

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

廣東住血線蟲感染鼯鼠的致病過程中核轉錄因子kappa B的調節
(第3年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 103-2320-B-040-023-MY3
執行期間：105年08月01日至106年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：賴世展

計畫參與人員：此計畫無其他參與人員

中華民國 106 年 10 月 26 日

中文摘要：本試驗利用廣東住血線蟲 (*Angiostrongylus cantonensis*) 感染鼯鼠之動物模型，來研究基質金屬蛋白酶 (Matrix metalloproteinase, MMP)-9 在感染時，造成血腦障壁 (blood-brain barrier) 及血腦脊髓液障壁 (blood-cerebrospinal fluid barrier) 損傷之角色。結果顯示，廣東住血線蟲感染鼯鼠會促進核轉錄因子 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of B cells, NF- κ B) 及核因子抑制蛋白 (inhibitor of κ B, I κ B) 的磷酸化，給予MG132處理組發現，經MG132處理會減少NF- κ B的磷酸化及MMP-9的活性，顯示感染誘發MMP-9的活化是藉由核轉錄因子這個路徑。在廣東住血線蟲感染的鼯鼠腦部發現緊密連結蛋白 claudin-5 表現量是減少的，但在腦脊髓液中是增加的，給予廣效型基質金屬蛋白酶抑制劑 (GM6001) 能減輕 claudin-5 的降解，意味著感染會造成血腦脊髓液障壁損傷而促使 claudin-5 釋放到腦脊髓液中，是與MMP-9活性有關。進一步，以廣東住血線蟲感染MMP-9基因剔除鼠相較於對照組的結果發現，MMP-9基因剔除會減少因感染造成血腦障壁瓦解 (緊密連結降解、細胞基底膜瓦解及星狀膠細胞損傷) 及血腦障壁通透性增加。這些結果顯示，在廣東住血線蟲感染鼯鼠誘發嗜伊紅性腦膜腦炎中，血腦障壁及血腦脊髓液障壁的破壞，是與MMP-9有密切關聯的。本試驗結果顯示MMP-9在感染廣東住血線蟲侵入腦部誘發嗜伊紅性腦膜腦炎之病理機轉扮演重要的角色，並提供一個新的治療策略，達到降低死亡率的目的。

中文關鍵詞：廣東住血線蟲、核轉錄因子-kappa B、基質金屬蛋白酶

英文摘要：The objective of this study was to investigate the role of the matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the disruption of blood-brain barrier (BBB) and blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier during infection with rat nematode lungworm *Angiostrongylus cantonensis*. The results showed that phosphorylation of I κ B and NF- κ B was increased in brain, treatment with MG132 reduced the phosphorylation of NF- κ B and the activity of MMP-9, indicating upregulation of MMP-9 through the NF- κ B signaling pathway during infection. Claudin-5 was reduced in the brain but elevated in the CSF, treatment with the MMP inhibitor GM6001 attenuated the degradation of claudin-5, implying that *A. cantonensis* infection caused blood-CSF barrier breakdown by MMP-9 and led to claudin-5 release into the CSF. In addition, BBB disruption is associated with tight junction protein degradation, basal membrane disruption, and astrocyte damage led to elevate BBB permeability, which attenuated in MMP-9 knockout mice compared with wild-type mice during *A. cantonensis* infection. These results suggested that disruption of BBB and blood-CSF barrier was caused by MMP-9 in angiostrongyliasis meningoencephalitis. This study improves understanding of molecular mechanisms that underlie brain invasion by *A. cantonensis*, which is a key step in the pathogenesis of meningoencephalitis, and can

offer a new strategy to reduce mortality.

英文關鍵詞：Angiostrongylus cantonensis; NF- κ B, matrix metalloproteinase

行政院科技部補助專題研究計畫 成果報告 期中進度報告

(計畫名稱)

Regulation of NF- κ B in the pathogenesis of mouse infected with *Angiostrongylus cantonensis*

廣東住血線蟲感染鼯鼠的致病過程中核轉錄因子 kappa B 的調節

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 103-2320-B-040-023-MY3

執行期間：2014 年 08 月 01 日至 2017 年 07 月 31 日

計畫主持人：賴世展

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫

及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 106 年 10 月 26 日

中文摘要

關鍵詞：廣東住血線蟲、核轉錄因子- κ B、基質金屬蛋白酶

本試驗利用廣東住血線蟲 (*Angiostrongylus cantonensis*) 感染鼯鼠之動物模型，來研究基質金屬蛋白酶 (Matrix metalloproteinase, MMP)-9 在感染時，造成血腦障壁 (blood-brain barrier) 及血腦脊髓液障壁 (blood-cerebrospinal fluid barrier) 損傷之角色。結果顯示，廣東住血線蟲感染鼯鼠會促進核轉錄因子 (nuclear factor κ -light-chain-enhancer of B cells, NF- κ B) 及核因子抑制蛋白 (inhibitor of κ B, I κ B) 的磷酸化，給予 MG132 處理組發現，經 MG132 處理會減少 NF- κ B 的磷酸化及 MMP-9 的活性，顯示感染誘發 MMP-9 的活化是藉由核轉錄因子這個路徑。在廣東住血線蟲感染的鼯鼠腦部發現緊密連結蛋白 claudin-5 表現量是減少的，但在腦脊髓液中是增加的，給予廣效型基質金屬蛋白酶抑制劑 (GM6001) 能減輕 claudin-5 的降解，

意味著感染會造成血腦脊髓液障壁損傷而促使 claudin-5 釋放到腦脊髓液中，是與 MMP-9 活性有關。進一步，以廣東住血線蟲感染 MMP-9 基因剔除鼠相較於對照組的結果發現，MMP-9 基因剔除會減少因感染造成血腦障壁瓦解 (緊密連結降解、細胞基底膜瓦解及星狀膠細胞損傷) 及血腦障壁通透性增加。這些結果顯示，在廣東住血線蟲感染鼯鼠誘發嗜伊紅性腦膜腦炎中，血腦障壁及血腦脊髓液障壁的破壞，是與 MMP-9 有密切關聯的。本試驗結果顯示 MMP-9 在感染廣東住血線蟲侵入腦部誘發嗜伊紅性腦膜腦炎之病理機轉扮演重要的角色，並提供一個新的治療策略，達到降低死亡率的目的。

英文摘要

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*; NF- κ B, matrix metalloproteinase

The objective of this study was to investigate the role of the matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the

disruption of blood-brain barrier (BBB) and blood- cerebrospinal fluid (CSF) barrier during infection with rat nematode lungworm *Angiostrongylus cantonensis*. The results showed that phosphorylation of I κ B and NF- κ B was increased in brain, treatment with MG132 reduced the phosphorylation of NF- κ B and the activity of MMP-9, indicating upregulation of MMP-9 through the NF- κ B signaling pathway during infection. Claudin-5 was reduced in the brain but elevated in the CSF, treatment with the MMP inhibitor GM6001 attenuated the degradation of claudin-5, implying that *A. cantonensis* infection caused blood-CSF barrier breakdown by MMP-9 and led to claudin-5 release into the CSF. In addition, BBB disruption is associated with tight junction protein degradation, basal membrane disruption, and astrocyte damage led to elevate BBB permeability, which attenuated in MMP-9 knockout mice compared with wild-type mice during *A. cantonensis*

infection. These results suggested that disruption of BBB and blood-CSF barrier was caused by MMP-9 in angiostrongyliasis meningoencephalitis. This study improves understanding of molecular mechanisms that underlie brain invasion by *A. cantonensis*, which is a key step in the pathogenesis of meningoencephalitis, and can offer a new strategy to reduce mortality.

前言

廣東住血線蟲 (*Angiostrongylus cantonensis*) 是人畜共通的寄生蟲 (zoonotic parasites), 寄生在大鼠 (rat) 心臟及肺動脈血管。台灣整個島嶼幾乎都有此寄生蟲的存在, 每年都有因飲食不當而感染廣東住血線蟲的病例報告 (Yii, 1976; Tsai et al., 2004)。人類的感染主要是由於吃生的或未煮熟的蝸牛肉而感染廣東住血線蟲第三期幼蟲 (Alicata, 1965), 此寄生蟲發育中的幼蟲會侵入人類中樞神經系統 (central nervous system, CNS), 造成神經細胞脫髓鞘 (demyelination) (Lin et al., 2010), 小腦浦金氏細胞 (Purkinje

cells) 喪失、損傷及空泡化 (Yoshimura, 1993; Chen et al., 2004), 嗜伊紅性腦膜炎 (eosinophilic meningitis) (Hsu et al., 1990) 或嗜伊紅性腦膜腦炎 (eosinophilic meningoencephalitis) (Gardiner et al., 1990) 等病理現象, 而引起這些病症的重要機制主要是腦障壁 (brain barrier) 被破壞, 導致發炎細胞及毒性蛋白侵入 CNS 破壞組織細胞。血液中的物質進入腦組織時會受到一定的限制 (或選擇), 這就是血液-中樞神經系統屏障 (blood-CNS barrier), 其中阻隔在血液及腦部組織之間的血-腦屏障 (blood-brain barrier, BBB) 位於血液與腦、脊髓的神經細胞之間, 主要由毛細血管內皮細胞、基底膜和星狀細胞 (astrocyte) 足板 (end feet) 組成, 是維持 CNS 內環境穩定的重要結構, 可以保護 CNS 免於受到血液中有毒物質的侵入 (Vorbrodt and Dobrogowska, 2003)。我們實驗室的研究以廣東住血線蟲感染鼯鼠證實基質金屬蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 在廣東住血線蟲感染鼯鼠誘發之嗜伊紅性腦膜炎致病過程中扮演重要角色 (Lai et al.,

2004), 此蟲引起腦膜炎的機轉主要是藉由蛋白分解酶 (proteolytic enzymes) 破壞 blood-CNS barrier (Chen et al., 2006; Wei et al., 2011; Chiu and Lai, 2013)。

材料與方法

一、廣東住血線蟲第三期幼蟲

(AcL3) 之收集:

大白鼠感染廣東住血線蟲後, 糞便中會含廣東住血線蟲的第一期幼蟲 (AcL1), 收集糞便中的 AcL1 感染水螺 (*Biomphalaria glabrata*), 待 AcL1 發育至第三期幼蟲 (AcL3) 時, 將水螺外殼碾碎, 取其組織, 剝碎。用組織均質器絞碎, 以 1:30 (組織: 消化液) 比例加入人工胃蛋白酶消化液 (pepsin, Sigma, USA), 以磁性攪拌子於 37°C 之恆溫箱中, 均勻攪拌消化 2 小時。以雙層紗布濾去雜質, 加入生理食鹽水稀釋並靜置, 每隔 30 分鐘倒去約一半的上清液, 再加入生理食鹽水稀釋靜置, 重複上述步驟至完全清澈為止。以滴管吸取下層之沈澱物, 置於玻璃皿中, 在解剖顯微鏡下, 觀察並吸取 AcL3。每 30 隻 AcL3 為一單

位，置於玻璃培養皿中。

二、動物試驗：誘發嗜伊紅性腦膜炎或腦膜腦炎

BALB/c 品系鼯鼠，購自國科會動物中心，為五週齡雄性鼯鼠。感染前至少飼養於 12 小時亮及 12 小時暗的動物飼養中心一週。將 60 隻 BALB/c 品系鼯鼠隨機各別分為 6 組，分別為未感染的對照組、廣東住血線蟲感染第 5 天、第 10 天、第 15 天、第 20 天和第 25 天。鼯鼠在感染前 12 小時均給予禁水及禁食，每隻鼯鼠以口胃管分別灌入 30 隻 AcL3，於感染後 12 小時再恢復其供水、供食。對照組則灌入等量的生理食鹽水。

三、西方點墨法 (Western blotting) 蛋白質 (sirtuin1) 的檢測方法依照本實驗室先前的研究成果 (Chen et al., 2004)。簡述如下，將檢體 (鼯鼠腦部組織均質液或細胞均質液) 在 4 °C，12,000 g 離心 10 分鐘，取上清液並進行定量。將收集之新鮮蛋白質，填入 SDS 電泳膠片進行電泳。電泳結束後，將膠片上之蛋白轉移至

nitrocellulose membrane。利用 primary antibody 及 horse radish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody 進行反應，以 enhanced chemiluminescence (ECL) 檢測蛋白質。

四、NF- κ B 去乙酰化作用

由初步的試驗結果得知廣東住血線蟲感染鼯鼠後，去乙酰化酶-1 在感染後第 15 天、第 20 天和第 25 天明顯減少，因此去乙酰化酶-1 活化劑 resveratrol 作用在廣東住血線蟲感染的鼯鼠皆以感染第 20 天的鼯鼠做研究。以 resveratrol 作用的組別分為 4 組，將 60 隻 BALB/c 品系鼯鼠分別為未感染的對照組、廣東住血線蟲感染的鼯鼠第 20 天、廣東住血線蟲感染同時加入 DMSO 處理、廣東住血線蟲感染同時加入 3.0mg resveratrol 處理、廣東住血線蟲感染同時加入 albendazole (10mg/kg) 處理及廣東住血線蟲感染同時合併 albendazole (10mg/kg) 和 3.0mg resveratrol 處理。

五、Gelatin zymography 分析試驗

基質金屬蛋白酶 MMP-9 酵素活性以 gelatin zymography 方法來分析，依照本實驗室先前的研究成果 (Hou et al., 2004)。簡述如下，膠體的配製法(gel preparation) 與 SDS-PAGE 相同，不同的是 separating gel 中加入 0.1 % 的 gelatin (Sigma, USA)。電泳後，取下 gel，加入 100 ml washing buffer (2.5% Triton X-100 in double-distilled H₂O) 清洗 gel。在室溫下搖動 30 分鐘，換 washing buffer 再洗一次。倒掉 washing buffer，gel 以 double-distilled H₂O 清洗一次。加入 200 ml reaction buffer (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃)，在 37°C 作用 18 小時以上。以 stain solution (0.25% Coomassie Blue R250, in 50% MeOH, 10% acetic acid) 染 gel 1 小時。以 destain solution (20% methanol, 10% acetic acid) 退去染液，取膠片以密度掃描儀量化分析結果。

六、免疫共同沉澱

(Co-immunoprecipitation)

於 1.5 ml 離心管中，每組反應取 20 μ l rProtein G beads Agarose

(invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，以 1 ml PBS 清洗 3 次，每次以 10,000 rpm 1 分鐘，小心去除上清液，加入 Goat anti-mouse claudin-5 polyclone antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)，置於 360 度旋轉器上，在 4°C 下反應 120 分鐘，待抗體反應完成後，加入 brain homogenates 及 RIPA lysis buffer (含有 50 mM Tris-HCl pH 7.5，150 mM NaCl，1 % NP-40，0.5 % sodium deoxycholate 及 0.1 % sodium dodecyl sulfate) 補至 500 μ l，放置搖擺器上，在 4°C 冰箱中，以轉速 6-12 rpm，over night 反應完成後，以 10,000 rpm 離心並去除上清液。以 1 ml RIPA lysis buffer 進行清洗，離心 10,000 rpm 1 分鐘，3 次。再以 1 ml PBS 清洗，離心 10,000 rpm 1 分鐘，2 次，去除上清液。最後加入 20 μ l sample buffer (65.8 mM Tris-HCl，pH 6.8，2 % SDS，20 % (w/v) glycerol，0.01 % bromophenol blue)，於 95°C 煮 10 分鐘後，以 Goat Anti-mouse MMP-9 polyclone antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) 做 immunoblotting 檢測 claudin-5 與 MMP-9 是否有交互

作用。

七、共軛焦顯微鏡 (Confocal microscopy) 觀察

組織以切片機切成 10 μ m 並固定於玻片上，以二甲苯進行脫蠟，再以序列酒精 (100 %，95 %，75 % 及 50 %) 置換二甲苯，以純水清洗後。再以 PBS 清洗，隨後置於含 3 % H₂O₂ 之 Methanol 中反應 10 分鐘以去除內生性之 peroxidase，再加入 trypsin 於 37 °C 反應 20 分鐘，以 PBS 清洗 10 分鐘，加入 3 % BSA 在 37°C 反應 1 小時進行 blocking，減少非特異性抗原抗體反應。以 PBS 清洗 10 分鐘，再分別與一級抗體 Goat anti-mouse claudin-5 polyclone antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 溶於 1 % BSA，並在 4°C 冰箱反應 overnight，隔天，以 PBS 洗滌 3 次，每次 5 分鐘，將切片與 DyLight 488-conjugated Donkey anti-goat IgG (H+L) antibody 於 37°C 烘箱內，於避光盒中反應一小時。加入第二組一級抗體 Rabbit anti-mouse MMP-9 polyclone antibody (Abcam, UK) 溶於 1 % BSA，且於 4 °C 冰箱，於避光盒中反應 overnight，

以 PBS 洗滌 3 次，每次 5 分鐘，將切片與 Rhodamine Red-conjugated Donkey anti-rabbit IgG (H+L) antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) 於 37°C 避光反應 1 小時，再以 PBS 洗滌 3 次，每次 5 分鐘。接者以 DAPI mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA) 封片。最後，於共軛焦顯微鏡 (Zeiss LSM 510 META, Heidelberg, Germany) 下，以相對應之激發光觀察並拍照。

八、統計分析

不同組別所得檢測結果，以 Kruskal-Wallis 進行統計分析，以 Dunn, s multiple comparison 做多重比較。結果皆以平均值 \pm 標準差 (mean \pm SD) 表示，P<0.05 表示有統計上顯著的意義。

結果

一、腦部組織中 NF- κ B 及 p-NF- κ B 蛋白質的表現

I κ B 蛋白的磷酸化可活化 NF- κ B 蛋白，造成下游發炎相關蛋白轉

錄。為了觀察 PPAR γ 拮抗劑 GW9662 改變 I κ B- α 及 p-I κ B- α 蛋白表現量對於其下游蛋白 NF- κ B 造成的影響，以 Western blotting 分析廣東住血線蟲感染鼯鼠的腦部組織中 NF- κ B 及 p-NF- κ B 蛋白表現量，並以 β -actin 為 loading control。結果顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠可造成 NF- κ B 及 p-NF- κ B 蛋白表現量上升；NF- κ B 及 p-NF- κ B 蛋白表現量在廣東住血線蟲感染鼯鼠組給予 GW9662 6mg/kg/day 後有增加 (P<0.05) 的趨勢，而在未感染組之間則無顯著差異。蛋白量化結果顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠可造成 NF- κ B 蛋白表現上升 20% 及 p-NF- κ B 蛋白表現上升 21%。GW9662 6mg/kg/day 在廣東住血線蟲感染鼯鼠組可造成 NF- κ B 及 p-NF- κ B 蛋白表現量分別上升約 23% 及 23% (圖一)。

二、腦脊髓液中 iNOS 蛋白質的表現
由圖一及圖二的結果可知廣東住血線蟲感染鼯鼠及 PPAR γ 的不活化可造成發炎上游相關蛋白 I- κ B- α 、NF- κ B 的活化及表現量上升，為了解這樣的改變是否會對其下游發炎相關蛋白

產生影響，以 Western blotting 分析廣東住血線蟲感染鼯鼠的腦脊髓液中 iNOS 蛋白表現量。結果顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠可造成 iNOS 蛋白表現上升；iNOS 蛋白表現量在廣東住血線蟲感染鼯鼠組中隨 GW9662 給予劑量的上升而有增加 (P<0.05) 的趨勢，在未感染組之間則無顯著差異。將 iNOS 蛋白質質量化顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠組在給予 GW9662 3mg/kg/day 或 6mg/kg/day 後，分別增加了 1.26 倍及 4.87 倍 (圖二)。

三、腦脊髓液中 COX-2 蛋白質的表現
以 Western blotting 分析廣東住血線蟲感染鼯鼠的腦脊髓液中 COX-2 蛋白表現量。結果顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠可造成 COX-2 蛋白表現上升；COX-2 蛋白表現量在鼯鼠感染廣東住血線蟲組及未感染組中隨 GW9662 給予劑量的增加有上升 (P<0.05) 的趨勢。蛋白量化結果顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠可造成 COX-2 表現約上升 3.33 倍；廣東住血線蟲感染鼯鼠組在給予 GW9662 3mg/kg/day 及 6mg/kg/day 後，可造成 COX-2 表現分

別上升約 18%及 25%；未感染組給予 GW9662 3mg/kg/day 及 6mg/kg/day 後，COX-2 表現分別上升約 74%及 100% (圖三)。

四、腦部組織及腦脊髓液中 claudin-5 蛋白質的表現

探究廣東住血線蟲感染鼯鼠是否會影響緊密連結蛋白之表現，將廣東住血線蟲感染鼯鼠的動物模式，以 Western blotting 分析廣東住血線蟲感染鼯鼠腦部組織中 claudin-5 蛋白量，以 β -actin 當 loading control，及腦脊髓液中 claudin-5 蛋白量。結果顯示 claudin-5 蛋白在感染後第 10 天、第 15 天、第 20 天及第 25 天，相較於對照組 claudin-5 蛋白量有減少的趨勢。而腦脊髓液中 claudin-5 蛋白量在感染後第 15 天、第 20 天及第 25 天，相較於對照組有上升的趨勢。經量化分析結果顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠過程中，會減少腦部組織中 claudin-5 蛋白量，但會增加腦脊髓液中 claudin-5 蛋白量 ($P < 0.05$) (圖四)。

五、MMP-9 和 claudin-5 之交互作用

以免疫共同沉澱技術來測定鼯鼠感染廣東住血線蟲之腦部組織中，

MMP-9 蛋白酶與緊密連結蛋白 claudin-5 是否有交互作用。結果顯示當鼯鼠感染廣東住血線蟲第 20 天時，以 immunoblotting 觀察到在 105 kDa 的位置出現明顯的條帶，證明在廣東住血線蟲感染過程 MMP-9 與 claudin-5 會有互相作用(圖五)。

六、MMP-9 和 claudin-5 在鼯鼠腦部脈絡叢之表現

以免疫螢光染色來觀察鼯鼠腦部脈絡叢之 MMP-9 及 claudin-5 蛋白質分佈，探討在廣東住血線蟲感染時，claudin-5 蛋白質表現是否與 MMP-9 有關。以共軛焦顯微鏡觀察廣東住血線蟲感染的鼯鼠，感染後第 20 天的腦部組織切片，染色結果顯示在鼯鼠受到廣東住血線蟲感染過程中，在脈絡叢緊密連結蛋白 claudin-5 的降解與 MMP-9 有關聯(圖六)。

七、腦脊髓液中 claudin-5 濃度與 Evans blue 濃度之相關性

為探究在廣東住血線蟲感染過程中，腦脊髓液中 claudin-5 蛋白量是否與血腦脊髓液障壁完整性有相關。測量腦脊髓液中 Evans blue 濃度及 claudin-5 蛋白量，並以 Spearman's

ranking 進行分析，結果顯示腦脊髓液中 claudin-5 蛋白質濃度與 Evans blue 濃度有顯著的相關性 ($r=0.95$)。(圖七)。

討論

於正常狀態時，PPAR γ 可調節脂肪組織分化、脂肪酸代謝以及體內葡萄糖恆定 (Tontomoz et al., 1994, Tontomoz et al., 1995; Burn et al., 1996) 以維持正常生理功能。而透過本研究未感染組並抑制 PPAR γ 活化的結果可知，未產生發炎反應時，PPAR γ 仍可調控 COX-2 及 nNOS 蛋白的表現，這些結果顯示 PPAR γ 可於發炎時調控發炎相關蛋白的表現，於正常狀態下除了調控脂肪組織分化及體內葡萄糖恆定等主要功能外，還調控了前列腺素化合物及 NO 參與之正常生理功能。

綜合以上論點，可歸納出抑制 PPAR γ 活化影響廣東住血線蟲感染造成之嗜伊紅性腦膜腦炎所扮演之機制 (如圖八)：受到廣東住血線蟲感染之個體，其 BBB 發生破壞，造成白血球浸潤到中樞神經系統，這些浸潤的

白血球可透過細胞激素、蛋白質水解酵素、NO 等系統引起發炎反應。於正常狀態時，PPAR γ 可透過增加 I κ B- α 表現量抑制 NF- κ B 而調控這些發炎相關蛋白之表現，進而降低發炎反應的強度；一旦透過拮抗劑抑制 PPAR γ 活化，I κ B- α 表現量下降，其抑制 NF- κ B 目標基因的功能即受影響，活化態 (磷酸化) I κ B- α 、NF- κ B 表現上升，活化的 NF- κ B 進一步進入細胞核促進基因轉錄，造成發炎相關蛋白如 MMP-9、iNOS、IL-1 β 、COX-2 等更加明顯的表現。這些蛋白及其所產生的產物進一步的釋放到細胞外，刺激其它免疫細胞活化或是造成細胞外基質降解，使發炎反應更加強烈。

參考文獻

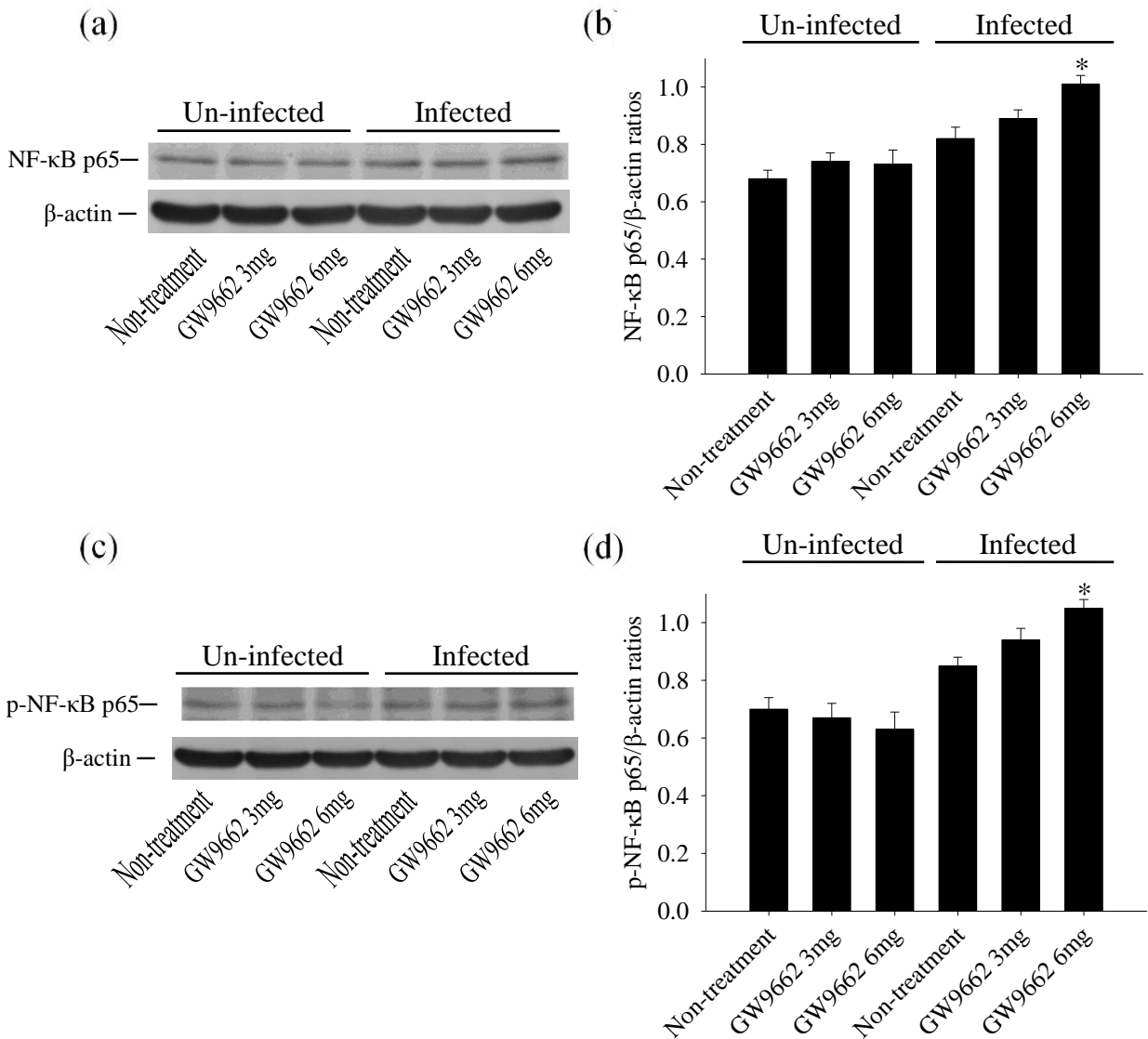
Alicata JE. 1965. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. *Advances in Parasitology* 3, 223-248.

- Barnes PJ, Karin M. 1997. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine* 336, 1066-1071
- Chen KM, Lee HH, Lu KH, Tseng YK, Hsu LS, Chou HL, Lai SC. 2004. Association of matrix metalloproteinase-9 and Purkinje cell degeneration in mouse cerebellum caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *International Journal for Parasitology* 34, 1147-1156.
- Chen KM, Liu JY, Lai SC, Hsu LS, Lee HH. 2006. Association of plasminogen activators and matrix metalloproteinase-9 proteolytic cascade with blood-CNS barrier damage of angiostrongyliasis. *International Journal of Experimental Pathology* 87, 113-119.
- Chiu PS, Lai SC. 2013. Matrix metalloproteinase-9 leads to claudin-5 degradation via the NF- κ B pathway in BALB/c mice with eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Plos One* 8, e53370.
- Gardiner CH, Well S, Gutter AE, Fitzgerald L, Anderson DC, Harris RK, Nichols DK. 1990. Eosinophili meningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* as the cause of death in captive non-human primates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42, 70-74.
- Hsu WT, Chen JY, Chien CT, Chi CS, Han NT. 1990. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Pediatric Infectious Disease Journal* 9, 443-445.
- Jin Q, Yan T, Ge X, Sun C, Shi X, Zhai Q. 2007. Cytoplasm-localized SIRT1 enhances apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* 213, 88-97.
- Lai SC, Twu JJ, Jiang ST, Hsu JD, Chen KM, Chiaing HC, Wang CJ, Lee HH. 2004. Induction of matrix-metalloproteinase-9 in the

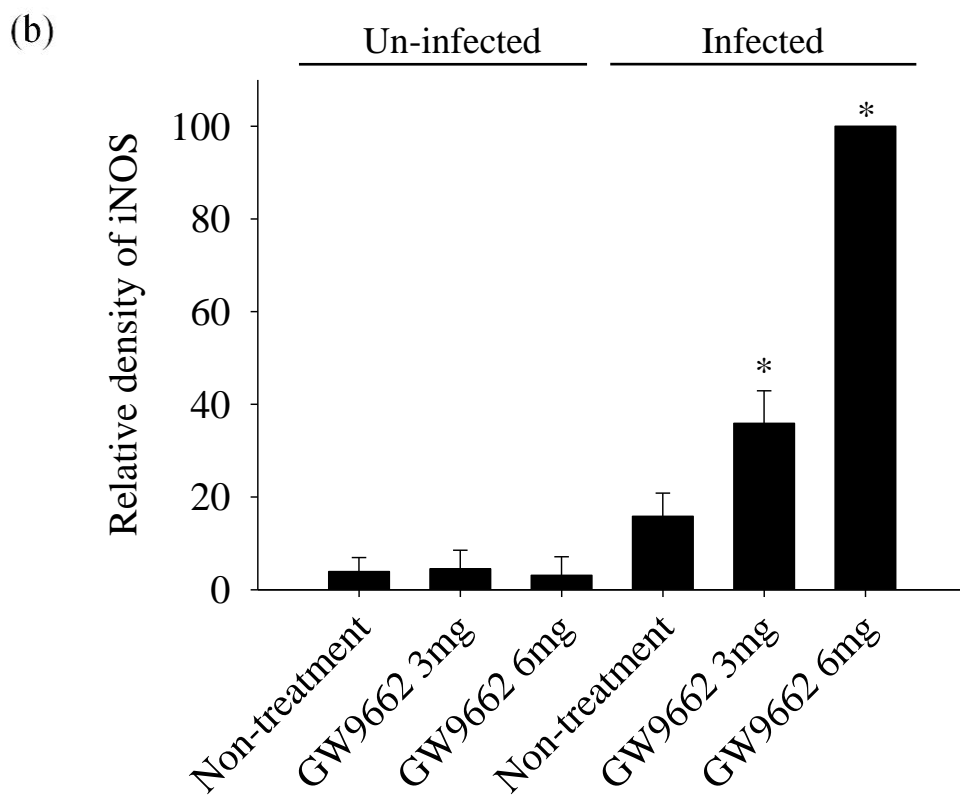
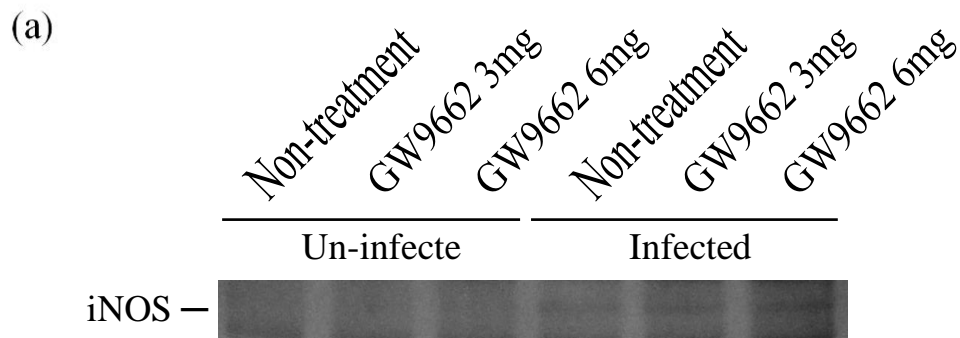
- pathogenesis of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Annals of Tropical and Medicine and Parasitology* 98, 715-724.
- Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. 2008. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 27628-27635.
- Lin KY, Chen KM, Lan KP, Lee HH, Lai SC. 2010. Alterations of myelin proteins in inflammatory demyelination of BALB/c mice caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Veterinary Parasitology* 171, 74-80.
- Schug TT, Xu Q, Gao H, Peres-da-Silva A, Draper DW, Fessler MB, Purushotham A, Li X. 2010. Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress. *Molecular and Cellular Biology* 30, 4712-4721.
- Springer TA. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. 2007. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *Journal of Biological Chemistry* 282, 6823-6832.
- Tsai HC, Lee SS, Huang CK, Yen CM, Chen ER, Liu YC. 2004. Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in Southern Taiwan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71, 222-226.
- Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. 2003. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Research Reviews* 42, 221-242.
- Wei PC, Tsai CH, Chiu PS, Lai SC. 2011.

- Matrix metalloproteinase-12 leads to elastin degradation in BALB/c mice with eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. International Journal for Parasitology 41, 1175-1183.
- Yii CY. 1976. Clinical observations on eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* on Taiwan. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 25, 233-249.
- Yoshimura K. 1993. Mechanism of parasite killing by eosinophils in parasitic infections. Nippon Rinsho 51, 657-663.

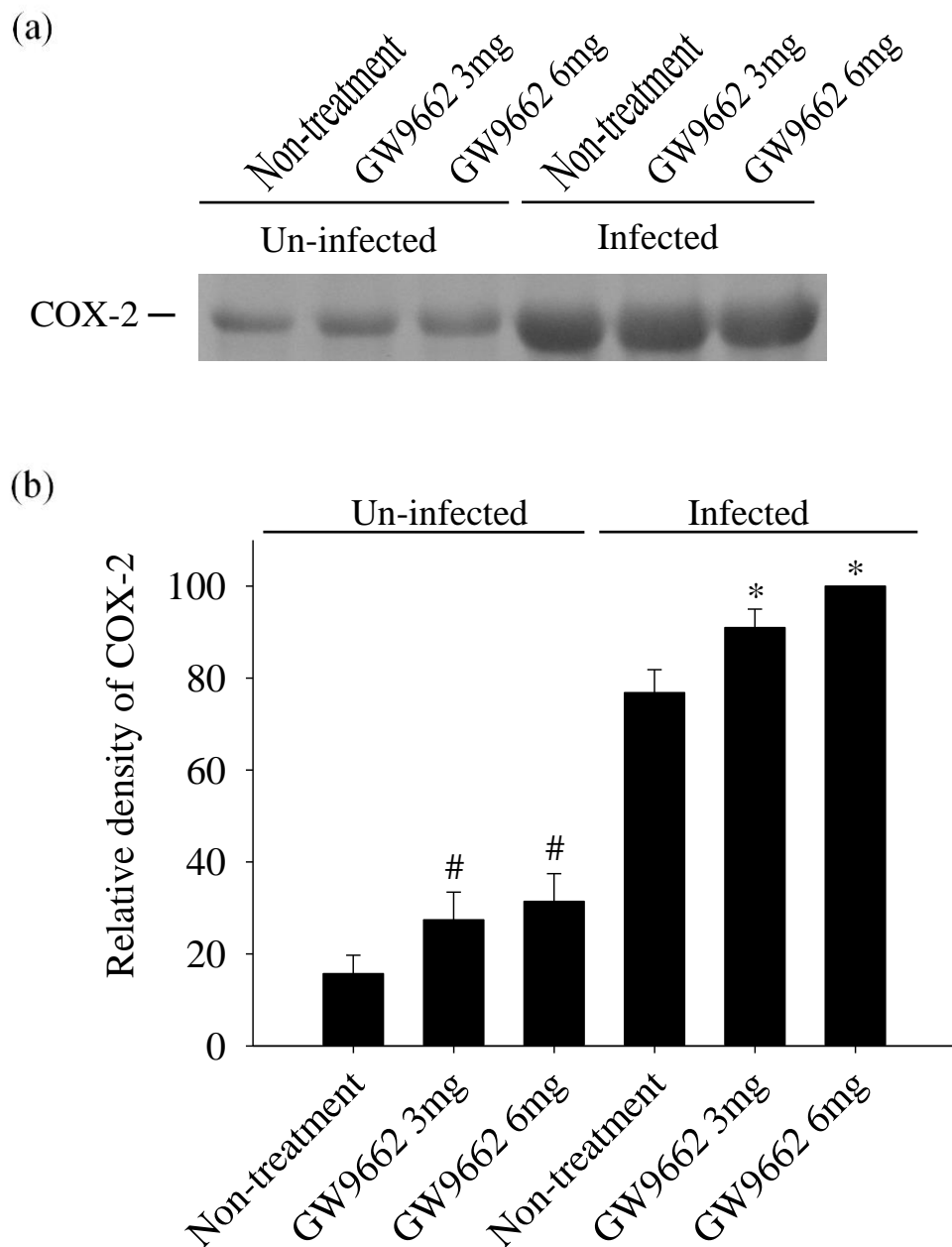
圖表



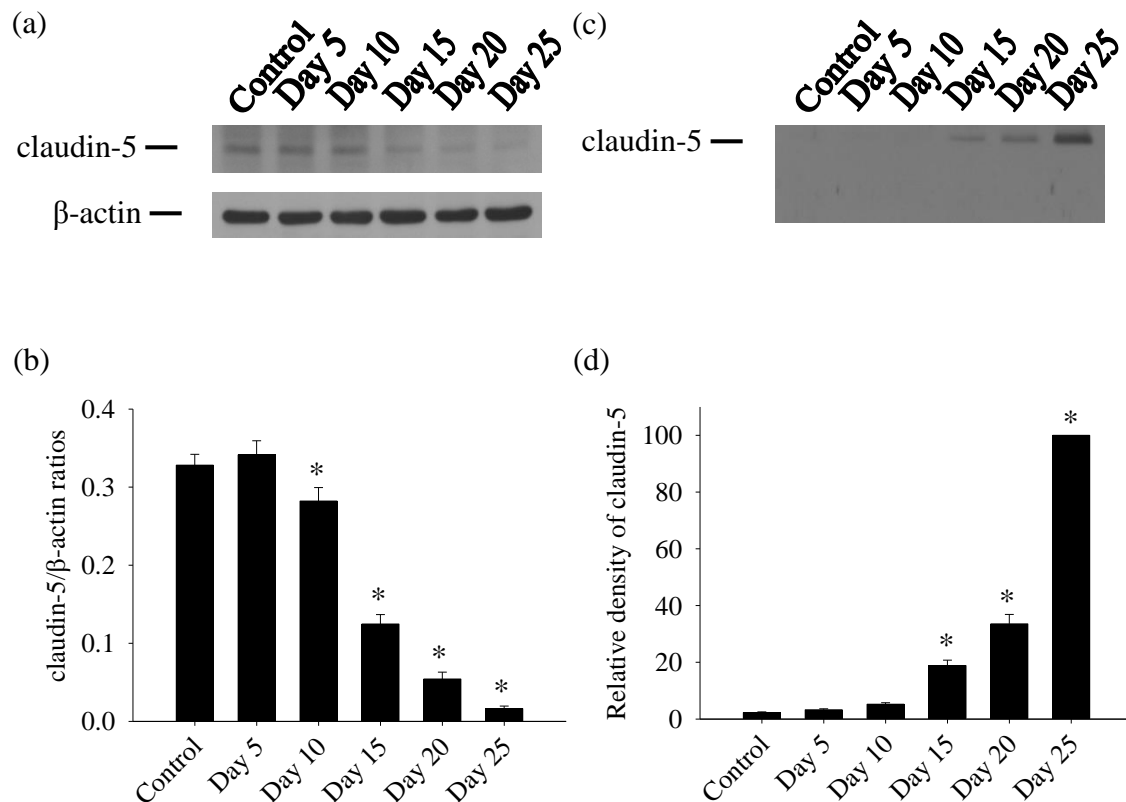
圖一、鼯鼠腦部組織中 NF-κB 及 p-NF-κB 蛋白質的表現。(a) 在腦部組織可檢測到蛋白質分子量 65 kDa 的 NF-κB，β-actin 為 loading control。(b) NF-κB 的量化結果顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠組給予 GW9662 6mg/kg/day 後，NF-κB 有顯著的增加。(c) 在腦部組織可檢測到蛋白質分子量 65 kDa 的 p-NF-κB，β-actin 為 loading control。(d) p-NF-κB 的量化結果顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠組給予 GW9662 6mg/kg/day 後 NF-κB 有顯著的增加。(＃表示相較於未感染未給藥組有顯著差異， $P < 0.05$ ；*表示相較於感染未給藥組具有顯著差異， $P < 0.05$)。



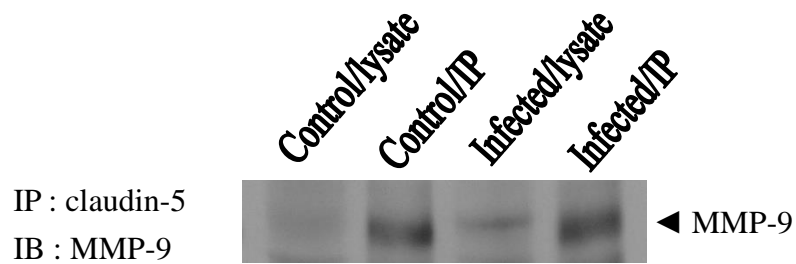
圖二、鼯鼠腦脊髓液中 iNOS 蛋白質的表現。(a) 在腦脊髓液可檢測到蛋白質分子量 130 kDa 的 iNOS。(b) 量化結果顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠組在給予 GW9662 3mg/kg/day 或 6mg/kg/day 後，iNOS 有顯著的增加。(*表示相較於感染未給藥組具有顯著差異， $P < 0.05$)。



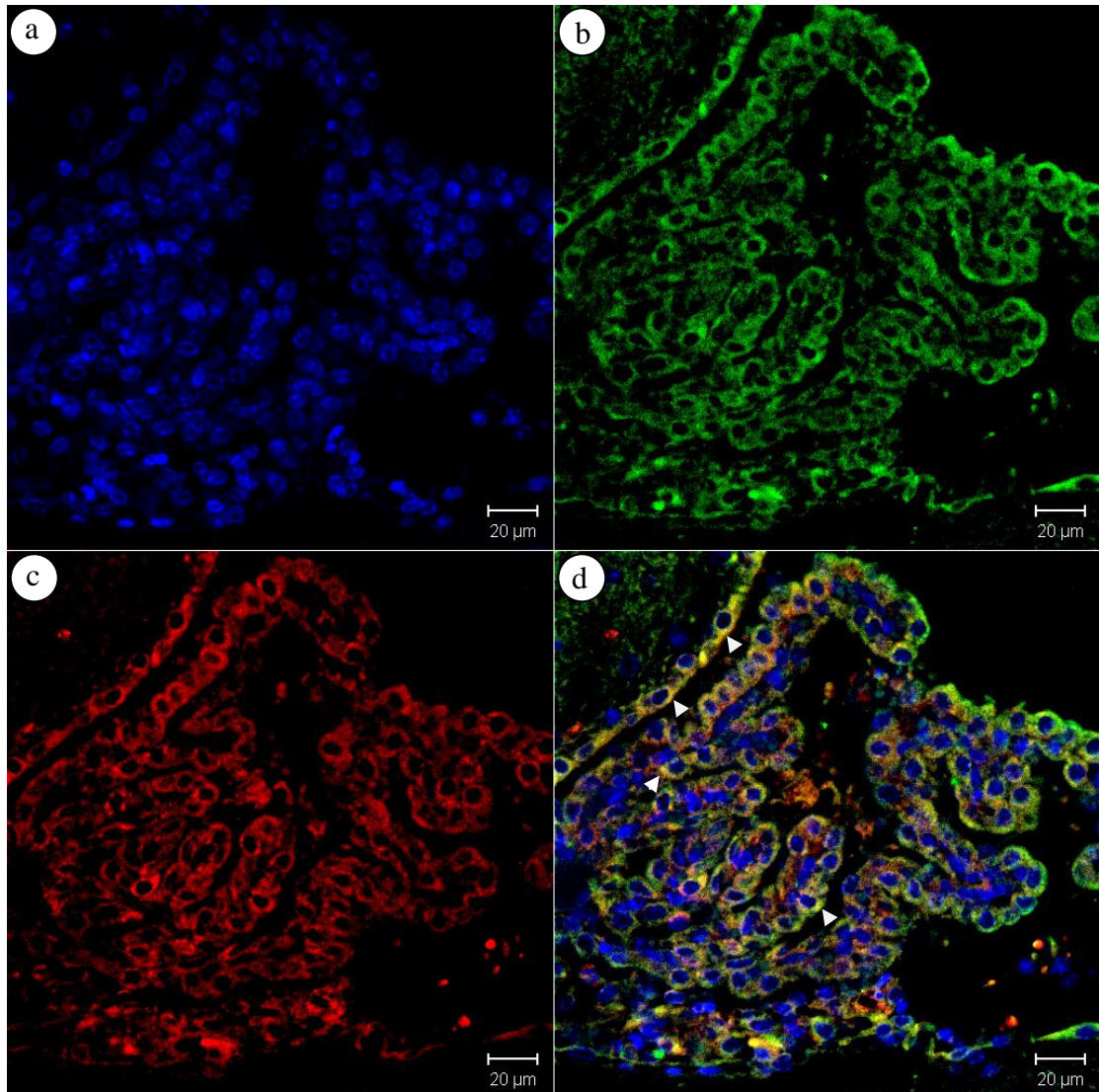
圖三、鯀鼠腦脊髓液中 COX-2 蛋白質的表現。(a) 在腦脊髓液可檢測到蛋白質分子量 72 kDa 的 COX-2。(b) 量化結果顯示廣東住血線蟲感染鯀鼠組及未感染組給予 GW9662 3mg/kg/day 或 6mg/kg/day 後，COX-2 表現均有顯著的增加。(＃表示相較於未感染未給藥組有顯著差異， $P < 0.05$ ；*表示相較於感染未給藥組具有顯著差異， $P < 0.05$)。



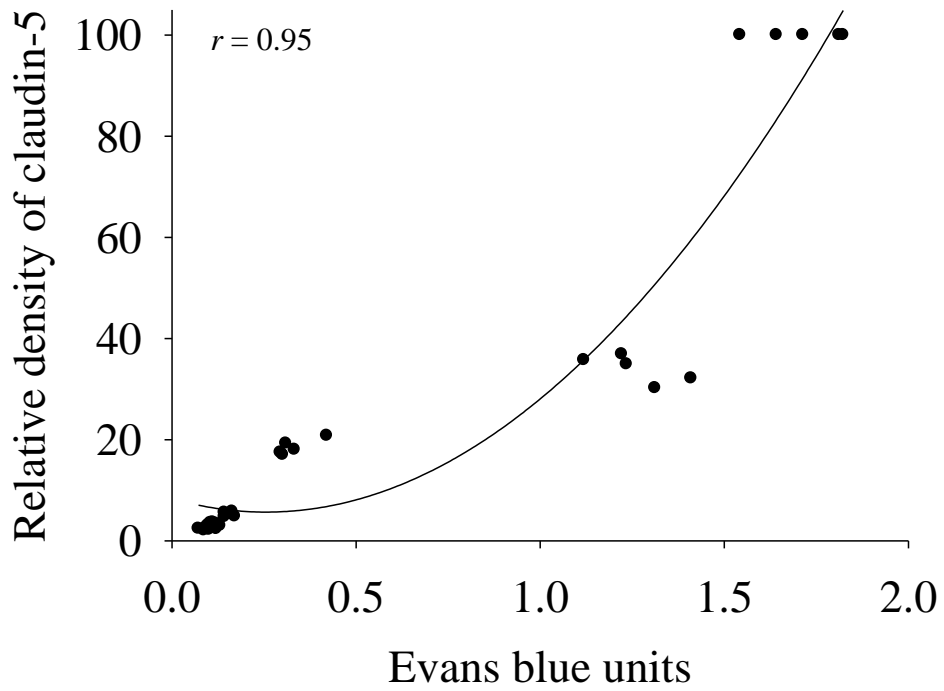
圖四、鼯鼠腦部組織及腦脊髓液中 claudin-5 蛋白的表現。(a) 在腦部組織可檢測到分子量為 23 kDa 的 claudin-5， β -actin 為 loading control。(b) 在廣東住血線蟲感染鼯鼠第 10、15、20 及第 25 天，claudin-5 經量化結果顯示相較於未感染組有顯著的減少 ($*P < 0.05$)。(c) 在腦脊髓液中可檢測到分子量為 23 kDa 的 claudin-5。(d) 在廣東住血線蟲感染鼯鼠第 15、20 及第 25 天，claudin-5 經量化結果顯示相較於未感染組有顯著的增加 ($*P < 0.05$)。



圖五、claudin-5 與 MMP-9 免疫共同沉澱試驗。在 MMP-9 分子量 105 kDa 的位置出現明顯的條帶（黑色箭頭），證明 MMP-9 與 claudin-5 在腦實質中確實有交互作用。Control 為沒有感染的 BALB/c 小鼠腦部組織均質液。Infected 為受到廣東住血線蟲感染第 20 天之小鼠腦部組織均質液。Lysate 為腦部均質液。IP 為有進行免疫共同沉澱試驗組。



圖六、claudin-5 與 MMP-9 在廣東住血線蟲感染鼯鼠第 20 天腦部脈絡叢的表現。
(a) 鼯鼠腦部切片細胞核排列 (藍色)。(b) 鼯鼠腦部 claudin-5 蛋白呈現 (綠色)。(c) 鼯鼠腦部 MMP-9 蛋白呈現 (紅色)。(d) 鼯鼠腦部脈絡叢中，claudin-5 和 MMP-9 的共同表現之位置 (白色箭頭)。Bar scale=20 μm 。



圖七、腦脊髓液中 claudin-5 濃度與 Evans blue 濃度之相關性。結果顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠後，腦脊髓液中 claudin-5 與 Evans blue 濃度呈高度相關，相關係數 $r=0.95$ 。

103年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：賴世展			計畫編號：103-2320-B-040-023-MY3			
計畫名稱：廣東住血線蟲感染鼯鼠的致病過程中核轉錄因子kappa B的調節						
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文	1	篇	Chiu, P. S., Lai, S. C.* 2014. Matrix metalloproteinase-9 leads to blood-brain barrier leakage in mice with eosinophilic meningoencephalitis caused by Angiostrongylus cantonensis. Acta Tropica 140, 141-150. (SCI)	
		研討會論文	0			
		專書	0	本		
		專書論文	0	章		
		技術報告	0	篇		
		其他	0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	
				已獲得	0	
				新型/設計專利	0	
		商標權	0			
		營業秘密	0	件		
		積體電路電路布局權	0			
		著作權	0			
		品種權	0			
		其他	0			
	技術移轉	件數	0	件		
		收入	0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文	0	篇	
			研討會論文	0		
專書			0	本		
專書論文			0	章		
技術報告			0	篇		
其他			0	篇		
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	
				已獲得	0	
				新型/設計專利	0	
		商標權	0			

		營業秘密	0		
		積體電路電路布局權	0		
		著作權	0		
		品種權	0		
		其他	0		
技術移轉	件數	0	件		
	收入	0	千元		
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

Chiu, P. S., Lai, S. C.* 2014. Matrix metalloproteinase-9 leads to blood-brain barrier leakage in mice with eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Acta Tropica* 140,

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

瞭解NF- κ B去乙酰化作用與廣東住血線蟲致病機轉之關係。使研究工作人員瞭解這種本土性寄生蟲(廣東住血線蟲)之致病機轉，此一試驗結果可成功的在蠕蟲建立生化研究的模式，對於寄生蟲之訊息傳遞與致病機轉的關係上將有相當貢獻與突破。對研究工作人員可獲得之訓練，有蛋白質操作、西方點墨法、EMSA等技術之訓練。找出廣東住血線蟲感染時導致中樞神經系統發炎之致病機轉，由此模式建立預防及治療之管道。

研究成果之學術或應用價值：找出廣東住血線蟲感染時導致腦炎之致病機轉，由此模式提供臨床上診斷此症之參考。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）

證實NF- κ B與廣東住血線蟲症的關係。