

2018 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090011

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 探討 CHI3L1 對 M1 巨噬細胞極化及其功能
之影響

得獎獎項 大會獎：三等獎
美國 ISEF 正選代表

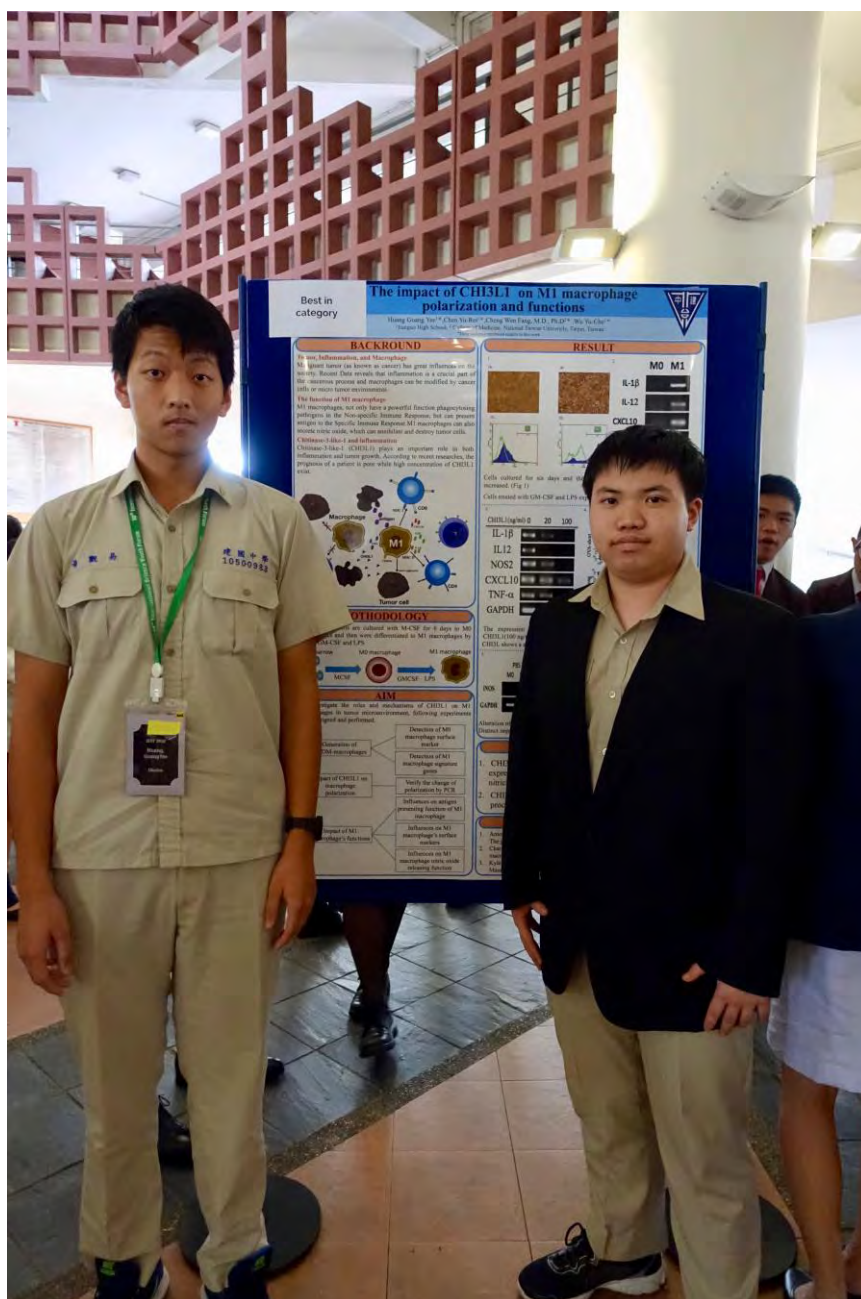
就讀學校 臺北市立建國高級中學

指導教師 鄭文芳、吳雨哲

作者姓名 黃觀易、陳昱睿

關鍵詞 巨噬細胞極化、M1 巨噬細胞、CHI3L1

作者簡介



能夠提前體驗當研究生的生活 對我們高中生來說絕對是一個夢寐以求的機會。過程中當然會有很多幻想破滅，但更多的是前所未聞的樂趣。過去一年來經歷了各種磨礪，雖然很累（常常在奇怪的時間出入實驗室），但我們確實從中學到了很多，無論是做實驗的技巧、做研究應有的態度還是最重要的——發現問題的能力。相信這一切都會幫助我們在未來的路上走的更順、走得更遠。

摘要

癌症多年來高居國人十大死因之首，過去研究顯示慢性發炎與癌症生成密切相關。在發炎反應中巨噬細胞的角色相當關鍵，但在腫瘤微環境下反而幫助腫瘤細胞生長。CHI3L1 廣泛表現在腫瘤組織與發炎相關的疾病，在發炎中可能調控不同的免疫相關細胞。因此我們想探討 CHI3L1 在腫瘤微環境中的功能，研究 CHI3L1 是否影響巨噬細胞之極化及其他後續功能。結果證實有 CHI3L1 存在時，巨噬細胞無法正常表現 M1 巨噬細胞之特徵基因，且其濃度越高，特徵基因表現量就越低。而利用巨噬細胞抗原呈現試驗也發現 CHI3L1 會降低 M1 巨噬細胞的抗原呈現能力。綜合以上結果，得知 CHI3L1 會導致 M1 巨噬細胞功能缺失。未來將探討 CHI3L1 如何調控巨噬細胞內的分子機轉，並尋找小分子藥物阻斷 CHI3L1 的作用，期待對腫瘤合併治療有所幫助。

Abstract

Cancer has been the leading cause of death for many years. In recent studies, scientists found that tumor is highly associated with inflammation; furthermore, macrophage, which plays an important role in inflammatory response, is found to be interfered by the other factors and may support the growth of tumor. CHI3L1 is a protein that can be found in a large amount in tumor micro environments, so we want to investigate whether this protein affects polarization and other functions of macrophages.

In our study, we found out that with the addition of CHI3L1, the functions of M1 macrophages were suppressed, including the suppression of signature genes' expressions and antigen presentation-related molecules. CHI3L1 could also decline the ability of antigen up taking and processing of M1 macrophages, which leads to inferior activations of M1 macrophages to CD4 and CD8 T cells. Furthermore, we infer that CHI3L1 could activate several signaling pathways in M1 macrophages, p-AKT, p-ERK, p-JNK, p-STAT3. The major signaling pathways in M1 macrophage would be tested in further studies.

壹、前言

一、文獻探討

(一) 腫瘤 (tumor) 與發炎反應 (Inflammation)

癌症 (即惡性腫瘤或肉瘤) 多年來一直高居國人十大死因之首, 是國人健康最大的威脅。105 年國人癌症死亡人數為 4 萬 7,760 人, 占總死亡人數之 27.7%, 平均每日死亡數 130 人; 其中男性為 2 萬 9,215 人, 女性為 1 萬 8,545 人。癌症相關的醫療費用超過健保全部花費十分之一以上, 所造成對國家、社會、家庭及個人的影響甚大。癌症相關的研究、教學、醫療及服務是台大醫院重要的任務。政府亦於 2003 年 5 月 21 日通過「癌症防治法」, 大力推動癌症相關之措施。(105 年衛生福利部統計資料)

腫瘤在醫學上是指細胞的異常病變, 這一種病變使身體部分細胞有不受控制的增生, 接著集結成為腫塊。腫瘤細胞與正常細胞相比, 有結構、功能和代謝的異常, 它們具有超過正常的增生能力, 這種增生和機體不相協調。過去相信癌症基本上是由於細胞突變或是某些致癌基因 (oncogene) 功能失控所造成, 但最近數十年, 越來越多分子、細胞或免疫機轉層面的研究已直接地顯示發炎作用也與癌症密切相關。近期研究數據充分闡明了發炎作用是癌化過程中之重要關鍵部分, 並提出許多腫瘤的起源點與病原菌、病毒或其他許多生化因子造成之感染、慢性刺激及發炎的組織部位有關。在腫瘤微環境中之發炎細胞也被證實可促進癌細胞之細胞增生、存

活、移行侵略以及血管新生，因此可促進腫瘤之發展。



圖一、102 年台灣十大疾病及死亡率

(二) 發炎反應 (Inflammation) 與巨噬細胞 (macrophage)

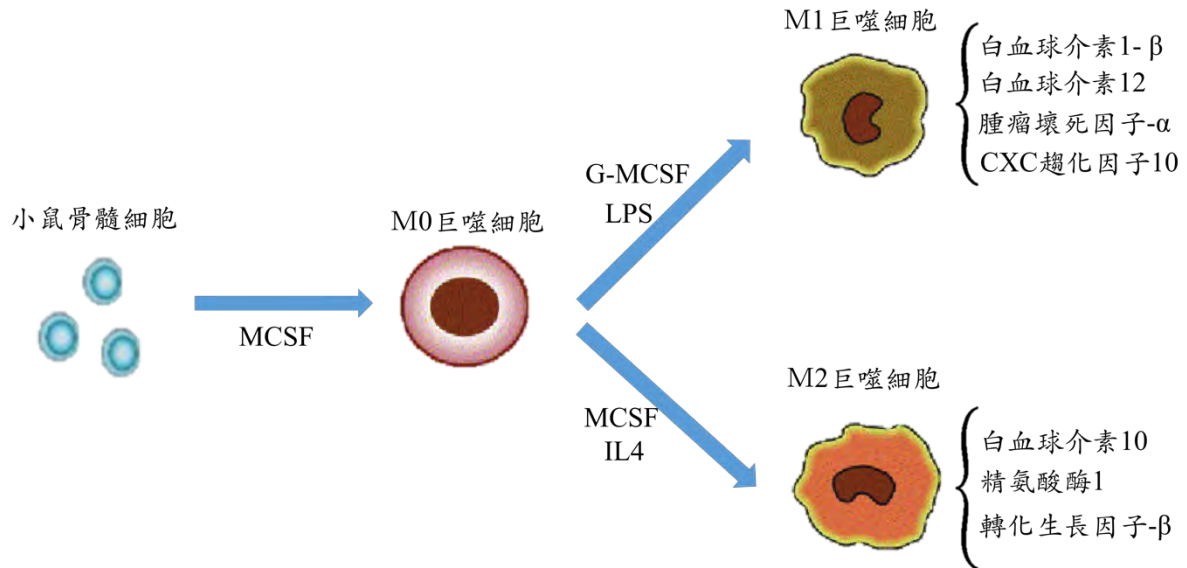
在免疫反應中，巨噬細胞扮演一個相當重要的角色，巨噬細胞在免疫反應過程中，在不同的階段都有參與，它先吞噬抗原，被刺激後釋放細胞激素，並可以呈現抗原給 T-細胞。雖然巨噬細胞之前被認為具有抑制腫瘤作用之免疫細胞，然而卻有研究發現癌細胞與週遭環境中的發炎細胞（或白血球）有交互作用。中央研究院之研究中就曾經發現在肺癌病人腫瘤組織中，若發炎之巨噬細胞數目愈高，則病人存活情況變差且癌細胞較容易發生轉移。而在腫瘤組織中，他們亦同樣發現巨噬細胞數愈多，其腫瘤血管的新生也愈多。若將腫瘤細胞與巨噬細胞一起培養，腫瘤細胞會被

活化，使腫瘤細胞更容易跑出去，且腫瘤細胞的侵襲能力也明顯增加。再參照其他實驗結果，已有足夠的證據顯示巨噬細胞可被癌細胞或腫瘤微環境更改，促進腫瘤細胞之生長、腫瘤血管的新生，甚至促進癌細胞的轉移。(楊寧蓀, 2008)

(三) 巨噬細胞極化 (Polarization of Macrophage)

巨噬細胞是由骨髓細胞經巨噬細胞株刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 分化而來，而巨噬細胞的極化作用會產生兩種型態 (subtype)：古典活化巨噬細胞(classical activated macrophage, M1)和替代活化巨噬細胞(alternatively activated macrophage, M2)。M1 這種殺手巨噬細胞受到如干擾素- γ (Interferon- γ ,IFN- γ)、脂多醣 (Lipopolysaccharide,LPS) 以及顆粒球巨噬細胞株刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 等分子的活化，其目的是快速將入侵體內的病原體吞噬並分解，會產生促發炎反應的細胞激素且刺激免疫反應，抑制腫瘤生長；而 M2，被白血球介素 4 (Interleukin-4, IL-4) 以及巨噬細胞株刺激因子 M-CSF (M-CSF) 刺激而極化的巨噬細胞就是泛稱的結構修補巨噬細胞，參與傷口癒合、組織修補、血管生成及改變基質環境 (matrix remodeling)。M2 巨噬細胞可以製造像白血球介素 10 之類的抗發炎細胞激素，一種可以避免免疫系統受到傷害的激素。根據參考

文獻所述，越到癌症末期，腫瘤相關巨噬細胞(Tumor-associated macrophage, TAM)的組成就越趨向 M2，且 M2 會透過改變環境積極地促進腫瘤生長。(Antonio Sica, 2012)



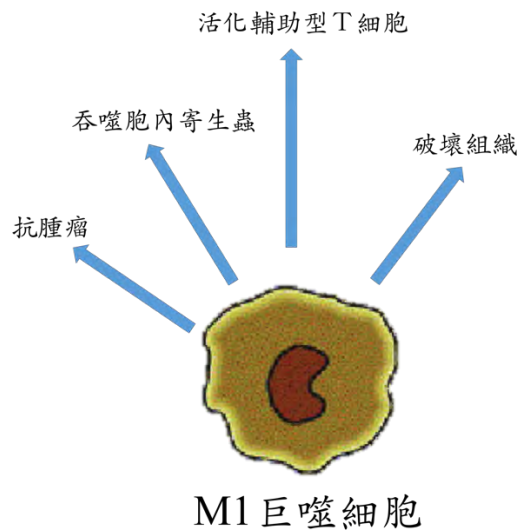
圖二、巨噬細胞之極化現象以及其極化後之特徵蛋白

(四) M1 巨噬細胞的功能

M1 巨噬細胞作為發炎階段的主要吞噬白血球，負責清除病原體、胞內寄生蟲、突變的細胞（包含癌細胞）、體內損傷處組織以及細胞的壞死碎片等，因此也是很好的清道夫。M1 巨噬細胞為抗原呈現細胞

(Antigen-presenting cell, APC)，可將吞噬後的抗原呈現並且釋出白血球介素 1 (IL-1) 吸引輔助型 T 細胞 (helper T cell, Th cell) 前來接收，再由輔助型 T 細胞分泌白血球介素 2 (IL-2) 刺激 B 細胞和毒殺型 T 細胞 (Cytotoxic T cell, CTL) 活化，由此可知 M1 巨噬細胞除了在非專一性免

疫中發揮吞噬病原體的強大功用，也在專一性免疫中扮演先驅者及指揮者的角色。除此之外，M1 巨噬細胞還能刺激其他組織內皮細胞產生發炎反應，以及分泌一氧化氮 (nitric oxide)，可破壞腫瘤細胞而將其殺死或停止其繁殖。(Paola Italiani , 2014)



圖三、M1 巨噬細胞之功能

(五) 主要組織相容性複合物與巨噬細胞

主要組織相容性複合物 (major histocompatibility complex, MHC) 是一種細胞表面醣蛋白複合物，人類的 MHC 醣蛋白，又稱為人類白血球抗原群 (human leukocyte antigens, HLA) ,最初是因為研究皮膚的移植和排斥反應被發現。人類的 MHC 蛋白可以分為兩大類：第一型 MHC 分子 (MHC class I) 和第二型 MHC 分子 (MHC class II)，前者位於個體中所有有核的細胞上，後者則只分布在抗原呈現細胞 (antigen-

presenting cell, APC) 上，例如巨噬細胞、B 細胞等。第一型 MHC 分子使得被病原體感染的一般細胞能將抗原呈現給毒殺型 T 細胞 (cytotoxic T cell, TCL) 讓細胞毒殺免疫反應 (cell-mediated immune) 能正常運作。

至於第二型 MHC 分子，和它結合的胜肽並不是來自於細胞質，而是來自於胞吞作用 (endocytosis) 後攝入再被降解的蛋白質。當第二型 MHC 分子仍在內質網組裝時，與其胜肽結合的溝槽會先被自身的胜肽鏈阻擋住，防止其與內生的蛋白質或來自細胞質降解的蛋白質結合；而當其被運送到高基氏體，並與來自溶體裝有降解後蛋白質的囊泡結合後，其原先阻擋溝槽的胜肽部分才會被切除，最後再送至細胞膜表面呈現。

(科技部高瞻自然科學教學資源平台, 2013)

(六) CHI3L1 與發炎反應

該醣蛋白全名為 Chitinase-3-like protein 1 (YKL40)，是一種分泌型醣蛋白，其大小大約為 40 千道爾頓，是由 CHI3L1 基因轉譯而來。

CHI3L1 在 1992 年被找到，YKL40 之命名由來是由於他從細胞中分泌出來的蛋白質結構中氮端的最後三個氨基酸的縮寫為 Y (Tyrosine) K (Lysine) L (Leucine) 且其分子量為 40 千道爾頓。很多種細胞型態的細胞會分泌 CHI3L1，像是巨噬細胞 (macrophages), 軟骨細胞 (chondrocytes), 類纖維母細胞的滑膜細胞 (fibroblast-like synovial cells)、血管平滑肌細胞

(Vascular smooth muscle cells)、肝星狀細胞 (hepatic stellate cells) 等，雖然結構類似幾丁質酶，本身卻無任何酵素的機能與作用，但在發炎反應和組織修復中皆扮演一個重要的角色。常作為調控主因而見於以下五種反應：細胞分化、細胞存活、細胞成長、發炎反應失衡、腫瘤生長，過去的研究顯示，CHI3L1 可能促進單核球 (monocytes)、軟骨細胞 (chondrocytes)、血管平滑肌細胞 (Vascular smooth muscle cells) 的分化並且會促使軟骨細胞 (chondrocytes)、滑膜細胞 (synovial cells) 及纖維母細胞 (fibroblasts) 的生長，CHI3L1 可以在乳房退化中界定哪些細胞需要被保留下來並且在細胞自噬中給予保護，過去大量的研究結果證實高濃度的 CHI3L1 與乳癌、大腸癌、卵巢癌的預後差有高度相關性。

(Stephania Libreros, 2015)

二、研究動機

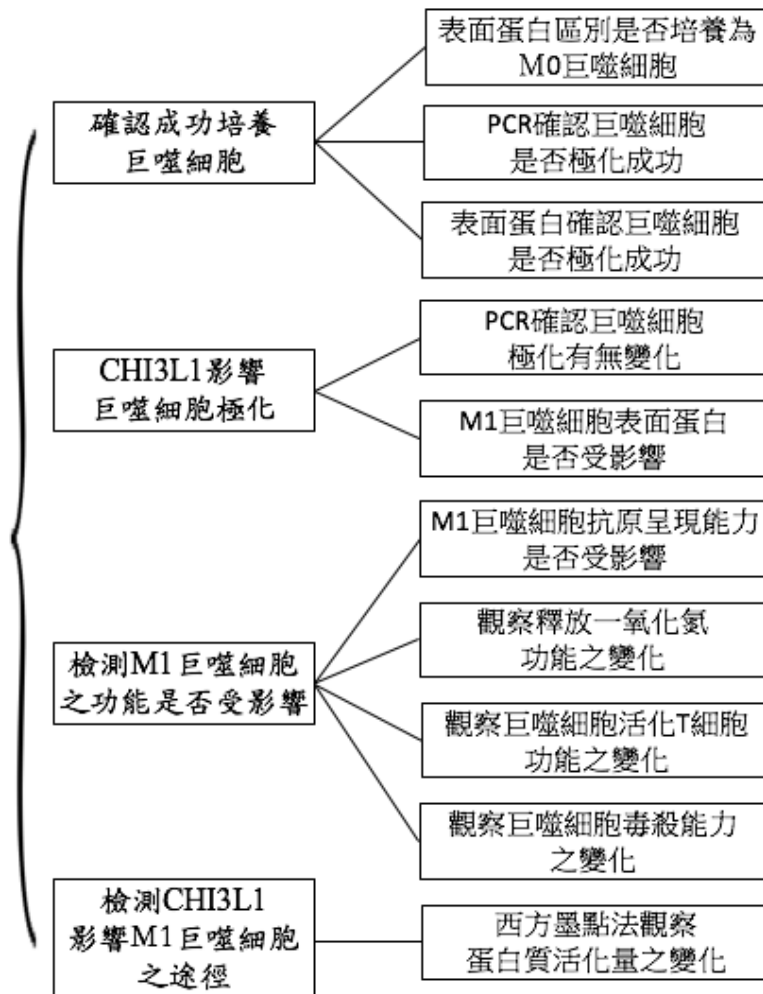
目前癌症的治療方式有化學治療、放射治療、手術開刀以及最近興起的免疫治療。在病人的身上，免疫力的好壞與預後息息相關，然而免疫治療卻常常遇到免疫反應在腫瘤微環境下都處於抑制的狀況。我們從文獻中得知腫瘤微環境長期處於慢性發炎反應之下，因此腫瘤的分泌物很可能透過各種分泌物去達成免疫抑制，而在發炎反應中，巨噬細胞佔有非常重要的角色。近年來也有研究顯示，腫瘤微環境中的巨噬細胞會幫助腫瘤生長與抑制免疫反應，因此我們希望透過探

討論腫瘤是否調控巨噬細胞極化的改變，對於腫瘤微環境中免疫反應的影響，以便將來結合免疫治療應用。

三、研究目的

我們想研究 CHI3L1 在癌症組織中大量生成後，對於腫瘤微環境中巨噬細胞的極化可能造成的改變，檢驗這種改變對於巨噬細胞的功能是否有受到影響，並且透過了解相關分子機轉，以期能尋求可能的藥物在臨床上應用。

貳、研究方法與過程



一、細胞培養

將骨髓細胞培養於底面積 2 平方公分的培養盤 (6 well dish) 中，置於含 5 % 二氧化碳，37 °C 培養箱中。每隔兩天加入不同濃度的 CHI3L1，使其濃度恆定，模擬腫瘤微環境中的狀況，並於第六天加入顆粒球巨噬細胞株刺激因子 (GM-CSF) 與脂多糖 (LPS) 使巨噬細胞分化。在第七天收取細胞以供後續不同實驗使用。

二、RNA 萃取

除去培養皿中的培養液後，加入 1 ml 的 TRIzol 試劑，然後將貼附在培養皿底部細胞以刮棒刮破。接著在含有細胞的 TRIzol 裝入至 1.5ml 微量離心管中，然後加入 0.2 ml 氯仿 (使用每 1ml TRIzol 加 0.2ml 氯仿的比率)，激烈震盪 15 秒鐘 (使其成粉乳色)，再以 15000 rpm 於 4°C 離心 15 分鐘，液體會分成三層 (氯仿層，中間層，顏色較淡的水層)，而 RNA 存在最上面的水層。將最上面的水層液體吸出 400 μ l，放入新的微量離心管中，而後加入等量之異丙醇並靜置 10 分，接著用 4°C、15000rpm 高速離心 15 分鐘以沉澱 RNA，離心後在離心管的底部會有 RNA 沉澱。吸掉上清液，然後加入 1ml 的 75% 乙醇清洗 RNA 沈澱物 (以碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水配置)，在 4°C 離心 15000 rpm 5 分鐘以沉澱 RNA，並除去乙醇溶液。將 RNA pellet 短暫乾燥 5-10 分鐘直到透明，但是不能完全乾燥，然後加入 DEPC 處理過的水溶解 (依 pellet 大小調整水

量)，並保存在 -80°C 冰箱中。

三、反轉錄聚合酶連鎖反應 (**reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR**)

此部分是要利用反轉錄酵素將萃取出來的 RNA 經反轉錄作用合成 cDNA。首先將萃取出 RNA 溶液共 $21\ \mu\text{l}$ (含 $5\ \mu\text{g}$ RNA) 加入至微量離心管中，並加入 $5\times$ RT-Buffer $8\ \mu\text{l}$ 、Enzyme mix $11\ \mu\text{l}$ ，總體積共 $40\ \mu\text{l}$ 。放入機器中加熱到 37°C 兩小時，再加熱到 70°C 十分鐘以終止反應，冷卻到 4°C 五分鐘。最後從機器中取出 cDNA，再放入 -20°C 冰箱保存。

四、聚合酶連鎖反應 (**Polymerase chain reaction, PCR**)

此步驟之目的在於透過專一性的引子的結合，去放大我們想確認在細胞中的特殊基因片段，了解這些基因在細胞中的表現量高低。首先在微量離心管中加入水和 cDNA 共 $13.8\ \mu\text{l}$ (含 $5\ \text{ng}$ cDNA)，再加入 dream taq buffer 及 dNTP 各 $2\ \mu\text{l}$ 、二甲基亞砷(DMSO) $0.5\ \mu\text{l}$ ，最後加入 taq 聚合酶 $0.2\ \mu\text{l}$ 及引子溶液 $1.5\ \mu\text{l}$ 。接著放入 PCR 機中，首先加熱到 94°C ，6 分鐘(將 DNA 的兩股分離)，接著降溫到 58°C 30 秒 (引子接到 DNA 的一股)，最後加熱至 72°C ，8 分鐘 (鹼基接到引子後方進行延伸)。此過程一共需重複約 30 次，完成後放入 -20°C 冰箱保存。

(一) 引子 (primer)

由於實驗中我們使用聚合酶鏈鎖反應以確認細胞是否培養成功，因此我們選擇了幾個較為重要的引子作為評斷依據。

1. 腫瘤壞死因子- α 基因 (Tumor necrosis factor α gene, TNF α gene)

由此基因轉錄而成的蛋白質——腫瘤壞死因子 α ——的主要作用是調節免疫細胞的功能。它能夠促使發熱，引起細胞凋亡及發炎，阻止腫瘤發生及病毒複製。

2. 白血球介素 12 基因 (Interleukin 12 gene, IL-12 gene)

由此基因轉錄而成的蛋白質是白血球介素 12，可活化 T 淋巴細胞 (T cell) 以及自然殺手細胞 (Natural killer cell, NK cell)，同時刺激此二種細胞產生干擾素- γ (Interferon gamma, IFN γ)。

3. CXC 趨化因子 10 基因 (C-X-C motif chemokine 10 gene, CXCL10 gene)

由此基因轉錄而成的蛋白質是 CXC 趨化因子 10。其功能包括對 T 細胞和單核細胞的細胞趨化作用、促進 T 細胞黏附於內皮細胞以及抗腫瘤。

4. 白血球介素 1- β 基因 (Interleukin 1 beta, IL1- β)

由此基因轉錄而成的蛋白質是白血球介素 1- β ，它可以活化 B 細胞 (B cell)，並刺激自然殺手細胞的細胞毒殺作用。

5. 誘導型一氧化氮合酶基因 (Nitric oxide synthase 2, iNOS)

由此基因轉錄而成的蛋白質是誘導型一氧化氮合酶，iNOS 在正常情況下並不表現，但當由干擾素- γ (Interferon- γ , IFN γ) 活化時，會釋放

大量的一氧化氮。

6. 甘油醛-3-磷酸脫氫酶基因 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)

由此基因轉錄而成的蛋白質是糖酵解反應中的一個酶——甘油醛-3-磷酸脫氫酶。此基因幾乎在所有組織中都具有高表現量，在各種細胞中表達量一般是恆定的，因此也作為管家基因 (house keeping gene)，也做為實驗的基本控制組。(來自 GeneCards)

五、膠體電泳 (Gel Electrophoresis)

電泳 (electrophoresis) 是指在均勻的電場作用下，帶電荷的分子在流體中發生移動的現象。電泳進行時，常會放入基質 (matrix) 來協助更有效率地分離各分子。基質是指具有多孔隙 (porosity) 的固體物質，常用的有瓊脂膠體 (agarose gel) 、聚丙烯醯胺膠體 (polyacrylamide gel) 等，而本研究所用之基質為瓊脂膠體。將各分子置於基質內，再通上電流，此時分子若帶負電會向陽極移動，若帶正電則往陰極移動，其移動的速率受到各分子的大小、形狀及電荷等物理性質的影響，故可將不同的分子分開來，因此科學家常用來分析分子間的差異性，也利用作為純分子的製備技術之一，而本研究將膠體電泳用於檢測 DNA 分子的表現量及大小，DNA 中含有磷酸根，在中性和鹼性環境下帶負電荷，在電場中會往正極移動。

首先計算計算所需的瓊脂膠體 (agarose) 量，一片膠體需要約 45~50ml 的 TAE 緩衝液 (TAE buffer) 加 0.8~1% 的瓊脂膠體 (agarose)，用秤量紙秤取瓊脂膠體 (agarose) 並倒入一燒杯，再加入所需的 TAE 緩衝溶液，並放入微波爐加熱使其完全溶解。溶解後，稍微降溫至攝氏 50~60 度，在燒杯中加入溴化乙錠 (為一種核酸螢光染劑，會嵌在 DNA 中，有致癌性，Ethidium bromide，ETBR，在 UV 照射下會發光) 每 50ml TAE 緩衝溶液加入 1 μ l 的溴化乙錠並搖勻，接著倒入鑄膠模中並插上尺梳 (comb)，使其產生井 (wells)。使其靜置 30~40 分鐘，完全凝固後即可拔掉尺梳。在跑好的 PCR 八連排 (20 μ l) 中加入 DNA 電泳染劑 (6x DNA gel loading dye) 4 μ l，以稀釋 6 倍，並且混合均勻，將此溶液吸取 6 μ l 的量加進膠上的井中，取 2 μ l 的一千鹼基對核酸分子量標準液 (1kb marker) 加進另一個 well 中作輔助判斷用。將膠體放進充滿 TAE 緩衝液的電泳槽並且蓋過膠體，插上電源，將電壓改為 120V，時間 40 分鐘。跑完後，將膠體放進紫外線箱，用紫外線檢測其表現量及大小。

六、流氏細胞儀 (Flow cytometer)

除去細胞培養液，接著拿康氏管放入已用鋁箔指包覆好的鐵架中並在管上標示好，在每個 well 加入 500 μ l 細胞等張溶液(PBS)將細胞培養液清洗乾淨，吸掉後每個 well 加入 200 μ l 胰蛋白酶(Trypsin EDTA)替代酶並放入細胞培養箱 5~10 分鐘，使貼附於培養基底的巨噬細胞脫離。用 50ml 離心管取 Flow Cytometry

Staining Buffer (FASCAN) 並且插在冰上，將 6 well 細胞培養盤取出後，在每個 well 中加入 500 μ l 的 FASCAN buffer 並將細胞均勻打下後置入事先標好組別的康氏管中，並且以 4 $^{\circ}$ C ,1300rpm, 3mins 離心，離心後除去管內液體，依據實驗組別需要，將全部細胞進行分管以利後續染色（溫度、轉速、時間同前）。拿不同螢光顏色的抗體（Fluorescein, FITC、pycoerythrin, PE、Phycoerythrin-cyanine5 conjugate, PECy5）以 100:2 配置好在每一管加 100 μ l 並混合均勻，放進 4 $^{\circ}$ C 冰箱靜置 30 分鐘讓螢光抗體與細胞表面抗原結合。取出後在每管加入 500 μ l FASCAN buffer 並離心，將倒掉管內多餘抗體液體（溫度、轉速、時間同前），在每一管加入 450 μ l FASCAN buffer 並混合均勻，接著使用流式細胞儀分析。

若要進行細胞內染色，則需在打下細胞後每離心 1500rpm、3 分鐘抽去上清液。接著在康試管中加入 300 μ l 的細胞通透液（Fixation/Permeabilization solution）並置於冰上 20 分鐘。隨後在管中加入 500 μ l 的緩衝液（Perm/Wash Buffer）及 100:2 配置之抗體，最後染色 30 分鐘。

七、抗原呈現實驗

本實驗所用之胜肽分為兩種：OVA(ovalbumin)短肽（OVA short peptide）和 OVA 長肽（OVA long peptide），其胺基酸序列如表一所示。最終實驗濃度為 1 μ g/ml 的 OVA 短肽和 10 μ g/ml 的 OVA 長肽，加入後稍微傾斜搖晃使其均勻覆蓋於各個培養盤中，放入細胞培養箱約 3 小時，拿出後吸除細胞培養液並且在每一個 well 中加入 500 μ l 的 PBS 清洗，把多餘的胜肽洗除。在每個 well 中加入

200 μ l 的胰蛋白酶替代酶並放入細胞培養箱 5~10 分鐘，使貼附於培養基底的巨噬細胞脫離。用 50ml 離心管取 Flow Cytometry Staining Buffer (FASCAN) 並且插在冰上，將 6 well 細胞培養盤取出後，在每個 well 中加入 500 μ l 的 FASCAN buffer 並將細胞均勻打下後置入事先標好組別的康氏管中，並且以 4 $^{\circ}$ C ,1300rpm, 3mins 離心，離心後除去管內液體，依據實驗組別需要，將全部細胞進行分管以利後續染色（溫度、轉速、時間同前）。拿不同螢光顏色的抗體（Fluorescein, FITC、pycoerythrin, PE、Phycoerythrin-cyanine5 conjugate, PECy5）以 100:2 配置好在每一管加 100 μ l 並混合均勻，放進 4 $^{\circ}$ C 冰箱靜置 30 分鐘讓螢光抗體與細胞表面抗原結合。取出後在每管加入 500 μ l FASCAN buffer 並離心，將倒掉管內多餘抗體液體（溫度、轉速、時間同前），在每一管加入 450 μ l FASCAN buffer 並混合均勻，接著使用流式細胞儀分析。

表一、OVA 長短肽之胺基酸序列

序列	
OVA long peptide	FITC- β -Ala-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH
OVA short peptide	FITC- β -Ala-Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu-OH

八、賴抗體之巨噬細胞毒殺作用

利用水浴槽以 37 °C 解凍腫瘤細胞之細胞株。以適量之 CTL 培養液(CTL medium)回溶。離心 1500 rpm，3 分鐘，隨後將上清液置換成新的 CTL 培養液(CTL medium)。將腫瘤細胞分裝到 96 孔盤中，接著加入針對此細胞株之抗體與巨噬細胞使其反應，並補入培養液使每一孔的體積皆為 200 μ l。反應 24 小時後加入冷光酵素 (Luciferase)，並以非侵入式活體分子影像系統(Caliper IVIS system)觀察巨噬細胞之毒殺情形。

九、巨噬細胞抗原呈現與 T 細胞 (T-cell) 之活化

利用水浴槽以 37 °C 解凍 T-cell，並以適量之 CTL 培養液(CTL medium)回溶。離心 1500 rpm，3 分鐘，隨後將上清液置換成新的 CTL 培養液(CTL medium)。將含有 T-cell 之培養液加到已經培養好的巨噬細胞中，並在反應 24 小時過後將培養液收集，接著把收集好之培養液加入已經培養好的腫瘤細胞株中(在 96 孔盤)，使其反應 24 小時。最後在細胞中加入 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)，並在 3 小時後以 MTT 試驗檢測 T 細胞是否被活化並具有抗腫瘤之功能。

十、 西方墨點法

(一) 蛋白質萃取

在細胞分化後，將細胞培養液換成不含血清的 RPMI1640 細胞培養液，並放入細胞培養箱一天。加 0、20、100 ng/ml 的 CHI3L1 到每一個六孔培養盤，放入細胞培養箱 15~30 分鐘，將細胞培養液移除，以磷酸塩緩

沖生理鹽水(phosphate buffered saline, PBS, Sigma)0.5ml/well 沖洗 2 次，加入 1 倍細胞裂解緩沖液(lysis buffer)，利用細胞刮杓刮破細胞，斜插在冰上 5~10 分鐘，將蛋白質收取至微量離心管，離心 4 度 C、12500 rpm、10 分鐘、取上部澄清液到另外以標注好的微量離心管中，保存於 80 度 C。

(二) 蛋白質定量

使用 BSA protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 偵測蛋白質濃度。先將 5x Bio Red protein assay 試劑以 1:4 與去離子水稀釋。在 96 孔盤內，每孔加入 200 μ l 的稀釋後試劑分別與不同濃度之 Bovine serum albumin standard (BSA) 標準品 (12.5, 62.5, 125, 250, 375, 500 μ g/ml) 及稀釋過蛋白質萃取樣品混勻反應 5 分鐘，以 Elisa Reader (Dynatech Laboratories, West Sussex, UK)，測定其吸光值。將各濃度標準品數值作為一條標準迴歸曲線，將蛋白質萃取樣品之吸光值代入標準曲線計算樣品蛋白質濃度以及定量 40 μ g/ μ l 的蛋白量。

(三) 蛋白質電泳

以 SDS-PAGE (聚丙烯醯胺凝膠電泳)進行分析。取已定量的蛋白質，加入 5 倍 protein loading dye，加熱至 95 $^{\circ}$ C 5 分鐘。將夾有 12% SDS-PAGE 的玻璃板固定於電泳槽內，並於槽內 10 注滿 1 X Running Buffer [10X TG-SDS Buffer (0.025M Tris+ 0.192M Glycine+ 0.1% SDS) 以二次去

離子水稀釋至 1X]，以上膠 60 伏特 60 分鐘，下膠 100 伏特 100 分鐘進行電泳。

(四) 轉印

取下電泳完成之膠片，於轉漬卡匣依序疊放沾濕海綿、濾紙、膠片、PVDF 膜 (Thermo)，需先浸泡甲醇活化，濾紙、海綿，夾緊並放入電泳轉漬槽，並加入 Transfer buffer [1L transfer buffer : 800ml 1X TG、200ml 甲醇，其中 10X TG (Tris 250mM+ Glycine 1.92M)以二次去離子水稀釋為 1X 後使用]，以 300mAh 轉漬 120 分鐘，使膠體的蛋白質轉印到 PVDF 膜。

(五) 免疫反應與呈色

將轉印膜以 5%脫脂牛奶進行 blocking，溶劑為 TBST [1X TBS Buffer (Tris-base 2M+NaCl 1M):Tween20=1000:1]，放上振動器，於室溫作用 1 小時。Blocking 完成後，加入一級抗體，放上振動器，於室溫作用 2 小時。移除一級抗體，利用 TBST buffer 室溫清洗共 3 次，加入二級抗體，放上振動器，於室溫作用 1 小時。最後利用 TBST buffer 室溫清洗共 3 次，將 PVDF 膜與 Western Lightning Plus ECL (WLP) 顯影劑反應。

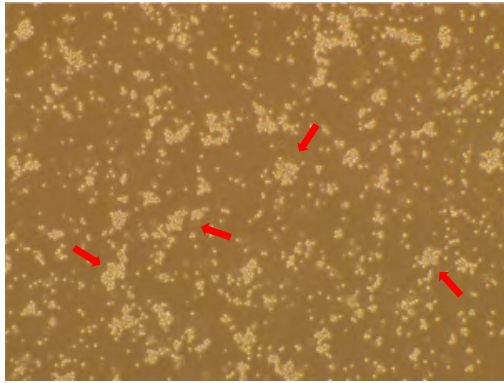
參、研究結果與討論

一、細胞培養

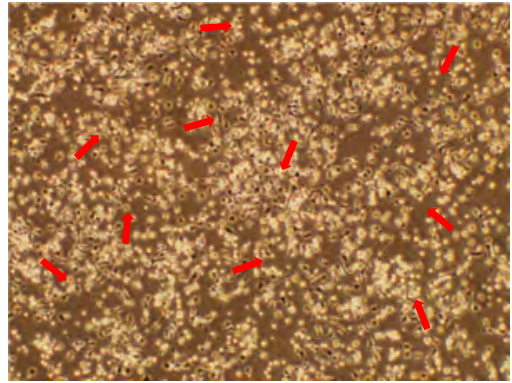
(一)骨髓細胞培養成巨噬細胞

觀察骨髓細胞在不同時間生長情形並拍照如下圖所示，在第一天的時候，所有的細胞呈現懸浮狀，如下圖四 A1。經過 6 天以巨噬細胞集落刺激因子 (M-CSF) 培養之細胞型態明顯與剛開始之細胞有所差異，呈現貼附於培養皿上，如下圖四 A2。接著我們利用流式細胞儀技術檢測培養不同天的骨髓細胞，其表面上巨噬細胞特定蛋白 F4/80 之整體表現量，由圖 B1 可以發現培養一天的骨髓細胞多數沒有表現 F4/80(圖四 B1)，經過 6 天以巨噬細胞集落刺激因子 (M-CSF) 培養之細胞則大量表現 F4/80(圖四 B2)，結果也顯示這種培養方式的確可以成功將骨髓細胞培養成巨噬細胞。

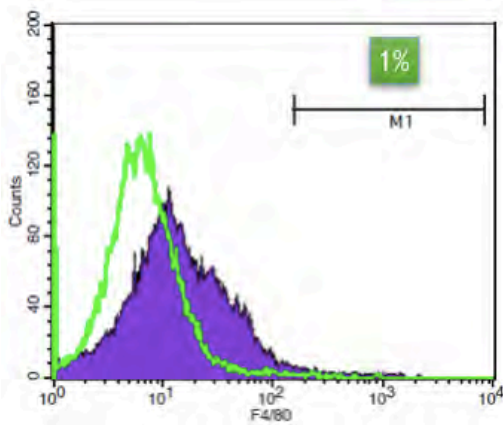
4A.



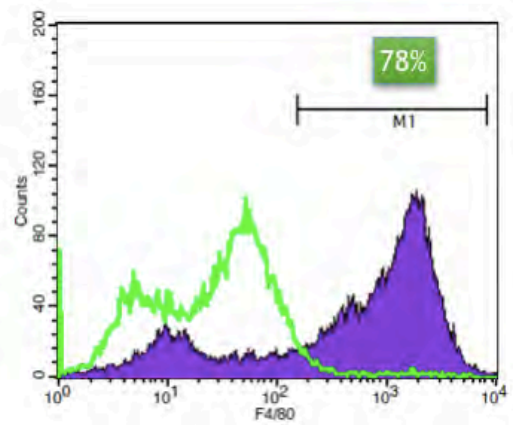
4B.



4C.



4D.



圖四、骨髓細胞與巨噬細胞型態觀察

4A.培養第0天骨髓細胞在顯微鏡下的型態，4B.培養第6天巨噬細胞在顯微鏡下的型態，4C.第0天細胞數對巨噬細胞表面標記的表現量，4D.第6天細胞數對巨噬細胞表面標記的表現量。綠線：同型抗體（控制組），以上圖片均由倒立顯微鏡放大40倍拍攝。

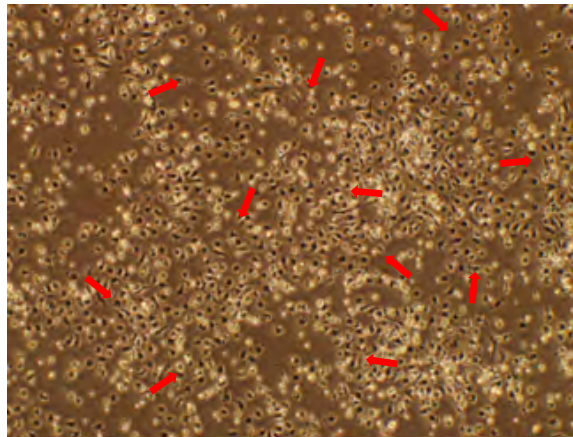
(二) 由M0巨噬細胞極化成為M1巨噬細胞

加入顆粒球巨噬細胞株刺激因子(GM-CSF,50ng/ml)及酯多糖

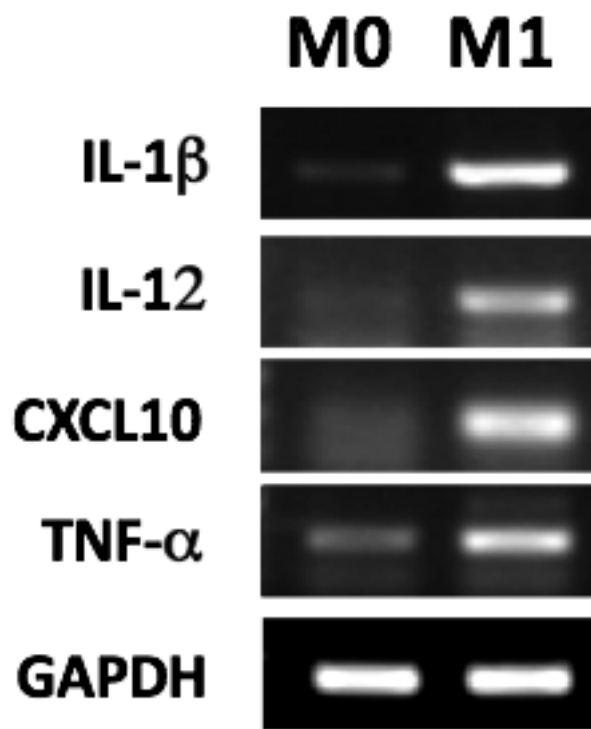
(LPS,50ng/ml)使巨噬細胞分化後，並以顯微鏡觀察細胞生長情形（如圖五

所示），顯示分化為M1巨噬細胞的細胞外型與M0巨噬細胞並無差別(圖

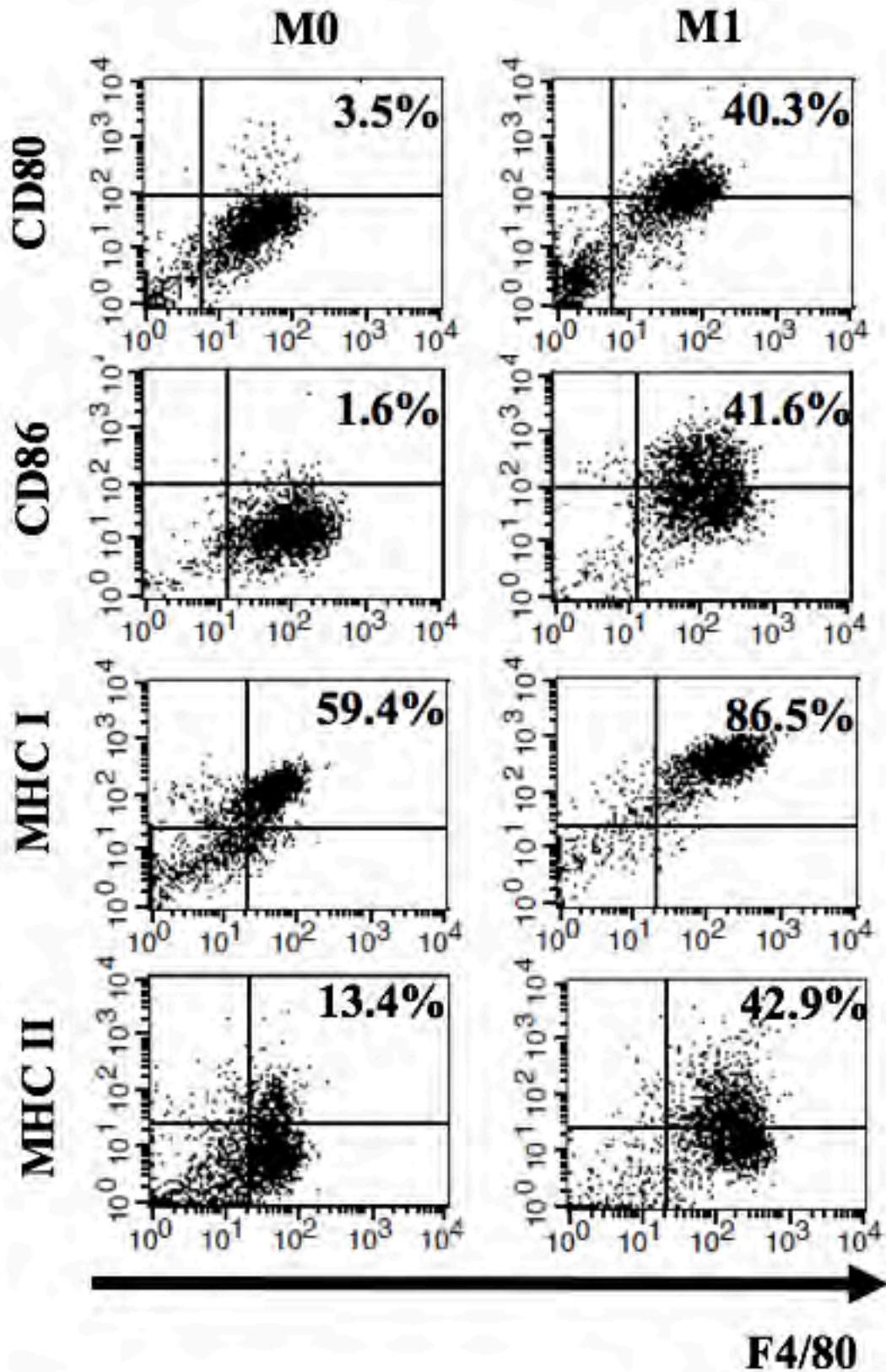
四 A2)。然後我們以 PCR 檢測其不同特徵基因之表現量。結果如圖六，M0 巨噬細胞經過脂多糖(LPS)及顆粒球巨噬細胞株刺激因子(GM-CSF)刺激後，明顯表現更多的M1 巨噬細胞特徵基因的 mRNA，包含了白血球介素 1- β 基因 (IL1- β gene)，白血球介素 12 基因(IL-12 gene), CXC 趨化因子 10 基因 (CXCL10 gene)，腫瘤壞死因子- α 基因(TNF- α gene)。同樣的，我們也使用流式細胞儀去分析比較受過極化刺激的 M1 巨噬細胞與原本的 M0 巨噬細胞在細胞表面特徵蛋白的改變，結果顯示 CD80、CD86、MHC I 和 MHC II 的表現量都是 M1 巨噬細胞比較高。



圖五、顯微鏡下M1 巨噬細胞之生長情形 (放大 40 倍)



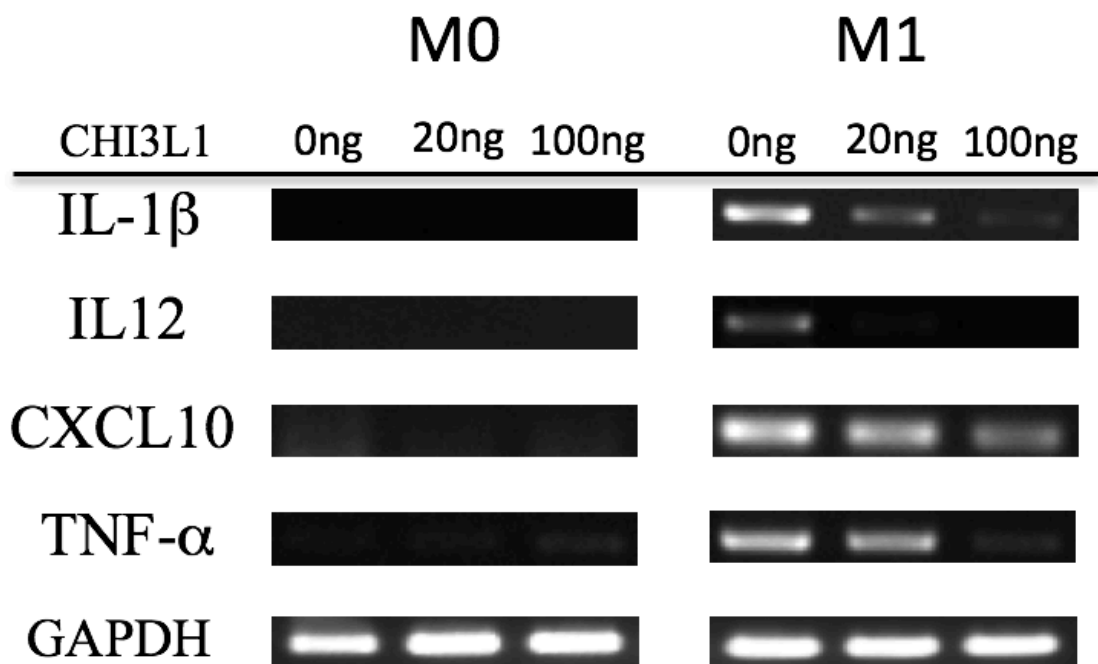
圖六、M0 巨噬細胞與 M1 巨噬細胞基因表現量之差異



圖七、M0 巨噬細胞與 M1 巨噬細胞之表面蛋白差異

二、外加 CHI3L1，觀察巨噬細胞極化之改變

在確定培養骨髓細胞成為巨噬細胞與分化 M1 巨噬細胞的流程順利後，我們下一步要確認 CHI3L1 是否會對巨噬細胞分化與極化有影響，因此我們在培養過程中外加不同濃度的 CHI3L1 進行實驗。然後我們再以 PCR 檢測以兩種不同的 CHI3L1 濃度 (20ng/ml 和 100ng/ml) 培養細胞中 M1 巨噬細胞特徵基因的表現量是否會受到改變，實驗結果如圖九所示。M1 的特徵基因白血球介素 1- β 基因 (IL-1 β gene)、白血球介素 12 基因 (IL-12 gene)、CXC 趨化因子 10 基因 (CXCL10 gene) 與腫瘤壞死因子基因 (TNF- α gene) 的表現量受到 CHI3L1 的抑制，且有隨著濃度提升而增強影響效果的趨勢。

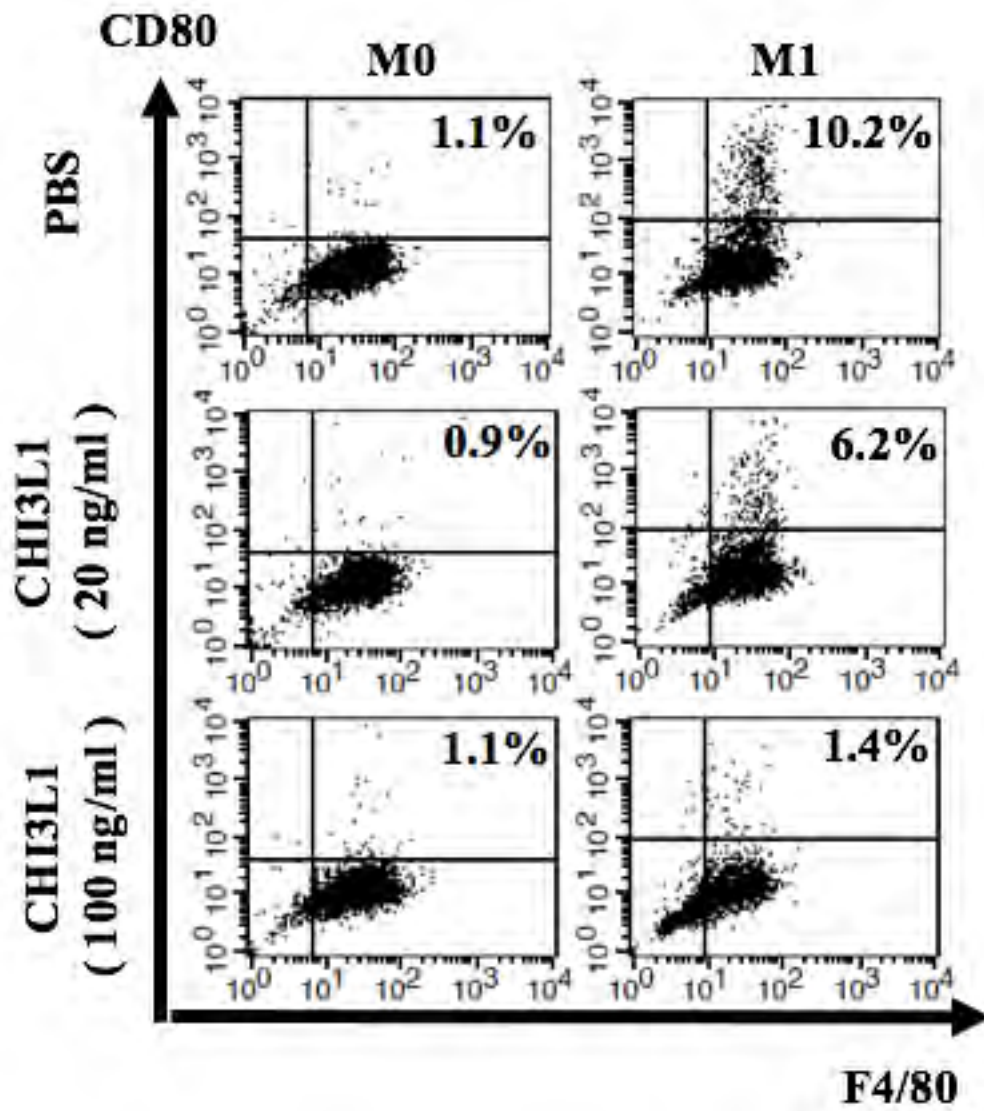


圖八、巨噬細胞在外加不同濃度的 CHI3L1 時，基因表現量的差異

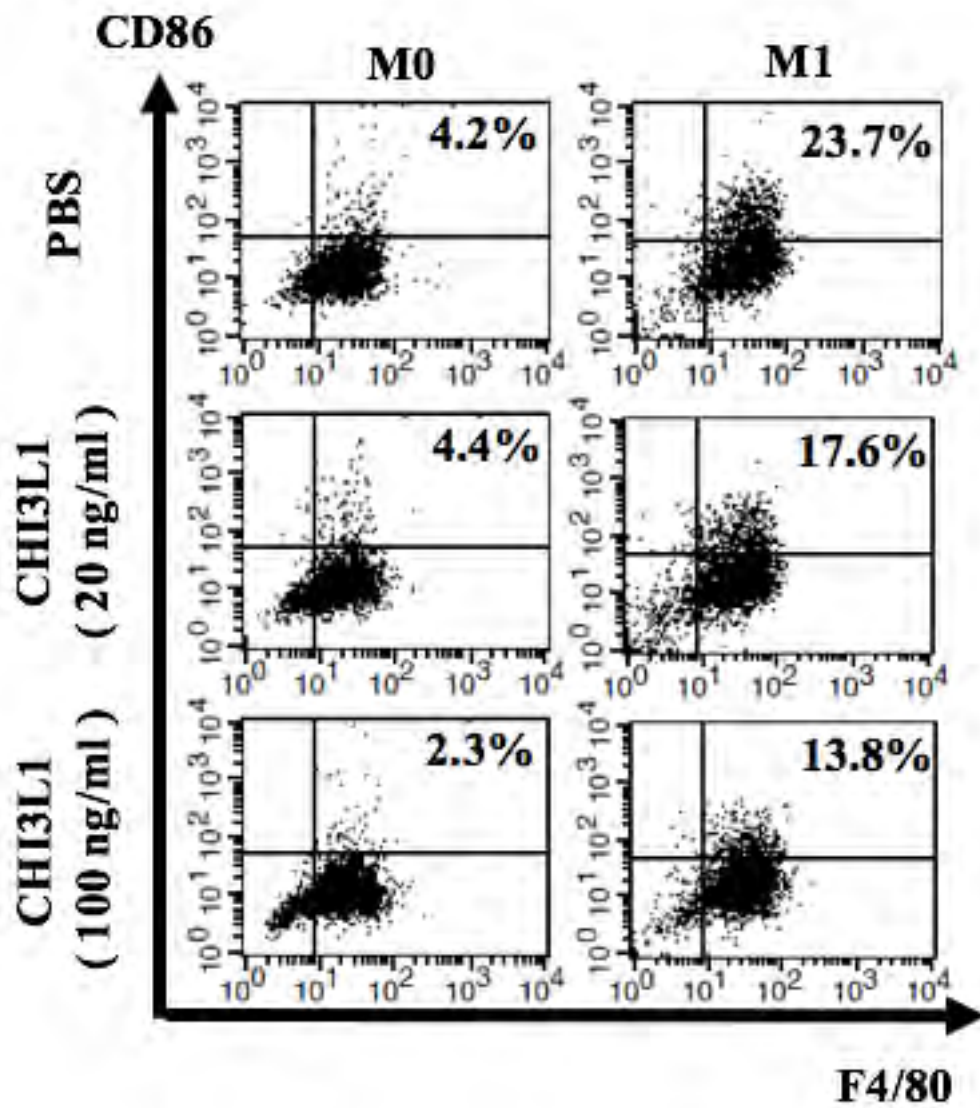
三、外加 CHI3L1，觀察巨噬細胞表面蛋白之改變

(一) 利用流式細胞儀觀察表面蛋白表現量之改變

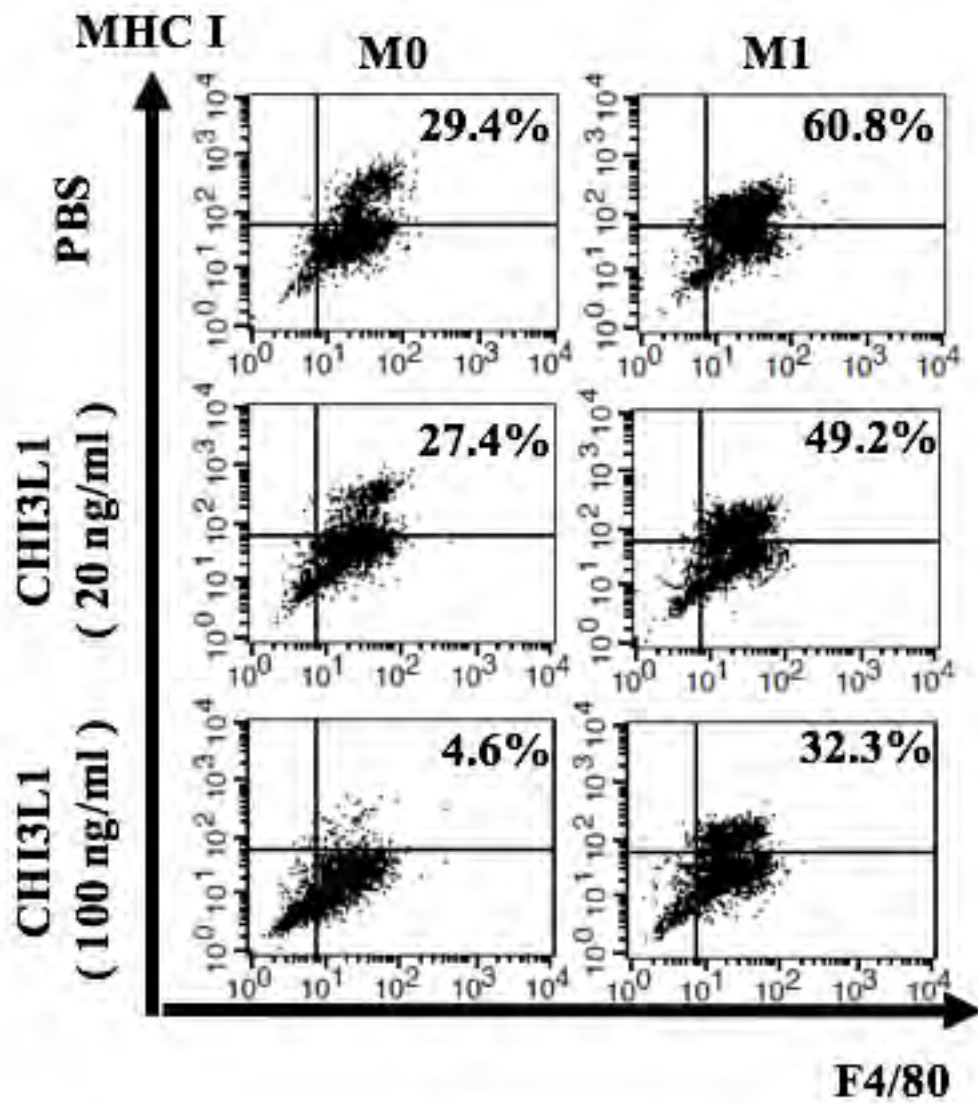
在我們發現 CHI3L1 會改變 M1 巨噬細胞中特徵基因表現量的改變後，我們進一步想要了解，這些改變是否也顯示 M1 巨噬細胞的表面蛋白也會受到影響。因此我們也分別檢測了 CD80、CD86、MHC I、MHC II 等表面蛋白的表現量，結果如圖九、十、十一、十二所示。各個表面蛋白的表現量均在 M0 巨噬細胞極化到 M1 巨噬細胞時大幅度增加，而當環境中有 CHI3L1 存在時，表現量會隨著 CHI3L1 濃度的增加而下降。



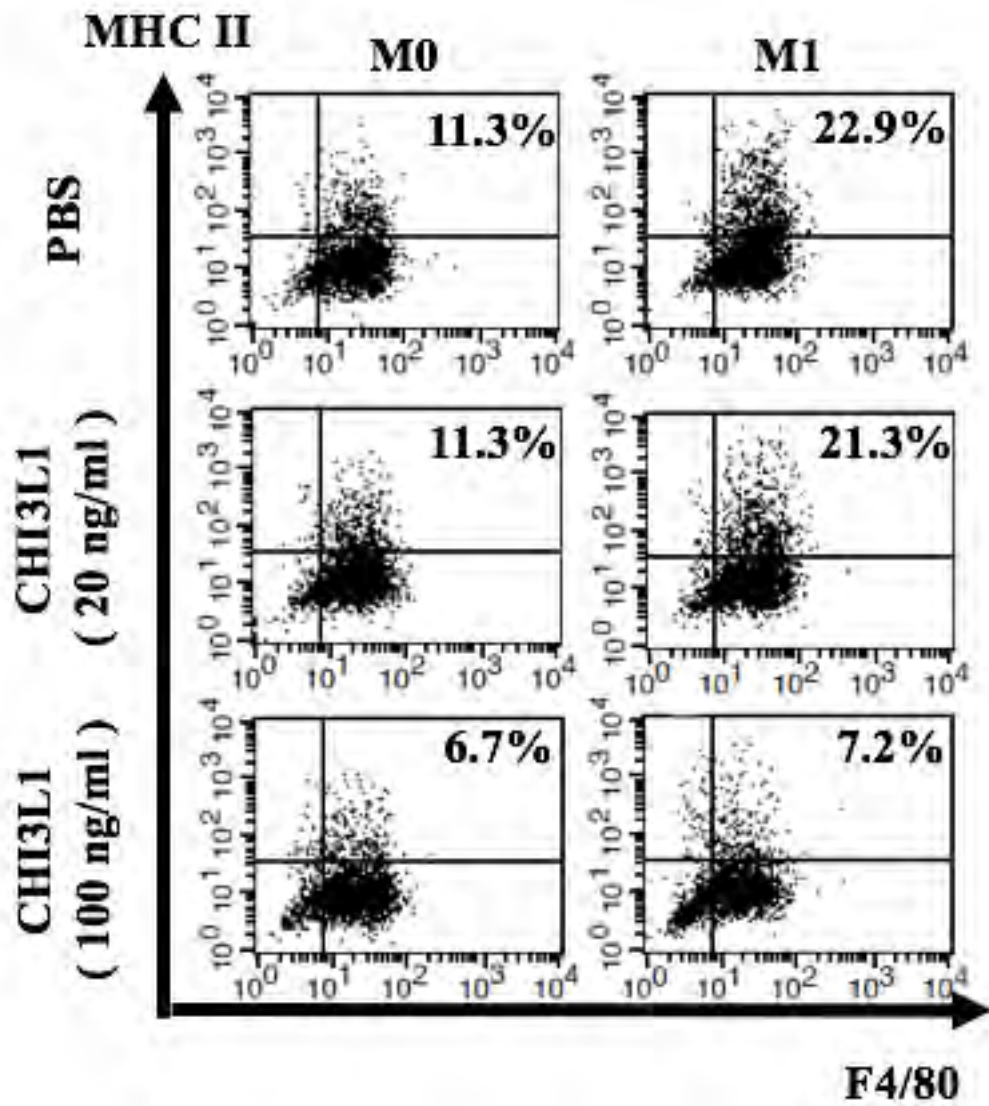
圖九、巨噬細胞在外加不同濃度的 CHI3L1 時，巨噬細胞表面蛋白的差異



圖十、巨噬細胞在外加不同濃度的 CHI3L1 時，巨噬細胞表面蛋白的差異



圖十一、巨噬細胞在外加不同濃度的 CHI3L1 時，巨噬細胞表面蛋白的差異

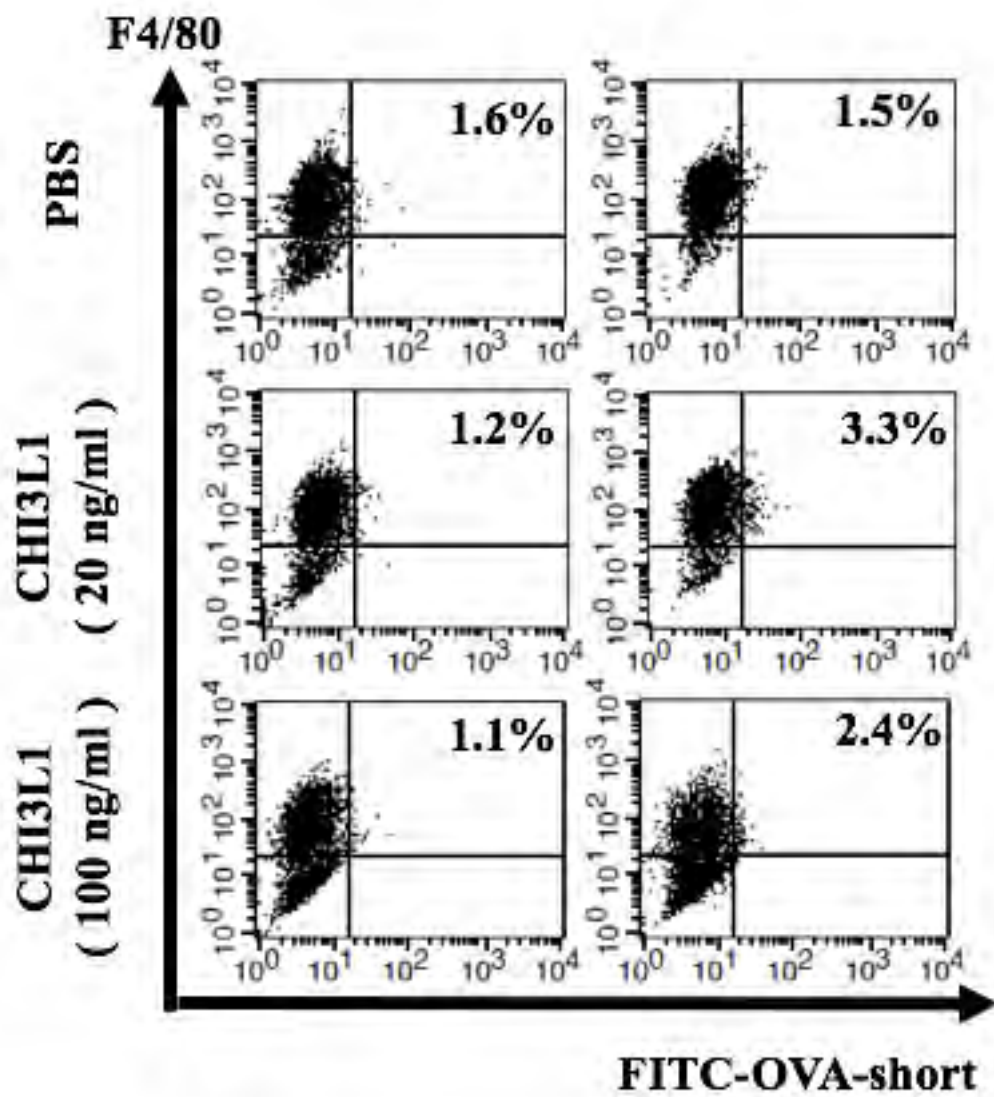


圖十二、巨噬細胞在外加不同濃度的 CHI3L1 時，巨噬細胞表面蛋白的差異

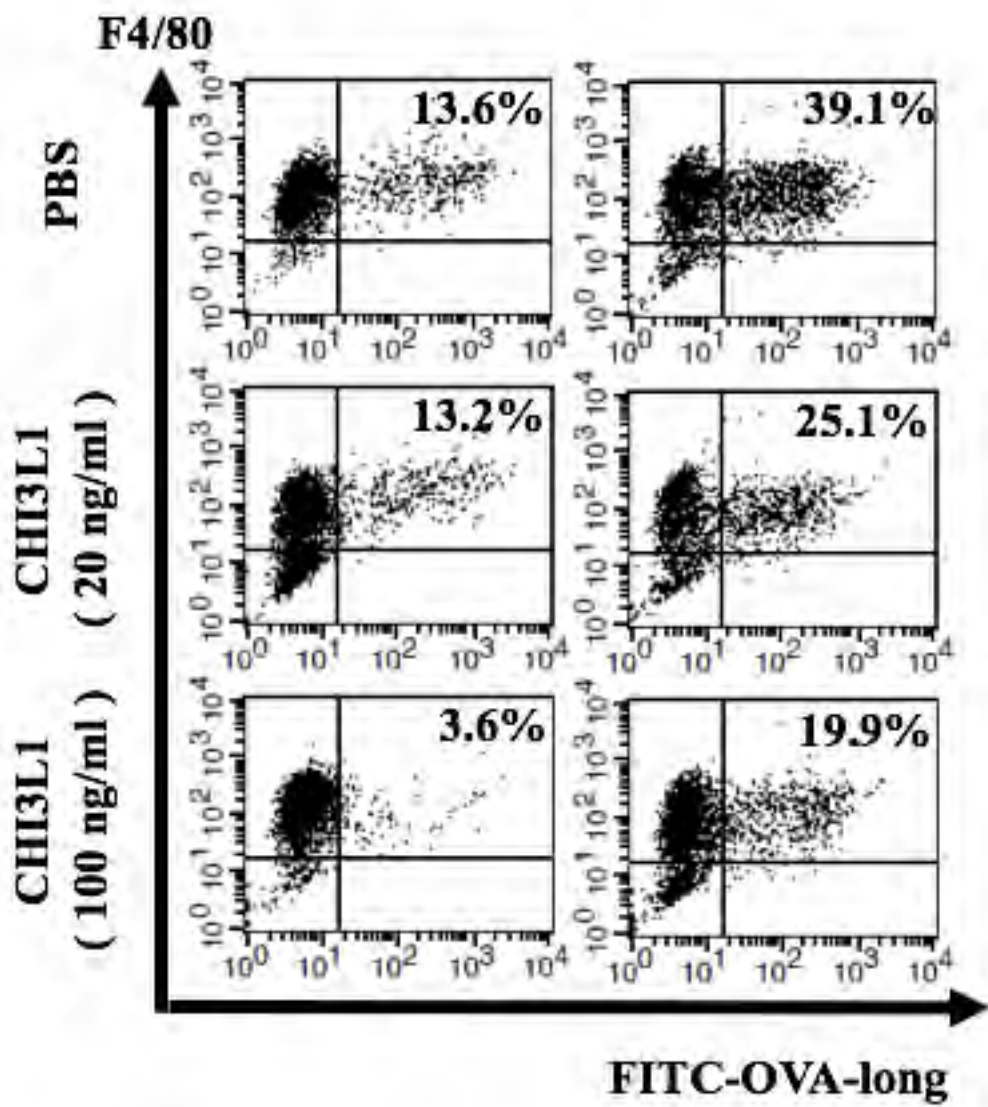
四、外加 CHI3L1，觀察巨噬細胞功能之改變

(一) 對抗原呈現的影響

CHI3L1 會改變 M1 巨噬細胞中 MHC I、MHC II 表現量的改變，我們進一步想要了解 M1 巨噬細胞的抗原功能也會連帶的受到影響。因此我們準備了抗原呈現能力試驗，去檢測 CHI3L1 對於 M1 巨噬細胞抗原呈現的影響。我們選用了兩種不同長度的螢光胜肽劑型測試，實驗結果顯示，在短肽方面，無論是 M0 或 M1 巨噬細胞皆幾乎不呈現，也不受 CHI3L1 影響如圖九。在長肽的實驗結果顯示，M1 巨噬細胞符合理論的大量表現，在受到 CHI3L1 影響之後 M0 及 M1 巨噬細胞皆在抗原呈現量有下降的趨勢，以上結果也顯示在 CHI3L1 的影響下，M1 巨噬細胞的抗原呈現受到抑制。



圖十三、MO 與 M1 在 CHI3L1 環境下對 OVA 短肽抗原呈現能力之差異



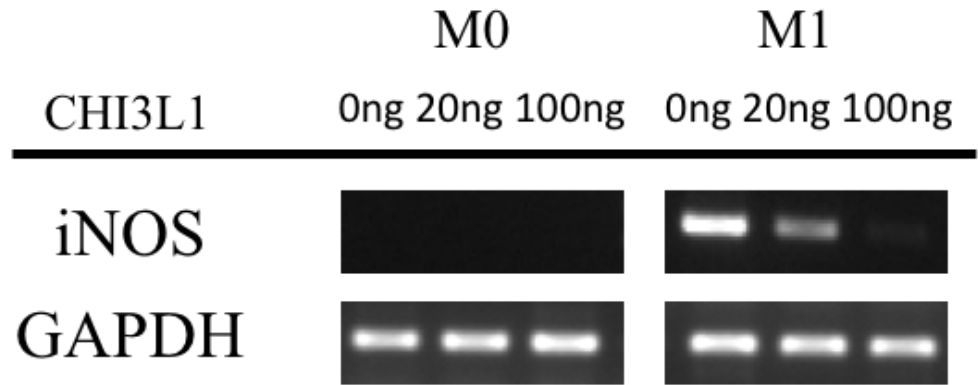
圖十四、M0 與 M1 在 CHI3L1 環境下對 OVA 長肽抗原呈現能力之差異

(二) 對釋放一氧化氮的影響

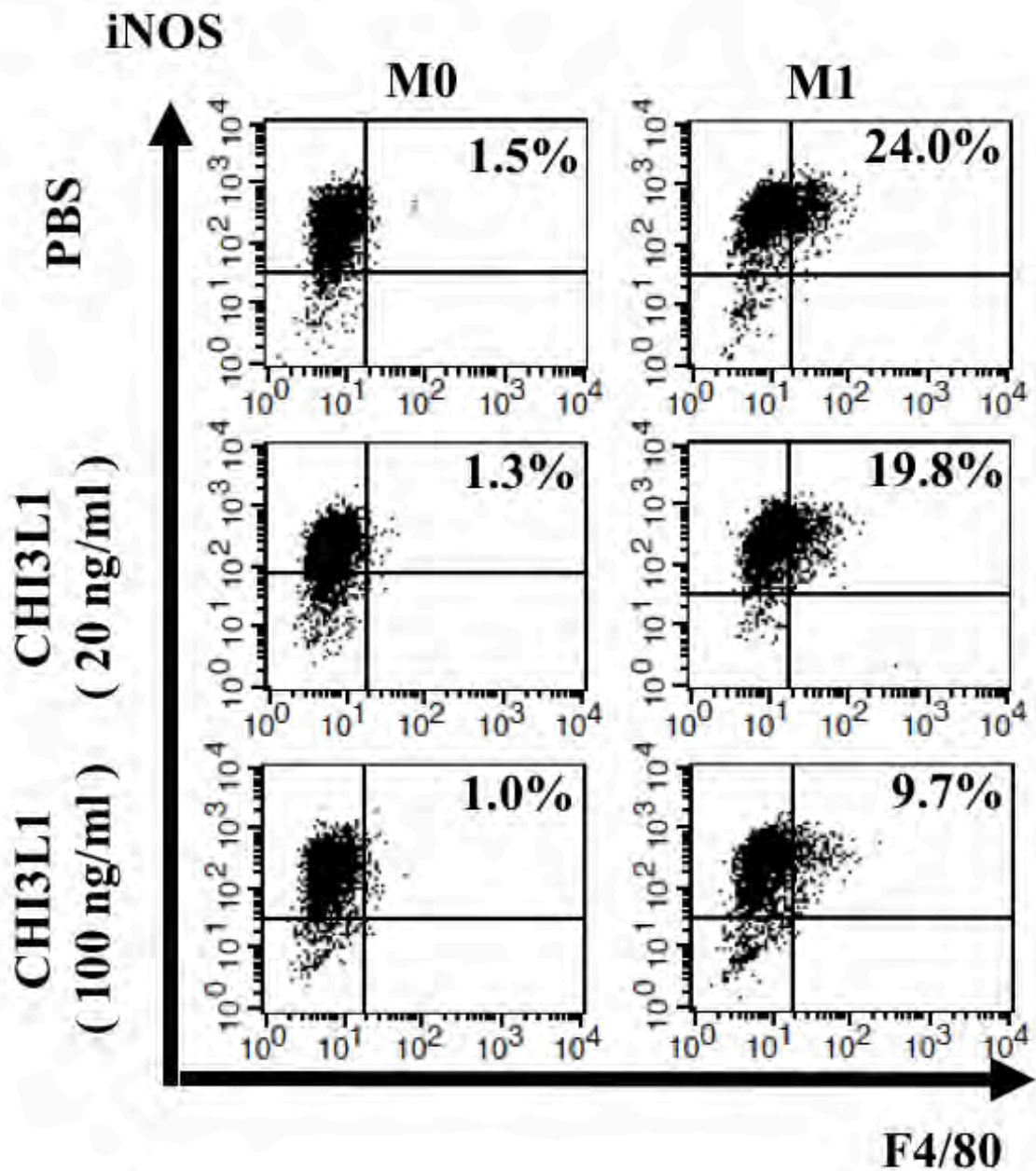
在前一個實驗中，我們看到了 M1 巨噬細胞抗原呈現的功能有可能受到 CHI3L1 的調控而改變。在巨噬細胞相關研究中，能偵測 M1 巨噬細胞功能且具有指標性的一個標的是 NO 的生成。因此，我們進一步將細胞培養於 CHI3L1 濃度為 0ng/ml、20ng/ml、100ng/ml 的環境中，並針對誘導型一氧化氮合酶基因 (iNOS gene) 進行初步測試，由此基因轉錄出來的蛋白質，可參與釋放 NO 之反應。雖然此實驗無法直接顯示 NO 的實際產量，不過對於後續的研究也能夠提供一個關連性的指標。實驗結果如圖十五所示，在 M0 巨噬細胞中，iNOS 基因不管是在控制組 (PBS) 的部分，或是外加不同濃度的 CHI3L1，皆不表現。而 M1 巨噬細胞中，則看到在控制組 (PBS) 的情況下，一氧化氮合酶基因 (iNOS gene) 會表現，符合過去文獻研究結果；但隨著外加 CHI3L1 的濃度升高，一氧化氮合酶基因 (iNOS gene) 的 mRNA 表現量顯著降低。

我們使用流式細胞儀檢測誘導型一氧化氮合酶 (iNOS) 在不同濃度 CHI3L1 培養後的細胞中的表現量。如圖十六所示，在不同濃度的 CHI3L1 培養後的 M0 巨噬細胞，在誘導型一氧化氮合酶 (iNOS) 表現量中無顯著差異；而 M1 巨噬細胞則隨著 CHI3L1 濃度的增加，誘導型

一氧化氮合酶 (iNOS) 的表現量顯著下降。



圖十五、M0 巨噬細胞與 M1 巨噬細胞受 CHI3L1 影響其基因表現量之差異

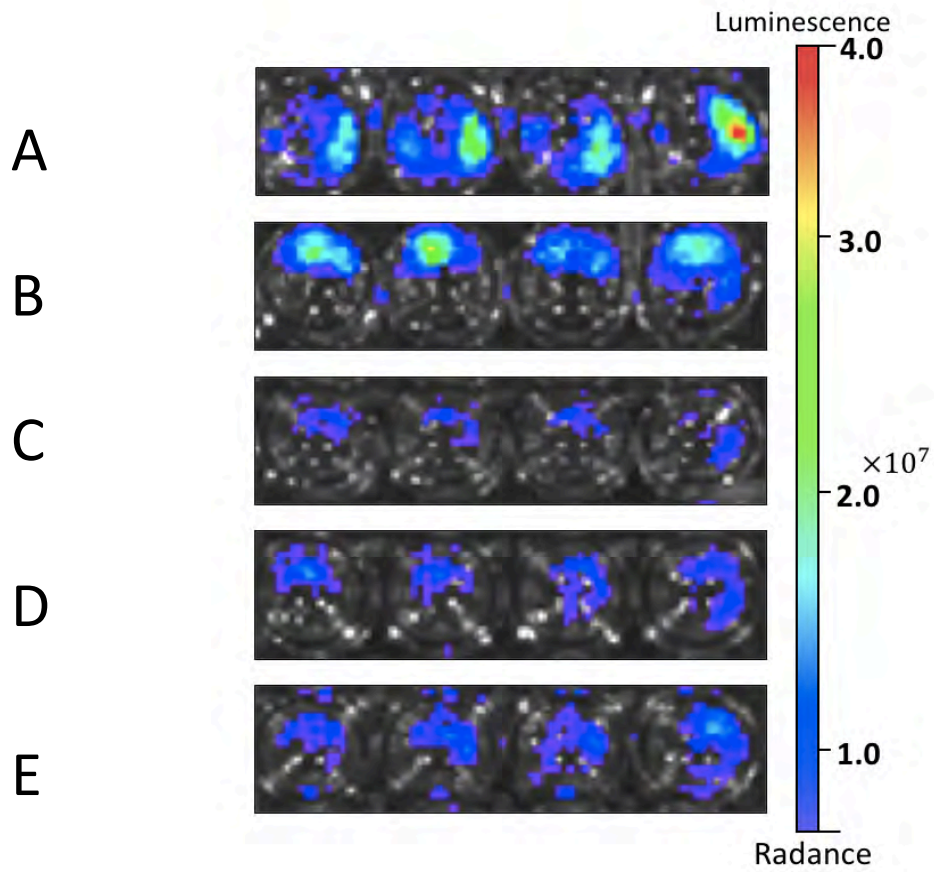


圖十六、M0 巨噬細胞與 M1 巨噬細胞受 CHI3L1 影響其蛋白質表現量之差異

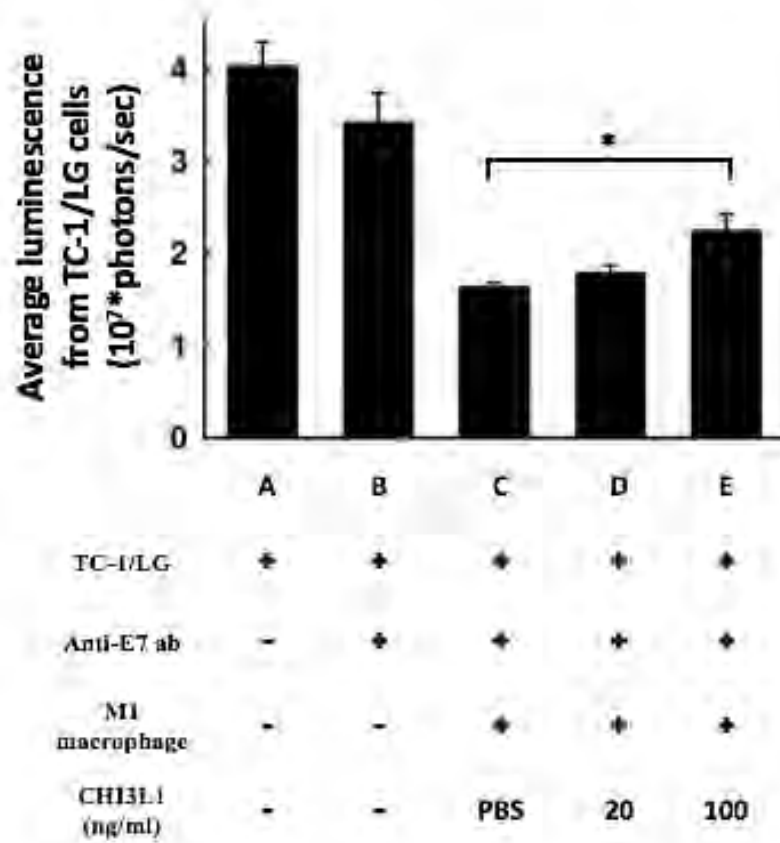
(三) 檢驗巨噬細胞賴抗體毒殺作用之變化

先前的實驗雖然已經看到了巨噬細胞功能的改變，但仍舊無法直接代表當腫瘤存在於環境中時，巨噬細胞之反應確實會受到影響。因此在此實驗中我們檢驗在環境中含有 CHI3L1 時巨噬細胞賴抗體毒殺作用。我們利用冷

光酵素 (Luciferase)協助觀察，實驗結果顯示隨著 CHI3L1 濃度的增加，冷光強度隨之下降，而這也代表腫瘤細胞的存活量增加。



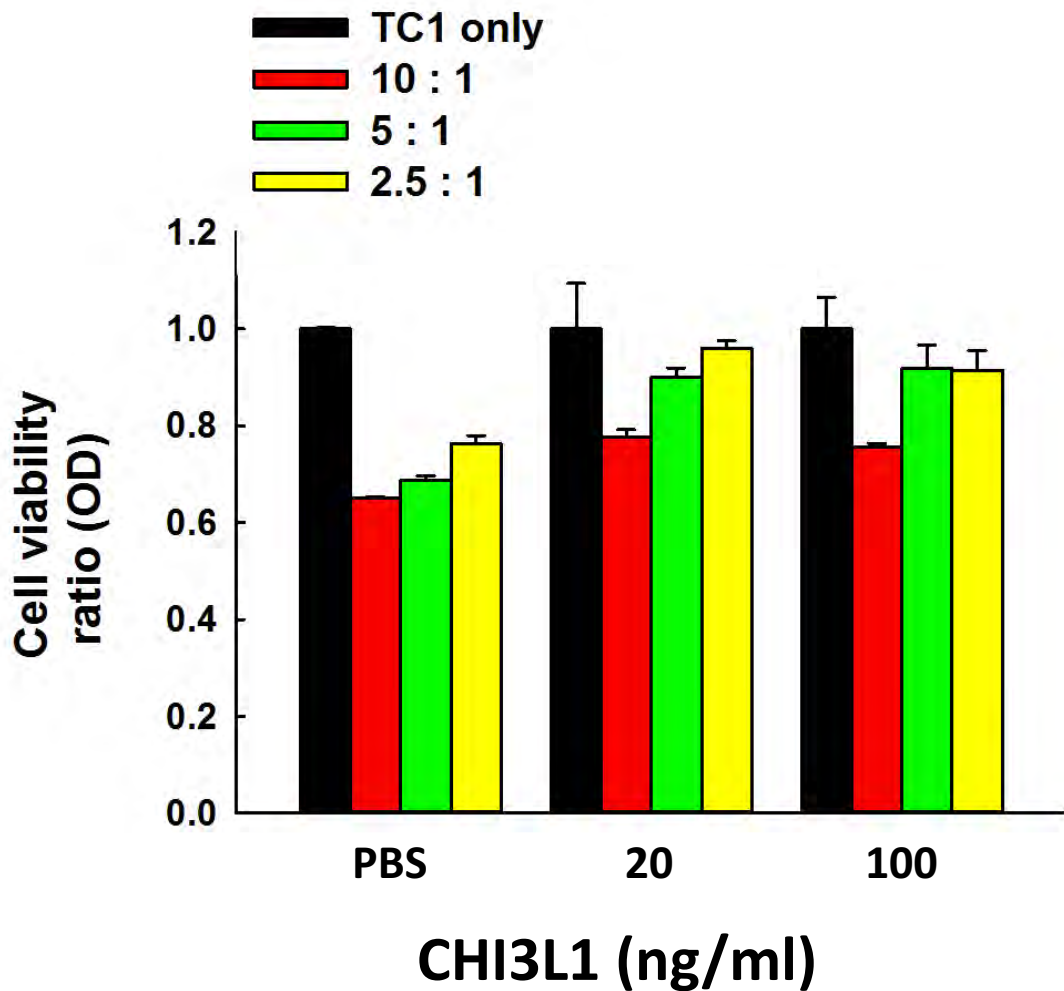
圖十七、冷光成色之實驗結果



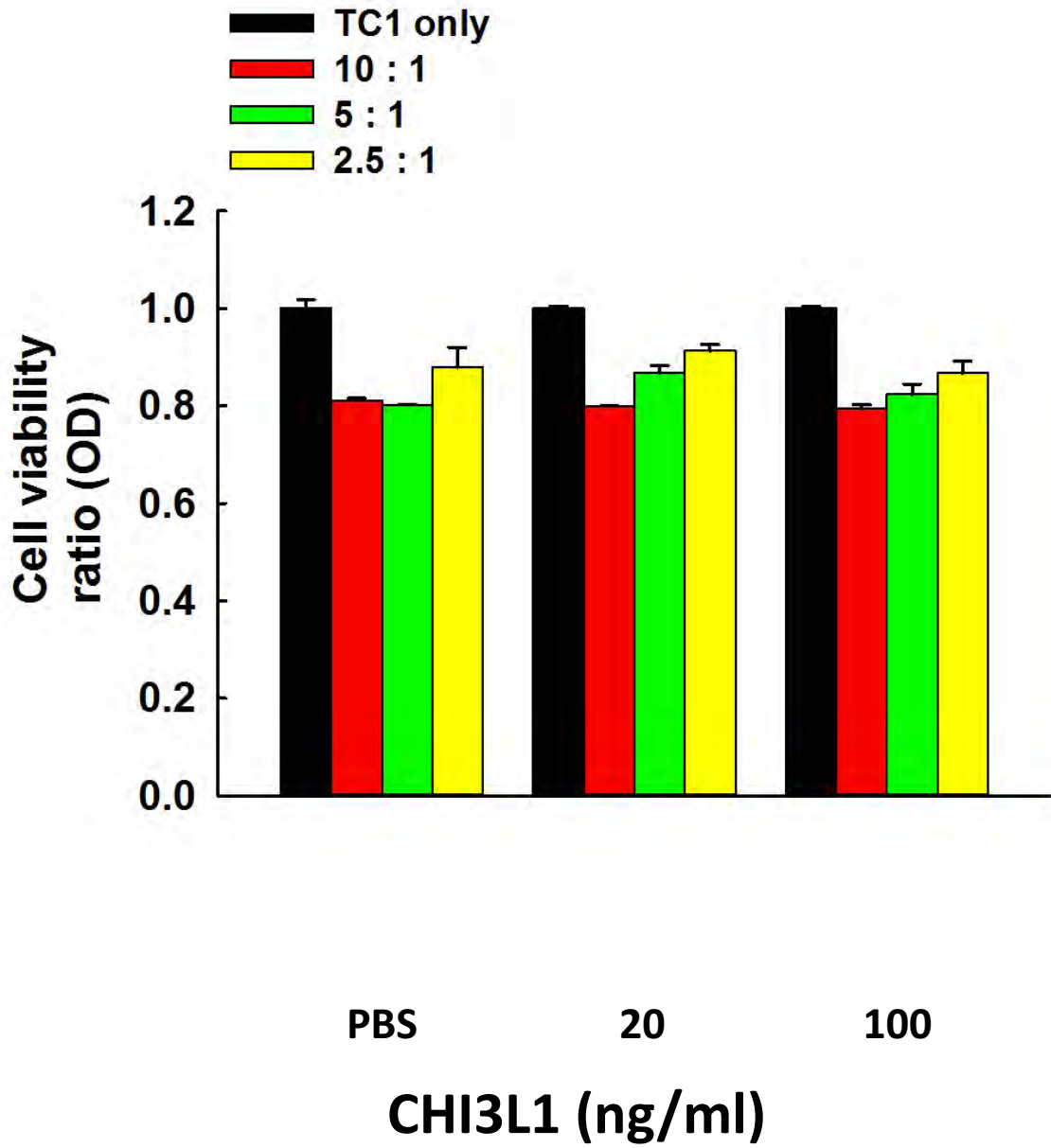
圖十八、巨噬細胞賴抗體毒殺作用之變化

(四) 檢驗巨噬細胞抗原呈現及活化 T 細胞能力之改變

在前先的實驗我們發現到巨噬細胞抗原呈現作用受到 CHI3L1 的影響，因此我們想知道這是否代表著活化 T 細胞的能力會受到影響。我們將腫瘤細胞與 T 細胞的混合比例分成三種。由實驗結果可以發現到隨著 T 細胞比例的增加，抗腫瘤的效果也變得更好。但隨著 CHI3L1 的濃度增加，CD4 T 細胞的抗腫瘤的能力則跟著下降，而 CD8 T 細胞則似乎不受影響。



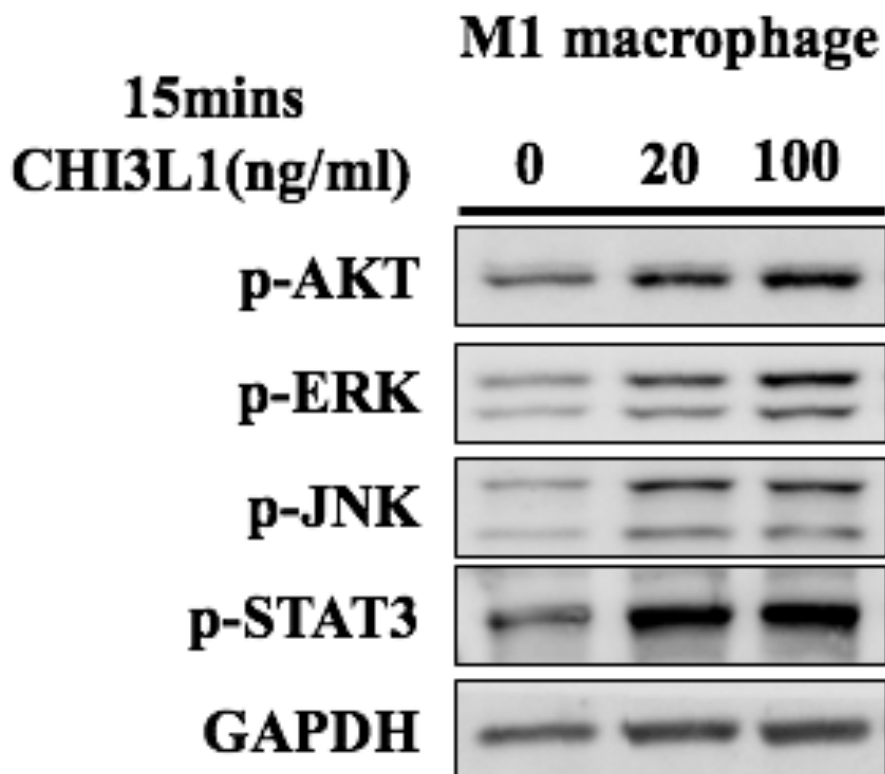
圖十九、CD4 T 細胞受活化後抗腫瘤 (TC1) 能力之改變



圖二十、CD8 T 細胞受活化後抗腫瘤 (TC1) 能力之改變

(五) CHI3L1 對 M1 巨噬細胞作用之機轉

在確認 CHI3L1 會改變 M1 巨噬細胞極化及功能後，我們想探討其作用機轉。如圖二十一所示，我們將三種不同濃度的 CHI3L1 加入培養盤中並放回細胞培養箱作用 15 分鐘後，我們看到了 p-AKT、p-ERK、p-JNK、p-STAT3 這四種蛋白質活化的差異。隨著 CHI3L1 濃度的增加，四種蛋白質的活化程度皆顯著提升。



圖二十一、外加 CHI3L1 後蛋白質的活化差異

四、討論

在流式細胞儀檢驗過後我們得知以巨噬細胞集落刺激因子 (M-CSF) 培養小鼠骨髓細胞經過 6 天後會大量表現巨噬細胞表面特徵蛋白 F4/80。同時，如果在培養的第六天加入顆粒球巨噬細胞株刺激因子 (GM-CSF) 及酯多糖(LPS)刺激巨噬細胞，則可以使 M0 巨噬細胞表現出 M1 巨噬細胞的特徵基因，故可以確認我們的操作方式能成功的培養出 M0 及 M1 巨噬細胞，此種操作方法也與現今多數研究論文的結果一致。

接著我們模擬腫瘤微環境中含有大量 CHI3L1 的情況。在特徵基因表現量方面，M0 巨噬細胞似乎並不受到 CHI3L1 的影響，M1 巨噬細胞的特徵基因皆幾乎不表現。然而 M1 巨噬細胞卻明顯受到了 CHI3L1 的影響，隨著整體外加 CHI3L1 濃度的增加，M1 特徵基因的表現量會逐漸減少，在 CHI3L1 濃度為 100ng/ml 時幾乎都不表現。同時，我們也檢測了巨噬細胞表面蛋白表現量的差異，結果顯示 CHI3L1 確實會導致各個表面蛋白的表現量下降，且此影響有隨著 CHI3L1 濃度增加而增強的趨勢。

在前一實驗我們發現到 MHC II 的表現量受 CHI3L1 的影響而降低。根據文獻所述，MHC II 的表現與抗原呈現能力的好壞有著直接的關係。因此我們便測試了當環境中存在有 CHI3L1 時抗原呈現能力的變化。我們分別測試了長短兩種胜肽，短肽的部分，CHI3L1 沒有造成影響，推測可能的原因是短肽呈現並非 M1 巨噬細胞的主要功能，當然也可能是實驗的方法需要進一步調整，因此需要再

進一步的研究。長肽的部分，由於 M1 巨噬細胞才會發展出完整的抗原呈現功能，因此 M1 巨噬細胞的抗原呈現能力明顯高於 M0 巨噬細胞。由此我們推論 CHI3L1 抑制 M1 巨噬細胞在長肽抗原呈現的能力有可能一部份原因是透過抑制 MHC II 分子的表現量而達成。

此外，我們在之前的實驗中看到了 M1 巨噬細胞抗原呈現功能受到 CHI3L1 影響，而在巨噬細胞中 NO 的產生與調控是在功能性上非常具有代表性的指標，因此我們進一步的分析與產生 NO 相關的基因：誘導型一氧化氮合酶 (iNOS) 基因表現量是否也有受到 CHI3L1 的影響，而研究結果顯示誘導型一氧化氮聚合酶 (iNOS) 明顯受到 CHI3L1 的調控，其中一氧化氮聚合酶基因 (iNOS) 的表現量隨著 CHI3L1 濃度的上升而下降，因其負責將精氨酸中的氮原子，在氧氣 (O₂) 及其他輔助因素的存在環境下合成一氧化氮，並且可以利用一氧化氮的氧化自由基，協助巨噬細胞在免疫系統中對抗病原體。同時，我們也利用流式細胞儀直接檢測細胞內一氧化氮聚合酶(iNOS)的表現量，結果與前一實驗一致。而這部分實驗結果顯示 CHI3L1 有可能會影響 M1 巨噬細胞表現 NO 的功能，進而影響整個 M1 巨噬細胞功能的改變，更直接的證據需要之後再更細部的研究證實。

統整以上實驗結果後，我們加入其他各種細胞以求模擬腫瘤微環境中的狀態。首先我們觀察了巨噬細胞的賴抗體毒殺作用，研究結果顯示為隨著 CHI3L1 的濃度增加，腫瘤細胞的存活率也隨之提升。由此結果我們可以推論 M1 巨噬細胞的毒殺功能確實下降了。在這個實驗中我們也發現到即便單純加入抗體，腫瘤

的存活率依舊會下降，也就是單純加入抗體就會造成腫瘤細胞死亡。然而，由於沒有其他實驗作為輔助資料，這個現象仍舊仰賴後續實驗以證實。接著我們檢測了巨噬細胞抗原呈現及活化 T 細胞的能力。從本次實驗以及以往的實驗推斷，由於 CHI3L1 會弱化 M1 巨噬細胞抗原呈現的能力，也因此受影響的巨噬細胞無法正常活化 T 細胞，從而導致在 T 細胞與腫瘤細胞交互作用的環境中，T 細胞的抗腫瘤功能變得不明顯。而在綜合這兩個實驗後，我們可以肯定 CHI3L1 會導致免疫功能下降。

在了解 CHI3L1 對 M1 巨噬細胞的影響過後，我們想要了解 CHI3L1 作用的機轉。在外加 CHI3L1 15 分鐘後，我們看到了 p-AKT、p-ERK、p-JNK、p-STAT3 四種蛋白質活化差異的趨勢，推測 CHI3L1 的作用機制可能與這些訊息傳遞途徑有關，至於主要是以哪種途徑作用以及如何作用，仍需後續的實驗佐證。

肆、結論及應用

一、結論

- (一) 透過骨髓細胞的培養與分化可以得到 M0 巨噬細胞，並且經由 PCR 與流式細胞儀以及抗原呈現實驗，發現 M1 巨噬細胞與 M0 巨噬細胞的不同。
- (二) 透過外加 CHI3L1 培養的實驗，我們發現 M1 巨噬細胞不管是在特徵基因的呈現或是抗原呈現實驗中，都會受到 CHI3L1 的影響，導致原本的功能改變。
- (三) 透過 PCR 觀察 M1 巨噬細胞功能相關基因表現量之變化，我們發現與 M1 巨噬細胞功能相關的一氧化氮聚合酶 (iNOS) 基因表現會受到 CHI3L1 的影響，且其下游蛋白質亦受到影響，進而導致其相關功能表現異常改變。
- (四) 當 CHI3L1 濃度增加時，M1 巨噬細胞活化 T 細胞的能力會被削弱，而這也與我們先前的實驗一致，接著我們觀察巨噬細胞賴抗體毒殺作用，透過冷光成色實驗，我們發現隨著 CHI3L1 濃度的增高，巨噬細胞的作用能力下降。
- (五) 透過西方墨點法，我們看到了 p-AKT、p-ERK、p-JNK、p-STAT3 四種蛋白質會隨著 CHI3L1 濃度的增加，而有越高的活化表現。

二、未來展望

- (一) 我們看到了一氧化氮聚合酶 (iNOS) 基因會受 CHI3L1 影響且下游蛋白質亦改變，但仍續測量一氧化氮的釋出是否真的有差異，需要進一步的驗證。
- (二) 在圖十八中，再加入抗體後腫瘤細胞存活量就已經下降，可能是抗體本身就會導致中流細胞死亡，但究竟是否為此仍待進一步的實驗證實。
- (三) 我們在機轉實驗中看到了 CHI3L1 造成了 p-AKT、p-ERK、p-JNK、p-STAT3 這四種蛋白質的活化，但這屬於一個現象的觀察，我們需要進一步的去了解細胞內的分子機轉，包含了 CHI3L1 與如何與巨噬細胞表面受器相結合，透過下游哪種訊息傳遞路徑，最後影響到基因特徵表現量甚至表面蛋白的表現改變。經由真正了解 CHI3L1 分子透過何種機轉去影響 M1 巨噬細胞，我們才更有機會去尋求適合的相關藥物或解決方法來針對 CHI3L1 所造成的影響並修正，而達到與免疫治療相結合並應用在醫療上的目標。

伍、參考資料

- 一、科技部高瞻自然科學教學資源平台。張哲睿、劉翠華 (2013) 主要組織相容性複合物 (Major Histocompatibility Complex, MHC)

- 二、科技部高瞻自然科學教學資源平台。范姜文榮、李冠群 (2015) 先天免疫的記憶功能 (Immunological memory in innate immunity)

- 三、袁昂 (2013), 篩選調控腫瘤巨噬細胞偏極化之藥物, 並以腫瘤微環境之腫瘤巨噬細胞為治療標的之肺癌治療新策略。行政院國家科學委員會期末報告 (編號: NSC 101-2314-B-002-171), 未出版

- 四、袁昂 (2009), 第一型及第二型腫瘤巨噬細胞(M1/M2)對肺癌生長、轉移、血管新生、基因表現及病患診斷與預後之影響, 以及調控 M1/M2 表現型對肺癌治療之應用, 未出版

- 五、袁昂 (2011), 肺癌轉移之分子機制---(子計畫六)第一型及第二型腫瘤巨噬細胞 (M1/M2)對肺癌生長、轉移、血管新生、基因表現及病患診斷與預後之影響, 以及調控 M1/M2 表現型對肺癌治療之應用, 未出版

- 六、袁昂 (2011), M1/M2 腫瘤巨噬細胞對非小細胞肺癌之微小核醣核酸(microRNA)之調控,以及微小核醣核酸對非小細胞肺癌腫瘤生成、血管新生與轉移之影響, 未出版
- 七、袁昂 (2012), 篩選調控腫瘤巨噬細胞偏極化之藥物, 並以腫瘤微環境之腫瘤巨噬細胞為治療標的之肺癌治療新策略, 未出版
- 八、袁昂 (2014), 候選藥物對腫瘤巨噬細胞偏極化及肺癌細胞生物行為與基因調控之影響, 未出版
- 九、楊寧蓀 (2008), 中草藥之抗發炎與免疫增強活性的系統生物學研究, 中醫藥年報 第 26 期 第 2 冊
- 十、Antonio Sica(2012), Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas, The journal of clinical investigation(JCL), Volume 122, Pages 787~795
- 十一、Chao He(2015), The Metabolic Prospective and Redox Regulation of Macrophage Polarization, Journal of Clinical & Cellular Immunology(JCCI), Volume 6, Pages 371~376

十二、Charles Dudley Mills(2015) , Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages ,

Frontiers in immunology , Volume 6 Article 212

十三、Christina E. Arnold(2015), The activation status of human macrophages presenting

antigen determines the efficiency of Th17 responses, Immunobiology, Volume 220,

Pages 10-19

十四、Daphne Y.S. Vogel(2014), Human macrophage polarization in vitro: Maturation and

activation methods compared, Immunobiology, Volume 219, Pages 695-703

十五、Encyclopedia of Immunobiology(2016), Macrophage Activation and Polarization,

Volume 1, Pages 289-292

十六、Fernando O. Martinez (2014), The M1 and M2 paradigm of macrophage activation:

time for reassessment, F1000Prime Reports, Volume 6, Pages 1~13

- 十七、Hassan M.Rostam(2016), The impact of surface chemistry modification on macrophage polarization, *Immunobiology*, Volume 221, Pages 1237~1246
- 十八、Kondaiah Moganti(2017), Hyperglycemia induces mixed M1/M2 cytokine profile in primary human monocyte-derived macrophages, *Immunobiology*, Volume 222, Pages 952~959
- 十九、Kyle A. Jablonski(2015), Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages, *PLOS ONE*, Volume 10, Pages 12~26
- 二十、Paola Italiani(2014), From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation, *Frontiers in immunology*, Volume 5, Pages 514
- 二十一、Stephania Libreros (2015), YKL40/CHI3L1 drives inflammation on the road of tumor progression, *Journal of Leukocyte Biology(JLB)*, Volume 98, Pages 931~936

【評語】 090011

研究目的：探討 CHI3L1 對 M1 巨噬細胞極化及其功能之影響。

研究 CHI3L1 癌細胞組織大量生產後 對腫瘤微環境中巨噬細胞極化可能造成的改變，檢驗這改變對巨噬細胞的功能是否受到影響，並了解有關的分子機轉。

1. M1/M2 的標誌應該同時測量
2. 有不少類似的研究 應該突顯你跟別人不一樣的地方