

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 ： 精胺酸甲基轉移酶調控誘發型一氧化氮生成之機轉研究 名 稱
--

執行計畫學生：李美寰

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-034-B

研究期間：108年07月01日至109年02月28日止，計8個月

指導教授：林庭慧

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

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 109年04月20日



## (一)摘要

脂多醣(Lipopolysaccharide, LPS)是革蘭氏陰性菌外膜的構造。腎臟絲球細胞(glomerular mesangial cells, MES-13 cells)藉由 LPS 與干擾素(Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )同時的刺激，可以藉由促發誘導型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)蛋白質的表現，產生大量的一氧化氮(nitric oxide, NO)，是炎症反應的重要指標。**我們實驗室在之前發表的研究論文中**，報導了一系列對於 iNOS 蛋白質表現的分子調控機轉。有研究指出，細胞內的甲基化反應，如 DNA 甲基化和離胺酸甲基化可以調控 iNOS 蛋白質的表現。然而，對於 iNOS 蛋白質是否會受到精胺酸甲基化的調控，目前的研究報導並不多。精胺酸甲基轉移酶(protein arginine methyltransferases, PRMTs)催化細胞內精胺酸甲基化反應。PRMTs 家族共有九個成員，其中 PRMT1、PRMT4、PRMT5 和 PRMT6 在炎症反應中扮演了重要的角色。有研究發現，PRMTs 可以藉由與轉錄因子 NF- $\kappa$ B 或 STAT1 交互作用，來調控下游基因的表現。**在我們的實驗結果中發現**，S-adenosine aldehyde (S-AdOx)，一種廣效性的甲基轉移酶抑制劑，可以抑制由 LPS 及 IFN- $\gamma$  誘發的 NO 的生成及 iNOS 蛋白質的表現。此外，我們利用 siRNA 技術分別成功的抑制了 MES-13 細胞中的 Set7/9, PRMT1 和-4 蛋白質的表現。我們發現抑制 Set7/9 蛋白質的表達會降低由 LPS 及 IFN- $\gamma$  誘發的 NO 的生成及下調 iNOS 蛋白質的表現。抑制 PRMT1 和-4 則分別會增加及降低由 LPS 及 IFN- $\gamma$  誘發的 iNOS 蛋白質的表達。**我們的研究結果顯示**，細胞內的甲基轉移酶，包括 Set7/9 和 PRMTs，與 iNOS 蛋白質之間存在著複雜的調控機轉。

## (二)研究動機與研究問題

近年來許多的研究顯示，表觀遺傳學與許多疾病的發生皆有相關，像是癌症、自閉症和炎症相關疾病。表觀遺傳學的概念主要是研究在非 DNA 序列的遺傳調控機制，研究較為透徹的例子包括:DNA 甲基化、組蛋白修飾、核小體定位和 miRNA，它們都參與了表觀遺傳之調控 [1, 2]。最近的研究指出，細胞內甲基化反應除了 DNA 上之甲基化，可抑制某些基因表達；組蛋白質上的甲基化，也與組蛋白質上的乙醯化一樣，在表觀遺傳學上扮演重要的角色。因此，細胞內蛋白質的甲基化是一個重要的議題[3]。

在蛋白質的甲基化反應中，蛋白質甲基轉移酶會將 S-腺嘌呤甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)所提供的甲基，轉移到特定的氨基酸殘基上。SAM 依賴性的甲基轉移酶依照組成的結構可以分為三種類型[4]，第一類型，具有七股扭曲的  $\beta$ -折疊結構；第二類型，是包含 SET 結構域的離氨酸甲基轉移酶；第三類型，則是包含膜相關的甲基轉移酶。SAM 依賴型蛋白質甲基轉移酶可以經由甲基化 histone protein 來調控基因的表達。但越來越多研究顯示，SAM 依賴型蛋白質甲基轉移酶也可以藉由甲基化 nonhiston protein 來調控基因的表達

[5]。

精氨酸甲基化是蛋白質甲基化反應中的其中一種，藉由蛋白質精氨酸甲基轉移酶(protein arginine methyltransferases, PRMTs)家族來進行催化反應。PRMTs 家族目前有 9 個成員。其中，PRMT1、PRMT4、PRMT5 和 PRMT6 目前被認為與炎症反應有關。他們可以通過調節 NF- $\kappa$ B(炎症關鍵因子)的表達，來調控炎症反應的發生。然而，將 PRMTs 與炎症反應聯繫起來的研究，目前大多為間接的證據，研究尚處於初期階段，因此還需要其他更深入的研究，來探討 PRMTs 與炎症反應的確切關聯性[4]。

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一種高活性且不穩定的自由基，通常是在 L-Arginine 轉換成 L-Citrulline 的過程中產生。調控 NO 產生的一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)有三種，其中誘導型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)在炎症反應上扮演了重要的角色[6, 7]。我們實驗室對於 iNOS 蛋白質表現的分子調控機轉，在之前發表的研究論文中，有一系列的報導[8-12]。由於 DNA 及蛋白質的甲基化在炎症反應中扮演了重要的角色[1, 4]，且 iNOS 是發炎反應中重要的指標蛋白質[13-15]，已有研究指出，DNA[16, 17]和蛋白質離胺酸的甲基化[18-20]，可參與調控 iNOS 蛋白質的表現。我們的初步結果顯示 [Fig.1-5]，adenosine aldehyde (AdOx)，一個廣效的甲基轉移酶抑制劑，可以抑制由酯多醣(Lipopolysaccharide, LPS)及干擾素(Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )誘發的 NO 的生成及 iNOS 蛋白質的表現 [Fig.3、4]；在腎絲球細胞(MES-13 cells)中有 PRMT1、PRMT4、PRMT5 和 PRMT6 之表現 [Fig.5]。由於 PRMTs 是否可以調控 iNOS 蛋白質的表現目前並沒很清楚的報導，所以在此份研究計畫中，我們將探討蛋白質精氨酸甲基化是否參與調控誘發型一氧化氮的生成。

先前的研究報導指出，小鼠[21]及巨噬細胞[22]經由 LPS 處理後，可以誘導細胞產生炎症反應並藉由 NF- $\kappa$ B 誘發 iNOS 蛋白質的表達。而在 MES-13 cells 中，單單經由 LPS 處理並不會誘發 iNOS 蛋白質的表達，須額外加入 IFN- $\gamma$ ，才會誘發 iNOS 蛋白質的表現。而 STAT-1 $\alpha$  是 IFN- $\gamma$  下游之重要轉錄因子 [23, 24]。因此，我們也想探討蛋白質精氨酸甲基化是否可藉由 STAT-1 $\alpha$  的途徑，來調控下游基因的表達。

### (三)文獻回顧與探討

在細胞中，過度產生的 NO 濃度與細胞的病理狀態有關。NO 的產生是藉由 NOS 來調控的。在哺乳類動物中，NOS 分為三種不同的類型，分別為：神經元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、內皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和誘導型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)。在正常情況下，nNOS 和 eNOS 會在心臟和骨骼肌中表

達，並產生低濃度的 NO。而 iNOS 基因的表現通常伴隨著炎症反應的發生，並且還會顯著上調 NO 的表現量，使 NO 與超氧化物(superoxide,  $O_2^-$ )反應產生過氧亞硝酸鹽(peroxynitrite,  $ONOO^-$ )，造成細胞的氧化壓力[6, 7]。

iNOS 蛋白質在發炎反應中是重要的指標蛋白質[13-15]。然而，有研究指出，NO 在炎症反應的過程中可能扮演著兩種截然不同的角色。有研究發現，和野生型小鼠相比，iNOS 基因缺陷小鼠較易受到腸道炎的影響，並且損傷復原能力也較低[25]。還有另一個研究表示，抑制 iNOS 基因的表現，會影響巨噬細胞的生長，並且進一步導致動脈粥樣硬化斑塊的形成[26]。相反的，iNOS 所誘導的 NO 也會破壞正常組織細胞導致疾病產生，或參與不同疾病的進程，如牛皮癬所導致的腎功能障礙[13]和下丘腦炎症[14]。

在細胞內的甲基化反應中，SAM 是較常見的甲基提供者，SAM 依賴性的甲基轉移酶依照組成的結構可以分為三種類型，最大宗的一群是第 I 類型，具有七鏈  $\beta$ -折疊的結構，可以對 DNA、RNA 和蛋白質進行甲基化，DNA 甲基轉移酶家族(DNA methyltransferases, DNMTs)和 PRMTs 是其中兩種主要的甲基轉移酶；第 II 類型，是包含 SET 結構域的甲基轉移酶，因為是針對離氨酸來進行甲基化，所以又被稱為離氨酸甲基轉移酶(protein lysine methyltransferases, PKMTs)[27]；第 III 類型，則是細胞膜上的異戊烯半胱氨酸甲基轉移酶[28]。

DNA 甲基化主要是利用 DNMTs，將 SAM 上的甲基轉移到胞嘧啶(Cytosine)第 5 號碳的位置上，並藉由抑制 DNA 的轉錄來調控基因的表達[17, 29]。目前，已有許多的研究顯示，DNA 的甲基化可以調控 iNOS 基因的表達，像是通過 DNMT1 和 Tet1 介導 iNOS 基因的甲基化，可以顯著減少 NO 的產生，以及抑制 Wistar 大鼠燒傷模型中的腸道炎症和氧化壓力[30]。DNA 的 CpG 位點低度甲基化會誘導 iNOS 蛋白質的產生，其介導的炎症可能與帕金森病之間有關聯[31]。

蛋白質的甲基化可以發生在許多不同的氨基酸殘基上，包括組蛋白或非組蛋白物質上的離氨酸和精氨酸。目前，已被提出的 PKMT 包括 EZH2 [18]、SET7/9[19]和 SET-1A [20]，他們皆可調控 iNOS 蛋白質的表現量，並誘導 NO 的產生。而 PRMTs 家族目前有 9 個成員，根據精氨酸甲基化所產生的產物，可以分為三大類型，第一類型，產生不對稱二甲基精氨酸(asymmetrically dimethylated arginine, aDMA)，包括 PRMT1、PRMT2、PRMT3、PRMT4/CARM1、PRMT6 和 PRMT8；第二類型，產生對稱二甲基精氨酸(symmetrically dimethylated arginines, sDMA)，像是 PRMT5、PRMT7(有爭議的)和 PRMT9；第三類型，產生單甲基精氨酸(mono-methylated arginine, MMA)，被認為是形成 DMA 的中間產物，只有 PRMT7 屬於此類。[4] 有研究顯示，在卵泡期第 2-4 天內，收集患有多囊卵巢綜合徵的病人的外周血，發現外周血中，iNOS 和 eNOS 的轉錄減少，且 PRMT1 和參與精氨酸生物利用度的相關物質，表現量也發生了變化[32]。這項研究間接的指出，PRMTs 家族的調控可能會影響 iNOS 蛋白質的表現。因此我們需要進一步的研究，來探討 PRMTs 對 iNOS 蛋白質的

調控是否會有直接性的影響。

有研究顯示，PRMTs除了可以甲基化 histone protein 來調控基因的表達，PRMTs也可以藉由甲基化 nonhistone protein(如一些轉錄因子)來調控基因的表達[5]。舉例而言，轉錄因子，NF- $\kappa$ B 在炎症基因的表達中扮演著關鍵的角色，也是誘導 iNOS 蛋白質之重要調控因子[33]。有研究報導，NF- $\kappa$ B 可以藉由 PRMTs 進行甲基化反應，來調控下游基因的表達[34-36]。PRMT1 可以對 RelA 蛋白質，NF- $\kappa$ B 異質二聚體的其中一個，進行精氨酸甲基化，降低 RelA 蛋白質與 DNA 結合的親和力，使得 NF- $\kappa$ B 的轉錄效力降低，來影響了下游的細胞免疫相關基因的調節[36]。另一個研究顯示，PRMT6 通過與 RelA 蛋白質的交互作用，被集中到選擇性 NF- $\kappa$ B 啟動子上，促進 NF- $\kappa$ B 轉錄的活性，來調控下游基因的表達[35]。因此，我們想探討，精氨酸的甲基化是否可以藉由甲基化 NF- $\kappa$ B，來調控 iNOS 蛋白質之表達及 NO 的產生。

IFN- $\gamma$  可以藉由 JAK-STAT1 途徑調控下游基因的表達[23]，如 iNOS 蛋白質[37]。PRMTs 是否可以透過 STAT1 來調控 iNOS 基因的表達，相關的研究仍然是非常模糊，甚至研究的結果也非常兩極。有研究顯示，PRMTs 可以調控 STAT 轉錄因子的活性[38]。Mowen KA 等人的研究發現，STAT-1 可以被 PRMT1 甲基化，抑制 STAT-1 與 DNA 結合的能力和抑制 STAT-1 介導的轉錄發生[39]。相反的，也有研究表示，STAT1 和 STAT3 的精氨酸並未被觀察到有甲基化的反應發生[40]。因此，我們想探討，精氨酸的甲基化是否可以藉由甲基化 STAT-1，而來調控 iNOS 蛋白質之表達及 NO 的產生。

#### (四)研究方法

##### 1. 細胞株和細胞培養

本研究需要製備細胞株是腎絲球細胞(MES-13 cells)，培養在DMEM medium(內含有F12 Nutrient Mixture、6.138 g/L Sodium bicarbonate、5% FBS、1% PS、1% L-glutamine及1M HEPES)，在37 °C，5%的CO<sub>2</sub>條件下培養。

##### 2. 細胞存活率估算(MTT Assay)

將 $2 \times 10^5$ 個MES-13 cells種植在6 wells 盤，加入含0.5mg/ml MTT之medium，在3小時後，加入1000 $\mu$ l isopropanol，然後吸取300 $\mu$ l 至eppendorf tubes，離心7000rpm，5min。利用ELISA reader測得其在細胞在波長570 nm的O.D.值。

##### 3. NO 測定(Griess反應)

加藥時用no phenol red medium。加藥處理24小時後，將no phenol red medium取出，以7000rpm離心5分鐘。從離心後的上清液取出100 $\mu$ l no phenol red medium與100 $\mu$ l Griess solution(50 $\mu$ l A液+ 50 $\mu$ l B液)以體積1:1的比例混和。暗反應10分

鐘。再用ELISA Reader 去測吸光值OD540(96 well plate)，再利用標準曲線將吸光值換算成Nitrite的濃度或是抑制百分比。

A液：0.1% N-(1-naphthyl) ethyl-enediamide(C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> · 2HCl)。

B液：0.1% Sulfanilamide。

#### 4.蛋白質萃取與西方墨點法(Protein extraction and Western blotting)

##### [蛋白質萃取]

收取細胞前以1 x PBS 清洗兩次，加入300 µl RIPA，以細胞刮杓將細胞連同蛋白質刮下置於1.5 ml 離心管，利用超音波細胞粉碎儀打破細胞。接下來於4°C下離心12000 rpm、30 分鐘，取上清液稀釋並加入Bio-Rad protein assay dye。利用分光光度計OD595測定，算出蛋白質濃度並定量。配置好等濃度的樣品後，於95°C加熱 5分鐘後，使蛋白質denature 並在-20°C 保存或進行下一步實驗。

##### [西方墨點法]

經由SDS-PAGE電泳膠體，將蛋白質轉到PVDF膜上，用5%的脫脂牛奶溶於buffer B室溫一小時，buffer A清洗三次，每次10分鐘。一抗抗體(1:1000稀釋)，置於4°C 處理隔夜。隔日，buffer A清洗3次，每次10分鐘。加入二抗抗體(1:2000稀釋)，室溫處理1小時後，清洗三次，每次10分鐘。利用Chemiluminescence substrate 呈色，以冷光螢光數位分析系統進行冷光測定。

#### 8.免疫螢光分析(Immunofluorescence analysis)

將 $2 \times 10^5$ 個MES-13 細胞種植在6 well，並且在每個組別中加入coverslip，經加藥培養24hr後，細胞拿出後用PBS沖洗，加入4% paraformaldehyde/PBS 室溫下反應15 min 後，再用PBS 洗滌，再加入0.5% Triton X-100/PBS 室溫下反應5 min(此步驟是將細胞膜上打洞，讓抗體可以進入細胞內)，再用PBS 沖洗，接下來用2% BSA/PBS blocking室溫下反應1 hr，直接加入一抗反應16-18hr，後加入二抗反應2hr，直接加入DAPI 室溫下反應5 min，再用PBS 沖洗，封片完成後，即可用螢光顯微鏡觀察。

#### 9.siRNA的製備和transfection實驗

第一天數完細胞細胞後，將 $3 \times 10^5$ 的細胞種到3.5cm 的培養皿，使細胞第二天生長達70-80%(此步驟用正常培養細胞的medium)，第二天需先事先製備好Set7/9的siRNA和含有lipofectamine 2000的無FBS和PS的medium，先將dish的換成無FBS和PS的medium，然後加入PRMTs的siRNA，培養6小時，接下來去除舊的medium，讓細胞穩定生長18小時後，第三天將medium換成no phenol red medium，再加藥處理24小時；第四天收下蛋白後，測訂蛋白質的濃度，然後計算蛋白質的總產量，另外還要測NO，收下來的蛋白質樣本，再做Western blot實驗。



第一天數完細胞細胞後，將 $2 \times 10^5$ 的細胞種到3.5cm 的培養皿，使細胞第二天生長達70-80%(此步驟用正常培養細胞的medium)，第二天需先事先製備好PRMTs的siRNA和含有TransIT-X2的無FBS和PS的medium，先將dish的換成新的medium，然後加入PRMTs的siRNA，培養24小時；接下來第三天去除舊的medium，並換成no phenol red medium，再加藥處理；第四天收下蛋白後，測訂蛋白質的濃度，然後計算蛋白質的總產量，另外還要測NO，收下來的蛋白質樣本，再做Western blot實驗。

## 10. Lentiviruses transfection 實驗

測試細胞株對抗生素Puromycin的耐受度。種細胞 $1 \times 10^6$  cells/dish，並培養24hr。用PBS潤洗一次後，更換新的medium，並加入 $8 \mu\text{g/ml}$ 的Polybrene和病毒液。培養24hr後，將培養盤內的medium吸除，並用PBS潤洗2次，並換成含有 $2 \mu\text{g/ml}$  Puromycin的medium培養24hr。隔天觀察細胞生長的狀況，並更換新的含有Puromycin的medium。細胞長滿後，每2~3天繼代一次。

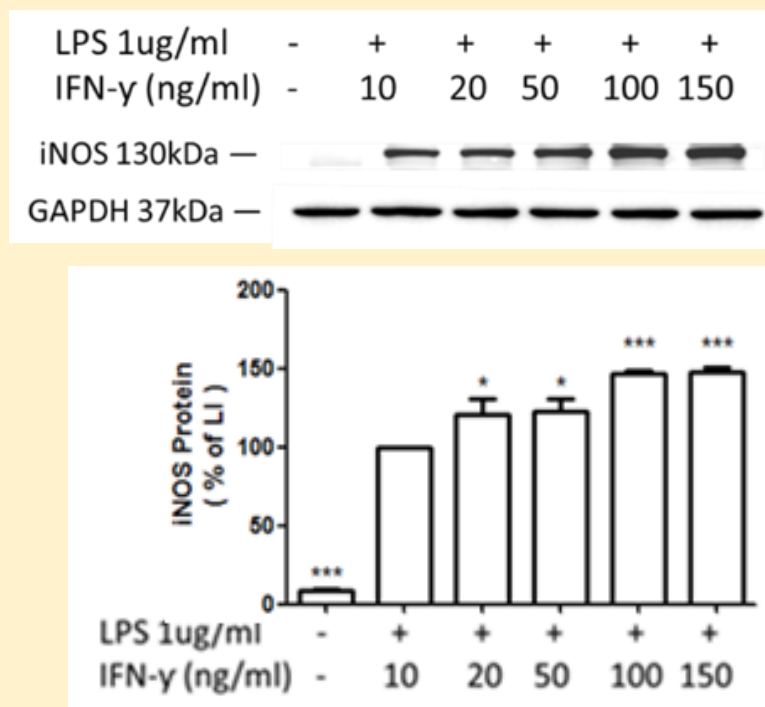
## 11. 免疫共沉澱 (co-Immunoprecipitation)

用 10 cm dish 培養細胞及處理，PBS wash\*2，add 1X lysis buffer  $150 \mu\text{l}$ ，刮細胞，震細胞，離心 15000rpm，30min。蛋白質定量。取上清液(蛋白質  $1000 \mu\text{g}$ )，1:50(體積)加入抗體， $4^\circ\text{C}$ 旋轉 overnight(剩下的上清液定量後，取適量作為 Input control)。拿磁珠、磁座，均勻打散後取磁珠  $25 \mu\text{l}$  至新的離心管，放至磁座上除水。再加入  $500 \mu\text{l}$  PBS(含 1% tween20)，均勻混和 10s，放至磁座上，除 PBS。將含有抗體的樣品加入磁珠，反應 RT10min，放至磁座上，將上清液移除。PBS wash\*3，放至磁座上，除 PBS。加入  $40 \mu\text{l}$  lysis buffer 及  $10 \mu\text{l}$  sample dye，乾熱器加熱  $80^\circ\text{C}$ ，10min。放至磁座上，取出樣品[IP]。即可跑 WB。  
(loading sample  $40 \mu\text{l/well}$ )

## (五) 結果

為了確認使用 LPS/IFN- $\gamma$  刺激所產生的炎症反應，在 MES-13 細胞中可以誘發 iNOS 蛋白質的表達。因此，我們分別在 LPS 存在或不存在的條件下，以不同濃度的 IFN- $\gamma$  對細胞進行處理[fig. 1]。我們發現在  $1 \mu\text{g/ml}$  的 LPS 和  $10\text{ng/ml}$  的 IFN- $\gamma$  刺激下就可以誘發 iNOS 蛋白質的表達[fig. 1, lane 2]，而且隨著 IFN- $\gamma$  濃度的增加，iNOS 蛋白質的表現量也隨之上升[fig. 1]。這個結果表示，在 LPS/IFN- $\gamma$  誘發的炎症反應中，IFN- $\gamma$  可能扮演著增強 iNOS 蛋白質上調的角色。在 LPS/IFN- $\gamma$  誘發的炎症反應中，IFN- $\gamma$  與 iNOS 蛋白質表達之間的潛在機制還有待其他研究進一步的探索。

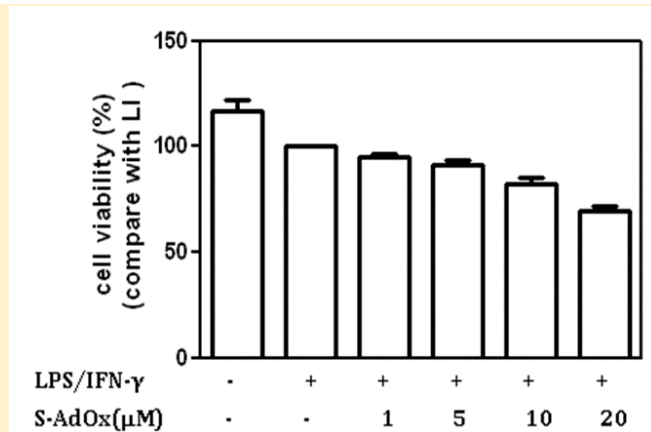




**Fig.1 在 MES-13 細胞中，LPS/IFN- $\gamma$  誘發並上調 iNOS 蛋白質的表達**

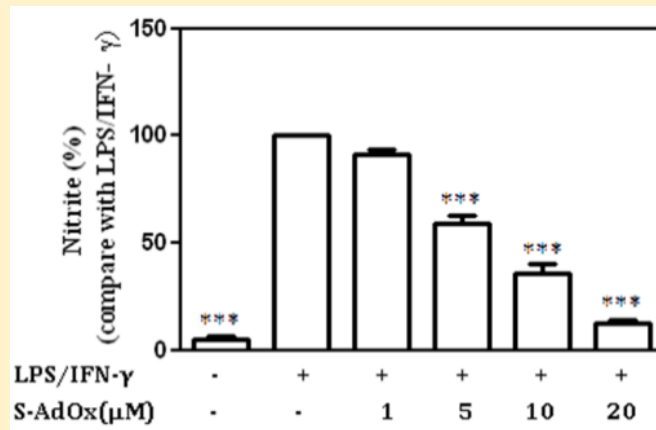
MES-13 細胞在只有培養基的環境下培養 24 小時(lane 1)或在濃度為 1 $\mu$ g/mL 的 LPS 及濃度梯度為 10~150ng/ mL 的 IFN- $\gamma$  (lane 2-6) 的環境下培養 24 小時。如圖所示，通過 Western blot 分析測定 iNOS 蛋白質的表現量。GAPDH 作為內部對照。最終結果使用能夠誘發 iNOS 蛋白質表達的 LPS/IFN- $\gamma$  最小濃度 (lane 2) 作為百分比的對照組。上述的數據結果是至少進行了三次獨立實驗的平均值 $\pm$ SEM。星號表示與對照的組別相比有顯著差異 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )。

接下來，為了瞭解細胞內的甲基轉移酶是否參與了 LPS/IFN- $\gamma$  誘導產生的 iNOS 蛋白質表達及一氧化氮生成的調控。我們在 LPS/IFN- $\gamma$  存在或不存在的條件下使用 S-AdOx，一種廣效性的甲基轉移酶抑制劑，以不同的濃度對細胞進行處理[fig. 2, 3, 4]，並測量 S-AdOx 對 MES-13 細胞存活率的影響[fig. 2]。我們發現利用 S-AdOx 抑制細胞內的甲基轉移酶，可以有效地降低一氧化氮的生成[fig. 3]並顯著的下調 iNOS 蛋白質的表現[fig. 4]。這個結果證實了，細胞內的甲基轉移酶確實會影響 LPS/IFN- $\gamma$  誘導所產生的 iNOS 蛋白質的表現及一氧化氮的生成。換句話說，細胞內的甲基轉移酶可能與 LPS/IFN- $\gamma$  誘發的炎症反應的調控有關。



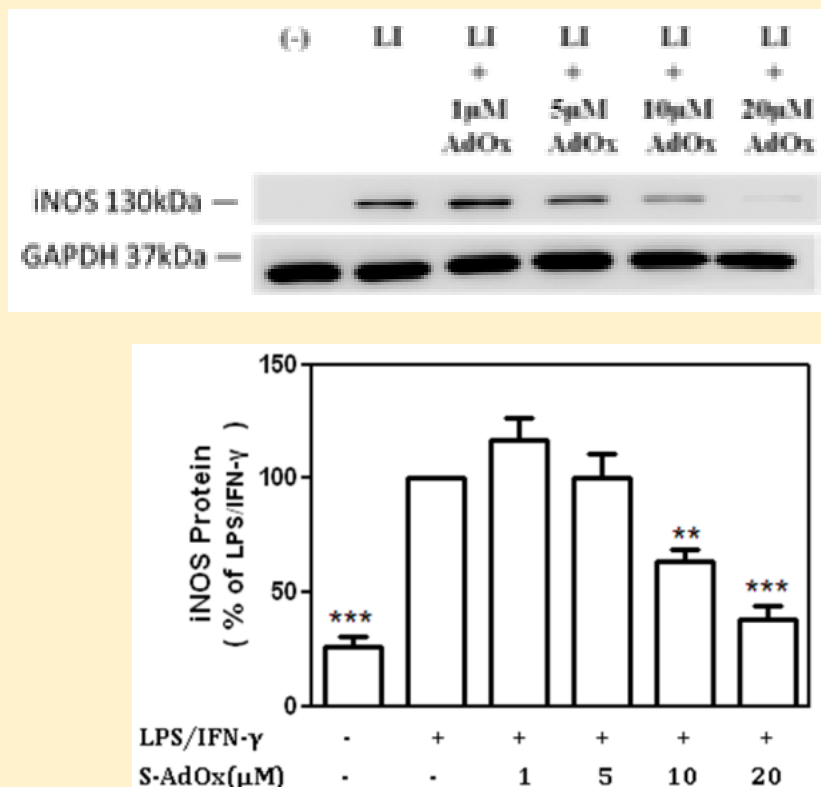
**Fig. 2 S-AdOx 對 MES-13 細胞存活率的影響**

在存在不同濃度的 S-AdOx 的情況下，用  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS 和  $10 \text{ ng/ml}$  IFN- $\gamma$  處理細胞 24 小時。細胞存活率藉由 MTT assay 測量。數據是至少三個單獨實驗的平均值 $\pm$ SEM，並用單獨使用 LPS/IFN- $\gamma$  處理的組別作為百分比的對照組(柱狀 2)。星號表示與單獨使用 LPS /IFN- $\gamma$  處理的組別相比有顯著差異 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )。



**Fig.3 在 MES-13 細胞中，S-AdOx 對 LPS/ IFN- $\gamma$  誘發的一氧化氮生成的影響**

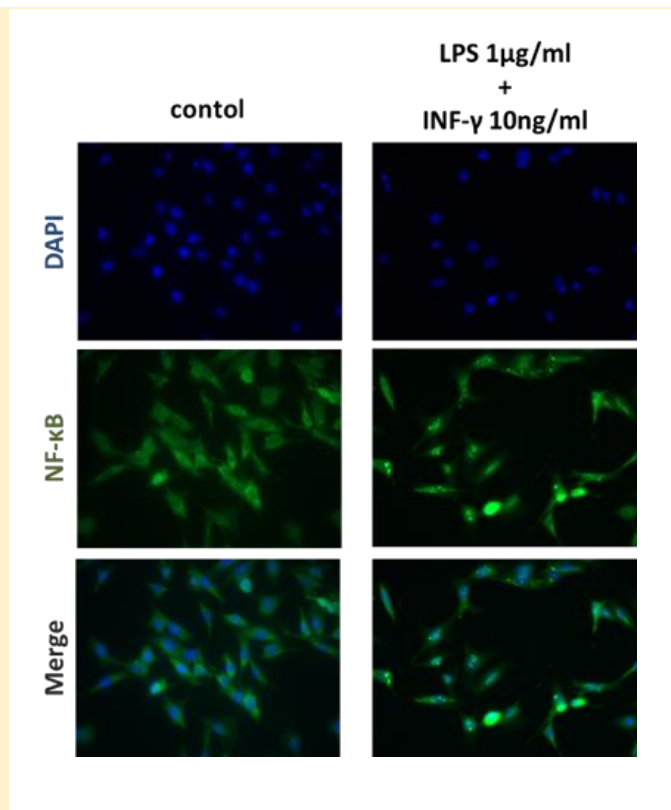
在存在不同濃度的 S-AdOx 的情況下，用  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS 和  $10 \text{ ng/ml}$  IFN- $\gamma$  處理細胞 24 小時。通過 Griess 反應測量一氧化氮濃度。數據是至少三個單獨實驗的平均值 $\pm$ SEM，並用單獨使用 LPS/IFN- $\gamma$  處理的組別作為百分比的對照組(柱狀 2)。星號表示與單獨使用 LPS /IFN- $\gamma$  處理的組別相比有顯著差異 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )。



**Fig.4** 在 MES-13 細胞中，S-AdOx 對 LPS/IFN- $\gamma$  誘導產生的 iNOS 蛋白表達的影響。

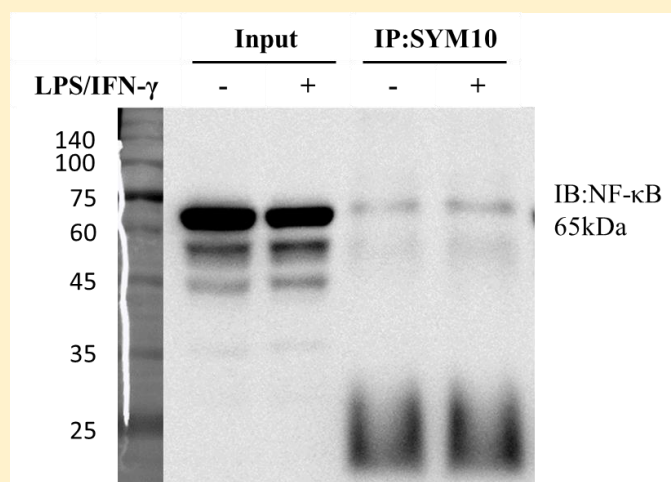
在存在不同濃度的 S-AdOx 的情況下，用  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS 和  $10 \text{ ng/ml}$  IFN- $\gamma$  處理細胞 24 小時。通過 Western blot 分析測量 iNOS 蛋白表達。GAPDH 作為內部對照。數據是至少三個單獨實驗的平均值 $\pm$ SEM，並用單獨使用 LPS/IFN- $\gamma$  處理的組別作為百分比的對照組(lane 2)。星號表示與單獨使用 LPS /IFN- $\gamma$  處理的組別相比有顯著差異 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )。

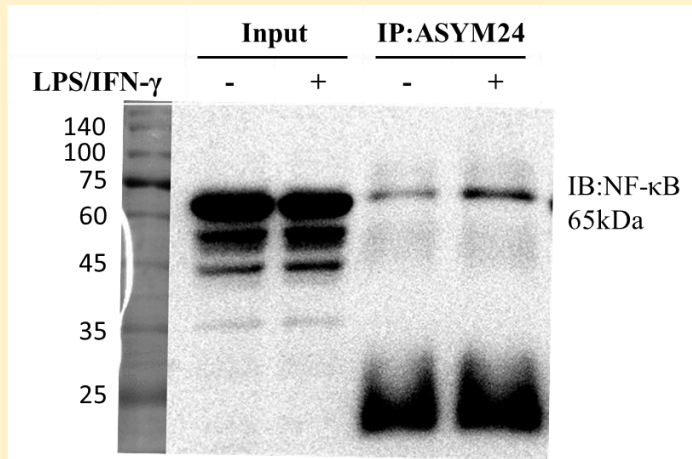
有研究報告指出，細胞內多種甲基轉移酶，包括 Set7/9, PRMT1, -4, -5 和 -6，可以藉由 NF- $\kappa$ B 作為訊號傳遞因子來調控下游基因的表達。我們在免疫螢光分析中觀察到，藉由 LPS/IFN- $\gamma$  刺激的 MES-13 細胞中，NF- $\kappa$ B 會進到細胞核內進行訊號的傳遞[fig. 5]。另外，我們還利用免疫沉澱法觀察到，在 LPS/IFN- $\gamma$  刺激之下，對稱型或非對稱型二甲基精胺酸和 NF- $\kappa$ B 之間會有交互作用，而且非對稱型二甲基精胺酸與 NF- $\kappa$ B 之間的交互作用，在經過 LPS/IFN- $\gamma$  處理之後會明顯的增加[fig. 6]。上述結果都暗示著，調控 iNOS 蛋白質表達的細胞內甲基轉移酶可能是藉由與 NF- $\kappa$ B 相關的傳遞路徑來進行基因的調控。



**Fig.5** 藉由 LPS 和  $\text{INF-}\gamma$  刺激 MES-13 細胞，會活化 NF- $\kappa$ B 進入細胞核中。

利用免疫螢光分析，來觀察 NF- $\kappa$ B(綠色訊號)在 MES-13 細胞接受 LPS/ $\text{INF-}\gamma$  處理前後，在細胞內分布的狀況。細胞核是用 DAPI 染色(藍色訊號)。

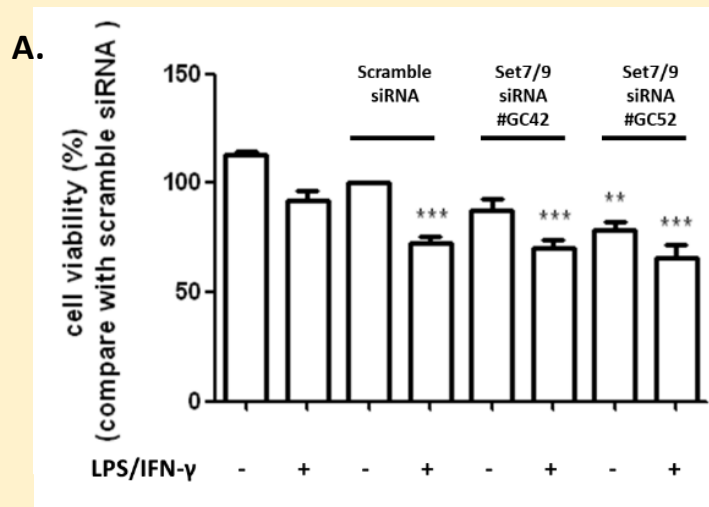




**Fig.6** 藉由 LPS 和  $\text{INF-}\gamma$  刺激 MES-13 細胞，NF- $\kappa$ B 蛋白質上的不對稱精氨酸甲基化會增加。

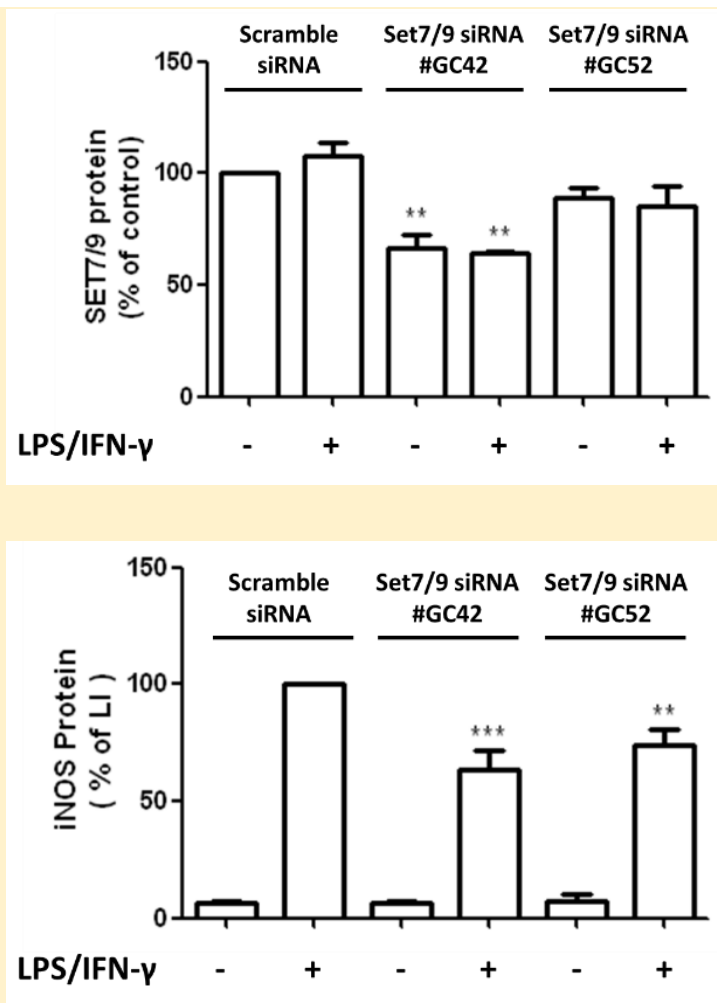
使用對稱型或非對稱型二甲基精胺酸的抗體 SYM10 和 ASYM24 對 MES-13 細胞進行免疫沉澱實驗，然後再用 NF- $\kappa$ B 抗體做免疫染色印跡。

為了研究何種細胞內的甲基轉移酶實際的參與了 iNOS 蛋白質及一氧化氮的調控。首先，我們使用針對 Set7/9 專一阻斷的 siRNA 對細胞進行處理[fig. 7, 8]，並檢測 Set7/9 siRNA 對 MES-13 細胞存活率的影響[fig. 7A]。在 Griess assay[fig. 7B]和 western blot[fig. 8]實驗中，我們發現抑制 Set7/9 蛋白質的表現，可以顯著的降低一氧化氮的生成與下調 iNOS 蛋白質的表達。這個結果確認了 Set7/9 是參與 iNOS 蛋白質調控的其中一種甲基轉移酶。此結果與目前已發表的研究論文結果相符合[19]。





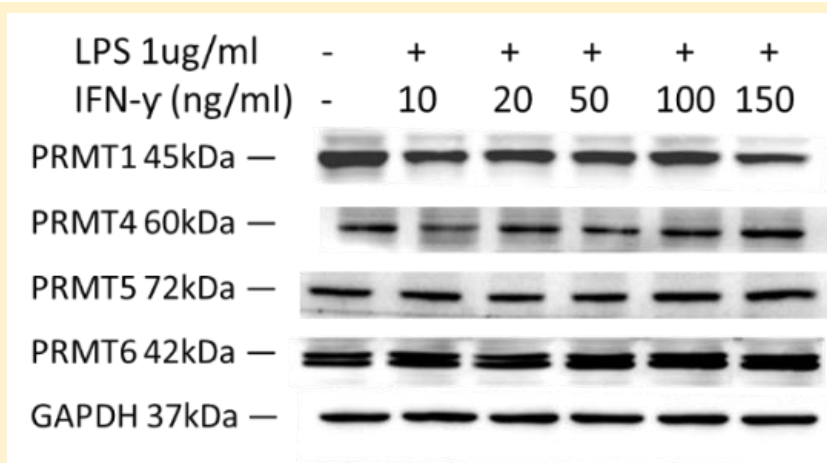




**Fig.8** 在 MES-13 細胞中，Set7/9 蛋白質表現量降低，減少了 LPS 和 IFN- $\gamma$  誘發的 iNOS 蛋白質表達。

MES-13 細胞藉由 Set7/9 siRNA 處理後，加入 1  $\mu$ g/ml LPS 和 10 ng/ml IFN- $\gamma$  作用 24 小時，藉由 western blot 觀察 Set7/9 蛋白質和 iNOS 蛋白質的表現量。以 GAPDH 作為細胞內部對照，來進行 Set7/9 蛋白質和 iNOS 蛋白質的定量。上述的數據結果是至少進行了三次獨立實驗的平均值 $\pm$ SEM。星號表示與對照的組別相比有顯著差異 (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)。

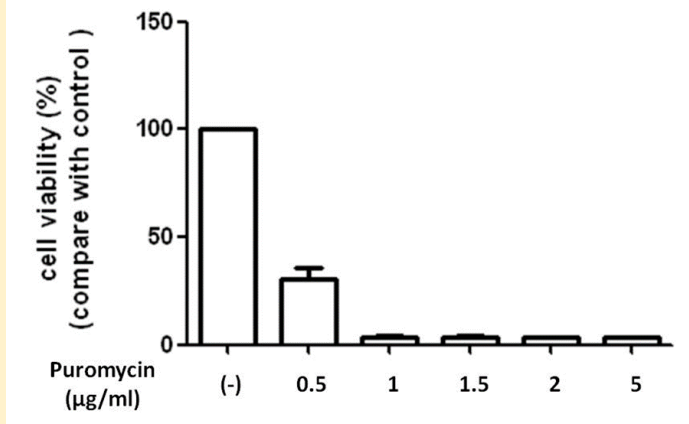
接著，為了瞭解不同的 PRMTs 亞型是否也參與了 iNOS 蛋白質表達的調控。我們利用 LPS/IFN- $\gamma$  刺激 MES-13 細胞，來觀察 PRMT1,-4,-5 和 -6 蛋白質在細胞中的表現量。與對照組相比，使用 LPS/IFN- $\gamma$  刺激的組別中，PRMT1,-4,-5 和 -6 蛋白質的表現量在細胞中並無明顯的變化[fig. 9]。



**Fig.9 藉由 LPS/IFN- $\gamma$  刺激 MES-13 細胞，來觀察不同的 PRMTs 亞型的蛋白質在細胞中的表現量**

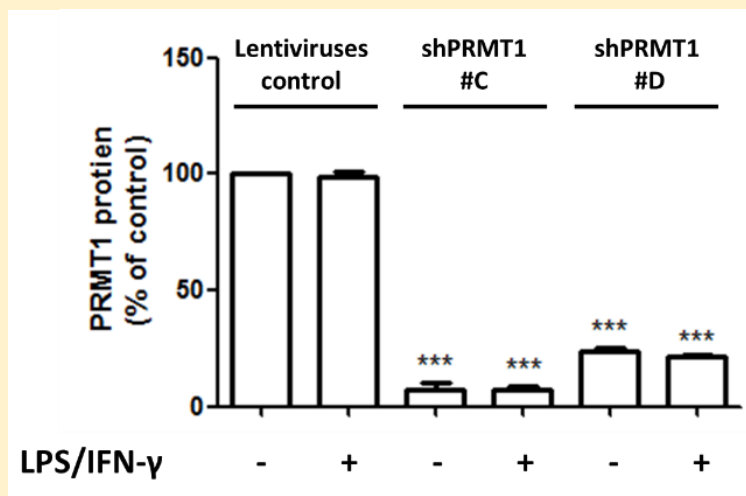
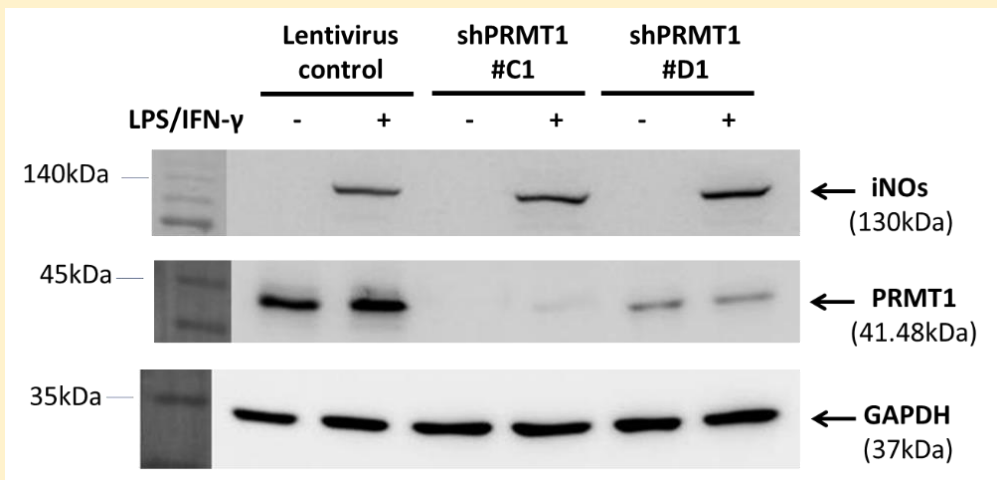
MES-13 細胞在只有培養基的環境下培養 24 小時 (lane 1) 或在濃度為 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS 及濃度梯度為 10~150ng/ mL 的 IFN- $\gamma$  (lane 2-6) 的環境下培養 24 小時。如圖所示，通過 Western blot 分析分別測定不同的 PRMTs 亞型蛋白質的表現量，包括 PRMT1, -4, -5 和-6。GAPDH 作為內部對照。此圖初步確認了 PRMT1, -4, -5 和-6 在 MES-13 細胞中皆有表現，但是，PRMT1, -4, -5 和-6 是否與 LPS/IFN- $\gamma$  誘發的 iNOS 蛋白質的調控相關，仍需進一步的研究確認。

為了進一步的研究不同的 PRMTs 亞型對於 iNOS 蛋白質表達各別的影響。我們使用 shRNA Lentivirus(使用 Puromycin 進行篩選[fig.10])或 siRNA 分別對 PRMT -1,-4,-5 和-6 進行抑制[fig. 11, 12, S1, S2]。PRMT1 蛋白質表現量被抑制，會促進 LPS/INF- $\gamma$  誘發的 iNOS 蛋白質表達上升[fig.11]，而 PRMT4 蛋白質表現量被抑制，則會下調 LPS/INF- $\gamma$  誘發的 iNOS 蛋白質表達[fig.12]。另外，值得注意的是，經由 LPS/INF- $\gamma$  處理而誘發 iNOS 蛋白質表達的組別，其 PRM4 蛋白質的表現又比 control 組還要低[fig.12, lane 2,4,6 versus lane 1]。這些結果顯示，PRMTs 和 iNOS 蛋白質的表達之間有著密切的調控機轉和複雜的交互作用，值得我們進一步的探討。

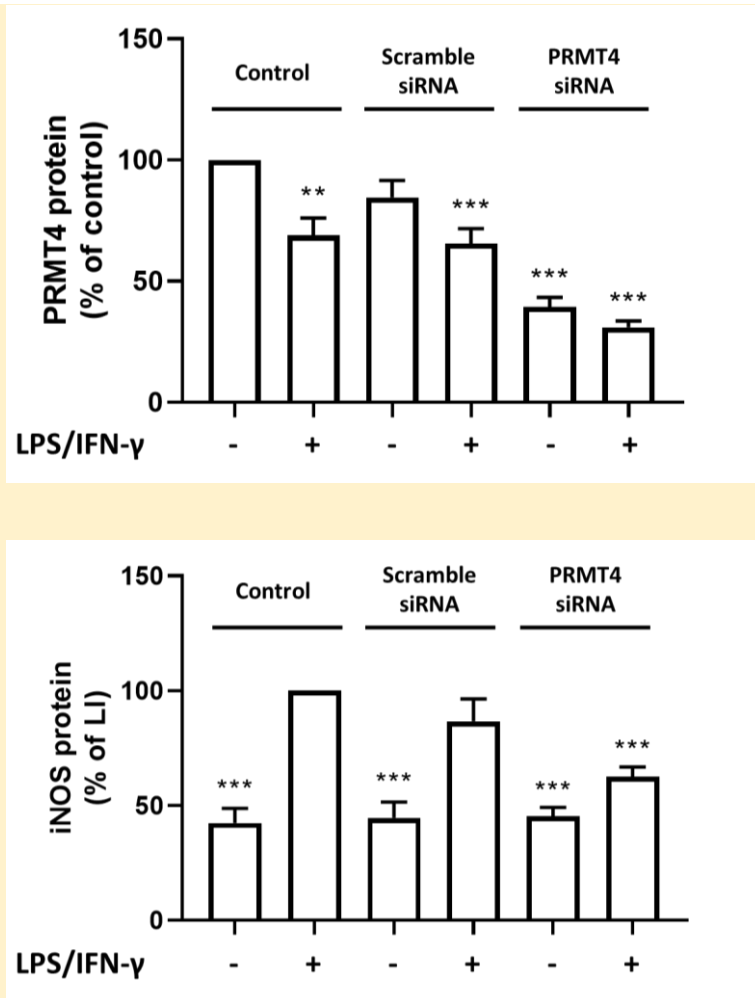


**Fig.10** MES-13 細胞對 Puromycin 耐受濃度的測試。

MES-13 細胞藉由 Puromycin 處理 24 小時後，藉由 MTT assay 測量細胞存活率。上述的數據結果是至少進行了三次獨立實驗的平均值±SEM。





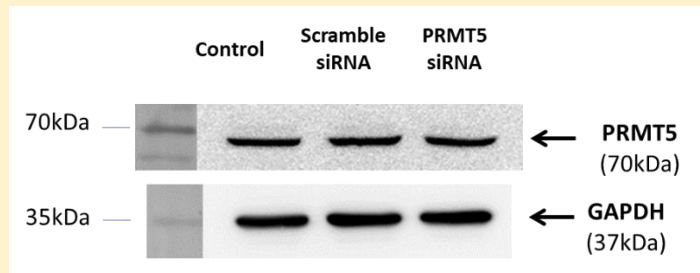


**Fig.12** 在 MES-13 細胞中，PRMT4 蛋白質表現量降低，降低了 LPS 和 IFN- $\gamma$  誘發的 iNOS 蛋白質表達。

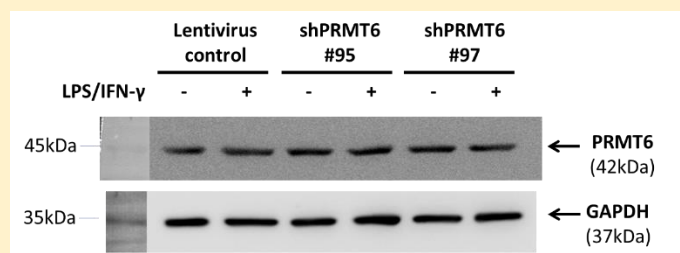
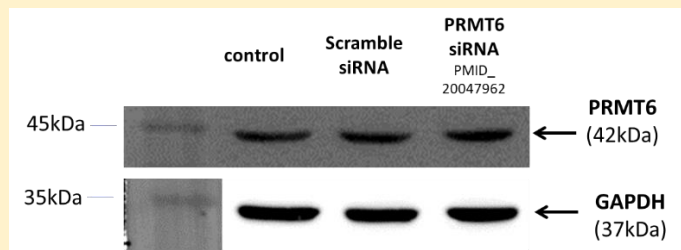
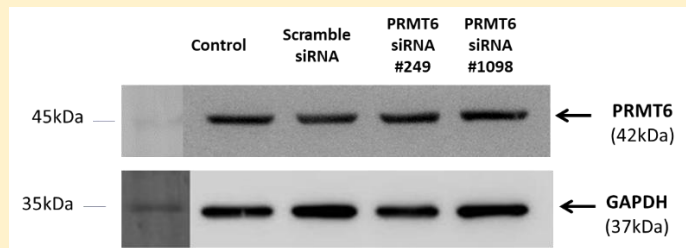
MES-13 細胞藉由 PRMT4 siRNA 處理後，加入  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS 和  $10 \text{ ng/ml}$  IFN- $\gamma$  作用 24 小時，利用 western blot 觀察 PRMT4 蛋白質和 iNOS 蛋白質的表現量。以 GAPDH 作為細胞內部對照。上述的數據結果是至少進行了三次獨立實驗的平均值 $\pm$ SEM。星號表示與對照的組別相比有顯著差異 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )。

## (六)補充資料

我們初步得到的結果顯示，在 MES-13 細胞中，PRMT5 和 PRMT6 蛋白質的表達未能在計畫執行結束前成功抑制 [fig.S1, S2]。



**Fig.S1** 在 MES-13 細胞中，PRMT5 蛋白質表現量未能成功被抑制。MES-13 細胞藉由 PRMT5 siRNA 處理 24 小時後，利用 western blot 觀察 PRMT5 蛋白質的表現量。



**Fig.S2** 在 MES-13 細胞中，PRMT6 蛋白質表現量未能成功被抑制。MES-13 細胞藉由 PRMT6 siRNA(共 3 條 PRMT6 siRNA)處理 24 小時後，利用 western blot 觀察 PRMT6 蛋白質的表現量。MES-13 細胞藉由 shPRMT6 lentiviruses(共 2 組 shPRMT6 lentiviruses)處理後，加入 LPS/IFN- $\gamma$  作用 24 小時，利用 western blot 觀察 PRMT6 蛋白質的表現量。



## (七) 討論

LPS 是革蘭氏陰性菌外膜的構造，作為細菌釋放到周圍環境中的內毒素，可以誘發強烈的炎症反應。目前有研究發現，LPS 可以藉由上調 IFN- $\gamma$  的表達來誘發小鼠的急性腎損傷[41]。另外，在我們之前的研究中顯示，經由 LPS 和 IFN- $\gamma$  刺激會誘發 iNOS 蛋白質的表達和一氧化氮的生成，而且受到 LPS 和 IFN- $\gamma$  刺激的腎絲球細胞會顯著的下調結締組織生長因子(connective tissue growth factor, CTGF)，這可能是造成腎臟纖維化的原因之一[12]。因此，LPS 和 IFN- $\gamma$  在腎臟損傷中扮演了重要的角色。在本研究中，我們藉由使用 LPS 和 IFN- $\gamma$  來誘發 MES-13 細胞的炎症反應[fig. 1]，得到的實驗結果與之前的研究相符，並且進一步的發現 IFN- $\gamma$  的增加會增強 iNOS 蛋白質的表達和一氧化氮的生成，但是詳細的作用機轉目前仍是未知的。

表觀遺傳的修飾，例如 DNA 甲基化和蛋白甲基化，可以藉由細胞內不同的甲基轉移酶進行調控。我們發現抑制細胞內整體的甲基轉移酶，會抑制 iNOS 蛋白質的表達和一氧化氮的生成。根據文獻顯示，細胞內的甲基轉移酶可以透過活化 NF- $\kappa$ B 來調控下游基因的表達[34-36]。我們初步的結果也發現，利用 LPS/IFN- $\gamma$  刺激 MES-13 細胞，會活化 NF- $\kappa$ B 進入細胞核中[fig. 5]，而且對稱或不對稱二甲基精氨酸與 NF- $\kappa$ B 的交互作用也跟著上調了[fig. 6]。綜合上述，我們合理的推測，MES-13 細胞中的甲基轉移酶可以經由活化 NF- $\kappa$ B 來調控 iNOS 蛋白質的表達。另外，有研究發現，IFN- $\gamma$  可以藉由 JAK-STAT1 途徑調控下游基因的表達[23]。然而，在 MES-13 細胞中，PRMTs 是否會藉由與 STAT1 交互作用進而影響 iNOS 蛋白質的表達，目前仍是未知的，需要我們之後的研究來作進一步的確認。

在此項研究中，我們分別成功的利用 Set7/9, PRMT1 和-4 siRNA 對 MES-13 細胞進行專一性的抑制[fig. 8, 11, 12]。抑制 Set7/9 蛋白質的表達會降低 LPS/IFN- $\gamma$  誘發的 iNOS 蛋白質及一氧化氮的生成[fig. 8]，此結果與目前已發表的論文結果相符[19]。另外，抑制 PRMT1 和-4 蛋白質的表達分別會提高及降低 LPS/IFN- $\gamma$  誘發的 iNOS 蛋白質的表達[fig. 11, 12]。其中，值得注意的是，經由 LPS/INF- $\gamma$  誘發產生的 iNOS 蛋白質組別，其 PRM4 蛋白質的表現比 control 組還要低[fig.12, lane 2,4,6 versus lane 1]。上述的結果顯示，細胞內的甲基轉移酶和 iNOS 蛋白質的表達之間可能有著複雜的調控機轉，其潛在的作用機制或許能夠作為未來治療腎臟發炎有效的候補途徑。

## (八) 致謝

我們感謝李娟老師為這項研究提供了 shPRMT1 lentivirus。  
以及感謝本實驗室成員的協助。

### (九)參考文獻

1. Samanta, S., et al., *Epigenetic dysfunctional diseases and therapy for infection and inflammation*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(2): p. 518-528.
2. Zoghbi, H.Y. and A.L. Beaudet, *Epigenetics and Human Disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(2): p. a019497.
3. Blanc, R.S. and S. Richard, *Arginine Methylation: The Coming of Age*. Mol Cell, 2017. **65**(1): p. 8-24.
4. Kim, J.H., et al., *The Role of Protein Arginine Methyltransferases in Inflammatory Responses*. Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 4028353.
5. Lee, Y.H. and M.R. Stallcup, *Minireview: protein arginine methylation of nonhistone proteins in transcriptional regulation*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(4): p. 425-33.
6. Lind, M., et al., *Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?* Biomed Pharmacother, 2017. **93**: p. 370-375.
7. Sarkozy, M., et al., *Mechanisms and Modulation of Oxidative/Nitrative Stress in Type 4 Cardio-Renal Syndrome and Renal Sarcopenia*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 1648.
8. Huang, C.N., et al., *PGE2 enhances cytokine-elicited nitric oxide production in mouse cortical collecting duct cells*. Nitric Oxide, 2005. **12**(3): p. 150-8.
9. Lin, Y.S., et al., *AH23848 accelerates inducible nitric oxide synthase degradation through attenuation of cAMP signaling in glomerular mesangial cells*. Nitric Oxide, 2008. **18**(2): p. 93-104.
10. Liu, B.H., et al., *The fungal metabolite, citrinin, inhibits lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced nitric oxide production in glomerular mesangial cells*. Int Immunopharmacol, 2010. **10**(12): p. 1608-15.
11. Tsai, K.D., et al., *Differential effects of LY294002 and wortmannin on inducible nitric oxide synthase expression in glomerular mesangial cells*. Int Immunopharmacol, 2012. **12**(3): p. 471-80.
12. Tsai, K.D., et al., *Downregulation of connective tissue growth factor by LPS/IFN-gamma-induced nitric oxide is reversed by aristolochic acid treatment in glomerular mesangial cells via STAT-1alpha and NF-kappaB signaling*. Chem Biol Interact, 2014. **210**: p. 86-95.

13. Al-Harbi, N.O., et al., *Psoriasis-like inflammation leads to renal dysfunction via upregulation of NADPH oxidases and inducible nitric oxide synthase*. *Int Immunopharmacol*, 2017. **46**: p. 1-8.
14. Lee, C.H., et al., *Hypothalamic Macrophage Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Obesity-Associated Hypothalamic Inflammation*. *Cell Rep*, 2018. **25**(4): p. 934-946 e5.
15. Tripathi, P., et al., *The role of nitric oxide in inflammatory reactions*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2007. **51**(3): p. 443-52.
16. Bakshi, C., R. Vijayvergiya, and V. Dhawan, *Aberrant DNA methylation of M1-macrophage genes in coronary artery disease*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 1429.
17. Yu, Z. and B.C. Kone, *Hypermethylation of the inducible nitric-oxide synthase gene promoter inhibits its transcription*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(45): p. 46954-61.
18. Dreger, H., et al., *Epigenetic suppression of iNOS expression in human endothelial cells: A potential role of Ezh2-mediated H3K27me3*. *Genomics*, 2016. **107**(4): p. 145-9.
19. Fujimaki, K., et al., *SET7/9 Enzyme Regulates Cytokine-induced Expression of Inducible Nitric-oxide Synthase through Methylation of Lysine 4 at Histone 3 in the Islet beta Cell*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(27): p. 16607-18.
20. El Mansouri, F.E., et al., *Contribution of H3K4 methylation by SET-1A to interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in human osteoarthritis chondrocytes*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(1): p. 168-79.
21. Chen, Y., et al., *Dexmedetomidine protects against lipopolysaccharide-induced early acute kidney injury by inhibiting the iNOS/NO signaling pathway in rats*. *Nitric Oxide*, 2019. **85**: p. 1-9.
22. Wu, J.J., et al., *Farnesyl thiosalicylic acid prevents iNOS induction triggered by lipopolysaccharide via suppression of iNOS mRNA transcription in murine macrophages*. *Int Immunopharmacol*, 2019. **68**: p. 218-225.
23. Majoros, A., et al., *Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK-STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 29.
24. Majumder, S., et al., *p48/STAT-1alpha-containing complexes play a predominant role in induction of IFN-gamma-inducible protein, 10 kDa (IP-10) by IFN-gamma alone or in synergy with TNF-alpha*. *J Immunol.*, 1998. **161**(9): p. 4736-44.
25. McCafferty, D.M., et al., *Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation*. *Gastroenterology*, 1997. **112**(3): p. 1022-7.

26. Brunner, M., et al., *Proliferation of macrophages due to the inhibition of inducible nitric oxide synthesis by oxidized low-density lipoproteins*. EXCLI J, 2015. **14**: p. 439-51.
27. Clarke, S.G., *Protein methylation at the surface and buried deep: thinking outside the histone box*. Trends Biochem Sci., 2013.
28. Anderson, J.L. and C.A. Hrycyna, *Structure and function of isoprenylcysteine carboxymethyltransferase (Icmt): A key enzyme in CaaX processing*. Enzymes, 2006. **24**: p. 245-72.
29. Laisne, M., et al., *Mechanisms of DNA Methyltransferase Recruitment in Mammals*. Genes (Basel), 2018. **9**(12).
30. Gong ZY, Y.Z., Dong ZW, Peng YZ., *Glutamine with probiotics attenuates intestinal inflammation and oxidative stress in a rat burn injury model through altered iNOS gene aberrant methylation*. Am J Transl Res., 2017.
31. Searles Nielsen, S., et al., *Inducible nitric oxide synthase gene methylation and parkinsonism in manganese-exposed welders*. Parkinsonism Relat Disord, 2015. **21**(4): p. 355-60.
32. Krishna, M.B., et al., *Impaired Arginine Metabolism Coupled to a Defective Redox Conduit Contributes to Low Plasma Nitric Oxide in Polycystic Ovary Syndrome*. Cell Physiol Biochem, 2017. **43**(5): p. 1880-1892.
33. Li, Y., et al., *C-peptide prevents NF-kappaB from recruiting p300 and binding to the inos promoter in diabetic nephropathy*. FASEB J, 2018. **32**(4): p. 2269-2279.
34. Lu, T. and G.R. Stark, *NF-kappaB: Regulation by Methylation*. Cancer Res, 2015. **75**(18): p. 3692-5.
35. Di Lorenzo A, Y.Y., Macaluso M, Bedford MT., *A gain-of-function mouse model identifies PRMT6 as a NF-kB coactivator*. Nucleic Acids Res., 2014.
36. Reintjes A, F.J., Kremser L, Lindner HH, Liedl KR, Huber LA, Valovka T., *Asymmetric arginine dimethylation of RelA provides a repressive mark to modulate TNFalpha/NF-kB response*. Proc Natl Acad Sci U S A. , 2016.
37. Yang, S.H., et al., *IFN-gamma-STAT1-iNOS Induces Myeloid Progenitors to Acquire Immunosuppressive Activity*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1192.
38. Bedford, M.T. and S.G. Clarke, *Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why*. Molecular Cell, 2009. **33**(1): p. 1-13.
39. Mowen KA, et al., *Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription*. Cell., 2001. **104**(5): p. 731-41.
40. Komyod, W., et al., *Are STATS Arginine-methylated?* Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(23): p. 21700-21705.
41. Li, Q., et al., *Increased TLR4 Expression Aggravates Sepsis by Promoting IFN-*

*gamma* Expression in CD38(-/-) Mice. J Immunol Res, 2019. **2019**: p. 3737890.

## (十)指導教授指導內容

1. 設計具完整性及邏輯性思維的實驗。
2. 實驗目的、原理及背景瞭解。
3. 解決實驗問題之方法。
4. 實驗結果探討，數據分析。