

國立政治大學神經科學研究所

碩士學位論文

發炎の機制以及其在中樞代謝調控中的
作用研究

The Study of the Mechanisms of Inflammation and Its roles in
Central Controls of Metabolism



指導教授：陳紹寬博士

研究生：章學榛撰

中華民國 107 年 7 月

謝 誌

感謝父母支持我讀研究所。

感謝指導老師 陳紹寬老師對實驗研究及論文書寫的指導。

感謝所秘于姊在行政上的幫忙，以及讓我們有一個紓壓的場所。

感謝實驗室珮文學姊、牧昀、佳欣、之皓在實驗上給予的幫助。

感謝趙知章老師在實驗設備上的幫助。

感謝所上老師給予的課業指導。

感謝為本論文研究所犧牲的老鼠。



摘要

本研究包括兩個部分。第一部分是發現 *Ifitm* 基因剔除鼠中產生的自發性發炎反應表型。*Ifitm* 基因是一組會受干擾素所誘導表現的基因，干擾素刺激後所轉譯出的蛋白質在抗病毒功能中有著重要作用。然而，這些蛋白質的生化性質和生物功能上還不清楚。在先前的研究中，剔除 5 個 *Ifitm* 基因的 *IfitmDel* 小鼠被用來探討 *Ifitm* 基因的生物功能，我們在 *IfitmDel* 小鼠中觀察到隨著年齡的增加會產生低度發炎，在周邊血中單核細胞活化標誌物如 CD86 和 MHCII 的水平升高。*IfitmDel* 小鼠在文獻中被指出有肥胖和食慾過盛的表現，我們發現這些小鼠的下視丘中 *Nos2* 表現顯著增加，表示著下視丘有發炎的情況。為了測試是否是機能不全的骨髓細胞或是過多的發炎訊號引起 *IfitmDel* 小鼠低度發炎，我們取野生型小鼠及 *IfitmDel* 小鼠的骨髓，並將其誘導成巨噬細胞來，比較其對發炎刺激的反應。在脂多醣體(LPS)和干擾素- γ (Interferon- γ) 的刺激下，*IfitmDel* 小鼠骨髓誘導巨噬細胞被活化的程度顯著較高。我們的結果顯示 IFITM 蛋白在巨噬細胞中具有調節發炎反應的功能，*Ifitm* 基因的缺失導致在刺激下有較強烈的發炎反應。本研究的第二部分是研究促發炎細胞因子如何改變 POMC 神經元的代謝信號。位於下視丘弓狀核的 POMC 神經元在飲食調控和能量平衡中扮演重要角色，透過接受周邊代謝信號，如瘦蛋白和胰島素，來調控食慾下降並增加能量消耗，最近的研究中表明發炎可能會干擾 POMC 神經元中的代謝調節路徑。在我們的研究中，檢測了促發炎因子的增加如何影響 mHypoA-POMC / GFP 細胞株的代謝信號傳導。此外，考慮到造成發炎的物質並不局限於單一促發炎細胞因子，所以將以 LPS 處理過的誘導巨噬細胞培養液應用為條件培養液加入 POMC 神經元中，此條件培養液中含有促炎細胞因子混合物。我們首先檢測 POMC 神經元對混合促炎細胞因子的反應，調控 POMC 神經元厭食反應的基因，如：POMC 和 *Socs3*，在發炎信號的刺激下升高。之後檢測在有條件培養液的環境下，POMC 神經元中瘦素或胰島素誘導的信號傳導途徑的活化是否會受影響，瘦素或胰島素信號傳導在促炎細胞因子存在下會被破壞。另外，POMC 神經元中的關鍵代謝調節蛋白：單磷酸腺苷活化蛋白質激酶(AMPK)的活化會被促炎細胞因子抑制。綜合上述觀察結果，我們認為 POMC 神經元的代謝調控會在發炎的環境下遭到破壞。

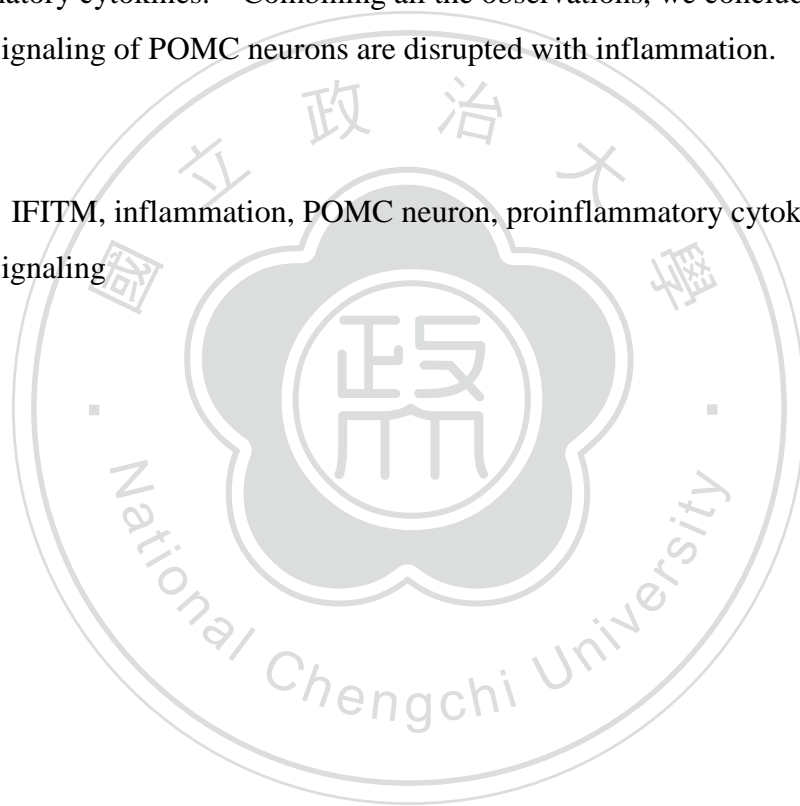
關鍵字：干擾素誘導跨膜蛋白、發炎、POMC 神經元、促發炎細胞因子、代謝調控

Abstract

This study consists of two major parts. The first part is to characterize the inflammation developed in *Ifitm* genes knockout mutants. *Ifitm* genes are a group of interferon inducible genes that are transcriptional activated upon interferon stimulation and play important roles in interferon mediated antiviral functions. However, the biochemical properties and other biological functions of these proteins are not fully understood. Previously *IfitmDel* mutant mice that lack 5 *Ifitm* genes were generated to investigate the biological functions of *Ifitm* genes. We recently observed age dependent low-grade inflammation phenotype in *IfitmDel* mice. Mutants at 4-month of age started to exhibit elevated levels of monocyte activation markers such as CD86 and MHCII in peripheral blood. Obesity and hyperphagia have previously been reported in *IfitmDel* mutants. The expression of hypothalamic *nos2* is upregulated in the mutants, indicating that hypothalamic inflammation is also developed. To test whether inflammation is caused by malfunctioned mutant myeloid cells or by excessive inflammatory signals, we further generate bone marrow derived macrophages from both *IfitmDel* mutants and wild type controls. Upon LPS and interferon- γ stimulation, mutant macrophages are drastically activated and the activation status is significantly higher than that of wild type macrophages. Our data suggest the anti-inflammatory roles of IFITM proteins. Ablating *Ifitm* genes augment the inflammatory response upon stimulation. The second part of this study is to investigate how proinflammatory cytokines altered the metabolic signaling in POMC neurons. POMC neurons in arcuate nucleus play pivotal roles in feeding controls and energy homeostasis. This group of neurons respond to peripheral metabolic signals, such as leptin and insulin, and mediate the anorexigenic response and increase energy expenditure in the hypothalamus. Recently accumulating data suggest that inflammation might interrupt metabolic regulations by affecting this group of neurons. In this study, we examined how increase of proinflammatory molecules influence metabolic signaling in the cell line mHypoA-POMC/GFP, which is generated by immortalizing the primary hypothalamic POMC neurons cultures. Also, considering that the effect of inflammation might not be limited to single kind of proinflammatory cytokines, we applied conditioned medium of LPS-primed

macrophages, which contained a mixture of proinflammatory cytokines, to the POMC neuron culture. We first examined the response of the POMC neurons to the mixed proinflammatory cytokines. The genes mediating anorexigenic response of POMC neurons, such as POMC and Socs3, are elevated upon the stimulation of the inflammatory signals. Additionally, the activation of signaling pathways of the POMC neurons induced by leptin or insulin were examined with the conditioned medium. Both leptin or insulin signaling are disrupted at the presence of proinflammatory cytokines. Also, the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), a key metabolic regulator in POMC neurons, is also inhibited by proinflammatory cytokines. Combining all the observations, we conclude that metabolic signaling of POMC neurons are disrupted with inflammation.

Key words: IFITM, inflammation, POMC neuron, proinflammatory cytokines, metabolic signaling



目 次

謝誌.....	錯誤! 尚未定義書籤。
摘要.....	錯誤! 尚未定義書籤。
Abstract.....	錯誤! 尚未定義書籤。
目次.....	錯誤! 尚未定義書籤。
圖次.....	錯誤! 尚未定義書籤。 錯誤! 尚未定義書籤。
縮寫對照表.....	x
第一章 緒論.....	1
第一節 文獻回顧.....	1
一、干擾素誘導跨膜蛋白 (Interferon induced transmembrane proteins, IFITMs).....	1
二、炎症機制 (Inflammation mechanisms)	3
三、巨噬細胞的發育和在發炎中的生物學作用 (Macrophage development and biological roles in inflammation).....	5
四、代謝所引發的發炎和肥胖的關係 (Inflammation metabolism and obesity).....	7
五、中央代謝調節系統和 POMC 神經元 (Central metabolic regulating system and POMC neurons)	8
六、下視丘炎症 (Hypothalamic inflammation).....	9
第二節 論文目的及研究策略.....	10
一、研究目的及動機.....	10
二、實驗設計	11
第二章 材料與方法.....	12
第一節 實驗動物.....	12
第二節 瘦素抗性實驗 (Leptin resistance).....	12

第三節 細胞培養.....	12
一、細胞培養.....	12
二、細胞繼代培養與計數.....	13
第四節 藥物處理.....	14
第五節 西方點墨法 (Western blot)	14
一、蛋白質萃取.....	14
二、蛋白質濃度測定.....	15
三、樣品配置.....	15
四、鑄膠和十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺凝膠電泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)	15
五、蛋白質轉漬 (Transfer)	16
六、免疫反應 (Immunoblotting)	16
七、顯像及分析.....	17
第六節 定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real time polymerase chain reaction, Q-PCR)	17
一、RNA 萃取及濃度測定	17
二、逆轉錄聚合酶鏈鎖反應(reverse transcription-PCR, RT-PCR) ..	18
三、定量即時聚合酶鏈鎖反應.....	18
第七節 流式細胞儀檢測 (Flow cytometer).....	19
一、樣品備置.....	19
二、樣品分析.....	20
第八節 統計分析.....	22

第三章 實驗結果	23
第一節 在 <i>IfitmDel</i> 突變體中發展的炎症型態	23
第二節 <i>Ifitm</i> 基因缺失對於造血作用的改變	24
第三節 <i>Ifitm</i> 基因缺失對於骨髓細胞誘導巨噬細胞功能產生的影響	26
第四節 <i>Ifitm</i> 基因缺失小鼠表現瘦素不敏感	28
第五節 mHypoA-POMC / GFP-1 細胞對瘦素的反應	28
第六節 mHypoA-POMC / GFP-1 細胞對胰島素的反應	30
第七節 發炎物質對 mHypoA-POMC / GFP-1 細胞中 AMPK 路徑的改變	31
第四章 討論	33
實驗圖表	36
參考文獻	54
附錄	59

圖次

圖一、在 <i>IfitmDel</i> 小鼠中隨著年齡的增加會伴隨著自發性的發炎	36
圖二、 <i>IfitmDel</i> 小鼠在下視丘中有發炎的情形	37
圖三、 <i>Ifitm1-3</i> 基因在小鼠不同組織中的表現.....	38
圖四、野生型小鼠與 <i>IfitmDel</i> 小鼠周邊血中單核細胞 (PBMC) 數量一致	39
圖五、在 <i>IfitmDel</i> 小鼠骨髓中多功能前驅細胞(MPP)、共同血球前驅細胞 (CMP) 以及顆粒性球/單核細胞前驅細胞 (GMP) 所佔的百分比與野生 型小鼠相似.....	40
圖六、 <i>IfitmDel</i> 小鼠的骨髓細胞在透過 L929 培養液的誘導成為巨噬細胞的分化 過程中速度較快.....	41
圖七、在體外分化培養骨髓細胞分化成樹突細胞上，沒有 <i>Ifitm</i> 基因不會增加對 樹突細胞的分化的偏好.....	42
圖八、 <i>IfitmDel</i> 小鼠骨髓誘導的巨噬細胞 (BMDM) 在沒有刺激下與野生型小 鼠相似.....	43
圖九、對於 LPS 的刺激，在 <i>IfitmDel</i> 骨髓誘導的巨噬細胞中反應較野生型小鼠 骨髓誘導巨噬細胞強.....	44
圖十、對於 IFNG 的刺激，在 <i>IfitmDel</i> 骨髓誘導的巨噬細胞中反應亦較野生型 小鼠骨髓誘導巨噬細胞強.....	46
圖十一、 <i>IfitmDel</i> 小鼠的骨髓誘導巨噬細胞對 IL-4 的刺激反應與對照組相仿 ..	48
圖十二、在 <i>IfitmDel</i> 小鼠中檢測到瘦素抗性	49

圖十三、瘦素和胰島素可以使 mHypoA-POMC / GFP-1 細胞的 POMC 表現量上升.....50

圖十四、促發炎細胞因子改變 POMC 神經元對瘦素信號的反應51

圖十五、促發炎細胞因子乾擾 POMC 神經元對胰島素的反應52

圖十六、促發炎細胞因子破壞 POMC 神經元中的葡萄糖感應53

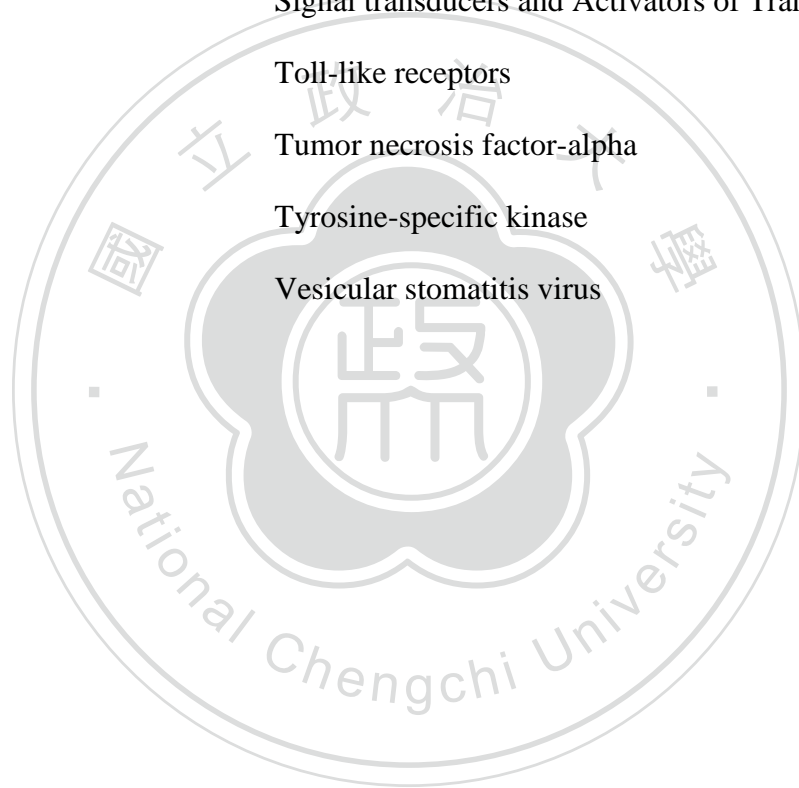


縮寫對照表

AgRP	Agouti related protein
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	AMP activated protein kinase
ARC	Arcuate nucleus
BMDCs	Bone marrow derived dendritic cells
BMDM	Bone marrow-derived macrophages
BSA	Bovine serum albumin
CART	Cocaine-amphetamine regulated transcript
CLP	Common lymphoid progenitors
CMP	Common myeloid progenitor
CSF	Colony stimulating factor
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DMN	Dorsomedial nucleus
EPO	Erythropoietin
FBS	Fetal bovine serum
FoxO1	Forkhead/winged helix box gene, group O-1
FSC	Forward scatter
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GMP	Granulocyte-macrophage progenitors
HSC	Hematopoietic stem cell
IAV	Influenza A virus
IFITMs	Interferon induced transmembrane proteins
IFNG	Interferon- γ

iNOS	inducible nitroxide synthase
IL-1 β	Interleukin-1-beta
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
InsR	Insulin receptor
ITT	Insulin resistance test
JAKs	Janus kinases
LepR-b	Leptin receptor b
LHA	Lateral hypothalamic area
LPS	Lipopolysaccharide
M1	Classical activated macrophage
M2	Alternatively activated macrophage,
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MHC II	mouse IA/IE, major histocomplexity class II
MPP	multipotent progenitors
mTOR	Mammalian target of rapamycin
multi-CSF	Multilineage colony stimulating factor
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NLRs	Leucine-rich-repeat containing receptors
NPY	Neuropeptide Y
NTS	Nucleus tractus solitarius
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase

PI3K-Akt signalling pathway	Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase B
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKB, AKT	Protein kinase B
POMC	Proopiomelanocortin
PVN	Paraventricular nucleus
SSC	Side scatter
STAT	Signal transducers and Activators of Transcription
TLRs	Toll-like receptors
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
TYK	Tyrosine-specific kinase
VSV	Vesicular stomatitis virus



第一章 緒論

第一節 文獻回顧

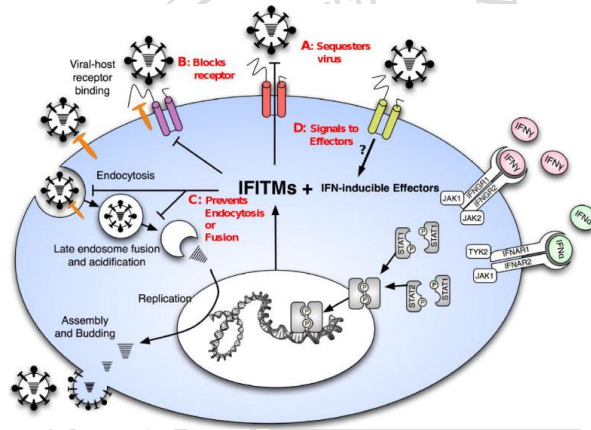
一、干擾素誘導跨膜蛋白 (Interferon induced transmembrane proteins, IFITMs)

Ifitm 基因是一組干擾素誘導基因，干擾素透過受體活化 Janus 激酶 (Janus kinases, JAKs) 和酪氨酸特異性激酶 (tyrosine-specific kinase, TYK)，進一步磷酸化轉錄訊息傳遞及活化子蛋白 (Signal transducers and Activators of Transcription, STAT)。P-STAT 蛋白進入到細胞核中，並且與干擾素調節蛋白結合以促進 *Ifitm* 基因的表達 (Diamond MS and Farzan M., 2013, Bailey CC *et al.*, 2014)。

Ifitm 基因最早是在 1984 年，根據干擾素刺激神經母瘤細胞後篩選 cDNA 中被發現的 (Friedman RL *et al.*, 1984)。人類的 *Ifitm1*, *Ifitm2* 和 *Ifitm3* 和 *Ifitm5* 基因相鄰位於 11 號染色體上，老鼠基因位於 7 號染色體上 (Lange UC *et al.*, 2003)。從其基因的相似性以及功能，可以分為三大類，第一類為具有抗病毒活性的所有人類蛋白質，即 *Ifitm1*, *Ifitm2* 和 *Ifitm3*，他們也被稱之為免疫相關 IFITM 蛋白 (immunity-related IFITMs, IR-IFITM)，第二類是 *Ifitm5*，主要是在成骨細胞中表達 (Hanagata N *et al.*, 2011)，第三類是 *Ifitm10* 基因，其表達方式及功能尚不完全清楚 (Zhang Z, 2012)。

IFITM 蛋白皆存在於真核以及原核生物中 (Sällman Almén M *et al.*, 2012)，並且在不同的組織中都有表現，透過 mRNA 分析大鼠 32 個器官組織中 IFITMs 的表達，發現到 *Ifitm1*, *Ifitm2* 和 *Ifitm3* 在各組織中均有表達，在骨髓中除了 *Ifitm3* 和 *Ifitm6* 外，其他 *Ifitm* 皆有較高的表達，尤其以 *Ifitm5* 的表達量最高，而 *Ifitm5* 在胰臟的表現量僅次於骨髓。*Ifitm2*、*Ifitm5*、*Ifitm7* 和 *Ifitm10* 在食道和氣管中有較高的表現亮。*Ifitm6* 在眼中的表達最高 (Yanqin Lu *et al.*, 2017)。

最早提出 IFITM 蛋白有抗病毒功能的是在 1996 年，研究指出 *Ifitm1* 可以抑制水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 的複製 (Alber D and Staeheli P, 1996)。之後有其他的 research 指出 *Ifitm3* 可能是甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 的制約因子，在病毒進入的各個不同階段做出相對應的抗病毒功能，可以通過直接結合病毒已達到隔離在細胞表面或附近的病毒進入細胞 (A)，阻斷受體通路，抑制與宿主細胞受體的相互作用 (B)，抑制內吞作用，防止病毒膜融合或重新灌注囊泡運輸 (C)，在細胞表面或內吞囊泡上起模式識別受體的作用，在那裡它們可以向下游抗病毒效應物發出信號 (D) (Brass AL *et al.*, 2009, Shapira SD *et al.*, 2009)。



(Brass AL *et al.*, 2009)

雖然 IFITM 蛋白的抗病毒功能正在透過各種方法進行研究，但還沒有確切的蛋白的三維結構。透過其基因檢視，可以發現五個相類似的結構域，這些包括可變的疏水性胺基端結構域 (N-末端, NTD)、保守的疏水性膜內結構域 (IMD)、保守的細胞內環 (CIL)、可變疏水跨膜結構域 (TMD) 以及短的，高度可變的羧基端結構域 (C-末端, CTD) (Brass AL *et al.*, 2009, Bailey CC *et al.*, 2014)。IFITM 蛋白的三種不同的膜拓撲結構模型已被提出：N-末端和 C-末端接暴露於細胞膜外的雙跨膜蛋白 (Takahashi S *et al.*, 1990, Evans SS *et al.*, 1990, Brass AL *et al.*, 2009, Bailey CC *et al.*, 2014)；N-末端結構域和 C 端結構域暴露於細胞質的膜內鑲嵌蛋白 (Jia R *et al.*, 2012, Yount JS *et al.*, 2012)；C-末端單一跨膜暴露在細胞外和 N-末端暴露在細胞質 (Bailey CC *et al.*, 2013, Weston S *et al.*, 2014, Ling S *et al.*, 2016)。

這些蛋白質的生物化學性質和其他生物學功能尚未完全了解，為了研究 *Ifitm* 基因的生物學作用(免疫信號傳導途徑中的作用)，可以透過幾種不同的 *Ifitm* 基因敲除小鼠作為實驗動物，本論文所選用的是將小鼠染色體 7 號上的 *Ifitm1*、*Ifitm2*、*Ifitm3*、*Ifitm5* 以及 *Ifitm6* 這五個基因約 120 kb 去除，只保留了 *Ifitm10* 和 16 號染色體上的 *Ifitm7* 基因的 *IfitmDel* 小鼠(Lange UC *et al.*, 2008)。這種小鼠在發育、生存以及生育能力上，與野生型並沒有明顯差異。

Wee *et al* 報導，*IfitmDel* 小鼠的食物攝取量顯著高於野生型小鼠。隨著年齡的增加，體重也會顯著增加，在 6 個月大時體重已顯著高於野生型小鼠，在雄性突變鼠體重約會比野生型雄鼠重 30%，同時腹部的脂肪與總脂肪量增也顯著高於野生型小鼠，代表此基因剔除鼠有肥胖的表型(Wee YS *et al.*, 2015)。*IfitmDel* 小鼠同時也有代謝異常的症狀，這些突變鼠的氧氣消耗率與體熱生成率較低，代表其基礎代謝率較低，其空腹血糖較高及胰島素容忍測試(insulin resistance test, ITT)的結果均顯示此基因剔除鼠有類似第二型糖尿病的胰島素不敏感(insulin resistance)症狀。另外，脂肪的增加會促使脂肪細胞分泌瘦素，瘦素的主要作用標的是下視丘的弓狀核，瘦素會促使弓狀核中的神經細胞產生 POMC，進而產生抑制攝食及促進代謝率的效果。另外瘦素是一種能夠在不同的營養狀態下活化免疫細胞的發炎因子(Howard JK *et al.*, 1999, Lord GM *et al.*, 2002)。抽取 *IfitmDel* 小鼠血液分析發現到有較高濃度的瘦素，但在下視丘卻測得較低含量的 POMC，表示 *IfitmDel* 小鼠的中樞攝食及代謝調控系統功能異常(Wee YS *et al.*, 2015)

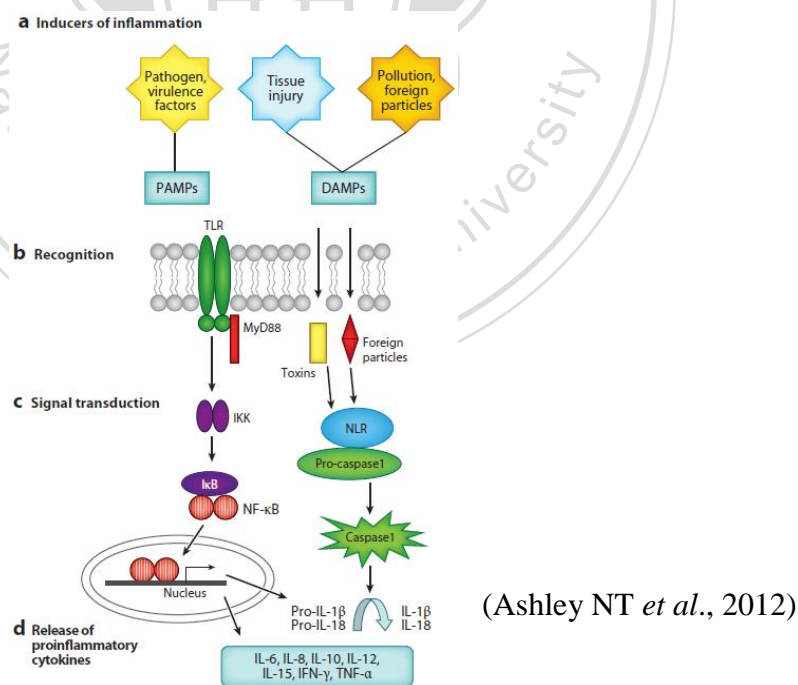
在思覺失調患者前額葉發現到 *Ifitm1*、*Ifitm2* 和 *Ifitm3* 的表現量增加，認為涉及調節該腦區的免疫反應，而神經發炎被認為是精神分裂症發病的潛在因素(Trépanier MO *et al.*, 2016)。

二、炎症機制 (Inflammation mechanisms)

發炎(Inflammation)是一個複雜的生理反應，通常通過細胞因子(cytokine)來調節。發炎起始於生物體受到病原感染、組織受到損傷或是受到外來物質污染

等情況，透過檢測病原體相關分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMP)可以辨識病原體存活所表達的特定分子，而組織損傷或是污染則可以由損傷相關分子模式(Damage-associated molecular patterns, DAMPs)檢測。經由這些檢測可以使免疫細胞不會攻擊生物體本身的組織，因為與後天免疫不同的地方是先天免疫沒有區分不同病原體細菌株的能力 (Janeway CA *et al.*, 2005)。

被檢測到的訊號會被不同的受體辨識，例如跨膜 Toll 樣受體(Toll-like receptors, TLRs)、細胞內核苷酸結合結構域或是亮氨酸重複序列的受體(leucine-rich-repeat containing receptors, NOD-like receptors or NLRs) (Lange C *et al.*, 2001, Proell *et al.*, 2008, Roach *et al.*, 2005)。TLRs 會進一步的活化 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)並進入細胞核，結合目標基因，這是一個快速的反應，因為這個過程並不需要再與其他的蛋白質在做結合 (Ghosh S *et al.*, 1998, Friedman R and Hughes AL, 2002)。位在細胞內的 NLRs 在接受到越來越多的 DAMP 會提供免疫系統感知細胞損傷或是環境中可能是毒素或是污染的途徑。



接著，轉譯出的促發炎細胞因子(proinflammatory cytokines)如白細胞介素-1 β (interleukin-1-beta, IL-1 β)、白細胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) 等等會促進如單核細胞(monocytes)和嗜中性球(neutrophils)向受到感染的部位聚集。嗜中性球通過從細胞質顆粒釋放

有毒化學物質而產生細胞毒性環境，這些化學物質釋放需要消耗葡萄糖和氧氣，稱為呼吸爆發，釋放的有毒化學物質包括高活性氧和氮物質(分別為 ROS 和 RNS)和各種蛋白酶。這些物質對病原體和宿主都具有破壞性，並且誘導周圍組織的液化以阻止微生物轉移(Nathan C, 2002)。這些機制也會造成在局部發炎中發紅、腫脹、發熱、痛和功能喪失這些傷害的主要原因(Medzhitov R, 2008)。

發炎的最後階段是消退(resolution)，在發炎過後的頭幾個小時之後，回復的協調程序由停留在組織的巨噬細胞進行。在急性發炎期間，這些細胞產生發炎前列腺素(proinflammatory prostaglandins)和白三烯(leukotrienes)，迅速轉換成脂氧素(lipoxins)，阻斷了嗜中性球進一步的聚集，並且有利於增強傷口癒合(Serhan and Savill, 2005)。

三、巨噬細胞的發育和在發炎中的生物學作用 (Macrophage development and biological roles in inflammation)

巨噬細胞的活化牽涉到它的作用與活化程度和它本身的狀態，也與活化它的細胞激素種類及刺激本身皆有關聯。巨噬細胞是單核吞噬細胞系統的主要一員，由共同骨髓前驅細胞(common myeloid progenitor cell)的骨髓幹細胞在骨髓中分化成顆粒球(granulocyte/macrophage progenitor cell)，到了血液中再分化成嗜中性球(neutrophil)、嗜酸性球(eosinophil)、嗜鹼性球(basophil)和單核細胞(monocyte)。單核細胞遷移到各種組織後會再轉化成巨噬細胞(macrophage)，巨噬細胞在特定組織有另外的名稱，像是在神經中樞稱為微膠細胞(Microglia)，其活性模式也由不同組織的微環境差異調節。此外，這些原始細胞也可以分化成未成熟的樹突細胞(immature dendritic cell)，組織中的未成熟樹突細胞捕捉到外來抗原會進入淋巴結活化，變為成熟的樹突細胞(mature dendritic cell)。

在透過適當的生長因子及細胞激素的刺激下可以讓造血幹細胞增生及分化成不同功能的細胞。在沒有受到病原感染或是傷害的情況下，是透過骨髓中的基質細胞(stromal cell)包含：脂肪細胞、內皮細胞、纖維母細胞(fibroblast)和巨噬細

胞所釋放出的細胞激素，來讓造血幹細胞生長以及分化。而在受到微生物感染時，活化的巨噬細胞及輔助性 T 細胞就會誘發更多的造血活性，使得白血球細胞快速增生，攻擊外來微生物。這些生長因子包括：群落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)、紅血球生長因子(erythropoietin, EPO)。CSF為刺激造血幹細胞群落所形成，屬於酸性醣蛋白，例如：multilineage CSF (multi-CSF)；巨噬細胞群落刺激因子(macrophage CSF, M-CSF)；顆粒球群落刺激因子(granulocyte CSF, G-CSF)和顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(granulocyte macrophage CSF, GM-CSF) (張立德, 2013)。

巨噬細胞活化可分為兩種古典活化巨噬細胞(classical activated macrophage, M1)和選擇性活化巨噬細胞(alternatively activated macrophage, M2)，M1 主要是由 IFN- γ 、LPS 或 TNF 刺激所引導，M2 主要是由 IL-4 和 IL-10 刺激所引導。(Martinez FO and Gordon S., 2014)

巨噬細胞在發炎反應的過程中扮演著相當重要的角色，在不同的階段都有份參與，最主要有三大功能：抗原呈遞、吞噬作用以及通過產生各種細胞因子和生長因子的達到調節免疫反應。當巨噬細胞吞噬抗原後，可以將抗原呈現給 T-細胞(T-cell)，並且釋放出 TNF、IL-1、IL-6 等細胞激素，T-細胞接收到特定抗原後會釋放出更多細胞激素，活化更多的巨噬細胞來參與發炎反應，增加病原的清除(Fujiwara N and Kobayashi K, 2005)。當入侵病原被清除後，T-cell 會分泌如 IL-4 和 IL-13 等細胞激素，使巨噬細胞極化成為選擇性活化巨噬細胞(M2)，幫助組織的再生與重整(Stout RD and Suttles J., 2004)。

巨噬細胞具有相當大的多樣性和可塑性，不像一般的淋巴細胞在碰到環境中的細胞因子而成為不可逆的表型，它能夠因應周圍組織為環境的變化快速的切換其表型，像是給予 M2 的巨噬細胞 LPS 的刺激後，會讓巨噬細胞轉換成 M1 後，使 TNF- α 、IL-12、iNOS 和 COX-2 表達增加，並抑制抗炎活性 IL-10 生產(Stout RD *et al.*, 2005)；而 M1 巨噬細胞在抑制了 PI3K / AKT 途徑極化為 M2 樣巨噬細胞(Hyam SR *et al.*, 2013)

四、代謝所引發的發炎和肥胖的關係 (Inflammation metabolism and obesity)

肥胖被認為是一種系統性疾病，主要是因為體內脂肪過量和異常積聚導致不良的健康影響。肥胖成為全球性的公共健康問題，因為肥胖和超重會增加罹患慢性疾病的風險，包括第二型糖尿病、高血壓、心血管疾病、哮喘和某些形式的癌症等等(M. Abdelaal *et al.*, 2017)。

被認為是儲存能量的脂肪組織也是重要的內分泌器官，在 Ouchi 等(2011)的評論中，脂肪組織透過多種脂肪因子參與體內平衡，而這些細胞因子同時具有著促發炎或是抗發炎的性質，而因為脂肪組織的增加影響的這些因子與其他細胞內之間的相互作用，在組織中產生了低度發炎的情況(Ferrante AW Jr, 2007; Ouchi N *et al.*, 2011)。這種低度發炎，也被稱為代謝引發的發炎或代謝性發炎 (metabolic-triggered inflammation or meta-inflammation)，由於營養物和代謝過剩引發的長期發炎反應(Hotamisligil, 2006)。與傳統炎症不同，代謝性發炎是一種慢性、低度、無菌的炎症，並非是任何微生物感染所造成的。

在已知的 50 多種脂肪因子中，有較多的研究發現到瘦素 (leptin)、脂聯素 (adiponectin)、IL-6 以及 TNF- α 對脂肪細胞代謝和胰島素敏感性的作用，並且涉及發炎相關的分子/信號傳導途徑，而在這種情況下，這些分子/信號傳導途徑具有作為炎症介質和能量代謝調節劑的雙重作用。(Ouchi *et al.*, 2011, Stolarczyk E.,2017)。

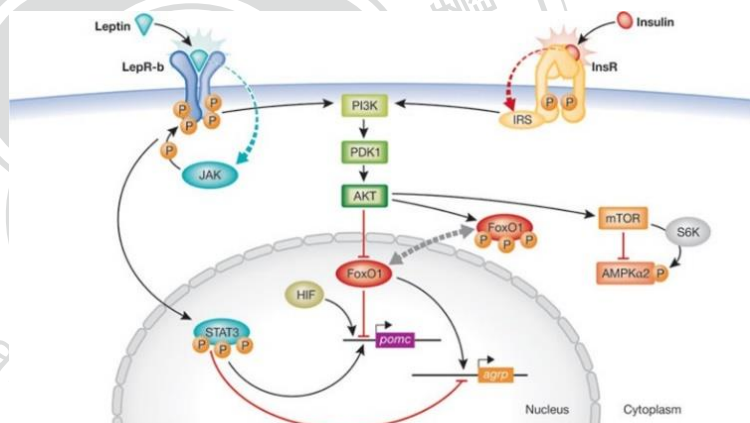
將脂肪組織功能障礙和胰島素抵抗與代謝性肝病聯繫起來的確切機制尚未完全了解，但有幾個過程有牽連。首先，內臟脂肪的脂肪分解增加導致游離脂肪酸流向肝臟。其次，脂肪組織促進的促炎性和胰島素抗性脂肪因子 TNF- α 和 IL-6 的分泌增加，同時脂聯素釋放減少(Sanyal AJ, 2005)。最後，在游離脂肪酸氧化和組合的肝功能失調從頭脂肪合成繼發於肝改變胰島素敏感性(Tilg, H and Moschen AR., 2008)。

五、中央代謝調節系統和 POMC 神經元 (Central metabolic regulating system and POMC neurons)

生物體中可以調控食慾及體重的包含腸胃道、肝臟、脂肪細胞及中樞神經所分泌的內分泌、神經肽、酶(Valassi E *et al.*, 2008)。中樞神經調節飲食及能量平衡最重要的位置是在大腦下視丘(hypothalamus)的弓狀核(arcuate nucleus, ARC)，在這個區域主要有兩群神經元，一群是會分泌神經肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 及刺鼠蛋白 (agouti related protein, AgRP) 刺激食欲的神經元和另一群會分泌物質促黑激素肽 (proopiomelanocortin, POMC) 及古柯鹼與安非他命調控的轉錄物 (cocaine-amphetamine regulated transcript, CART) 抑制食物攝取的神經元，NPY/AgRP 與 POMC/CART 之間有著相互的拮抗作用。兩群的神經元會投射到下視丘其他腦區如下視丘室旁核(paraventricular nucleus, PVN)、下視丘背中核(dorsomedial nucleus, DMN)和側下視丘區 (lateral hypothalamic area, LHA) 進行食慾調節。瘦素 (leptin) 和胰島素 (insulin) 可以刺激 POMC 神經元，POMC 神經元被激活，會導致食物攝入減少，能量消耗增加和體重下降。(Schwartz *et al.*, 2000, Bouret SG *et al.*, 2004, Atasoy D *et al.*, 2012) ARC POMC 神經元的長期但不是急性激活抑制了動物的攝食行為。週邊急性營養狀況及脂肪是否過多則經由腦幹獨立束核(nucleus tractus solitarius, NTS)轉至弓狀核，瘦體素將脂肪組織多少之信息傳至腦，但是大部份胖子，對瘦體素不敏感(Elmqvist JK *et al.*, 1999, Zhan C *et al.*, 2013)。

瘦素和胰島素分別作用在瘦素受體 b (leptin receptor b, LepR-b)和胰島素受體 (insulin receptor, InsR)。當瘦素結合到 LepR-b 的細胞外結構域時，會募集 JAKs 並讓 JAK 1 和 JKS 2 自體磷酸化，活化了的 JAKs 會使 LepR-b 磷酸化從而激活 STAT3，STAT3 會進入細胞核中與 POMC 和 AGRP 啟動子結合，刺激 POMC 表達，抑制 AgRP 的產生(Leshan RL *et al.*, 2006)。除了 JAK-STAT 路徑，瘦素也會活化磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B 信號通路(phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase B, PI3K-Akt signalling pathway)，這條路徑同時也可以被胰島素活化，

(Niswender KD *et al.*, 2003)，來達到調節體重和葡萄糖平衡。活化的磷脂酰肌醇激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)可以使 PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate)合成 PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) (Hill JW *et al.*, 2008)，PIP3 的積累讓 PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1)活化再進一步的活化蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB，也稱為 AKT)，這個是個在許多蛋白質和轉錄因子之間調節和活化中起重要作用的蛋白，其中包含有 FoxO1 (Forkhead/winged helix box gene, group O-1) (Kim MS *et al.*, 2006)，單磷酸腺苷活化蛋白質激酶(AMP activated protein kinase, AMPK) (Minokoshi Y *et al.*, 2004, Claret M *et al.*, 2007)和哺乳動物雷帕黴素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) (Cota D *et al.*, 2006)。FoxO1 作為 POMC 表達的抑制劑，當瘦素和胰島素信號傳導導致 FoxO1 的磷酸化時，它會離開細胞核，讓 STAT3 與 POMC 啟動子結合以刺激其表達。



(Varela L and Horvath TL., 2012)

AMPK 會因為細胞缺乏能量導致單磷酸腺苷(Adenosine monophosphate, AMP)的含量增加而被活化，而像瘦素和胰島素這類的代表著能量過剩的訊號則會抑制 AMPK 以及其下游蛋白的活化(Claret M *et al.*, 2007)。一篇研究指出 mTOR 為 AMPK 上游調控因子，抑制其活性，p70S6K 也是一種 AMPK 激酶，其直接磷酸化 AMPK α 上的絲氨酸 485/491，從而抑制其活性(Dagon Y *et al.*, 2012)。

六、下視丘炎症 (Hypothalamic inflammation)

下視丘是大腦調節能量平衡的關鍵區域，它會整營養相關信號來達到控制食物攝取以及能量儲存和支出的平衡，最近幾年的研究發現到神經膠細胞 (glial

cell)，像是：微膠細胞(microglia)和星形細胞(astrocytes)也會參與協調代謝功能(Le Thuc O *et al.*, 2017)。下視丘發炎與攝食行為失調息息相關，高度的發炎會導致體重的下降，反之，低度的發炎則會造成肥胖(Velloso LA *et al.*, 2008, Zhang X *et al.*, 2008, Braun TP and Marks DL., 2010)。給予老鼠食用高脂飲食，導致促炎症細胞因子的產生以及胰島素和瘦素信號傳導的損傷，在營養過剩並將訊號傳遞這中樞的情況下會刺激下視丘的代謝性炎症介質 IKK β / NF- κ B，中斷了中樞胰島素/瘦素信號傳導和作用(De Souza CT *et al.*, 2005)。除了脂肪酸外，將星狀細胞暴露在果糖中，會引起的星形細胞增生並產生下視丘發炎(Li JM *et al.*, 2015)。

在營養缺乏和營養過剩的情況下，血腦障壁(blood brain barrier, BBB)的滲透性增加(Langlet F *et al.*, 2013)，這個生理變化讓 ARC 的神經元更能夠感知到血液中的訊號，包括細胞因子。

第二節 論文目的及研究策略

一、研究目的及動機

從先前的研究中發現，對野生型小鼠與 *IfitmDel* 小鼠進行長期注射 Poly I:C 後檢測下視丘中 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- β 、iNOS、IL-10 以及 F4/80 的 mRNA 表現量，發現 *IfitmDel* 小鼠在 TNF- α 、IL-1 β 和 F4/80 的表現量上有顯著差異，這表示了 *IfitmDel* 小鼠在病毒感染時會活化的 TLR3 (toll-like receptor 3) 訊息傳導途徑被活化時會有更強的促發炎反應(Wee YS *et al.*, 2015)，本實驗室之前的實驗結果也表明，單次給予高劑量的格蘭氏陰性菌可產生的內毒素 LPS，*IfitmDel* 小鼠在血液細胞中 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表現量是顯著高於野生型小鼠(附圖一)，這些實驗結果顯示 *IfitmDel* 小鼠在受到促發炎刺激時會產生較高的免疫反應。由於巨噬細胞在發炎反應的調控扮演重要的功能，因此我們猜測 *Ifitm* 基因缺失可能造成巨噬細胞的特性產生變化，並導致異常的發炎反應。我們先測試在 *IfitmDel* 小鼠是否可以觀察到異常的發炎現象。由於 *Ifitm* 基因在免疫細胞分化的各個階

段均有表現，我們也分析是否 *Ifitm* 基因缺失是否導致免疫細胞分化異常，尤其是巨噬細胞的分化。同時我們也針對巨噬細胞對發炎刺激的反應進行測試，看其是否會對發炎刺激有較強的反應。

促發炎細胞因子在下視丘會引起代謝等生理平衡產生改變。如感染造成的急性發炎會造成食慾減低，代謝平衡改變等病理現象，而近來下視丘慢性發炎也被認為是肥胖與代謝失衡等症狀的重要原因。在 *IfitmDel* 小鼠中也有下視丘發炎的現象，而發炎環境會對 POMC 神經元的功能造成甚麼影響目前尚未完全清楚。因此我們對發炎環境下 POMC 神經元對代謝調控因子如瘦素及胰島素等的反應進行分析。我們採用由下視丘弓狀核的 POMC 神經元 immortalize 產生的 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞株進行實驗。

二、實驗設計

透過血液分析以及腦組織 NOS2 mRNA 表現量看是否 *IfitmDel* 小鼠發炎強度有所改變

透過分析血液及骨髓細胞，以確認 *IfitmDel* 小鼠的造血作用是否正常

取出老鼠骨髓細胞誘導成巨噬細胞，在給予不同發炎階段刺激，觀察細胞各項指標的表現量

透過血液分析 *IfitmDel* 突變小鼠瘦素抗性

在刺激過巨噬細胞培養液環境中給予 mHypo-POMC-GFP 細胞處理胰島素及瘦素，是否會影響 STAT3, AKT, AMPK 等蛋白的表現

第二章 材料與方法

第一節 實驗動物

本論文所使用的小鼠的照顧符合國立政治大學實驗動物照護及使用委員會規定。實驗小鼠為 2-8 個月大的 *IfitmDel* 小鼠，及背景、年齡和性別匹配的同窩仔作為野生型小鼠(WT)對照。所有小鼠置於受控溫度(22-25°C)、濕度(50-70%)和 12 小時光照/黑暗週期，飼養期間給予充足的飲用水及標準飼料。

第二節 瘦素抗性實驗(Leptin resistance)

本實驗包括 4 組。使用 6 個月大的 *IfitmDel* 小鼠和年齡相匹配的野生型小鼠做為對照，分別在腹部注射生理食鹽水或是瘦素(5 mg / kg)後單籠飼養，每籠給予約 20 g 的飼料，經過 24 小時之後將所剩的飼料取出秤重，記錄下小鼠的食物攝取量。

第三節 細胞培養

一、細胞培養

mHypoA-POMC/GFP-1

本實驗所使用的 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞株是購自 CELLutions Biosystems Inc。細胞株取自於 8 週大的雄性 POMC-GFP 小鼠下視丘，具有表達神經肽(neuropeptides)、酶標記物(enzymatic markers)和生物活性受體(biologically active receptors)的性質，可以運用來研究中樞神經系統疾病和障礙，如：肥胖、壓力以及代謝失調(Nazarians-Armavil, *et al.* 2014)。

細胞培養在含有 10%胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS, gibicol)的 DMEM (Sigma D5796)培養液中，放置於溫度 37°C 及包含 5%二氧化碳的培養箱中，約

1 至 3 天更換培養液，讓細胞保持在養分充足的生長環境，培養期間以倒立式顯微鏡觀察細胞生長情形，當細胞數量約培養盤的 8 至 9 分滿則進行分盤。

骨髓細胞誘導成巨噬細胞 (Bone marrow-derived macrophages, BMDM)及樹突細胞(Bone marrow derived dendritic cells, BMDCs)

將小鼠犧牲後，取股骨(femur)及脛骨(tibia)，剪去骨兩端，利用針筒以 1x PBS 將骨髓腔中的細胞沖出來並打散，以 500 xg 離心 5 分鐘，抽掉上清液後加入紅血球裂解液(ACK lysis buffer)靜置約 2 分鐘，再加入 1x PBS 停止作用，以 500 xg 離心 5 分鐘，然後用 1x PBS 及 DMEM 培養液各沖洗一次，接著過濾細胞液並計數細胞，分別種入 10 公分及 6-well 培養盤培養。

骨髓細胞培養在含有 20% L-929 conditional medium 以及 80% culture medium (10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS, gibicol) 及 100U/ml 抗生素 (penicillin/streptomycin,) 的 DMEM (gibicol) 培養液，放置於溫度 37°C 及包含 5% 二氧化碳的培養箱中，約 2 天更換培養液，第二天起透過流式細胞儀測是否分化為巨噬細胞。

骨髓細胞培養在加有含有 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS, gibicol) ，100U/ml 抗生素 (penicillin/streptomycin,) 的 RPMI (gibicol) 培養液並加入 20 ng/ml GM-CSF，3 天後再加入新的培養液及 20 ng/ml GM-CSF 持續培養，將細胞放置在溫度 37°C 及包含 5% 二氧化碳的培養箱中培養 6 天，培養期間皆以倒立式顯微鏡觀察細胞生長情形。

二、細胞繼代培養與計數

先將培養液及 1x PBS 放入 37°C 水域槽回溫後，噴 75% 酒精放入無菌操作台。將培養盤中舊的培養液抽掉，以 1x PBS 清洗 3 次，加入 2 ml Trypsin 使其均勻覆蓋過盤面後抽掉，放入細胞培養箱約 1 分鐘後取出，加入 5 ml 培養液並將細胞打散。取 10 μ l 細胞液與等體積的 Trypan-Blue (Sigma, T8154) 均勻混合，

取 10 μ l 混合好的液體滴入細胞計數器凹槽，帶細胞液分布均勻後，將細胞計數器放置於顯微鏡下，計數九宮格中四角之平均細胞數後，乘以 10⁴ 以及細胞液稀釋倍數，來回推母盤中 1 ml 培養液中含有多少顆細胞。最後依實驗需求，種植不同密度的細胞至 6、12、24 孔培養盤或是 3、6、10 cm 培養盤中。

第四節 藥物處理

骨髓細胞誘導成巨噬細胞後給予脂多醣體(Lipopolysaccharide, LPS)、白血球介素-4 (Interleukin-4, IL-4)以及干擾素- γ (Interferon- γ , IFNG)處理。LPS 為所上詹銘煥教授所提供，初始濃度為 1 mg/ml，取 1 μ l 加入 1 ml 培養液中，使最終濃度為 1 μ g/ml、0.3 μ g/ml 及 0.1 μ g/ml。IL-4 是購自 Biolegend，以 1x PBS 將粉末溶成初始濃度為 20 μ g/ml 的液體，放置於-80 $^{\circ}$ C 保存，取 1 μ l 加入 1 ml 培養液中，使最終濃度為 20 ng/ml、5 ng/ml 及 2 ng/ml。活化巨噬細胞的 IFNG 是購自 Sino Biological Inc.，以滅菌水將粉末溶成初始濃度為 100 μ g/ml 的液體，放置於-80 $^{\circ}$ C 保存取 0.5 μ l 加入 1 ml 培養液中，使最終濃度為 50 ng/ml、10 ng/ml 及 5 ng/ml。

細胞在經過 24 小時處理後，收集培養液來處理 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞株，收集細胞後染色上流式細胞儀分析，萃取蛋白質進行西方墨點法，以及萃取 RNA 進行定量即時聚合酶鏈鎖反應。

mHypoA-POMC/GFP-1 細胞株給予細胞 10 nM 胰島素(Tocris Bioscience)、200 nM 瘦素(PeproTech)以及處理 24 小時 WT BMDM LPS treat 細胞液(condition medium)，在 24 小時後萃取蛋白質進行西方墨點法，以及萃取 RNA 進行定量即時聚合酶鏈鎖反應。

第五節 西方點墨法 (Western blot)

一、蛋白質萃取

細胞依實驗藥物處理後，從培養箱取出，將細胞培養液抽掉，以 1x PBS 沖洗 3 次，加入含有蛋白酶抑制劑 (protease inhibitor, Calbiochem)及磷酸酶抑制劑 (phosphatase inhibitor, Calbiochem)的裂解緩衝液 (lysis buffer) 150 μ l ~ 200 μ l，靜至於冰上約 5 分鐘，再以 110 rpm 轉速搖晃 2 分鐘，放置到顯微鏡下觀察細胞是否裂解後，將 lysis buffer 吸取至微量離心管中，在 4 $^{\circ}$ C 下以 14000 xg 離心 10 分鐘，抽取上清液至新的微量離心管中。樣品放置於-80 $^{\circ}$ C 保存。

二、蛋白質濃度測定

依據 Bradford 測定法來測定蛋白質濃度。考馬斯亮藍 G-250 染料 (Coomassie Brilliant Blue G-250, CBG)在酸性溶液中與蛋白質結合後，溶液顏色會由紅棕色轉變成為藍色，最大的吸收峰的位置也會由 465nm 變為 595 nm，故透過分光光度計偵測樣品在 OD595 的吸光值，並用牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 做出標準曲線計算出樣品中蛋白質的濃度。將 2 μ l 樣本，加入 798 μ l 的 ddH₂O 以及 200 μ l Bio-Red Protein Assay dye 均勻混合後，透過分光光度計進行樣本蛋白質濃度測定。

三、樣品配置

測定出蛋白質濃度後，計算 20 μ g 所需要的體積，加入 5x loading dye (0.25M Tris-HCL, pH6.8、0.5M DTT、10% SDS、0.5% Bromophenol blue、50% Glycerol)，最後補 ddH₂O 使每個樣品達到相同的體積，將樣本均勻的混合後放到設置 90 $^{\circ}$ C 的加熱板上 10 分鐘，藉以打斷蛋白質的雙硫鍵，使蛋白質變成線性結構，加熱完後將樣品放置於冰上，冷卻後儲存至-80 $^{\circ}$ C 冰箱。

四、鑄膠和十二烷基硫酸鈉聚丙稀酰胺凝膠電泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

先將 Hoefer 鑄膠器用清水清洗乾淨並用酒精擦拭，架好鑄膠器後，加入 ddH₂O 檢查是否有液體外漏的情況，確認過後將 ddH₂O 倒掉以濾紙將殘餘的 ddH₂O 吸乾，配置 10% 的 Running gel 混合均勻倒入鑄膠器(一片約 9 ml)，加入 75% 酒精使 Running gel 平整，待約 40 分鐘後膠體凝固後，倒掉酒精，將配置好的 4% Stacking gel 混合均勻倒入鑄膠器(一片約 3 ml)，插入 15 格齒梳(comb)，待約 30 分鐘後膠體凝固後即可進行電泳。

將 SDS-PAGE 架置在電泳槽 (Amersham Biosciences)，小心的移除齒梳，加入 1x Tank buffer (25mM Tris-HCl、192mM Glycine、0.1% SDS)，將處理好的蛋白質樣品注入樣品槽中，並在樣品左右兩側加入蛋白質分子量標誌，以每片膠體為基準，設定電流 25 mA，電壓則設定最大，電泳約 2 小時。

五、蛋白質轉漬 (Transfer)

跑完電泳後將膠片取出，先浸泡在 1x Transfer buffer (25 mM Tris-HCl、192 mM Glycine、15% Methanol)內以 70 rpm 轉速清洗 10 分鐘，同時將與膠片同大小的 PVDF 膜 (Millipore)浸泡於 100% 甲醇(methanol)搖晃 30 秒，再放入 ddH₂O 中清洗，最後再浸泡在 1x Transfer buffer，在準備 4 張濾紙浸泡在 1x Transfer buffer 內。將膠片、PVDF 膜以及濾紙組裝，並且避免之間有氣泡產生，放入裝有 1x Transfer buffer 的轉漬槽(Bio-Rad)中，設定電壓 100V，電流則設定最大，時間為 1 小時。

六、免疫反應 (Immunoblotting)

將轉漬完成的 PVDF 膜取出後放到滴有 0.05% TBST 緩衝液的保鮮膜上，在 PVDF 膜包好後，沿著兩側蛋白質分子量標誌標記要觀測的蛋白質區域，之後將剪裁好的 PVDF 膜放入 blocking buffer (2% BSA 於 0.05% TBST 緩衝容液)，在室溫下以 40 rpm 的轉速搖 1 小時，來清除 PVDF 膜上的非特異性蛋白質與抗體結合。接著加入以 0.05% TBST 緩衝溶液或含有 5% BSA 的 0.1% TBST 所稀釋的

一級抗體在 4°C 反映 16~18 小時。所使用的一級抗體包含 mouse anti-actin antibody (1:100000, Chemicon)、rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) antibody (1: 5000, Cell Signaling)、rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) antibody (1:10000, Cell Signaling)、rabbit anti-phospho-stat3 (Tyr705) antibody (1:2000, Cell Signaling)、rabbit anti-phospho-AMPK α (Thr172) antibody (1:1000, Cell Signaling)、rabbit anti-phospho-akt antibody (1:2000, Cell Signaling)、rabbit anti-akt (pan) antibody (1:1000, Cell Signaling)。

等一級抗體反應完成後，以 0.1% TBST 緩衝液以 70 rpm 的轉速搖晃 10 分鐘三次，加入以 0.05% TBST 緩衝液所稀釋的二級抗體，所使用的二級抗體有 Goat Anti-Mouse IgG Antibody, horseradish peroxidase conjugate antibody (1:5000, Millipore) 以及 Goat Anti-rabbit IgG Antibody, horseradish peroxidase conjugate antibody (1:5000, Millipore)，在室溫下以 40 rpm 的轉速搖晃 1 小時，接著再以 0.1% TBST 緩衝液以 70 rpm 的轉速搖晃 10 分鐘三次後準備照相。

七、顯像及分析

在 PVDF 膜上加上 Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Millipore)，使二級抗體上接有的 HRP (Horseradish peroxidase) 與 ECL 反應產生冷光，透過電泳膠影像系統(AVEGENE)進行訊號擷取。結果透過 NHI Image J 軟體進行量化分析。

第六節 定量即時聚合酶連鎖反應 (Quantitative real time polymerase chain reaction, Q-PCR)

一、RNA 萃取及濃度測定

樣品放置於-80°C保存。使用 Molecular Research Center, Inc.的 RNAzol® RT (RN 190)來萃取 RNA。RNAzol® RT 中含有酚(phenol)和胍(guanidine)分離 RNA 與其他分子。

細胞依實驗藥物處理後，從培養箱取出，將細胞培養液抽掉，以 1x PBS 沖洗 3 次，加入 500 µl RNAzol® RT 將盤面沖一遍後將細胞裂解後取至微量離心管中，加入 200 µl RNase-Free Water 靜置 15 分鐘，讓 DNA、蛋白質、多醣和其它分子沉澱，之後以 12000 xg 離心 15 分鐘，取出含有 RNA 的上清液到新的微量離心管中，並加入 280 µl 75%酒精靜置 10 分鐘來沉澱出 RNA，再以 12000 xg 離心 8 分鐘，將上清液抽掉，加入 75%酒精以 8000 xg 離心 3 分鐘，來清洗 mRNA，一共清洗兩次，最後加入 20~30 µl RNase-Free Water 回溶 RNA。

以 Nanodrop 2000 (Thermo)測定 RNA 濃度，將樣品放置於-80°C保存。

二、逆轉錄聚合酵素鏈鎖反應 (reverse transcription-PCR, RT-PCR)

測定出 RNA 濃度後，計算 1 µg 所需要的體積，加入 1 µl 濃度為 100 µM 的 oligo-dT primers，最後補 RNase-Free Water 使每個樣品體積達到 10 µl，在 65°C 反應 2 分鐘，破壞 RNA 二級結構，快速地放置在冰上至少 1 分鐘後，加入 2 µl 10x RT-script buffer、0.5 µl 濃度為 40 U/ul 的 RNase inhibitor、1 µl 濃度為 10 mM 的 dNTP solution MMLV、0.5 µl RT-script enzyme 以及 6 µl RNase-Free Water 使最終體積達到 20 µl，均勻混合後放置在 37°C 反應 1 小時 30 分鐘，合成 cDNA，之後將溫度提高到 85°C 放置 5 分鐘，終止 cDNA 合成反應，最後將樣品放置於冰上，待冷卻後儲存至-20°C 冰箱。

三、定量即時聚合酶鏈鎖反應

將 1 µl 樣品、1 µl 10nM 前導引子、1 µl 10nM 後導引子、7 µl ddH₂O 以及 10 µl SYBR Green Master Mix (Thermo)依序加入 0.2 ml 反應管中，均勻混合後放入定量聚合酶連鎖反應儀器(Applied Biosystem 7300 Real-Time PCR System)進行

即時定量聚合酶連鎖反應，設定的反應條件為：50°C、2 分鐘，95°C、2 分鐘；95°C、20 秒，60°C、20 秒，72°C、30 秒，進行 40 個循環。反應完成後，透過儀器所附的軟體取得 Ct 值，根據 Ct 值可以算出標的基因與 GADPH 的相對值 $\Delta\Delta Ct$ ，而基因表現量差異為 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ，實驗所使用的引子序列如下：

基因	序列
<i>GADPH</i>	Forward : 5' - AGGTCGGTGTGAACGGATTTG - 3'
	Reverse : 5' - TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA - 3'
<i>Nos2</i>	Forward : 5' - CTTTGCCACGGACGAGAC - 3'
	Reverse : 5' - TCATTGTACTCTGAGGGCTGAC - 3'
<i>Arg</i>	Forward : 5' - GAATCTGCATGGGCAACC - 3'
	Reverse : 5' - GAATCCTGGTACATCTGGGAAC - 3'
<i>Ym-1</i>	Forward : 5' - AAGAACACTGAGCTAAAACTCTCCT - 3'
	Reverse : 5' - GAGACCATGGCACTGAACG - 3'
<i>POMC</i>	Forward : 5' - ACCTCACCACGGAGAGCA - 3'
	Reverse : 5' - GCGAGAGGTCGAGTTTGC - 3'
<i>Tnf-α</i>	Forward : 5' -CCCTCACACTCAGATCATCTTCA - 3'
	Reverse : 5' -GCTACGACGTGGGCTACAG - 3'
<i>Il-6</i>	Forward : 5' -TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC - 3'
	Reverse : 5' -TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC - 3'
<i>Ifitm1</i>	Forward : 5' - CTTCAAAGCCGAGAGCTG - 3'
	Reverse : 5' - CCACCATCTTCCTGTCCCTA - 3'
<i>Ifitm2</i>	Forward : 5' -CCATCCTCCAGACGGGGCGATTG - 3'
	Reverse : 5' -TATTCAGGCACTTGGCAGTG - 3'
<i>Ifitm3</i>	Forward : 5' -CTTTGCTCCGCACCATGAACCA - 3'
	Reverse : 5' -AGGCACTTAGCAGTGGAGGCGT - 3'

第七節 流式細胞儀檢測 (Flow cytometer)

一、樣品備置

細胞樣品：將培養盤中舊的培養液抽掉，以 1X PBS 清洗 3 次，加入 5mM EDTA，放入 37°C 培養箱約 5 分鐘，將細胞沖下放入微量離心管，以 500g 離心

5 分鐘，並以 flow buffer (0.1% Fetal bovine serum 和 0.1% sodium azide 在 1x PBS 緩衝溶液)清洗 1 次，用 flow buffer 回溶染色。

血球樣品：在微量離心管中先加入 10-20 μ l 的 0.5M EDTA，透過臉頰採血約 100-500 μ l，之後加入 500 μ l ACK 靜置約 3-5 分鐘後以 8000 rpm 室溫離心 5 分鐘，用 flow buffer 回溶染色。

脾臟樣品：將小鼠犧牲後，取出脾臟，利用針頭將脾臟戳洞，以 3 ml 4°C 1x PBS 將脾臟細胞(splenocytes)沖出，收集組織液至 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 室溫離心 5 分鐘，加入 3 ml ACK 靜置約 3-5 分鐘後，以 1500 rpm 室溫離心 5 分鐘，用 3 ml 4°C 1x PBS 回溶細胞後，將細胞液過濾網，以 1500 rpm 室溫離心 5 分鐘，以 1ml flow buffer 回溶至 1.5 ml eppendorf 中染色。

將收集到的樣品依據不同處理分別加入 TCR β chain (1:500, Biolegend)、CD45R/B220 (1:250, Biolegend)、Lineage cocktail with isotype ctrl (1: 50, Biolegend)、CD117 (c-kit, 1:500, Biolegend)、Ly-6A/E (Sca-1, 1:50, Biolegend)、F4/80 (1:100, Biolegend)、CD34 (1:20, Biolegend)、CD127 (IL-7R α , 1:200, Biolegend)、CD16/32 (1:500, Biolegend)、CD11c (1:200, Biolegend)、CD11b (1:500, Biolegend)、CD86 (1:100, Biolegend)、MHC class II (1:200, Biolegend)，細胞與抗體在 4°C 避光作用 1 小時後以 500 xg 離心 5 分鐘，並以 flow buffer 清洗 1 次，藉此洗去未標定的抗體，之後加入 100 μ l flow buffer 以及等體積的 4% paraformaldehyde solution (PFA) 固定，樣品存放在 4°C。

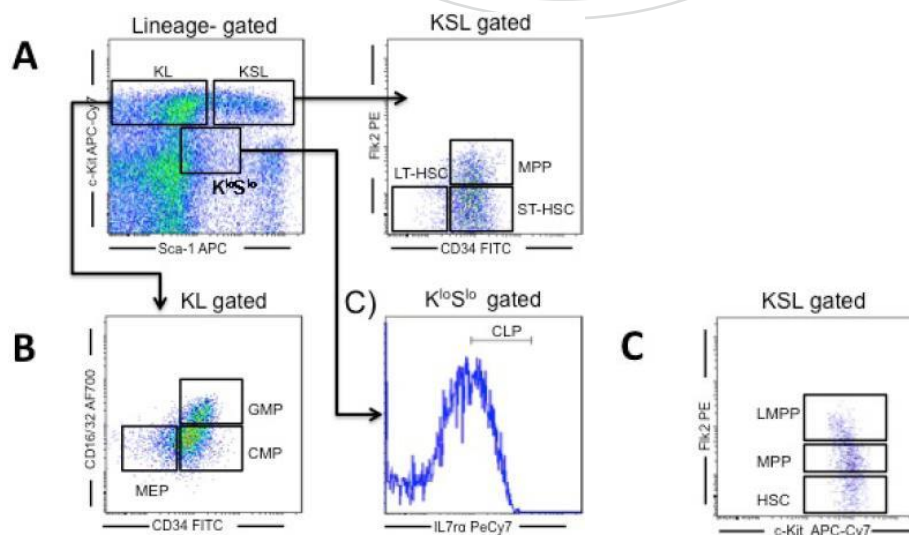
二、樣品分析

樣品準備好用流式細胞儀(Beckman coulter)分析每個樣品，先調整 forward scatter (FSC)與 side scatter (SSC)電壓值，利用細胞大小及顆粒性選取出活細胞群，收集 10,000 細胞已進行分析。根據細胞類型不同，透過以下不同標記抗體是否表現來區分：

細胞類型	標記抗體
巨噬細胞(macrophage)和單核細胞(monocyte)	CD11b ⁺
T-細胞(T-cell)	TCR ⁺
B-細胞(B-cell)	CD45R ⁺
造血幹細胞(Hematopoietic stem cell, HSC)和多功能前驅細胞(multipotent progenitors, MPP)	KLS (Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺)
共同骨髓前驅細胞 (Common myeloid progenitor, CMP)	Lin ⁻ IL7rα ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁻ CD34 ⁺ CD16/32 ⁻
顆粒細胞-巨噬細胞前驅細胞 (Granulocyte-macrophage progenitors, GMP)	Lin ⁻ IL7rα ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁻ CD34 ⁺ CD16/32 ⁺
骨髓細胞誘導巨噬細胞(BMDM)	CD11b ⁺
骨髓細胞誘導(BMDC)	CD11c ⁺

(Challen GA *et al.*, 2009)

骨髓細胞中的前驅細胞，包括 MPP，CMP，GMP 與巨噬細胞分化過程中的前驅細胞的分析會同時對 Lineage，Sca-1，c-Kit，IL7rα，CD34，CD16/32 六種抗體進行染色，分析時的 gating strategy 如下圖：



(Mayle A *et al.*, 2013)

DOI:10.6814/THE.NCCU.IN.003.2018.C05

第八節 統計分析

實驗結果數據以 GraphPad Prism 軟體進行分析，所有結果均以平均值±S.D 表示，當實驗僅有實驗組及對照組時，使用 Student's t-test 逕行分析，當實驗組別為三組或三組以上時，則以單因子獨立變異數分析(Analysis of Variance, ANOVA)，當 ANOVA 達到顯著性時，使用 Tukey's multiple comparisons test 進行事後比較。統計分析結果顯著差異表示分法：*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ ，***表示 $p < 0.001$ ，****表示 $p < 0.0001$ 。



第三章 實驗結果

第一節 在 *IfitmDel* 突變體中發展的炎症型態

如研究目的中所述，*IfitmDel* 小鼠對促發炎性的刺激會誘發較強的發炎反應，同時此突變鼠在年齡增加後也有肥胖的表型。因此我們測試在 *IfitmDel* 小鼠中是否有自發性發炎或免疫異常活化的表型。我們先對不同年齡的小鼠進行採血，透過血液中細胞活化的程度來看 *IfitmDel* 小鼠的發炎程度。我們以 CD11b 做為辨識髓細胞(myeloid cells)的標記，並針對週邊血中髓細胞的細胞表面活性標記(activation markers) MHC II (mouse IA/IE, major histocomplexity class II)以及 CD86 進行抗體染色，並以流式細胞儀進行分析，實驗結果顯示 *IfitmDel* 小鼠在 2-3 個月大時 MHC II 以及 CD86 的表現量相較於野生型小鼠沒有顯著差異，但到 6-8 個月大的 *IfitmDel* 小鼠其週邊血髓細胞中被活化的比例顯著較野生型小鼠為高(圖一 B)；另外，在犧牲老鼠時取出最大淋巴器官-脾臟中的脾臟細胞，以同樣方式進行脾臟中髓細胞的活化程度分析，在 4-6 個月大的 *IfitmDel* 小鼠中具有活化程度較高的趨勢，但並未達顯著差異(圖一 C)。這個結果顯示 *IfitmDel* 小鼠隨著年齡的增加其髓細胞會有較高的活化比例。與本實驗室其他針對 *IfitmDel* 小鼠的週邊血分析，包括血清中促發炎細胞因子的濃度分析結果合併來看(附圖一)，此種基因剔除鼠會在年紀較大後會自發性產生系統性低度發炎。

除系統性低度發炎外，我們也就個別組織進行發炎分析，例如與飲食及代謝調控有關的下視丘。我們針對常用的 M1 標記 iNOS (inducible nitroxide synthase) 的基因表現(其基因為 *Nos2*)進行分析，在下視丘組織研磨抽取 mRNA 測定 *Nos2* 基因表現量後，發現在 4-6 個月大的 *IfitmDel* 小鼠其下視丘之 *Nos2* 表現量與野生型相比高了約兩倍，並達到統計上的顯著差異(圖二)。本實驗室也同時針對下視丘的星狀細胞(astrocyte)及小膠質細胞(microglia)進行組織染色分析，發現在 *IfitmDel* 小鼠其下視丘中小膠質細胞量增多，且型態上也呈現細胞核變大或多核，

及分枝變短變少等活化的型態(附圖二)。這些觀察顯示在 *IfitmDel* 小鼠產生明顯肥胖及系統性低度發炎以前，下視丘就已出現發炎的現象。

第二節 *Ifitm* 基因缺失對於造血作用的改變

Ifitm 基因在小鼠的不同時期及許多不同組織中均有不同程度的表現。*Ifitm1*，*Ifitm2* 及 *Ifitm3* 基因在淋巴細胞及巨噬細胞的細胞株中有中度的表現，在干擾素處理後這些基因的表現會大幅增加(Bailey CC *et al.*, 2014)。在大鼠的骨髓細胞中，*Ifitm1*，*Ifitm2* 基因均高度表現(Yanqin Lu *et al.*, 2017)。我們對小鼠的各免疫細胞的 *Ifitm1*，*Ifitm2* 及 *Ifitm3* 基因表現進行分析。取兩個月大的 C57BL/6 小鼠的周邊血，骨髓，胸腺及脾臟細胞以 real time PCR 進行分析，與未受促發炎刺激的巨噬細胞中低表現的 *tnfa* 基因表現相較，*Ifitm1*，*Ifitm2* 及 *Ifitm3* 基因在不同的組織中均有高量的表現(圖三)。在週邊血和脾臟中我們看到的基因表現主要來自於成熟的免疫細胞，在胸腺中則主要是發育中的 T 細胞，骨髓細胞中含有不同族群的前驅細胞。雖然我們並未把不同的細胞分離再進行實驗，但綜合我們的實驗結果及前人研究，*Ifitm* 基因在造血作用的許多時期均有中量到高量的表現。因此這些基因可能參與免疫細胞的分化，也可能與成熟的免疫細胞的功能有關。

在發炎反應中，巨噬細胞在其中佔了很重要的角色，除了摧毀病原及清除受傷或死亡的組織外，巨噬細胞也會分泌許多不同功能的細胞因子以調節發炎反應。因此我們猜測在 *IfitmDel* 小鼠中發現的異常發炎現象有可能是 *Ifitm* 基因缺失導致巨噬細胞的功能異常所致。而此功能異常可能是因免疫細胞發育過程受到影響，也有可能是成熟的巨噬細胞的功能異常所造成。因此我們收集 *IfitmDel* 小鼠與年齡相等的野生型對照組小鼠的骨髓，培養並誘導其成為巨噬細胞(BMDM)，並比較其分化過程中的細胞特性或分化完成後對不同發炎刺激的反應。

因此我們先測試是否在 *IfitmDel* 小鼠中可觀察到造血作用異常，我們針對周邊血中免疫細胞的組成，及骨髓細胞中不同前驅細胞(progenitor cells)族群的比例進行分析。透過免疫染色及流式細胞分析，血液中的巨噬細胞、T 細胞以及 B 細

胞所含的量沒有顯著的差異(圖四)。另就骨髓細胞的組成分析看是否能看到造血作用的差異，同樣以抗體染色及流式細胞分析，分析了包括分化早期的多功能前驅細胞(MPP)、共同骨髓前驅細胞(CMP)，以及 myeloid lineage 的顆粒細胞-巨噬細胞前驅細胞(GMP)，在野生型及 *IfitmDel* 小鼠之間表現上述細胞的 identity markers 的細胞比例並沒有差異(圖五)，綜合前述兩項觀察，在免疫細胞不同 lineages 的細胞表面標記進行分析並沒有發現免疫細胞的分化因為 *Ifitm* 基因缺失而造成影響。

除了上述以活體中的組織進行標記分析，我們也以誘導分化的方式對於基因缺失的骨髓細胞的分化進行測試。我們針對單核細胞/巨噬細胞系(lineage)以體外誘導骨髓細胞分化成巨噬細胞。L929 纖維母細胞在培養中會分泌包括 M-CSF 等，因此收集 L929 纖維母細胞培養後之培養基作為 conditioned medium 加到培養骨髓細胞的培養基是一種常被採用的誘導分化成巨噬細胞的方式(Boltz-Nitulescu G *et al.*, 1987)。我們以 CD11b 作為單核細胞/巨噬細胞的分化標記，在 CD57BL/6 小鼠的骨髓細胞培養，培養到第五天時超過 90% 以上的細胞均會表現出 CD11b(圖六 A)。*IfitmDel* 小鼠的骨髓細胞在培養到第七天時，也有 90% 以上成功分化成巨噬細胞(圖六 B)，與對照組並無顯著差異。

我們對分化的速度進行進一步的分析，發現在培養第二天時，野生型與 *IfitmDel* 小鼠的骨髓細胞均各有約 20% 的細胞表現 CD11b;但在培養到第三天時，從 *IfitmDel* 小鼠中取出的骨髓細胞對比野生型小鼠有超過 60% 已經分化成巨噬細胞，較對照組多 10%，並且達到顯著差異。但在培養的第五天兩組中分化成巨噬細胞均到達 90% 以上。另外在以 L929 conditioned medium 培養的骨髓細胞，在分化完成時以 FSC 和 SSC 的 plot 中可以看到兩群大小不同的細胞，野生型與 *IfitmDel* 小鼠的分化的骨髓細胞在這兩群細胞的比例亦有顯著差異(圖五 C)。這兩群細胞其中一群會表現 CD45R，此細胞標記一般被用為 B 細胞的標記，在以 L929 conditioned medium 培養的骨髓細胞不僅會分化產生巨噬細胞，也會產生樹突細胞(dendritic cell) (Marim FM *et al.*, 2010)，在分化中的樹突細胞也會表現

CD45R(Nikolic T *et al.*, 2002)。因此我們猜測 *Ifitm* 基因缺失會影響 L929 conditioned medium 培養環境下細胞分化的趨勢。我們另外將野生型與 *IfitmDel* 小鼠的骨髓細胞以 GM-CSF 誘導產生分化，在此條件下骨髓細胞會分化產生巨噬細胞及樹突細胞，我們以 CD11c 為樹突細胞的標記分析 *Ifitm* 基因缺失對巨噬細胞或樹突細胞分化趨勢的影響。我們發現不論是野生型小鼠或 *IfitmDel* 小鼠的骨髓細胞在體外分化培養六天後，兩者均有約 30% 表現出 CD11c 抗原(圖七)。綜合上述的觀察我們認為 *Ifitm* 基因缺失在分化中對許多不同細胞系其標記的表現上不會產生影響，但這些基因應該參與了免疫細胞的分化，剔除後會在巨噬細胞分化的過程中產生改變，可能因此會造成巨噬細胞特性的改變。

第三節 *Ifitm* 基因缺失對於骨髓細胞誘導巨噬細胞功能產生的影響

先前的文獻與本實驗室先前的實驗結果均顯示，在給予同樣的 Poly I:C 或 LPS 後 *IfitmDel* 小鼠較野生型小鼠有更強的發炎反應(Wee YS *et al.*, 2015, 附圖一)，以及我們針對 *IfitmDel* 小鼠的週邊血分析發現此突變鼠會產生自發性產生系統性低度發炎，因此 *Ifitm* 基因缺失可能造成免疫細胞的特性產生變化，並導致異常的發炎反應。在誘導分化的實驗中我們也看到，*IfitmDel* 小鼠的血液細胞的確與野生型的血液細胞有不同的特性，由於巨噬細胞在發炎的發生與調控扮演關鍵的角色，因此我們猜測 *Ifitm* 基因缺失會造成巨噬細胞在促發炎因子缺乏時仍會產生發炎反應，或是巨噬細胞會對環境的刺激有較強的反應。我們選擇使用 2-4 個月大，在 *IfitmDel* 小鼠發展出系統性低度發炎之前及收集其骨髓細胞並在體外誘導成巨噬細胞(BMDM)。對這些細胞給予了 LPS、IFNG 以及 IL-4，模擬不同發炎刺激，來測試巨噬細胞在發炎反應的功能上是否會有差異。其中 LPS 與 IFNG 是促發炎因子，一般也將其歸類於 M1 刺激，LPS 刺激相當於病原細菌出現時對 TLR 訊息途徑進行活化，而 IFNG 刺激則是 TH1 細胞對巨噬細胞的活化因子。所產生的發炎反應我們以 M1 標記如 MHCII 及 CD86; iNOS 的基因表現，

及促發炎細胞因子如 TNF- α 及 IL-6 的基因表現進行分析。IL-4 是 M2 刺激，會促使巨噬細胞由發炎狀態轉換成組織修補狀態，促發炎因子的表現會被降低或抑制，轉而表現組織修補需要的基因，我們以 M2 標記的表現，包括 Arg 及 Ym-1 的表現進行分析。

我們先就誘導分化完成的巨噬細胞進行分析，在沒有加入發炎刺激的狀況下，由 *IfitmDel* 小鼠骨髓細胞誘導出來的巨噬細胞在 M1 標記的表現，iNOS 及促發炎細胞因子的生成相較於野生型的骨髓誘導巨噬細胞都沒有顯著的增加(圖八)，顯示在體外誘導分化的環境下，*Ifitm* 基因缺失並不會使巨噬細胞在沒有發炎刺激的存在下持續產生發炎反應。

我們再以不同濃度的 M1 刺激對上述的巨噬細胞進行處理，測試是否 *IfitmDel* 小鼠骨髓誘導巨噬細胞對 M1 刺激有較強的反應或有較高的敏感度。在以 LPS 刺激的實驗中，我們使用 1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.3 $\mu\text{g/ml}$ 及 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 三種不同的濃度。M1 標記 MHCII 及 CD86 在三種不同的濃度均相較於未處理均顯著增加(圖九 A)，然而不同濃度間表現增加幅度並沒有顯著差異。在 *nos2*、*tnfa* 及 *il6* 基因表現上，LPS 刺激顯著提高這些基因的表現，刺激的濃度高低與基因表現的多少呈正相關，上述刺激所產生的效果符合我們的預期(圖九 B、C、D)。*IfitmDel* 小鼠骨髓誘導巨噬細胞相較於野生型的骨髓誘導巨噬細胞在三種不同濃度的刺激其 *nos2*、*tnfa* 及 *il6* 基因表現均顯著較高(圖九)。在以 IFNG 刺激的實驗中，我們使用 50 ng/ml、10 ng/ml 及 5 ng/ml 三種不同的濃度，巨噬細胞同樣對 IFNG 刺激產生與濃度正向關聯的反應(圖十)。與 LPS 刺激結果相同，*IfitmDel* 小鼠骨髓誘導巨噬細胞相較於野生型的骨髓誘導巨噬細胞在三種不同濃度的刺激其 *nos2*、*tnfa* 及 *il6* 基因表現均顯著較高(圖十 B、C、D)。上述實驗結果表明，對不同的 M1 刺激，*Ifitm* 基因缺失會造成巨噬細胞對這些刺激有較高的敏感度，也會產生較強的反應。

在以 IL-4 刺激的實驗中，我們使用 20 ng/ml、5 ng/ml 及 2 ng/ml 三種不同的濃度。兩種 M2 標記 Arg 和 Ym-1 的表現均會在刺激後顯著上升(圖十一)。但若以 *IfitmDel* 小鼠骨髓誘導巨噬細胞與野生型小鼠的骨髓誘導巨噬細胞相較，雖然

有較高增加的趨勢，但並未達到顯著的反應差異(圖十一)。因此 *Ifitm* 基因缺失並不會造成巨噬細胞對所有環境刺激反應均變強，在我們的實驗結果中對兩個 M1 刺激反應較強，對 M2 刺激的反應則與正常細胞相當。

第四節 *Ifitm* 基因缺失小鼠表現瘦素不敏感

過去的文獻提到 *IfitmDel* 小鼠相較於野生型小鼠有增加的食物攝取的行為，且在禁食的狀況下血清中含有較高的瘦素(Wee YS *et al.*, 2015)，因此此基因剔除小鼠可能存在對瘦素反應不敏感的現象。因此我們以透過腹腔注射瘦素到野生型及 *IfitmDel* 小鼠中，紀錄小鼠 24 小時內食物攝取的狀況，發現到野生型小鼠在注射瘦素後會抑止食物的攝取，而在 *IfitmDel* 小鼠則是沒有產生抑制攝食的效果(圖十二)，此實驗結果顯示出 *IfitmDel* 小鼠對瘦素反應的不敏感，可能在瘦素反應的訊息傳導途徑中有異常的不活化。這個表型有可能是因為 IFITM 蛋白可調控瘦素反應的訊息傳導，也可能因為 *Ifitm* 基因缺失導致表現瘦素受體的微環境(microenvironment)產生改變，造成 non-cell autonomous 的作用。例如我們已知在 *IfitmDel* 小鼠會產生系統性及下視丘等組織的發炎，可能造成瘦素的主要調控標的下視丘中弓狀核的 POMC 神經元，及其他瘦素標的細胞對瘦素反應異常或不反應。

第五節 mHypoA-POMC / GFP-1 細胞對瘦素的反應

過去的文獻指出在大腦中，弓狀核中的 POMC 神經元以及 AgRP 神經元被認為是瘦素和胰島素最主要的作用標的(Varela L and Horvath TL., 2012)，在中樞的代謝及攝食調控扮演關鍵的角色。由於近年來的研究成果顯示發炎在肥胖和代謝疾病的產生中是一項非常重要的因子。本研究的第二個部分目的在探討在發炎環境下 POMC 神經元對於體內的代謝調控訊號，如瘦素及胰島素的反應會產生甚麼樣的影響。我們採用體外培養 mHypoA-POMC / GFP-1 並加入促發炎因子的

方式分析瘦素及胰島素得尋息傳導會如何改變，主要觀察 JAK-STAT 路徑和 PI3K-Akt 路徑上的蛋白質，如：STAT3、AKT 蛋白含量及磷酸化的程度。

mHypoA-POMC / GFP-1 是由下視丘的 POMC 神經元初級培養(primary culture)細胞以 SV40 large antigen 又導使其 immortalization 產生的細胞株。因此我們先測試此細胞株是否對瘦素及胰島素等代謝刺激的反應與初級培養的 POMC 神經元相同。瘦素對 POMC 神經元刺激後可活化 STAT3，而胰島素對 POMC 神經元刺激後可活化 PI3K-AKT 途徑，兩者皆可造成 *pomc* 基因的表現量上升(Varela L and Horvath TL., 2012)。我們給予 mHypoA-POMC / GFP-1 細胞 200nM 瘦素或 10nM 胰島素，在經過 4 小時處理後，收集 mRNA 分析 *pomc* 基因的表現，real-time PCR 定量分析的實驗結果顯示在瘦素或胰島素刺激後相較刺激前 *pomc* 基因的表現有顯著的提升(圖十三 A 與 B)，表示此細胞株對瘦素及胰島素的刺激後提高 POMC 表現的反應沒有改變，因此我們可以應用此細胞株進行後續發炎環境的測試。

發炎的微環境對細胞造成的影響主要是經由細胞因子，尤其是促發炎細胞因子的作用，及 NO 的產生及氧化壓力上升合併產生的影響。因此我們選擇不採用在細胞培養環境中單獨加入某一種特定的細胞因子，而是將培養的由骨髓細胞誘導產生的巨噬細胞以 LPS 進行刺激後，收集其所分泌的促發炎因子的培養基做為 conditioned medium，加至培養的 POMC 神經元，以探討在發炎環境下，瘦素路徑上蛋白質的活性與表現是否會有改變。由於本實驗是模擬在慢性發炎且環境中的瘦素持續出現的環境，因此我們的實驗設計是分成四個培養條件，對 mHypoA-POMC / GFP-1 分別給予 20% condition medium、200nM 瘦素以及 20% condition medium + 200nM 瘦素，及不包含 condition medium 及瘦素的對照組，我們以長時間處理模擬慢性發炎及代謝失衡時瘦素長期增高的現象，處理 24 小時後，利用西方點墨法分析，由(圖十四 B)可以看出 P-stat3 蛋白質表現在給予 20% condition medium 有顯著的增加，由於促發炎細胞因子可活化許多 JAK-STAT，此結果符合我們的預期。而 STAT3 是瘦素途徑中一個重要的成員，會調

控 POMC 基因的表現，但在長期處理後因 SOCS3 會對 STAT3 進行負向回饋的調控，因此反而瘦素組的 P-stat3 與對照組相近，而 20% condition medium + 200nM 瘦素會降低發炎作用的影響，但仍然較瘦素組為高。這些結果顯示在發炎的環境下會更能夠活化 STAT3 蛋白質。AKT 蛋白質的表現量在不同的處理之下並沒有差異(圖十四 C)，而在磷酸化的 AKT 蛋白質表現來看，加了 20% condition medium 會抑制 AKT 的活化，給予 200nM 瘦素蛋白質的表現量則會活化 AKT，而促發炎因子會干擾瘦素途徑中 AKT 的活化。Erk1/2 蛋白質含量在加入 200nM 瘦素 Erk1 有增加的趨勢，Erk2 則是有顯著的增加(圖十四 D)，磷酸化的 Erk1/2 在給予 200nM 瘦素後皆有顯著的增加(圖十四 D)，然而發炎環境亦會破壞此活化。以上實驗結果顯示，瘦素對 POMC 神經元的調控在發炎環境下會受到擾亂。

第六節 mHypoA-POMC / GFP-1 細胞對胰島素的反應

除了瘦素，胰島素也是會調控 POMC 神經元並影響攝食行為及代謝恆定的重要的代謝訊號，會透過 PI3K-Akt 路徑影響 POMC 神經元(Niswender KD *et al.*, 2003)，因此我們也透過西方墨點法觀察在發炎環境下 AKT 的活化與蛋白含量的變化，同時也觀察 STAT3 及 MAPK 的變化。

胰島素刺激的實驗同樣分成 4 組，分別對 mHypoA-POMC / GFP-1 給予 20% condition medium、10nM 胰島素以及 20% condition medium + 10nM 胰島素以及不包含 condition medium 及胰島素的對照組，經過 24 小時後利用西方點墨法分析。AKT 蛋白質的表現量在不同的處理之下並沒有差異(圖十五 C)，如我們所知，在胰島素的刺激下 POMC 神經元中的 AKT 會被高度磷酸化，而加了 20% condition medium 的 AKT 的磷酸化程度與未加任何刺激的對照組相較有顯著的下降，而加入 20% condition medium + 200nM 瘦素的組別則同樣會抑制胰島素所產生的 AKT 活化。在對 STAT3 與 ERK1/2 的活化的影響上與瘦素處理的影響相似由(圖十五 B)可以看出 P-stat3 蛋白質表現在給予 20% condition medium 和 20% condition medium + 200nM 瘦素有顯著的增加，兩者相較於給予 200nM 瘦素

的組別 P-stat3 蛋白質表現量也有顯著的增加。以上實驗結果同樣顯示胰島素對 POMC 神經元所進行的代謝調控在發炎環境下會受到干擾。

第七節 發炎物質對 mHypoA-POMC / GFP-1 細胞中 AMPK 路徑的改變

從文獻中發現，除了瘦素和胰島素外，AMPK 信號通路也是一個參與 POMC 神經細胞對能量代謝調控的重要參與者，AMPK 參與葡萄糖的偵測(glucose sensing)並會在低能量的狀態下被 AMP 活化(Claret M *et al.*,2007)。在 POMC 神經細胞中對 AMPK 作條件性剔除(conditional knockout)會產生肥胖的表型(Huynh MK *et al.*, 2016)。而 AMPK 會參與瘦素與胰島素的訊息傳導路徑，因此我們分析在發炎環境下 AMPK 活性的改變，及在瘦素或胰島素存在下其活性的改變。我們分析了 6 種狀況下 AMPK 的活性，分別是對 mHypoA-POMC / GFP-1 分別給予 20% condition medium、200nM 瘦素、20% condition medium + 200nM 瘦素、10nM 胰島素、20% condition medium + 10nM 胰島素以及不包含 condition medium、瘦素和胰島素的對照組，經過 24 小時後利用西方點墨法分析。實驗結果顯示在給予瘦素後，磷酸化的 AMPK $\alpha 1$ 以及 AMPK $\alpha 2$ 皆有顯著的增加(圖十六 B)，而給予胰島素則是會讓磷酸化的 AMPK $\alpha 1$ 有顯著的增加，磷酸化的 AMPK $\alpha 2$ 有增加的趨勢但與對照組相比還未達到顯著差異(圖十六 C)。在單獨處理 20% condition medium 後，磷酸化的 AMPK $\alpha 2$ 表現量有 30% 下降，並達到統計上顯著的差異(圖十六 B, C)。

在處理了 20% condition medium 與處理瘦素相比，給予 20% condition medium 在磷酸化的 AMPK $\alpha 1$ 與 AMPK $\alpha 2$ 的表現量較低於給予瘦素的組別(圖十六 B)，這樣的情況也在同時給予 20% condition medium 和 200nM 瘦素的組別中被觀察到(圖十六 B)，這個結果表示當環境中有促發炎因子存在時，會使受到瘦素影響 AMPK $\alpha 1$ 與 AMPK $\alpha 2$ 的磷酸化被抑制。

在處理了 20% condition medium 與處理胰島素相比，給予 20% condition medium 在磷酸化的 AMPK $\alpha 1$ 的表現量較低於給予胰島素的組別(圖十六 C)。在處理了 20% condition medium+ 10nM 胰島素與處理胰島素相比，給予 20% condition medium+ 10nM 胰島素在磷酸化的 AMPK $\alpha 2$ 的表現量較低於給予胰島素的組別(圖十六 C)。這個結果表示當環境中有促發炎因子存在時，會使原本接收到胰島素訊號會活化的 AMPK $\alpha 1$ 與 AMPK $\alpha 2$ 的磷酸化被抑制。

在這個實驗中我們發現，促發炎細胞因子會抑制 AMPK 的活化，而胰島素或瘦素則會刺激 AMPK 活化，兩者的作用是相拮抗的，而發炎環境同樣會改變原來胰島素或瘦素對 AMPK 的活性刺激。



第四章 討論

本論文從實驗的結果發現到 *ifitmDel* 小鼠存在著低度發炎，而這個發炎狀況也在下視丘被發現到，而 *Ifitm* 基因的缺失導致在刺激下有較強烈的發炎反應，推測 *Ifitm* 基因是能夠調節發炎強度的基因。關於促發炎細胞因子如何改變 POMC 神經元的代謝信號，POMC 神經元在含有混合促炎細胞因子的環境下，瘦素或胰島素信號傳導會被破壞，有關代謝調控的 AMPK 活化會被促炎細胞因子抑制。

干擾素並不是全面的使發炎因子增加，也可以能是抑制發炎作用(Rauch I et al., 2013)，在沒有了 *ifitm* 基因的 BMDM 對於促發炎因子會有較強烈的反應有可能是在受到第一型干擾素(IFN-1)訊號但是沒有轉譯出 IFITM 蛋白，而無法調節發炎強度。從先前的研究中看到，受體接收到干擾素的訊號後可以活化 STAT1 路徑也可以活化 STAT3 路徑，而若是走 STAT3 路徑則會降低 IFN-1 對發炎調節的功能(Ho HH and Ivashkiv LB., 2006)。

從先前的研究中指出，*IfitmDel* 小鼠在 3 個月大不但吃的相較於野生型來的多體重也較重，血清中所測得的瘦素含量也較高(Wee YS et al., 2015)，我們的實驗指出，在 5-6 個月大的 *IfitmDel* 小鼠血清中有較高含量的促發炎因子，從文獻中發現到瘦素的結構跟瘦素受體與細胞因子 IL-6 相似(Baumann H et al., 1996)，並在瘦素或瘦素受體遺傳異常的齧齒動物的研究中發現到巨噬細胞吞噬作用和促發炎因子的分泌與肥胖相關，外加瘦素可以調控吞噬作用和細胞因子的產生(Fernández-Riejos P et al., 2010)，推測 *IfitmDel* 小鼠吃的多導致脂肪細胞產生較多的瘦素，因瘦素的結構與細胞因子相似，進一步影響到 *IfitmDel* 小鼠免疫系統，可能也是此小鼠會發展出自體發炎現象的成因。

在 *IfitmDel* 小鼠中發現到有瘦素抗性情形，細胞對於瘦素可能會有不反應或是訊息傳遞異常的情況，*IfitmDel* 小鼠中發現到的發炎可能與體內化學環境變化或是細胞受損所導致發炎，由基因序列來看，IFITM 蛋白是一種穿膜蛋白(Bailey CC et al., 2014)，實驗結果發現到在沒有刺激的狀況下，*IfitmDel* BMDM

與野生型 BMDM 在細胞表面發炎活性標記上沒有差異，但是在給予了不論是促發炎的刺激或是抑制發炎反應的刺激，缺少了 *Ifitm* 基因的巨噬細胞的反應較大，推測 IFITM 蛋白在巨噬細胞上可能扮演著調節受體接受訊號的能力或是調控瘦素反應的訊息傳導。

大多數的生物體在受到病毒或細菌感染後而發炎會產生發燒、噁心、食慾減退、睡眠障礙等等症狀(Klein S.L. and Nelson R.J., 2010)，在本論文所使用的 *IfitmDel* 小鼠，一種長期處在低度發炎的狀耐下的小鼠，在發炎的情況下，反而吃得更多。從我們的實驗結果來看，在持續有發炎物質的環境下，Stat-3 可以被持續磷酸化，推測可能發炎物質可以抑制 Socs3，使 STAT3 持續的活化產生 POMC 影響食慾。當瘦素跟發炎物質一起出現時，兩者會彼此干擾。在長時間處理瘦素或是胰島素會讓 PI3K 路徑活化，而在有混合促發炎因子混合培養液的處理下，則會抑制 akt 的活化。

下視丘中的 AMPK 在營養缺乏的情況下會被活化(Han SM *et al.*, 2005)，在動物腦室中注射瘦素，也可以發現到磷酸化的 AMPK 下降(Gao S *et al.*, 2007)，但是在去除 AMPK $\alpha 2$ 基因的小鼠上，卻發現到其代謝下降並產生輕度肥胖(Claret M *et al.*, 2007)。我們透過細胞觀察到在給予瘦素或胰島素這類顯示著能量過剩的訊號時，AMPK 有磷酸化的現象，反而在有發炎物質的情況下則會降低 AMPK 的磷酸化，有文獻指出 AMPK 跟自噬有關聯，在 POMC 神經元中沒有了 *Atg7* (autophagy-related 7)，小鼠會增加食物的攝取，體重也會增加(Quan W *et al.*, 2012)。在低葡萄糖濃度下，下視丘 ARC 的 AMPK 會被活化產生自噬，提高 *Npy* 表現，降低 *pomc* 表現(Oh TS *et al.*, 2016)。之後可以在細胞上去掉 *ifitm* 基因看是否會有影響。

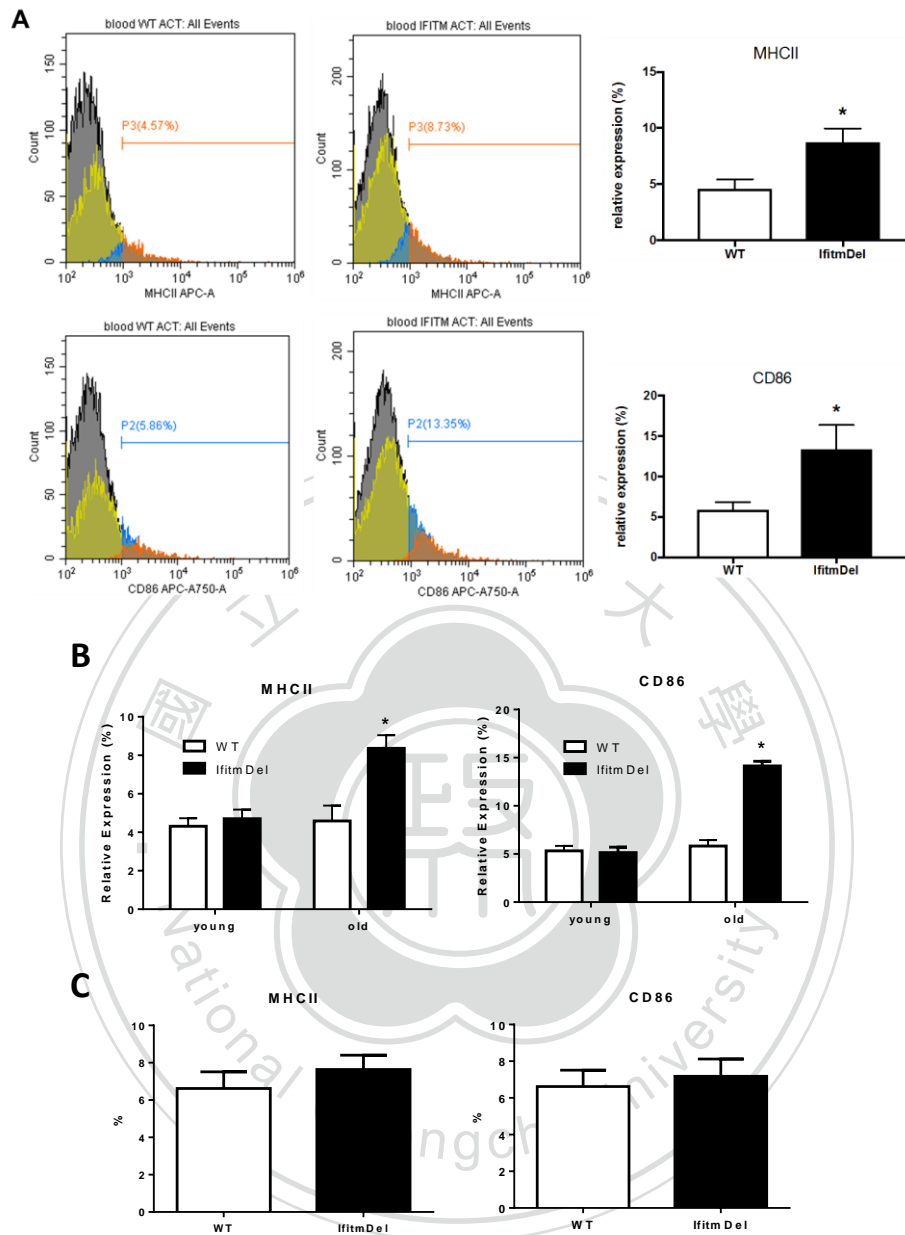
第一型以及第二型干擾素是在細胞受到病毒感染時所產生的重要細胞因子(Samuel CE., 2001)，過去的研究中顯示著干擾素會影響脂質代謝以及促進糖解作用(Fritsch SD and Weichhart T., 2016, Burke JD *et al.*, 2014)。細胞的受體在接收到了干擾素的訊號後會活化 JAKs 和 TYK，之後更進一步磷酸化 STAT(Diamond

MS and Farzan M., 2013)。IFN-1 最主要活化 STAT1 和 STAT2，但是也會磷酸化 STAT 3 (Thomas C *et al.*, 2011)。POMC 神經元上也有著 IFN-1 的受體，在發炎的強況下，有可能會影響到 leptin 的路徑。

總結而言，在 *IfitmDel* 小鼠上，發現到有慢性自體發炎以及代謝異常，包含：基礎代謝較慢、瘦素抗性、胰島素抗性。這之間是發炎影響到代謝還是代謝異常導致發炎從全身性的去除掉 *Ifitm* 基因無法得知，可以透過個別在不同的細胞中去除 *Ifitm* 基因來看是否是單一細胞在缺少了 *Ifitm* 基因而產生影響。

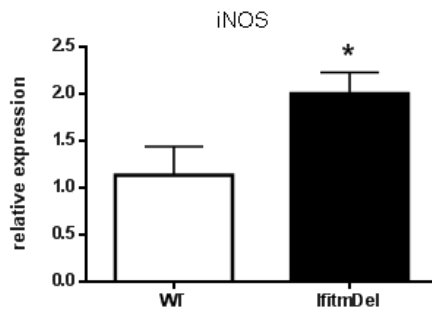


實驗圖表



圖一、在 *IfitmDel* 小鼠中隨著年齡的增加會伴隨著自發性的發炎

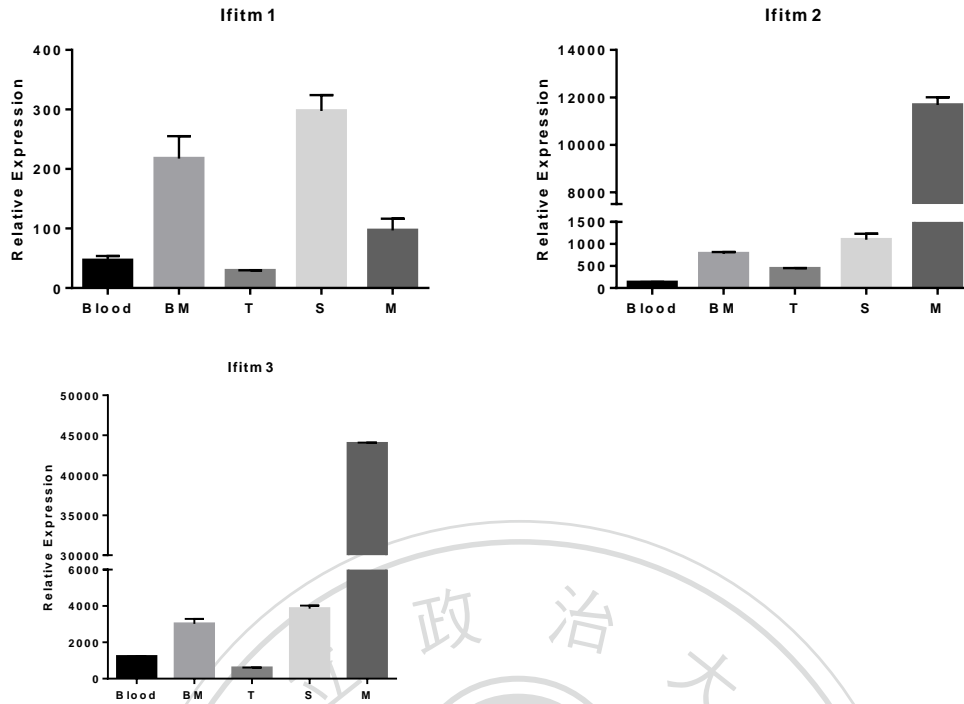
取 *IfitmDel* 小鼠及野生型小鼠的週邊血及脾臟細胞，針對 M1 標記 MHCII 及 CD86 進行免疫染色，並以流式細胞儀進行分析。(A) 6-8 個月大的小鼠的週邊血;(B) 2-3 個月大的小鼠的週邊血與 6-8 個月大的小鼠的週邊血的 M1 標記比較 (WT n= 8, *IfitmDel* n= 8); (C)脾臟細胞的 M1 標記比較(WT n= 5, *IfitmDel* n= 5)。
實驗數據以 mean± SEM 表示，以 Student's t-test 進行統計分析，其中*表示 p<0.05。



圖二、*IfitmDel* 小鼠在下視丘中有發炎的情形

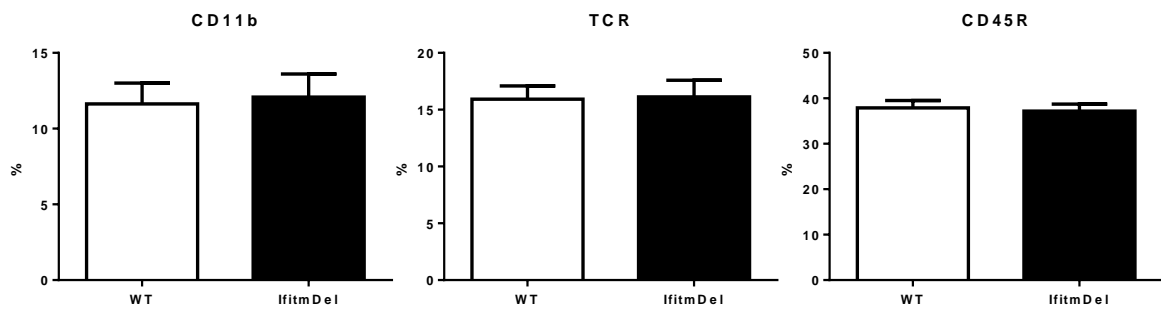
將 *IfitmDel* 小鼠及野生型小鼠下視丘研磨抽取 RNA 進行定量即時聚合酶鏈鎖反應，測定 NOS2 mRNA 的表現量(WT n= 5, *IfitmDel* n= 5)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 Student's t-test 進行統計分析，其中*表示 $p < 0.05$ 。





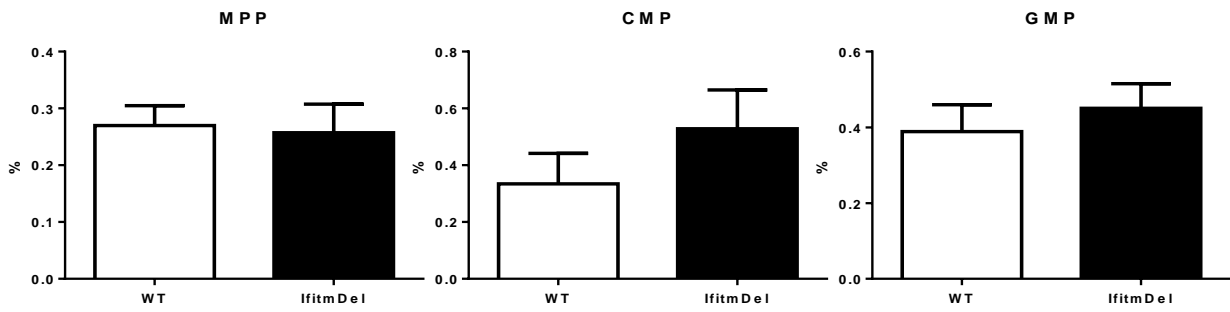
圖三、*Ifitm1-3* 基因在小鼠不同組織中的表現

取 2 個月大 C57BL/6 小鼠，採其骨髓細胞，胸腺細胞，脾臟細胞及週邊血細胞，骨髓細胞並以 L929 纖維母細胞培養液為 conditioned medium 培養誘導分化成為巨噬細胞。RNA 抽取後進行定量即時聚合酶鏈鎖反應，測定 *Ifitm1*，*Ifitm2* 及 *Ifitm3* mRNA 的表現量。mRNA 的表現量再與未受發炎刺激的組織中的 *tnfa* 表現量相比。未受發炎刺激的細胞或組織中的 *tnfa* 基因為低量表現。實驗結果中的相對表現量即是 *Ifitm1*，*Ifitm2* 及 *Ifitm3* 的基因表現對 *tnfa* 表現量的倍數。實驗數據以 mean± SEM 表示。(BM：骨髓細胞；T：胸腺；S：脾臟；M：巨噬細胞)



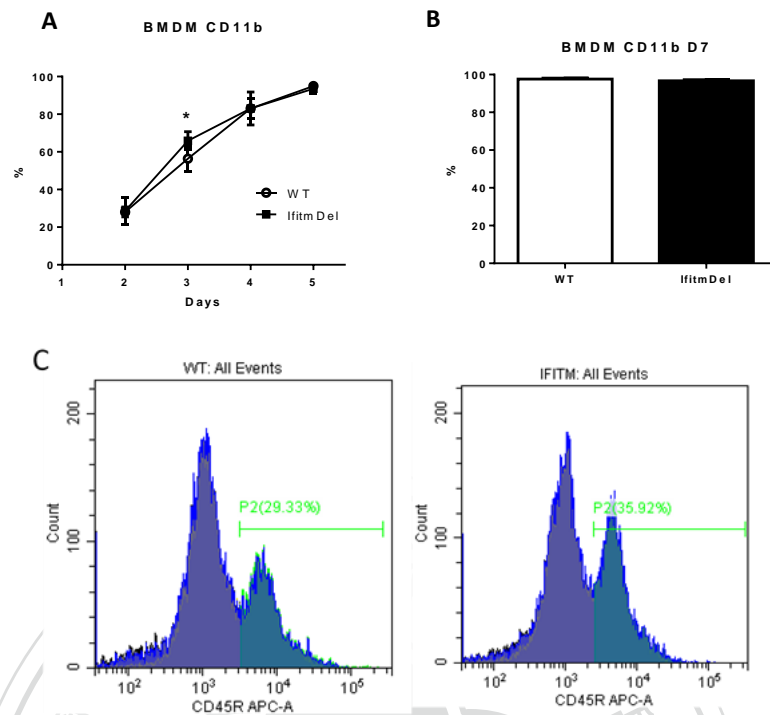
圖四、野生型小鼠與 *IfitmDel* 小鼠周邊血中單核細胞 (PBMC) 數量一致

透過臉頰採血約 150 μ l 加入 CD11b 抗體、T 細胞受體 (TCR) 以及 CD45R 抗體，完成染色後透過流式細胞儀分析。周邊血中野生型小鼠與 *IfitmDel* 小鼠在單核細胞、T 細胞以及 B 細胞所佔的百分比相當 (WT n= 4, *IfitmDel* n= 4)。實驗數據以 mean \pm SME 表示，以 Student's t-test 行統計分析。



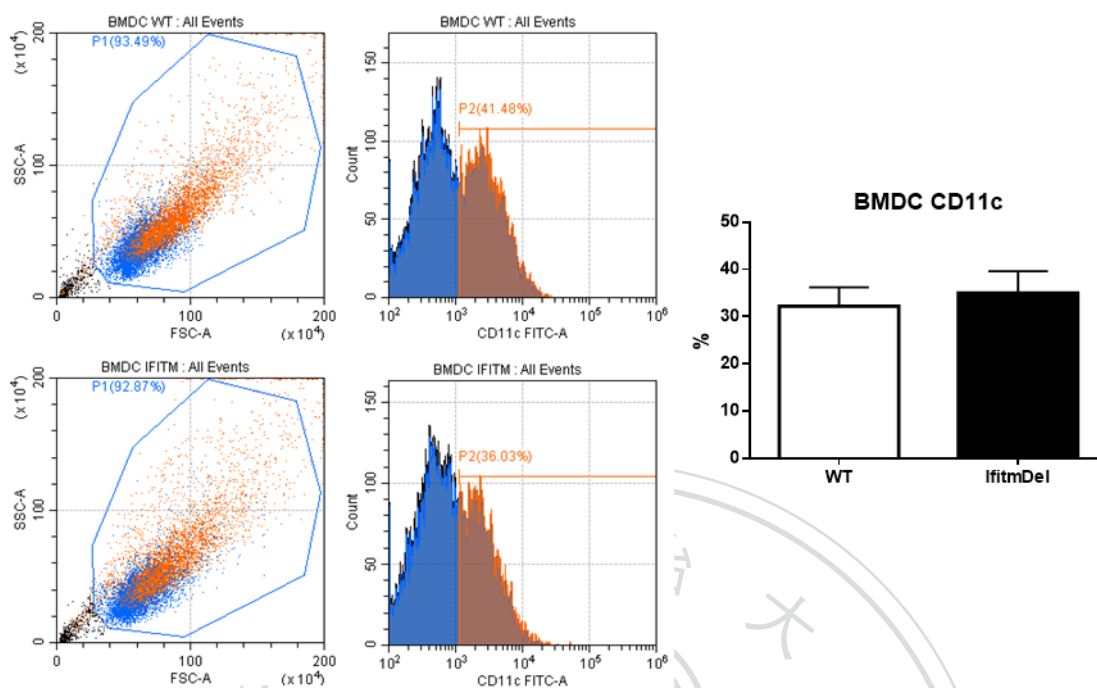
圖五、在 *IfitmDel* 小鼠骨髓中多功能前驅細胞(MPP)、共同血球前驅細胞 (CMP) 以及顆粒性球/單核細胞前驅細胞 (GMP) 所佔的百分比與野生型小鼠相似

將股骨及脛骨中的骨髓細胞沖出，加入 Sca-1 抗體、CD34 抗體、CD127 抗體、CD16/32 抗體、CD117 (c-kit) 抗體、以及 Lineage 抗體，完成染色後透過流式細胞儀分析(WT n= 5, *IfitmDel* n= 5)。MPP: Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺; CMP: Lin⁻IL7 α ⁻c-Kit⁺Sca-1⁻CD34⁺CD16/32⁻; GMP: Lin⁻IL7 α ⁻c-Kit⁺Sca-1⁻CD34⁺CD16/32⁺。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 Student's t-test 進行統計分析。



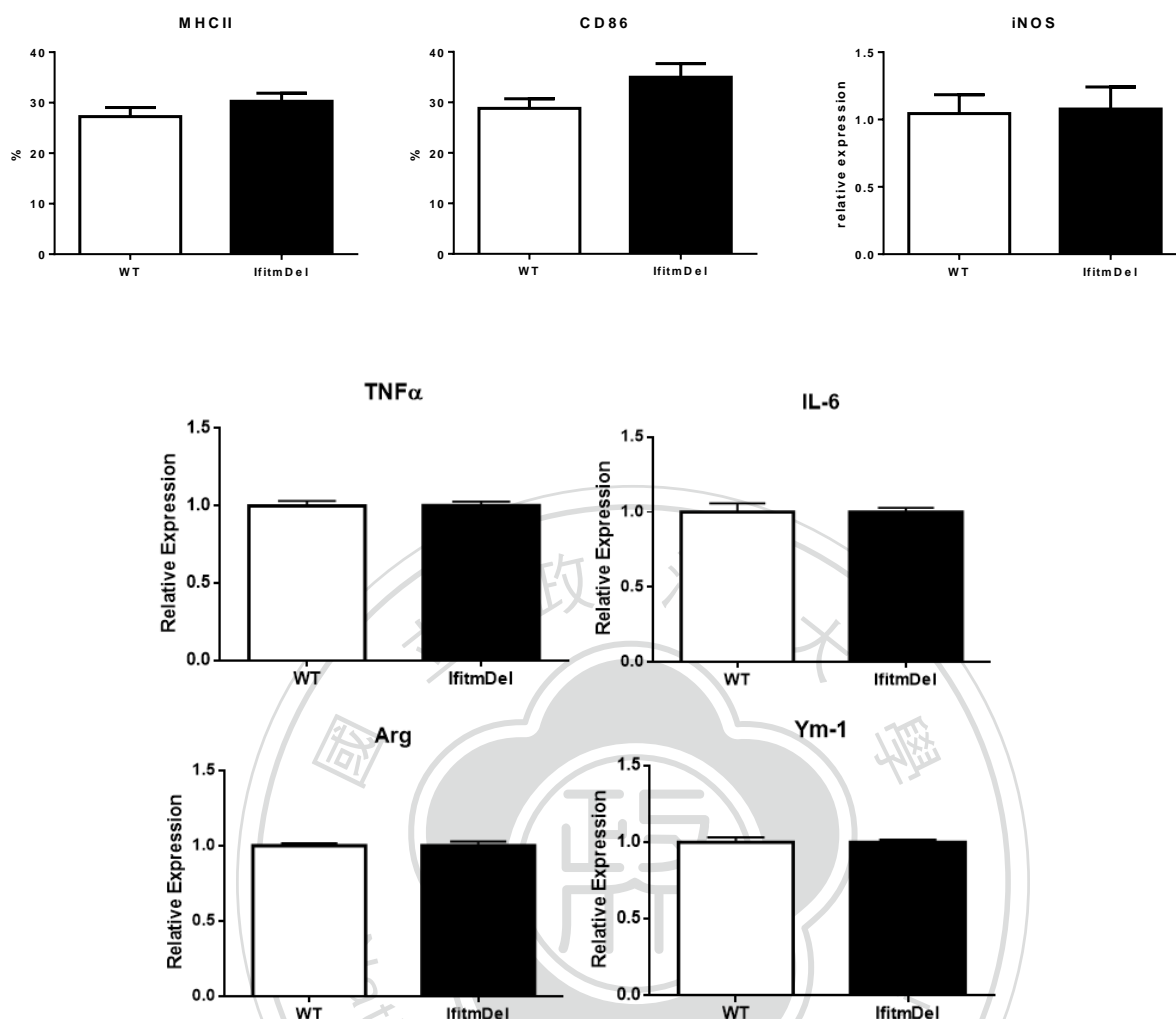
圖六、*IfitmDel* 小鼠的骨髓細胞在透過 L929 培養液的誘導成為巨噬細胞的分化過程中速度較快

將股骨及脛骨中的骨髓細胞沖出，放入含有 20% 的 L929 培養液的 DMEM 培養液中，分別在第二天、第三天、第四天、第五天以及第七天將收下的細胞加入 CD11b 抗體，完成染色後透過流式細胞儀分析。(A)在培養到第三天，*IfitmDel* 小鼠的骨髓細胞有多 20% 的細胞誘導成巨噬細胞(WT n= 6, *IfitmDel* n= 6)。(B)在培養到第七天，野生型以及 *IfitmDel* 皆有 90% 以上誘導成巨噬細胞(WT n= 8, *IfitmDel* n= 8)。(C)在野生型以及 *IfitmDel* 骨髓細胞誘導出來的細胞中表現 CD45R 的數量有差異，統計圖?。實驗數據以 mean± SEM 表示，以 Student's t-test 進行統計分析，其中*表示 p<0.05 。



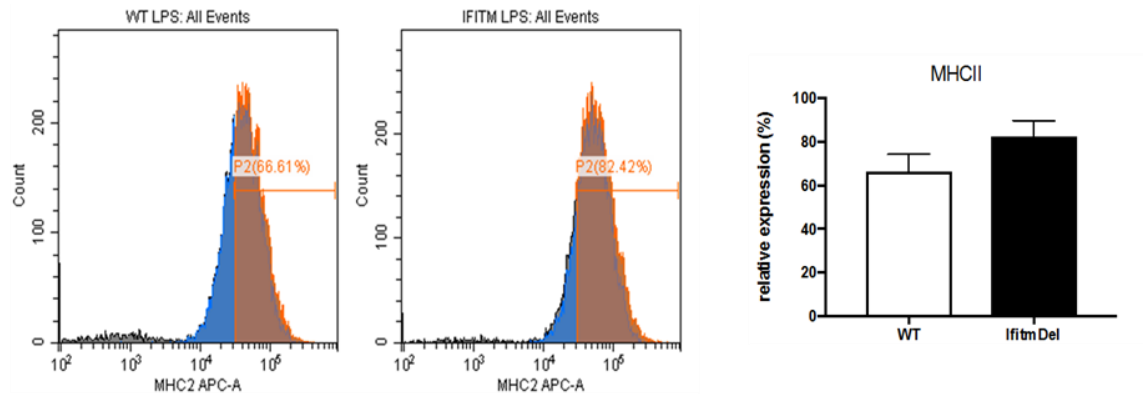
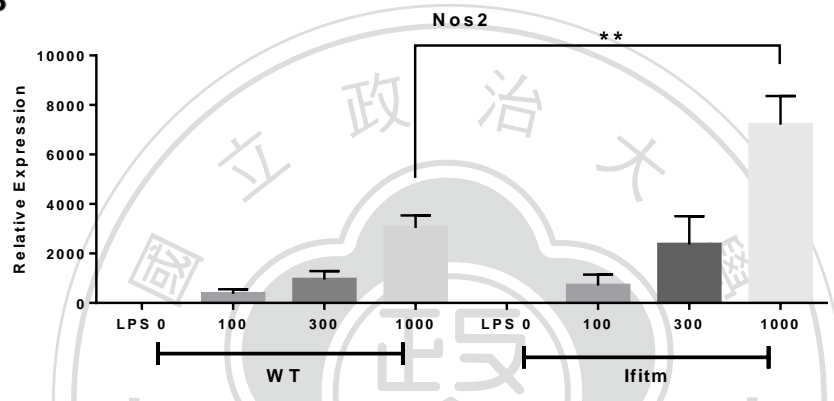
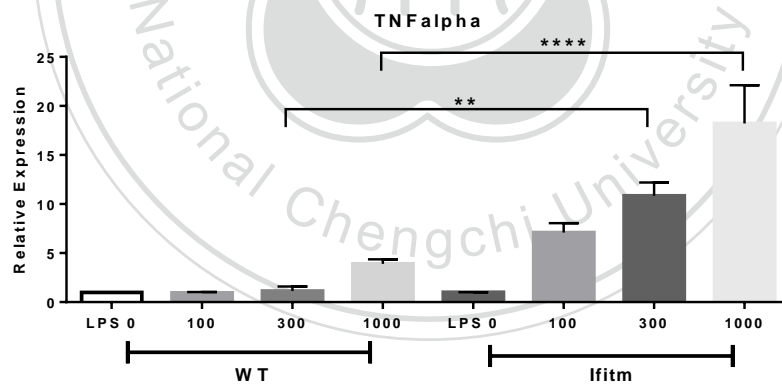
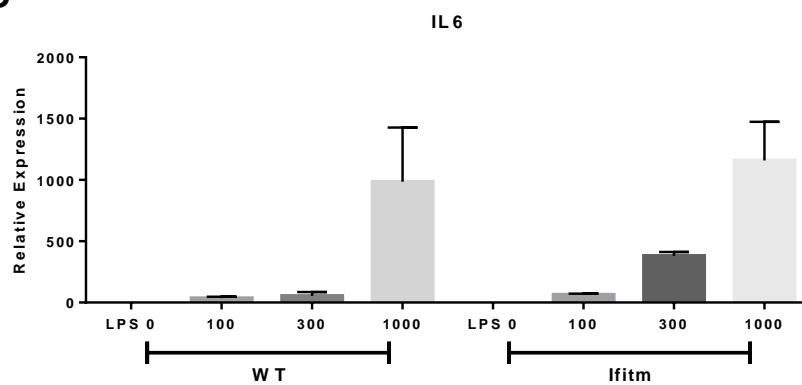
圖七、在體外分化培養骨髓細胞分化成樹突細胞上，沒有 *Ifitm* 基因不會增加對樹突細胞的分化的偏好

將股骨及脛骨中的骨髓細胞沖出，放入含有 20 ng/ml GM-CSF 的 RPMI 培養液中，培養到第六天收下細胞，加入 CD11c 抗體，完成染色後透過流式細胞儀分析(WT n= 3, *IfitmDel* n= 3)，野生型小鼠與 *IfitmDel* 小鼠在 BMDC 分化上沒有差異。實驗數據以 mean± SEM 表示，以 Student's t-test 進行統計分析。



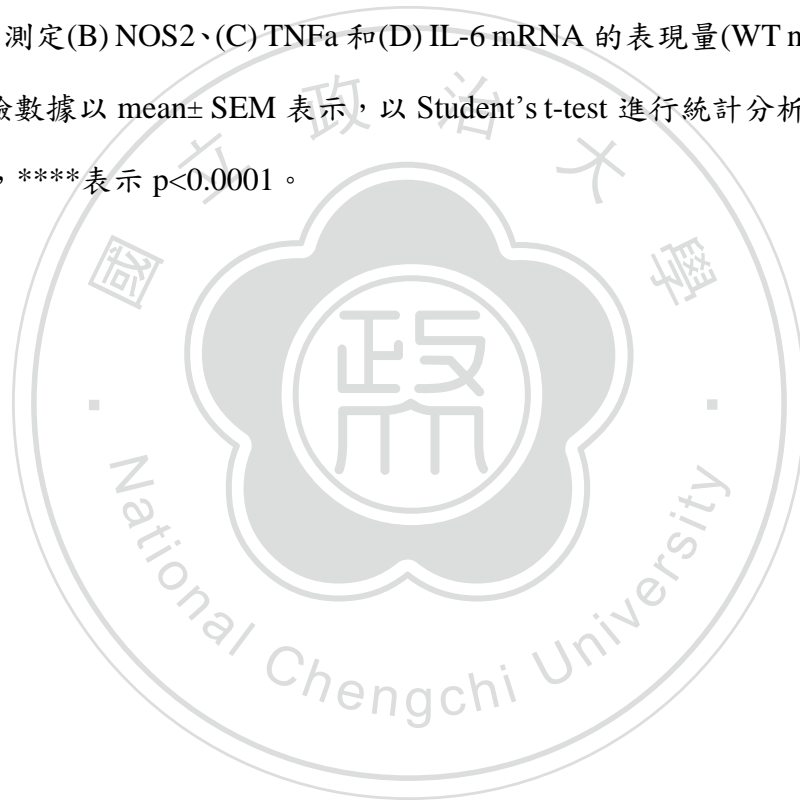
圖八、*IfitmDel* 小鼠骨髓誘導的巨噬細胞 (BMDM) 在沒有刺激下與野生型小鼠相似

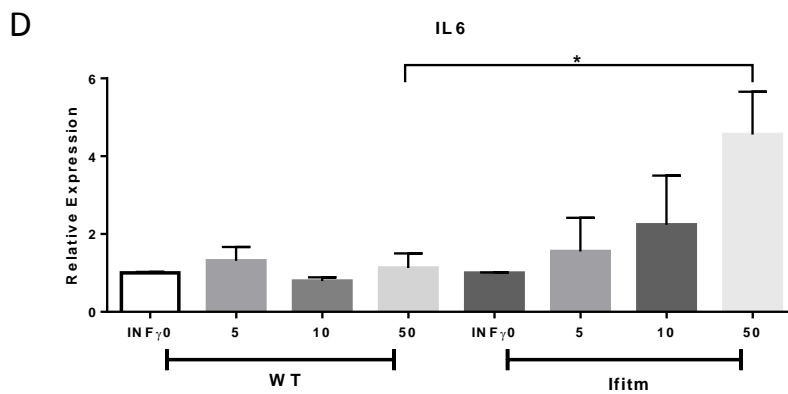
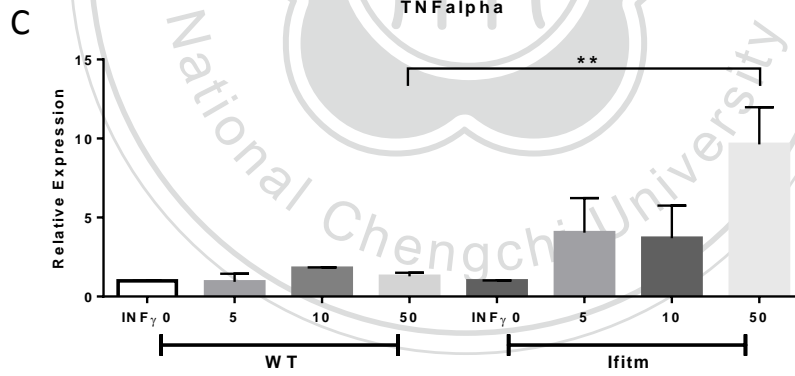
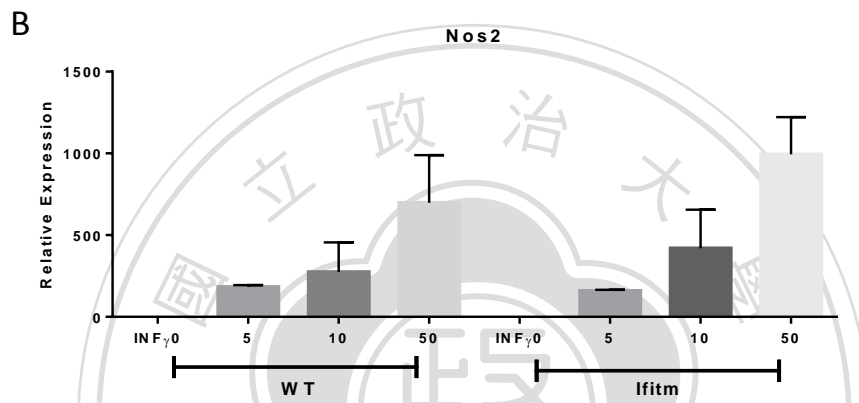
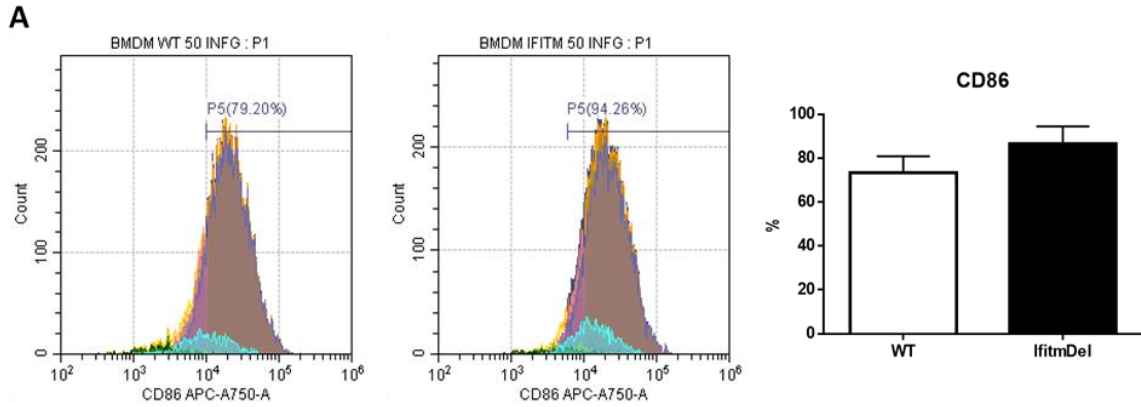
將股骨及脛骨中的骨髓細胞沖出，放入含有 20% 的 L929 培養液的 DMEM 培養液中，培養至第五天以 1×10^6 個細胞種入 6 公分培養盤中，經過 24 小時後加入 PBS 處理，再經過 24 小時之後收集細胞，加入 CD11b 抗體、MHC2 抗體以及 CD86 抗體，完成染色後透過流式細胞儀分析 (WT n= 5, *IfitmDel* n= 5)。細胞在萃取 RNA 之後進行定量即時聚合酶鏈鎖反應，測定 NOS2、TNF α 、IL-6、Arg 和 Ym-1 mRNA 的表現量 (WT n= 5, *IfitmDel* n= 5)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 Student's t-test 進行統計分析，其中*表示 $p < 0.05$ 。

A**B****C****D**

圖九、對於 LPS 的刺激，在 *IfitmDel* 骨髓誘導的巨噬細胞中反應較野生型小鼠骨髓誘導巨噬細胞強

將股骨及脛骨中的骨髓細胞沖出，放入含有 20% 的 L929 培養液的 DMEM 培養液中，培養至第五天以 1×10^6 個細胞種入 6 公分培養盤中，經過 24 小時後分別加入 1000 ng/ml、300 ng/ml 及 100 ng/ml 的 LPS，再經過 24 小時之後收集細胞，加入 CD11b 抗體、MHC2 抗體以及 CD86 抗體，完成染色後透過流式細胞儀分析 (WT n= 4, *IfitmDel* n= 4)。細胞在萃取 RAN 之後進行定量即時聚合酶鏈鎖反應，測定(B) NOS2、(C) TNF α 和(D) IL-6 mRNA 的表現量(WT n=3, *IfitmDel* n=3)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 Student's t-test 進行統計分析，其中**表示 p<0.01，****表示 p<0.0001。

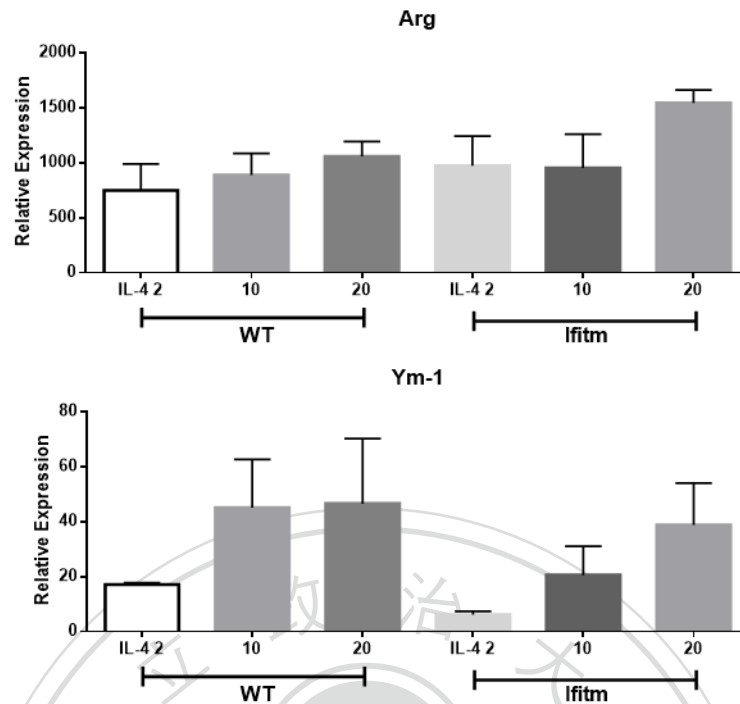




圖十、對於 IFNG 的刺激，在 *IfitmDel* 骨髓誘導的巨噬細胞中反應亦較野生型小鼠骨髓誘導巨噬細胞強

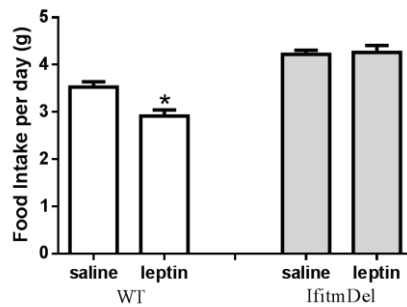
將股骨及脛骨中的骨髓細胞沖出，放入含有 20% 的 L929 培養液的 DMEM 培養液中，培養至第五天以 1×10^6 個細胞種入 6 公分培養盤中，經過 24 小時後分別加入 50ng/ml，10ng/ml 及 5ng/ml 的 IFNG，再經過 24 小時之後收集細胞，加入 CD11b 抗體、MHC2 抗體以及 CD86 抗體，完成染色後透過流式細胞儀分析 (WT n= 4, *IfitmDel* n= 4)。細胞在萃取 RAN 之後進行定量即時聚合酶鏈鎖反應，測定 NOS2、TNFa 和 IL-6 mRNA 的表現量 (WT n= 3, *IfitmDel* n= 3)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 Student's t-test 進行統計分析，其中*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ 。





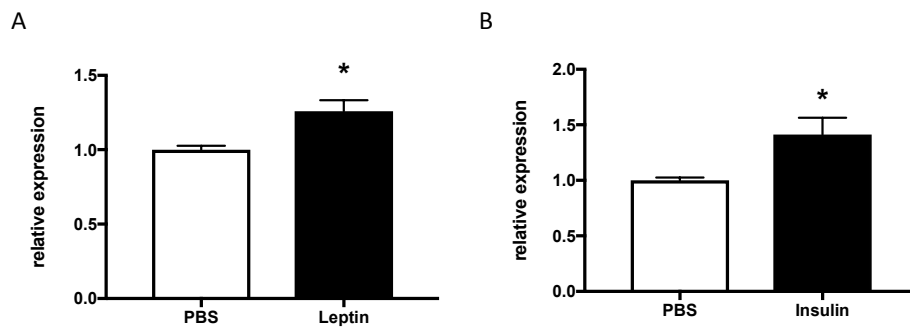
圖十一、*IfitmDel* 小鼠的骨髓誘導巨噬細胞對 IL-4 的刺激反應與對照組相仿

將股骨及脛骨中的骨髓細胞沖出，放入含有 20% 的 L929 培養液的 DMEM 培養液中，培養至第五天以 1×10^6 個細胞種入 6 公分培養盤中，經過 24 小時後分別加入 20ng/ml、5ng/ml 及 2ng/ml 的 IL-4，再經過 24 小時之後收集細胞，萃取 RAN 進行定量即時聚合酶鏈鎖反應，測定 Ym-1 和 Arg mRNA 的表現量(WT $n=3$, *IfitmDel* $n=3$)。實驗數據以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，以 Student's t-test 進行統計分析，其中*表示 $p < 0.05$ 。



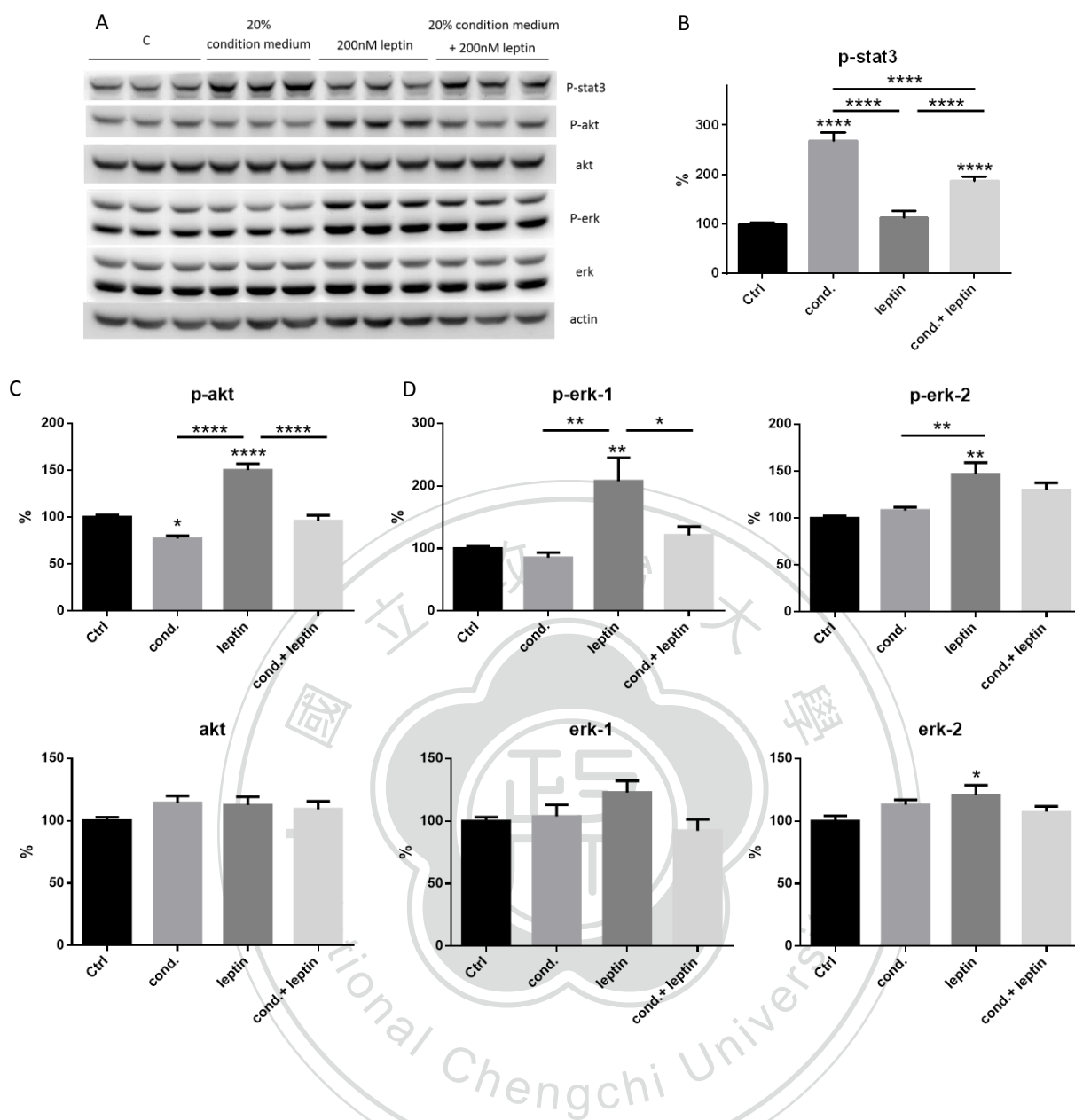
圖十二、在 *IfitmDel* 小鼠中檢測到瘦素抗性

在6個月大的 *IfitmDel* 小鼠和野生型小鼠注射生理食鹽水或瘦素(5 mg/kg)，紀錄小鼠24小時食物攝取量。野生型小鼠在注射瘦素後所攝取的食物量有減少，而 *IfitmDel* 突變體的攝食行為則保持不變(WT n = 4, *IfitmDel* n = 4)。實驗數據以 mean ± SEM 表示，以 One way ANOVA 進行統計分析，其中*表示 p < 0.05。



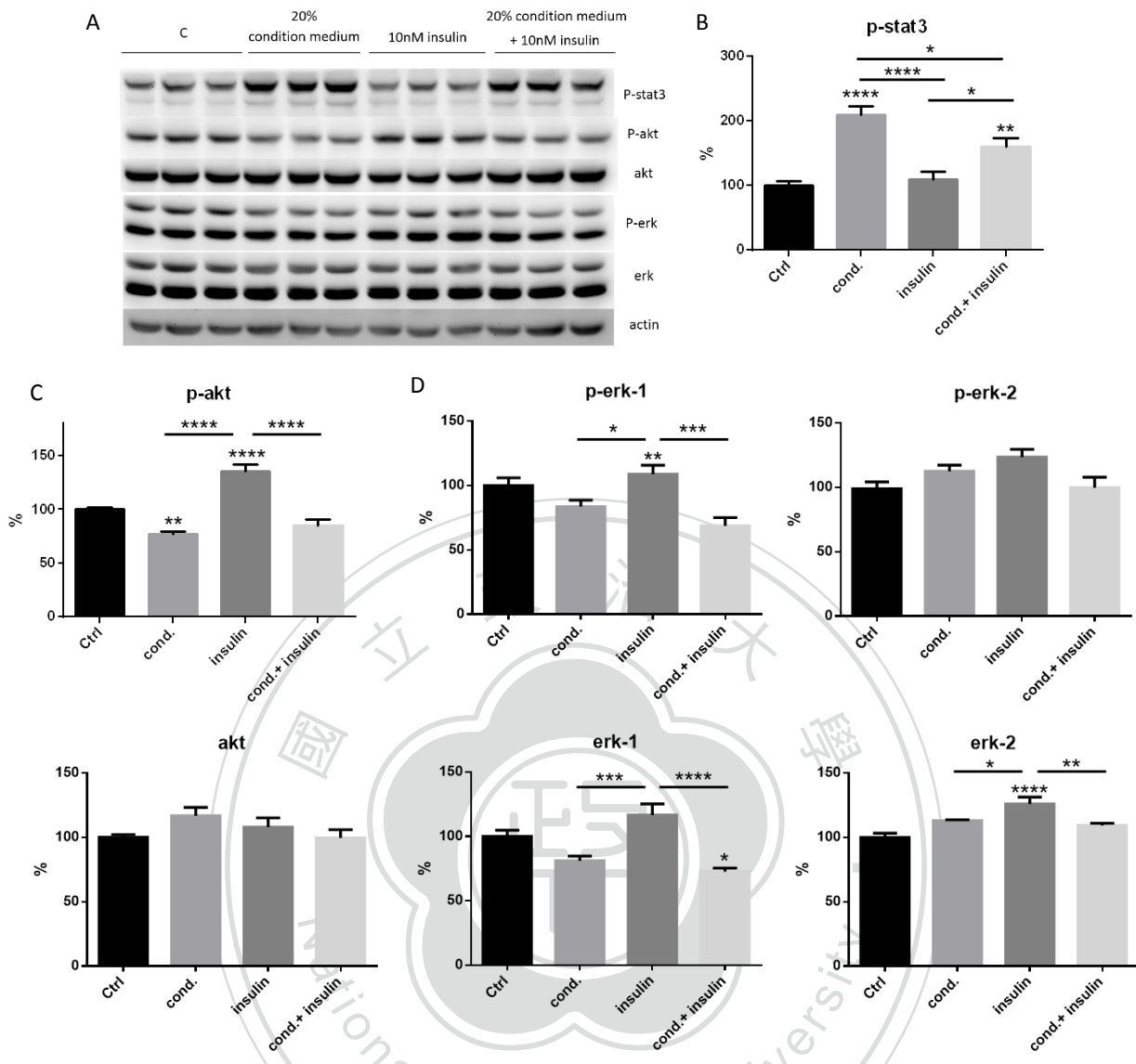
圖十三、瘦素和胰島素可以使 mHypoA-POMC / GFP-1 細胞的 POMC 表現量上升

在 6-well 中種入 1.5×10^5 的 mHypoA-POMC / GFP-1，經過 24 小時後加入(A)瘦素(leptin)或是(B)胰島素(insulin) 4 小時之後，利用 RT-PCR 進行 POMC mRNA 含量分析(n=9)。實驗數據以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，以 Student's t-test 進行統計分析，其中*表示 $p < 0.05$ 。



圖十四、促發炎細胞因子改變 POMC 神經元對瘦素信號的反應

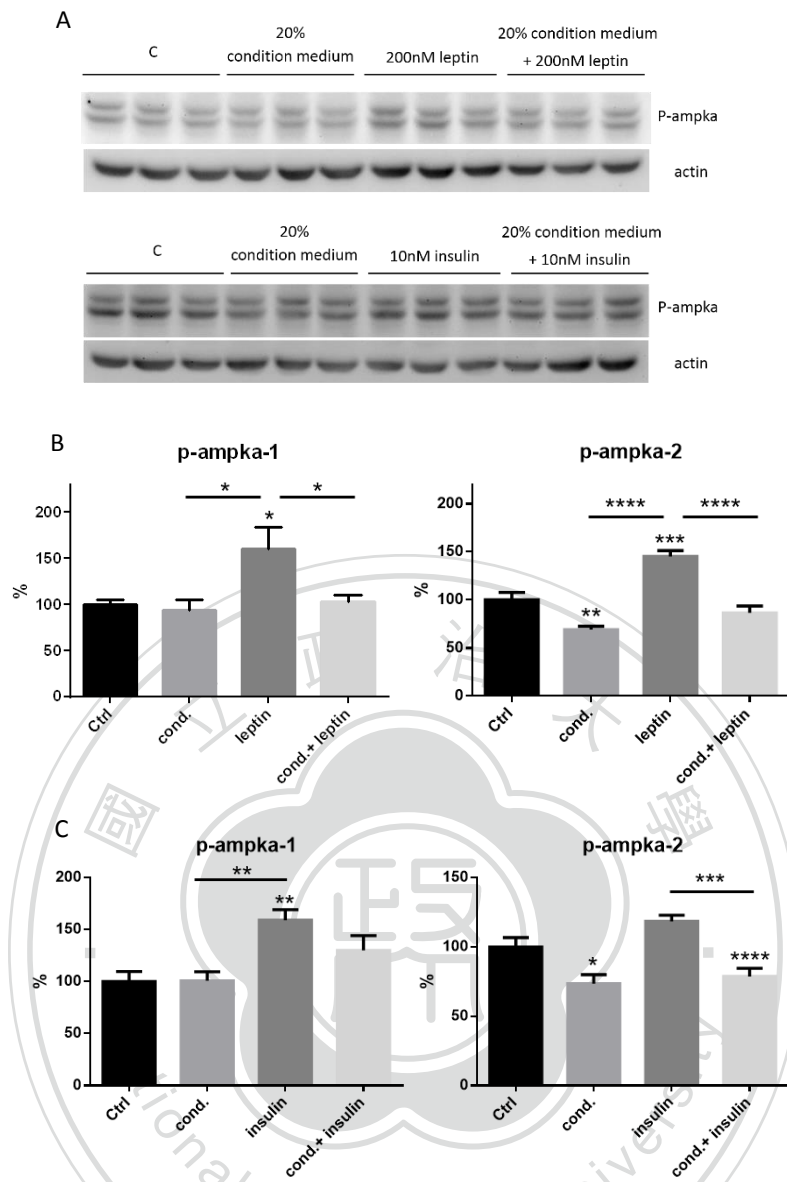
在 6-well 中種入 7×10^4 的 mHypoA-POMC/GFP-1，分別加入 20% condition medium、200nM leptin 以及 20% condition medium + 200nM leptin 經過 24 小時後，分別萃取蛋白質進行西方點墨法分析，(A)蛋白質電泳圖譜，(B) P-stat3 蛋白質含量(n=9)，(C) P-akt 和 akt 蛋白質含量(n=9)，(D) P-erk1/2 和 erk1/2 蛋白質含量(n=9)。實驗數據以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，以 One way ANOVA 進行統計分析，其中*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ ，****表示 $p < 0.0001$



圖十五、促發炎細胞因子

子干擾 POMC 神經元對胰島素的反應

在 6-well 中種入 7×10^4 的 mHypoA-POMC/GFP-1，分別加入 20% condition medium、10nM insulin 以及 20% condition medium + 10nM insulin 經過 24 小時後，分別萃取蛋白質進行西方點墨法分析，(A)蛋白質電泳圖譜，(B) P-stat3 蛋白質含量(n=9)，(C) P-akt 和 akt 蛋白質含量(n=9)，(D) P-erk1/2 和 erk1/2 蛋白質含量(n=9)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 One way ANOVA 進行統計分析，其中*表示 p<0.05，**表示 p<0.01，***表示 p<0.001，****表示 p<0.0001。



圖十六、促發炎細胞因子破壞 POMC 神經元中的葡萄糖感應

在 6-well 中種入 7×10^4 的 mHypoA-POMC/GFP-1，分別加入 20% condition medium、10nM insulin、20% condition medium 10nM insulin、200nM leptin 以及 20% condition medium + 200nM leptin 經過 24 小時後，分別萃取蛋白質進行西方點墨法分析，(A)蛋白質電泳圖譜，(B) P-AMPK α 蛋白質(瘦素組)含量(n=9)，(C) P-AMPK α 蛋白質(胰島素組)含量(n=9)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 One way ANOVA 進行統計分析，其中*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ ，***表示 $p < 0.001$ ，****表示 $p < 0.0001$ 。

參考文獻

- 張立德、林翠品、陳金滄、張讚昌、陳至理、楊堉麟、周秀慧、吳正男、戴國峯、吳文勉、施科念、郭加恩 (2007) 免疫學 華格那出版社
- Abdelaal M, le Roux CW, Docherty NG (2017) Morbidity and mortality associated with obesity. *Ann Transl Med.* 5(7):161.
- Alber D, Staeheli P. (1996) Partial inhibition of vesicular stomatitis virus by the interferon-induced human 9-27 protein. *J Interferon Cytokine Res* 165:375-380.
- Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ. (2012) Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 43:385–406.
- Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. (2012) Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature.* 488:172–177.
- Bailey CC, Kondur HR, Huang IC, Farzan M. (2013) Interferon-induced Transmembrane Protein 3 Is a Type II Transmembrane Protein. *J Biol Chem* 288(45): 32184–32193.
- Bailey CC, Zhong G, Huang IC, Farzan M (2014) IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense. *Annu. Rev. Virol.* 1:261–83
- Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA. (1996) The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(16):8374-8.
- Boltz-Nitulescu G, Wiltschke C, Holzinger C, Fellingner A, Scheiner O, Gessl A, Förster O. (1987) Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *J Leukoc Biol.* 41(1):83-91.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. (2004) Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci.* 24(11):2797-805.
- Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, van der Weyden L, Fikrig E, Adams DJ, Xavier RJ, Farzan M, Elledge SJ. (2009) The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell.* 139(7):1243-1254.
- Braun TP, Marks DL. (2010) Pathophysiology and treatment of inflammatory anorexia in chronic disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 1:135–45.
- Burke JD, Plataniotis LC, Fish EN. (2014) Beta interferon regulation of glucose metabolism is PI3K/Akt dependent and important for antiviral activity against coxsackievirus B3. *J Virol.* 88(6):3485-95.
- Challen GA, Boles N, Lin KK, Goodell MA. (2009) Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification And Analysis. *Cytometry A.* 75(1): 14–24.
- Claret M, Smith MA, Batterham RL, Selman C, Choudhury AI, Fryer LG, Clements M, Al-Qassab H, Heffron H, Xu AW, Speakman JR, Barsh GS, Viollet B, Vaulont S, Ashford ML, Carling D, Withers DJ. (2007) AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest.* 117(8):2325-36.
- Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ. (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science.* 312(5775):927-30.
- Dagon Y, Hur E, Zheng B, Wellenstein K, Cantley LC, Kahn BB. (2012) p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metab.* 16(1):104-12.

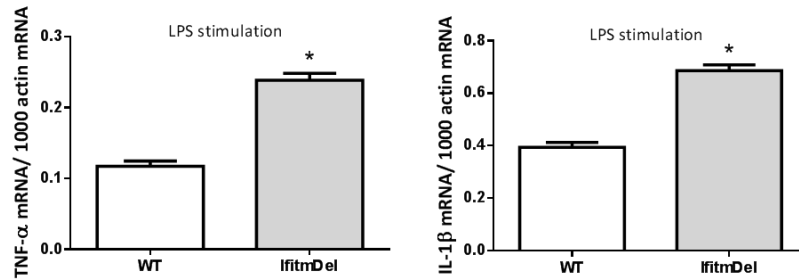
- De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 146(10):4192–9.
- Diamond MS, Farzan M. (2013) The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 13:46–57
- Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*. 22:221–232.
- Evans SS, Lee DB, Han T, Tomasi TB, Evans RL. (1990) Monoclonal antibody to the interferon-inducible protein Leu-13 triggers aggregation and inhibits proliferation of leukemic B cells. *Blood* 76, 2583–93.
- Fernández-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martín-Romero C, Pérez-Pérez A, González-Yanes C, Sánchez-Margalet V. (2010) Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm*. 2010:568343.
- Ferrante AW Jr. (2007). Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J. Intern. Med.* 262, 408–414.
- Friedman R, Hughes AL. (2002) Molecular evolution of the NF- κ B signaling system. *Immunogenetics* 53:964–74
- Friedman RL, Manly SP, McMahon M, Kerr IM, Stark GR. (1984) Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell*. 38:745–755.
- Fritsch SD, Weichhart T. (2016) Effects of Interferons and Viruses on Metabolism. *Front Immunol.* 7:630. 10.3389
- Fujiwara N, Kobayashi K. (2005) Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4(3):281–6.
- Gao S, Kinzig KP, Aja S, Scott KA, Keung W, Kelly S, Strynadka K, Chohnan S, Smith WW, Tamashiro KL, Ladenheim EE, Ronnett GV, Tu Y, Birnbaum MJ, Lopaschuk GD, Moran TH. (2007) Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(44):17358–63.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225–60
- Han SM, Namkoong C, Jang PG, Park IS, Hong SW, Katakami H, Chun S, Kim SW, Park JY, Lee KU, Kim MS. (2005) Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia*. 48(10):2170–8.
- Hanagata N, Li X, Morita H, Takemura T, Li J, Minowa T. (2011) Characterization of the osteoblast-specific transmembrane protein IFITM5 and analysis of IFITM5-deficient mice. *J Bone Miner Metab* 29(3):279–90.
- Hill JW, Williams KW, Ye C, Luo J, Balthasar N, Coppari R, Cowley MA, Cantley LC, Lowell BB, Elmquist JK. (2008) Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J Clin Invest*. 118:1796–1805.
- Ho HH, Ivashkiv LB. (2006) Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation. *J Biol Chem*. 281(20):14111–8.
- Hotamisligil GS. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867.
- Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA, Lechler RI, Bloom SR. (1999) Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J Clin Invest*. 104(8):1051–9.

- Huynh MK, Kinyua AW, Yang DJ, Kim KW. (2016) Hypothalamic AMPK as a regulator of energy homeostasis. *Neural Plast.* 2016:2754078.
- Hyam SR, Lee IA, Gu W, Kim KA, Jeong JJ, Jang SE, Han MJ, Kim DH. (2013) Arctigenin ameliorates inflammation in vitro and in vivo by inhibiting the PI3K/AKT pathway and polarizing M1 macrophages to M2-like macrophages. *Eur J Pharmacol.* 708(1-3):21-9
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. (2005) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* New York: Garland Sci.
- Jia R, Pan Q, Ding S, Rong L, Liu SL, Geng Y, Qiao W, Liang C. (2012) The N-terminal region of IFITM3 modulates its antiviral activity by regulating IFITM3 cellular localization. *J Virol* 86, 13697–707.
- Kim MS, Pak YK, Jang PG, Namkoong C, Choi YS, Won JC, Kim KS, Kim SW, Kim HS, Park JY, Kim YB, Lee KU. (2006) Role of hypothalamic Foxo1 in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Nat Neurosci.* 9(7):901-6.
- Klein S.L. and Nelson R.J. (2010) Social Behavior and Parasites. In: Breed M.D. and Moore J., (eds.) *Encyclopedia of Animal Behavior*, volume 3, pp. 216-225
- Lange C, Hemmrich G, Klostermeier UC, López-Quintero JA, Miller DJ, Rahn T, Weiss Y, Bosch TC, Rosenstiel P. (2001) Defining the origins of the NOD-like receptor system at the base of animal evolution. *Mol Biol Evol* 28:1687–702
- Lange UC, Adams DJ, Lee C, Barton S, Schneider R, Bradley A, Surani MA. (2008) Normal germ line establishment in mice carrying a deletion of the Ifitm/Fragilis gene family cluster. *Mol Cell Biol* 28(15):4688-96.
- Lange UC, Saitou M, Western PS, Barton SC, Surani MA. (2003) The Fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice. *BMC Dev Biol.* 3: 1.
- Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Carmeliet P, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. (2013) Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab.* 17(4):607-17.
- Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Carmeliet P, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. (2013) Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab.* 17(4):607-17.
- Le Thuc O, Stobbe K, Cansell C, Nahon JL, Blondeau N, Rovère C. (2017) Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. *Front Endocrinol (Lausanne).* 14;8:197.
- Leshan RL, Björnholm M, Münzberg H, Myers MG Jr. (2006) Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity (Silver Spring).* Suppl 5:208S-212S.
- Li JM, Ge CX, Xu MX, Wang W, Yu R, Fan CY, Kong LD. (2015) Betaine recovers hypothalamic neural injury by inhibiting astrogliosis and inflammation in fructose-fed rats. *Molecular nutrition & food research.* 59(2):189–202.
- Ling S., Zhang C., Wang W., Cai X., Yu L., Wu F., Chang L, Tian, C. (2016). Combined approaches of EPR and NMR illustrate only one transmembrane helix in the human IFITM3. *Sci Rep,* 6:24029.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Bloom SR, Lechler RI. (2002) Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol.* 72(2):330-8.
- Lu Y, Zuo Q, Zhang Y, Wang Y, Li T, Han J. (2017) The expression profile of IFITM family gene in rats. *Intractable Rare Dis Res* 6(4): 274–280.

- Marim FM, Silveira TN, Lima DS Jr, Zamboni DS. (2010) A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One*. 5(12):e15263.
- Martinez FO, Gordon S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 10.12703/P6-13
- Mayle A, Luo M, Jeong M, Goodell MA. (2013) Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. *Cytometry A*. Jan;83(1):27-37.
- Medzhitov R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203): 428–435
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fofelle F, Ferré P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB. (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*. 428(6982):569-74.
- Nathan C. (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420:846–52
- Nazarians-Armavil A, Chalmers JA, Lee CB, Ye W, Belsham DD. (2014) Cellular insulin resistance disrupts hypothalamic mHypoA-POMC/GFP neuronal signaling pathways. *Journal of Endocrinology* 220.1: 13-24.
- Nikolic T, Dingjan GM, Leenen PJ, Hendriks RW. (2002) A subfraction of B220(+) cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics. *Eur J Immunol*. 32(3):686-92.
- Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG Jr, Seeley RJ, Schwartz MW. (2003) Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes*. 52(2):227-31.
Nutr Metab Cardiovasc Dis. 18(2):158-68.
- Oh TS, Cho H, Cho JH, Yu SW, Kim EK. (2016) Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression. *Autophagy*. 12(11):2009-2025.
- Ouchi N., Parker JL., Lugus JJ., and Walsh K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol*. 11, 85–97.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol*. 11, 85–97.
- Proell M, Riedel SJ, Fritz JH, Rojas AM, Schwarzenbacher R. (2008) The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS One* 3:e2199
- Quan W, Kim HK, Moon EY, Kim SS, Choi CS, Komatsu M, Jeong YT, Lee MK, Kim KW, Kim MS, Lee MS. (2012) Role of hypothalamic proopiomelanocortin neuron autophagy in the control of appetite and leptin response. *Endocrinology*. 153(4):1817-26.
- Rauch I, Müller M, Decker T. (2013) The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAKSTAT*. 2(1):e23820.
- Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, Aderem A. (2005) The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:9577–82
- Sällman Almén M, Bringeland N, Fredriksson R, Schiöth HB. (2012) The dispanins: a novel gene family of ancient origin that contains 14 human members. *PLoS One* 7(2):e31961
- Samuel CE. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*. 14(4):778-809
- Sanyal AJ (2005). Mechanisms of disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol*. 2, 46–53.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. (2000) Central nervous

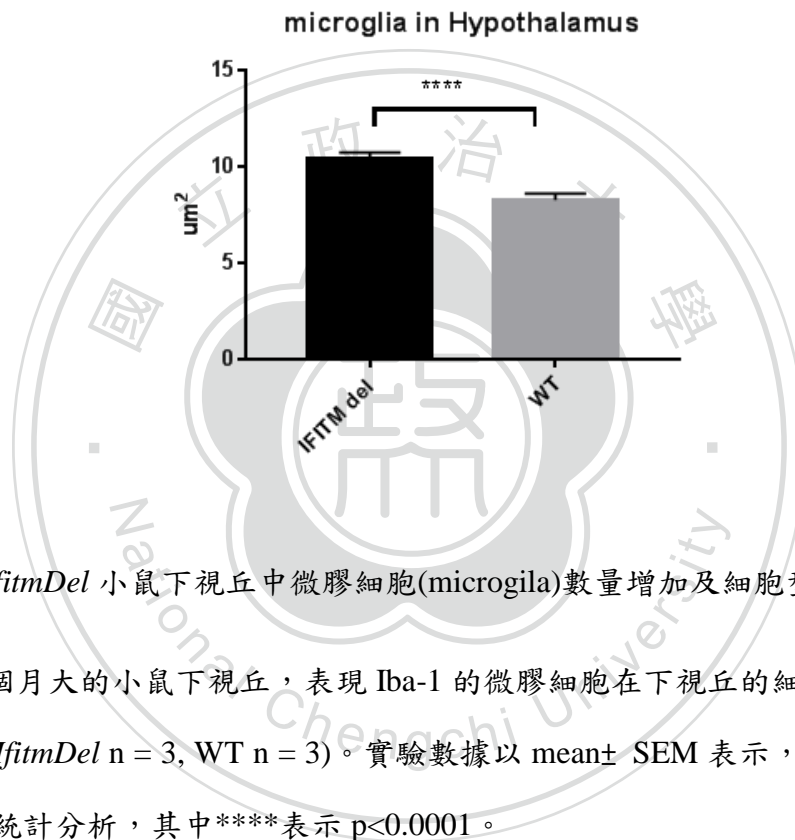
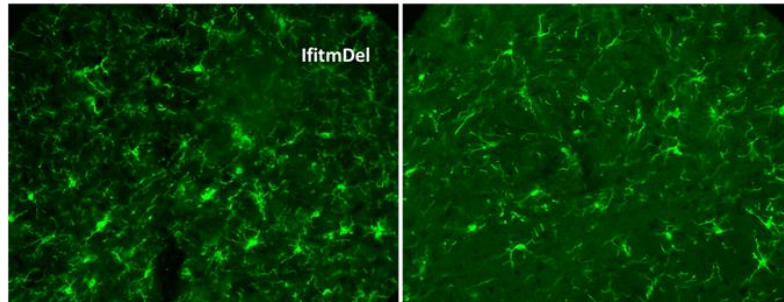
- system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- Serhan CN, Savill J. (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6:1191-97
- Shapira SD, Gat-Viks I, Shum BO, Dricot A, de Grace MM, Wu L, Gupta PB, Hao T, Silver SJ, Root DE, Hill DE, Regev A, Hacohen N. (2009) A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. *Cell*, 139(7):1255-1267.
- Stolarczyk E. (2017) Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr Opin Pharmacol.* 37:35-40.
- Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. (2005) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol.* 175(1):342-9
- Stout RD, Suttles J. (2004) Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 76(3):509-13.
- Takahashi S, Doss C, Levy S, Levy R. (1990) Tapa-1, the Target of an Antiproliferative Antibody, Is Associated on the Cell-Surface with the Leu-13 Antigen. *Journal of Immunology* 145, 2207-2213.
- Thomas C, Moraga I, Levin D, Krutzik P O, Podoplelova Y, Trejo A, Lee, C, Yarden G, Vleck S E, Glenn J S, Nolan G P, Pihler J, Schreiber G, and Garcia K C. (2011) Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell* 146, 621-632.
- Tilg H., and Moschen AR. (2008). Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 19, 371-379.
- Trépanier MO, Hopperton KE, Mizrahi R, Mechawar N, Bazinet RP. (2016) Postmortem evidence of cerebral inflammation in schizophrenia: a systematic review. *Mol Psychiatry* 21(8): 1009-1026.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. (2008) Neuroendocrine control of food intake.
- Varela L, Horvath TL. (2012) Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep.* 13(12):1079-86.
- Velloso LA, Araújo EP, de Souza CT. (2008) Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation.* 15:189-93.
- Wee YS, Weis JJ, Gahring LC, Rogers SW, Weis JH (2015) Age-related onset of obesity corresponds with metabolic dysregulation and altered microglia morphology in mice deficient for Ifitm proteins. *PLoS One.* 10(4):e0123218.
- Weston S, Czieso S, White IJ, Smith SE, Kellam P, Marsh M. (2014) A membrane topology model for human interferon inducible transmembrane protein 1. *PLoS One* 9(8):e104341.
- Yount JS, Karssemeijer RA, Hang HC. (2012) S-palmitoylation and ubiquitination differentially regulate interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3)-mediated resistance to influenza virus. *J Biol Chem* 287, 19631-41.
- Zhan C, Zhou J, Feng Q, Zhang JE, Lin S, Bao J, Wu P, Luo M. (2013) Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J Neurosci.* 33:3624-3632.
- Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. (2008) Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell.* 135(1):61-73.
- Zhang Z, Liu J, Li M, Yang H, Zhang C. (2012) Evolutionary dynamics of the interferon-induced transmembrane gene family in vertebrates. *PLoS One* 7(11):e49265.

附錄



附圖一、*IfitmDel* 小鼠在 LPS 誘導所產生的促發炎物質有較高的表現量

在腹部注射 1mg/kg LPS 經過 2 小時後採血，檢測血球中 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表現量(WT n= 5, *IfitmDel* n= 5)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 Student's t-test 進行統計分析，其中*表示 p<0.05。



附圖二、*IfitmDel* 小鼠下視丘中微膠細胞(microglia)數量增加及細胞型態改變

取 4 個月大的小鼠下視丘，表現 Iba-1 的微膠細胞在下視丘的細胞數量以及細胞型態(*IfitmDel* n = 3, WT n = 3)。實驗數據以 mean± SEM 表示，以 Student's t-test 進行統計分析，其中****表示 p<0.0001。