

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 探討乙型生長因子誘導巨噬細胞凋亡之機制 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2314-B-040-032-  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學分子毒理學研究所

計畫主持人：吳文俊

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：鍾艾伶、曾威蒲

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96年10月30日

## 研究目的：

在1999年Singhal等人發表急性酒精暴露後會造成大鼠體內TGF- $\beta$ 濃度上升(Singhal et al., 1999)，而在之前本實驗室的研究也發現，急性酒精暴露後會造成小鼠血液和腹腔液的TGF- $\beta$ 濃度上升，導致腹腔巨噬細胞的細胞數目及免疫功能下降。後來的研究證實細胞數目的減少是由於腹腔巨噬細胞發生細胞凋亡所引起。因此我們懷疑，急性酒精暴露後致使老鼠腹腔巨噬細胞發生細胞凋亡可能是誘發TGF- $\beta$ 濃度上升所造成。本研究我們欲進一步探究TGF- $\beta$ 誘導巨噬細胞發生細胞凋亡之機制，以幫助我們釐清何種分子參與此路徑的進行，並可藉由抑制此分子的作用降低細胞凋亡現象，促使巨噬細胞免疫功能回升。

## 文獻探討：

### 一、乙型轉形生長因子(transforming growth factor- $\beta$ ；TGF- $\beta$ )家族

乙型轉形生長因子(transforming growth factor- $\beta$ ；TGF- $\beta$ )家族成員有：TGF- $\beta$ 、成骨蛋白(bone morphogenetic proteins，簡稱BMPs、活化素(activins)和相關蛋白(related proteins)。在人類細胞株中發現的TGF- $\beta$ 通常具有三種isoforms：TGF- $\beta$ 1、 $\beta$ 2及 $\beta$ 3(Barttram and Speer, 2004; Hartner et al., 2003; Rotzer et al., 2001)，其中以TGF- $\beta$ 1最被廣泛研究。TGF- $\beta$ 為一多功能的細胞激素，在不同種類的細胞中扮演調控細胞生長、分化、趨化作用、細胞週期的進行、促進細胞凋亡和抗細胞凋亡的角色(Horowitz et al., 2004; Jang et al., 2002; Kim et al., 2004; Massague, 2000)。

### 二、巨噬細胞

巨噬細胞是屬於由骨髓幹細胞分化而來的單核吞噬細胞譜系(lineage)白血球，壽命長，能非專一性辨認外來微生物，並進而吞噬摧毀之，具有清除病原及調節免疫反應的功能(Cutolo et al., 1993; Singhal et al., 1999)，為先天性免疫反應。巨噬細胞在急性、慢性發炎反應和傷口修復方面扮演重要的角色。當受到外來病毒或微生物感染時，巨噬細胞的防禦系統會被啟動進而吞噬入侵的細菌、被病毒感染的細胞及正常細胞遭受攻擊而裂解形成的細胞殘骸，同時也會分泌多種生長因子來促進血管新生及促進平滑肌和纖維母細胞的生長進而修復傷口(Cooper et al., 2005; Tidball, 1995)。因而，巨噬細胞被認為是免疫防禦的第一道防線(Pixley and Stanley, 2004; Roger et al., 2001)。

### 三、細胞凋亡

細胞凋亡機制的發生主要與caspases(cysteine aspartate proteases)家族成員有關。Caspases是一群可在aspartate殘基的碳端上切割其受質的分子。雖然caspases家族成員在序列上及對受質切割的專一性方面有個別的差異，但在其他方面卻有三個相同之處：(A)每一個活化的caspase是由二個相同的大次單元(17-22 kD)及二個相同的小次單元(10-12 kD)組成 $\alpha$ 2 $\beta$ 2的四聚體(tetramer)；(B)未活化的caspase是以zymogen的形式存在，包含NH<sub>2</sub>-terminal domain、largesubunit(~20 kD)及small subunit(~10 kD)等三個domains；(C)

caspase 活化的過程需caspase 在aspartate 殘基的碳端上作用 (Kaufmann and Hengartner, 2001; Thornberry and Lazebnik, 1998)。Caspases 依據功能上的不同可分為兩種，一種是會活化細胞激素而與免疫相關的caspase-1、-4、-5、-11、-12 及-14，另一種是會促進細胞凋亡反應發生的caspase-2、-3、-6、-7、-8、-9 -10 (Earnshaw et al., 1999)。另外，依據促進細胞凋亡的活化順序及蛋白結構上的不同，又可將caspases 分為兩種，分別是upstream (initiator) caspases 及 downstream (effector) caspases。Initiator caspases 包括caspase-2、-8、-9 和-10，含有較長的 prodomain 可辨認並活化與細胞凋亡相關的蛋白，例如：death effector domain (DED) 或 caspase activation and recruitment domain (CARD)；而effector caspases 則包括caspases-3、-6 和-7，其前驅物 (zymogen) 含有較短的prodomain，可被initiator caspases 切割而活化，活化的effector caspases 會切割細胞內與細胞凋亡相關的受質，導致細胞發生細胞凋亡(Hengartner, 2000)。Caspases會抑制負責保護細胞免於走向細胞凋亡路徑的蛋白表現，如caspases會切割Bcl-2 家族成員而促進細胞發生細胞凋亡(Adams and Cory, 1998; Morita and Tilly, 1999; Tsujimoto, 1998)。啟動caspases 活化而誘導細胞發生細胞凋亡的路徑，大致上可分為死亡受體 (death receptor；DR) 及粒線體 (mitochondria) 這兩條路徑。

## 研究方法：

### 一、細胞培養

RAW264.7 細胞株以含有0.03% L-glutamin、0.22% sodium bicarbonate、100 unit/ml penicillin/streptomycin、100  $\mu$ M NEAA、100  $\mu$ M sodium pyruvate 及10% FBS 之細胞培養液DMEM 培養。將細胞株置於含5% CO<sub>2</sub> 的37°C 恆溫培養箱中培養，每兩天更換新鮮的培養液，每株細胞約隔三到四天分盤培養。

### 二、西方墨點法

將製備好的膠以1X running buffer 填滿，每個well 放入35~50 $\mu$ g 的樣品，先以50 volt 跑30分鐘，再用100 volt跑90分鐘，直到樣品接近底部即可停止。在膠快跑完的前10分鐘，準備一張大小恰當的PVDF membrane，先用甲醇漂洗(約15秒)，再換成一次水漂洗5分鐘。將膠卸下後，同時與PVDF membrane 及二片濾紙一起浸在轉漬緩衝溶液中，利用Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell 通以電壓100 volt 2小時，將膠上的蛋白以負極往正極的方式轉移到PVDF membrane 上。之後將轉漬好的PVDF membrane 浸在含5%脫脂奶粉的1XTTBS 緩衝溶液(含50 mM Tris、0.2% Tween 20 和 150 mM NaCl, pH 7.5) 中，於室溫下輕輕振盪90分鐘。再加入欲觀察之蛋白的一次抗體，於4°C 振盪一夜。隔夜，將一次抗體作用完之PVDF membrane 用含5%脫脂奶粉的1XTTBS 緩衝溶液清洗兩次，再用1XTTBS 緩衝溶液清洗兩次，每次10分鐘，之後以anti-mouse IgG 或anti-rabbit IgG 之二次抗體於室溫下反應1小時。將處理完二次抗體之PVDF membrane 用含5%脫脂奶粉的1XTTBS+緩衝溶液(含50 mM Tris、0.5% Tween 20 和300 mM NaCl, PH 7.5) 清洗兩次，再用1XTTBS+緩衝溶液清洗兩次。最後利用ECL呈色劑將經抗

體作用之蛋白影像以冷光螢光數位分析儀 (FUJIFILM Image Reader Las-1000) 分析定量。

### 三、細胞凋亡偵測

當細胞發生細胞凋亡時，會發生細胞核內DNA 斷裂，而使DNA內AT 序列的凹槽裸露外翻。DAPI 染劑可辨認DNA裡AT序列的凹槽並與之結合，吸收光波長為345 nm，螢光波長為455 nm，因此可藉由此方法利用螢光顯微鏡觀察細胞凋亡的情形。首先將細胞以 $2 \times 10^5$  個/well 種於6 well plate 中培養24小時，之後加入2 ml 處理不同濃度的藥物，置於37°C 培養24小時。時間到達之後，以1XPBS 清洗細胞三次，加入1 ml 4% paraformaldehyde 將細胞固定30分鐘後，再以1XPBS 清洗細胞三次，加入1 ml 的DAPI 染劑 (1  $\mu$ g/ml)，於避光條件下作用1分鐘，1分鐘後再以1XPBS 清洗細胞二次，即可用螢光顯微鏡觀察細胞核外觀上的變化。凋亡細胞占有所有細胞百分比計算方式是在顯微鏡下 (200倍) 觀察每個樣本6 個視野，求取平均值，並重複三次實驗所得之結果。

### 結果：

#### 一、不同濃度之血清和TGF- $\beta$ 1 對RAW264.7 細胞發生細胞凋亡之影響

為了探究TGF- $\beta$ 1 如何誘導巨噬細胞發生細胞凋亡，因此我們測試了含有不同低濃度血清的培養液，欲排除血清對TGF- $\beta$ 1 誘導細胞凋亡之影響。首先利用DAPI 染色法分析不同濃度之血清在兩種不同的時間點對細胞產生的凋亡形。細胞凋亡之分析結果如下：12.8% (serum-free 培養液培養十二小時)、14.6% (serum-free 培養液培養二十四小時)、7.1% (含0.5%血清的培養液培養十二小時)、11.1% (含0.5%血清的培養液培養二十四小時)、5.2% (含0.8%血清的培養液培養十二小時)、6.7% (含0.8%血清的培養液培養二十四小時) (圖一A)。由此結果顯示，RAW264.7 細胞在含有0.8%血清的培養液培養十二或二十四小時下，有較低的細胞凋亡率，因此我們使用此血清濃度的培養液進行TGF- $\beta$ 1 刺激細胞發生細胞凋亡之實驗。接著細胞分別處理不同濃度之TGF- $\beta$ 1，培養二十四小時後，以DAPI 染色法分析細胞凋亡比率，其結果如下：6.2% (控制組)、16.6% (實驗組：處理5 ng/ml TGF- $\beta$ 1)、21.9% (實驗組：處理10 ng/ml TGF- $\beta$ 1)、33.1% (實驗組：處理15 ng/ml TGF- $\beta$ 1) (圖一B)，由此分析結果發現10 ng/ml 的TGF- $\beta$ 1 比5 ng/ml 的TGF- $\beta$ 1 有較高的誘導細胞凋亡比率，而15 ng/ml 的TGF- $\beta$ 1 對細胞而言會誘導過高的細胞凋亡率，並且此濃度的TGF- $\beta$ 1 在誘發細胞凋亡的文獻中尚未被報導，因此在往後實驗中我們將使用濃度為10 ng/ml 的TGF- $\beta$ 1 進行實驗。

#### 二、TGF- $\beta$ 1 誘導RAW264.7 細胞之凋亡分子、抗凋亡分子及粒線體釋放因子之表現情形

由之前的實驗已得知TGF- $\beta$ 1 會誘導RAW264.7 細胞發生細胞凋亡，而細胞凋亡主要可分成粒線體依賴型路徑與死亡受體依賴型路徑，為了進一步了解此細胞凋亡反應與何種路徑有關，因此我們分別對這二種路徑進行探討。首先利用西

方墨點法觀察細胞在處理TGF- $\beta$ 1 十二小時和二十四小時後，其與粒線體有關的Bcl-2 家族之凋亡分子—Bad、Bax、Bak 和Bid 的表現情形。圖二結果顯示，TGF- $\beta$ 1皆能誘導Bad、Bax 和Bak 分子的表現，而Bid 蛋白也有被切割的情形，使t-Bid 蛋白表現量增加，這些分子中尤其以Bad 蛋白表現量最高。接著我們進一步觀察TGF- $\beta$ 1 是否相對的能誘導或抑制RAW264.7細胞之抗凋亡分子的表現。同樣的，我們利用西方墨點法觀察細胞中抗凋亡分子—Bcl-XL、Bcl-2 和Mcl-1 的表現情形。圖三結果顯示，Mcl-1 蛋白的表現量有下降的情形出現，而Bcl-2 蛋白與控制組相比則有些微增加的趨勢，雖然Bcl-2 蛋白表現有些微增加，但與表現量較高的凋亡分子Bad 和Bax 蛋白相比較後，細胞表現仍較趨於細胞凋亡反應。另外在粒線體釋放因子—cytochrome c 蛋白表現部分也有增加的趨勢，但Smac/Diablo 表現量則沒有改變（圖四）。

三、TGF- $\beta$ 1 誘導RAW264.7 細胞之死亡受器配子、死亡受器和死亡受器相關之致凋亡分子之表現情形

我們欲繼續觀察TGF- $\beta$ 1 是否會誘導另一條細胞凋亡路徑—死亡受體路徑之表現。在此，我們利用西方墨點法在細胞處理TGF- $\beta$ 1 十二小時和二十四小時後進行觀察。圖五實驗結果顯示，死亡受器—Fas和TNF-RI 及死亡受器配子—Fas-L (Fas ligand) 和TNF- $\alpha$ 表現量皆沒有明顯的增加，反而Fas-L 和TNF-RI 有下降的情形發生，因此也說明了Fas-L/Fas 和TNF- $\alpha$ /TNF-RI 之反應可能與TGF- $\beta$ 1 所誘導的細胞凋亡反應無關。另外在死亡受器相關之致凋亡分子—Daxx 蛋白的表現卻有明顯增加的趨勢，這可能與TGF- $\beta$ 1 的誘導有關。

四、TGF- $\beta$ 1 誘導RAW264.7 細胞之caspases 分子之表現情形

細胞凋亡反應發生時會活化caspases 蛋白，於是我們接著觀察TGF- $\beta$ 1 是否能誘導細胞中caspases 蛋白的活化。在利用西方墨點法觀察後發現，未活化的caspase-3、-8 和-9 表現量皆有明顯的下降，相對的，活化態的caspase-3、-8 和-9 表現量則有明顯的增加。另外，無論是活化或未活化的caspase-2，皆無明顯的改變（圖六）。由以上結果得知，TGF- $\beta$ 1 確實會活化caspases 蛋白，而使細胞發生細胞凋亡反應。接著我們欲進一步證實，是否阻斷caspases 也能阻斷TGF- $\beta$ 1所誘導的細胞凋亡反應。首先，我們事先加入對細胞無害之不同caspases 抑制劑濃度（結果未列），分別為：caspase-3 抑制劑（20  $\mu$ M）、caspase-8 抑制劑（20  $\mu$ M）、caspase-9 抑制劑（20  $\mu$ M）和Pan caspase抑制劑（40  $\mu$ M）於細胞中作用二小時，之後再處理TGF- $\beta$ 1（10 ng/ml）刺激細胞二十四小時後，以DAPI 染色法觀察細胞的凋亡程度，實驗結果如下：6.4%（控制組：處理DMSO）、22.7%（實驗組：處理TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml）、10.1%（實驗組：處理caspase-3 抑制劑和TGF- $\beta$ 1）、13.1%（實驗組：處理caspase-8 抑制劑和TGF- $\beta$ 1）、12.4%（實驗組：處理caspase-9 抑制劑和TGF- $\beta$ 1）、10.6%（實驗組：處理caspase-8 抑制劑和caspase-9 抑制劑和TGF- $\beta$ 1）、6.9%（實驗組：處理Pan caspase 抑制劑和TGF- $\beta$ 1）（圖七）。由實驗結果得知，抑制caspases 活性能有效降低TGF- $\beta$ 1 所誘導的細胞凋亡比率。

## 討論：

誘導細胞凋亡路徑的發生大致上可區分為死亡受體依賴型和粒線體依賴型這兩種路徑。由實驗結果發現，RAW264.7 細胞處理TGF- $\beta$ 1 後其Fas-L、Fas 和TNF-RI 沒有上升的趨勢，而caspase-8 則有活化的情形出現。在Wu 等人的文章中提及，TNF- $\alpha$ 可活化FADD進而活化caspase-8(Wu et al., 2005)。但在本實驗結果中卻發現TNF- $\alpha$ 並沒有明顯增加的趨勢。此外，有些報導指出，在B 淋巴瘤細胞 (BL41Burkitt's) 中，TGF- $\beta$ 1 可透過p38 誘導caspase-8 和Bid 活化，促使cytochrome c 釋出，進而活化caspase-9 和caspase-3，且此路徑並不需要FADD 的參與(Schranz et al., 2001)。而p38 也可能不用透過caspase-8 而直接活化Bid(Zhuang et al., 2000)。因此，caspase-8 的活化是否與p38 有關，或者其活化是透過死亡受器活化adaptor proteins (如: FADD等)所導致，這得再進一步證實。另外，Wieder 等人發表的文章中指出，caspase-3 可透過非Fas 調控的路徑而活化 caspase-8 (Wieder et al., 2001)，這種現象在本實驗模式中可能是不存在的，因為當單獨抑制caspase-8 或caspase-9 時其抑制細胞凋亡的效果並沒有比抑制caspase-3 來的好，而共同抑制caspase-8 和caspase-9時其抑制效果與抑制caspase-3 差不多，因此我們推測，caspase8 和caspase-9 有可能共同活化caspase-3 進而導致細胞凋亡反應發生。

我們的實驗結果顯示，細胞在TGF- $\beta$ 1刺激下其細胞內的凋亡分子—Bad 和Bax 有較高的表現量，尤其以Bad 表現量最高，而cytochrome c、caspase-9 和caspase-3 表現量也有增加的趨勢。綜觀以上結果我們推測TGF- $\beta$ 1 刺激RAW264.7細胞後會經由粒線體依賴型/非粒線體依賴型路徑共同造成細胞凋亡。當我們以抑制劑方式抑制caspase-8 和caspase-9 的活性時，只能部分抑制TGF- $\beta$ 1 誘導的細胞凋亡反應，雖然caspase-3 抑制劑的抑制效果比caspase-8 和caspase-9 抑制劑的抑制效果好，卻也仍無法完全抑制細胞凋亡反應。但當我們使用pan caspase 抑制劑抑制大部分的caspases 蛋白活性時，同時也幾乎完全阻斷了TGF- $\beta$ 1 誘導的細胞凋亡反應。因此，在TGF- $\beta$ 1 誘導細胞凋亡路徑中可能有其他的caspases 分子參與作用，這些分子有可能是caspase-6、caspase-7、caspase-10 和caspase-12 等分子。

## 參考文獻：

- Adams, J.M. and Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-1326.
- Bartram, U. and Speer, C.P. (2004) The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest*, **125**, 754-765.
- Cooper, L., Johnson, C., Burslem, F. and Martin, P. (2005) Wound healing and inflammation genes revealed by array analysis of 'macrophageless' PU.1 null mice. *Genome Biol*, **6**, R5.
- Cutolo, M., Sulli, A., Barone, A., Seriola, B. and Accardo, S. (1993) Macrophages,

- synovial tissue and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, **11**, 331-339.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 383-424.
- Hartner, A., Hilgers, K.F., Bitzer, M., Veelken, R. and Schocklmann, H.O. (2003) Dynamic expression patterns of transforming growth factor-beta(2) and transforming growth factor-beta receptors in experimental glomerulonephritis. *J Mol Med*, **81**, 32-42.
- Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-776.
- Horowitz, J.C., Lee, D.Y., Waghray, M., Keshamouni, V.G., Thomas, P.E., Zhang, H., Cui, Z. and Thannickal, V.J. (2004) Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *J Biol Chem*, **279**, 1359-1367.
- Jang, C.W., Chen, C.H., Chen, C.C., Chen, J.Y., Su, Y.H. and Chen, R.H. (2002) TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol*, **4**, 51-58.
- Kaufmann, S.H. and Hengartner, M.O. (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol*, **11**, 526-534.
- Kim, W.K., Hwang, S.Y., Oh, E.S., Piao, H.Z., Kim, K.W. and Han, I.O. (2004) TGF-beta1 represses activation and resultant death of microglia via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Immunol*, **172**, 7015-7023.
- Massague, J. (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 169-178.
- Morita, Y. and Tilly, J.L. (1999) Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol*, **213**, 1-17.
- Pixley, F.J. and Stanley, E.R. (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol*, **14**, 628-638.
- Roger, T., David, J., Glauser, M.P. and Calandra, T. (2001) MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*, **414**, 920-924.
- Rotzer, D., Roth, M., Lutz, M., Lindemann, D., Sebald, W. and Knaus, P. (2001) Type III TGF-beta receptor-independent signalling of TGF-beta2 via TbetarII-B, an alternatively spliced TGF-beta type II receptor. *Embo J*, **20**, 480-490.
- Schranz, N., Bourgeade, M.F., Mouhamad, S., Leca, G., Sharma, S. and Vazquez, A. (2001) p38-mediated regulation of an Fas-associated death domain protein-independent pathway leading to caspase-8 activation during TGFbeta-induced apoptosis in human Burkitt lymphoma B cells BL41. *Mol*

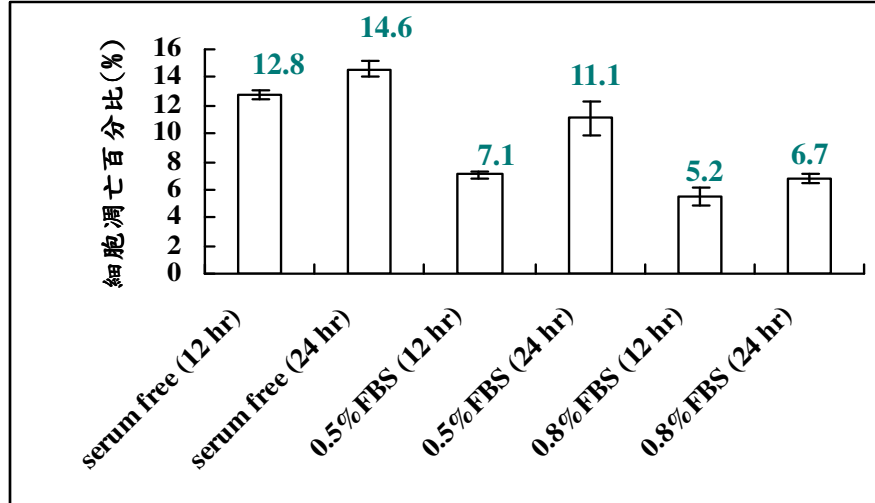
- Biol Cell*, **12**, 3139-3151.
- Singhal, P.C., Reddy, K., Ding, G., Kapasi, A., Franki, N., Ranjan, R., Nwakoby, I.E. and Gibbons, N. (1999) Ethanol-induced macrophage apoptosis: the role of TGF-beta. *J Immunol*, **162**, 3031-3036.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.
- Tidball, J.G. (1995) Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*, **27**, 1022-1032.
- Tsujimoto, Y. (1998) Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, **3**, 697-707.
- Wieder, T., Essmann, F., Prokop, A., Schmelz, K., Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Dorken, B. and Daniel, P.T. (2001) Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood*, **97**, 1378-1387.
- Wu, Y.P., Mizukami, H., Matsuda, J., Saito, Y., Proia, R.L. and Suzuki, K. (2005) Apoptosis accompanied by up-regulation of TNF-alpha death pathway genes in the brain of Niemann-Pick type C disease. *Mol Genet Metab*, **84**, 9-17.
- Zhuang, S., Demirs, J.T. and Kochevar, I.E. (2000) p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, **275**, 25939-25948.

#### 計畫成果自評：

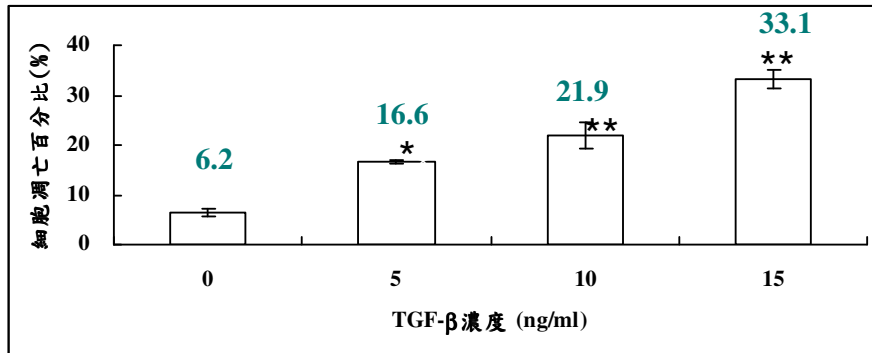
酗酒已經是一個世界性的問題，本研究發現酒精誘導生成的乙型轉形生長因子(TGF- $\beta$ )會誘導老鼠巨噬細胞發生凋亡進而降低其免疫功能。而且巨噬細胞又是對抗外來感染及癌症形成的第一道防線，本研究在人類健康上將可帶來莫大的助益。而且這些研究結果，將為未來的研究提供一個重要的啟發。在藥理學的應用上，可研發阻斷內分泌物質或細胞激素的藥物進而減少對免疫功能的危害，進而達到預防及治療疾病的目的。



A

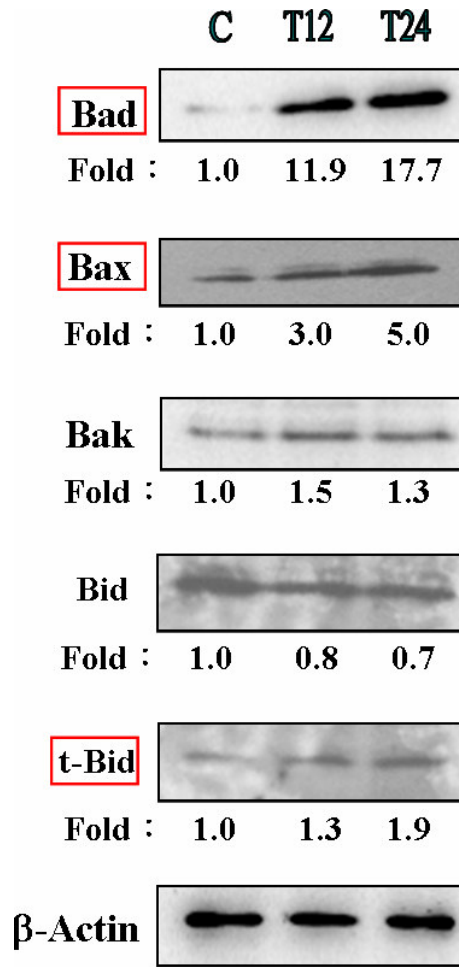


B



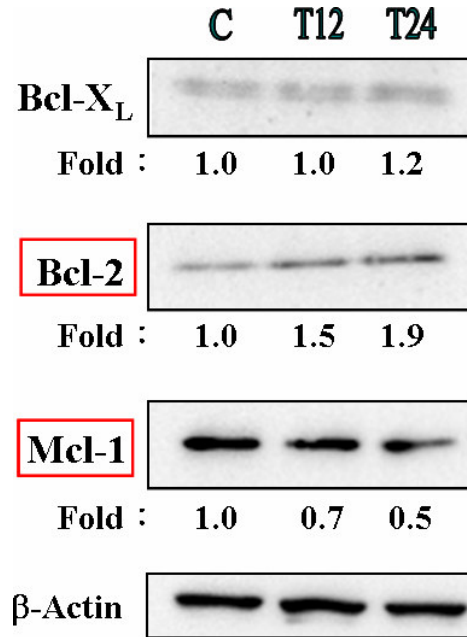
圖一、不同濃度之血清和TGF-β1對RAW264.7 細胞發生細胞凋亡之影響

圖A 為細胞分別處理serum-free 培養液、含0.5%FBS 的培養液和含0.8%FBS 的培養液，於培養12 和24 小時後以DAPI 染色法分析細胞凋亡比率。圖B 為細胞處理不同濃度之TGF-β1：0 ng/ml、5ng/ml、10 ng/ml 和15 ng/ml，於處理24 小時後以DAPI 染色法分析細胞凋亡百分比。圖中數據\* ( $p < 0.05$ ) 或\*\* ( $p < 0.01$ ) 代表控制組與實驗組間具有明顯的差異。



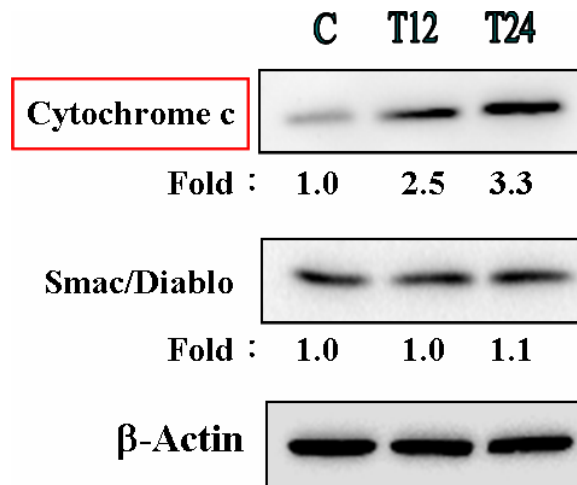
圖二、TGF-β1 誘導RAW264.7 細胞之凋亡分子之表現情形

RAW264.7 細胞處理TGF-β1 (10 ng/ml) 培養12 和24 小時後，以西方墨點法偵測凋亡分子—Bad、Bax、Bak 和t-Bid 之表現。



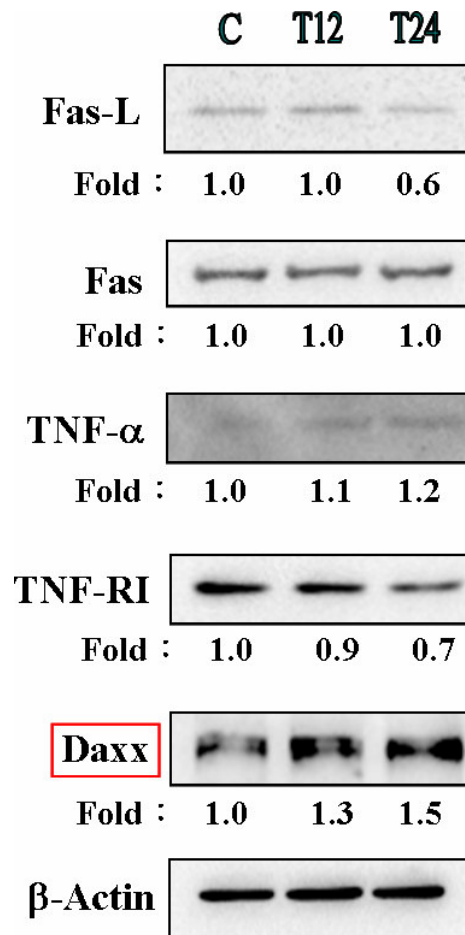
圖三、TGF-β1 誘導RAW264.7 細胞之抗凋亡分子之表現情形

RAW264.7 細胞處理TGF-β1 (10 ng/ml) 培養12 和24 小時後，以西方墨點法偵測抗凋亡分子 (Bcl-XL、Bcl-2、Mcl-1) 之表現。



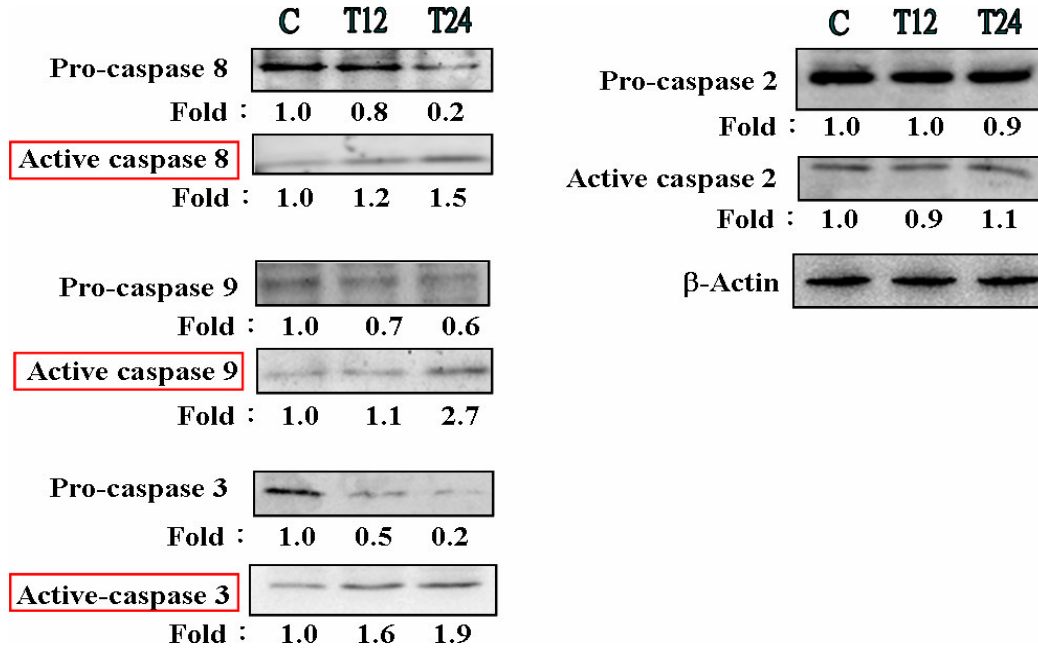
圖四、TGF-β1 誘導RAW264.7 細胞之粒線體釋放因子之表現情形

RAW264.7 細胞處理TGF-β1 (10 ng/ml) 培養12 和24 小時後，以西方墨點法偵測粒線體釋放因子 (cytochrome c 和Smac/Diablo) 之表現。



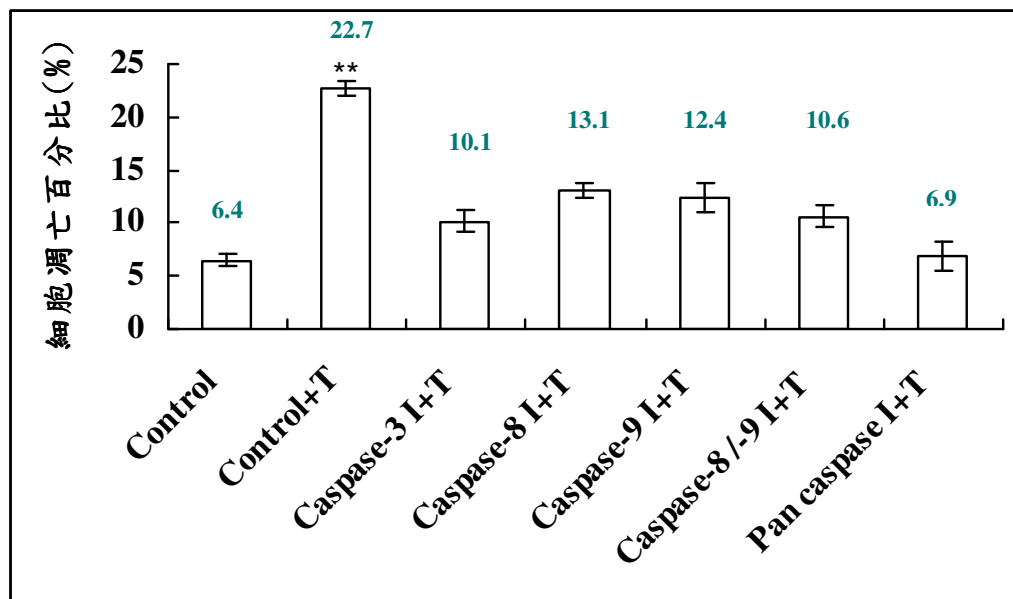
圖五、TGF- $\beta$ 1 誘導RAW264.7 細胞之死亡受器配子、死亡受器和死亡受器相關之致凋亡分子之表現情形

RAW264.7 細胞處理TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) 培養12 和24 小時後，以西方墨點法偵測死亡受器配子 (Fas-L 和TNF- $\alpha$ )、死亡受器 (Fas和TNF-RI) 及死亡受器相關之致凋亡分子 (Daxx) 的表現。



圖六、TGF-β1 誘導RAW264.7 細胞之caspases 分子之表現情形

RAW264.7 細胞處理TGF-β1 (10 ng/ml) 培養12 和24 小時後，以西方墨點法偵測caspase-2、-3、-8 和-9 之表現。



圖七、阻斷caspases 對TGF-β1 誘導RAW264.7 細胞發生細胞凋亡之影響

RAW264.7 細胞事先處理caspase-3 抑制劑 (20 μM)、caspase-8抑制劑 (20 μM)、caspase-9 抑制劑 (20 μM) 和Pan caspase 抑制劑 (40 μM) 作用2 小時後，再加入TGF-β1 (10 ng/ml) 培養24 小時，之後利用DAPI 染色法分析細胞凋亡百分比。圖中數據\*\* (p<0.01) 代表與控制組間具有明顯的差異。