

國立台灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所

碩士論文

Graduate Insititute of Biochemistry and Molecular Biology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

位於 G-CSF 3'端 UTR 之 SLDE 序列在 SB203580 誘

導下增加 G-CSF mRNA 穩定度的角色

Role of SLDE in G-CSF 3'UTR mediates increase of
mRNA stability induced by SB203580



Huai-Tzu Li

指導教授：呂紹俊 博士

Advisor: Shao-Chun Lu, Ph.D.

中華民國 101 年 6 月

June, 2012

國立台灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

位於 G-CSF 3' 端 UTR 之 SLDE 序列在 SB203580 誘
導下增加 G-CSF mRNA 穩定度的角色

Role of SLDE in G-CSF 3'UTR mediates
SB203580-induced increase of G-CSF mRNA stability

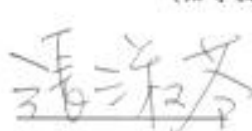
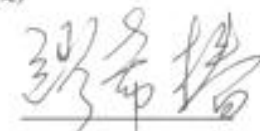
本論文係黎懷慈君(學號 R99442011)在國立台灣大學
醫學院生物化學暨分子生物學研究所完成之碩士學位論
文，於民國一百零一年七月五日成下列考試委員審查通過
及口試及格，特此證明

口試委員：

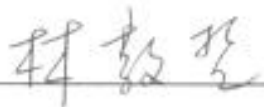


(簽名)

(指導教授)


所長：



(簽名)

謝誌

兩年的碩士班生涯一下子就到尾聲了，感謝我的指導老師呂紹俊老師讓我加入 R810 這個充滿歡笑的地方，老師總是很有耐心的指導我的實驗，除了教導我許多關於 cloning 方面的技巧之外，也教我如何思考及設計實驗來驗證我們的假設，並且當我在實驗上遇到問題時陪我討論分析每一個可能的原因。此外，我也要感謝北醫張淑芬老師，除了提供我們 Q-PCR 的技術支援之外，也在百忙中抽空前來擔任我的口試委員，仔細的閱讀並修改我的碩士論文。感謝繆希椿老師及余明俊老師擔任我的口試委員，給了我許多寶貴的建議，使我的論文更趨完善。

感謝怡潔學姐，每次在我趕 seminar、寫論文跟找工作焦慮的時期很有耐心的聽我該該叫，並提供我許多好吃的零食解嘴饞，祝福你可以天天開心、事事順利。實驗桌的好鄰居小賴學長，在我當值日生的時候會幫我抬 25L 的水，真得很重!!在每一次出去玩的時候總是幫大家拍照，留下開心的時刻，祝福你和老大可以超前君尹學姐的進度。感謝子慶學長，在我的電腦失去控制的時候幫我修好他，也會幫實驗室的大家買午餐，聽不到你跟羅凱晏鬥嘴我一定會很不習慣，祝你可以天天有好浪衝、日日有好 data!!感謝君尹學姐，每個月都幫我們報薪水，跟環安衛的人周旋，祝福你新婚生活可以幸福美滿喔!早日生個可愛的小孩。感謝蔡蔡學姐在我剛進實驗室的時候教我做實驗，並細心的告訴我實驗中該注意的地方。感謝我的同學羅凱晏，雖然我們常常說你是壞學長、壞同學跟壞學弟，但是因為有你我跟詩珊才可以利用多數決的方式以看似民主的方式讓你當上實驗室負責人，真是辛苦你了，而你對事情堅持到底的決心也讓我十分的佩服，祝福你和七七可以繼續閃瞎身邊所有人。詩珊是個做事情很有規畫的人，不管是 seminar、考試還是作業都會早早就完成，我真的需要跟你好好的學習，除此之外，你也是羅凱晏的剋星，用很自然的語調讓羅凱晏講不出話來，很感謝你常常提醒我許多事情的 deadline，讓我可以如期完成，祝福你可以找到理想的工作。

碩一的學妹們，因為有妳們實驗室變得很熱鬧。非常有風紀股長架勢、一個眼神就讓子慶學長安靜的豈裝，祝福妳實驗順利、愛情甜蜜喔!!下一屆實驗室負責人郭機靈，我想我也會想念你跟子慶學長嗆來嗆去的聲音，希望你的 LDOC1 可以早早發 paper。采采你常常在眨眼間就消失在實驗室的功力也令我非常敬佩，謝謝你幫我搶救我的豆子，雖然最後還是霉菌感染了，祝你的動物實驗可以順利成功。R810 的每一個人我一定會很想很想你們，祝福大家都順順利利。

感謝我的爸媽，回高雄的時候不管多晚都會等我、接我回家，還會煮很多好吃的菜，買很多我喜歡的水果讓我帶回台北，聽我講一些五四三的話，並且讓我在高消費的台北仍然是經濟無虞的專心念完碩士班，雖然現在微薄的薪水沒辦法讓你們有很好的生活，但是我會努力的。感謝三姨、小姨和小姨爹，每次要吃好吃的、玩好玩的都會打電話找我一起去。另外，感謝郭先生常常在假日陪我到學校做實驗，當我實驗不順利的時候隨我毆打。最後，將碩士班的成果與所有愛我的人及我愛的人分享。



目錄

口試委員審定書.....	i
謝誌.....	ii
摘要.....	viii
第一章 緒論.....	1
第一節 文獻回顧.....	2
第二節 研究動機及目的.....	16
第二章 材料方法.....	17
實驗材料.....	18
第二節 細胞培養.....	19
第三節 細胞毒殺活性測試之檢測.....	20
第四節 細胞內 RNA 抽取與基因表現量分析.....	21
第五節 蛋白質表現量分析.....	24
第六節 質體的建構.....	28
第七節 螢火蟲冷光酶活性分析 (luciferase activity assay).....	34
第八節 資料統計分析.....	36
第三章 實驗結果.....	37
第一節 探討 SB203580 增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度是否是透過 G-CSF mRNA 3'UTR.....	38
第二節 探討 SB203580 增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度是透過 G-CSFmRNA 3'UTR 當中哪一段序列.....	39
第三節 探討不同 p38 MAPK 抑制劑對 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現的影 響.....	41
第四節 探討只單獨處理 SB203580 是否就會增加 G-CSF mRNA 表現.....	43
第四章 討論.....	45
第一節 SB203580 透過 G-CSF mRNA 3'UTR SLDE 來增加 LPS 誘導的 G-CSF	

mRNA 穩定度	46
第二節 LPS 除了透過 ARE 之外也會透過 SLDE 增加 G-CSF mRNA 穩定度	47
第三節 不同 p38MAPKs 抑制劑對 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現有不同影響	48
第四節 單獨處理 SB203580、SB202190 和 PD169316 增加 G-CSF mRNA 穩定度不是藉由抑制 p38 MAPKs 磷酸酶活性所導致	50
第五節 結論	52
第五章 圖表	53
參考文獻	70
附錄	85



圖目錄

Fig. 1 Effect of SB203580 on LPS-induced G-CSF mRNA stability in Raw264.7 cells.	54
Fig. 2 Effect of SB203580 on luciferase activity in Raw264.7 cells that transfected with GAPDHP-Luc construct (basic construct).	55
Fig. 3 Luciferase activity and mRNA in Raw264.7 cells that transfected with basic construct and GAPDHP-Luc-3'UTR construct (3'UTR construct).	57
Fig. 4 Effect of SB203580/LPS on luciferase activity and mRNA in Raw264.7 cells transfected with 3'UTR construct.	58
Fig. 5 Effect of SB203580/LPS on on luciferase activity in Raw264.7 cells that transfected with GAPDHP-Luc-3'UTR SLDE mutant1 construct(SLDE mutant1).	59
Fig. 6 Effect of SB203580/LPS on luciferase activity in Raw264.7 cells that transfected with GAPDHP-Luc-3'UTR SLDE mutant 2 construct(SLDE mutant 2).	60
Fig. 7 Effect of SB203580/LPS on luciferase activity and mRNA in Raw264.7 cells that transfected GAPDHP-Luc-G-CSF 3'UTR SLDE mutant 3(SLDE mutant 3) activity.	61
Fig. 8 Effect of various p38 MAPKs inhibitors on LPS-induced G-CSF expression in Raw264.7 cells.	62
Fig. 9 Effect of various p38 MAPKs inhibitors on LPS-induced G-CSF mRNA expression in Bone marrow derived macrophage (BMDM).	63
Fig. 10 Effects of various p38 inhibitors on LPS-induced G-CSF mRNA expression in THP-1 cells.	64
Fig. 11 Effect of various p38MAPKs inhibitors on LPS-induced luciferase activity in cells transfected with 3'UTR construct.	65

Fig. 12 Effects of various p38 inhibitors on protein levels of p38, p-p38 and p-Hsp27 in THP-1 cells.	66
Fig. 13 Effect of SB203580 on G-CSF mRNA expression in Raw264.7	67
Fig. 14 Effect of SB203580 on G-CSF mRNA turn-over in RAW264.7 cells.	68
Fig. 15 Effect of different p38MAPK inhibitors on luciferase activity in cells transfected with 3'UTR construct.....	69



摘要

顆粒性白血球群落刺激因子(G-CSF)為造血性糖蛋白家族中的一員，也是一種細胞激素，主要由巨噬細胞及單核球細胞所分泌，具有促進噬中性白血球分化、增生及移動的功能。細胞受到 LPS 刺激活化 p38 MAPK 會使 G-CSF mRNA 穩定度增加，增加 G-CSF 表現。G-CSF mRNA 的穩定度主要由 3'UTR 的 ARE 及 SLDE 所調控。許多研究顯示給予 SB203580 抑制 p38 MAPK 活性後，會使在 3'UTR 帶有 ARE 的 mRNA 半衰期變短，進而降低其表現量。但是本實驗室先前的研究結果發現，以小鼠巨噬細胞 Raw264.7 經 LPS 刺激之下預先給予 SB203580，會增加 G-CSF mRNA 的穩定度，更增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 及蛋白質的表現量，顯示 SB203580 對 G-CSF 表現的影響與對其他帶有 ARE 的細胞激素的 mRNA 作用是不同的。本研究的目的是探討 SLDE 在 SB203580 增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度所扮演的角色。

實驗結果發現當細胞不受刺激時 G-CSF 3'UTR 會使 mRNA 不穩定；而給予 LPS 及 SB203580 後會提高 mRNA 穩定度。將 3'UTR 接到 luciferase 後，以 site direct mutagenesis 分析發現 SB203580 提高 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度是透過 3'UTR SLDE 內 TTAAATATTTA 這段高保留性序列。此外，不同的 p38 MAPKs 抑制劑對 G-CSF mRNA 及蛋白質的量有不同的影響，其中預先給予 SB203580、SB202190 及 PD169316 都會提高 G-CSF mRNA 穩定度進而提高 LPS 誘導的 mRNA 及蛋白質表現，而 SKF86002 及 SB239063 則不會影響 G-CSF 蛋白質表現，但是 SKF86002 也會些微增加約 1.8 倍的 mRNA 表現。最後我們也發現在沒有 LPS 刺激的情況下，SB203580、SB202190 及 PD169316 也會透 G-CSF 3'UTR 來增加 G-CSF mRNA 穩定度，顯示這些抑制劑增加 G-CSF mRNA 穩定度可能不是藉由抑制 p38 MAPKs 磷酸酶活性所導致。綜合以上結果，SB203580 會透過 SLDE 中高保留性的序列提高 G-CSF mRNA 穩定度，而且 SB203580 增加 G-CSF mRNA 的作用可能不是藉由抑制 p38 MAPKs 磷酸酶活性所導致。

關鍵字：顆粒性白血球刺激因子、SB203580、stem-loop destabilizing element (SLDE)、mRNA 穩定度、p38 MAPK



Abstract

Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) is not only a member of hematopoietic growth factor but also a cytokine. G-CSF is known to control the production, differentiation and migration of neutrophils. LPS increasing G-CSF mRNA stability by activating p38 MAPK kinase activity, thus increases G-CSF production. There are two destabilizing elements in G-CSF 3'UTR-adenosine uridine-rich element (ARE) and stem-loop destabilizing element (SLDE) that regulate G-CSF mRNA stability. Numerous studies show that SB203580, a pyridinyl imidazole p38 MAPK inhibitors, reduces the half-life of the ARE-containing mRNA by inhibiting p38 MAPK kinase activity. However, our previous studies showed that SB203580 enhances LPS-induced G-CSF production by increasing mRNA stability. The aim of this study is to investigate the possible role of SLDE in SB203580 mediated increase in G-CSF mRNA stability in LPS treated macrophage.

Our results show that G-CSF 3'UTR decreases mRNA stability in unstimulated cells, but stabilized mRNA when p38 MAPKs activity was activated by LPS. We find that the consensus sequence "TTTAATATTTA" rather than the stem-loop structure in G-CSF 3'UTR SLDE is essential for the SB203580 enhanced LPS-increased G-CSF mRNA stability. Moreover, various p38 MAPK inhibitors had different effects on the expression levels of G-CSF mRNA and protein. The levels of LPS-induced G-CSF mRNA and protein in Raw 264.7 were increased by SB203580, SB202190 and PD169316, but not by SB239063. Furthermore, we discovered that SB203580, SB202190 and PD169316 increased G-CSF mRNA stability when p38 MAPK kinase activity was inactivated. Taken together, these results suggest that SB203580 increases G-CSF mRNA stability through the highly conserved sequence and this effect is independent p38 MAPKs kinase inhibition.

Key words: G-CSF, SB203580, SLDE, mRNA stability, p38 MAPK



第一節 文獻回顧

一、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)

顆粒性白血球刺激生長因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 屬於造血性醣蛋白家族中的一員，也是一種細胞激素 (cytokine)，分子量約 24~25KD (Hareng and Hartung, 2002)。Burgess 和 Nicola 等人分別於 1980 年和 1983 年由內毒素感染的小鼠血清及肺臟當中分離出 G-CSF 蛋白質 (Burgess and Metcalf, 1980; Nicola et al., 1983)，小鼠 G-CSF 基因則是在 1986 年由 C3H/He 細胞株建立的基因體 DNA 庫被選殖 (clone) 出來 (Tsuchiya et al., 1986)，而人類的 G-CSF 基因是在 1986 年由腎臟癌細胞株 5637 及鱗狀上皮細胞癌 CHU-2 的 cDNA 庫中被選殖出來；基因全長約為 2.3 kb，位於第十七號染色體上，由 5 個 exon 以及 4 個 intron 所組成 (Nagata et al., 1986)。G-CSF 在小鼠與人類當中有很高的同源性，其核酸與胺基酸序列分別有 69% 及 73% 的相似性 (Tsuchiya et al., 1987)。由 X-ray 分析結果顯示，G-CSF 是由四個反向平行的 α -螺旋結構組成， α -螺旋之間由兩短一長的環 (loop) 所連接，並有四個保守的半胱胺酸殘基 (cysteine residues) 形成兩個分子內雙硫鍵，幫助穩定四級結構，對抗蛋白酶的切割 (Hill et al., 1993; Nicola et al., 1983) 人類 G-CSF 前驅蛋白質是由 207 個胺基酸組成，其 N 端有 30 個胺基酸組成的訊號勝肽 (signal peptide)，經切割產生 174 個或 178 個胺基酸組成的成熟 G-CSF 並分泌出細胞外，是一種分泌性蛋白，其中 174 個胺基酸組成的 G-CSF 在細胞佔大多數也是活性較高的型式 (Nicola et al., 1990)。

二、G-CSF 的功能

(1) 促進嗜中性白血球生成

G-CSF 最主要的功能是刺激骨髓內顆粒性白血球前驅細胞 (progenitor cell) 分化形成嗜中性白血球 (Boneberg and Hartung, 2002b; Hareng and Hartung, 2002; Kamezaki et al., 2005)，並促進成熟的嗜中性白血球增生及移動到受感染的部

位，成熟的嗜中性白血球利用胞噬作用 (phagocytosis) 或是形成胞外殺菌網路 (Neutrophil Extracellular Traps, NETs) 的方式將外來的病原菌清除掉，強化先天免疫反應 (innate immunity)。此外G-CSF可以藉由抑制鈣內流 (Ca^{2+} influx) 來抑制calpain活化，使得X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) 表現增加，進而抑制caspase-3和caspase-9的活性，來延緩嗜中性白血球細胞凋亡(apoptosis) (van Raam et al., 2008)，延長嗜中性白血球的半生期，幫助抵抗外來病原菌，提高免疫力。

(2) 抗發炎

研究顯示，G-CSF透過不同途徑抑制發炎反應。Boneberg等人研究發現G-CSF藉由兩種不同的機制來抑制單核球細胞 (monocyte) 釋出IL-1 β 及TNF- α (Boneberg and Hartung, 2002a)。G-CSF可以藉由抑制caspase-1的活性，進而抑制pro-IL-1 β 切割成成熟的IL-1 β (Boneberg and Hartung, 2002a)；另一方面給予G-CSF會造成TNF- α 蛋白質表現減少，但是卻不影響TNF- α mRNA的表現，顯示G-CSF是藉由轉錄後調控或是抑制轉譯來抑制TNF- α 蛋白質表現，但是詳細的機制到目前仍不清楚 (Boneberg and Hartung, 2002a)。此外研究也發現G-CSF抑制IL-1 β 及TNF- α 釋出，造成INF- γ 釋出也減少 (Boneberg et al., 2000)。

另外，G-CSF會增加週邊血液中漿細胞樣樹突細胞 (Plasmacytoid Dendritic Cells, pDC) 數量，進而促進TH2細胞生成，並誘導調節性T細胞的生成，降低誘發self-reactive T cell的活化與增生，避免免疫系統過度活化，提高周邊耐受性 (peripheral tolerance) (Rutella et al., 2005)。

(3) 活化造血功能、促進造血細胞生成

除了促進嗜中性白血球移動之外，G-CSF也會藉由降低骨髓當中SDF-1以及提高CXCR4表現促進造血幹細胞由骨髓移動到周邊血液 (Petit et al., 2002)。G-CSF除了刺激嗜中性白血球生成外，亦可與IL-3協同作用促進megakaryocyte及血小板生成 (Catani et al., 1998; Chao et al., 1993)。

(4) 保護神經

除了在免疫方面及造血系統的功能之外，G-CSF也是一種神經營養物質

(neurotrophic factor)，在大腦和脊髓的神經元都有表現G-CSF 受器 (G-CSF receptor)，G-CSF可以通過血腦屏障 (blood-brain barrier) 促進神經再生，並透過活化STAT3來抑制神經細胞凋亡 (Schneider et al., 2005)，而G-CSF也可以透過活化Akt/GSK3 β /NF- κ B抑制由內毒素所引起的BV-2過度活化，減少NO的產生，以減少神經細胞受損而死亡具有保護神經的作用 (高, 2008)。

(5) 保護心臟

而近年的研究也發現，於心肌梗塞 (myocardial infarction) 後，以皮下注射的方式給予10-100 μ g/kg/day G-CSF可以透過心肌細胞 (cardiomyocyte) 上G-CSF受器活化Jak-stat3，進而抑制心肌細胞凋亡及誘導幹細胞移至受損的心臟部位，修補心肌細胞，改善心肌梗塞所導致的左心室重塑 (Left ventricular remodeling) (Harada et al., 2005)，促進心肌細胞復原 (Myocardial regeneration) 以增加病人癒後復原速度(Minatoguchi et al., 2004)。

三、G-CSF 臨床使用

在健康的人體血清G-CSF濃度為 19.4 ± 2.9 pg/ml，在1986年LM Souza等人建構可以直接轉譯出成熟G-CSF蛋白質的536-hG-CSF2質體，並送進E. coli大量表現人類的G-CSF，接著在以HPLC純化分離進而得到人類的重組G-CSF蛋白 (rhG-CSF) (Souza et al., 1986)。由實驗結果證實，以皮下注射的方式給予30 μ g/kg/day rhG-CSF蛋白會促進骨髓細胞增生及分化，提高周邊血液中嗜中性白血球數約八倍以及提高約兩倍的淋巴球數 (Price et al., 1996)。因此，在臨床上常在癌症病人接受化學治療後給予rh G-CSF，使嗜中性白血球的數目增加，以減少微生物感染的機會 (Chao et al., 1993)。此外G-CSF也可增加噬中性白血球對癌細胞的抗体依賴性細胞擔任的毒殺作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) (Valerius et al., 1993)。除了提高免疫力之外，Dührsen等人研究發現當給予癌症患者靜脈注射0.3 μ g/kg/day 的rh G-CSF之後，血液中造血先驅細胞 (hematopoietic progenitor cell) 數目增加一百倍 (Dührsen et al., 1988)。在Stroncel

等人的實驗中發現連續五天給予7.5-10 µg/kg/day rh G-CSF，五天後周邊血液幹細胞 (peripheral blood stem cell, PBSC) 數目增加約三十二倍 (Stroncek et al., 1997)，因此將G-CSF使用在週邊血液幹細胞捐贈者身上，可使幹細胞大量出現在血液中，以利收集 (Levesque, 2003; Petit et al., 2002)。最近一些研究也認為這些收集起來的幹細胞也可以用來治療心肌梗塞等疾病 (Zohlhöfer et al., 2006)。而G-CSF可以促進神經再生、分化及抑制神經細胞凋亡，可修補腦缺血所造成的神經細胞損害、延緩巴金森病患神經退化的情況 (Lu and Xiao, 2006; Meuer et al., 2006; Schabitz et al., 2003)。

但是在臨床上使用 rh G-CSF 也會有副作用的產生，常見的副作用包括骨頭酸痛、肌肉酸痛、頭痛、疲倦、噁心、嘔吐及發燒等 (Carr et al., 2003; Flomenberg, 2005)。因為 G-CSF 會使噬中性球聚集，噬中性球聚集在皮膚會造成紅疹、蕁麻疹、乾癬和 Sweet 症候群 (Garty et al., 1996; Oiso et al., 2006)。如果噬中性球聚集在肺部會導致咳嗽、呼吸喘、肺部浸潤增加 (Hierholzer et al., 1998)。Hirokawa 等人研究指出 G-CSF 使噬中性白血球增加，而過多的噬中性白血球會堆積在腎臟，使得腎功能變差、排尿量下降等 (Hirokawa et al., 1996)。

四、G-CSF 基因表現調控機制

G-CSF 主要表現在單核球細胞 (monocyte)、巨噬細胞 (macrophage)、血管內皮細胞 (vascular endothelial cell) 和纖維母細胞 (fibroblast) 等，當這些細胞遭受 LPS，或是細胞激素 (如：IL-1 β 、TNF- α 、GM-CSF、IL-17A) 等的刺激，都會使 G-CSF 表現增加 (Aulock et al., 2004; Demetri and Griffin, 1991; Hirai et al., 2011)，G-CSF 基因表現主要受轉錄層次 (transcriptional level) 和轉錄後層次 (post-transcriptional level) 的調控，分別敘述如下：

(1) 轉錄層次 (transcriptional level)

1990 年 Shannon 等人利用 reporter assay 發現在 G-CSF 啟動子上有一段在人類和小鼠都很保守的序列—CK-1 region (GAGATTCCC)，CK-1 region 位在轉錄

起點上游 188bp 處，相同的序列在 IL-3 和 GM-CSF 啟動子上都有，當在 TNF- α 或是 IL-1 β 刺激下，human T lymphotropic virus-1 transactivator(tax)和 GM-NF α 會結合上 CK-1 促進轉錄活性 (transcriptional activity) (Kuczek et al., 1991; Shannon et al., 1990)。另外在 CK-1 region 下游緊鄰著兩個 NF-IL6 結合位，其中一個與 CK-1 region 有部分重疊，當給予 TNF- α 刺激時，NF- κ B 的次單位 p65 和 NF-IL6 會分別結合到 CK-1 region 及 NF-IL6 結合位 (NF-IL6 binding site)，增加轉錄活性，因此 CK-1 region 及 NF-IL6 結合位也被稱為 TNF- α response element (Dunn et al., 1994)。除了 NF-IL6 之外，研究也發現 heat shock factor1 (HSF1) 會結合上 NF-IL6 結合位，與 NF-IL6 競爭使 G-CSF 轉錄活性被抑制 (Zhang et al., 2011)。

此外，在 G-CSF 啟動子 TATA box 上游 115bp 處的 octamer sequence (ATTTGCAT) 會被 octamer binding factor 1 (Oct1) 和 octamer binding factor2 (Oct2) 結合 (Müller et al., 1988)。在本實驗室未發表的結果顯示在 LPS 刺激下 Oct-2 會和 CEBP/ β 進行交互作用，增加 G-CSF 啟動子轉錄活性 (黃,2010)。而在本實驗室已發表的研究指出，雷帕霉素 (rapamycin) 會抑制 PI3K/Akt/mTOR pathway 活化造成 Oct-2 蛋白表現減少，進而抑制由 LPS 及 LTA 誘導的 G-CSF 和 iNOS 產生 (Chou et al., 2011; Chou and Lu, 2011)。此外，在 octamer sequence 上游約 20bp 處有 PU box (GAGGAA) 會被 PU.1 結合，也會參與在 IL-1 β 誘導的 G-CSF 產生過程中 (Shannon et al., 1992)。

Tsukada 等人在 1994 年也發現在 G-CSF 啟動子 CK-1 region 上游 11bp 之處有一段序列 GACGTCA，與不對稱 cAMP responsive element (CRE) (CGTCA) 序列完全相同，與對稱 CRE (TGACGTCA) 只有第一個核苷酸的差異 (Tsukada et al., 1994)。L. Hareng 等人研究發現，當細胞內 cAMP 濃度增加會使 cAMP element binding protein (CREB) 結合上 CRE 開啟轉錄作用 (Hareng and Hartung, 2002)。

另外，G-CSF promoter 上還帶有 4 個 cold shock protein binding site (CSD1、2、3、4)，CSD1、2 分別與 CK-1、NF-IL6 有部分重疊，CSD3、4 則位於 NF-IL6

與 octamer sequence 中間，CSD 最先發現於 GM-CSF promoter 上，在 IL-3 promoter 上也帶有相似的 CSD binding site，當 TNF- α 刺激的時候，NF-GMa 會結上 GM-CSF CSD1、2 的 noncoding strand 開啟基因轉錄；而 NF-GM b/c 會結合上 CSD3、4 coding strand 抑制轉錄活性 (Coles et al., 2000)，然而到目前為止 G-CSF 啟動子上 CSD 的調控機制是不完全清楚的。

(2) 轉錄後層次 (post-transcriptional level)

在未受刺激的細胞內 G-CSF mRNA 是很不穩定的，半衰期小於 15 分鐘，屬於短生命期 (short-lived) mRNA (Ernst et al., 1989)，許多前人研究顯示大部分 G-CSF mRNA 主要受到 3' 端不轉譯區 (3' untranslated region, 3'UTR) 所調控。在 G-CSF mRNA 3'UTR 有 AU-rich element (ARE) 會影響 mRNA 的穩定度。另外研究也發現在 G-CSF 3'UTR 還帶有一段莖-環不穩定區 (stem-loop destabilizing element, SLDE) 也會影響 mRNA 的穩定度 (Hill et al., 1993; Putland et al., 2002)，以下將分別討論這兩段區域對 G-CSF mRNA 穩定度的影響。

(a) AU-rich element (ARE)

研究發現在細胞不受刺激的情況下 ARE 會被一些 ARE 結合蛋白結合例如：tristetraprolin (TTP)、butyrate response factor (BRF-1) 和 ARE poly-(U)-binding/degradation factor (AUF1) 造成 mRNA 穩定度下降，促進 mRNA 分解 (Chen and Shyu, 2011)。另外，HuR 蛋白質結合上 ARE 則是會使 mRNA 變的穩定，G-CSF ARE 位在終止密碼子 (stop codon) 後面 40~80 個核苷酸內 (Chen and Shyu, 2011; Demetri and Griffin, 1991)。但目前尚沒有研究顯示 G-CSF 3'UTR 的 ARE 是否也會被這些蛋白質結合 (Anderson, 2010)。

而當細胞在 LPS 刺激時會活化 p38 MAPK 使這些帶有 ARE 的 mRNA 穩定度增加 (Lee and Young, 1996)。也有研究發現鈣離子會透過 G-CSF mRNA 的 ARE 提高 mRNA 的穩定度，(Brown et al., 1996)。

G-CSF:

AGTTT**ATTTA**TCTCT**ATTTA**AT**ATTTA**TGCAT**ATTTA**AGCCTACT**ATTTA**AAGACAAA

COX2:

TACTGACCAT**ATTTATTTATTTA**TGTGAAGA**ATTTAATTTAATTATTTA**AT**ATTTA**TATA

IL-1 β :

CT**ATTTATTTA**TGT**ATTTA**TTGATTGGTTGATCT**ATTTA**AGTTGATTCAAGGGGACAT

TNF- α :

TCCTCACAGAGCCAGCCCCCTCT**ATTTA**TATTTGCACTTATT**ATTTATTATTTATTT**
ATTATTTATTTATTTGCTTATGAATGT**ATTTA**TTTGGAAGGC

圖(一):不同 cytokine 3'UTR ARE 的序列

由圖(一)顯示，G-CSF mRNA 3'UTR 和 IL-1 β 、TNF- α 等細胞激素的 mRNA 3'UTR 具有相似的 ARE，ARE 是由許多的腺嘌呤 (Adenine) 和尿嘧啶 (uridine) 所組成，依序列的不同可分成三大類，第一大類:分散的 AUUUA 序列伴隨著 U-rich 區域，例如:c-fos、G-CSF 等，第二類是:至少有兩個 AUUUA 重疊在一起，例如:TNF- α ，第三類是:缺乏典型的 AUUUA 序列，但是有一段很長的 U-rich 區域，例如:c-jun(Chen and Shyu, 1995)。

(b) stem-loop destabilizing element (SLDE)

SLDE 是在 1996 年由 Brown 等人首先發現，在 G-CSF 3'UTR 除了 ARE 之外還帶有約 183 個核苷酸的 SLDE，其中有 11 個核苷酸 (+1050~+1061)在七個不同物種 (species) 之間具有高度保留性。研究發現 G-CSF 的 SLDE 促進 G-CSF mRNA 分解的能力不會受到鈣離子抑制。而在 IL-6、IL-2 的 3'UTR 也有類似的莖-環結構，但是 IL-6、IL-2 及 G-CSF mRNA 當中構成 SLDE 的序列及結構卻是不相似的。研究發現 SLDE 會促進 G-CSF mRNA 3'UTR 的 polyA tail 長度縮短，使 mRNA 變的不穩定，但是這中間的詳細機制仍是不太清楚 (Brown et al., 1996; Putland et al., 2002)。

應的主要結構 (Thorn, 2001)。當革蘭氏陰性菌死亡後釋出 LPS，LPS 會與單核球細胞、巨噬細胞膜上的接受器 (receptor) 例如:CD40 結合，接著再與 MD-2 結合，MD-2 可以增加 LPS 與類鐸受體 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 結合的機會，並促使 TLR4 形成雙體 (dimer)，這樣子的複合體稱為脂多醣-受器複合體 (LPS-receptor complex)。脂多醣-受器複合體會誘導細胞內 TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP) 與 TLR 的 TIR domain 結合，開啟下游訊號傳遞，促使免疫細胞產生細胞激素與趨化因子 (chemokine)，吸引更多吞噬細胞來將病原菌吞噬清除掉 (Shimazu et al., 1999)，引發一連串的發炎反應 (inflammatory response)。而 LPS 主要會活化 MAPK 與 NF- κ B，其活化路徑主要是透過 MyD88 dependent pathway 和 MyD88 independent pathway (Lu et al., 2008)，以下將分別描述。

(1) MyD88 dependent pathway

當TIRAP與TLR4結合後，會誘導MyD88過來與TLR4的細胞質側結合，接著再誘導IL-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4)、IRAK-1-Tollip複合體過來與MyD88結合，使IRAK-4與IRAK-1被磷酸化。此時Tollip離開，磷酸化的IRAK-1與TRAF-6結合活化MAPK跟NF- κ B，使促發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokine) 表現增加，造成發炎反應 (Lu et al., 2008; Lye et al., 2008)。

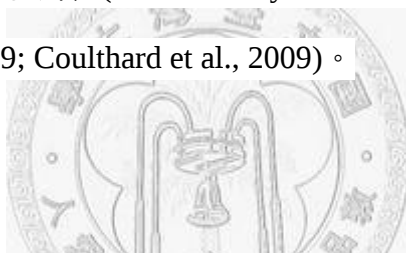
(2) MyD88 independent pathway

TRAM、TRIF與TLR4結合後活化TANK binding kinase 1 (TBK-1)，活化的TBK-1會在活化IKK ϵ 並與IKK ϵ 和TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK) 形成複合體，進而使IRF-3被磷酸化並形成雙體進入細胞核，誘導IFN- β 產生以及延長MAPK及NF- κ B的活性 (Fitzgerald et al., 2003; Hemmi et al., 2004)。

六、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)

MAPK 是一類 serine/threonine 蛋白質激酶(kinase)，利用 MAPKKK (MAP3K)→MAPKK (MKK) →MAPK 反應將外界訊號傳遞下去 (Kaminska,

2005)。當細胞遭受外來病原菌入侵或是環境刺激 (如:UV、生長因子) 下會透過 TLR、IL-1 receptor family 或是 TNF- α receptor family 等, 磷酸化 MAP3K, MAP3K 被磷酸化而活化後, 會磷酸化 MKK 上的 threonine 和 serine, 接著活化的 MKK 會辨認 MAPK activation loop 上的 Thr-X-Tyr 序列, 先磷酸化 tyrosin 後再磷酸化 threonine, 在 tyrosin 和 threonine 都被磷酸化之後 MAPK 才會活化(Hale et al., 1999)。接著 MAPK 才會去磷酸化下游的轉錄因子 (transcription factor) 像是: ATF-2、Elk-1、CHOP 等等, 進而影響到細胞生長、分化、分裂與死亡 (Kaminska, 2005; Waas et al., 2001)。到目前為止研究發現 MAPK 主要有六個 subgroups, 分別是 ERK1/2、ERK3/4、ERK5、ERK7/8、c-JNK、p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ (Herlaar and Brown, 1999; Pimienta and Pascual, 2007)。其中許多研究指出 p38 會調控細胞激素 (如:TNF- α 、IL-1 β) 和發炎介質 (inflammatory mediator) (如:COX-2、iNOS 等) 的生成(Baldassare et al., 1999; Coulthard et al., 2009)。



七、p38 MAPK

1993 年 Brewster 等人利用滲透壓缺陷的酵母菌研究發現由 360 個胺基酸組成的 38KD 蛋白質激酶, 因此稱為 p38 (Galcheva-Gargova et al., 1993), 並在隔年由 Han 等人從高滲透壓和內毒素刺激後的小鼠肝臟中分離出來 (Han et al., 1994) 發現 p38 MAPK 有四種不同的異質物 (isoform), 分別是 p38 α 、p38 β 、p38 γ 和 p38 δ , 它們在序列上有 60% 的同源性 (homology), 而在 kinase domain 有大於 90% 的相似性 (Coulthard et al., 2009), 他們在 activation loop 上都有一段保留的 Thr-Gly-Tyr 序列, 雖然在序列上有高度同源性, 這些異質物的分布具有組織特异性 (tissue specificity), p38 α/β 主要分布在像是 CD40⁺ T 細胞、嗜中性白血球細胞、巨噬細胞等免疫細胞上, p38 γ 只在骨骼肌當中表現, 而 p38 δ 在腎臟、腺體 (如:腎上腺、唾腺) 表現 (Hale et al., 1999; Wang et al., 1997)。因為 p38 α/β 主要表現在免疫細胞, 所以當細胞遭受外界刺激時, p38 α/β 是主要被活化的對象, 在細胞內傳遞訊號, 藉由轉錄和轉錄後層次增加細胞激素的表現, 進而促進發炎反應

(Hale et al., 1999; Herlaar and Brown, 1999; Zhang et al., 2007)。

(1) 轉錄層次 (transcriptional level)

活化的 p38 MAPK 會藉由增加轉錄因子的表現，例如:activating transcription factor (ATF-2)、C/EBP homologous protein 1 (GADD153)，或是藉由磷酸化間接調控轉錄因子的活性，例如: NF- κ B (Coulthard et al., 2009)。促進這些轉錄因子結合上細胞激素的啟動子 增加細胞激素 mRNA 的表現。而這些不同的轉錄因子之間也會有協同作用，可使轉錄活性增加，進而更大幅度的增加細胞激素的表現，例如:研究發現，當 THP-1 在 LPS 刺激下會活化 p38 MAPK 活化 p50/p65，p50/p65、Egr-1 和 CRE 結合蛋白質 (CRE binding protein) 會分別結合上 TNF- α 啟動子的 κ B3、egr-1、CRE 結合位產生協同作用增加轉錄活性 (Yao et al., 1997)。

(1) 轉錄後層次 (post-transcriptional level)

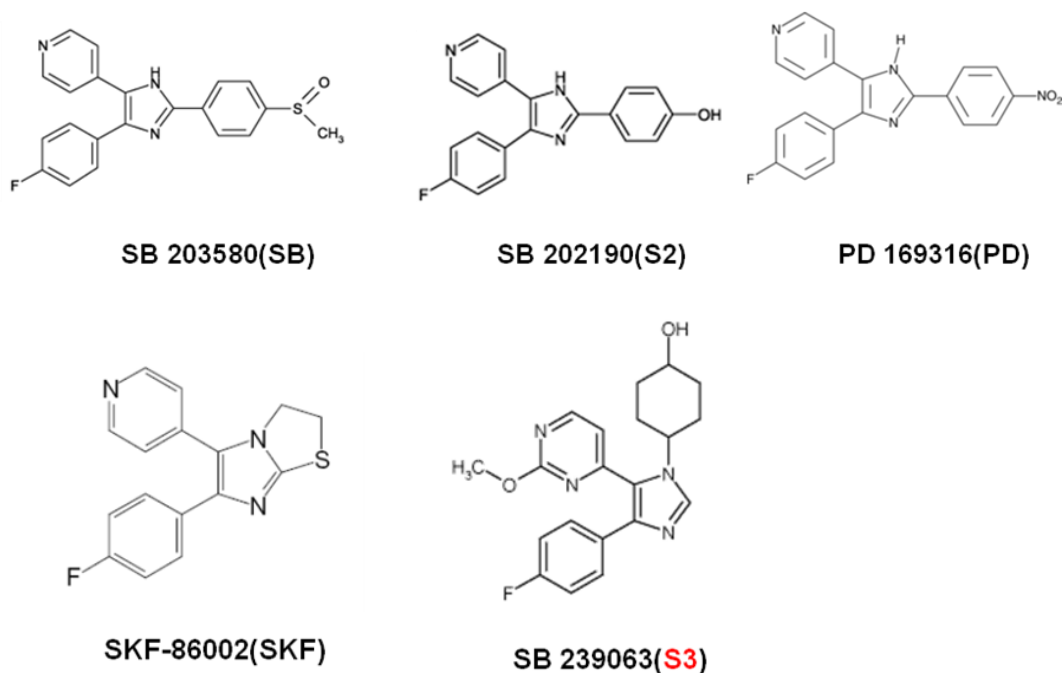
大部分的細胞激素 mRNA 3'UTR 都帶有 ARE，在細胞不受刺激的情況下會使 mRNA 穩定度降低，導致 mRNA 容易被分解。或是結合上不同的 ARE 結合蛋白影響 mRNA 的穩定度，例如: tristetraprolin (TTP) 會藉由它的 Zinc finger domain 結合到 TNF- α 、IL-1 β 、GM-CSF mRNA 的 ARE 上，誘導 exosome 過來促進 mRNA 3'端 deadenylation，導致 3'端 polyA tail 長度變短。當 3 端 polyA 長度變短後，ARE 也會藉由誘導 Dcp1 及 Dcp2 促進 5'端 decapping (Liu and Kiledjian, 2006)，使 mRNA 從兩端開始被分解，其中以 3'端 deadenylation 為主要的機制，進而使 mRNA 分解增加或是抑制轉譯(Anderson, 2010; Chen and Shyu, 2011; Clark et al., 2003)。當給予 LPS 或是細胞激素時 p38 MAPK 會被活化，使這些帶有 ARE 的 mRNA 穩定度增加。Chrestensen 等人研究發現，當 p38 MAPK 活化後會磷酸化 MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAPK-2) 使 MAPKAPK-2 被活化(Chrestensen et al., 2004)。活化的 p38 MAPK 和 MAPKAPK-2 會一起磷酸化 TTP serine178 使得 14-3-3 無法結合上 TTP，造成 TTP 離開 ARE，抑制 TTP 所促進的 deadenylation，進而使 mRNA 變的穩定 (Chrestensen et al., 2004)。Lasa 等人發現活化 p38 MAPK 導致 MAPKAPK-2 活化，進而磷酸化 Heat

shock protein27 (Hsp27)，在 COX-2 mRNA 穩定度扮演部分的角色 (Lasa et al., 2000)，Hsp27 磷酸化會和 AU-rich element/poly (U) binding factor 1 (AUF-1) 形成複合促使 AUF-1 被降解，使得 mRNA 穩定度增加，但是 Hsp27 如何促進 AUF-1 降解目前是未知的 (Knapinska et al., 2011)。另外，p38 MAPK 被活化的時候除了會增加轉錄因子的基因表現之外，也會影響 ARE 結合蛋白在細胞內的分布。Lin 等人指出當給予 LPS 活化 p38 MAPK 後，會促進 HuR 蛋白質由細胞核移動到細胞質 (Lin et al., 2006)。細胞質內 HuR 蛋白質表現增加，會增加 HuR 蛋白質結合上 ARE 的機會，抑制 miRNA 結合到 mRNA 上使得 mRNA 變得穩定，進而增加基因表現 (Lin et al., 2006; Young et al., 2012)。相反的，當 p38 活性被抑制的時候這些帶有 ARE 的細胞激素 mRNA 穩定度就會下降 (Baldassare et al., 1999)。

八、p38 MAPK 抑制劑

因為 p38 MAPK 過度活化引起免疫反應會導致許多與免疫相關的疾病像是風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis, RA)、慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)等慢性發炎疾病，因此過去十年 p38 MAPK 也被認為是抗發炎的一個治療標靶 (Coulthard et al., 2009; Herlaar and Brown, 1999; Saklatvala, 2004)。目前抑制 p38 MAPK 活性的方式主要是藉由抑制 p38 MAPK 與 ATP 結合，使 p38MAPK 不能磷酸化下游受質，進而抑制 p38 MAPK 訊號傳遞路徑。抑制 p38 MAPK 與 ATP 結合的方式有二，第一是藉由競爭的方式減少 ATP 和 p38 MAPK 結合的機會 (Kumar and Blake, 2005; Zhang et al., 2007)，例如 pyridinyl imidazole 化合物-SB20350、SB202190、PD169316、SB239063、SKF86002 等，利用其 pyridine 氮原子與 p38MAPK 的 Met109 形成氫鍵，接著 imidazole 環上的氮原子會和 p38 MAPK 的 Lys53 形成類似氫鍵 (H-bond-like) 的鍵結，剩下的 p-fluorophenyl 環會藉由疏水作用 (hydrophobic interaction) 使抑制劑與 p38 MAPK 的 ATP 結合位緊密結合，造成 ATP 與 p38 MAPK 結合的機率下降

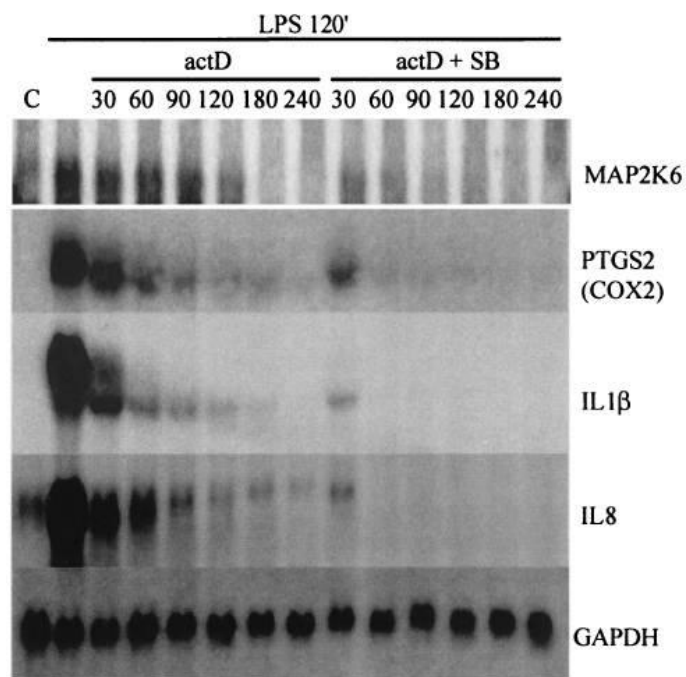
(Saklatvala, 2004; Zhang et al., 2007)，進而抑制 p38 MAPK 的活化。



圖(三):不同 p38 MAPK 抑制劑的結構

第二是藉由異位抑制 (Allosteric inhibition) 如:BIRB-769，藉由和異位結合位 (allosteric binding site) 結合，使 ATP 結合位中 Asp-phe-gly (DGF) motif 構形改變，造成 ATP 無法結合(Pargellis et al., 2002)。

SB203580、SB202190會專一性的抑制p38 α/β (Manthey et al., 1998)，研究指出預先處理SB203580再給予LPS刺激，小鼠巨噬細胞Raw 264.7的IL-1 β 、TNF- α 等mRNA半衰期變短，顯示抑制p38 MAPK活性會使這些細胞激素的mRNA變的不穩定，導致細胞激素表現減少進而減少發炎反應發生 (Baldassare et al., 1999)。(如下圖)



The Journal of Immunology, 1999, 162: 5367–5373.

圖四:預先給予SB203580使cytokine mRNA不穩定

而在動物實驗中同樣也顯示給予SB203580可以抑制由LPS所誘導的血漿(plasma)中TNF- α 以及血清中IL-16 (Badger et al., 1996), 減少關節炎產生, 提高老鼠的存活率。此外, Asaduzzaman等人利用cecal ligation and puncture (CLP) 引起敗血症的小鼠, 當給予不同的p38 MAPK抑制劑SB239063或是SKF86002時可以有有效的抑制p38 MAPK的活化, 並減少肺部嗜中性白血球數以及趨化因子(chemokine) 的表現, 改善由敗血症所引起的肺部浸潤現象, 減少肺部傷害 (Asaduzzaman et al., 2008)。但是在Su等人的動物實驗結果也發現給予*E. coli*感染的小鼠100mg/kg SB203580處理48小時後, 可以抑制p38 MAPK磷酸化, 但是卻會使肺部嗜中性白血球數增加造成肺部浸潤, 亦無法改善老鼠的死亡率 (Su et al., 2010)。因此不同的p38 MAPK抑制劑可能還是有其他除了抑制p38 MAPK活性之外的作用。一些研究也發現SB203580和SB202190會活化人類微血管內皮細胞株(human microvascular endothelial cells)的MLK3, 進而活化JNK (Muniyappa and Das, 2008)。由動物實驗及細胞實驗的結果顯示這些抑制劑可能有off-target的作用, 且原因不清楚, 因此這類藥物很少進展到臨床階段。

第二節 研究動機及目的

一、研究動機

由文獻回顧可知當 p38 MAPK 活性會被 SB203580、SB202190、SB239063、PD169316、SKF86002 抑制，會使細胞激素 (如:IL-1 β 、TNF- α) 轉錄活性被抑制、使帶有 ARE 的 mRNA 半衰期變短，進而抑制細胞激素的表現，但是在本實驗室未發表的實驗結果發現，在小鼠巨噬細胞 Raw 264.7 於 LPS 刺激之下給予 p38 MAPK 抑制劑 SB203580 等，卻是更增加 G-CSF 蛋白以及 mRNA 的表現量。SB203580 對 G-CSF 的影響與對其他帶有 ARE 的細胞激素的作用是不同的。並經由北方點墨法 (Northern blot) 及啟動子活性測試的實驗結果顯示：SB203580 是藉由增加 G-CSF mRNA 的穩定度進而更增加由 LPS 所誘導的 G-CSF 產生，而 SB203580 是如何增加 G-CSF mRNA 的穩定度目前是未知的，因此我們將做更進一步的探討。



二、研究目的

在 G-CSF mRNA 3'UTR 具有 ARE 及 SLDE 兩種序列會影響 G-CSF mRNA 的穩定度，而由文獻回顧可知在 p38 MAPK 活性被抑制的情況下 ARE 會使 mRNA 穩定度降低；因此首先研究 SB203580 是否是透過 G-CSF mRNA 3'UTR 的 SLDE 來增加 G-CSF mRNA 的穩定度，以及是 SLDE 的莖-環結構或是 SLDE 中保留的序列，對於 SB2033580 增加 G-CSF mRNA 穩定度比較重要。此外亦探討不同的 p38 MAPK 抑制劑對於 G-CSFmRNA 穩定度是否有相同的效果。

第二章 材料方法



實驗材料

- 1、Hyclone DMEM/High Glucose、Hyclone RPMI1640 和 Fetal bovine serum (FBS)
(Thermo Scientific)
- 2、L-glutamine、penicillin/streptomycin 和 trypsin (Gibco/Life Technologies)
- 3、SB203580、SB202190、SB239063、SB202474、PD169316 和 SKF86002
(Calbiochem)
- 4、LPS from *Escherichia coli* O111:B4、Actinomycin D、Dimethyl sulfoxide
(DMSO)、Thiazoyl blue tetrazolium bromide (MTT)、Ethidium bromide (EtBr)、
Albumin from bovine serum (BSA)、Ammonium persulfate (APS) 和
 β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)
- 5、Anti-rabbit p38 α MAPK antibody 和 Anti-rabbit phospho-p38 α MAPK
(Thr180/Tyr182) antibody (Cell signaling)
- 6、Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)
- 7、Anti-rabbit phospho-Hsp27 (Ser15) polyclonal antibody (Stressgen)
- 8、primer 由源資或明欣公司合成
- 9、G-CSF ELISA kit (R&D systems)
- 10、限制酶和 T4 DNA polymerase (New England Biolabs)
- 11、DNA polymerase、dNTP mixture、protein/DNA marker、PCR clean up/Gel
extraction kit、plasmid mini kit 和 Easy pure genomic DNA mini kit (Biomax)
- 12、Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Finnzymes)
- 13、murine M-CSF (Pepro Tech)
- 14、2-propanol、ethanol、chloroform、1-butanol 和 glycerol (J.T.Baker)
- 15、Superfect transfection reagent (QIAGEN)
- 16、T4 DNA ligase、p-GL3-basic vector、phRLTK plasmid、Dual-Luciferase reporter
assay system、M-MLV reverse transcriptase、RNase-free DNase 和 pGEM-T easy
vector system (Promega)

- 17、Sodium dodecyl sulfate (SDS)、glacial acetic acid、isoamyl alcohol (IAA)、
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)和 ethylenediaminetetracetic acid
(EDTA) (Merck)
- 18、30% acrylamide/Bis solution 和 DC protein assay Kit (BioRad)
- 19、PVDF membrane (Millipore)

第二節 細胞培養

一、Raw 264.7

將小鼠巨噬細胞 Raw 264.7 培養在含有 7% FBS 的 DMEM/High glucose 培養液中，並置於 37°C、5%二氧化碳培養箱內培養。當細胞長至八到九分滿時進行繼帶培養，以無菌的平板刮刀將細胞刮下並將細胞液至於 15 mL 尖底離心管，以 1000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液倒掉並依據細胞數多寡加入新鮮的培養液，以塑膠滴管沖吸使細胞重新懸浮後，以一分十的比例進行分盤。

二、THP-1

將懸浮性的人類單核球細胞 THP-1 培養在含有 10% FBS、2mM L-Glutamine、100 µg/mL penicillin/streptomycin 的 RPMI1640 培養液中，當細胞長至八到九分滿時進行繼代培養，將細胞倒進離心管中以 1000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液後重新懸浮細胞，接著再以一分十的比例進行分盤，若是要使 THP-1 分化成巨噬細胞時，加入 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 使其最終濃度為 160 nM，並置於 37°C、5%二氧化碳培養箱內培養三天。

三、Bone marrow derived macrophage (BMDM)

(1) L-292 cell conditional medium 置備

將L-292細胞以 5×10^5 cell/ml的密度種在T-150 flask，並加入50 mL含有10% FBS、100 µg/mL penicillin/streptomycin、2 mM L-glutamine和1 mM sodium

pyruvate的DMEM/High glucose培養液，在37°C培養1周後收集細胞培養液，即可得到L-292 cell conditional medium

(2)分離小鼠骨髓細胞

將小鼠犧牲後取其腿骨並將毛皮、肌肉去除乾淨，以針頭吸取含有10% FBS的DMEM/High glucose培養液將骨髓細胞沖出來，在室溫以3500 rpm離心5分鐘並移除上清液，以一比三的比例將L-929 Conditional medium和含有10% FBS的DMEM/High glucose培養液混合，以此培養液將細胞懸浮後種在細菌培養盤，在37°C、5%CO₂細胞培養箱培養1周後，貼附在盤子上的細胞即為由骨髓細胞分化而成的巨噬細胞。分盤時先以不含serum的DMEM/High glucose培養液潤洗細胞一次，接著加入1 mL trypsin在37°C作用1-2分鐘使細胞懸浮，再加入9 mL含有FBS的細胞培養液中止trypsin的作用，離心移除上清液，重懸浮進行細胞計數，最後將算好的細胞加入含有10 ng/mL的M-CSF和10% FBS的DMEM/High glucose培養液於細胞培養箱中培養隔天即可進行實驗。

第三節 細胞毒殺活性測試之檢測

本實驗使用 sigma 的 Thiazoyl blue tetrazolium bromide (MTT)，以滅菌的二次水配成濃度 10 mg/mL 於 4°C 避光保存，作用原理是利用活細胞內粒線體中的琥珀酸去氫酶之作用將 MTT 的 tetrazolium 轉為紫色的 formazan 堆積在細胞中，再利用 DMSO (和光純藥工業) 將紫色結晶溶出並測吸光值，此吸光值大小代表粒線體活性，也代表活細胞數的多寡。當進行細胞毒殺活性檢測時，前一天先將細胞分在 24well，隔天進行不同的處理，接著將培養液移除，並利用不含 FBS 的 DMEM 將 MTT 濃度稀釋至 0.5 mg/mL，避光下每 well 加入 200 µL 的 0.5 mg/mL MTT 並置於 37°C、5%二氧化碳培養箱內培養三小時，接著將上清液移除，每 well 加入 200 µL 的 DMSO 回溶 20 分鐘，將紫色結晶完全溶出後視情況決定稀釋的倍數，將稀釋好的溶液加入透明 ELISA plate，測 O.D540，最佳範圍讀值為 0.2~0.8。

第四節 細胞內 RNA 抽取與基因表現量分析

一、給予 LPS 以及不同 p38 MAPK 抑制劑處理

(1) Raw 264.7

在實驗的前一天經細胞計數後，將細胞分成每六公分細胞培養盤有 1×10^6 個細胞，每盤以總體積為 2.5 mL 含有 10% FBS 的 DMEM/High glucose 培養液培養，並置於 37°C、5% 二氧化碳培養箱內養至隔夜，實驗處理分為：(A) 細胞預先加入 2.5 μ L 濃度 10 mM 的 SB203580、SB202190、SB239063、SB202474、PD169316 及 SKF86002 使其最終濃度為 10 μ M，30 分鐘後加入 2.5 μ L 濃度為 100 ng/ μ L 的 LPS 使其最終濃度為 100 ng/mL，將細胞置於 37°C、5% 二氧化碳培養箱內培養 6 小時後，抽取細胞 RNA。(B) 細胞預先加入 2.5 μ L 濃度 10 mM 的 SB203580、SB202190 及 SB239063 使其最終濃度為 10 μ M，30 分鐘後加入 2.5 μ L 濃度為 100 ng/ μ L 的 LPS 使其最終濃度為 100 ng/mL，將細胞置於 37°C、5% 二氧化碳培養箱內培養 4 小時後，加入 5 μ L 濃度為 2 mg/mL 的 Actinomycin D 使其最終濃度為 4 μ g/mL，每隔 1 小時抽取其 RNA，至 3 小時後停止。

(2) THP-1

在加藥的前三天經細胞計數後，將細胞分成每盤六公分細胞培養盤有 2×10^6 個細胞，並加入 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 使其最終濃度為 160 nM，每盤以總體積為 2.5 mL 含有 10% FBS、2 mM L-Glutamine、100 μ g/mL penicillin/streptomycin 的 RPMI1640 培養液培養，並置於 37°C、5% 二氧化碳培養箱內養至隔夜，各抑制劑及 LPS 的劑量與 Raw 264.7 細胞相同，將細胞置於 37°C、5% 二氧化碳培養箱內培養 4 小時後，抽取細胞 RNA。

二、細胞內 RNA 抽取

預先將細胞分在六公分細胞培養盤，進行加藥處理後，以塑膠滴管將培養液移除，加入 2~3 mL 1X PBS 清洗兩次將殘餘的培養液清洗乾淨，接著加入 1 mL TRIzol reagent (Invitrogen) 並在室溫下置於 shaker 搖 5 分鐘，使細胞可以完全被

打破，將液體移至微量離心管，再加入 200 μ L 的 CIAA (chloroform:IAA = 24:1)，上下翻轉 15 秒使其混合均勻，靜置室溫 5 分鐘使溶液分層，以 12000 rpm 於 4 $^{\circ}$ C 下離心 15 分鐘，離心後溶液分三層，取最上層溶液 500 μ L 置於新的微量離心管，每管加入 0.5 mL isopropanol 上下搖晃混勻，置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱沉澱 1 小時或是隔夜。

三、RNase-free DNase I 處理

避免染色體 DNA 的汙染，所以 RNA 必須先以 RNase-free DNase I 處理。將沉澱在 isopropanol 的 RNA 取出，在 4 $^{\circ}$ C 以 12000 rpm 離心 15 分鐘，去除上清液後在微量離心管底部有白色沉澱物，加入 70% 的酒精清洗沉澱物後，每管加入 17 μ L DEPC-H₂O 於 60 $^{\circ}$ C 回溶 RNA 10 分鐘，再加入 1 μ L 10X DNase buffer、1 μ L DNase，混合均勻後至於 37 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘，接著再加入 80 μ L DEPC-H₂O 將體積補至 100 μ L，加入等體積飽和的 phenol 混合均勻後，於 4 $^{\circ}$ C、12000 rpm 離心 5 分鐘，將下層液移除並加入 100 μ L CIAA 混合均勻，於 4 $^{\circ}$ C、12000 rpm 離心 3 分鐘，吸取於 100 μ L 上層液置於新的微量離心管，加入 10 μ L (十分之一體積) 的 3M NaOAc 和 200 μ L (兩倍體積) 的 100% 酒精，混合均勻後置於 -20 $^{\circ}$ C 1 個小時或是隔夜以沉澱 RNA。在 4 $^{\circ}$ C 以 12000 rpm 離心 15 分鐘，去除上清液後在微量離心管底部有白色沉澱物，加入 70% 的酒精清洗沉澱物，靜置風乾 5 到 10 分鐘，接著依據沉澱物的大小加入 DEPC-H₂O (約 20~50 μ L)，於 60 $^{\circ}$ C 回溶 RNA 10 分鐘，置於冰上或是 -20 $^{\circ}$ C 保存，供後續實驗使用。

四、第一股互補 DNA (cDNA) 之合成

將 DNase 處理後的 RNA，以分光光度計測量其 O.D260/O.D280 的比值及定量 RNA 濃度，取每管 5 μ g RNA 並以 DEPC-H₂O 將體積補至 13 μ L，再加入 1 μ L 的 50 ng/ μ L oligo-dT，放置於循環定溫箱在 70 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘，再加入 4 μ L 的 M-MLV RT 5X buffer、1 μ L M-MLV Reverse transcriptase、1 μ L dNTP mixture，使

最後總體積為 20 μL ，放置於循環定溫箱以 25 $^{\circ}\text{C}$ 作用 10 分鐘，接著以 42 $^{\circ}\text{C}$ 作用 50 分鐘，最後再以 90 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5 分鐘，以上步驟皆完成後，置於冰上 10 分鐘，在加入 1 μL 濃度為 10 mg/mL 的 RNase，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 10 分鐘，在補 79 μL 的滅菌水使 DNA 最終濃度為 50 ng/ μL 。

五、聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

取 200 ng 合成好的互補 DNA 作為模板，依序加入 1 μL 的 10 mM dNTP、5 μL 的 10X Taq DNA polymerase buffer 使其最後濃度為 1X Taq DNA polymerase buffer、1 μL 的 10 μM 一對引子以及 1 μL Taq DNA polymerase，最後在加入滅過菌的二次水將總體積補置 50 μL ，以上溶液混合均勻後放置於循環定溫箱上，PCR 的條件依照不同的基因做調整。

六、洋菜凝膠 (agarose) 製備與電泳分析基因表現

(1) 洋菜凝膠置備

洋菜膠體濃度依照不同的 DNA 大小而有所不同，大部分在 1-2% 之間。秤取適量洋菜粉 (Biomann)，加入 1X TAE Running buffer (40 mM Tris-base, 0.114% glacial acetic acid, 1mM EDTA)，以微波爐加熱使洋菜粉溶解，待其冷卻後，每 100 mL 的 TAE 加入 1 μL 的 10 mg/mL EtBr，混合均勻後倒入注膠槽並插入齒梳(comb)，等到完全凝固後使用。

(2) 電泳分析

將凝固的洋菜膠體置於水平式電泳槽內，加入 1X TAE running buffer 使其淹沒膠體，另外，將 PCR 產物，與 6X loading dye (0.25% bromophenol blue, 30% glycerol) 以五比一的比例混合均勻後，加入洋菜膠體的溝槽內，以 120 伏特的電壓進行電泳 15 分鐘，置於紫外燈箱中觀察各組基因表現。

七、定量聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative-Polymerase Chain Reaction, Q-PCR)

以 ABI primer express 2.0 軟體設計引子，引子設計條件為： $T_m: 60 \pm 5^\circ\text{C}$ 、引子長度: 18-24bp、PCR 產物大小: 75-200bp，以定量聚合酶連鎖反應儀器 (ABI-7300) 進行，分別在八連排的微量離心管加入 5 μL 濃度為 50 ng/ μL 的 cDNA、一對引子，引子最終濃度為 400 nM、10 μL 的 SYBR Green (Abgene)，並以滅過菌的二次水將體積補至 20 μL 。進行即時定量聚合酶連鎖反應，反應設定條件如下：首先以 50°C 反應 2 分鐘，在以 95°C 反應 10 分鐘使雙股分開，再以 (1) 95°C 反應 15 秒 (2) 60°C 反應 1 分鐘使引子黏合 DNA 進行擴增，以上 (1)(2) 反應進行 40 個循環。以 Excel 將即時定量 PCR 得到不同時間的相對 G-CSF mRNA 做散布圖，可以得到回歸趨線及公式。

第五節 蛋白質表現量分析

一、培養液中 G-CSF 蛋白質濃度分析：酵素連結免疫吸附法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

使用 Mouse G-CSF Quantikine ELISA Kit (R&D systems) 分析 G-CSF 蛋白質濃度，在給予藥物處理前一天將細胞以每 well 有 1×10^5 個細胞數分至 24well，細胞給予 LPS 以及不同 p38 MAPK 抑制劑處理方式如前所述，將細胞置於 37°C 、5% 二氧化碳培養箱內培養 6 小時後收集 0.2 mL 細胞培養液，將細胞培養液與 kit 所附的標準品以 Calibrator Diluent RD5-16 稀釋，接著取出 kit 所附的接有 G-CSF 抗體的樣品槽，依序加入 50 μL Assay Diluent RD54-1、50 μL 稀釋好的樣品或是標準品，輕拍樣品槽邊緣使之混合均勻，貼上封口膜於室溫下靜置 2 個小時使 G-CSF 蛋白與抗體反應。以滅過菌的二次水將 wash buffer 稀釋至 1 倍，移除樣品槽內液體，加入 400 μL 的 wash buffer 將殘餘的液體移除，移除 wash buffer，此步驟重複 5 次確保殘餘的液體已清除乾淨，接著加入 100 μL mouse G-CSF Conjugate (內含 4.5 μL Conjugate Concentrate 及 99 μL Conjugate Dilute)，貼上封口膜，於室溫下靜置 2 個小時。同樣以 wash buffer 清洗五次，並在清洗最後一

次時，先避光配製 Color reagent A 和 Color reagent B 以 1:1 比例混合的 Substrate Solution，並在清洗完成後加入 100 μ L Substrate Solution，同樣避光反應 30 分鐘，接著再加入 100 μ L Stop Solution 輕拍樣品槽邊緣使之混合均勻，於 30 分鐘之內以酵素連結免疫吸附分析儀測波長 O.D540nm，最後將實驗得到的數值帶入標準曲線換算出 G-CSF 蛋白質的濃度。

二、細胞內蛋白質表現分析:西方點墨法 (Western Blot)

(1) 抽取細胞內蛋白質

前一天預先將細胞分在六公分細胞培養盤，細胞數和給予 LPS 以及不同 p38 MAPK 抑制劑處理劑量如所述，將細胞置於 37°C、5%二氧化碳培養箱內培養 30 分鐘後，移除培養液，以 4°C 的 PBS 清洗兩次將殘餘的培養液清除乾淨，每盤加入 100 μ L 的 lysis buffer (10 mM Tris, pH7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Triton-X100, 10% glycerol, 2mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 1X proteinase inhibitor cocktail)，於冰上以平板刮刀將細胞刮下，將刮下來的細胞移至微量離心管中，置於冰上靜置 20 到 30 分鐘使細胞可以被完全的打破，接著在 4°C 以 12000 rpm 離心 15 分鐘，將上清液取出至新的微量離心管置於冰上備用或是冰在 -20°C。

(2) 定量蛋白質濃度

本實驗使用 Dc Protein Assay Kit (Bio-rad) 定量蛋白質濃度，視細胞數多寡來決定稀釋倍數， 1×10^6 個細胞約稀釋十倍，並以 BSA 標準品做出標準曲線，將 BSA 依序稀釋為濃度 1.4 μ g/ μ L、0.7 μ g/ μ L、0.35 μ g/ μ L、0.175 μ g/ μ L、0 μ g/ μ L，並以滅過菌的二次水將體積補至 20 μ L，將樣品混合均勻後，依序加入 100 μ L reagent A (每 1mL reagentA 含有 20 μ L 的 reagent S)、800 μ L reagent B，混合均勻後，室溫下靜置 15 分鐘，以波長 755 nm 測吸光值，接著再帶

標準曲線換算得到蛋白質濃度。

(3) 樣品前處理

取出 40 μg 定量好的蛋白質至新的微量離心管，接著加入適量體積 5X SDS gel loading buffer (250 mM Tris-Cl, pH6.8, 10% SDS, 0.1% Bromophenol blue, 50% glycerol, 10% β -Mercaptoethanol) 使最終濃度為 1X SDS gel loading buffer，以滅過菌的二次水將每管補至相同體積，混合均勻，以 100°C 加熱 10 分鐘使蛋白質變性，加熱後置於冰上備用。

(4) SDS-PAGE 膠體配置

將 Hofer Mighty Small Mini-Vertical unit 鑄膠模組組合，並加入 70%酒精測漏以檢查模組是否緊密貼合。SDS-PAGE 膠體分上層聚焦膠體和下層分離膠體，配法如下：

(a) 下層膠：

10%的分離膠體，含有 5 mL 30% acrylamide mix、3.8 mL 1.5 M Tris buffer, pH 8.8、0.15 mL 10% SDS、0.015 mL 10% ammonium persulfate (APS)、0.006 mL TEMED，最後再補滅過菌的二次水至總體積為 15 mL。

(b) 上層聚焦膠體：

含有 1 mL 30% acrylamide mix、0.75 mL 1.5 M Tris buffer, pH 6.8、0.06 mL 10%SDS、0.06 mL 10% ammonium persulfate (APS)、0.006 mL TEMED，最後再補滅過菌的二次水至總體積為 6 mL。

先製作下層膠體，要鑄膠的時候再加入 TEMED 和 APS，混合均勻後加入鑄膠器，一片 SDS-PAGE gel 下層膠約 7.2 mL，接著再加入 70%酒精將膠體壓平，室溫靜置三十分鐘使膠體凝固後，移除酒精。接著加入上層膠體，一片 SDS-PAGE gel 上層膠約 2 mL，接著插入齒梳，室溫靜置 30 分鐘使膠體凝後可使用。

(5) SDS-PAGE 電泳

將凝固好的 SDS-PAGE 架在電泳槽內，兩片膠需要 250 mL 的 1X running

buffer (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 0.1%SDS)，每一個 well 加入 20 μ g 變性好的蛋白質，以 50-60 伏特的電壓進行電泳 30 分鐘，使樣品於聚焦膠體中聚集堆疊，等到樣品進入分離膠體後，將電壓調高至 110 伏特進行電泳約 2 小時。

(6) 半濕式蛋白質電泳轉漬

本實驗利用 Hoefer TE70 Semiphor Transpor 轉印槽進行。電泳結束後，移除上層聚焦膠體並將膠體泡在 1X transfer buffer (48 mM Tris-base, 39 mM Glycine, 0.037% SDS, 20% methanol)，同時準備與膠體大小相同的濾紙(一片膠體需要六張濾紙) 與 PVDF 膜，將 PVDF 膜泡在甲醇中 1 分鐘，使濾紙表面基團活化，接著將 PVDF membrane 和濾紙以 1X transfer buffer 濕潤。轉印前先以 1X transfer buffer 濕潤電極板，由下至上依照三張濾紙、一張 PVDF 膜、三張濾紙的順序堆疊，堆疊完成後以 15 mL 尖底離心管滾平，避免氣泡的產生，蓋上電極板，依照面積大小設定電流，每平方公分 1mA 的電流進行轉印，轉印的時間依據蛋白質大小決定。

(7) 免疫染色

將轉漬完成後，將 PVDF 膜浸泡在 blocking buffer (5%脫脂奶粉於 1x TBST buffer (140 mM NaCl, 10mM Tris base, 0.1% Tween20))，至於震盪器室溫搖晃 1 小時。接著移除 blocking buffer，以 1X TBST buffer 在室溫下搖晃清洗 PVDF 膜，每 10 分鐘換一次新的 TBST buffer，總共三次，清洗完後加入以 blocking buffer 或是 5%脫脂牛奶以一千倍稀釋的一級抗體，置於 4°C 搖晃 16 小時或是室溫搖晃 1 小時，回收一級抗體，以 1X TBST buffer 在室溫下搖晃清洗 PVDF 膜，每 10 分鐘換一次新的 TBST buffer，總共 3 次。接著，再加入以 5% blocking buffer 稀釋兩千倍的二級抗體，置於室溫下搖晃 1 小時，回收抗體，以 1X TBST buffer 在室溫下搖晃清洗 PVDF 膜，每 10 分鐘總共三次。清洗完後即可進行壓片呈色。

(8) 顯像

將 Enhanced-Chemiluminescence (ECL, PerkinElmer) 內的 Enhanced Luminol Reagent 及 Oxidizing Reagent 以一比一的比例混合均勻，將 PVDF 膜置於投影片上，混和好的 ECL 試劑均勻覆蓋在 PVDF 膜上反應 1 分鐘，以拭鏡紙將多餘的試劑擦掉，將第二張投影片蓋上並將氣泡壓除後，使用富士 UVP 成像系統拍照記錄蛋白表現

第六節 質體的建構

一、insert 及載體 (vector) 的製備

(1) 建構 mouse GAPDH 啟動子 (promoter) 質體:

mouse GAPDH promoter -574 到+26 接於 pGL-3 basic 質體上，在此以 GAPDHp (-574/+26) -Luc 表示。建構方法如下:

(a) 抽取基因體 DNA (genomic DNA)

使用 Easy Pure Genomic DNA mini Kit (Bioman) 抽取 Raw264.7 細胞株的基因體 DNA，將 Raw264.7 細胞種在十公分的細胞培養盤當中養至九分滿，將細胞培養液移除，以冰的 1X PBS 潤洗細胞一次將殘餘的細胞培養液移除乾淨，加入 1 mL 1X PBS 並以細胞刮勺將細胞刮下來，移置新的 1.5 mL 微量離心管當中，在室溫下以 3500 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液至剩下 10-50 μ L，加入 600 μ L 的 Cell Lysis Solution (kit 內附)，以 pipette 將細胞 pellet 打散，再加入 3 μ L RNase Solution 上下翻轉 25 次，於 37°C 作用 30 分鐘後在靜置室溫冷卻 5 分鐘，接著再加入 200 μ L Protein Precipitation Solution (kit 內附)強烈震盪 20 秒，於室溫 12000 rpm 離心 5 分鐘，接著將上清液移至新的 1.5 mL 微量離心管當中，並加入 600 μ L 室溫的 isopropanol，上下翻轉混合均勻，此時可見絲狀基因體 DNA，室溫 12000 rpm 離心 2 分鐘，以 70%酒精潤洗 pellete，室溫 12000 rpm 離心 2 分鐘，移除酒精並風乾，依照 pellete 大小決定加入的滅菌二次水量多寡，

於室溫回溶至隔夜或是 65°C 回溶 1 小時，最後冰在 4°C 冰箱備用。

(b) 以 PCR 放大所要的 GAPDH 啟動子片段

取 200 ng 基因體 DNA 當作 PCR 的模板，並依序加入依序加入 1 μ L 的 10 mM dNTP、1 μ L 的 10 μ M 一對引子 (序列詳見附錄)，最後再補滅菌二次水至體積 25 μ L，置於循環定溫箱上加熱至 98°C，再加入 25 μ L 2X Phusion Flash master mix (Finnzyme)，最後反應體積為 50 μ L，PCR 條件為:pre-denature 98°C 5 分鐘，denature 98°C 40 秒、annealing 57°C 30 秒、extension 72°C 45 秒，以上三個溫度重複 30 個循環，最後 72°C 反應 7 分鐘，PCR 產物大小為 600bp。

(C) PCR 產物純化

利用 PCR Clean up/Gel extraction Kit (Biomax)將 PCR 產物純化出來，取五倍樣品體積的 PG buffer (kit 內附)，混合均勻後移到 spin column 在室溫下 12000 rpm 離心 30 秒，將收集管內液體移除，加入 400 μ L Wash Buffer 到 spin column，室溫下 12000 rpm 離心 30 秒，將收集管內液體移除，室溫下 12000 rpm 離心 2 分鐘使殘餘在 spin column 內的 Wash buffer 完全離心下來，以新的 1.5 mL 微量離心管取代收集管，加入 20-50 μ L 滅菌二次水至 spin column 中，室溫下 12000 rpm 離心 2 分鐘後，微量離心管內為純化好的 PCR 產物。

(D)限制酶 (restriction enzyme) 切割

取出適量純化的 PCR 產物及 pGL3-basic 載體，加入 1 μ L 的 KpnI 和 Bgl II、1.5 μ L 10X NEB buffer 使其最終濃度為 1X、視情況決定是否加入 1.5 μ L 10X BSA 使其最終濃度也是 1X，最後以滅菌二次水將總體積補至 15 μ L，於 37°C 反應 1 到 2 小時。pGL-3 basic 載體 (vector) 也經過相同的限制酶切割步驟。

最後再以 PCR Clean up/Gel extraction Kit (Biomax)將限制酶切割過後的樣品及載體進行純化。

(2) 建構 GAPDHp (-81/+26) -Luc 質體 (Basic 質體):

利用一對引子 (詳見附錄) 以 PCR 的方式跳過-574 到-82 這一段序列，PCR 條件為 pre-denature 98°C 1 分鐘，denature 98°C 40 秒、annealing 55°C 1 分鐘、extension 72°C 3 分鐘，以上三個溫度重複 30 個循環，最後 72°C 反應 7 分即可得帶有-81 到+26 GAPDH promoter 的質體，以 DpnI 進行限制酶切割將帶有甲基的載體切除即可進行轉型 (transformation)，限制酶反應條件為 37°C 作用 20 分鐘。

(3) 建構 GAPDHp (-81/+26) Luc-3'UTR (+691/+1363) 質體 (3'UTR 質體):

將蔡雯茹學姐建構的 pGL3-Luc-3'UTR 質體和 GAPDHp (-81/+26)-Luc 以 Kpn I 和 Bgl II 進行限制酶切割，以切膠回收 pGL3-Luc-3'UTR 做為載體和 107bp GAPDH promoter (-81/+26) 做為 insert，再以 PCR Clean up/Gel extraction Kit (Bioman) 純化切膠回收的 insert 及載體，即可進行 ligation。

(4) 建構 GAPDHp(-81/+26)-Luc-3'UTR SLDE mutant 1 質體: G-CSF mRNA 的 TTTAATATTTA (+1052/+1062) 改變為 TGTCATCTGTC。

(a) Insert :

以兩對引子(第一對 : mG-CSF 3' UTR_F、3'R3，第二對 : mG-CSF 3' UTR_R、3'F3) (序列詳見附錄)，GAPDHp- (-81/+26) -Luc-3'UTR (+691/+1363)質體為模板以有 proofreading 功能的 Phusion Flash master mix (Finnzyme)進行 PCR 放大，PCR 條件如下:pre-denature 98°C 1 分鐘，denature 98°C 1 秒、annealing 55°C 5 秒、extension 72°C 15 秒，以上三個溫度重複 30 個循環，最後 72°C 反應 7 分鐘，將得到的兩個 PCR 產物純化後以 20 μ L 滅菌二次水回溶之後各取 10 μ L，接著在加入有 proofreading 功能的 Phusion Flash master mix (Finnzyme)，以 pre-denature 98°C 1 分鐘，denature 98°C 1 秒、annealing 37°C 5 秒、extension 72°C 15 秒，以上三個溫度重複 30 個循環，最後 72°C 反應 7 分鐘，使兩個 PCR 產物黏合成帶有突變序列的 3'UTR。

(b) Vector :補成 Blund end

將 GAPDHp (-81/+26)-Luc 質體以 XbaI 進行限制酶切割，之後再以 T4 DNA polymerase (NEB) 處理變成 blund end。取 500 ng 載體、1μL 1mM dNTP、1.5 μL 10X NEB buffer2 使其最終濃度為 1X、1.5 μL 10X BSA 使其最終濃度也是 1X，最後以滅菌二次水將總體積補至 14 μL 並置於循環定溫箱上，於 12°C 時加入 1 μL T4 DNA polymerase 反應 15 分鐘。在以 PCR Clean up/Gel extraction Kit (Bioman)純化可得到 blund end 載體，就可以進行 ligation。

(5) 建構 GAPDHp(-81/+26)-Luc-3'UTR SLDE mutant 2 質體: G-CSF mRNA 的 TTTAATATTTA (+1052/+1062) 突變為 TCGACTATTTA。

(a) insert :

詳如 GAPDHp(-81/+26)-Luc-3'UTR SLDE mutant 1 質體 insert 的建構，使用的引子詳如附件。

(b)載體:

將 GAPDHp(-81/+26)-Luc-3'UTR (+691/+1363) 質體以 XbaI 進行限制酶切割，之後再以 T4 DNA polymerase (NEB) 處理變成 blund end。再以 PCR Clean up/Gel extraction Kit (Bioman) 純化即可與 insert 進行 ligation。

(6) 建構 GAPDHp (-81/+26) -Luc-3'UTR SLDE mutant 3 質體:

G-CSF mRNA 的 TTTAATATTTA (+1052/+1062) 突變為 TATATATTAT。
Insert 與載體建構方法詳如 GAPDHp(-81/+26)-Luc-3'UTR SLDE mutant 2 質體的建構，PCR 所用的引子詳如附件。

二、Ligation

將純化的 insert 和載體以五比一的比例進行 ligation，並加入 5 X T4 ligase buffer (最後濃度要稀釋成 1X)、1 μL T4 DNA ligase (Promega)，在以滅菌水補體積，配置完成後在 16°C 反應 16 小時。

三、轉型作用 (transformation)

由-80°C取出 DH5 α 勝任細胞 (competent cell)置於冰上待其溶解，分裝成每管 25 μ L，取 3 μ L Ligation 產物加入菌液當中，輕拍管壁使菌液與 DNA 混合均勻，置於冰上 30 分鐘後，置於 42°C 水浴槽中 1 分鐘使質體 DNA 可以進入菌體當中，接著將菌液置於冰上兩分鐘使細胞膜冷縮，加入 25 μ L 2X LB (40 克 LB Broth Lennox 粉末加入 1L 的二次水並滅菌) 於 37°C 搖晃培養 30 分鐘，將菌液以無菌玻棒過火後塗抹於含有 1 mg/mL ampicilin 的 LB plate (100 mL 滅菌 LB 加入 1.5 g agar，微波使 agar 溶解，以水將 agar 冷卻至手可摸的溫度後加入 200 μ L 的 50 mg/mL ampicillin 使最後濃度為 1 mg/mL)，將 plate 倒置於 37°C 培養箱培養 12 到 16 小時。

四、小量質體抽取

無菌牙籤將菌落挑出接種於 3mL 含有 Ampicillin 的 LB，在 37°C 培養箱中震盪培養 12-16 小時，以 Plasmid Mini Kit (Bioman)進行小量抽取，取 1mL 菌液倒 1.5 mL 微量離心管中，室溫下以 12000 rpm 離心 1 分鐘，移除上清液，加入 200 μ L Kit 內附的 S1 Buffer (添加 Rnase) 並以 pipette 重複吸吐將菌塊打散，加入 200 μ L Kit 內附的 S2 Buffer 後上下翻轉 10 次使溶液混合均勻，此時溶液會變為澄清狀，再加入 300 μ L S3 Buffer 後上下翻轉 10 次使溶液混合均勻，此時會有白色沉澱物出現，室溫下以 12000 rpm 離心 3 分鐘。將 Spin column 與收集管組合，取出上清液到 Spin column 並在室溫下以 12000 rpm 離心 30 秒，倒掉收集管內溶液，加入 400 μ L W1 buffer 並在室溫下以 12000 rpm 離心 30 秒倒掉收集管內溶液，加入 600 μ L Wash buffer 並在室溫下以 12000 rpm 離心 30 秒倒掉收集管內溶液，接著在室溫下以 12000 rpm 離心 2 分鐘使殘留的 Wash buffer 完全移除乾淨。以新的 1.5 mL 微量離心管取代收集管，加入 20-40 μ L 滅菌二次水倒 Spin column，室溫靜置 2 分鐘，在室溫下以 12000 rpm 離心 2 分鐘，微量離心管中收集到的就是質體 DNA。

五、篩選菌落

(1)以 PCR 篩選具有 insert 的菌落：

以無菌牙籤將菌落挑出接種於 0.6 mL 含有 Ampicillin 的 LB，在 37°C 培養箱中震盪培養 6 小時，接著取出 4 μ L 菌液做為模板進行 PCR，將 PCR 產物利用洋菜凝膠分析是否有 insert。

(2)限制酶切割篩選具有 insert 的菌落

以無菌牙籤將菌落接於 3 mL 含有 Ampicillin 的 LB，在 37°C 培養箱中震盪培養 12-16 小時，以 Plasmid Mini Kit (Biomax) 進行小量抽取。取 500 ng 質體 DNA 以限制酶切割，將限制酶切割後的產物利用洋菜凝膠分析是否有 insert。

六、大量質體抽取

確認菌株當中帶有所建構的正確序列的質體之後，以 3 mL 含有 Ampicillin 的 LB 在 37°C 培養箱中震盪培養 12-16 小時，隔日將 3 mL 的菌液全部倒進 250 mL 含有 Ampicillin 的 LB 在 37°C 培養箱中震盪培養 12-16 小時。將菌液移至 250 mL 離心管並兩兩平衡後，在 4°C 下以 4500 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液，加入 10 mL solution I (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH8.0, 4°C 保存) 以塑膠滴管挑起一部分菌塊平均塗抹在離心管管壁上，再以 solution I 將菌塊沖下，重複此動作使菌塊均勻的沖散，接著再加入 20 mL solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS, 室溫保存)，輕輕搖晃使溶液混合均勻後在冰上靜置 10 分鐘，此時溶液會變成澄清狀，接著再加入 15 mL solution III (3M potassium acetate, 5M glacial acid, 4°C 保存)，輕輕搖晃使溶液混合均勻後在冰上靜置 10 分鐘，此時溶液當中會有白色沉澱出現，在 4°C 以 4000rpm 離心 15 分鐘。利用滅菌紗布將上清液過濾至 250 mL 的錐形瓶中，以 50 mL 尖底離心管定量過濾完的體積，再倒回 250 mL 錐形瓶，加入 0.6 倍體積冰的 isopropanol 至錐形瓶中搖晃混合均勻，靜置冰上 10 分鐘。在 4°C 以 4000 rpm 離心 15 分鐘，移除上清液，接著再以 70% 酒精潤洗 pellet，將離心管倒置 10 分鐘使其風乾，加入 4 mL TE buffer (H8.0) 強烈震盪回溶

DNA，以 pippete 定量體積，每 1 mL 體積加入 1.1 克 CsCl，在定量一次體積，每 1 mL 加入 0.08 mL 10 mg/mL 的 EtBr，在室溫以 4000 rpm 離心 20 分鐘。以 5 mL 的針筒取上清液至超高速離心管內，過程中盡量避免氣泡產生，平衡後封管，在 20°C 下以 65000 rpm 離心 16 小時。因為密度不同離心後會質體 DNA 會聚集成 band，針頭刺進離心管最上端釋壓，以 18g 的針頭接上 5 mL 針筒將質體 DNA 抽取出來並記錄體積。接著以飽和過的 butanol (與水以一比一的比例飽和) 加到質體 DNA，搖晃混合後 EtBr 會溶進上層的 butanol 內，靜置使其分層後吸去上層，此步驟重複六到七次將質體 DNA 當中的 EtBr 完全移除。將下層水取出到新的 15 mL 離心管中，補滅菌二次水到先前記錄體積的 3 倍，接著再加入 2 倍體積的 100%酒精，混合均勻並靜置於冰上 10 分鐘。4°C 以 4000 rpm 離心 15 分鐘，移除上清液，接著再加入 3 mL 的 70%酒精潤洗 pellete，4°C 以 4000 rpm 離心 5 分鐘，倒置使其風乾後加入滅菌二次水回溶質體 DNA，冰在 -20°C 備用。

第七節 螢火蟲冷光酶活性分析 (luciferase activity assay)

一、沉澱質體 DNA (plasmid DNA)

將 luciferase reporter 質體與 pRL-TK 質體以一比一的重量比例混合，並以滅菌的二次水將總體積補至 150 μ L，再加入兩倍體積的 100%酒精和十分之一體積的 3M NaOAc，混合均勻並置於 -20°C 沉澱三小時，之後在 4°C 以 12000 rpm 離心 15 分鐘，接著於無菌操作台中移除上清液後，以 70%酒精潤洗沉澱的 DNA 將多餘的鹽類帶走，於無菌操作台內靜置五分鐘使殘餘的酒精蒸發，最後再加入滅菌的二次水回溶 DNA 使 DNA 最終濃度為 1 μ g/ μ L，並置於 -20°C 冰箱備用。在此以 pRL-TK 質體當作螢火蟲冷光活性分析時的 internal control。

二、暫時性轉染 (transient transfection) Raw264.7

在轉染前一天將細胞以每個 well 當中有 1×10^5 個細胞分至 24 well。每個 well 轉染 1 μ g 沉澱好的質體 DNA，於 1.5 mL 微量離心管當中加入 1 μ g DNA 和 50 μ L

不含有血清的 High glucose DMEM 培養液混合均勻，接著在加入 5 μ L Superfect transfection reagent (QIAGEN)，混合均勻並於室溫靜置十分鐘，同時每個 well 以 0.5 mL 不含有血清的 High glucose DMEM 培養液潤洗一次，以將含有血清的殘餘培養液洗去後，每 well 中加入 200 μ L 不含有血清的 High glucose DMEM 培養液，接著每 well 加入 55 μ L 與 Superfect transfection reagent 混合好的 DNA，將細胞置於 37°C、5%二氧化碳培養箱內培養兩小時後，移除培養液並以不含血清的培養液潤洗細胞，最後再加入含有 7%血清的 High glucose DMEM 培養液，細胞培養箱培養四小時後加入抑制劑及 LPS 處理，加藥方式為：先將 1 μ L 10 mM 的 p38MAPK 抑制劑與 0.5 mL 含有血清的 High glucose DMEM 培養液於離心管混合均勻後，加入 well 當中，使 p38 抑制劑最終濃度為 10 μ M，30 分鐘之後在加入 1 μ L 的 100 ng/ μ L LPS，使其最終濃度為 100 ng/mL，於細胞培養箱中培養二十四小時後測螢火蟲冷光活性。

三、偵測螢火蟲冷光活性

其原理主要是利用冷光酶可以將 luciferin 激發產生冷光，利用冷光儀所測得的冷光強度可推知螢火蟲冷光酶基因表現的改變。本實驗使用 Dual- Luciferase Reporter assay system kit (Promega) 進行分析，將培養液移除，以冰的 PBS 潤洗細胞一次，接著將 kit 內附的 5X passive lysis buffer (PLB) 以滅菌的二次水稀釋成 1X PLB，每 well 加入 100 μ L 1X PLB，置於室溫下搖晃 20 分鐘，此時會有白色懸浮物出現，以 pipette 將白色懸浮物打散至看不見並移至 1.5 mL 微量離心管中，在 4°C 以 12000 rpm 離心十五分鐘，取上清液至新的 1.5 mL 微量離心管，接著在取出 20 μ L 到 96 孔螢光分析盤，先加入 100 μ L Luciferase Assay Reagent，於冷光儀測完螢火蟲螢光酶的螢光強度後，在加入 100 μ L Stop & Glo Reagent 測定水母冷光酶 (Renilla luciferase) 的螢光強度。將測得的螢火蟲螢光酶活性除以水母冷光酶活性，校正轉染效率，可得到相對的螢光酶活性。將不同處理的組別除以 DMSO 對照組的相對螢光酶活性，可以得到不同抑制劑誘導的相對螢光酶

活性倍數。

第八節 資料統計分析

以 Student's *t*-test 計算各實驗組間的差異性，當 $p < 0.05$ 時，表示各實驗組間具有顯著差異。





第三章 實驗結果

第一節 探討 SB203580 增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度是否是透過 G-CSF mRNA 3'UTR

首先，為了驗證學姐的結果確認 SB203580 是否可以增加 LPS 所誘導的 G-CSF mRNA 穩定度，所以預先給予 DMSO (對照組) 或是 SB203580 處理 30 分鐘後再加入 100 ng/mL 的 LPS 誘導 G-CSF 的表現，再給予 actinomycin D 抑制轉錄，之後在不同時間點測量 G-CSF mRNA 來看 mRNA 的降解。由 Fig. 1 的結果可以看到在預先處理 SB203580 再加入 LPS 的情況下 G-CSF mRNA 降解的速度比只單獨處理 LPS 的時候慢，並利用回歸式: $y = -27.655X + 125.78$ 計算可知，當 Actinomycin D 處理 2.7 小時後，在單獨處理 LPS 的組別 G-CSF mRNA 減少到剩下 0 小時的 50%；而預先處理 SB203580 在加入 LPS 的組別，G-CSF mRNA 還剩下 0 小時的 70%，顯示在 SB203580 存在下 G-CSF mRNA 比較穩定的，與學姐的結果相符。接下來我們想要探討 SB203580 增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度是否是與 G-CSF mRNA 3'UTR 有關。因此我們將小鼠 GAPDH 啟動子-574 到+26 接於 pGL-3 basic 質體上，由 luciferase 活性分析結果發現接入此段啟動子與不含 GAPDH 啟動子的時候相比，不給予任何處理時會增加約 400 倍 luciferase 活性，給予 LPS 後啟動子轉錄活性比不做處理時增加 2 倍，預先給予 SB203580 再加入 LPS 與只處理 LPS 的時候相比會抑制一半的轉錄活性，由以上結果顯示此段啟動子活性會受到 LPS 及 SB203580 的影響，以及啟動子本身的轉錄活性太強 (data not shown)。為了避免啟動子活性受到藥物影響及轉錄活性過高，導致我們要探討的 3'UTR 對 mRNA 穩定度的影響不明顯，所以我們將小鼠 GAPDH 啟動子序列縮短至-81 到+26，並同樣接入 pGL3-basic 載體，建構出 basic 質體(Fig. 2A) 並轉染進小鼠巨噬細胞 Raw264.7 內，測試小鼠 GAPDH 啟動子活性是否會受到 LPS 及 SB203580 的影響。由 luciferase 活性分析的結果顯示 (Fig. 2B)，與 DMSO 對照組相比單獨給予 SB203580 的相對 luciferase 活性沒有明顯差異，而給予 LPS 則是比 DMSO 對照組增加了約 2 倍的相對 luciferase 活性，由以上的實驗結果可知這一段啟動子序列不會受到 SB203580 的影響，但會被 LPS 誘導增加

2 倍相對的 luciferase 活性。確定了啟動子活性不會受到 SB203580 的影響後，我們將全長的小鼠 G-CSF mRNA 3'UTR 接近先前建構的 basic 質體內，建構出 3'UTR 質體 (Fig. 3A)。將 basic 質體和 3'UTR 質體分別轉染進小鼠巨噬細胞 Raw264.7 細胞內然後測 luciferase 的活性，間接評估 G-CSF 3'UTR 對 luciferase mRNA 穩定度的影響。實驗結果顯示，在不做任何處理時轉染進 3'UTR 質體的 luciferase 活性比轉染進 basic 質體的時候減少約 90% (Fig. 3B)。為了確認接入的 G-CSF 3'UTR 也會使 luciferase mRNA 減少，所以我們測量 luciferase mRNA 表現，由實驗結果顯示，轉染進 3'UTR 質體的 luciferase mRNA 比轉染進 basic 質體的時候減少約 60% (Fig. 3C)。顯示在細胞不受任何刺激的情況下，接入的 G-CSF 3'UTR 會使 luciferase mRNA 穩定度下降，使 luciferase mRNA 表現減少，造成 luciferase 蛋白質表現減少，進而使 luciferase 活性減少。接著我們將 3'UTR 質體轉染進 Raw264.7 細胞內並給予 LPS 處理，與 DMSO 對照組相比給予 LPS 會增加約 6-7 倍 luciferase 活性，顯示 LPS 會透過 G-CSF mRNA 3'UTR 提升 mRNA 穩定度。而預先處理 SB203580 再加入 LPS 與只處理 LPS 相比，會再更增加約 2-3 倍 luciferase 活性 (Fig. 4A)。令人意外的是我們發現只單獨給予 SB203580 的時候也可以增加約 2 倍的 luciferase 活性 (Fig. 4A)，並更進一步的測量 luciferase mRNA 也發現，與 DMSO 對照組相比單獨給予 SB203580 的時候 luciferase mRNA 表現量會增加約 1 倍 (Fig. 4B)。因此由以上結果顯示 SB203580 會透過 G-CSF 3'UTR 更增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現量；而在不給予 LPS 的時候，SB203580 還是會透過 G-CSF 3'UTR 增加 G-CSF mRNA 表現量。

第二節 探討 SB203580 增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度是透過 G-CSF mRNA 3'UTR 當中哪一段序列

在文獻回顧當中提到，給予 SB203580 抑制 p38 MAPK 活化會透過 ARE 使細胞激素 (cytokine) mRNA 穩定度下降。因此我們推測 SB203580 增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度可能不是透過 ARE 而可能是透過 SLDE。為了驗證我們

的假設，所以建構了 3'UTR SLDE mutant 1 (SLDE mutant 1)，此 mutant 是將 SLDE 在不同物種間都具有高保留性的 11 個核苷酸中的 5 個核苷酸做突變，同時也破壞莖-環結構 (Fig. 5A)。將 SLDE mutant 1 轉染進 Raw264.7 細胞內，由 luciferase 活性分析的結果可以看到，轉染進 SLDE mutant 1 質體在不做任何處理的情況下，SLDE mutant 1 的 luciferase 活性回升到 basic 質體的 80% (Fig. 5B)，顯示破壞 SLDE 後會使 3'UTR 降低 mRNA 穩定度的能力受到抑制。轉染進 SLDE mutant 1 質體並給予 LPS 處理後，LPS 所誘導的相對 luciferase 活性減少到約剩下 4 倍 (Fig. 5C)，顯示破壞 SLDE 後會使 LPS 穩定 mRNA 的能力受到抑制。而轉染進 SLDE mutant 1 之後，預先處理 SB203580 也無法再增加 LPS 所誘導的相對 luciferase 活性，此外單獨給予 SB203580 與 DMSO 對照組相比 luciferase 活性也沒有明顯差異 (Fig. 5C)。由以上 luciferase 活性分析的結果顯示 SB203580 是透過 SLDE 來增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度。接下來我們想知道如果減少突變得核苷酸數是否有相同的效果，所以將突變的核苷酸數由 5 個縮減為 3 個並同樣破壞莖-環結構，建構出 G-CSF 3'UTR SLDE mutant 2 質體 (SLDE mutant 2) (Fig. 6A)，在不做任何處理的情況下 SLDE mutant 2 luciferase 活性回升至 basic 質體的 40% (Fig. 6B)；而預先處理 SB203580 也同樣不會在更增加由 LPS 所誘導的相對 luciferase 活性，並且單獨給予 SB203580 與 DMSO 對照組相比 luciferase 活性也沒有明顯差異 (Fig. 6C)。顯示突變 3 個核苷酸也會抑制 SB203580 增加 LPS 誘導的 luciferase 活性。此外突變 5 個核苷酸與突變 3 個核苷酸相比，預先處理 SB203580 再給予 LPS，所誘導的相對 luciferase 活性在統計上沒有明顯差異 (Fig. 5C, 6B)。這些結果顯示只要破壞 SLDE 的莖-環結構及當中高保留性的序列就會抑制 SB203580 增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 的能力。因為以上的突變同時破壞莖-環結構以及高保留性序列，因此我們更進一步探討是莖-環結構還是高保留性序列對 SB203580 增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度比較重要。所以我們建構 G-CSF 3'UTR SLDE mutant 3 (SLDE mutant 3) 將保留序列做互補的 4 個核苷酸突變並維持莖-環結構 (Fig. 7A)，將此質體轉染進 Raw 264.7 細胞內，由 Fig. 7B

的結果顯示，轉染 SLDE mutnat3 之後，luciferase 活性僅回升至 basic 質體的 20%。而在 Fig. 7C 的結果顯示轉染進 SLDE mutant 3 質體後，預先給予 SB203580 再加入 LPS 所誘導的相對 luciferase 活性與只給予 LPS 的時候相比沒有明顯差異；同樣地，單獨給予 SB203580 與 DMSO 對照組相比 luciferase 活性也沒有明顯差異。更進一步測量 luciferase mRNA 也顯示轉染 SLDE mutant 3 質體後，給予 SB203580 與 DMSO 對照組相比 luciferase mRNA 表現沒有明顯差異(Fig. 7D)。綜合以上的實驗結果顯示，SLDE 當中高保留序列在 SB203580 增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度當中扮演重要的角色。此外，比較這些不同 SLDE mutant 發現，SLDE mutant 3 可以被 LPS 誘導的 luciferase 活性是比 SLDE mutant 1 和 2 高 (Fig. 5C, 6C 和 7C)。顯示 SLDE 的莖-環結構可能在 LPS 增加 G-CSF mRNA 穩定度中扮演部分的角色。

第三節 探討不同 p38 MAPK 抑制劑對 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現的影響

為了探討 SB203580 對 G-CSF mRNA 的影響是因為抑制了 p38 MAPKs 磷酸酶活性或是 SB203580 獨有的作用，因此我們比較給予 Raw264.7 細胞不同的 p38 MAPK 抑制劑，看這些不同的 p38 MAPK 抑制劑對 LPS 誘導的 G-CSF 表現是否與 SB203580 相似。由即時定量 PCR 的結果顯示，預先給予 10 μ M 的 SB202190 (S2) 與 PD169316 (PD) 再加入 LPS，可以更增加約 4 倍由 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現，預先給予 SKF86002 (SKF) 則是些微增加約 1.8 倍，由以上結果可知給予 SB202190 或 PD169316 對 G-CSF mRNA 表現的影響與給予 SB203580 的時候相似；相反的預先處理 SB239063 (S3) 再加入 LPS 與單獨處理 LPS 的時候相比 G-CSF mRNA 表現沒有明顯的差異(Fig. 8A)。而在預先給予 SB203580、SB202190、PD169316 和 SB239063 再加入 LPS 的時候，G-CSF 蛋白質表現也與 mRNA 的變化有相同的趨勢；但是在預先給予 SKF86002 雖然有些增加 LPS 誘導的 G-CSF 蛋白質表現，但是在統計沒有明顯的差異，這一點是與 mRNA 表現有不一致之處 (Fig. 8B)。此外，我們也以人類單核球細胞 THP-1 及由小鼠骨髓

細胞分化成的巨噬細胞 (BMDM) 預先給予這些不同的 p38MAPKs 抑制劑再加入 LPS，看這些不同的 p38 MAPKs 抑制劑對 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現的影響是否和 Raw 264.7 細胞相似。由 Fig. 9, 和 10A 的結果顯示在 THP-1 及 BMDM，給予 SB203580、SB202190 和 PD169316 再加入 LPS 都可以在更增加 2-5 倍 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現，對 BMDM 而言以 PD169316 增加的效果最好，而在 THP-1 細胞則是以 SB203580 增加的效果最好；此外給予 SB239063 的時候也同樣不會再增加 THP-1 及 BMDM 細胞內 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現，以上這些結果都與 Raw 264.7 細胞相似。與 Raw 264.7 細胞比較不一樣的是 BMDM 細胞在 SKF86002 處理之下不會更增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現 (Fig. 9)。由 Fig. 10B 可以看到隨著 LPS 處理時間增加 THP-1 細胞內 G-CSF mRNA 表現有逐漸增加的情況，以 4 小時的時候 LPS 誘導的倍率最高，6 小時後 LPS 誘導的效果就降低了。而預先給予 SB203580 再加入 LPS，在前 2 小時的時候會些微抑制 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現，但是在第 4 小時及第 6 小時都可以看到與先處理 SB203580 再加入 LPS 的細胞，G-CSF mRNA 的表現比單獨處理 LPS 所誘導的明顯增加，其中以 4 小時的時候 G-CSF 表現量達最高。接下來我們想更進一步確認這些不同的抑制劑對 LPS 誘導的 G-CSF 表現的影響是否與 SB203580 相似，都是藉由 3'UTR 影響 mRNA 的穩定度所導致。因此我們將 3'UTR 質體轉染進 Raw 264.7 細胞並預先給予這些不同 p38 MAPK 抑制劑後再加入 LPS，由 Fig. 11 的 luciferase 活性分析結果顯示與預先給予 SB203580 相似，Raw 264.7 細胞預先處理 SB202190 或 PD169316 再加入 LPS 會更增加約細胞 0.5-1 倍 LPS 誘導的 luciferase 活性；相反的預先處理 SB239063 或 SKF86002 再加入 LPS 與單獨處理 LPS 時，luciferase 活性在統計上沒有明顯差異。由以上 luciferase 活性分析的結果間接顯示，這些不同 p38 MAPK 抑制劑影響 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現可能是藉由 3'UTR 影響 mRNA 穩定度所致。由於這些 p38 MAPK 抑制劑對 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現有不同的影響，所以我們想確認這些 p38 MAPK 抑制劑是否真的都會抑制由 LPS 誘導的 p38 MAPKs 磷酸酶活性被活化，

因此我們分析 p38 MAPK 下游受質 Hsp27 蛋白質磷酸化是否會受這些抑制劑影響。由於在 Raw 264.7 細胞內偵測不到 Hsp27 蛋白質的表現，而在前面實驗結果顯示 THP-1 對這些不同 p38 MAPK 抑制劑在 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現與 Raw 264.7 細胞有相似反應，因此我們以 THP-1 為細胞模式並以 SB202474 這個已知不會抑制 p38 MAPK 磷酸酶活性的化合物當作 control，來看這些 p38 MAPK 抑制劑對 p38 MAPK 磷酸酶活化的抑制效果。由 Fig. 12 結果顯示，加入 100 ng/mL LPS 30 分鐘就可以看到 p38 MAPK 及 Hsp27 蛋白質被磷酸化，顯示 LPS 確實會活化 p38 MAPK 磷酸酶活性；當預先給予 p38 MAPK 抑制劑再加入 LPS 與單獨處理 LPS 相比，雖然 p38 MAPK 磷酸化沒有明顯減少，但是 Hsp27 蛋白質磷酸化有明顯被抑制下來，由此可知這些抑制劑都會抑制 p38 MAPK 磷酸酶活性被活化。另外由以上的實驗結果發現有效增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現的 p38 MAPK 抑制劑都具有 pyridinyl-imidazole 結構，因此我們想探討是否是透過這個結構來增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現。由 Fig. 8 結果顯示預先給予 SB202474 這個具有 pyridinyl-imidazole 結構的化合物再加入 LPS 與只處理 LPS 相比，G-CSF mRNA 表現減少約 50%。由此結果顯示 SB230580、SB202190 及 PD169316 可能不是藉由 pyridinyl-imidazole 結構來增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現。

第四節 探討只單獨處理 SB203580 是否就會增加 G-CSF mRNA 表現

由 Fig. 4A luciferase 活性分析結果發現，轉染進 3'UTR 質體並且只單獨處理 SB203580 的時候，與對照組相比 luciferase 活性上升約 2 倍左右，並由即時定量 PCR 的結果也可以看到 luciferase mRNA 在有 SB203580 處理的時候其表現量為 DMSO 對照組的 1.5 倍(Fig. 4B)。此外由 Fig. 7D 的結果也顯示，轉染 3'UTR mutant 3 質體並給予 SB203580 相較於 DMSO 對照組，SB203580 增加相對 luciferase 活性的效果就被抑制了。由 Fig. 11 的結果表示在不給予 LPS 時 p38MAPK 和 Hsp27 蛋白質不會被磷酸化，表示 p38 MAPK 磷酸酶的活性是在不

活化的狀態，因此我們推測在不給予 LPS、不活化 p38 MAPK 磷酸酶活性的情況下，只處理 SB203580 就可以透過 3'UTR SLDE 增加 G-CSF mRNA 穩定度。為了驗證以上的推測，首先去看是否只給予 SB203580 也會使 G-CSF mRNA 表現增加。我們給予 Raw 264.7 細胞 10 μ M 的 SB203580 並在不同時間點收 RNA 測量 G-CSF mRNA 的表現。由 Fig.12 結果顯示單獨給予 SB203580，4 小時後 G-CSF mRNA 表現比 DMSO 對照組高，這增加的效果可以一直持續到 8 小時；相反的，IL-1 β mRNA 表現則是隨著 SB203580 處理的時間增加，有逐漸被抑制的趨勢，由以上的實驗結果顯示，只單獨處理 SB203580 就可使 G-CSF mRNA 表現增加。接下來就去看沒有以 LPS 刺激活化 p38 MAPK 磷酸酶活性的情況下，SB203580 增加 G-CSF mRNA 表現是否也是藉由增加 G-CSF mRNA 穩定度所致，所以我們利用 actinomycin D 抑制轉錄來看 mRNA 降解。由 Fig. 13 結果顯示，在 DMSO 對照組，G-CSF mRNA 表現在抑制轉錄 1 小時後就測不到，並且由回歸式 $y = -28.32x + 89.707$ 推算出在 1.4 小時後 G-CSF mRNA 減少到剩下一開始的 50%；而在給予 SB203580 處理時，G-CSF mRNA 可以穩定表現至 3 小時後才有下降的情況，顯示給予 SB203580 後 G-CSF mRNA 是比 DMSO 處理的時候穩定。由以上的實驗結果可知在不給予 LPS、p38 MAPK 的磷酸酶活性不活化的情況下 SB203580 就可以增加 G-CSF mRNA 穩定度，顯示 SB203580 增加 G-CSF mRNA 穩定度可能不是藉由抑制 p38 MAPK 的磷酸酶活性所導致。此外我們也比較在不給予 LPS 時，不同 p38 MAPK 抑制劑對轉染 3'UTR 質體的 Raw 264.7 細胞表現得 luciferase 活性的影響。由 Fig. 14 的結果顯示給予 SB203580、SB202190 和 PD169316 與 DMSO 對照組相比可增加 luciferase 活性約 2 倍的表現；給予 SB239063 及 SKF86002 則是不會有明顯差異，與先前給予 LPS 處理的結果相似。顯示在不以 LPS 活化 p38 MAPK 的磷酸酶活性的情況下 SB203580、SB202190 及 PD169316 會透過 3'UTR 來增加 G-CSF mRNA 穩定度。



第四章 討論



第一節 SB203580 透過 G-CSF mRNA 3'UTR SLDE 來增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度

給予 LPS 使 p38 MAPK 活化會透過增加轉錄活性及 mRNA 穩定度來增加細胞激素 (如:IL-1 β 、TNF- α 和 COX-2 等) 表現 (Baldassare et al., 1999; Chrestensen et al., 2004; Clark et al., 2003)。給予 p38 MAPK 抑制劑 SB203580 抑制 p38 MAPK 磷酸酶活性後，則會使 IL-1 β 、TNF- α 和 COX-2 等轉錄活性被抑制、帶有 ARE 的 mRNA 半衰期變短，進而抑制這些細胞激素的表現 (Baldassare et al., 1999)。但是在本實驗室蔡雯茹學姐的研究結果發現，SB203580 對 G-CSF mRNA 表現的影響與其對其他帶有 ARE 的 mRNA 的影響相反—SB203580 會藉由增加 G-CSF mRNA 穩定度進而增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 及蛋白質的表現增加(蔡, 2011)。而在本篇研究中利用 luciferase 活性分析更進一步發現，SB203580 是透過 G-CSF mRNA 3'UTR 的 SLDE 來增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度，其中 SB203580 主要是透過 SLDE 當中的 TTTAATATTTA 這段在不同物種間具有高度保留性的序列，而不是透過 SLDE 的莖-環結構來增加 mRNA 穩定度。在 Brown 等人的研究中提到除了 G-CSF 之外，IL-6 和 IL-2 的 3'UTR 都具有類似的莖-環結構 (Brown et al., 1996; Paschoud et al., 2006)，但是我們利用 NCBI blast 發現 IL-2 和 IL-6 3'UTR 沒有 TTTAATATTTA 這一段高保留性的序列，而數個研究指出給予 SB203580 後會抑制由 LPS 誘導的 IL-2 和 IL-6 mRNA 及蛋白質的表現 (Diya et al., 2008; Patil et al., 2004; ten Hove et al., 2002)。以上前人的研究當中可知 IL-2、IL-6 及 G-CSF 的 mRNA 3'UTR 都具有莖-環結構，但是 SB203580 卻只會增加 G-CSF mRNA 表現，或許是因為我們發現 SB203580 增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度可能是透過 SLDE 高保留性的序列而不是莖-環結構所致。此外我們也利用 Miranda (<http://www.microrna.org/microrna/>) 分析發現在在 GCSF 3'UTR SLDE 的後面可能有 miR-141, 200a 或是 200c 的結合序列，因此我們不能完全排除 miRNA 參與 G-CSF mRNA 的調節的可能。

除了 G-CSF 之外 Lahti 等人研究發現，預先給予 1 μ M 的 SB203580、SB202190 及 SB220025 在加入 LPS 會使人類大腸上皮細胞 T-84 及小鼠巨噬細胞 J7742 的 iNOS mRNA 穩定度增加，進而使 iNOS 蛋白質表現增加 (Lahti et al., 2002; Lahti et al., 2006)。但是我們利用 NCBI blast 發現 iNOS mRNA 3'UTR 序列在人類及小鼠有很大的差異，人類的 iNOS mRNA 3'UTR 當中有 4 個重複的 ATTTA 序列，而小鼠的 iNOS mRNA 3'UTR 只有 1 個 ATTTA 序列，但是在人類及小鼠 iNOS mRNA 3'UTR 都沒有 TTTAATATTTA 這一段高保留性序列，因此我們推測 SB203580 增加 G-CSF mRNA 穩定度機制可能與對 iNOS mRNA 的影響不同。

在 Fig. 3 的結果顯示，接入 G-CSF 3'UTR 會使 luciferase mRNA 及活性減少，但是將 G-CSF 3'UTR 的 SLDE 中高保留性的序列與莖-環結構破壞後，部分的 luciferase 活性會被救回，表示在不做任何處理時 SLDE 也會促進 mRNA 降解導致 mRNA 穩定度降低，這與前人研究的結果相符 (Brown et al., 1996)。此外，Putland 等人在 2002 年的研究結果發現，莖-環結構中構成環的三個核苷酸—TAT 的 A 被其他核苷酸取代時，會使 SLDE 促進 mRNA 降解的能力被抑制 (Putland et al., 2002)；而在我們建構的 G-CSF 3'UTR mutant 1 在不做任何處理時相較於 mutant 2 和 mutant 3 可以被救回較多的 luciferase 活性，代表 mutant 1 相較於其他兩個 mutant luciferase mRNA 是比較穩定的，除了可能是因為 mutant 1 被突變的核苷酸數比其他兩個 mutant 多之外，也可能是因為我們也將 mutant 1 的 TAT 當中的 A 突變為 C，使 SLDE 促進 mRNA 降解的能力被抑制所致。另外，在三個 mutant 中以 mutant 3 被救回的相對 luciferase 活性最少，顯示 mutant 3 的 luciferase mRNA 最不穩定，表示即使改變莖的序列但維持莖-環結構，SLDE 還是會促進 mRNA 分解，這個結果也與前人研究結果相符 (Putland et al., 2002)。

第二節 LPS 除了透過 ARE 之外也會透過 SLDE 增加 G-CSF mRNA 穩定度

目前為止關於 LPS 對 G-CSF 表現的影響都著重在轉錄層次。在 G-CSF 啟動子上有 NF- κ B 結合位，受到 LPS 刺激時會使 NF- κ B 進入細胞核結並合上 G-CSF

啟動子，增加轉錄活性 (Nishizawa and Nagata, 1990)。此外 LPS 也會藉由活化 ERK1/2 增加 CEBP/β 活性，而 CEBP/β 會與 Oct1 進行交互作用使 G-CSF 轉錄增加 (楊, 2011; 黃, 2010)。另外，研究也發現在 LPS 及 LTA 刺激下會透過 PI3K/Akt/mTOR pathway 增加 Oct2 的表現，進而增加轉錄活性使 G-CSF mRNA 表現增加 (Chou et al., 2011)；對於轉錄後層次的研究則較少，生物資訊的研究提到 LPS 會透過 ARE 增加 G-CSF mRNA 穩定度，但沒有實質的研究分析 (Boneberg and Hartung, 2002b)。而在本研究的 luciferase 活性分析的結果發現將 SLDE 序列突變及破壞莖-環結構後，與 wild type 3'UTR 相比可以被 LPS 誘導的相對 luciferase 活性降低許多，其中 mutant 3 能被 LPS 誘導的相對 luciferase 活性又比其他兩個 mutant 高，代表 LPS 也會透過 SLDE 提高 G-CSF mRNA 的穩定度，並且莖-環結構比高保留性的序列更能反應 LPS 的刺激。此外不論是何種 SLDE mutant 給予 LPS 後被誘導的相對 luciferase 活性相較於對照組仍是有增加的情況，推測 3'UTR 的 ARE 可能扮演部分增加 mRNA 穩定度的作用，與前人研究相似 (Boneberg and Hartung, 2002b)。而什麼 factor 參與在 LPS 調控 G-CSF mRNA 穩定度的過程仍須要進一步的研究。

此外在 Fig. 13 的結果顯示，在不加入 LPS 的情況下，只要 1.4 小時 G-CSF mRNA 就減少到剩下 50%，而在 Fig. 1 給予 LPS 處理後 G-CSF mRNA 的半衰期增加至 2.7 小時，由此可知細胞在不受刺激的時候 G-CSF mRNA 很快就會被降解。雖然與 Ernst 等人研究 G-CSF mRNA 半衰期小於 15 分鐘有所不同 (Ernst et al., 1989)，推測可能是因為 Ernst 等人使用的是人類單核球細胞 THP-1，而我們使用的是小鼠巨噬細胞 Raw264.7，導致半衰期時間長短不一所致。

第三節 不同 p38MAPKs 抑制劑對 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現有不同影響

在我們使用的這些不同 p38 MAPK 抑制劑都是以 pyridinyl-imidazole 的結構為主，並且在 imidazole 的第 4 號碳上有 fluorophenyl 取代基，除了 SB239063 為第二代 p38 MAPK 抑制劑之外，其他的都是第一代 p38 MAPK 抑制劑 (Kunkel et

al., 2004; Underwood et al., 2000)。第一代抑制劑當中 SB203580、SB202190 和 PD169316 的差異在於 imidazole 的第 2 號碳接的 phenyl 內的取代基修飾不同；SKF86002 則是以 thiozole 取代 phenyl 取代基。研究發現若是在 imidazole 的第 2 號和第 3 號碳上有 pyridinyl 或是 phenyl 取代基會增加這些抑制劑的厭水性 (hydrophobic) 而與其他的酵素 (例如:cytochrome P450) 作用，增加 off-target 的效果 (Adams et al., 1998; Kunkel et al., 2004)。因此在第二代抑制劑 SB239063 除了在 pyridinyl 取代基上與其他四種 p38 MAPK 抑制劑有不同修飾之外，在 imidazole 的第 2 號碳上沒有 phenyl 取代基，取而代之的是在 imidazole 的第 1 號碳上以 hydroxycyclohexyl 取代基取代 (Adams et al., 1998)。而在 Fig.7 及 Fig.8 的結果顯示 SB203580、SB202190 及 PD169316 都可以增加 LPS 誘導的 G-CSF 表現，比較這些結構，我們推測可能是 imidazole 環的第 2 號碳上接 phenyl 取代基及第 4 號碳上接 fluorophenyl 取代基所組成的結構在提高 G-CSF 表現當中扮演重要的角色。

Asaduzzaman 等人利用 SB239063 及 SKF86002 也可以抑制有敗血症小鼠的 p38MAPKs 活化，並減少肺部噬中性白血球和趨化因子的表現 (Asaduzzaman et al., 2008)。但是 Su 等人的給予高劑量 (100mg/kg/day) SB203580 會使 *E. coli* 感染的小鼠肺部噬中性白血球數增加，造成肺部浸潤 (Su et al., 2010)。許多研究發現受到細菌感染時常伴隨有肺部白血球浸潤的情形，而 G-CSF 則在這當中扮演重要的角色 (Balamayooran et al., 2010; Hierholzer et al., 1998)。因此我們推測 Asaduzzaman 等人及 Su 等人結果的不同，除了可能是因為利用不同方式活化 p38 MAPK 之外，也有部分的可能是使用了不同的 p38 MAPK 抑制劑，對 G-CSF 表現影響不一致所造成。在 Fig. 7 的實驗結果顯示預先給予 10 μ M SB203580、SB202190 及 PD169316 都會增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 及蛋白質，而給予 10 μ M SKF86002 及 SB239063 卻不會在更增加 LPS 誘導的 G-CSF 蛋白質表現，這或許可以提供部分的解釋為什麼 Asaduzzaman 等人與 Su 等人會出現這樣的實驗結果差異。另外在 Underwood 等人由人類周邊血液分離出單核球細胞並給予

10 μ M 的 SB239063，發現 SB239063 也不會抑制由 LPS 所誘導的 G-CSF 蛋白質表現，並且可以有效降低豚鼠呼吸道內由 LPS 所誘導的噬酸性細胞數 (Underwood et al., 2000)。雖然 Underwood 等人並未進一步去看噬中性白血球數是否受 SB239063 影響，但是這或許可以部分印證我們的推測。

第四節 單獨處理 SB203580、SB202190 和 PD169316 增加 G-CSF mRNA 穩定度不是藉由抑制 p38 MAPKs 磷酸酶活性所導致

在 Fig. 12 的結果顯示，單獨給予 10 μ M SB203580 會隨著處理時間增加使 G-CSF mRNA 表現逐漸增加，而在 Fig. 13 及 Fig. 14 的結果顯示在不給予 LPS 時，SB203580 是透過 3'UTR 來增加 G-CSF mRNA 的穩定度造成 G-CSF mRNA 表現增加，並且在單獨給予 SB203580、SB202190 及 PD169316 仍會使轉染進 3'UTR 質體的 Raw 264.7 細胞 luciferase 活性增加。在不給予 LPS 刺激時 Raw 264.7 細胞的 p38 MAPK 是不活化的，因此我們認為這些不同的 p38 MAPK 抑制劑對 G-CSF mRNA 影響可能不是因為抑制 p38 MAPK 磷酸酶活性所導致。

研究發現給予 293T 細胞 10 μ M 的 SB203580 及 SB202190 會抑制 casein kinase (CK-1) 活化，進而抑制 CREB 結合蛋白質的活化，使 DNA 修補機制受損 (Shanware et al., 2009)；另外 SB203580 及 SB202190 也會使人類微血管內皮細胞株的 MLK3 活化，進而活化 JNK (Muniyappa and Das, 2008)。除此之外，研究也發現 SB203580、SB202190 及 PD169316 都會抑制 ALK5 活化，使 Smad 不能被磷酸化，導致 Smad 不能進入細胞核，造成 TGF- β 訊號傳遞路徑被抑制 (Fu et al., 2003)。而在 Yamagami 等人的研究發現在角膜內皮細胞當中，TGF- β 訊號傳遞路徑被活化的時候會抑制 G-CSF mRNA 及蛋白質的表現 (Yamagami, 2004)。這些結果清楚的顯示，SB203580、SB202190 及 PD169316 上有一些不是抑制 p38 MAPK 的其他作用，因此 SB203580 增加 G-CSF mRNA 的作用也可能是一種 off-target 的作用。

本篇研究結果發現當不給予 LPS，p38 MAPK 磷酸酶活性不活化的時候，給予 SB203580 還是可以增加 G-CSF mRNA 表現；而給予 SB202474 這種不會結合

到 p38 MAPK 上、不影響 p38MAPK 磷酸酶活性的 pyridinyl- imidazole 化合物 (Fabian et al., 2005)，會使 G-CSF mRNA 表現減少一半。此外本實驗室蔡雯茹學姐利用 siRNA knockdown 使 p38 MAPK 蛋白質表現減少一半，發現 SB203580 還是可以增加 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 表現，但是 LPS0 可以增加的 G-CSF mRNA 表現量比沒有 knockdown p38MAPK 的時候減少一半 (蔡, 2010)，因此我們推測 SB203580 增加 G-CSF mRNA 表現量不是因為抑制 p38 MAPK 磷酸酶活性所導致，因此不排除是 SB203580 結合到 p38 MAPK 後，影響到 p38 MAPK 酵素酶活性之外的功能。p38 MAPK 除了磷酸酶活性之外，近年來許多研究也發現 p38 MAPK 會有磷酸酶 (kinase) 之外的活性。像是研究發現 *S. pombe* 在減數分裂 DNA 重組過程中 (meiotic recombination)，p38 MAPK 的同源蛋白 Spc1 不是藉由磷酸化 ATF-1 而是幫助 ATF-1 結合到染色體上，使減數分裂 DNA 重組過程順利進行 (Gao et al., 2009)。另外研究發現當細胞處在 S 時期的時候 p38 MAPK α/β 會與轉錄活化因子 (transcription activator) Mirk 結合，使 MKK3 無法結合到 Mirk 上進而抑制 Mirk 的磷酸化，造成 Mirk 下游基因 HNF1 α 轉錄被抑制，使 low affinity/high capacity glucose cotransporter (SGLT2) 表現降低，影響血糖恆定，造成細胞生長受到抑制 (Lim et al., 2002; Pontoglio et al., 2000)。但是 SB203580 結合到 p38 MAPK 除了會抑制 p38 MAPK 磷酸酶的活性之外是否會影響到 p38 MAPK 其他的功能目前尚無相關的研究，這值得更進一步的探討。

臨床上 G-CSF 有很多用途，目前 G-CSF 被廣泛的使用在化療後的病人以提高成熟嗜中性白血球數，減少感染的機會 (Chao et al., 1993)。另外 G-CSF 也有神經保護的作用，研究顯示 G-CSF 可以讓帶有標記的造血幹細胞，從骨髓釋放到周邊血液中，游移到大腦受損區域，分化成新的神經細胞，取代受傷死亡的神經細胞，對於阿茲海默症有很好的療效，目前已進入臨床試驗第二期 (Tsai et al., 2007)。若是可以利用像 SB203580 類似結構的小分子藥物誘導內生性 G-CSF 蛋白質表現，或許可以減少對重組的 G-CSF 蛋白質的依賴；若是可以找出可能參與的 trans-acting factor 則可以提供一個標靶，設計更具專一性的藥物來增加

G-CSF 的表現；不過控制 G-CSF 的表現量可能也是一件困難的調控工程。有研究發現，G-CSF 表現增加會導致膠原蛋白誘導的關節炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 產生 (Eyles et al., 2008)，因此對於臨床上 G-CSF 的應用仍需審慎的評估。

第五節 結論

在本實驗的研究結果發現 SB203580 提高 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度是透過 G-CSF mRNA 3'UTR 當中的 SLDE，並更進一步發現 SB203580 不是透過 SLDE 的莖-環結構，而是透過 SLDE 當中 TTTAATATTTA 這一段高保留性序列提高 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 穩定度，使 G-CSF mRNA 及蛋白質的表現更增加。此外不同的 p38 MAPK 抑制劑對 G-CSF mRNA 及蛋白質的表現亦有不同的影響，其中 SB203580、SB202190 及 PD169316 都會提高 G-CSF mRNA 穩定度進而提高 LPS 誘導的 G-CSF mRNA 及蛋白質表現，而 SKF86002 及 SB239063 則不會影響 G-CSF 蛋白質表現，比較這些結果我們推測可能是 imidazole 環的第 2 號碳上接 phenyl 及第 4 號碳上接 fluorophenyl 所組成的結構提高 G-CSF mRNA 穩定度。最後我們也發現 SB203580、SB202190 及 PD169316 穩定 G-CSF mRNA 的作用在不給予 LPS、p38 MAPK 不活化的情況下仍然是存在的，顯示這些 p38 MAPK 抑制劑增加 G-CSF mRNA 穩定度不是藉由抑制 p38 MAPK 磷酸酶活性所導致。然而目前並不清楚是 p38 MAPK、ARE 結合蛋白質、microRNA 或是其他特殊的 trans-acting factor 參與這個調節機制，仍需要更進一步的研究。

第五章 圖表



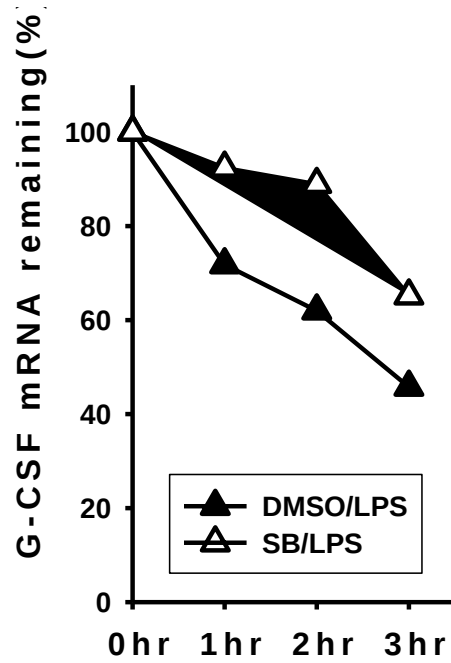
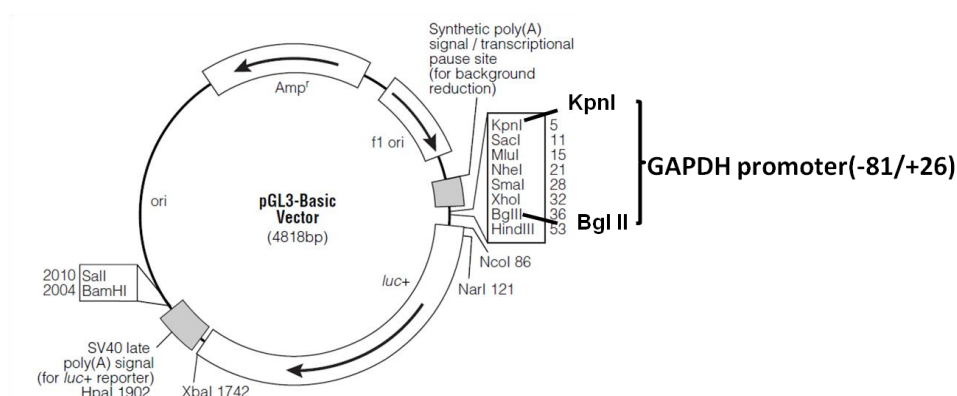


Fig. 1 Effect of SB203580 on LPS-induced G-CSF mRNA stability in Raw 264.7 cells. Raw264.7 cells pretreated with DMSO (LPS) or SB203580 (10 μ M) (SB) for 30 min, and then treated with LPS (100 ng/mL) for another 5.5 hr. Then actinomycin (ActD) was added to final of 4 μ g/mL and total mRNA was harvested at the indicated time. The levels of G-CSF mRNA were determined by quantitative real time-PCR and the G-CSF mRNA remaining was shown to relative to that at 0 hr (relative value = 100%).

(A)



(B) GAPDH promoter sequence(-81/+26):

5'-GATGATGGAGGACGTGATGGGGCGCACGGCGGGGAATGGAGGCGGG
GTGGGGGAGGGGACTGCCTGGTGTCTTCGGGCCACGCTAATCTCATT
TTCTTCTCCTGCAG-3'

(C)

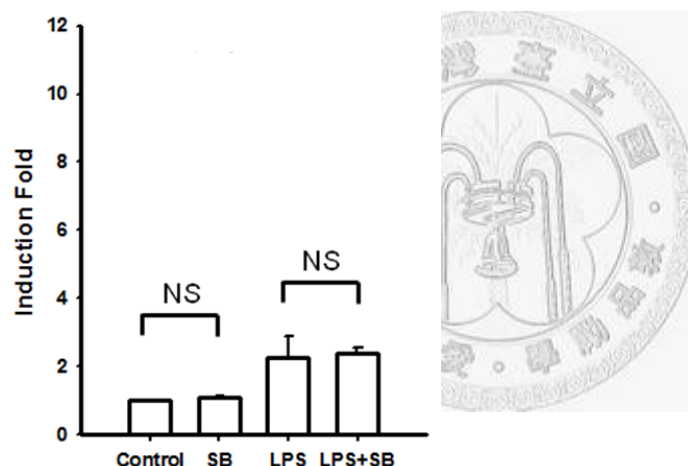
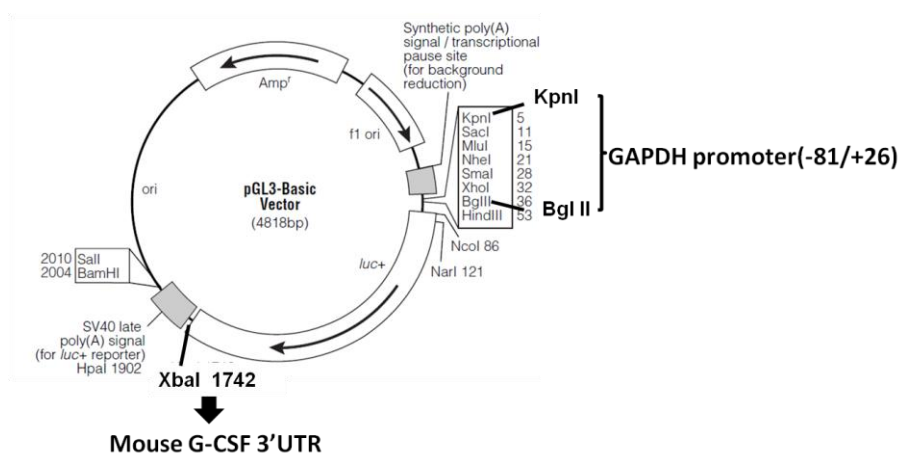


Fig. 2 Effect of SB203580 on luciferase activity in Raw 264.7 cells that transfected with GAPDHP-Luc construct (basic construct). (A) pGL3-basic vector (B) Sequence of GAPDH promoter from -81 to +26 wich was cloned into Kpn I/Bgl II site of the pGL3-basic vector. The plasmid is named basic construct. (C) Raw264.7 cells were cotransfected with phRLTK and basic constructs (1:1). At 4 hr after transfection, cells were treated with DMSO (control), 10 μ M SB203580 (SB), 100 ng/mL LPS, or co-treated with SB203580 and LPS (LPS+SB) for another 20 hr and luciferase activities were assayed as described in the methods. Firefly luciferase activities were normalized with renilla luciferase activities. The induction fold were shown relative to the control (induction fold = 1). Values are mean $\pm$ S.D. for 3 independent experiments. NS, not significant.

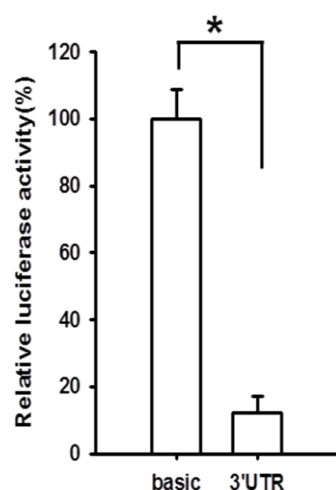
(A)



Mouse G-CSF 3'UTR sequence(+691/+1363) :

5'-ACCTGAGCAGAAAGCCCTTCCAGATAGTTTATTATCTCTATTTAATATTATGCATATTAA
GCCTACTATTTAAAGACAAAGACGAGAAAATGGAGCTCTAAGCTTCTAGATCATTCTCTCCACT
TCCGAGTTTTGTTCTCCTGCTTAGAGCAGAGAGAGAAGGCTCTGTGTCCTCCTGTGGAGGC
CAGGGAAGGAGATGGGTAAATACCAAGTATTGATTCTGCTGCTGCTCCAGGCACCCAGTTCT
GTGGCAGTACCCCCAAAAAATCAGTGAGCCCTGCCGTGCTGAGGCACCATCTCAGGGGGGC
CCAGGCAGCATCTGGTCTCCCTTCCGGGGGACAAGACATCCCTGTTTAATATTAAACAGCAG
TGTTCCAAACTGGGTTCTTATATCCCTTGCTCTGGTCAACCAGGTTGCAGGGTTTCCTGTCCT
CACAGGAACGAAGTCCCTAAAGAAACAGTGGCAGCCAGGTTTAGCCCCGGAATTGACTGGA
TTCCTTTTTTAGGGCCCTGCTGGCCTGGAAGTTGGAGTGGGGGGCAGAGGAGGCAGGAGG
AAGCCTGGGGGGGGGGTGGCATGGAGGGAGGCCTTCCATCCACCCTCACCTCCACCCC
ACCTGTCACTATAGCCAAGCTTGCGGATAATAAAGTGTGGTGTTC-3'

(B)



(C)

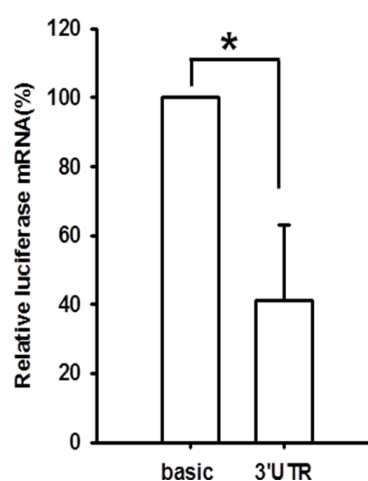


Fig. 3 Luciferase activity and mRNA in Raw 264.7 cells that transfected with basic construct and GAPDHp-Luc-3'UTR construct (3'UTR construct). (A) Mouse G-CSF 3'UTR sequence which as cloned to the 3'end of luciferase at XbaI site of the GAPDH-Luc to create the GAPDHp-Luc-3'UTR (3'UTR construct). (B) The basic construct and 3'UTR construct were mixed with phRLTK in a 1:1 ratio, and transfected into Raw264.7 separately. Luciferase activities were determined at 24 hr after transfection and firefly luciferase activities were normalized with renilla luciferase activities. The relative luciferase activities were shown relative to control (Relative value = 100%). (C) The same transfection were carried out, and firefly luciferase mRNA and renilla luciferase mRNA were measured by qRT-PCR. Levels of firefly luciferase mRNA were normalized with levels of renilla luciferase mRNA and relative luciferase mRNA are shown relative to basic reporter construct (relative value = 100%). Values are mean $\pm$ S.D. for 3 independent experiments. * p <0.05 compare with basic.



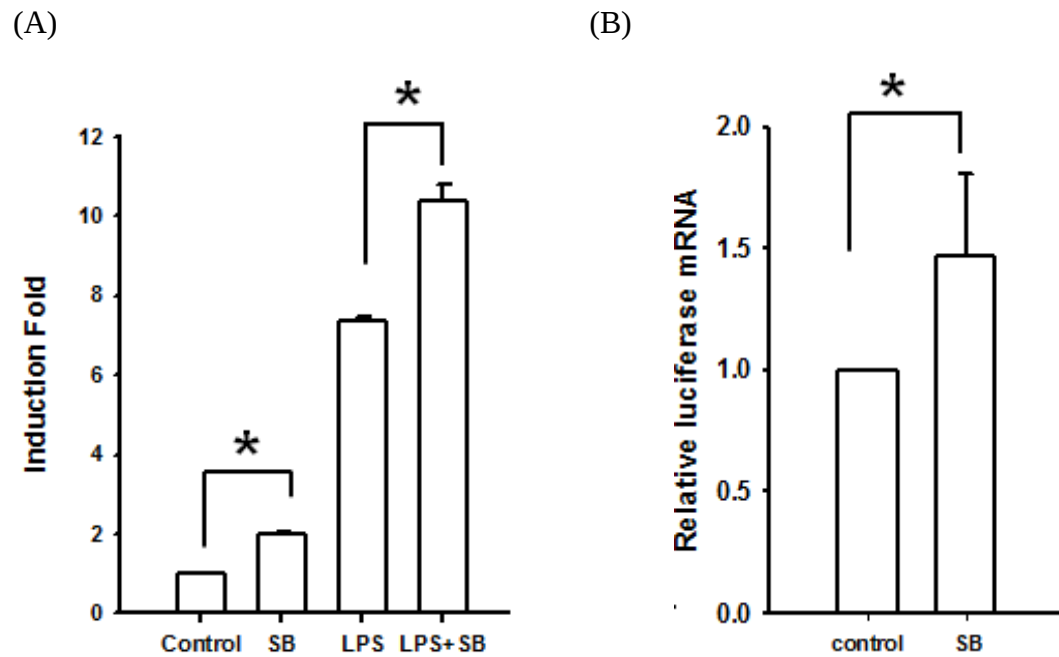
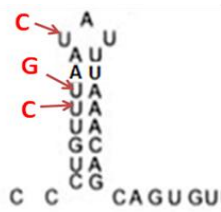


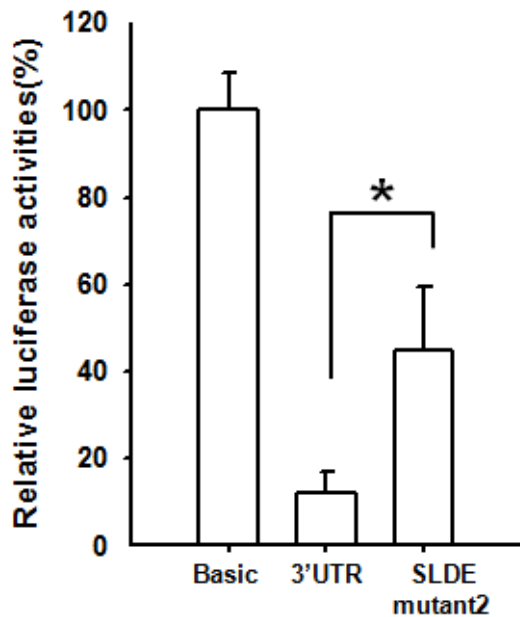
Fig. 4 Effect of SB203580/LPS on luciferase activity and mRNA in Raw 264.7 cells transfected with 3'UTR construct. (A) Raw 264.7 cells were cotransfected with phRLTK and 3'UTR construct (1:1). Transfection, treatment and luciferase activities were described as in Fig. 2. Firefly luciferase activities were normalized with renilla luciferase activities. The induction fold was shown relative to control (relative value = 1). (B) Transfection was carried out as described above, 4 hr after transfection cells were treated with DMSO (control), SB203580 (SB) for 20 hr and total RNA was harvested. Levels of firefly luciferase mRNA and renilla luciferase mRNA was measured by qRT-PCR. Levels of firefly luciferase mRNA were normalized with renilla luciferase mRNA and the levels of the relative luciferase mRNA are shown relative to the control (relative value = 1). Values are mean $\pm$ S.D. for 3 independent experiments. * p <0.05 compare with control or LPS.

Fig. 5 Effect of SB203580/LPS on on luciferase activity in Raw 264.7 cells that transfected with GAPDHP-Luc-3'UTR SLDE mutant 1 construct (SLDE mutant 1). (A) The putative stem-loop structure and the arrow indicated the mutation sites. (B) Raw 264.7 cells were transfected with basic, 3'UTR or SLDE mutant 1 constructs and phRLTK was also transfected as transfection control. Firefly luciferase activities were normalized to renilla luciferase activities, and relative luciferase activities were shown relative to the basic (relative value = 100%) (C) Transfection, treatment and luciferase activity assay were carried out as described in Fig. 2. The induction fold are shown relative to the control (relative value = 1). Values are mean $\pm$ S.D. for 3 independent experiments. * p <0.05 compare with 3'UTR, NS, not significant compare with control or LPS.

(A)



(B)



(C)

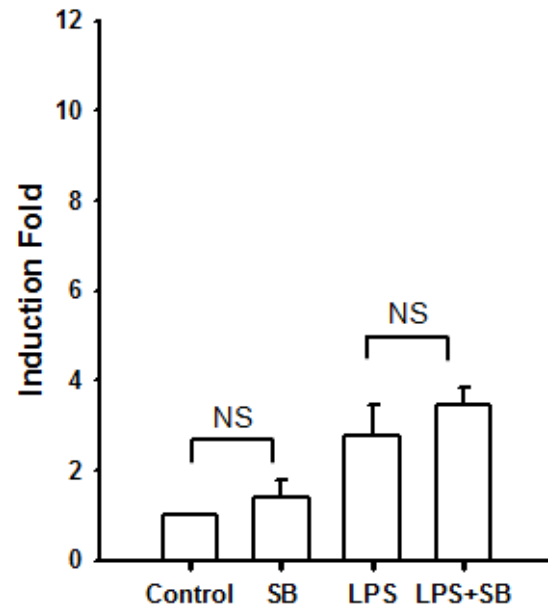
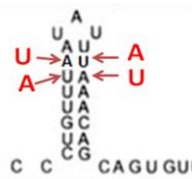
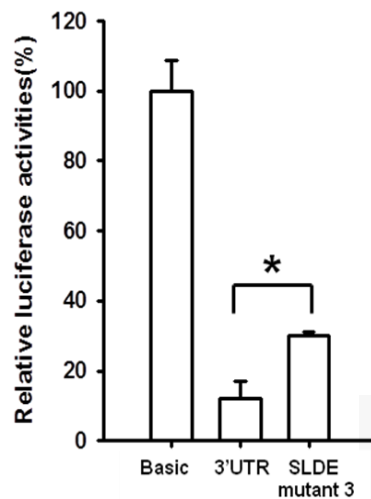


Fig. 6 Effect of SB203580/LPS on luciferase activity in Raw 264.7 cells that transfected with GAPDHp-Luc-3'UTR SLDE mutant 2 construct (SLDE mutant 2). (A) The putative stem-loop structure and the arrow indicated the mutation sites of the SLDE mutant 2. Transfection, treatment and luciferase activity assay were carried out as in Fig. 5, except that mutant 2 was transfected. (B) Relative luciferase activities were measured at 20 hr after transfection. (C) Fold induction of luciferase were determined after SB and/or LPS treat. The induction fold are shown relative to the corresponding control (relative value = 1). Values are mean $\pm$ S.D. for 3 independent experiments. * $p < 0.05$ compare with 3'UTR, NS, not significant compare with control or LPS.

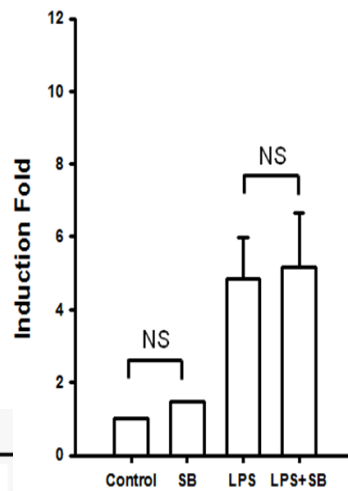
(A)



(B)



(C)



(D)

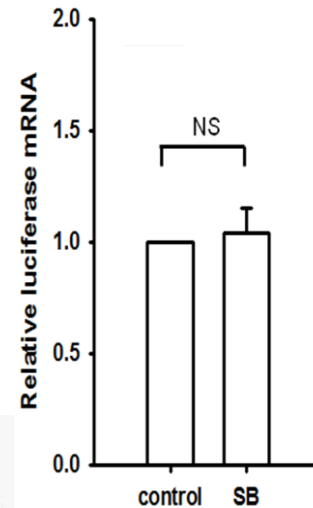


Fig. 7 Effect of SB203580/LPS on luciferase activity and mRNA in Raw 264.7 cells that transfected GAPDHp-Luc-G-CSF 3'UTR SLDE mutant 3 (SLDE mutant 3) activity. (A) The putative stem-loop structure and mutation site of the SLDE mutant 3 are shown. Transfection, treatment and luciferase activity assay were carried out as in Fig. 5, except that mutant 3 was transfected. (B) Relative luciferase activities were measured at 20 hr after transfection. (C) Fold induction of luciferase were determined after SB and/or LPS treat. The induction fold are shown relative to the corresponding control (relative value = 1). (D) Transfection, treatment and mRNA were carried out as described as in Fig. 4. The relative luciferase mRNA are shown relative to the control (relative value = 1). Values are mean $\pm$ S.D. of 3 independent experiments. * p <0.05 compare with 3'UTR, NS, not significant compare with control or LPS.

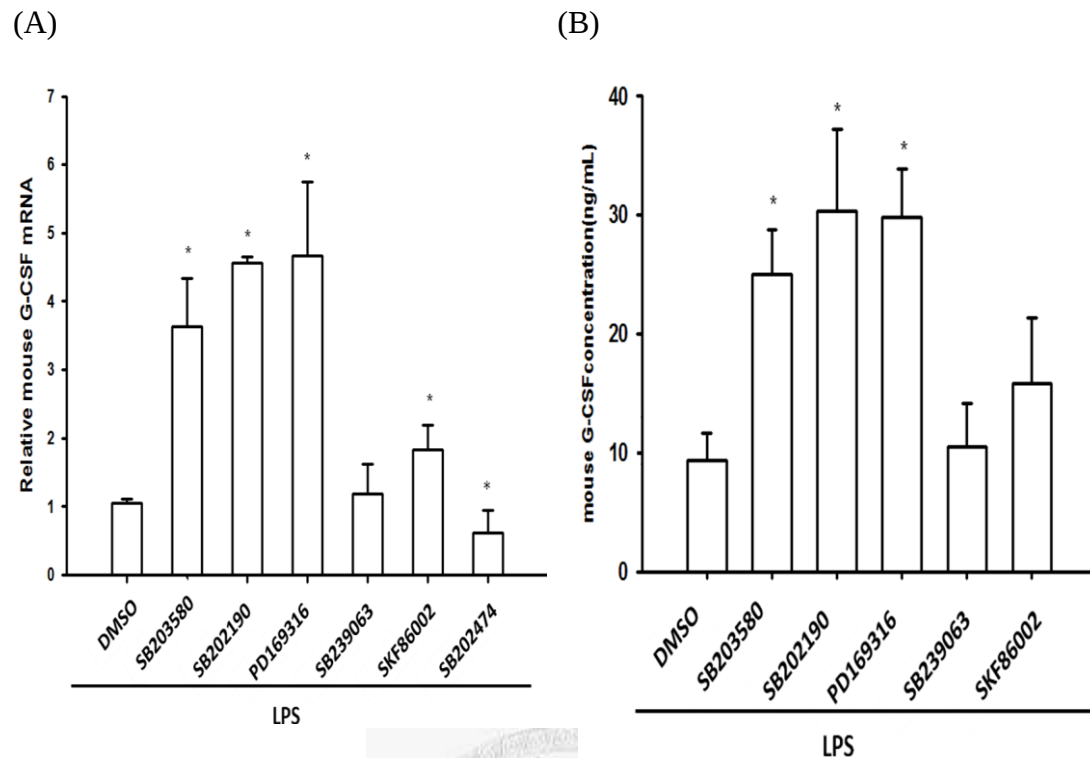


Fig. 8 Effect of various p38 MAPK inhibitors on LPS-induced G-CSF expression in Raw 264.7 cells. (A) Raw 264.7 cells were pretreated with DMSO, SB203580, SB202190, PD169316, SB239063, SKF86002 or SB202474 for 30 min and then treated with LPS (100 ng/mL) for 6 hr. Total RNA was harvested and the levels of G-CSF and GAPDH mRNA were determined by quantitative real time-PCR. Levels of G-CSF mRNA was normalized to the level of GAPDH mRNA and showed relative to that of LPS treated only (relative value = 1). (B) Raw 264.7 cells were pretreated with DMSO or inhibitors describe as above for 30 min and then treated with LPS (100 ng/mL) for 8 hr. The levels of G-CSF protein in the medium were determined by ELISA. Values are mean $\pm$ S.D. for 3 independent experiments. * $p < 0.05$ compare with DMSO

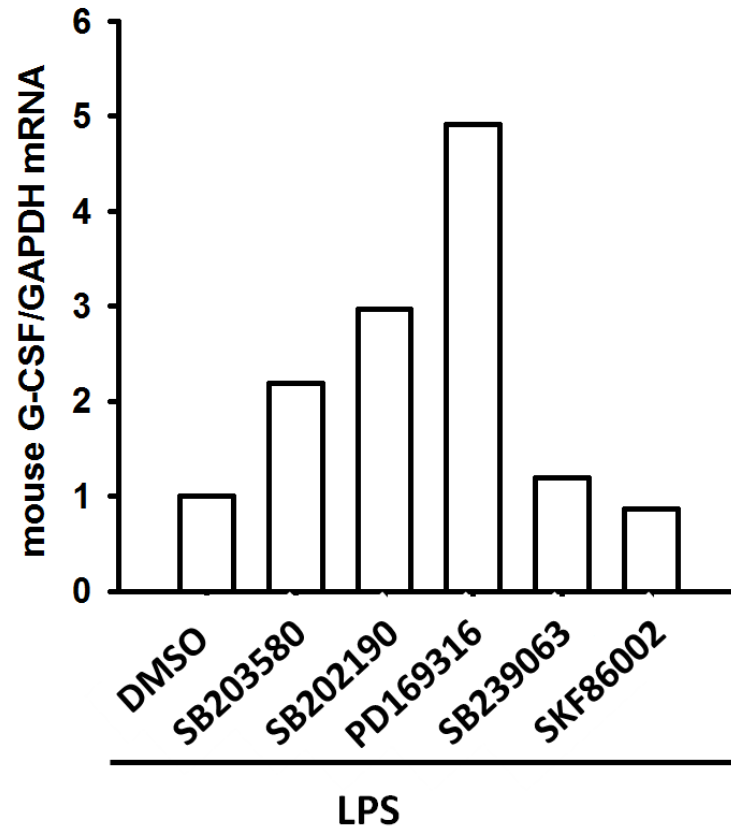
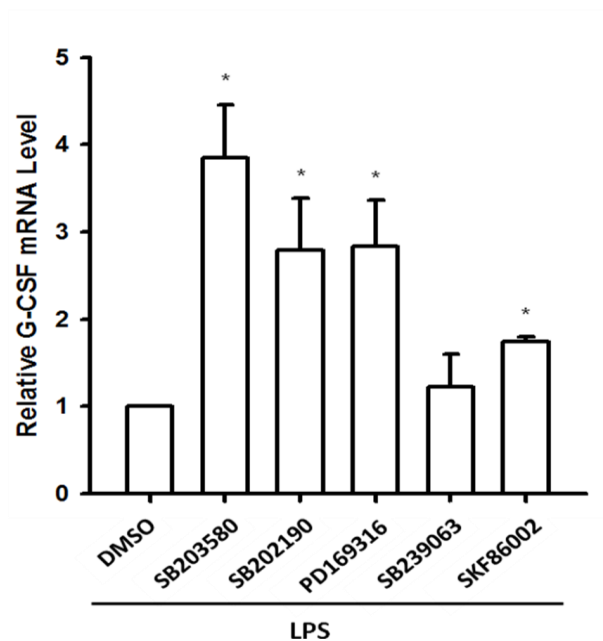


Fig. 9 Effect of various p38 MAPK inhibitors on LPS-induced G-CSF mRNA expression in Bone marrow derived macrophage (BMDM). BMDM cells were cultured as described in the methods, and were treated with various inhibitors as described in Fig. 7. Total RNA was harvested and the levels of G-CSF and GAPDH mRNA were determined by quantitative real time-PCR. Relative level of G-CSF mRNA was normalized to the level of GAPDH mRNA and showed relative to the DMSO control (relative value = 1).

(A)



(B)

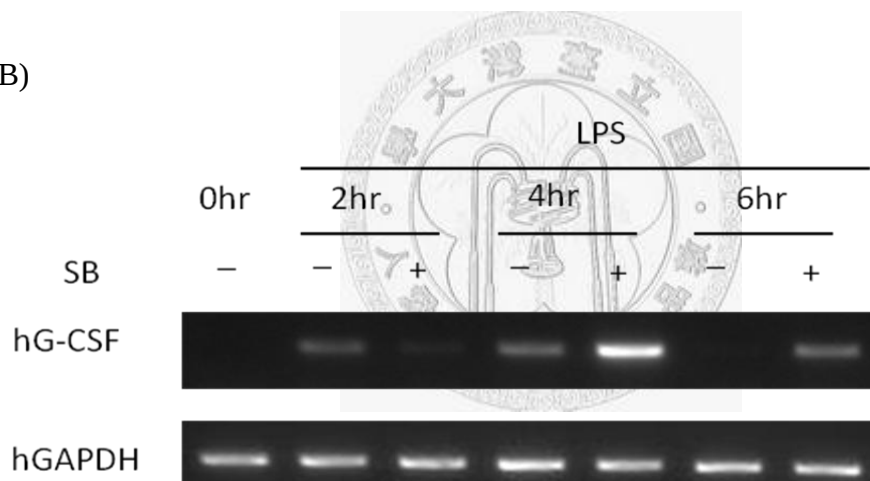


Fig. 10 Effects of various p38 inhibitors on LPS-induced G-CSF mRNA expression in THP-1 cells. (A) THP-1 cells were pretreated with DMSO, SB203580, SB202190, PD169316, SB239063 or SKF86002 for 30 min, followed by LPS (100 ng/ml) for 4 hr. Total RNA was harvested and the levels of G-CSF mRNA were quantitated by quantitative real-time PCR. The levels of G-CSF mRNA was normalized with the level of GAPDH mRNA, and showed relative to the DMSO (relative value = 1). **(B)** PMA induced differentiation of THP-1 macrophage were untreated (-) or pretreated with SB203580 (10 μ M) for 30 min, then stimulated with LPS (100 ng/ml). Total RNA was harvested at the indicated time. G-CSF and GAPDH mRNA were detected by RT-PCR.

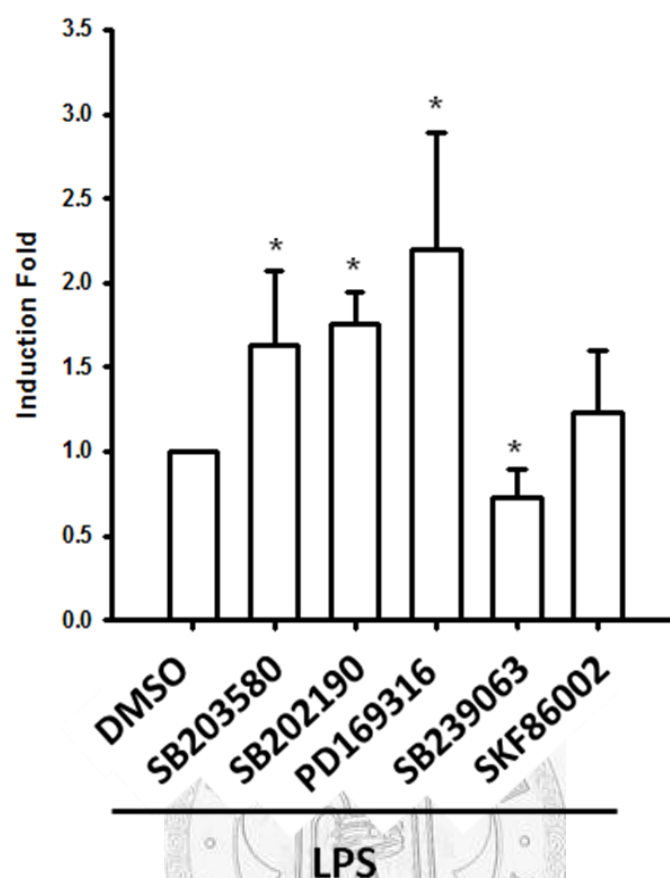


Fig. 11 Effect of various p38 MAPK inhibitors on LPS-induced luciferase activity in cells transfected with 3'UTR construct. Raw 264.7 cells were cotransfected with phRLTK and 3'UTR reporter constructs (1:1). Transfection was carried out as described in Fig.3. At 4 hr after transfection, cells were pretreated DMSO, SB203580, SB202190, PD169316, SB239063 or SKF86002 for 30 min and then treated LPS (100 ng/mL) for another 20 hr. Luciferase activities were assayed as described in Fig. 3. The induction fold are shown relative to the DMSO control (relative value = 1). Values are mean $\pm$ S.D. for 3 independent experiments. * p <0.05 compare with DMSO

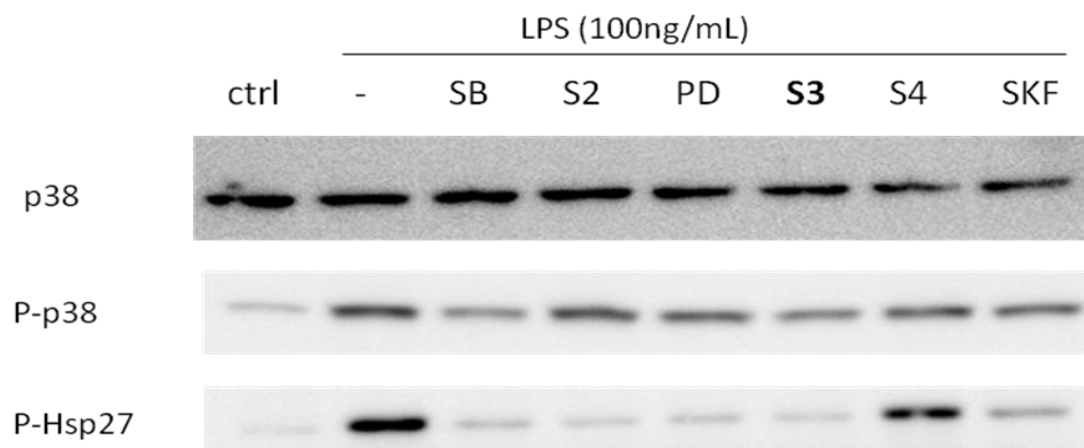
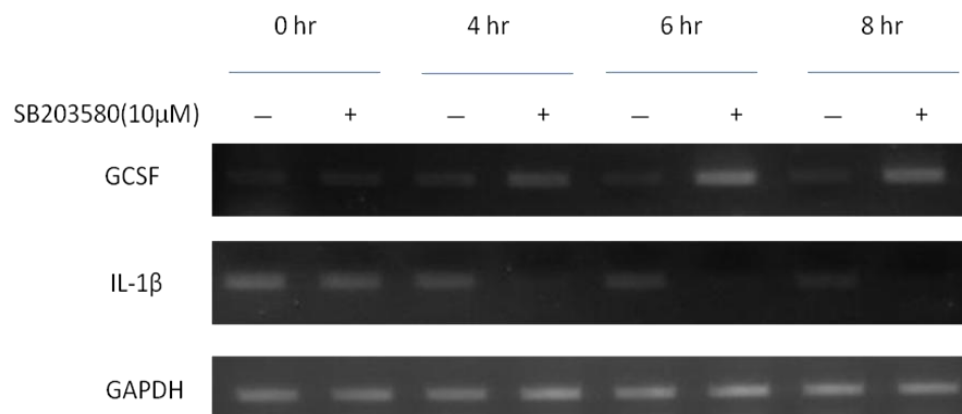


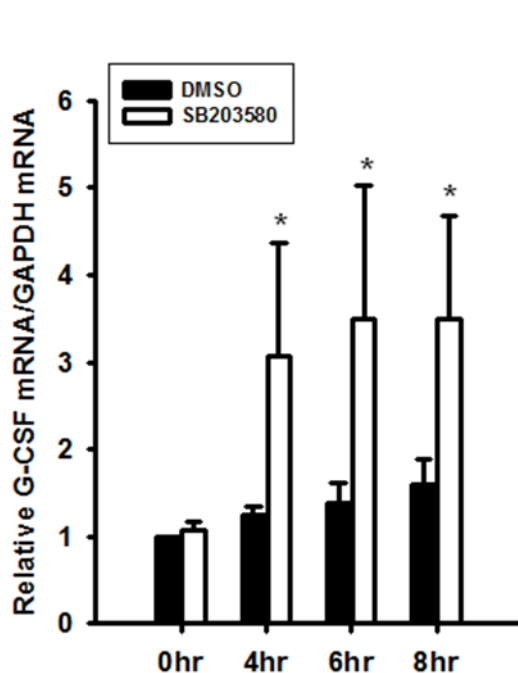
Fig. 12 Effects of various p38 inhibitors on protein levels of p38, p-p38 and p-Hsp27 in THP-1 cells. THP-1 cells were pretreated with p38 inhibitors for 30 min, followed by LPS (100 ng/ml) stimulation for another 30 min. Protein levels of phosphorylation of p38, total p38 α and phosphorylated of Hsp27 were detected by Western blotting.



(A)



(B)



(C)

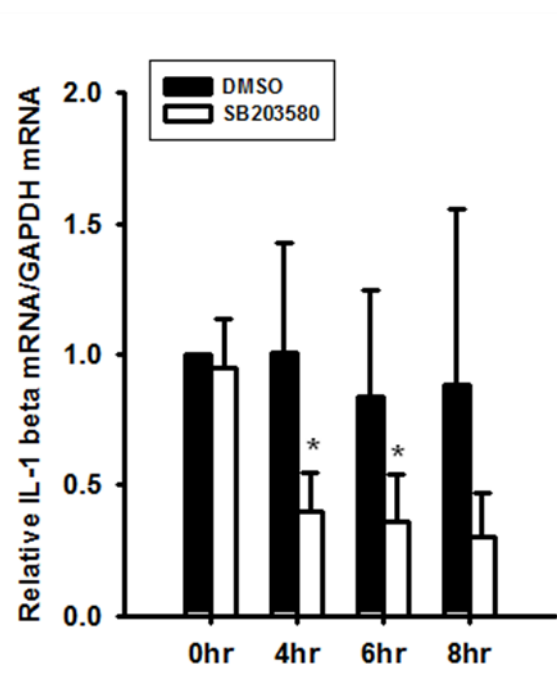


Fig. 13 Effect of SB203580 on G-CSF mRNA expression in Raw 264.7

(A) Raw 264.7 cells were treated with SB203580 (10 μM) for 4, 6 or 8 hr. Total RNA was harvested, and G-CSF, IL-1β and GAPDH mRNA were detected by RT-PCR. (B) The levels of G-CSF mRNA AND GAPDH mRNA were quantitated by image J and levels of G-CSF mRNA was normalized with GAPDH mRNA. (C) The levels of IL-1β mRNA AND GAPDH mRNA were quantitated by image J and levels of IL-1β mRNA was normalized with GAPDH mRNA. The G-CSF AND IL-1β mRNA was shown relative to DMSO at 0 hr (relative value = 1). Values are mean ± S.D. for 3 independent experiments. **p* < 0.05 compare with DMSO.

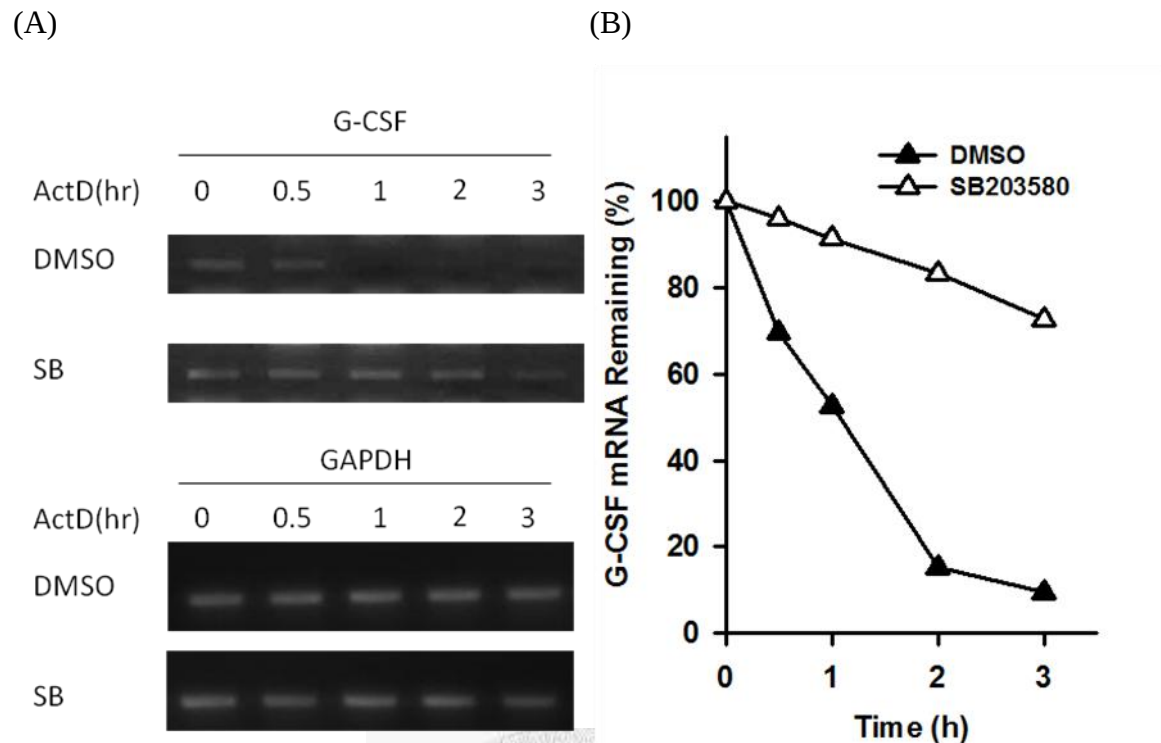


Fig. 14 Effect of SB203580 on G-CSF mRNA turn-over in Raw 264.7 cells.

(A) Raw 264.7 cells were pretreated with DMSO or SB203580 (10 μ M) for 5.5 hr, and then actinomycin D was added to a final of 4 μ g/ml. Total RNA was harvested at indicated time and G-CSF and GAPDH mRNA were detected by RT-PCR. (B) The levels of G-CSF mRNA AND GAPDH mRNA were quantitated by image J and levels of G-CSF mRNA was normalized with GAPDH mRNA. The G-CSF mRNA remaining was shown relative to that at 0 hr (relative value = 100%). Two independent experiments with similar results.

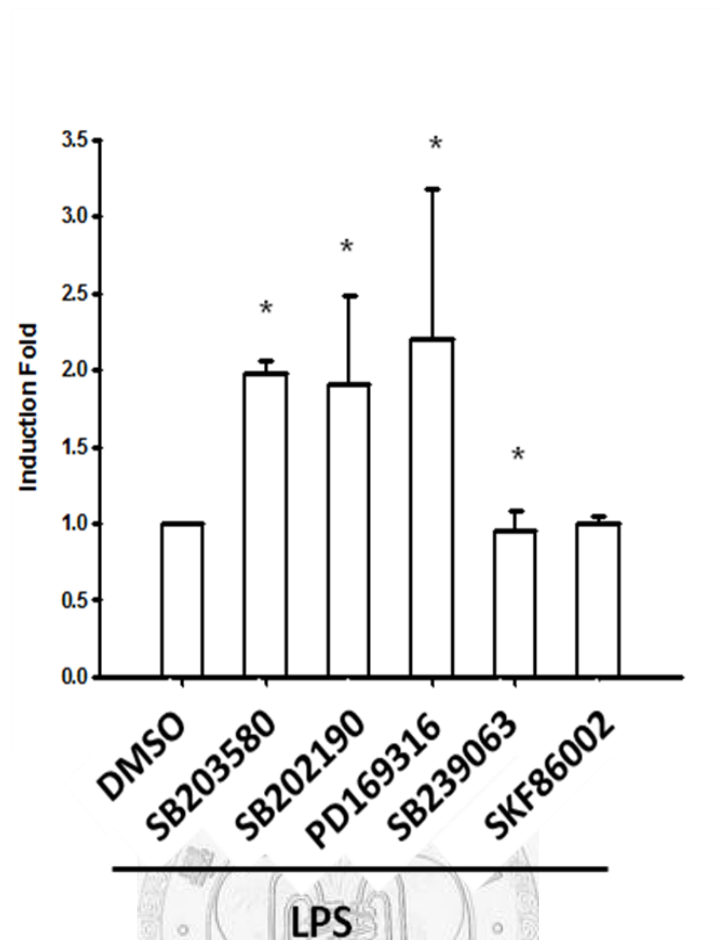


Fig. 15 Effect of different p38MAPKs inhibitors on luciferase activity in cells transfected with 3'UTR construct. Raw 264.7 cells were cotransfected with phRLTK and 3'UTR construct (1:1). Transfection, treatment and luciferase activity assay were carried out as described in Fig. 10, except that cells were not treated with LPS. The induction fold are shown relative to the DMSO control (relative value = 1). Values are mean $\pm$ S.D. of 3 independent experiments. * p <0.05 compare with DMSO.



高品筠(2008) 顆粒性白血球群落刺激因子可刺激 Akt/GSK3 β /NF κ B 的訊息傳遞以抑制內毒素引起之過度活化的微膠細胞。慈濟大學藥理暨毒理學研究所

蔡雯茹(2010) SB203580 增加 G-CSF mRNA 的穩定度進而增強巨噬細胞中 LPS 誘發 G-CSF 的產生。台大醫學院生物化學暨分子生物學研究所

黃宇澤(2010) 探討 LPS 刺激的小鼠聚噬細胞中 Oct2 在 G-CSF 表現過程中所扮演的角色。台大醫學院生物化學暨分子生物學研究所

楊惠晴(2011) MEK-ERK-C/EBP β 在巨噬細胞中對脂多醣誘導 G-CSF 表現的必要角色。台大醫學院生物化學暨分子生物學研究所

Adams, J.L., Boehm, J.C., Kassis, S., Gorycki, P.D., Webb, E.F., Hall, R., Sorenson, M., Lee, J.C., Ayrton, A., Griswold, D.E., *et al.* (1998). Pyrimidinylimidazole inhibitors of CSBP/p38 kinase demonstrating decreased inhibition of hepatic cytochrome P450 enzymes. *Bioorg Med Chem Lett.* 8, 3111-3116.

Anderson, P. (2010). Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, 24-35.

Asaduzzaman, M., Wang, Y., and Thorlacius, H. (2008). Critical role of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in septic lung injury. *Crit Care Med* 36, 482-488.

Aulock, S., Diterich, I., Hareng, L., and Hartung, T. (2004). G-CSF: Boosting endogenous production - a new strategy? *Curr. Opin. Investig. Drugs* 5, 1148-1152.

Badger, A.M., Bradbeer, J.N., Votta, B., Lee, J.C., Adams, J.L., and Griswold, D.E. (1996). Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine

suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J Pharmacol Exp Ther.* 279, 1451-1461.

Balamayooran, G., Batra, S., Fessler, M.B., Happel, K.I., and Jeyaseelan, S. (2010). Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43, 5-16.

Baldassare, J.J., Bi, Y., and Bellone, C.J. (1999). The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. *J Immunol* 162, 5367-5373.

Boneberg, E.M., Hareng, L., Gantner, F., Wendel, A., and Hartung, T. (2000). Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood* 95, 270-276.

Boneberg, E.M., and Hartung, T. (2002a). Granulocyte colony-stimulating factor attenuates LPS-stimulated IL-1beta release via suppressed processing of proIL-1beta, whereas TNF-alpha release is inhibited on the level of proTNF-alpha formation. *Eur. J. Immunol.* 32, 1717-1725.

Boneberg, E.M., and Hartung, T. (2002b). Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF. *Inflamm Res.* 51, 119-128.

Brown, C.Y., Lagnado, C.A., and Goodall, G.J. (1996). A cytokine mRNA-destabilizing element that is structurally and functionally distinct from A+U-rich elements *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13721-13725.

Burgess, A.W., and Metcalf, D. (1980). The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 56, 947-958.

Carr, R., Modi, N., and Doré, C.J. (2003). G-CSF and GM-CSF for treating or preventing neonatal infections. *Cochrane Database Syst Rev.* 3, CD003066

Catani, L., Gugliotta, L., Campanini, E., Mangianti, S., Gibellini, D., Baravelli, S., Vianelli, N., Lemoli, R.M., and Tura, S. (1998). Granulocyte colony-stimulating factor augments in vitro megakaryocyte colony formation by interleukin-3. *Br J Haematol.* *100*, 207-218.

Chao, N.J., Schriber, J.R., Grimes, K., Long, G.D., Negrin, R.S., Raimondi, C.M., Horning, S.J., Brown, S.L., Miller, L., and Blume, K.G. (1993). Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* *81*, 2031-3035.

Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* *20*, 465-470.

Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* *2*, 167-183.

Chou, Y.Y., Gao, J.I., Chang, S.F., Chang, P.Y., and Lu, S.C. (2011). Rapamycin inhibits lipopolysaccharide induction of granulocyte-colony stimulating factor and inducible nitric oxide synthase expression in macrophages by reducing the levels of octamer-binding factor-2. *FEBS J* *278*, 85-96.

Chou, Y.Y., and Lu, S.C. (2011). Inhibition by rapamycin of the lipoteichoic acid-induced granulocyte-colony stimulating factor expression in mouse macrophages. *Arch Biochem Biophys* *508*, 110-119.

Chrestensen, C.A., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Pelo, J.W., Worthington, M.T., and Sturgill, T.W. (2004). MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding. *J Bio Chem* *279*, 10176-10184.

Clark, A.R., Dean, J.L.E., and Saklatvala, J. (2003). Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. *FEBS Lett* *546*, 37-44.

Coles, L.S., Diamond, P., Occhiodoro, F.V., M.A., and Shannon, M.F. (2000). An ordered array of cold shock domain repressor elements across tumor necrosis factor-responsive elements of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter. *J Biol Chem.* 275, 14482-14493.

Coulthard, L.R., White, D.E., Jones, D.L., McDermott, M.F., and Burchill, S.A. (2009). p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol Med* 15, 369-379.

Dührsen, U., Villeval, J.L., Boyd, J., Kannourakis, G., Morstyn, G., and Metcalf, D. (1988). Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 72, 2074-2081.

Demetri, G.D., and Griffin, J.D. (1991). Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78, 2791-2808.

Diya, Z., Lili, C., Shenglai, L., Zhiyuan, G., and Jie, Y. (2008). Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate immun* 14, 99-107.

Dunn, S.M., Coles, L.S., Lang, R.K., Gerondakis, S., Vadas, M.A., and Shannon, M.F. (1994). Requirement for nuclear factor (NF)- κ B p65 and NF-interleukin-6 binding elements in the tumor necrosis factor response region of the granulocyte colony-stimulating factor promoter. *Blood* 83, 2469-2479.

Ernst, T.J., Ritchie, A.R., Demetri, G.D., and Griffin, J.D. (1989). Regulation of granulocyte- and monocyte-colony stimulating factor mRNA levels in human blood monocytes is mediated primarily at a post-transcriptional level. *J Biol Chem.* 264, 5700-5703.

Eyles, J.L., Hickey, M.J., Norman, M.U., Croker, B.A., Roberts, A.W., Drake, S.F., James, W.G., Metcalf, D., Campbell, I.K., and Wicks, I.P. (2008). A key role for G-CSF-induced neutrophil production and trafficking during inflammatory arthritis. *Blood* 112, 5193-5201.

Fabian, M.A., Biggs, W.H., 3rd, Treiber, D.K., Atteridge, C.E., Azimioara, M.D., Benedetti, M.G., Carter, T.A., Ciceri, P., Edeen, P.T., Floyd, M., *et al.* (2005). A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* 23, 329-336.

Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., and Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4, 491-496.

Flomenberg, N. (2005). The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 106, 1867-1874.

Fu, Y., O'Connor, L.M., Shepherd, T.G., and Nachtigal, M.W. (2003). The p38 MAPK inhibitor, PD169316, inhibits transforming growth factor β -induced Smad signaling in human ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 391-397.

Galcheva-Gargova, Z., Dérijard, B., Wu, I.H., and Davis, R.J. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* 259, 760-763.

Gao, J., Davidson, M.K., and Wahls, W.P. (2009). Phosphorylation-independent regulation of Atf1-promoted meiotic recombination by stress-activated, p38 kinase Spc1 of fission yeast. *PLoS One*. 4, e5533.

Garty, B.Z., Levy, I., Nitzan, M., and Barak, Y. (1996). Sweet syndrome associated with G-CSF treatment in a child with glycogen storage disease type Ib. *Pediatrics*. 97, 401-403.

Hale, K.K., Trollinger, D., Rihaneck, M., and Manthey, C.L. (1999). Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol*. 162, 4246-4252.

Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted

by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808-811.

Harada, M., Qin, Y., Takano, H., Minamino, T., Zou, Y., Toko, H., Ohtsuka, M., Matsuura, K., Sano, M., Nishi, J., *et al.* (2005). G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 11, 305-311.

Hareng, L., and Hartung, T. (2002). Induction and Regulation of Endogenous Granulocyte Colony-Stimulating Factor Formation. *Bio. Chem.* 383, 1501-1517.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S. (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* 199, 1641-1650.

Herlaar, E., and Brown, Z. (1999). p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today*. 5, 439-447.

Hierholzer, C., Kelly, E., Lyons, V., Roedling, E., Davies, P., Billiar, T.R., and Tweardy, D.J. (1998). G-CSF instillation into rat lungs mediates neutrophil recruitment, pulmonary edema, and hypoxia. *J Leukoc Biol.* 63, 169-174.

Hill, C.P., Osslund, T.D., and Eisenberg, D. (1993). The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5167-5171.

Hirai, Y., Iyoda, M., Shibata, T., Kuno, Y., Kawaguchi, M., Hizawa, N., Matsumoto, K., Wada, Y., Kokubu, F., and Akizawa, T. (2011). IL-17A stimulates granulocyte colony-stimulating factor production via ERK1/2 but not p38 or JNK in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 302, 244-250.

Hirokawa, M., Lee, M., Motegi, M., and Miura, A.B. (1996). Reversible renal impairment during leukocytosis induced by G-CSF in non-Hodgkin's lymphoma.

Am J Hematol 51, 328-329.

Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., *et al.* (2005). Roles of Stat3 and ERK in G-CSF signaling. *Stem Cells* 23, 252-263.

Kaminska, B. (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* 1754, 253-262.

Knapinska, A.M., Gratacos, F.M., Krause, C.D., Hernandez, K., Jensen, A.G., Bradley, J.J., Wu, X., Pestka, S., and Brewer, G. (2011). Chaperone Hsp27 modulates AUF1 proteolysis and AU-rich element-mediated mRNA degradation. *Mol Cell Biol* 31, 1419-1431.

Kuczek, E.S., Shannon, M.F., Pell, L.M., and Vadas, M.A. (1991). A granulocyte-colony-stimulating factor gene promoter element responsive to inflammatory mediators is functionally distinct from an identical sequence in the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *J Immunol.* 146, 2426-2433.

Kumar, S., and Blake, S.M. (2005). Pharmacological potential of p38 MAPK inhibitors. *Exp Pharmacol* 167, 65-83.

Kunkel, E.J., Plavec, I., Nguyen, D., Melrose, J., Rosler, E.S., Kao, L.T., Wang, Y., Hytopoulos, E., Bishop, A.C., Bateman, R., *et al.* (2004). Rapid structure-activity and selectivity analysis of kinase inhibitors by BioMAP analysis in complex human primary cell-based models. *Assay Drug Dev Technol.* 2, 431-441.

Lahti, A., Kankaanranta, H., and Moilanen, E. (2002). P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 has a bi-directional effect on iNOS expression and NO production. *Eur J Pharmacol.* 454, 115-123.

Lahti, A., Sareila, O., Kankaanranta, H., and Moilanen, E. (2006). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase enhances c-Jun N-terminal kinase activity:

implication in inducible nitric oxide synthase expression. *BMC pharmacol* 6, 5.

Lasa, M., Mahtani, K.R., Finch, A., Brewer, G., Saklatvala, J., and Clark, A.R. (2000). Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol Cell Biol.* 20, 4265-4274.

Lee, J.C., and Young, P.R. (1996). Role of CSBP/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J Leukoc Biol.* 59.

Levesque, J.P. (2003). Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 111, 187-196.

Lim, S., Zou, Y., and Friedman, E. (2002). The transcriptional activator Mirk/Dyrk1B is sequestered by p38alpha/beta MAP kinase. *J Bio Chem* 277, 49438-49445.



Lin, F.Y., Chen, Y.H., Lin, Y.W., Tsai, J.S., Chen, J.W., Wang, H.J., Chen, Y.L., Li, C.Y., and Lin, S.J. (2006). The role of human antigen R, an RNA-binding protein, in mediating the stabilization of toll-like receptor 4 mRNA induced by endotoxin: a novel mechanism involved in vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vascu Biol* 26, 2622-2629.

Liu, H., and Kiledjian, M. (2006). Decapping the message: a beginning or an end. *Biochem Soc Trans.* 34, 35-38.

Lu, C.Z., and Xiao, B.G. (2006). G-CSF and neuroprotection: a therapeutic perspective in cerebral ischaemia.. *Biochem Soc Trans.* 34, 1327-1333.

Lu, Y.C., Yeh, W.C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145-151.

Lye, E., Dhanji, S., Calzascia, T., Elford, A.R., and Ohashi, P.S. (2008). IRAK-4 kinase activity is required for IRAK-4-dependent innate and adaptive immune

responses. *Eur J Immunol* 38, 870-876.

Müller, M.M., Ruppert, S., Schaffner, W., and Matthias, P. (1988). A cloned octamer transcription factor stimulates transcription from lymphoid-specific promoters in non-B cells. *Nature* 336, 544-551.

Manthey, C.L., Wang, S.W., Kinney, S.D., and Yao, Z. (1998). SB202190, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, is a powerful regulator of LPS-induced mRNAs in monocytes. *J Leukoc Biol.* 64, 409-417.

Meuer, K., Pitzer, C., Teismann, P., Kruger, C., Goricke, B., Laage, R., Lingor, P., Peters, K., Schlachetzki, J.C., Kobayashi, K., *et al.* (2006). Granulocyte-colony stimulating factor is neuroprotective in a model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 97, 675-686.

Minatoguchi, S., Takemura, G., Chen, X.H., Wang, N., Uno, Y., Koda, M., Arai, M., Misao, Y., Lu, C., Suzuki, K., *et al.* (2004). Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 109, 2572-2580.

Muniyappa, H., and Das, K.C. (2008). Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: a MLK-3-MKK7-dependent mechanism. *Cell signal* 20, 675-683.

Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziyo, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., and Nomura, H. (1986). Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 319, 415-418.

Nicola, N.A., Metcalf, D., Matsumoto, M., and Johnson, G.R. (1983). Purification of a Factor Inducing Differentiation in Murine Myelomonocytic Leukemia Cell. *J Biol Chem.* 258, 9017-9023.

Nishizawa, M., and Nagata, S. (1990). Regulatory elements responsible for inducible expression of the granulocyte colony-stimulating factor gene in macrophages. *Mol Cell Biol.* 10, 2002-2011.

Oiso, N., Watanabe, K., and Kawada, A. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor-induced Sweet syndrome in a healthy donor. *Br J Hematol* 135, 148.

Pargellis, C., Tong, L., Churchill, L., Cirillo, P.F., Gilmore, T., Graham, A.G., Grob, P.M., Hickey, E.R., Moss, N., Pav, S., *et al.* (2002). Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat Struct Biol* 9, 268-272.

Paschoud, S., Dogar, A.M., Kuntz, C., Grisoni-Neupert, B., Richman, L., and Kuhn, L.C. (2006). Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF1. *Mol Cell Biol* 26, 8228-8241.

Patil, C., Zhu, X., Rossa, C.J., , Kim, Y.J., and Kirkwood, K.L. (2004). p38 MAPK regulates IL-1 β induced IL-6 expression through mRNA stability in osteoblasts. *Immunol Invest.* 32, 123-233.

Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R.S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., *et al.* (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 3, 687-694.

Pimienta, G., and Pascual, J. (2007). Canonical and Alternative MAPK Signaling. *Cell Cycle.* 6, 2628-2632.

Pontoglio, M., Prié, D., Cheret, C., Doyen, A., Leroy, C., Froguel, P., Velho, G., Yaniv, M., and Friedlander, G. (2000). HNF1 α controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep.* 1, 359-365.

Price, T.H., Chatta, G.S., and Dale, D.C. (1996). Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and

elderly humans. *Blood* 88, 335-340.

Putland, R.A., Sassinis, T.A., Harvey, J.S., Diamond, P., Coles, L.S., Brown, C.Y., and Goodall, G.J. (2002). RNA Destabilization by the Granulocyte Colony-Stimulating Factor Stem-Loop Destabilizing Element Involves a Single Stem-Loop That Promotes Deadenylation. *Mol Cell Biol* 22, 1664-1673.

Rutella, S., Zavala, F., Danese, S., Kared, H., and Leone, G. (2005). Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol.* 175, 7085-7091.

Saklatvala, J. (2004). The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Curr Opin Pharmacol* 4, 372-377.

Schabitz, W.R., Kollmar, R., Schwaninger, M., Juettler, E., Bardutzky, J., Scholzke, M.N., Sommer, C., and Schwab, S. (2003). Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke* 34, 745-751.

Schneider, A., Kruger, C., Steigleder, T., Weber, D., Pitzer, C., Laage, R., Aronowski, J., Maurer, M.H., Gassler, N., Mier, W., *et al.* (2005). The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest* 115, 2083-2098.

Shannon, M.F., Pell, L.M., Lenardo, M.J., Kuczek, E.S., Occhiodoro, F.S., Dunn, S.M., and Vadas, M.A. (1990). A novel tumor necrosis factor-responsive transcription factor which recognizes a regulatory element in hemopoietic growth factor genes. *Mol Cell Biol.* 10, 2950-2959.

Shanware, N.P., Williams, L.M., Bowler, M.J., and Tibbetts, R.S. (2009). Non-specific in vivo inhibition of CK1 by the pyridinyl imidazole p38 inhibitors SB 203580 and SB 202190. *BMB Rep.* 42, 142-147.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and

Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 189, 1777-1782.

Souza, L.M., Boone, T.C., Gabrilove, J., Lai, P.H., Zsebo, K.M., Murdock, D.C., Chazin, V.R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K.K., *et al.* (1986). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 233, 61-65.

Stroncek, D.F., Clay, M.E., Herr, G., Smith, J., Jaszcz, W.B., Ilstrup, S., and McCullough, J. (1997). The kinetics of G-CSF mobilization of CD34⁺ cells in healthy people. *Transfus Med.* 7, 19-24.

Su, J., Cui, X., Li, Y., Mani, H., Ferreyra, G.A., Danner, R.L., Hsu, L.L., Fitz, Y., and Eichacker, P.Q. (2010). SB203580, a p38 inhibitor, improved cardiac function but worsened lung injury and survival during *Escherichia coli* pneumonia in mice. *J Trauma* 68, 1317-1327.

ten Hove, T., van den Blink, B., Pronk, I., Drillenburger, P., Peppelenbosch, M.P., and van Deventer, S.J. (2002). Dichotomous role of inhibition of p38 MAPK with SB 203580 in experimental colitis. *Gut* 50, 507-512.

Thorn, J. (2001). The inflammatory response in humans after inhalation of bacterial endotoxin: a review. *Inflamm Res.* 50, 254-261.

Tsai, K.J., Tsai, Y.C., and Shen, C.K. (2007). G-CSF rescues the memory impairment of animal models of Alzheimer's disease. *J Exp Med* 204, 1273-1280.

Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., and Nagata, S. (1986). and characterization of the cDNA for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 7633-7637.

Tsuchiya, M., Kaziro, Y., and Nagata, S. (1987). The chromosomal gene structure for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Eur. J. Biochem.* 165, 7-12.

Tsukada, J., Saito, K., Waterman, W.R., Webb, A.C., and Auron, P.E. (1994). Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 beta gene. *Mol Cell Biol.* 14, 7285-7297.

Underwood, D.C., Osborn, R.R., Kotzer, C.J., Adams, J.L., Lee, J.C., Webb, E.F., Carpenter, D.C., Bochnowicz, S., Thomas, H.C., Hay, D.W., *et al.* (2000). SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence. *J Pharmacol Exp Ther.* 293, 281-288.

Valerius, T., Repp, R., de Wit, T.P., Berthold, S., Platzer, E., Kalden, J.R., Gramatzki, M., and van de Winkel, J.G. (1993). Involvement of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI; CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy. *Blood* 8, 931-939.

van Raam, B.J., Drewniak, A., Groenewold, V., van den Berg, T.K., and Kuijpers, T.W. (2008). Granulocyte colony-stimulating factor delays neutrophil apoptosis by inhibition of calpains upstream of caspase-3. *Blood* 112, 2046-2054.

Waas, W.F., Lo, H.H., and Dalby, K.N. (2001). The kinetic mechanism of the dual phosphorylation of the ATF2 transcription factor by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase alpha. Implications for signal/response profiles of MAP kinase pathways. *J Biol Chem* 276, 5676-5684.

Wang, X.S., Diener, K., Manthey, C.L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C.N., Chan-Hui, P.Y., Mantlo, N., *et al.* (1997). Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 272, 23668-23674.

Yamagami, S. (2004). Effects of TGF-2 on Immune Response-Related Gene Expression Profiles in the Human Corneal Endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 515-521.

Yao, J., Mackman, N., Edgington, T.S., and Fan, S.T. (1997). Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem.* 272,

17795-17801.

Young, L.E., Moore, A.E., Sokol, L., Meisner-Kober, N., and Dixon, D.A. (2012). The mRNA stability factor HuR inhibits microRNA-16 targeting of COX-2. *Mol Cancer Res* 10, 167-180.

Zhang, J., Shen, B., and Lin, A. (2007). Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. *Trend Pharmacol Sci* 28, 286-295.

Zhang, L., Yang, M., Wang, Q., Liu, M., Liang, Q., Zhang, H., and Xiao, X. (2011). HSF1 regulates expression of G-CSF through the binding element for NF-IL6/CCAAT enhancer binding protein beta. *Mol Cell Biochem* 352, 11-17.

Zohlnhöfer, D., Ott, I., Mehilli, J., Schömig, K., Michalk, F., Ibrahim, T., Meisetschläger, G., von Wedel, J., Bollwein, H., Seyfarth, M., *et al.* (2006). Stem Cell Mobilization by Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients With Acute Myocardial Infarction A Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 295, 1003-1010.





附錄一 PT-PCR 的 Primer

Gene number	Sequence (5' to 3')	Tm(°C)
GAPDH(XR 030830)	Forward:AAAGGATCCACTGGCGTCTTCACCACC	55
	Reverse:GAATTCGTCATGGATGACCTT	
mG-CSF (NM 009971.1)	Forward: CTCAACTTTCTGCCCAGAGG	55
	Reverse:CTGGAAGGCAGAAGTGAAGG	
hG-CSF (NM 172220.1)	Forward: CACTCTGGACAGTGCAGGAAG	60
	Reverse: CGACACCTCCAGGAAGCTCTG	
IL-1 β (NM 008361.3)	Forward: GACCTTCCAGGATGAGGACA	55
	Reverse: AGGCCACAGGTATTTTGTCTG	

附錄二 建立質體的 primer: Mus musculus colony stimulating factor 3

(NM 00971.1)

Plasmid	primer name	Sequence (5' to 3')	Tm(°C)
GAPDHp(-412/+26)-Luc	mouse GAPDH promoter_F	Forward(MluI):ACACGCGTGAGTCCTATCCTGGGAAC	57
	mouse GAPDH promoter_R	Reverse:ATCAGATCTGCAGGAGAAGAAAATGAG	
GAPDHp(-81/+26)-Luc (Basic)	short GPADH promoter_F	Forward:CGATAGGTACCGAGCTCTTACGATGATGGAGGACGTGATG	55
	short GPADH promoter_R	Reverse:CATCACGTCCTCCATCATCGTAAGAGCTCGGTACCTATCG	
GAPDHp(-81/+26)-Luc-3'UTR SLDE mutant1	mG-CSF 3'UTR-F	Forward:ACCTGAGCAGAAAGCCCTTTCC	55
	mG-CSF 3'UTR-R	Reverse:GGAACACCACACTTTATTATCCGCA	
	3'F3	Forward:GTGTCATCTGTCAACAGCAGTGTTCCCAAAGTCTG	55
	3'R3	Reverse:GTTGACAGATGACACAGGGATGTCTTGTCCCCCGGAA	
GAPDHp(-81/+26)-Luc-3'UTR SLDE mutant2	mG-CSF 3'UTR-F	Forward:ACCTGAGCAGAAAGCCCTTTCC	55
	mG-CSF 3'UTR-R	Reverse:GGAACACCACACTTTATTATCCGCA	

	3'F4	Forward:CCCTGTCGACTATTTAAAC AGCAGTGTCCCA	55
	3'R4	Reverse:AAATAGTCGACAGGGATGT CTTGTCCCCCGGAA	
GAPDHp(-81/+26)- Luc- 3'UTR SLDE mutant3	mG-CSF 3'UTR-F	Forward:ACCTGAGCAGAAAGCCCTT TCC	55
	mG-CSF 3'UTR-R	Reverse:GGAACACCACACTTTATTA TCCGCA	
	3'F6	Forward:CCCTGTTATATATTATAAC AGCAGTGTCCCAAAGT	55
	3'R6	Reverse:TGTTATAATATATAACAGG GATGTCTTGTCCCCCGGAA	

附錄三 qRT-PCR primer

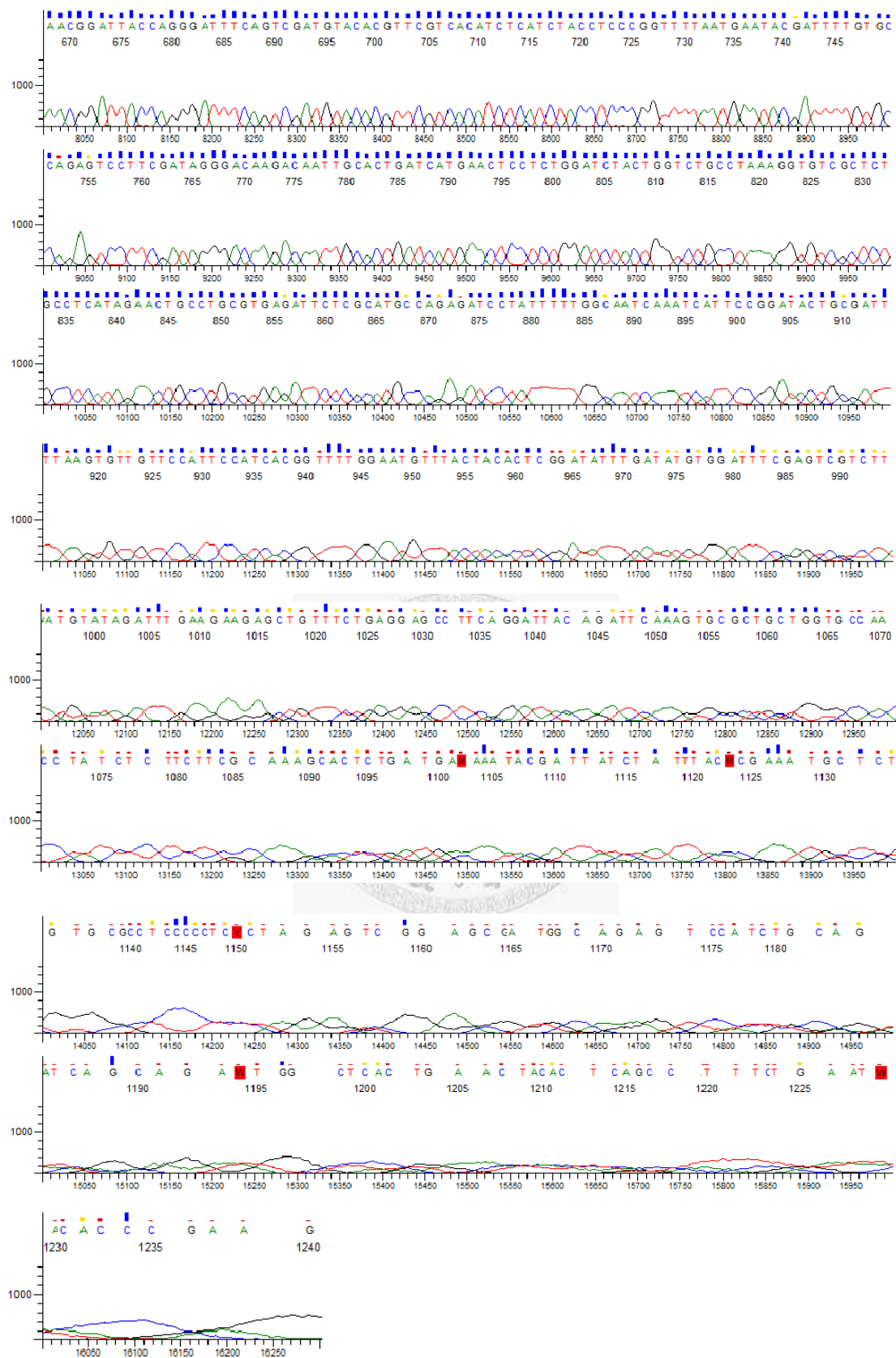
Gene number	Sequence (5' to 3')
GAPDH(XR 030830)	Forward:GGCATTGTGGAAGGGCTCAT
	Reverse:GACACATTGGGGGTAGGAACAC
mG-CSF(NM 009971.1)	Forward:TTGGCAACATCCAGCTGAAG
	Reverse:GCAGGCTCTATCGGGTATTTCC
hG-CSF(NM 172220.1)	Forward: TCCCCATCCCATGTATTTATCT
	Reverse: AACTCAGAAATGCAGGGAAGGA
Renilla luciferase(AF 025846.2)	Forward:GCAAGGGTTGGTCGTGAGG
	Reverse:TCATCCGTTTCCGTTCTG
firefly luciferase(U47295.2)	Forward:GCCTGAAGTCTCTGATTAAGT
	Reverse:ACACCTGCGTCGAAGA

Applied Biosystems

C#:44 W:C6 Plate Name:110614-2

TS:39 CRL:973 QV20+:983



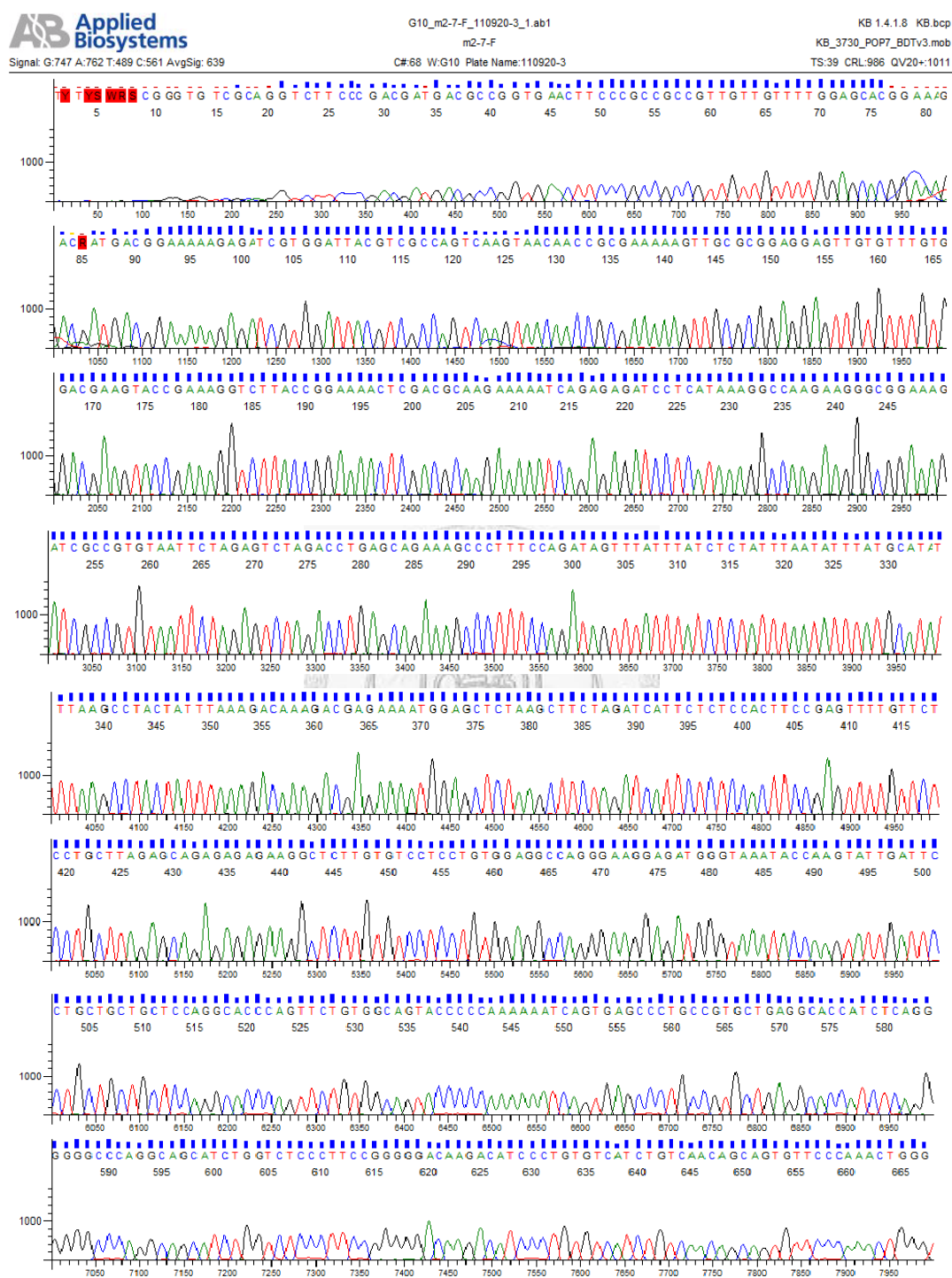


Inst ModelName:3730x/NTUH3730-1414-029
Sequence Scanner v1.0

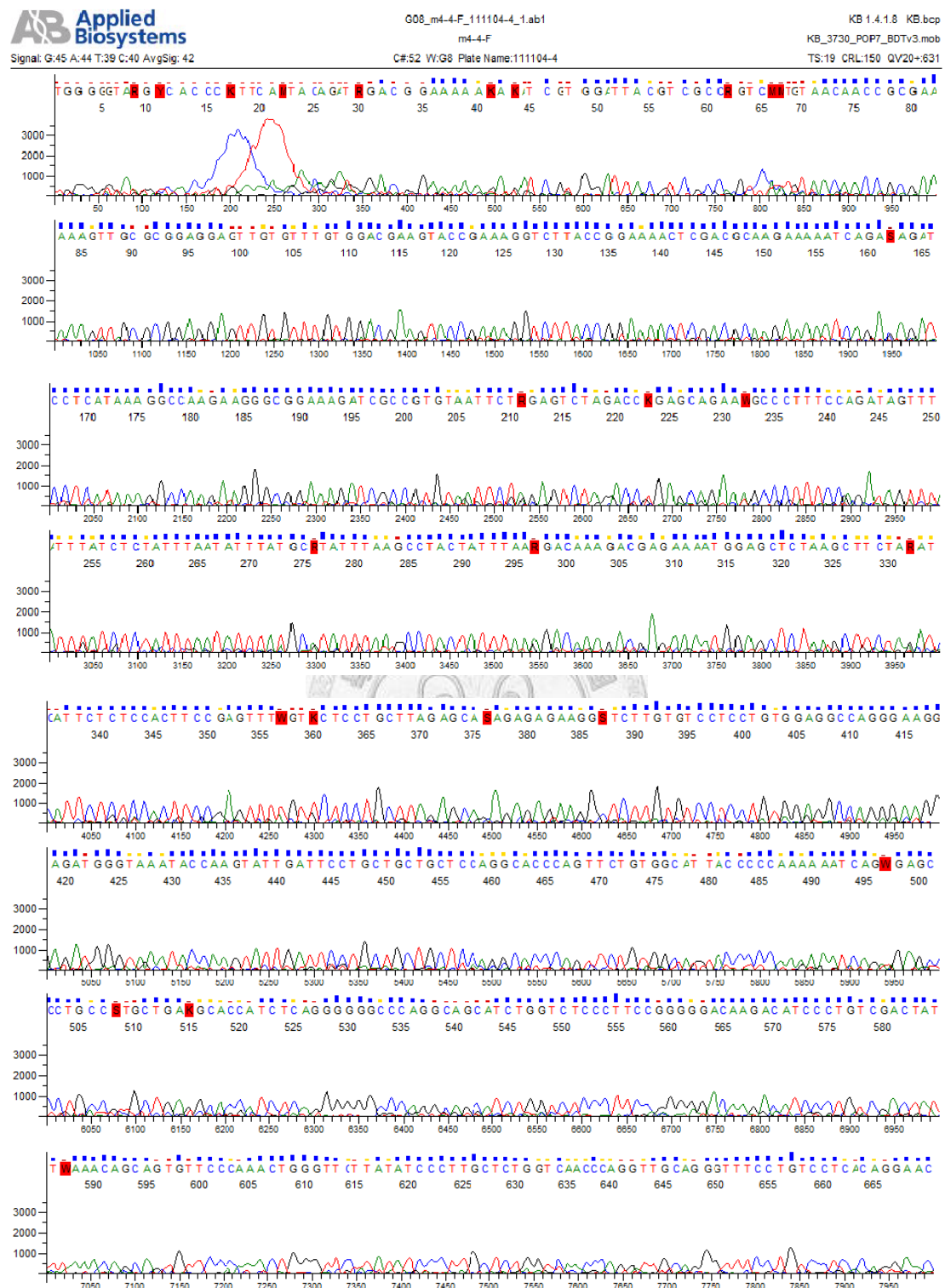
Pure Base QVs: 1520
Mixed Base QVs: 1016

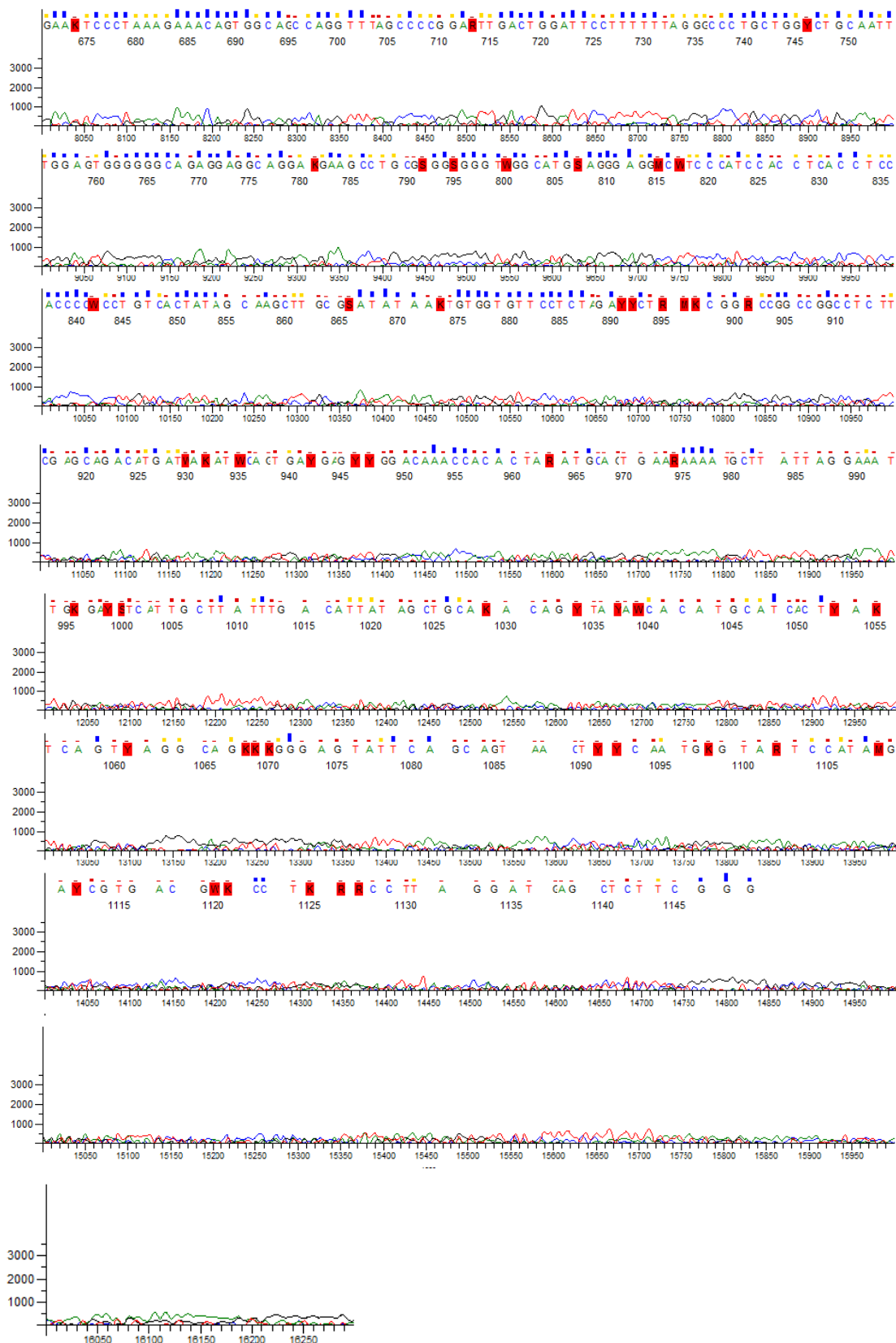
Printed on: 七月 30, 2012 10:15:58 GMT
Electropherogram Data Page 5 of 5

附錄五: GAPDHp(-81/+26)-Luc-3'UTR SLDE mutant 1



附錄六: GAPDHp(-81/+26)-Luc-3'UTR SLDE mutant 2



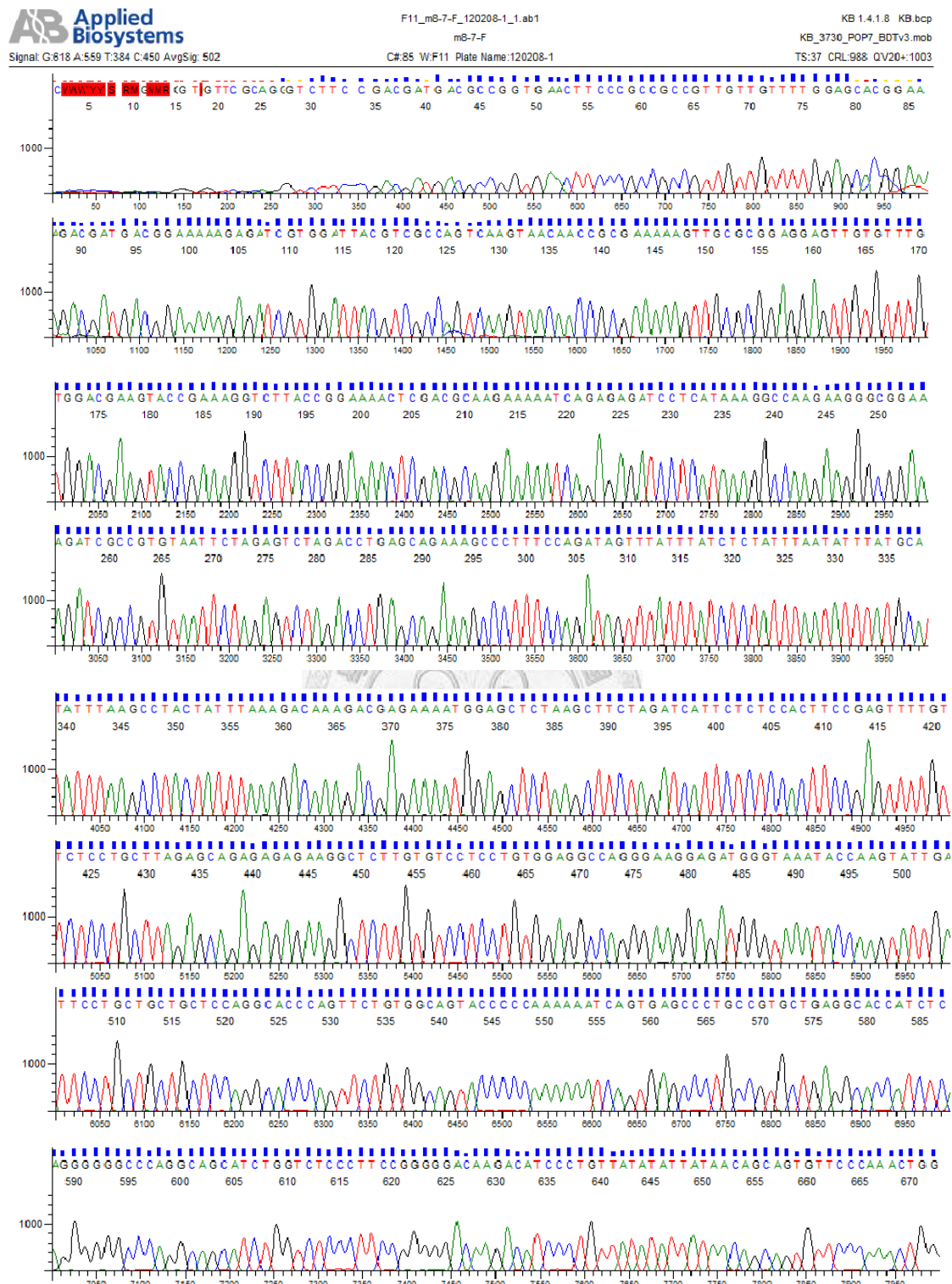


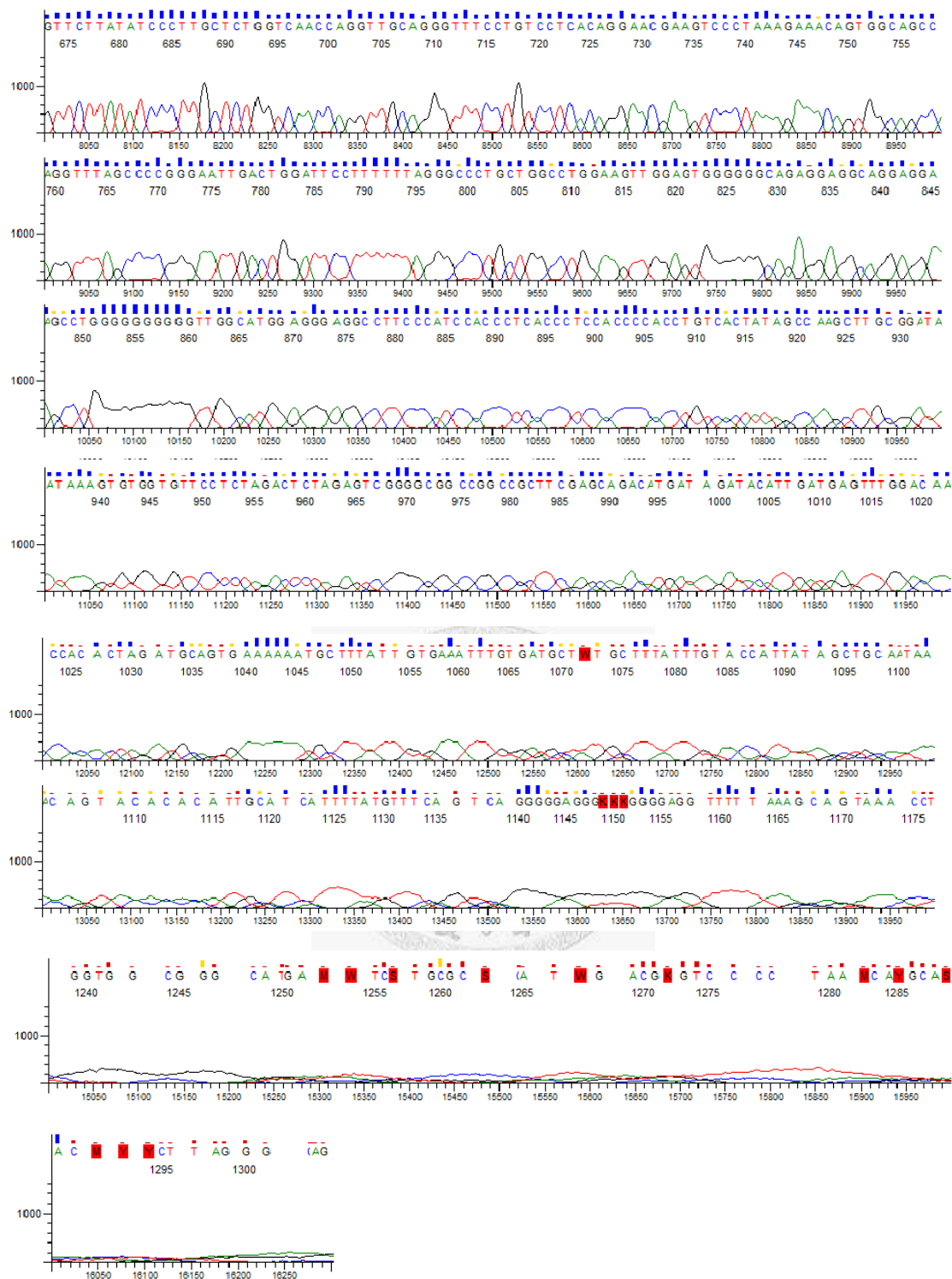
Inst ModelName:3730xINTUH3730-1414-029
Sequence Scanner v1.0

Pure Base QVs: 1520
Mixed Base QVs: 10 16

Printed on: 七月 30, 2012 10:05:27 GMT
Electropherogram Data Page 5 of 5

附錄七: GAPDHp(-81/+26)-Luc-3'UTR SLDE mutant 3





Inst ModelName:3730xl/NTUH3730-1414-029
Sequence Scanner v1.0

Pure Base QV's: 1820
Mixed Base QV's: 10-16

Printed on: 七月 30, 2012 10:18 GMT
Electropherogram Data Page 5 of 5