財團法人明日醫學基金會專題研究計畫申請書

一、基本資料： 申請條碼：

本申請案所需經費(單選)	■A 類(研究主持費及執行計畫所需經費) ☐B 類(研究主持費，限人文處計畫，不須填寫表 C002 及 C004 至 C009)					
計畫類別(單選)	☐一般型研究計畫 ☐特約研究計畫 ■新進人員研究計畫 ☐其他					
研究型別	■個別型計畫 ☐整合型計畫					
計畫歸屬	☐自然處 ☐工程處 ■生物處 ☐人文處 ☐科教處 ☐永續會					
申請機構/系所(單位)	中國醫藥大學 醫學系					
本計畫主持人姓名	賴志河	職稱	副教授	身分證號碼		
本計畫名稱	中文	探討幽門螺旋桿菌調節免疫反應之機轉				
	英文	The mechanisms of immune manipulation by *Helicobacter pylori*				
整合型總計畫名稱						
整合型總計畫主持人				身分證號碼		
全程執行期限	自民國 99 年 1 月 1 日起至民國 99 年 12 月 31 日					
研究學門(請參考本申請書所附之學門專長分類表填寫)	學門代碼	名稱(如為其他類，請自行填寫學門)				
	BI					
研究性質	■純基礎研究 ☐導向性基礎研究 ☐應用研究 ☐技術發展					
本計畫是否為國際合作計畫	■否； ☐是，合作國家：_____，請加填表 I001～I003					
本計畫是否申請海洋研究船	■否； ☐是，請務必填寫表 C014。					
本計畫是否有進行下列實驗：(勾選下列任一項，須附相關實驗之同意文件) ☐人體實驗 ☐基因重組實驗 ☐動物實驗						
計畫連絡人	姓名：賴志河 電話：(公) 04-22052121 ext 7729 (宅/手機) 0937-936212					
通訊地址	台中市學士路 91 號 醫學系 微生物學科					
傳真號碼	04-22053764	E-MAIL	chl@mail.cmu.edu.tw			

二、申請補助經費：

（一）請將本計畫申請書之第四項(表 C004)、第五項(表 C005)、第六項(表 C006)、第七項(表 C007)、第八項(表 C008)所列費用個別加總後，分別填入「研究人力費」、「耗材、物品及雜項費用」、「研究設備費」、「國外或大陸地區差旅費」及「出席國際學術會議差旅費」欄內。

（二）若有申請國際合作研究計畫費用者，請將表 I002 之「C 類經費合計」欄金額填入「國際合作研究計畫國外學者來臺費用」欄內，「A 類經費與 B 類經費合計」欄金額填入「國際合作研究計畫出國差旅費」欄內。

（三）管理費為申請機構配合執行本計畫所需之費用，其計算方式係依本會規定核給補助管理費之項目費用總和及各申請機構管理費補助比例計算後直接產生，申請人不須填寫「管理費」欄。

（四）「貴重儀器中心使用額度」係將第九項(表 C009)所列使用費用合計數填入。

（五）請依各年度申請博士後研究之名額填入下表。

（六）申請機構或其他單位（含產業界）提供之配合項目，請檢附相關證明文件。

金額單位：新台幣元

執行年次 / 補助項目		第一年（99 年 01 月～99 年 12 月)	第二年（___年___月～___年___月）	第三年（___年___月～___年___月）	第四年（___年___月～___年___月）	第五年（___年___月～___年___月）
業務費						
研究人力費						
耗材、物品及雜項費用						
國際合作研究計畫國外學者來臺費用						
研究設備費						
國外差旅費						
國外或大陸地區差旅費						
出席國際學術會議差旅費						
國際合作研究計畫出國差旅費						
管理費						
合計						
貴重儀器中心使用額度						
博士後研究	國內、外地區	共_____名	共_____名	共_____名	共_____名	共_____名
	大陸地區	共_____名	共_____名	共_____名	共_____名	共_____名

申請機構或其他單位（含產業界）提供之配合項目（無配合補助項目者免填）

配合單位名稱	配合補助項目	配合補助金額	配合年次	證明文件

三、主要研究人力：

（一）請依照「主持人」、「共同主持人」、「協同研究人員」及「博士後研究」等類別之順序分別填寫。

類 別	姓名	服務機構/系所	職稱	在本研究計畫內擔任之具體工作性質、項目及範圍	*每週平均投入工作時數比率(%)
主持人	賴志河	中國醫藥大學/醫學系	副教授	統籌及推動本研究計畫、參與主要實驗工作、整理文獻背景及撰寫研究成果	80%

※註：每週平均投入工作時數比率係填寫每人每週平均投入本計畫工作時數佔其每週全部工作時間之比率，以百分比表示（例如：50%即表示該研究人員每週投入本計畫研究工作之時數佔其每週全部工時之百分五十）。

（二）如申請博士後研究，請另填表 CIF2101 及 CIF2102(若已有人選者，請務必填註人選姓名，並將其個人資料表併同本計畫書送本會)。

四、研究人力費：

（一） 類別/級別欄請依專任助理(含碩士、學士、三專、五(二)專及高中職)、兼任助理(含博士生、碩士生、大專學生、講師及助教)及臨時工等填寫。

（二） 專任助理及兼任助理之每月工作酬金標準，不得超過本會補助專題研究計畫專任助理人員工作酬金參考表及本會補助專題研究計畫兼任助理人員工作酬金支給標準表之規定。

（三） 獲本會大專學生研究創作獎或碩士論文獎者，於本會公布獲獎之日起三年內就讀國內公私立大專校院碩士班或博士班，並參與本計畫研究工作，申請每月碩士班研究生研究助學金 10,000 元或博士班研究生獎助金 28,000 元部分請務必於「級別/姓名欄」填列姓名，並檢附得獎證明影本及學生證正反面影本，以利審核。

（四） 申請專任助理者，除依工作月數填列工作酬金及至多 1.5 個月年終工作獎金外，須另填列投保勞保及健保之「雇主應負擔之勞、健保費」(可至本會網站下載)。

（五） 請分年列述。

金額單位：新台幣元

（一）專任助理、講師及助教級兼任助理、臨時工資						
類別/級別	人數	姓 名	工 作 月 數	月支酬金 （含勞健保費）	小計	請述明：1. 最高學歷 2. 曾擔任專題研究計畫專任助理之經歷 3. 在本計畫內擔任之具體工作性質、項目及範圍
合 計（一）						
（二）博士班研究生、碩士班研究生及大專學生兼任助理						
級別/姓名	人數 （1）	每人每月 單元數(2)	獎助月數 （3）	小計（4）= $ 2000×(1)×(2)×(3)		在本研究計畫內擔任之具體工作性質、項目及範圍
合計（二）						
總計（三） ＝合計(一) ＋合計(二)						

五、耗材、物品及雜項費用：

（一） 凡執行研究計畫所需之耗材、物品及雜項費用，均可填入本表內。

（二） 說明欄請就該項目之規格、用途等相關資料詳細填寫，以利審查。

（三） 若申請單位有配合款，請於備註欄註明。

（四） 請分年列述。

金額單位：新台幣元

項 目 名 稱	說明	單位	數量	單價	金額	備註
消耗性器材	細胞培養耗材：培養基、胎牛血清、無菌培養皿、液態氮、無菌吸管及離心管等	年	1			
消耗性器材	微生物培養耗材：培養基、綿羊血、棉棒、培養皿、無菌吸管及離心管等	年	1			
消耗性器材	Reporter assay kit，利用 reporter kit 分析 IL-8，NF-kB 及 AP-1 promoter activity，每組十瓶，共五組	年	2			
消耗性器材	分子生物學實驗藥品：限制酶、聚合酶、電泳膠、緩衝液及 DNA marker 等	年	1			
消耗性器材	蛋白質電泳耗材：電泳配製試劑、protein marker、nitrocellulose membrane 及濾紙等	批	1			
消耗性器材	玻璃瓶、吸管、塑膠瓶及血清瓶等耗材	年	1			

消耗性器材	酒精、有機溶劑及化學試劑等	批	1			
資訊設備費	影印紙、碳粉夾、光碟片等資訊耗材	年	1			
論文投稿費	期刊雜誌投稿	篇	2			
合　　計						

十一、研究計畫中英文摘要：請就本計畫要點作一概述，並依本計畫性質自訂關鍵詞。

（一） 計畫中文摘要。(五百字以內)

幽門螺旋菌感染宿主後會引起強烈但無效的免疫反應，反而使細菌在宿主體內持續感染。我們實驗室初步的研究發現，幽門螺旋菌抑制經致裂原誘導巨噬細胞產生一氧化氮的能力，顯示幽門螺旋菌可能會經由抑制巨噬細胞的活化，而讓細菌持續感染。本研究計畫目標一：我們將利用小鼠巨噬細胞當作體外模式，分析幽門螺旋菌抑制對致裂原活化巨噬細胞的能力，同時比較野生種與分別來自臨床分離具抗藥性之菌株，及可能致病基因突變之菌株，另外，我們也將探討是否具感染活性的幽門螺旋菌才具影響力及其機轉。目標二：建立幽門螺旋菌感染小鼠的體內模式，探討不同的菌株群聚宿主的能力，並比較其對於整體免疫反應影響之差異，我們將特別著重在分析巨噬細胞活性、B 細胞產生抗體辨識菌株的能力，以及輔助性 T cell 第一型或第二型細胞激素之分泌。藉由本研究計畫之執行，我們嘗試揭開幽門螺旋菌影響免疫系統及能長期持續感染人類可能的機制。

關鍵詞：幽門螺旋菌、持續感染、巨噬細胞、一氧化氮、抗藥性及輔助性 T cell

（二） 計畫英文摘要。（五百字以內）

Helicobacter pylori cause strong but useless immune responses; therefore, it induced the persistent infection in humans. From preliminary data, we found that *Helicobacter pylori* inhibit the mitogen-induced nitric oxide production from macrophages. It implied that *Helicobacter pylori* might cause long-term infection in host through inhibiting the activities of macrophages. The first aim in this project, we'll use mouse macrophages as an *in vitro* model to study and compare the effects of wild type strain, clinically isolates, and variant virulence factor mutant strains on the functions of mitogen-stimulated macrophages. Meanwhile, we'll study whether active or inactive *Helicobacter pylori* have different effects on immune responses and their possible mechanisms. In the second aim, we'll evaluate the colonization activities of different strains by an *in vivo* mice infectious model. Therefore, the activities of macrophages, the *Helicobacter pylori* specific antibody produced from B cells, and the helper T cells type I and II cytokines productions are monitored and compared. Based on the results of the plan, we'll select the most potential *Helicobacter pylori* strains on affecting immune responses. Through this study, we'll provide more information to explore the possible mechanisms about the effect of *Helicobacter pylori* on the immune system and persistent infection.

Keywords: *Helicobacter pylori*, persistent infection, macrophage, nitric oxide, antibiotic resistance, and helper T cells

十二、研究計畫內容：

（一）近五年之研究計畫內容與主要研究成果說明。（連續性計畫應同時檢附上年度研究進度報告）

（二）研究計畫之背景及目的。請詳述本研究計畫之背景、目的、重要性及國內外有關本計畫之研究情況、重要參考文獻之評述等。本計畫如為整合型研究計畫之子計畫，請就以上各點分別述明與其他子計畫之相關性。

（三）研究方法、進行步驟及執行進度。請分年列述：1.本計畫採用之研究方法與原因。2.預計可能遭遇之困難及解決途徑。3.重要儀器之配合使用情形。4.如為整合型研究計畫，請就以上各點分別說明與其他子計畫之相關性。5.如為須赴國外或大陸地區研究，請詳述其必要性以及預期成果等。

（四）預期完成之工作項目及成果。請分年列述：1.預期完成之工作項目。2.對於學術研究、國家發展及其他應用方面預期之貢獻。3.對於參與之工作人員，預期可獲之訓練。4.本計畫如為整合型研究計畫之子計畫，請就以上各點分別說明與其他子計畫之相關性。

(一) 研究計畫之背景

一、幽門螺旋菌的微生物特性

幽門螺旋菌為一種微需氧的革蘭氏陰性細菌 (1)，長度約為 2.5-5.0 μm，寬度約為 0.5-1 μm。菌體外形呈螺旋狀；末端具有 4~6 根可幫助菌體運動的端鞭毛 (2,3)。幽門螺旋菌以人為其唯一的宿主，感染人類的胃細胞，由於此菌具有強烈的尿素水解能力，能幫助菌體生長於胃部之酸性環境；還具有過氧化氫酶可以幫助細菌對抗外來的氧化壓力。一般臨床菌株可培養於含有羊血的培養基，2~3 天後可觀察到細小的灰色菌落。

二、幽門螺旋菌之流行病學及感染機制

世界上超過 50%的人口感染有幽門螺旋菌 (4)，而開發中國家人民感染幽門螺旋菌的比例高過已開發國家 (5)，可見得幽門螺旋菌的感染受飲食習慣及衛生條件的影響。幽門螺旋菌的感染可以導致一般胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍及胃癌等疾病 (4)，而最近的報導指出也可能與胃食道逆流疾病 (gastroesophogeal reflux disease，GERD) 有關。在台灣地區的研究發現患有非潰瘍性消化不良的病人中，有 55.5%受到幽門螺旋菌的感染 (6)。而且受幽門螺旋菌感染的病人得到消化性潰瘍的機率比未受幽門螺旋菌感染的病人高 (7)；感染幽門螺旋菌後，細菌會逐漸侵入胃黏膜細胞內，持續感染並刺激胃細胞分泌大量的胃酸及胃泌素 (gastrin)，導致慢性胃炎 (8)；此種慢性胃發炎的反應容易造成胃萎縮 (9)，而患有萎縮性胃炎的病人被認為罹患胃癌的機會較高 (10)，台灣地區有 60.3%的胃癌患者受到幽門螺旋菌的感染 (6)，可見得幽門螺旋菌與台灣地區病人罹患胃癌有極大關係。

三、幽門螺旋菌之毒力因子

細菌通常具有許多特殊的基因負責形成功能特殊的蛋白質，用以保護自己免於宿主免疫系統的侵害或分泌毒素分子破壞宿主細胞，這些特殊的蛋白質統稱為毒力因子 (virulence factor)。幽門螺旋菌之所以能生存在極酸性的胃部，也與其所具有的毒力因子有關。在本計畫中，我們有興趣研究的幽門螺旋菌毒力因子如下所介紹：

1. 液泡毒素 (Vacuolating toxin, VacA)

一半以上的幽門螺旋菌會造成培養細胞發生空泡狀現象，是由於幽門螺旋菌分泌的一種毒素所導致，因此這種毒素被命名為液泡毒素。液泡毒素為一種 AB (“A” for active, “B” for binding)型毒素，具有負責結合到細胞 (B subunit) 與毒素活性 (A subunit) 兩個次單位。Telford 等人研究發現液泡毒素有 37 kDa 及 58 kDa 兩個次單位，58 kDa 會在細胞膜上形成孔洞，37kDa 再經由此孔洞進入細胞內造成感染細胞空泡化 (1)。不同的細胞對於 *vacA* 不同基因型的感受性也有差異，所以，造成細胞傷害的不同程度除了和 *vacA* 基因型有關以外，也和受感染細胞的種類有相關 (11,12)。

2. 細胞毒素相關基因 (Cytotoxin associated gene-pathogenicity associated island, *cag*-PAI)

幽門螺旋菌具有一段基因集合體—cytotoxin associated gene–pathogenicity associated island，簡稱為 *cag*-PAI。*cag*-PAI 為一個 40 kb 含有 31 個不同但相鄰基因的片段，分別負責形成幽門螺旋菌所具有的獨特蛋白質以幫助細菌感染宿主細胞 (13)，*cag*-PAI 當中有許多基因如:*cagE*、*cagG*、*cagH*、*cagI*、*cagL*…等，會導致細胞分泌 IL-8 及細胞發炎反應，(14-16)。*cag*-PAI 中絕大多數的基因功能目前仍不清楚,其中 *cagE* 及其他五個基因與 *Bordetella pertussis* 轉譯第四型分泌系統的基因相似度非常高,推測可能形成第四型分泌系統以幫助幽門螺旋菌將其本身之蛋白質注入宿主細胞中 (17,18) 。

3. CagA 的細胞作用機轉

cagA 基因轉譯出的 CagA 蛋白質是一具有高度免疫抗原性的膜蛋白質，會經由第四型分泌系統進入宿主細胞 (19,20)，待進入宿主細胞之後，CagA 會被宿主細胞內的 c-src kinase 磷酸化其 tyrosine (21,22)，被磷酸化的 CagA 坐落於宿主細胞的細胞膜上(20,22,23)，並接續影響宿主細胞內的訊號傳遞，使宿主細胞形成一種狹長狀之細胞型態稱為 humming bird phenotype (23)，並可能進一步導致細胞之癌化或細胞凋亡 (apoptosis)。最近，Higashi 等人也發現 translocated CagA 會與細胞膜 association 是依賴 EPIYA motif 的幫忙 (24),而 Tsutsumi 等人的研究也發現 CagA 與 C-terminal Src kinase 作用將使 CagA•SHP-2 的訊息下降，並阻礙 CagA 的磷酸化 (25)。

四、幽門螺旋桿菌感染與宿主的關係

幽門螺旋桿菌的感染先會引發急性胃炎，在持續感染的情況下，可使胃上皮細胞發炎及大量分泌胃酸及胃泌素(gastrin)，導致慢性胃炎(chronic gastritis) (8)。而十二指腸潰瘍與幽門螺旋桿菌感染更是有絕對的關係，臨床上以根除細菌療法不但可以大大減低其復發率，甚至可以使十二指腸潰瘍復原(healing) (26)。少部分的人在感染後期會發展形成胃癌，但幽門螺旋桿菌的致癌機轉目前尚未找到直接的證據來解釋。但臨床上的一些現象可支持胃癌的發生與此菌感染有關連；大多數因感染幽門螺旋桿菌而產生的慢性胃炎會發展成萎縮性胃炎(atrophic gastritis)，而萎縮性胃炎的病人則成為胃癌的高危險群 (27)。由以上種種證據顯示，幽門螺旋桿菌的感染與十二指腸潰瘍、胃炎、胃癌等等消化疾病之間的確存在一定的關係。目前正致力研究是否某些特別的細菌株與致病能力有關連。

六、幽門螺旋菌引起的免疫反應

當幽門螺旋菌群聚 (colonization)到胃的上皮細胞時，宿主的上皮細胞會表現大量的 pro-inflammatory cytokines 與 anti-bacterial factors (28)。此外，幽門螺旋菌將更進一步刺激先天性免疫的活化，也因而引起更加嚴重的發炎反應及產生後天性免疫反應。另外，幽門螺旋菌也會影響 dendritic cells 的活化及 cytokines 的分泌,這些細胞激素包括:IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-1β 與 TNFα

等 (29,30)，而不同的臨床分離 *cag+*的幽門螺旋菌誘導 pro-inflammatory cytokines 的表現程度亦不同，而這些細胞激素如：IL-10, IL-1β 與 TNF-α 的 genotypes 則被認為與胃癌有相當大的關聯 (31-33)。

細胞性免疫反應對抗幽門螺旋菌的感染是以 TH1 (T-helper 1)為主 (34)，TH1 細胞分泌 IFN-γ, IL-12, IL-18 等細胞激素，而 Lehmann 等人以 *in situ* 的方法研究發現幽門螺旋菌感染分泌 IFN-γ 的細胞數與胃發炎的嚴重程度有相關，而 IFN-γ 即被認為與導致 pre-cancerous 與 dysplasia 等疾病的重要因子 (35)。而研究也發現幽門螺旋菌感染 C57BL/6 的小鼠產生很強的 Th1 細胞反應，甚至引起較嚴重的胃潰瘍 (36)。另外在 *in vitro* 的研究則發現具有 down-regulate T 細胞的能力，例如：CagA 抑制淋巴球的細胞週期 cell-cycle arrest (37)，VacA 抑制 MHC class II 的呈現與抑制 T 細胞的活化 (38,39)。最近的研究更指出，幽門螺旋菌感染胃的上皮細胞會使 B7-HI 的表現增加進而抑制 T 細胞的活化 (40)。

(二) 研究目標及先期研究成果

幽門螺旋菌感染宿主的胃之後會引起強烈但沒有功效的免疫反應，因此多半無法將細菌清除，反而使細菌在宿主身上進行持續性感染。由於我們初步的研究結果發現，幽門螺旋菌會抑制經致裂原(mitogen)誘導小鼠巨噬細胞株產生一氧化氮(nitric oxide, NO)及一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的能力(figure 1)，而在小鼠活體巨噬細胞(primary macrophage)亦可以發現相同的現象(figure 2 and figure 3)。這個結果顯示幽門螺旋菌可能會經由抑制巨噬細胞的活化，而讓細菌有能力在宿主身上持續感染。因此，我們將針對幽門螺旋菌如何影響宿主先天性免疫與後天性免疫反應的機制，作更進一步的探討。

本研究計畫預定的第一目標包括：(一) 我們將探討幽門螺旋菌對先天性免疫反應之影響，利用小鼠巨噬細胞株(RAW 264.7)與新鮮取得小鼠腹腔內的活體巨噬細胞(primary macrophages)當作體外(*in vitro*)模式，分析幽門螺旋菌對致裂原活化的巨噬細胞產生一氧化氮、一氧化氮合成酶 mRNA 及蛋白質的表現等。(二) 我們將同時分析野生種(wild-type strain 26695)與分別來自經由抗生素治療前、後臨床病人體內分離所得到具抗藥性之幽門螺旋菌菌株，其治療前、後致病因子的差異(table 1)，(三) 及由各種可能致病基因包括：*vacA, cagA, cagE* 及 *sabA* 與 *babA* 等基因突變之幽門螺旋菌菌種，另外，也將探討是否需要具感染活性的幽門螺旋菌才能產生影響免疫細胞的效應，及其可能的作用機轉。

依據第一目標的結果，在本計畫的第二目標包括：(一) 我們將藉由已經建立一個幽門螺旋菌感染小鼠的體內(*in vivo*)模式，探討臨床分離得到之幽門螺旋菌及由實驗室取得致病基因突變之幽門螺旋菌的菌株在小鼠體內形成菌落的能力(colonization) (figure 4)。(二)比較其對於小鼠的感染能力與對免疫反應的影響是否有差異，我們將特別著重在分析先天性免疫反應(innate immunity)中巨噬細胞活性、體液性免疫反應(humoral immunity)中 B 細胞產生抗體辨識菌株的能力，以及細胞性免疫反應(cellular immunity)中輔助性 T cell 第一型或第二型(TH1/TH2)細胞激素分泌等的研究。本計畫預計實施的兩個目標同時包括 *in vitro* 及 *in vivo* 的實驗設計，相信藉由本研究計畫之執行，我們將有機會揭開幽門螺旋菌影響免疫系統及能長期持續感染宿主可能的機制。

Table 1. Characteristics of nucleotide divergence in *H. pylori* isolates obtained from antibiotics therapy failure patients.

	No. of nucleotide divergence (no. of deduced amino acid changed)					
Subject no.	*vacA* m region	*babA2*	*atoS*	*cdrS*	*arsS*	RAPD
42	0 (0)	5 (4)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	+
43	0 (0)	4 (4)	1 (1)	38 (15)	0 (0)	+
44	1 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	+
45	3 (0)	81 (29)†	12 (2)	14 (6)	19 (3)	+
46	1 (0)	35 (219)‡	15 (1)	15 (4)	14 (5)	+

† N255 changed to stop codon.

‡ Frame changed.

Five paired pre- and post- treatment isolates were obtained from the antibiotic-therapy failure patients. The RAPD profiles analyzed for 5 patients were colonized by the same strain before and after therapy. Sequencing analyses were performed between pre- and post- strains.

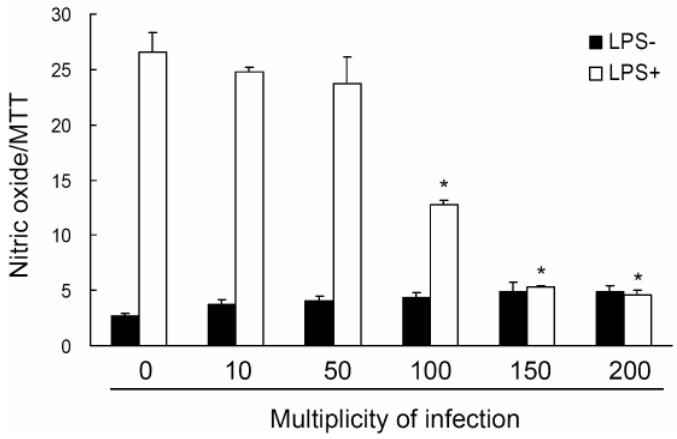

Figure 1. *H. pylori* suppressed LPS-induced nitric oxide generation by RAW 264.7 cells. *H. pylori* strain 26695 was co-cultured with macrophages in RPMI-1640 medium in the presence or absence of 2 μg/ml LPS at a MOI between 0 and 200. Production of nitric oxide was determined in culture supernatants after 24 hrs by the Griess reaction. The cell viability was evaluated by a standard MTT formazan assay. Data represent mean ± SD of three independent experiments. Statistical analysis was evaluated using Student's *t*-test with * $P < 0.05$.

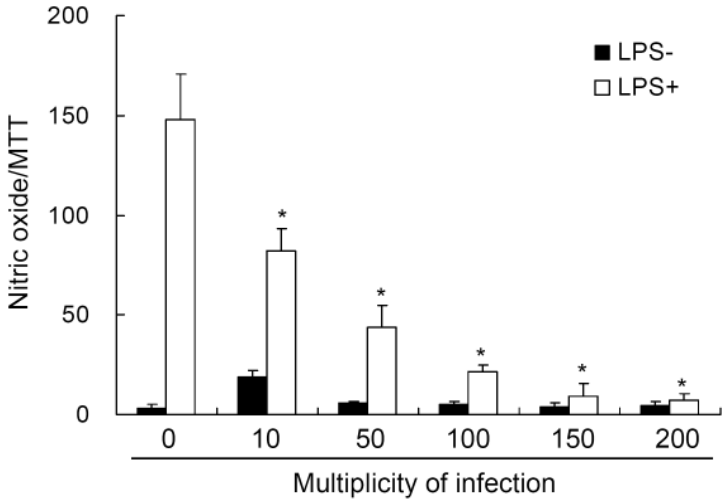

Figure 2. *H. pylori* inhibited LPS-induced nitric oxide production by mouse primary macrophages. Mouse peritoneal exclude macrophages were obtained from C57BL/6 after intraperitoneal injection of thioglycolate for 3 days. Cells were infected with *H. pylori* strain 26695 at a MOI of 0–200 in RPMI-1640 medium in the presence or absence of 2 μg/ml LPS. After co-cultured of bacteria and macrophages for 48 hrs, the production of nitric oxide was determined by the Griess reaction. The cell viability was evaluated by a standard MTT formazan assay. Data represent mean ± SD of three independent experiments. Statistical analysis was evaluated using Student's *t*-test with * $P < 0.05$.

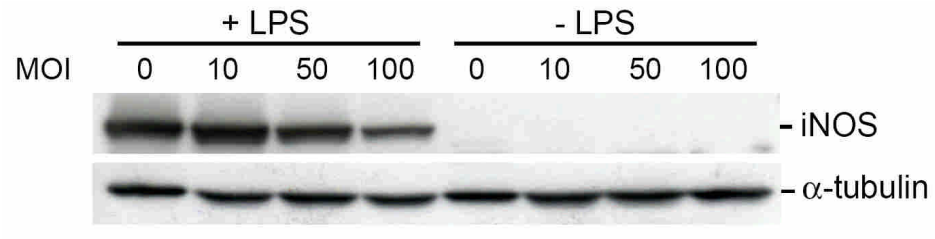

Figure 3. *H. pylori* inhibited LPS-induced iNOS protein expression in mouse primary macrophages. Macrophages grown on 6 well plates were infected with *H. pylori* strain 26695 in RPMI-1640 medium in containing with or without 2 μg/ml LPS at a MOI of 0–100. After 48 hrs incubation, the infected cells were lysed using RIPA solution. Cellular level of iNOS, and α-tubulin as an internal control to demonstrate equal sample loadings, were evaluated by Western blot.

（三）研究目的：我們初期的研究結果發現，幽門螺旋菌會抑制經致裂原(mitogen)誘導小鼠巨噬細胞產生一氧化氮及一氧化氮合成酶(iNOS)的能力。這個結果顯示幽門螺旋菌可能會經由抑制巨噬細胞的活化，而讓細菌有逃脫宿主先天性免疫防禦的能力。因此我們計畫探討幽門螺旋菌對先天性免疫反應之影響，特別針對兼具吞噬能力與抗原呈現能力的巨噬細胞為對象，我們將以小鼠腹腔活體巨噬細胞及 RAW 264.7 細胞株作為探討幽門螺旋菌感染的研究模式(計畫流程如 figure 5)。

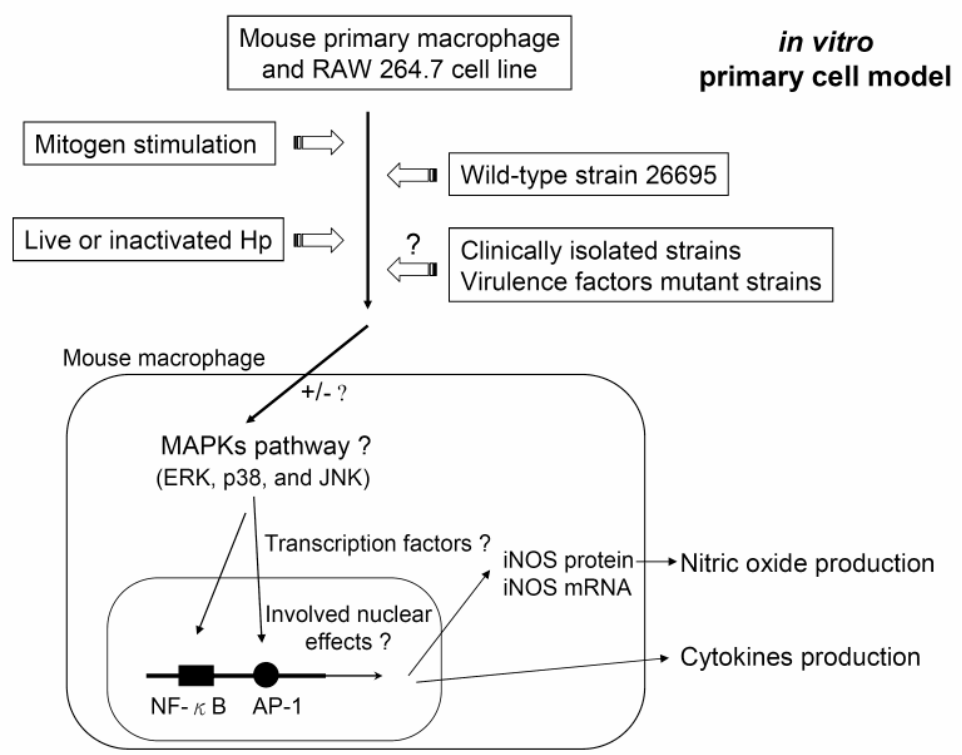

Figure 5 體外活體細胞實驗流程圖

A. 分析幽門螺旋菌對活化的巨噬細胞產生一氧化氮：利用小鼠腹腔巨噬細胞當作體外(*in vitro*)感染幽門螺旋菌的模式，一氧化氮、一氧化氮合成酶(iNOS) mRNA 及蛋白質的表現等影響，及其可能的作用機轉。

B. 探討幽門螺旋菌會抑制巨噬細胞產生一氧化氮對轉錄因子的影響：將幽門螺旋菌感染LPS處理巨噬細胞之後，分別利用AP-1或NF-κB promoter constructs觀察AP-1或NF-κB activity。

C. 分析 MAPKs pathway 是否參與幽門螺旋菌會抑制巨噬細胞產生一氧化氮：MAPKs pathway 在很多的報告指出可以調控 AP-1 及 NF-κB 的作用，因此我們將探討 MAPKs 是否參與幽門螺旋菌會抑制 LPS-誘導巨噬細胞產生 NO 的作用。

D. 分析具活性或去活性的幽門螺旋菌對活化的巨噬細胞產生一氧化氮的比較：我們也將一併探討是否需要感染活性的幽門螺旋菌才能產生影響巨噬細胞的效應。

(四) 研究方法

1. 幽門螺旋菌的培養

目的：為獲得幽門螺旋菌作為感染巨噬細胞之菌株來源。

方法：臨床分離之幽門螺旋菌抗生素治療前、後臨床病人體內分離所得到具抗藥性之幽門螺旋菌菌種，及各種可能致病基因包括：*vacA, cagA, cagE* 及 *babA* 等基因突變之幽門螺旋菌菌株，將冰在-80℃冰箱的幽門螺旋菌取出回溫至可以吸取，塗抹於 Brucella blood agar plate (2.8% Brucella broth powder、0.2% β-cyclodextran、0.1% yeast extract、1.5% agar) 上，微需氧條件下 37℃培養 2~3 天，待細菌生長即可收集進行以下實驗。

2. 幽門螺旋菌染色體的萃取

目的：分析抗生素治療前、後臨床病人體內分離所得到具抗藥性之幽門螺旋菌菌株其基因體之差異。

方法：先將幽門螺旋菌菌體用棉花棒刮下，懸浮於 1×PBS 中，以 6,000g、5 分鐘離心，取得沉澱之菌體後，以 TENS 溶液 (10 mM Tris，5 mM EDTA，0.5% SDS，0.2μg/μl protease K) 溶解細菌，再以酚(phenol, Sigma, St. Louis, MO, USA)及氯仿(chloroform, Sigma, St. Louis, MO, USA)使蛋白質變性，吸取上面水層加入等體積之異丙醇和 1/10 體積的 NaOAC (pH 5.2)於-20℃冷凍沉澱 30 分鐘以上，接著以 70%酒精清洗兩次，溶於適當的去離子水中即可。

3. 幽門螺旋菌致病因子序列分析質體的選殖 (pGEM-T vector system, Promega)

目的：鑑別抗生素治療前、後臨床菌株致病基因是否發生突變。

方法：選殖致病基因如下列步驟。

(1) 聚合酶連鎖反應

使用根據 gene bank 中 *Helicobacter pylori* strain 26695 所設計的寡核苷酸引子對(核苷酸序列如 table 2)，以幽門螺旋菌染色體 DNA 為模板，置於 DNA 溫度循環控制機進行反應。再以 1 % 瓊脂凝膠電泳分析，以確認複製所得的核酸片段為正確的基因。

(2) 電泳分離法純化基因片段

將聚合酶鏈鎖反應的產物以瓊脂凝膠電泳分離，利用 Gel Extraction System Kit (Viogene) 純化，並以 1 % 瓊脂凝膠的電泳確定 DNA 之品質及濃度。

(3) 接合反應(ligation)與轉化作用(transformation)

純化的 DNA 片段以 T 與 A 核苷酸接合方式，利用 TA cloning kit (Promega)接入 pGEM-T 質體中置於 4℃下反應 16 小時。再將 ligation mixture 置入製備好的 competent cell (SURE cell)，以 heat shock 的方法進行 transformation，再將其塗於含 100 μg/ml ampicllin 與 80 μg/ml X-gal 及 0.5 mM IPTG 的 LB 篩選培養基上，於 37℃培養 16-18 小時，挑選白色菌落，繼續確定正確插入基因的質體，並進行基因定序分析。

Table 2. Oligonucleotide primers used for analysis of *H. pylori* clinical isolates

Primer name	Primer sequence	Description
VacA_m1T-F	5'GGCCACAATGCAGT ATGG	
VacA_m1T-R	5'CTCTTAGTGCCTAAAGAAACA	0.29Kb
VacA_m2_F	5'GGAGCCCCAGGAAACATTG	
VacA_m2_R	5' CATAACTAGCGCCTTGCAC	0.35Kb
nthu_babA2-F	5'AATCGAAAAAGGAGA AAACATGAAA AA	
babA2-R	5'TGTTAGTGATTTCGGTGTAGGACA	0.8Kb
babA_stop	5'TTAGTAAGCGAACACATAATTC	2.2Kb
HP0244_F	5'GGATCCATGAAAAAATCCAAGCACTTAAAACGC	
HP0244_R	5' GTCGACTTAAGAAGCGTTAAGAATCTTAATTTC	1.1Kb
HP1364_F	5'GCGAAGCTTGTGTTGATGCTAGTGATTAGCG	
HP1364_R	5'GCGCTCGAGTTATCCTTGAAATTGAACGCAAAAC	1.2Kb
HP0164_F	5'GCGAAGCTTAATCAATGCGATGAATGAATCTCG	
HP0164_R	5'GCGCTCGAGTCAAATTTTCGGGGGGGGGGG	0.7Kb
HP0165_F	5'GCGAAGCTT TCGCTTTGTTTATGATAACGCTC	
HP0165_R	5'GCGCTCGAG TCACGCTTTTATCCCCTTGAGC	0.5Kb
p1281	5' AACGCGCAAC	
p1283	5' GCGAT CCCCA	

4. 動物健康狀況之觀察

目的：分離小鼠活體巨噬細胞，以建立 *in vitro* 幽門螺旋菌感染巨噬細胞的模型。

方法：選用之動物為 6-8 周大之 C57BL/6 雌性小白鼠。小鼠的飼養於中國醫藥大學動物中心，狀況為 ad libitum。每周記錄小鼠體重並觀察小鼠的活動情形、毛色變化，及水與飼料之消耗量。實驗動物的飼養與操作將遵循 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NRC, U.S.A.)，並且經過中國醫藥大學實驗動物審查委員會的審核。

5. 細胞培養 (cell culture)

目的：培養巨噬細胞株及小鼠腹腔巨噬細胞。

方法：我們所使用的細胞株是購自 American Type Culture Collection (Manassas, VA, U.S.A)的小鼠巨噬細胞株(RAW 264.7)。RAW 264.7 已被證實具有與正常小鼠巨噬細胞相同之功能，例如：合成及分泌溶菌酶、吞噬酵素分解酶原。我們把細胞培養在 75 ㎝^{2} 的細胞培養瓶裡，維持足夠量的細胞培養液，並將培養瓶放入培養箱，讓細胞在適合的生長環境下（37 ℃ in 5% CO_2）生長。細胞培養液由 RPMI-1640 with 10%胎牛血清及抗生素（100 U/ml of penicillin、100 g/ml of streptomycin）組成。小鼠腹腔巨噬細胞的採集由正常老鼠腹腔以生理食鹽水沖洗腹腔液內的吞噬細胞，2×10^5 個細胞與不同濃度之幽門螺旋菌株，在有或無致裂原(mitogen)誘導的情況下，一起培養於培養盤，經 24 小時後，取出培養液，測量 NO 量及細胞激素(TNF-α, IL-10, IL-12)量，細胞激素的測定基本上是利用 sandwich-ELISA 法。並同時以 MTT assay 的方法了解細胞的存活率，並比較幽門螺旋菌

株對免疫細胞功能之敏感度上是否有顯著差異。

6. 細胞存活率（cell viability）

目的：分析幽門螺旋菌株對巨噬細胞的毒性。

方法：在 96-well or 24-well 的組織培養盤，細胞密度 2×10^6 cells/ml 中，放入具有不同幽門螺旋菌株濃度的細胞培養液。利用 Mitochondrial respiration- dependent MTT assay 來評估藥物的細胞毒性，在每一個洞中加入 MTT（MTT in PBS 0.1mg）後，放入 incubator 裡培養 4 小時。室溫中加入可溶解 MTT 所形成之結晶[1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan]的酸性異丁醇(isopropanol)，並混合均勻，20 分鐘後使用 microplate reader 偵測在波長 570nm 的吸光度（optical density，OD）。計算四重複平均值的百分比來評估幽門螺旋菌株對細胞的毒性。

7. 一氧化氮試驗（nitric oxide determination）

目的：分析幽門螺旋菌株抑制 LPS-誘導巨噬細胞產生一氧化氮的活性。

方法：細胞在存有或缺少致裂原(mitogen)誘導的兩種情形下，分別加入含有各種不同幽門螺旋菌株濃度的細胞培養液，總體積要相同。我們吸取巨噬細胞的上清液並加入等量的 Griess reaction (Sigma-Aldrich)測量其中含有多少的亞硝酸類之產物（nitrite，NO 的穩定產物），並用已知濃度的亞硝酸鈉作為標準值，靜置於室溫中 10 分鐘後使用 microplate reader 測量在波長 540nm 的吸光度。

8. 細胞激素試驗（cytokine assay）

目的：分析幽門螺旋菌株抑制 LPS-誘導巨噬細胞產生細胞激素的能力。

方法：分別在加有和未加有致裂原(mitogen)誘導的巨噬細胞裡加入不同幽門螺旋菌株濃度，共同培養在細胞培養箱中 24 小時後收集上清液，在尚未使用酵素免疫分析實驗前，先保存在-80℃的冰箱。分別以 TNF-α 和 IL-12 作為標準值。

9. 西方墨點法分析巨噬細胞 iNOS 的表現

目的：為探討幽門螺旋菌株抑制 LPS-誘導巨噬細胞產生一氧化氮是否也抑制 iNOS 蛋白質的表現。

方法：分析巨噬細胞 iNOS 的表現是利用西方墨點法，方法如下所述。

(1) 蛋白質電泳凝膠製備與電泳分析（SDS-PAGE）

組合蛋白質電泳儀器組件，配製 12~14 % SDS-PAGE，倒入玻璃夾層中，加入去離子水壓平凝膠界面，待凝膠凝固後旋即倒入 4 % 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠並插入樣品槽製造梳，凝固後將玻片架於電泳槽上。取蛋白質樣品液置於凝膠之樣品槽中，將電泳槽充滿 1 倍蛋白質電泳緩衝液（250 mM glycine, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 25 mM Tris-HCl, pH 8.5），以 100 伏特電壓進行電泳約 2-4 小時，使蛋白質依分子量大小分離。

(2)西方墨點法（Western Blot）

取自得到的蛋白質利用 12-14 %蛋白質凝膠電泳，使蛋白質依分子量大小分離，再轉漬至 PVDF 膜。取出 PVDF 膜改置入含稀釋的初級抗體（anti-iNOS Ab, Santa Cruz）之含 5%脫脂奶 TTBS 溶液內，再將 PVDF 膜移至含稀釋的二級抗體（IgG HRP conjugated）中，最後將 PVDF 膜以混合的冷光呈色劑作用 3 分鐘，進行自動放射顯影。

10. RT-PCR 分析 iNOS mRNA 的表現

目的：為釐清幽門螺旋菌株抑制 LPS-誘導巨噬細胞 iNOS 蛋白質的表現是否在 RNA level 即受到影響。

方法：抽取 mRNA 使用 Cyclo-Prep Total RNA Purification Kit (AMRESCO K312-50RXN)，依 Kit 中所附詳細操作方式進行。分析 iNOS RNA 的引子 (forward: 5'-GCCTCGCTCTGGAAAGA-3' and reverse: 5'-TCCATGCAGACAACCTT-3')反應混合物混合後在 PCR machine 中反應 30-35 個循環(denaturation 在 94℃進行 1 分鐘，annealing 於 60℃進行 1-2 分鐘，elongation 於 72℃進行 1 分鐘)反應完畢後，各個樣本與 DNA loading dye 混合，以 TAE buffer 配置 agarose gel，並在電泳槽中注入 TAE buffer，電泳完畢後，以 UV 照射，DNA 產物會與膠上的 ethidium bromide 結合，使得有 DNA 的位置發光，攝影後可利用影像處理程式比對 iNOS mRNA 表現的多寡。

11. 冷光活性試驗 (Luciferase activity assay)

目的：LPS 處理巨噬細胞，會使細胞分泌大量發炎反應的細胞激素，而這些反應包括了細胞內訊息傳遞的分子，例如：NF-κB 與 AP-1。冷光活性試驗可以快速偵測幽們螺旋菌是否也具有抑制 LPS-誘導巨噬細胞活化 NF-κB 與 AP-1 的能力。

方法：我們將已接有 NF-κB 或 AP-1 binding site 的 reporter gene (41)藉由 Lipofectamin 2000（Invitrogene）送入巨噬細胞內，待 24 小時反應之後，加入幽門螺旋菌株於 37℃感染 6 小時，再以 reporter lysis (Promega)溶解細胞，加入 luciferase substract (Promega)，並以冷光儀偵測 reporter 冷光的強度，而以 β-galactosidase expression vector (Promega) transfection 當作 control 組。

12. 西方墨點法分析巨噬細胞內轉錄因子的影響

目的：我們先前的研究發現幽門螺旋菌會抑制LPS-誘導巨噬細胞產生NO，除了分析iNOS protein與mRNA之外，我們亦分析MAPKs pathway，MAPKs pathway 在很多的報告指出可以調控AP-1及NF-κB的作用，因此我們將探討MAPKs是否參與幽門螺旋菌會抑制LPS-誘導巨噬細胞產生NO的作用。

方法：收集幽門螺旋菌感染LPS處理之巨噬細胞，利用Western blot 分析ERK、p38 及JNK 磷酸化的情況。此外我們前處理MEK抑制劑(PD98059)、p38抑制劑(SB 203580)或JNK抑制劑(SP 600125) 處理30分鐘後再給予LPS及感染幽門螺旋菌，利用Western blot分析ERK、p38及JNK磷酸化的情況。

13. 統計分析：本實驗所得數據均以平均值加減標準偏差表示。並進行 paired Student's *t*-test 分析數據，以 *P* 值小於 0.05 認為有顯著意義。

預期完成之工作項目

1. 了解野生株(strain 26695)與分別來自臨床病人體內分離所得到具抗藥性之幽門螺旋菌菌株，對活化的巨噬細胞產生細胞激素、一氧化氮、一氧化氮合成酶 mRNA 及蛋白質的表現等之影響。
2. 釐清野生株(strain 26695)與分別來自各種幽門螺旋菌菌種，對巨噬細胞活化過程訊息傳遞路徑之影響。
3. 解是否需要具感染活性的幽門螺旋菌才能產生影響巨噬細胞的效應。
4. 建立一個幽門螺旋菌感染小鼠的體內(*in vivo*)模式。
5. 各種幽門螺旋菌菌種對免疫反應的產生是否有差異，了解巨噬細胞活性、體液性免疫反應中產生抗體辨識菌株的能力，以及細胞性免疫反應中輔助性 T cell 第一型或第二型(TH1/TH2)細胞激素分泌及調節型 T cell ($CD25^+$ Treg)的活化等的研究。

References

1. Telford, J. L., Ghiara, P., Dell'Orco, M., Comanducci, M., Burroni, D., Bugnoli, M., Tecce, M. F., Censini, S., Covacci, A., Xiang, Z., and et al. (1994) *J Exp Med* **179**(5), 1653-1658
2. Goodwin, C. S. A., J. A. (1990) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**(1), 1-13
3. Goodwin, C. S., McCulloch, R. K., Armstrong, J. A., and Wee, S. H. (1985) *J Med Microbiol* **19**(2), 257-267
4. Blaser, M. J. (1992) *Clin. Infect. Dis* **15**, 386-391
5. Pounder, R. E., and Ng, D. (1995) *Aliment Pharmacol Ther* **9 Suppl 2**, 33-39
6. Lin, J. T., Wang, J. T., Wu, M. S., Wang, T. H., Lee, T. K., and Chen, C. J. (1994) *J Formos Med Assoc* **93**(2), 122-127
7. Peek, R. M., Jr., and Blaser, M. J. (1997) *Am J Med* **102**(2), 200-207
8. Blaser, M. J. (1990) *The Journal of infectious diseases* **161**(4), 626-633
9. Peek, R. M., Jr., Moss, S. F., Tham, K. T., Perez-Perez, G. I., Wang, S., Miller, G. G., Atherton, J. C., Holt, P. R., and Blaser, M. J. (1997) *Journal of the National Cancer Institute* **89**(12), 863-868
10. Tatsuta, M., Iishi, H., Nakaizumi, A., Okuda, S., Taniguchi, H., Hiyama, T., Tsukuma, H., and Oshima, A. (1993) *Int J Cancer* **53**(1), 70-74
11. Pagliaccia, C., de Bernard, M., Lupetti, P., Ji, X., Burroni, D., Cover, T. L., Papini, E., Rappuoli, R., Telford, J. L., and Reyrat, J. M. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17), 10212-10217
12. Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M., Jr., Tummuru, M. K., Blaser, M. J., and Cover, T. L. (1995) *J Biol Chem* **270**(30), 17771-17777

13. Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., and Covacci, A. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25), 14648-14653
14. Crabtree, J. E., Xiang, Z., Lindley, I. J., Tompkins, D. S., Rappuoli, R., and Covacci, A. (1995) *J Clin Pathol* **48**(10), 967-969
15. Sharma, S. A., Tummuru, M. K., Miller, G. G., and Blaser, M. J. (1995) *Infect Immun* **63**(5), 1681-1687
16. Tummuru, M. K., Sharma, S. A., and Blaser, M. J. (1995) *Mol Microbiol* **18**(5), 867-876
17. Segal, E. D., Lange, C., Covacci, A., Tompkins, L. S., and Falkow, S. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14), 7595-7599
18. Covacci A, T. J., Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. (1999) *science* **284**, 1328-1333
19. Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P. R., Naumann, M., and Meyer, T. F. (2000) *Cell Microbiol* **2**(2), 155-164
20. Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., and Haas, R. (2000) *Science* **287**(5457), 1497-1500
21. Selbach, M., Moese, S., Hauck, C. R., Meyer, T. F., and Backert, S. (2002) *J Biol Chem* **277**(9), 6775-6778
22. Stein, M., Rappuoli, R., and Covacci, A. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3), 1263-1268
23. Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., and Tompkins, L. S. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25), 14559-14564
24. Higashi, H., Yokoyama, K., Fujii, Y., Ren, S., Yuasa, H., Saadat, I., Murata-Kamiya, N., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**(24), 23130-23137
25. Tsutsumi, R., Higashi, H., Higuchi, M., Okada, M., and Hatakeyama, M. (2003) *The Journal of biological chemistry* **278**(6), 3664-3670
26. Marshall, B. J., Goodwin, C. S., Warren, J. R., Murray, R., Blincow, E. D., Blackbourn, S. J., Phillips, M., Waters, T. E., and Sanderson, C. R. (1988) *Lancet* **2**(8626-8627), 1437-1442
27. Forman, D. (1991) *Journal of the National Cancer Institute* **83**(23), 1702-1703
28. George, J. T., Boughan, P. K., Karageorgiou, H., and Bajaj-Elliott, M. (2003) *Mol Immunol* **40**(7), 451-456
29. Kranzer, K., Sollner, L., Aigner, M., Lehn, N., Deml, L., Rehli, M., and Schneider-Brachert, W. (2005) *Infection and immunity* **73**(7), 4180-4189
30. Hafsi, N., Voland, P., Schwendy, S., Rad, R., Reindl, W., Gerhard, M., and Prinz, C. (2004) *J Immunol* **173**(2), 1249-1257
31. Machado, J. C., Figueiredo, C., Canedo, P., Pharoah, P., Carvalho, R., Nabais, S., Castro Alves, C., Campos, M. L., Van Doorn, L. J., Caldas, C., Seruca, R., Carneiro, F., and Sobrinho-Simoes, M. (2003) *Gastroenterology* **125**(2), 364-371
32. Rad, R., Prinz, C., Neu, B., Neuhofer, M., Zeitner, M., Voland, P., Becker, I., Schepp, W., and Gerhard, M. (2003) *The Journal of infectious diseases* **188**(2), 272-281
33. El-Omar, E. M., Carrington, M., Chow, W. H., McColl, K. E., Bream, J. H., Young, H. A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C. C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni, J. F., Jr., and Rabkin, C. S. (2000) *Nature* **404**(6776), 398-402
34. Bamford, K. B., Fan, X., Crowe, S. E., Leary, J. F., Gourley, W. K., Luthra, G. K., Brooks, E. G.,

Graham, D. Y., Reyes, V. E., and Ernst, P. B. (1998) *Gastroenterology* **114**(3), 482-492

35. Lehmann, F. S., Terracciano, L., Carena, I., Baeriswyl, C., Drewe, J., Tornillo, L., De Libero, G., and Beglinger, C. (2002) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**(2), G481-488
36. Smythies, L. E., Waites, K. B., Lindsey, J. R., Harris, P. R., Ghiara, P., and Smith, P. D. (2000) *J Immunol* **165**(2), 1022-1029
37. Paziak-Domanska, B., Chmiela, M., Jarosinska, A., and Rudnicka, W. (2000) *Cell Immunol* **202**(2), 136-139
38. Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., and Haas, R. (2003) *Science (New York, N.Y* **301**(5636), 1099-1102
39. Boncristiano, M., Paccani, S. R., Barone, S., Ulivieri, C., Patrussi, L., Ilver, D., Amedei, A., D'Elios, M. M., Telford, J. L., and Baldari, C. T. (2003) *J Exp Med* **198**(12), 1887-1897
40. Das, S., Suarez, G., Beswick, E. J., Sierra, J. C., Graham, D. Y., and Reyes, V. E. (2006) *J Immunol* **176**(5), 3000-3009
41. Tang, C. H., Yang, R. S., Chen, Y. F., and Fu, W. M. (2007) *J Cell Physiol* **211**(1), 45-55