

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 基質金屬蛋白酶在弓蟲性腦炎之變化(第3年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 97-2320-B-040-007-MY3  
執行期間：99年08月01日至100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

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 100年10月24日

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)

Changes of matrix metalloproteinases in encephalitis caused by *Toxoplasma gondii*

基質金屬蛋白酶在弓蟲性腦炎之變化

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2320-B-040-007-MY3

執行期間：2008 年 08 月 01 日至 2011 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 2011 年 08 月 23 日

## 目錄

中文摘要 .....	3
英文摘要 .....	4
前言 .....	4
材料與方法 .....	5
結果 .....	8
討論 .....	10
參考文獻 .....	11
圖、表 .....	14
計劃成果自評 .....	21

## 中文摘要

### 中文摘要

弓蟲 (*Toxoplasma gondii*) 能感染絕大部分的哺乳類動物，包括人。當弓蟲感染免疫不全的宿主常會誘發弓蟲性腦炎 (toxoplasmic encephalitis)。本研究我們利用弓蟲速殖子 (TS-4 strain) 感染星狀膠細胞 (astroglia) 的細胞模式進行研究，探討基質金屬蛋白酶-12 (matrix metalloproteinase-12, MMP-12) 和其受質彈性蛋白 (elastin) 的變化之致病機轉。結果顯示在感染組細胞培養液中發現 MMP-12 蛋白表現量在感染後第 24 小時和第 48 小時開始有明顯的增加。同樣的，彈性蛋白表現量在相同時間點也有顯著的增加。抑制組的星狀膠細胞於感染後分別加入 0.01mM、0.1mM、0.5mM 和 1mM 等四種不同濃度的 MMPs 專一酵素抑制劑 GM6001 共同培養。結果顯示 0.5mM 及 1mM 等兩種濃度，細胞崩解的程度及 MMP-12 和彈性蛋白的蛋白表現量相較於感染組也有明顯的

降低。試驗結果顯示在弓蟲感染星狀膠細胞的發展過程中，MMP-12 扮演降解彈性蛋白的角色。

關鍵詞：弓蟲、基質金屬蛋白酶、腦炎

### 英文摘要

*Toxoplasma gondii* infection in human can induce toxoplasmic encephalitis in immune disorders. In this study, astroglia infected with TS-4 strain *T. gondii* tachyzoite and to investigate the changes of matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) and its substrate elastin in the pathogenesis. The results showed that MMP-12 was found in the cell clutered medium of *T. gondii* infected-astroglia and significantly increased at 24hrs and 48 hrs post-infection (PI). Similarly, the expression of elastin was also increased at the same time points. The inhibitory test of astroglia infected with *T. gondii* was co-cultured with four different concentrations of MMPs inhibitor

GM6001 (0.01mM, 0.1mM, 0.5mM and 1mM). The concentrations of GM6001 on 0.5mM and 1mM were significantly reduced the astroglia degradation, and the expression of MMP-12 and elastin in astroglia infected with *T. gondii*. These results suggested that MMP-12 may contribute to elastin degradation occurring in astroglia infected with *T. gondii*. Thus, we hypothesize that MMP-12 cleave elastin and may contribute to the astroglia reaction and leukocyte migration to the sites of *T. gondii* replication during toxoplasmic encephalitis.

Keywords : *Toxoplasma gondii*; matrix metalloproteinases; encephalitis

## 前言

人類感染弓蟲(*Toxoplasma gondii*)引發的病症日趨重要,例如在懷孕婦女(Desmonts and Couvreur, 1974)或後天免疫缺失症候群(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)病人(Luft and Remington, 1992) 會得到較嚴重的

病徵。免疫缺失病人因為本身的免疫系統已遭到破壞或抑制,所以無法抵抗弓蟲的感染,會表現出明顯的病徵,其中最主要的病徵為弓蟲性腦炎(toxoplasmic encephalitis),該病徵主要是由於弓蟲感染之後破壞中樞神經系統而造成嚴重的腦部傷害(Luft and Remington, 1992),臨床症狀為發燒、頭痛、眼痛、厭食、肌肉痛、淋巴結腫大、精神混亂、昏迷等症狀(Dubey, 1994),病變區多位於腦幹基底神經節、腦下垂體及髓質和皮質交界處,特徵為多發性局部壞死,周圍有炎症細胞的浸潤及速殖子(tachyzoites)的存在,這種弓蟲性腦炎在AIDS病人會迅速造成破壞,若不加以處理,最後往往會造成死亡(Luft et al., 1992; Porter and Sande, 1992),所以弓蟲性腦炎已是AIDS病人感染弓蟲症的一個重要指標。另外,懷孕中的婦女也值得注意,因為婦女在懷孕期間藉由胎盤感染到胎兒會引起流產和胎兒畸形;若是在懷孕後期感染則會造成胎兒的運動障礙,智力發展受損和目盲,亦會併發腦部鈣化、水腦症或脈絡膜視網膜炎(Porter and Sande, 1992)。

基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一種含鋅的金屬酵素，以酵素原型態(proenzyme)產生，能分解細胞外質(extracellular matrix, ECM)。MMPs 家族的蛋白酵素目前共有 28 種，依照其一級結構、受質專一性及在細胞的定位可區分為 collagenases、gelatinases、stromelysins、membrane-type、matrilysin、elastase 及其它 MMPs 等次家族(subfamily) (Gross and Lapiere, 1962; Park et al., 2000; Uriá and Lopez-Otín, 2000)。蛋白質的結構分析顯示，大部分的 MMPs 有三個明確的 domain，分別是維持酵素潛力的 propeptide、含有 conserved cys residue、含鋅結合位的催化區域及扮演受質結合位的 hemopexin-like domain。這些蛋白分解酶(proteolytic enzymes)在生理和病理方面對結締組織的重建佔有重要地位，就如同發炎反應的調節器。本實驗室先前的研究以廣東住血線蟲(*Angiostrongylus cantonensis*)感染鼯鼠，證實 MMP-9 (Lai et al., 2004; Lee et al., 2004)在廣東住血線蟲感染之嗜伊紅性腦膜炎發生過程中扮演重要角色。

本研究室過去幾年來一直專注在多細胞線蟲造成宿主中樞神經系統異常與蛋白分解酵素之關係，研究的結果顯示多細胞線蟲造成宿主中樞神經系統異常之病理機制與治療方式與細菌或病毒所引起之病理機制與治療方式有一些差異。因此本研究建立單細胞原蟲造成宿主中樞神經系統異常與蛋白分解酵素之關係，期望瞭解多細胞線蟲與單細胞原蟲造成宿主中樞神經系統異常之病理機制是否有差異。

## 材料與方法

### 一、細胞株

選用星狀神經膠細胞 (astroglia; astrocyte)細胞株，此細胞株購自食品工業發展研究所菌種中心。以含有 10% FBS 的 DMEM 培養基(2 mM L-glutamine, 0.1 mM NEAA, 1.0 mM sodium pyruvate, 1.5 g/L NaHCO<sub>3</sub>)繼代培養，細胞株的培養依照食品工業發展研究所菌種中心之標準操作方法。

### 二、弓蟲速殖子之製備

選用 TS-4 strain 弓蟲感染細胞株，TS-4 strain 弓蟲購自 American Type Culture Collection (ATCC)，弓蟲的培養及感染依照 ATCC 之標準操作方

### 三、體外試驗：細胞株感染弓蟲速殖子

在無菌操作台上將試驗組 astroglia 細胞株感染弓蟲速殖子分為六組，分別為第 0 小時、第 1 小時、第 6 小時、第 12 小時、第 24 小時、第 48 小時。對照組只有第 24 小時一組，為 astroglia 細胞株未感染弓蟲速殖子並加入等量不含胎牛血清的培養液。

### 四、細胞感染弓蟲速殖子後之細胞培養液(cell clutered medium)的收集

在無菌操作台上將 astroglia 細胞株培養 24 小時後，感染弓蟲速殖子，在感染第 0、1、6、12、24 及 48 小時之細胞培養液收集起來，並觀察細胞的病變程度。收集之培養液，以 12000 rpm 在 4°C 下離心 10 分鐘除去沉澱物，進行蛋白質定量

分析使用將 protein assay kits (BIO-Rad, USA)並以 bovine serum albumin (BSA) 為標準品。將萃取出之新鮮含蛋白質上清液收集起來放置於 -20 度 C 冰箱保存。

### 五、基質金屬蛋白酶抑制試驗

在無菌操作台上將 astroglia 細胞株培養 24 小時後，分別加入弓蟲速殖子和 0.01mM、0.1mM、0.5mM、1mM 等四種不同濃度的 MMPs 專一酵素抑制劑 GM6001 共同培養，分別將感染第 24 小時之細胞培養液收集起來，並觀察細胞的病變程度。收集之培養液，以 12000 rpm 在 4°C 下離心 10 分鐘除去沉澱物，進行蛋白質定量分析使用將 protein assay kits (BIO-Rad, USA)並以 bovine serum albumin (BSA) 為標準品。將萃取出之新鮮含蛋白質上清液收集起來放置於 -20 度 C 冰箱保存。

### 六、西方點墨法(Western blotting)

在無菌操作台上將細胞感染弓蟲速殖子第 0 小時、第 1 小時、第 6 小時、第 12 小時、第 24 小時、第 48 小

時之細胞培養液收集起來，以 12000 rpm 在 4°C 下離心 10 分鐘除去沉澱物，取上清液，進行蛋白質定量分析使用 protein assay kits (BIO-Rad, USA) 並以 bovine serum albumin (BSA) 為標準品。取含有 45 µg 的蛋白質上清液加入 5 µg 的 loading buffer (62.5 mM Tris-HCl、pH 6.8, 10% glycerol、2% SDS、5% 2-mercaptoethanol、0.05% bromophenol) 混合加熱 5 分鐘後進行 SDS-polyacrylamide gel 電泳，將蛋白質轉漬至 polyvinylidene fluoride (PVDF)。將 PVDF 浸泡於含有 0.1% Tween 20 的 PBS (PBS-T) 於室溫下作用 30 分鐘。加入一級抗體(primary antibody) (Anti-elastin 和 Anti-MMP-12) 與 PVDF 於 4°C 作用 2 小時，以 PBS-T 清洗 PVDF 3 次，再加入對應之二級抗體 (HRP-conjugated secondary antibody) 在 4°C 作用 45 分鐘，與附著於 PVDF 上的 primary antibody 作用，以 PBS-T 清洗 PVDF 3 次，反應完畢。再藉由 enhanced chemiluminescence (ECL)(Amersham, UK) 與 HRP 作用產生冷光將 X 光片感光來加以偵測。

## 七、免疫共同沉澱試驗 (Co-Immunoprecipitation)

取 Protein A/G beads (Invitrogen, Taiwan) 20ul，以 1ml PBS wash，10,000 rpm 在 4°C 下離心 2 分鐘 3 次，去除上清液。加入 5% BSA 1ml blocking，放置 360 度旋轉器上，以 6-12 rpm 在 4°C 下轉 1 小時，以 1ml PBS wash，10,000 rpm 在 4°C 下離心 2 分鐘 3 次，去除上清液。加入 sample 及 Goat anti-human elastin polyclonal antibody (Santa cruz, USA) 1:1,000，加入 lysis buffer (0.5 M Tris-HCl、pH 8.0, 120 nM NaCl、0.5% NP-40 or Triton X-100) 至 500ul，放置搖擺器，6-12rpm 在 4°C 下轉 24 小時。取 1ml lysis buffer wash 離心 10,000 rpm 2 分鐘 2 次。以 1ml PBS wash，10,000 rpm 在 4°C 下離心 2 分鐘、3 次，去除上清液。再將蛋白質上清液加入等量的 sample buffer (62.5 mM Tris-HCl、pH 6.8, 10% glycerol、2% SDS、5% 2-mercaptoethanol、0.05% bromophenol) 混合加熱 5 分鐘後進行 SDS-polyacrylamide gel 電泳，將蛋白質轉漬至 PVDF (Pall, USA)。將



PVDF 浸泡於含有 0.1% Tween 20 的 PBS (PBS-T) 於室溫下作用 30 分鐘。加入一級抗體 (primary antibody) Rabbit anti-human MMP-12 monoclonal antibody (Abcam, UK) 1:1,000 與 PVDF 於 4°C 作用 2 小時，以 PBS-T 清洗 PVDF 3 次，再加入對應之二級抗體 HRP-conjugated anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch, USA) 1:3,000 在 4°C 作用 45 分鐘，與附著於 PVDF 上的 primary antibody 作用，以 PBS-T 清洗 PVDF 3 次。再藉 ECL (Amersham, UK) 與 HRP 作用產生冷光，將 X 光片感光來加以偵測。

## 結果

### 一、觀察弓蟲速殖子感染星狀膠細胞後之形態變化

在光學顯微鏡下觀察弓蟲速殖子感染星狀膠細胞後，星狀膠細胞的細胞形態變化。結果顯示感染前 (圖一，a) 和感染後的第 1 小時，細胞形態沒什麼改變 (圖一，b)；感染後的第 6 小時，細胞內已可發現到弓蟲速殖子的存在 (圖一，c)；感染後的第

12 小時，細胞形態開始有崩解現象出現，細胞內也可發現到弓蟲速殖子的存在 (圖一，d)；感染後的第 24 小時，70% 的細胞形態呈現崩解現象，細胞內仍可見弓蟲速殖子的存在 (圖一，e)；感染後的第 48 小時，90% 的細胞呈現崩解現象，細胞內尚具弓蟲速殖子 (圖一，f)。

### 二、細胞培養液中 MMP-12 蛋白表現量

藉由西方點墨法分析弓蟲速殖子感染星狀膠細胞後，細胞培養液中 MMP-12 蛋白表現量 (圖二，a)。量化分析的結果顯示從感染後的第 6 小時，MMP-12 蛋白表現量開始增加；感染後的第 24 小時和第 48 小時，MMP-12 蛋白表現量達到高點。(P < 0.05; 圖二，b)。

### 三、細胞培養液中彈性蛋白蛋白表現量

藉由西方點墨法分析弓蟲速殖子感染星狀膠細胞後的細胞培養液中彈性蛋白的蛋白表現量。結果顯示感染後第 24 小時及第 48 小時可以檢測到

68kDa、58kDa、55kDa 和 25kD 等 4 條不同分子量的蛋白條帶。分子量 68kDa 為原彈性蛋白，分子量 58kDa、55kDa 和 25kD 分別為被降解的彈性蛋白產物 (elastin degradation products) (圖三, a)。量化分析的結果顯示弓蟲速殖子感染星狀膠細胞後的第 24 小時和第 48 小時，彈性蛋白表現量達到高點。(P<0.05;圖三, b)。

#### 四、酵素抑制劑 GM6001 對弓蟲速殖子感染星狀膠細胞之抑制作用

在光學顯微鏡下觀察弓蟲速殖子感染星狀膠細胞並加入酵素抑制劑 GM6001 共同培養 24 小時。結果顯示感染後的第 24 小時，70%的細胞呈現崩解現象，細胞內可發現到弓蟲速殖子的存在 (圖四, a); 感染後並加入 100% DMSO 後的第 24 小時，50%的細胞呈現崩解現象，細胞內仍見到弓蟲速殖子的存在 (圖四, b); 感染後並加入 0.01mM GM6001 後的第 24 小時，70%的細胞呈現崩解現象，細胞內也可發現到弓蟲速殖子的存在 (圖四, c); 感染後並加入 0.1mM GM6001 後的第 24 小時，70%的細胞呈現崩解

現象，細胞內也可發現弓蟲速殖子的存在 (圖四, d); 感染後並加入 0.5mM (圖四, e) 和 1mM GM6001 (圖四, f) 後第 24 小時的細胞崩解現象，相較於未處理的感染組及加入 0.01mM 和 0.1mM GM6001 的感染組有明顯的降低，且仍可見弓蟲速殖子存在細胞內。

#### 五、加入酵素抑制劑 GM6001 對細胞培養液中 MMP-12 蛋白表現量的影響

藉由西方點墨法分析弓蟲速殖子感染星狀膠細胞並加入酵素抑制劑 GM6001 共同培養 24 小時，分析細胞培養液中各組別 MMP-12 蛋白表現量。結果顯示 GM6001 濃度為 0.01mM 和 0.1mM 時，MMP-12 的蛋白表現量和未處理的感染組差不多。在 0.5mM 時，MMP-12 蛋白表現量大約減少 74%; 在 1mM 時，MMP-12 蛋白表現量大約減少 76% (圖五, a)。量化分析的結果顯示 MMP-12 蛋白表現量隨著 GM6001 濃度的增加而減少，在統計上有顯著差異。(P<0.05;圖五, b)。

#### 六、加入酵素抑制劑 GM6001 對細胞培養液中彈性蛋白表現量的影

響

藉由西方點墨法分析弓蟲速殖子感染星狀膠細胞並加入酵素抑制劑 GM6001 共同培養 24 小時，分析細胞培養液中各組別彈性蛋白表現量。結果顯示 GM6001 濃度為 0.01mM 和 0.1mM 時，可以檢測到 68kDa、58kDa、55kDa 和 25kD 等 4 條不同分子量的蛋白條帶。分子量 68kDa 為原彈性蛋白，分子量 58kDa、55kDa 和 25kD 分別為被降解的彈性蛋白，4 條不同分子量的彈性蛋白表現量和未處理的感染組差不多。在 0.5mM 時，68kDa、58kDa、55kDa 和 25kD 等 4 條不同分子量的蛋白表現量大約減少 98%、97%、100%和 100%；在 1mM 時，68kDa、58kDa、55kDa 和 25kD 等 4 條不同分子量的蛋白表現量大約減少 95%、94%、100%和 100%(圖六，a)。量化分析結果顯示 4 條不同分子量的彈性蛋白表現量隨著 GM6001 濃度的增加而減少，在統計上有顯著差異。(P<0.05；圖六，b)。

七、MMP-12 與彈性蛋白之相互作用  
利用免疫共同沉澱技術檢測弓蟲

速殖子感染星狀膠細胞 24 小時之細胞培養液中，MMP-12 與彈性蛋白是否存在交互作用。免疫共同沉澱結果顯示在 45kDa 的位置出現清晰的條帶，此結果顯示 MMP-12 與彈性蛋白兩者有交互作用 (圖七)。

## 討論

GM6001 可與 MMPs 鋅離子活化位螯合使 MMPs 無法活化 (Galardy *et al.*, 1994; Chintda *et al.*, 2003)，因此臨床上常用此合成的廣效型 MMPs 專一性的酵素抑制劑來調控 MMPs 活性。當中樞神經系統受到外來傷害時，會造成神經細胞受損並伴隨 MMP-9 的上升，經由 GM6001 治療後，MMP-9 下降、神經細胞傷害減少 77% ( Nguyen *et al.*, 2007)。巴氏阿米巴原蟲 (*Balamuthia mandrillaris*) 感染所造成的致命性肉芽腫腦炎 ( fatal granulomatous encephalitis )，經由 GM6001 處理後，MMP 和 ECM 降解有減少的趨勢 (Matin *et al.*, 2006)。本研究以 0.01mM、0.1mM、0.5mM、1mM 等四種不同濃度的 GM6001 處理受弓蟲速殖子感染的星狀膠細胞，評估酵素抑制劑

對星狀膠細胞感染弓蟲後誘發之 MMP-12及細胞病癥之抑制作用。本試驗所使用的 GM6001 溶於 100% DMSO，因此試驗中加入一組 100% DMSO 處理感染弓蟲的星狀膠細胞當作控制組。試驗結果顯示抑制組在 0.5mM 和 1mM 時，細胞形態完好無崩解現象，而在蛋白表現量上 MMP-12 有明顯的減少。而 68kDa 的原彈性蛋白，58kDa、55kDa 和 25kDa 被降解的彈性蛋白，幾乎偵測不到。若各將 1mM 和 100% DMSO 與感染組相比較，在抑制 MMP-12 的表現上，GM6001 約佔 78% 而 DMSO 約抑制 22%，而原彈性蛋白抑制效果上 GM6001 約佔 83% 而 DMSO 約抑制 17%。結果顯示 GM6001 處理過後，細胞形態完好，MMP 抑制效果佳。推測弓蟲感染星狀膠細胞後，在接受 MMP 抑制劑 GM6001 處理後，具有抑制 MMP-12 的效果，減少星狀膠細胞崩解及活化發炎的現象。

### 參考文獻

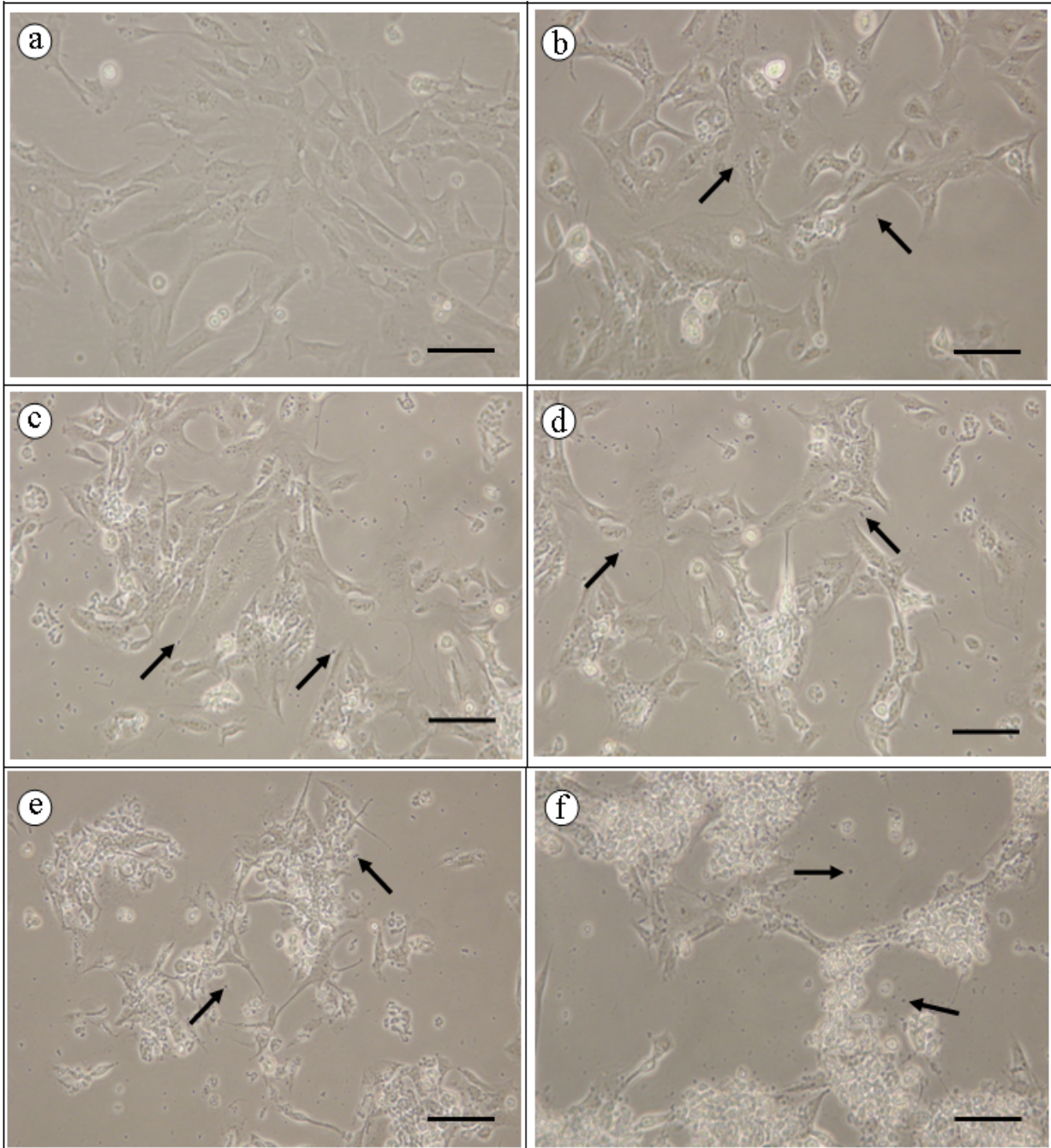
- Chintda, Santiskulvong., Enrique, Rozengurt., 2003. Galardin (GM 6001), a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, blocks bombesin- and LPA-induced EGF receptor transactivation and DNA synthesis in rat-1 cells. *Experimental Cell Research* 290, 437-446.
- Desmonts G, Couvreur J. 1974. Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 50, 146-159.
- Dubey, J. P. 1994. Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 205, 1593-1598.
- Galardy, R.E., Cassabonne, M.E., Giese, C., Gilbert, J.H., Lapierre, F., Lopez, H., Schaefer, M. E., Stack, R., Sullivan, M., and Summers, B., 1994. Low molecular weight inhibitors in corneal ulceration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 732, 315-323.
- Gross, J., and Lapiere, C. M. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissue: A tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences* 48, 1014-1022.
- Lai, S. C., Twu, J. J., Jiang, S. T., Hsu, J. D., Chen, K. M., Chiaing, H. C., Wang, C. J., and Lee, H. H. 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.
- Lee, H. H., Chou, H. L., Chen, K. M., and Lai, S. C. 2004. Association of matrix-metalloproteinase-9 in eosinophilic meningitis of BALB/c mice caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitology Research*. 94, 321-328.
- Luft BJ, Remington JS. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clinical infectious diseases* 15, 211-222.
- Matin, A., Stins, M., Kim, K.S., Khan, N.A., 2006. *Balamuthia mandrillaris* exhibits metalloprotease activities. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 47, 83-91.
- Nguyen, H.X., O'Barr, T.J., Anderson, A.J., 2007. Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF-alpha. *Journal of Neurochemistry* 102, 900-912.
- Park, H. I., Ni, J., Gerkema, F. E., Liu, D., Belozero, V E., and Sang, Q-X. A. 2000. Identification and characterization of human endometase (matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 20540-20544.
- Porter SB, Sande MA. 1992. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England journal of medicine* 327, 1643-1648.
- Uría, J. A., and López-Otín, C. 2000. Regulation of collagenase-3

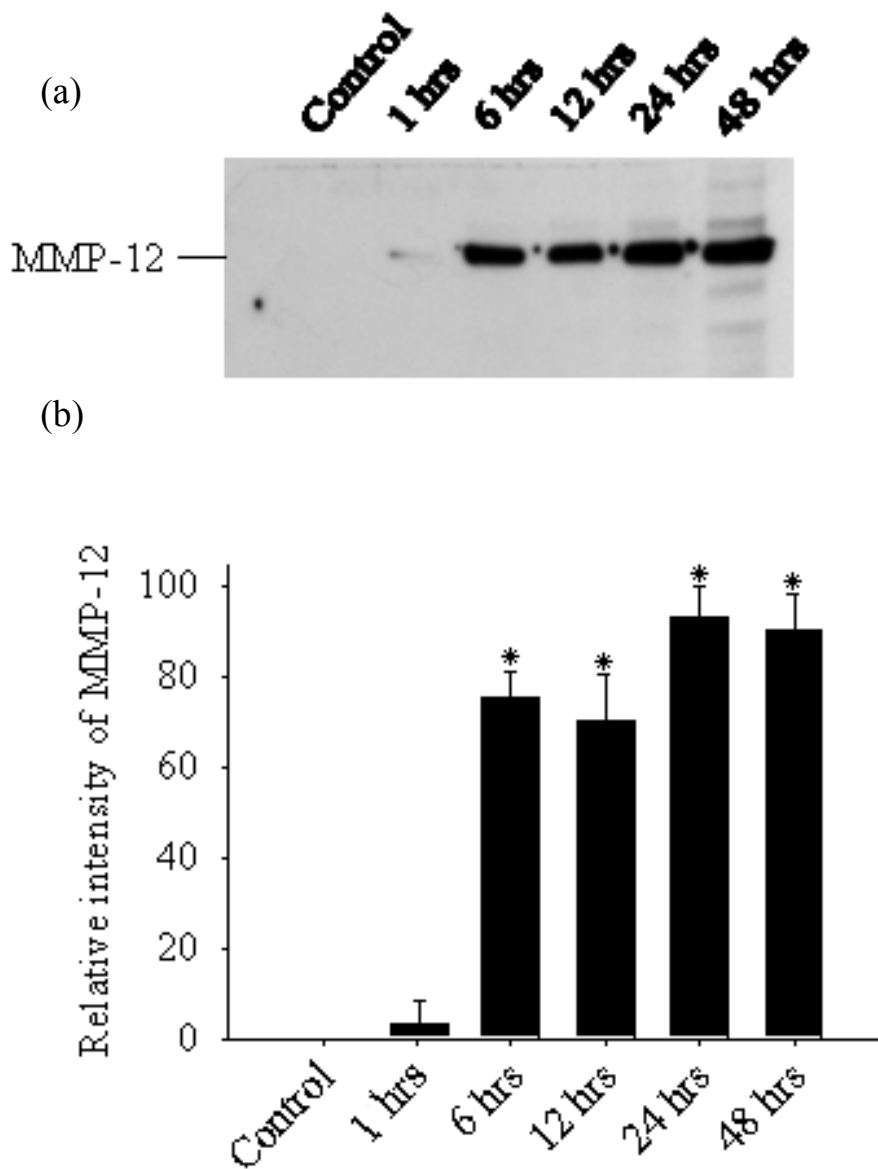
expression in human breast  
carcinomas is mediated by

stromal-epithelial cell interactions.  
*Cancer Research* 60, 4745-4751.

圖、表

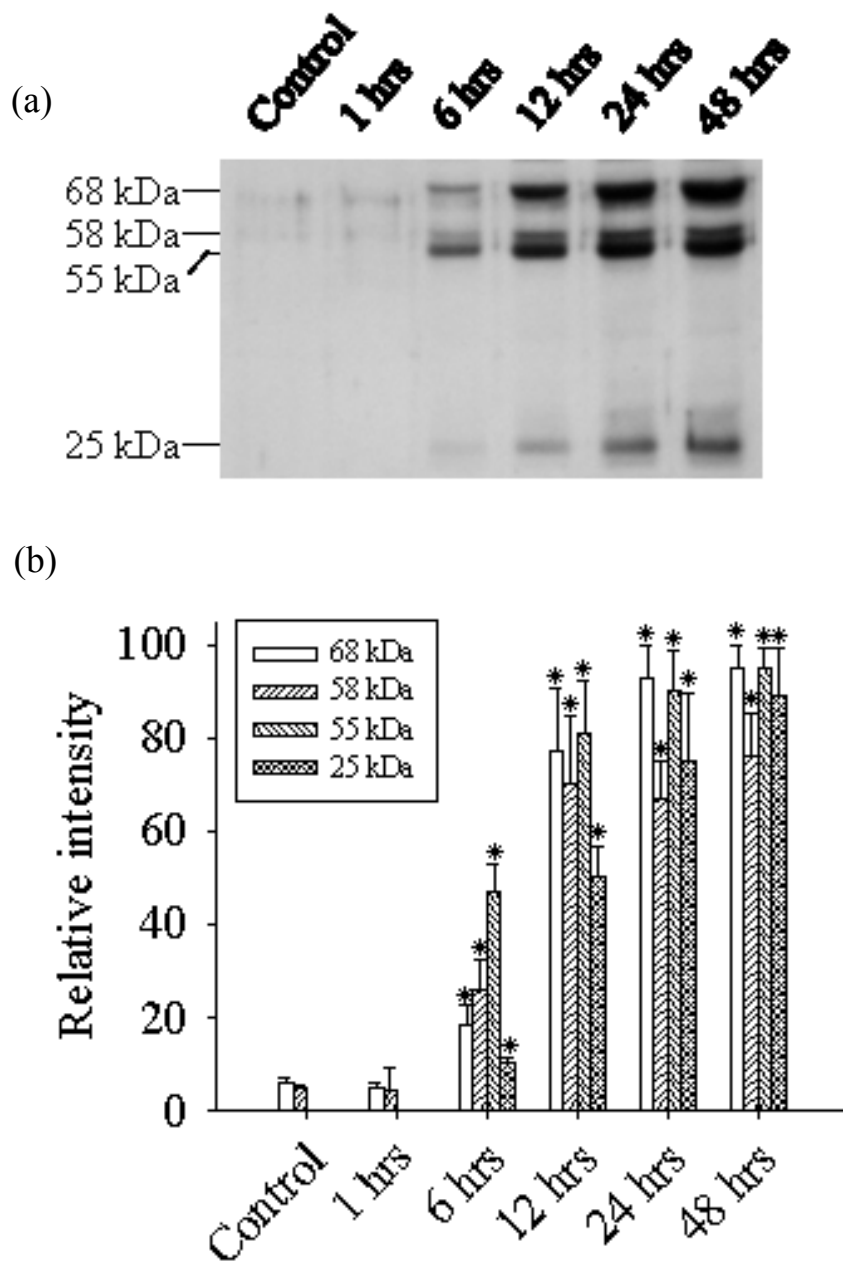


圖一、觀察弓蟲速殖子感染星狀膠細胞後之形態變化。(a) 未感染細胞。(b) 感染後第 1 小時。(c) 感染後第 6 小時。(d) 感染後第 12 小時。(e) 感染後第 24 小時。(f) 感染後第 48 小時。箭號所指為弓蟲。Bar scale= 40µm。



圖二、弓蟲速殖子感染星狀膠細胞之細胞培養液中基質金屬蛋白酶-12(matrix metalloproteinases-12, MMP-12)蛋白質的表現。(a) MMP-12(分子量 45kDa) bands，以 control 組的表現量做為 base-line。(b) MMP-12 在各時間點蛋白質表現量是利用 computer-assisted imaging densitometer system 進行定量分析，在感染後第 6、12、24 及第 48 小時有顯著的增加 (\* $P < 0.05$ )。

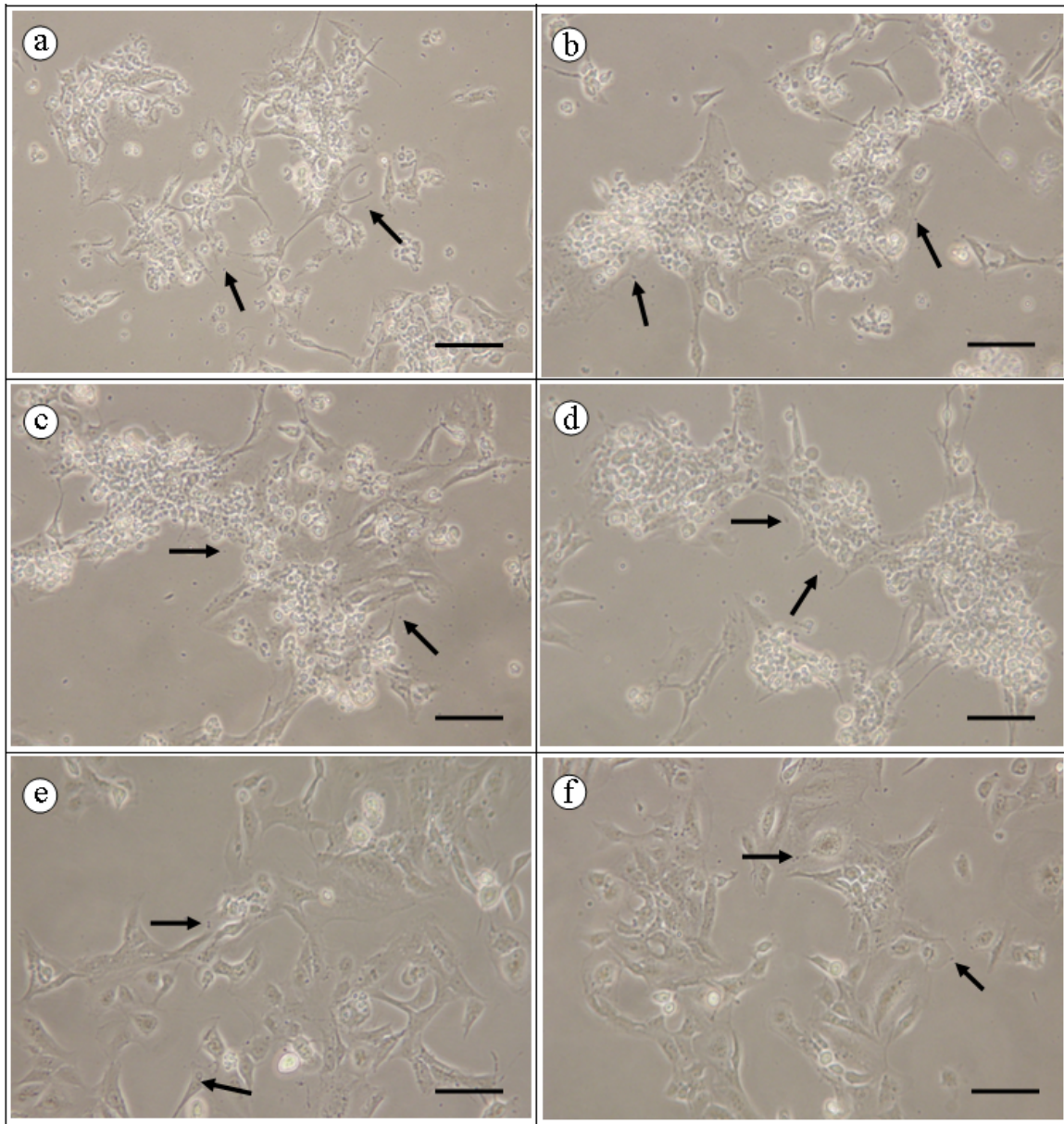




圖三、弓蟲速殖子感染星狀膠細胞之細胞培養液中彈性蛋白 (elastin) 蛋白質的表現。(a)

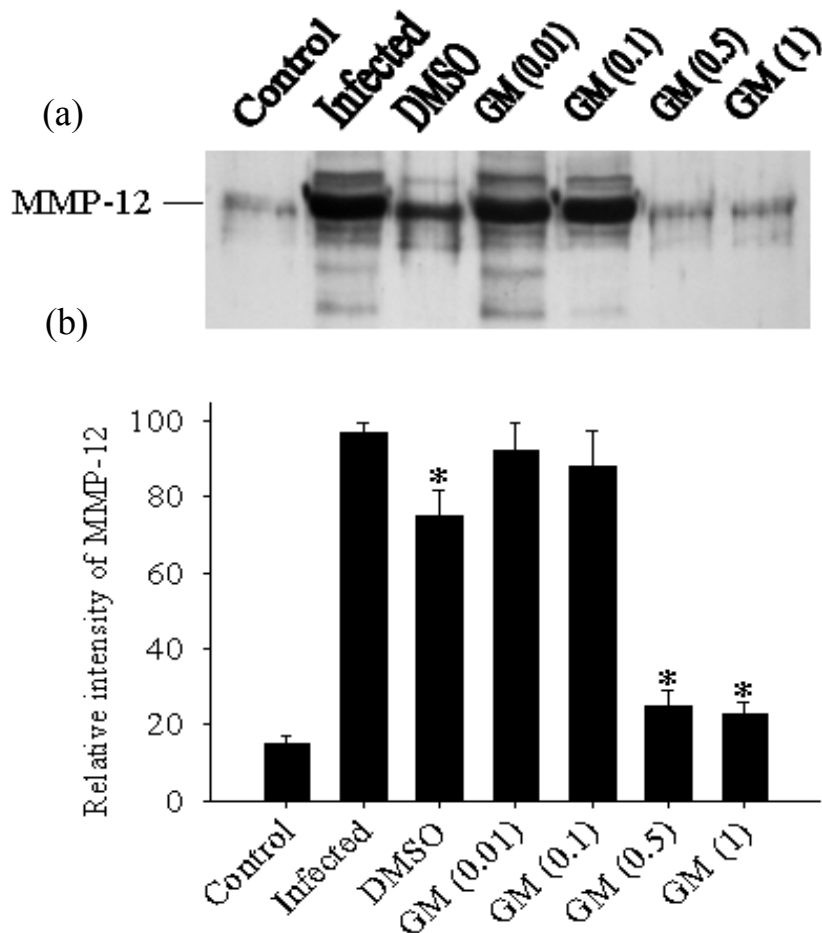
彈性蛋白 (分子量 68、58、55 和 25kDa) bands，以 control 組的表現量做為 base-line。

(b) 彈性蛋白在各時間點蛋白質表現量是利用 computer-assisted imaging densitometer system 進行定量分析，在感染後第 12、24 及第 48 小時有顯著的增加 (\* $P < 0.05$ )。



圖四、觀察 MMPs 專一酵素抑制劑 GM6001 對弓蟲速殖子感染星狀膠細胞之抑制作用。

(a) 弓蟲感染細胞後第 24 小時。(b) 弓蟲感染細胞並加入 100% DMSO 第 24 小時。(c) 弓蟲感染細胞並加入 0.01mM GM6001 第 24 小時。(d) 弓蟲感染細胞並加入 0.1mM GM6001 第 24 小時。(e) 弓蟲感染細胞並加入 0.5mM GM6001 第 24 小時。(f) 弓蟲感染細胞並加入 1mM GM6001 第 24 小時。箭號所指為弓蟲。Bar scale=40 $\mu$ m。



圖五、弓蟲速殖子感染星狀膠細胞並加入 DMSO 和 MMPs 專一酵素抑制劑 GM6001，在感染第 24 小時對細胞培養液中基質金屬蛋白酶-12 (matrix metalloproteinases-12, MMP-12) 蛋白量表現的影響。由左而右分別為 control、infected、DMSO 和 0.01mM、0.1mM、0.5mM、1mM 等 4 種不同濃度的 GM6001。(a)MMP-12 (分子量 45kDa) bands，以 infected 組的表現量做為 base-line。(b) MMP-12 在各組別間蛋白質表現量是利用 computer-assisted imaging densitometer system 進行定量分析，發現在 0.5mM、1mM 等兩種濃度 MMP-12 蛋白表現量，相較於感染組有明顯的降低，在統計上有顯著的差異 (\* $P < 0.05$ )。

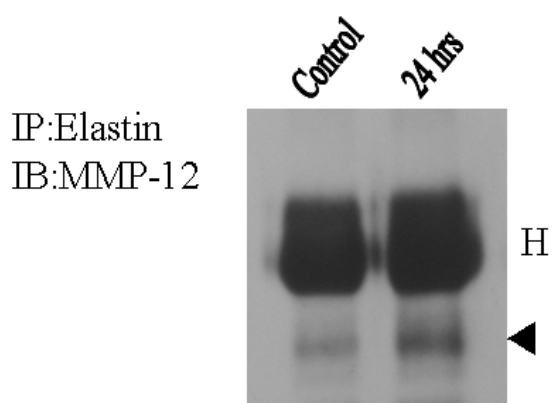


(a)

(b)

圖六、弓蟲速殖子感染星狀膠細胞並加入 DMSO 和 MMPs 專一酵素抑制劑 GM6001，在感染第 24 小時對細胞培養液中彈性蛋白 (elastin) 蛋白量表現的影響。由左而右分別為 control、infected、DMSO 和 0.01mM、0.1mM、0.5mM、1mM 等 4 種不同濃度的 GM6001。(a) 彈性蛋白(分子量 68kDa、58kDa、55kDa 和 25kD) bands，以 infected 組的表現量做為 base-line。(b) 彈性蛋白在各組別間蛋白質表現量是利用 computer-assisted imaging densitometer system 進行定量分析，發現在 0.5mM、1mM

等兩種濃度彈性蛋白表現量，相較於感染組有明顯的降低，在統計上有顯著的差異 (\* $P < 0.05$ )。



圖七、基質金屬蛋白酶-12 (matrix metalloproteinases-12, MMP-12) 與彈性蛋白 (elastin) 免疫共同沉澱試驗。在 MMP-12 分子量的位置出現明顯的條帶(黑色箭頭)，證明 MMP-12 與彈性蛋白確實有交互作用。H, IgG heavy chain。

計劃成果自評

一、 研究內容與原計畫相符程度達 72%

二、 達成預期目標情況：分析 MMP 在感染弓蟲的人類腦細胞株表現及酵素活性。

藉由 MMPs 抑制劑作用在感染弓蟲的人類腦細胞株誘發 MMPs 及細胞病變之抑制的效果。

三、 研究成果之學術或應用價值：找出弓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、 適合在學術期刊發表

五、 主要發現：藉由 MMPs 抑制劑作用在感染弓蟲的人類腦細胞株誘發 MMPs 及細胞病變之抑制的效果，提供未來動物試驗治療試驗之參考，進而提供臨床上治療試驗之參考。

# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/10/24

國科會補助計畫	計畫名稱: 基質金屬蛋白酶在弓蟲性腦炎之變化
	計畫主持人: 賴世展
	計畫編號: 97-2320-B-040-007-MY3 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	

97 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：97-2320-B-040-007-MY3				計畫名稱：基質金屬蛋白羰在弓蟲性腦炎之變化	
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	2	2	100%	人次	
		博士生	1	1	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	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	2	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	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%		



<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	

## 國科會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）

藉由瞭解 MMPs 在感染弓蟲的人類腦細胞株誘之研究，提供未來動物試驗及臨床試驗之參考，進而提供臨床上治療試驗之參考。研究成果應可發表兩篇 SCI 論文。