



中國醫藥大學  
基礎醫學研究所  
碩士學位論文

iNOS 及 Src 於 LPS 誘發 IL-6 的角色探討

The Role of Inducible Nitric Oxide Synthase and Src for  
LPS-Stimulated Interleukin-6 Secretion

指導教授：馬明琪教授

(Dr. Ming-Chei Maa)

研究生：黃春霖

(Chun-Lin Huang)

中華民國九十八年七月

## 目 錄

致謝.....	III
中文摘要 (Abstract in Chinese).....	IV
英文摘要 (Abstract in English).....	V
第一章 序論 (Introduction).....	1
1) 免疫系統及巨噬細胞的活化.....	1
2) Cytokines 及 IL-6.....	2
3) Nitric Oxide 及 iNOS.....	4
4) Src Family Kinases 及 Src 參與巨噬細胞的活化.....	6
5) MAPK Pathway 與 ERK Kinase 及其下游途徑.....	8
第二章 實驗材料與方法 (Materials and Methods).....	10
第一節 實驗材料.....	10
1) 動物.....	10
2) 細胞.....	10
3) 試劑.....	10
4) 實驗儀器與耗材.....	13
第二節 實驗方法.....	14
1) 細胞培養.....	14
2) 收集 Cell lysates.....	17
3) 蛋白質濃度測定.....	18
4) 蛋白質電泳 (SDS-PAGE).....	19
5) Western blot analysis.....	22
6) IL-6測定.....	24
第三章 結果 (Results).....	27
1) LPS 可以誘導 RAW264.7 macrophage 的 iNOS, Src 及 IL-6 表現增加.....	27
2) AG 及 ODQ 可以抑制在 LPS 刺激之下 macrophage 所產生的 Src 與 IL-6.....	27
3) PP2 可以抑制 RAW264.7 cell line 產生 IL-6.....	28
4) LPS 無法誘導 iNOS knockout mice peritoneal macrophage 產生 IL-6.....	28
5) SNAP 及 8-br-cGMP 可以誘導 iNOS knockout mice PEM 產生 IL-6.....	29
6) PD98059 可以有效地抑制巨噬細胞分泌 IL-6.....	29
7) AG 能有效抑制 LPS 誘導 pERK 的表現.....	30
第四章 討論 (Discussion).....	31
參考文獻 (References).....	35
圖表 (Figures).....	41
Figure.1.....	41
Figure.2.....	42
Figure.3.....	44

Figure.4.....45  
Figure.5.....46  
Figure.6.....47  
Figure.7.....48  
Figure.8.....49  
附圖、一.....50



## 致謝

碩士生涯隨著論文的完成即將結束，在歷經波折之後，首先要先感謝我的指導教授馬明琪老師，在我求學的過程中讓我看到了光明，在這段研究的過程中不斷的提醒我、讓我的心智成長與茁壯。不論在待人處事上，或者是在實驗工作上，老師總是用心的帶領我們，也確實讓我學到了與以往不同學科的科學方法。雖然過程中難免有挫折，但是在實驗室學姐、同學的相互勉勵之下，總是能適時的調適、適當的調整自己的步伐與方針。在這個熱鬧的研究環境中，讓我快速的成長，特別是論文的產生。在這裡特別感謝口試時呂增宏老師與賴志河老師的特別叮嚀與指教，使得我的論文更趨於完整。

另外，要特別感謝實驗室的成員，妙瑩學姐在我的實驗過程中及論文上的指導，還有實驗室的一對寶：阿國和蝦米，著實為我們枯燥的實驗室生涯注入強烈的歡笑。當然，銘育、青昭和阿凱陪著我一同入生入死、互相扶持，有了他們，我也更能夠專心於實驗和課業，銘謝同在這條路上奮鬥的各位，希望大家都有美好的前程。

## 摘要

無論就先天性免疫或後天性免疫而言，cytokines 中 interleukin-6 的多功能性扮演著一個很重要的角色。IL-6 除了在感染初期做為急性發炎反應的媒介之外，在接下來的適應性免疫中，IL-6 也參與了 B 細胞產生抗體的過程、調節 regulatory T 細胞對抗微生物感染等。在我們的研究中，我們觀察到了，在利用 LPS 刺激 macrophages 時，inducible nitric oxide synthase (iNOS) 會被誘導出來，並且有 IL-6 的釋出。這使人聯想到 iNOS 的產物 -- NO 這個次級訊息傳遞分子可能會對於 IL-6 的產生有著影響。另外，Src 已經被證實了對於在 LPS 的刺激之下 macrophages 的活化有著調節的作用。我們使用了抑制 iNOS 活性的藥物以及 iNOS knockout mice 的實驗結果皆顯示出 iNOS 對於 IL-6 的產出有著很大的影響；而在使用 Src 的抑制劑後，發現 Src 也對 IL-6 的釋出有著調節的作用。接著，在加入了 NO donor -- SNAP 及 cGMP homolog -- 8-br-cGMP 之後，都能使 wild type 和 iNOS null mice 的腹腔巨噬細胞誘發出 IL-6。這些發現指出做為 NO/cGMP pathway 的下游標的，Src 對於 LPS 刺激之下 macrophages 產生 IL-6 是不可或缺的。

## Abstract

Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine that plays a pivotal role in both innate and adaptive immunity. As a predominant mediator of the acute phase response triggered by infection and inflammation, IL-6 also participates in the subsequent development of acquired immunity against pathogens such as stimulation of antibody production by B cells and regulation of the response of regulatory T cells to microbial infection. In this study, we observed concomitant induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and generation of IL-6 in LPS-treated macrophages. This raised a possibility that NO, a well-known second messenger produced by iNOS, might contribute to IL-6 production. In addition, Src is also a well-studied tyrosine kinase and is proved to be an important regulator in LPS-induced macrophage migration. Pharmacological blockade or knockout of iNOS reduced LPS-induced IL-6 secretion. Inhibition of Src kinase activity caused the reduction of LPS-stimulated IL-6 expression. Interestingly, SNAP (a NO donor) or 8-br-cGMP (a cGMP analogue) provoked the production of IL-6 in both wild type and iNOS null macrophages. These findings indicate that iNOS and Src are indispensable in LPS-elicited IL-6 production. These finds indicated that

as a downstream target of NO/cGMP pathway, Src plays a critical role in LPS-triggered IL-6 generation.



## 第一章 序論 (Introduction)

### 1) 免疫系統及巨噬細胞的活化

人體藉由免疫系統對抗外來微生物抗原入侵，而免疫系統又可以分為先天性免疫 (innate immunity) 和後天性免疫 (adaptive immunity)；當器官或組織受到損傷時，兩者可以在不同的階段互相的結合與作用。先天性的免疫包括一些天然的屏障來阻隔外來物的入侵，並且會持續不斷的監視體內各種外來入侵物。在遇到像是LPS這樣的病原時就會形成即時的發炎反應，阻止大部分的病原威脅。與先天性免疫有關的細胞中 (包括macrophage、monocyte等等)，對於遭遇外來病原的威脅時有一個很重要的功能，是產生與發炎反應有關的媒介物，諸如cytokines、chemokines、nitric oxide 及 reactive oxygen species。

發炎反應對於身體而言是很重要的，如果沒有有效的發炎反應，將可能導致生物體更大規模的感染甚至其與癌症的形成有關。然而過度的發炎反應卻也有可能使一些疾病日形惡化導致生物體死亡，例如，rheumatoid arthritis (RA)，Crohn's disease，atherosclerosis，diabetes，Alzheimer's disease，multiple sclerosis，以及 cerebral and myocardial ischaemia (1).

Lipopolysaccharide (LPS)是一種存在於 Gram negative 細菌細胞



壁的內毒素(Endotoxin)。當人體在受到細菌入侵、感染後，monocyte 或 macrophage 會透過細胞表面 Toll-like receptor (TLR) family 中 TLR4 所引發的訊息途徑產生 inflammatory cytokines 並且活化 (activate)，進一步去對 innate immunity 做出回應。活化之後的 macrophages 能夠移行 (migration)到發炎的病灶，藉由吞噬作用 (phagocytosis)來清除病原。另一方面，在 macrophages 表面，LPS 與 LPS binding protein (LBP) (2)結合後，就會被 TLR4 與 CD14 所形成的複合體辨識，而使得 TLR4 在細胞內的部分靠著 MyD88 dependent 或 TRIF 的 pathway 來活化下游的許多訊息傳遞途徑，包括轉錄因子 NF- $\kappa$ B 及 MAPK pathway，進而控制與發炎反應相關的基因表現 (3)。過去的研究指出，MyD88-deficient mice 在遇到 LPS 這樣的病原時，並無法表現出發炎相關的 cytokine (例如 TNF- $\alpha$ ) (4)，此一結果顯示出 TLR-MyD88 pathway 對遭遇病原入侵的細胞產生發炎反應是必需的。而和發炎相關的 cytokines 可以使得免疫系統發揮安全防護機制，避免外來物質對生物體的危害。

## 2) Cytokines 及 IL-6

免疫系統和血液系統中細胞的分化和成長是受到 cytokines 或 interleukins (ILs)的調節。這些 cytokines 的其中一個特點是有著重複

性的功能。例如，一種 cytokine 對於許多不同的細胞或組織有著很廣泛的生物功能，而其它不同的 cytokines 也可以在特定的細胞上表現出相似且重疊的作用。IL-6 就是這種典型的多功能 cytokine。

IL-6 最初是以 B cells stimulating factor (BSF) 的形式被發現，並且能夠促進漿細胞的分化 (5)。在許多不同 stimuli 的刺激之下，professional APC (Antigen Presenting Cell) 可以快速的產生及釋出 IL-6。IL-6 可以像 IL-12 一樣去導致 naïve CD4 T cell 分化，進一步使 naïve CD4 T cell 成為成熟 T cell。先前的文獻指出，IL-6 也可以調節處於 Th1/Th2 平衡狀態的細胞群走向 Th2 的細胞分化 (6)。有趣的是，一些研究中顯示，在感染的過程中，如果缺少 IL-6 會使得 T cell 沒有辦法進入受感染的肺部中，因此 IL-6 被認為跟活化的 T 細胞的移行作用有關 (7)。另外，在 *in vitro* 的實驗中，IL-6 似乎是藉由維持細胞內 Bcl-2 蛋白質的表現，而使得 CD4 T 細胞的生存延長，因此被認為具有抵抗細胞凋亡的功能 (8)。

通常在一般的情形下，IL-6 是不會表現的，當處於許多自體外的刺激時，例如細菌性或病毒性的病原感染，IL-6 可以透過訊息傳遞被包括了 Macrophage，T 與 B 淋巴球在內的許多細胞所分泌。另外，透過 IL-6/gp130 signaling，IL-6 也能調節自身的合成 (9; 10)。

IL-6 的缺乏的確會導致一些免疫方面的現象與疾病，包括對於細

菌和病毒的抵抗力減少 (11) ，使周邊循環系統的 T cell 數量下降與 leukocyte 移動到發炎地方的能力下降 (12) ，但另一方面卻也可以使得一些急性發炎反應 (Acute Phase Response, APR) 減低。另外，在使用了 IL-6 knockout mice 所做的實驗顯示出，在缺乏 IL-6 的存在下，對於一些和發炎反應相關的代謝疾病有著重大的影響，例如在 cartilage destruction 中 IL-6 扮演著的關鍵性角色，間接影響 Antigen-induced Arthritis (AIA) 的形成，使得阻斷 IL-6 的藥物開發成為治療 AIA 的一個方向 (13)。在某些研究甚至把 IL-6 視為內分泌系統的一部分，並且暗示著 IL-6 對於中樞神經系統的發展及相關病理扮演著重要的角色 (9)。

近年來有許多關於癌症方面的研究指出，IL-6 在細胞處於發炎環境時，會促使細胞漸具癌化徵象，使得發炎反應與癌症產生連結。實驗動物模式中，IL-6 的分泌對於肝臟受損受後的 hepatocyte proliferation 和 liver regeneration 是必需的，但是卻也提高了肝細胞癌化的危險 (14 ; 15)。

### 3) Nitric Oxide 及 iNOS

一氧化氮(NO)是一種常見的氣體，可以經由許多包括發電廠、汽車引擎等產生，為主要的大氣污染源之一。然而在生物體中，NO 卻

是重要的訊息傳遞分子。在包括許多生理、病理的疾病病程中，NO 的訊息通常在哺乳動物的體內可以是有益的，也有可能是有害的 (16)。適當的 NO 表現對於器官的保護作用是重要的，例如肝臟的 ischemic damage。可是，持續產生的 NO 卻會導致直接造成組織的傷害並且引發與 Septic shock 有關的血管萎縮。文獻中也指出，慢性的 NO 表現與許多的 carcinoma 及發炎有關，甚至包含了成年糖尿病、多重壞死、關節炎、大腸潰瘍在內的一些疾病 (17)

1980 年代 Furchgott, Ignarro, 與 Murad 等人的發現說明了為何 acetylcholine 可以導致血管的擴張，他們的研究結果使得原本在大氣中被視為污染源的一氧化氮成為了治療人類一些重大疾病的大功臣，而這三位科學家也因而榮獲 1998 年的諾貝爾生理醫學獎的殊榮。他們指出，在血管中的內皮細胞會利用 nitric oxide synthase (NOS) 來將 L-arginine 轉為 citrullin 及 NO。藉由血管內皮細胞 NO 的產生使周邊的平滑肌得以放鬆，進而使血管擴張及血流量增加。

NO 也可以被 phagocytes 所產生，包括了 monocytes、macrophages 和 neutrophils 在內，NO 對於免疫系統的影響目前正熱烈地被探討。而在 phagocyte 中，NO 主要是由 iNOS (inducible NOS) 所催化形成。iNOS 正如其名，主要是由外來的刺激所產生。NOS 是一系列能產生 NO 的酵素，共有三種 isoforms，並分別由三個獨立的基因所 encode

(17)。除了 iNOS 以外，其它兩種 isoform 是呈穩定性表現的 (constitutive expression)，並且其活性為 calcium-dependent，分別為 brain constitutive NOS (NOS1, nNOS) 及 endothelial constitutive NOS (NOS3, eNOS) (18)。雖然名稱顯示出它們最初被發現的器官或組織，但是這兩種 NOS 後來也被發現可以表現在其它組織的細胞中。iNOS 是 calcium-independent，並且會隨著時間的增加而分泌大量的 NO；所產生的 NO 可以活化 soluble guanylate cyclase (sGC)，進而將 GTP 轉化成 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)，活化包括 cGMP-dependent protein kinases (PKG) 在內的下游標的蛋白 (19)，使得 NO 間接的參與一些包括 smooth muscle relaxation、platelet function regulation、sperm metabolism、cell division、和 nucleic acid synthesis 在內的重要生理作用。

#### 4) Src Family Kinases 及 Src 參與巨噬細胞的活化

Src family kinases (SFKs) 是一群結構類似的 nonreceptor tyrosine kinases。早期 J. Michael Bishop 和 Harold E. Varmus 對於致癌基因的研究中，使用了變異的 Rous retrovirus 來探討在正常細胞與癌化細胞中 oncogene 的影響，進而發現了 *src* 基因，並因此獲得 1989 年的諾貝爾生理醫學獎。

SFK有九個成員，包括了Src，Blk，Lyn，Fgr，Hck，Lck，Yes，Fyn和Lyk。從免疫細胞到其它血液相關的細胞，SFKs在複雜的訊息傳遞中皆扮演著重要的角色 (21; 21)，使得細胞得以進行移行作用、細胞增生等等的生理作用。在血液細胞中，SFKs在不同種類的細胞之內都會有不同程度的表現 (22)；例如，在macrophages中主要表現的為Lyn、Fgr及Hck。

近年來另一個廣泛被研究的重點是SFKs對於macrophage移行作用的影響。早期，由Jan Bohuslav等人探討人體monocytes與chemoattractant的關係指出，Lyn、Fgr、Hck、Fyn會在受到外來的刺激之後有著顯著的表現，這些tyrosine phosphorylation的大量表現意味著在受到chemical agent的刺激之時，有著調節monocyte移行的作用 (23)。之後陸陸續續有著許多的研究來探討Src family kinases對於細胞移動性的影響，並且都認為上述的這些SFKs (Hck，Lyn，Fgr)磷酸化的大量表現對於從巨噬細胞活化到cytokine的分泌中扮演著重要的角色(24; 25; 26)。直到Meng F.和Lowell CA.的實驗室使用了Hck<sup>-/-</sup>，Fgr<sup>-/-</sup>，Lyn<sup>-/-</sup>的triple knockout mice並抽取其peritoneal macrophage實驗的結果，顯示出上述這三種SFK其實在macrophage的活化及cytokine產生中並不是絕對必需的tyrosine kinases，這使人懷疑是否有著其它的SFK參與或與這三種SFK有著互補的作用 (27)。到了2006年一篇

探討LPS引發macrophage活化的文獻中指出，對於巨噬細胞的活化、一氧化氮的分泌及cytokine的表現，c-Src可能參與了其中的訊息傳遞機制 (28)。Dr. M.C. Maa等人更在2008年完整闡述了iNOS及其下游的pathway對由LPS引起的macrophage migration而言是重要的，而Src在這條pathway中又扮演著關鍵性的角色 (29)。

除了Src 之外，學者也發現，Lyn 與 myeloproliferation和自體免疫的關係 (30)。還有Lyn、Fgr、Hck在leukocyte中對於integrin beta-2 signal transduction的影響 (31)等等，一再的顯示出SFks對於免疫系統所扮演的不可或缺的角色。

##### **5) MAPK Pathway 與 ERK Kinase 及其下游途徑**

Ras/Raf/MEK/ERK pathway，又稱MAPK pathway，是由細胞表面到細胞核藉由一系列蛋白質磷酸化的訊息傳遞過程 (32)。一開始，受到細胞外面的stimuli刺激時，包括受到growth factor 引發的receptor tyrosine kinases (RTKs)在內，Ras會和GTP結合而被活化，接著，Raf因此從細胞質中被轉移到細胞膜下，並且可能受到Src family kinases (SFks)的作用而活化 (33; 34)。活化後的Raf會引起MAP kinase extracellular signal regulated kinases 1/2 (MEK1/2)的磷酸化，進而使extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2)上面Thr及Tyr

residues的磷酸化 (35; 36; 37)。活化後的ERK轉移到細胞核中，並磷酸化一些轉錄因子 (例如：Elk-1、Myc、CREB、Fos等等)使其結合到許多基因的promoter上，導致像是growth factor及cytokines的表現，使得細胞得以進行分化 (differentiation)、增生 (proliferation)等等。





## 第二章 實驗材料與方法 (Materials and Methods)

### 第一節 實驗材料

#### 1) 動物:

使用的動物有 C57BL/6 的 wild type 和 iNOS knockout mice 兩種，其中 wild type mice 購自國家實驗動物中心，而 iNOS knockout mice 來自國立成功大學藥理學科呂增宏教授實驗室。

#### 2) 細胞:

本實驗所使用的老鼠巨噬細胞株 (murine macrophage-like cell line) 為 Raw264.7，購於食品工業研究所，取自品種公的 BALB/c 老鼠的巨噬細胞，經過 c-Abl (abelson) transform。第二種是從活體老鼠取得之巨噬細胞 (rat peritoneal macrophages)，簡稱為 PEM 細胞。

#### 3) 試劑:

##### A. 實驗藥品

1. Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* serotype 0111:B4 和 thioglycollate (Sigma) (St. Louis, Missouri, USA)
2. Aminoguanidine hemisulfate salt (AG) (Sigma)
3. 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo [3,4-d]

pyrimidine (PP2) (Sigma)

4. 1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (Sigma)
5. S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) (Sigma)
6. 8-Bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (8-Br-cGMP) (Sigma)
7. 2'-amino-3'-methoxyflavone (PD98059) (Merck)

#### **B. 細胞培養試劑**

1. RPMI-1640 (Invitrogen)
2. Fetal bovine serum (FBS) (JRH Biosource)
3. Penicillin-Streptomycin (Sigma)
4. L-Glutamine (Sigma)

#### **C. Electrophoresis 及 Western blot 試劑**

1. Protein assay reagent (Bio-Rad)
2. Ammonium persulfate (APS) (Gibco BRL)
3. N,N,N,N-Tetramethyl ethylene diamine (TEMED) (Gibco BRL)
4. Bis-acrylamide (AMRESCO)
5. Tween 20 (Merck)
6. Prestained marker (Bio-Rad)
7. SDS-PAGE molecular weight standard[Bio-Rad (Bio-Rad)]
8. Sodium dodecylsulfate (SDS) (USB)
9. Tris-base (USB)

10. Glycine (USB)
11. Western Blot detection reagent (ECL kit) [Amersham Pharmacia]
12. Thioglycolate (Merck)
13. Methanol (Fisins Scientific Equipment)

#### D. 抗體

1. Anti-iNOS/NOS II (rabbit polyclonal IgG) (upstate cell signaling solutions)
2. Anti-Src (mouse mAb, GD11) (provided by Dr. Sarah J. Parsons in University of Virginia)
3. Phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) (E10) Mouse mAb (Cell Signaling)
4. ERK-1 (K-23): sc-94 (Santa cruz biotechnology, inc)  
Anti-actin (anti-actin mouse monoclonal antibody) (Sigma)
5. HRP-goat anti-mouse antibody (Jackson)
6. HRP-goat anti-rabbit antibody (Jackson)

#### 4) 實驗儀器與耗材

儀器	廠牌
Centrifuge	Eppendorf 5424
Centrifuge	Beckman Allegra
TE70PH meter	JENCO 6071
Power supply	EPS 1001
Shaker	TKS RS01
Universal Microplate Spectrophotometer	BIO-TEK
Automated Strip Washer	BIO-TEK
Stirrer/Hot plate	CORNING PC640
Vertical slab gel unit	Hoefer SE400
Vortex	GENIE SI-2 G560
Water bath	TKS ZX-400
耗材	廠牌
Protein Assay Kit	Bio-Rad
Polycarbonate filter (8 $\mu$ m)	Neuro probe
PVDF transfer membrane	NEN
X-15RDigital analysis system	Kodak EDAS 120

## 第二節 實驗方法

### 1)細胞培養 (cell culture)

#### A. 培養液

培養細胞的培養液為 RPMI，配置前將滅好菌且烘乾過的玻璃瓶拿到無菌操作台裡面照 UV 一個晚上。配置時將一單位的 RPMI powder、2.0 g 的  $\text{NaHCO}_3$  和 5.957 g 的 HEPES 溶於滅菌的二次水中，將 pH 值調至 pH 7.4，補二次水至總體積 1 liter。再以 0.22  $\mu\text{m}$  的濾膜過濾分裝，保存於 4 °C。

#### B. 培養液添加物

##### 1. Fetal bovine serum

將冷凍的血清靜置於水中，使其慢慢溶解後，於無菌操作檯中分裝至 50 ml 無菌離心管中，再用 parafilm 包覆瓶口，保存於 -20°C。

##### 2. Penicillin-Streptomycin (10X ; 10000 unit/ml-10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

每 450 ml 的 RPMI 加 5 ml 的 Penicillin-Streptomycin。

##### 3. L-Glutamine (10X ; 200 mM)

每 450 ml 的 RPMI 加 5 ml 的 L-Glutamine。

### C. PBS (phosphate balanced solution)

1X PBS 以 8 g NaCl、1.2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  加二次水配製，將其 pH 調成 7.4 後補二次水到 1L，滅菌後保存於 4°C。為了實驗方便也可配製成 10X PBS 保存於 4°C，使用前稀釋並調整體積與 pH 值在滅菌即可。

### D. 40% DMSO 與冷凍培養液

以 4 ml 的 DMSO 加上 6 ml 的 RPMI 配製成 40% DMSO，這裡的 RPMI 必須是沒添加過血清但有添加 P/S 與 L-Glu，以上混何均勻後存放於 -20°C。冷凍培養液，以 2.5 ml 的 40% DMSO 與 7.5 ml 混合，最後的 DMSO 濃度為 10%

### E. 細胞培養步驟

#### 1. 細胞分盤 (subculture)

將細胞培養於 culture RPMI medium (10% FBS、1% P/S、1% L-Glu)，放置於細胞培養箱 (37°C，5%  $\text{CO}_2$ )，等細胞成長約八至九分滿時，進行分盤培養。分盤前務必在新的培養皿上標明細胞株的名稱以及分盤時間，分盤時將舊的培養液吸走，每次以 37°C 回溫後的滅菌 1X PBS 3~5 ml 沖洗細胞，共清洗三次。再加入 8~10 ml 37°C 回溫後的培養液，將細胞全部沖下來，並吸放數次

直到均勻沖散細胞以 1 : 3 或 1 : 4 的比例分盤培養。

## 2. 冷凍細胞：

培養好約八分滿的細胞，且冷凍細胞前一天需更換成新鮮的培養液。首先將舊的培養液吸走，每次以 3~5 ml 滅菌 1X PBS 沖洗細胞，共清洗三次。加入 8~10 ml 的培養液，將細胞全部沖下來，再將細胞液吸取置於 50ml 離心管，離心 (1000rpm, 10 分鐘) 之後將細胞沉澱下來。去除上清液之後，以 1 ml 冷凍培養液將細胞上下吸、放數次，直到細胞被均勻打散，置於冷凍管，先存放於 4°C 冰箱 30 分鐘，再移置於 -80°C 冰箱，12 小時之後再存放於液態氮桶。

## 3. 解凍細胞：

由液態氮桶中取出細胞，將細胞溶於適量的 RPMI 培養液，離心 2000 rpm 五分鐘。倒掉 RPMI 培養液，以 10 ml 的 RPMI 將細胞打散，隔天細胞貼附後再換培養液，約一個禮拜細胞穩定後才可以做實驗。

## 2) 收集 cell lysates

### A. 試劑：

主要溶液 Lysis buffer (RIPA buffer)，可將細胞裂解。以 4.38 g NaCl、3.0285g Tris-base、1.25g Deoxycholate、5 ml IGEPAL CA-630 (相當的粘稠，要緩慢的取) 來配製。以上藥品溶於適量的二次水後，將溶液配成 500 ml pH 7.4，高溫高壓滅菌後保存於 4°C。每當要使用前，必須將它配置成 Modified RIPA buffer，若要配製成 1 ml，則需要 1 ml RIPA、10  $\mu$ l 200 mM Sodium orthovanadate (final conc.= 1 mM)、5  $\mu$ l 200 mM EGTA (final conc. = 1 mM)、10  $\mu$ l 0.5% Aprotinin (final conc. = 0.0025%)、4  $\mu$ l 200 mM PMSF (final conc. = 1 mM)。後面追加的是蛋白質水解酶抑制劑，包括 Sodium orthovanadate 是 phosphatase inhibitor，EGTA 是鈣離子的螯合劑，Aprotinin 是 serine protease inhibitor，PMSF 也是 serine protease inhibitor。

### B. 步驟：

1. 將 medium 吸走，每次以 1ml 1X PBS 清洗細胞，共兩次，之後再將 PBS 吸乾。
2. 加入 500  $\mu$ l modified RIPA buffer (6 cm dish)，利用刮勺來回將細胞刮下 (置於冰上操作)，再將細胞液置於 eppendorf，將



eppendorf 在 rack 上左右來回刮數次。

3. 以  $4^{\circ}\text{C}$ 、10000 rpm，離心 10 分鐘，取上清液到新的 eppendorf，保存於  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

### 3)蛋白質濃度測定

#### A. 試劑：

1. BSA ( $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
2. Protein Assay Kit

#### B. 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  $\mu\text{l}$  BSA ( $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) eppendorfs。
2. 加入不同量的 d.d  $\text{H}_2\text{O}$  到 eppendorfs 中，使其總體積達 800  $\mu\text{l}$ 。
3. 加 200  $\mu\text{l}$  Protein Assay Kit (dye) 到 eppendorfs，以 vortex 混合均勻。
4. 在 sample 的測定上，取 10  $\mu\text{l}$  cell lysates，790  $\mu\text{l}$  d.d  $\text{H}_2\text{O}$ ，200  $\mu\text{l}$  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。

#### 4)蛋白質電泳 (SDS-PAGE)

##### A. 試劑：

1. Acryamide 150 g

N'N'-Methylene bisacryamide 4 g

將所需之化學藥品溶於 350 ml d.d H<sub>2</sub>O

再加 d.d H<sub>2</sub>O 至 500 ml，保存於 4°C。

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

Tris-HCl 121.14g

將 Tris-HCl 溶於 350 ml d.d H<sub>2</sub>O，pH 調成 8.8

再加 d.d H<sub>2</sub>O 至 500 ml。

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

Tris-HCl 121.14g

將 Tris-HCl 溶於 350 ml d.d H<sub>2</sub>O，pH 調成 6.8

再加 d.d H<sub>2</sub>O 至 500 ml。

4. 10% APS 10 ml

APS 1 g

將 APS 溶於 8 ml d.d H<sub>2</sub>O

再加 d.d H<sub>2</sub>O 至 10 ml， 保存於 4°C。

5. Resolving gel (8%)	30 ml
H <sub>2</sub> 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 (8%)	10 ml
H <sub>2</sub> O	8 ml
2M Tris-HCl, pH 6.8	0.625ml
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 H<sub>2</sub>O，再加 d.d H<sub>2</sub>O 至 500 ml，  
保存於室溫。

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

再加 d.d H<sub>2</sub>O 至 500 ml，保存於室溫。

**B. 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 H<sub>2</sub>O，隔絕空氣，待凝膠 (約 25 分鐘)。
4. 將 d.d H<sub>2</sub>O 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)。

## 5) Western blot analysis

### A. 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 H<sub>2</sub>O

再加 d.d H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O，pH 調成 8.8

再加 d.d H<sub>2</sub>O 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 $\mu$ l

將所需之化學藥品溶於 35 ml d.d H<sub>2</sub>O

再加 d.d H<sub>2</sub>O 至 50 ml，保存於室溫。

4. Washing buffer	500 ml
10X TBS	50 ml
Tween 20	500 $\mu$ l

將所需之化學藥品溶於 350 ml d.d H<sub>2</sub>O

再加 d.d H<sub>2</sub>O 至 500 ml，保存於室溫。

## B. 步驟：

1. 剪取適當大小的 PVDF transfer membrane，以 methanol 浸泡約 30 秒後，再以 d.d H<sub>2</sub>O 浸泡。
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 transfer membrane 取出，浸泡於 30 ml blotting buffer 中，在室溫下置於 shaker 上 preblotting 2.5 小時 (shaker 擺動速度：5rpm)。
4. 將 blotting buffer 倒掉，加入 10 ml 含有 primary antibody (1：1000) 的 blotting buffer，置於 4°C 作用 12 小時。

5. 隔天取出之後，在室溫下先置於 shaker 上作用 30 分鐘 (shaker 擺動速度: 5rpm)，再以 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: 30 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. 再以 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: 30 rpm)。
8. 依 membrane 大小 ( $0.125 \text{ ml/cm}^2$ )，加入適量的 ECL kit solution I 與 II 等比例的均勻混和液。在 membrane 與之作用 5 分鐘後，以 X-ray film 感光。

## 6) IL-6 測定

### A. 試劑

#### 1. Assay buffer

配製方式為 8.0 g NaCl、1.13 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.2 g KCl、5.0 g BSA、1 ml Tween20，加二次水到 1.0 L，PH 調至 7.4。主要的功能在於稀釋檢體 (包括 standards) 與抗體

(coating Ab 除外)。

## 2. Other buffer

Coating buffer B，配製法 4.3 g NaHCO<sub>3</sub>、5.3 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，加二次水到 1.0 L，pH 調至 7.4。主要功能用於稀釋 Coating Ab。Washing buffer，以 9.0 g NaCl、1 ml Tween20，加二次水到 1.0 L，PH 調至 7.4。主要功能用來洗去未連接的抗體或蛋白。Stop solution，配製 1.8 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，主要功能用來終止呈色反應。

## B. Plate coating

以coating buffer B稀釋coating Ab (1.25 µg/ml)，例如：10 ml則以 12.5 µl coating Ab + 9.988 ml coating buffer。於96孔盤中每個well放入 100 µl coating solution，輕拍盤子讓溶液均勻，再用保鮮膜或蓋子封好，於4°C下放置12~18 hrs。將多餘的coating solution到掉後，倒放在擦手紙上盡量把液體吸乾。每個well加入300 µl assay buffer來做block的動作 (依kit不同有些為特殊的blocking buffer)，於室溫下放置1 hr，也可放在2~8°C下可保存五天。倒掉assay buffer，倒放在擦手紙上。在配置好樣品後，以300~400 µl washing buffer 洗3~6次，再倒放在擦手紙上吸乾水分。

## C. ELISA method



用 assay buffer 序列稀釋來稀釋 standards。standards 的濃度依序為 1000 pg/ml、500 pg/ml、250 pg/ml、125 pg/ml、62.5 pg/ml、31.25 pg/ml、15.625 pg/ml、0 pg/ml，共八組濃度。同樣的以 assay buffer 稀釋欲待測 samples。第一次實驗欲稀釋倍數，可由一倍到五千倍來做大範圍的稀釋，往後則挑選落在標準曲線內的稀釋倍數來做多重複的實驗以求誤差值。首先將先前 plate 300 $\mu$ l assay buffer 倒掉，再以 300~400 $\mu$ l washing buffer 洗滌 3 次後，倒放在擦手紙上以利吸乾多餘液體，再至已事先設計好 wells 內依序加入 100 $\mu$ l standards 或 sample，立即馬上加入 50 $\mu$ l Detection Antibody 反應，於室溫下作用 2 小時，之後再加 300~400 $\mu$ l washing buffer 洗滌 3 次，再加入 assay buffer 稀釋後的 streptavidin-HRP 100 $\mu$ l 於室溫下作用 30 mins。再使用 300~400 $\mu$ l washing buffer 洗滌 3 次，依序每 well 加入 100 $\mu$ l chromogen TMB 反應，避光 30 mins 之後每 well 依序加入 100  $\mu$ l stop solution (需於 30 分鐘內測定吸光值)。使用 ELISA reader 測得 450/650 nm 的吸光值後，使用電腦將所得的 standards 做成標準曲線，將 sample 測得的數值帶入標準曲線後，依照稀釋倍數與蛋白質濃度定量換算出每毫升所含的數值。

### 第三章 結果 (Results)

#### 1) LPS 可以誘導 RAW264.7 macrophage 的 iNOS、Src 及 IL-6 表現增加

先前的研究指出，巨噬細胞在 LPS 的刺激之下，經由許多途徑的訊息傳遞，能夠產生 proinflammatory cytokine，如 TNF- $\alpha$ , interferon, interleukin (IL) 等 (38)，更可以刺激 macrophage 使 iNOS 以及 Src 的表現 (39)。我們使用 LPS (100ng/ml) 去刺激 Raw264.7 這株細胞時，發現 IL-6 的表現明顯地受到加入 LPS 的影響而有所提高。同時，我們也觀察到了 iNOS 和 Src 在 LPS 的刺激之下能夠有顯著的表現 (Fig.1)。由此，說明了 LPS 確實會增加 iNOS, Src, 和 IL-6 的產生。

#### 2) AG 及 ODQ 可以抑制在 LPS 刺激之下 macrophage 所產生的 Src 與 IL-6

接著，我們要先探討的是，IL-6 受到 LPS 刺激之後的大量表現是否與 iNOS 的表現有關係？在先前的研究中指出 (40)，iNOS 可以產生 NO，再活化 sGC 後，而產生 cGMP。為了確立 iNOS/NO/sGC/cGMP 這條訊息傳導路徑是否與 LPS-induced IL-6

expression 有關，於是，我們使用了 iNOS 的抑制劑 AG (2mM)，處理 Raw264.7 這株細胞 30 分鐘後再給予 LPS (100ng/ml) 的刺激，結果發現在 LPS 的刺激之下，AG 能明顯地抑制 IL-6 的表現 (Fig.2A)。而在加入了 sGC 的抑制 ODQ (100 $\mu$ M) 之後也可以發現 IL-6 產生能夠顯著地被抑制 (Fig.2B)。另外，我們也觀察到了 Src 的蛋白質表現量也會因為 iNOS 被抑制而有明顯的減少 (Fig.2A)，說明了先前的文獻中指出 Src 在 LPS 刺激下 macrophage 的活化中扮演的角色 (附圖、一) (29).

### **3) PP2 可以抑制 RAW264.7 cell line 產生 IL-6**

在發現 iNOS 的抑制劑 AG 可以抑制 Src 和 IL-6 的表現之後，我們使用了 SFKs 的抑制劑去觀察 IL-6 及 iNOS 的表現。在預先將 RAW264.7 這株細胞處理 PP2 (SFKs inhibitor, 10mM) 30 分鐘後，加入 LPS (100 ng/ml) 予以刺激。從 Fig.3 結果顯示出 PP2 可以有效地抑制 macrophage 產生 IL-6，並且 PP2 也對 iNOS 的表現量有著顯著的抑制效果。

### **4) LPS 無法誘導 iNOS knockout mice peritoneal macrophage 產生 IL-6**

在以抑制劑確定 iNOS 及其下游產物對於 macrophage 受 LPS 刺

激後可能與其產生 IL-6 有著重大影響後，為了強化這項論點，我們也使用了 iNOS knockout mice 與 wild type mice 的腹腔巨噬細胞 (Peritoneal macrophage, PEM) 來做實驗，發現在加入 LPS (100ng/ml) 48 小時之後，iNOS knockout 的 PEM 對於 LPS 的刺激所產生的 IL-6 明顯的小於相同刺激條件的 wild type PEM，這證實了 iNOS 為 macrophage 受 LPS 刺激後產生 IL-6 所需要的重要蛋白(Fig.4)。

#### **5) SNAP 與 8-Br-cGMP 可以誘導 iNOS knockout PEM 產生 IL-6**

另外，我們又使用了 iNOS 下游產物 NO 的 donor—SNAP 以及 cGMP 的 analog—8-br-cGMP 去處理 Raw264.7 這株細胞。結果顯示，在加入 SNAP(100 $\mu$ M)與 cGMP (100 $\mu$ M)之後，macrophage 表現的 IL-6 相較於未處理任何藥物的組別，不管是 wild type PEM 或是 iNOS Knockout PEM，皆有顯著的提高 (Fig.5)。以上的結果皆顯示出 iNOS 及其下游產物的途徑對於在 LPS 的誘發巨噬細胞 IL-6 的產生扮演著重要的角色。

#### **6) PD98059 可以有效地抑制巨噬細胞分泌 IL-6**

已經有文獻指出，在 LPS 的刺激之下，macrophage 內會透過 ERK pathway 增加 cytokine 的釋出 (38)，所以我們想進一步去確認在 LPS

的剌激之下，ERK pathway 在 IL-6 的分泌中到底扮演著什麼樣的角色？首先我們使用 PD98059 (MEK inhibitor, 10  $\mu$ M) 前處理 RAW264.7 這株細胞 30 分鐘之後再加入 LPS (100ng/ml)。48 小時之後收集 cell lysate 與 condition medium 分別去分析 iNOS, Src, pERK 的表現及 IL-6 的分泌量。結果顯示，在 LPS 剌激之後，ERK 的活性 (pERK) 與 IL-6 的分泌量皆有顯著的提升；而在予以處理 PD98059 的組別中，pERK 與 IL-6 的表現很明顯的被 PD98059 所抑制，但 iNOS 及 Src 的表現並沒有減少。這結果指出 ERK pathway 確實在 LPS-stimulated macrophage 的 IL-6 分泌扮演著一個很重要的角色 (Fig.6)。

#### 7) AG 能有效抑制 LPS 誘導 pERK 的表現

接著，為了了解在 LPS 透過 iNOS 及其途徑所引起的 IL-6 分泌中，ERK pathway 有無參與其中，我們回過頭來利用了 AG (2mM) 預先處理 RAW264.7 細胞株 30 分鐘，再予以 LPS (100ng/ml) 剌激，48 小時後收集 cell lysate 去分析 pERK 的表現。結果顯示，與控制組比較，LPS 剌激之後的 pERK 表現量增加，而加入抑制劑的 pERK 的表現有顯著的降低，指出 AG 能夠大幅的降低 ERK 的活化。這意味著 iNOS 與其下游途徑在 LPS 誘導的 ERK pathway 過程扮演著一個很重要的角色。

#### 第四章 討論 (Discussion)

發炎反應是一系列經由活化的巨噬細胞產生 cytokines、growth factors、NO 所調控的複雜過程。巨噬細胞經由 Toll like receptors (TLRs) 辨識多樣病原來達成免疫方面的功能；隨著對於細胞表面受器的分子結構、受體辨識、訊息傳遞及基因剔除動物實驗等的廣泛研究，TLRs 在生物體免疫系統的重要性也是現代分子生物學上的焦點之一。LPS 這個源自 Gram negative bacteria 細胞壁的病原，在經由人體血清中的 LBP 結合後，在 CD14 的輔助之下形成 LPS-LBP-CD14 三體複合體，接著經由巨噬細胞上 TLR4 的辨識，啟動一系列包括 NF- $\kappa$ B pathway、MAPK pathway 在內的訊息傳遞，同時也會活化 Src family kinases (SFKs)，接著在轉錄因子 (NF- $\kappa$ B、AP-1) 被活化之後，產生 pro-inflammatory agents (iNOS, IL-6, TNF- $\alpha$ ) 導致發炎反應 (41)。

由於 LPS 的 receptor 並不具有 intrinsic tyrosine kinase 的活性，因此在巨噬細胞的活化過程中，令人猜想可能有一些 membrane-associated tyrosine kinases 參與其中，使得 signal transduction 得以被啟動。早期研究懷疑 SFKs 可能參與巨噬細胞活化的文獻中，多以 Lyn、Fgr、Hck 為研究對象，認為這三者對於巨噬細胞在受到刺激活化之後的 migration、cytokines production 扮演著重要的角色，但是這些研究多半看的是 Lyn、Fgr、Hck 三者

時間內的活性顯現 (42; 43; 44; 45)。而到了 2006 年由 Tzeng-Horng Leu 等人研究的結果顯示出，Src 不僅僅在 LPS 的刺激之下有立即、短暫的表現，其持續隨著時間而增加的特性，使得我們得以解釋 Lowell C.A. 等人於 1997 年使用  $Lyn^{-/-}$ 、 $Fgr^{-/-}$ 、 $Hck^{-/-}$  triple knockout mice 所做出的結果。而從我們以 PP2 處理巨噬細胞所得到的結果也顯示出 Src 在長時間 (48 小時) 受到 LPS 刺激的情況之下的確能夠影響巨噬細胞被活化之後的 IL-6 表現，但是如果能夠使用 Src 的 knockout mice 來做實驗，或許更能直接證實 Src 對於 IL-6 表現的重要性。雖然 Src 被證實在巨噬細胞活化時扮演著重要的角色，但是其它的 SFKs 仍然有研究指出 SFK 參與了細胞在各個層面的生理表現，令人好奇 SFKs 之間究竟存在著什麼樣的關係，值得進一步探究。

在 2008 年的一篇使用缺乏  $p85\alpha$  (PI3K 的 subunit) 的  $Pik3rl$ -deficient mice 來探討 LPS 誘導巨噬細胞產生 cytokines 的文獻中指出，PI3K-Akt pathway 會抑制 ERK1/2 的活化，並降低轉錄因子 Egr-1 的量。相較於 wild type mice 的巨噬細胞， $Pik3rl$ -deficient mice 的巨噬細胞所產生的包括 IL-6 在內的 cytokines 的量會明顯的增加 (46)，但是調節 PI3K-Akt pathway 對於 LPS 引發的  $I\kappa B\alpha$  降解或 NF- $\kappa B$  的 translocation 並不會有影響；然而較早之前類似的實驗指出使

用別的 PI3K 抑制劑對於 NF- $\kappa$ B 有著調控作用 (47; 48)，會產生這樣的矛盾據推測，原因可能是抑制劑的非專一性、細胞的種類、及抑制劑的濃度等等。我們的實驗顯示出，在 LPS 刺激之下，MAPK pathway 能夠調控 IL-6 的表現；經由 PD98059 的抑制之後，雖然 IL-6 被抑制有到達顯著的標準，但是相較於使用 PP2 或 AG 等上游抑制劑來看，IL-6 的量仍舊偏高，會導致這樣的情況可能是 iNOS/Src pathway 的下游還有許多能夠影響 IL-6 轉錄的 pathway (包括 NF- $\kappa$ B)，而在巨噬細胞中 iNOS/Src pathway 與 PI3K-Akt pathway 之間的關聯性目前仍不清楚。已有證據顯示 Src/PI3K/Akt dependent pathway 參與在 nNOS 產生 NO 的過程 (49)，也有研究指出在 valsartan-induced eNOS activation 中，Src/PI3K/Akt pathway 可以經由調節 eNOS 來調控 NO 的產生 (50)；而在巨噬細胞中，透過抑制 Src/PI3K/Akt pathway 可以使得 NO 及 proinflammatory agents 的產量減少，但是並沒有人了解到 Src/PI3K/Akt 與 iNOS 之間的關係 (41)。綜合上述的結果：1) PI3K/Akt pathway 能抑制 MAPK pathway 而影響 IL-6 的表現；2) Src/PI3K/Akt pathway 能調控 NO 及 cytokines 的產出；3) 從我們的研究結果得知 iNOS/Src pathway 藉由調控 MAPK pathway 去影響 IL-6 的表現 (Fig.8)。這使得我們好奇這些 pathway 之間真正的角色關係為何？在巨噬細胞中我們已經知道 iNOS/Src 與 MAPK pathway 之間的關係，



而 iNOS 會不會和 eNOS、nNOS 一樣與 Src/PI3K pathway 有著相似的情形，則有待進一步的實驗證實。

此外，許多研究的結果認為在 LPS 的刺激之下，經由 NF- $\kappa$ B 的 translocation 使得 iNOS 和 IL-6 的基因同時轉錄出來，而我們的研究結果顯示出 iNOS 透過 MAPK pathway 對處於慢性發炎反應中的巨噬細胞扮演著調控 IL-6 的重要角色，顛覆了先前的看法。值得一提的是，這些研究多半是巨噬細胞處於急性期時（小於 2 小時）的研究，而我們使用 LPS 處理巨噬細胞長達 48 小時。已知某些細胞種類在受到刺激活化之後，pERK 的持續時間會影響 cell signaling decisions (51)；而 transient pERK 和 sustained pERK 與 iNOS、IL-6 之間的角色關係在受到 LPS 刺激之後會不會有可能不一樣，值得深入探索。

目前有許多研究正針對 iNOS 及 Src 的抑制作用進行，而 iNOS 本身為發炎反應的重要物質，Src 則在細胞的癌化過程中扮演著重要的角色。本實驗揭露了「LPS 在誘發 iNOS 及 Src 之後，透過增加 ERK 的磷酸化來影響 IL-6 表現」的觀點，希望未來對於癌症與發炎反應的連結以及對抗癌、免疫製劑等的應用有所幫助。

## 参考文献 (References)

1. Kevin J. Tracey, The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420:853-859.
2. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, and Ulevitch RJ, Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990;249:1429-31.
3. Olivera SC, de Olivera FS, Macedo GC, de Almeida LA, and Carvalho NB, The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond. *Microbes Infect.* 2008;10:1005-09.
4. Taro Kawai, Osamu Adachi, Tomohiko Ogawa, Kiyoshi Takeda, and Shizuo Akira, Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. *Immunity* 1999;11:115-22.
5. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;324:73-76.
6. Rincón M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA, Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med.* 1997;185:461-9.
7. Weissenbach M, Clahsen T, Weber C, Spitzer D, Wirth D, Vestweber D, Heinrich PC, Schaper F, Interleukin-6 is a direct mediator of T cell migration. *Eur J Immunol.* 2004;34:2895-906.
8. Teague TK, Marrack P, Kappler JW, Vella AT, IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol.* 1997;158:5791-6.
9. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T, IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;149:1-38.

10. Shabo Y, Lotem J, Sachs L, Autoregulation of interleukin 6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the differentiation of myeloid leukemic cells. *Mol Cell Biol.* 1989;9:4109-12.
11. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G, Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994;368:339-42.
12. Wang J, Homer RJ, Chen Q, Elias JA, Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. *J Immunol.* 2000;165:4051-61.
13. Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M, Kishimoto T, Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:8222-6.
14. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ, Liver regeneration. *Hepatology.* 2006;43:S45-53.
15. Michalopoulos GK, Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007;213:286-300.
16. Hou YC, Janczuk A, Wang PG, Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr Pharm Des.* 1999;5:417-41.
17. Fukatsu K, Lundberg AH, Hanna MK, Wu Y, Wilcox HG, Granger DN, Gaber AO, Kudsk KA, Increased expression of intestinal P-selectin and pulmonary E-selectin during intravenous total parenteral nutrition. *Arch Surg.* 2000;135:1177-82.
18. Gilkeson GS, Mudgett JS, Seldin MF, Ruiz P, Alexander AA, Misukonis MA, Pisetsky DS, Weinberg JB, Clinical and serologic manifestations of autoimmune disease in MRL-lpr/lpr mice lacking nitric oxide synthase type 2. *J Exp Med.* 1997;186:365-73.

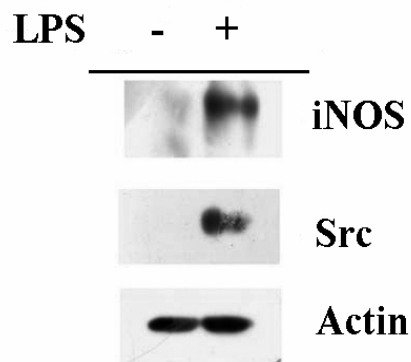
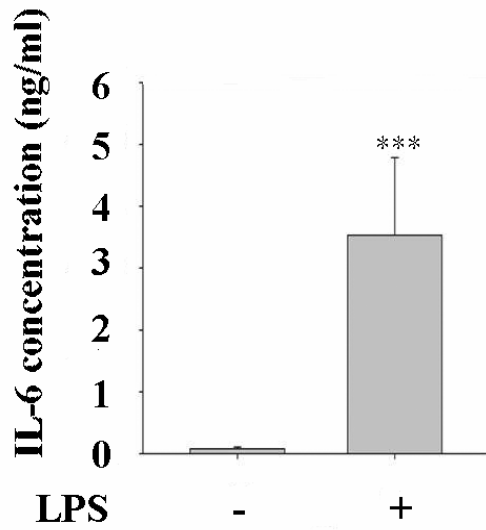
19. Cary SP, Winger JA, Derbyshire ER, Marletta MA, Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem Sci.* 2006;31:231-9.
20. Cowen MS, Schumann G, Yagi T, Spanagel R, Role of Fyn tyrosine kinase in ethanol consumption by mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27:1213-9.
21. Kabuyama Y, Homma MK, Kurosaki T, Homma Y, Early signaling events induced by 280-nm UV irradiation. *Eur J Biochem.* 2002;269:664-70.
22. Lowell CA, Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol.* 2004;41:631-43.
23. Bohuslav J, Horejsí V, Hansmann C, Stöckl J, Weidle UH, Majdic O, Bartke I, Knapp W, Stockinger H. Urokinase plasminogen activator receptor, beta 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J Exp Med.* 1995;181:1381-90.
24. Stefanová I, Corcoran ML, Horak EM, Wahl LM, Bolen JB, Horak ID. Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56lyn. *J Biol Chem.* 1993;268:20725-8.
25. Beaty CD, Franklin TL, Uehara Y, Wilson CB. Lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur J Immunol.* 1994;24:1278-84.
26. Ziegler SF, Wilson CB, Perlmutter RM. Augmented expression of a myeloid-specific protein tyrosine kinase gene (hck) after macrophage activation. *J Exp Med.* 1988;168:1801-10.
27. Meng F, Lowell CA. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med.* 1997;185:1661-70.

28. Leu TH, Charoenfuprasert S, Yen CK, Fan CW, Maa MC. Lipopolysaccharide-induced c-Src expression plays a role in nitric oxide and TNFalpha secretion in macrophages. *Mol Immunol*. 2006;43:308-16.
29. Maa MC, Chang MY, Chen YJ, Lin CH, Yu CJ, Yang YL, Li J, Chen PR, Tang CH, Lei HY, Leu TH. Requirement of inducible nitric-oxide synthase in lipopolysaccharide-mediated Src induction and macrophage migration. *J Biol Chem*. 2008;283:31408-16.
30. Scapini P, Pereira S, Zhang H, Lowell CA. Multiple roles of Lyn kinase in myeloid cell signaling and function. *Immunol Rev*. 2009;228:23-40.
31. Paul R, Obermaier B, Van Ziffle J, Angele B, Pfister HW, Lowell CA, Koedel U. Myeloid Src kinases regulate phagocytosis and oxidative burst in pneumococcal meningitis by activating NADPH oxidase. *J Leukoc Biol*. 2008;84:1141-50.
32. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6:313-9.
33. Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, Dérijard B, Davis RJ, Johnson GL, Karin M. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*. 1994;266:1719-23.
34. Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J*. 1995;14:3136-45.
35. Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1997;272:4378-83.
36. Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J*. 1999;18:2137-48.

37. Xu S, Robbins D, Frost J, Dang A, Lange-Carter C, Cobb MH. MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:6808-12.
38. Wang X, Liu Y. Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1. *Cell Signal*. 2007;19:1372-82.
39. Orlicek SL, Hanke JH, English BK. The src family-selective tyrosine kinase inhibitor PP1 blocks LPS and IFN-gamma-mediated TNF and iNOS production in murine macrophages. *Shock*. 1999;12:350-4.
40. Cary SP, Winger JA, Derbyshire ER, Marletta MA. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem Sci*. 2006;31:231-9.
41. Lee YG, Lee WM, Kim JY, Lee JY, Lee IK, Yun BS, Rhee MH, Cho JY. Src kinase-targeted anti-inflammatory activity of davallialactone from *Inonotus xeranticus* in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. *Br J Pharmacol*. 2008;154:852-63.
42. Ziegler SF, Wilson CB, Perlmutter RM. Augmented expression of a myeloid-specific protein tyrosine kinase gene (hck) after macrophage activation. *J Exp Med*. 1988;168:1801-10.
43. Boulet I, Ralph S, Stanley E, Lock P, Dunn AR, Green SP, Phillips WA. Lipopolysaccharide- and interferon-gamma-induced expression of hck and lyn tyrosine kinases in murine bone marrow-derived macrophages. *Oncogene*. 1992;7:703-10.
44. Beaty CD, Franklin TL, Uehara Y, Wilson CB. Lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur J Immunol*. 1994;24:1278-84.

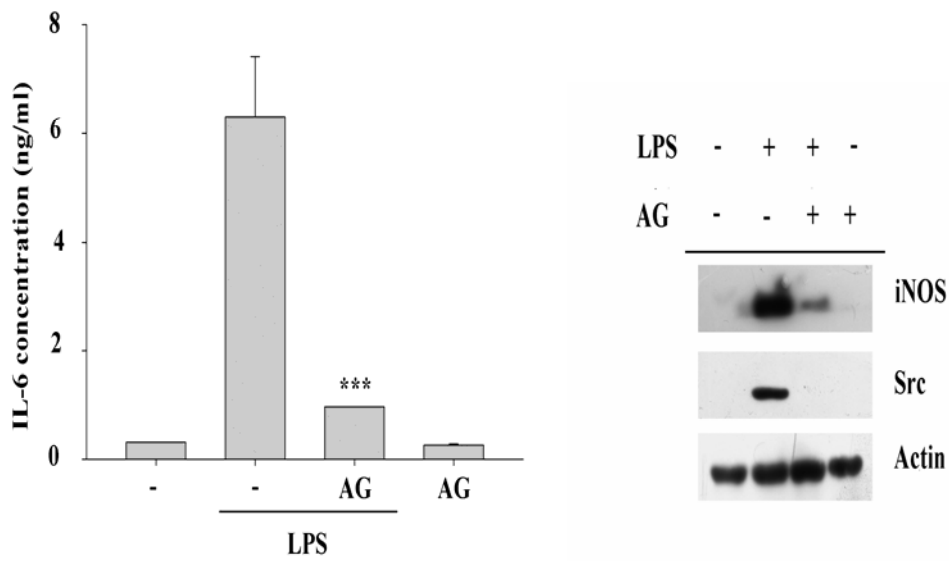
45. Herrera-Velit P, Reiner NE. Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56lyn and phosphatidylinositol 3-kinase in human monocytes. *J Immunol.* 1996;156:1157-65.
46. Luyendyk JP, Schabbauer GA, Tencati M, Holscher T, Pawlinski R, Mackman N. Genetic analysis of the role of the PI3K-Akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages. *J Immunol.* 2008;180:4218-26.
47. Díaz-Guerra MJ, Castrillo A, Martín-Sanz P, Boscá L. Negative regulation by phosphatidylinositol 3-kinase of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *J Immunol.* 1999;162:6184-90.
48. Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem.* 2002;277:32124-32.
49. Lin BR, Chang CC, Chen LR, Wu MH, Wang MY, Kuo IH, Chu CY, Chang KJ, Lee PH, Chen WJ, Kuo ML, Lin MT. Cysteine-rich 61 (CCN1) enhances chemotactic migration, transendothelial cell migration, and intravasation by concomitantly up-regulating chemokine receptor 1 and 2. *Mol Cancer Res.* 2007;5:1111-23.
50. Su KH, Tsai JY, Kou YR, Chiang AN, Hsiao SH, Wu YL, Hou HH, Pan CC, Shyue SK, Lee TS. Valsartan regulates the interaction of angiotensin II type 1 receptor and endothelial nitric oxide synthase via Src/PI3K/Akt signaling. *Cardiovasc Res.* 2009;82:468-75.
51. C. J. Marshall Specificity of Receptor Tyrosine Kinase Signaling: Transient versus Sustained Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Cell* 1995;179-85.

圖表 (Figures)

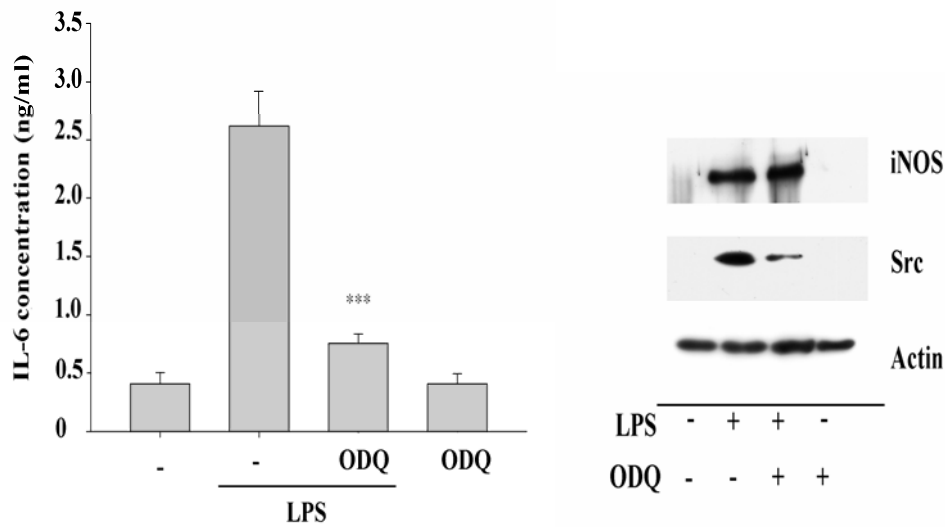


**Figure.1 LPS-induced IL-6 secretion in RAW264.7 macrophage.** RAW264.7 cell line were treated with LPS (100 ng/ml) for 48 hours. Then the condition medium were collected to determine the IL-6 expression by ELISA. Total cell lysates (80  $\mu$ g) from each group were collected and soon resolved by SDS-PAGE and then probed with antibodies of iNOS, Src, and Actin.





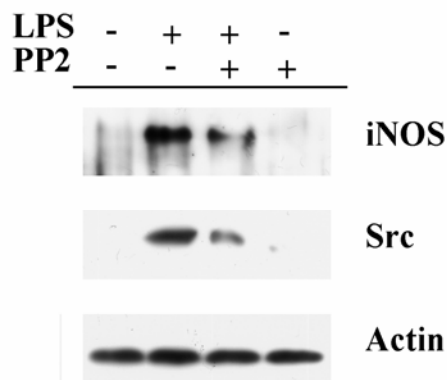
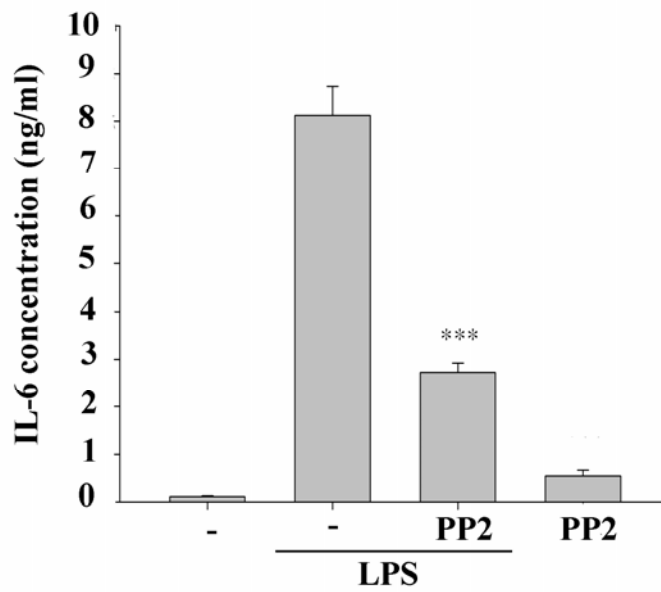
(A)



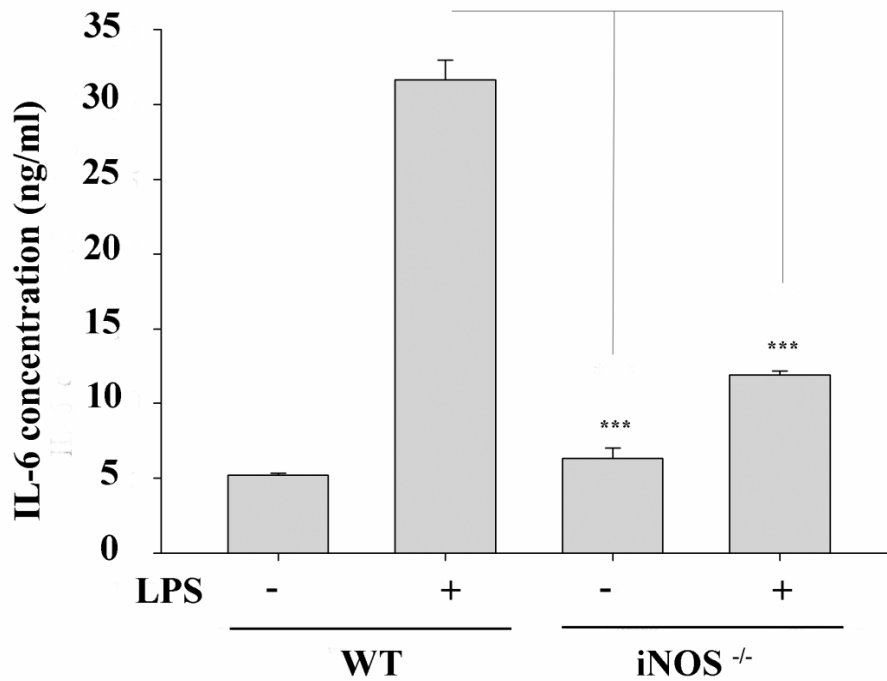
(B)

**Figure.2 The inhibitory effect of AG and ODQ on LPS-induced macrophage IL-6 expression.** (A) Raw264.7 cells were pre-treated with AG (2 mM) for 30 minutes and then cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 48 hours. The IL-6 expression was determined by ELISA kit (Invitrogen Corporation). Total cell lysates (80  $\mu$ g) from each group were collected and resolved by SDS-PAGE and then probed with antibodies of iNOS, Src, and Actin. \*\*\*,  $P < 0.001$  as compared with LPS-stimulated

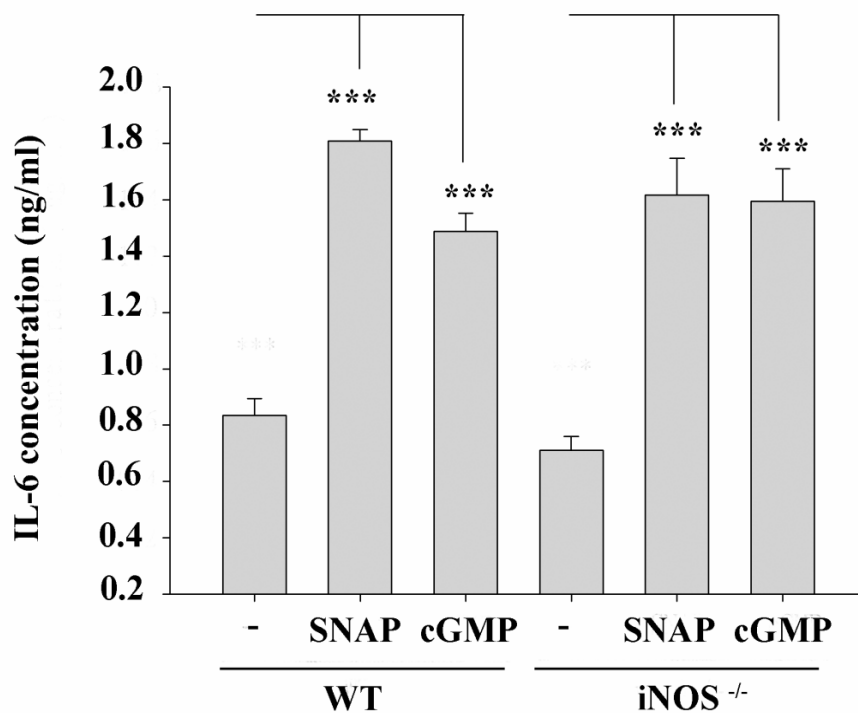
groups. (AG -- aminoguanidine hemisulfate, inhibitor of iNOS) (B) Raw 264.7 cells were pre-treated without or with ODQ (100  $\mu$ M) for 30 minutes and then stimulated with LPS (100 ng/ml) for 48 hours. Equal amounts of cell lysates (80  $\mu$ g) from each groups were resolved by SDS-PAGE immediately and probed with anti-iNOS and anti-Actin antibodies. The concentration of IL-6 in culture medium was determined by ELISA. \*\*\*,  $P < 0.001$  as compared with LPS-stimulated groups. (ODQ -- 1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]guinoxalin-1-one, inhibitor of sGC)



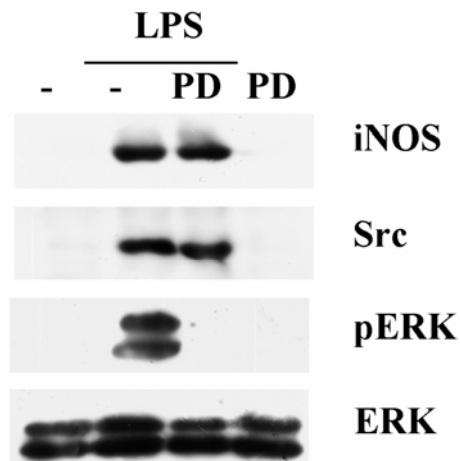
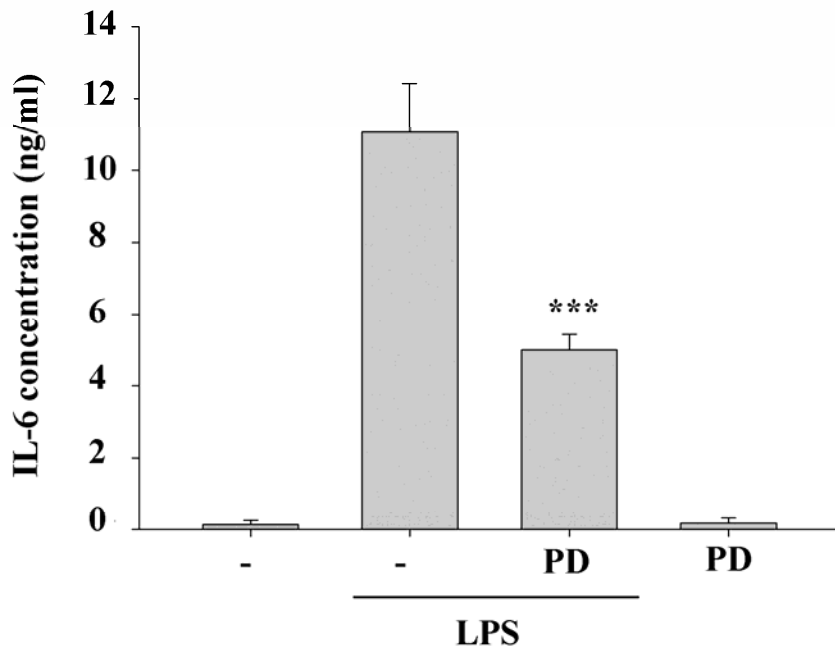
**Figure.3 The inhibitory effect of PP2 in IL-6 secretion of LPS-stimulated RAW264.7 macrophage.** Raw264.7 cells were pre-treated with PP2 (10  $\mu$ M) for 30 minutes and then cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 48 hours. The IL-6 expression was determined by ELISA kit (Invitrogen Corporation). Total cell lysates (80  $\mu$ g) from each group were collected and resolved by SDS-PAGE and then probed with antibodies of iNOS, Src, and Actin. \*\*\*,  $P < 0.001$  as compared with LPS-stimulated groups.



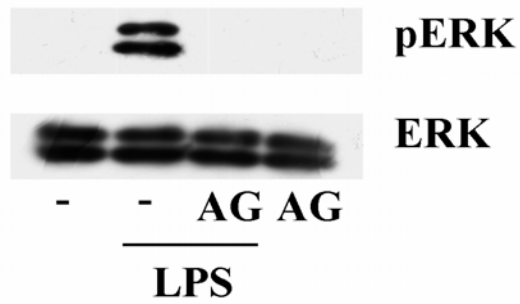
**Figure.4 LPS-induced IL-6 expression in wild type and iNOS knockout mice peritoneal macrophage ( PEM ).** PEM isolated from wild type ( WT ) and iNOS knockout ( iNOS<sup>-/-</sup> ) C57BL/6 mice were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 48 hours, then the concentration of IL-6 in culture medium was determined by ELISA. \*\*\*,  $P < 0.001$  as compared with wild type LPS-stimulated group.



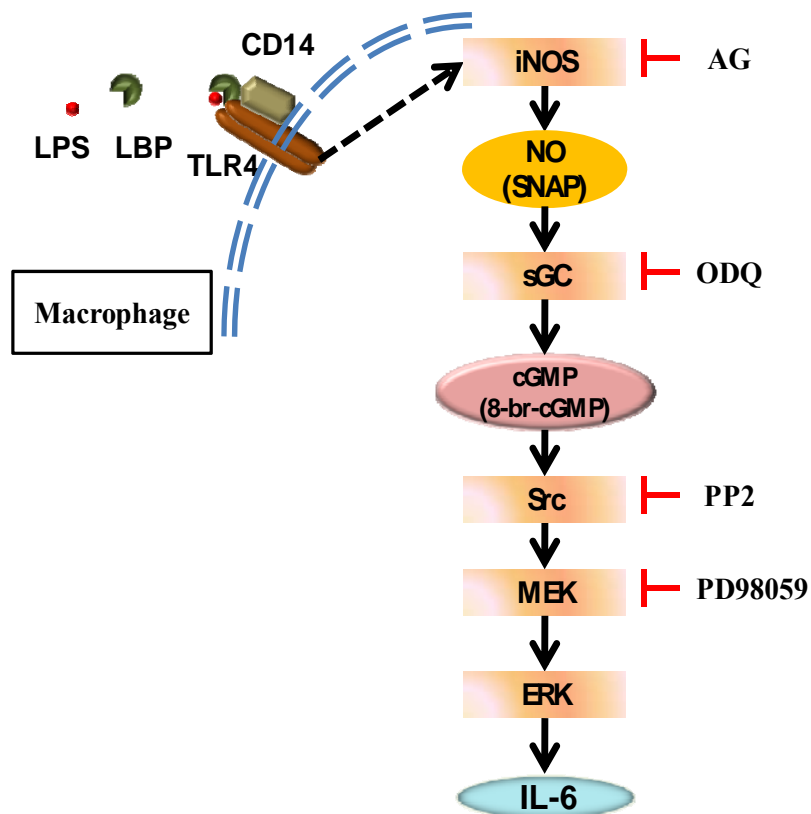
**Figure.5 IL-6 expression was increased by adding SNAP and cGMP in both wild type and iNOS knockout mice PEM.** PEM isolated from wild type (WT) and iNOS knockout (iNOS<sup>-/-</sup>) C57BL/6 mice were treated with or without SNAP (100  $\mu$ M) and 8-br-cGMP (cGMP, 100  $\mu$ M) for 48 hours, then the concentration of IL-6 in culture medium was determined by ELISA. \*\*\*,  $P < 0.001$  as compared with untreated groups. (SNAP – S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine, NO donor ; 8-br-cGMP – 8-bromoguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate sodium salt, homolog of cGMP.)



**Figure.6 The inhibitory effect of PD98059 on LPS-induced macrophage IL-6 expression.** Raw264.7 cells were pre-treated with PD98059 (10  $\mu$ M) for 30 minutes and then cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 48 hours. The IL-6 expression was determined by ELISA kit. Equal amounts of cell lysates (80  $\mu$ g) from each groups were resolved by SDS-PAGE immediately and probed with anti-iNOS, anti-Src, anti-pERK, and anti-ERK antibodies. \*\*\*,  $P < 0.001$  as compared with LPS-stimulated groups.



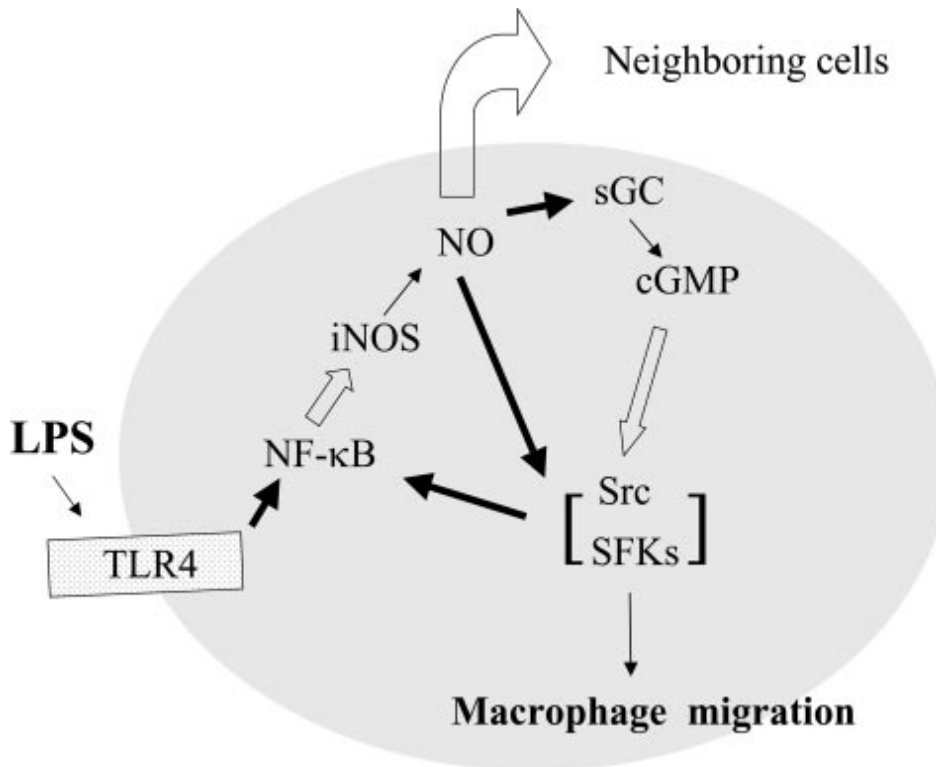
**Figure.7 The inhibitory effect of AG on LPS-induced macrophage pERK expression.** Raw264.7 cells were pre-treated with AG (2mM) for 30 minutes and then cells were stimulated with LPS ( 100ng/ml) for 48 hours. Equal amounts of cell lysates (80µg) from each groups were resolved by SDS-PAGE immediately and probed with anti-pERK, and anti-ERK antibodies.



**Figure. 8** The proposed iNOS/Src/ERK signaling pathway for IL-6 secretion in LPS-stimulated macrophages. When macrophages are stimulated with LPS, the signal will be transduced inside the cell via TLR4 and leads to induction of iNOS. NO/cGMP pathway then upregulate and activate Src, which results in sustained ERK activation and contributes to IL-6 production.



附圖、一



**Model of iNOS and Src in LPS-mediated macrophage migration.**

Upon LPS stimulation, NF- $\kappa$ B becomes activated and increases iNOS expression, NO production. The following activation of sGC results in the production of cGMP and augments the expression of Src. Meanwhile, NO retains the ability to promote the activity of SFKs, including Src via nitrosylation. Because SFKs can mediate the activation of NF-kappaB, thus a loop of signal amplification for macrophage movement can be constructed. The *open arrow* indicates increased protein expression, whereas the *closed arrow* indicates increased activity of enzymes and transcription factor(s) (*i.e.* NF-kappaB) (THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 2008; 283: 31408–31416).