

國立台灣大學醫學院免疫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Immunology

College of medicine

National Taiwan University

Master Thesis



探討 Syk 磷酸激酶在腸道表皮細胞中調控多聚免疫球
蛋白受體之角色

Study the role of spleen tyrosine kinase(Syk)
in regulating polymeric immunoglobulin receptor(pIgR)
expression in intestinal epithelial cell(IEC)

林子暄

Tzu-Shiuan Lin

指導教授： 朱清良 博士

Advisor: Dr. Ching-Liang Chu

中華民國 107 年 7 月

July, 2018

誌謝

呆愣著坐在電腦前盯著誌謝兩個字出神，遲疑的雙手一次又一次重複刪除與鍵入的句子，在逐漸深沉的夜裡思緒也跟著沉浸在兩年多來的每個日子裡。

我清晰地記得每一個瞬間，兩年的時間很長，長得足以令我反覆思索與反省，考場裡看著考卷想得出神，口試榜單出現的那剎那驚慌的心情，踏進免疫所口試那天對著老師們說出能來到這一關甚而是我的榮幸，錄取後忐忑著跟老師們面談，走進朱老師實驗室裡學長姐們的招呼，學期開始對著看不懂的講義重複安慰自己沒關係，課堂上似懂非懂，實驗一再失敗的挫折感堆積著，每天慌慌張張而時間似乎總是不夠用；兩年的時間也很短，短得不夠我珍惜每一個學習的時光，和同學們一同努力、歡笑、討論的感受。

這些日子中，包含著有很多需要感謝的事情。首先要感謝的是我的指導老師朱清良老師，從最開始願意收我這個沒進過實驗室的學生，到給予我許多幫助與建議，由衷的感謝老師的支持與鼓勵。同時也要感謝帶著我從零開始做實驗的學長姐，偉廷和貴云，在碩一還不甚習慣實驗跟課業的情況下悉心的給我許多幫助；還有一同努力奮戰度過每個時刻的好朋友，林怡孜、陳名，有你們的陪伴和各種援助才讓我能努力的在每一個快要放棄的時候繼續加油；實驗室的好夥伴莊凱富，我們一起努力奮戰了兩年。還有可靠的學弟妹們，若寧、榮謙、羽歡、振宇，有你們在的實驗室總是熱鬧不已，充滿歡笑。感謝在這兩年來，陪伴我的朋友們，有你們陪我聊天、聽我抱怨、看我煩惱、找我打球，這些都是支撐著我的點點滴滴。

最後，要感謝我的父母總是支持我的所有決定，在我決定從回學校的那一刻開始就二話不說的支撐著我，讓我無後顧之憂的享受再次當學生的快樂。

雖然說我不是最優秀的學生，也在這裡看見了比我優秀的人比我更認真這個可怕的事實，我還是可以很驕傲的說出我很努力了，無愧於陪伴著我的人們，再次感謝所有人，往後我會帶著這份熱誠繼續努力下去。

中文摘要

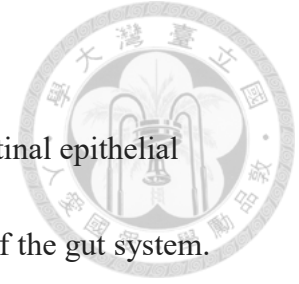
多聚免疫球蛋白受體 (polymeric immunoglobulin receptor, pIgR) 表現在腸道表皮細胞中，其對於維持腸道免疫系統的恆定扮演相當重要的角色，主要功能為協助免疫球蛋白 (Immunoglobulin A, IgA) 轉變成為分泌型免疫球蛋白 (Secretory immunoglobulin A, sIgA)，並協助運送至腸道中，幫助維持腸道系統恆定。腸道表皮細胞會受到多種不同的刺激而增加多聚免疫球蛋白受體的表現，包含類鐸配體 (Toll-like receptor ligand)、介白素-17(Interleukin17, IL-17)、腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 等等。

脾酪氨酸激酶 (Spleen tyrosine kinase, Syk) 在免疫細胞中已有許多研究指出其在訊號傳遞中扮演重要角色，但在腸道表皮細胞中的角色尚未有深入地探討。過去曾有報導指出，在以脾酪氨酸激酶抑制劑治療發炎性疾病時，會導致腹瀉的副作用。而脾酪氨酸激酶在免疫細胞以及部分非免疫細胞中會參與在介白素-17、腫瘤壞死因子、以及類鐸配體等之訊號傳遞過程，但在腸道表皮細胞上仍未有相關研究，因此本研究即是探討脾酪氨酸激酶是否可能會參與並影響在腸道表皮細胞中多聚免疫球蛋白受體的表現。

實驗中發現，在給予腸道表皮細胞介白素-17、腫瘤壞死因子- α 等的刺激之後，降低脾酪氨酸激酶會影響部分多聚免疫球蛋白受體的蛋白質的表現量。

關鍵字：脾酪氨酸激酶、腸道表皮細胞、多聚免疫球蛋白受體、介白素-17、腫瘤壞死因子- α 、干擾素- γ 、聚肌胞苷酸

Abstract



Polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) expressed in intestinal epithelial cells, which plays an essential role to maintain the homeostasis of the gut system.

The main function of pIgR is to facilitate immunoglobulin A (IgA) transform to secretory immunoglobulin A (SIgA) and transport from lamina propria to lumen.

Intestinal epithelial cells are regulated by different stimulations to upregulate the expression of pIgR, which included toll-like receptors (TLRs), interleukin-17 (IL-17), tumor necrosis factor- α (TNF- α). Spleen tyrosine kinase (Syk) has been reported to participate in different and abundant signaling transduction, but the role of Syk in intestinal epithelial cells remains unclear. Syk has been reported to participate in the signal transduction of IL-17, TLRs, and TNF in immune and non-immune cells, however not on intestinal epithelia. Hence we hypothesized that Syk may participate and influence the expression of pIgR and affect the homeostasis of the gut system. In this study, we found that Syk may have participated in the regulation of pIgR expression, but need further experiment to confirm the effect of Syk in pIgR regulation.

Key word: spleen tyrosine kinase (Syk), intestinal epithelial cell (IEC), Polymeric immunoglobulin receptor (pIgR), Interleukin-17A (IL-17A), Interferon-gamma (IFN- γ), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C)

目錄



誌謝.....	i
中文摘要.....	ii
Abstract.....	iii
目錄.....	iv
一、背景介紹 (Introduction).....	1
1.腸道免疫系統恆定的維持.....	1
2. 腸道表皮細胞 (Intestinal epithelial cell, IEC).....	1
3.免疫球蛋白 A (Immunoglobulin A, IgA).....	2
4.免疫球蛋白 A 缺失.....	3
5.多聚免疫球蛋白受體 (polymeric immunoglobulin receptor, pIgR).....	3
6.多聚免疫球蛋白受體的調控.....	4
6-1 介白素-17A (Interleukin-17 A).....	4
6-2 類鐸受體-3 (Toll-like receptor 3, TLR-3).....	5
6-3 腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factor alpha, TNF- α).....	5
6-4 干擾素- γ (Interferon- γ).....	6
7.脾酪胺酸激酶 (Spleen tyrosine kinase, Syk).....	6
8.脾酪胺酸激酶在腸道中的研究.....	7
二、研究動機 (Rationale).....	8
三、材料與方法(Materials and methods).....	9
1.細胞培養.....	9
1.1 使用細胞株以及相關試劑.....	9
1.2 細胞培養方式.....	9
2.降低脾酪胺酸激酶 (Syk) 在細胞中的表現.....	9
3.細胞蛋白萃取(Protein extraction)及西方墨點法(western blot).....	10
3.1 細胞蛋白萃取.....	10

3.2 膠體製備 (SDS-PAGE preparation)	11
3.3 電泳 (Electrophoresis).....	11
3.4 轉漬 (Transfer)	11
3.5 阻攔 (Blocking)	11
3.6 檢測	12
4. RNA 純化 (RNA extraction) 及核酸序列定量偵測系統(Real-time PCR)	13
5.分離小鼠腸道表皮細胞	14
5-1. Buffer.....	14
5.2 分離步驟.....	14
6. 統計分析方法 (Statistical analysis)	15
四、實驗結果 (Results).....	16
1.探討在降低腸道表皮細胞上脾酪胺酸激酶的活性下，以介白素-17、腫瘤壞死因子- α 、干擾素- γ 以及聚肌胞甘酸的刺激下，大腸表皮細胞株 (HT-29) 多聚免疫球蛋白受體表現量改變。	16
2.建立以 Syk shRNA 轉染降低在人類大腸表皮細胞株(HT-29)中脾酪胺酸激酶之基因表現之系統.....	17
3.降低脾酪胺酸激酶基因表現的細胞株在未受到刺激的情況下，多聚免疫球蛋白受體的表現量在不同天數的培養情況下並無顯著差異。	17
4. 比較在不同培養時間下，同樣給予介白素-17 的刺激後，降低脾酪胺酸激酶基因表現細胞株與控制組的多聚免疫球蛋白受體表現量提升的差異性。	18
5.在同樣給予腫瘤壞死因子- α 的刺激下，相較於控制組降低脾酪胺酸激酶基因表現細胞株的多聚免疫球蛋白受體表現量提升受到抑制。	18
6.在同樣給予干擾素- γ 的刺激下，比較於控制組降低脾酪胺酸激酶基因表現細胞株的多聚免疫球蛋白受體表現量。	19
7. 在同樣給予聚肌胞甘酸的刺激下，比較於控制組降低脾酪胺酸激酶基因表現細胞株的多聚免疫球蛋白受體表現量。	19
9.以西方墨點法確認在降低脾酪胺酸激酶的組別相比於控制組，多聚免疫球蛋白受體蛋白表現量的差異。	19
10.在腸道表皮細胞脾酪胺酸激酶基因敲除小鼠中分離出來的腸道表皮細胞，分析其腸道的多聚免疫球蛋白受體基因表現量。	20

五、討論.....	21
六、附圖.....	23
七、參考資料 (Reference)	34



一、背景介紹 (Introduction)



1. 腸道免疫系統恆定的維持

腸道是一個相當複雜且重要的系統，最主要的功能即是吸收與消化養分；但除此之外腸道也是最大的免疫器官。由免疫細胞，包含先天性免疫的樹突細胞、巨噬細胞；後天免疫系統的 T 細胞、B 細胞等等，以及非免疫細胞（表皮細胞、潘式細胞、體細胞）等共通組成，這些細胞會各自或是相互透過分泌不同的細胞激素來影響並調控彼此的功能。由於腸道是一個向外開放的器官，與其他免疫系統不同的地方在於會直接受到外來的刺激，包含一些食物、過敏原、細菌、真菌、寄生蟲等，以及腸道內共生菌等等的影響，所以為了維持恆定的狀態，有著錯綜複雜的免疫反應。

2. 腸道表皮細胞 (Intestinal epithelial cell, IEC)

腸道表皮細胞在維持恆定中扮演著相當重要的一環，腸道表皮細胞可以根據其不同功能而被細分類為幾種不同類型，例如吸收型表皮細胞、杯狀細胞、潘氏細胞等，由這些不同類型的表皮細胞各司其職幫助維持腸道免疫系統的恆定。

腸道表皮細胞在生理功能上主要是吸收水分、養分，另外還具有一個相當重要的功能，阻隔與調控。腸道表皮細胞作為阻隔腸道內部與腸腔之間的屏障，調控營養與水分的吸收並且同時兼顧區隔腸道中共生菌和維持黏膜免疫，避免腸道中的大分子物質進入造成發炎，其有物理性以及化學性等的不同阻隔方式，物理性會以形成細胞間的緊密連結(tight junction)、黏液層(mucus)等方式直接阻隔較大的細胞進入腸腔中，而化學性的阻隔則是以潘式細胞所分泌的抗微生物肽(antimicrobial peptides, AMPs)為主；另一方，腸道表皮細胞會與腸道中的共生菌、外來入侵的細菌等反應，或是接收到免疫細胞所釋放的細胞激素調控，進一步釋放一些調控因子，直接對細菌產生影響或是反向對免疫細胞刺激以及協助免疫細胞清除危害。[1]

腸道表皮細胞上會表現初級免疫受體(Innate immune receptor)以及後天免疫受體(Adaptive immune receptor)，初級免疫受體主要針對腸道中的微生物以及其相關分子，這些模式識別受體(Pattern recognition receptor, PRRs)會辨認到病原相關分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMP)，並藉此引發一連串的免疫反應包含類鐸受體(Toll-like receptors, TLRs)，不同的類鐸受體會針對不同來源的刺激進而活化下游反應；後天免疫受體則包含有多聚免疫球蛋白受體(polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)等。

3.免疫球蛋白 A (Immunoglobulin A, IgA)

腸道中有許多複雜的免疫作用幫助對抗外來的細菌入侵，其中腸道內的分泌型免疫球蛋白 A(secretory immunoglobulin A, SIgA)就是一個很重要的防禦機制。

免疫球蛋白 A 在黏膜免疫中扮演非常重要的一部分，主要可以分為兩個類型：IgA1 以及 IgA2，IgA1 相較於 IgA2 在血清中占大多數，約為 90%。IgA1 是以單體(monomeric)型態存在，而在分泌液中 IgA1 與 IgA2 的比例相近，在唾液、淚液、腸液、腸胃道分泌液等等的分泌液中，IgA 是以分泌型免疫球蛋白 A 的型態為主。[2]

由黏膜層淋巴組織(Mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)中淋巴球所分泌的免疫球蛋白 A 結合至腸道表皮細胞上的多聚免疫球蛋白受體後，傳送至腸腔中作用。多聚免疫球蛋白受體會受到蛋白分解酶切割後形成分泌片並與免疫球蛋白 A 結合，形成分泌型免疫球蛋白 A。人體一天會分泌大約 3 公克的分泌型免疫球蛋白 A 至腸道中，這些腸腔中的分泌型免疫球蛋白 A 具有許多作用，包含中和毒素與病毒、抵抗細菌侵入腸腔等。

4. 免疫球蛋白 A 缺失

免疫球蛋白 A 缺失多以血清中的免疫球蛋白 A 濃度來決定，定義為年齡四歲以上血清中免疫球蛋白 A 濃度少於 7 mg/dL。[2]免疫球蛋白 A 缺失主要是因為 B 細胞無法正確分化成可 IgA-positive B 細胞，因其功能不全導致免疫球蛋白 A 不足；免疫球蛋白 A 缺失的人大多為無症狀的，目前認為有代償機制來取代免疫球蛋白 A 不足的部分。

目前對於血清循環中免疫球蛋白 A 的功用還不是很清楚，但認為會連接上單核球 (monocyte)或是顆粒性白血球(granulocyte)上的抗體恆定接受器- α (Fc receptor- α)上，幫助直接藉由吞噬作用 (Phagocytosis)來清除這些外來的抗原。[3, 4]

5. 多聚免疫球蛋白受體 (polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)

將免疫球蛋白由腸道內部的固有層(lamina propria)向外部運送受到腸道表皮細胞上所表現的多聚免疫球蛋白受體(polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)所調控；多聚免疫球蛋白受體屬於醮化的第一型穿膜蛋白，有五個並列的類免疫球蛋白區域，分子量約在 81kDa。

固有層中的漿細胞 (Plasma cell)分泌的二聚體免疫球蛋白 (dimeric immune globulin, dIgA)會結合至表皮細胞上表現的多聚免疫球蛋白受體，接著由受體所引致的胞吞作用 (Endocytosis)過程中會將這個複合體由底側 (Basolateral)運送至頂側 (Apical)，而多聚免疫球蛋白受體會降解並釋放出分泌片 (Secretory component, SC)，分泌片會與免疫球蛋白結合並生成分泌型免疫球蛋白 A1，這樣的複合體有助於避免免疫球蛋白受到腸道中的細菌或是蛋白酶分解，以及避免細菌附著在腸道黏膜層上[5]。由於每次將免疫球蛋白運送至腸道中都會損耗一個分子的多聚免疫球蛋白受體，所以腸道表皮細胞所調控生成多聚免疫球蛋白受體對於維持腸道中的免疫就相當的重要。

在發炎性腸道疾病的病人中，疾病的嚴重程度與多聚免疫球蛋白受體的下

降有相關性[6]，在小鼠發炎性腸道疾病的模式中也可以看到相同的情況[7]，顯示多聚免疫球蛋白受體對腸道免疫的重要性。

6. 多聚免疫球蛋白受體的調控

目前對於腸道表皮細胞如何調控多聚免疫球蛋白受體有許多不同的研究路徑與機制。過去研究指出，多聚免疫球蛋白受體的分泌受到微生物相 (microbiota) 所影響[8]，這些微生物的副產物會透過各式路徑影響多聚免疫球蛋白受體的生成，包含透過類鐸受體 (Toll-like receptors, TLRs) 以及間接刺激到其他免疫細胞產生的細胞激素等等。類鐸受體中包含 TLR-3 以及 TLR-4 都被報導過影響參與在多聚免疫球蛋白受體的調控中[9]，其中 TLR-4 可能是透過活化核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) 來調控[10]；而在促發炎激素中，包含腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 以及介白素-17 (Interleukin-17, IL-17) 都被報導過參與其中。[11, 12]

6-1 介白素-17A (Interleukin-17 A)

原先被稱為 CTLA-8 的介白素-17A，屬於介白素-17 家族，介白素-17A 的接受器分別為 IL-17RA 以及 IL-17RC；主要是由一群 Th17 輔助型 T 細胞 (Type 17 T helper cell, Th17 cell) 以及先天淋巴球 (Innate lymphoid cells, ILC) 所分泌。介白素-17A 在表皮屏障的部位扮演一個重要的角色，例如皮膚、口腔、腸道系統等。

由於在腸道發炎性疾病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 病人的腸道組織中發現介白素-17 以及製造介白素-17 細胞的增加[13]，被認為是屬於促進腸道發炎的角色，但是近期在以抗體中和介白素-17 的臨床研究中發現，不僅無法達到預期效果，還會導致更嚴重的發炎情況與增加感染的機率[14]，顯示其可能不僅只是促進發炎。介白素-17 在腸道免疫中扮演一個調控的角色，會與其他細胞激素一起作用；在幫助腸道免疫的方面，會與

介白素-22 一同促進抗微生物肽，包含 Reg3 γ 、 β -defensins 等產生，抵抗微生物的入侵；在 2016 年的一篇報導中表示，腸道表皮細胞上 IL-17 receptor 剔除小鼠上，會有不平衡的腸道菌相，並被認為與減少多聚免疫球蛋白受體表現量有關係[15]。過去發表過的報導中，在皮膚角質細胞中脾酪胺酸激酶會參與在介白素-17 的訊號中[16]

6-2 類鐸受體-3 (Toll-like receptor 3, TLR-3)

類鐸受體屬於模式辨別受體 (Pattern recognition receptor, PPR) 的一種，主要會辨認病原相關分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMP)。在腸道表皮細胞上表現的類鐸受體主要辨認到腸腔內的共生菌，影響細胞增生、免疫球蛋白生成、維持腸道緊密連結以及促進抗微生物肽的生成等。[17]類鐸受體-3 即是屬於類鐸受體家族的一員，主要表現在胞內體上；主要辨識到進入細胞中的 dsRNA，進而活化下游免疫反應。

在 2005 年的一篇報導中曾經指出，藉由聚肌胞苷酸的刺激會引起類鐸受體-3 的活化，進而促進下游 NF- κ B 訊號的活化，導致多聚免疫球蛋白受體基因活化，增加其表現量幫助將 lamina propria 產生的免疫球蛋白運送至腸腔中。[9]

6-3 腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factor alpha, TNF- α)

腫瘤壞死因子是一種促進發炎的細胞激素，在腸道免疫中處於一個相當主要的位置。有多種細胞會在受到刺激之後分泌 TNF- α ，包含免疫細胞 (巨噬細胞、自然殺手細胞、T 細胞以及 B 細胞)、體細胞以及表皮細胞，而在腸道表皮細胞上則是會表達 TNF-R1 以及 TNF-R2 兩種接受器。

TNF- α 對腸道表皮具有多重的功用，包含破壞細胞緊密連結導致腸道通透性的增加、引起細胞凋亡、影響黏膜免疫功能等[18]，以影響黏膜免疫功能來說，TNF- α 刺激腸道表皮細胞後會促進多聚免疫球蛋白受體表現量的增加，而這主要是透過 intron 1 NF- κ B。[10]

6-4 干擾素- γ (Interferon- γ)

干擾素- γ 屬於干擾素家族中的第二型干擾素，主要會由 T 細胞、NK 細胞、B 細胞、抗原呈現細胞(巨噬細胞、樹突細胞)以及 ILC1 (Innate lymphoid cell)所分泌。干擾素- γ 的接受器包含有 IFNR1 以及 IFNR2 兩者，當受到干擾素- γ 的訊號後會導致接受器的構象改變 (conformation change)，使得 Jak-2 自體磷酸化並且進而活化 Jak-1 進而活化 JAK-STAT 路徑。[19, 20]

干擾素- γ 在 1993 年時即被報導出來會引致多聚免疫球蛋白受體的生成[21]，藉由 Stat-1 進核結合至 Interferon Regulatory factor (IRF)1，IRF-1 進而促使多聚免疫球蛋白受體轉錄。[22]

7.脾酪胺酸激酶 (Spleen tyrosine kinase, Syk)

Tyrosine kinase 家族之一，主要由兩個 Src homology 2 (SH2) domain 以及具有酪胺酸激酶活性的 domain 組成。過去研究指出酪胺酸激酶主要表現在免疫細胞中，並參與在各種不同的訊息傳遞中。當細胞受體中具有免疫受體酪胺酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAM) 的部分被磷酸化時，脾酪胺酸激酶會利用其 SH2 domain 去辨認與結合，並活化酪胺酸激酶活性，進而引發下游一連串的訊息傳遞，參與在活化許多免疫反應的活化訊息傳遞中。[23]在部分自體免疫疾病中即是過度活化脾酪胺酸激酶的抑制劑被作為多種自體免疫系統疾病的療法候選，例如類風濕性關節炎等[24]，但臨床研究顯示脾酪胺酸激酶抑制劑用於治療時，會引起部分不良反應，例如腹瀉是最常見的副作用。[25]

脾酪胺酸激酶者要是表現在造血細胞上，例如 B 細胞、巨噬細胞等等，例如雖然大部分的研究是針對免疫細胞，脾酪胺酸激酶也會表現在非免疫細胞上，諸如纖維母細胞、表皮細胞、內皮細胞等等；[26]相對於免疫細胞來說，

脾酪胺酸激酶在這些細胞上所參與的訊息傳遞等角色就還不是很清楚。



8.脾酪胺酸激酶在腸道中的研究

過去有研究指出，在發炎性腸道疾病病患的腸道中，有較高的磷酸激酶表現；而也有報導顯示，在大鼠的腸炎模式中，其腸道組織有較多的脾酪胺酸激酶表現，而在給予脾酪胺酸激抑制劑治療後，可以減緩腸炎的嚴重程度。[27]此外，已有實驗證實脾酪胺酸激酶會表現在腸道表皮細胞，並參與在 Decin-1 的訊號傳遞中。[28]但對於是否參與在其他訊號傳遞中還仍未清楚。

二、研究動機 (Rationale)

脾酪胺酸激酶在免疫細胞中的功能以及其所參與的傳遞訊號是與細胞活化及免疫調控等有關，而在非免疫細胞中參與的部分仍較未知。目前已知脾酪氨酸激酶會參與在許多不同的訊號傳遞之中，例如在皮膚角質細胞中參與在介白素-17 的訊號中，或是參與在腫瘤壞死因子- α 的訊號傳遞中。因為脾酪胺酸激酶其參與在免疫活化的特性，目前也有需多研究以抑制脾酪氨酸激酶活性為治療一些發炎性疾病，例如類風溼性關節炎；而在這些治療之中有被報導過，病人會伴隨著腸道發炎的副作用。

腸道表皮細胞作為抵禦病原菌以及外來入侵的第一線，以及在後續調控腸道系統免疫上，佔有相當重要的一席之地。而過去已有研究指出脾酪胺酸激酶也會在腸道表皮細胞中表達，但是其所扮演的角色以及參與的訊號傳遞仍還未明確。

在腸道表皮細胞中，多聚免疫球蛋白受體會受到多種不同的刺激進而增加受體表現，其中包含有介白素-17、類鐸受體、腫瘤壞死因子等等。而脾酪胺酸激酶在免疫細胞以及非免疫細胞上曾有被報導過參與在這之中的訊號傳遞，但在腸道表皮細胞上仍未有相關研究，因此我們假設脾酪胺酸激酶可能會參與並影響在腸道表皮細胞中免疫球蛋白受體的表現。

三、材料與方法(Materials and methods)



1.細胞培養

1.1 使用細胞株以及相關試劑

人類大腸表皮細胞株：HT-29

培養液：DMEM medium (Gibco) high glucose 與 10% 胎牛血清 (Thermol)、1%Penicillin/Streptomycin solution (P/S)

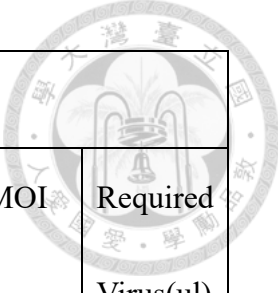
1.2 細胞培養方式

細胞生長至七至八分滿時會繼代，期間約為三至四天。以 0.25 M 胰蛋白酶(trypsin)放置 6 分鐘後，加入細胞培養液中和，離心 1100 rpm 5 分鐘，抽掉上清液，1 ml 培養液回溶細胞，並計算細胞數量，最後回種至 10 cm dish 中。細胞培養溫度在攝氏 37 度，並供給 5%的 CO₂。

2.降低脾酪胺酸激酶 (Syk) 在細胞中的表現

中研院的 RNAi 資料庫中四種分別送入不同 Syk shRNA 的 lenti-virus 以及另一作為控制組帶有 luciferase gene 的載體 (control vector) 來做降低 syk 表現之用。

先將細胞以 5×10^5 細胞/well 的數量種在 6 孔盤中，隔天抽掉原培養液，並換成包含 8ug/ml polybrene 的培養液後，分別以 3M.O.I 的病毒量感染細胞。24 小時候抽掉原溶液，以 PBS 清洗後換成包含 2ug/ml puromycin 的培養液做篩選之用；經過 48 小時候，再以 PBS 清洗後，同樣加入包含 2ug/ml puromycin 的培養液繼續篩選，72 小時候抽掉原溶液後換成一般的培養液。待細胞放大至一定數量時則將細胞移至 10cm 盤放大，分盤過程中取少量細胞做西方墨點 (western blot) 確認 syk 表現量的降低，以確認效率。



列表：Syk shRNA					
Target	Clone ID	Titer, RIU/uL	symbol	MOI	Required Virus(ul)
Human	TRCN0000072249	82893	Luciferase	3	18.1
Human	TRCN0000196401	32044	Syk	3	46.8
Human	TRCN0000197242	52476	Syk	3	28.58
Human	TRCN0000197257	77911	Syk	3	19.25
Human	TRCN0000003163	82678	Syk	3	18.14

3.細胞蛋白萃取(Protein extraction)及西方墨點法(western blot)

3.1 細胞蛋白萃取

細胞加入不同刺激物後待 48 小時後，以 PBS 清洗細胞，將細胞以 trypsin 收集下來至 eppendorf 後，以 12000 rpm 高速離心，抽掉上清液後再以 PBS 清洗一次，再次高速離心後抽掉上清液，加入 Novagen' s phosphosafe extraction reagent (Millipore,#71296) 60 μ L 破細胞，高速震盪後以 12000rpm 進行 20 分鐘高速離心，離心後取上清液轉移至新的 eppendorf 後，以 Protein assay dye reagent (Bio-rad, laboratories, Inc., USA, Cat#500-006) 進行蛋白質濃度定量，接著加入 5x sample buffer dye (250 mM Tris \cdot HCl, pH 6.8, 10% SDS, 30 % (v/v) Glycerol, 5% β -mercaptoethanol , 0.05%(w/v) Bromophenol Blue,10 % β -mercaptoethanol) 以 95°C 加熱 5 分鐘使蛋白變性 (denaturation) ，將 sample 放置於-20°C 保存。

3.2 膠體製備 (SDS-PAGE preparation)

製作 SDS-PAGE 膠，上層為 4% 膠集膠體 (stacking gel)，下層為 8% 或是 10% 的分離膠體 (resolving gel)。將製膠台架好後，先注入下層的分離膠體至約 3/2 高度，再加入 75% Ethanol 將膠體壓平，待下層膠體凝結後倒掉 Ethanol，並注入上層膠體，此時也會一併插入 10 或 15 孔的齒梳，待其凝結，即可直接進入電泳或是冰存在 4°C 冰箱。

3.3 電泳 (Electrophoresis)

膠連同玻璃夾層一併放入電泳槽中，將 1xRunning buffer (10xRunning buffer: 144g/L Glycine, 30.2g/L Tris-base, 10g/L SDS) 倒入電泳槽中至蓋過膠體。將置備好的 sample 計算好 25 ug protein 的量後分別注入孔洞中，sample 兩端分別注入 page ruler protein marker (Thermol page ruler protein ladder#26616) 2.5ul，以 80V 跑約 20 分鐘，接著轉以 120V 跑 60 分鐘，待蛋白質分離。

3.4 轉漬 (Transfer)

電泳結束後，以 semi-dry transfer 系統進行轉漬，將濾紙浸入 1XTransfer buffer (10XTransfer buffer: 29 g/L Glycine, 58 g/L Tris-base, 3.7 g/L SDS, 稀釋成一倍時會另外加入 100ml 100% methanol), 中，0.45 PVDF 膜 (Millipore, #Immobilon-P PVDF) 以 100% methanol 潤濕。依序以濾紙、膠體、PVDF 膜、濾紙的順序放進 semi-dry transfer 機器，以棒子將氣泡趕走後，以固定電流 7v 的方式 transfer 70 至 75 分鐘不等。

3.5 阻攔 (Blocking)

轉漬完成後將 PVDF 膜放入 5% 的 non-fat dry milk 配置於 1XTBST buffer (10X TBS Buffer: Tris, NaCl, Tween-20:0.1%)，在 shaker 上搖晃一小時以阻止非特異性結合。

3.6 檢測

Blocking 結束後加入一級抗體，在 4°C 搖晃 overnight。隔天以 TBST buffer 清洗五分鐘三次、十分鐘兩次；接著加入二級抗體(配置於 5%non-fat milk 中)在室溫中搖晃 50 分鐘。之後接著以 TBST buffer 清洗五分鐘三次、十分鐘兩次。接著利用 Western blotting detection kit(Western Bright™ ECL)或是 milipore ECL 做呈色。



西方墨點法：一級抗體					
目標蛋白	辨認物種	產品編號	宿主	濃度	Blocking Buffer
β-actin	All	Millipore #MAB 1501	Mouse	1:15000	5% Non-fat milk in TBST
Syk	Human, Mouse	Cell signaling #D1I5Q	Rabbit	1:1000	5% Non-fat milk in TBST
pIgR	Human Mouse	GeneTex #GTX54608	Rabbit	1:1000	5% Non-fat milk in TBST

西方墨點法：二級抗體列表			
目標蛋白	宿主	產品編號	濃度
Anti-mouse, IgG-HRP	Goat	Jacson immunoresearch #AP124P	1:10000
Anti-Rabbit, IgG-HRP	Goat	Jacson immunoresearch #111-035-003	1:10000


4. RNA 純化 (RNA extraction) 及核酸序列定量偵測系統(Real-time PCR)

將細胞種於 12 孔盤中，每一格細胞量為 1×10^5 per well，分別在細胞生長 48 小時、72 小時、96 小時後，分別加入 Recombinant Human IL-17A (Peperotech) 50 ng/ml、Recombinant Human Tumor necrosis factor- α (Peperotech) 10 ng/ml、Human Recombinant Interferon- γ (Peperotech)、Lipopolysaccharide 1 ug/ml、Polyinosinic:polycytidylic acid (invivogene) 5ug/ml，刺激 24 小時。

抽掉原培養液，並以 PBS wash 細胞後，以 TRIzol 500 λ 收集細胞至 Eppendorf。首先加入 Choloform 100 λ 以 vortex 混和均勻後在室溫下靜置五分鐘，以 12500rpm 離心 20 分鐘；將上清液移轉至新標籤好的 eppendorf 裡，加入 Isopropanol 500 λ 後上下輕搖使其混和均勻後在室溫下作用 5 分鐘，接著以 12500 rpm 離心 30 分鐘。抽乾後接著以 Ethanol wash pellet 兩次各 200 λ ，12500 rpm 離心 15 分鐘以及 10 分鐘，抽乾 Eppendorf 中的有機溶劑後倒置風乾，並以 55°C 乾浴槽加熱促進有機溶劑揮發後，以 15-50 λ 的 DEPC 水回溶 RNA，測完濃度後接著利用 kit (Invitrogene/GenedireX, GScript First-Strand Synthesis Kit, #MB305-0050)，將 RNA 反轉錄成 cDNA。

將 RNA 以 1~2 ug 的濃度以及 50 μ M 的 Oligo (dT) 0.5 μ L 和 10 mM dNTP 0.5 μ L 混和，以 DEPC 水將體積調成 6.5 μ L，以 65°C 加熱 5 分鐘後，再混入包含 5X 1st strand buffer 2 μ L、0.1 M DTT 0.5 μ L、Gscript RTase 0.5 μ L 的混和液，離心後放入 PCR machine。

將 cDNA 混和 EVA Green Master Mix (bio-rad) 或是 HieffTM qPCR SYBER® Green Master Mix、0.2uM 引子 (Forward & Reverse) 後，以 PikoReal 96 Real-Time PCR 機器 (Thermo scientific) 進行 RT-PCR，每個條件進行三重複；並利用 GAPDH 做為參考基準進行標準化，以利各種條件的比對。



Primer list		
Target gene		Sequence(5'-3')
Human <i>pIgR</i>	Forward	CTCTCTGGACCACCGT
	Reverse	CAGCCGTGACATTCCCTG
Human <i>GAPDH</i>	Forward	CCCATCACCATCTTCCAGGAG
	Reverse	GTTGTCATGGATGACCTTGGC

5.分離小鼠腸道表皮細胞

5-1. Buffer

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS buffer, Gibco #24020-117)

Isolation buffer: HBSS buffer, 5 mM EDTA (EDTA, usb #15699) , 5%FBS (Hyclone#SH30071.03) , 1 mM DTT (dithiothreitol, Invitrogen #1752163J) ,

Culture Buffer: DMEM/F12 (Gibco, #12660-012) , 1%P/S (Penicillin-Streptomycin, Thermo # 15140122) , 1%NEAA (Non-Essential Amino Acid, Simply, #CC517-0100) , 10 mM HEPES (Simply, #CC519-0100) , 10% FBS (Hyclone#SH30071.03)

5.2 分離步驟

小鼠犧牲之後，取出小腸（小腸係指胃部下方至盲腸上方）以及大腸（盲腸下方至肛門口）的部分，分開處理小腸與大腸。

小腸組織取出之後，浸入放有預熱的 HEPES 的 10 cm dish 中，以鑷子去除脂肪組織，以細胞刮杓將腸腔內部的食糜與糞便推出，接著以剪刀與鑷子去除腸道上的 peyer' s patch 去除。然後將清理乾淨的小腸組織放入浸有預熱的 Isolation buffer 的 10 cm dish 中，以剪刀將腸道縱剪開後，再剪成約 0.5 cm 的小碎片。

將 Isolation buffer 與小腸碎片加入攪拌子放入小燒杯中，以 300~400 rpm 攪拌 30 分鐘後放入 50 ml 的離心管中，靜置一分鐘後抽取上清液移置 eppendorf 中離心。將剩餘的細胞以 Trizol 溶解後抽取

RNA 分析。

6. 統計分析方法 (Statistical analysis)

實驗數據以 Prism 軟體分析，數據以平均值以及標準誤差表示。P 值小於 0.05 時具有統計差異。



四、實驗結果 (Results)



1.探討在降低腸道表皮細胞上脾酪胺酸激酶的活性下，以介白素-17、腫瘤壞死因子- α 、干擾素- γ 以及聚肌胞甘酸的刺激下，大腸表皮細胞株 (HT-29) 多聚免疫球蛋白受體表現量改變。

在過去文獻中指出，腸道表皮細胞會受到介白素-17A、腫瘤壞死因子- α 、干擾素- γ 、脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 以及聚肌胞甘酸刺激，進而促進多聚免疫球蛋白受體的表現量增加。首先要探討的是在腸道表皮細胞上降低脾酪胺酸激酶的表現的情況下，是否在受到同樣的刺激下多聚免疫球蛋白受體表現量增加會受到抑制。

在本篇實驗中以大腸表皮細胞株 (HT-29) 為研究材料，以 10^5 cell/well 的細胞濃度種在 12-well 的 culture plate 兩天待細胞狀態穩定後，先以脾酪胺酸激酶抑制劑 (R406) 處理 30 分鐘後以降低 HT-29 細胞上脾酪胺酸激酶的活性；再分別以 IL-17A (50 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml)、LPS (1 μ g/ml)、Poly I:C (5 ug/ml) 以及 IFN- γ (10 ng/ml) 刺激 48 小時之後，收取細胞後利用西方墨點法分析其多聚免疫球蛋白受體的表現量。

如 (圖一(A)) 所示，可以看到以 IL-17A、TNF- α 、Poly I:C 以及 IFN- γ 的刺激下，大腸表皮細胞的多聚免疫球蛋白受體表現量會上升，然而在 LPS 的組別中則未能見到多聚免疫球蛋白受體表現量的上升；而在降低脾酪胺酸激酶活性的情況下，這 IL-17A、TNF- α 、Poly I:C 以及 IFN- γ 四組皆可以看到下降。

而 (圖一(B)) 同樣是顯示在以 IL-17A (50 ng/ml) 刺激 HT-29 細胞 48 小時的情況下，多聚免疫球蛋白受體的表現量會上升；但如果是先以脾酪胺酸激酶抑制劑降低活性的組別則會有下降的趨勢，以 Image J 軟體分析後可以看見其下降的趨勢，如 (圖一(C)) 所示。

綜合以上可以得知，與控制組相比，給予 IL-17A、TNF- α 、Poly I:C 以

及 INF- γ 的刺激下會增加多聚免疫球蛋白受體表現量，但是在先以 R406 降低脾酪胺酸激酶活性的情況下，其多聚免疫球蛋白受體的表現量會受到影響，可以推斷說脾酪胺酸激酶可能會參與並影響其表現。



2.建立以 Syk shRNA 轉染降低在人類大腸表皮細胞株(HT-29)中脾酪胺酸激酶之基因表現之系統

為了研究將腸道表皮細胞降低脾酪胺酸激酶的情況下，在 IL-17、TNF α 、Poly I:C 以及 IFN- γ 的刺激下引起多聚免疫球蛋白受體量增加是否受到影響，我們將 HT-29 細胞以帶有四種不同序列 shRNA 的病毒感染 (MOI=3) 之後，經過抗生素篩選後以西方墨點法確認脾酪胺酸激酶表現量的下降。由（圖二）可得知，相比控制組，四個品系的確都能有效的降低脾酪胺酸激酶的表現量。最後我們選用其中一個品系來做為實驗組，以比較在不同刺激下降低脾酪胺酸激酶的表現量時是否會影響到多聚免疫球蛋白受體表現的差異性。

3.降低脾酪胺酸激酶基因表現的細胞株在未受到刺激的情況下，多聚免疫球蛋白受體的表現量在不同天數的培養情況下並無顯著差異。

確認在降低脾酪胺酸激酶基因表現的腸道表皮細胞株是否在未受到刺激的情況下，因為不同的細胞成長速度以及細胞的滿盤程度等而影響到多聚免疫球蛋白受體基礎表現值的差異性，在本實驗中 HT-29 細胞以 10^5 cell/well 的細胞濃度種在 12-well 的 culture plate 中，培養至 72 小時、96 小時以及 120 小時分別收集 RNA，並且將 RNA 純化後轉換成 cDNA，並以核酸序列定量偵測系統 (Real-time PCR) 偵測其多聚免疫球蛋白受體基因表現量的差異性。

在（圖三）中可以看到以多聚免疫球蛋白受體的表現量在降低脾酪胺酸激酶的基因表現組別中相較於控制組都有略微上升的情況，但兩者之間

並未有顯著差異性；比較相同培養天數時，控制組以及實驗組的多具免疫球蛋白受體表現量隨著培養時間而有上升的情況，但同樣皆未達到顯著差異。



4. 比較在不同培養時間下，同樣給予介白素-17 的刺激後，降低脾酪胺酸激酶基因表現細胞株與控制組的多聚免疫球蛋白受體表現量提升的差異性。

HT-29 細胞以 10^5 cell/well 的細胞濃度種在 12-well 的 culture plate 中培養至 48 小時、72 小時以及 96 小時分別予以 IL-17A (50 ng/ml) 刺激 24 小時後分別收集 RNA，並且將 RNA 純化後轉換成 cDNA，並以核酸序列定量偵測系統 (Real-time PCR) 偵測其多聚免疫球蛋白受體表現量的差異性，如 (圖四(A))。

由 (圖四(B)) 可以得知，在培養至 48 小時的時候以 IL-17 刺激可以看到控制組有上升的情況，而相較於控制組，降低脾酪胺酸激酶組別上升的幅度則較少；但是在培養至 72 小時以及 96 小時的情況下再給予 IL-17 的刺激下則無法觀測到多聚免疫球蛋白受體表現量上升。

5. 在同樣給予腫瘤壞死因子- α 的刺激下，相較於控制組降低脾酪胺酸激酶基因表現細胞株的多聚免疫球蛋白受體表現量提升受到抑制。

HT-29 細胞以 10^5 cell/well 的細胞濃度種在 12-well 的 culture plate 中，培養至 48 小時以及 72 小時，分別予 TNF- α (10 ng/ml) 刺激 24 小時後收集 RNA，並且將 RNA 純化後轉換成 cDNA，並以核酸序列定量偵測系統偵測其多聚免疫球蛋白受體表現量的差異性。

如 (圖五(A)) 所示，在培養至 48 小時給予腫瘤壞死因子- α 刺激下，降低脾酪胺酸激酶的組別中可以觀察多聚免疫球蛋白受體表現量提升受到

抑制，表示脾酪胺酸激酶可能會影響並參與在由腫瘤壞死因子- α 所調控的多聚免疫球蛋白受體表現量。



6.在同樣給予干擾素- γ 的刺激下，比較於控制組降低脾酪胺酸激酶基因表現細胞株的多聚免疫球蛋白受體表現量。

在培養腸道表皮細胞株控制組以及脾酪胺酸激酶降低組別培養第 48 小時加入 IFN- γ (10 ng/ml) 後收取其 RNA 並分析多聚免疫球蛋白受體表現量提升的差異。如 (圖六(A)) 所示可以發現相比控制組與降低脾酪胺酸激酶組的免疫球蛋白受體表現量，兩組並無顯著差異。

7. 在同樣給予聚肌胞甘酸的刺激下，比較於控制組降低脾酪胺酸激酶基因表現細胞株的多聚免疫球蛋白受體表現量。

在培養腸道表皮細胞株控制組以及脾酪胺酸激酶降低組別培養第 48 小時加入 Poly I:C (5 ug/ml) 後收取其 RNA 並分析多聚免疫球蛋白受體表現量提升的差異。如 (圖七(A)) 所示可以發現相比控制組與降低脾酪胺酸激酶組的免疫球蛋白受體表現量有較低的趨勢。

9.以西方墨點法確認在降低脾酪胺酸激酶的組別相比於控制組，多聚免疫球蛋白受體蛋白表現量的差異。

為了確認在蛋白質層面上，在降低脾酪胺酸激酶的情況下是否具有差異性；以 HT-29 細胞以 10^5 cell/well 的細胞濃度種在 12-well 的 culture plate 中，在培養至第二天時分別給予以 IL-17A (50 ng/ml) 、Poly I:C (5 ug/ml) 以及 IFN- γ (10 ng/ml) 刺激 48 小時之後，收取細胞後利用西方墨點法分析多聚免疫球蛋白提升表現量的差異性。

如圖八所示，相較於脾酪胺酸激酶基因下降組別，控制組的部分可以看見與未刺激組別相比，多聚免疫球蛋白受體的表現量增加，特別是在 IFN- γ 的刺激下，而在脾酪胺酸激酶下降的組別中表現量則與未刺激組別

則未能看出相同趨勢。

10.在腸道表皮細胞脾酪胺酸激酶基因敲除小鼠中分離出來的腸道表皮細胞，分析其腸道的多聚免疫球蛋白受體基因表現量。

腸道表皮細胞分離後，直接將細胞收取其 RNA 做進一步分析。分析時以 vil-1 基因作為定量腸道表皮細胞相對定量，如圖九所示，可以見到相比野生型的小鼠大腸腸道表皮細胞，Syk^ΔIEC 小鼠的大腸腸道表皮細胞中含有的多聚免疫球蛋白受體的表現量有較低的傾向，但仍須累積更多樣本數以確認此現象。



五、討論

腸道是一個包含多元功用的複雜系統，除了作為基礎維持生命營養吸收代謝之用，也同時是人體中最大的免疫系統。為避免腸道因過度反應而造成多於的損傷以維持腸道免疫的恆定性，在第一線作為抵禦的表皮細胞就有著許多不同屏障功能，包含物理性以及化學性屏障；這些由表皮細胞所提供的保護作用會更進一步由初級以及次級免疫系統藉由其間的交互作用來達到提升的效果，提升避免外來物入侵甚而是清除入侵物的效率。

分泌型免疫球蛋白在避免外來的病原菌、微生物等的入侵中扮演極為重要的角色。分泌型的免疫球蛋白在腸腔內具有中和病原菌、抑制病原菌結合等功用，主要是由固有層(lamina propria)中的漿細胞分泌的免疫球蛋白 A 藉由結合至腸道表皮細胞上的多聚免疫球蛋白受體來運送，以發揮其功用。

在本篇實驗中所要探討的是脾酪胺酸激酶在腸道表皮細胞上是否會參與並且影響在調控多聚免疫球蛋白受體的訊號中。在這次的實驗中選用的是人類大腸表皮細胞株 (HT-29)，在過去研究多聚免疫球蛋白受體如何在腸道表皮細胞中被調控大多數的實驗皆是以 HT-29 為模式。但是在本次實驗中並未能如同其他探討多聚免疫球蛋白受體調控的研究中，以同樣劑量的細胞激素或是配體刺激下引發出同等的反應，比預期會出現的反應稍弱。與過去探討多聚免疫球蛋白受體調控的研究相比，本次實驗中有幾個相異處。其一是有部分文獻中使用的是 HT-29.74 或是 HT-29v206,8,9,22 細胞株，這兩種不同的亞細胞株分別在 1987 年以及 1991 年被分類出來 [29]；這些 subclone 被以限制葡萄糖的方式由原先的 HT-29 細胞株中分化出來，具有較高的多聚免疫球蛋白受體表現，特別是在有 TNF- α 以及 IFN- γ 的情形下[30]；其二可能是因為部分接受器的分布位置並非位於腸道表皮細胞的頂端 (apical)，而是位於下端 (basal lateral)；在給予細胞激

素刺激時所能引致的反應較小，在 2007 年的一篇文獻中有提及，在限制 HT-29 細胞葡萄糖情況下致使細胞分化出不同的亞克隆情況下，可以分離出能夠生長成單層狀態的 HT-29 進而可以在 transwell 上生長；在這樣的情況下由下端的地方給予 IFN- γ 以及 IL-4 的刺激，比起由頂端加入能引致更好的多聚免疫球蛋白受體增加。[31]在本篇實驗中，在不同天數的培養下加入細胞激素所引致的反應有不同的趨勢，雖然這之間未有顯著差異性，但是仍是一個值得注意的部分，可能還需要更加深入探討是否與表皮細胞本身特性有關。

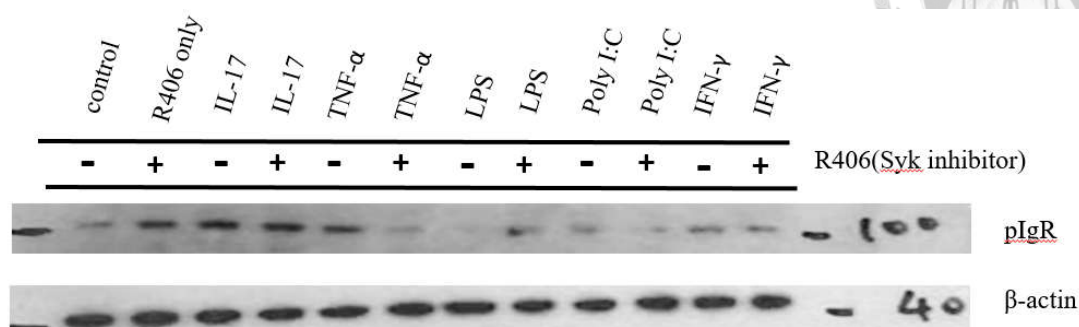
而在本次實驗中，有以核酸序列定量偵測系統以及西方墨點兩種層面的方法來探討脾酪胺酸激酶參與其中的影響；由圖一的抑制劑實驗中以及圖六的實驗中以西方墨點法來探討的實驗中，可以看到在降低了脾酪胺酸激酶的表現後，多聚免疫球蛋白受體的蛋白質表現量有下降的趨勢存在，然而在圖五的 B 與 C 中以 IFN- γ 以及 Poly I:C 刺激的下，則有一個相反的趨勢。在過去探討 IFN- γ 以及 Poly I:C 對於多聚免疫球蛋白受體調控的文獻中，多以核酸序列定量偵測系統為主，這樣不同的結果除了可能還需要更多次的實驗重複去做確認。此外，是否會影響到後轉錄調控 (Post transcriptional regulation) 的部分可能也值得做探討。

總結本篇實驗來說，脾酪胺酸激酶可能對於腸道表皮細胞調控多聚免疫球蛋白受體方面有影響，但對於如何影響以及影響的程度仍然需要做更多的探討與實驗去證實。

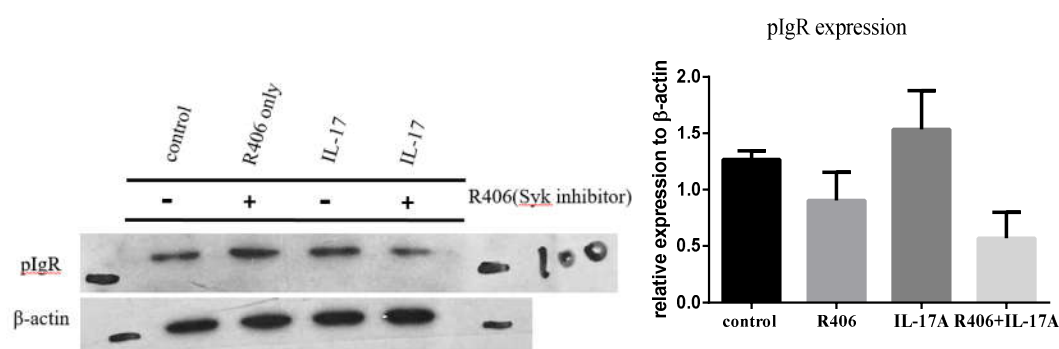
六、附圖



(A)

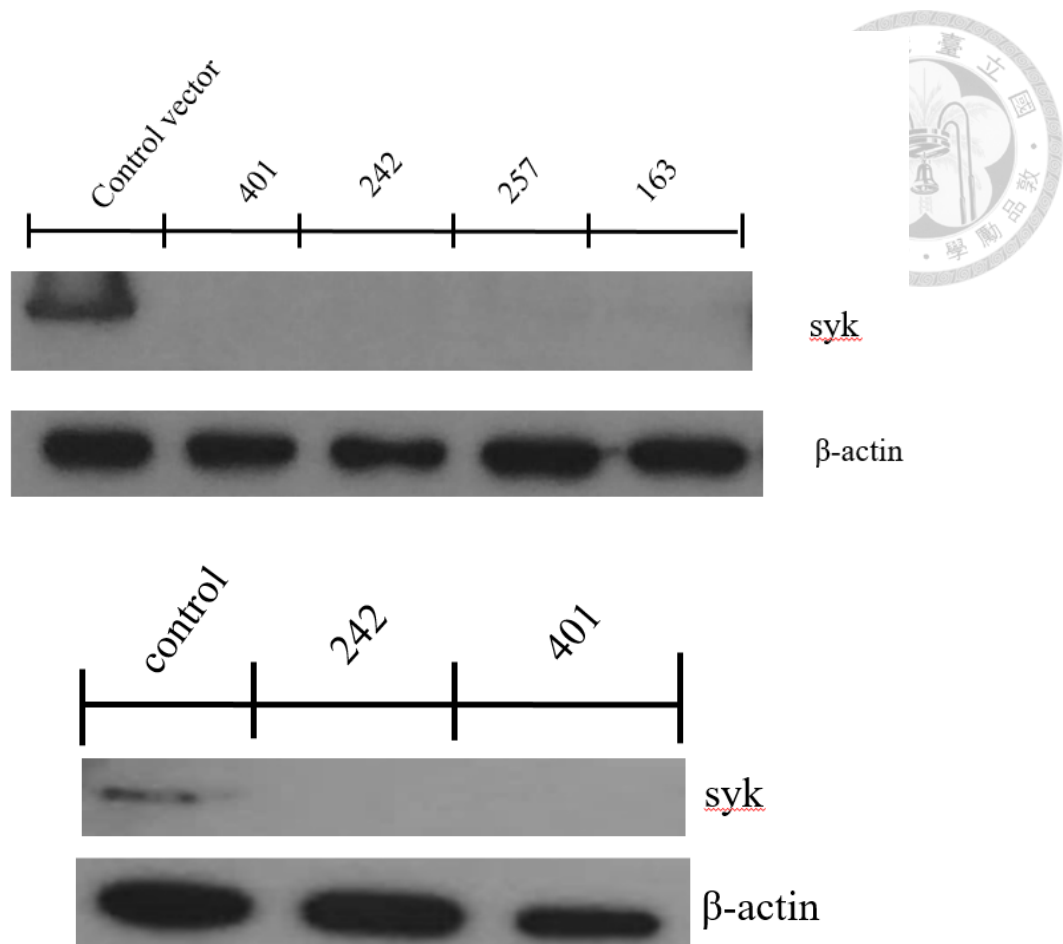


(B)



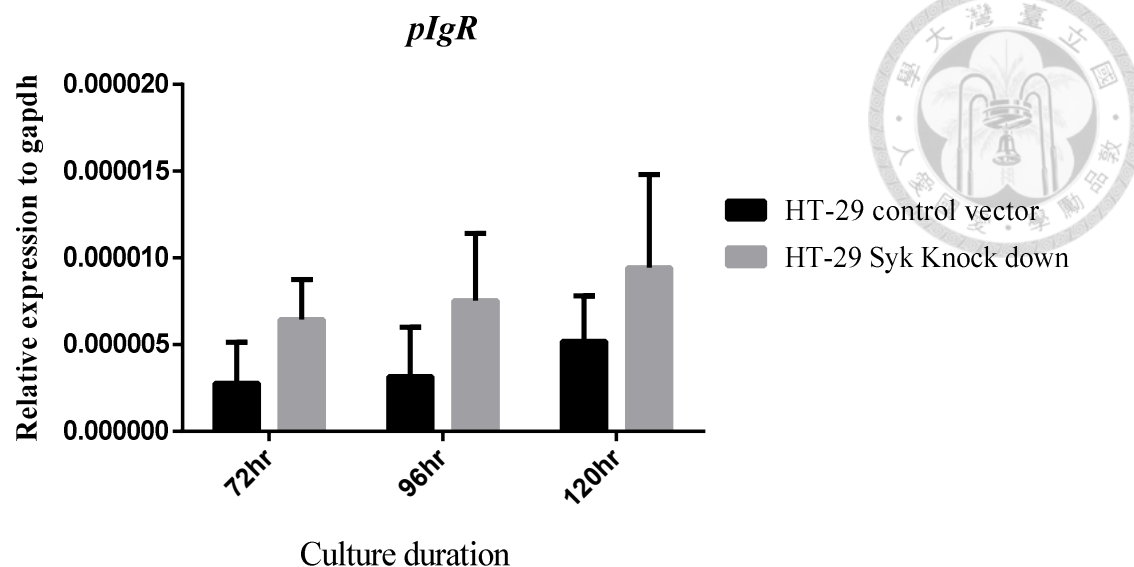
圖一、腸道表皮細胞株在 IL-17A、TNF-α、Poly I:C、IFN-γ 的刺激下，多聚免疫球蛋白受體的蛋白質表現量被提升，但在經脾酪胺酸激酶抑制劑 (R406) 處理後，其表現量受到抑制，而呈現下降的趨勢。

利用西方墨點技術法發現，在人類腸道表皮細胞株(HT-29)，先經脾酪胺酸激酶抑制劑 (R406) 預處理 30 分鐘後，再分別以 IL-17A、TNF-α、Poly I:C、IFN-γ 處理 48 小時後，可以發現多聚免疫球蛋白受體蛋白質會受到抑制劑的影響而降低 (圖 A、圖 B，各 n=3)。而以 Image J 分析結果可以看到抑制劑不會直接影響到多聚免疫球蛋白受體蛋白質的表現，而在以抑制劑處理的情況下會有下降的趨勢。



圖二、利用帶有脾酪胺酸激酶 (Syk) shRNA 的病毒送入人類腸道表皮細胞株降低脾酪胺酸激酶的表現量。

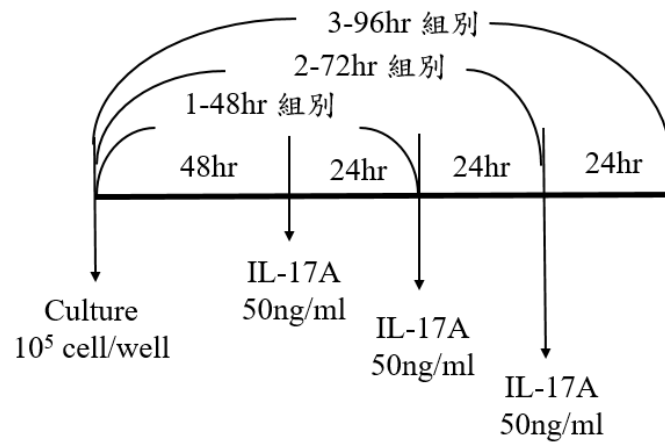
將帶有 4 種不同序列的脾酪胺酸激酶 (Syk) shRNA 的病毒轉染 HT-29 後，以西方墨點法確認脾酪胺酸激酶的表現量的確有顯著的下降。



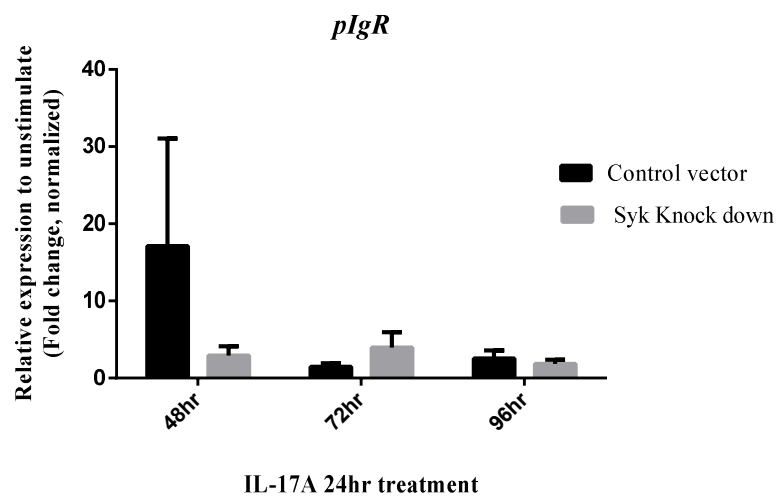
圖三、降低脾酪胺酸激酶基因表現的細胞株在未受到刺激的情況下，細胞在不同天數的培養下，多聚免疫球蛋白受體的表現量並無差異。(n=3)

將腸道表皮細胞株培養 72 小時、96 小時、120 小時之後，抽取其 RNA 並分析其表現量。由圖中可以發現在未刺激的情況下控制組與降低脾酪胺酸激酶的組別並沒有統計上的差異。

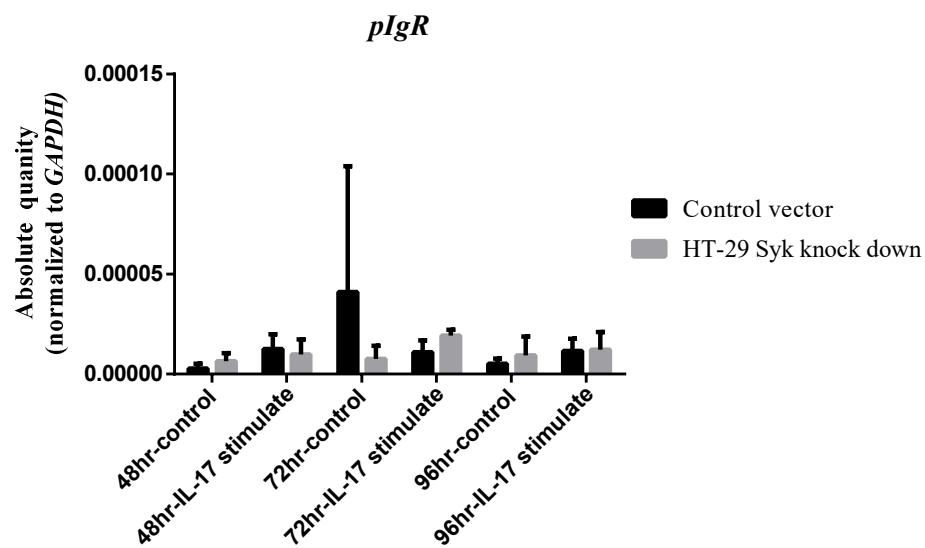
(A)



(B)



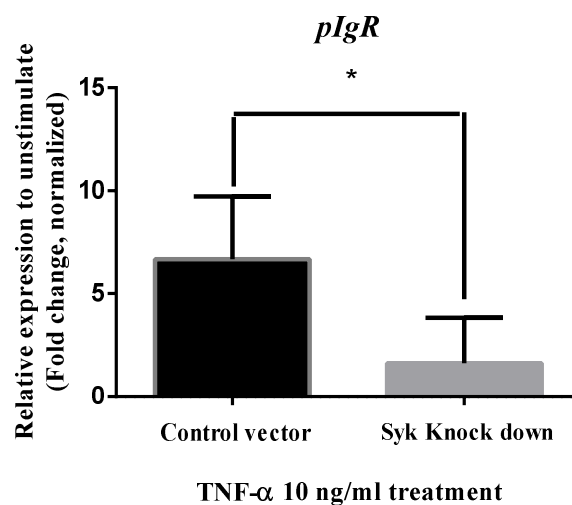
(C)



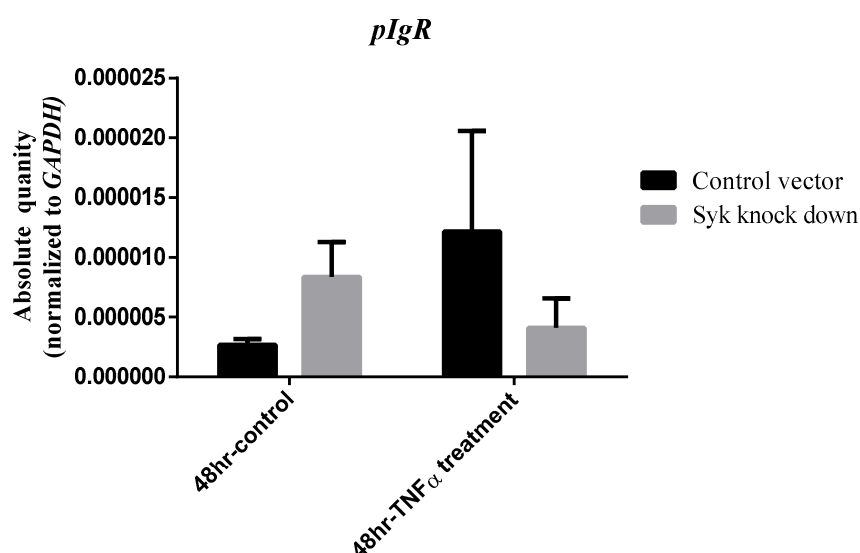
圖四、降低脾酪胺酸激酶基因表現的細胞株中，在不同天數培養的情形下，以介白素-17 刺激後，多聚免疫球蛋白受體量的表現 (n=3)。

在培養腸道表皮細胞株控制組以及脾酪胺酸激酶降低組別培養第 48 小時、72 小時以及 96 小時予以 IL-17A (50 ng/ml) 刺激 24 小時，收取 RNA 後以 RT-PCR 分析其多聚免疫球蛋白受體表現量，由圖 A 可以發現在培養 48 小時候給予 IL-17A 刺激會引起控制組的 pIgR 表現量提升，但是在脾酪胺酸激酶降低組則較無法提升。圖 B 是以 *GAPDH* 標準化後的多聚免疫球蛋白受體表現量絕對值呈現。

(A)



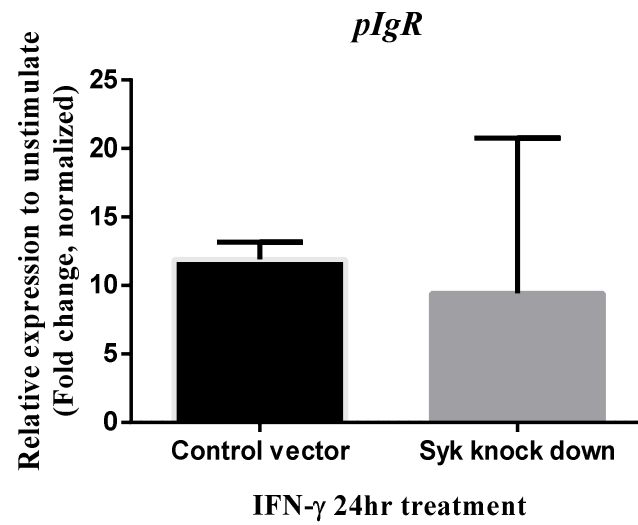
(B)



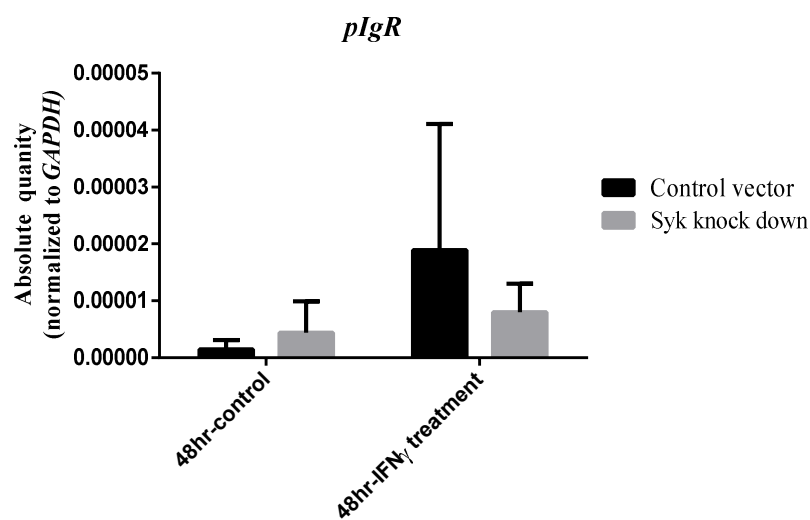
圖五、在同樣給予腫瘤壞死因子- α 的刺激下，相較於控制組降低脾酪胺酸激酶基因表現細胞株的多聚免疫球蛋白受體表現量提升受到抑制。(n=3)

在培養腸道表皮細胞株控制組以及脾酪胺酸激酶降低組別培養第 48 小時加入腫瘤壞死因子- α 後收取其 RNA 並分析多聚免疫球蛋白受體表現量差異。如圖 A 所示可以發現相較於控制組的多聚免疫球蛋白受體表現量，脾酪胺酸激酶降低組別表現量提升受到抑制，圖 B 是以 *GAPDH* 標準化後的多聚免疫球蛋白受體表現量絕對值呈現。(p<0.05)

(A)



(B)

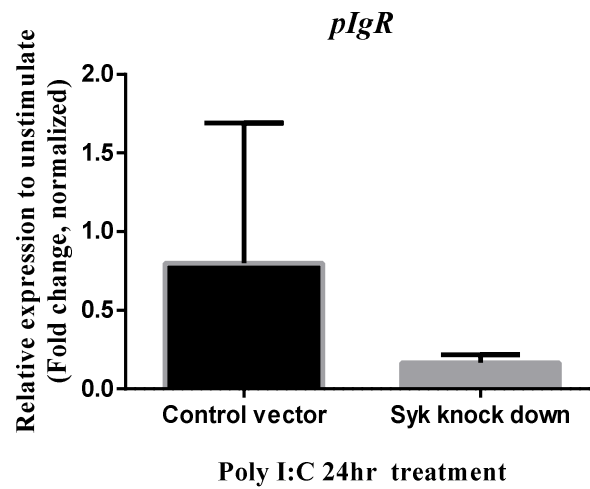


圖六、 在同樣給予干擾素- γ 的刺激下，相較於控制組降低脾酪胺酸激酶基因表現細胞株的多聚免疫球蛋白受體表現量。(n=3)

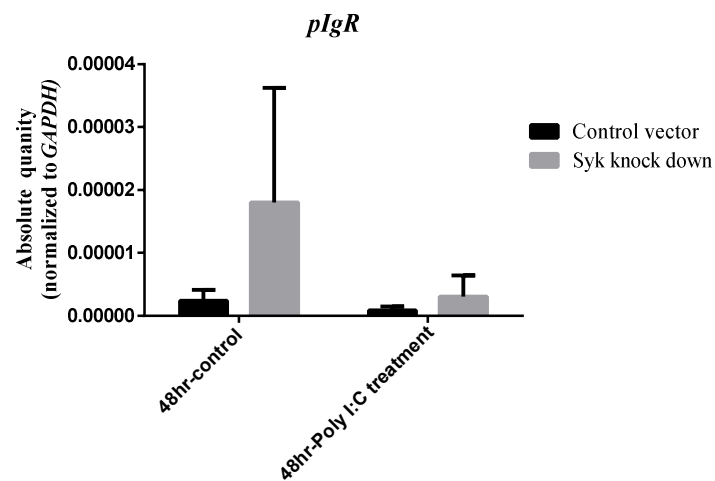
在培養 48 小時的情況下予以干擾素- γ 的刺激下，脾酪胺酸激酶降低組別與控制組的表現量並無差異，圖 B 是以 *GAPDH* 標準化後的多聚免疫球蛋白受體表現量絕對值呈現。



(A)

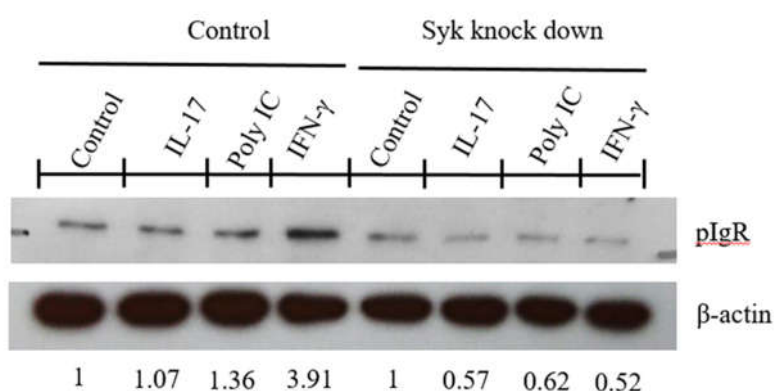


(B)



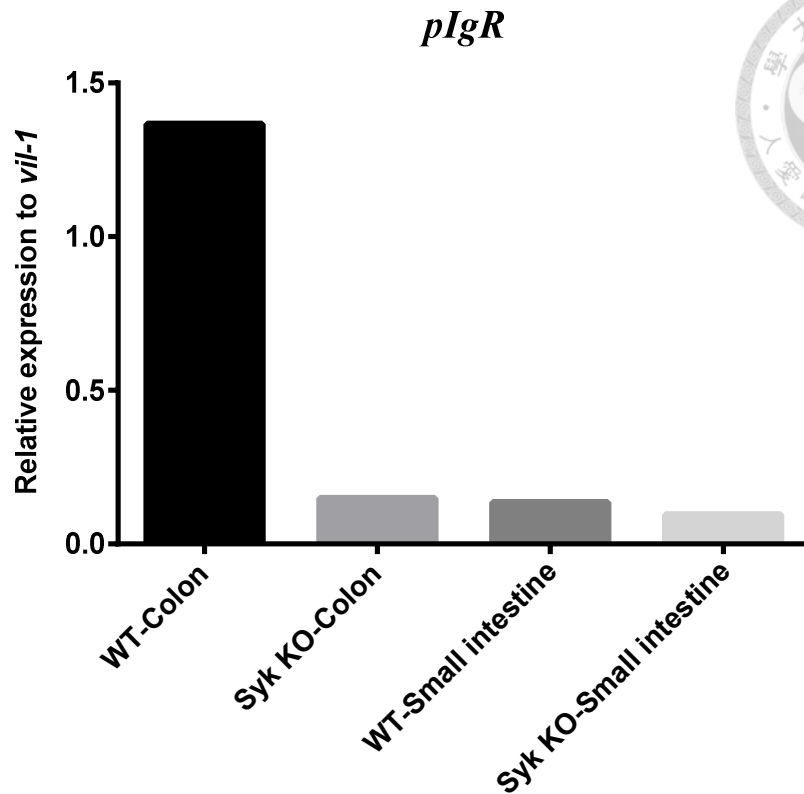
圖七、降低脾酪胺酸激酶基因表現細胞株中，在聚肌胞甘酸的刺激下，多聚免疫球蛋白受體表現量。(n=3)

在培養 48 小時的情況下予以聚肌胞甘酸的刺激下，脾酪胺酸激酶降低組別的表現量提升較控制組有較低的趨勢，圖 B 是以 *GAPDH* 標準化後的多聚免疫球蛋白受體表現量絕對值呈現。



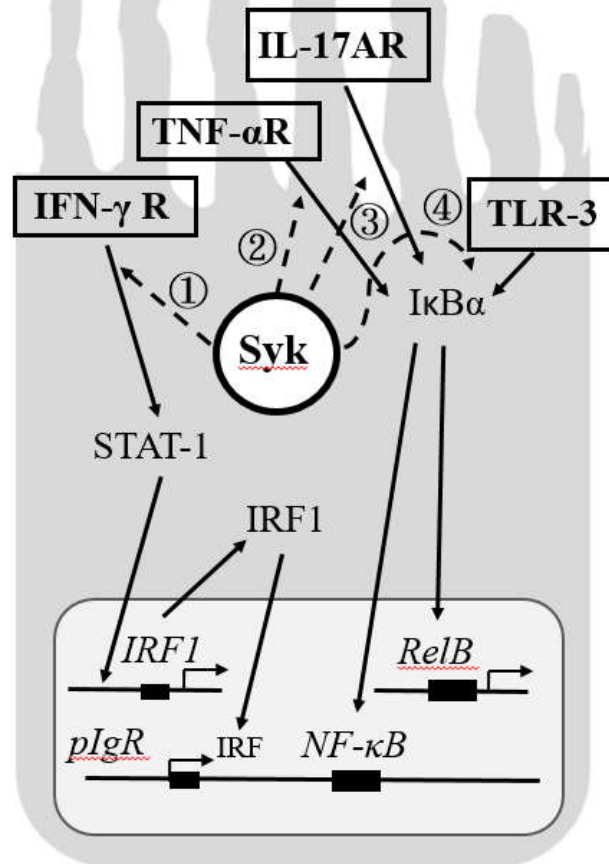
圖八、以西方墨點法確認在降低脾酪胺酸激酶的組別相比於控制組，多聚免疫球蛋白受體蛋白表現量的差異(n=3)

控制組與脾酪胺酸激酶表現量降低組在培養 48 小時候分別以 IL-17A (50 ng/ml) 、 Poly I:C(5 ug/ml) 、 IFN- γ (10 ng/ml) 刺激 48 小時之後，收取細胞做西方墨點法確認多聚免疫球蛋白受體的蛋白質表現量。在控制組方面相較於未刺激的情況下，IL-17A、Poly I:C、IFN- γ 的刺激下都可以看到多聚免疫球蛋白受體的表現量上升；而在降低脾酪胺酸激酶的組別則無法看到顯著的提升。



圖九、在腸道表皮細胞脾酪胺酸激酶基因敲除小鼠中分離出來的腸道表皮細胞，分析其腸道的多聚免疫球蛋白受體基因表現量。(n=1)

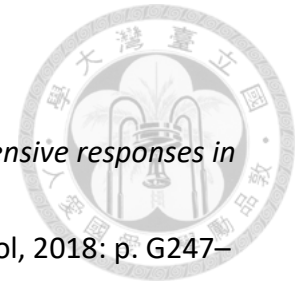
分離出小鼠腸道表皮細胞後，收集其 RNA 做分析。以 *vil-1* 基因作為定量比較 wild-type 老鼠與 Syk^{ΔIEC} 小鼠的大腸腸道表皮細胞以及小腸腸道表皮細胞， Syk^{ΔIEC} 小鼠的大腸腸道表皮細胞相較 wild-type 老鼠的 *pIgR* 有較低的傾向。



圖十、腸道表皮細胞受到介白素-17、腫瘤壞死因子- α 、干擾素- γ 以及類鐸受體-3 配體，所引發多聚免疫球蛋白受體增加由脾酪胺酸激酶調控的假設機制圖。

在腸道表皮細胞中可能影響多聚免疫球蛋白受體的路徑包含很多，在本篇實驗中假設脾酪胺酸激酶可能參與在由①干擾素- γ 、②腫瘤壞死因子- α 、③介白素-17、④類鐸受體-3 配體所引發多聚免疫球蛋白受體調控路徑中。

七、參考資料 (Reference)




1. Pardo-Camacho, C., et al., *Epithelial immunity: priming defensive responses in the intestinal mucosa*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2018: p. G247–G255.
2. Latiff, A.H.A. and M.A. Kerr, *The clinical significance of immunoglobulin A deficiency*. The Association for Clinical Biochemistry, 2007. **44**: p. 131–139.
3. MW, R., et al., *IgA antibody as a non-inflammatory regulator of immunity*. Biochem Soc Trans., 1997. **25**: p. 466–70.
4. Yel, L., *Selective IgA Deficiency*. J Clin Immunol, 2010. **30**: p. 10-16.
5. Kaetzel, C.S., *Cooperativity among secretory IgA, the polymeric immunoglobulin receptor, and the gut microbiota promotes host-microbial mutualism*. Immunol Lett, 2014. **162**: p. 10–21.
6. AE, H., B. PJ, and H. AB, *Structural insights into antibody-mediated mucosal immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, Herr AB. **308**: p. 173-204.
7. R, A., et al., *Signature biomarkers in Crohn's disease: toward a molecular classification*. Mucosal Immunol., 2008. **1**: p. 399-411.
8. Phalipon, A. and B. Corthe'sy, *Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins*. TRENDS in Immunology, 2003. **24**.
9. Schneeman, T.A., et al., *Regulation of the Polymeric Ig Receptor by Signaling*



- through TLRs 3 and 4: Linking Innate and Adaptive Immune Responses. The Journal of Immunology, 2005. 175: p. 376-384.*
10. Schjerven, H., P. Brandtzaeg, and F.-E. Johansen, *A Novel NF- κ B/Rel Site in Intron 1 Cooperates with Proximal Promoter Elements to Mediate TNF- α -Induced Transcription of the Human Polymeric Ig Receptor. The Journal of Immunology, 2001.*
 11. Cao, A.T., et al., *Th17 Cells Upregulate Polymeric Ig Receptor and Intestinal IgA and Contribute to Intestinal Homeostasis. The Journal of Immunology, 2012. 189: p. 4666-4673.*
 12. Johansen, F.-E. and C. Kaetzel, *Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity Mucosal Immunol., 2011. 4(6).*
 13. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. Gut, 2003. 52: p. 65–70.*
 14. SR, T., et al., *A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Study of Brodalumab in Patients With Moderate-to-Severe Crohn's Disease. Am J Gastroenterol, 2016. 111(11).*
 15. Kumar, P., et al., *Intestinal interleukin-17 receptor signaling mediates*

reciprocal control of the gut microbiota and autoimmune inflammation.

Immunity, 2016. **44**: p. 659–671.

- 
16. Wu, N.-L., et al., *Syk Mediates IL-17-Induced CCL20 Expression by Targeting Act1-Dependent K63-Linked Ubiquitination of TRAF6*. Journal of Investigative Dermatology, 2015. **135**: p. 490–498.
17. MT, A., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol., 2010. **10**(2): p. 131-44.
18. Leppkes, M., et al., *Pleiotropic functions of TNF- α in the regulation of the intestinal epithelial reponse to inflammation*. International Immunology. International Immunology, 2014. **26**(9): p. 509–515.
19. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
20. MF, N., *Cytokines in inflammatory bowel disease*. Nat Rev Immunol., 2014. **14**(5): p. 329-42.
21. P., K., et al., *Interferon- γ stimulation of messemger RNA for human secretory component(poly-Ig receptor) depends on continuous intermediate protein synthesis*. Scand J. Immun., 1993. **37**: p. 251-256.
22. JF, P., Y. KR, and P. KM, *Transcriptional regulation of the human polymeric*



- immunoglobulin receptor gene by interferon- γ* . *Molec Immunol*, 1997. **34**: p. 75-91.
23. Mócsai, A., J. Ruland, and V.L.J. Tybulewicz, *The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions*. *NATuRe ReVlews | Immunology*, 2010. **10**: p. 387-402.
24. Deng, G.-M., V.C. Kyttaris, and G.C. Tsokos, *Targeting Syk in Autoimmune Rheumatic Diseases*. *Fronties in Immunology*. **7**(78).
25. Friedberg, J.W. and J. Sharman, *Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2010. **115**(15): p. 2578-2858.
26. Duta, F., et al., *Differential expression of spleen tyrosine kinase Syk isoforms in tissues: Effects of the microbial flora*. *Histochem Cell Biol* 2006. **126**(4): p. 495-505.
27. G, C., et al., *The Syk Inhibitor Fostamatinib Decreases the Severity of Colonic Mucosal Damage in a Rodent Model of Colitis*. *J Crohns Colitis*, 2015. **9**(10): p. 907-17.
28. S, C.-K., et al., *Human intestinal epithelial cells respond to β -glucans via Dectin-1 and Syk*. *Eur J Immunol*, 2014. **12**: p. 3729-40.
29. R, C.K., et al., *Cell polarity regulates the release of secretory component, the*

epithelial receptor for polymeric immunoglobulins, from the surface of HT-29

colon carcinoma cells. 148, 1991: p. 35-47.

30. Blanch, V.J., J.F. Piskurich, and C.S. Kaetzel, *Cutting edge: coordinate regulation of IFN regulatory factor-1 and the polymeric Ig receptor by proinflammatory cytokines.* 162, 1999. **3**: p. 1232-1235.
31. M.D., P.B.A., et al., *T-cell cytokines affect mucosal immunoglobulin A transport.* The American Journal of Surgery. **194**(1): p. 128-133.

