

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## CD93 在單核球分化之功能研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2320-B-041-013-  
執行期間：95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日  
執行單位：嘉南藥理科技大學生物科技系(所)

計畫主持人：陳品晟

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：李芳姿、李郁芳  
大學生-兼任助理：黃祥青、黃恩澤

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 96 年 09 月 19 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ☒ 成果報告  
☐ 期中進度報告

CD93 在單核球分化之功能研究

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2320-B-041-013-

執行期間：95 年 8 月 1 日至 96 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳品晟

共同主持人：

計畫參與人員：李芳姿、李郁芳、黃祥青、黃恩澤

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☒ 精簡報告 ☐ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

☐ 赴國外出差或研習心得報告一份

☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告一份

☒ 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

☐ 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☐ 一年☐ 二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學生物科技系

中 華 民 國 96 年 9 月 19 日

## 摘要

關鍵詞：CD93，單核球 THP-1 細胞，吞噬作用，貼附作用

人類 CD93 蛋白是一種位於細胞表面的穿膜糖蛋白。其被發現表現在單核球、嗜中性球、血小板、小神經膠質細胞、內皮細胞、早期幹細胞等多種細胞。CD93 蛋白具有 652 個胺基酸，其中包含了碳水化合物辨認區域、五個 EGF 相似區域、一個黏蛋白相似區以及一個短的細胞內尾端。CD93 蛋白最初被命名為 C1qRp，認為和補體分子 C1q 促進的吞噬作用有關。然而最近的一些報導卻認為 CD93 蛋白並不參與在 C1q 促進的吞噬作用中。因此 CD93 蛋白的功能目前仍然是未知而且是有爭議的。在本計畫中，我們從人類淋巴瘤細胞 U937 選殖並構築 CD93 基因的表現載體，並將 CD93 及其不同長度的片段 DNA，包括刪除碳水化合物辨認區域的 CD93 蛋白(CD93 $\Delta$ L)與刪除細胞內尾端的 CD93 蛋白(CD93 $\Delta$ C)的基因轉殖入單核球 THP-1 細胞，研究 CD93 及其片段蛋白質對於 THP-1 細胞分化為巨噬細胞的影響，以及分析這些蛋白質對巨噬細胞之吞噬作用的影響。結果發現，當 THP-1 細胞接受 PMA 刺激而分化為巨噬細胞時，CD93 蛋白的表現會下降。當 THP-1 細胞過量表現 CD93 蛋白時，細胞的吞噬作用會被抑制，並且 THP-1 細胞吸附到內皮細胞的能力也會被抑制。這些結果顯示，CD93 蛋白可能調節了單核球的某些功能。

## Abstract

Keywords: CD93, THP-1 cell, phagocytosis, adhesion

CD93 is a type I cell surface glycoprotein predominantly expressed on myeloid lineage cells, microglia cells, endothelial cells, and early stem cell precursors. Human CD93 consists of 652 amino acids and contains a carbohydrate recognition domain (CRD), five EGF-like domains, a mucin-like region juxtaposed to the transmembrane region, and a short cytoplasmic tail. CD93 was originally named for its suggested participation in the enhancement of FcR and complement receptor (CR1)-mediated phagocytosis. However, other reports suggested that CD93 was not required for enhancing phagocytosis in vitro. The function of CD93 remains controversial. In this study, we cloned the gene of CD93 from human histiocytic lymphoma U937 cells and investigated the functions of CD93 in monocyte THP-1 cells, which stably expressed CD93, CRD deleted CD93 (CD93 $\Delta$ L) and cytoplasmic tail deleted CD93 (CD93 $\Delta$ C). We used flow cytometry to explore the expression of CD93 in PMA-stimulated THP-1 differentiation, and demonstrated that CD93 expression level was down-regulated by PMA. In THP-1 cells overexpressed CD93, the phagocytosis and adhesion to endothelial cells were suppressed. These results suggested that the expression of CD93 might regulate the functions of monocyte.

## 前言

人類 CD93 蛋白是一種位於細胞表面的穿膜糖蛋白。其被發現會表現在單核球(monocytes)、嗜中性球(neutrophils)、血小板(platelets)、小神經膠質細胞(microglia)、內皮細胞(endothelial cells)及造血幹細胞(haematopoietic cells)等多種細胞<sup>1</sup>。CD93 基因位於人類第 20 號染色體，為可表現出具有 652 個胺基酸的蛋白質。其蛋白質結構，由 N 端開始依序為含 C-type 碳水化合物辨識區域(C-type carbohydrate recognition domain, CRD)，五個上皮細胞生長因子(epidermal growth factor, EGF)相似區域，一個黏蛋白(mucin)相似區，穿膜(transmembrane) 區域，以及最末端一個僅含有 47 個胺基酸的細胞內尾端(intracellular tail)。CD93 預測的分子量為 66 kD，但以西方點墨法分析後為 126 kD，推測此蛋白可能具有高度的糖化作用<sup>2,3</sup>。

CD93 最初被命名為 complement component 1q receptor (C1qRp)，意即 C1q 的受體。C1qRp 蛋白在 1989 年被發現並分離出<sup>4</sup>，並在後續的研究中，發現此蛋白質的單株抗體可以抑制由 C1q 所促進的單核球吞噬作用(monocytic phagocytosis)，表示 C1q 可能藉由與此蛋白質結合而調控吞噬作用<sup>5</sup>。此外，附著到 C1qRp 抗體的細胞亦會促進吞噬作用<sup>6</sup>。一直到 1997 年，由 Nepomuceno 等人選殖出 CD93 的 cDNA，經由序列比對才確定 C1qRp 即為 CD93<sup>2</sup>。然而，CD93 是否真能促進單核球吞噬作用，以及其機制為何，目前仍不清楚。

## 研究目的

由於 CD93 蛋白的功能仍不確定，此外，CD93 蛋白的不同區域的功能亦不清楚。因此在本研究計畫，我們由 U937 細胞中選殖出 CD93 基因，以及刪除碳水化合物辨識區域的 CD93 蛋白( $\Delta$ L)與刪除細胞內尾端的 CD93 蛋白( $\Delta$ C)的基因，並將全長的 CD93 以及 CD93- $\Delta$ L、CD93- $\Delta$ C 等片段基因送至單核球，分析單核球被刺激分化成巨噬細胞，以及巨噬細胞進行吞噬作用時，CD93 及其片段所可能扮演的角色。本年度計畫之目的如下：

1. 選殖 CD93 基因，並將全長、刪除 CRD (CRD-deleted,  $\Delta$ L) 與刪除細胞內區域 (cytoplasmic-deleted,  $\Delta$ C) 的 CD93 基因構築到綠色螢光蛋白(GFP)表現載體 pEGFP-N1。
2. 分析單核球分化成巨噬細胞(macrophage)時，CD93 蛋白表現的變化。
3. 探討 CD93、CD93- $\Delta$ L 及 CD93- $\Delta$ C 的表現是否影響單核球分化成為巨噬細胞。
4. 分析 CD93、CD93- $\Delta$ L 及 CD93- $\Delta$ C 的表現是否影響巨噬細胞的吞噬作用。

## 文獻探討

雖然 CD93 被認為可能在調控單核球的吞噬作用扮演角色，但最近卻有不同的看法。在 CD93 與 C1q 結合的研究中，Tenner 等人發現以 CD93 抗體(U40.3、R139 及 R3)處理過後的人類單核球，並不能抑制 C1q 結合到細胞上，僅有 R3 抗體約有 30%的抑制效果。由於 R3 抗體是 IgM 的型態，推測是因為巨大的空間排列而阻礙蛋白質接觸到 C1q 的結合位置，而非專一性地阻斷 CD93 與 C1q 的結合<sup>7</sup>。因此推測 CD93 可能不是 C1q 直接結合的受體 (Tenner *et al.*, 1999)。此外，Gasque 等人利用 CD93-Fc 融合蛋白為材料，發現亦無法與 C1q 做結合<sup>8</sup>。而在 2004 年，CD93 基因剔除老鼠被製造出來，發現其不像 C1q 基因剔除

老鼠，會發生紅斑性狼瘡等疾病，間接証明 CD93 與 C1q 可能沒有直接的相互作用。相對的，CD93 剔除老鼠可以健全的存活與生長，唯一受到影響的是吞噬細胞清除凋亡細胞的作用。由此推論 CD93 可能參與辨識凋亡細胞的過程，進而傳遞清除凋亡細胞的訊息<sup>9</sup>。

為了進一步研究 CD93 與細胞吞噬作用的相關性，Tenner 團隊使用基因工程方法將 CD93 之細胞內片段與 GST (glutathione S-transferase)接在一起，並表現出融合蛋白。再利用 GST (glutathione S-transferase) pull down 的方法，尋找可能會與 CD93 細胞內片段蛋白進行交互作用的蛋白質。結果發現 CD93 會與 moesin 發生交互作用。以螢光免疫色法觀察人類單核球，也觀察到 Moesin 與 CD93 分佈在相同的位置，確定這兩種蛋白質在細胞內亦會結合在一起。Moesin 為 zrin/radixin/moesin(ERM)家族的一員，ERM 蛋白可作為一些細胞膜蛋白與細胞骨架蛋白，如 actin，的架橋蛋白。更深入的研究發現，CD93 細胞內片段蛋白的細胞膜旁(juxtamembrane)區域之正電荷胺基酸，以及 C 端末尾的 11 個胺基酸，對於 moesin 的結合是相當重要的。Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)亦會藉由影響 CD93 與 Moesin 的交互作用。這些結果顯示 CD93 可能藉由與 moesin 結合，影響細胞骨架蛋白，進而調控細胞功能<sup>10</sup>。

最近的研究也發現，表現在單核球及嗜中性球細胞表面的 CD93，會因為一些刺激，包括發炎反應，而被切除。這些被切除並被釋放到細胞外的 CD93 片段，包括有 CRD，以及 EGF 相似區域等片段。而這些片段也可在血液中被發現，顯示 CD 93 的切割在正常生理條件下是存在的<sup>11</sup>。而這些游離的 CD93 片段蛋白，是否具有其他生理功能，則是完全未知。

CD93 在許多不同種類的細胞也都有表現，顯示 CD93 在不同的生理狀況下，可能具有不同的生物功能。例如人類 CD93 在老鼠的同源基因 AA4，會大量表現在老鼠的血管內皮細胞，被推測與調控細胞生長，參與血管的重新塑型、血管新生以及微血管生成有關<sup>12</sup>。

## 研究方法

本計畫將以單核球為材料，研究 CD93 在發炎反應時所扮演的角色。研究方法分列如下：

1. 從人類單核球前期細胞株 U937 中抽取 RNA，以 RT-PCR 方法選殖人類 CD93 基因。再以 PCR 方法取得全長、刪除 CRD (CRD-deleted,  $\Delta L$ ) 與刪除細胞內區域 (cytoplasmic-deleted,  $\Delta C$ ) 的 CD93 基因。DNA 兩端分別以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割後轉接至螢光蛋白(GFP)表現載體 pEGFP-N1。CD93 與 pEGFPN1 載體接合後轉移到大腸桿菌 DH5- $\alpha$  勝任細胞，再以 kanamycin 初步篩選菌落。將選出的菌落進行小量培養後抽取 DNA，並以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割加以確認。再利用 CD93-pEGFPN1 質體作為模版，以 PCR 夾出 CRD 區域缺失的 CD93 DNA，並在 5'端接上 CD93 基因前端的訊息片段(signal peptide)DNA，選殖出的表現載體稱為 CD93 $\Delta L$ -pEGFPN1。CD93 $\Delta C$  的基因片段同樣是以 CD93-pEGFPN1 為模版，以 PCR 方法得到 C-tail 缺失的 CD93，再以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割後，接合並且進行轉移，篩選菌落以及確認序列，將此基因表現載體命名為 CD93 $\Delta C$  -pEGFPN1。
2. 我們利用人類單核球細胞 THP-1 來研究 CD93 的功能，觀察活化的 THP-1 細胞是否會影響人類 CD93 的表現。將 THP-1 以刺激發炎反應的物質，PMA (phorbol myristate acetate) 處理 24 與 48 小時後，THP-1 細胞會由懸浮型態的細胞，發生型態變化並貼附於培養皿

底部，分化為具有高度吞噬能力的巨噬細胞。收集細胞，以 1% paraformaldehyde 固定後，再以 anti-CD93 抗體(VIMD2b)偵測細胞表面的 CD93 蛋白，經螢光二級抗體作用後，以流式細胞分析儀(flow cytometer)分析細胞表面的 CD93 蛋白變化。

3. 將 CD93、CD93 $\Delta$ L 及 CD93 $\Delta$ C 表現載體轉染入 THP-1 細胞後，探討其分化成巨噬細胞後對吞噬作用的影響。先以 PMA 刺激 THP-1 分化為巨噬細胞後，再以相同濃度的乳膠螢光顆粒處理兩小時，經過仔細的清洗後，藉由流式細胞分析儀偵測細胞的螢光量，代表其吞入的乳膠顆粒數量，並比較吞噬能力的強弱。
4. 探討 CD93、CD93 $\Delta$ L 及 CD93 $\Delta$ C 對 THP-1 細胞分化成巨噬細胞能力的影響。將 CD93、CD93 $\Delta$ L 及 CD93 $\Delta$ C-pEGFP 表現載體轉染入 THP-1 細胞後，以 10 nM PMA 刺激活化 THP-1，經 24 與 48 小時後，細胞會貼附於培養皿底部，此時可以計算貼附的細胞數，並反應出 THP-1 分化成巨噬細胞的能力。另一方面，收集貼附的細胞並以 1% paraformaldehyde 固定，再以巨噬細胞之 marker 蛋白 CD68 的抗體 (DAKO) 進行螢光免疫染色，以確定分化成為巨噬細胞。利用細胞貼附的特性以及 CD68 標誌蛋白的染色，我們將可比較 CD93 及其片段基因對 THP-1 細胞分化成為巨噬細胞的影響。
5. 比較 THP-1 細胞對 TNF- $\alpha$ 活化的 HUVECs 黏著的能力。先將轉染後的 THP-1 細胞以活細胞染劑 Calcein AM 染色，再與被 25 ng/ml TNF- $\alpha$  活化的 HUVEC 培養 1 小時，最後用螢光儀偵測螢光，由螢光的高低表示細胞黏著的數量，藉此代表黏著能力的差異。

## 結果與討論

經由本計畫的執行，我們選殖出 CD93 的 cDNA，並得到 CD93 全長、CD93- $\Delta$ L-及 CD93- $\Delta$ C-pEGFP 等表現載體。將 CD93 轉殖入單核球 THP-1 細胞表現後，我們分析 CD93 的表現對 THP-1 細胞被 PMA 刺激而分化成巨噬細胞之影響，也探討 CD93 對巨噬細胞之吞噬作用的影響。

### 一、構築人類 CD93 全長 (CD93-pEGFPN1)、人類 CD93 刪除 lectin-like 區域 (CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1)、人類 CD93 刪除細胞內尾端 (CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1) 的基因

由於人類 CD93 基因中內含一個插入序列，因此我們先分離出人類淋巴瘤細胞株 U937 的 mRNA，反轉錄為 cDNA 後，再進行基因的選殖。人類 CD93 全長 1956bp，從 1129bp 位置分兩段 PCR，再將產物接起來，成為全長的 CD93。兩端分別以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割後接入哺乳動物表現載體 pEGFPN1，pEGFPN1 是一個有綠色螢光蛋白 GFP 基因的載體。人類 CD93 基因與 pEGFPN1 載體接合後轉移到 DH5- $\alpha$ 勝任細胞中，再以 kanamycin 初步篩選菌落。將選出的菌落進行小量培養後抽取 DNA，並以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割加以檢視，其切下的片段大小為 1956bp (圖一)，在限制酶確認無誤後的質體，將其命名為 CD93-pEGFPN1，接著進行正向與反向的 DNA 定序，確認定序結果無誤。再利用 CD93-pEGFPN1 質體作為模版，夾出 CRD 區域缺失的 CD93 的後半部，再夾出前端的訊息片段(signal peptide)，兩個產物都以 EcoR I 限制酶切割後，互相接合並進行轉移，篩選菌落以及確認都與全長的過程相同，其片段大小為 1451bp，其命名為 CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1。CD93 $\Delta$ C 的基因片段同樣是以 CD93-pEGFPN1 作為模版，做聚合酶連鎖反應得到 C-tail 缺失的 CD93，再以 EcoR I 和 BamH I 限制酶切割後，接合並且進行轉移，篩選菌落以及確認都與全長的過程相

同，其片段大小為 1802bp，其命名為 CD93 $\Delta$ C -pEGFPN1 (圖一)。

## 二、PMA 刺激 THP-1 分化會降低人類 CD93 蛋白的表現

我們利用人類單核球細胞 THP-1 來研究 CD93 的功能。首先，我們觀察由 PMA 活化的細胞是否會影響人類 CD93 的表現。將 THP-1 在 10 nM 的 PMA (phorbol myristate acetate)處理，經 24 與 48 小時後，再以 anti-CD93 抗體(VIMD2b)偵測 CD93 蛋白表現，並利用流式細胞分析儀分析細胞表面的 CD93 蛋白變化。由圖二所示，隨著 THP-1 被 PMA 刺激活化的時間增加，細胞表面的 CD93 蛋白表現量會逐漸減低。在刺激後的第一天降低約百分之五十，第二天更降低到約百分之二十五的表現量。由此可知 PMA 的刺激分化 THP-1 會降低人類 CD93 蛋白的表現。

## 三、PMA 刺激 THP-1 分化會刺激對乳膠顆粒的吞噬作用

我們又更進一步觀察 PMA 刺激 THP-1 分化為巨噬細胞後，其吞噬作用是否有影響。將 10 nM PMA 刺激活化 THP-1，經 24 與 48 小時後，收集細胞並與相同濃度的乳膠螢光顆粒互相混合反應兩小時後，經過仔細的清洗，藉由流式細胞分析儀偵測細胞的螢光量，代表其吞入的乳膠顆粒數量，以及吞噬能力的強弱。由圖三所示，我們可以發現 PMA 刺激的時間越長，THP-1 細胞吞噬乳膠顆粒的能力就越強，刺激一天後的吞噬能力相較於未活化但是有加入乳膠顆粒作為陰性對照的組別來得高兩倍，而刺激過兩天的細胞吞噬能力更是高於對照組九倍。配合先前觀察到 PMA 的刺激分化 THP-1 會降低人類 CD93 蛋白的表現，顯示 PMA 刺激活化 THP-1 且降低人類 CD93 蛋白的表現可能與吞噬能力有關。

由上述兩個實驗數據，我們發現在單核球被 PMA 刺激為巨噬細胞的過程中，CD93 的表現量隨著時間越長逐漸減少；同時，我們亦觀察到巨噬細胞的吞噬能力會隨著活化的天數而增加，此結果顯示 CD93 蛋白的表現可能與單核球的分化有關。因此我們推測人類 CD93 在 PMA 刺激活化 THP-1 轉變的過程中，對於巨噬細胞吞噬作用是負向的調控，在單核球未受到免疫刺激時，穩定表現的 CD93 可以抑制單核球被活化成巨噬細胞；相反地當單核球受到刺激需要進行免疫活化時，CD93 的量減少，同時單核球受到調控活化轉變為巨噬細胞。

## 四、比較 THP-1 細胞轉染 CD93-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 後吞噬乳膠顆粒能力的差異

為了進一步研究人類 CD93 蛋白的表現減少與巨噬細胞吞噬能力的相關性，我們將不同人類 CD93 片段的質體轉染至 THP-1 作為實驗組，而轉染入 pEGFPN1 載體作為對照組，在細胞轉染並培養六小時後確保轉染入的質體已經開始表現蛋白後，以 10 nM PMA 刺激活化 THP-1，在 16 到 24 小時間收取細胞，進行乳膠顆粒的吞噬實驗，最後以流式細胞分析儀偵測紅色螢光。首先比較未轉染任何質體，但有 PMA 處理的細胞比未經由 PMA 刺激的細胞有更多的紅色螢光，確定 PMA 的刺激成功。再圈選有綠色螢光表現細胞(pEGFPN1 為綠色螢光，表示有轉染入標的質體)，分析其紅色螢光百分比(乳膠顆粒為紅色螢光，代表細胞吞噬乳膠顆粒的程度)。所得結果如圖四所示，發現轉染入 CD93-pEGFPN1 的實驗組吞噬乳膠的百分比比較空載體對照組低百分之四十，而轉染入 CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 的實驗組則與對照組沒有明顯

的差異，顯示全長的人類 CD 93 蛋白表現會影響 PMA 刺激分化 THP-1 的乳膠吞噬能力，造成吞噬能力的降低。當去除掉 lectin-like 區域以及細胞內尾端時，都會影響對吞噬能力的調控，而使吞噬能力回復到和 pEGFPN1 載體的對照組一樣。此結果推測不論是醣蛋白辨識區域或是細胞內尾端，對於人類 CD93 抑制細胞吞噬作用的調控都有扮演重要角色。

#### 五、分析轉染 CD93-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 的 THP-1 細胞經 PMA 刺激分化後附著能力的差異

在觀察轉染全長的人類 CD93 蛋白會抑制細胞吞噬乳膠顆粒的同時，我們也發現到轉染不同片段的人類 CD93 基因後的 THP-1，經 PMA 刺激分化後，其附著到培養皿的細胞數量有明顯的差異。我們由圖五可見，細胞轉染 CD93-pEGFPN1 的實驗組經刺激分化黏著的細胞數量明顯少於轉染入 pEGFPN1 載體的對照組。黏著細胞數降低百分之六十；而轉染入 CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1 的實驗組則與對照組沒有明顯的差異。比較特殊的是轉染入 CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 的實驗組相對於對照組，細胞黏著的數量增加百分之六十。

此結果顯示 CD93 的表現可能與單核球活化成為巨噬細胞中，黏著的步驟有負向的調控；而轉染入 CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1 細胞黏附能力與對照組一樣，推測醣類辨識區域對於細胞黏著的步驟有其重要的角色，以至於當刪除掉這個區域時就無法抑制細胞黏著。而轉染入 CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 的細胞有促進細胞黏著的現象，推測與蛋白質構型的改變或外送位置不正確有關。因此人類 CD93 蛋白可能與抑制巨噬細胞的細胞黏著與吞噬作用有關，並且 CD93 蛋白的 CRD 片段與細胞質內尾端可能在 CD93 的不同細胞功能中扮演不同角色。

#### 六、觀察 THP-1 細胞轉染 CD93-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1、CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 後對 TNF- $\alpha$ 活化的人類臍帶靜脈內皮細胞(HUVEC)黏著能力的差異

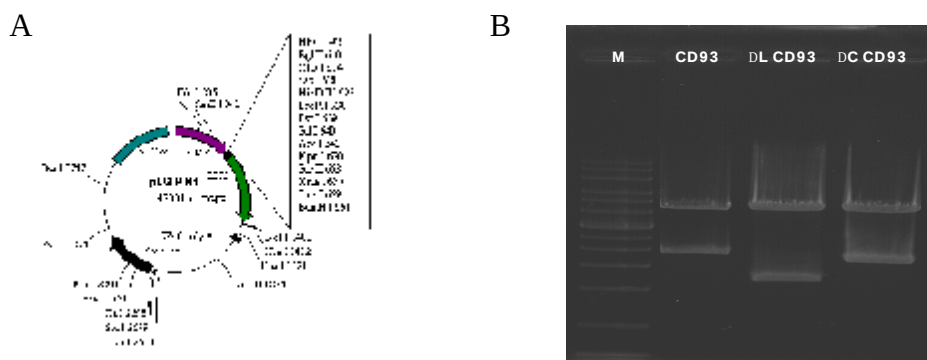
最後，我們利用活化的血管內皮細胞來誘發 THP-1 成為巨噬細胞，以此來研究 CD93 的功能。我們先將轉染後的 THP-1 細胞標定活細胞染劑 Calcein AM，再事先用 25 ng/ml TNF- $\alpha$  活化的 HUVEC 培養一個小時，最後用螢光儀偵測螢光，由螢光的高低表示細胞黏著的數量，藉此代表黏著能力的差異。結果由圖六所示，細胞轉染 CD93-pEGFPN1 的實驗組黏著的細胞數量明顯少於轉染入空載體的對照組，黏著細胞數降低百分之三十三，而轉染入 CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 的實驗組則與對照組沒有明顯的差異，顯示人類 CD93 蛋白是確實對於單核球細胞黏著到內皮細胞的能力有其抑制的作用，並且 CD93 蛋白的細胞質內尾端對於調控抑制 THP-1 細胞黏著到 HUVEC 的能力可能是有重要影響。

#### 參考文獻

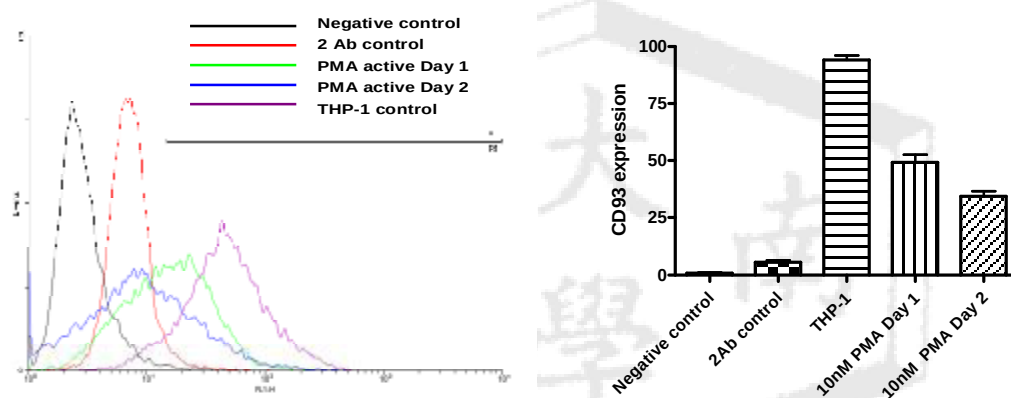
1. Nepomuceno RR, Tenner AJ. C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. J Immunol. 160:1929-35, 1998.
2. Nepomuceno RR, Henschen-Edman AH, Burgess WH, Tenner AJ. cDNA cloning and



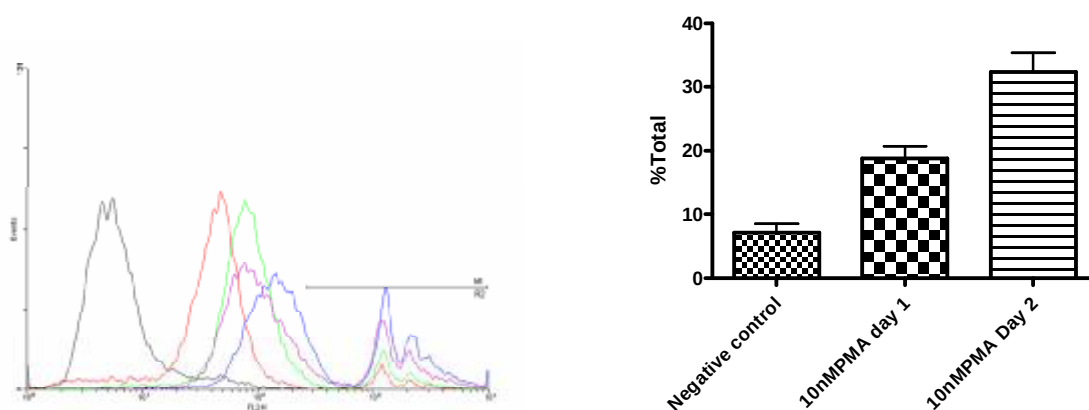
- primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. *Immunity*. 6:119-29, 1997.
3. Park M, Tenner AJ. Cell surface expression of C1qRP/CD93 is stabilized by O-glycosylation. *J Cell Physiol*. 196:512-22, 2003.
  4. Malhotra R, Sim RB. Chemical and hydrodynamic characterization of the human leucocyte receptor for complement subcomponent C1q. *Biochem J*. 262:625-31, 1989.
  5. Guan E, Robinson SL, Goodman EB, Tenner AJ. Cell-surface protein identified on phagocytic cells modulates the C1q-mediated enhancement of phagocytosis. *J Immunol*. 152:4005-16, 1994.
  6. Nepomuceno RR, Ruiz S, Park M, Tenner AJ. C1qRp is a heavily O-glycosylated cell surface protein involved in the regulation of phagocytic activity. *J Immunol*. 162:3583-9, 1999.
  7. Tenner AJ. Membrane receptors for soluble defense collagens. *Curr Opin Immunol*. 11:34-41, 1999.
  8. McGreal EP, Ikewaki N, Akatsu H, Morgan BP, Gasque P. Human C1qRp is identical with CD93 and the mNI-11 antigen but does not bind C1q. *J Immunol*. 168:5222-32, 2002.
  9. Norsworthy PJ, Fossati-Jimack L, Cortes-Hernandez J, Taylor PR, Bygrave AE, Thompson RD, Nourshargh S, Walport MJ, Botto M. Murine CD93 (C1qRp) contributes to the removal of apoptotic cells in vivo but is not required for C1q-mediated enhancement of phagocytosis. *J Immunol*. 172:3406-14, 2004.
  10. Zhang M, Bohlson SS, Dy M, Tenner AJ. Modulated interaction of the ERM protein, moesin, with CD93. *Immunology*. 115:63-73, 2005.
  11. Bohlson SS, Silva R, Fonseca MI, Tenner AJ. CD93 is rapidly shed from the surface of human myeloid cells and the soluble form is detected in human plasma. *J Immunol*. 175:1239-47, 2005.
  12. Dean YD, McGreal EP, Gasque P. Endothelial cells, megakaryoblasts, platelets and alveolar epithelial cells express abundant levels of the mouse AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor involved in homing activities and innate immune host defense. *Eur J Immunol*. 31:1370-81, 2001.
  13. Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb*. 11:88-97, 2004



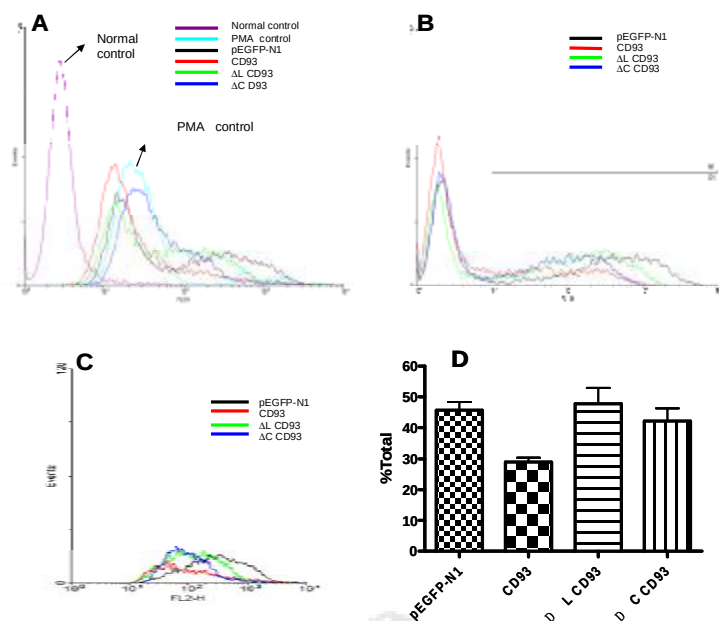
圖一、分別將 CD93、CD93-  $\Delta$ L 及 CD93-  $\Delta$ C 基因構築到螢光蛋白(GFP)表現載體 pEGFP-N1 (A)。以限制酶檢視構築在載體上基因之正確性 (B)。CD93-pEGFPN1 和 CD93 $\Delta$ C-pEGFPN1 以限制酶 EcoR I and BamH I 切割；CD93 $\Delta$ L-pEGFPN1 以限制酶 BamH I and Hind III 切割。



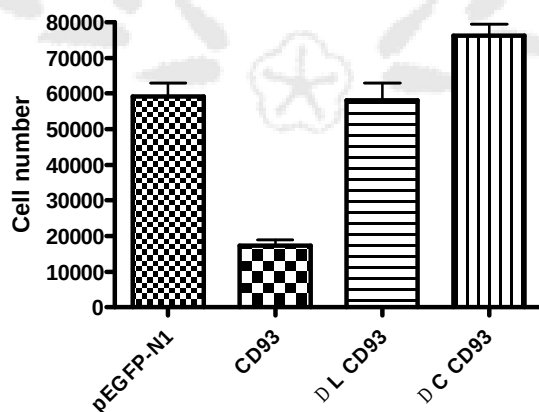
圖二、利用流式細胞分析儀偵測 THP-1 細胞經 PMA 刺激後的人類 CD93 表現。在 Histogram 圖中，定義 THP-1control 與 2Ab control 間約  $10^1$  到  $10^4$  螢光表現為 M1/R1 區域，圈選此區域定義為有表現 CD93 蛋白的細胞，每個組別都偵測  $10^4$  顆細胞 (此為五次實驗中的代表)。



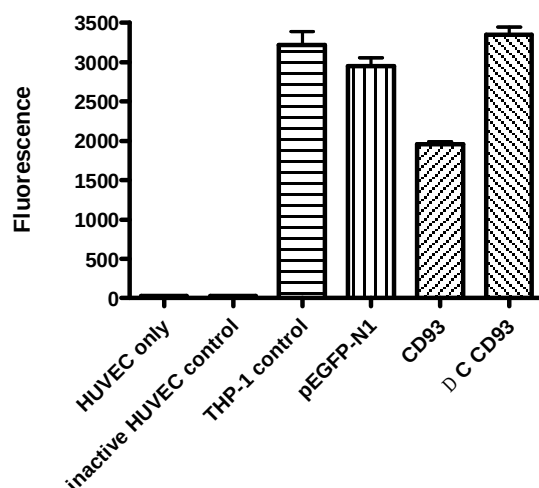
圖三、利用流式細胞分析儀偵測 THP-1 細胞經 PMA 刺激後吞噬乳膠顆粒的百分比 (此為四次實驗中的代表)。在 Histogram 圖中，定義  $2 \times 10^2$  到  $10^4$  螢光表現為 M1/R1 區域，圈選此區域定義為有吞噬乳膠顆粒的細胞。% Total : 有吞噬乳膠顆粒的細胞佔所有偵測細胞的百分比。每個組別都偵測  $10^4$  顆細胞。



圖四、利用流式細胞分析儀偵測轉染 CD93、CD93 $\Delta L$ 、CD93 $\Delta C$  之 THP-1 細胞經 PMA 刺激後吞噬乳膠顆粒的百分比 (此為四次實驗中的代表)。(A) THP-1 細胞吞入的乳膠顆粒螢光表現量 (紅光)。(B) THP-1 細胞轉染入 CD93 不同片段表現螢光表現量 (綠光)。(C) 轉染後 THP-1 細胞有吞入乳膠顆粒的細胞數與螢光表現量。藉由定義 B.圖中  $10^1$  到  $10^4$  的螢光表現區域為轉染陽性區 M1/R1，圈選此區域的細胞偵測其乳膠螢光量，每個組別偵測  $10^4$  顆細胞。(D) 轉染後 THP-1 細胞有吞噬乳膠顆粒的細胞數百分比。將圈選出的 C.圖的細胞除以所有偵測細胞，每個組別都偵測  $10^4$  顆細胞。% Total : 有吞噬乳膠顆粒的細胞佔所有偵測細胞的百分比。



圖五、轉染 CD93、CD93 $\Delta L$ 、CD93 $\Delta C$  之 THP-1 細胞經 PMA 刺激後細胞分化黏著的分析圖 (此結果為三次實驗的代表)。



圖六、轉染 CD93、CD93 $\Delta$ C 之 THP-1 細胞黏著於 TNF- $\alpha$  活化的 HUVEC 細胞分析圖 (此為四次實驗中的代表)

#### 計畫成果自評

在本年度的研究計畫中，我們完成了 CD93 基因的選殖，也成功地將全長 CD93，CD93 $\Delta$ L 與 CD93 $\Delta$ C 接至 pEGFP 質體。接著將這三種質體分別轉染至單核球 THP-1 細胞，以研究 CD93 及其不同片段的功能。研究發現，CD93 蛋白在細胞表面的表現與 THP-1 細胞被 PMA 刺激而分化成巨噬細胞呈現負相關。進一步的研究也發現，過度表現 CD93 的 THP-1 細胞較不易被 PMA 刺激分化成巨噬細胞，同時這些表現 CD93 之巨噬細胞的吞噬能力亦下降。這些數據皆顯示 CD93 的表現可能會抑制 THP-1 細胞分化為巨噬細胞及其吞噬作用。我們也以這些表現 CD93 的 THP-1 細胞進行與 HUVEC 的貼附作用，結果呈現 CD93 確會抑制 THP-1 細胞被活化並貼附於血管內皮細胞。所以，在本年度的研究成果，完全達到當初計畫書所提之預期目標。而此研究成果也為 CD93 的功能研究提出新的看法，亦即 CD93 的功能可能不僅止於過去所認為的與 C1q 促進的吞噬作用有關，我們更認為 CD93 的表現與否可能調控單核球細胞受發炎反應的活化及調控後來巨噬細胞的吞噬作用。接下來我們將針對 CD93 如何影響 THP-1 細胞分化的機制上做深入的研究，如果能進一步瞭解 CD93 蛋白是透過何種機制來進行調控，那這部分的研究成果將可發表在不錯的期刊上。

這些研究成果，使我們有更大的思考空間來全面探討 CD93 蛋白質對吞噬作用的影響，而不僅侷限在 CD93 與 C1q 之交互作用的分析。同時，利用調控單核球 THP-1 細胞之 CD93 蛋白表現，亦能對 CD93 作用的機轉做更深入的研究。這將提供我們更多關於 CD93 蛋白功能的資訊，讓我們有更大的機會可以利用這些成果來研發出可改善生理健康功能的相關醫藥應用。

# 行政院國家科學委員會補助國內專家學者出席國際學術會議報告

95 年 9 月 28 日

附件三

|                |                                                                                                      |              |                        |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|------------------------|
| 報告人姓名          | 陳品晟                                                                                                  | 服務機構及職稱      | 嘉南藥理科技大學生物科技系<br>助理教授  |
| 時間<br>會議地點     | 95.9.21~95.9.23<br>中國，蘇州市                                                                            | 本會核定<br>補助文號 | NSC 95-2320-B-041-013- |
| 會議<br>名稱       | (中文) 第 4 屆亞太血栓形成及止血會議<br>(英文) The 4th Asian-Pacific Congress on Thrombosis and Hemostasis            |              |                        |
| 發表<br>論文<br>題目 | (中文) 凝血酶調節素在內皮細胞分佈的特徵描述<br>(英文) Characterization of Thrombomodulin Distribution in Endothelial Cells |              |                        |

報告內容應包括下列各項：

## 一、加會議經過

此次參加之會議為第 4 屆亞太血栓形成及止血會議，於 95 年 9 月 21 日至 95 年 9 月 23 日於中國蘇州市舉行，總共為期 3 天。此會議舉行的場所為蘇州市最正式的國際會議場地-蘇州國際會議中心(Suzhou International Conference Centre)，共有來自包括台灣、中國、日本、韓國、新加坡、澳洲以及美國、歐洲等世界各國超過五百多位之學者及臨床醫師參加，顯示此兩年一次的會議，除了亞太地區各國踴躍參加之外，也相當受到其他地區各國相關研究人員的重視。會議主題包括凝血因子及抑制劑，血纖維形成及分解之相關研究，血液相關疾病，以及血小板，血栓相關疾病與血管生物學等研究。每天早上先有一小時三十分鐘的 Plenary Lecture，介紹各個領域的完整概念與最新進展。接下來分別在 3 個演講廳進行各主題的最新研究成果報告及討論。中午則有三場 Luncheon Seminars，介紹一些針對血液相關疾病的臨床診斷與治療的最新發展狀況。下午則繼續分別在三個場地進行各專精領域的最新研究進展。最後在傍晚有一個半小時的海報展示時段，共約有 200 篇左右的研究成果展示。本人之海報成果於 9 月 21 日展出，編號為 P2-1。

## 二、與會心得

由於血液相關疾病已經成為現代國家影響國民健康相當嚴重的疾病，包括不正常的血栓形成，止血，乃至於血管硬化阻塞等新血管疾病，每年都有許多人因這些疾病而失去生命。因此對於血液及血管相關疾病之研究、預防與治療乃成為全世界共同努力的方向。此次會議乃兩年舉辦一次，主要為邀請亞太地區相關的研究學者專家及臨床醫師等共同參與的大型國際會議。在生物醫學科學快速發展的今天，兩年一度的研討會吸引了世界各地的研究人員及醫療團隊前來發表最新研究成果。因此，在這大會上的確聽到、看到，同時也分享到全世界第一流的學術研究成果，從這些成果可以瞭解到全世界第一流的研究團隊的研究方式，以及如何看待血液及血管疾病的成因。

在這次的會期中，我對幾場的演講留下深刻的印象。在會議第一天的 Plenary Lecture 中，來自日本的 Koji Suzuki 教授發表 serine protease inhibitor (SERPIN) 功能研究的回顧與最新研究進展。他特別針對 Protein C inhibitor (PCI) 這種 SERPIN，深入介紹其對生理功能的影響及可能透過的機轉。PCI 可以抑制 activated protein C (APC) 的作用及抑制 thrombin 與 thrombomodulin 的結合，進而影響抗凝血作用。此外，PCI 也被發現會存在於尿液中，並與 urinary plasminogen activator (uPA) 結合，故又稱為 plasminogen activator inhibitor-3 (PAI-3)。因此，PCI 也可能透過調控 uPA 而影響其他的生理作用，例如癌細胞轉移等。PCI 也能抑制癌細胞轉移因子，血管新生因子等蛋白的作用，而呈現抑制癌細胞轉移及血管新生的作用。PCI 也會抑制 thrombin 活化 hepatocyte growth factor (HGF) activator (HGFA) 的過程，而抑制 HGF 的形成並影響傷口癒合及組織再生。所以，PCI 是個多功能的蛋白質，能調控凝血、發炎作用、腫瘤細胞侵入轉移及血管新生等多種功能。在亞洲各國的研究方面，分別有來自台灣、中國、日本與韓國等國家的學者，發表他們在各自國家針對凝血/溶血相關蛋白所進行的大規模調查研究，包括 antithrombin、protein C 與 protein S 等。並探討不同性別、年齡的族群中這些參數的變化。此外，也探討特定基因突變的機率與相關血管疾病的相關性。除了這些臨床的研究報告，來自台灣成功大學的吳華林教授，在大會中發表在細胞及分子生物學層次對 thrombomodulin 新穎功能的最新研究，吸引許多各國學者的注意，並留下深刻印象。Thrombomodulin (TM) 過去一直被認為在抗凝血作用扮演重要角色，但最近的一些研究發現 TM 還扮演其他角色，包括抑制腫瘤細胞轉移，抗發炎作用等。吳華林教授最近的研究則提出 TM 的 lectin-like domain 可能具有調控細胞間黏附的功能，而重組的 lectin-like domain 蛋白片段，則具有抗發炎的作用。此外，也發現重組的 TM EGF-like domain 蛋白片段具有促進血管新生的作用。這些研究成果顯示 TM 亦是一個多功能的蛋白質，並在細胞內扮演重要的生理角色。最後，關於血液相關疾病的診斷分析與治療，更吸引非常多的臨床醫師和各大藥廠的注意，各種新開發藥物的治療效果報告與評估，更是討論的重點。從這次會議，可以充分瞭解目前全世界對血液相關疾病、血栓形成及止血的議題，以及心血管疾病研究的最新進展，並掌握自己的研究方向該如何調整，研究方法及技術該如何更新，並學習更先進的技術，以提升自己的研究水準。

### 三、建議

對於此種重要的國際會議，應多鼓勵台灣的相關研究團隊及醫療團隊參與，方能瞭解世界一流的研究進展，並思考如何應用於本身的研究，以提高研究成果及水準，並能應用且落實於本土的疾病預防及醫療，促進全體國民的健康。此外，關於最新的臨床偵測方式，應儘快加入研發的行列，讓成果能實際服務所需的民眾。在基礎醫學研究方面，也應該多看看、多學學國外學者專家的研究成果，以提升自己的學術研究水準。對於目前深具潛力的治療藥物，例如 statin，也應積極投入開發，以創造真正的治療效果。

### 四、攜回資料名稱及內容

#### 1. 會議議程

Final Program. The 4<sup>th</sup> Asian-Pacific Congress on Thrombosis and Hemostasis.  
Suzhou, China. Sep 21- 23, 2006.

2. 摘要集

Abstract Book. The 4<sup>th</sup> Asian-Pacific Congress on Thrombosis and Hemostasis.  
Suzhou, China. Sep 21- 23, 2006.

