

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

蛋白質體在調節廣東住血線蟲誘發鼯鼠腦膜炎或腦膜腦炎之
機轉

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC 102-2320-B-040-017-
執行期間：102年08月01日至103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

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：是，

中華民國 103 年 11 月 05 日

中文摘要：脈絡叢上皮細胞 (choroid plexus epithelial cells) 間的緊密連結蛋白 (tight junctions) 是構成血液-腦脊髓液障壁 (blood-cerebrospinal fluid barrier, BCB) 的主要結構。蛋白酶體 (proteasome) 主要作用是降解細胞中不需要的或受到損傷的蛋白質。當廣東住血線蟲 (*Angiostrongylus cantonensis*) 感染非適宜宿主，會引起腦膜腦炎及 BCB 的瓦解。本研究以廣東住血線蟲感染鼯鼠為模型，觀察到蛋白酶體的表現量在感染期間明顯增加。以免疫螢光染色法發現緊密連結蛋白閉合蛋白 (occludin) 和基質金屬蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 在脈絡叢有相同的分布，並以共同免疫沉澱法證明閉合蛋白和 MMP-9 有交互作用。並分別給予蛋白酶體活性抑制劑 MG132 1.5 及 3.0mg/kg/day，觀察到磷酸化的 $I\kappa B\alpha$ 及 NF- κB 減少。除此之外，MMP-9 的活性及閉合蛋白的降解也因為 MG132 的作用而減少。綜合上述，當鼯鼠受到廣東住血線蟲感染而引發嗜伊紅性腦膜腦炎時，蛋白酶體是透過降解磷酸化的 $I\kappa B\alpha$ 來調節 NF- κB 的活化，進而來調控下游 MMP-9 的作用及閉合蛋白的降解。

中文關鍵詞：廣東住血線蟲、蛋白酶體、嗜伊紅性腦膜腦炎、基質金屬蛋白酶-9、核轉錄因子 κB

英文摘要：The tight junctions in the epithelial cell of the choroids are the major structures of the blood-cerebrospinal fluid barrier (BCB). The major function of proteasome is to degrade unneeded or damage proteins by proteolysis. Disruption of BCB and resulted in meningoencephalitis are important pathological events in non-permissive hosts caused by *Angiostrongylus cantonensis*. In this study, five-week BALB/c mice were infected with the third-stage larvae of *A. cantonensis*. The results showed the protein levels of proteasome were increased during *A. cantonensis* infection. Occludin was co-localized with matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by confocal immunofluorescence microscopy. Further, we demonstrated that occludin interacted with MMP-9 in brain tissue of infected-mice by co-immunoprecipitation. The infected-mice were treated with proteasomal activity inhibitor MG132 in 1.5 and 3.0 mg/kg/day, respectively. The protein levels of phosphorylated $I\kappa B\alpha$ were significantly decreased as

compared with untreated control. Also, phosphorylated nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) has similar result. In addition, activity of MMP-9 and occludin degradation were reduced because of MG132. The role of proteasome in *A. cantonensis* infection is to degrade phosphorylated I κ B α , and modulate phosphorylated NF- κ B, and then regulate the activation of MMP-9 and occludin degradation.

英文關鍵詞： *Angiostrongylus cantonensis*, proteasome, eosinophilic meningoencephalitis, matrix metalloproteinase-9, NF- κ B

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告 期中進度報告

(計畫名稱)

Regulation of mouse meningitis or meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* through proteasome

蛋白酶體在調節廣東住血線蟲誘發鼯鼠腦膜炎或腦膜腦炎之機轉

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 102-2320-B-040-017-

執行期間：2013 年 08 月 01 日至 2014 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 2014 年 10 月 20 日

目錄

中文摘要	3
英文摘要	3
前言	4
材料與方法	5
結果	7
討論	8
參考文獻	9
圖、表	13
計劃成果自評	22

中文摘要

脈絡叢上皮細胞 (choroid plexus epithelial cells) 間的緊密連結蛋白 (tight junctions) 是構成血液-腦脊髓液障壁 (blood-cerebrospinal fluid barrier, BCB) 的主要結構。蛋白酶體 (proteasome) 主要作用是降解細胞中不需要的或受到損傷的蛋白質。當廣東住血線蟲 (*Angiostrongylus cantonensis*) 感染非適宜宿主, 會引起腦膜腦炎及 BCB 的瓦解。本研究以廣東住血線蟲感染鼯鼠為模型, 觀察到蛋白酶體的表現量在感染期間明顯增加。以免疫螢光染色法發現緊密連結蛋白閉合蛋白 (occludin) 和基質金屬蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 在脈絡叢有相同的分布, 並以共同免疫沉澱法證明閉合蛋白和 MMP-9 有交互作用。並分別給予蛋白酶體活性抑制劑 MG132 1.5 及 3.0mg/kg/day, 觀察到磷酸化的 I κ B α 及 NF- κ B 減少。除此之外, MMP-9 的活性及閉合蛋白的降解也因為 MG132 的作用而減少。綜合上述, 當鼯鼠受到廣東住血線蟲感染而引發嗜伊紅性腦膜腦炎時, 蛋白酶體是透過降解磷酸化的 I κ B α 來調節 NF- κ B 的活化, 進而來調控下游 MMP-9 的作用及閉合蛋白的降解。

關鍵詞：廣東住血線蟲、蛋白酶體、嗜伊紅性腦膜腦炎、基質金屬蛋白酶-9、核轉錄因子 κ B

英文摘要

The tight junctions in the epithelial cell of the choroids are the major structures of the blood-cerebrospinal

fluid barrier (BCB). The major function of proteasome is to degrade unneeded or damage proteins by proteolysis. Disruption of BCB and resulted in meningoencephalitis are important pathological events in non-permissive hosts caused by *Angiostrongylus cantonensis*. In this study, five-week BALB/c mice were infected with the third-stage larvae of *A. cantonensis*. The results showed the protein levels of proteasome were increased during *A. cantonensis* infection. Occludin was co-localized with matrix metalloproteinase-9(MMP-9) by confocal immunofluorescence microscopy. Further, we demonstrated that occludin interacted with MMP-9 in brain tissue of infected-mice by co-immunoprecipitation. The infected-mice were treated with proteasomal activity inhibitor MG132 in 1.5 and 3.0 mg/kg/day, respectively. The protein levels of phosphorylated I κ B α were significantly decreased as compared with untreated control. Also, phosphorylated nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) has similar result. In addition, activity of MMP-9 and occludin degradation were reduced because of MG132. The role of proteasome in *A. cantonensis* infection is to degrade phosphorylated I κ B α , and modulate phosphorylated NF- κ B, and then regulate the activation of MMP-9 and occludin degradation.

Keywords : *Angiostrongylus cantonensis*, proteasome, eosinophilic meningoencephalitis, matrix metalloproteinase-9, NF- κ B

前言

當廣東住血線蟲感染非適宜宿主（例如人類、鼯鼠、天竺鼠）時，幼蟲主要侵犯的位置為中樞神經系統（central nervous system, CNS），造成腦部的發炎並引起嗜伊紅性腦膜炎（eosinophilic meningitis）及嗜伊紅性腦膜腦炎（eosinophilic meningoencephalitis）（Kuberski and Wallace, 1979）。腦的功能要正常進行，其周圍的微環境必須保持一定的穩定性。血液中的物質進入腦組織時會受到選擇，這就是血液-中樞神經系統屏障（blood-CNS barrier）。蛋白酶體存在於細胞質與細胞核中，是由多個次單元蛋白所組成的蛋白分解酶，其功能主要是降解細胞內不需要的蛋白質。這些蛋白質會先被泛素（ubiquitin）標誌，接著再被蛋白酶體降解，在細胞內的生化功能中扮演著重要的角色（Kornitzer and Ciechanver, 2000）。當蛋白酶體受抑制後，NF- κ B 和 I κ B α 所形成之複合體間的鍵結會更加穩固，始進入細胞核中的 NF- κ B 減少，而影響了後續的免疫反應（Traenckner et al., 1994）。當位於內皮細胞的閉合蛋白發生突變時，會使得緊密連結蛋白的通道及隔離功能發生改變（Balda et al., 1996），進而影響嗜中性白血球在移行上皮的移動（Huber et al., 2000）。閉合蛋白的分子量大約在 62-82 kDa，這是由於其磷酸化的位置不同而產生的差異，其磷酸化的位置有三，分別位於絲氨酸、蘇氨酸

（Sakakibara et al., 1997），以及酪氨酸（Chen et al., 2002）。在上皮細胞株，高度磷酸化的閉合蛋白分子在細胞質中比低度磷酸化或未磷酸化的閉合蛋白分子更具選擇性（Sakakibara et al., 1997）。在內皮細胞中，切割的壓力會明顯的減少閉合蛋白的含量並增加其酪氨酸的磷酸化並伴隨著水份傳輸的增加（DeMaio et al., 2001）。先前有研究指出，在敗血症時，20S 蛋白酶體的表現量，會呈現逐漸上升的趨勢（Hobler et al., 1999）。而利用人類腦部內皮細胞（hCMEC/D3）建立 BBB 模式感染 HIV-1，發現可經由蛋白酶體來調節緊密連結蛋白的表現（Huang et al., 2009）。然而目前並無相關研究指出蛋白酶體在寄生蟲所引起的腦部病變中所扮演的角色。因此本試驗利用廣東住血線蟲感染鼯鼠為模型，來探討嗜伊紅性腦膜腦炎與閉合蛋白降解的關係，並探討蛋白酶體在閉合蛋白的降解過程中所扮演的角色。

材料與方法

一、實驗動物

自國家科學委員會動物中心（National Animal Breeding and Research）購買五週齡雄性 BALB/c 品系鼯鼠。將鼯鼠飼育於每天 12 小時光照和 12 小時黑暗的光週期環境下，室溫控制在 25°C 及相對濕度 55%，提供動物蒸餾水及 LabDiet（Laboratory Rodent Diet, 5001）飼料。

二、廣東住血線蟲第三期幼蟲之製備

本研究所用非洲大蝸牛在台

中縣霧峰試驗農場飼育並感染廣東住血線蟲，將非洲大蝸牛外殼以菜刀碾碎去除，剝碎取其組織，置於組織均質器絞碎，組織均質後利用胃蛋白酶-鹽酸溶液（pH 1-2，500 I.U. pepsin/g tissue）消化，置於 37°C 之恆溫箱中放入磁性攪拌子，均勻攪拌反應 2 小時。利用雙層紗布濾去雜質，加入生理食鹽水稀釋並靜置，每隔 30 分鐘吸去約一半的上清液，再加入生理食鹽水稀釋靜置沉澱，重複至完全澄清為止。以滴管吸取下層之沈澱物，置於玻璃皿中於解剖顯微鏡下，觀察並吸取第三期幼蟲。以每 50 隻 L3 幼蟲為一單位，置於 1.5 c.c. 之小管中，以感染鼯鼠。

三、鼯鼠感染試驗

BALB/c 雄性鼯鼠在感染前 12 小時均給予禁水、禁食，將 120 隻鼯鼠隨機分為六組，每組 20 隻，分別為未感染之對照組（Control）及感染廣東住血線蟲天數不同的感染組五組。除對照組外，感染組以口餵管餵食 50 隻廣東住血線蟲第三期幼蟲，於感染後 12 小時再恢復其供水、供食，並分別在感染後的第 5，10，15，20，25 天犧牲。對照組只餵食蒸餾水，並在第 25 天犧牲。

四、鼯鼠治療試驗

將 BALB/c 雄性鼯鼠隨機分為 2 組每組 8 隻，分別於感染後蛋白酶體抑制劑 MG132（Cayman, USA）進行抑制作用，其藥物劑量分別為 1.5mg/kg/day 及 3.0mg/kg/day 皆以腹腔注射給予，連續給藥 20 天並作犧牲。未治療組則注射蒸餾水，於感染

後第二十天犧牲。

五、CSF 液的收集

利用 Urethane（1.25g/kg）以腹腔注射將鼯鼠麻醉，將其頸部的毛剃除後，將鼯鼠頭部固定於支架上。將欲手術部位以酒精消毒後，將頭部皮切開並撐開後，將傷口以棉花棒擦乾後，將鼯鼠身體垂下與頭部呈 135 度角，以玻璃毛細管刺穿硬腦膜（dura mater），伸入腦池（Cisterna magna）中，CSF 會因毛細現象而進入毛細管中，取得後以 3ml 針筒將腦脊髓液推出，收集於 0.5ml 離心管中，標記後置於冰上，完成後將檢體冷凍於 -80°C 待用。

六、腦均質液的備製

將鼯鼠腦組織於 Proteo JETTM Mammalian Cell Lysis Reagent（Formentas, USA）中，以 0.1g 的腦組織對 1 c.c. 的 lysis buffer 之比例，於低溫下進行均質，均質後以 4°C，15000 rpm，離心 10 分鐘，取上清液並進行蛋白質定量，置於 -80°C 冰箱中存放。

七、抗體

一級抗體：Mouse anti-mouse β -actin monoclonal antibody（Sigma, St. Louis, MO）、goat proteasome β 5 polyclonal antibody、goat occludin polyclonal antibody（Santa Cruz, USA）、Goat anti-mouse MMP-9 polyclone antibody（R&D Systems, USA）、rabbit anti-mouse I κ B α monoclonal antibody、rabbit anti-mouse phospho-I κ B α monoclonal antibody、rabbit anti-mouse NF- κ B p65

monoclonal antibody、rabbit anti-mouse phospho- NF- κ B p65 monoclonal antibody (Cell Signaling, USA)

二級抗體：HRP-conjugated Goat anti-mouse IgG (H+L) antibody、HRP-conjugated Bovine anti-goat IgG (H+L) antibody 及 HRP-conjugated Goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA)。

八、西方點墨法 (Western blotting)

將萃取出之新鮮蛋白質與 sample buffer 混合，填入 SDS 電泳膠片進行電泳。電泳結束後，將膠片上之蛋白點轉移至 polyvinylidene fluoride (PVDF, PALL, Mexico)。浸入 Blocking buffer (1% BSA 溶於含 0.1% Tween 20 的 PBS)，在室溫下搖晃一個小時進行 Blocking。以 PBST 清洗三次，每一次 10 分鐘後，分別加入一級抗體在室溫下反應 1 小時後，以 PBST 清洗三次，每一次 10 分鐘後。接著再分別加入對應之二級抗體於室溫下反應 40 分鐘，以 PBST 清洗三次，每一次 10 分鐘後，最後以加入 enhanced chemiluminescence (ECL, Perkin Elmer Life Sciences Inc, USA) 冷光試劑進行反應並使 X-ray 底片 (FUJIFILM, Japan) 曝光來偵測蛋白質的表現量。

九、明膠酶譜法 (Gelatin zymography)

取腦均質液及 CSF 加入相等體積的 sample buffer 混合 loading 於含有受質 1% gelatin (Sigma, USA) 的 7.5% SDS-PAGE 中進行電泳。膠體在室溫

下用 2.5% Triton X-100 洗兩次，每次在搖擺器搖擺 30 分鐘，再用二次水洗兩次，每次 10 分鐘。再將膠體置於 reaction buffer 37°C 下反應 18 個小時。以清水將鈣離子洗去，膠體再利用 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 染色一個小時，接著用 15% 甲醇和 7.5% 醋酸脫染色。在藍色背景的膠下，除了在 gelatinase 與受質反應的區域，可看到未染上色的 band 為 gelatinase。MMP-9 的定量分析是利用 computer-assisted imaging densitometer system, UN-SCAN-ITTM gel Version 5.1 (Silk Scientific, USA)。

十、免疫共同沉澱 (Co-immunoprecipitation)

取 rProtein G beads Agarose (Invitrogen, Taiwan) 20 μ l，以 1ml PBS wash 3 次，每次以 10000 rpm 1 分鐘後，去除上清液，加入 5% BSA 1ml blocking，置於 360 度旋轉器上，在 4°C 下反應 60 分鐘，以 10000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液，加入 PBS wash。加入 sample 及 anti-goat occludin polyclonal antibody (Santa Cruz, USA)，並以 RIPA lysis buffer (含有 50mM Tris-HCl pH 7.5，150mM NaCl，1% NP-40，0.5% sodium deoxycholate and 0.1% sodium dodecyl sulfate) 補至 500 μ l，放置搖擺器上，在 4°C 下，6-12rpm，反應 over night。反應完成後，以 10000 rpm 離心並去除上清液。以 1ml RIPA lysis buffer 進行 wash，離心 10000 rpm 1 分鐘，3 次。再以 1ml PBS wash，離心 10000 rpm 1 分鐘，2 次，去除上清液。最後加入 20 μ l sample buffer，於 95°C 煮 10 分鐘

後，以 goat anti-mouse MMP-9 polyclone antibody (R&D Systems, USA) 做 immunoblotting 檢測 occludin 與 MMP-9 是否有交互作用。

十一、共軛焦顯微鏡 (Confocal microscopy)

將鼯鼠的腦組織固定於 10% 中性福馬林 (neutralized formalin) 24 小時，依序在不同濃度 (50%, 75%, 95% and 100%) 的酒精 (alcohol) 中脫水，以二甲苯 (xylene) 置換酒精，並於 55°C 以 paraffin 包埋 24 小時。將包埋的組織做成 10 μm 的切片並固定於玻片上，以二甲苯進行脫蠟，再以不同濃度的酒精置換二甲苯。之後，加入 proteinase K solution (20μg/ml in TE buffer pH 8.0) 在 37°C 培養箱中活化抗原 10 分鐘，再以 pH 7.4 PBS 洗滌 3 次，每次各 5 分鐘。將切片與非特異性的 3% BSA 於 37°C 下 blocking 1 小時，再分別與一級抗體 goat polyclonal antibody (R&D Systems, USA) 和 rabbit anti-mouse MMP-9 polyclone antibody (Abcam, UK) 於 4°C 作用 overnight，之後，以 PBS 洗滌 3 次，每次各 5 分鐘。將切片與 DyLight 488-conjugated Donkey anti-goat IgG (H+L) antibody 和 Rhodamine Red-conjugated Donkey anti-rabbit IgG (H+L) antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) 於 37°C 作用 1 小時，再以 PBS 洗滌 3 次，每次各 5 分鐘。接者以 DAPI mounting medium (Vector Laboratories, USA) 封片。最後，於共軛焦顯微鏡 (Zeiss LSM 510 META, Germany) 下，以雷射光激發觀察並拍照。

十二、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 ± 標準差 (means ± SD) 表示，* $P < 0.05$ 表示有統計上顯著的意義。

結果

一、腦部組織及 CSF 中蛋白酶體的蛋白表現量

以西方點墨法分析廣東住血線蟲感染鼯鼠後其腦部組織中蛋白酶體的蛋白表現量，結果顯示蛋白酶體在感染後，其蛋白表現量隨感染時間的增加而上升 ($P < 0.05$)，並在感染的第 20 天達到最高值。廣東住血線蟲感染鼯鼠後其 CSF 中蛋白酶體的蛋白表現量，結果顯示蛋白酶體在感染的第 25 天達到最高值 (圖一)。

二、腦部組織及 CSF 中閉合蛋白的蛋白表現量

以西方點墨法分析廣東住血線蟲感染鼯鼠後其腦部組織中閉合蛋白的蛋白表現量，結果顯示閉合蛋白在感染後，其蛋白表現量隨感染時間的增加而下降 ($P < 0.05$)。廣東住血線蟲感染鼯鼠後其 CSF 中閉合蛋白的蛋白表現量隨感染時間增加而增加，結果亦顯示閉合蛋白在感染的第 25 天達到最高值 (圖二)。

三、MMP-9 和閉合蛋白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，探討在廣東住血線蟲感染

時，閉合蛋白表現是否與 MMP-9 有關。以共軛焦顯微鏡觀察廣東住血線蟲感染鼯鼠第 20 天的腦部切片，結果顯示廣東住血線蟲感染鼯鼠時，閉合蛋白和 MMP-9 分佈在脈絡叢的相同位置（圖三）。

四、MMP-9 和閉合蛋白之交互作用

以免疫共同沉澱技術來檢測廣東住血線蟲感染鼯鼠之腦部，MMP-9 與閉合蛋白是否有交互作用。結果顯示當廣東住血線蟲感染鼯鼠第 20 天時，MMP-9 與閉合蛋白會有互相作用（圖四）。

五、蛋白酶體活性抑制試驗後，腦部組織中 I κ B α 及 p-I κ B α 的蛋白表現量以西方點墨法分析廣東住血線蟲感染鼯鼠病並給予蛋白酶體抑制劑後第二十天其腦部組織中 p-I κ B α 的蛋白表現量，結果顯示 p-I κ B α 在感染並給予蛋白酶體抑制劑後，其蛋白表現量較未給藥之感染組有減少 ($P < 0.05$) 的情形（圖五）。

六、蛋白酶體活性抑制試驗後，腦部組織中 p65 及 p-p65 的蛋白表現量以西方點墨法分析廣東住血線蟲感染鼯鼠並給予蛋白酶體抑制劑後第二十天其腦部組織中 p-p65 的蛋白表現量，結果顯示 p-p65 在感染並給予蛋白酶體抑制劑後，其蛋白表現量較未給藥之感染組有減少 ($P < 0.05$) 的趨勢情形（圖六）。

七、蛋白酶體活性抑制試驗後，腦部組織及 CSF 中 MMP-9 的活性以 gelatin zymography 分析廣東住血線

蟲感染鼯鼠並給予蛋白酶體抑制劑後第二十天其腦部組織中 MMP-9 的活性，結果顯示 MMP-9 在感染並給予蛋白酶體抑制劑後，其活性較未給藥之感染組有減少 ($P < 0.05$) 的情形。而在 CSF 中 MMP-9 的活性也較未給藥之感染組有減少的情形（圖七）。

八、蛋白酶體活性抑制試驗後，腦部組織及 CSF 中閉合蛋白的蛋白表現量

以西方點墨法分析廣東住血線蟲感染鼯鼠並給予蛋白酶體抑制劑後第二十天其腦部組織中閉合蛋白的蛋白表現量，結果顯示閉合蛋白在感染並給予蛋白酶體抑制劑後，其蛋白表現量較未給藥之感染組有增加的情形，即閉合蛋白的降解量減少 ($P < 0.05$)。在 CSF 中閉合蛋白的蛋白表現量較未給藥之感染組有減少的情形（圖八）。

討論

緊密連結蛋白 JAM-A、ZO-1 及閉合蛋白的交互作用，在維持緊密連結的完整性扮演重要的角色 (Bazzoni et al., 2000)。在 rat 誘發缺血性中風時，缺血一側之腦部閉合蛋白和 claudin-5 蛋白與未中風的一側比較是相對減少的 (Yang et al., 2007)。在細胞模式上，當受到 HIV 感染時，JAM-A、閉合蛋白和 ZO-1 的蛋白表現量會下降，而使障壁的功能缺失 (Pu et al., 2007; Huang et al., 2009)。HIV-1 所誘發的腦炎會破壞腦障壁上的閉合蛋白和 ZO-1 等緊密連結蛋白 (Dallasta et al., 1999)。棘阿米巴 (Acanthamoeba) 所誘發的腦炎會影響腦部微血管內皮細胞的完整性，並且會將閉合蛋白和 ZO-1 等緊密連結蛋白降解 (Khan et

al.,2009)。在奈瑟氏菌所誘發的細菌性腦膜炎中，腦部微血管的內皮細胞會因為基質及閉合蛋白的裂解而脫離 (Schubert-Unkmeir et al., 2010)。在患有高血壓的 rat 中，過高的滲透壓會導致 BBB 和 BCB 的破壞(Al-Sarraf et al., 2005)。另外，在 rat 脈絡叢細胞株 Z310 cells 為 BCB 模型的細胞試驗中，以重金屬鉛作處理後發現 BCB 的通透性會因為緊密連結蛋白的表現量降低而增加 (Shi et al., 2007)。在本試驗中以廣東住血線蟲感染鼯鼠誘發腦膜炎，發現腦實質中閉合蛋白的蛋白表現量，是隨著感染的時間增加而減少，而 CSF 中閉合蛋白的表現量則是隨感染時間增加而增加，這顯示當鼯鼠受到廣東住血線蟲感染的期間，腦部閉合蛋白會被破壞而釋放到 CSF 中。

在 rat 腦部誘發細菌性腦膜炎，MMP-9 的表現量有增加趨勢(Kieseier et al., 1999)，而在兔子誘發腦膜炎動物模式，在 CSF 中也發現 MMP-9 的活性增加 (Azeh et al., 1998)，在患有李斯特氏菌性腦膜炎的羊隻中，其 MMP-9 會分布在中樞神經系統發炎的區域，如內皮細胞、神經細胞和神經 (Ilhan et al., 2011)。這些動物模式與細菌性腦膜炎患者檢測到的結果，都是得到 MMP-9 上升的趨勢(Kieseier et al., 1999; Leppert et al., 2000)。此外，在病毒性腦膜炎(Kolb et al., 1998)及寄生蟲引起的腦膜炎 (Lai et al., 2004; Lee et al., 2004) 都發現有類似的結果。在黴菌性或結核性腦膜炎病患的 CSF 中，MMP-9 的表現量有增加的趨勢 (Matsuura et al., 2000)。不論是細菌、病毒、黴菌或寄生蟲所引起

的腦膜炎，都會導致 MMPs 的表現量和活性增加 (Pastuszka et al., 2008)。而在感染 HIV-1 後，其 pg120 可藉由增加 MMP-2 及 MMP-9 的表現而造成 BBB 的緊密連結蛋白破壞 (Louboutin et al., 2010)。在廣東住血線蟲所引發的嗜伊紅性腦膜炎中，MMP-9 跟 blood-CNS barrier 的破壞有關 (Chen et al., 2006)。在本試驗中，廣東住血線蟲感染鼯鼠誘發腦膜炎時，以免疫螢光技術證實脈絡叢上皮細胞及腦血管內皮細胞中有閉合蛋白及 MMP-9 的表現，而且兩者分布在相同的位置，進一步以共同免疫沉澱法證明閉合蛋白及 MMP-9 有交互作用。這些結果顯示閉合蛋白的降解和 MMP-9 有關。

我們的試驗利用蛋白酶體活性抑制劑來探討蛋白酶體在受到廣東住血線蟲感染的鼯鼠中所扮演的角色，結果顯示蛋白酶體被抑制後，磷酸化 I κ B α 的表現量減少，而磷酸化的 NF- κ B、MMP-9 的活性和閉合蛋白的降解量都減少了。因此，推論出一個可能的途徑 (圖九)，當蛋白酶體的活性受到了抑制，使得磷酸化 I κ B α 的降解減少，使得進入細胞核和目標基因結合的 NF- κ B 減少，進而使得 MMP-9 的產量也隨著減少，最後導致閉合蛋白被降解的量也減少了。因此，蛋白酶體在廣東住血線蟲症所扮演的角色是透過降解 I κ B α 來調節 NF- κ B，進而來調控下游 MMP-9 的作用及閉合蛋白的降解。

參考文獻

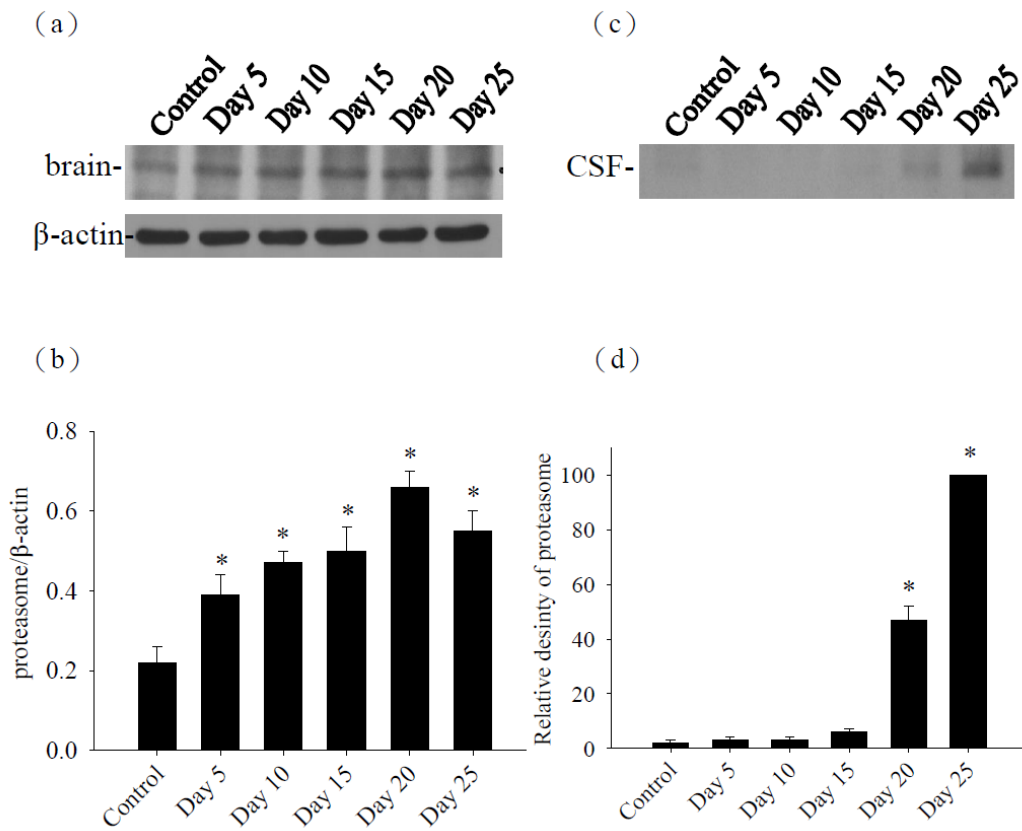
Al-Sarraf H, Ggaedi F, Redzic F. 2005. Time course of hyperosmolar

- opening of the blood-brain and blood-CSF barriers in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Vascular Research*. 44: 99-109.
- Azeh I, Mäder M, Smirnov A, Beuche W, Nau R, Weber F. 1998. Experimental pneumococcal meningitis in rabbits: the increase of matrix metalloproteinase-9 in cerebrospinal fluid correlates with leucocyte invasion. *Neuroscience Letters*. 256: 127-130.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cereijido M, Matter K. 1996. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *The Journal of Cell Biology*. 134: 1031-1049.
- Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. 2000. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 20520-20526.
- 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 pathology. 87: 113-119.
- Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeanson B. 2002. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Molecular Biology of Cell* 13: 1227-1237.
- Dallasta LM, Pisarov LA, Esplen JE, Werley JV, Moses AV, Nelson JA, Achim CL. 1999. Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *The American Journal of Pathology*. 155: 1915-1927.
- DeMaio L, Chang YS, Gardner TW, Tarbell JM, Antonetti DA. 2001. Shear stress regulates occludin content and phosphorylation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 281: H105-H113.
- Hobler SC, Williams A, Fischer D, Wang JJ, Sun X, Fischer JE, Monaco JJ, Hasselgren P-O. 1997. Activity and expression of the 20S proteasome are increased in skeletal muscle during sepsis. *American Journal of Physiology*. 277: R434-R440.
- Huang W, Eum SY, Andrés IE, Hennig B, Toborek M. 2009. PPAR α and PPAR γ attenuate HIV-induced dysregulation of tight junction proteins by modulations of matrix metalloproteinase and proteasome activities. *FASEB Journal*. 23: 1596-1606.

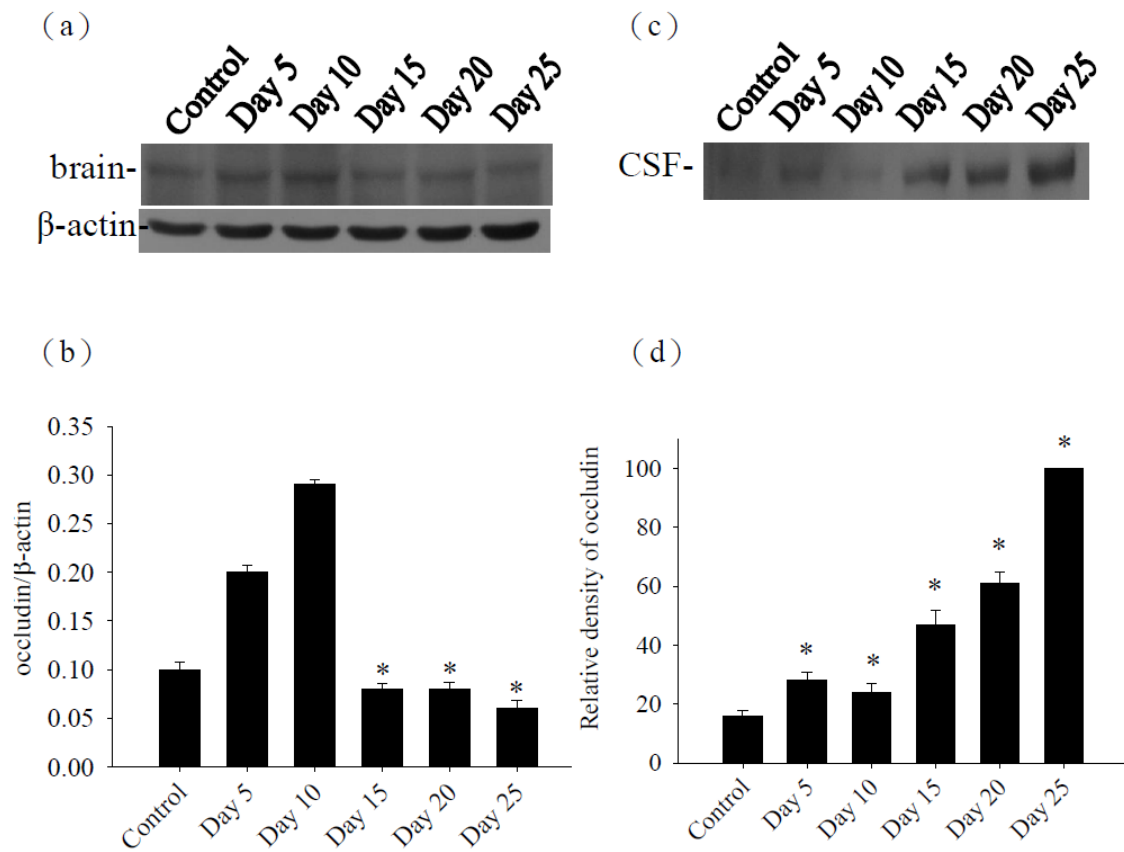
- Ilhan F, Ulusoy Y, Halıgür M. 2011. Matrix metalloproteinase expression in sheep with listerial meningoencephalitis. *Research of Veterinary Science*.
- Kieseier BC, Paul R, Koedel U, Seifert T, Clements JM, Gearing AJ, Pfister HW, Hartung HP. 1999. Differential expression of matrix metalloproteinases in bacterial meningitis. *Brain*. 122: 1579-1587.
- Khan NA, Siddiqui R. 2009. Acanthamoeba affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins. *International Journal for Parasitology*. 39: 1611-1616.
- Kolb SA, Lahrtz F, Paul R, Leppert D, Nadal D, Pfister HW, Fontana A. 1998. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in viral meningitis: upregulation of MMP-9 and TIMP-1 in cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroimmunology*. 84: 143-150.
- Kornitzer D, Ciechanver A. 2000. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *Journal of Cell Physiology*. 182: 1-11.
- Kuberski T, Wallace GD. 1979. Clinical manifestations of eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis*. *Neurology*. 29: 1566-1570.
- Lee HH, Chou HL, Chen KM, Lai SC. 2004. Association of matrix-metalloproteinase-9 in eosinophilic meningitis of BALB/c mice caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitology Research*. 94: 321-328.
- Leppert D, Leib SL, Grygar C, Miller KM, Schaad UB, Holländer GA. 2000. Matrix metalloproteinase (MMP) -8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clinical infectious diseases*. 31: 80-84.
- Louboutin JP, Agrawal L, Reyes BA, Van Bockstaele EJ, Strayer DS. 2010. HIV-1 gp120-induced injury to the blood-brain barrier: role of metalloproteinases 2 and 9 and relationship to oxidative stress. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 69: 801-816.
- Matsuura E, Umehara F, Hashiguchi T, Fujimoto N, Okada Y, Osame M. 2000. Marked increase of matrix metalloproteinase 9 in cerebrospinal fluid of patients with fungal or tuberculous meningoencephalitis. *Journal of Neurological Sciences*. 173: 45-52.
- Pastuszka E, Pabin A, Radkowski M. 2008. Metalloproteinases in meningoencephalitis. *Przegląd Epidemiologiczny*. 62: 401-406.
- Pu H, Hayashi K, Andras IE, Eum SY, Hennig B, Toborek M. 2007. Limited role of COX-2 in HIV Tat-induced

- alterations of tight junction protein expression and disruption of the blood-brain barrier. *Brain Research*. 1184: 333-344.
- Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Tsukita, S., 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *The Journal of Cell Biology*. 137: 1393-1401.
- Schubert-Unkmeir A, Konrad C, Slanina H, Czapek F, Hebling S, Frosch M. 2010 . *Neisseria meningitidis* induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. *PLoS Pathogens*. 29: e1000874.
- Shi LZ, Zheng W. 2007. Early lead exposure increases the leakage of the blood-cerebrospinal fluid barrier, in vitro. *Human and Experimental Toxicology*. 26: 159-167.
- Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA. 1994. A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B- α that is still bound to NF- κ B. *The EMBO Journal*. 13: 5433-5441.
- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. 2007. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 27: 697-709.
- Yii CY, Chen CY, Chen ER, Hsieh HC, Shih CC. 1975. Epidemiologic studies of eosinophilic meningitis in Southern Taiwan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 24: 447-454.

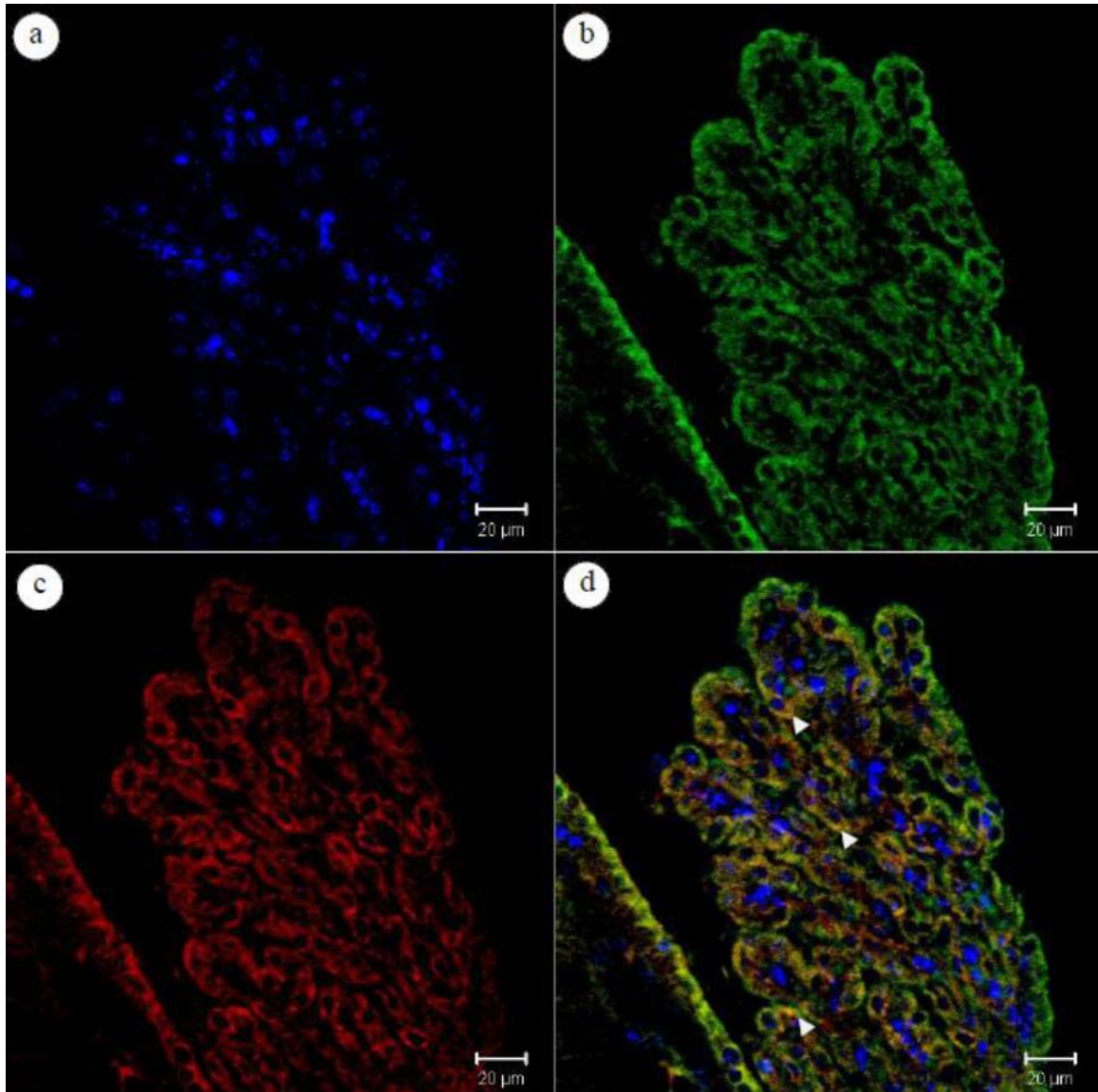
圖、表



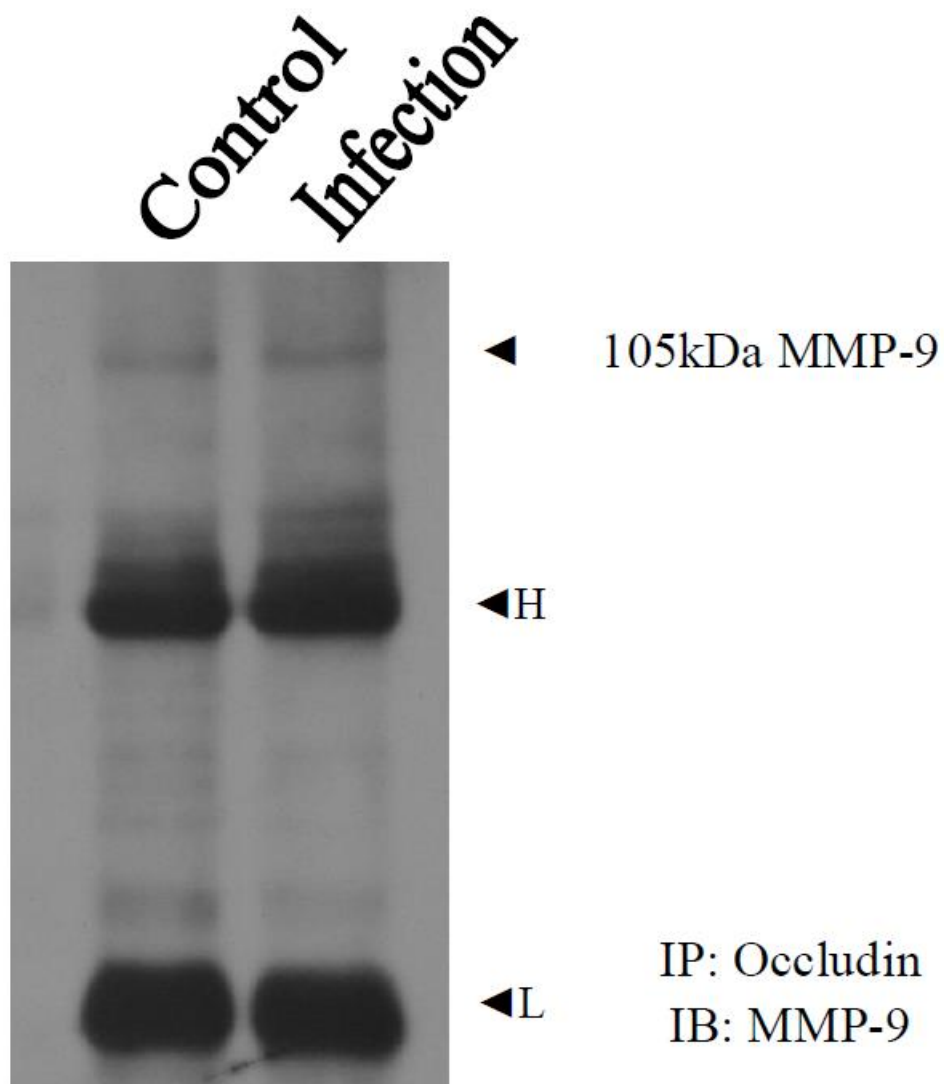
圖一、鼯鼠腦部組織及腦脊髓液中蛋白酶體 (proteasome β 5) 的表現。(a) 在腦部組織中可檢測到分子量 23kDa 的蛋白酶體， β -actin 為 loading control。(b) 蛋白質的量化結果顯示，蛋白酶體在感染第五天後有增加的現象。(c) 在腦脊髓液中亦可檢測到蛋白質分子量 23kDa 的蛋白酶體。(d) 蛋白質的量化結果顯示，蛋白酶體在感染後第二十天及第二十五天有增加的現象。(*表示相較於未感染組有顯著差異， $P < 0.05$ ，Day 為廣東住血線蟲感染鼯鼠後之天數。)



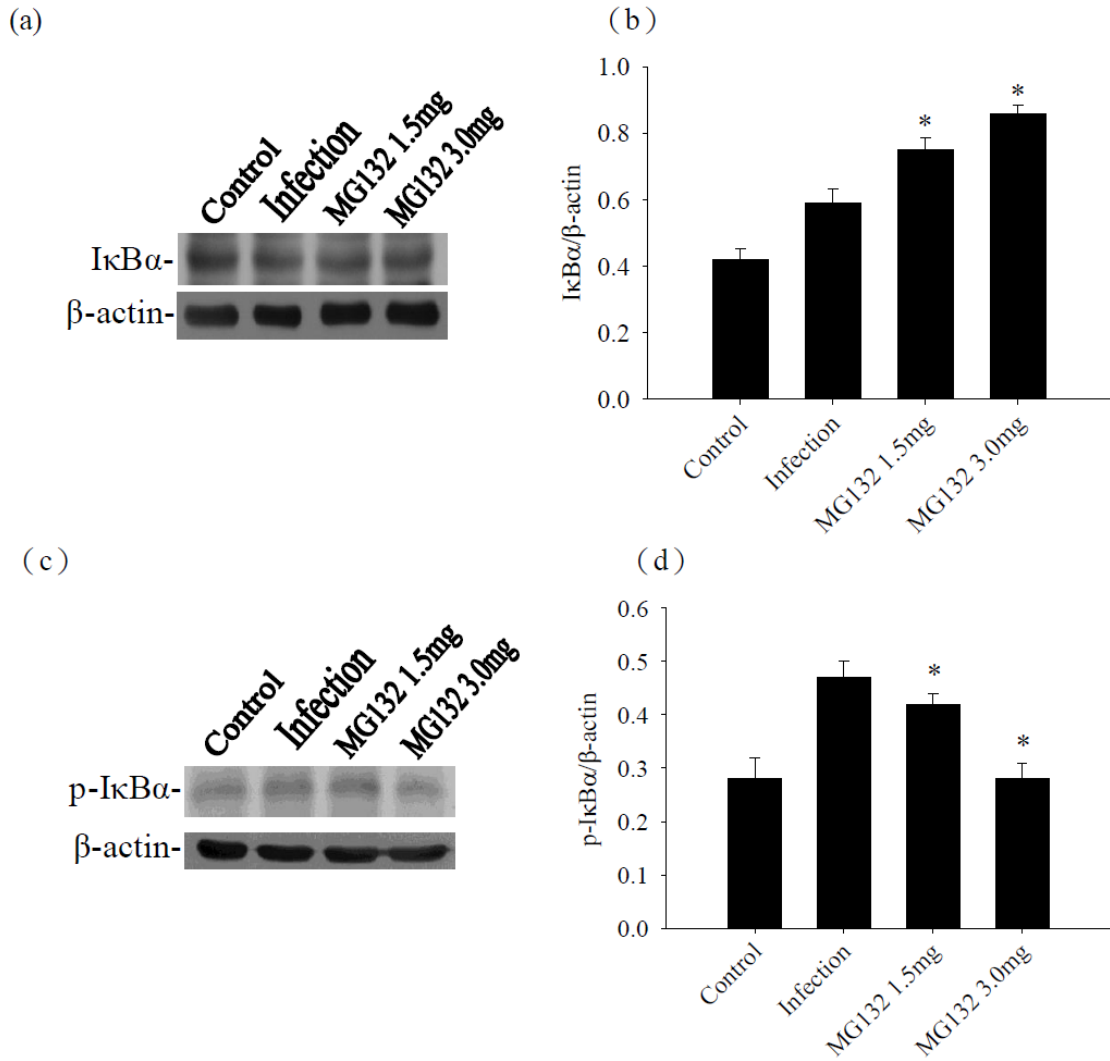
圖二、鼯鼠腦部組織及腦脊髓液中閉合蛋白 (occludin) 的表現。(a) 在腦部組織中可檢測到分子量 85kDa 的閉合蛋白， β -actin 為 loading control。(b) 蛋白質的量化結果顯示，閉合蛋白的量在受感染第十五天後有顯著的減少。(c) 在腦脊髓液中亦可檢測到蛋白質分子量 85kDa 的閉合蛋白。(d) 蛋白質的量化結果顯示，閉合蛋白的量在受感染第五天後有顯著的增加。(*表示相較於未感染組有顯著差異， $P < 0.05$ ，Day 為廣東住血線蟲感染鼯鼠後之天數。)



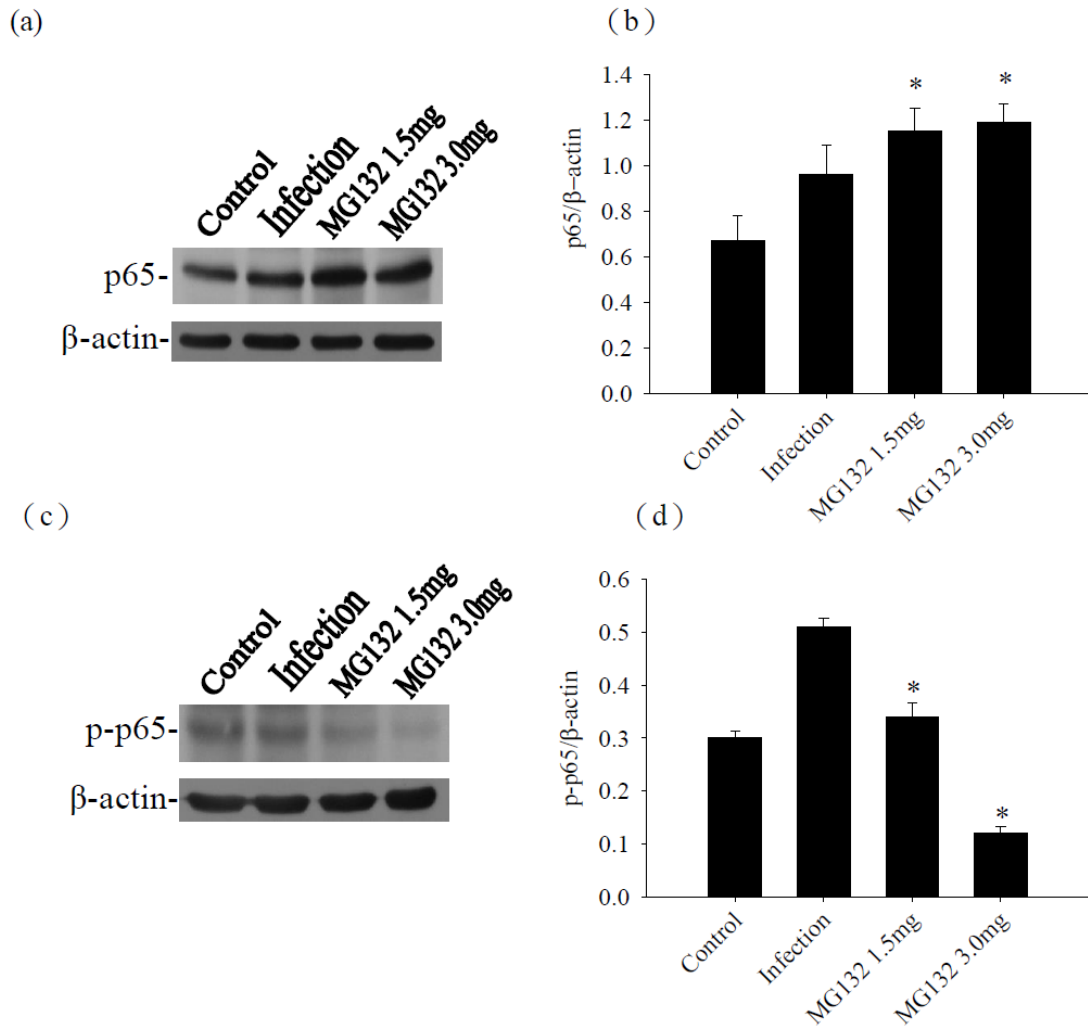
圖三、以免疫螢光染色來觀察鼯鼠腦部脈絡叢，探討廣東住血線蟲感染時，閉合蛋白與 MMP-9 的分佈。(a) 鼯鼠腦部切片細胞核排列 (藍色)。(b) 鼯鼠腦部閉合蛋白表現 (綠色)。(c) 鼯鼠腦部 MMP-9 蛋白表現 (紅色)。(d) 鼯鼠腦部閉合蛋白和 MMP-9 的分布位置相同 (白色箭頭及圖中呈現黃色之位置)。



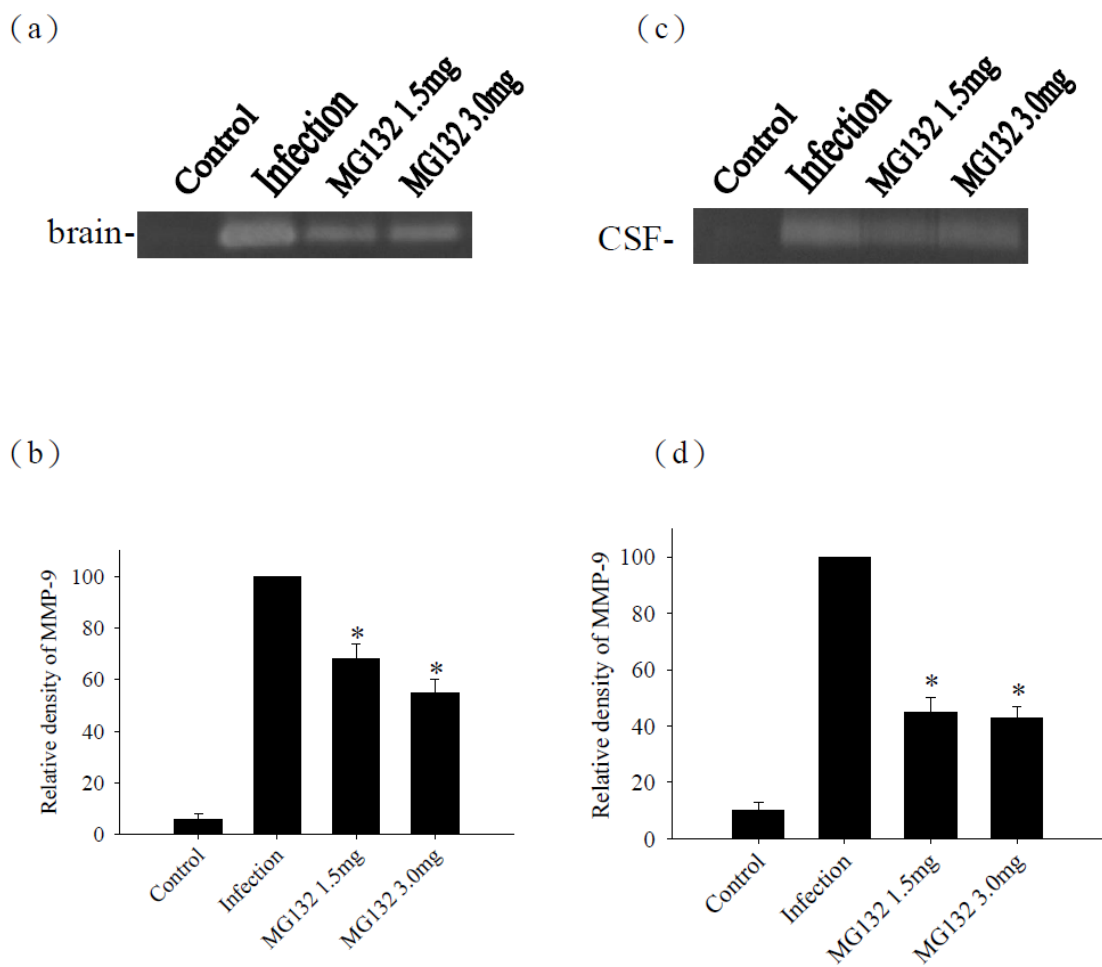
圖四、閉合蛋白與 MMP-9 免疫共同沉澱試驗。在 MMP-9 分子量 105kDa 的位置出現明顯的條帶（黑色箭頭），顯示 MMP-9 與 Occludin 在腦實質中確實有交互作用。Control 為沒有感染的 BALB/c 小鼠腦組織均質液。Infection 為廣東住血線蟲感染小鼠後第 20 天之腦組織均質液。H, IgG heavy chain; L, IgG light chain; IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting。



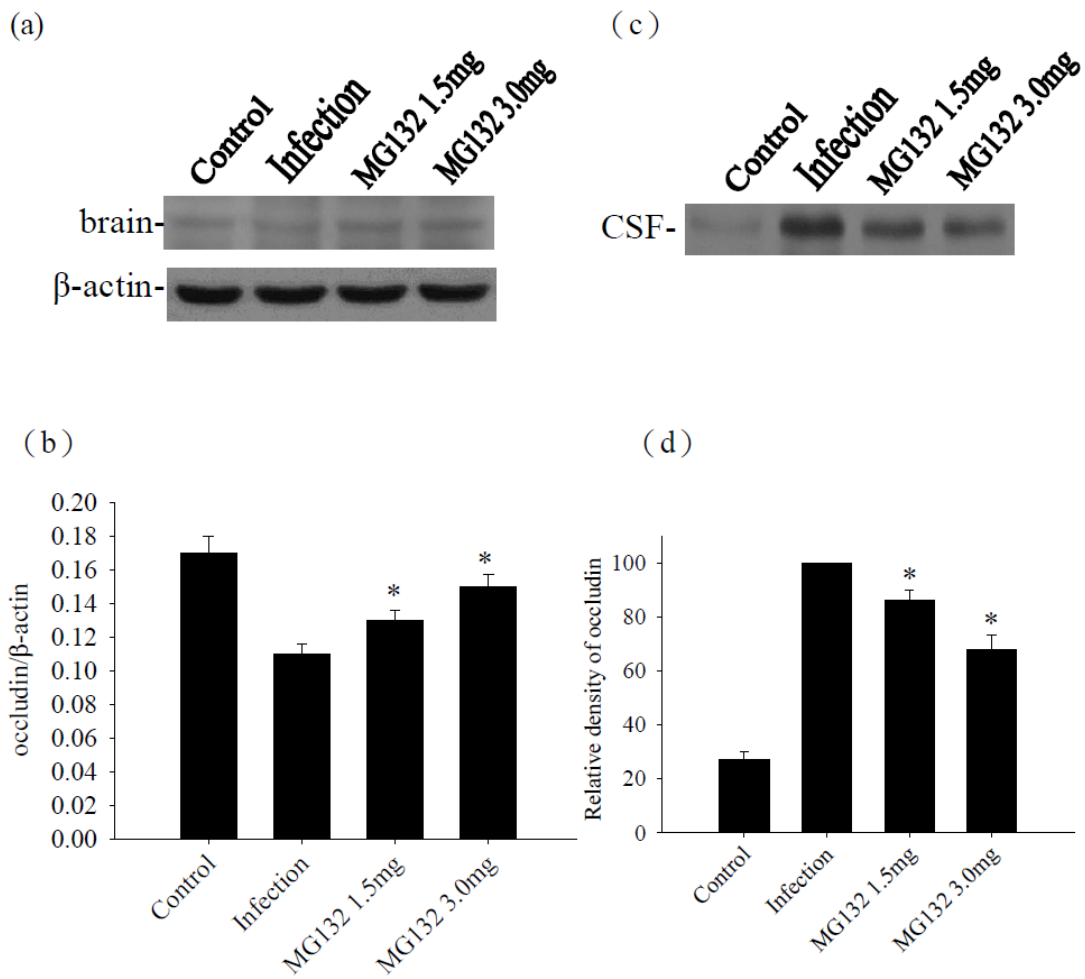
圖五、蛋白酶體活性抑制後，其 IκBα 及 p-IκBα 在腦部中的表現。(a) 在腦部組織中可檢測到分子量 40kDa 的 IκBα，β-actin 為 loading control。(b) 蛋白質的量化結果顯示，p-IκBα 的量在給予 MG132 後增加。(c) 在腦部組織中可檢測到分子量 40kDa 的 p-IκBα，β-actin 為 loading control。(d) 蛋白質的量化結果顯示，p-IκBα 的量在給予 MG132 後減少。(*表示相較於感染未抑制組有顯著差異， $P < 0.05$ ，Infection 為廣東住血線蟲感染鼯鼠後第 20 天。)



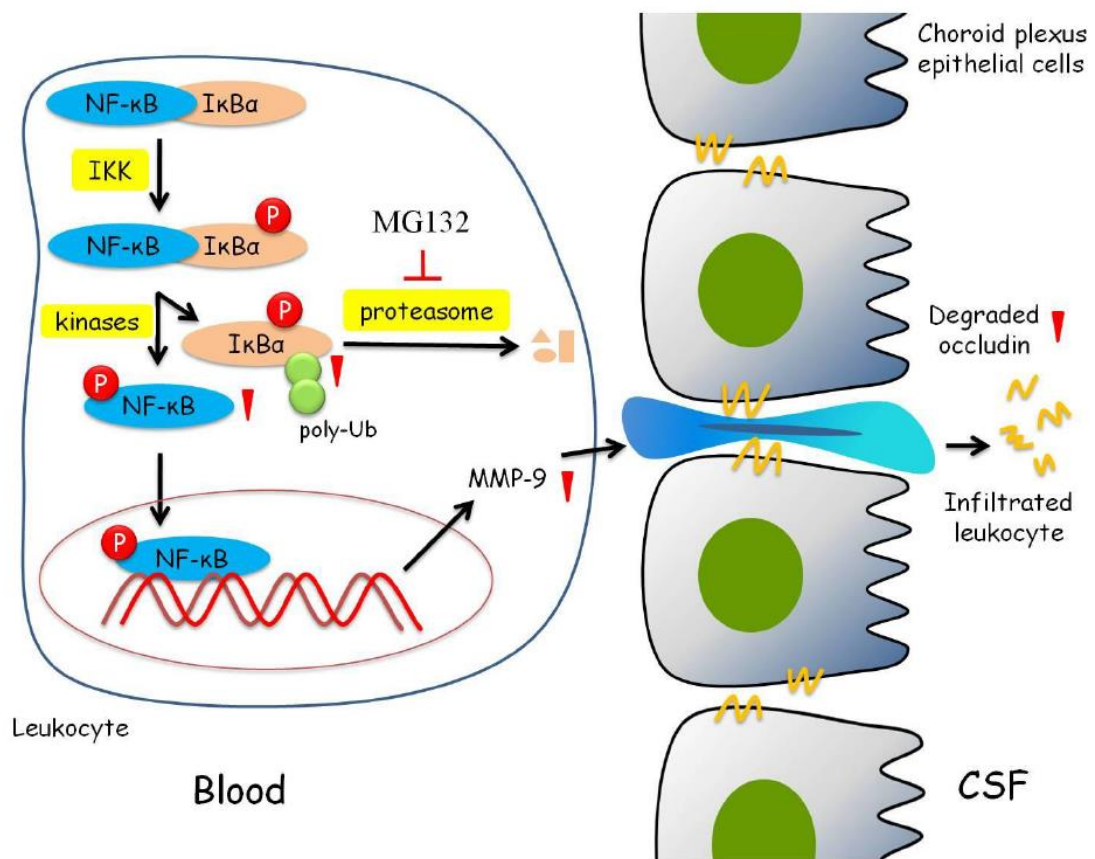
圖六、蛋白酶體活性抑制後，其 p65 及 p-p65 在腦部中的表現。(a) 在腦部組織中可檢測到蛋白質分子量 65kDa 的 p65， β -actin 為 loading control。(b) 蛋白質的量化結果顯示，p65 的量在給予 MG132 後逐漸增加。(c) 在腦部組織中可檢測到蛋白質分子量 65kDa 的 p-p65， β -actin 為 loading control。(d) 蛋白質的量化結果顯示，p-p65 的量在給予 MG132 後逐漸減少。(*表示相較於感染未抑制組有顯著差異， $P < 0.05$ ，Infection 為廣東住血線蟲感染鼯鼠後第 20 天。)



圖七、蛋白酶體活性抑制後，其 MMP-9 在腦部及腦脊髓液中的活性。(a) 在腦部組織中可檢測到分子量 105kDa 的 MMP-9。(b) 活性量化結果顯示，MMP-9 的活性在給予 MG132 後有減少的現象。(c) 在腦脊髓液中可檢測到蛋白質分子量 105kDa 的 MMP-9。(d) 活性量化結果顯示，MMP-9 的活性在給予 MG132 後有減少的現象。(*表示相較於感染未抑制組有顯著差異， $P < 0.05$ ，Infection 為廣東住血線蟲感染鼯鼠後第 20 天。)



圖八、蛋白酶體活性抑制後，其閉合蛋白在腦部及腦脊髓液中的表現。(a) 在腦部組織中可檢測到分子量 85kDa 的閉合蛋白， β -actin 為 loading control。(b) 蛋白質的量化結果顯示，閉合蛋白的量在給予 MG132 後逐漸增加。(c) 在腦脊髓液中可檢測到蛋白質分子量 85kDa 的閉合蛋白。(d) 蛋白質的量化結果顯示，閉合蛋白的量在給予 MG132 後減少。(*表示相較於感染未抑制組有顯著差異， $P < 0.05$ ，Infection 為廣東住血線蟲感染鼯鼠後第 20 天。)



圖九、當蛋白酶體的活性受到了抑制，使得磷酸化 IκBα 的降解減少，使得進入細胞核和目標基因結合的 NF-κB 減少，進而使得 MMP-9 的活性也隨著降低，最後導致閉合蛋白被降解的量也減少了。因此，蛋白酶體在廣東住血線蟲症所扮演的角色是透過降解 IκBα 來調節的 NF-κB，進而來調控下游 MMP-9 的作用及閉合蛋白的降解。

計劃成果自評

- 一、 研究內容與原計畫相符程度達 85%
- 二、 達成預期目標情況：瞭解廣東住血線蟲感染鼯鼠後，蛋白酶體與廣東住血線蟲症的關係。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。
- 三、 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。
- 四、 預期完成之研究成果可投稿一篇 SCI 期刊論文。
- 五、 主要發現：蛋白酶體與廣東住血線蟲症的關係。

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2014/11/05

科技部補助計畫	計畫名稱: 蛋白酶體在調節廣東住血線蟲誘發鼯鼠腦膜炎或腦膜腦炎之機轉
	計畫主持人: 賴世展
	計畫編號: 102-2320-B-040-017- 學門領域: 寄生蟲學、醫事技術及實驗診斷
無研發成果推廣資料	

102 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：賴世展		計畫編號：102-2320-B-040-017-					
計畫名稱：蛋白?體在調節廣東住血線蟲誘發鼯鼠腦膜炎或腦膜腦炎之機轉							
成果項目		量化			單位	備註(質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等)	
		實際已達成數(被接受或已發表)	預期總達成數(含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (本國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (外國籍)	碩士生	30	20	100%	人次	
		博士生	10	5	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>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。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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 100 字為限）

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）

我們的研究結果達成預期目標情況，瞭解廣東住血線蟲感染鼯鼠後，蛋白酶體與廣東住血線蟲症的關係。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。預期完成之研究成果可投稿一篇 SCI 期刊論文。