

中山醫學大學生化暨生物科技研究所
Institute of Biochemistry and Biotechnology,
Chung Shan Medical University

博士論文

Ph. D. Thesis

口腔黏膜下纖維化症的致病機轉

Pathological mechanisms of oral submucous fibrosis



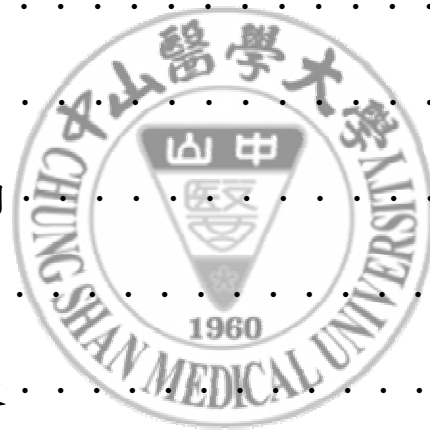
指導教授：謝易修 博士 (Yih-Shou Hsieh, Ph.D.)

研 究 生：楊順發 (Shun-Fa Yang)

中華民國九十四年六月

目錄

壹、中英文摘要	1
貳、縮寫檢索表	5
參、緒論	7
肆、實驗動機	30
伍、實驗材料與方法	31
陸、結果	49
柒、討論	60
捌、參考文獻	68
玖、圖表與圖表說明	98
拾、附錄	119
拾壹、已發表之論文	128



壹、中文摘要

口腔黏膜下纖維化症(oral submucous fibrosis; OSF)為一種口腔癌前期病變，主要與檳榔的嚼食習慣有關。而造成口腔黏膜下纖維化症的主要原因是細胞外基質中膠原蛋白異常的堆積及分解所導致的。基質金屬蛋白水解酶 (matrix metalloproteinases; MMPs)及纖維蛋白溶解系統(plasminogen activator (PA)/plasmin system)在細胞外基質的組成及分解過程中扮演很重要的角色。可是 MMPs、t-PA 及 PAI-1 在口腔黏膜下纖維化症致病過程中的機制卻仍不清楚。因此，我們除了觀察上述基因在正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化的差異性表現之外，也進一步利用檳榔素(arecoline)來探討其引發口腔黏膜下纖維化症的致病機轉，試圖解釋由嚼食檳榔所引發之口腔黏膜下纖維化症可能的原因。因此我們利用 gelatin zymography、western blotting 及 ELISA 等分析方式，發現在口腔黏膜下纖維化症的纖維母細胞比正常頰黏膜的纖維母細胞有較高的 TIMP-1、t-PA 及 PAI-1的蛋白表現，而在 PAI-1 的 mRNA 轉錄層次也有顯著的上升。我們也進一步利用檳榔素來探討其引起口腔黏膜下纖維化症的致病機轉。由實驗結果發現，當正常頰黏膜的纖維母細胞在處理不同濃度的檳榔素(10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$)之後，TIMP-1、t-PA 及 PAI-1 的蛋白表現都有顯著的上升，而 MMP-2 的蛋白表現則隨著檳榔素濃

度的增加而有明顯的降低。另外，我們也觀察 PAI-1 promoter region 第-675bp位置的4G/5G 基因多型性。我們利用 ASPCR 及 ASRS 的方式證明 PAI-1 在正常頰黏膜組織中的 4G/4G : 4G/5G : 5G5/G 的比例為 21.9% : 46.9% : 31.2 %；而在口腔黏膜下纖維化組織中的 4G/4G : 4G/5G : 5G5/G 的比例為 42.3% : 44.2% : 13.5 %，而我們進一步用卡氏平方的統計方式發現在正常頰黏膜組織及口腔黏膜下纖維化的組織中，其 PAI-1 的 4G/5G 基因多型性具有統計學上的意義 ($P < 0.05$)。根據上述結果可以發現，形成口腔黏膜下纖維化症的可能原因是由於 MMP-2 的減少及 TIMP-1 的增加，而導致細胞外基質中膠原蛋白異常的堆積及分解。而在 PAI-1 方面，由於口腔黏膜下纖維化症患者中 4G/4G 的比例明顯增加，可能進而導致 PAI-1 蛋白表現的增加，而增加了口腔黏膜下纖維化症形成的機率。

Abstract

Oral submucous fibrosis (OSF) is a pre-malignant fibrotic lesion of the mouth in areca quid chewers. It is probably a consequence of disturbances in the homeostatic equilibrium between synthesis and degradation of extracellular matrix molecules (ECM). To date, there has been little research about the role of matrix metalloproteinases (MMPs) and plasminogen activator (PA)/plasmin system in the pathogenesis of OSF. In the present study, we examined the activity of TIMP-1 and PAI-1 from cell cultured from OSF and normal buccal mucosa. OSF specimens were found to have higher TIMP-1 and PAI-1 expression than normal buccal mucosal fibroblasts (BMFs) by Western blots. To verify whether arecoline, a major areca nut alkaloid, could affect TIMP-1 or MMP-2 production by human BMFs, Western blots and gelatine zymography were used. Arecoline was found to elevate TIMP-1 and PAI-1 expression at the concentration level under 20 $\mu\text{g/ml}$ in a dose-dependent manner. From gelatin zymograms, the main gelatinolytic proteinase secreted by the human BMFs was MMP-2, and only minimal amounts of MMP-9 could be detectable from zymogram. In addition, arecoline was found to inhibit MMP-2 secretion and production in a dose-dependent manner. In

this study, we also investigated the genetic analysis of PAI-1 in the promoter region between OSF and normal buccal mucosa. PAI-1 genotyping with allele specific polymerase chain reaction (ASPCR) and allele-specific restriction enzyme site analysis (ASRS) was performed in the tissue of 52 OSF and 32 normal buccal mucosa. There were significant differences between the OSF and BMF for the frequencies of the 4G/4G, 4G/5G and 5G/5G genotypes ($P < 0.05$). In the OSF group, it had a high frequency of PAI-1 (4G/4G) genotypes than those in BMF group ($P < 0.05$). Taken together, it was found that arecoline acted not only as an inhibitor on gelatinolytic activity of MMP-2, but also a stimulator for TIMP-1, t-PA and PAI-1 activity. These synergistic effects may contribute to the ECM components accumulation in the areca quid associated OSF. Furthermore, our finding also suggested that the distribution pattern of PAI-1 promoter were different between OSF and BMF tissue. PAI-1 4G allele, with a higher transcription activity, was more prevalent in OSF.

貳、縮寫檢索表

APS	: ammonium persulphate
ASPCR	: allele specific polymerase chain reaction
ASRS	: allele-specific restriction enzyme site analysis
BMF	: buccal mucosal fibroblast
bp	: base pairs
BSA	: bovine serum albumin
CaCl ₂	: calcium chloride
4CN	: 4-chloro-1-naphthol
DAB	: 3,3'-diaminobenzidine
DMEM	: dulbecco's modified eagle's medium
ECM	: extracellular matrix
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
EtBr	: ethidium bromide
FBS	: fetal bovine serum
HCl	: hydrogen chloride
H ₂ O ₂	: hydrogen peroxide
MMPs	: matrix metalloproteinases
mRNA	: messenger RNA
β-MSH	: 2-mercaptoethanol
NaN ₃	: sodium azide
OSF	: oral submucous fibrosis
PA	: plasminogen activator
PAI	: plasminogen activator inhibitor

PBS : phosphate-buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
RT : reverse transcription
SDS : sodium dodecyl sulfate
TAE : tris-acetate-EDTA buffer
TEMED : N, N, N', N', -tetramethylethylenediamine
TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase
t-PA : tissue-type plasminogen activator
Tris : hydroxymethyl-aminomethane
u-PA : urokinase-type plasminogen activator



參、緒論

一、口腔黏膜下纖維化症的形成原因

口腔黏膜下纖維化症(oral submucous fibrosis, 簡稱OSF)是臺灣常見的慢性口腔黏膜病變(Pillai et al., 1992), 也被視為是一種口腔癌的前期病變。臨床上最常發生於頰黏膜, 其病理特徵為慢性發炎, 口腔黏膜上皮下方結締組織中含有過量的膠原蛋白沉積, 並伴隨著固有層或深部結締組織的局部發炎反應與肌肉組織的退行性變化(Hamner et al., 1971; Mani, 1977; Sirsat and Pindborg, 1967), 當病人吃刺激性食物時會有燒灼感, 進而造成唾液分泌改變, 並且會逐漸的造成口腔黏膜僵硬(stiffness)、開口及吞嚥困難(trismus and dysphagia)。由於口腔黏膜下纖維化症的臨床症狀以口腔灼熱及刺痛感為特徵, 特別在食用辛辣或其他刺激性食物時最為明顯。因此早期曾有學者認為印度民眾食用辛辣食物是造成口腔黏膜下纖維化症的主要原因(Pindborg and Sirsat, 1966)。但依流行病學研究顯示, 嚼食檳榔才是造成口腔黏膜下纖維化症的主要原因(Maher et al., 1994; Murti et al., 1995; Shah and Sharma, 1998)。有關其致病機轉複雜至今尚無定論, 除了嚼食檳榔之外, 遺傳因子、免疫反應、病毒感染、營養缺乏與致癌因子都被認為與口腔黏膜下纖維化症的形成有關(Mutri et al., 1995)。

早在1976年, Sirsat 等人以 HE (hematoxylin and eosin) 染色觀

察結締組織的變化，發現口腔黏膜下纖維化症發生的過程和結締組織內膠原蛋白過量的堆積及分解息息相關，且將口腔黏膜下纖維化症發生的過程分為最早期、早期、中期及晚期四個階段 (Sirsat and Pindborg, 1967)：

【1】最早期 (very early stage)：結締組織中存在著纖細並且排列整齊的膠原蛋白，而纖維母細胞呈現正常的紡錘狀。可是結締組織間の間質會有些微水腫，而其血管徑為正常或些微擴張，有時會有充血的現象。並且會有發炎細胞出現，且以多核性白血球及嗜伊性紅血球為主。

【2】早期(early stage)：在這個時期的膠原蛋白會開始增厚，可是排列仍很整齊，只有鄰接上皮結締組織處的膠原蛋白開始出現透明化。而纖維母細胞的型態及數目仍算正常。可是血管會有較嚴重的擴張且充血，並且會有發炎細胞出現，而大部份為單核性淋巴細胞、嗜伊性紅血球和少數的漿細胞。

【3】中期(moderately advanced stage)：此時期的膠原蛋白開始呈現中等程度的玻璃樣變性，且從鄰接上皮基底膜處向深層之結締組織層開始無形化(amorphous)。而結締組織間の間質水腫程度慢慢降低。而成熟的纖維母細胞形狀變為梭形，形成纖維組織的反應減少，血管因這些膠原纖維的推壓而使管徑變小甚至阻塞。並有發炎細胞浸潤，而此時的發炎細胞大部份為淋巴細胞及漿細胞。

【4】晚期(advanced stage)：此時期的膠原蛋白完全透明變性，且結締組織間の間質水腫消失。膠原蛋白透明化的地方幾乎沒有纖維母細胞的存在。此時的血管管徑變小甚至完全阻塞。並有大量的發炎細胞出現，而此時的發炎細胞和中期一樣主要為淋巴細胞和漿細胞。

由以上的分期就可以清楚的發現，膠原蛋白的過度堆積及透明化可能是造成口腔黏膜下纖維化症的主因。而截至目前為止，有許多證據支持這個理論。Meghji 等人發現口腔黏膜下纖維化症病人的纖維母細胞其細胞增生的速率和正常細胞比較並無明顯的增加，但合成膠原蛋白的基本速率比正常細胞升高了約15% (Meghji et al., 1987)。而在1995年也有學者提出相同的看法。他們發現罹患口腔黏膜下纖維化症病人的纖維母細胞其膠原蛋白的合成速率比正常細胞高出1.5-2倍 (Kuo et al., 1995)，而他們也發現罹患口腔黏膜下纖維化症病人的纖維母細胞其膠原蛋白 mRNA 的轉錄能力 (transcription) 也比正常細胞高。另外，Shieh 等人也發現，口腔黏膜下纖維化症組織中的膠原蛋白酶含量約為正常者的 45 % (Shieh et al., 1992)。Tsai 等人也發現口腔黏膜下纖維化症病人的纖維母細胞其吞噬膠原蛋白的能力比正常者低 (Tsai et al., 1999)。而從病理組織研究顯示，口腔黏膜下纖維化症的 type I collagen 形態雖然正常但其總量增加且形成團塊狀 (Van Wyk et al., 1990)，但是控制纖維成長的 type III procollagen 及賦

予膠原纖維彈性之 type VI collagen 均有減少的現象(Reichart et al., 1994)，但是從電泳分析發現口腔黏膜下纖維化症 collagen 組成與正常口腔黏膜無差異，僅 type I collagen / type V collagen 比值有隨疾病的嚴重程度增加而有增加的趨勢(Huang et al., 1989)。因此，綜合上述的發現可知，由於膠原蛋白合成增加與分解減少之故，造成膠原蛋白含量的不平衡，進而形成纖維化。這顯示膠原蛋白及膠原蛋白酶之間的不平衡存在可能是形成口腔黏膜下纖維化的一大主因。

而口腔黏膜下纖維化症一直被視為是具有口腔癌前期病變的特質，的確也有許多證據支持這個理論。在1956年 Paymaster 就發現口腔黏膜下纖維化症與口腔癌的發生是息息相關的(Paymaster, 1956)。而在1972年， Pindborg 根據其觀察口腔黏膜下纖維化症的患者與口腔癌患者的組織，發現口腔黏膜下纖維化症與口腔癌患者中有五種類似的現象，也可以進一步的說明並解釋口腔黏膜下纖維化症與口腔癌的關係：**【1】** 口腔黏膜下纖維化症的患者與口腔癌患者口腔中常可同時觀察到口腔白斑症的存在。**【2】** 口腔黏膜下纖維化症患者之上皮細胞與口腔癌患者一樣可同時觀察到上皮細胞的變異 (cell dysplasia)。**【3】** 口腔癌的患者中也常可同時觀察到有口腔黏膜下纖維化症的存在。**【4】** 口腔黏膜下纖維化症患者之上皮細胞常可以同時觀察到口腔癌的組織學變化。**【5】** 口腔黏膜下纖維化症的患者常

會發展成口腔癌(Pindborg, 1972)。而且， Pindborg 在1984年更進一步認為口腔黏膜下纖維化症轉變為口腔癌的機轉可能是由於初期皮下的發炎反應導致結締組織的破壞，在堆積過多的膠原蛋白後，使血管變窄且變少，進而導致上皮萎縮，而使上皮組織容易受到致癌物質的癌化作用，產生口腔癌(Pindborg et al., 1984)。另外，在流行病學的研究方面， Murti 在印度孟買針對66個口腔黏膜下纖維化症患者做了10年、15年、17年的長期追蹤研究發現，口腔黏膜下纖維化症轉變成口腔癌的比例分別是2.3%、4.5% 和7.6% (Mutri et al., 1995)。而在台灣地區， Shiau 及 Kwan 在35例的口腔黏膜下纖維化症中發現有8例(23%)伴隨著口腔癌的發生(Shiau and Kwan, 1979)。這顯示了罹患口腔黏膜下纖維化症的時間愈長，口腔黏膜下纖維化症的惡化程度及轉變成口腔癌的比例愈高。而一般而言，在診斷為口腔黏膜下纖維化症後大約在3到16年間就有可能會發展成口腔癌(Paymaster, 1956；Pindborg et al., 1984；Murti et al., 1985)。

口腔黏膜下纖維化症的患者較常見於印度(Pindborg et al., 1966)，還有台灣(Shiau and Kwan, 1979)、南非(Lemmer and Shear, 1967)、歐洲(Simpson, 1969)等地的亞洲移民及其後裔。在印度約0.5%的人口罹患此疾病，此疾病可發生於任何年齡，常見於 20-40歲患者(Pindborg et al., 1984)。在台灣地區，口腔黏膜下纖維化症最常發生於

30-50歲患者，大多數發生於男性，僅偶而發生於女性，而這和嚼食檳榔的習慣非常有關係，可是和抽菸、飲酒、嗜食辛辣食物則較無明顯的相關性(Shiau and Kwan, 1979；Chiang et al., 2000)。

在台灣地區，嚼食檳榔的人口超過二百萬，這與口腔黏膜下纖維化症的高發生率有密切的相關性。而檳榔的組成成分中，含量最多的就是檳榔素，其具有細胞毒性及基因毒性，會抑制細胞附著、擴張、移動、生長且會抑制細胞間質蛋白及 DNA 合成(Jeng et al., 1994)。而許多的研究實驗也顯示，檳榔的各種成分，是造成口腔黏膜下纖維化症的主要致病因子。在1981年，有學者發現檳榔萃取物會促進人類纖維母細胞的增殖，同時也會增加其膠原蛋白的合成量(Canniff and Harvey, 1981)。而1987年 Scutt 等人則發現檳榔萃取物會使膠原蛋白的 peptide bond 形成交叉鍵結 (cross-link)，使膠原蛋白的結構變得更為穩定，不容易被膠原蛋白酶分解 (Scutt et al., 1987)。而 Scutt 等人更發現檳榔萃取物抑制膠原蛋白酶分解膠原蛋白的能力會隨著兒茶素(catechin)、類黃酮(flavonoids)或單寧酸(Tannins)等濃度的增加而增加 (Scutt et al., 1987)。而在1995年，Ma 等人進一步發現口腔黏膜下纖維化症病人的纖維母細胞其 lysyl oxidase 的活性比正常細胞約高了46%，而 lysyl oxidase 會促使膠原蛋白形成交互鍵結，使膠原蛋白結構更穩定(Ma et al., 1995)。另外，Tsai 等人也發現

檳榔成分中的檳榔素(arecoline)會使正常纖維母細胞吞噬膠原蛋白的能力下降 (Tsai et al., 1999)。因此，不論從流行病學或實驗室的研究中都可以發現，檳榔萃取物及其成分是造成口腔黏膜下纖維化症的主要原因。

一般而言，結締組織內膠原蛋白過量的堆積是口腔黏膜下纖維化症的重要致病機轉。另外，從流行病學調查研究顯示，嚼食檳榔是導致口腔黏膜下纖維化症的主要原因 (Maher et al., 1994)。而在臺灣地區嚼食檳榔所引起口腔黏膜下纖維化症的病例相當多，因此我們利用檳榔素來探討其引發口腔黏膜下纖維化症的致病機轉，試圖解釋由嚼食檳榔所引發之口腔黏膜下纖維化症可能的原因及和結締組織內膠原蛋白相關基因的機制為何？而和結締組織內膠原蛋白相關的基因不外乎一些蛋白水解酵素，本論文即針對 matrix metalloproteinase 及 serine proteinase 詳加探討。

二、Matrix metalloproteinase的組成及分類

Matrix metalloproteinases 簡稱 MMPs，為一群結構類似且含鋅 (zinc ion) 金屬離子之蛋白水解酶 (Kotra et al., 2001)。因 MMPs 的催化作用需金屬離子加以活化，並具備催化水解細胞外基質蛋白 (extracellular matrix proteins) 之能力，且具有特有的基因序列可加以區別為不同的 MMPs，因而稱之為基質金屬蛋白水解酶 (Stöcker et

al., 1995)。MMPs 最早是在1960年代由 Gross 和 Lapierre 在蝌蚪的尾巴中分離出來，並指出富含膠原基質的蝌蚪尾巴，在成長為青蛙的過程中，因為 collagenase 的作用而使蝌蚪尾巴被溶解或被重吸收 (Gross and Lapierre, 1962)。而 MMPs 在正常生理狀態下可以分解細胞外基質蛋白與基底膜中不同的組成成份，而在生理作用上如正常的組織重建、血管生成、胚胎發育、傷口癒合等作用及病理狀態中如癌症侵襲轉移、組織纖維化、骨關節炎、心血管疾病、動脈硬化、中樞神經疾病皆扮演著重要角色 (Stetler-Sevenson et al., 1993 ; Nagase and Woessner, 1999 ; Singer et al., 2002)。MMPs 是由結締組織的細胞以一種潛在型或酵素原形態分泌，其活化時須內生性離子及外生性鈣離子，皆以 zymogen 方式被分泌出來，zymogen 需藉由蛋白酶或 organomecurials 來活化，活化型的 MMPs 會比未活化型的 MMPs 少掉10 kDa，MMPs 活化可被組織蛋白抑制劑 (tissues inhibitor of metalloproteinases ; TIMPs) 抑制。在正常組織中膠原蛋白的合成與轉換是平衡的，這意味著 MMPs 與 TIMPs 間相互調節可維持著結締組織的完整性，若其平衡被改變可能會造成結締組織病變。而目前為止已有 28 種不同的 MMPs 被辨識出來，且持續的在增加之中 (Handsley and Edwards, 2005)。而 MMPs 的分類相當複雜，因此我們將已知的 MMPs 相關酵素列表於附錄一，並在附錄二中依其功能及

結構加以區分為下列八類，將有助於我們瞭解 MMPs 序列的相互關係(Egeblad and Werb, 2002)。

(A) Minimal Domain MMPs : MMP-7、26

(B) Simple Hemopexin Domain-Containing MMPs : MMP-1、3、8、10、12、13、18、19、20、22、27

(C) Gelatin-binding MMPs : MMP-2、9

(D) Furin-activated Secreted MMPs : MMP-11、28

(E) Transmembrane MMPs : MMP-14、15、16、27

(F) GPI-linked MMPs : MMP-17、25

(G) Vitronectin-like Insert Linker-less MMPs : MMP-21

(H) Cysteine/Proline-Rich IL-1 Receptor-like Domain MMPs : MMP-23

而 MMPs 的結構骨架由N端至C端主要分為幾部分：signal peptide domain--可指引轉譯後產物至內質網，且當 MMPs 要分泌至細胞外時，須先切除 signal peptide 才能離開細胞。Propeptide domain--MMPs 活化過程中需被切除，方有活性產生。Catalytic domain--包含 thermolysin-type zinc-binding region，另外有結構性的鋅離子及2-3個鈣離子來維持 MMPs 活化後的穩定性及持續性。最後為 carboxyl-terminal domain (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1993)。MMPs 利用 propeptide domain 中的 cysteine 與 catalytic domain 上的鋅結

合，使分泌至細胞體外之 MMPs 維持在未活化狀態。而 MMPs 可分解結締組織受質及其它蛋白成分，在附錄三中，MMPs 若依其主要催化之結締性受質成分以區別其差異性，共可分為下列五類：(A) collagenases：如 MMP-1、-8、-13與-18，它們為主要催化裂解結締組織中的 collagen I、II及III。(B) gelatinases：如 MMP-2 與-9，主要催化裂解 gelatin 與 collagen type IV、V、VII、X等。(C) stromelysins：如 MMP-3、-10與-11，主要催化裂解 fibronectin 與 collagen type IV 等。(D) membrane-type MMPs (MT-MMPs)：如 MMP-14、-15、-16、-17、-24與-25，結構皆附著位於細胞膜上，主要功能為活化 pro-MMP-2等。(E) Others：如 MMP-7、-12、-19、-20、-23與 -26。一般而言，不同類型的細胞會分泌不同的 MMPs，如人類臍帶靜脈內皮細胞，主要以持續性(constitutive)的分泌 MMP-2 為主(De Lorenzo et al., 2000)。而活化的人類單核球或巨噬細胞，其分泌之主要形式為誘發性(inducible) MMP-9為主(Lepidi et al., 2001)。而 MMPs 主要可歸納出幾項特徵：(Nelson et al., 2000)

1. 催化的機制需要 Zn^{2+}/Ca^{2+} 位於活性中心(Woessner, 1998)。
2. MMPs 是以 zymogen (inactive form)的方式被分泌出來。
3. zymogen 需要被一些外來的蛋白水解酵素或是 organomercurials 所活化。

4. 活化態的 MMPs 因為 N 端的 propeptide domain 被切掉，所以分子量大約會減少 10kDa。
5. MMPs 可以分解數種的細胞外基質成份。
6. MMPs 的活性可以被 TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) 所抑制。

所有的 MMPs 皆是以未活化狀態分泌到細胞外(inactive form；或稱 pro-form)，由於 propeptide 中的 cysteine 與 catalytic domain 中的鋅結合，使 MMPs 無法發揮作用。MMPs 之活化過程需有蛋白酶之參與，將 cysteine 與鋅的結合打斷，再切除 propeptide，使鋅完全外顯，即成為活化態之 MMPs (Harper et al., 1971)。1990年，美國學者 Van Wart 及 Birkedal-Hansen 提出「cysteine switch」來解釋 proMMPs 的活化機轉 (Van et al., 1990)。此機制提出之主要根據為 MMPs 結構內 propeptide 的 conserved PRCG【V/N】PD 序列中的 single cysteine 可與酵素中的催化性鋅離子直接產生交互作用，也藉此作用防止鋅離子與水解 peptide 所需之 H₂O 結合，以維持 proMMPs 處於不活化狀態。換句話說，對於 proMMPs 的活化，Cys...Zn²⁺ 間的斷裂是必須的。此機制又可稱為「velcro mechanism」(Vallee et al., 1990)。而 MMPs 可由下列幾種方式活化：(附錄四)

1. 受 plasmin 的活化 (Knauper et al., 1998；Baramova et al., 1997)：

plasminogen 由 plasminogen activators 活化成 plasmin，plasmin 參與以 latent form 被分泌釋出的 MMPs 活化的 pathway。

2. 受 stromelysin、elastase、kallikrein、MT-MMPs 等酵素催化: 如已被活化的 stromelysin 會變成 superactivate MMPs，使 MMPs 的活性比活化態的活性更高出 5-8 倍。且不同 MMPs 也參與在 MMPs 活化過程中，例如：MT1-MMP 可活化 pro-MMP-2。(Vissers et al., 1998；Desrivieres et al., 1993；Sato et al., 1994)
3. 受加熱處理(heat treatment)所活化(Koklitis et al., 1991)
4. 受含汞化合物(mercurial compounds)而活化(Lazarus et al., 1972；Sopata et al., 1974)，如 4-aminophenylmercuric acetate (APMA) (Galazka et al., 1999)等
5. 受活性氧化物 (reactive oxygens) 所活化 (Rajagopalan et al., 1996)，如 HOCl、H₂O₂ (Saari et al., 1990)、ONOO⁻ (Maeda et al., 1998)、NO₂ (Okamoto et al., 1997)或 SDS (Birkedal-Hansen et al., 1982)等。

MMPs 的活化與否，也與內生性組織抑制劑 (tissue inhibitor of metalloproteinases；TIMPs) 生成與結合有關 (Bauer et al., 1975)。TIMPs 以其特殊環狀構造與雙硫鍵 (位於Cys₁和Cys₇₀間)，利用非共價鍵結與 MMPs 形成複合物，同時遮蔽了鋅，使 MMPs 無法

執行其功能(Gomez et al., 1997)。TIMPs 為一群分子量在 20-29 kDa 之蛋白，其抑制 MMPs 比例為1：1的 stoichiometric fashion 且為可逆反應(Gomez et al., 1997)。不同的 TIMPs 抑制不同的 MMPs 且抑制能力也有差異(Woessner and Nagase, 2000)。如 TIMP-1 的 C-terminal domain (loops 4~6)會與MMP-9上的 hemopexin domain 結合形成一複合物，而 TIMP-2 的 C-terminal domain 則會優先與 MMP-2 上的 hemopexin domain 結合來調節酵素的活化與否 (Murphy and Willenbrock, 1995)，藉此來達成一平衡狀態。而當 MMPs 與 TIMPs 的平衡一旦受到破壞，則會造成結締組織內膠原蛋白過量的堆積，進而造成組織纖維化。

三、Tissue inhibitor of metalloproteinase的組成及分類

Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)是 MMPs 的內生性抑制劑，它可以專一性的抑制 MMPs 的活性(Kugler, 1999)。而 MMPs 對於 tumor invasion and metastasis 及 ECM 的破壞中扮演一個很重要的角色 (Murphy et al., 1989)，因此 TIMPs 在抑制腫瘤的增生及維持 ECM 的平衡方面便顯得格外重要(Gomez et al., 1997; Murphy et al., 1992)。截至目前為止已經有四種 TIMPs 被發現，分別命名為 TIMP-1, -2, -3, -4(附錄五)。從結構上分析，這四種 TIMP 有相當多相似的地方。首先從氨基酸序列而言，TIMP-2 有40%與

TIMP-1 一致； TIMP-3 與 TIMP-2 有30%的一致，與 TIMP-1 則有38%的一致。最後 TIMP-4 與 TIMP-1 也有37%的一致，與 TIMP-2 及 TIMP-3 的一致性則達到了51% (Gomez, 1997)。而在結構上，四種 TIMP 在固定的位置都擁有12 個半胱胺酸(cysteine)，形成六個雙硫鍵，構成蛋白質基本的結構。其次對於 MMPs 活性抑制相當重要的胺基端也發現四種 TIMP 都有著 VIRAK 的氨基酸序列，顯示此序列與 MMPs 的活性抑制有非常重要的關連。而我們將 TIMPs 分類敘述如下：

1. TIMP-1: 位於 X 染色體 p 區(Xp23) (Huebner et al ., 1986)，是 TIMPs 中最早被發現的，也是被研究最清楚的。而 TIMP-1 是一種醣蛋白(glycoprotein)，需要醣基化的過程來作蛋白質的後修飾(post-translation)，形成具有完整功能的蛋白質。以 TIMP-1 來說，未經過醣基化的 TIMP-1 分子量大概 20 kDa 左右，經過醣基化後，一般的分子量是 28.5 kDa，但是有時候其分子量會分佈在30到34 kDa 之間，就看其醣基化的程度 (Tolley, 1993)。而已知 TIMP-1 的功能有許多，例如抑制活化態的 MMPs(Woessner, 1991)、和未活化的 MMP-9 結合(Kolkenbrock et al., 1995; Goldberg et al., 1992)、抑制血管新生 (Johnson et al., 1994; Takigawa et al., 1990; Thorgeirsson et al., 1996)、抑制腫瘤的侵襲和轉移(Alvarez et

- al., 1990 ; DeClerck et al., 1992 ; Schultz et al., 1988 ; Thoregerirsson et al., 1982)、在胚胎的形成過程中也扮演著重要的角色 (Flenniken et al., 1990)。
2. TIMP-2: 位於第 17 對染色體 q 區 (17q23) (DeClerck et al., 1992b), 分子量大約為 21kDa, TIMP-2 在 1990 年由 human melanoma cell cDNA library 中所分離出來(Boone et al., 1990)。
- TIMP-2 和 TIMP-1 功能相似, 尤其在抑制腫瘤的侵襲和轉移中扮演著重要的角色, 雖然 TIMP-2 和 TIMP-1 的序列有 40% 的相似度, 但在某些時候, 因為 TIMP-2 的表達會被修飾, 因此在同樣情況下, TIMP-2 和 TIMP-1 的結果往往會有所差異 (Shapiro et al., 1992 ; Stetler-Stevenson et al., 1990)。
3. TIMP-3: 位於 22 染色體 q 區 (22q12)(Apte et al., 1995), 分子量大約為 21kDa, TIMP-3 是 TIMP family 中唯一存在 membrane 中的, 它會和 ECM 結合在一起(Leco et al., 1994 ; Stricklin et al., 1983)。TIMP-3 功能和 TIMP-1、-2 較不相同, TIMP-3 主要功能是和調節細胞分化及細胞週期有關, 甚至可以當成細胞分化結束時的一個指標 (Yang et al., 1992)。其中有學者指出在 HL-60 leukemia cell 的分化過程, TIMP-3 的上升和 cell cycle 停留在 G1 phase 有關(Wick et al., 1994)。

4. TIMP-4: TIMP-4 是在1996年時，由 human heart cDNA library 中分離出來的(Greene et al., 1996)，分子量大約為22 kDa，目前對 TIMP-4 的了解尚未清楚，只大約了解 TIMP-4 可能有組織特異性，尤其是存在人類的心臟組織 (Greene et al., 1996)。

四、Plasminogen activator/ plasmin system

纖維蛋白溶解系統(plasminogen activator/ plasmin system)是哺乳動物血液中用來限制過度纖維蛋白(fibrin)形成及分解血塊的酵素系統，另和基底膜的降解、組織纖維化及組織重組非常有關係。在 1930 年至 1950 年期間，陸續發現了 18 種參於此系統反應的組成物，依其所扮演角色不同，劃分成：纖維蛋白溶解酶原(plasminogen)；纖維蛋白溶解酶(plasmin)；纖維蛋白溶解酶原的活化因子(plasminogen activators, PAs)；纖維蛋白溶解酶原活化因子的抑制因子(plasminogen activators inhibitors, PAIs)及溶酶抑制因子(antiplasmin, AP) (Collen, 1980)。plasmin 是負責溶解 fibrin 的酵素型式，是由 plasminogen 被其活化因子 plasminogen activators 催化而成。目前已知的活化因子主要為尿激酶型 (urokinase-type plasminogen activator, u-PA)，組織型纖維蛋白溶酶原活化因子(tissue-type plasminogen activator, t-PA) (Victor and Hinsbergh, 1988)。而具有酵素活性的 plasmin 和 PAs 又分別受到抑制因子的調控，抑制 plasmin 主要是 α_2 -antiplasmin (Mullerti

and Clemmensen, 1976), 而抑制 Pas 的是 PAI-1 與 PAI-2 (Andreasen et al., 1990; Kruitthof, 1988; Sprengers and Kluft, 1987) (附錄六)。而清除血塊並非纖維蛋白溶酶作用系統唯一的作用，其亦參於其它生理功能，如組織修補、血管新生、巨噬細胞活化及腫瘤轉移等，在這些過程中擔任蛋白水解的工作 (Saksela, 1985)。

(一) 纖維蛋白溶解酶原 (plasminogen)

自然型的人類 Glu-plasminogen(N 端第一個胺基酸為 glutamine) 是一種單鏈的糖蛋白，整個分子由 790 個胺基酸及 24 對雙硫鍵組成，N 端前 76 個胺基酸很容易被水解而成為 Lys-plasminogen。Glu-plasminogen 之結構分成兩個部分：第一部份由 N 端胺基酸到 Arg-560 稱為重胜鏈，有 5 個胺基酸序列相似的三級結構，稱為 kringle，各以三個雙硫鍵連接成三個迴圈 (Novokhatny, 1984)。第二部分，由靠 C 端胜鏈所組成，含 Val₅₆₁-Asn₇₉₀，又稱為輕胜鏈。Glu-plasminogen 的 kringle 結構與 t-PA N 端的 2 個 kringle，u-PA N 端的 1 個 kringle 以及 prothrombin N 端的 2 個 kringle 構造均有相似性。此部分含有離胺酸結合部位(lysine-binding site，簡稱為 LBS)能與許多的 ω -amino carboxylic acid 結合如：L-lysine、6-amino hexanoic acid 及 Trqnexamic acid (Sixtus, 1975; Isafia, 1982; Markus and Wissler, 1979) (附錄七)。而生理上透過此部分與 fibrin、 α_2 -AP、

fibronectin、thrombospondin、subendothelial matrices 及內皮細胞表面結合 (Plow and Mile, 1990)。而原型的 plasminogen 在人類、猴子及老鼠是由肝臟合成，在人類血液中的濃度約 21 mg/dl (2.4 μ M)。纖維蛋白溶解活性的調節主要依 plasminogen 與肝臟及血管內皮細胞所含的活化因子 t-PA、u-PA 以及蛋白抑制因子如 α_2 -AP 和 PAIs 等因子之間活性的表現來調控。Plasminogen 的輕鏈含有活化中心，序列與許多絲胺酸蛋白酶的活化中心很相似，如凝血酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、彈性酶、t-PA 及 u-PA (Strassburger et al., 1983)。而 plasminogen，它可以被 plasminogen activators 轉化成 plasmin，以執行裂解纖維蛋白的任務(Collen et al., 1991)。Plasmin 由兩段蛋白組成，A 段具有五個相似的 kringle domain，這些結構具有 lysine-binding sites，而藉由這些位置和纖維蛋白及 α_2 -antiplasmin 作用。B 段則含有 active sites: His-602, Asp-645 和 Ser-740 (Wiman, 1977)。PA 刺激 plasminogen 變成 plasmin 是引起纖溶作用的重要關鍵。而 plasminogen activator/ plasmin system 也和 MMPs 有非常密切的關係。Plasmin 是 MMPs 的上游，因此 MMPs 的調控也和 plasmin 有關，MMPs 會受 plasmin 的活化(Knauper et al., 1998)。當 plasminogen 由 plasminogen activators 活化成 plasmin 之後，plasmin 會參與以 latent form 被分泌釋出的 MMPs 活化的 pathway，而造

成 MMP 的活化(Lijnen, 2002) (附錄八)。

(二) 纖維蛋白溶解酶原活化因子(Plasminogen activators, PAs)

Plasminogen activators (PAs) 為一群 serine proteinases，與 plasminogen 具有高度的專一性。故可將 plasminogen 水解成 plasmin，被活化的 plasmin 具有蛋白水解酶的功能，可將血液凝塊中的 fibrin 溶解，進而防止血栓的形成。內皮細胞 PAs 活性的調解可分為幾個層次：A. 誘使新的 t-PA 及 u-PA 分子合成。B. t-PA 和 u-PA 與細胞接受體和基質成分的相互作用。C. t-PA 和 u-PA 與其他抑制因子的相互作用(Victor et al., 1988)。

t-PA 分子量為 70 kDa，屬於單鏈型，其基因位於第 8 號染色體。為 plasminogen 主要活化劑 (Collen and Lijnen, 1991)，其分子結構有一個與 fibronectin 相似的 finger domain (Banyai et al., 1983)及兩個與 plasminogen 相似的三環構造 (kringle)，最後才是絲胺酸蛋白酶部位。t-PA 也會被 plasminogen 切割成以雙鏈連接的兩條鏈，由內皮細胞合成及分泌。在血漿中 t-PA 的量會受到一些刺激而提升，例如：劇烈運動、缺氧、壓力或血管閉塞等 (Prowse et al., 1984；Markwardt and Kiocking, 1976；Dobrovolsky and Titaeva, 2002)。

u-PA 分子量為 50 kDa，其基因位於第 10 號染色體，單鏈型的 u-PA 也會被 plasminogen 切割成以雙鏈連接的兩條鏈(Blasi et al.,

1987)。主要來源是由腎臟及血管的內皮細胞所分泌。u-PA 會與細胞膜表面接受器 (u-PAR) 結合，它的蛋白質水解活性會造成細胞外基質中所含成分的降解，因此被認定與癌細胞的侵入與轉移有關 (Hofmann et al., 1994 ; Romer et al., 1996)。

(三) 纖維蛋白溶解酶原活化因子抑制劑 (plasminogen activator inhibitors, PAIs)

體內最重要的 PAI 是 PAI-1 和 PAI-2，前者由內皮細胞產生；後者由單核球產生。PAI-1 是 t-PA 最主要的抑制劑。許多可溶性的物質都會調控 t-PA 和 PAI-1 的產生，例如：thrombin (Dichek et al., 1989)、phorbol myristate actate (PMA)(Levin et al., 1989)和 butyric acid (Kooistra et al., 1987)都會誘導 t-PA 的表現，而 thrombin 同時也會引起 PAI-1 的高度表現(Dichek et al., 1989)。而一些細胞激素也會對 t-PA 和 PAI-1 的表現有所影響，例如在細胞培養的系統上，IL-1 會引起 t-PA 的 mRNA 及蛋白質的表現而抑制 PAI-1 的表現，而 TGF- β 則有相反的作用(Wilson et al., 1997 ; Rox et al., 1996)。在人體內，TNF 會先引起 t-PA 的產生而後再引起 PAI-1 量的上升。而在細胞培養時，卻引起內皮細胞 PAI-1 量的增加而抑制的 t-PA 生成 (Van Hinsebergh et al., 1990)。如上所述，t-PA 和 PAI-1 會分別由不同刺激而引起表現量增加，因此內皮細胞內 t-PA 和 PAI-1 產生的調

控似乎是獨立事件。另外， t-PA 和 PAI-1 之間的平衡及調控和纖維化也有很大的關係。纖維化的疾病發生在大部分的組織上，而且被認為是由一些路徑所調控的，而這些路徑被認為和一些分子會參與 collagen 的分解及形成有關。因此， PAI-1 被認為和 fibrosis 有很大的關係，而 PAI-1 的升高也被證明和許多纖維化的疾病有關，包括經由高血壓及 X-radiation 所引起的 glomerulosclerosis (Fogo et al., 1999)，或者是由 bycarbon tetrachloride 所引起的 liver fibrosis (Eitzman et al., 1997; Zhang, 1999)以及由 bleomycin 所引發的肺部纖維化 (Olman et al., 1995)。更值得注意的是在轉殖基因的老鼠中，經由 bleomycin 所引發的肺部纖維化會有非常大量的 PAI-1 表達出現，而在 PAI-1 缺乏的老鼠身上就看不到這個現象(Eitzman et al., 1996)。而 Hattori 等人更利用 bleomycin 來處理 PAI-1 缺乏的老鼠來證明 PAI-1 在纖維化疾病的重要性 (Hattori, 2000)。綜合以上一些證據，我們更加證明了 PAI-1 的不正常存在和組織的纖維化有非常大的相關性。另外，也有一些證據指出， PAI- 1 不管在 *In vivo* 或者 *In vitro* 中，都可以調節細胞的附著能力及轉移的能力 (Bajou, 1998; Chapman, 1997)。根據以上的文獻，也可以發現 PAI-1 可以促進 collagen 的分解，並且藉由刺激 collagen 的轉移來達到傷害組織的目的。

五、DNA polymorphism of PAI-1

人類以及其他物種基因組序列的完成將大幅增進我們對疾病的認知。疾病的一個重要成因是單個或多個基因的突變，主要發生在基因組所謂的「多型性區域」(polymorphism，即人類個體之間可能發生差異的 DNA 序列區域)。人體中的基因發生突變，就可能讓病變細胞以無法控制的方式增長和分裂。通過對 DNA polymorphism 的研究，我們將會對許多已知和未知的疾病的基因成因加深了解。

而之前的研究指出：PAI-1 被認為和纖維化有很大的關係，而 PAI-1 的升高也被證明的和許多纖維化的疾病有關，包括經由高血壓所引起的 glomerulosclerosis (Fogo, 1999) 及由 bleomycin 所引發的肺部纖維化 (Olman et al., 1995)。而目前有許多研究指出：PAI-1 的多型性和許多疾病有非常密切的相關性。無論在 colorectal cancer (Smolarz et al., 2001)、Ovarian cancer (Turkmen et al., 1997)、myocardia infarction (Fu et al., 2001)、type 2 diabetes (Nagi et al., 1997) 等疾病，皆和 PAI-1 的 polymorphism 有非常大的相關性。之前的研究皆明顯的發現，PAI-1 的 polymorphism 大多出現 PAI-1 promoter region，而這些位置包含 promoter 區域第 -675 base pairs 的 4G/5G insertion/deletion (Mansfield et al. 1999) 及 A-844G polymorphism. (Dawson S et al. 1991)。而這些學者亦證明了當 PAI-1 第 -675bp 為

4G/4G 的基因型時，對 PAI-1 的轉錄能力是扮演著一個增強子 (enhancer) 的作用。可是當 PAI-1 第-675bp 為 5G/5G 的基因型時，對 PAI-1 gene 的 transcription 不僅只是扮演著一個增強子的角色，亦有可能是扮演著抑制者 (suppressor) 的角色。所以當 PAI-1 的基因型為 5G/5G 時，有可能導致 PAI-1 的轉錄能力降低。相對的，當 PAI-1 的基因型為 4G/4G 時，有可能導致 PAI-1 的轉錄能力升高，進而促使 PAI-1 的蛋白表現量上升。因此本實驗擬於探討 PAI-1 對於口腔黏膜下纖維化症的詳細機制為何，是否與其先天性的基因的改变有關。



肆、實驗動機

在臺灣地區，嚼食檳榔和口腔癌、口腔白斑症以及口腔黏膜下纖維化症的發生有密切的關係。而嚼食檳榔所引起口腔黏膜下纖維化症的病例相當多，且口腔黏膜下纖維化症一直被視為是一種口腔癌前期病變，臨床上最常發生於頰黏膜，而造成口腔黏膜下纖維化症的主要原因是細胞外基質中膠原蛋白異常的堆積及分解所導致的。基質金屬蛋白水解酶 (matrix metalloproteinases ; MMPs)及纖維蛋白溶解系統(plasminogen activator (PA)/plasmin system)在細胞外基質的組成及分解過程中扮演很重要的角色。可是 MMPs、t-PA 及 PAI-1 在口腔黏膜下纖維化症致病過程中的詳細機制卻仍不清楚。因此本論文希望能利用檳榔素來探討其引發口腔黏膜下纖維化的致病機轉，也希望藉此實驗對口腔黏膜下纖維化症能有更進一步的了解。

伍、實驗材料與方法

一、實驗材料

1. 人類正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞的培養

人類正常頰黏膜纖維母細胞及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞來自台中市中山醫學大學附設醫院牙科部。正常的頰黏膜纖維母細胞是來自年輕健康且沒有嚼食檳榔習慣的患者手術檢體，而口腔黏膜下纖維化纖維母細胞則來自嚼食檳榔習慣且經醫師診斷為口腔黏膜下纖維化的患者。這些組織會先利用含有抗生素(100 units/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml fungizone)的 phosphate-buffered saline (PBS) 清洗兩次，然後馬上放置到含有 10% 胎牛血清及抗生素的 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 的 60mm 培養皿中，在無菌操作檯(laminar flow)下，將正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化組織切碎，存放於 37°C 的培養箱中培養。待細胞長成之後，再利用 0.25% trypsin and 0.05% EDTA 反應 5 分鐘，使細胞自培養皿上游離下來，再加入含胎牛血清的 DMEM 培養液進行繼代培養，等正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞培養到第 3~6 代之後再進行實驗。而當細胞繼代培養到第 25 代之後，就不再進行實驗。

2. 人類正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化檢體的收集

在人類正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化檢體的收集可分為兩個部份進行，第一部份是直接由患者的口腔頰黏膜組織經手術取得。而將取得的組織研磨再萃取其 DNA，定量並置於 -70°C 備用。而第二部分是來自口腔黏膜下纖維化症的病理切片，經由二甲苯 (xylene) 去蠟再萃取其 DNA，定量並置於 -70°C 備用。

二、化學試藥

1. 細胞培養的試藥

- (1) dulbecco's modified eagle medium (DMEM)購自 Gibco life technologies, NY, USA
- (2) fetal bovine serum (FBS) 購自 Gibco life technologies, NY, USA
- (3) glutamine 購自 Sigma chemical company, MO, USA
- (4) penicillin G 購自 Sigma chemical company, MO, USA
- (5) sodium bicarbonate (NaHCO_3)購自 Sigma chemical company, MO, USA
- (6) streptomycin sulfate 購自 Sigma chemical company, MO, USA

2. 蛋白質電泳分析的試藥

- (1) acetic acid 購自 Tedia chemical company, OH, USA

- (2) acrylamide 購自 Sigma chemical company, MO, USA
- (3) ammonium persulfate (APS) 購自 Serva chemical company,
NY, USA
- (4) calcium chloride (CaCl_2) 購自 Sigma chemical company, MO,
USA
- (5) 4-chloro-1-naphthol (4CN) 購自 Sigma chemical company,
MO, USA
- (6) coomassie brilliant blue R-250 購自 Merck chemical company,
PA, USA
- (7) 3,3-diaminobenzidine (DAB) 購自 Sigma chemical company,
MO, USA
- (8) gelatin 購自 Sigma chemical company, MO, USA
- (9) glycine 購自 Sigma chemical company, MO, USA
- (10) hydrogen chloride (HCl) 購自 Merck chemical company, PA,
USA
- (11) hydroxymethyl-aminomethane (Tris) 購自 Merck chemical
company, PA, USA
- (12) methanol 購自 Tedia chemical company, OH, USA
- (13) N,N-methylene-bis-acrylamide 購自 Sigma chemical company,
MO, USA



(14) sodium azide (NaN_3) 購自 USB chemical company, OH, USA

(15) TEMED 購自 Sigma chemical company, MO, USA

(16) triton X-100 購自 Merck chemical company, PA, USA

3. DNA 電泳分析的試藥

(1) acetic acid 購自 Tdia chemical company, OH, USA

(2) agarose 購自 Gibco life technologies, NY, USA

(3) ethidium bromide (EtBr)購自 Sigma chemical company, MO,
USA

(4) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)購自 Sigma chemical
company, MO, USA

(5) hydroxymethyl-Aminomethane (Tris)購自 Merck chemical
company, PA, USA

4. 其他實驗分析的試藥

(1) bovine serum albumin (BSA)購自 Sigma chemical company ,
MO, USA

(2) hydrogen peroxide (H_2O_2) 購自 Sigma chemical company,
MO, USA

(3) sodium chloride (NaCl)購自 Merck chemical company, PA,
USA

(4) sodium citrate 購自 Sigma chemical company, MO, USA

- (5) sodium dodecyl sulfate (SDS) 購自 USB chemical company,
OH, USA
- (6) sodium hydroxide (NaOH)購自 Sigma chemical company,
MO, USA
- (7) sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)購自 Merck chemical
company, PA, USA
- (8) sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4)購自 Merck chemical
company, PA, USA

三、儀器設備

1. Centrifuge : Beckman GS-6R
2. ELISA reader : VERSA maxBO2153 , Bio-Rad
3. Horizontal gel electrophoresis apparatus : Cosmo Mupid-2
4. Microfuge : Eppendorf 5415C 96
5. Power supply : Model 200/2.0 , Bio-Rad
6. Shaker : TKS RS01
7. Spectrophotometer : Beckman DU640
8. Thermal cycler : GeneAmp PCR system 2400 , Perkin Elme
9. Vertical gel electrophoresis apparatus : OWL P-1
10. Vortex : Genie SI-2
11. Water bath : TKS WB201

四、緩衝液及溶液

1. 0.1% gelatin-8 % SDS-PAGE 製備

在下層膠的配置方面，我們依序加入 3 ml 的 dd H₂O、3 ml 的 1.5M Tris-HCl, pH8.8 緩衝溶液、4.2 ml 的 30 % acrylamide- 1.2 % N, N methylene-bis-acrylamide、0.6 ml 的 10 mg/ml ammonium persulfate、120 μl 的 10 % SDS (在配製 10 % SDS 時需帶口罩，以避免吸入 SDS)、0.6 ml 的 2 % gelatin，將上述溶液混合均勻之後，再加入 10μl 的 TEMED 混合均勻，倒入預先架設好的電泳用玻璃槽中到 4/5 滿的位置，再加入 dd H₂O，等下層膠體凝固之後再架設上層膠。在上層膠的配置方面，等下層膠凝固之後，將 2.7 ml 的 dd H₂O、1.3 ml 的 0.5M Tris-HCl、pH6.8 緩衝溶液、0.7 ml 的 30 % acrylamide- 1.2 % N,N methylene- bisacrylamide、0.25 ml 的 10 mg/ml ammonium persulfate 及 50μl 的 10 % SDS 混合均勻之後，再加入 10μl 的 TEMED 混合均勻，倒入預先架設好的電泳用玻璃槽中，再插上適當的 comb，等上層膠體凝固後，拔掉 comb，置於電泳槽中，進行電泳分析。

2. Zymography washing buffer (2.5 % Triton X-100) 製備

在 zymography washing buffer 的製備，我們先加入 3900 ml ddH₂O，再緩慢加入 100 ml 的 Triton X-100，混合均勻，置於 4°C 冰箱備用。

3. Zymography reaction buffer (40mM Tris-HCl, pH8.0、10mM CaCl₂、0.01 %NaN₃) 製備

在 zymography washing buffer 的製備，我們先配製高濃度的溶液(2 M Tris-HCl, pH8.0、1 M CaCl₂ 及 1 % NaN₃)，置於 4°C 冰箱備用。在使用時，取 1ml 的 2 M Tris-HCl, pH8.0，0.5ml 的 1 M CaCl₂ 及 0.5ml 的 1 % NaN₃ 加水到 50 ml 混合均勻備用。

4. Staining solution (0.25 % coomassie brilliant blue R-250) 製備

染色液的配製方面，依序加入 1.25 克的 coomassie brilliant blue R-250 及 0.5 克的 amino black、227 ml 的 dd H₂O 及 227 ml 的甲醇，混合均勻(在混合過程中需置於冰上)，等完全溶解後再加入 46ml 的醋酸，混合均勻，置於室溫備用。

5. Destaining solution (20 % methanol、10 % acetic acid) 製備

褪色液的配製方面，依序加入 200 ml 的甲醇及 100 ml 的醋酸，再加水至 1000 ml，混合均勻，置於室溫備用。

6. TBS buffer (pH 7.4) 製備 (2000 ml)

TBS buffer 的配置方面，依序加入 2.66 克 Tris-base 及 18 克 NaCl 於量筒中，再加入 2000 ml 的 dd H₂O，使其粉末溶解，然後調整利用 6N HCl 調整 pH 值至 7.4 即可。

7. Washing buffer 製備(pH 7.4)

Tween 20 與 Triton X-100 同屬於界面活性劑，具有濃稠的性質，因此，先取適量的 2000 ml 的 TBS buffer 在量筒中，利用 pipetman 緩慢的吸取 1 ml 的 Tween 20，再緩慢的加進量筒中混合均勻即可。

8. Blocking buffer 配置(50 ml)

加入 2.5g 的脫脂奶粉(安佳)，再加入 50 ml 的 TBS buffer 溶解即可。

9. 1.5% DNA gel 製備(50ml)

將 0.75 克的 agarose 倒入 200 ml 的錐形瓶，並加入 1 ml 的 50 倍 TAE buffer，最後再加入 49 ml dd H₂O，稍微輕輕搖晃一下，再放置在微波爐中加熱使其溶解，大約每 25 秒鐘即拿出來搖晃使其充分溶解，差不多 3~4 次即可。最後將溶解好的 agarose 倒入製膠容器中，在室溫中靜置約三十分鐘即可。(若有氣泡產生，可利用滅菌好的 tip 將氣泡搓破)

五、實驗方法

1. 實驗設計

實驗設計分為兩部分:第一部分培養人類正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞，觀察兩者在一些纖維化相關基因蛋白表現的差異性(如 MMP-2, TIMP-1, t-PA 及 PAI-1 等基因)。再利用檳榔素

加入人類正常頰黏膜的纖維母細胞，觀察相同基因的差異性表現。第二部分取人類正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化的組織，萃取其 DNA，觀察 PAI-1 的基因多型性。

2. 定量細胞的分配及藥物處理

將正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞培養到第 3~6 代的培養液吸出，加入 PBS，輕輕搖動數十下沖洗，再加以吸掉。加入 0.25% trypsin and 0.05% EDTA 5 分鐘，使細胞自培養皿上游離下來，加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培養液，然後進行細胞計數，並分盤，使每個培養皿的細胞數達到 5×10^4 的時候，培養 48hrs 再換掉培養液，再加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培養液及加入不同濃度的 arecoline 培養。然後在特定時間收集 media、cell extracts 及 RNA。然後進行定量並儲存在 -20°C 備用。

3. 蛋白濃度測定 (Bradford MM. 1976)

蛋白質的定量是採用 Bradford protein assay，其原理為蛋白質可與 coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白質濃度越高。測試方法首先以一系列已知濃度的 BSA 加入五分之一體積的 bradford protein dye，以波長 595nm 可見光之吸光度做一標準曲線，再以同樣的方法測得樣品之 O.D. 值，再以內差法求得樣品蛋白之濃度。

4. MMPs 活性分析 (gelatin zymography) (Oliver et al., 1997)

4-1 原理

利用 zymography 的方法，先將 2% 的 gelatin 溶入 SDS-PAGE 的凝膠片內，利用 gelatinase 對 gelatin 的活化作用，經電泳過程及反應程序後染色，即可看出凝膠片內 gelatin 被活化的 band，再依其分子量對照被活化的 band 即為 MMP-2 及 MMP-9。

4-2 實驗步驟

將 0.1% gelatin-8 % SDS-PAGE 電泳膠片置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，取一定量的細胞培養液加入 5 μ l loading buffer 均勻混和後，注入膠片中，分別以 100V 與 140V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，以 washing buffer 在室溫下反應 30 分鐘 2 次後，再加入 reaction buffer 在 37°C 恆溫箱中反應 12 小時，反應完之膠片以染色液進行染色 30 分鐘，再以退色液退染，觀看結果。

4-3 計算

利用 alpha imager 2000 數位化影像處理系統，分析電泳片上 gelatin 被活化的 band 的密度，藉此可測出各組培養液中 MMPs 的活性。

5. Tissue plasminogen activator (t-PA) 定量(de Witte et al., 1999)

5-1 原理

使用購置 biopool tintElize 的 t-PA kit 進行分析，goat anti-tPA IgG 已 coating 在 96 well 上，將培養液加入 well 內反應後再添加 conjugate solution，之後用 OPD/H₂O₂ 使之呈色，最後加入 H₂SO₄ 終止反應。

5-2 實驗步驟

50 µl PET buffer 加入含 goat anti-t-PA IgG 的 well 中後，再將 20 µl 的培養液及 standard 加入 well 中，室溫下使用 shaker 反應 1 小時，加入 50 µl biotin conjugate，室溫下培養 15 分鐘之後，使用 PET buffer 清洗 4 次，加入 OPD/H₂O₂ 100 µl，室溫下 15 分鐘之後，加入 H₂SO₄ 100 µl 終止反應，以 ELISA reader 於波長 OD_{492nm} 吸光值下，測定 t-PA 濃度。

5-3 標準曲線之製作

使用濃度為 0、10、20、30 ng/ml 之 t-PA standard，依上述方法測定，可得一標準曲線圖。

5-4 計算

細胞培養液中 t-PA 濃度之計算，由標準曲線以內插法 ($y = ax+b$) 代入計算，濃度表示方式為 ng/ml。

6. PAI-1 的定量分析 (PAI-1 ELISA) (de Witte et al., 1999)

6.1 實驗步驟

使用購置 R&D systems 的 human PAI-1Kit 進行分析，先加入 100 μ l 的 assay diluent's buffer，再將 20 μ l 的培養液及 standard 加入 96 well 中，於室溫下使用 shaker 反應 2 小時，使用 washing buffer 清洗 4 次，然後加入 200 μ l conjugate，室溫下反應 2 小時之後，再使用 washing buffer 清洗 4 次，最後加入 OPD/H₂O₂ 100 μ l，室溫下反應 30 分鐘之後，加入 H₂SO₄ 100 μ l 終止反應，以 ELISA reader 於波長 OD_{450nm} 吸光值下，測定 PAI-1 的濃度。

6.2 標準曲線之製作

使用活性為 0、10、20、50、100、200 ng/ml 之 PAI-1 standard，依述上方法測定，可得一標準曲線圖。

6.3 計算

細胞培養液中 PAI-1 濃度之計算，由標準曲線以內插法 ($y = ax+b$)代入計算，濃度表示方式為 ng/ml。

7. PAI-1 的測定

利用 western blotting 測定 PAI-1 的量。首先製備 12.5% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 16 μ l sample (蛋白總量 20 μ g)，加入 4 μ l loading buffer，將 sample

denature (99°C, 10 min) 之後再 loading 到電泳片中，以 140 伏特進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下後進行蛋白轉移，將膠體置入冰冷之 transfer buffer，將預先浸濕的 NC paper 蓋在膠體上面後裝入 transfer holder，於 4°C 下，以 100 伏特進行轉漬 1 小時之後，取出 NC paper 加入 blocking buffer，在室溫下搖動一個小時。然後加入一級抗體 (PAI-1) 於 TBS buffer，在 4°C 下反應 overnight，之後以 washing buffer (TBS+0.05% Tween 20) 清洗三次，每一次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用二個小時，之後以 washing buffer 清洗三次，每一次 10 分鐘。最後加入 25ml substrate buffer 進行呈色反應，待 NC paper 上有明顯的 band 出現，即以水終止反應，並晾乾。

8. 細胞免疫染色

取正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化組織以 10% 福馬林固定處理，再以低至高濃度之酒精及以二甲苯脫水，然後以石臘固定包埋，以 4 μ m 的厚度作切片，固定於玻片上，接著放入烘箱中以 37°C overnight 將石臘溶解，然後再以二甲苯進行脫臘，利用高至低濃度酒精進行復水，並以 1% H₂O₂ 去除內生性過氧化酶再以 PBS buffer 處理，使其具有滲透性。接著以胎牛血清處理而阻止一些非特異性抗原的結合，20 分鐘後將水吸乾，然後在室溫下加入一級抗體作用一

小時後，以 PBS wash 二次來移除未結合之抗體，接著再加入二級抗體 (含有 biotin) 作用一小時後，以 PBS wash 二次，再加入 ABC solution (含有 avidin) ，在室溫下作用 45 分鐘，再以 PBS wash 二次，接著以 substrate buffer 進行染色，大約 10 分鐘後一起中止反應再以 hematoxylin 染色 (細胞核)，再利用 ddH₂O 洗去多餘的染色液。最後以酒精脫水，將封片膠滴入玻片上以蓋玻片覆蓋著，在顯微鏡下觀察褐色分布的結果。

9. 萃取 cell RNA

取 cell 置入研磨管中，加入 1ml solution D (4M GNTC，25mM sodium citrate，0.5% sarcosyl，0.1M 2-mercaptoethanol) 研磨，研磨完後把研磨液各取 0.5ml 置入 1.5ml 離心管，加入 50 μ l Sodium acetate (2M，pH 4.0) ， 100 μ l chloroform 及 phenol (pH 4.0) 0.5ml 混合均勻後置於冰上靜置一分鐘，再拿起來用手均勻搖動 30 秒，重複冰上靜置及搖動 10 分鐘，最後冰上靜置 5 分鐘後，離心 (12000g，2 分鐘)，吸取分層的上層液(RNA 及水層)到新的離心管，並加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，再離心 12000g，2 分鐘，吸上層到新的離心管，再加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，重複此步驟直到分層中看不見白色蛋白質沉澱後，把水層吸到新的離心管並加入等體積體積的 isopropanol ，混合均勻後於-20

°C 冰箱靜置保存，等要使用時再拿出離心(12000g，4°C，30 分鐘)，倒掉上層 isopropanol 取沉澱物並加入 75% ethanol 清洗之後，將 75% ethanol 倒掉並吸乾，加入適量的 DEPC-H₂O 溶解 RNA，並測量其吸光值 (OD₂₆₀) 換算 RNA 濃度。

10. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

10-1. RT reaction :

取 4μg 的 RNA，加入適量的 DEPC-H₂O (總體積為 33μl)，以 70°C 處理 5 分鐘去除 harpin。再加入 0.25μl (40U/μl) RNase inhibitor，再加入 10μl 5 倍 RT buffer 及 4μl (2.5mM) dNTP，和 1μl (50 pmole/μl) Oligo dT 及 1μl (200U/μl) RTase，在 42°C 反應 1 小時之後，以 99°C 作用 5 分鐘後保存於 4°C。

10-2 PCR:

接著取 5μl cDNA 加入 26μl DEPC-H₂O，加入 primer-5' 和 primer-3' 各 5μl，加入 (2.5mM) dNTP 3.2μl 及 10 倍 PCR buffer 5μl 最後再加入 DNA polymerase 0.5μl (2U/μl)，置於溫度循環機 94°C 1 分鐘之後，annealing 溫度 1 分鐘，72°C 2 分鐘，共 30 個循環，最後再以 72°C 反應 20 分鐘，並於 4°C 保存。而各個基因的 primers 序列如下。

Enzyme	Primer sequence (5' 3')	Position	Temp.
PAI-1	5'-GGATCCAGCCACTGGAAAGGCAACATG-3'	1470-1490	55
	5'-GGATTCGTGCCGGACCACAAAGAGGAA-3'	1236-1216	
GADPH	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'	94-126	65
	5'-AGCCTTCTCCATGGTTGGTGAAGAC-3'	399-375	

11. 萃取組織 DNA

取口腔頰黏膜纖維母細胞或病理切片組織置入研磨管，加入 1ml solution D (4M GNTC，25mM sodium citrate，0.5% sarcosyl，0.1M 2-mercaptoethanol) 研磨，研磨完後把研磨液各取 0.5ml 置入 1.5ml 離心管，加入 sodium acetate (2M，pH4.0) 50 μ l，chloroform 100 μ l 及 phenol(pH8.0) 0.5ml 混合均勻後在冰上靜置，再拿起來混合均勻，重複冰上靜置及 mix，再放到冰上靜置 5 分鐘後，離心 (12000g，2 分鐘)，取離心管的上層(DNA 及水層)到新的離心管，並加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，再離心 (12000g，2 分鐘)，吸上層到新的離心管，再加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，重複此步驟直到分層中看不見白色蛋白質沉澱後，把水層吸到新的離心管並加入等體積的 isopropanol，混合均勻後放到 -20 $^{\circ}$ C 冰箱靜置，直到要使用時再拿去離心 (12000g，4 $^{\circ}$ C，30 分鐘)，此時 DNA 會形成一白色沉澱，將 isopropanol 倒掉後，以 75% ethanol

wash 之後，將 75% ethanol 倒掉並吸乾，加入適量的 DEPC-H₂O 溶解 DNA，測量其 260 nm 吸光值並計算 DNA 濃度。

12. PAI-1 4G/5G polymorphism 的測定

12-1. Allele specific polymerase chain reaction (ASPCR) (Wong et al. 2000)

ASPCR 的測定方式如下：取 5 μ l DNA 加入適量的 DEPC-H₂O 至 26 μ l，加入 primer-5' 和 primer-3' 各 5 μ l，加入 3.2 μ l dNTP (2.5mM) 及 5 μ l 10 倍 PCR buffer 最後再加入 DNA polymerase 1 μ l (2U/ μ l)，置於溫度循環機 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘之後，annealing 溫度 1 分鐘，72 $^{\circ}$ C 2 分鐘共 30 個循環，最後再以 72 $^{\circ}$ C 反應 20 分鐘，並於 4 $^{\circ}$ C 保存。而 PAI 4G/5G polymorphism 的 primers 序列如下。

Primer sequence	/time (min)	Cycles
Insertion 5G allele: 5'-GTCTGGACACGTGGGGG-3'	94 /1	
Deletion 4G allele: 5'-GTCTGGACACGTGGGGA-3	58 /1	40
Control primer: 5'-AAGCTTTTACCATGG TAACCCCTGGT-3'	72 /2	
Downstream primer: 5'-TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCTAG-3'		

12-2. ASRA: allele-specific restriction enzyme site analysis: (Nauck et al. 2000)

此方法是利用 PCR 結束之後所夾出來之片段，再利用 Bsl-1 這一個限制酶(restriction enzyme)只會作用在其片段上面的限制酶切點

(-GGGGG-)。如此便可以很輕易的得到我們所要觀察的 PAI 4G/5G

DNA polymorphism。而 ASRA 的 primers 如下。

primer sequence	/time (min)	Cycles	Restriction enzyme used
PAI-1 amplification (99 bp)	94 /1		BsII
Sense: 5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'	60 /1	40	55
Antisense: 5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3'	72 /2		4hr

13. DNA 電泳

預先配置 1.2 % agarose gel，取 5 μ l 的 PCR 產物加入 1 μ l 的 loading dye 充份混合後。於電壓 100V，進行電泳 45 分鐘之後，以 1 μ g/ml ethidium bromide 染色，再以 ddH₂O 退染，於 UV 燈下分析所要的位置是否有表現。

14. 統計分析

各組實驗數據以平均值加減標準差(mean \pm standard error)表示，統計則以 SPSS 軟體進行分析，各處理組之間在 P-Value 值 \leq 0.05 時才具統計上的顯著差異。

陸、結果

一、人類正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞的型態

首先我們培養人類正常頰黏膜纖維母細胞及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞是來自台中市中山醫學大學附設醫院牙科部，正常的頰黏膜纖維母細胞是來自年輕健康且沒有嚼食檳榔習慣患者手術檢體，而口腔黏膜下纖維化纖維母細胞則來自有嚼食檳榔習慣且經醫師診斷為口腔黏膜下纖維化的患者。在顯微鏡底下觀察，我們可以發現無論是正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞，其細胞型態都呈現細長的紡錘狀，且外觀上並無很大的差異 (Fig-1)。

二、TIMP-1 及 TIMP-2 在正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞的表現

口腔黏膜下纖維化症發生的過程和結締組織內膠原蛋白過量的堆積及分解息息相關，而 MMPs 及其抑制劑 TIMPs 的表現及平衡與否在膠原蛋白的堆積或分解扮演著很重要的角色。於是我們首先觀察正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞細胞內 TIMP-1 及 TIMP-2 的蛋白質表現是否有差異。如 Fig-2 及 Fig-3 所示，我們利用 western blotting 來觀察兩者的差異。結果發現在口腔黏膜下纖維化纖維母細胞中存在著較多的 TIMP-1，而 TIMP-2 的蛋白表現則無明顯的差異。這意味著在口腔黏膜下纖維化的患者中，TIMP-1 的

不正常表現可能會增加口腔黏膜下纖維化的機率。

三、正常頰黏膜纖維母細胞在不同濃度 arecoline 處理下 TIMP-1 的蛋白表現

在台灣地區，口腔黏膜下纖維化症最常發生於 30-50 歲患者，大多數發生於男性，僅偶而發生於女性，而從流行病學調查研究顯示，在台灣地區，嚼食檳榔是導致口腔黏膜下纖維化症的主要原因。因此我們利用檳榔的主要成份檳榔素 (arecoline) 來探討其引發口腔黏膜下纖維化症的致病機轉，試圖解釋由嚼食檳榔所引發之口腔黏膜下纖維化症可能的原因及和結締組織內膠原蛋白相關基因的機制為何。於是我們利用不同濃度的 arecoline (1, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$)，處理正常頰黏膜纖維母細胞 24 小時，收集其細胞萃取物，利用 western blotting 的分析方式，觀察 TIMP-1 在 arecoline 處理下的蛋白表現情形。如 Fig-4A 所示，我們發現在 arecoline 處理下，細胞內的 TIMP-1 的確有較高度的表現。而且 TIMP-1 在 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 arecoline 處理下有最大量的蛋白表現 (Fig-4B)。

四、正常頰黏膜纖維母細胞在不同濃度 arecoline 處理下 MMP-2 及 MMP-9 的蛋白表現

由 Fig-4 可以發現，口腔黏膜下纖維化纖維母細胞在 arecoline 處理下，細胞內的 TIMP-1 的確有較高度的表現。而 MMP-2 、

MMP-9 及其抑制劑 TIMP-1 和 TIMP-2 的表現及平衡與否在膠原蛋白的堆積或分解扮演著很重要的角色。所以我們進一步觀察細胞在不同濃度的 arecoline (10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g/ml}$) 處理下，收集其細胞培養液，利用 gelatin zymography 的分析方式，觀察 MMP-2 及 MMP-9 在 arecoline 處理下的蛋白表現情形。由 Fig-5A 可以清楚的看見，此細胞的培養液在 72kDa 的地方有明顯的活性產生，也就是所謂的 MMP-2。而在 92 kDa 的地方為 MMP-9，由這裡可以發現，此細胞主要分泌的 gelatinase 為 MMP-2，而 MMP-9 只有些微的產生。另外，從 Fig-5B 的量化圖可以發現，在不同濃度的 arecoline 處理下，MMP-2 的分泌會受到明顯的抑制，而且會隨著 arecoline 濃度的增加而有更顯著的抑制。由以上的結果就可以發現，經由 arecoline 所引發的口腔黏膜下纖維化可能是經由抑制 MMP-2 的表現及增加 TIMP-1 的高度表達所造成的。而在 arecoline 的處理下，纖維母細胞對於 MMP-2 及 TIMP-1 截然不同的表現，可能在結締組織內膠原蛋白的堆積及分解上扮演著很重要的角色。也有可能是台灣地區嚼食檳榔所導致口腔黏膜下纖維化症的一個重要的因素。

五、PAI-1 在正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化組織的表現

蛋白水解酶及其抑制劑在細胞外基質的形成及分解是很重要

的，而細胞外基質的形成及分解則關係著膠原蛋白的堆積與否。因此，除了探討如基質金屬蛋白水解酶所屬的 MMP-2 以外，我們亦想要探討另一種絲胺酸蛋白水解酶 (serine proteinase) 及其抑制劑在口腔黏膜下纖維化症所扮演的角色。而之前有許多文獻指出，屬於絲胺酸蛋白水解酶抑制劑中的 PAI-1 在許多纖維化疾病中會有高度的表達。因此我們利用免疫組織染色法 (immunohistochemistry) 觀察 PAI-1 在正常頰黏膜組織及口腔黏膜下纖維化組織中的表現。而在觀察 PAI-1 的表現之前，我們先利用 HE (hematoxylin and eosin) 染色觀察正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化結締組織的變化。如 Fig-6 所示，我們發現在正常頰黏膜組織中有較少的纖維母細胞 (Fig-6A)，而在口腔黏膜下纖維化的切片中，我們發現其纖維母細胞及膠原蛋白較為緊密且不規則 (Fig-6B)。另外，在 PAI-1 的表現方面，我們發現在正常頰黏膜組織中，PAI-1 的表現較不明顯 (Fig-7A)；而在口腔黏膜下纖維化組織中則有非常明顯的表現，而且主要是分布在纖維母細胞、表皮細胞及一些發炎的細胞中 (Fig-7B)。

六、PAI-1 的 protein 及 mRNA 轉錄層次在正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞的表現

當我們利用免疫組織染色法發現在口腔黏膜下纖維化組織中 PAI-1 有較高的表現之後，我們接著觀察正常頰黏膜及口腔黏膜下纖

維化所培養的纖維母細胞其細胞內 PAI-1 的表現為何，如 Fig-8A 所示，我們利用 RT-PCR 的分析方式，觀察 PAI-1 mRNA 轉錄層次在兩者之間的差異，我們可以由量化圖可以明顯發現，在口腔黏膜纖維化的組織中所培養的纖維母細胞其 mRNA 轉錄層次有較高度的 PAI-1 表現 (Fig-8B)。而在蛋白質層次，利用 western blotting 分析，發現在口腔黏膜下纖維化所培養的纖維母細胞中亦存在較多的 PAI-1 (Fig-9A, B)。因此，我們發現在口腔黏膜下纖維化所培養的纖維母細胞比正常頰黏膜所培養的纖維母細胞中 PAI-1 的表現，無論是 mRNA 或 protein 層次都有較高度的表現。這意味著在口腔黏膜下纖維化的患者中，PAI-1 的不正常表現可能會增加口腔黏膜的纖維化機率。

七、正常頰黏膜纖維母細胞在不同濃度 arecoline 處理下 PAI-1 的表現

基於嚼食檳榔是導致口腔黏膜下纖維化症的主要原因。因此我們利用檳榔的主要成份 arecoline 來探討其引發口腔黏膜下纖維化症的致病機轉。於是我們利用不同濃度的 arecoline (10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g/ml}$)，處理正常頰黏膜纖維母細胞 24 小時，收集其細胞萃取物及 mRNA，利用 western blotting 及 RT-PCR 的分析方式，觀察 PAI-1 在 arecoline 處理下的 protein 及 mRNA 層次的表現情形。如 Fig-10A 所

示，我們發現在 arecoline 處理下，細胞內的 PAI-1 mRNA 轉錄層次的確有較高度的表現。而且在 80 $\mu\text{g/ml}$ 的 arecoline 處理下有最大量的表現(Fig-10B)。另外，在 PAI-1 的 protein 表現方面，利用 western blotting 的分析方式，我們發現在不同濃度的 arecoline 處理下，細胞內 PAI-1 的蛋白表現的確有較明顯的上升。而且在 40 $\mu\text{g/ml}$ 的 arecoline 處理下有最高量的表現(Fig-11A, B)。

八、t-PA 及 PAI-1 在正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞的表現

蛋白水解酶及其抑制劑關係著膠原蛋白的堆積與否，亦關係著組織纖維化的嚴重程度。因此，我們除了探討 PAI-1 在口腔黏膜下纖維化的表現情形之外，我們亦想探討 t-PA 的表現情形。更進一步分析 PAI-1/t-PA 的 ratio，觀察造成口腔黏膜下纖維化是否與 PAI-1/t-PA 的不平衡有關。因此，我們收集 12 個正常頰黏膜纖維母細胞及 26 個口腔黏膜下纖維化纖維母細胞，在繼代培養之後，收集其培養液，利用 ELISA 的分析方式，觀察正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化所培養的纖維母細胞其培養液中 t-PA 及 PAI-1 的表現為何。由 Table-1 可以發現，在培養 24hr 之後，12 個正常頰黏膜纖維母細胞的 t-PA 分泌量介於 21.9-41.74 $\text{ng}/10^6 \text{ cell}$ ，其 PAI-1 的分泌量介於 29.38-39.31 $\text{ng}/10^6 \text{ cell}$ ，而其 PAI-1/t-PA 的 ratio 則介於 0.81-1.58 之間。另外，在 26 組口腔黏

膜下纖維化所培養的纖維母細胞其培養液中，我們發現 t-PA 分泌量介於 27.45-118.16 ng/10⁶ cell，其 PAI-1 的分泌量介於 45.17-94.53 ng/10⁶ cell，而其 PAI-1/t-PA 的 ratio 則介於 0.55-2.2 之間 (Table-2)。因此，我們可以發現，口腔黏膜下纖維化所培養的纖維母細胞比起正常頰黏膜纖維母細胞，無論在 t-PA 及 PAI-1 的分泌量，或者在 PAI-1/t-PA 的 ratio 都有明顯的增加(Table-3)。這也代表著 PAI-1 及 t-PA 的增加及其之間的不平衡分泌可能是造成口腔黏膜下纖維化的原因之一。

九、正常頰黏膜纖維母細胞在不同濃度 arecoline 處理下 t-PA 及 PAI-1 的表現

接著我們利用檳榔的主要成份 arecoline 來觀察正常頰黏膜纖維母細胞在 arecoline 處理下 t-PA 及 PAI-1 的表現情形。我們利用不同濃度的 arecoline (10, 20, 40, 80 µg/ml)，處理正常頰黏膜纖維母細胞 24 小時，收集其培養液，利用 ELISA 的分析方式，觀察正常頰黏膜所培養的纖維母細胞處理 arecoline 其培養液中 t-PA 及 PAI-1 的表現為何。如 Fig-12 所示，我們發現在不同濃度的 arecoline 處理下，細胞培養液中 t-PA 及 PAI-1 的蛋白表現的確有較明顯的上升。

十、觀察正常頰黏膜纖維母細胞在不同濃度 arecoline 處理下其 PAI-1/t-PA ratio 的表現

我們發現口腔黏膜下纖維化所培養的纖維母細胞比起正常頰黏膜纖維母細胞，在 PAI-1/t-PA 的 ratio 有明顯的增加 (Table-3)。因此我們也觀察正常頰黏膜纖維母細胞在 arecoline 處理下 PAI-1/t-PA 的 ratio 表現情形。我們利用不同濃度的 arecoline (10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$)，處理正常頰黏膜纖維母細胞 24 小時，收集其培養液，利用 ELISA 的分析方式，觀察正常頰黏膜所培養的纖維母細胞處理 arecoline 其培養液中 PAI-1 及 t-PA 的含量，並計算 PAI-1/t-PA 的 ratio。如 Fig-13 所示，我們發現在不同濃度的 arecoline 處理下，細胞培養液中 PAI-1/t-PA 的 ratio 的確有較明顯的上升。而且是隨著 arecoline 濃度的增加而有顯著的增加。

十一、正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化組織中其 DNA 的 PAI-1 polymorphism 的表現

之前的研究發現 PAI-1 被認為和纖維化有很大的關係，而 PAI-1 的升高也被證明和許多纖維化的疾病有關。而目前有許多研究指出，PAI-1 的基因多型性(DNA polymorphism)和許多疾病有非常密切的相關性。而在 1999 年有學者發現，當 PAI-1 的基因型為 4G/4G 的時候，會導致 PAI-1 的轉錄能力上升，進而促使 PAI-1 的蛋白表現上升。因此，我們接著想探討在口腔黏膜下纖維化患者的組織中，其 PAI-1 的顯著上升是否和其 DNA polymorphism 有關。而之前的研究皆明顯的

發現，PAI-1 的 polymorphism 大多出現在 PAI-1 promoter region，而其中又以 promoter 區域第 675 base pairs 的 4G/5G insertion/deletion 最為重要。因此，我們收集了 32 個正常頰黏膜組織及 52 個口腔黏膜下纖維化的組織，萃取其 DNA，觀察 PAI-1 4G/5G 的 DNA polymorphism。

十二、利用 ASPCR (allele specific polymerase chain reaction) 觀察 PAI-1 polymorphism 的表現

在測定 PAI-1 4G/5G polymorphism 方面，我們利用了 2 種不同的方式，首先我們利用了 ASPCR 的方式，設計 3 組 primer，直接針對 4G 或 5G 作黏合。如 Fig-14 所示，247bp 的位置為 Positive control，而在 139bp 的位置則決定了 PAI-1 的序列是 4G 或 5G。如果此檢體的基因型為 4G/5G，則利用 4G 及 5G 的 primer 皆會在 139bp 的地方有訊號。若此檢體的基因型為 4G/4G，則只有 4G 的 primer 在 139bp 的地方有訊號。相對的，若此檢體的基因型為 5G/5G，則只有 5G 的 primer 在 139bp 的地方有訊號。利用這 2 組不同的 primer 序列及 1 組作為 positive control 的 primer 便可以正確的偵測此檢體的基因型。

十三、利用 ASRA (allele-specific restriction enzyme site analysis) 的觀察 PAI-1 polymorphism 的表現

另一方面，第二種方式則利用 PCR 再加上 restriction enzyme 的

方法。我們利用 PCR 反應結束之後所夾出來的片段，再利用限制酶 Bsl-1 會作用在其片段上面的限制酶切點-GGGGG-，因此利用這些方式，我們就可以很輕易的得到我們所要觀察的 PAI-1 4G/5G DNA polymorphism。由 Table-4 可以發現，在我們收集的 32 組正常頰黏膜組織及 52 組口腔黏膜下纖維化的組織中，在正常頰黏膜組織中的 4G/4G : 4G/5G : 5G/5G 的比例為 21.9% : 46.9% : 31.2 %；而在口腔黏膜下纖維化的組織中的 4G/4G : 4G/5G : 5G/5G 的比例為 42.3% : 44.2% : 13.5 %，而我們進一步用卡氏平方的統計方式發現在正常頰黏膜組織及口腔黏膜下纖維化的組織中，其 PAI-1 的 4G/5G polymorphism 是有統計學上的意義($P < 0.05$)。

十四、MMPs、t-PA 及 PAI-1 在口腔黏膜下纖維化所扮演的角色

我們將上述的所有實驗結果整理並歸納，利用簡圖來說明 MMPs、t-PA 及 PAI-1 在整個口腔黏膜下纖維化中所扮演的角色。在 Fig-16 中，當正常頰黏膜組織的纖維母細胞處理 arecoline 之後，我們發現 TIMP-1、t-PA 及 PAI-1 會隨著 arecoline 濃度的增加，而有明顯的上昇，反而在 MMP-2 的表現方面，則會隨著 arecoline 濃度的增加而有顯著的下降。另外，我們也利用 ELISA 的分析發現 PAI-1/t-PA 的比值也會隨著 arecoline 濃度的增加而也明顯的上昇。因此，我們推論，在嚼食檳榔而導致口腔黏膜下纖維化症的過程中，

可能是由於 MMP-2 的下降及 TIMP-1 的上昇，進而造成整個 MMPs/TIMPs 系統的平衡失調，促使 ECM 的堆積而造成纖維化。在 t-PA 及 PAI-1 這個系統中也是如此。此外，我們也分析了 PAI-1 中 DNA polymorphism 在口腔黏膜下纖維化症中的重要性。結果發現在罹患口腔黏膜下纖維化症的患者中，PAI-1 的 4G/4G 的基因型出現的機率比正常頰黏膜組織有明顯的提高。因此，我們推論由於口腔黏膜下纖維化症患者中 PAI-1 的 4G/4G 的基因型的比例明顯增加，可能進而導致 PAI-1 蛋白表現的增加，而增加了口腔黏膜下纖維化症形成的機率。



柒、討論

Matrix metalloproteinases (MMPs) 是一群天然的蛋白水解酵素，其在正常生理狀態下可以分解細胞外基質與不同的基底膜組成，在正常組織重建、血管生成、胚胎發育及病理狀態如癌症侵襲轉移、組織纖維化皆扮演著重要角色(Stetler-Sevenson et al.,1993)。MMPs 皆以 zymogen 方式被分泌出來，zymogen 需藉由蛋白酶或 organomecurials 來活化，活化型 MMPs 會比未活化型 MMPs 少掉 10 kDa，MMPs 的活化可被組織蛋白抑制劑(tissues inhibitor of metalloproteinases；TIMPs)所抑制。在正常組織中膠原蛋白的合成與轉換是平衡的，此意味著 MMPs 與 TIMPs 間相互調節結締組織的完整性，若其間平衡改變可能會造成結締組織病變。我們以組織培養法，培養人類正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞，我們發現這些細胞在經過一段時間培養後，正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞的增殖情形並沒有很顯著的差異，而在加入 arecoline 的刺激後也沒有明顯差異，這些結果和之前的研究結果相同(Van et al., 1995)。由此可知纖維母細胞的增殖作用並非造成口腔黏膜下纖維化的主要原因。而造成口腔黏膜下纖維化的主要原因可能與細胞外基質內膠原蛋白過量的堆積及分解有關。

我們進一步觀察人類正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞中 TIMPs 的差異性表現。藉由 western blotting 發現在口腔黏膜下纖維化纖維母細胞中有較高的 TIMP-1 活性(Fig-2)。而在 TIMP-2 方面，人類正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化纖維母細胞之間並無明顯的差異(Fig-3)。接著利用 arecoline 去處理正常頰黏膜纖維母細胞，我們發現 arecoline 可提高 TIMP-1 活性(Fig-4)，另外以 gelatin zymography 發現 arecoline 會抑制正常頰黏膜纖維母細胞分泌 MMP-2 (Fig-5)。從上述研究結果顯示，OSF 重要致病機轉可能是因 MMPs 與 TIMPs 之間轉換不平衡所致，進而造成結締組織病變。另外，arecoline 藉由促進正常頰黏膜纖維母細胞 TIMP-1 活性及抑制 MMP-2 的活性也許可以解釋嚼食檳榔而造成口腔黏膜下纖維化的原因。

而最近也有學者利用 arecoline, arecaidine 及 safrole 這一些檳榔的其它組成分，處理正常頰黏膜纖維母細胞，發現這些成分也會促進 TIMP-1 的表現，而且也會使 TIMP-1 的 mRNA 轉錄層次表現增加。這結果也更證明了 TIMP-1 的確參與在由檳榔所引起的口腔黏膜下纖維化(Shieh et al., 2003)。而 TIMPs 與 MMPs 的平衡關係著結締組織正常的分解及代謝，當組織中 TIMP-1 的濃度增加會進而抑制 MMP-2 的活性，而使得細胞組織間質中的膠原蛋白堆積，這些組織間質中的膠原蛋白堆積與許多結締組織的病變有關，例如腎臟的纖維化、肝纖維化

病變、心臟相關疾病、肺癌及一些發炎性的關節炎等(Johnson et al., 2002; Lindsay et al., 2002)。在肝纖維化病變中，因為TIMP-1 很容易進入到血液中，所以肝纖維化病變的病人可以由其血漿中偵測到TIMP-1 的增加(Murawak et al., 1993)。而在許多肺部疾病中也發現到TIMP-1 mRNA 增加的情形(Ramos et al., 2001)。另外，TIMP-1可由多種細胞分泌，除了正常人的尿液外，幾乎所有體液中都可以發現TIMP-1的存在(Clark et al., 1991)。而TIMP-1的濃度也會受到一些細胞激素的調控，例如TGF- β 會促使纖維母細胞增殖，並促使纖維母細胞的TIMP-1分泌增加(Delanian et al., 2001)；另外，TIMP-1也與許多口腔疾病有所關聯，例如在口腔牙齦液(gingival crevicular fluid, GCF)中，TIMP-1的濃度與牙周炎有密切的相關性(Alpagot et al., 2001)。而在其它頭頸部的鱗狀上皮細胞癌中的腫瘤也可以發現到較高濃度TIMP-1的存在(Birkedal-Hansen et al., 2000)。因此，本研究發現在口腔黏膜下纖維化症的所培養的組織中有較高濃度TIMP-1蛋白，並且在arecoline這一種檳榔成分的刺激更使得TIMP-1大量增加而且伴隨著MMP-2活性的減少，可見TIMP-1在由檳榔所引起的口腔黏膜纖維化病變中扮演著十分重要的角色。

而纖維蛋白溶解系統在MMPs及TIMPs的調控也扮演著很重要的角色，另外也與組織纖維化的過程有非常密切的關係。在MMPs的調

控方面，MMPs 會受 plasmin 的活化 (Knauper et al., 1998)。當 plasminogen 由 plasminogen activators 活化成 plasmin 之後，plasmin 會參與 latent form MMPs 活化的 pathway，而造成 MMP 的活化。因此從我們的研究結果發現，我們利用 ELISA 的分析發現口腔黏膜纖維化所培養的纖維母細胞較人類正常頰黏膜有著大量的 t-PA 及 PAI-1 表現，而且在 PAI-1/t-PA 的 ratio 也有明顯的增加 (Table-3)。我們也發現在 arecoline 的處理下，可以提高正常頰黏膜纖維母細胞 t-PA 及 PAI-1 的表達。另外，在細胞培養液中 PAI-1/t-PA 的 ratio 的確有較明顯的上升 (Fig-13)。由這些研究結果發現口腔黏膜纖維化的重要致病機轉可能是因纖維蛋白溶解系統的不平衡表現，進而影響到 TIMP-1 的上升及抑制 MMP-2 的活性，也因為這些和結締組織內膠原蛋白息息相關的蛋白水解酵素及其抑制劑的不平衡調控，而造成結締組織內膠原蛋白異常的堆積，進而造成口腔黏膜纖維化。

另外，PAI-1 被認為和 fibrosis 有很大的關係，而 PAI-1 的升高也被證明和許多纖維化的疾病有關。更值得大家注意的是在基因轉殖的老鼠中由 bleomycin 所引起的肺部纖維化會有非常大量的 PAI-1 表達出現，而在缺乏 PAI-1 的老鼠身上就看不到這個現象 (Eitzman et al., 1996)。而 Hattori 等人更利用的 bleomycin 來處理 PAI-1 缺乏的老鼠來證明 PAI-1 在 fibrosis 的重要性 (Hattori, 2000)。綜合以上證據，我們更加

證明 PAI-1 的不正常存在，和膠原蛋白的纖維化有非常大的相關性。而這些 PAI-1 與纖維化疾病的相關性也間接的驗證了本實驗的結果。根據以上的實驗，也可以更加證實 PAI-1 的確參與在口腔黏膜下纖維化的致病過程中。

此外，人類以及其他物種的基因序列的完成將大幅增進我們對疾病的認知。疾病的一個重要成因是單個或多個基因的突變，主要發生在基因組所謂的「多型性區域」(polymorphism，即人類個體之間可能發生差異的 DNA 序列區域)。通過對 DNA 多型性的研究，我們將會對許多已知和未知疾病的成因加深了解。而最近就有許多有關口腔黏膜下纖維化疾病及其相關基因多型性的探討。在 1998 年，Trivedy 等人發現 p53 蛋白的突變是口腔黏膜下纖維化發展成口腔疾病的一個重要因素 (Trivedy et al., 1998)。而在 2001 年，Chiu 等人發現 TNF-308 區域的變異容易導致口腔黏膜下纖維化病變 (Chiu et al., 2001)。而 Chiu 等人在 2002 年更發現了 6 個跟膠原蛋白相關的基因如 collagen 1A1、1A2、collagenase-1、TGF-beta、lysyl oxidase 及 cystatin C 都與口腔黏膜下纖維化病變有關 (Chiu et al., 2002)。而 Liu 等人也發現 major histocompatibility complex class I chain-related gene A (MICA) 的 allele A6 存在時，會提高罹患口腔黏膜下纖維化的危險性 (Liu et al., 2004)。另外，Shin 等人也發現 Cytotoxic T lymphocyte-associated

antigen-4 (CTLA-4) 的 exon 1 區域第 49 位置的 G allele 和口腔黏膜下纖維化的形成過程有非常大的相關性 (Shin et al., 2004)。而在 MMP-1 及 MMP-2 方面，也有學者發現 MMP-1 及 MMP-2 的基因多型性也和口腔黏膜下纖維化的形成有關 (Lin et al., 2004a, 2004b)。另外，Chang 等人也發現 heme oxygenase-1 (HO-1) 的基因多型性關係著嚼食檳榔所引起的口腔黏膜下纖維化病變 (Chang et al., 2004)。

1995 年有學者首先指出 PAI-1 的蛋白表現和其 DNA 的 polymorphism 有很大的相關性 (Eriksson et al., 1995)。他們發現在 promoter 區域第 675 base pairs 若是 4G/4G 時，對 PAI-1 gene 的轉錄作用是扮演著一個增強子的角色，它會導致 PAI-1 的轉錄能力升高，進而促使 PAI-1 的 protein 表現量上升。而目前有許多研究指出 PAI-1 的多型性和許多疾病有非常密切的相關性。無論在 colorectal cancer (Smolarz et al., 2001)、Ovarian cancer (Turkmen et al., 1997)、myocardia infarction (Fu et al., 2001)、type 2 diabetes (Nagi et al., 1997) 等疾病，皆和 PAI-1 的 polymorphism 有非常大的相關性。因此，當我們發現 PAI-1 的蛋白表現量在口腔黏膜下纖維化症中有非常高度的表現時，我們也想更進一步探討 PAI-1 表現量的上升是否和 PAI-1 的上游調控區域的多型性有關。因此我們利用了 ASPCR 及 ASRS 的方式，探討 PAI-1 4G/5G polymorphism 在口腔黏膜下纖維化症的差異性。結果發現在口

腔黏膜下纖維化的組織中其 4G/4G 的比例的確有明顯的增加 (Table-4)。同時我們也比較了 PAI-1 的蛋白質表現，發現 PAI-1 的蛋白質表現也有明顯的增加。這和 Eriksson 等人發現 PAI-1 基因型為 4G/4G 時會有較高的 PAI-1 活性相符合(Eriksson et al., 1995)。因此，由 PAI-1 的 DNA 多型性及其蛋白活性的表現可以發現，PAI-1 基因中 4G/4G 的存在可能會促使 PAI-1 蛋白的高度表現進而提高罹患口腔黏膜下纖維化症的機率。

最後我們利用簡圖來說明 MMPs、t-PA 及 PAI-1 在整個口腔黏膜下纖維化中所扮演的角色。在 Fig-16 中，我們推論，在嚼食檳榔而導致口腔黏膜下纖維化症的過程中，可能是由於 MMP-2 的下降及 TIMP-1 的上昇，進而造成整個 MMPs/TIMPs 系統的平衡失調，促使 ECM 的堆積而造成纖維化。在 t-PA 及 PAI-1 這個系統中也是如此。而在 PAI-1 中 DNA polymorphism 方面，我們也發現在罹患口腔黏膜下纖維化症的患者中，PAI-1 的 4G/4G 的基因型出現的機率比正常頰黏膜組織有明顯的提高。因此，我們推論由於口腔黏膜下纖維化症患者中 PAI-1 的 4G/4G 的基因型的比例明顯增加，可能進而導致 PAI-1 蛋白表現的增加，而增加了口腔黏膜下纖維化症形成的機率。所以在本篇論文實驗結果中，發現 TIMP-1 及 t-PA 的增加是導致口腔黏膜下纖維化症形成的主要因素。因此也許一些臨床上 TIMP

及 t-PA 抑制劑的使用，可以來減少口腔黏膜下纖維化症形成的可能性。而在許多文獻也發現，在罹患口腔黏膜下纖維化症之後，許多患者在 3 到 16 年間就有可能會發展成口腔癌。因此，在罹患口腔黏膜下纖維化症之後，適時的給予一些抑制劑來降低 MMPs、t-PA 及 PAI-1 的含量，也許是有助於降低口腔黏膜下纖維化症患者發展成口腔癌的機率。

從流行病學調查研究顯示估計台灣嚼食檳榔的人口數約已達二百八十萬，口腔黏膜下纖維化症是嚼食檳榔者特有的口腔疾病之一，也是一種口腔癌前期病變。因此我們以檳榔素對正常頰黏膜纖維母細胞的影響為模式，提出一個可能的致病機轉，希望有助於防治因嚼食檳榔而引發的口腔黏膜下纖維化症。



捌、參考文獻

Alpagot T, Bell C, Lundergan W, Chambers DW, Rudin R. Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2001; 28: 353-359.

Alvarez OA, Carmichael DE, DeClerck YA. Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. *Journal of the National Cancer Institute*. 1990; 82: 589-595.

Andreasen PA, Georg B, Lund LR, Riccio A, Stacey SN. Plasminogen activator inhibitors : hormonally regulated serpins. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1990; 68: 1-19.

Apte SS, Olaen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-3) and its inhibitor activities define the distinct TIMP gene family. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270: 14313-14318.

Bajou K. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents

- cancer invasion and vascularization. *Nature Medicine*. 1998; 4: 923-928.
- Banyai L, Varadi A, Patthy L. Common evolutionary origin of the fibrin-binding structure of fibronectin and tissue-type plasminogen activator. *FEBS Letters*. 1983; 163: 37-41.
- Baramova EN, Bajou K, L'Hoir C, Krell HW, Weidle UH, Noel A, Foidart JM. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Letters*. 1997; 405: 157-162.
- Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ. Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1975; 64: 232-240.
- Birkedal-Hansen B, Pavelic ZP, Gluckman JL, Stambrook P, Li YQ, Stetler-Stevenson WG. MMP and TIMP gene expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissues. *Oral Diseases*. 2000; 6: 376-382.
- Birkedal-Hansen H, Taylor RE. Detergent-activation of latent collagenase

and resolution of its component molecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1982; 107: 1173-1178.

Blasi F, Vassalli JD, Dano k. Urokinase-type plasminogen activator. proenzyme, receptor, inhibitors. *The Journal of Cell Biology*. 1987; 104: 801-804.

Boone TC, Johnson MJ, DeClerck YA, Langley KE. cDNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87: 2800-2804.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.

Canniff JP, Harvey W. The aetiology of oral submucous fibrosis: the stimulation of collagen synthesis by extracts of areca nut. *International Journal of Oral Surgery*. 1981; 10: 163-167.

Chang KW, Lee TC, Yeh WI, Chung MY, Liu CJ, Chi LY, Lin SC. Polymorphism in heme oxygenase-1 (HO-1) promoter is related to the

risk of oral squamous cell carcinoma occurring on male areca chewers.

British Journal of Cancer. 2004; 91: 1551-1555.

Chang YC, Tai KW, Cheng MH, Chou LS, Chou MY. Cytotoxic and nongenotoxic effects of arecoline on human buccal fibroblasts in vitro.

Journal of Oral Pathology and Medicine. 1998; 27: 68-72.

Chang YC, Huang FM, Cheng MH, Chou LS, Chou MY. In vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal on human pulp fibroblasts. *Journal of Endodontics.* 1998; 24; 604-606.

Chapman HA. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Current Opinion in Cell Biology.* 1997; 9: 714-724.

Chiang CP, Lang MJ, Liu BY, Wang JT, Leu JS, Hahn LJ, Kuo MYP. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oral submucous fibrosis, oral epithelial hyperkeratosis and oral epithelial dysplasia in Taiwan. *Oral Oncology.* 2000; 36: 353-359.

Chiu CJ, Chang ML, Chiang CP, Hahn LJ, Hsieh LL, Chen CJ. Interaction of collagen-related genes and susceptibility to betel

quid-induced oral submucous fibrosis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2002; 11: 646-653.

Chiu CJ, Chiang CP, Chang ML, Chen HM, Hahn LJ, Hsieh LL, Kuo YS, Chen CJ. Association between genetic polymorphism of tumor necrosis factor-alpha and risk of oral submucous fibrosis, a pre-cancerous condition of oral cancer. *Journal of Dental Research*. 2001; 80: 2055-2059.

Clark IM, Powell EK, Wright JK, Cawston TE. Polyclonal and monoclonal antibodies against human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) and the design of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure TIMP. *Matrix*. 1991; 11: 76-85.

Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. *Thrombosis and Haemostasis*. 1980; 43: 77-89.

Collen D. The plasminogen system. *Thrombosis and Haemostasis*. 1999; 82: 259-270.

Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolytic and thrombolysis. *Blood*. 1991; 78: 3114-3124.

Dawson S, Hamsten A, Wiman B, Henney A, Humphries S. Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1991; 11: 183–190.

DeClerck YA, Perez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE, Taylor SM. Inhibition of invasion and metastasis in cell transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Research*. 1992a; 52: 701-708.

DeClerck YA, Szpirer C, Aly MS, Cassiman JJ, Eeckhout Y, Rousseau G. The gene for tissue inhibitor of metallo- proteinases-2 is localized on human chromosome arm 17q25. *Genomics*. 1992b; 14: 782-784.

Delanian S, Martin M, Bravard A, Luccioni C, Lefaix JL. Cu/Zn superoxide dismutase modulates phenotypic changes in cultured fibroblasts from human skin with chronic radiotherapy damage. *Radiotherapy and Oncology*. 2001; 58: 325-331.

De Lorenzo MS, Alonso DF, Gomez DE. Nafoxidine modulates the expression of matrix-metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in endothelial cells. *Anticancer Research*. 2000; 20: 395-400.

Desrivieres S, Lu H, Soria C, Legrand Y, Menashi S. Activation of the 92 kDa Type IV collagenase by tissue kallikrein. *Journal of Cellular Physiology*. 1993; 157: 587-593.

de Witte JH, Sweep CG, Klijn JG, Grebenshikov N, Peters HA, Look MP, van Tienoven TH, Heuvel JJ, Bolt-De Vries J, Benraad TJ, Foekens JA. Prognostic value of tissue-type plasminogen activator (tPA) and its complex with the type-1 inhibitor (PAI-1) in breast cancer. *British Journal of Cancer*. 1999; 80: 286-94.

Dichek D, Quertermous T. Thrombin regulation the mRNA levels of the plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Blood*. 1989; 74: 222-228.

Dobrovolsky AB, Titaeva EV. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry*. 2002; 67: 99-108.

Eitzman DT. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996; 97:

232-237.

Eitzman DT, Ginsburg D. Of mice and men. The function of plasminogen activator inhibitors (PAIs) in vivo. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1997; 425: 131-141.

Eriksson P, Kallin B, van 't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92: 1851-1855.

Fini ME, Cook JR, Mohan R. Regulation of gene expression, in parks WC, Mecham, R. P. (eds): Matrix Metallo proteinases. San Diego, CA, Academic press, 1998; 299-356.

Flenniken AM, Williams BR. Developmental expression of the endogenous TIMP gene and a TIMP-lacZ fusion gene in transgenic mice. *Genes and development*. 1990; 4: 1094-1106.

Fogo AB. Mesangial matrix modulation and glomerulosclerosis. *Experimental Nephrology*. 1999; 7: 147-159.

Fu L, Jin H, Song K, Zhang C, Shen J, Huang Y. Relationship between gene polymorphism of the PAI-1 promoter and myocardial infarction. *Chinese Medical Journal*. 2001; 114: 266-269.

Galazka G, Windsor LJ, Birkedal-Hansen H, Engler JA. Spontaneous propeptide processing of mini-stromelysin-1 mutants blocked by APMA ((4-Aminophenyl) mercuric acetate). *Biochemistry*. 1999; 38: 1316-1322.

Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267: 4583-4591.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology*. 1997; 74: 111-122.

Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of

metalloproteinase 4. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271: 30375-30380.

Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1962; 48: 1014-1022.

Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of Matrix Metalloproteinase Production by Recombinant Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer from Transfected Chinese Hamster Ovary Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 24-27.

Hamner JE 3rd, Mehta FS, Pindborg JJ, Daftary DK. Altered staining reaction of connective tissues in 53 submucous fibrosis patients. *Journal of Dental Research*. 1971; 50: 388-392.

Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer*. 2005; (In press).

Harper E, Bloch KJ, Gross J. The zymogen of tadpole collagenase. *Biochemistry*. 1971; 10: 3035-3041.

Hattori N. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice.

The Journal of Clinical Investigation. 2000; 106: 1341-1350.

Hofmann GE, Glaststein I, Schatz F, Heller D, Deligdish L.

Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen inhibitor 1 and 2 in early implantation sites.

American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1994; 170: 671-676.

Huang IY, Shieh TY. Collagen content and types in oral submucous

fibrosis. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences.* 1989; 5: 172-179.

Huebner K, Isobe M, Gasson JC, Golde DW, Croce CM. localization of the gene encoding erythroid-potentiating activity to chromosome region Xp11.1-Xp11.4. *American Journal of Human Genetics.* 1986; 38:

819-826.

Isofia V. Location of the intermediate and high affinity aminocarboxylic acid-binding site in human plasminogen. *The Journal of Biological Chemistry.* 1982; 257: 2104-2110.

Jeng JH, Kuo ML, Hahn LJ, Kuo MYP. Genotoxic and nongenotoxic effects of betel quid ingredients on oral mucosal fibroblast in vitro.

Journal of Dental Research. 1994; 73: 1043-1049.

Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao WG, Bouck N, Polverini PJ.

Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase.

Journal of Cellular Physiology. 1994; 160: 194-202.

Johnson TS, Haylor JL, Thomas GL, Fisher M, El Nahas AM. Matrix metalloproteinases and their inhibitions in experimental renal scarring.

Experimental Nephrology. 2002; 10: 182-195.

Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Current Opinion in Cell Biology.*

1993; 5: 891-897.

Knäuper V, Murphy G. Membrane-type matrix metalloproteinases and cell surface-associated activation cascades for matrix metalloproteinases, in parks WC, Mecham, R. P. (eds): Matrix Metalloproteinases. San Diego, CA, Academic press, 1998; 199-218.

Kolkenbrock H, Orgel D, Hecker A, Zimmermann J, Ulbrich N.

Generation and activity of ternary gelatinase B/TTMP-1/

LMW-stromelysin-1 complex. *Biological chemistry Hoppe-Seyler.* 1995;

376: 495-500.

Kooistra TJ, Van Der Berg, Tons A. Protein kinase C and the stimulation of plasminogen activator synthesis in cultured human endothelial cells. *The Biochemical Journal*. 1987; 247: 605-612.

Kotra LP, Cross JB, Shimura Y, Fridman R, Schlegel HB, Mobashery S. Insight into the complex and dynamic process of activation of matrix metalloproteinases. *Journal of the American Chemical Society*. 2001; 123: 3108-3113.

Kruitthof EK. Plasminogen activator inhibitor type 1: biochemical, biological and clinical aspects. *Fibrinolysis*. 1988; 2: 59-70.

Kugler A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Research*. 1999; 19: 1589-1592.

Koklitis PA, Murphy G, Sutton C, Angal S. Purification of recombinant human prostromelysin. Studies on heat activation to give high-Mr and low-Mr active forms, and a comparison of recombinant with natural stromelysin activities. *The Biochemical Journal*. 1991; 276: 217-221.

Kuo MYP, Chen HM, Hahn LJ, Hsieh CC, Chiang CP. Collagen

biosynthesis in human oral submucous fibrosis fibroblast cultures.

Journal of Dental Research. 1995; 74: 1783-1788.

Lazarus GS, Daniels JR, Lian J, Burleigh MC. Role of granulocyte collagenase in collagen degradation. *The American Journal of Pathology.* 1972; 68: 565-578.

Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *The Journal of Biological Chemistry.* 1994; 269: 9352-9360.

Lemmer J, Shear M. Oral submucous fibrosis. *British Dental Journal.* 1967; 122: 343-346.

Lepidi S, Kenagy RD, Raines EW, Chiu ES, Chait A, Clowes AW. MMP-9 production by human monocyte-derived macrophages is decreased on polymerized type I collagen. *Journal of Vascular Surgery.* 2001; 34: 1111-1118.

Levin EG, Marotti K, L Santell. Protein kinase C and the stimulation of

plasminogen activator release from human endothelial cells. Dependence on the elevation of messenger RNA. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264: 16030-16036.

Lin SC, Chung MY, Huang JW, Shieh TM, Liu CJ, Chang KW. Correlation between functional genotypes in the matrix metalloproteinases-1 promoter and risk of oral squamous cell carcinomas. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2004a; 33: 323-326.

Lin SC, Lo SS, Liu CJ, Chung MY, Huang JW, Chang KW. Functional genotype in matrix metalloproteinases-2 promoter is a risk factor for oral carcinogenesis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2004b; 33: 405-409.

Lindsay MM, Maxwell P, Dunn FG. TIMP-1 a marker of left ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in hypertension. *Hypertension*. 2002; 40: 136-141.

Liu CJ, Lee YJ, Chang KW, Shih YN, Liu HF, Dang CW. Polymorphism of the MICA gene and risk for oral submucous fibrosis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2004; 33: 1-6.

Ma RH, Tsai CC, Shieh TY. Increased lysyl oxidase activity in fibroblasts cultured from oral submucous fibrosis associated with betel nut chewing in Taiwan. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1995; 24: 407-412.

Maeda H, Okamoto T, Akaike T. Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biological Chemistry*. 1998; 379: 193-200.

Maher R, Lee AJ, Warnakulasuriya KKAS, Lewis JA, Johnson NW. Role of areca nut in the causation of oral submucous fibrosis: a case-control study in Pakistan. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1994; 23: 65-69.

Mani NJ. Studies on oral submucous fibrosis. IV. Connective tissue changes. *Journal of Oral Medicine*. 1977; 32: 70-74.

Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. PAI-1 concentrations in first degree relative of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: metabolic and genetic associations. *Thrombosis and Haemostasis*. 1999; 77: 357-361.

Markus G, Wissler FC. The binding of tranexamic acid to native and modified human plasminogen and its effect on conformation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1979; 254: 1211-1216.

Markwardt F, Kiocking KP. Studies on the release of plasminogen activators. *Thrombosis Research*. 1976; 8: 217-233.

Meghji S, Scutt A, Harvey W, Canniff JP. An in vitro comparison of human fibroblasts from normal and oral submucous fibrosis tissue. *Archives of Oral Biology*. 1987; 32: 213-215.

Mullerti S, Clemmensen I. The primary inhibitor of plasmin in human plasmin. *The Biochemical Journal*. 1976; 159: 545-553.

Murawaki Y, Yamamoto H, Kawasaki H, Shima H. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clinica Chimica Acta*. 1993; 218: 47-58.

Murphy G, Reynolds JJ, Hembry RM. Metalloproteinases and cancer invasion and metastasis. *International Journal of Cancer*. 1989; 44: 757-760.

Murphy G, Docherty AJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors.

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 1992; 7:
120-125.

Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods in Enzymology.* 1995; 248: 496-510.

Mutri PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Pindborg JJ, Mehta FS. Etiology of oral submucous fibrosis with special reference to the role of areca nut chewing. *Journal of Oral Pathology and Medicine.* 1995; 24: 145-152.

Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry.* 1999; 274: 21491-21494.

Nagi DK, McCormack LJ, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Knowler WC, Grant PJ. Diabetic retinopathy, promoter (4G/5G) polymorphism of PAI-1 gene, and PAI-1 activity in Pima Indians with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1997; 20: 1304-1309.

Nauck M, Wieland H, Marz W. Rapid, homogeneous genotyping of the 4G/5G polymorphism in the promoter region of the PAI-I gene by

- fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves. *Clinical Chemistry*.1999; 45: 1141-1147.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase: biologic activity and clinical Implications. *Journal of Clinical Oncology*. 2000; 18: 1135-1149.
- Novokhatny VV. Domains in human plasminogen. *Journal of Molecular Biology*. 1984; 179: 215-232.
- Oliver GW, Leferson JD, Stetler-Stevenson WG, Kleiner DE. Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. *Analytical Biochemistry*. 1997; 244: 161-6
- Olman MA, Mackman N, Gladson CL, Moser KM, Loskutoff DJ. Changes in procoagulant and fibrinolytic gene expression during bleomycin-induced lung injury in the mouse. *The Journal of Clinical Investigation*. 1995; 96: 1621-1630.
- Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, Ichimori K, Maeda H. Activation of human neutrophil procollagenase by

nitrogen dioxide and peroxyxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997; 342: 261-274.

Paymaster JC. Cancer of the buccal mucosa; a clinical study of 650 cases in Indian patients. *Cancer*. 1956; 9: 431-435.

Pillai R, Balaram P, Reddiar KS. Pathogenesis of oral submucous fibrosis. Relationship to risk factors associated with oral cancer. *Cancer*. 1992; 69: 2011-2020.

Pindborg JJ, Sirsat SM. Oral submucous fibrosis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 1966; 22: 764-779.

Pindborg JJ, Mehta FS, Gupta PC, Daftary DK. Prevalence of oral submucous fibrosis among 50,915 Indian villagers. *British Journal of Cancer*. 1968; 22: 646-654.

Pindborg JJ. Is submucous fibrosis a precancerous condition in the oral cavity? *International Dental Journal*. 1972; 22: 474-480.

Pindborg JJ, Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Mehta FS.

- Oral submucous fibrosis as a precancerous condition. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 1984; 92: 224-229.
- Plow EF, Miles LA. Plasminogen receptors in the mediation of pericellular proteolysis. *Cell Differentiation and Development*. 1990; 32: 293-298.
- Prowse CV, Cash JD. Physiologic and pharmacologic enhancement of fibrinolysis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 1984; 10: 51-60.
- Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996; 98: 2572-2579.
- Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, Pardo A. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2001; 24: 591-598.
- Reichart PA, van Wky CW, Becker J, Schuppan D. Distribution of procollagen type III, collagen type VI and tenascin in oral submucous fibrosis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1994; 23: 394-398.

- Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund L, Flick MJ, Dengen JL, Dan k.
Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene.
Nature Medicine. 1996; 2: 287-292.
- Rox JM, Reinartz J, Kramer MD. Interlukin-1 beta upregulates
tissue-type plasminogen activator in a keratinocyte cell line (HaCaT).
Archives of Dermatological Research. 1996; 288: 554-558.
- Saari H, Suomalainen K, Lindy O, Konttinen YT, Sorsa T. Activation of
latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and
serine proteases. *Biochemical and Biophysical Research
Communications*. 1990; 171: 979-987.
- Saksela O. Plasminogen activators and regulation of pericellular
proteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1985; 823: 35-65.
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M.
A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor
cells. *Nature*. 1994; 370: 61-65.
- Schultz RM, Silberman S, Persky B, Bajkowski AS, Carmichael DF.
Inhibition of human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases
of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10
melanoma cells. *Cancer Research*. 1988; 48: 5539-5545.

Scutt A, Meghji S, Canniff JP, Harvey W. Stabilization of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. *Experientia*. 1987; 43: 391-393.

Shah N, Sharma PP. Role of chewing and smoking habits in the etiology of oral submucous fibrosis (OSF): a case-control study. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1998; 27:475-479.

Shapiro SD, Kobayashi DK, Welgus HG. Identification of TIMP-2 in human alveolar macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267: 13890-13894.

Shiau YY, Kwan HW. Submucous fibrosis in Taiwan. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 1979; 47: 453-457.

Shieh DH, Chiang LC, Shieh TY. Augmented mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in buccal mucosal fibroblasts by arecoline and safrole as a possible pathogenesis for oral submucous fibrosis. *Oral Oncology*. 2003; 39: 728-735.

Shieh TY, Yang JF. Collangase activity in oral submucous fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the Republic of China*. 1992; 16: 106-110.

- Shin YN, Liu CJ, Chang KW, Lee YJ, Liu HF. Association of CTLA-4 gene polymorphism with oral submucous fibrosis in Taiwan. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2004; 33: 200-203.
- Simpson W. Submucous fibrosis. *The British Journal of Oral Surgery*. 1969; 6: 196-200.
- Singer CF, Kronsteiner N, Marton E, Kubista M, Cullen KJ, Hirtenlehner K, Seifert M, Kubista E. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblast is differentially regulated by stromal-epithelial interaction. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2002; 72: 69-77.
- Sirsat SM, Pindborg JJ. Subepithelial changes in oral submucous fibrosis. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. 1967; 70: 161-173.
- Sixtus T. Differences in the binding to fibrin of native plasminogen and plasminogen modified by proteolytic degradation influence of amino carboxylic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1975; 393: 55-65.
- Smolarz B, Blasiak J, Kulig A, Romanowicz-Makowska H, Dziki A, Ulanska J, Pander B, Szewczyk T. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels and gene promoter polymorphisms in subjects with colorectal cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer*

- Research.* 2001; 20: 247-252.
- Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood.* 1987; 69: 381-387.
- Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto M, Levy AT, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *The Journal of Biological Chemistry.* 1990; 265: 13933-13938.
- Stetler-Sevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE. Extracellular matrix: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB Journal.* 1993; 7: 1434-1441.
- Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, Bode W. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Science.* 1995; 4: 823-840
- Strassburger W, Wollmer A, Pitts JE. Adaptation of plasminogen activator sequences to known protease structures. *FEBS letters.* 1983; 157: 219-223.
- Stricklin GP, Welgus HG. Human skin fibroblast collagenases inhibitors:

- purification and biochemical characterization. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983; 258: 12252-12258.
- Takigawa M, Nishida Y, Suzuki F, Kishi J, Yamashita K, Hayakawa T. Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1990; 171: 1264-1271.
- Thorgeirsson UP, Liotta LA, Kalebic T, Margulies IM, Thomas K, Rios-Candelore M, Russo RG. Effect of natural protease inhibitors and a chemoattractant on tumor cell invasion in vitro. *Journal of the National Cancer Institute*. 1982; 69: 1049-1054.
- Thorgeirsson UP, Yoshiji H, Sinha CC, Gomez DE. Breast cancer: tumor neovasculature and the effect of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) on angiogenesis. *In Vivo*. 1996; 10: 137-144.
- Tolley SP, Davies GJ, O'Shea M, Cockett MI, Docherty AJ, Murphy G. Crystallization and preliminary X-ray analysis of nonglycosylated tissue inhibitor of metalloproteinases-1, N30QN78Q TIMP-1. *Proteins*. 1993; 17: 435-437.
- Trivedy C, Warnakulasuriya KA, Tavassoli M, Steingrimsdottir H,

- Penhallow J, Maher R, Johnson NW. P53 aberrations in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma detected by immunocytochemistry and PCR-SSCP. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1998; 27: 72-77.
- Tsai CC, Ma RH, Shieh TY. Deficiency in collagen and fibronectin phagocytosis by human buccal mucosa fibroblasts *in vitro* as a possible mechanism for oral submucous fibrosis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1999; 28: 59-63.
- Turkmen B, Schmitt M, Schmalfeldt B, Trommler P, Hell W, Creutzburg S, Graeff H, Magdolen V. Mutational analysis of the genes encoding urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in advanced ovarian cancer. *Electrophoresis*. 1997; 18 :686-689.
- Vallee BL, Auld DS. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*. 1990; 29: 5647-5659.
- Van Hinsbergh VW, Bauer KA, Kooistra T, Kluft C, Dooijewaard ML, Nieuwenhuizen W. Progress of the fibrinolysis during the tumor necrosis factor in fusions in human. Concomitant in crease in tissue-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, and fibrin(ogen) degradation products. *Blood*. 1990; 76: 2284-2289.

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87: 5578-5582.

Van Wyk CW, Olivier A, Hoal-van Helden EG, Grobler-Rabie AF. Growth of oral and skin fibroblasts from patients with oral submucous fibrosis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1995; 24: 349-353.

Van Wyk CW, Seedat HA, Phillips VM. Collagen in submucous fibrosis: an electron-microscopic study. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1990; 19: 182-187.

Victor WH, Hinsbergh V. Regulation of the synthesis and secretion of plasminogen activators by endothelial cells. *Haemostasis*. 1988; 18: 307-327.

Vissers MC, Winterbourn CC. Activation of human neutrophil gelatinase by endogenous serine proteases. *The Biochemical Journal*. 1988; 249: 327-331.

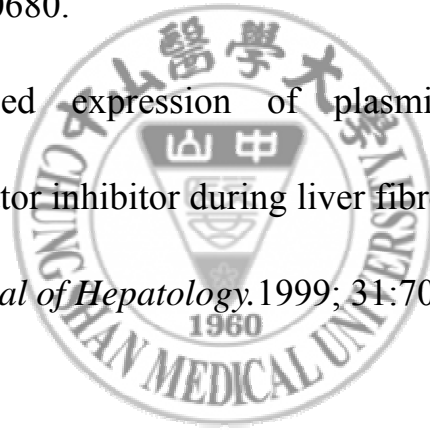
Wick M, Burger C, BNsselbach S, Lucibello E, Muller R. A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene

- family is regulated during GI progression, mitogenic stimulation, differentiation and senescence. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269: 18953-18960.
- Wilson HM, Haites NE, Booth NA. Opposing effect of interleukin-1 and transforming growth factor 1-beta on the regulation of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 expression by human mesangial cells. *Experimental nephrology*. 1997; 5: 233-238.
- Wiman B. Primary structure of the B-chain of human plasmin. *European Journal of Biochemistry*. 1977; 76: 159-165.
- Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB Journal*. 1991; 5: 2145-2155.
- Woessner JF. The matrix metalloproteinase family, in Parks WC, Mecham RP (eds): Matrix Metalloproteinase. San Diego, CA, Academic Press, 1998; 1-14.
- Woessner, J.F. and Nagase, H. Matrix Metalloproteinases and TIMPs. In, Three-dimensional structures of the MMPs and TIMPs, New York: Oxford Univ. Press, pp. 50-71, and Activation of the zymogen forms of MMPs, 2000; 72-86

Wong TY, Poon P, Szeto CC, Chan JC, Li PK. Association of plasminogen activator inhibitor-1 4G/4G genotype and type 2 diabetic nephropathy in Chinese patients. *Kidney International*. 2000; 57: 632-638.

Yang TT, Hawkes SP. Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89: 10676-10680.

Zhang LP. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. *Journal of Hepatology*. 1999; 31:703-711.



玖、圖表與圖表說明



Table-1. Individual values with t-PA, PAI-1 and the ratio of t-PA to PAI-1 in BMF.

Subject no.	t-PA (ng/10 ⁶ cell)	PAI-1 (ng/10 ⁶ cell)	PAI-1/t-PA ratio
1.	21.90	29.38	1.34
2.	36.22	33.19	0.91
3.	39.33	36.59	0.93
4.	28.98	34.41	1.18
5.	38.12	33.60	0.88
6.	41.74	34.14	0.81
7.	22.08	35.09	1.58
8.	33.81	34.41	1.01
9.	23.80	30.74	1.29
10.	36.39	38.63	1.06
11.	38.81	35.77	0.92
12.	41.74	39.31	0.94
Media	36.31	34.41	0.94



Table-2. Individual values with t-PA, PAI-1 and the ratio of t-PA to PAI-1 in OSF.

Subject no.	t-PA (ng/10 ⁶ cell)	PAI-1 (ng/10 ⁶ cell)	PAI-1/t-PA ratio
1.	27.94	61.49	2.20
2.	28.11	61.28	2.17
3.	29.67	55.42	1.86
4.	32.08	55.84	1.74
5.	32.94	54.16	1.64
6.	36.74	64.62	1.75
7.	40.36	62.95	1.55
8.	42.26	62.11	1.46
9.	42.60	61.28	1.43
10.	42.61	59.39	1.39
11.	42.63	68.81	1.61
12.	44.16	67.76	1.53
13.	44.67	66.30	1.48
14.	45.36	72.36	1.59
15.	50.54	69.85	1.38
16.	53.82	69.85	1.29
17.	59.51	56.05	0.94
18.	59.85	74.45	1.24
19.	61.41	94.53	1.53
20.	68.13	45.17	0.66
21.	77.97	67.97	0.87
22.	78.14	55.84	0.71
23.	91.94	72.15	0.78
24.	118.16	65.25	0.55
25.	50.23	60.44	1.20
26.	54.06	75.71	1.40
Media	45.02	63.79	1.43

Table-3. The value with t-PA, PAI-1 and ratio of t-PA to PAI-1 from BMF and OSF.

Subjects	BMF (n=12)		OSF (n=26)	
	Media	Range	Media	Range
t-PA	36.31	21.9-41.74	45.02	27.45-118.16
PAI-1	34.41	29.38-39.31	63.79	45.17-94.53
PAI-1/t-PA ratio	0.94	0.81-1.58	1.43	0.55-2.2

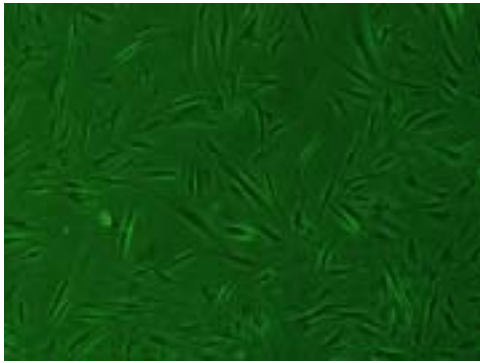


Table-4. Comparison of PAI-1 polymorphism between OSF and BMF

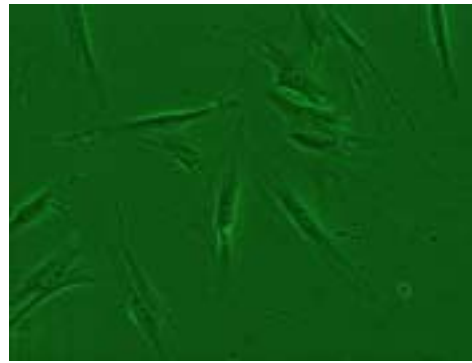
	BMF		OSF		<i>P</i> -value
	N=32	%	N=52	%	
PAI-1 Genotype					
4G/4G	7	21.9 %	22	42.3 %	<0.05
4G/5G	15	46.9 %	23	44.2 %	
5G/5G	10	31.2 %	7	13.5 %	
Allele frequencies					
4G	29	45.3 %	67	64.4 %	<0.05
5G	35	54.7 %	37	35.6 %	



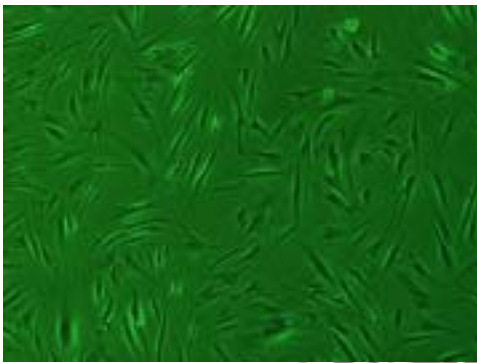
(A) BMF 100X



(B) BMF 400X



(C) OSF 100X



(D) OSF 400X

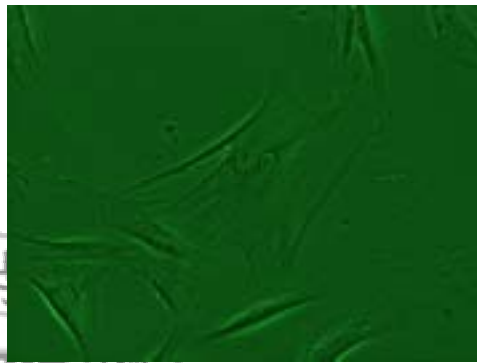
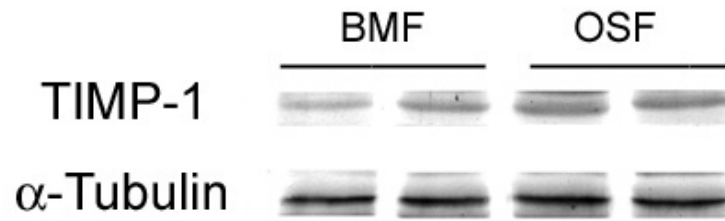


Fig-1. Morphology of oral submucous fibrosis fibroblast (OSF) and normal buccal mucosa fibroblast (BMF). (A,C) Representative 100X magnification of BMF and OSF. (B,D) Representative 400X magnification of BMF and OSF.

(A)



(B)

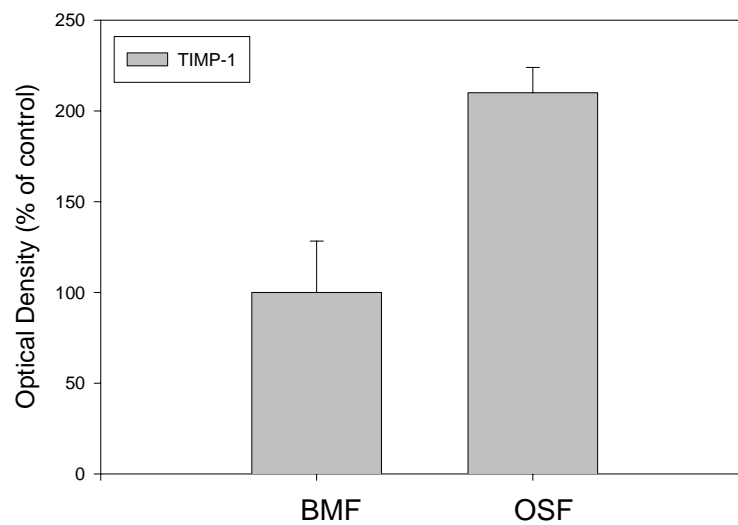
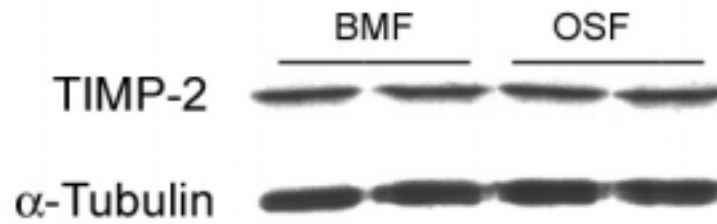


Fig-2. (A) Comparison of the TIMP-1 protein expression from BMF and OSF using Western blot assay. OSF specimens were found to have higher TIMP-1 expression than BMF (B) Densitometric analysis of TIMP-1 bands obtained by Western blots was calculated from their protein activity. Optical density values represent the means of six different BMF and OSF \pm standard deviations.

(A)



(B)

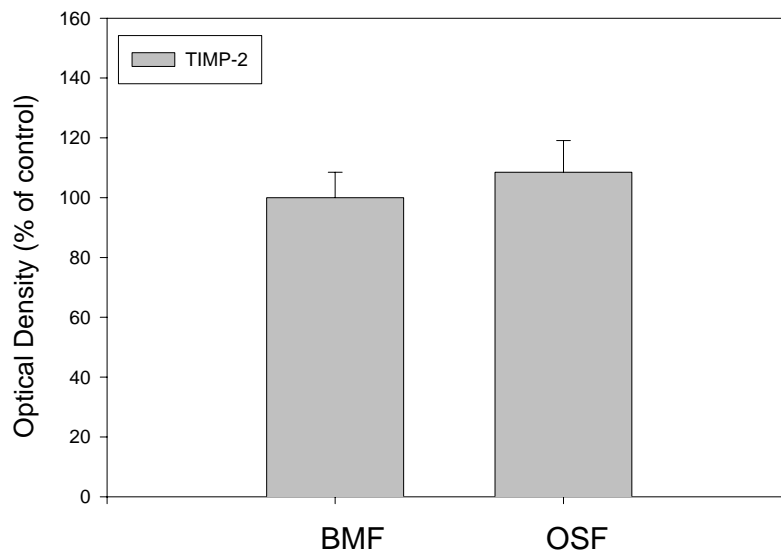
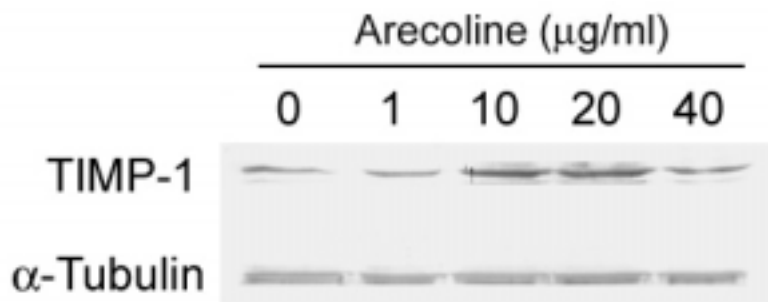


Fig-3. (A) Comparison of the TIMP-2 protein expression from BMF and OSF using Western blot assay. No difference in the TIMP-2 level was noted between the OSF and BMF. (B) Densitometric analysis of TIMP-2 bands obtained by Western blots was calculated from their protein activity. Optical density values represent the means of six different BMF and OSF \pm standard deviations.

(A)



(B)

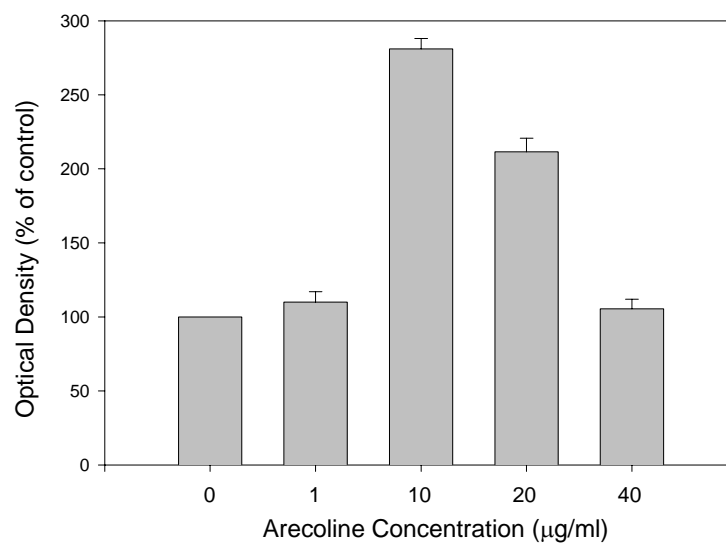
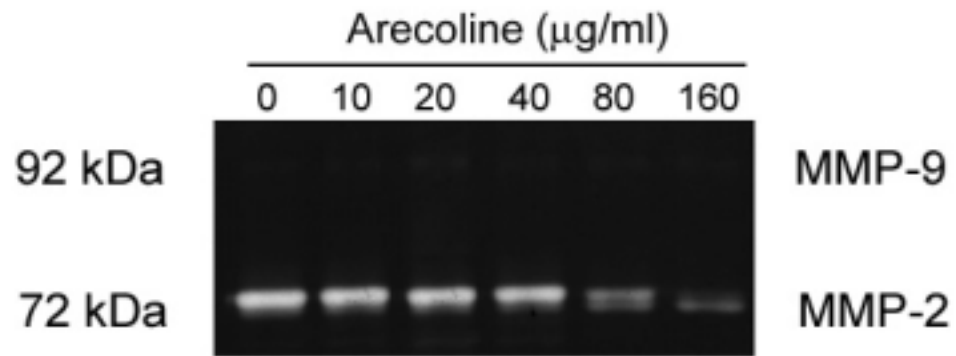


Fig-4. (A) Elevated TIMP-1 expression by BMF with arecoline. (B) Densitometric analysis of the TIMP-1 bands obtained by Western blots were calculated from their protein activity. Optical density values represent the means of three different BMF \pm standard deviations.

(A)



(B)

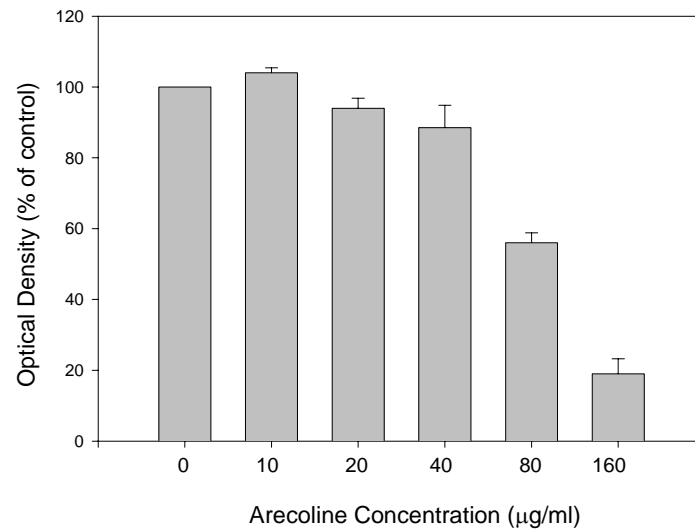
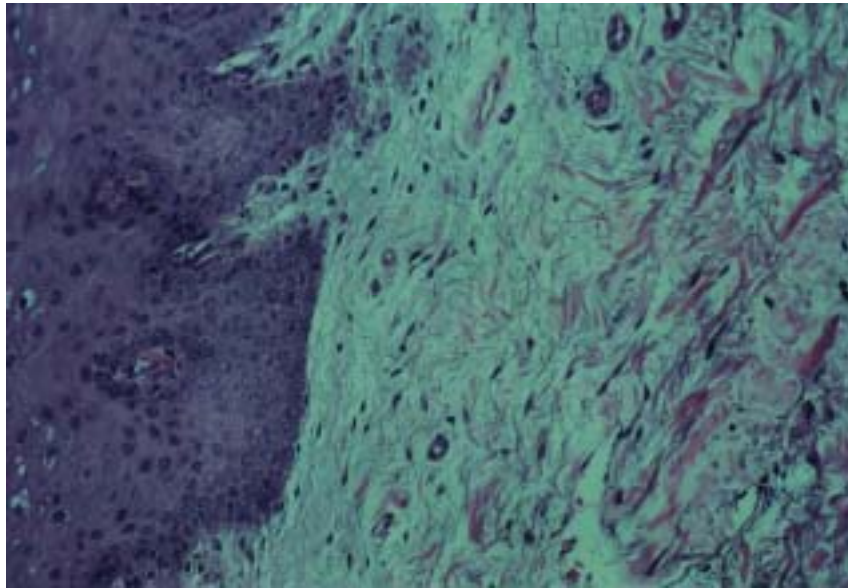


Fig-5. (A) Gelatin zymography of conditioned medium from BMFs treated with different arecoline concentrations during 24 h. The 72 kDa band corresponds to MMP-2 and was inhibited by the addition of arecoline in a dose-response manner. (B) Levels of MMP-2 from conditioned medium were calculated from their gelatinolytic activity, as measured by Alpha-Imager 2000. Optical density values represent the means of six different BMF \pm standard deviations.

(A)



(B)

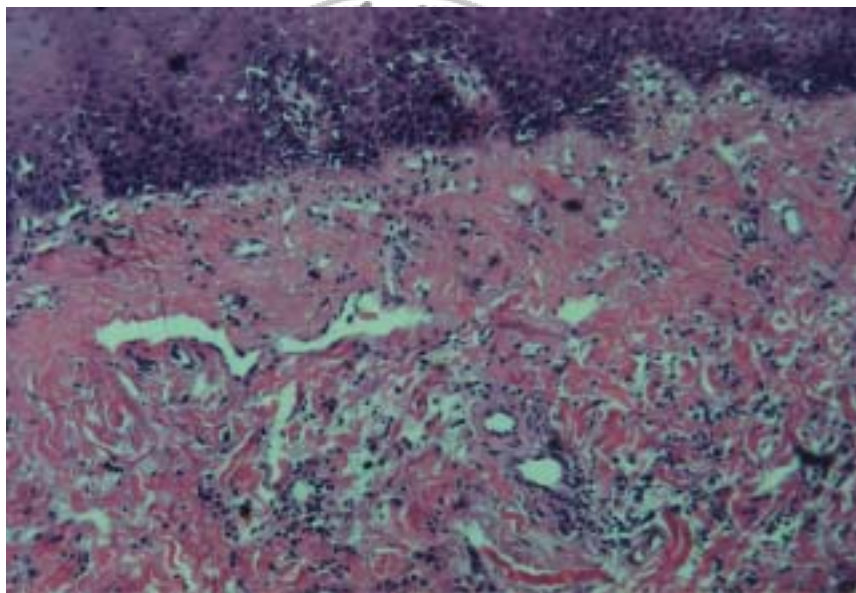
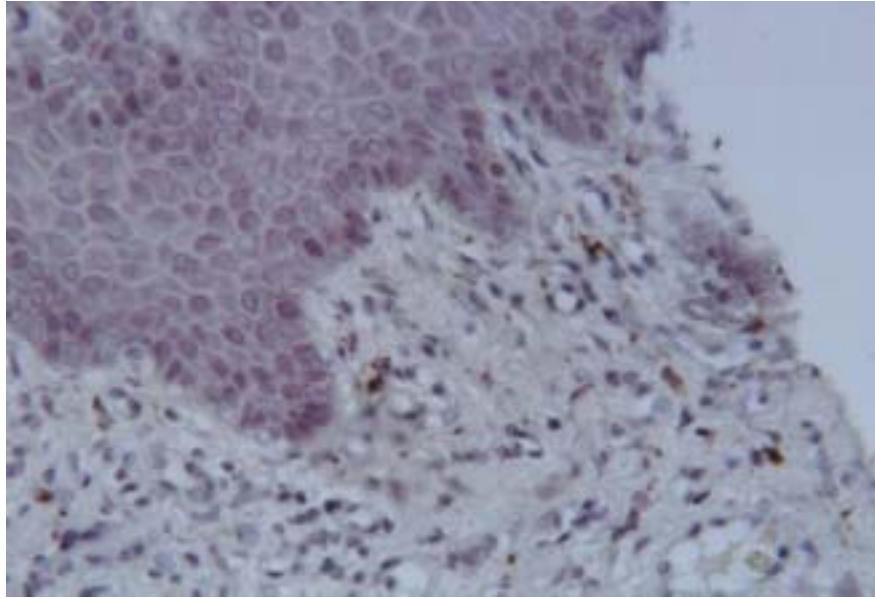


Fig-6 (A) There were few fibroblasts and collagens in normal human buccal mucosa and the very weak immunoreactivity of hematoxylin and eosin stain was observed in BMF (100X). (B) Hematoxylin and eosin stain shows strong immunoreactivity in the fibroblasts and collagens of the oral submucous fibrosis (100X).

(A)



(B)

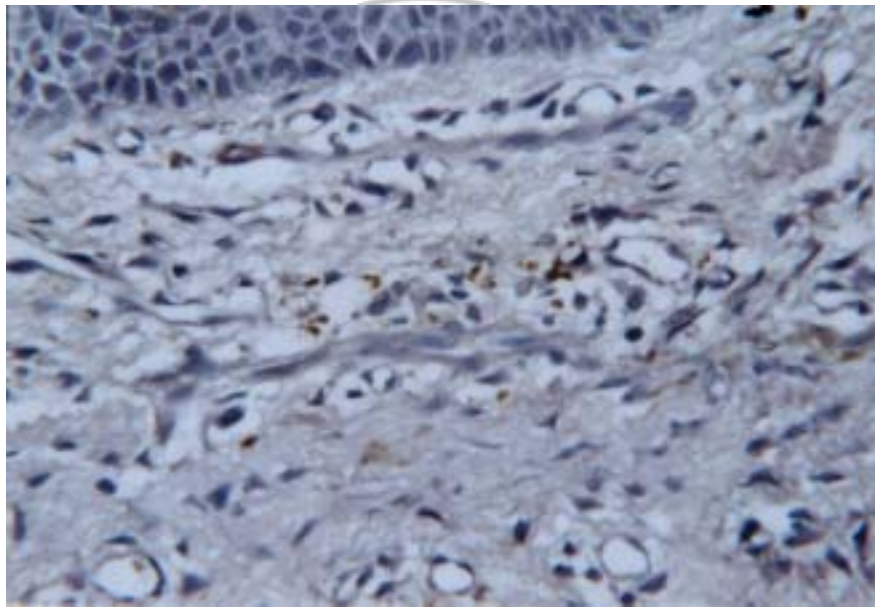
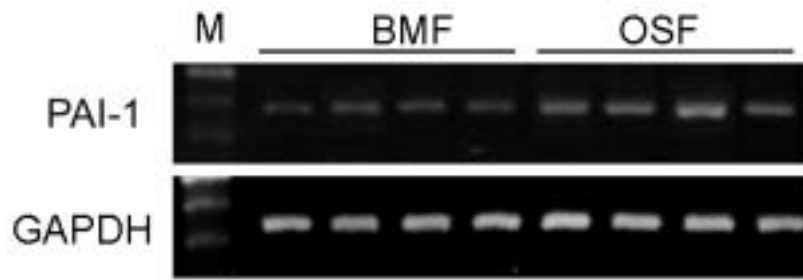


Fig-7. (A) Very faint immunoreactivity of PAI-1 was observed in normal human buccal mucosa and almost totally limited to the lamina propria (200X). (B) PAI-1 was noted subepithelially and expressed in the cytoplasm of fibroblasts, endothelial cells and inflammatory cells (200X).

(A)



(B)

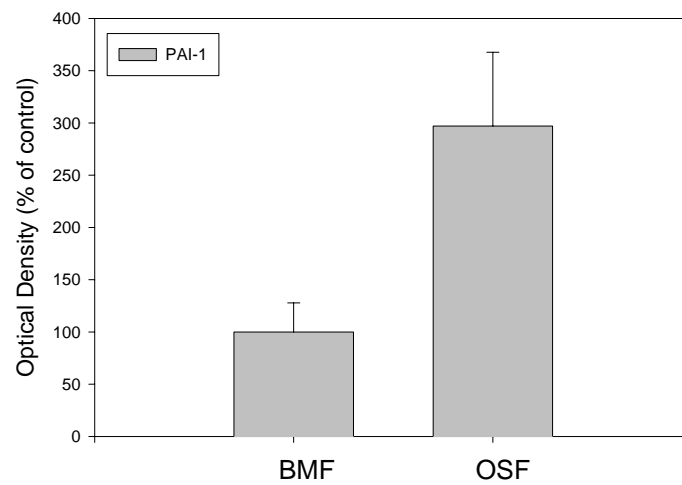
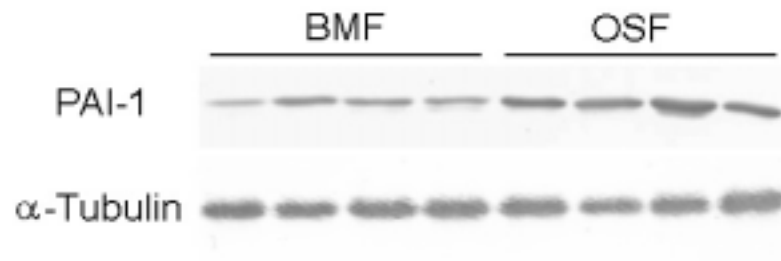


Fig-8. (A) Comparison of the PAI-1 mRNA level from BMF and OSF using RT-PCR assay. GAPDH gene was performed in order to monitor equal RNA loading. OSF specimens are significantly upregulated PAI-1 mRNA expression than BMFs. (B) Densitometric analysis of PAI-1 bands obtained by RT-PCR were calculated from their mRNA level. Optical density values represent the means of six different BMF and OSF \pm standard deviations.

(A)



(B)

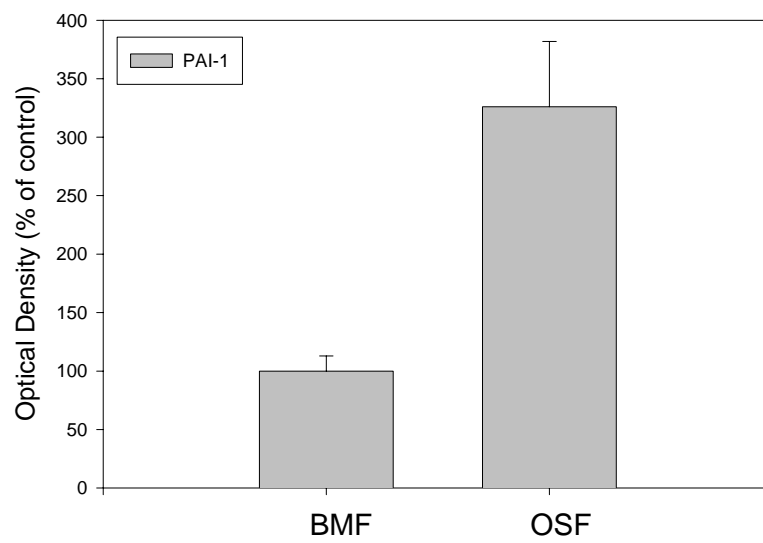
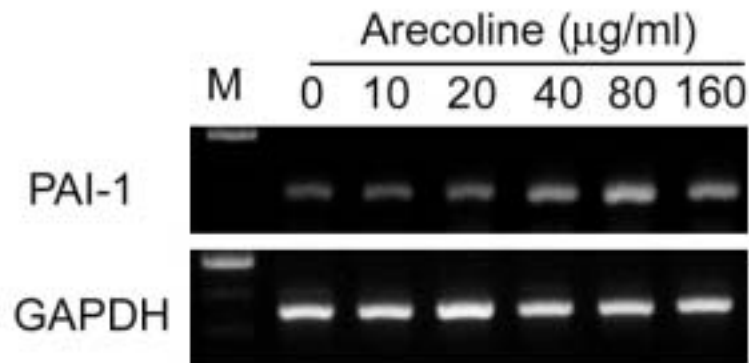


Fig-9. Comparison of the PAI-1 protein expression from BMF and OSF using Western blot assay. α -Tubulin was performed in order to monitor equal protein loading. OSF specimens exhibit significantly higher PAI-1 expression than BMF. (B) Densitometric analysis of PAI-1 bands obtained by Western blot were calculated from their protein activity. Optical density values represent the means of six different BMF and OSF \pm standard deviations.

(A)



(B)

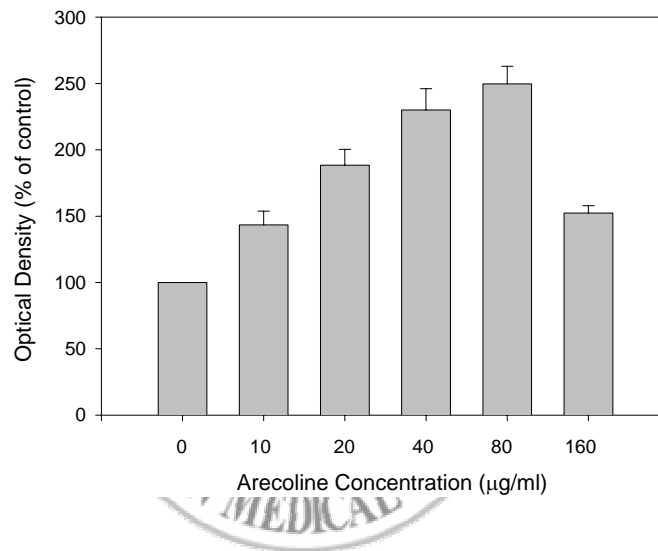
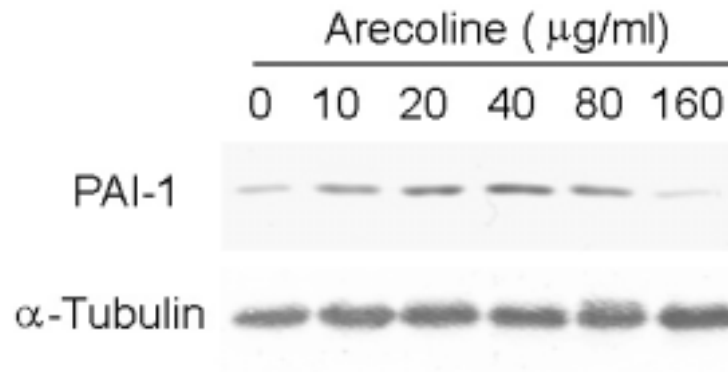


Fig-10. (A) Expression of PAI-1 mRNA gene in arecoline-treated human BMF by RT-PCR assays. M=DNA molecular size marker. (B) Densitometric analysis of the PAI-1 bands was calculated from their mRNA activity. Optical density values represent the means of three different BMF \pm standard deviations.

(A)



(B)

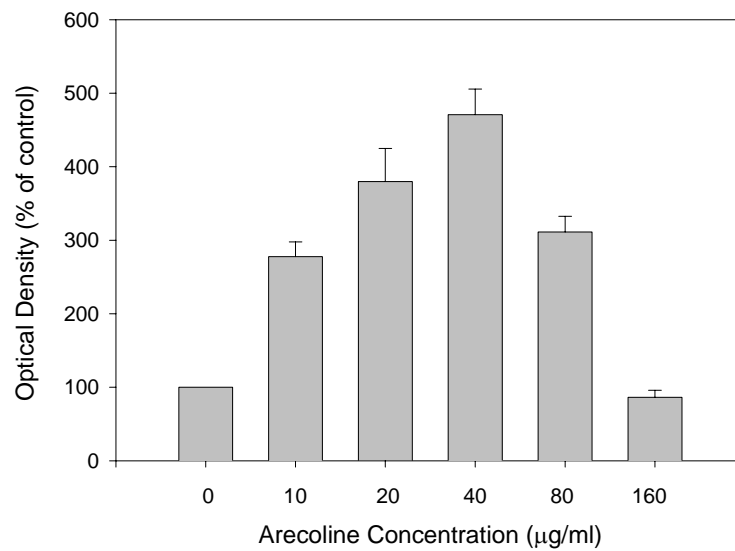


Fig-11. (A) Expression of PAI-1 in arecoline-treated human BMFs by Western blot. (B) Densitometric analysis of the PAI-1 bands was calculated from their protein activity. Optical density values represent the means of three different BMF \pm standard deviations.

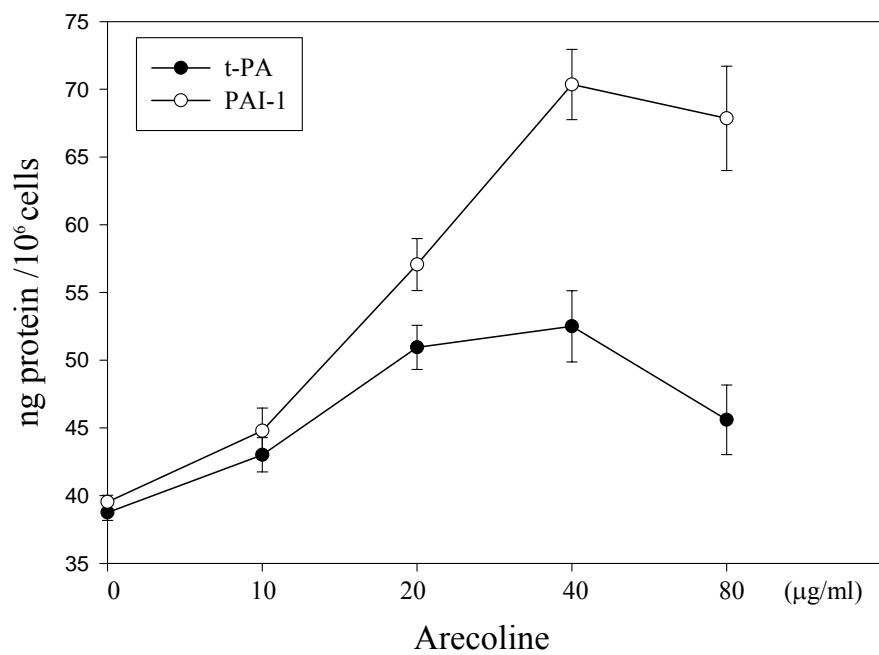


Fig.-12. The values of t-PA and PAI-1 in arecoline-treated BMFs. ELISA assay of conditioned medium from BMF treated with different arecoline concentrations during 24 h. The values represent the means of three different BMF \pm standard deviations.

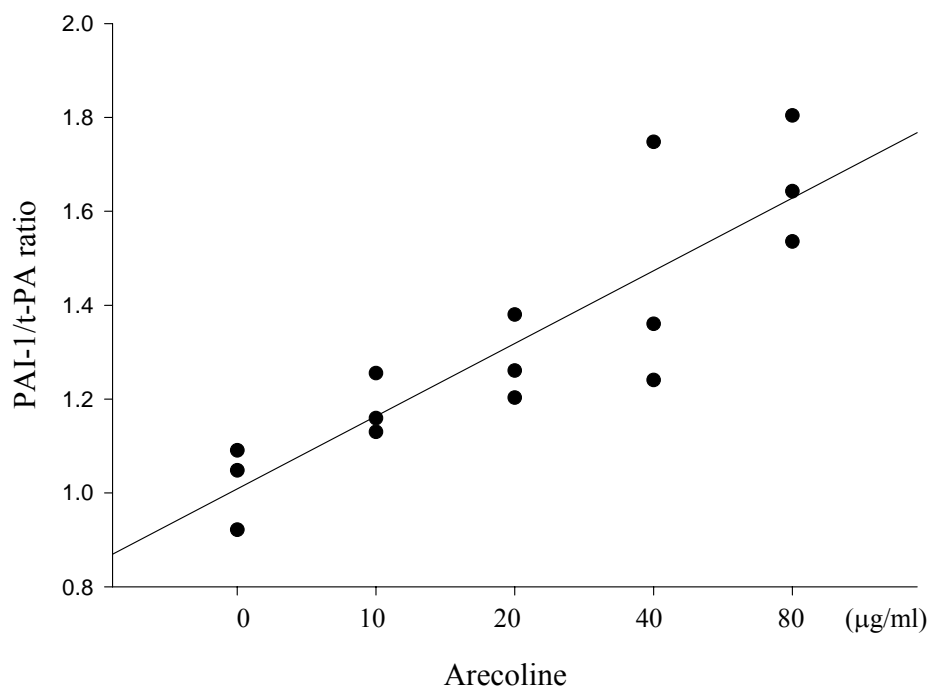


Fig-13. In the BMF treated arecoline, the linear regression analysis shows a significant direct correlation between the arecoline concentration and the PAI-1/t-PA ratio. ($Y = -97.163 + 96.433 X$, $R^2 = 0.734$, $p < 0.001$)

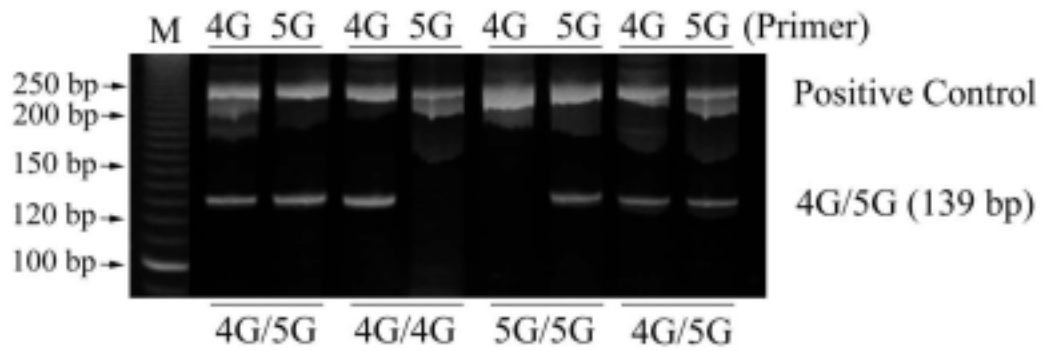


Fig-14 PAI-1 gene polymorphism by allele specific polymerase chain reaction of four patients. The different genotypes were loaded in the following manner: 4G/5G, 4G/4G, 5G/5G and 4G/5G. Abbreviation is: M, molecular weight marker.



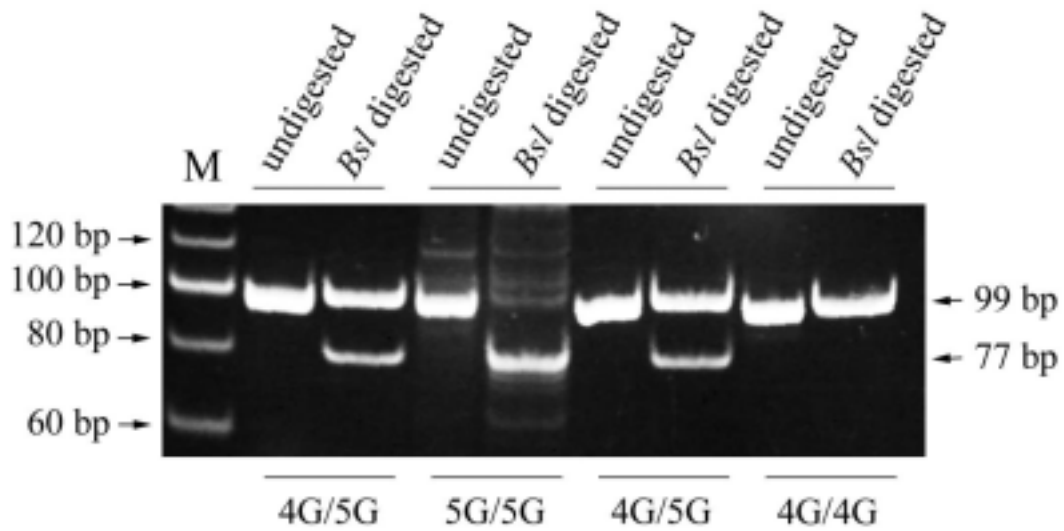
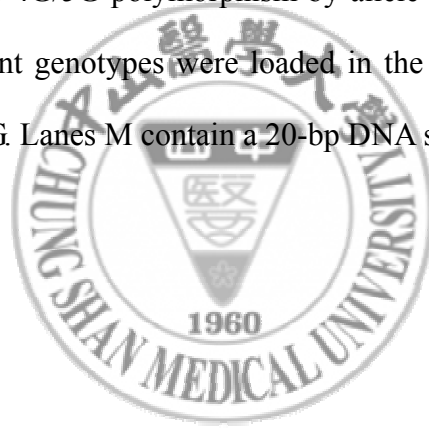


Fig.15 Genotyping of the 4G/5G polymorphism by allele-specific restriction enzyme site analysis. The different genotypes were loaded in the following manner: 4G/5G, 5G/5G, 4G/5G and 4G/4G. Lanes M contain a 20-bp DNA size marker.



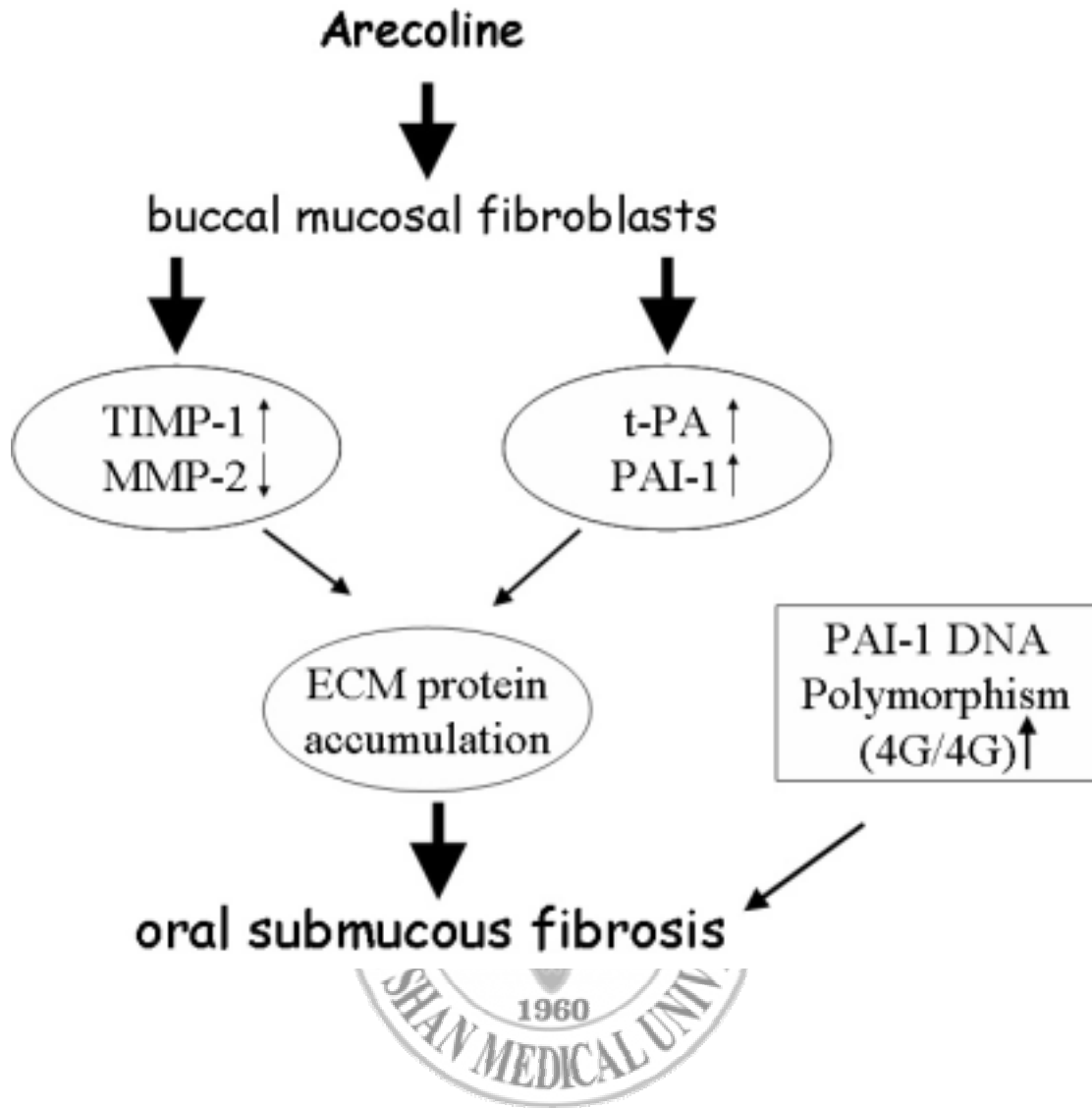


Fig.16 Best-fit model of the pathological mechanisms of oral submucous fibrosis.

拾、附錄



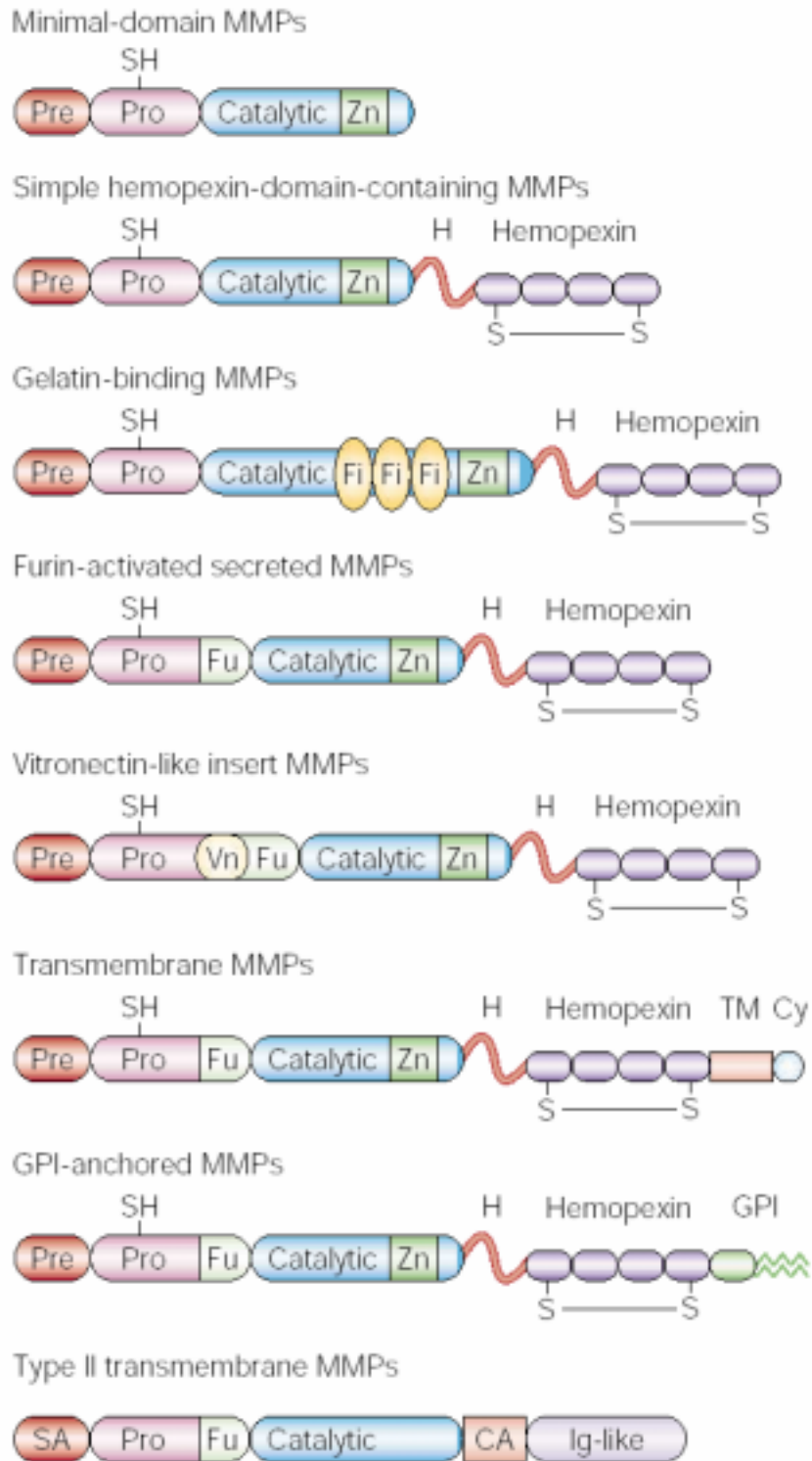
附錄一、MMPs 的分類表

MMP designation*	Structural class	Common name(s)
MMP-1	Simple hemopexin domain	Collagenase-1, interstitial collagenase, fibroblast collagenase, tissue collagenase
MMP-2	Gelatin-binding	Gelatinase A, 72-kDa gelatinase, 72-kDa type IV collagenase, neutrophil gelatinase
MMP-3	Simple hemopexin domain	Stromelysin-1, transin-1, proteoglycanase, procollagenase-activating protein
MMP-7	Minimal domain	Matrilysin, matrin, PUMP1, small uterine metalloproteinase
MMP-8	Simple hemopexin domain	Collagenase-2, neutrophil collagenase, PMN collagenase, granulocyte collagenase
MMP-9	Gelatin-binding	Gelatinase B, 92-kDa gelatinase, 92-kDa type IV collagenase
MMP-10	Simple hemopexin domain	Stromelysin-2, transin-2
MMP-11	Furin-activated and secreted	Stromelysin-3
MMP-12	Simple hemopexin domain	Metalloelastase, macrophage elastase, macrophage metalloelastase
MMP-13	Simple hemopexin domain	Collagenase-3
MMP-14	Transmembrane	MT1-MMP, MT-MMP1
MMP-15	Transmembrane	MT2-MMP, MT-MMP2
MMP-16	Transmembrane	MT3-MMP, MT-MMP3
MMP-17	GPI-linked	MT4-MMP, MT-MMP4
MMP-18	Simple hemopexin domain	Collagenase-4 (<i>Xenopus</i> ; no human homologue known)
MMP-19	Simple hemopexin domain	RAS1, MMP-18 ¹
MMP-20	Simple hemopexin domain	Enamelysin
MMP-21 ²	Vitronectin-like insert	Homologue of <i>Xenopus</i> XMMP
MMP-22	Simple hemopexin domain	CMMP (chicken; no human homologue known)
MMP-23	Type II transmembrane ³	Cysteine array MMP (CA-MMP), femalysin, MIFR, MMP-21/MMP-22 ⁴
MMP-24	Transmembrane	MT5-MMP, MT-MMP5
MMP-25	GPI-linked	MT6-MMP, MT-MMP6, leukotysin
MMP-26	Minimal domain	Endometase, matrilysin-2
MMP-27 ⁵	Simple hemopexin domain	
MMP-28	Furin-activated and secreted	Epilysin
No designation	Simple hemopexin domain	Mcol-A (Mouse)
No designation	Simple hemopexin domain	Mcol-B (Mouse)
No designation	Gelatin-binding	75-kDa gelatinase (chicken)

*MMP-4, -5 and -6 have been abandoned. ¹When MMP-19 was cloned it was initially called MMP-18 (REF 147). However, an MMP from *Xenopus* had already received that designation, and therefore this MMP is now known as MMP-19. ²The cloning of a partial fragment of human MMP-21 has been described¹⁸, but the sequence has not been submitted to GenBank and the human enzyme has not been characterized. ³By similarity with mouse and rat MMP-23 (REFS 149,150). ⁴Gunatillan and colleagues identified two new MMP genes, which they called MMP21 and MMP22. The nucleotide sequences of the two genes are almost identical¹⁹, so they are now designated MMP23A and MMP23B. ⁵Sequence submitted to GenBank (access no. AF105102). GPI, glycosylphosphatidylinositol; MMP, matrix metalloproteinase; MT-MMP, membrane type MMP; PMN, polymorphonuclear neutrophil; PUMP, putative metalloproteinase.

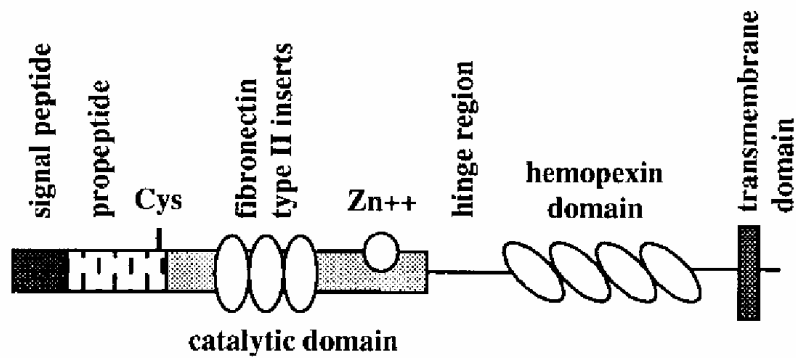
(Egeblad and Werb, 2002)

附錄二、MMPs 的結構圖



(Egeblad and Werb, 2002)

附錄三、MMPs依受質特異性的分類圖

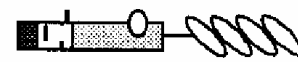


Collagenases

Collagenase-1	(MMP-1)
Collagenase-2	(MMP-8)
Collagenase-3	(MMP-13)

MW (kD)

52/41
75/65
65/55



Stromelysins

Stromelysin-1	(MMP-3)
Stromelysin-2	(MMP-10)
Metalloelastase	(MMP-12)

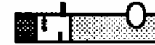
57/45
57/45
53/45
22



Matrilysin

(MMP-7)

28/19



Gelatinases

Gelatinase-A (72 kDa)	(MMP-2)
Gelatinase-B (92 kDa)	(MMP-9)

72/67
92/84



Membrane-type MMPs

MT1-MMP	(MMP-14)
MT2-MMP	(MMP-15)
MT3-MMP	(MMP-16)
MT4-MMP	(MMP-17)

66



Other MMPs

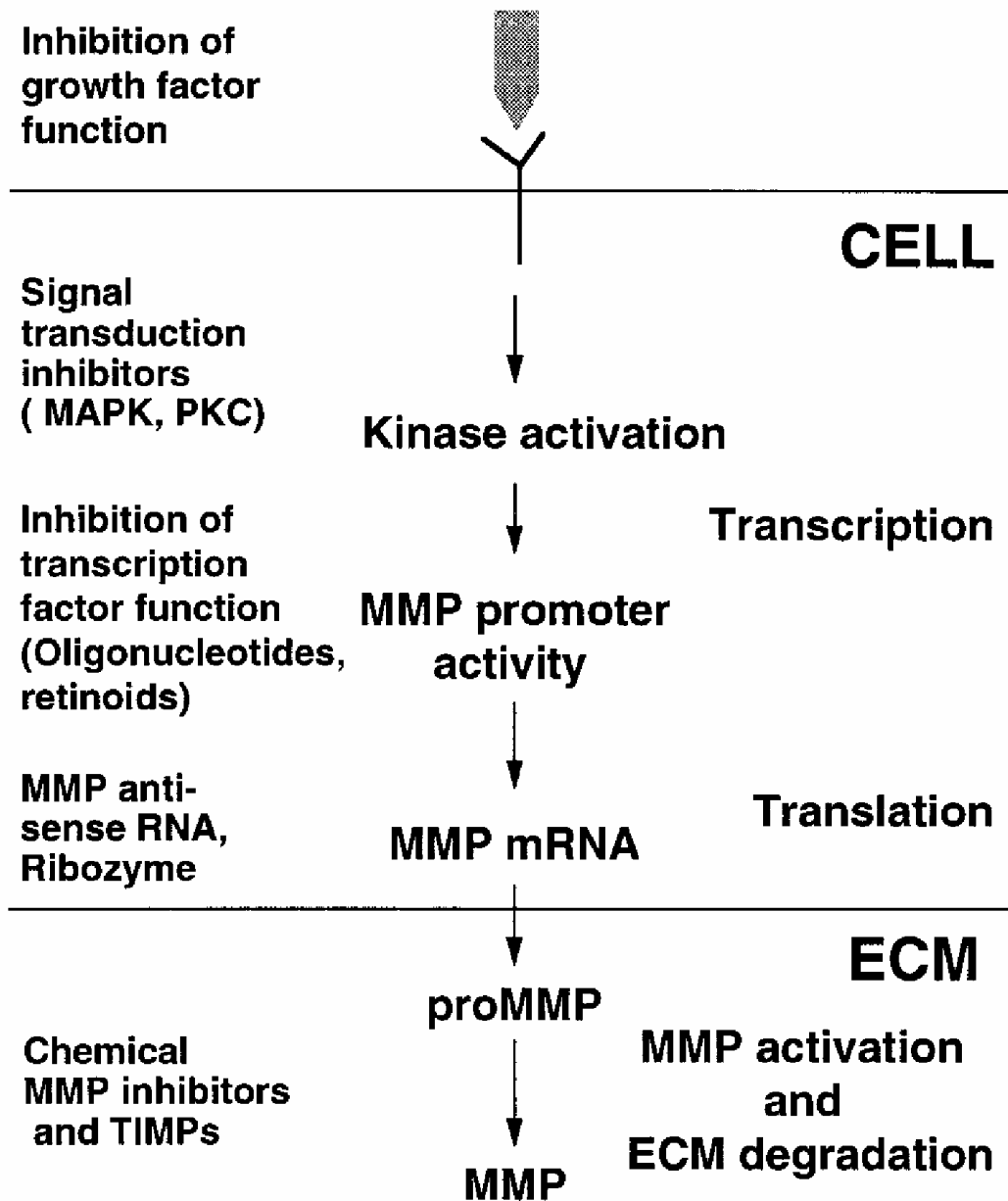
Stromelysin-3	(MMP-11)
MMP-19	
Enamelysin	(MMP-20)

55/28
57



(Westermarc and Kahari, 1999)

附錄四、MMPs 的調節及活化圖



(Westermarc and Kahari, 1999)

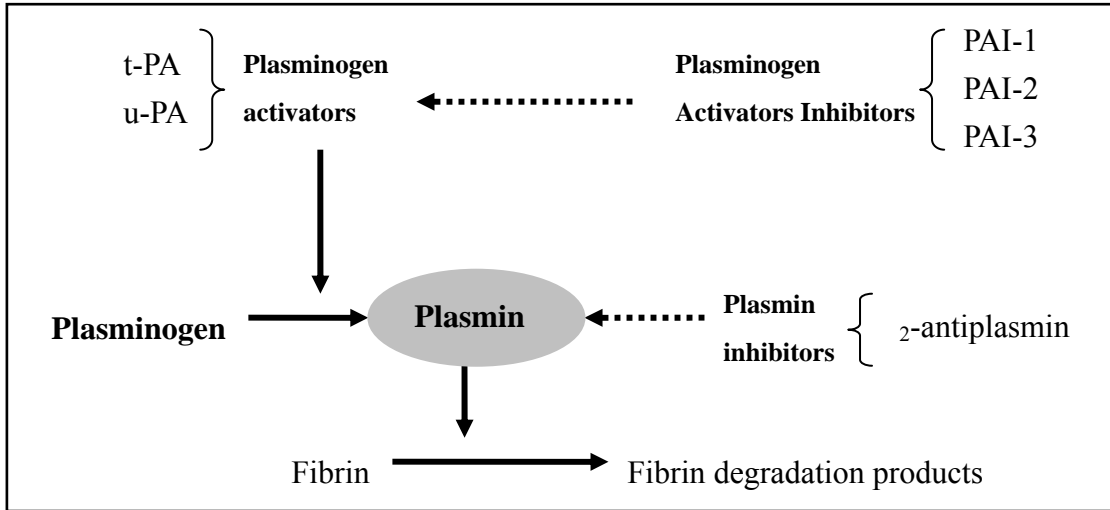
附錄五、TIMPs 的分類及分子量大小

TIMP	Chromosome location in humans	mRNA (kb)	Protein (kD)
TIMP-1	Xp11.23-Xp11.4	0.9	28.5
TIMP-2	17q23-17q25	3.5, 1.0	21.0
TIMP-3	22q12-22q13	5.0, 2.6, 2.4	21.0
TIMP-4	unknown	1.4	22.0

(Gomez et al., 1997)



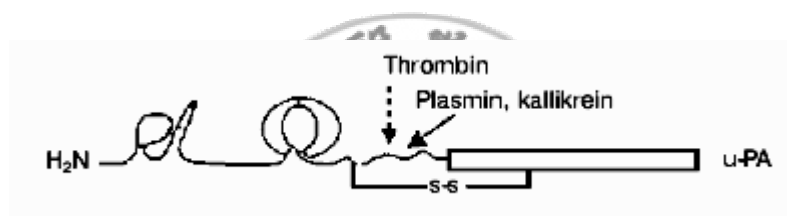
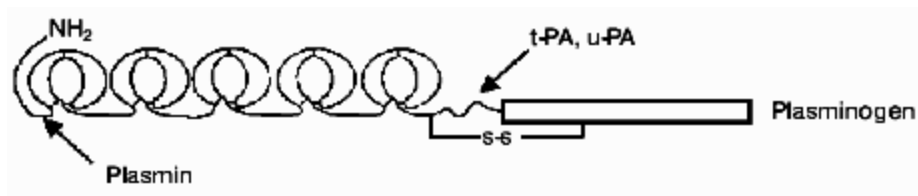
附錄六、血漿中纖維蛋白溶解系統活化劑與抑制劑的角色



(Victor and Hinsbergh, 1988)

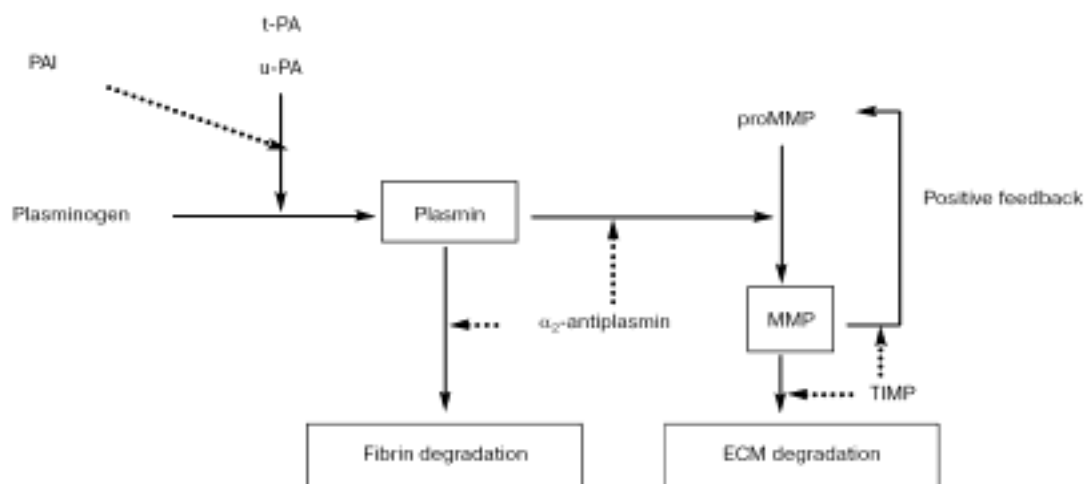


附錄七、Plasminogen、t-PA 及 u-PA 之結構圖



(Novokhatny, 1984)

附錄八、纖維蛋白溶解系統活化 MMPs 的過程圖



(Lijnen, 2002)



已發表論文:

A. 第一作者

1. **Yang, S.F.**, Hsieh, Y.S., Huang, F.M., Liu, C.M. and Chang, Y.C.* (2003) Effect of black-pigmented bacteria on the plasminogen/plasmin system in human pulp and osteoblastic cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 95: 621-625. (SCI)
2. **Yang, S.F.**, Hsieh, Y.S., Huang, F.M., Yang, L.C. and Chang, Y.C.* (2003) Upregulation of plasminogen activator inhibitor-I in oral submucous fibrosis. *Oral Oncology* 39: 367-372. (SCI)
3. **Yang, S.F.**, Chu, S.C., Chiang, I.C., Kuo, W.F., Chiou, H.L., Chou, F.P., Kuo, W.H. and Hsieh, Y.S.* (2005) Excessive matrix metalloproteinase-9 in the plasma of community-acquired pneumonia. *Clinica Chimica Acta* 352: 209-215. (SCI)
4. **Yang, S.F.**, Hsieh, Y.S., Lin, C.L., Hsu, N.Y., Chiou, H.L., Chou, F.P. and Chu, S.C.* (2005) Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 in non-small cell lung cancer patients. *Clinica Chimica Acta* 354:91-99. (SCI)

B. 非第一作者

1. Chang, Y.C., **Yang, S.F.** and Hsieh, Y.S.* (2001) Regulation of matrix metalloproteinase-2 production by cytokines and pharmacological agents in human pulp cell culture. *Journal of Endodontics* 27: 679-682. (SCI)
2. Chiang, W.L., Chu, S.C., Lai, J.C., **Yang, S.F.**, Chiou H.L. and Hsieh, Y.S.* (2001) Alternations in quantities and activities of erythrocyte cytosolic carbonic anhydrase isoenzymes in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency individuals. *Clinica Chimica Acta* 314: 195-201. (SCI)
3. Chang, Y.C., **Yang, S.F.**, Tai, K.W., Chou, M.Y. and Hsieh, Y.S.* (2002) Increases tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and inhibition of

- gelatinase A activity in buccal mucosal fibroblasts by arecoline as possible mechanisms for oral submucous fibrosis. *Oral Oncology* 38: 195-200. (SCI)
4. Chang, Y.C., Lai, C.C., **Yang, S.F.**, Chan, Y. and Hsieh, Y.S.* (2002) Stimulation of matrix metalloproteinase by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp and periodontal ligament cells cultures. *Journal of Endodontics* 28: 90-93. (SCI)
 5. Chang, Y.C., **Yang, S.F.**, Lai, C.C. Liu, J.Y. and Hsieh, Y.S.* (2002) Regulation of matrix metalloproteinases production by cytokines, pharmacological agents, and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *Journal of Periodontal Research* 37: 1-8. (SCI)
 6. Chou, F.P., Chu, S.C., Cheng, M.C., **Yang, S.F.**, Cheung, W.N., Chiou, H.L., and Hsieh, Y.S.* (2002) Effect of hemodialysis on the plasma level of type IV collagenases and their inhibitors. *Clinical Biochemistry* 35: 383-388. (SCI)
 7. Chiang, W.L., Chu, S.C., Yang, S.S., Li, M.C. Lai, J.C, **Yang, S.F.**, Chiou, H.L., and Hsieh, Y.S.* (2002) The aberrant expression of cytosolic carbonic anhydrase and its clinical significance in human non-small cell lung cancer. *Cancer Letters* 188: 199-205. (SCI)
 8. Kuo, W.H., **Yang, S.F.**, Chu, S.C., Lu, S.C., Chou, F.P.* and Hsieh, Y.S.* (2003) Differential inductions of MMP-2 and MMP-9 in host tissues during the growth of ascitic sarcoma 180 cells in mice. *Cancer Letters* 189: 103-112. (SCI)
 9. Chang, Y.C., **Yang, S.F.**, Huang, F.M., Tasi, K.W. and Hsieh, Y.S.* (2003) Induction of tissue plasminogen activator gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblast. *Journal of Endodontics* 29: 114-117. (SCI)
 10. Chang, Y.C., **Yang, S.F.**, Huang, F.M., Liu, C.M., Tasi, K.W. and Hsieh, Y.S.* (2003) Proinflammatory cytokines induce cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human pulp cell cultures. *Journal of Endodontics* 29: 201-204.

(SCI)

11. Chang, Y.C., Huang, F.M., **Yang, S.F.**, Liu, C.M., Lai, C.C., Chan, Y. and Hsieh, Y.S.* (2003) Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human pulp cells stimulated with black-pigmented bacteroides. *Journal of Endodontics* 29: 240-243. (SCI)
12. Tsai, C.H., Hsieh, Y.S., **Yang, S.F.**, Chou, M.Y. and Chang, Y.C.* (2003) Matrix metalloproteinase 2 and 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase C inhibitors: preliminary observations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 95: 710-716. (SCI)
13. Kuo, W.H., Chiang, W.L., **Yang, S.F.**, Yeh, C.T., Yeh, C.M., Hsieh, Y.S., and Chu, S.C.* (2003) The differential expression of cytosolic carbonic anhydrase in human hepatocellular carcinoma. *Life Science* 73: 2211-2223. (SCI)
14. Lin, H.L., Wu, D.J., Ueng, K.C., **Yang, S.F.**, Lin, C.S. and Hsieh, Y.S.* (2003) Matrix metalloproteinase activity following cardiac catheterization. *Chung Shan Medical Journal* 14: 37-43. 1960
15. Chu, S.C., **Yang, S.F.**, Lue, K.H., Hsieh, Y.S., Hsiao, T.Y. and Lu, K.H. (2004) The clinical significance of gelatinase B in gouty arthritis of the knee. *Clinica Chimica Acta* 339:77-84. (SCI)
16. Huang, F.M., **Yang, S.F.**, Hsieh, Y.S., Liu, C.M., Yang, L.C. and Chang Y.C.*(2004) Examination of the signal transduction pathways involved in matrix metalloproteinase-2 in human pulp cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 97: 398-403. (SCI)
17. Lu, K.H., **Yang, S.F.**, Chu, S.C., Chen, P.N., Chou, M.C., Hsiao, T.Y. and Hsieh, Y.S.* (2004) The significance of altered expression of gelatinases in the synovium of patient with arthritic effusions. *Clinical Rheumatology* 23:21-26. (SCI)

18. Hsieh, Y.S., **Yang, S.F.**, Chu, S.C., Chen, P.N., Chou, M.C., Hsu, M.C. and Lu, K.H.* (2004) Expression changes of gelatinases in human osteoarthritic knee and the arthroscopic débridement. *Arthroscopy* 20: 482-488. (SCI)
19. Chu, S.C., Wang, C.P., Chang, Y.H., Hsieh, Y.S., **Yang, S.F.**, Su, J.M., Lin, K.L. and Chiou, H.L.* (2004) Increased cystatin C serum concentrations in patients with hepatic diseases of various severities. *Clinica Chimica Acta* 341: 133-138. (SCI)
20. Chang, Y.C., Chu, S.C., **Yang, S.F.**, Hsieh, Y.S., Yang, L.C. and Huang, F.M.* (2004) Examination of the signal transduction pathways leading to activation of gelatinolytic activity by interleukin-1 α and *Prophyromonas giingivalis* in human osteosarcoma. *Journal of Periodontal Research* 39: 168-174. (SCI)
21. Chu, S.C., Chiou, H.L., Chen, P.N., **Yang, S.F.** and Hsieh, Y.S.* (2004) Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Molecular Carcinogenesis* 40: 143-149. (SCI)
22. Chu, S.C., Tsai, C.H., **Yang, S.F.**, Huang, F.M., Su, Y.F., Hsieh, Y.S. and Chang, Y.C.* (2004) Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblast. *Journal of Endodontics* 30:704-707. (SCI)
23. Chu, S.C., **Yang, S.F.**, Lue, K.H., Hsieh, Y.S., Hsu, M.C. and Lu, K.H.* (2004) Regulation of gelatinases expression by cytokines, endotoxins and pharmacological agents in the human osteoarthritic knee. *Connective Tissue Research* 45:142-50. (SCI)
24. Chiang, W.L., Liu, J.Y., Liao, C.Y., **Yang, S.F.**, Hsieh, Y.S. and Chu, S.C.* (2004) Alternation cytosolic carbonic anhydrase isoenzymes during deciduomatal development in pregnant mice. *Fertility and Sterility* 82 (Suppl 3): 1095-1100. (SCI)

25. Chu, S.C., **Yang, S.F.**, Lue, K.H., Hsieh, Y.S. Lin Z. I. and Lu, K.H.* (2004)
The clinical significance of gelatinases in septic arthritis of the native and
replaced knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 427:179-183.
(SCI)
26. Chu, S.C., Hu, D.N.*, **Yang, S.F.**, Yang, P.Y., Hsieh, Y.S. and McCormick, S.A.
(2004) Uveal melanocytes produce matrix metalloproteinase-2 and -9 *in vitro*.
Pigment Cell Research 17:636-42. (SCI)
27. Tsai, C.H., **Yang, S.F.**, Chen, Y. J., Chu, S.C., Hsieh, Y.S. and Chang, Y.C.*
(2004) Regulation of interleukin-6 expression by arecoline in human buccal
fibroblasts is related to intracellular glutathione levels. *Oral Disease* 10:360-4.
(SCI)
28. Hsieh, Y.S., Hsu, J.D., **Yang, S.F.** and Kuo, D.Y.* (2004) Immunohistochemical
and genomic evidence for the involvement of hypothalamic neuropeptide Y
(NPY) in phenylpropranolamine-mediated appetite suppression. *Peptides*
25:2155-2161. (SCI)
29. Kuo, W.H., **Yang, S.F.**, Hsieh, Y.S., Tsai, C.H., Hwang, W.L. and Chu, S.C.*
(2005) Differential expression of carbonic anhydrase isoenzymes in various
types of anemia. *Clinica Chimica Acta* 351:79-86. (SCI)
30. Hsieh, Y.S., **Yang, S.F.**, and Kuo, D.Y.* (2005) Amphetamine, an appetite
suppressant, decreases neuropeptide Y immunoreactivity in rat hypothalamic
paraventriculum. *Regulatory Peptides* 127: 169-176. (SCI)
31. Weng, M.W., Hsiao, Y.M., Chiou, H.L., **Yang, S.F.**, Hsieh, Y.S., Cheng, Y.W.,
Yang, C.H. and Ko, J.L.* (2005) Allevation of benzo[a]pyrene
diolepoxide-DNA damage in human lung carcinoma by glutathione
S-transferase M2. *DNA Repair* 4:493-502. (SCI)
32. Chen, T.Y., Hsieh, Y.S., Yang, C.C., Wang, C.P., **Yang, S.F.**, Cheng, Y.W., Chiou,
H.L.* (2005) Relationship between matrix metalloproteinase-2 activity and

cystatin C levels in patients with hepatic disease. *Clinical Biochemistry* (In press) (SCI)

