

目錄

中文摘要	2-3
英文摘要	4-5
前言	6-13
材料與方法	14-20
結果	21-29
討論	30-42
參考文獻	43-48
圖表	49-66
附圖	67-71
個人資料	72

摘要

動脈粥狀硬化是在動脈血管壁中一種慢性的發炎反應，有很多不同的細胞參與其中，包含內皮細胞，平滑肌細胞和巨噬細胞。在動脈粥狀硬化斑塊中，發現氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 表現量很高，而 ox-LDL 會引發細胞產生很多初發性的 cytokines 和生長因子。過去研究顯示細胞在受到氧化刺激下會釋放的分子 Cyclophilin A (CypA) 也可能是一種初發性的 cytokine。因此本研究中我們想證實，ox-LDL 是否會使巨噬細胞釋放出 CypA。利用西方點墨法 (Western Blot) 分析胞外蛋白 CypA 的表現量，我們發現當巨噬細胞處理 ox-LDL 時，分泌型 CypA 表現量會隨著時間增加而增加。我們也觀察胞內蛋白的表現量，發現磷酸化 p38 和磷酸化 Erk 的蛋白表現量都有增加。雖然我們並沒有發現 MMP-9 的活化情況有明顯的改變，但是西方點墨法結果顯示 MMP-9 有增加的現象。再者，利用外加 CypA 結果顯示，巨噬細胞在分泌型 CypA 的刺激下，MMP-9 的活化情況雖然沒有明顯的增加，但磷酸化 p38 和磷酸化 Erk 的蛋白表現量卻有增加。另一方面，CD147 是分泌型 CypA 在細胞膜上的接受器，而我們利用了免疫螢光染色去分析 CD147 的表現，在外加 CypA 或 ox-LDL 的情況下，在細胞膜上 CD147 的表現量會累積增加。總而言

之，我們的結果指出，在 ox-LDL 的處理下，由單核球 (monocyte) 分化的巨噬細胞會分泌出 CypA 並且活化 MAPK pathway。而分泌型 CypA 會促使 CD147 的表現量在細胞膜上聚集，並且活化 ERK pathway。此外，藉由免疫組織染色 (immunohistochemistry) 實驗顯示，在餵食高膽固醇飲食 (模擬動脈粥狀硬化的動物模型) 兔子腎臟組織中，CypA 會堆積在腎絲球細胞周圍，因此我們使用腎絲球腎隔細胞 (MES-13) 在處理 H₂O₂ 或高血糖所引發的氧化壓力之下，分析分泌型 CypA 的表現量。發現當 MES-13 處理 H₂O₂ 或高葡萄糖後分泌型 CypA 的表現量都會隨著改變。或許分泌型 CypA 除了在動脈粥狀硬化疾病發展早期中扮演著重要的角色，而此分泌型 CypA 也是腎臟發生早期發炎性反應的重要因子。

Abstract

Atherosclerosis is a chronic inflammatory response in the walls of arteries. Different types of cells are involved in the atherosclerosis progression, including endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages. Oxidized low-density lipoproteins (ox-LDLs), with high concentrations in atherosclerotic plaques, induce the production of numerous proinflammatory cytokines and growth factors. Cyclophilin A (CypA) is a secreted oxidative stress-induced factor that promotes inflammation. In the present study, we examined whether ox-LDL induces macrophages to secrete CypA. Western blot analysis showed that secreted CypA increases with time in the cultured macrophages treated with ox-LDL. Furthermore both phospho-p38 and phospho-Erk levels are increased in the cells treated with ox-LDL. In addition, we observed an increased MMP-9 expression by Western blot analysis. Next, we assessed whether recombinant CypA stimulates and regulates MMP-9 in the cultured macrophages. Under CypA stimulation, phospho-p38 and phospho-Erk levels are increased upon CypA treatment. Because CD147 is a signaling receptor for extracellular CypA, we performed immunofluorescence analysis to study the expression of CD147. The data showed an increased accumulation of CD147 on cell membrane upon the treatment of CypA or ox-LDL. Taken together, our results indicate that monocyte-derived macrophages secrete CypA and activate MAPK pathway under ox-LDL treatment. Extracellular addition of CypA in the cultured macrophages leads to an increased accumulation of CD147 on cell membrane and ERK activation. Furthermore, as evidenced by

immunohistochemical staining, the accumulation of CypA was observed among glomerular cells in the kidney tissues of the rabbits treated with high cholesterol diet. The cultured mesangial cells were treated with oxidative stress induced by H₂O₂ or high glucose. Western blot analysis showed that secreted CypA expression increases with time in the cultured mesangial cells treated with H₂O₂ or high glucose. This thesis provides evidence that secreted CypA acts as an inflammatory mediator that may be involved in the pathogenesis of atherosclerosis. Moreover, CypA may also act as an inflammatory factor in the initial stage of nephropathy.

前言

動脈粥狀硬化(Atherosclerosis)

動脈粥狀硬化是一種在動脈血管壁中的慢性發炎反應，這種疾病易引起其他的併發症，如腦中風、心肌梗塞(Glass and Witztum, 2001)。動脈粥狀硬化的形成的過程是當血管腔中的內皮細胞受到損傷，在血管腔中的低密度脂蛋白(low-density lipoprotein)會由這損傷處進入到血管腔的內膜中，經由一些自由基的攻擊後，會形成氧化型的低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein) (Niki, 2004)。這時在血管腔中的單核球(monocyte)，也會經由內皮細胞損傷處進入到內膜中，並成熟形成巨噬細胞(macrophage)，巨噬細胞會藉由其表面上的 scavenger receptor 吞噬氧化型低密度脂蛋白並形成膽固醇和膽固醇酯堆積在細胞內，形成泡沫細胞(foam cell) (Yamada et al., 1998)。泡沫細胞會分泌很多發炎性分子，如 interleukin-6 (IL-6)、腫瘤壞死因子(tumor necrotic factor- α , TNF- α) 和 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (Glass and Witztum, 2001)。這些發炎性分子會使得在血管中膜的平滑肌細胞分裂，移行至內膜堆積而轉變成泡沫細胞，最後形成斑塊(plaque) (Glass and Witztum, 2001)。斑塊會阻塞血液的流動，造成局部組織壞死，而巨噬細胞會分泌基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinase)，使斑塊崩解，在同時血液中的血小板會因為斑塊

會阻塞血液正常流動，在此處大量的堆積，形成血栓。加上結締組織不斷在此增生和基質修補，最後形成纖維帽(fibrous cap) (Glass and Witztum, 2001)。若硬化斑塊和纖維帽不斷的惡化，則會形成動脈粥瘤。在動脈粥狀硬化中，基質金屬蛋白酶將基質分解，會造成粥狀斑塊崩解脫落，而脫落的斑塊會隨著血液流至全身部位，易造成腦中風、心肌梗塞等疾病。而在動脈粥狀硬化過程中，氧化型的低密度脂蛋白扮演著氧化壓力的角色，巨噬細胞在受到氧化刺激下，會分泌出 interleukin-1 (IL-1)、interleukin-6 (IL-6)、干擾素- γ (interferon- γ)、腫瘤壞死因子(tumor necrotic factor, TNF) 等分子 (Lusis et al., 2004)。這些分子皆在細胞的免疫反應中扮演重要的角色，IL-1 會在免疫系統中調節免疫反應，並參與活化造血作用。IL-6 是 cytokine 的一種也是發炎性分子之一，會活化免疫反應。干擾素- γ (interferon- γ) 是 macrophage-activating factor，會幫助 macrophage 活化 (Lusis et al., 2004)。這些分子在動脈粥狀硬化中，會促使免疫反應的活化，並使巨噬細胞、平滑肌細胞有能力轉變成泡沫細胞，移動並堆積形成斑塊，加速動脈硬化的形成 (Glass and Witztum, 2001)。

Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) 氧化型低密度脂蛋白

氧化型低密度脂蛋白，是當低密度脂蛋白(low-density lipoprotein) 受到自由基的攻擊後，而形成氧化型的低密度脂蛋白。Ox-LDL 曾被

報導與心臟疾病有密切的關係，尤其是冠狀動脈疾病(coronary heart disease)，根據研究顯示含有較高 ox-LDL 表現量的人，罹患冠狀動脈疾病的機率較高(Holvoet, 2004)。Ox-LDL 中主要成分為 LPC (lysophosphatidylcholine) 和其他氧化型的磷酸膽鹼 (oxidized phospholipids)，且文獻指出 LPC 是動脈粥狀硬化中重要的致病因子之一(Matsumoto et al., 2007)。過去研究發現在動脈粥狀硬化的內皮細胞中，LPC 會使初發炎性分子的表現量增加，如 IL-1 和 TNF。LPC 會活化單核球細胞並刺激單核球細胞產生急性發炎蛋白，如 C-反應蛋白 (C-reactive protein) (Maseri, 1997)。另外許多參與動脈粥狀硬化的細胞在 ox-LDL 的刺激下，會啟動細胞內的訊息調控機制，過去研究指出內皮細胞受到 ox-LDL 的氧化刺激下，會增加細胞內活性氧 (Reactive oxygen species) 的表現量，活化 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) pathway，進一步調控細胞存活或凋亡(Cominacini et al., 2000)。在平滑肌細胞中，利用 ox-LDL 處理後，細胞內會活化 phosphoinositide 3-kinase (PI-3K) pathways，促進細胞增生，防止細胞凋亡(Auge et al., 2002)。而在巨噬細胞中利用不同濃度 ox-LDL 處理後，matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 的活性表現量會隨著 ox-LDL 濃度增加而增加(Yue et al., 2009)。

Matrix metalloproteinase (MMP) 基質金屬蛋白酶

基質金屬蛋白酶是一種分解酵素，可以分解細胞外基質，如明膠 (gelatin)、膠原蛋白(collagen)和彈性蛋白(elastin)。這種酵素需要和 Zn^{2+} 結合，才有分解作用(Nagase and Woessner, 1999)。基質金屬蛋白酶在很多細胞行為中扮演著重要的角色，例如，細胞增生、細胞移動、細胞分化、細胞凋亡和血管新生 (Egeblad and Werb, 2002)，且 MMPs 也會參與在腫瘤的生長過程中 (Coussens et al., 2002)。在動脈粥狀硬化中，MMPs 將基質分解，會造成粥狀斑塊崩解脫落，而脫落的斑塊會隨著血液流至全身部位，易造成腦中風等疾病。目前研究發現有 25 種的 MMP，皆參與在分解細胞外基質(extracellular matrix)和扮演生物活性的調解者(Brinckerhoff and Matrisian, 2002)，其中 MMP-2 和 MMP-9，又稱做 gelatinase-A 和 gelatinase-B，在細胞中扮演的角色主要是分解明膠，修補細胞外基質(Starckx et al., 2003)。過去的研究指出，在受傷的內皮細胞中，發現活性氧 (Reactive oxygen species)和 MMP-2 有增加的表現 (Paduch et al., 2005)。而在由人類血液中取出的單核球細胞 (monocyte)所衍生出的巨噬細胞 (macrophage)，加入不同濃度的 ox-LDL 處理 24 小時，利用西方點墨法 (Western Blot) 和明膠電泳法分析 (Zymography) MMP-9 蛋白表現量和活性隨著處理 ox-LDL 的濃度愈高 MMP-9 的表現量隨著增加 (Xu et al., 1999)。

Cyclophilin A (CypA)

過去的研究顯示 cyclophilin A 作為胞內蛋白，廣泛的分布於各細胞和組織中(Marks, 1996)。人類 cyclophilins 蛋白分別有 CypA、CypB (cyclophilin B)和 CypD (cyclophilin D)，皆屬於 immunophilin family (Price et al., 1991; Bergsma et al., 1991)。這個家族都具有 peptidyl-prolyl isomerase 的酵素活性，可以幫助脯氨酸(proline)和其他氨基酸形成正確的肽鍵(peptide bond)，使蛋白可以正確的摺疊，因此 CypA 可做為一個伴侶蛋白(chaperone) (Galat, 1993)。CypA 是 cyclophilins 蛋白家族中表現量最多和分布最廣的蛋白，大多分布於細胞質內，CypB 則大部分分佈在內質網(Bergsma et al., 1991)，而 CypD 大部分分布在粒線體中(Baines et al., 2005)。CypA 除了幫助胺基酸形成正確的肽鍵，也參與細胞內運輸作用 (Zhu et al., 2007)、訊息傳導 (signal transduction)和調控轉錄作用 (Krummrei et al., 1995)。再者 CypA 也會幫助 T 細胞訊息傳遞和 T 輔助細胞型態 2 (T helper cell 2) 的分泌，扮演細胞內免疫調節者的角色(Colgan et al., 2004)。

另一方面研究也發現，在類風濕性關節炎病患的滑液中，有偵測到 CypA 的表現(Billich et al., 1997)。後來進一步的研究發現，在類風濕性關節炎病患的滑液中的 CypA，是由巨噬細胞和內皮細胞所分泌的(Kim et al., 2005)。過去研究發現巨噬細胞在 LPS (lipopolysaccharide) 內毒素的刺激之下，分泌型的 CypA 會被釋放出來(Sherry et al., 1992)。

此外當血管的平滑肌細胞，在超氧化物(O₂⁻)的氧化刺激下，分泌型的 CypA 會刺激細胞生長和抑制細胞凋亡(Jin et al., 2000)，以及刺激細胞移動、細胞增生、ERK 的活化、DNA 的合成甚至是發炎性的細胞堆積(Satoh et al., 2008)。CypA 分泌的機制，是藉由 Rho GTPase 改變細胞骨架的組成，利用囊泡運送 (vesicular trafficking)方式運送至胞外。已知當細胞內接收到活性氧的訊號後，細胞內 Rho 和 Rho kinase 作用，會使細胞微絲(actin filaments)重新排列，此時肌動蛋白 (Myosin II)會被活化一起參與細胞骨架的重新排列。Cdc42 (Rho 家族的一員)會幫助含有 CypA 的囊泡相接並融合，進一步被運送出去，並使細胞骨架重新完整排列(Suzuki et al., 2006)。Cluster of Differentiation 147 (CD147) 則是分泌型 cyclophilins (CypA 和 CypB)在細胞膜上的接受器(receptor) (Pushkarsky et al., 2005)。CD147 屬於 immunoglobulin superfamily 的一員，這家族的分子都具有免疫球蛋白的特性(Toole, 2003)。CD147 也稱為 Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)，顧名思義是 MMPs 的誘導者，藉由活化 ERK (Extracellular signal-regulated kinase) pathway 來幫助調節 MMPs mRNA 表現量的活化 (Tomita et al., 2002)。因此當分泌型的 cyclophilins 與細胞膜上的 CD147 結合後，會促使細胞內 ERK pathway 的活化，進一步調控細胞內 MMP-9 的轉錄作用 (Yang et al., 2008)。

CypA 與動脈粥狀硬化之間相關性

根據過去文獻指出，在人類動脈粥狀硬化斑塊中，利用免疫組織染色分析，在富含巨噬細胞的區域和內皮細胞的內腔中可偵測到 CD147 和 CypA 的表現，且 CD147 是透過活化 ERK (Extracellular signal-regulated kinase) pathway 和 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) pathway 來調控 MMP-9 的轉錄作用 (Kim et al., 2009)。在 2009 年這篇文獻中，作者使用巨噬細胞株 (THP-1) 處理 immobilized anti- CD147 利用明膠電泳法 (Zymography) 觀看 MMP-9 活性的變化，發現 MMP-9 的活性表現有增加的表現。之後作者再加入 ERK 抑制劑 (PD98059 和 U0126) 或 NF- κ B 抑制劑 (sulfasalazine、TPCK 和 ethyl pyruvate)。發現隨著處理抑制劑的濃度增加，MMP-9 的活性表現有下降的趨勢。而在類風濕性關節炎病患的周圍血管細胞在處理 CypA 之下會增加 MMP-9 的表現量，而使用巨噬細胞株 (THP-1) 處理外加 CypA 之下也會使 MMP-9 有增加的表現 (Yang et al., 2008)。而另一種巨噬細胞株 (U937) 在使用不同濃度的 ox-LDL 處理後，發現 MMP-9 的活性表現量會隨著處理 ox-LDL 的濃度增加有增加的表現 (Yue et al., 2009)。由此可知，動脈粥狀硬化疾病中各種不同細胞，在 ox-LDL 的刺激或是 CypA 的處理之下，都會調控 MMP-9 的表現量。

但是過去文獻對於分泌型 CypA 是否會受到 ox-LDL 的刺激之下，而由巨噬細胞所分泌出來，並無相關的報導。因此在本論文中，我們主要想要使用與動脈粥狀硬化相關的氧化壓力 ox-LDL，來刺激參與在動脈粥狀硬化的細胞-巨噬細胞，想要知道當巨噬細胞在 ox-LDL 這種氧化壓力的刺激之下，是否會釋放出 CypA 這種蛋白，而分泌型的 CypA 是否活化細胞內訊息調控的機制，進一步做為影響 MMP-9 的活化作用的中間分子。

材料與方法

細胞模型

U937 是一種人類單核球細胞株 (購買於食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心)，使用 RPMI 1640 培養液培養並進行實驗。將細胞株穩定培養在 25 cm² 的培養皿中 (flask)，維持 5×10^5 - 1×10^6 /flask 細胞數。進行實驗時，取 1×10^6 /6 cm dish 的細胞，並加入含有 100 nM PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) 的培養液，使單核球細胞 (monocyte) 變成巨噬細胞 (macrophage)，培養 48 小時後去除培養液，在正常培養液下培養 48 小時後，再進行藥物的處理。

MES-13 是種老鼠腎絲球腎隔細胞株 (glomerular mesangial cells) (取自於中山醫學大學林庭慧老師)，使用 Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) 和 F-12 (Ham) 3:1 混合液做為培養並進行實驗。進行實驗時，取 1×10^6 /6 cm dish 細胞數，種植並培養 16-18 小時，再進行藥物的處理。

藥物處理 (巨噬細胞 U937)

由單核球細胞所分化成巨噬細胞，在 0.1 % FBS 下利用不同的實驗步驟 (附圖一、二) 加入 20 μ g/ml ox-LDL 進行實驗，處理不同的時間點下，收取胞外蛋白，利用明膠電泳法或西方點墨法進行分析。

或是根據過去文獻的實驗步驟 (Yue et al., 2009)，由單核球細胞所分化成巨噬細胞，在無血清的培養液 (serum-free) 培養 48 小時後，加入含有不同濃度 ox-LDL (0、20 及 50 μ g/ml) 的無血清培養液 (serum-free) 培養 48 小時。最後收取胞外蛋白，利用明膠電泳法或西方點墨法進行分析。或是由單核球細胞所分化成巨噬細胞，在 10 % FBS 下利用附圖二加入 50 nM recombinant CypA (Sigma) 進行實驗，處理不同的時間點下，收取胞外蛋白，利用明膠電泳法或西方點墨法進行分析。

藥物處理 (腎絲球腎隔細胞 MES-13)

取 1×10^6 的細胞數 (MES-13)，種植在 6 cm 培養皿 (6 cm dish) 中。利用 DMEM/High Glucose 與 F-12 3:1 混合液培養並進行實驗。培養 16-18 小時後，換取新鮮的培養液，並加入 40 μ M H_2O_2 ，分別處理 0、10、20 和 30 分鐘 (0 分鐘不加入藥物)。或是取 1×10^6 /6 cm dish 的細胞數 (MES-13)，種植在 6 cm 培養皿 (6 cm dish) 中，培養 16-18 小時後，換取無血清 (serum-free) 的 M199/Low Glucose 與 F-12 3:1 培養液培養 48 小時後，在無血清的狀態下加入 25 mM high glucose，分別處理 0、24 及 48 小時 (0 小時不加入藥物)。

收取胞外蛋白

細胞經藥物處理後，收取細胞外的培養液，利用 0.22 μ m 的過濾

器進行過濾。過濾後的溶液可直接進行明膠電泳分析法。另一部分，過濾後的溶液加入含有 0.35 % 2-methyl-diethyltryptamine 的 50 % Trichloroacetic Acid (TCA) (最後的濃度為 10 %)，放置-20 °C，作用 16-18 小時，使蛋白沉澱。作用後取出 12000 rpm，4 °C，離心 20 分鐘。去除上清液，加入含有 0.07 % 2-methyl-diethyltryptamine 的丙酮 (acetone)，12000 rpm，4 °C，離心 20 分鐘，進行清洗。去除上清液，留下 pellet，加入 lysis buffer (7 M Urea、2 M Thiourea、4 % CHAPS、60 mM DTT 及 0.002 % Bromophenol Blue) 進行回溶。利用西方點墨法分析胞外蛋白時，蛋白量取 80 µg 進行分析。

細胞免疫螢光染色

事先把玻片浸泡在 95 % 酒精中，將玻片過火後置於三公分培養皿 (3cm dish) 或是 24 well 培養皿 (24 well plate) 內，並種植 1×10^5 - 3×10^5 /well 細胞數，使其貼附生長隔夜做其實驗。再使用含有 100 nM PMA(Phorbol-12-myristate-13-acetate)的培養液，使單核球細胞(monocyte) 變成巨噬細胞 (macrophage)，培養 48 小時後去除培養液，在正常培養液下培養 48 小時後，加入藥物，24 小時後，先利用 PBS 進行清洗。利用 4 % PA (paraformaldehyde) 在室溫下固定細胞三十分鐘。以 PBST (含 0.2 % TritonX-100 的 1X PBS) 清洗五分鐘三次後，將含有 10 % 胎牛血清 (FBS/PBST) 及 1:500 RNase 在室溫下進行

非特異性抗體雜合 (blocking) 一個小時。PBST 清洗五分鐘三次，使用一級抗體置於 4 °C 冰箱中作用 16 至 18 個小時，PBST 清洗五分鐘三次，加入二級螢光抗體至於室溫下避光作用一小時，PBST 清洗五分鐘三次後，使用 PI (propidium iodide) 室溫下進行 15 分鐘細胞核染色。使用 100 % 甘油進行封片，封片後使用共軛焦螢光顯微鏡進行觀察。一級抗體使用 goat-anti-EMMPRIN (1:200) 及 rabbit-anti-Cyclophilin A (1:200)。二級抗體使用 donkey-anti-goat-FITC (1:200) 及 mouse-anti-rabbit-DyL (1:200)。

西方點墨法

取 20-80 μg 的蛋白，使用 10 % 或 12 % SDS-PAGE (聚丙烯醯膠) 進行電泳分析。之後將進行完電泳的 SDS-PAGE 與濾紙、硝化纖維紙(nitrocellulose paper, NC) 以三明治的方式夾起，放置於 Bio-Rad 轉漬裝置中，並加入轉漬緩衝液 (transfer buffer, 25 mM Tris pH 8.3、192 mM glycine 及 20 % methanol)，以電壓 100 伏特轉漬 75 分鐘。轉漬後的 NC 膜浸泡於含 5 % 脫脂牛奶的 TTBS (10 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl 及 0.05 % Tween 20) 中，在室溫下振盪 1 小時進行阻塞作用。作用完的 NC 膜，使用 TTBS 緩衝液清洗後，加入含有一級抗體的 TTBS 緩衝液在 4 °C 冰箱中震盪 16 至 18 個小時。倒出含有一級抗體的 TTBS 緩衝液後，使用 TTBS 緩衝液潤洗五分鐘三次，在倒入

含有二級抗體的 TTBS 緩衝液，在室溫下作用 1 小時。倒出二級抗體後使用 TTBS 緩衝液潤洗五分鐘三次，將 NC 置於富士照相系統中，加入 1:1 混合好的冷光呈色劑，充分的與 NC 膜作用後，擷取訊號，依照訊號調整曝光時間。

免疫組織染色 (Immunohistochemistry)

先將石蠟包埋組織玻片置於 40 °C 作用 10 分鐘，使組織能與玻片緊密貼附。石蠟包埋組織玻片放置二甲苯中浸泡 3 分鐘兩次，再分別浸置於 100 % 和 95 % 酒精中各 2 分鐘，取出後放入二次水中 10 分鐘。配置 3 % 雙氧水在 100 % 的甲醇，玻片在配置後的雙氧水中作用 7 分鐘。取出後，利用 PBS 進行清洗，2 分鐘三次。加入含有一級抗體的 PBS，rabbit-anti-Cyclophilin A (1:5000-1:10000)，避光於室溫作用 1 小時。利用 PBS 進行清洗，2 分鐘三次。加入二級抗體，HRP/Fab polymer conjugate (PicTure-Plus™, Zymed, South San Francisco, CA, USA)，避光於室溫作用 30 分鐘。作用完後，利用 PBS 進行清洗，2 分鐘三次。使用呈色劑 (Aminoethyl carbazole chromogen)，室溫下避光作用 15 分鐘。利用二次水洗去多餘的染劑，作用 5 分鐘。使用 Hematoxylin 進行細胞核染色，作用 8 至 10 分鐘。再利用二次水洗去多餘的染劑，作用 5 分鐘。最後使用 Clearmount solution (Invitrogen) 進行封片。置於 60 °C，作用 15 分鐘，使組織能與玻片緊密貼附。

萃取 RNA

使用 3 公分培養皿種植細胞，取 1×10^6 細胞，進行實驗。用 PBS 將細胞進行清洗兩次。加入 1 ml Trizol (Invitrogen) 在室溫下作用 5 分鐘，使細胞可以懸浮在溶液中。移至新的 1.5 ml 管子中並加入 200 μ l 氯仿 (chloroform)，均勻混合後，在室溫下作用 2 分鐘。12000 rpm，4 °C，離心 15 分鐘。取出上清液，移至新的管子中，並加入 500 μ l 異丙醇 (Isopropyl alcohol)，-20 °C，作用 30 分鐘。12000 rpm，4 °C，離心 10 分鐘。去除上清液，留下的管中的 pellet，利用 75 % 酒精，進行清洗。12000 rpm，4 °C，離心 5 分鐘。去除上清液，風乾 pellet，並加入 10 μ l DEPC 水進行回溶。利用分光光度計 (Infinigen, SSP-3000) 進行 RNA 濃度的測定。

反轉錄聚合酵素鏈鎖反應

(Reverse transcription Polymerase chain reaction)

將 RNA 反轉錄成 cDNA 的條件如下：5 μ g 的 RNA 依序加入 25 μ g/ml Oligo dT、500 μ M dNTP Mix。在 65 °C 下作用 5 分鐘、冰上作用 2 分鐘。再加入反轉錄緩衝液、10 mM DTT、2 unit/ μ l RNase OUT，在 37 °C 下作用 2 分鐘。加入 M-MLV RTase 10 unit/ μ l，37 °C 作用 50 分鐘，70 °C 作用 15 分鐘，最後置於 -20 °C 冷凍儲存。而 CD147-PCR 的反應條件如下：1X PCR 緩衝液、500 μ M dNTP Mix、各 0.2 μ M 順

向和反向引子；順向：5'-GGCCAGAAAACGGAGTTCAA-3'；反向：5'-GCGCTTCTCGTAGATGAAGA-3'、2 unit Taq DNA 聚合酶、2 μ l cDNA。作用條件：94 °C 作用 5 分鐘，之後 94 °C 作用 30 秒、62 °C 作用 30 秒、72 °C 作用 30 秒，進行 20 個循環，最後以 72 °C 作用 7 分鐘結束反應，置放於 16 °C 下。GAPDH PCR 反應條件：1X PCR 緩衝液、500 μ M dNTP Mix、各 0.2 μ M 順向和反向引子；順向：5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'；反向：5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'、2 unit Taq DNA 聚合酶、2 μ l cDNA。作用條件：94 °C 作用 5 分鐘，之後 94 °C 作用 30 秒、62 °C 作用 30 秒、72 °C 作用 30 秒，進行 20 個循環，最後以 72 °C 作用 7 分鐘結束反應，置放於 16 °C 下。

明膠電泳分析法 (Gelatin Zymography Assay)

製作 7.5 % 的 SDS-PAGE(含有 0.3 % gelatin)。將蛋白樣品和 2X Sample Buffer(0.5 M Tris-HCl pH 6.8、20 % glycerol、4 % SDS 及 0.005 % Bromophenol blue)已 1:1 混合，至於 37 °C 下作用 15 分鐘，之後進行電泳分析。電泳分析後，使用 1X Renaturing Buffer(25 % Triton X-100 in water)室溫下作用 30 分鐘兩次，轉置於 Developing Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5、200 mM NaCl、5 mM CaCl₂ 及 0.02 % 月桂醇聚氧乙烯醚 35 Brij-35) 37 °C 作用 16 至 18 小時，再以 Coomassie Blue 進行染色。

結果

一、由單核球所分化的巨噬細胞在 ox-LDL 的氧化刺激之下確實會分泌出 CypA

過去的文獻指出巨噬細胞在氧化壓力的刺激下，會釋放出很多初發炎症性分子 (pro-inflammation factors) (Kume et al., 1994)。因此我想觀察由單核球所分化的巨噬細胞，在 ox-LDL 所導致的氧化壓力之下，是否會釋放出分泌型的 CypA 分子。因此使用 U937 (單核球細胞株) 利用 100 nM PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) 處理，使單核球細胞 (monocyte) 變成巨噬細胞 (macrophage)，培養 48 小時後去除含有 PMA 的培養液，在正常培養液下持續培養 48 小時後，去除培養液，再換取含有 0.1 % FBS 的培養液並加入 20 $\mu\text{g/ml}$ ox-LDL 處理 0、0.5、1、2 和 24 小時(0 小時不加入 ox-LDL，細胞在 0.1 % FBS 下培養 24 小時)。正常的培養液是含有 10 % FBS，為了避免正常培養液中(10 % FBS) 會影響胞外蛋白的收取，也為了避免細胞在沒有血清 (serum-free) 的狀況下會死亡，因此使用 0.1 % FBS 培養液處理巨噬細胞並加入 ox-LDL，收取胞外蛋白分析分泌型 CypA 的表現量。巨噬細胞在 0.1 % FBS 下處理 ox-LDL 的結果 (圖一) 顯示，由單核球所分化的巨噬細胞在隨著處理 ox-LDL 的時間增加，分泌型的 CypA

的表現量也會隨著增加。十次獨立實驗的統計圖，可發現增加的表現量有達到顯著差異。由此可知，當巨噬細胞在氧化壓力刺激下，短時間內就會釋放出 CypA。分泌型的 CypA 或許可以當作一個早期發炎性的分子。在分析胞外蛋白時，無法有控制蛋白可當作基準，因此利用統一的總蛋白量做為控制基準。而細胞內的 CypA 的表現量並沒有明顯的改變(圖一 (C))。

二、由單核球所分化的巨噬細胞在處理 ox-LDL 之下會影響 MMP-9 的表達

過去文獻指出巨噬細胞在處理不同濃度的 ox-LDL 情況下，發現隨著處理 ox-LDL 的濃度愈高，MMP-9 的表現量也會隨著處理的 ox-LDL 濃度增加而有會增加的趨勢 (Yue et al., 2009)。因此我們也想觀察利用 ox-LDL 處理巨噬細胞，MMP-9 的活性表現是否會有改變。實驗處理的過程，分別在不同的時間點下換成 0.1% FBS 的培養液並加入 ox-LDL，0 小時也換成 0.1%FBS 的培養液並加入 ox-LDL(附圖一)。圖二的結果是利用明膠電泳法分析 MMP-9 的活性表現量，發現當處理 ox-LDL 的時間增加，MMP-9 的活性表現量也會增加。然而這實驗方法的處理方式，並未考慮到細胞在低血清培養液的培養下，亦可能所分泌出來的蛋白，因此改換另一種實驗加藥的方法(附圖二)。實驗流程是在同一時間點下，將所有細胞換成 0.1 % FBS 的培養液，

而在不同的時間下加入 ox-LDL，處理至一定的時間後進行收取。然而在 0 小時的時間點下雖不加入 ox-LDL，這時細胞是在 0.1 % FBS 下處理了 48 小時。在考慮了 0.1 % FBS 培養液對細胞的影響後，我們首先也是用明膠電泳法分析 MMP-9 的活性表現量。但發現當處理 ox-LDL 的時間增加，MMP-9 的活性表現量並沒有隨著處理藥物的時間增加而增加(圖三 (A))。在多次實驗之後，由統計圖(圖三 (B))可知細胞處理 ox-LDL 之後，胞外 MMP-9 的活性並沒有增加，且處理 ox-LDL 48 小時後，MMP-9 還有下降的趨勢。這個結果和圖二的結果明顯不同，顯示 MMP-9 的活性可能會因低血清 (low serum) 的刺激而活化。為了知道是否因為低血清刺激細胞而導致 MMP-9 的活化，因此我們利用正常培養液(10 % FBS)去處理巨噬細胞，在同一個時間點下換取新鮮的培養液(10 % FBS)，在不同的時間點下加入 ox-LDL，明膠電泳分析法結果仍然顯示 MMP-9 活性的表現量是下降的 (圖四)，發現 MMP-9 活性表現量似乎不是因為低血清的關係所造成的。為了進一步釐清明膠電泳法分析結果和過去文獻的差異，因此利用實驗室的細胞模型系統(U937)，重複與 2009 年的文獻 (Yue et al., 2009) 相同的實驗步驟。利用巨噬細胞 (U937) 在無血清 (serum-free) 的狀態下，使用不同濃度的 ox-LDL(0、25、50 及 100 $\mu\text{g/ml}$)處理 48 小時之下，利用明膠電泳法發現 MMP-9 的活性表現量會增加 (Yue et al.,

2009)。因此我也使用巨噬細胞株 (U937)，在無血清的狀態下，使用不同濃度的 ox-LDL(0、20 及 50 $\mu\text{g/ml}$) 處理 48 小時之下，利用明膠電泳法發現 MMP-9 的活性表現量並沒有明顯的改變，因此使用西方點墨法偵測 MMP-9 蛋白表現量，結果發現 MMP-9 的蛋白表現量會隨著處理的 ox-LDL 濃度增加而增加 (圖五)。

三、由單核球所分化的巨噬細胞在處理 ox-LDL 之下會使細胞內 ERK pathway 的活化

已知在巨噬細胞中 MMP-9 的表現是透過活化 ERK pathway 和 NF- κ B pathway (Kim et al., 2009)。我們也檢查了經 ox-LDL 處理的細胞內 ERK 活化的情況，利用附圖一的實驗流程。西方點墨法分析胞內 p38 及 ERK 的活化，結果(圖六)發現，磷酸化 p38 和磷酸化 ERK 在處理了 ox-LDL 後，磷酸化 p38 在處理 ox-LDL 24 小時後，表現量有顯著的增加，而磷酸化 ERK 是在處理 ox-LDL 48 小時後，表現量會有顯著的增加。另一方面，根據之前實驗的結果，磷酸化 p38 和磷酸化 ERK 在處理了 ox-LDL 後，隨著時間的改變表現量也會有改變(圖六)，我也使用附圖二的實驗流程來觀察細胞內蛋白的表現量是否有改變。由圖六的結果看來，磷酸化 p38 和磷酸化 ERK，處理了 ox-LDL 後，同樣會隨著時間的改變表現量也會有改變(圖七)。因此我們可以得知，巨噬細胞在氧化壓力下(利用 ox-LDL 的處理)，會活

化細胞內 Mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway，且這種活化作用並不會隨著不同的加藥方式而有所改變。

四、由單核球所分化的巨噬細胞在處理外加 CypA 之下細胞內的調控

已知胞外 CypA 是藉由和細胞膜上 CD147 的結合，進而影響細胞內的分子調控 (Yurchenko et al., 2010)。曾經有文獻指出，當巨噬細胞 (THP-1)處理外加 CypA 20 小時後，CD147 mRNA 的表現量沒有明顯的改變 (Yang et al., 2008; Kim et al., 2009)。另有文獻指出在初發炎的白血球細胞中，細胞膜上的 CD147 蛋白表現量會比無發炎的白血球細胞還要高 (Zhu et al., 2005)。因此我們嘗試使用由單核球所分化的巨噬細胞 (U937)，在外加 CypA 和 ox-LDL 的處理之下，利用半定量反轉錄 PCR 分析 CD147 mRNA 的表現量。如圖八 (A) 的結果顯示，巨噬細胞中的 CD147 mRNA 表現量，不管是否有處理 CypA 或 ox-LDL 的狀態下，表現量沒有太大的差異。三次實驗的統計圖(圖八 (B))顯示，CD147 mRNA 表現量並沒有顯著增加或減少。因為在 mRNA 的表現量上，並沒有看到明顯的差異，所以我們利用細胞免疫螢光染色 (Immunofluorescence)去觀察 CD147 蛋白在細胞內的分布是否有改變。細胞免疫螢光染色結果顯示 (圖九)，處理 24 小時 CypA 和 ox-LDL 後，CD147 在細胞膜上的表現量有明顯的聚集。我同時也觀察細胞內 MAPK pathway 活化的情況。由單核球所分化的

巨噬細胞，在外加 CypA 的處理下，分別在 60 分鐘或 10 分鐘後細胞內的磷酸化 p38 (圖十 (A)) 和磷酸化 ERK (圖十 (B)) 的表現量都有明顯增加。由此可知，巨噬細胞在處理外加 CypA 可以發現細胞膜的 CD147 表現量會有明顯的聚集，並且快速活化細胞內 ERK pathway，進一步的促使細胞內訊息調控。另一方面，之前的文獻也指出，在類風濕性關節炎病患的周邊血管細胞在處理 CypA 之下會增加 MMP-9 的表現，並且使用巨噬細胞 (THP-1) 處理外加 CypA 24 小時之下也會使 MMP-9 有增加的表現 (Yang et al., 2008)。我們也想知道是否利用由單核球所分化的巨噬細胞(U937)，在外加 CypA 的處理之下，是否也會調控 MMP-9 活性的表現量。因此細胞在正常的培養液下(含 10 % FBS)外加 CypA 處理下，利用明膠電泳法分析 MMP-9 的活性表現量。圖十一 (A) 中的結果，發現由單核球所分化的巨噬細胞，在外加 CypA 的處理之下，MMP-9 活性的表現量雖見有增加的傾向，然而由三次實驗的統計結果(圖十一 (B)) 來看，MMP-9 的活性表現量有增加的趨勢，但並沒有達到顯著上的差異。為了確定 MMP-9 的蛋白表現量是如何，進一步利用西方點墨法去觀察 MMP-9 蛋白的表現量，結果發現使用巨噬細胞(U937)處理外加 450 ng/ml (50 nM) CypA 2 小時後，MMP-9 的蛋白是有明顯增加的表現(圖十一 (C))。

五、CypA 的表現量在餵食高膽固醇食物的兔子組織中與無餵食高膽固醇的兔子組織的差異性

過去文獻指出，在人類動脈粥狀硬化斑塊中，利用組織免疫染色分析，在富含巨噬細胞的區域和內皮細胞的內腔中可偵測到 CypA 的表現 (Kim et al., 2009)。為了在動物模式中了解 CypA 與動脈粥狀硬化的關係，我們取得模擬動脈粥狀硬化早期的動物模型-餵食五週高膽固醇食物紐西蘭白兔的部分組織玻片(取自於彰化基督教醫院)，研究 CypA 在非心臟組織的表現。餵食五週高膽固醇食物紐西蘭白兔(模擬動脈粥狀硬化的動物模型)，測量其血液中總膽固醇含量，結果顯示比未餵食高膽固醇食物的正常兔子高出約 24 倍之多(附圖三) (Lin et al., 2006)。利用組織免疫染色法分析兔子肝臟組織和腎臟組織，發現在肝臟組織中，有無餵食高膽固醇食物的兔子組織中，CypA 的表現量都很多，在血管周圍細胞並沒有太大的差異性，且大部分都堆積在細胞內 (圖十二)。可是在腎臟組織中，CypA 的表現量在有餵食高膽固醇食物的兔子腎臟組織中，有高度的表現量，而且會大量的堆積在腎絲球細胞的周圍 (圖十三)。染色實驗重複六次，並且對腎臟組織的染色結果進行評分，評分標準依紅色的深淺度分別給予 0、1、2、3 分(最深)，請三位同學在不知道組織處理的狀況之下(是否有餵食高膽固醇食物)，觀看隨機挑選的 10 張組織染色圖，分別給予分數，平

均之後得到的結果。無餵食高膽固醇的兔子腎臟組織平均分數為 0.83 ± 0.12 ，有餵食高膽固醇的兔子腎臟組織平均分數 1.5 ± 0.17 。

六、腎臟病變與 CypA 之間的相關性

過去並沒有文獻指出 CypA 與腎臟病變(nephropathy)有直接的相關性，而我們的結果顯示，在有餵食高膽固醇食物的兔子腎臟組織中，CypA 有高度的表現量，我們認為 CypA 也許有可能是腎臟組織發炎反應的早期分子。為了探討分泌型 CypA 與腎臟病變之間的相關性，所以使用 MES-13 腎絲球腎隔細胞 (glomerular mesangial cells) (取自於中山醫學大學林庭慧老師)來做為細胞模型。過去的文獻指出，在 MES-13 中因血管緊張素 (angiotensin II) 所引發的 ERK 活化，ROS 在此扮演重要的角色(Gorin et al., 2004)。在 MES-13 的細胞模型中，ROS 會幫助 ERK 的活化(Wu et al., 2009)。所以我們想知道利用 MES-13 在氧化壓力的處理之下，是否會釋放出分泌型的 CypA。而過去的文獻在氧化壓力的處理，大多是使用過氧化氫(H_2O_2) (Wu et al., 2009)。因此我們也使用過氧化氫來處理 MES-13，利用西方點墨法分析分泌型的 CypA。先利用 H_2O_2 對 MES-13 做不同濃度(40、60 及 80 μM)的測試，最後取得對細胞處理後無明顯死亡的濃度下(40 μM)做實驗處理。初步結果發現當細胞處理 40 $\mu M H_2O_2$ 0、10、20、30 分鐘，觀察胞外的 CypA，發現當處理 H_2O_2 後，胞外的 CypA 在 10

分鐘表現量有明顯的增加 (圖十四)。另一方面，過去研究指出，在糖尿病患者腎臟病變的過程中，會增加氧化壓力和初發炎性分子的產生，如 ICAM-1、Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Wu et al., 2009)。我們使用腎絲球腎隔細胞(MES-13)，在處理高葡萄糖(high glucose)的狀態下，觀察細胞是否會釋放出分泌型的 CypA。我們想知道模擬糖尿病患者在持續高血糖所引發的慢性腎炎狀態下，是否會釋放出分泌型的 CypA。我們利用 M199 培養液進行實驗，M199 是低葡萄糖的培養液，為了有效的觀察高葡萄糖是否會對細胞產生分泌性的蛋白，因此使用了 M199/low glucose 的培養液。實驗方法，是將細胞先培養在無血清的 M199/low glucose 的培養液中 48 小時後，在依時間點的不同加入 25 mM 的葡萄糖溶液。初步結果顯示，當 MES-13 處理高葡萄糖 24 小時後，細胞外分泌型 CypA 有明顯的增加(圖十五)。根據 MES-13 初步的結果可知，當 MES-13 在氧化壓力或發炎反應之下，確實會釋放出 CypA。

討論

動脈粥狀硬化是一種在動脈血管壁中的慢性發炎反應，這種疾病易引起其他的併發症，如腦中風、心肌梗塞(Glass and Witztum, 2001)，且這種疾病死亡率極高。很多研究都想嘗試了解這種疾病產生的機轉，因此很多關於動脈粥狀硬化的研究就如此的產生，例如，動脈粥狀硬化形成的過程、過程中會釋放哪些分子、是否可以用這些分子當作一些指標分子...等。而在過去，也有一些分泌性分子被當作動脈粥狀硬化的指標分子，如，C-反應蛋白 (C-reactive protein, CRP)，過去研究發現當 CRP 表現量愈高，發生動脈粥狀硬化的機率愈高 (Maseri, 1997)。過去許多研究也指出，不同細胞黏著分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1、inter-cellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表現量，都被當作檢驗動脈粥狀硬化的分子之一 (Lin et al., 2005)。過去許多研究也指出，不同的細胞型態會參與在動脈粥狀硬化中，如血管腔的內皮細胞、由單核球所分化的巨噬細胞、平滑肌細胞 (Glass and Witztum, 2001)。已知在人類動脈粥狀硬化斑塊中，利用免疫組織染色分析，在巨噬細胞和內皮細胞中可偵測到 CD147 和 CypA 的表現 (Kim et al., 2009)。在類風濕性關節炎病患滑液組織中的巨噬細胞和內皮細胞也會分泌出 CypA (Kim et al., 2005)。而巨噬細胞在缺氧的

壓力之下，細胞會分泌 CypA (Seko et al., 2004)。當血管腔中的內皮細胞受到超氧化物 (O_2^-) 所引起的氧化壓力之下，內皮細胞會釋放出 CypA 且會進一步刺激細胞生長和抑制細胞凋亡 (Jin et al., 2000)。當血管腔平滑肌細胞 (VSMC) 受到 ROS 所引起的氧化壓力之下，會釋放出分泌性 CypA，且 CypA 會刺激細胞增生和發炎性細胞移動 (Sato et al., 2010)。

根據上述研究結果，我們進一步想要了解在模擬動脈粥狀硬化的氧化壓力之下，巨噬細胞與分泌性 CypA 之間的關係。根據我們的結果顯示，當培養的巨噬細胞在外加 ox-LDL 所引起的氧化壓力之下，細胞會在 1 小時後顯著釋放出分泌型的 CypA，由於過去的文獻並沒有針對動脈粥狀硬化與分泌型的 CypA 的角色探討，我們的結果顯示這兩者之間具有直接的相關性。因此，我們想知道分泌型的 CypA 是否可以當作動脈粥狀硬化的早期指標分子。過去研究已指出當巨噬細胞 (U937) 在 ox-LDL 不同濃度的處理 48 小時之下，MMP-9 的活性表現量會增加 (Yue et al., 2009)。另一研究顯示類風濕性關節炎病患的周邊血管細胞在處理 CypA 之下會增加 MMP-9 的表現，他們進一步使用巨噬細胞 (THP-1) 處理外加 CypA 24 小時，利用明膠電泳法也顯示 MMP-9 有增加的表現 (Yang et al., 2008)。綜合以上，可知當巨噬細胞處理 ox-LDL 或外加 CypA 時，都會調節 MMP-9 的產生。

根據研究指出在動脈粥狀硬化早期時內皮細胞受到損傷時 MMPs 會參與在基質重整(matrix remodeling)中，而在動脈粥狀硬化的晚期，因為纖維帽(fibrous cap)破裂或內皮組織受到腐蝕所造成斑塊的瓦解，MMPs 也會參與在基質重整中，這些結果顯示 MMPs 在動脈粥狀硬化疾病發展中扮演重要的角色(Orbe et al., 2003)。因此在我的實驗中，我想知道 CypA 是否可做為 ox-LDL 和 MMP-9 活化的中間分子。為了回答這個問題，我觀察在 ox-LDL 的處理下 MMP-9 的活性表現量，發現若在不同的時間點下換成 0.1%FBS 的培養液並加入 ox-LDL (附圖一)，MMP-9 的活性表現量會隨著 ox-LDL 處理時間的增加而增加(圖二)。可是當使用另一個實驗加藥方法 (附圖二)，在同一個時間點下，將所有細胞換成 0.1 % FBS 的培養液，而在不同的時間下加入 ox-LDL，處理至一定的時間後進行收取。0 小時的控制組細胞是不加入 ox-LDL，但在 0.1 % FBS 下培養了 48 小時。明膠電泳結果顯示當細胞處理 ox-LDL 的時間增加，MMP-9 的活性表現量並不會隨之增加。這個結果和圖二的結果明顯不同，也跟過去的文獻不符合。猜想可能是我們培養的巨噬細胞(U937)會因低血清的刺激而活化 MMP-9，為了確定是否因為低血清刺激細胞而導致 MMP-9 的活化，所以我們利用正常培養液(10 % FBS)去處理巨噬細胞，在同一個時間點下換取新鮮的培養液(10 % FBS)，在不同的時間點下加入 ox-LDL，明膠電

泳分析法結果仍然顯示 MMP-9 活性的表現量是下降的 (圖五), 發現 MMP-9 活性表現量似乎不是因為低血清的關係所造成的。因此, 也可能是分析 MMP-9 活性的分析方法有問題, 我們使用明膠電泳法 (Zymography) 來分析 MMP-9 的活性表現量, 雖然這個分析方法是文獻上普遍使用的分析方法 (Xu et al., 1999; Yue et al., 2009), 可是當我使用這種分析方法進行多次實驗, 但還是無法看到 MMP-9 表現量的差異性。因為無法利用明膠電泳法觀察 MMP-9 活性的改變, 因此使用西方點墨法直接去觀察 MMP-9 蛋白表現量的差異性, 發現當我們使用不同濃度 ox-LDL 去處理巨噬細胞 24 小時後, MMP-9 的蛋白表現量有明顯的增加 (圖六)。這個結果顯示, 當巨噬細胞處理 ox-LDL 後會調節 MMP-9 的表現量, 然而在我們細胞系統中並沒有看到 MMP-9 的活性有改變。另一方面, 在臨床的資料也顯示(與彰化基督教醫院合作), 屬於動脈粥狀硬化晚期的急性心肌梗塞病人的周邊血液中, MMP-9 的表現量跟健康人做比較是呈現顯著上升的 (附表一)。

反觀分泌型 CypA 在急性心肌梗塞病人周邊血液中的表現量, 與健康人做比較則是沒有差異的 (附表一)。彰化基督教醫院的臨床資料是測量動脈粥狀硬化晚期急性心肌梗塞病人的周邊血液中, 不同因子和蛋白的含量, 做成圖表。因此, 我們認為分泌型 CypA 在動脈粥狀硬化晚期的病人身上, 沒有做為檢測因子的條件, 然而我們並無法排除

分泌型 CypA 可能在動脈粥狀硬化發展的早期中扮演著重要的角色。

雖然明膠分析 MMP-9 的活性表現並未隨著 ox-LDL 的處理而有明顯的改變，與西方點墨法分析蛋白表達量的結果不同，但是不管用哪一種實驗加藥方法處理之下，我們都可以發現，當巨噬細胞處理 ox-LDL 之後，會使細胞內磷酸化 ERK 有增加的表現（圖三及圖七），進一步促使細胞內的訊息傳遞。已知在細胞內 ERK pathway 參與很多重要的作用，例如，調控細胞週期 (cell cycle)、細胞增生、防止細胞凋亡等 (Chang et al., 2003)。由此可知細胞在受到 ox-LDL 這種氧化壓力之下，會使 ERK pathway 的活化導致 MMP-9 表達的增加，並促使細胞增生，防止細胞凋亡。由於在動脈粥狀硬化形成的過程中會形成血栓，使組織壞死，所以結締組織中的內皮細胞會不斷增生和修補基質，最後形成纖維帽(fibrous cap) (Glass and Witztum, 2001)。因此在動脈粥狀硬化中，我們猜測 ERK pathway 的活化會使內皮細胞不斷增生，是疾病形成的重要因素之一。過去文獻也指出在血管腔平滑肌細胞的增生和移行，分泌型 CypA 也扮演著重要的角色。作者利用轉殖老鼠(Transgenic mouse)過度表現 CypA，取出這些轉殖老鼠的大動脈平滑肌細胞分析細胞移行和細胞增生的結果，發現過度表現 CypA 的大動脈平滑肌細胞比控制組的細胞，細胞移行和細胞增生的比例都有明顯的增加 (Sato et al., 2008)。

過去對分泌型 CypA 的研究已知，CD147 是分泌型 CypA 在細胞膜上的接受者(receptor) (Pushkarsky et al., 2005)。有文獻指出經由 CypA 處理 24 小時後的巨噬細胞 (THP-1)，利用 Real-Time PCR 分析，發現 CD147 mRNA 的表現量並不會增加(Yang et al., 2008)，這篇作者是認為 CypA 調控 MMPs 可能是藉由直接與 CD147 結合，並非去影響 CD147 mRNA 的表現量。而另有文獻提出利用 ox-LDL 處理後的巨噬細胞 (U937)，利用流式細胞儀分析細胞膜上的 CD147，可以觀察到細胞膜上的 CD147 蛋白表現量的改變 (Yue et al., 2009)。因此我們想知道在我們的實驗中，利用巨噬細胞(U937)處理外加 CypA 或 ox-LDL 後，CD147 mRNA 或 CD147 蛋白是否會有所改變，並且進一步探討細胞內 ERK pathway 活化的狀況。在我們的實驗中發現，利用巨噬細胞(U937)處理外加 CypA 或 ox-LDL 24 小時後，CD147 mRNA 並沒有顯著的改變(圖八)，是跟 Yang 等人的報導是相同的 (Yang et al., 2008)。也符合過去文獻指出利用不同濃度的 ox-LDL 處理巨噬細胞 (U937)，CD147 mRNA 的表現量也沒有明顯的改變 (Yue et al., 2009)。因為在 mRNA 的層面上並沒有看到明顯的改變，因此我觀察了 CD147 在細胞中的分佈的蛋白表現分佈。利用細胞免疫螢光染色(Immunofluorescence)，在處理 CypA 或 ox-LDL 的情況之下，去偵測在細胞中 CD147 的表現分佈。發現當細胞處理 CypA 之後，

細胞膜上的 CD147 表現量會有明顯的聚集(圖九 (A))。我們的結果符合過去文獻，在初發炎的白血球細胞中細胞膜上的 CD147 蛋白表現量會比無發炎的白血球細胞還要高，作者猜測在細胞膜上增加 CD147 表現量是為了提升白血球和胞外 CypA 之間的互動 (Zhu et al., 2005)。由此我們推測 ox-LDL 刺激巨噬細胞後產生的分泌型 CypA 可以使 CD147 在細胞膜上的表現分佈呈現改變，有利於增強分泌型 CypA 對於細胞的作用。過去研究指出，當細胞外的 CypA 與細胞上的 CD147 結合後，細胞膜上的 CD147 會透過活化 ERK pathway 和 NF- κ B pathway 來調控 MMP-9 的表現 (Kim et al., 2009)。因此我們同時也觀察細胞內 MAPK pathway 活化的情況。西方點墨法分析結果顯示巨噬細胞在外加 CypA 的處理下，細胞內的磷酸化 p38 (圖十 (A)) 和磷酸化 ERK (圖十 (B)) 的表現量都有顯著改變。所以，我們認為當巨噬細胞在處理外加 CypA 後，細胞外的 CypA 會與細胞上的 CD147 結合，快速活化細胞內 ERK pathway，進一步的促使細胞內訊息調控。

之前文獻曾指出，使用巨噬細胞 (THP-1) 外加 200 ng/ml CypA 的處理之下會使 MMP-9 有增加的表現，且作者在處理外加 CypA 時也加入 ERK 的抑制劑 (U0126) 的一起處理巨噬細胞後，去觀察 MMP-9 的活性表現，發現 MMP-9 的活性表現量是下降的，因此這篇

文獻指出 CypA 調節 MMP-9 的表現是藉由活化 ERK pathway (Yang et al., 2008)。因此接下來，我想探討如果在巨噬細胞(U937)中外加 CypA 處理，是否可以也看到 MMPs 蛋白表達的改變。而在我們的實驗中，使用巨噬細胞(U937)外加 450 ng/ml (50 nM) CypA 處理後，利用明膠電泳法分析 MMP-9 活性的表現量，發現 MMP-9 的活性表現量並沒有明顯的增加 (圖十一)。因為在蛋白活性上並沒有觀察到顯著的增加，因此我們利用西方點墨法進行 MMP-9 的偵測。同樣使用巨噬細胞 (U937) 處理外加 450 ng/ml (50 nM) CypA 2 小時，結果顯示當處理外加 CypA 2 小時後，MMP-9 蛋白表現量有增加 (圖十一 (C))。我們的結果顯示，巨噬細胞在外加 CypA 處理下，分泌型 CypA 會去調節 MMP-9 的表現量，而這結果是跟之前的文獻吻合的(Yang et al., 2008)。綜合我們的結果，我們認為當巨噬細胞在處理外加 CypA 後，細胞外的 CypA 會與細胞上的 CD147 結合，快速活化細胞內 ERK pathway，進一步的調控細胞內 MMP-9 的蛋白表現量。因此分泌型的 CypA 可能在動脈粥狀硬化中扮演著重要的角色。

過去文獻指出，在人類動脈粥狀硬化斑塊中，利用組織免疫染色分析，在富含巨噬細胞的區域和內皮細胞的內腔中可偵測到 CypA 的表現 (Kim et al., 2009)，但在其他組織的血管部分並無探討 CypA 的表現是如何，因此我們取得模擬動脈粥狀硬化早期的動物模型-連續

五週餵食高膽固醇食物紐西蘭白兔的組織(來自於彰化基督教醫院)，進一步研究 CypA 在其他組織的表現。在餵食五週高膽固醇食物紐西蘭白兔，測量其血液中總膽固醇含量，結果顯示比未餵食高膽固醇食物的正常兔子高出約 24 倍之多(附圖三) (Lin et al., 2006)，確實餵食高膽固醇食物會引起動物的動脈粥狀硬化症狀出現。過去利用此動脈粥狀硬化的動物模型-餵食高膽固醇食物紐西蘭白兔的組織，曾發現在第五週粥瘤病變將開始出現時，caveolin-1 的表現量到達最高，而持續餵食高膽固醇食物至第八週時，粥瘤持續增厚，caveolin-1 的表現量有顯著下降，因此作者認為 caveolin-1 可以當作一個初期動脈硬化的指標 (Lin et al., 2006)。Caveolin-1 為燒杯狀膜小囊 caveolae 的主體蛋白，與細胞膽固醇的代謝、運輸及動脈硬化有相關性(Fielding and Fielding, 2001)。過去有文獻指出，CD147 會跟 caveolin-1 做結合。當 CD147 與 caveolin-1 結合後，caveolin-1 會抑制 CD147 的活性，進一步影響 MMPs 的表現(Yurchenko et al., 2010)。在本論文中，我們利用組織免疫染色法分析兔子肝臟組織和腎臟組織，發現在肝臟組織中，有無餵食高膽固醇食物的兔子組織中，CypA 在血管周圍的表現量都很多，並沒有顯著上的差異性，且大部分都堆積在細胞內 (圖十)。在有餵食高膽固醇食物兔子肝臟組織中，雖觀察到很多脂肪堆積但是在肝臟組織中 CypA 表達是無差異性的。而在腎臟組織中，CypA 的

表現量在有餵食高膽固醇食物的兔子腎臟組織中，則有高度的表現量，而且會大量的堆積在腎絲球細胞的周圍（圖十三）。而根據我們的評分結果，無餵食高膽固醇的兔子腎臟組織平均分數為 0.83 ± 0.12 ，有餵食高膽固醇的兔子腎臟組織平均分數 1.5 ± 0.17 ，這結果具有統計上顯著差異。人類的腎臟主要負責過濾血液中的雜質、維持體液和電解質的平衡，腎的基本單位為腎元 (nephron)，腎小球是腎元中的一部分，進行過濾的工作，包含了由動脈性微血管組成的腎絲球 (glomerulus)，並由囊狀的鮑氏囊 (Bowman's capsule) 包圍起來。而我們的結果發現 CypA 在有餵食高膽固醇兔子腎臟組織的腎絲球部分表現量比較高。我們推論，當動物體發生發炎反應時，有可能會分泌出 CypA 這個發炎性分子，經由血液帶動，進入腎臟中進行過濾，最後堆積在腎絲球周圍。然而過去在臨床上，動脈粥狀硬化的病患在發病晚期時，會引起腎臟病變，但是疾病早期，並無腎臟變異相關報導。雖然過去並沒有文獻指出，分泌型 CypA 與腎臟病變有直接的相關性，但根據我們的結果顯示，這兩者之間似乎有重要的相關性。

接下來為了更進一步了解分泌性 CypA 與腎臟病變之間的相關性，我們使用腎絲球腎隔細胞株做為細胞模型進行實驗。過去的文獻指出，在 MES-13 中因血管緊張素 (angiotensin II) 所引發的 ERK 活化，ROS 會在此路徑中扮演重要的角色 (Gorin et al., 2004)。已知在 MES-13

的細胞模型中，ROS 會引發 ERK 的活化 (Ohashi et al., 2010)。所以我們想知道利用 MES-13 在氧化壓力的處理之下，是否會釋放出分泌型的 CypA。我們使用 H₂O₂ 來處理 MES-13，利用西方點墨法分析分泌型的 CypA。首先利用 H₂O₂ 對 MES-13 做不同濃度(40 μM、60 μM 及 80 μM)的測試，最後取得對細胞處理後無明顯死亡的濃度下(40 μM)做實驗處理。結果發現當細胞處理 40 μM H₂O₂ 0、10、20、30 分鐘，觀察胞外的 CypA，發現當處理 H₂O₂ 的時間增加，胞外的 CypA 的增加在 10 分鐘時就達到顯著的增加 (圖十四)。另一方面，過去研究指出，在糖尿病患者腎臟病變的過程中，會增加氧化壓力和初發炎症分子的產生，如 ICAM-1、Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Wu et al., 2009)。因此我們使用腎絲球腎隔細胞(MES-13)，處理高葡萄糖(glucose)的狀態來模擬糖尿病患者持續高血糖所引發的慢性發炎狀態下，是否會釋放出分泌型的 CypA。MES-13 平常使用的培養液為 M199/low glucose 的培養液，為了有效的觀察高葡萄糖是否會對細胞產生分泌性的蛋白有影響，將細胞先培養在無血清的 M199/low glucose 的培養液中 48 小時後，在依時間點的不同加入 25 mM 的葡萄糖溶液。初步結果顯示，發現當處理高葡萄糖的時間增加，胞外的 CypA 的增加在 24 小時達到顯著的增加 (圖十五)。由這些實驗結果可得知 MES-13 在氧化壓力或是發炎狀態之下，確實會釋

放出分泌型的 CypA。因此我們認為分泌型 CypA 或許可以當作一個腎病變早期發炎性的指標分子。另一方面，從臨床腎臟病變患者檢體分析資料中顯示，愈嚴重的腎臟病變患者(AC ratio 高者)，尿蛋白比例愈高，分泌型的 CypA 也會愈高(附表二)。這代表著在發炎反應愈嚴重的情況下，分泌型 CypA 的表現量愈高。而且在腎臟發炎的早期分泌型 CypA 的表現量就可以被偵測出來，並且隨著發炎反應的嚴重性分泌型 CypA 的表現量愈高。這個臨床資料的分析結果支持，分泌型 CypA 或許可以當作一個腎病變早期發炎性的指標分子。

綜合以上的觀點，本論文提出當巨噬細胞受到 ox-LDL 的氧化壓力之下，會釋放出分泌型 CypA，進一步活化細胞內 ERK pathway，促使細胞增生。而利用外加 CypA 處理巨噬細胞後，雖然不會增加 CD147 的表現量，但會使細胞膜上 CD147 的表現量有明顯的聚集，猜測是為了提升巨噬細胞和胞外 CypA 之間的互動，快速調控細胞內的訊息傳遞。當分泌型 CypA 與細胞膜上的 CD147 結合後會使細胞內 ERK 的活化，進一步調節 MMP-9 的表現量，促使動脈粥狀硬化的形成。我們結果顯示分泌型 CypA 可能是一個動脈粥狀硬化的早期分子，在疾病過程中扮演重要的角色。而在腎臟細胞方面，我們利用氧化壓力或發炎反應處理之下，都可以看到 CypA 被釋放出來，且在臨床資料的配合下，我們認為分泌型 CypA 應該可以當作一個腎病變

早期發炎性的分子。然而未來針對分泌型 CypA 在腎臟病變中所扮演的角色，仍需更多的研究。

參考文獻

- Auge N, Garcia V, Maupas-Schwalm F, Levade T, Salvayre R, Negre-Salvayre A (2002) Oxidized LDL-Induced Smooth Muscle Cell Proliferation Involves the EGF receptor/PI-3 Kinase/Akt and the Sphingolipid Signaling Pathways. *American Heart Association* 22:1990-1995
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434: 658-662
- Bergsma DJ, Eder C, Gross M, Kersten H, Sylvester D, Appelbam E (1991) The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases: Characterization of three separate human isoforms. *J Biol Chem* 266: 23204-23214
- Billich A, Winkler G, Aschauer H, Rot A, Peichl P (1997) Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 185:975-980
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3207-3214
- Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin R, McCubrey JA (2003) Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Int J Oncol.* 22: 469-480
- Colgan J, Asmal M, Neagu M, Yu B, Schneidkraut J, Lee Y, Sokolskaja E, Andreotti A, Luban J (2004) Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk. *Immunity.* 21:189-201.
- Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Tosetti ML, Campagnola M, Rigoni A, Pastorino AM, Cascio VL, Sawamura T (2000) Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in

endothelial cells induces the activation of NF- κ B through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 275:12633-12638

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*. 295: 2387-2392

Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinase in cancer progression. *Nature Rev Cancer*. 2:163-175

Fielding CJ, Fielding PE (2001) Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev*. 49:251-264

Galat A (1993) Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem* 216:689-707

Gorin Y, Ricono JM, Wagner B, Kim NH, Bhandari B, Choudhury G, Abboud HE (2004) Angiotensin II-induced ERK1/ERK2 activation and protein synthesis are redox-dependent in glomerular mesangial cells. *Biochem J* 381: 231-239

Glass CK, Witztum JL (2001) Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* 104:503-516

Holvoet P (2004) Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol* 59: 479-484

Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, Lambeth JD, Berk BC (2000) Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res*. 87:789-796

Kim H, Kim WJ, Jeon ST, Koh EM, Cha HS, Ahn KS, Lee WH (2005) Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clin Immunol*. 116:217-224

Kim JY, Kim WJ, Kim H, Suk K, Lee WH (2009) The stimulation of CD147 induces MMP-9 expression through ERK and NF- κ B in

macrophages: implication for Atherosclerosis. *Immune Netw.* 9: 90-97

Krummrei U, Bang R, Schmidtchen R, Brune K, Bang H (1995) Cyclophilin-A is a zinc-dependent DNA binding protein in macrophages. *FEBS Lett.* 371: 47-51

Kume N, Gimbrone, MA Jr (1994) Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest.* 93: 907-11

Lin SJ, Shyue SK, Hung YY, Chen YH, Ku HH, Chen JW, Tam KB, Chen YL (2005) Superoxide dismutase inhibits the expression of VCAM-1 and ICAM-1 induced by TNF α in human endothelial cells via the JNK/p38 pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 334-340

Lin WW, Lin YC, Chang TY, Tsai SH, Ho HC, Chen YT, Yang VC (2006) Caveolin-1 expression is associated with plaque formation in hypercholesterolemic rabbits. *J Histochem Cytochem.* 54: 897-904

Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC (2004) Genetic basis of Atherosclerosis: Part I new genes and pathways. *Circulation.* 110: 1868-1873

Maseri A (1997) Inflammation, atherosclerosis, and ischemic events: exploring the hidden side of the moon. *N Engl J Med* 336: 1014

Marks AR (1996) Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev* 76: 631-649

Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K (2007) Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis. *Curr Med Chem.* 14:3209-3220

Nagase H, Woessner JF (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274: 21491-21494

Niki E (2004) Antioxidants and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions* 32:156-159

Ohashi N, Urushihara M, Satou R, Kobori H (2010) Glomerular

angiotensinogen is induced in mesangial cells in diabetic rats via reactive oxygen species-ERK/JNK pathways. *Hypertension Research* 33: 1174-1181

Orbe J, Rodríguez JA, Arias R (2003) Antioxidant vitamins increase the collagen content and reduce MMP-1 in a porcine model of atherosclerosis: Implications for plaque stabilization. *Atherosclerosis*. 167:45-53

Paduch R, Walter-Croneck A, Zdzisińska B, Szuster-Ciesielska A, Kandefer-Szerszeń M (2005) Role of reactive oxygen species (ROS), metalloproteinase-2 (MMP-2) and interleukin-6 (IL-6) in direct interactions between tumour cell spheroids and endothelial cell monolayer. *Cell Biol Int*. 29:497-505.

Price ER, Zydowsky LD, Jin MJ, Baker CH, McKeon FD, Walsh CT (1991) Human cyclophilin B: A second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 1903-1907

Pushkarsky T, Yurchenko V, Vanpouille C, Brichacek B, Vaisman I, Hatakeyama S, Nakayama KI, Sherry B, Bukrinsky MI (2005) Cell surface expression of CD147/emmprin is regulated by cyclophilin 60. *J. Biol. Chem*. 280:27866-27871

Satoh K, Matoba T, Suzuki J, O'Dell MR., Patrizia Nigro Zhaoqiang Cui, Mohan A, Pan S, Li L, Jin ZG, Yan C, Abe JI, Berk BC (2008) Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 117:3088-3098

Satoh K, Shimokawa H, Berk BC (2010) Cyclophilin A—Promising new target in cardiovascular therapy. *Circ J*. 74: 2249-2256

Seko Y, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Murayama R, Nagai R (2004) Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Comm*. 317: 162-168

Sherry B, Yarlett N, Strupp A, Cerami A (1992) Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biochemistry* 89:3511-3515

Starckx S, Van den Steen PE, Verbeek R, van Noort JM, Opdenakker G (2003) A novel rationale for inhibition of gelatinase B in multiple sclerosis: MMP-9 destroys alpha B-crystallin and generates a promiscuous T cell epitope. *J. Neuroimmunol.* 141: 47-57.

Suzuki J, Jin ZG, Meoli DF, Matoba T, Berk BC (2006) Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 98:811-817

Tomita T, Nakase T, Kaneko M, Shi K, Takahi K, Ochi T, Yoshikawa H (2002) Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 46: 373-378

Toole BP (2003) Emmprin (CD147), a cell surface regulator of Matrix MetalloProteinase production and function. *Curr Top Dev Biol.* 54:371-389

Wu J, Mei CL, Vlassara H, Striker GE, Zheng F (2009) Oxidative stress-induced JNK activation contributes to proinflammatory phenotype of aging diabetic mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 297:1622-1631

Xu XP, Meisel SR., Ong JM., Kaul S, Cercek B, Rajavashisth TB., Sharifi B, Shah PK. (1999) Oxidized Low-Density Lipoprotein regulates Matrix Metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* 99:993-998

Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T (1998) Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:628-640

Yang Y, Lu N, Zhou J, Chen ZN, Zhu P (2008) Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages

via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 47:1299-1310

Yue HH, Leng N, Wu ZB, Li HM, Zhu P (2009) Expression of CD147 on phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-treated U937 cells differentiating into foam cells. *Arch Biochem Biophys*. 485:30-34

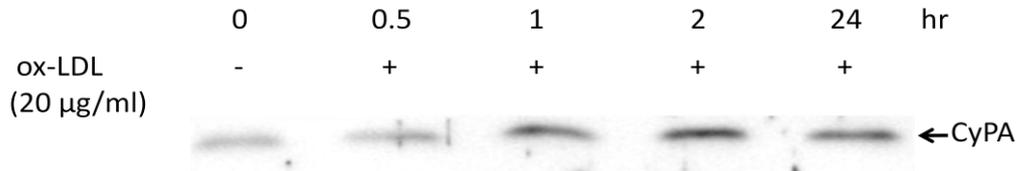
Yurchenko V, Constant S, Eisenmesser E, Bukrinsky M (2010) Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin Exp Immunol*. 160: 305-317

Zhu P, Ding J, Zhou J, Dong WJ, Fan CM, Chen ZN (2005) Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production. *Arthritis Res Ther* 7:1023-1033

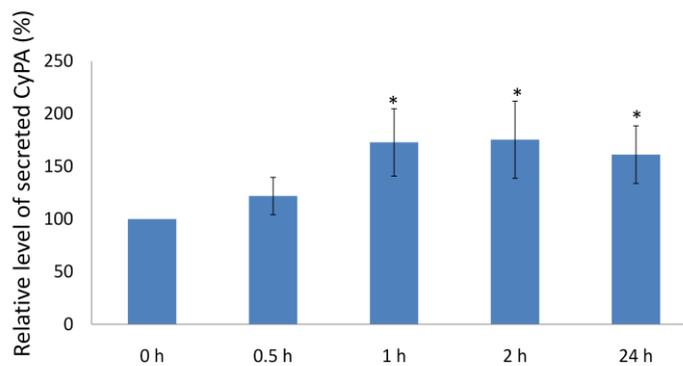
Zhu C, Wang X, Deinum J, Huang Z, Gao J, Modjtahedi N (2007) Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia. *J Exp Med*. 204:1741-1748

圖目

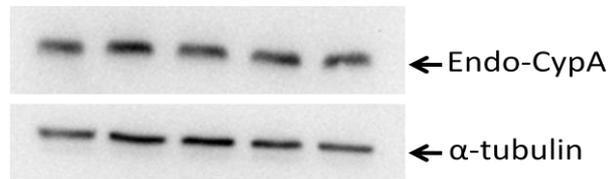
(A)



(B)

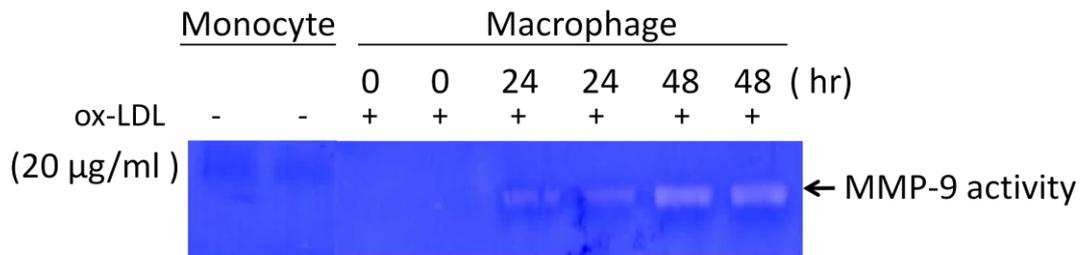


(C)



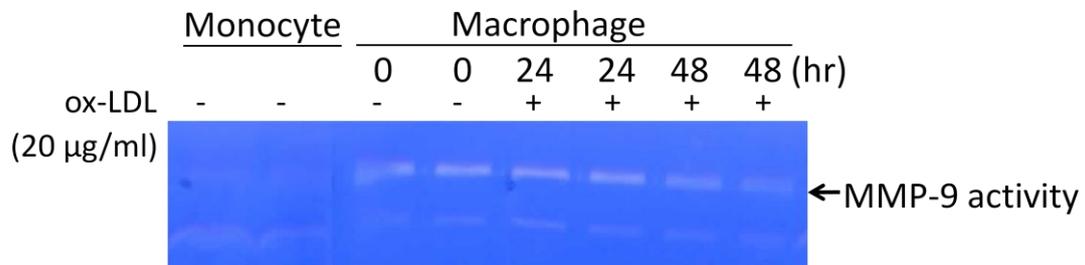
圖一、由單核球所分化的巨噬細胞在處理 ox-LDL 下分泌性 CypA 有增加的表現。(A)由單核球所分化的巨噬細胞在 0.1% FBS 下，利用 20 μ g/ml ox-LDL 分別處理 0、0.5、1、2 及 24 小時(0 小時不加 ox-LDL)，收取胞外蛋白，利用西方點墨法分析分泌型的 CypA。(B)統計圖為十次獨立實驗的 means \pm SEM，*代表與未經處理的相同細胞比較後達顯著差異(P<0.05)。(C) 由單核球所分化的巨噬細胞在 0.1% FBS 下，利用 20 μ g/ml ox-LDL 分別處理 0、0.5、1、2 及 24 小時(0 小時不加

ox-LDL)，收取胞內蛋白，利用西方點墨法分析細胞內 CypA 的表現樣。 α -tubulin 為胞內蛋白控制組。

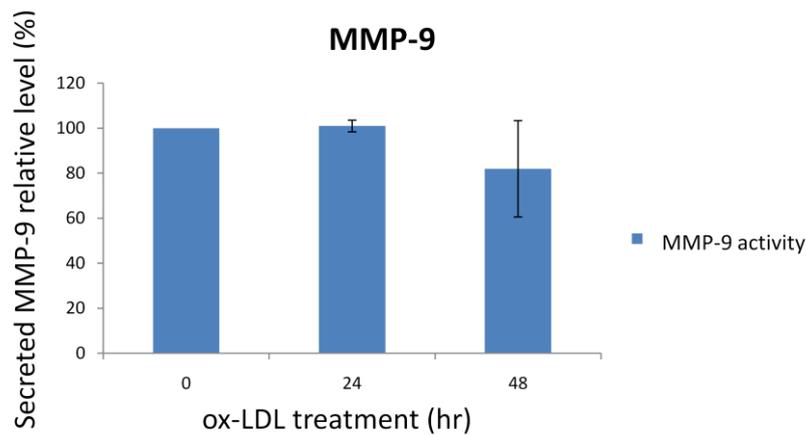


圖二、由單核球所分化的巨噬細胞在處理 ox-LDL 下胞外 MMP-9 的活性有增加的表現。由單核球所分化的巨噬細胞在 0.1% FBS 下，利用 20 μ g/ml ox-LDL 分別處理 0、24 及 48 小時(0 小時加 ox-LDL)，收取胞外蛋白，利用明膠電泳分析法分析胞外 MMP-9 的活性。未處理 ox-LDL 的單核球細胞作為比對。

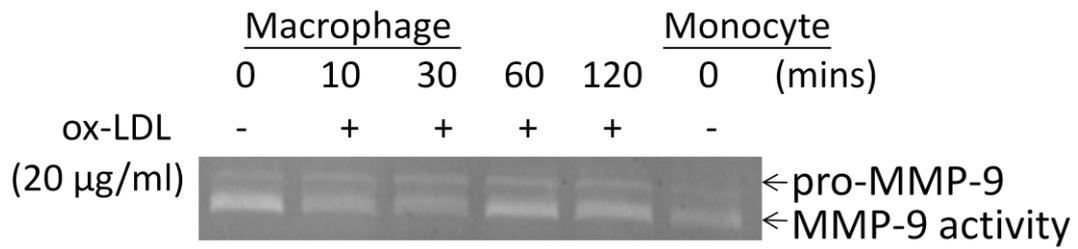
(A)



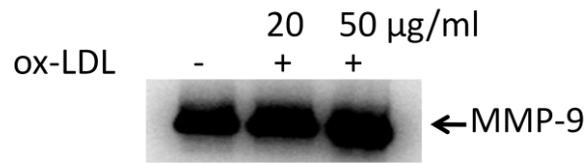
(B)



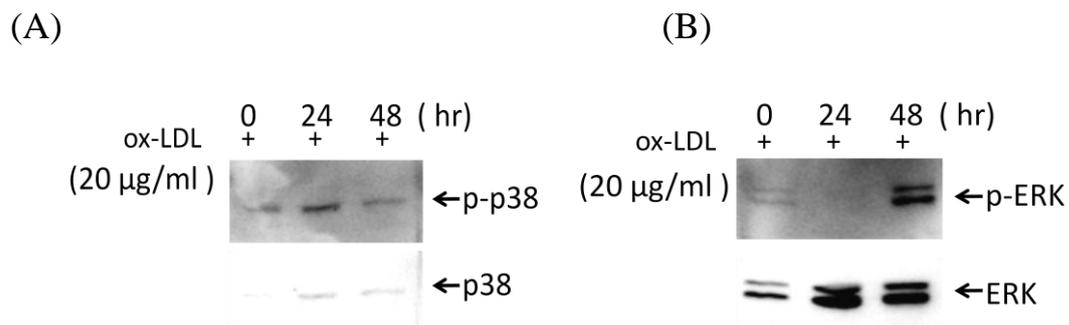
圖三、由單核球所分化的巨噬細胞在處理 0.1 % FBS 之後即增加胞外 MMP-9 的活性。(A)由單核球所分化的巨噬細胞在 0.1% FBS 下，利用 20 µg/ml ox-LDL 分別處理 0、24 及 48 小時(0 小時不加 ox-LDL，但在 0.1 % FBS 處理下 48 小時)，收取細胞外蛋白，利用明膠電泳分析法分析胞外 MMP-9 的活性。未處理 ox-LDL 的單核球細胞作為比對。(B)統計圖為四次獨立實驗的 means±SEM。



圖四、在 10 % FBS 下 MMP-9 的活性表現量。由單核球所分化的巨噬細胞在 10 % FBS 下，利用 20 µg/ml ox-LDL 分別處理 0、10、30、60 及 120 分鐘 (0 分鐘不加 ox-LDL，但在 10 % FBS 處理下 120 分鐘)，收取細胞外蛋白，利用明膠電泳分析法分析胞外 MMP-9 的活性。未處理 ox-LDL 的單核球細胞作為比對。



圖五、由單核球所分化的巨噬細胞在處理不同濃度 ox-LDL 後胞外 MMP-9 蛋白表現量會增加。(A)由單核球所分化的巨噬細胞在無血清 (no serum)的情況下，分別利用 20 和 50 µg/ml ox-LDL 處理 48 小時 (0 小時不加 ox-LDL，但在無血清處理下 48 小時)，收取細胞外蛋白，利用西方點墨法分析胞外 MMP-9 的蛋白表現量。



圖六、由單核球所分化的巨噬細胞在處理 ox-LDL 下細胞內

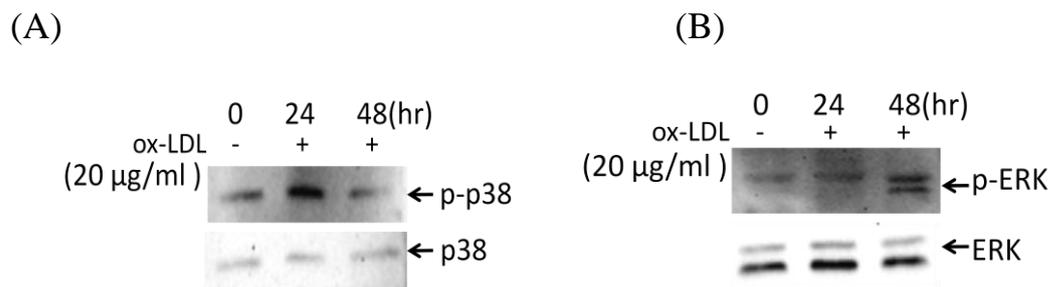
phospho-p38 和 phospho-ERK 有增加的表現。由單核球所分化的巨

噬細胞在 0.1% FBS 下，利用 20µg/ml ox-LDL 分別處理 0、24 及 48

小時(0 小時加 ox-LDL)，收取胞內蛋白，利用西方點墨法分析細胞內

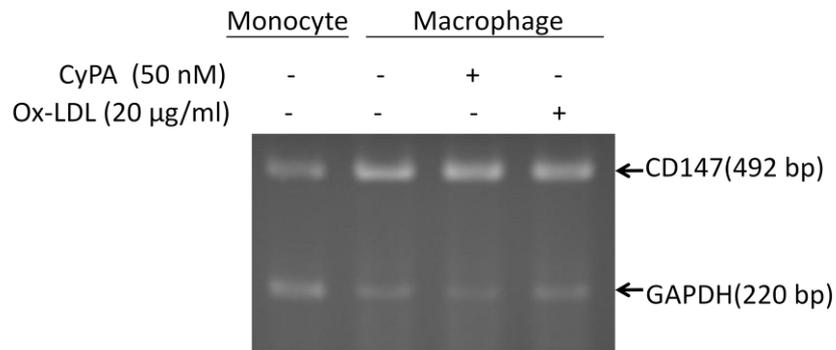
phospho-p38 (A) 和 phospho-ERK (B)。一級抗體使用 anti-

phospho-p38、anti- phospho-pERK、anti- p38 及 anti- ERK。

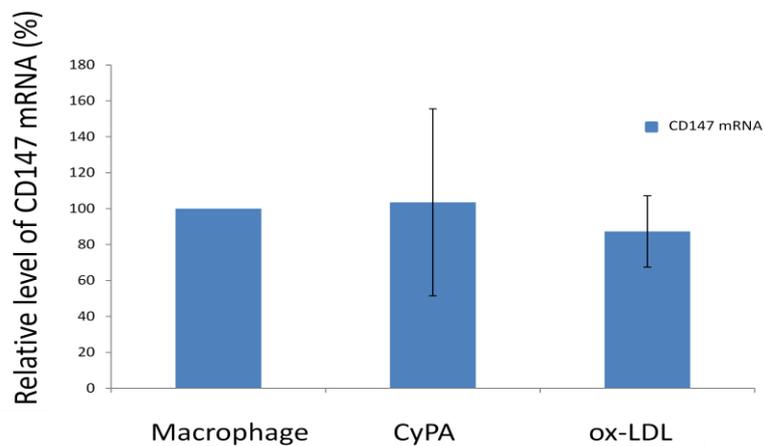


圖七、由單核球所分化的巨噬細胞在處理 0.1 % FBS 後細胞內 phospho-p38 和 phospho-ERK 有增加的表現。由單核球所分化的巨噬細胞在 0.1% FBS 下，利用 20µg/ml ox-LDL 分別處理 0、24 及 48 小時(0 小時不加 ox-LDL，但在 0.1 % FBS 處理下 48 小時)，收取胞內蛋白，利用西方點墨法分析細胞內 phospho-p38 (A)和 phospho-ERK (B)。一級抗體使用 anti- phospho-p38、anti- phospho-pERK、anti- p38 及 anti- ERK。

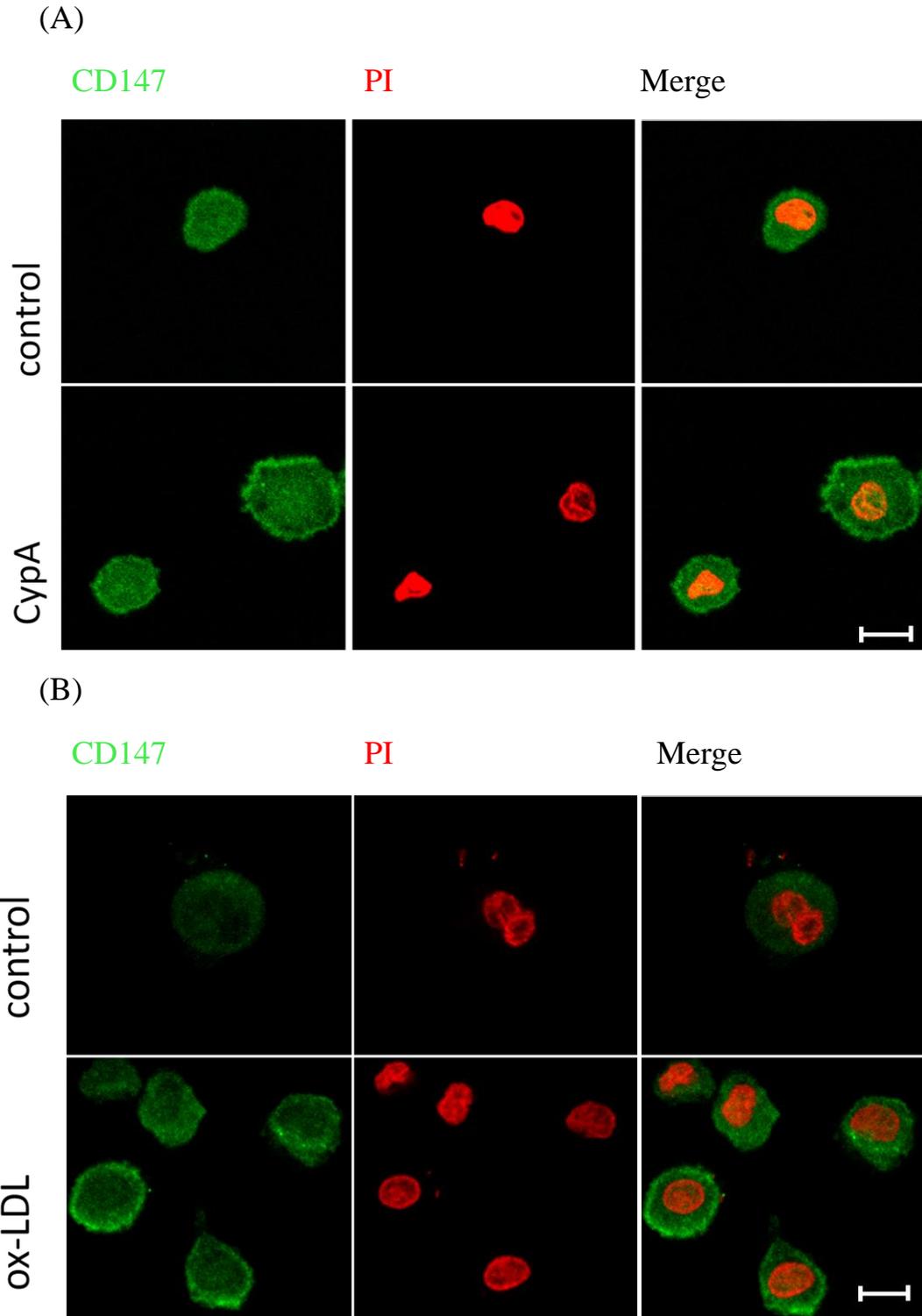
(A)



(B)

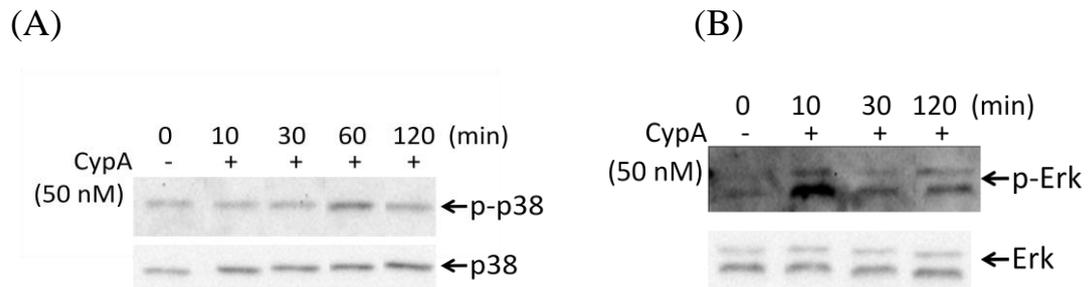


圖八、單核球所分化的巨噬細胞在處理 CypA 和 ox-LDL 下 CD147 mRNA 的表現量並沒有太大的差異性。(A)由單核球所分化的巨噬細胞，利用 50 nM CypA 和 20 μ g/ml ox-LDL 處理 24 小時，收取細胞內的 RNA，利用半定量 RT-PCR 分析 CD147 mRNA 的表現量。GAPDH mRNA 做為內控制組。(B) 統計圖為三次獨立實驗的 means \pm SEM。



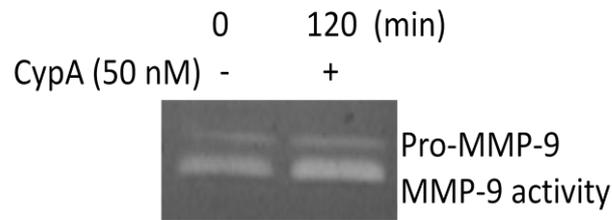
圖九、由單核球所分化的巨噬細胞在處理 CypA 或 ox-LDL 後 CD147 在細胞膜上表現量有明顯的聚集。(A)由單核球所分化的巨噬細胞，

利用 50 nM CypA 處理 24 小時，進行細胞免疫螢光觀察。(B)利用 20 μ g/ml ox-LDL 處理 24 小時，利用細胞免疫螢光染色觀察 CD147 的表現位置。利用 PI (propidium iodide) 標定細胞核(紅色)，一級抗體使用 anti-CD147(綠色) 偵測 CD147。比例尺=10 μ m。

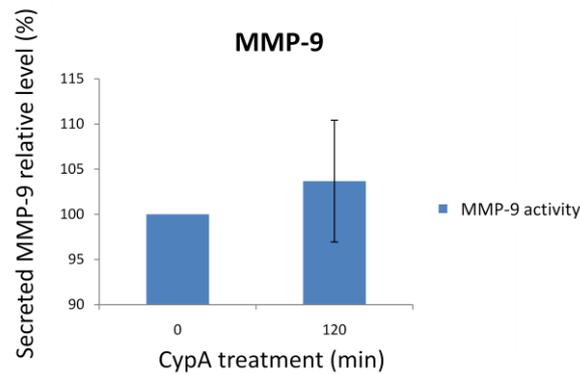


圖十、由單核球所分化成的巨噬細胞在外加 CypA 處理下細胞內 phospho-p38 和 phospho-ERK 有增加的表現。由單核球所分化的巨噬細胞，利用 50 nM CypA 分別處理 0、10、30、60 及 120 分鐘 (0 分鐘不加 CypA)，收取細胞內蛋白，利用西方點墨法分析細胞內 phospho-p38 (A) 和 phospho-ERK (B) 的表現。一級抗體使用 anti-phospho-p38、anti-phospho-pERK、anti-p38 及 anti-ERK。

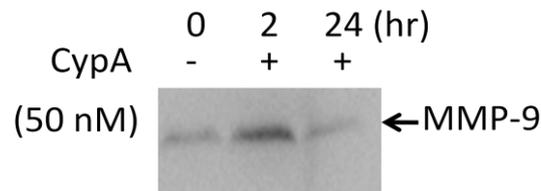
(A)



(B)

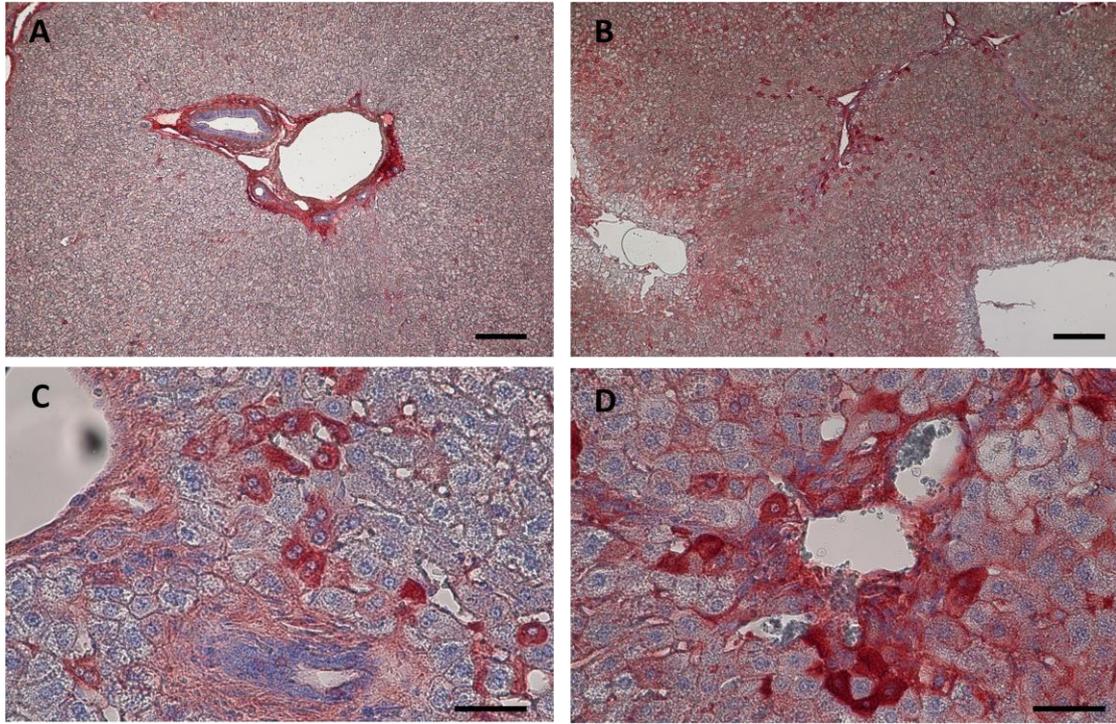


(C)

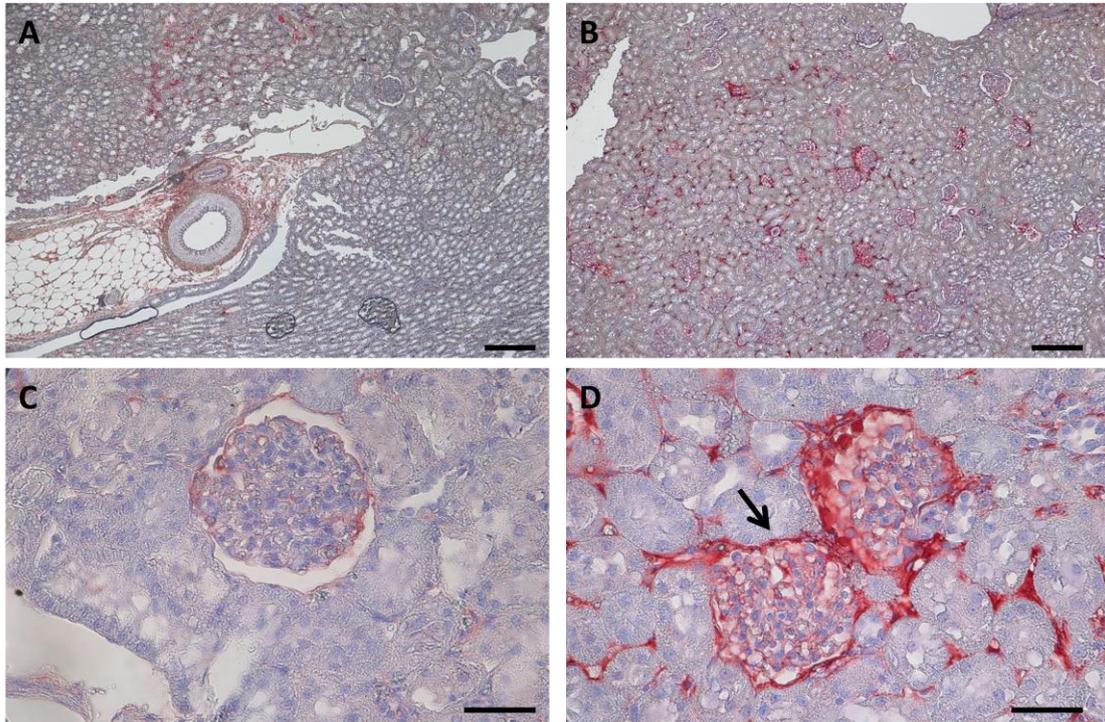


圖十一、由單核球所分化的巨噬細胞在處理外加 CypA 下細胞外 MMP-9 的活性有增加的趨勢。(A) 由單核球所分化的巨噬細胞在 complete medium 培養下，利用 50 nM CypA 分別處理 0 及 120 分鐘 (0 分鐘不加 CypA)，收取細胞外蛋白，利用明膠電泳分析法分析胞外 MMP-9 的活性。(B) 統計圖為三次獨立實驗的 means±SEM。(C) 由

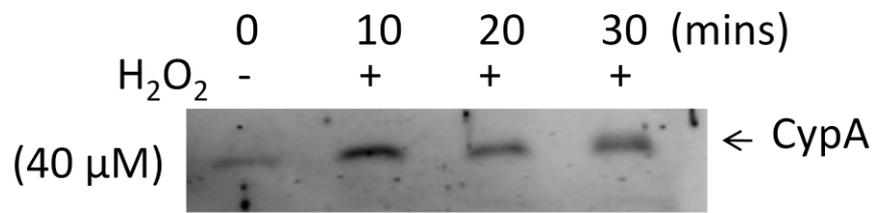
單核球所分化的巨噬細胞在 complete medium 培養下，利用 50 nM CypA 分別處理 0、2 及 24 小時 (0 小時不加 CypA)，收取細胞外蛋白，利用西方點墨法分析胞外 MMP-9 的表現。



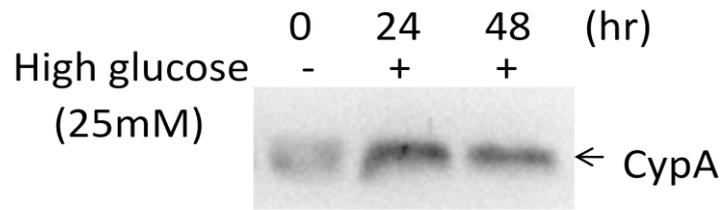
圖十二、在餵食高膽固醇食物的兔子肝臟組織中 CypA 的表現量與無餵食高膽固醇的兔子肝臟組織並無太大差異。(A、C)為未餵食高膽固醇食物兔子肝臟組織，(B、D) 為餵食 2 %高膽固醇食物五個禮拜的兔子肝臟組織。使用免疫組織染色 (請見材料與方法) 分析 CypA 的表現位置和表現量(深紅色)。A 及 B 的比例尺為 400 μm ; C 及 D 的比例尺為 100 μm 。



圖十三、在餵食高膽固醇食物的兔子腎臟組織中 CypA 的表現量有增加且會堆積在腎絲球(Glomerular)周圍。(A、C)為未餵食高膽固醇食物兔子腎臟組織，(B、D) 為餵食 2% 高膽固醇食物五個禮拜的兔子腎臟組織。使用免疫組織染色分析 CypA 的表現位置(深紅色)和表現量，而箭頭所指為腎絲球(glomerular)。A 及 B 的比例尺為 400 μm ；C 及 D 的比例尺為 100 μm 。

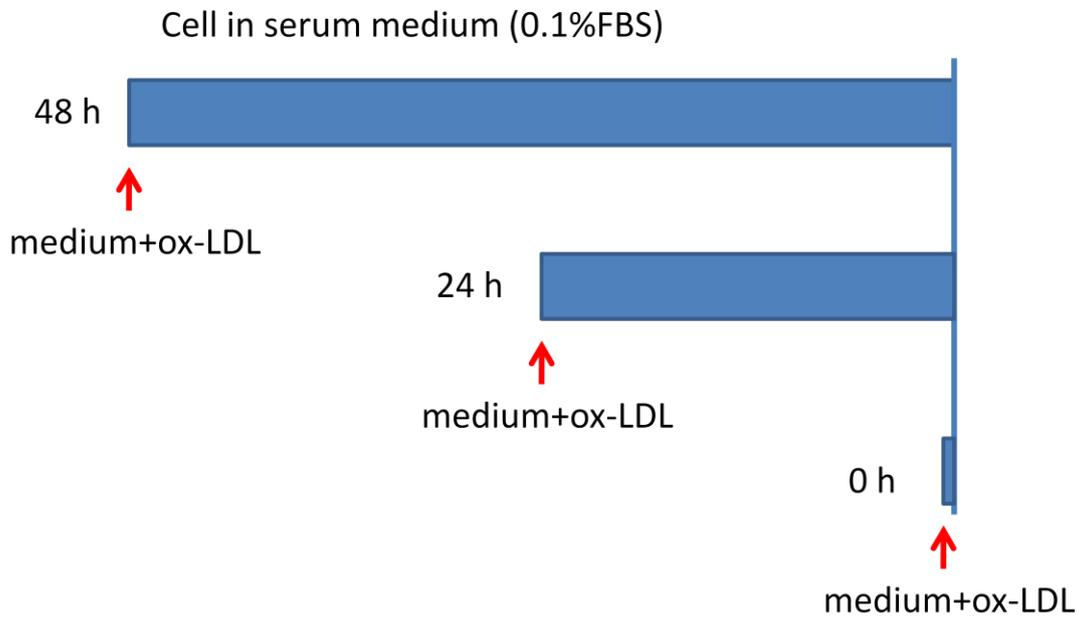


圖十四、腎絲球腎隔細胞(MES-13)在 H_2O_2 的處理下會釋放出分泌型 CypA。MES-13 在 40 μM H_2O_2 的處理 0、10、20 及 30 分鐘後，利用西方點墨法觀察胞外 CypA 的表現量。

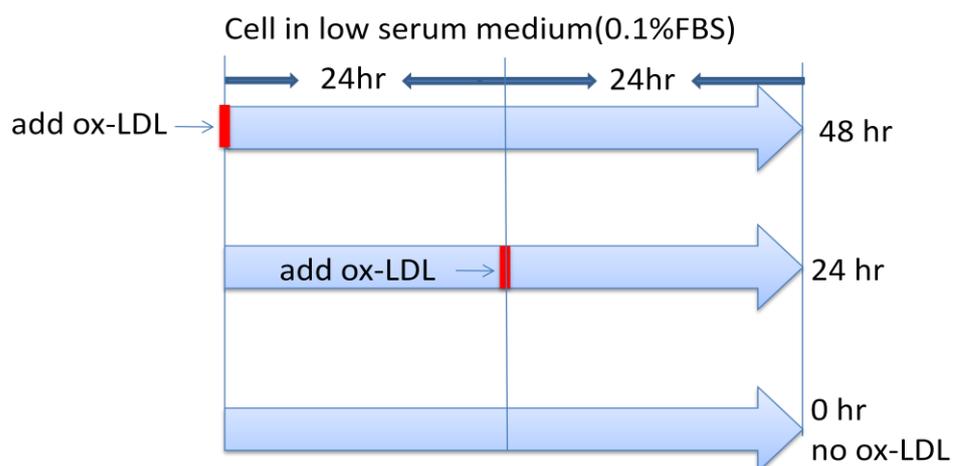


圖十五、腎絲球腎隔細胞(MES-13)在 25 mM glucose 的處理下會釋放出分泌型 CypA。MES-13 在 25 mM glucose 的處理 0、24 及 48 小時後，利用西方點墨法觀察胞外 CypA 的表現量。

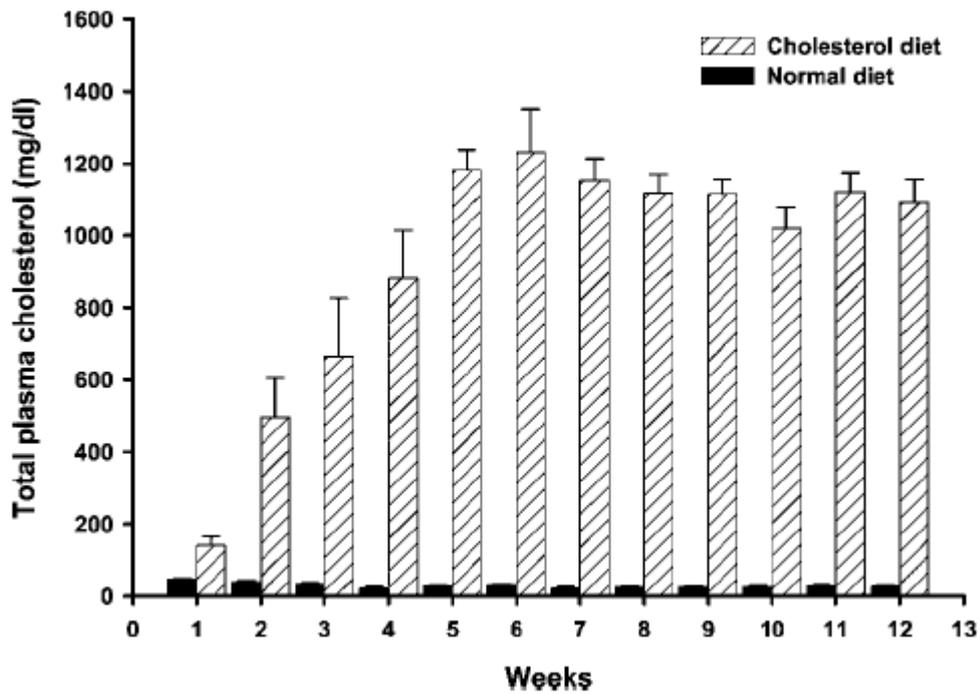
附圖



附圖一、實驗加藥方法。在不同的時間點下換取 0.1 %FBS 的培養液並同時加入 20 $\mu\text{g/ml}$ ox-LDL。而在 0 小時的時間點下，是換取 0.1 %FBS 培養液和加入 ox-LDL 後就收取培養液和細胞內蛋白。



附圖二、實驗加藥方法。在相同的時間點下換取 0.1 %FBS 的培養液，而在不同的時間點下加入 20 $\mu\text{g/ml}$ ox-LDL。而在 0 小時的時間點下，是在 0.1 %FBS 培養液培養 48 小時且不加入 ox-LDL。到了時間點後就收取培養液和細胞內蛋白。



附圖三、餵食高膽固醇食物的兔子與正常兔子(未餵食高膽固醇食物)血液中總膽固醇濃度。模擬動脈粥狀硬化的動物模型-餵食2%高膽固醇食物的紐西蘭大白兔1-13周與未餵食高膽固醇食物的兔子，測量血液中總膽固醇的濃度。統計圖為平均值±SE，n=20-40 (Lin et al., 2006)。

附表一

Variables	Health subjects	myocardial infarction	p-value
	Mean \pm SD (N=53)	patients Mean \pm SD (N=65)	
Age, years	37 \pm 10	58 \pm 12	*
Sex (male/female), numbers	11/53	56/65	*
BMI, kg/cm ²	21.5 \pm 2.6	25.6 \pm 3.5	*
Smoking Index ¹ , pack year	0.38 \pm 2.75	20.8 \pm 34.4	*
Ac-Glucose (mg/dl)	87.0 \pm 7.6	173.9 \pm 91.6	*
HbA1c	5.09 \pm 0.31	6.51 \pm 1.71	*
Insulin	10.34 \pm 17.07	19.46 \pm 23.46	*
PLT	226.8 \pm 50.5	250.2 \pm 20.0	
WBC	5.76 \pm 1.36	10.52 \pm 3.07	*
Creatinine	0.81 \pm 0.14	1.00 \pm 0.31	*
Cholesterol	169.7 \pm 31.3	191.6 \pm 46.60	*
Triglyceride	70.90 \pm 37.56	88.51 \pm 121.1	
LDL-Chol	95.98 \pm 22.28	134.1 \pm 39.61	*
Oxi-LDL	52.78 \pm 31.73	66.68 \pm 20.97	*
OLAB	501.4 \pm 408.5	317.9 \pm 300.4	*
Cyclophilin A	57.87 \pm 22.70	56.25 \pm 10.32	
Total MMP-9	26.68 \pm 27.52	246.05 \pm 245.3	*
Risk factor	2.65 \pm 0.69	4.68 \pm 1.27	
Hs-CRP	0.04 \pm 0.05	0.26 \pm 0.29	*
Fibrinogen	285.9 \pm 32.1	452.9 \pm 92.53	*

資料來自彰化基督教醫院血管暨基因體研究中心

附表二

Demographics

Group of patients	Diabetes Mellitus with Nephropathy			P [#] /P ^{&}
	AC ratio \leq 20 (n=47)	AC ratio=21-200 (n=53)	AC ratio \geq 201 (n=27)	
Creatinine (mg/dL)	1.07 \pm 0.27	1.23 \pm 0.32	1.31 \pm 0.44	0.245
BUN (mg/dL)	17.96 \pm 4.53	19.52 \pm 7.13	22.93 \pm 10.17	0.004*/0.039*
Ac sugar (mg/dL)	140.8 \pm 48.43	157.7 \pm 80.60	153.6 \pm 58.7	0.499
sE-selectin (mg/dL)	44.46 \pm 20.75	41.94 \pm 19.32	43.66 \pm 19.08	0.813
sVCAM-1 (mg/dL)	1050.8 \pm 307.6	1126.8 \pm 302.0	1301.5 \pm 548.6	0.005*/0.042*
sICAM-1 (mg/dL)	308.7 \pm 125.6	320.0 \pm 87.05	328.4 \pm 94.50	0.724
Insulin	47.03 \pm 54.85	39.10 \pm 34.36	33.94 \pm 44.66	0.457
HbA	7.43 \pm 1.90	7.84 \pm 1.70	8.25 \pm 1.92	0.171
Triglyceride (mg/dL)	115.0 \pm 63.02	112.5 \pm 60.96	142.6 \pm 73.8	0.296
LDL-C (mg/dL)	95.61 \pm 19.67	97.95 \pm 25.06	107.3 \pm 23.63	0.101
VEGF	117.7 \pm 79.17	135.7 \pm 66.96	169.4 \pm 89.24	0.018*/0.005*
enG-CSF (μ g/L)	640.9 \pm 536.5	898.7 \pm 650.2	636.0 \pm 588.4	0.184
CypA	84.81 \pm 32.27	98.22 \pm 37.52	112.9 \pm 37.62	0.006*/0.002*
Total MMP-9	103.4 \pm 76.62	105.9 \pm 81.65	95.90 \pm 56.88	0.851

Intra-group compared by one-way ANOVA.

&P<0.05, AC ratio \leq 20 compared AC ratio \geq 201 by one-way ANOVA.

資料來自彰化基督教醫院血管暨基因體研究中心