

# 2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

- 作品編號** 090001
- 參展科別** 醫學與健康科學
- 作品名稱** 探討雙黃酮類 CRYT 對抑制發炎反應與免疫  
細胞移動的影響
- 得獎獎項** 大會獎 一等獎  
青少年科學獎  
美國 ISEF 正選代表
- 就讀學校** 臺北市立第一女子高級中學
- 指導教師** 林于鈴、孫譽真
- 作者姓名** 陳芊睿、葉芸廷

**關鍵詞** 雙黃酮類 CRYT、發炎反應、細胞遷移

## 作者簡介



我們是北一女中的高三生，兩個人都對生命科學與醫學充滿興趣和熱忱。經過各領域的探索和學校的培訓之後，我們決定依照興趣選擇以生物科為研究領域，並幸運地進入了林于鈴老師的實驗室學習和研究。在實驗室中，我們逐漸找到研究的意義和自己的方向，而這段日子裡累積的醫學知識和實驗技術，都是我們踏向未來研究的基石。

## 摘要

發炎反應與癌症具有密切的關係，而如何抗發炎是現今重要的研究主題。本研究主要探討雙黃酮類藥物 CRYT 對 LPS 誘發之發炎反應與免疫細胞遷移的影響。本研究首先以細胞試驗分析細胞激素與趨化因子的表現量觀察 CRYT 對發炎反應的影響。接著，利用反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 和共軛焦顯微鏡觀察黏附分子與調控細胞骨架分子的表現量，以了解 CRYT 對免疫細胞遷移的影響。再來我們以西方墨點法分析免疫反應調控路徑之蛋白質表現量來研究 CRYT 的作用途徑。同時，透過程式模擬 CRYT 的標的蛋白，並用細胞轉染與雙冷光技術驗證模擬結果。本研究發現，CRYT 會抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及 IL-6 三種促發炎因子與 CXCL1、CCL3 及 CCL4 三種趨化因子的表現量。另外，CRYT 會抑制黏附分子 LFA-1 與 VLA-4 與調控細胞骨架分子 Cdc42、PAK1、WASP、Rac1 及 LIMK1 之 mRNA 表現量，以阻礙 F-actin 進行聚合作用。本研究也發現，CRYT 能藉由抑制 NF- $\kappa$ B 的表現量，進而影響巨噬細胞的發炎作用與細胞移動。在作用機制的方面，CRYT 會結合在雌激素受體的配體結合位，並抑制雌激素受體的轉錄作用，而抑制發炎作用與細胞轉移。結論得知，CRYT 不但可以抑制發炎反應，還能有效抑制免疫細胞的遷移。

## Abstract

Inflammation is closely related to cancer, and how to fight inflammation is an important research topic in recent years. Our study mainly explored the effect of the biflavonoid CRYT on the inflammatory response and migration in LPS-induced macrophage. In this study, the release of cytokines and chemokines in LPS-induced macrophage was determined to evaluate the effect of CRYT on inflammation. Secondly, the expression of adhesion molecules and cytoskeleton regulators were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and a confocal microscope to observe the effect of CRYT on cell migration during inflammation. We analyzed the molecules involved in the CRYT-regulated signaling pathway by western blot. The interaction of the target protein with CRYT was predicted by the drug docking tool and validated by the dual luminescence reporter system. Our results suggested that CRYT could inhibit the expression of proinflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6, and chemokines such as CXCL1, CCL3 and CCL4. CRYT inhibited the mRNA expression of adhesion molecules LFA-1 and VLA-4 and cytoskeleton regulators, including Cdc42, PAK1, WASP, Rac1 and LIMK1 to prevent F-actin from polymerization. CRYT inhibited the expression of NF- $\kappa$ B, thereby impeding the inflammation and cell movement in LPS-induced macrophage. In addition, CRYT could bind to the ligand-binding site of the estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and affect the transcription of ER $\alpha$ , which also regulate inflammation and cell migration. Therefore, CRYT effectively inhibited inflammation and cell migration through modulating the ER $\alpha$  and NF- $\kappa$ B pathway.

# 一、前言

## (一) 研究動機

發炎反應是身體在受到外來病原菌入侵時所引發的防禦機制，但是當體內過度發炎時，可能會帶來更嚴重的後果，甚至會有生命危險。癌症、糖尿病及發燒等許多疾病皆與發炎反應有密切關係，以癌症來說，除了致癌因子 (Carcinogen) 之外，近來許多的研究發現長期發炎反應 (Long-term inflammatory response) 是讓腫瘤生長與更惡性的關鍵因素之一。因此，如何抗發炎是現今在治療上備受關注的一個方法。槲皮素、木犀草素、大豆異黃酮等黃酮類化合物已被證明具有抗發炎的功能 (Stewart et al., 2008) (Hämäläinen et al., 2007)，其中槲皮素、木犀草素亦具有抗癌的功效 (Nöthlings et al., 2007)，例如木犀草素能夠抑制血管新生及誘導細胞凋亡，進而降低腫瘤的生長速度 (López-Lázaro, 2009)。本篇研究中的 CRYT 是一種雙黃酮類的藥物，先前的研究顯示 CRYT 能有效的抑制黑色素瘤的生長與轉移，在此篇研究中，我們將對 CRYT 抑制發炎反應與免疫細胞移動的影響進行探討，希望其在未來可開發為抗發炎的植物新藥。

## (二) 研究目的

我們的研究目的是雙黃酮類藥物 CRYT 對發炎反應的影響。藉由研究 CRYT 對老鼠脾臟細胞分泌細胞激素與趨化因子的作用觀察其對發炎反應的影響，再進一步觀察其對控制免疫細胞遷移的黏附分子以及細胞骨架調控分子基因的影響。利用西方墨點法分析免疫反應調控路徑之蛋白質表現量來研究 CRYT 作用途徑。另外，我們也透過程式模擬 CRYT 的標的蛋白，並用細胞轉染與雙冷光技術驗證模擬結果以找出 CRYT 的作用機制。

## 二、研究方法或過程

### (一) 研究設備與器材

#### 1. 本研究所使用的細胞株

小鼠巨噬細胞株 (RAW 264.7, ATCC TIB-71, BCRC, Hsinchu, Taiwan)

小鼠初代脾臟細胞 (Primary splenocyte)

人類胚胎腎細胞 (HEK-293, ATCC CRL-1573, BCRC, Hsinchu, Taiwan)

#### 2. 設備與器材

微電腦水匣式無菌循環二氧化碳培養箱 (Incubator, Thermo Forma Series II, U.S.A.)

冷凍高速離心機 (Centrifuge 5424R, Eppendorf AG 22331, Hamburg, Germany)

超微量分光光度計 (ND-1000, J&H Technology Co., Ltd, Taipei City, Taiwan)

盤式全波長光譜儀 (Eon™ Microplate Spectrophotometer, BioTek, U.S.A.)

核酸增量儀 (Nexus x2, Eppendorf AG 22331, Hamburg, Germany)

DNA 電泳系統 (MJ-105A, Major Science, Taoyuan, Taiwan)

紫外光照膠分析系統 (BioDoc-IT 2UV Imaging System LM-20E, UVP, Germany)

倒立共軛焦暨超高解析度顯微鏡 (Zeiss LSM 780 plus ELYRA S.1, Jena, Germany)

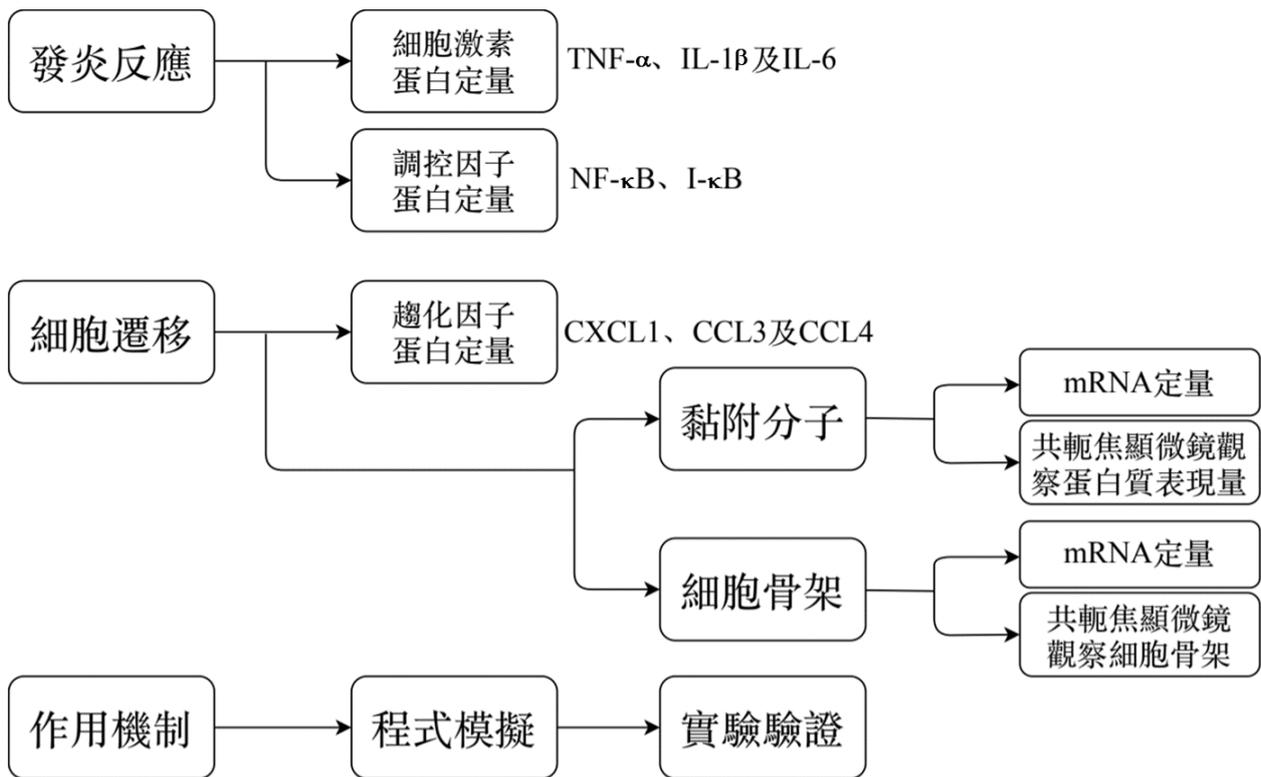
全自動高敏感冷光影像系統 (BioSpectrum 815 Imaging System, UVP, Germany)

大型堆疊式試管培養箱 (New Brunswick Scientific Innova 44R, Eppendorf AG 22331, Hamburg, Germany)

高速定角度轉子 (JLA-10.500 Fixed-Angle Aluminum Rotor, Beckman Coulter Life Sciences, U.S.A.)

雙系統多功能光學分析儀 (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, U.S.A.)

## (二) 研究架構圖



## (三) 實驗方法

### 1. 巨噬細胞株的培養

以含有 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, 縮寫為 FBS, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA) 與青黴素/鏈黴素雙抗生素 (Penicillin-Streptomycin, GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.) 之 DMEM 培養液 (GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.) 培養小鼠巨噬細胞株 RAW 264.7, 並置於含 5% 二氧化碳 (CO<sub>2</sub>) 的 37°C 培養箱中培養, 待細胞長至約培養盤七、八成滿時, 以細胞刮勺將細胞取下, 離心收集細胞, 取其中 1/4 的細胞繼續繼代 (passage) 培養。

### 2. 小鼠初代脾臟細胞的分離

先將老鼠以二氧化碳進行安樂死, 取下脾臟磨碎, 接著以 10 mL DMEM 培養液將細胞沖洗後, 以 1200 轉離心 5 分鐘後倒掉上清液, 加入 10 mL 紅血球裂解液 (ACK lysis buffer) 後, 靜置於室溫 5 分鐘。接著, 再以 1200 轉離心 5 分鐘, 倒掉上清液, 並用 PBS (Phosphate buffered saline, 縮寫為 PBS) 清洗兩次, 最後計算細胞數以進行後續實驗。

### 3. 人類胚胎腎細胞株的培養

以含有 10% 胎牛血清 (FBS) 與青黴素/鏈黴素雙抗生素 (Penicillin-Streptomycin) 之 MEM 培養液 (GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.) 培養人類胚胎腎細胞株 HEK-293, 並置於含 5% 二氧化碳 (CO<sub>2</sub>) 的 37 °C 培養箱中培養, 待細胞長至約培養盤七、八成滿時, 以 Trypsin-EDTA 0.25% (GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.) 將細胞切下, 離心收集細胞, 取其中 1/4 的細胞繼續繼代培養。

### 4. 分析 CRYT 對細胞增生的影響

將  $1 \times 10^4$  cells/well 種於 96 孔盤 16 小時後, 加入脂多醣 (Lipopolysacchride, 縮寫為 LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 及不同濃度的 CRYT 100  $\mu$ L/well, 間隔 48 小時後, 去除上清液, 加入 0.5 mg/mL MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich) 作用 4 小時。接著, 去除上清液, 加入 DMSO 並放置於旋轉混合器約 15 分鐘以溶解細胞代謝產生的結晶紫, 再以盤式全波長光譜儀測量波長 595 nm 的吸收值。

### 5. 分析 CRYT 對脾臟細胞分泌細胞激素與趨化因子的影響

將計數完的脾臟細胞以  $1 \times 10^6$  cells/well 種於 24 孔盤 (24-well culture plate, Corning, U.S.A.) 中。將 1  $\mu$ g/mL LPS 與 0.6  $\mu$ g/mL CRYT 加入孔內, 等待 48 小時後, 收集上清液。接著, 將收集的樣本請永馥有限公司進行多重細胞激素及趨化因子分析 (Bio-Plex™ Cytokine Assay), 以偵測樣本中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、等發炎因子及 CXCL1、CCL3、CCL4 等趨化因子的含量。

### 6. 分析 CRYT 對細胞遷移的影響

RAW 264.7 細胞以  $3 \times 10^5$  cells/well 種在 transwell 的上層中, 並加入 1  $\mu$ g/mL LPS 及 0.6  $\mu$ g/mL CRYT, 而在 transwell 下層加入 500  $\mu$ L/well 10% FBS-DMEM。培養 10 小時後, 用鑷子將 transwells 取出。以 PBS 輕輕沖洗上室, 並用棉花棒去除上層的細胞。接著以甲醇固定細胞 10 分鐘, 再以 50 mg/mL Propidium iodide (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) 在避光環境下染色 30 分鐘。最後以 PBS 輕輕沖洗後, 細胞以倒立式螢光顯微鏡拍攝。

## 7. RNA 萃取 (RNA isolation)

RAW 264.7 細胞加入 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CRYT 培養後，將細胞置入微量離心管離心後，去除上清液，並加入 1 mL TRIzol (Invitrogen, New Taipei City, Taiwan)，保存於  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。

將樣品取出後放置於室溫中待其解凍。解凍後加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿 (Chloroform, Sigma-Aldrich)，上下搖晃約 15 秒後，在室溫中靜置 3 分鐘。接著以  $12,000 \times g$ ， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  離心 15 分鐘後，取上層透明液至新的微量離心管，並加入 500  $\mu\text{L}$  異丙醇 (2-Propanol, J.T.Baker, Valley, PA, U.S.A.)，上下搖晃 15 秒，在室溫中靜置 10 分鐘。接著以  $12,000 \times g$ ， $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  離心 10 分鐘，去除上清液並加入 1 mL 70 % 乙醇 (Ethanol, ECHO CHEMICAL, Taiwan)。以  $10,000 \times g$ ， $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  離心 5 分鐘後去除上清液，在抽風櫃中風乾，並加入 20  $\mu\text{L}$  無菌二次水。最後以超微量分光光度計測量 RNA 的 OD 值。

## 8. 反轉錄 RT-PCR

取出前述步驟萃取之 RNA 模板，與 Random Hexamers primer (GeneDireX, Inc., Taoyuan, Taiwan) 及 2X Deoxy<sup>+</sup> RT premix (Yeastern Biotech Co., Ltd., New Taipei City, Taiwan) 加入到 PCR 小管中。先使用核酸增量儀以  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，反應 5 分鐘，打開 RNA 及引子，再降溫至  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。每個反應加入 200 單位的 HiSpec Reverse Transcriptase (Yeastern Biotech Co., Ltd.) 後，放入核酸增量儀中，設定條件： $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  反應 10 分鐘； $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  反應 60 分鐘； $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  反應 15 分鐘，最後降溫至  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，得到的 cDNA 後保存於  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。

## 9. 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, 縮寫為 PCR)

將 cDNA 模板、Forward Primer、Reverse Primer、10x AppEx PCR Buffer、10 mM dNTPs Mixtures (Genomics GeneDireX, INC.)、AppEx DNA Polymerase (GeneTeks, New Taipei City, Taiwan)、DDW 加入 PCR 小管並放入核酸增量儀中，目標基因分別為 ITGAL、ITGA4、ITGB2、Cdc42、PAK1、N-WASP、Rac1 及 LIMK1。設定溫度， $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，3 分鐘，再來進行循環。首先是變性 (denaturation)， $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  反應 30 秒，再來是接合 (annealing)，不同基因的引子以各自的最佳黏合溫度反應 30 秒，最後是延伸 (elongation)， $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  反應 40 秒。此三個步驟共循環 35 次，最後降溫至  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

## 10. DNA 電泳

將 2 g 洋菜粉倒入玻璃瓶中，加入 100 mL TAE buffer，以保鮮膜封口並戳些許小洞。用微波爐加熱 2 分鐘使液體澄清，並倒入鑄膠模具中。待其冷卻凝固後，放在 TAE buffer 中並存放於 4 °C 冰箱，隔夜後使用。

將洋菜膠放入模具後置入 DNA 電泳槽，倒入 TAE buffer 直到淹過洋菜膠。接著，將 2  $\mu$ L 6x DNA Loading Dye (GeneDireX, INC.) 和 5  $\mu$ L sample cDNA 混勻，加入上樣孔中。將 10  $\mu$ L 100bp DNA Ladder RTU (GeneDireX, INC.) 加入上樣孔。以電壓 100 V，電流 400 mA 電泳。接著，將洋菜膠取出並放入 EtBr (Sigma-Aldrich) 溶液中染色 30 分鐘後，以紫外光照膠影像系統照膠。

利用軟體 ImageJ 分析膠體電泳照片，藉以觀察 LPS 以及 CRYT 對 RAW 264.7 細胞不同控制細胞遷移基因的影響。

## 11. 共軛焦顯微鏡樣品製作 (觀察細胞黏附分子)

首先將 RAW 264.7 細胞以  $1.2 \times 10^6$  cells/well 分別種於含有 16 mm 蓋玻片之 6 孔盤 (6-well culture plate, Corning)，12 小時後個別加入含有 1  $\mu$ g/mL LPS、0.6  $\mu$ g/mL CRYT 的培養液 10 小時。

將細胞培養液移除並以無菌 PBS 輕輕沖洗，加入 100 倍稀釋的 Concanavalin A (Invitrogen)，在室溫的遮光環境中染色 1 小時。以無菌 PBS 輕輕沖洗後，在室溫中以 4% 多聚甲醛固定 10 分鐘。以無菌 PBS 輕輕沖洗後，接著加入 anti-mouse LFA-1 (Biolegend) 或 anti-mouse VLA-4 (Biolegend) 在室溫的遮光環境中染色 1 小時。以無菌 PBS 輕輕沖洗後，在載玻片上滴上 2  $\mu$ L 片 DAPI (含封片膠)，並用鑷子將蓋玻片從 6 孔盤中取出，倒置在載玻片上。最後以指甲油封片。

Concanavalin A、anti-mouse LFA-1 及 DAPI 可分別被激發出綠色、紅色、藍色螢光，因此藉由倒立共軛焦顯微鏡觀察螢光，以觀察 LPS 以及 CRYT 對 RAW 264.7 細胞型態及黏附分子基因 ITGAL 的產物蛋白質 LFA-1 及 ITGA4 的產物蛋白質 VLA-4 的影響。

## 12. 共軛焦顯微鏡樣品製作 (觀察細胞骨架)

首先將 RAW 264.7 細胞以  $1.2 \times 10^6$  cells/well 分別種於含有 16 mm 蓋玻片之 6 孔盤，12 小時後個別加入含有 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS、0.6  $\mu\text{g/mL}$  CRYT 的培養液 10 小時。

將細胞培養液移除並以無菌 PBS 輕輕沖洗，在室溫中以 4 % 多聚甲醛固定 20 分鐘。以無菌 PBS 輕輕沖洗後，加入 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 打洞 15 分鐘。以無菌 PBS 輕輕沖洗後，接著加入 40 倍稀釋的 Phalloidin (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin, Invitrogen) 在室溫的遮光環境中染色 1 小時。以無菌 PBS 輕輕沖洗後，在載玻片上滴上 2  $\mu\text{L}$ /片 DAPI (含封片膠)，並用鑷子將蓋玻片從 6 孔盤中取出，倒置在載玻片上。最後以指甲油封片。

Phalloidin 及 DAPI 可分別被激發出綠色及藍色螢光，因此藉由倒立共軛焦顯微鏡觀察螢光，以觀察 LPS 以及 CRYT 對 RAW 264.7 細胞骨架型態變化的影響。

## 13. 西方墨點法

脾臟細胞以  $1 \times 10^6$  cells/well 種於 24 孔盤中。將 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS 與 0.6  $\mu\text{g/mL}$  CRYT 加入孔內，等待 48 小時。離心收集細胞後，加入 50  $\mu\text{L}$  的 RIPA buffer (Merck Millipore, U.S.A.)，以 10000  $\times g$ ，4  $^{\circ}\text{C}$  離心 30 分鐘，收集上清液。將蛋白質溶液稀釋 20 倍，同時將 BSA 序列稀釋，並加入 Dual Bradford (Bionovas, Taipei, Taiwan)，以 ELISA reader 測量其 OD 值。根據 BSA 溶液濃度繪製濃度曲線，推知稀釋後蛋白質濃度，乘上稀釋倍率即為蛋白質濃度。

在膠槽中製作上下膠。在 eppendorf 中加入相同量的蛋白質、5  $\mu\text{L}$  4x Sample Buffer (1M Tris-HCL (pH6.8), 8% SDS, 0.04 % bromophenol blue, 40 % glycerol, and 20 % 2-mercaptoethanol) 與 DDW (樣品最終體積為 20  $\mu\text{L}$ )，加熱破壞蛋白質構形。將樣品與 Protein Ladder (GeneDireX, INC.) 加入上樣孔，以 100V 電泳 2 小時。電泳完畢後將蛋白以 150mA 轉印 (transfer) 至 PVDF (Pall Corporation, U.S.A.) 上。以 5 % BSA 溶液或 5 % 脫脂奶在室溫下 blocking 1 小時。以 5 % BSA 溶液或 5 % 脫脂奶作為溶劑，在 PVDF 上分別加入 1000 倍稀釋的 NF- $\kappa$ B 抗體 (NF- $\kappa$ B p65 XP Rabbit mAb D14E15, Asia Bioscience co., ltd., Taipei, Taiwan)、10000 倍稀釋的  $\beta$ -actin 抗體 (beta Actin Loading Control Monoclonal Antibody BA3R, Invitrogen) 與 1000 倍稀釋的 I $\kappa$ B 抗體 (I $\kappa$ B $\alpha$  Mouse mAb L35A5, Asia Bioscience co., ltd., Asia Bioscience co., ltd.)，在 4 $^{\circ}\text{C}$  反應至隔天。以 TBST 潤洗三次後，加入稀釋 10000 倍 Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 抗體

(Jackson ImmunoResearch Inc., U.S.A.) 或 Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)抗體 (Jackson ImmunoResearch Inc.) 置於水平式旋轉器上在室溫反應 1 小時。

在 PVDF 上以 1:1 加入 ECL™ Western Blotting Detection Reagent 1 及 2 (GE Healthcare, U.S.A.)，以全自動高敏感冷光影像系統照膠，並利用 ImageJ 進行分析。

#### 14. 質體放大

分別將預冷且稀釋至 5 µg/mL 的質體 pBIND-ERα Vector (Promega, U.S.A.)及 pGL4.35 [*Luc2P19XGAL4UAS/Hygro*] Vector (Promega) 加入 DH5α (ECOS™ 101 Competent Cells, Yeastern Biotech Co., Ltd., New Taipei City, Taiwan) 在冰上作用 30 分鐘。以 42 °C 使其熱休克 30 秒，放回冰裡 5 分鐘，將細菌加入含有 30 µg/mL 抗生素阿斯匹林 Ampicillin (Sigma-Aldrich) 的 LB medium (Sigma-Aldrich)，在 37 °C 恆溫培養箱培養 16 小時。以高速冷凍離心機 60000 ×g，4°C 離心 15 分鐘，去上清液後，依序加入 Plasmid Midi Kits (Qiagen, Hilden, Germany) P1、P2 及 P3 並離心 18000 ×g，4 °C 離心 10 分鐘，使質體與其他蛋白分離。將上清液倒入 Column 中，以 QC Buffer 清洗雜質，並以 QF Buffer 洗脫質體，並加入其體積 70 % 的 IPA (J.T.Baker) 以進一步提高質體純度，並以酒精清洗，最後以二次水回溶質體。

#### 15. 細胞轉染與雙冷光技術

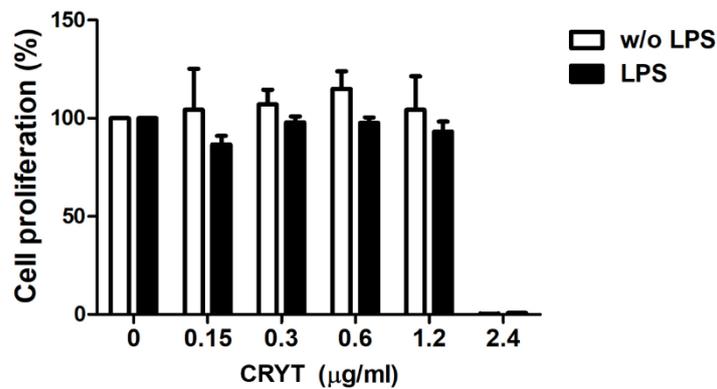
首先將 HEK-293 細胞以  $3 \times 10^4$  cells/well 分別種於 96 孔白盤 (96-well culture plate, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) 16 小時。在 eppendorf 中加入 0.05 µg 的 pBIND-ERα 及 pGL4.35、9 µL 不含血清的 MEM 及 0.3 µL 的 Transit-X2 (Mirus Bio, U.S.A.) 反應 30 分鐘。去除白盤中培養液，將含血清的 MEM 與反應後的質體加入孔中進行轉染 (transfect)。培養 24 小時後分別加入不同濃度之 CRYT 與競爭性雌激素受體拮抗劑 Fulvestrant (Cayman Chemical, U.S.A.)，2 小時後再加入 0.5 nM 的 E2 (Estrodial, Biogems, U.S.A.)，反應 24 小時。以 Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) 依序測量待測物冷光表現，並利用 Excel 進行數據分析。

### 三、研究結果與討論

#### (一) 研究結果

##### 1. 分析 CRYT 對 RAW 264.7 細胞增生的影響

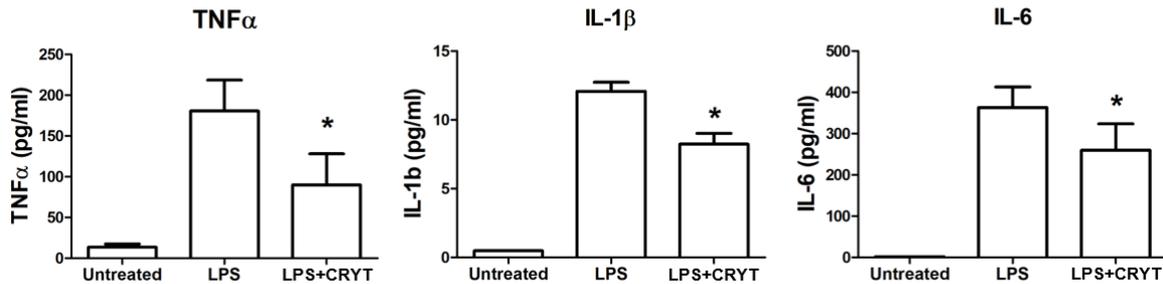
首先分析 CRYT 對免疫細胞增生的影響，由圖一中可以得知，當 CRYT 濃度範圍為 0.15-1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時對 RAW 264.7 細胞沒有毒性，即使加入 LPS 引發 RAW264.7 細胞產生發炎反應，0.15-1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CRYT 仍不影響其細胞增生。根據此結果，我們選擇了濃度 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以進行後續實驗。



圖一、不同濃度的 CRYT 對小鼠巨噬細胞的增生的影響。RAW 264.7 細胞或加入 LPS 的 RAW 264.7 細胞分別以 0.15-1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CRYT 培養 48 小時後，觀察其細胞增生。以未加入 CRYT 的細胞增生作為 100%，並計算加入 CRYT 後之抑制的百分比。

## 2. 分析 CRYT 對脾臟細胞分泌細胞激素與趨化因子的影響

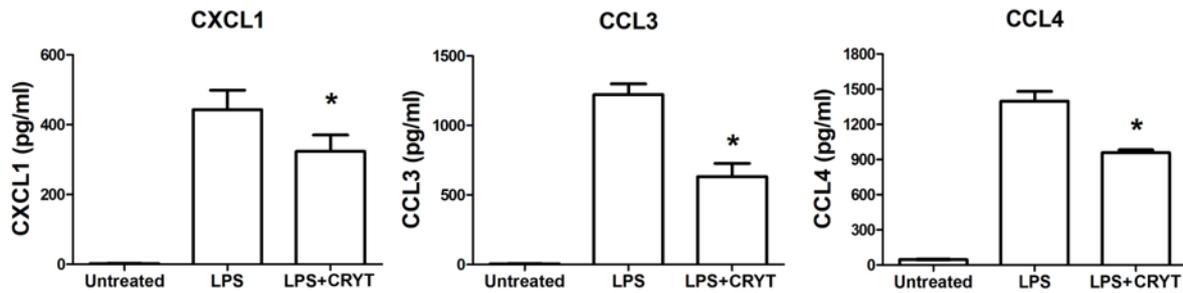
為了觀察 CRYT 對於發炎反應的影響，我們使用小鼠脾臟組織細胞作為研究對象，研究細胞激素及趨化因子的變化。由圖二中可以看出，三種發炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及 IL-6 的表現量經由 LPS 活化免疫細胞後上升，而加入 CRYT 後會表現量皆明顯降低。根據此結果可以推知，CRYT 對於 LPS 誘發之發炎反應有抑制的效果。



圖二、CRYT 對於脾臟細胞之細胞激素 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及 IL-6 表現量之影響。加入 LPS 的脾臟細胞分別以 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CRYT 培養 48 小時後，分析細胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及 IL-6 的濃度。

\* : LPS + CRYT 組與 LPS 組比較有顯著性差異 ( $P < 0.05$ )。

當免疫細胞受到病原菌或外來物刺激時，除了釋放促發炎細胞激素外，還會刺激趨化因子的釋放，以進行趨化免疫細胞遷移的作用。由圖三中可以看出，三種趨化因子 CXCL1、CCL3 及 CCL4 的表現量經由 LPS 活化免疫細胞後顯著上升，而加入 CRYT 後會表現量皆降低。根據此結果可以推知，CRYT 對於 LPS 誘發的趨化因子有抑制的效果。由於脾臟組織中有多種細胞，本實驗探討 CRYT 抑制發炎反應與降低趨化因子的作用，應是對脾臟中的單核球/巨噬細胞有影響，因此後續實驗以巨噬細胞株 RAW 264.7 進行。

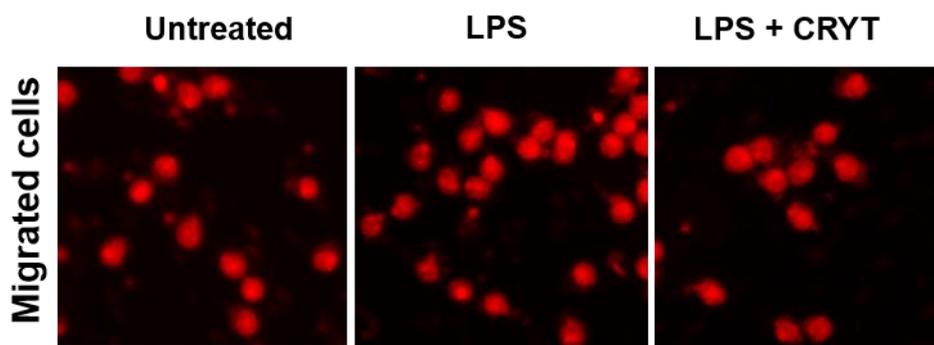


圖三、CRYT 對於脾臟細胞之趨化因子 CXCL1、CCL3 及 CCL4 表現量之影響。加入 LPS 的脾臟細胞分別以 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CRYT 培養 48 小時後，分析細胞上清液中 CXCL1、CCL3 及 CCL4 的濃度。

\* : LPS + CRYT 組與 LPS 組比較有顯著性差異 ( $P < 0.05$ )。

### 3. 分析 CRYT 對 RAW 264.7 細胞遷移的影響

當巨噬細胞釋放趨化因子後，便會趨化免疫細胞進行遷移的作用，因此，分析 CRYT 對免疫細胞遷移的影響。由圖四結果得知，RAW 264.7 細胞在 LPS 的誘發下，細胞遷移數較多，而加入 CRYT 後遷移數變少。因此，可以推知在 LPS 誘發後，CRYT 會抑制 RAW 264.7 細胞的遷移。後續實驗中會進一步探討 CRYT 對不同控制細胞遷移的機制。

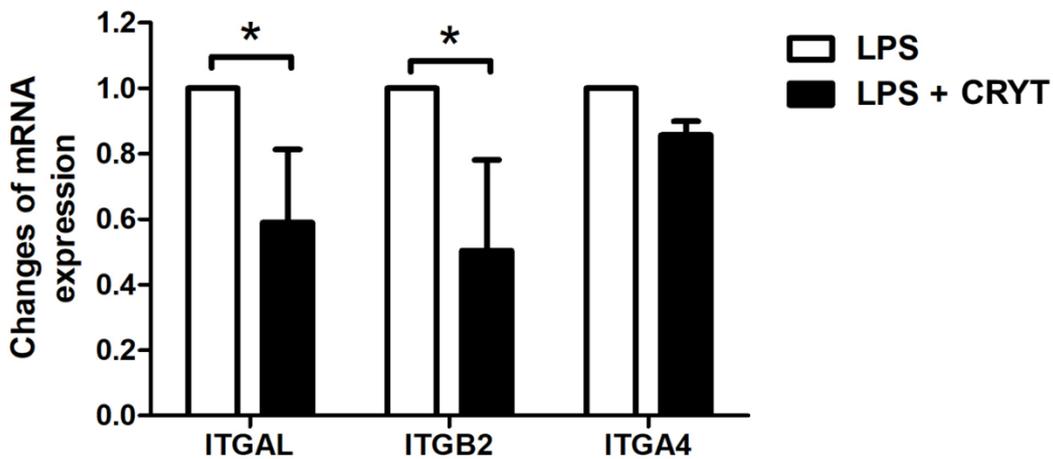


圖四、CRYT 對巨噬細胞遷移之影響。加入 LPS 的 RAW 264.7 細胞以 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CRYT 培養 10 小時後，以螢光顯微鏡分析細胞的遷移。紅色螢光代表遷移的細胞。

#### 4. 分析 CRYT 對不同控制 RAW 264.7 細胞遷移的黏附分子基因表現量的影響

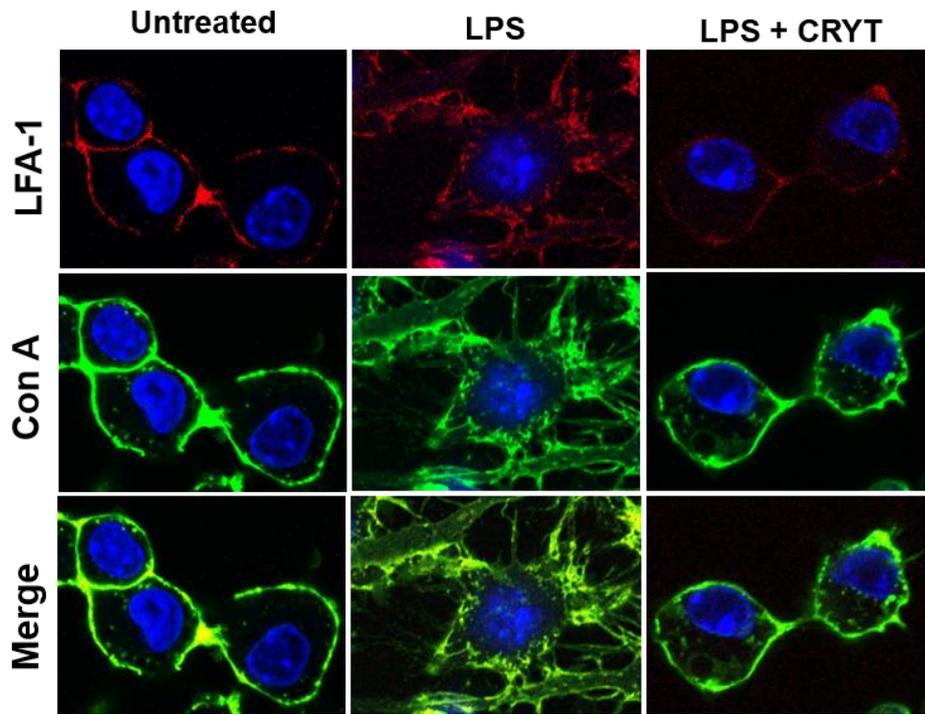
當巨噬細胞受到趨化因子活化後，便會刺激細胞表面黏附分子的增加，以利其在血管中的滾動並進行遷移。本研究針對 LFA-1 與 VLA-4 兩種黏附分子進行研究。為分析 CRYT 對 LFA-1 與 VLA-4 兩種黏附分子表現量之影響，我們利用 RT-PCR 分析 LFA-1 (其組成單位之基因名為 ITGAL 及 ITGB2) 與 VLA-4 (其組成單位之基因名為 ITGA4 及 ITGB2) 兩種黏附分子之 mRNA 的表現量。

圖五結果得知，RAW 264.7 細胞在含有 LPS 的環境中加入 CRYT 後，CRYT 顯著抑制 ITGAL 的 mRNA 表現量。而 CRYT 也會抑制 ITGA4 的表現，但未達統計上的顯著差異。

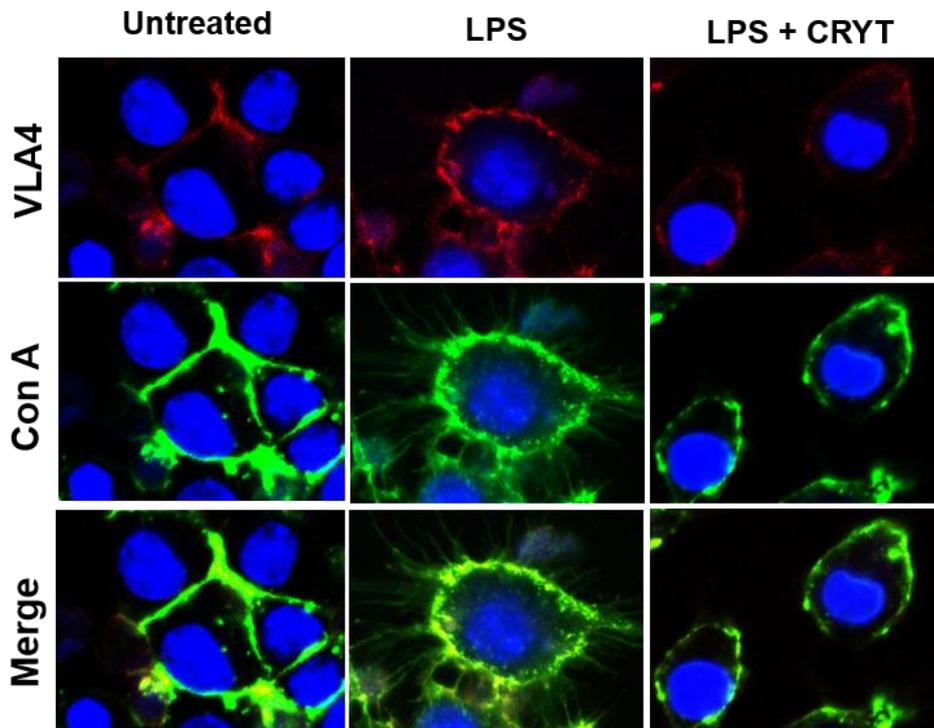


圖五、CRYT 對巨噬細胞表面黏附分子 ITGAL、ITGB2 與 ITGA4 的 mRNA 表現量之影響。以 LPS 組的 mRNA 表現量作為 100%，並計算加入 CRYT 後之抑制的百分比 (normalization)。\* : LPS + CRYT 組與 LPS 組比較有顯著性差異 (P < 0.05)。

接著，以共軛焦顯微鏡觀察 RAW 264.7 在 LPS 和 CRYT 作用下其 LFA-1 和 VLA-4 的表現量。由圖六及圖七可見，CRYT 可抑制 LFA-1 以及 VLA-4 在細胞表面的表現量，此結果與 mRNA 表現量相符。另外，可藉由影像分析觀察細胞型態的變化，在 LPS 誘發下，RAW 264.7 細胞有偽足 (Pseudopodia) 的生成，而加入 CRYT 後，細胞型態回復如同 Untreated 的組別，由此結果亦顯示 CRYT 不但抑制細胞表面黏附分子的表現量，應還可抑制細胞骨架的變化。



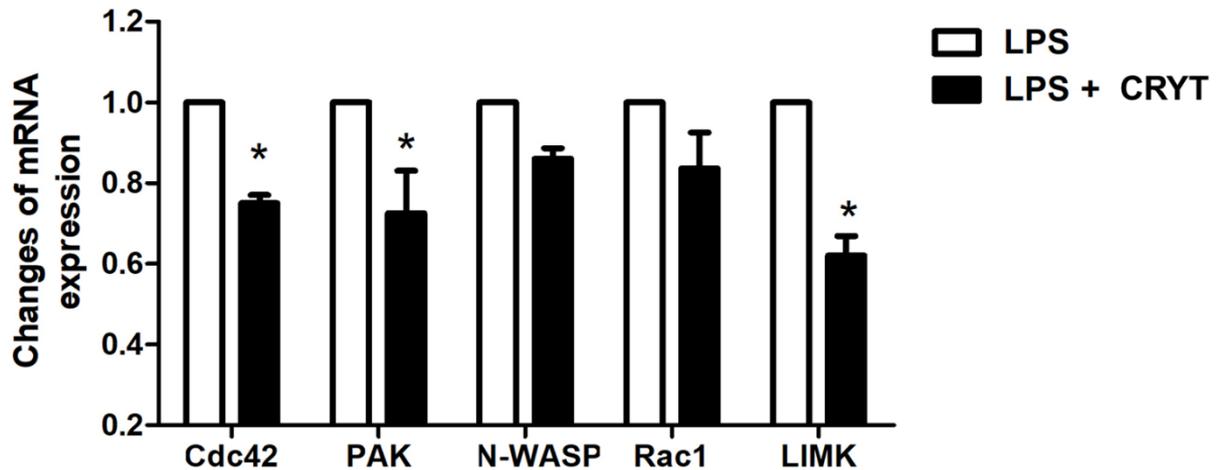
圖六、CRYT 對細胞表面黏附分子 LFA-1 的影響。RAW 264.7 細胞經 LPS 刺激，並加入 CRYT 培養 10 小時，再利用共軛焦顯微鏡觀察 LFA-1 的表現量。紅螢光為 LFA-1，綠螢光為 Con A，代表細胞膜，藍螢光為細胞核。本分析在 400X 視野下觀察。



圖七、CRYT 對細胞表面黏附分子 VLA-4 的影響。RAW 264.7 細胞經 LPS 刺激，並加入 CRYT 培養 10 小時，再利用共軛焦顯微鏡觀察 VLA-4 的表現量。紅螢光為 VLA-4，綠螢光為 Con A，代表細胞膜，藍螢光為細胞核。本分析在 400X 視野下觀察。

## 5. 分析 CRYT 對 RAW 264.7 細胞骨架的調控分子的影響

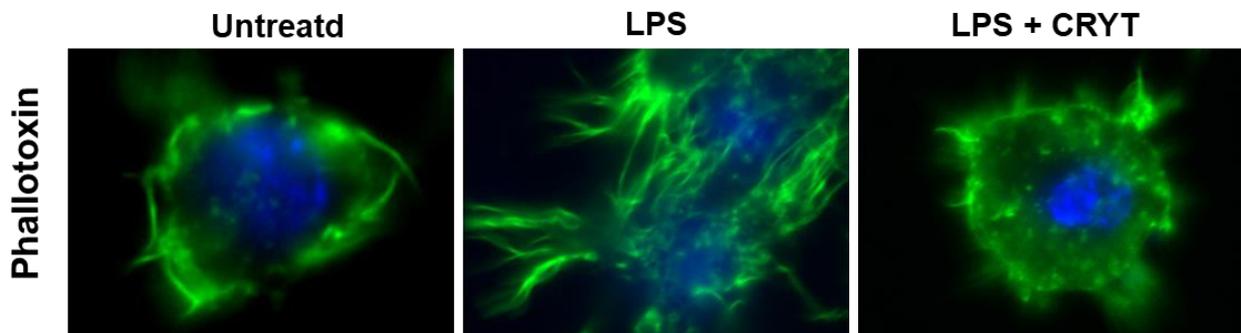
為了研究 CRYT 對 RAW 264.7 細胞骨架的調控有影響，以 RT-PCR 分析調控分子 Cdc42、PAK1、WASP、Rac1 及 LIMK1 的 mRNA 表現量。RAW 264.7 細胞在同樣含有 LPS 的環境中，CRYT 可抑制 Cdc42、PAK1、WASP、Rac1 及 LIMK1 的 mRNA 表現量。因此可以推知，在 LPS 誘發後，CRYT 對 RAW 264.7 的此五種調控細胞骨架的分子具有抑制效果。



圖八、CRYT 對 RAW 264.7 細胞骨架的調控分子的影響。以 LPS 組的 mRNA 表現量作為 100%，並計算加入 CRYT 後之抑制的百分比。

\*: LPS + CRYT 組與 LPS 組比較有顯著性差異 ( $P < 0.05$ )。

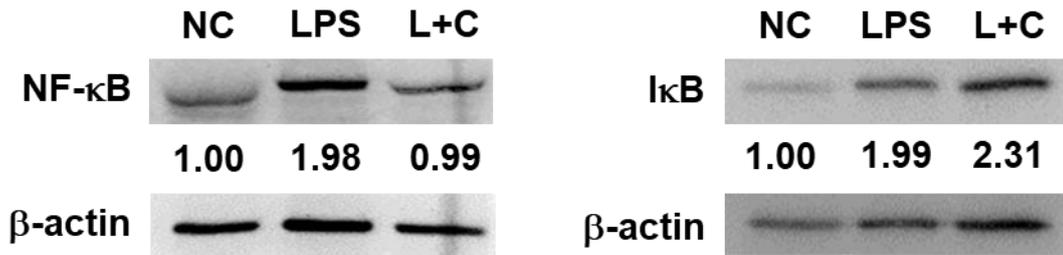
接著，以共軛焦顯微鏡觀察 RAW 264.7 在 LPS 和 CRYT 作用下其細胞骨架的型態。由圖十可見，在 LPS 誘發下，RAW 264.7 細胞骨架 F-actin 明顯呈現絲狀，而加入 CRYT 後，細胞骨架則呈現點狀。此結果顯示 CRYT 可以影響細胞骨架的接合，進而抑制細胞的遷移。



圖十、CRYT 對細胞骨架的影響。RAW 264.7 細胞經 LPS 刺激，並加入 CRYT 培養 10 小時，再利用共軛焦顯微鏡觀察細胞骨架的型態。綠螢光為 Phallotoxin，代表細胞骨架，藍螢光為細胞核。本分析在 1200X 視野下觀察。

## 6. 分析 CRYT 對於發炎反應的作用機制

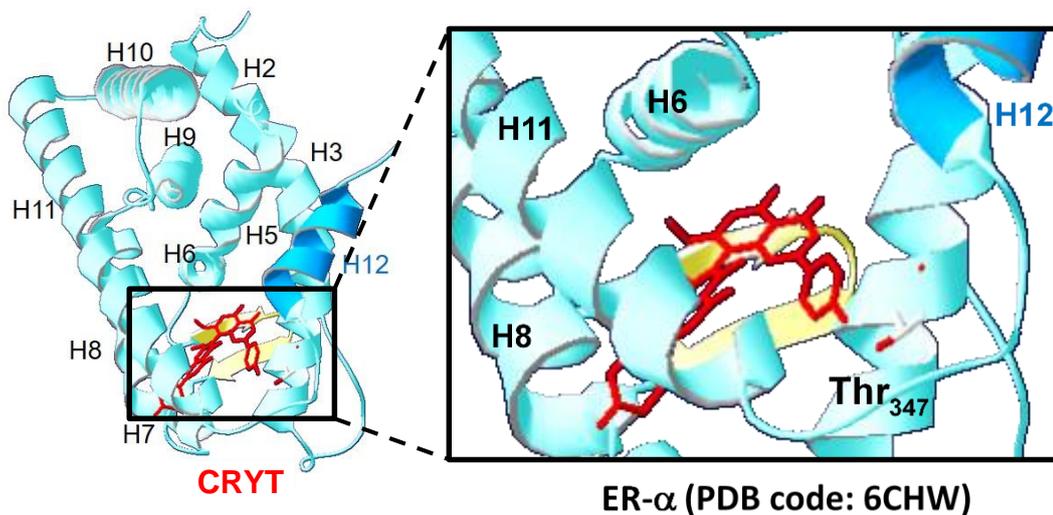
為了確認 CRYT 是否透過 NF- $\kappa$ B 路徑影響細胞的發炎反應與遷移，我們利用西方墨點法分析蛋白 NF- $\kappa$ B 與其抑制蛋白 I $\kappa$ B 的表現量。由圖十一可見，小鼠脾臟細胞在 LPS 的誘發下，NF- $\kappa$ B 的蛋白表現量顯著上升，而在加入 CRYT 後則會明顯下降。同時，抑制蛋白 I $\kappa$ B 的表現量變化與 NF- $\kappa$ B 相反。因此可以推知，CRYT 能有效抑制由 NF- $\kappa$ B 路徑引起的發炎反應與細胞遷移。



圖十一、CRYT 對 NF- $\kappa$ B 與 I $\kappa$ B 蛋白表現量的影響。小鼠脾臟細胞經 LPS 刺激，並加入 CRYT 培養 10 小時，再利用西方墨點法分析 NF- $\kappa$ B 與 I $\kappa$ B 蛋白表現量。

## 7. 以程式預測藥物標的蛋白

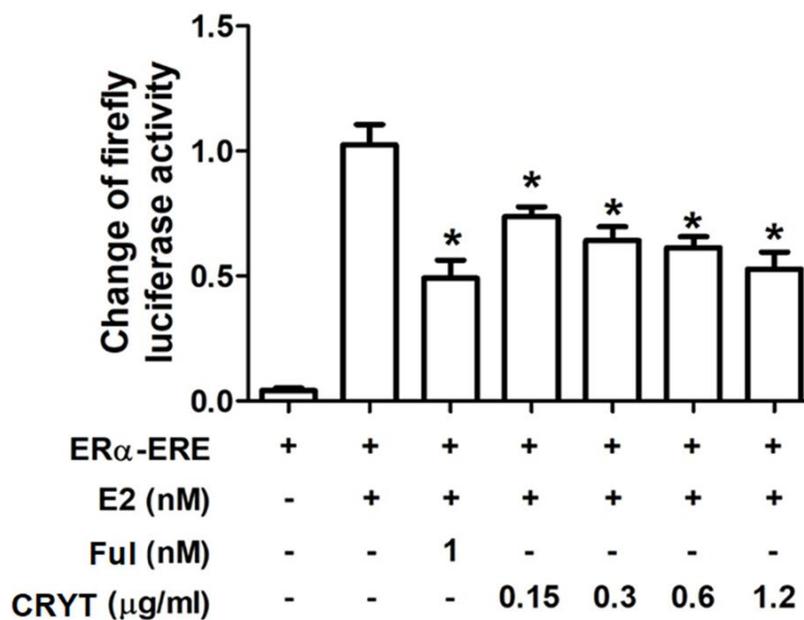
我們利用 SwissPrediction 程式模擬 CRYT 標的蛋白。我們選用與免疫反應相關的雌激素受體，並利用 iGEMDOCK 程式模擬最佳的藥物結合位置，結果如圖十二。圖十二中 CRYT 在雌激素受體上的接合位置與雌激素相同，因此我們推測 CRYT 會作用在雌激素接合位。



圖十二、CRYT 在 ER 的結合位置。

## 8. 利用細胞表現藥物標的蛋白

為了驗證模擬結果，我們將含有 ER- Estrogen Response Elements (ER-ERE) 的質體轉染進 HEK-293 細胞，使其表現雌激素受體，再利用 CRYT 與雌激素競爭 ER 上的接合位，分析 CRYT 是否透過雌激素受體影響免疫反應。由圖十三可見，加入 E2 後冷光強度確實會上升。我們選用競爭性雌激素接受體拮抗劑 Fulvestrant 作為正控制組，以驗證此實驗的可行性。從圖十三中也可看出，隨著 CRYT 的劑量上升，其冷光表現下降。因此可以得知，CRYT 與雌激素受體結合後會抑制雌激素受體的轉錄作用。



圖十三、加入 E2、Fulvestrant 與不同濃度之 CRYT 後冷光表現的變化。質體轉染進 HEK-293 細胞，24 小時後加入 CRYT 與 Fulvestrant，2 小時後再加入 E2，作用 24 小時，最後利用雙冷光技術測量冷光強度。

\* : E2 + CRYT 組與 E2 組比較有顯著性差異 (P < 0.05)。

## (二) 討論

免疫細胞受到刺激時會釋放促發炎細胞激素以及趨化因子，趨化免疫細胞遷移，引起發炎反應，而細胞的遷移主要透過兩種方式：一種為利用細胞膜上的黏附分子在血管中滾動遷移，另一種為透過細胞骨架的變化來移動。由實驗的圖二和圖三結果可得知此雙黃酮類藥物 CRYT 能夠抑制促發炎細胞激素以及趨化因子的釋放，也能進而抑制免疫細胞的遷移 (圖四)。在免疫細胞的兩種遷移方式上，CRYT 能夠抑制黏附分子基因的表現 (圖五)，對於細胞中細胞骨架調控分子的基因也有抑制的效果 (圖八)。綜合上述實驗結果，CRYT 能夠抑制發炎反應與免疫細胞的遷移。

2005 年在 *British Journal of Pharmacology* 由 Duraisamy Kempuraj 等人發現在 100  $\mu\text{M}$  不同黃酮醇 (Flavonols) 作用下對於人臍血來源的肥大細胞 (hCBMCs) 在 IgE 激活下產生的 IL-6、IL-8 及 TNF- $\alpha$  有顯著的抑制效果。由上述研究得知，黃酮醇可能適合用於治療 IgE 調控之發炎性疾病。而 Nan Xia 等人在 *Experimental and Therapeutic Medicine* (2016) 的研究發現在實驗性自身免疫性甲狀腺炎 (experimental autoimmune thyroiditis, EAT) 中，木犀草素 (20  $\mu\text{M}$ ) 透過抑制 IFN- $\gamma$  誘導之 COX2、p-STAT1 (Y701) 和 p-STAT3 (Y705) 的表達而發揮抗炎作用，而總 STAT1 和 STAT3 仍然存在不變。上清液中細胞因子 TNF- $\alpha$  的檢測還表明木犀草素通過顯著降低體外 TNF- $\alpha$  的分泌，抑制發炎反應。此外，2015 年由 Mascaraque C. 等人發表在 *British Journal of Nutrition* 的研究顯示對大鼠口服施用 3 mg/kg 芹菜素 K (Apigenin K) 可以使結腸炎性的標誌物表達降低，包含 TNF- $\alpha$  等發炎因子，轉化生長因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )，IL-6，細胞間黏附分子及趨化因子 (CC 基序) 配體。從以上三篇研究中可以得知，在相同抑制發炎反應的效果下，CRYT 用藥的濃度較低，我們推測 CRYT 未來有抑制發炎及抗腫瘤的能力，更對治療腫瘤有幫助。

NF- $\kappa\text{B}$  是發炎反應的重要調控者，因此，抑制 NF- $\kappa\text{B}$  的作用已被作為抑制發炎反應的關鍵指標。黃酮類化合物包括金雀異黃酮 (Genistein)、山柰酚 (Kaempferol)、槲皮素 (Quercetin) 等能夠抑制 NF- $\kappa\text{B}$  的活化，以抑制發炎反應 (Hämäläinen et al., 2007)。薑黃素衍生物 3, 5-Bis (2-pyridinylmethylidene)-4-piperidone (EF31) 能夠抑制 NF- $\kappa\text{B}$  信號路徑，進而抑制發炎反應，同時也能抗癌 (Olivera et al., 2011)。本研究中，CRYT 可有效抑制 NF- $\kappa\text{B}$  的表現量，並同時增加 I $\kappa\text{B}$  的表現量 (圖十一)，與其它黃酮類藥物有類似的結果。因此，CRYT 能夠透過抑制 NF- $\kappa\text{B}$  的表現來抗發炎。

CRYT 可直接與標的蛋白 ER 的雌激素接合位結合 (圖十二)，並抑制 ER 的轉錄作用 (圖十三)。ER 是一種轉錄因子，在我們研究中所分析的細胞激素、黏附分子與調控 F-actin 的遷移分子，其基因的啟動子上皆有 ER 的轉錄因子結合位，由此可以得知，研究中分析的分子皆會受 ER 調控。因此，CRYT 能藉由抑制 ER 的轉錄作用而抑制發炎反應與細胞的遷移。

未來，我們希望能利用其他技術驗證 CRYT 作用的機制，研究其成為抗發炎藥物的可能性。

## 四、結論與應用

### (一) 結論

根據實驗結果，CRYT 在濃度範圍為 0.15-1.2  $\mu\text{g/mL}$  時不影響 RAW 264.7 細胞的增生。其在濃度為 0.6  $\mu\text{g/mL}$  時能夠抑制脾臟細胞分泌發炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 與趨化因子 CXCL1、CCL3 及 CCL4，並能夠顯著抑制 RAW 264.7 細胞之黏附分子 LFA-1 的 mRNA 表現量，進而抑制免疫細胞在血管中的遷移。以共軛焦顯微鏡觀察，CRYT 能夠抑制黏附分子 LFA-1 及 VLA-4 的表現量。CRYT 也能夠抑制細胞骨架調控分子 Cdc42、PAK1、WASP、Rac1 及 LIMK1 的 mRNA 表現量，同時也會抑制細胞骨架結合以抑制免疫細胞的移動。在作用途徑的部分，CRYT 能抑制 NF- $\kappa$ B 的表現量並促進 I $\kappa$ B 的表現量，進而影響其下游免疫反應。而在作用機制的方面，CRYT 會與雌激素受體結合，抑制雌激素受體的轉錄作用，以抑制促發炎激素與細胞移動分子的調控。因此可以得知，CRYT 對發炎反應以及免疫細胞的遷移都有抑制的效果。

### (二) 應用

發炎反應是身體的防禦機制，以對抗外來病原體入侵，但是過度的發炎反應可能會導致更嚴重的後果，甚至會有生命危險。以細菌性或病毒性所引發的敗血症為例，其致死率可達 30%，而若引發敗血性休克，則死亡率高達 80%，其致病原因主要是過度免疫反應而造成器官衰竭，最後導致死亡。另外，許多流行病毒的死亡案例亦是因為過度發炎引起的免疫風暴所造成的。我們認為本研究主要的應用性在於 CRYT 能夠減緩過度急性發炎，以爭取更多治療時間，同時 CRYT 也能改善過度發炎造成的免疫混亂，進而恢復免疫平衡。

## 五、參考文獻

1. Hämäläinen M., Nieminen R., Vuorela P., Heinonen M., & Moilanen E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2007, 45673. doi: 10.1155/2007/45673
2. Hwang C. H., Lin Y. L., Liu Y. K., Chen C. H., Wu H. Y., Chang C. C., Chang C. Y., Chang Y. K., Chiu Y. H., Liao K. W., Lai Y. K. (2011). 7,7"-Dimethoxyagastisflavone-induced apoptotic or autophagic cell death in different cancer cells. *Phytotherapy Research*, 26(4), 528-534. doi: 10.1002/ptr.3583
3. Jawad I., Lukšić I., Rafnsson S. (2012). Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. *Journal of Global Health*, 2(1), 010404. doi:10.7189/jogh.02.010404
4. Kempuraj D., Madhappan B., Christodoulou S., Boucher W., Cao J., Papadopoulou N., Cetrulo C. L., Theoharides T. C. (2005). Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. *British Journal of Pharmacology*, 145(7), 934-944. doi: 10.1038/sj.bjp.0706246
5. Lin C. M., Lin Y. L., Ho S. Y., Chen P. R., Tsai Y. H., Chung C. H., Hwang C. H., Tsai N. M., Tzou S. C., Ke C. Y., Chang J., Chan Y. L., Wang Y. S., Chi K. H., Liao K. W. (2017). The inhibitory effect of 7,7"-dimethoxyagastisflavone on the metastasis of melanoma cells via the suppression of F-actin polymerization. *Oncotarget*, 8(36), 60046-60059. doi: 10.18632/oncotarget.10960
6. Liu Q., Zhou Y. H., Yang Z. Q. (2015). The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cellular & Molecular Immunology*, 13(1), 3-10. doi: 10.1038/cmi.2015.74
7. López-Lázaro M. (2011). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(1), 31-59. doi: 10.2174/138955709787001712

8. Mascaraque C., González R., Suárez M. D., Zarzuelo A., Sánchez de Medina F., & Martínez-Augustín O. (2015). Intestinal anti-inflammatory activity of apigenin K in two rat colitis models induced by trinitrobenzenesulfonic acid and dextran sulphate sodium. *The British Journal of Nutrition*, 113(4), 618-626. doi: 10.1017/S0007114514004292
9. Nothlings U., Murphy S. P., Wilkens L. R., Henderson B. E., Kolonel L. N. (2007). Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. *American Journal of Epidemiology*, 166(8), 924-931. doi: 10.1093/aje/kwm172
10. Olivera A., Moore T. W., Hu F., Brown A. P., Sun A., Liotta D. C., Snyder J. P., Yoon Y., Shim H., Marcus A. I., Miller A. H., Pace T. W. (2011). Inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway by the curcumin analog, 3,5-Bis(2-pyridinylmethylidene)-4-piperidone (EF31): anti-inflammatory and anti-cancer properties. *International Immunopharmacology*, 12(2), 368-377. doi: 10.1016/j.intimp.2011.12.009
11. Xia N., Chen G., Liu M., Ye X., Pan Y., Ge J., Mao Y., Wang H., Wang J., Xie S. (2016). Anti-inflammatory effects of luteolin on experimental autoimmune thyroiditis in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(6), 4049-4054. doi: 10.3892/etm.2016.3854

附件一

Primer

Name	Sequence
mITGAL sense	5'-GCCAGTCAGCCTACATGGTT
mITGAL antisense	5'-AGGTCTGTGAGCCATCGAAC
mITGA4 sense	5'-CAGCAAAAAGGCATAGCGGG
mITGA4 antisense	5'-CATGGGCCACGTTCTCATCT
mCdc42 sense	5'-CGGAGAAGCTGAGGACAAGAT
mCdc42 antisense	5'-GAGTGTATGGCTCTCCACCAA
mPAK1 sense	5'-ACTATGATTGGAGCCGGCAG
mPAK1 antisense	5'-TGGCATTCCCGTAAACTCCC
mWASP sense	5'-AATGCTGGACACTGGCTACC
mWASP antisense	5'-ACGGGGTGGGAGTGAGATAA
mRac1 sense	5'-AGATGCAGGCCATCAAGTGT
mRac1 antisense	5'-TAGGAGAGGGGACGCAATCT
mLIMK1 sense	5'-CCATCAAGGTGACACACCGA
mLIMK1 antisense	5'-GCAAAGCTGACCCTCTGACT
mbeta-Actin sense	5'-TTGGGTATGGAATCCTGTGG
mbeta-Actin antisense	5'-TCGTACTCCTGCTTGCTGAT

## 【評語】 090001

非常有趣！作者研究設計完備，預測 ER 作用標的為一重要發現。作者是使用多重實驗設計證明其假設，深度廣度皆備。未來實驗可以再加強下列方向：作者研究 CRYT 對 LPS 誘發之發炎反應與免疫細胞遷移的影響，並發現 CRYT 確實會抑制發炎與免疫反應。除了巨噬細胞外，CRYT 其他的免疫細胞有用嗎？在不同程度下的免疫反應中，CRYT 都有相同的作用嗎？免疫反應是自我保護的一道防線。該如何將 CRYT 送到想要他到的地方，而不影響身體其他部位的免疫反應？