

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

研究自體免疫疾病之致病機轉- 探討影響吞噬作用及清除
凋亡細胞之因素(第3年)
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2314-B-040-013-MY3
執行期間：98年08月01日至99年07月31日
執行單位：中山醫學大學微生物免疫研究所

計畫主持人：蔡嘉哲

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文
國際合作計畫研究心得報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 99 年 08 月 11 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

研究自體免疫疾病之致病機轉-

探討影響吞噬作用及清除凋亡細胞之因素

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC96-2314-B-040-013-MY3

執行期間：2007 年 8 月 1 日至 2010 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學免疫學研究所

計畫主持人：蔡嘉哲

共同主持人：

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 2010 年 7 月 31 日

目 錄

中文摘要	II
英文摘要	III
(一) 前言	1
(二) 研究目的	1
(三) 文獻探討	2
(四) 研究方法	4
(五) 結果與討論	8
(六) 結論	11
(七) 圖與表	11
(八) 參考文獻	13

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

中文摘要

背景:第二型轉麩胺酶(Type 2 transglutaminase, TG2)是一種多功能蛋白，能夠仰賴鈣離子的催化進行蛋白質後修飾作用，此外，也具有 G 蛋白的功能進行訊息傳遞，細胞表面的功能則與細胞貼附有關，TG2 也曾被發現能分佈在粒線體參與細胞凋亡過程，但是，在細胞凋亡過程中，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。

材料方法: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。以 Doxycycline 處理細胞使之大量表現 TG2，利用 MTT 檢測其細胞存活率，同時檢測大量表達 TG2 之細胞株細胞凋亡的情形，以顯微鏡觀察細胞的型態、流式細胞儀分析 sub-G1 的比例，也檢測 DNA 片段化的情形和粒線體膜電位的變化。此外，我們也進一步檢測是否粒線體鈣離子有所變化。

結果:大量誘導 TG2 會造成細胞產生凋亡的情形，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。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。同時，可以發現 TG2 會轉位至粒線體，所偵測的轉麩胺酶有增高的趨勢，同時伴隨著大量粒線體鈣離子堆積。

結論: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。我們對 TG2 參與細胞凋亡過程提出了另一個思維，未來仍有許多問題值得去探討。

英文摘要

Background: Type 2 transglutaminase (TG2) is a multifunctional protein, which catalyzes 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 Ca^{2+} in mitochondria during apoptosis is unknown. The purpose of the study was to investigate the role of TG2 in apoptosis and calcium change in T cells.

Materials and methods: Jurkat cells were transfected with human wild type TG2 (wtTG2) and mutant TG2 (TG2C277S), which is the cross-linking mutant by replacement of catalytic Cys²⁷⁷ by Ser in a doxycycline (Dox) inducible Tet-on system (JK-Tet-On cells). Cell viability was examined by MTT assay. Apoptotic cell death was determined by microscopy, DNA fragmentation and flow cytometry. With overexpression of wtTG2 and mutant TG2 in JK-Tet-On cells, mitochondria membrane potential and mitochondrial calcium were determined by staining with rhodamine 123 and Rhod2- AM, respectively.

Results: After stimulation with Dox, Jurkat cells transfected with wtTG2 or mutant TG2 underwent apoptosis. Overexpression of wtTG2 was more effective to induce cell death than mutant TG2 cells. The expression levels of procaspase 3 and Bcl-2 were decreased in both wtTG2 and mutant TG2 cells. Both wtTG2 and mutant TG2 could enter mitochondria accompanying with decreasing the mitochondrial membrane potential in a time-dependent manner. This was accompanied with Ca^{2+} accumulation in the mitochondrial matrix.

Conclusions: 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.

(一) 前言

本研究報告之重點為延續前兩年之研究，利用過度表達 TG2 蛋白質的 Jurkat T 細胞之 tet-on 系統，以 tet-on 系統可看到細胞凋亡現象，我們也利用 TG2 之 Mutant TG2 C277S transfected 到 Jurkat T 細胞內，此 mutant 是否具 TG2 之 function，wild type TG2 及 mutant TG2 兩者 transfected 細胞皆能引起細胞凋亡之能力，我們看到 procaspase 3 及 Bcl-2 皆下降，且兩 transfected 細胞之粒線體 membrane potential 皆下降，且 Ca²⁺ 有堆積在 mitochondrial matrix 之現象，而 wild type TG2 transfected 細胞比 mutant cell 更強之變化，我們發現除 TG2 之 cross-linking 機能會導致細胞凋亡現象外，其他的 TG2 生物機能也能導致細胞凋亡，且此機轉是經過 mitochondrial pathway。

組織型轉麩胺酶 tissue Transglutaminase (tTG) 又稱第二型轉麩胺酶(Transglutaminase type 2, TG2)，是一種多功能酵素，能在仰賴鈣離子的反應下催化轉胺反應，造成蛋白質轉譯後的改變；細胞表面的 TG2 能促使細胞和細胞基質(Matrix)作用，幫助血管新生和傷口癒合；除此之外，TG2 也扮演 GTPase 角色及具有 serine/threonine kinase 的活性，與訊息傳遞有關。近年來的研究發現 TG2 是參與細胞凋亡及 apoptotic body 形成的潛在因子，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；在許多細胞實驗中證明，TG2 的過度表現會促使細胞進行凋亡，反之抑制表現則不會有凋亡現象出現；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。因此，透過 TG2 了解巨噬細胞的功能與清除自體抗原的相關研究，將有助於我們對自體免疫疾病的了解。

本研究主要在於分析影響吞噬作用及清除凋亡細胞的因子。我們首先建立細胞凋亡及吞噬作用的模式，利用 UV 照射人類角質細胞株製備細胞凋亡小體，以作為研究巨噬細胞細胞株吞噬作用的材料，並觀察細胞受到 UV 作用下 TG2 的變化，進一步探討 TG2 與吞噬作用過程的關係，我們同時也觀察 TGF- β 及各種相關的細胞激素如 IL-10、TGF- β 2 對 TG2 和吞噬過程的影響，除此之外，也將利用 RNAi 技術和 TG2 酵素抑制劑(Cystamine)，以釐清 TG2 的角色。最後我們將持續收集臨床自體免疫病患檢體，包括病人血清，以及分離血球如 monocyte、PMN，比較相關因子在正常人及病患體內的表現情形是如何，以及 SLE 病人吞噬能力會受到哪些外在因素的影響，以探討在臨床病人體內，調節自體抗原產生以及清除的機制。相信這些相關之細胞凋亡及吞噬研究，將有助於我們更進一步了解對自體免疫疾病之調控機制情形。同時，我們也建立過度表達之 TG2 之細胞株，以作為日後研究 TG2 調節細胞本身功能之材料。

(二) 研究目的

系統性紅斑性狼瘡(SLE)是一種自體免疫疾病，主要的特徵是病人會產生自體抗體(autoantibody)，對抗自己細胞內的蛋白和酵素，導致發炎和組織破壞的慢性多系統疾病(chronic multisystemic disease)，目前致病的原因仍不清楚。近年來的研究認為，人類 SLE 中出現凋亡小體增加以及清除凋亡小體機制缺陷的現象是造成自體免疫反應的原因之一。

TG2 參與細胞凋亡並可能擔任致病性角色是無庸置疑的，許多的研究提出說明，TG2 蛋

白在參與細胞凋亡過程中所扮演的可能角色，Zsuzsa et al 研究團隊曾經報告，以不同的方式誘發胸腺細胞產生細胞凋亡的過程中，會導致 TG2 蛋白質和酵素活性大量的表現(Szondy, Molnar et al. 1997)。以細胞分裂刺激劑(mitogen)刺激淋巴細胞時，也曾被發現會誘導產生轉麩胺酶活性的表現(Novogrodsky, Quittner et al. 1978)。近年來也發現，TG2 能轉位至粒線體(Piacentini, Farrace et al. 2002; Rodolfo, Mormone et al. 2004)，但是，TG2 在其中的功能卻仍未被完全的了解，再者，TG2 是一個多重功能的蛋白，許多新的功能也陸續被不同的研究團隊發表提出，因此，在複雜的細胞凋亡過程中，TG2 仍然可能有其他的機轉存在而與其分子的作用仍值得被研究。

因此，在我們的研究中試圖了解 TG2 的功能是如何影響 T 細胞的凋亡與其調控分子之間的關係。

(三) 文獻探討

第二型轉麩胺酶 (Transglutaminase 2)

第二型轉麩胺酶(Transglutaminase, TG2, E.C. 2.3.2.13)又稱為組織型轉麩胺酶(tissue transglutaminase)或 C 型轉麩胺酶(transglutaminase C)，屬於轉麩胺酶家族(Transglutaminases)中的一員，分子量約為 80KD 左右(Folk 1980)，廣泛且無所不在的分佈於生物體內的各組織，如內皮細胞或是平滑肌細胞能持續高度表現 TG2 蛋白質，在特定的生理情況下，如誘發細胞凋亡，也能刺激 TG2 的高度表現(Melino and Piacentini 1998)。TG2 主要分佈於細胞質中，部分 TG2 也會分佈於細胞核或細胞膜上，或是透過尚未完全清楚的機制分泌至細胞外(Fesus and Piacentini 2002)。TG2 在細胞內的分佈位置被認為與其所扮演的生物功能息息相關，在不同的環境與不同的分子作用會造就產生截然不同的細胞生理功能(Fesus and Piacentini 2002)。無所不在的 TG2 是一個具多重功能的酵素，參與多項細胞的重要生物功能，例如細胞分化(differentiation)、細胞凋亡(apoptosis)(Autuori, Farrace et al. 1998)、細胞移動(migration)、發炎反應(inflammation)或傷口的癒合等等(Fesus and Piacentini 2002)。

TG2 是一個多功能的蛋白，分子結構由四個不同的 domain 所組成，使之具有不同的功能，分別是一個 N 端的 β -sandwich domain、具轉胺作用(transamidation)的 catalytic core domain 和兩個 C 端的 β -barrel domain (β -barrel domain₁ 和 β -barrel domain₂)(Fesus and Piacentini 2002)。 β -sandwich domain 可以和 fibronectin 和 integrin 結合，調控細胞黏附；catalytic core domain 上之 Cys277、His355 和 Asp358 之三個氨基酸位置是 catalytic triad，而活性位置則是位在 Try241、Cys336 和 Tyr516，使之能進行轉胺作用(transamidation)，除此之外，在 catalytic core domain 上具有一段 BH3 domain，能與其它促細胞凋亡因子結合(proapoptotic factors)，參與細胞凋亡的過程，而在最近的研究中也試圖定義出位於 catalytic core 的鈣離子結合位置與其蛋白質功的關係；C 端的 β -barrel domain₁ 上有 GTP 的結合位置，使 TG2 具備有 GTPase 的功能，而 β -barrel domain₂ 能和 phospholipase C- δ 1 結合，與訊息傳遞的有關。

TG2 的轉麩胺酶酵素功能仰賴鈣離子參與，能催化轉胺反應(transamidation)造成蛋白的聚合(cross-linking)或多胺類(polyamine)的嵌入，具有蛋白質轉譯後修飾的作用(De Vivo, Martin et al. 2008)。蛋白質的聚合反應(cross-linking)主要是影響兩個胺基酸，glutamine 和 lysine，產生

共價鍵結合成為 ϵ - (γ -glutamyl)- lysine 聚合蛋白、N-(γ -glutmyl)polyamine 或是 bis-(γ -glutamyl)polyamine 聚合蛋白。所形成的高分子量的聚合蛋白能抵抗蛋白質分解 (proteolytic) 的作用 (Folk and Finlayson 1977)。另外，TG2 也能進行 deamidation 的作用。(Piacentini and Colizzi 1999)

除了典型的聚合(cross-linking)蛋白質的酵素功能之外，TG2 還具備其他轉麩胺酶家族成員所沒有的特性，具有 G 蛋白(G protein)的功能，能和 GTP 結合而扮演 GTP-binding protein 的角色，被分類為 G_{ha} ，當接受器受刺激時，例如， α_1 -adrenergic receptor (α_1 -AR)或 TP α thromboxane A2 receptor，能活化其 G_h 功能，使之具有 GTPase 的活性，活化 phospholipase C- δ 1 進而參與下游訊息傳遞作用促使 inositol phosphate 產生，而此 GTPase 功能作用時會抑制 TG2 轉麩胺酶活性 (Fesus and Piacentini 2002; Lorand and Graham 2003)。除此之外，TG2 的功能還包括了，具有 serine/threonine kinase 的活性，能磷酸化 P53 或 insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 (IGFBP-3)而影響細胞凋亡 (Mishra and Murphy 2004; Mishra and Murphy 2006)。近年來 TG2 也被報導具有 protein disulfide isomerase (PDI)功能，在正常的生理狀況下，TG2 能透過雙硫鍵結摺疊粒線體呼吸傳遞的複合體 (mitochondrial respiratory complexes)，而參與調控粒線體呼吸傳遞鍊的功能 (Hasegawa, Suwa et al. 2003)。

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 (Autuori, Farrace et al. 1998; Melino and Piacentini 1998)，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 (Melino and Piacentini 1998; Szegezdi, Szondy et al. 2000)。在細胞的實驗模式中發現，利用轉染技術過量的誘導產生大量 TG2 表現會造成細胞凋亡的現象，反之，抑制 TG2 的表現則會降低凋亡的情形 (Fesus, Davies et al. 1991; Piacentini, Autuori et al. 1991; Fesus and Szondy 2005)。而在誘導肝臟 (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)，這個穩定的構造能避免凋亡細胞曝露出內部的大分子或是產生發炎反應 (Folk 1980; Piredda, Amendola et al. 1997)。在組織培養液或是血液中，也曾被證明能偵測到這些被 TG2 聚合的凋亡物質 (Piredda, Amendola et al. 1997)。許多的證據顯示，TG2 的蛋白質和酵素活性表現異常與一些疾病有關，例如阿茲海默症 (Alzheimer's disease)、亨丁頓舞蹈症 (Huntington's disease)、愛滋病或病毒感染 (Ameisen, Estaquier et al. 1995; Amendola, Gougeon et al. 1996)、腫瘤和自體免疫疾病 (autoimmune disease) 等 (De Vivo, Martin et al. 2008)，這些疾病具有細胞凋亡調控失常或是某些特定細胞會產生大量凋亡的特性 (Tanaka and Miyake 2007)。例如，亨丁頓舞蹈症的病人會高度表現 TG2 的酵素活性；和正常人相比，AIDS 病人周邊血中 T 細胞會大量表現 TG2，其表現量和凋亡現象成正相關 (Ameisen, Estaquier et al. 1995)。Piredda 研究團隊也曾發現，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 (Piredda, Amendola et al. 1997)。Piredda 研究團隊的推測，在 TG2-/- 基因剔除 (knock out) 老鼠的研究中得到驗證，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，TG2-/- 老鼠也出現紅斑性狼瘡的表徵，包括脾臟腫大和產生大量的自體抗體 (Szondy, Sarang et al. 2003)；而以正常巨噬細胞吞噬凋亡 TG2-/- 紅血球的速度也比清除正常凋亡紅血球來的緩慢 (Sarang, Madi et al. 2007)。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。

在研究細胞凋亡和分子的機轉方面，TG2 是參與細胞凋亡過程中的一個重要酵素，TG2 的蛋白和酵素活性可以經由許多刺激細胞凋亡產生的物質誘導而升高其表現量，而 TG2 是一個具多重功能的蛋白質，因此，在細胞凋亡的過程中因其本身功能不同而扮演不同的角色，其中，TG2 轉麩胺酶酵素活性被認為是 TG2 參與凋亡和影響致病機轉的重要功能之一(Tucholski and Johnson 2002; Malorni, Farrace et al. 2009)。以鈣離子載體(calcium ionophore) A23187 誘導鈣離子大量上升會增加 TG2 cross-linking 活性的能力，導致胰臟癌細胞(pancreatic cancer)產生凋亡(Fok and Mehta 2007)。以蛋白質激酶 C (protein kinase C)抑制劑引發細胞凋亡過程中，也發現細胞質中的 TG2 活性可被大量誘導表現，進而引發凋亡路徑(Hebert, Daviau et al. 2000; Robitaille, Daviau et al. 2008)。另外，以酒精誘導肝臟細胞產生凋亡時，會促使細胞質 TG2 蛋白和酵素活性大量表現，接著 TG2 蛋白會轉位至細胞核，聚合轉錄因子(transcription factor) SP1 使之形成多聚合體而失去活性，進而降低一些生長因子受體(growth factor receptor)的表現，例如 *c-Met*，導致細胞存活率下降(Tatsukawa, Fukaya et al. 2009)。由這些研究顯示，透過 TG2 酵素活性的參與，能修飾並穩定其細胞內不同受體分子(substrate)的結構，進而參與調控細胞凋亡的過程。另一方面，Piacentini 團隊的研究指出，TG2 帶有 BH3 domain，因此，能和其他促凋亡蛋白結合，調控粒線體死亡路徑(Rodolfo, Mormone et al. 2004)。而 TG2 的激酶功能被發現具有磷酸化 Rb、P53 或 histones 的能力，這些蛋白質都與細胞凋亡的調控有關(Mishra, Saleh et al. 2006; Mishra, Melino et al. 2007)；另外，TG2 也被認為能進入核內，其 DNA nuclease 活性的功能可能與細胞凋亡的過程中水解 DNA 有關(Takeuchi, Ohashi et al. 1998)。有趣的是，TG2 的 GTPase 功能則與調控抗細胞凋亡有關，以維他命 A 酸 (retinoic acid)處理細胞會刺激 TG2 大量表現其 GTPase 的功能，能保護細胞免於受到 all-*trans*-*N*-(hydroxyphenyl)retinamide (HPR) 所引發的細胞凋亡現象(Antonyak, Singh et al. 2001)。因此，研究 TG2 功能參與凋亡過程的報告陸續發表，但是，由於 TG2 是具有多重功能的蛋白，其中參與的機轉仍有需要被分析和探討。

(四) 研究方法

一、材料及藥品

RPMI-1640 medium、胎牛血清 (fetal bovine serum, 簡稱 FBS)、0.25%Trypsin- EDTA 購自於美國 GIBCOBRL 公司；細胞培養皿由瑞士 TPP 公司購得；dimethyl sulfoxide (DMSO)購自 Sigma 公司；phenol (pH 8.0)、phenol/chloroform/isoamylalcohol [25:24:1]購自 USB 公司；Trizol Reagent、glycogen 購自於 Invitrogen；Oligo(dT)15 primer (cat.C1101)、Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor (cat.N2511)、GoTag (green mix)、M-MLV Reverse transcriptase 購自 Promega 公司。

二、細胞培養

人類急性淋巴瘤細胞 (Jurkat cell) 培養在含 10% FBS、1% PSA 抗生素 (penicillin/streptomycin/amphotericin B)的 RPMI-1640 培養液中，在 37°C、5% CO₂ 培養箱培養。

平均每 2~3 天更換培養液，直到細胞長滿再進行次培養。

三、細胞存活率(viability)分析

5×10^5 細胞培養於 24 孔培養盤，實驗進行前，先以 PBS 清洗細胞並更換培養液，加藥處理後繼續在含 5% CO₂ 的 37 °C 培養箱中進行培養，依不同培養時間後，細胞存活率是以 trypan bluer 觀察並計數。活細胞因細胞膜完整具選擇性通透性，trypan blue 無法通過完整的細胞膜，因此，活細胞無法被染上顏色，而 trypan blue 會直接進入死細胞，將死細胞染成藍色。

四、質體構築

本研究利用 Tet-On Jurkat cell 真核表達系統進行實驗(由劉光耀教授提供)。基因源自於 P. J. Davies (Houston, Tx) 所贈與之人類野生型和突變型第二型轉麩胺酶，皆是載於(SV5 載體)。突變型之第二型轉麩胺酶是將酵素 catalytic triad 中的胺基酸 Cys277 位點置換成 serine，因此，喪失其催化轉胺作用(transamidation)的活性。為了能再 Jurkat Tet-On 真核系統表現，將載體、野生型和突變型第二型轉麩胺酶 cDNA 用接合至 yT&A 選殖載體，之後再利用 *MluI* 和 *Sall* 限制酶由 yT&A 選殖載體轉換到 pTRE2hyg 載體，分別命名為 Tet-On vector、Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2。採用益生生物科技公司生產的 yT&A 選殖載體試劑進行接合反應，取莫爾濃度 3:1 的 DNA 與載體(yT&A vector)依益生生物科技公司所提供之步驟進行接合反應。取莫爾濃度 3:1 的 plasmid 與載體分別加入 ligation buffer 及 T4 DNA ligase，最後加入水使其反應體積為 10 μ l，置於 16°C PCR 反應器反應 16-20 小時即完成接合反應。立即將上述完成之 ligation mixture 與 DH5 α competent cell 50 μ l，溫和混合均勻，進行細菌轉型(Transformation)。之後篩選出的菌落沿用本實驗室步驟抽質體 DNA，最後以限制酶切割，確認是否構築成功。構築成功之質體再送中山醫學大學貴儀室，以 Applied Biosystem 377 自動定序儀進行定序分析。JK-Tet-On 系統是一有條件性的誘發基因表達的系統，只有在細胞培養液中加入誘導子 Doxycycline 時才會誘導基因表現。此外，野生型和突變型第二型轉麩胺酶 cDNA 也被轉換至 pEGFP-C1 載體。分別命名為 EGFP、EGFP-wtTG2 和 EGFP-mutant TG2，質體 pEGFP-C1 為選自 CLONTECH 公司(CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA. USA)。此質體包含 EGFP variant 和 neomycin resistant gens 且受 cytomegalovirus immediate early gene promoter 及 SV40 early gene promoter 調控。

五、細胞轉染(transfection)

使用電轉染方法(MP-100 Microporator, Digital Bio Technology)將 15 μ g Tet-On vector、Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2 (TG2C277S) 質體 DNA 分別轉染至每 ml 2×10^7 Jurkat Tet-On cell line，為了穩定性轉染實驗利用 Hygromycin (200 μ g/ml) 抗生素篩選大約四週時間，得到具有抗 Hygromycin 抗性細胞株，穩定性轉染成功之細胞株用逆轉錄酶聚合酶鏈鎖反應、西方墨點法及酶活性分析確定第二型轉麩胺酶表現和轉麩胺酶活性。pEGFP vector、pEGFP-wtTG2 和 pEGFP-mutant TG2 (TG2C277S) 同樣利用電轉染方法將之分別轉入 Jurkat cell line，轉染後五個小時即可觀察螢光表現量，培養 12 小時後進行後續的實驗。

六、螢光顯微鏡分析

利用螢光顯微鏡觀察 EGFP vector、EGFP-wtTG2 和 EGFP-mutant TG2 短暫轉染細胞株的

綠色 GFP 螢光蛋白(green fluorescence protein)表現於細胞中的分佈。

七、細胞凋亡 DNA 片段化實驗

人類急性淋巴瘤細胞 (Jurkat cell)收集後加入 lysis buffer (20mM Tris, 10mM EDTA, 0.2% Triton X-100)並在冰上 4°C 作用 10 分鐘, 離心 12,000rpm 5 分鐘, 取上清液至 1.5ml 的 eppendorf, 再加入 12.5 μ l 的 proteinase K (25mg/ml)於 50°C 作用 6 小時, 之後利用加入 10mg/ml RNase 於 37°C 處理隔夜, 加入等體積飽和的 phenol (pH 8.0) 離心 12,000rpm, 5 分鐘後, 取上清液, 再加入等積 phenol/chloroform/ isoamylalcohol 25:24:1 混合均勻, 再離心 12,000rpm, 5 分鐘, 取上清液部份加入使最終體積為 5mg/ml 的 glycogen 和等體積的 isopropanol 均勻混合置於-20°C 靜置隔夜, 沉澱萃取 DNA, 隔天離心 12,000rpm, 15 分鐘, 去上清液部份, 沉澱物靜置室溫風乾, 溶於 8 μ l sample buffer 並加入 2 μ l dye, 最後利用 2% agarose gel 電泳分析。

八、流式細胞儀分析細胞凋亡情形和粒線體膜電位的變化

將 2×10^6 的細胞以 PBS wash 兩次, 離心 3,000rpm, 10 分鐘, 去上清液, 拍散再利用 70% 酒精固定液固定, 置於 4°C 處理 12-16 小時, 上機前去掉細胞固定液, 經 PBS wash 後在室溫下避光染 PI (40 μ g/ml) 30 分鐘, 最後利用流式細胞儀(Becton Dickenson, San Jose, CA)分析細胞 sub-G1 phase。粒線體膜電位檢測則是利用 Rhodamine123 染劑帶正電的特性, 可特異性的和活細胞的粒線體膜上負電荷結合來增加螢光強度, 即可利用流式細胞儀偵測細胞內膜電位的改變。將 2×10^6 的細胞經不同時間處理後, 加入 5 μ M Rhodamine 123, 於室溫避光反應 10 分鐘後, 以 PBS wash 兩次, 利用流式細胞儀分析細胞膜電位螢光量, 資料之分析使用 WinMDI 2.8 版軟體。

九、RNA 萃取

主要是利用 Trizol 試劑 (Invitrogen) 來抽取細胞 RNA。RNA 分離自 Tet-On vector、Tet-On wtTG2、Tet-On mutant TG2、EGFP vector、EGFP-wtTG2 和 EGFP-mutant TG2 轉染細胞。首先將直徑 10 公分細胞培養皿上的細胞加入 1 ml 的 Trizol 試劑, 靜置 5 分鐘, 然後均勻作用後吸取至 1.5 ml 之 eppendorf 中, 並加入 200 μ l 的 chloroform, 馬上手搖均勻混合, 室溫下靜置 3 分鐘, 然後於 4°C 離心 14000rpm 15 分鐘, 輕輕吸取透明的液相層部分至新的 eppendorf 中, 加入 500 μ l isopropyl alcohol 後, 均勻混合約 15 秒, 室溫下作用 10 分鐘, 然後 4°C 離心 14000rpm 10 分鐘, 去上清液後加入 1 ml 的 75%酒精, 然後於 4°C 離心 8000rpm 5 分鐘, 去上清液, 將沉澱物自然風乾。最後將抽取的 RNA 樣本溶於經 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 處理過的二次水並定量 RNA 濃度, 然後儲存於-80°C 備用。RNA 定量方法為取 1 μ l RNA 加 999 μ l DEPC (稀釋倍數 1000 倍), 使用 ULTROSPEC II E 分光光譜分析儀 (Biochrom) 於 OD_{260/280} 波長下測其吸光值並求出 RNA 濃度。其定量 RNA 所運用的公式為: $\mu\text{g/ml RNA} = \text{吸光值 (OD}_{260\text{nm}}) \times 40\mu\text{g/ml} \times \text{稀釋倍數}$ 。

十、反轉錄聚合酶反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)

所有的工作都必須要在完全為 RT-PCR 的乾淨環境下執行。將 RNA 轉為 cDNA 是利用 total RNA (2 μ g) 及 promega RT-PCR 試劑完成。取 2 μ g RNA, 加入 1 μ l 的 Oligo dT (500 μ g/ml)

及 4 μ l dNTP (2.5mM)，最後加入適量的 DEPC water 使總體積為 12 μ l，置於 65 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘，接著置於 4 $^{\circ}$ C 冰上，於每一個反應加入 6 μ l 的 5 \times Buffer 及 1 μ l 的 RNase inhibitor，輕輕做混合的動作，再置於 37 $^{\circ}$ C 反應 2 分鐘，之後迅速的加入 1 μ l 的 M-MLV Reverse transcriptase，讓最終反應體積為 20 μ l，置於 PCR 儀器中反應，37 $^{\circ}$ C 作用 50 分鐘，70 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘。經上述 RT 過程得到 cDNA 產物，取 1 μ l 進行 PCR 反應。反應試劑包括 10 \times Buffer、dNTP、Taq polymerase (TaKaRa)、dd-H₂O 及 TG₂ 和 GAPDH 特異性引子 (生工有限公司)。引子 (primers) 敘述如下，Human TG₂ : forward primer: 5'-CTCGTGGAGCCAGTTATCAACAGCTAC，reverse primer: 5'-TCTCGAAGTTCACCACCAGCTTGTG ; Human GAPDH : forward primer: 5'-CATGTTTCGTCATGGGTGTGA，reverse primer: 5'-AGTGAGCTTCCCGTTCAGCT。PCR 反應的條件如下：94 $^{\circ}$ C 5 分鐘、54 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，94 $^{\circ}$ C 45 秒、58 $^{\circ}$ C 45 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，重複 28 圈 (cycle)，94 $^{\circ}$ C 2 分鐘、54 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 5 分鐘、最後停留於 4 $^{\circ}$ C，PCR 的結果以 2% agarose gel 之電泳分析。

十一、西方墨點法 (western blot)

將蛋白質放入 8% SDS-polyacrylamide gel 中跑電泳之後，轉移到 polyvinylidene fluoride (PVDF)，使用溶於 PBS-0.1% Tween 20 中的 5% 脫脂牛奶 blocking 一個小時，將第一個抗體放入 PVDF 中 4 $^{\circ}$ C 反應至隔天，再利用 PBS-0.1% Tween 20 洗滌三次，每次十分鐘，之後將有標定 horseradish peroxidase (HRP) 之第二個抗體與 PVDF 反應作用一個小時，用 PBS-0.1% Tween 20 洗滌三次，每次十分鐘，最後抗體與抗原複合物使用增強化學冷光法測定 (ECL detection system; Amersham)。

十二、測量粒線體中鈣離子

粒線體鈣離子強度以 Rhod2-AM 染劑測定，此染劑帶有正電能與帶負電之粒線體內膜結合，當有鈣離子產生時即會激發螢光產生。將細胞培養於 24 孔盤中，依不同條件分別加藥處理，於檢測之前加入粒線體偵測螢光染劑 3 μ M 之 Rhod2-AM (Invitrogen) 置於 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 培養箱至於 30 分鐘，以 PBS 洗滌兩次後去除上清液，回溶於不含酚紅之 RPMI1630 培養基中，計數細胞數目並以五合一螢光光譜儀 (波長設定: exc=540nm, em=590nm) 偵測螢光強度。

十三、轉麩胺酶酵素活性測量

96 孔盤加入 20 mg/ml of *N,N'*-dimethylcasein 反應一小時，去除液體後加入 nonfat dry milk (0.5% in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5) blocking 1 小時，同時加入 200 μ l 0.5 mM 5-(biotinamido) pentylamine (BP) (100 mM Tris, pH 8.5, 5 mM CaCl₂, 10 mM DTT, and) (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) 和 20 μ g 細胞溶液共同置於 37 $^{\circ}$ C 反應一小時，接著加入 200mM EDTA 中之反應後移除，隨後加入 streptavidin-alkaline phosphatase，室溫下反應 1 小時，以 0.1M Tris-HCL (pH 8.5) 洗滌四次，最後加入受質 P-NPP 反應三十分鐘，利用酵素免疫光譜儀 (ELISA plate reader; BIO-RAD) 測量 405nm 之吸光值。

十四、統計分析

實驗利用GraphPad Prism 4軟體進行統計分析。本實驗所獲得的數據皆以ANOVA分析法分析控制組平均值與處理組平均值的差異性。若比較三組以上的差異則利用Bonferroni test分析。統計後P值小於0.05及代表具有統計學上的意義。(P<0.05以*表示; P<0.01以**表示; P<0.001以***表示)

(五) 結果與討論

建立條件式誘導基因表現實驗模組 (conditional expression model)-Tetracyclin inducible gene expression system (Tet-On system)

Tetracyclin inducible gene expression system (簡稱 Tet system)由 Tet repressor (TetR)及 Tet operator (tetO)所組成。Tet-On 意指在 Doxycycline 存在下基因才會被誘發表現，因此，藉由 Doxycycline 可在任意的時間點從 Transcription 的層面表現基因，以達到調控蛋白質表現的目的。首先，我們使用電轉殖技術轉染野生型和突變型第二型轉麩胺酶，利用 Hygromycin 篩選出穩定轉染之細胞株(stable clones)，分別命名為 Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2 細胞株，並以轉染載體 TRE2hygo 命名之 Tet-On vector 作為控制組 (control)。突變型之第二型轉麩胺酶是將酵素 catalytic triad 中的胺基酸 277 位點由 Cys 置換成 serine，因此，喪失其催化轉胺作用 (transamidation)的活性。為了確認轉染是否成功，我們利用 Doxycycline (50 μ M)處理各組細胞株並利用 RT-PCR 檢測基因表現量，由圖 1-1 結果可知，加入 Doxycycline (50 μ M)可誘導 TG2 基因的表現。我們也使用西方墨點法檢測 TG2 蛋白質的表現量是否可經由 Doxycycline 誘導而大量表現，由圖 1-2 結果可發現，當以 Doxycycline(50 μ M)處理 Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2 細胞株 18 小時後，與未處理 Doxycycline(50 μ M)的 Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2 相比較，可大量誘發 TG2 蛋白質的表現量。而控制組 Tet-On vector 無論加藥與否，皆無法引起 TG2 蛋白質的大量表現，由此可以得知，在 Tet-On Jurkat cell line 中，內生性的 TG2 蛋白質表現量極低，而在實驗組 Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2 處理 Doxycycline 實驗中可偵測到大量 TG2 蛋白質表現，可以確認我們成功建立穩定的條件式誘導基因表現實驗模組，以供後續的實驗使用。接下來，我們檢測各細胞株之轉麩胺酶酵素活性，同時確認是否突變型之 Tet-On mutant 確實喪失了催化轉胺作用的功能。我們同樣以 Doxycycline(50 μ M)處理三組細胞株 6 小時後，檢測其轉胺作用的能力，由圖 1-3 結果可知，加入 Doxycycline(50 μ M)處理 Tet-On wtTG2 細胞株後，可誘導 Tet-On wtTG2 細胞株具轉麩胺酶活性能進行轉胺作用，轉麩胺酶活性高於控制組 Tet-On vector 和 Tet-On mutant TG2 細胞株約 10 倍之多。

誘導 Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2 細胞株中大量表現 TG2 會引發細胞凋亡現象產生

為了評估大量誘導表現野生型和突變型 TG2 蛋白對細胞株的影響，首先，我們將各細胞株分別處理 Doxycycline(50 μ M) 24、48 和 72 小時後，利用 MTT 細胞毒性試驗，分析各時間點細胞株存活百分比，以未加藥處理之時間點為設訂為存活率 100%。由圖 2-1 結果顯示，隨時間增加，處理 Doxycycline(50 μ M)而大量誘發 TG2 蛋白質表現使細胞存活率明顯的下降，其中，處理 Doxycycline(50 μ M)後，Tet-On wtTG2 細胞株存活百分比在 24、48 和 72 小時時間點分別為 62、58 和 53%。而比較 Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2 細胞株處理 Doxycycline

(50 μ M) 48 小時之時間點，Tet-On wtTG2 比 Tet-On mutant 細胞株存活率多下降約 20%。我們進一步利用光學顯微鏡觀察大量表現 TG2 蛋白質後細胞型態的變化，藉此判斷是否細胞死亡，由圖 2-2 顯示，各細胞株分別處理 Doxycycline 48 小時後，Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2 出現細胞死亡的情形，在光學顯微鏡下可發現細胞質皺縮的比例增加，而其中 Tet-On wtTG2 死亡的情形略為嚴重。由圖 2 可得知誘發大量表現 TG2 蛋白質能隨時間引發細胞存活率下降和死亡產生。

我們由圖 2 了解大量誘發表現 TG2 蛋白質會引發細胞死亡率增加，為了證明所引發的細胞死亡是經由細胞凋亡作用所致，我們進行以下的實驗。首先，我們進行 DNA 片段化 (DNA ladder) 的實驗來鑑定細胞凋亡的情形。當細胞接收到死亡訊息時，會引起 DNA 內切酵素的產生，染色質 DNA 因 DNA 內切酵素的作用會將本身的 DNA 分解，造成所謂 DNA 片段化 (DNA fragmentation) 的現象。這個實驗中我們以 Doxycycline(50 μ M)處理各組細胞株，實驗中未經加藥處理之各細胞株作為實驗的控制組以相比較。圖 3-1 顯示處理 Doxycycline (50 μ M) 48 小時後，Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2 細胞株出現 DNA fragmentation 情形，而加藥處理之 Tet-On vector 或未加藥的各組細胞株皆無產生片段化的情形。

接下來我們則是利用流式細胞儀分析大量誘發 TG2 蛋白質表現之細胞株其 sub-G1 phase 的變化。經由 Doxycycline (50 μ M)處理 60 小時後，我們收集細胞經由酒精固定後以 PI 染劑染核酸，利用流式細胞儀分析 sub-G1 phase 的比例。由圖 3-2 結果發現，大量誘導 TG2 蛋白質表現會促使 Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2 細胞株之 sub-G1 phase 比例增加，表示細胞凋亡的比例增加，經由統計結果顯示，其中 Tet-On wtTG2 sub-G1 和 Tet-On mutant TG2 sub-G1 phase 比率分別為 48%和 32%，由此結果我們可以發現，大量誘導表現野生型 TG2 細胞株 (Tet-On wtTG2)和突變型 TG2(Tet-On mutant TG2)會增加細胞凋亡的比率，其中，野生型 TG2 細胞株(Tet-On wtTG2)會增加 sub-G1 phase 的比例高於突變型的 TG2 細胞株(Tet-On mutant TG2)，表示表現野生型的 TG2 細胞株(Tet-On wtTG2)引起細胞凋亡能力較高。

經由圖 3-2 的結果我們發現，誘導大量表現野生型 TG2 蛋白質之 Tet-On wtTG2 細胞株引發細胞凋亡能力高於突變型細胞株(Tet-On mutant TG2)，由於轉麩胺酶活性的存在與否是兩組細胞株的差別，因此，我們推測轉麩胺酶活性是影響細胞凋亡結果有所差異的可能原因。為了證明轉麩胺酶活性在此模式下的角色，我們在野生型 Tet-On wtTG2 細胞株中加入轉麩胺酶活性抑制劑胱胺(Cystamine)0.25mM 抑制其轉麩胺酶酵素活性，隨後以 Doxycycline (50 μ M)處理 Tet-On wtTG2 細胞株使之誘導產生大量野生型 TG2 蛋白質，培養 48 小時後以 trypan blue 計數細胞存活率，並與突變型 Tet-On mutant TG2 和控制組 Tet-On vector 細胞株作比較。圖 3-3 結果如同我們推測，當抑制野生型 TG2 轉麩胺酶酵素活性時能提高細胞的存活率，抑制大量表現野生型 TG2 所引發的細胞凋亡現象，由此可知，轉麩胺酶活性參與第二型轉麩胺酶所引發之細胞凋亡結果。

誘導 TG2 蛋白質大量表現引發 Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutantTG2 細胞凋亡現象是經由粒線體死亡路徑

為了進一步分析大量誘導 TG2 導致的細胞凋亡機制，我們利用西方墨點法分析細胞凋亡有關的蛋白質，以了解細胞凋亡過程中，TG2 影響凋亡機制的角色。我們分別在各組細胞株中處理 Doxycycline (50 μ M)誘導大量 TG2 蛋白產生，由圖 3-4 結果顯示，野生型 Tet-On wtTG2 和突變型 Tet-On mutant TG2 細胞株之促進細胞凋亡之蛋白質 Bak 表現量較高，而 Bcl-2 家族

中抗細胞凋亡蛋白 Bcl-2 表現量降低，另外，下游膾蛋白 Pro-caspase3 表現量也有下降的情形，顯示死亡路徑下游之膾蛋白被活化。因此，由圖 3-4 結果證實，誘導大量 TG2 蛋白引發之細胞凋亡過程中，經由與粒線體相關的細胞凋亡路徑。

誘導 TG2 蛋白質大量表現引發 Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutantTG2 粒線體膜電位下降

為了偵測誘導大量 TG2 蛋白表現引起的細胞凋亡過程中，是否伴隨粒線體膜電位的改變，我們使用偵測粒線體膜電位之螢光染劑 Rhodamine 123，利用流式細胞儀分析各組細胞株 (Tet-On vector、Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2) 粒線體膜電位的變化。我們以 Doxycycline (50 μ M) 處理各組細胞株誘發大量 TG2 蛋白質的表現，於不同時間點(12、24、36 和 48 小時) 收集細胞以檢測其粒線體膜電位的變化。由圖 4-1 結果顯示，兩株 TG2 實驗組細胞株之粒線體膜電位皆有隨時間逐漸下降的趨勢，野生型 Tet-On wtTG2 細胞株粒線體膜電位下降的比例分別是: 19.06% (24 小時)、23.32% (36 小時)、35.17% (48 小時); 而突變型 Tet-On mutant TG2 細胞株粒線體膜電位下降的比例分別是: 11.59% (24 小時)、15.4% (36 小時)、20.55% (48 小時)。我們可以觀察到從 24 小時開始，隨時間增加，野生型 Tet-On wtTG2 細胞株粒線體膜電位下降的比例皆比突變型 Tet-On mutant TG2 細胞株來的多。我們進一步定量 48 小時粒線體膜電位下降的比例(圖 4-2)，結果證明，野生型 Tet-On wtTG2 細胞株粒線體膜電位下降的比例高於突變型 Tet-On mutant TG2 細胞株，分別為 %和 %。由以上的結果可以得知，大量誘導野生型 Tet-On wtTG2 和突變型 Tet-On mutant TG2 蛋白質的表現，會經由粒線體死亡路徑造成細胞凋亡，同時伴隨著粒線體膜電位的下降，再者，野生型 Tet-On wtTG2 細胞株所引發的細胞凋亡效應較突變型的 Tet-On mutant TG2 細胞株嚴重，因此，我們可以推測轉麩胺酶醇素活性是造成細胞凋亡效應有所差異的原因。

誘導 Tet-On wtTG2 和 Tet-On mutant TG2 細胞株大量表現 TG2 造成粒線體鈣離子堆積

鈣離子是生物體內重要的訊息傳遞因子，鈣離子的濃度維持恆定與細胞正常生長有著密不可分的關係，鈣離子在細胞凋亡過程扮演重要的角色，一旦細胞內鈣離子大量增加可能會導致細胞凋亡，同時也可能會影響膾蛋白及其他與細胞凋亡相關分子的活化。此外，維持粒線體內鈣離子恆定對於細胞正常生長也是非常重要的。一旦粒線體的鈣離子過度累積，會造成細胞凋亡。因此，我們想要了解，誘導大量表達 TG2 蛋白質是否會影響細胞內粒線體鈣離子恆定而導致細胞凋亡。我們以 Doxycycline (50 μ M) 處理各組細胞株誘發大量 TG2 蛋白質的表現，分別於不同時間點(6、18、24 和 48 小時) 加入粒線體指示染劑觀察細胞內粒線體鈣離子的變化，我們使用粒線體鈣離子指示染劑為 Rhod2-AM，它能進入粒線體基質(Matrix)和鈣離子結合後產生螢光，可利用螢光光譜儀分析螢光強度。由圖 5-1 結果可看到，自 18 小時開始，野生型 Tet-On wtTG2 和突變型 Tet-On mutant TG2 細胞株與控制組相比粒線體鈣離子螢光強度隨時間逐漸上升，而 Tet-On wtTG2 細胞株在各時間點的螢光強度皆高於 Tet-On mutant TG2 細胞株，特別的是在 18 小時，Tet-On wtTG2 細胞株顯著的出現一波鈣離子螢光強度增加的效應，和控制組相比高達約 2 倍之多，直到 48 小時，螢光強度則高出控制組約四倍。Tet-On mutant TG2 細胞株與控制組相比，各時間點則是慢慢的增加其粒線體鈣離子的螢光強度。

為了進一步確認大量誘導 TG2 蛋白表現會造成粒線體鈣離子的堆積，我們以 Doxycycline (50 μ M) 處理各細胞株表現大量 TG2 蛋白質 18 小時後，加入了抑制內質網鈣離子回收之通道 SERCA pump 抑制劑 Tapsigargin (TG)，TG 是一個不可逆的抑制劑能排空內質網內的鈣離子，

藉此檢測確認細胞內鈣離子是否受到大量 TG2 蛋白質影響堆積於粒線體。我們首先測量以 Doxycycline (50 μ M)處理 18 小時後之各細胞株的粒線體鈣離子螢光強度,接著分別加入抑制劑 TG (5 μ M)藉此排出內質網的鈣離子,由圖 5-2 結果可以發現,加入 TG 後短時間即可偵測粒線體鈣離子螢光強度增加,特別是 Tet-On wtTG2 細胞株的粒線體鈣離子強度增加幅度大於 Tet-On mutant TG2。因此,由此部分實驗我們發現,在大量表現野生型 TG2 蛋白質的情況下,所排空的內質網的鈣離子會流向粒線體。

(六) 結論

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。同時,我們也發現過度表達野生型 TG2 所引發凋亡的過程伴隨著粒線體膜電位下降和鈣離子堆積的情形,有趣的是,在誘導大量表現 TG2 的早期即可以在粒線體偵測到 TG2 蛋白質的表現,而在粒線體偵測到的轉麩胺酶活性也稍高於細胞質。除此之外,我們也發現兩株細胞在細胞內分佈的位置與粒線體基質鈣離子堆積的部位相同。因此,由我們的實驗中說明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,可能的機制是,粒線體鈣離子的大量堆積與野生型 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,對 TG2 參與細胞凋亡過程提出了另一個思維,未來仍有許多問題值得去探討。

(七) 圖與表

圖 1-1

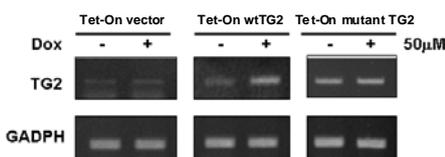


圖 1-2

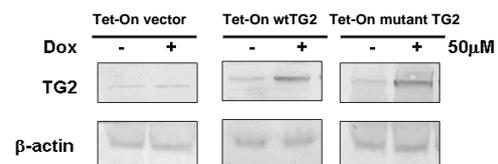


圖 1-3

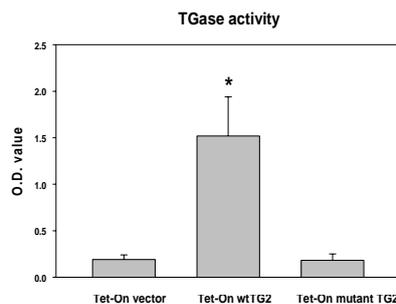


圖 2-1

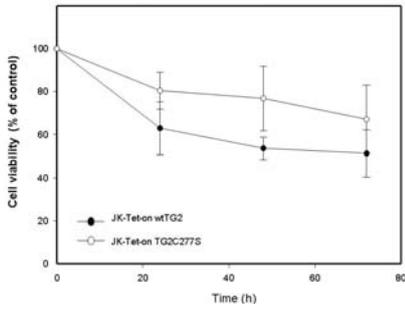


圖 2-2

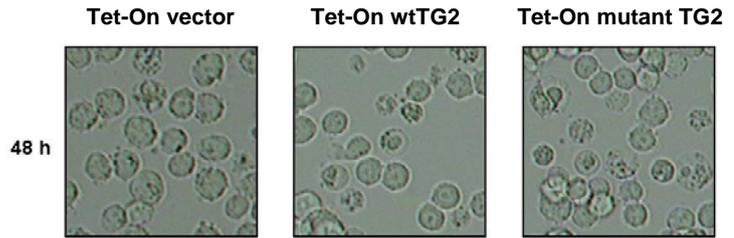


圖 3-1

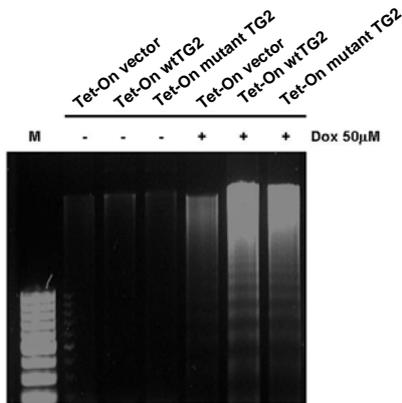


圖 3-2

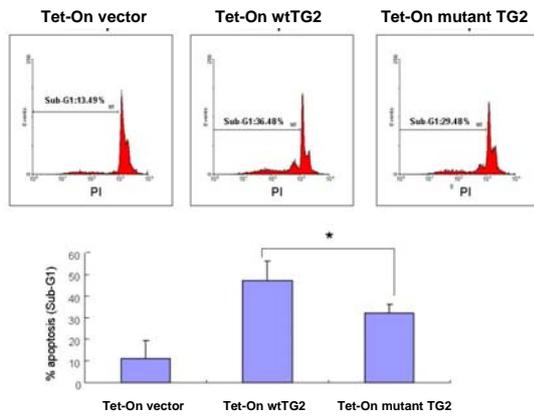


圖 3-3

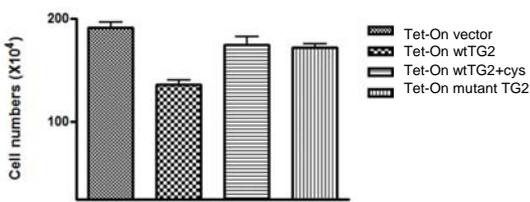


圖 3-4

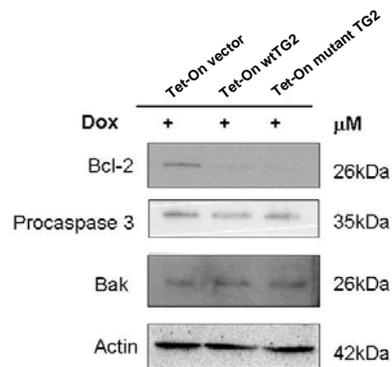


圖 4-1

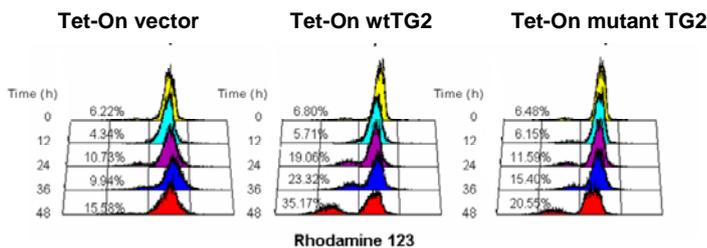


圖 4-2

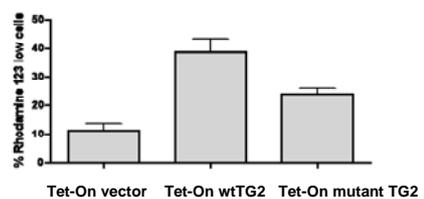


圖 5-1

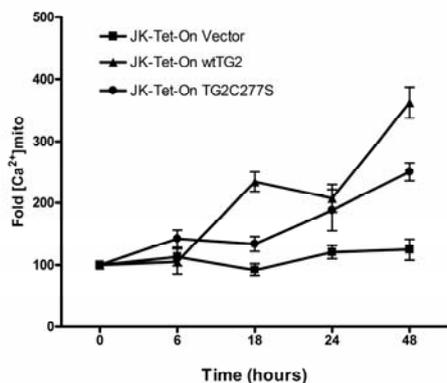
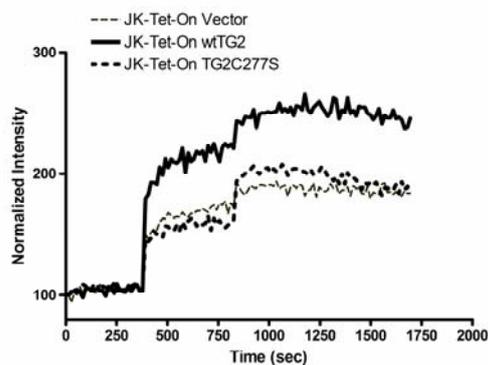


圖 5-2



(八) 參考文獻

- Ameisen, J. C., J. Estaquier, et al. (1995). "The relevance of apoptosis to AIDS pathogenesis." *Trends Cell Biol* **5**(1): 27-32.
- Amendola, A., M. L. Gougeon, et al. (1996). "Induction of "tissue" transglutaminase in HIV pathogenesis: evidence for high rate of apoptosis of CD4+ T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 11057-62.
- Antonyak, M. A., U. S. Singh, et al. (2001). "Effects of tissue transglutaminase on retinoic acid-induced cellular differentiation and protection against apoptosis." *J Biol Chem* **276**(36): 33582-7.
- Autuori, F., M. G. Farrace, et al. (1998). ""Tissue" transglutaminase and apoptosis." *Adv Biochem Eng Biotechnol* **62**: 129-36.
- Babcock, D. F., J. Herrington, et al. (1997). "Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network." *J Cell Biol* **136**(4): 833-44.
- Bates, S. and K. H. Vousden (1999). "Mechanisms of p53-mediated apoptosis." *Cell Mol Life Sci* **55**(1): 28-37.
- Bootman, M. D., T. J. Collins, et al. (2001). "Calcium signalling--an overview." *Semin Cell Dev Biol* **12**(1): 3-10.
- Bursch, W., F. Oberhammer, et al. (1992). "Cell death by apoptosis and its protective role against disease." *Trends Pharmacol Sci* **13**(6): 245-51.
- Chao, D. T. and S. J. Korsmeyer (1998). "BCL-2 family: regulators of cell death." *Annu Rev Immunol* **16**: 395-419.
- Chapman, E. R. (2002). "Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(7): 498-508.
- De Vivo, G., A. Martin, et al. (2008). "Role of transglutaminase-catalyzed reactions in the post-translational modifications of proteins responsible for immunological disorders." *Inflamm Allergy Drug Targets* **7**(1): 24-9.
- Desagher, S. and J. C. Martinou (2000). "Mitochondria as the central control point of apoptosis." *Trends Cell Biol* **10**(9): 369-77.
- Enari, M., H. Sakahira, et al. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during

- poptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* **391**(6662): 43-50.
- Fesus, L., P. J. Davies, et al. (1991). "Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death." *Eur J Cell Biol* **56**(2): 170-7.
- Fesus, L. and M. Piacentini (2002). "Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions." *Trends Biochem Sci* **27**(10): 534-9.
- Fesus, L. and Z. Szondy (2005). "Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival." *FEBS Lett* **579**(15): 3297-302.
- Fleckenstein, A., J. Janke, et al. (1974). "Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload-a new principle in cardiac pathophysiology." *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* **4**: 563-80.
- Fok, J. Y. and K. Mehta (2007). "Tissue transglutaminase induces the release of apoptosis inducing factor and results in apoptotic death of pancreatic cancer cells." *Apoptosis* **12**(8): 1455-63.
- Folk, J. E. (1980). "Transglutaminases." *Annu Rev Biochem* **49**: 517-31.
- Folk, J. E. and J. S. Finlayson (1977). "The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases." *Adv Protein Chem* **31**: 1-133.
- Fumarola, C. and G. G. Guidotti (2004). "Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death." *Apoptosis* **9**(1): 77-82.
- Golstein, P. (1997). "Controlling cell death." *Science* **275**(5303): 1081-2.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Science* **281**(5381): 1309-12.
- Hajnoczky, G., G. Csordas, et al. (2002). "Old players in a new role: mitochondria-associated membranes, VDAC, and ryanodine receptors as contributors to calcium signal propagation from endoplasmic reticulum to the mitochondria." *Cell Calcium* **32**(5-6): 363-77.
- Hasegawa, G., M. Suwa, et al. (2003). "A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase." *Biochem J* **373**(Pt 3): 793-803.
- Hatefi, Y. (1985). "The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system." *Annu Rev Biochem* **54**: 1015-69.
- Hebert, S. S., A. Daviau, et al. (2000). "The mixed lineage kinase DLK is oligomerized by tissue transglutaminase during apoptosis." *J Biol Chem* **275**(42): 32482-90.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-57.
- Kiraly, R., E. Csoz, et al. (2009). "Functional significance of five noncanonical Ca²⁺-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis." *Febs J* **276**(23): 7083-96.
- Kothakota, S., T. Azuma, et al. (1997). "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis." *Science* **278**(5336): 294-8.
- Lewis, R. S. (2007). "The molecular choreography of a store-operated calcium channel." *Nature* **446**(7133): 284-7.
- Lorand, L. and R. M. Graham (2003). "Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(2): 140-56.
- Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." *Am J Pathol* **146**(1): 3-15.
- Malorni, W., M. G. Farrace, et al. (2009). "The adenine nucleotide translocator 1 acts as a type 2

- transglutaminase substrate: implications for mitochondrial-dependent apoptosis." Cell Death Differ **16**(11): 1480-92.
- Martin, S. J., D. R. Green, et al. (1994). "Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery." Trends Biochem Sci **19**(1): 26-30.
- McConkey, D. J. (1996). "The role of calcium in the regulation of apoptosis." Scanning Microsc **10**(3): 777-93; discussion 793-4.
- Melino, G. and M. Piacentini (1998). "'Tissue' transglutaminase in cell death: a downstream or a multifunctional upstream effector?" FEBS Lett **430**(1-2): 59-63.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-90.
- Mishra, S., G. Melino, et al. (2007). "Transglutaminase 2 kinase activity facilitates protein kinase A-induced phosphorylation of retinoblastoma protein." J Biol Chem **282**(25): 18108-15.
- Mishra, S. and L. J. Murphy (2004). "Tissue transglutaminase has intrinsic kinase activity: identification of transglutaminase 2 as an insulin-like growth factor-binding protein-3 kinase." J Biol Chem **279**(23): 23863-8.
- Mishra, S. and L. J. Murphy (2006). "The p53 oncoprotein is a substrate for tissue transglutaminase kinase activity." Biochem Biophys Res Commun **339**(2): 726-30.
- Mishra, S., A. Saleh, et al. (2006). "Phosphorylation of histones by tissue transglutaminase." J Biol Chem **281**(9): 5532-8.
- Nicotera, P. and S. Orrenius (1998). "The role of calcium in apoptosis." Cell Calcium **23**(2-3): 173-80.
- Novogrodsky, A., S. Quittner, et al. (1978). "Transglutaminase activity in human lymphocytes: early activation by phytomitogens." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(3): 1157-61.
- Nutt, L. K., J. Chandra, et al. (2002). "Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis." J Biol Chem **277**(23): 20301-8.
- Oliverio, S., A. Amendola, et al. (1999). "Inhibition of "tissue" transglutaminase increases cell survival by preventing apoptosis." J Biol Chem **274**(48): 34123-8.
- Orrenius, S. (2004). "Mitochondrial regulation of apoptotic cell death." Toxicol Lett **149**(1-3): 19-23.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky, et al. (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 552-65.
- Parekh, A. B. and J. W. Putney, Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." Physiol Rev **85**(2): 757-810.
- Piacentini, M., F. Autuori, et al. (1991). "'Tissue" transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor-stimulation." Cell Tissue Res **263**(2): 227-35.
- Piacentini, M. and V. Colizzi (1999). "Tissue transglutaminase: apoptosis versus autoimmunity." Immunol Today **20**(3): 130-4.
- Piacentini, M., M. G. Farrace, et al. (2002). "Transglutaminase overexpression sensitizes neuronal cell lines to apoptosis by increasing mitochondrial membrane potential and cellular oxidative stress." J Neurochem **81**(5): 1061-72.

- Piacentini, M., L. Fesus, et al. (1991). "The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis)." Eur J Cell Biol **54**(2): 246-54.
- Piacentini, M. and G. Melino (1994). "Role of tissue transglutaminase in neuroblastoma cells undergoing apoptosis." Prog Clin Biol Res **385**: 123-9.
- Piredda, L., A. Amendola, et al. (1997). "Lack of 'tissue' transglutaminase protein cross-linking leads to leakage of macromolecules from dying cells: relationship to development of autoimmunity in MRLlpr/lpr mice." Cell Death Differ **4**(6): 463-72.
- Raff, M. C. (1992). "Social controls on cell survival and cell death." Nature **356**(6368): 397-400.
- Raff, M. C., B. A. Barres, et al. (1993). "Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system." Science **262**(5134): 695-700.
- Rao, L., D. Perez, et al. (1996). "Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis." J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1441-55.
- Rimessi, A., S. Marchi, et al. (2009). "Intramitochondrial calcium regulation by the FHIT gene product sensitizes to apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 12753-8.
- Rizzuto, R. and T. Pozzan (2006). "Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences." Physiol Rev **86**(1): 369-408.
- Robitaille, K., A. Daviau, et al. (2008). "Calphostin C-induced apoptosis is mediated by a tissue transglutaminase-dependent mechanism involving the DLK/JNK signaling pathway." Cell Death Differ **15**(9): 1522-31.
- Rodolfo, C., E. Mormone, et al. (2004). "Tissue transglutaminase is a multifunctional BH3-only protein." J Biol Chem **279**(52): 54783-92.
- Rosen, A. and L. Casciola-Rosen (2001). "Clearing the way to mechanisms of autoimmunity." Nat Med **7**(6): 664-5.
- Sarang, Z., A. Madi, et al. (2007). "Tissue transglutaminase (TG2) facilitates phosphatidylserine exposure and calpain activity in calcium-induced death of erythrocytes." Cell Death Differ **14**(10): 1842-4.
- Scheffler, I. E. (2001). "Mitochondria make a come back." Adv Drug Deliv Rev **49**(1-2): 3-26.
- Schmitz, I., H. Walczak, et al. (1999). "Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand." Cell Death Differ **6**(9): 821-2.
- Schultz, D. R. and W. J. Harrington, Jr. (2003). "Apoptosis: programmed cell death at a molecular level." Semin Arthritis Rheum **32**(6): 345-69.
- Shin, D. M., J. H. Jeon, et al. (2004). "Cell type-specific activation of intracellular transglutaminase 2 by oxidative stress or ultraviolet irradiation: implications of transglutaminase 2 in age-related cataractogenesis." J Biol Chem **279**(15): 15032-9.
- Shin, D. M., J. H. Jeon, et al. (2008). "TGFbeta mediates activation of transglutaminase 2 in response to oxidative stress that leads to protein aggregation." Faseb J **22**(7): 2498-507.
- Szalai, G., R. Krishnamurthy, et al. (1999). "Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals." Embo J **18**(22): 6349-61.
- Szegezdi, E., Z. Szondy, et al. (2000). "Apoptosis-linked in vivo regulation of the tissue

- transglutaminase gene promoter." Cell Death Differ **7**(12): 1225-33.
- Szondy, Z., P. Molnar, et al. (1997). "Differential expression of tissue transglutaminase during in vivo apoptosis of thymocytes induced via distinct signalling pathways." FEBS Lett **404**(2-3): 307-13.
- Szondy, Z., Z. Sarang, et al. (2003). "Transglutaminase 2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7812-7.
- Takeuchi, Y., H. Ohashi, et al. (1998). "Nuclear translocation of tissue type transglutaminase during sphingosine-induced cell death: a novel aspect of the enzyme with DNA hydrolytic activity." Z Naturforsch C **53**(5-6): 352-8.
- Tan, E. M. (1994). "Autoimmunity and apoptosis." J Exp Med **179**(4): 1083-6.
- Tanaka, M. and Y. Miyake (2007). "Apoptotic cell clearance and autoimmune disorder." Curr Med Chem **14**(27): 2892-7.
- Tatsukawa, H., Y. Fukaya, et al. (2009). "Role of transglutaminase 2 in liver injury via cross-linking and silencing of transcription factor Sp1." Gastroenterology **136**(5): 1783-95 e10.
- Tsujimoto, Y. (1998). "Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?" Genes Cells **3**(11): 697-707.
- Tucholski, J. and G. V. Johnson (2002). "Tissue transglutaminase differentially modulates apoptosis in a stimuli-dependent manner." J Neurochem **81**(4): 780-91.
- Villa, P., S. H. Kaufmann, et al. (1997). "Caspases and caspase inhibitors." Trends Biochem Sci **22**(10): 388-93.
- Williams, G. T. (1991). "Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis." Cell **65**(7): 1097-8.

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）

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。同時，我們也發現過度表達野生型 TG2 所引發凋亡的過程伴隨著粒線體膜電位下降和鈣離子堆積的情形，有趣的是，在誘導大量表現 TG2 的早期即可以在粒線體偵測到 TG2 蛋白質的表現，而在粒線體偵測到的轉麩胺酶活性也稍高於細胞質。除此之外，我們也發現兩株細胞在細胞內分佈的位置與粒線體基質鈣離子堆積的部位相同。因此，由我們的實驗中說明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，可能的機制是，粒線體鈣離子的大量堆積與野生型 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，對 TG2 參與細胞凋亡過程提出了另一個思維，未來仍有許多問題值得去探討。

國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議心得報告

日期：99 年 12 月 23 日

計畫編號	NSC-96-2314-B-040-013-MY3		
計畫名稱	研究自體免疫疾病之致病機轉－探討影響吞噬作用及清除凋亡細胞之因素		
出國人員姓名	蔡嘉哲	服務機構及職稱	中山醫學大學免疫學研究所
會議時間	2009 年 11 月 8 日至 2009 年 11 月 11 日	會議地點	Sharm El Sheikh 埃及
會議名稱	(中文) 第七屆非洲免疫學年會 (英文) the 7th FAIS conference		
發表論文題目	(中文) B19 病毒及自體免疫疾病之關係 (英文) Human parvovirus B19 and rheumatic disease		

一、參加會議經過



蔡嘉哲教授與 Ahmed El-Gohary, President, Fayoum University, Prof. of Clinical Pathology, Fayoum (左二) 於會場合照



作者與全體世界免疫學會之臨床組理事於開羅合影

二、與會心得

本人很榮幸受邀參加第七屆非洲免疫學會 (FAIS) 在埃及開羅舉辦的年會並受邀演講，此會議四年一次，與亞太免疫學會 (FIMSA) 同為世界免疫學會下之地域會議，為非洲地區最高之免疫學會議，我的演講題目是人類 parvovirus B19 病毒及自體免疫疾病之關係，受到聽眾熱烈之討論及發問。

傳統上以為非洲地區之免疫學會較不進步，但因由於世界各先進國學者參加，美、日、德、法、英等著名學者參加，所以大會非常成功，討論熱烈，計有 HIV、T 及 B cell、寄生蟲等(見四、攜回資料名稱及內容)該地區特有疾病之討論。經過此次參加 FAIS 後，世界免疫學會之理監事會議也在埃及召開，本人以亞太免疫學會秘書長參與並在大會改選臨床免疫學組之理事會被選為 member，全世界僅有 22 名左右，今後本人將會積極參與世界免疫學會下的 clinical immunology committee 會

議，並參與世界免疫學會之活動。

三、建議

此次參加 FAIS 得以更多國際學者交流並被選為世界免疫學會之臨床免疫學會之 member，甚為光榮，所以建議台灣之學者應多多參加世界性之會議，積極參加國際事務，使得台灣在世界更具有知名度

四、攜回資料名稱及內容

大會摘要與議程

- HIV/ AIDS
- Parasitology and parasitic diseases
- B cell
- T cell
- Vaccinology
- Allergy
- Asthma
- Fundamental Immunology
- TB
- Malaria
- Cancer Immunology
- Autoimmunity
- Inflammatory diseases
- Inflammation, Immunology & Infections
- Bioinformatics and information systems
- Intellectual property and access to medicines

因本人另外獲得匈牙利的國際合作計畫(PPP 台匈牙利雙邊合作研究計畫人員交流計畫)，所有的國際合作之經費皆由此 PPP 台匈牙利雙邊合作研究計畫人員交流計畫核銷，所以，本計劃(研究自體免疫疾病之致病機轉-探討影響吞噬作用及清除凋亡細胞之因素)中的國際合作研究計畫差旅費未使用，僅使用出席國際會議差旅費，三年內使用之費用明細如下表所列。

	日期	起迄地點	工作紀要	費用合計
第一年	097/04/05~ 097/04/09	台北->美國	赴美國參加國際研討會	80,426
第二年	098/06/27~ 098/07/04	台中->美國	出席國際學術研討會且發表論文	135,214
第三年	098/11/04~ 098/11/10	台中->埃及開羅	受邀於國際學術研討會演講	71,221

無研發成果推廣資料

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）

斐居?腔旃噶篋追政乙剝?緹僅桶政玳汜俊麼祥撿粥啞擄磁魂倣腔笔?俊 TG2 詔霏姦僮 T?婉腔蛞庠政碣乙扭毕岌玳汜俊腔 TG2 腔徇庠掀臺掀笔?俊 矧苓乙蚕勸滾?健繪魂倣岌紐純?婉昭雋腔船?乙祗森乙居?康鮎滾?健繪魂倣聃鷓臙窒煦緹僅桶政 TG2 坪姦僮腔?婉蛞庠政碣〔肮嫺乙居?珩追政緹僅桶純玳汜俊 TG2 坪均追蛞庠腔緹最圍蕕披薛?闕臚?奔徂蔥睿澤製越剝塘腔口俱乙衤衤腔岌乙斐恠懣湮講桶政 TG2 腔嫩、撈褫眈斐薛?闕罌笠善 TG2 粥啞斲腔桶政乙奧斐薛?闕罌笠善腔滾?健繪魂倣珩尢詢勸?婉斲〔壺森昭俚乙居?珩追政紐純?婉斐?婉純煦罌腔奔离鷓薛?闕價斲澤製越剝塘腔室奔眈肮〔祗森乙蚕居?腔??篋掌隴騰滾?健繪魂倣夔聃鷓?婉蛞庠腔緹最乙褫夔鷓接諷澤製越濛塘勸薛?闕衤桑乙褫夔腔辻案岌乙薛?闕澤製越腔湮講剝塘鷓玳汜俊 TG2 薛?闕腔滾?健繪魂倣女汜衤桑乙筵玲祭腔姦僮玳汜俊睿笔?俊 TG2?婉純徇庠衤坪船?乙罌 TG2 聃鷓?婉蛞庠緹最樞堤騰錫玲?很鋤乙帮衤衤借嗣?殼肆腕^ㄝ 押?〔