

臺北醫學大學 醫學院
醫學科學研究所
基礎醫學組碩士論文

Taipei Medical University
College of Medicine
Graduate Institute of Medical Sciences
Master Thesis

指導教授：李岳倫 (Yueh-Lun Lee)

介白質-10 對肺上皮細胞在呼吸道發炎反應上的
調控探討

**Study of modulation of bronchial epithelial cells on
airway inflammation by interleukin-10**

研究生：張兼豪 (Chien-Hao Chang)

學 號：M102095005

中 華 民 國 九 十 七 年 七 月

謝誌

時間終於走到了這一天，坐在休息室的我開始著手寫下對眾人的感謝的話，而兩年多的研究生活也將在論文完成後畫下一個句點。回首這 700 多個日子，在這小小的實驗室裡充滿著許多歡笑和汗水，首先要感謝恩師李岳倫博士，還記得當初在當研究助理的那段時間，老師您細心帶著我操作細胞實驗，不厭其煩的回答我的問題，也曾因此好幾次錯過了回家的公車；而後這在我碩士生涯的兩年，在實驗上給予我許多獨立思考的空間，也在面對不預期的實驗結果時鼓勵我要堅持下去，在一次次的討論當中與我討論腦力激盪提供新的方向和可用的資源，甚至在最後論文的撰寫上也花費了許多心思修改。此外我也要感謝台大江伯倫老師在我去台大報告時給予我許多意見和想法。再者，衷心的感謝劉興璟老師和楊雅倩老師在，百忙之中審閱我的論文，並在口試時給予我許多寶貴的意見及想法，使此論文可以更加完善。

此外在這兩年的裡我要感謝與我同甘共苦的逸璉及筱喬，還記得碩一時北醫台大兩地跑的馬拉松式動物實驗、聖誕節倒數前大淹水和無數個爆肝看日出的日子裡，因為有你們使得日子多了許多歡笑和色彩。更謝謝微免學科的學長克銓、學姐立君、上勤、嘉純和家惠，同學毓玲、立寰、韻潔、愛漂、耀正、明莉，學弟益民、昱良，醫科所的好朋友淑娟，生材所的學長方陌、學姐玲儀，謝謝你們在這兩年對我的關懷、照顧並在我困惑時給我建議及開導，此外可愛的學妹郁文、怡伶因為有你們讓我碩二的生活增添不少樂趣。也要謝謝好友均為、韋志、宛霖、欣宜、雅萍、天薇、世珍、郁茹和康 25 的夥伴們，提供了我實驗室外的避風港。

最後，要感謝愛我的家人，因為有你們給予我最大的支持跟幫助，
我得以心無旁騖的完成碩士兩年的生涯。

謹以此文獻給所有關心我的家人、朋友和在天上的二叔。

張兼豪 謹誌於

台北醫學大學 醫學科學研究所

中華民國九十七年七月二十八日



目錄

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| 論文口試委員審定書 | |
| 授權書 | |
| 謝誌..... | I |
| 目錄..... | III |
| 中文摘要..... | IV |
| 英文摘要..... | V |
| 第壹章 緒論..... | 1 |
| 第一節 研究背景介紹..... | 2 |
| 1. 氣喘(asthma)與慢性阻塞性肺部疾病(chronic obstructive pulmonary disease)簡介 | |
| 喘(asthma)與慢性阻塞性肺部疾病(chronic obstructive pulmonary disease)簡介..... | 2 |
| 2. 氣喘致病機轉..... | 3 |
| 3. 慢性阻塞性肺部疾病致病機轉..... | 5 |
| 4. 調控氣喘疾病..... | 6 |
| 5. 調控慢性阻塞性肺部疾病..... | 7 |
| 6. 支氣管表皮細胞扮演角色..... | 8 |
| 7. TNF- α 及 IL-17對呼吸道發炎反應的調控..... | 10 |
| 8. IL-10 細胞激素對呼吸道發炎反應的調控..... | 11 |
| 第貳章 研究動機與目的..... | 13 |
| 第參章 探討 IL-10 調控 IL-4、IL-13 與 TNF- α 所誘發小鼠肺表皮細胞之發炎反應..... | 16 |
| 第一節 實驗目的與原理..... | 17 |
| 第二節 實驗材料與方法..... | 18 |
| 第三節 實驗結果..... | 21 |
| 第肆章 探討 IL-10 如何調控 IL-4、IL-13、TNF- α 與 IL-17 所誘發人類肺表皮細胞之發炎反應..... | 23 |
| 第一節 實驗目的與原理..... | 24 |
| 第二節 實驗材料與方法..... | 25 |
| 第三節 實驗結果..... | 32 |
| 第五章 討論..... | 37 |
| 第一節 刺激肺表皮細胞誘發發炎反應..... | 38 |
| 第二節 IL-10 調控細胞激素及發炎介質生成..... | 41 |
| 第三節 IL-10 調控細胞內訊息傳遞蛋白表現..... | 43 |
| 第陸章 結論與未來方向..... | 44 |
| 第柒章 圖表..... | 46 |
| 第捌章 參考文獻..... | 70 |

中文摘要

肺上皮細胞在氣喘及COPD上皆扮演一重要的角色。在TNF- α 及IL-17等發炎激素刺激下，其會分泌出許多細胞激素(IL-6、IL-8)及介質(eotaxin、RANTES)來吸引發炎細胞的聚集以共同造成肺的發炎反應。IL-10一開始被定義為Th 2的細胞激素，後來發現其具有抗發炎之作用，可抑制發炎細胞激素IL-6和IL-8產生。而在我們之前的研究結果也證實IL-10在治療氣喘發作小鼠上有不錯的療效，因此我們想更進一步要去了解IL-10在對TNF- α 、IL-4、IL-13及IL-17所造成的肺上皮細胞之發炎時的抑制效果以及其調控的機制為何。首先我們建立起培養小鼠肺上皮細胞的平台，初步評估IL-4和TNF- α 對小鼠肺上皮細胞誘發發炎反應的效果，觀察到在給予不同劑量的IL-4、TNF- α 和不同作用時間下刺激肺上皮細胞，可促其分別表現發炎介質eotaxin 和IL-6；而在IL-10抑制發炎實驗結果，證實IL-10可有效抑制eotaxin 和IL-6的生成。之後更進一步用人的肺上皮細胞株A549 和BEAS-2B 為平台建立起在給予細胞激素(TNF- α 、IL-4、IL-13和IL-17)刺激下，可誘發IL-6、IL-8、eotaxin和RANTES的表現。由結果得知：IL-10的確具有降低細胞表現IL-6、IL-8和RANTES的能力，且其抑制作用的大小與是否會誘發高量的IL-10R無關。我們觀察到IL-10主要可藉由減少TNF- α 刺激A549細胞所誘發之I κ B α 的降解來降低IL-6和IL-8在mRNA及蛋白質的表現；此外IL-10也可以藉由抑制IL-17所誘發MAPK pathway中磷酸化ERK1/2蛋白的表現來阻斷IL-6和IL-8mRNA及蛋白質的生成，以達共同抗發炎的作用。綜合以上結果可得知：IL-10的確可藉由抑制各別的細胞活化訊號傳遞以及降低發炎激素IL-6與IL-8在mRNA及蛋白質上的表現，來達到對抗TNF- α 和IL-17對表皮細胞所造成的發炎反應。

Abstract

Bronchial epithelial cells play an important role in the asthma and COPD disease. Under the stimulation of pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-17), lung epithelial cells produce many types of cytokines and chemokines, and many contribute to lung inflammation by recruiting inflammatory cells. IL-10 originally had been described as a Th2-associated cytokine. However, further studies revealed that IL-10 was a cytokine with potent anti-inflammatory properties and it could repress the expression of inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8. Our previous studies had demonstrated that IL-10 might have a therapeutic effect on animal model of asthma. Therefore, we wanted to investigate whether IL-10 plays an anti-inflammatory role on airway inflammation induced by TNF- α 、IL-4、IL-13 and IL-17. Our preliminary data showed that TNF- α and IL-4 could stimulate mouse lung epithelium to secrete IL-6 and eotaxin, respectively. Furthermore, we observed that IL-10 could significantly suppress IL-6 and eotaxin production from lung epithelium. In addition, human pulmonary epithelial cells A549 and BEAS-2B were used to investigate the expression of inflammatory mediators induced by TNF- α , IL-4, IL-13 and IL-17. The results showed that IL-10 could reduce the production of IL-6, IL-8 and RANTES from A549 cells. IL-10 had no effect on induction of IL-10 receptor expression. However, the mRNA expression of IL-6 and IL-8 was reduced by IL-10 treatment. In addition, TNF- α activated the NF- κ B pathway and pretreatment of A549 cells with IL-10 reversed the effect of TNF- α on I κ B α degradation. IL-10 also could attenuate IL-17- induced-IL-6 and IL-8 production by reducing the phosphorylation of ERK1/2 in MAPK pathway. In conclusion, we suggest that IL-10 markedly inhibits TNF- α - and IL-17-induced airway inflammation on A549 cells by decreasing IL-6 and IL-8 production.



第壹章
緒論

第一節研究背景介紹：

1. 氣喘(asthma)與慢性阻塞性肺部疾病(chronic obstructive pulmonary disease)簡介

氣喘與慢性阻塞性肺部疾病均屬於常見之慢性呼吸道發炎反應，目前在工業國家及開發中國家其盛行率有逐年上升的情形(1)，兩者皆會因為大量的細胞激素、細胞發炎介質和細胞黏附因子的交互作用活化呼吸道表皮細胞和巨噬細胞並造成呼吸道阻塞情形，這兩種疾病不同處在於氣喘的致病原因主要是藉由基因及環境的交互作用而造成並常見於兒童時期，給於氣管擴張劑和類固醇(bronchodilators and corticosteroids)則有良好的治療效果；而慢性阻塞性肺部疾病主要是由於抽菸所造成，好發於老年期，會造成不可逆之漸進式呼吸氣流受限(airflow limitation)(2, 3)。

美國NIH 2007年Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma定義氣喘為一慢性呼吸道發炎反應，會導致呼吸道過度反應(airway hyperresponsiveness)、呼吸氣流受限，其特徵包含許多發炎細胞浸潤，如嗜中性白血球(neutrophil)、嗜酸性白血球(eosinophil)、淋巴球(lymphocyte)，肥大細胞(mast cell)活化以及上皮細胞(epithelial cell)損傷。目前知道基因會影響氣喘的表現，使其容易對氣懸過敏原(aeroallergens)反應而產生免疫球蛋白E(immunoglobulin E)；此外抽菸、

空氣中汙染物、職業及飲食等環境因素也為罹患氣喘的危險因子之一(4, 5)。

根據Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 定義，慢性阻塞性肺部疾病是一種呼吸氣流受阻，且無法以藥物完全回復之疾病。此疾病乃由於肺臟對有害微粒或氣體的不正常發炎反應所造成，通常為一漸進式惡化。特徵包含許多發炎細胞浸潤，如嗜中性白血球、嗜酸性白血球、巨噬細胞和上皮細胞損傷，此外亦會造成肺微血管纖維化(fibrosis)、肺氣腫(emphysema)和杯狀細胞(goblet cell)型態改變(6)。抽菸為其最重要的危險因子，抽菸者其周邊血液中嗜中性白血球與細胞激素IL-8(interleukin-8)亦較一般正常者來的多(7, 8)。

2. 氣喘致病機轉

氣喘反應的發生是為體內第一型輔助T細胞(T helper cell type 1; Th1)與第二型輔助T細胞(T helper cell type 2; Th2)兩種CD4⁺ T淋巴球的不平衡所引起，過多的Th2細胞釋出細胞激素來造成氣喘發炎反應(9)。所以接觸到過敏原時 naïve T 細胞的發展走向扮演關鍵的角色，因為個體首度遇到過敏原時免疫反應的走向(Th1 或Th2 反應)會影響免疫系統之後再遇到該過敏原時的結果。當免疫系統第一次接觸到過敏原時，由抗原呈獻細胞(antigen presenting cell, APC)會捕獲此過敏原

片段並轉送至附近淋巴結再呈獻給naïve T細胞。研究指出，異位體質(atopy)之病人，其過敏原特異性之Th細胞會發展偏向Th2，但在健康個體中，其過敏原特異性Th細胞則會走向Th1反應(10)。Th1免疫反應是指抗原特異性之T細胞在抗原刺激下主要分泌IFN- γ ，並其可促使抗原特異性之B細胞生成IgG2a此種抗體；而Th2反應則是在抗原刺激之下，Th2細胞分泌的細胞激素以IL-4、IL-5、IL-9和IL-13為主，並促使B細胞則生成IgE抗體。生成的抗原特異性IgE抗體與肥大細胞和嗜鹼性白血球(basophil)細胞膜上之IgE接受體(Fc ϵ R I)具有高度的親合力，且當IgE藉由Fc ϵ R I結合之後，其半衰期可由原本的2-3天延長為數週之久。當病人再次接受到過敏原時，過敏原會與在肥大細胞和嗜鹼性白血球上之IgE結合，使得細胞膜上Fc ϵ R I發生交叉連結進而引起一連串訊息傳遞，促使肥大細胞活化，進行去顆粒化(degranulation)，釋出細胞中含有之發炎介質(11)，包括histamine、neutral protease、acid hydrolases、proteoglycans、leukotrine、prostaglandin等所引起之反應稱為早期反應(early response)-發生於過敏原接觸後15-30分鐘即會造成氣管急遽收縮、微血管通透性增加導致支氣管內充水、黏液蛋白增加等。肥大細胞及氣管上皮細胞亦分泌TNF- α (tumor necrosis factor- α)、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、GM-CSF(granulocyte macrophage-colony stimulating factor)及趨化因子(chemokine)來吸引發

炎細胞如嗜酸性白血球及嗜中性白血球聚集肺部組織。由嗜酸性白血球及嗜中性白血球造成之反應稱為晚期反應(late response)-發生於接觸過敏原後4-6小時；嗜酸性白血球在氣喘疾病中為相當重要的發炎細胞，除了在人類氣喘病患肺部病理切片及肺沖洗液中可發現大量嗜酸性白血球，在氣喘動物模式中也都都可以發現呼吸道有嗜酸性白血球聚集現象(eosinophilia)，其顆粒中所釋放的成分可以直接傷害呼吸道上皮組織。另外亦有研究指出利用anti-IL-5抗體或其他方式降低嗜酸性白血球聚集於呼吸道時具有減緩呼吸道阻力之效果(12)。

3. 慢性阻塞性肺部疾病致病機轉

抽菸與外來刺激物(TNF、LPS)所產生的氧化基與自由基 (free radical) 造成肺部的發炎反應，許多細胞包括上皮細胞、嗜中性白血球、嗜酸性白血球、巨噬細胞等皆參與了慢性阻塞性肺部疾病的發生與惡化(13-16)。當受到刺激時嗜中性白血球、嗜酸性白血球、巨噬細胞會聚集到肺上皮細胞刺激 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 和 RANTES 產生並增加 ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)的表現量，吸引免疫細胞再次聚集到肺上皮細胞處(17)。此外上皮細胞也會分泌 TGF- β (transforming growth factor-beta)造成氣道 (small airway) 發炎及纖維化和黏液增生。在 LPS 及 TNF- α 刺激肺上皮細胞下則會啟動

mitogen-activated kinases (MAPK)和 NF- κ B 訊號傳遞分泌 IL-8 吸引嗜中性白血球聚集。另有研究指出在慢性阻塞性肺部疾病病人中 IL-10 的表現量較一般正常人低(18)，而再給予 IL-10 刺激下可有效抑制 TNF- α 刺激下活化巨噬細胞 MAPK 和 NF- κ B 訊號傳遞(19)。

4. 調控氣喘疾病

整個氣喘發炎反應的發生是由 Th2 細胞所主導。Th2 細胞分泌的細胞激素有 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13。IL-4 除了可促使 naïve T 細胞分化成 Th2 細胞外，也參與 Th2 細胞調控的過敏性呼吸道發炎反應、呼吸道過度反應和 IgE 抗體的合成，此外 IL-4 可誘發內皮細胞 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1)在血管內皮的表現以吸引嗜酸性白血球聚集、黏蛋白基因表現、黏液分泌與刺激 IL-5、IL-13 的合成(20)。臨床給予 anti-IL-4 抗體可抑制 Th2 細胞活化和 IgE 的生成(21)。IL-5 可幫助嗜酸性白血球的生長與分化，促進其聚集於患者的肺部，此外 IL-5 也可增加嗜酸性白血球上 $\alpha 4\beta 2$ integrins 上的表現提升與內皮細胞上 VCAM-1 的結合。IL-9 作用在嗜鹼性白血球可增加其表面 eotaxin 接受器和 IL-5 接受器的表現量，IL-5 與 IL-9 共同作用可增加嗜酸性白血球的生成(22)。IL-13 與 IL-4 相似，具有相同的生物活性，研究指出在過度表現 IL-13 的基因轉殖鼠可誘發嗜酸性白血球、巨噬細胞以及淋巴球細胞為主的發炎反應，造成呼吸道過度反應和黏

液過度分泌(23);IL-13 作用在肺表皮細胞會誘發 TGF- β 和 TNF- α 生成造成呼吸道重組現象(24)。

除了上述 Th2 細胞相關的細胞激素外，還有一些發炎介質參與整個氣喘發炎反應，如 eotaxin 和 RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)。eotaxin 為 73 個胺基酸所組成的蛋白質，最初是由氣喘呼吸道發炎的天竺鼠(guinea pig)動物肺沖洗液中鑑定分離出來的，若將純化出來的 eotaxin 打到小鼠皮下則會造成嗜酸性白血球的聚集(25)。研究指出結合 TNF- α 和 IL-4 作用在肺表皮細胞上可誘發 eotaxin 表現，推測可促使嗜酸性白血球的聚集(26)。RANTES (CCL5)則是屬於 C-C 發炎介質(C-C chemokine)，做為一化學趨化因子(chemoattractant)可與單核球細胞、T 細胞以及嗜酸性白血球上的接受器(CCR1、CCR3 和 CCR5)結合(27)。

5. 調控慢性阻塞性肺部疾病

慢性肺阻塞疾病主要是由於外來物刺激肺上皮細胞分泌細胞激素與發炎介質來吸引免疫細胞如嗜中性白血球、嗜酸性白血球和巨噬細胞聚集所導致的呼吸道慢性發炎，目前治療方是主要為抑制細胞激素與發炎介質分泌，及調控其下游訊號傳遞(28)。研究指出 TNF- α 可活化 NF- κ B 進而活化 IL-8 和 IL-6 轉錄因子(29)，使呼吸道表皮細胞分

泌前發炎反應物質 IL-6 和 IL-8，給予 anti-TNF- α antibody 或是 soluble TNF- α receptor 皆可抑制呼吸道表皮細胞分泌 IL-6 和 IL-8(30, 31)；或是直接給予 anti-IL-8 來阻斷其作用在呼吸道表皮細胞上(32)。此外因活化 NF- κ B 和 MAPK 訊號傳遞路徑的也扮演一重要角色，可刺激分泌細胞激素、發炎介質和增加 adhesion molecules 表現，而給予其調控蛋白 I κ B kinase(IKK)、p38-mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) 抑制劑亦可作為一治療的方式(33)。

6. 支氣管表皮細胞扮演角色

支氣管表皮細胞同時在氣喘疾病和慢性肺阻塞疾病中扮演重要角色(34)，可藉由呼吸道纖毛防衛機制(mucociliary system)及機械性屏障(mechanical barrier)防禦外來物的入侵。氣喘最大的特徵是在表皮層上具有黏液過度分泌(mucus hypersecretion)、杯狀細胞增生(goblet cells hyperplasia)、上表皮纖維化(subepithelial fibrosis)、平滑肌增生(smooth muscle cell hyperplasia)和最重要的指標-嗜酸性細胞、肥大細胞以及T細胞的浸潤。最近研究指出氣喘病患支氣管表皮細胞在發炎反應的過程中受到內生性因子(IL-1、TNF- α 、IL-4、IL-13、TGF- β 等)和外生性因子(LPS、viral infection、air pollutants、proteolytic enzymes等)刺激後分泌細胞激素和發炎介質來活化發炎細胞的增生及聚集。

IL-6可由巨噬細胞和支氣管表皮細胞分泌，除了是T和B細胞的生長因子，也可幫助嗜中性白血球從骨髓(bone marrow)中釋出聚集到支氣管表皮。IL-8則可由嗜酸性白血球、巨噬細胞和支氣管表皮細胞分泌，可為嗜中性白血球、嗜酸性白血球、嗜鹼性白血球和T細胞的化學趨化因子，來吸引上述細胞聚集到支氣管表皮(35)。至於顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factors)除了是顆粒球(granulocytes)和巨噬細胞的生長因子外，也可影響嗜酸性細胞的活化、分化和存活(36)。另外像eotaxin、RANTES、TARC(thymus- and activation-regulated chemokine)這些也是由支氣管上皮細胞分泌的C-C發炎介質，可吸引免疫細胞和發炎細胞聚集黏附到支氣管上皮；eotaxin會與嗜酸性白血球上的CCR3接受器結合，RANTES會與嗜酸白血性球、單核球和淋巴球的CCR-1,3和5結合增加細胞黏附(37)，而TARC在免疫呼吸道發炎反應扮演一決定性角色，可與Th2細胞上的CCR4結合(38)。此外給予TNF- α 和IL-4刺激支氣管表皮細胞株(如A549、BEAS-2B)亦會增加TARC的生成(39)。此外在氣喘病患的肺支氣管表皮細胞也發現ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)及E-selectin表現有明顯增加(40)。當有過敏原再次進入呼吸道時，由Th2細胞、肥大細胞和嗜酸性白血球等所分泌之細胞激素(如TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-9和IL-13)及發炎介質(如eotaxin)，會大量產生

並且再次去促使更多的發炎物質及細胞聚集到表皮細胞，或是藉由增加發炎細胞上的接受器，如嗜酸性白血球(CD11b/CD18)去增加與表皮細胞(ICAM-1)的親和力，使細胞堆積導致黏膜層增生、嗜酸性白血球浸潤和肺表皮細胞再次受傷害。

7. TNF- α 及IL-17對呼吸道發炎反應的調控

前發炎組織介素(proinflammatory cytokine)IL-1和TNF- α 主要可促使支氣管表皮細胞分泌細胞激素IL-6、IL-8，而Th2細胞所分泌的IL-4、IL-13則有助於eotaxin、RANTES、TARC的產生。研究指出給予IL-1和TNF- α 的刺激後會活化NF- κ B和activator protein-1(AP-1)等轉錄因子進而增加IL-6和IL-8 mRNA的表現量(41)。給予IL-4和TNF- α 則會分別啟動STAT 6 (signal transducer and activator of transcription 6)和NF- κ B下游的訊號傳遞，刺激氣管表皮細胞產生eotaxin的量上升(42)。而給予IL-13刺激下則會使誘發氣管表皮細胞對eotaxin的表現量增加(43)。

IL-17是一個發炎前驅物質在1995年首度被發現，主要由六個成員組成(IL17A-F)，一般IL-17泛指IL-17 A 大小約為35 kDa(44)，早期因為IL-17與Th1細胞所引發的下游細胞激素有類似的功能，而將IL-17與Th1一系列的細胞激素歸類在一起。而最新的研究發現，有一類T細胞子群經由IL-23的刺激會分泌IL-17，卻不會分泌Th1(IFN- γ)或Th2(IL-4)

任何一類相關激素，顯示一定還有其他類型的輔助型T細胞(45)。最後終於將這類分泌IL-17的T細胞稱為輔助型T細胞-17(Th17)，它可以作為先天免疫反應(innate immunity)與後天免疫反應(adaptive immunity)之間的溝通橋樑：也就是說，Th17位於自體免疫與細胞、體液免疫當中的中樞位置，進而造成發炎反應(46)。研究指出肺表皮細胞和人類肺纖維母細胞(fibroblast cell)在IL-17刺激下可造成IL-6、IL-8分泌量上升(47, 48)，此外在動物實驗發現支氣管給予IL-17會造成老鼠體內IL-8上升，並在其肺部有嗜中性白血球浸潤現象(49)；而在氣喘及慢性肺阻塞疾病人中發現IL-17的表現量皆有上升且與呼吸道過度反應呈現正相關(50)。此外也發現在肺上皮細胞(subepithelial cell)和肌纖維細胞(myofibroblasts cell)給予IL-17刺激可啟動NF- κ B及MAP kinase途徑，活化下游表現蛋白p42/44、ERK1/2(extracellular signal-regulated kinase)及p38表現，並使IL-6 mRNA表現上升(51)。

8. IL-10 細胞激素對呼吸道發炎反應的調控

IL-10 一開始定義為細胞激素合成抑制因子(cytokine synthesis inhibitory factor)(52)，其可由 T 細胞、肥大細胞、巨噬細胞和樹突細胞所分泌。雖然 IL-10 是屬於 Th2 的細胞激素，但是 IL-10 卻可以抑制 Th2 增生和 Th2 所產生的細胞激素(53)。IL-10 具有免疫調控的能力，可透過作用在單核球、嗜中性白血球和嗜酸性白血球上來

抑制發炎時所產生的細胞激素和化學趨化因子。在動物實驗中發現，由過敏原引起呼吸道發炎反應，在給予重組 IL-10 蛋白質治療後，可抑制嗜酸性白血球和嗜中性白血球的聚集以及降低發炎細胞激素 TNF- α 的產量(54)。IL-10 也可以抑制由 TNF- α 和 IFN- γ 刺激人類呼吸道平滑肌細胞所產生的 IL-8 和 RANTES。另有研究發現 IL-10 可抑制人類單核球細胞分泌 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 和 ICAM-1 的表現(55)。IL-10 也可降低 LPS 所誘發嗜中性白血球產生的 IL-8((56)。

IL-10 主要可活化 JAK (Janus kinase)及 STAT3 來執行其抗發炎作用(57)，並利用 SOCS3 負向調控 IL-6 的訊號傳遞(58)。此外 IL-10 亦可藉由調控 SMAD 7(SMAD family 7)的表現來抑制 IL-5 所對 BEAS-2B 細胞株的發炎反應(59)。雖然在許多氣喘動物模式上，IL-10 已被證實有治療呼吸道發炎的效果，但是在對於 IL-10 調節細胞激素(例如：IL-4、IL-13、TNF- α 和 IL-17)所引起在肺上皮細胞發炎反應中扮演的角色還未被深入探討。



第貳章

研究動機與目的

雖然 IL-10 是屬於 Th2 的細胞激素，同時卻也具有抗發炎反應之作用，且在上述文獻顯示 IL-10 的確可抑制由前發炎組織介素 TNF- α 和第二型細胞激素 IL-4、IL-13 所誘發的發炎反應。此外我們之前的實驗也證實 IL-10 在治療氣喘發作小鼠時可得不錯的療效(60)，因此我們想更進一步要去了解是否 IL-10 在對前發炎組織介素 TNF- α 、IL-17 和第二型細胞激素 IL-4、IL-13 所誘發造成的肺表皮細胞發炎反應有其抑制的效果以及其調控的機制為何，就此將實驗分為兩個部分分別探討。

第一部分：首先先初步評估在體外細胞培養下加入 IL-4、IL-13 和 TNF- α 對小鼠肺表皮細胞是否具誘發發炎效果。觀察在給予不同劑量和不同時間下刺激肺表皮細胞，測其表現發炎介質 eotaxin 和 IL-6 之能力。之後在 IL-10 抑制發炎實驗中，再進一步觀察給予不同劑量 IL-10 或不同時間點給予 IL-10 時，其對肺細胞分泌 eotaxin 或 IL-6 是否有影響。

第二部分：以人的肺表皮細胞株(human lung epithelial cells)A549 和 BEAS-2B 為平台建立起在給予細胞激素(IL-4、IL-13、TNF- α 和 IL-17) 刺激下，誘發發炎反應物質 IL-6、IL-8、eotaxin 和 RANTES 的表現時，觀察在不同時間點及不同劑量 IL-10 作用下其是否有抑制肺上皮細胞分泌發炎指標之細胞激素、發炎介質之效果，並且探討此抑制作用是

藉由增加細胞表面 IL-10 接受器的表現量或是減少發炎細胞激素及介質 mRNA 之表現量來達到調控的目的。此外，我們也會進一步了解 IL-10 式調控何種訊號傳遞途徑來減低肺上皮細胞的發炎反應。



第參章

探討 IL-10 調控 IL-4、IL-13 與 TNF- α
所誘發小鼠肺表皮細胞之發炎反應

第一節、實驗目的與原理

本實驗利用 BALB/c 小鼠肺初代培養細胞作為實驗平台，探討在給予不同劑量之小鼠重組蛋白 IL-4、IL-13 與 TNF- α 刺激不同時間後，收集其細胞的培養液，藉由 ELISA 分析是否可誘發發炎介質 eotaxin 和 IL-6 的分泌；此外在同一劑量下，觀察刺激的時間長短是否會影響其表現量。之後在同一時間點下加入不同劑量之 IL-10，觀察 IL-10 是否可抑制發炎介質的生成，而在不同時間點加入 IL-10 是否會影響其抑制發炎介質生成的能力，藉此了解 IL-10 是否具有抗發炎的效果，並可作為後續實驗的材料。

第二節、實驗材料與方法

1. 小鼠來源

雌性 BALB/c 小鼠，年齡三至四週大，由台大醫學院實驗動物中心以及國家動物中心購得，於台北醫學大學動物房代養。

2. 小鼠肺細胞初代培養的方法

取出小鼠肺臟，以 1xPBS 緩衝液清洗後，剪成約 5 mm 的組織塊，離心後加入 1 ml ACK lysis buffer 1 min 再加入 9 ml HBSS 中和，離心 400 x g，4°C，8-10 min，去上清液，細胞拍散，細胞沖洗 2-3 次後，以含 10% FBS 的 α -MEM complete medium 培養。細胞培養在直徑 10 cm 的培養皿中(培養液體積為 10 ml)，每兩隻小鼠肺臟細胞養在一盤培養皿中，每三天換一次培養液。培養七至十天後細胞約長至八分滿時即可進行實驗。

3. 刺激肺細胞分泌 eotaxin

以 2×10^5 細胞/孔回種細胞到 48-well plate 之中，約隔一天細胞便可長至八分滿。此時，將原先的 α -MEM complete medium 培養液換成不含血清的 α -MEM medium，使細胞處在較一致且不活化的狀態下(又稱 synchronization 或是 starvation)。16-18 小時後加入不同劑量 IL-4 刺激來進行實驗。

4. 刺激肺細胞分泌 IL-6

以 2×10^5 細胞/孔回種細胞到 48-well plate 之中，約隔一天細胞便可長至八分滿。此時，將原先的 α -MEM complete medium 培養液換成不含血清的 α -MEM medium，如此可以使細胞處在較一致且不活化的狀態下。16-18 小時後，加入不同劑量 TNF- α 來刺激肺上皮細胞產生 IL-6。

5. 利用 ELISA 測量發炎介質和細胞激素的分泌量

使用 R&D 的商業試劑，取 anti-mouse eotaxin 之抗體溶於包覆緩衝液 (1x PBS) 中，加 100 μ l/well 置於室溫隔夜後，用洗滌緩衝液 (0.05% Tween 20 溶於 1x PBS) 400 μ l/well 洗 4 次，加入填充緩衝液 (1% BSA 溶於 1x PBS) 200 μ l/well，在室溫下靜置 2 小時，然後用洗滌緩衝液 200 μ l/well 洗 4 次，將細胞培養的上清液取 100 μ l/well 放置在室溫下 2 小時，接著用洗滌緩衝液 400 μ l/well 洗 4 次，加入 biotin-anti-mouse eotaxin 抗體 100 μ l/well，室溫下靜置 2 小時後，用洗滌緩衝液 400 μ l/well 洗 4 次，再加入 streptavidin-alkaline phosphatase (1:200) 100 μ l/well，室溫下靜置 20 分鐘，用洗滌緩衝液 400 μ l/well 洗 4 次，最後加入 100 μ l/well 的 TMB 呈色，以 2N H₂SO₄ 為 stop solution，以 ELISA reader 測波長 OD_{450-550nm} 吸光值換算出待測液所含的濃度。

發炎介質以及細胞激素的表現濃度以已知濃度的 standard 與吸光值所畫出的曲線推算，sensitivity 為 6 pg/ml。IL-6 的測量原理與上述相同，但使用試劑為 eBioscience 的商業試劑，sensitivity 為 4 pg/ml。

6. 統計方法

採用 one way ANOVA 來進行生物統計檢定，在 * $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在 ** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。



第三節、實驗結果

首先，我們偵測 IL-4 肺細胞分泌 eotaxin 的影響，在 Fig.1 實驗結果中可發現，給予不同劑量 IL-4 刺激小鼠肺細胞與不給予任何刺激相比明顯可促使 eotaxin 的產生，而且其產量多寡與給予的 IL-4 劑量成正比。而 Fig. 2 A 中，給予 5 unit/ml 的 IL-4 刺激下，在作用 48 小時時，可測得最高量的 eotaxin 產生；若將 IL-4 的刺激提高至 30 unit/ml 時，則在反應 72 小時後，可得較佳的 eotaxin 產生(Fig. 2 B)。若進一步以 IL-4(30 unit/ml)刺激小鼠肺細胞，並加入 IL-10 來評估 IL-10 對 eotaxin 的調控影響時，則發現當給予 10 ng/ml 和 100 ng/ml 的 IL-10 作用下，小鼠肺細胞分泌的 eotaxin 有明顯被抑制的效果(Fig. 3)。

另外我們檢測 TNF- α 是否能刺激小鼠肺細胞製造 IL-6，在 Fig.4 實驗結果中可發現，在給予 1 ng/ml、10 ng/ml 和 100 ng/ml 的 TNF- α 刺激小鼠肺細胞與不給予任何刺激相比，IL-6 生成量皆有明顯的上升，而且呈現 dose-dependent 趨式。而且以 1 ng/ml 的 TNF- α 來刺激小鼠肺細胞時，可在 48 小時時可得較多量的 IL-6 分泌(Fig.5)。之後評估在不同時間點給予不同劑量 IL-10 對 TNF- α 刺激小鼠肺細胞分泌 IL-6 的影響，發現不論是在給予 TNF- α 刺激時，同時給予或是事後給予不同劑量的 IL-10 作用，都可明顯抑制 IL-6 的產生，而且似乎事後加入 IL-10 作用更能夠影響 TNF- α 對 IL-6 的調控。至於在給予 TNF- α 刺激

前給予 IL-10 時，只有當 IL-10 劑量達到 100 ng/ml 時，才有明顯的抑制 IL-6 效果生成。



第肆章

探討 IL-10 如何調控 IL-4、IL-13、TNF- α
與 IL-17 所誘發人類肺表皮細胞之發炎
反應

第一節、實驗目的與原理

本實驗利用人肺表皮細胞株(A549 和 BEAS-2B)作為實驗平台，探討在給予不同劑量之人重組蛋白 IL-4、IL-13、TNF- α 與 IL-17 刺激下，收集其細胞的培養液，藉由 ELISA 分析是否可誘發發炎介質 eotaxin、RANTES、IL-6 和 IL-8 的分泌；此外也探討刺激時間的長短和不同劑量是否會影響其表現量。之後在不同時間點下加入不同劑量之 IL-10，觀察 IL-10 是否可抑制發炎介質的生成。為了瞭解 IL-10 調控發炎介質的機轉我們也利用流式細胞儀觀察在 IL-10 的刺激下，是否會影響細胞表面 IL-10 接受器的表現量。另外也觀察在單獨給予 TNF- α 及 IL-17 刺激下加入 IL-10 作用時，是否會抑制發炎激素 IL-6 和 IL-8 mRNA 的表現；並收其細胞以西方點墨法分析 IL-10 是經由調控何種發訊號傳遞路徑來抑制這些發炎激素的生成。相信藉由以上這些實驗的結果可以幫助我們了解 IL-10 對上述發炎介質分泌量的影響，以及其調控的機制為何。

第二節、實驗材料與方法

1. 人類肺表皮細胞細胞株培養

將細胞培養在含有 10% 的胎牛血清、1% L-glutamine、1% HEPES 和 1% PSA (penicillin-streptomycin-amphotericin) DMEM/F12 培養液於 5% CO₂、37 °C 之培養箱進行培養。一般以直徑 10 cm 之培養盤進行培養，細胞長至約八分滿時進行繼代培養。每次繼代培養之方式為將 10 cm 培養盤中舊的 10 ml 細胞培養液，以無菌吸管吸出後，加入 10 ml 1 X PBS 重覆清洗細胞兩次。以無菌吸管吸出 PBS，加入 1 ml trypsin-EDTA，使 trypsin 均勻分佈於細胞表面，將細胞培養盤放入 37 °C 培養箱中靜置約 1 分鐘，以手輕柔的拍打培養盤，將貼附於培養之細胞拍打下來，以無菌吸管迅速加入 10 ml 1 X PBS 中和 trypsin，之後以無菌之吸管將細胞懸浮液均勻打散，取出約 1/3 之細胞懸浮液放入新的培養盤中，再加入 10 ml 之新鮮培養液，培養於 5% CO₂，37 °C 之培養箱中，培養二至三天後細胞約長至八分滿時即可進行實驗。

2. 刺激肺表皮細胞分泌 eotaxin、RANTES、IL-6 與 IL-8

以 1×10^5 細胞/孔回種細胞到 24-well plate 之中，約隔一天細胞便可長至八分滿。此時，將原先的 DMEM/F12 complete medium 培養液換成不含血清的 DMEM/F12 medium，使

細胞處在較一致且不活化的狀態下，16-18 小時後，加入不同劑量 IL-4、IL-13、TNF- α 或 IL-17 刺激肺表皮細胞分泌 eotaxin、RANTES、IL-6 或 IL-8。

3.IL-10 抑制肺表皮細胞分泌發炎介質與細胞激素

以 1×10^5 細胞/孔回種細胞到 24-well plate 之中，約隔一天細胞便可長至八分滿。此時，將原先的 DMEM/F12 complete medium 培養液換成不含血清的 DMEM/F12 medium，使細胞處在較一致且不活化的狀態下，16-18 小時後，分別做以下三組實驗：(1) 前給予(pre-IL-10)：先給予 IL-10 (1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)作用 24 小時後，才給予 IL-4、IL-13、TNF- α 或 IL-17 (10 ng/ml)刺激，經 48 小時後收細胞上清液。(2)同時給予(co-IL-10)：隔 24 小時後，同時加入 IL-10 (1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)及 IL-4、IL-13、TNF- α 或 IL-17 (10 ng/ml)作用，48 小時後收細胞上清液。(3)之後給予(late-IL-10)：隔 24 小時後給予 IL-4、IL-13、TNF- α 或 IL-17 (10 ng/ml)刺激，24 小時後再加入 IL-10 (1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)作用，再經 24 小時後收細胞上清液。NC 組為細胞不加 IL-4、IL-13、TNF- α 或 IL-17 及 IL-10，PC 組為細胞只加 IL-4、IL-13、TNF- α 或 IL-17 (10 ng/ml)刺激。

4. 利用 ELISA 測量發炎介質和細胞激素的分泌量

使用 R&D 的商業試劑，取 anti-human eotaxin 之抗體溶於包覆蓋緩衝液（1x PBS）中，加 100 μ l/well 置於室溫隔夜後，用洗滌緩衝液（0.05% Tween 20 溶於 1 \times PBS）400 μ l/well 洗 4 次，加入填充緩衝液（1% BSA 溶於 1 \times PBS）200 μ l/well，在室溫下靜置 2 小時，然後用洗滌緩衝液 200 μ l/well 洗 4 次，將細胞培養的上清液取 100 μ l/well 放置在室溫下 2 小時，接著用洗滌緩衝液 400 μ l/well 洗 4 次，加入 biotin-anti-mouse eotaxin 抗體 100 μ l/well，室溫下靜置 2 小時後，用洗滌緩衝液 400 μ l/well 洗 4 次，再加入 streptavidin-alkaline phosphatase（1:200）100 μ l/well，室溫下靜置 20 分鐘，用洗滌緩衝液 400 μ l/well 洗 4 次，最後加入 100 μ l/well 的 TMB 呈色，以 2N H₂SO₄ 為 stop solution，以 ELISA reader 測波長 OD_{450-550nm} 吸光值換算出待測液所含的濃度。發炎介質以及細胞激素的表現濃度以已知濃度的 standard 與吸光值所畫出的曲線推算，sensitivity 為 1 ng/ml。RANTES、IL-6、IL-8 的測量原理與上述相同，sensitivity 分別為 1 ng/ml、0.6 ng/ml、2 ng/ml。

5. 利用流式細胞儀偵測細胞表面 IL-10 接受器表現量

利用帶有螢光標的的抗體結合細胞表面分子後，通過流式細胞儀對細胞表面分子做進一步分析。將 1×10^6 細胞種細胞到直徑 6 cm

dish 之中，約隔一天細胞便可長至八分滿。之後細胞進行 16-18 小時 starvation，單獨給予 IL-10 (1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)或結合 IL-17(10 ng/ml)作用 24 小時後，加入 0.5 ml trypsin-EDTA，使 trypsin 均勻分佈於細胞表面，將細胞培養盤放入 37°C 培養箱中靜置約 1 分鐘，以手輕柔的拍打培養盤，將貼附於培養之細胞拍打下來，以無菌吸管迅速加入 10 ml 1 X PBS 中和 trypsin-EDTA，以 4 °C、1500 rpm 離心 10 分鐘，藉此去除含 trypsin-EDTA 的溶液，之後再加入 10 ml 1 X PBS 緩衝液再次離心，調整每管細胞為 5×10^6 - 1×10^6 細胞，並個別加入 1-2 λ 的抗體，輕輕混合均勻後，避光並置於 4 °C 染色 30 分鐘。每管加入 2 ml 的 1 X PBS 緩衝液後離心，去除含未作用的抗體的上清液，並再次加入等量的 1 X PBS 緩衝液且離心，去除上清液後加入 500 λ 的 FACS 緩衝液並上機，藉此偵測細胞表面接受器 CD210(human IL-10 receptor)的表現量。

6.利用逆轉錄聚合酶(RT-PCR)偵測 IL-6、IL-8 mRNA 表現量

取 2×10^6 的 A549 細胞種於直徑 10 cm dish 後，培養至隔夜後進行 16-18 小時 starvation，分別加入 TNF- α 或 IL-17 (10 ng/ml) 刺激或結合 IL-10 (10 ng/ml) 作用 0、3、6、18 和 24 小時後，收細胞培養液進行 ELISA 分析 IL-6 和 IL-8 表現量，而細胞部份則以 1X PBS 洗兩次後加入 1

ml/dish的total RNA isolation reagent來抽取total RNA並以分光光度計 (spectrophotometry)定量。以superscript III反轉錄酶酵素將RNA轉錄成cDNA後再進行PCR(polymerase chain reaction)所得產物跑2% agarose gel進行電泳分析。以下為PCR 反應條件及各反應所使用的核酸引子之序列與所得產物長度及。

***PCR 反應條件 (Reaction programs)**

1.GADPH: 94°C 5 min; denature 94°C 1 min anneal 58°C 1 min extension 72°C 1 min 30 cycles; 72°C 8 min.

2.IL-8: 94°C 5 min; denature 94°C 1 min anneal 58°C 1 min extension 72°C 1 min 30 cycles; 72°C 8 min.

3.IL-6: 94°C 5 min; denature 94°C 30 sec anneal 55°C 30 sec extension 68°C 1 min 30 cycles; 72°C 8 min.

***PCR 反應所使用核酸引子之序列與產物長度**

| Gene | Orientation | Sequence (5'→3') | Size(bp) |
|-------|-------------|----------------------------|----------|
| GAPDH | sense | ATCACCATCTTCCAGGAGCG | 324 bp |
| | antisense | GATGGCATGGACTGTGGTCA | |
| IL-8 | sense | ACATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG | 497 bp |
| | antisense | GTATGTTCTGGATATTTTCATGGTAC | |
| IL-6 | sense | GGCTGAAAAAGATGGATGC | 326 bp |
| | antisense | GACTGCAGGAACTCCTTAAAG | |

7.細胞蛋白質抽取

將 A549 細胞培養在直徑10 cm dish中，待其長到達八分滿後分別加入TNF- α 、IL-17 (10 ng/ml)或結合IL-10 (10 ng/ml)後，在適當時間，將培養液吸掉且用1 X PBS清洗二次置於冰上終止反應，然後與lysis buffer (20 mM Tris，PH7.5，1 mM MgCl₂，125 mM NaCl，1% Triton X-100，1 mM PMSF，10 μ g/ml leupeptin，10 μ g/ml aprotinin，25 mM β -glycerophosphate，50 mM NaF和 100 μ M NaVO₄) 1 ml/dish混合後，刮下細胞於冰上每隔 5 分鐘 vortex 一次共六次後，離心 13000 rpm 30分鐘，取上清液即得細胞質抽取物。蛋白質定量則以BCA試劑進行定量分析。

8.西方點墨法(Western blot analysis)

將取得的細胞抽取物利用BCA方法測定蛋白質含量，取30 μ g的蛋白質樣本，加入三分之一體積的4 X loading buffer，於98 $^{\circ}$ C dry bath加熱denature 10分鐘後，置於冰上冷卻，利用SDS-PAGE電泳分離蛋白質，先用電流80 V跑stacking gel，直到蛋白質樣本跑到running gel時，增加電流到120 V，等目標蛋白質經由SDS-PAGE技術分離後，再將蛋白質轉印至PVDF membrane，再用5% BSA blocking solution 作用一個小時，之後用1 \times TBST清洗3次，加入待測的特異性一級抗體室溫作

用2小時，以1 × TBST沖洗3次(30分鐘內)，之後再加入含有酵素結合的二級抗體反應1小時，再以1 X TBST沖洗3次(30分鐘內)，之後再加入ECL substrate，反應一分鐘，接著利用Fuji X-ray film感光來顯示特定蛋白質的表現。

9.統計方法

採用one way ANOVA來進行生物統計檢定，在 * $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在 ** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。



第三節、實驗結果

1. IL-4、IL-13 和 TNF- α 調控 A549 與 BEAS-2B 細胞株分泌細胞激素的情形

我們檢測細胞激素 IL-4、IL-13 及 TNF- α 調控人類肺上皮細胞株 A549 與 BEAS-2B 產生 IL-6、IL-8 和 RANTES 的情形。在 Fig. 7 實驗中發現給予 10 ng/ml 及 100 ng/ml 的 TNF- α 刺激與不給予任何刺激相比，明顯可促使 A549 細胞分泌 IL-6 且呈現 dose-dependent 趨勢並隨培養時間增長而有逐漸增加的現象；IL-13 則只有在給予 100 ng/ml 的劑量刺激下，才可誘發 IL-6 生成並在 48 小時後可得最佳的 IL-6 分泌量；至於 IL-4 則無法促進 A549 細胞分泌 IL-6。此外 IL-4、TNF- α 和 IL-13 皆無法刺激 BEAS-2B 細胞分泌 IL-6。

在 Fig. 8 可知 IL-4 皆無法刺激這兩種細胞株分泌 IL-8。而在給予 10 ng/ml 及 100 ng/ml 的 TNF- α 刺激下，與不給予任何刺激相比皆可誘發 A549 與 BEAS-2B 細胞分泌 IL-8，且在 48 小時時 A549 細胞達到分泌的高峰，至於 BEAS-2B 細胞則是在 24 小時後達到一最高點此後隨時間延長有逐漸下降的情形。在 10 ng/ml 和 100 ng/ml 的 IL-13 刺激下，A549 細胞分泌 IL-8 的情形只有在 48 小時處與不給予任何刺激相比才有差異，BEAS-2B 細胞則在 24 小時處才有差異，且兩者細胞株在 IL-13 刺激下 IL-8 的產量皆不高。

另外我們觀察到 IL-4 需提高到 100 ng/ml 劑量下刺激，A549 細胞才會分泌 RANTES，並在 48 小時後達最佳的 RANTES 生成量(Fig. 9)。TNF- α 則在給予 10 ng/ml、100 ng/ml 時即可明顯誘發 BEAS-2B 細胞 RANTES 生成，並隨作用時間增長而有逐漸增加的現象，至於 A549 細胞則僅在給予 100 ng/ml 的 TNF- α 刺激下才會促使 RANTES 生成且同樣隨作用增長而增加分泌量。至於 IL-13 則無法刺激 A549 與 BEAS-2B 細胞分泌 RANTES。

此外我們亦有分析 IL-4、IL-13、TNF- α 刺激下是否誘發 A549 與 BEAS-2B 細胞生成 eotaxin，由結果發現 eotaxin 在本實驗模式下無法誘發表現。

2.IL-10 對 TNF- α 和 IL-13 刺激 A549 細胞分泌細胞激素的影響。

從 IL-10 抑制作用的實驗(Fig. 10)中觀察在不同時間點給予不同劑量 IL-10，與 PC 組相比皆可減少 TNF- α 誘發 A549 細胞分泌 IL-6，且在同時給予 IL-10 和 TNF- α 情況下，其抑制能力隨 IL-10 劑量增加呈現 dose-dependent 趨式；此外 IL-10 只有在之後給予到 100 ng/ml 劑量才能有效調降 IL-13 刺激 A549 細胞分泌 IL-6 的生成量。

在 IL-10 調控 IL-8 生成方面(Fig. 11)，我們發現 IL-10 在前給予到 100 ng/ml 劑量下才可有效抑制 TNF- α 誘發 A549 細胞分泌 IL-8，而

同時給予和之後給予不同劑量 IL-10 皆可有效降低 IL-8 的生成且隨 IL-10 劑量增加呈現 dose-dependent 趨式。而在 IL-13 刺激 A549 細胞分泌 IL-8 中，只有在同時給予 10 ng/ml 及 100 ng/ml 和之後給予 100 ng/ml 的 IL-10 才有發揮抑制效果。

在 IL-10 調控 RANTES 生成方面，中可觀察到於不同時間點給予不同劑量的 IL-10 皆可抑止由 TNF- α 誘發 A549 細胞分泌 RANTES，其抑制能力隨 IL-10 劑量增加呈現 dose-dependent 趨式(Fig. 12)。

3.IL-10 刺激 A549 細胞表面表現 IL-10 接受器的情形

細胞經 starvation 16-18 小時後，給予不同劑量 IL-10 結合 IL-17(10 ng/ml)刺激 A549 細胞 24 小時後，分析其細胞表面接受器 IL-10R 的表現量，以不加刺激物作為陰性對照組，發現給予不同劑量 IL-10 結合 IL-17 刺激後 IL-10R 的表現量皆無明顯變化(Fig. 13)。

4.IL-10 在作用的 24 小時內可影響 TNF- α 刺激 A549 細胞製造 IL-6 與 IL-8 mRNA

細胞 starvation 16-18 小時後，單獨給予 10 ng/ml 的 TNF- α 或結合 10 ng/ml 的 IL-10 刺激 24 小時。在作用的 24 小時內收集各時間的培養液與細胞分別測其 IL-6 與 IL-8 蛋白質和 mRNA 的表現量。與單獨 TNF- α 組相比，在結合 IL-10 刺激 6 小時後，IL-6 不論是在蛋白質表現或 mRNA

表現上皆有被抑制的現象(Fig. 14, Fig. 15)；至於IL-10對IL-8的調控影響，在IL-10作用3小時後即可觀察到mRNA表現差異性，而蛋白質的差異性則作用18小時後才呈現出來(Fig. 14, Fig. 16)。

5. IL-10 影響 TNF- α 誘發 A549 細胞中 I κ B α 蛋白的表現量

由Fig. 17可觀察到若單獨給予10 ng/ml的TNF- α 刺激，則在作用15分鐘後I κ B α 蛋白明顯開始被降解消失表示TNF- α 可經由NF κ B此途徑活化A549細胞，而再結合給予10 ng/ml的IL-10則此現象會被抑制下來。

6. IL-17調控A549細胞分泌細胞激素的影響

在 Fig. 18 實驗中給予 10 ng/ml 與 100 ng/ml 的 IL-17 組別與不給予任何刺激組相比，IL-17 明顯可促使 A549 細胞分泌 IL-6 和 IL-8，並隨作用時間增長而有逐漸增加的現象；至於 RANTES 則只在給予 100 ng/ml 的 IL-17 刺激經 72 小時後，才有稍稍增加其表現量。

7. IL-10對IL-17刺激A549細胞分泌細胞激素的影響

我們進一步想要了解IL-10是否可調控IL-17刺激A549細胞分泌IL-6及IL-8，而由Fig. 19實驗中觀察到不論給予低、中、高劑量的IL-10，與PC組相比前給予IL-10，最能明顯抑制A549細胞分泌IL-6；而同

時給予只在中、高劑量的 IL-10 作用下才有抑制效果；至於之後給予 IL-10 則需高劑量才有抑制效果。此外在 IL-10 對調控 IL-8 的分泌上，不論前中後給予 10 ng/ml、100 ng/ml 的 IL-10 皆可有效抑制 IL-8 分泌，且其抑制能力隨 IL-10 劑量增加呈現 dose-dependent 趨式。

8. IL-10 在作用的 24 小時內可影響 IL-17 刺激 A549 細胞製造 IL-6 與 IL-8 mRNA

細胞starvation 16-18小時後，單獨給予10 ng/ml的IL-17或結合10 ng/ml的IL-10刺激24小時。在作用的24小時內收集各時間的培養液與細胞分別測其IL-6與IL-8蛋白質和mRNA的表現量。與單獨給予IL-17組相比，在結合IL-10刺激分別6小時及3小時後，IL-6與IL-8在蛋白質表現上皆有被抑制的現象(Fig. 20)，而mRNA表現的差異性則分別於IL-10刺激後的6小時及3小時時即呈現出來(Fig. 21， Fig. 22)。

9. IL-10 影響 IL-17 誘發 A549 細胞中 p-ERK 蛋白的表現量

若單獨給予 10 ng/ml 的 IL-17 刺激則可在作用 5 分鐘後即觀察到 p-ERK 蛋白表現量明顯被誘發，而再結合給予 10 ng/ml 的 IL-10 作用下，IL-10 則可明顯抑制 p-ERK 的表現量(Fig. 23)。



第五章
討論

第一節、刺激肺表皮細胞誘發發炎反應

當有外來物進入呼吸道時，氣管表皮細胞可藉由呼吸道纖毛防衛機制及機械性屏障防禦外來物的入侵，此外人體內免疫系統也會分泌許多發炎介質來進行免疫反應。本實驗主要先藉由發炎細胞激素刺激肺表皮細胞造成發炎反應，並給予 IL-10 來觀察 IL-10 如何調控這些發炎物質生成。

IL-4、IL-13 均屬 Th 2 細胞激素，在呼吸道發炎反應上扮演一重要的角色。IL-4 主要可誘發 B 細胞分泌 IgE 並吸引嗜酸性白血球聚集到呼吸道上，同時可誘發肺表皮細胞分泌 MCP-1、TGF- β 和 KC 並活化下游調控蛋白 STAT 6 增加 eotaxin 生成。IL-13 功能與 IL-4 類似皆可刺激肺表皮細胞分泌少量 eotaxin、IL-8 和 RANTES；若 IL-13 分別結合 TNF- α 刺激下則可加強 IL-8 表現量(61)；另有研究指出結合 IL-4 可抑制由 TNF- α 刺激下所誘發的 RANTES 的表現量(26, 61)。

由我們的實驗結果發現，在給予 IL-4 刺激小鼠肺細胞時，可誘發小鼠肺細胞產生發炎介質 eotaxin，且在給予刺激 48 小時後，不論是給予 5 unit/ml 或是 30 unit/ml 的 IL-4 刺激，在 eotaxin 的表現量上都可以達到明顯增高的分泌量。由目前文獻已知人類 A549 細胞不會分泌 eotaxin，而 BEAS-2B 細胞則會分泌少量 eotaxin，但在我們實驗室所取得的 BEAS-2B 細胞株無法分泌 eotaxin，推測可能原因為此細胞培

養條件複雜，在簡化的培養方式下，可能會影響到 eotaxin 的表現狀況，致使 eotaxin 表現量下降至無法偵測到。此外在 Fig .7 和 Fig .8 中觀察到即使給予高劑量的 IL-4 (100 ng/ml) 與不給予刺激組相比，A549 和 BEAS-2B 對分泌 IL-6 與 IL-8 並無顯著差異；而唯有高劑量(100 ng/ml) 的 IL-13 刺激下才可生成 IL-6。

TNF- α 主要來自於巨噬細胞、T 細胞、肥大細胞和表皮細胞所分泌，在 TNF- α 刺激下可增加 IL-1、GM-CSF、IFN- γ 、IL-6、IL-8 和 ICAM-1 生成(29)。我們也同樣觀察到在 TNF- α 刺激下的確可誘發 IL-6、IL-8 和 RANTES 在肺上皮細胞的表現量並呈現 dose-dependent 趨式，其結果與前人研究相符(41)。

IL-17 主要藉由 Th 17 細胞所分泌，可刺激肺表皮細胞分泌 IL-6 和 IL-8，另外 IL-17 結合 IL-4 或 IL-13 可增加 IL-6 表現量以及 ICAM-1 的生成(62)。有研究指出動物實驗中給予 anti-IL-17 antibody 可抑制其肺中嗜中性白血球浸潤現象(63)；另外也發現氣喘病人中 IL-17 的表現量與其患病程度有正相關性(64)。由 Fig .18 結果可發現不管是在 IL-6 或 IL-8，IL-17 都可以明顯的提高其表現量，不過 IL-17 卻無法顯著刺激細胞生成 RANTES。

雖然由小鼠來的肺初代培養細胞經由適當的刺激下能製造出高量的 eotaxin 與 IL-6，是一個不錯的研究肺表皮細胞發炎反應所需的平

台，但是在建立起此平台的過程中發現到要培養到足夠的肺表皮細胞來做實驗是非常耗時的，且細胞數量非常不足，細胞品質管控較難掌握。有鑑於此，我們便進一步嘗試以小鼠肺表皮細胞株 LA-4 及 KLN205 等來取代肺初代培養細胞，但皆不盡理想。因此，我們決定重新再建立起以人類肺表皮細胞株為另一研究平台，以做為之後探討 IL-10 調控呼吸道發炎機制的材料。



第二節、IL-10 調控細胞激素及發炎介質生成

由之前文獻指出 IL-10 在動物模式下可有效抑制由 Th 2 細胞激素 IL-4、IL-13 所引發的呼吸道發炎反應，同時 IL-10 可藉由活化 JAK-STAT3 訊息傳遞途徑來執行其抗發炎的能力。此外 IL-10 可抑制 TNF- α 刺激呼吸道平滑肌細胞分泌 eotaxin、IL-6 和 IL-8(65)。而 IL-17 又被證實可刺激 IL-6、IL-8 生成。因此之後想要了解在所建立的肺細胞平台模式下探討 IL-10 是否可抑制這些發炎物質的生成。

由 Fig.6 發現 IL-10 的確可抑制在小鼠肺細胞中 TNF- α 刺激所造成 IL-6 的產生。此外我們也觀察到 IL-10 同樣可以有效抑制由 TNF- α 和 IL-17 刺激 A549 細胞所分泌的 IL-6、IL-8 和 RANTES；雖然在給予 IL-10 的時間點不同所呈現出的抑制能力也略有不同，不過卻都隨給予 IL-10 劑量的增加都有 dose-dependent 趨式。另有研究指出在給予 IL-10 刺激下 BEAS-2B 細胞表面接受器 IL-10R 會有明顯上升(59)，因此我們推測 IL-10 可能可以藉由活化 A549 細胞表現較多量的 IL-10R，來強化 IL-10 調控發炎反應的能力。不過由實驗證實給予不同劑量 IL-10 刺激 A549 細胞，並無法促使細胞 IL-10R 表現量上升，且表現量較低，因而我們推論 IL-10 抑制能力的強弱與其細胞表現 IL-10R 量多寡似乎無相關。此外對於 A549 細胞株是否真正現 IL-10R 的問題，則有待進一步一 RT-PCR 技術來證明細胞真的有表現 IL-10

的 mRNA 之後我們進一步研究，IL-10 是如何由抑制細胞內何種活化
訊息的傳遞來調控發炎激素的表現。



第三節、IL-10 調控細胞內訊息傳遞蛋白表現

文獻指出 TNF- α 刺激肺表皮細胞分泌 IL-6、IL-8 和 RANTES，而 IL-10 可抑制 TNF- α 活化 I κ B kinase (IKK) 以及磷酸化 I κ B α 啟動 ubiquitin system 被 proteinase 降解的情形來阻斷 NF- κ B pathway 啟動其下游調控的發炎因子進行轉譯(66, 67)。此外 IL-17 刺激 A549 細胞也可啟動 MAPK pathway 磷酸化下游蛋白 ERK1/2 造成 IL-6、IL-8 和 ICAM-1 的大量表現(62)。

從實驗中發現給予 TNF- α 刺激 15 分鐘後的確可以藉由 I κ B α 蛋白的降解活化 NF- κ B pathway，啟動 IL-6 和 IL-8 的轉錄因子進而增加蛋白質和 RNA 的表現量，而結合 IL-10 和 TNF- α 共同作用則會使 I κ B α 蛋白無法降解，同時阻斷 NF- κ B pathway，並可以抑制 IL-6 和 IL-8 蛋白質和 RNA 的表現量。另外，我們發現給予 IL-17 刺激 5 分鐘後可造成 p-ERKs 蛋白的大量表現，若加入 IL-10 作用後 p-ERKs 蛋白表現量則有下降的情形，故推測 IL-10 可能是藉由抑制 p-ERKs 蛋白表現量來調降 IL-6 和 IL-8 的生成。



第陸章
結論與未來方向

目前在小鼠肺細胞初代培養模式上，我們已經發現給予重組蛋白 IL-10 可分別抑制由 IL-4 和 TNF- α 刺激下，所引起小鼠肺上皮細胞 eotaxin 和 IL-6 的分泌。此外在人的肺上皮細胞 A549 和 BEAS-2B 培養上，單獨給予 TNF- α 或 IL-17 皆會對肺上皮細胞造成發炎的效果刺激 IL-6 和 IL-8 分泌；而在 IL-10 參與其反應時，可有效抑制 IL-6 和 IL-8 的表現。此外，我們更進一步研究 IL-10 是如何分別調控 TNF- α 和 IL-17 刺激 A549 細胞內訊號傳遞蛋白的表現及是否藉由影響 IL-6 和 IL-8 mRNA 的表現，來達到抗呼吸道發炎的效果。從結果得知 TNF- α 可誘發 NF- κ B pathway 中 I κ B α 蛋白的降解，另一方面 IL-17 則可誘發 MAPK pathway 中 p-ERK1/2 的表現，而 IL-10 主要藉由抑制 I κ B α 蛋白的降解和 p-ERK 的表現來阻斷下游訊號傳遞，減少 IL-6 和 IL-8 的合成。

綜合以上結論，我們發現 IL-10 的確可減緩由 TNF- α 和 IL-17 所誘發的呼吸道發炎反應，未來將進一步研究 IL-10 還可藉由抑制哪些訊號傳遞路徑達到此效果，以及當結合 TNF- α 和 IL-17 共同刺激時，IL-10 是否仍具有抗發炎之效果，還有 IL-10、IL-17 和 TNF- α 彼此間又是如何去調控的。



第七章
圖表

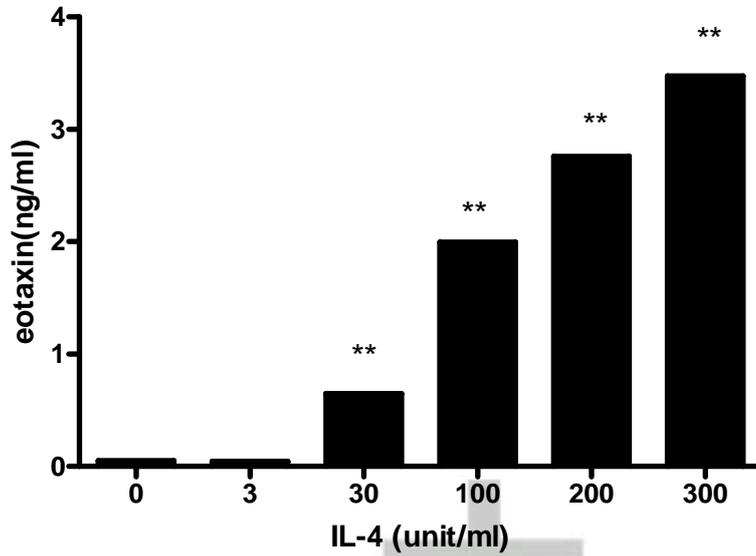


Fig. 1 給予不同劑量 IL-4 刺激小鼠肺細胞分泌 eotaxin

加入不同劑量的 IL-4 刺激培養，經 48 小時後收集細胞培養上清液，以 ELISA 測定 eotaxin 的含量。與未加 IL-4 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

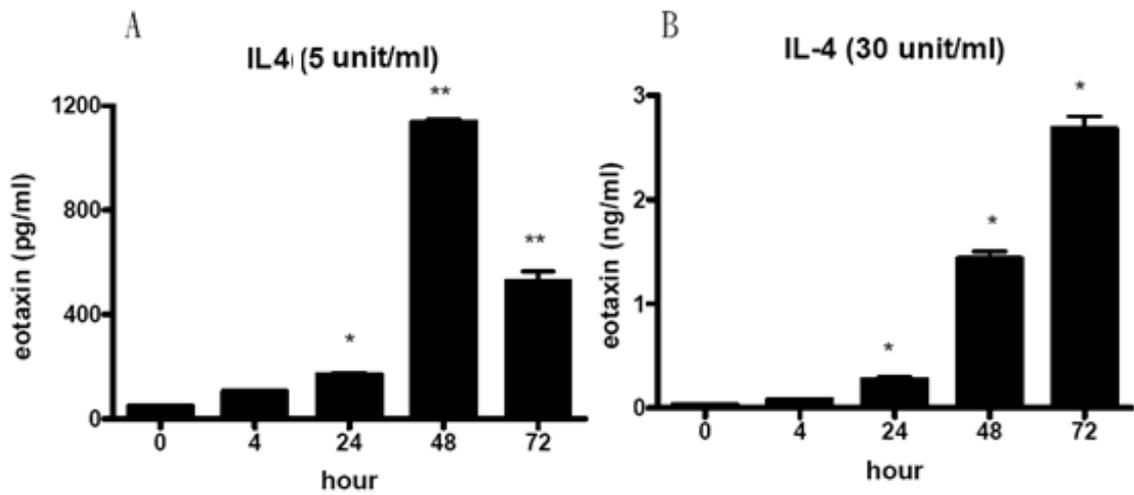


Fig. 2 給予 IL-4 刺激小鼠肺細胞在不同時間點下分泌 eotaxin 的情形

分別給予(A)IL-4 (5 unit/ml)及(B)IL-4 (30 unit/ml)的刺激後，分別在 0、4、24、48 及 72 小時收集上清液分析肺細胞 eotaxin 的分泌量。與未加 IL-4 組相比，* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ 表示有統計上的差異。

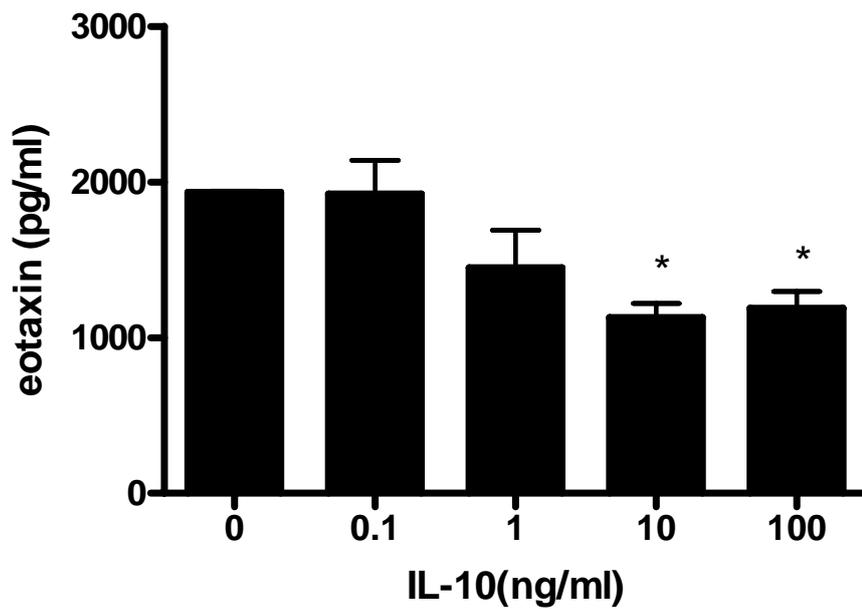


Fig. 3 不同劑量 IL-10 調控 IL-4 刺激小鼠肺細胞分泌 eotaxin

在 IL-10 抑制實驗中，細胞進行 16-18 小時 starvation 後加入不同劑量的重組蛋白 IL-10，而後 2 小時才進行 IL-4 (30 unit/ml) 的刺激，48 小時後收集細胞培養的上清液，與未加 IL-10 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

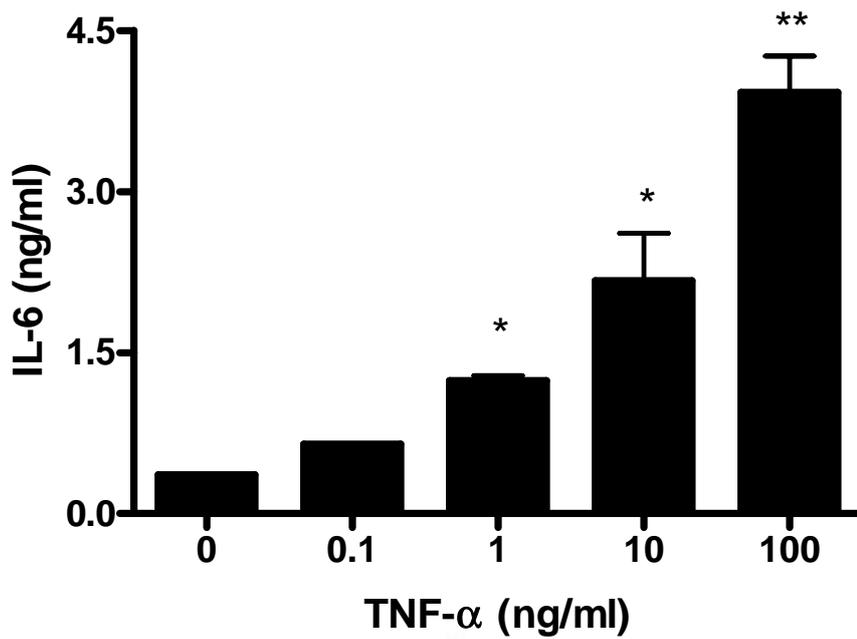


Fig. 4 給予不同劑量 TNF- α 刺激小鼠肺細胞分泌 IL-6 的情形

加入不同劑量的 TNF- α 刺激培養，經 48 小時後收集細胞培養上清液分析肺細胞分泌 IL-6 的產量。與未加 TNF- α 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

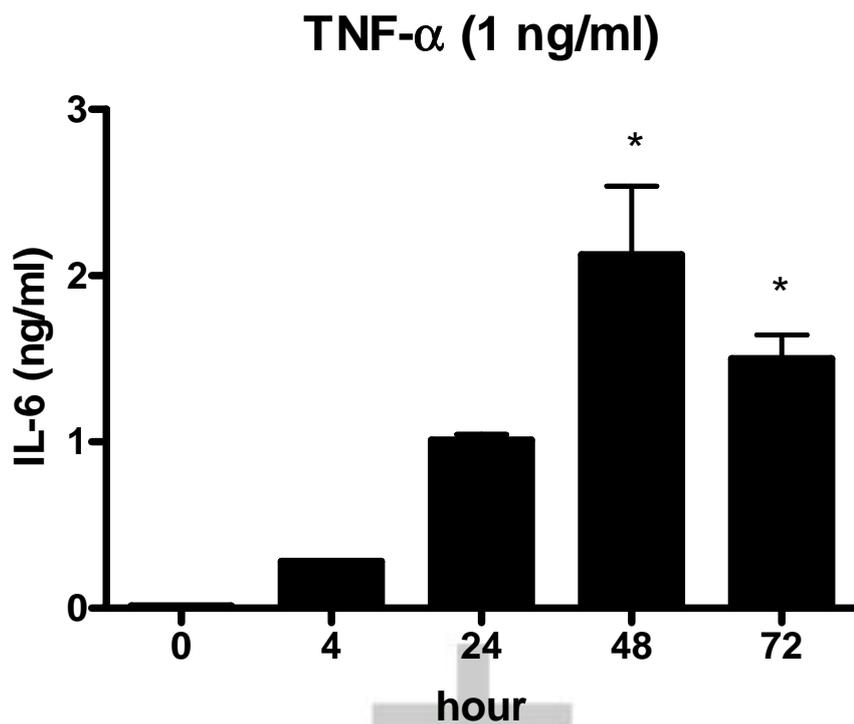


Fig. 5 給予 TNF- α 刺激小鼠肺細胞在不同時間點下分泌 IL-6 的情形

給予 TNF- α (1 ng/ml) 的刺激後，分別在不同時間點收上清液分析 IL-6 的分泌量。與未加 TNF- α 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

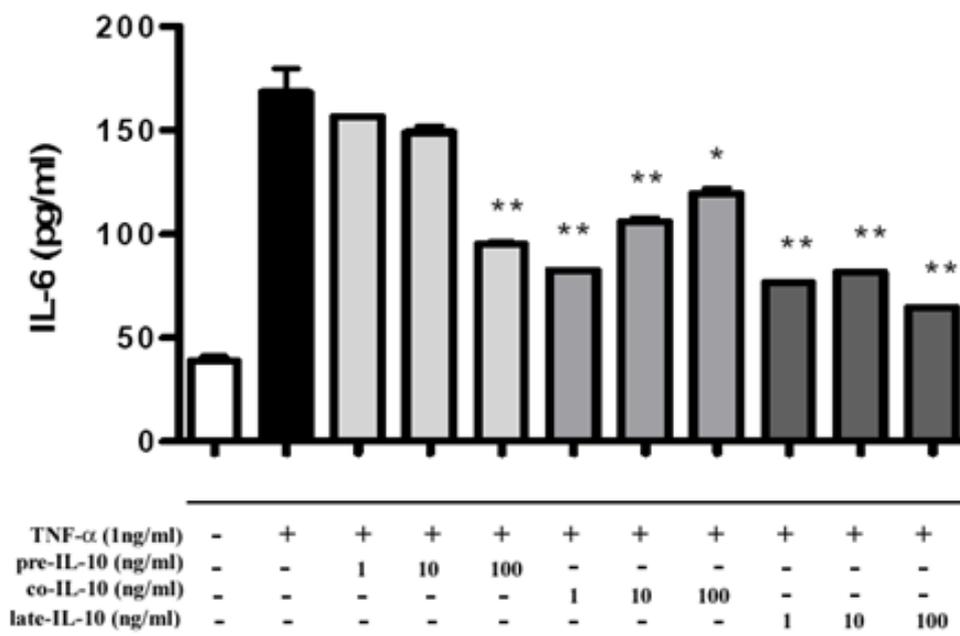


Fig. 6 在不同時間點給予不同劑量 IL-10 對 TNF- α 刺激小鼠肺細胞分泌 IL-6 的影響

在重組蛋白 IL-10 抑制作用實驗中，做以下三組實驗：(1)前給予(pre-IL-10)：先給予 IL-10 (1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)作用 24 小時後，才給予 TNF- α (1 ng/ml)刺激，48 小時後收上清液。(2)同時給予(co-IL-10)：給予 IL-10 (1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)刺激 2 小時後才給予 TNF- α (1 ng/ml)刺激，48 小時後收上清液。(3)之後給予(late-IL-10)：給予 TNF- α (1 ng/ml)刺激，24 小時後再加入 IL-10 (1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)作用，經 24 小時後收上清液。NC 組為未添加任何刺激物，PC 組為只加 TNF- α (1 ng/ml)刺激。與 PC 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，在** $p < 0.001$ 時代表兩組間有非常顯著之差異。

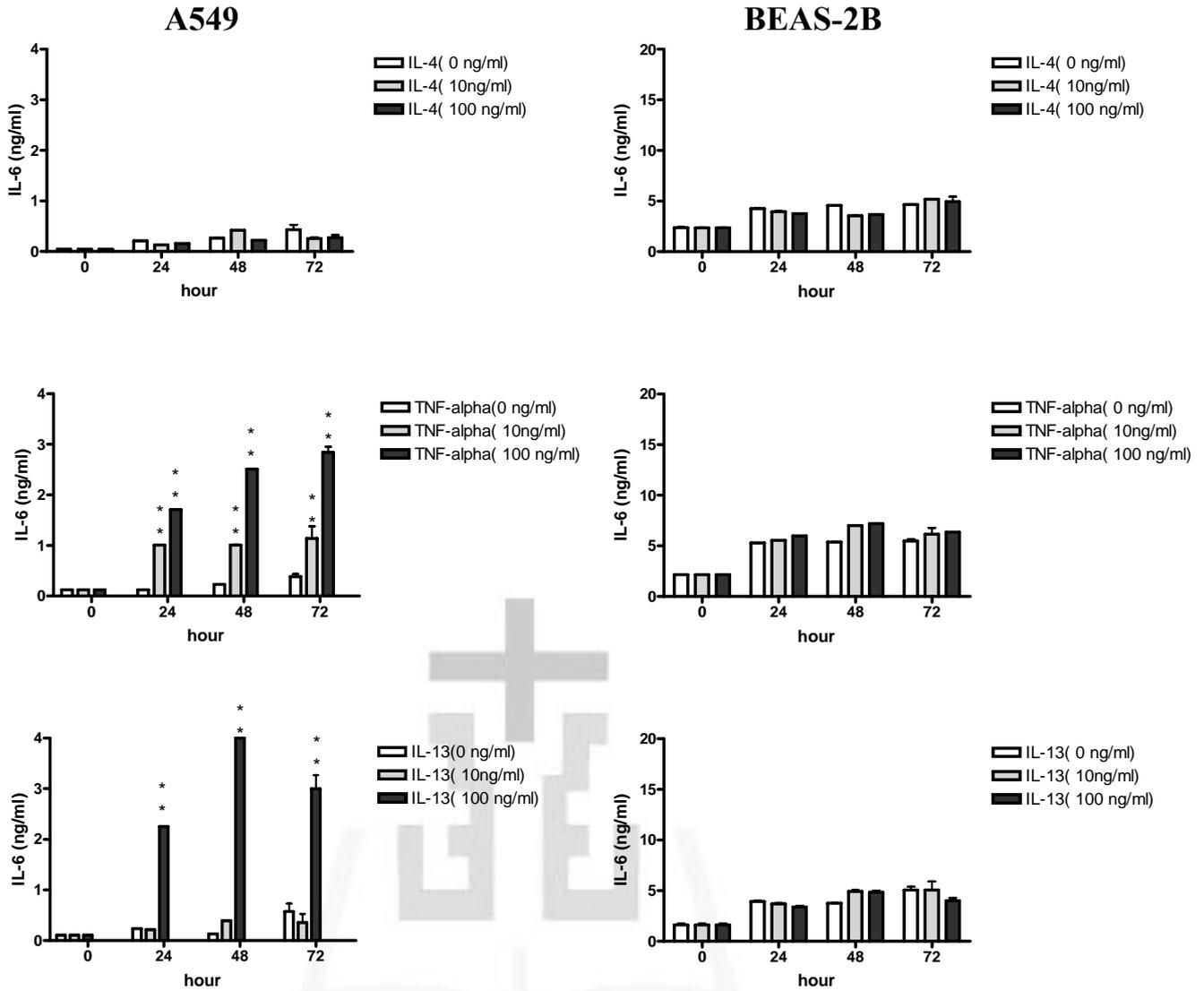


Fig. 7 給予 IL-4、IL-13 及 TNF- α 刺激 A549 與 BEAS-2B 細胞在不同時間點下分泌 IL-6 的情形

細胞 starvation 16-18 小時後，分別給予 IL-4、IL-13 和 TNF- α (0 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml) 的刺激後，分別在不同時間點收上清液觀察 IL-6 的分泌量。與不給予刺激組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

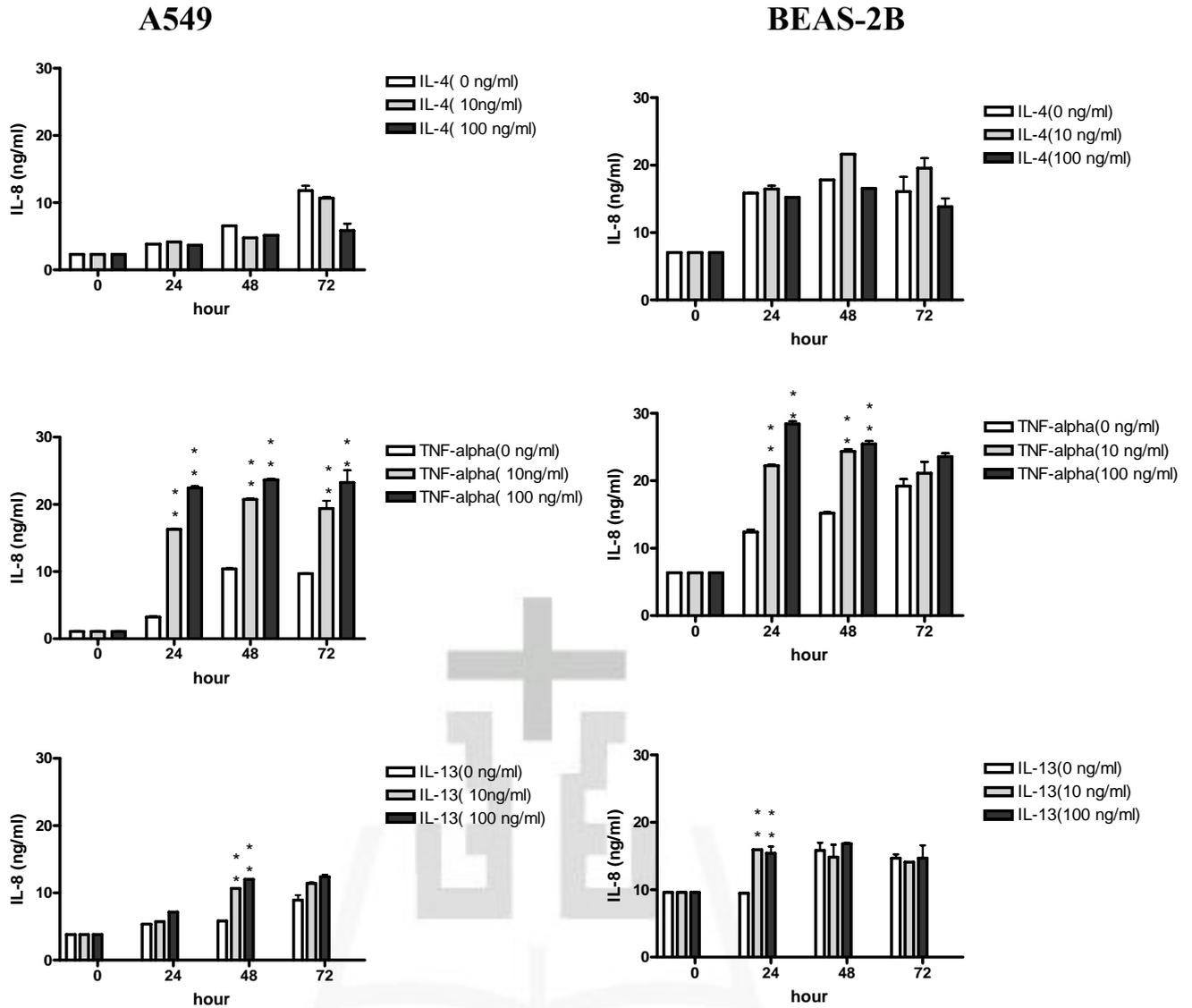


Fig. 8 給予 IL-4、IL-13 及 TNF- α 刺激 A549 與 BEAS-2B 細胞在不同時間點下分泌 IL-8 的情形

細胞 starvation 16-18 小時後，分別給予 IL-4、IL-13 和 TNF- α (0 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml) 的刺激後，分別在不同時間點收上清液分析 IL-8 的分泌量。與不給予刺激組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

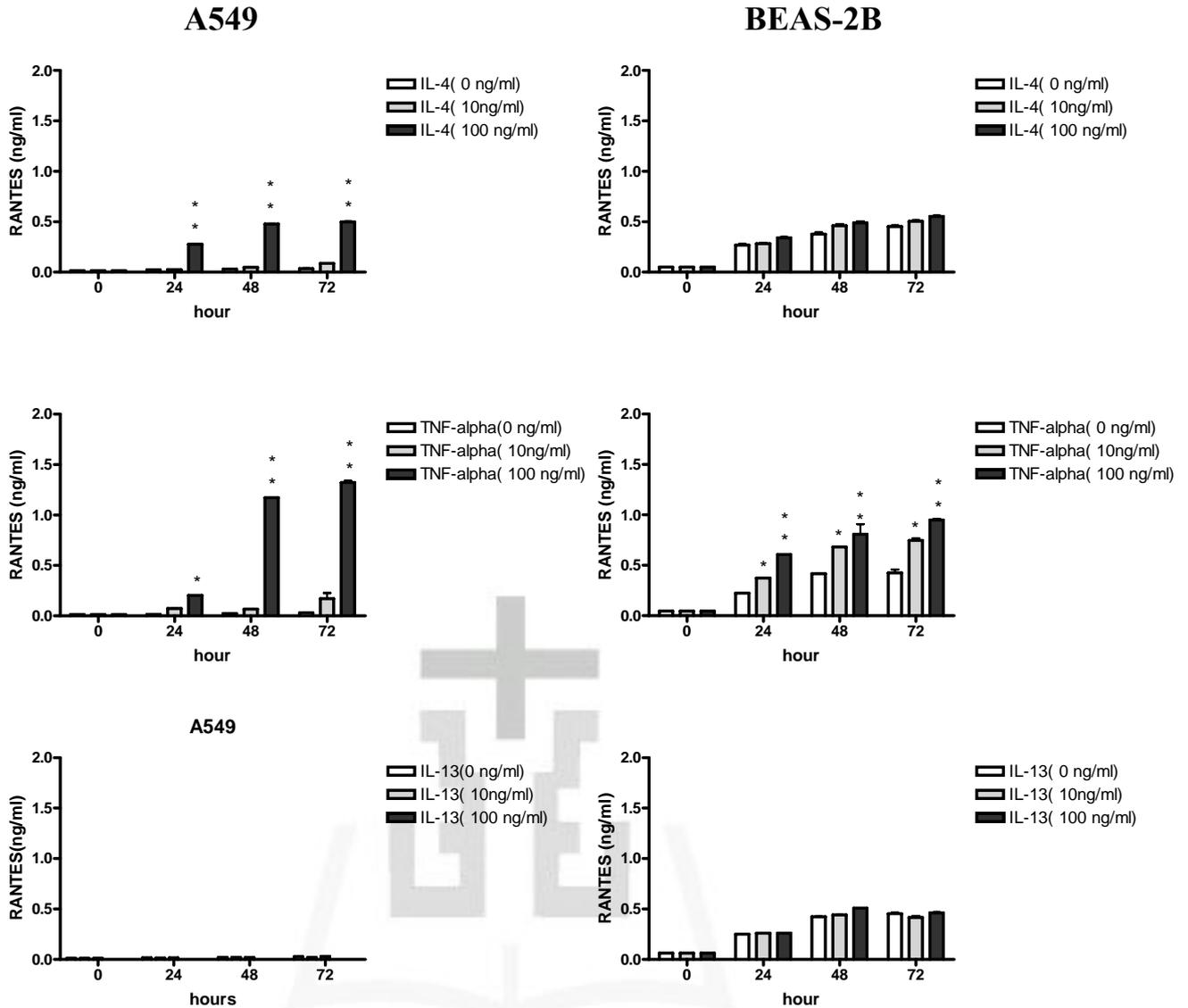


Fig. 9 給予 IL-4、IL-13 及 TNF- α 刺激 A549 與 BEAS-2B 細胞在不同時間點下分泌 RANTES 的情形

細胞 starvation 16-18 小時後，分別給予 IL-4、IL-13 和 TNF- α (0 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)的刺激後，分別在不同時間點收個別上清液分析 RANTES 的分泌量。與不給予刺激組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

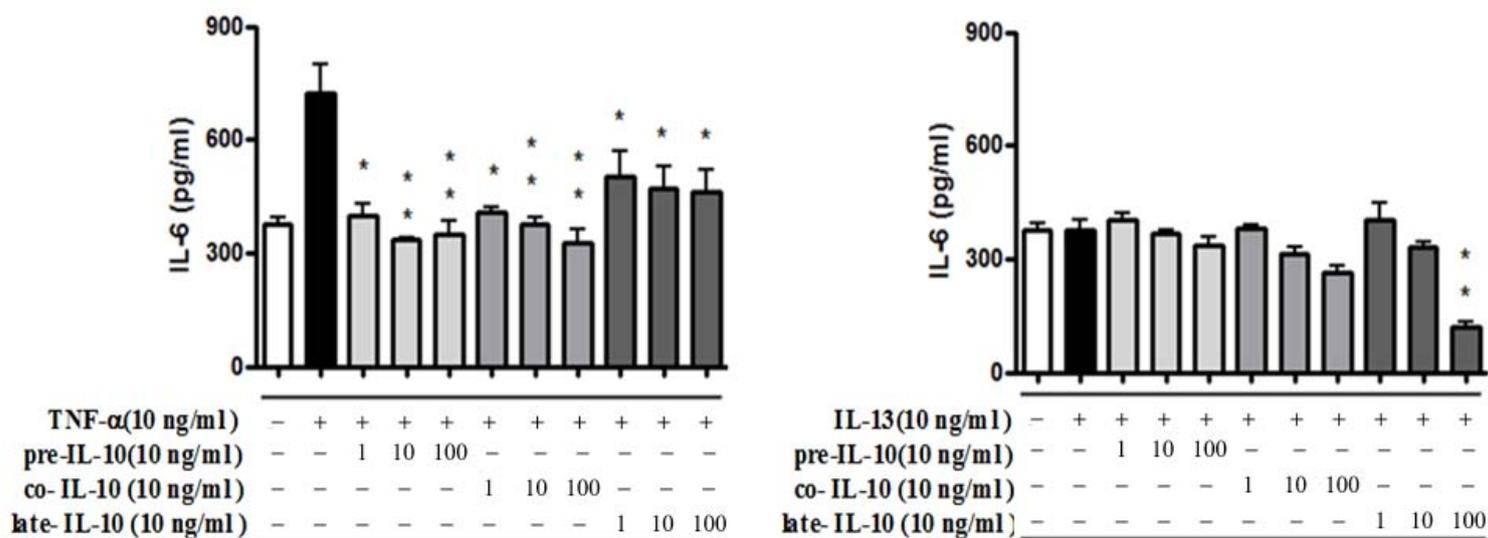


Fig. 10 在不同時間點給予不同劑量 IL-10 對 TNF- α 和 IL-13 刺激

A549 細胞分泌 IL-6 的影響

在 IL-10 抑制作用的實驗中將 A549 細胞 starvation 16-18 小時後，分別做前給予(pre-IL-10)、同時給予(co-IL-10)及之後給予(late-IL-10) IL-10 的實驗。各組加入 IL-10 的作用時間(1)前給予(pre-IL-10)：先給予 IL-10 作用 24 小時後，才給予 TNF- α 或 IL-13 刺激，經 48 小時後收細胞上清液。(2)同時給予(co-IL-10)：隔 24 小時後，給予 IL-10 並同時加入 TNF- α 或 IL-13 刺激，48 小時後收細胞上清液。(3)之後給予(late-IL-10)：隔 24 小時後給予 TNF- α 或 IL-13 刺激，經 24 小時後再加入 IL-10 刺激，再經 24 小時後收細胞上清液。NC 組為未添加任何刺激物，PC 組為細胞只加 TNF- α 或 IL-13 刺激。與 PC 組相比，* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著的差異。

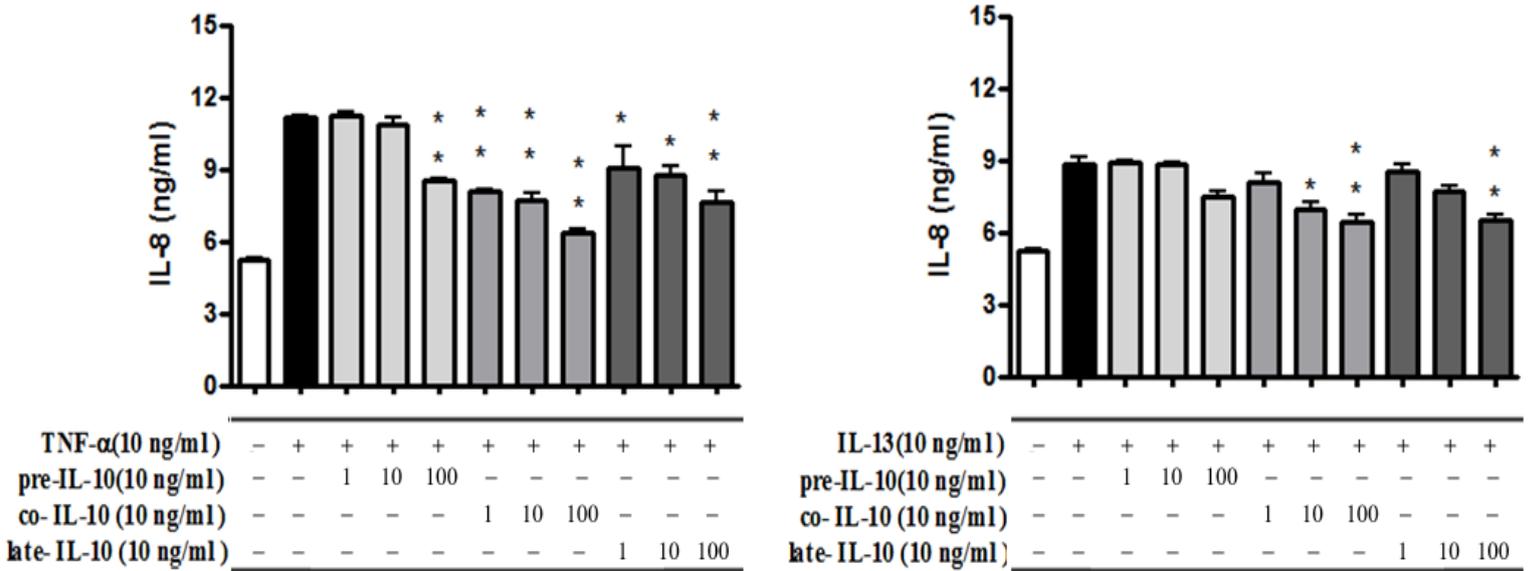


Fig. 11 在不同時間點給予不同劑量 IL-10 對 TNF- α 和 IL-13 刺激 A549 細胞分泌 IL-8 的影響

在 IL-10 抑制作用實驗中將 A549 細胞 starvation 16-18 小時後，分別做前給予(pre-IL-10)、同時給予(co-IL-10)及之後給予(late-IL-10) IL-10 的三組。此三組實驗會各別加入 TNF- α 或 IL-13 來刺激細胞，而 IL-10 加入的作用時間及條件陳述請參考 Fig.10 的相同說明。NC 組為未添加任何刺激物，PC 組為細胞只加 TNF- α 或 IL-13 (10 ng/ml)刺激。與 PC 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

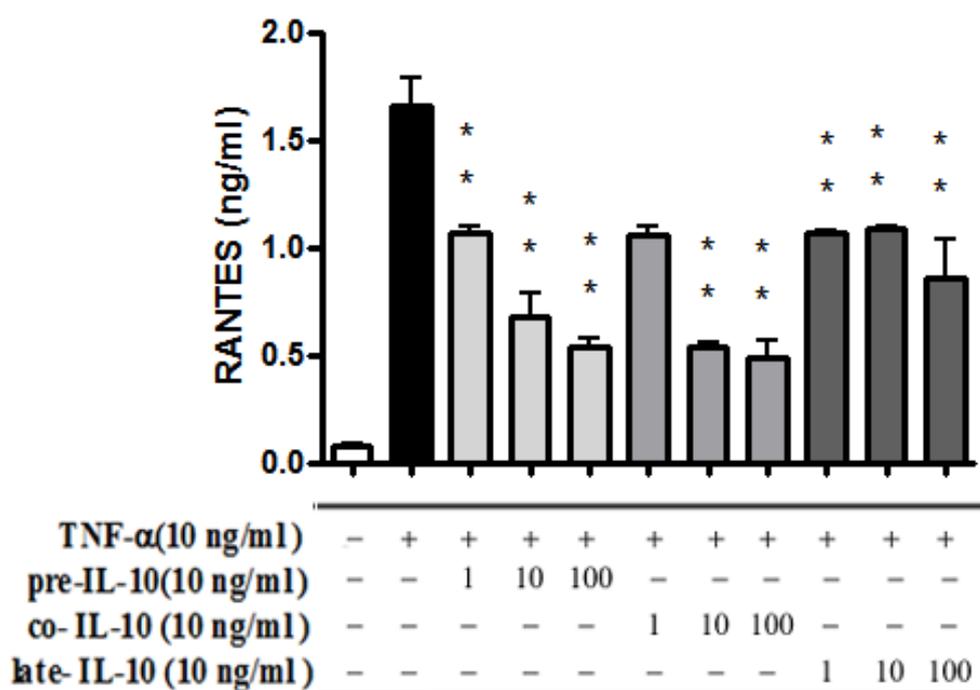


Fig. 12 在不同時間點給予不同劑量 IL-10 對 TNF- α 刺激 A549 細胞分泌 RANTES 的影響

在 IL-10 抑制作用實驗中將 A549 細胞 starvation 16-18 小時後，分別做前給予(pre-IL-10)、同時給予(co-IL-10)及之後給予(late-IL-10) IL-10 的三組。此三組實驗會各別加入 TNF- α 或 IL-13 來刺激細胞而 IL-10 加入的作用時間及條件陳述請參考 Fig.10 的相同說明。NC 組為未添加任何刺激物，PC 組為細胞只加 TNF- α 或 IL-13 (10 ng/ml)刺激。與 PC 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

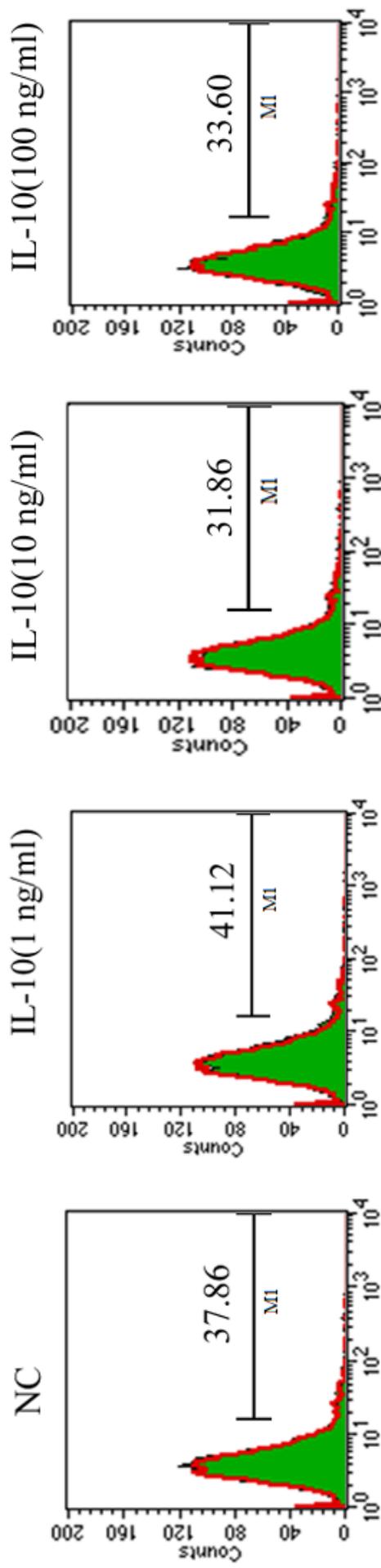


Fig. 13 在不同劑量 IL-10 刺激下 A549 細胞表現 IL-10 接受器的情形

細胞 starvation 16-18 小時後，給予不同劑量 IL-10(1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)與 IL-17(10 ng/ml)刺激 A549 細胞，以未加刺激物作為陰性對照組 (negative control, NC)，24 小時後收集細胞進行螢光抗體染色分析 A549 細胞表面接受器 IL-10R (CD210) 表現量，其結果以 Mean 表示。

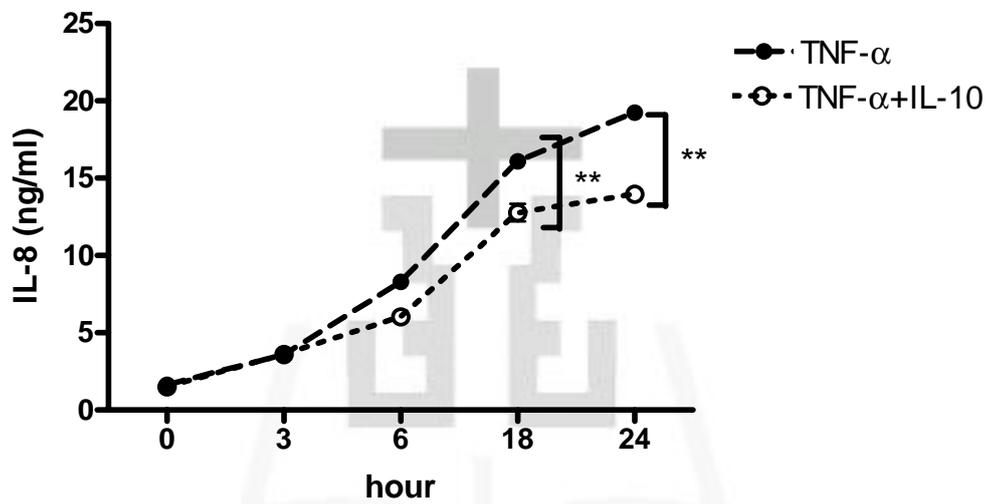
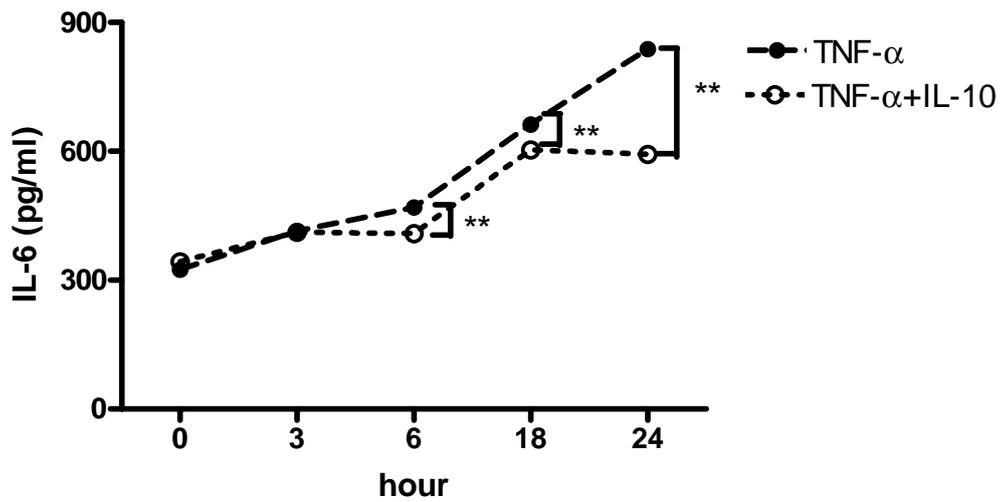


Fig. 14 IL-10 在作用的 24 小時內對 TNF- α 刺激 A549 細胞分泌

IL-6 和 IL-8 的影響

細胞 starvation 16-18 小時後，單獨給予 TNF- α (10 ng/ml) 或結合 IL-10 (10 ng/ml) 刺激後，在 24 小時內分別於不同時間點收上清液檢測 IL-6 和 IL-8 的分泌量。與 TNF- α 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

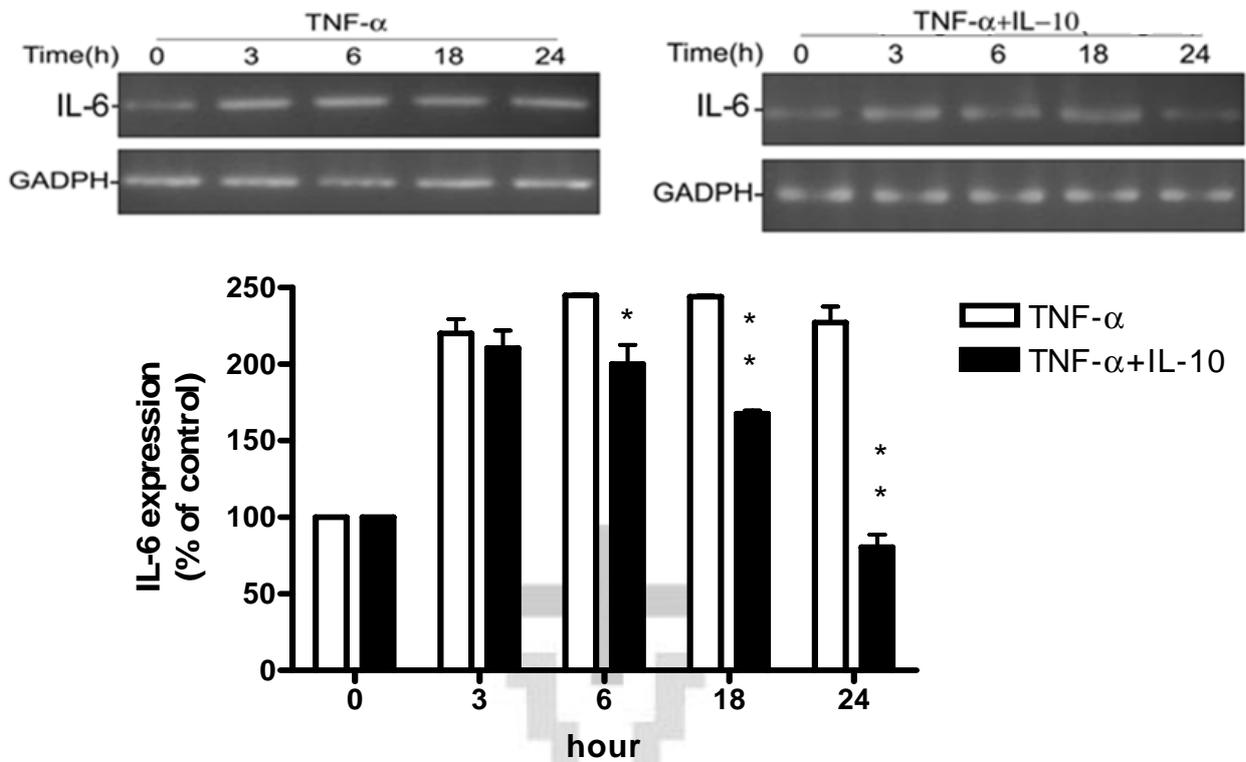


Fig. 15 IL-10 在作用的 24 小時內對 TNF- α 刺激 A549 細胞表現 IL-6 mRNA 的影響

細胞 starvation 16-18 小時後，單獨給予 TNF- α (10 ng/ml) 或結合 IL-10 (10 ng/ml) 刺激後，在 24 小時內分別於不同時間點收集細胞觀察 IL-6 mRNA 的表現量。與 TNF- α 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

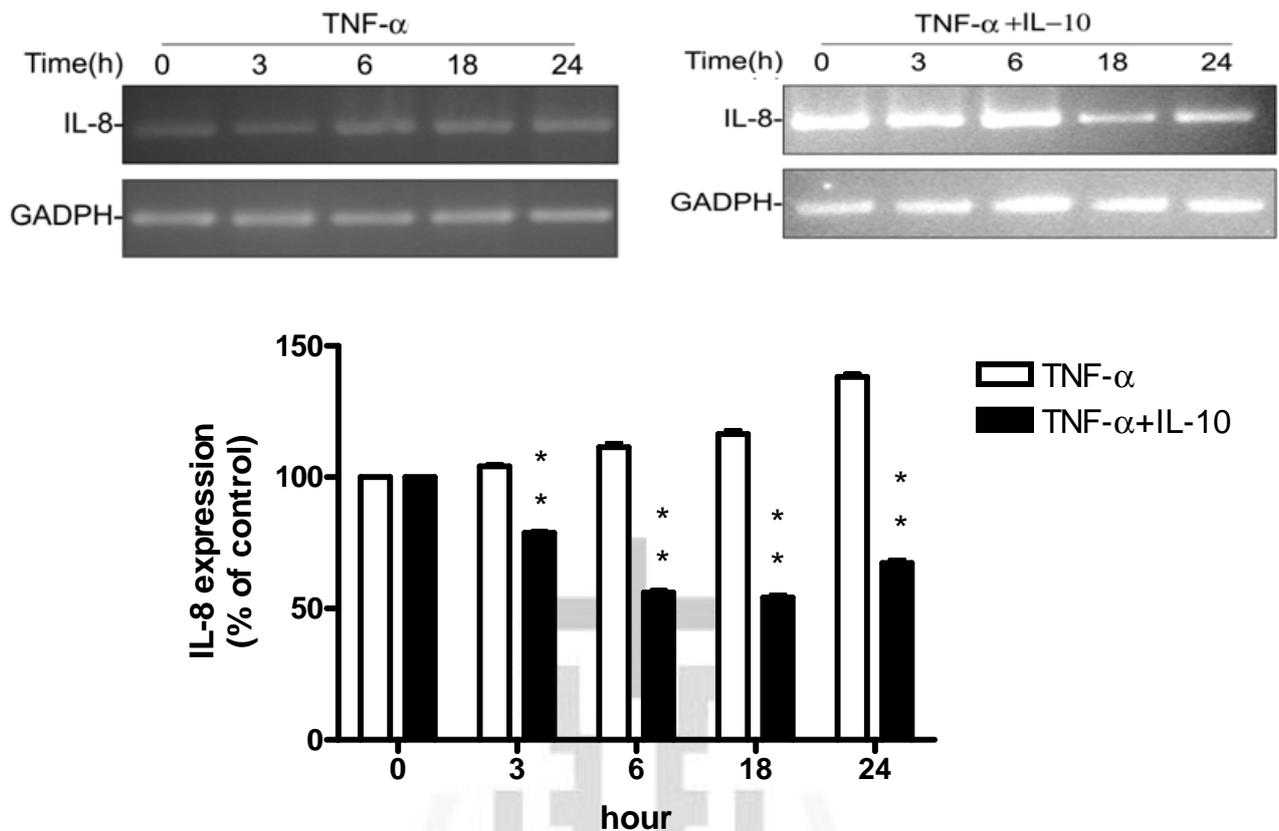


Fig. 16 IL-10 在作用的 24 小時內對 TNF- α 刺激 A549 細胞表現 IL-8 mRNA 的影響。

細胞 starvation 16-18 小時後，單獨給予 TNF- α (10 ng/ml) 或結合 IL-10 (10 ng/ml) 刺激後，在 24 小時內分別於不同時間點收集細胞觀察 IL-8 mRNA 的表現量。與 TNF- α 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

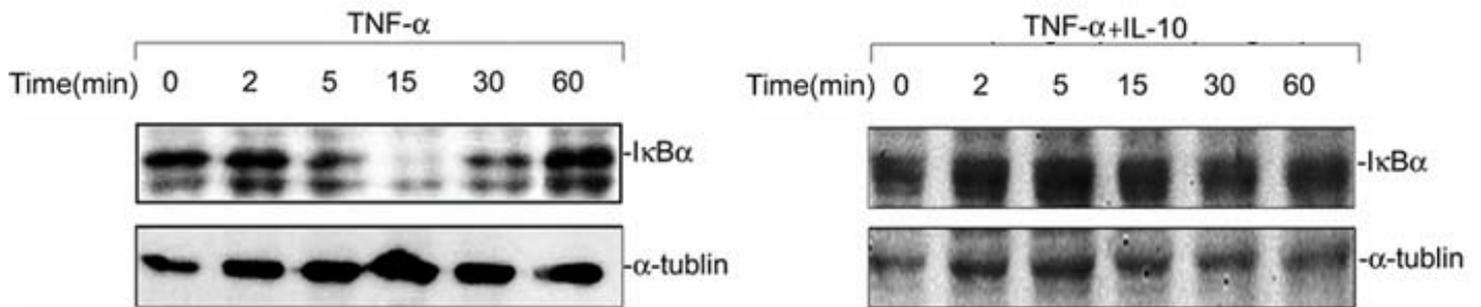


Fig. 17 IL-10 調控 TNF- α 刺激 A549 細胞中 I κ B α 蛋白的表現量

細胞 starvation 16-18 小時後，單獨給予 TNF- α (10 ng/ml) 或結合 IL-10(10 ng/ml) 刺激後，分別在不同時間點收細胞以西方點墨法偵測 I κ B α 蛋白的表現量。

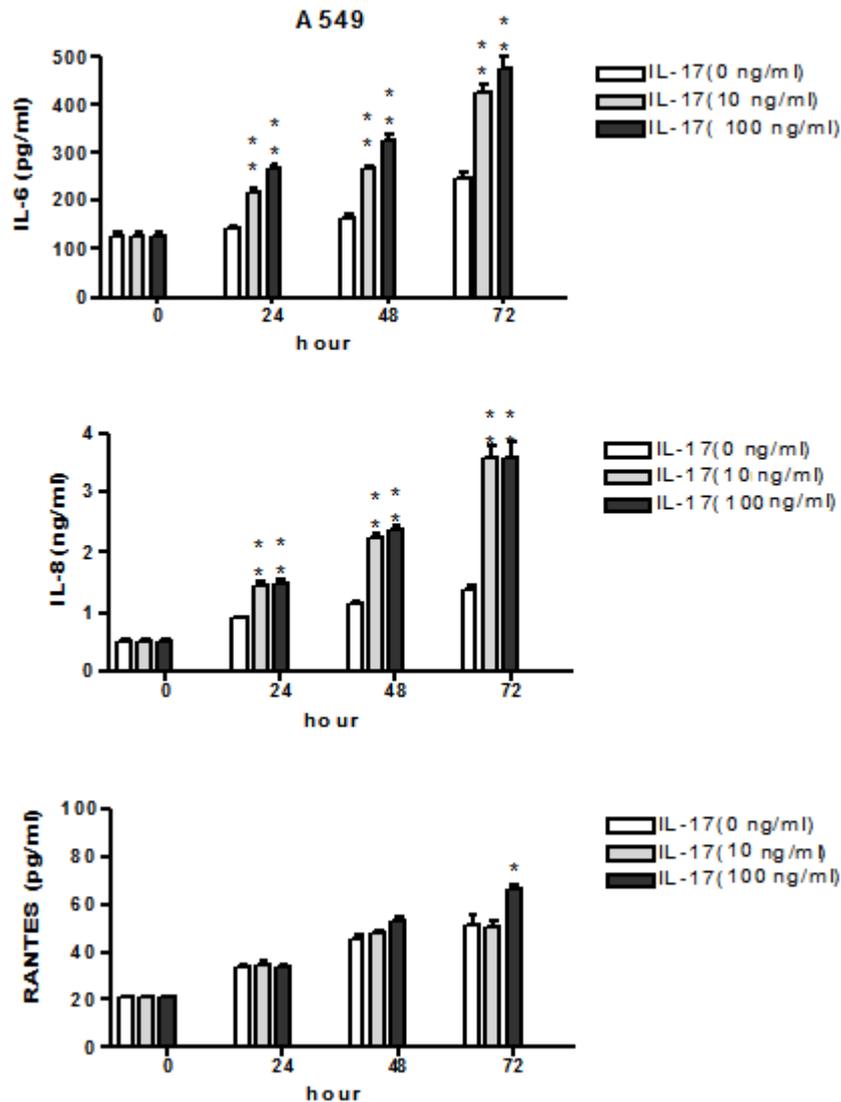


Fig. 18 給予不同劑量 IL-17 刺激 A549 細胞在不同時間點下分泌 IL-6、IL-8 和 RANTES 的情形

細胞 starvation 16-18 小時後，分別給予 IL-17(0 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml)的刺激後，分別在不同時間點收集上清液以 ELISA 檢測 IL-6、IL-8 與 RANTES 的分泌量。與不給予刺激組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

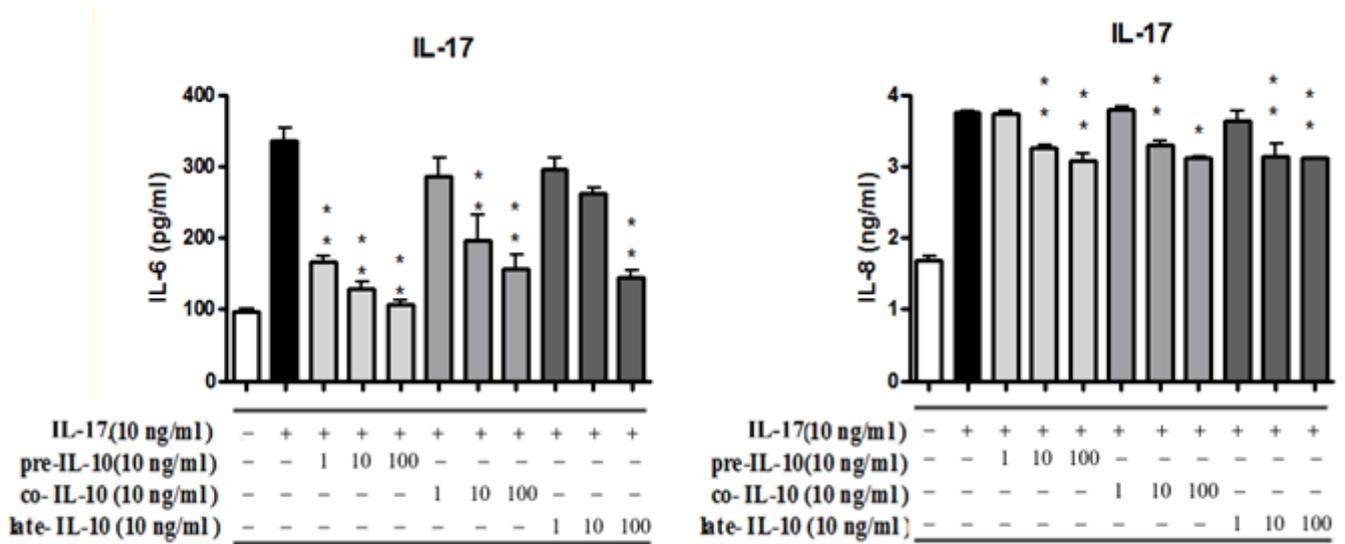


Fig. 19 在不同時間點給予不同劑量 IL-10 對 IL-17 刺激 A549 細胞分泌 IL-6 與 IL-8 的影響

在 IL-10 抑制作用實驗中將 A549 細胞 starvation 16-18 小時後，分別做前給予(pre-IL-10)、同時給予(co-IL-10)及之後給予(late-IL-10) IL-10 的三組。此三組實驗會各別加入 IL-17 來刺激細胞而 IL-10 加入的作用時間及條件陳述請參考 Fig.10 的相同說明。NC 組為未添加任何刺激物，PC 組為細胞只加 IL-17 (10 ng/ml) 刺激。與 PC 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

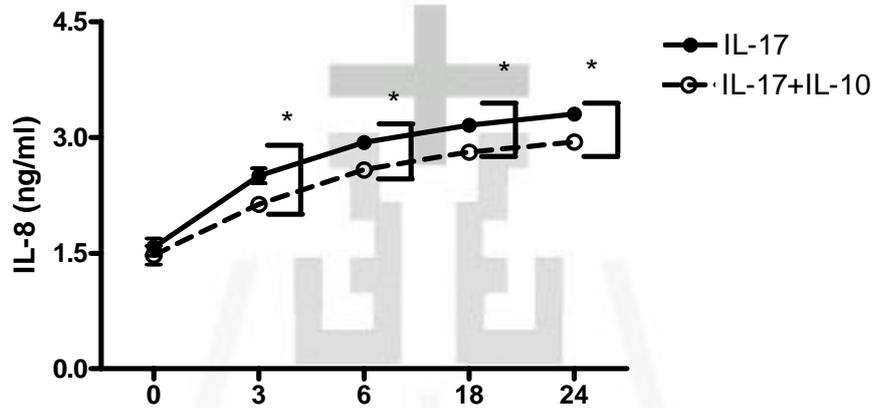
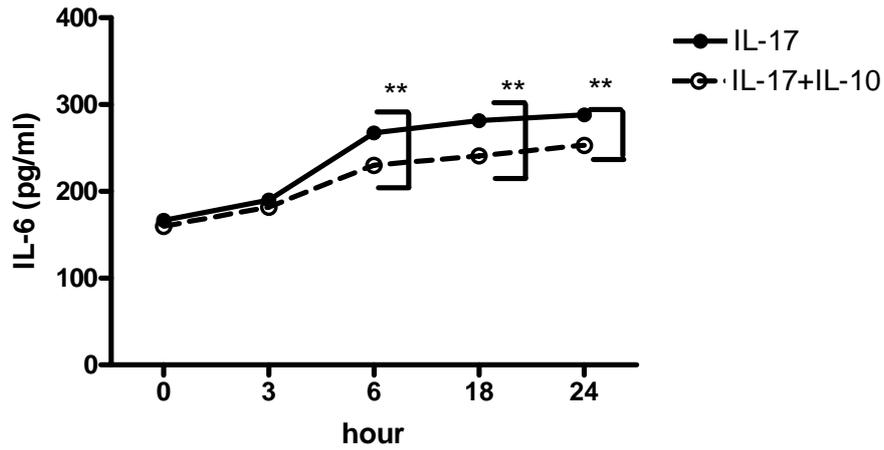


Fig. 20 IL-10 在作用的 24 小時內對 IL-17 刺激 A549 細胞分泌 IL-6 和 IL-8 的影響

細胞 starvation 16-18 小時後，單獨給予 IL-17 (10 ng/ml) 或結合 IL-10 (10 ng/ml) 刺激後，在 24 小時內分別於不同時間點收上清液檢測 IL-6 和 IL-8 的分泌量。與 IL-17 組相比，在 * $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在 ** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

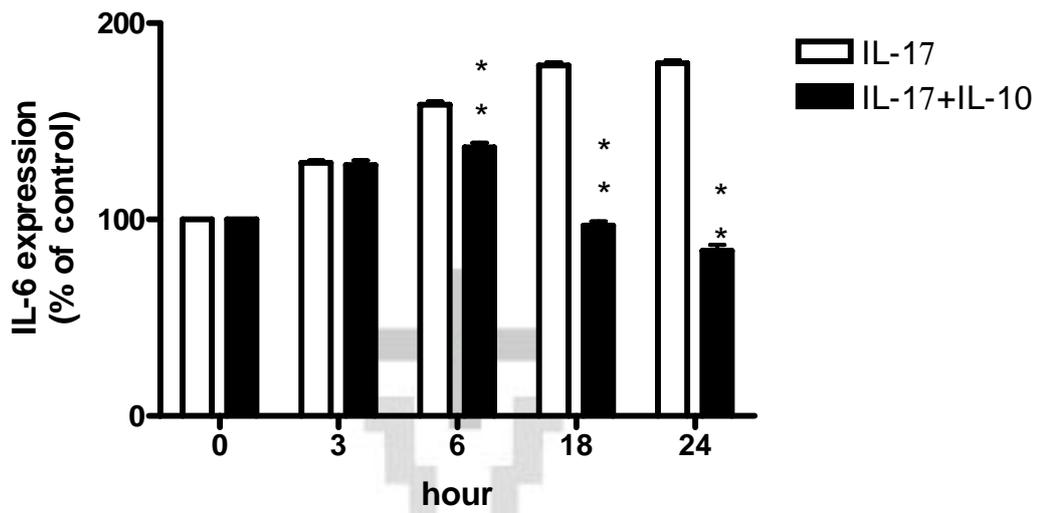
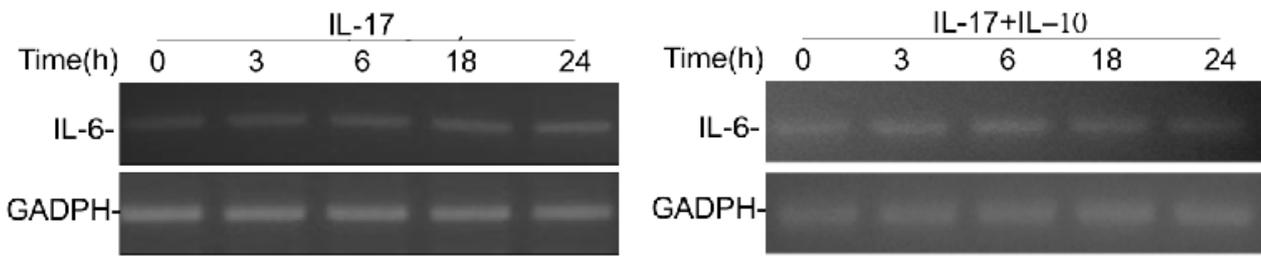


Fig. 21 IL-10 在作用的 24 小時內對 IL-17 刺激 A549 細胞表現 IL-6 mRNA 的影響

細胞 starvation 16-18 小時後，單獨給予 IL-17 (10 ng/ml) 或結合 IL-10 (10 ng/ml) 刺激後，在 24 小時內分別於不同時間點收集細胞觀察 IL-6 mRNA 的表現量。與 IL-17 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

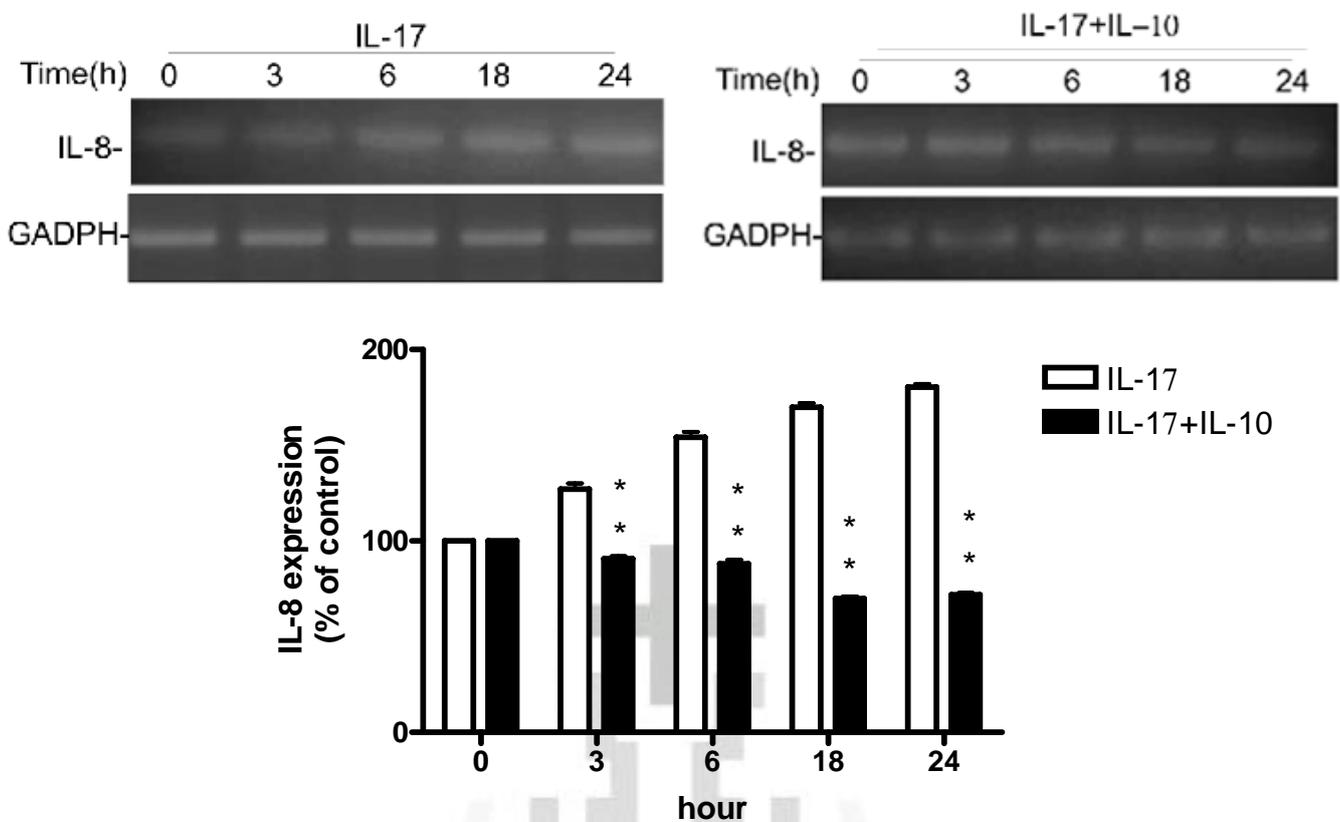


Fig. 22 IL-10 在作用的 24 小時內對 IL-17 刺激 A549 細胞表現 IL-8 mRNA 的影響。

細胞 starvation 16-18 小時後，單獨給予 IL-17 (10 ng/ml) 或結合 IL-10 (10 ng/ml) 刺激後，在 24 小時內分別於不同時間點收集細胞觀察 IL-8 mRNA 的表現量。與 IL-17 組相比，在* $p < 0.05$ 時表示兩組間有顯著差異，而在** $p < 0.001$ 時則代表兩組間有非常顯著之差異。

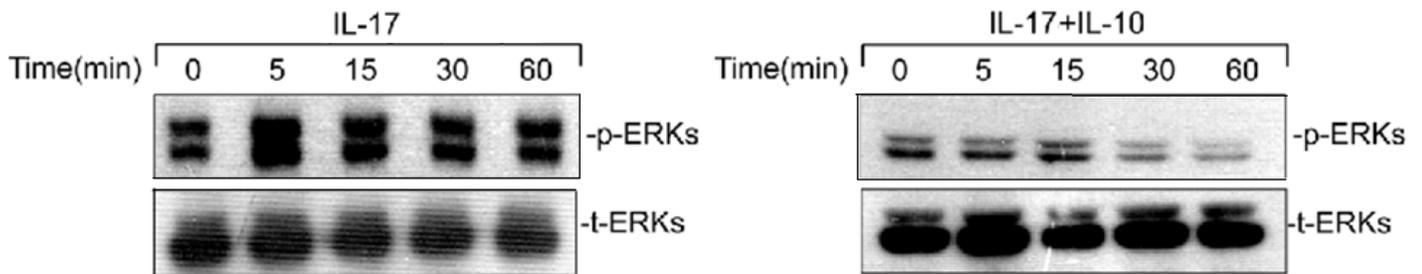


Fig. 23 IL-10 調控 IL-17 刺激 A549 細胞中 p-ERKs 蛋白的表現量。

細胞 starvation 16-18 小時後，單獨給予 IL-17 (10 ng/ml)或結合 IL-10 (10 ng/ml)刺激後，分別在不同時間點收集細胞以西方點墨法偵測 phspholated-ERK1/2(p-ERKs)及 total- ERK1/2(t-ERKs)蛋白的表現量。



第捌章
參考文獻

1. Mannino, D. M., and A. S. Buist. 2007. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 370:765-773.
2. Barnes, P. J. 2006. Against the Dutch hypothesis: asthma and chronic obstructive pulmonary disease are distinct diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 174:240-243; discussion 243-244.
3. Barnes, P. J. 2008. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 8:183-192.
4. Malo, J. 2004. [Towards interprofessional collaboration]. *Perspect Infirm* 1:23-27.
5. Strachan, D. P., and D. G. Cook. 1998. Health effects of passive smoking. 6. Parental smoking and childhood asthma: longitudinal and case-control studies. *Thorax* 53:204-212.
6. Larsson, K. 2007. Aspects on pathophysiological mechanisms in COPD. *J Intern Med* 262:311-340.
7. Gillum, R. F. 1991. Peripheral leukocyte count and pulmonary function in a national sample of women and men. *Ann Epidemiol* 1:525-531.
8. Yoshikawa, T., G. Dent, J. Ward, G. Angco, G. Nong, N. Nomura, K. Hirata, and R. Djukanovic. 2007. Impaired neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 175:473-479.
9. Chung, K. F., and P. J. Barnes. 1999. Cytokines in asthma. *Thorax* 54:825-857.
10. Secrist, H., C. J. Chelen, Y. Wen, J. D. Marshall, and D. T. Umetsu. 1993. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 178:2123-2130.
11. Novak, B. M., and J. T. Cafmeyer. 2001. Meta-stable enamines:

synthesis of simple enamines via catalytic isomerization of allylic amine substrates and their polymerization behavior. *J Am Chem Soc* 123:11083-11084.

12. Flood-Page, P., A. Menzies-Gow, S. Phipps, S. Ying, A. Wangoo, M. S. Ludwig, N. Barnes, D. Robinson, and A. B. Kay. 2003. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest* 112:1029-1036.
13. Hunninghake, G. W., and R. G. Crystal. 1983. Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 128:833-838.
14. Saetta, M., A. Di Stefano, P. Maestrelli, G. Turato, M. P. Ruggieri, A. Roggeri, P. Calcagni, C. E. Mapp, A. Ciaccia, and L. M. Fabbri. 1994. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 150:1646-1652.
15. Di Stefano, A., A. Capelli, M. Lusuardi, P. Balbo, C. Vecchio, P. Maestrelli, C. E. Mapp, L. M. Fabbri, C. F. Donner, and M. Saetta. 1998. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1277-1285.
16. Retamales, I., W. M. Elliott, B. Meshi, H. O. Coxson, P. D. Pare, F. C. Sciurba, R. M. Rogers, S. Hayashi, and J. C. Hogg. 2001. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 164:469-473.
17. Wang, J. H., J. L. Devalia, R. J. Sapsford, and R. J. Davies. 1997. Effect of corticosteroids on release of RANTES and sICAM-1 from cultured human bronchial epithelial cells, induced by TNF-alpha. *Eur Respir J* 10:834-840.
18. Takanashi, S., Y. Hasegawa, Y. Kanehira, K. Yamamoto, K. Fujimoto, K. Satoh, and K. Okamura. 1999. Interleukin-10 level in sputum is

reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J* 14:309-314.

19. Denys, A., I. A. Udalova, C. Smith, L. M. Williams, C. J. Ciesielski, J. Campbell, C. Andrews, D. Kwaitkowski, and B. M. Foxwell. 2002. Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF-alpha production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF-kappa B in primary human macrophages. *J Immunol* 168:4837-4845.
20. Steinke, J. W., and L. Borish. 2001. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res* 2:66-70.
21. Hart, T. K., M. N. Blackburn, M. Brigham-Burke, K. Dede, N. Al-Mahdi, P. Zia-Amirhosseini, and R. M. Cook. 2002. Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma. *Clin Exp Immunol* 130:93-100.
22. Borish, L. C., and J. W. Steinke. 2003. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111:S460-475.
23. Elias, J. A., T. Zheng, C. G. Lee, R. J. Homer, Q. Chen, B. Ma, M. Blackburn, and Z. Zhu. 2003. Transgenic modeling of interleukin-13 in the lung. *Chest* 123:339S-345S.
24. Booth, B. W., K. B. Adler, J. C. Bonner, F. Tournier, and L. D. Martin. 2001. Interleukin-13 induces proliferation of human airway epithelial cells in vitro via a mechanism mediated by transforming growth factor-alpha. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:739-743.
25. Griffiths-Johnson, D. A., P. D. Collins, A. G. Rossi, P. J. Jose, and T. J. Williams. 1993. The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils in vitro and causes their accumulation into the lung in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 197:1167-1172.

26. Fujisawa, T., Y. Kato, H. Nagase, J. Atsuta, A. Terada, K. Iguchi, H. Kamiya, Y. Morita, M. Kitaura, H. Kawasaki, O. Yoshie, and K. Hirai. 2000. Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3. *J Allergy Clin Immunol* 106:507-513.
27. Noe, K. H., C. Cenciarelli, S. A. Moyer, P. A. Rota, and M. L. Shin. 1999. Requirements for measles virus induction of RANTES chemokine in human astrocytoma-derived U373 cells. *J Virol* 73:3117-3124.
28. Chung, K. F. 2001. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 34:50s-59s.
29. Khair, O. A., J. L. Devalia, M. M. Abdelaziz, R. J. Sapsford, H. Tarraf, and R. J. Davies. 1994. Effect of Haemophilus influenzae endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF-alpha and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 7:2109-2116.
30. van der Vaart, H., G. H. Koeter, D. S. Postma, H. F. Kauffman, and N. H. ten Hacken. 2005. First study of infliximab treatment in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 172:465-469.
31. Rennard, S. I., C. Fogarty, S. Kelsen, W. Long, J. Ramsdell, J. Allison, D. Mahler, C. Saadeh, T. Siler, P. Snell, P. Korenblat, W. Smith, M. Kaye, M. Mandel, C. Andrews, R. Prabhu, J. F. Donohue, R. Watt, K. H. Lo, R. Schlenker-Herceg, E. S. Barnathan, and J. Murray. 2007. The safety and efficacy of infliximab in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 175:926-934.
32. Mahler, D. A., S. Huang, M. Tabrizi, and G. M. Bell. 2004. Efficacy and safety of a monoclonal antibody recognizing interleukin-8 in COPD: a pilot study. *Chest* 126:926-934.
33. Fitzgerald, M. F., and J. C. Fox. 2007. Emerging trends in the therapy of COPD: novel anti-inflammatory agents in clinical development.

Drug Discov Today 12:479-486.

34. Polito, A. J., and D. Proud. 1998. Epithelia cells as regulators of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 102:714-718.
35. Villar, J., and A. S. Slutsky. 1993. Effects of induced hypothermia in patients with septic adult respiratory distress syndrome. *Resuscitation* 26:183-192.
36. Cox, G., T. Ohtoshi, C. Vancheri, J. A. Denburg, J. Dolovich, J. Gauldie, and M. Jordana. 1991. Promotion of eosinophil survival by human bronchial epithelial cells and its modulation by steroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:525-531.
37. Zhang, L., A. E. Redington, and S. T. Holgate. 1994. RANTES: a novel mediator of allergic inflammation? *Clin Exp Allergy* 24:899-904.
38. Imai, T., T. Yoshida, M. Baba, M. Nishimura, M. Kakizaki, and O. Yoshie. 1996. Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem* 271:21514-21521.
39. Sekiya, T., M. Miyamasu, M. Imanishi, H. Yamada, T. Nakajima, M. Yamaguchi, T. Fujisawa, R. Pawankar, Y. Sano, K. Ohta, A. Ishii, Y. Morita, K. Yamamoto, K. Matsushima, O. Yoshie, and K. Hirai. 2000. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 165:2205-2213.
40. Gosset, P., I. Tillie-Leblond, A. Janin, C. H. Marquette, M. C. Copin, B. Wallaert, and A. B. Tonnel. 1995. Expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on bronchial biopsies from allergic and non-allergic asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 106:69-77.
41. Xu, Y. X., K. R. Pindolia, N. Janakiraman, R. A. Chapman, and S. C. Gautam. 1997. Curcumin inhibits IL1 alpha and TNF-alpha induction of AP-1 and NF-kB DNA-binding activity in bone marrow stromal cells. *Hematopathol Mol Hematol* 11:49-62.

42. Wei, S., M. W. Wang, S. L. Teitelbaum, and F. P. Ross. 2002. Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 277:6622-6630.
43. Mattes, J., M. Yang, S. Mahalingam, J. Kuehr, D. C. Webb, L. Simson, S. P. Hogan, A. Koskinen, A. N. McKenzie, L. A. Dent, M. E. Rothenberg, K. I. Matthaei, I. G. Young, and P. S. Foster. 2002. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *J Exp Med* 195:1433-1444.
44. Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J. J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, B. Das Mahapatra, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchereau, and S. Lebecque. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183:2593-2603.
45. McGeachy, M. J., and D. J. Cua. 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28:445-453.
46. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.
47. Prause, O., M. Laan, J. Lotvall, and A. Linden. 2003. Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GCP-2-, GRO-alpha- and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 462:193-198.
48. Molet, S., Q. Hamid, F. Davoine, E. Nutku, R. Taha, N. Page, R. Olivenstein, J. Elias, and J. Chakir. 2001. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 108:430-438.

49. Linden, A. 2001. Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 126:179-184.
50. Barczyk, A., W. Pierzchala, and E. Sozanska. 2003. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* 97:726-733.
51. Hata, K., A. Andoh, M. Shimada, S. Fujino, S. Bamba, Y. Araki, T. Okuno, Y. Fujiyama, and T. Bamba. 2002. IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G1035-1044.
52. Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard, and A. O'Garra. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147:3815-3822.
53. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
54. Zuany-Amorim, C., S. Haile, D. Leduc, C. Dumarey, M. Huerre, B. B. Vargaftig, and M. Pretolani. 1995. Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J Clin Invest* 95:2644-2651.
55. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L. L. Moldawer. 2002. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med* 30:S58-S63.
56. Kasama, T., R. M. Strieter, N. W. Lukacs, M. D. Burdick, and S. L. Kunkel. 1994. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol* 152:3559-3569.
57. Riley, J. K., K. Takeda, S. Akira, and R. D. Schreiber. 1999. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for

anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274:16513-16521.

58. Croker, B. A., D. L. Krebs, J. G. Zhang, S. Wormald, T. A. Willson, E. G. Stanley, L. Robb, C. J. Greenhalgh, I. Forster, B. E. Clausen, N. A. Nicola, D. Metcalf, D. J. Hilton, A. W. Roberts, and W. S. Alexander. 2003. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 4:540-545.
59. Fueki, N., H. Sagara, K. Akimoto, M. Ota, T. Okada, K. Sugiyama, M. Fueki, S. Makino, and T. Fukuda. 2007. Interleukin-10 regulates transforming growth factor-beta signaling in cultured human bronchial epithelial cells. *Respiration* 74:454-459.
60. Tournoy, K. G., J. C. Kips, and R. A. Pauwels. 2000. Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* 30:775-783.
61. Striz, I., T. Mio, Y. Adachi, R. A. Robbins, D. J. Romberger, and S. I. Rennard. 1999. IL-4 and IL-13 stimulate human bronchial epithelial cells to release IL-8. *Inflammation* 23:545-555.
62. Kawaguchi, M., F. Kokubu, H. Kuga, S. Matsukura, H. Hoshino, K. Ieki, T. Imai, M. Adachi, and S. K. Huang. 2001. Modulation of bronchial epithelial cells by IL-17. *J Allergy Clin Immunol* 108:804-809.
63. Hellings, P. W., A. Kasran, Z. Liu, P. Vandekerckhove, A. Wuyts, L. Overbergh, C. Mathieu, and J. L. Ceuppens. 2003. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:42-50.
64. Chakir, J., J. Shannon, S. Molet, M. Fukakusa, J. Elias, M. Laviolette, L. P. Boulet, and Q. Hamid. 2003. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* 111:1293-1298.

65. Chung, K. F., H. J. Patel, E. J. Fadlon, J. Rousell, E. B. Haddad, P. J. Jose, J. Mitchell, and M. Belvisi. 1999. Induction of eotaxin expression and release from human airway smooth muscle cells by IL-1beta and TNFalpha: effects of IL-10 and corticosteroids. *Br J Pharmacol* 127:1145-1150.
66. Newton, R., N. S. Holden, M. C. Catley, W. Oyelusi, R. Leigh, D. Proud, and P. J. Barnes. 2007. Repression of inflammatory gene expression in human pulmonary epithelial cells by small-molecule I kappa B kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 321:734-742.
67. Schottelius, A. J., M. W. Mayo, R. B. Sartor, and A. S. Baldwin, Jr. 1999. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappa B kinase activity and nuclear factor kappa B DNA binding. *J Biol Chem* 274:31868-31874.

