



中國醫藥大學
基礎醫學研究所
碩士學位論文

HMGB1 對於人類肺部纖維母細胞之轉移與增生的
影響

Effects of Human High Mobility Group Box 1 on Human Lung
Fibroblasts Migration and Proliferation

指導教授：李珍珍 副教授(Chen-Chen Lee)

研究生：蔡宜儒 (Yi-Ru Tsai)

中華民國 101 年 2 月

致謝

走到今天終於把碩士論文給完成了，從我當完兵到現在已經快要28歲了，而到這個年紀才把碩士學位拿到手，其實也是稍嫌晚了些。但是我還是很感謝老師們與學長姐學弟妹的幫助才能夠把它完成。

說起來我要感謝的人真的很多，老爸老媽是第一個我必須要感謝的，謝謝你們讓我做這個回來繼續念研究所的決定，我也會告訴自己爾後必須要更加的注意自己的一些生活行為；其次就是我的指導教授李珍珍副教授，您真的是我完全沒有後悔念完研究所的一個老師，我有時候不懂得您會指導我，我有時候在生活上的一些問題您也會給予我建議，我真的還是一點都不像個快到而立之年的人，但是由於老師給予我不少的建議與肯定，我想我今後也會從這些需要加強的地方著手，成為一個不讓自己失望的人，接下來就是王建能學長及學弟妹的幫助，感謝你們在口試時候的幫忙，還有在實驗上的協助，真的很感激。

最後感謝當天的口試委員湯智昕副教授及台北醫學大學的鄭幼文副教授，鄭老師特別在當天趕火車來台中參加我的口試，真的很感謝老師的幫忙，同時在論文的寄送上有了些狀況在這邊向老師致上很深的歉意，也同時謝謝兩位口試委員在我研究論文上的肯定。

最後，再一次的謝謝各位，我終於畢業了。

摘要

背景

呼吸道重塑為慢性氣喘中很重要的病理現象之一，而在呼吸道重塑下造成的下上皮纖維化機制目前尚未被完整發現，在下上皮纖維化中纖維母細胞因為細胞外基質像是膠原蛋白，fibronectins 與 Laminins 的沉積；High mobility group box 1 (HMGB1) 在早期被發現是涉及 DNA 與染色體調節與轉錄的細胞核蛋白。在近年被發現到 HMGB1 亦屬於一種細胞激素，其可以活化免疫細胞如單核球造成免疫反應的擴大。

研究動機

在本研究中，我們想要去調查 HMGB1 在人類肺部纖維母細胞 WI-38 在細胞移行及細胞增生的影響。

方法與結果

在利用不同濃度的 HMGB1 去刺激 WI-38 24 小時後以 MTT assay 及 BrdU cell proliferation assay 我們並沒有發現到明顯的細胞毒殺反應及增生反應；結論：而在傷口癒合實驗中，我們發現到 HMGB1 在濃度變化刺激下發現了 WI-38 的細胞移行量呈現濃度梯度變化。我們利用不同蛋白質激酶抑制劑觀察到 MAP kinases 的 ERK, JNK, p38 及 NF- κ B 受到抑制後 HMGB1 刺激 WI-38 的細胞移行程度被抑制的結果，在西方墨點法發現了 MAP kinases 在 HMGB1 最高作用濃度 100ng/ml 刺激後活化的結果，而在細胞核蛋白中看見了 p65 的表現量增加。我們在明膠電泳中觀察到了 HMGB1 在濃度變化刺激 WI-38 中 MMP-9 的酵素活性增加，在即時聚合酶連鎖反應及西方墨點法都看到了 MMP-9 的 mRNA 及蛋白質表現量的增加；此外我們也發現了 PI3 kinase/Akt 受到抑制的情況下 HMGB1 刺激 WI-38 的細胞移行程度有抑制的現象，及我們看到在細胞核內 β -catenin 在一小時後表現量增加，接著我們發現到了 HMGB1 最高濃度刺激下 WI-38 的細胞表面受器 TLR2, TLR4 及 RAGE 的 mRNA 表現量皆有上升的趨勢。

結論

我們發現到 HMGB1 刺激人類肺部纖維母細胞 WI-38 的細胞移行是透過 MMP-9 活化及 PI3 kinase/Akt、MAPKs 與 β -catenin 的訊息傳遞路徑。

關鍵字：high mobility group box 1, human lung fibroblast, extracellular matrix, migration, matrix metalloproteinase-9

Abstract

Background

Airway remodeling is an important characteristic in severe asthma. Subepithelial fibrosis is one of the features of airway remodeling and the mechanism is still unclear. Fibroblasts is the main resource of extracellular matrix including collagens, fibronectin and laminins which cause airway remodeling. High mobility group box 1(HMGB1) is a nuclear protein that involves the interactions with DNA and chromatin regulation and transcription. HMGB1 is also a cytokine that can activate monocytes neutrophils involving in inflammation.

Statement of purpose

In this study, we want to investigate the role of HMGB1 on cell migration on human fibroblast cell line - WI-38.

Methods and results

After treated with HMGB1 1, 10, 100 ng/ml for 24hrs, we did not found obviously cytotoxicity and proliferation effect on WI-38 cells by MTT and BrdU incorporation assay, respectively. We found that HMGB1 induced cell migration on WI38 by dose-dependent manner. Using zymography to investigate matrix metalloproteinase (MMP) activity, we found that HMGB1 induced MMP9 activation but not MMP2. Using specific inhibitor of protein kinases, we observed that extracellular signal related kinase (ERK) inhibitor- PD98059(10 μ M), c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor - SB203580(5 μ M), p38 mitogen activated protein kinase (p38) inhibitor-SP600125(5 μ M), phosphoinositide 3-kinase (PI3 kinase) inhibitor- LY294002(5 μ M), and NF- κ B inhibitor-Bay117082(10 μ M) all showed the inhibition effect on HMGB1 induced WI-38 cells migration. We also found that HMGB1 induced ERK, JNK and p38 activated and increased the nucleus p65 and β -catenin expression by time-dependently through Western blotting. Last we observed the WI-38 increased RAGE, toll-like receptor 2 (TLR2) and 4 (TLR4) mRNA and protein expression on Western blotting and Real-time PCR through HMGB1 treated.

Conclusion

We found that HMGB1-induced cell migration on WI-38 through MMP9 activation, PI3 kinas/AKT, MAPKs, and β -catenin signaling.

Key words

high mobility group box 1, human lung fibroblast, extracellular matrix, migration, matrix metalloproteinase-9

目錄

| | |
|--------------------------------------|-----|
| 中文摘要 | I |
| 英文摘要 | II |
| 目錄 | III |
| 第一章 緒論 | 1 |
| 第一節：慢性氣喘的簡介 | 1 |
| 1-1：氣喘的產生與細胞免疫反應 | 2 |
| 1-2：氣喘的治療 | 4 |
| 第二節：呼吸道重塑的病理變化與病理機轉 | 4 |
| 2-1：上皮脫落 | 4 |
| 2-2：下上皮纖維化 | 5 |
| 2-3：呼吸道平滑肌的肥大與增生 | 7 |
| 2-4：黏膜下腺體增生 | 7 |
| 2-5：血管新生 | 8 |
| 2-6：基質金屬蛋白酶的調控 | 8 |
| 2-7：纖維球與纖維母細胞的角色 | 11 |
| 2-8：呼吸道平滑肌的角色 | 12 |
| 第三節：High mobility group box 1 所扮演的角色 | 12 |
| 3-1：HMGB1 簡介 | 12 |

| | |
|----------------------------|----|
| 3-2 : HMGB1 與肺部疾病的關連性 | 15 |
| 3-3 : HMGB1 與細胞轉移及細胞增生的關連性 | 16 |
| 第二章 研究動機 | 18 |
| 第三章 實驗方法與材料 | 19 |
| 第 1 節 : 化學藥劑 | 19 |
| 第 2 節 : 緩衝液配方 | 20 |
| 第 3 節 : 使用細胞株背景資料 | 21 |
| 第 4 節 : 培養細胞使用培養基 | 21 |
| 第 5 節 : 使用藥物 | 21 |
| 第 6 節 : 細胞毒性實驗 | 24 |
| 第 7 節 : 細胞增生實驗 | 25 |
| 第 8 節 : 細胞移行實驗 | 26 |
| 第 9 節 : 蛋白激酶抑制後細胞移行實驗 | 27 |
| 第 10 節 : 酵素活性實驗—明膠電泳 | 28 |
| 第 11 節 : 西方墨點法 | 30 |
| 第 12 節 : 即時定量聚合酶連鎖反應 | 34 |
| 第 13 節 : 統計方法 | 36 |
| 第四章 實驗結果 | 38 |
| 第五章 討論 | 42 |

| | |
|----------|----|
| 第六章 結論 | 48 |
| 實驗結果 圖表 | 49 |
| Figure 1 | 49 |
| Figure 2 | 50 |
| Figure 3 | 51 |
| Figure 4 | 52 |
| Figure 5 | 53 |
| Figure 6 | 54 |
| Figure 7 | 55 |
| Figure 8 | 57 |
| Figure 9 | 58 |
| 參考文獻 | 59 |



第一章 緒論

第 1 節：慢性氣喘的簡介

慢性氣喘是造成肺功能慢性長期減低的呼吸道疾病之一。於各種阻塞性呼吸道疾病中，慢性阻塞性肺病（chronic obstructive pulmonary disease, COPD）廣泛的被認為會導致肺功能的長期下降，其包含了不可逆的呼吸道阻塞（irreversible airway obstruction）。相對於慢性阻塞性肺病，氣喘的可逆性呼吸道阻塞（reversible airway obstruction）是一個生理性特點（*Spertini, Raymond et al. 2009*）。氣喘形成有兩大因素；一是過敏體質，或稱為異位性體質，也就是一種遺傳因素，父母親中一人有過敏體質，則小孩 1/3 會有過敏體質，若是父母兩人都有過敏體質，則小孩有 60 % 的機率會有過敏體質。至於氣喘病方面，父母都有氣喘病，則孩子得氣喘病之機率是 100%（*Dold, Wjst et al. 1992*）。而光是過敏體質並不會造成氣喘病，必須加上環境因素，也就是過敏原，在台灣常見的過敏原最常見是塵蟎、蟑螂、家塵、貓狗毛屑、黴菌等。當體質與環境因素加在一起，會造成不正常的免疫反應，在支氣管黏膜造成一種持續的發炎狀態，再加上誘發因素時會造成發作，例如天氣的變化、二手菸、呼吸道感染、油漆、廚房的油煙、空氣污染、冰的食物、心理壓力等等（*Andrae, Axelson et al. 1988*）。

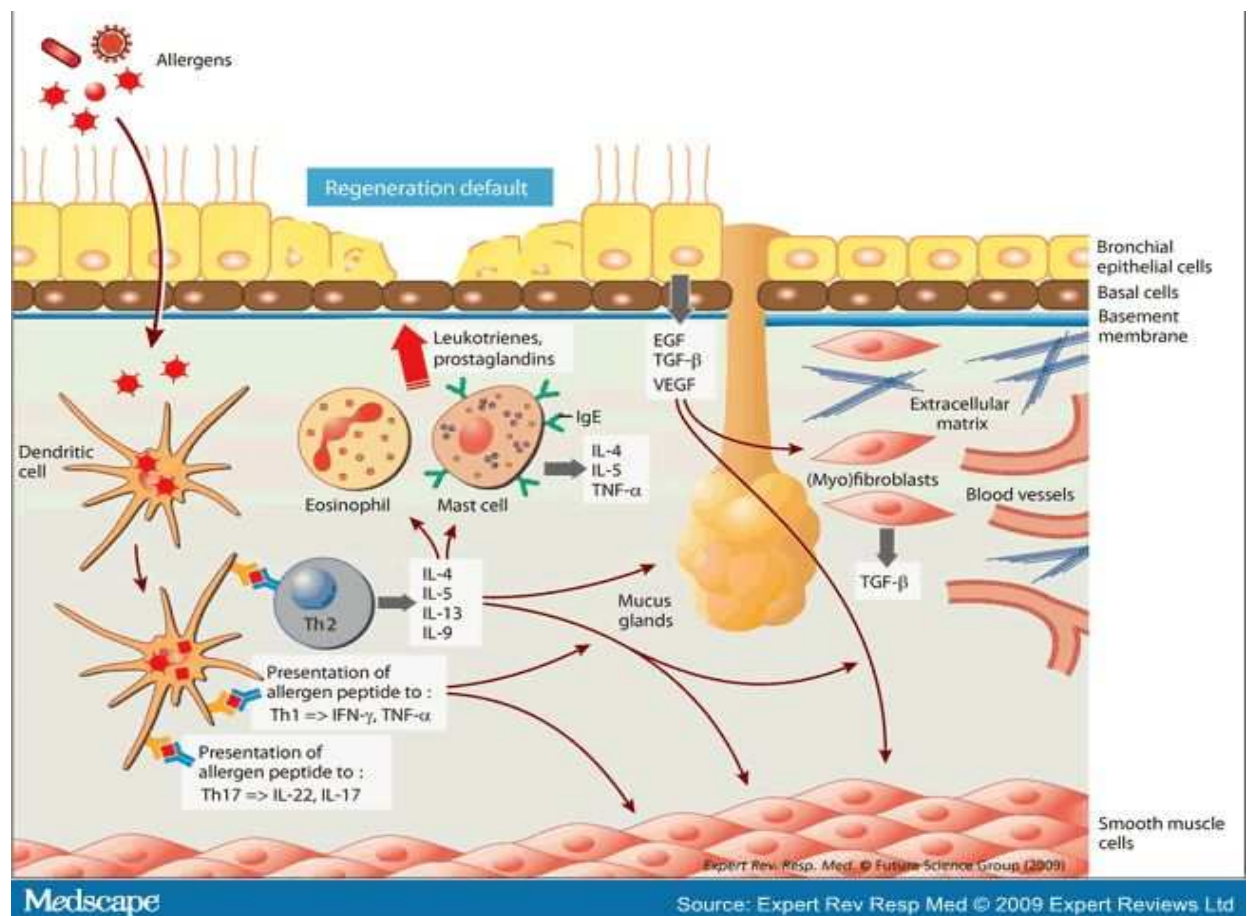
綜合上述，有過敏體質的人，在接觸過敏原時，體內免疫系統異常反應，而導致支氣管慢性發炎、狹窄及收縮，引起咳嗽、呼吸急促、呼氣時有喘鳴聲等症狀，嚴重時可因呼吸困難而致命。氣喘病的發作是陣發性的，因此是一種反覆發作的慢性疾病。

近年來，對於氣喘病的發病機制已有很清楚的了解，使支氣管收縮、狹窄，長久以後纖維化。所以，治療上並不只是在發作時使用支氣管擴張劑緩解支氣管收縮而已，還必須考慮慢性發炎的因子，抑制此發炎反應才能作更有效的控制。

1-1 氣喘的產生與細胞免疫反應

慢性氣喘的造成起因於持續性的免疫反應，在過敏原持續性暴露在呼吸道中，在呼吸道的數突狀細胞 (dendritic cells) 接觸到了侵入呼吸道的過敏原後利用 MHC class II 將抗原肽呈現給第二型 T 輔助型細胞；同時他也會呈現給第一型 T 細胞與第十七型 T 細胞，三種類型的 T 細胞將會產生細胞激素，第二型 T 輔助細胞產生的 Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-9, Interleukin-13 會去刺激並活化嗜酸性白血球與肥大細胞去產生更多的細胞激素；嗜酸性白血球則會從血流中移行至肺部的黏液腺，並且會釋放白三烯素 (leucotrienes) 與前列腺素 (prostaglandins) 造成支氣管上皮的傷害。受損的支氣管上皮會產生生長因子如 epithelial growth

factor (EGF) 及 transforming growth factor (TGF)-beta 去活化上皮下層的肌纖維母細胞使其增生並且有細胞肥大的情況，vascular endothelial growth factor (VEGF) 會使支氣管壁新生血管。在這些情形交互之下最後會造成呼吸道重塑的現象產生。(如圖一所示)



圖一：慢性氣喘時造成的免疫反應(Spertini, Raymond et al. 2009)過敏原侵入基底膜內受到樹突狀細胞所接受並且將其抗原呈現給不同類型的輔助 T 細胞如 Th2, Th1 及 Th17 並且經由活化這些 T 細胞產生細胞激素，Th2 細胞產生的細胞激素會去刺激嗜酸性白血球活化並且移動到黏液腺並且產生具有細胞毒性的脂質蛋白 leukotrienes 與 prostaglandins 使支氣管上皮受到損傷，且透過 IgE 使肥大細胞活化產生更多的促發炎細胞激素；受損傷的上皮細胞因受損而產生生長因子如 transforming growth factor-beta(TGF-beta) 及 Epithelial growth factor (EGF)，生長因子造成了肌纖維母細胞的增生及造成基底膜的厚度增加，同時也因為血管生長因子的刺激使黏液腺區域產生新生血管，生長因子與促發炎細胞激素的影響讓肺部平滑肌細胞增生

1-2 氣喘的治療

在一般狀況下，在充足的治療下，氣喘造成的肺功能損傷可以被控制在較小的程度。目前吸入性類固醇（inhaled corticosteroids）在治療上已被全世界廣泛使用，但是有醫生發現到呼吸道阻塞仍舊會發現於部分使用口服類固醇、吸入性類固醇與支氣管擴張劑的氣喘病患身上。有文獻指出，因氣喘死亡的病患其氣道的厚度可增加 50% 至 300% 不等，而屬於輕度氣喘的患者其氣道壁也有 10% 至 100% 不等的增加（James, Maxwell et al. 2002）

第 2 節：呼吸道重塑的病理變化及病理機轉

呼吸道阻塞被認為主要原因是在於呼吸道重塑（airway remodeling）。構成呼吸道重塑的變化像是上皮脫落（epithelial detachment）、下上皮纖維化（subepithelial fibrosis）、氣道平滑肌肥大增生（airway smooth muscle hypertrophy / hyperplasia）、杯狀細胞與黏膜下腺體增生（goblet cells and submucosal glands hyperplasia）及血管新生（angiogenesis）。其中的病理特徵分述如下（見圖二）：

2-1 上皮脫落（Epithelial detachment）：

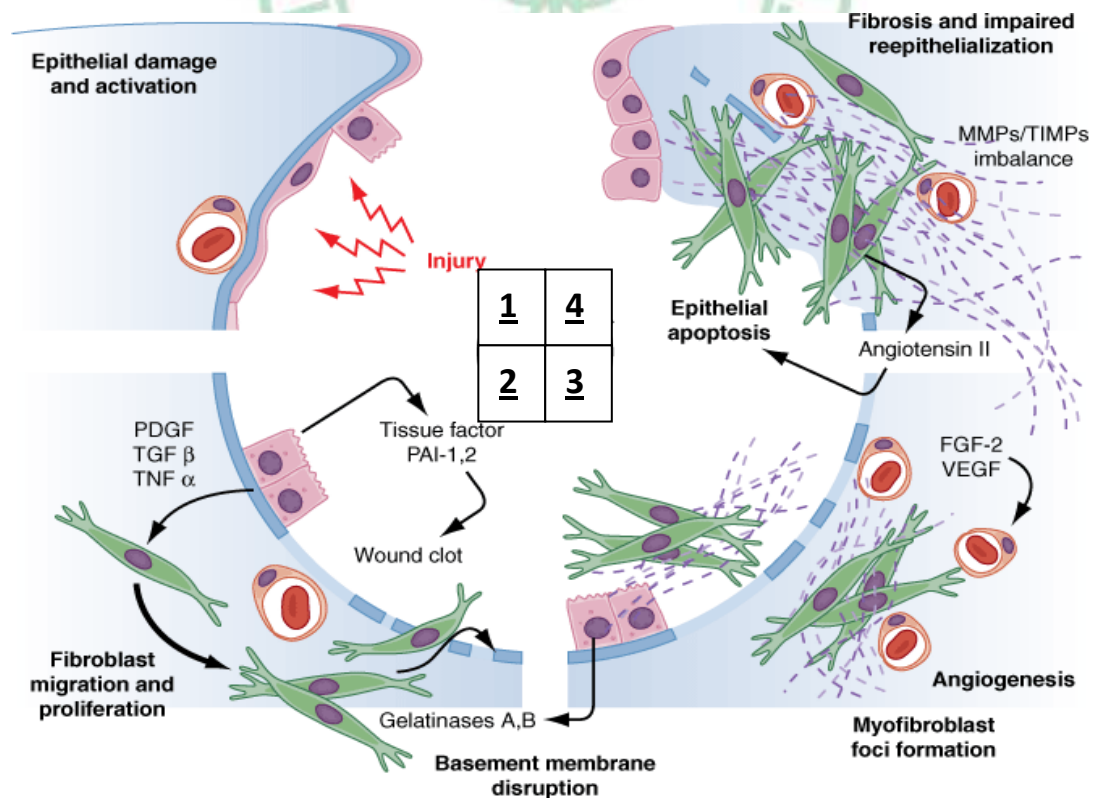
正常人的呼吸道也會有上皮脫落的現象，但在一些文獻報告中指出氣喘患者皆有這樣的情形而且比起正常人更容易有細胞凋亡的

(Ordonez, Ferrando et al. 2000; Bucchieri, Puddicombe et al. 2002; Trautmann, Schmid-Grendelmeier et al. 2002)這可能與過度的呼吸道發炎以及呼吸道收縮反應有關。

2-2 下上皮纖維化 (Subepithelial fibrosis):

下上皮纖維化的區域在基底膜以下。氣喘病人的基底膜下層是被緊密的膠原纖維所取代，起因是發炎細胞產生的細胞激素，造成了纖維母細胞向下上皮區域轉移及活化造成 (Roche, Beasley et al. 1989)。纖維化反應是組織傷害的修復過程中的現象之一。氣喘的慢性呼吸道發炎會使上皮受到傷害，而跟隨而來的修復組織會造成基底膜的厚度增加，此為氣喘的典型情形，在早期文獻也有此一報告。在文獻中利用光學顯微鏡發現到的基底膜增厚可以相對應於電子顯微鏡中看見的上皮下區域的細胞外間質沉積 (deposition of extracellular matrix)，此一現象稱做下上皮纖維化。沉積的細胞外基質包括了第三型、第五型的膠原蛋白，而造成細胞外基質沉積的其中一項機制被認為是一種合成與破壞的不平衡導致 (Yamauchi and Inoue 2007)。如嗜酸性白血球等發炎細胞在穿透基底膜的過程中，會釋放基質金屬蛋白酶 gelatinase A 與 gelatinase B (MMP-2 與 MMP-9) 來破壞基底膜的組成物。同時組織會釋放抑制 MMP-9 的物質-TIMP-1，TIMP-1 會抑制細胞外基質的破壞，從而形成細胞外基質

的沉積與基底膜的增厚 (Okada, Kita et al. 1997)。在研究中顯示，氣喘患者的肺泡灌洗液中，MMP-9 及 TIMP-1 其總量都有增加，這個現象與呼吸道阻塞的程度呈現了一個顯著的關連性 (Kelly and Jarjour 2003)。除了 MMP-9 對於 TIMP-1 的調控性造成 TIMP-1 的增加，細胞激素像是 TGF-beta1、InterLeukin-13 皆都會造成 TIMP-1 的直接增加與間接增加，而這些細胞激素都會經由各種細胞如巨噬細胞、淋巴細胞、纖維母細胞、呼吸道上皮細胞、嗜酸性白血球以及肥大細胞產生 (Ohno, Nitta et al. 1996; Vignola, Chanez et al. 1997)。此說明了細胞外基質沉積是經由在 Th2 細胞激素為主的持續性發炎反應中進行的 (Zhou, Hu et al. 2007)。

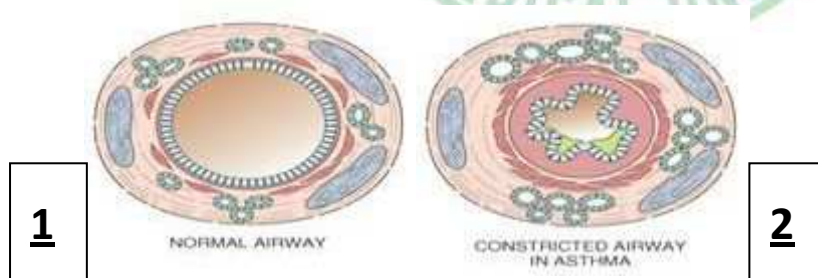


Source: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: <http://www.accessmedicine.com>
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

圖二: (*M Selman et al, 2001*)為下上皮纖維化的示意圖。1. 肺泡上皮細胞受到傷害會造成其活化；2. 活化後的上皮細胞會產生生長因子如 platelet-derived growth factor (PDGF)、transforming growth factor β (TGF- β)、tumor necrosis factor α (TNF- α)使纖維母細胞增生與易位，及組織因子 plasminogen activator inhibitor 1, 2 (PAI-1, PAI-2)會促成受傷組織凝固並放出基質金屬蛋白酶 Gelatinase A 與 B 來破壞基底膜達到纖維母細胞及肌纖維母細胞易位；3. 易位的纖維母細胞與肌纖維母細胞會釋放以膠原蛋白為主的細胞外基質蛋白，而產生的血管新生因子如 vascular endothelial growth factor (VEGF) 及 fibroblast growth factor 2 (FGF-2) 會造成血管新生；4. 在細胞外基質蛋白釋出的情形下為平衡而產生的膠原蛋白酶與基質金屬蛋白酶抑制因子緩慢交互作用的結果造成了細胞外基質沉積，肌纖維母細胞產生的血管收縮素 II 會造成肺泡上皮細胞的凋亡，最後造成纖維化的結果。

2-3 呼吸道平滑肌的肥大與增生 (Airway smooth muscle hypertrophy / hyperplasia):

平滑肌質量的增加包含肥大及增生變化。肥大是指平滑肌細胞變大，增生則是指平滑肌細胞變多。氣喘病人的呼吸道平滑肌細胞肥大增生的情形都相當的靠近上皮細胞，且位置集中於主呼吸道，支氣管及細支氣管，所以有些研究顯示這些平滑肌細胞可能由周邊組織所轉化或轉移而來的 (Fernandes, Mitchell et al. 2003)，如圖三。



圖三: (*MBBS ; Humanity first*)圖 1 為正常的呼吸道；圖二為平滑肌肥大化與增生後的呼吸道。

2-4 黏膜下腺體增生 (submucosal glands hyperplasia):

黏膜下腺體是黏液性醣蛋白的製造來源，上皮生長因子受器 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的活化對於黏液蛋白的

製造扮演重要角色。在氣喘病患的呼吸道上皮中，EGFR 有明顯的增加，在老鼠的實驗模型中，EGFR 的活化也會造成黏液糖蛋白產生增加(Amishima, Munakata et al. 1998)。許多的細胞激素的刺激亦可導致黏液蛋白的過度分泌。因黏液蛋白的過度分泌，會讓呼吸道的管徑狹窄，也是造成氣喘病患進一步阻塞的原因之一 (Shim, Dabbagh et al. 2001)。

2-5 血管新生 (angiogenesis):

從傳統的支氣管切片檢查即可觀察到輕度的氣喘病患支氣管血管新生的變化 (Li and Wilson 1997)。而有文獻指出經由哮喘病患的支氣管黏膜也可以觀察到增加的新生血管(Tanaka, Yamada et al. 2003)。

2-6 基質金屬蛋白酶 (Matrix Metalloproteinases, MMPs) 的調控

而造成基底膜破壞與纖維母細胞移行增生促成細胞外基質沉積最主要調控酵素就是基質金屬蛋白酶的作用造成。可以被追訴到最早發現的基質金屬蛋白酶為在 1962 年初由蝌蚪尾巴發現的間質性膠原蛋白酶 (interstitial collagenase) 是最先被描述與純化出來的 MMP，MMPs 參予了多種生理功能，如創傷的癒合 (wound healing)、結締組織重建與修補 (remodeling and repair)、排卵

(ovulation)、骨生長與重塑 (bone growth and remodeling)與血管新生 (angiogenesis)。在病理如癌症細胞的轉移、關節炎及多發性硬化症 (Bafetti, Young et al. 1998; Vu, Shipley et al. 1998; Vu and Werb 2000; Opdenakker, Nelissen et al. 2003; Fingleton 2007)，基質金屬蛋白酶的活化與會抑制他作用的抗基質金屬蛋白酶組織因子 (tissue inhibitors of MMPs, TIMPs)與細胞外基質的代謝有重要的調節作用。基質金屬蛋白酶的種類目前已知有 20 種之多，分類上可以分成 collagenases, gelatinases, stromelysins, macrophage, metalloelastase, matrilysin and membrane type MMPs (Sbardella, Fasciglione et al. 2012)。有文獻研究說明在肺部纖維化疾病之一的肺泡下上皮纖維化會發現到間質細胞如纖維母細胞，以及免疫細胞從間質轉移到肺泡 (Basset, Okada et al. 1997)。而福田 (Fukuda, Ishizaki et al. 1998) 等人的研究發現到了在特定性肺部纖維化的肺泡內纖維化區域偵測到了細胞外基質蛋白諸如 fibronectin、collagens-I, III and IV；也在肺泡內纖維化區域偵測到基質金屬蛋白酶的 MMP-1、MMP-2、MMP-9 及抗基質金屬蛋白酶組織因子 TIMP-2 包覆在重生的上皮細胞。然而哪些細胞會產生 MMPs 與如何調控？基質金屬蛋白酶屬於一 Zn(鋅)依賴型-內肽酶，其結構均以 N 端組成的一個 signal peptide 或 propeptide，

與含有一個具高度保留性的鋅所結合的催化區域 (catalytic domain) 及 C 端 結構類似的 hemopexin 及 vitronectin 所形成的酶原 (proenzymes) 方式分泌存在，它們必需經由活化作用才具有蛋白分解活性，。正常的生理情況下，基質金屬蛋白酶通常不表現於靜止狀態下之組織或細胞，它的表現是當細胞外間質發生重建時才會誘發分泌。基質金屬蛋白酶基因表現主要受到轉錄層次

(transcriptional level) 的調控 (Johnsen, Lund et al. 1998)，在誘發性基質金屬蛋白酶基因，包含了 MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13 的啟動子區域都具有 AP-1 (activator protein-1)、PEA3 (polyoma enhancer A binding protein-3)、TIE (TGF- β inhibitory element)、GC、Sp-1 binding site、SBE (STAT binding element)、C/EBP- β (CCAAT/enhancer binding protein- β)、OSE-2 (osteoblast-specific element-2)、SPRE (stromelysin-1 PDGF-responsive element)、TRF (octamer binding protein)、Sil (silencer sequence)、NF- κ B (nuclear factor kappa binding protein)、NF-1 (nuclear factor-1) 及 RARE (retinoic acid responsive element) 等保留性調節單元的轉錄因子。這些轉錄因子的表現會受到腫瘤細胞或基質細胞及活化免疫細胞釋放的訊息而調

控，如細胞激素 (cytokines)、生長因子 (growth factor)及致癌基因 (oncogene)，此外在細胞型態改變或者因環境壓力刺激會活化 mitogen-activated protein kinase (MAPK, ERK, JNK/SAPK, p38) 訊息傳遞路徑，結合至基質金屬蛋白酶基因啟動子上的 AP-1 及 ETS 轉錄因子，誘發調控基質金屬蛋白酶的轉錄表現 (Robinson and Cobb 1997; Lewis and Norman 1998)。

2-7 纖維球及纖維母細胞的角色

有一項研究顯示出血液中有一類似纖維母細胞 (fibroblasts) 的纖維球 (fibrocytes) (Quan, Cowper et al. 2004)。由骨髓產生後釋放至血液中的纖維球可以移行至組織受傷部位，作為纖維母細胞與肌纖維母細胞的來源的重要角色，參與組織修復的過程 (Abe, Donnelly et al. 2001)。在 Schmidt 等學者的研究文獻中指出 (Schmidt, Sun et al. 2003)，在過敏性氣喘的患者暴露於過敏原中，造成了類似纖維球的細胞聚集在支氣管黏膜。這些細胞經過實驗證實其具有 CD34 的陽性反應同時也有表現第一型膠原以及 alpha-平滑肌肌動蛋白 (alpha-smooth muscle actin, α -SMA)，並且聚積在上皮下的膠原沉積處。另外在前人研究中顯示，血液中的纖維球經促進纖維化的細胞激素刺激後，可以轉化成為肌纖維母細胞，這樣的結果似乎說明了血液中的纖維球可以成為肌纖維母細胞的前驅細胞並且造

成氣喘患者的下上皮纖維化。

2-8 呼吸道平滑肌的角色

呼吸道平滑肌存在於氣管到末梢的細支氣管中，它被認為是調節支氣管運動張力的重要組織 (Gunst and Tang 2000)。許多證據指出呼吸道平滑肌除了是被動的角色外亦可參與呼吸道發炎與重塑的進行 (Amrani and Panettieri 2003)。呼吸道平滑肌的變化會受到細胞激素與細胞外間質的影響，導致氣道過度反應。

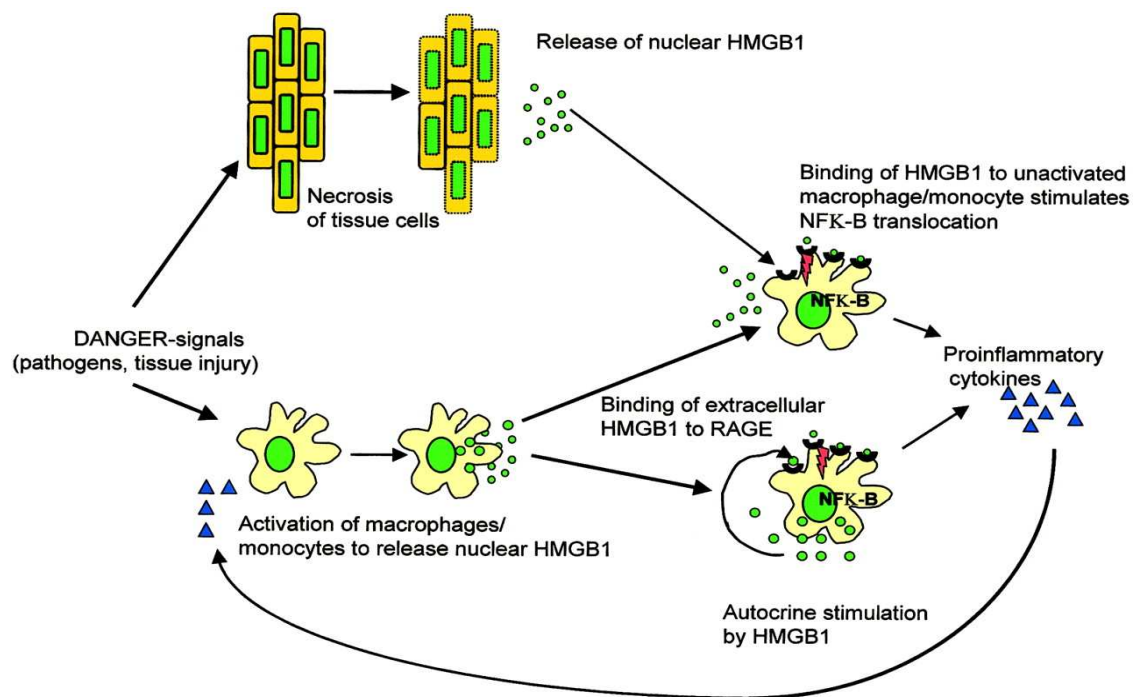
第 3 節：High mobility group box 1 (HMGB1) 所扮演的角色

3-1 HMGB1 簡介

High mobility group box 1 proteins (HMGB1) 是在 1973 年被發現的 (Goodwin, Sanders et al. 1973)。HMGB1 的蛋白結構如圖四。HMGB1 為一與染色質有關的蛋白並參與了 DNA 的調節與轉錄。HMGB1 是 HMG proteins 裡的一族，它與 DNA 的鍵結是屬非專一性的 (Bustin 1999)。HMGB1 在早期的研究發現為一個 DNA 結合蛋白，可以維持 nucleosome 的結構，調控基因轉錄及活化 DNA 重組、修復與複製的功能 (Landsman and Bustin 1993)。

圖六: (Lotze and Tracey 2005) HMGB1 在細胞核內與核外的角色。 a. 在細胞核內，HMGB1 與 DNA 結合並且會調節 DNA 上轉錄因子； b. 在神經系統發育與軸突損傷中，HMGB1 會表現在軸突細胞表面被發現其會促進軸突出芽生長與突起的生長，此外也會表現在癌症細胞表面促進細胞移行與癌症轉移； c. 在細胞外時他會結合細胞表面受器 RAGE、TLR2 或 TLR4，使 NF- κ B translocation 進入細胞核內； d. HMGB1 會透過活化的免疫細胞如巨噬細胞及突觸細胞，這些細胞他們會透過細胞激素或是內毒素的刺激而活化，由於活化免疫細胞產生了過乙酰化的 HMGB1 聚集在分泌出去的溶酶體且以此釋放出細胞外； e. 在細胞壞死的過程中會經由細胞核內釋放，細胞死亡可能是因為發炎或是修復造成； f. 倘若細胞是經由細胞凋亡或是經由 UV 的影響，HMGB1 則會被留置於細胞核內並且不會釋放出細胞外。

在發炎反應的損傷中如：肺部纖維化疾病、巨噬細胞或其他免疫細胞的活化都會增加 HMGB1 的反應，同時 HMGB1 也會刺激下游細胞激素的反應。許多細胞的表現量增加以及發炎的細胞激素分泌都會促使 HMGB1 增加樹突狀細胞 (dendritic cell) 的成熟 (Messmer, Yang et al. 2004)。被 HMGB1 刺激的單核球 (monocytes) 會增加黏附作用以及釋放許多的細胞激素和發炎反應物質 (Rouhiainen, Kuja-Panula et al. 2004; Kokkola, Andersson et al. 2005)。這些影響都會伴隨著其他的細胞激素而增加 (DeMarco, Fink et al. 2005)。嗜中性白血球被 HMGB1 刺激則會增加 MAC-1 和 RAGE，因此而活化這些細胞黏附及轉移的能力 (Orlova, Choi et al. 2007)。



圖六: (Abraham, Arcaroli et al. 2000) HMGB1 造成發炎反應的擴大

3-2 HMGB1 與肺部疾病的關連性

在肺部，急性肺部損傷的病人及給予小鼠 LPS 都會增加血液及肺沖洗液 (BALF) HMGB1 的表現 (Ueno, Matsuda et al. 2004)；以氣管滴入方式給予小鼠 HMGB1 會引發急性肺部損傷、肺水腫、增加肺部 TNF、IL-1 β 、MIP-2 的表現 (Abraham, Arcaroli et al. 2000)；在肺部纖維化疾病如 cystic fibrosis 發現 HMGB1 的表現量增加，而給予 HMGB1 會造成肺部嗜中性白血球入侵及肺部間質降解產物 proline-glycine-proline (PGP) 的產生 (Rowe, Jackson et al. 2008)。因此 HMGB1 與肺部纖維化應有關連。在動物實驗部份，Sato 等人 (Sato, Suzuki et al. 2000) 利用 bleomycin 誘發肺炎後

造成肺部纖維化的動物模式中發現到 HMGB1 在 BALF 中的濃度增加，此外他們發現到 HMGB1 對人類肺部纖維母細胞增生有促進的影響性存在。這些都說明了 HMGB1 對於肺部纖維化的關聯性。

3-3 HMGB1 對於細胞轉移與細胞增生的關連性

近年的文獻說明 HMGB1 會促進細胞的轉移， 研究表示 HMGB1 會促使人類的樹突狀細胞其活化並且會造成細胞轉移 (Yang, Chen et al. 2007)，Taguchi 等人發現了 HMGB1 對腫瘤細胞的轉移佔有很大的關係 (Taguchi, Blood et al. 2000)。除了免疫細胞與腫瘤細胞之外，在其他細胞像是角質細胞 (keratinocytes)、平滑肌細胞 (smooth muscle cell)、膠質瘤細胞 (glioma cell) 及間質血管幹細胞 (mesoangioblasts) 則是有發現到 HMGB1 具有促進這些細胞轉移的能力 (Palumbo, Sampaolesi et al. 2004; Bassi, Giussani et al. 2008; Ranzato, Patrone et al. 2010)，在影響細胞轉移的訊息傳遞路徑中，角質細胞發現可能是透過 ERK1/ERK2 蛋白激酶的訊息傳遞所造成 (Ranzato, Patrone et al. 2010)；活化的免疫細胞如巨噬細胞則是發現到 HMGB1 會透過 toll-like receptor 2 或 4 (TLR2, TLR4) 經由 MyD88 途徑刺激 serine / threonine kinase (IRAK) 而活化 MAP kinase 途徑或是直接造成 I κ B 的 degradation ；亦或是經過 receptor for advanced glycation end products (RAGE) 此

細胞表面的受器，刺激 ras 的訊息傳遞而活化 MAP kinase 途徑產生更多的促發炎激素與發炎激素使免疫反應擴大 (Abraham, Arcaroli et al. 2000 ; Yang, Chen et al. 2007)。此外 HMGB1 會透過 RAGE 受器去刺激 CDC42 與 Rac (guanosine triphosphatases) 的活化並刺激神經細胞發展時突起的生長 (neurite growth) (Huttunen, Fages et al. 2002)。



第二章 研究動機

呼吸道重塑是慢性氣喘重要致病機轉，呼吸道的增厚以及下上皮的纖維化是呼吸道重塑的最主要成因之一，而此現象與纖維母細胞的聚集有相關性存在。如諸論文獻中提到 HMGB1 對纖維母細胞移行以及細胞增生有一定的影響性，因此在我們的研究中，我們將針對 HMGB1 對於人類肺部纖維母細胞的細胞移行與細胞增生的作用與機制進行探討。



第三章 實驗材料與方法

第 1 節 化學藥劑 (chemicals)

| 試劑名稱 | 廠牌 |
|---|--------------------|
| Acrylamide | AMRESCO, USA |
| Ammonium peroxodisulfate (APS) | MERCK, DE |
| Ammonium chloride (NH ₄ Cl) | Sigma-aldrich, USA |
| Albumin, from bovine serum (BSA) | Sigma-aldrich, USA |
| L-Ascorbate (L-form vit. C) | Sigma-aldrich, USA |
| Bromophenol blue | BioShop, CA |
| Chloroform (CHCl ₃) | J. T. Baker, USA |
| Calcium chloride (CaCl ₂) | BioShop, CA |
| Coomassie blue | BioShop, CA |
| Dimethyl sulfoxide (DMSO) | Sigma-aldrich, USA |
| Ethanol (C ₂ H ₅ OH) | MERCK, DE |
| Glycine | Bio Basic, CA |
| Glycerol | BioShop, CA |
| Gelatin, from bovine skin | Sigma-aldrich, USA |
| Isopropanol | Sigma-aldrich, USA |
| Methanol (CH ₃ OH) | MERCK, DE |
| Nonidet P40 | BioShop, CA |
| Potassium chloride (KCl) | J. T. Baker, USA |
| Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄) | J. T. Baker, USA |
| Potassium hydrogen carbonate (KHCO ₃) | J. T. Baker, USA |
| Sodium azide (NaN ₃) | MERCK, DE |
| Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃) | AMRESCO, US |
| Sodium chloride (NaCl) | Sigma-aldrich, USA |
| Sodium hydroxide (NaOH) | MERCK, DE |
| Sodium phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄) | MERCK, DE |
| Sulfuric acid (H ₂ SO ₄) | Sigma-aldrich, USA |
| Sodium dodecyl sulfated (SDS) | BioShop, CA |
| TEMED | BioShop, CA |
| TRIS | Bionovas, CA |

| | |
|------------------------------------|--------------|
| Trypan-blue | AMRESCO, USA |
| Tween-20 | BioShop, CA |
| Triton X-100 | BioShop, CA |
| Zinc chloride (ZnCl ₂) | Panreac, ES |
| | |

第 2 節 緩衝液配方 (buffer solution)

RIPA lysis buffer pH 7.4 500ml

| Component | ml / 500/ml |
|---------------------|-------------|
| 1M Tris-HCl pH 7.4 | 25ml |
| 5M NaCl | 15ml |
| 0.5M EDTA | 15ml |
| 20% Triton X-100 | 12.5ml |
| 10% Nonidet P-40 | 50ml |
| dd H ₂ O | 382.5ml |

10X PAGE running buffer pH 8.4 1L

| Component | g/1L |
|-----------|------|
| Tris base | 30g |
| Glycine | 144g |

溶解完全後將 pH 調至 8.4 再補 dd H₂O 至 1L

10X TBS pH 7.4 1L

| Component | g/1L |
|-----------|---------|
| NaCl | 87.66g |
| Tris base | 121.14g |

溶解完全後將 pH 調至 7.4 再補 dd H₂O 至 1L，滅菌

10X PBS pH 7.4 1L

| Component | g/1L |
|--|--------|
| Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O | 28.71g |
| NaCl | 80g |
| KH ₂ PO ₄ | 2g |
| KCl | 2g |

加入 dd H₂O 溶解完全後，pH 調整至 7.4 再補 dd H₂O 到 1L，滅菌

第 3 節 使用細胞株背景資料:

WI-38：為人類肺部的纖維母細胞，來源為一般人類正常情況下的肺部，細胞特性屬於貼附型細胞，他的複製期為 24 小時，細胞購自財團法人食品工業發展研究所/生物資源保存及研究中心。

第 4 節 培養細胞使用培養基:

使用之培養基為 MEM alpha Modification (1X) 購買自 HyClone；培養基使用的血清 Fetal Bovine Serum 購買自 GIBCO。

第 5 節 使用藥物:

細胞激素 (cytokine):

Recombinant human High-mobility group box 1 protein (Amphoterin ; HMGB1) :購自 SIGMA-ALDRICH (Catalog Number H4652)，為 *E. coli* 所表現的人類來源的重組蛋白。Recombinant HMGB1 High-mobility group box 1 protein (Amphoterin ; HMGB1) : 購買自 R&D systems (Catalog Number 1690-HM)，為小鼠骨髓瘤細

胞所表現的人類來源的重組蛋白。 Recombinant human TGF- β_1
 (Transforming growth factor-beta1) : 購買自 PEPROTECH, 為 HEK293
 cells 所表現的人類來源的重組蛋白。

蛋白激酶抑制劑(protein kinase inhibitor) : 全部皆購自
 SIMGA-ALDRICH, USA。

| 抑制劑名稱 | 抑制劑主要功用 | Catalog No. |
|-----------|--|-------------|
| SP600125 | c-Jun N-terminal kinase (JNK) | 129-56-6 |
| SB203580 | p38 MAP kinase | 152121-47-6 |
| LY294002 | phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) | 934389-88-5 |
| PD98059 | Extracellular signal-regulated kinases (ERK) | 167869-21-8 |
| BAY117082 | nuclear factor of kappa B (NF- κ B) | 19542-67-7 |
| SB415286 | Glycogen synthase kinase-3 | 264218-23-7 |

西方墨點法使用之抗體:

一級抗體 :

| 抗體種類 | 廠牌 |
|---|---------------------|
| Mouse-anti-human beta-actin antibody | Gene Tex, USA |
| Rabbit-anti-human Lamin a/c antibody | cell signaling, USA |
| Rabbit-anti-human Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) antibody | epitomic, USA |
| Mouse-anti-human RAGE antibody | Gene Tex, USA |
| Mouse-anti-human toll-like receptor 4 antibody | epitomic, USA |
| Mouse-anti-human toll-like receptor 2 antibody | epitomic, USA |

| | |
|--|---------------------|
| Rabbit-anti-human Akt antibody | epitomic, USA |
| Rabbit-anti-human phosphor-Akt antibody | epitomic, USA |
| Rabbit-anti-human phosphor-GSK3 beta antibody | epitomic, USA |
| Rabbit-anti-human phosphor-IkappaB alpha antibody | Cell signaling, USA |
| Mouse-anti-human NF- κ B p65 antibody | Cell signaling, USA |
| Rabbit-anti-human beta-catenin antibody | epitomic, USA |
| Rabbit-anti-human phosphor-p38 MAP kinase antibody | epitomic, USA |
| Mouse-anti-human p38 kinase antibody | Santa cruz, USA |
| Mouse-anti-human ERK antibody | Santa cruz, USA |
| Mouse-anti-human phosphor-ERK antibody | Santa cruz, USA |
| Mouse-anti-human JNK antibody | Santa cruz, USA |
| Mouse-anti-human phosphor-JNK antibody | Santa cruz, USA |

藥物與 Kit:

Thiazolyl Blue (MTT)購自 AMRESCO, USA ; Cell proliferation ELISA 購買自 Roche, DE ; 細胞核酸的純化使用的 REzol C & T RNA isolation solution 購買自 PROTECH 。

Real-time PCR 所使用引子:

使用的引子是用 applied biosystems 引子設計軟體 primer express 設計後請 MISSION BIOTECH (MISSION BIOTECH, USA) 製作 (引子來源的完整 DNA 資訊取自於 NCBI 核酸資料庫網站)。

| Primer 種類 | Forward | Reverse |
|-------------|-----------------------|------------------------|
| Human MMP-9 | CGCGCTGGGCTTAGATCAT | GGTGCCGGATGCCATTC |
| Human TLR2 | TTGTGACCGCAATGGTATCTG | GCCCTGAGGGAATGGAGTTTA |
| Human TLR4 | TGGTGTCCCAGCACTTCATC | GCCAGGTCTGAGCAATCTCATA |
| Human RAGE | GAGCCAGAAGGTGGAGCAGTA | GCAAGGGCACACCATCCT |
| Human GAPDH | TGCACCACCAACTGCTTAGC | TCTTCTGGGTGGCAGTGATG |

第 6 節 細胞毒性實驗 (Cell viability)

實驗目的：

為了了解 HMGB1 對於 WI-38 是否具有細胞毒性，我們決定利用 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay 作為細胞毒性測試，其原理是利用細胞內粒線體的琥珀酸去氫酶作用使 MTT 的 tetrazolium 轉變成藍色的 MTT formazan，加入了 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 後去測量吸光值 570nm 即可得到細胞還原 MTT 的能力，即表示粒線體的活性。

實驗步驟：

1. 我們使用低血清培養基 MEM-alpha (FBS0.5%, PSA 1%, vitamin C 50ng/ml)我們將細胞種入 96 well 細胞培養盤，每個 well 內含 1×10^4 細胞，並待其貼附 24 小時。
2. 不換掉培養基，加入 HMGB1 濃度分別為 1ng/ml、10ng/ml、100ng/ml 及對照組，經過 21 小時後，加入 MTT 溶於低血清培養基 (濃度 2mg/ml) 後每個孔加入 50 μ l，後放回培養箱 3 小時後取出培養盤。
3. 去掉培養基並加入 DMSO 100 μ l，置於室溫下 10 分鐘後測量吸光值波長 570nm，設定背景吸光值波長 650nm。我們使用偵測吸光值波長的 ELISA reader 為 MULTISKAN EX microplate photometer (購自 Thermo, USA) 再利用後述的統計軟體與統計方式測定吸光值

代表的細胞死亡率

第 7 節 細胞增生實驗 (Cell proliferation)

實驗目的：

我們想看 HMGB1 對於 WI-38 是否具有提高細胞增生的效果，決定利用 BrdU assay；緣理則是利用 5-Bromodeoxy-uridine (BrdU) 在 DNA 複製過程中，BrdU 會進入新合成的鏈並且佔據 T 的位置，依據 DNA 的半保留複製規律，哺乳動物或者人的細胞會在含有 BrdU 的環境下被攝入，BrdU 會去標記細胞週期 S phase 的細胞，我們再以單株抗體去偵測 BrdU 量多寡來判定細胞增生量。

實驗步驟：

1. 我們利用低血清培養基 MEM-alpha 將細胞種入 96 well 細胞培養盤，每個 well 內種下細胞數為 5×10^3 ，等待 24 小時貼附後我們再以不同 HMGB1 濃度 (1ng/ml、10ng/ml、100ng/ml) 與其對照組，HMGB1 加入孔內 18 小時後再加入含 BrdU labeling 之低血清培養基 (濃度:100 μ M) 6 小時後再收下培養盤。
2. 吸除含 labeling 培養基，並於培養盤每個 well 加入 FixDenat solution 200 μ l，並於室溫靜置 30 分鐘，時間過後吸除 FixDenat solution 每個 well 加入 100 μ l peroxidase-conjugated anti-BrdU antibody (anti-BrdU-POD)，並置於室溫 90 分鐘。

3. 時間到了以後移除 BrdU-POD solution 並以 washing buffer (1X PBS) 每個 well 200 μ l 沖洗 3 次。
4. 之後在避光環境下加入 substrate solution 每個 well 100 μ l 置於室溫 30 分鐘。
5. 時間到了以後加入 stop solution (1M H₂SO₄) 每個 well 25 μ l 並以 300 轉的震盪器震盪約 1 分鐘，最後偵測吸光值波長 450nm (背景吸光值波長 690nm)。

第 8 節 細胞移行實驗 (Cell migration)

實驗目的：

我們為了評估 HMGB1 對 WI-38 細胞移行能力的影響，利用了細胞刮痕實驗 (In vitro scratch assay) 來觀測細胞移行，細胞貼附後我們以低血清培養基讓細胞達到 starvation 的環境，在 100% 細胞長滿單層厚再刮除細胞面產生一條刮痕線以不同濃度 HMGB1 去刺激 WI-38，來達到刺激 WI-38 的效果。

實驗步驟：

1. 將 WI-38 種入 24 well 細胞培養盤，每個 well 內有 5×10^4 的細胞。
2. 待細胞貼附後，利用低血清培養基 MEM-alpha (FBS 0.5%, PSA 1%, vitamin C 50ng/ml) 讓 WI-38 於 starvation 狀態 24 小時。

3. 時間過後以 100 μ l 微量吸管尖對每個 well 刮出一道直線痕跡，並吸除含有刮去細胞的 starvation 狀態培養基。
4. 加入新的低血清培養基並且以不同濃度的 HMGB1 去刺激。
(1ng/ml、10ng/ml、100ng/ml)
5. 經過 16 小時後吸除含 HMGB1 之低血清培養基後以 1X PBS 沖洗兩次後使用劉氏染色法染色，再風乾後以顯微鏡拍攝 migration 結果。

第 9 節 蛋白激酶抑制劑後細胞移行實驗：

實驗目的：

利用特定的蛋白質激酶抑制劑刺激 WI-38，在不傷害細胞存活的抑制劑濃度下再以作用濃度 HMGB1 去刺激 WI-38 來尋找 HMGB1 是否透過這些影響 migration 相關的蛋白激酶來造成細胞移行。

實驗步驟：

1. 將 WI-38 種入 24 well 細胞培養盤，每個 well 內有 5×10^4 的細胞。
2. 待細胞貼附後，利用低血清培養基 MEM-alpha (FBS0.5%, PSA 1%, vitamin C 50ng/ml) 讓 WI-38 於 starvation 狀態 24 小時。
3. 時間過後以 100 μ l 微量吸管尖對每個 well 刮出一道直線痕跡，並吸除含有刮去細胞的 starvation 狀態培養基。
4. 區分加入不同的蛋白激酶抑制劑與 HMGB1 作用濃度 (100ng/ml)

的組別，SP600125 (2 μ M)、SB203580 (2 μ M)、LY294002 (2 μ M)、PD98059 (2 μ M)、BAY117082 (1 μ M)、SB415286 (2.5 μ M)，加上對照組與抑制劑 DMSO 對照組，另外還有 HMGB1 作用對照組以及各抑制劑對照組

5. 抑制劑加入細胞後作用 10 分鐘後再加入可作用濃度 HMGB1 刺激 16 小時後收下培養盤。
6. 1X PBS 沖洗兩次；以劉氏染色法染色，風乾以後以電子顯微鏡觀察結果。

第 10 節 酵素活性實驗-明膠電泳 (Zymography)

實驗目的：

細胞移行通常會分泌基質金屬蛋白酶(MMPs)來幫助移行，我們希望可以利用細胞移行實驗所留下的培養基利用濃縮蛋白離心管純化後來測量細胞分泌的 MMPs；明膠電泳為一種高敏感度的分析法，可將 MMP-2 與 MMP-9 這兩個明膠酵素分離並且同時檢測他們的酵素活性。他的原理是利用明膠酵素分解明膠的特性，將加入明膠的 SDS-PAGE 將純化後的培養基執行電泳，由於 MMP-2 分子量為 72kDa 而 MMP-9 分子量是 92kDa，因此可以將兩者利用電泳分離，再經過 comassine blue 染色後褪染而可以看見 MMP-2 與 MMP-9 會分解明膠的特性而造成染色區域無法染上色，再以定量方式去測量 MMP-2 區域

與 MMP-9 區域的酵素活性。

實驗步驟：

培養基濃縮：利用 Centrifugal filter units 30K (cat no: UFC803024, 購自 MILLIPORE, UK) 將細胞移行實驗中經過 16 小時的低血清培養基離心濃縮，離心轉速 3000g 設定 10 分鐘。我們將每一個組別的培養基以此條件做 10 倍的濃縮。

蛋白質定量：濃縮培養基以滅菌後的 1X PBS 作 10 倍稀釋，將稀釋後的樣本取 10 μ l 置入 ELISA plate 中，再加入 200 μ l 蛋白質濃度測定液（以 ddH₂O 稀釋五倍後使用），經過輕微震盪約 1 分鐘，再測量波長 595nm 的吸光值。使用標準蛋白質為 BSA（購買自 SIGMA），濃度分別為 1，0.5，0.25，0.125，0.0625 mg/ml。

製作 gelatin gel：我們製作的 gelatin gel 下層分離膠體 (separating gel) 濃度為 8.5%，gelatin 濃度為 0.1mg/ml (詳細配置方法請參閱試劑製備)，上層積層膠 (stacking gel) 的濃度為 4% (配置法參閱試劑製備)。倒入上層膠體後插入梳狀尺待其凝固即可使用。

樣本稀釋：將定量完成之濃縮培養基加入四分之一的 non-reduced sample buffer (配置法請參閱試劑製備) 稀釋後不需要加熱。

電泳：將製備好的 gelatin gel 裝置上電泳裝置，並且加入 running

buffer (配置方法參閱試劑製備)，將稀釋好的樣本加入積層膠槽內，並且須留一槽加入 5 μ l 標準蛋白質標示液 (PageRuler™ prestained protein ladder, 購買自 Fermentas)，積層膠以 80V 電泳，待樣本濃縮培養基進入分離膠體頂部後開始 100V，全程須在低溫 (4°C) 下進行電泳 (保護濃縮培養基內的 MMPs 酵素活性減低因高溫造成 degradation)。

展開：比對蛋白質標示液想觀測的位置得到較大的解析度後停止電泳，拆下電泳裝置上的膠體並且去除積層膠留下分離膠體，分離膠體以 ddH₂O 清洗兩次，再利用洗去 SDS 的清洗緩衝液 (配置參閱試劑製備) 清洗 30 分鐘；接著以 50mM Tris-HCl (pH7.5) 清洗 15 分鐘兩次。接著用展開緩衝液 (配置法參閱試劑配置) 作用於可接觸外在環境，震盪速度 80rpm，37°C 且經過 20 小時以上。

染色：展開過後取出分離膠體，並以 coomassie blue 染色液 (配置法參閱試劑製備) 染色 40 分鐘，後再以 coomassie blue 褪染液褪染 40 分鐘至 1 小時 達到可以看見膠體上的褪染染色區域。再以電腦掃描器將膠體掃描後利用影像分析軟體 Image J (National Institutes of Health, NIH) 定量。

第 11 節 西方墨點法 (Western blot)

實驗目的：

西方墨點法目的在於利用蛋白質電泳方式，使蛋白質依分子量大小分離，再利用電導力將於分離膠體上的蛋白轉印到 PVDF 轉漬膜上。利用一級抗體與二級抗體，轉漬膜上有欲觀測的蛋白，即可被一級抗體偵測到，再利用與酵素連結的二級抗體與一級抗體連結後，利用冷光試劑激發冷光，利用底片或是影像系統偵測冷光強度後定量，根據冷光的粗細與強弱來判定蛋白相對產量的影響。

實驗步驟：

蛋白質的收取：將 WI-38 種於 6 well 培養盤上，每個 well 內細胞數為 3×10^5 ；待貼附後以低血清培養基為培養基，收取的蛋白質組別區分為”不同濃度的 HMGB1 (1ng/ml、10ng/ml 及 100ng/ml 及無添加對照組，作用 24 小時)”及”最高作用劑量的 HMGB1 (100ng/ml) 從 0 分鐘、5 分鐘、30 分鐘、1 小時及 2 小時”。在作用時間後收下培養盤，以過濾過的 1X PBS 沖洗兩次，以 RIPA 細胞溶解緩衝液（配置方法參閱試劑製備），細胞數 3×10^5 加入 300 μ l RIPA 細胞溶解緩衝液後將其充分混合，置於冰上作用 20 分鐘，再以 4 $^{\circ}$ C 環境下 14000 轉速離心 30 分鐘，離心後抽取上清液即為細胞總蛋白液，離心管底層的細胞團塊可以丟棄，細胞蛋白液則可以置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

細胞核與細胞質蛋白分離的採取：我們利用核質蛋白分離組合套包 (NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, 購買自

Thermo)來分離 WI-38 細胞核與細胞質蛋白。WI-38 種於 10 公分培養盤上，每個 well 細胞數目為 1×10^6 ，在利用 HMGB1 最高作用劑量分別刺激 1 小時、3 小時、4 小時及 0 小時做為對照組。作用時間後收下培養盤，以過濾的 1X PBS 沖洗兩次後，依照組合套包的實驗操作步驟分離出細胞核內蛋白與細胞質蛋白。

蛋白質定量:純化後的蛋白液樣本我們利用滅菌後的 ddH₂O 稀釋十倍後取稀釋樣本 10 μ l 至 ELISA plate 中，再加入 200 μ l 蛋白質測定液，經過輕微震盪後，我們將測量樣本波長 595nm 的吸光值，使用的標準蛋白質為 BSA (購買自 SIGMA)，濃度分別為 1，0.5，0.25，0.125，0.0625 mg/ml。

製備聚丙烯醯胺膠體: 本實驗配置下層分離膠體聚丙烯醯胺濃度為 10%，上層積層膠濃度為 4%。

蛋白質變性: 定量蛋白液後取所需要蛋白質克數的蛋白液並加入三分之一的 loading sample duffer (配置方法詳見試劑製備)，混合均勻後利用乾浴器以 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後取出置於室溫冷卻。

進行電泳:將配置好的膠體架設於電泳裝置上，加入 running buffer 後取出梳狀尺，並將變性完成後的蛋白液加入電泳膠體槽內，並於一槽加入標準蛋白標示液，以 80V 的方式置於室溫下執行電泳，在蛋白液樣本通過上層膠體底部至下層膠體頂部即可調整伏特數為 100V 進

行電泳，利用標準蛋白標示液電泳的位置來判斷所需觀察的蛋白質位置來停止電泳。

蛋白質轉漬：我們採用的蛋白質轉漬為濕式轉漬法。待電泳結束前，準備轉漬需要的轉漬夾、轉漬用海綿、濾紙（whatman 3mm paper）及轉漬膜（Bio Trace™ PVDF，購買自 Life sciences），濾紙與轉漬膜裁剪成適合下層膠體的大小。轉漬膜使用 100% 的甲醇（methanol）浸泡 15 秒以上後再置於 1X 的轉漬緩衝液待用（transfer buffer，配置方法詳細於試劑製備），拆下電泳裝置的膠體並移除上層膠，留下下層分離膠體並將他夾入轉漬夾內，轉漬夾內的擺置順序為：轉漬夾黑色面-轉漬海綿-濾紙-分離膠體-轉漬膜-濾紙-轉漬海綿-轉漬夾白色面。擺置全程需有轉漬緩衝液濕潤且在每個夾層間避免氣泡的產生。將裝置好的轉漬夾置入轉漬電泳槽內，轉漬夾黑色面對負極，白色面對正極，並於電泳槽內加滿轉漬緩衝液，以 70V 的電壓進行轉漬 2 小時（轉漬期間須保持低溫狀態，可將轉漬電泳槽置於碎冰桶內，減低轉漬電壓造成的高溫影響轉漬結果）。

轉漬膜免疫染色：轉漬後取出轉漬夾內的轉漬膜利用標準蛋白標示液來確認轉漬是否成功，並且以 5% 沖泡式脫脂奶粉加入 1X TBST（配置法參閱試劑製備）混合均勻後加入轉漬膜並浸泡 1 小時，以牛奶蛋白將轉漬膜上非專一性的蛋白結合部位遮蓋（blocking），用以減

低免疫染色的背景值。接著再將轉漬膜浸泡入含一級抗體的 1X TBST 緩衝液內（抗體稀釋倍率則是依照購買來源廠商建議為準），在 4°C 作用 14 小時以上；結束後以 1X TBST 沖洗 3 次（每次 10 分鐘），接著將轉漬膜加入含二及抗體的 1X TBST 緩衝液內作用 1 小時；作用時間後以 1X TBST 沖洗三次（每次 10 分鐘），即可將轉漬膜加入適當的基質作用。以底片感應或者是電腦影像系統做感應呈色的結果

呈色:使用的冷光呈色劑為 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate（購買自 MILLIPORE, USA），將保存於 1X TBST 的轉漬膜取出並盡量將 TBST 吸乾，再置入冷光呈色劑後，以底片感光方式或者是利用 ImageQuant LAS 4000 影像系統（GE healthcare Life science, USA）來偵測冷光強度。

抗體脫附 (stripping): 抗體脫附的目的是將轉漬膜上已經連結的抗體脫離下來，以便可以另一次的免疫染色。我們通常利用抗體脫附的方式，再觀察完磷酸化蛋白的表現後，再利用同一片轉漬膜將其抗體脫附後進行相對應非磷酸化蛋白的表現情形。同理，我們也會利用抗體脫附進行內部控制 (Internal control) 蛋白的表現。我們使用的抗體脫附緩衝液為 T-Pro Western Blot Stripping Reagent I（購買自 T-Pro biotechnology, R.O.C），使用方法依照其產品建議。

第 12 節 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time polymerase chain

reaction)

實驗目的:

我們希望可以看看 WI-38 經由 HMGB1 不同濃度的刺激下，在相關於細胞增生與細胞移行的相關 mRNA 上是否有影響性。

實驗步驟:

mRNA 的收取:將 WI-38 種入 6 well 細胞培養盤，每個 well 細胞數為 3×10^5 ，並待其貼附後以低血清培養基作 starvation 24 小時，時間後加入不同濃度的 HMGB1，在作用 18 小時之後取出培養盤去除培養基，以滅菌後的 4°C 1X PBS 沖洗兩次，在每個 well 加入 1 cc 的 Trizol，將貼附於盤上的細胞混合均勻後取自新的離心管放置於冰上。將 Trizol 樣本每管加入 200 μl 的氯仿 (chloroform, CHCl_3)，並以劇烈震盪震盪 10 秒後，靜置於室溫 10 分鐘；接著以 12000g， 4°C 離心 15 分鐘；取出離心後的樣本並取上清液約 400 μl 至新的離心管且放在冰上保存並丟棄下層的 phenol-chloroform；接下來再取與上清液同體積的異丙醇 (isopropanol) 加入上清液，震盪均勻後於室溫靜置 10 分鐘，再以 12000g， 4°C 離心 15 分鐘；將上清液去除，底部的沉澱物即為 mRNA，我們再加入 1ml 的 75% 酒精進入沉澱物，震盪以洗去多餘的有機溶劑，並放置於 4°C 保存一天；再以 7500g， 4°C 離心 5 分鐘；之後去除酒精，以風乾方式風乾離心管沉澱物；加

入 20l 的 DEPC 水混合均勻後，用乾浴器以 55°C 加熱 10 分鐘，置於冰上保存。

mRNA 的定量：我們將 mRNA 樣本取 1 μ l 用 DEPC 水作十倍稀釋。測量吸光值 A260 與 A280 吸光值得到 mRNA 的濃度。

反轉錄製作 cDNA：換算出各樣本 3 μ g 的 mRNA 克數所需要的體積後，以 DEPC 水補至 20 μ l，並加入 Oligo dT (購買自 PROTECH) 2 μ l，置於 PCR machine 以 65°C，2 分鐘處理；隨後再使用 MMLV high performance RT kit (購買自 PROTECH，使用方法請參閱試劑製備)，並加入 reverse transcriptase 後以 Biometra Tpersonal PCR cyclor (Kyratec, USA) 37 °C，1 小時、85°C，5 分鐘，最後 10 °C 停止，反轉錄完成的 cDNA 可以置於-20~-80°C 保存。

定量聚合酶連鎖反應：我們選用 SYBR green (購買自 PROTECH)，將 cDNA 樣本以 nuclease-free water 作 5 倍稀釋，實驗組與 GAPDH 對照組做三重複，每個 well 加入樣本體積 5 μ l，再加入目標引子 (forward primer 與 reverse primer (濃度皆 2 μ M) 各 2.5 μ l) 5 μ l 以及 SYBR green 10 μ l，最終體積為 20 μ l。我們使用的即時定量聚合酶連鎖反應機器為 StepOnePlus real-time PCR systems (Applied Biosystems, ABI, SG)，得到的數值經過換算得到測定基因的表現量。

第 13 節 統計方法

統計方式為 one-way ANOVA (and nonparametrics)，事後檢定為 Newman-Keuls，我們設定該值顯著性(P value) 小於 0.05 為一個星號或井字號 (* / #)，小於 0.01 為兩個星號，小於 0.001 為三個星號。



第四章 實驗結果

HMGB1 人類肺部纖維母細胞存活率與增生率的影響

首先我們利用重組蛋白 HMGB1 對人類肺部纖維母細胞 WI-38 刺激 24 小時後觀察細胞存活率與細胞增生率 (圖 1A 及 1B)。結果發現在 HMGB1 1、10、100ng/ml 變化下，相較於對照組的細胞存活率與增生率皆沒有顯著的變化，這表示 HMGB1 在 1、10、100ng/ml 對於 WI-38 不具有細胞毒性且亦不具有造成細胞增生的影響力。

HMGB1 對人類肺部纖維母細胞會造成細胞轉移

在先前的文獻報導中指出 HMGB1 對黑色素瘤、前列腺癌細胞的轉移有著促進的影響 (*Ellerman et al, 2007; Brezniceanu et al, 2003*)，接著我們就利用 HMGB1 刺激 WI-38 去觀察細胞轉移的影響 (圖 2A 與圖 2B)。結果指出了在 HMGB1 10、100ng/ml 濃度相較於對照組，HMGB1 有促進 WI-38 細胞轉移的現象出現，在 HMGB1 最高濃度 100 ng/ml 達到最高。結果顯示 HMGB1 對於人類肺部纖維母細胞具有促進細胞轉移的能力。

HMGB1 透過抑制人類肺部纖維母細胞細胞轉移相關蛋白激酶造成細胞轉移程度的降低

我們發現 HMGB1 促進了 WI-38 的細胞轉移，因此我們想知道 HMGB1 會經由什麼樣的訊息傳遞途徑去影響細胞轉移，在前處理不造成細胞

死亡的濃度之各種不同與細胞轉移相關的蛋白質激酶抑制劑再加入 HMGB1 100ng/ml 觀察 WI-38 的細胞轉移程度 (圖 3A 與圖 3B)。我們發現到在相較於 HMGB 100ng/ml 濃度組, PD98059 (extracellular signal-related kinase (ERK) inhibitor)、SP600125 (c-Jun NH2-terminal kinases (JNK) inhibitor)、SB203580 (p38 inhibitor) 及 BAY117082 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) inhibitor) 抑制了 HMGB1 對 WI-38 細胞轉移刺激的 (加入不同抑制劑抑制的 100%)。我們進一步利用 Western blotting 去觀察上述的蛋白質激酶的蛋白質表現量 (圖 4A 及 4B) 看到了在一個小時的時間點, HMGB1 100ng/ml 明顯造成 ERK、JNK 及 p-38 磷酸化而活化, 這說明了 HMGB1 會透過 ERK、JNK 及 p-38 的活化 WI-38 的細胞轉移增加。進一步, 我們觀察 HMGB1 是否調控 NF- κ B 的活化。首先, 發現處理 HMGB1 100ng/ml 在 30 分鐘可以發現磷酸化 I κ B- α 時候表現量增加而到一小時後減少 (圖 5A)。此外, 我們將 WI-38 經由 HMGB1 100ng/ml 刺激後的核與質蛋白分離後觀察細胞核內 p65 的表現量 (圖 5B)。觀察到了核內蛋白 p65 表現量在一小時的表現量較對照組顯著的增加, 在細胞質蛋白 p65 的表現量則沒有時間上的變化。

HMGB1 造成人類肺部纖維母細胞基質金屬蛋白酶 MMP-9 的蛋白質表

現量及酵素活性增加

先前的文獻指出細胞轉移與基質金屬蛋白酶的酵素(matrix metalloproteinases, MMPs) MMP-2 及 MMP-9 活性有著關聯性存在 (Karni et al, 2006 ; Diego et al, 2011) , 因此我們將不同濃度的 HMGB1 刺激 WI-38 後的培養基濃縮後以明膠電泳去觀察 MMP-2 及 MMP-9 的酵素活性 (圖 6A 與圖 6B) 。我們發現到了在給予不同濃度 HMGB1 刺激 WI-38 後, MMP-9 的酵素活性在 HMGB1 10ng/ml 及 100ng/ml 明顯增加, 。我們進一步發現 HMGB1 10ng/ml 及 100ng/ml 明顯增加 MMP9 mRNA 及蛋白質表現量 (圖 6C 及圖 6D)

HMGB1 會造成磷酸化 Akt 的表現量上升及磷酸化 Glycogen synthase kinase 3 beta (phospho-GSK3 β) 表現量增加及細胞核內與細胞質內 beta-catenin 的增加

之前文獻中指出了細胞轉移機制中涉及了 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) /protein kinase B (Akt) 參與, 因此我們發現 LY294002 (PI3 kinase inhibitor) 抑制 HMGB1 100ng/ml 所誘導 WI-38 細胞轉移(圖七 A) , 而 SB415286 (Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) inhibitor) 抑制 GSK3 β 則是促進了 WI-38 的細胞轉移, 在抑制 GSK3 β 後加入 HMGB1 對 WI-38 細胞轉移程度與抑制 GSK3 對照組沒有顯著變化。然後我們去觀察磷

酸化 Akt 的表現量及其下游的 phospho-GSK3 β 表現量 (圖 8A 與圖 8B)。結果顯示，處理 HMGB1 100ng/ml，相較於對照組，磷酸化 Akt 的表現量在一小時顯著的增加，phospho-GSK3 β 的表現量在兩個小時的增加最為顯著。接著我們觀察 GSK3 β 下游 β -catenin 在細胞核內與細胞質的表現 (圖 8C)。我們觀察到核內與細胞質的 β -catenin 表現量都在一小時之後顯著的提升。

HMGB1 造成人類肺部纖維母細胞的表面受器 Toll-like receptor 4 (TLR4)、Toll-like receptor 2 (TLR2) 及 RAGE 的 mRNA 表現量增加

在之前的文獻報導指出 HMGB1 對巨噬細胞或單核球的活化會透過 TLR4、TLR2 或 RAGE 造成活化 (Yang *et al*, 2005)。我們想了解 HMGB1 對 WI-38 是否有透過 TLR4、TLR2 及 RAGE 細胞表面受器來造成細胞轉移。我們利用 1、10ng/ml 及 100ng/ml HMGB1 刺激 WI-38 後去觀察 TLR2、TLR4 及 RAGE (圖 9)，發現到在 HMGB1 100ng/ml 的刺激後 18 小時，WI-38 在 TLR2、TLR4 及 RAGE 的 mRNA 表現量均有顯著的上升。

第五章 討論

HMGB1 不會對人類肺部纖維母細胞造成死亡與增生

HMGB1 在早期的研究中發現它屬於 non-histone chromosomal proteins 之一。其功能為維持 nucleosome 的結構、調控基因轉錄作用及活化 DNA 重組、修復與複製功能 (Landsman *et al*, 1993 ; Calogero *et al*, 1999)。而在近年的研究中 HMGB1 被發現具有細胞激素的角色。他會經由凋亡的細胞或是活化後的免疫細胞釋放，刺激免疫細胞釋放更多的促發炎細胞激素產生 (Yang *et al*, 2005)。我們在細胞毒性與細胞增生中發現到了 WI-38 在濃度 1ng/ml, 10ng/ml 及 100ng/ml 的 HMGB1 刺激下 24 小時之後都沒有顯著的造成細胞死亡以及細胞增生率提升的結果，我們在先前其他學者文獻中得到了 HMGB1 在人體發炎反應之下測得血清中 HMGB1 濃度為 30ng/ml 至 100ng/ml (Steven *et al*, 2008)，這個結果我們認為是沒有互相衝突的，因為 HMGB1 本身會刺激活化免疫細胞如單核球產生促發炎激素如 tumor necrosis factor (TNF)-alpha 的增加，目前並沒有文獻指出 HMGB1 會造成人體肺部纖維母細胞死亡或是增生的研究結果。

HMGB1 會造成肺部纖維母細胞移行

接下來我們看到了在細胞移行實驗中 WI-38 在 HMGB1 不同濃度的影刺激下觀察到了 WI-38 細胞移行的程度具有濃度梯度的表現，在

HMGB1 100ng/ml 的濃度下細胞移行的數目最高，這個部分在一些文獻上證實了 HMGB1 會促進人類大腸癌或前列腺癌細胞的轉移 (Sparvero et al, 2009 ; Ellerman et al, 2007)、這樣的結果與我們看見其他研究中得到了 HMGB1 確實具有促進細胞移行的能力，但是並非相同的細胞，我們認為這不能完全說明 HMGB1 造成癌症細胞的轉移機轉與造成 WI-38 細胞移行的機轉是一樣的。因此我們做了更多的實驗去證實。我們抑制了與細胞移行相關的蛋白質激酶來觀察 HMGB1 的刺激對 WI-38 的影響。發現到了 MAP kinase 及 NF- κ B 受到抑制後 WI-38 的細胞移行能力受到了抑制，而在抑制了 PI3 kinase 的蛋白質激酶則是發現到 HMGB1 刺激 WI-38 的細胞移行能力也同樣受到了抑制，這樣的結果我們認為 HMGB1 在 WI-38 細胞移行機制中 MAP kinase 及 NF- κ B 的 translocation 有著活化的影響。而在其他文獻中說明了 HMGB1 會透過免疫細胞表面受器如 TLR2 、 TLR4 及 RAGE 的結合去活化 myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88) 途徑，使 IKK 複合體活化，複合體包含了 IKK-alpha 、 IKK-beta 及 NF- κ B essential modulator (NEMO)，IKB-alpha 的磷酸化造成了 NF- κ B 的 translocation 並且造成促發炎基因如 interleukin-1 的轉錄 (Michael et al, 2005)。而在目前文獻中我們也得到了一些人實驗證實 HMGB1 會透過 MAP kinase 的活化來造

成 NF- κ B 的 translocation (Kokkola et al, 2005)，但是詳細機制目前還不清楚。因此細胞移行實驗以及利用蛋白質激酶抑制劑得到的結果是可以證實 HMGB1 會透過這些蛋白質激酶的活化來造成細胞移行。

HMGB1 活化人類肺部纖維母細胞 MAP kinase 以及活化 I κ B-alpha 造成細胞核內 p65 的表現量增加

在西方墨點法中我們觀察在各種時間點最高作用濃度 HMGB1 刺激 WI-38 的蛋白質表現，發現到了磷酸化 ERK、JNK 及 p38 均有在 1 小時表現量增加的情形，證實了 HMGB1 會活化這些蛋白質激酶的表現，此外觀察磷酸化 I κ B-alpha 於一小時也有表現量增加的情形，而總 I κ B-alpha 則是在 30 分鐘的時候呈現減少的情況，這說明了 HMGB1 使磷酸化 I κ B-alpha 的增加造成總 I κ B-alpha 減少；我們也利用了將 WI-38 核質分離後去觀察 NF- κ B translocation p65 在細胞核內與細胞質的表現量，也發現了在一小時的時候細胞核內 p65 蛋白的表現量增加，這個部份我們得到了一個很清楚的結果就是 HMGB1 會刺激 WI-38 的 NF- κ B translocation。這個部份在我們前述文獻中也證實了 HMGB1 在免疫細胞中造成 NF- κ B translocation，但是在一些文獻中指出，HMGB1 在癌症細胞的轉移中並非是必要的，HMGB1 會使黑色素瘤的抑制活性受到活化，促成黑色素瘤的轉移與移行 (Poser

et al, 2003)。但是我們認為 HMGB1 在黑色素瘤的角色是屬於輔助的地位，而 WI-38 實驗中我們是直接以 HMGB1 作用濃度去刺激造成細胞移行，因此是不一樣的。

HMGB1 使人類肺部纖維母細胞基質金屬蛋白酶活性增加

由於細胞移行涉及了細胞外基質的沉積與基質金屬蛋白酶的活性，我們在明膠電泳中得到了在 HMGB1 梯度濃度的刺激下，明膠酶 MMP-9 的表現量增加了而 MMP-2 的表現量則沒有變化是一個很重要的發現。基質金屬蛋白酶的種類繁多，多種研究發現到在細胞移行的情況下，會使細胞外基質受到破壞，細胞外基質中充斥著多種膠原蛋白如 gelatin 等，文獻中指出 MMP-2 在癌症細胞產生、血管新生、腱與肌肉疾病與神經系統疾病涉及影響性之高。而 MMP-9 與 MMP-2 在分類上皆屬於明膠酶，但是 MMP-9 除了與 MMP-2 在上述的疾病均有參與外，在呼吸道疾病中的研究文獻中也說明了氣喘患者的呼吸道重塑現象中發現了 MMP-9 的表現 (*Araujo et al, 2008 ; Kaminska et al, 2009*)，而在動物活體氣喘模式中也測得了在肺部沖洗液內 MMP-9 的表現量增加，這對我們的實驗結果是具有相當的證據說明了 HMGB1 對人類肺部纖維母細胞的細胞移行造成 MMP-9 的產生及酵素活性的表現量增加有著重要的影響。我們在利用即時聚合酶連鎖反應及西方墨點法中也發現了 MMP-9 的 mRNA 表現量與蛋白表現量的增加，更證實

了這樣的說法。

HMGB1 除了透過與 RAGE 的結合，可能也會透過 toll-like receptors 去造成細胞移行的增加

接著我們去觀察 HMGB1 作用濃度刺激下 WI-38 的細胞表面受器的 mRNA 表現量發現到了與 HMGB1 相關的表面受器 TLR2、TLR4 及 RAGE mRNA 均有表現量上升的情形，這個部份我們得到了 WI-38 似乎也是透過這些表面受器去刺激 WI-38 的細胞移行。而在文獻中我們發現到 HMGB1 還與其他表面受器的親和力具有相關性像是 triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1)、thrombospondin 與 CD24 會與 HMGB1 結合且提供負調節訊號去抑制 HMGB1 參與的發炎反應與凝血作用 (Kazama et al, 2008)。不過這些受器我們是否存在於 WI-38 的表面上值得進一步觀察。

HMGB1 造成 PI3 kinase /Akt 的活化及細胞核內 β -catenin 增加

我們發現了抑制 PI3 kinase 後造成 HMGB1 刺激 WI-38 細胞移行的程度減低，同時我們利用 GSK3 β 的抑制劑抑制 WI-38 造成細胞移行增加，而在抑制了 GSK3 β 後再以 HMGB1 最高作用濃度 100ng/ml 刺激下細胞移行程度沒有影響。在不少文獻中說明了 PI3 kinase / Protein kinase B (Akt) 在癌症細胞轉移中有重要的影響 (Vivanco et al, 2002; Chang et al, 2003)。PI3 kinases 在 Cancer 研究領

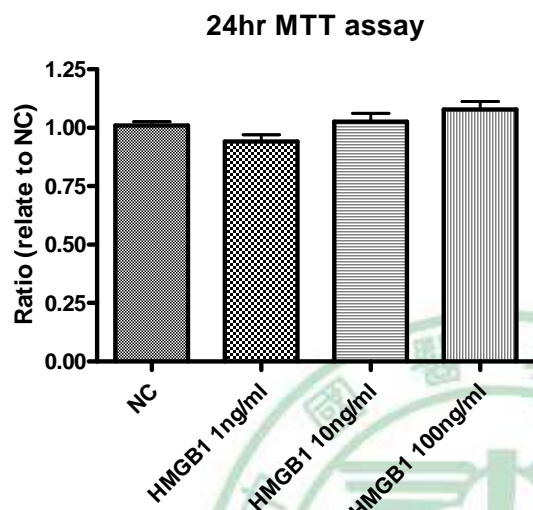
域中於 1980 年中期發現，目前 PI3 kinases 發現到與細胞凋亡、細胞增生、細胞生長及細胞骨架的重組這些細胞行為有關 (*Vivanco et al, 2002*)。而其下游的 Akt 為一 serine / threonine 激酶，Akt 的活化則是透過聚積在通過質膜 (plasma membrane) 後與 PtdIns(3, 4, 5)P₃ (PIP₃) 的 pleckstrin-homology domain 結合 (*Vivanco et al, 2002*)。做為 PI3 kinases 下游的 Akt 也跟細胞行為如增生、生長與凋亡的調控有關連，且在其他如癌症細胞生長也是具有調節 PI3 kinases 活性的關係 (*Araújo et al, 2009*)。我們研究中發現到了 HMGB1 刺激了磷酸化 Akt 表現量增加以及磷酸化 GSK3 β 的增加證實了 HMGB1 也會透過活化 PI3 kinases 並刺激下游的 Akt 磷酸化使磷酸化的 GSK3 β 增加。而在文獻中指出磷酸化 GSK3 β 增加會使 GSK3 β -APC-Axin 複合體減少進而抑制 β -catenin 活化促使聚積在細胞質的 β -catenin 進入細胞核中造成 β -catenin 結合 TCF/LEF 轉錄細胞移行相關蛋白如 fibronectin 的增加 (*Wang et al, 2011*)。我們也將 WI-38 細胞核質分離後以西方墨點法觀察到了細胞核內 β -catenin 表現量的增加。但是更加詳細的機制我們必須再進一步的探討才能了解。

第六章 結論

我們在這次的研究中得到了 HMGB1 在 10 與 100 ng/ml 會造成人類肺部纖維母細胞 WI-38 轉移的作用。在進一步探討其所透過得機制，研究結果顯示在 HMGB1 100 ng/ml（此濃度也是動物實驗及人體試驗肺部發炎之肺沖洗液中的濃度）會透過 MAP kinase 的活化以及造成磷酸化 I κ B-alpha 的增加，並且看見了 p65 在細胞核內短時間的增加；此外，HMGB1 也會透過活化 PI3kinase/AKT 與 β -catenin 而促進細胞轉移。我們也發現到 HMGB1 除了在之前文獻中發現到會經由 RAGE 之外亦可能會透過 TLR2 及 TLR4 的細胞表面受器來造成活化細胞移行訊息傳遞途徑。這樣的研究結果對於氣喘病患的呼吸道重塑病理現象來說，有著重要的治療意義。我們可以在未來透過相關訊息傳遞藥劑的開發以及療程來改善呼吸道重塑的現象。

實驗結果 圖表

A



B

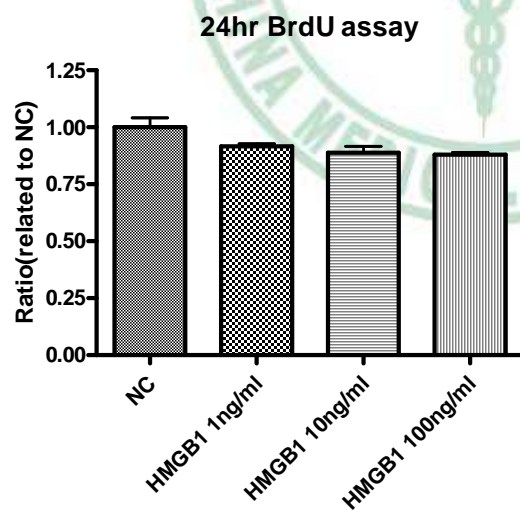
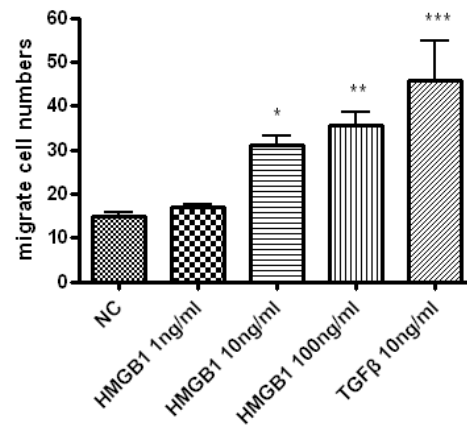
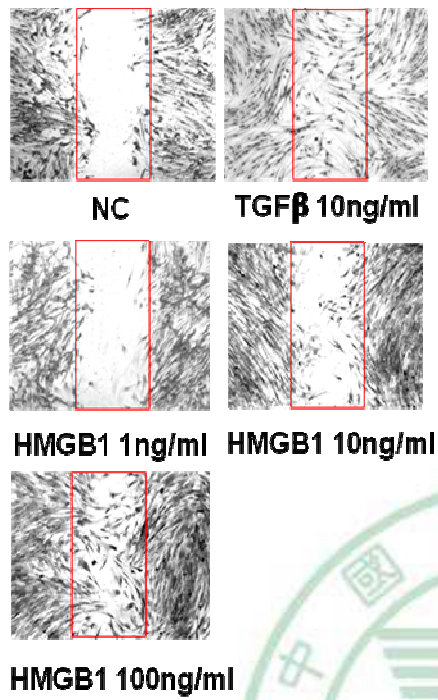


Figure. 1

A 為 24 小時細胞毒殺性實驗，對照組為 NC (normal control)，實驗組分別為 HMGB1 1ng/ml、10ng/ml 及 100ng/ml；B 為 24 小時細胞增生實驗，對照組為 NC (normal control)，實驗組分別為 HMGB1 1ng/ml、10ng/ml 及 100ng/ml，所有實驗組皆與對照組比較(n=5)。

A

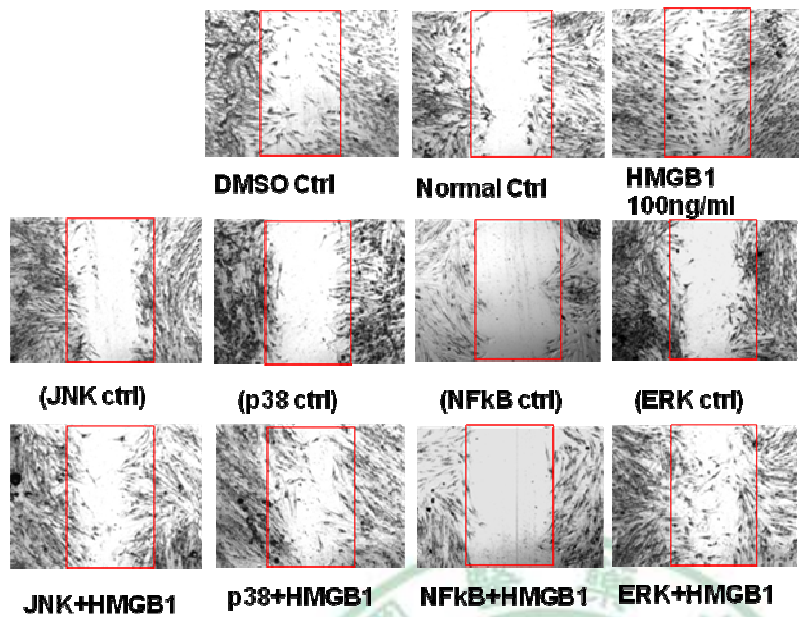


B

Figure. 2

A 為 16 小時細胞移行傷口癒合實驗，一般對照組為 NC 而 TGF β 為正對照組，實驗組一濃度梯度分別為 HMGB1 1ng/ml、10ng/ml 及 100ng/ml；B 為細胞移行傷口癒合實驗數據量化後的統計圖 (n=6)，所有實驗組與正對照組皆與對照組做比較，P 值小於 0.05 為一個*，P 值小於 0.01 為兩個*，P 值小於 0.001 為三個*。

A



B

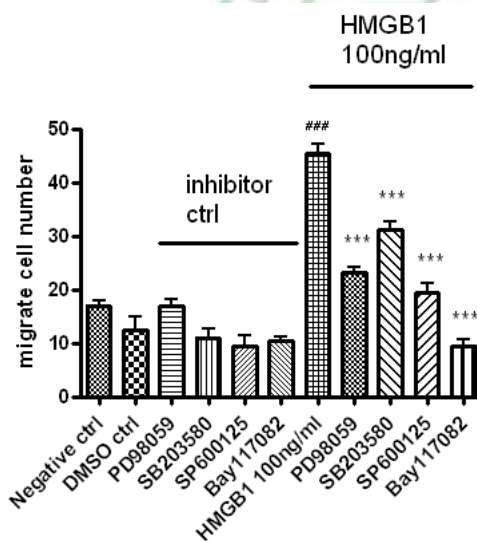


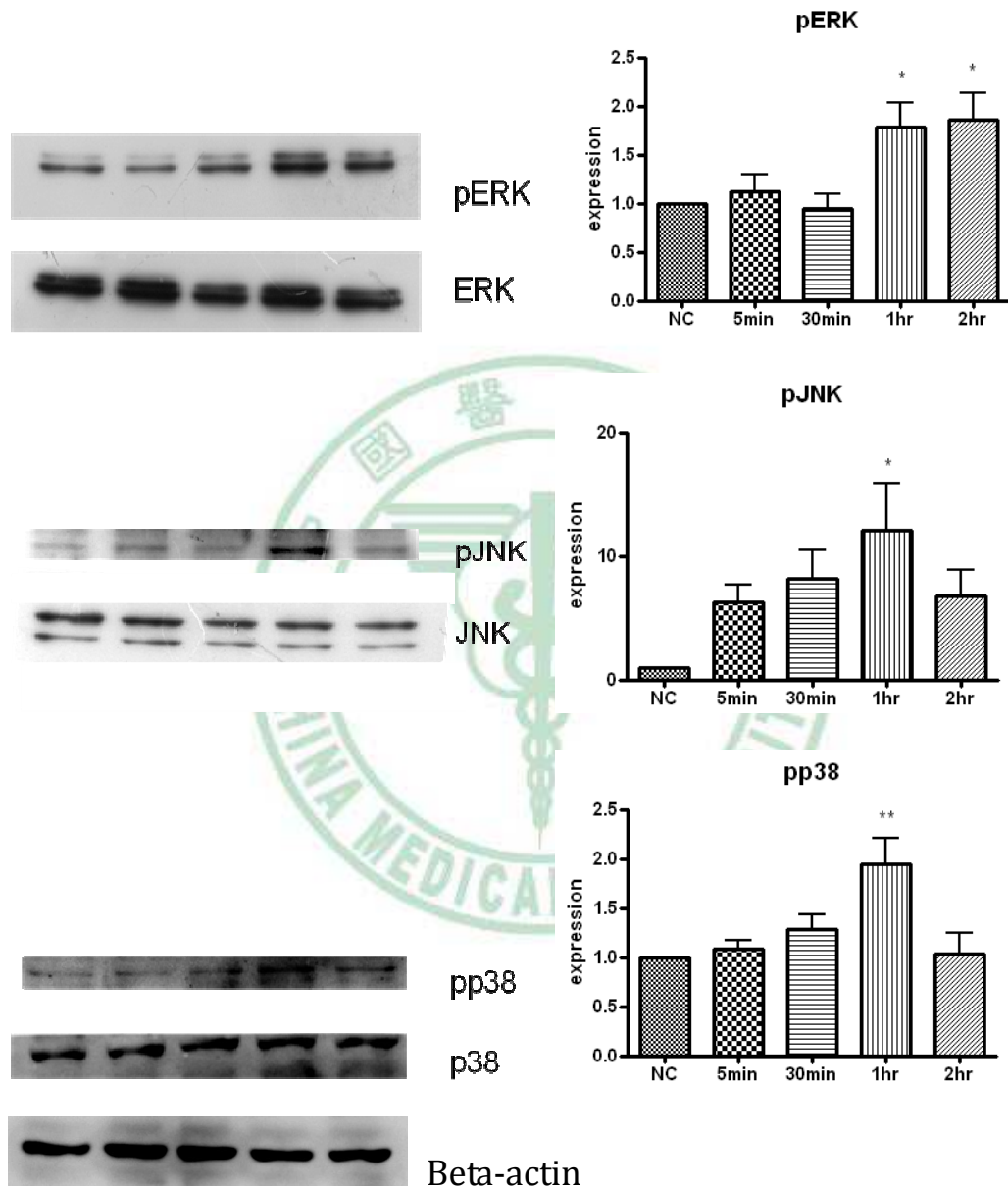
Figure. 3

A 為 WI-38 經由蛋白質激酶抑制劑處理 10 分鐘後在以 HMGB1 最高作用濃度刺激 16 小時後細胞移行傷口癒合實驗圖。全部組別的對照組為 Negative ctrl，抑制劑組對照組為 DMSO ctrl，左邊 PD98059、SB203580、SP600125 及 Bay117082 上標 inhibitor ctrl 為右邊上標 HMGB1 100ng/ml 的對照組，實驗組為 HMGB1 100ng/ml 標示組別。B 為將移行細胞數做量化之後的統計圖，# 字號為正對照組 HMGB1 100ng/ml 與對照組 DMSO ctrl 的比較結果 (n=7)，P 值小於 0.001 為三個#；* 為 HMGB1+抑制劑組與抑制劑對照組的比較結果，P 值小於 0.001 為三個*。

A

HMGB1 100ng/ml

NC 5min 30min 1hour 2hour

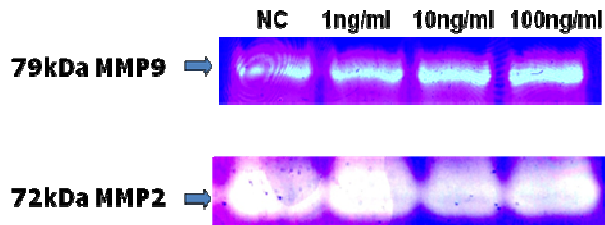


B

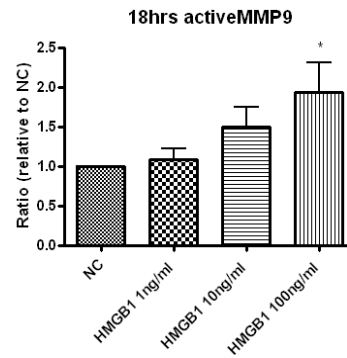
Figure. 4

A 為西方墨點法將 WI-38 以 HMGB1 最高作用濃度 100ng/ml 刺激各種時間(NC 為 0 分鐘，依時間變化為 5 分鐘、30 分鐘、1 小時及 2 小時)變化下的活化態 MAP kinases pERK, pJNK, pp38 蛋白質激酶表現結果。 β -actin 為 internal ctrl。B 為將西方墨點法量化後統計結果，時間變化組別與對照組 NC 做比較(n=5)。P 值小於 0.05 為一個*，P 值小於 0.01 為兩個*。

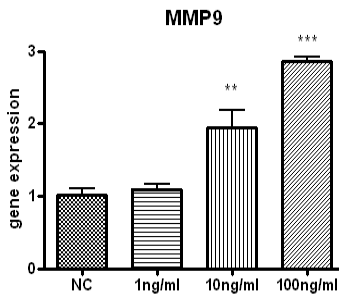
A



B



C



D

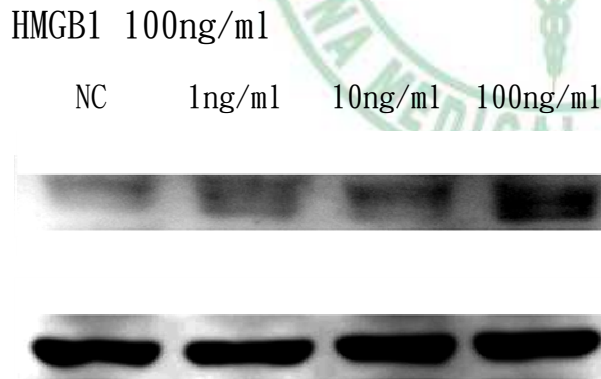
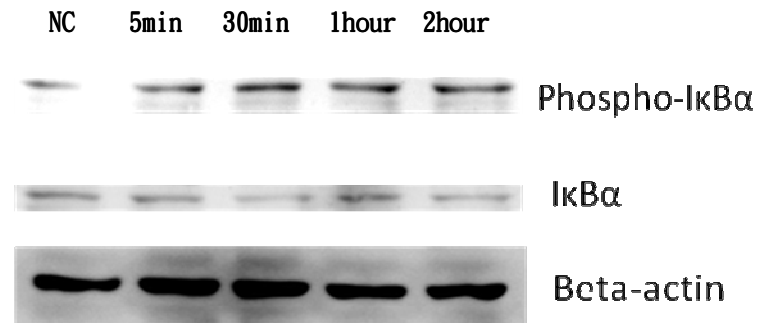


Figure. 5

Figure. 5A 為 WI-38 利用不同作用濃度的 HMGB1 刺激後將培養基濃縮後以明膠電泳測量基質金屬蛋白酶 MMP-2 與 MMP-9 的酵素活性表現；Figure. 5B 為將明膠電泳結果量化後的統計圖，HMGB1 不同濃度的實驗組皆與對照組 NC 比較。P 值小於 0.05 為一個*；Figure. 5C 為不同濃度 HMGB1 刺激 WI-38 經過 18 小時後的 MMP-9 mRNA 表現，HMGB1 濃度梯度組與對照組 NC 比較(n=3)，P 值小於 0.01 為兩個*，P 值小於 0.001 為三個*；Figure. 5D 為不同濃度 HMGB1 刺激 WI-38 經過 24 小時後的 MMP-9 蛋白質表現。

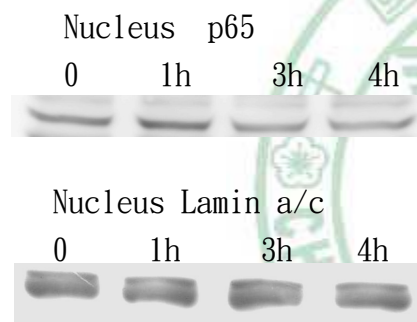
A

HMGB1 100ng/ml



B

HMGB1 100ng/ml



C

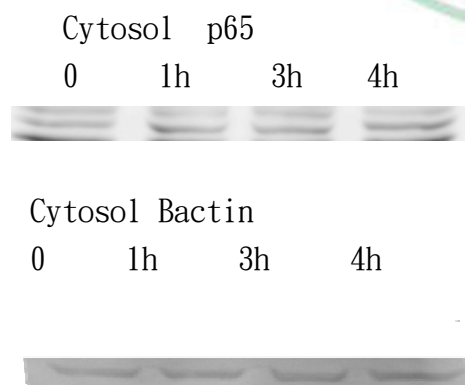
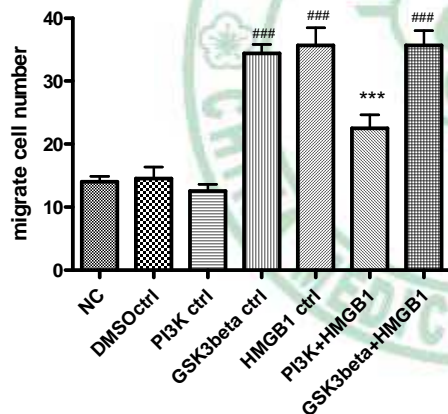
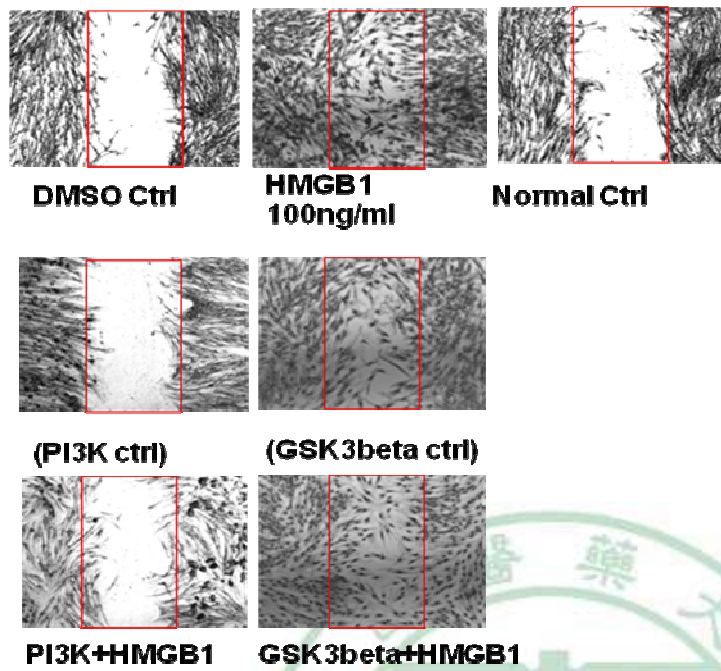


Figure. 6

A 為 HMGB1 100ng/ml 刺激 WI-38 於不同時間點下磷酸化 IκB-α 的表現量。β-actin 為 internal ctrl；B and C 為 HMGB1 刺激 WI-38 於不同時間點後將細胞核質分離後以西方墨點法檢測 p65 表現量，Lamin a/c 為細胞核蛋白的 internal ctrl，β-actin 為細胞質蛋白的 internal ctrl。

A

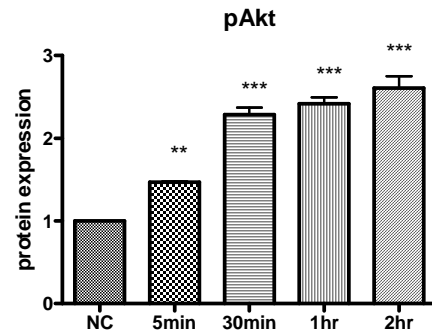
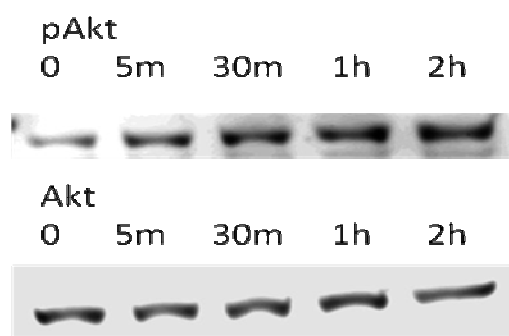


B

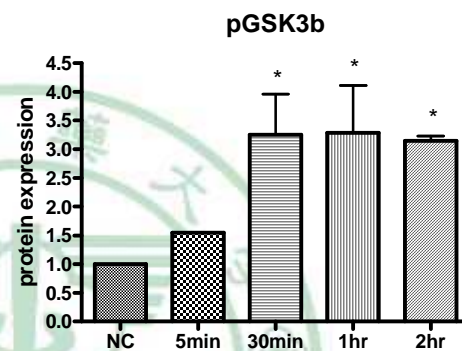
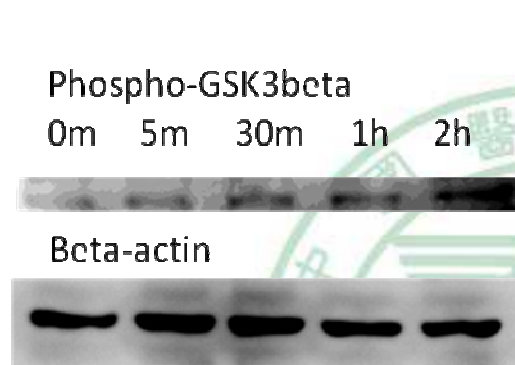
Figure. 7

A 為利用 PI3 kinase 及 GSK3 抑制劑抑制 WI-38 十分鐘後，再以 HMGB1 最高作用濃度 100ng/ml 刺激 16 小時的傷口癒合實驗。Normal ctrl 為所有組別對照組，DMSO ctrl 為 PI3K 及 GSK3beta 抑制劑的對照組，HMGB1 100ng/ml 為正對照組。B 為傷口癒合實驗的數值量化後統計圖 (n=6)，# 字號為與 DMSO 對照組比較後 P 值小於 0.001 為三個#；* 為與 HMGB1 正對照組比較後 P 值小於 0.001 為三個*。

A



B



C

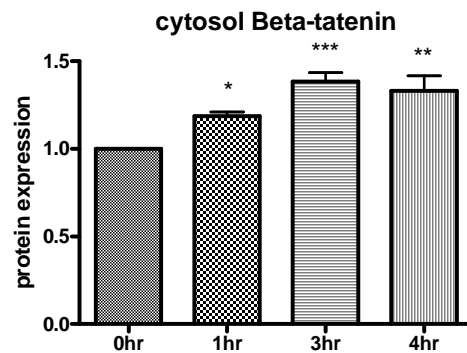
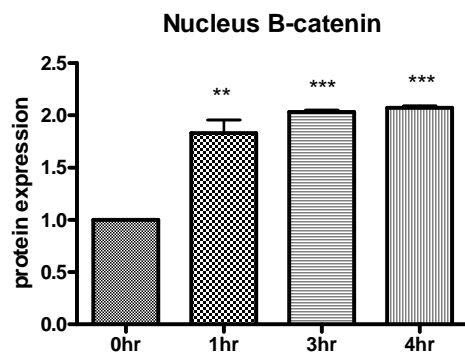
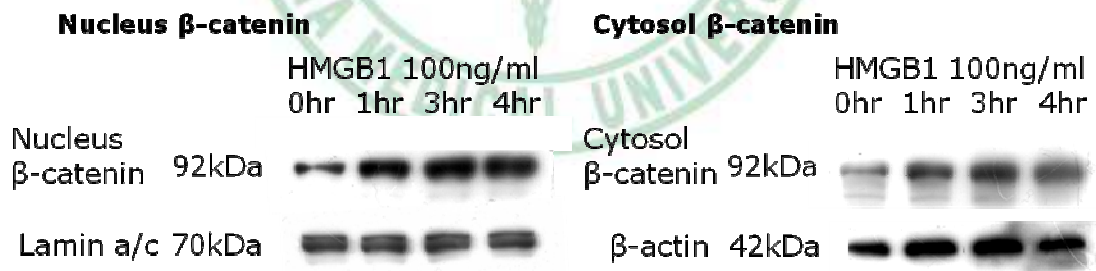
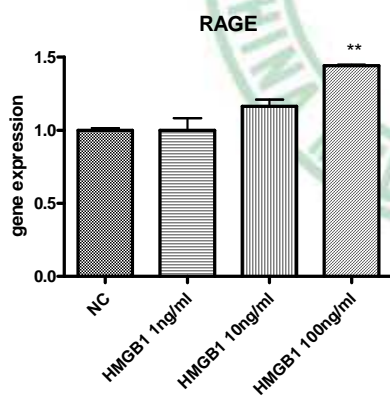
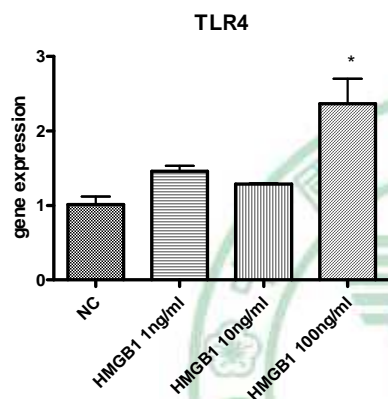
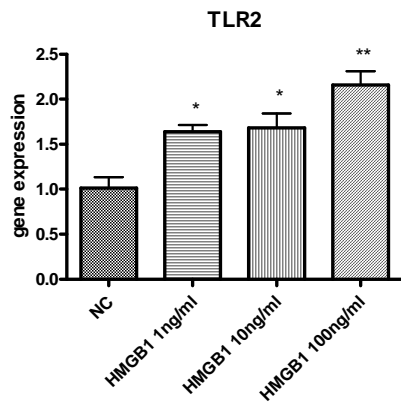


Figure. 8

Figure. 8A 與 8B 為 HMGB1 最高作用濃度 100ng/ml 刺激 WI-38 個時間點後以西方墨點法檢測磷酸化 Akt 與磷酸化 GSK3 的蛋白質表現。Figure. 8C 我們利用 HMGB1 100ng/ml 刺激 WI-38 於各時間點後將細胞核質分離觀察細胞核與質內 β -catenin 的表現量，Lamin a/c 為細胞核蛋白的 internal ctrl， β -actin 為細胞質蛋白的 internal ctrl，下方統計圖則為量化後的數據結果，各時間點與 0hr 對照組比較(n=3)，P 值小於 0.01 為兩個*，小於 0.001 為三個*。



A

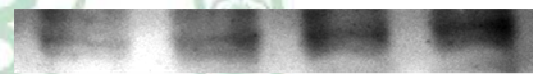


B

TLR2
NC 1ng/ml 10ng/ml 100ng/ml



TLR4
NC 1ng/ml 10ng/ml 100ng/ml



RAGE
NC 1ng/ml 10ng/ml 100ng/ml

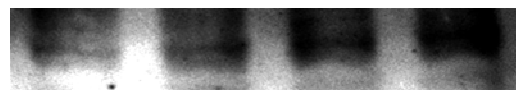


Figure. 9

A 為 WI-38 經過不同濃度 HMGB1 刺激 18 小時後將抽取細胞的 mRNA 以即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 檢測 mRNA 的表現，各實驗組與 NC 做比較(n=4)，P 值小於 0.05 為一個*，P 值小於 0.01 為兩個*。B 為利用 HMGB1 刺激 WI-38 經過 24 小時後抽取細胞的蛋白以西方墨點法檢測蛋白質的表現。

參考文獻:

- Abe, R., S. C. Donnelly, et al. (2001). "Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites." J Immunol **166**(12): 7556-7562.
- Abraham, E., J. Arcaroli, et al. (2000). "HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation." J Immunol **165**(6): 2950-2954.
- Amishima, M., M. Munakata, et al. (1998). "Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the asthmatic human airway." Am J Respir Crit Care Med **157**(6 Pt 1): 1907-1912.
- Amrani, Y. and R. A. Panettieri (2003). "Airway smooth muscle: contraction and beyond." Int J Biochem Cell Biol **35**(3): 272-276.
- Andrae, S., O. Axelson, et al. (1988). "Symptoms of bronchial hyperreactivity and asthma in relation to environmental factors." Arch Dis Child **63**(5): 473-478.
- Bafetti, L. M., T. N. Young, et al. (1998). "Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells." J Biol Chem **273**(1): 143-149.
- Basset, P., A. Okada, et al. (1997). "Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications." Matrix Biol **15**(8-9): 535-541.
- Bassi, R., P. Giussani, et al. (2008). "HMGB1 as an autocrine stimulus in human T98G glioblastoma cells: role in cell growth and migration." J Neurooncol **87**(1): 23-33.
- Bucchieri, F., S. M. Puddicombe, et al. (2002). "Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis." Am J Respir Cell Mol Biol **27**(2): 179-185.
- Bustin, M. (1999). "Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins." Mol Cell Biol **19**(8): 5237-5246.
- DeMarco, R. A., M. P. Fink, et al. (2005). "Monocytes promote natural killer cell interferon gamma production in response to the endogenous danger signal HMGB1." Mol Immunol **42**(4): 433-444.
- Dold, S., M. Wjst, et al. (1992). "Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis." Arch Dis Child **67**(8): 1018-1022.
- Fernandes, D. J., R. W. Mitchell, et al. (2003). "Do inflammatory mediators influence the contribution of airway smooth muscle contraction to airway hyperresponsiveness in asthma?" J Appl Physiol **95**(2): 844-853.
- Fingleton, B. (2007). "Matrix metalloproteinases as valid clinical targets." Curr Pharm

- Des **13**(3): 333-346.
- Fukuda, Y., M. Ishizaki, et al. (1998). "Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases." Lab Invest **78**(6): 687-698.
- Goodwin, G. H., C. Sanders, et al. (1973). "A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids." Eur J Biochem **38**(1): 14-19.
- Gunst, S. J. and D. D. Tang (2000). "The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle." Eur Respir J **15**(3): 600-616.
- Huttunen, H. J., C. Fages, et al. (2002). "Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphotericin B inhibits invasive migration and metastasis." Cancer Res **62**(16): 4805-4811.
- James, A. L., P. S. Maxwell, et al. (2002). "The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma." Am J Respir Crit Care Med **166**(12 Pt 1): 1590-1595.
- Johnsen, M., L. R. Lund, et al. (1998). "Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 667-671.
- Kelly, E. A. and N. N. Jarjour (2003). "Role of matrix metalloproteinases in asthma." Curr Opin Pulm Med **9**(1): 28-33.
- Kokkola, R., A. Andersson, et al. (2005). "RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages." Scand J Immunol **61**(1): 1-9.
- Landsman, D. and M. Bustin (1993). "A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins." Bioessays **15**(8): 539-546.
- Lewis, M. P. and J. T. Norman (1998). "Differential response of activated versus non-activated renal fibroblasts to tubular epithelial cells: a model of initiation and progression of fibrosis?" Exp Nephrol **6**(2): 132-143.
- Li, X. and J. W. Wilson (1997). "Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma." Am J Respir Crit Care Med **156**(1): 229-233.
- Lotze, M. T. and K. J. Tracey (2005). "High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal." Nat Rev Immunol **5**(4): 331-342.
- Messmer, D., H. Yang, et al. (2004). "High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization." J Immunol **173**(1): 307-313.
- Ohno, I., Y. Nitta, et al. (1996). "Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation." Am J Respir Cell Mol Biol **15**(3): 404-409.

- Okada, S., H. Kita, et al. (1997). "Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9." Am J Respir Cell Mol Biol **17**(4): 519-528.
- Opendakker, G., I. Nelissen, et al. (2003). "Functional roles and therapeutic targeting of gelatinase B and chemokines in multiple sclerosis." Lancet Neurol **2**(12): 747-756.
- Ordonez, C., R. Ferrando, et al. (2000). "Epithelial desquamation in asthma: artifact or pathology?" Am J Respir Crit Care Med **162**(6): 2324-2329.
- Orlova, V. V., E. Y. Choi, et al. (2007). "A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin." EMBO J **26**(4): 1129-1139.
- Palumbo, R., M. Sampaolesi, et al. (2004). "Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation." J Cell Biol **164**(3): 441-449.
- Quan, T. E., S. Cowper, et al. (2004). "Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood." Int J Biochem Cell Biol **36**(4): 598-606.
- Ranzato, E., M. Patrone, et al. (2010). "Hmgb1 promotes wound healing of 3T3 mouse fibroblasts via RAGE-dependent ERK1/2 activation." Cell Biochem Biophys **57**(1): 9-17.
- Robinson, M. J. and M. H. Cobb (1997). "Mitogen-activated protein kinase pathways." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 180-186.
- Roche, W. R., R. Beasley, et al. (1989). "Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics." Lancet **1**(8637): 520-524.
- Rouhiainen, A., J. Kuja-Panula, et al. (2004). "Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1)." Blood **104**(4): 1174-1182.
- Rowe, S. M., P. L. Jackson, et al. (2008). "Potential role of high-mobility group box 1 in cystic fibrosis airway disease." Am J Respir Crit Care Med **178**(8): 822-831.
- Sato, N., Y. Suzuki, et al. (2000). "Roles of ICAM-1 for abnormal leukocyte recruitment in the microcirculation of bleomycin-induced fibrotic lung injury." Am J Respir Crit Care Med **161**(5): 1681-1688.
- Sbardella, D., G. F. Fasciglione, et al. (2012). "Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes." Mol Aspects Med **33**(2): 119-208.
- Schmidt, M., G. Sun, et al. (2003). "Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma." J Immunol **171**(1): 380-389.
- Shim, J. J., K. Dabbagh, et al. (2001). "IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils." Am J

- Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(1): L134-140.
- Spertini, F., C. Reymond, et al. (2009). "Allergen-specific immunotherapy of allergy and asthma: current and future trends." Expert Rev Respir Med **3**(1): 37-51.
- Taguchi, A., D. C. Blood, et al. (2000). "Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases." Nature **405**(6784): 354-360.
- Tanaka, H., G. Yamada, et al. (2003). "Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope." Am J Respir Crit Care Med **168**(12): 1495-1499.
- Trautmann, A., P. Schmid-Grendelmeier, et al. (2002). "T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial cell apoptosis in asthma." J Allergy Clin Immunol **109**(2): 329-337.
- Ueno, H., T. Matsuda, et al. (2004). "Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury." Am J Respir Crit Care Med **170**(12): 1310-1316.
- Vignola, A. M., P. Chanez, et al. (1997). "Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis." Am J Respir Crit Care Med **156**(2 Pt 1): 591-599.
- Vu, T. H., J. M. Shipley, et al. (1998). "MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes." Cell **93**(3): 411-422.
- Vu, T. H. and Z. Werb (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." Genes Dev **14**(17): 2123-2133.
- Yamauchi, K. and H. Inoue (2007). "Airway remodeling in asthma and irreversible airflow limitation-ECM deposition in airway and possible therapy for remodeling." Allergol Int **56**(4): 321-329.
- Yang, D., Q. Chen, et al. (2007). "High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin." J Leukoc Biol **81**(1): 59-66.
- Zhou, X., H. Hu, et al. (2007). "Mechanisms of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 augmentation by IL-13 on TGF-beta 1-stimulated primary human fibroblasts." J Allergy Clin Immunol **119**(6): 1388-1397.