大專學生研究計畫

年度 ： 106 ～ 106
執行機關： 公立大學 國立嘉義大學 微生物免疫與生物藥學系
學生姓名： 計畫名稱：
學門 ： 生物科學類 全部
排序 ： 依年度 依機關 依姓名

查詢

設定每頁顯示筆數： 10

年度	學生姓名	執行機關	內容
106	[illegible]	國立嘉義大學微生物免疫與生物藥學系	計畫名稱：Cloning and activity analysis of human GSTM5 gene promoter using luciferase reporter plasmid 計畫編號：106-2813-C-415-048-B 成果報告：無電子檔 執行起迄：2017/07/01~2018/02/28 指導教授：劉怡文 核定金額：48,000元
106	籃子喬	國立嘉義大學微生物免疫與生物藥學系	計畫名稱：一氧化碳釋放劑對視網膜色素上皮細胞抗氧化壓力及抗發炎的保護機轉 計畫編號：106-2813-C-415-051-B 成果報告：無電子檔 執行起迄：2017/07/01~2018/02/28 指導教授：翁炳孫 核定金額：48,000元
106	[illegible]	國立嘉義大學微生物免疫與生物藥學系	計畫名稱：Vorinostat 於膀胱癌中抗癌機制探討與小鼠膀胱癌之經尿道給藥治療效果 計畫編號：106-2813-C-415-049-B 成果報告：無電子檔 執行起迄：2017/07/01~2018/02/28 指導教授：劉怡文 核定金額：48,000元

共1頁(共3筆)，目前在 第1頁

二、研究計畫內容

(一) 摘要

視網膜病變會導致視力下降甚至失明，這尤其是老年性黃斑部病變的重要病理。在高齡化甚至超高齡化的社會趨勢下，為了高齡長者的生活品質，預防及治療因老化、生活習慣以及環境因素而導致的視網膜病變相關眼疾日趨重要。

位於視網膜最底層的色素上皮層由單一層細胞組成，具有為視網膜其他組成細胞提供養分，並且調控物質運輸及廢物代謝的重要角色，而氧化壓力與發炎反應所誘發此部分細胞的凋亡壞死是視網膜病變的成因之一，因此研究能輔助細胞對抗氧化壓力及抑制其發炎反應的藥物，探討保護此部分細胞的機轉，對預防此類病變將具有很大的意義與價值。

一氧化碳釋放劑在先前研究中，曾被指出對其他哺乳類細胞有抗氧化、抗發炎或血管舒張等保護效果；近期本實驗室使用 CORM-2 及 CORM-3 的初步測試結果也顯示：加藥處理後，人類視網膜色素上皮細胞 ARPE-19 中，抗氧化相關胜肽 GSH 的含量有顯著提升、發炎因子 ICAM-1 也得到抑制，因此我們希望研究一氧化碳釋放劑對人類視網膜色素上皮細胞抗氧化與抗發炎的保護效果，並進一步探討此類試劑保護該種細胞的可能機轉。

(二) 研究動機與研究問題

老年性黃斑部病變 (Age-related macular degeneration, AMD) 是造成老年人視力退化甚至失明的主因。危險因子包括抽菸、缺乏運動、高血壓、高膽固醇、缺乏微生素等，也有研究顯示出特定種族與家族病史也可能是高危險群，且年齡越高，罹患率也越高。在高齡化越發嚴重的社會，逐漸受到重視。其病程，依據在視網膜底層的脂質與蛋白質沉積物的大小數量分為三階段，前期、中期和晚期，晚期病程又分為乾濕兩種。發展到晚期時，將導致視力嚴重模糊乃至失明，嚴重影響患者的生活品質。因此預防並且延緩發病進程是視力保健與醫療的重要目標。

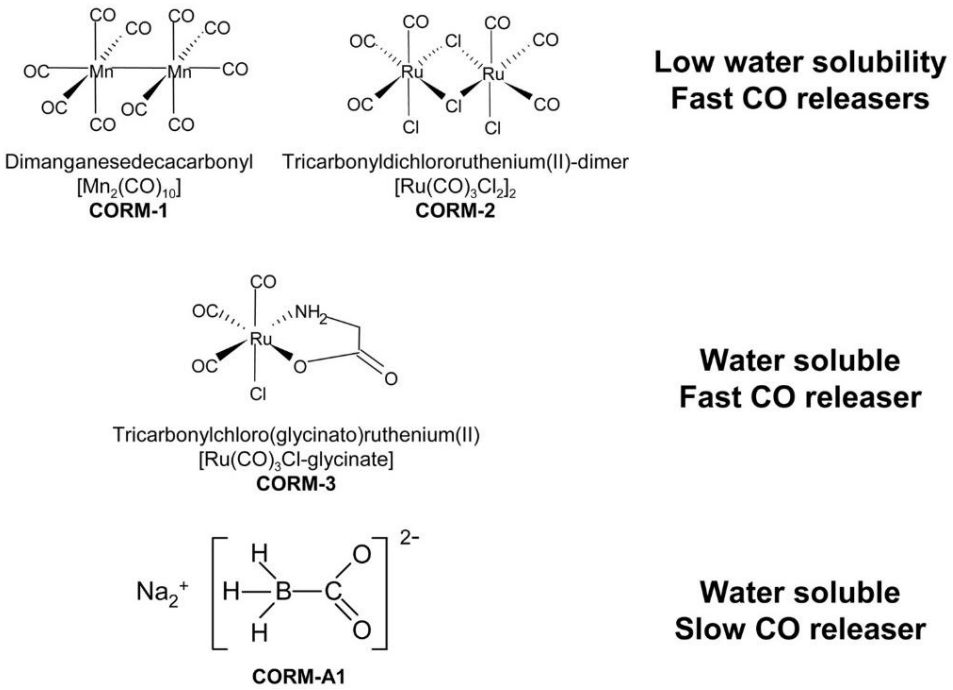
化學因子 (如吸菸、特殊藥物) 或物理因子 (如強光直射、缺血再灌注) 等造成的氧化壓力導致視網膜細胞的損傷與死亡，被認為是誘發/增進黃斑部病變的成因之一。原本位於視網膜最底層的視網膜色素上皮層富含色素，例如：黑色素、胡蘿蔔素、葉黃素與玉米黃素等，可以過濾對視網膜細胞造成傷害與毒性的藍光與紫外光。還具有酵素 (如：SOD、Catalase) 和非酵素類 (如：類胡蘿蔔素、GSH、黑色素) 的抗氧化成分，保護強光造成的氧化傷害。並且依靠健康細胞中本身具有對受損 DNA、脂質與蛋白質的修復作用，維持著整個視網膜的正常運作和結構[1]。因此我們希望由此下手，保護視網膜色素上皮細胞，進而增強整個視網膜的健康，作為預防老年性黃斑部病變的方法，或者至少輔助延緩病程。

也有越來越多研究指出，由補體系統活化的發炎反應也是黃斑部病變惡化的病理因素之一[2]。透過先天及後天的免疫反應，可以促使壞死的視網膜細胞的清除，只是一旦發炎反應被過度的誘發，周遭健康的細胞也會慘遭池魚之殃。距離脈絡膜微血管最近，作為視網膜-微血管屏障的色素上皮層尤其容易遭受通透出血管的免疫細胞攻擊，故減少視網膜色素上皮細胞釋放促發炎物質，即降低發炎反應程度，也可以做為預防或減緩病程的可能方式之一。

一氧化碳因容易取代氧與血紅素中的鐵離子緊緊結合，阻礙體內氧的運輸，大量吸入會使人缺氧致死，因此長年被認為在體內除了造成毒性意外沒有甚麼生理作用。然而，一氧化碳在西元 1969 年被指出是哺乳動物體內血紅素氧化酶 (Heme oxygenase) 氧化分解血紅素的產物之一[3]，在體內自然產生；自 1990 年代起，小劑量的一氧化碳在哺乳動物體內的生理功能也逐漸被研究發現，並且令越來越多化學、生物、藥學、醫學等領域科學家感興趣並重視[4, 5]，甚至因為它在循環系統、神經系統、免疫系統

等相關疾病被指出有治療潛能，促使科學家人工合成多種可以在體內釋放有限濃度一氧化碳的分子，Motterlini 博士等人在此方面尤其有許多著名貢獻[4]。典型的一氧化碳釋放劑 (Carbon monoxide releasing molecule, CORM) 多以過度金屬為中心 (如 Ru、Mn、Fe、Bo) 結合數個羰基 (-CO)，加上一些其他修飾元素或官能基。當羰基被有機溶劑分子或水取代後，即被以一氧化碳氣體的形式釋放出來。

由於多重對人體有益的生理功能，CORM 近年來被大量研究嘗試於各種疾病的預防與治療，我們也很看好其潛力，想測試是否能利用 CORM 以抗氧化或其他途徑保護視網膜色素上皮層，進而預防老年性黃斑部病變甚至延緩病程。如果真能有效保護該部分細胞，將進一步探討其保護機轉，以供保健及臨床應用參考。本研究計畫使用兩種 CORM，利用 ARPE-19 細胞株作為人類視網膜色素上皮細胞的模型，測試其對細胞產生的各種影響：一種是疏水性的 CORM-2，分子式$[Ru(CO)_3Cl_2]_2$ (Tricarbonyl dichlororuthenium(II) dimer, TCDC)；另一種是水溶性的 CORM-3，分子式 $C_5H_4ClNO_5Ru$ (Tricarbonylchloro (glycinato) ruthenium(II))。兩種分子皆由 Motterlini 博士所在團隊合成出，相對於更早合成出的 CORM-1，分別為第 2、3 代，故以 CORM-2、CORM-3 編號命名之[6]。



圖一、早期四種一氧化碳釋放劑的結構與性質

綜上所述，本研究計畫探討的問題概括為以下三點：

1. 一氧化碳釋放劑是否對視網膜色素上皮細胞有抗氧化壓力保護效果？
2. 一氧化碳釋放劑是否對視網膜色素上皮細胞有抗發炎的作用？
3. 一氧化碳釋放劑可能透過那些機轉保護視網膜色素上皮細胞？

(三) 文獻回顧與探討

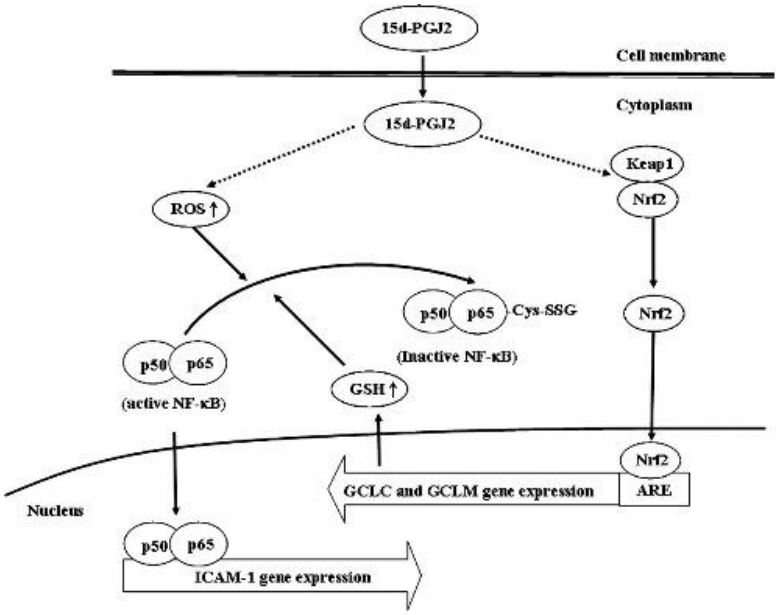
根據國際衛生組織 WHO 在 2002 年公布的失明原因統計，老年性黃斑部病變 (Age-related macular degeneration, AMD) 是最常見導致不可逆失明的成因，且在老年人口中為主要原因。高危險因子包括高齡、性別種族差異、飲食缺乏維生素、吸菸、強光直射、高血脂、高血壓、高膽固醇等，這些多會造成視網膜底層的氧化還原平衡失調，使色素上皮細胞受到強烈氧化壓力傷害。有研究顯示，適量補充抗氧化維生素，如類胡蘿蔔素、維生素 C 和 E 等，有助於預防和減緩病程發展[2]。

生活中我們隨時隨地面臨著來自體內體外的各種氧化壓力，在合理範圍內，身體可以靠酵素或非酵素類的抗氧化分子，例如超氧化物歧化酶 (Superoxidase dismutase, SOD)、觸酶 (Catalase)、穀胱甘肽 (Glutathione, GSH)、類胡蘿蔔素等，將活性氧族群 (Reactive oxygen species, ROS) 清除。然而，一旦打破體內的氧化還原平衡狀態，就會無法壓制過多的氧化壓力，導致許多生理機能因核酸及蛋白質被自由基攻擊而失去活性，例如脂質的代謝酵素遭到直接或間接破壞，就容易在視網膜底部囤積多與脂質，導致視網膜下不平整、脈絡膜微血管阻塞等病態現象，在眼底形成影響精確視力的許多大型廢物囤積斑塊 (drusen) [2]。幾十年來，越來越多細胞組織及動物模式的實驗也證明，在健康個體中原本應該有免疫反應降低機制的視網膜細胞，若失去平衡而被穿透 Bruch membrane 的免疫細胞大量攻擊的話，會加重 drusen 的累積，惡化病情[2]。

Ling Wang 等人在 2008 年發表的一篇研究論文指出：在視網膜色素上皮細胞中，PI3K/Akt 路徑在調控轉錄因子 Nrf2 與抗氧化反應因子 (Antioxidant response element, ARE) 結合相關的抗氧化壓力保護扮演相當重要的角色[7]。Xuan Zou 等人在 2011 年也指出：JNK 路徑活化 Nrf2 轉錄因子進而促使內源性抗氧化成分之一的穀胱甘肽 GSH 生成，也是保護視網膜色素上皮細胞避免凋亡的重要機制[8]。

而 Li MH.等人在 2007 年一篇研究論文指出，在老鼠的 PC12 細胞株中，由對氧化壓力敏感的 HO-1 細胞保護性酵素分解血紅素所產生的一氧化碳，可以透過促進 Nrf2 信息傳遞路徑下游的 PI3K/Akt 路徑，活化 GSH 合成酵素之一的 GCLC，保護細胞避免亞硝酸導致的細胞壓力，而一氧化碳釋放劑的介入補充能夠有相同效果[9]。Johnson TR 等人 2003 年的回顧性論文[10]以及 Alberto R 等人 2007 年的回顧性論文[11]也提到過多種一氧化碳在生理運作與疾病治療上的重要角色，故我們想探討一氧化碳釋放劑是否在視網膜色素上皮細胞也能有抗氧化保護效果。

根據 Lawrence T.在 2009 年發表的研究，TNF-α (tumor necrosis factor α) 為細胞發炎因子，能活化 NF-κB [12]，轉位進入細胞核內結合啟動子而轉錄出 ICAM-1[13]，造成發炎反應。而一氧化碳已知在血管內皮細胞可抑制 TNF-α 誘導單核球細胞黏附至內皮細胞和 ICAM-1 表現[14]。在信息傳遞路徑上，短時間內抑制 TNF-α 誘導的 IκB 降解，可抑制 NF-κB 活化，進而抑制 ICAM-1 表現；當細胞內 GSH 及 ROS 含量增加，透過 Nrf2 路徑誘導 p65 麩甘胱化，進而抑制 NF-κB 活化，也能減少 ICAM-1，有助於抗發炎，如下圖二[15]。ICAM-1 為發炎作用中關鍵蛋白，所以可推論一氧化碳對於內皮細胞具有抗發炎的作用。故也可從一氧化碳釋放劑能否使人類視網膜色素上皮細胞抗發炎的角度，探討一氧化碳釋放劑在預防及治療黃斑部病變的可能潛力。



圖二、透過 Nrf2 路徑誘導 p65 麩甘胱化，抑制 NF-κB 活化，減少 ICAM-1

因此，我們希望藉由實驗測試，是否一氧化碳釋放分子也能像上述諸多理論與實驗結果一樣，透過適當的信息傳遞路徑活化，對視網膜色素上皮細胞產生一定的保護效果，並且進一步探討其確切的保護機轉。

(四) 研究方法及步驟

細胞培養 (Cell culture and subculture)

將人類視網膜色素上皮細胞 (Retinal pigment epithelial cells, ARPE-19 cell line, American Type Culture Collection) 以添加了 10% (v/v) 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、100 units/mL Penicillin 和 100 μg/mL Streptomycin 的 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)高葡萄糖(Low glucose) + Ham's F12 培養液，培養於 5% CO_2，37°C 恆溫培養箱中。繼代時，移除培養液並以 37ºC 的 1 × PBS 清洗，加入 TrypLE^{TM} 懸浮 ARPE-19，再用培養液減緩細胞膜蛋白分解，以 1000 rpm 離心 7 分鐘，移除含 TrypLE^{TM} 之培養液。用新鮮培養液將 ARPE-19 均勻懸浮稀釋至合適濃度，分別移入合適大小及數量的培養盤中。以 5% CO_2，37°C 恆溫培養至適宜密度。每次實驗前，細胞均以上述培養液將 FBS 體積濃度取代成 1%後培養 12 小時，做飢餓處理(Serum starvation)。

細胞內穀胱甘肽含量測試 (Mesurement of intracellular glutathione)

細胞加藥處理後，移除培養液並以 37°C的 1 × PBS 清洗 2 次，每盤細胞加入 1ml (含 300 μM 的 Monochlorobimane (MCB))，並於 37°C培養箱內作用 20 分鐘。將細胞取出並置於冰上，接著使用刮棒將細胞刮下並置於 1.5 ml 的微量離心管中，最後利用螢光分光儀，以激發波長 360 nm 及放射波長 460 nm 來偵測 GSH 的相對含量值。

細胞內活性氧族群檢測 (Measurement of intracellular reactive oxygen species)

利用過氧化靈敏螢光探針 5-(and 6)-carboxy-2, 7, dichlorodihydro fluorescein diacetate (即 Carboxyl-H_2DCFDA) 穿透細胞膜進入細胞內之後，脂解酶 (esterase) 會去除其 dichlorodihydro，變為 DCFH，與細胞內活性氧族群 (ROS) 結合成螢光物質，透過偵測反應後的螢光亮度 (Ex: 485 nm, Em: 528 nm) ，即可比較不同處理組間，細胞內 ROS 的濃度。檢測過程盡可能避光。加藥處理後，用 1 × PBS 清洗 2 次，加入 1 ml 溶於 1 × PBS 的 20 μM H_2DCFDA 溶液，37ºC 反應 30 分鐘。再以 1 × PBS 清洗 2 次，並加入 1 ml 1 × PBS 後將細胞至於冰上。以刮棒刮下細胞後，用螢光分析儀按上述條件偵測螢光值。將各處理組數據與控制組數據比較，得出細胞內 ROS 變化量。

細胞貼附試驗 (Cell adhesion assay)

事先以含有 10%F.B.S.及 1%抗生素的 RPMI 1640 培養液將 THP-1 細胞株培養至適當密度，以備 Calcein AM 標定之用。將 ARPE-19 以繼代方式懸浮並稀釋至 1×10^5 個/ml，每孔 250 μl 加於 96 孔盤中，於培養箱中培養隔夜。然後去除培養液，再用配於 1% FBS 培養液的待測藥品，每孔加入 200 μl 處理。加藥處理後，去除原來藥品處理的培養液，每孔換入 200 μl 配於 1% FBS 培養液的 1000 U TNF-α 培養 4 小時，誘導 ARPE-19 細胞的發炎反應。之後，每孔再加入 100 μl 經 Calcein AM 標定之 THP-1 細胞 (Calcein AM:THP-1 = 1000:5) 共同培養 20 分鐘，此步驟多加入兩孔標定後的 THP-1 至無 ARPE-19 的孔作為空白對照。完成後，以 1% FBS 培養液清洗兩次，兩孔空白對照則一孔一起清洗、一孔不洗。最後每孔加入 200 μl 的 1% FBS 培養液，並以酵素免疫螢光偵測儀 (Ex: 490 nm, Em: 515 nm) 偵測螢光亮差異，加藥處理組與控制組比較，即可得出細胞貼附比例的差異，間接得知發炎反應程度。

細胞存活率測試 (Cell viability assay)

以 Alamar blue assay 測試細胞代謝活動，間接比較出每個處理組經過以 H_2O_2 人為控制的氧化傷害之後，事先加藥處理的細胞是否具有提高傷害後細胞存活率的效果。將細胞以繼代方式懸浮並稀釋至 1×10^5 個/ml，每孔 250 μl 加於 96 孔盤中，培養隔夜。加藥處理後，每孔以 2 mM H_2O_2 水溶液施以氧化壓力，處理 1 小時後，每孔再加入 10%體積的 Alamar blue 試劑處理 3 小時。活細胞可將原本呈深藍色的氧化態 Alamar blue 還原變成紅色，活細胞數量越多，還原成紅色化合物就越多，於原本的深藍色混合呈現紫紅色的程度就有不同，以分光光度計分析每孔溶液對 570 nm 和 600 nm 波長的吸光值，依據 Serotec, Oxford, UK 提供的公式[A570 – (A600 * 0.8)*100]，換算活細胞數，再與控制組做存活率比較。

細胞蛋白質萃取與定量 (Preparation of whole cell lysates and protein quantification)

細胞加藥處理後，以 1 × PBS 清洗 2 次，每盤細胞加入 150 μl 含有 5 種蛋白質水解酶抑制劑 (Aprotinin, leupeptin, PMSF, NaF, Na_3VO_4) 及 0.5%介面活性劑 SDS 的 RIPA 緩衝液，在冰上反應 10~15 分鐘。用細胞刮棒將細胞裂解液刮下，全數收集至 1.5 ml 微量離心管中。接著以裝有 27G 規格針頭(使用後集中回收)的 1 ml 針筒來回吸吐細胞裂解液打碎細胞。最後以 4ºC、13000 rpm 轉速離心 10 分鐘，將細胞碎屑沉澱分離，即完成細胞總蛋白質的萃取。取 2 μl 上清液以無菌水稀釋 10 倍，用 Bio-Rad DC protein assay kit 定量蛋白質溶液，以 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mg/ml 之 BSA 標準液製作檢量線，換算出每管樣品的蛋白質濃度，再將每一管要分析比較的蛋白質溶液以無菌水統一稀釋成相同濃度，並加入適量體積之含有甘油的 5 × reducing dye，使最終混合液中 reducing dye 濃度稀釋為 1 倍。將整管混合液以 95ºC 水浴加熱 5 分鐘，變性蛋白質。最後，至於冰上冷卻後進行西方墨點法或以-20ºC 冷凍保存。

核內蛋白質萃取與定量 (Preparation of nuclear lysates and protein quantification)

細胞加藥處理後，以 1 × PBS 清洗 2 次。加入 800 μl 的 Buffer A (10 mM HEPES, pH7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1% (w/v) Nonidet P-40)，冰上靜置 10 分鐘。將細胞液收集到 1.5 ml 微量離心管內，加入 20 μl 10% NP-40 水溶液，強力震盪 30 秒。接著以 6000 rpm 轉速離心 4 分鐘，將上清液移至新的微量離心管中，為細胞質內蛋白質溶液。加入 50 μl RIPA buffer 到移除上清液的沉澱物。然後以 27G 針頭和 1 ml 針筒來回吸吐破碎細胞核，再以低溫微量離心機 4ºC、13000 rpm 轉速離心 10 分鐘，去除細胞碎屑，此上清液即為細胞核內蛋白質溶液。取 2 μl 蛋白質溶液以無菌水稀釋 10 倍，用 Bio-Rad DC protein assay kit 定量蛋白質溶液，以 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mg/ml 之 BSA 標準液製作檢量線，換算出每管樣品的蛋白質濃度，再將每一管要分析比較的蛋白質溶液以無菌水統一稀釋成相同濃度，加入含有甘油的 reducing dye。將整管混合液以 95ºC 水浴加熱 5 分鐘，變性蛋白質。最後，於冰上冷卻後進行西方墨點法或以-20ºC 冷凍保存。

西方墨點法 (Western blot)

架置直立式蛋白質電泳槽，將 SDS 電泳膠片 (含上膠 Stacking gel 和下膠 Separation gel) 固定好，拔起齒梳，加入 1 × Running buffer 使液面蓋過膠片上端。將定量後之蛋白質樣品以 65°C水浴加熱 1 分鐘。左右兩端孔洞各注入 1 μl protein marker，其餘每孔注入 40 μg 樣品，在 4°C以 160V 通電約 70 分鐘，使蛋白質依分子量 (kDa) 大小不同的特性分離。接著於半乾式轉漬槽 (Bio-Rad semi-dry transfer cell) 以 Transfer buffer 浸濕的濾紙緊密夾住電泳後的 SDS 膠片及 PVDF 膜，10V 通電 90 分鐘，進行蛋白質轉漬。轉漬後的 PVDF 膜在 Blocking buffer (skim milk + TBST) 中震盪 6 小時。

取出 Blocking 後的 PVDF 膜，將欲標定分析的蛋白質位置裁出適當大小。1 × TBST 清洗三次後，加入專一性高的初級抗體，震盪過夜。1 × TBST 清洗三次後，加入二次抗體，震盪 2 小時。1 × TBST 清洗三次，將 ECL 呈色劑加於 PVDF 膜上作用，再以冷光影像拍攝系統紀錄冷光條帶，或在暗房中以柯達底片顯影。目前計畫標定的蛋白質有：Nrf2、HO-1、ICAM-1、NF-κB p65。

免疫螢光染色 (Immunofluorescent staining)

細胞加藥處理後，以 1 × PBS 清洗一次，用 80%乙醇處理 6 小時，將細胞固定於培養盤內。1 × PBS 清洗後以 0.1%配於 1 × PBS 的 Triton X-100 作用 10 分鐘，將細胞膜穿孔變性。然後用 1.5 μg/ml 的 p65 初級抗體標定隔夜。1 × PBS 清洗後，加入 1.5 μg/ml 二級螢光抗體 (Alexa flour 488 goat anti-rabbit IgG antibody) 避光反應 30 分鐘。避光清洗多餘抗體，並加入 10 ng/ml 的 Propidium Iodine 處理 10 分鐘，使細胞核染上紅色螢光。最後用螢光顯微鏡進行觀察並攝影紀錄 NF-κB p65 之入核情況。

核糖核酸的萃取與定量 (RNA extraction and quantification)

細胞加藥處理後，以 1 × PBS 清洗 1 次。每盤細胞 (直徑 6 公分培養盤) 加入 2 ml TRIzol 試劑，室溫靜置 5 分鐘。以微量吸管吸起 TRIzol 試劑多次沖洗盤底，並將混合液移至 15 ml 離心管，再加入 400 μl 氯仿。用力搖晃離心管至內容物均勻混合後，室溫靜置 3 分鐘。以 4ºC、12000 g 離心力離心 15 分鐘後，將上清液取至新的 15 ml 離心管，加入 0.5 ml 異丙醇混合均勻，試問靜置 10 分鐘。以 4ºC、12000 g 離心力離心 10 分鐘後，移除上清液，用 70%乙醇沖下沉澱，移至 1.5 ml 微量離心管。以 13000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，將沉澱物完全乾燥。加入含 RNase 抑制劑 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 的 2 次水溶解萃取出的 RNA。取出少量 RNA 溶液稀釋，利用分光光度計 A260/A280 定量 RNA。其餘樣品低溫保存備用。

反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcriptase- Polymerase chain reaction, RT-PCR)

取 5 μg 的 RNA，加入 Oligo(dT)、反轉錄酶、氯化鎂、dNTP、反應緩衝液等試劑，在 PCR 機器中作用約 1 小時，將萃取出的 RNA 反轉錄 (reverse-transcription, RT) 成 cDNA。經由反轉錄後得到的 cDNA，再利用 PCR 增幅。

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

將 PCR buffer、dNTP、正反股 primers、Taq DNA polymerase 及氯化鎂等試劑，與 cDNA 產物混合均勻，放置 PCR 機器的反應槽中，以 94℃/30 sec、55℃/30 sec、72℃/1 min 條件，循環反應 25 次。使用之人工合成引子序列註明如下：

GCLM	Sense：5'-CAGCGAGGAGCTTCATGATTG-3' anti-sense：5'-TGATCACAGAATCCAGCTGTGC-3'
GCLC	Sense：5'-GTTCTTGAAACTCTGCAAGAGAAG-3' anti-sense：5'-ATGGAGATGGTGTATTCTTGTCC-3'
GAPDH	Sense：5'-TATCGTGGAAGGACTCATGACC-3' anti-sense：5'-TACATGGCAACTGTGAGGGG-3'
ICAM-1	Sense：5'-AGCAATGTGCAAGAAGATAGCCAA -3' anti-sense：5'-GGTCCCCTGCGTGTTCCACC -3'

以 Agarose 粉末、TAE buffer 和 EtBr (Ethidium bromide) 配製成適量的 1% Agarose、EtBr 溶液，倒入已安裝齒梳與底座的製膠模中，等待溶液完全凝固後拔起齒梳，完成洋菜膠體製備。把上述製備好的洋菜膠片連同底座一起放入電泳槽中，倒入 TAE buffer 淹過膠片。將所得到之 RT-PCR 產物與適量 loading dye 混合後，加入洋菜膠片的孔洞，並加入合適的 marker，通電 15~30 分鐘分離核酸。最後使用 UV 照膠系統顯像分析。

質體轉殖及啟動子活性實驗 (Plasmid transfection and promoter activity assay)

將欲轉入細胞的等量 β-gal、pGL3 promoter vector 兩質體以及 Lipofectamine 試劑分別混合於不含血清及抗生素的 Basal 培養液，加入兩管裝在 1.5 ml 微量離心管中。質體與 Lipofectamine 試劑混合液先分開在室溫靜置 5 分鐘。兩者混合均勻後，室溫靜置 20 分鐘。以 Basal 培養液清洗培養盤內細胞 2 次，再加入培養液與帶有質體與 Lipofectamine 試劑的混合液，37ºC 培養箱培養 6 小時後，更換為純 Basal 培養液培養 12 小時，完成質體轉染。轉染完的細胞加藥處理後，以 1 × PBS 清洗兩次，加入 150 μl 的 Lysis buffer。室溫靜置 15 分鐘後，用刮棒將細胞裂解液收集到 1.5 ml 離心管中，以微量離心機 13000 rpm 轉速離心 10 分鐘。每管樣品取 5 μl 上清液加入 20 μl Firefly luciferase assay buffer 以 FB 12 冷光儀偵測冷光值，處理組與未加質體的控制組數值相比，即代表待測轉錄因子之表現量，再依加藥處理的條件，將表現量比例作成分析圖；另外取 50 μl 上清液加入 50 μl ONPG 試劑混合均勻，加入 96 孔盤，在 37ºC 培養箱中避光靜置過夜，然後以酵素免疫分析儀讀取 420 nm 波長之吸光值，作為 β-galactosidase 之活性值，與未加質體的控制組數據相比，即代表轉染效率。目前計畫測試的啟動子有：Nrf2 及 NF-κB。

資料分析 (Statistical analysis)

所有資料均以平均值 ± 標準誤差 (mean ± S.E.M.) 表示。使用 SigmaPlot 軟體完成統計圖與數據分析。處理組與控制組之間的數據皆以 t-test 分析是否具有統計上的差異，$^*p < 0.05$ 即代表兩組數據有顯著差異。

(五) 預期結果

在抗氧化效果初步測試，發現以 10 μM 的 CORM-2 處理 9 小時過後，細胞內 GSH 的含量有顯著提高 (見圖三)；抗發炎效果方面，細胞貼附測試 (Adhesion assay) 發現以 25 μM 的 CORM-3 處理 12 小時後，可以明顯降低由 TNF-α 誘導發炎所產生的單核球黏附狀況 (見圖四)，發炎細胞黏附分子 (Inflamation cell adhesion molecule, ICAM) 西方墨點法測試結果顯示，以 25 μM CORM-2 處理 6 小時，或是以 25 μM 的 CORM-3 處理 12 小時後，可明顯抑制 TNF-α 誘導發炎後細胞產生的 ICAM-1 (見圖五)。故推測 CORM-2 與 CORM-3 具有保護視網膜色素上皮細胞抗氧化及抗發炎的效果。

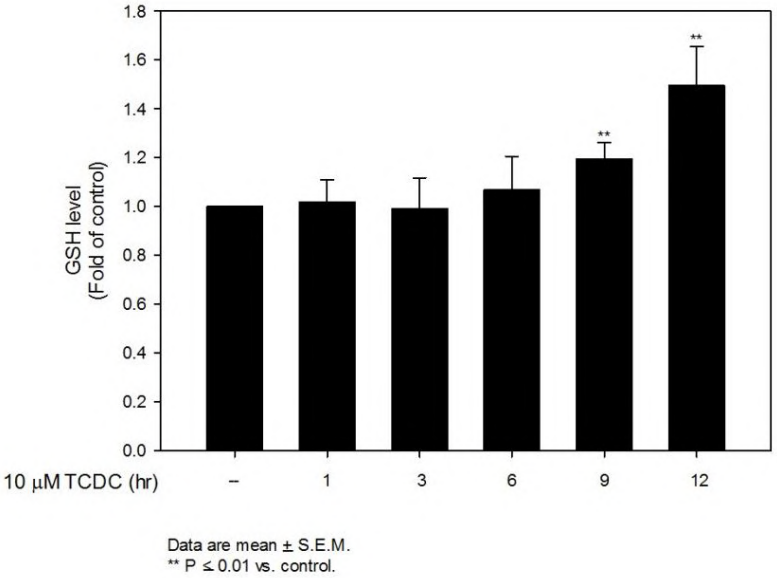
在抗氧化保護測試方面，計畫繼續分析加藥後，細胞內 ROS 的下降情形，期望在有效濃度及適當的處理時間後，細胞內本身的 ROS 會顯著下降。然後加上 2 mM 的 H_2O_2 處理 1 小時，對細胞造成氧化損傷，並以 Alamar blue assay 檢測以 CORM-2 或 CORM-3 預處理過的處理組與控制組間，細胞存活率、GSH 及 ROS 的比較，若一氧化碳釋放劑確實可以保護細胞對抗氧化壓力，處理組細胞存活率較控制組會有顯著提升、GSH 有顯著增多、ROS 則會較陽性控制組降低許多。接著，進一步萃取 RNA 加上 RT-PCR 與核算電泳，分析 GSH 的合成酵素 GCLC、GCLM 是否也明顯被大量轉錄出。再以西方墨點法信息傳遞路徑上游的轉錄因子 Nrf2 是否大量入核，並將含有抗氧化反應因子 (Antioxidant response element, ARE) 基因 promotor 與 luciferase 報導基因的質體以脂質體轉染送入 ARPE-19，測試加藥處理後 Nrf2 會入核且接上 ARE 的啟動子，間接證實 Nrf2 會將抗氧化胜肽或蛋白質的基因轉錄出來。若沿路徑向源頭

分析的測試都產生有效結果,還會以西方墨點法分析除 GSH 以外的其他抗氧化酵素，例如 HO-1 是否有所提升，全面探討抗氧化保護的可能機轉。

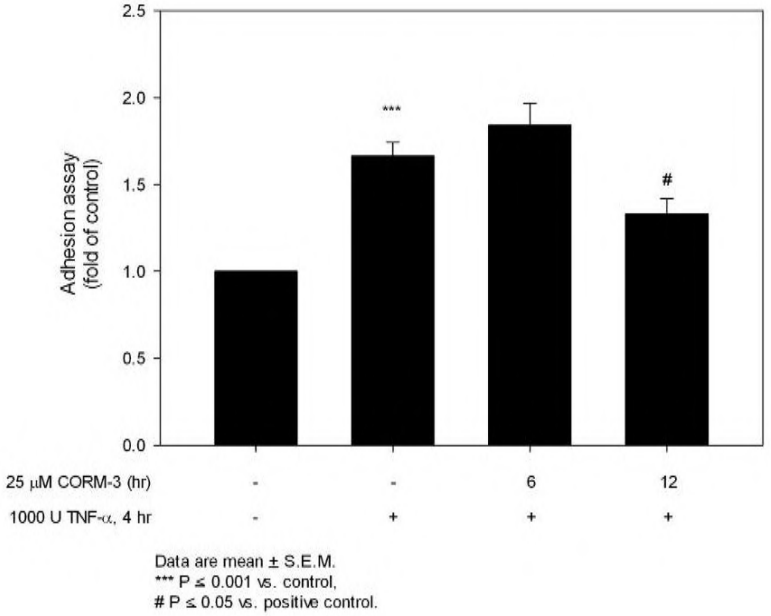
在抗發炎保護測試方面，會根據初步測試結果，繼續以西方墨點法和免疫螢光標定分析發炎物質相關的轉錄因子 NF-κB p65 是否大量入核。並用具有 luciferase 報導基因的質體測試 NF-κB 入核後大量接上對應的 promotor，間接證實 NF-κB 會將促發炎物質的基因轉錄出來。若一氧化碳釋放劑確實可保護細胞抗發炎，則 NF-κB 的轉位及轉錄活性都會減少。

綜合以上實驗結果，即可針對一氧化碳釋放劑有系統地研究其在預防或治療視網膜病變相關疾病的可能應用價值。

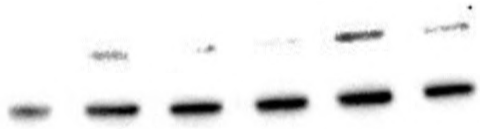
初步實驗結果：



圖三、以 10 μM CORM-2 (TCDC) 處理不同時間後 ARPE-19 細胞內 GSH 的含量



圖四、以 25 μM CORM-3 處理不同時間後細胞黏附試驗結果



25 μM CORM-2 (hr)	--	--	6	12	--	--
25 μM CORM-3 (hr)	--	--	--	--	6	12
1000 U TNF-α, 2 hr	--	+	+	+	+	+

圖五、以 25 μM CORM-2 及 CORM-3 處理不同時間後 ICAM 蛋白質表現量

(六) 參考文獻

1. Strauss O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Reviews*. 2005; 85(3): 845-881. DOI: 10.1152/physrev.00021.2004.
2. Ding X, Patela M, Chan C. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2009; 28(1): 1-18. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2008.10.001.
3. Tenhunen R, Marver HS and Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 1969; 244(23): 6388-94.
4. Alberto R and Motterlini R. Chemistry and biological activities of CO-releasing molecules (CORMs) and transition metal complexes. *Dalton Transaction*. 2007; 17: 1651-1660. DOI: 10.1039/B701992K.
5. Marks GS. Heme oxygenase: the physiological role of one of its metabolites, carbon monoxide and interactions with zinc protoporphyrin, cobalt protoporphyrin and other metalloporphyrins. *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-le-Grand, France). 1994; 40(7): 863-70.
6. Mann BE. CO-Releasing Molecules: A Personal View. *Organometallics*. 2012; 31(16): 5728−5735. DOI: 10.1021/om300364a.
7. Wang L, Chen Y, Sternberg P, Cai J. Essential Roles of the PI3 Kinase/Akt Pathway in Regulating Nrf2-Dependent Antioxidant Functions in the RPE. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008; 49(4): 1671-1678. DOI: 10.1167/iovs.07-1099.
8. Zou X, Feng Z, Li Y, Wang Y, Wertze K, Weber P, Fua Y, Liu J. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012; 23(8): 994-1006. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2011.05.006
9. Li MH, Jang JH, Na HK, Cha YN, and Surh YJ. Carbon Monoxide Produced by Heme Oxygenase-1 in Response to Nitrosative Stress Induces Expression of Glutamate-Cysteine Ligase in PC12 Cells via Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Nrf2 Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(39): 28577–28586. DOI: 10.1074/jbc.M701916200.
10. Johnson TR, Mann BE, Clark JE, Foresti R, Green CJ, and Motterlini R. Metal Carbonyls: A New Class of Pharmaceuticals? *Angewandte Chemie International Editon*. 2003; 42(32): 3722-3729. DOI: 10.1002/anie.200301634.
11. Alberto R, Motterlini R. Chemistry and biological activities of CO-releasing molecules (CORMs) and transition metal complexes. *Dalton Transactions*. 2007; 17: 1651-1660. DOI: 10.1039/b701992k
12. Lawrence T. The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biology*. 2009; DOI: 10.1101/cshperspect.a001651.

13. Panico A, Maccari R, Cardile V, Avondo S, Crascì L, Ottanà R. Evaluation of the anti-inflammatory/chondroprotective activity of aldose reductase inhibitors in human chondrocyte cultures. *Medicinal Chemical Communications*. 2015;6: 823-830. DOI: 10.1039/C4MD00556B.
14. Ye PY, Li CY, Hsieh CW, Yang YC, Yang PM, Wung BS. CO-releasing molecules and increased heme oxygenase-1 induce protein S-glutathionylation to modulate NF-κB activity in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 70: 1-13. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.042.
15. Lin YC, Huang GD, Hsieh CW, Wung BS. The glutathionylation of p65 modulates NF-κB activity in 15-deoxy-Δ12,14-prostaglandin J2-treated endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012;52:1844-53 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed
16. Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. NF-κB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. Cell Research. 2011;21(1):146-158. DOI:10.1038/cr.2010.175.
17. He M, Pan H, Chang RC, So KF, Brecha NC, Pu M. *PLOS one*. Activation of the Nrf2/HO-1 Antioxidant Pathway Contributes to the Protective Effects of Lycium Barbarum Polysaccharides in the Rodent Retina after I/R-Induced Damage. *PLOS One*. 2014; 9(1): e84800. DOI: 10.1371/journal.pone.0084800.
18. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016; 73: 3221-3247. DOI: 10.1007/s00018-016-2223-0.

(七) 需要指導教授指導內容

1. 實驗細節設計與調整的討論
2. 對實驗結果的分析與呈現的專業建議
3. 實驗報告的修正

大專學生研究計畫指導教授初評意見表

一、學生潛力評估：

籃子喬同學在校成績表現並不好，主要原因是她有內耳平衡的毛病，在熬夜後常會發作，因此當期中或期末考時常會發作影響其學業成績表現。但是她在一般學習上比別人更主動努力。我覺得有時甚至把時間排得太緊密來學習各個課程，並且也會花時間在校外補習外文電腦等各種技能。她的英文能力非常好也敢表達。她在研究上的經驗大約是在大二暑假開始在我實驗室工作，對於研究工作表現積極，是難得能夠主動自我學習並積極投入實驗的學生。此專題計劃她花了很多時間對於資料蒐集，文獻閱讀，計劃的撰寫及初步結果的證明等，且都是其獨立完成。對於研究工作有興趣且積極主動，是值得鼓勵培養的未來研究人員。

二、對學生所提研究計畫內容之評述：

籃子喬同學主要研究的題目為一氧化碳釋放劑對視網膜色素上皮細胞抗氧化壓力及抗發炎的保護機轉。因為黃斑部病變是老年人視力受損甚至失明最主要原因。視網膜色素上皮細胞的保健並沒有很多研究。之前我們曾以茄紅素發表過此方面的研究。而一氧化碳是氣體應該更具通過微血管屏障的能力。籃同學初步實驗也發現某些一氧化碳釋放劑可增加細胞內 GSH 量亦發現抑制發炎因子作用，因此推測其可能具細胞保護功能。詳細的機轉跟較明確的數據仍需未來繼續研究。我們實驗室對一氧化碳釋放劑對血管細胞所造成的保護機轉持續有研究。現在籃同學將繼續研究在視網膜色素上皮細胞保護機轉。我覺得此研究題目動機清楚且有其可預期性，並且其結果也具有基礎醫學研究與應用的價值。非常適合大專學生執行，因此我願意全力配合藍同學執行計劃。

三、指導方式：

1. 相關文獻搜尋與研讀
2. 實驗設計
3. 相關實驗技術
   - A. 細胞培養
   - B. 細胞毒性、GSH、ROS 等生化試驗
   - C. 免疫螢光染色
   - D. 基因表現分析: RT-PCR、西方墨點法
4. 結果整理與報告撰寫

四、本人同意指導學生瞭解並遵照學術倫理規範；本計畫無違反學術倫理。

表 C803

承諾指導教授簽名：翁炳孫

106 年 2 月 15 日