

中國醫藥大學 藥物化學研究所
碩士論文

指導教授：郭盛助教授
王繼平教授

FAL 抑制嗜中性白血球生成超氧自由基的研究

**Inhibitory Effect of FAL on Superoxide Anion
Generation in Neutrophils**

研究生：林慧怡

Hui-Yi Lin

中華民國九十五年七月

誌謝

本論文可以順利的完成，首先要感謝我的恩師王繼平教授、郭盛助教授及黃麗嬌教授，在課業上細心教導和鼓勵，在實驗方面幫我解決許多疑惑及教導我實驗技巧和觀念，使我在這兩年的研究生活對於藥理領域有更進一步的了解，也對於讀書研究有了不同的體會。感謝口試委員林瑞生教授不吝指正和教導，使本論文能夠去蕪存菁、更臻完美。

在這兩年所接觸到的人事物，都讓我感受良多，不管是開心或是難過的事都讓我成長不少。感謝菊子學姐、曹學姐、孟葳學長、小關學長和文元學長在實驗方面不厭其煩的指導，當實驗遇到瓶頸時可以和我一同討論及給予適時的幫助。感謝曉瑜、佳慧和郁芳在生活上所帶給我的歡笑和鼓勵及分擔實驗室的工作，讓我在實驗等待的過程不覺得漫長或是實驗不順利時可以給我精神上的鼓勵。也感謝和我同班兩年的每一位同學在課業上及生活上給予我的幫助，使我不至於和學校脫節。

最後要感謝我的家人：爺爺、奶奶、老爸、老媽、大姐、二姐、小妹和興鴻，因為有你們的支持和照顧，在我到不順遂時陪我聊天，聽我傾訴，在我疲憊不堪時給我安慰，讓我有勇氣去面對所遇到的一切困難，可以順利完成學業。謝謝你們，願將此喜悅和你們分享。

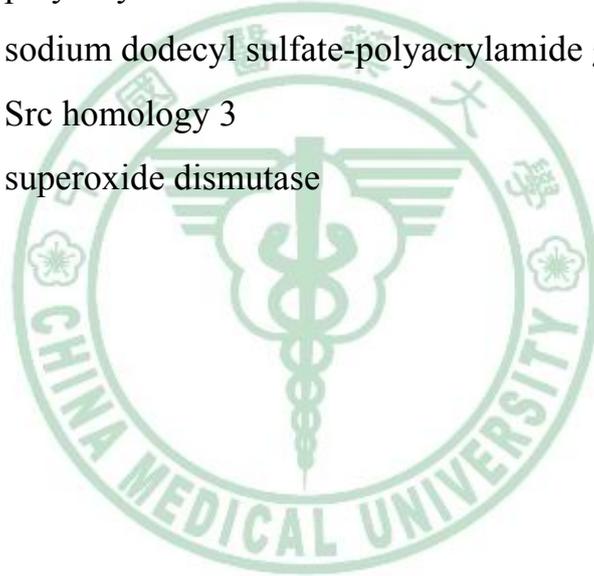
目錄

	頁數
縮寫表-----	1
中文摘要-----	3
英文摘要-----	4
第一章 緒論	
一、前言-----	6
二、NADPH oxidase-----	8
三、G protein-coupled receptor-----	11
四、Small G proteins-----	12
五、Phosphoinositide 3-kinase-----	13
六、Protein kinase C-----	16
七、Phospholipase D-----	18
八、Mitogen-activated protein kinase-----	19
九、Phospholipase C 及 Ca^{2+} -----	20
十、蛋白質上 tyrosine 的磷酸化-----	22
第二章 FAL 抑制嗜中性白血球生成超氧自由基的研究	
一、實驗背景與目的-----	34
二、實驗材料及方法-----	34
三、結果-----	45
四、討論-----	52
結論-----	56
參考文獻-----	78

縮寫表

ARF	ADP-ribosylation factor
CB	cytochalasin B
cPKC	conventional protein kinase C
DAG	diacylglycerol
DHF	dihydroxyfumaric acid
DMSO	dimethyl sulphoxide
ERK	extracellular signal-regulated kinase
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FPR	formyl-peptide receptor
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF	guanine nucleotide exchange factor
HBSS	Hanks' balanced salt solution
IP ₃	inositol 1,4,5-trisphosphate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK2	MAPK-activated protein kinase-2
MKK	MAPK kinase
MKKK	MAPK kinase kinase
NBT	nitroblue tetrazolium
PA	phosphatidic acid
PDK	phosphoinositide-dependent kinase
PI3K	phosphoinositide 3-kinase

PI(3,4)P ₂	phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate
PI(4,5)P ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI(3,4,5)P ₃	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SH3	Src homology 3
SOD	superoxide dismutase



中文摘要

新合成 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 類化合物 FAL 以濃度及時間依存性的方式抑制 formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) 刺激大鼠的嗜中性白血球生成超氧自由基，其 IC_{50} 值為 $13.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$ 。此種抑制作用為不可逆性，並且非來自於對細胞的毒性。FAL 不會抑制 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激嗜中性白血球生成超氧自由基。FAL 不影響 dihydroxyfumaric acid (DHF) 自體氧化產生超氧自由基。FAL 會以濃度依存性的方式抑制細胞的去顆粒化作用 (degranulation)。FAL 不會影響 fMLP 刺激嗜中性白血球所引起的 Akt(Ser⁴⁷³)、Akt(Thr³⁰⁸) 及 glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) 的磷酸化，不影響細胞內鈣離子的釋出，也不影響 PKC α 及 PKC ζ 之膜轉位。高濃度的 FAL 會抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球引起的 extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、MAPK-activated protein kinase-2 (MAPKAPK2)、蛋白質 tyrosine 的磷酸化、ADP-ribosylation factor (ARF)、protein kinase C (PKC) β I、PKC β II 和 PKC δ 的膜轉位作用及細胞外鈣離子的流入。FAL 會抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球引起的 phospholipase D (PLD) 活性，也會明顯減少 RhoA 之膜轉位，其 IC_{50} 值各別為 $16.0 \pm 8.6 \mu\text{M}$ 和 $18.7 \pm 7.9 \mu\text{M}$ 。在無細胞反應系統中，FAL 對於 GTP γ S 刺激的 ARF 和 RhoA 的膜轉位，均無顯著的抑制作用。綜合上述的結果，FAL 抑制 fMLP 刺激大鼠的嗜中性白血球生成超氧自由基和去顆粒化的作用，可能主要經由減少 RhoA 之膜轉位來抑制 PLD 的活化所致。

Abstract

FAL, a synthetic 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid derivative, inhibited formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)-induced superoxide anion generation in a concentration- and time-dependent manner in rat neutrophils with an IC_{50} value of $13.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$. This inhibitory effect was not reversed by washing and not caused by cytotoxicity. FAL had no effect on phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced superoxide anion generation in neutrophils and did not affect the superoxide generation during dihydroxyfumaric acid (DHF) autoxidation in a cell-free system. FAL also inhibited fMLP-induced neutrophil degranulation in a concentration-dependent manner. FAL did not affect the phosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase 3β (GSK3 β), the Ca^{2+} release from the internal store, and the membrane recruitment of protein kinase C (PKC) α and PKC ζ in neutrophils in response to fMLP. However, a prominent inhibition of the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), MAPK-activated protein kinase-2 (MAPKAPK2) and protein tyrosine, the membrane translocation of ADP-ribosylation factor (ARF) and PKC β I, PKC β II and PKC δ and the influx of external Ca^{2+} in fMLP-stimulated neutrophils by FAL was observed only at high concentration. FAL inhibited the fMLP-induced phospholipase D (PLD) activation and the recruitment of RhoA to membrane with IC_{50} values of 16.0 ± 8.6 and $18.7 \pm 7.9 \mu\text{M}$, respectively. However, FAL did not reduce the

membrane-associated ARF and RhoA in a cell-free system in response to $GTP\gamma S$. Taken together, the inhibition by FAL of fMLP-induced superoxide anion generation and degranulation in neutrophils is probably mainly attributed to the attenuation of RhoA recruitment to membrane and thus suppresses the PLD activation.



第一章 緒論

一、前言

血液由 55% 的血漿和 45% 的血球組成。血漿中的組成，除了有 90-92% 的水份之外，就是蛋白質（包含血清球蛋白、抗體、抗毒素、血清白蛋白、纖維蛋白元、酵素等）、礦物質（包含氯化鈉、碳酸氫鈉、極微量的鉀、鎂、磷、鈣、鐵、銅、碘等）、營養物質（包含氨基酸、葡萄糖、脂肪酸、維他命 D、賀爾蒙等）、有機廢物（包含有尿素、尿酸、肌酸肝等）等。血液中血球的部分，可分為紅血球、白血球和血小板。紅血球的功效是將肺吸入的氧氣送到身體各組織的細胞，同時將細胞產生的二氧化碳送到肺呼出體外，以維持身體各部分的正常氧需求。血小板的含量在 1 毫升血液中有 30 萬個。當血管受傷時，血小板可在損傷處凝集，並促進血液凝固防止血液流失。白血球在血液中的含量約 1 毫升血液有 8,000 個，包括顆粒性白血球 (granulocytes)、淋巴球 (lymphocytes) 及單核球 (monocytes)。顆粒性白血球又可分為嗜中性白血球 (neutrophils)、嗜酸性白血球 (eosinophils) 和嗜鹼性白血球 (basophils)。嗜中性白血球具有吞噬作用，對防範病菌感染扮演第一線的角色。嗜鹼性白血球及嗜酸性白血球與過敏、氣喘、及消滅寄生蟲有關。而淋巴球則參與抗體的生成及細胞毒殺。單核球可離開血管進入組織器官轉變成巨噬細胞 (macrophages)，對防範病菌的感染也扮演重要的角色。

嗜中性白血球是一種已完全分化的細胞（直徑大約 10 μm ）。人體一天

大約製造出 10^{11} 個細胞。當嗜中性白血球離開造血骨髓進入人體的循環系統之後，在沒有外在適當的刺激情況下，存活時間很短 ($t_{1/2}$ 約 6 小時)，主要經由細胞凋亡 (apoptosis) 及巨噬細胞來清除 (Lee et al., 2003)。如果當人體受到感染時，嗜中性白血球會大量增加來抵抗病菌。

當外來的病菌入侵時，會在感染的位置產生 chemokine 或 cytokine。在血液中的嗜性白血球受到這些物質的刺激，會藉由趨化作用 (chemotaxis) 到達感染的位置。趨化作用的過程包括血流中嗜中性白血球會向血管壁靠近，先沿著內皮細胞上滾動 (rolling)，進而附著 (adhesion) 在內皮細胞上，然後經由內皮細胞間隙滲出 (diapedesis) 離開血管向著病菌感染的位置移動。當接觸到病菌後即開始進行吞噬作用 (phagocytosis) (圖 1-1)，形成吞噬體 (phagosome)，吞噬體再與分泌顆粒結合形成噬菌消解體 (phagolysosome)。利用顆粒中儲存的多種分解酵素，將細菌殺死並溶解 (Silliman et al., 2005)。

嗜中性白血球的殺菌作用，可分為兩類：非氧化性 (non-oxidative) 及氧化性 (oxidative) 兩種機制。非氧化性機制是嗜中性白血球利用細胞質中不同種類的酵素來進行殺菌，包括初級顆粒 (primary azurophilic granules) 中的 lysozyme、 β -glycerophosphatase、bactericidal permeability increasing protein、elastase、cathepsin G、protease 3、azurocidin 及 myeloperoxidase 等。另外還有次級顆粒 (secondary 或 specific granules) 中的 lactoferrin、lipocalin、lysozyme、LL37、MMP8、MMP9 和 MMP25 及三級顆粒 (tertiary 或 gelatinase granules) 中的 lysozyme、gelatinase、acetyltransferase 等 (Nathan, 2006)。Chediak-Higashi syndrome 和 specific granule deficiency 為兩種罕見的遺傳疾病，因缺乏非氧化性機制造成白血

球功能的異常，導致病患容易造成較嚴重的感染 (Mayer-Scholl et al., 2004)。氧化性機制是嗜中性白血球經由呼吸爆發作用 (respiratory burst) 產生大量的超氧自由基 (superoxide anion, O_2^-) 來破壞病菌。嗜中性白血球會活化膜上的 NADPH oxidase，將氧分子還原成超氧自由基。因過程中有大量的氧迅速消耗，所以稱呼吸爆發作用。生成的超氧自由基可進一步轉變為 H_2O_2 ，或在 superoxide dismutase (SOD) 存在下加速將超氧自由基轉變為 H_2O_2 。而 H_2O_2 在適當的環境下也可轉變為氫氧自由基 (hydroxyl radical, $HO\cdot$)。 H_2O_2 在 myeloperoxidase 的作用下可轉變為 HOCl 或 chloramines 的氧代謝物。這些活性氧化合物合稱為活性氧物質 (reactive oxygen species) (圖1-2)。活性氧物質可以和細胞內重要的生物分子，如：核酸、蛋白質、脂肪和醣類等作用，造成結構和生理功能的改變。慢性肉芽腫疾病 (chronic granulomatous disease) 為一種罕見的疾病，是 NADPH oxidase 的基因缺陷，造成功能不全，無法生成足量的超氧自由基來殺死入侵的病菌，因而引起嚴重的細菌感染 (Dinauer, 2005)。

二、NADPH oxidase

NADPH oxidase 在嗜中性白血球呼吸爆發過程中扮演關鍵的角色。NADPH oxidase 是由數種蛋白質所組成的複合體，在未受刺激活化時，其組成包含分佈在細胞膜上的 cytochrome b_{558} (是一種 flavohemoprotein，由 $gp91^{phox}$ (β subunit) 及 $p22^{phox}$ (α subunit) 組成) 和在細胞質中的 $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ 、 $p40^{phox}$ 及 Rac (Babior et al., 2002)。當細胞受到 chemoattractants (如：formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP) 的刺

激，會活化細胞膜上的受體，經由細胞內一連串的訊息傳遞路徑，最後活化 NADPH oxidase。細胞活化使得位於細胞質的 $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ 、 $p40^{phox}$ 及 Rac 轉移到膜上，與 cytochrome b_{558} 結合形成完整的且具酵素活性的 NADPH oxidase。在 NADPH 的存在下提供電子進入 NADPH oxidase 的電子傳遞鏈 (transmembrane electron transport chain) ($NADPH \rightarrow FAD \rightarrow 2 \text{ heme} \rightarrow O_2^-$)，將氧分子還原形成超氧自由基 ($NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + 2O_2^- + H^+$) (Babior, 2004) (圖 1-3)。

在 $gp91^{phox}$ 的 N-terminal 有六個穿過細胞膜的 α -helices，而在第三和第五的 helices 各包含著兩個 His 可以和兩個 hemes 相互結合，其中一個朝外，另一個朝內。而 $gp91^{phox}$ 的 C-terminal 存在細胞質中，並且和 NADPH 及 FAD 結合在一起。在 cell-free system 中加入 arachidonic acid 會使 $gp91^{phox}$ 、 $p22^{phox}$ 、 $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ 、 $p40^{phox}$ 及 Rac 結合在一起進而活化 NADPH oxidase (Nauseef et al., 2004)。有文獻指出將 $gp91^{phox}$ 的 C-terminal 阻斷後並不會影響 NADPH oxidase 其他蛋白質的結合，但是會使 NADPH oxidase 的活性下降 (Burritt et al., 2003)。

$p22^{phox}$ 的結構上包含兩個穿過細胞膜的部份可以和 $gp91^{phox}$ 形成穩定的化合物。在 C-terminal 包含 proline-rich region 會與細胞質內的 $p47^{phox}$ 結合，因此 $gp91^{phox}$ 和 $p22^{phox}$ 之間的相互調控是很重要的。在 cell-free system 中， $p22^{phox}$ 可經由 phosphatidic acid (PA) 依存性的方式進行磷酸化，進而活化 NADPH oxidase (Regier et al., 1999)。

$p47^{phox}$ 的結構上包含有兩個 SH3 (Src homology 3) domains、autoinhibitory region、proline-rich region 及在 N-terminal 的 PX domain。細胞未活化時，經由 autoinhibitory region 和 proline-rich region 結合在一

起，將 SH3 domain 的作用位置遮蔽起來。而 PX domain 則會與 SH3 domain 結合，將 PX domain 作用位置遮蔽起來 (Hiroaki et al., 2001)。當細胞受到適當的刺激，經由 autoinhibitory region 的磷酸化改變 p47^{phox} 的構形，使 SH3 domain 暴露出來和膜上 p22^{phox} 的 proline-rich region 結合。而 p47^{phox} 上的 proline-rich region 則會和 p67^{phox} 上的 SH3 domain 結合 (Sumimoto et al., 2005)。有些學者認為 p47^{phox} 是將細胞質的 p67^{phox} 和 p40^{phox} 轉移至細胞膜活化 NADPH oxidase 的重要因子 (Babior, 2004)。也有學者認為 p47^{phox} 並非絕對重要，因為在 p47^{phox} 不存在下，高濃度的 p67^{phox} 仍可產生超氧自由基 (Freeman and Lambeth, 1996)。另有學者指出 p47^{phox} 指揮調控 p67^{phox}，使得 p67^{phox} 和 Rac2 的 insert domain 結合可和 cytochrome b₅₅₈ 相互作用，而 Rac2 便可以活化 NADPH oxidase (Gary, 2005)。

p67^{phox} 結構上的 N-terminal 具有四個 tetratricopeptide repeat motifs，而 C-terminal 有兩個 SH3 domains 和介於 SH3 domain 中間的 PB1 domain。Tetratricopeptide repeat motif 會和 Rac 結合，而 PB1 domain 則會和 p40^{phox} 上的 PB1 domain 結合 (Sumimoto et al., 2005)。所以在 Rac 存在下，可促進 p67^{phox} 和 gp91^{phox} 間的結合。p67^{phox} 也參與將 NADPH 所提供的電子傳給氧分子。有研究指出，當細胞缺乏 cytochrome b₅₅₈ 時，p47^{phox} 和 p67^{phox} 便無法轉移至膜上。而 p67^{phox} 在沒有 p47^{phox} 時也無法轉移到膜上。但 p47^{phox} 在沒有 p67^{phox} 仍然可以轉移到膜上。可能是 p47^{phox} 活化後產生 p67^{phox} 的結合位置，使 p67^{phox} 轉移至膜上 (Roos et al., 2003)。

p40^{phox} 結構上的 N-terminal 有 PX domain 和 SH3 domain 在

C-terminal 有 PB1 domain。由於 p67^{phox} 無 PX domain，但藉由和 p40^{phox} 的結合，能從細胞質轉移到細胞膜上和 gp91^{phox} 結合 (Ellson et al., 2001)。目前對 p40^{phox} 功能的了解仍然有限。有些學者認為 p40^{phox} 會活化 NADPH oxidase (Tsunawaki et al., 1996)，但也有些學者認為 p40^{phox} 會抑制 NADPH oxidase (Sathyamoorthy et al., 1997)。

Rac (21 kDa) 是一種 small G protein，有兩種 isoforms：Rac1 及 Rac2。Rac1 主要表現在巨噬細胞和單核細胞，而 Rac2 主要表現在嗜中性白血球。在未活化的細胞，Rac-GDP 位於細胞質中與 guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI) 結合，抑制了 GDP 與 GTP 的交換。當嗜中性白血球受刺激活化，Rac 由 GDI 釋放出來 (Chuang et al., 1993)。在 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 的調節下 (Bokoch, 1994)，Rac 會與 GDP 分離而與 GTP 結合而形成活化態，並轉移到膜上與 cytochrome *b*₅₅₈ 及 p67^{phox} 結構上 N 端的 tetra-tryptophan repeat domain 結合 (Koga et al., 1999) 導致活化 NADPH oxidase 產生超氧自由基 (Sarfstein et al., 2004)。

三、G protein-coupled receptor

當嗜中性白血球受到 chemoattractants 刺激活化 G protein-coupled receptor。G protein 依其組成成分成兩大類：單一蛋白質的 small G proteins 和 heterotrimeric G proteins。後者包括三個 subunits： α 、 β 及 γ 。其命名則根據它們的 α subunit 種類。 α subunit 具有 guanine nucleotide 結合以及 GTPase 的能力 (Bourne et al., 1990)。G protein 和

GDP 結合時為不活化態。當 G protein-coupled receptor 受到適當刺激，可促使 G protein 上的 GTP 與 GDP 交換，造成 $\beta\gamma$ subunits 與 α subunit 分離，此時的 G_{α} -GTP 代表活化態，當 G_{α} -GTP 的 GTP 被水解為 GDP，會和 $G_{\beta\gamma}$ subunit 再結合回到不活化態 (Simon et al., 1991) (圖 1-4)。目前已發現有 18 種 α subunits，根據彼此序列的同質性可分為四大類： $G_{s/olf}$ 、 $G_{i/o}$ 、 $G_{q/11}$ 及 $G_{12/13}$ 。 β subunit 有 5 種，而 γ subunit 有 11 種 (Hepler and Gilman, 1992)。

N-formyl peptides 是細菌細胞壁上一段特殊的 peptide，會與嗜中性白血球細胞膜上的 FPR 結合。FPR 是 G_i protein-coupled receptor (Le et al., 2002)。fMLP 被廣泛用來作為嗜中性白血球刺激劑。當 fMLP 作用到 FPR，會使得 G_i protein 的 $G_{i\alpha}$ subunit 上 GDP 交換形成活化態的 GTP 再和 $G_{\beta\gamma}$ 脫離。G protein 活化後，會刺激 phospholipase C (PLC) 而促進 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) 水解為 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) 與 diacylglycerol (DAG)； IP_3 與內質網 (endoplasmic reticulum) 膜上的 IP_3 receptor 結合，開啟鈣離子通道，釋放內質網中儲存的鈣離子到細胞質，並誘發與鈣離子有關的反應同時 DAG 會活化 protein kinase C (PKC)，並催化下游蛋白質磷酸化，引起細胞的許多反應 (Sternweis et al., 1992)。

四、Small G proteins

Small G proteins (20-40 kDa) 依結構的不同可分為五大類：Ras, Rho, Rab, ADP-ribosylation factor (ARF) 和 Ran。Small G proteins 可調控許

多細胞的功能，如生長分化、胞吐作用、呼吸爆發、細胞骨架重組合、基因表現、趨化作用等 (Takai et al., 2001)。Small G proteins 與 heterotrimeric G proteins 相同，與 GTP 結合為活化態，而與 GDP 結合為去活化態。Small G proteins 的活化過程中需要三種蛋白質參與調節。其中 GDI 可以阻止 small G proteins 上的 GDP 與細胞質中的 GTP 交換，並且阻止 small G proteins 轉移到細胞膜。GEF 可以促使 small G proteins 上 GDP 與 GTP 的交換。而 GTPase-activating protein 可促進 GTP 水解成 GDP (Tereas et al., 2005)。當細胞未活化時，small G proteins 會與 GDI 結合。當細胞受到適當刺激，會使 small G proteins 與 GDI 分離。而 GEF 上的 DH domain 可與 small G proteins 結合，促使 GDP 與 GTP 的交換。於未活化時，GEF 的 PH domain 會遮蔽 DH domain 產生自體抑制作用。活化後，則會展開此遮蔽結構，並轉位到細胞膜上與 small GTPase 結合，並促使 GDP 轉換成 GTP。當 small G proteins 與 GTP 結合成活化態時便可將訊息傳到下游。GTPase-activating protein 可促使 small G proteins 上的 GTP 水解成 GDP，然後與 GDI 結合呈現不活化態 (圖 1-5)。

五、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)

PI3K 依受質的不同可分三大類：class I_A、I_B、II 及 III (圖 1-6)。每種形態的 PI3K 都具有 C2 domain 及 catalytic domain，且都經由 helical domain (PIK domain) 連接。Class I 可作用於 phosphatidylinositol、phosphatidylinositol 4-phosphate 和 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

(PI(4,5)P₂); class II 可作用於 phosphatidylinositol 和 phosphatidylinositol 4-phosphate; 而 class III 可作用於 phosphatidylinositol (Koyasu, 2003)。

Class I_A 以 heterodimer (adaptor subunit 及 catalytic subunit) 複合體形式存在。Class I_A 的 catalytic subunit 有 p110 α 、 β 及 δ 三種。p110 α 及 β 表現在各個組織或器官，而 p110 δ 主要表現在白血球。Class I_A 的 adaptor subunit 有 p85 α 、p85 β 、p55 α 、p55 γ 及 p50 α 五種。主要受到 receptor intrinsic tyrosine kinase 或 non-receptor tyrosine kinase 的調節 (Anderson and Jackson, 2003)。其中 p85 α 、p85 β 皆具有二個 SH2 domain。SH2 domain 會與 p110 的 N-terminal region 結合，而維持 p110 的穩定。p85 的二個 SH2 domain 會促進 p110 聚集到膜上，以便受到 tyrosine kinase 的磷酸化作用，造成 p110 的活化 (Wymann and Pirola, 1998)。Class I_B 的 catalytic subunit 為 p110 γ ，其 adaptor subunit 為 p101。此外，p85 α 和 p85 β 在 N-terminal region 還含有 SH3 domain、proline-rich region 和 Bcr homology (BH) domain。其中 BH domain 會和 Cdc42 及 Rac1 結合。Class I_B 只存在哺乳動物，且主要表現在白血球中。Class I_B 和 I_A 非常相似，Class I_B 主要受到 G protein-coupled receptor 所調節，G $_{\beta\gamma}$ 作用到 p101 並活化 p110 γ (Furman et al., 1998; Vanhaesebroek and Waterfield, 1999)。Class I_A 或 I_B 皆具有 Ras-binding domain，因此活化態的 Ras-GTP 也會活化 Class I_A 或 I_B。Class II 有 PI3K-C2 α 、PI3K-C2 β 及 PI3K-C2 γ 三種。Class II 會受到 growth factor receptor、chemokine receptor 及 integrins 所活化。在 C-terminal 中含有 phox homology (PX) domain 和 C2 domain，而 phosphatidylinositol 3-phosphate、PI(4,5)P₂ 會與 PX domain 結合。然而 class II 及 class III

的詳細活化機轉還有待釐清 (Koyasu, 2003)。活化後的 PI3K 會對細胞膜的 phosphatidylinositol 4-phosphate 或 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) 上 inositol 第三位的羥基 (hydroxyl group) 進行磷酸化，分別生成 phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PI(3,4)P₂) 或 phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P₃)。Phosphoinositide-dependent kinase (PDK) 和 protein kinase B (PKB)/Akt 可利用其結構上的 PH domain 與 PI(3,4)P₂ 及 PI(3,4,5)P₃ 結合，使其由細胞質中轉移至細胞膜上，方便 PDK 對 Akt 的磷酸化作用 (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000; Koyasu, 2003)。

Akt (57-60 kDa) 為 Ser/Thr kinase。Akt 參與細胞生長、存活和轉錄因子調控。有文獻指出 Akt 在癌細胞中有 anti-apoptotic 的功效，而 angiotensin II 在血管平滑肌細胞藉由 Akt 的活化可促進細胞的增生 (Maria and Ernest, 2006)。Akt 有三種 isoforms 即 PKB α /Akt1、PKB β /Akt2 和 PKB γ /Akt3。Akt 結構上的 N-terminal 有 PH domain，中間為 kinase domain，而 C-terminal 則有 hydrophobic motif。Akt 在 kinase domain (又稱為 activation loop) 上的 Thr³⁰⁸ 及 hydrophobic motif 上的 Ser⁴⁷³ 可被分別被 PDK1 和 PDK2 磷酸化，與 Akt 的活化有關 (Cantrell, 2002; Vanhaesebroek and Alessi, 2000)。但是 Akt3 的結構上缺乏 hydrophobic motif，表示 Akt3 的活化只需要經由對 kinase domain 磷酸化 (Brodbeck et al., 2001)。

PDK (63 kD) 為 Ser/Thr kinase，分為二類：PDK1 及 PDK2。PDK1 在結構上 N-terminal 有 kinase domain，C-terminal 有 PH domain，但缺乏 hydrophobic motif。已知 PDK1 在細胞內維持活化的狀態 (Wick et al.,

2003), 但 PDK2 是何種蛋白質, 目前尚未被確認。有學者認為當 Akt 受到 PDK1 的磷酸化後, 會引起對 Ser⁴⁷³ 產生自體磷酸化 (Toker and Newton, 2000)。也有文獻指出 PDK2 可能是 MAPK-activated protein kinase-2 (MAPKAPK2) (Rane et al., 2001)。Akt 可直接磷酸化 p47^{phox} 而參與 NADPH oxidase 的活化 (Chen et al., 2003)。而 Akt 活化後可以磷酸化下游蛋白質如 glycogen synthase kinase 3 (GSK3) 的 α 和 β 兩種 isoforms。

六、PKC

PKC 為一種 Ser/Thr kinase, 目前已知 PKC 的結構可分成 4 類, 分別為 conventional (或 classical) PKC (cPKC)、novel PKC、atypical PKC 及 PKC μ (protein kinase D) (Nishizuka, 1995) (圖 1-7)。PKC 是單一胜肽的結構, 其 N-terminal 為調節區域, C-terminal 為催化區域, 兩者間經由一個樞紐 (hinge region) 連接 (Nishizuka, 1995)。調節區域包含有 C1 及 C2 domains, 而催化區域有 C3 及 C4 domains。C1 domain 含 cysteine-rich 結構, 可以和 DAG 或 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 為 DAG 的類似物) 結合。C1 domain 的 N-terminal 有一段 pseudosubstrate 序列, 會造成自體抑制的現象 (autoinhibition), 使 PKC 維持在不活化態 (Bell and Burns, 1991)。C2 domain 為鈣離子及 phosphatidylserine 結合的位置 (Igarashi et al., 1995)。C3 domain 為 ATP 結合的位置, 與 PKC 活化有關, 而 C4 domain 為與受質結合的位置 (Silinsky and Searl, 2003)。cPKC 包括有 PKC α 、PKC β I、PKC β II 及

PKC γ 。cPKC 的活化需要 phosphatidylserine、DAG 及鈣離子的存在。Novel PKC 包括有 PKC δ 、PKC ϵ 、PKC η 及 PKC θ 。Novel PKC 的活化需要 phosphatidylserine 及 DAG，此類 PKC 的結構上無 C2 domain 所以不需要鈣離子的參與。Atypical PKC 包括有 PKC ζ 及 ι/λ ，其活化不需要鈣離子及 DAG，但可以受到磷脂質如 phosphatidylserine、PA、PI(3,4,5)P₂ 及 ceramides 刺激而活化 (Newton, 1997)。許多文獻證實，人類嗜中性白球中，具有 PKC α 、PKC β I、PKC β II、PKC δ 及 PKC ζ 等 isoforms (Kent et al., 1996; Majumdar et al., 1993)。本實驗室所發表的文獻證實，大鼠的嗜中性白球中具有 PKC α 、PKC β 、PKC δ 、PKC ϵ 、PKC θ 、PKC μ 、PKC ι/λ 及 PKC ζ ，但 PKC λ 及 PKC ζ 含量很少 (Tsao and Wang, 1997)。

一般認為在未活化的細胞，PKC 位於細胞質中，當細胞受到適當的刺激，PKC 會轉移到細胞質上並活化。當活化的 PLC 對 PI(4,5)P₂ 進行水解作用產生 DAG 及 IP₃，其中 IP₃ 可作用到內質網膜上的 IP₃ receptor，造成內質網內儲存的鈣離子釋出來，使細胞中鈣離子濃度迅速上升，而 PKC 會經由 C1 domain 與細胞膜上的 DAG 結合而活化 (Nishizuka, 1995)。此外，phospholipase D (PLD) 對 phosphatidylcholine 進行水解作用，產生 PA 及 choline。而 PA 亦會進一步轉化成 DAG 而活化 PKC。許多文獻指出，在嗜中性白血球細胞中，cPKC、PKC δ 及 PKC ζ 會對 p47^{phox} 進行磷酸化，進而促進 p47^{phox} 轉移到膜上，也會促進 p47^{phox} 與 p22^{phox} 結合，而增加 NADPH oxidase 的活性 (Fontayne et al., 2002)。

七、PLD

PLD 參與細胞骨架重建和蛋白質表現，也參與嗜中性白血球的吞噬和呼吸爆發作用 (Wate et al., 1997)。在哺乳類動物細胞中 PLD 有二種 isoforms：PLD1 (120 kDa) 及 PLD2 (105 kDa)，兩者間有 50% 胺基酸相似度 (Colley et al., 1997; Hammond et al., 1997)。PLD1 因為 gene splice 的不同又分成 PLD1a 及 PLD1b。PLD1 為 low basal activity，當細胞受到適當的刺激，可顯著的增加 PLD1 活性，而 PLD2 為 high basal activity，在細胞活化時 PLD2 活性的增加有限。PLD1 主要分布於細胞核周圍的 Golgi、內質網及 late endosome (Jenkins and Froman, 2005)，PLD2 主要位於細胞膜上及 caveolae (Du et al., 2004)。PLD1 及 PLD2 在 N-terminal 皆具有 4 個 conserved domain (I-IV)、PH domain 及 PX domain。其中 conserved domain II 和 IV 各有一個 HKD motif (Ponting and Kerr, 1996)，conserved domain III 則有 $PI(4,5)P_2$ 結合的位置 (Sciorra et al., 1999)。PH domain 是 PLD 活化與轉移到膜上所必須的 (Hodgkin et al., 2000)，而 PX domain 則可以和 $PI(3,4,5)P_3$ 結合 (Stahelin et al., 2004) (圖 1-8)。PLD1 和 PLD2 的結構上差別在於 PLD1 有 conserved loop region 而 PLD2 則無 (Sung et al., 1999)。

多種不同的刺激物作用到細胞上不同的 receptors 可以來活化 PLD，表示 PLD 可以經由許多訊息傳遞路徑所活化，如：鈣離子、PKC、tyrosine kinase 和 RhoA 及 ARF (以 ARF6 較為重要) (Exton, 1999)。PKC α 與 PLD1 的 N-terminal 經由蛋白質間的交互作用來活化 PLD1 (Kook and Exton, 2005；Sung et al., 1999)，但是 PKC α 若對 PLD1 進行

磷酸化則會導致 PLD1 去活化 (Exton, 2003)。有研究指出 PKC α 對 PLD2 進行磷酸化並非造成 PLD2 活化的必要條件，是經由 PLD2 和 PKC α 蛋白質間的結合作用便可活化 PLD2 (Exton and Chen, 2005)。許多文獻指出 Rho family 會活化 PLD1，但不會活化 PLD2，其中以 RhoA 引起的活性最大，RhoA 是經由 C-terminal 與 PLD1 結合 (Bae et al., 1998; Hammond et al., 1997)。而 ARF 幾乎不影響 PLD2 的活化 (Sung et al., 1999; Tsai et al., 1998)。有文獻指出，當 fMLP 刺激嗜中性白血球，可經由 PI(4,5)P₂ 或 PI(3,4,5)P₃ 使 GEF 利用結構上的 PH domain 轉移至細胞膜上，經由 DH domain 與 Rho 結合，進而使 Rho-GDP 轉變成 Rho-GTP 的活化態，而和 PLD 結合促使 PLD 活化 (Francis et al., 2006)。PLD 活化後會對細胞膜上的 phosphatidylcholine 進行水解作用，產生 PA 及 choline。PA 是一個重要的二次訊息傳遞分子，會受到 PA phosphohydrolase 作用生成 DAG (Brindley and Waggoner, 1998) 或經由 phospholipase A (PLA) 作用生成 lysophosphatidic acid (Jenkins and Frohman, 2005) (圖 1-9)。PA 可經由活化 PA-activated kinase 來磷酸化 p47^{phox}，並活化 NADPH oxidase (Babior, 1999)。

八、Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

MAPK 為一 Ser/Thr kinase 廣泛存在於細胞中，調節細胞內許多重要的訊息傳遞。MAPK 主要可分成四類：p38 MAP kinase、extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 及 ERK5。p38 MAPK 具有四種 isoforms：p38 α 、p38 β I、p38 β II、p38 γ 及 p38 δ 。其中

p38 α 在白血球和骨髓中有較高表現量， p38 β 則在心臟和腦中有較高表現量，而骨骼肌中有較多的 p38 γ (Cuschieri and Maier, 2005)。JNK 具有三種 isoforms：JNK1、JNK2 及 JNK3。ERK 具有二種 isoforms：ERK1 及 ERK2，通常合稱為 ERK1/2 (English et al., 1999; Schaeffer and Weber, 1999)。存在於嗜中性白血球中的 MAPK 有 ERK1/2、p38 α 、p38 β 、p38 γ 及 p38 δ (Widmann et al., 1999)。鼠嗜中性白血球受到 fMLP 刺激後，會快速引起 ERK 和 p38 MAPK 磷酸化 (Chang and Wang, 1999, 2000)。fMLP 和 PMA 刺激嗜中性白血球，有 ERK 和 p38 MAPK 會參與 p47^{phox} 磷酸化，但 JNK 並不參與此作用 (El Benna et al. 1996)。而 fMLP 刺激的嗜中性白血球，ERK2 及 p38 MAPK 會參與 p67^{phox} 磷酸化 (Dang et al., 2003)。

當細胞受到刺激造成 MAPK cascade 的活化，此過程可分成三階段：MAPK kinase kinase (MKKK 或 MEKK)、MAPK kinase (MKK 或 MEK) 及 MAPK (圖 1-10)。MKKK 及 MKK 為 dual Tyr and Thr kinase。當受到活化會對下游的蛋白質進行 Tyr/Thr 雙磷酸化作用 (English et al., 1999)。常見的 MAP kinase 在 activation loop 上通常會有二個 phosphorylation motif T-X-Y，在 JNK kinases 中為 T-P-Y，在 ERK kinases 中為 T-E-Y，在 p38 MAP kinases 中為 T-G-Y (Platanias, 2005)。當細胞受到刺激，經由 small G protein 活化 MKKK，然後對 MKK 進行雙磷酸化作用，而活化的 MKK 會對 MAPK 進行雙磷酸化並活化 MAPK。

九、PLC 及鈣離子

在哺乳動物細胞已發現有 12 種 PLC，可分為 PLC β 、PLC γ 、PLC δ 、PLC ζ 及 PLC ϵ 四類。其中 PLC β 有四種 (PLC β 1-4)、PLC γ 有二種 (PLC γ 1-2)、PLC δ 有四種 (PLC δ 1-4)、PLC ζ 及 PLC ϵ 各一種 (Michele et al., 2003)。PLC 具有 X 及 Y domain 形成一個 catalytic domain，以及 PH domain、EF-hand domain 及 C2 domain (Katan, 1998) (圖 1-11)。PLC β 和 PLC γ 分別受細胞內的 G $\beta\gamma$ 和 tyrosine kinase 調控。而 PLC δ 會由鈣離子調控，在鈣離子存在下會和 PLC δ 的 catalytic domain 結合使構形產生變化 (Okada et al., 2005)。PLC ϵ 可能是藉由 Ras 所調節 (Fukami, 2002)。在嗜中性白血球中以 PLC β II 為主，以 fMLP 刺激後 PLC β II 活化產生 DAG 和鈣離子能活化 PKC，進一步使 p47^{phox} 磷酸化而活化 NADPH oxidase (Sayeed, 2000)。

鈣離子可以調控許多生理功能，例如：肌肉的收縮、血管的收縮、基因的表現、神經訊號的傳遞及細胞凋亡。在嗜中性白血球，鈣離子是調控呼吸爆發不可或缺的。維持細胞內鈣離子的恆定，需要依靠許多的調控機制，鈣離子由細胞內儲存所釋出或從細胞膜通道流入，都會增加細胞內游離鈣離子的濃度。反之當細胞內游離鈣離子進入細胞內的鈣離子儲存所或經由細胞膜排出，會降低細胞內游離鈣離子的濃度。目前有許多理論說明細胞外的鈣離子是如何進入細胞中，在嗜中性白血球有 capacitative calcium entry 機制參與細胞外鈣離子進入細胞。此機制發生在當內質網內儲存的鈣離子排空後，會使細胞膜上的鈣離子通道開啟，使胞外鈣離子內流 (Putney, 1990)。在嗜中性白血球，以 fMLP 刺激細胞引起的鈣離子濃度增加可分成二個時期，第一個時期來自於內質網儲存的鈣釋放，第二個時期來自於細胞外的鈣離子流入細胞內。

細胞在未受到刺激時，PLC 是存在於細胞質中，當受到適當的刺激後，PLC 會轉移到細胞膜上，對細胞膜上的 PI(4,5)P₂ 進行水解作用，生成 IP₃ 及 DAG (Andresen et al., 2002)。IP₃ 可作用到內質網膜上的 IP₃ receptor，造成內質網內儲存的鈣離子釋出到細胞質，使胞內游離的鈣離子 ([Ca²⁺]_i) 濃度迅速上升 (Taylor, 1998)。在足夠的鈣離子存在下，PLC 活化後生成的 DAG 可活化 PKC 或 DAG 更進一步生成的 PA，皆會進一步促進 p47^{phox} 磷酸化而活化 NADPH oxidase，生成超氧自由基。

十、蛋白質上 tyrosine 的磷酸化

嗜中性白血球受 chemoattractants 刺激會引起蛋白質上 tyrosine 的磷酸化，所活化的 tyrosine kinase 為 non-receptor tyrosine kinase，因為 G protein-coupled receptor 的結構上不具 tyrosine kinase 活性。而存在於嗜中白血球的 non-receptor tyrosine kinase 主要有 Src family (Fgr、Hck、Lyn) (Korade-Miemics and Corey, 2000)、Syk (Fernandez and suchard, 1998) 和 Pyk2 (Fuortes et al., 1999) 三類。fMLP 刺激嗜中性白血球活化之訊息傳遞路徑，有許多受 non-receptor tyrosine kinase 的調控，如 Src family 參與 PI3K-Akt (Nijhuis et al., 2002)、MAPK (Korade-Miemics and Corey, 2000; Mocsai et al., 2000) 及 PLC γ (Wilde and Watson, 2001) 的活化。因此 Src family 也參與活化 NADPH oxidase。

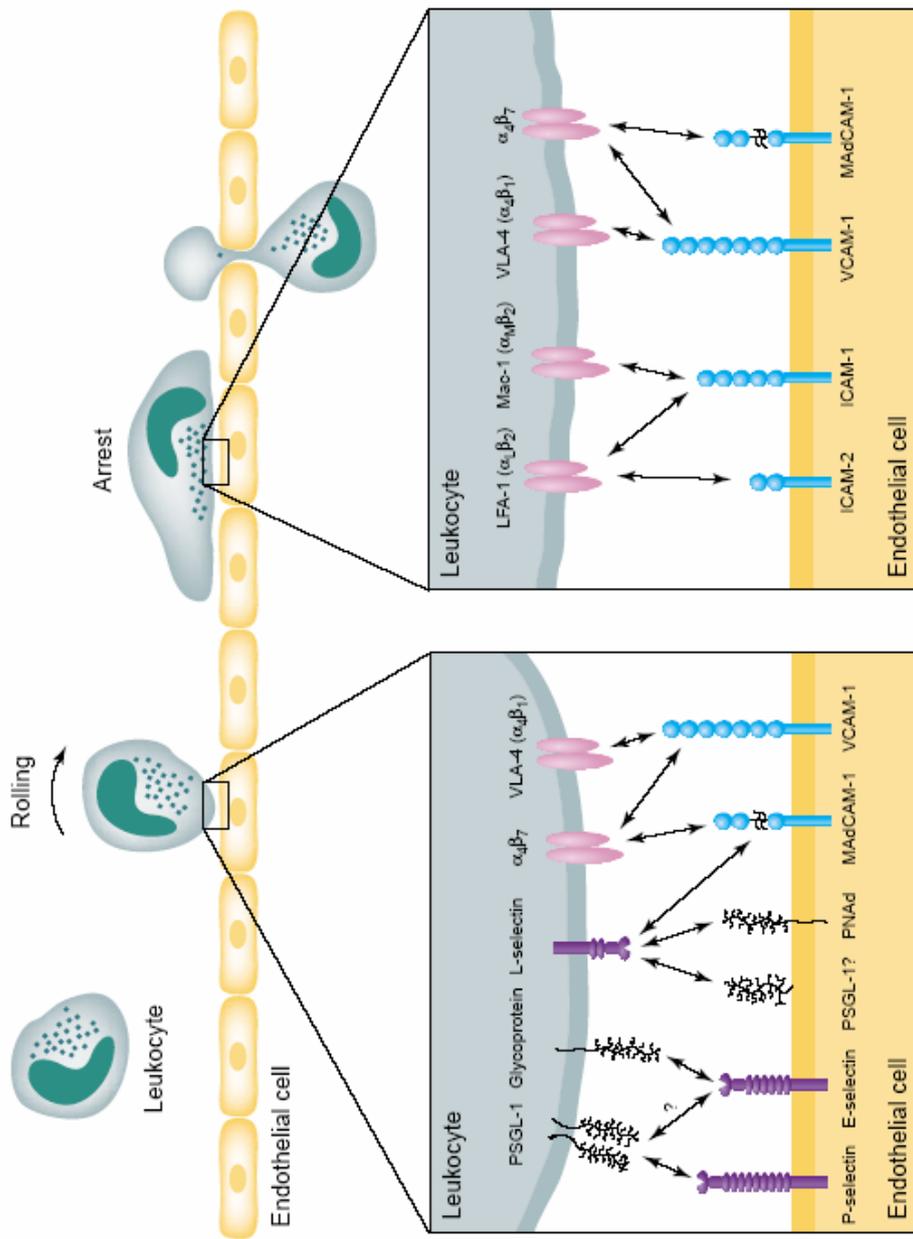


圖 1-1. 嗜中性白血球進行趨化作用，到達細菌感染的組織（摘錄自 Ulbrich et al., 2003）

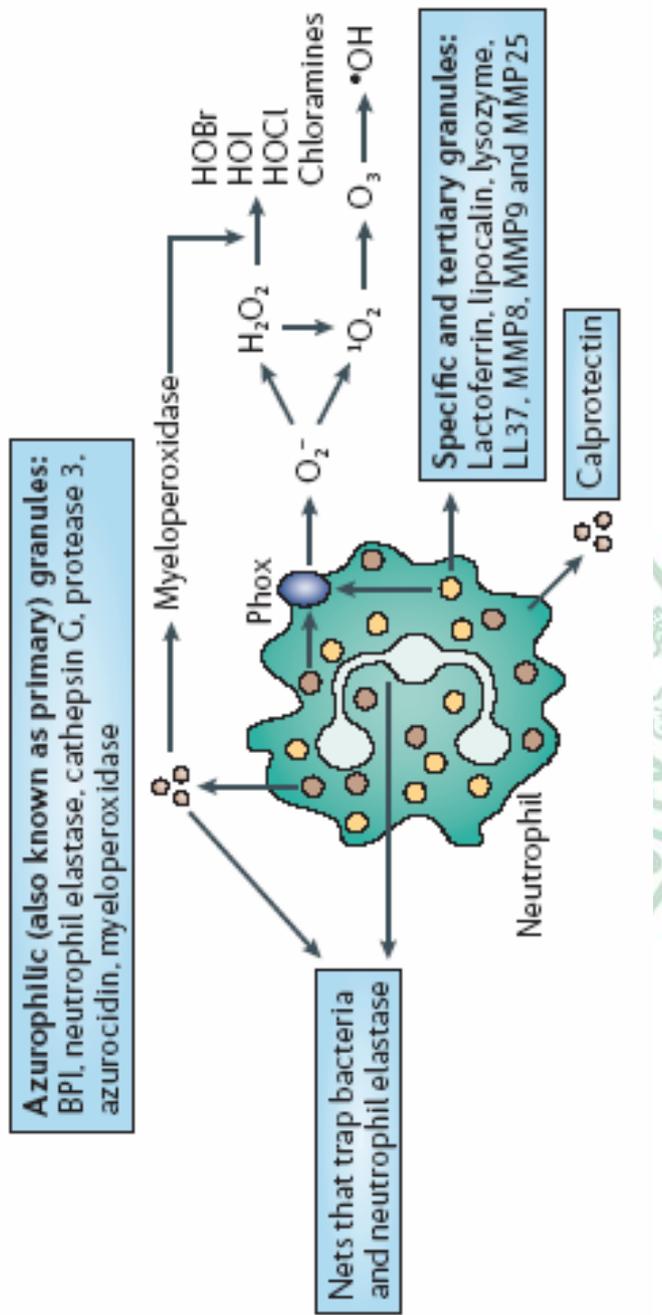


圖 1-2. 嗜中性白血球的殺菌機制 (摘錄自 Allen et al., 2003)

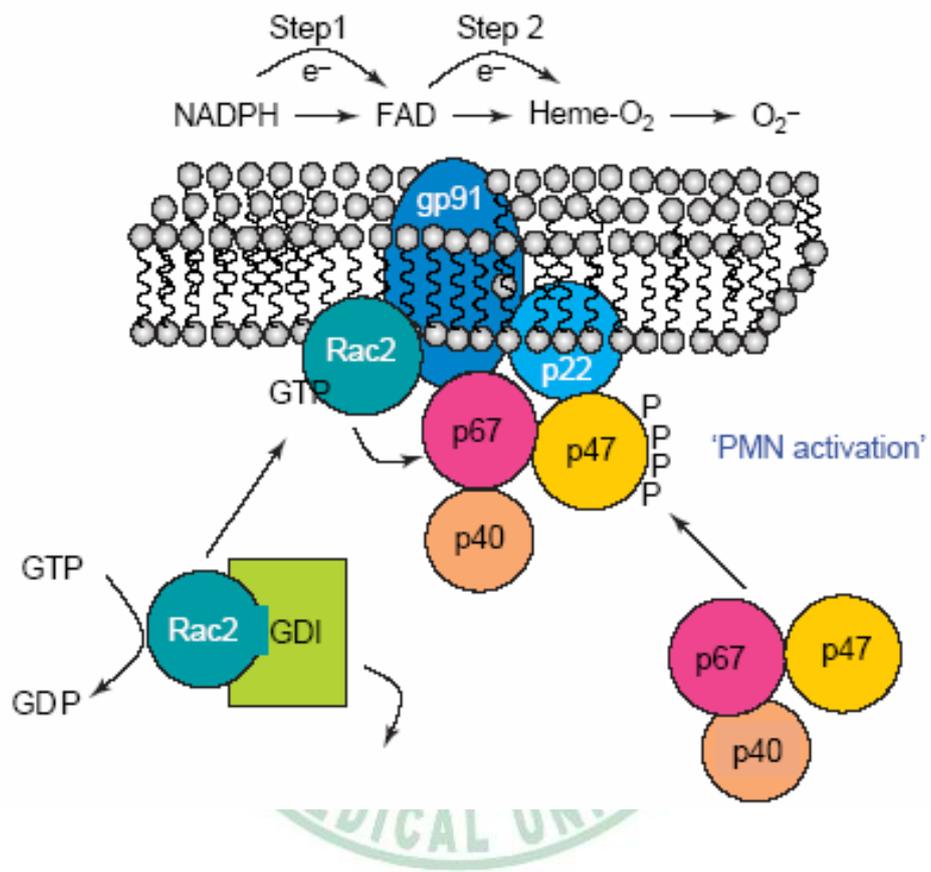


圖1-3. 活化的 NADPH oxidase 產生超氧自由基的機轉 (摘錄自 Gary, 2005)

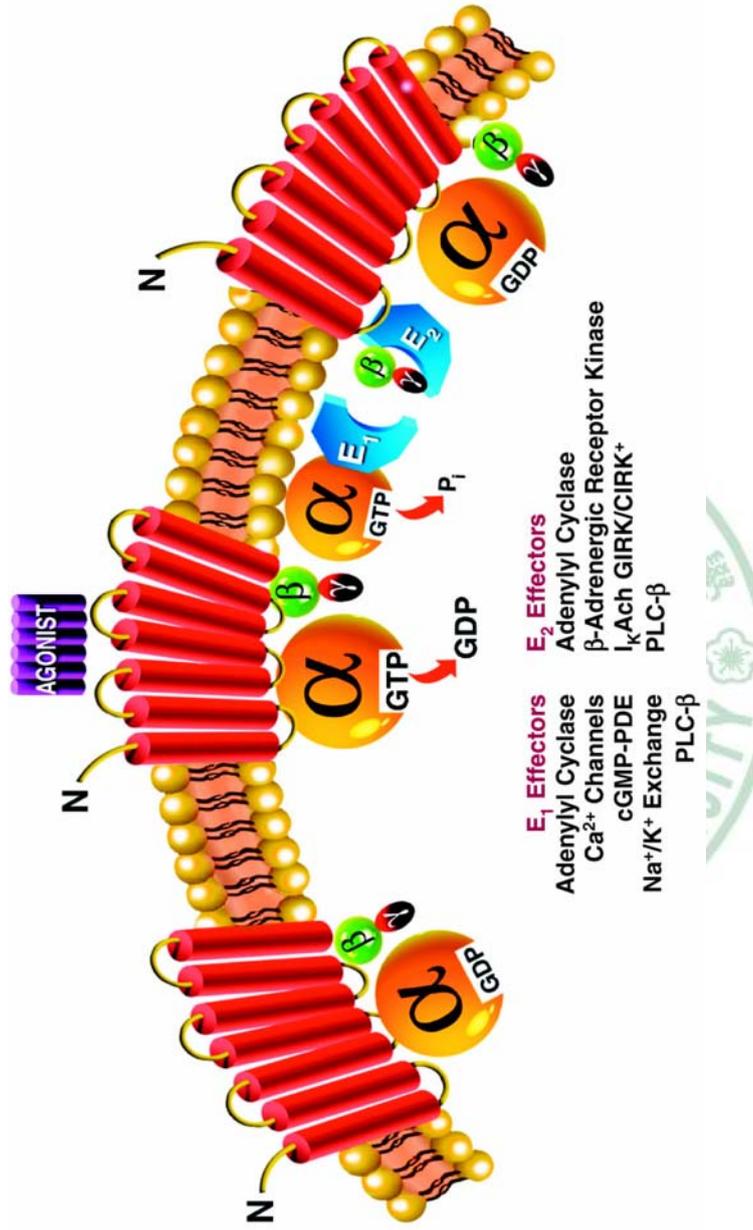


圖1-4. G protein 的活化過程 (摘錄自 Graber, 1999)

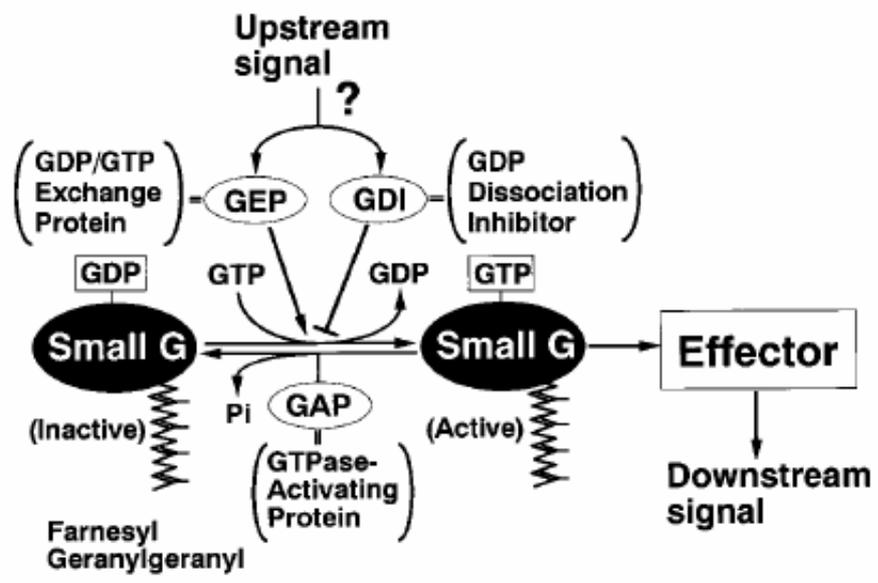


圖 1-5. Small G protein 的活化調控 (摘錄自 Yoshimi et al., 2001)

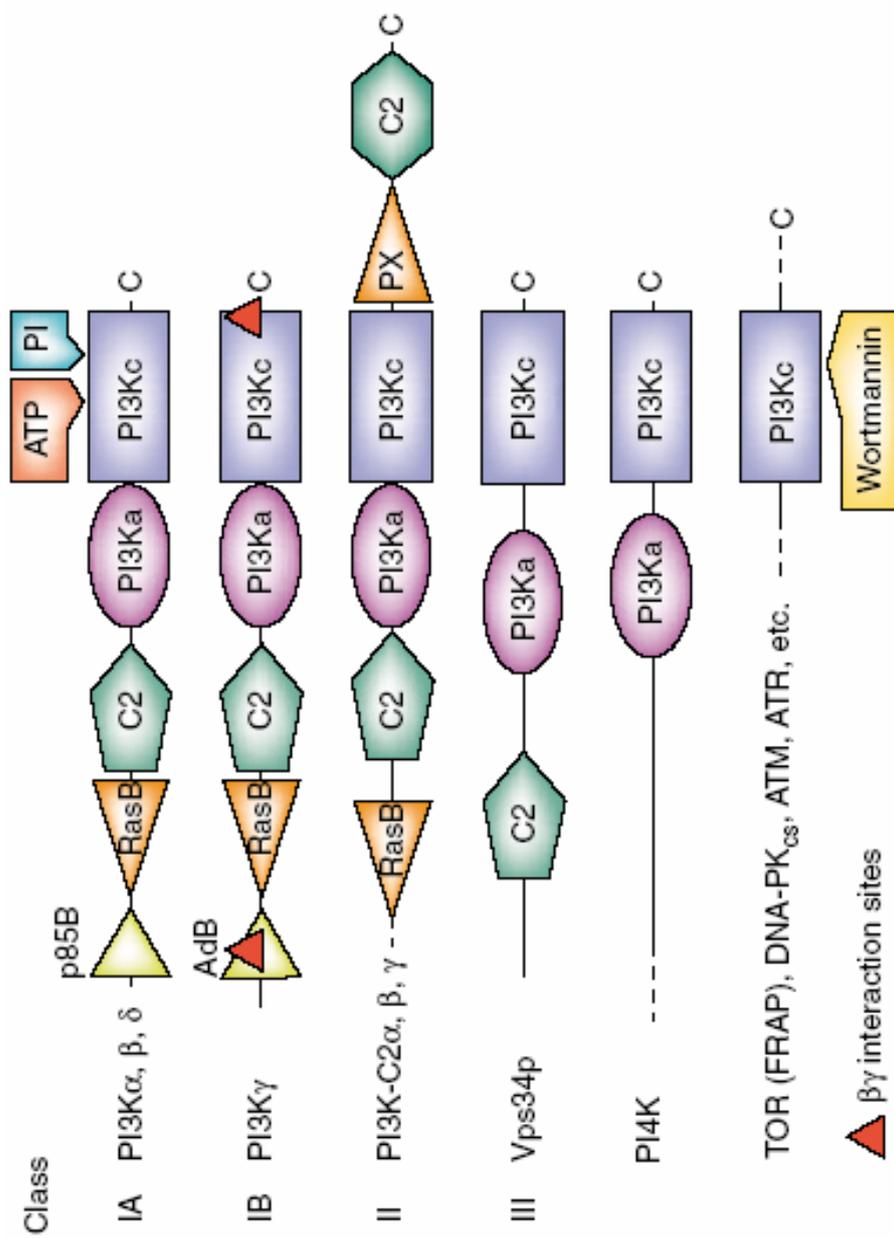


圖 1-6. PI3K families 的結構 (摘錄自 Wymann et al., 2003)

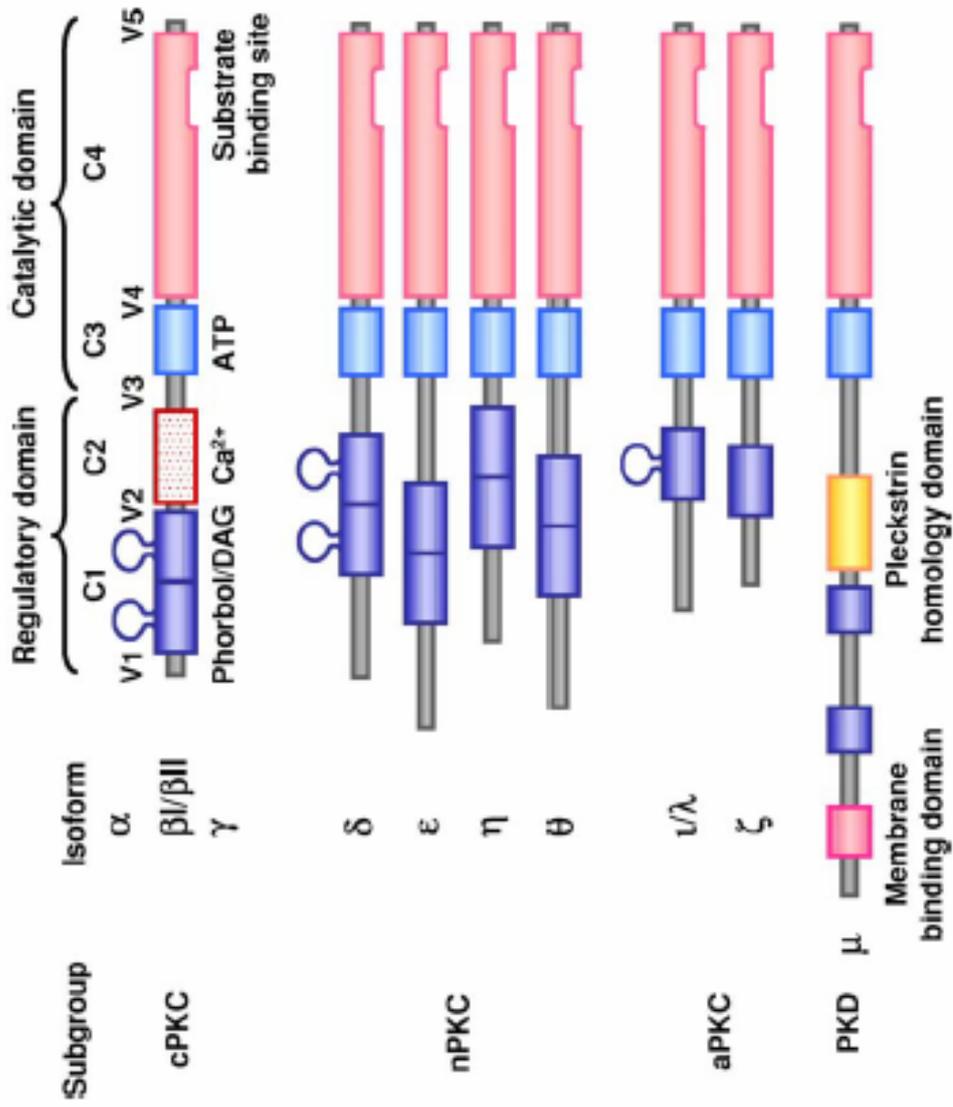


圖1-7. PKC isoform 的結構 (摘錄自Daisy et al., 2005)

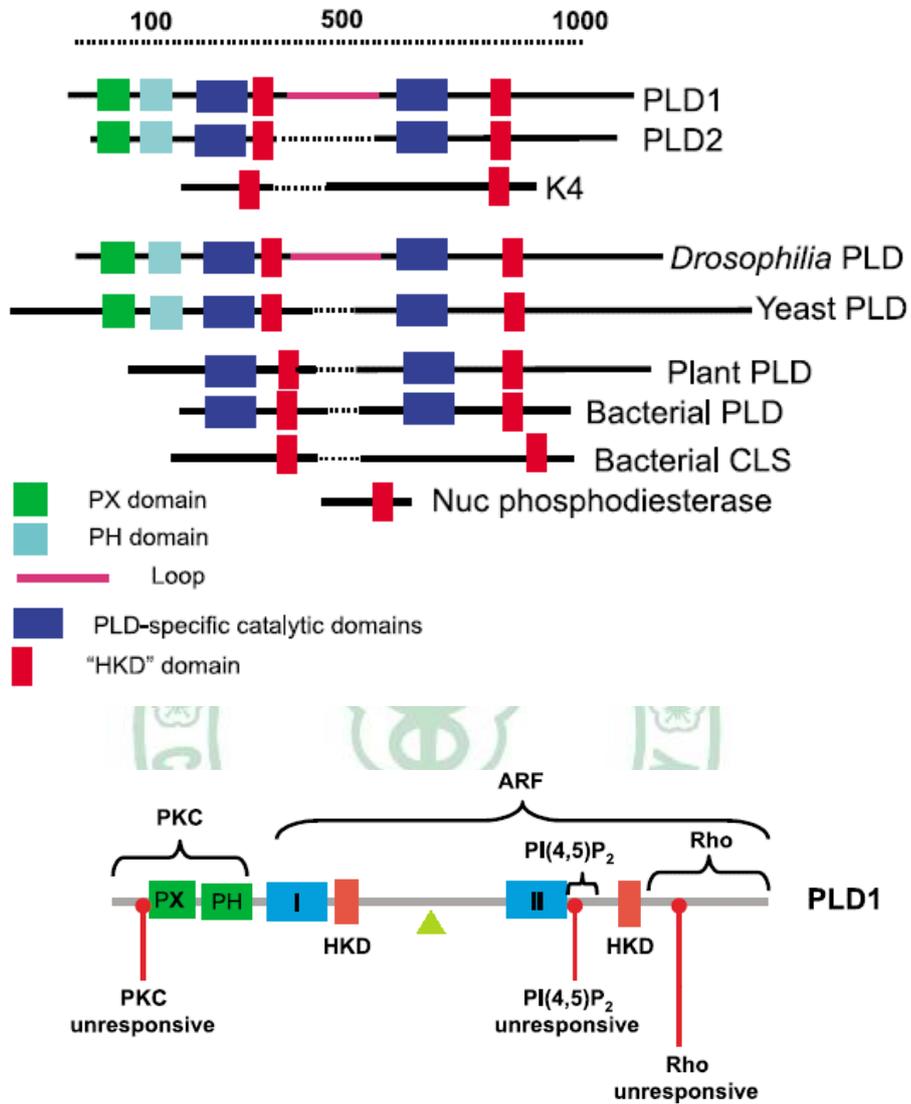


圖1-8. PLD 的結構 (摘錄自 Mark et al., 2004)

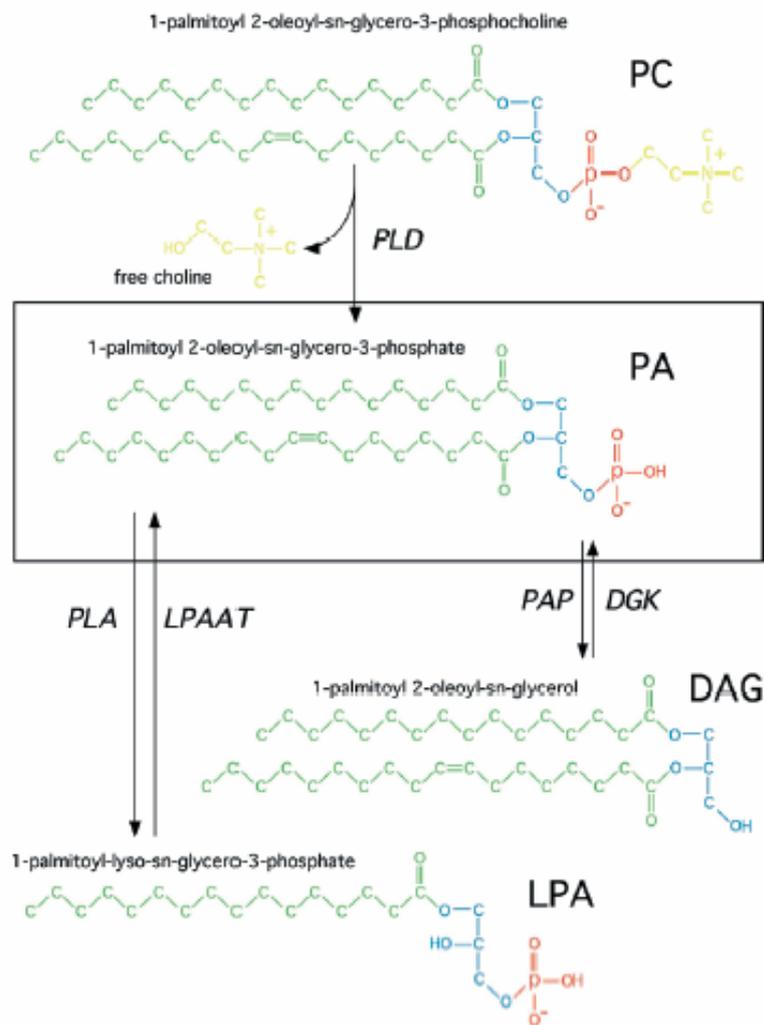


圖 1-9. PLD 水解 phosphatidylcholine 的過程 (摘錄自 Jenkins and Frohman et al., 2005)

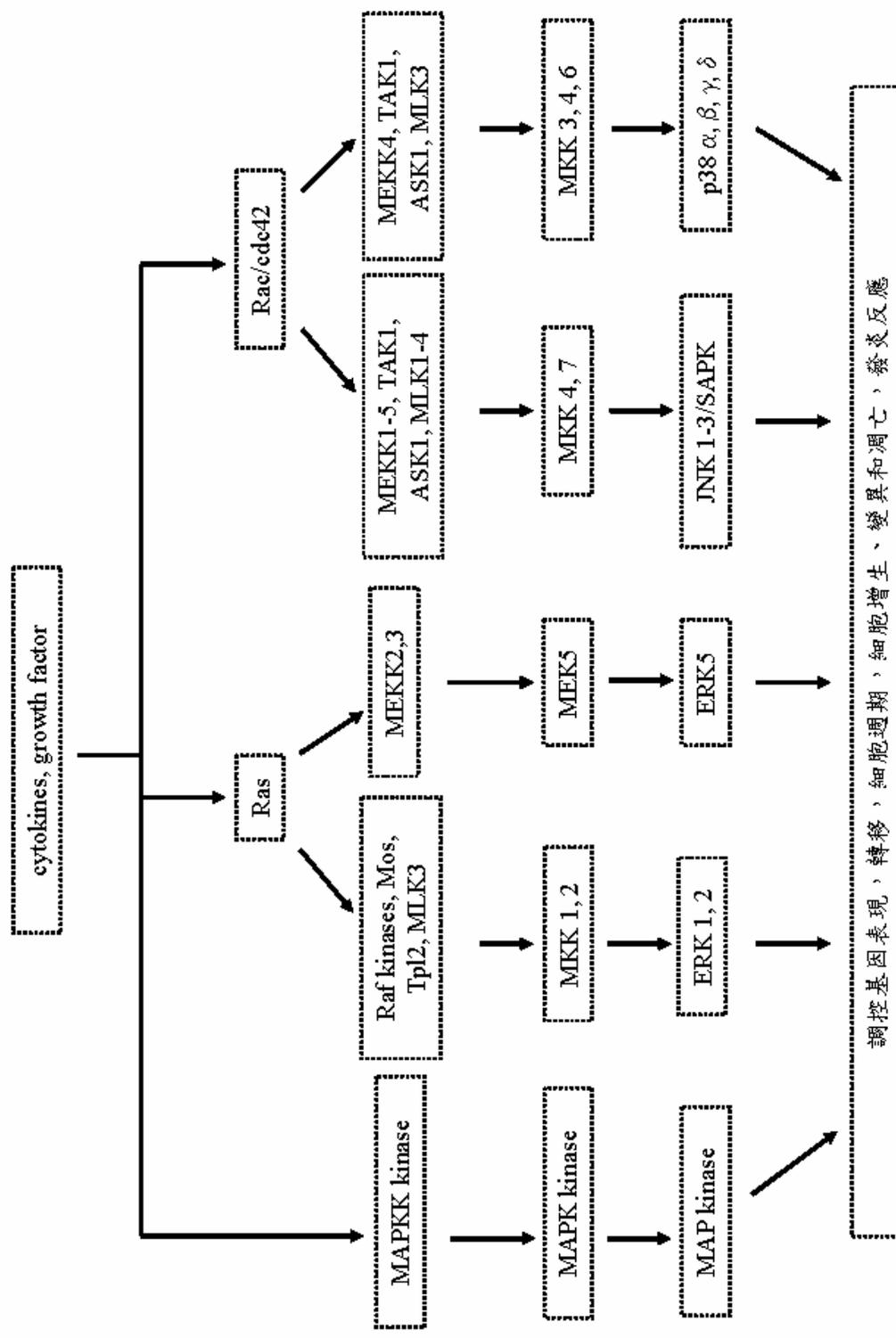


圖1-10. 活化 MAPK pathway 機制 (摘錄自Katsoulidis et al., 2003 並經修改)

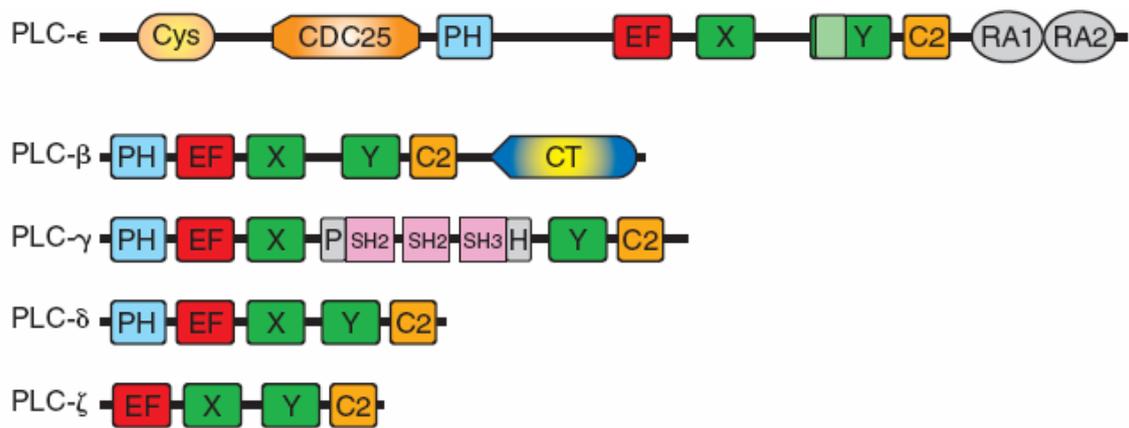


圖1-11. PLC 的結構 (摘錄自Michele et al., 2003)

第二章 FAL 抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球生成超氧自由 基的研究

一、實驗背景與目的

當病菌入侵到體內，嗜中性白血球會受到活化引起呼吸爆發作用，產生大量的超氧自由基及有毒活性氧物質來毒殺病菌。然而，過量的超氧自由基，又會造成周邊組織的傷害，引起發炎現象。臨床上許多疾病與過量的超氧自由基產生有關，如類風濕性關節炎、肺氣腫、腎絲球炎等 (Halliwell and Gutteridge, 1990)。藥物如能適當的控制嗜中性白血球細胞內的訊息傳遞過程，可有效殺死微生物也可避免因過量的超氧自由基所造成的疾病。目前臨床上所使用的抗發炎藥物可分為類固醇及非類固醇消炎藥物，對某些發炎疾病雖有不錯的效果，但仍不敷使用。所以研發新抗發炎化合物仍是必要的。本研究針對中國醫藥大學藥物化學研究所新合成的 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 類化合物 FAL，探討其抑制 fMLP 刺激大鼠嗜中性白血球生成超氧自由基的相關細胞內訊息傳遞機制。

二、實驗材料及方法

(一) 分離嗜中性白血球

以腹腔注射 pentobarbital (60 mg/kg) 麻醉大鼠 (Sprague Dawley, 300-350 g)。由鼠腹腔大動脈抽取全血，與針筒中的 100 mM EDTA 溶液 (作為抗凝劑) 均勻混合，在倒入試管中與 dextran 充分混合後靜置。待紅血球沉降，取上清液離心 (500 *g*, 4°C) 10 分鐘。沉澱物轉移至含 Ficoll-Hypaque 的試管中離心 (400 *g*, 20°C) 20 分鐘 (Wang et al., 1994)。將沉澱物懸浮在 Hanks' balanced salt solution (HBSS) 含 10 mM HEPES (pH 7.3) 及 4 mM NaHCO₃ 中離心 (800 *g*, 4°C) 10 分鐘。將沉澱物先以低張 NaCl 溶液 (0.05% w/v) 打破殘餘的紅血球，再以等量高張 NaCl 溶液 (1.75% NaCl 含 0.25% (w/v) bovine serum albumin) 調回等張。可製備純度及存活率皆於 95% 以上的嗜中性白血球懸浮液。

(二) 測量藥物對細胞之毒性

使用三種方式來檢驗 FAL 對於嗜中性白血球的毒殺能力，以確保 FAL 對於抑制超氧自由基的生成不是藉由對細胞損傷或死亡所造成的。

(1) LDH release

嗜中性白血球懸浮液 (2×10^6 cells/ml) 於 37°C 下預熱 3 分鐘，加入 FAL，並以 dimethyl sulphoxide (DMSO) 或 10% Triton X-100 當對照組，反應 30 分鐘離心 (1000 *g*, 4°C) 5 分鐘，取上清液以 cytotoxicity detection kit 測量 450 nm 吸光值變化。

(2) Trypan blue exclusion

將上述與 FAL 或 DMSO 反應後的細胞懸浮液取部分稀釋，重從中取 10 μ l 至細胞計數盤上，於顯微鏡下觀察並計算細胞受損或死亡的比例。

(3) Calcein-AM assay

將 5 μ M calcein-AM 加到嗜中性白血球懸浮液 (1×10^6 cells/ml) 中，於 37°C 下預熱 15 分鐘，再用 HBSS buffer 沖洗兩次。加入 FAL，並以 DMSO 或 10% Triton X-100 當對照組反應 30 分鐘後，以 5 倍體積的 HBSS buffer 終止反應。以 HBSS buffer 沖洗兩次，沉澱物以 HBSS buffer 懸浮。將細胞懸浮液加至 microplate 中，讀取 485/538 nm 的螢光值 (Neri et al., 2001)。以 DMSO 作對照組，計算細胞受損的比例。

(三) 測量藥物對嗜中性白血球生成超氧自由基的作用

嗜中性白血球懸浮液 (2×10^6 cells/ml) 先與 cytochrome *c* (0.5 mg/ml)、cytochalasin B (CB) (5 μ g/ml) 及 CaCl₂ (1 mM) 於比色槽中混合，並置於 37°C 恆溫的雙光束分光光譜儀 (Hitachi, U-3210) 中預熱 3 分鐘。在加入 FAL 作用後，使用 1 μ M fMLP 刺激細胞 5 分鐘。而於對照組的比色槽中則另含 6.6 μ g/ml 的 SOD。讀取在 550 nm 波長吸光值的變化 (Wang et al., 2003)。

(四) 測量藥物對超氧自由基的直接清除作用

測量 dihydroxyfumaric acid (DHF) 自發性氧化反應。比色槽中含

0.891 mM DHF 及 0.274 mM nitroblue tetrazolium (NBT)，而對照組的比色槽中，另外含有 6.6 $\mu\text{g/ml}$ 的 SOD。在加入 FAL 作用後，讀取 560 nm 吸光值的變化 (Goldberg and Stern, 1977)。

(五) FAL 對 fMLP 刺激細胞產生超氧自由基之可逆性

嗜中性白血球懸浮液 (2×10^6 cells/ml) 先與 CB (5 $\mu\text{g/ml}$) 及 CaCl_2 (1 mM) 於比色槽中混合，並置於 37°C 恆溫的雙光束分光光譜儀中預熱 3 分鐘，加入 FAL 或 DMSO 反應 10 分鐘後，以 HBSS buffer 清洗兩次。然後以前面敘述的方法測量細胞生成超氧自由基。

(六) 測量細胞去顆粒化作用 (degranulation)

嗜中性白血球懸浮液 (1×10^6 cells/ml) 先與 CB (5 $\mu\text{g/ml}$) 及 CaCl_2 (1 mM) 混合，置於 37°C 溫浴 3 分鐘。在加入 FAL 作用後，以 1 μM fMLP 刺激細胞 10 分鐘。而對照組中則含有 DMSO 或 10% Triton X-100。離心後取上清液分別測量 β -glucuronidase 和 lysozyme 的含量。在上清液中加入 0.1 M acetate buffer (pH 4.5) 和 0.75 mM phenolphalin- β -glucuranide，在 37°C 反應兩小時後加入 50 mM Na_2CO_3 終止反應，使用 ELISA reader 讀取於 550 nm 吸光值的變化來作為 β -glucuronidase 釋出的指標。另外在上清液中加入 0.06 M phosphate butter (pH 6.2) 和 0.02% *Micrococcus lysodeikticus* 懸浮液在 37°C 水浴槽反應大約 30 分鐘，讀取 450 nm 吸光值的變化。

(七) 細胞內鈣離子的測量

嗜中性白血球 (5×10^6 cells/ml) 與 $5 \mu\text{M}$ fluo 3-AM 在 37°C 下反應 45 分鐘後，洗去細胞外的 fluo 3-AM。將細胞重新懸浮於 HBSS 中，於 1 mM Ca^{2+} 存在或不存在下，在 37°C 預熱 3 分鐘。利用螢光分光光譜儀 (PTI, Deltascan 4000) 測量 488/535 nm 螢光強度變化，並換算成 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Merritt et al., 1990)。 $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times [(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)]$ ，其中 K_d 為 400 nm ， F_{\max} 及 F_{\min} 分別為結束反應後加入 0.33% Triton X-100 後加入 50 mM EGTA 產生的螢光強度。

(八) 測量細胞中蛋白質酪氨酸、ERK、p38 MAPK、MAPKAPK2、Akt 及 GSK3 β 的磷酸化程度

在反應後的嗜中性白血球 (1×10^7 cells/ml) 懸浮液中加入相同體積反應終止試劑 (20% trichloroacetic acid、 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 pepstatin 及 leupeptin、 2 mM *N*-ethylmaleimide、 100 mM NaF、 1 mM sodium vanadate、 1 mM *p*-nitrophenylphosphate 和 1 mM PMSF) 混合並離心，以 HBSS buffer (pH 7.4) 含 2 mM PMSF 清洗兩次。沉澱物溶於 Laemmli sample buffer 中，並煮沸 5 分鐘。離心取上清液，並以 Lowery method 測量蛋白質的含量。蛋白質以 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 展開後，轉移至 polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜上。以含 5% (w/v) 脫脂奶粉的 TBST Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、 150 mM NaCl 和 0.1% Tween 20) 充填後，用

anti-phosphotyrosine、anti-phospho-p38 MAP kinase、anti-phospho-MAPK
APK2、anti-phospho-p42/44 MAP kinase、anti-phospho-GSK3 β 、
anti-phospho-Akt(Ser⁴⁷³) 或 anti-phospho-Akt(Thr³⁰⁸) 抗體反應來辨識。辨
識後的 PVDF 膜，利用 stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、100
mM β -mercaptoethanol 和 2% SDS) 在 50°C 清洗 20 分鐘後，再次以含
5% (w/v) 脫脂奶粉的 TBST Buffer 充填膜後。並以 Anti-pan-ERK、
anti-p38 MAPK、anti-Akt 或 anti- β actin 抗體辨識作為 loading control
(Chang and Wang, 1999, 2000)。測量結果以 Luminescent Image Analyzer
(Fujifilm LAS-3000) MultiGauge software 分析，並計算磷酸化程度與
loading control 的比值。

(九) 測量細胞中 PKC、ARF 及 RhoA 膜轉位作用

反應後的嗜中性白血球 (1×10^7 cells/ml) 懸浮液，在加入五倍體積冷
的 HBSS 終止反應後離心 (1000 g, 4°C) 5 分鐘。將細胞懸浮於 300 μ l
溶解溶液 (0.34 M sucrose、10 mM Tris-HCl (pH 7.0)、10 μ g/ml 的 leupeptin
和 antipain、1 mM PMSF、1 mM *p*-nitrophenylphosphate、10 mM
benzaleimide 和 1 mM EGTA)。於冰浴中，以超音波震碎細胞後離心 (800
g, 4°C) 10 分鐘。取上清液進行超高速離心 (50,000 g, 4°C) 30 分鐘。
取沉澱物為細胞膜分割。蛋白質經定量後，以 SDS-PAGE 展開，並轉移
至 PVDF 膜上。以含 5% 脫脂奶粉的 TBST buffer (10 mM Tris-HCl (pH
7.5)、150 mM NaCl 和 0.1% Tween 20) 充填後，用 anti-PKC、anti-RhoA 及
anti-ARF 抗體反應來辨識 (Tsao and Wang, 1997; Wang et al., 2002)。同時

利用 β -actin 抗體辨識作為 loading control。

在無細胞系統 (cell-free system) 的實驗，先將嗜中性白血球 (3×10^7 cells/ml) 懸浮於 buffer B (含 25 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM KCl、3 mM NaCl、5 mM $MgCl_2$ 、1 mM Mg-ATP、1 mM EGTA、5 mM dithiothreitol、1 mM Na_3VO_4 、0.5 mM PMSF 和 10 μ g/ml leupeptin)。在冰浴中以超音波震碎細胞離心 (800 g, 4°C) 10 分鐘。取上清液進行藥物反應，在加入 5 倍體積冷的 buffer B 終止反應後，以超高速離心 (100,000 g, 4°C) 30 分鐘，而沉澱物為細胞膜分割。RhoA 和 Arf 以 15% 的 SDS-PAGE 展開後，轉移至 PVDF 膜上。利用 anti-RhoA 及 anti-ARF 抗體反應來辨識。同時利用 β -actin 抗體辨識作為 loading control。

(十) 測量細胞中 PLD 的活性

嗜中性白血球 (4×10^7 cells/ml) 懸浮液與 10 μ Ci 1-*O*-[3 H]octadecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine 在 37°C 下反應 75 分鐘。清洗後將細胞重新懸浮於 HBSS 中。在 1 mM $CaCl_2$ 以及 0.5% ethanol 存在下，與 FAL 在 37°C 反應 10 分鐘。然後在 CB 存在下加入 fMLP 刺激。反應完成後，加入 $CHCl_3/CH_3OH$ 混合液抽取脂質。經濃縮乾燥後，以少量的 $CHCl_3$ 溶解，以 silica gel 60 分離 (Wang et al., 1997)。TLC 板置於含有 hexane : diethyl ether : methanol : acetic acid (90:20:3:2) 的展開液中展開到一半，待乾燥後再以 ethylacetate : isooctant : acetic acid : water (110:50:20:100; v/v) 混合液的上層液作為展開液。使用 PhosphorImage (Molecular Dynamics 445 SI) 觀察含有放射線活性的

[³H]phosphatidylethanol (Wang et al., 2002) 在 TLC 板上位置，並刮下以 liquid scintillation counter (Packard, Tri-carb 2900TR) 偵測放射線強度。

(十一) RNA 的分離

嗜中性白血球 (5×10^7 cells/ml) 或組織加入 4 ml 的 solution A buffer (4 M guanidium thiocyanate、0.5% *N*-lauroylsarcosine、25 mM sodium citrate 2H₂O (pH 7.0) 和 0.1 M β -mercaptoethanol) 進行均質化並離心 (4 °C, 10000 g) 10 分鐘。取上清液加入 0.1 ml 2 M sodium acetate (pH 5.2)、1 ml phenol 和 0.2 ml chloroform/isoamylalcohol 混合 15 秒後置冰上 20 分鐘。離心 (4°C, 10000 g) 20 分鐘後，取上清液至另一離心管。再加入 2 ml phenol 和 2 ml chloroform/isoamylalcohol 混合 15 秒，並置冰上 20 分鐘。離心 (4°C, 10000 g) 20 分鐘後，取上清液至另一離心管，加入等體積 isopropanol，置 -20°C 20 分鐘後，離心 (4°C, 10000 g) 10 分鐘去上清液，加入 2 ml 75% 酒精洗二次，風乾後加入溶於 0.1% DEPC 水並且存在 -70°C 備用。

(十二) Polymerase chain reaction

利用上述所得的 RNA 合成 cDNA。在反應液中加入 5 μ g total RNA, 再用滅菌水調整體積至 10 μ l, 放入 70°C 溫浴 3 分鐘，再加入 0.5 μ g Oligo(dT)₁₅、0.5 mM dNTP、1 \times Reaction Buffer、0.01 M DTT、2 U/ μ l RNA sin 和 10 U/ μ l SUPERSRIPT II (RT)，再放入 42°C 溫浴 60

分鐘，再轉至加熱 70°C 下 15 分鐘。而 PCR 的最終反應體積為 25 μ l，包含 1 μ l cDNA、5 U/ μ l Ex Taq DNA polymerase、0.25 mM dNTP 和 0.5 μ l 特定的 primer，而所設定的 primer 和溫度設定如下：

PI3K primer pairs

α	GCCAGATTTTCATGGATGCTT (s) CCTTGGTTTTTGCCAGATGTT (as)	261 bp
β	CAGGAAAGCAGGAAAAGTGC (s) CGAAGACCAGCTGTGCAATA (as)	109 bp
γ	ATGACGTCAGTTCCTCAAGTT (s) CGCAGATCATCACCATGTTT (as)	247 bp
δ	GCACTCTATGCTGTCGTGGA (s) CGTACTGTACCCGCAGGATT (as)	203 bp

PCR 之反應條件

p110 α 94°C 45 秒→60°C 30 秒→72°C 1 分鐘，共 28 cycle

p110 β 94°C 45 秒→58°C 30 秒→72°C 1 分鐘，共 28 cycle

p110 γ 94°C 45 秒→54°C 30 秒→72°C 1 分鐘，共 28 cycle

p110 δ 94°C 45 秒→60°C 30 秒→72°C 1 分鐘，共 28 cycle

PCR 產物以 2% agarose gel 展開

PLC primer pairs

β 1	AAGCCCGTGTGCGTGTCCGA (s) TCCTCTTGAGGGATGGAATC (as)	578 bp
β 2	GCCCACCAAGTTTATCTCCTTCGAG (s) GCCACCTTGTCTGTGGTGACTTTGG (as)	1521 bp
β 3	ATCGAGACCTGAGGGAACTG (s) CTGAAGCTCCCTTCTTCTCCC (as)	377 bp
β 4a	AAGATTCAGACCCTGACATCGG (s) CATCTCCTTCGCCTGCTCATTC (as)	483 bp
γ 1	CTACTCCAAGAAGTCGCAGC (s) TAGTTGACCTGTGACAGGCAT (as)	444 bp
γ 2	AGTACATGCAGATGAACCATGC (s) ATCTAAATCCTGATTTGATGCC (as)	435 bp
δ 1	TCATCCTGTCCCTGGAGAAC (s) TCAGACACGTCAGTGGCTTC (as)	229 bp
δ 4	CCACTAATCAGGACCTGCTGC (s) CTTCTCTGAAACTCATCCGGC (as)	447 bp

PLC 反應條件均為 94°C 45 秒→58°C 30 秒→72°C 1 分鐘，共 28 cycle。PCR 產物以 2% agarose gel 展開。將膠染上 ethidium bromide，再用 UV 燈進行偵測，最後再利用 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 和 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 進行定序。

(十三) 實驗材料

Dextran T-500 購自 Pharmacia Biotech (Uppsala., Sweden)。HBSS 購自 Gibco Life Technologies (Grand Island, NY., USA)。Diphenylene iodonium 購自 Research Biochemicals International (Natick, MA., USA)。U0126 購自 Promega (Madison, WI., USA)。Fluo-3-AM、SB203580 和 LY294002 購自 Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA., USA)。Enhanced chemiluminescence reagent 購自 Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK)。Polyvinylidene difluoride membrane 購自 Millipore (Bedford, MA., USA)。Cytotoxicity detection kit 購自 Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)。Anti-p38 MAPK antibody、anti-Akt antibody、anti-PKC β I antibody、anti-PKC β II antibody、anti-PKC ζ antibody、anti-ARF antibody、anti-RhoA antibody 和 β -actin antibody 購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA., USA)。Anti-phospho-ERK antibody、anti-phospho-Akt(Ser⁴⁷³) antibody、anti-phospho-Akt(Thr⁴⁷³) antibody 及 anti-phospho-p38 MAPK antibody 購自 New England Biolabs (Beverly, MA., USA)。Anti-pan-ERK antibody、anti-PKC α antibody、anti-PKC δ antibody 和 anti-phosphotyrosine antibody 購自 BD Transduction (Lexington, KY., USA)。其餘化合物購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO., USA)。藥物皆溶於 DMSO，不超過反應溶液體積的 0.5 % (v/v)。DMSO 購自 Merck (Taiwan, ROC)。

(十四) 統計分析

實驗數據以 means \pm S.D. 表示。統計以 Student's *t*-test 來比兩組間的差異，多組間的比較則先以 ANOVA 分析，再經 Bonferroni *t*-test 比較差異。分析結果以 *P* 值小於 0.05 視為有統計上的差異。分析 regression line 來定藥物抑制作用的 IC₅₀ 值。

三、結果

(一) FAL 對超氧自由基生成之影響

利用 SOD 可抑制的 ferricytochrome *c* 還原方法測定大鼠嗜中性白血球生成超氧自由基的量。以 fMLP 刺激細胞懸浮液，可引起快速且短暫的超氧自由基生成。當細胞懸浮液先與 DMSO 反應不同的時間 (0、1、3、5、10、15、20 分鐘) 後，加入 1 μ M fMLP 活化細胞，發現 DMSO 不會顯著影響超氧自由基的生成。但當細胞懸浮液與 30 μ M FAL 反應不同的時間後，則發現 FAL 時間依存性 (time-dependent) 的抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球生成超氧自由基 (圖 2-1)。細胞與 FAL 反應 3 分鐘之後即有超過 50% 的抑制效果 ($P < 0.01$)，而反應 10 與 15 分鐘間已接近最大的抑制百分比。因此選擇 10 分鐘當作之後反應的時間。

當細胞懸浮液與不同濃度的 FAL (3、10、30、50 μ M) 反應 10 分鐘後，加入 1 μ M fMLP 活化細胞，發現 FAL 以濃度依存性

(concentration-dependent) 的方式抑制嗜中性白血球產生超氧自由基 (圖 2-2)。FAL 於 10 μM 時，與 DMSO 組比較，即有顯著的抑制效果 ($46.6 \pm 8.9\%$ 抑制, $P < 0.05$)。當濃度增加至 50 μM 可達到 $75.4 \pm 3.5\%$ 的抑制效果 (IC_{50} 值為 $13.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$)。另外，不同濃度的 FAL 與細胞懸浮液反應 10 分鐘後，加入 3 nM PMA 活化細胞，發現 FAL 不會抑制 PMA 刺激嗜中性白血球產生超氧自由基 (50 μM 才達到 $13.9 \pm 3.2\%$ 的抑制, $P > 0.05$) (圖 2-3)。而抑制 NADPH oxidase 的 diphenyleneiodonium chloride (DPI) 1 μM 可產生 $83.0 \pm 8.0\%$ 抑制效果 ($P < 0.01$)。

當細胞懸浮液與 50 μM FAL 反應 10 分鐘後，加入 1 μM fMLP 刺激嗜中性白血球，可抑制 $69.2 \pm 0.9\%$ 超氧自由基的產生。而以 50 μM FAL 處理 10 分鐘後，先利用 HBSS buffer 清洗兩次，再加入 1 μM fMLP 刺激細胞則有 $56.2 \pm 3.2\%$ 的抑制。上述兩者互相比較，發現並沒有統計學上的意義。因此 FAL 抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球產生超氧自由基的作用不具可逆性 (圖 2-4)。

(二) FAL 對嗜中性白血球的毒性測試

利用細胞釋出 LDH、trypan blue exclusion 和 calcein 發出的螢光值三種方法來檢驗 FAL 對細胞的毒性。發現細胞與 30 或 50 μM FAL 反應 30 分鐘後，以三種檢測方法的測量值與 DMSO 反應的數值比較 FAL 對細胞的毒性增加範圍均 $< 3\%$ (表 3-1)。

(三) FAL 對 DHF 自體氧化反應的測試

於 DHF 自體氧化產生超氧自由基反應的實驗，主要是測量 FAL 是否會直接清除超氧自由基。加入 30 或 50 μM FAL 和對照組比較，發現均不會抑制 DHF 自體氧化產生超氧自由基的現象 (表 3-2)。

(四) FAL 對嗜中性白血球去顆粒化的影響

嗜中性白血球懸浮液經 DMSO 或 3、10、30、50 μM FAL 反應 10 分鐘後，加入 1 μM fMLP 刺激細胞。測量細胞釋放出來的 β -Glucuronidase 和 lysozyme。發現 FAL 以濃度依存性的方式抑制細胞釋放出來的 β -Glucuronidase。在 3 μM FAL 時與對照組比較下即有明顯的抑制效果 ($13.6 \pm 7.8\%$ 抑制, $P < 0.01$), 其 IC_{50} 值為 $32.8 \pm 7.6 \mu\text{M}$ (圖 2-5)。測量細胞釋放出來的 lysozyme，發現 FAL 的抑制效果不如 β -Glucuronidase 好。FAL 在測試的最高濃度 (50 μM) 只抑制了 $34.2 \pm 5.6\%$ (圖 2-6)。

(四) FAL 影響 fMLP 刺激 ERK、MAPKAPK2 及 p38 MAPK 磷酸化的作用

嗜中性白血球懸浮液經 fMLP 刺激，細胞蛋白質以 SDS-PAGE 展開。利用 anti-phospho-ERK 抗體辨識，發現有 ERK 磷酸化作用增加。嗜中性白血球懸浮液與 3、10、30、50 μM FAL 反應 10 分鐘後，發現

FAL 在高濃度 (50 μ M) 時有微弱的抑制 ERK 的磷酸化作用，但在較低濃度時並不會影響 ERK 的磷酸化作用。使用 ERK 抑制劑 1 μ M U0126 (Favata et al., 1998) 可幾乎完全抑制 ERK 的磷酸化作用 (圖 2-7)。

fMLP 刺激後的嗜中性白血球，細胞蛋白質以 SDS-PAGE 展開。利用 anti-phospho-p38 MAPK 或 anti-phospho-MAPKAPK2 抗體辨識，發現有明顯 p38 MAPK 及 MAPKAPK2 磷酸化作用的增加。細胞懸浮液先與 3、10、30 或 50 μ M FAL 反應 10 分鐘後，FAL 在 10 μ M 時可見抑制 fMLP 刺激引起的 MAPKAPK2 磷酸化，在 30 μ M 會抑制 p38 MAPK 的磷酸化作用。FAL 在 50 μ M 時有 $51 \pm 17.5\%$ 的抑制 p38 MAPK 磷酸化和 $59.3 \pm 12.2\%$ 的抑制 MAPKAPK2 的磷酸化作用。而使用 p38 MAPK 抑制劑 SB203580 (30 μ M) (Cuenda et al., 1995) 與細胞懸浮液反應，也可見 $57.8 \pm 10.2\%$ 的抑制 p38 MAPK 磷酸化，幾乎完全抑制 MAPKAPK2 的磷酸化作用 (圖 2-8)。

(五) 大鼠嗜中性白血球 PI3K isoforms 的表現

以 RT-PCR 的實驗方法，使用專一的 primer pairs 來測量嗜中性白血球細胞中 class IA、IB PI3K isoforms 的 catalytic subunit mRNA 表現。PCR 產物以 2% agarose gel 展開後，發現有出現與預期 base pair 數大小相同且單一 band 屬於 IA 的 p110 α 、p110 β 及 p110 δ 和屬於 IB 的 p110 γ 存在 (圖 2-9)。經與 GenBank database 的資料作序列比對，其相似程度分別為 99%、100%、100% 和 99%。

(六) FAL 對 fMLP 刺激 Akt 與 GSK3 β 磷酸化的影響

嗜中性白血球懸浮液經 fMLP 刺激後，細胞蛋白質以 SDS-PAGE 展開，利用 anti-phospho-Akt(Ser⁴⁷³) 或 anti-phospho-Akt(Thr³⁰⁸) 抗體抗體辨識，發現有 Akt(Ser⁴⁷³) 和 Akt(Thr³⁰⁸) 磷酸化的增加。細胞懸浮液與 3、10、30 或 50 μ M FAL 反應 10 分鐘後，並不會影響 fMLP 引起的 Akt(Ser⁴⁷³) 和 Akt(Thr³⁰⁸) 磷酸化。而使用 PI3K 抑制劑 30 μ M LY294002 (Vlahos et al., 1994) 則幾乎完全抑制了 Akt(Ser⁴⁷³) 和 Akt(Thr³⁰⁸) 的磷酸化作用 (圖 2-10)。

同樣的，對於 fMLP 刺激細胞引起的 GSK3 β 磷酸化。FAL (3-50 μ M) 也不會影響 GSK3 β 的磷酸化作用。而 LY294002 對 GSK3 β 的磷酸化產生 $32.1 \pm 9.1\%$ 抑制作用 (圖 2-10)。

(七) FAL 影響 fMLP 刺激蛋白質酪氨酸磷酸化作用

fMLP 刺激後的嗜中性白血球，細胞蛋白質以 SDS-PAGE 展開，利用 anti-phosphotyrosine 抗體辨識，可見到蛋白質磷酸化的增加。細胞懸浮液與 3、10、30 或 50 μ M FAL 反應 10 分鐘後，顯示 FAL 只有在使用 50 μ M 時可產生明顯的抑制效果 (抑制 $51.3 \pm 29.8\%$)。使用 tyrosine kinases 抑制劑 genistein (100 μ M) (Coyne and Morrison et al., 1990)，可以有 $75 \pm 26.6\%$ 的抑制蛋白質磷酸化作用 (圖 2-11)。

(八) FAL 對 fMLP 刺激 PLD 活性的影響

1-*O*-[³H]octadecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine 標示的嗜中性白血球，在 1 mM CaCl₂ 以及 0.5% ethanol 存在下，與 100 μM genistein 或 3、10、30 或 50 μM FAL 反應。經 fMLP 刺激後，將抽取脂質經 TLC 展開，偵測 [³H]phosphatidylethanol 產物的含量變化作為 PLD 活性的指標。可發現 FAL 以濃度依存性的方式抑制 fMLP 引起的 phosphatidylethanol 生成。FAL 在 10 μM 已顯示統計學上顯著的抑制效果 (41.2 ± 21.4 % 抑制，*P* < 0.01)。當濃度增加至 30 或 50 μM 則可分別達到 69.4 ± 14.9 % 和 75.7 ± 15.6 % 的抑制效果，其 IC₅₀ 值為 16.0 ± 8.6 μM (圖 2-12)。

(九) 大鼠嗜中性白血球 PLC isoforms 的表現

以 RT-PCR 的實驗方法，使用專一的 primer pairs 來測量嗜中性白血球細胞中 PLC isoforms 的 mRNA 表現。PCR 產物以 2% agarose gel 展開後，發現有出現與預期 base pair 數大小相同的 PLCβ1-4、PLCγ1-2 及 PLCδ1 的存在 (圖 2-13)，除 PLCβ3 有兩條 bands (下方的 band 為 PLCβ3) 外其餘均為單一 band。經與 GenBank database 的資料作序列比對，其相似程度分別為 100%、100%、99%、100%、99%、99% 和 98%。PLCδ4 似乎不存在於嗜中性白血球細胞，但可見於鼠腦組織中。

(十) FAL 影響 fMLP 刺激細胞內鈣離子增加的作用

在含 fluo-3 的嗜中性白血球懸浮液中，在細胞外鈣離子存在的情況下，fMLP 刺激細胞可引起細胞內游離鈣離子明顯的增加。加入 30 μM 的 FAL 反應 10 分鐘後，對 fMLP 刺激細胞引起的初期快速且短暫的鈣離子增加現象沒有明顯抑制作用，但對其後細胞內鈣離子的持續增加產生輕微的抑制效果。在細胞外鈣離子不存在的情況下，FAL (30 μM) 並不會抑制 fMLP 引起的快速且短暫的鈣離子增加作用 (圖 2-14)。

(十一) FAL 影響 fMLP 刺激 PKC 的膜轉位作用

fMLP 會促使嗜中性白血球細胞 PKC α 、 βI 、 βII 、 ζ 及 δ 產生膜轉位作用。細胞經與 FAL (50 μM) 反應後，並不明顯影響 fMLP 引起 PKC α 和 PKC βII (分別為 27% 和 38% 的抑制) 的膜轉位作用，PKC βI 的膜轉位 FAL 在 30 μM 時即有顯著的抑制，在 50 μM 時有 $51.4 \pm 13.1\%$ 的抑制效果 (圖 2-15)。fMLP 刺激嗜中性白血球可見 PKC ζ 和 PKC δ 的膜轉位。FAL 不抑制 fMLP 引起的 PKC ζ 膜轉位，但濃度提高到 50 μM 可抑制 PKC δ 的膜轉位 (32% 的抑制) (圖 2-16)。

(十二) FAL 影響 fMLP 刺激 ARF 及 RhoA 的膜轉位作用

fMLP 刺激嗜中性白血球可引起 ARF 及 RhoA 的膜轉位增加。細胞與 FAL 反應後，可見以濃度依存性的方式抑制 fMLP 引起的 ARF 及

RhoA 膜轉位作用。使用 10 μM FAL 對 RhoA 的膜轉位已有明顯的抑制效果 ($52.5 \pm 17.8 \%$, $P < 0.01$)，當 FAL 濃度提高至 50 μM 時，抑制效果更可達 $80.4 \pm 28.3 \%$ ($P < 0.01$)。而 FAL 的濃度在 30 μM 時對 ARF 的膜轉位產生抑制效果 ($52.1 \pm 20.9 \%$, $P < 0.01$)，而在 50 μM 時可產生 $65.1 \pm 19.8 \%$ ($P < 0.01$) 的抑制效果 (圖 2-17)。FAL 抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球中 RhoA 的膜轉位作用的 IC_{50} 值為 $18.7 \pm 7.9 \mu\text{M}$ 。對 ARF 的 IC_{50} 值為 $25.9 \pm 13.1 \mu\text{M}$ 。

(十三) 於 cell-free 系統下，FAL 影響 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 刺激的 RhoA 與 ARF 膜轉位作用

經震碎的嗜中性白血球懸浮液，去除未破裂的細胞與細胞核後。經 10 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 刺激後，可見 ARF 及 RhoA 的膜轉位。而細胞分解液與 3-50 μM FAL 反應後，都不影響 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 引起的 ARF 和 RhoA 的膜轉位作用 (圖 2-18)。

四、討論

經由實驗結果發現 FAL 抑制 fMLP 而非 PMA 刺激嗜中性白血球產生超氧自由基的作用，顯示 FAL 的作用位置應該不在 final common pathway 如 NADPH oxidase，而且在 fMLP 可活化的訊息途徑。因 FAL 抑制 fMLP 刺激細胞產生超氧自由基的作用是不可逆性，可能是 FAL 和作用位置的結合能力比較強，不易脫離。細胞毒性測驗也顯示 FAL 抑

制超氧自由基的產生並非來自於細胞毒性造成的。由於 FAL 並不影響 DHF 自體氧化產生超氧自由基的作用，所以 FAL 不是超氧自由基清除劑。此結果也符合前述的推論，FAL 是影響嗜中性白血球細胞內的訊息傳遞路徑。

已知 fMLP 刺激大鼠嗜中性白血球，能快速引起 ERK 和 p38 MAPK 磷酸化 (Chang and Wang, 1999, 2000)。活化的 ERK 和 p38 MAPK 參與 p47^{phox} 及 p67^{phox} 的磷酸化 (Dang et al., 2003; El Benna et al., 1996)，造成 NADPH oxidase 活化及生成超氧自由基。因為 FAL 並不明顯抑制 ERK 磷酸化作用，而對於 p38 MAPK 的磷酸化作用 FAL 要在較高濃度 (50 μ M) 才有約 50% 的抑制，因此，FAL (30 μ M) 可能不是經由此訊息途徑來抑制超氧自由基的生成。

活化細胞內 PI3K/Akt 訊息途徑是 fMLP 刺激嗜中性白血球產生超氧自由基的重要路徑 (Didichenko et al., 1996)。而由 RT-PCR 實驗中也證實出大鼠的嗜中性白血球中有 class I PI3K 的 p110 α 、 β 、 γ 及 δ 四種 catalytic subunits。已知 fMLP 作用到嗜中性白血球上的 FPR，會經 G $\beta\gamma$ 結合 PI3K 上的 p101 adaptor protein，接著活化 p110 γ (Stephens et al., 1997; Krugmann et al., 1999)。而產生的 PI(3,4,5)P₃ 會促使 PDK1 和 Akt 由細胞質轉移到細胞膜上。PDK1 會磷酸化 Akt 上的 Thr³⁰⁸ (Vanhaesebroek and Alessi, 2000)，而 PDK2 可以磷酸化 Akt 結構上的 Ser⁴⁷³ (Vanhaesebroek and Alessi, 2000)。當 Thr³⁰⁸ 和 Ser⁴⁷³ 同時被磷酸化，可完全活化 Akt。Akt 除了可磷酸化 p47^{phox}，導致 NADPH oxidase 的活化外 (Chen et al., 2003)，也會磷酸化下游的 GSK3 β 。可藉由測量 Akt 磷酸化的程度，評估藥物是否會經由 PI3K 的途徑活化 NADPH

oxidase。實驗結果發現 FAL 不會抑制 Akt 上 Thr³⁰⁸、Ser⁴⁷³ 及 GSK3 β 的磷酸化作用。因此 FAL 可能不是經由影響此訊息途徑來抑制超氧自由基的生成。

蛋白質上 tyrosine 的磷酸化對於調控 fMLP 刺激嗜中性白血球的呼吸爆發很重要 (Torres et al., 1993)。實驗結果顯示，FAL 要在較高濃度 (50 μ M) 才有約 50% 的抑制 fMLP 所誘發的蛋白質 tyrosine 磷酸化。因此 FAL 抑制 fMLP 活化嗜中性白血球生成超氧自由基的過程中，抑制蛋白質上 tyrosine 的磷酸化應該不是為主要的作用位置。

PLD 所生成的次級傳訊物質 PA 可活化 PA-activated kinase。PA-activated kinase 可磷酸化 p47^{phox}，導致 NADPH oxidase 的活化 (Babior, 1999; Waite et al., 1997)。顯示 PLD 的活化在 fMLP 刺激嗜中性白血球產生超氧自由基的過程中是重要的一環。活化的 PLD 會和細胞膜結合，水解 phosphatidylcholine 生成 PA。在 ethanol 存在下，經由 transphosphatidylation 的作用，生成 phosphatidylethanol 取代 PA (Morris et al., 1997)。此種測量 phosphatidylethanol 的生成實驗常用來表示 PLD 的活化。FAL 可以濃度依存性的關係抑制 PLD 活性。已知 PLD 的活化過程有 ARF、RhoA 的活化及 ARF、Rho 和 cPKC 轉移到細胞膜上，與 PLD 結合並活化 PLD (Fensome et al., 1998)。實驗結果顯示，FAL 抑制 ARF 轉移到細胞膜上的 IC₅₀ 值約為 25 μ M 而抑制 RhoA 膜轉移的 IC₅₀ 值為 18.7 \pm 7.9 μ M。顯示 FAL 主要是抑制 RhoA 轉移至細胞膜上，因而抑制 PLD 活化。在無細胞反應系統中，ARF 和 RhoA 在 GTP γ S 刺激下可以不用經由 GEF 的作用轉移到細胞膜上，進而活化 PLD (Mansfield et al., 2004; Kwak et al., 1995)。由實驗發現 FAL 不會抑

制 GTP γ S 在無細胞系統中引起的 RhoA 和 ARF 轉位到細胞膜上。顯示 FAL 不會直接抑制 RhoA 和 ARF 的活化。

經由 RT-PCR 實驗證實在大鼠的嗜中性白血球中有七種 PLC isoforms mRNA 的表現包括 PLC β 1-4、PLC γ 1-2 及 PLC δ 1。fMLP 刺激嗜中性白血球生成超氧自由基的過程中是屬於 Ca²⁺ 依存性，而經由 PLC 調節細胞內 Ca²⁺ 的濃度便相當重要 (Erickson et al., 1999)。PLC 被活化後生成 DAG 及 IP₃，使細胞內的鈣離子濃度提高以及活化 PKC (Andresen et al., 2002)。實驗結果顯示，FAL 的濃度提高到 30 μ M 也不會抑制細胞內鈣離子的釋放，對細胞外鈣離子的流入僅輕微的抑制。所以推測 PLC 可能並不參與 FAL 抑制超氧自由基生成的機制。

fMLP 刺激嗜中性白血球可以促進細胞內 PKC α 、PKC β I、PKC β II、PKC δ 及 PKC ζ 對 p47^{phox} 進行磷酸化，進而促進 p47^{phox} 轉移到膜上而活化 NADPH oxidase (Fontayne et al., 2002)。實驗發現除了 PKC β I、PKC β II 和 PKC δ 外，FAL 不抑制 fMLP 刺激細胞引起的 PKC α 和 PKC ζ 的膜轉位作用。FAL 要在 50 μ M 才能有 51.4 \pm 13.1 % 抑制 PKC β I 的膜轉位作用。由於 FAL 對 cPKC 膜轉位作用的影響不大，此作用在 FAL 抑制 PLD 活化的過程中可能扮演的角色有限。推測 fMLP 所刺激 PKC 的膜轉位作用可能並不參與 FAL 抑制超氧自由基生成的機制。

當嗜中性白血球受到活化後，會經由一連串的訊號傳遞進行去顆粒化作用。已知 PLD 參與去顆粒化作用 (Faurischou and Borregard, 2003)。發現 FAL 會抑制嗜中性白血球釋放出 β -glucuronidase 和 lysozyme。FAL 可抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球引起的去顆粒化作用，與已知 FAL 可抑

制 PLD 活性的結果相符。

綜合上述結果，FAL 可能主要經由抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球造成的 RhoA 膜轉位作用來抑制 PLD 的活化，進而抑制超氧自由基的生成和去顆粒化作用。而 p38 MAPK、蛋白質 tyrosine 磷酸化、PLC/Ca²⁺、ARF 和 PKC 等訊息途徑可能扮演的角色有限。

結論

在人體的免疫系統中嗜中性白血球扮演著重要的角色。當有病菌入侵到體內，嗜中性白血球會經由趨化作用到達感染位置。嗜中性白血球會活化 NADPH oxidase，引起呼吸爆發作用，產生大量的超氧自由基及其它代謝活性氧物質。這些活性氧物質可以經由氧化及破壞細菌的蛋白質、脂肪及核酸等結構來殺死病菌。因此生成適量的超氧自由基可以毒殺病菌，但是過量的超氧自由基也會造成組織的傷害，引起發炎現象。本研究針對新合成 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid 類化合物 FAL 研究其抑制 fMLP 刺激大鼠嗜中性白血球生成超氧自由基的細胞內訊息傳遞機制，以期望可以發現新的抗發炎藥物。

實驗結果發現，FAL 以時間和濃度依存性抑制 fMLP 刺激的嗜中性白血球生成超氧自由基，但不影響 PMA 刺激的嗜中性白血球生成超氧自由基的作用。FAL 也會抑制 fMLP 刺激的嗜中性白血球進行去顆粒化作用。FAL 不抑制細胞內 Akt 的磷酸化作用和細胞內鈣離子釋出。但在高濃度 FAL 存在下，則對於 p38 MAPK 和蛋白質 tyrosine 磷酸化及

ARF 和 PKC β I 的膜轉位作用有接近 50 % 的抑制，對於 ERK 的磷酸化和 PKC β II 與 PKC δ 的膜轉位作用則有較不明顯的抑制。綜合上述結果顯示 FAL 主要抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球引起的 RhoA 膜轉位作用，進而降低 PLD 的活性來抑制超氧自由基生成和去顆粒化的作用。然而 FAL 的詳細作用機制仍有可進一步探討的空間。



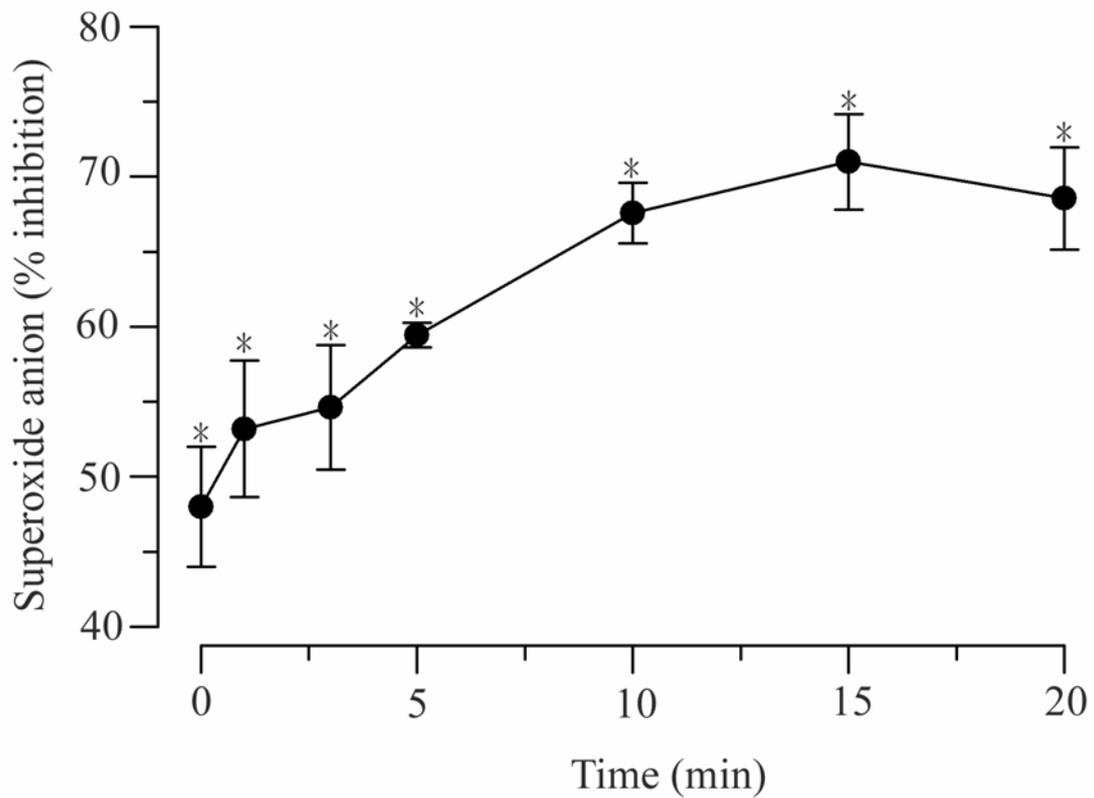


圖 2-1. FAL 時間依存性抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球產生超氧自由基。嗜中性白血球懸浮液與 5 $\mu\text{g/ml}$ 的 CB 及 1 mM CaCl_2 於 37°C 下預熱 3 分鐘後，與 DMSO (control) 或 30 μM FAL 作用 0-20 分鐘。在 ferricytochrome *c* 的存在下加入 1 μM fMLP 刺激 5 分鐘，讀取於 550 nm 吸光值的變化。數據以 mean \pm S.D. 表示。

* $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=3)。

計算方法： $(\text{control-FAL} / \text{control}) \times 100$

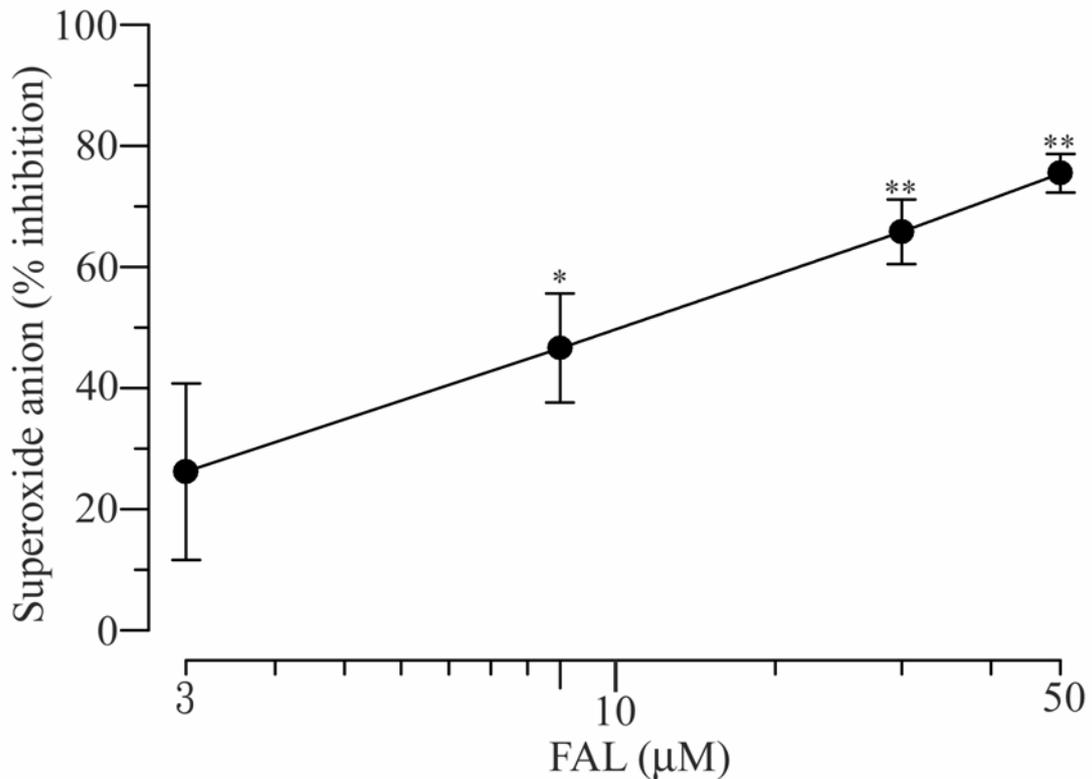


圖 2-2. FAL 濃度依存性抑制 fMLP 刺激嗜中性白血球產生超氧自由基。嗜中性白血球懸浮液與 5 µg/ml 的 CB 及 1 mM CaCl₂ 於 37°C 下預熱 3 分鐘後，與 DMSO (control) 或 3-50 µM FAL 作用 10 分鐘。在 ferricytochrome *c* 的存在下加入 1 µM fMLP 刺激 5 分鐘，讀取於 550 nm 吸光值的變化並與 control 值比較。數據以 means ± S.D. 表示。Control 值之超氧自由基生成量為 6.4 ± 2.4 nmol/5 min/2 × 10⁶ cells。* *P* < 0.05, ***P* < 0.01 與 control 值比較 (n=3)。

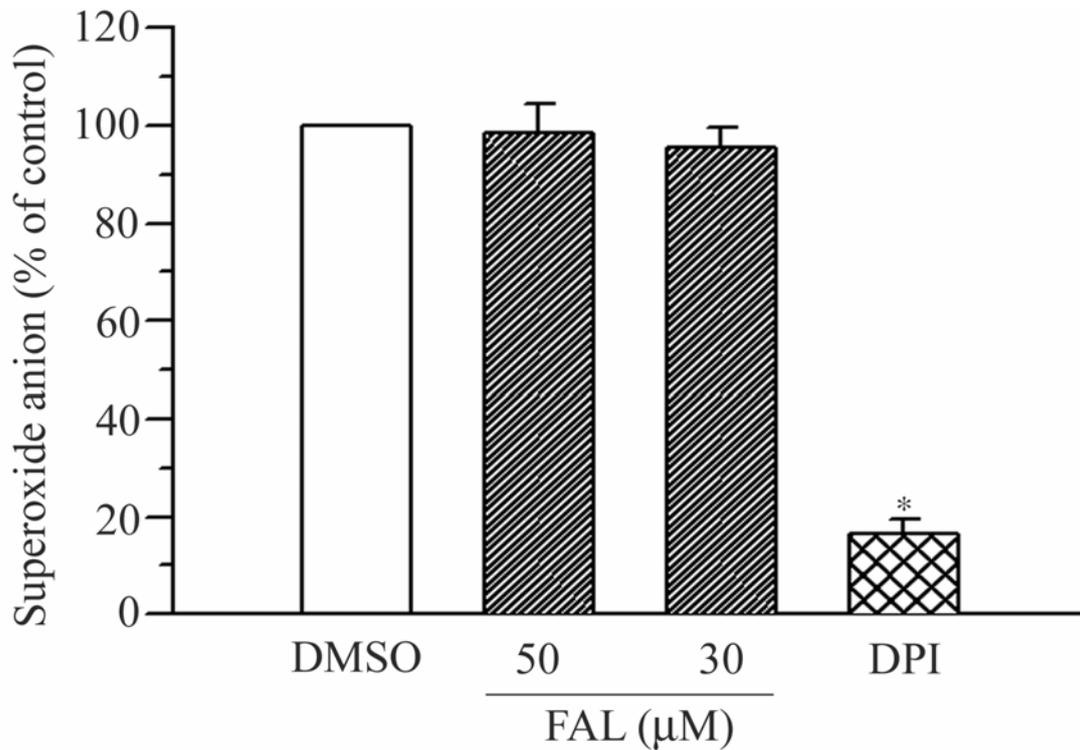


圖 2-3. FAL 對 PMA 刺激嗜中性白血球產生超氧自由基之影響

嗜中性白血球懸浮液於 37°C 下預熱 3 分鐘後，與 DMSO (control)、1 μM DPI、30 或 50 μM FAL 作用 10 分鐘。在 ferricytochrome *c* 的存在下加入 3 nM PMA 刺激 10 分鐘，讀取於 550 nm 吸光值的變化並與 control 值比較。Control 值之超氧自由基生成量為 $14.1 \pm 2.8 \text{ nmol}/5 \text{ min}/2 \times 10^6 \text{ cells}$ 。數據以 means \pm S.D. 表示。* $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=3)。

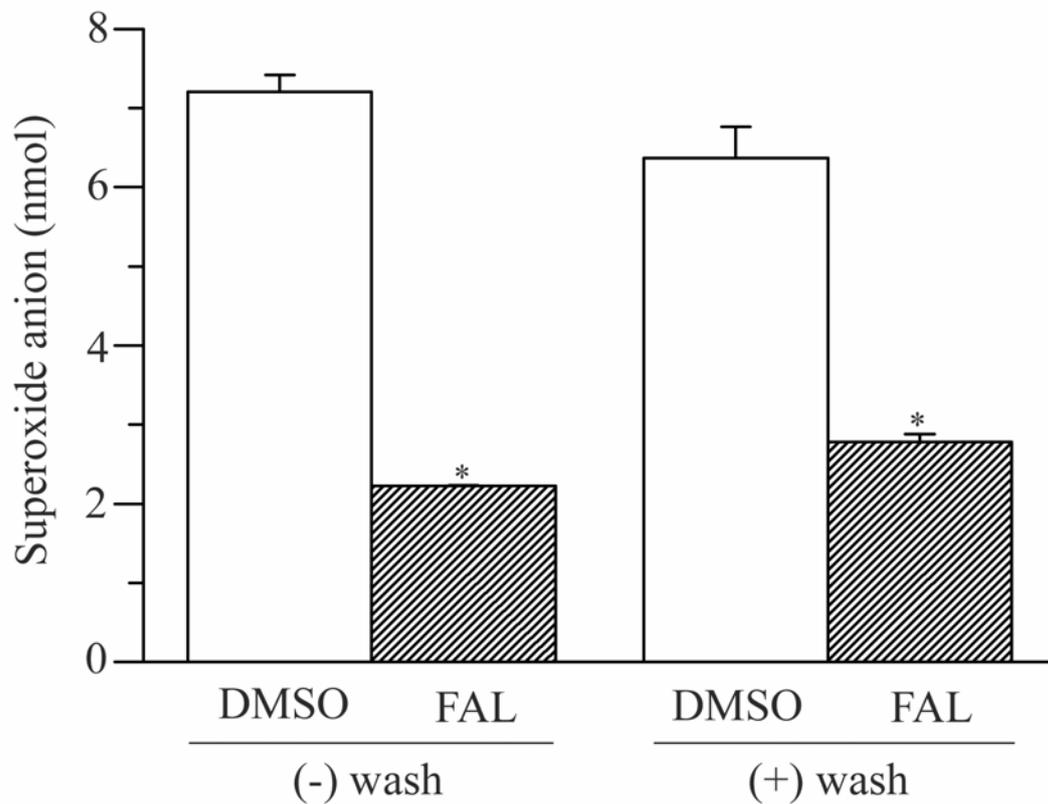


圖 2-4. FAL 對 fMLP 刺激細胞產生超氧自由基之不可逆性

嗜中性白血球懸浮液與 5 μg/ml 的 CB 及 1 mM CaCl₂ 於 37°C 下預熱 3 分鐘後，與 DMSO (control) 或 50 μM FAL 作用 10 分鐘。以 HBSS buffer 清洗兩次或不清洗處理後，在 ferricytochrome *c* 的存在下加入 1 μM fMLP 刺激 5 分鐘，讀取於 550 nm 吸光值的變化，數據以 means ± S.D. 表示。* $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=3)。

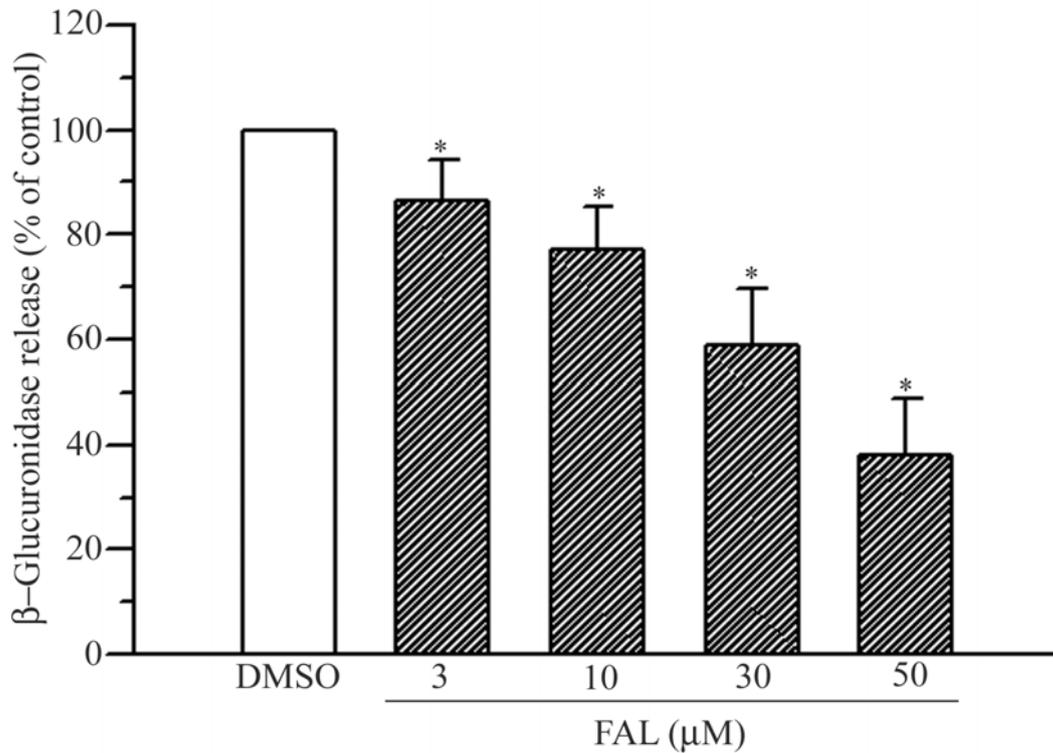


圖 2-5. FAL 對 fMLP 刺激細胞釋出 β -glucuronidase 的影響

嗜中性白血球懸浮液 (1×10^6 cells/ml) 先與 CB ($5 \mu\text{g/ml}$) 及 CaCl_2 (1 mM) 混合，置於 37°C 溫浴 3 分鐘，加入 DMSO (control) 或 FAL 作用 10 分鐘後，以 $1 \mu\text{M}$ fMLP 刺激細胞 10 分鐘。取上清液測量 β -glucuronidase。數據以 means \pm S.D. 表示。* $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=3~4)。

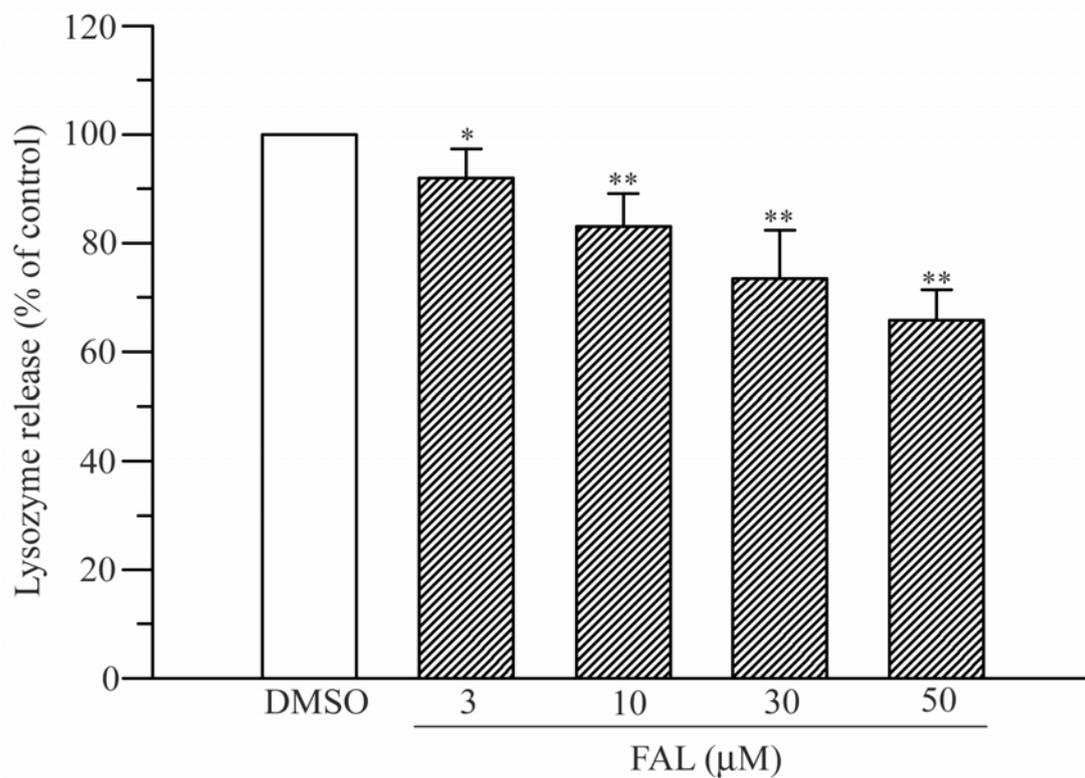


圖 2-6. FAL 對 fMLP 刺激細胞釋出 lysozyme 的影響

嗜中性白血球懸浮液 (1×10^6 cells/ml) 先與 CB (5 μ g/ml) 及 CaCl_2 (1 mM) 混合，置於 37°C 溫浴 3 分鐘，加入 DMSO (control) 或 FAL 作用 10 分鐘後，以 1 μ M fMLP 刺激細胞 10 分鐘。取上清液測量 lysozyme。數據以 means \pm S.D. 表示。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=3~4)。

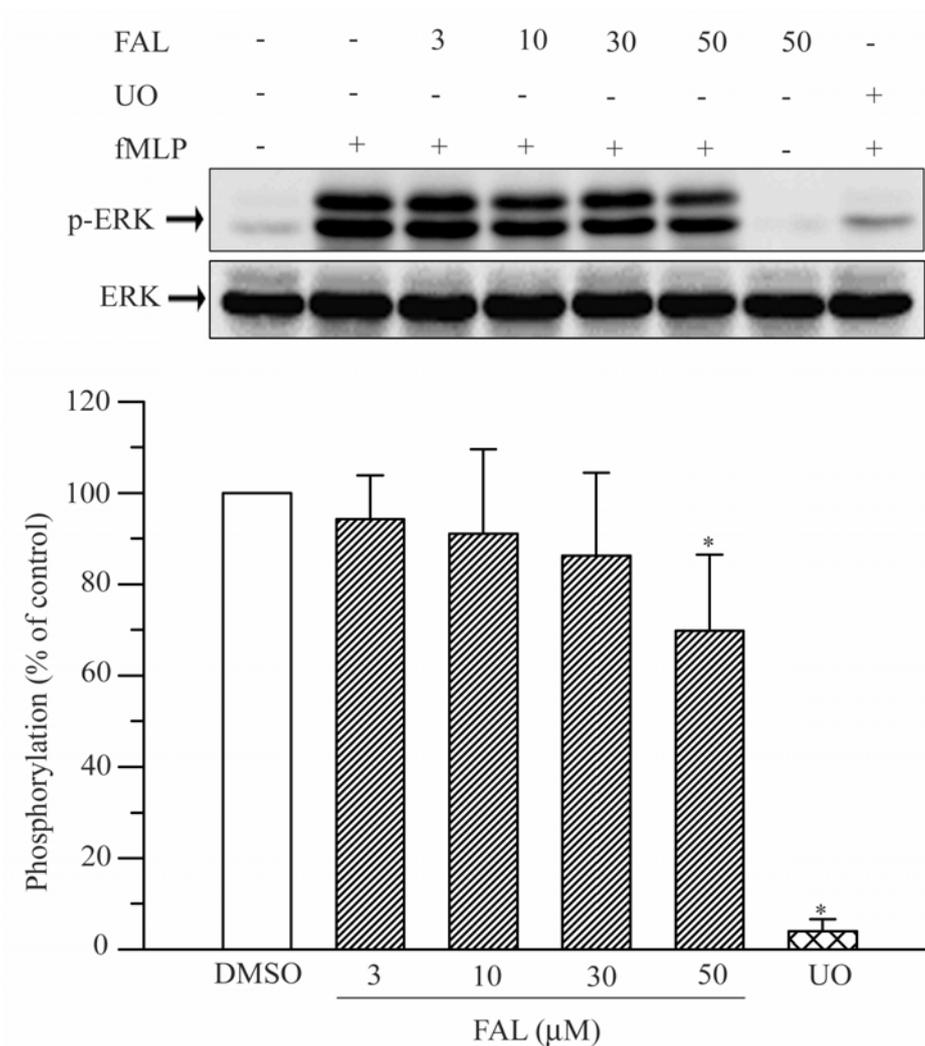


圖 2-7. FAL 對 fMLP 刺激 ERK 磷酸化之影響

嗜中性白血球懸浮液與 1 mM CaCl₂ 於 37°C 下預熱 3 分鐘後，與 DMSO (control)、3-50 μM FAL 或 3 μM U0126 (UO) 作用 10 分鐘，加入 1 μM fMLP 刺激 1 分鐘。細胞蛋白質經 SDS-PAGE 展開後，用 anti-phospho-ERK 抗體辨識。洗去抗體後以 anti-ERK 抗體辨識作為 loading control，並利用 densitometer 分析。數據以 means ± S.D. 表示。* $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=3~4)。

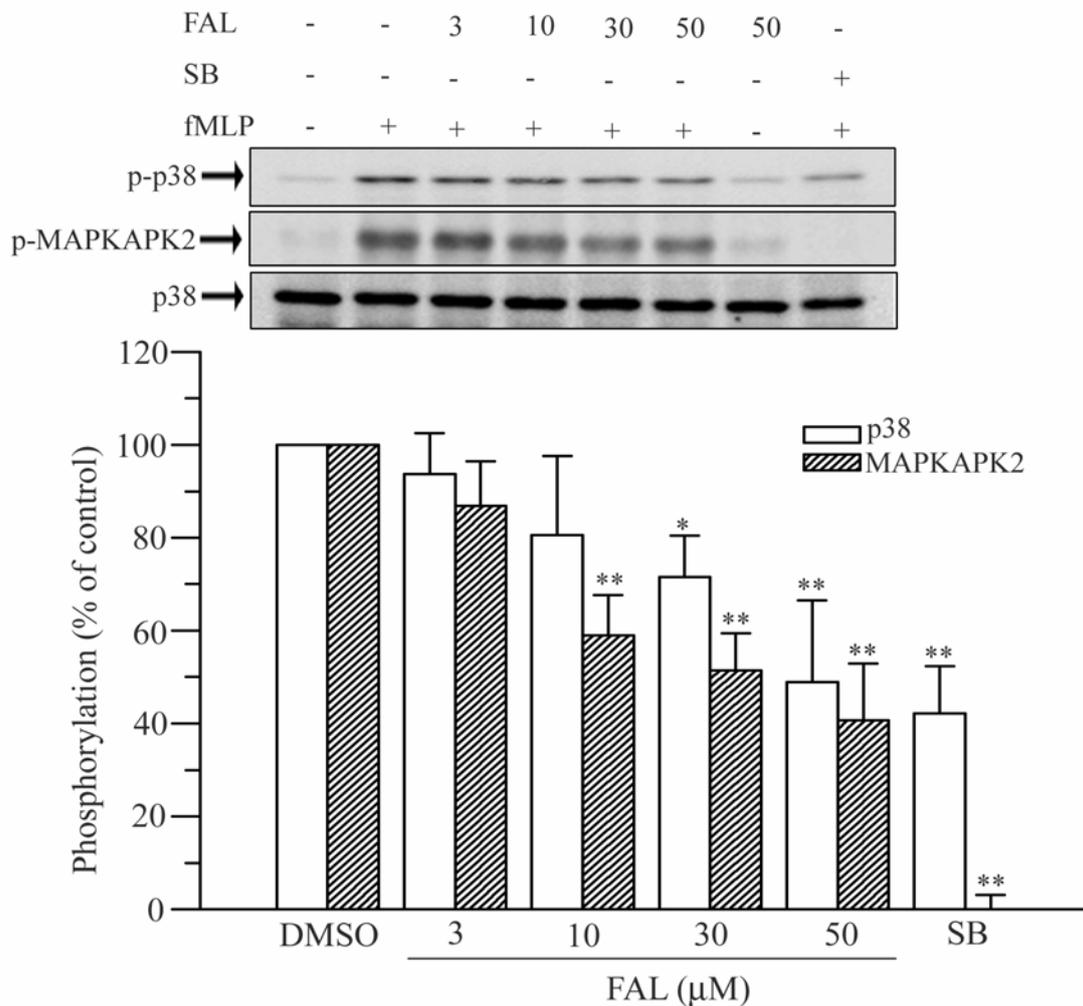


圖 2-8. FAL 對 fMLP 刺激 p38 MAPK 與 MAPKAPK2 磷酸化之影響

嗜中性白血球懸浮液與 1 mM CaCl₂ 於 37°C 下預熱 3 分鐘後，與 DMSO (control)、3-50 μM FAL 或 30 μM SB203580 (SB) 作用 10 分鐘，加入 1 μM fMLP 刺激 1 分鐘。細胞蛋白質經 SDS-PAGE 展開後，用 anti-phospho-p38 MAPK 或 anti-phospho-MAPKAPK2 抗體辨識。洗去抗體後，以 anti-p38 抗體辨識作為 loading control，並利用 densitometer 分析。數據以 means ± S.D. 表示。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=3~4)。

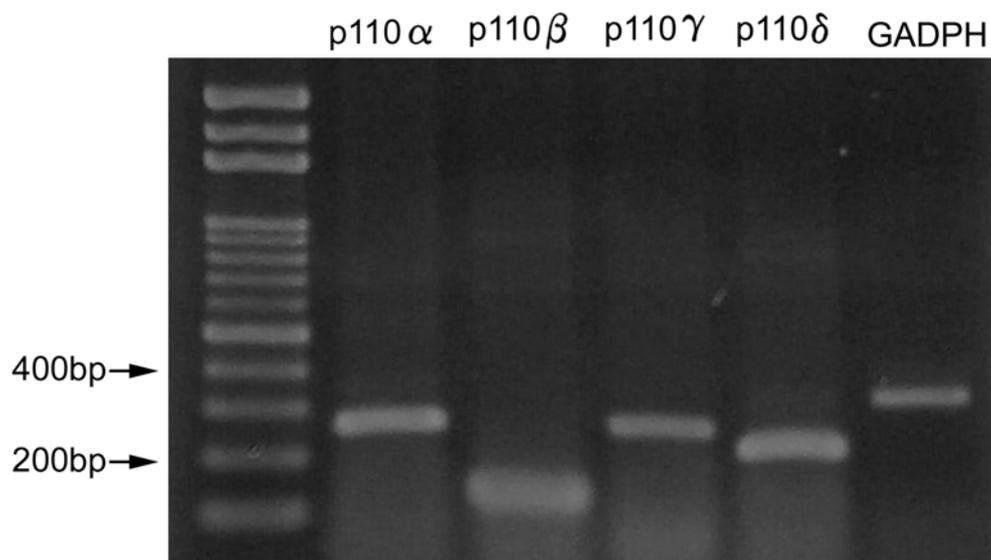


圖 2-9. 在大鼠嗜中性白血球中 PI3K isoforms 的基因表現

RT-PCR 的產物以 2% agarose gel 展開，而 GADPH 則當作 internal control。

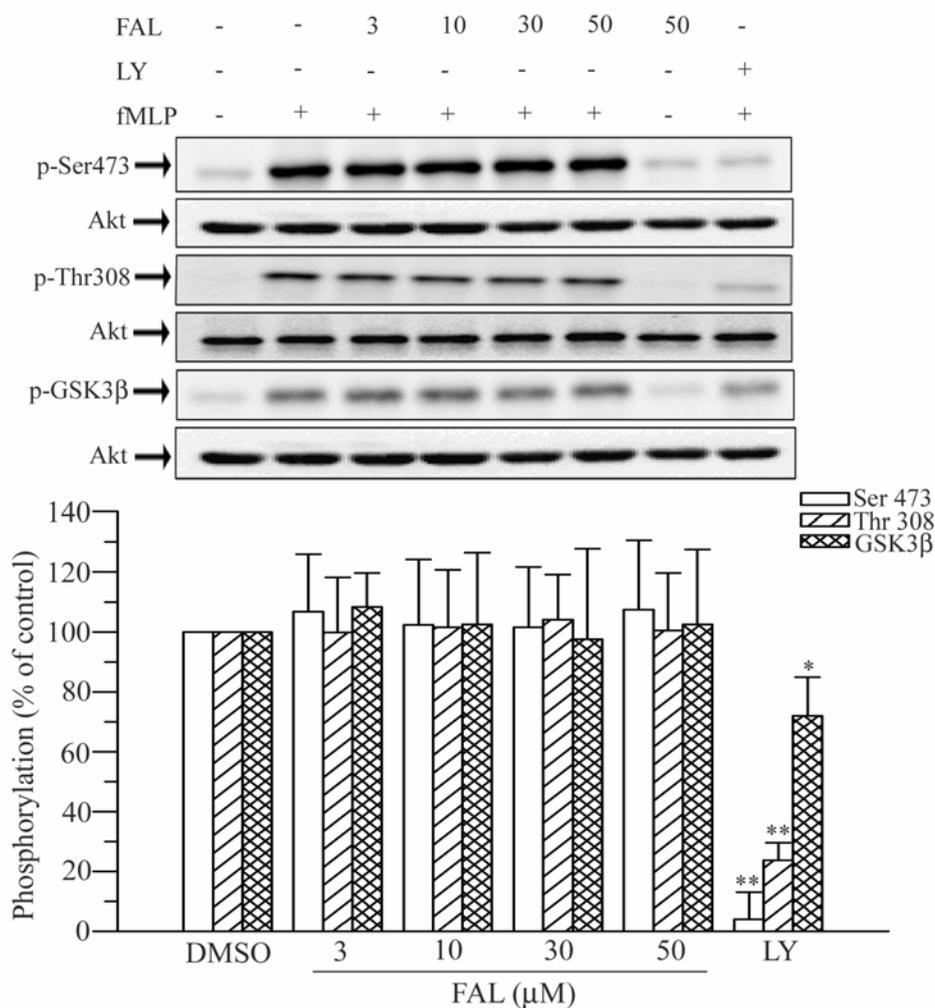


圖 2-10. FAL 對 fMLP 刺激 Akt(Ser⁴⁷³)、Akt(Thr³⁰⁸) 與 GSK3β 磷酸化作用之影響

嗜中性白血球懸浮液與 1 mM CaCl₂ 於 37°C 下預熱 3 分鐘後，與 DMSO (control)、3-50 μM FAL 或 30 μM LY294002 (LY) 作用 10 分鐘，加入 1 μM fMLP 刺激 1 分鐘。細胞蛋白質以 SDS-PAGE 展開後，用 anti-phospho-Akt(Ser⁴⁷³)、anti-phospho-Akt(Thr³⁰⁸) 與 anti-phospho-GSK3β 抗體辨識。洗去抗體後，以 anti-Akt 辨識作為 loading control，並利用 densitometer 分析。數據以 means ± S.D. 表示。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=4)。

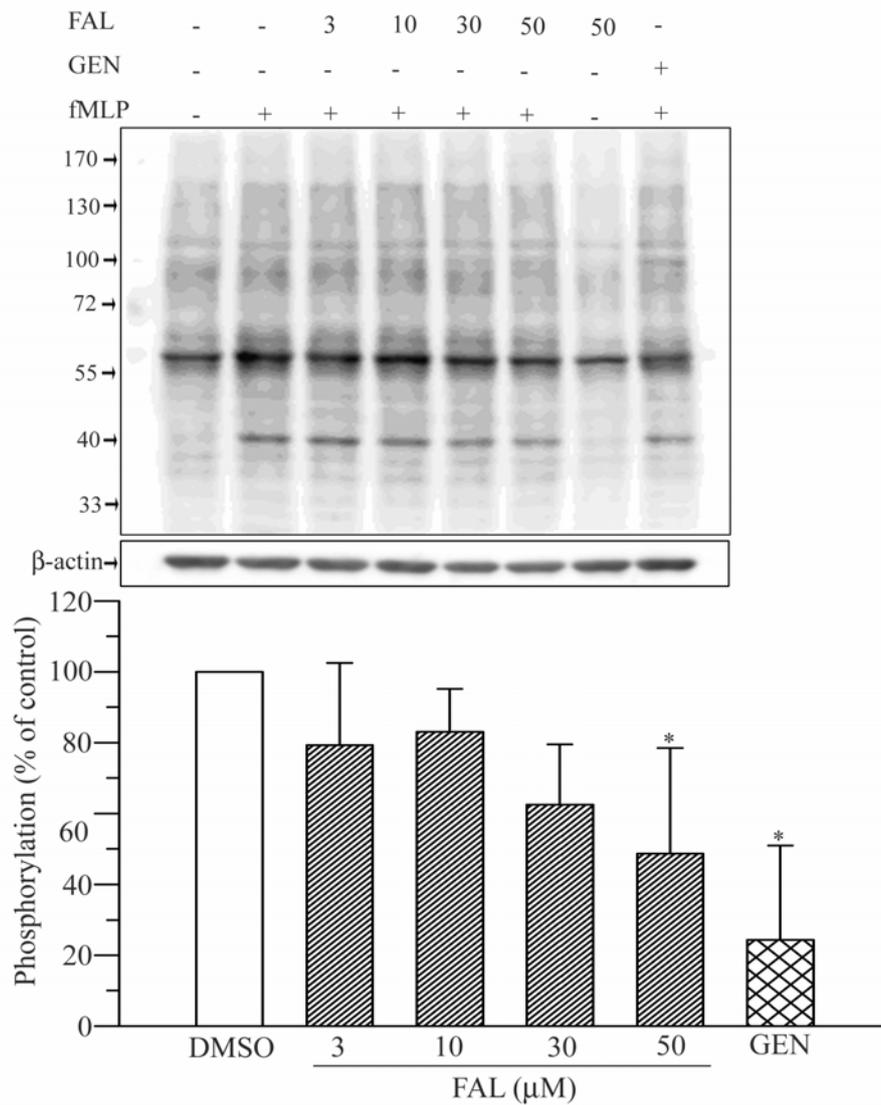


圖 2-11. FAL 對 fMLP 刺激蛋白質酪氨酸磷酸化作用之影響

嗜中性白血球 ($2 \times 10^6/1.5\text{ml}$) 與 1 mM CaCl_2 於 37°C 下預熱 3 分鐘後，與 DMSO (control)、 $3\text{-}50 \mu\text{M}$ FAL 作用 10 分鐘 或 $100 \mu\text{M}$ genistein (GEN) 作用 30 分鐘，加入 $1 \mu\text{M}$ fMLP 刺激 1 分鐘。細胞蛋白質經 SDS-PAGE 展開後，用 anti-phosphotyrosine 抗體辨識。洗去抗體後，以 anti- β -actin 辨識作為 loading control，利用 densitometer 分析。數據以 means \pm S.D. 表示。* $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=4)。

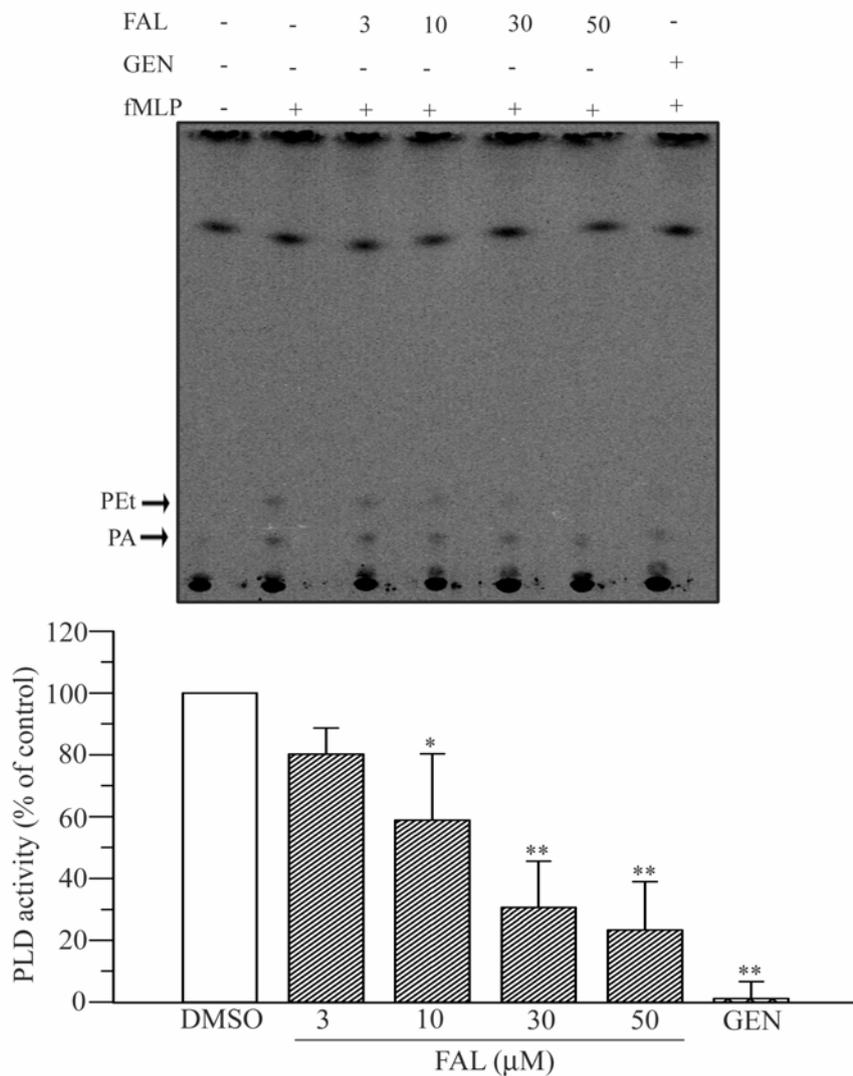


圖 2-12. FAL 濃度依存性對 PLD 活性之影響

含 1-*O*-[³H]octadecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine 標定的嗜中性白血球 (4×10^7 cells/ml) 懸浮液，在 1 mM CaCl₂ 以及 0.5% ethanol 存在下，於 37°C 與 DMSO (control)、3-50 μM FAL 或 100 μM genistein (GEN) 反應 3 分鐘後，在 CB 存在下加入 fMLP 刺激，反應完成後，將萃取脂質以 TLC 展開後，使用 PhosphorImage 測量 [³H]phosphatidylethanol (PEt) 的生成。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=3)。

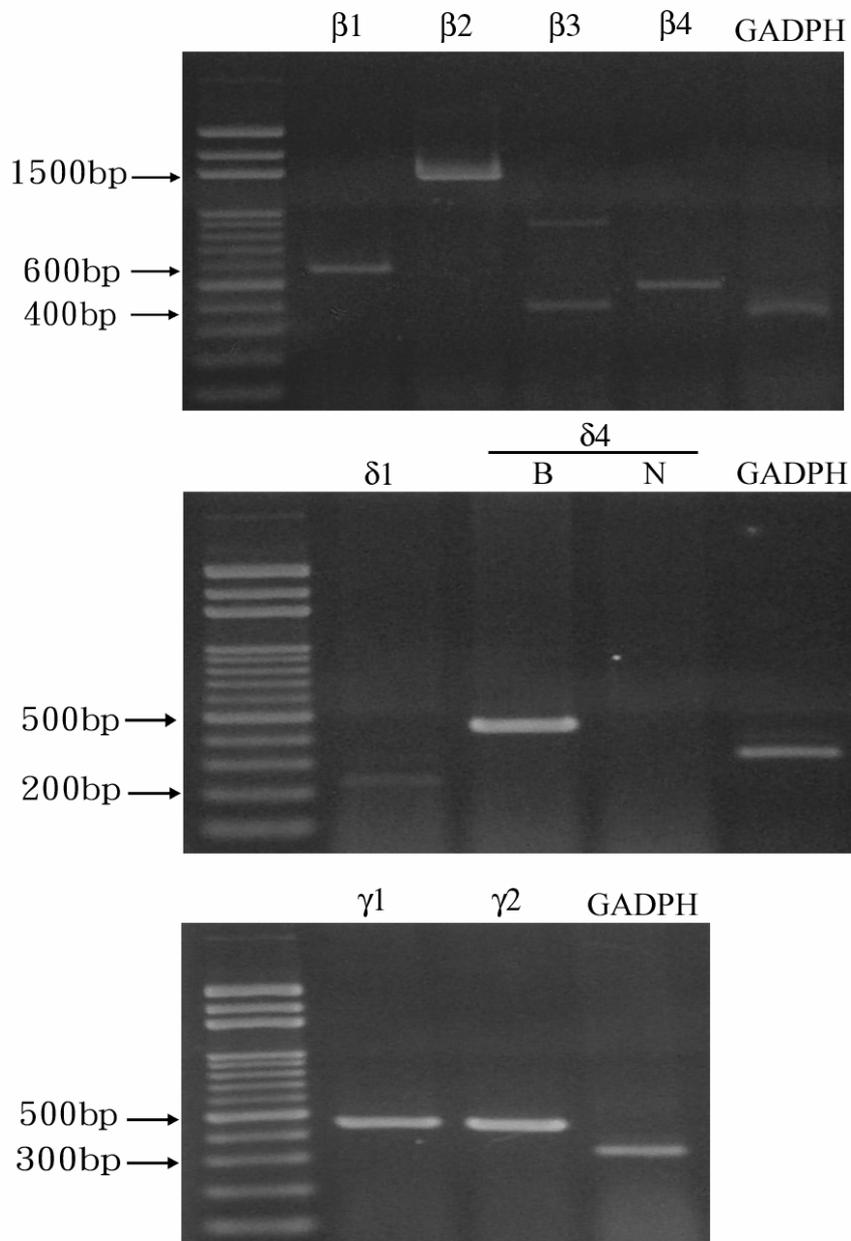


圖 2-13. 在大鼠嗜中性白血球中 PLC isoforms 的基因表現

RT-PCR 的產物以 2% agarose gel 展開，而 GADPH 則當作 internal control。B, brain;
N, neutrophils

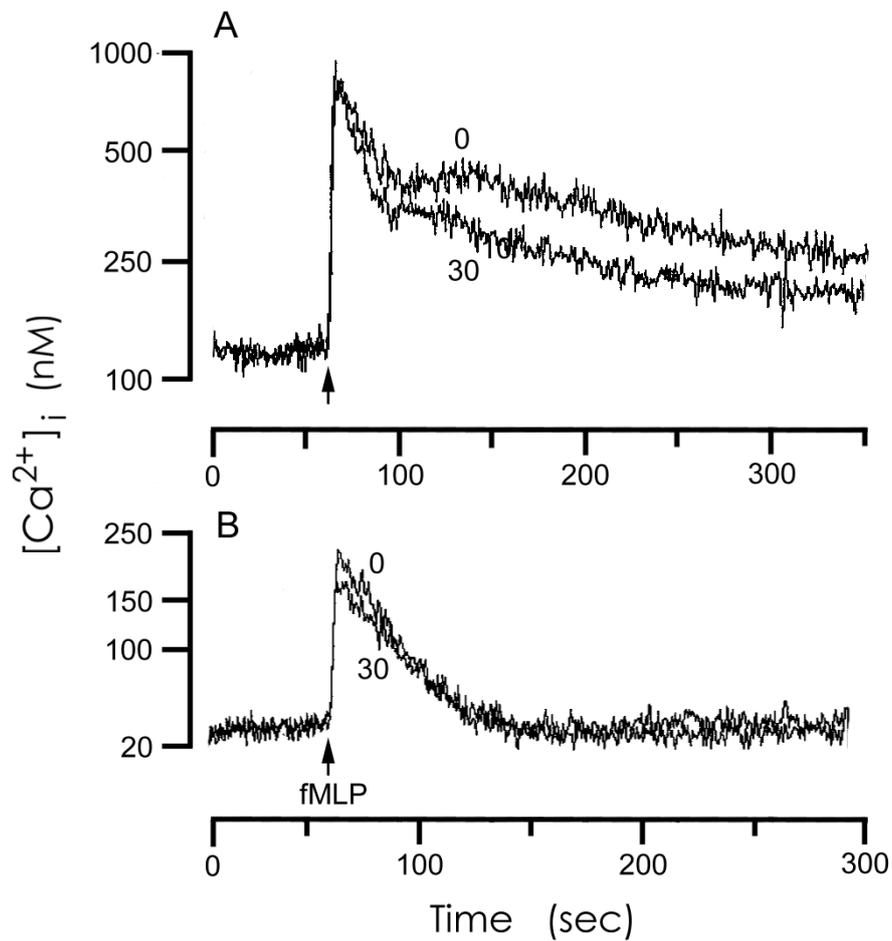


圖 2-14. FAL 對 fMLP 刺激 $[Ca^{2+}]_i$ 增加之影響

含 Fluo-3 的嗜中性白血球 (5×10^6 cells) 懸浮液，在 1 mM $CaCl_2$ 存在(A) 或不存在 (B)下，於 37°C 預熱 3 分鐘後，加入 DMSO 或 30 μ M FAL 作用 10 分鐘後，再以 fMLP 刺激，於 488/535 nm 的波長下偵測螢光值的變化 (n=3)。

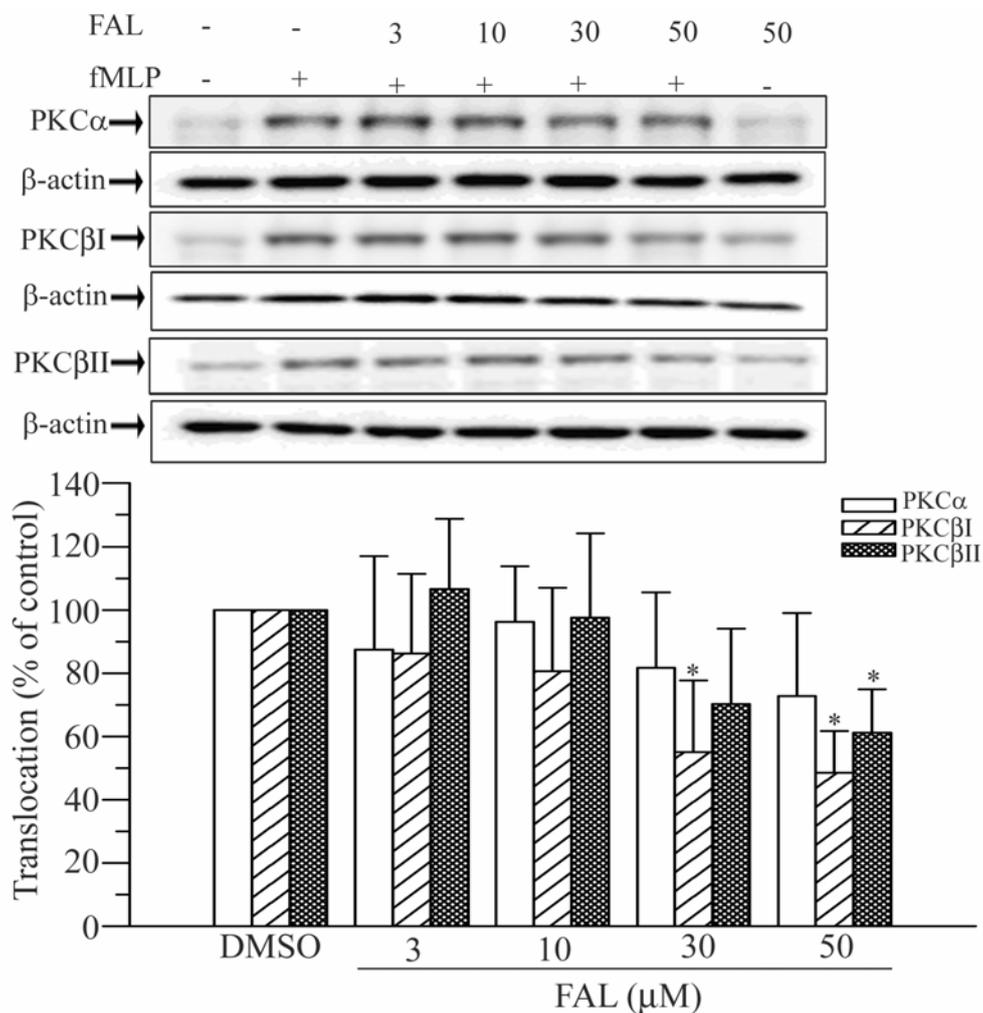


圖 2-15. FAL 對 fMLP 刺激引起 PKC α 、PKC β I 和 PKC β II 的膜轉位作用之影響

嗜中性白血球懸浮液與 1 mM CaCl₂，於 37°C 下預熱 3 分鐘，加入 DMSO (control) 或 3-50 μ M FAL 反應 10 分鐘後，再加入 1 μ M fMLP 刺激 1 分鐘。取得細胞膜分割的蛋白質，經 10 % SDS-PAGE 展開，利用 anti-PKC α 、anti-PKC β I 或 anti-PKC β II 抗體確認 PKC 的膜轉位程度。洗去抗體後，以 anti- β -actin 抗體辨識作為 loading control，並利用 densitometer 分析。數據以 means \pm S.D. 表示。* $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=4-5)。

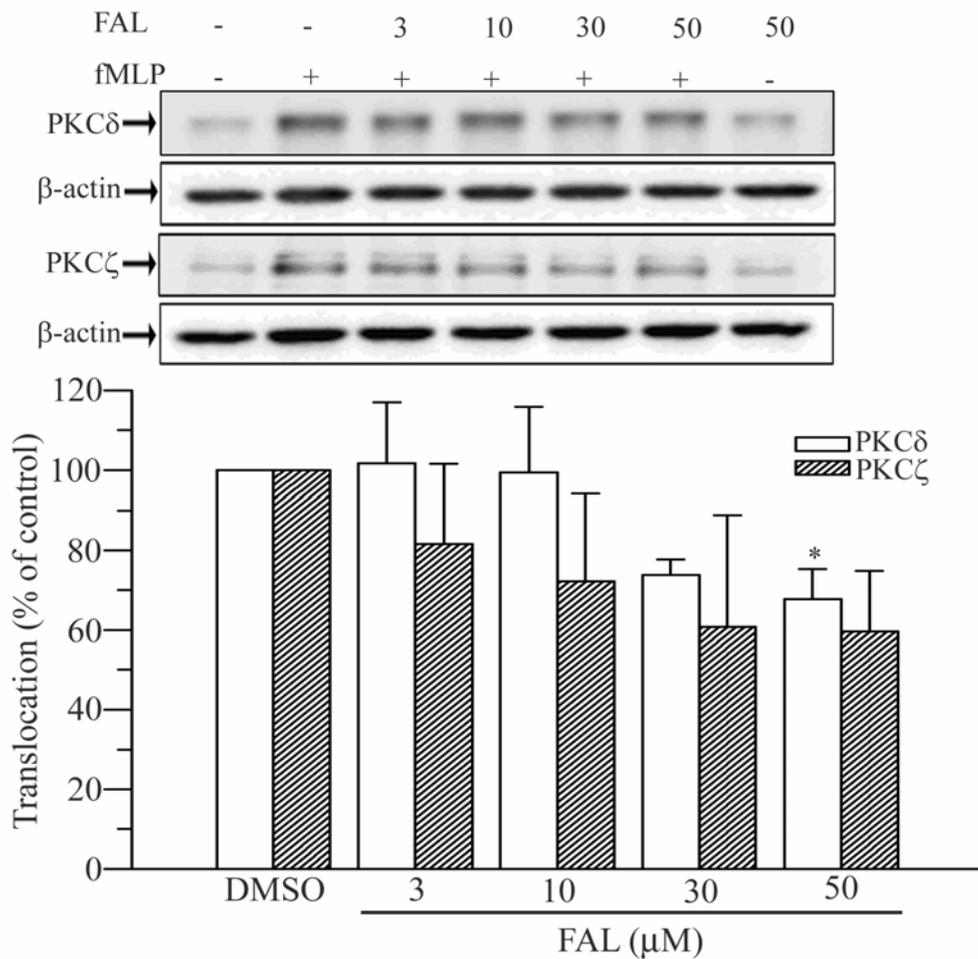


圖 2-16. FAL 對 fMLP 刺激所產生 PKC δ 和 PKC ζ 的膜轉位作用之影響

嗜中性白血球懸浮液與 1 mM CaCl₂，於 37°C 下預熱 3 分鐘，加入 DMSO (control) 或 3-50 μ M FAL 反應 10 分鐘後，再加入 1 μ M fMLP 刺激 1 分鐘。取得細胞膜分割的蛋白質，經 10 % SDS-PAGE 展開後，利用 anti- PKC δ 或 anti-PKC ζ 抗體確認 PKC 的膜轉位程度。洗去抗體後，以 anti- β -actin 抗體辨識作為 loading control，並利用 densitometer 分析。數據以 means \pm S.D. 表示。* $P < 0.05$ 與 control 值比較 (n = 4-5)。

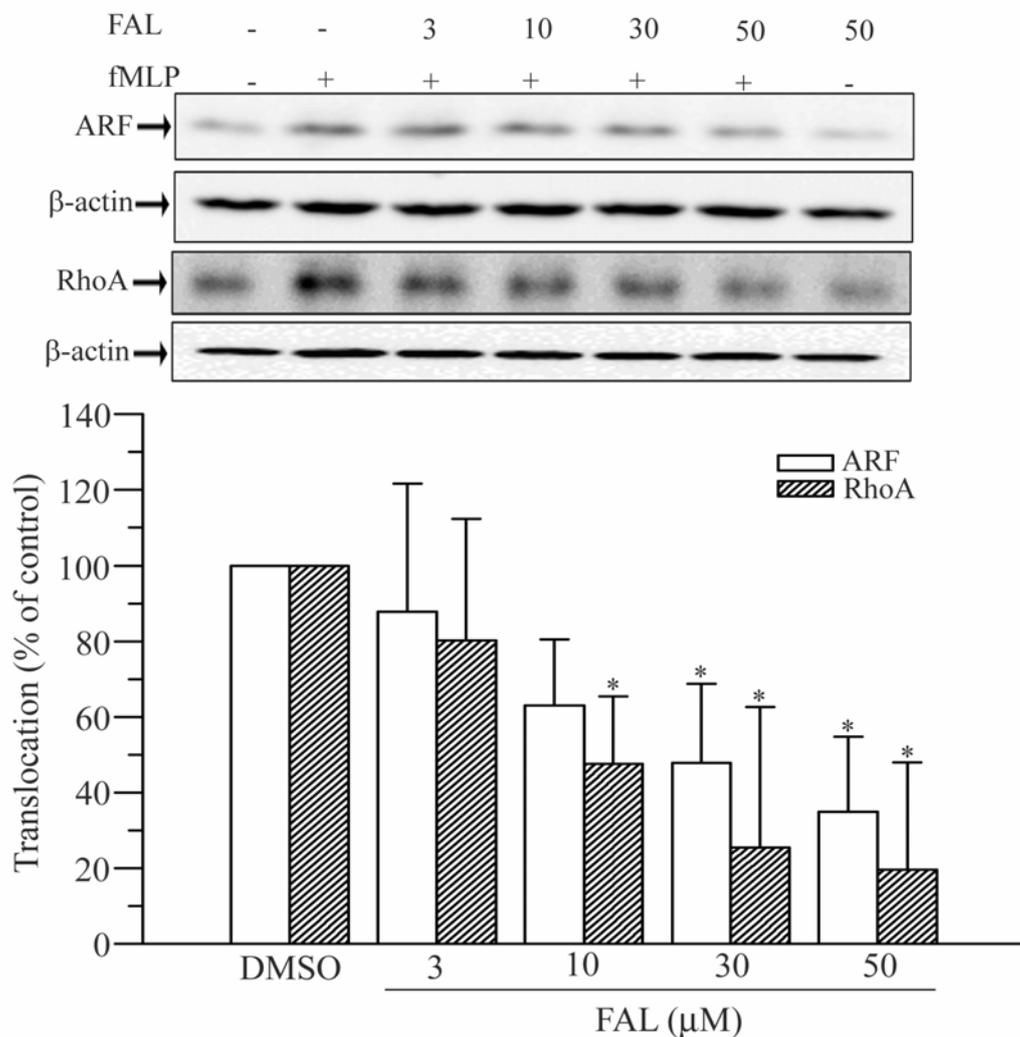


圖 2-17. FAL 對 fMLP 引起 ARF 及 RhoA 的膜轉位作用之影響

嗜中性白血球懸浮液與 1 mM CaCl₂ 於 37°C 下預熱 3 分鐘，加入 DMSO (control) 或 3-50 μM FAL 反應 10 分鐘後，再加入 1 μM fMLP 刺激 1 分鐘。將細胞膜分割的蛋白質，經 15% SDS-PAGE 展開後，利用 anti-ARF 或 anti-RhoA 抗體確認 RhoA 與 Arf 轉位程度。洗去抗體後，以 anti-β-actin 抗體辨識作為 loading control，並利用 densitometer 分析。數據以 means ± S.D. 表示。* $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=4-5)。

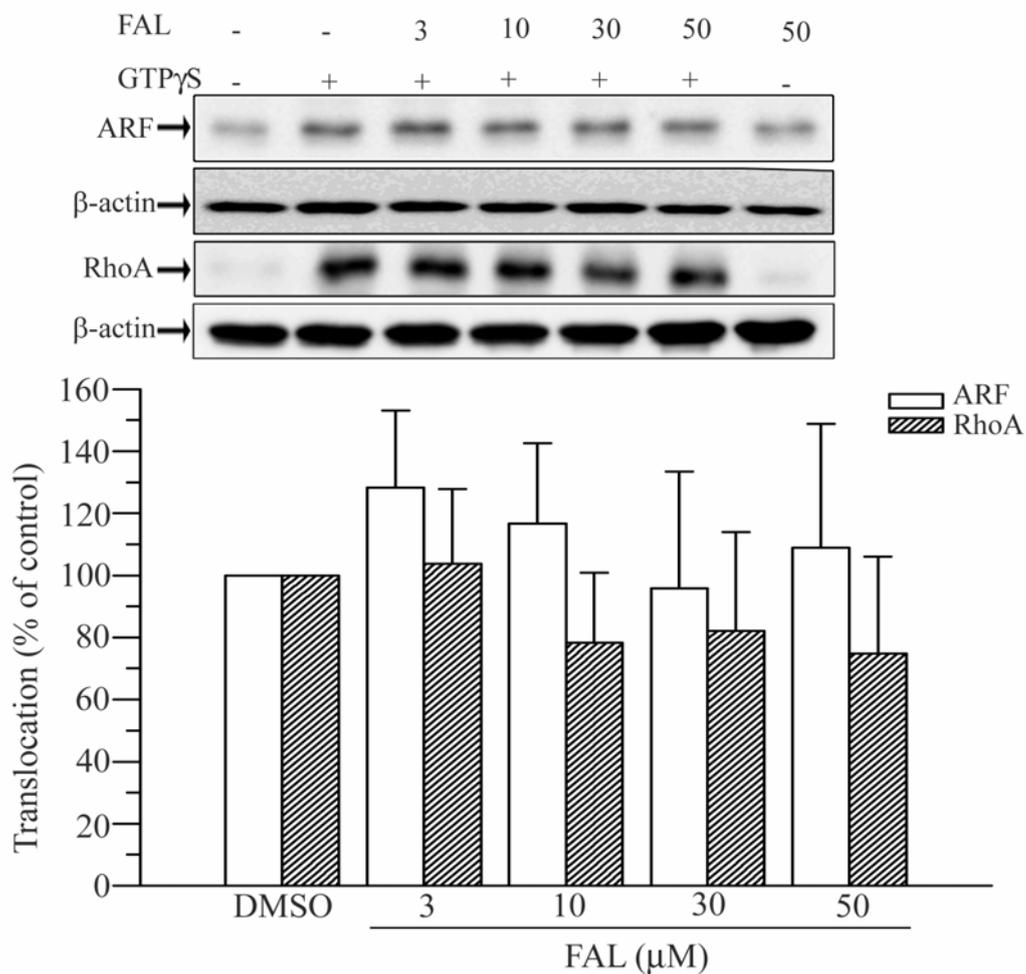


圖 2-18. 在無細胞系統下，FAL 對 GTP γ S 刺激所產生 RhoA 與 Arf 轉位作用之影響

嗜中性白血球細胞分解液與 DMSO (control) 或 3-50 μ M FAL 在 37°C 下，反應 10 分鐘後，加入 10 μ M GTP γ S 刺激 10 分鐘。取得細胞膜分割的蛋白質，經 15% SDS-PAGE 展開後，利用 anti-RhoA 或 anti-Arf 抗體確認 RhoA 與 Arf 轉位程度。洗去抗體後，以 anti- β -actin 抗體辨識作為 loading control，利用 densitometer 分析。數據以 means \pm S.D. 表示 (n=4-5)。

表 3-1. FAL 對嗜中性白血球的毒性

細胞釋放 LDH，細胞對 trypan blue 染色的排斥，和細胞內 calcein 的螢光值。嗜中性白血球懸浮液 (2×10^6 cells/1.5ml) 於 37°C 下均勻混合 3 分鐘，加入 DMSO (control)、30 或 50 μ M FAL 作用 30 分鐘。在扣除 control 值後的細胞毒性。數據以 means \pm S.D. 表示 (n=3)。

細胞毒性 (均反應 30 分鐘)

藥物濃度		細胞毒性 (%) ^a		
		LDH	Trypan blue	Calcein-AM
FAL	50 μ M	1.9 \pm 1.7	2.1 \pm 0.5	-0.9 \pm 4.2
	30 μ M	-0.3 \pm 2.7	1.0 \pm 0.4	2.5 \pm 0.2

^a LDH 毒性計算 (FAL-control / triton-control) \times 100；Trypan blue 毒性計算 (死細胞/死細胞-活細胞) \times 100；Calcein-AM 毒性計算 (control-FAL / control) \times 100

表 3-2. FAL 對 DHF 自體氧化的影響

將 DMSO (control)、SOD 或 FAL，加入含 0.891 mM DHF 的反應溶液中，於 37°C 下預熱 3 分鐘，加入 0.374 mM NBT 使反應開始並讀取 NBT 的吸光值變化。數據以 means \pm S.D. 表示。* $P < 0.01$ 與 control 值比較 (n=3)。

		Superoxide anion (nmol)
DMSO		4.6 \pm 1.0
FAL	50 μ M	4.2 \pm 0.9
	30 μ M	4.4 \pm 0.8
SOD	2.5 μ g/ml	1.2 \pm 0.5 *



參考文獻

- Anderson, K.E., Jackson, S.P. (2003) Class I phosphoinositide 3-kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35: 1028-103.
- Andresen, B.T., Rizzo, M.A., Shome, K., Romero, G. (2002) The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Lett.* 531: 65-68.
- Babior, B.M. (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93: 1464-1476.
- Babior, B.M. (2004) NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 42-47.
- Babior, B.M., Lambeth, J.D., Nauseef, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 342-344.
- Bae, C.D., Min, D.S., Fleming, I.N., Exton, J.H. (1998) Determination of Interaction Sites on the Small G Protein RhoA for Phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 273: 11596-11604.
- Bell, R.M., Burns, D.J. (1991) Lipid activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266: 4661-4664.
- Bokoch, G.M. (1994) Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Ras GTP-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 1396-1397.
- Bokoch, G.M., Bohl, B.P., Chuang, T.H. (1994) Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 269: 31674-31679.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell function. *Nature* 348: 125-132.
- Brodbeck, D., Hill, M.M., Hemmings, B.A. (2001) Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the

- regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain. *J. Biol. Chem.* 276: 29550-29558.
- Brindley, D.N., Waggoner, D.W. (1998) Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J. Biol. Chem.* 273: 24281-24284.
- Burritt, J.B., Foubert, T.R., Baniulis, D., Lord, C.I., Taylor, R.M., Mills, J. S., Baughan, T.D., Roos, D., Parkos, C. A., Jesaitis, A.J. (2003) Functional epitope on human neutrophil flavocytochrome *b₅₅₈*. *J. Immunol.* 170: 6082-6089.
- Cantrell, D. (2002) Protein kinase B (Akt) regulation and function in T lymphocytes. *Semin. Immunol.* 14: 19-26.
- Chang, L.C., Wang, J.P. (1999) Examination of the signal transduction pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in rat neutrophils. *FEBS Lett.* 454: 165-168.
- Chang, L.C., Wang, J.P. (2000) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in rat neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 390: 61-66.
- Chen, Q., Powell, D.W., Rane, M.J., Singh, S., Butt, W., Klein, J.B., McLeish, K.R. (2003) Akt phosphorylates p47^{phox} and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J. Immunol.* 170: 5302-5308.
- Chuang, T.H., Bohl, B.P., Bokoch, G.M. (1993) Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation. *J. Biol. Chem.* 268: 26206-26211.
- Colley, W.C., Sung, T.C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S.M., Altshulle, Y., Bar Sagi, D., Morris, A.J., Frohman, M.A. (1997) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization.

- Curr. Biol. 7: 191-201.
- Coyne, D.W., Morrison, A.R. (1990) Effect of the tyrosine kinase inhibitor, genistein, on interleukin-1 stimulated PGE2 production in mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 718-724.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R., Lee, J.C. (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 364: 229-233.
- Cuschieri, J., Maier, R. V. (2005) Mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Crit. Care Med.* 33: 417-419.
- Dang, P.M., Morel, F., Gougerot-Pocidalo, M.A., Benna, J.E. (2003) Phosphorylation of the NADPH Oxidase Component p67^{phox} by ERK2 and P38MAPK: Selectivity of Phosphorylated Sites and Existence of an Intramolecular Regulatory Domain in the Tetratricopeptide-Rich Region. *Biochemistry* 42: 4520-4526.
- Didichenko, S., Tilton, B., Hemmings, B.A., Ballmer-Hofer, K., Thelen, M. (1996) Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47^{phox} by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. *Curr. Biol.* 6: 1271-1278.
- Dinauer, M.C. (2005) Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. *Hematology* 10: 89-95.
- Du, G., Huang, P., Liang, B.T., Frohman, M.A. (2004) Phospholipase D2 localizes to the plasma membrane and regulates angiotensin II receptor endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 15: 1024-1030.
- El Benna, J., Faust, R.P., Johnson, J.L., Babior, B.M. (1996) Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47^{phox} as determined by two-dimensional

- phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 6374-6378.
- Ellson, C.D., Gobert-Gosse, S., Anderson, K. E., Davidson, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Thuring, J.W., Cooper, M.A., Lim, Z.Y., Holmes, A.B. (2001) PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40^{phox}. *Nat Cell Biol.* 3: 679-682.
- English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., Cobb, M.H. (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell Res.* 253: 255-270.
- Erickson, R.W., Langel-Peveri, P., Traynor-Kaplan, A.E., Heyworth, P.G., Curnutte, J.T. (1999) Activation of human neutrophil NADPH oxidase by phosphatidic acid or diacylglycerol in a cell-free system. Activity of diacylglycerol is dependent on its conversion to phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 274: 22243-22250.
- Exton, J.H. (1999) Regulation of phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta* 1439: 121-133.
- Exton, J.H., Hu, T. (2003) Mechanisms of regulation of phospholipase D1 by protein kinase C α . *J. Biol. Chem.* 278: 2348-2355.
- Exton, J.H., Chen, J.S. (2005) Sites on phospholipase D2 phosphorylated by PKC α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333: 1322-1326.
- Faurschou, M., Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes. Infect.* 5: 1317-1327.
- Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A., Trzaskos, J.M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated

- protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 18623-18632.
- Fensome, A., Whatmore, J., Morgan, C., Jones, D., Cockcroft, S. (1998) ADP-ribosylation factor and Rho proteins mediate fMLP-dependent activation of phospholipase D in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 273: 13157-13164.
- Fernandez, R., Suchard, S.J. (1998) Syk activation is required for spreading and H₂O₂ release in adherent human neutrophils. *J. Immunol.* 160: 5154-5162.
- Fontayne, A., Dang, P.M., Gougerot-Pocidalo, M.A., El Benna, J. (2002) Phosphorylation of p47^{phox} sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22^{phox} and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 41: 7743-7750.
- Fourcade, O., Le Balle, F., Fauvel, J., Simon, M.F., Chap, H. (1998) Regulation of secretory type-II phospholipase A2 and of lysophosphatidic acid synthesis. *Adv. Enzyme Regul.* 38: 99-107.
- Francis, S.A., Shen, X., Young, J.B., Kaul, P., Lerner, D.J. (2006) Rho GEF Lsc is required for normal polarization, migration, and adhesion of formyl-peptide-stimulated neutrophils. *Blood* 107: 1627-1635.
- Freeman, J.L., Lambeth, J.D., (1996) NADPH oxidase activity is independent of p47^{phox} in vitro. *J. Biol. Chem.* 271: 22578-22582.
- Fukami, K. (2002) Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J. Biochem.* 131: 293-299.
- Fuortes, M., Melchior, M., Han, H., Lyon, G.J., Nathan, C. (1999) Role of the tyrosine kinase pyk2 in the integrin-dependent activation of human neutrophils by TNF. *J. Clin. Invest.* 104: 327-335.
- Furman, D.A., Meyer, R.E., Cantley, L.C. (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev.*

- Biochem. 67: 481-507.
- Gary, M. (2005) Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol.* 15: 163-171.
- Graber, S.G. (1999) *G-Proteins: An Introduction*. Calbiochem 1999. 6.
- Goldberg, B., Stern, A. (1977) The role of the superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte. *Arch. Biochem. Biophys.* 178: 218-225.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85
- Hammond, S.M., Jenco, J.M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q., Cook, S., Nozawa, N., Preswich, G.D., Morris, A.J., Frohman, M.A. (1997) Characterization of two alternatively spliced forms of phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* 272: 3860-3868.
- Henderson, L.M., Charppell, J.B. (1996) NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta.* 1273: 87-107.
- Hepler, J.R., Gilman, A.G. (1992) G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17: 383-387.
- Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H., Kohda, D. (2001) Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat. Struct. Biol.* 8: 526-530.
- Hodgkin, M.N., Masson, M.R., Powner, D., Saqib, K.M., Ponting, C.P., Wakelam, M.J. (2000) Phospholipase D regulation and localization is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-specific PH domain. *Curr. Biol.* 10: 43-46.
- Igarashi, K., Kanecla, M., Yamaji, A., Said, T., Kikkawa, U., On, Y., Inoue, K., Umeda, M. (1995) A novel phosphatidylserine-binding peptide motif defined by an anti-idiotypic monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 270: 29075-29078.
- Jenkins, G.M., Frohman, M.A. (2005) Phospholipase D α lipid centric review. *Cell Mol.*

- Life Sci. 62: 2305-2316.
- Katan, M. (1998) Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436: 5-17
- Katsoulidis, E., Li, Y., Mears, H., Platanias, L. C. (2005) The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction. *J. Interf. Cytok. Res.* 25: 749-756
- Kent, J.D., Sergeant, S., Burns, D.J., McPhail, L.C. (1996) Identification and regulation of protein kinase C- δ in human neutrophils. *J. Immunol.* 157: 4641-4647
- Kwak, J.Y., Lopez, I., Uhlinger, D.J., Ryu, S.H., Lambeth, D.J. (1995) RhoA and a cytosolic 50 kDa factor reconstitute GTP γ S-dependent phospholipase D activity in human neutrophil subcellular fractions. *J. Biol. Chem.* 270: 27093-27098.
- Koga, H., Terasawa, H., Nunoi, H., Takeshige, K., Inagaki, F., and Sumimoto, H. (1999) Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67^{phox} participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 274: 25051-25060.
- Kook, S., Exton, J. H. (2005) Identification of interaction sites of protein kinase C α on phospholipase D1. *Cell Signal.* 17: 1423-1432
- Korade-Miemics, Z., Corey, S.J. (2000) Src kinase-mediated signaling in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 68: 603-613.
- Koyasu, S. (2003) The role of PI3K in immune cells. *Nat. Immunol.* 4: 313-319.
- Krugmann, S., Hawkins, P.T., Pryer, N., Braselmann, S. (1999) Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110 γ phosphoinositide 3-kinases and their role in the activation of this enzyme by G $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* 274:

17152-17158.

- Le, Y., Yang, Y., Cui, Y., Yazawa, H., Gong, W., Qiu, C., Wang, J.M. (2002) Receptors for chemotactic formyl peptides as pharmacological targets. *Int. Immunopharmacol* 2: 1-13.
- Lee, W.L., Harrison, R.E., Grinstein, S. (2003) Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 5: 1299-1306.
- Liu, H., Qiu, Y., Xiao, L., Dong, F. (2006) Involvement of protein kinase C ϵ in the negative regulation of Akt activation stimulated by granulocyte colony-stimulating factor. *The J. Immunol.* 176: 2407-2413.
- Majumdar, S., Kane, L.H., Rossi, M.W., Volpp, B.D., Nauseef, W.M., Korchak, H.M. (1993) Protein kinase C isotypes and signal-transduction in human neutrophils: selective substrate specificity of calcium-dependent beta-PKC and novel calcium-independent nPKC. *Biochim. Biophys. Acta.* 1176: 276-286.
- Mansfield, P.J., Carey, S.S., Hinkovska-Galcheva, V., Shayman, J.A., Boxer, L.A. (2004) Ceramide inhibition of phospholipase D and its relationship to RhoA and ARF1 translocation in GTP γ S-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 103: 2363-2368
- Maria, L. W., Ernest, J. F. (2006) Regulation of Akt by arachidonic acid and phosphoinositide 3-kinase in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 11-16.
- Mark, M.D., Michael, J.O., Wakelam, Andrew, J. M. (2004) Phospholipase D. *Biochem Cell Biol.* 82: 225-253.
- Mayer-Scholl, A., Averhoff, P., Zychlinsky, A. (2004) How do neutrophils and pathogens

- interact? *Curr Opin Microbiol.* 7: 62-66.
- Merritt, J.E., McCarthy, S.A., Davies, M.P., Moores, K.E. (1990) Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca^{2+} in platelets and neutrophils. Loading cells with the dye, calibration of traces, measurements in the presence of plasma, and buffering of cytosolic Ca^{2+} . *Biochem. J.* 269: 513-519.
- Michele, R. W., David, M. B., Kendall H. (2003) PLC- ϵ : A Shared Effector Protein in Ras-, Rho-, and $G\alpha\beta\gamma$ -Mediated Signaling. *August.* 3:273-280.
- Mocsai, A., Jakus, Z., Vantus, T., Berton, G., Lowell, C.A., Ligeti, E. (2000) Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J. Immunol.* 164: 4321-4331.
- Morris, A.J., Frohman, M.A., Engebrecht, J. (1997) Measurement of phospholipase D activity. *Anal. Biochem.* 252: 1-9.
- Nathan C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 173-182.
- Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L., Facchini, A. (2001) Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 1131-1135.
- Newton, A.C. (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 161-167.
- Nijhuis, E., Lammers, J.J., Koenderman, L., Coffers P.J. (2002) Src kinases regulate PKB activation and modulate cytokine and chemoattractant-controlled neutrophil functioning. *J. Leukoc. Biol.* 71: 115-124.

- Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9: 484-496.
- Okada, M., Ishimoto, T., Naito, Y., Hirata, H., Yagisawa, H. (2005) Phospholipase C δ_1 associates with importin β_1 and translocates into the nucleus in a Ca²⁺-dependent manner. *FEBS Letters.* 579: 4949-4954.
- Platanias, L.C. (2005) Mechanisms of type-I and type-II interferon-mediated signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 375-386.
- Ponting, C.P., Kerr, I.D. (1996) A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipids synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci.* 5: 914-922.
- Putney, J.W. (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11: 611-624.
- Rane, M.J., Coxon, P.Y., Powell, D.W., Webster, R., Klein, J.B., Pierce, W., Ping, P., McLeish, K.R. (2001) p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation function as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 276: 3517-3523.
- Regier, D.S., Waite, K.A., Wallin, R., McPhail, L.C. (1999) A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22^{phox}, an NADPH oxidase component. *J. Biol. Chem.* 274: 36601-36608.
- Roos, D., Bruggen, R.V., Meischl, C. (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 5: 1307-1315.
- Sarfstein, R., Gorzalczany, Y., Mizrahi, A., Berdichevsky, Y., Molshanski-Mor, S., Weinbaum, C., Hirshberg, M., Dagher, M.C., Pick, E. (2004) Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67^{phox}: a

- study based on mutagenesis of p67^{phox}-Rac1 chimeras. *J. Biol. Chem.* 279: 16007-16016.
- Sathyamoorthy, M., Mendez, I., Adams, A.G., Leto, T.L., (1997) p40^{phox} down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J. Biol. Chem.* 272: 9141-9146.
- Sayed, M.M. (2002) Exuberant Ca⁺² signaling in neutrophils: A Cause for concern. *News Physiol Sci.* 15: 130-136.
- Sciorra, V.A., Rudge, S.A., Prestwich, G.D., Frohman, M.A., Engebrecht, J., Morris, A.J. (1999) Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes. *EMBO J.* 18: 5911-5921.
- Schaeffer, H.J., Weber, M.J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.* 19: 2435-2444.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P., Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252: 802-808.
- Silinsky, E.M., Searl, T.J. (2003) Phorbol esters and neurotransmitter release: more than just protein kinase C? *Br. J. Pharmacol.* 138: 1191-1201.
- Silliman, C.C., Ambruso, D.R., Boshkov, L.K. (2005) Transfusion-related acute lung injury. *Blood* 105: 2266-2273.
- Stahelin, R.V., Ananthanarayanan, B., Blatner, N.R., Singh, S., Bruzik, K.S., Murray, D., Cho, W. (2004) Mechanism of membrane binding of the phospholipase D1 PX domain. *J. Biol. Chem.* 279: 54918-54926.
- Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A.S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., Hawkins, P.T. (1997) The G

- beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89: 105-114.
- Sternweis, P.C., Smrcka, A.V. (1992) Regulation of phospholipase C by G protein. *Trends Biochem. Sci.* 17: 502-506.
- Sumimoto, H., Miyano, K., Takeya, R. (2005) Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 677-686.
- Sung, T.C., Zhang, Y.M., Morris, A.J., Frohman, M.A. (1999) Structural analysis of human phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* 274: 3659-3666.
- Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 81: 153-208.
- Taylor, C.W. (1998) Inositol trisphosphate receptors: Ca^{2+} -modulated intracellular Ca^{2+} -channels. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436: 19-33.
- Teresa, G., Salvador, A., Benitah, P. F., Valeron, C. E., Juan, C. L. (2005) Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *BioEssays.* 27: 602-613.
- Torres, M., Hall, F.L., O'Neill, K. (1993) Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases. *J. Immunol.* 150: 1563-1577.
- Toker, A., Newton, A.C. (2000) Akt/Protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.* 275: 8271-8274.
- Tsao, L.T., Wang, J.P. (1997) Translocation of protein kinase C isoform in rat neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 412-418.
- Tsunawaki, S., Kagara, S., Yoshikawa, K., Yoshida, L.S., Kuratsuji, T., Namiki, H. (1996)

- Involvement of p40^{phox} in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p67^{phox}. J. Exp. Med. 184: 893-902.
- Uings, I.J., Thompson, N.T., Randall, R.W., Spacey, G.D., Bonser, R.W., Hudson, A.T., Garland, L.G. (1992) Tyrosine phosphorylation is involved in receptor coupling to phospholipase D but not phospholipase C in the human neutrophil. Biochem. J. 281: 9097-9102.
- Ulbrich, H., Eriksson, E.E., Lindbom, L. (2003) Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. TIPS. 24: 640-647.
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., Brown, R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J. Biol. Chem. 26: 5241-5248.
- Vanhaesebroek, B., Alessi, D.R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. Biochem. J. 346: 561-576.
- Vanhaesebroek, B., Waterfield, M.D. (1999) Signal by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. Exp. Cell Res. 253: 239-254.
- Waite, K.A., Wallin, R., Qualliotine-Mann, D., McPhail, L.C. (1997) Phosphatidic acid-mediated phosphorylation of the NADPH oxidase component p47^{phox}. Evidence that phosphatidic acid may activate a novel protein kinase. J. Biol. Chem. 272: 15569-15578.
- Wang, J.P., Raung, S.L., Hsu, M.F., Lin, C.N. (1994) Inhibition by gmisin C (a lignan from *Schizandra Chinensis*) of the respiratory burst of rat neutrophils. Br. J. Pharmacol. 113:

945-953.

- Wang, J.P., Tsao, L.T., Raung, S.L., Hsu, M.F., Kuo, S.C. (1997a) Inhibition by HAJ11 of respiratory burst in neutrophils and the involvement of protein tyrosine phosphorylation and phospholipase D activation. *Br. J. Pharmacol.* 120: 79-87.
- Wang, J.P., Raung, S.L., Tsao, L.T., Hsu, M.F., Lin, C.N. (1997b) Blocked of protein kinase C is involved in the inhibition by cycloheterophyllin of neutrophil superoxide anion generation. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 355: 551-558.
- Wang, J.P., Chng, L.C., Hsu, M.F., Chen, S.C., Kuo, S.C. (2002) Inhibition of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated respiratory burst by cirsimaritin involves inhibition of phospholipase D signaling in rat neutrophils. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 366: 307-314.
- Wang, J.P., Chang, L.C., Hsu, M.F., Lin, C.N. (2003) The blockade of formyl peptide-induced respiratory burst by 2',5'-dihydroxy-2-furfurylchalcone involves phospholipase D signaling in neutrophils. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 368: 166-174.
- Wick, M.J., Ramos, F.J., Chen, H., Quon, M.J., Dong, L.Q., Lin, F. (2003) Mouse 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 undergoes dimerization and trans-phosphorylation in the activation loop. *J. Biol. Chem.* 278: 42913-42919.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79: 143-180.
- Wilde, J.I., Watson, S.P. (2001) Regulation of phospholipase C- γ isoforms in haematopoietic cells: why one, not the other? *Cell Signal.* 13: 691-701.

Wymann, M.P., Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases.
Biochim. Biophys. Acta. 1436: 127-150.

