

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

比較雙股 RNA 及 LPS 對人類巨噬細胞活化及基因表現影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-040-050-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中山醫學大學免疫學研究所

計畫主持人：陳孟琦

共同主持人：蔡嘉哲

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 94 年 11 月 1 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ■ 期末進度報告

(計畫名稱)

比較雙股 RNA 及 LPS 對人類巨噬細胞活化及基因表現影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 93-2320-B-040-040-050

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

計畫主持人：陳孟琦

共同主持人：蔡嘉哲

計畫參與人員：許美芳 莊千純

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 免疫研究所

中 華 民 國 94 年 10 月 30 日

1. 前言

1.1. 巨噬細胞簡介

巨噬細胞 (macrophage)，屬於骨髓的幹細胞分化而來的單核吞噬細胞譜系 (lineage) 白血球，擁有非專一性辨認外來微生物的功能並吞噬、摧毀，及分泌促發炎物質及抗微生物的媒介物質，在發炎反應時會持續表現，進而調節免疫反應，屬於先天性免疫反應。因此巨噬細胞被認為是免疫防禦的第一道防線。當受到外來的微生物或病毒感染時，巨噬細胞的防禦系統會被啟動去吞噬入侵的細菌、異物及正常細胞遭受到攻擊而裂解形成的細胞殘骸，同時也會分泌多種的生長因子促進血管新生及促進纖維母細胞和平滑肌的生長進而修復傷口。巨噬細胞也會藉由分泌過氧化氫 (hydrogen peroxide; H_2O_2) 及一氧化氮 (nitric oxide; NO) 去毒殺入侵的微生物或腫瘤細胞。巨噬細胞是抗原呈現細胞 (antigen-presenting cell; APC) 可呈現外來抗原給 T cell 而活化 T cell。巨噬細胞在不同細胞及組織中有不同的表現型態，也各具有不同的功能和影響。活化後的 T cell 會分泌 interleukin 2 (IL-2) 及 interferon- γ (IFN- γ) 作用於巨噬細胞上。活化後的巨噬細胞會分泌 tumor necrosis factor α (TNF- α)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 IL-12，這些細胞激素會促進體液性 (humoral) 免疫反應及細胞性 (cellular) 免疫反應，所以巨噬細胞是聯結第一道先天性免疫防線和第二道特異性免疫防線的主角 [1-4]。

Stein *et al* [5] 首先提出有兩種主要的巨噬細胞活化類型：典型 (classical) 及替代型 (alternative)。典型的巨噬細胞活化是呈現 Th1-like 的型式，會加強發炎反應、細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) 的破壞、及細胞凋亡 (apoptosis) 形成，趨向引起慢性發炎及組織損傷 [1-4]。此種細胞需要 IFN- γ 經由 IFN- γ 受器 (interferon- γ receptor; IFN- γ R) [6] 或細菌成份 lipopolysaccharide (LPS) 活化巨噬細胞 [7]，在內膜也會產生一些物質活化鄰近細胞並增強滑膜的發炎反應。例如：IL-1 β 和 TNF- α 均由滑膜的巨噬細胞產生，可刺激纖維母細胞 (fibroblast) 增生並且產生 IL-6、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、IL-8 和其它趨化因子，因而造成關節被破壞 [8]。

替代型的活化巨噬細胞呈現 Th2-like 的型式，會強化細胞外基質的結構、細胞增生

(proliferation)、及血管新生 (angiogenesis)，趨向消除發炎反應及幫助修復痊癒。功能異常的巨噬細胞常會導致一些免疫失調的疾病發生，例如：風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis)、克隆氏病 (Crohn's disease) 或敗血症 (sepsis)。

1.2. HL-60 細胞活化與分化

HL-60 細胞是從患有急性前骨髓性白血病 (acute promyelocytic leukaemia; APL) 女性病患取得，而製成細胞株。HL-60 細胞有著前骨髓性細胞的特性，所以它可以自然的分化為成熟的顆粒球細胞及單核球細胞，分化後的細胞，與一般成熟的細胞表現著不同的抗原 [9]。由先前文獻指出，藉由 *all-trans* retinoic acid (ATRA)、dimethylsulphoxide (DMSO)、 α 1,25-dihydroxyvitamin D3 (Vit-D3)、12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) 分化細胞會誘發 CD11b 抗原表現。藉由 Vit-D3 分化細胞，會分化成單核球細胞 (monocytes)，則會誘發 CD14 表現。藉由 ATRA 刺激細胞，會分化成顆粒球細胞 (granulocytes)，會誘發 CD38、CD40 表現，但會使 CD13 的表現量下降。TPA 分化成類似巨噬細胞 (macrophage-like)，會使懸浮的 HL-60 細胞變為貼壁的細胞，且可測得 CD11b 表現。當 ATRA、DMSO 及 TPA 分化細胞後，CD71 (transferrin receptor) 表現量下降。除了增生的巨噬細胞之外，在所有成熟的白血球細胞都會表現 CD71 [10]。經 ATRA 分化的細胞、正常成熟的單核球細胞，及巨噬細胞皆會表現 c-fms (M-CSF 接受器)，但是嗜中性球 (neutrophils) 並不會表現。HL-60 細胞經分化後，細胞停止生長，細胞週期 (cell cycle) 會停止，此時，細胞會成熟、活化。分化的形態的改變，與抗原表現的改變同時在進行。

1.2.1. 細胞激素 Interferon- γ (IFN- γ)

細胞激素經由活化的巨噬細胞及淋巴球所產生 [11]；在發炎反應中，促發炎細胞激素，如：IL-1 β 、TNF- α 和 IFN- γ ，會再刺激其他細胞激素或趨化因子的產生。干擾素可分為兩大類，分別為第一型 (type I, IFN- α 及 β) 及第二型 (type II, IFN- γ)；第一型干擾

素主要是當細胞遭受外來病毒的感染時，所分泌之細胞激素；而第二型干擾素則是在 T 細胞或是自然殺手細胞 (natural killer cell; NK cell) 於某些特殊情況下 (如 T 細胞接受抗原之呈獻) 被活化，才會被分泌 [12]。

幾乎所有細胞表面均有 IFN- γ 的受器 [13]。當 IFN- γ homodimer 與兩個 IFN- γ 接受器結合，而 IFN- γ 接受器 subunit 上分別帶有 JAK (Janus kinase, α -chain, JAK1 ; β -chain, JAK2) 分子，會彼此活化，再進行磷酸化反應；此時 STAT1 (signal transducer and activators of transcription 1) 分子會與 α -chain subunits 上之結合位置結合，而被磷酸化，形成 STAT1 homodimer (又稱為 GAF, gamma-interferon activation factor)。而位於細胞質中的 STAT1 分子，經由 transphosphorylated dimerization 之後，會位移至細胞核，STAT1 再和調控基因上的 IFN- γ 反應區 (promoter)，如 IRF-1 (IFN- γ regulatory factor-1) 上的 GAS (gamma-interferon activated site) 相互結合，促使特定基因進行轉譯 [14]。

在 1986 年時，Mosmann [15] 等人首先提出 IFN- γ 及 IL-2 主為 CD4+ 第一型輔助性 T 細胞 (T helper cell 1, Th1 cell) 所分泌。IFN- γ 的作用，如直接抗病毒作用、誘發呼吸爆發 (respiratory burst) 及 iNOS 基因活化，導致 NO 之產生 [14]、影響第一型或第二型人類白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) 的表現 [14, 16]、調控白血球與內皮細胞的交互作用 (Leukocyte-Endothelial interactions)、細胞激素 (cytokine) 及趨化激素 (chemokine) 的基因表現 [14]，與誘發細胞凋亡 (apoptosis) [17]，所以，IFN- γ 在免疫機轉的調控上扮演著重要角色。

1.2.2. 病毒感染 (RNA viral infection)

雙股核糖核酸 (double-stranded RNA; dsRNA) 是 RNA 病毒感染時，複製過程中的產物 [18]。雙股核糖核酸活化蛋白激酶 (dsRNA activated protein kinase; PKR) 是一種絲胺酸/酪胺酸蛋白激酶，IFN- γ 可使 PKR 表現量增加，而雙股核糖核酸、細胞激素、生長因子和壓力訊息可活化之，且 dsRNA activated protein kinase (PKR) 可自體磷酸化 [19]。poly inosinic-polycytidylic acid sodium salt (poly IC) 是一種由 inosinic 和 cytidylic acids 化

學合成的 dsRNA 類似物，經常被用來模擬 dsRNA 病毒感染的情形 [20]。以 dsRNA 刺激胰島β細胞會產生趨化因子，可能在胰島炎 (insulinitis) 的形成，及β細胞的死亡扮演一個重要的角色 [21]。以 poly IC 刺激內皮細胞 (HUVEC)，會比刺激 IL-1β產生較高量的 IL-6、oligoadenylate synthetase (OAS)、PKR、IFN-γ-inducible protein (IRF-1) 等抗病毒反應基因 [22]。在老鼠主動脈內皮細胞用 poly IC 和 TNF-α刺激能引發黏附因子 E-selectin 及 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 的表現，此一改變需要 PKR 的參與 [23]。這些基因表現主要是 dsRNA 與其接受器 toll-like receptor3 (TLR-3) 結合後，活化訊號傳遞路徑 (例如 NF-κB) 所引起。

toll-like receptor 在果蠅中被發現，是 toll transmembrane receptor，在先天性非特異性免疫反應 (innate nonspecific immune response) 及訊號傳遞中扮演一個很重要的角色。人類的 toll 屬於第一型穿膜蛋白 (type I transmembrane protein) 由 leucine-rich repeat region (LRR) 組成 extracellular domain 及一個同源的人類 IL-1 receptor (IL1R) 相似區域 (toll-interleukin-1 related domain; TIR) 組成 intracellular domain (詳細請參見 Fig. 1)。在哺乳類細胞藉由 IL1R 及經由 TLR 兩者傳遞訊號造成 NF-κB 路徑的活化。

TLR3 mRNA 高度表現在胎盤及胰臟 [24]。但是在白血球細胞的表現受到爭議，有文獻指出 TLR3 只表現在樹突細胞 (dendritic cells; DCs) [25, 26]，而白血球細胞及單核球細胞皆不會表現 [26]，而有些發現則指出 TLR3 可表現在 T 細胞或 NK 細胞 [27, 28]。

TLR3 的表現受分化及感染而改變。*In vitro*，人類單核球細胞 (THP-1 細胞) 經由 TPA 分化後，TLR3 表現增加。藉由自泌素 (autocrine) 如，IFN-γ、IFN-β、IL-6、IL-10、TNF-α 作用後，再曝露於葛蘭氏陽性菌 (gram-positive) 下，TLR3 mRNA 表現高過於曝露在葛蘭氏陰性菌 (gram negative) 之下 [28]。單核球及顆粒球曝露於葛蘭氏陰性菌下，TLR3 的表現增高 [28]。當樹突細胞被細菌感染後，TLR3 mRNA 的表現量會減少，而對細菌反應的 TLR4 mRNA 的表現量會增加 [26]。而人類支氣管上皮細胞 (BEAS-2B 細胞) 在 poly IC 或 A 型流行性病毒 (influenza A virus) 的感染之下，TLR3 mRNA 的表現量會大量增加 [29]。

TLR3 是以 homodimer 的形式去辨識雙股 RNA 病毒 (dsRNA) [30, 31]。一般而言，TLR3 表現於細胞表面，一些報導則認為 TLR3 可能位於細胞內。有文獻指出，使用 poly IC 刺激腎臟細胞，TLR3 會專一性的辨識 poly IC，而與之結合，進而活化 NF- κ B 路徑，產生 IFN- α 、IFN- β [32]。dsRNA 與 TLR3 結合後，會經由 RIP1 及活化的 TNF 參與整個晚期的抗病毒免疫反應。

Doyle *et al.* [33] 利用基因晶片方式，比較老鼠 B 淋巴球細胞刺激 CD40L 或 LPS 的基因表現，鑑定出 IRF3；IRF3 是一個在 TLR 或 TLR4 刺激之下才會表現的基因。IRF3 活化的初級反應是受到 NF- κ B、TLRs、Tumour necrosis factor receptors (TNFRs) 及 IRF3 路徑所共同調控的；此外，基因表現活化的二級反應是受自泌性及旁泌性的 IFN- β 所調控的。TLR3 和 TLR4 兩者皆會活化 IRF3，因此而達到抑制病毒複製的目的，啟動先天性免疫反應去保護宿主免受病毒感染。

Alexopoulou *et al.* [32] 報導指出，正常老鼠細胞經 poly IC 刺激，會活化 NF- κ B 及產生發炎性的細胞激素 IL-6、IL-12 及 TNF- α ；而在 TLR3 knockout 老鼠的細胞，NF- κ B 的活化及細胞激素的產量都會減弱。作者並利用 MyD88^{-/-} 細胞證明 MyD88 與 dsRNA 誘導產生細胞激素及發炎反應有關。NF- κ B 及 MAP kinases 的活化在 MyD88^{-/-} 不受影響，所以，可能有其他路徑如 TIR-domain containing adapter protein (TIRAP, MAL) 參與整個反應 (詳細請參見 Fig.1)。

1.2.3. 細菌感染 (Bacterial infection)

細菌系屬原核細胞 (prokaryocytes) 構造或分子比真菌、原蟲、蠕蟲更具外來性。因此比較有機會被人體的防禦系統攻擊，宿主的溶菌酵素 (lysozyme) 可以攻擊細菌卻不傷害宿主。

細菌的細胞壁 (cell wall) 外有一層 peptidoglycan (PG) 的黏液多肽類 (mucopolysaccharide) 組成的壁；溶菌酵素就是攻擊位於此壁上的 N-acetyl muramic acid 及 N-acetyl glucosamine 的連接。此外，革蘭氏陰性細菌在其細胞壁中的第二層細胞膜，含有脂多醣

類 lipopolysaccharides (LPS)，也稱作內毒素 (endotoxin)。LPS 是內毒素的成份之一。當細菌被分解而釋放大量內毒素時，會造成宿主心臟血管生理功能衰竭，最後導致敗血性休克 (septic shock)。目前已知，內毒素可促進體內免疫細胞和非免疫細胞產生細胞激素 TNF- α 、血小板致活因子 (platelet activators)、介白質 (interleukins)，及含氧自由基 (oxygen free radical) 等媒介物，導致心血管平滑肌細胞之損傷，引起循環功能衰竭 [34]。

到宿主會分泌 LBP (LPS binding proteins) 與 LPS 結合，再與細胞膜上的 CD14 聯結，接著與穿膜 toll-like receptors 尤其是 TLR4 結合，經由這個 LPS-LBP-CD14 複合物會結合 TLR4，經由 MyD88 傳遞訊號。MyD88 的 N-terminal death domain 與 IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) 的絲胺酸蛋白激酶相互作用下；是自體磷酸化 (autophosphorylation) 及和 TRAF6 形成複合物，活化 NF- κ B 路徑 [35] (詳細請參見 Fig.1)；經由 NF- κ B 及 MAPK 訊號去活化發炎基因的表現，當 LPS 與 LBP、CD14 的結合受阻，磷脂質的氧化 [36] 或 IRAK 無法磷酸化時，LPS 所調控 NF- κ B 的活化及細胞激素的產生都會受影響，但對 TNF- α 或 IL-1 β 所調控的機制卻不會造成影響。此外，LPS 注射到老鼠，形成致死性內毒素休克，而磷脂質的氧化則會抑制 LPS 引起的發炎及對老鼠有保護性。因此，在嚴重的葛蘭氏陰性菌感染，內源性的磷脂質的氧化會形成一個負回饋作用，使先天性免疫 (innate immune) 反應遲緩。

Hsu *et al* [37] 發現由活的致病性葛蘭氏陽性菌及陰性菌需要 TLR4 及 PKR 誘導細胞凋亡，可能的機制是致病性細菌藉由特殊的毒性因子去躲避先天性免疫系統的偵測及破壞。經由 TRIF 及 TRIF-related adapter molecule (TRAM) 接合蛋白活化 TLR4 及 PKR 導致 apoptosis 產生及去抑制 PKR 去增強巨噬細胞所媒介的抗菌反應。Arbour *et al.* [38] 發現 TLR4 變異 (Asp299 變為 Gly，及 Thr399 變為 Ile) 使人類血球細胞對 LPS 的反應變的不靈敏。也有報導指出，TLR4 的胺基酸變異與心臟動脈硬化症 (carotid atherosclerosis) 的疾病嚴重程度有關聯性 [39]。TLR4 可和其他 TLR 形成複合物 (heterodimer)，辨識細菌 pathogen associated molecular patterns (PAMPs) (包括 lymphotoxin-alpha; LTA) 及辨識病毒，包括呼吸道融合病毒 (RSV)、C 型肝炎病毒 (HCV)

和老鼠乳癌病毒 (MMTV)。TLR4 複合物也可以辨識內源性 ligands，例如：熱休克蛋白，fibrinogen，fibronectin，surfactant protein A (SP-A) 及 β -defensins [7, 30, 31, 40-43]。

有報導指出，暴露於細菌或促發炎性細胞激素會增加 TLR4 的表現，而 IL-10 會將此路徑阻斷 [26]。TLR4 表現在內皮細胞、B 細胞、巨噬細胞、心臟肌肉及骨髓細胞；IFN- γ 不會增強 TLR4 的表現，目前仍不清楚 TLR4 是否是持續表現而不是被誘導的 [24]。

1.3. 研究目的:

我們利用不同分化的藥物 ATRA、Vit-D3、TPA 刺激 HL-60 細胞，比較其基因表現，包括和發炎反應相關的細胞激素 (如 IL-1 β 、TNF- α)、趨化因子 (IL-8、MCP-1、IP-10) 及和細胞轉移、變形有關的基因，如 MMPs、transglutaminase-2 (TG-2)，並比較細菌感染 (以 LPS) 及病毒感染 (以 poly IC 模擬 dsRNA) 時，這些基因表現是否有所不同。

2. 材料與方法

2.1. 細胞培養 (Cell culture)

人類前骨髓性白血病細胞 (Human promyelocytic leukemia, HL-60 cell) 購自財團法人食品工業發展研究所。HL-60 細胞 (5×10^5 或 1.5×10^6 cells) 平均培養在 3 及 6 公分的培養皿 (Corning) 上，使用的培養基為 RPMI1640 (Gibco) 另加 10% fetal bovine serum (FBS, Biological Industries)。細胞靜置隔夜使之穩定後，以藥物或細胞激素刺激，使用的藥物有：1、5、10 mg/ml LPS (*E. coli* O128:B12, Sigma)、100 U/ml IFN- γ (Biosource)、100 μ g/ml poly IC (Sigma)。細胞刺激 6 至 24 小時，收集萃取 RNA 或 protein，分別作 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 及 Western blot。

2.2. mRNA 萃取及 RT-PCR

A. mRNA 萃取 (mRNA extraction)

使用 Dynabeads® mRNA DIRECT Kit (DYNAL) 自培養的 HL-60 細胞 (5×10^5 cells) 刺激後收集的細胞萃取 mRNA (poly (A)⁺ RNA)。此方法利用包覆 oligo dT 的細珠去吸附真核細胞的 mRNA (含 poly A tail) 在收集的細胞中加入 100 μ l 溶解/結合緩衝液，強力振盪 1 分鐘後靜置在冰上 1 分鐘，接著於 14,000 rpm，離心 2 分鐘。上清液移到含有 50 μ g Dynabeads oligo (dT)₂₅ (約 10 μ l) 的離心管中，室溫靜置 3 分鐘，使 mRNA 結合至磁珠上。利用磁座 (Calbiochem) 將磁珠吸住，可吸掉上清液，利用此原理，以 100 μ l 緩衝液 A 洗二次，再以 100 μ l 緩衝液 B 洗一次，最後，以 50 μ l 洗滌緩衝液 (elution buffer) 混合，放置在 65°C 水浴槽中 2 分鐘，使 mRNA 與磁珠分開，以磁座吸住磁珠，取上清液 (含 mRNA) 至新的離心管，即為 mRNA，冷藏在 -20°C。

B. Reverse transcription (RT)

每 10 μ l 的總反應體積，含 3 μ l 的 mRNA (約 3.75×10^4 個 cell) 及 7 μ l 的反應溶液 (1 \times buffer (Promega), 0.5 mM of each dNTP (Viogene), 2.5 μ M random hexamer primers (GeneMark), 2.5 U/ μ l RNase inhibitor (Bio Basic) 及 12.5 U/ μ l M-MLV reverse transcriptase (Promega)。放置在 37°C 水浴反應 1 小時，陰性對照組使用滅菌水代替 mRNA。cDNA 冷藏在 -20°C 冰箱。

C. Polymerase chain reaction (PCR)

PCR 是一種利用寡核苷酸引子放大專一 gDNA 或 cDNA 的技術。利用 (a) 高溫分開雙股 DNA、(b) 引子連結到 DNA 模版、(c) DNA 聚合酶將 DNA 由 5' 端至 3' 端複製，以重覆步驟放大 DNA 片段。使用 0.2 ml 薄壁 PCR 管 (Viogene) 在聚合酶連鎖反應熱循環儀 (GeneAmp PCR System 2700) 反應。配製含有 2.5 μ l cDNA (約 1×10^4 cell) 1 \times PCR 反應溶液 (100 mM Tris-HCl pH9.0, 500 mM KCl, 0.1% (w/v) gelatin, 1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl₂, 0.4 μ M of primers, 0.5 U GeneTaq DNA polymerase (GeneMark)，總體積調至

25 μ l。反應條件為前熱處理 94°C、5 分鐘，接著 PCR 循環包括 94°C、45 秒，58°C、45 秒，72°C、1 分 20 秒，最後再於 72°C 反應 10 分鐘；各組引子的最佳 PCR 循環數皆經過實驗選定。每個 RT-PCR 實驗在 reverse transcription 實驗時都用滅菌水替代 mRNA 做為陰性對照。每次實驗自細胞培養算起，重複 3-5 次。

D. 洋菜膠電泳 (Agarose electrophoresis)

使用 1x TBE 緩衝液 (89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) 配製 2% 洋菜膠 (Viogene)，含微量 (約 0.6 l) 的 ethidium bromide。將 PCR 產物與 1x loading dye 緩衝液 (40% sucrose, 0.1 M EDTA, 0.08% (w/v) bromophenol blue) 混合好，在電壓為 50V，使 DNA 在洋菜膠移動約 30 分鐘，利用數位影像處理系統 (AlphaImager 2200) 記錄經紫外線燈照射的 PCR 產物，以分子量大小作為鑑別的標準。

2.3. 細胞存活率的分析 (Assessment of HL-60 cell viability)

螢光顯微鏡觀察

分析藥物刺激對於細胞存活率的影響，HL-60 細胞 (1.5×10^6 個 cells) 培養在 6 公分的培養皿中，刺激後的 HL-60 細胞利用細胞雷射截取儀 (Laser Capture Microdissection. LM 200) 照下細胞型態，接著使用 1x PBS 洗 3 次，然後加入 1:1 混合的 10 (g/ml propidium iodide (PI, Sigma) 和 20 (g/ml Hoechst 33342 (Ho 342, Sigma)，37°C、避光染色 15 分鐘，利用正立螢光顯微鏡 (Axioskop 2. ZEISS) 並配合影像軟體 (CCD Picture Frame) 觀察螢光分佈情形。在螢光顯微鏡下，每個樣本觀察 5 個視野 (400 倍)，以凋亡細胞佔所有細胞百分比之方式，計算細胞凋亡的比率。

2.4. 蛋白質電泳及西方墨點法 (Western blot)

A. 蛋白質萃取 (protein extraction) 及定量

經藥物刺激的 HL-60 細胞 (1.5×10^6 細胞)，收集後以 200 l 的 lysis buffer 2% SDS, 2.5% (-mercaptoethanol, bromophenol blue) 混合成 1x，以 95°C 到 100°C 乾浴器 (Major

Science, MD-12N-110) 煮 10 分鐘，然後迅速放於冰上 10 分鐘。

B. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS/PAGE 及 Commassie blue 染色法，依實驗所需配製 6~12% 下膠 (含 6~12% acrylamide : bis-acrylamide, (37.5:1) 混合均勻後，加入直立式膠台座中，靜置 30~60 分鐘。待下膠凝固後，再加入 5% 上膠 (含 5% acrylamide : bis-acrylamide, (37.5:1), 125 mM Tris, pH 6.8, 0.1% SDS)。將膠 (含玻璃片) 放入含 1x running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% SDS, Ph 8.3) 的電泳槽中，將檢體及 marker 加入不同的孔洞中，通電先以 70 V、25 mA 跑 30 分鐘，再以 120 V、25 mA，直到 loading dye 移到最底部，約 1 小時 20 分鐘。結束電泳後，將膠以無菌水稍微清洗以進行轉漬。

取出電泳完畢的膠片，浸漬於染色溶液 (含 0.2% Brilliant Blue R-250, 50% methanol 及 10% acetic acid glacial)，並輕微搖晃 40~60 分鐘，再將膠片轉置於脫色溶液 (含 10% methanol 及 10% acetic acid glacial)，更換脫色溶液數次直到膠片脫色完成。

C. 西方點墨法 Western blot

將適當大小的 PVDF 濾膜 (NEN life science)，泡在甲醇 (methanol, Bio Basic) 2 分鐘，再用二次水浸洗 5 分鐘，重複浸洗 2 次後，接著與 SDS/PAGE 泡在 1x transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3) 15 分鐘備用。SDS/PAGE 緊貼於 PVDF 濾膜，置於轉漬器中，並使用固定電壓 100 V、250 mA、4°C 中轉漬 2 小時。

轉漬後的 PVDF 濾膜以 5% blocking buffer (5% nonfat milk in TBS-T) 室溫下作用 1 小時 30 分以上，再與不同比例的初級抗體於 4°C 作用 8 小時以上。作用完後以 1x TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 在室溫浸洗三次，每次 10 分鐘。接著加入稀釋 5000 倍的二級抗體 (HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz) 室溫作用 1 小時，再以 1x TBS-T 在室溫洗三次，每次 10 分鐘。之後以 1:1 混合的 ECL 冷光試劑 (enhanced chemiluminescence, Perkin Elmer Life science) 覆蓋在 PVDF 上 10 秒鐘，接著以保鮮膜包覆著以 X 光片 (Kodak) 進行呈像。

3. 結果

3.1. HL-60 細胞的分化及基因表現

當病原入侵時，血球細胞如顆粒球、巨噬細胞、單核球細胞，會藉由分泌細胞激素或趨化激素對抗病原的感染，進而保護人體。因此我們想了解前骨髓性白血病細胞 (HL-60) 經由細菌、病毒感染下所誘發和發炎反應相關，如細胞激素、趨化因子等基因的表現。我們利用 RT-PCR 分析 HL-60 細胞經由 ATRA、Vit-D3、TPA 分化，或刺激 LPS、dsRNA 分別模擬細菌及病毒感染後的基因表現，並以顯微鏡觀察分化前後細胞型態上的改變。

3.1.1. ATRA

HL-60 細胞經由 ATRA 分化，以一般光學顯微鏡觀察細胞分化情形及細胞型態。HL-60 細胞原本為懸浮、圓形球狀；當細胞經由 ATRA (1 (g/ml) 培養 24 小時後，細胞分化成顆粒球細胞，細胞型態沒有明顯的改變，仍呈現懸浮、圓形球狀，無法以肉眼分辨細胞是否分化完全，需要分析基因的表現來證明細胞的分化。

HL-60 細胞經由 ATRA 分化成顆粒球細胞，可能誘發一些基因表現，當細菌感染細胞後，我們使用 RT-PCR 方法來分析顆粒球細胞抵抗細菌感染之基因表現。使用 ATRA (1 (g/ml) 培養 24 小時使細胞分化，再分別或共同加入 LPS (1 (g/ml)、IFN- γ (100 U/ml)，6 或 24 小時。結果顯示經由 ATRA 分化 24 小時後，即可表現 MMP-2、TG-2。在 ATRA 存在下，LPS 能引發 IL-1 β 、IL-8、MCP-1、COX-2、MMP-1 基因表現；而 IFN- γ 單獨無法引發基因表現，但卻能增強 LPS 的效應。特別的是，IP-10 只在 LPS、IFN- γ 兩者同時存在下才會表現 (Fig. 4A、B)。

3.1.2. TPA

HL-60 細胞經由 TPA 分化，以一般光學顯微鏡觀察細胞分化情形及細胞型態。HL-60 細胞原本為懸浮、圓形球狀；當細胞經由 30、80、160 nM TPA 分別培養 48、72 小時，細胞分化成巨噬細胞，細胞型態改變，細胞被拉扯，呈現貼壁、紡錘狀；在 80、160 nM

TPA、72 小時作用下細胞分化完全 (Fig. 5A)。

HL-60 細胞經由 TPA 分別分化成巨噬細胞，可能誘發一些基因表現，我們使用 RT-PCR 方法來分析分化成巨噬細胞之基因表現。我們使用 30、80、160 nM TPA 分別培養 48、72 小時，細胞分化成巨噬細胞。結果顯示，分化成巨噬細胞後 IL-1 β 、IL-8、MCP-1、TG-2、MMP-1、MMP-2、MMP-9 基因會表現；但是在 160 nM TPA 作用下，細胞因過度分化，導致細胞死亡，所以 IL-1 β 、IL-8、MMP-9 反而表現降低 (Fig. 5B)。

3.1.3. Vit-D3

HL-60 細胞經由 Vit-D3 分別分化成單核球，可能誘發一些基因表現，我們使用 RT-PCR 方法來分析分化成單核球之基因表現。

而經由 1、10、100 nM Vit-D3 分別作用 72、96 小時，細胞分化成單核球，細胞型態略呈現破碎、非圓形球狀，在 10、100 nM Vit-D3、96 小時作用下細胞分化完全 (Fig. 6A)。

而 HL-60 細胞經由 1、10、100 nM Vit-D3 分別培養 72、96 小時，細胞分化成單核球，結果顯示 Vit-D3 分化後 IL-1 β 、IL-8、COX-2、MMP-2 基因會表現；然而在 100 nM Vit-D3，72 小時培養下，MMP-1 會表現；MMP-9 在 96 小時才會表現；MMP-2 隨濃度增加表現量漸減；IL-1 β 、IL-8 在 96 小時表現降低，MCP-1、TG-2 不表現 (Fig. 6B)。

3.1.4. 細胞激素及細菌、病毒感染

HL-60 細胞分別及共同刺激 LPS (1 μ g/ml)、IFN- γ (100 U/ml)、poly IC (100 μ g/ml)，6、24 小時，以 RT-PCR 方法來分析基因表現。結果顯示，IL-1 β 、IL-8、MCP-1 能被 LPS 誘發表現，IFN- γ 能增強 LPS 的效果；但是 IL-8、MCP-1 在單獨 LPS 及兩者共同刺激下，mRNA 的表現量在 6 小時大量增加，但在 24 小時則減退。而 IP-10 則是由 IFN- γ 誘發表現，LPS 能增強 IFN- γ 的效果，且兩者共同刺激下，mRNA 的表現量在 24 小時會比 6 小時高 (Fig. 7A)。

HL-60 細胞在 poly IC 單獨作用下並無法誘導如 IL-1 β 、IL-8、MCP-1 等基因的表現。當 IFN- γ 刺激後 IP-10 會表現，在 poly IC 加 IFN- γ 共同刺激下會加強 IP-10 的表現，所以 IP-10 是由 IFN- γ 誘導，poly IC 能加強其作用 (Fig 7B)。

由於 poly IC 刺激 HL-60 細胞無法引起基因的表現，我們懷疑 HL-60 細胞是否缺乏 dsRNA 的接受器 TLR-3，所以我們拿血管內皮細胞 (ECV 304)。實驗結果顯示，ECV 304 細胞原來就表現 TLR-3，經 poly IC 刺激之後 TLR-3 大量增加，而 HL-60 細胞則是在 poly IC 刺激前後，都不會表現 TLR-3 (Fig 7C)。

4. 討論

4.1. 人類前骨髓性白血病細胞 (HL-60 細胞) 的基因表現

HL-60 細胞為血球細胞的前驅細胞，當細胞成熟並分化為顆粒球，嗜中性球、單核球、巨噬細胞會各自發揮其功能去對抗外來病毒，細菌的感染，以及產生一些發炎性的細胞激素或趨化因子對抗外來病原，執行免疫反應及達到保護宿主的目的地。因此，我們用 RT-PCR 分析 HL-60 細胞經 ATRA、TPA、Vit-D3 分化或模擬細菌 (LPS)、病毒 (dsRNA) 感染，觀察基因表現。

4.1.1. ATRA 對基因表現的影響

HL-60 細胞在一般顯微鏡觀察下是圓型、亮亮的懸浮細胞，經由 ATRA 分化後，細胞外型上沒有明顯的改變，但是，如果在分化後再加以刺激 LPS 或 IFN- γ ，細胞則有 15~20%死亡現象。以 RT-PCR 分析基因表現，發現 HL-60 細胞只要經由 ATRA 分化 24 小時，MMP-2、TG-2 基因都會表現。而利用 ATRA 分化後的 HL-60 細胞再刺激 LPS 模擬細菌感染，則會引發 IL-1 β 、IL-8、MCP-1、COX-2、MMP-1 基因表現，而 IFN- γ 單純無法引發基因表現，但卻能增強 LPS 的效應，且在 24 小時 mRNA 的表現量較 6 小時強。因此，我們推測 LPS 是經由活化 NF- κ B 路徑去產生 IL-1 β 、IL-8、MCP-1、COX-2 這些發炎因子，而 IL-1 β 可能再活化 NF- κ B 造成放大效果。由文獻指出，當 LPS 刺激人

類單核球細胞 THP-1 細胞，會誘導細胞激素 IL-1、TNF- α 、IL-6 及趨化因子 IL-8、MCP-1 基因表現，還會誘發 iNOS 的基因表現。另外，在細胞激素，細菌產物 (LPS、CpG DNA) 的刺激下，會誘發 COX-2 基因表現。有文獻指出，MMP 在血管新生 (angiogenesis)、腫瘤生長及細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 被破壞及改變時，都會表現。重要的是，在急性前骨髓性白血病細胞被證實會表現 MMP-2 及 MMP-9 基因。與我們結果相同的是 IL-1、IL-8、MCP-1、COX-2、MMP-1、MMP-2 表因會表現。但是，我們的 HL-60 細胞經 LPS 作用於顆粒球細胞並不表現 iNOS 及 TNF- α 基因，我們推測可能是細胞株不同，所以表達的基因也不盡相同。

4.1.2. TPA 對基因表現的影響

HL-60 細胞經由不同濃度的 TPA 分化 48、72 小時後，以一般光學顯微鏡觀察細胞分化情形及型態。HL-60 細胞分化為巨噬細胞後，外形呈現貼壁、紡錘狀。我們懷疑是否有分化過度現象。於是利用 PI 及 Ho342 染劑染分化前後的 HL-60 細胞，發現細胞分化前後的死亡比率都維持於 5-10%是一般細胞的正常存活率，因此，細胞處於適度活化狀態。只有 160 nM TPA 作用下，細胞過度分化，細胞週期停止，細胞約有 60%死亡。

在之前的研究指出，在細胞激素或病毒感染的刺激下，會使單核球細胞趨化及活化變成巨噬細胞，引發免疫反應消除感染原，而此一趨化 (chemotaxis) 過程需要 MCP-1 的參與。此外，在動脈硬化斑形成過程中，活化的巨噬細胞會吞噬 ox-LDL 形成泡沫細胞在本研究中，我們發現 TPA 分化為巨噬細胞後，MCP-1 會表現。

有文獻報導，TG-2 的表現和細胞的貼附性有關，它可能參與細胞間質 (ECM) 的作用。我們用 TPA 分化細胞造成細胞構形的改變，細胞受拉扯變為貼壁，紡錘樹枝狀且 TG-2 mRNA 表現，證明 TG-2 在細胞分化時是其中一個重要的指標。

巨噬細胞在成熟與活化時，會分泌一些細胞激素與趨化因子，如 IL-1、TNF- α 、IL-8 等，執行免疫反應的第一道防線去攻擊外來致病原，與我們結果相同的是 IL-1 β 、IL-8，表現於 TPA 分化細胞成巨噬細胞之時，但不同的是 TPA 化分 HL-60 細胞成巨噬細胞卻

測不到 TNF- α 及 iNOS 的表現，我們推測可能是此細胞株不會表現，而 RAW 264.7 細胞是巨噬細胞的細胞株，所以會表現。

4.1.3. Vit-D3 對基因表現的影響

HL-60 細胞經由不同濃度 Vit-D3 分化 48、72 小時後，以一般光學顯微鏡觀察細胞分化情形及型態。HL-60 細胞分化為單核球細胞後，外形呈現非圓形、棘狀。我們同樣懷疑是否有分化過度現象。於是利用 PI 及 H0342 染劑染分化前後的 HL-60 細胞，發現細胞分化前後的死亡比率都維持於 5-10% 是細胞的正常存活率，所以細胞處於適度活化狀態。

在先前研究指出，Vit-D3 會與 Vit-D3 Receptor (VDR) 結合，造成下游訊息傳遞，Vit-D3 刺激 HL-60 細胞分化以基因晶片分析，發現會活化一些基因的表現，如 ligand 結合 cytokine 受器。細胞表面抗原、防禦力 (defense)、免疫力 (immunity) 及黏著分子的功能。在本研究中，證明 Vit-D3 將 HL-60 細胞分化為單核球細胞時，IL-1 β 、IL-8 會表現，這些表現和先天性免疫力有相關性，另外 COX-2、MMP-2 也會表現，而且 MMP-9 在成熟單核球及顆粒球會表現。且已有文獻提出在急性前骨髓性白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) 細胞會表現 MMP-2 及 MMP-9，顯示了這二個基因與腫瘤生長及白血病病程的發展很有關。

4.1.4. 細菌及病毒感染對基因表現的影響

之前文獻報導，HL-60 細胞經細菌產物 (LPS) 的刺激後會誘發一些基因表現，如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8。我們的結果，都會誘發 IL-1 β 、IL-8 的表現，但是我們測不到 TNF- α 的存在，可能是因為 LPS 濃度不同；文獻使用 LPS 為 10 $\mu\text{g/ml}$ 。而我們用的濃度為 1 $\mu\text{g/ml}$ 。

有文獻指出，HL-60 細胞經 LPS 刺激可以誘發 MCP-1 的表現，MCP-1 為單核球或巨噬細胞的趨化因子，當外加細胞激素 IFN- γ 、GM-CSF、M-CSF 等則可加強 LPS 的反應。由於 LPS 的作用是屬於較前期的反應，所以在 6 小時刺激下，IL-1、IL-8、MCP-1

的 mRNA 表現會大量升高，而 24 小時消退，且 IFN- γ 單獨刺激並不會影響這些基因的表現，但卻能增強 LPS 的效果。有趣的是，IP-10 在 HL-60 細胞刺激 IFN- γ 時表現，且 poly IC 會增強 IP-10 的表現。

先前文獻指出，leukocyte 類的細胞並不表現 TLR3，與我們結果相同的是 HL-60 細胞並不表現 TLR3，是否 TLR3 表現在細胞分化前後會有改變，值得進一步研究。我們以 poly IC 模擬病毒感染去刺激 HL-60 細胞，由於 HL-60 細胞乏 TLR3，poly IC 無法與 TLR3 結合傳遞下游訊息分子，所以測不到細胞激素與趨化因子的表現。

5. 參考資料:

1. Duffield JS (2003) The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)* 104: 27-38
2. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35
3. Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF and Konttinen YT (2003) Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 60: 2334-2346
4. Mosser DM (2003) The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73: 209-212
5. Stein M, Keshav S, Harris N and Gordon S (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176: 287-292
6. Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM and Aguet M (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259: 1742-1745
7. Janeway CA, Jr. and Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216
8. Sweeney SE and Firestein GS (2004) Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 372-378
9. Trayner ID, Bustorff T, Etches AE, Mufti GJ, Foss Y and Farzaneh F (1998) Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid, alpha1,25-dihydroxyvitamin D3 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leuk Res* 22: 537-547
10. Drayson MT, Michell RH, Durham J and Brown G (2001) Cell proliferation and CD11b expression are controlled independently during HL60 cell differentiation initiated by 1,25 alpha-dihydroxyvitamin D(3) or all-trans-retinoic acid. *Exp Cell Res* 266: 126-134
11. Nagornev VA (1995) [Atherogenesis and immune inflammation]. *Arkh Patol* 57: 6-14
12. Isaacs A LJ (1957) Virus interference. The interferon. *Proc R Soc B* 147: 258
13. Ijzermans JN and Marquet RL (1989) Interferon-gamma: a review. *Immunobiology* 179: 456-473

14. Boehm U, Klamp T, Groot M and Howard JC (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15: 749-795
15. Nakamura M, Manser T, Pearson GD, Daley MJ and Geffer ML (1984) Effect of IFN-gamma on the immune response in vivo and on gene expression in vitro. *Nature* 307: 381-382
16. Petrovsky N and Harrison LC (1997) HLA class II-associated polymorphism of interferon-gamma production. Implications for HLA-disease association. *Hum Immunol* 53: 12-16
17. Shi ZO, Fischer MJ, De Sanctis GT, Schuyler MR and Tesfaigzi Y (2002) IFN-gamma, but not Fas, mediates reduction of allergen-induced mucous cell metaplasia by inducing apoptosis. *J Immunol* 168: 4764-4771
18. Iordanov MS, Paranjape JM, Zhou A, Wong J, Williams BR, Meurs EF, Silverman RH and Magun BE (2000) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. *Mol Cell Biol* 20: 617-627
19. Williams BR (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18: 6112-6120
20. Auch CJ, Saha RN, Sheikh FG, Liu X, Jacobs BL and Pahan K (2004) Role of protein kinase R in double-stranded RNA-induced expression of nitric oxide synthase in human astroglia. *FEBS Lett* 563: 223-228
21. Liu D, Cardozo AK, Darville MI and Eizirik DL (2002) Double-stranded RNA cooperates with interferon-gamma and IL-1 beta to induce both chemokine expression and nuclear factor-kappa B-dependent apoptosis in pancreatic beta-cells: potential mechanisms for viral-induced insulinitis and beta-cell death in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinology* 143: 1225-1234
22. Harcourt JL, Hagan MK and Offermann MK (2000) Modulation of double-stranded RNA-mediated gene induction by interferon in human umbilical vein endothelial cells. *J Interferon Cytokine Res* 20: 1007-1013
23. Bandyopadhyay SK, de La Motte CA and Williams BR (2000) Induction of E-selectin expression by double-stranded RNA and TNF-alpha is attenuated in murine aortic endothelial cells derived from double-stranded RNA-activated kinase (PKR)-null mice. *J Immunol* 164: 2077-2083
24. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA and Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 588-593
25. Rehli M (2002) Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol* 23: 375-378
26. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P and Mantovani A (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164: 5998-6004
27. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S and Hartmann G (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168: 4531-4537
28. Zarembek KA and Godowski PJ (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168: 554-561
29. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M and Si-Tahar M (2005) Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 280: 5571-5580
30. Heine H and Lien E (2003) Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 130: 180-192

31. Barton GM and Medzhitov R (2002) Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 270: 81-92
32. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R and Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738
33. Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, Rao G, Sun R, Haberland M, Modlin R and Cheng G (2002) IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17: 251-263
34. Michie HR, Spriggs DR, Manogue KR, Sherman ML, Revhaug A, O'Dwyer ST, Arthur K, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM and et al. (1988) Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery* 104: 280-286
35. Aderem A and Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787
36. Bochkov VN, Kadl A, Huber J, Gruber F, Binder BR and Leitinger N (2002) Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature* 419: 77-81
37. Hsu LC, Park JM, Zhang K, Luo JL, Maeda S, Kaufman RJ, Eckmann L, Guiney DG and Karin M (2004) The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature* 428: 341-345
38. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL and Schwartz DA (2000) TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25: 187-191
39. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J and Schwartz DA (2002) Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 347: 185-192
40. Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudravalli R and Ross SR (2002) Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2281-2286
41. Duesberg U, von dem Bussche A, Kirschning C, Miyake K, Sauerbruch T and Spengler U (2002) Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV)--core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4. *Immunol Lett* 84: 89-95
42. Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 135-145
43. Dunne A and O'Neill LA (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003: re3

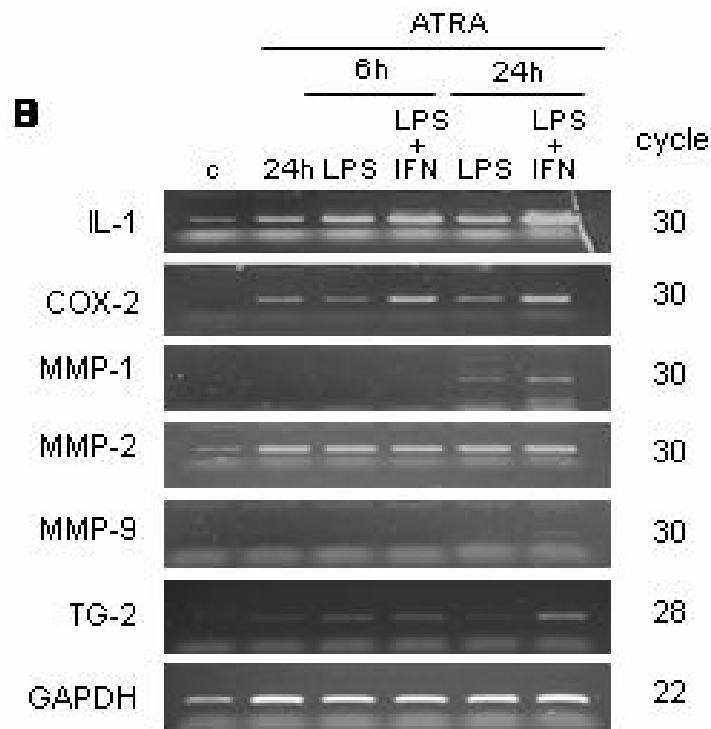
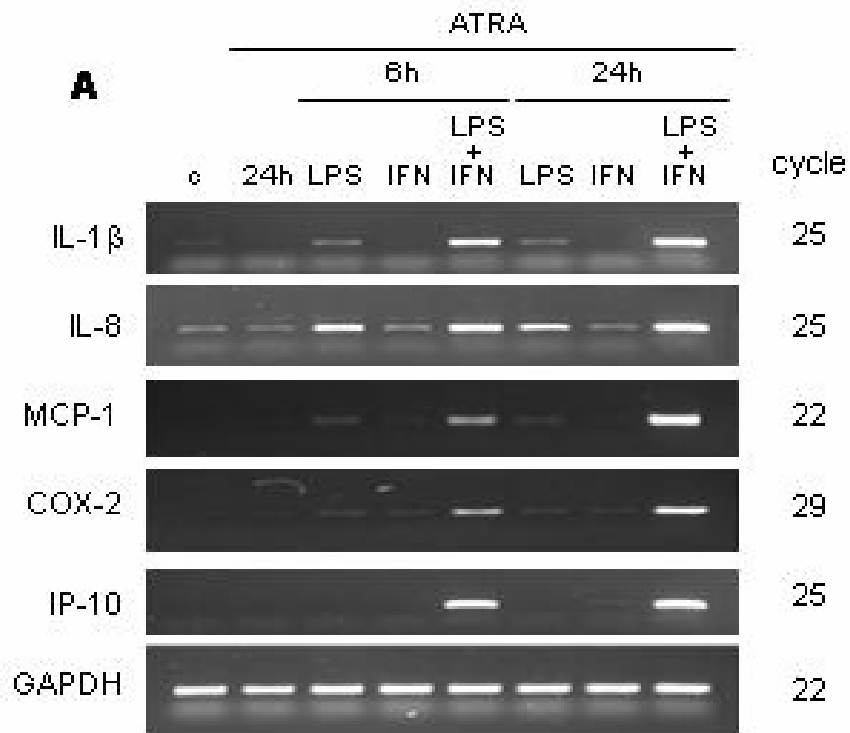


Fig.4. HL-60 cell 經由 ATRA 分化及 LPS、IFN- γ 刺激之基因表現。5 \times 10⁶ cell 經由 ATRA (1 μ g/ml) 培養 24h 後細胞分化成 granulocytes 後，再分別或共同刺激 LPS (1 μ g/ml)、IFN- γ (100 U/ml)，6、24h，mRNA 量以 RT-PCR 分析基因表現。GAPDH 為 mRNA 總量的對照。

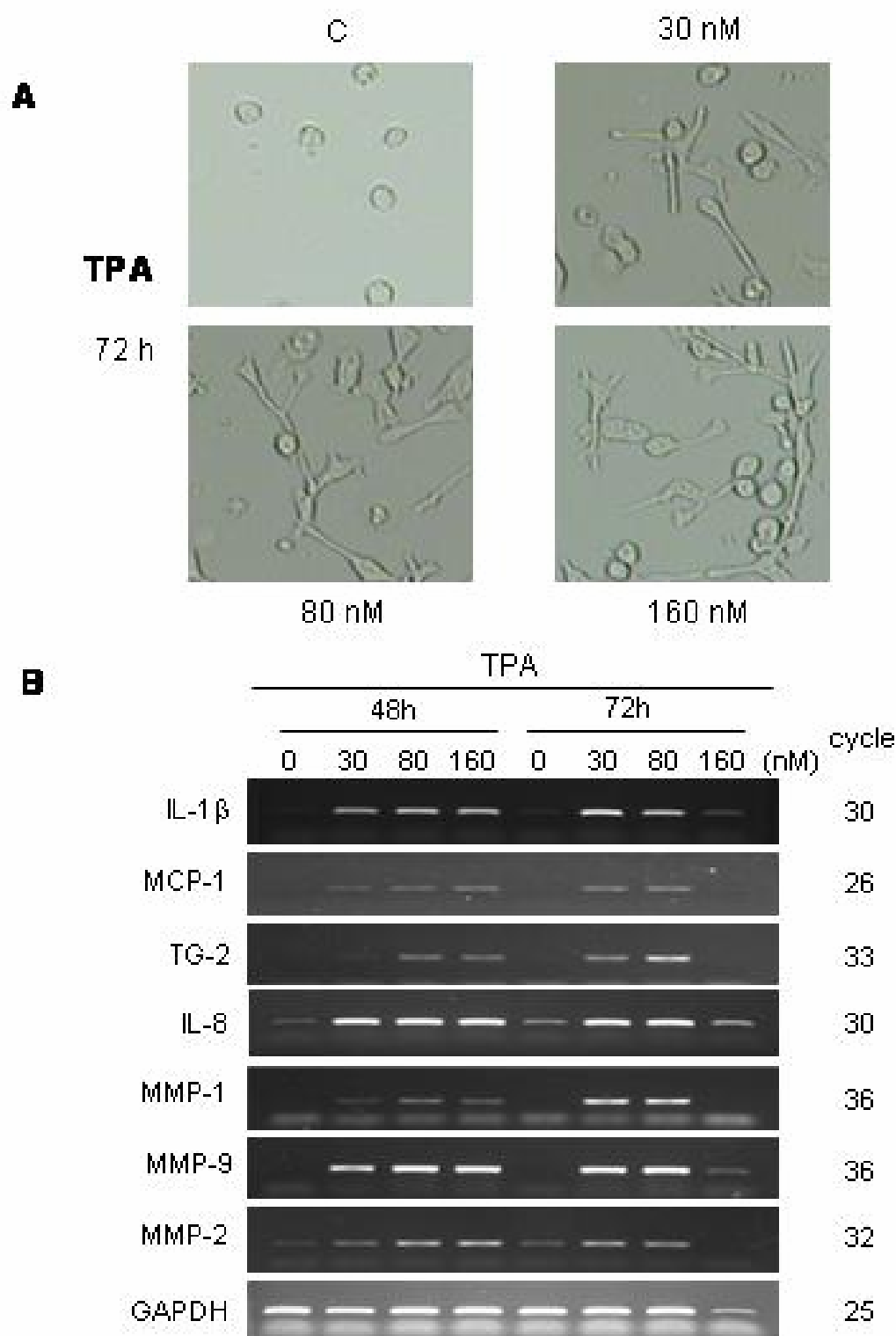


Fig.5. HL-60 cell 經由 TPA 分化及基因表現。(A) 5×10^6 cell 經由不同濃度 TPA 分化作用 72h，細胞分化成巨噬細胞，以一般光學顯微鏡觀察細胞分化情形。(B) 5×10^6 cell 經由不同濃度 TPA 分別培養 48、72h，細胞分化成巨噬細胞後，mRNA 量以 RT-PCR 分析。GAPDH 為 mRNA 總量的對照。

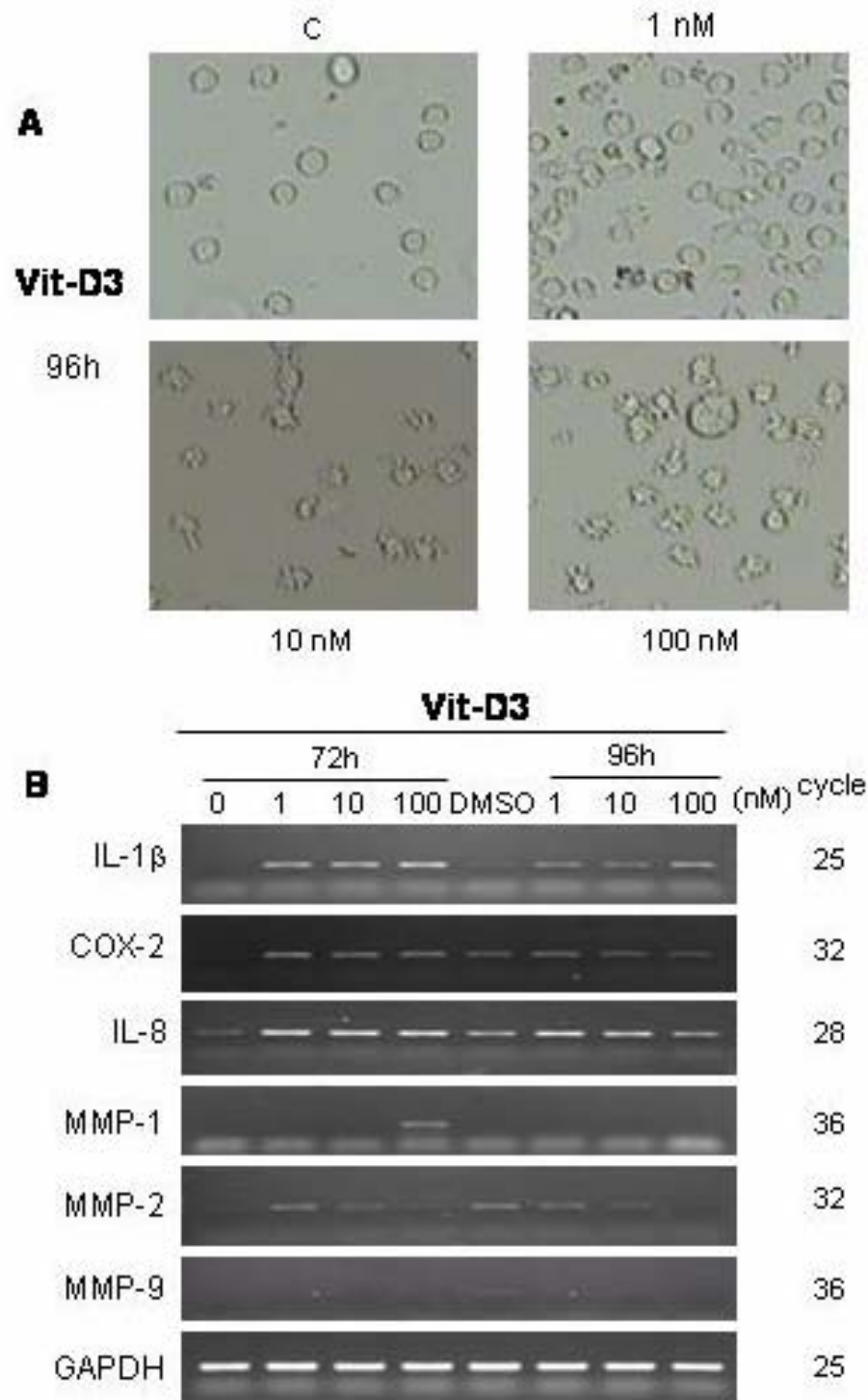


Fig.6. HL-60 cell 經由 Vit-D3 分化及基因表現。(A) 5×10^6 cell 經由不同濃度 Vit-D3 分別作用 96h，細胞分化成單核球後，以一般光學顯微鏡觀察細胞分化情形。(B) 5×10^6 cell 經由不同濃度 Vit-D3 分別作用 72、96h，細胞分化成單核球後，mRNA 量以 RT-PCR 分析。GAPDH 為 mRNA 總量的對照。

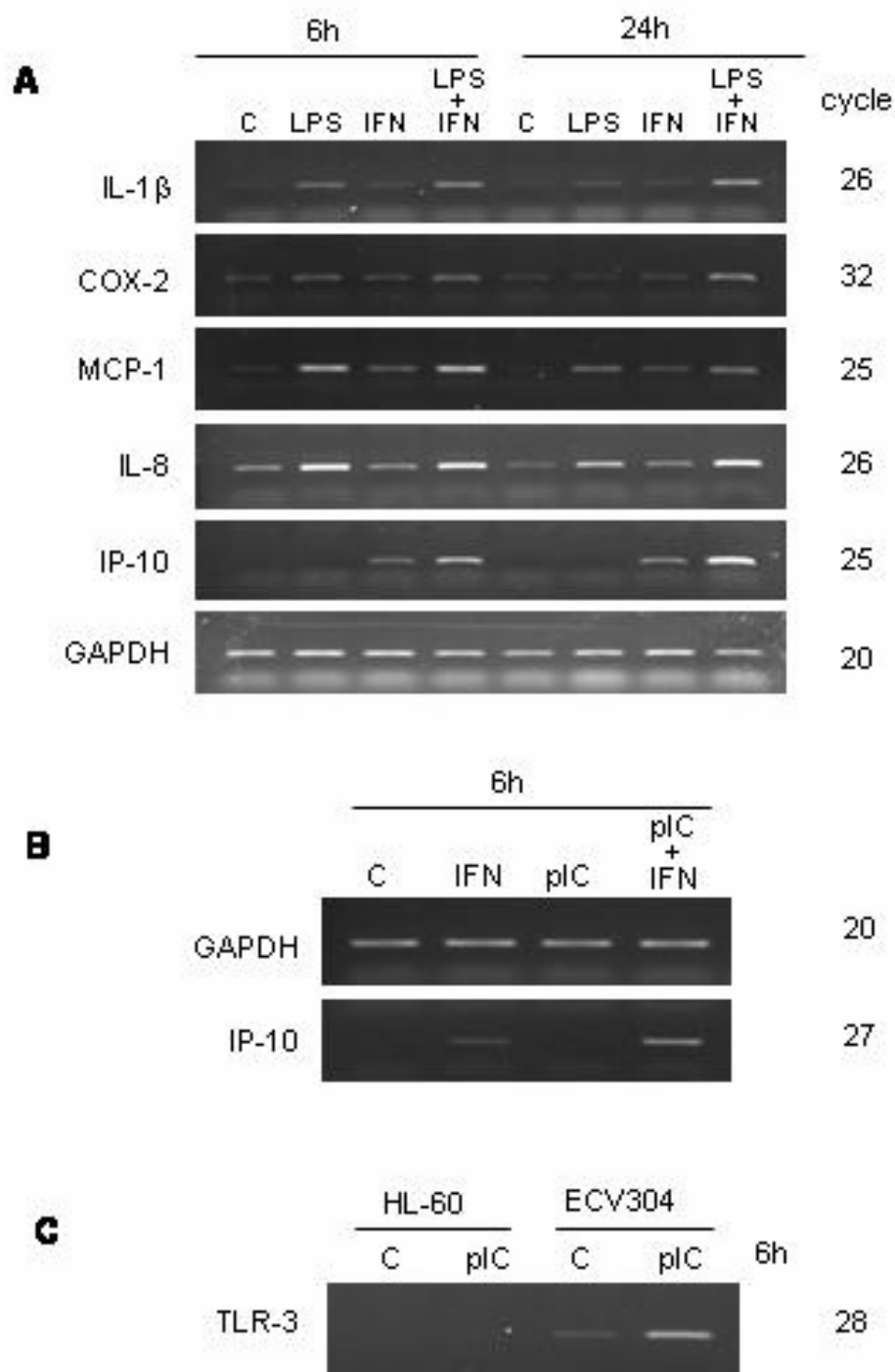


Fig.7. LPS、poly IC 及 IFN- γ 刺激 HL-60 cell 對基因表現之影響。(A) 5×10^6 cell 分別或共同刺激 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、IFN- γ (100 U/ml), 6h 及 24h。(B) 細胞分別或共同刺激 poly IC (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、IFN- γ (100 U/ml) 6h ; (C) HL-60 cell 及 ECV304 cell 刺激 poly IC (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 6h 後, mRNA 量以 RT-PCR 分析。GAPDH 為 mRNA 總量的對照。