

# 目 錄

一、 謝誌	1
二、 圖目錄	2
三、 表目錄	4
四、 中文摘要	5
五、 英文摘要	6
六、 前言	7
第一節、 鼻息肉(nasal polyps)之簡介	
第二節、 皮質類固醇(corticosteroids)與鼻息肉之治療	
第三節、 皮質類固醇(corticosteroids)與細胞凋亡(apoptosis)	
第四節、 皮質類固醇(corticosteroids)與細胞周期的調控	
七、 實驗目的	26
八、 材料及方法	28
第一節、 實驗組織樣品之收集	
第二節、 組織蛋白質抽取	
第三節、 組織蛋白質定量	
第四節、 蛋白質電泳分析(SDS-PAGE)	
第五節、 西方墨漬法( western blot )	
第六節、 統計分析法	
九、 結果	41
十、 討論	66
十一、 參考資料	82

## 圖 目 錄

- 圖 1. 皮質類固醇對細胞內調控之訊息傳遞路徑
- 圖 2. 細胞凋亡的訊息傳遞路徑
- 圖 3. 細胞周期 G1 期的分子傳遞與調控
- 圖 4. 細胞周期 G1 期的 CDK 抑制分子
- 圖 5. 經鼻內皮質類固醇(intranasal corticosteroid, INCS) 治療後, 控制組織與鼻息肉組織 Fas Ligand 蛋白質表現之比較
- 圖 6. 經 INCS 治療後, 控制組織與鼻息肉組織 Fas 蛋白質表現之比較
- 圖 7. 經 INCS 治療後, 控制組織與鼻息肉組織 caspase 8 蛋白質表現之比較
- 圖 8. 經 INCS 治療後, 控制組織與鼻息肉組織 caspase 9 蛋白質表現之比較
- 圖 9. 經 INCS 治療後, 控制組織與鼻息肉組織 caspase 3 蛋白質表現之比較
- 圖 10. 經 INCS 經治療後, 控制組織與鼻息肉組織 caspase 3 (cleaved form) 的 17kDa 蛋白表現之比較
- 圖 11. 經 INCS 治療後, 控制組織與鼻息肉組織 p53 蛋白質表現之比較

較

圖 12. 經 INCS 治療後，控制組織與鼻息肉組織 p21 蛋白質表現之比較

較

圖 13. 經 INCS 治療後，控制組織與鼻息肉組織 p27 蛋白質表現之比較

較

圖 14. 經 INCS 治療後，控制組織與鼻息肉組織 PCNA 蛋白質表現之比較

比較

圖 15. 經 INCS 治療後，控制組織與鼻息肉組織 pRb 蛋白質表現之比較

較

圖 16. 經 INCS 治療後，控制組織與鼻息肉組織 pRb 蛋白質表現之比較

較

圖 17. INCS 促進鼻息肉組織細胞凋亡可能的途徑

圖 18. INCS 影響鼻息肉組織內細胞周期調控的可能機轉

# 表 目 錄

表一、實驗組織檢體來源之病患年齡及性別之比較

# 前 言

## 第一節 鼻息肉之簡介

### 一、鼻息肉(Nasal Polyps)

鼻息肉是一種從鼻黏膜或副鼻竇中任何部位產生的一種不正常組織。為一種良性的、外表呈現珍珠白，無痛，有梗的脫垂組織[1,2]。鼻息肉所含的血管和腺體較少且幾乎沒有神經分佈，它屬於一種慢性的疾病，一般人發生率約 4%，而患有氣喘者鼻息肉發生率從 7%至 42%皆曾被報告過[3,4]。鼻息肉所引起的症狀包括鼻塞、分泌物增加及造成嗅覺喪失、頭痛等[5]。

### 二、鼻息肉形成原因

雖然早在5000年前的古老埃及就有鼻息肉的相關描述，但至今，關於它的致病原因仍不是很清楚。很多研究者致力於此方面的探討，所提出的學說假設包括感染、過敏、運動血管障礙、新陳代謝及自主神經失調等等。然而所有學說假設皆未成定論。從1933年起，很多學者認為過敏與慢性發炎是鼻息肉形成的重要原因[5-8]。認為鼻息肉的形成起始於鼻黏膜滲出物的產生且在反覆性感染後會導致鼻黏膜產生慢性的血管改變，使細胞內的液體輸送系統發生問題，造成結締組織水腫[9]。Tos 和 Mogensen認為鼻息肉形成的早期在鼻黏膜會有浸潤及

水腫產生，另外也發現有上皮組織破損及顆粒性組織的產生。組織形態學上通常有明顯的黏膜上皮損傷，其基底膜較厚，並且在基質產生腫脹，形成假性囊腫及發炎細胞的浸潤，其中約有80-90 % 鼻息肉明顯嗜伊紅性白血球增加的情形[1,2]。嗜伊紅性白血球主要用來鑑別發炎性細胞，當嗜伊紅性白血球去顆粒後將釋出一些對組織有害的物質，這些物質包括leukotrienes, eosinophilic cationic protein, eosinophilic peroxidase 和一些趨化性因子，這些物質可導致上皮細胞破損、黏膜水腫與敏感性增加[10]。大部分的鼻息肉出現有嗜伊紅性發炎現象，此現象可解釋為移行到組織的嗜伊紅性白血球的數量增加或因其它機轉而抑制嗜伊紅性白血球的細胞凋亡(apoptosis)，導致它的壽命增長，或者同時存在此兩種因素[11,12]。

### 三、鼻息肉的臨床治療

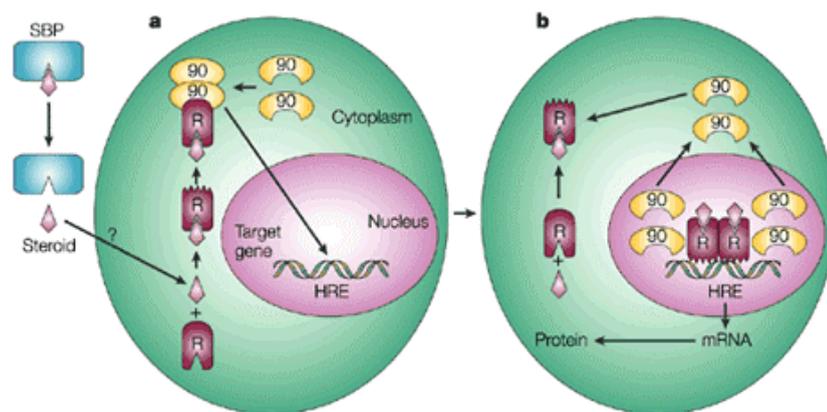
目前臨床治療鼻息肉的方式包括以外科手術切除治療或長期給予局部的腎上腺皮質醇來治療或減輕鼻息肉之症狀及降低手術後的復發率[13,14]。

## 第二節 皮質類固醇與鼻息肉之治療

### 一、皮質類固醇( Corticosteroid )之簡介

皮質類固醇在哺乳動物的細胞內扮演著調節生物功能的重要角色，包括細胞代謝與基因的表現。當動物處在壓力狀態下會由腎上腺（adrenal gland）釋出，以增加蛋白質、脂肪及醣類的代謝進而增加血糖。皮質類固醇本身是親脂性的小分子，它能經由擴散通過細胞膜。在細胞質中它與皮質類固醇接受器結合形成一個複合體（glucocorticoid – receptor complex），此複合體會再移行進入細胞核，結合上特定的 DNA 序列 glucocorticoid response element (GRE)，以影響特定的基因轉錄及細胞生物活性[15,16]。

### Translocation of steroid hormone receptors into the nucleus



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

圖 1.皮質類固醇對細胞內調控之訊息傳遞路徑

## 二、 皮質類固醇的作用機轉

皮質類固醇具有調節不同生物過程的作用；其中包括免疫反應、代謝、細胞生長及細胞增殖等[17]。也因其具有明顯的抑制細胞增殖作用，因此常被用來作為免疫抑制劑、抗發炎及抗癌藥[18,19]。研究發現免疫系統對皮質類固醇的作用非常敏感，並證實皮質類固醇會促使血液系統中具核細胞如 T 淋巴球（T-lymphocytes）、單核球（monocytes）及嗜伊紅細胞（eosinophil）等發炎細胞的細胞凋亡[20,21]。藉由促進細胞凋亡的過程來減少發炎細胞的數量，進而達到抑制發炎反應。

雖然皮質類固醇在臨床上被廣泛使用於抗發炎，也同意它確實會促進發炎細胞走向凋亡，但它真正的作用機轉仍未被確認。目前有二種理論解釋皮質類固醇如何引發細胞凋亡，第一種理論為皮質類固醇經由活化特定的死亡基因（death-specific genes）轉錄以啟動一連串的細胞凋亡連鎖反應[22-25]。第二種理論為皮質類固醇會抑制生存基因（survival genes），特別是對細胞週期 G1 進入 S-phase 之間的基因調控，致使細胞週期停滯進而造成細胞凋亡[18,26,27]。然而確認的

機轉仍有待進一步的研究與探討。

### 三、 皮質類固醇與鼻息肉

從 1973 年起，臨床開始以鼻內局部給予皮質類固醇的方式來治療過敏性鼻炎[28]。以此方式給予皮質類固醇除了可以有效治療過敏性鼻炎外，也可避免因系統性給藥所造成的全身性反應及副作用。除了過敏性鼻炎外，目前也證實經由鼻滴劑及鼻噴劑局部給予皮質類固醇能有效治療鼻息肉及降低手術後鼻息肉復發率[29]。

皮質類固醇對呼吸道黏膜的作用可能是多方面的，其中包括減少嗜伊紅性白血球的聚集、減少黏膜上嗜伊紅性白血球的匯入及黏附[20,21]。而局部給予皮質類固醇也能降低鼻息肉中活化態嗜伊紅性白血球的比率及淋巴球數量。因血管內皮含有皮質類固醇的接受器，局部給予糖皮質類固醇會促使多種發炎性細胞進行凋亡[22-25]。

雖然鼻息肉形成的原因並不能完全確定，但一般相信它的形成與慢性發炎反應有關。在組織學上可觀察到鼻息肉組織浸潤著大量的發炎細胞，尤其是嗜伊紅性白血球。發炎細胞釋出發炎物質所造成的慢性發炎反應可能是促使鼻息肉形成的主要原因之一。臨床實驗證實鼻內給予皮質類固醇如 budesonide aqueous 鼻噴劑可有效減少鼻息肉大小、減輕症狀並降低手術後鼻息肉復發率。

鼻息肉患者局部使用皮質類固醇可能是藉由促進浸潤在鼻息肉內的

發炎性細胞進行凋亡，降低發炎反應進而達到治療效果[29,30]。

### 第三節 皮質類固醇與細胞凋亡

#### 一、細胞凋亡(Apoptosis)

皮質類固醇可經由活化特定的死亡基因 ( death- specific genes ) 轉錄以啟動一連串的細胞凋亡連鎖反應[22-25]。在多細胞的有機體，它的細胞數目是經由控制細胞分裂的速度和細胞死亡的速度來緊密調節，以維持個體細胞數目動態的恆定(homeostasis)[31]。而細胞分裂與細胞死亡也是每一個細胞所必需經歷的過程，細胞凋亡是最常用的細胞死亡機制。在希臘文中，apoptosis 這個字是用來描述樹葉從枝頭掉落的狀態。細胞凋亡(apoptosis) 這種機制是早就存在於遺傳基因之中的，因此，細胞凋亡又稱為計劃性細胞死亡(programmed cell death ) 或者 cell suicide。是指細胞在一定的生理或病理條件下，遵循自身的程序，自己結束其生命的過程。為一受到生命時鐘控制發生的計劃性死亡[32,33]。在不同的生物系統中扮演著重要的生理功能；如胚胎的發育、器官的構形及免疫機制的調控等；當細胞並非長所需時，它們會經由啟動細胞內死亡程序而主動性死亡。發生在器官發展時期及成熟動物組織的細胞凋亡數量是很可觀的，在脊椎動物的神經系統，在它們發育成形後約有一半甚至一半以上的神經細胞會正常死亡。而再

在健康人，每小時有上億個骨髓細胞和腸細胞會進行細胞凋亡 [34,35]。

## 二、細胞凋亡的分子機轉與途徑

在所有動物細胞凋亡的細胞內分子機轉幾乎都一樣，而引發細胞凋亡的因素包括生長因子的缺乏，death receptors 的活化，DNA、粒線體、或其它胞器的傷害等。目前已知的 death receptors 如腫瘤壞死因子配體家族(ligand family) 中的 TNF 和 FasL(也叫 Apo-1L 或 CD95L)經由和它們具有死亡區域的受體 TNFR-1、Fas 結合可引發細胞凋亡作用，如此藉由和標的細胞上的相對受體(receptor family)之間的結合而傳遞訊息，影響細胞的生物反應，其主要與個體免疫系統及發炎反應的調節有關[36,37]。此種引發細胞凋亡的方式又稱為外在途徑。另外一個方式稱為內在途徑，當細胞遭受缺氧、毒素或化學藥物的作用、游離輻射、紫外線、以及其它物理性的傷害如過冷或過熱等壓力時，會促使粒腺體釋放電子攜帶蛋白 cytochrome c 到細胞質中，cytochrome c 會與細胞質中的接合蛋白 Apaf-1 結合，進而活化 caspase 9。不管是外在途徑或內在途徑最後都會活化 caspase 3[38-40]。一旦 caspases 被活化就進入執行期(execution phase)。在細胞凋亡早期位於細胞膜內側的磷脂醯氨酸 phosphatidylserine ( PS ) 會翻移至細胞膜外側。接著逐漸可觀察到凋亡細胞外觀變圓，細胞會皺縮、胞質濃縮。細胞核內的變化

包括：染色質濃縮(condensation)聚集在核膜、一些活化的 caspases 會去分解細胞內的蛋白和 nuclear lamins，有些則會去分解一些使 DNA-degrading enzyme inactive 的蛋白，導致核內酵素 endogenous endonuclease 活性增加而將 DNA 降解成 180-200 base pairs 多聚體的 DNA 片段 (DNA fragmentation) [41-43]。接著，細胞膜形成突起將細胞質內的胞器包圍，最終分解成許多具有胞膜的凋亡小體。如此細胞內可能會引起發炎反應的內容物被包圍住而不至於漏出來，因此在細胞凋亡過程中沒有明顯的發炎反應。最後，這些凋亡小體會吸引鄰近細胞或吞噬細胞將之吞噬吸收，整個清除與吞噬吸收的過程是非常迅速的，通常會在一個小時之內完成[44-46]。

### 三、Caspase的結構與功能

研究指出 caspases 家族在凋亡的啟動與執行過程中扮演著關鍵的角色 [47-49]。它們直接參與了細胞凋亡的早期啟動，凋亡訊息的傳遞，以及在凋亡晚期因它的作用而改變了一些 DNA 酵素的活性、影響一些細胞骨架蛋白，因而產生細胞皺縮 membrane blebbing，DNA 斷裂等凋亡特有現象。早期研究細胞凋亡機制發現線蟲(*Caenorhabditis elegans*) 的 CED 蛋白與哺乳動物的白介素-1 $\beta$  轉換酶 (Interleukin-1 beta - converting Enzyme, ICE)有相似作用，其死亡基因產物 CED-3 就是一種 caspase[50]。caspase (cystein-containing, aspartate-specific proteases)

的本身是一些半胱氨酸蛋白？，其剪切位點是在特異的天冬氨酸 (aspartate)殘基 在正常的狀態下,它們是以無活性的原? (proenzymes) 形式存在[51]。當它接收到凋亡訊息時,半胱天冬? 前體 (procaspase) 之特異性天冬氨酸殘基處會被剪切成為大、小兩個片段(20kb 和 10kb) 並釋放 N-端前構區域形成 heterodimer, 兩個 heterodimer 結合形成一個含有四條蛋白質片段的聚合物時才具有活性[45]。所有的 caspase 都被剪切在特異性天冬氨酸殘基, 一些上游的 caspase 就能循序地 激活 其它下游的 caspase, 形成 caspase 的一連鎖反應, 將其所接收的凋亡 訊號一一傳遞下去, 以完成細胞凋亡[52,53]。

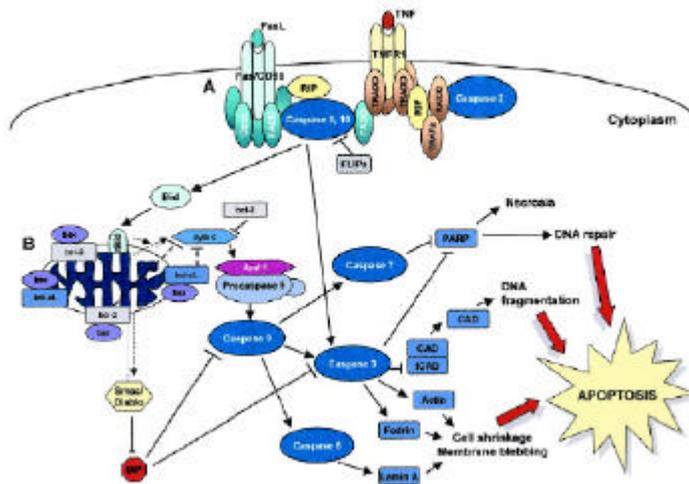
#### 四、Fas(CD95/APO-1)與Fas Ligand(CD95 L):

Fas(CD95/APO-1)是表達於多種細胞表面的受體分子,其中包括一些免疫細胞如T 細胞及巨噬細胞、內皮細胞和皮膚細胞,屬於TNF家族中之第二型跨膜蛋白質[54-56]。TNF家族主要藉由和標的細胞上的相對接受器結合而傳遞訊息,影響細胞的生物反應。主要作用與免疫系統及發炎反應的調節有關。其中 TNFR1、Fas、TRAIL-R1及 TRAIL-R2 因與細胞凋亡的訊息傳遞有關因此稱之為death domain[57-59]。

Fas 位於細胞內的部分是具有約80個氨基酸序列相似區域稱death domain, 因為此區域可直接活化caspase 或吸引一些接附蛋白(adaptor protein)如FADD, 間接活化caspase, 以傳遞死亡訊息造成細胞凋亡

[60]。

Fas Ligand (CD95 L) , 在休息狀態的 T 細胞不會出現Fas Ligand , 而在活化的 T 細胞則可看到大量的Fas Ligand。當Fas Ligand與標的細胞膜上的 Fas 結合會造成標的細胞的凋亡[61]。



*Clinical Cancer Research Vol. 8, 1681–1694, June 2002*

圖 2.細胞凋亡的訊息傳遞路徑

(A. 外在途徑 , B.內在途徑)

#### 第四節 皮質類固醇與細胞周期的調控

##### 一、細胞周期(Cell Cycle)

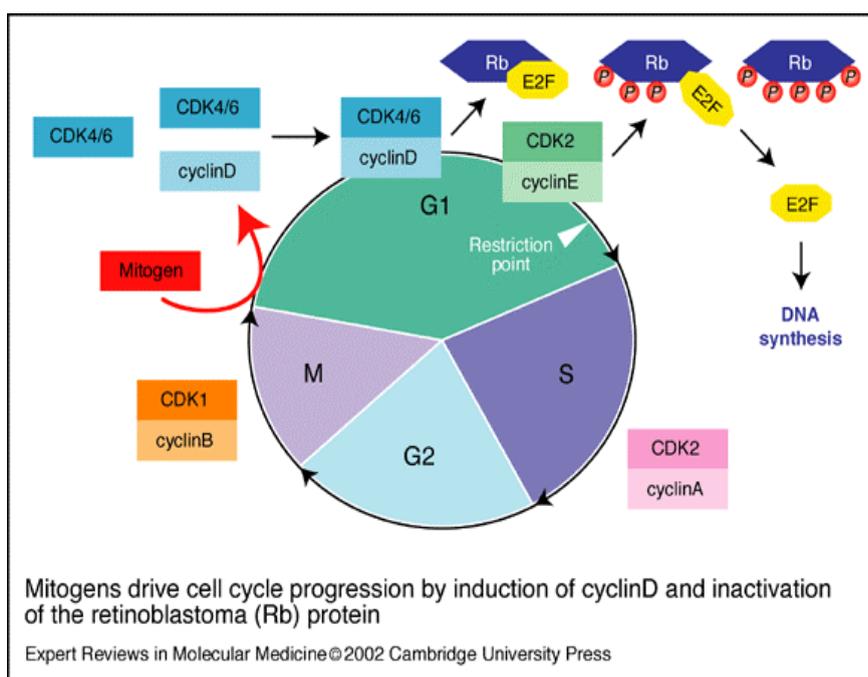
在細胞分裂周期包括了四個不同階段；第一階段為複製前期(G1 期) , 這是在有絲分裂期結束和去氧核糖核酸(DNA)複製之間的一段空隙。在此階段細胞一方面會成長變大 , 另一方面也同時會接受各種生長環

境的刺激與調控以決定細胞是否要進行分裂[62]。這個階段持續多久依不同的細胞而有不同，對大部份的哺乳動物細胞來說，G1 期約為十二小時。當細胞長到足夠大小且接受到鄰近細胞所給予的訊息，當這些訊息形成促細胞分裂劑(mitogens)時，促細胞分裂劑會去阻斷細胞內抑制細胞周期進行的機轉，容許細胞由 G1 期進入第二階段的複製期(S 期)，位於細胞核內的去氧核糖核酸(DNA)在這個時期合成及複製；之後進入第三階段的細胞分裂前期(G2 期)，這是細胞進入有絲分裂前的準備時期。在 G2 期 DNA 的複製受到監控，確保 DNA、染色體已達原來細胞的雙倍量，作為細胞進入有絲分裂前的最後確認。當一切無誤時，細胞即進行第四階段的細胞分裂期(M 期)。當二個子細胞分離並各獲得一份完整的染色體時即完成一個細胞周期[63]。文獻指出皮質類固醇會經由抑制生存基因，特別是對細胞週期 G1 進入 S 期之間的基因調控，致使細胞週期停滯在 G1 期而造成細胞凋亡[26-27,64,65]

## 二、細胞周期的分子調控

細胞周期的每一個階段都必須受到嚴密的監控與調節，以保證每次所複製的細胞是完整健康的細胞。在細胞周期的進行中，周期素(cyclins)和周期素依賴激酶(CDKs)複合物扮演著重要的調節功能。在細胞周期

的不同階段受到不同的周期素依賴激酶所正調控。CDKs 本身並不具活性，必須與特定的周期素(cyclins)結合形成複合物，此複合物才具有調控細胞周期的活性。在細胞周期中 G1 期的監控與蛋白分子的調節，在決定細胞是否繼續進行細胞分裂上扮演著關鍵性的角色。在脊椎動物細胞 G1 期的周期素(cyclins)為周期素 D1(cyclin D1)，其配對周期素依賴激酶為 CDK4/ CDK6；G1-S 期的周期素為周期素 E(cyclin E)，配對周期素依賴激酶為 CDK2[63,64]。當細胞接受到促細胞分裂劑(mitogens)的訊息時，會引發周期素 D1 與周期素依賴激酶 CDK4/ CDK6 及周期素 E 與配對周期素依賴激酶 CDK2 結合形成複合物，共同促使視網膜胚細胞瘤(retinoblastoma,Rb)磷酸化。當 Rb 磷酸化後會釋放轉錄因子 E2F，E2F 控制著多種細胞分裂所需酵素的表現並促進去氧核糖核酸(DNA)的合成，於是細胞分裂繼續進行，細胞由 G1 期進入 S 期[65,66]。



Expert Review in Molecular Medicine; 25 April 2002

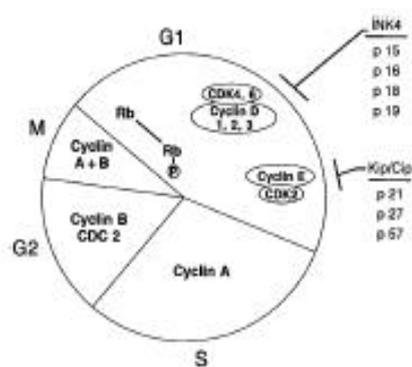
圖 3.細胞周期 G1 期的分子傳遞與調控

### 三、周期素依賴激酶抑制劑(CDKIs):

細胞周期受到周期素依賴激酶所調控，而周期素依賴激酶的活性又受到周期素依賴激酶抑制劑 (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs) 所影響，CDKIs 會抑制細胞周期的進行。周期素依賴激酶抑制劑主要可分為 2 個家族，一為 INK4 家族；包括 p16/INK4 (p16)、p15/INK4B (p15)、p18/INK4C (p18) 和 p19/INK4D (p19) [62,64]。當細胞內正常的視網膜胚細胞瘤 (Rb) 蛋白質達一定量時會活化這些抑制劑，在增殖細胞的 S 期中期可看到這些抑制蛋白大量表現。另一個 CDK 抑制家

族是 Cip/Kip 家族;包括 p21/WAF1/CIP1(p21)、 p27/Kip1 (p27) 和 p57/Kip2 (p57), 這些蛋白會抑制 G1 期 cyclin E-CDK2、 cyclin D1-CDK4/6 及其他周期素的活化[65-67]。Cip/Kip 蛋白質家族是個普遍的 CDKs 抑制劑, 因為它能與各種不同的 CDKs 複合物相互作用, 也可以單獨與周期素 A、 E、 D1、 D2、 D3 和 CDKs 作用, 當 Kip 蛋白過度表現時會阻止細胞周期往下一階段進行 p21 經由與周期素 A (或 B、 D、 E)、 CDK2 (或 CDK 4)及 PCNA 形成四合體, 當 CDKs 與 p21 結合時, 它的活性就會受到抑制, 藉由抑制 CDKs 來引發細胞周期停止[68-70]。

p27 在細胞周期的任一個階段皆可藉由抑制 cyclins 與 CDKs 複合物的活性, 尤其是對 G1 期 cyclinE-CDK2 複合物的抑制, 使細胞停滯在 G1 期, 進而抑制細胞的分裂與增殖[71-73]。



*American Journal of Pathology, Vol. 154, No. 2, February 1999*

圖 4.細胞周期 G1 期的 CDK 抑制分子

## 研究目的與假設

過敏與慢性發炎是鼻息肉形成的主要原因之一，從鼻息肉的組織形態學上可看到其有明顯的黏膜上皮損傷，且在基質產生腫脹，形成假性囊腫並浸潤著發炎細胞。其中約有 80-90 % 的鼻息肉有嗜伊紅性白血球增加的情形。研究發現人體免疫系統對於皮質類固醇的作用非常敏感，並證實皮質類固醇會促使血液系統中 T 淋巴球、單核球及嗜伊紅血球等發炎細胞之凋亡。自 1973 年起，臨床開始以局部給予皮質類固醇之方式來治療過敏性鼻炎，後來證實經由鼻滴劑及鼻噴劑等方式局部給予皮質類固醇也可應用於鼻息肉的治療及降低手術後復發

率。然而其治療機轉目前仍未被確認，因此研究中我們將著手於細胞凋亡及細胞周期調控二大途徑的相關蛋白質分析，以瞭解皮質類固醇治療鼻息肉的可能機轉。

實驗假設：

1. 局部給予皮質類固醇會經由活化特定之死亡基因轉錄，以啟動一連串之細胞凋亡連鎖反應。
2. 皮質類固醇會抑制生存基因，特別是對細胞週期 G1 進入 S 期之間的基因調控，致使細胞週期停滯進而造成細胞凋亡。

## 實驗材料與方法

### 第一節 病患及實驗組織檢體之收集

本實驗所有檢體皆取自民國 91 年 10 月至 92 年 4 月間，至中國醫藥學院附設醫院耳鼻喉科就診之患者。以隨機方式給予人工合成之皮質類固醇水性鼻噴劑 budesonide (商品名 Pulmicort)，給藥劑量及方法如下：

經由鼻腔給藥，一天一次、每次每個鼻孔分別提供二個噴劑的藥量 (100mg/噴劑)，一天的總劑量為 400 mg，治療至少持續四星期。

鼻息肉組織檢體(以下稱為鼻息肉組織:NP)取自 12 位經內視鏡及斷層掃描確定為鼻息肉且接受 budesonide 治療之病患。而控制組檢體則取自 12 位非鼻息肉診斷且接受 budesonide 治療病患的下鼻甲組織(以下稱為控制組織:IT)。

經皮質類固醇治療四星期後，所有組織檢體皆以內視鏡手術方式取

得，並將取得的組織立刻放入液態氮，之後放在-80 ℃ 冰箱保存直到  
要做分析時才取出。

## 第二節 組織蛋白質抽取

### 1. 儀器:

- 均質機 Polytron PT 3100 (POLYTRON ,Luzernerstrasse,Switzerland)
- 超音波震盪器 SonicaterXL-2020  
(MISONIX,Farmingdale,NY,USA)

### 2. 試劑(Sheer' s buffer):

藥 品	容量
50 mM Hepes (PH 7.5)	50 ml
150mM NaCl	75 ml
1 mM EDTA	1 ml
2.5 mM EGTA	2.5 ml
Tween 20	0.5 ml
Glycerol	50 ml
加 dd H <sub>2</sub> O 至 500 ml	

- 50 mM Hepes (pH 7.5)  
( GERBU,Am Kirchwald, Germany )
- 150 mM NaCl  
( MERCK,Darmstadt, Germany ) 75 ml
- 1 mM EDTA  
( USB,Ohio,USA ) 1 ml
- 5mM EGTA

( SIGMA, ST.Louis, MO,USA ) 2.5 ml

- Tween 20

( USB,Ohio,USA )

- Glycerol

( MERCK,Darmstadt, Germany )

### 3. 步驟:

將組織從-80 ℃ 冰箱取出，取適度大小的組織約 0.5×0.5×0.5 cm 剪碎，放入養菌管中，每 0.5 公克組織加入 500 μl Sheer's buffer。將組織倒入 dounce grinder 中，輕輕轉動、研磨，將研磨出之液體收集在 microtube 中，用 sonicator 將細胞震破均質，時間勿持續超過 30 秒，冰上冷卻後再繼續均質。再將均質好的樣品在 4 ℃ 時離心 13000 RPM × 10 分鐘，取其上清液保存於 - 20 ℃ 。

## 第三節 組織蛋白質定量

### 1. 應用原理

Bradford reagent 的 dye-binding method 是利用 Coomassie brilliant blue G-250 (CBG) 可與蛋白質結合而變色的特性來定量 (Bradford, 1976); 若試樣中的蛋白質量較多，則結合到蛋白質而變色的 CBG 也多，因而呈色較深。先以一組標準蛋白質 Bovine serum albumin (BSA) 為對象，製作一條蛋白質量與吸光度的標準校正線。

## 2. 儀器:

ELISA 光度計

(Anthos-2020,Salzbrug,Austria)

## 3. 試劑:

- Bradford reagent

(BIO-RAD, Hercules,California,USA)

- Bovine serum albumin(BSA)

(SIGMA, ST.Louis,MO,USA)

## 4. 步驟:

先將 ELISA 光度計電源打開暖機 30 分鐘，設定波長為 590nm。取 6 個薄壁微量管分別標示 0,5,10,15,20,25 並個別加入二次水,Bradford, Bovine serum albumin (BSA), 依照下列表格進行蛋白質量與吸光度的標準校正線:

組成	1	2	3	4	5	6
蛋白質濃度(μg/ml)	0	5	10	15	20	25
0.1mg/ml BSA(μl)	0	50	100	150	200	250
DDW(μl)	800	750	700	650	600	550
Bradford 染劑	200μl					
總體積	1000μl					

待反應 5 分鐘後，依 0~25 μg/ml 不同蛋白質濃度的次序分別放入 96

well plate 利用 590nm 波長測定吸光值微量滴定盤中以 ELISA 光度計測其吸光值，以製作 standard curve，其 R-squared 值在 0.980~0.999 之間。

#### 5. 樣品蛋白質濃度測定：

再取薄壁微量管製作待測樣本：10ul sample 加 200ul Bradford 加入 790ul 二次水，同樣地等反應 5 分鐘後放入 96well plate 利用 590nm 波長測定吸光值分光光度計中測吸光值，再以 standard curve 所求出的方程式換算出樣本蛋白質濃度。

### 第四節 蛋白質電泳分析

#### 1. 應用原理

採用 SDS-PAGE，偵測目標蛋白質之位置

#### 2. 儀器用具：

- 造膠台 Hoefer mini VE  
( Amersham Biosciences,Piscataway,NJ,USA)
- Power supply OWL OSP-135  
(Hoefer,San Francisco, USA)
- Power supply PS500 XT DC  
( Hoefer,San Francisco,USA)

#### 3. 藥品試劑：

## A. 上下層膠

藥品試劑	下層膠	上層膠
ddH <sub>2</sub> O	4.75ml	3.04ml
1.5M Tris . HCl ( pH : 8.8 )	2.5ml	-
1M Tris . HCl ( pH : 6.8 )	-	1.25ml
40% acrylamide /Bis	2.5ml	0.6ml
10 % SDS	0.1ml	50μl
10 % APS	50μl	50μl
Temed	10μl	5μl

- 1.5M Tris . HCl (pH 8.8 )  
( Pharmacia Biotech,Uppsala,Swedan )
- 1.0M Tris . HCl (pH 6.8)  
( Pharmacia Biotech,Uppsala,Swedan )
- 10% SDS  
( USB,Ohio,USA )
- 40% acrylamide /Bis solution  
( BIO-RAD, Hercules,California,USA)
- 10% APS  
( USB,Ohio,USA )
- TEMED  
( Pharmacia Biotech,Uppsala,Swedan )

## B. 染劑(4 ×dye):

- Glycerol 2 ml  
( MERCK,Darmstadt, Germany )
- 2-mercaptoethanol 1 ml  
( SIGMA, ST.Louis, MO,USA )
- 20 % SDS 3 ml  
( USB,Ohio,USA )
- 1M Tris . HCl ( pH6.8 ) 2.5 ml

( USB,Ohio,USA )

加入二次水 1.5 ml 再加入 0.01 % Bromophenol blue 有顏色即可

### C. Running buffer 組成:

組 成	重 量
Tris	30g
Glycine	144g
SDS	10g
加入 DDW 到 10 L	

- Tris ( Pharmacia Biotech,Uppsala,Swedan )
- Glycine ( USB,Ohio,USA ) 57.6 g
- SDS ( USB,Ohio,USA )

### D. Rainbow Marker

(BIO-RAD,Hercules,California,USA)

### E.0.1% Coomassie blue

- Coomassie brillant bule 0.25g  
( USB,Ohio,USA )
- Methanol 45 ml  
( TEDIA,Fairfield,Ohio,USA )
- Glyceial acetic acid 10 ml  
( MERCK,Darmstadt,Germany )

加入二次水到 100 ml

### 4. 步驟 :

準備一組鑄膠器 , 以酒精拭淨 , 組合後直立 , 準備 SDS 膠體溶液

依序如上表所列之藥品試劑。常用之膠體百分比為 10% ~12% 共需下層膠體溶液 10 ml 與上層膠體溶液 4 ml。將下層膠體溶液倒入鑄膠組合到 8 成高，儘量不要產生氣泡，再輕輕小心加上一層水層，靜置 30 分鐘。倒去水層，加上層膠體溶液到滿，並插入樣品槽齒模，靜置 30 分鐘、取下齒模即可進行電泳。將鑄好的膠及膠台放入電泳槽中，倒入 Running buffer，並用 dropper 抽吸將 Gel 下方的氣泡去除 鑄好的膠先以上 100V 300mA 預跑 15 分鐘 將預 loading 的蛋白質置入乾浴器 95 °C 加熱 5 分鐘後取出冷卻 將蛋白質 sample 15 µl 及 standard marker 7 µl 分別 loading 到各 Well 中，以 100V、300mA 跑膠 1 小時 30 分鐘。

## 第五節 西方墨漬法 (Western blot)

### 1. 應用原理:

轉印電泳後膠體上的蛋白質色帶轉印到硝化纖維 (nitrocellulose) 紙，再以免疫染色法 (immunostaining) 專一性地染出目標分子。

### 2. 儀器用具：

- Power supply OWL OSP-135  
(Hoefer, San Francisco, USA)
- Power supply PS500 XT DC  
(Hoefer, San Francisco, USA)
- PVDF Membrane  
(Hybond-P, Uppsala, Sweden)

- 3M papers ( 3M,ST. Paul Minnesota , USA )
- X-ray film (Fujifilm,Kanagawa ,Japan)
- Developer (Kodak,Rochester, NY, USA)
- Fixer (Kodak,Rochester, NY ,USA)
- ECL ( Pierce,Rockford ,Illinois ,USA ) 內含

第一劑:supersignal west pico stable peroxide solution

第二劑:supersignal west pico luminol/enhancer solution

### 3.試劑:

#### A.Transfer buffer :

組 成	重 量	總容積
Tris	18.2g	加 DDW 到 6000ml
Glycine	86.4g	
100% MeOH	1200 ml	

- Glycine ( USB,Ohio,USA )
- Tris ( Pharmacia Biotech,Uppsala,Swedan )
- Methanol ( TEDIA,Fairfield,Ohio,USA )

#### B. PBST

加 0.1% Tween 20 ( USB,Ohio,USA ) 至 1X PBS

#### C. 5% fat free Milk

- Fat free milk ( Anchor,Wellington,Newzealand ) 2.5 g
- Tween 20 ( USB,Ohio,USA ) 50µl

加 1X PBS 至 50 ml

#### D. 抗體 :

##### 第一級抗體 :

Fas Ligand 1:1000

(BD Pharmingen ,California ,USA)

Fas 1:500

(BD Pharmingen ,California ,USA)

caspase 8 1:1000

(BD Pharmingen ,California ,USA)

caspase 9 1:1000

(BD Pharmingen ,California ,USA)

caspase 3 1:1000

(BD Pharmingen ,California ,USA)

PCNA 1:1000

(BD Pharmingen ,California ,USA)

p21 1:1000

(BD Pharmingen ,California ,USA)

p27 1:1000

(BD Pharmingen ,California ,USA)

p53 1:500

(BD Pharmingen ,California ,USA)

E2F1 1:500

(BD Pharmingen ,California ,USA)

Phospho-Rb 1:500

(BD Pharmingen ,California ,USA)

## 第二級抗體：

peroxidase-conjugated anti-mouse IgG

(BD Pharmingen ,California ,USA)

peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG

(BD Pharmingen ,California ,USA)

## 3. 轉漬步驟:

進行轉漬時先將轉漬夾片的黑色面朝下，取海棉片 1 片浸泡轉漬 buffer 後放在其上。依序在海棉片上放 3M paper 2 片、Gel、PVDF membrane 1 片（先用 100% 甲醇濕潤 15 秒、再浸泡轉漬 buffer 1 分鐘）、3M paper 2 片，最後再放上 1 片海棉片。轉漬夾片合上並放入轉漬 box（內置磁石 1 顆）並加滿轉漬 buffer，將轉漬 box 放上攪拌器，接電源供應器，按 DC 開始電源設定為 50 伏特，整個儀器放進  
4 冰箱轉印時間 2 小時 30 分鐘。2 小時 30 分鐘後自轉漬 box 內取

出 gel 及 membrane。將 membrane 放入 5 % milk 加 0.1 % Tween in PBS (即 0.1 % PBST) blocking 1 小時後置於 0.1 % PBST 泡一下以 3M paper 壓乾。membrane 放於封口袋內加入第一級抗體，封口機封好放入 4 冰箱隔夜 ( blocking )。隔日取出 membrane 置於 0.1 % PBST 中 blocking 20 分鐘共 3 次。membrane 以 3M paper 壓乾放於封口袋內加入第二級抗體，封口機封好置於室溫 blocking 1 小時。取出 membrane 置於 0.1 % PBST 中 blocking 20 分鐘共 3 次。最後於暗房中，將 membrane 加入 ECL ( 1 ) ( 2 ) 劑各 0.5ml 以反應出螢光，片夾內置入 X-ray film 與 membrane 進行壓片，再取出 X-ray film，進行顯影及定影。Protein band 含量採 Kodak digital science 1D (ver.2.03) ( Kodak, Rochester, NY, USA ) 軟體分析。

## 第六節 統計分析方法

數據統計分析採用 Sigma plot 8.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) 統計軟體之 paired *t*-test，mean ± SE 表示各項結果平均值±標準誤，圖中\*表示與控制組相比  $P < 0.05$ ；當\*  $P < 0.05$  時，表示該實驗數據有統計學上的明顯差異。

## 實驗結果

表一、實驗組織檢體來源之自願者年齡及性別之比較:

	控制組織 (IT)	鼻息肉組織 (NP)
人數	12 人	12 人
平均年齡	32.26 歲	30.83 歲
標準誤	2.86	1.71
標準差	15.67	9.36
年齡最小值	18 歲	19 歲
年齡最大值	64 歲	51 歲
性別(男)	8 人	9 人
性別(女)	4 人	3 人

12 位非鼻息肉自願者(控制組織)及 12 位鼻息肉自願患者(鼻息肉組織)

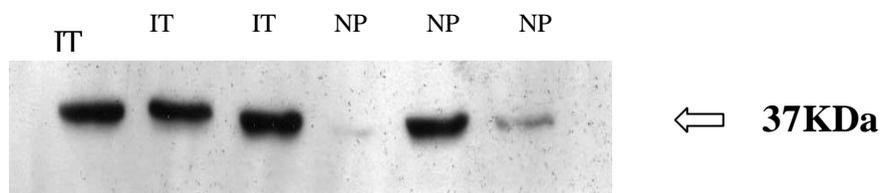
兩組在年齡及性別上無明顯之統計學上差異。

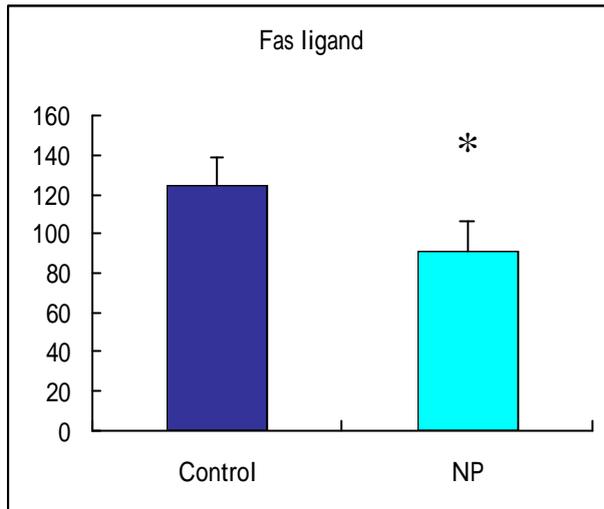
第一節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 Fas Ligand 蛋白

質表現之比較

經皮質類固醇治療四星期後， 12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12 個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析及西方墨漬法( Western blot )，經由加入 Fas Ligand 抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 Fas Ligand 的蛋白質表現量。控制組組織平均數為 124.87；標準誤 14.30，鼻息肉組織平均數為 91.47；標準誤 14.95。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 Fas Ligand 蛋白質表現明顯比控制組織減少(P value =0.0436) (P<0.05)。

### Fas Ligand





\*( $P < 0.05$ )

圖 1.經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 Fas Ligand 蛋白質表現之比較

Results of an density analysis Fas Ligand performed on human non-nasal polyps(as control) and nasal polyps(as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error is expressed as standard error of the mean. There was a significant difference (\*, $P < 0.05$ )between control( $n=12$ )and NP( $n=12$ ) groups.

## 第二節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 Fas 蛋白質表現之比較

經皮質類固醇治療四星期後， 12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12 個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析及西方墨漬法(Western blot)，經由加入 Fas 抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 Fas 的蛋白質表現量。控制組組

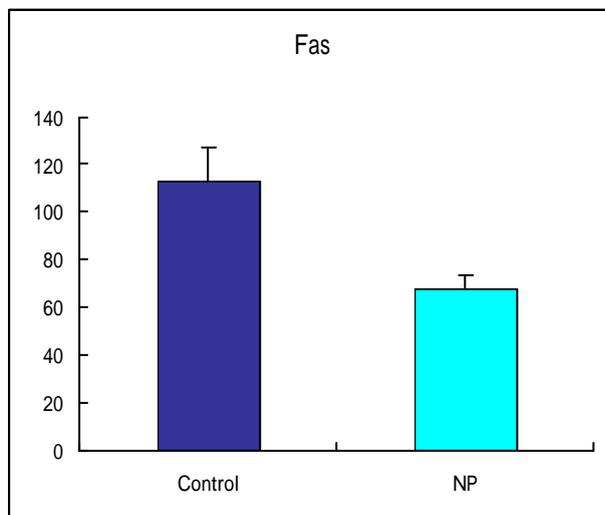
織平均數為 172.036；標準誤 34.47，鼻息肉組織平均數為 99.61；標準誤 36.99。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 Fas 蛋白質表現明顯比控制組織減少(P value =0.38319)(P>0.05)。

## Fas

IT IT IT NP NP NP



← 45KDa



( $P>0.05$ )

## 圖 2.經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 Fas 蛋白質表現之比較

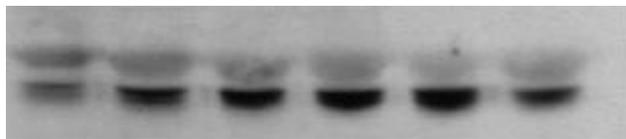
Results of an density analysis Fas performed on human non-nasal polyps(as control) and nasal polyps(as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error is expressed as standard error of the mean. There was no significant difference between control (n=12)and NP(n=12)groups.

## 第三節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 caspase8 蛋白質表現之比較

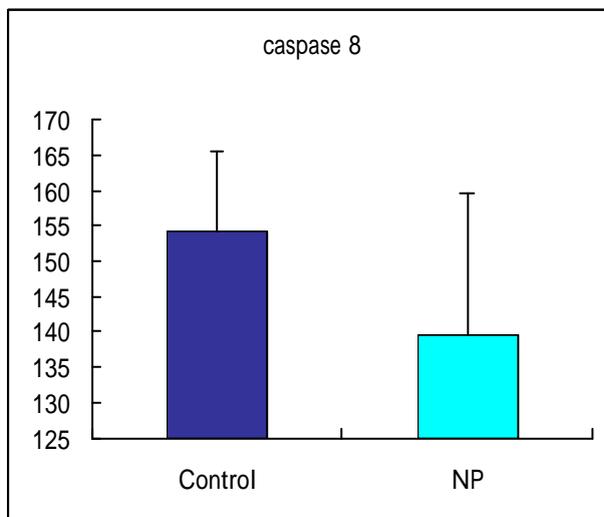
經皮質類固醇治療四星期後， 12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12 個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE蛋白質電泳分析及西方墨漬法(Western blot )，經由加入 caspase 8 抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 caspase 8 的蛋白質表現量。控制組組織平均數為 154.32；標準誤 11.32，鼻息肉組織平均數為 139.49；標準誤 20.24。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 caspase 8 蛋白質表現與控制組織無明顯差異( $P$  value =0.4268) ( $P>0.05$ ) 。

## Caspase 8

IT IT IT NP NP NP



← 55KDa



( $P > 0.05$ )

圖 3.經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 caspase 8 蛋

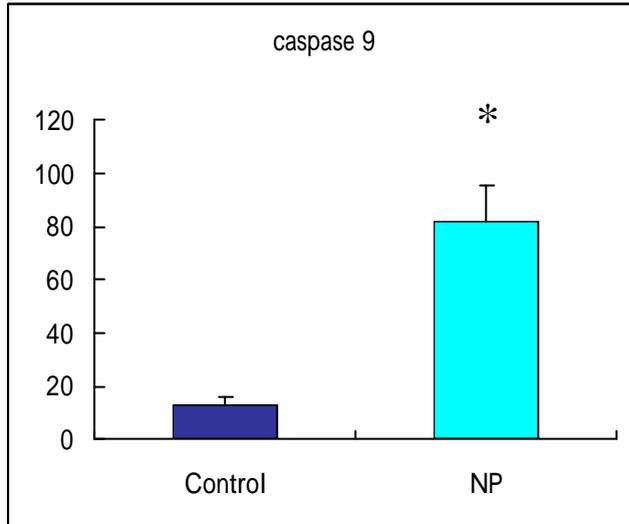
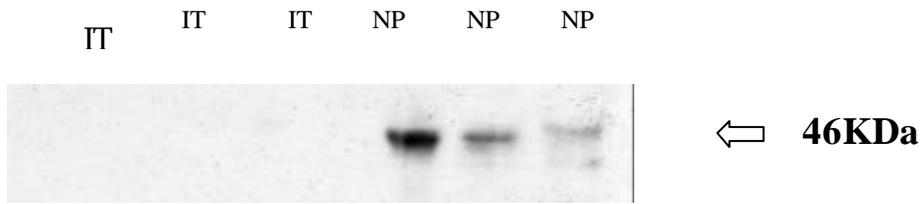
白質表現之比較

Results of an density analysis caspase 8 performed on human non-nasal polyps(as control) and nasal polyps(as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error

is expressed as standard error of the mean. There was no significant difference between control(n=12)and NP(n=12) groups.

#### 第四節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 caspase9 蛋白質表現之比較

經皮質類固醇治療四星期後， 12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12 個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE蛋白質電泳分析及西方墨漬法(Western blot )，經由加入 caspase 9 抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 caspase 9 的蛋白質表現量。控制組組織平均數為 12.91；標準誤 3.14，鼻息肉組織平均數為 81.93；標準誤 13.76。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 caspase 9 蛋白質表現與控制組織無明顯差異(P value =0.0412) (P<0.05) 。



(P<0.05)

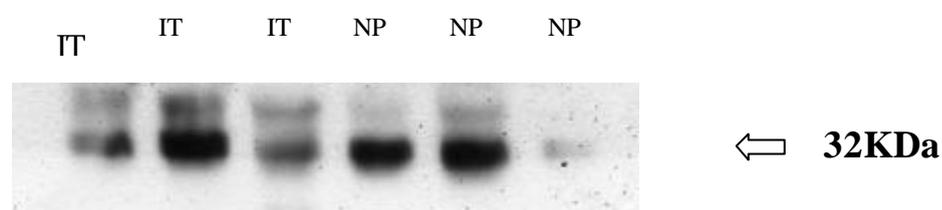
圖 4.經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 caspase 9 蛋白質表現之比較

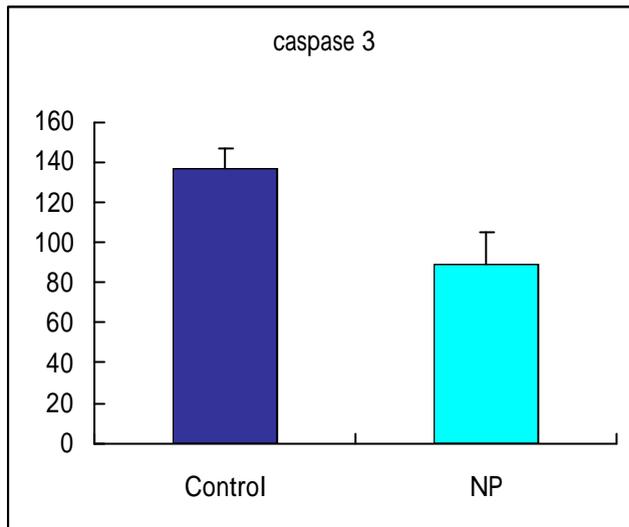
Results of an density analysis caspase 9 performed on human non-nasal polyps(as control) and nasal polyps(as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error is expressed as standard error of the mean. There was a significant difference(\*,P<0.05) between control(n=12)and NP(n=12) groups.

第五節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 caspase3 蛋白質表現之比較

經皮質類固醇治療四星期後， 12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12 個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析及西方墨漬法( Western blot )，經由加入 caspase 3 抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 caspase 3 的蛋白質表現量。控制組組織平均數為 137.07；標準誤 9.89，鼻息肉組織平均數為 89.21；標準誤 15.43。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 caspase 3 蛋白質表現與控制組織無明顯差異(P value =0.1741) (P>0.05) 。

### Caspase 3





( $P > 0.05$ )

圖 5.經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 caspase 3 蛋白質表現之比較

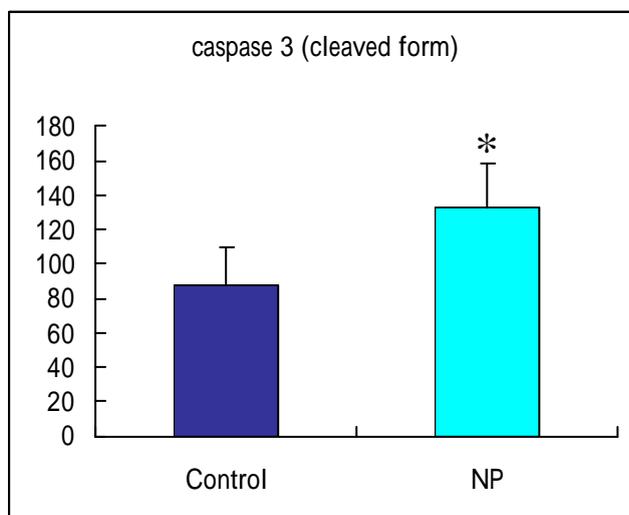
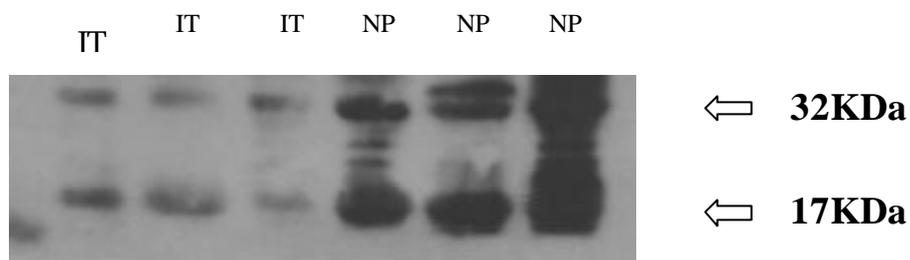
Results of an density analysis caspase 3 performed on human non-nasal polyps(as control) and nasal polyps(as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error is expressed as standard error of the mean. There was no significant difference between control(n=12)and NP(n=12) groups.

#### 第六節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 caspase 3 (cleaved form)蛋白質表現之比較

經皮質類固醇治療四星期後， 12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12 個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析及西方墨漬法( Western blot )，經由加入 caspase 3(cleaved form)抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 caspase

3 的 17kDa 蛋白質表現量。控制組組織平均數為 88.03; 標準誤 22.21 , 鼻息肉組織平均數為 132.89 ; 標準誤 25.65。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 caspase 3 17kDa 蛋白質表現明顯比控制組織增加(P value =0.03314) (P<0.05) 。

### Caspase 3 ( cleaved form )



\*( $P < 0.05$ )

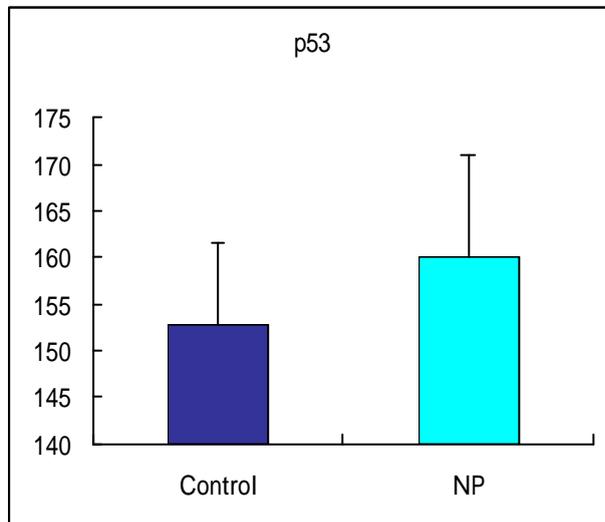
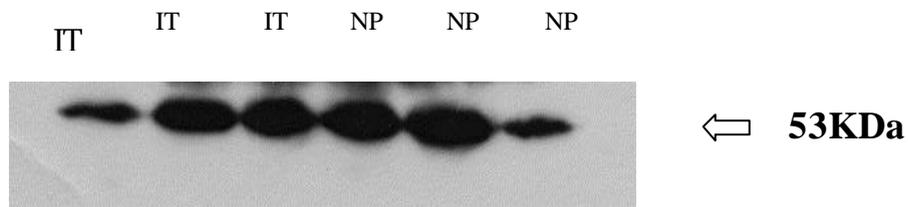
## 圖 6. 經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 caspase 3 (cleaved form) 17kDa 蛋白表現之比較

Results of an density analysis caspase3 17kDa protein performed on human non-nasal polyps (as control) and nasal polyps(as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error is expressed as standard error of the mean. There was a significant difference (\*, $P < 0.05$ ) between control (n=12)and NP (n=12)groups.

## 第七節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 p53 蛋白質表現之比較

經皮質類固醇治療四星期後， 12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12 個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析及西方墨漬法( Western blot )，經由加入 p53 抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 p53 蛋白質表現量。控制組組織平均數為 152.73；標準誤 8.75，鼻息肉組織平均數為 160.06；標準誤 10.99。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 p53 蛋白質表現與控制組織無明顯差異( $P \text{ value} = 0.2659$ ) ( $P > 0.05$ )。

P53



( $P > 0.05$ )

圖 7.經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 p53 蛋白質表

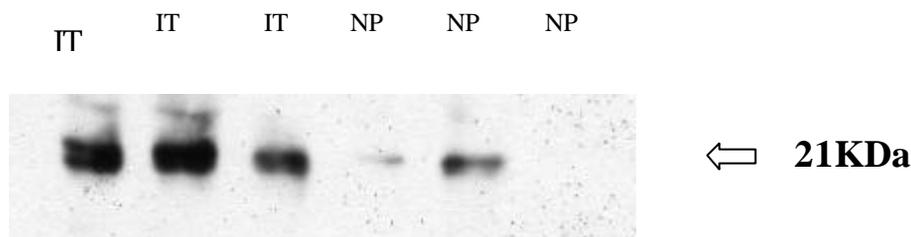
現之比較

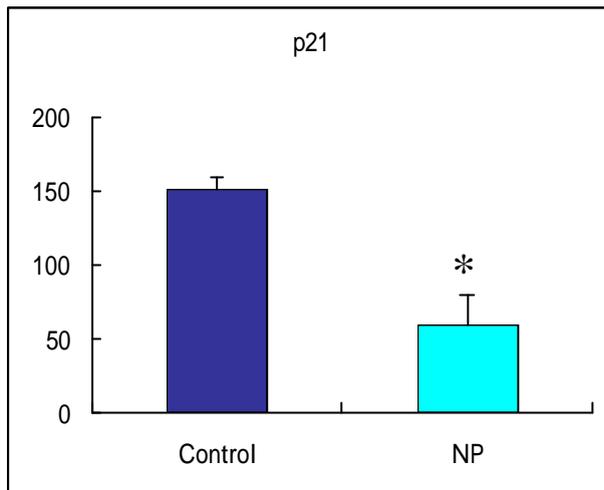
Results of an density analysis p53 performed on human non-nasal polyps(as control) and nasal polyps(as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error is expressed as standard error of the mean. There was no significant difference between control(n=12)and NP(n=12)groups.

## 第八節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 p21 蛋白質表現之比較

經皮質類固醇治療四星期後，12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12 個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析及西方墨漬法( Western blot )，經由加入 p21 抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 p21 蛋白質表現量。控制組組織平均數為 151.44；標準誤 7.71，鼻息肉組織平均數為 58.57；標準誤 20.73。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 p21 蛋白質表現明顯比控制組織減少(P value =0.0154) (P<0.05)。

P21





\*( $P < 0.05$ )

圖 8.經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 p21 蛋白質表現之比較

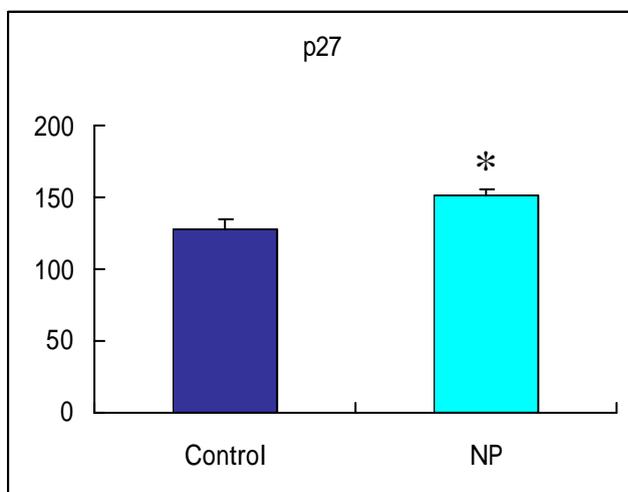
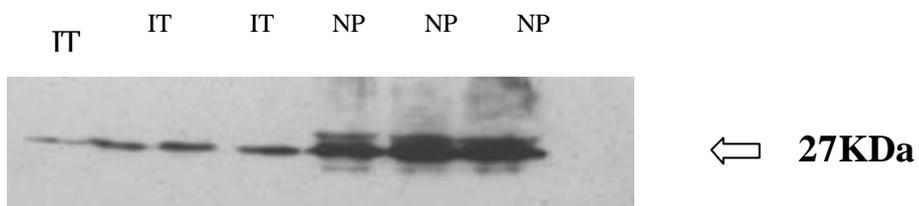
Results of an density analysis p21 performed on human non-nasal polyps(as control) and nasal polyps(as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error is expressed as standard error of the mean. There was a significant difference (\*, $P < 0.05$ ) between control( $n=12$ )and NP ( $n=12$ ) groups.

### 第九節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 p27 蛋白質表現之比較

經皮質類固醇治療四星期後， 12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12 個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析及西方墨漬法( Western blot )，經由加入 p27 抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 p27 蛋白質表現量。控制組組

織平均數為 127.64 ; 標準誤 6.94 , 鼻息肉組織平均數為 150.67 ; 標準誤 4.66。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 p27 蛋白質表現明顯比控制組織增加(P value =0.0108) (P<0.05) 。

P27



\*(P<0.05)

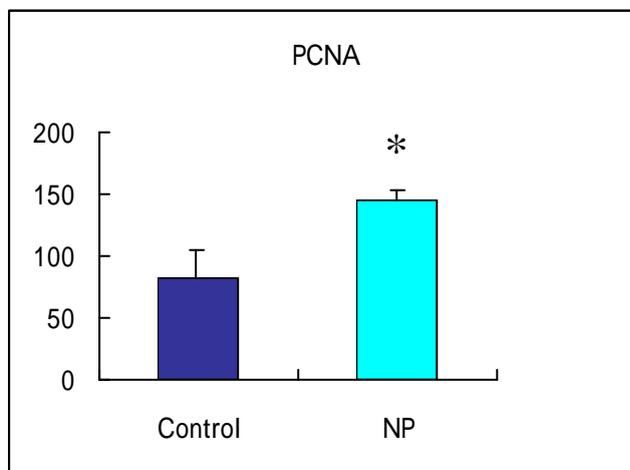
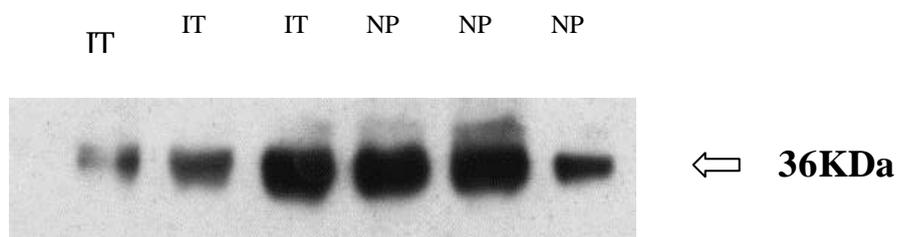
## 圖 9.經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 p27 蛋白質表現之比較

Results of an density analysis p27 performed on human non-nasal polyps(as control) and nasal polyps(as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error is expressed as standard error of the mean. There was a significant difference (\*,P<0.05) between control(n=12)and NP(n=12) groups.

## 第十節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 PCNA 蛋白質表現之比較

經皮質類固醇治療四星期後， 12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12 個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析及西方墨漬法( Western blot ),經由加入 PCNA 抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 PCNA 蛋白質表現量。控制組組織平均數為 82.72；標準誤 21.76，鼻息肉組織平均數為 145.56；標準誤 7.12。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 PCNA 蛋白質表現明顯比控制組織增加(P value =0.0489) (P<0.05)。

PCNA



\*(P<0.05)

圖 10.經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 PCNA 蛋白質表現之比較

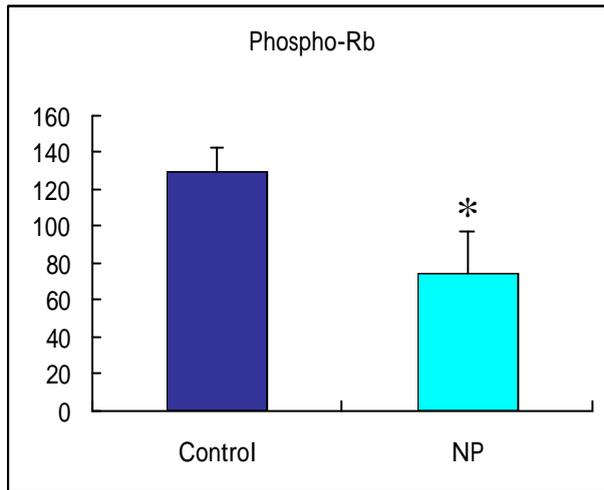
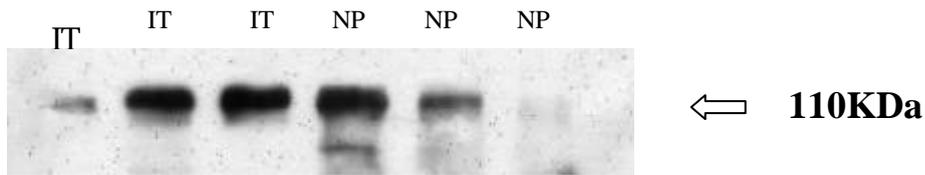
Results of an density analysis PCNA performed on human non-nasal polyps(as control) and nasal polyps(as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error

is expressed as standard error of the mean. There was a significant difference (\*, $P<0.05$ ) between control( $n=12$ )and NP( $n=12$ ) groups.

## 第十一節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 pRb 蛋白質表現之比較

經皮質類固醇治療四星期後， 12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12 個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析及西方墨漬法( Western blot )，經由加入 pRb 抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 pRb 蛋白質表現量。控制組織平均數為 129.58；標準誤 13.40，鼻息肉組織平均數為 74.72；標準誤 21.86。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 pRb 蛋白質表現明顯比控制組織減少( $P$  value =0.0338) ( $P<0.05$ )。

Phospho-Rb



\*( $P < 0.05$ )

圖 11.經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 pRb 蛋白質表現之比較

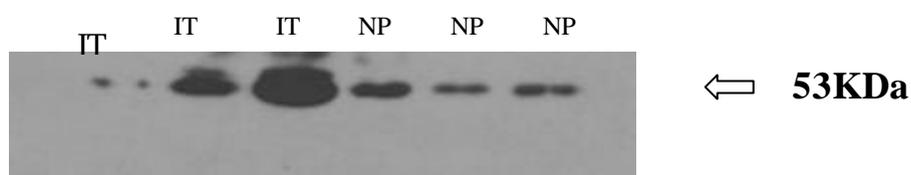
Results of an density analysis phospho-Rb performed on human non-nasal polyps(as control) and nasal polyps(as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error is expressed as standard error of the mean. There was a significant difference (\*, $P < 0.05$ ) between control( $n=12$ )and NP( $n=12$ ) groups.

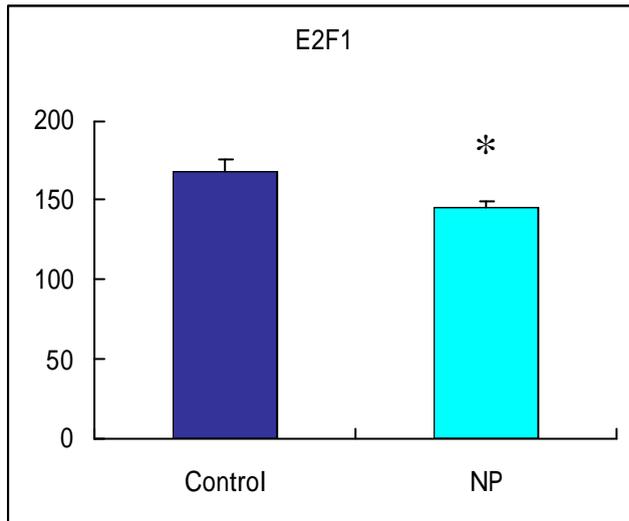
## 第十二節 經皮質類固醇治療後控制組織與鼻息肉組織 E2F1 蛋白質表現之比較

經皮質類固醇治療四星期後， 12 個非鼻息肉患者的控制組織與 12

個鼻息肉自願患者的鼻息肉組織經蛋白質抽取定量，分別做 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析及西方墨漬法( Western blot )，經由加入 E2F1 抗體，以比較控制組織及鼻息肉組織中 E2F1 蛋白質表現量。控制組組織平均數為 168.06；標準誤 7.02，鼻息肉組織平均數為 144.98；標準誤 4.48。統計結果顯示經皮質類固醇治療四星期後鼻息肉組織中的 E2F1 的蛋白質表現明顯比控制組織減少 (P value =0.000094) (P<0.05)。

E2F1





\*( $P < 0.05$ )

圖 12.經皮質類固醇治療四星期後控制組織與鼻息肉組織 E2F1 蛋白質表現之比較

Results of an density analysis E2F1 performed on human non-nasal polyps(as control) and nasal polyps (as NP)tissues 4 weeks after corticosteroids treatment. Error is expressed as standard error of the mean. There was a significant difference (\*, $P < 0.05$ ) between control( $n=12$ )and NP( $n=12$ ) groups.

## 討 論

過敏與慢性發炎是鼻息肉形成的主要原因之一，從鼻息肉的組織形態學上可看到其有明顯的黏膜上皮損傷，且在基質產生腫脹，形成假性囊腫並浸潤著發炎細胞。其中約有 80 - 90 % 的鼻息肉有嗜伊紅性白血球增加的情[1,3]。

鼻息肉組織的嗜伊紅性白血球增加，可解釋為移行到組織的嗜伊紅性

白血球數量上的增加，或者是因為某些機轉而抑制它的細胞凋亡，導致它的壽命增長，或者同時存在此兩種因素而造成組織的嗜伊紅性白血球增加[11,12]。

隨著鼻息肉組織大小的增加，常會造成患者味覺上的喪失、鼻塞，進而影響呼吸。在臨床上，治療鼻息肉的方式包括：進行外科手術切除或長期給予局部的腎上腺皮質醇來治療。然而，若單純採用以外科手術切除，其復發率較高。因此，目前多先採以外科手術切除，再長期給予局部的皮質類固醇來治療，以降低手術後復發率[13,14]。

皮質類固醇為親脂性之小分子，具有調節不同生物過程之作用。研究發現人體免疫系統對於皮質類固醇之生物作用過程非常敏感，並經證實皮質類固醇會促使血液系統中，T 淋巴球、單核球及嗜伊紅血球等發炎細胞之凋亡[74-76]。自 1973 年起，臨床開始以局部給予皮質類固醇之方式來治療過敏性鼻炎，後來亦證實經由鼻滴劑及鼻噴劑等，亦可應用於鼻息肉的治療及降低手術後復發率。其治療機轉目前仍未確認，但可能包括：皮質類固醇會經由活化特定之死亡基因轉錄，以啟動一連串之細胞凋亡連鎖反應。或者經由抑制生存基因，特別是對細胞週期 G1 期進入 S 期 之間的基因調控，致使細胞週期停滯，進而造成細胞凋亡[77]。

本篇研究也以這二個方向來探討經由局部給予皮質類固醇方式治療

鼻息肉之可能機轉。

### 第一節 皮質類固醇與鼻息肉組織細胞的凋亡

本篇分別偵測細胞凋亡中，外在途徑及內在途徑的訊息分子來了解皮質類固醇治療鼻息肉之可能機轉。外在途徑主要經由活化死亡受體 (death receptor, 如 Fas L (Apo-1L ; CD95L), 經由和它們死亡區或受體如 Fas 結合, 之後活化 caspase 8 進而活化 caspase 3, 執行細胞凋亡, 如此藉由和標的細胞上的相對受體之間的結合而傳遞訊息, 影響細胞的生物反應, 主要與個體免疫系統及發炎反應的調節有關 [78,79]。將相同的方式與劑量, 給予鼻息肉患者皮質類固醇治療後, 經手術取得鼻息肉的組織及控制組織分別作組織均質與蛋白質定量, 取相同蛋白質量來作 western blot 分析從結果發現鼻息肉組織的 Fas ligand(Apo-1L 或 CD 95 L) 蛋白質表現量明顯較控制組織(inferior turbinate)減少( $P < 0.05$ )。Fas ligand 參與了細胞凋亡的啟動, 而它主要表現於活化的下淋巴球細胞膜表面, 另外它也可以在一些非淋巴性組織如眼睛、睪丸、大腦看到它的表現。當組織發生局部發炎時會刺激其上皮細胞大量表現 Fas ligand。因此, 它的表現增加與發炎及病毒感染有著密切關係[80]。除此之外, 在一些癌化的腫瘤細胞, 它也會大量表現 Fas ligand 使得這些不正常細胞能逃脫個體免疫系統的

監控[80]。在 Fang 和 Yang 的研究發現在鼻息肉組織中可看到 Fas ligand 基因及蛋白表現量明顯較正常組織增加且經免疫染色發現人類鼻息肉組織的 Fas ligand 蛋白表現主要集中在與鼻息肉新腺體形成有關的上皮細胞生長下層[81-83]。

本篇結果發現在給予皮質類固醇後鼻息肉組織的 Fas ligand 蛋白表現明顯較控制組織低( $P < 0.05$ )，而在 Fas 蛋白表現兩組並無明顯差異，這似乎可解釋為經由給予皮質類固醇可降低鼻息肉組織中活化的 T-淋巴球的數量，另一方面它也抑制了鼻息肉組織上皮細胞 Fas ligand 蛋白表現。然而，Fas ligand 既然是與 Fas 結合共同啟動外在途徑的細胞凋亡，且 Fas ligand 主要表現在與鼻息肉新腺體形成有關的上皮細胞生長下層，為何給予皮質類固醇治療後，其 Fas ligand 蛋白表現下降而細胞凋亡的執行蛋白 caspase 3(cleaved form)反而增加呢？是否 Fas ligand 蛋白在鼻息肉組織中也扮有使組織細胞逃脫免疫監控的功能，因而有利鼻息肉的形成，一旦給予皮質類固醇治療後，Fas ligand 蛋白表現下降，使得鼻息肉組織不再享有特權並接受正常免疫監控，且在皮質類固醇的作用下啟動細胞凋亡的蛋白分子，促進鼻息肉組織細胞走向凋亡。然而是否真的如此，仍有待進一步的研究。

在 caspase 的表現結果發現，經皮質類固醇治療的鼻息肉組織中

caspase 8、caspase 9 及 caspase 3 的蛋白表現與控制組織並沒有明顯差異。這個結果的可能原因是 caspase 在正常狀態下是以無活性的原酶 (procaspase) 形式存在。當它接收到凋亡訊息時, procaspase 會被剪切成為大、小兩個片段(約 20kb 和 10kb) 並釋放 N-端前構區域形成 heterodimer, 兩個 heterodimer 結合形成一個含有四條蛋白質片段的聚合物時才具有活性[47-51]。因此, 在本實驗中單以 caspase 8、caspase 9 及 caspase 3 的抗體做 Western Blot 分析其蛋白質表現量, 並無法得知 caspase 蛋白酶是否具活性。基於此, 我們再用 caspase 3 活化態 (cleaved form) 抗體, 同樣以 Western blot 來做 caspase 3 的蛋白質分析, 若組織中的 caspase 3 是已被活化的蛋白酶, 將可在 western blot 分析中出現 22kD 及 17kD 的蛋白質表現。結果指出鼻息肉組織的 17kD 蛋白表現明顯較控制組織增加( $P < 0.05$ )。

Caspase 3 位在 caspase 8、caspase 9 的下游, 為細胞凋亡內、外途徑中的共同路徑, caspase 8、caspase 9 為細胞凋亡的啟動蛋白酶。雖然從實驗中無法合理解釋鼻息肉組織細胞是經由那一條途徑進行凋亡, 但因其共同路徑 caspase 3 扮演著執行細胞凋亡的角色, 一旦 caspase 3 被活化後會去分解細胞內的蛋白並導致核內蛋白酶活性增加而將 DNA 降解成 180-200 base pairs 多聚體的 DNA 片段。因此, 從鼻息肉組織 caspase 3 裂解成 17kD 蛋白表現明顯增加, 可確定其 caspase

3 已被活化，並推論經皮質類固醇治療的鼻息肉組織較控制組織有明顯進行細胞凋亡的現象。

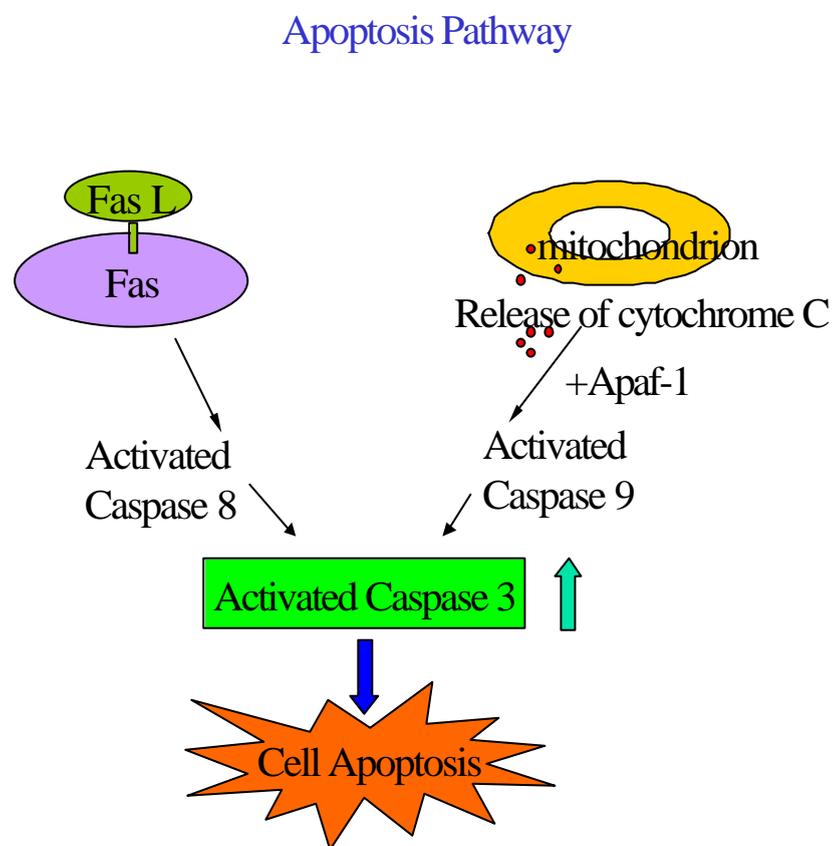


圖 17.鼻內皮質類固醇促進鼻息肉組織細胞凋亡可能的途徑

## 第二節 皮質類固醇與鼻息肉組織中細胞周期的調控

皮質類固醇除了可能活化特定的死亡基因轉錄以啟動細胞凋亡外，也

可能藉由抑制生存基因致使細胞周期停滯，促進浸潤在鼻息肉組織中的發炎性細胞進行凋亡以降低發炎反應，進而達治療效果[26,27]。在此研究中，分別分析 G1 期的調控基因 p53、p21、PCNA、p27、pRb 及轉錄活化因子 E2F 的蛋白質表現，以了解皮質類固醇對鼻息肉組織細胞周期中 G1 期調控的可能影響[84-86]。

p53 蛋白是一個很重要的腫瘤抑制基因，當正常細胞受損或已癌化的細胞會經由 p53 依賴或非依賴途徑促使 p21 合成。p21 是一個 21-kDa 的細胞周期調節蛋白，它的基因位在 6p21.2 為位置。當正常或已癌化的細胞會經由 p53 依賴或非依賴途徑促使 p21<sup>WAF1</sup> 合成，導致細胞周期停止於 G1 期或 S 期以利細胞進行損害 DNA 的修復[87,88]。

一般相信 p21<sup>WAF1</sup> 會抑制細胞分裂並與正常細胞的分化、老化及癌化息息相關，並與 p53 和 Rb 共同調節及引發細胞凋亡[89,90]。p53 會直接且具特異性的與 DNA 結合而調控 p21<sup>WAF1</sup> 分子的表現。研究發現增加 p53 蛋白分子表現會促使腫瘤細胞進行細胞凋亡。在正常狀況下，p53 蛋白的半衰期約只有三十分鐘且相當不穩定，若將正常細胞暴露在放射線、紫外線或其他 DNA 傷害源時會活化 p53 分子，同時提高它的穩定性，造成細胞內的 p53 蛋白大量增加，而 p21<sup>WAF1</sup> mRNA 和蛋白質量也會快速增加，結果造成細胞周期停滯或細胞凋亡[89,90]。

如此可使受損的細胞得以修復或移除過度受損的細胞。在 p21<sup>WAF1</sup>(-/-)

細胞給予放射線刺激並不會使細胞周期停止，並發現在細胞周期的調控中，p53 會去調控下游的 p21。p21 會經由 G1 關卡(Check point) 以反應各種外在及內在環境因素以決定細胞周期是否繼續進行或終止。p21<sup>WAF1</sup> 經由與周期素 A (或 B、D、E)、CDK2 (或 CDK 4) 及 PCNA 形成四合體，當 CDKs 與 p21<sup>WAF1</sup> 結合時，它的活性就會受到抑制，藉由抑制 CDKs 來引發細胞周期停止[91,92]。如此一來，驅動細胞周期的增生訊息如 Rb 的磷酸化、活化的 E2F 或 DNA Polymerase 的合成及 CDKs 就不會被引發，使得細胞周期停止在 G1 期。另外，當 p21<sup>WAF1</sup> 與 PCNA 結合時，會打開 DNA Polymerase 與 PCNA 間的接合以抑制 DNA 的合成進而抑制細胞增殖。也就是說 p21<sup>WAF1</sup> 可同時抑制 CDK 及 PCNA 使得細胞周期無法進行[93]。

目前認為鼻息肉的形成主要與慢性的組織發炎有關，而非細胞受損或發生癌化現象。因此，在此研究結果顯示 P53 蛋白質表現在鼻息肉組織及控制組織間並無明顯不同。

另外，在鼻息肉組織其 P21 蛋白明顯較控制組織減少(P<0.05)，而 PCNA 則明顯較控制組織增加(P<0.05)。依此結果推論皮質類固醇非經由調控 P21 蛋白來促進鼻息肉組織細胞周期停止及凋亡。或者最好再有一組未經皮質類固醇治療的鼻息肉組織及正常組織來對照比較四組的 p21 蛋白表現，將能更確定皮質類固醇對鼻息肉組織中 p21、

PCNA 細胞周期調控蛋白的影響。

p27 基因位在染色體 12p12-12p13.1 接合點上 12p13 的位置，於 1994 年被純化出來。p27 蛋白分子最初是在經生長因子處理過的細胞培養中發現，一般認為 p27 參與細胞生長的接觸與性抑制。在體外培養的細胞當它細胞量增殖達到臨界密度時，細胞會出現生長的接觸抑制，並刺激 p27 蛋白分子表現[94,95]。另外，p27 在細胞周期的任一個階段皆可藉由抑制 cyclins 與 CDKs 複合物的活性，尤其是對 G1 期 cyclinE-CDK2 複合物的抑制，使細胞停滯在 G1 期，進而抑制細胞的分裂與增殖。大部份研究指出；p27 蛋白在正常和腫瘤細胞中扮演著 CDKs 抑制的角色，並推測它是一個腫瘤抑制基因[96-98]。

從結果發現經皮質類固醇治療的鼻息肉組織中 p27 蛋白表現明顯較控制組織增加( $P < 0.05$ )，p27 蛋白增加時會抑制 cyclin E-CDK2 複合物的活性，當 cyclin E-CDK2 活性被抑制後，將使得磷酸化的 Rb 減少，而被 Rb 釋放出來、未結合態的轉錄活化因子 E2F 的蛋白質表現也將減少。Rb 家族共有三個成員分別是 pRb、p107 和 p130，它們都與細胞周期的調控有關[99]。pRb 蛋白是 105-110 kDa 的核內磷酸蛋白，它主要是藉由活化的 cyclin E-CDK2 複合物使其磷酸化[100]。研究結果發現經皮質類固醇治療的鼻息肉組織，其磷酸化的 Rb 蛋白表現明顯較控制組織減少( $P < 0.05$ )。

除此之外，在 E2F 的 western blot 蛋白質分析上也發現在鼻息肉組織的 E2F 表現明顯較控制組織減少( $P < 0.05$ )。E2F 是細胞周期由 G1 期進入 S 期及 DNA 複製中數種調控基因轉錄的活化因子，E2F 的成員包括 E2F-1、 E2F-2、 E2F-3、 E2F-4 及 E2F-5，所有的成員皆能活化 E2F 所調控基因的轉錄[101]。當細胞處在 G1 期與 S 期之間時可偵測到 E2F-1、 E2F-2 和 E2F-3 的大量表現，因此它們對細胞周期是否由 G1 期進入 S 期扮有決定性角色。另外，E2F-4 及 E2F-5 則主要表現於 G0 期靜止狀態的細胞，且與 Rb 家族中的 p107 和 p130 蛋白結合[102,103]。研究中我們選用 E2F-1 抗體來做組織 E2F-1 蛋白分析，從鼻息肉組織的 E2F 表現減少的結果可推論：經皮質類固醇治療的鼻息肉組織中的發炎性細胞進入 S 期的數量比控制組織細胞來得少，也就是說皮質類固醇能將鼻息肉組織細胞停滯在 G1 期。



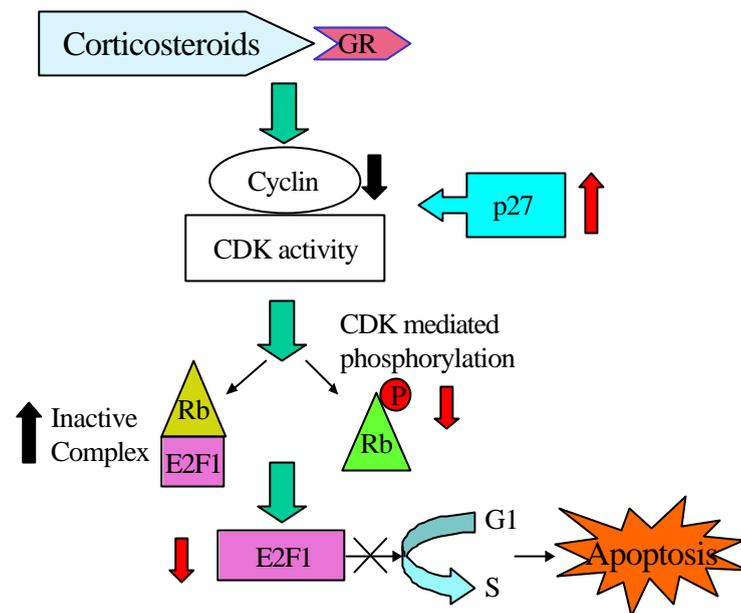


圖 18.鼻內皮質類固醇影響鼻息肉組織內細胞周期調控的可能機轉

## 結 論

鼻息肉的形成與組織的慢性發炎有著密切的關係，臨床實驗證實經由局部給予皮質類固醇治療能有效改善鼻息肉的症狀及其大小。皮質類固醇具有抑制細胞增殖的作用，特別是對分裂快速的免疫細胞的增殖抑制尤其明顯。從實驗結果推論，皮質類固醇一方面經由活化特的死亡基因蛋白如 caspase 3 來執行鼻息肉組織中發炎細胞的凋亡，另一方面則藉由影響細胞周期中 G1 期的調控基因如 p27、pRb 及轉錄活

化因子 E2F 的蛋白質表現，使得細胞停滯在 G1 期，進而促使浸潤在鼻息肉中的發炎性細胞進行凋亡，降低發炎反應以達其治療效果。

## 研究限制及建議

鼻息肉主要組成成份為各種發炎性細胞，包括 T-淋巴球、單核球、嗜中性白血球及嗜伊紅性白血球，是否所有的發炎性細胞在給予皮質類固醇治療後皆會增加其細胞的凋亡，或者少數發炎細胞反而是處在增殖的狀況。因此，若能將鼻息肉中的細胞分離、純化後再作相同的分析，將更有助於了解鼻息肉中各種發炎細胞對皮質類固醇治療後的確切反應。

另外，也可再分析更多的細胞周期調控分子如 CDKs 及 cyclins 的蛋白質表現與其活性分析，將能更完整的了解皮質類固醇對鼻息肉中發炎細胞之細胞周期的影響。