Heart

(三) 報告內容：

研究背景

紅斑性狼瘡(Systemic lupus erythematosus, SLE)，是一種全身性自體免疫疾病，會侵犯全身器官或組織，包括皮膚、關節、心臟、血管、肝臟、腎臟、腦部和神經系統[Winchester et al., 1996; Mok et al., 2003]。目前對紅斑性狼瘡的致病原因仍不清楚，但認為與遺傳、免疫缺陷、病毒感染、UV 及藥物有關[Tan et al., 1966]。

近年在紅斑性狼瘡的研究中發現，病患肝臟異常的盛行率相當高。有文獻指出，238 個紅斑性狼瘡病患中，其中有 39%肝腫大、6%脾腫大、24%黃疸和 21%肝功能不正常[Herlong et al., 1994; Lu et al., 2006]。在另一個研究中發現，81 個紅斑性狼瘡病患中，就有 55%肝臟酵素不正常[Abraham et al., 2004]。另外，流行病學研究也指出，紅斑性狼瘡病人心血管疾病(CVD)的危險因子及發生率比正常族群高出許多，並和動脈粥樣硬化有重要關聯[Jara et al., 2006]。小於 45 歲的紅斑性狼瘡婦女，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[Gorman et al., 2004]。而我們近幾年的動物模式研究中也發現狼瘡鼠具有顯著肝臟及心臟的發炎反應和細胞凋亡[Hsu et al., 2008; Huang et al., 2009]。這些現象確實凸顯出自體免疫疾病，特別是紅斑性狼瘡，的肝臟及心臟之異常及凋亡，為極重要之病灶。目前全身性紅斑性狼瘡的治療方式有以下幾種，包括非固醇類抗發炎 (NSAID) 或抗瘡藥 (例如 Hydroxychloroquine)，口服的固醇類藥品(如 Prednisolone)和免疫抑制劑 (例如 Azathioprine 或 Cyclophosphamide)。但很可惜的是，治療的藥物可能造成：體內水分滯留，而使血壓升高、增高血脂與血糖、刺激腸胃道而引起潰瘍、減少流至腎臟的血流量，而造成腎臟的傷害。然而這幾年研究，證實牛磺酸確實可以調節脂肪消化吸收、維持血糖恆定、滲透壓之調節(osmoregulator)、以及降低血脂的功能。牛磺酸為成人的非必需胺基酸，它並不會結合成蛋白質，在大多數的組織中是游離的狀態存在，可由甲硫胺酸等胺基酸在人體中代謝合成；牛磺酸之生合成是以甲硫胺酸 (Methionine) 和半胱氨酸(cysteine)等含硫胺基酸代謝成半胱胺酸亞硫酸鹽(cysteine sulfinic acid; CSA)，再經由脫羧作用而形成過氧化牛磺酸(hypotaurine)，再經由氧化作用生成牛磺酸，在這個合成過程中 CSA 脫羧酶 (cysteine sulfinic acid decarboxylase;CSAD)為關鍵酵素，其輔助因子為維生素 B6 [Brosnan et al., 2006; Bouckennooghe et al., 2006]。而許多研究證實，牛磺酸確實可以調節脂肪消化吸收、維持血糖恆定、調節滲透壓、降低血脂、刺激神經的調節、預防動脈硬化、以及防止脂質過氧化等[Brosnan et al., 2006; Bouckennooghe et al., 2006]。但牛磺酸對狼瘡之效益仍無相關之研究。

實驗結果

在第一年度中，我們將狼瘡小鼠分成三組，分別餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加上牛磺酸之飼料 13 週後，犧牲小鼠進行分析。表一為三組實驗小鼠之飼料成分表。而

此三組小鼠之體重及心跳在飼育期間並無明顯差異〔圖一及圖二〕，但是餵食高膽固醇之小鼠其平均動脈壓卻有顯著上升；而餵食高膽固醇加上牛磺酸飼料之小鼠其平均動脈壓相較餵食高膽固醇小鼠有顯著下降〔圖三〕。當小鼠犧牲後，我們秤量其肝臟重量，發現餵食高膽固醇之小鼠其肝臟重量顯著上升；而餵食高膽固醇加上牛磺酸飼料之小鼠其肝臟重量相較餵食高膽固醇小鼠有顯著下降〔表二〕。利用蘇丹3號染色後，發現牛磺酸確實有效降低狼瘡小鼠肝臟脂肪堆積〔圖四〕。此外，我們的實驗結果也顯示牛磺酸可以有效降低餵食膽固醇之狼瘡小鼠的血液中三酸甘油酯濃度〔圖五〕，以及AST及ALT的數值〔圖六〕。在C反應蛋白的表現上，牛磺酸也被發現可以有效降低高膽固醇飲食誘發之發炎反應，包括肝臟中及血清中之C反應蛋白質的表現〔圖七，圖八〕。這些結果指出膽固醇飲食會增加狼瘡小鼠疾病嚴重度，而牛磺酸能有效減緩這些發炎反應。

在第二年度中，我們更進一步分析牛磺酸對於高膽固醇食物所誘發的狼瘡小鼠肝臟凋亡的影響。首先我們先利用Caspase-3活性試劑組，檢測餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠發病前後之肝臟中Caspase-3的活性，發現餵食正常飼料，高膽固醇飼料發病後的狼瘡小鼠，其Caspase-3的活性顯著升高〔圖九，A〕，而餵食高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠，其肝臟中Caspase-3的活性相較其他兩組則顯著降低。再以TUNEL試驗分析三組小鼠肝臟切片，也發現餵食高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠肝臟中TUNEL-positive細胞相較其他兩組小鼠顯著降低〔圖九，B〕。所以我們更進一步分析牛磺酸對於狼瘡小鼠肝臟凋亡機制的影響為何。首先我們檢測了Fas-dependent 凋亡路徑，發現餵食高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠，其肝臟之Fas〔圖十〕，活化型Caspase-8〔圖十一〕蛋白質的表現量，有顯著的降低。同時，我們也檢測了粒腺體相關的凋亡路徑，發現餵食高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠，其肝臟之活化型Caspase-9〔圖十二，A〕，Apaf-1〔圖十二，B〕，Bax〔圖十三，A〕，Bad〔圖十三，B〕，及Cytochrome C〔圖十四，A〕蛋白質的表現量，都有顯著的降低。而與凋亡相拮抗的BCL-2蛋白質則在餵食高膽固醇加牛磺酸飼料狼瘡小鼠肝臟中，有顯著的升高〔圖十四，B〕。為了更進一步確認餵食牛磺酸對狼瘡小鼠肝臟凋亡減緩的現象，是否與會提升促進肝臟細胞存活的訊息，我們檢測了MAPK路徑中三個主要路徑的蛋白質，磷酸化AKT，P65，及ERK 1/2蛋白質。結果我們發現這三個蛋白質在餵食高膽固醇加牛磺酸飼料狼瘡小鼠肝臟中都有顯著的升高〔圖十五〕。這些發現證明了牛磺酸能有效抑制狼瘡小鼠肝臟凋亡，並促進肝臟細胞存活訊息。

流行病學研究指出，狼瘡病人心血管疾病的危險因子及發生率較正常族群高出許多，並和動脈粥樣硬化有重要關聯〔Jara et al., 2006〕。而小於45歲的狼瘡婦女，比同齡健康婦女患心肌梗塞(MI)的機率高出50倍〔Gorman et al., 2004〕。所以我們在第三年度中，更進一步分析牛磺酸對於狼瘡小鼠心臟之保護效益。首先我們利用福馬林固定餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟，進行組織切片後染色後〔圖十六，A〕，

可見到餵食高膽固醇飼料之狼瘡小鼠之心臟細胞排列方向較餵食正常飼料小鼠之心臟紊亂，而在餵食高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟細胞排列又回復較為正常。相似狀況也在 TUNEL 螢光染色的實驗中發現[圖十六, B]。由 TUNEL 量化解果可知[圖十六, C]，在餵食高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟細胞凋亡的現象，較餵食正常飼料及高膽固醇飼料的狼瘡小鼠減少很多。進一步分析狼瘡小鼠心臟之 Fas 依賴型凋亡相關蛋白質分子，發現餵食高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟的 TNF- α 、Fas L、Fas、Fadd 等分子，表現上較餵食正常飼料及高膽固醇飼料狼瘡小鼠減少很多[圖十七]。相同現象也在粒線體依賴型凋亡相關蛋白質分子的表現上發現，包括活化型 Caspase 8 及 tBid 蛋白質[圖十八]。此外，餵食高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟之 Bcl-2、Bax 相較餵食正常飼料或高膽固醇飼料狼瘡小鼠表現顯著增加，而活化型 Caspase 9 及活化型 Caspase-3 之表現則降低[圖十九]。在心臟纖維化相關分子則發現，餵食高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟之 FGF、p-ERK、ERK、uPA、MMP-2 及 MMP-9 蛋白分子的表現較餵食正常飼料或高膽固醇飼料狼瘡小鼠表現顯著降低[圖二十]。最後，我們還發現狼瘡小鼠若餵食高膽固醇加牛磺酸飼料，相較餵食正常飼料及高膽固醇飼料之心臟之存活訊息相關分子，包括 IGFIR、PI3K 及 Akt，會顯著上升[圖二十一]。總而言之，本年的實驗結果證實牛磺酸可降低狼瘡小鼠心臟之 FAS-依賴型、粒線體-依賴型凋亡及纖維化訊息。此外，更能提升 IGFR 依賴型的存活訊息[圖二十二]。相信未來對於作為狼瘡病患之日常保健甚至是治療，具有一定的潛力。

(四)參考文獻

- Abraham et al., 2004 S. Abraham, S. Begum and D. Isenberg, Hepatic manifestations of autoimmune rheumatic diseases, *Ann. Rheum. Dis.* 63 (2004), pp. 123–129.
- Bouckenooghe T, Remacle C, Reusens B "Is taurine a functional nutrient?". *Curr Opin Clin Nutr* 9 (6): 728-733,2006
- Brosnan J, Brosnan M. "The sulfur-containing amino acids: an overview.". *J Nutr* 136 :1636S-1640S,2006
- Gorman C. and Isenberg D. , Atherosclerosis and lupus , *Rheumatology*, Aug 2004; 43: 943 - 945.
- Herlong, 1994 H.F. Herlong, Approach to the patient with abnormal liver enzymes, *Hosp. Pract. (Off. Ed.)* 29 (1994), pp. 32–38.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003; 56:481–90.
- 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.
- Winchester RJ. Systemic lupus erythematosus pathogenesis. In: Koopman WJ. Eds. *Arthritis and Allied Conditions*. Birmingham Alabama: William and Wilkins, 1996:1361-91.

(五)附表及附圖

Table 1 Compositions of experimental diets (g/kg)

Ingredients	Experimental groups		
	Control	Cholesterol	Cholesterol + taurine
5001 ^a	930	920	910
Soybean oil	70	70	70
Cholesterol	0	10	10
Taurine	0	0	10

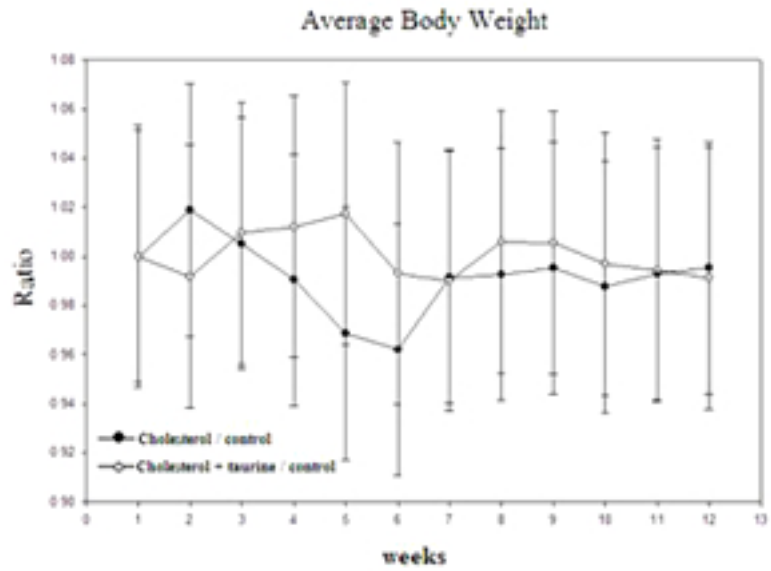
^a 5001 indicates chow diet, Rodent 5001

Table 2 The ratio of liver-to-body weight.

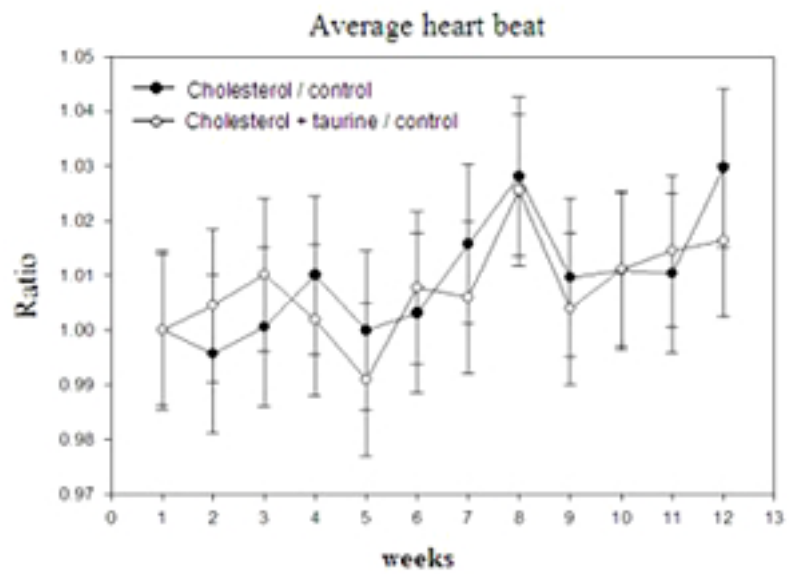
Groups	Liver weight / Body weight	P value
Control	0.0490±0.0025	
Cholesterol	0.0552±0.0023 [*]	0.0026
Cholesterol + taurine	0.0483±0.0038 [#]	0.0015

^{*} Indicates cholesterol vs. control

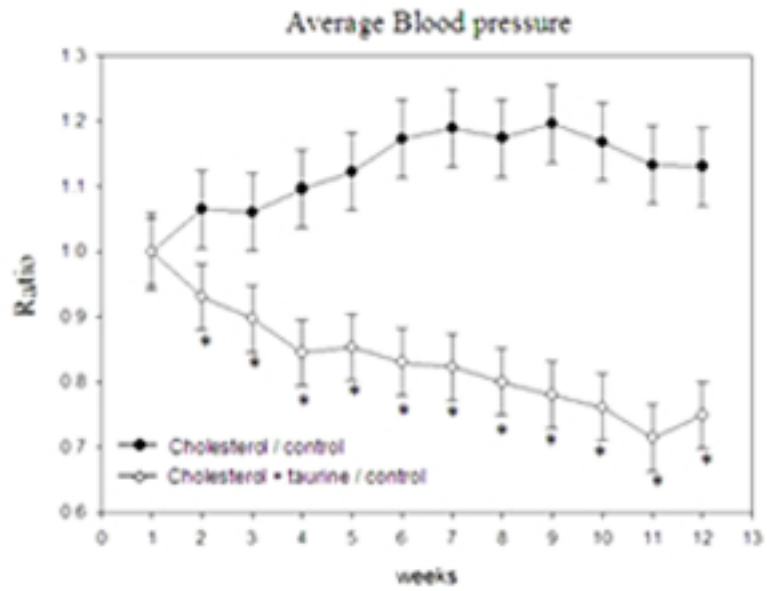
[#] Indicates (cholesterol + taurine) vs. cholesterol



圖一，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠體重變化。



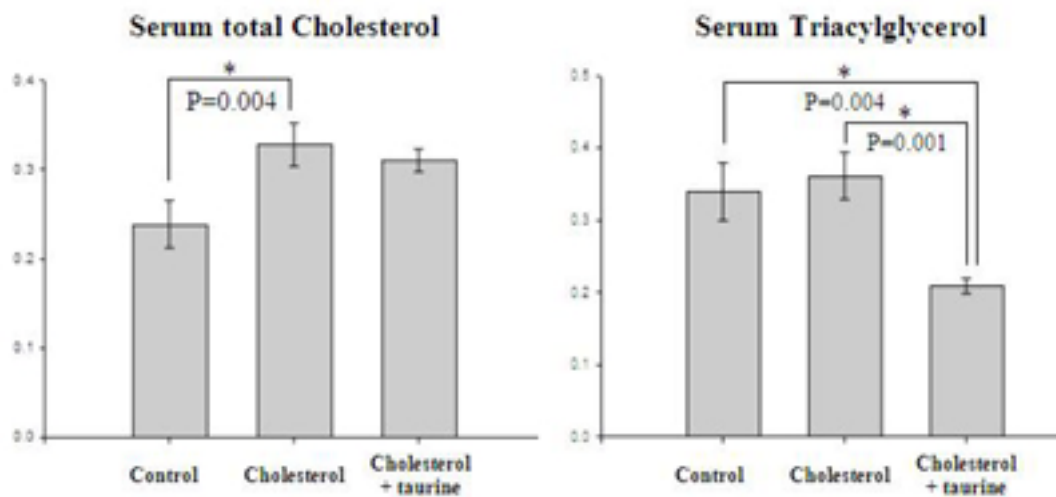
圖二，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心跳變化。



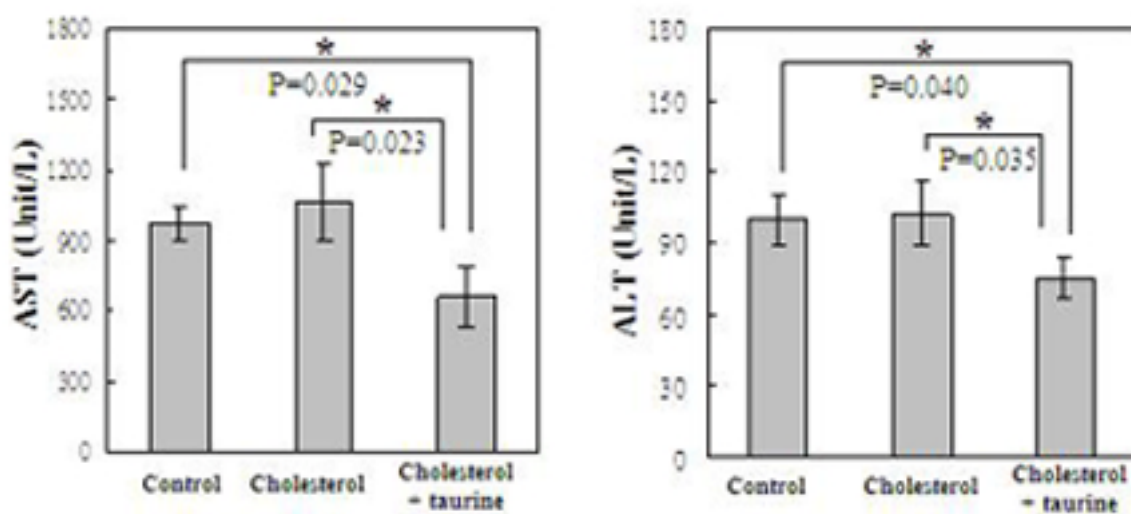
圖三，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠血壓變化。



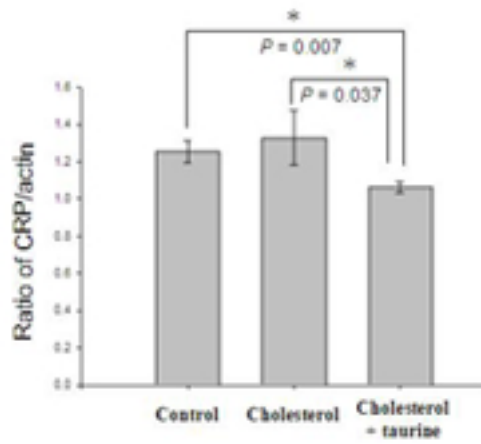
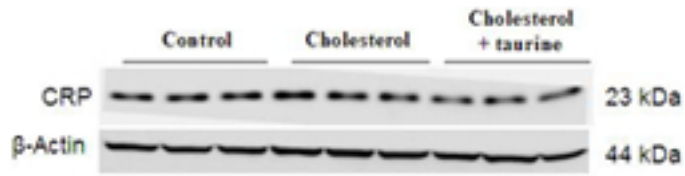
圖四，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠肝臟切片之蘇丹3號染色結果。



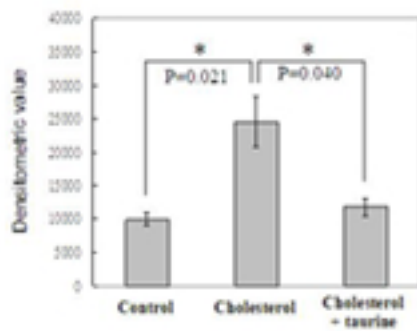
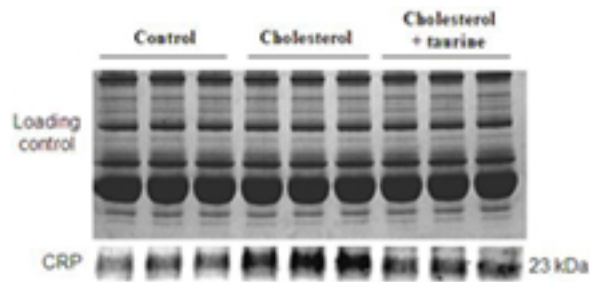
圖五，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠血清中總膽固醇及三酸甘油酯之變化。



圖六，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠血清中AST及ALT之變化。

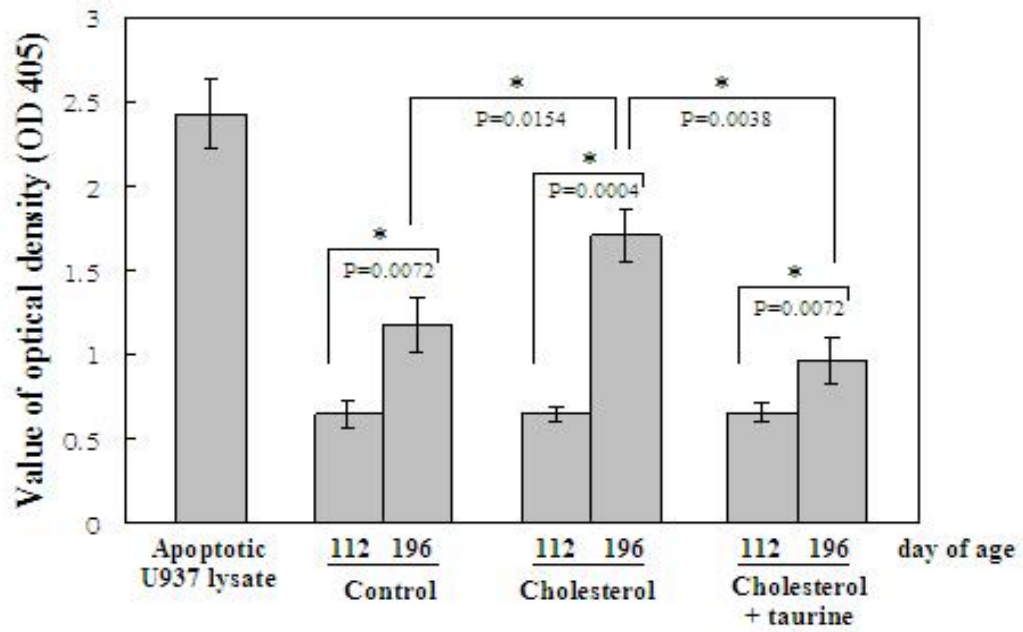


圖七，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠肝臟中 CRP 變化。

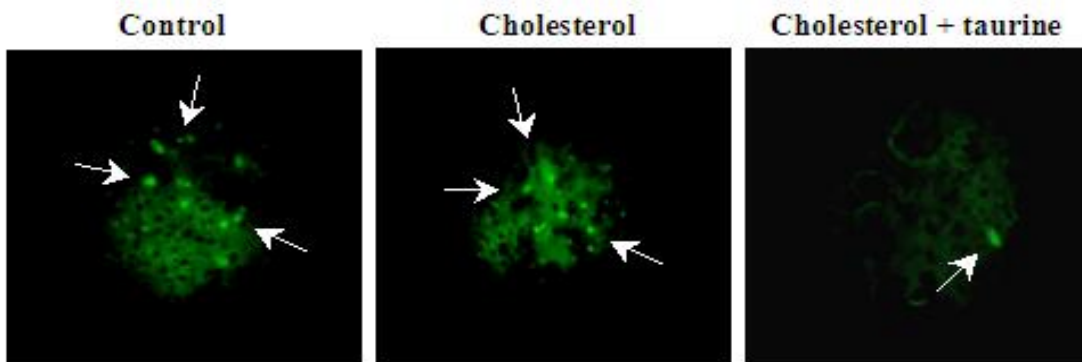


圖八，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠血清中 CRP 變化。

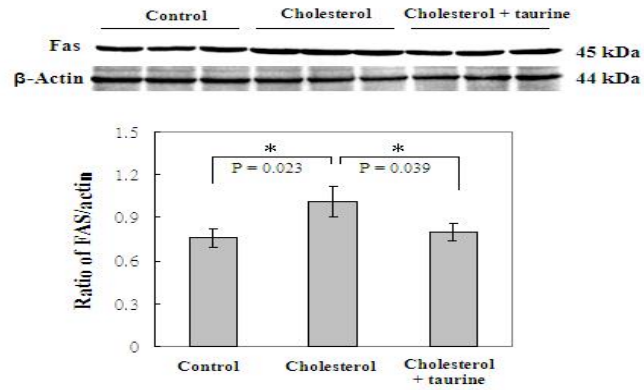
A



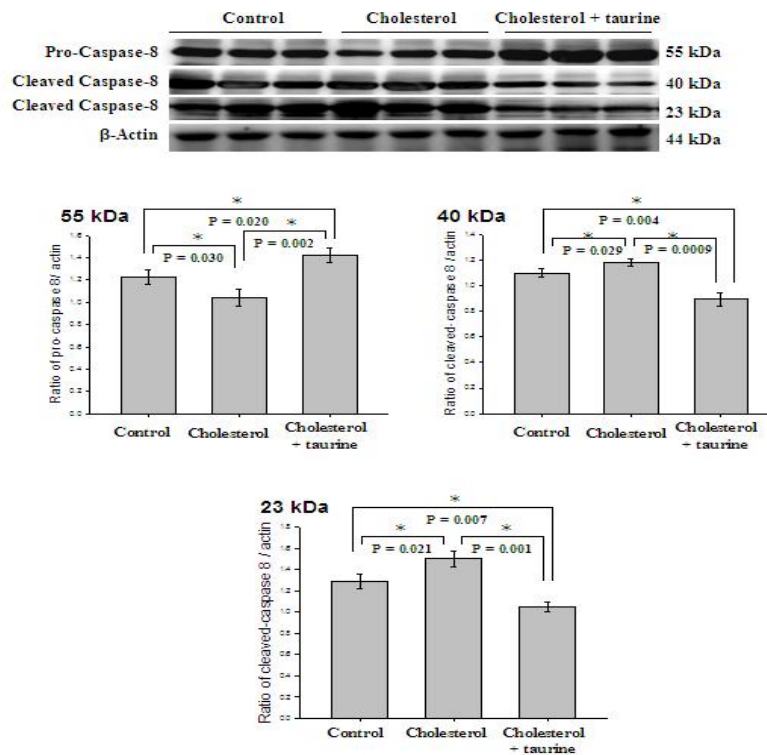
B



圖九，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠發病前後之(A)肝臟 Caspase 3 活性以及(B)肝臟切片後之 TUNEL-positive 凋亡細胞。

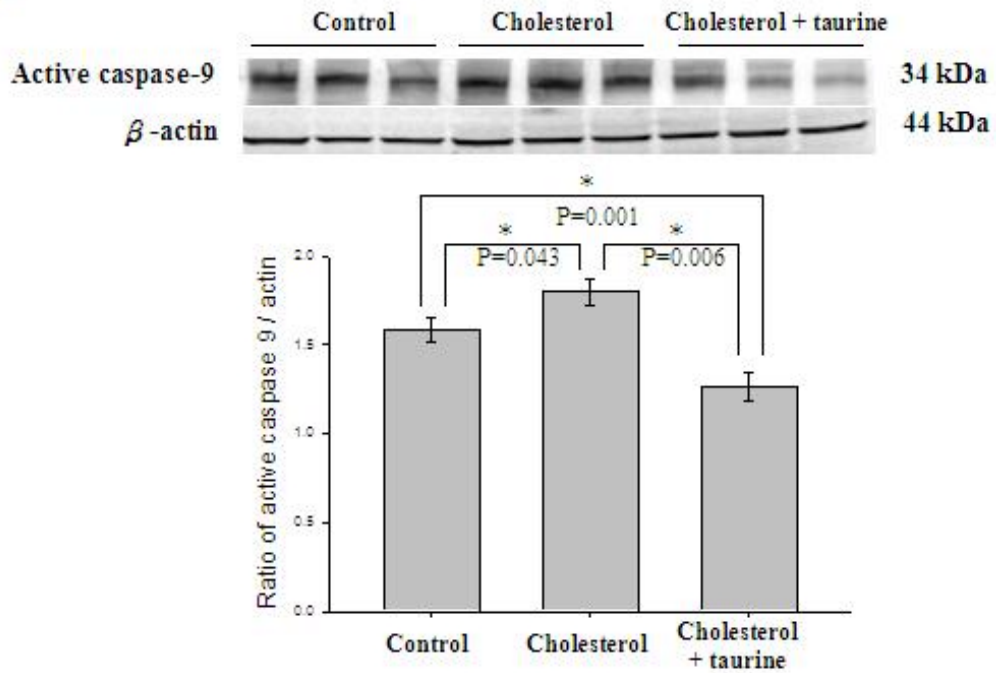


圖十，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠肝臟中 Fas 蛋白質的表現量。

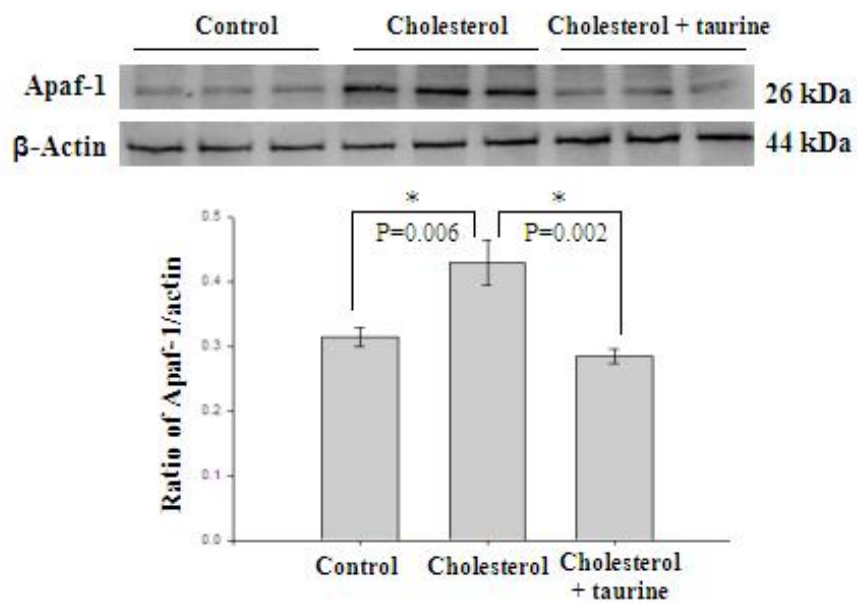


圖十一，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠肝臟中 Pro-caspase 8 及 cleaved-caspase 8 蛋白質的表現量。

A

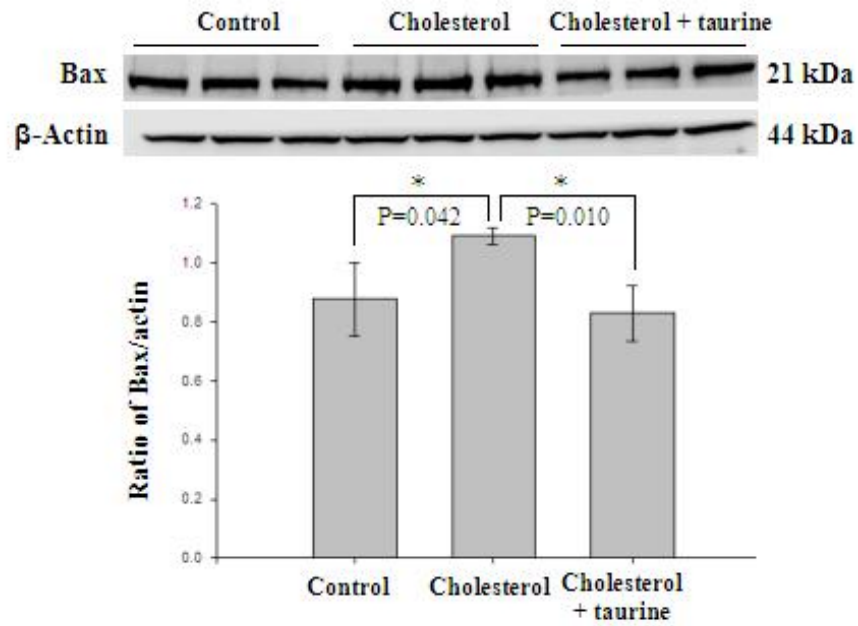


B

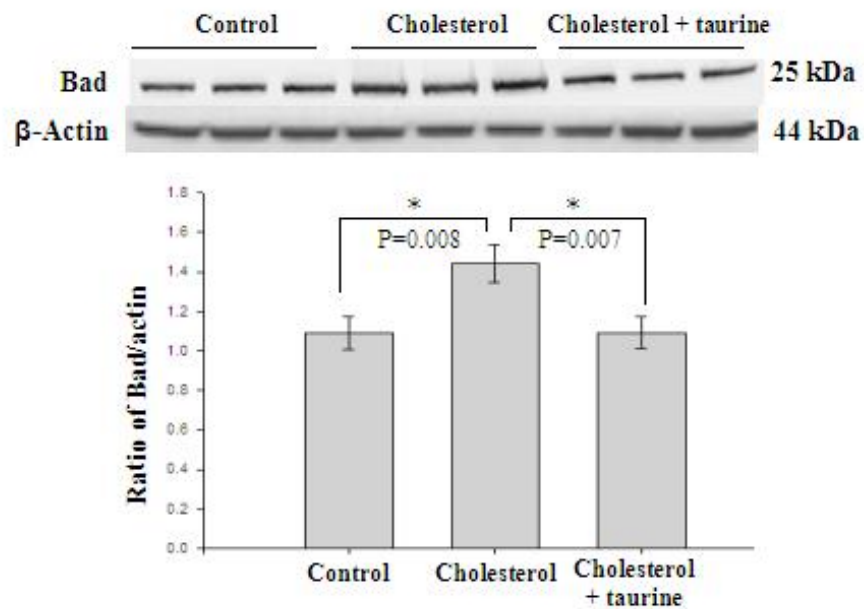


圖十二，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠肝臟中(A) active caspase 9 及(B) Apaf-1 蛋白質的表現量。

A

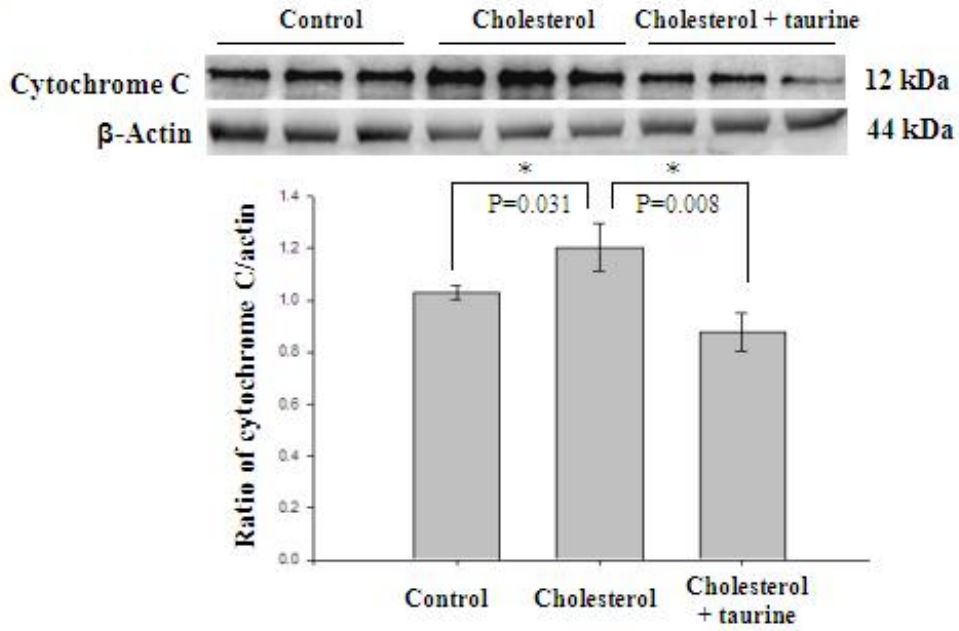


B

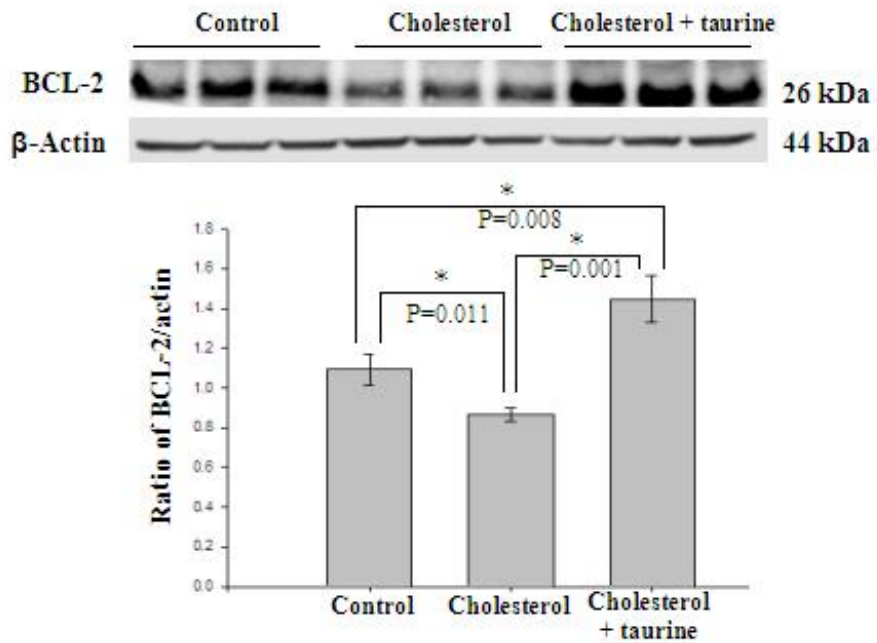


圖十三，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠肝臟中(A) Bax 及(B) Bad 蛋白質的表現量。

A

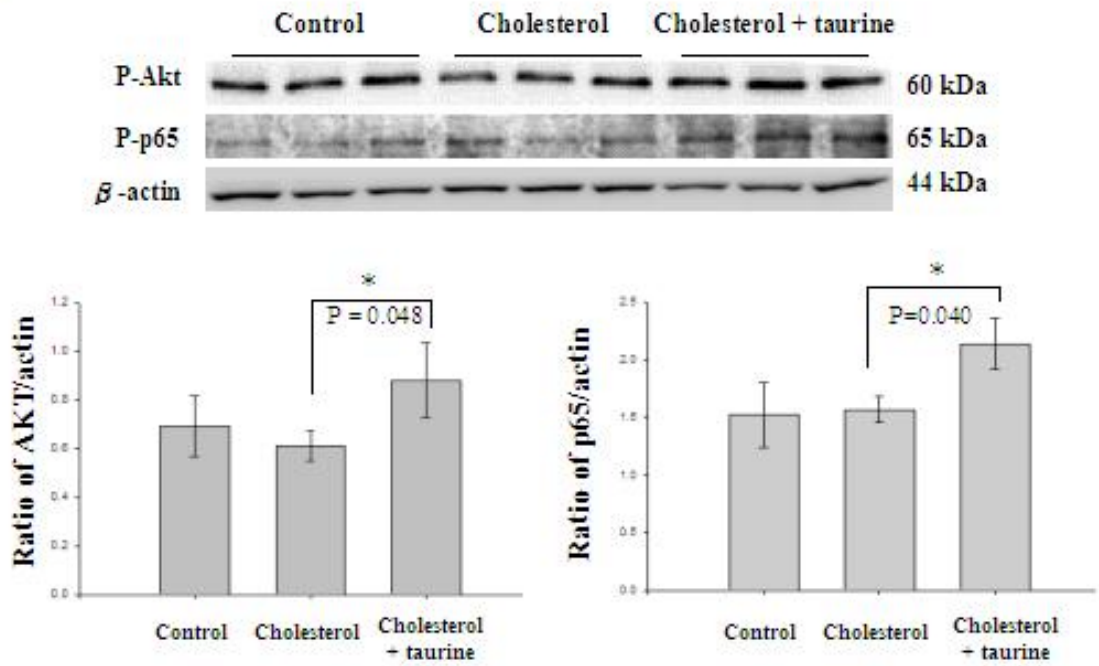


B

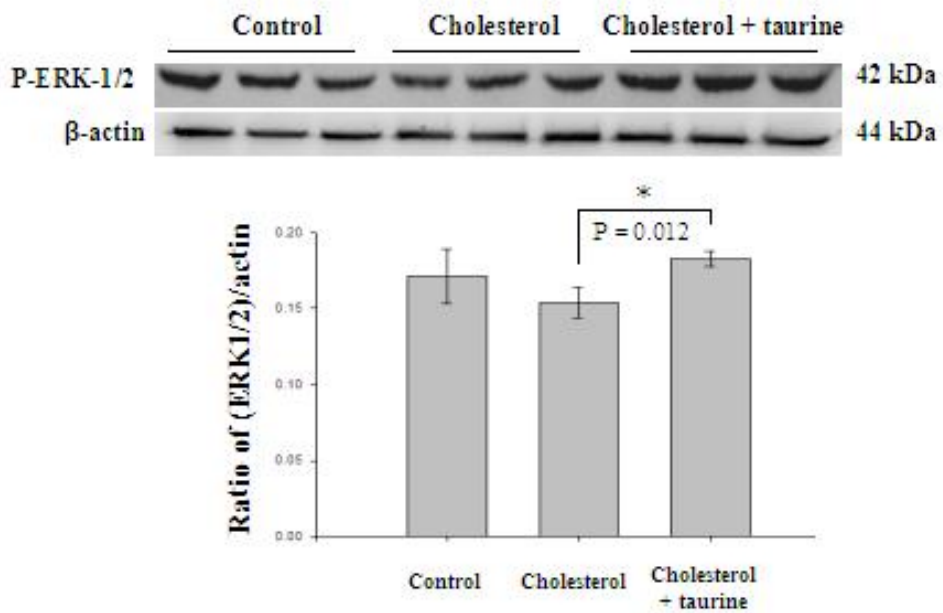


圖十四，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠肝臟中(A) Cytochrome C 及(B) BCL-2 蛋白質的表現量。

A



B



圖十五，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠肝臟中(A) 磷酸化 AKT，磷酸化 P65 及(B) 磷酸化 EKR 1/2 蛋白質的表現量。

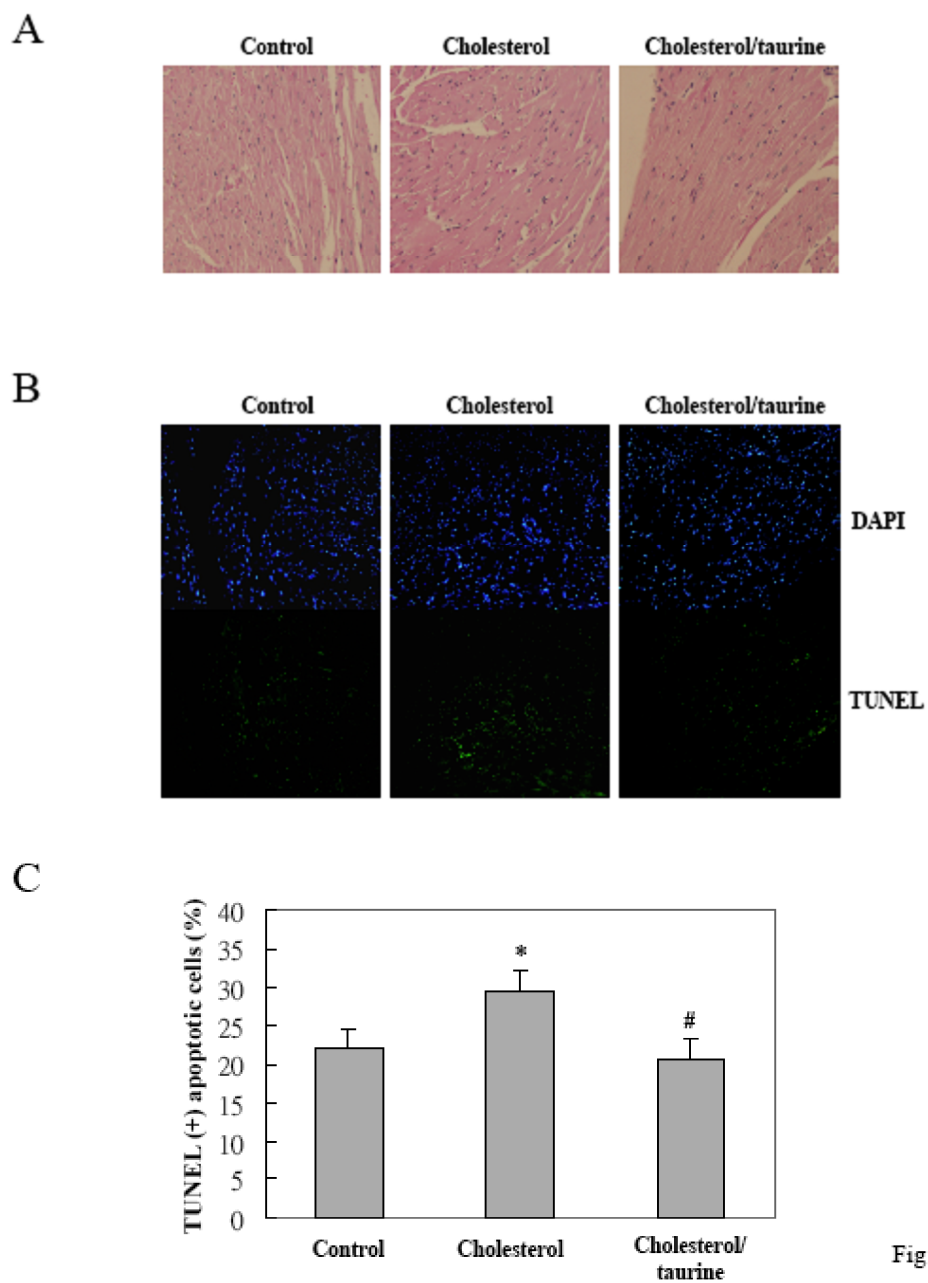
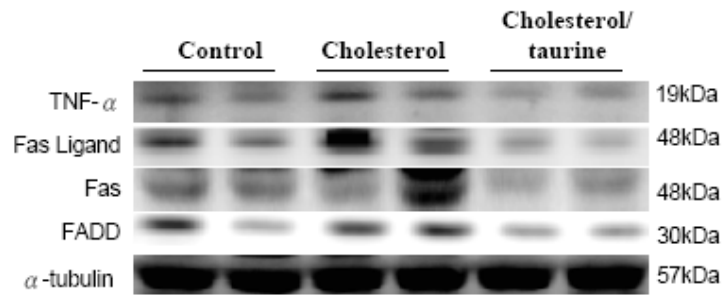


Fig 1

圖十六，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟(A) Trichrome 染色 (B) TUNEL 螢光染色及 (C) TUNEL 量化分析。

A



B

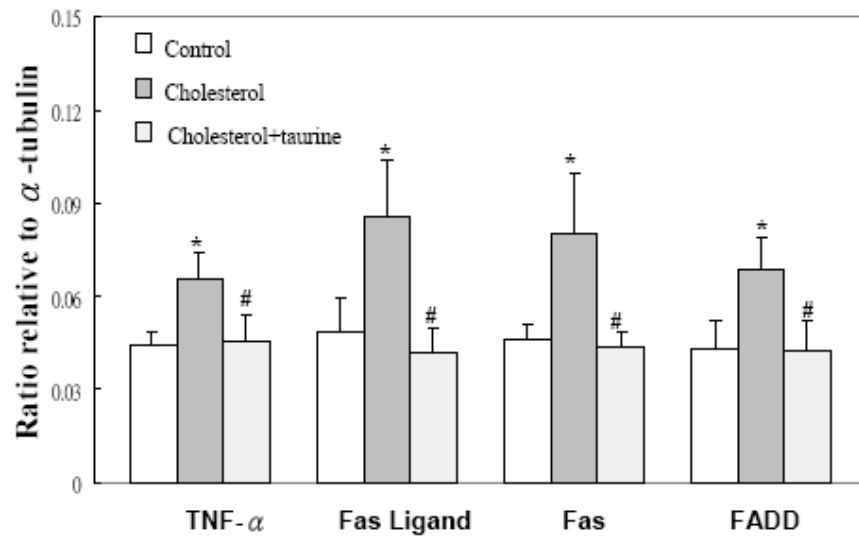
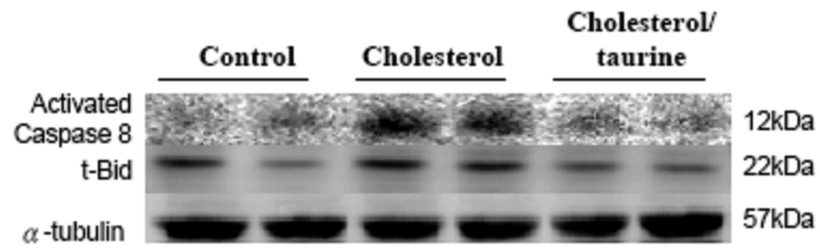


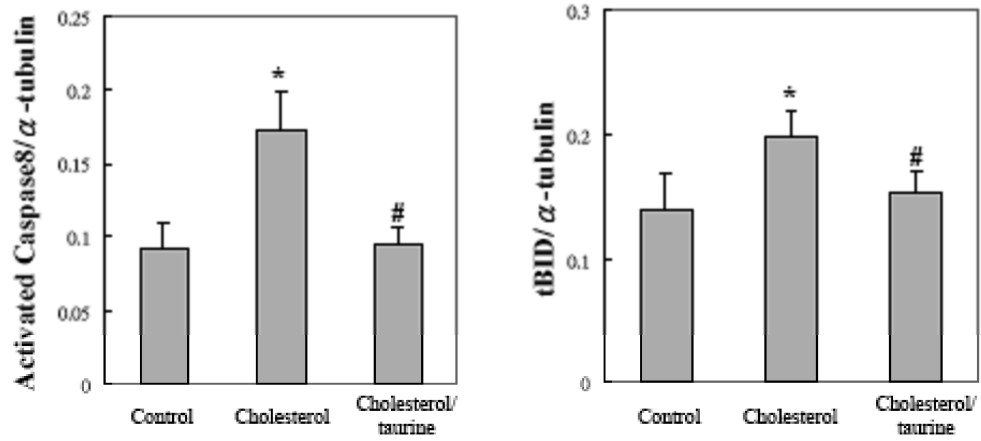
Fig 2

圖十七，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟之(A) TNF- α 、Fas L、Fas、Fadd、 α -tubulin 西方墨點結果及其(B)量化分析。

A

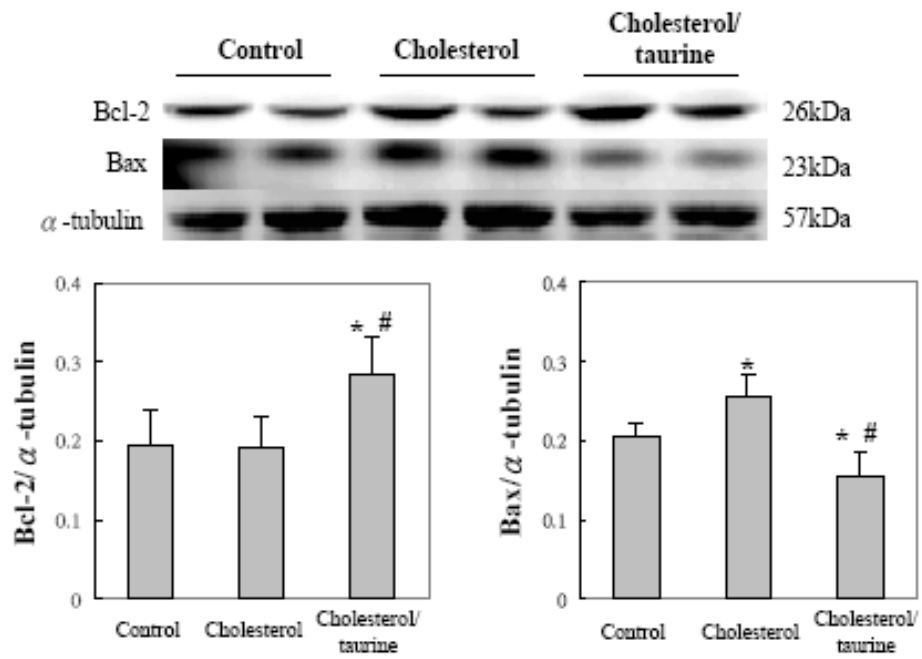


B

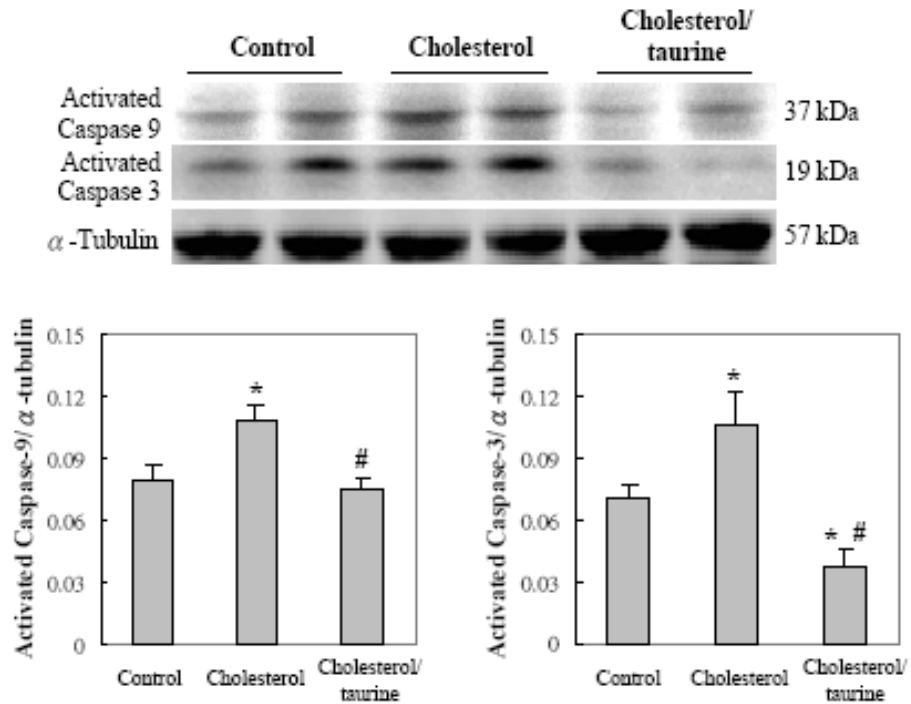


圖十八，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟之(A) activated Caspase 8、tBid、 α -tubulin 西方墨點結果及其(B)量化分析。

A



B



圖十九，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟之(A) Bcl-2、Bax、activated Caspase 9、activated Caspase-3、 α -tubulin 西方墨點結果及其(B)量化分析。

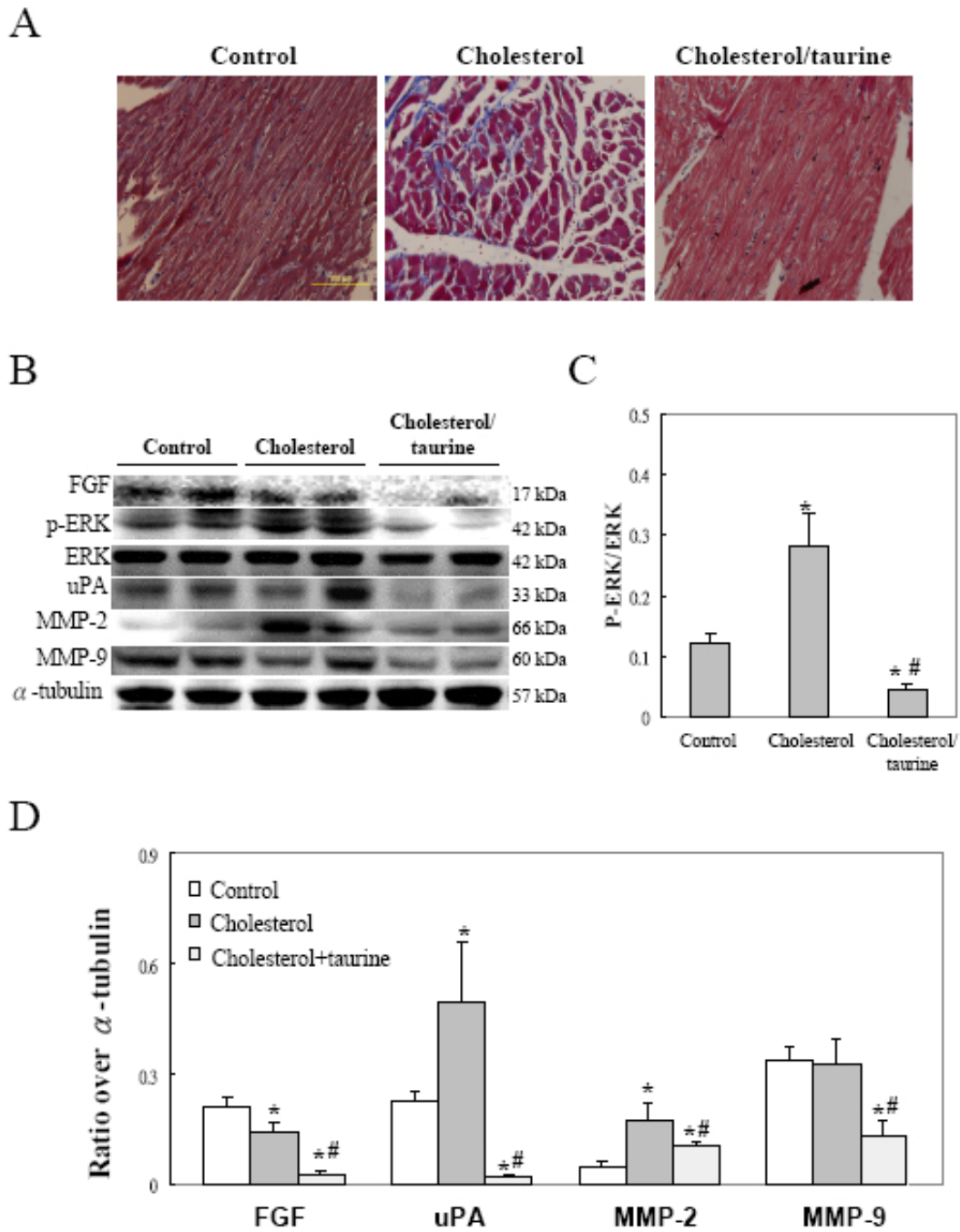
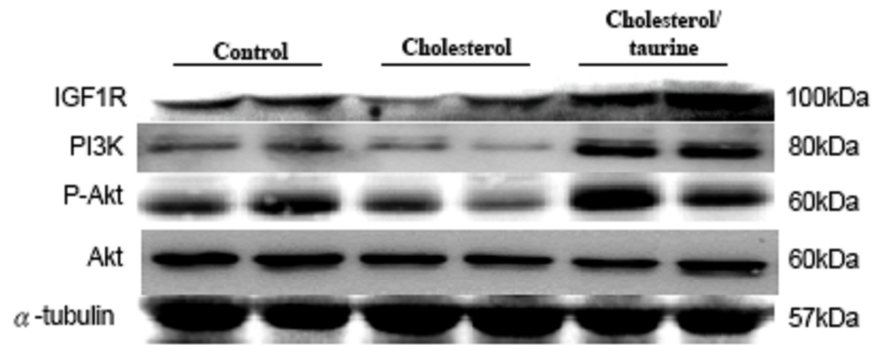


Fig 5

圖二十，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟之(A) Trichrome 染色、(B) FGF、p-ERK、ERK、uPA、MMP-2、MMP-9、 α -tubulin 西方墨點結果、(C) p-ERK/ERK 及(D) FGF、uPA、MMP-2、MMP-9 量化分析。

A



B

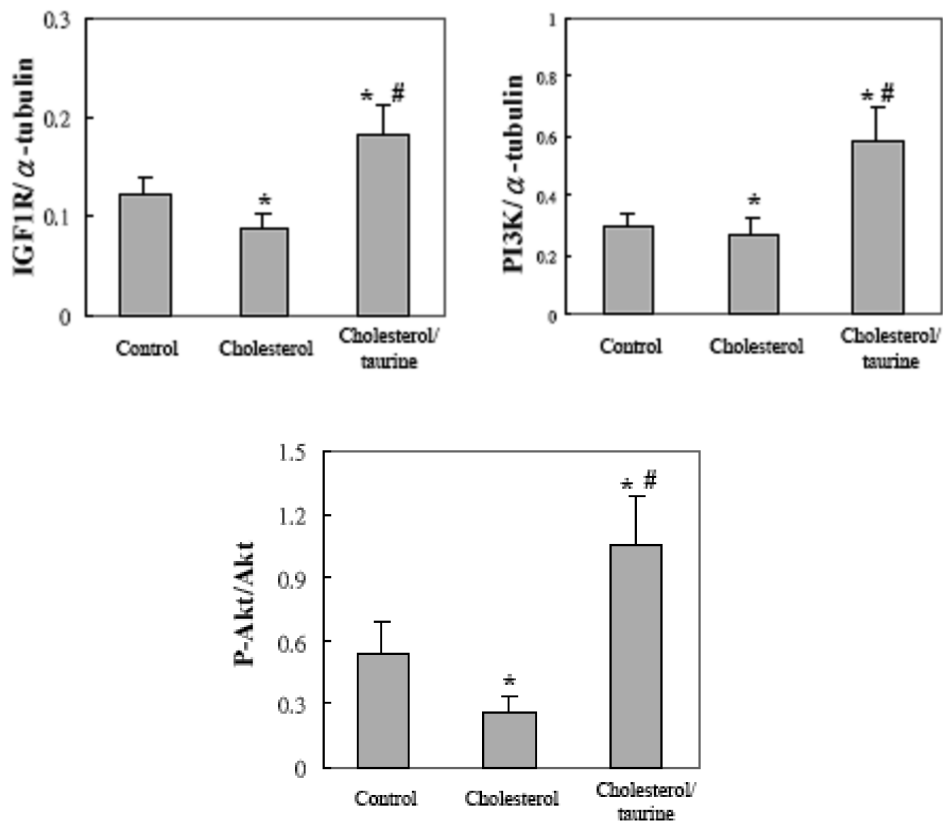
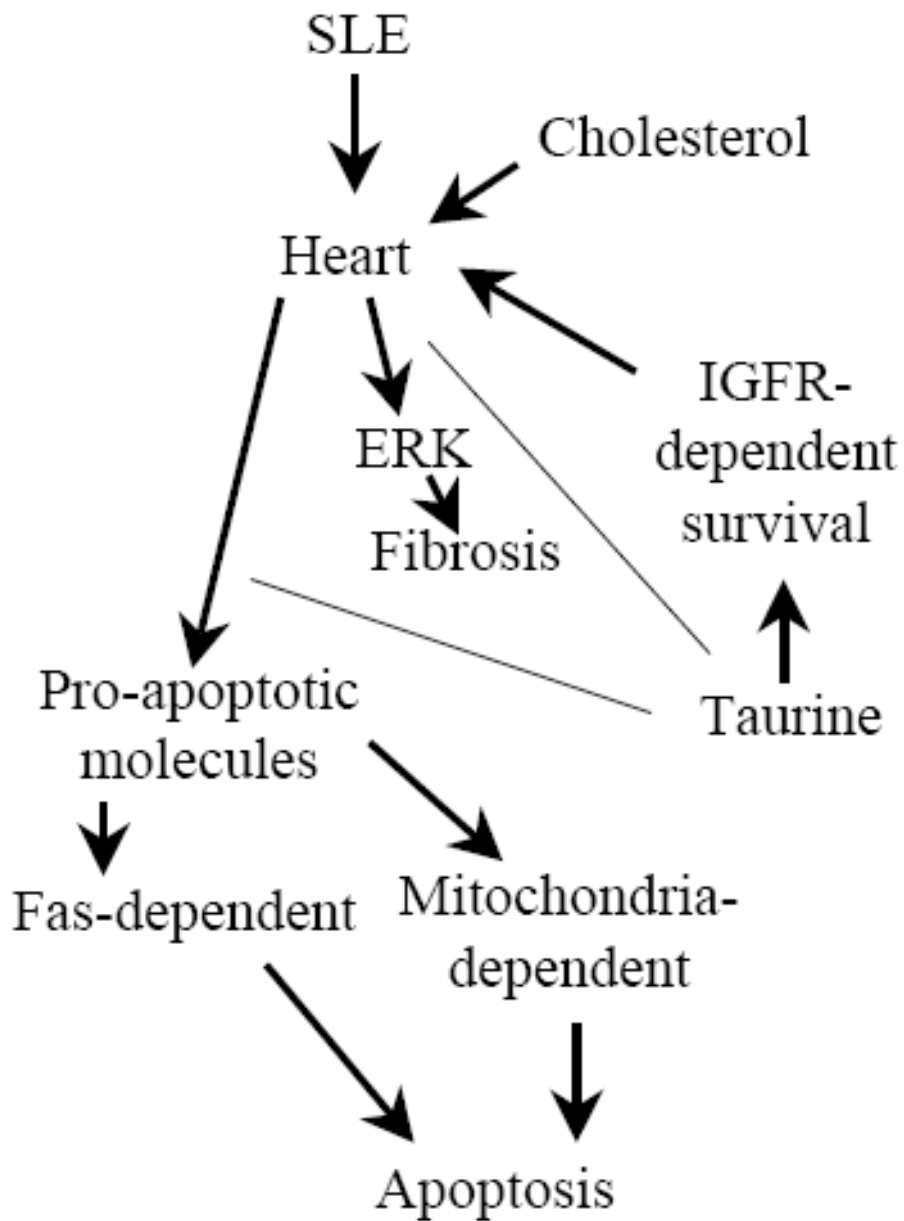


Fig 6

圖二十一，餵食正常飼料，高膽固醇飼料，及高膽固醇加牛磺酸飼料之狼瘡小鼠心臟之(A) IGF1R、PI3K、Akt、 α -tubulin 西方墨點結果及(B) IGF1R/ α -tubulin、PI3K/ α -tubulin 及 p-Akt/Akt 量化分析。



圖二十二，牛磺酸可降低狼瘡小鼠心臟之 FAS-依賴型、粒線體-依賴型凋亡及纖維化訊息。此外，更能提升 IGFR 依賴型的存活訊息。

(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。

本研究的實驗結果，符合計畫書之設計及及預期達成目標。從研究結果發現，牛磺酸確實對於餵食高膽固醇之狼瘡小鼠有明顯的保護效果，包括有效降低平均動脈壓，肝臟脂肪堆積，血液中三酸甘油酯濃度，AST，ALT 及肝臟中及血清中之 C 反應蛋白質的表現。這些結果指出膽固醇飲食會增加狼瘡小鼠疾病嚴重度，而牛磺酸能有效減緩這些發炎反應。此外，牛磺酸更能有效減緩狼瘡小鼠肝臟接受器相關及粒腺體相關的肝細胞凋亡。這對自體免疫疾病而言，是相當重要的結果。因為凋亡在近年的研究上，被認為是自體反應產生的重要源頭，尤其是在自體抗原的暴露及自體抗體的產生。而我們也發現牛磺酸能顯著提升 MAPK 路徑中三個主要路徑的蛋白質，磷酸化 AKT，P65，及 ERK 1/2 蛋白質的表現，並促進肝臟細胞存活訊息。這些結果指出牛磺酸能有效減緩因為膽固醇飲食所增加的發炎及凋亡反應。

除了肝臟異常之外，狼瘡病人心血管疾病的危險因子及發生率較正常族群高出許多，並和動脈粥樣硬化有重要關聯。所以我們亦進一步分析牛磺酸對於狼瘡小鼠心臟之保護效益。我們發現牛磺酸能有效減緩狼瘡小鼠之心臟細胞排列紊亂之現象，並降低狼瘡小鼠心臟細胞的凋亡。其機制為透過降低之 Fas 及粒線體依賴型凋亡相關蛋白質分子表現，包括 TNF- α 、Fas L、Fas、Fadd、活化型 Caspase 8、tBid、活化型 Caspase 9 及活化型 Caspase-3。此外，牛磺酸亦可減緩狼瘡小鼠心臟纖維化相關分子表現並提升 IGFR 依賴型的存活訊息。相信這些研究結果，可以作為提升狼瘡病人日常生活品質及保健的重要參考，應用在減緩狼瘡病症及狼瘡病人日常保健方面。

本三年期計畫已發表三篇排名前百分之五的國際期刊論文。

JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY

J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 9685–9691 9685

Treatment with Taurine Attenuates Hepatic Apoptosis in NZB/W F1 Mice Fed with a High-Cholesterol Diet

TSAI-CHING HSU,[†] SZU-YI CHIANG,[‡] JEN-HUANG WU,[§] CHUN-CHOU TSAI,[†]
CHIH-YANG HUANG,^{||,L,#} YI-CHEN CHEN,^{#,V} AND BOR-SHOW TZANG^{*,§,#}

Institute of Immunology, Institute of Biochemistry and Biotechnology, and School of Nutrition, Chung Shan Medical University, Taichung, Department of Health, Executive Yuan, Hua-Lien Hospital, Hua-Lien, Institute of Basic Medical Science and Graduate Institute of Chinese Medical Science, China Medical University, Taichung, and Department of Health and Nutrition Biotechnology, Asia University, Taichung, Taiwan, Republic of China

Beneficial Effects of Taurine on Cardiac Abnormality in NZB/W F1 Mice Fed with a High-Cholesterol Diet

CHIH-YANG HUANG,^{†,‡,§,◆} TSAI-CHING HSU,^{||,◆} WEI-WEN KUO,^{⊥,◆} SHIH-PING WU,[#]
YUEH-MIN LIN,[∇] CHUN-YU YEN,[○] JEN-HUANG WU,[○] AND BOR-SHOW TZANG^{*,○}

[†]Graduate Institute of Chinese Medical Science and [‡]Institute of Basic Medical Science, China Medical University, Taichung, Taiwan, [§]Department of Health and Nutrition Biotechnology, Asia University, Taichung, Taiwan, ^{||}Institute of Immunology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, [⊥]Department of Biological Science and Technology, China Medical University, Taichung, Taiwan, [#]Internal Cardiovascular Department, Show Chwan Memory Hospital, Changhua, Taiwan, [∇]Department of Pathology, Changhua Christian Hospital, Changhua, Taiwan, and [○]Institute of Biochemistry and Biotechnology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan. [◆]These authors contributed equally to this work.

Food Chemistry 119 (2010) 62–68



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Protective effects of taurine against hepatic abnormality in NZB/W F1 mice fed a hypercholesterolemic diet

Tsai-Ching Hsu^{a,1}, Yi-Chen Chen^{b,1}, Chun-Chou Tsai^a, Jen-Huang Wu^c, Sin-Lun Li^c, Bor-Show Tzang^{c,d,e,*}

^a Institute of Immunology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, ROC

^b School of Nutrition, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, ROC

^c Institute of Biochemistry and Biotechnology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, ROC

^d Department of Biochemistry, School of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, ROC

^e Clinical Laboratory, Chung Shan Medical University Hospital, Taichung, Taiwan, ROC

出席國際學術會議心得報告

計畫編號	96-2320-B-040-025-MY3 (3/3)
計畫名稱	探討牛磺酸對紅斑性狼瘡之免疫機制影響與相關訊息路徑
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	2010年2月4日至2月6日，瑞士日內瓦
會議名稱	9 th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy, February 4-6, 2010, Geneva, Switzerland
發表論文題目	Secreted Phospholipase A2 (SPLA2) Activity of Human Parvovirus B19-VP1 Unique Region (VP1u) is Essential in Activating Macrophage Responses

參加會議經過與心得

感謝國科會的補助，讓我有機會參加今年2月4日到2月6日在瑞士日內瓦所舉行的第九屆免疫抑制及免疫治療新知研討會。因為班機銜接的關係。我搭乘2月3日清晨的班機到法蘭克福後，再轉機到日內瓦。到達日內瓦時正下著雪，但是空氣卻特別的好。

本次參加的年會主軸，著重在免疫調節及轉譯醫學方面，包括了許多重新應用的免疫耐受藥物及相當多最新的學術假說、及基礎與臨床的研究案例，讓人有如入寶山，不想空手而回的感覺。2月4日由德國籍的大會主席 Volk, HD 及以色列籍的總座長 Yussim A 致辭後，正式展開所有活動。本日主題包括生物標記、免疫診斷開發、生物標記臨床應用及前臨床試驗。其中不乏牛津大學、哈佛大學、史丹佛大學及各國名校的講者，相當精彩。2月5日的安排更是精彩，包括了免疫調節、新式免疫療法與其臨床驗證、免疫治療新標地開發及幹細胞移植在免疫治療的應用。而2月6日的主題更是緊湊，包括癌症免疫療法、免疫新機制發表、自體免疫機制及治療。在這三天除了有機會認識各國優秀研究人員外，更吸收了不少新知，可謂獲益良多。

這是相當寶貴的經驗，能有機會參加這個研討會，不但學習及見識到需多啟發性質的新知識，更能與同好彼此交流，受益斐淺。當然，特別要感謝國科會的補助，這趟日內瓦之行對於研究工作將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	96-2320-B-040-025-MY3 (3/3)
計畫名稱	探討牛磺酸對紅斑性狼瘡之免疫機制影響與相關訊息路徑
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	2010年2月4日至2月6日，瑞士日內瓦
會議名稱	9 th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy, February 4-6, 2010, Geneva, Switzerland
發表論文題目	Secreted Phospholipase A2 (SPLA2) Activity of Human Parvovirus B19-VP1 Unique Region (VP1u) is Essential in Activating Macrophage Responses

參加會議經過與心得

感謝國科會的補助，讓我有機會參加今年2月4日到2月6日在瑞士日內瓦所舉行的第九屆免疫抑制及免疫治療新知研討會。因為班機銜接的關係。我搭乘2月3日清晨的班機到法蘭克福後，再轉機到日內瓦。到達日內瓦時正下著雪，但是空氣卻特別的好。

本次參加的年會主軸，著重在免疫調節及轉譯醫學方面，包括了許多重新應用的免疫耐受藥物及相當多最新的學術假說、及基礎與臨床的研究案例，讓人有如入寶山，不想空手而回的感覺。2月4日由德國籍的大會主席 Volk, HD 及以色列籍的總座長 Yussim A 致辭後，正式展開所有活動。本日主題包括生物標記、免疫診斷開發、生物標記臨床應用及前臨床試驗。其中不乏牛津大學、哈佛大學、史丹佛大學及各國名校的講者，相當精彩。2月5日的安排更是精彩，包括了免疫調節、新式免疫療法與其臨床驗證、免疫治療新標地開發及幹細胞移植在免疫治療的應用。而2月6日的主題更是緊湊，包括癌症免疫療法、免疫新機制發表、自體免疫機制及治療。在這三天除了有機會認識各國優秀研究人員外，更吸收了不少新知，可謂獲益良多。

這是相當寶貴的經驗，能有機會參加這個研討會，不但學習及見識到需多啟發性質的新知識，更能與同好彼此交流，受益斐淺。當然，特別要感謝國科會的補助，這趟日內瓦之行對於研究工作將會有莫大的鼓舞及幫助。

Scientific Programme: Mechanisms Of Immune Mediated Disorders

Author's preference: Poster presentation

Secreted phospholipase A2 (sPLA2) activity of human parvovirus B19-VP1 unique region (VP1u) is essential in activating macrophage responses

Bor-Show Tzang^{1,2}, Tsai-Ching Hsu³

¹ Institute of Biochemistry and Biotechnology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, No.110, Sec.1, Jianguo N. Rd., Taichung City 402, Taiwan., TEL: 886-4-23248168, 886-4-24730022 ext. 11680, E-mail: bstzang@csmu.edu.tw

² Department of Biochemistry, School of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, No.110, Sec.1, Jianguo N. Rd., Taichung City 402, Taiwan., TEL: 886-4-23248168, 886-4-24730022 ext. 11680, E-mail: bstzang@csmu.edu.tw

³ Institute of Immunology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, No.110, Sec.1, Jianguo N. Rd., Taichung City 402, Taiwan., TEL: 886-4-23248168, 886-4-24730022 ext. 11702, E-mail: htc@csmu.edu.tw

Abstract

Objectives:

The infection of human parvovirus B19 (B19) has been recognized as a trigger of autoimmune diseases that is strongly related to the activity of secreted phospholipase A2 (sPLA2) on B19-VP1 unique region (VP1u). However, little is known about the roles of this sPLA2 activity on macrophage.

Methods:

To investigate the effects of B19-VP1u-sPLA2 activity on macrophage responses, a mutant form of B19-VP1u without sPLA2 activity, B19-VP1uD175A, was constructed, expressed and purified. Additionally, phospholipase A2 activity, cell migration assay, phagocytosis activity, RT-PCR, gel zymography, and immunoblotting were performed to verify the consequences.

Results:

Significantly increased cell migration, phagocytosis, IL-6, IL-1 β mRNA, and MMP9 activity are observed in RAW264.7 cells by B19-VP1u protein with sPLA2 activity, but not by

B19-VP1uD175A protein. Additionally, significantly increased expression of phosphorylated ERK1/2 and JNK proteins were detected in macrophages that were treated with B19-VP1u protein, but not when they were treated with B19-VP1uD175A protein.

Conclusions:

Taken together, our experimental results suggest that B19-VP1u with sPLA2 activity affects production of IL-6, IL-1 β mRNA, and MMP9 activity, possibly through the involvement of ERK1/2 and JNK signaling pathways. These findings could provide clues in understanding the role of B19-VP1u and its sPLA2 enzymatic activity in B19 infection and B19-related diseases.

Key Words: secreted phospholipase A (sPLA2), human parvovirus B19-VP1 unique region (B19-VP1u), macrophage

無研發成果推廣資料

96 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：96-2320-B-040-025-MY3				計畫名稱：探討牛磺酸對紅斑性狼瘡之免疫機制影響與相關訊息路徑	
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	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%		
國外	論文著作	期刊論文	3	3	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%	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%		

<p>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。)</p>	獲得中華民國免疫學會 98 學年度莊淑綺女士紅斑性狼瘡傑出醫學研究獎
--	------------------------------------

	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）

目前已將研究成果發表在排名前百分之五之國際期刊，共有 3 篇

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）

針對牛磺酸在紅斑性狼瘡動物模式之保護效益及機轉上，有正面效益之成果，可做為醫師對狼瘡患者日常保健之參考