

臺北醫學大學 醫學科學研究所碩士論文

Taipei Medical University

Graduate Institute of Medical Sciences

Master Thesis

脂締素透過活化 PPAR $\alpha$  誘發 HO-1/COX-2 的表現及

對肝細胞鐵過度沉載之保護機制

**Adiponectin inhibits iron-induced hepatic damage  
through the activation of PPAR $\alpha$  mediated  
HO-1/COX-2 expression**

研究生：任治宇 (Chih-Yu Jan)

指導教授：阮淑慧 博士 (Shu-Hui Juan, Ph.D)

中華民國 98 年 6 月

# 致謝

兩年的碩士生活即將隨著這本論文的完成而告一段落。在實驗室的這兩年雖然過得不輕鬆，但卻是充足的每一天。真的很感謝一直在我身邊指導我和支持我的人：阮老師，智程、志鵬學長、周穎以及我的家人。謝謝你們的陪伴讓我能有毅力堅持到最後一刻，帶著豐碩的成果完成我的學業。

糟糕，我辦不下去了...總而言之是謝謝大家啦！！我會帶著大家的祝福朝下一個目標努力邁進。

2009.07.22

治宇

# 目錄

縮寫表-----	4
中文摘要-----	5
英文摘要-----	6
<b>第一章 緒論-----</b>	<b>7</b>
1.1 脂締素 (Adiponectin)-----	7
1.2 過氧化增生活化受體 (PPAR)-----	9
1.3 第一型血紅素氧化酶 (HO-1)-----	10
1.4 第二型環氧酶 (COX-2)-----	11
1.5 鐵 (iron)-----	12
<b>第二章 研究動機與目標-----</b>	<b>15</b>
<b>第三章 材料與方法-----</b>	<b>16</b>
3.1 細胞培養技術-----	16
3.2 西方墨點分析 (Western blotting assay)-----	17
3.3 萃取分離細胞核及細胞質蛋白-----	22
3.4 反轉錄聚合酶連鎖反應 RT-PCR-----	23
3.5 染色質免疫沉澱 (chromatin immunoprecipitation)-----	29
3.6 TUNEL assay-----	35
3.7 質體轉染法 (Plasmid Transfection)-----	35
3.8 核酸干擾技術 (RNA interference)-----	36
3.9 細胞螢光免疫染色 (immunocytochemistry)-----	38
3.10 啟動子活性分析-----	39
3.11 鐵質染色-----	40
3.12 HO-1 酵素活性測定-----	41
3.13 Electrophoretic Mobility Shift assay (EMSA)-----	41
3.14 統計分析方法-----	44
<b>第四章 實驗結果-----</b>	<b>45</b>
4.1 脂締素對老鼠肝細胞中 HO-1 及 COX-2 的影響-----	45
4.2 脂締素在肝細胞中可能的訊息傳遞途徑-----	47
4.2.1 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)在脂締素的訊息傳遞途徑 中所扮演的角色-----	47

4.2.2 p38 在脂締素的訊息傳遞途徑中所扮演的角色-----	48
4.2.3 脂締素透過 AMPK 活化促進 PPAR $\alpha$ 的核轉移-----	49
4.3 脂締素所活化的 PPAR $\alpha$ 對其下游的第一型血紅素氧化酶及第 二型環氧酶可能的調控-----	49
4.3.1 PPAR $\alpha$ 在脂締素所誘發的 HO-1 及 COX-2 中所扮演的中 間傳訊角色-----	50
4.3.2 利用轉染 Flag-PPAR $\alpha$ 融合蛋白的質體來觀察 PPAR $\alpha$ 對 HO-1 及 COX-2 表現的影響-----	50
4.3.3 以核酸干擾技術分析 PPAR $\alpha$ 在脂締素誘發 HO-1 及 COX-2 表現的必要性-----	52
4.4.4 以染色質免疫沉澱法及啟動子活性測式觀察 PPAR $\alpha$ 和 HO-1 及 COX-2 的交互作用-----	52
4.4 脂締素保護肝細胞防止鐵沉積所帶來的傷害-----	54
4.4.1 PPAR $\alpha$ 所參與的脂締素保護細胞的訊息途徑-----	55
4.4.2 HO-1 在保護細胞的機制中所扮演的角色-----	56
4.4.3 COX-2 在保護細胞的機制中所扮演的角色-----	58
4.4.4 脂締素在肝細胞中的抗發炎反應機制-----	59
<b>第五章 討論-----</b>	<b>61</b>
5.1 脂締素和 HO-1 與 COX-2 的誘發-----	61
5.2 脂締素的細胞保護功能-----	62
<b>第六章 結論和未來展望-----</b>	<b>65</b>
<b>第七章 實驗結果圖次目錄-----</b>	<b>67</b>
Fig. 1 脂締素在肝細胞中誘發 HO-1 及 COX-2 的表現，並提高 HO-1 的酵素活性	69
Fig. 2 脂締素改善不同濃度的鐵質對肝細胞的傷害-----	72
Fig. 3 脂締素在肝細胞中活化 AMPK 的訊息傳遞-----	74
Fig. 4 脂締素在肝細胞中不活化 p38 的訊息傳遞-----	75
Fig. 5 脂締素促進 PPAR $\alpha$ 的核轉移現象-----	76
Fig. 6 脂締素在肝細胞中誘發 HO-1/COX-2 的表現，需透過 PPAR $\alpha$ 的活化-----	77
Fig. 7 透過轉染 pcDNA-Flag-PPAR $\alpha$ 可大幅增加 HO-1 及 COX-2 的誘發現象-----	78
Fig. 8 給予脂締素後觀察 Flag-PPAR $\alpha$ 的核轉移現象 (螢光免疫 染色)-----	79
Fig. 9 以核酸干擾技術降低 PPAR $\alpha$ 的表現可抑制 HO-1 及 COX-2 的誘發-----	80

Fig.10 脂締素增強 PPAR $\alpha$ 和 HO-1 及 COX-2 啟動子的交互作用 (以染色質免疫沉澱法分析)-----	82
Fig.11 脂締素促進 PPAR $\alpha$ 在 HO-1 及 COX-2 上 PPRE 位置上的 binding (以 EMSA 分析)-----	83
Fig.12 脂締素增加帶 PPRE 促進子的啟動子活性-----	84
Fig.13 脂締素增加 HO-1 的啟動子活性-----	85
Fig.14 脂締素透過 PPAR $\alpha$ 的活化保護細胞防止來自鐵質的傷害--	86
Fig.15 HO-1 可保護細胞防止來自鐵質所造成的凋亡-----	87
Fig.16 HO-1 緩解鐵在細胞中的堆積現象-----	88
Fig.17 COX-2 可保護細胞防止來自鐵質所造成的凋亡-----	90
Fig.18 脂締素保護細胞防止鐵質造成細胞凋亡的情形 (TUNEL assay)-----	91
Fig.19 脂締素的抗發炎反應功能-----	93
<b>參考文獻</b> -----	<b>94</b>



## 縮寫表

AMPK	5'AMP-activated protein kinase
APN	Adiponectin
APS	Ammonium persulfate
BSA	Bovine serum albumin
caspase	Cysteine-aspartic acid proteases
COX	Cyclooxygenase
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMT	Divalent metal transporter
EtBr	Ethidium bromide
FBS	Fetal bovine serum
GADPH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HLA	Histocompatibility leukocyte antigen
HO	Heme oxygenase
P/S	Penicilin-streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PG	Prostaglandin
PI	Protease inhibitor
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PLB	Passive lysis buffer
PMSF	Phentlmethylsulphonyl fluoride
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	Peroxisome proliferators response element
PVDF	Polyvinylidene fluoride membrane
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
ROS	Reactive oxygen species
RXR	Retinoid X receptor
SDS	Sodum dodecyl sulfate
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TNF	Tumor necrosis fector
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

## 摘要

鐵質的沉積常發生在地中海型貧血或酒精性肝炎的病患體內，因為鐵質無法被正常代謝與再利用，而使得細胞中出現過多的鐵離子。過多的鐵離子將造成不正常的氧化作用與細胞傷害，它會造成細胞發炎反應、粒線體功能異常及細胞凋亡的發生。在許多研究中已指出：第一型血紅素氧化酶 (HO-1)及第二型環氧酶 (COX-2)在許多不同的組織當中，具有抗發炎及抗細胞凋亡的功能。透過誘發這些蛋白的表現，能保護細胞防止來自氧化壓力或發炎反應的傷害。在我們的實驗中，證實透過給予肝細胞脂締素 (adiponectin)可明顯增加 HO-1 及 COX-2 的 RNA 及蛋白質的表現量。透過轉染帶 PPAR $\alpha$  的質體處理後，可更明顯的提高蛋白表現量達 6.5 倍。而相對的，減少細胞中 PPAR $\alpha$  的表現量將會反轉脂締素誘發其表現的效果。顯示了這個誘發作用是必須依賴 PPAR $\alpha$  的。此外，脂締素所誘發的 HO-1 及 COX-2 可以減輕過多鐵質所造成的肝細胞的凋亡和發炎反應。透過給予不同的抑制劑，我們發現了脂締素的細胞保護功能主要是建立在 HO-1 的抗細胞凋亡及 COX-2 的抗發炎反應的功能上。在本實驗中，證明了脂締素透過活化 PPAR $\alpha$  誘發 HO-1 及 COX-2 表現的分子機轉；以及脂締素保護肝細胞防止細胞凋亡效果。

# Abstract

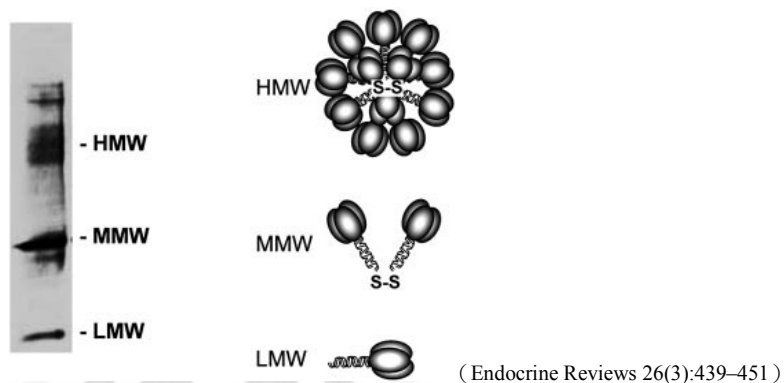
Iron deposition usually occurs in Thalassemia or alcoholic liver injury patients, of which the process of iron transportation or utilization is suppressed. Overloaded iron in cells causes oxidative injury and mitochondria dysfunction. It elicits inflammatory response and the activation of apoptotic pathway in various cell types, thereby leading to cell death and tissue damage. Many studies have shown that heme oxygenase-1 (HO-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) have important anti-inflammatory and anti-apoptotic roles in various tissues. Induction of these enzymes has been shown to protect various cells from oxidative or inflammatory insults. In this study, we demonstrated that hepatocytes treated with adiponectin caused significant increases in HO-1/COX-2 RNAs and protein expressions. It was further increased by approximately 6.5 fold in cells transfected with pcDNA3.1-PPAR $\alpha$ . Conversely, PPAR $\alpha$  knock down reversed APN-mediated HO-1/COX-2 induction, suggesting that induction of HO-1/COX-2 is dependent on PPAR $\alpha$ . Additionally, adiponectin mediated HO-1/COX-2 induction is essential for the elimination of iron-mediated apoptosis and inflammation in hepatocytes. Using pharmaceutical inhibitors, we further demonstrated that the anti-apoptotic effect of HO-1 and anti-inflammatory effect of COX-2 synergistically contributed to the protection of adiponectin against iron-mediated hepatic injury. Taken together, we illustrated the effects and molecular mechanism of adiponectin mediated PPAR $\alpha$  activation, in a concomitant induction of HO-1/COX-2 in the protection of hepatic apoptosis in vitro.



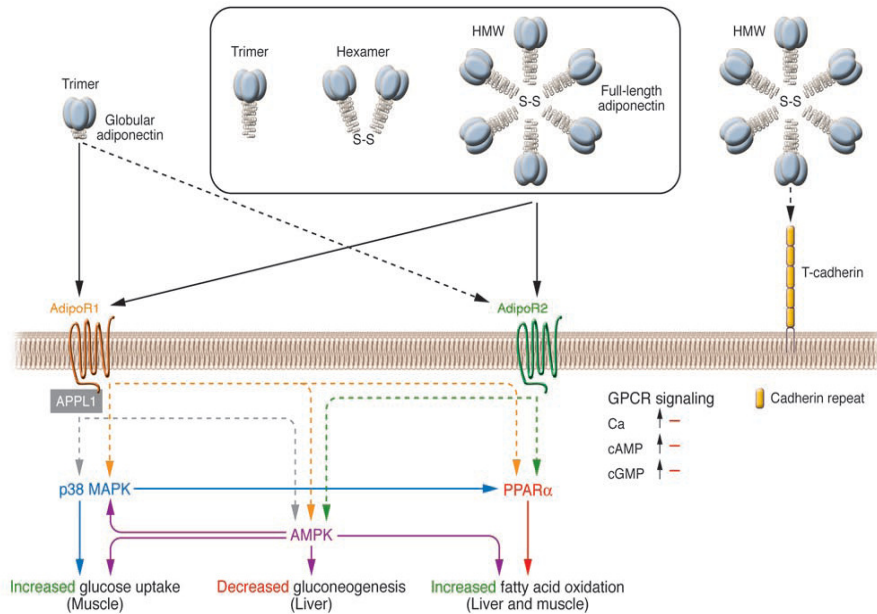
# 一、緒論

## 1.1 脂締素 (Adiponectin)

脂締素 (adiponectin) 是一種由脂肪細胞所分泌的血漿蛋白，主要存在於母乳和血漿中(1)。一般可依其分子量分類為高分子量、中分子量及低分子量等三種類型 (2)。



它被認為是直接和脂質的代謝有關 (3, 4)，可透過數種細胞核上的接受器或和 AMPK (5'AMP-activated protein kinase) 等磷酸化激酶來對脂肪細胞的分化和脂質的堆積造成影響 (1, 3, 4)；它也和肌肉中的脂肪酸利用相關，能影響其氧化的效率 (2, 5)。



(*J. Clin. Invest.* 116:1784 - 1792 (2006).)

另一方面，肝細胞及肌肉細胞的胰島素敏感度 (insulin sensitive) 也和脂締素有關，它能夠對此敏感度有所提升 (4)。報告指出：第二型糖尿病患者血液中脂締素的量較一般正常的平均值為低。而給予脂締素來治療時，能讓此對胰島素敏感度低的情形獲得改善 (6)。在抗發炎反應的角色中，有報告指出：脂締素在心血管具有抑制氧化傷害及發炎反應相關的細胞激素表現來達到保護的功用。在某些患有心血管硬化或血管梗塞的病人血中的脂締素的含量，也被發現較一般正常平均值為低 (7)。另外，脂締素也可透過對於某些細胞核上接受器的活化，來降低發炎反應對細胞的傷害 (8)。

## 1.2 過氧化增生活化受體

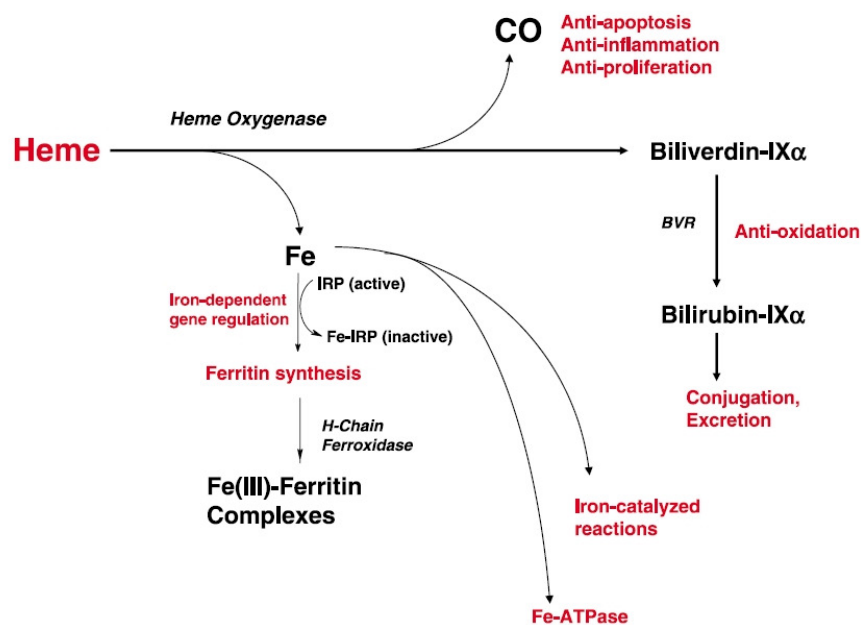
### (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)

過氧化體增生活化受體 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 為一種 nuclear receptor。當 ligand 附著上後會被活化並核轉移 (nuclear translocation) 進入細胞核內和 RXR (retinoid X receptor) 形成一雙聚體 (heterodimer) 附著到 DNA 序列上的 PPREs (peroxisome proliferators response elements) 進行下游基因的調控 (9)。另外也有報告指出：PPAR $\alpha$  及 PPAR $\gamma$  會透過某些蛋白質激酶 (protein kinase) 如 AMPK (5'AMP-activated protein kinase) 的磷酸化，也可使它發生核轉移並進行其調控的功能 (5,10)。目前已知 PPAR 分為三種型態：分別是 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta/\delta$  及 PPAR $\gamma$  (5)。我們這次主要探討的 PPAR $\alpha$ ，主要分布在肝臟、心臟、肌肉及脂肪組織中 (9, 11)，所調控的下游基因功能也不盡相同。目前已被發現的是，它可以調控脂肪細胞 (adipocyte) 的增生以及脂肪的累積 (2, 4)。也和體內胰島素的敏感程度 (insulin sensitive) 有關，第二類型的糖尿病便和此類受器的異常有關 (12)。另外在心血管系統方面，它具有抗發炎等保護細胞的作用，防止因細胞發炎所導致的傷害而導致的血管硬化等病變 (13)。而這類的心血管保護作用是和其下游所調控的 HO-1 有關也已經獲得證實

(11)。

### 1.3 第一型血紅素氧化酶 (Heme Oxygenase-1, HO-1)

血紅素氧化酶 (Heme oxygenase) 主要可分為兩型：第一型與第二型。其中第二型 (Heme oxygenase 2, HO-2) 為細胞中的構成酵素 (constitutive enzyme)；本論文中所探討的第一型血紅素氧化酶 (Heme oxygenase 1, HO-1) 則是一種經過刺激才會被大量表現的誘發酵素 (induced enzyme) (14)。在氧化反應劇烈進行的細胞如心肌細胞或肝細胞等，它的誘發現象會更明顯 (14, 15)。HO-1 主要是透過代謝血紅素 (heme) 過程的產物包含一氧化碳及膽紅素 (bilirubin) 來進行抗發炎反應 (anti-inflammation) 及清除掉細胞刺激物如自由基 (ROS) 等 (16)。



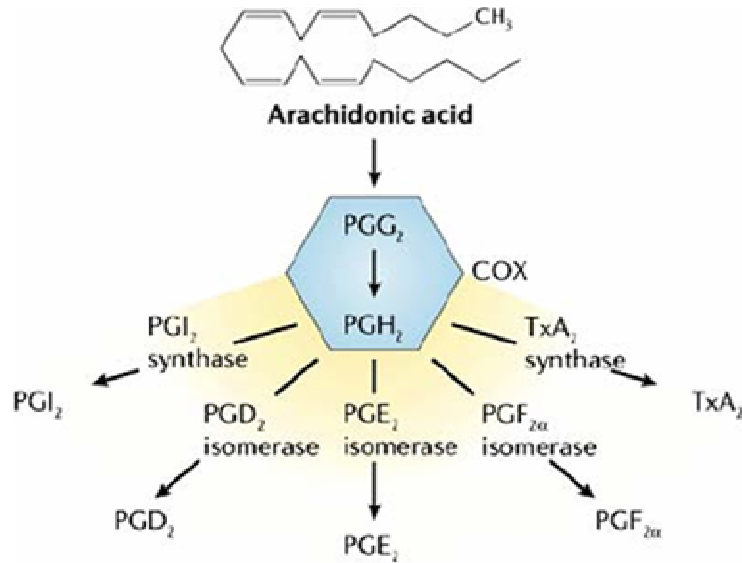
(*Physiol Rev* 86: 583–650, 2006)

同時也可對會造成細胞凋亡的分子如 caspase 3 進行抑制，來降低

細胞的死亡 (15)。另一方面，也有報告指出：HO-1 可和控制細胞生存 (cell survive) 的 PI3K/AKT 訊號途徑反應，促進此訊號途徑的活化，進一步的達到細胞生存的目標 (15, 17)。透過以上幾點，HO-1 被認為是在細胞保護方面佔有很重要的地位。

#### 1.4 環氧酶 (Cyclooxygenase, COX)

環氧酶 (Cyclooxygenase, COX) 為體內代謝脂質的酵素之一。主要負責和花生油四烯酸有關的代謝，而其產物為前列腺素類的激素，常見的有 PGE<sub>2</sub>、血栓素等。本篇論文所提的 COX-2 則和 HO-1 一樣，是受到刺激才會大量表現的誘發酵素。一般認為，COX-2 除了和脂質代謝有關外，也和發炎反應有關 (9)。如在心血管方面，被認定在缺氧後再充氧過程 (ischemia-reperfusion) 所造成的氧化性發炎反應中，能有效的扮演一個抗發炎反應的角色。所以能降低血管硬化或栓塞所帶來的風險 (8)。另一方面，COX-2 的某些下游產物也能和細胞核膜上的特定受器作用，同樣也能達到抗發炎等細胞保護。這部分已有報告指出：COX-2 產物中的 prostaglandin I<sub>2</sub> and E<sub>2</sub>



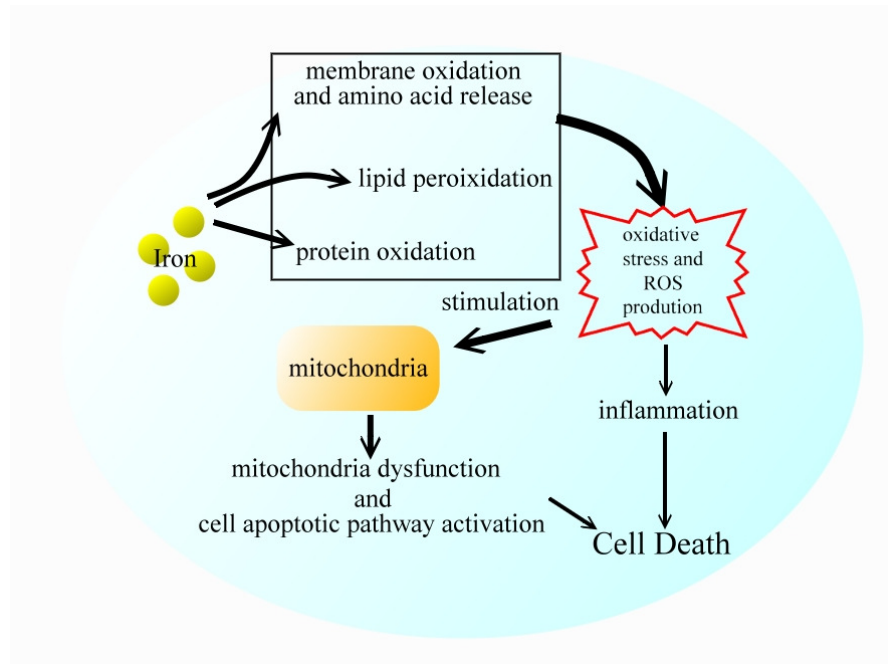
在肝細胞內可有效的降低某些細胞激素（cytokine）如干擾素（interferon INF- $\gamma$ ）及腫瘤壞死因子（TNF- $\alpha$ ）所造成的發炎反應，降低組織的損傷 (18, 19)。

## 1.5 鐵 (Iron)

鐵 (Iron) 為身體機能正常維持所需的必要元素之一，主要的來源為食物攝取。鐵的主要吸收區段為十二指腸的前段，此處對於身體需鐵量敏感，為主要的調控區段。而鐵質恆定的調控可分為儲存調控 (stores regulators)：是依照體內儲鐵量的改變，改變腸細胞的吸鐵能力；以及造血調控 (erythropoietic regulators)：反應造血鐵的需求量還有需氧量的變化情形，維持體內紅血球產量的平衡 (20)。另外鐵的恆定需維生素C及數種運鐵蛋白的參與。目前已知的運輸蛋白，除了 transferrin及ferritin外還有hepcidin，HLA-1 (histocompatibility

leukocyte antigen) , DMT-1 (divalent metal transporter-1) 及 ferroportin。Transferrin 及 ferritin 主要是負責血中鐵質的運輸及將細胞中過多的鐵離子游離出細胞；hepcidin 用於平衡體內儲存鐵及吸收鐵的關係，防止過多的鐵對身體造成傷害。HLA-1 為協助 transferrin receptor 吸收鐵質，DMT-1為腸細胞上的一種穿膜蛋白 (transmembrane protein) 協助吸收及運輸二價鐵離子。Ferroportin 也是一種穿膜蛋白，存在於運鐵細胞和儲鐵細胞中，負責將細胞中的鐵離子由基底膜引出細胞。而它也受 hepcidin 的調控，維持體內的鐵平衡 (20, 21, 22, 23)。

在酒精的刺激下或是某些疾病如地中海型貧血 (Thalassaemia) 的情況下時，這些運輸蛋白及鐵的利用方面會受到影響而導致不正常的鐵質堆積。而這些不正常的鐵質堆積常會引起稱為鐵色素堆積症 (Hemochromatosis) 而造成組織的傷害 (24, 25, 26)：



過多的鐵沉積在細胞內常會造成細胞膜、脂質及蛋白質的不正常過度氧化。而這個過程往往會產生氧化壓力及活性氧物質（ROS），並產生發炎反應還有粒線體的刺激，最後造成粒線體的功能喪失並啟動細胞凋亡的機制，造成細胞的死亡。而最後這些細胞凋亡的結果，將造成大規模組織或系統上的傷害 (27, 28, 29)。而目前已有研究指出：HO-1這類具抗氧化機制的蛋白質，對因過度氧化所造成的傷害，具有一個保護的作用；同時也有研究指出，HO-1和細胞中鐵質的向外運輸機制可能有相關 (30)。



## 二. 研究動機和目標

目前已有報告指出，透過血管平滑肌細胞中 PPAR 的活化，將會使它進入細胞核內進行 HO-1 的蛋白質表現的調控，降低發炎反應對血管硬化的影響 (11, 12)。Adiponectin 也被發現可透過和 PPAR 作用來進行促進脂肪細胞的分裂以及血管管壁細胞的保護作用(5, 7, 12)。這些作用是否也和 HO-1 所引導的一連串細胞保護作用相關，目前相關的機制還不清楚。另一方面，透過 PPAR 的調控，也能夠藉由 COX-2 的作用來達到抗發炎反應。所以我的論文主要以肝細胞中的 PPAR $\alpha$  為研究目標，觀察透過 adiponectin 活化 PPAR $\alpha$  是否能達到促進 HO-1 及 COX-2 的表現來達到細胞保護。本次計畫的重點如下：第一、PPAR $\alpha$  的活化是否能有效促使 HO-1/COX-2 的表現。第二、透過給予細胞 adiponectin 能夠透過 PPAR 來對鐵劑引起的發炎反應及細胞凋亡的機制進行抑制，以達成細胞保護的目標。

## 三. 材料與方法

### 3.1 細胞培養技術

#### 細胞培養

##### 【材料】

- DMEM : (Dulbecco's modified Eagle medium) (Sigma)
- FBS : (fetal bovine serum) (GIBCORL)
- NaHCO<sub>3</sub> (Sigma)
- P/S : (Penicilin-streptomycin) (GIBCORL)
- PBS : (phosphate buffered saline)
- Trypsin-EDTA (GIBCORL)

##### 【使用細胞】

- Balb/C mouse embryonic liver cell line, NO.60180

##### 【物品製備】

- 10% DMEM :

DMEM 培養液中加入 3.7 g NaHCO<sub>3</sub>，並調整 pH 值至 7.2 至 7.4 之間。加入 1% P/S 再以無菌過濾膜過濾，最後添加 10% FBS。

### 【步驟】

細胞培養於含 10% FBS DMEM 中，並置於 37 °C、5%的培養箱中。待細胞長至 9 成滿時，吸去原培養基，並以 1X PBS 洗滌細胞兩次。加入 1 ml Trypsin-EDTA，均勻覆蓋表面後讓其反應數分鐘。觀察細胞的狀況，待其從培養皿上脫落後，加入等體積的 DMEM 中和 Trypsin-EDTA 的反應。將細胞以 1000  $\mu$ l 微量吸管吸起並均勻打散，視實驗的需求，將不同稀釋濃度的細胞種入含有新鮮 10% FBS DMEM 的培養皿中。

## 3.2 Western Blotting assay 西方墨點分析

### 【材料】

- RIPA (protein extraction buffer)
- protease inhibitor cocktail tablets provided in EASYpack (Roche)
- 1X PBS (phosphate buffered saline)
- Bio-Rad protein assay dye reagent (Bio-Rad)
- BSA (bovine serum albumin) (Sigma)
- 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) (Bionovas)
- 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) (Bionovas)
- 40% acrylamide (Bio-rad)

- 20% SDS (sodium dodecyl sulfate) (Sigma)
- 10% APS (ammonia persulfate) (Sigma)
- 4X loading dye
- iso-propenol (Scharlau)
- SDS-PAGE electrophoresis buffer
- protein marker (Biomax)
- PVDF membrane (polyvinylidene fluoride membrane ) (Pall Corporation)
- towbin buffer
- blocking buffer (5% skim milk)
- 冷光顯影劑 (Western Lighting™ Plus-ECL)

#### 【物品製備】

RIPA:

5 M NaCl 30  $\mu$ l , 5% NP-40 200  $\mu$ l , 10% SDS 10  $\mu$ l 2 M Tris-HCl (pH 8.8) 25  $\mu$ l , 溶於 735  $\mu$ l H<sub>2</sub>O 中。

4X loading dye :

250 mM Tris (pH 6.8) , 8% SDS , 40% glycerol , 400 mM DTT , 0.2% bromophenol blue (BPB) 。

SDS-PAGE electrophoresis buffer :

30.25 g/L Tris (base) , 144 g/L glycine , 10 g/L SDS , 調 pH 至 8.3 。

Tawbin buffer :

6.05 g Tris (base) , 28.25 g glycine , 400 ml methanol 溶於 2 公升去離

子水中 , 調 pH 至 8.3 。

### 【抗體】

- 1.HO-1 (SPA-896)  
Assay Designs, Inc., Ann Arbor, Michigan 48108 USA
- 2.COX-2 (160112)  
Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan 48108 USA
- 3.pAMPK (07-681SP)  
Millipore Corp., Burlington, MA
4. AMPK (07-357SP)  
Millipore Corp., Burlington, MA
- 5.pp38 (#9211)  
Cell Signaling Technology, Dancers, MA
- 6.p38 (#9211)  
Cell Signaling Technology, Dancers, MA
- 7.pPPAR $\alpha$  (PA1-821)  
ABR Affinity Bioreagents, Rockford, IL 61105
8. PPAR $\alpha$  (sc-9000)  
Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA.
- 9.Bcl-XL (sc-7195)  
Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA.
- 10.BAX (sc-6236)  
Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA.
- 11.cleaved caspase3 (160745)  
Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan 48108 USA
12. GAPDH (LP-PA0018)  
Ab Frontier, Seoul, Korea
13. Anti-Flag (F3165)  
Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.

## 【步驟】

### 3.2.1 萃取總蛋白質

細胞培養皿置於冰上，吸去原培養基並以冰涼 1X PBS 輕輕洗滌兩次，靜置瀝乾。蛋白質萃取緩衝液 (RIPA) 先加入蛋白酶抑制劑 (PI)，再取 50  $\mu$ l 加到培養皿中，使之均勻分布。使用刮勺將細胞刮下，收集到 1.5 ml 的小離心管中，置於冰上。每 10 分鐘劇烈震盪一次，持續 40 分鐘。離心機預冷至 4  $^{\circ}$ C，將震盪完的樣本以 10,000 rpm 離心處理 20 分鐘。收集上清液至另一小離心管中即為總蛋白質。

### 3.2.2 蛋白質定量

1. 準備比色管 (cuvette)，加入 200  $\mu$ l Bio-Rad dye 和 800  $\mu$ l 二次水及待測樣本。小牛血清白蛋白 (BSA) 標準品濃度 (0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml) 則依樣本的濃度予以增減。分光光度計設定波長為 595 nm，先歸零校正後，再測標準品及待測樣本。結果回歸線值需大於 0.99，最後透過函數計算樣本的濃度。取蛋白質相同的量，並以滅菌後的二次水將所有樣本體積調整相同，再加入 loading dye 以 4 倍稀釋混合均勻。乾浴槽先預熱至 100  $^{\circ}$ C，將樣本套上防爆夾後加熱 5 分鐘，取下冷卻並以小離心機甩下管壁的水珠。

### 3.2.3 SDS-PAGE 製作

	Resolving gel		Stacking gel
Gel concentration	8%	12%	5%
ddH <sub>2</sub> O	4.42 ml	3.432 ml	2.6262 ml
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	2 ml	1.95 ml	
1.0M Tris-HCl (pH 6.8)			0.675 ml
40% Acrylamide	1.62 ml	2.34 ml	360 µl
20% SDS (pre-warm)	40 µl	39 µl	18 µl
10% APS	80 µl	52 µl	36 µl
TEMED	4.8 µl	10.4 µl	7.2 µl

組裝製膠模組，依序配製 resolving gel。快速延著邊緣加入模組中，小心勿使氣泡產生。加至適當高度，再沿著表面加入異丙醇 (iso-propenol) 將表面壓平。在室溫下靜置 40 分鐘完全凝固。將異丙醇倒入有機不含鹵廢液回收瓶中，靜置數分。配製上層 stacking gel，迅速加入模組中。最後將齒梳 (comb) 垂直插入，等待其完全凝固。

### 3.2.4 SDS-PAGE 電泳

將電泳裝置準備好，加入足夠量的 SDS-PAGE electrophoresis buffer。依序將 protein marker 及樣本注入 gel 的齒槽 (well) 中，設定電流強度 (stacking: 60 mA， resolving: 120 mA) 時間長短則依預定觀察的蛋白質大小而決定。完成後小心的將膠體取出，浸泡在轉印緩衝液中 20-30 分鐘。剪下適當大小的 PVDF 轉印膜先以甲醇處理數分鐘。正確的包裹膠體和轉印膜於卡夾中，放入轉印電泳槽。加入轉印

緩衝液及電動攪拌棒，設定電流 110 mA，進行至少 15 小時的轉印。

### 3.2.5 抗體反應與冷光顯影

收下轉印完成的 PVDF 轉印後，以 blocking buffer 進行 30 分鐘的 blocking。完成後以 TBST 清洗緩衝液清洗 3 次，每次各 5 分鐘。加入欲觀察蛋白質的初級抗體，視情況調整反應的時間。以 TBST 清洗緩衝液清洗 3 次，每次各 5 分鐘。加入初級抗體的相對應物種的二級抗體，反應 2 小時。以 TBST 清洗緩衝液清洗 3 次，每次各 5 分鐘。移除緩衝液，加入冷光顯影劑並以冷光顯影系統得到結果。

## 3.3 萃取分離細胞核及細胞質蛋白質

### 【材料】

- NE-PER<sup>®</sup> nuclear and cytoplasmic extraction reagents (PIERCE)
- protease 抑制劑 cocktail tablets provided in EASY pack (Roche)
- 1X PBS (phosphate buffered saline)

### 【步驟】

將細胞以冷的 1X PBS 洗滌 2 次，放在冰上瀝乾。加入 1 ml PBS 再以細胞刮杓將細胞快速收下，離心機預冷至 4 °C。將細胞以 5000



rpm, 3 分鐘離心處理。完成後, 小心移去上清液。加入 50  $\mu$ l CER I (含 PI), 劇烈震盪 15 秒均勻打散細胞, 在冰上靜置十分鐘。加入 2.75  $\mu$ l CER II 均勻混合, 在冰上靜置 2 分鐘後以 10,000 rpm 離心 10 分鐘。取出上清液至另一新的小離心管即為細胞質的蛋白質。將殘留的上清液盡可能去除, 剩下的沉澱物加入 25  $\mu$ l 的 NER (含 PI), 每 10 分鐘劇烈振盪 10 秒, 持續 40 分鐘。離心機預冷至 4  $^{\circ}$ C, 將樣本以 10,000 rpm 離心 20 分鐘, 收取上清液即為細胞核內的蛋白質, 保存於 -80  $^{\circ}$ C。

### 3.4 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

#### 3.4.1 萃取細胞中的 mRNA

##### 【材料】

- TRIzol (Sigma)
- DEPC H<sub>2</sub>O
- chloroform (Sigma)
- iso-propenol (Scharlau)
- 75% ethanol in DEPC H<sub>2</sub>O
- RNase out (Bioman)

### 【物品製備】

1. 所用的小離心管先以 DEPC H<sub>2</sub>O 處理一晚再經滅菌，烘乾後再使用。
2. 實驗所用之器材均先以 RNase out 處理。

### 【步驟】

取 700  $\mu$ l TRIzol 溶解細胞，並以微量吸管抽起收集到小離心管中。均勻的抽吸溶液，打破細胞膜。離心機預冷至 4 °C，再將樣本以 12,000 g 離心 10 分鐘並收集上清液到新的小離心管中。輕輕混合約 10 次，放在 30 °C 的乾浴機上加熱 5 分鐘。再加入原體積 1/5 的 chloroform。劇烈搖晃 1 分鐘，再置於 30 °C 的乾浴機上加熱 5 分鐘。離心機預冷至 4 °C，再將樣本以 12,000 g 離心 10 分鐘並收集上清液到新的小離心管中。加入 chloroform : TRIzol = 1:4 的混合液，重複步驟 5 的動作一次。加入等體積的 iso-propanol，均勻混合後，置於 30 °C 的乾浴機上加熱 5 分鐘。4 °C 下，離心 12,000 g 10 分鐘。加入 1 ml 冰涼的 75% ethanol，接著離心 10,000 g 10 分鐘 4 °C。移去上清液，風乾約 5-10 分鐘，再加入 30  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O 溶解沉澱物即為所抽取出的細胞 mRNA，保存到 -80 °C。

### 3.4.2 cDNA synthesis reaction

#### 【材料】

- SuperScript™ Reverse Transcriptase
- 40 U/μl RNaseOUT™
- oligo dT<sub>20</sub> (50 μM)
- 0.1 M DTT
- 5X cDNA Synthesis buffer
- 10 mM dNTP

(以上皆購於 Invitrogen)

- DEPC-H<sub>2</sub>O (自行配製)

#### 【步驟】

1. 將下列三物質混勻，在 65°C 下反應 5 分鐘。再置於冰上 1 分鐘終止反應。

• RNA(10 pg-5μg)	9 μl
• oligo dT <sub>20</sub> (50 μM)	1 μl
• dNTP Mix (10 mM)	2 μl

2. 將下列物質加入：

• 5X cDNA Synthesis buffer	4 $\mu$ l
• 0.1 M DTT	1 $\mu$ l
• RNaseOUT™ (40 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
• SuperScript™ RT (200 units/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
• DEPC-H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ l

3. 混合均勻後，置於 50 °C 恆溫槽中反應 50 分鐘，最後置於 85 °C 5 分鐘完成整個反應。

### 3.4.3 聚合酶連鎖反應 PCR

#### 【材料】

NAME	Forward primer (5')	Reverse primer (3')
HO-1	5'-CACGCATATAACCCGCTACCT-3'	5'-CCAGAGTGGTCATTCGAGCA-3'
COX-2	5'-AGAAGGAAATGGCTGCAGAA-3'	5'-GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'
GADPH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

NAME	Forward primer (5') melt temp (°C)	Reverse primer (3') melt temp (°C)
HO-1	53.8	51.8
COX-2	53.8	51.8
GADPH	55	55

1. 使用 Taq DNA polymerase master mix red (Biomax)，配置每管 mixture 總體積 30  $\mu$ l。

各個條件設定如下:

### HO-1, COX-2

• template	5 µg
• reverse primer (10 µM)	1.5 µl
• forward primer (10 µM)	1.5 µl
• DMSO	3 µl
• master mix red	15 µl

最後以 DDH<sub>2</sub>O 將體積補至 30 µl

### GADPH

• template	5 µg
• reverse primer (10 µM)	1.5 µl
• forward primer (10 µM)	1.5 µl
• DMSO	3 µl
• master mix red	15 µl

最後以 DDH<sub>2</sub>O 將體積補至 30 µl

## 2. PCR program

1 cycle	94°C 2 分鐘
30 cycle	94°C 30 秒
	X°C 45 秒
	72°C 45 秒
1 cycle	72°C 5 分鐘
1 cycle	4°C 20 分鐘

X 為根據不同 primer 所設定的 annealing 溫度

NAME	annealing temp(°C)
HO-1, COX-2	59
GADPH	55

### 3.4.4 洋菜膠電泳

#### 【材料】

- agarose (Sigma)
- 5X TBE buffer (Amresco)
- EtBr (Ethidium bromide) : 10 mg/ml

#### 【步驟】

製備 2% 的 agarose gel，過程中加入 2  $\mu$ l EtBr。完成後，將膠體放入電泳槽中，加入 0.5x TBE buffer 至少淹過膠體。將樣本和 6x loading dye 混合好後，注入齒槽中。以電壓 120 mV 進行電泳，並在樣本約跑到膠體下方 2/3 處(約 35 分鐘)後停止電泳。最後使用拍照系統得出結果。

## 3.5 染色質免疫沉澱 (chromatin immunoprecipitation)

### 3.5.1 染色質的準備

#### 【材料】

- 36.5% formaldehyde (Riedel-de Haën)
- 2.5 M glycine (J.T. Baker)
- 1X PBS (phosphate buffered saline)
- swelling buffer
- sonication buffer
- 10% SDS (Sigma)
- KCl (Sigma)

#### 【物品製備】

##### 1. swelling buffer:

5 mM PRPES pH 8 , 1% NP-40 , PMSF , protease 抑制劑溶於去離子水中。

##### 2. sonication buffer:

10 mM EDTA , 50 mM Tris-HCl , PMSF , protease 抑制劑溶於去離子水中。

##### 3. 2.5 M glycine:

9.384 g glycine 溶於 50 ml 去離子水中。

### 【步驟】

在 10 公分培養皿的細胞培養液中加入 36.5% formaldehyde，最終濃度為 1%並在 25 °C 下反應 10 分鐘。加入 0.125 M glycine 在室溫下反應 5 分鐘，終止反應。以 1X PBS 洗滌兩次，加入含 PMSF 及 PI 的 PBS 1 ml 刮下細胞收集至小離心管中。離心機預冷至 4 °C，再以 13,000 rpm 離心十分鐘，加入 swelling buffer (含 PMSF 及 PI) 500  $\mu$ l，並使用均質機器於冰上以每次 15 秒共 10 次打破細胞膜。4 °C 下，離心 5000 rpm 5 分鐘。移去上液，再加入 sonication buffer 重新懸浮細胞沉澱物。以超音波細胞震碎機 (ultrasonic cell disrupter) 於冰上震碎 15 次，每次 5 秒讓 DNA 長度介於 200-1000 bp 間。加入 0.1% SDS 和 85 mM KCl 減少非專一性結合，4 °C 下離心 14,000 rpm 10 分鐘，取上清液至另一小離心管中。蛋白質定量後，取等量的蛋白質進行免疫沉澱。

### 3.5.2 免疫沉澱

#### 【材料】

- salmon sperm DNA/protein A agrose slurry (Upstate)
- low salt immune complex wash buffer
- high salt immune complex wash buffer
- LiCl immune complex wash buffer
- TE buffer



### 【物品製備】

1. low salt immune complex wash buffer :

0.1% SDS , 1% Triton X-100 , 2 mM EDTA , 20 mM Tris-HCl pH 8.0 , 150 mM NaCl 溶於去離子中。

2. high salt immune complex wash buffer :

0.1% SDS , 1% Triton X-100 , 2 mM EDTA , 20 mM Tris-HCl pH 8.0 , 500 mM NaCl 溶於去離子中。

3. LiCl buffer :

0.25 M LiCl , 1% NP-40 , 1% deoxycholic acid , 1 mM EDTA , 10 mM Tris 溶於去離子水中 , 調 pH 至 8.1 。 deoxycholic acid 難溶 , 可用 NaOH 滴定至溶解。

4. TE buffer :

10 mM Tris-HCl , 1 mM EDTA pH8.0 。

### 【步驟】

加入一級抗體到每個樣本中 , 於 4 °C 下持續均勻混合 1 小時。再加入 salmon sperm DNA/protein A agrose slurry , 在 4 °C 至少混合 5 小時。取出以 1000 g 離心 1 分鐘 , 去掉上清液。加入 1 ml 低鹽洗滌緩衝液 (low salt immune complex wash buffer) 洗滌 5 分鐘後 , 以 1000 g 離心 1 分鐘 , 去掉上清液。加入 1 ml 高鹽洗滌緩衝液 (high salt immune

complex wash buffer)洗滌 5 分鐘後，以 1000g 離心 1 分鐘，去掉上清液。加入 1 ml LiCl immune complex wash buffer 洗滌 5 分鐘後，以 1000 g 離心 1 分鐘，去掉上清液。加入 1 ml TE buffer 洗滌 2 次 5 分鐘後，以 1000 g 離心 1 分鐘，去掉上清液。

### 3.5.3 DNA Elution

#### 【材料】

- Elution buffer

#### 【物品製備】

- Elution buffer :

1% SDS , 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 。

#### 【步驟】

去除 TE buffer，加入新鮮配製的 elution buffer 100 µl，在室溫下均勻混合 15 分鐘。以 1000 g 離心 1 分鐘後，收集上清液至另一新的小離心管中。本步驟需重複 2 次。

### 3.5.4 Reverse cross-linking

#### 【材料】

- 0.2 M NaCl
- Protease K

#### 【步驟】

每 200  $\mu\text{l}$  的體積中，加入 0.2 M NaCl 在 65  $^{\circ}\text{C}$  下反應四小時以上。  
加入濃度達 0.01 M EDTA， 0.04 M Tris-HCl pH 6.5， 0.8  $\mu\text{l}$  的 10 mg/ml protease K 在 45  $^{\circ}\text{C}$  下反應一小時。

### 3.5.5 DNA purification

#### 【材料】

- Qiagen PCR purification kit (Qiagen)

#### 【步驟】

加入五倍體積的 PB 至樣本中，混勻後將樣本移到 QIAquick 離心管柱離心 13,000 rpm 1 分鐘。移去離心管柱中的液體，加入 0.75 ml PE buffer 洗滌離心 13,000 rpm 1 分鐘。移去離心管柱中液體後，再空離 13,000 rpm 1 分鐘完全去除酒精。以 50  $\mu\text{l}$  EB 分 2 次溶出 DNA，離心 13,000 rpm 1 分鐘。

### 3.5.6. 聚合酶連鎖反應 PCR

#### 【材料】

NAME	Forward primer (5')	Reverse primer (3')
HO-1	5'- GCTCAGATTCCCCACCTGTA-3'	5'- ACCTTCCCGGAACCTCTTAGG-3'
COX-2	5' -CAGATGTGGACCCTGACAGA-3'	5' - TCCCGGGATCTAAGGTCCTA-3'

NAME	Forward primer (5') melt temp(°C)	Reverse primer (3') melt temp (°C)
HO-1, COX-2	57	57

1. 使用 Taq DNA polymerase master mix red (Biomax), 配置每管 mixture 總體積 30  $\mu$ l。

• template	8 $\mu$ l
• reverse primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l
• forward primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l
• DMSO	3 $\mu$ l
• master mix red	15 $\mu$ l
• MgCl <sub>2</sub>	0.6 $\mu$ l
• DDH <sub>2</sub> O	0.4 $\mu$ l

2. PCR program

1 cycle	94 °C 2 分鐘
40 cycle	94 °C 30 秒
	57 °C 45 秒
	72 °C 45 秒
1 cycle	72 °C 5 分鐘
1 cycle	4 °C 20 分鐘

### 3.6 TUNEL assay

#### 【材料】

- 4% formaldehyde
- 1X PBS
- In situ cell death detection kit POD (Roche)

#### 【步驟】

種細胞於 6 公分培養皿中，並放入在蓋玻片，視細胞貼附的情形調整培養的時間。在加藥後 18 小時取出蓋玻片。以 PBS 洗滌 3 次，再用 4% formaldehyde 處理 30 分鐘固定細胞。以 PBS 洗滌 3 次後除去過多水份，在避光環境下以 50  $\mu$ l TUNEL reaction mixture (450  $\mu$ l label solution + 50  $\mu$ l enzyme solution) 均勻加在玻片上。放入 humidified chamber 保持濕度，在 37  $^{\circ}$ C 下避光反應 1 小時。拿出後以 PBS 洗滌 3 次，即可以螢光顯微鏡觀察。

### 3.7 質體轉染法 (Plasmid Transfection)

#### 【材料】

- OPTI-MEM (GIBCORL)
- 10% DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (Sigma)
- PBS (phosphate buffered saline)
- Lipofectamine 2000

### 【步驟】

Transfection 的前一天先種細胞於 6 公分培養皿中，目標是讓細胞能達到約 9 成的滿度。實驗前 1 小時先將原培養液抽起，以 37 °C OPT-MEM 洗滌 1 次後換成 OPT-MEM 2 ml。準備欲送入細胞的質體 (plasmid) 及 transfection liposome reagent (lipofectamine 2000)。取質體 2 µg 和 250 µl OPT-MEM 於小離心管混合，輕拍管壁使其能均勻。另取 lipofectamine 2000 5 µl 和 OPT-MEM 於小離心管混合，輕拍管壁使其能均勻。將混合好的小離心管用小型離心機離心處理數秒，靜待 5 分鐘。將兩管混合，輕拍管壁使其能均勻。靜待 20 分鐘後，以微量吸管將混合液加入培養皿中並混合均勻。於 37 °C 培養箱中繼續培養 6 小時後，抽去培養液換回原培養液 10% DMEM。繼續培養 48 小時後收下細胞進行分析。

### 3.8 核酸干擾技術 (RNA interference)

#### 【材料】

- Silencer<sup>®</sup> select Pre-designed (Non-inventoried) siRNA product (Ambion)

Target gene : PPAR $\alpha$

siRNA ID : s72004, s72005

NAME	Forward primer (5')	Reverse primer (3')
PPAR $\alpha$	5'- GAACAUCGAGUGUCGAAUAtt -3'	5'- UAUUCGACACUCGAUGUUCag -3'
PPAR $\alpha$	5'-GACUACCAGUACUUAGGAAAtt -3'	5'- UUCCUAAGUACUGGUAGUCtg -3'

- OPTI-MEM (GIBCORL)
- 10 % DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (Sigma)
- TransIT-Neural (TKO reagent) (Mirus)

### 【RT PCR】

- Primer

PPAR $\alpha$	5'-ATGCCAGTACTGCCGTTTTC-3'	5'-GGCCTTGACCTTGTTTCATGT-3'
---------------	----------------------------	-----------------------------

- 溫度

NAME	Forward primer (5') melt temp (°C)	Reverse primer (3') melt temp (°C)
PPAR $\alpha$	51.8	51.8

- 條件

### PPAR $\alpha$

- template 5 ug
- reverse primer (10 uM) 1.5 ul
- forward primer (10 uM) 1.5 ul
- DMSO 3 ul
- master mix red 15 ul
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 0.6 ul

最後以 DDH<sub>2</sub>O 將體積補至 30 ul

HO-1, COX-2 及 GAPDH 所使用 primer 和條件同前。

### 【步驟】

欲進行實驗的前一天，先將細胞種於六孔盤中。細胞密度需達 60%~80%。培養液為不含抗生素的 10% 胎牛血清的 DMEM。實驗前，將培養液體積調整至每孔 1 ml。將 siRNA 原液稀釋至 5  $\mu$ M；接著混合：

- ① 115  $\mu$ l OPTI-MEM + 10  $\mu$ l TKO reagent
- ② 123.75  $\mu$ l OPTI-MEM + 1.25  $\mu$ l siRNA (5  $\mu$ M)

均勻混合並以離心機處理數秒，在室溫下靜置 5 到 10 分鐘後將兩者混合。以離心機處理數秒，在室溫下靜置 20 分鐘。緩慢的加入相對應的孔盤中，均勻混合。繼續培養 24 小時後，加藥取下細胞。

## 3.9 細胞螢光免疫染色 (immunocytochemistry)

### 【材料】

- 1X PBS
- 4% formaldehyde
- blocking solution (3% BSA + 0.2% Triton + 0.1% Tween 20/1X PBS)
- 一級抗體：mouse anti-FLAG
- 二級抗體：goat anti-mouse Cy3
- 1X DAPI

### 【步驟】

去除培養液再以 1X PBS 沖洗細胞 5 分鐘，共 3 次。以 4%



formaldehyde 溶液固定細胞 1 小時。以 1X PBS 沖洗細胞 5 分鐘，共 3 次後加 blocking solution 反應 2 小時。以 1X PBS 沖洗細胞 3 分鐘再加一級抗體以 blocking solution 稀釋 (1 : 100)，於 4 °C 下反應一晚。以 1X PBS 沖洗細胞 5 分鐘，共 6 次。加二級抗體以 blocking solution 稀釋 (1 : 500)，避光、室溫下反應 1 小時。以 1X PBS 沖洗細胞 5 分鐘，共 6 次後加入 DAPI (1X)，避光、反應 10 分鐘。以 1X PBS 沖洗細胞 5 分鐘，共 6 次。最後以螢光顯微鏡觀察並拍照紀錄螢光的表現。

### 3.10 啟動子活性分析

#### 【材料】

- 1X phosphate buffered saline ( PBS)
- PRL-tk (renilla)
- Lipofectamin 2000 (transfection liposome reagent)
- Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)
  - Passive lysis buffer (PLB)
  - Luciferase assay buffer II + substrate (LAR II)
  - Stop & Glo buffer + substrate
- OPTI-MEM (GIBCORL)

#### 【步驟】

細胞培養於 24-well plate，細胞密度約為  $2.5 \times 10^4$  cell/well，以 10 % DMEM 培養一天後進行質體轉染。完成後換回原 10 % DMEM 繼

續培養 17~20 小時。移除培養基，以冷 PBS 沖洗 2 次，需完全去除培養皿中的 PBS。加入 40  $\mu$ l /well PLB 將細胞刮下來，取 30  $\mu$ l /well 的樣本至 1.5 ml 離心管。加入 40  $\mu$ l LAR II 使用冷光儀器測量 firefly luciferase 活性，接著再加入 40  $\mu$ l Stop & Glo reagent 測量 renilla luciferase 活性，兩數值的比值即為啟動子活性表現量。

### 3.11 鐵質染色

#### 【材料】

- 1X phosphate buffered saline (PBS)
- 3.7% formaldehyde
- 3% H<sub>2</sub>O
- DAB (peroxidase substrate kit) (Vector laboratories, Inc)
- 1X hematoxylin
- 25%, 50%, 75%, 95% ethanol

#### 【步驟】

種細胞於 6 公分培養皿中，並放入蓋玻片。培養 24 小時。給予 iron dextran 後繼續培養 48 小時後，給藥並在適當時間收下細胞。以 PBS 洗滌 3 次，以 3.7% formaldehyde 處理 30 分鐘。PBS 洗滌 3 次後，加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理 30 分鐘。以 PBS 洗滌 3 次，除去多於水份。以 DAB 進行鐵質染色，需避光；配合顯微鏡觀察，勿使顏色過深。完成後，以 PBS 洗滌 3 次。再進行 hematoxylin 染色，配合顯微鏡觀

察，勿使顏色過深。最後以 H<sub>2</sub>O 終止反應。以低濃度到高濃度的酒精脫水處理，封片後即可以顯微鏡照相觀察。

### 3.12 HO-1 酵素活性測定

#### 【材料】

- benzene (Sigma)
- BaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O (Sigma)

#### 【步驟】

準備小離心管，包上鋁箔紙。直接抽取細胞培養基 500 µl 至小離心管中並和 0.15 g 的 BaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 混合，劇烈震盪到完全溶解。在抽氣室中加入 700 µl 的 benzene，震盪至完全混合呈混濁狀。離心 10,000 rpm 十分鐘，移去最上面的 benzene 層。準備石英比色管，分光光度劑設定雙波長吸光值：450 nm 及 600 nm。歸零 blank 使用 benzene，最後使用下面公式得到酵素活性：

$$[(OD_{450}/OD_{600})_E - (OD_{450}/OD_{600})_C] / 27.3 * 1000 \text{ (uM)}$$

### 3.13 Electrophoretic Mobility Shift assay (EMSA)

#### 【材料】

- Biotin 3' End DNA labeling kit (Thermo, prod # 89818)
- EMSA kit (Panomics, # 7193)

【probe】

NAME	Forward primer (5')	Reverse primer (3')
HO-1	5'-ATAAACCATGGAAAAGTTAA -3'	5'- TTAAGTTTTGGATCCTTTAT -3'
COX-2	5'-GCCCCAGTGGGGAGAGGTGAGGG -3'	5'- CCCTCACCTCTCCCCACTGGGGC -3'

### 3.13.1 Biotin 3' End labeling

【材料】

- Ultrapure water
- 1  $\mu$ M oligonucleotide for labeling
- 0.2 M EDTA, pH 8.0
- Chloroform : isoamyl alcohol (24:1)

【步驟】

混合 TdT working solution:

- 5X TdT reaction buffer 2  $\mu$ l
- ultrapure water 7  $\mu$ l
- 20 U/ $\mu$ l TdT 1  $\mu$ l

可供一次實驗使用 (forward + reverse)

混合下列成份 (勿劇烈震盪)

- Ultrapure water 20  $\mu$ l
- 5X TdT reaction buffer 10  $\mu$ l
- probe (1  $\mu$ M) 10  $\mu$ l
- Biotin-||-dUTP (5  $\mu$ M) 5  $\mu$ l
- TdT (2 U/ $\mu$ l) 5  $\mu$ l

在 37 °C 下反應 30 分鐘後加入 2.5  $\mu$ l 0.2 M EDTA 終止反應。加入 50  $\mu$ l chloroform : isoamyl alcohol 除去 TdT 短暫震盪後高速離心 1~2 分鐘。最後收集上層的水相中的 probe。

### 3.13.2 annealing

#### 【步驟】

水浴鍋加熱至 95 °C，再將 reverse probe 和 forward probe 混合後加熱五分鐘。此步驟須同時進行 cold probe 的製備 (取 probe 原液各 1  $\mu$ l 混合)完成後慢慢放涼待回到室溫後可保存在 -20 °C 下。

### 3.13.3 electrophoresis

#### 【步驟】

混合以下成份

• nuclear extract (10 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
• poly dI-dC (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
• 5X binding buffer	2 $\mu$ l
• Biotin-  -dUTP (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l

室溫下靜置 5 分鐘後每管加入 5  $\mu$ l probe，另準備 cold probe 及 probe only 的組別，在 15 °C 下反應 30 分鐘。

製備膠體：混合下列成份 (為一片膠的量)：

• 5X TBE	2 ml
• 40% acryamide	3 ml
• dd water	15 ml
• 100% glycerol	500 $\mu$ l
• 10% APS	300 $\mu$ l
• TEMED	20 $\mu$ l

跑膠用的緩衝液為 0.5X TBE

將反應好的混合物加入 1  $\mu$ l 的 loading dye，跑膠到 dye 達到膠體的底部約 3 公分處。進行全濕式 transfer。

### 3.13.4 blotting

#### 【步驟】

首先進行 cross-linking :先以 302 ~ 320 nm UV 10 ~ 15 分鐘，再以 80 °C 烤箱烘 1 小時。以 1x blocking buffer 在室溫下輕搖 15 分鐘，再取出 1 ml 的 blocking buffer 加入 20  $\mu$ l straptavidin-HRP，混合均勻後加回原 blocking buffer 中輕搖 15 分鐘。以 wash buffer 洗滌 3 次，每次 8 分鐘。加入 detection buffer 輕搖 5 分鐘，移去 buffer 後加入 2 ml working solution (0.2 ml solution 1 + 0.2 ml solution 2 + 1.6 ml solution 3)，輕搖 5 分鐘。移去 working solution 後加入 ECL 即可拍照觀察。

### 3.14 統計分析方法

每一個實驗至少進行 3 次，並使用 one-tailed Student's t test 做統計分析，統計水準定為  $\alpha = 0.05$

## 四、實驗結果

### 4.1 脂締素對老鼠肝細胞中 HO-1 及 COX-2 的影響及其可能的保護作用。

細胞中的鐵質過度沉積會造成細胞中的氧化壓力 (27, 28, 29)，進一步導致發炎反應及細胞凋亡路徑的活化。目前有許多研究報告指出：第一型血紅素氧化酶 (HO-1) 及第二型環氧酶 (COX-2)，在保護細胞防止因為氧化壓力所造成的發炎反應及細胞凋亡上，扮演重要的角色。脂締素所提供的細胞保護能力是否有這兩個蛋白質的參與，因此我們直接給予細胞脂締素後，再以反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR ) 及西方墨點法 (Western blotting) 來觀察 HO-1 及 COX-2 的訊息核糖核酸及蛋白質表現的變化趨勢。

首先透過西方墨點法分析不同濃度脂締素對 HO-1 及 COX-2 誘發的影響 (Fig. 1A)及參考之前實驗的結果 (31)，我們選用 30  $\mu\text{g/ml}$  作為脂締素使用的濃度。PCR 的結果 (Fig. 1B) 顯示：在給予細胞脂締素 30  $\mu\text{g/ml}$  後，兩者的訊息核糖核酸 (mRNA) 在兩小時的時間點上都開始出現上升的現象，而此上升現象的最高點出現在給藥後六小時的時間點上。而脂締素的給予至少可對兩者的影響持續至少 24 小時。接下來使用西方墨點法 (Western Blotting) 來觀察兩者蛋白質

表現的變化 (Fig. 1C) :在給予脂締素後，兩者的蛋白質表現量也在兩小時的時間點上開始有上升的現象。而也在六小時的時間點上出現了表現量的最大值；同樣的，脂締素對兩者蛋白質表現量的影響可持續 24 小時，因此接下來的實驗有關 HO-1 及 COX-2 蛋白質表現量的，均選用 6 小時作為觀測時間點。透過這部分的實驗可以推得：給予細胞脂締素可以對細胞中的 HO-1 及 COX-2 的表現進行一個正調控。另外我們也測定了 HO-1 酵素活性的變化 (Fig. 1D)，可以看到在給予脂締素後 HO-1 的酵素活性隨時間上升，最大值出現在給予脂締素 12 小時後。

接下來，我們想知道這個濃度的脂締素給予是否能在肝細胞中達到防止來自鐵質的傷害。所以我們先給予細胞脂締素進行前處理，再給予不同濃度的 iron dextran 作為鐵的刺激後先以西方墨點法分析 (Fig. 2A) :在給予鐵質的濃度低於 20  $\mu\text{M}$  時，脂締素的給予可降低因鐵刺激而上升的活化態 caspase 3 的表現量，表示脂締素可改善來自鐵質的傷害。而接下來有關鐵質傷害的實驗中，都是選用 20  $\mu\text{M}$  作為實驗濃度。另外，我們也進行了鐵質染色，觀察脂締素是否能減輕鐵質堆積的情形 (Fig. 2B)。在給予 iron dextran 處理 48 小時的組別中可以看到明顯的鐵質堆積現象；而在同時給予脂締素處理的組別中，這個現象能明顯的被改善。



## 4.2 脂締素在肝細胞中可能的訊息傳遞途徑

脂締素為一種由脂肪細胞所分泌的細胞激素，其作用方式需透過和細胞膜表面特定的受器結合，再透過此受器活化細胞中的次級傳訊者來對細胞中的特定反應進行調控。而目前研究指出：其有可能活化的次級傳訊者為腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 及 p38。並透過這兩者繼續活化特定的核受器蛋白 (nuclear receptor protein) 來達到對特定蛋白質轉錄進行調控 (1, 31, 32, 33)。這裡我們所探討的核受器蛋白為 PPAR $\alpha$ ，是否有可能會受到此一連串的訊息傳遞途徑而被活化。

### 4.2.1 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 在脂締素的訊息傳遞途徑中所扮演的角色

為了瞭解 AMPK 在脂締素活化的一連串訊號傳遞途徑中所扮演的可能角色，在這邊使用 AMPK 的抑制劑 Compound C 來對細胞進行前處理，並在 30 分鐘後給予脂締素。最後以西方墨點法 (Western Blotting) 觀察 20 分鐘時的 AMPK 的活化情形，1 小時的 PPAR $\alpha$  的活化及六小時的 HO-1 及 COX-2 的調控情形。在早期的 20 分鐘的時間點上 (Fig. 3A)，給予脂締素會刺激 AMPK 的活化；而此活化現象會因為抑制劑 Compound C 的給予而被反轉回來。同時在此時

間點上，PPAR $\alpha$  並沒有出現一個被磷酸化的情形。而在 1 小時的時間點上 (Fig. 3B)，給予脂締素可以看到過 PPAR $\alpha$  出現一個明顯的磷酸化現象；而此活化現象也因給予 AMPK 的抑制劑 Compound C 而被反轉。因此顯示了給予脂締素可以透過 AMPK 來進一步的磷酸化 PPAR $\alpha$ 。而在較晚的時間點 6 小時上 (Fig. 3C)，HO-1 及 COX-2 的正調控現象也因 Compound C 的給予而被反轉。從這部分的實驗中可以推得：AMPK 及 PPAR $\alpha$  在脂締素所誘發的一連串調控作用中，扮演一個可能的中間訊息傳遞的角色。

#### 4.2.2 p38 在脂締素的訊息傳遞途徑中所扮演的角色

為了瞭解 p38 在脂締素活化的一連串訊號途徑中的作用，這部分的實驗使用了 p38 的抑制劑 SB 202190 來抑制 p38 的活化。同之前的 AMPK 的部份，也是以西方墨點法分析在 20 分鐘時 p38 的活化現象，1 小時的 PPAR $\alpha$  活化情形及 6 小時的 HO-1 和 COX-2 的情形。結果透過 (Fig. 4A) 可以看到：在給予脂締素 20 分鐘後，p38 並沒有出現一個被活化的情形；而在接下來 1 小時的時間點上 (Fig. 4B)，PPAR $\alpha$  也沒有出現被磷酸化的情形。同樣的在 6 小時的時間點上 (Fig. 4C)，HO-1 及 COX-2 表現量上升的情形也沒因 p38 抑制劑的給予而出現一個被反轉的現象。所以透過這部分的實驗可以推得：脂締素在肝細胞中所透過的訊號傳遞途徑應該是和 p38 無關的。

### 4.2.3 脂締素透過 AMPK 活化促進 PPAR $\alpha$ 的核轉移。

由前面的實驗得知：在肝細胞中給予脂締素可以透過 AMPK 的訊號途徑，並進一步磷酸化 PPAR $\alpha$ 。而 PPAR $\alpha$  是一種核受器蛋白，若要繼續往下進行其它調控的話，必須進行核轉移。所以接下來的實驗我們想知道，被磷酸化的 PPAR $\alpha$  是否會再進一步的發生核轉移現象。於是，我們先給予肝細胞 AMPK 的抑制劑 Compound C 前處理 30 分鐘；再給予脂締素處理 1 小時。另外透過給予肝細胞 PPAR $\alpha$  的促效劑 WY 14643 做為一個正控制 (Positive control)。最後進行核質分離後再以西方墨點法分析 (Western Blotting)。結果可看到 (Fig. 5)：單獨給予脂締素及促效素的組別中，PPAR $\alpha$  都出現了一個明顯的核轉移現象，而這個核轉移現象會因為給予 Compound C 而被反轉回來。所以透過這個實驗可推得：脂締素在肝細胞中可活化 PPAR $\alpha$  以及促進它的核轉移現象。

### 4.3 脂締素所活化的 PPAR $\alpha$ 對其下游的第一型血紅素氧化酶及第二型環氧酶可能的調控。

透過最初的實驗，我們可以看到給予肝細胞脂締素可以誘發其 HO-1 及 COX-2 的表現。接下來這部分的實驗，我們想要進一步探討脂締素活化的 PPAR $\alpha$  和誘發表現的 HO-1 及 COX-2 之間的關

係，以及可能的調控機制。

### **4.3.1 PPAR $\alpha$ 在脂締素所誘發的 HO-1 及 COX-2 中所扮演的中間傳訊角色。**

這部分的實驗主要是由蛋白表現的層級來看 PPAR $\alpha$  在整個調控機制所扮演的可能角色。使用 PPAR $\alpha$  的抑制劑 GW 6471 來抑制 PPAR $\alpha$  的活化；Compound C 來抑制 PPAR $\alpha$  上游 AMPK 訊息途徑的活化。分別前處理 1 小時及 30 分鐘後再給予脂締素。同時也使用了 PPAR $\alpha$  的促效劑 WY 14643 做為一個正控制，反應六小時後，再透過西方墨點法（Western Blotting）分析。結果（Fig. 6）顯示：在給予脂締素或促效劑處理 6 小時的組別中，HO-1 及 COX-2 的表現都有出現了一個上升的現象。而以 Compound C 前處理過的組別中，這個上升現象會被反轉回來。而抑制 PPAR $\alpha$  活化的組別中，這個誘發現象也一樣的被反轉。所以這邊的結果可推得：脂締素所誘發 HO-1 及 COX-2 的表現上升，是需要 PPAR $\alpha$  做為一個中間傳訊角色。降低它的活性便會影響到整個調控機制。

### **4.3.2 利用轉染 Flag-PPAR $\alpha$ 融合蛋白的質體來觀察 PPAR $\alpha$ 對 HO-1 及 COX-2 表現的影響。**

透過之前的實驗已知，PPAR $\alpha$  在脂締素所誘發的 HO-1 及

COX-2 的表現途徑中，扮演一個重要的中間訊息傳遞角色。接下來的實驗將透過轉染 Flag-PPAR $\alpha$  的質體，在肝細胞中大量表現 PPAR $\alpha$ 。再給予脂締素後觀察早期 1 小時時間點的 Flag-PPAR $\alpha$  核轉移情形及 6 小時時間點上的 HO-1 及 COX-2 表現情形。結果使用西方墨點法來分析，並使用 anti-FLAG 的抗體來偵測外來的 PPAR $\alpha$ 。(Fig. 7A) 在轉染質體 48 小時後給予脂締素處理 1 小時的組別中，可以看到一個明顯的 Flag-PPAR $\alpha$  的核轉移現象。而在轉染空的質體的組別中則沒有看到此現象。而給予脂締素處理 6 小時後 (Fig. 7B)，轉染空質體的組別中，其 HO-1 及 COX-2 的表現都出現了一個上升的情形；而在轉染 Flag-PPAR $\alpha$  的組別中，這個上升的情況更明顯。所以透過這個實驗，我們可以更加的確定 PPAR $\alpha$  在脂締素所誘發肝細胞表現 HO-1 及 COX-2 的調控中，是一個重要的中間訊號傳遞者。

另一方面，這部分的實驗我們也進行了免疫螢光染色 (Fig. 8A~8L) 觀察其核轉移現象。在轉染 Flag-PPAR $\alpha$  的組別可以看到：在沒給予脂締素前，Flag-PPAR $\alpha$  主要是大量表現在細胞質內；而在給予脂締素處理 1 小時的組別中，則可以看到 Flag-PPAR $\alpha$  很明顯的往細胞核集中。而在轉染空的質體的組別中則無法染到 Flag-PPAR $\alpha$ 。

### 4.3.3 以核酸干擾技術分析 PPAR $\alpha$ 在脂締素誘發 HO-1 及 COX-2 表現的必要性。

之前的實驗以透過在細胞中過度表現 PPAR $\alpha$  來說明 PPAR $\alpha$  在 HO-1 及 COX-2 表現誘發的相關性；這部分的實驗將透過以 siRNA 干擾的方式，抑制住 PPAR $\alpha$  在細胞中的表現，再來觀察給予脂締素後，細胞中 HO-1 及 COX-2 的誘發是否會受到影響。同時也藉這個實驗來去除抑制劑可能存在的專一性不足所造成的結果。

在以 siRNA 處理 24 小時後，給予脂締素處理 6 小時。收下細胞以 RT-PCR (Fig. 9A)和西方墨點法分析 (Fig. 9B) 可看到，以 siRNA 處理的組別中，其 PPAR $\alpha$  的表現量下降。在給藥前，HO-1 及 COX-2 的表現均沒有出現變化。而在給予脂締素處理六小時後，控制組或給予 scramble RNA 的組別中，HO-1 及 COX-2 的表現量都被明顯的誘發；但是在以 siRNA 處理的組別中，這個誘發現象則明顯的抑制。透過這個實驗，我們証明了 PPAR $\alpha$  在脂締素誘發 HO-1 及 COX-2 表現的途徑中是必要的。

### 4.3.4 PPAR $\alpha$ 調控 HO-1 及 COX-2 表現的機制。

透過之前的實驗，我們已經觀察到 PPAR $\alpha$  對於 HO-1 及 COX-2 的調控作用。接下來的實驗，我們想要來分析 PPAR $\alpha$  調控 HO-1 及 COX-2 的方式。是直接的和其啟動子交互作用或還需要再透過其他

分子的參與。若是透過直接的交互作用則在其序列的啟動子區域便能找一個可能的 PPAR $\alpha$  附著位置 PPRE。首先透過資料庫的比對，在兩種蛋白質的啟動子區域，都發現了可能的 PPAR $\alpha$  附著位置。而再以這段區域為目標來進行實驗。首先對肝細胞以 PPAR $\alpha$  的抑制劑 GW 6471 及 AMPK 的抑制劑 Compound C 對細胞進行前處理；之後在給予細胞脂締素，同時也給予細胞 PPAR $\alpha$  的促效劑 WY 14643 作為一個正調控。1 小時後收細胞進行染色質免疫沉澱的實驗。結果 (Fig. 10) 可以看到：在給予脂締素或 PPAR $\alpha$  促效劑的組別中觀察到一個明顯的蛋白質與 DNA 序列交互作用的現象；而當以藥物抑制住 PPAR $\alpha$  上游 AMPK 的活性或抑制住 PPAR $\alpha$  活性的組別，此交互作用的現象會被反轉。另外我們也同時進行了 EMSA 更直接的觀察 PPAR $\alpha$  和啟動子上 PPRE 的附著現象 (Fig. 11)：結果和之前的染色質免疫沉澱法所看到的現象類似，在給予脂締素或促效劑的組別中可以觀察到明顯的 PPAR $\alpha$  和 PPRE 交互作用現象；而在給予不同抑制劑的兩個組別中則會被抑制。

接著我們轉染帶有一段含 PPRE 促進子的啟動子螢光蛋白質體進入細胞，也轉染了空的質體作為控制組。給予脂締素後進行啟動子活性測試。結果 (Fig. 12) 可以看到在只轉染空質體的組別中，給予脂締素處理後，其螢光的表現量沒有出現變化；而在轉染帶含

PPRE 促進子的啟動子螢光蛋白的組別中則可以看到：在給予脂締素後，螢光的活性有一個明顯的上升，增幅可達 90 倍。另外我們也轉染了一段帶 HO-1 啟動子的螢光質體蛋白進行另一組啟動子活性測試 (Fig. 13)：可以看到在給予脂締素後，轉染帶 HO-1 啟動子螢光蛋白質體的組別中，其螢光的表現量上升達未給予時的兩倍；而在轉染空質體的控制組中則沒有明顯的變化。

而透過這個實驗我們可以推得：PPAR $\alpha$  調控 HO-1 或 COX-2 的表現，是透過直接附著到它們的啟動子上的 PPRE 區段來進行一個蛋白質與 DNA 的反應，促進它們的轉錄作用來增加下游蛋白質的表現。這個訊號的傳遞可以不透過其他的訊息傳遞分子來作為 PPAR $\alpha$  的下游傳訊。

總合這部份得結論：脂締素在肝細胞中誘發 HO-1 及 COX-2 表現的訊息途徑中，是以 PPAR $\alpha$  做為最主要的中間傳訊分子；再透過 PPAR $\alpha$  直接調控誘發 HO-1 及 COX-2 的表現。而 PPAR $\alpha$  在細胞中表現的量，也可能直接影響到下游 HO-1 及 COX-2 的表現。

#### 4.4 脂締素保護肝細胞防止鐵沉積所帶來的傷害。

目前已有研究指出：多餘的鐵堆積於細胞中，將會對細胞帶來氧化壓力而更進一步的造成發炎反應或活化細胞凋亡的訊息路徑 (27, 28, 29)。而在之前的實驗中我們已知道：給予肝細胞脂締素的處理



後，將會誘發肝細胞中的 HO-1 及 COX-2 的大量表現；而這兩種蛋白質也被認為具有保護細胞的功能。因此這部分的實驗，我們將來探討這兩種蛋白質對於鐵所造成的細胞傷害是否有一個保護的效果。

#### 4.4.1 PPAR $\alpha$ 所參與的脂締素保護細胞的訊息途徑。

這部分的實驗是給予肝細胞 iron dextran 來模擬一個鐵過度堆積的狀況，再給予脂締素來看原本鐵離子所造成的傷害是否能得到改善。而脂締素誘發 HO-1 及 COX-2 表現的訊號途徑將以 Compound C 或 PPAR $\alpha$  抑制劑 GW 6471 來進行阻斷；同時也給予 PPAR $\alpha$  的促效劑 WY 14643 做為一個正控制。在給予 iron dextran 後經過 18 小時收下細胞，再以西方墨點法分析幾個和細胞凋亡有關的蛋白質的變化。透過 (Fig. 14) 可看到：在只給予 iron dextran 的組別中，其活化態的 caspase 3 的表現量有一個增加的情形。顯示了給予細胞鐵離子的刺激，將可能導致細胞凋亡的情形發生。而這個傷害現象在給予脂締素或 PPAR $\alpha$  促效劑的組別中可以得到一個改善的情形。而這個改善的現象也會因為 PPAR $\alpha$  上游的 AMPK 活性被抑制或 PPAR $\alpha$  活性被抑制時而消失。同時，在這個實驗中我們也看到：Bcl-XL 這個抗細胞凋亡的蛋白質表現也會因脂締素或 PPAR $\alpha$  促效劑的給予而被誘發；而以不同抑制劑阻擋住這一連串訊號途徑的情況下，也會因此而被反轉。另一方面，促進細胞凋亡的蛋白質 BAX 則

沒有出現明顯的變化，可能和我們所探討的機制較無關。而透過這個實驗我們可以知道：透過給予肝細胞脂締素，可以保護細胞降低來自鐵離子所造成的傷害。而這個保護細胞的途徑是必須透過 PPAR $\alpha$  所調控的這條訊息途徑的；同時 Bcl-XL 的誘發也可能包含在脂締素的細胞保護機制裡。

#### 4.4.2 HO-1 在保護細胞的機制中所扮演的角色。

在之前的實驗中，我們看到了給予脂締素後的細胞保護功能；而 HO-1 及 COX-2 的誘發現象也一直都有被觀察到。所以接下來的實驗中，我們想來分別探討 HO-1 及 COX-2 在這一整個保護細胞的機制中所扮演的可能角色。

首先是 HO-1 的部分：透過給予 HO-1 活性抑制劑 SnPP 來抑制 HO-1 的活性，再來觀察 HO-1 對於鐵離子所造成的細胞傷害中所扮演的可能角色。結果將以西方墨點法分析幾個和細胞凋亡相關的蛋白質的變化 ( Fig. 15)。在給予脂締素處理的組別可以明顯的看到：原本因鐵離子刺激而表現量上升的活化態 caspase 3 有出現一個反轉的現象；但在以活性抑制劑 SnPP 抑制 HO-1 性的組別中，活化態 caspase 3 的表現量又再度上升。這顯示了脂締素的細胞保護機制中，HO-1 的參與是必須的。另一方面我們也觀察到：Bcl-XL 的誘發情形應該是和 HO-1 的活性有關。在給予脂締素的組別中，Bcl-XL

出現了一個誘發表現量上升的情形；而同樣的，當把 HO-1 活性抑制後，這個表現量上升的情形也一併被反轉回來。最後，BAX 在這部分的實驗中，一樣沒有被觀察到有明顯的變化。

另外，由於 HO-1 也參與在鐵的代謝機轉中。因此接下來便進行了鐵質染色，觀察 HO-1 是否對鐵的堆積有改善作用。實驗中所用的細胞除了正常的肝細胞外，也使用了永久過度表現 HO-1 (HO-1 overexpression) 的肝細胞株及降低 HO-1 表現 (HO-1 knock-down) 的肝細胞株。在給予 iron dextran 48 小時後收下細胞進行染色 (Fig. 16A)：在 HO-1 過度表現的組別中可以看到，其鐵質堆積的情形減少；而在 HO-1 表現降低的組別中，這個鐵質堆積的情形會變得更明顯。表示 HO-1 可能和細胞內鐵的向外運輸機制有關。而透過西方墨點法分析也可以看到 (Fig. 16B) HO-1 過度表現的細胞中，其 Bcl-XL 的表現量有被誘發，和之前透過給予脂締素誘發 HO-1 後所看到 Bcl-XL 也被誘發的情形類似。而 shHO-1 的組別中，其 Bcl-XL 的表現量也是三者最低的。另外，HO-1 過度表現的細胞中其活化態 caspase 3 的表現量也是三者最低的；相對的，shHO-1 的組別則可以看到活化態 caspase 3 的表現量明顯上升。這個差異性也顯示了 HO-1 的保護作用是重要的。

#### 4.4.3 COX-2 在保護細胞的機制中所扮演的角色。

剛剛已探討過 HO-1 對於保護細胞的機制中是一個必要的角色後，接下來的這個部分是要來探討 COX-2 所扮演的角色。利用 COX-2 活性的抑制劑 NS 398 來抑制住 COX-2 的活性，再來看對於脂締素的細胞保護功能有無造成影響。結果將透過西方墨點法，觀察幾個和細胞凋亡相關的蛋白質表現的變化。透過 (Fig. 17) 可以看到：在脂締素處理的組別中，因鐵離子刺激所造成的活化態 caspase 3 上升的情形，會被反轉回來；而這個保護的作用會因為 COX-2 的活性被抑制後而減少。這個實驗顯示了 COX-2 在脂締素也提供了細胞保護作用中，也是被需要的。而 Bcl-XL 誘發的部分，在這裡並沒有觀察到 Bcl-XL 的調控會因為 COX-2 的活性被抑制住而有變化。所以可以推測：Bcl-XL 的調控應該是和 COX-2 較無關，而是主要受到 HO-1 的影響而變化。另一方面，BAX 在這邊也是沒有觀察到明顯的變化。

最後，我們再以 TUNEL Assay 的方式，直接觀察細胞凋亡的情形。最後以螢光顯微鏡記錄下結果。而透過 (Fig. 18A ~ 18G) 可以看到在給予鐵刺激的組別中，相較於控制組出現了明顯的螢光反應，表示有大量的細胞凋亡狀況正在發生。而脂締素的給予則可以改善細胞凋亡的情形，螢光反應下降。若給予不同的抑制劑對脂締素所活化

的訊號傳遞或細胞保護功能進行不同階段的抑制時，細胞凋亡的情形又再度的上升。

#### 4.4.4 脂締素在肝細胞中的抗發炎反應機制。

剛剛已探討了脂締素在肝細胞中的抗細胞凋亡相關的細胞保護機制，而由於鐵離子的刺激同時也會導致細胞的發炎反應的發生。所以接下來的實驗，我們想了解脂締素在肝細胞中，是否也可以提供一個抗發炎反應的功能；而 HO-1 及 COX-2 在這個可能的機制中又是什麼樣的角色。

首先給予細胞 PPAR $\alpha$  的抑制劑 GW 6417 或 HO-1 的抑制劑 SnPP 或 COX-2 的抑制劑對細胞進行前處理；再給予細胞脂締素。最後再透過投予細胞 iron dextran 來模擬鐵離子刺激的情形。結果將以 RT-PCR 來觀察早期發炎反應的相關細胞激素 TNF $\alpha$  及較晚期的發炎反應相關細胞激素 ICAM-1 及 MCP-1 來得到發炎反應的情形。結果 (Fig. 19) 顯示：在只給予 iron dextran 處理的組別中，三種細胞激素都出現了明顯的上升情形，表示細胞發生了發炎反應。而在給予脂締素後，這個上升的情形被降低，顯示了脂締素在這邊也提供了細胞一個抗發炎反應的作用。而這個抗發炎反應的作用會因為 PPAR $\alpha$  被抑制後而被反轉，這也表示了 PPAR $\alpha$  所調控的下游機制也和脂締素的抗發炎反應相關。而透過給予 HO-1 或 COX-2 抑制劑

的組別間比較可以看到：給予 HO-1 抑制劑的組別中，三種細胞激素並沒有出現一個上升的情形；但在給予 COX-2 抑制劑的組別中則可以觀察到，三種細胞激素出現的了一個明顯的上升情形。所以我們可以推得在脂締素所提供的抗發炎反應中，COX-2 佔了很重要的地位，而和 HO-1 較無關。

綜合這部分實驗結果：脂締素的抗發炎及抗細胞凋亡的功能可以保護肝細胞防止來自鐵離子刺激所造成的傷害。而這個功能主要是建立在 PPAR $\alpha$  所調控的 HO-1 及 COX-2 活性表現上。HO-1 可以誘發 Bcl-XL 達到抗細胞凋亡的目的，抗發炎反應則是和 COX-2 的活性表現比較相關。

## 五、討論

### 5.1 脂締素和 HO-1 與 COX-2 的誘發

在本實驗中，我們發現了給予脂締素可誘發肝細胞中 HO-1 及 COX-2 的表現。在此之前的實驗對於脂締素和 COX-2 的關係，已有一定程度的了解。在心血管方面，脂締素和 COX-2 的表現，將有助於減少缺氧後再充氧（ischemia-reperfusion）所造成的氧化性傷害。但一般而言多認為 (8, 31)，HO-1 的表現可誘發細胞中的脂締素 (34, 35)；而在我們的實驗中卻觀察到，透過外來給予脂締素，可以誘發細胞中 HO-1 的表現。而這個機制需透過 PPAR $\alpha$  作為一個中間傳遞物。脂締素活化 PPAR $\alpha$  的過程已在一些代謝快速的細胞中被觀察到 (32, 36)：在不同種類的細胞中，脂締素可先和其表面的特化受器作用，再由此活化的受器繼續往下進行傳遞 (37)。而這時的訊息傳遞分子則以 AMPK 或 p38 為主，根據細胞的種類可能有所不同。在我們的實驗中觀察到，肝細胞中脂締素活化 PPAR $\alpha$  的過程可能主要是透過 AMPK 的活化而和 p38 較無關。在給予脂締素後的 20 分鐘後，我們便透過西方墨點法觀察到了活化態 AMPK 的表現量出現了上升的情形，且在這個時間點上 PPAR $\alpha$  並未出現活化。而在較晚的時間點上，AMPK 的活化將能進一步促進 PPAR $\alpha$  的活化與核轉移現象。若以 AMPK 抑制劑抑制住 AMPK 的活化則能使這

些現象都反轉回來，同時更進一步的對於誘發 HO-1 及 COX-2 的情形做一的抑制。透過這一部分的實驗，我們可確立出脂締素在細胞中可能誘發 HO-1 及 COX-2 的訊息途徑其上下游可能的關係。在之前的研究中 PPAR 這類核受器蛋白調控 HO-1 及 COX-2 的機制已被觀察到 (9, 11, 18)，在不同種類的細胞中參與調控過程的 PPAR 系列蛋白可能不同 (38)。而它們共同的機制主要是附著到 HO-1 或 COX-2 啟動子上的一段特定的 PPRE 附著位 (binding site)，藉由直接增加轉錄的效率，讓細胞中的蛋白表現量大幅上升。在我們的實驗中也觀察到了相同的結果，透過 RT-PCR 及西方墨點法觀察到了脂締素的給予造成的 HO-1 及 COX-2 RNA 階段及蛋白質階段的上升情形；同時也透過染色質免疫沉澱法等觀察到了 PPAR $\alpha$  和其啟動子反應的情形，且透過 PPAR $\alpha$  在細胞中的過度表達造成 HO-1 及 COX-2 的表現情形，再次證明了它們之間的關係。所以，在我們這次的實驗中得到了一個脂締素可能的誘發細胞中 HO-1 及 COX-2 表現的訊號途徑和機制的新發現。

## 5.2 脂締素的細胞保護功能

脂締素最早的研究主要是和身體的醣類和脂質的代謝有關，它對於身體對胰島素敏感度的調節，是一個重要的角色 (1, 4)。而接下來在心血管相關的研究中指出：在多數心血管阻塞的病變中，發炎反應

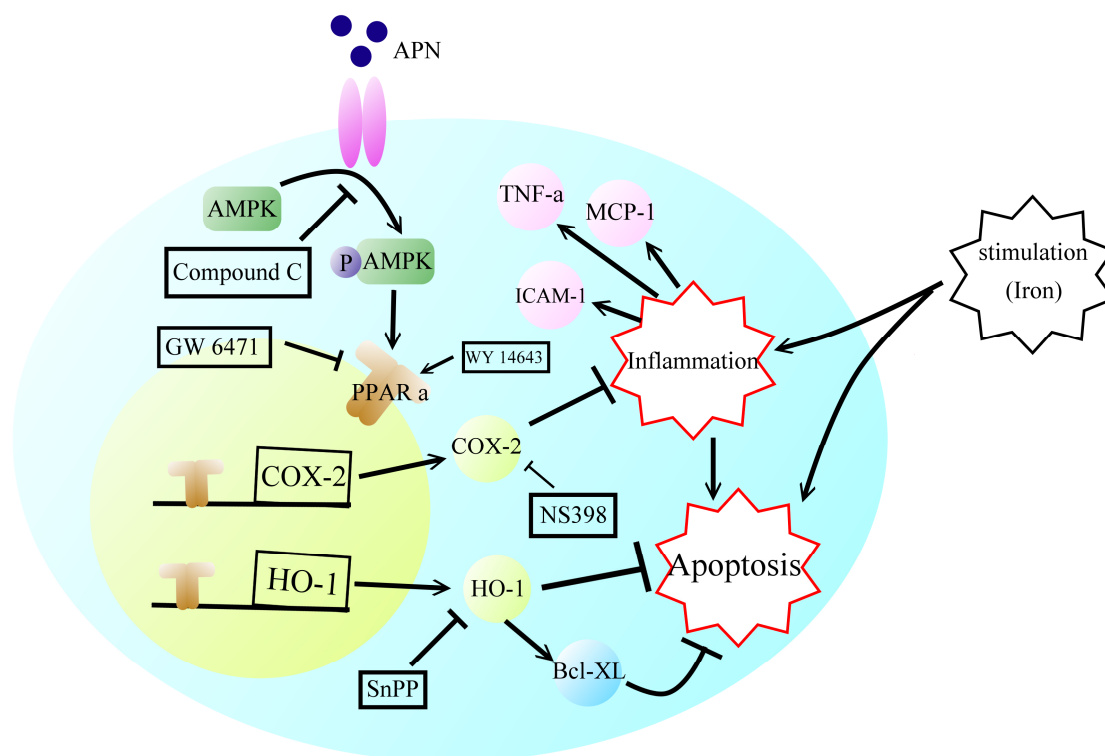


與氧化性傷害扮演一個重要的因素 (8)。而在缺乏脂締素或血中脂締素含量過低的個體中，這個現象會更加的惡化或是這類的個體罹患這類心血管疾病的機率會較一般正常個體來得高 (7)。這也是我們希望能以它來緩解鐵離子沉積所造成的細胞傷害。在地中海型貧血或酒精性肝傷害的病人體中，常會因為鐵質的利用不正常而造成大量的鐵沉積現象。而不正常的鐵離子沉積於細胞中，往往會造成細胞機能的異常、過氧化的情形發生而導致發炎反應和細胞死亡 (24)。在本實驗中，我們給予細胞脂締素，並發現它可以大幅改善鐵沉積所造成的細胞傷害。透過觀察和細胞凋亡相關蛋白，活化態 caspase 3 表現量的抑制及 TUNEL assay 的分析，可以很明顯的看到這個結果。以西方墨點法分析數種與細胞凋亡相關的蛋白質表現，與脂締素所誘發的 HO-1 及 COX-2 之間的關係，我們可以發現到：Bcl-XL 這個抗細胞凋亡的蛋白質有被誘發的情形發生。這點在之前的研究報告 (39, 40, 41)中指出，當細胞中的 HO-1 被大量表現時，Bcl-XL 也會出現一個被誘發的情形。兩者共同參與細胞的抗凋亡反應。因此在本實驗中，我們也利用給予 HO-1 的活性抑制劑 SnPP 來觀察是否會影響到 Bcl-XL 的變化。而結果顯示 HO-1 的確扮演一個調控 Bcl-XL 表現的角色；而 COX-2 則較和 Bcl-XL 的調控較無關。另外 HO-1 是否直接有參與到抗細胞凋亡的過程，以目前實驗所得到的資料，並不

能證明 HO-1 和細胞凋亡間的直接關係。另一方面，COX-2 在抗細胞凋亡上，其所扮演的角色可能不比 HO-1 來得直接。由西方墨點法及 TUNEL assay 分析中可觀察到：當抑制住 COX-2 的活性時，其所造成的細胞凋亡現象不及將 HO-1 抑制住時來得明顯。HO-1 被抑制住時所造成的細胞凋亡現象，甚至較只給予鐵劑的組別嚴重。而在鐵質染色的實驗結果可看到，HO-1 有助於減輕細胞內鐵質堆積的情形；而減少 HO-1 在細胞中的表現量會使得鐵在細胞中堆積的情況惡化。這個 HO-1 排除鐵質的功能，應該也是細胞保護機制重要的一環。而在我們目前的實驗結果還無法解釋其可能的分子機轉。最後在抗發炎反應方面，我們是透過利用 RT-PCR 來分析數種和發炎反應相關的細胞激素的 mRNA 量的變化，來推定發炎反應的情形。而結果可以看到，脂締素的給予可降低鐵劑所造成的發炎反應。而當以 PPAR $\alpha$  抑制劑來阻斷脂締素所活化的訊息傳遞後這個保護現象便消失了。表示了這個保現象也有可能是建立在下游的 HO-1 及 COX-2 的功能上。而在我們的實驗中利用了相關的抑制劑抑制了個別的活性中可以看到，抗發炎反應的作用主要建立在 COX-2 的活性上，HO-1 抗發炎反應較不相關。另外，有研究指出當 AMPK 被活化時所啟動的一些訊息傳遞，也具有抑制發炎反應的效果 (8, 42, 43)。但以我們目前的結果中，無法看出 AMPK 的相關性。

## 六、結論與未來展望

在本實驗中，我們提供了一個透過脂締素保護細胞的可能機制。



藉由給予脂締素誘發 HO-1 及 COX-2 的表現，可以透過抗細胞凋亡及抗發炎反應的多重機制，大幅緩解鐵質所造成的細胞傷害。所以或許可成為一個可能的抑制人體中因鐵代謝失調所造成的發炎反應的新治療方法。

接下來的實驗發展：由於目前已知一個可能的保護機制。但這並不包括了 HO-1 如何將細胞中多餘的鐵排出的部分。要能徹底的減輕細胞的刺激，其詳細的作用過程必定是個關鍵。另一方面是關於脂締素在動物體內中的應用上：由於目前只進行了細胞實驗，而我們所用的濃度的確能達到細胞保護的作用。但脂締素在人體中不僅只有細

胞保護的功能，它還和許多代謝相關反應。因此在建立一個可能的有效範圍時，是否會對身體造成其他的影響，可能都必須列入考慮的範圍內。



## 七、實驗結果圖次目錄

Fig. 1 脂締素在肝細胞中誘發 HO-1 及 COX-2 的表現，並提高 HO-1 的酵素活性。

Fig. 2 脂締素改善不同濃度的鐵質對肝細胞的傷害。

Fig. 3 脂締素在肝細胞中活化 AMPK 的訊息傳遞。

Fig. 4 脂締素在肝細胞中不活化 p38 的訊息傳遞。

Fig. 5 脂締素促進 PPAR $\alpha$  的核轉移現象。

Fig. 6 脂締素在肝細胞中誘發 HO-1/COX-2 的表現，需透過 PPAR $\alpha$  的活化。

Fig. 7 透過轉染 pcDNA-Flag-PPAR $\alpha$  可大幅增加 HO-1 及 COX-2 的誘發現象。

Fig. 8 給予脂締素後觀察 Flag-PPAR $\alpha$  的核轉移現象 (螢光免疫染色)。

Fig. 9 以核酸干擾技術降低 PPAR $\alpha$  的表現可抑制 HO-1 及 COX-2 的誘發。

Fig. 10 脂締素增強 PPAR $\alpha$  和 HO-1 及 COX-2 啟動子的交互作用 (以染色質免疫沉澱法分析)。

Fig. 11 脂締素促進 PPAR $\alpha$  在 HO-1 及 COX-2 上 PPRE 位置上的 binding (以 EMSA 分析)。

Fig. 12 脂締素增加帶 PPRE 促進子的啟動子活性。

Fig. 13 脂締素增加 HO-1 的啟動子活性。

Fig. 14 脂締素透過 PPAR $\alpha$  的活化保護細胞防止來自鐵質的傷害。

Fig. 15 HO-1 可保護細胞防止來自鐵質所造成的凋亡。

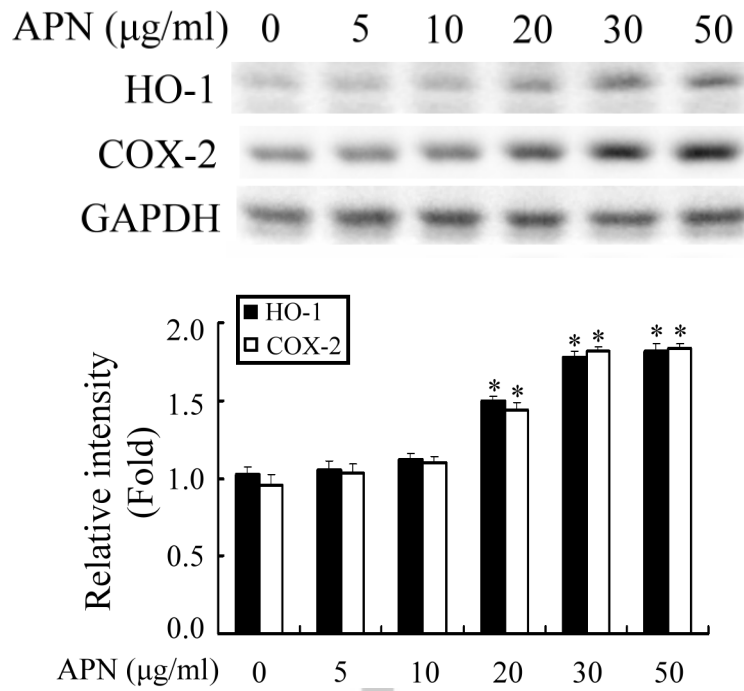
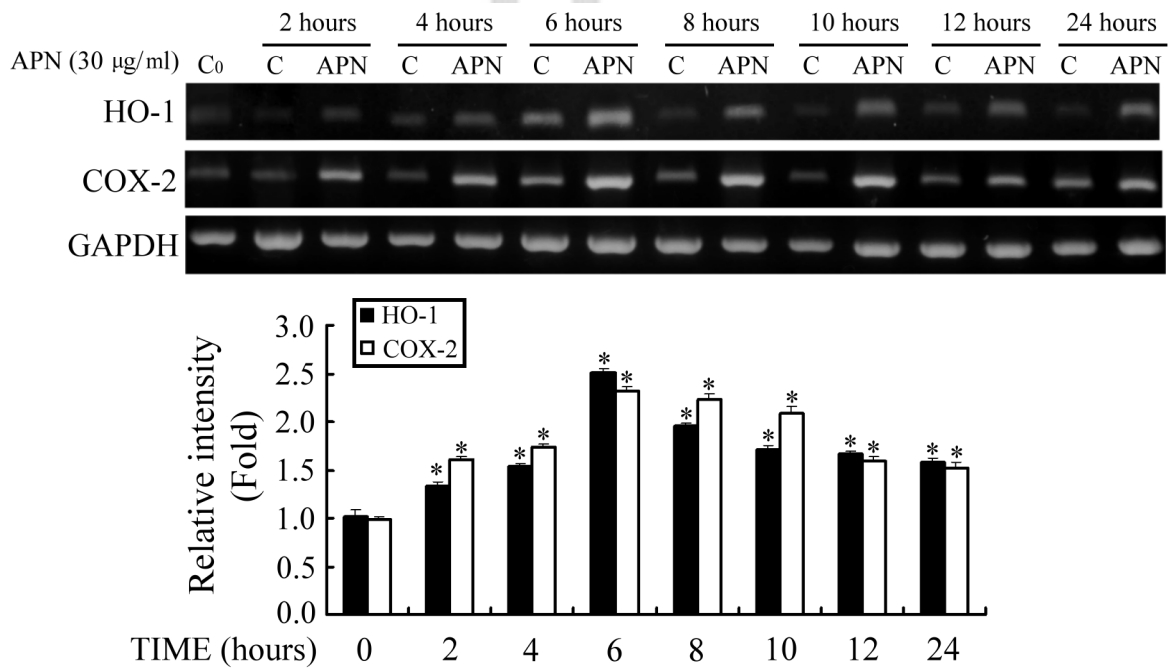
Fig. 16 HO-1 緩解鐵在細胞中的堆積現象。

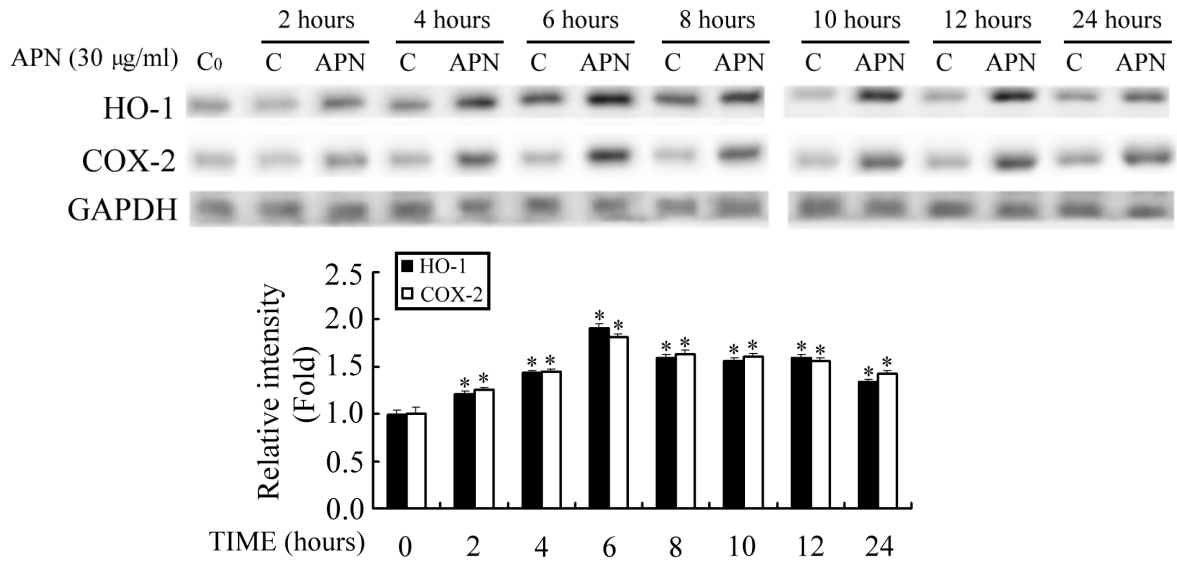
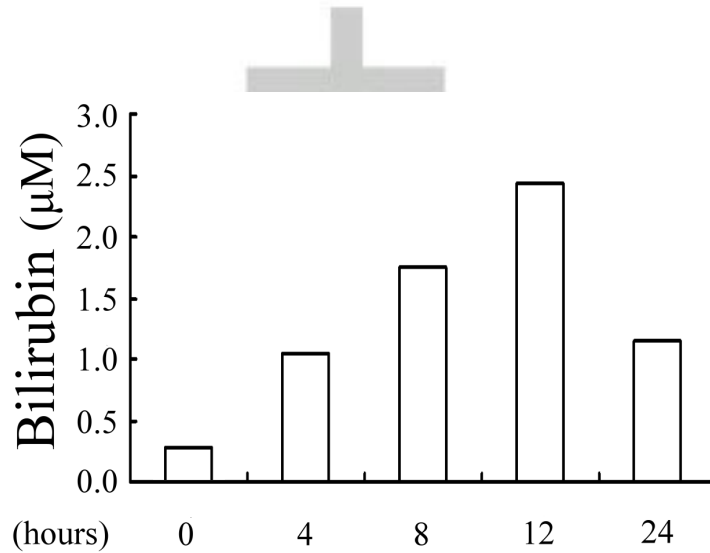
Fig. 17 COX-2 可保護細胞防止來自鐵質所造成的凋亡。

Fig. 18 Iron dextran 造成細胞凋亡的情形 (TUNEL assay)。

Fig. 19 脂締素的抗發炎反應功能。



**A****B**

**C****D**

**Fig. 1 脂締素在肝細胞中誘發 HO-1 及 COX-2 的表現，並提高**

**HO-1 的酵素活性。**

直接給予細胞脂締素後，在不同的時間點收下細胞。並用 RT-PCR 及西方墨點法分析。(A)以西方墨點法分析：隨著給予的脂締素濃度的上升，HO-1 及 COX-2 的誘發量也跟著上升。(B) RT-PCR 的結果可看到，在給予脂締素二小時後，HO-1 及 COX-2 RNA 的量都有

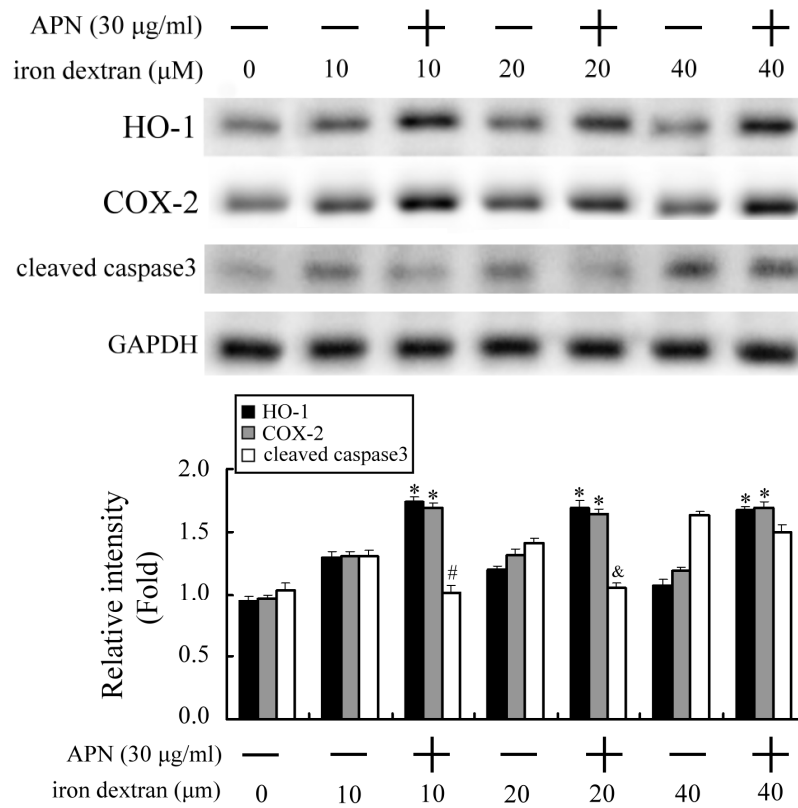


上升。最大量出現在給藥後六小時，並可繼續到 24 小時。(C) 以西方墨點法分析，兩種蛋白的變化走勢和 RT-PCR 的結果類似。(D) 脂締素可增加 HO-1 的活性，並在給藥後 12 小時出現最大值。

(\* ,  $P < 0.05$  versus ctrl)



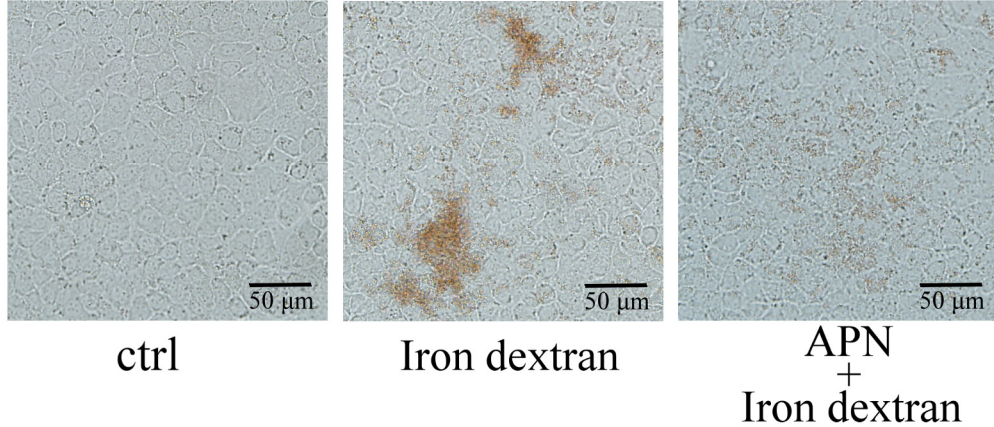
**A**



## B

APN (30  $\mu\text{g/ml}$ )

Iron dextran (20  $\mu\text{M}$ )

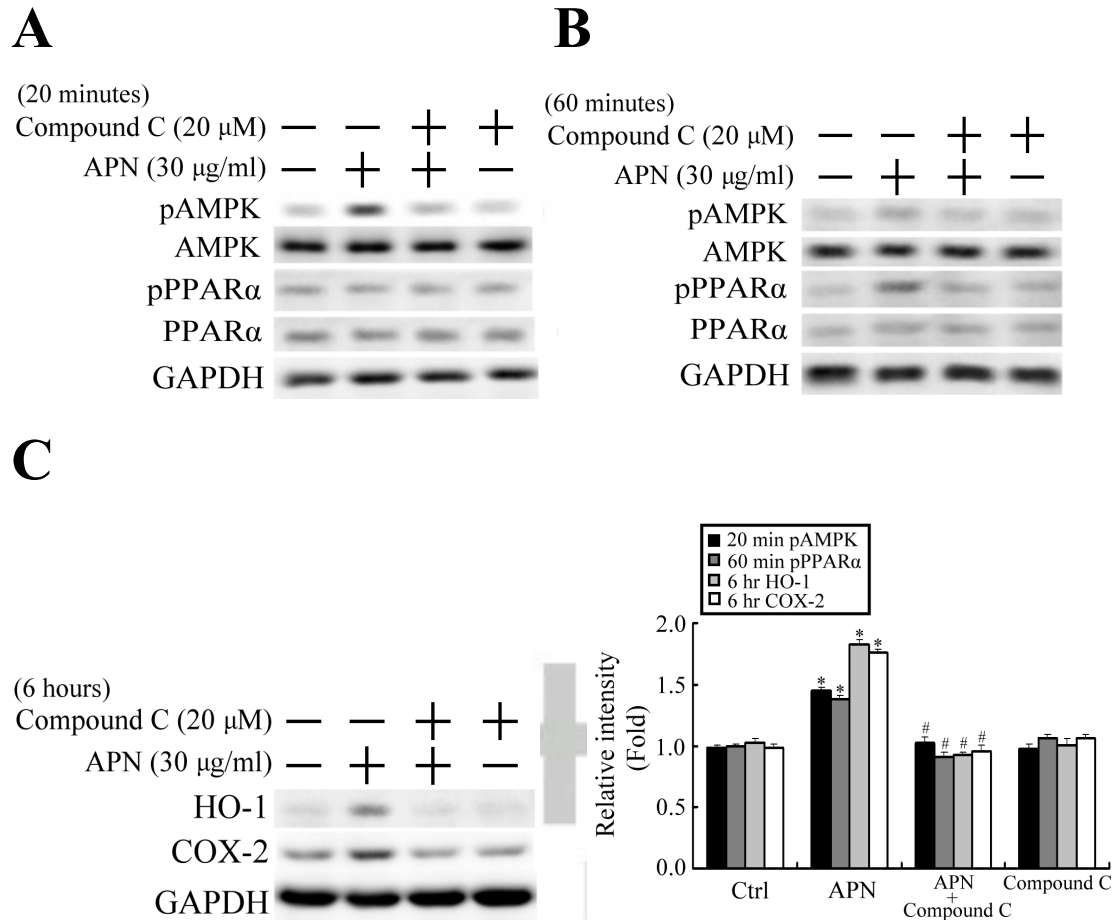


**Fig. 2** 脂締素改善不同濃度的鐵質對肝細胞的傷害。

在給予不同濃度鐵質，以及脂締素 30  $\mu\text{g/ml}$  後，以西方墨點法分析。(A) 脂締素在給予鐵質濃度 20  $\mu\text{M}$  以下時可達到保護細胞的作用，活化態 caspase 3 的表現量下降。而同時也能觀察到 HO-1 和 COX-2 這兩個細胞保護的蛋白質被誘發的現象。

而在只給予鐵質刺激的組別中，也可以看到此誘發的現象。但這個誘發的量並不足以保護細胞防止鐵質的傷害。(B) 透過鐵質的染色可以看到，在給予 iron dextran 的組別中有明顯的鐵質沉積的現象；而在同時給予脂締素的組別，這個現象明顯的被改善。

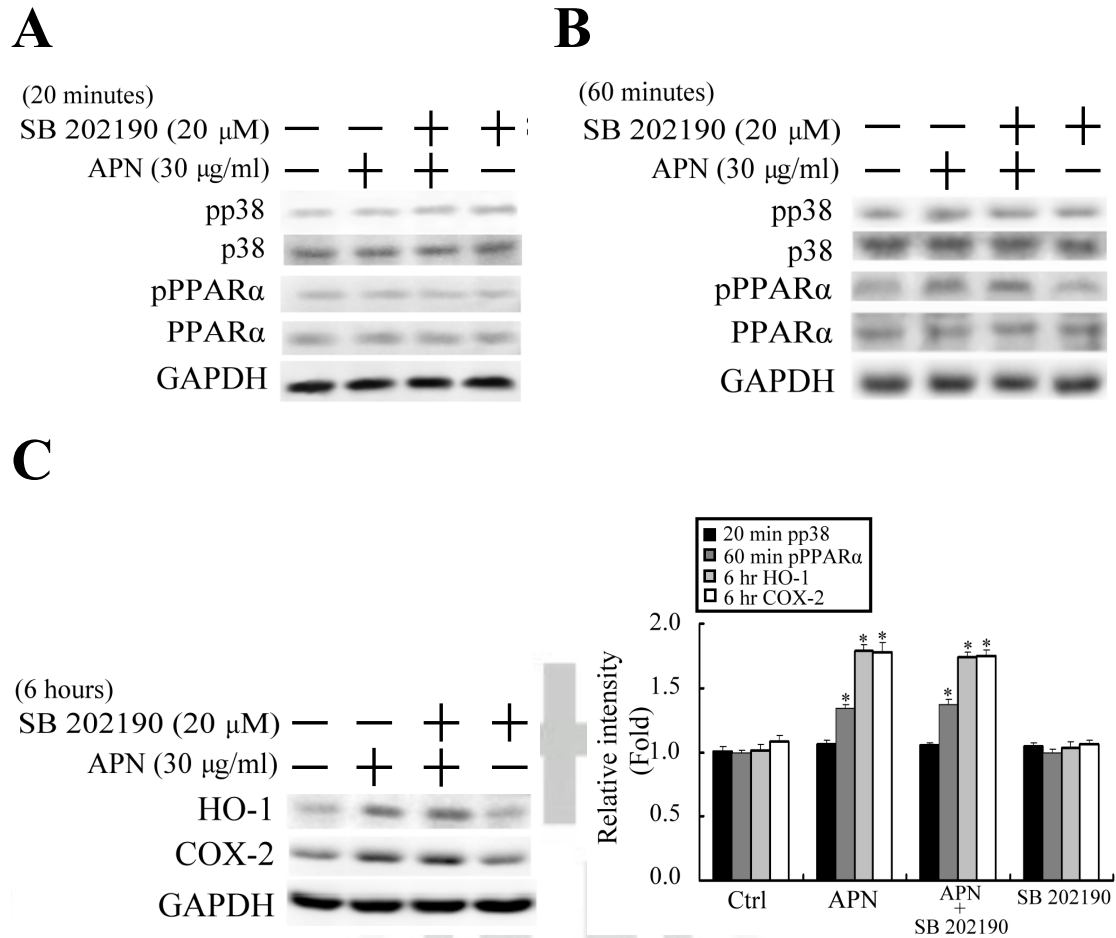
(\* ,  $P < 0.05$  versus ctrl, #,  $P < 0.05$  versus iron dextran 10  $\mu\text{M}$ -treated group, &,  $P < 0.05$  versus iron dextran 20  $\mu\text{M}$ -treated group)



**Fig. 3 脂締素在肝細胞中活化 AMPK 的訊息傳遞。**

以 AMPK 的抑制劑 Compound C 對細胞進行前處理後，再給予脂締素。最後以西方墨點法分析。(A) 20 分鐘時，可以觀察到磷酸化 AMPK 的表現量上升，而給予 Compound C 處理的組別則被反轉。(B) 60 分鐘時，給予脂締素處理的組別，磷酸化 PPAR $\alpha$  的表現量上升；而給予 Compound C 的組別則沒有變化。(C) 6 小時的時間點上，給予脂締素的組別可以誘發 HO-1 及 COX-2 的表現，而給予 Compound C 的組別則此誘發反應會被反轉。

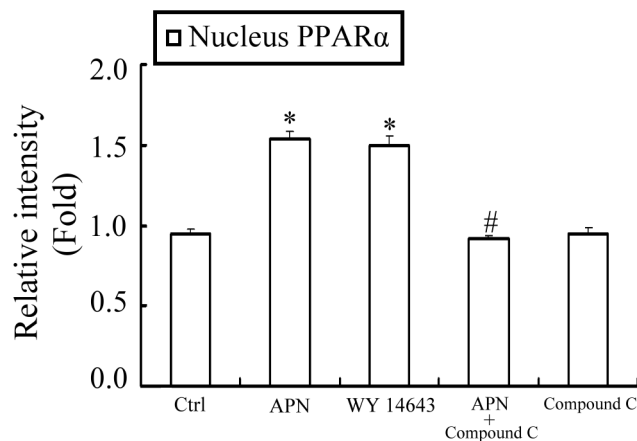
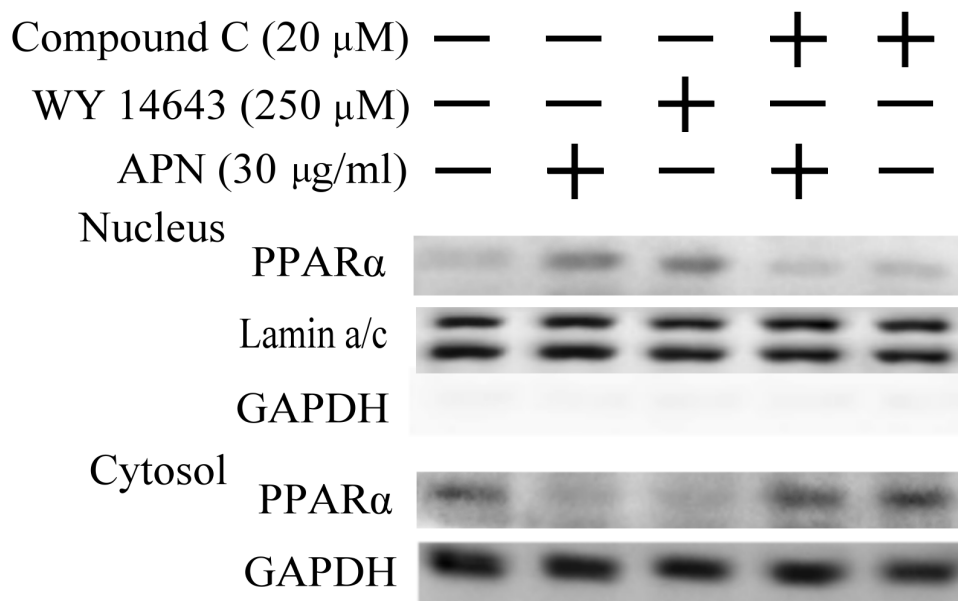
(\* , P < 0.05 versus ctrl, # , P < 0.05 versus APN-treated group)



**Fig. 4 脂締素在肝細胞中不活化 p38 的訊息傳遞。**

以 p38 的抑制劑 SB 202190 對細胞進行前處理後，給予脂締素；再以西方墨點法分析。(A) 20 分鐘時，不論是否有給予抑制劑前處理的組別，p38 的活化情形都沒有出現一個明顯的上升。(B) 60 分鐘時，p38 依然沒有出現活化態上升的情形；而給予脂締素的組別都出現了 PPAR $\alpha$  被磷酸化的情形。不論是否有給予抑制劑，均不對 PPAR $\alpha$  的磷酸化造成影響。(C) 6 小時的時間點上，HO-1 及 COX-2 被誘發的情形也不受抑制劑的影響。

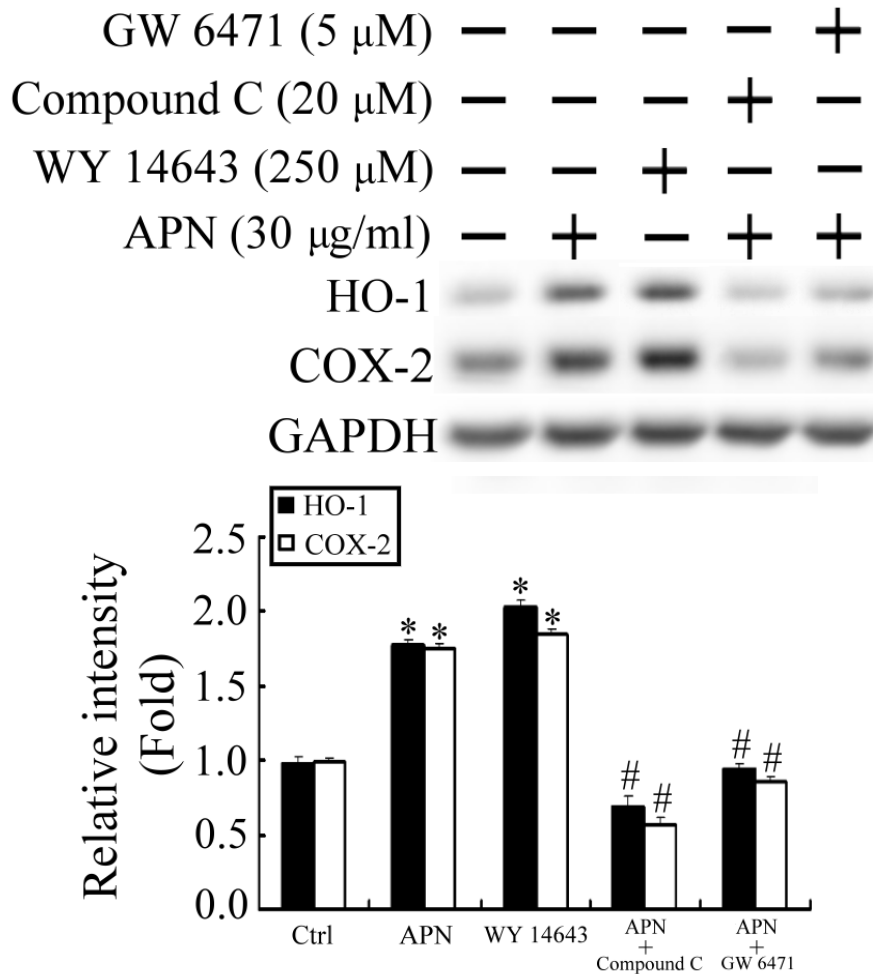
(\*,  $P < 0.05$  versus ctrl, #,  $P < 0.05$  versus APN-treated group)



**Fig. 5 脂締素促進 PPAR $\alpha$  的核轉移現象。**

首先以 Compound C 對細胞進行前處理，再給予細胞脂締素。同時以 PPAR $\alpha$  的促效劑 WY 14643 做為正調控。一小時後收下細胞進行核質分離，再以西方墨點法分析。在給予脂締素及促效劑的組別中可以看到 PPAR $\alpha$  出現了一個明顯的核轉移現象；而在以 Compound C 前處理的組別中，這個現象則會被反轉。

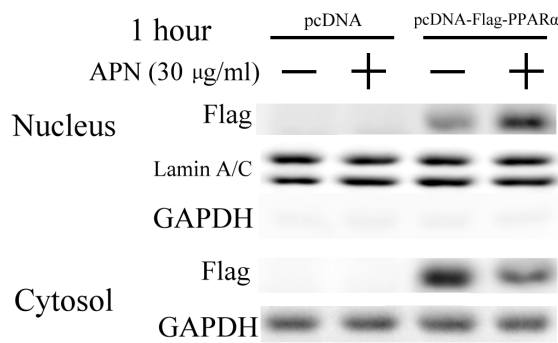
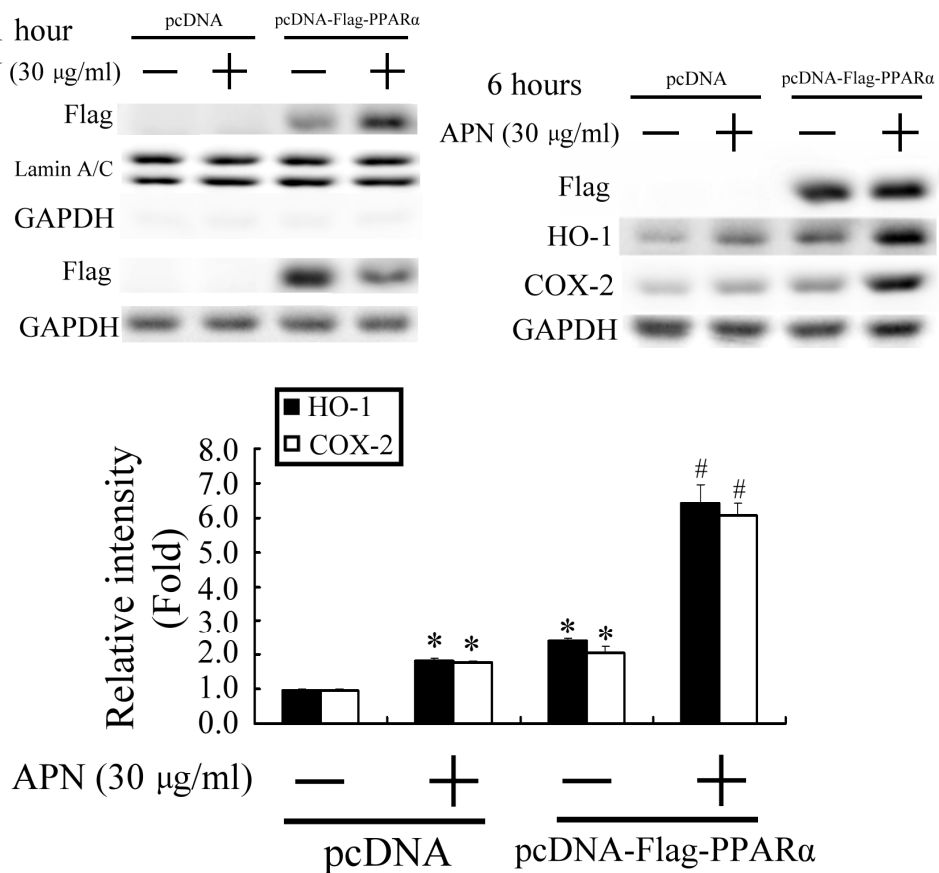
(\*,  $P < 0.05$  versus ctrl, #,  $P < 0.05$  versus APN-treated group)



**Fig. 6 脂締素在肝細胞中誘發 HO-1/COX-2 的表現，需透過 PPAR $\alpha$  的活化。**

先以 Compound C 或 PPAR $\alpha$  抑制劑 GW 6471 對細胞進行前處理，再給予脂締素。PPAR $\alpha$  促效劑 WY 14643 則做為一正調控的組別。收下細胞後，以西方墨點法分析。結果可看到，在給予脂締素或促效劑的組別中，HO-1 及 COX-2 均有一個明顯的誘發情形；而在給予 Compound C 或 GW 6471 的組別中，這個誘發現象則被反轉。

(\*,  $P < 0.05$  versus ctrl, #,  $P < 0.05$  versus APN-treated group)

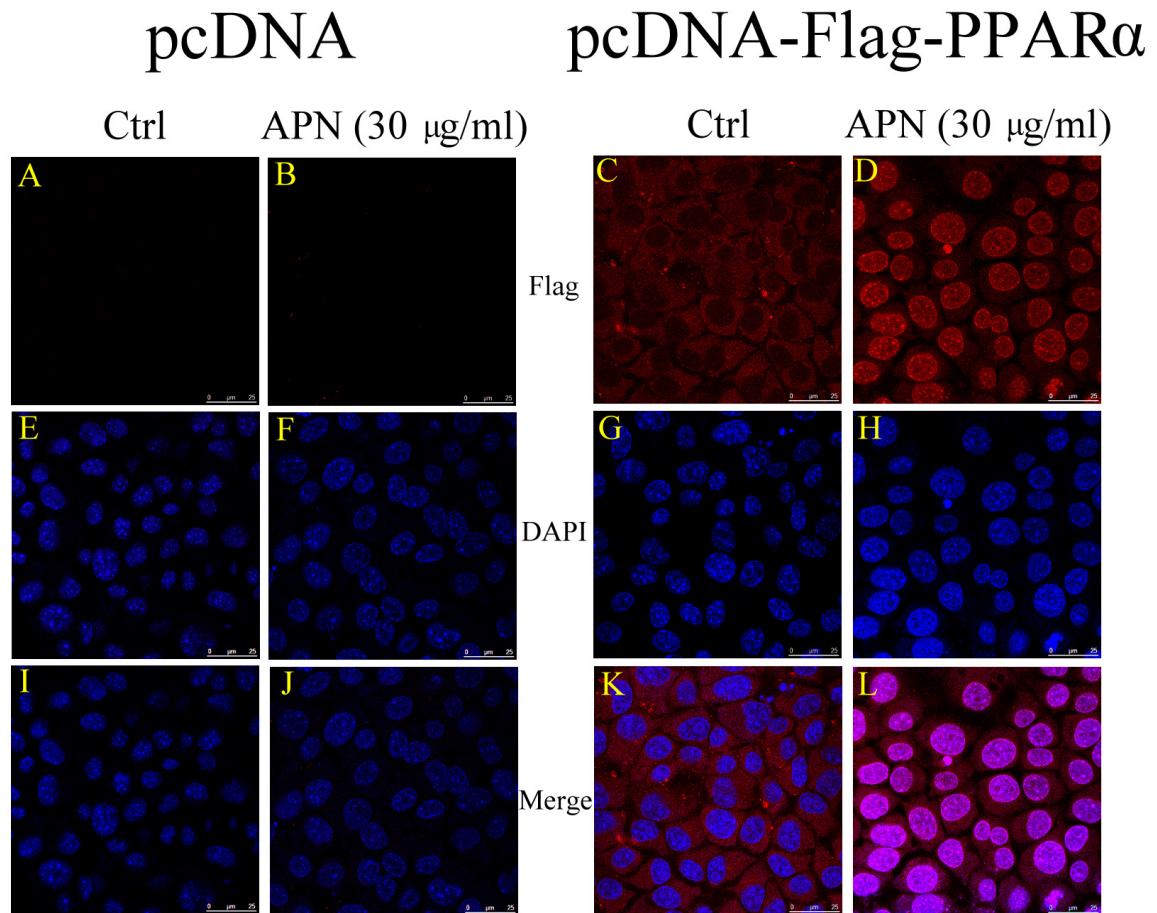
**A****B**

**Fig. 7 透過轉染 pcDNA-Flag-PPAR $\alpha$  可大幅增加 HO-1 及 COX-2 的誘發現象。**

對肝細胞轉染帶 Flag-PPAR $\alpha$  的質體，同時也轉染空的質體作為控制組。經過 48 小時後給予脂諦素作用並分析 1 小時上的 Flag-PPAR $\alpha$  融合蛋白的核轉移現象，6 小時上的 HO-1 與 COX-2 的誘發情形。結果可看到：給藥 1 小時後，融合蛋白出現明顯的核轉移；6 小時的 HO-1 與 COX-2 的誘發現象也更明顯的上升。

(\* , P < 0.05 versus ctrl, # , P < 0.05 versus APN-treated pcDNA)





**Fig. 8 給予脂締素後觀察 Flag-PPAR $\alpha$  的核轉移現象 (螢光免疫染色)**

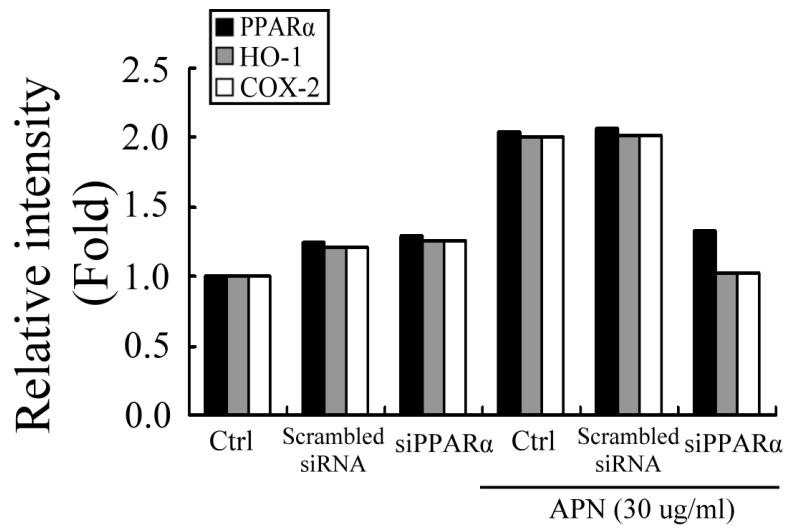
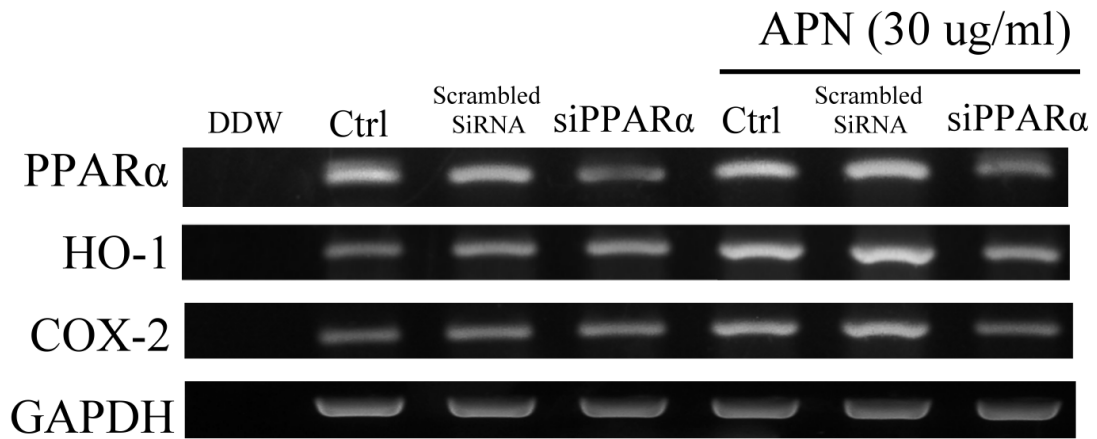
首先對肝細胞轉染 Flag-PPAR $\alpha$  的質體，同時也轉染 pcDNA 單獨的質體作為控制組。經過 48 小時後給予脂締素 1 小時，收下細胞進行實驗。轉染帶 Flag-PPAR $\alpha$  的組別中可看到再投予脂締素後出現一個很明顯的核轉移現象。

(A)~(D):以 Anti-Flag 作為一級抗體，再染 Texas Red

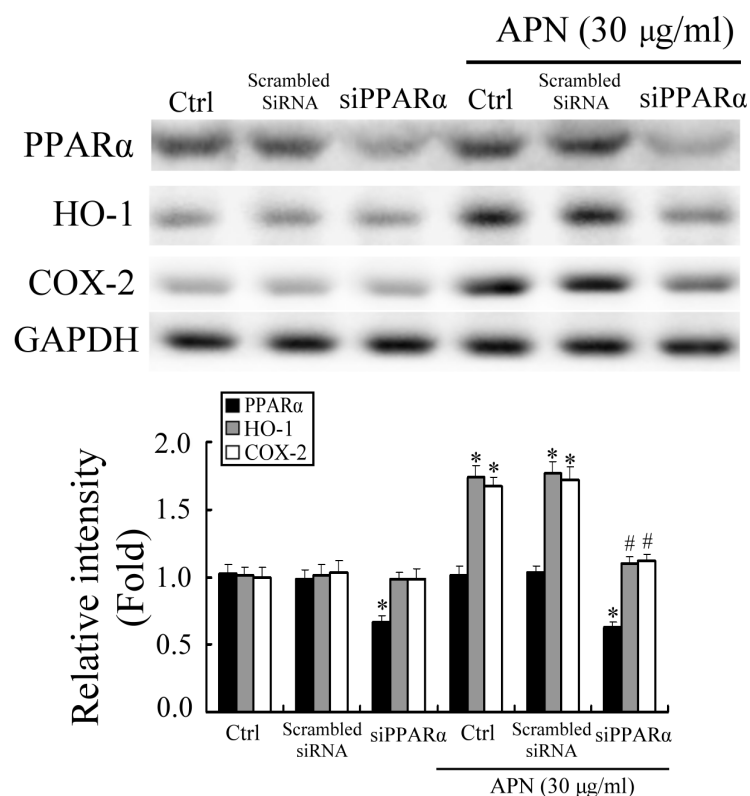
(E)~(H):以 DAPI 進行核染色

(I)~(L):各組疊合後的情形

A

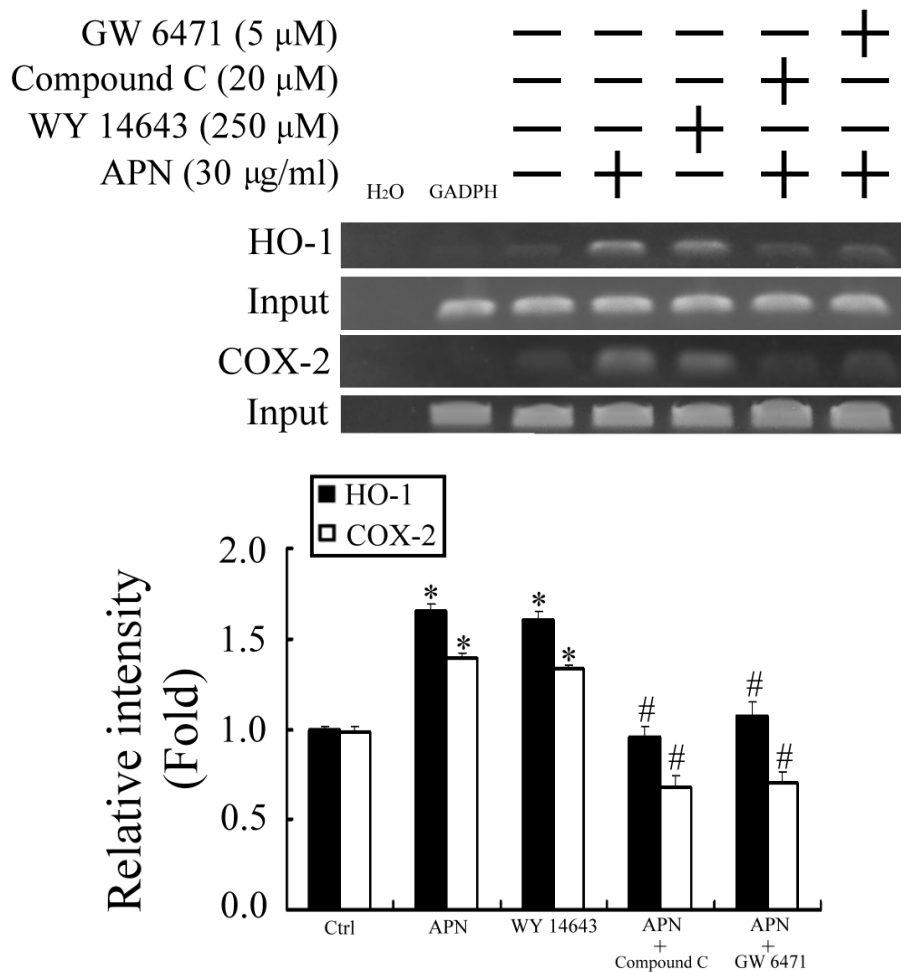


B



**Fig. 9 以核酸干擾技術降低 PPARα 的表現可抑制 HO-1 及 COX-2 的誘發。**

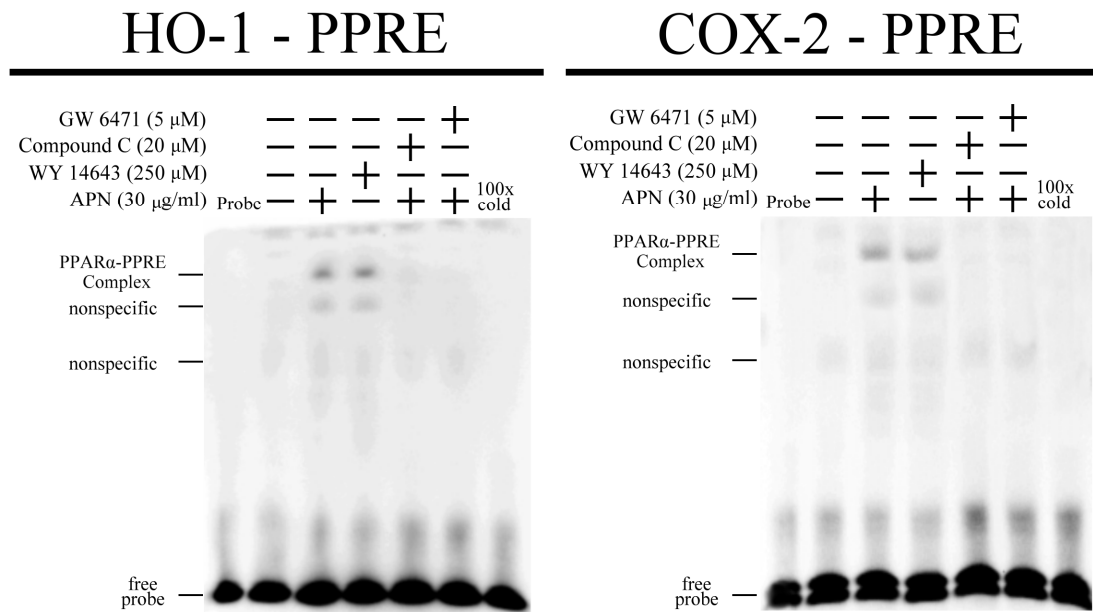
先轉染針對 PPARα 設計的 siRNA，同時以 scrambled siRNA 做為一個負控制。過 24 小時後給予脂締素，再經 6 小時收下細胞並以 RT PCR (A)及西方墨點法 (B)分析。在以 siPPARα 處理的組別中可以看到：PPARα 的表現量較控制組及以 scrambled siRNA 處理的組別來得下降；HO-1 及 COX-2 的表現量在沒給予脂締素前均沒有出現一個明顯的變化。而在給予脂締素後，以 siPPARα 處理的組別中，其 HO-1 及 COX-2 的誘發情形被抑制住；在另外兩組則可以觀察到明顯的誘發情形。(\*, P < 0.05 vs ctrl, #, P < 0.05 vs APN-treated group)



**Fig. 10 脂締素增強 PPAR $\alpha$  和 HO-1 及 COX-2 啟動子的交互作用 (以染色質免疫沉澱法分析)。**

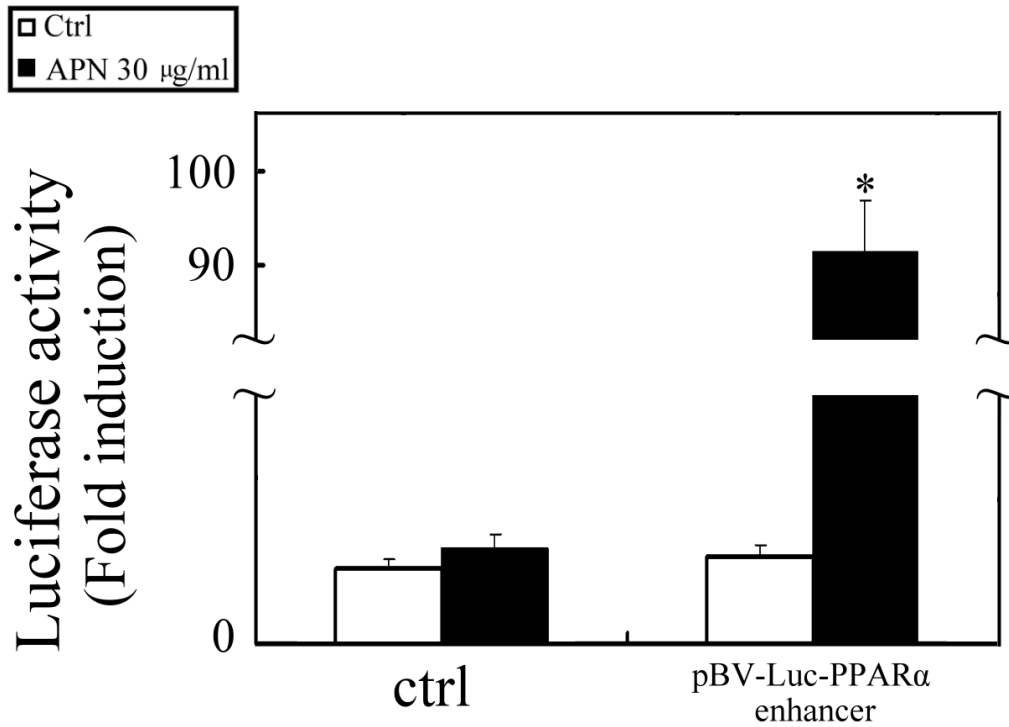
先以 AMPK 抑制劑 Compound C 或 PPAR $\alpha$  抑制劑 GW 6471 對細胞進行前處理，再給予脂締素。並以 PPAR $\alpha$  促效劑 WY 14643 做為一個正調控，一小時後收下細胞進行染色質免疫沉澱。在給予脂締素或促效劑的組別中可以看到有一個明顯的交互作用的情況發生；而在給予 Compound C 或 GW 6471 的組別中，這個現象則會下降。

(\*,  $P < 0.05$  versus ctrl, #,  $P < 0.05$  versus APN-treated group)



**Fig. 11 脂締素促進 PPAR $\alpha$  在 HO-1 及 COX-2 上 PPRE 位置上的 binding (以 EMSA 分析)。**

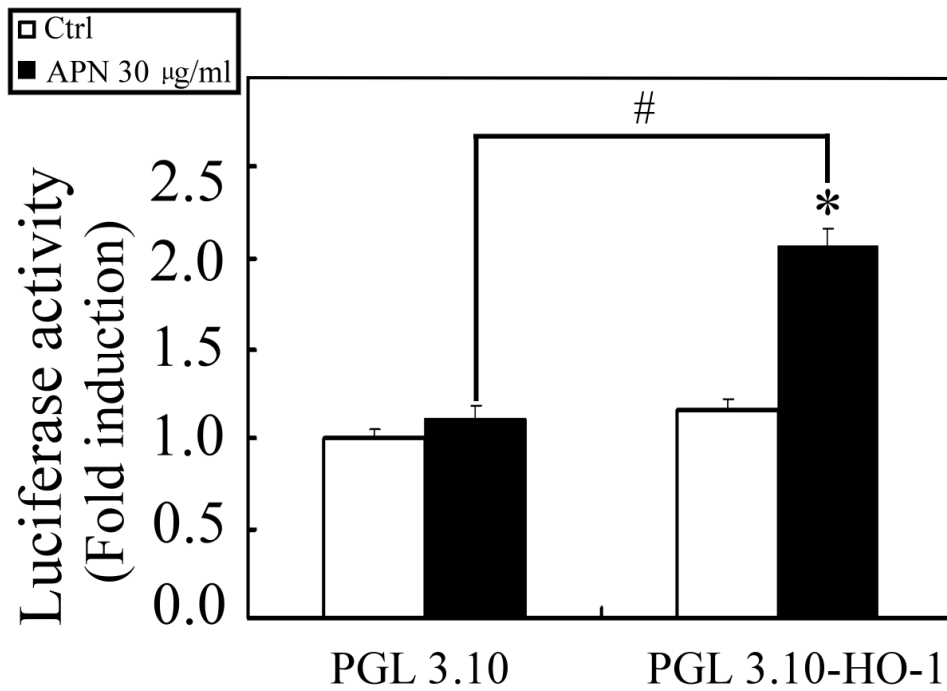
先以 AMPK 抑制劑 Compound C 或 PPAR $\alpha$  抑制劑 GW 6471 對細胞進行前處理，再給予脂締素。並以 PPAR $\alpha$  促效劑 WY 14643 做為一個正調控，一小時後收下細胞進行 EMSA。在給予脂締素或促效劑的組別中可以看到明顯的 PPAR $\alpha$  與 PPRE 的 binding 現象；而在同時給予不同抑制劑的組別中，這個現象則會被抑制住。



**Fig. 12** 脂締素增加帶 PPRE 促進子的啟動子活性。

轉染帶 PPRE 促進子的螢光蛋白質體，並在給予脂締素後進行活性測試；同時轉染空的質體作為控制組。在給予脂締素 6 小時後，透過螢光的表現可知帶 PPRE 促進子的啟動子活性上升約 90 倍。在轉染空質體的組別中，加藥後則沒有明顯變化。

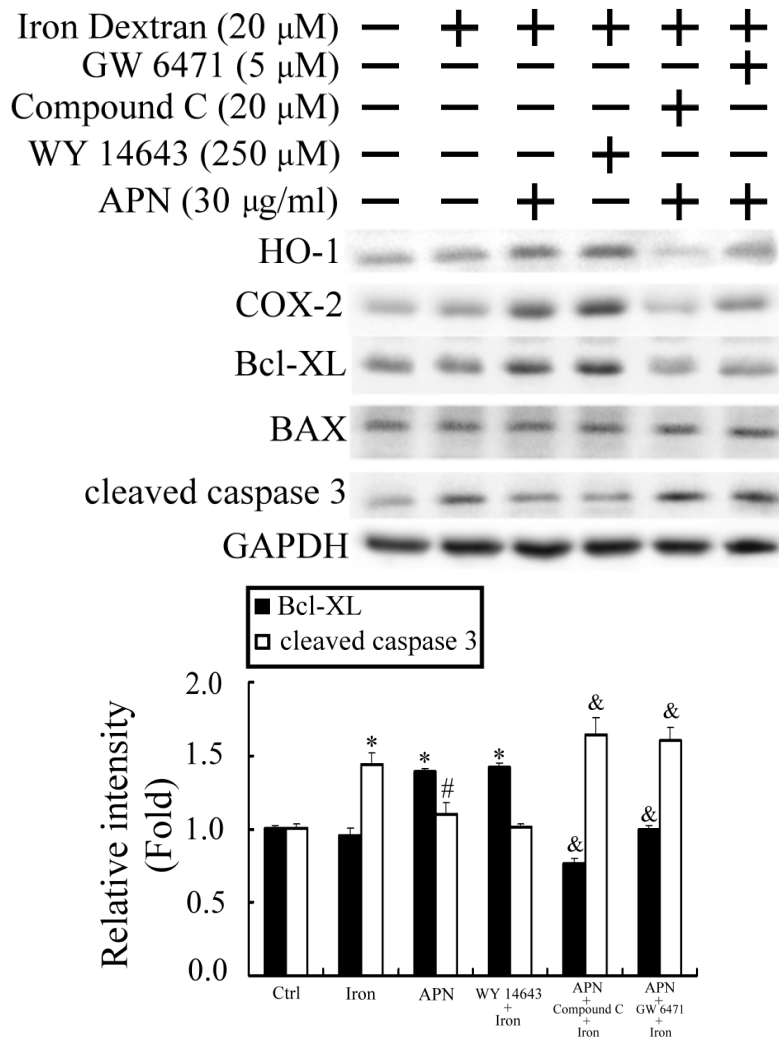
(\*,  $P < 0.05$  versus ctrl)



**Fig. 13** 脂締素增加 HO-1 的啟動子活性。

轉染帶 HO-1 啟動子的螢光蛋白質體，並在給予脂締素後進行活性測試，並轉染空的質體當作控制組。在給予脂締素 6 小時後進行螢光活性測試。透過螢光的表現可知脂締素可增加 HO-1 啟動子的活性約 2 倍；而控制組中則沒有看到螢光表現上升的情形。

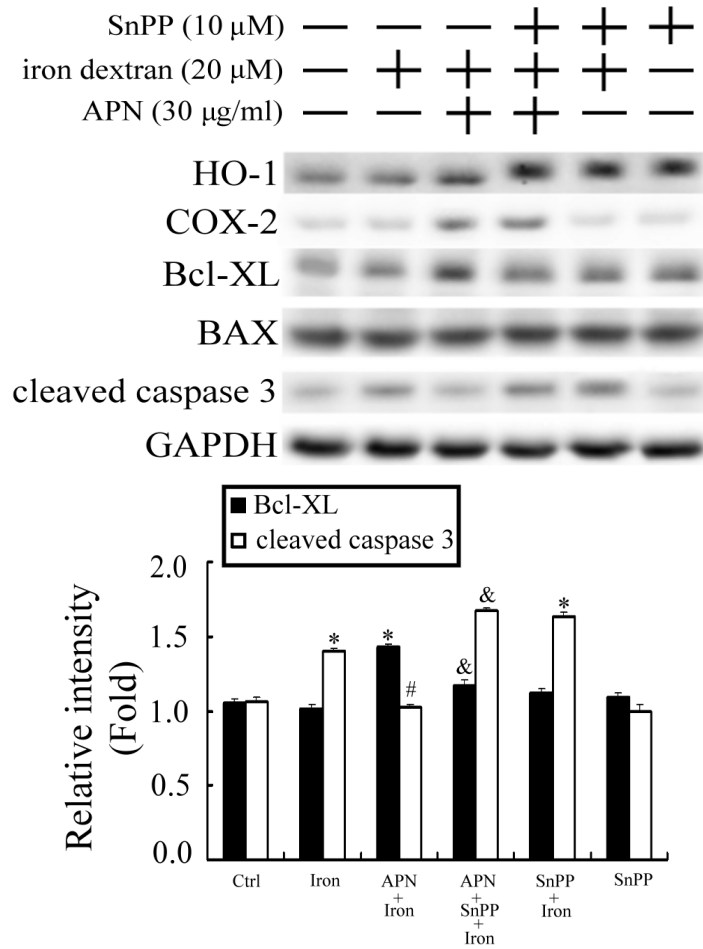
(\*,  $p < 0.05$  versus PGL 3.10 ctrl, #,  $P < 0.05$  versus APN-treated PGL 3.10)



**Fig. 14 脂締素透過 PPAR $\alpha$  的活化保護細胞防止來自鐵質的傷害。**

以 Compound C 及 GW 6471 對細胞進行前處理，再給予脂締素及以 WY 14643 作為正控制；最後給予 iron dextran 刺激，18 小時後收下細胞以西方墨點法分析。給予脂締素及促效劑的組別可以反轉因鐵刺激而造成的活化態 caspase 3 上升；同時誘發抗細胞凋亡的蛋白質 Bcl-XL 表現量上升。而在給予不同抑制劑的組別中，原本的保護現象都被反轉。(\*,  $P < 0.05$  vs ctrl, #,  $P < 0.05$  versus iron dextran-treated group, &,  $P < 0.05$  versus APN and iron dextran-treated group)



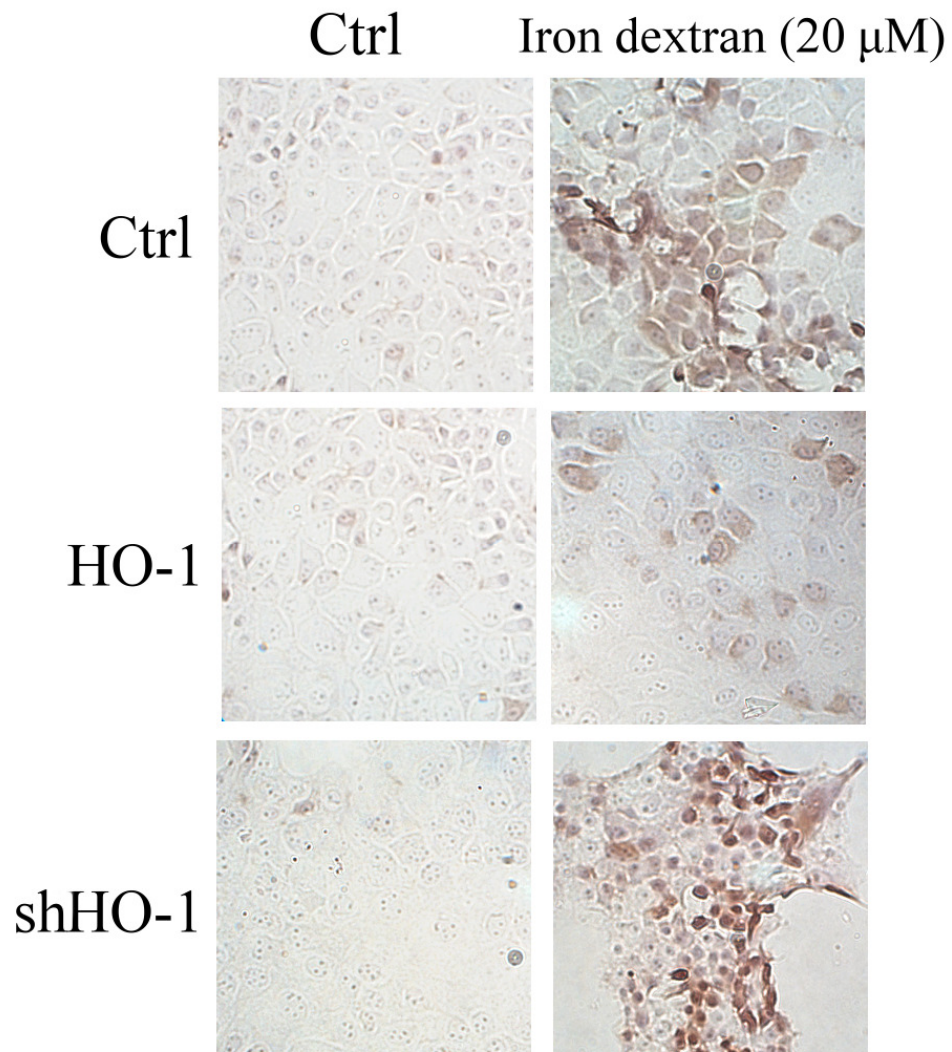


**Fig. 15 HO-1 可保護細胞防止來自鐵質所造成的凋亡。**

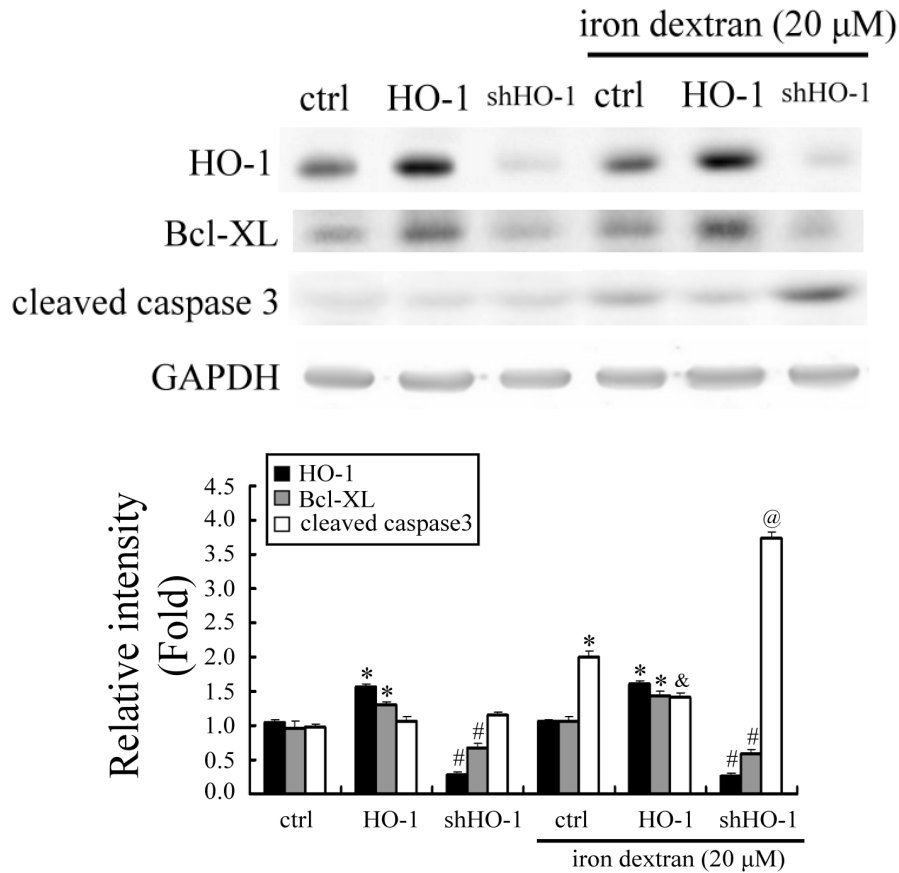
先以 HO-1 的抑制劑對細胞前處理，再給予細胞脂締素。最後再給予 iron dextran 刺激，18 小時後收下細胞以西方墨點法分析。在以抑制劑處理的組別中，可以看到活化態 caspase 3 的表現量上升。表示原本脂締素保護細胞的功能被反轉，HO-1 是參與在脂締素的細胞保護機制裡。而 Bcl-XL 的誘發現象，也因抑制劑的給予而降低。

(\*,  $P < 0.05$  versus ctrl, #,  $P < 0.05$  versus iron dextran-treated group, &,  $P < 0.05$  versus APN and iron dextran-treated group)

**A**



**B**



**Fig. 16 HO-1 緩解鐵在細胞中的堆積現象。**

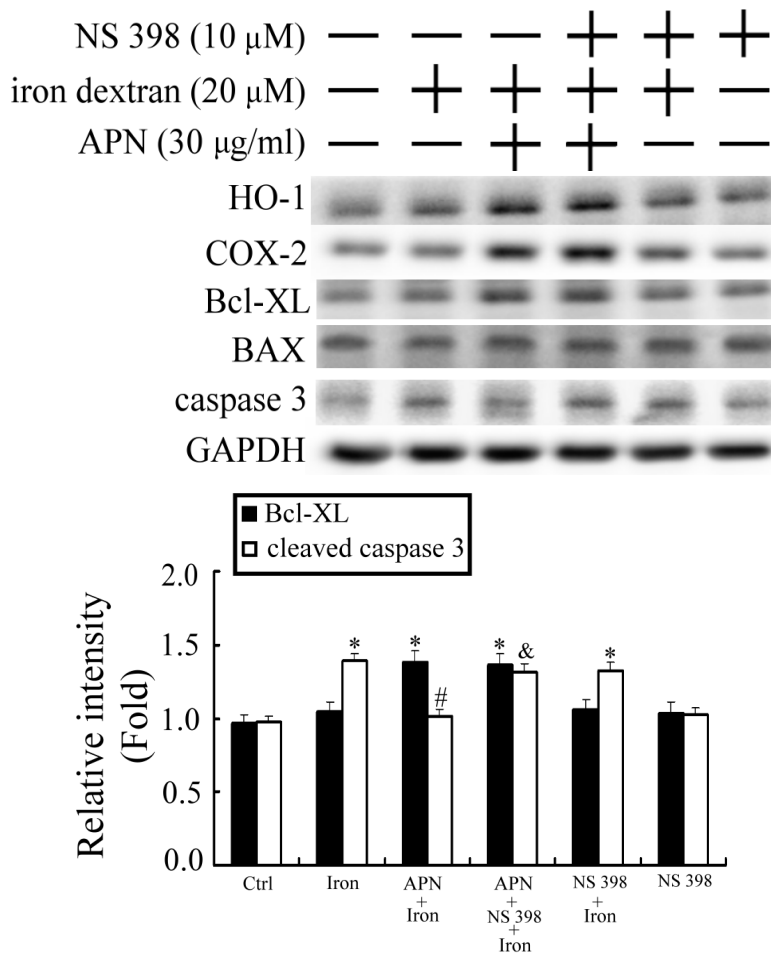
對三種細胞給予 iron dextran 後經過 48 小時收下，進行實驗。以 DAB 對鐵質染色後，再以 haematoxylin 染色。(A) 在 HO-1 過度表現

(HO-1 overexpression) 的組別中 (HO-1) 可以看到：相較於控制組，鐵的堆積情形有明顯的改善；而在以 shRNA 抑制 HO-1 表現 (HO-1

knock-down) 的組別中則可以看到最嚴重的鐵堆積的情形。(B) 透過

西方墨點法的分析也可以看到 caspase 3 及 Bcl-XL 的變化情形。

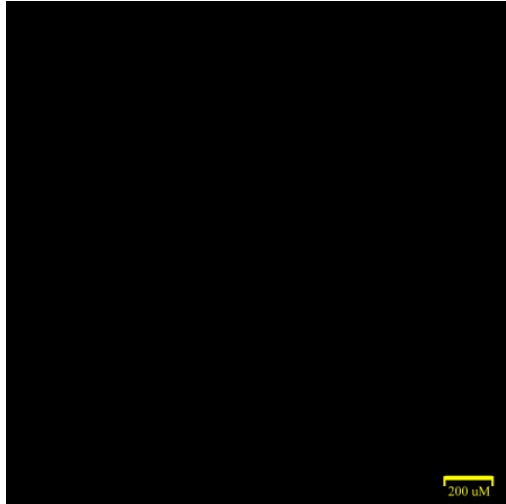
(\*,  $P < 0.05$  versus ctrl, #,  $P < 0.05$  versus HO-1 group, &,  $P < 0.05$  versus iron dextran-treated group, @,  $P < 0.05$  versus iron dextran-treated HO-1 group)



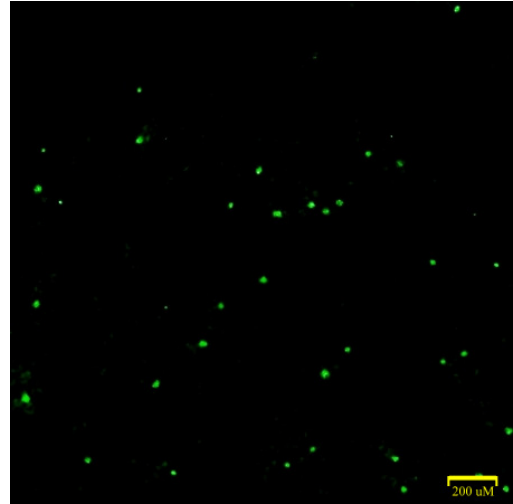
**Fig. 17 COX-2 可保護細胞防止來自鐵質所造成的凋亡。**

先以 COX-2 抑制劑 NS 398 對細胞進行前處理，再給予細胞脂締素。以 iron dextran 刺激，18 小時後收下細胞以西方墨點法分析。在給予 NS 398 的組別中可以看到，原本因脂締素保護細胞來自於鐵的刺激而下降的活化態 caspase 3 的表現量再度上升，表示脂締素保護細胞的功能也是包含 COX-2 的作用。而 Bcl-XL 的誘發現象並沒有因為 NS 398 的給予而受到影響。(\*,  $P < 0.05$  versus ctrl, #,  $P < 0.05$  versus iron dextran-treated group, &,  $P < 0.05$  versus APN and iron dextran-treated group)

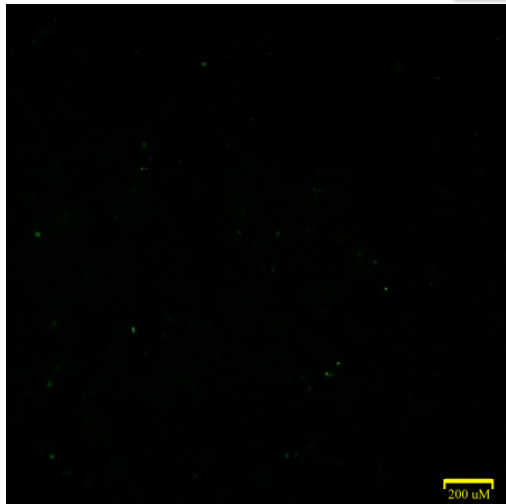
**A**



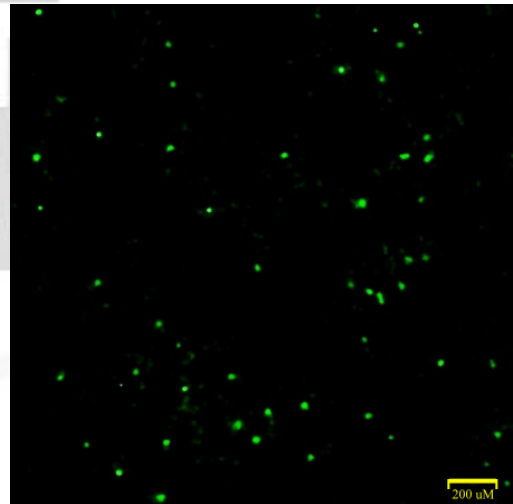
**B**

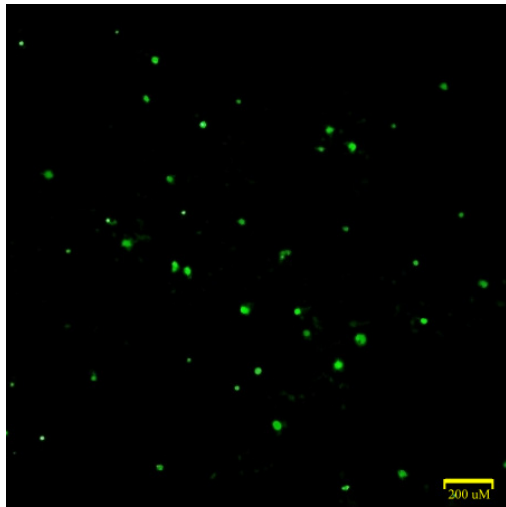
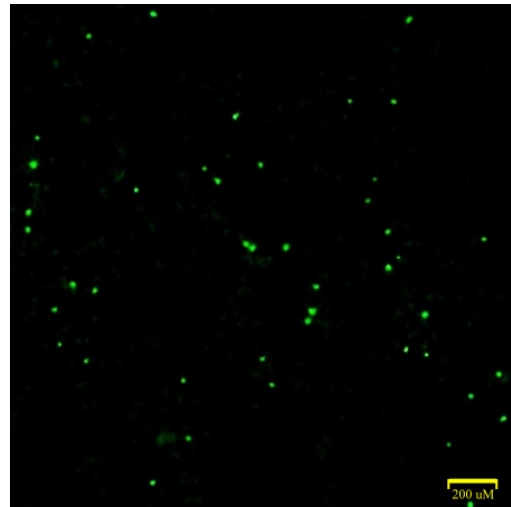
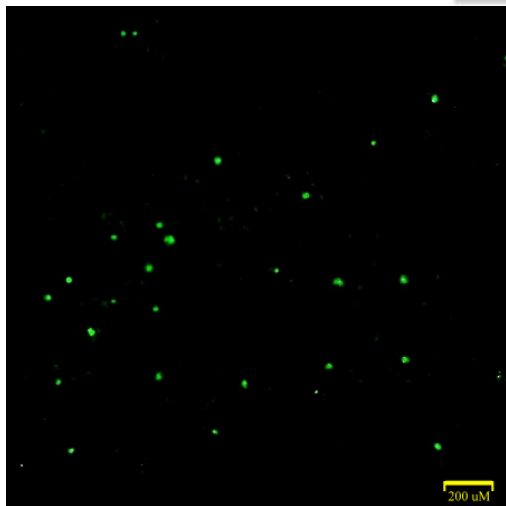


**C**



**D**



**E****F****G**

A : ctrl

B : iron dextran

C : APN + iron dextran

D : Compound C + APN + iron dextran

E : GW 6471 + APN + iron dextran

F : SnPP + APN + iron dextran

G : NS 398 + APN + iron dextran

APN : 30 μg/ml

iron dextran : 20 μM

Compound C : 20 μM

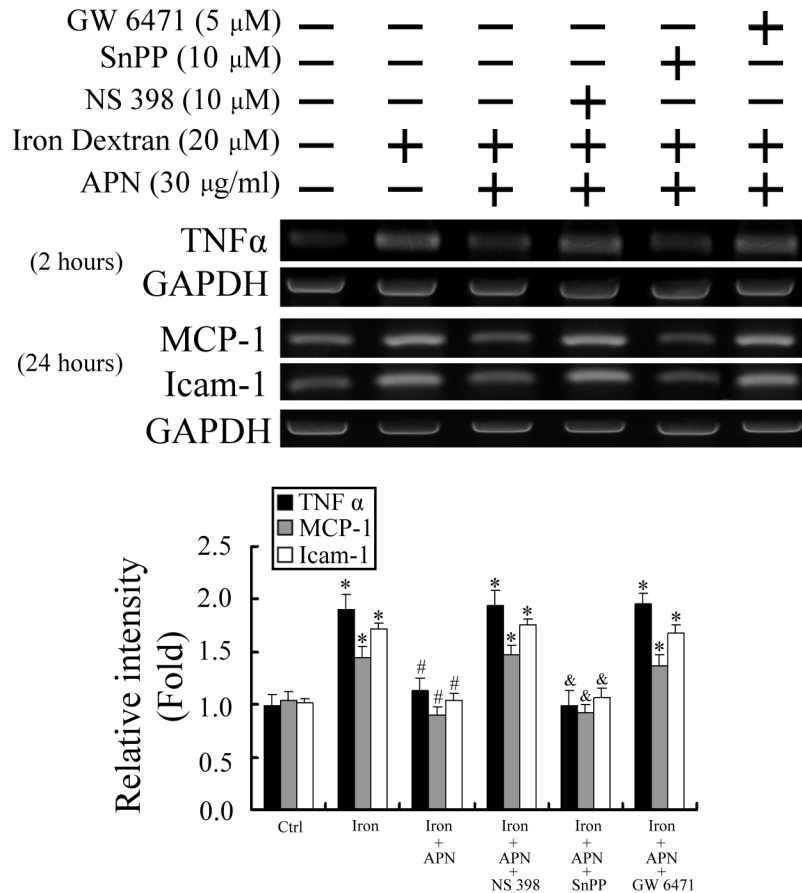
GW 6471 : 5 μM

SnPP : 10 μM

NS 398 : 10 μM

**Fig. 18 Iron dextran 造成細胞凋亡的情形 (TUNEL assay)。**

給予 iron dextran 可以觀察到明顯的細胞凋亡現象，符合之前西方墨點法所看到的結果；而在給予脂締素後，這個細胞凋亡的現象得到了明顯的改善。給予不同抑制物的組別中，則又可以觀察到明顯的細胞凋亡現象。



**Fig. 19 脂締素的抗發炎反應功能。**

先給予 PPAR $\alpha$  抑制劑 GW 6471 行前處理來抑制住 PPAR $\alpha$  的活性，做為阻斷脂締素的細胞保護的訊息傳遞；另外也給予 COX-2 或 HO-1 的抑制劑進行前處理來觀察它們所扮演的角色。再給予脂締素，並給予鐵的刺激。以 RT-PCR 觀察 2 小時或 24 小時特定的發炎反應相關細胞激素的變化。在給予脂締素的組別中可以看到，三種細胞激素的 mRNA 量都有下降，表示發炎反應有受到抑制。而這個抗發炎作用會因為 PPAR $\alpha$  被抑制或 COX-2 被抑制而被反轉；而 HO-1 則和這方面較不相關。（\*, P < 0.05 versus ctrl, #, P < 0.05 versus iron dextran-treated group, &, P < 0.05 NS 398-treated group）

## 参考文献

1. Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005) *Endocr Rev* **26**, 439-451
2. do Carmo Avides, M., Domingues, L., Vicente, A., and Teixeira, J. (2008) *Protein Expr Purif* **59**, 122-126
3. Mendez-Sanchez, N., Chavez-Tapia, N. C., Villa, A. R., Sanchez-Lara, K., Zamora-Valdes, D., Ramos, M. H., and Uribe, M. (2005) *World J Gastroenterol* **11**, 1737-1741
4. Fu, Y., Luo, N., Klein, R. L., and Garvey, W. T. (2005) *J Lipid Res* **46**, 1369-1379
5. Lee, W. J., Kim, M., Park, H. S., Kim, H. S., Jeon, M. J., Oh, K. S., Koh, E. H., Won, J. C., Kim, M. S., Oh, G. T., Yoon, M., Lee, K. U., and Park, J. Y. (2006) *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 291-295
6. Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T., and Matsuzawa, Y. (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1595-1599
7. Cavusoglu, E., Chopra, V., Battala, V., Ruwende, C., Yanamadala, S., Eng, C., Pinsky, D. J., and Marmur, J. D. (2008) *Am J Cardiol* **101**, 1073-1078
8. Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D. R., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N., and Walsh, K. (2005) *Nat Med* **11**, 1096-1103
9. Lin, H., Hou, C. C., Cheng, C. F., Chiu, T. H., Hsu, Y. H., Sue, Y. M., Chen, T. H., Hou, H. H., Chao, Y. C., Cheng, T. H., and Chen, C. H. (2007) *Mol Pharmacol* **72**, 1238-1245
10. Burns, K. A., and Vanden Heuvel, J. P. (2007) *Biochim Biophys Acta* **1771**, 952-960
11. Kronke, G., Kadl, A., Ikonomu, E., Bluml, S., Furnkranz, A., Sarembock, I. J., Bochkov, V. N., Exner, M., Binder, B. R., and Leitinger, N. (2007) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1276-1282
12. L'Abbate, A., Neglia, D., Vecoli, C., Novelli, M., Ottaviano, V., Baldi, S., Barsacchi, R., Paolicchi, A., Masiello, P., Drummond, G. S., McClung, J. A., and Abraham, N. G. (2007) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H3532-3541
13. Fujita, K., Maeda, N., Sonoda, M., Ohashi, K., Hibuse, T., Nishizawa, H., Nishida, M., Hiuge, A., Kurata, A., Kihara, S., Shimomura, I., and Funahashi, T. (2008) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 863-870



14. Ryter, S. W., Alam, J., and Choi, A. M. (2006) *Physiol Rev* **86**, 583-650
15. Pachori, A. S., Smith, A., McDonald, P., Zhang, L., Dzau, V. J., and Melo, L. G. (2007) *J Mol Cell Cardiol* **43**, 580-592
16. Donna, L. C., Neil, G (2000) *J Pathol*; **190**, 255 ~266.
17. Matsui, T., and Rosenzweig, A. (2005) *J Mol Cell Cardiol* **38**, 63-71
18. Taketa, K., Matsumura, T., Yano, M., Ishii, N., Senokuchi, T., Motoshima, H., Murata, Y., Kim-Mitsuyama, S., Kawada, T., Itabe, H., Takeya, M., Nishikawa, T., Tsuruzoe, K., and Araki, E. (2008) *J Biol Chem* **283**, 9852-9862
19. Yin, H., Cheng, L., Langenbach, R., and Ju, C. (2007) *Hepatology* **45**, 159-169
20. Fleming, R. E., and Bacon, B. R. (2005) *N Engl J Med* **352**, 1741-1744
21. Ganz, T. (2003) *Blood* **102**, 783-788
22. Lee, P. L., and Beutler, E. (2009) *Annu Rev Pathol* **4**, 489-515
23. Bleackley, M. R., Wong, A. Y., Hudson, D. M., Wu, C. H., and Macgillivray, R. T. (2009) *Transfus Med Rev* **23**, 103-123
24. Birgens, H., and Ljung, R. (2007) *Scand J Clin Lab Invest* **67**, 11-25
25. Conde de la Rosa, L., Moshage, H., and Nieto, N. (2008) *Rev Esp Enferm Dig* **100**, 156-163
26. Harrison-Findik, D. D. (2007) *World J Gastroenterol* **13**, 4925-4930
27. Shin, S. M., and Kim, S. G. (2009) *Mol Pharmacol* **75**, 242-253
28. Mattered, R., Stone, G. P., Bahhur, N., and Kuryshev, Y. A. (2001) *Circulation* **103**, 2395-2401
29. Cederbaum, A. I. (2003) *Alcohol* **30**, 115-120
30. Mostert, V., Nakayama, A., Austin, L. M., Levander, X. A., Ferris, C. D., Hill, K. E., and Burk, R. F. (2007) *Drug Metab Rev* **39**, 619-626
31. Diez, J. J., and Iglesias, P. (2003) *Eur J Endocrinol* **148**, 293-300
32. Rasouli, N., and Kern, P. A. (2008) *J Clin Endocrinol Metab* **93**, S64-73
33. Li, L., Wu, L., Wang, C., Liu, L., and Zhao, Y. (2007) *Regul Pept* **139**, 72-79
34. Li, M., Kim, D. H., Tsenovoy, P. L., Peterson, S. J., Rezzani, R., Rodella, L. F., Aronow, W. S., Ikehara, S., and Abraham, N. G. (2008) *Diabetes* **57**, 1526-1535
35. Ndisang, J. F., and Jadhav, A. (2009) *Endocrinology* **150**, 2627-2636
36. Waki, H., and Tontonoz, P. (2007) *Annu Rev Pathol* **2**, 31-56
37. Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I., and Scherer, P. E. (2008) *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**, 753-768, x-xi
38. Diradourian, C., Girard, J., and Pegorier, J. P. (2005) *Biochimie* **87**, 33-38

39. Antonsson, B. (2001) *Cell Tissue Res* **306**, 347-361
40. Goodman, A. I., Olszanecki, R., Yang, L. M., Quan, S., Li, M., Omura, S., Stec, D. E., and Abraham, N. G. (2007) *Kidney Int* **72**, 945-953
41. Sue, Y. M., Cheng, C. F., Chang, C. C., Chou, Y., Chen, C. H., and Juan, S. H. (2009) *Nephrol Dial Transplant* **24**, 769-777
42. Ouchi, N., and Walsh, K. (2007) *Clin Chim Acta* **380**, 24-30
43. Huang, N. L., Chiang, S. H., Hsueh, C. H., Liang, Y. J., Chen, Y. J., and Lai, L. P. (2009) *Int J Cardiol* **134**, 169-175

