

誌謝

兩年充實忙碌的研究生涯，感謝恩師馬明琪副教授不辭辛勞的指導，引領學生走入研究的領域，培養學生在邏輯思考、表達以及文獻閱讀的能力。在您的細心指導下，讓學生或益良多，更增加學生對於研究的興趣，也讓學生學習到做研究的正確態度。此外感謝成功大學藥理所呂增宏副教授在實驗及論文上的指導，使得本論文的以順利進行。文稿初成感謝成功大學微免所林以行教授、本校營養所李宗貴教授悉心的審閱與斧正，使得本論文更臻完善。

感謝生化所的老師在實驗與知識上的教導。在此特別感謝滄澤學長、景泓學長以及俊憲，在動物實驗上給予我非常多的幫助。感謝旭華學姊、宗瑤學長、茂村學長、淑琍、瓊文、佳冠，在實驗及生活上的互相扶持。感謝生化所的學長同學們的幫助讓我的研究所生涯更多采多姿。

感謝我的親戚朋友們，讓一個人在外求學的我能夠擁有家一般的溫暖。感謝勳錦學長兩年來的扶持、照顧與鼓勵，讓我的研究所生涯中更增添了許多寶貴的回憶，並對未來的生涯有了更確切的方向。

最後感謝我的父母，雖然沒有您們時時刻刻在身邊，但您們的叮嚀與鼓勵給我精神上莫大的支持使我得以順利完成學業。僅以此論文獻給所有關心與支持我的師長、家人及朋友們，謝謝你們。

中文摘要 (Abstract in Chinese)

Lipopolysaccharides (LPS; 內毒素)為格蘭氏陰性菌細胞壁中的成份之一。當人體受到格蘭氏陰性菌嚴重感染時，細菌的 LPS 會經由血液侵犯人體，引發發燒、敗血性休克，甚至是器官衰竭等症狀。當細菌侵入時，由單核球分化而來的巨噬細胞會透過吞噬作用將這些危害人體的毒素吞入，裂解並消滅之，因此巨噬細胞在細菌引發的發炎反應中扮演著非常重要的角色。本文研究發現，在 Raw264.7 巨噬細胞株活化的過程中 LPS 可誘發 c-Src 表現量的增加。另外利用老鼠做為 model，抽取的 thioglycolate-elicited peritoneal macrophages (PEM) 在 LPS 處理後，也有 LPS-induced c-Src expression 的現象，也與 LPS 處理細胞造成第二階段蛋白 tyrosyl phosphorylation 增加的發現不謀而合。有趣的是，在 LPS 引發第一波短暫的蛋白的 tyrosyl phosphorylation 之後隨即加入 PP2，則細胞無論在第二階段中無論總蛋白 tyrosyl phosphorylation 的增加、COX-2 蛋白表現量的上升、或一氧化氮的釋出上均有效受到抑制。最後，我們更證明了腹腔注射 LPS 老鼠的巨噬細胞較諸對照組，不但呈現活化而且其 c-Src 表現量也明顯增加。這意味著 LPS 誘發 c-Src 蛋白量的增加在巨噬細胞的活化上可能扮演一重要的角色。

英文摘要 (Abstract in English)

Lipopolysaccharides (LPS) are cell wall components of most Gram-negative bacteria. During severe Gram-negative bacterial infections, large amounts of LPS may be released into the blood stream and result in various pathophysiological symptoms such as fever, septic shock, and multi-organ failure. During bacterial infection, monocytes will differentiate into macrophages that can phagocytize the pathogens neutralize the toxins and play a critical role in inflammatory responses. In this study, we observed that LPS induced c-Src expression in Raw264.7 murine macrophage cell lines. Furthermore, we demonstrated that LPS induces c-Src expression in isolate thioglycolate-elicited peritoneal macrophages (PEM). In parallel with c-Src induction is the second wave increase of the total protein phosphorylation in LPS-treated Raw264.7 cells. Interestingly, the LPS-induced protein tyrosyl phosphorylation, COX-2 expression and NO production are abrogated in cells treated with PP2. Furthermore, we demonstrated that macrophages harvest from rats peritoneally injected LPS exhibits increase of c-Src expression as compared to those derived from PBS-injected control. Our study suggests that LPS-induced c-Src expression is a physiological event that might play an important role in macrophage activation.

第一章 序論 (Introduction)

巨噬細胞 (macrophage)

人體對抗外來物質所導致疾病的機制中，以免疫反應最為重要，而它的啓動又與先天性免疫 (innate immunity) 息息相關。以人體而言，皮膚是防止細菌入侵的第一道防線。藉由人體體溫、皮膚表層的pH值、以及胞器所分泌出來的化學物質，皮膚可以有效地阻絕細菌的侵入。當此一機制無法完全奏效時，包括單核球 (monocytes)、嗜中性球 (neutrophils)、以及巨噬細胞 (macrophages) 在內具有吞噬能力的細胞就會進行吞噬作用 (phagocytosis) 將細菌消滅，同時釋放出許多的細胞激素 (cytokines) 引發發炎反應。在這些具吞噬能力的細胞中又以巨噬細胞最為敏感，也因此巨噬細胞在因細菌感染所產生的發炎反應中扮演著非常重要的角色 (Didier and Roger, 2002)。

巨噬細胞由單核球分化而來，當細胞受到細菌侵入時，單核球會黏附及穿透血管壁而進入細菌感染的組織，並於轉移期間分化成巨噬細胞。透過吞噬作用，巨噬細胞會將這些危害人體的病原菌、抗原、細胞殘渣等吞入細胞內裂解並消滅之。另外在吞噬這些抗原之後，巨噬細胞更可以製造出具有專一性的接受器，並將其呈現於細胞膜上成為抗原呈現細胞 (antigen-presenting cells; APC)。在巨噬細胞將抗原呈

現出來後，具抗原接受器的 Th 細胞會與之結合而被活化，進而激化 B 細胞製造出具有高度專一性的抗體破壞抗原，消滅入侵者。

脂多醣 (Lipopolysaccharide)

脂多醣 (Lipopolysaccharide; LPS) 為內毒素 (endotoxin) 一種，為格蘭氏陰性菌細胞壁的主要成分之一。在 1892 年時，首度被 Richard Pfeiffer 從霍亂弧菌中分離出來。由於內毒素含有一個多聚醣 (polysaccharide) 及一部分的脂質 (lipid)，因此內毒素又被稱為 lipopolysaccharide (Pfeiffer, 1892)。

LPS 在結構上主要可以分成 3 個部份，最內側與細菌細胞壁連接的是磷酸化雙醣 (phosphorylated disaccharide) 與脂肪酸 (fatty acid) 組成所謂 lipid A 的長鏈結構，其也是 LPS 引起人體疾病的部份 (Galanos et al., 1977)。LPS 的最外側為一段具有抗原特異性的多聚醣，稱為 outer-polysaccharide；由於其內含可誘發專一抗體的 O 抗原 (O-specific chain)，因此可被應用於臨床診斷做為辨識各種不同格蘭氏陰性菌的依據 (Knirel, 1990)。至於 LPS 中間一段較短被稱為 core-polysaccharide (core region) 的多聚醣，其以共價鍵的結合方式連

接 O-specific chain 及 lipid A (Unger et al., 1981)。

在細菌侵入宿主細胞時由細胞壁所釋放的 LPS 會刺激體內包括 T 細胞、單核球細胞、巨噬細胞、上皮細胞、血管內皮細胞在內多種不同細胞的生理反應 (例如: 調節物質的產生、胞飲作用、增生及分化等), 而造成宿主嚴重的發炎、水腫、以及敗血性休克 (Nogare, 1991)。目前已知低濃度的 LPS 會活化 Th 細胞, 進而激化 B 細胞產生有專一性的抗體。而高濃度的 LPS 則可以活化非專一性的 B 細胞與之結合。由於巨噬細胞是具有 LPS 接受器的主要細胞, 故在 LPS 所引起的發炎反應中, 巨噬細胞扮演著舉足輕重的角色。

Src family kinase

c-Src (cellular Src) 廣泛存在於真核生物的組織中, 是一個分子量為 60 kDa 的非接受器酪胺酸激酶 (nonreceptor tyrosine kinase; NRTK) (Levy et al., 1984)。與其類似的 NRTK 尚有 Yes、Fyn、Lyn、Hck、Fgr、Lck、以及 Blk 等, 皆為 Src family kinase 的成員。Src 家族成員的蛋白結構可分為六部份, 由 N 端到 C 端分別為: SH4 domain (Src homology domain 4)、unique domain、SH3 domain (Src

homology domain 3)、SH2 domain (Src homology domain 2)、kinase domain、以及 regulatory domain (Megan and Jonathan, 1996)。在 SH4 domain 上的 Gly-2 位置進行 myristylation 可協助 c-Src 附著於細胞膜內側 (Courtenidge et al., 1980)；SH3 domain 約有 50 個 amino acids，可以和富含 proline (proline rich) 的 peptide 結合 (Moran et al., 1990)。SH2 domain 為一約有 100 個 amino acids 的區域，其與 phosphorylated tyrosine 有很高的親和力 (Anderson et al., 1990)。c-Src 有二個可以磷酸化的 tyrosine residues，分別是位於 kinase domain 的 Tyr-416 與 regulatory domain 的 Tyr-527。Src 可以磷酸化自己在 Tyr-416，而自體磷酸化的 Src 酵素活性增加 (Smart et al., 1981)；至於 Tyr-527 的磷酸化則由 Csk (C-terminal Src kinase) 來執行。由於 Pi-Tyr-527 會與 Src 的 SH2 domain 產生分子內的作用，故此時的 c-Src 活性下降。也因此 Tyr-527 的磷酸化會負調控 c-Src 的酵素活性 (Rosen et al., 1995)。

Src family kinase 的成員可分為二類，一為普遍表現於各種細胞，包括了 Src、Yes、Fyn；另一為僅表現於造血系統者，包括了表現於 T 細胞的 Lck 以及表現在骨髓單核細胞的 Hck。然而先前有報導指出 Src family kinases 成員中的 Hck、Fgr 以及 Lyn 三者

巨噬細胞受到 LPS 刺激之下其酵素活性皆會上升。而 Lyn 在巨噬細胞受 LPS 刺激之下還可直接與 CD14 結合，並透過 PI 3-kinase 的路徑促使細胞活化。另有研究發現，若將巨噬細胞大量表現持續活化態的 Hck 會促使巨噬細胞增加 TNF- α 的產生及釋出，且此現象會因送入 *hck* 之 antisense oligonucleotides 而受到抑制。然而已有文獻指出，在巨噬細胞受到 LPS 長時間的刺激 (約 24-48 小時)，會誘發 Hck 以及 Lyn 的表現量增加，而這也與長時間受到 LPS 刺激之下所產生的呼吸窘迫 (respiratory burst) 的疾病情形不謀而合。因此，綜觀以上的研究顯示，巨噬細胞在受到 LPS 所活化的訊息傳遞路徑中，酪胺酸激酶 (protein tyrosine kinases) 尤以 Hck、Fgr 以及 Lyn 會參與其中並扮演著重要的角色。

巨噬細胞受到 LPS 刺激而活化

格蘭氏陰性菌所釋放出的 LPS 會與 LPS-binding protein (LBP) 形成複合體後，可被巨噬細胞膜上的 CD14 所辨識。由於 CD14 不具有 intracellular domain，故當 LPS 與 CD14 結合後，可以利用與 Toll-like receptors (TLRs) 相接連之分泌型蛋白 MD-2 之結合，透過蛋白結構的改變而活化 TLRs 傳遞下游訊息 (Silva et al., 2001；

Viriyakosol et al., 2001)。

Toll-like receptors (TLRs) 屬於 transmembrane proteins，是一群可以與細菌各種不同成分結合的接受器，主要結構有二，一為在細胞外的 leucine-rich repeat domain (LRR domain)，另一為位於細胞內的 Toll / interleukin-1 receptor domain (TIR domain)。當 CD14 辨識到 LPS 後，會透過 LRR domain 將 LPS 呈現給 TLRs。受到刺激後的 TLRs 則會利用 TIR domain 與 cytoplasmic adapter MyD88 結合，並且將 interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK) 磷酸化。受到活化的 IRAK 與 MyD88 分離後，進而與 tumor necrosis factor receptor activated factor 6 (TRAF6) 結合，透過 IKK 磷酸化 I- κ B 進而活化了細胞中非常重要的轉錄因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B)。

NF- κ B 調控細胞增生、凋亡、致癌以及發炎等生理反應。在巨噬細胞的活化過程中，NF- κ B 為最主要的轉錄因子。當巨噬細胞受到刺激後，透過訊息傳遞將 NF- κ B 活化，開動許多與發炎反應有關的基因，進而產生了包括介白素-1 (interleukin-1; IL-1)、介白素-6 (interleukin-6; IL-6)、介白素-8 (interleukin-8; IL-8)、tumor necrosis factor alpha (TNF- α) 在內的諸多細胞激素。此外，活化的巨噬細胞也會產生一些包括了一氧化氮 (nitric oxide; NO)、superoxide anion、

hydrogen peroxide 等在內的自由基，以及 prostaglandins、thromboxane 及 leukotrienes 等具生理活性的物質 (Otto et al., 1996)。這些物質的分泌可以活化體內防禦系統，開啓保護機制對抗細菌感染 (Rietschel et al., 1994; Rietschel et al., 1996)。

有研究指出，在巨噬細胞受到 LPS 刺激而活化的過程中會有一群酪胺酸激酶 (protein tyrosine kinases) 參與期間並磷酸化細胞內蛋白，引起發炎反應。然而當巨噬細胞事先處理 tyrosine kinase 抑制劑 tyrphostins 以及 herbimycin A 後，可以有效的抑制 LPS 所誘導巨噬細胞的活化 (Stefanova et al., 1993; Beaty et al., 1994)。由於先前已有報導指出 Lyn、Hck 及 Fgr 這三個 Src 家族成員為主要參與 LPS 活化巨噬細胞的 tyrosine kinases，故在研究這三者的重要性時，Meng 等人製備了剔除 Lyn、Hck 以及 Fgr 的 triple knockout mice ($lyn^{-/-} hck^{-/-} fgr^{-/-}$)。有趣的是 triple knockout mice 巨噬細胞對 LPS 的反應和正常老鼠的巨噬細胞無分軒輊 (Meng et al., 1997)。這結果顯示著可能還有其他的 tyrosine kinase(s) 參與 LPS 對巨噬細胞的活化。

實驗研究動機

在 LPS 所引發的發炎反應中，蛋白質 tyrosyl phosphorylation 扮演一個很重要的角色。然而先前對巨噬細胞活化過程以及蛋白質 tyrosyl phosphorylation 增加所引發訊息傳遞的研究中，大多只探討細胞在 LPS 處理後短時間內的變化。由於本實驗室先前的研究發現，大腸癌細胞株 Caco2 在 LPS 加入至少 6 小時後，其 c-Src 的含量會明顯增加，而這個現象使我們聯想到受 LPS 刺激的巨噬細胞有可能也發生類似的反應。由於在 Src 家族成員，Hck、Fgr 以及 Lyn 三者皆剔除的巨噬細胞仍具有類似正常巨噬細胞對 LPS 的反應，因此有可能其他的 tyrosine kinase 也參與了 LPS 活化巨噬細胞的過程。有鑑於此，我們嘗試探討，當巨噬細胞在 LPS 長時間的刺激之下，其 c-Src 的表現量是否也會有變化。如果確有變化的話，其是否意味著 c-Src 在 LPS 所造成巨噬細胞活化的過程中扮演著某種必要的角色？

第二章 實驗材料與方法 (Materials and Methods)

第一節 實驗材料

(一) 細胞 :

老鼠巨噬細胞株 (Murine macrophage cell line) : Raw264.7

自活體老鼠取得巨噬細胞 (Rat peritoneal macrophages)

(二) 試劑 :

25 mg 的 Lipopolysaccharide 溶於 5 ml 滅菌水中

(LPS 的 stock concentration = 5 mg/ml)

(三) 抗體 :

Anti-COX-2: anti-COX-2 polyclonal antibody

Anti-Eps8: anti-Eps8 monoclonal antibody

Anti-Eps8: anti-Eps8 polyclonal antibody

Anti-Src: anti-Src monoclonal antibody

Rabbit anti-goat antibody

HRP-protein A: HRP-conjugated protein A

HRP-rabbit anti-mouse antibody

PY20: HRP-conjugated mouse pTyr monoclonal antibody

(四) 實驗儀器：

名稱	廠牌
Centrifuge	Eppendorf 5415C
Centrifuge	KUBOTA1720
Digital analysis system	Kodak EDAS 120
GeneAmp PCR system 2400	Perkin Elmer
Hemocytometer	BOECO
Hoefer semiPhor	Pharmacia Biotech TE70
PH meter	JENCO 6071
Power supply	EPS2A200
Protein-A sepharose beads	Pharmacia
Protein Assay Kit	Bio-Rad
PVDF transfer membrane	NEN
Shaker	TKS RS01
Spectrophotometer	Beckman DU640
Stirrer/Hot plate	CORNING PC640
Vertical slab gel unit	Hoefer SE400
Vortex	GENIE SI-2 G560
Water bath	TKS ZX-400

(五) 實驗藥品：

1. 下列藥品購自 Acors (New Jersey, USA)：

Deoxycholate
Sodium orthovanadate

2. 下列藥品購自 American bioganics (New York, USA)：

Acrylamide
N'N'-Methylene bisacrylamide

3. 下列藥品購自 Amersco :

Chloroform
50X TAE buffer

4. 下列藥品購自 Amersham :

Protein A Sepharose

5. 下列藥品購自 Arch :

Isopropanol

6. 下列器材購自 Bio-Rad (Hercules, CA, USA) :

Gel dryer
Protein Assay Kit

7. 下列藥品購自 Fisher Scientific (New Jersey, USA) :

Acetic acid, glacial
Methanol
Tween 20

8. 下列藥品購自 Fisons Scientific Equipment (Bishop Meadow Road, England) :

Sucrose
Sodium chloride

9. 下列藥品購自 Gibco BRL (New York, NY, USA) :

Agarose
Ammonium persulfate
DMEM

EDTA
Fetal bovine serum
Glycine
L-Glutamine
Penicillin-streptomycin
SDS
Sodium Bicarbonate
TEMED
Trypsin-EDTA (10X)

10. 下列物品購自 Nunc (Roskilde, Denmark) :

100 X 20 mm culture dish
60 X 15 mm culture dish
35 X 10 mm culture dish
15 ml conical tube
50 ml conical tube

11. 下列物品購自 Promega :

5X RT buffer
dNTP
Oligo dT
DTT
RNase inhibitor
Reverse transcriptase
Taq polymerase

12. 下列藥品購自 Sigma (St. Louis, MO, USA) :

2-mercaptoethanol
37% Formaldehyde
aprotinin
bromophenol blue
EGTA
gelatin
glycerol
IGEPAL CA-630
lipopolysaccharide

PMSF
Methanol

13. 下列藥品購自 Tedia (Fairfield, Ohio, USA) :

Hydrochloric acid

14. 下列藥品購自美國 USB :

coomassie brilliant blue R-250
Tris-HCl
acrylamide
SDS
Glycine
Tween 20

第二節 實驗方法

(一) 細胞培養 (cell culture) :

試劑 :

1. RPMI 1 liter

將 1 單位的 RPMI powder 和 2.0 g 的 NaHCO₃ 溶於 600 ml 滅菌 d.d H₂O , pH 值以 HCl 調成 7.4 , 再加滅菌 d.d H₂O 至 1 liter 後 , 在 hood 中以 0.22 μm 的濾膜過濾後分裝 , 保存於 4°C 。

2. Fetal bovine serum

回溫之後 , 分裝到 50 ml 無菌離心管 , 用 parafilm 包覆瓶口 , 保存於 -20°C 。

3. Penicillin-Streptomycin (10X; 10000 unit/ml-10000 μg/ml)

每 450 ml 的 RPMI 加 5 ml 的 P-S。

4. L-Glutamine (10X; 200 mM)

每 450 ml 的 RPMI 加 5 ml 的 L-Glutamine。

5. Trypsin-EDTA (10X)

利用稀釋滅菌過的 1X PBS 將 10X trypsin 稀釋成 1X trypsin。

6. 10X PBS 1 liter

NaCl 80 g

NaH₂PO₄·H₂O 12 g

將所需之化學藥品溶於 500 ml d.d H₂O 將其 pH 調成 7.4，再加 d.d H₂O 至 1 liter 滅菌後保存於 4°C。可用 d.d H₂O 稀釋成 1X PBS 之後使用。

7. Culture medium 510 ml

RPMI 450 ml

Fetal bovine serum 50 ml
(final conc. = 10%)

10X Penicillin-Streptomycin 5 ml
(final conc. = 0.1X)

10X L-Glutamine 5 ml
(final conc. = 0.1X)

8. 40% DMSO stock solution 10 ml

DMSO 4 ml

RPMI 6 ml

以 0.22 μ m 的濾膜過濾，保存於 -20°C。

9. Freezing medium 10 ml

RPMI medium 5.5 ml

40% DMSO stock solution 2.5 ml
(final conc. = 10%)

Fetal bovine serum 2.0 ml

步驟：

1. 將細胞培養於 culture RPMI (10% FBS, 1% P-S, 1% L-Glu)，置於 CO₂ 培養箱 (37°C, 5% CO₂)，當細胞長到 90% confluency 後，分盤培養。

2. 細胞分盤 (subculture)：

a. 將 medium 吸走，以 2 ml 滅菌 1X PBS 沖洗一次，吸乾 PBS。

b. 加 1.5 ml 1X trypsin 置於 CO₂ 培養箱 (37°C, 5% CO₂) 進行 trypsinization，作用約 5 分鐘。

c. 加入 8 ml fresh medium 終止反應，上下吸、放數次，直到將細胞均勻打散，並以 1:2 或 1:3 的比例分盤培養。

3. 冷凍細胞：

a. 將 medium 吸走，以 2 ml 滅菌 1X PBS 沖洗，吸乾 PBS。(冷凍細胞的前一天必須換 fresh medium。)

b. 加入 2 ml 1X trypsin 置於 CO₂ 培養箱 (37°C, 5% CO₂) 進行 trypsinization 5 分鐘，以 3 ml culture medium 將細胞打下，

並且均勻打散。

- c. 將細胞移到 50 ml conical tube, 4°C、1000 rpm 離心 5 分鐘。
- d. 去除上清液, 加入 1 ml freezing medium, 並移至冷凍管, 置於液態氮儲存。

(二) 收集細胞 lysates :

試劑 :

1. Lysis buffer (RIPA buffer)	500 ml
NaCl	4.38 g
Tris-HCl	3.0285 g
Deoxycholate	1.25 g
IGEPAL CA-630	5 ml

將所需之化學藥品溶於 350 ml d.d H₂O, pH 調成 7.5, 再加 d.d H₂O 至 500 ml, 保存於 4°C。

2. Modified RIPA buffer	1 ml
RIPA	1 ml
200 mM Sodium orthovanadate (final conc.= 1 mM)	5 µl
200 mM EGTA (final conc. = 1 mM)	5 µl
0.5% Aprotinin (final conc. = 0.0025%)	5 µl

200 mM PMSF
(final conc. = 1 mM)

5 μ l

步驟：

1. 將 medium 吸走，細胞以 1X PBS 清洗兩次，吸乾 PBS。
2. 加入 400 μ l modified RIPA buffer (6 cm dish)，用刮杓把細胞刮下 (冰上操作)，上下沖打細胞，將細胞液置於 eppendorf。接著把 eppendorf 在 rake 上刮動，來回數次。
3. 以 4°C、10000 rpm，離心 10 分鐘，取上清液到新的 eppendorf，保存於 -80°C。

(三) 蛋白質濃度測定：

試劑：

1. BSA (1 μ g/ μ l)
2. Protein Assay Kit

步驟：

1. 以不同濃度的 BSA 畫出蛋白質濃度測定的 standard curve。其方法如下：取 0、5、10、15、20、25、30 μ l BSA (1 μ g/ μ l)到 eppendorfs。
2. 加入不同量的 d.d H₂O 到 eppendorfs 中，使其總體積達 800 μ l。
3. 加 200 μ l Protein Assay Kit (dye) 到 eppendorfs，以 vortex 混合均勻。
4. 在 sample 的測定上，取 10 μ l cell lysates，790 μ l d.d H₂O，200 μ l dye，混合均勻。
5. 採用 Bradford Protein Assay，測各種不同量之 BSA 在波長 595 nm 的吸光值，畫出 standard curve。再測 sample 的 O.D.值，求出

sample 的蛋白質濃度。

(四) 蛋白質電泳 (SDS-PAGE) :

試劑 :

1. 30% Acryamide/0.8% bisacryamide 500 ml

Acryamide 150 g

N'N'-Methylene bisacryamide 4 g

將所需之化學藥品溶於 350 ml d.d H₂O

再加 d.d H₂O 至 500 ml，保存於 4°C。

2. Tris-HCl (2 M, pH 8.8) 500 ml

Tris-HCl 121.14 g

將 Tris-HCl 溶於 350 ml d.d H₂O，pH 調成 8.8

再加 d.d H₂O 至 500 ml。

3. Tris-HCl (2 M, pH 6.8) 500 ml

將 Tris-HCl 溶於 350 ml d.d H₂O，pH 調成 6.8

再加 d.d H₂O 至 500 ml。

4. 10% APS 10 ml

APS 1 g

將 APS 溶於 8 ml d.d H₂O

再加 d.d H₂O 至 10 ml，保存於 4°C。

5. Resolving gel (8%) 30 ml

H ₂ O	15.8 ml
2M Tris-HCl, pH 8.8	6 ml
Acrylamide/bis (30%/0.8%)	8 ml
20% SDS	150 µl
10% APS	150 µl
TEMED	20 µl
6. Stacking gel	10 ml
H ₂ O	8 ml
2M Tris-HCl, pH 6.8	0.625 ml
Acrylamide/bis (30% / 0.8%)	1.33 ml
20% SDS	50 µl
10% APS	50 µl
TEMED	10 µl
7. 10X Sample buffer	50 ml
1M Tris-HCl, pH 6.8	1 ml
SDS	5 g
Sucrose	25 g
Bromophenol blue	10 mg
2-mercaptoethanol	5 ml

將所需之化學藥品溶於 350 ml d.d H₂O
再加 d.d H₂O 至 500 ml， 保存於室溫。

7. Running buffer	500 ml
Tris-HCl	7.5 g
Glycine	36 g
10 % SDS	2.5 g

再加 d.d H₂O 至 500 ml， 保存於室溫。

步驟：

1. 將兩塊玻璃板、兩條 spacer 及灰色夾組合成一個製膠架，然後利用黑色旋鈕固定在底座。
2. 將下層膠配方所需的藥劑依序加入燒杯，攪拌均勻，利用 pipette 加到電泳槽至適當位置。
3. 加入 1 ml d.d H₂O，隔絕空氣，待凝膠 (約 20 分鐘)。
4. 將 d.d H₂O 倒掉，插入 comb，將上層膠配方所需的藥劑依序加入燒杯，攪拌均勻，利用 pipette 加到電泳槽。
5. 等上層膠凝固之後，將 comb 拿走，倒入上、下層各 200 ml 1X running buffer。
6. 將 sample 和 10X sample buffer (10:1) 混和均勻，稍微 spin 一下，然後煮沸 5 分鐘。
7. 利用 micropipette，將 sample 加到 well 內，進行膠體電泳法 (50 V、20 mA，時間 18 小時；200 V、30 mA，時間 5 小時)。

(五) Western blot analysis：

試劑：

1. Transfer buffer	500 ml
Tris-HCl	1.5 g
Glycine	7.2 g
SDS	0.5 g
Methanol	100 ml

將所需之化學藥品溶於 350 ml d.d H₂O

再加 d.d H₂O 至 500 ml，隔夜去除氣泡，保存於室溫。

2. 10X TBS	500 ml
Tris-HCl	30.3 g
NaCl	43.83 g

將所需之化學藥品溶於 350 ml d.d H₂O，pH 調成 8.8

再加 d.d H₂O 至 500 ml，保存於室溫。

3. Blotting buffer	50 ml
10X TBS	5 ml
BSA	1.5 g
Tween 20 (USB)	25 µl

將所需之化學藥品溶於 35 ml d.d H₂O

再加 d.d H₂O 至 50 ml，保存於室溫。

4. Washing buffer	500 ml
-------------------	--------

10X TBS 50 ml

Tween 20 500 μ l

將所需之化學藥品溶於 350 ml d.d H₂O
再加 d.d H₂O 至 500 ml，保存於室溫。

步驟：

1. 利用 methanol 浸泡 PVDF transfer membrane 約 10 秒，再以 d.d H₂O 浸泡約 5 分鐘。
2. 利用 semi-phor transblotter 將電泳膠中的蛋白質 transfer 到 PVDF transfer membrane (25V、300 mA，1.5 小時)。
3. 將 PVDF membrane 放入 30 ml blotting buffer，在 4°C 冰箱中 preblotting overnight。隔天，室溫下在 shaker 上 preblotting 30 分鐘 (shaker 擺動速度: 5 rpm)。
4. 倒掉 preblotting buffer，加入 10 ml 含 primary antibody (1:1000) 的 blotting buffer，室溫下在 shaker 上 blotting 1.5 小時 (shaker 擺動速度: 5 rpm)。
5. 以 washing buffer 清洗 membrane 三次，50 ml、5 分鐘；50 ml、5 分鐘；100 ml、10 分鐘 (shaker 擺動速度: 40 rpm)。
6. 加入 10 ml 含 secondary antibody 的 blotting buffer (1:2000)，室溫 blotting 1.5 小時 (shaker 擺動速度: 5 rpm)。
7. 以 washing buffer 清洗 membrane 五次，50 ml、5 分鐘；50 ml、5 分鐘；100 ml、10 分鐘；150 ml、15 分鐘；150 ml、15 分鐘 (shaker 擺動速度: 40 rpm)。
8. 依 membrane 大小 (0.125 ml/cm²)，加入適量的 ECL kit solution I 與 II 等比例的均勻混和液 (Amersham)。在 membrane 與之作

用 5 分鐘後，以 X-ray film 感光。

(六) 免疫沉澱法 (Immunoprecipitation) :

試劑 :

1. Protein A Sepharose beads

Protein A Sepharose CL-4B 0.15 g

1X TBS (滅菌) 10 ml

以滅菌 600 μ l 1X TBS 清洗六次，每次 30 分鐘 (置於 4°C)，隔天再以 1X TBS 清洗三次，最後存於 1.5 ml 1X TBS，保存於 4°C。

步驟 :

1. 取 5 μ l antibody，加入 35 μ l Protein A Sepharose，將 eppendorf 置於試管旋轉器，在 4°C 下，旋轉 1.5 小時 (旋轉器轉速: 12 rpm)。
2. 加入 500 μ g lysates，旋轉 1.5 小時 (旋轉器轉速: 12 rpm) 後，在 4°C 下，離心 5 分鐘 (10000 rpm)，移除上清液 (勿吸到 beads)。取 600 μ l RIPA buffer 清洗 Protein A Sepharose beads，在 4°C 下，離心 5 分鐘 (10000 rpm)，共清洗 3 次。
3. 移除上清液 (勿吸到 beads)，加 60 μ l 2X sample buffer，100°C 水浴槽煮沸 3 分鐘，spin 後，取上清液直接 loading。

(七) 萃取 total RNA :

試劑 :

1. RNA extraction reagent (貯存於 4°C)

2. Chloroform

3. Isopropanol

4. DEPC

1 liter 滅菌水加 1 ml DEPC, 以 1000:1 的比例配製成 DEPC H₂O, 搖晃混合均勻後, 靜置於抽風櫥, 靜置 2 個小時以上, 之後 121 °C 濕滅 30 分鐘。

5. 75% ethanol

取 75 ml 100% ethanol (Merck), 加入 25 ml DEPC H₂O, 配製成 75% ethanol, 置於 -20°C。

6. 50X TAE buffer

使用時可用 DEPC H₂O, 稀釋成 0.5X TAE buffer。

7. 2% agarose gel

0.5X TAE buffer	50 ml
agarose	1 g
滅菌 d.d H ₂ O	50 ml

將 agarose powder 與 buffer 均勻攪拌, 然後以微波爐分段加熱, 分別為 30 秒、10 秒、10 秒, 使 agarose 完全溶解, 倒入 tray, 插上 comb 使之凝固。

8. 37% Formaldehyde

9. 4X RNA loading dye

步驟：

1. 將舊的 medium 吸乾，此時千萬不可用 1X PBS wash。直接加入 1 ml RNA extraction reagent (1×10^7 cells/1 ml) 使細胞溶解，然後將粘稠狀的溶解物移至 15 ml conical tube，靜置室溫反應 5 分鐘。
2. 加入 0.2 ml chloroform，劇烈搖晃 15 秒，然後靜置室溫反應 2 分鐘。之後以 4°C、12000 rpm 離心 15 分鐘。
3. 離心後，將上清液小心抽出至新的 15 ml conical tube，加入等體積 (大約 0.5 ml) 的 isopropanol，然後均勻混和，放置在冰上 4°C 反應 10 分鐘。之後以 4°C、12000 rpm 離心 10 分鐘。
4. 將上清液倒掉，可以看到管部底層白色的 pellet，用 cold 1 ml 75% ethanol 沖洗底部 RNA 沉澱物來回數次，接著以 vortex 混合均勻。之後以 4°C、12000 rpm 離心 5 分鐘。
5. 倒掉上清液，將剩餘的 ethanol 吸乾，然後放入抽氣櫥中，使 RNA 沉澱物變的乾燥透明 (約 5 分鐘)。依照 pellet 的大小，加入適量的 DEPC H₂O 均勻混和，60~65°C 加熱 5 分鐘。
6. 加熱後，用 vortex 震勻，取 1 μl RNA 加入 99 μl DEPC H₂O，利用分光光度儀測量 O.D. 值並計算 RNA 與 DNA 或非 RNA 物質的比值。
7. 取 2 μg total RNA (約 2 μl)，加入 DEPC H₂O (3 μl)、37% formaldehyde (2.5 μl)、4X RNA loading dye (2.5 μl)，混和均勻後以 65°C 加熱 5 分鐘。然後以 2% agarose gel 和 0.5X TAE buffer 進行電泳 20 分鐘 (100 V)。實驗結束後，agarose gel 以 EtBr 染色，膠內的 RNA 利用貴儀室的數位顯像儀分析結果。

(八) RT-PCR：

試劑：

1. DEPC H₂O
2. 5X RT buffer
3. dNTP (2.5 mM)
4. Oligo dT (0.5 µg/µl)
5. DTT (0.1 M)
6. RNase inhibitor (40 U/µl)
7. Reverse transcriptase (200 U/µl)
8. Primers

c-src : (PCR 產物為 390 bp)

Forward : 5'-AGC AAC AAG AGC AAG CCC AAG GA-3'

Reverse : 5'-TAG AGG GCC ACA AAG GTG GTC AC-3'

此 primers 的 PCR 產物，可反映出 *c-src* mRNA 的量。

9. 10X PCR buffer
10. Taq polymerase (5U/µl)

步驟：

1. 取 5 µg total RNA (約 6 µl)，加 26µl DEPC H₂O，乾浴槽 70°C 加熱 5 分鐘後，馬上放到冰上。
2. 加入 10 µl 5X RT buffer、4 µl dNTP (2.5 mM)、1 µl Oligo dT (0.5µg/µl)、1 µl DTT (1 M)、1 µl RNase inhibitor (40U/µl)，水浴

槽 42°C 預熱 5 分鐘。

3. 加入 1 μl reverse transcriptase (200 U/ μl)，水浴槽 42°C 進行逆轉錄反應 1 小時。
4. 乾浴槽 94°C 加熱 5 分鐘，終止反應 (保存於 -20°C)。
5. 取 1 μl cDNA、37.5 μl 滅菌水、5 μl 10X PCR buffer、4 μl dNTP (2.5 mM)、1 μl forward primer (10 μM)、1 μl reverse primer (10 μM)、0.5 μl Taq polymerase (5 U/ μl)，混和均勻，進行 PCR 反應 (94°C，5 分鐘後，以 94°C，30 秒；62°C，40 秒；72°C，30 秒，重複 35 個循環；最後再以 72°C 反應 5 分鐘)。

(九) 抽老鼠腹腔巨噬細胞 (preparation of rat peritoneal macrophage)

動物：

SD Rat (4-6 weeks) 體重約為 250-300 g。

試劑：

4 % Brewer tioglycollate medium 8 ml/隻

步驟：

1. 將 4-6 weeks 的 SD rat 腹腔注射，打入 Brewer tioglycollate medium，誘發老鼠產生發炎反應。
2. 4 天後，以 CO₂ 犧牲。
3. 利用 37°C，50 ml 的 PBS 打入老鼠腹腔中。按摩老鼠腹部約 1 分鐘後，緩慢將 PBS 回抽 (此時 PBS 呈混濁)。回抽過程中應盡量避免氣泡的產生。
4. 將回抽的 PBS 離心 (2000 rpm, 20 分鐘)，去掉上清液。
5. 以 2 ml RPMI (10% FBS) 將細胞輕輕打散，數細胞數並培養在

culture dish。

6. 在 37°C, 5% CO₂ 下培養 4 小時後，待細胞貼附，換上新的 medium，繼續培養 24 小時準備做實驗。

(十) 一氧化氮濃度的測定 (Nitrite concentration measurement)

試劑：

1. reagent A4

Sulfanilamine	500 mg
H ₃ PO ₄	2.5 ml

再加 d.d H₂O 至 500 ml，保存於 4°C。

2. reagent A5

N-(1-naphthyl)-ethylenediamine	50 mg
--------------------------------	-------

再加 d.d H₂O 至 500 ml，保存於 4°C。

步驟：

1. 自 culture dish 先取 50 μl 的 medium 加至 96 well dish 中、利用 ELISA reader 讀取波長 540 nm 的吸光值。(A1)
2. 分別加入 45 μl 的 5% Sulfanilamide 以及 45 μl 1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 呈色、避光十分鐘。
3. 再用相同波長讀取第二次的吸光值 (A2)。
4. Nitrite 濃度計算公式：

$$\text{Total Nitrite} = (A2 - A1)_{\text{nitrite}} - (0.006)_{\text{blank nitrite}}$$

利用 NaNO_2 做 Standard curve :

$$4.5361 \times A_{3_{\text{Total Nitrite}}} - 0.001 = (\text{NO}_2 \text{ 量}) \mu\text{g} / \text{ml}$$

(十二) Gelatin zymography

試劑 :

1. Resolving gel (8%)	30 ml
30% acrylamide/Bis	8 ml
2 M Tris-HCl (pH 8.8)	6 ml
d.d. H_2O	13.8 ml
2 % Gelatin solution	2 ml
20 % SDS	150 μl
10 % APS	150 μl
TEMED	20 μl
2. Stacking gel	10 ml
30% acrylamide/Bis	1.33 ml
2 M Tris-HCl (pH 8.8)	625 μl
d.d. H_2O	8.0 ml
20 % SDS	50 μl
10 % APS	50 μl
TEMED	10 μl

3. Stain solution (可回收)	1000 ml
Coomassie brilliant blue R250	2.25 g
Amido black	1.00 g
d.d. H ₂ O	454 ml
Mix 至 dye 完全溶解	
Acetic acid	92 ml
Methanol	454 ml
4. 退色液 (可回收)	1000 ml
d.d. H ₂ O	875 ml
Methanol	50 ml
Acetic acid	75 ml
5. 縮膠液	100 ml
Methanol	35 ml
Glycerol	1.6 ml
再加 d.d H ₂ O 至 500 ml，保存於室溫。	
6. Washing buffer	1000 ml
Triton X-100	25 ml

再加 d.d H₂O 至 1000 ml，保存於 4°C。

7. Reaction buffer	50 ml
2 M Tris-HCl (pH 8.0)	1 ml
1 M CaCl ₂	0.5 ml
1% NaN ₃	0.5 ml

再加 d.d H₂O 至 50 ml，保存於 4°C。

8. 5X Sample buffer	500 ml
Tris-HCl (1 M, pH 6.8)	12.5 ml
SDS	2.5 g
Sucrose	12.5 g
Bromophenol blue	5 mg

再加 d.d H₂O 至 500 ml，保存於 4°C。

9. Running buffer	500 ml
Tris-HCl	7.5 g
Glycine	36 g
10 % SDS	2.5 g

再加 d.d H₂O 至 500 ml，保存於室溫。

步驟：

1. 配製 0.1 % Gelatin-8 % SDS-PAGE
2. 將以凝固之版膠固定到電泳裝置上，於電泳槽內注滿緩衝液 (Running buffer)。
3. 取 20 μ l sample (25 μ g) 加入 5 μ l 5X loading buffer (不含有 β -Mercaptoethanol 或其他 reducing agents)，混合後 loading。
4. 以 140 V [30 mA] 跑膠 5 hours。
5. 跑完膠後，取出膠並加入 100 ml Washing buffer 室溫下，搖晃 30 分鐘 (rpm 5)，重複二次。
6. 倒掉 Washing buffer，膠先以 d.d H₂O rinse 在加入 300 ml Reaction buffer，於 37°C 中搖晃 12-16 hrs。
7. 取出膠，以 d.d H₂O wash 兩次。
8. 膠以 0.25 % Coomassie blue R-250 染色 20-30 分鐘。
9. 利用退色液退色 30 分鐘，二次。
10. 倒掉退色液後加入縮膠液，縮膠 1 小時。
11. 用玻璃紙(先浸在 d.d H₂O)，將膠固定在玻璃片上乾膠。

第三章 結果 (Results)

一、 LPS 促進 Raw264.7 巨噬細胞株活化及 c-Src 表現量的增加

已有報導指出， LPS 刺激巨噬細胞之後，細胞內許多蛋白的 tyrosyl phosphorylation 會大量增加。但這些實驗中只探討短時間內 (少於 2 個小時) 蛋白 tyrosyl phosphorylation 的變化。為了解巨噬細胞在被 LPS 活化後長時中整體蛋白 tyrosyl phosphorylation 的變化，我們利用 LPS (100 ng/ml) 處理 Raw264.7 巨噬細胞株，0.5、1、1.5、2、4、6、12、24、48 及 72 小時之後，收集 cell lysates 並以 anti-pTyr antibody (PY20) 進行 western immunoblotting。實驗結果顯示在 LPS 刺激下，Raw264.7 巨噬細胞株確實會受到活化而使得細胞總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation 產生變化；除了先前已知 LPS 作用後 2 小時內 tyrosyl phosphorylation 呈暫時性 (transient) 增加外，我們也發現在 LPS 作用 2 小時後，細胞內蛋白的 tyrosyl phosphorylation 呈現另一波的增加 (*Figure 1*)。若將此實驗中收得的 cell lysates 再利用 anti-COX-2 antibody 進行 western immunoblotting 的分析，由 COX-2 蛋白質表現量的明顯上升證實本實驗巨噬細胞的確因 LPS 的刺激而活化 (*Figure 2A*)。而這個實驗結果也可由巨噬細胞受 LPS 刺激後 NO 產量的增加再次獲得印證 (*Figure 2B*)。

由於先前本實驗室發現大腸表皮細胞 (Caco2) 其 c-Src 的量會因 LPS 的刺激而增加，因此我們也想看看類似的情形是否也會發生於巨噬細胞？我們分別在 Raw264.7 巨噬細胞株加入 LPS 後 0、12、24、48、72、及 96 小時，收集 cell lysates，利用 anti-Src 及 anti- α -tubulin antibodies 進行 western immunoblotting 分析 (Figure 2A)。我們發現 c-Src 蛋白質的表現量的確會因 LPS 的刺激而明顯增加，並且呈現 time-dependent 的現象。以上實驗結果得知，LPS 活化 Raw264.7 巨噬細胞株的過程中，c-Src 的蛋白質表現是會被誘導出來的。

二、LPS 可誘導 peritoneal macrophages c-Src 表現量的增加

在圖 2A 的實驗中，我們證明了巨噬細胞株的 c-Src 會隨著 LPS 刺激時間的增加而表現量增加。為了更確定此實驗結果，我們利用老鼠做為 model，以 thioglycolate-elicited peritoneal macrophages (PEM) 進行 LPS 的活化實驗。當 PEM 以 LPS 分別處理 0、12、24、及 48 小時後，我們收集 cell lysates，以 anti-Src antibody 做 western immunoblotting 觀察 c-Src 蛋白量的變化。由圖 3A 可知，當 PEM 受 LPS 刺激後，細胞內 α -tubulin 的量並沒有太大的變化，但 c-Src 表現量明顯增加。另外，再由 LPS 刺激之後 COX-2 蛋

白量 (*Figure 3A*) 及 NO₂ 釋出量 (*Figure 3B*) 也是隨 LPS 處理時間而增加，證實了 PEM 的確受到 LPS 的作用而活化，這個活化結果也可另由 gelatin zymography 所觀察到 MMP-9 活性增加得到進一步印證 (*Figure 3A*)。由上述結果得知在 LPS 刺激後的 PEM 會產生活化反應，並且如同 Raw264.7 巨噬細胞株一樣，其 c-Src 的表現量會因 LPS 的刺激而顯著上升。

三、 PP2 抑制了 LPS 所誘導巨噬細胞的活化

由先前的實驗證明巨噬細胞的 c-Src 表現量會同在 LPS 刺激後增加。故我們進一步探討 c-Src 是否會參與 LPS 所誘導巨噬細胞的活化。於是我們利用 c-Src 的 specific inhibitor (PP2) 觀察 PP2 是否可抑制是細胞的活化。Raw264.7 細胞先以 PP2 處理 20 分鐘後加入 LPS 刺激 24 小時，收集 cell lysates 利用 anti-COX-2 以及 anti- α -tubulin antibody 進行 western immunoblotting 的分析 (*Figure 4A*)，並測定 NO₂ 的產量 (*Figure 4B*)。實驗結果顯示，細胞事先處理 PP2 後再以 LPS 刺激，則 Raw264.7 細胞株無論是 COX-2 的蛋白質表現量或是細胞釋放出一氧化氮的量均明顯受到抑制。由此可知 PP2 可以抑制 LPS 對巨噬細胞的活化。此實驗結果意味著 Src family kinases 在 LPS 活化巨噬細胞過程中扮演著舉足輕重的角色。

四、 LPS 所誘導 c-Src 表現量的增加與巨噬細胞的活化密切相關

由上述實驗總結，我們認為 LPS 在活化巨噬細胞的過程中，細胞內 tyrosyl phosphorylation 會呈兩階段的變化。第一次 tyrosyl phosphorylation 的增加發生於細胞受 LPS 刺激初期，其呈暫時性 (transient) 的變化。第二次 tyrosyl phosphorylation 的增加則具長效性，而與 c-Src 表現量的增加有關。由於 PP2 的處理會抑制上述二階段蛋白的 tyrosyl phosphorylation 也抑制 LPS 對巨噬細胞的活化，因此我們想探討 LPS 誘發 c-Src 表現量的增加在 LPS 的活化巨噬細胞過程中所扮演的角色。為回答這個問題，我們先以 LPS 刺激巨噬細胞 2 小時後於 medium 中加入或不加入 PP2，再收集不同時間 LPS 處理的 cell lysates，並以 anti-pTyr、anti-COX-2 及 anti- α -tubulin antibodies 進行 western immunoblotting 的分析 (Figure 5, 6A)。從以上結果我們可以很明顯看出巨噬細胞在經過 LPS 引發的第一波短暫蛋白的 tyrosyl phosphorylation 之後隨即加入 PP2 抑制 c-Src 活性的話，則細胞無論在第二階段總蛋白 tyrosyl phosphorylation 的增加、COX-2 蛋白表現量的上升、以及一氧化氮的釋出上均被有效的抑制。由此實驗我們證實，在 LPS 活化巨噬細胞過程中，c-Src 是一個參與其中很重要的 tyrosine kinase。

五、動物體內巨噬細胞的 c-Src 表現量會因 LPS 的刺激而增加

由於上述的實驗均是在細胞株或是 primary culture 完成的，實驗性質上偏向 in vitro。為證明我們的發現也確實發生於活體內 (in vivo)，因此我們使用 8 週以上的大白鼠做為 model，將老鼠以腹腔注射的方式打入 PBS 或 LPS (1 mg/kg)，24 小時後以 CO₂ 處理，抽取其腹腔巨噬細胞，收集 cell lysates，以 anti-Src antibody 做 western immunoblotting 觀察 c-Src 蛋白量的變化情形。我們發現腹腔注射 PBS 老鼠的巨噬細胞與腹腔注射 LPS 的巨噬細胞在 α -tubulin 的表現量上並沒有太大差異，但 LPS 組 c-Src 的表現量則比前者 (對照組) 為高。此外再由 COX-2 蛋白量 (Figure 7A) 及 NO₂ 量 (Figure 7B) 的增加，證實了腹腔注射 LPS 老鼠的巨噬細胞的確會受到 LPS 的活化，而這個結果也可由 gelatin zymography 所觀察到 MMP-9 活性的增加而得到印證 (Figure 7A)。

第四章 討論 (Discussion)

在我們生活環境中受細菌感染的機會無數，輕則無任何症狀產生，重則導致生命垂危甚至死亡。在某些情況下 (如感冒)，即便沒有服用任何藥物也能自然痊癒。究其因，乃緣於人體免疫系統發揮了作用，因此免疫系統是我們自有的保護機制。正因為免疫機制是如此重要，因此當其失去正常調控機能時將會對人體的健康造成莫大威脅。當免疫能力下降，如：先天性免疫不全症患者病人常因體內感染嚴重而死亡；相反地，若病人免疫系統防衛過當，則病人體內器官會因長時間持續性的發炎而衰竭。

已知細菌感染人體時，會釋放出內毒素 LPS 引起人體發炎反應；巨噬細胞不但參與其中，並扮演著非常重要的角色。在 LPS 刺激之下，利用細胞膜上的接受器，巨噬細胞在接收了 LPS 的刺激後透過了蛋白質的 tyrosyl phosphorylation 傳遞下游的訊息，開啓發炎的反應機制。為了解 LPS 活化巨噬細胞的過程，我們先觀察巨噬細胞在 LPS 處理後整體蛋白 tyrosyl phosphorylation 的變化情形。

早期相關的研究指出，LPS 短時間的刺激可使巨噬細胞整體蛋白的 tyrosyl phosphorylation 呈短暫性增加 (transient increase)。但在本實驗中我們發現以 LPS (100 ng/ml) 長時間刺激巨噬細胞後，許多

蛋白的 tyrosyl phosphorylation 亦呈顯著增加 (*Figure 1*)。因此我們想探究巨噬細胞在受到 LPS 長效性的刺激後是否有 tyrosine kinases 受到活化並參與其所誘發巨噬細胞的發炎反應。

早期的研究指出巨噬細胞在 LPS 處理後，Src 家族成員 Hck、Fgr 及 Lyn 均呈暫時性酵素活性增加並參與 LPS 所誘導巨噬細胞的活化。1997 年 Meng 等人就將這三個蛋白質做 triple knock out mice ($lyn^{-/-} hck^{-/-} fgr^{-/-}$) 來研究，卻出乎意料地發現其巨噬細胞和正常巨噬細胞班都能為 LPS 所活化。但再以 herbimycin A 處理這二種巨噬細胞，則發現 LPS-induced NO production 及 ERK1/2 phosphorylation 均會減少。因此這意味著除了 Hck、Fgr、Lyn 外還有其他的 tyrosine kinase 參與並影響 LPS 所誘導巨噬細胞的活化 (Meng et al., 1997)。由於本實驗發現巨噬細胞同腸道表皮細胞般在 LPS 刺激後，細胞內的 c-Src 表現量會顯著增加；而這也與我們所發現 LPS 長期刺激細胞會增加其整體蛋白 tyrosyl phosphorylation 的結果相吻合。因此我們不禁懷疑 c-Src 是那個“身居要位”，但尚未被認定的 tyrosine kinase。要驗證這個論點，我們先以 PP2 處理巨噬細胞後再以 LPS 活化之。結果我們發現，巨噬細胞所有受 LPS 活化的生理反應均被明顯抑制 (*Figure 4*)。

為進一步確認 c-Src 於期間所扮演的角色，我們先以 LPS 刺激巨噬細胞 2 小時後再以 PP2 作用之。此舉可使 Hck、Fgr、Lyn 三個 tyrosine kinases 因 LPS 誘發之短暫性活化不受影響，但在 LPS 刺激後期表現量增加之 c-Src 活性卻可因而受到抑制。的確，如我們所預期般，PP2 抑制了第二階段巨噬細胞因 LPS 刺激所增加整體蛋白的 tyrosyl phosphorylation。而有趣的是 LPS-induced COX-2 expression，NO production 也因 PP2 的存在而大幅降低。因此我們相信 LPS 所誘導 c-Src 表現量的增加在 LPS 的活化巨噬細胞上扮演重要的角色。惟在本實驗中發現在加入 PP2 處理 24 到 48 小時後，細胞內的 tyrosyl phosphorylation 以及 COX-2 的表現量有些許的回升。這現象可以由 (1) 24 小時後的 PP2 其抑制效果減弱甚而消失了；(2) 另外還有其他非 Src family 的 tyrosine kinases 參與其中來解釋。

我們先在巨噬細胞株 (Raw264.7)，繼而在 murine peritoneal macrophages 發現 LPS-induced c-Src expression。為證明其非 in vitro 情況下的實驗假象 (experimental artifact)，我們進一步以老鼠做實驗，檢測其在 LPS 刺激後，其巨噬細胞的生理反應。結果相較於注射 PBS 的老鼠，注射 LPS 的老鼠其巨噬細胞內 c-Src 表現量是增加的。這說明了 LPS 的誘發 c-Src 蛋白表現量不但真的發生於動物

體內的巨噬細胞，而且也可能在 LPS 的活化巨噬細胞上扮演一重要的角色。而這個發現也可以解釋為什麼 triple knockout mice (*lyn*^{-/-} *hck*^{-/-} *fgr*^{-/-}) 和正常老鼠的巨噬細胞在 LPS 的刺激後有相似的生理反應。我們認為 LPS 所誘發 c-Src 表現量的增加補上了 triple knockout mice 所剔除的 Src 家族成員，而使其巨噬細胞仍保有傳遞 LPS 訊息的能力。要證明這個假說則有待進一步培育 *lyn*^{-/-} *hck*^{-/-} *fgr*^{-/-} *src*^{-/-} 老鼠，觀察其巨噬細胞受 LPS 活化的情形，才能有結論。

在本論文實驗中，我們雖然發現 LPS 可誘發 c-Src 蛋白表現量增加，但對於其分子機轉仍不甚清楚。因此接下來值得探討的是 (1) *c-src* gene 上的 LPS- responsive element (LRE) 在那裡? (2) 與 *c-src* LRE 結合的轉錄因子為何? 此外 LPS 透過何種訊息傳遞增加 *c-src* transcription 及 c-Src 蛋白量也是值得再進一步探討的課題。

參考文獻 (Reference)

Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN. (2002) Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infection & Immunity*. 70, 6068-74.

An SJ, Pae HO, Oh GS, Choi BM, Jeong S, Jang SI, Oh H, Kwon TO, Song CE, Chung HT. (2002) Inhibition of TNF-alpha, IL-1beta, and IL-6 productions and NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don *International Immunopharmacology*. 2, 1173-81.

Anderson D, Joch CA, Gery L, Ellis C, Moran MF, Pawson T. (1990) Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* 250, 979-982.

Beaty CD, Franklin TL, Uehara Y, Wilson CB.(1994) Lipopolysaccharide induced cytokine production in human monocytes: Role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur. J. Immunol*. 24, 1278-1284.

Beutler B, Rietschel ET. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews. Immunology*. 3, 169-76.

Blonska M, Czuba ZP, Krol W. (2003) Effect of flavone derivatives on interleukin-1beta (IL-1beta) mRNA expression and IL-1beta protein synthesis in stimulated RAW 264.7 macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*. 57, 162-6.

Courtenidge SA, Levinson AC, Bishop MJ. (1980) The protein encoded by the transforming gene of avian sarcoma virus pp60^{src} and a homologous protein pp60^{proto-src} in normal cells are associated with the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77, 3783-3987.

Didier Heumann, and Thierry Roger. (2002) Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta* 323, 59-72

Ejima K, Layne MD, Carvajal IM, Nanri H, Ith B, Yet SF, Perrella MA. (2002) Modulation of the thioredoxin system during inflammatory responses and its effect on heme oxygenase-1 expression. *Antioxidants & Redox Signaling*. 4, 569-75.

Ernst M, Inglese M, Scholz GM, Harder KW, Clay FJ, Bozinovski S, Waring P, Darwiche R, Kay T, Sly P, Collins R, Turner D, Hibbs ML, Anderson GP, Dunn AR. (2002) Constitutive activation of the SRC family kinase Hck results in spontaneous pulmonary inflammation and an enhanced innate immune response. *Journal of Experimental Medicine*. 196, 589-604.

Eugenin EA, Branes MC, Berman JW, Saez JC. (2003) TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. *Journal of Immunology*. 170, 1320-8.

Fazioli F, Minichiello L, Matoska V, Castagnino P, Miki T, Wong W, Di Fiore P. (1993). Eps8, a substrate for the epidermal growth factor receptor kinase, enhances EGF-dependent mitogenic signals. *EMBO J*. 12, 3799-808.

Galanos C, Ludcritz O, Rietschel E.Th, Westphal O. (1977) Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with special reference to their lipid A component. In: *International Review of Biochemistry, Biochemistry of Lipid II*. 14, 239-335.

Grossman BJ, Shanley TP, Odoms K, Dunsmore KE, Denenberg AG, Wong HR. (2002) Temporal and mechanistic effects of heat shock on LPS-mediated degradation of $\text{I}\kappa\text{-B}\alpha$ in macrophages. *Inflammation*. 26, 129-37.

Habara T, Nakatsuka M, Konishi H, Asagiri K, Noguchi S, Kudo T. (2002) The biological effects of antiadhesion agents on activated RAW264.7 macrophages. *Journal of Biomedical Materials Research*. 61, 628-33.

Knirel YA. (1990) Polysaccharide antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol*. 17, 273-304

Lei MG, and Morrison DC (1998) Specific endotoxin lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes I. Detection of lipopolysaccharide-binding sites on splenocytes and splenocyte subpopulations. *J.Immunol.* 141, 996-1005.

Lei MG, and Morrison DC (1998) Specific endotoxin lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes II. Membrane localization and binding characteristics. *J.Immunol.* 141, 1006-1011.

Lei MG, Stimpson SA, Morrison DC. (1991) Specific endotoxin lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes III. Binding specificity and characterization. *J. Immunol.* 147, 1925-1932.

Levy BT, Sorge LK, Meymandi A, Maness PF. (1984) pp60c-src kinase is in chick and human embryonic tissues. *Dev Boil.*104, 9-17.

Maa MC, Lai JR, Lin RW, Leu TH. (1999) Enhancement of tyrosyl phosphorylation and protein expression of eps8 by v-Src. *Biochim Biophys Acta.* 1450, 341-51.

Megan TB, and Jonathan AC. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta.* 1287, 121-149.

Moran MF, Koch CA, Anderson D, Ellis C, England L, Martin GS, Pawson T. (1990) Src homology region 2 domains direct proteinprotein interactions in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87, 8622-8626.

Morr M, Takeuchi O, Akira S, Simon MM, Muhlradt PF. (2002) Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *European Journal of Immunology.* 32, 3337-47.

Nogare D. (1991) Southwestern Internal Medicine Conference: Septic Shock. *Am. J. Med. Sci.* 302, 50-65.

Otto H, Artur JU, Helmut B, Hans-Dieter F, Ernst TR. (1996) Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Mic.* 16, 83-104.

Park SJ, Lee SC, Hong SH, Kim HM. (2002) Degradation of I κ -B α in activated RAW264.7 cells is blocked by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *Cell Biology & Toxicology*. 18, 121-30.

Pfeiffer R. (1892) Untersuchungen uber das Choleragift. *Z. Hyg.* 11, 393-412.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, Brade H. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 218, 217-225.

Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller Loennies S, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schonbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade UF, Di Padova F, Kusumoto S, Schumann RR. (1996) Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response and immunological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 216, 39-81.

Rosen MK, Yamazaki T, Gish GD, Kay CM, Pawson T, Kay LE (1995) Direct demonstration of an intramolecular SH2-phosphotyrosine interaction in the Crk protein. *Nature* 374, 477-479.

Schilling D, Thomas K, Nixdorff K, Vogel SN, Fenton MJ. (2002) Toll-like receptor 4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP)/myeloid differentiation protein 88 adapter-like (Mal) contribute to maximal IL-6 expression in macrophages. *Journal of Immunology*. 169, 5874-80.

Sengupta M, and Bishayi B. (2002) Effect of lead and arsenic on murine macrophage response. *Drug & Chemical Toxicology*. 25, 459-72.

Silva D, Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. (2001) Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. *J Biol Chem*. 276, 21129– 35.

Smart JE, Oppermann H, Czermilofsky AP, Purchio AF, Erikson RL, Bishop JM. (1981) Characterization of site for tyrosine phosphorylation

in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src). *Proc Natl Acad Sci USA*. 78, 6013-6017.

Stefanova I, Corcoran ML, Horak EM, Wahl LM, Bolen JB, Horak ID. (1993) Lipopolysaccharide induced activation of CD14 associated protein tyrosine kinase p53/56 lyn. *J. Biol. Chem.* 269, 2241-2244.

Suzuki F, Okayasu H, Tashiro M, Hashimoto K, Yokote Y, Akahane K, Hongo S, Sakagami H. (2002) Effect of lignins and their precursors on nitric oxide, citrulline and asparagine production by mouse macrophage-like Raw 264.7 cells. *Anticancer Research*. 22, 2719-24.

Telepnev M, Golovliov I, Grundstrom T, Tarnvik A, Sjostedt A. (2003) *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF-alpha and IL-1 from murine macrophages. *Cellular Microbiology*. 5, 41-51.

Touhara K, Ingless J, Pitcher J, Shaw G, Lefkowitz R. (1994) Binding of G protein bg-subunits to pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* 269, 10217-20.

Unger F.M. (1981) The chemistry and biological significance of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo). *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 38, 323-387.

Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN. (2001) MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, 276, 38044– 51.

Zhang Y, and Bliska JB. (2003) Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to *Yersinia* infection. *Infection & Immunity*. 71, 1513-9.

Zhou YQ, Chen YQ, Fisher JH, Wang MH. (2002) Activation of the RON receptor tyrosine kinase by macrophage-stimulating protein inhibits inducible cyclooxygenase-2 expression in murine macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 38104-10.

Time (hr): 0 0.5 1 1.5 2 4 12 24 48

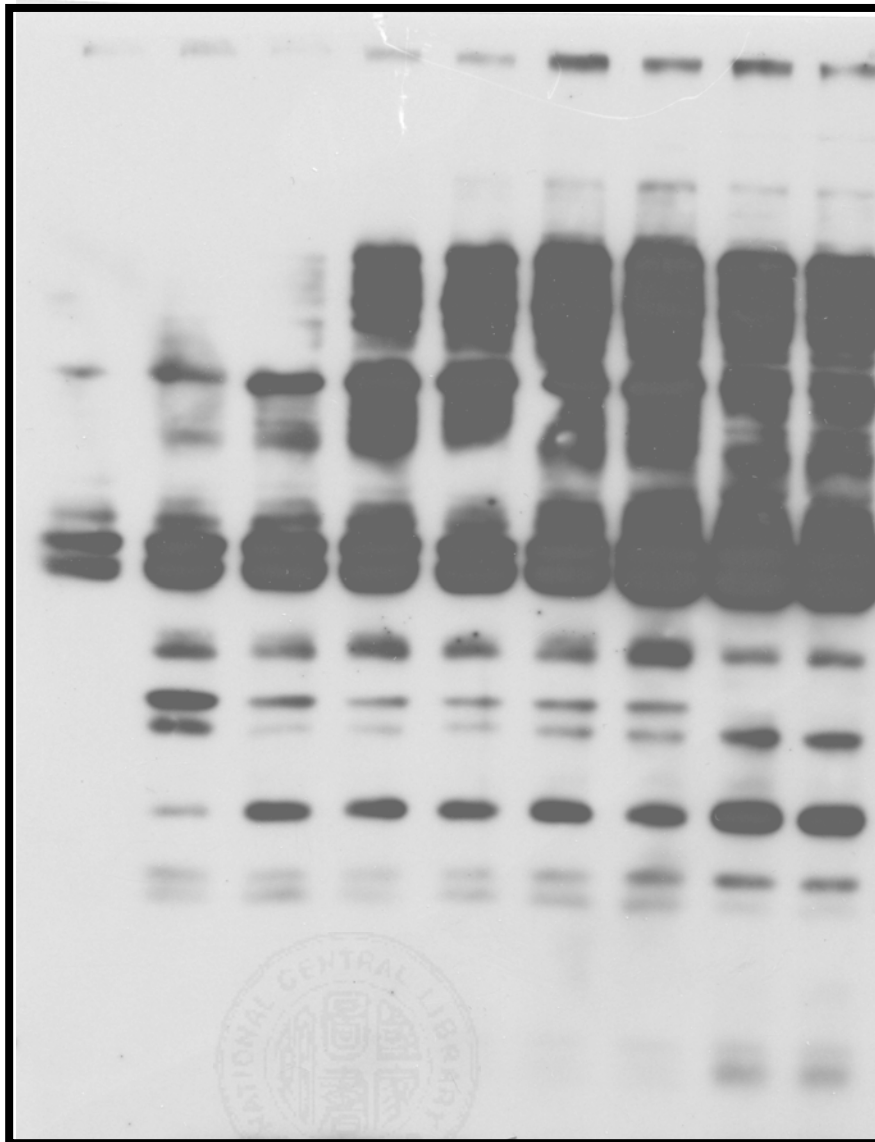
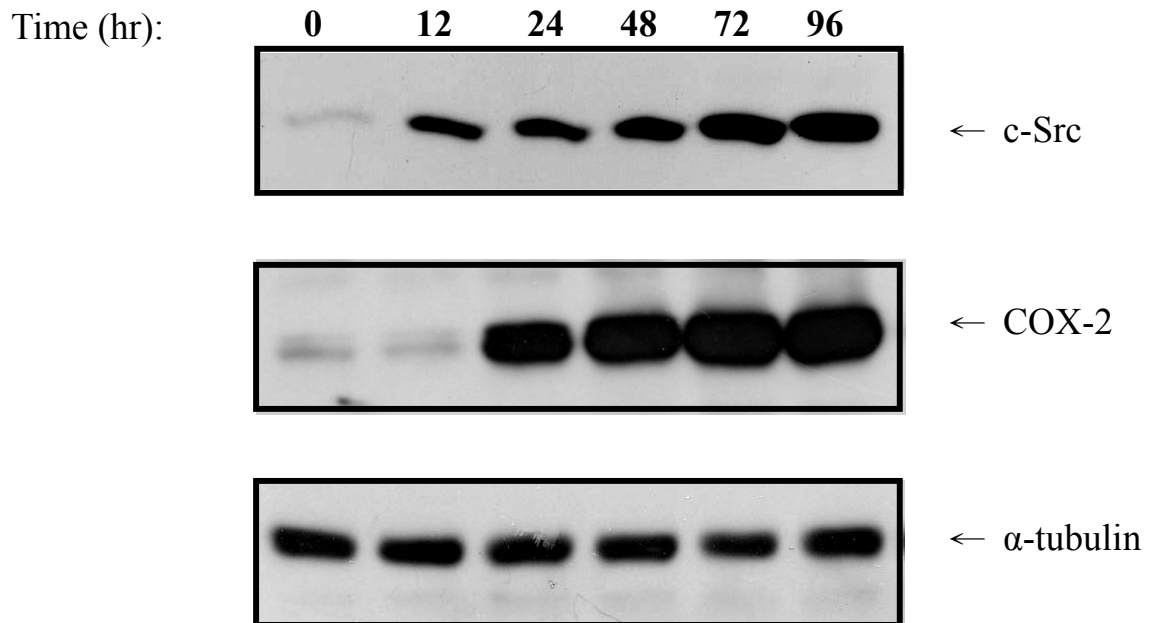


Figure 1. Enhanced tyrosyl phosphorylation in LPS-treated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with or without LPS (100 ng/ml) for various times as indicated. Equal amounts of lysates (100 μ g) were analyzed by Western immunoblotting with anti- pTyr antibody.

A.



B.

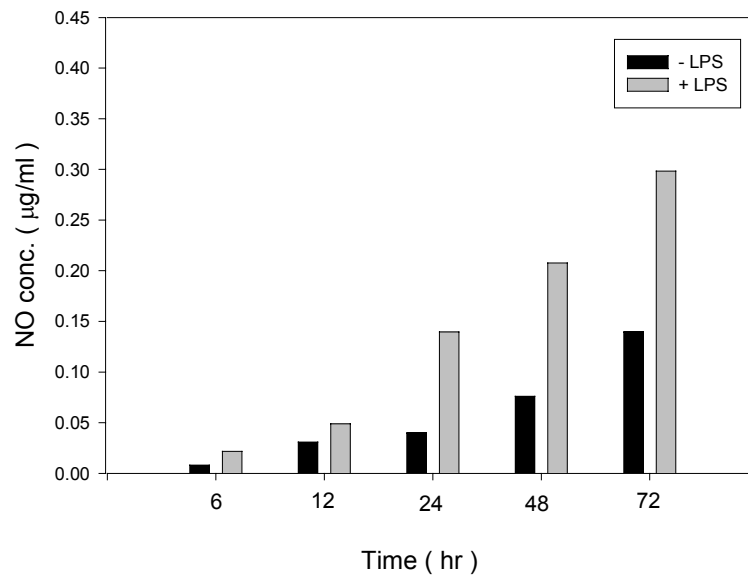
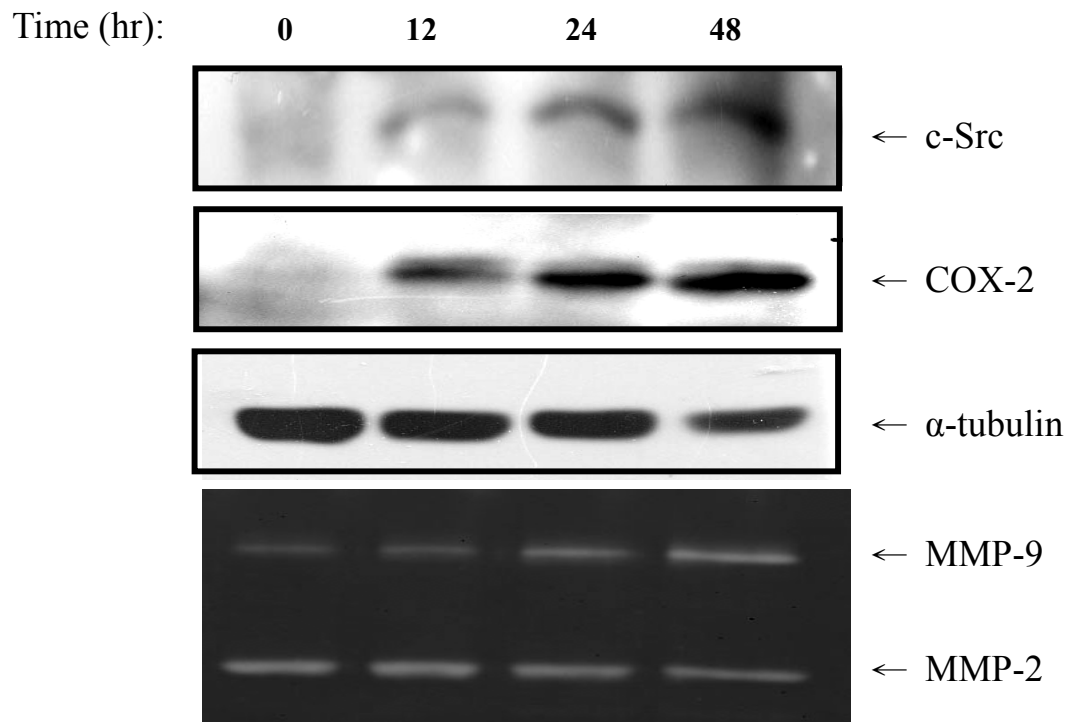


Figure 2. Enhanced c-Src expression in LPS-treated Raw264.7 macrophage cells.

(A) Raw 264.7 cells were treated with or without LPS (100 ng/ml) for various times as indicated. Total lysates (100 μ g) were analyzed directly by Western immunoblotting with anti-Src; anti-COX-2 and anti-tubulin antibodies. (B) The NO₂ generated in the medium was measured with Greiss reagent.

A.



B.

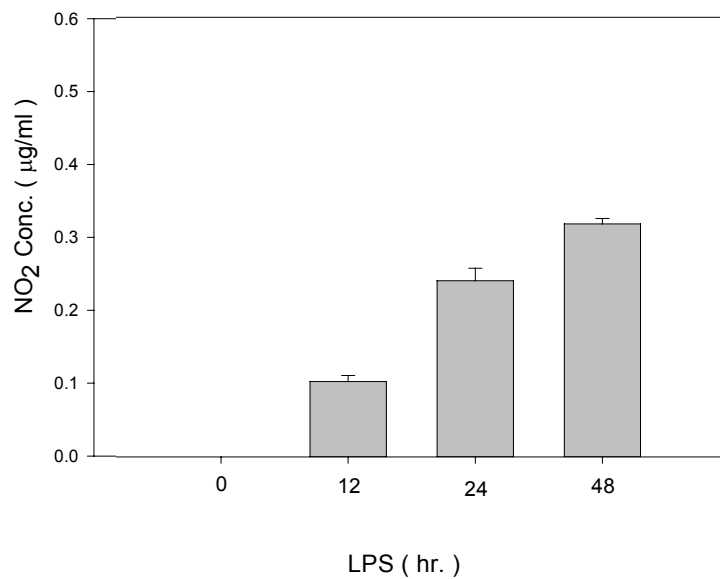


Figure 3. Enhanced c-Src expression in rat peritoneal macrophages upon LPS exposure. (A) Total lysates (100 µg) prepared from rat peritoneal macrophages that treated with or without LPS for various times as indicated were analyzed directly by Western immunoblotting with anti-Src; anti-COX-2 and anti-tubulin antibodies. (B) The NO₂ generated in the medium was measured with Greiss reagent.

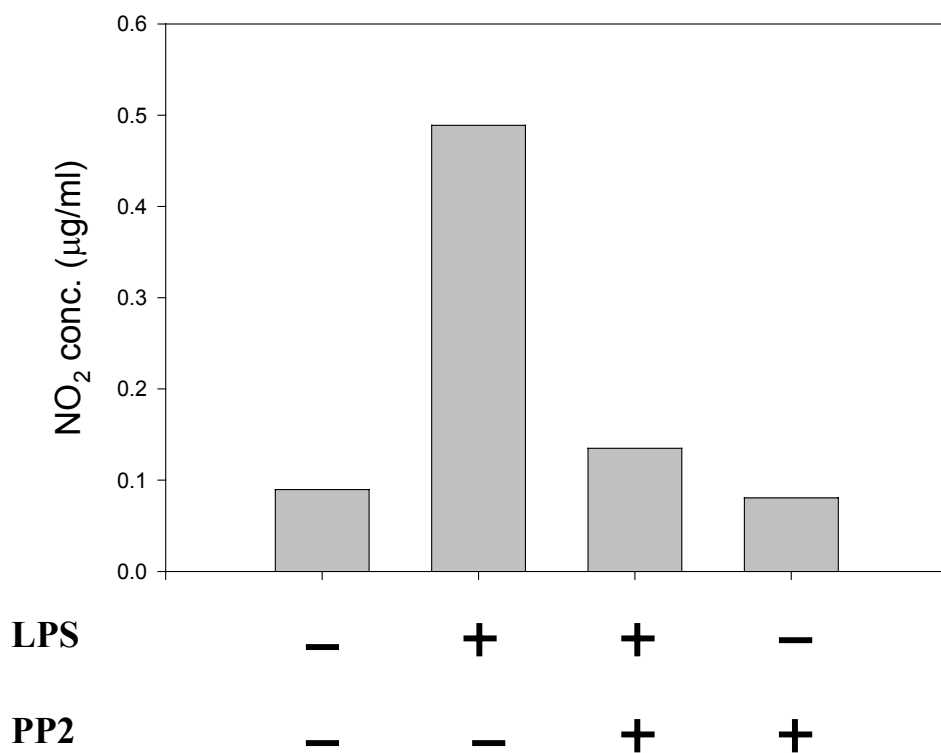


Figure 4. Abrogation of LPS-induced NO₂ production by PP2 treatment in Raw264.7 macrophage cells. Raw 264.7 cells were pretreated with PP2 (30 µM) and incubated with LPS (100 ng/ml) for 24 hours. The NO₂ generated in the medium was measured with Greiss reagent.

Time (hr)	0	0.5	1	1.5	2	4	12	24	48	2	4	12	24	48
PP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

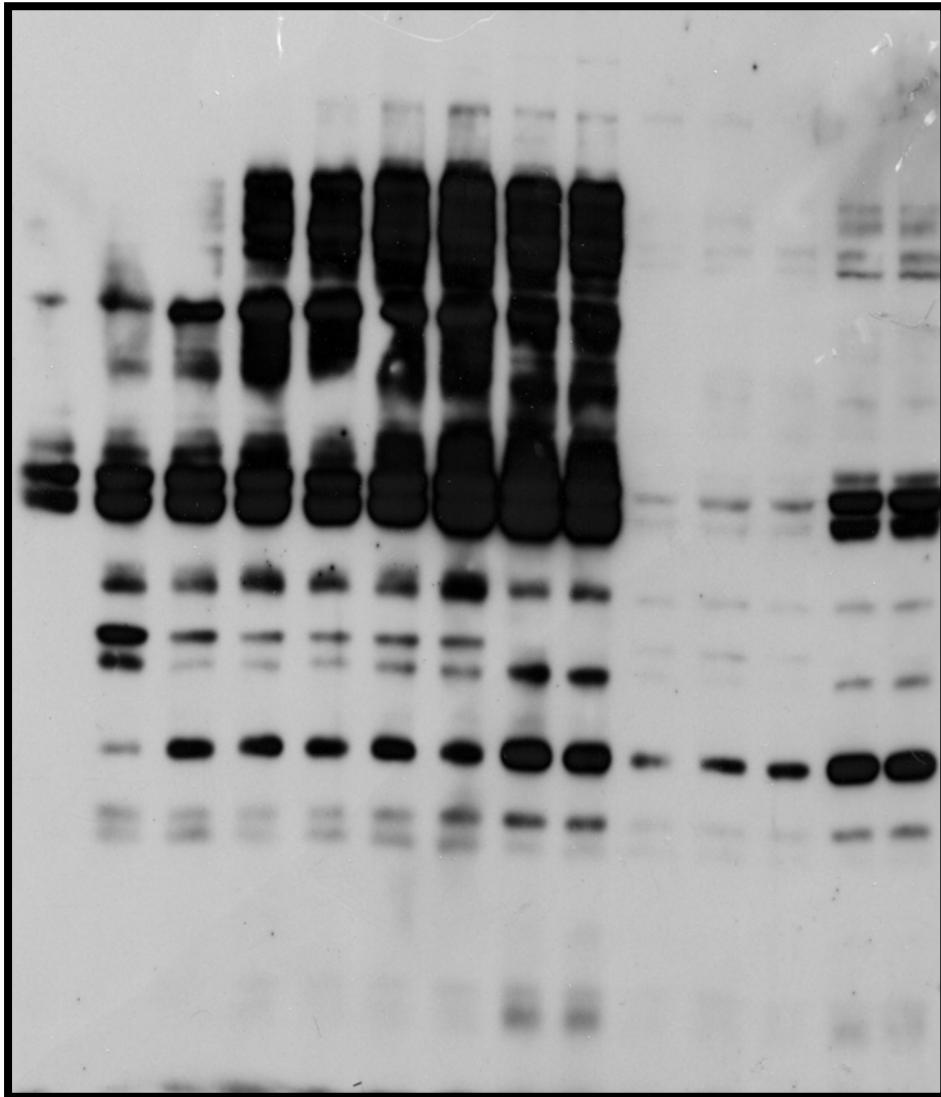
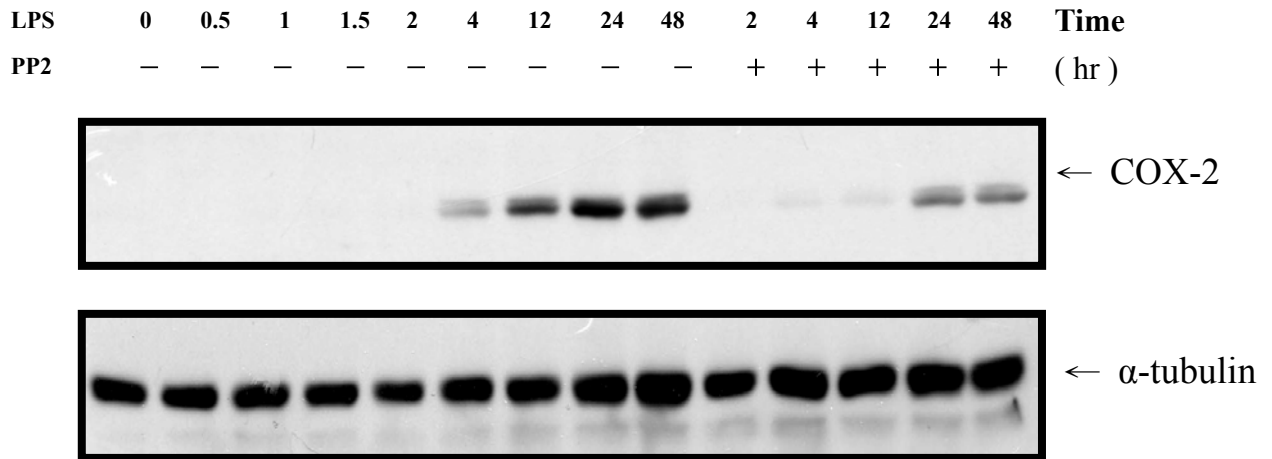


Figure 5. PP2 could decrease tyrosyl phosphorylation in response to LPS in Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with LPS (100 ng/ml) for various times as indicated. For the PP2 treatment experiment, PP2 was added to the medium after 100 min LPS stimulation. Sample were collected at the various time points as indicated. Equal amounts of lysates (100 μ g) were analyzed by Western immunoblotting with anti- pTyr antibody.

A.



B.

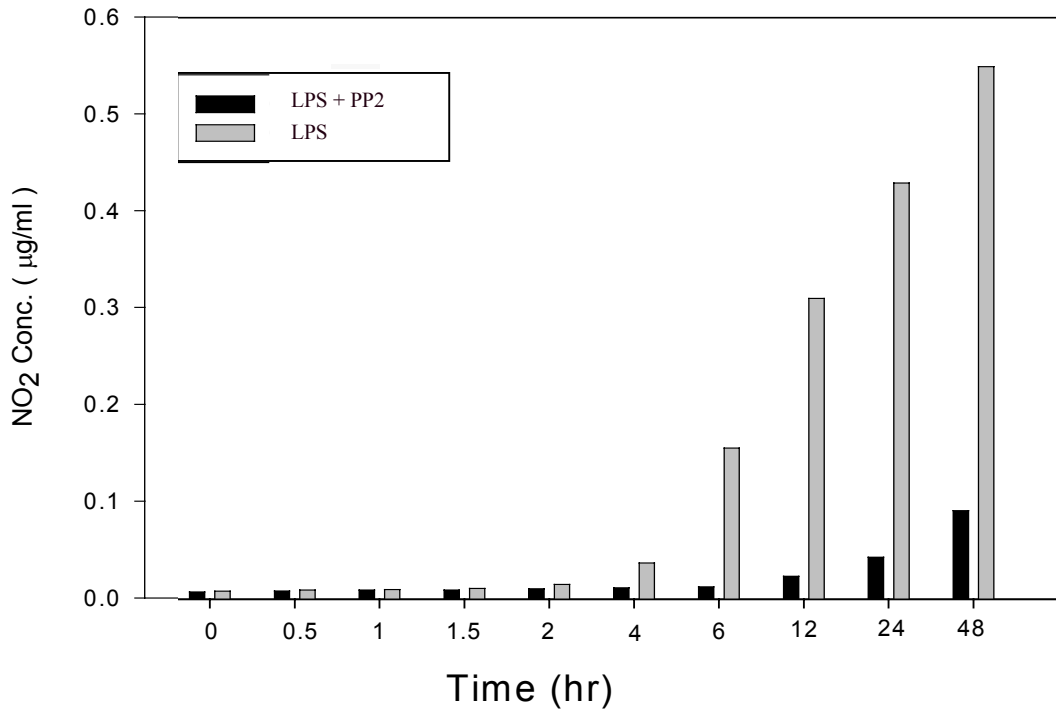


Figure 6. PP2 could decrease LPS-mediated NO production. (A) Raw264.7 cells were treated with LPS (100 ng/ml) for various times as indicated. For the PP2 treatment experiment, PP2 was added to the medium after 100 min LPS stimulation. Samples were collected at the various time points as indicated. Equal amounts of lysates (100 μ g) were analyzed by Western immunoblotting with anti-COX-2 and anti-tubulin antibodies. (B) The NO₂ generated in the medium was measured with Greiss reagent.

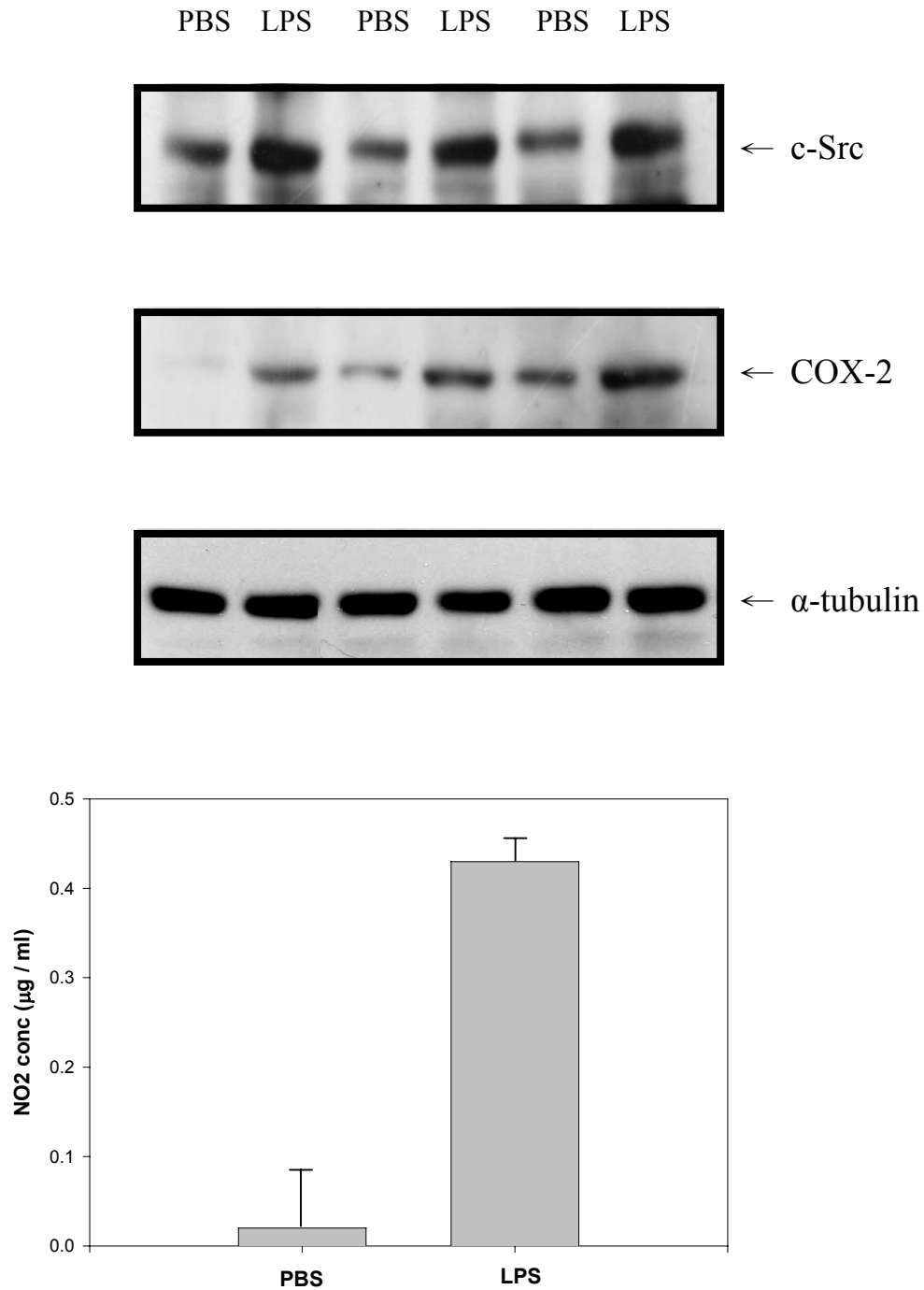


Figure 7. Enhanced c-Src expression in LPS-induced rats. (A) Rat were intraperitoneal inject of sterile PBS or LPS (1 mg/kg) for 24 hours. Total lysates (100 µg) were analyzed directly by Western immunoblotting with anti-Src; anti-COX-2 and anti-tubulin antibodies. (B) The NO₂ generated in the medium was measured with Greiss reagent.