

R
008.8
3843
88

私立中山醫學院生物化學研究所
Graduate Institute of Biochemistry
Chung Shan Medical and Dental College

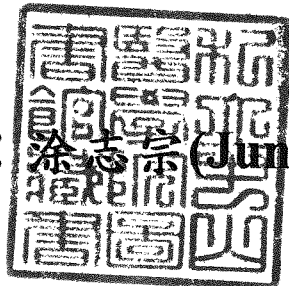
碩士論文
Master Thesis

Gelatinase B(MMP-9)在廣東住血線蟲
感染老鼠腦部之表現

Gelatinase B (Matrix Metalloprotease-9) in brain of
Angiostrongylus cantonensis infected mice

指導教授：李秀雄 博士(Hsiu-Hsiung Lee)
蕭松瑞 博士(Song-Jui Shio)

研究生：涂志昂 (Jun-Jhon Twu)



中華民國八十八年六月
(June, 1999)



授權書
(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 大學(學院) 生化所 系所
組 87 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱: Gelatinase B(MMP-9)在廣東住血線蟲感染老鼠腦部之表現

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號:)

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名: 李秀雄教授 蕭松瑞教授

研究生簽名: 深志榮
(親筆正楷)

學號: R85213
(務必填寫)

日期: 民國 88 年 6 月 14 日

1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄台北市 10636 和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 江守田、王淑貞。(本授權書諮詢電話: 02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請經濟部智慧財產局修正定稿。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員審查合格及口試通過。

口試委員

私立高雄醫學院寄生蟲學科
教授

陳瑩霖 博士

陳瑩霖

國立中興大學獸醫學系
教授

王俊秀 博士

王俊秀

私立中山醫學院生物化學研究所
教授兼所長

王朝鐘 博士

王朝鐘

私立中山醫學院生物化學研究所
教授
(本論文指導教授)

蕭松瑞 博士

蕭松瑞

私立中山醫學院寄生蟲學科
教授兼主任
(本論文指導教授)

李秀雄 博士

李秀雄

中華民國八十八年六月

學生涂志宗論文題目為 Gelatinase B(MMP-9)在廣東住
血線蟲感染老鼠腦部之表現，其論文已經中山醫學院
生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試
通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：李秀雄 博士

簽名：李秀雄

蕭松瑞 博士

簽名：蕭松瑞

中華民國八十八年六月

中文摘要

Matrix metalloproteases(MMPs) 是一群細胞外基質 (Extracellular matrix ECM) 分解酵素，在傷口癒合及發炎狀態下，能分解組織間隙結締組織(interstitial connective tissue) 和基底膜(basement membrane)。

MMPs 在廣東住血線蟲感染，造成腦部傷害的機轉並不清楚。是否與 MMPs 有關？我們對 MMPs 在此過程的所扮演角色感興趣，因此，利用 Substrate gelatine zymography 技術，來測定廣東住血線蟲感染老鼠，腦部組織中 gelatinase 蛋白酶的活性。

本研究中，我們發現在廣東住血線蟲感染 ICR strain 的老鼠腦部，有一明膠(gelatine)分解活性的蛋白酶產生，此蛋白酶分子量約為 94kDa，依據其分子量及蛋白酶抑制劑反應特性，確認此蛋白酶屬於 gelatinase(type IV collagenase)，歸類於 MMPs 家族。

72kDa 蛋白酶，出現於所有檢體，包括未被感染的老鼠，94kDa 蛋白酶只出現於廣東住血線蟲感染老鼠腦部。94kDa 蛋白酶活性是一種鈣離子(Ca^{++})依賴性，在 pH 值 6-8 時具最大活性，在 1,10-phenanthroline 存在下，其活性受到抑制，此蛋白酶元會被有機汞類(APMA)及胰蛋白酶(trypsin)切斷並活化。用特異性 MMP-9 抗血清做免疫墨點 (immunoblot) 測定，在 94kDa 有一陽性帶(band)產生，因此，確認此 94kDa 蛋白酶是 gelatinase B (MMP-9)。

在廣東住血線蟲感染腦部，中樞神經系統(CNS)內神經膠細胞 (glia) 或發炎浸潤細胞，所產生的膠蛋白酶 B(gelatinase B)，可能和其他神經發炎性疾病相同，此酵素與血-腦障礙(Blood-Brain barrier(BBB))的損傷及神經髓鞘的破壞的病理機制有關。這是我們更進一步的探討的方向。

關鍵字：廣東住血線蟲，Gelatinase-B，MMP-9，CNS

Abstract

Matrix metalloproteinases(MMPs) are a group of extracellular matrix (ECM) degrading enzyme, responsible for the degradation of interstitial connective tissue and basement membrane, during wound healing and in other inflammatory states.

The mechanism to brain injury, little is known about the ECM-degrading MMPs that in *Angiostrongylus cantonensis* infection. Thus, it was of interest to determine MMPs in the *Angiostrongylus cantonensis* infected mice brains tissue, we use substrate gelatine zymography to detected brain tissue homogenate express of a gelatinase(GLase) activity.

In this study, we demonstrated the presence of gelatinolytic activity in the brain of *Angiostrongylus cantonensis* infected ICR strain mice. This protease M.W. about 94kDa, We identified this gelatinolytic activity as gelatinase(type IV collagenase), belonging to family of the matrix metalloproteinases(MMPs), based on the molecular weight and the inhibition by protease inhibitors.

The 72 kDa form was present in all samples, even in those derived from non infection mice, whereas the 94 kDa form was present only in samples from mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. The 94-kDa GLase activity was Ca^{++} dependent, showed maximal activity in the pH 6-8, their activity was inhibited in the presence of 1,10-phenanthroline, and their proenzymes were cleaved and activated after incubation with organomercurial compounds (APMA) and trypsin. When immunoblots were performed using specific

antisera against the 94-kDa gelatinase B (MMP-9) with brain tissue homogenate, a 94-kDa immunopositive band was observed. Thus, it indicated that the 94-kDa GLase is gelatinase B(MMP-9).

Gelatinase production within the CNS by glia or infiltrating inflammatory cells may constitute an important pathogenic mechanism for both the disruption of the blood-brain barrier and the destruction of myelin, as observed in several neuroinflammatory disorders. This would be the direction for further research.

Key word : *Angiostrongylus cantonensis* , Gelatinase B ,
MMP-9 , CNS

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
目錄.....	iv
縮寫表.....	v
研究動機.....	vi
研究架構.....	viii
第一章 緒言.....	1
第二章 研究材料與方法.....	18
第三章 實驗結果.....	27
第四章 討論.....	31
第五章 圖表及圖表說明	38
第六章 參考文獻.....	55
附錄：圖、表.....	73

縮寫表

A.C.	: <i>Angiostrongylus cantonensis</i>
APMA	: 4-aminophenyl mercuric acetate
BSA	: Bovine serum albumin
DMSO	: Dimethylsulfoxide
EAE	: Experimental autoimmune encephalomyelitis
EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic acid
Eso	: Eosinophil
E/S Ag	: Excretory/secretory antigen
L1	: 第一期幼蟲
L3	: 第三期幼蟲
MMP	: Matrix metalloproteinase
MS	: Multiple sclerosis
PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: Phosphate buffered saline
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
TEMED	: Tetramethyl ethylenediamine
PGHS2	: Prostaglandin H Synthase-2

研究動機

本省位於熱帶及亞熱帶地區，氣候溫暖潮濕，適合各種寄生蟲的生長。近年來，由於醫療的進步，農業社會的轉型，人民生活水準的提高，環境衛生的改善，及政府機關致力於寄生蟲病的防治，寄生蟲病的流行率與嚴重性已比從前大為降低，過去一般常見的，如蛔蟲、鉤蟲、鞭蟲等，已不多見，如瘧疾除境外移入並例外，甚至達到根除的境界。

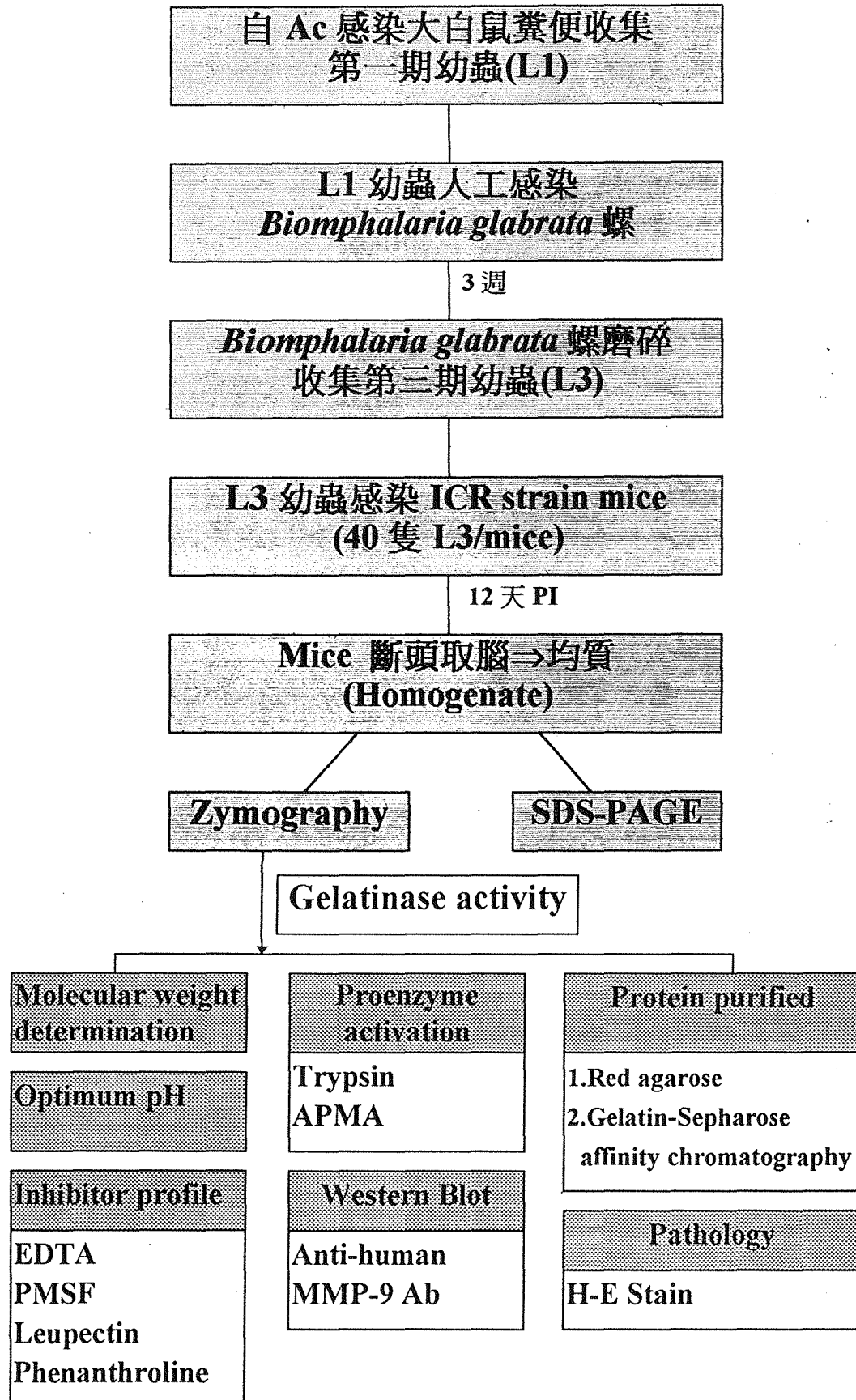
但代之而起的，卻有不少人畜共通的寄生蟲，如狗、貓蛔蟲(*Toxocara spp*)、廣東住血線蟲(*Angiostrongylus cantonensis*)，或自然界的自由生活阿米巴原蟲，或在國外感染的蟠尾絲蟲(*Onchocerca volvulus*)、羅阿羅絲蟲(*Loa loa*)、血吸蟲(*Schistosoma spp*)等，或因外勞引進的，如菲律賓賓毛線蟲(*Capillaria philippinesis*)、廣節裂頭條蟲(*Diphyllobothrium latum*)、旋毛蟲(*Trichinella spiralis*)等，或因感染 AIDS 等免疫不全病人的伺機性感染，如肺孢子蟲(*Pneumocystis carinii*)、隱孢子蟲(*Cryptosporidium spp.*)、弓形蟲(*Toxoplasma spp.*)等，都是近幾年來，特別受到注意的寄生蟲。

廣東住血線蟲(*Angiostrongylus cantonensis*)主要分佈於東南亞和南太平洋一帶，台灣整個島嶼幾乎都有此寄生蟲的存在，每年都有因飲食不當而感染廣東住血線蟲病例報告出現，大部分發生於南部和東部山地部落等，尤以屏東縣最多，因吃蝸牛肉或保蟲宿主(paratenic host)而感染，主要侵犯人類中樞神經系統(CNS)，引起嗜伊紅性腦膜炎(eosinophilic meningitis)或嗜伊紅性腦膜腦炎(eosinophilic meningoencephalitis)，因而對人類性命造成嚴重威脅。引起的病理組織變化特徵是，腦脊髓液(CSF)及末梢血液的嗜伊

紅性白血球 (Eosinophils) 增加，腦部嗜伊紅性白血球 (Eosinophils)、及淋巴球浸潤等發炎反應，血腦障壁 (BBB) 破壞，神經細胞脫髓鞘 (demyelination) 及小腦 (cerebellar) 浦金氏細胞 (purkinje cells) 喪失、損傷、空泡化等。常見臨床症狀有頭痛、噁心、嘔吐、嗜睡及發燒等，有時會出現頸部強直、視覺障礙及昏迷等神經症狀。但目前為止，相關文獻所知廣東住血線蟲感染，造成腦部傷害的病理機轉包括：1. 幼蟲移行的機械性損傷，引起所謂的隧道、局部出血。2. 急性發炎反應，造成大量發炎細胞、PMN, Macrophage, Eosinophil 侵入腦部，造成腦部的傷害，甚至引起肉芽腫反應 (granuloma)。3. 過敏性免疫反應，由於蟲體分泌的抗原或代謝物引起的免疫反應，甚至由 IgE 所促使的過敏性免疫反應。4. Eosinophil 的鹼性細胞毒性蛋白，包括 EPO, EDN, ECP, MBP 等，有報告指出這些成分能殺死蟲體。但是這些機轉都無法解釋造成其組織病理變化如：Purkinje cell 喪失，脫髓鞘 (demyelination)，空泡化 Vaculization, Gitter cell 形成, BBB 破壞等，引起腦部傷害及神經細胞損傷的原因，而這些病理變化都與細胞外基質的破壞或蛋白質成份的分解有關。因為這些病理變化都與蛋白成分的分解有關，所以我們推測與蛋白酶的產生有關。

為此本研究希望藉助對現代寄生蟲學的認識，應用生化學技術，在活體內 (in vivo) 模式，利用 Substrate gelatine zymography 及 SDS-PAGE 技術，分析蛋白酶酵素活性的產生。來探討受到廣東住血線蟲感染後腦部組織是否有特殊蛋白或蛋白分解酵素的產生，參與破壞腦部結締組織及神經細胞，而造成神經症狀。進而探討確立廣東住血線蟲引起神經細胞損傷的機制，及可能的控制方法，以提昇廣東住血線蟲病的診斷、治療和預防方法。

研究架構



第一章 緒言

廣東住血線蟲是一種寄生在大白鼠(Rat)肺動脈和螺類的線蟲⁽¹⁾，可經意外感染於人類，屬於人畜共通寄生蟲(zoonotic parasites)中的一種⁽¹⁾；是引起嗜伊紅性腦膜炎(eosinophilic meningitis)⁽²⁻⁵⁾與嗜伊紅性腦膜腦炎(eosinophilic meningoencephalitis)⁽⁶⁻⁸⁾的主要原因。其分佈區域主要位於熱帶與亞熱帶地區，從南緯 23 度到北緯 23 度，從東經 100 度到西經 150 度，其氣候溫暖潮濕多雨，涵蓋範圍西從象牙海岸、埃及、馬達加斯加、模里西斯、經印度、錫蘭到東南亞地區，包括泰國、高棉、馬來西亞及印尼等國，中國南部、蘇門答臘、婆羅州、菲律賓、台灣和澳洲北部，東達太平洋島嶼，大溪地、夏威夷等，在日本、琉球，都有報告指出這種線蟲是流行性嗜伊紅性腦膜炎的致病原因之一。人類常常因食用被這種線蟲所感染的螺類而致病。廣東住血線蟲感染症的歷史，主要是在 1933 年，陳心陶先生在廣東鼠的肺動脈和心臟內首先發現有此類線蟲之寄生⁽⁹⁾；1937 年日本人 Matsumoto⁽¹⁰⁾首先在台灣花蓮之野鼠中首次報告有廣東住血線蟲的感染，並以為是鼠肺的寄生蟲；而又於 1945 年，Nomura, S 和 Lin P.H.⁽¹²⁾報告第一個感染人類的廣東住血線蟲的病例，一個 15 歲小男孩，最初以為得到氣喘，卻始終治療無效，一直到 1944 年 10 月該患者突然出現嚴重症狀，隨即死亡，並在其脊髓液中抽出 5 隻該類線蟲。但是真正為此線蟲正名卻是在 1946 年，由 E.C.Dougherty 正式將其命名為廣東住血線蟲(*Angiostrongylus cantonensis*)⁽¹³⁾。1968 年 Yii C.Y.⁽³⁷⁾等人報告第一個感染到人肺的廣東住血線蟲症，可見此蟲很少侵犯人肺。

老鼠為其終宿主，截至目前為止在台灣有 7 種鼠類被發現為此蟲自然終宿主^(19,22,29-32)，分別是刺鼠(*Rattus coxinga coxinga*)、白腹鼠(*R. losea*)、褐鼠(*R. norvegicus*)、家鼠(*R.*

rattus subsp)、鬼鼠(*Bandicota indica nemorivaga*)、蘭嶼黑鼠(*R. rattus mindanensis*)、澎湖黑鼠(*R. rattus rufescens*)等。由實驗室動物感染模式瞭解，廣東住血線蟲的生活史^(15,16)，此過程中需要一些軟體動物當作中間宿主，包括陸生螺類：有非洲大蝸牛(*Achatina fulica*)⁽¹⁷⁻²¹⁾與薄殼蝸牛(*Bradybaena similaris*)⁽¹⁷⁾，水生螺類：有田螺(*Cipangopaludina chinensis*)⁽²³⁾、小壺腹螺(*Ampullarium canaliculatus*)⁽²⁴⁾與圓寶螺(*Pomacea canaliculata*)⁽²⁵⁾及兩種蛞蝓：大型蛞蝓(*Laevicaulis alte*)⁽²²⁾、小型蛞蝓(*Vaginulus plebeius*)⁽¹⁸⁾等；此外，亦有多種動物被當作為保蟲宿主，包括蛙類⁽²²⁾、渦蟲類(Planarian)⁽¹⁸⁾、淡水蟹與淡水蝦^(26,27)，也有報告指出第三期幼蟲會隨著中間宿主所分泌的黏液而附著在蔬菜、水果⁽¹⁾或水中⁽²⁸⁾。在台灣地區，這些中間宿主至少包括六種以上的水生或陸生蝸牛和蛞蝓⁽²²⁾，但非洲大蝸牛⁽¹⁷⁻²⁰⁾被認為與人類致病最有關。它登陸台灣的歷史也頗有趣：最早在 1932 年元月，一日本人叫 Shimojo 的，從新加坡引進了 20 隻非洲大蝸牛，但皆因當時冬季寒冷而全部死亡。翌年 4 月，這位先生再引進了 12 隻蝸牛到台北，這次則培養成功而開始繁殖。1967 年學者開始調查台灣非洲大蝸牛受廣東住血線蟲感染的程度，台東屏東取樣檢查結果是 32%及 28%，分別於 1967 年 Cross, J. H. 及 1971 年 Chen E. R. 已有報告。1977 年 Otsuru M 全省的調查則為 26%非洲大蝸牛受廣東住血線蟲第三期幼蟲感染，因此感染率相當高。其後，1979 年，福壽螺被人偷偷的帶進台灣，也很快的氾濫成災，最初只引起農業單位的注意與憂心其危害農作物至劇，未料高雄醫學院於 1984 年在二項廣東住血線蟲幼蟲對福壽螺的感染實驗中證實此種螺具有新的感染危害能力。同年屏東，美濃地區四個食用福壽螺而引起嗜伊紅性腦膜炎的集體羅病事件更證實這種軟體動物與腦膜炎間的相關性，也告訴我們這是個不容忽視的問題。

廣東住血線蟲的生活史(附圖一)：成蟲寄生於鼠類(rat)

肺動脈，每一雌蟲每天約可產卵一千五百個，這些蟲卵在鼠肺孵出第一期幼蟲(L1)，移行至氣管，下嚥經胃腸，隨鼠便排出。可鑽進中間宿主螺類、蝸牛、蛞蝓、及淡水蝦、蟹等。廣東住血線蟲由老鼠至中間宿主，長成第三期幼蟲時，便可感染人。線蟲在螺體內的分佈會隨隨著螺體種類之不同而異，在福壽螺，其幼蟲主要分佈在頭足，而在非洲大蝸牛其幼蟲主要分佈在內臟中，但一般來說，L1 幼蟲進入中間宿主以後會先進入肌肉內，第 7-9 天經第一次脫皮(L2)，第 12-16 天第兩次脫皮變成第三期幼蟲(L3)，即成為傳染性幼蟲。其在軟體動物宿主中停留一段相當長的時間，可能終其壽命。在中間宿主 *Biomphalaria glabrata* 體內，廣東住血線蟲的第三期幼蟲可在感染後 12 個月仍然倖存。(I)當傳染性幼蟲(L3)被適當宿主大白鼠(rat)食入後，1-2 天移行至腦，經兩次脫皮長成年輕成蟲(Young adult worms)，再穿入擴張的大腦靜脈內，到達肺動脈(約需 26-29 天)，2 週後開始產卵，完成此線蟲之自然生活史^(15,16,34)。大白鼠(rat)對此線蟲來說是適當宿主，不至於造成老鼠死亡⁽³³⁾。(II)當非適當宿主人⁽²⁸⁾、老鼠(mice)、天竺鼠(Guinea pig)吃了這些帶有傳染性幼蟲的中間宿主後，幼蟲穿過胃腸壁而進入靜脈或腹部淋巴管內，回到右心，經過肺循環進入左心，再由體循環進入內臟器官，在感染後 1-2 天(17 小時)幼蟲會集中到中樞神經，尤其大腦的前方，並在腦部移行時進行第三次脫皮，而後移行到終點蜘蛛膜下腔⁽³⁴⁾，進行第四次脫皮，形成第五期幼蟲(L5)或年輕的成蟲；因為人類並非此線蟲之適當宿主，因此蟲體無法在人體完成發育甚至成熟產卵。它的潛伏期一般少於 2 週，最快是 3 天，甚至也有 1 天後出現症狀的可能。雖然其幼蟲也是由胃壁、淋巴管、右心室、肺動脈而後到達腦部、脊髓、肺部和眼睛，但蟲體在此長到某一程度之後，就在 CSF 內到處流竄一直到死，其蟲體死後屍體若跑到腦部血管內則常因而造成栓塞，而且死亡的蟲體會引起明顯的炎症反應，使得腦

脊髓液和末梢血液的嗜伊紅白血球增加⁽³⁹⁾，而臨床的表徵主要因蟲體的數目和所在部位不同而異，主要包括頸部僵硬、凱耳尼格氏表徵(Kernigs sign)陽性、瞳孔不對等、視乳頭水腫、發燒、頭痛⁽⁴⁵⁾、嘔吐、嗜睡、昏迷等等，尤其成蟲在腦部和眼部⁽⁴⁰⁻⁴²⁾的移行往往會造成組織的破壞和其他反應，失明是主要之後遺症之一。因此，有些學者並不贊同使用驅蟲藥，因多數蟲體死亡可能誘發嚴重的炎症反應，故藥物治療的結果仍在研究階段。

廣東住血線蟲的成熟，一定要經過神經組織，老鼠的或人的均可。而人並不是它的確定宿主(definite host)，它利用人的神經組織，由第三腰椎→第四腰椎→第五腰椎，也可以再到肺部去，不過常在第五腰椎就死了，不到肺部。目前已知的報告中，由解剖證明到肺部的不過 3 個。由於此蟲和神經組織的淵源頗深，所以病人多有感覺異常、肌肉痛、背疼等神經、肌肉方面的徵候，這是因為它由腸胃道進入後，會到肌肉，再循二途徑感染人體：一是血行，二是由周圍神經溯源而上，到脊髓造成蜘蛛膜炎直至腦部，所以它在神經系統方面的病變是多樣的、廣泛的。不單是腦膜炎；腦各處、脊髓、腦幹、周圍神經等均可受犯。在眼類型(ocular type)方面，最常見的是單側眼房(eye chamber)中找到蟲體，也可嵌入視網膜靜脈，引起視網膜靜脈栓塞，也可引起視神經炎；除此亦有只以單側動眼神經或顏面神經麻痺來表現的病例。

廣東住血線蟲症

一、致病源

廣東住血線蟲是一種寄生在鼠肺和螺類的線蟲，為一種白色蟲體，外表光滑，年輕成蟲約 0.7-1.2cm，♂成蟲 1.6-2.0 公分，♀成蟲 2.0-3.3 公分，老鼠(rat)為其天然中宿主，其成蟲主要寄生在老鼠的肺動脈裏⁽³⁴⁾，在此交配後產卵。

卵經肺動脈循環進入肺臟，而後在肺微血管造成血栓阻塞，並在此孵化成第一期幼蟲，這些幼蟲穿出呼吸道，向上經由氣管移行到咽喉，經由吞嚥動作而進入食道與胃腸內，其最後經鼠體所排出的大便含第一期幼蟲，而進入土壤內，這些幼蟲若正巧有蝸牛或蛞蝓爬過去，則蟲體鑽入螺體內，或被蝸牛、蛞蝓、淡水蝦等中間宿主吃下後，即在其體內發育成第三期幼蟲，當人類或老鼠吃了這些具傳染性的中間宿主後，幼蟲即移行至腦部，經兩次脫皮發育成第四和第五期幼蟲，於人類其幼蟲停留在腦部而終其壽命，於老鼠(rat)體內則可完成生活史。

人類為廣東住血線蟲的非適當宿主，當幼蟲侵入人體後，在人體內很少發育為正常成蟲⁽¹⁴⁾，但其幼蟲會沿著神經徑路侵犯人類中樞神經系統⁽³⁸⁾，造成臨床上常見的嗜伊紅性腦膜炎(eosinophilic meningitis)。實驗室檢查，以腦脊髓液中出現嗜伊紅性白血球為其特徵^(1,8)。但仍需與其他寄生蟲感染，如豬肉囊蟲、棘口線蟲、吸蟲等，及某些非寄生蟲原因如隱球菌、病毒、腫瘤、藥物反應等做鑑別診斷。而在泰國、台灣東南部、大溪地、印度、大陸、澳洲等地，此種嗜伊紅性腦膜炎^(3,5)則以廣東住血線蟲感染較為常見。

此蟲的蟲體在活著的時候不會有明顯的嗜伊紅白血球增加之反應；死去的蟲體，才會招來一堆的嗜伊紅白血球，當初次感染時蟲體在腦內鑽動形成坑道，如果是新的隧道(Track)，嗜伊紅白血球反應並不強，有「蟲死」處才明顯。

在 1980 年左右，此種腦膜炎曾在夏威夷等太平洋群島等處造成流行。美國人稱它為良性嗜伊紅白血球性腦膜炎(benign eosinophilic meningitis)，但此病到了台灣、泰國、韓國等處，就一點也不那麼「良性」了。這是因為前者都由小蝸牛、污染的蔬菜等得到感染，是屬於少量的，長期性的感染；後者則多是大量的感染，像非洲大蝸牛。此病的嚴重程度和感染的量有關。

二、流行病學

廣東住血線蟲主要發現於台灣、泰國、大溪地、印尼、中國大陸、澳洲、夏威夷及太平洋一些島嶼中。在台灣 80% 病人為 15 歲以下小孩，病例數以屏東縣最多，其次為高雄縣、台東縣和花蓮縣，每年的六月至十月為流行季節，這和雨季時中間宿主活動較頻繁有關⁽²⁵⁾。

據 Yii CY⁽³¹⁾等自 1944 年至 1978 年的統計，大部分患者嗜伊紅腦膜炎或腦膜腦炎的病例，均屬於小孩，以 15 歲以下居多，其中 66% 為 0 至 9 歲的孩童，男女性別無差異。這與泰國的報告不同，他們的患者則多為 20 至 39 歲之成年人。

此病在本省的流行，以東、南部為多，在這二地的居民以皮膚試驗來看感染的狀況，東、南部各有 50% 及 36% 為陽性反應。而北、中、南、東部分別以 IHA 試驗調查的結果，各為 20.1%、17%、28% 及 36%，仍是以東、南部居多。由此可見感染此症的比率甚高，而診斷出來的卻很少，輕微的病例，常被當成上呼吸道感染。另外，也有把日本腦炎的病人，包括已證實的，未確定的、或證實不是的，找來做廣東住血線蟲症的 IHA 試驗，陽性率如下：1972 年是 48.7%，1973 年是 40.6%，1974 年是 33.3%，1975 年是 100%。依此推想，可能不少日本腦炎的病例，實際上是感染此病，引起嗜伊紅性腦膜腦炎，而被誤診的。當此線蟲活生生的鑽入腦部時，會引起嚴重的組織破壞，而當它死後則會引起厲害的炎症反應。

三、傳染途徑

至於傳染途徑多因吃下被感染之軟體動物或被汙染蔬果⁽¹⁾而羅病。病人通常是吃下具感染性中間宿主或保蟲宿主而致病，若水果、蔬菜或飲水中含第三期幼蟲，亦可能造

成感染。台灣的病人感染來源主要是非洲大蝸牛、蛞蝓等中間宿主，此外蝦、蟹、青蛙等亦可為保蟲宿主。

四、臨床症狀

廣東住血線蟲具有趨神經特質，當它被人吞食後隨即移行至神經組織或眼球內，其潛伏期由 2 至 35 天不等，小孩的潛伏期較短，平均是 12-13 天，大人平均是 16.7 天。症狀則以暫時性腦膜炎和腦膜腦炎為主，由於蟲體在人類腦部移行，臨床上以額部、枕部或雙顳側之難耐性頭痛最常見；約佔 90-99%；且頭痛在腰椎穿刺後將迅速緩解，其它較常見症狀有頸部僵硬、咳嗽、嘔吐、煩躁不安、倦怠、嗜睡等，同時會伴隨陽性 Kernig 氏徵和 Brudzinski 氏徵，深部肌腱反射異常及四肢無力或麻痺，嚴重者會昏迷甚至死亡。此外病人大多以輕度發燒表現，體溫很少超過攝氏三十八度。另外由於蟲體移行所造成的機械性傷害，亦可造成第二、六、七對腦神經損傷，導致內斜視、顏面神經麻痺和複視等現象。少數病人尚會引起神經根脊髓炎，導致軀幹和下肢疼痛及感覺異常。由於人類體內蟲體短期內將於神經組織中死亡，故若無重複感染在急性期過後將自然痊癒，而少見有後遺症。

1976 年 Yii CY⁽³⁵⁾ 等一篇包括 114 嗜伊紅腦膜炎或腦膜腦炎病例對有關併發症狀的報告如下：頭痛(86%)，噁心/嘔吐(83%)，嗜睡(82%)，發燒(80%)，便秘(76%)，不適(71%)，厭食(64%)，咳嗽(54%)，頸部僵硬(40%)，腹痛(34%)，感覺異常(28%)，四肢無力(17%)，肌肉微弱(13%)，複視(10%)，打噴嚏(10%)，昏迷(10%)，全身痙攣(3%)。

五、診斷

診斷上主要依據臨床症狀，流行病學及腦脊髓液檢查等三大特徵，最後並經血清學陽性反應而確定診斷。

廣東住血線蟲症在台灣南部較多，南部醫師對這個病的診斷也較有心得，脊髓穿刺後作診斷，可有 20% 的成功率，抽出的 CSF，應在黑暗背景下觀察，可見有棉花絲狀物。

臨床診斷上凡具有典型症狀和腦膜炎表徵，有可能被感染之病史(居住在流行地區，或曾食用中間宿主或保蟲宿主者)，及腦脊髓液中有高比率嗜伊紅性白血球等三要素者，均應高度懷疑為廣東住血線蟲腦膜炎。腦脊髓液檢查顏色清澈或輕度混濁，白血球常介於 150 至 2000 cells/ul 之間，95% 患者其嗜伊紅白血球超過 10%，且一般均介於 20% 至 70% 之間。蛋白質濃度升高，葡萄糖濃度則正常或輕微降低。週邊血液檢查白血球總數及嗜伊紅性白血球均會些微上升，但與臨床症狀的嚴重度或腦脊髓液之嗜伊紅性白血球數無正相關性。電腦斷層掃描與核磁共振掃描並無法提供特異性的診斷訊息。最確切的診斷是從腦脊髓液中找到蟲體，唯因要在腦脊髓液中尋獲幼蟲蟲體極為不易，故最後尚須依賴血清學試驗酵素免疫分析法(ELISA)以輔助診斷。

六、鑑別診斷

臨床上廣東住血線蟲症特別應與豬肉囊蟲症、棘口線蟲症鑑別診斷。其中豬肉囊蟲病，極少侵犯大腦實質，而主要以表現高腦壓症狀為主。棘口線蟲則好發於東南亞地區，尤其是泰國，症狀則以神經根疼痛，脊髓腦炎併四肢麻痺為主，且常遺有極嚴重之後遺症，腦脊髓液為稻草色，廣東住血線蟲血清學檢驗呈陰性反應。其它會造成腦脊髓液之嗜伊紅性白血球過多者，尚有如豬肉旋毛蟲症，貓犬蛔蟲症，結核性腦炎，但其腦脊髓液之嗜伊紅性白血球大多小於 10%。

七、治療

七、治療

廣東住血線蟲引起的嗜伊紅性腦膜炎，目前尚無有效的治療方法，主要仍採取支持性療法。只能針對病人現有的臨床症狀加以舒緩，重複做腰椎穿刺放出蟲體，以免蟲體阻塞腦脊髓液循環造成水腦症，以及腦壓升高。若腦壓升高時間過久，病人呈昏迷狀態，還是會有生命危險。治療上則以症狀治療及支持性療法為主，其中類固醇可降低腦壓及減輕人體對蟲體的致敏反應，類固醇的使用⁽⁴⁵⁾，存有爭議，尚無定論。因為廣東住血線蟲為一良性自限性的疾病，很少引起患者死亡，故有些人認為不使用類固醇藥物，大多數病人亦會自行復原，更何況類固醇藥物會產生許多不良的副作用，固不建議使用。但類固醇可改善腦部急性的發炎反應⁽⁴⁵⁾。對於患者臨床症狀的舒解，神經病變得改善，後遺症的減輕或許有幫忙。藥物(如 Glycerol、Mannitol)，重複抽取腦脊髓液，或腦室腹膜引流術則能有效解除高腦壓症狀。其它視症狀給予解熱劑或鎮痛劑。若懷疑有細菌感染之現象，可給予抗生素治療。至於驅蟲藥如 Albendazole，Levamisole 和 Flubendazole 在小白鼠的實驗發現有很好的療效，在人體之治療方面高醫黃高彬教授 87 臨床病例研究發現，使用 Levamisole 5mg/kg/day 或 Albendazole 10mg/kg/day 連續治療 21 天，預後良好，因此建議廣東住血線蟲感染引起之嗜伊紅性腦膜炎應以積極的、有效的驅蟲藥物配合支持性的治療為宜。

八、預防措施

預防上則首重於滅鼠，確實清洗蔬果，勿生食具傳染性的蝸牛、螺、蝦、蟹及其它中間或保蟲宿主。通常煮沸達兩分鐘以上，或冷凍至攝氏零下十五度達二十四小時以上，即可殺死廣東住血線蟲。至於住院病人則無需特別的隔離或警戒措施。

九、致病機轉

從人體及動物病理切片的觀察得知，廣東住血線蟲症造成腦部傷害的病理機轉(附圖 2)主要可能有五項：

- (一)蟲體本身對人體腦部直接產生機械性的破壞。
- (二)蟲體釋放出對人體有害的抗原或代謝性產物。
- (三)蟲體在人體腦部形成肉芽組織般的腫塊，破壞腦部結構。
- (四)引發腦部血管週邊組織的炎性反應，使得發炎細胞得以大量侵入腦部，造成腦部的傷害。
- (五)Eosinophil 的鹼性細胞毒性蛋白，包括 EPO, EDN, ECP, MBP 等，有報告指出這些成分能殺死寄生蟲體，同時造成組織傷害。

雖然上述為廣東住血線蟲症可能的致病原因，但是主要的病理機轉並不清楚，因此本研究主要是利用老鼠(mice)感染廣東住血線蟲後，是否有特殊蛋白產生，而破壞腦部結締組織及神經細胞，因此利用 Substrate Gelatine Zymography 及 SDS-PAGE 技術，分析蛋白酶酵素活性的產生。期更進一步探討與疾病的相關性。



細胞外基質 [Extracellular matrix(ECM)]

細胞外基質(ECM)成份的重要性不只是組織結構的支撐者，同時會影響許多的生物活性，包括細胞生長及分化、細胞吸附(cell adhesion)、遊走(migration)和組織型態(tissue morphogenesis)的重要調節者⁽⁶²⁾。

細胞外基質(ECM)藉由細胞的接觸、mitogenesis 的調節和細胞的分化決定組織的架構，並且扮演對大分子的選擇性濾膜之角色。正常情況下它不會讓大分子蛋白質或者細胞通過，然而在組織重整或侵犯過程，包括發炎、傷口修補、血管生成或腫瘤形成時，則組織細胞、發炎細胞、免疫細胞或腫瘤細胞等會產生蛋白酵素，分解破壞細胞外基質(ECM)而允許細胞的移動。

細胞外基質 (Extracellular matrices) 包括：(一) 基底膜 (Basement membranes) (二) 組織間隙結締組織 (Interstitial connective tissue)

(一) 基底膜 (Basement membranes)

上皮組織與結締組織交接處的一層結構構造，稱之為基底膜。主要是由基板(basal lamina)、基質、網狀纖維三層所組成的。

基底膜的主要成份：(1) type-IV Collagen：為基底膜的主要成份，用來形成網狀結構並且是細胞接觸的蛋白，會和 heparan sulfate proteoglycan、fibronectin 有交互作用。(2) Laminin、(3) heparan sulfate、(4) Chondroitin sulfate、(5) Entactin。

(二)組織間隙結締組織(Interstitial connective tissue)

是由細胞 fibroblasts、osteoblasts、chondrocytes 和 macrophages 所構成的，其可分成幾種類型：腱(tendons)、骨(bone)、筋膜(fasciae)、鬆的基質(loose stroma)、韌帶(ligaments)。其廣泛分佈在身體的膠原纖維和 glycoprotein、proteoglycan、hyaluronic acid ground substance 所形成的網狀組織中，主要是做為支撐作用。

細胞基質分解蛋白酵素(Matrix-degrading proteinase)：

細胞外基質的主要成分是 collagen，屬於纖維蛋白，為哺乳類動物體內最多量的蛋白質，與此分解相關的酵素包含有 (1)matrix metalloproteinases(MMPs) 如 Interstitial collagenase, Type IV collagenase (gelatinase A, B) (MMP-2, MMP-9), Stromelysin 等。(2)serine proteinase，如 Plasminogen activators, 包括 urokinase-type PA(u-PA)及 Tissue-type PA(t-PA)兩種。(3)Cathepsins。(4)Proteoglycanase。(5)其他：如 Elastase。細胞外基質的分解是一連串複雜蛋白酵素的作用，而分解不同型 collagen，所需要的蛋白酵素也不同而且有可能需要二種以上。

蛋白酵素(Proteases)

蛋白酵素(protease)是一種蛋白鏈分解酵素⁽⁵²⁾，主要分為外胜酶(exopeptidases)及內胜酶(endopeptidase)兩大類，其中內胜酶(endopeptidase)主要包括 1.Serine protease，2.Cysteine protease(*thiol* proteinase)，3.Aspartyl protease(*acid* proteinase)，4.Metalloproteinase 四類。

Exopeptidases	Endopeptidases
Aminopeptidase Dipeptidyl-peptidases Tripeptidyl-peptidases Carboxypeptidases Peptidyl-dipeptidases Dipeptidases Omega peptidases	Serine proteases Cysteine proteases Aspartic proteases Metallo-proteases

MMPs (Matrix Metalloproteinases) :

MMPs 一種含鋅(Zn^{2+})的金屬酵素(metalloenzyme)⁽⁶⁷⁾，能夠分解細胞外基質(ECM)的蛋白成分。參與各種正常生理過程或病理過程(附表-3)，MMPs 在正常生理過程具重要的功能，其參與傷口癒合(wound healing)^(57,61,62)、組織重建(remodelling)^(61,62)、排卵(ovulation)、胚胎著床(blastocyst implantation)、骨骼成長(bone growth)、血管新生(angiogenesis)⁽⁵⁸⁾等，相對的 MMPs 在各種疾病的過程也有其病理上角色，如腫瘤細胞的侵襲(invasion)及轉移(metastasis)⁽⁵³⁻⁵⁸⁾、類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)、牙周病(periodontal disease)、動脈硬化(atherosclerosis)⁽⁴⁷⁾等。

MMPs 也被證明參與中樞神經系統(CNS)疾病⁽⁴⁶⁾，如多發性硬化症(multiple sclerosis)，Alzheimer's disease 及 malignant glioma。同時 MMPs 也被探討其可能促進 CNS 疾病的復原。

MMPs 家族目前為止已知至少有 18 個成員(附表-1)。它們共同具有 propeptide domain 及 N-terminus domains(附圖-2)，另外分別附加 fibronectin -like repeats，transmembrane domains 及 C-terminus hemopexin-like domains。MMPs 依其結構及受質特異性主要包括① collagenase，② gelatinase，③ stromelysin，④ membrane-type MMP(MT-MMP) 四個次家族(subfamilies)(附表-1)。

每一種 MMP 都有不同的受質特異性^(46,47)，例如：interstitial collagenase (MMP-1) 能分解 type I, II, III collagens；Stromelysin 1 (MMP-3) 是一種廣泛受質特異性的酵素，能分解 type III 及 IV collagens, proteoglycan, fibronectin 及 laminin；72 kDa 及 92 kDa gelatinase(MMP-2, MMP-9) 能分解 type IV 及 V collagens，fibronectin，laminin、gelatins。已有報告指出，在許多病理狀態下如：腫瘤轉移(tumor metastasis)⁽⁵³⁻⁵⁸⁾和類風濕性關節炎(Rheumatoid arthritis)會不正常的大量表現。然而其正常控制下的表現，是一些正常生理過程所必須的如：胚胎發育(embryogenesis)，組織重建(tissue remodelling)，傷口癒合(wound healing)^(61,62)。

MMPs 家族有幾項特徵⁽⁶²⁾：

1.MMPs 是以非活化型(Inactive,zymogen,proenzymes)方式被分泌出來，需要經過活化作用才具有蛋白分解活性。2.具催化活性機制需要 Zn^{2+}/Ca^{2+} 位於其催化位(catalytic site)。3.Zymogen 能被其他蛋白酶或有機汞(organomercurials)(如 APMA)活化。4.活化作用使其 N-端被切掉一部份，而少掉約 10 kD 的分子量。5.MMPs 酵素能分解一種以上的細胞外基質(ECM)成份。6.MMPs 的活性可以被 TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase)所抑制。7.因含有 Zn^{2+} 及活性需有 Ca^{2+} 存在所以會被金屬螯合劑(chelating agent)如 EDTA 所抑制。8.MMPs 成員間的胺基酸序列相似性很高。

MMPs 生理活性調控方式主要有三個層次：

一、基因轉錄(gene transcription)。二、酵素元活化(proenzyme activation)。三、組織蛋白酵素抑制劑(Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs))。

一、轉錄層次的調控(Transcriptional regulation)

1、轉錄調控(Transcriptional regulation)：

①正調節作用：MMPs 的基因並非 constitutively expressed，但可以受到一些生物活化劑如賀爾蒙(hormone)、生長因子(growth factors)、proto-oncogenes、inflammatory cytokines、tumor promoters、phorbol esters、細胞與細胞外基質(ECM)或細胞與細胞間交互作用(cell-cell interaction)的正調節。②負調節作用：這些正向的調節可以被其它的生物性關聯的作用者如類固醇(steroids)及 TGF β 所抑制。

大部分這些刺激誘導 c-fos 及 c-jun protooncogene 產生, 這些產物形成同質及異質性雙體(homo-,heterodimeric form)的轉錄因子(transcription factors) activator protein-1(AP-1)。此 AP-1 因子結合到基因促進子(promoters)或增強子(enhancers)的特異 DNA 序列(稱為 AP-1 binding sites,phorbol ester response elements or TREs)上, 而促使基因轉錄作用。MMP-9, stromelysins, collagenases 的促進子(promoters)上含有 AP-1 序列, 而 MMP-2 則不具有 AP-1 的結合位⁽⁴⁶⁾。

二、酵素活性的調節(Regulation metalloproteases activity) :

MMPs 最初是以非活化型的 zymogens 形式產生, 其催化位(catalytic domain)含有鋅離子(Zn^{++})與 pro-peptide 區的 cysteine 結合, 活化因子破壞 cysteine-zinc interaction (cysteine switch mechanism) 而暴露出催化位, 產生部分活化的中間產物, 再經由自體催化作用(autocatalysis)切除 propeptide 區域, 而形成完全活化態的酵素⁽⁶⁰⁾。

內生性活化因子(endogenous activator) :

包括①、Plasmin/Plasminogen 活化系統：包括 urokinase-type PA(u-PA)及 Tissue-type PA(t-PA)兩種。②、其他酵素的活化作用：trypsin, plasmin, kallikrein, cathepsin B, stromelysin。③、細胞表面相關活化因子/接受器(activator/receptor)系統：gelatinase A-TIMP2 receptor for gelatinase B。

三、酵素活性抑制作用(Inhibition enzyme activity)：

(1) Plasminogen(PA)活性抑制劑：包括①u-PA 抑制劑，antithrombin III、 α 1-proteinase inhibitor、 α 2-macroglobulin。②t-PA 抑制劑， α 2-antiplasmin、 α 1-antitrypsin、 α 2-macroglobulin。③serine proteinase 抑制劑(serpin)家族成員，protease nexin 1(PN-1)、PA inhibitor type 1(PAI-1)、PA inhibitor type 2(PAI-2)。

(2) MMPs 抑制劑(inhibitor)：包括① α 2-macroglobulin。② β 1-anticollagenase。③serum C-reactive protein。④TIMP(Tissue inhibitors of metalloproteinase)。⑤Chelating agents (EDTA)。

活化後的 MMPs 會與 TIMPs 以 1:1 比例形成複合物⁽⁵¹⁾，酵素活性因而受到抑制，TIMPs 也會與非活化型 pro-enzyme form 形成 complex(pro-MMP-9/TIMP-1, pro-MMP-2/TIMP-2, pro-MMP-2/TIMP-3)。目前已知有四種 TIMP 具許多共同特性但有不同的活性⁽⁴⁶⁾(附表-2)。

MMPs 在生理 pH 值下，它們能將結構蛋白成份如 collagen、proteoglycan、fibronectin 和 laminin 等分解，而這些成份是維持結締組織完整性所必需。

正常生理狀態下 MMPs 受到嚴謹控制，許多研究指出在許多發炎反應⁽⁵⁷⁾及惡性腫瘤⁽⁵⁸⁾等疾病時 MMP 會過量產生及活化是其病理特徵。欲維持細胞外基質(ECM)的正常生理功能，蛋白酵素和蛋白酵素抑制劑的平衡是非常重要的。若要減少細胞的”轉移”或”侵犯”可以從幾方面著手(1)降低相關蛋白酵素基因的表現。(2)提高內生性蛋白酵素抑制劑的表現。(3)攝取自然或合成之蛋白酵素抑制劑。

第二章 研究材料與方法

一、廣東住血線蟲第三期幼蟲(L3)之收集

由田野檢拾非洲大蝸牛，將非洲大蝸牛外殼碾碎，取其組織，剝碎，再用組織均質器絞碎之後以 1:30 比例加入人工胃蛋白酵素消化液，以磁性攪拌子於 37°C 之恆溫箱中，均勻攪拌消化 2 小時之後，以雙層紗布濾去雜質，加入生理食鹽水稀釋並靜置。每間隔 30 分鐘倒去約一半的上清液，再加入生理食鹽水稀釋靜置，重複至完全清澈為止。以滴管吸取下層之沈澱物，置於玻璃皿中，置於解剖顯微鏡下，觀察並吸取 L3 幼蟲，每 30 隻 L3 幼蟲為一單位，置於玻璃皿中。

*人工胃蛋白酵素消化液：

8 ml HCl
7 gm Pepsin (1 : 2500, Sigma)
加 distilled water 至 1000 ml

二、實驗動物

ICR(Institute for Cancer Research)品系小鼠(Mice)，購自國科會動物中心，為三週齡雄性小鼠。感染前至少飼養於動物房一週，並維持在 12 小時亮及 12 小時暗的動物飼養中心。

三、動物感染

對照組與實驗組之小白鼠(ICR strain),在感染前 12 小時均給予禁水、禁食;除陰性對照組外,每隻小白鼠以口胃管分別灌入 30 隻第三期幼蟲(L3),於感染後 12 小時再恢復其供水、供食。

四、腦部組織均質(Brain tissue preparation)

所有的操作都在 4°C 下完成。在感染後 14 天,將小白鼠經斷頭、取腦、秤重,每 100 mg 組織以 1 ml PBS 研磨,於冰浴中用均質機上下研磨約 10 下,將此均質液倒入離心管,於冷凍離心機以 6,000g 轉速 4°C 下離心 30 分鐘,分離出上清液(Cytosol)部分,沈澱物(Pellet)部分,再以 0.25%(v/v)Triton X-100 混合萃取,於冷凍離心機以 14,000g 轉速 4°C 下離心 30 分鐘,分離出上清液(Triton extract)部分,Cytosol 及 Triton extract 部分皆貯存於-70°C 冷凍櫃中。

五、蛋白質濃度測定(Protein assay)

蛋白質的定量採用 Bio-Rad Protein Assay 方法,其原理為蛋白質可與 coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物,所以藍色越深表示蛋白質量愈高。方法 1.製作 BSA 的 Standard curve:以一系列已知濃度的 BSA,加五分之一體積的 Bio-Rad dye,對波長 505nm 可見光之吸光度作一標準曲線。再以同樣的方法測得樣品之 OD 值後,根據標準曲線求得蛋白質濃度。

六、SDS-PAGE 電泳

◎Reagents and Gel Preparation for SDS-PAGE Slab Gels

步驟:

I、Assembling the Glass plate Sandwiches

II、膠體的配製法(Gel Preparation)

A) Separating Gel

B) Stacking Gel

%T	0.1% Gelatin SDS-PAGE			Separating Gel			Stacking Gel		
	單位	8%	10%	12%	8%	10%	12%	3%	4%
dH ₂ O	ml	12.3	10.3	8.3	14.0	12.0	10.0	6.5	6.1
1.5M Tris,pH8.8	ml	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5		
0.5M Tris,pH6.8	ml							2.5	2.5
30% Acryamide/bis	ml	8.0	10.0	12.0	8.0	10.0	12.0	0.98	1.3
10%SDS	ml	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1
10%APS	ml	0.5	0.5	0.5	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1
2%Gelatin	ml	1.5	1.5	1.5					
TEMED	ul	15	15	15	15	15	15	10	10
Toral Volume	ml	30	30	30	30	30	30	10	10

12%For 10-100 K Daltons

7.5% For 40-250 K Daltons

※注意事項

丙烯醯胺(Acrylamide)在聚合之前，毒性甚烈，且能直接侵入皮膚，使用時必須戴手套。污染的玻璃器皿，也必須徹底洗淨。

配膠法：

1. Prepare the separating gel monomer solution → by combining all reagents(除 Ammonium persulfate(APS)及 TEMED外).

2. Degas for ≥ 15 minutes at room temperature.
3. 加 APS & TEMED \rightarrow mix.
4. Pour the solution to the Sandwiches.
(pour the solution smoothly to prevent it from mixing with air).
5. Immediately overlay solution with water.
6. Allow the gel to polymerize for 45 min - 1 hour.
Note: 若不立即電泳, 則在上面加入約5ml of 1:4 diluted stock solution B 避免脫水
7. Prepare the stacking gel monomer solution. (同上)
8. 倒入 stacking gel 之前, 先用濾紙吸乾 Separating gel 表面的水份.
9. 放入 Comb \rightarrow Allow the gel to polymerize 30-45 minutes.
10. 移去 Comb \rightarrow Rinse the wells with distilled water.
11. Sample loaded \rightarrow gels run.

III 、 Loading the Samples

Sample buffer 必須含有 10% Sucrose or glycerol 讓 Sample 下沉.

※ 2X Sample buffer (prepared fresh each week and stored at 4°C)

Distilled water	4.1 ml
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml
Glycerol	2.0 ml (20%)
SDS	0.4 gm (4%)
β -mercaptoethanol	1.0 ml
0.5%(w/v) bromophenol blue	0.4 ml
Total	10 ml
Sample	: Sample buffer (1 : 1)

IV 、 Prepare electrode buffer

配置約2000ml的electrode buffer →350ml for upper buffer chamber，剩餘放入lower buffer chamber 盡量避免產生氣泡。

V、Running the Gel

set voltage : 150V 、60 min。

VI、Fixation & Staining

染色液(Staining solution): 30min to 1 h

0.1%Coomassie Blue R250 (0.25%)

40% Methanol (40-50%)

10% Acetic acid

VII、Destaining

脫色液:

7.5% Acetic acid, 10% Methanol

VIII、膠體保存液:

7.5% acetic acid

IX、縮膠

70%Methanol, 0.8%Glycerine

X、封膠

gel drying between sheets of cellophane(玻璃紙)

七、Gelatin-substrate Zymography⁽⁸²⁻⁸⁹⁾

本法利用內含 0.1%gelatin 的 SDS polyacrylamide 為蛋白酵素作用基質，當具有 gelatinase 的蛋白酵素經過適當的活化後，會將其電泳移動後，所在位置的 gelatin 分解，如此經過 coomassie blue 染色後，蛋白酵素所在位置，因不具有 gelatin 無法被染色，而呈透明之 gelatinolytic band，藉此可判斷蛋白酵素的的存在與其相對分子量。

I、Gelatin-SDS-polyacrylamide gel 之製備

本實驗所用板膠的濃度為 8%，其組成如下：

	Separating gel	Stacking gel
1.5M Tris-HCl, pH8.8	2.5ml	0
0.5M Tris-HCl, pH6.8	0	0.65ml
30%acrylamide-0.8%bis-acrylamide	2.7ml	0.35ml
Ammonium persulfate(10mg/ml)	0.5ml	0.18
10%SDS	100.0ul	25.0ul
Gelatin(2%)	0.5ml	0
d H ₂ O	3.7ml	1.35ml
TEMED	10.0ul	6.0ul

Gelatin-SDS-polyacrylamide 板膠之配製方法如同一般之 SDS-polyacrylamide 板膠，不同處為 separating gel 內含 0.1% 之 gelatin。

II、Loading the Samples

同 SDS-PAGE, 但 Sample buffer 不能含還原劑, Sample 與 Sample buffer 混合後不能加熱, 會影響蛋白質 (gelatinase) 的 refolding。

III、0.1%Gelatin SDS-PAGE 電泳後 gel 之處理：

取下膠片 (gel), 加入 100ml Washing buffer(2.5% Triton X-100 in dH₂O) 在室溫下輕微搖動 30 分鐘後, 換新 100ml Washing buffer 再洗一次。倒掉 Washing buffer, 膠片以 dH₂O washing, 再加入 200ml Reaction buffer (40 mM Tris-HCL, pH 7.8, 10 mM CaCl₂, 0.01%NaN₃), 於 37°C 恆溫水浴中, 搖動 12 小時以上, 反應後取出膠片以 0.25% Coomassie Blue R250 染色液染色一小時, 再用 20%MeOH, 10%Acetic acid 脫色。

八、Determination of pH optimum

取 30 μ l Sample loading 至 0.1%Gelatin-8%SDS-PAGE(Bio-Rad Mini-Protean II), 進行電泳分析: 150 V、60 min, 經過電泳後的凝膠, 每個 Lane 切成小片後加入 50ml 含 2.5%Triton X-100 的 Washing buffer 在室溫下洗 30min, 在換一次 Washing buffer 洗 30min, 將每條凝膠分別放入各種不同 pH 值的 Reaction buffer(內含 10 mM CaCl₂)中, 在 37°C 下反應 15 小時以上, 反應後之凝膠, 再染色和脫色, 方法同前述。

九、EDTA 對酵素活性之影響

方法與 gelatin-Zymography 相同, 然反應溶液中加入

0.5mM 的 EDTA。

十、蛋白酶抑制劑對酵素活性的影響(Effect of inhibitor on activity)

方法與 gelatin-Zymography 相同，然反應溶液中加入各種不同之蛋白酵素抑制劑，並使其最終濃度為：

EDTA	: 10mM
Leupeptin	: 10ug/ml
PMSF	: 2mM
Phenanthroline	: 5mM

十一、Activation by APMA and Trypsin

a、以 APMA 活化 Proenzyme：

* APMA 溶解在 0.1M NaOH，再以 2M Tris-HCl 調整至 pH 7.5。

25 μ l 檢體(25 μ g) 加入 0.5mM APMA，混合後在 37 $^{\circ}$ C 下反應一小時，↓加入 30 μ l 2X loading buffer(不含 β -MSH 或其它 reducing agents)，取 30 μ l 進行電泳方法同 Gelatin-substrate zymography 分析。

b、以 Trypsin 活化 Proenzyme：

25 μ l 檢體(25 μ g) 加入 5 μ l 5mg/ml Trypsin 溶液，混合後在 37 $^{\circ}$ C 下反應 10 分鐘，加入 30 μ l 2X loading buffer (不含 β -MSH 或其它 reducing agents)，取 30 μ l 進行電泳方法同 Gelatin-substrate zymography 分析。

十二、MMP-9 的純化

利用 affinity chromatography 來純化此蛋白酶，將均質液通過 Red agarose，在利用 gelatin-Sepharose affinity chromatography 來純化此蛋白酶。

十三、抗發炎藥物對蛋白酶產生的影響

以廣東住血線蟲感染小白鼠(ICR strain)，於飲用水內分別加入抗發炎藥 (Aspirin(0.8mg/ml)、prednisolone(0.2mg/ml))等。經過兩週後小白鼠經斷頭、取腦、均質，取其均質液進行 Gelatin-substrate zymography 分析，觀察其蛋白酶產生之情形。

十四、蛋白酶產生的時間曲線(Time course)

以廣東住血線蟲感染小白鼠(ICR strain)，經 3 天、1 週、2 週、3 週、4 週、5 週、6 週。分別將小白鼠斷頭、取腦、均質，取其均質液進行 Gelatin-substrate zymography 分析，觀察其蛋白酶產生之情形。

第三章實驗結果

一、廣東住血線蟲感染老鼠(ICR strain)腦部均質液中 gelatinase 的表現

以廣東住血線蟲感染小白鼠後 12 天，利用 gelatin-substrate zymography 電泳分析感染組(infection)老鼠，與未受感染老鼠(control 組)腦部均質液，結果顯示有三條具蛋白酶活性的電泳帶產生，分子量分別是約 230、94、72 kD，72kD band 不論在感染組或 Control 組都有出現活性，而~230 kD band 也在感染組或 Control 組的 Triton-extracts 部分都有出現活性，然而 94 kD band 則特異性的只有出現於感染組。而在廣東住血線蟲感染之適當宿主大白鼠(rat)則無任何蛋白酶 gelatinase 活性的表現。(Fig-1)

二、EDTA 對蛋白酶 gelatinase 活性的影響

為了確定前面 gelatin 分解酶活性電泳帶(band)是特異性的由 gelatinase 所產生的，因此在 zymography 後，在反應液(reaction buffer)內加入 10mM 的 EDTA，發現不論感染組或 Control 組，所有的 band 都消失了，因此可以確認前面之反應是特異性由於蛋白酶活性所產生的，同時瞭解這些 gelatinase 需要二價陽離子作為 cofactor，即此 gelatinase 是一種鈣(Ca^{++})離子依賴性。(Fig-2)

三、72 及 94-kDa gelatinase Optimal pH 值得測定

為了更進一步瞭解 72 及 94-kDa 蛋白酵素 gelatinase 的性質，在何種 pH 值下會有最大的活性值，因此利用各種不同 pH 值的緩衝液做為反應溶液。結果得知，72、94-kDa gelatinase 的活性出現在 pH 6-10 之間，且以 pH6-8 活性最大。(Fig-3)

四、蛋白酶抑制劑抑制 72、94-kDa gelatinase 活性的分析

藉由各種蛋白酶抑制劑的抑制效果，可以了解 72、94kDa gelatinase 是屬於那一類的蛋白酶。

Leupeptin 是一種 Cysteine proteases 的抑制劑，當加入 10 μ g 至反應液(reaction buffer)後，gelatinase 活性並不會受到影響，因此知道此 gelatinase 並不屬於 Cysteine 類蛋白酶。(Fig-4)

PMSF, 是一種 serine protease 抑制劑,當加 2mM PMSF 至反應液(reaction buffer)後，並不影響 72kDa 及 94kDa 的酵素活性，因此知道此蛋白酶並不屬於 serine 類蛋白酶。(Fig-5)

1.10-Phenanthrolin 是一種 Metalloprotease 抑制劑,當加 5mM 1.10-Phenanthrolin 至反應液(reaction buffer)後，gelatinase 活性完全受到抑制，故其為 metalloproteinase。(Fig-6)

五、以 Trypsin 及 APMA 對 proMMP gelatinase 的活化作用

因 metalloproteinase 是以 proenzyme form 型式產生，需要經過其它酵素的切割或自體催化(autocatalysis)作用才具有活性，前面 pro-MMP 之所以有活性產生，乃因在 zymography 電泳過程被 SDS 所活化，為確認此 pro-MMP 能被其他酵素或有機化合物切除 propeptide domain 後能產生活化型的 MMP，因此我們將腦均質液用 5ng/ml trypsin 處理 10 分後，再跑 zymography 電泳，發現四條新的 gelatinase 電泳帶，分別是約 85kDa(94kDa 之活化型)，63kDa(72kDa 之活化型)及另外兩條小分子量的電泳帶。(Fig-7)

用 APMA 處理後 94kDa 及 72kDa，分別被切割成約 85kDa 及 63kDa 的活化型，但與 trypsin 處理的差別是並無兩條小分子量的電泳帶。(Fig-8)

六、MMP 蛋白酵素的 Western immunoblot 測定

由前面之 gelatin 分解活性，分子量，酵素活性的抑制劑抑制效果型態，及 trypsin、APMA 切割產生活活化型酵素等特性，可以判斷此特異性的 94kDa gelatinase 是屬於 metalloproteinase 類的 MMP-9。但這些都是間接證明，因此我們用 Anti-human MMP-9 做 Western immunoblot 來確認，結果發現在 94kDa 有一條 band 產生，因此可以確認此廣東住血線蟲感染後產生

的特異性 94kDa gelatinase 是 MMP-9。(Fig-9)

七、SDS-PAGE 電泳分析

我們將均質液同時跑 SDS-PAGE 電泳，結果並無特殊電泳帶(band)的產生。(Fig-10)

八、MMP-9 的純化

利用 affinity chromatography 來純化此 MMP-9，將均質液通過 Red agarose 後，再利用 gelatin-Sepharose affinity chromatography 來純化 MMP-9，結果僅抓到約 40-50kDa 的片段，無法純化出完整的 MMP-9。(Fig-11)
(Fig-12)

九、MMP-9 產生的時間曲線(Time course)

結果如 Table-1，MMP-9 在第二週開始產生持續至第三週，第四週後則無法測得 MMP-9(Gelatinase B)的活性；當第一次感染後一週再追加感染一次時，Gelatinase B 的酵素活性可以持續到第四週。

十、抗發炎藥物對蛋白酶產生的影響

在小白鼠(mice)飲用水內，分別加入 Aspirin (0.8mg/ml)、Prednisolone(0.2mg/ml)等抗發炎藥物，二週後仍然有 Gelatinase B 的活性產生，因此判斷抗發炎藥物並不影響 MMP-9 的產生。(Table-1)

第四章討論

由 Fig-1 在感染組與對照組比較得知，感染組多出現一條 94kDa band gelatinase，因為小白鼠(mice)與人類都是廣東住血線蟲的非適當宿主，其病理變化與人類相似。因此我們同時分析廣東住血線蟲的適當宿主大白鼠(rat)，受感染後是否也有相同的情形，結果不管 control 組(lane 8)或感染組(lane 9)並無任何蛋白酶活性產生，由 Fig-2，EDTA 抑制 gelatinase 活性，得知此 gelatinase 是一種鈣(Ca^{++})離子依賴性，由 Fig-4,5,6，得知 PMSF(serine protease inhibitor)、Leupeptin (cysteine protease inhibitor)並不影響酵素活性，而 chelating agent：EDTA 及 Phenanthroline (metalloproteinase inhibitor)完全抑制酵素活性，因此確認此 94 kDa gelatinase 是屬於 Metalloproteinase 家族，由 Fig-7.8，瞭解此 94kDa 的 proMMP 可以被 trypsin 及 APMA 切割產生活化型的 MMP，由 Fig-9，Western-blot 確認此 94kDa MMP 是 gelatinase B(MMP-9)。

我們嘗試用 affinity chromatography 來純化此 MMP-9，結果僅抓到約 40-50kDa 的片段，無法純化出完整的 MMP-9，因此只好暫時放棄。另外我們將均質液同時跑 SDS-PAGE 電泳(Fig-10)，並無發現特別差異產生，可能是 zymography 的敏感度能偵測到 ng/ml 甚至 pg/ml⁽⁸⁴⁾，而 SDS-PAGE 只能偵測到 $\mu\text{g/ml}$ ，因此無法表現出來。

由 Table-1 結果得知 MMP-9 的產生，從第二週開始持續至第三週，第四週以後則無法測得 MMP-9 之活性。

類固醇類藥物(Steroid)是一種抗發炎藥物，經由抑制磷脂酵素(Phospholipase)活性，而抑制前列線素(Prostacyclin)合成(附圖-9)^(158,159)，前列線素是引起發炎反應的主要物質，是由組織細胞膜所衍生的長鏈不飽和脂肪酸(附圖-7)。在磷脂酵素(Phospholipase)的作用下，花生四烯酸(arachidonic acid)自細胞膜釋出，經過一系列的酵素作用，而轉化成為各種前列腺素及相關化合物。非類固醇抗發炎藥(NSAIDs)的主要藥理作用是止痛、解熱、抗發炎，詳細的作用機轉目前仍不明確，較為大家所接受的作用機轉是抑制環氧化酵素(Cyclooxygenase)活性，減少前列腺素(Prostaglandins)的生合成有關。至於發炎反應過程中，其它非前列腺素物質所扮演的角色及重要性目前仍不十分清楚^(158,159)。

我們懷疑 MMP-9 是因腦部發炎過程^(123,131-136)(附圖-5、6)，經由 Cytokine 的作用⁽¹³⁵⁾，促使腦部實質細胞或發炎細胞所產生的，以促使發炎細胞、Eosinophil、Macrophage 等往發炎部位聚集。因此分別以 Aspirin(屬 NSAIDs)及 Prednisolone 餵食小白鼠(mice)，抑制發炎反應，看是否能同時抑制 MMP-9 的產生。結果 MMP-9 酵素活性並不因抗發炎藥的作用而被抑制，已知 Aspirin 是以不可逆的方式抑制環氧化酵素，其作用時間與重新合成環氧化酵素的速率有關。所有的 NSAIDs 都會抑制環氧化酵素，但是個別藥物抑制環氧化酵素程度並不相同⁽¹⁵⁸⁾，並且也無研究顯示 NSAIDs 抑制環氧化酵素的程度與其抗發炎效果之相關性⁽¹⁵⁹⁾。NSAIDs 的抗發炎作用被認為是由於對 COX-2 的抑制作用而來，再者，COX-2 在發炎反應的過程中僅扮演部分的角色(附圖-8)。Pugin J.⁽¹¹⁰⁾ 曾經使用 Endotoxin 及

Proinflammatory mediator 刺激人類 Neutrophil 能促使分泌 Gelatinase B, 並使用 Ibuprofen(Cyclooxygenase inhibitor)處理並不影響 Gelatinase B 的產生。由於 Aspirin(NSAIDs)及 Prednisolone 接無法抑制 MMP-9 酵素活性, 因此推測 MMP-9 的產生與前列腺素(Prostaglandins)的生成無關。

MMP 是一種含鋅離子的酵素, 以酵素元型態(proenzyme)產生, 在組織內可經由自體催化溶解(autocatalytically)⁽⁶⁰⁾, 或其他酵素分解而活化, 每種 MMP 都具有基質(substrate)特異性, 能分解多種結締組織成份, collagens, laminin, fibronectin, 及 proteoglycans 等, 因此在組織重建⁽⁶²⁾及血管新生⁽⁵⁸⁾過程扮演重要角色。其活性受到 TIMP(tissue inhibitors of metalloproteinase)^(50,51)及血清蛋白的抑制, 因此在正常生理狀態下受到嚴謹控制。

廣東住血線蟲是一種寄生於大白鼠(rat)肺動脈的線蟲(nematode), 人類、小白鼠(mice)等非適當宿主, 感染後主要是侵犯腦部, 而且不能完成其生活史, 因此無法發育為成蟲, 引起的病理變化特徵是, 腦脊髓液(CSF)及末梢血液的嗜伊紅性白血球(Eosinophils)增加^(38,39), 腦部嗜伊紅性白血球(Eosinophils)、及淋巴球浸潤等發炎反應, 血腦障壁(BBB)破壞, 神經細胞脫髓鞘(demyelination)及小腦(cerebellar)浦金氏細胞(purkinje cells)喪失⁽³⁸⁾、損傷、有空泡等, 臨床症狀主要包括, Gordon phenomenon、頸部僵硬、瞳孔不對等、發燒、頭痛、嘔吐、昏睡、智能障礙、運動失調(ataxia)、麻痺(paralysis)、缺乏定向感和說話不連貫等中樞神經系統之病害^(35,95)。

血腦障壁(BBB)是由腦血管內皮細胞及週圍由 astrocyte

細胞質包圍所行成的，腦血管與一般血管不同處，它的內皮細胞之間的連結特別緊，造成 tight junction，限制物質通過，具有重大的生理保護作用，當腦部因發炎或病變時血腦障壁(BBB)就會被破壞^(105,119)，而使血管滲透性增加。

中樞神經系統的髓鞘主要存在大腦白質，是由 oligodendrocyte 的細胞質一層層的圍繞著神經軸突(neuronal axon)所造成的一種膜(membrane)，MBP(myelin basic protein)是神經髓鞘的主要成分^(96,99,106)，也是中樞神經系統(CNS)主要結構蛋白成分之一。

許多神經系統發炎性疾病，如：多發性硬化症(multiple sclerosis(MS))⁽⁹²⁾及實驗自體免疫腦脊髓膜炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE))⁽⁹⁴⁾ (常被用來當作研究 MS 的實驗模式)等，其病理學特徵是血腦障壁(BBB)受損⁽¹²³⁾，發炎細胞、Macrophage 等浸入中樞神經系統(CNS)⁽¹²⁵⁾，及神經細胞脫髓鞘(demyelination)。之前許多報告指出 protease 參與多發性硬化症(MS)⁽¹²¹⁾或 EAE⁽¹²²⁾的病理過程，包括發炎細胞聚集^(124,131)、血腦障壁(BBB)破壞^(50,55,119,120)，神經細胞的髓鞘成份 MBP⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾的分解，造成神經細胞脫髓鞘(demyelination)^(95-100,109,125)。

因此推論(Fig-13):當人類吃入含廣東住血線蟲第三期幼蟲(L3)的中間宿主，感染後 1-2 天 L3 幼蟲即進入腦部，在 4-6 天經蛻皮形成第四期幼蟲，約 7-9 天再蛻皮形成第五期幼蟲，最後幼蟲會移行至腦的表面和蜘蛛膜下腔⁽³⁴⁾。這段期間幼蟲在腦部移動引起機械性傷害，及蛻皮或分泌出的 E/S 產物，刺激使腦內細胞，Microglia, Astrocyte, Oligodendrocyte, T-lymphocyte, Mast cell 等活化，分泌細胞激

素 (cytokines)^(65,95) 及其它媒介質 (mediator) 或趨化物質 (chemokines)^(108,109)，進入血液循環，促使白血球增加(主要是 Eosinophil)，這些發炎細胞 (inflammatory cell)、eosinophil、lymphocyte 等欲移動至發炎部位或受傷組織，必須先通過血腦障壁 (BBB)，才能進入腦部，因此這些細胞經由 Cell-Cell 接觸⁽¹¹⁴⁾ 促使分泌蛋白酶^(75,90) 來幫助分解 BBB 結構，打開血腦障壁 (BBB)^(119,120)，讓發炎細胞，eosinophil 等進入，因此 MMP-9 之作用可能在廣東住血線蟲感染後，E/S 抗原促使免疫反應，這些發炎細胞 (inflammatory cell)^(77,78,100)、eosinophil^(38,39,80,81)、lymphocyte^(79,116)、Neutrophil^(110,123)、Macrophage^(115,132) 等在通過血腦障壁 (BBB) 時所分泌出來，並造成血腦障壁 (BBB) 的損傷，也可能經由 T-Lymphocyte 促使血管內皮細胞 (Endothelial cell) 分泌^(111,125) 使血腦障壁 (BBB) 滲透性增加，造成腦水腫及腦壓升高的主要原因^(95,105)。

同樣情形當發炎細胞通過 BBB 後，欲移動到病變部位過程，必須經過腦部的結締組織，因此也必需由發炎細胞分泌蛋白酶 gelatinase B (MMP-9) 或因發炎反應產生的一連串免疫反應產生的細胞激素 (cytokine)^(65,95,108,109,135,142) 等誘導腦部的常駐細胞分泌 MMP-9，分解周圍結締組織蛋白以幫助細胞的移動，正常時期產生的量不大，而且正常的負調控機轉會馬上產生蛋白酶抑制劑，使 MMP-9 失去活性，當大量細胞移動或聚集時，其產生的蛋白酶 gelatinase B (MMP-9) 量大，而且負調控機轉異常，因此 MMP-9 除了分解周圍的結締組織蛋白之外，同時也分解了神經細胞的髓鞘蛋白 MBP⁽⁹⁷⁻¹⁰⁰⁾，而被分解的 MBP 蛋白成分，再引起一系列的免疫反應或自體免疫^(66,95,142)，而造成神經細胞的

破壞(Fig-14)，因此在感染後期才會有各種的神經症狀。這些作用機轉在類似症狀的神經性脫髓鞘、發炎疾病，如同多發性硬化症(multiple sclerosis(MS))及實驗自體免疫腦脊髓膜炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis(EAE))都已有報告獲得證實⁽⁹⁵⁻¹⁰⁰⁾。至於廣東住血線蟲引起的神經性病變機轉，是否與這些發炎性神經病變機轉相同，MMP-9在此所扮演的角色，及重要性為何，有待我們進一步探討。

Stuve O.⁽⁷¹⁾1996 年報告，用 Interferon beta-1b 能治療 Activated T lymphocyte 侵入腦部造成 Oligodendrocytes 的損傷，而減少脫髓鞘反應(demyelination)。

Shankavaram U.T.⁽¹⁴⁴⁾1997 年報告經由 PKC 訊息傳導路徑，調控 PGHS-2 而促使 PGE2 的行成，而調控 MMPs 的產生，而造成氣喘(asthma)病人的發炎反應，並使用 Indomethacin(NSAIDs)抑制 PGHS-2 降低 PGE2 的形成，而抑制 Monocyte 產生 MMPs。

Zhang Y.⁽¹⁵¹⁾等運用白血球分泌之蛋白酶抑制劑(SLPI)(一種 Serine protease inhibitor)能抑制 PGH2、PGE2、MMPs 的產生，而達到抗發炎作用。因此我們也許能嘗試運用 Interferon beta-1b、Indomethacin(NSAIDs)、Protease inhibitor 等來治療發炎性疾病如：氣喘，風濕性關節炎、多發性硬化症(MS)及廣東住血線蟲感染引起之神經系統發炎性疾病。

目前尚有許多未明瞭的地方，需要我們去證實，在廣東住血線蟲感染後，蛋白酶 gelatinase(MMP-9)如何產生？由何種細胞產生？其調控機轉為何？作用為何？是否與血腦障壁(BBB)的損傷，神經細胞的脫髓鞘(demyelination)，小腦的

浦金氏細胞(purkinje cells)喪失這些病理變化有關，尚待我們下一步的確認。

第五章圖表與圖表說明

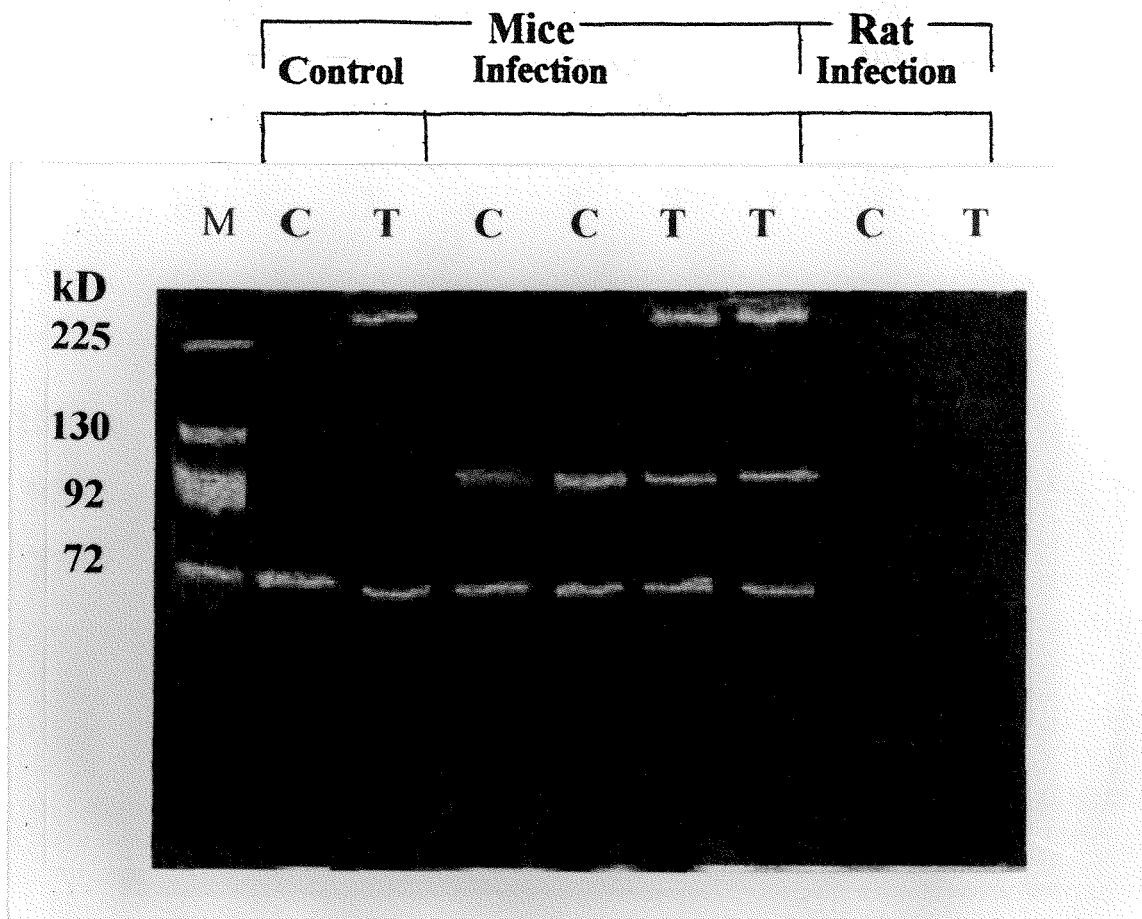


Fig 1. 94 kD gelatinase is present in A.C. infection mice Brain extracts.

Samples of brain extracts from two control and four infection mice were analyzed by gelatin zymography as described in *Methods*.

M : Human whole blood MMPs Marker⁽⁸⁷⁾

C : Cytosol

T : Triton extract

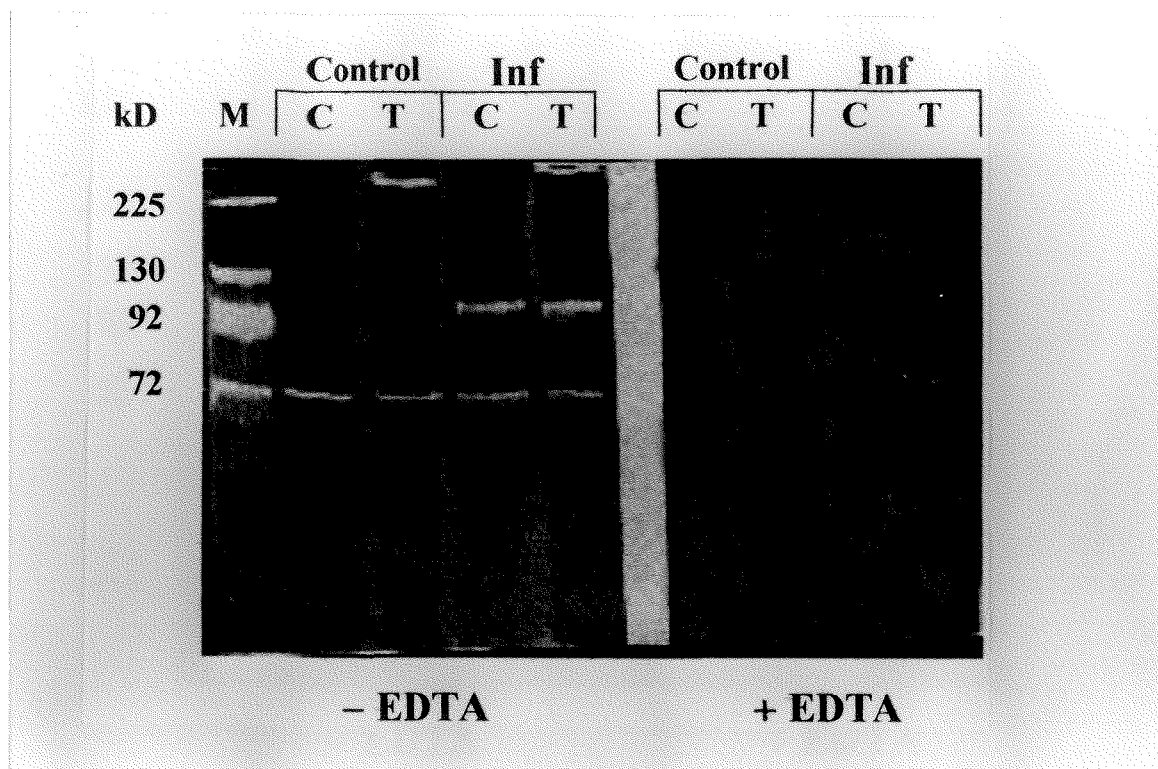


Fig 2. Inhibition of metalloproteinases on gelatin zymography of various brain extracts with 10 mM EDTA.

M : Human whole blood MMPs Marker⁽⁸⁷⁾

C : Cytosol T : Triton extract

Control : control group(no infection)

Inf : infection group

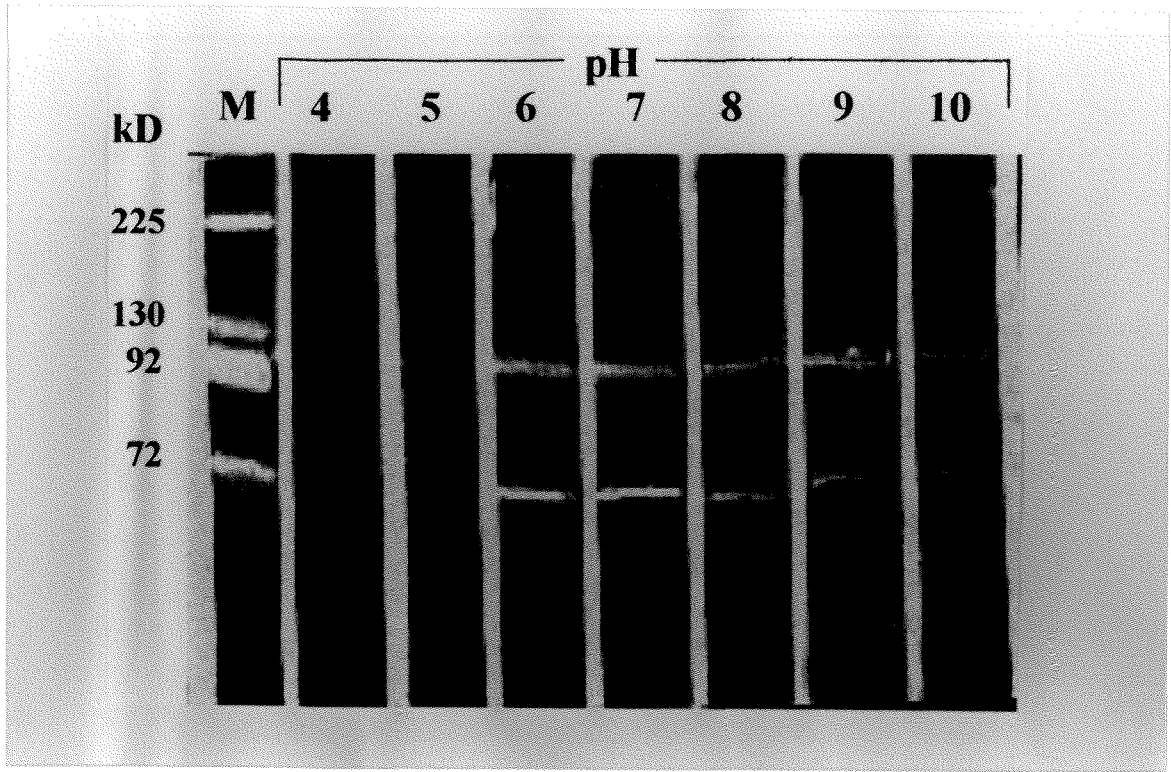


Fig 3. 94 kD gelatinase Optimum pH Activity

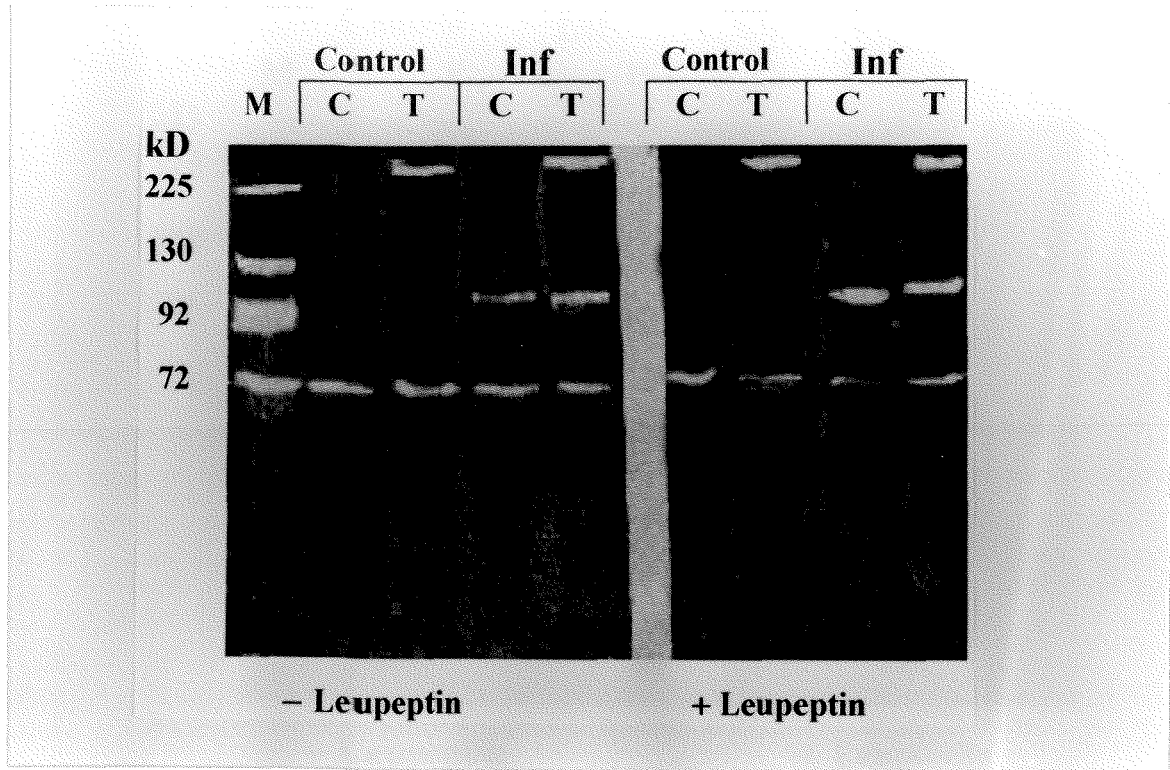


Fig 4. Inhibition of Mr 94 kD type IV collagenase with leupeptin in brain extracts by gelatin zymography.

M : Human whole blood MMPs Marker⁽⁸⁷⁾

C : Cytosol

T : Triton extract

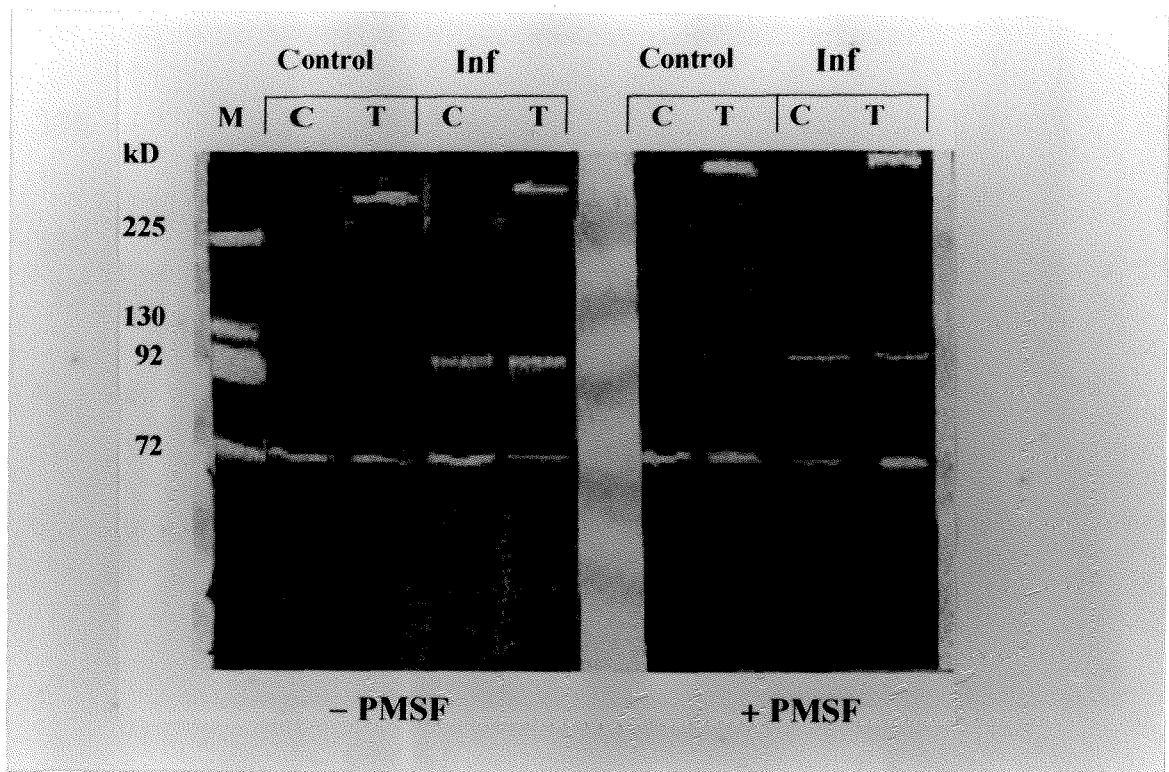


Fig 5. Inhibition of Mr 94 kD type IV collagenase on gelatin zymography of various brain extracts with 2 mM PMSF.

M : Human whole blood MMPs Marker⁽⁸⁷⁾
 C : Cytosol T : Triton extract

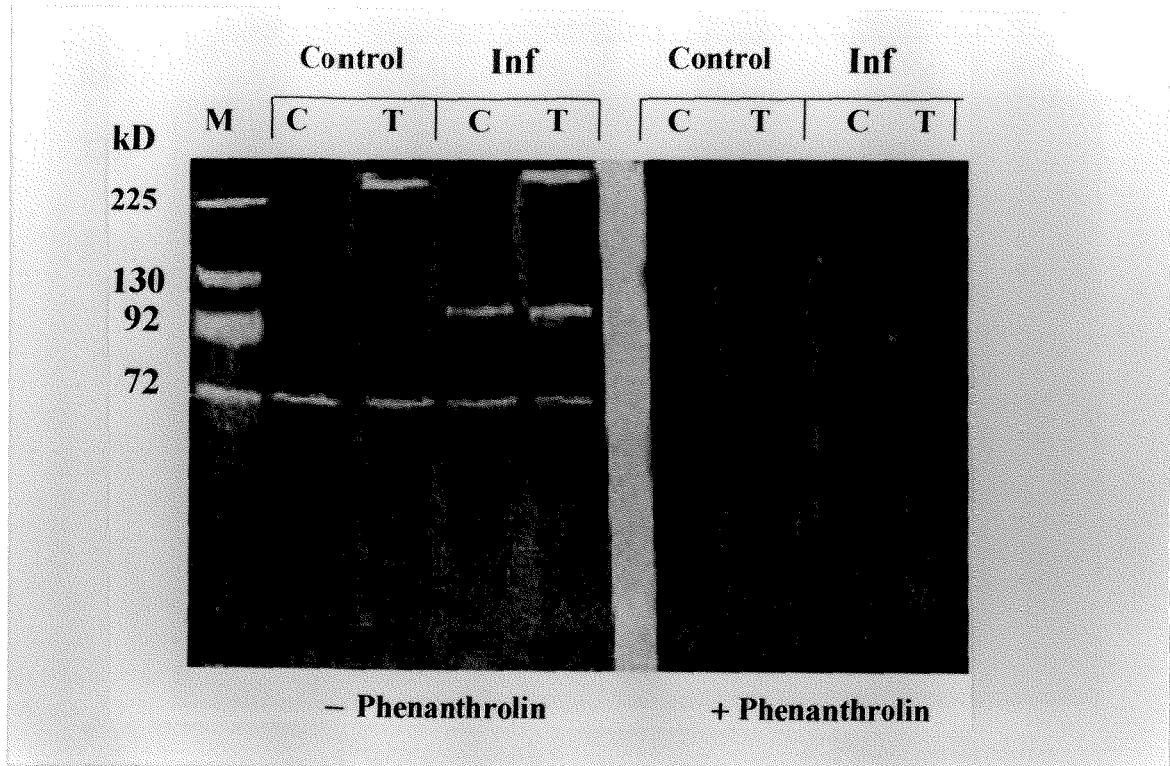


Fig 6. Inhibition of Mr 94 kD type IV collagenase on gelatin zymography of various brain extracts with 5 mM Phenanthroline.

M : Human whole blood MMPs Marker⁽⁸⁷⁾

C : Cytosol

T : Triton extract

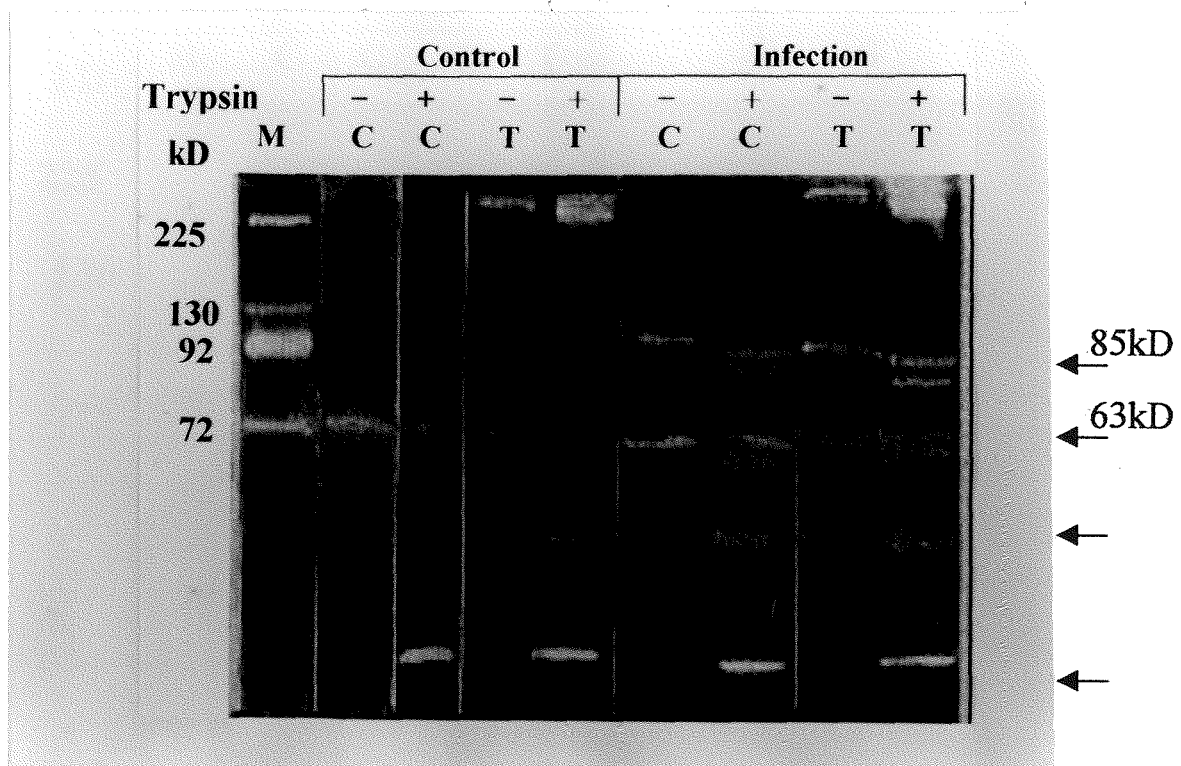


Fig 7. Samples were pretreated with 5ng/ml Trypsin to activate metalloproteinases.

M : Human whole blood MMPs Marker⁽¹⁾
 C : Cytosol T : Triton extract
 + : sample pretreated with 5ng/ml Trypsin
 - : no trypsin

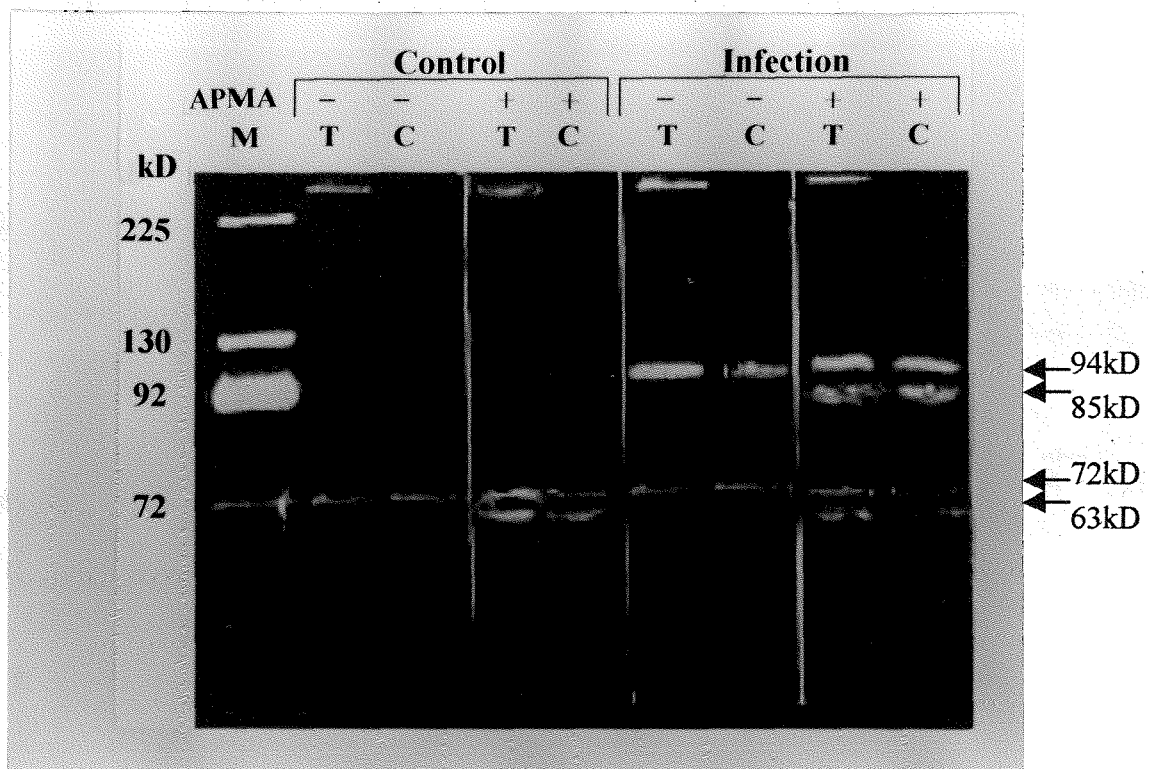


Fig-8 、 Samples were treated with 1 mM APMA to activate metalloproteinases. The gelatinolytic bands at ~94 and 72 kD (solid arrowheads) shifted to lower molecular weight species (open arrowheads) in samples pretreated with APMA(+).

M : Human whole blood MMPs Marker⁽⁸⁷⁾

C : Cytosol T : Triton extract

+ : sample pretreated with 1mM APMA

- : not pretreated with 1mM APMA

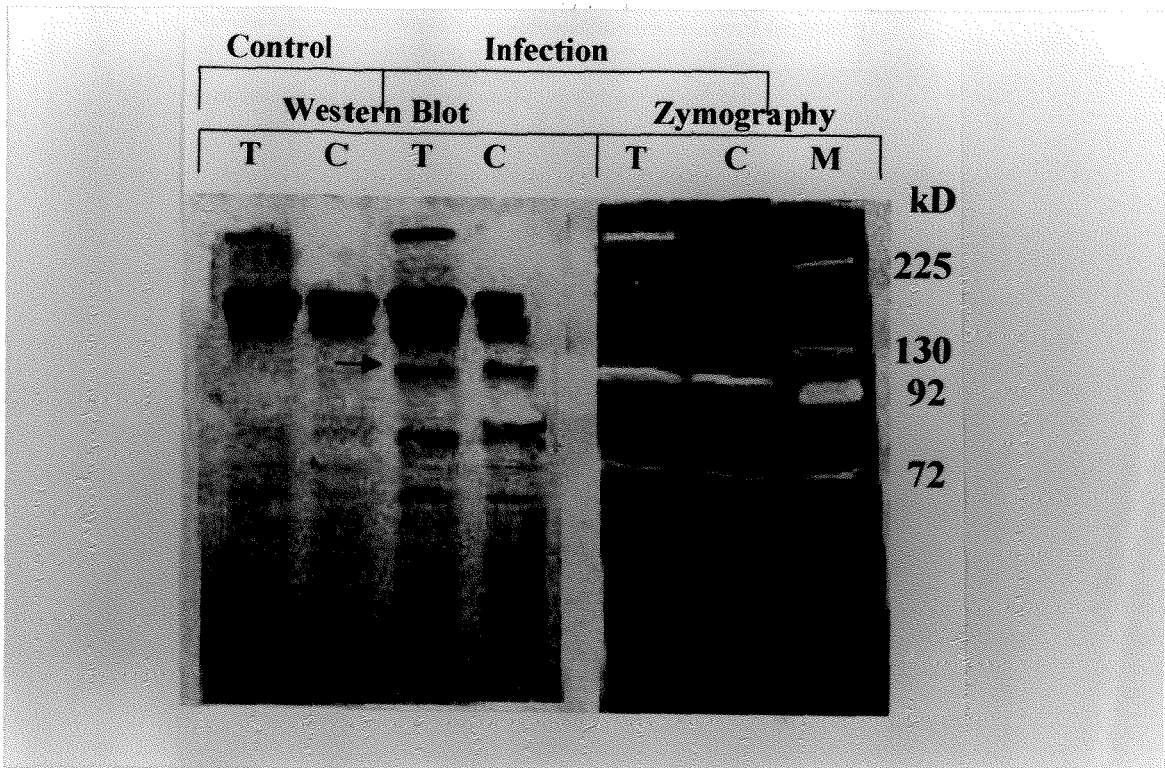


Fig 9. Immunoblotting with antibody to human 92 kD gelatinase (MMP9) demonstrated the presence of this enzyme only in infection mice brain samples.

M : Human whole blood MMPs Marker⁽⁸⁷⁾

C : Cytosol

T : Triton extract

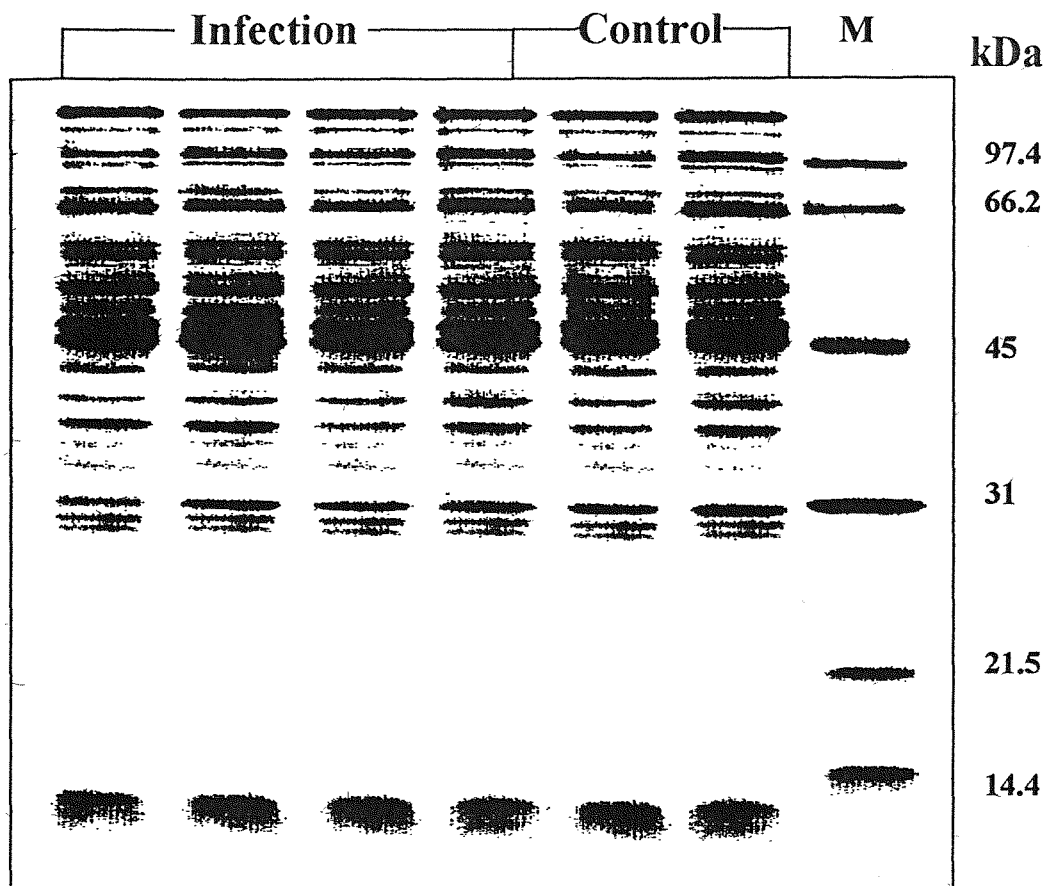


Fig 10. 8%SDS-PAGE of *Angiostrongylus cantonensis* infected mice brain extract

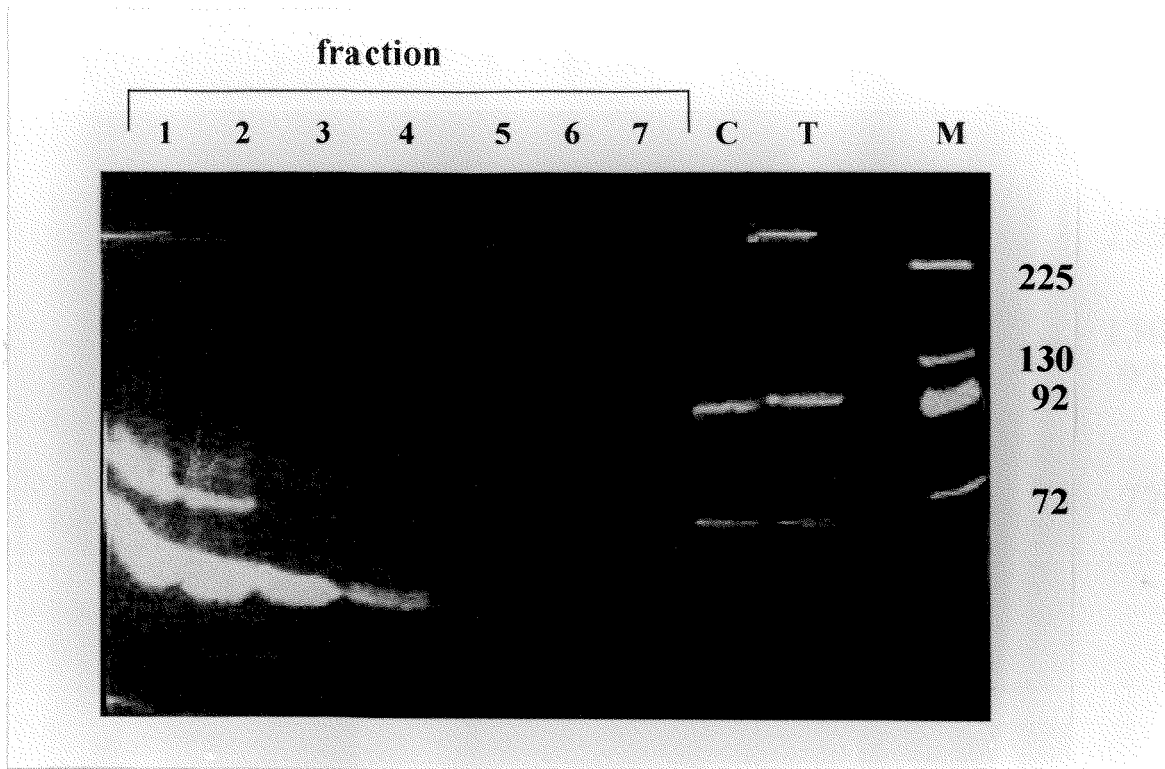


Fig 11. Purified with Red agarose

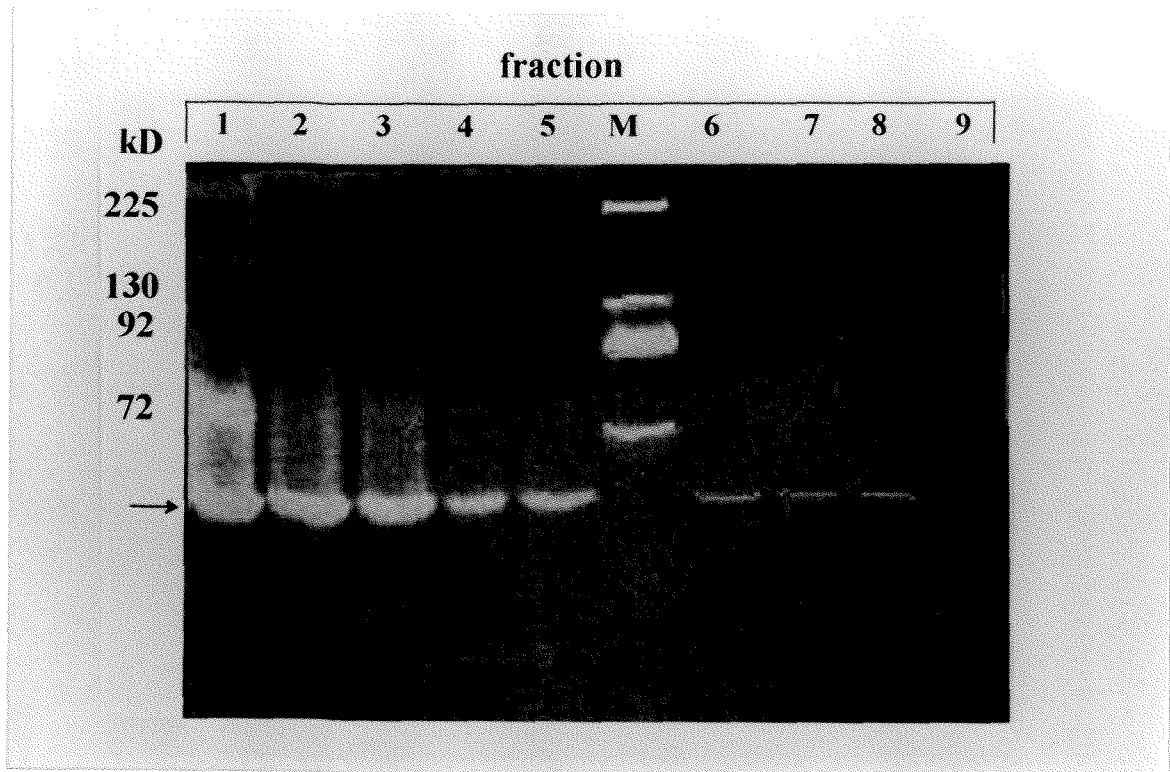


Fig 12. Purified with gelatin-Sepharose affinity chromatography

項目 \ 時間	3D	1W	2W	3W	4W	5W	6W	B2W	B4W
MMP9	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Worm recovery	(+++) L3	(+++) L3	(++) L4	(+) L4	(±) L5(die)	ND	ND	(++) L4	(+) L5
Inhibited by Aspirin	ND	MMP9 (-)	MMP9 (+)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Inhibited by prednisolone	ND	MMP9 (-)	MMP9 (+)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

3D : after infection 3 day

1W : after infection 1 week

2W : after infection 2 weeks

3W : after infection 3 weeks

4W : after infection 4 weeks

5W : after infection 5 weeks

6W : after infection 6 weeks

B2W : after infection 1 week challenge infection 1 week

B4W : after infection 1 week challenge infection 3 week

ND : No detected

Aspirin : 0.8mg/ml (60mg/kg/day)

Prednisolone : 0.2mg/ml

**Table 1. Angiostrongylus cantonensis infected mice brain
MMP-9 time course**

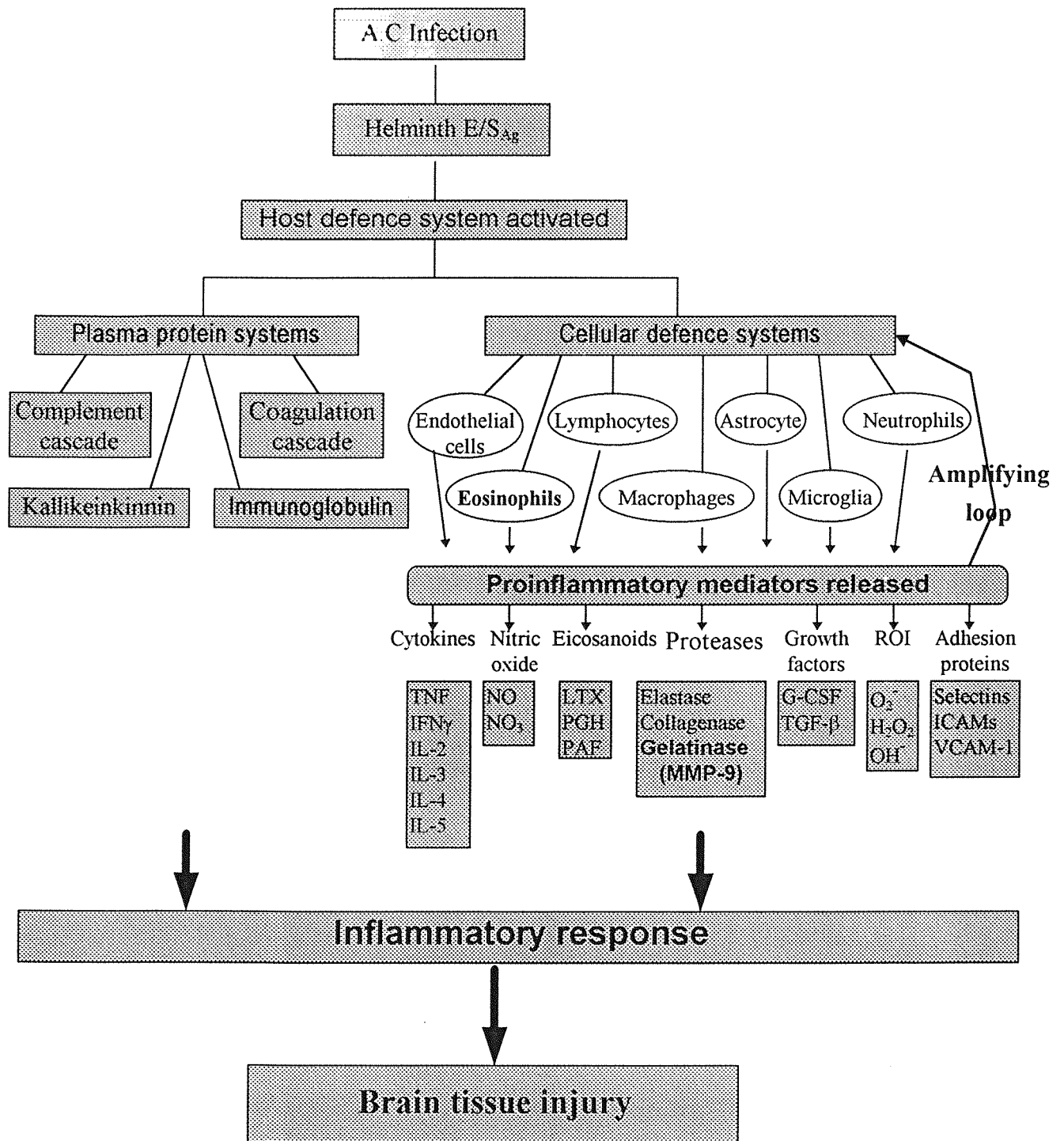


Fig-13 MMP-9 在廣東住血線蟲感染之角色推論

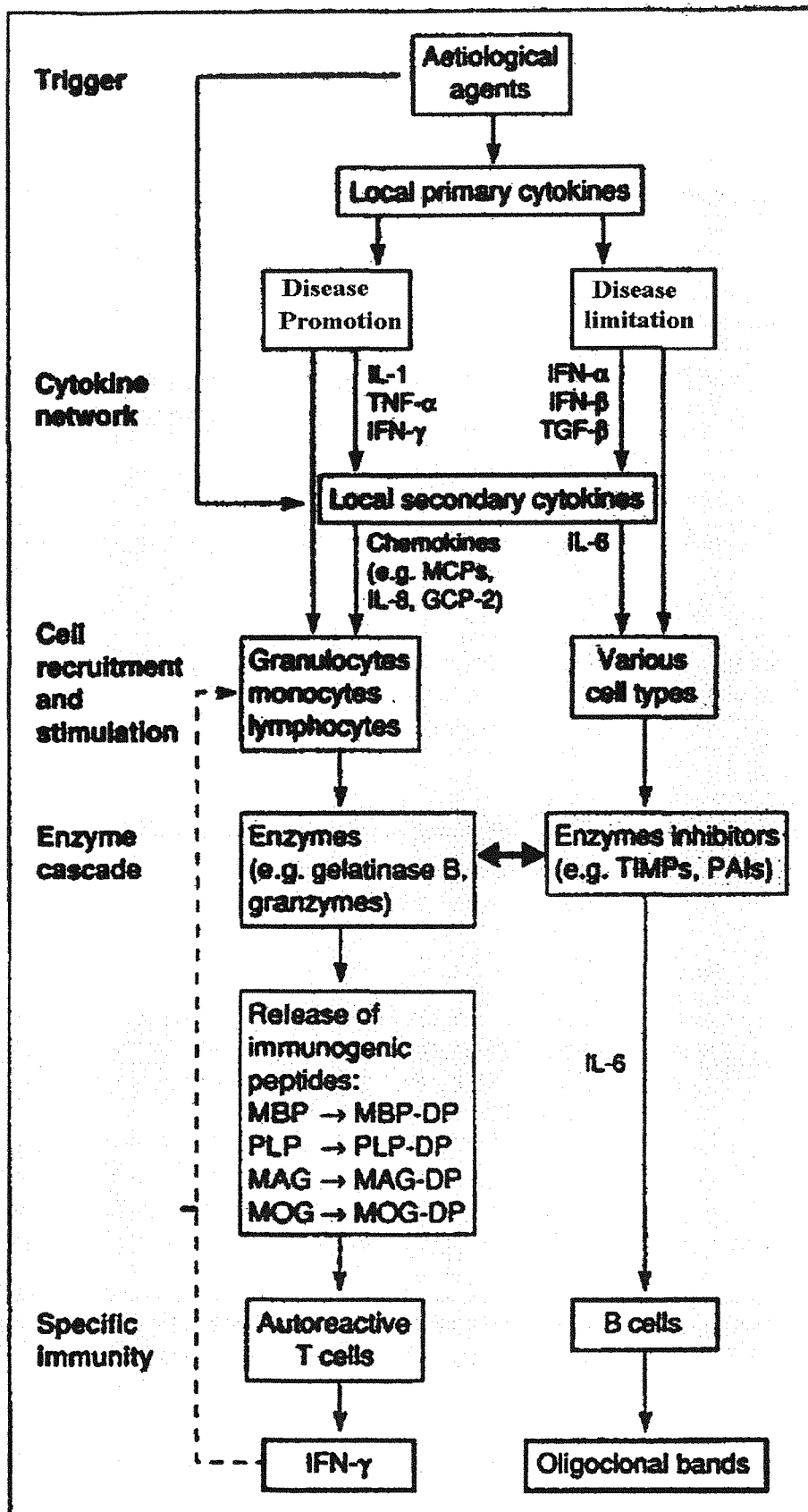


Fig 14. Gelatinase B(MMP9)造成脫髓鞘後誘發自體免疫可能機轉

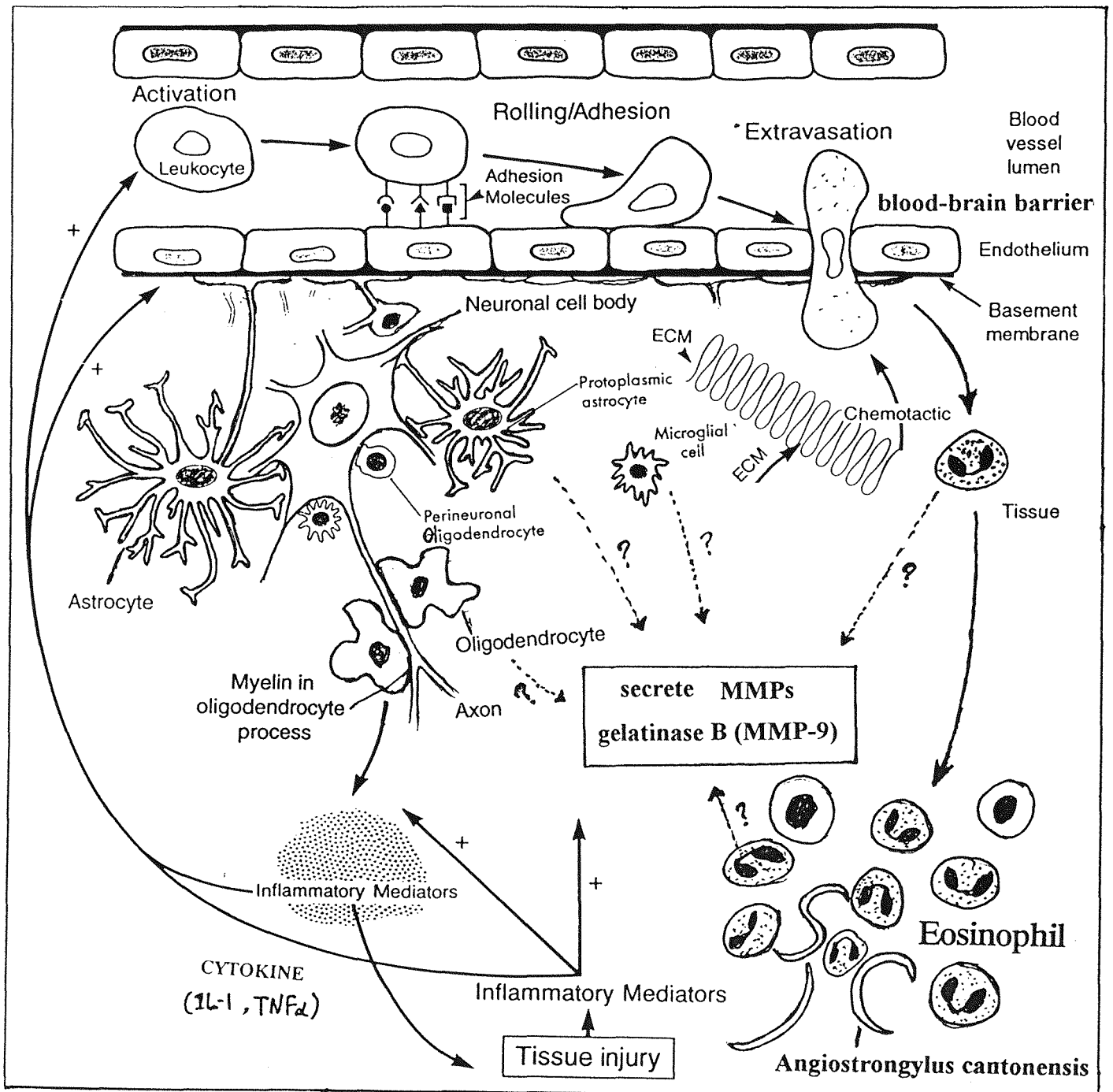


Fig 15. MMP-9 產生機轉之推論

第六章參考文獻

1. Alicata JE; Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis* and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. In: Advances in parasitology. (Dawes, B. etal), Academic press, London and New York: 1965; 223-48.
2. Hsu WT; Chen JY; Chien CT; Chi CS and Han NT; Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. Pediatric Infectious Disease Journal 1990; 9:443-5.
3. Ismail Y and Arsur EL; Eosinophilic meningitis. Western J. Med. .1993; 159: 623.
4. Rosen L; Laigret J and Boris S; Observation on an outbreak of eosinophilic meningitis on Tahiti, French Polynesia. Am. J. Hyg 1961; 74:26-42.
5. Fischer PR; Eosinophili meningitis. Western J. Med. 1983; 139:372-3.
6. Gardiner CH; Well S; Gutter AE; Fitzgerald L; Anderson DC; Harris RK and Nichols DK; Eosinophili meningocephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* as the cause of death in captive non-human primates. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990; 42:70-4.
7. Wittonpanich R; Chuahirun S; Soranasaporn S and Rojanasunan P; Eosinophilic myelomeningoencephalitis cause by *Angiostrongylus cantonensis* a report of three cases. Southeast Asian J. Trop. Med. & Pub. Heal. 1991; 22:262-7.
8. Hwang K P; Chen ER and Chen TS; Eosinophilic meningitis and meningoencephalitis in children. Acta Paediatrica Sinica. 1994; 35:124-35.
9. Chen HT; A preliminary report on a survey of animal parasites of Canton, China, rat. Lingnan Sci. J. 1933; 12:65-74.
10. Matsumoto T; Nematode found in lung, especially in the pulmonary artery of the wild rat. Taiwan Igakai Zasshi 1937; 36:32-35.
11. Yokogawa S; A new species of nematode found in the lungs of rat *Haemostrongylus ratti* sp. Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa 1937; 27:247-50.

12. Nomura S and Lin PH The first human case infected with *Haemostrongylus ratti*. Taiwan No Ikai 1945; 3:589-92.
13. Dougherty EC; The genus *Aelurostrongylus* Cameron, 1927 (Nematoda: Metastrongylidae), and its relatives, with the description of *Parafilaroides*, gen. nov. and *Angiostrongylus gubernaculatus*, sp. Nov. Proc. Helminth Soc. Wash. 1946; 13:16-26.
14. Viqar Z and Loh AK; *Angiostrongylus cantonensis* In: Hand book of medical parasitology 1989; 226-28.
15. Mackerras MJ and Sanders DF The life history of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis* (Chen) (Nematoda: Metastrongyloidea). Aust. J. Zool. 1955; 3:1-25.
16. Weinstein PP; Rosen L; Laqueur GL and Sawyer TK. *Angiostrongylus cantonensis* infection in rats and rhesus monkey, and observations survival of the parasite in vitro. Am. J. Trop. Hyg. 1963; 12:358-77.
17. Chiu JK; Snail hosts of *Angiostrongylus cantonensis* in Taipei, Taiwan. Bull. Inst. Zool. Acad. Sin. 1964; 3:55-62.
18. Cross JH; Review of angiostrongyliasis in Taiwan. Seminar on helminthiases and eosinophilic meningitis, South Pacific Commission, Noumea, New Caledonia. 1967; 7.
19. Chen ER; Hsieh HC and Shih CC; First report on biological study of *Achatina fulica* (an intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis*) in south Taiwan. J. Formosan. Med. Assoc. 1971; 70:364.
20. Wen YF; Distribution patterns of *Angiostrongylus cantonensis* in *Achatina fulica*. Chinese J. Microbiol. 1973; 6:116-21.
21. Chen SN; Lo CT; Lee SY and Liu KH; *Angiostrongylus cantonensis* infection in *Achatina fulica* from Taiwan. Chinese J. Microbiol. 1974; 7:62-63.

22. Kliks M M; Kroenke K and Hardman J M; Eosinophilic radiculomyeloencephalitis: an angiostrongyliasis outbreak in American Samoa related to ingestion of *Achatina fulica* snails. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1982; 31:1114-22.
23. Chang PK and Cross JH; Eosinophilic meningoencephalitis cause by *Angiostrongylus cantonensis*: Report of a human infection and a new intermediate host. *J. Formosan. Med. Assoc.* 1966; 65:637-8.
24. Yen CM; Chen E R and Cheng CW; A survey of *Ampullarium canaliculatus* for natural infection of *Angiostrongylus cantonensis* in south Taiwan. *J. Trop. Med. Hyg.* 1990; 93:347-50.
25. Chen ER; Angiostrongyliasis and eosinophilic meningitis on Taiwan: a review. In: J. H. Cross(Ed.), *Studies on Angiostrongyliasis in Eastern Asia and Australia*. Taipei, Taiwan, U.S. Naval Medical Research Unit No. 2, NAMRU-2-SP-44 1979; 57-73.
26. Rosen L; Loison G; Laigret J and Wallace G D; Studies on eosinophilic meningitis.3 Epidemiologic and clinical observations on Pacific islands and the possible etiologic role of *Angiostrongylus cantonensis*. *Am. J. Epidemiol.* 1967; 85:17-44.
27. Beck MJ; Cardina TM and Alicata JE; Eosinophil meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in American Samoa. *Hawaii Med. J.* 1980; 39:254-7.
28. Alicata JE; Present status of *Angiostrongylus cantonensis* infection in man and animals in the tropics. *J. Trop. Med. Hyg.* 1969; 72:53-63.
29. Kuntz RE and Myers BJ; The lungworm *Angiostrongylus cantonensis* of rodents on Taiwan(Formosa) and the offshore island. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1964; 13:686-92.
30. Chen SNA; survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rodents and snails on pescadores islands(Peng-hu). *Chinese J. Microbiol.* 1972; 5:129.
31. Yü CY; Chen ER; Hsieh HC; Shih CC; Cross JH and Rosen L; Epidemiologic studies of eosinophilic meningitis in Southern Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1975;

24:447-54.

32. Cross JH and Van Peenen PFD; *Angiostrongylus cantonensis* in rats on Makung, Pescadores islands. Chinese J. Microbiol. 1976; 9:85-6.
33. Noda S; Uchikawa R; Matayoshi S; Watanabe Y and Sato A; Observations on the transmission of *Angiostrongylus cantonensis* from snail to rodent. J. Helminth. 1987; 61:241-6.
34. Shih HH and Chen SN; Migratory effects on the body surface of *Angiostrongylus cantonensis* from subarachnoid space to pulmonary artery in rats. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 1990; 21:475-81.
35. Yii CY; Clinical observations on eosinophilic meningitis and meningocephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* on Taiwa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1976; 25:233-49.
36. Purohit AK; Dinakar I; Sundaeam, C. and Ratnakar, K. S. *Angiostrongylus cantonensis* in the brain. J. Neuro. Neurosurgery & Psychiatry. 1991; 54:1015-6.
37. Yii C. Y.; C. Y. Chen; J. W. Fresh; T. Chen and J. H. Cross; Human angiostrongyliasis involving the lungs. Chin. J. Microbiol. (Taipei) 1968; 148-50.
38. Perez O; Capron M; Lastre M; Venge P; Khalife J; Capron A; *Angiostrongylus cantonensis*: role of eosinophils in the neurotoxic syndrome (Gordon-like phenomenon). Experimental Parasitology 1989; 68:403-13.
39. Yoshimura K; Sugaya H and Ishida K; The role of eosinophils in *Angiostrongylus cantonensis* infection. Parasitol. Today 1994; 10:231-3.
40. Nelson RG; Warren RC; Scotti FA; Call TG and Kim BS; Ocular angiostrongyliasis in Japan: a case report. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1988; 38:130-2.
41. Prommindaroj K; Leelawongs N and Pradatsundarasar A; Human angiostrongyliasis of the eye in Bangkok. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1962; 6:759-61.

42. Huang WH; Cheng KH and Chang IH; The rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) found in human eye in Taiwan. J. Formosan Med. Assoc. 1964; 63:598.
43. Renapurkar DM; Bhopale MK; Limaye LS and Sharma KD; Prevalence of *Angiostrongylus cantonensis* infection in commensal rat in Bombay. J. Helminthol. 1982; 56:345-9.
44. Aguiar PH; Morera P and Pascual J; First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1981; 30:963-5.
45. Peng GS and Tsao W L; Effect of steroid on angiostrongyliasis: report of four cases. J. Med. Sci. 1996; 16:401-6.
46. Yong VW; Krekoski CA; Forsyth PA; Bell R and Edwards DR; Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. TINS 1998; 21:75-80.
47. Celentano DC and Frishman WH; Matrix metalloproteinases and coronary artery disease: A novel therapeutic target. J. Clin. Pharmacol. 1997; 37:991-1000.
48. Matrisian LM; The Matrix-Degrading Metalloproteinases. BioEssays 1992; 14:455-63.
49. Rosenberg GA; Dencoff JE; McGuire PG; Liotta LA; Stetler-Stevenson, W. G. Injury-induced 92-kDa gelatinase and urokinase expression in rat brain. Lab Invest. 1994; 71:417-22.
50. Rosenberg GA; Kornfeld M; Estrada E; Kelley RO; Liotta LA; Stetler-Stevenson, W. G. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. Brain Res 1992; 576:203-7.
51. Murphy G and Docherty AJP; The matrix metalloproteinases and their inhibitors. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1992; 7:120-5.
52. Bone JS and Butler PE; Intracellular Protease. Ann. Rev. Biochem. 1987; 56: 333-

53. Mignatti P and Rifkin DB; Biology and Biochemistry of Proteinases in Tumor Invasion. *Physiological Reviews* 1993; 73:161-95.
54. Woessner JF; Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal* 1991; 5: 2145-53.
55. Stetler-Stevenson WG; Liotta LA; Kleiner DE; Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 1993; 7:1434-41.
56. Venstrom KA; Reichardt LF; Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J.* 1993; 7: 996-1003.
57. Raghov R; The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J.* 1994; 8: 823-31.
58. Blood CH; and Zetter BR; Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1990; 1032:89-118.
59. Huhtala P; Tuuttila A; Chow LT; Lohi J; Keski-Oja J; and Tryggvason K; Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. *The Journal of Biological Chemistry* 1991; 266:16485-90.
60. Springman EB; Angleton EL; Birkedal-Hansen H; and Van Wart HE; Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 364-8.
61. Mutsaers SE; Bishop JE; Mcgrouther G; Laurent GJ; Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int. J. Biochem. cell biol.* 1997; 29: 5-17.
62. Matrisian LM; Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *TIG* 1990; 6:121-5.
63. Docherty AJP; O'Connell J; Crabbe T; Angal S; and Murphy G; The matrix

- metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases. *TIBTECH* 1992; 10: 200-7.
64. Birkedal-Hansen H; Proteolytic remodeling of extracellular matrix.[Review] *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7:728-35.
65. Ries C; Petrides PE; Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376:345-55.
66. Opdenakker G; and Damme JV; Cytokine-regulated proteases in autoimmune disease. *Immunology Today*. 1994; 15:103-6.
67. Manicourt DH and Lefebvre V; An assay for matrix metalloproteinases and other proteases acting on proteoglycans, casein, or gelatin. *Analytical Biochemistry* 1993; 215:171-9.
68. Colton CD; Keri JE; Chen WT; Monsky WL; Protease production by cultured microglia : substrate gel analysis and immobilized matrix degradation. *J Neurosci Res* 1993; 35: 297-304.
69. Gottschall PE; Yu X; Bing B; Increased production of gelatinase B(matrix metalloproteinase-9) and interleukin-6 by activated rat microglia in culture. *J Neurosci Res* 1995; 42:335-42.
70. Rao JS; Yamamoto M; Mohaman S; Gokaslan ZL; Fuller GN; Stetler-Stevenson, W. G., Rao, V. H., Liotta, L. A., Nicolson, G. L., Sawaya, R. E. Expression and localization of 92 kDa type IV collagenase/ gelatinase B (MMP-9) in human gliomas. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14:12-18.
71. Stuve O; Dooley NP; Uhm JH; Antel JP; Francis GS; Williams G; Yong VW; Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol* 1996; 40:853-63.
72. Rosenberg GA; Navratil M; Barone F; Feuerstein G; Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;

16:360-6.

73. Backstrom JR; Lim GP; Cullen MJ; Tokes ZA; Matrix metalloproteinase-9(MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide(1-40). *J Neurosci* 1996; 16:7910-9.
74. Lim GP; Russell MJ; Cullen MJ; Tokes SA; Matrix metalloproteinases in dog brains exhibiting Alzheimer-like characteristics. *J Neurochem* 1997; 68:1606-11.
75. Shibayama M; Kuchiwaki H; Inao S; Ichimi K; Yoshida J; Hamaguchi M; Induction of matrix metalloproteinases following brain injury in rats. *Acta Neurochir Suppl (wien)* 1997; 70: 220-1.
76. Maeda A; Sobel RA; Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 300-9.
77. Nielsen BS; Timshel S; Kjeldsen L; Sehested M; Pyke C; Borregaard N; et al. 92-kDa type IV collagenase(MMP-9) is expressed in Neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer. *Int J Cancer* 1996; 65:57-62.
78. Welgus HG; Campbell EJ; Cury JD; Eisen AZ; Senior RM; Wilhelm SM; et al. Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. *J clin Invest* 1990; 86:1496-1502.
79. Leppert D; Waubant E; Galardy R; Bunnett NW; Hauser SL; T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* 1995; 154: 4379-89.
80. Okada S; Kita H; George TJ; Gleich GJ; Leiferman KM; Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. *Am. J. Respir. Cell Mol.* 1997; 17:519-28.
81. Ohno I; Ohtani H; Nitta Y; Suzuki J; Hoshi H; Honma M; et al Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am. J.*

- Respir. Cell Mol. 1997; 16:212-9.
82. Garcia-Carreno FL; Dimes LE; and Haard NF; Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry* 1993; 214:65-9.
83. Manicourt DH and Lefebvre V; An assay for matrix metalloproteinases and other proteases acting on proteoglycans, casein, or gelatin. *Analytical Biochemistry* 1993; 215:171-9.
84. Kleiner D E; and Stetler-Stevenson WG; Quantitative Zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. *Analytical Biochemistry* 1994; 218: 325-9.
85. Fernandez-Resa P; Mira E; and Quesada AR; Enhanced detection of Casein Zymography of matrix metalloproteinases. *Analytical Biochemistry* 1995; 224: 434-5.
86. Miura RO; Yamagata S; Miura Y; Harada T; Yamagata T; Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (Zymography). *Analytical Biochemistry* 1995; 225:333-40.
87. Makowski GS; Ramsby ML; Calibrating gelatin zymograms with human gelatinase standards. *Analytical Biochemistry* 1996; 236: 353-6.
88. Hummel KM; Penheiter AR; Gathman AC; Lilly WW; Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS-PAGE. *Analytical Biochemistry* 1996; 33:140-2.
89. Leber TM; Balkwill FR; Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical Biochemistry* 1997; 249: 24-8.
90. Cuzner ML; Davison AN; Rudge P; Proteolytic enzyme activity of blood leukocytes and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1978; 4:337-44.
91. Inuzuka T; Sato S; Baba H; Miyatake T; Neutral protease in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *Acta. Neurol.*

Scand. 71987; 6:18-23.

92. Gijbels K; Masure S; Carton H; Opdenakker G; Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J. Neuroimmunol.* 1992; 41:29-34.
93. Rosenberg GA; Dencoff JE; Correa N; Jr Reiners M; Ford C C; Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury. *Neurology* 1996; 46:1626-32.
94. Kieseier BC; Kiefer R; Clements J M; Miller K; Wells GMA; Schweitzer, T., Gearing, A. J. H., and Hartung, H. Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 1998; 121: 159-66.
95. Opdenakker G; Van Damme J; Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunol Today* 1994; 15:103-7.
96. Kamholz J; DeFerra F; Puckett C. and Lazzarizi, R; Identification of three forms of human myelin basic protein by cDNA cloning. *Proc. Natl. Sci. USA* 1986; 83:4962-6.
97. Chandler S; Coates R; Gearing A; Lury J; Wells G; Bone E; Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett* 1995; 201:223-6.
98. Gijbels K; Proost P; Masure S; Carton H; Billiau A; Opdenakker G; Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein. *J Neurosci Res* 1993; 36:432-40.
99. Proost P; Van Damme J; Opdenakker G; Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192:1175-81.
100. Cammer W; Bloom BR; Norton WT; Gordon S; Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages: A possible

- mechanism of inflammatory demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75:1554-8.
101. Gijbels, K., Galardy, R.E., Steinman, L. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Clin Invest* 1994; 94:2177-82.
102. Hewson AK; Smith T; Leonard JP; Cuzner ML; Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat by the matrix metalloproteinase inhibitor Ro31-9790. *Inflamm Res* 1995; 44:345-9.
103. Cuzner ML; Gveric D; Strand C; Loughlin AJ; Paemen L; Opdenakker G et al. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 1194-204.
104. Leppert D; Waubant E; Burk M R; Oksenberg J R; Hauser S L; Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1997; 40:846-52.
105. De Vries H E; Kuiper J; Deboer A G; Van Berkel TJC and Dreimer DD; The Blood-Brain barrier in Neuroinflammatory disease. *Pharmacological Review*. 1997; 49:143-55.
106. Uhm JH; Dooley NP; Oh LY; Yong VW; Oligodendrocytes utilize a matrix metalloproteinase, MMP-9, to extend processes along an astrocyte extracellular matrix. *Glia* Jan 1998; 22:53-63.
107. Giraudon P; Buart S; Bernard A; Thomasset N Belin MF Extracellular matrix-remodeling metalloproteinases and infection of the central nervous system with retrovirus human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Prog. Neurobiol.* 1996; 49:169-84.

108. Biddison WE; Taub DD, Cruikshank WW; Center DM Connor EW; Honma K
Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8+ T cells: potential roles in inflammation. *J Immunol* 1997; 158:3046-53.
109. Giraudon P; Buart S; Bernard A; Belin MF Cytokines secreted by glial cells infected with HTLV-I modulate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their natural inhibitor (TIMPs): possible involvement in neurodegenerative processes. *Mol Psychiatry* 1997; 2:107-10.
110. Pugin J; Widmer MC; Kossodo S; Liang CM; Preas HL 2nd Suffredini AF Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:458-64.
111. Mach F; Schonbeck U; Fabunmi RP; Murphy C Atkinson E; Bonnefoy JY; Graber P; Libby P T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation. *Am J Pathol* 1999; 154:229-38.
112. Deage V; Burger D; Dayer JM Exposure of T lymphocytes to leflunomide but not to dexamethasone favors the production by monocytic cells of interleukin-1 receptor antagonist and the tissue-inhibitor of metalloproteinases-1 over that of interleukin-1beta and metalloproteinases. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9:663-8.
113. Makela M; Salo T; Larjava H MMP-9 from TNF alpha-stimulated keratinocytes binds to cell membranes and type I collagen: a cause for extended matrix degradation in inflammation? *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253:325-35.
114. Wize J; Sopata I; Smerdel A; Maslinski S Ligation of selectin L and integrin CD11b/CD18 (Mac-1) induces release of gelatinase B (MMP-9) from human neutrophils *Inflamm Res* 1998; 47:325-7.
115. Xie B; Dong Z; Fidler I. J. Regulatory mechanism for the expression of type IV collagenases/gelatinase in murine macrophage. *J Immuno.* 1994; 152:3637-44.

116. Trocme C; Gaudin P; Berthier S; Barro C; Zaoui P Morel F Human B lymphocytes synthesize the 92-kDa gelatinase, matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 1998; 273:20677-84.
117. Xie B; Laouar A; Huberman E Autocrine regulation of macrophage differentiation and 92-kDa gelatinase production by tumor necrosis factor-alpha via alpha5 beta1 integrin in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1998; 273:11583-8.
118. Esteve PO; Tremblay P; Houde M; St-Pierre Y Mandeville R In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1403:85-96.
119. Paul, R., Lorenzl, S., Koedel, U., Sporer, B., Vogel, U., Frosch, M., Pfister, H. W. Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Ann Neurol* 1998; 44:592-600.
120. Mun-Bryce, S., Rosenberg, G. A. Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol.* 1998; 274: R1203-11.
121. Leppert, D., Ford, J., Stabler, G., Grygar, C., Lienert, C., Huber, S., Miller, K. M., Hauser, S. L., Kappos, L. Matrix metalloproteinases-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 1998; 121:2327-34.
122. Kieseier, B. C., Clements, J. M., Pischel, H. B., Wells, G. M., Miller, K., Gearing, A. J., Hartung, H. P. Matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-7 are expressed in experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 1998; 43:427-34.
123. Anthony DC; Ferguson B; Matyzak MK; Miller KM Esiri MM; Perry VH Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997; 23:406-15.
124. Anthony DC; Miller KM; Fearn S; Townsend MJ Opdenakker G; Wells GM; Clements JM; Chandler S; Gearing AJ ; Perry VH Matrix metalloproteinase

- expression in an experimentally-induced DTH model of multiple sclerosis in the rat CNS. *J Neuroimmunol* 1998; 87:62-72.
125. Cossins JA; Clements JM; Ford J; Miller KM; Pigott R Vos W; Van der Valk P; De Groot CJ Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997; 94:590-8.
126. Lee MA; Palace J; Stabler G; Ford J; Gearing A; Miller K Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study *Brain* 1999; 122 :191-7.
127. Zhang JW; Deb S; Gottschall PE Regional and differential expression of gelatinases in rat brain after systemic kainic acid or bicuculline administration. *Eur J Neurosci* 1998; 10:3358-68.
128. Kieseier BC; Kiefer R; Clements JM; Miller K Wells GM; Schweitzer T; Gearing AJ; Hartung HP Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 1998; 121:159-66.
129. Friedberg MH; Glantz MJ; Klempner MS; Cole BF Perides G Specific matrix metalloproteinase profiles in the cerebrospinal fluid correlated with the presence of malignant astrocytomas, brain metastases, and carcinomatous meningitis. *Cancer* 1998; 82:923-30.
130. Backstrom JR; Tokes ZA The 84-kDa form of human matrix metalloproteinase-9 degrades substance P and gelatin. *J Neurochem* 1995; 64:1312-8.
131. Kumagai K; Ohno I; Okada S; Ohkawara Y; Suzuki K Shinya T; Nagase H; Iwata K; Shirato K Inhibition of Matrix Metalloproteinases Prevents Allergen-Induced Airway Inflammation in a Murine Model of Asthma. *J Immunol* 1999; 162:4212-9.
132. Vaalamo M; Kariniemi AL; Shapiro SD Saarialho-Kere U Enhanced expression of human metalloelastase (MMP-12) in cutaneous granulomas and macrophage migration. *J Invest Dermatol* 1999; 112:499-505.

133. Lemjabbar H; Gosset P; Lamblin C; Tillie I Hartmann D; Wallaert B; Tonnel AB; Lafuma C Contribution of 92 kDa Gelatinase/Type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1298-307.
134. Gipson TS; Bless NM; Shanley TP; Crouch LD Bleavins MR; Younkin EM; Sarma V; Gibbs DF; Tefera W; McConnell PC Mueller WT; Johnson KJ; Ward PA Regulatory effects of endogenous protease inhibitors in acute lung inflammatory injury. *J Immunol* 1999; 162:3653-62.
135. Pugin J; Verghese G; Widmer MC; Matthay MA The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome *Crit Care Med* 1999 ; 27:304-12.
136. Bosse M; Chakir J; Rouabhia M; Boulet LP; Audette M Laviolette M Serum matrix metalloproteinase-9:Tissue inhibitor of metalloproteinase- 1 ratio correlates with steroid responsiveness in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:596-602.
137. Radomski A; Sawicki G; Olson DM; Radomski MW The role of nitric oxide and metalloproteinases in the pathogenesis of hyperoxia-induced lung injury in newborn rats. *Br J Pharmacol* 1998; 125:1455-62.
138. Vignola AM; Riccobono L; Mirabella A; Profita M Chanez P; Bellia V; Mautino G; D'accardi P; Bousquet J Bonsignore G Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1945-50.
139. Hoshino M; Nakamura Y; Sim J; Shimojo J; Isogai S Bronchial subepithelial fibrosis and expression of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:783-8.
140. Di Girolamo N; Tedla N; Lloyd A; Wakefield D Expression of matrix metalloproteinases by human plasma cells and B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998;

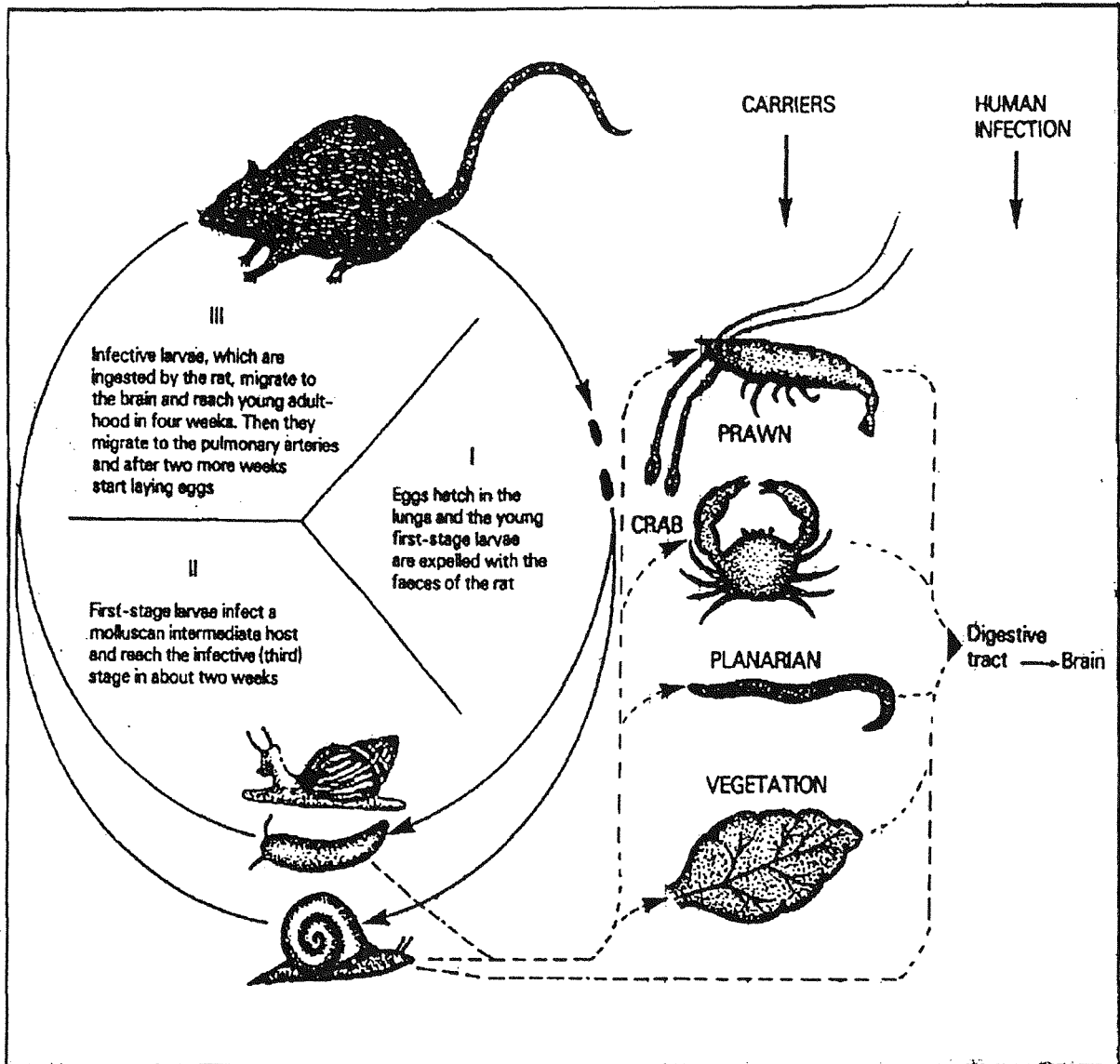
- 28.1773-84.
- 141.Romanic AM; White RF; Arleth AJ; Ohlstein EH Barone FC Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 1998; 29:1020-30.
- 142.Opdenakker G On the roles of extracellular matrix remodeling by gelatinase B. *Verh K Acad Geneesk Belg* 1998; 59:489-514.
- 143.Mautino G; Oliver N; Chanez P; Bousquet J; Capony F Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17583-91.
- 144.Shankavaram UT; DeWitt DL; Funk SE; Sage EH; Wahl LM Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *J Cell Physiol* 1997; 173:327-34.
- 145.Gaudin P; Berthier S; Barro C; Zaoui P; Morel F Proteolytic potential of human neutrophil membranes. *Eur J Cell Biol* 1997; 72:345-51.
- 146.Rajagopalan S; Meng XP; Ramasamy S; Harrison DG Galis ZS Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996; 98:2572-9.
- 147.Ahrens D; Koch AE; Pope RM; Stein-Picarella M Niedbala MJ Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39:1576-87.
- 148.McMillan JI; Weeks R; West JW; Bursten S; Rice GC Lovett DH Pharmacological inhibition of gelatinase B induction and tumor cell invasion. *Int J Cancer* 1996; 67:523-31.
- 149.Mukaiyama A; Itoh Y; Nagase H; Thogersen IB Enghild JJ; Sasaguri Y; Mori Y

- Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1996; 271:14657-60.
150. Kylmaniemi M; Oikarinen A; Oikarinen K; Salo T Effects of dexamethasone and cell proliferation on the expression of matrix metalloproteinases in human mucosal normal and malignant cells. *J Dent Res* 1996; 75:919-26.
151. Zhang Y; DeWitt DL; McNeely TB; Wahl SM; Wahl LM Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *J Clin Invest* 1997; 99:894-900.
152. Freestone T; Turner RJ; Coady A; Higman DJ Greenhalgh RM; Powell JT Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1145-51.
153. Corcoran ML; Kibbey MC; Kleinman HK; Wahl LM Laminin SIKVAV peptide induction of monocyte/macrophage prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1995; 270:10365-8.
154. Sopata I; Wize J; Filipowicz-Sosnowska A Stanislawska-Biernat E; Brzezinska B; Maslinski S Neutrophil gelatinase levels in plasma and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Rheumatol Int* 1995; 15:9-14.
155. Hibbs MS Expression of 92 kDa phagocyte gelatinase by inflammatory and connective tissue cells. *Matrix Suppl* 1992; 1:51-7.
156. Massova I; Kotra L.P.; Fridman R.; Mobashery S. Matrix metalloproteases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998; 12:1075-95.
157. Steven D. S. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences *Current Opinion in Cell Biology*. 1998; 10:602-8.
158. Frolich J.C. A classification of NSAIDs according to the relative inhibitor of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends in Pharmacological Sciences* 1997; 18:30-4.

159. Simon LS Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current Opinion in Rheumatology* 1996; 8:169-75.
160. Axel P; Anne KS.; Carrie LK; Steven D S; Iain L C Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am. J. Pathol.* 1998; 152:729-41.
161. Pugin J; Widmer MC; Kossodo S; Liang CM; Preas HL; Suffredini AF; Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. 1999; 20:458-64.

附錄

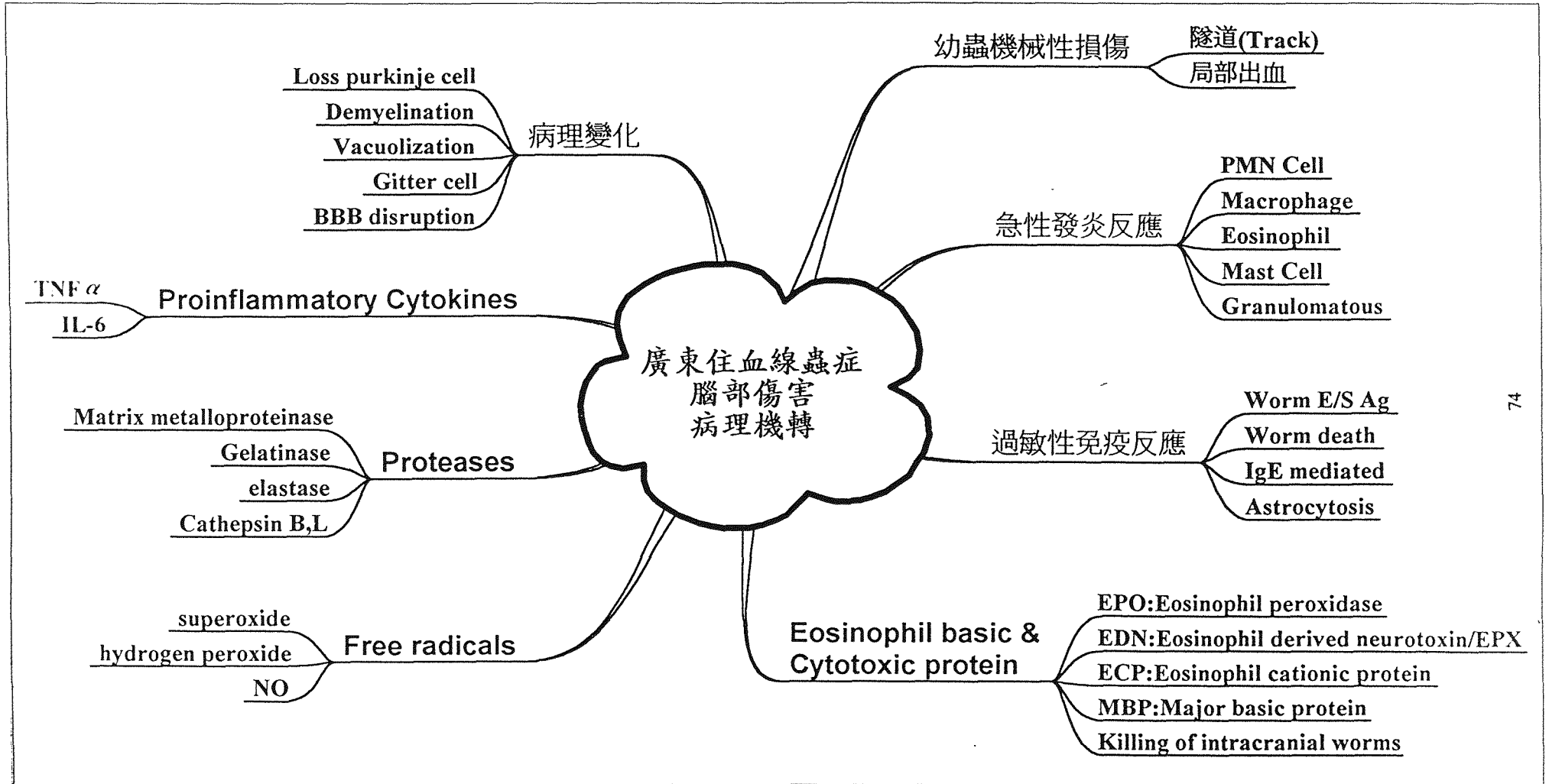
附圖-1：廣東住血線蟲生活史



Redrawn from Alicata, J.E.: Parasites of Man and Animals in Hawaii (Karger, Basel 1969).

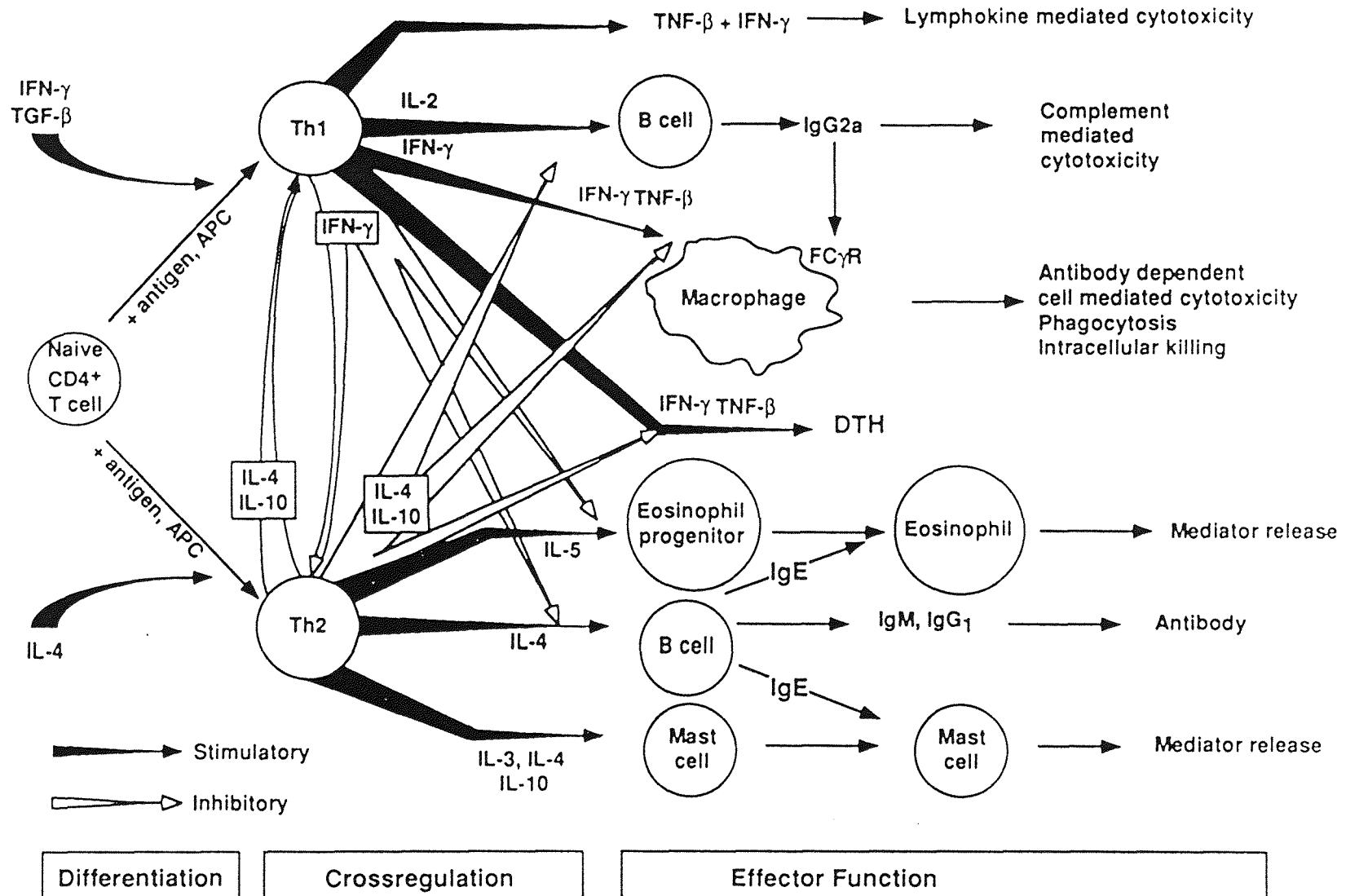
附圖-2

廣東住血線蟲之致病機轉：



附圖-3

廣東住血線蟲感染促使嗜酸性白血球(Eosinophil)增加之免疫機轉：



附圖-4

MMPs 的結構：

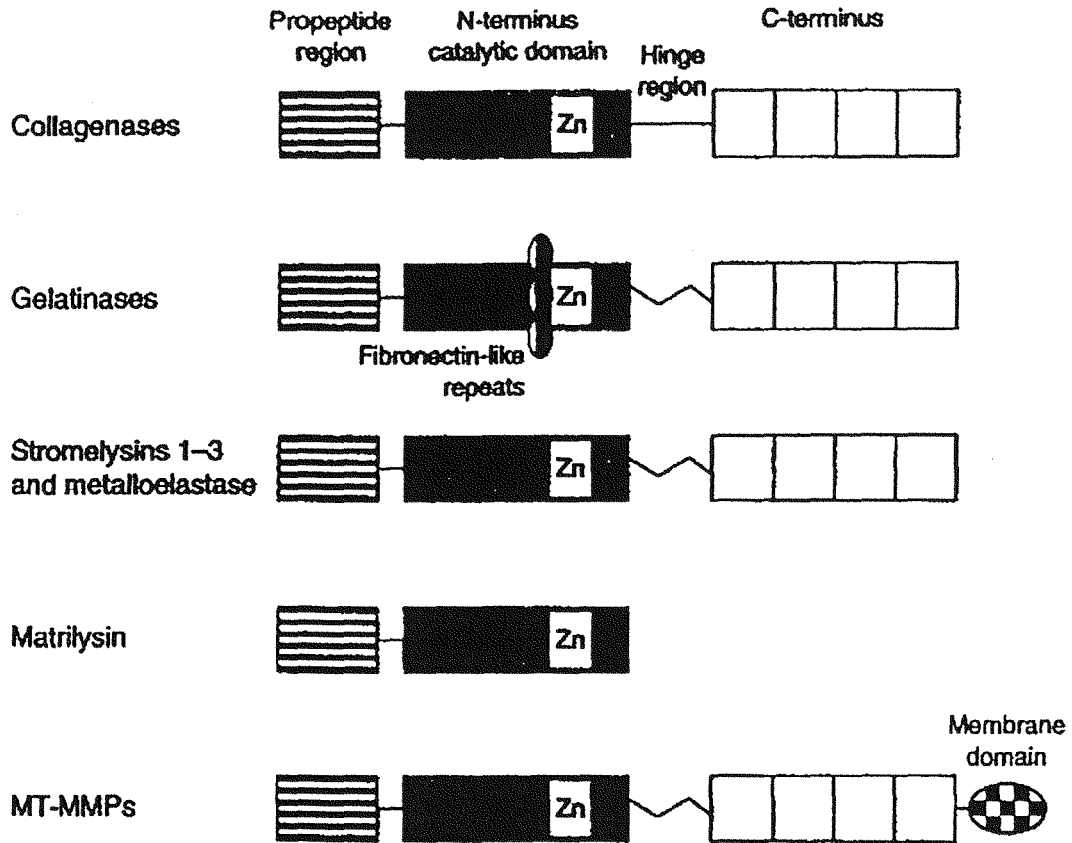


Fig. 4. Modular domain structures of the matrix metalloproteinases (MMPs). The N-terminus propeptide region has about 80 amino acids and is common to all MMPs. An invariant cysteine residue in the propeptide domain ligates to the zinc ion (Zn) of the catalytic domain and blocks its activity. The C-terminus domain, present in all MMPs except matrilysin, has a high level of homology with members of the hemapexin family. C- and N-terminus domains are connected by a linker region or hinge that is short in collagenases and long in other MMPs².

附表-1

MMPs 種類：

TABLE 1. Members of the matrix metalloproteinase (MMP) family

Group	Members	MMP number	Main substrates
Collagenases	Interstitial collagenase	MMP-1	Fibrillar collagens
	Neutrophil collagenase	MMP-8	Fibrillar collagens
	Collagenase-3	MMP-13	Fibrillar collagens
	Collagenase-4	MMP-?	Not known
Gelatinases	Gelatinase A	MMP-2	Gelatin, Types IV, V collagens, fibronectin
	Gelatinase B	MMP-9	Gelatin, Types IV, V collagens, fibronectin
Stromelysins	Stromelysin-1	MMP-3	Laminin, non-fibrillar collagens, fibronectin
	Stromelysin-2	MMP-10	Laminin, non-fibrillar collagens, fibronectin
	Matrilysin	MMP-7	Laminin, non-fibrillar collagens, fibronectin
	Stromelysin-3	MMP-11	α 1 proteinase inhibitor (serpin)
MT-MMPs	MT1-MMP	MMP-14	Pro-MMP-2, collagens, gelatin
	MT2-MMP	MMP-15	Pro-MMP-2, collagens, gelatin
	MT3-MMP	MMP-16	Pro-MMP-2, collagens, gelatin
	MT4-MMP	MMP-17	Pro-MMP-2, collagens, gelatin
Others	Matrilysin	MMP-12	Elastin
	Enamelysin	MMP-?	Not known
	Xenopus MMP	MMP-?	Not known
	Not known	MMP-19	Aggrecan

Abbreviations: MMP, matrix metalloproteinases; MT-MMPs, membrane-type matrix metalloproteinases. There is no MMP-4, -5 or -6. MMP-? refers to members where the numerical designation has not been assigned.

附表-2

TIMPs 種類：

TABLE 2. Properties of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)*

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Chromosome gene location (human)	Xp11.23-11.4	17q23-25	22q12.1-13.2	?
Protein (kDa)	28	21	24	22
RNA (kb) [†]	0.9	3.5(1.0)	4.5(2.8,2.4)	1.2
Major sites	Ovary, bone	Lung, brain	Kidney, decidua, brain	Brain, heart
Expression	Inducible	Largely constitutive	Inducible	?
Predominant form of expressed molecule	Secreted	Secreted	ECM-associated	Secreted
Pro-MMP complex	MMP-9	MMP-2	MMP-2	?
Inhibition of MT-MMP	No	Yes	Yes	?
Inhibition of gelatinases	Yes	Yes	Yes	Yes

*Reviewed in Refs 2,3. †, numbers in brackets denote possible splice variants. Abbreviations: ECM, extracellular matrix; MMP, matrix metalloproteinases; MT-MMP, membrane-type matrix metalloproteinases; ?, unknown.

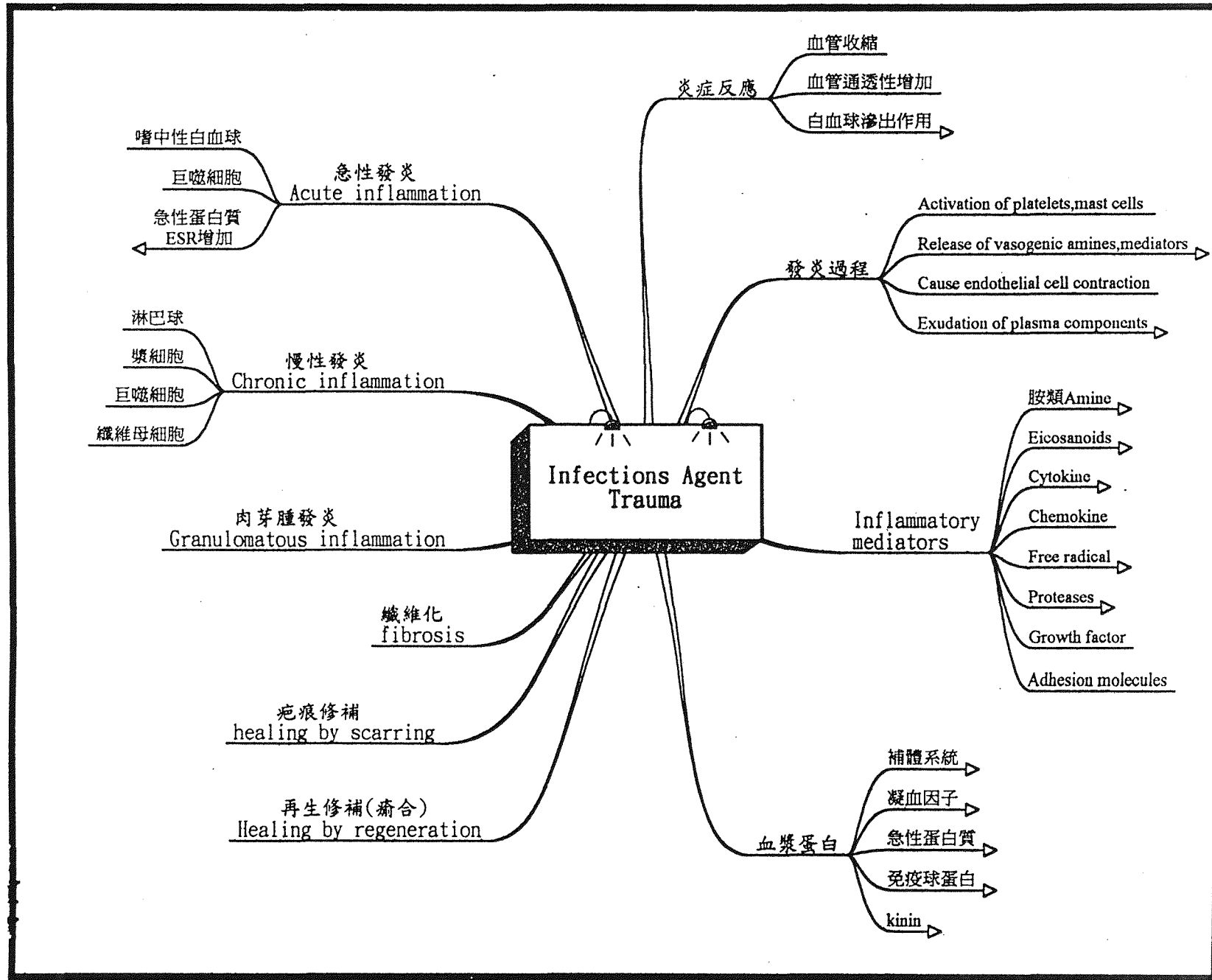
附表-3

MMPs 正常生理及病理上之功用：

TABLE III

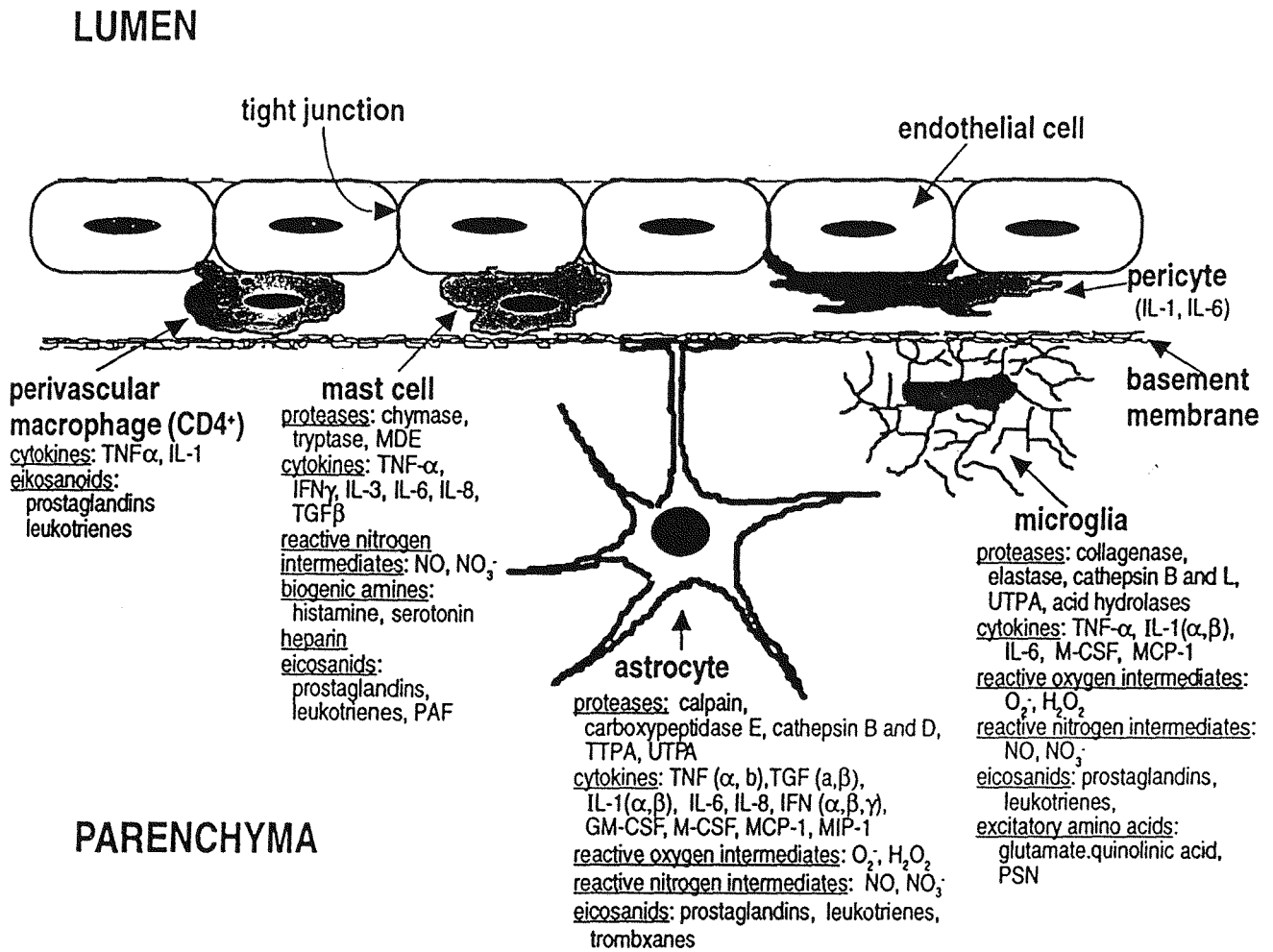
Matrix Metalloproteinase Involvement in Tissue Resorption/Degradation	
Normal Process	Pathological Process
Ovulation	Cancer invasion
Endometrial cycling	Tumor metastasis
Blastocyst implantation	Rheumatoid arthritis
Embryogenesis	Osteoarthritic cartilage
Salivary gland morphogenesis	Periodontal disease
Mammary development/ involution	Wound/fracture healing
Cervical dilatation	Fibrotic lung disease
Fetal membrane rupture	Liver cirrhosis
Uterine involution	Corneal ulceration
Bone growth plate	Gastric ulcer
Bone remodeling	Dilated cardiomyopathy
Angiogenesis	Aortic aneurysm
Tooth eruption	Atherosclerosis
Hair follicle cycle	Otosclerosis
Macrophage function	Epidermolysis bullosa
Neutrophil function	

From Woessner JF Jr.: The family of matrix metalloproteinases. Ann NY Acad Sci 1994;732:14, with permission.



附圖-6

腦部發炎反應後各種媒介質(Mediator)的產生



Ref: Journal of Neuroscience Research 51:423-430, 1998

附圖-7

前列腺素的合成

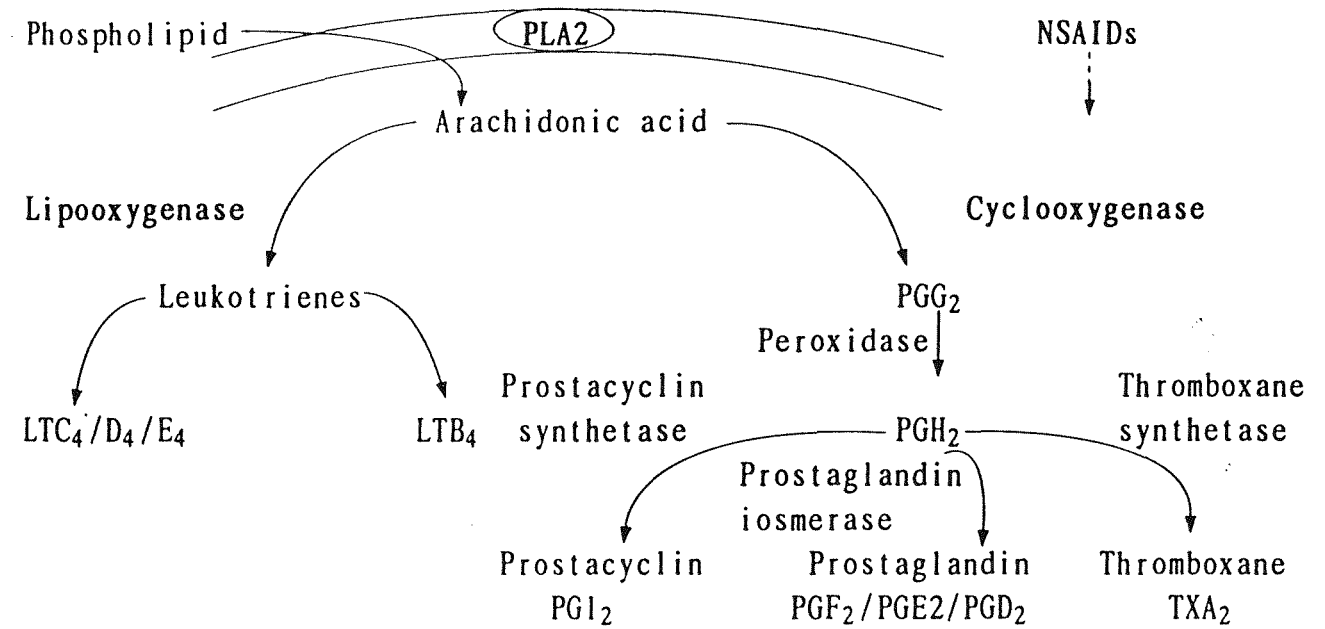
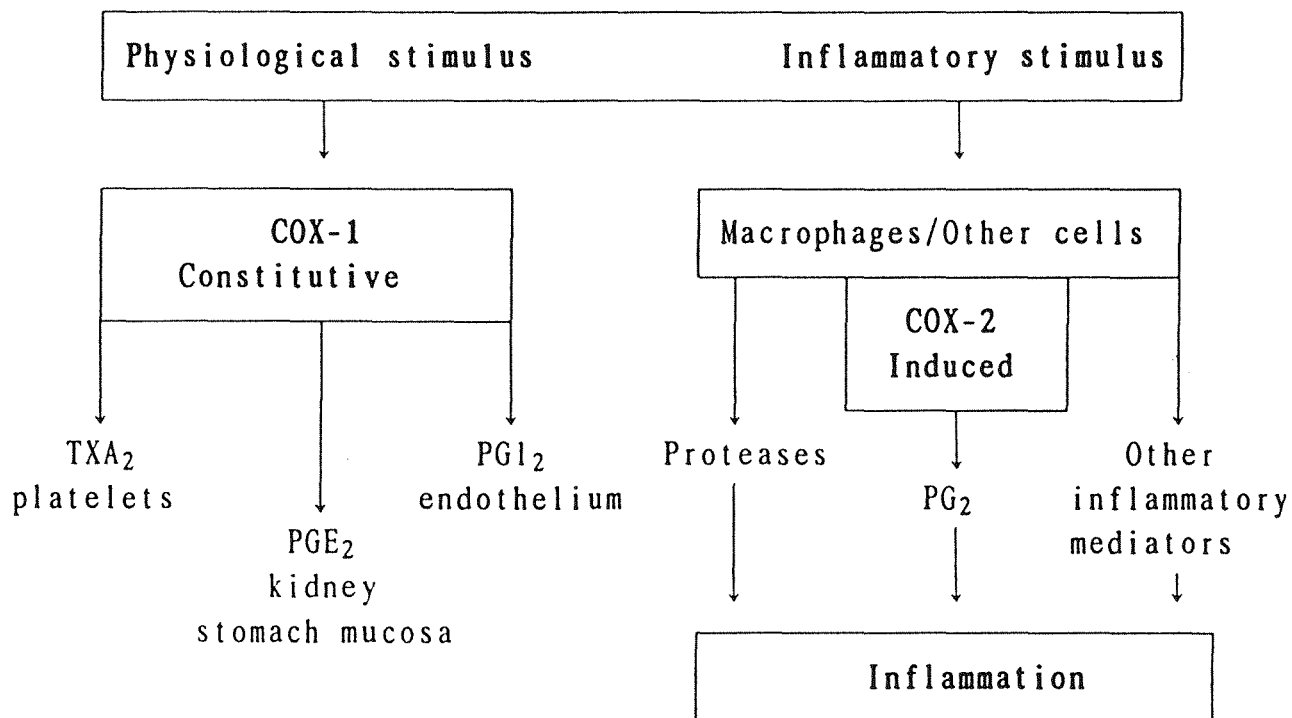


圖-7. 前列腺素合成與 NSAIDs 的作用

(註) PLA₂:phospholipase A₂; LT:leukotriene; PG: prostaglandin; TX:thromboxane.

附圖-8

COX-1 與 COX-2 於前列腺素合成的角色



圖·8. COX-1 與 COX-2 於前列腺素合成的角色

(註) PLA₂:phospholipase A₂; LT:leukotriene; PG: prostaglandin; TX:thromboxane.

附圖-9

類固醇(Glucocorticoids)與非類固醇類藥物(NSAIDs)抑制發炎反應之機轉

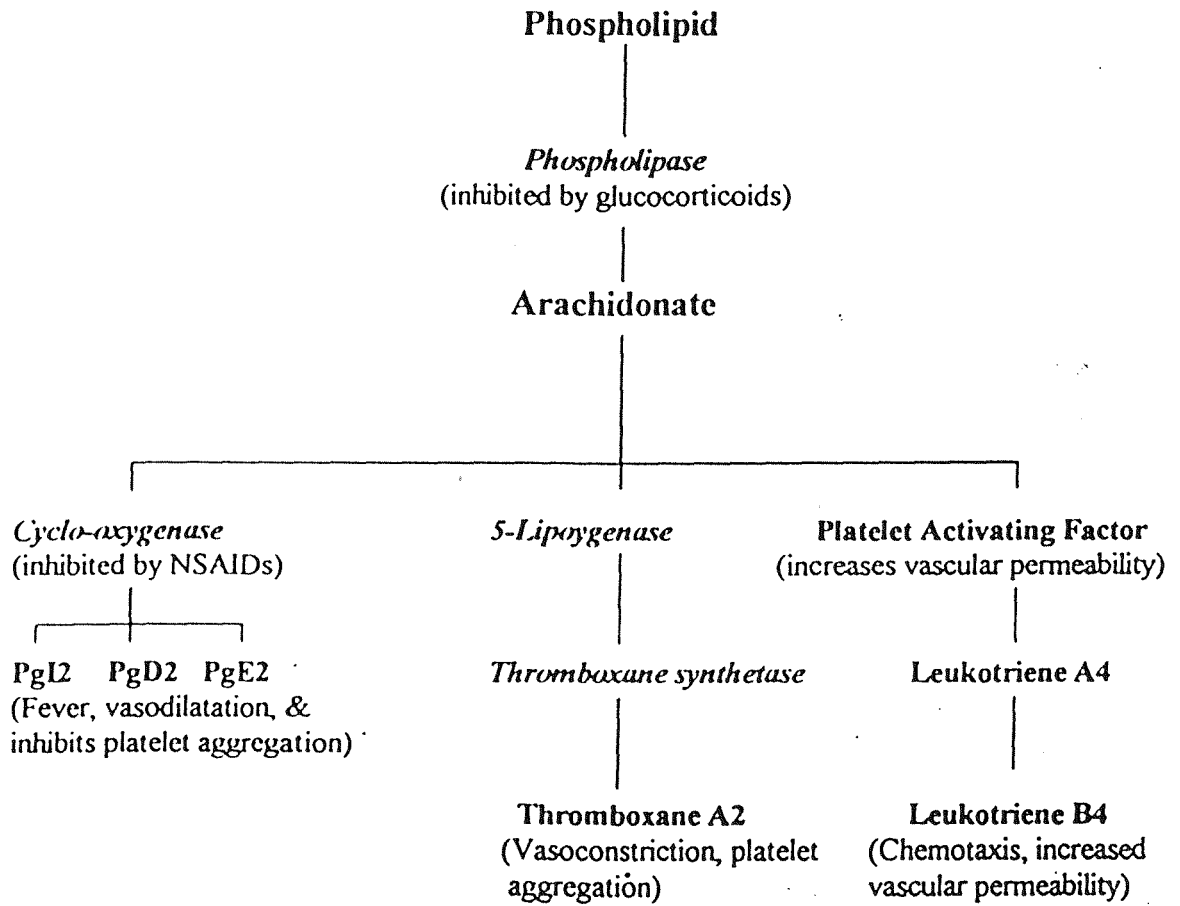


FIGURE 9. Some major eicosanoid pathways. (Key enzymes are shown in italics.)