

R
008.8
1134
88

私立中山醫學院 生化研究所

碩士論文

感染廣東住血線蟲之小白鼠腦組織中
誘導型一氧化氮合成酶及細胞核原致癌基因之表現

Expression of nitric oxide synthase
and nuclear proto-oncogenes in
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：張宏基 (Hung-Chi Chung)

參考書恕不外借

中華民國八十八年六月

中山醫學院圖書館



C055216

授權書

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 生物化學研究所 _____ 組
87 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：感染廣東住血線蟲之小白鼠腦組織中誘導型一氧化氮合成酶及細胞核
原致癌基因之表現。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要,授予國家圖書館,本人畢業學校及行政院國家
科學委員會科學技術資料中心,得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路,並
與台灣學術網路及科技網路連線,得不限地域時間與次數,以光碟或紙本重製發
行。

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,得不限地域時間與次數以微縮,光碟重製後發行,並得享該中心微縮小組
製作之研究報告,獎勵代表作,博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本
論文因涉及專利等智慧財產權之申請,請將本論文全文延後至民國____年____月
後再公開。

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。

指導教授姓名：李秀雄

研究生簽名：張宏基 學號：
(親筆正楷)

日期：民國 88 年 12 月 28 日

- 備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選,本人同意視同授權。
2. 授權第二項者,請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國 ____ 年 ____ 月 ____ 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定,任何單位以網路,光碟與微縮等方式整合國內學術資料,均須先得到著作財產權人授權,請分別在三種利用方式的同意欄內勾選並填妥各項資料.
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權,授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用;反之即為專屬授權,如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人,請勿簽署本授權書.
3. 授權人的權利與義務:
在美國授權博碩士論文予 UMI 公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行,須交付美金 45 元的出版費,銷售年逾七件以上時得享收入 10% 的權利金約美金 20 元;在國內本計畫之經費全數由政府支應,收入亦應歸國庫,為答謝您的支持,科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告,獎勵代表作,博碩士論文三檔為限),請逕洽本案聯絡人,地址電話詳如第五項.義務方面唯一要注意是,著作人日後不可以主張終止本授權書,但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為.
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益:
在個人方面,您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年,實證已逾百年),也因為您的授權,使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索,您的論文將因而被充分利用.在國家總體利益方面,紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害,圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞,唯有賴政府全面性的整合,借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益,回憶您過去尋找資料之不便經驗,學弟與學妹確實須要您的論文與授權書.
5. 本案聯絡電話:(022)7377746 江守田,王淑貞
地址:台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名: 張宏琴 聯絡電話: (07)2312512
地址: 臺南市南進三街 19 號

本論文為中山醫學院授與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論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

中興大學獸醫學系教授

王俊秀 博士

王俊秀

高雄醫學院醫學系教授

顏全敏 博士

顏全敏

中山醫學院生物化學研究所教授

王朝鐘 博士

王朝鐘

中山醫學院醫學系教授

蕭松瑞 博士

(論文指導教授)

蕭松瑞

中山醫學院醫學系教授

李秀雄 博士

(論文指導教授)

李秀雄

學生張宏基論文題目為感染廣東住血線蟲之小白鼠腦組織中誘導型一氧化氮合成酶及細胞核原致癌基因之表現,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,並經由其指導教授核閱無誤.

指導教授: 李秀雄 博士

簽名: 李秀雄

蕭松瑞 博士

簽名: 蕭松瑞

誌 謝

再度踏入學習的生活中,其心中之感受是百感交集,在這三年的研究生涯中,使我能繼續成長,日子也過的踏實和愉快,也讓我重享做學生的樂趣,並又可得到相當多的知識,在這三年當中,我要感謝我的賢內助 鍾秀絨 小姐,由於有她的鼓勵與支持,並不辭辛勞的照顧家庭及兒女,才能使我安心的學習而完成研究生涯,在此深深地向她說聲“謝謝!”。

當然一個人的成就,除了背後的賢內助外,更需要有很多的教導和協助,那就是指導我完成論文的恩師群—寄生蟲學科主任 李秀雄教授,生化所 蕭松瑞教授,生化所所長 王朝鐘教授...等,在學識上的傳授及實驗上的指導,同時也要感謝寄生蟲學科 徐玲玉老師‘麗如,生化學科 林玉玲老師‘李妙真老師‘倩玲小姐,對實驗的協助與幫忙,還有滄澤‘楊恕奇‘李志清對本論文之細心編輯,最後我要說一句“要感謝的人非常多,也無法一一列名,僅以此論文之出版向所有鼓勵我,關心我的師長及朋友大聲地說謝謝!”。

| | |
|--|----|
| 中文摘要 | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 前言 | 3 |
| 第一章 分佈、生活史 | 5 |
| 一、廣東住血線蟲之分佈 | 5 |
| 二、中間宿主 | 6 |
| 三、廣東住血線蟲之生活史 | 8 |
| 四、病理及症狀 | 9 |
| 五、控制及預防 | 10 |
| 第二章 PY-54、PKC、MEK、ERK、iNOS 和 C-JUN、C-FOS、C-MYC 之關係 | 11 |
| 一、PY-54 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌基因之關係 | 11 |
| 二、PKC 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌基因之關係 | 12 |
| 三、MEK 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌基因之關係 | 19 |
| 四、ERK 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌基因之關係 | 20 |
| 五、iNOS 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌基因之關係 | 21 |
| 六、NFκ-B 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌基因之關係 | 23 |
| 第三章 研究動機 | 25 |
| 研究架構 | 26 |
| 第四章 材料與方法 | 27 |
| 一、材料 | 27 |
| 二、方法 | 29 |
| 第五章 實驗結果 | 48 |
| 一、西方墨點吸漬法偵測 PKC、PY-54、MEK、ERK、iNOS、c-JUN、c-FOS、c-Myc、NFκ-B 的表現 | 48 |
| 二、腦部組織病理切片染色觀察 | 50 |
| 三、免疫組織化學染色觀察 | 51 |
| 第六章 討論 | 52 |
| SUMMARY | 59 |
| REFERENCES | 84 |

中文摘要

為探討廣東住血線蟲的致病機轉，本研究以雄性 ICR 鼠為實驗動物，研究分實驗組與對照組，實驗組餵食廣東住血線蟲第三期幼蟲 30 隻，感染後 1、2、3、4、5、6 週均以斷頭方法，分別取其血液及腦組織，藉生化電泳分析(SDS-PAGE)、西方墨點(Western-blot)分析腦部是否有特異性蛋白出現及藉冷凍組織切片分析其 py-54、MEK、ERK、iNOS 的活性表現以及用 HE stain 觀看其組織變化情形。

實驗結果：在實驗組與對照組比較時，實驗組 py-54、MEK、ERK、iNOS 和 HE stain 在第 1、2 週並未有明顯表現，而 py-54、MEK、iNOS 和 HE Stain 在第 3、4、5 週有明顯的表現，並且在第 6 週時慢慢消失。在 HE stain 中其組織發炎表現現象和包埋切片及 Western-blot 所觀察到的具一致性。

由以上結果得知廣東住血線蟲，對一些癌化訊息傳遞是有表現而讓組織產生發炎現象。

Abstract

The purpose of this study was to investigate the pathogenic mechanism of Angiostrongylus cantonensis (A.c) male ICR mice were used as experimental animals and divided into experimental group and control group. Each mouse in the experimented group was fed with 30 third stage larvae of Angiostrongylus Cantonensis certain number of animals were sacrificed each week after infection till the sixth week to collect blood and brain tissues which were further analyzed by SDS-PAGE and Western blot to identify the change in protein expression the pathogenic mechanism was also dissected from the analysis of py-54 · MEK · ERK and iNOS levels in frozen sections histonic changes were. Observed by HE.

The result showed no significant express of stains py-54 · MEK · ERK and iNOS levels in both experimental and control groups. First week however on the 2nd 3rd and 4th weeks the protein levels of these signal transducers in experimental mice in creased significantly, followed by a gradual decline on the 5th and 6 weeks. In addition, HE stain showed inflammatory reaction that was cousistant with the results of Western blot and immuno cyto chemistry.

According to the result described above. It indicate that A.c infection induces the expression of some signal transducers that night leads to the inflamation of tissues.

前言

在東南亞和太平洋島嶼一些國家，廣東住血線蟲 (*Angiostrongylus cantonesis*) 是導致當地居民嗜酸性球腦膜炎和嗜酸性球腦膜腦炎 (Eosinophilic meningitis or meningoencephalitis) 的主要病因。最早發現這種寄生蟲的是一位中國學者陳心陶先生，1933 年他在廣東省近郊調查玄鼠和褐鼠的寄生蟲時，在鼠肺中發現此蟲，到了 1949 年才由 Dougherty 正式命名為廣東住血線蟲⁽¹⁾。

台灣的首位病例是在 1945 年由野村(Nomura)和林(Lin)提出一位 15 歲的日本男孩疑似腦膜炎死亡，後來在其腦脊髓液中發現蟲體，經橫川(Yokogawa)證實為廣東住血線蟲。

由於台灣地處氣候濕熱的亞熱帶及熱帶，非常適合廣東住血線蟲中間宿主生存，而國人又喜食螺肉，常因此而感染廣東住血線蟲症，所以廣東住血線蟲在台灣是一種極重要的人畜共通寄生蟲(Zoonotic parasite)，報告指出每年雨季來臨後必有許多的人體病例。台灣至目前已有數百名的人體病例，因此廣東住血線蟲症在台灣為一種不容忽視的寄生蟲疾病^(1,2)。

近年來台灣地區學者對廣東住血線蟲的研究多集中在化學

治療及廣東住血線蟲在不同宿主所引起的反應，而隨著社會的進步，台灣人民生活富裕，愈來愈注重一些引起癌症的因子，而本實驗的目的，便是在實驗室中以人工的方式感染小白鼠，觀察其一些引起癌症的傳遞因子是否有所變化，或其變化週期如何，並且察看其病理上的變化如何。

第一章分佈、生活史

一、廣東住血線蟲之分佈

廣東住血線蟲主要分佈在一條狹長的熱道帶(Tropical belt)上，大概是由南緯 23 度到北緯 23 度，東經 100 度到西經 150 度。為熱帶或亞熱帶，中度到豐富的降雨量。其涵蓋的範圍從馬達加斯加到模里西斯東部經印度、錫蘭、東南亞、中國南部、菲律賓、澳洲北部最東可到夏威夷及大溪地，在琉球、日本、澳洲之昆士蘭也有廣東住血線蟲之分佈。(圖 1)

二、中間宿主

在台灣廣東住血線蟲的中間宿主有五種軟體動物，其中有二種陸生螺類(*Achatina fulica* and *Bradybaena sinilaris*)、二種淡水生螺類 (*Cipangopaludina chinensis* and *Ampullarium canaliculatus*)及二種蛞蝓 (*Laevicavlis aote* and *Vaginulus pelbeius*)。保幼宿主則包括了一種 *Planaria*. sp. 及二種蛙類 (*Ranatigrina* and *R. plancyi*)。

在台灣這些廣東住血線蟲的中間宿主中最重要的應屬 *A. fulica*，即一般所稱的非洲巨螺。Chen 1971 年所發表對中間宿主的調查報告指出非洲巨螺的廣東住血線蟲寄生率與其體形大小成正比^(1,2)。

廣東住血線蟲(*Angiostrongylus cantonesis*)的生活史中，除自然確定宿主外，還需上述一個軟體動物(mollusca)當為中間宿主。Chen 逾 1933 年首先在廣東的家鼠及溝鼠肺動脈及心臟發現成蟲，又經許多學者研究報告指出台灣目前有七種野鼠發現感染廣東住血線蟲，即 *Rattus coxinga*、*R. rattus*、*B. indica menorivaga*、*R. rattus midanensis*、*R. rattus rufescans*^(1,2)。

在台灣廣東住血線蟲的中間宿主為非洲巨螺(*Achatina fulica*)。除非洲巨螺外，尚有許多陸螺、水螺(*Terrestrial and aquatic snails*)及蛞蝓(*Slugs*)均可當為其中間宿主⁽¹⁾。

廣東住血線蟲第一期幼蟲在中間宿主體內也因宿主的種類不同而有不同的情形。以 *Ampuilarium canaliculatus* 及 *Laevicaulia alte* 為例，在 *A. canaliculatus* 體內有 52 % 的第三期幼蟲分佈在肺部，42 % 分佈在其他臟器內，少數第三期幼蟲則分佈在足部。但在 *L. alte* 所有的幼蟲都分佈在肌肉部分。由組織切片則可發現其分佈在肌肉附近上皮細胞處⁽³⁾。

三、廣東住血線蟲之生活史

廣東住血線蟲的生活使經實驗室感染而探知其途徑。在老鼠糞便排出第一期幼蟲經由軟體動物吃入或蟲體直接穿入而感染，經二週左右，在其體內發育成爲第三期幼蟲。大鼠(Rat)吃入含第三期幼蟲的中間宿主或保幼宿主(paratenic hosts)後，蟲體穿過腸壁，經腸系膜微血管或乳糜管移行至幼心室，經由肺循環至左心室，在進入體循環，而於感染後 17 小時左右可至大腦半球(cerebral hemisphere)及脊髓(spinal cord)，向腦表面移行且停留在蜘蛛膜下腔，約在感染後 14 天左右。隨後青年期蟲體經擴張的大腦靜脈帶至右心及肺動脈，進一步發育至成蟲，而感染後 45 天，即可在糞便中找到第一期成蟲⁽⁴⁾。

四、病理及症狀

人類感染廣東住血線蟲後引起之臨床症狀，主要特徵為嗜伊紅性腦炎或腦膜炎，確實診斷仍需依據腰椎穿刺(lumbar puncture)取得腦脊髓液中檢出青年期(young adult worm)蟲體及偶可由檢眼鏡於眼前房檢查時發現蟲體，此外亦需參考臨床綜合症狀如劇烈頭痛，噁心，嘔吐，發燒，嗜眠，頸部僵直，Kering's sign， Brudzinske's sign，四肢麻痺及某些神經反射的喪失或降低等症狀。

五、控制及預防

寄生蟲的預防及控制應注意防止寄生蟲的繁殖及斷絕寄生蟲傳入人或中間宿主體內之途徑，因此控制廣東住血線蟲的感染有下列方法：

一、 推行衛生教育：

宣傳本病的傳播途徑，讓一般民眾瞭解吃螺肉的危險性。

二、 消滅廣東住血線蟲的中間宿主：

消滅廣東住血線蟲的中間宿主如非洲蝸牛...等。

三、 普遍檢查及治療：

如有流行產生應普遍檢查及治療患者，以減少此種寄生蟲的感染。



第二章 py-54、PKC、MEK、ERK、 iNOS 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 之關係

一、 py-54 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌 基因之關係

py-54 分子量 120Kda，在受到外來因素(如細菌、病毒、寄生蟲...等等)的刺激後便使它產生磷酸化，而在磷酸化之同時有可能使 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 α 的活性上升，而在磷酸化活性上升後便會使下游的一些 mitogen-activated protein kinase family(MAPK family)如: MEK、ERK、p46^{JNK}/SAPK、p38 MAPK 的活性也跟著被磷酸化後上升⁽⁵⁾，在這種情況之下便會促使 iNOS 的活性上升，進而促進 NO 大量的釋放(產生)，NO 是一種自由基，其能促使一些 proto-oncogene 如: c-JUN、c-Myc、c-FOS 轉變成 oncogene^(6.7)。

二、PKC 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌 基因之關係

在身體或組織受到一些致癌物 (如:細菌、病毒、寄生蟲)的
刺激後會導致白血球的浸潤。而白血球在慢性發炎的部位會產
生過量的 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及其他自由基，而這些活性氧系會導致細
胞或組織劇烈的傷害。組織傷害會將金屬離子自其在細胞中的
儲存位置釋出，而導致 OH^{\cdot} 的產生。當過量形成 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 時，細
胞內的遺傳物質如 DNA 便會受到傷害甚至斷裂。

當氧化平衡傾向氧化狀態的一邊時，對刺激細胞分裂是一個
有效的指標⁽⁵⁾。因此喪失了良好的氧化平衡可能導致細胞轉化為
不可控制的複製，甚至是癌症的形成⁽⁶⁾，下面就對活性氧與自
由基之致癌作用作簡單介紹:

- (1) · 所生成的物質，如 H_2O_2 ，屬於腫瘤促進劑中的一種。
- (2) · 傷害生物體中的大分子⁽⁹⁾。
- (3) · 促使癌細胞轉移⁽¹⁰⁾。
- (4) · 經活化蛋白質激酶 (protein kinase)。
- (5) · 活化與生長及分化相關的基因。
- (6) · 影響細胞內及細胞間的交流作用。
- (7) · 誘導致癌基因之活化和抑癌基因之不活化。

Protein kinase C (PKC)是 1977 年首先由日本學者 Nishizuka 等人，從牛的小腦所發現異於 protein kinase A 的 protein kinase⁽¹¹⁾，此後即受到廣泛地重視與研究，因而得知 PKC 是一種鈣和磷脂依賴的蛋白激酶⁽¹²⁾，是由肌醇磷脂 (inositol phospholipid 7 ip)所分解而來；在穿透細胞膜的訊息傳遞系統上扮演一個相當重要的角色^(13,14)，此酶的活化需要細胞膜的磷脂和 diacylglycerol (DAG)^(15,16)，當細胞受到外界刺激時，外來物與膜上相關接受器作用後，經由受體的活化可進而活化 phospholipase C(PLC)，可將細胞膜上的肌醇磷脂 (inositol phospholipid) 分解，產生第二訊息傳遞物 (second messengers)：diacylglycerol (DAG)和 inositol triphosphates (IP3)。DAG 是一種與細胞內傳遞訊息有關的物質⁽¹⁷⁾，因此當時認為 PKC 可能與細胞內傳遞訊息(signal transduction)的作用有關，此論點經由發現血小板所釋放的 serotonin 可被 PKC 增強而得到證實⁽¹⁸⁾。IP3 溶解於細胞質促使儲存的鈣離子釋放兩增加細胞中的鈣離子濃度，親脂性的 DAG 則留在膜上，在此時細胞質內的 PKC 會移動到細胞膜上與 DAG-鈣、磷脂質形成複合體^(15,16,19)，當 PKC 轉位到膜上時會造成細胞內特殊蛋白質，例如 p80/87 kDa、68 kDa 或 Marcks 蛋白等的磷酸化而引起訊息

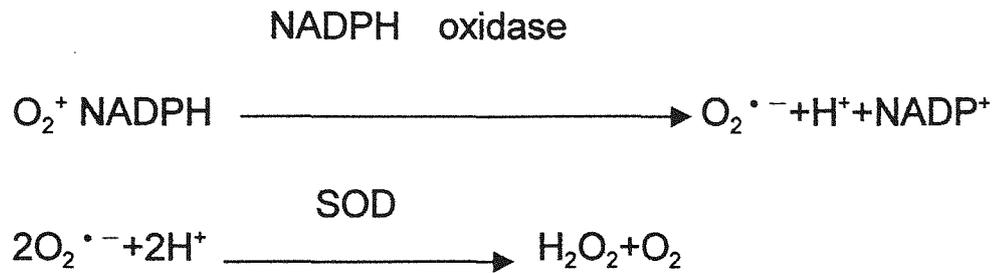
傳遞⁽²⁰⁾。

而當 PKC 引發了與細胞開始進入分裂週期有密切關係的原
致癌基因(proto-oncogene) c-FOS、c-JUN 的表現，所產生的
JUN-FOS complex(AP-1) 便能聳動多種基因的轉譯作用
(transcription)，而帶動整個細胞進入活躍狀態，使細胞產生增
殖(proliferation)和分化(differentiation)⁽²¹⁾。因此 PKC 被認為有
促進細胞增殖、分化作用、基因表現和腫瘤催化作用⁽²²⁾，截至
目前我們對 PKC 的了解，尚可歸納出至少約有 12 種的異構體
(isoforms)(α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 、 κ 、 λ 與
 μ)⁽²³⁾，而各種異構體在細胞內負責不同訊息的傳遞工作，也具
有不同調控的基因表現和細胞增殖的能力⁽²⁴⁾。而依照參與 PKC
活化所需的輔因子(cofactor)的不同，可將異構體區分為三類
^(16,18,25)：第一類為鈣離子依賴性 (Ca^{2+} -dependent)的異構體，
如 α 、 β I、 β II 稱為 cPKCS (conventional PKCs)，第二類為
不需要鈣離子 (Ca^{2+} -independent)參與活化反應的異構體，如
 δ 、 ϵ 、 η 、 θ 與 μ ，稱為 nPKCs(novel PKCs)，第三類為不
需要鈣離子(Ca^{2+} -independent)及磷脂質(diacylglycerol 或
phosphatidyl-serine)參與活化反應的異構體，如 ζ 、 κ 、與 λ ，
稱為 aPKCs (atypical PKCs)。

在細胞訊息傳遞中，PKC 具有調節基因表現及細胞增殖等的作用，而不同的異構體間由於結構的不同，其酵素特性、活化方式及所表現出來的生理功能便有所不同。

而一旦 PKC 被活化，將進一步促使細胞內的許多蛋白質磷酸化，如 histone⁽²⁶⁾、EGF receptor⁽²⁷⁾、insulin receptor⁽²⁸⁾、transferrin receptor、轉譯作用二號起始因子(elf2)、ribosomal protein S6..等，而引發一連串細胞內的訊息傳遞途徑。在一些細胞外的訊息如生長因子 (growth factors)、荷爾蒙 (hormones) 和神經傳導物質(neuro-transmitters) 的傳遞穿過細胞膜的反應中，PK 扮演著一個重要的角色^(29,30)。

PKC 的結構包括有：分子量約 50 kDa 具 protein kinase 活性區及分子量約 30-35 kDa 的調節區，調節區有結合位置，可與 DAG、鈣、磷脂質結合。PKC 與 Ca²⁺可共同增強激發 H₂O₂ 的生成⁽³¹⁾，另外，PKC 經過磷酸化的活化之後促使非活化型的 NADPH oxidase 轉變成活化型的 NADPH oxidase，以進行：



而使得 H_2O_2 增加。 H_2O_2 在人體被發現會造成 DNA 的損傷。在 Rochat^(32,37) 等的研究中顯示 H_2O_2 除了如前述會被 PKC 所引發而增加外，在 H_2O_2 增加的情況之下， H_2O_2 也會反過來刺激 PKC 的活性而促進訊息傳遞，另外 Rao⁽³⁸⁾ 等則在 vascular smooth muscle cell 的 model 中發現 H_2O_2 會經由刺激 PKC 的活化而刺激 c-jun(protooncogene，原致癌基因的一種) 進行 transcription，而 Rao⁽³⁹⁾ 也在另一項研究中指出， H_2O_2 也會經由刺激 PKC 的活化而刺激 c-fos 的表現。

就 PKC、 H_2O_2 與 proto-oncogene(如 c-jun、c-fos、c-myc 等等)的關係而言，proto-oncogene 是指存在於正常細胞的一段基因，平時有其正常的生理功能，但當細胞受到外界刺激後，會促使 proto-oncogene^(6,7) 在很短的時間內被激發而大量表現故又稱為早期反應基因。基因過度活化的結果很可能會使得細胞增生或變形，亦有可能因病毒的感染而使得某段基因被插入、漏失導致生成融合蛋白質，而參與癌症的形成^(6,7)。

1987年 Maki⁽⁴⁰⁾在小雞自發性肉瘤細胞中分離出一種反轉錄病毒，其中含有一段具有轉形能力的基因，命名為 v-JUN，其蛋白產物的 C 端與酵母菌的轉錄因子 GCN4 的 DNA 結合區具有相當高的相似性，而在正常細胞中也存在著一段相對應的 c-JUN 原致癌基因，它是一個 early response gene，在遇到促細胞分裂劑(mitogen)刺激的細胞生長時，c-JUN 就會被活化，其基因產物為構成轉錄因子 AP-1 (Activator protein 1)的其中成員，執行細胞內的轉錄作用⁽⁴¹⁾。

v-FOS 最早是從鼠類的反轉錄病毒 osteosarcoma virus 中所分離出來的，同樣地，在人體的正常細胞中亦有相對應的 c-FOS 原致癌基因具有調節轉錄的功能⁽⁴²⁾。c-FOS 基因的表現是細胞受刺激後早期的反應，c-FOS 基因的表現受其上游三個調節區的控制，此三個區域分別為①TATA box。②c-FOS 基本表現控制區，其包含一段受 cAMP 調控的區域(CRE)與一段 GC rich 的區域。③加強表現區，此區內含有一段對稱序列 DSE，又稱 TRE，主要受到過氧化物、生長因子、TPA 而表現^(43,44)。

根據以往研究推測 H₂O₂ 可能是經 PLA2 dependent 的 arachidonic acid 釋出及經由 lipoygenase cytochrome p450 monooxygenase 系統的傳遞而使得 c-jun mRNA 的表現增加，

在這種傳遞之間，PKC 可能也參與其中，而在 H_2O_2 的刺激下，
c-FOS 與 c-Myc 表現增加的機轉可能也與 c-JUN 的路徑相同。

三、MEK 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌 基因之關係

在身體或組織受到一些致癌物(如細菌、病毒、寄生蟲...等等)的刺激後會導致蛋白質之磷酸化，進而促使一連串的細胞進入活躍狀態，使細胞產生增生 (proliferation) 和分化 (differentiation)，如果過量的刺激便會使一些正常細胞過度增生和分化而造成癌症。

MEK 是 MAP kinase (mitogen-activated protein)和 ERK kinase (extra cellular signal-regulated protein kinase)之總稱⁽⁴⁵⁾，MEK 能在 T183 和 Y185 使 ERK2 產生磷酸化。

能從 cytes 分離出 45Kda 分子量的 MEK，MEK 能使 serine、threonine、tyrosine 的 residues 產生 autophosphorylation。

在磷酸化的過程中，如果調適得當能使細胞正常生長分化，如果磷酸化過量將促使一些生長因子過度分化，進而促使一些 proto-oncogene 如 c-JUN、c-Myc、c-FOS 被激發而大量表現稱早期反應基因。基因過度活化的結果很可能使得細胞增生或變形而轉成 oncogene^(6.7)。

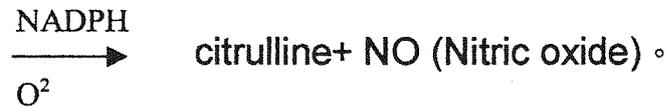
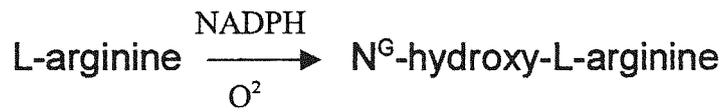
四、 ERK 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌 基因之關係

ERK (extra cellular signal-regulated protein kinase), 分 ERK1、ERK2、ERK3、ERK4。ERK1 和 ERK2 在所有的組織和細胞中都可被發現, 而 ERK3 和 ERK4 在 cytoplasm 和 nuclei 中有少量被發現⁽⁴⁶⁾。

ERK 受到 MEK 作用時, 使其 threonine 183 和 tyrosine 185 的位置被磷酸化, 在正常的情況下其磷酸化能使細胞產生正常的分化, 如受外來因素(如細菌、病毒、寄生蟲...等等)過度的刺激而使其磷酸化過度產生, 便會使細胞產生過度增生 (proliferation) 和分化 (differentiation), 進而使一些 proto-oncogene 如 c-JUN、c-Myc、c-FOS 被激發而大量表現 proto-oncogene 轉變成 oncogene^(6,7)。

五、iNOS 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌基因之關係

NOS(nitric oxide synthetase)有二種 isoforms，便是 iNOS (inducible NOS)和 cNOS (constitutive NOS)。iNOS 之產生在以前就有所研究,是因被 Macrophage 刺激,受 Macrophage 刺激而使 $\text{INF-}\gamma$ 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的活化上升。 $\text{TNF-}\alpha$ 使 iNOS 表現是因為受到 mitogen-activated protein kinase(MAPK) family 的輔助使 transcription factors 而產生活化，MAPK 家族包含有① p42 MPK/ERK2、②p46 c-JUN NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase (p46^{JNK}/SAPK)和③p38 MAPK。在最近幾年研究當中 iNOS 之活化表現也受 $\text{TNF-}\alpha$ / $\text{IL-1}\alpha$ 刺激而產生⁽⁴⁷⁾，但 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\alpha$ 如果無 MAPK 參與,如：p38 MAPK 之輔助便不能使 iNOS 活化增加， $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\alpha$ 如果單一存在也不能使 iNOS 表現，並且還要 MAPK family 之輔助。由以上之關係，得知在外來刺激之下(如寄生蟲)，能使一些機轉產生變化，機轉變化之結果便促使 iNOS 的上升，而 iNOS 又能促使 NO 大量的生成或釋放,其催化 NO 產生如下列步驟：



NO 是一種 free radical，如果 NO 過度上升會使氧化平衡傾向氧化狀態的一邊，此現象是刺激細胞分裂的一個有效的指標，在喪失良好氧化平衡可能導致細胞轉化為不可控制之複製，甚至是癌症之形成。在其有可能形成癌症之過程中，便會活化和增強相關 proto-oncogene 如 c-JUN、c-Myc、c-FOS 轉變成 oncogene^(6,7)。

六、NF κ -B 和 c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌基因之關係

NF κ -B 便是 Nuclear factor κ -binding，NF κ -B 在 cytosol 中經 nuclear translocation signal(NLS)轉至 nuclear，NF κ -B 最初發現於 lymphoid protein，而結合於 GGGACTTCC 之 sequence 上面時，便能促進 Ig κ 基因之提升⁽⁴⁸⁾。

NF κ -B-activating 是可能被① cytokines 如 TNF- α (tumor necrosis factor- α)、IL-2(interleukin-2)。② Mitogens 如 PDGF (platelet-derived growth factor)。③ Bacteria 如 Shigella flexneri。④ Virus 如 Hepatitis B virus(HBV) Human T cell leukemia virus-1(HTLV-1)。⑤ Physical stress 如 UV light。⑥ Oxidative stress 如 Hydrogen peroxide。⑦ Chemical agents 如 okadaic acid 以上等等之因素所刺激而使 NF κ -B 之活性上升。

在 NF κ -B 活性上升以後，其能和① Cytokines and growth factors 如 IL-1B(interleukin-1B)。② Immunoreceptor 如 T cell receptor B chain。③ Acute phase proteins 如 complement factor B、complement factor C4。④ Viruses 如 Human immunodeficiency virus I(HIV-I) 和 Human immunodeficiency virus II(HIV-II)。⑤ Transcription factor and regulators 如 c-

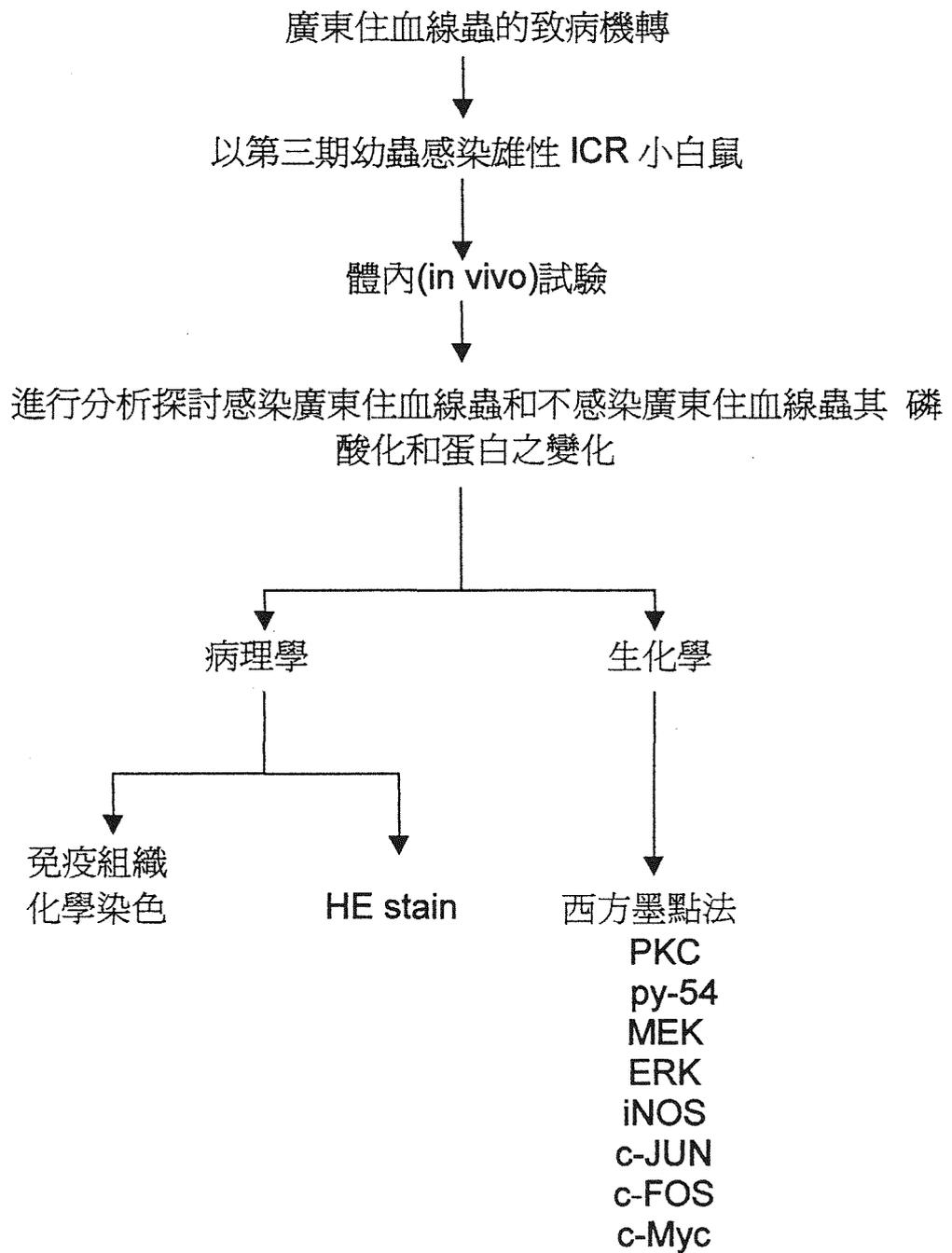
Myc、IKB- α 、IRF-1(Interferon regulatory factor I) 和 IRF-2(Interferon regulatory factor II)，形成 NF κ -B-responsive，進而使這些 gene 之活性上升。

在外來之因素如:細菌、病毒或寄生蟲之入侵，可造成磷酸化活性上升，免疫機轉產生變化，使一些 cytokines 都能提升，如此一來 NF κ -B 便能上升，而 NF κ -B 又能和一些 proto-oncogene 如 c-Myc 相結合，而使其 proto-oncogene 之活性上升，便有可能轉變成 oncogene.

第三章研究動機

廣東住血線蟲在台灣地區是一種重要的人畜共通寄生蟲病。廣東住血線蟲病是由廣東住血線蟲寄生在腦部所造成的寄生蟲病，其能引起劇烈頭痛、噁心、嘔吐、發燒、嗜眠、頸部僵直、四肢麻痺、併生腦膜炎和腦膜腦炎。由於過去研究廣東住血線蟲大都以組織病理學的技術來研究其致病機轉，有鑑於此本篇研究是以各種生化技術評估廣東住血線蟲感染或無感染在小白鼠腦部組織之蛋白變化現象和其磷酸化情形如 **py54**、**MEK**、**ERK**、**iNOS** 和致癌基因 **c-JUN**、**c-FOS**、**c-Myc** 蛋白的表現是否有差異來評估感染廣東住血線蟲和一些癌化現象是否有相關性，以探討廣東住血線蟲的致病機轉。

研究架構



第四章材料與方法

一、材料

(一)、動物試驗

1.第三期幼蟲收集：

感染之第三期幼蟲取自台灣台中非洲蝸牛，將蝸牛之內臟以均質機攪碎，以 1：30 比例加入人工胃蛋白消化液，放入磁性攪拌子在 37°C 恆溫箱以攪拌機攪拌，2 小時後取出用紗布過濾，過濾液以 1：1 生理食鹽水稀釋，靜置 30 分鐘，以後每隔 30 分鐘倒掉一半上清液，再加滿生理食鹽水，重複此步驟直到上清液清澈為止(約 3 小時)，再用滴管吸取沉澱物，再於解剖顯微鏡下收集第三期幼蟲。

人工胃蛋白消化液之配製：

7 mg Pepsin (1:2500, Sigma)

8 ml HCl

加二次水稀釋至 1000ml

2.動物感染

感染組鼯鼠，於感染前 12 小時禁食空腹，每隻老鼠以口餵管餵食 30 隻第三期廣東住血線蟲之幼蟲，對照組則不作感染。

3.實驗動物分組

使用 42 隻 ICR 雄性小白鼠作實驗，共分(A)對照組(B)感染組。而感染組又分 A、B、C、D、E、F 六組，每組各 6 隻 ICR 雄性小白鼠,分別感染後逐週斷頭取其腦組織和血液。

二、方法

(一)、生化評析

1.腦組織萃取

將正常組、感染組的斷頭，取出其腦組織，分別置入相當於其重量五倍體積比例之均質液內，在冰浴中切碎腦組織，用均質機上下研磨至完全均質。

* 均質液：

| | |
|-------------|--------------------------------|
| 0.242g | Tris-HCl, pH7.4(20mM) |
| 67.24mg | EDTA (2mM) |
| 19mg | EGTA (0.5mM) |
| 10ml | Glycerol(10(w/v)%) |
| 11.29g | Sucrose(0.33M) |
| 349 μ l | β -mercaptoethanol(50mM) |
| 34.8mg | PMSF(2mM) |
| 2.5mg | Leupeptin(25 μ g/ml) |

加 distilled water 至 100ml

PMSF、Leupeptin 為酵素抑制劑，以防止所要抽取之蛋白質被酵素所分解。

2 蛋白質濃度測定

其原理為利用蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色愈深表示蛋白質含量愈高。測試的方法如下：

取 10 μ l 之腦組織萃取液，加入所購買的蛋白質定量試劑組 (protein assay dye, Bio-Rad) 200 μ l，補蒸餾水至 1ml，於室溫下反應 10 分鐘後，在波長 595nm 條件下偵測吸光值，

以 Bovin serum albumin (BSA) 為標準液以換算各萃取液的蛋白質濃度。再取已定量的 40 μ g 蛋白質萃取液，加入等體積的 protein loading buffer，於 100°C Dri-Bath 機器加熱 5 分鐘使蛋白質變性，迅速置回冰上 5 分鐘，再經 microcentrifuge 低速離心後，放於冰上，等待 loading。

* protein loading buffer :

| | |
|--------|---------------------------------|
| 1ml | 0.5M Tris-Hcl, pH 6.8 |
| 1.6 ml | Glycerol(10(w/v)%) |
| 1.6 ml | 10%SDS |
| 0.4 ml | β -mercaptoethanol |
| 0.4 ml | 0.5% bromophenol blue(in water) |
| 3.0 ml | Distilled water |

3 蛋白質電泳：

SDS-PAGE 電泳分析方法，主要是參照 Laemmli 在 1970 所建立的模式，濃縮用的上層膠濃度為 4%，而分離用的下層膠濃度為 10%，利用 16x20 cm 大小的電泳槽(PROTEAN[®] II xi slab cell, Bio-Rad)進行蛋白質分析；其詳細做法是將電泳玻片洗淨，烘乾，擦乾後，用厚度為 0.75mm 的 spacer 為間隔裝好電泳片，製備 10% 的下層 separating gel，混合均勻後迅速倒入電泳片中，直到液面距離 well 約 1.5cm 處為止，加入去離子水覆蓋液面，待膠體凝固後，將上層的水吸掉；在開始製備 4.0% 的上層 stacking gel，混合均勻後倒入電泳片中，將電泳齒梳插入電泳片中，若有氣泡，則上下移動齒梳，使氣泡離開 stacking gel，待上層膠凝固後，拔掉齒梳，以電泳緩衝液清洗 well 數次，準備 loading sample。

取經定量等步驟處理的蛋白質樣本，用毛細管 tips 小心加到每個 well 內，將 protein standard marker(Bio-Rad)亦加入其中一個 well 內。用塑膠滴管取一倍的 SDS 電泳緩衝液 (electrode buffer)小心地將每個 well 填滿，已避免樣本被激出，將上下電泳槽各加入一倍的電泳緩衝液至電導線被蓋過為止。

將電源供應器與電泳槽相連，打開電源。開始時以 15mA 的

電泳跑 stacking gel，直到色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 的交界處，調整電流為 30mA，當色帶跑至底線時，才停止電泳。

電泳完畢後，將膠體取出，切除上層的 stacking gel，將下層 separating gel 以 coomassie blue 染色，再以脫色液脫色。

*10 % separating gel :

| | |
|-------------|---------------------------|
| 12.5 ml | Acrylamide/bis (30%/0.8%) |
| 24.25 ml | distilled water |
| 12.5 ml | 1.5M Tris-HCl, pH=8.8 |
| 500 μ l | 10%SDS |
| 250 μ l | 10% ammonium persulfate |
| 25 μ l | TEMED |

* 4.0% separating gel :

| | |
|-------------|---------------------------|
| 1.3 ml | acrylamide/bis (30%/0.8%) |
| 6.1 ml | distilled water |
| 2.5 ml | 0.5M Tris-HCl, pH=6.8 |
| 100 μ l | 10% SDS |
| 50 μ l | 10% ammonium persulfate |
| 10 μ l | TEMED |

* 5x electrode running buffer :

| | |
|----------------------------|-----------------|
| 15.0 g | Tris base(25mM) |
| 72 g | glycine (192mM) |
| 5g | SDS (0.1%) |
| 加 distilled Water 至 1000ml | (pH=8.3) |

* 0.1% coomassie blue :

| | |
|--------|----------------------|
| 1.0 g | coomassie blue G-250 |
| 100 ml | acetic acid |
| 400 ml | Methanol |

加 distilled water 至 1000ml，待 coomassie blue 溶解後，
過濾之

* 脫色液 :

75 ml acetic acid

100 ml Methanol

加 distilled water 至 1000ml

4 西方墨點吸漬法分析 PKC 的轉位作用

大白鼠腦組織經解剖取出後，將腦組織置入 1.8 ml 均質液 buffer A 中，在冰浴中切碎腦組織，用均質機上下 研磨約 20 下，將此均質液在 4°C 下，以 100,000 g 的 轉速離 心 1 小時，離心後所得的上清液先貯存-70°C 冰箱，此即為細胞質萃取液 (Cytosolic fractions)。

下層沉澱物則加入 buffer B 1ml，用振盪器震盪數次，接著冰浴 1 小時，期間每隔 5 分鐘震盪一次，之後再加入 buffer A 2.0 ml 使 Triton X-100 的濃度為 0.1%，然後再以 100,000g 的轉速，在 4°C 下，離心 1 小時，所得的上清液部份即為細胞膜萃取液(memnbrane or particulate fraction)，亦貯存於-70°C 冰箱中。

上述萃取所得之樣本仍有各種細胞質或細胞膜的酵素，以及其他內在干擾物質，為使 PKC 之純度提高，以利活性測定，我們採用 DEAE-cellulose chromatography 來純化。

純化的方法是先製備 cellulose column，以 1 公克之 DEAE-cellulose 與 4ml 之 20mM Tris-HCl，pH7.5，混合，通入塞以玻璃棉 6x100mm 之玻璃管柱中，再以 0.75ml 組織緩衝液 (tissue buffer,沖洗三次。然後通入樣本，以 0.75ml 組織緩

衝液再次沖洗四次和 0.5ml 含 120mM KCl 之組織緩衝液沖洗一次，最後再一次通入 1ml 含有 120mM KCl 之組織緩衝液並收集之，此液即含有較高純度之 PKC。

取經蛋白定量 50 μ g 腦組織萃取液，加入等體積的 protein loading buffer 混合均勻，經前處理後，loading 至 10% 的 SDS-PAGE，電泳完畢後，將膠體及 Whatman 3 MM 濾紙浸入冰冷的 electrotransfer buffer 10 分鐘，將膠體平鋪在一張浸溼的 Whatman 3 MM 濾紙上，然後再將預先浸溼的硝化纖維紙(nitrocellulose paper, 45 nm, Amersham)覆蓋在上面，再蓋上一張浸溼的 3 MM 濾紙，用玻璃棒趕走其間的氣泡，然後裝入 transfer holder 內，再置入事先裝滿 electrotransfer buffer 的 electrotransfer tank (Hoefer TE 50X)，以 4°C，100 mA 進行電泳膠轉移。

電轉移過夜後，將硝化纖維紙取出浸入含有 3 (w/v) %胎牛血清的 PBST 緩衝液 (即 blocking buffer) 內，在室溫下搖動 2 小時，將硝化纖維紙空白處覆蓋上蛋白後，加入 primary antibody，即 PKC antibody (50 μ g 購自 Transduction Lab. 的 PKC α antibody，溶於含 3%胎牛血清的 PBST 緩衝液)，於室溫下與硝化纖維紙作用 3.5 小時，再以 PBST 緩衝液清洗三

次，每次 10 分鐘;與 primary antibody 作用後的硝化纖維紙再進一步與 secondary antibody (即 alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG, Promega)，約 0.2 μ g/ml 溶於含 1%胎牛血清的 PBST 緩衝液，於室溫下與硝化纖維紙作用 1 小時。

再以 PBST 緩衝液清洗三次，每次 10 分鐘，最後將硝化纖維紙加入受質緩衝液(內含有 1:1 混和的 ECL substrate，慢慢蓋上塑膠膜以形成一層水膜以進行反應，約一分鐘後再擠乾膠套中多餘的受質，將膠套置放於 Cassette 中，以 X-ray film 顯影即可，一般而言，壓片 3-6 分鐘即可顯影。)

* buffer A :

| | |
|-------------|---------------------------------|
| 0.242 g | Tris-HCl, pH 7.4 (20 mM) |
| 67.24 mg | EDTA (2mM) |
| 10 ml | glycerol (10%) |
| 11.29 g | sucrose (0.33M) |
| 349 μ l | β -mercaptoethanol (50mM) |
| 34.8 mg | PMSF(2mM) |
| 2.5 mg | Leupeptin (25 μ g/ml) |

加 distilled water 至 100 ml (pH=7.4)

*buffer B :

| | |
|-------------|------------------------------------|
| 0.242 g | Tris-HCl, pH7.4(20mM) |
| 67.24 mg | EDTA(2mM) |
| 10 ml | glycerol (10%) |
| 11.29 g | sucrose (0.33M) |
| 0.3 ml | Triton X-100 (3%) |
| 349 μ l | β -mercaptoethanol (50 Mm) |
| 34.8 mg | PMSF (2mM) |
| 2.5 mg | Leupeptin (25 μ g/ml) |

加 distilled water 至 100 ml (pH=7.4)

* 10 % separating gel :

| | |
|-------------|---------------------------|
| 16.65 ml | acrylamide/bis (30%/0.8%) |
| 20.1 ml | distilled water |
| 12.5 ml | 1.5M Tris-HCl,pH=8.8 |
| 500 μ l | 10% SDS |
| 250 μ l | 10% ammonium persulfate |
| 25 μ l | TEMED |

*blocking buffer:

| | |
|----------------------------------|------------------------------|
| 1.5 ml | 胎牛血清(Foetal Bovine Serum) |
| 0.605 g | Tri-HCl (10mM) |
| 0.45 g | NaCl(100mM) |
| 0.05 ml | Tween-20(0.1%) |
| 加 distilled water 至 50ml(pH=7.5) | |

5 西方墨點吸漬法分析 c-JUN、c-FOS、c-Myc、py54、MEK、ERK、iNOS 致癌基因蛋白表現

將解剖後所得的大白鼠腦組織個別置入相當於其重量比五倍體積比例之均質液 buffer A 內，在冰浴中切碎腦組織，用均質機上下研磨約 20 下，將此均質液置於冷凍離心機中，在 4°C 下，以 600g 轉速離心 10 分鐘，離心後所得的下層沈澱物即為細胞核(nucleus)萃取物。取細胞核萃取物經蛋白定量 50 μ g 腦組織萃取液，加入等體積的 protein loading buffer 混合均勻，經前處理後，loading 至 10%的 SDS-PAGE，電泳完畢後，再以 4 °C，100mA 進行電泳膠轉移(參考前述蛋白電泳、電轉移方法)。

電轉移過夜後，將硝化纖維紙取出浸入含有 3%胎牛血清的 PBST 緩衝液 (即 blocking buffer)內，在室溫下搖動 2 小時，將硝化纖維紙空白處覆蓋上蛋白後，在分別於硝化纖維紙加入 c-JUN、c-FOS、c-Myc、py54、MEK、ERK、iNOS 七種 primary antibodies (購自 CALBIOCHEM antibody，溶於含 3% 胎牛血清的 PBST 緩衝液)，於室溫下與硝化纖維紙作用 3.5 小時，再以 PBST 緩衝液清洗三次，每次 10 分鐘。與 primary antibody 作用後的硝化纖維紙再進一步與 secondary antibody (即 c-JUN 為 alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse

IgG , Promega; c-FOS 爲 alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG , Promega; c-Myc 爲 alkaline phosphates conjugated anti-mouse IgG , Promega; py54 爲 alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG , Promega; MEK 爲 alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG , Promega; ERK 爲 alkaline phosphates conjugated goat anti-mouse IgG , Promega; iNOS 爲 alkaline phosphates conjugated goat anti-mouse IgG , Promega), 約 0.2 g/ml 溶於含 1 % 胎牛血清的 PBST 緩衝液, 於室溫下與硝化纖維紙作用 1 小時。

再以 PBST 緩衝液清洗三次, 每次 10 分鐘, 最後將硝化纖維紙浸入受質緩衝液(內含有 1:1 混和的 ECL substrate), 慢慢蓋上塑膠膜以形成一層水膜以進行反應, 約一分鐘後再擠乾膠套中多餘的受質, 將膠套置放於 Cassette 中, 以 X-ray film 顯影即可, 一般而言, 壓片 3-6 分鐘即可顯影。

(二)、腦組織病理變化觀察

1、病理切片

將腦組織，製成病理切片，以觀察發炎(inflammation)，浸潤 (infiltration)之情形;其切片製作過程如下:

(1)固定(fixation)

將腦組織保存於中性福馬林 (10%neutral buffered formalin) 固定 24 小時以上，將組織切成 0.5cm^2 ，置於包埋盒中，然後於連續的水流中沖洗 2 小時，以除去福馬林，避免影響切片的製作。

(2)脫水(dehydration)

將已去除福馬林的組織取出，用吸水紙吸取多餘的水份，然後進行下列的脫水步驟:

- | | | |
|--------|--------|-------|
| 1)70% | 酒精 | 20 分鐘 |
| 2)80% | 酒精 | 20 分鐘 |
| 3)90% | 酒精 | 20 分鐘 |
| 4)95% | 酒精(I) | 20 分鐘 |
| 5)95% | 酒精(II) | 20 分鐘 |
| 6)100% | 酒精(I) | 20 分鐘 |
| 7)100% | 酒精(II) | 20 分鐘 |

(3)澄清(clearing)

將已完全脫水的組織，浸置於二甲苯 (xylene)中，直到組織浸至透明。因為酒精與石蠟(paraffin)不互溶，所以必須完全以二甲苯取代組織內的酒精成份，才不至於影響浸潤過程。步驟如下：

- | | |
|-----------|------|
| 1)二甲苯 (I) | 6 分鐘 |
| 2)二甲苯(II) | 6 分鐘 |

(4)浸潤(infiltration)

由於二甲苯與石蠟可以互溶，故先以二甲苯澄清後，才能使浸潤過程得以完全，浸潤的目的是為了使石蠟能完全進入組織內。步驟如下：

- | | | |
|---------------|------|-------|
| 1)二甲苯:石蠟(1:1) | 40°C | 60 分鐘 |
| 2)石蠟(I) | 55°C | 30 分鐘 |
| 3)石蠟(II) | 55°C | 30 分鐘 |
| 4)石蠟(III) | 55°C | 30 分鐘 |

(5)包埋(embedding)

將已浸潤完成的組織置於模子中央，然後於模子中加入融化的石蠟以覆蓋組織，接著將包埋臺置於模子上，再加少許石蠟使組織固定於包埋臺。然後置於-20°C冰箱，使石蠟結晶較細，待石蠟凝固後，除去模子，即完成包埋。

(6)連續切片(serial section)

將包埋臺固定於連續切片機上，調整刀片角度及距離，先以 20 μm 粗切至所要觀察的組織面，然後調整為 5 μm 切出連續切片，取下所切出的連續切片，置於 38°C 的水中，使其完全伸展，再將切片置於沾附有蛋白與甘油比例為 1:1 的玻片中央，然後置於 38°C 的乾燥台上烘乾。

(7)染色(stain)

以紫蘇木-伊紅(hematoxylin-eosin)染色法，H&E stain 方式如下：

| | |
|-----------------|-------|
| 1)二甲苯(I) | 6 分鐘 |
| 2)二甲苯(II) | 6 分鐘 |
| 3)100%酒精 (I) | 6 分鐘 |
| 4)100%酒精 (II) | 3 分鐘 |
| 5)95%酒精 | 6 分鐘 |
| 6)80%酒精 | 6 分鐘 |
| 7)沖水 | 30 分鐘 |
| 8)以紫蘇木溶液染色 | 10 分鐘 |
| 9)以酸性酒精辨色至核清楚為止 | |
| 10)沖水 | 30 分鐘 |
| 11)以伊紅 Y 溶液染色 | 5 分鐘 |
| 12)70%酒精 | 30 秒 |
| 13)80%酒精 | 30 秒 |
| 14)90%酒精 | 30 秒 |
| 15)100%酒精(I) | 6 分鐘 |
| 16)100%酒精(II) | 3 分鐘 |
| 17)二甲苯(I) | 6 分鐘 |
| 18)二甲苯(II) | 6 分鐘 |

(8)封蓋(mount)

將封片膠滴於已染色的組織切片上，以 45° 慢慢蓋上蓋玻片，以避免氣泡產生，待封片膠凝固後即完成封片。

2、免疫組織化學染色觀察 PKC、py21、MEK、ERK、iNOS、c-JUN、c-FOS、c-Myc 致癌基因蛋白表現

- (1).將包埋在蠟中的組織切片置入已預熱至 56 °C 的烘箱中脫蠟。
- (2).將已加熱的切片依照順序移至純約二甲苯，絕對酒精，95% 酒精中各五分鐘。
- (3).將切片以二次水沖洗十分鐘。
- (4).將切片移至 Tris buffer(0.05M，pH7.8;NaCl 0.15M 再加入 1ml Triton X-100/1000ml)中五分鐘。
- (5).將 citrite buffer 以微波爐加熱至沸騰。
- (6).將已脫蠟完全的切片移至煮沸中的 citrite buffer，再繼續加熱五分鐘。
- (7).待玻片自動降溫至室溫。
- (8).將玻片取出後以二次水沖洗。
- (9).用 Tris buffer 沖洗五分鐘。
- (10).用 3%的 H₂O₂ 沖洗五至十分鐘。
- (11).將玻片取出後以二次水沖洗。
- (12).用 Tris buffer 沖洗五分鐘。

- (13).在玻片上加入第一次抗體反應 20 至 40 分鐘。
- (14).將玻片取出後以二次水沖洗。
- (15).用 Tris buffer 沖洗五分鐘。
- (16).在玻片上加入第二次抗體反應 30 分鐘。
- (17).將玻片取出後以二次水沖洗。
- (18).用 Tris buffer 沖洗五分鐘。
- (19).在玻片上加入 Biotin ligand 反應 30 分鐘。
- (20).將玻片取出後以二次水沖洗。
- (21).用 Tris buffer 沖洗五分鐘。
- (22).加入 DAB 呈色劑在室溫下反應五分鐘。
- (23).以二次水清洗五分鐘。
- (24).加入 Hematoxylin 以染背景，但染色的時間不能超過一分鐘。
- (25).以二次水清洗五分鐘。
- (26).將已染色的玻片置於 95%的酒精。
- (27).將玻片置於絕對酒精鐘五分鐘以脫水。
- (28).將玻片滴上 xylene。
- (29).用封片膠來封片。

第五章實驗結果

一、西方墨點吸漬法偵測 PKC、py-54、MEK、ERK、iNOS、c-JUN、c-FOS、c-Myc、NF κ -B 的表現

對照組與感染廣東住血線蟲的 ICR 雄性小白鼠之腦部組織萃取物，利用西方墨點分析法(Western blot)測定 PKC、py-54、MEK、ERK、iNOS、c-JUN、c-FOS、c-Myc、NF κ -B 蛋白表現，其結果對照組和感染組 PKC 蛋白表現並無差異(圖 2)，而在 py-54 蛋白則於感染第一、二週無明顯差異，但於感染後第三、四、五週則有明顯差異，在第六週其差異又明顯縮小(圖 3)。而在 MEK 蛋白則感染組和對照組其蛋白表現並無明顯差異(圖 4)。而在 ERK 蛋白則於感染第一、二週無明顯差異，但於感染後第三、四週則有些微差異，在第五、六週其差異又明顯加大(圖 5)。在 NF κ -B 蛋白則於感染第一、二週有明顯差異，而在於感染後第三、四、五週則有明顯差異，在第六週其差異又明顯縮小(圖 6)。而在 iNOS 蛋白則於感染第一、二週無明顯差異，但於感染後第三、四、五週則有明顯差異，在第六週其差異又明顯縮小(圖 7)。而在 c-Myc 蛋白則於感染第一、二週無明顯差異，但於感染後第三、四、五週則有明顯差異，在第六

週其差異又明顯縮小(圖 8)。而在 c-JUN 蛋白則於感染第一、二週無明顯差異，但於感染後第三、四、五週則有明顯差異，在第六週其差異又明顯縮小(圖 9)。而在 c-FOS 蛋白則於感染第一週無明顯差異，但於感染後第二、三、四、五、六週則有明顯差異(圖 10)。

二、腦部組織病理切片染色觀察

對照組與感染廣東住血線蟲組的腦部組織病理切片染色觀察之比較。對照組可見微量的 PMN 發炎細胞(圖 11)，而在感染組中，於感染後第 1、2 週的小白鼠腦部組之中，其 PMN 有部份增加,而在感染組中(圖 12)，於感染後第 3、4 週的小白鼠腦部組之中，有明顯的 PMN 增加現象(圖 13)。於感染後第 5,6 週的小白鼠腦部組之中，PMN 增加現象慢慢地減少(圖 14)。

三、免疫組織化學染色觀察

廣東住血線蟲感染 ICR 雄性小白鼠利用免疫組織化學染色法(Immuno-histo chemistry stain)，染色觀察感染組和對照組之腦部組織 PKC、py-20、MEK、ERK、iNOS、c-JUN、c-FOS、c-Myc 蛋白的表現，兩組在不同週數 PKC 方面無差異(圖 15)，而在 c-Myc、MEK、ERK、iNOS 則在第三、四週有明顯差異(圖 22,17,18)，py-20,c-JUN、c-FOS 在兩組中無明顯差異(圖 16,23,24)。

第六章討論

廣東住血線蟲是廣泛存在東南亞各國，包括印度、錫蘭、中國南部、菲律賓、澳洲北部，最東可到夏威夷及大溪地，琉球、日本、澳洲之昆士蘭也有不少廣東住血線蟲。同時也是台灣一種重要的公共衛生上的寄生蟲。由於台灣人們爲了滿足口腹之慾而喜歡吃蝸牛肉。而廣東住血線蟲便可能由此感染到人體。人體感染此蟲後引起之臨床症狀主要特徵爲嗜伊紅性腦炎或腦膜炎，其確實診斷需以腰椎穿刺取得腦脊髓液(CSF)，檢出青年期(young adult worm)蟲體，此外亦需參考臨床綜合症狀如劇烈頭痛、噁心、嘔吐、發燒、嗜眠、頸部僵直、四肢麻痺及某些神經反射的喪失或降低....等。

由組織病理學切片 HE stain 觀察可發現感染組在腦部組織中有增加許多發炎細胞如(PMN)的浸潤和嗜伊紅性白血球增加。在 1980 年，Yoshimura 發現天竺鼠(非適宜宿主)在感染廣東住血線蟲後其嗜酸性球的數目有明顯上升。而在 1988 年，Sugaya⁽⁴⁹⁾發現廣東住血線蟲感染非適宜宿主，其嗜酸性球也有大量的增加。

由免疫組織化學染色觀察 PKC、py-20、MEK、ERK、iNOS、

c-JUN、c-FOS、c-Myc 蛋白表現，在此實驗中 PKC 於對照組與感染組並無差異，而 py-21 僅有些微差異，而 c-JUN、c-FOS、c-Myc 則有輕微之差異。由此 stain 得知在 ICR 雄性小白鼠感染廣東住血線蟲並不會引起 PKC 的上升，而經由 receptor tyrosine kinase 的訊息路徑，而使 MEK、ERK 上升。並且在感染後第一、二週，對照組與感染組並無明顯差異，而再感染後第三、四週 MEK、ERK、iNOS 則有相當明顯差異，而在感染後第五、六週又有漸漸下降而使對照組與感染組形成不明顯差異。由此 stain 結果得知磷酸化所影響的蛋白上升是在第三、四週達到高峰。在此 stain 中得知，在第一、二週有可能因其受廣東住血線蟲感染，其磷酸化之蛋白並未完全表現，因在病理切片中發現，其發炎現象，嗜酸性白血球在第三、四週表現量最多。

而發炎現象，便表示一些免疫機轉有變化，免疫機轉產生變化便能刺激蛋白磷酸化產生，而在三、四週 Stain 結果和病理切片相吻合，在第五、六週又漸漸下降，有可能：(1)東住血線蟲部份死亡或移行⁽¹⁾。(2)可能廣東住血線蟲餵食量太少，如果持續餵食廣東住血線蟲，可能在第五、六週其蛋白磷酸化還一直表現。

由西方墨點吸漬法偵測 PKC 的表現，觀察其和致癌基因 c-JUN、c-FOS、c-Myc 是否有相關性。PKC 是一種和 cyclic nucleotide 無關的多功能酵素，在一般的情況下是以不活化的形式出現於細胞的 Cytosol，一般當細胞受到適當的刺激時，則會變成 membrane-bound 的活化形式，許多研究發現顯示 PKC 與 metastatic potential 有關；就 PKC 的表現量而言，當外來物，如病毒、細菌或寄生蟲感染時與細胞膜上相關接受器作用後導致特異性之 Phospho-lipase C (PLC) 去水解 Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) 產生 inositol phosphate (IP₃)及 diacylglycerol (DAG)，IP₃ 溶解於細胞質以促進儲存的鈣離子釋放出來而增加細胞中鈣離子濃度，親脂性的 DAG 則留在膜上，此時細胞質內的 PKC 會變成 membrane-bound 的活性化形成而移動到細胞膜上形成複合體。當 PKC 轉位到膜上時會造成細胞內特定之蛋白質磷酸化而引發細胞內訊息傳遞的現象。

在原致癌基因方面，當 PKC 因受外界刺激而引發其表現後，可伴隨激發 c-FOS 5' 端特定序列區域的表現，如 TRE 及 TPA response element，進而促使 c-FOS 的表現量增加，且 PKC 也可使 c-JUN 蛋白的 c-磷酸化而使 c-JUN 的表現量增加，進而

促使以 FOS-JUN 的複合體存在，在促使多種基因，如 c-Myc 的轉譯作用(transcription)而帶動細胞進入活躍狀態使細胞進行增殖(proliferation)和細胞分化 differentiation);這些活化態的基因如 c-JUN 及 c-FOS 在受到刺激後，便會開始進行轉錄 (Transcription)的工作，並開始兩者相互的結合並相互的活化，此時便會結合到 AP-1 binding site 上。然而在許多基因的 promoter 上都具有一段的能與 AP-1 結合的序列，許多的基因便藉此機制開始生成大量的蛋白。這些結果告訴我們活化 c-JUN、c-FOS 而間接促使 PKC 的活化，進一步的促使組織的發炎反應增加。

根據 Dang 等在 1994 年所作的研究⁽⁵⁰⁾，從人類的白血球中抽出 PKC 之後，再以各種不同的 PKC isoform 抗體去做免疫呈色反應。結果發現有三種 isoform 包括 α 、 β 及 ζ 在組織尚未受到藥物刺激便可以在 cytosol 中很明顯的發現，而在受到了 phorbol ester 的刺激之後，會使這三種 isoform 從原本的不活化狀態的 cytosol 轉位到活化態的 particular 中。這些已經被活化的 PKC isoform 會促使其他的蛋白接上磷酸，包括促使 PKC 80-kDa 的受質活化。

另一方面這些活化型的 PKC 也會促使一些轉錄因子如 c-

FOS、c-JUN 或其他的 proto-oncogene 的表現。

由於這一連串訊息傳遞而促使這些蛋白活化的結果會使 NADPH oxidase 被活化而開始進行其氧化的功能。

當 NADPH oxidase 被活化再加上 catalase 的作用，便能促使組織內 H_2O_2 的表現量增加。在本次的實驗中我們所使用的 western blot 的方式來觀察組織中的 PKC 是否有被活化的現象，所使用的抗體也是利用 α -form。我們可以看到 PKC 的 α -form 的表現量增加。

而 H_2O_2 在體內的作用方面，有許多的學者研究指出，當細胞內的 H_2O_2 含量變高時，可能會促使這些活性氧系經由下列的這些途徑使 c-FOS 及 c-JUN 的表現量增加：

使 DAC 的表現量增多而刺激 PKC，經由活化 PKC 這個訊息傳遞路徑的不斷刺激與磷酸化而進一步使 c-JUN 及 c-FOS 等的原致癌基因活化。

H_2O_2 會刺激 PLA_2 的活性上升而使 arachidonic acid 的產量增加，進而刺激 PKC 的活性，再促使 c-JUN 及 C-FOS 增加。

H_2O_2 也會刺激 phase I 的解毒系統，使 monooxygenase-Cytochrome p450 system 活化，這個過程也可能刺激 c-JUN 的

表現。

由此實驗發現，PKC 並無上升的現象，而 c-JUN、c-Myc、c-FOS 則在第三、四、五週有明顯的上升表現。因此可發現本實驗造成 c-JUN、c-Myc、c-FOS 等致癌因子上升是另有其他因素所造成，並不是走 PKC 的路徑。

經由西方墨點吸漬法偵測 py-54、MEK、ERK、的表現觀察其和致癌因子 c-JUN、c-Myc、c-FOS 是具有相關性的，因 receptor tyrosine kinase 是會經由外來因素如病毒、細菌、寄生蟲而上升。所以此實驗室要探討經廣東住血線蟲感染其磷酸化是否提升，進而一連串的活化其下游的分化(生長)激素促使一些 proto-oncogene 如 c-JUN、c-Myc、c-FOS 過度活化，而轉變成 oncogene 的一連串機轉。

經實驗的結果在感染組於感染後第一、二週和對照組並無明顯差異。但感染後第三、四、五週和對照組就有明顯上升。而於第六週又漸漸拉近其差距。由此實驗得知感染廣東住血線蟲可促使磷酸化，進而活化一連串的分化激素，更可能使一些致癌因子活化上升，而轉變成癌化現象。

經由西方墨點吸漬法偵測 py-54 和 iNOS 的表現是否具有相關性，由上面討論得隻小白鼠經感染廣東住血線蟲後其磷酸化

於第三、四、五週有明顯的上升，而 iNOS 也可經病毒、細菌的感染而上升，所以便利用感染寄生蟲(廣東住血線蟲)，測其 iNOS 是否上升，經實驗其結果所表現的與 py-54 的表現相當一致。由此結果可推測小白鼠經感染廣東住血線蟲後，其磷酸化也可能刺激 iNOS 的上升，而使 NO ↑，進而使一些致癌因子(proto-oncogene)如 c-JUN、c-Myc、c-FOS 更加活化而轉變成 oncogene。

綜合以上的各種實驗結果，得知 ICR 雄性小白鼠經感染廣東住血線蟲後，其可走磷酸化的路徑，使 MEK、ERK、iNOS 活性上升，進一步使 c-JUN、c-FOS、c-Myc 的活性上升，但是並不走 PKC 這條訊息傳遞路徑。

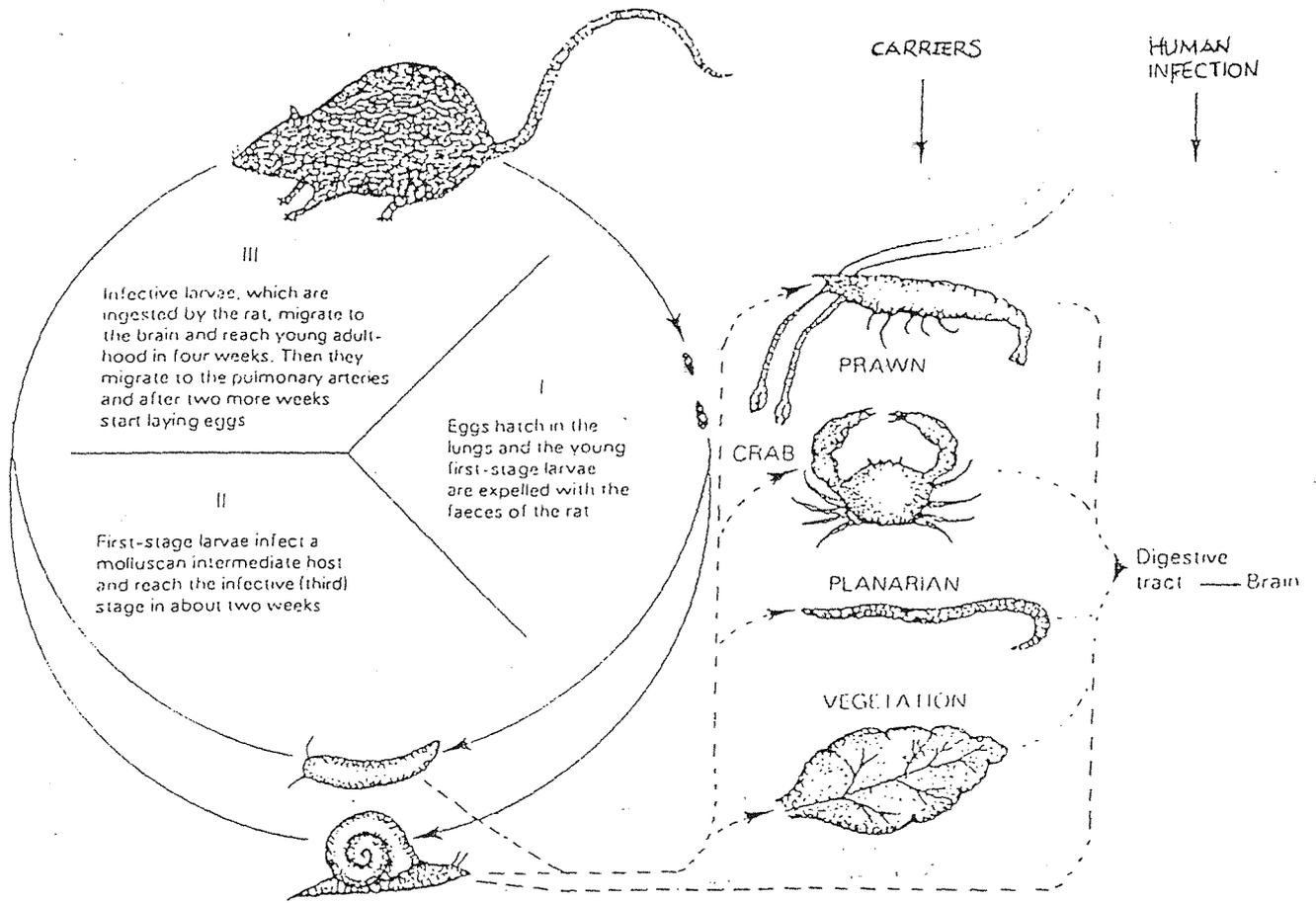


圖 1：廣東住血線蟲生活史

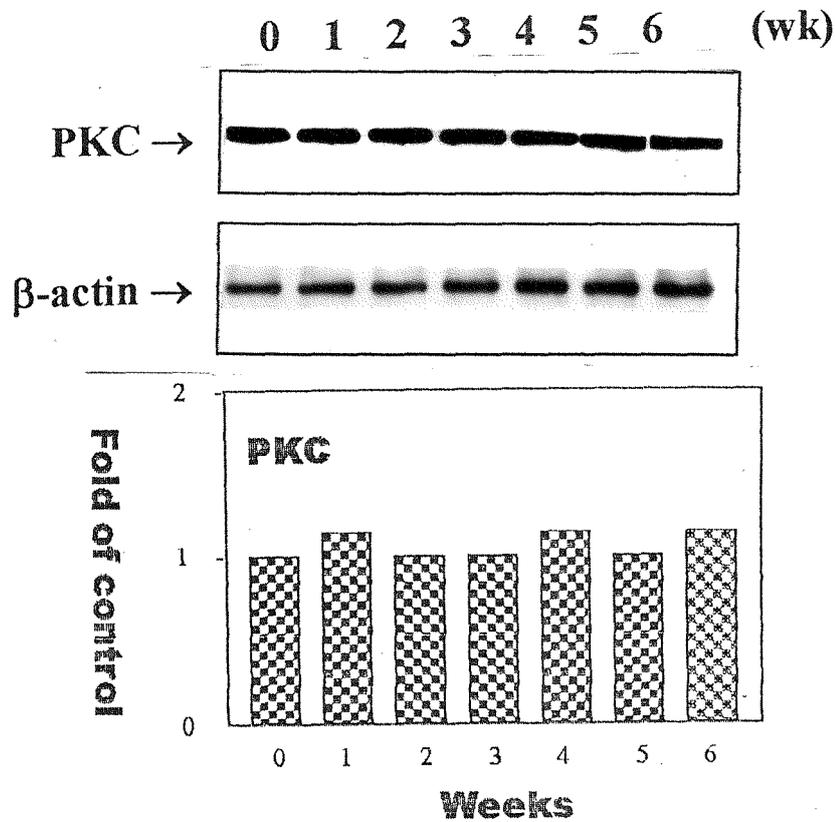


圖 2 : PKC expression in *Angiostrongylus cantonensis*-infected ICR mice by the period after infection. The PKC in mice brain tissue were partially purified and then were analysed by Western blot, β -actin as internal standard.

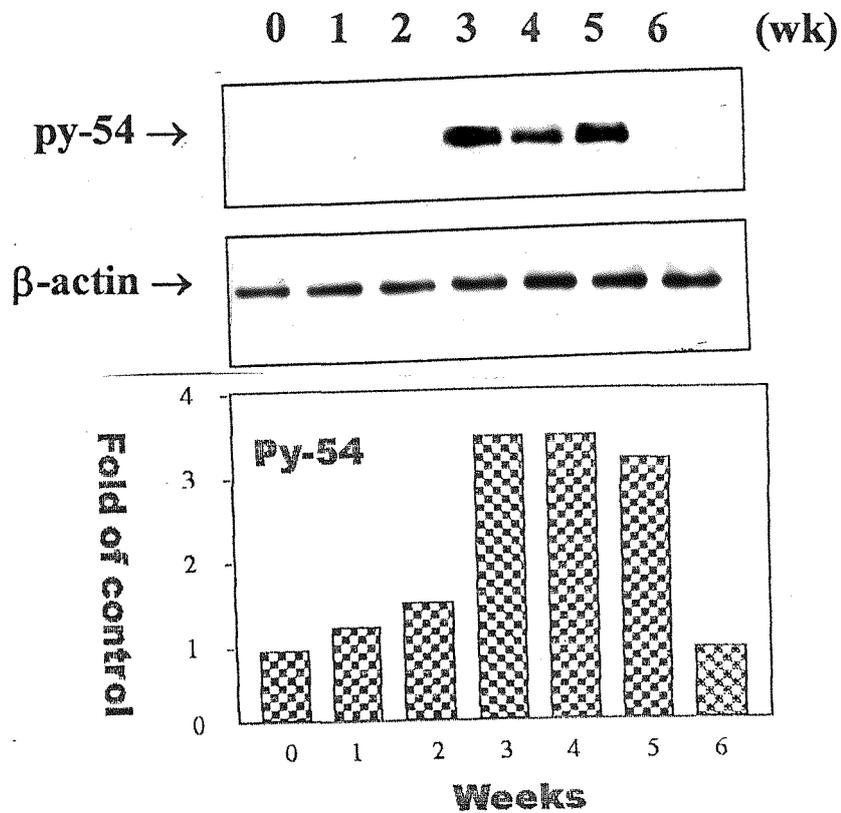


圖 3 : Py-54 expression in *Angiostrongylus Cantonensis*-infected *Angiostrongylus Cantonensis* worm were ingested ICR mice for indicated time. Mice brain tissue was excised and partially purified protein. The py-54 expression were analysed by Western blot, β -actin as internal standard.

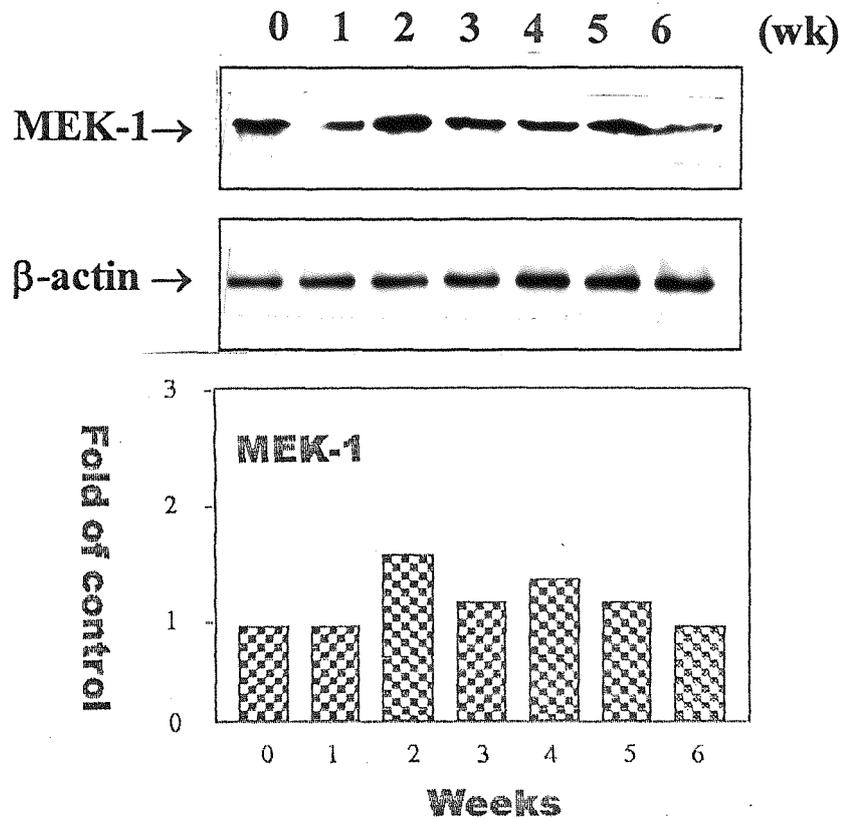


圖 4 : MEK-1 expression in *Angiostrongylus Cantonensis*-infected \circ *Angiostrongylus Cantonensis* worm were ingested ICR mice for indicated time \circ Mice brain tissue was excised and partially purified protein \circ The MEK-1 expression were analysed by Western blot , β -actin as internal standard \circ

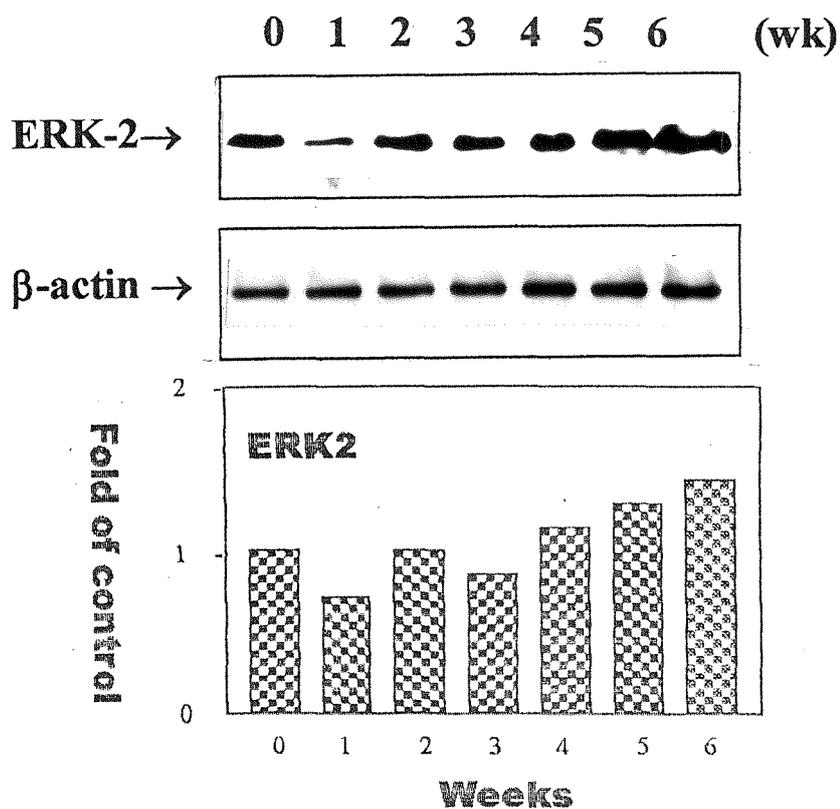


圖 5 : ERK-2 expression in *Angiostrongylus Cantonensis*-infected *Angiostrongylus Cantonensis* worm were ingested ICR mice for indicated time. Mice brain tissue was excised and partially purified protein. The ERK-2 expression were analysed by Western blot, β -actin as internal standard.

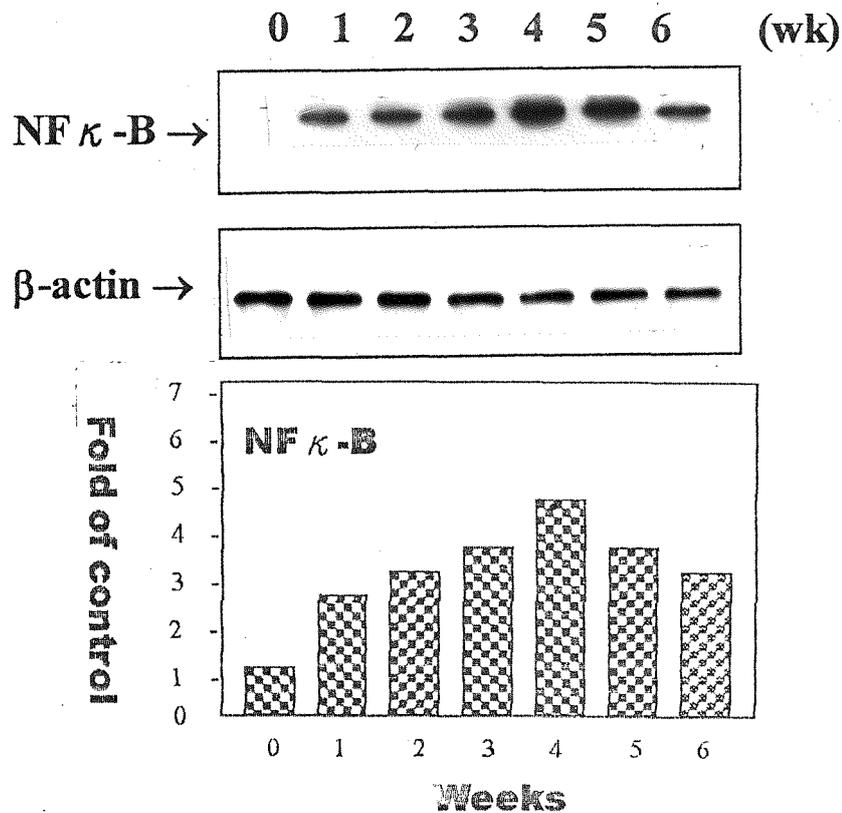


圖 6 : NF κ -B expression in *Angiostrongylus Cantonensis*-infected . *Angiostrongylus Cantonensis* worm were ingested ICR mice for indicated time . Mice brain tissue was excised and partially purified protein . The NF κ -B expression were analysed by Western blot , β -actin as internal standard .

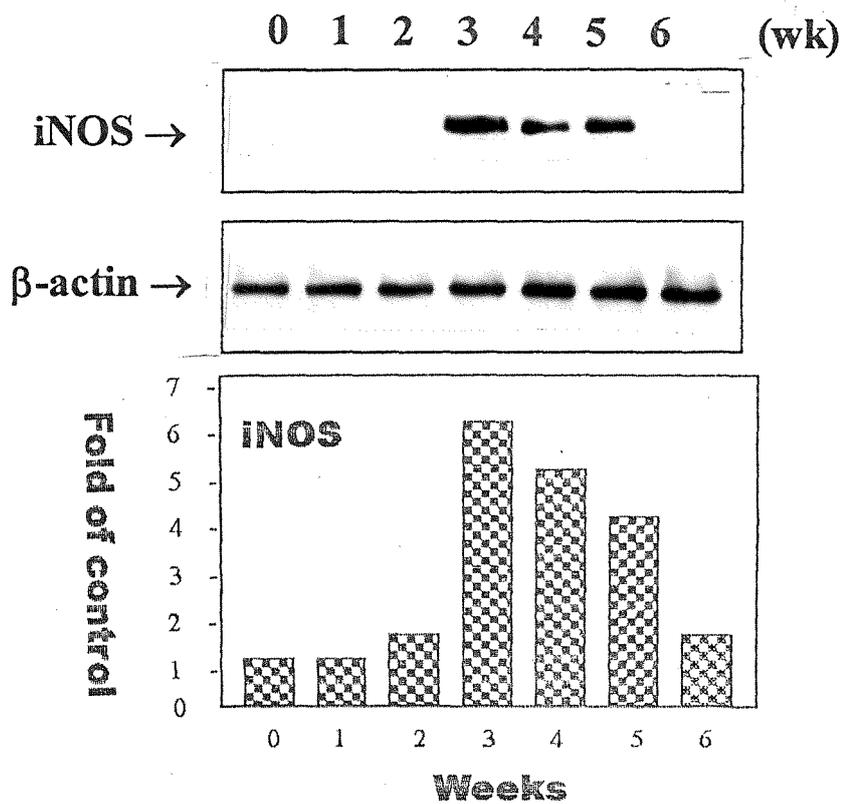


圖 7 : iNOS expression in *Angiostrongylus Cantonensis*-infected *Angiostrongylus Cantonensis* worm were ingested ICR mice for indicated time. Mice brain tissue was excised and partially purified protein. The iNOS expression were analysed by Western blot, β -actin as internal standard.

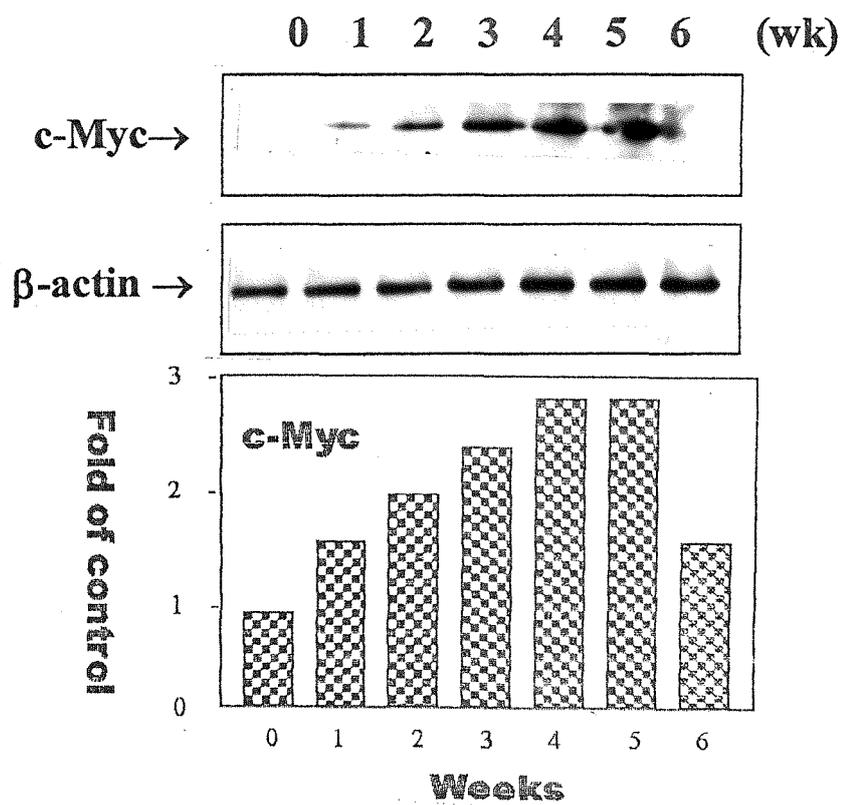


圖 8 : c-Myc expression in *Angiostrongylus Cantonensis*-infected . *Angiostrongylus Cantonensis* worm were ingested ICR mice for indicated time . Mice brain tissue was excised and partially purified protein . The c-Myc expression were analysed by Western blot , β -actin as internal standard .

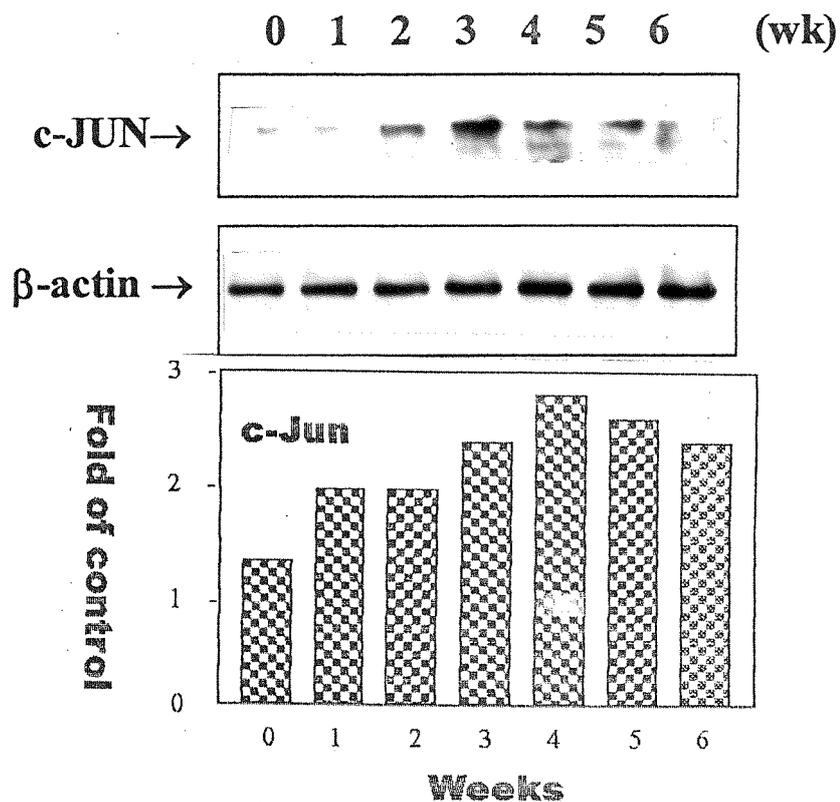


圖 9 : C-JUN expression in *Angiostrongylus Cantonensis*-infected . *Angiostrongylus Cantonensis* worm were ingested ICR mice for indicated time . Mice brain tissue was excised and partially purified protein . The c-JUN expression were analysed by Western blot , β -actin as internal standard .

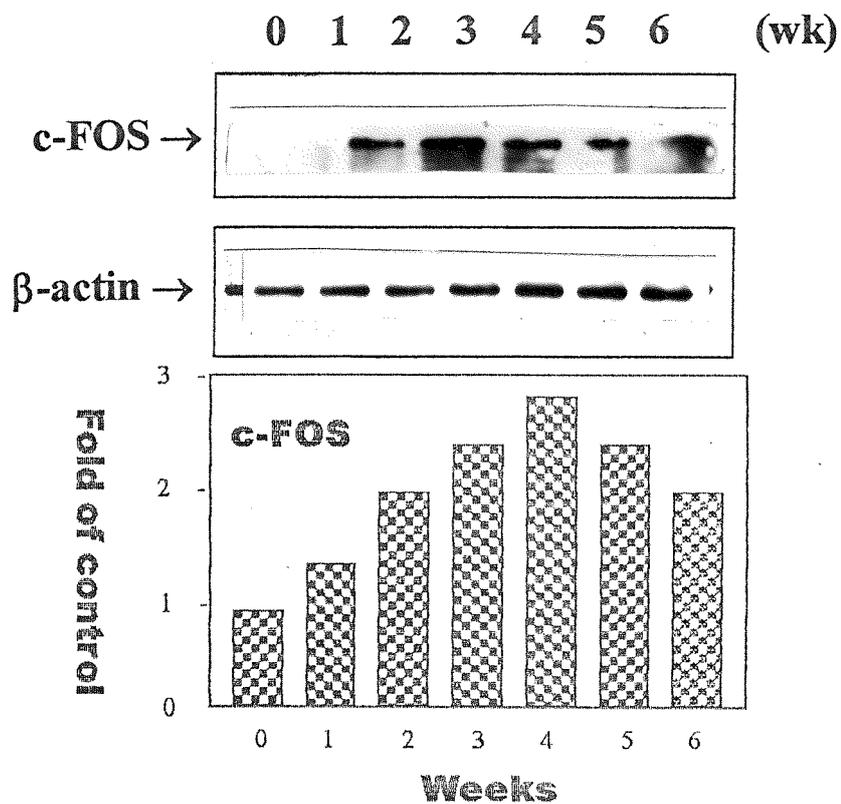


圖 10 : c-FOS expression in *Angiostrongylus Cantonensis*-infected . *Angiostrongylus Cantonensis* worm were ingested ICR mice for indicated time . Mice brain tissue was excised and partially purified protein . The c-FOS expression were analysed by Western blot , β -actin as internal standard .

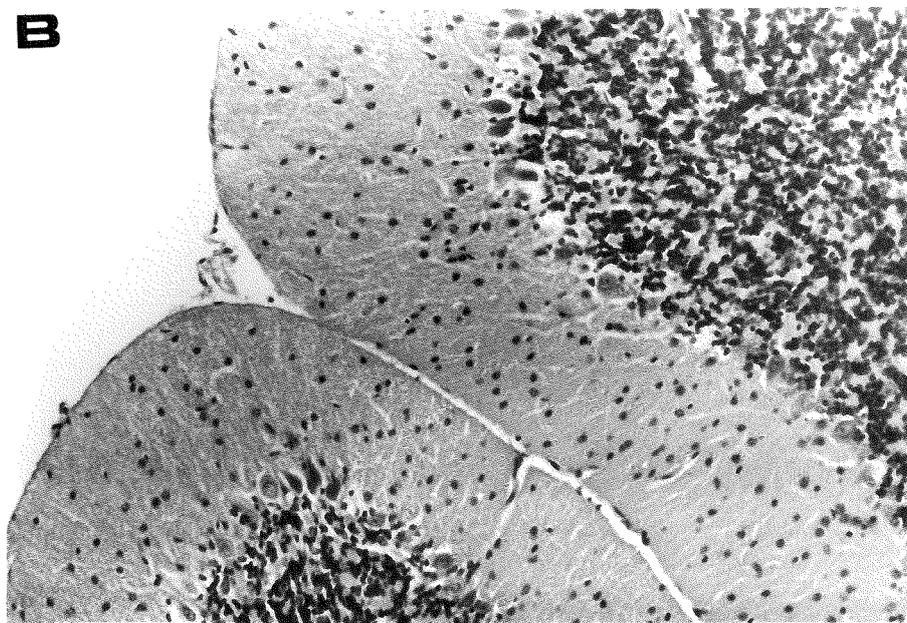
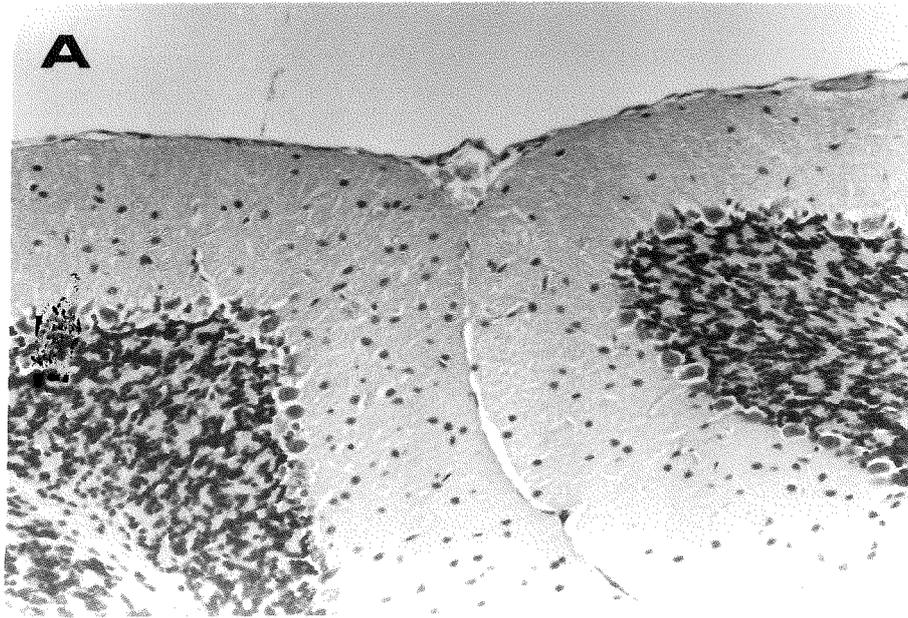


圖 11 : Histopathological examination of uninfected *Angiostrongylus cantonensis* mice brain section obtained from showed no inflammation. (H&E stain ; x200)

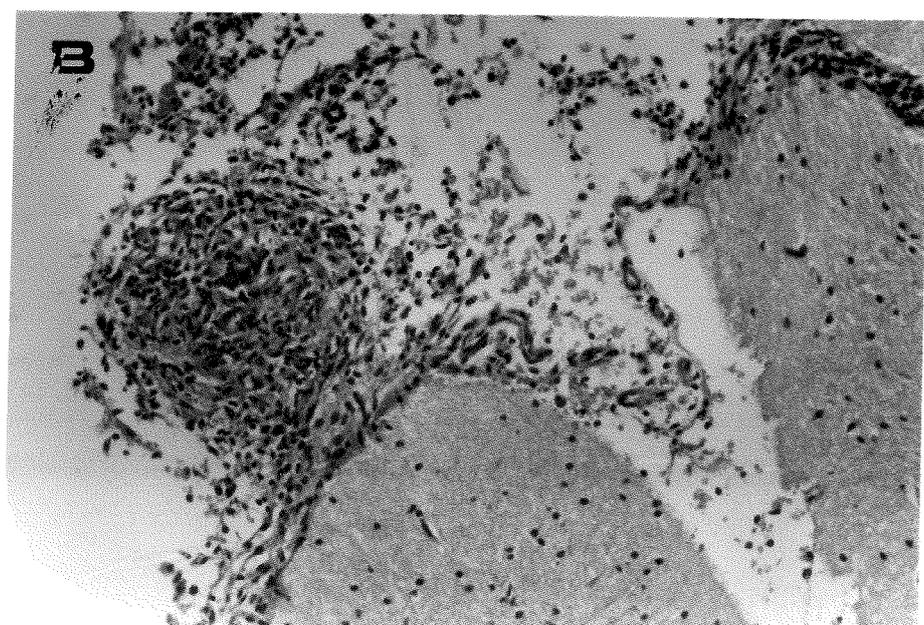
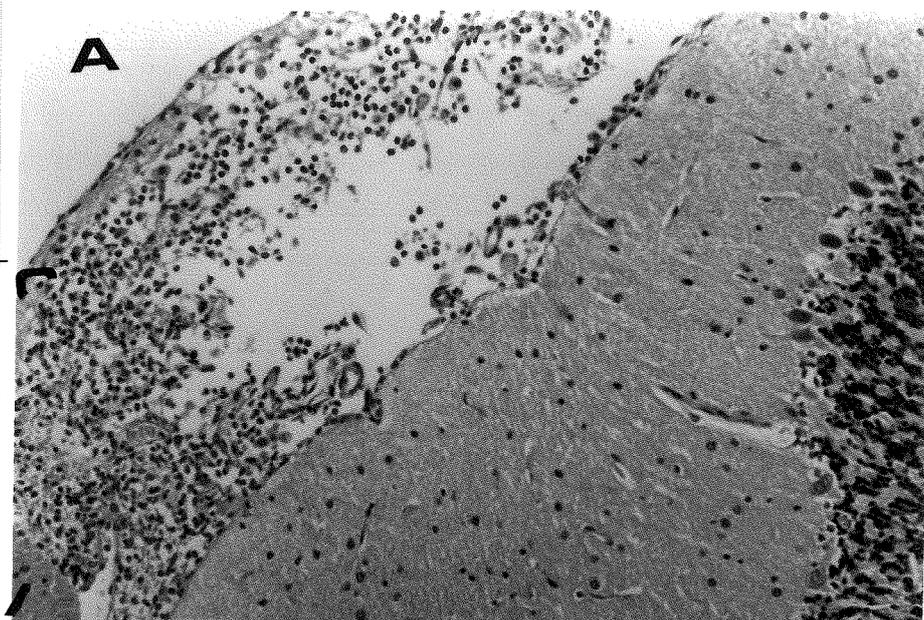


圖 12 : Histopathological examination of *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from the infected mice showed inflammation.(H&E stain ;x200) ; A.infected 1 weeks ; B. infected 2 weeks

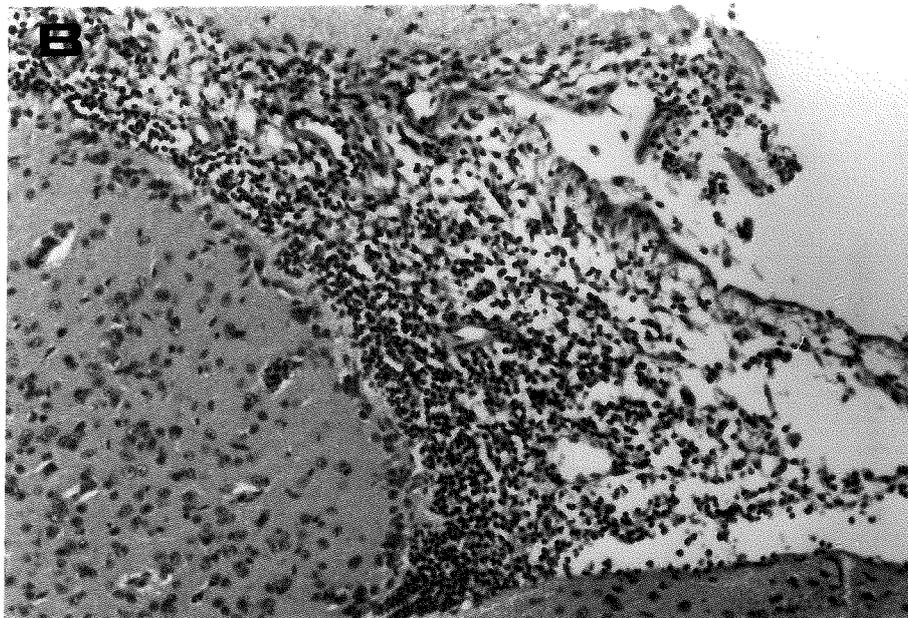
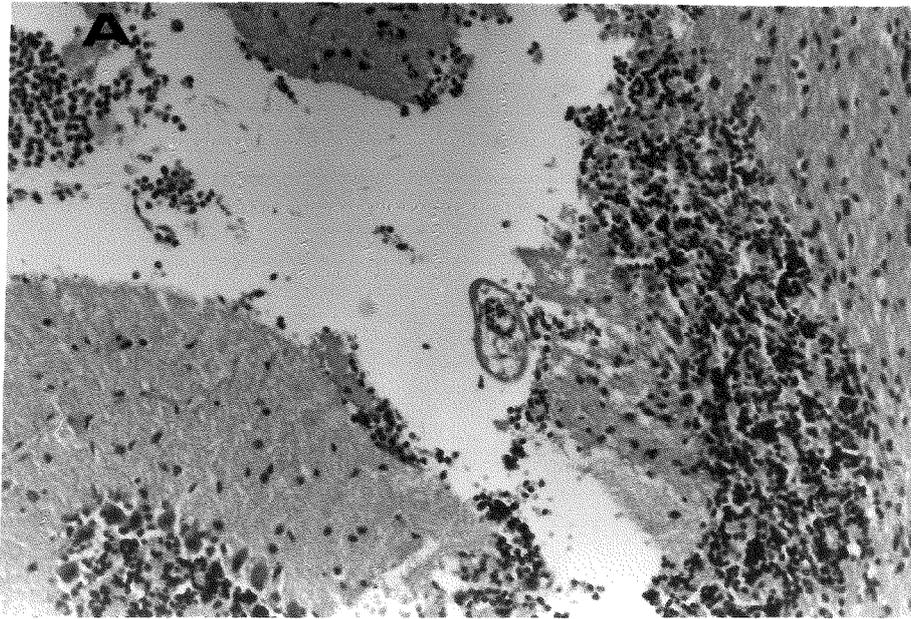


圖 13 : Histopathological examination of *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from the infected mice showed inflammation.(H&E stain;x200); A.infected 3 weeks ; B. infected 4 weeks

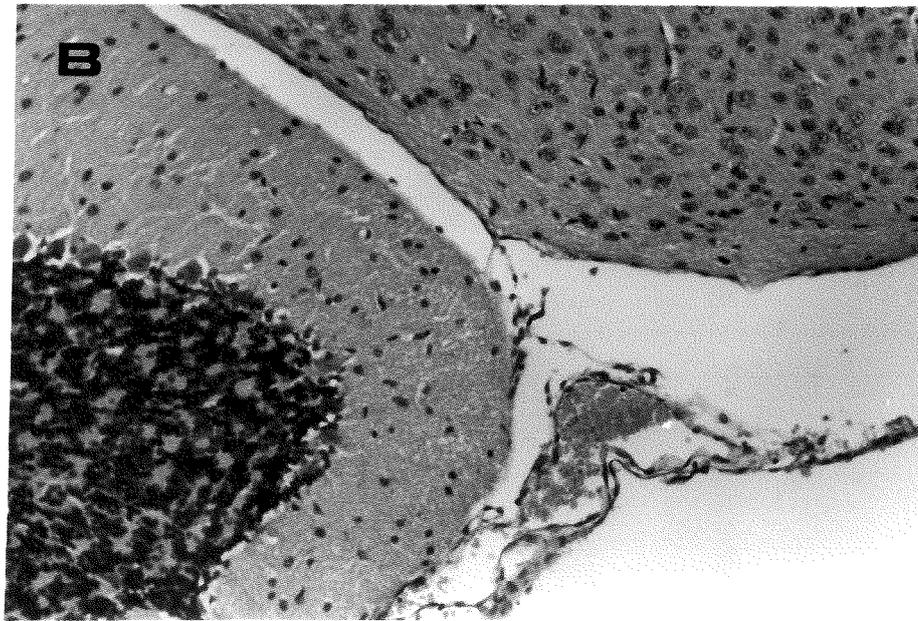
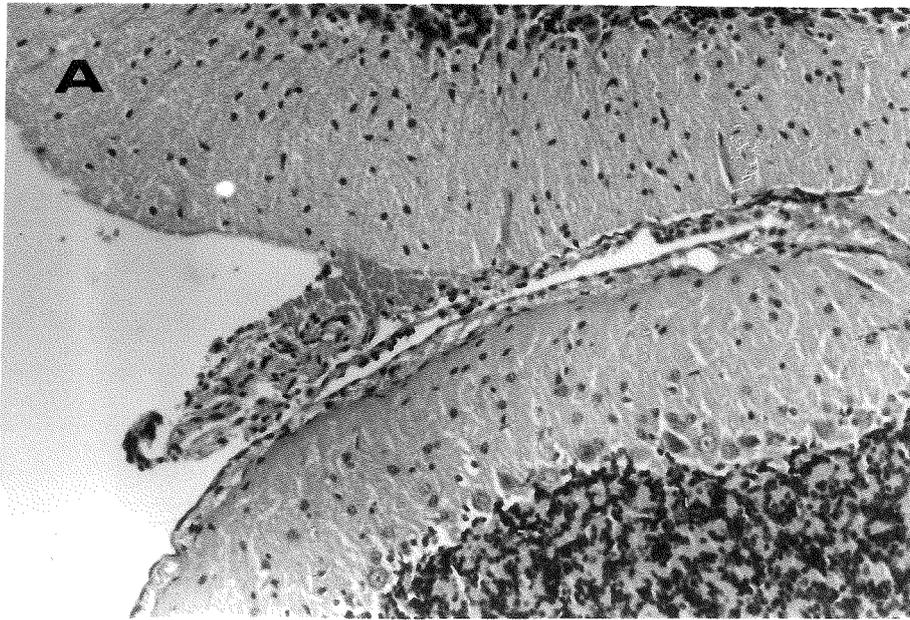


圖 14 : Histopathological examination of *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from the infected mice showed inflammation.(H&E stain ;x200) ; A.infected 5 weeks ; B. infected 6 weeks

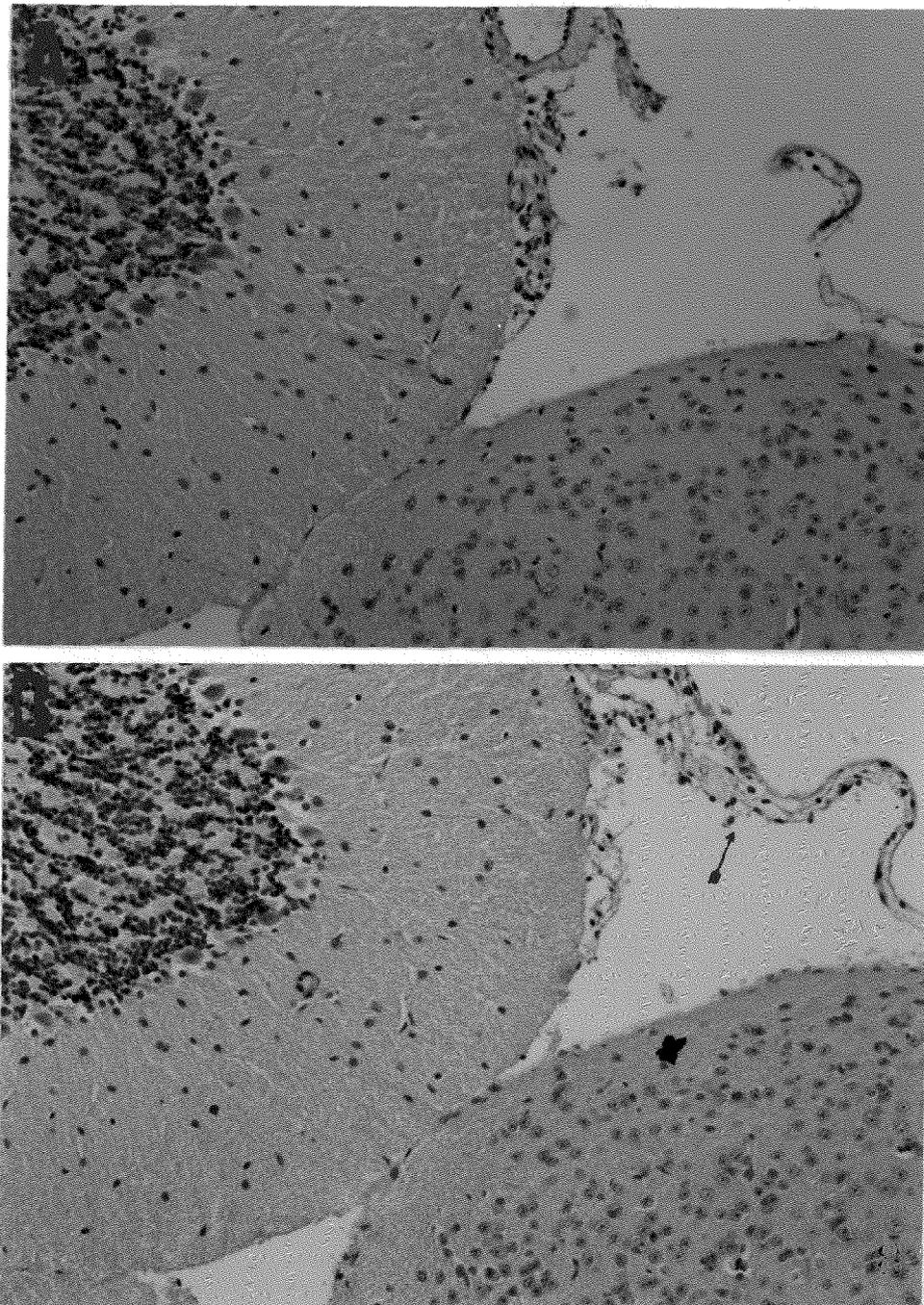


圖 15 : Immunocytochemical examination on the PKC expression in *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from infected and control mice were subjected to immuno-cytochemical examination for PKC expression using mouse ployclonal antibody as primary antibody and biotin peroxidase dictating system (x200).; A.control; B.infected 3 weeks

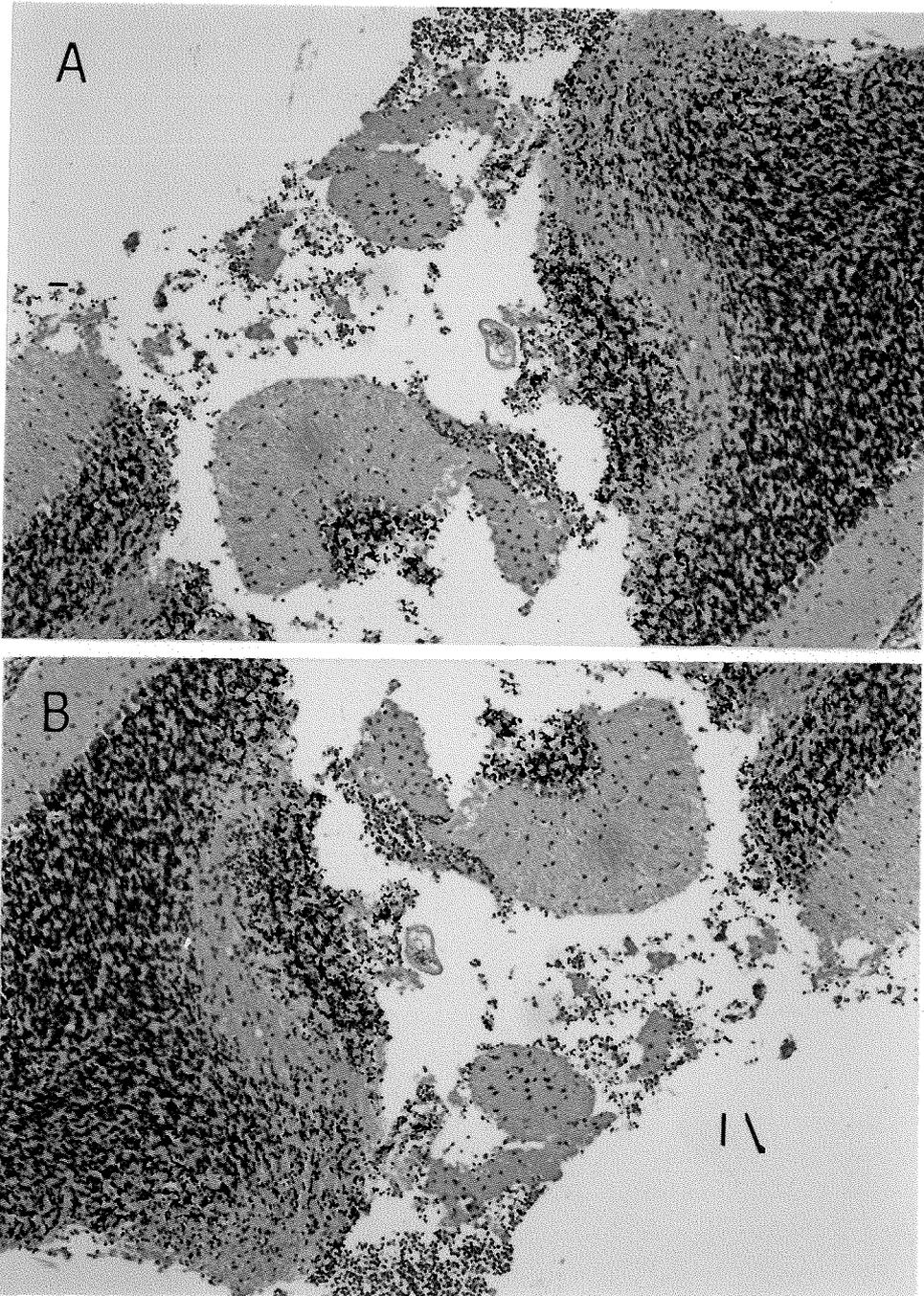


圖 16 : Immunocytochemical examination on the py-21 expression in *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from infected and control mice were subjected to immuno-cytochemical examination for py-21 expression using mouse ployclonal antibody as primary antibody and biotin peroxidase dictating system(x200).;A.control; B.infected 3 weeks

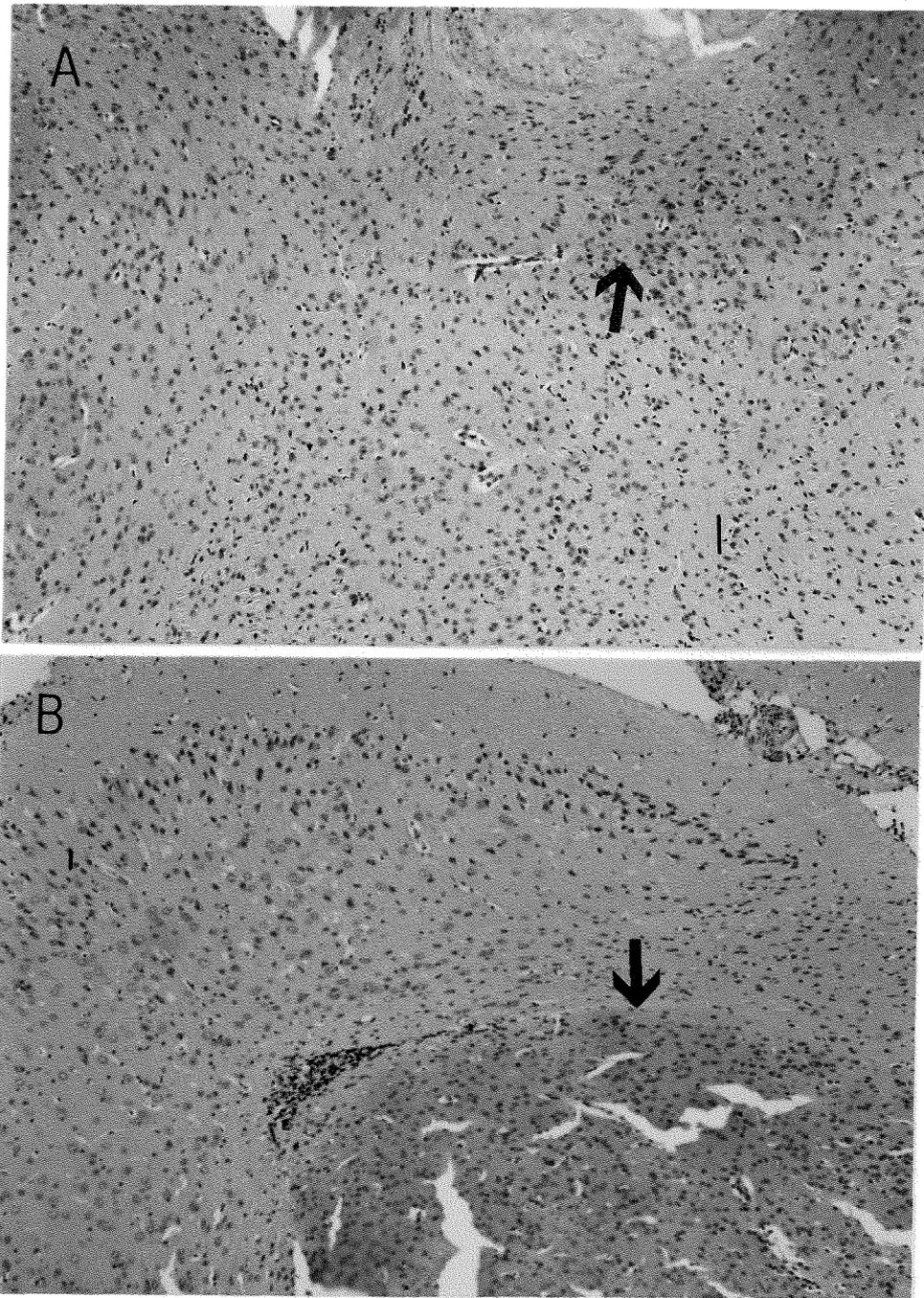


圖 17 : Immunocytochemical examination on the MEK-1 expression in *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from infected and control mice were subjected to immuno-cytochemical examination for MEK-1 expression using mouse ployclonal antibody as primary antibody and biotin peroxidase dictating system(x200).; A.control;B.infected 3 weeks

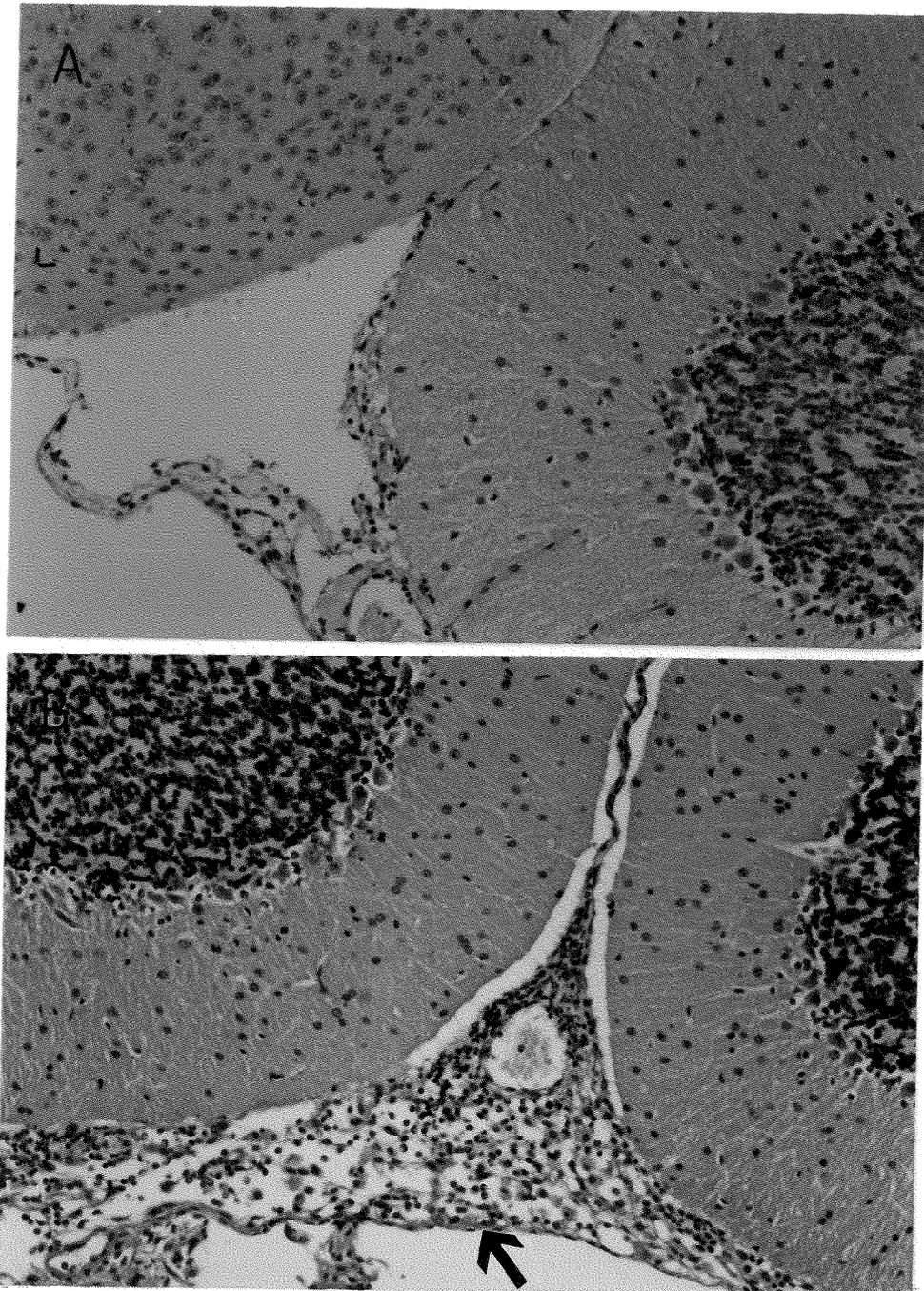


圖 18: Immunocytochemical examination on the ERK-1 expression in *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from infected and control mice were subjected to immuno-cytochemical examination for ERK-1 expression using mouse ployclonal antibody as primary antibody and biotin peroxidase dictating system(x200).; A.control;B.infected 3 weeks

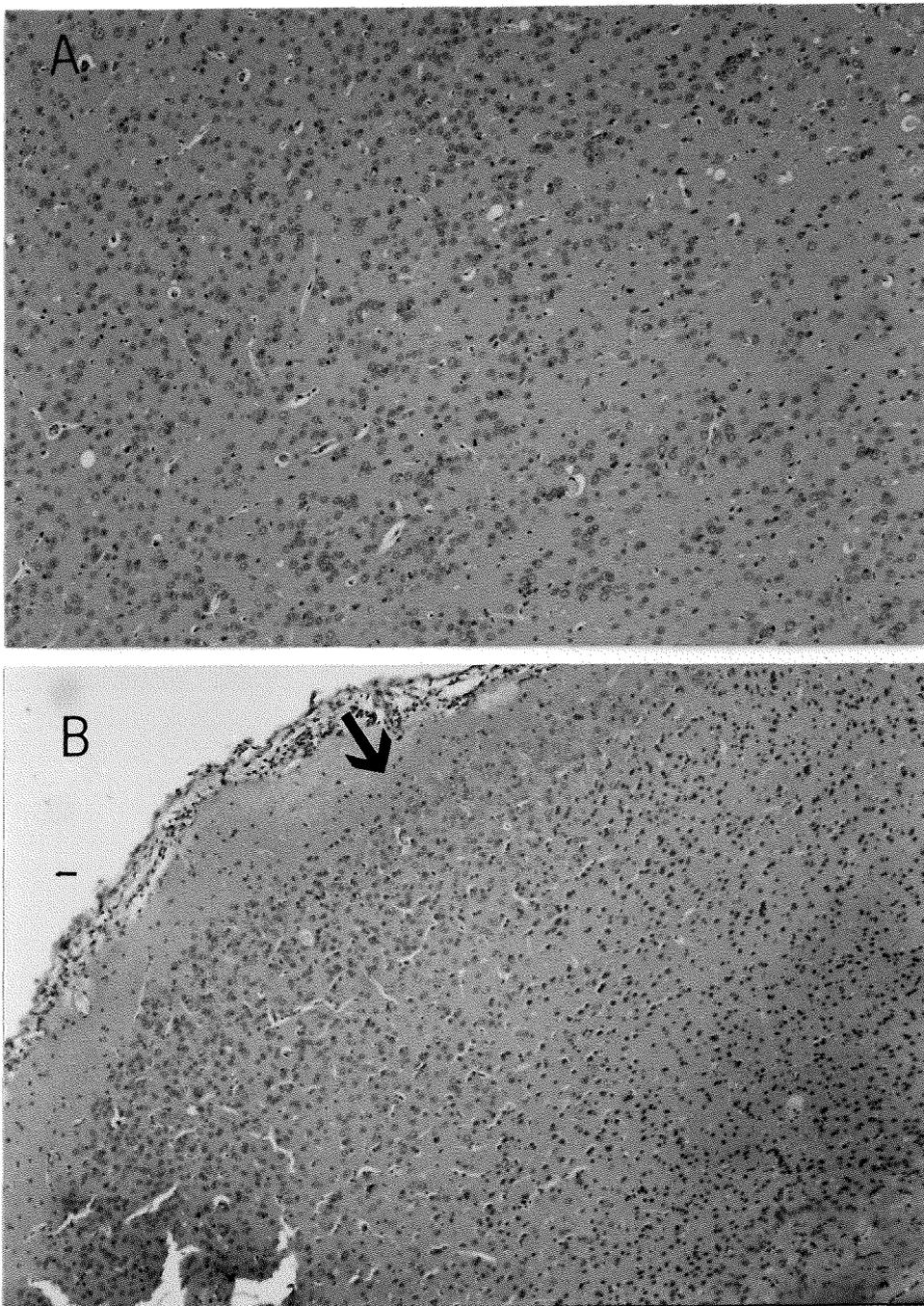


圖 19： Immunocytochemical examination on the ERK2 expression in *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from infected and control mice were subjected to immuno-cytochemical examination for ERK2 expression using mouse ployclonal antibody as primary antibody and biotin peroxidase dictating system(x200).; A.control; B.infected 3 weeks

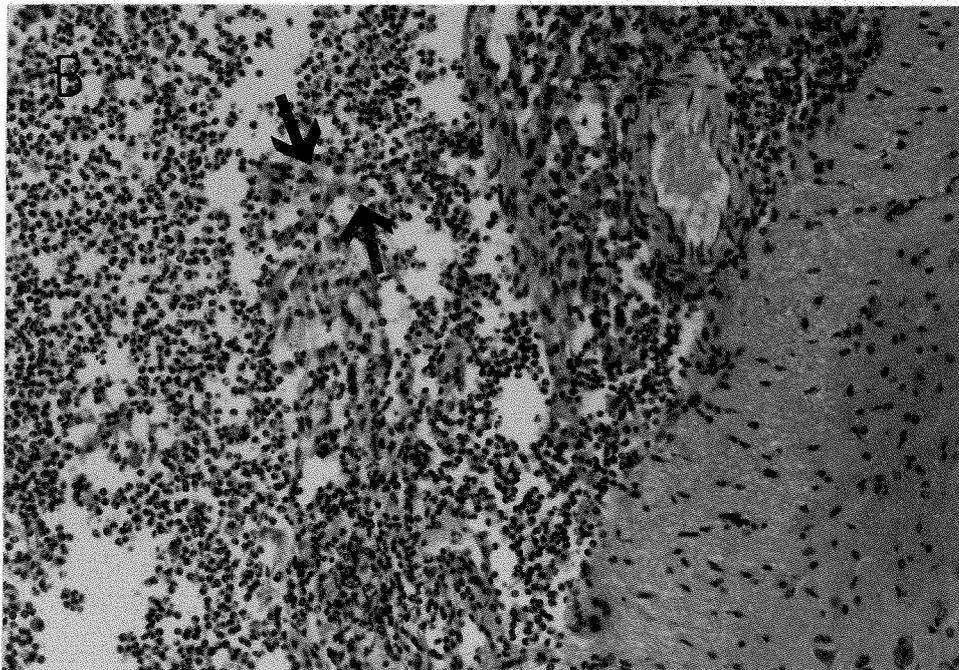
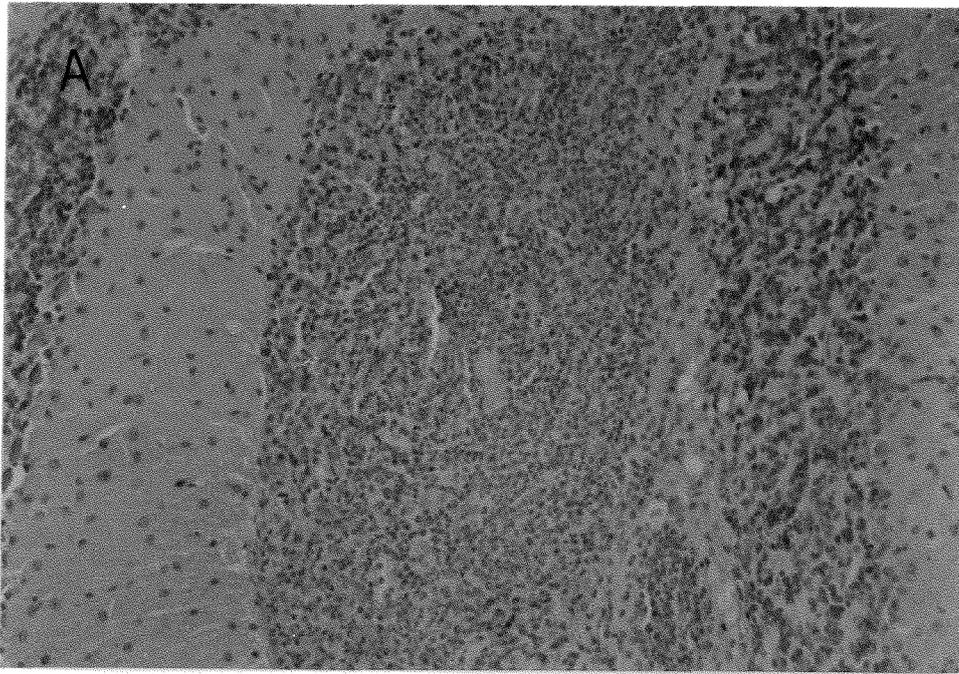


圖 20 : Immunocytochemical examination on the iNOS expression in *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from infected and control mice were subjected to immuno-cytochemical examination for iNOS expression using mouse ployclonal antibody as primary antibody and biotin peroxidase dictating system (x200). ; A.control; B.infected 3 weeks

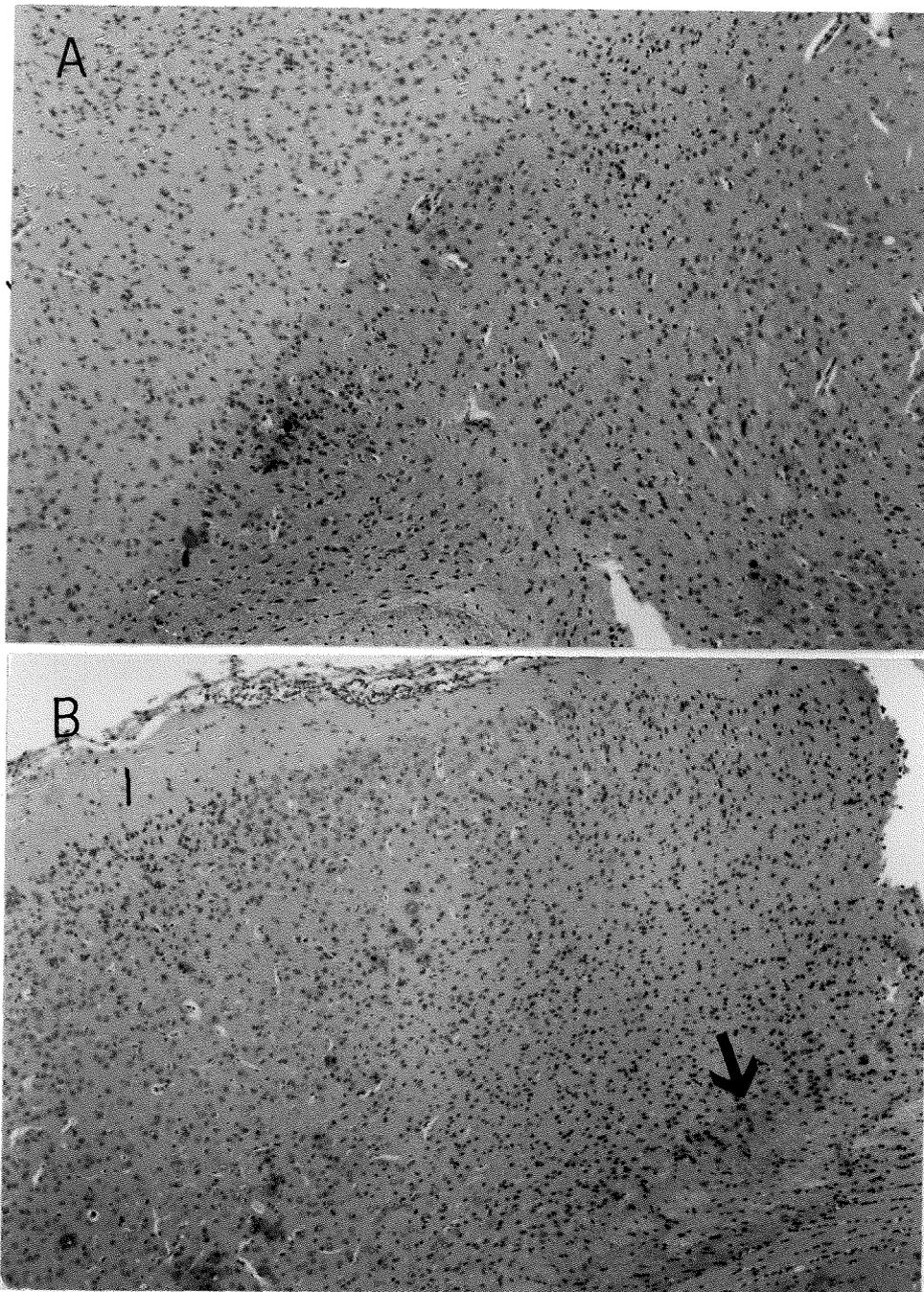


圖 21 : Immunocytochemical examination on the NF κ -B expression in *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from infected and control mice were subjected to immuno-cytochemical examination for NF κ -B expression using mouse ployclonal antibody as primary antibody and biotin peroxidase dictating system (x200).; A.control; B.infected 3 weeks

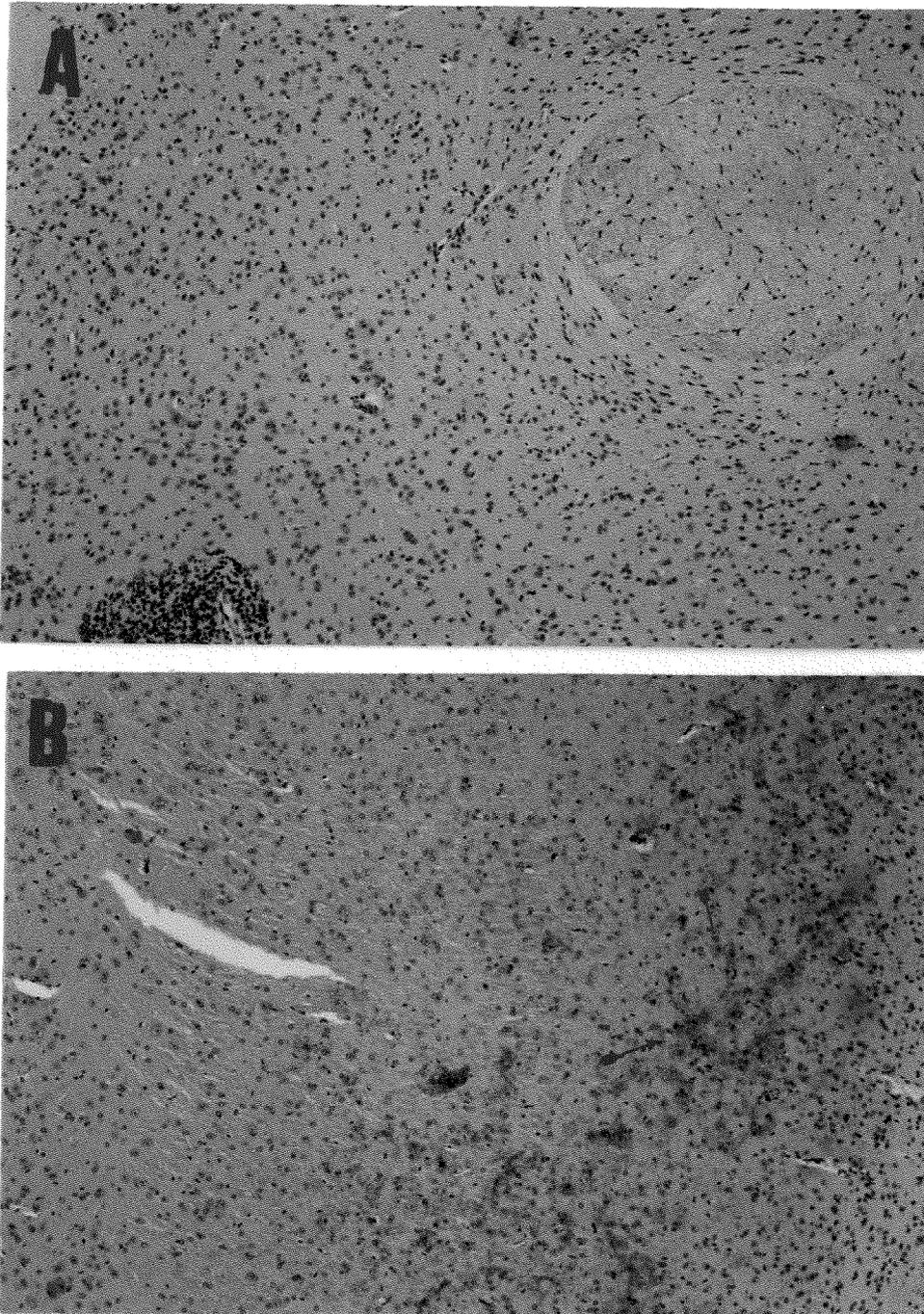


圖 22 : Immunocytochemical examination on the c-Myc expression in *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from infected and control mice were subjected to immuno-cytochemical examination for c-Myc expression using mouse ployclonal antibody as primary antibody and biotin peroxidase dictating system(x100).; A.control;B.infected 3 weeks

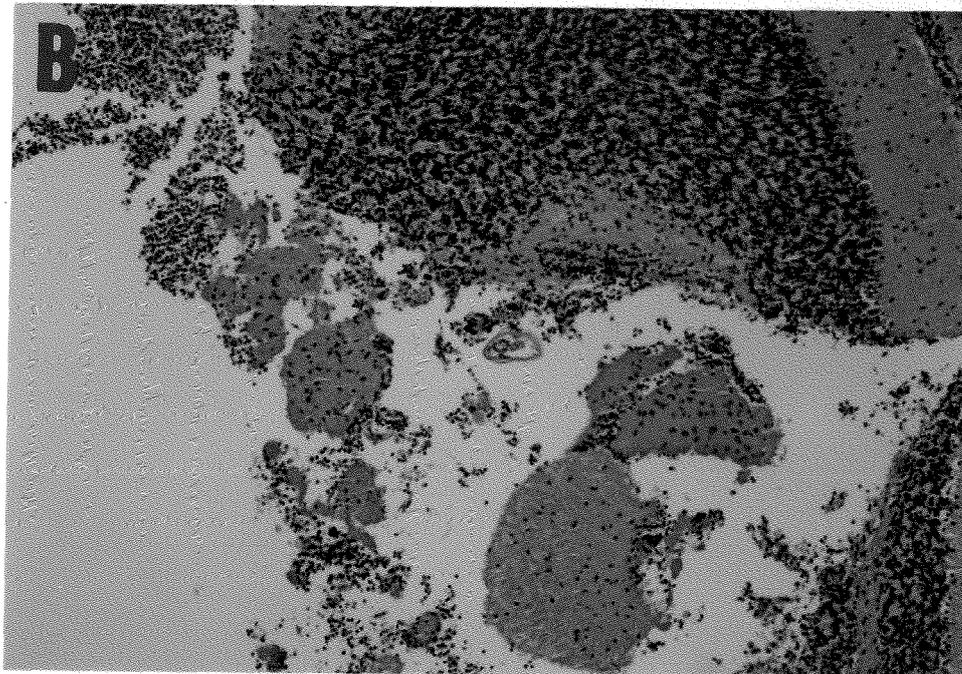
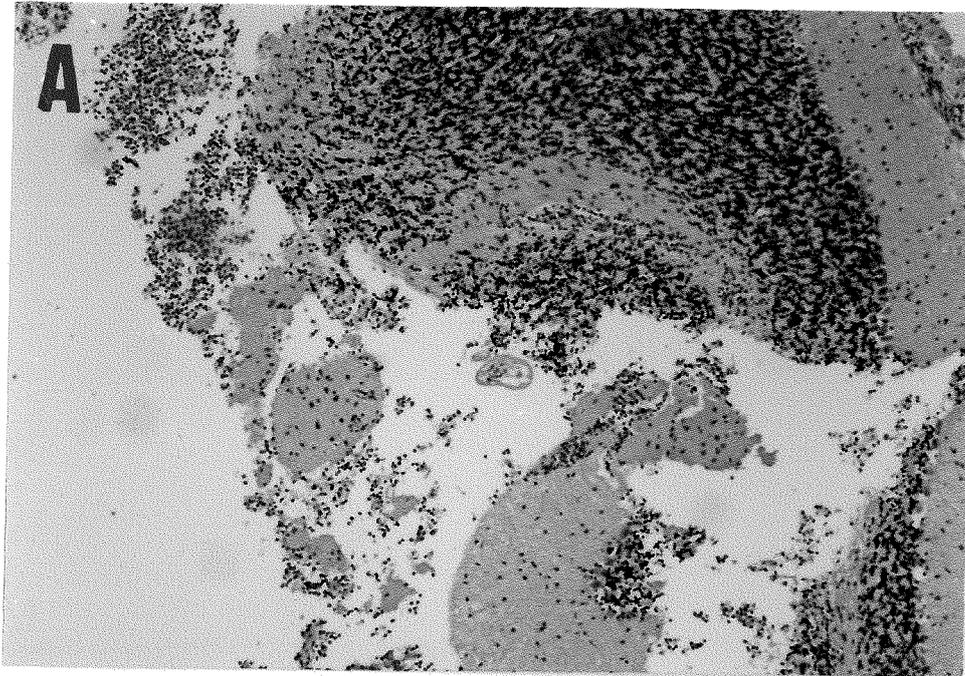


圖 23 : Immunocytochemical examination on the c-JUN expression in *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from infected and control mice were subjected to immuno-cytochemical examination for c-JUN expression using mouse ployclonal antibody as primary antibody and biotin peroxidase dictating system(x200).; A.control;B.infected 3 weeks

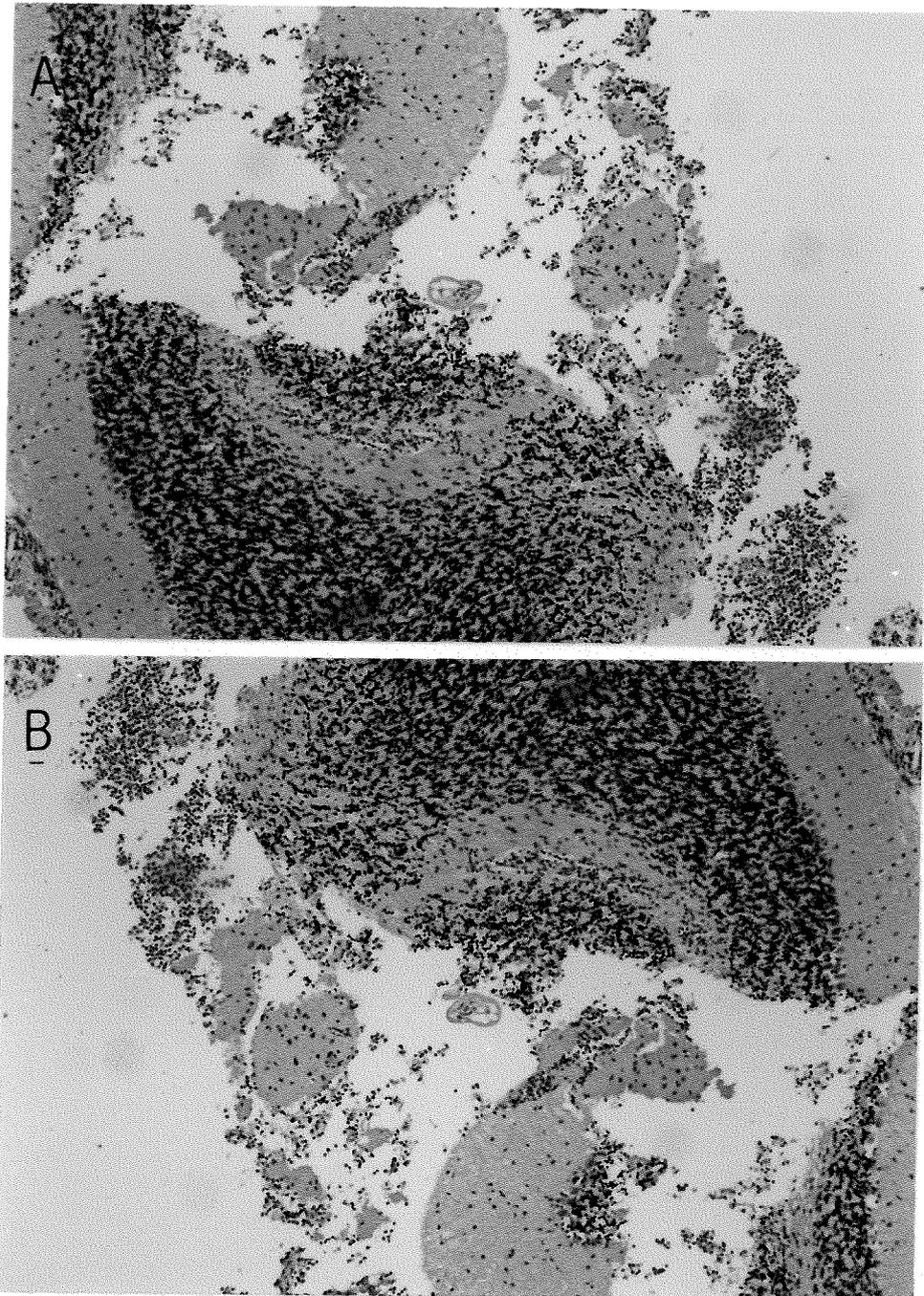


圖 24 : Immunocytochemical examination on the c-FOS expression in *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain section obtained from infected and control mice were subjected to immuno-cytochemical examination for c-FOS expression using mouse polyclonal antibody as primary antibody and biotin peroxidase dictating system(x200).; A.control; B.infected 3 weeks

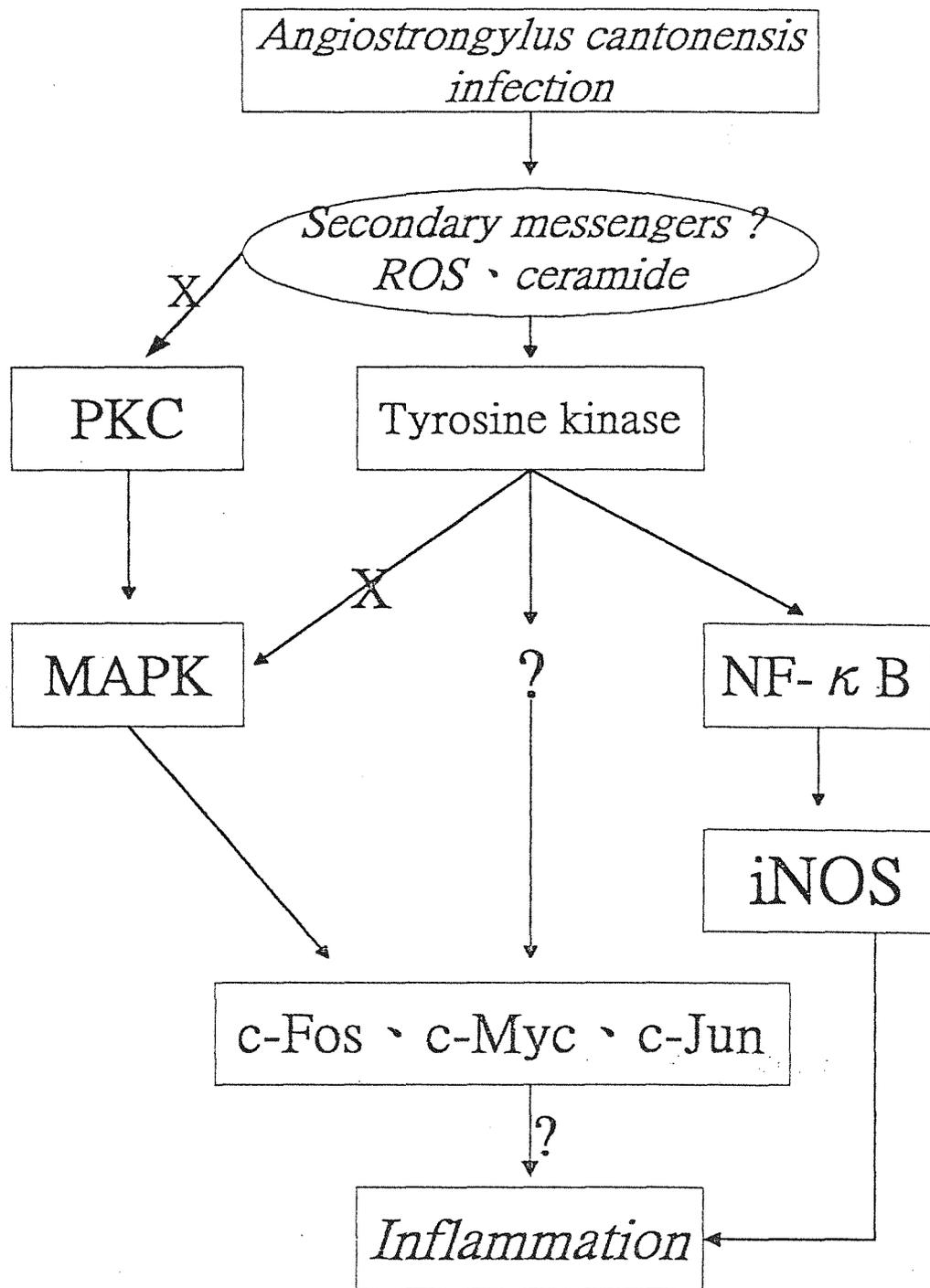


圖 25 : Activation of NF κ -B through protein tyrosine kinase but not PKC in *Angiostrongylus Cantonensis* infected mice brain

REFERENCES

1. 蕭孟芳,陳正成,陳瑩霖. 1987 . 廣東住血線蟲. P 103-108. 醫學寄生蟲學 2nd ed.
2. Chen, E.R 1979. Angiostrongyliasis and eosinophilic meningitis on Taiwan: A review. Studies on angiostrongyliasis in eastern Asia and Australia. J.H. Cross (editor). U.S. NAMRU-2, Taipei, Taiwan.57-73.
3. Chao, D., C.C. Lee, and Y. A. Chen. 1987. Studies on growth and distribution of *Angiostrongylus cantonensis* larvae in *Ampullarium canaliculatus*. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 18:248-252.
4. Allicata, J. E. 1965. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and other neurological disorders of man and animals. *Advances Pathol.* 3, 223.
5. Edward D.chan Brent W. Winston Evaluation of the Role of Mitogen-Activated protein kinase in the Expression of Inducible Nitric oxide synthase by INF and INF-2 in Mouse Macrophages. *The Journal of Immunology* 1999 162:415-422
6. Curran T, Franza BR. Fos and Jun the AP-1 concentration. *Cell*, 55, 395-397, 1988.

7. Lewis CC, Kurt RA, Christopher C, Brian D, Andres D, Rosanna K, Stephen S. Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 64, 282-302, 1991.
8. Church SL, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW, Swanson PE, Meltzer PS, and Trent JM., Increased manganese superoxide dimutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 3113-3117, 1993.
9. Niki E., Active oxygens and free radicals in biology., *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 41, 768-773, 1992. (Japanese)
10. Orr FW, Adamson IY, Warner D. The effects of oxygen radicalmediated pulmonary endothelial damage on cancer metastasis., *Mol. Cell. Biochem.*, 84, 189-198, 1988.
11. Takai Y, Kishimoto A, Nishizuka Y, Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues *J. Biol. Chem.*, 252, 7603-7609, 1977.
12. Warskulat U; Schliess F; Haussinger D. Compatible Organic osmolytes and osmotic modulation of inducible nitric oxide synthetase in RAW 264. 7 mouse macrophages. *Biol Chem* 1998; 379: 867-74.

13. Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T, Nishizuka Y. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids., *J. Biol. Chem.*, 254, 3692-3695, 1979.
14. Hisaki T, Stephane. M, Masami S, Koiti T. Mristorylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) a major protein kinase C substrate is an in vivo substrate of proline-directed protein kinase., *J. Biol. Chem.*, 269, 18299-18302, 1994.
15. Michell RH. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta.*, 415, 81-147, 1975.
16. Chec CC. Protein kinase α , δ , ϵ and ζ in C6 glioma cells. TPA induced translocation and down-regulation of conventional and new PKC isoforms but not atypical PKC ζ ., *FEBS Lett.*, 332, 169-173, 1993.
17. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion., *Nature*, 308, 693-698, 1984.
18. Nishizuka Y., Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C., *Science*, 258, 607-614, 1992.

19. Sharkly NA, Leach KL, Blumberg PM. Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 607-610, 1984.
20. Blumberg PM. In vitro studies on the model of action of phorbol ester, potent tumor promoter., Part 2, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 8, 199-234, 1981.
21. Nishizuka Y. studies and perspectives of protein kinase C., *Science*, 233, 305-312, 1989.
22. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*, 334, 661-665, 1988.
23. Bell RM, Burn DJ, lipid activation of protein kinase c.J. *Biol. Chem.*, 266,4664,1991.
24. Zhou G, Wooten MW, Coliman WS. Regulation of atypical ζ -protein kinase C in cellular signaling. *Exp. Cell Res.*, 214, 1-11, 1994.
25. Blumberg PM. Complexities of the protein kinase C pathway., *Mol. Carcinogen.*, 4, 339-334, 1991.
26. Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues., *J. Biol. Chem.*, 252, 7603-7609, 1977.

27. Hunter T, Ling N, Cooper JA. Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threptnine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane., *Nature*, 311, 480-483, 1984.
28. Jacobs S, Sahyoun NE, Saltiel AR, Cuatrecasas P. Phorbol ester stimulate the phosphorylation of receptors for insulin and somatomedin C., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 6211-6213, 1983.
29. Le Peuch CJ, Ballester R, Rosen OM. Purified rat brain calcium and phospholipid-depedent protein kinase phosphorylates ribosomal protein S6., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 6858-6862, 1983.
30. Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacylglycerol, two interacting second messengers., *Annu. Rev. Biochem.*, 56, 153-193, 1987.
31. Rozengurt E. Signal transduction pathways in mitogenesis., *Brit. Med. Bull.*, 45, 515-528, 1989.
32. Krystyna F. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage., *pharmac. Ther.*, 53, 127-166, 1992.

33. Rochat T, Burkhard C, Finci-Cerkez V, Meda P. Oxidative stress causes a protein kinase C-independent increase of paracellular permeability in an in vivo epithelial model. *Amer. J. Respir. Cell & Mol. Biol.*, 9, 496-504, 1993.
34. Klyszcz-Nasko H, Richter-Landsberg C, Beyersmann D. Modulation of bradykinin-induced calcium signals by oxidative stress in PC21 cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 306, 383-390, 1993.
35. Miura T, Muraoka S, Ogiso T. Inhibitory effect of urate on oxidative damage induced by adriamycin-Fe³⁺ in the presence of H₂O₂. *Res. Commun. Chem. Patho. & Pharmac.* 79, 75-85, 1993.
36. Chakraborti S, Michael JR. Role of protein kinase C in oxidant-mediated activation of phospholipase A2 in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells. *Mol. & Cell. Biochem.* 122, 9-15, 1993.
37. Taher MM, Garcia JG, Natarajan V. Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch. Biochem. & Biophys.*, 303, 260-266, 1993.

38. Rao GN, Lassegue B, Griendling KK, Alexander RW.: Hydrogen peroxide stimulates transcription of c-jun in vascular smooth muscle cells: role of arachidonic acid. *Oncogene*, 10: 2759 – 2764, 1993.
39. Rao GN, Lassegue B, Griendling KK, Alexander RW and Berk BC.: Hydrogen peroxide-induced c-fos expression is mediated by arachidonic acid release: role of protein kinase C. *Nucleic Acid Res.* 21: 1259 – 1263, 1993.
40. Maki Y, Bos TJ, Davis C, Starbuck M, Vogt PK. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 2848-2852, 1987.
41. Maki Y, Bos TJ, Davis C, Starbuck M, Vogt PK. Avian sarcoma virus 17 carries the iun oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 2848- 2852, 1987.
42. Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein BP, Karin M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis-element reconized by a TPA modulated transacting factor. *Cell*, 49, 729-739, 1987.
43. Sasson CP, Sisson JC, Verma IM. Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature*, 245, 314-319, 1988.

44. Verma IM, Sasson CP. Proto-oncogene fos: complex but versatile regulation. *Cell*, 51, 513-514, 1987.
45. BrabLeys, TAYLOR Shubing. LIU, Targeting of P38 MAPK mitopen-Activated protein kinase to MEF2 Transcription Factors *Mol cell Biol* 1999 19:4028-4038
46. Jacob.L.todd,Kirk G. Tanner, and John M.Denu Extracellular regulated kinase(ERK), and ERK2 are authentic substrates for the dualspecificity protein-tyrosine phosphatase VHR. A novel role in down-regulating the erk pathway. *J. Biol chem* 1999 274:13271-80
47. Jean Da Silva. Benoitpierrat. Jean-Luc Mary Blockade of p38 Mitogen-activated protein kinase pathway Inhibits Inducible Nitric-oxide synthase Expression in mouse Astrocytes. *J,Bio.chemical* 1997 272:28373-28380
48. Ranjan Sen and David Baltimore. Multiple Nuclear Factors Interact with the Immunoglobulin Enhancer Sequences. *Cell*, Vol. 46, 705-716,1986.
49. Sano, M., Ishii, A.I., Kino, H. and Hayashi, M. 1982. Experimental light infection of *Angiostrongylus cantonensis* in rats. *J. Trop. Med. Hyg.* 85:73-75.

11.07.88
11

50. Dang PM, Hakim J Perianin A.: Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils., FEBS Lett., : 338-342, 1994.