

國立臺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



半乳糖凝集素-3 與介白素-22 訊號傳遞對於

腸表皮細胞表現抗菌胜肽之影響

The Effect of Galectin-3 and IL-22 Signaling

on Antimicrobial Peptides Gene Expression

in Intestinal Epithelial Cells

鄭貴云

Guei-Yun Cheng

指導教授：朱清良 博士

Advisor: Ching-Liang Chu, Ph.D.

中華民國 一零六 年 七 月

July 2017

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

The Effect of Galectin-3 and IL-22 Signaling
on Antimicrobial Peptides Gene Expression
in Intestinal Epithelial Cells

本論文係鄭貴云君(學號 R04449010)在國立臺灣大學醫學院免疫學研究所完成之碩士學位論文，於民國 106 年 07 月 24 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

朱清良

(簽名)

鄧希楷 (指導教授)

徐志文

所長 李 建 國

致謝



時間飛逝很快，短短兩年的研究所碩士班之旅就此告一段落。最初的感謝，來自於以前當助理時認識的潘秀玲老師，看著不知天高地厚地混日子的我，點醒我該回頭充實自己，讓自己多點競爭力。也許是藉由她的吉言以及老天的恩惠，在短短時間內，跌破眾人眼鏡，考上了台大免疫所。

進免疫所後，看著同學們與學長姐們各個能力與反應力超群，真覺得誤入叢林。感謝進入朱家實驗室，讓我有空間照著自己的步調前進，又有好笑有趣的同學、學長姐弟妹們可以嬉鬧拌嘴。而打從碩一上就被繆希椿老師關懷，雖然令我受寵若驚，但明白繆老師是期望我往前走。在各種機緣巧合下，有幸在最後半年內突然獲得徐志文老師的指導，打通沒注意到的模糊概念，讓毫無頭緒的研究能夠進行下去。

這過程中，要感謝的人事物實在太多，從誤打誤撞地選擇了有關 galectins 的研究題目，獲得劉扶東院士的特定資源，之中又有陳煥源博士與陳宏霖博士對於 galectins 概念的講解指導；加以透過徐志文老師與呂學翰學長協助，將 galecitn-3 銜接上 IL-22。很幸運的，這一路走來，在腦袋、考試與實驗卡關時，總是會有過路高手突然出現出手搭救。潘毅耕學長與林軒兆學長解救 Western Blotting 遇到的困境；李芳諺學長指導 knockdown 技術；蔡明勳學長解答了我實驗上遇到的許多瑣碎問題，且在最後關鍵倒數時刻，突然又路過搭救，真的好神！此外還有蕭又綾及陳名提供實驗鼠大腸，作為練習與測試用。



另外更要感謝我的精神與實驗耗材支柱的許秉寧老師實驗室的學長姊弟妹們，宋奇璋學長、蕭世鴻學長、葉致宏學長、趙伯翰學長、陳思穎、林怡孜、劉威延，不管是在考前臨時抱佛腳時、玻璃心快破碎時、耗材臨時缺乏時、渾身乏力時，晃去許家實驗室準沒錯！

兩年時間，轉眼即逝，要感謝的人，繁族不及備載。在專業知識領域中，也許我只獲得冰山一角，但邏輯思維的推演與辯論，卻是學到最多！感謝免疫所的一切，期望自己未來的視野能更寬廣！

中文摘要



Galectin-3 (Gal-3) 在生理反應上調控許多生物活性功能。在腸炎症患者中，腸道中的 Gal-3 表現量明顯較健康人低。在腸道發炎情況下，Interleukin-22 (IL-22) 能透過表現抗菌蛋白，如 Reg3 β /3 γ 及 S100A8/A9，來保護腸道避免遭受病原菌侵犯。IL-22 結合到 IL-22 受器後，會活化下游 Jak1/Tyk2-STAT3、Akt 及 MAPK 訊號路徑。許多研究顯示 Gal-3 及 IL-22 對於維持腸道生理平衡扮演重要角色，故我們假設 Gal-3 也許參與在 IL-22/IL-22R 訊號傳遞，並調控腸表皮細胞的功能。我們研究中發現，Gal-3 似乎不參與在 IL-22/IL-22R 下游主要的三條訊號路徑。在動物實驗的大腸組織中，雖然 Gal-3 不參與在調控 Reg3b/3g 的表現，但 Gal-3 會負調控 IL-22 所誘導表現的 S100A8/A9。

關鍵字：半乳糖凝集素-3、介白素-22、炎症性腸病、抗菌肽、Reg3b、Reg3g、S100A8、S100A9

Abstract



Galectin-3 (Gal-3) is known to exert a lot of biological function. Expression of Gal-3 is significantly downregulated in the gut of patients with inflammatory bowel disease (IBD). Interleukin-22 (IL-22) is known to protect against colitis through enhancing the production of antimicrobial peptides (AMP), such as Reg3 β /3 γ and S100A8/A9. Binding of IL-22 to its receptor activates Jak1/Tyk2-STAT3, Akt and MAPK signaling pathways. It has been reported that Gal-3 and IL-22 are important to maintain the intestinal homeostasis. We hypothesize that Gal-3 may participate in IL-22 signaling and regulate the functions in intestinal epithelial cells (IECs). In our study, Gal-3 seems not regulate the three major IL-22 signaling pathways. Although Gal-3 is not involved in regulating Reg3b/3g expression, it negatively regulates IL-22-induced S100A8/A9 expression in colon.

Key words: galectin-3, Interleukin-22, inflammatory bowel disease, antimicrobial peptides, Reg3b, Reg3g, S100A8, S100A9

目錄



致謝	I
中文摘要	III
Abstract.....	IV
一、前言	1
1. Inflammatory bowel disease (IBD)	1
2. Galectin (Gal)	2
2.1 Galectins 簡介	2
表一、Galectins 依結構分類	2
表二、Galectins 在人類與小鼠的分布情形	2
2.2 Galectin-3 (Gal-3)	3
3. Interleukin-22 (IL-22)	4
4. 抗菌蛋白 (antimicrobial peptides/proteins, AMPs).....	5
4.1 Reg3 β /3 γ	5
4.2 S100A8/A9	5
二、材料與方法	7
1. 細胞培養	7
1.1 CMT-93 (Mouse intestinal epithelial cell line).....	7
1.2 HT-29 (human intestinal epithelial cell line)	7
2. 動物實驗	7
2.1 操作與培養步驟	7
2.2 組織處理配方	8
3. Knockdown.....	8



4. Real-time PCR.....	9
5. 西方墨點法 (Western Blotting)	9
6. 統計分析	10
三、結果	11
1. Galectin-3 普遍表現在 IEC	11
2. 細胞生長密度不影響 galectins profile	11
3. IL-22 不影響腸表皮細胞 galectins 的表現分布	11
4. Gal-3 也許不參與在 IL-22 所誘導的 AMPs 之表現 in vitro	12
5. Gal-3 不影響 IL-22/IL-22R axis 的主要訊號傳遞.....	13
6. Gal-3 會影響 IL-22Ra1 的表現 ex vivo.....	13
7. Gal-3 缺失不影響 IL-22 所誘導的 Reg3 β / γ 之表現 ex vivo.....	14
8. Gal-3 缺失會促進 IL-22 所誘導的 S100A8/A9 之表現 in vivo.....	14
四、討論	15
五、圖表	18
六、參考文獻	29
七、附件	i
附件一：名稱縮寫	i
附件二：Lgals3 shRNA sequence.....	ii
1. Mouse	ii
2. Human	ii
附件三：試劑	iv
附件四：Real-time PCR Primers	v
1. Mouse	v

2. Human	vi
附件五：實驗動物鼠品系與資訊	vii



圖表目錄



Figure 1.	The profile of galectins in IEC cell line.....	19
Figure 2.	The profile of galectins in IL-22 treated CMT-93 cell line.....	20
Figure 3.	The efficiency of Galectin-3 knockdown.....	21
Figure 4.	The mRNA expression of IL-22-induced-antimicrobial proteins.	22
Figure 5.	The expression of Reg3 β in IL-22-treated CMT-93 cell line.....	23
Figure 6.	The IL-22/IL-22 receptor signaling pathways in CMT-93 cell line.....	24
Figure 7.	小鼠大腸組織中 Gal-3 缺失對於 rIL-22 誘導表現 AMPs 之影響。	26
Figure 8.	Gal-3 調控腸道中 IL-22 誘導 AMPs 表現之假設機制。	28

一、前言



腸表皮細胞 (intestinal epithelial cell, IEC) 為腸道內天然屏障，隔絕腸道內外，並分泌 extracellular matrix (如 fibrin, fibronectin 和 collagen 等)，以維持腸道的完整性 (Midwood KS, et al. 2004)。健康正常的腸道受到外力傷害或病原菌感染而破損時，腸道中的正常菌叢、病原菌、食物碎屑等外來物會侵入 lamina propria 中。這些帶有外來抗原以及致病菌等會促發免疫反應，導致腸道發炎，進而引起下痢、血便等症狀。當腸道壁受到損傷時，會分泌多種蛋白質 (如 galectins, osteopontin, tenascins, thrombospondins, vitronectin 等)，以抵禦外來病原菌或降低發炎反應 (Midwood KS, et al. 2004)。故維持腸道壁及腸道黏膜的完整性是非常重要的。

1. Inflammatory bowel disease (IBD)

腸炎症 (Inflammatory bowel disease; IBD) 為自體免疫疾病，部分與基因突變或表現量異常有關 (如 NOD2, IL10, IL10R 及 IL23R)。當腸道受損或嚴重發炎未及時修復時，易步入慢性發炎，基因的缺陷更易使腸道對於正常菌叢的耐受性下降，並影響腸道表皮屏障的完整性 (Khor, Gardet, and Xavier 2011)。

人類的 IBD 主要區分為兩類：Crohn's disease (CD) 及 ulcerative colitis (UC)。臨床上，CD 患者從食道到肛門，呈現不連續性發炎潰瘍，尤其以迴腸 (ileum) 和大腸 (colon) 最為嚴重；而 UC 患者發炎潰瘍的部分主要集中於大腸 (Podolsky 2002)。

2. Galectin (Gal)

2.1 Galectins 簡介

Galectins 屬於 β -galactoside binding lectin family，會辨認具有 β -galactoside group 修飾的蛋白質，故而稱之。其基因名稱為 *LGALS*。目前已知在哺乳動物中，具有 15 種 galectins，依其結構可分成三類：(1) Prototypical form，(2) chimeric form，(3) Tandem repeat。不同物種，其所屬的 galectins 分布情形也不同。此外，同一物種的不同器官及細胞，所表現 galectins 分布情形也不同。(Cummings RD, Liu FT. 2009)

表一、Galectins 依結構分類

Form	Structure	Galectins
Prototypical	Homodimer	Gal-1, Gal-2, Gal-7, Gal-10, Gal-13, Gal-14
Chimeric	Monomer	Gal-3
Tandem repeat	Heterodimer	Gal-4, Gal-8, Gal-9, Gal-12

(Cummings RD, Liu FT. 2009)

表二、Galectins 在人類與小鼠的分布情形

Species	Galectins
Human	gal-1, gal-2, gal-3, gal-4, gal-7, gal-8, gal-9, gal-10, gal-12, gal-13, gal-14
Mouse	gal-1, gal-2, gal-3, gal-4, gal-7, gal-8, gal-9, gal-12

(Cummings RD, Liu FT. 2009)

2.2 Galectin-3 (Gal-3)

Galectin-3 為唯一 chimeric galectin，其結構之一端為 carbohydrate recognition domain (CRD)，負責辨認含有 β -galactoside 修飾的蛋白質或 lactose，另一端則為 amino-terminal domain。Galectin-3 蛋白之分子重約為 36kDa，其基因 *LGALS3* 座落在第 14 號染色體 q21-22 (Raimond et al. 1997)。不同於一般蛋白質的合成方式，galectin-3 的生成不走 endoplasmic reticulum (ER)-Golgi apparatus 系統。許多組織細胞與免疫細胞會表現 Galectin-3，Galectin-3 高度表現在細胞質 (Hubert et al. 1995)，此外也表現在細胞核 (Moutsatsos et al. 1987)、細胞表面與胞外基質 (Sato and Hughes 1994)。

在不同的組織細胞中，galectin-3 的表現量與生物活性功能非常多元，包括參與調控細胞凋亡、增生、移行、貼附、活化及分化等 (Dumic, Dabelic, and Flogel 2006)。此外也參與傷口癒合、發炎反應 (del Pozo et al. 2002) 與抗發炎反應 (Li et al. 2008)。

在 IBD 患者中，腸表皮細胞所表現的 galectin-3 較低 (Jensen-Jarolim E, et al 2002; Muller et al. 2006)，而 matrix metalloproteinases 表現較高，其能瓦解 galectin-3 (Baugh et al. 1999)。在 DSS 動物模式中，galectin-3^{-/-} 老鼠在餵食 DSS 後，體重下降速度比 wild type 快，腸道長度也較短，若再投予 galectin-3，則能改善 DSS 所造成的損害 (Tsai HF, et al. 2016)。以上各種跡象皆意味著 galectin-3 參與維持腸道 homeostasis。

3. Interleukin-22 (IL-22)



IL-22 隸屬 IL-10 family，由 179 amino acids 所組成，分子量約為 20 kDa，基因 *IL22* 座落在第 12 號染色體上。IL-22 僅由免疫細胞所表現，如 Th17、Th22、type 3 innate lymphoid cells (ILC3s) 等。IL-22 receptor 則表現在眾多非免疫細胞上，如肝臟、腎臟、胰臟、皮膚、腸道等 (Perusina Lanfranca M, et al. 2016)。IL-22 receptor 由 IL-22R1 與 IL-10R2 所構成，當 IL-22 結合上 IL-22R1 後，造成構型改變，利於與 IL-10R2 形成 heterodimer，進而啟動細胞內訊號傳遞，如 JAK1/Tyk2-STAT3 signaling (Geethanjali Pickert, et al. 2009; Eva Hainzl, et al. 2015)、PI3K/Akt pathway、MAPK pathway (Mitra A, et al. 2012; Lejeune D, et al. 2002; Wolk K, et al. 2006)。

在腸道發炎與腸道內病原菌 (如 *C. rodentium* 和 *S. typhimurium*) 感染實驗模組中，IL-22 扮演腸道保護的角色 (Zheng Y, et al. 2008; Raffatellu M, et al. 2008)。此外 IL-22 能調控 IEC 的眾多基因，如 Antimicrobial peptides (Reg3 β 、Reg3 γ 、S100A7、S100A8)、mucin (MUC1、MUC3、MUC10 和 MUC 13)。此外也能調控抗細胞凋亡相關基因 (如 Bcl-2、Bcl-x) 之表現，以增加腸表皮幹細胞及 goblet cells 的分化及增生。在 DSS 動物模式中，IL-22^{-/-} 老鼠在餵食 DSS 後，不管是體重下降或腸道病理組織切片損傷情形，皆比 wild type 還嚴重 (Pickert G, et al. 2009)。整體來說，IL-22 對於腸胃道的 homeostasis 扮演非常重要的角色 (Pham TA, et al. 2014; Schreiber F, et al. 2015)。

4. 抗菌蛋白 (antimicrobial peptides/proteins, AMPs)



4.1 Reg3 β /3 γ

抗菌蛋白 Reg3 (regenerating gene family protein III)，隸屬於 lectin family。Reg3 β 蛋白之分子重約為 17kDa，Reg3 γ 約為 19 kDa。腸道中的 Reg3 β / γ 主要由 epithelial cells 所分泌，而其特化的 Paneth cells 為主要分泌者 (Cash HL, et al. Science. 2006)。Reg3 β / γ 能在 Gram-positive bacteria 的細胞壁上形成孔洞，造成細菌死亡，但只有 Reg3 β 能結合到 Gram-negative bacteria 細胞壁上 lipopolysaccharides (LPS) 的 carbohydrate moieties，造成細菌死亡 (Sohini Mukherjee and Lora V. Hooper. 2015)。此外在心肌缺血症 (myocardial ischemia) 研究中發現，Reg3 β 具有 chemokine 特性能聚集 macrophage 至患部 (Lörchner H, et al. 2015)。故 Reg3 β / γ 對於維持腸胃道正常菌叢及抵禦病原菌感染扮演重要角色。

4.2 S100A8/A9

S100A8 (calgranulin A 或稱 migration inhibitory factor-related protein 8; MRP-8) 及 S100A9 (calgranulin B 或稱 MRP-14) 隸屬於 S100 calcium-binding family，此家族不僅對於調控生理鈣訊的平衡扮演重要腳色，也參與調控眾多生理功能，發炎時容易產生 S100s。S100A8 與 S100A9 各有不同的生理功能，也能彼此結合形成 heterocomplex (又名 S100A8/A9 或 calprotectin)。

S100A8/A9 廣泛表現在組織細胞中，當細胞面臨壓力或處於發炎環境，能被 LPS、TNF α 、IL1 α 、IL-1 β 、IL-10 或 IL-22 等誘導產生更多 S100A8/A9；此外會表現眾多免疫細胞中，如 dendritic cells (DCs)、macrophages、neutrophils 等，用以調控免疫細胞的生理活性與功能 (Geetha Srikrishna, 2011 (review); Michelle M. Averill, 2012 (review))。

S100A8/A9 角色非常多元，調控許多生理功能。細胞內的 S100A8/A9 能感測鈣訊、活化 NADPH oxidase、作為 transcription factors、參與 DNA 修復及參與 tubulin-dependent cytoskeletal rearrangements 等。在發炎時期，分泌至細胞外的 S100A8/A9 能作為 damage-associated molecular pattern (DAMP)，活化 TLR4 促進免疫反應 (Geetha Srikrishna, 2011 (review))。

許多病原菌 (如 *Staphylococcus aureus*、*Salmonella Typhimurium*) 生長時，需要 Mn²⁺ 和 Zn²⁺ 作為營養源。S100A8/A9 具有螯合劑特性，能抓取環境中的 Mn²⁺ 及 Zn²⁺，進而達到抑制病原菌生長 (Brian D., 2008)。而 *S. Typhimurium* 透過大量表現 zinc transporter (ZnuABC) 來對抗 S100A8/A9 作用 (Janet Z. Liu, 2012)。

由於 Gal-3 及 IL-22 對於腸胃道維持生理平衡皆扮演重要角色，但目前仍不清楚彼此之間的作用機轉是否具有關聯，我們假設在腸胃道中，Gal-3 參與在 IL-22 的訊號傳遞與功能表現。

二、材料與方法



1. 細胞培養

1.1 CMT-93 (Mouse intestinal epithelial cell line)

培養基配方：

DMEM medium (Gibco #11885-076), 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

1.2 HT-29 (human intestinal epithelial cell line)

培養基配方：

DMEM medium (Gibco #11885-076), 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

2. 動物實驗

2.1 操作與培養步驟

- (1) 取出小鼠的肛門到盲腸區段，將之浸潤在配方 1。
- (2) 以配方 1 將拭手紙潤濕，將腸道組織置於其上，成一直線。
- (3) 以彎口鑷子將腸道中的糞便以平移方式推擠出。
- (4) 從肛門口算起，移除 0.5 cm 的直腸區段後，擷取近肛門口端總長約 2cm 的大腸區段。
- (5) 以剪刀將腸道橫向剖開，使內部裸露在外。

(6) 以配方 1 多次清洗腸道。

(7) 以配方 2 進行 starvation 半小時。

(8) 將 2 cm 大腸片段再分成四小段，隨機選取大腸片段進行分組，處理/不處理 100 ng/ml 的 IL-22，培養在配方 3，六小時後收下組織，之後進行 real-time PCR。



2.2 組織處理配方

配 方	1	2	3
Condition for	Washing	Starvation	Incubation
RPMI medium (Gibco 11875-085)	+	+	+
FBS	-	1 %	20 %
L-Glutamine	4 mM	4 mM	4 mM
Fungizone-amphotericin B	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml
Gentamycin	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml
Penicillin	200 U/ml	200 U/ml	200 U/ml
Streptomycin	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml

3. Knockdown

(1) 將細胞種於 6-well culture dish 中 overnight。

(2) 移除 medium，加入含有 8 µg/ml polybrene 的 culture medium，再加入攜帶 mouse Gal-3 shRNA (附件二) 的 lentivirus 轉染 CMT-93；攜帶 human Gal-3 shRNA (附件二) 的 lentivirus 轉染 HT-29；攜帶 shLuc 的 lentivirus

則作為 control 分別轉染此兩株 cell lines。MOI 為 3，作用時間 24 小時。

- (3) 移除 medium，加入含有 1~2 $\mu\text{g/ml}$ puromycin 的 growth medium，作用時間最少 72 小時。(puromycin 能毒殺哺乳動物細胞，lentivirus 具有 anti-puromycin 特性，能篩選掉未轉染成功之細胞。)

4. Real-time PCR

- (1) 利用 trizol 打散溶解細胞。
- (2) 加入 1cc chloroform，震盪，13,000rpm 離心 30mins。
- (3) 抽取出上層水層，內含 RNA。
- (4) 以 isopropanol 鹽析出 RNA，13,000rpm 離心 30mins。
- (5) 移除 isopropanol，加入 75% methanol 洗去殘餘有機物，13,000rpm 離心 30mins。
- (6) 利用 reverse transcription kit (BIO-RAD, Thermo Scientific #K1642) 將 RNA 反轉錄成 cDNA。
- (7) 利用 SYBR GREEN (BIO-RAD) 及目標基因之 primer (附件三) 偵測目標 cDNA 的生成量，藉以反推得知 RNA 的表現量。

5. 西方墨點法 (Western Blotting)

將細胞利用 Novagen's phosphosafe extraction reagent (Millipore) 瓦解並定量蛋白質濃度後，利用 SDS-PAGE 分離不同分子量大小的蛋白質。將蛋白質轉滯到 PVDF membrane (0.2 μM 或 0.45 μM Millipore)，利用含有 3~5 % BSA 的

TBST 溶液作為阻隔劑 (blocking buffer)。利用特定抗體 (附件三) 偵測目標蛋白，之後利用帶有 HRP 的第二抗原作用之。以 chemiluminescence detection kit 偵測目標蛋白的表現量。



6. 統計分析

Real-time PCR 之數據係利用 GraphPad Prism 6 Software (GraphPad, San Diego, CA) 進行統計分析。利用 unpaired two-tailed t tests 比較兩組之間的差異。 $p < 0.05$ 視為有顯著差異。數據表示方式為平均值 $\pm$ SD。

三、結果



1. Galectin-3 普遍表現在 IEC

由於人類與小鼠所擁有的 galectins 種類不盡相同，不同器官與細胞型態所表現的 galectins 也有所不同。為了確認 CMT-93 cell lines 與 HT-29 intestinal epithelial cell lines 所表現的 galectins profile，分別將此兩株細胞種於 culture dishes，僅以一般培養基培養，收下細胞後利用 real-time PCR 掃描此兩株細胞的 galectins profile。發現 CMT-93 cell lines 高度表現 Gal-1，Gal-3 次之 (Fig. 1A)；HT-29 cell lines 高度表現 Gal-4，Gal-3 次之，Gal-8 和 Gal-9 則微量表現 (Fig. 1B)。故 Gal-3 普遍存在於腸表皮細胞中。

2. 細胞生長密度不影響 galectins profile

由於 galectin-3 能促進細胞的生長、移行等，為了確認 CMT-93 cell lines 與 HT-29 cell lines 的細胞密度是否會影響 galectins profile。故於第 2 天及第 4 天滿盤時收下細胞，利用 real-time PCR 掃描此兩株細胞的 galectins profile。發現細胞密度不影響 galectins profile (Fig. 1)。

3. IL-22 不影響腸表皮細胞 galectins 的表現分布

由於目前無任何文獻表示 IL-22 是否會影響 galectins 的表現量，為了確認 IL-22 是否會影響腸表皮細胞的 galectins profile 以及 galectins 的表現量，故將 CMT-93 cell lines 經過 starvation overnight 後，再給予或不給予 40ng/ml rIL-22 處理 24 小時，利用 real-time PCR 偵測 galectin profile，發現 rIL-22 不影響腸表細胞的 galectins 分布情形及其表現量 (Fig. 2)。

4. Gal-3 也許不參與在 IL-22 所誘導的 AMPs 之表現 in vitro

IL-22 能調控 IECs 表現 AMPs (Reg3 β 、Reg3 γ 、S100A7、S100A8) (Zheng Y, et al. 2008)。為了確認 Gal-3 是否參與在其路徑中，我們利用 lentivirus 轉染 galectin-3 shRNA 至 CMT-93 及 HT-29 cell lines 中。mouse Gal-3 shRNA (附件二) 的 lentivirus 轉染 CMT-93；攜帶 human Gal-3 shRNA (附件二) 的 lentivirus 轉染 HT-29；攜帶 shLuc 的 lentivirus 則作為 control 分別轉染此兩株 cell lines。利用 Western blot 確認感染效率，發現 CMT-93 (#54867) 抑制 Gal-3 表現效率最佳 (Fig. 3)。

轉染成功後的 Gal-3 KD (#54867) CMT-93 cell line，先 starvation overnight，再以 20 ng/ml rIL-22 處理/不處理 24 小時，進行 real-time PCR。rIL-22 誘導 CMT-93 cell line 表現 AMPs 之效率，不論是 control 組或 Knockdown 組，統計上無顯著差異。

為確認 AMPs 的蛋白質表現量是否有差異，故以 Reg3 β 做代表。以 rIL-22 刺激 Control/Gal-3 KD (#54867) CMT-93 cell lines，再依序不同時間點 (0 hr, 12

hrs, 18 hrs, 24 hrs) 收取細胞進行 Western Blotting。Control 組在刺激 12 小時後，表現較高的 Reg3 β ，而 Gal-3 KD 組的 Reg3 β 整體表現皆低於 control 組 (Fig. 5)



5. Gal-3 不影響 IL-22/IL-22R axis 的主要訊號傳遞

由於 Gal-3 參與在 IL-22 所誘導的 Reg3 β / γ 之表現中，而在腸道細胞的 IL-22/IL-22R 主要有三條訊號傳遞路徑，分別為 JAK1/Tyk2-STAT3 pathway、PI3K/Akt pathway、MAPK pathway。為確認 Gal-3 是否透過此三條路徑來調控 Reg3 β / γ 表現量，我們以 rIL-22 處理經 Gal-3 KD (#54867) CMT-93 cell lines 後，分別於不同時間點收取細胞，以 Western Blotting 來確認 Gal-3 是否參與在 IL-22/IL-22R 訊號傳遞路徑中。從 Figure 6 得知，Gal-3 不影響 pSTAT3、pAKT、pERK、pJNK 的磷酸化表現量。故 Gal-3 可能透過其他路徑或協同方式影響 IL-22 所誘導的 Reg3 β / γ 之表現量。

6. Gal-3 會影響 IL-22Ra1 的表現 ex vivo

腸道中不同區段的菌量分布情形不同，故從 wild type 與 Gal-3 KO mice (附件五) 肛門口算起移除 0.5 cm 的直腸區段後，擷取近肛門口端總長約 2cm 的大腸區段，再分四段，隨機選取大腸片段後，處理/不處理 100 ng/ml rIL-22，六小時後收下組織，之後進行 real-time PCR。自然情況下與 wild type 相比，Gal-3 KO mice 的大腸表現較多 IL-22 Ra1。在 rIL-22 刺激後，不影響 wild type 與 Gal-3 KO mice 的 IL-22 Ra1 表現 (Fig. 7C)。

7. Gal-3 缺失不影響 IL-22 所誘導的 Reg3 β / γ 之表現 *ex vivo*

在自然情況下，wild type 與 Gal-3 KO mice 的 Reg3b/3g 的基礎表現量相同。在 rIL-22 刺激後，wild type 的 Reg3b/3g 表現量其趨勢上升，但無顯著統計差異，Gal-3 KO mice 的 Reg3b/3g 則無變化 (Fig. 7D)。

8. Gal-3 缺失會促進 IL-22 所誘導的 S100A8/A9 之表現 *in vivo*

在自然情況下，wild type 與 Gal-3 KO mice 大腸組織的 S100A8/A9 基礎表現量較低。在 IL-22 刺激後，wild type 的 S100A8 表現量上升，而 A100A9 表現量無顯著差異；Gal-3 KO mice 的 S100A8/A9 在 IL-22 刺激後皆顯著上升。與 wild type mice 相比，Gal-3 KO mice 的大腸組織在 rIL-22 刺激後，其 S100A8/A9 的表現量顯著上升 (Fig. 7D)。

四、討論



C. rodentium 感染動物模式中，IL-22 能誘導 antimicrobial proteins 的表現，包括 Reg3 β /3 γ 、S100A8/A9，用於抵禦病原菌，且 IL-22-KO mice 因 AMPs 表現不足，死亡率大幅上升；故腸胃道中 IL-22 在 innate immune 中扮演重要角色 (Zheng Y, et al. Nat Med. 2008)。

腸道中 Reg3b/3g 主要由表皮細胞所分泌。在 CMT-93 cell line 中，IL-22 誘導 Reg3b 之表現，在 control 組中雖然有上升趨勢，Gal-3 KD 組中趨勢上受到抑制，然而在統計學上無顯著差異 (Fig. 4A)。由於樣本數 $n=3$ ，SD 值高。需再將樣本數放大，已確認其表現。而在 Reg3 β 蛋白質表現量上，則可觀察到 Gal-3 會影響 IL-22 誘導表現 Reg3 β 的產生 (Fig. 5)，此須再重複多次實驗，已確認是否符合 real-time PCR 之結果。

腸道中 IL-22/IL-22R axis 的下游傳遞路徑主要有三條 STAT3 pathway、AKT pathway、MAPK pathway (Akira Sekikawa, 2010)。Reg3 的表現受 STAT3 高度調控 (Pickert G, et al. J Exp Med. 2009)。在 CMT-93 cell line 中，Gal-3 並不影響 IL-22/IL-22R/STAT3 axis (Fig. 6)，但是否會影響到 pSTAT3 結合到 promoter 上，目前仍未知。此外，Gal-3 也無參與在 AKT pathway、MAPK pathway 中 (Fig. 6)，推測 Gal-3 可能透過其他未知路徑調控 AMPs 表現。

IL-22 能活化 NF- κ B 並與 STAT3 協同促進細胞增生或產生 inflammatory cytokine (H. Fukui, et al. 2011; K.A. Cho, et al. 2012; Lim C, Savan R. 2014)。而 NF- κ B 與 STAT3 皆為 Reg3 的 transcription factors (Nata K, et al. 2004)。在許多細胞中，Gal-3 的缺失會降低 NF- κ B 的活化反應，並且減少 cytokines 的產生 (Chen, H. Y., 2006; Hsu, D. K., 2000)，但在腸表皮細胞中，Gal-3 是否調控 IL22R/NF- κ B pathway 並影響 Reg3 的表現仍有待進一步確認。此外，STAT1, STAT5 也被報導參與在 IL-22/IL-22R axis 路徑中，也有待進一步確認 (Lim C, Savan R. 2014)。

在動物大腸實驗中，Gal-3 缺失時，IL-22Ra1 的基礎表現上升，這似乎意味著 IL-22/IL-22R signaling 的訊號增強 (Fig. 7C)，然而 Reg3b/3g 以及 S100A8/A9 的基礎表現並無此趨勢，由此推測 Gal-3 可能透過不同路徑分別影響 IL-22Ra1 與 Reg3b/3g 及 S100A8/A9 的表現。

與 wild type mice 相比，Gal-3 KO mice 的大腸組織中，rIL-22 誘導產生的 Reg3b/3g 統計學上無明顯差異 (Fig. 7D)，此現象與 CMT-93 cell line 所觀察到的現象一致 (Fig. 4A)。

然而 rIL-22 誘導產生的 S100A8/A9 在 Gal-3 KO mice 的大腸組織中，卻是顯著上升。S100A8/A9 及 Reg3b/3g 皆受 rIL-22 所調控，彼此呈現連動關係。在 Judith Behnsen 等人的研究中發現，與 wild type mice 相比，IL-22 KO mice 的 Reg3g 的基礎表現量較低，而 S100A8/A9 則較高，兩者呈現相反的趨勢。此外 IL-22 KO mice 在受到 *Salmonella* 感染後，S100A8/A9 表現量僅受到抑制，而

Reg3g 則幾乎不表現 (Judith Behnsen, et al. 2014)，由此證明 IL-22 並非 S100A8/A9 的唯一調控者，而 Reg3g 則受到 IL-22 高度調控。



在 Gal-3 KO mice 的大腸組織中，rIL-22 所誘導的 S100A8/A9 的表現量較 wild type 高，意味 Gal-3 能調控 IL-22 所誘導的 S100A8/A9 表現 (Fig. 7D)。然而，S100A8/A9 除了腸表皮細胞會表現外，許多免疫細胞也會表現。在 Theodore Kouo 等人的腫瘤研究中發現，跟 wild type mice 相比，Gal-3 KO mice 的 CD8⁺ TILs 會表現較多的 S100A8 (Theodore Kouo, et al. 2015)。由於大腸組織的 lamina propria 中富含各類免疫細胞，而僅腸表皮細胞會對 IL-22 做出反應，rIL-22 誘導 Gal-3 KO mice 大腸組織產生的 S100A8/A9 呈現顯著上升 (Fig. 7D)，推測部分原因可能來自於腸表皮細胞透過其他機轉誘導免疫細胞產生 S100A8/A9。

整體來說，在生理平衡狀況下，Gal-3 不影響 AMPs 的基礎表現量。當大腸組織受到 IL-22 刺激時，Gal-3 能負調控 IL-22 誘導表現 S100A8/A9。由此可知，Gal-3 在調控腸道抵禦病原菌上扮演重要角色。

五、圖表

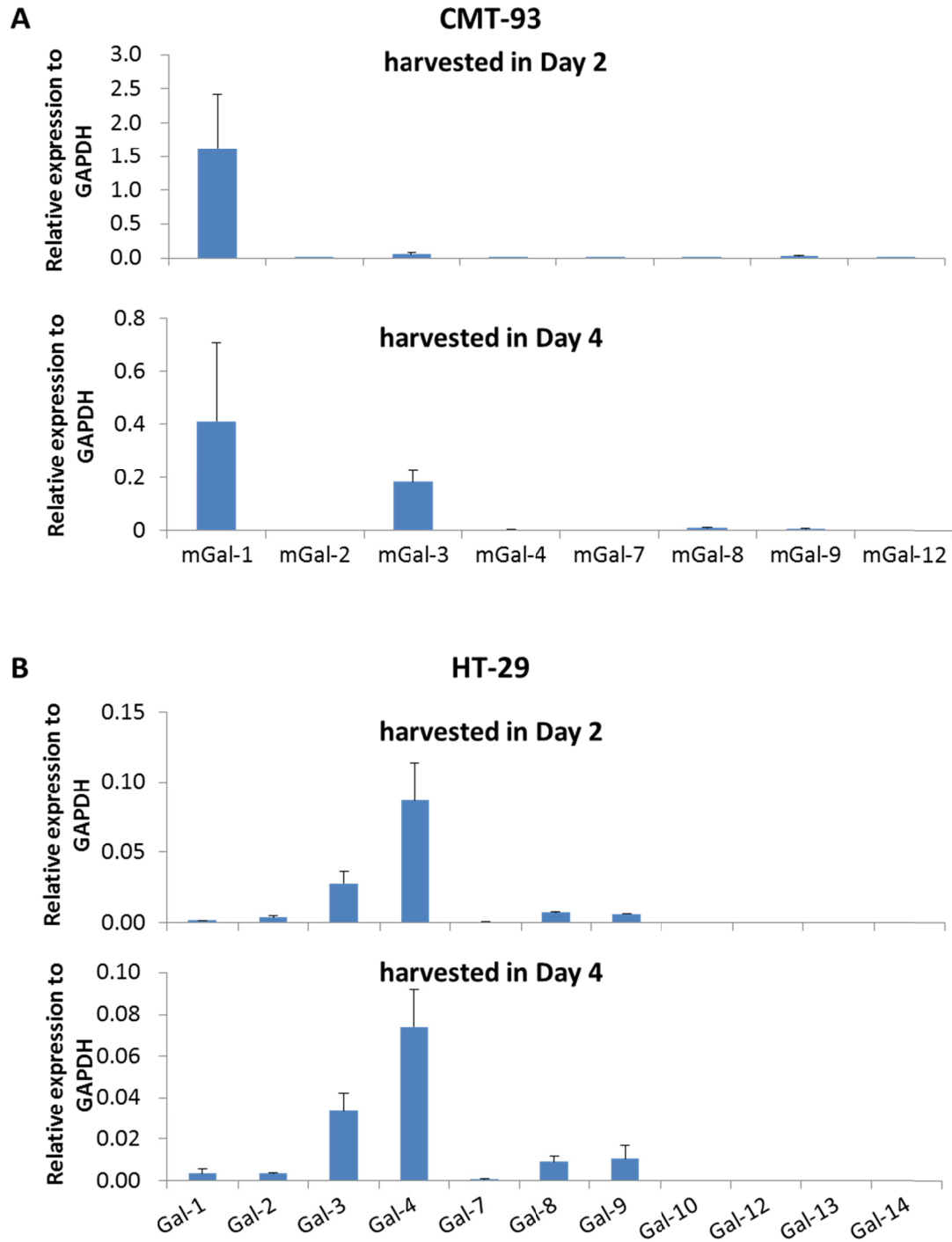
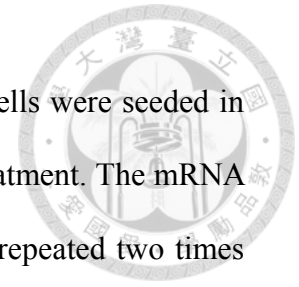


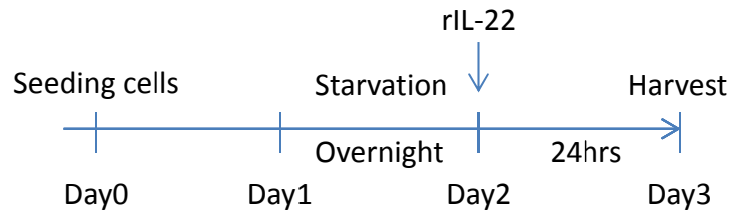
Figure 1. The profile of galectins in IEC cell line.

(A) mouse cell line, CMT-93. (B) human cell line, HT-29. The cells were seeded in day0 and harvested in day2 and day4, respectively, without any treatment. The mRNA expression of galectins are screened by real-time PCR. Data was repeated two times independently.





A



B

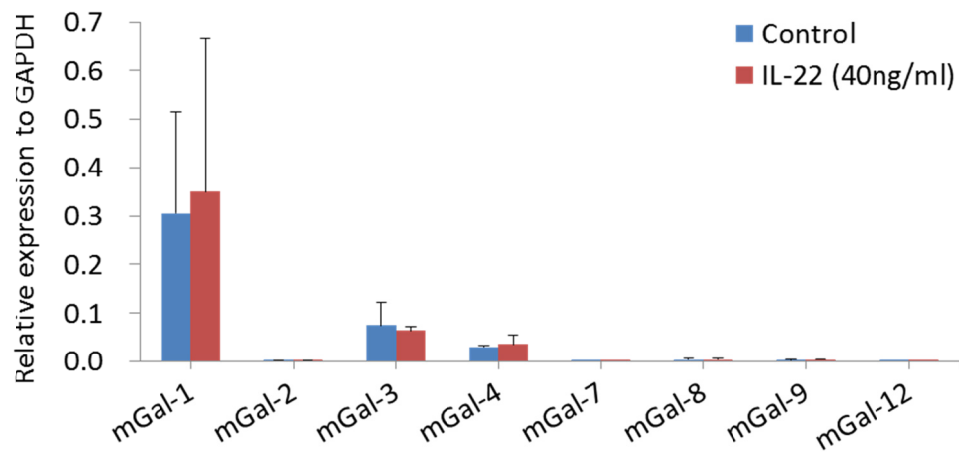
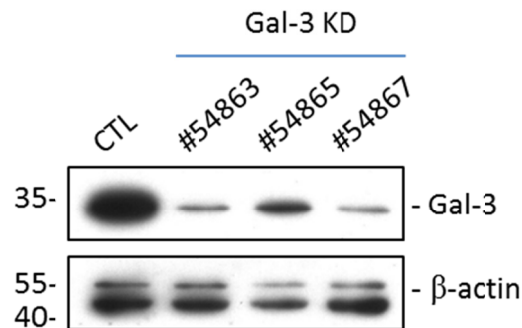


Figure 2. The profile of galectins in IL-22 treated CMT-93 cell line.

CMT-93 cell line is treated with or without recombinant IL-22 (40ng/ml) for 24 hours after starvation overnight, and then screened the profile of galectins by real-time PCR. Data was repeated two times independently.



CMT-93



HT-29

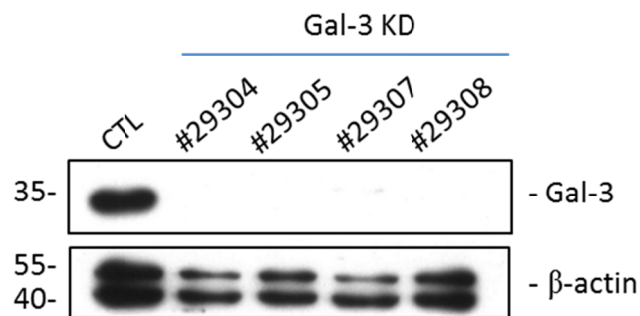
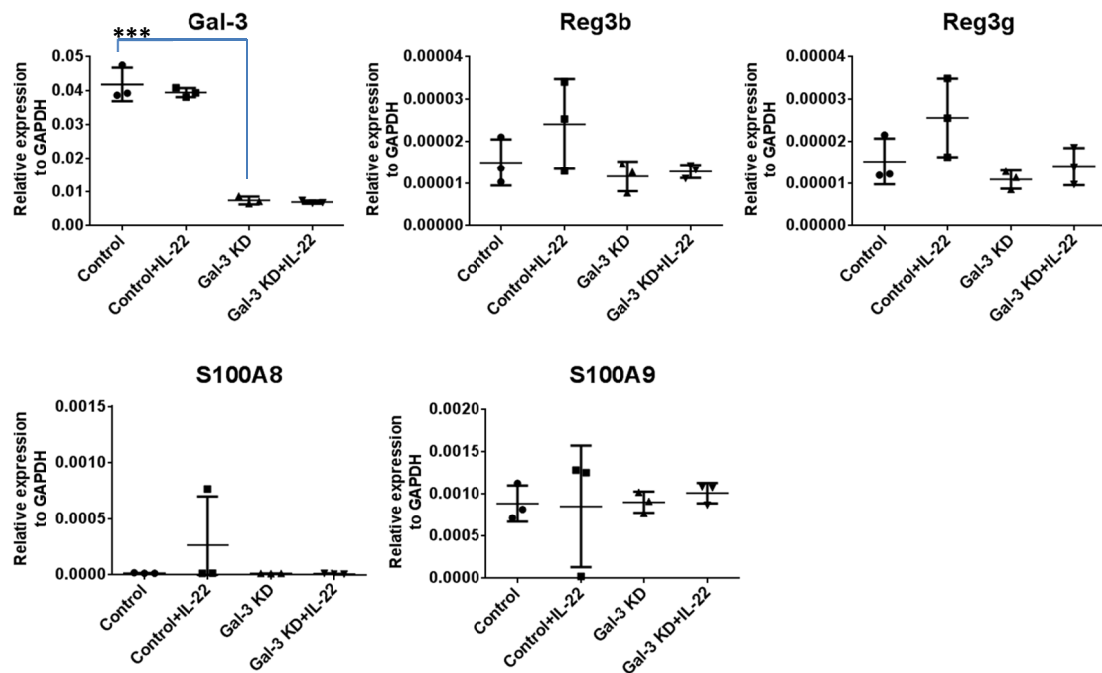


Figure 3. The efficiency of Galectin-3 knockdown.

利用攜帶 mouse Gal-3 shRNA (#54863、#54865、#54867) 的 lentivirus 轉染 CMT-93 cell line；攜帶 human Gal-3 shRNA (#29304、#29305、#29307、#29308) 的 lentivirus 轉染 HT-29 cell line；攜帶 shLuc 的 lentivirus 則作為 control (CTL) 分別轉染此兩株 cell lines。

A CMT-93



B HT-29

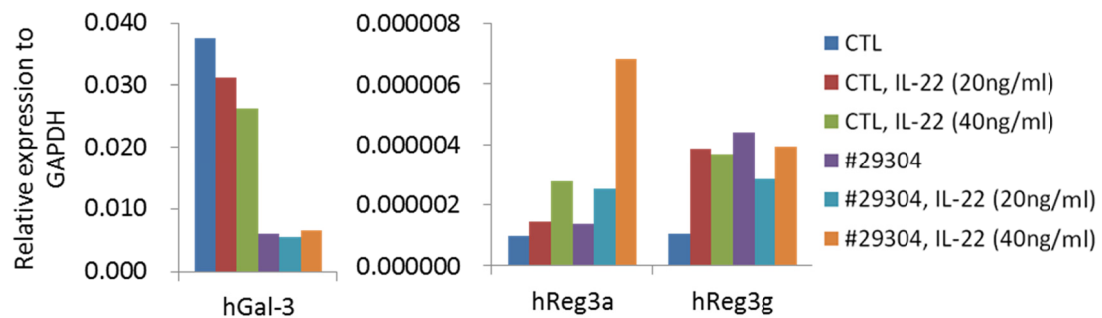


Figure 4. The mRNA expression of IL-22-induced-antimicrobial proteins.

Gal-3-Knockdown cell lines were treated with or without recombinant IL-22 for 24 hours after starvation overnight, and then measured the mRNA expression of AMPs by real-time PCR. (A) CMT-93 cell line, n=3 (B) HT-29 cell line, n=1. *** $P<0.001$.



Intracellular expression

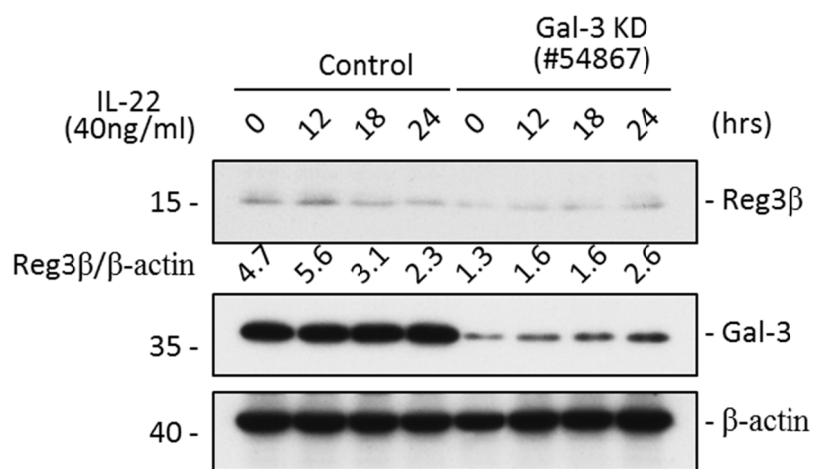


Figure 5. The expression of Reg3β in IL-22-treated CMT-93 cell line.

CMT-93 cell line with or without Gal-3-Knockdown are treated with recombinant IL-22 (20ng/ml) for serious time points after starvation overnight.

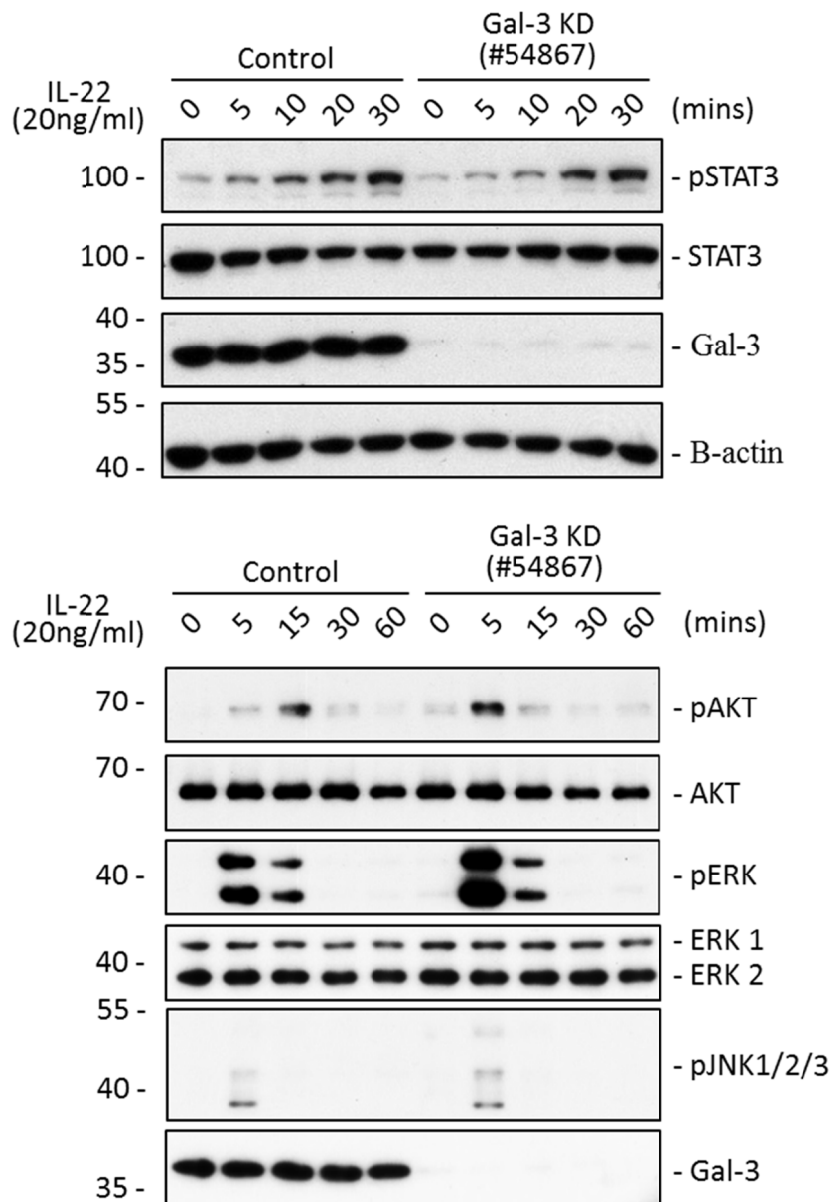
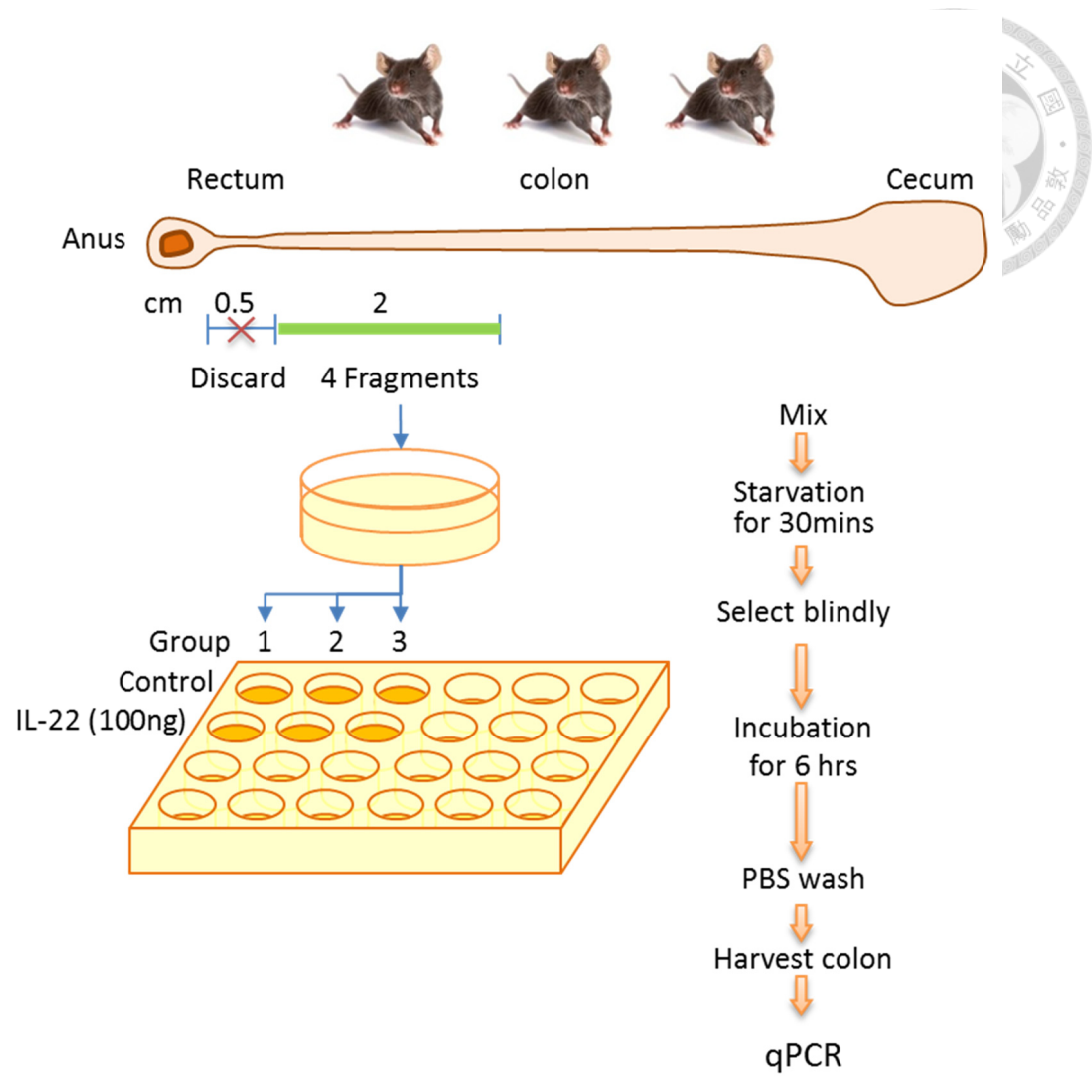


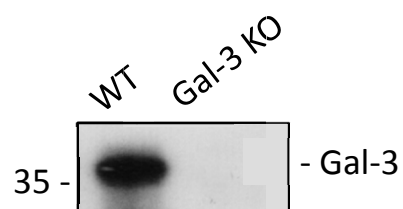
Figure 6. The IL-22/IL-22 receptor signaling pathways in CMT-93 cell line.

CMT-93 cell line starvation overnight 後，再加入 20 ng/ml recombinant IL-22 進行刺激，依序在不同時間點收取細胞，利用 Western Blotting 確認 Gal-3 是否影響 IL-22/IL-22R 下游主要訊號傳遞 (STAT3, Akt and MAPK signaling pathways)。

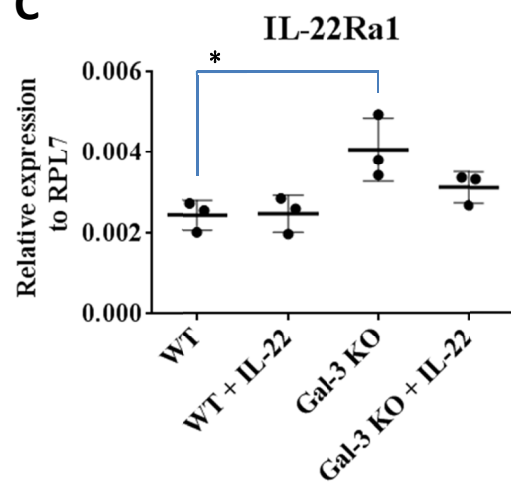
A



B



C



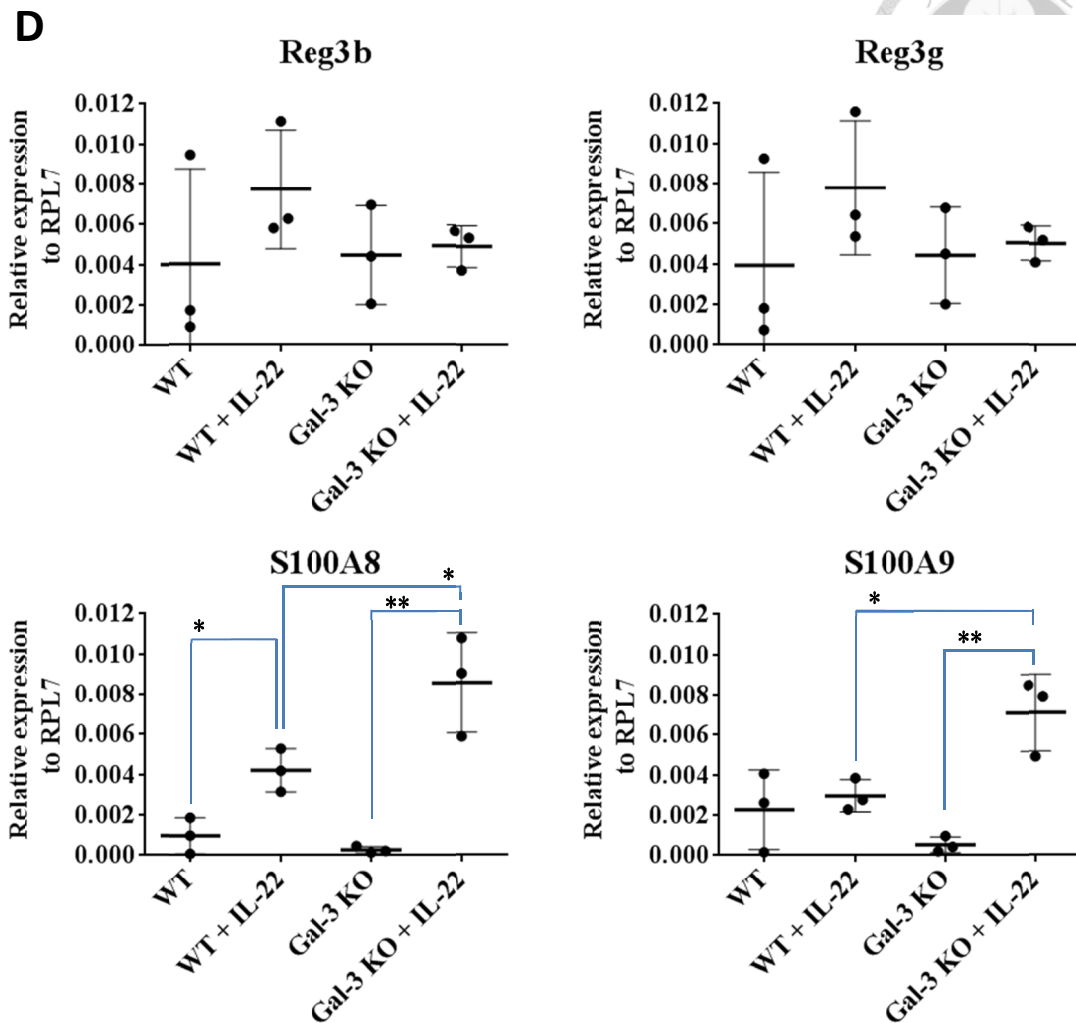


Figure 7. 小鼠大腸組織中 Gal-3 缺失對於 rIL-22 誘導表現 AMPs 之影響。

A. 從 wild type 與 Gal-3 KO mice (附件五) 肛門口算起移除 0.5 cm 的直腸區段後，擷取近肛門口端總長約 2 cm 的大腸區段，再分四段，隨機選取大腸片段後，處理/不處理 100 ng/ml 的 rIL-22，六小時後收下組織，之後進行 real-time PCR，分別偵測 B. Gal-3 mRNA、C. IL-22Ra1、D. AMPs (Reg3b/3g、S100A8/A9) 之 mRNA 表現量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

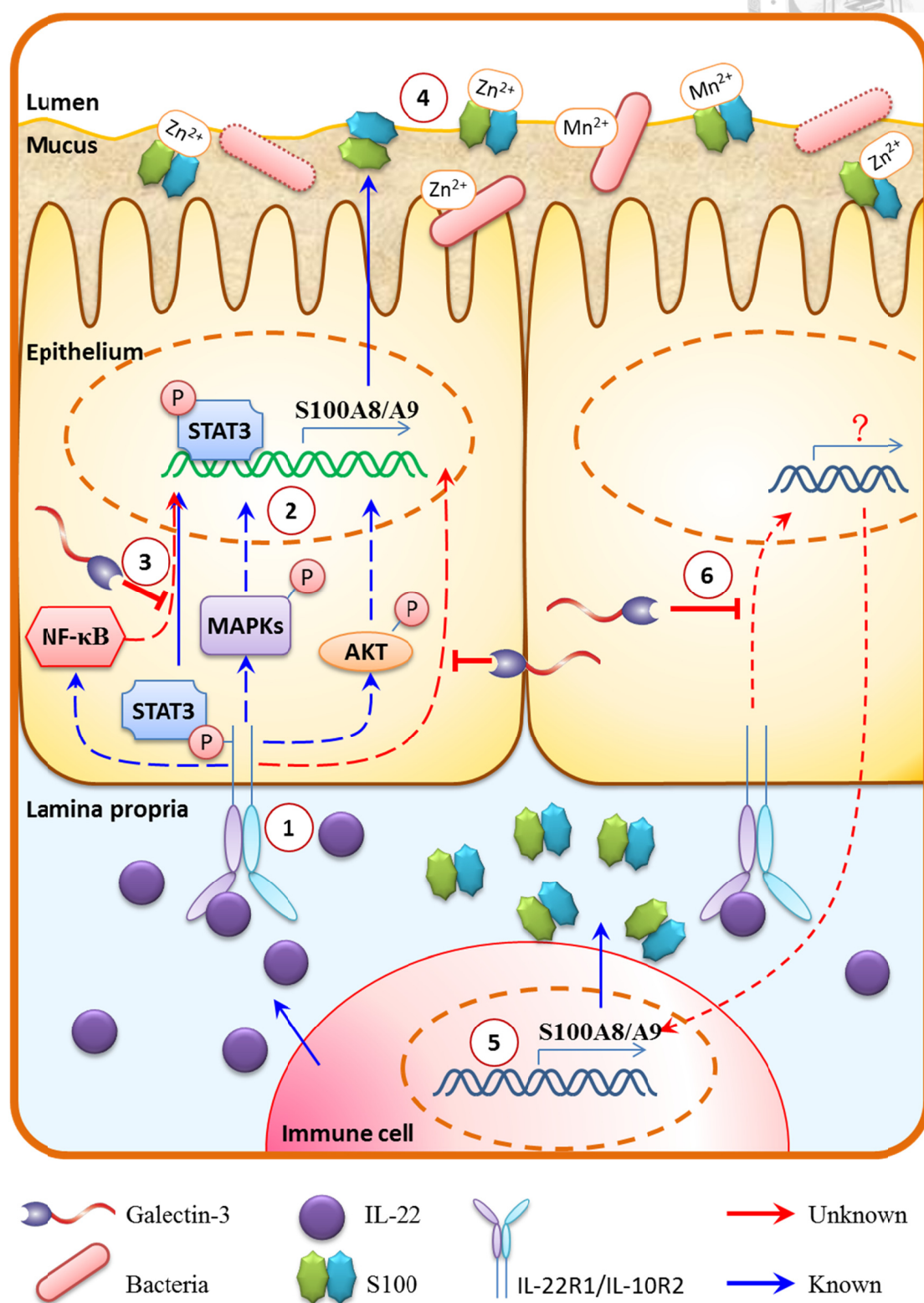


Figure 8. Gal-3 調控腸道中 IL-22 誘導 AMPs 表現之假設機制。

在生理平衡狀態下，腸表皮細胞所分泌的 mucus 能阻擋病原菌直接接觸到腸表皮細胞，當病原菌入侵到腸表皮層或 lamina propria，會吸引多種免疫細胞聚集並分泌 IL-22。IL-22 結合到 IL-22R1 後，會形成 IL-22R1/IL-10R2 dimer ①，進而促發主要下游訊號 (STAT3 pathway, AKT pathway, MAPK pathway)，進而產生 S100A8/A9 ②。Gal-3 會抑制 IL-22 誘導產生 S100A8/A9 之表現，然而 Gal-3 卻不參與在這三條主要路徑上，而是透過其他未知路徑。NF- κ B 能與 STAT3 協同表達下游基因，NF- κ B 與 STAT3 皆為 Reg3 的 transcription factors ③，但 Gal-3 是否調控 IL22R/NF- κ B pathway 仍有待進一步確認。Mn²⁺ 與 Zn²⁺ 為病原菌的營養源，S100A8/A9 具有螯合劑特性，能抓取 Mn²⁺ 與 Zn²⁺ 進而抑制細菌生長 ④。腸道中的 S100A8/A9 除了腸表皮細胞會表現外，許多免疫細胞也會表現 ⑤，因此 Gal-3 可能阻斷 IL-22 透過其他機轉誘導免疫細胞產生 S100A8/A9 的這條路徑 ⑥。

六、參考文獻



Akira Sekikawa, et al. Involvement of the IL-22/REG 1 α axis in ulcerative colitis.

Laboratory Investigation. 2010 January; 90, 496–505.

Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. Lancet. 2012 Nov 3;380(9853):1590-605.

Brian D., et al. Metal Chelation and Inhibition of Bacterial Growth in Tissue Abscesses. Science. 2008 Feb; 319 (5865): 962-965

Chen HY, et al. Role of galectin-3 in mast cell functions: galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression. J Immunol. 2006 Oct 15;177(8):4991-7.

Cho KA, et al. Interleukin-17 and Interleukin-22 Induced Proinflammatory Cytokine Production in Keratinocytes via Inhibitor of Nuclear Factor κ B Kinase- α Expression. Ann Dermatol. 2012 Nov;24(4):398-405.

Cummings RD, Liu FT. Galectins. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 33.

Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. N Engl J Med. 2011 Nov 3;365(18):1713-25.

Dessein R, et al. TLR2 is critical for induction of Reg3 β expression and intestinal clearance of *Y. pseudotuberculosis*. Gut. 2009 Jun;58(6):771-6.

Eva Hainzl, et al. Intestinal Epithelial Cell Tyrosine Kinase 2 Transduces IL-22 Signals To Protect from Acute Colitis. J Immunol. 2015 Nov 15; 195(10): 5011–5024.

Fukui H, et al. DMBT1 is a novel gene induced by IL-22 in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 2011 May;17(5):1177-88.

Geetha Srikrishna. S100A8 and S100A9: New Insights into Their Roles in

- Malignancy. J Innate Immun. 2011 Dec; 4(1): 31–40.
- Geethanjali Pickert, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. J Exp Med. 2009 Jul 6; 206(7): 1465–1472.
- Hsu DK, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. Am J Pathol. 2000 Mar;156(3):1073-83.
- Janet Z. Liu, et al. Zinc sequestration by the neutrophil protein calprotectin enhances *Salmonella* growth in the inflamed gut. Cell Host Microbe. 2012 Mar 15; 11(3): 227–239.
- Jensen-Jarolim E, et al. The constitutive expression of galectin-3 is downregulated in the intestinal epithelia of Crohn's disease patients, and tumour necrosis factor alpha decreases the level of galectin-3-specific mRNA in HCT-8 cells. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2002 Feb;14(2):145-52.
- Judith Behnsen, et al. The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. Immunity. 2014 Feb 20; 40(2): 262–273.
- Lejeune D, et al. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. J Biol Chem. 2002 Sep 13;277(37):33676-82.
- Lim C, Savan R. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2014 Jun;25(3):257-71.
- Lörchner H, et al. Myocardial healing requires Reg3 β -dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. Nat Med. 2015 Apr;21(4):353-62.
- Michelle M. Averill, et al. S100A8 and S100A9 in Cardiovascular Biology and Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 Feb; 32(2): 223–229.
- Midwood KS, et al. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. Int J

Biochem Cell Biol. 2004 Jun;36(6):1031-7.

Mitra A, et al. IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. Cytokine. 2012 Oct;60(1):38-42.

Nata K, et al. Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a novel human REG family gene, REG III. Gene. 2004 Sep 29;340(1):161-70.

Perusina Lanfranca M, et al. Biological and pathological activities of interleukin-22. J Mol Med (Berl). 2016 May;94(5):523-34.

Pham TA, et al. Epithelial IL-22RA1-mediated fucosylation promotes intestinal colonization resistance to an opportunistic pathogen. Cell Host Microbe. 2014 Oct 8;16(4):504-16.

Pickert G, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. J Exp Med. 2009 Jul 6;206(7):1465-72.

Raffatellu M, et al. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut. Nat Med. 2008 Apr;14(4):421-8.

Schreiber F, et al. Pathogen Resistance Mediated by IL-22 Signaling at the Epithelial-Microbiota Interface. J Mol Biol. 2015 Nov 20;427(23):3676-82.

Sohini Mukherjee and Lora V. Hooper. Antimicrobial Defense of the Intestine. Immunity. 2015 Jan; 42(1): 28-39, January

Theodore Kouo, et al. Galectin-3 shapes antitumor immune responses by suppressing CD8⁺ T cells via LAG-3 and inhibiting expansion of plasmacytoid dendritic cells. Cancer Immunol Res. 2015 Apr; 3(4): 412–423.

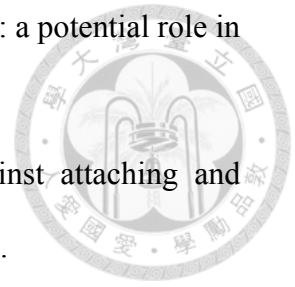
Tsai HF, et al. Galectin-3 suppresses mucosal inflammation and reduces disease severity in experimental colitis. J Mol Med (Berl). 2016 May;94(5):545-56.

Wolk K, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial



defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2006 May;36(5):1309-23.

Zheng Y, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med.* 2008 Mar;14(3):282-9.



七、附件



附件一：名稱縮寫

Abbr.

AMPs	Antimicrobial peptides
CD	Crohn's disease
CRD	Carbohydrate recognition domain
DSS	Dextran sodium sulfate
Gal	Galectin
IBD	Inflammatory bowel disease
IEC	Intestinal Epithelial Cell
UC	Ulcerative colitis

附件二： *Lgals3* shRNA sequence



1. Mouse

Clone ID	Vector	Target Sequence	Oligo Sequence
TRCN00000	pLKO.1	CCCAACGC	CCGGCCCAACGCAAACAGGATTG
54863		AAACAGGA	TTCTCGAGAACAAATCCTGTTTGCG
		TTGTT	TTGGGTTTTTG
TRCN00000	pLKO.1	GCAGTACA	CCGGGCAGTACAACCATCGGATG
54865		ACCATCGG	AACTCGAGTTCATCCGATGGTTGT
		ATGAA	ACTGCTTTTTTG
TRCN00000	pLKO.1	CCGCATGCT	CCGGCCGCATGCTGATCACAATCA
54867		GATCACAAT	TCTCGAGATGATTGTGATCAGCAT
		CAT	GCGGTTTTTG

來源：中研院標靶式操控基因表達核心設施 (RNAi core)，由劉扶東院士實驗室提供。

2. Human

Clone ID	Vector	Target Sequence	Oligo Sequence
TRCN00000	pLKO.1	GCTCACTTG	CCGGGCTCACTTGTTGCAGTACAATC
29304		TTGCAGTAC	TCGAGATTGTACTGCAACAAGTGAG
		AAT	CTTTTT
TRCN00000	pLKO.1	CCCACGCTT	CCGGCCCACGCTTCAATGAGAACAA
29305		CAATGAGA	CTCGAGTTGTTCTCATTGAAGCGTGG

		ACAA	GTTTTT
TRCN00000	pLKO.1	GCAGTACA	CCGGGCAGTACAATCATCGGGTTAA
29307		ATCATCGGG	CTCGAGTTAACCCGATGATTGTACTG
		TTAA	CTTTTT



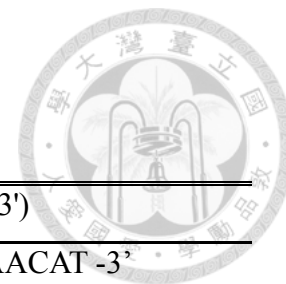
來源：中研院標靶式操控基因表達核心設施 (RNAi core)，由劉扶東院士實驗室提供。

附件三：試劑



	Source	Catalog Number
Anti-mouse β -actin	Genetex	GTX109639
Anti-mouse Gal-3	(中央研究院劉扶東院士實驗室)	
Anti-human Gal-3	(中央研究院劉扶東院士實驗室)	
Anti-mouse STAT3 (79D7)	Cell signaling	#4904
Anti-mouse pSTAT3 (Y705)	Abcam	Ab76315
Anti-mouse AKT (pan) (C67E7)	Cell signaling	#4691
Anti-mouse pAKT (Ser473)	Cell signaling	#9271
Anti-mouse p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)	Cell signaling	#4695
Anti-mouse P-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	#4370
Anti-mouse pJNK1(pY185) /pJNK2(pY185)/pJNK3(pY223)	Abcam	#ab76572
Anti-mouse Reg3b	R&D Systems	AF5110
Recombinant mouse IL-22	eBioscience	14-8221-63
Recombinant human IL-22	PEPROTECH	200-22

附件四：Real-time PCR Primers



1. Mouse

Name		Sequence (5' to 3')
RPL7	Forward	5'- TCAACAAGGCTTCAATTAACAT -3'
	Reverse	5'- CAATCAAGGAATTATCTGTCAA -3'
IL-22Ra1	Forward	5'- TCG GCT TGC TCT GTT ATC
	Reverse	5'- CCA CTG AGG TCC AAG ACA
Reg3b	Forward	5'- ATGGCTCCTACTGCTATGCC
	Reverse	5'- GTG TCC TCC AGG CCT CTT T
Reg3g	Forward	5'- ATG GCT CCT ATT GCT ATG CC
	Reverse	5'- GAT GTC CTG AGG GCC TCT T
S100A8	Forward	5'- TGT CCT CAG TTT GTG CAG AAT ATA AA
	Reverse	5'- TCA CCA TCG CAA GGA ACT CC
S100A9	Forward	5'- GGT GGA AGC ACA GTT GGC A
	Reverse	5'- GTG TCC AGG TCC TCC ATG ATG
Galectin-1	Forward	5'- CTCTCGGGTGGAGTCTTCTG -3'
	Reverse	5'- GGTTTGAGATTCAGGTTGCTG -3'
Galectin-2	Forward	5'- CTAGGAGCAACTGGGAGAGC -3'
	Reverse	5'- CCCTGGTTTCATGTTCAGGT -3'
Galectin-3	Forward	5'- GCCTACCCCAGTGCTCCT -3'
	Reverse	5'- GGTCATAGGGCACCGTCA -3'
Galectin-4	Forward	5'- CATGCCTGAGCACTACAAGG -3'
	Reverse	5'- CGAGGAAGTTGATGGACTGAA -3'
Galectin-7	Forward	5'- ATGAGAATTCGAGGCATGGT -3'
	Reverse	5'- CACCGCATAGCAGGTTTACA -3'
Galectin-8	Forward	5'- ATCGTGTTTCATGGTGCTCAA -3'
	Reverse	5'- CGTACAGCAGAACATGCCTTC -3'
Galectin-9	Forward	5'- ACCCTACCACCTCGTGGAC -3'
	Reverse	5'- GACAGGGGCTGCAGAGTTC -3'
Galectin-12	Forward	5'- ACCCGATTCTGACAGCTT -3'
	Reverse	5'- GTGACCATCTTGCCTGCATA -3'

Galectins 來源：中央研究院劉扶東院士實驗室

2. Human

Name		Sequence (5' to 3')
GAPDH	Forward	CCC ATC ACC ATC TTC CAG GAG
	Reverse	GTT GTC ATG GAT GAC CTT GG
Reg3a	Forward	GAG AGT GAC TCC TGA TTG CCT CCT
	Reverse	GGG ACA GCG GAT CCG TGC AG
Reg3g	Forward	GTG ACC CGA TTG CCT CCT CAA GTC
	Reverse	GGC AGG AAA GCA GCA TCC AGG AC
Galectin-1	Forward	CGC CAG CAA CCT GAA TCT
	Reverse	CAG GTT CAG CAC GAA GCT CT
Galectin-2	Forward	GGT TAA GAA CAT GGA CAT GAA GC
	Reverse	TGG CCC AGA TTA ATT ACA AAG C
Galectin-3	Forward	GAG CCT ACC CTG CCA CTG
	Reverse	AGG CAA AGG CAG GTT ATA AGG
Galectin-4	Forward	TTC ATA GTC CTG GCT GAG CAC
	Reverse	CGG TGC CCG TAC TCA TAG A
Galectin-7	Forward	CAG ACG ACG GCT TCA AGG
	Reverse	AAG ATC CTC ACG GAG TCC AG
Galectin-8	Forward	TGC ACC AAA ATA CCA CCT ATG A
	Reverse	CAC TTC TCC TTT AAC GAC GAC A
Galectin-9	Forward	CAC CGT GTG GAC ACC ATC T
	Reverse	GAA GGC AGG CTG AAC AGG
Galectin-10	Forward	ATG CTC AGT TCA AAT TCT TGG
	Reverse	AGT GTG CTT TGG TCG TCG T
Galectin-12	Forward	GGA GTT GCC CCA CTG TCA T
	Reverse	CGT CGT GAC ATA AGG AAC CA
Galectin-13	Forward	GCG TGA GTT TGG GAT ATG GA
	Reverse	ATG CGT ATG CCA TTG ACC TT
Galectin-14	Forward	TCA CAC AGA AGA CTG GAC ACA A
	Reverse	AAC AGG CAG TGT GTA TGG TAC G

Galectins 來源：中央研究院劉扶東院士實驗室

附件五：實驗動物鼠品系與資訊



品系名稱：B6.Lgals 1/3/12-wt		
飼養房號：124(B)	標記方式：無	動物房負責人：洪書璇

動物標記	代數	出生日期	來源		性別	基因型	箱號	備註
			♀	♂				
無	F5	04/13/2017	F3-無編號	F4-無編號	♀	N/A	EL-02(左)	
無	F5	04/13/2017	F3-無編號	F4-無編號	♀	N/A	EL-02(左)	
無	F5	04/13/2017	F3-無編號	F4-無編號	♀	N/A	EL-02(左)	

品系名稱：B6.lgals-3+/--(het*het)		
飼養房號：124(B)	標記方式：無	動物房負責人：洪書璇

動物標記	代數	出生日期	來源		性別	基因型	箱號	備註
			♀	♂		lgals-3		
2060	F5	05/08/2017	F4-1853	F4-1856	♀	-/-	EL-01(左)	
2061	F5	05/08/2017	F4-1853	F4-1856	♀	-/-	EL-01(左)	
2102	F5	05/13/2017	F4-0975	F4-1155	♀	-/-	EL-01(左)	

隻數：3隻母鼠,0隻公鼠,0隻仔鼠