

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090012

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 探討半乳糖凝集素-4 在腸道沙門氏菌感染中扮演的角色

得獎獎項

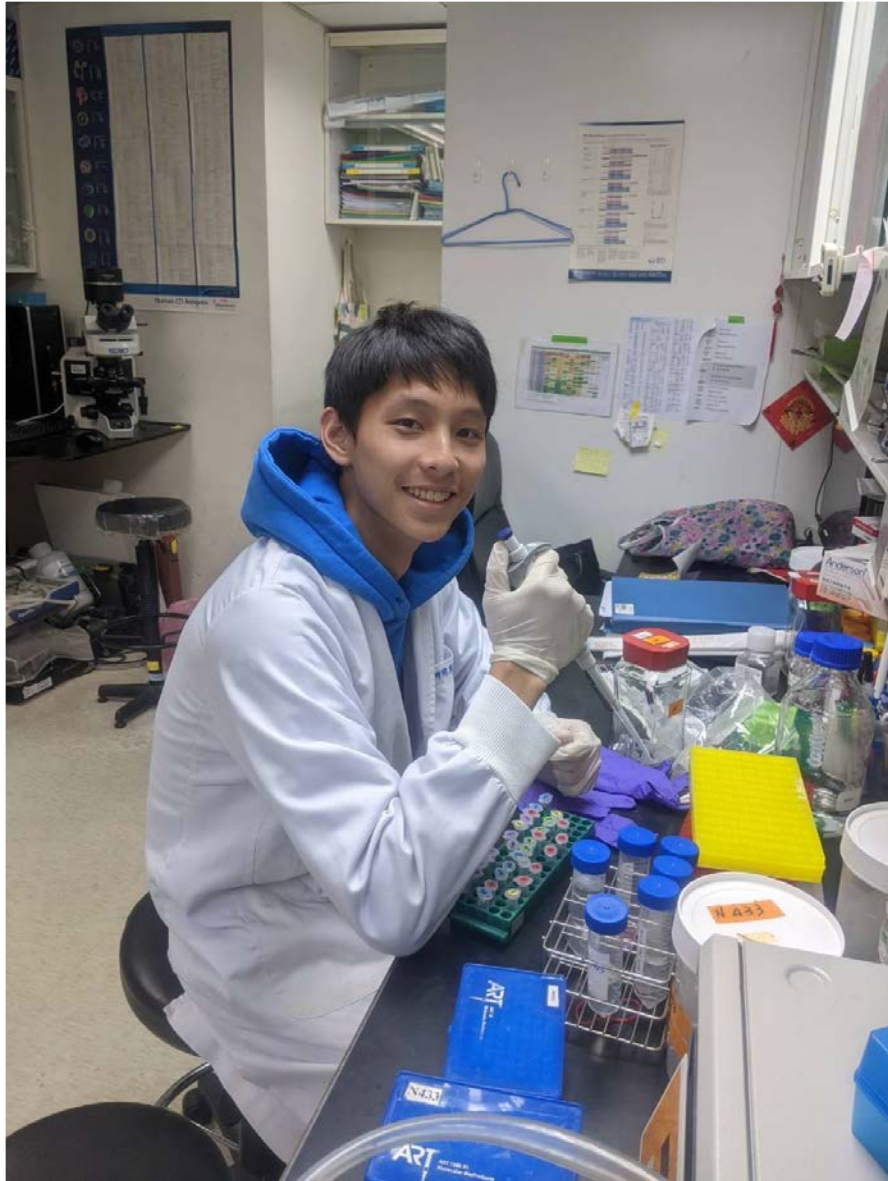
就讀學校 臺北市立建國高級中學

指導教師 劉扶東、周麗芬

作者姓名 楊理硯

關鍵詞 半乳糖凝集素-4(galectin-4)、
腸道沙門氏菌(Salmonella enterica)、
腸道上皮細胞(intestinal epithelial cells)

作者簡介



我是台北市立建國高級中學高二的學生，從小我就對許多科學相關的事物感到好奇，而隨著年紀漸增，學得愈多，我也體悟到「The more you know, the more you don' t know」這句話的涵義，科學總是充滿未知，但也是因為如此才會令人深深著迷。透過這次的科展經驗，我也從過程中學習到許多學校不會教的知識，也接觸到了以往沒接處過的科學領域，十分謝謝劉福東老師實驗室裡每位學長姐的教導，校內指導老師周麗芬老師以及每位幫助我的人，讓我在這過程中受益良多。

摘要

此研究旨在探討當腸道沙門氏菌感染人類腸道上皮細胞 (HT-29) 時半乳糖凝集素-4 (galectin-4) 所扮演的角色。我們用野生型 (wild-type) 以及半乳糖凝集素-4 剔除 (galectin-4 knockout) 的 HT-29 細胞進行沙門氏菌感染。我們首先經由 CFU 計數探討 galectin-4 對細胞內細菌量的影響，並檢測細胞釋出的 LDH 及 IL-18 和 mature caspase-1 的量，以此研究 galectin-4 是否會活化發炎體 (inflammasome)。

結果發現， wild type HT-29 cells 相較 galectin-4 knockout cells 有較少的活細菌，釋出的 LDH, IL-18 也較少。但在經過 wortmannin (一種自噬抑制劑) treatment 後， wildtype HT-29 cells 釋出較多的 LDH, IL-18, 並且也釋出了 mature caspase-1。這些研究結果顯示 galectin-4 能夠降低細胞內活細菌的量，且能夠活化 inflammasome。

Abstract

In this research, we investigated the role of galectin-4, an intracellular glycan-binding protein, in intestinal epithelial cells (HT-29 cells) when infected by *Salmonella enterica*. We studied the effect of galectin-4 on the bacterial number inside the cells by CFU, and the ability of galectin-4 to activate inflammasome through analyzing the amount of LDH, IL-18, and mature caspase-1 released out of the cell. Results have shown that wild-type cells contained fewer live bacteria and also released less LDH and IL-18 than galectin-4 knockout cells. However, when treated with autophagy inhibitor (wortmannin), wild-type cells released more LDH and IL-18 than galectin-4 knockout cells. In addition, wild-type cells treated with wortmannin secrete more mature caspase-1, which indicates the activation of inflammasome. These results suggest that galectin-4 decreases the amount of live intracellular bacteria and participates in activating inflammasome.

壹、前言 (含研究動機、目的)

一、研究動機

腸胃道在人體中極為重要，裡面有複雜的腸道神經系統 (**enteric nervous system, ENS**) 以及龐大的腸道菌叢，因此又被稱為是「人體的第二個大腦」。腸胃道疾病十分常見，常見的症狀有腹瀉，潰瘍，發炎等，而不斷的發炎亦可能增加癌症發生的機率。腸胃道疾病的一大成因是微生物感染，其中腸道沙門氏菌 (*Salmonella enterica*) 的感染是典型的例子之一。

近年來，有許多文獻指出半乳糖凝集素 (**galectin**) 在沙門氏菌入侵宿主時會以各種途徑對細菌和細胞造成影響。其中 **galectin-8** 會誘導腸道細胞自噬作用 (**autophagy**)，**galectin-3** 可誘導細胞激素增加來造成受感染動物內毒素休克。 (Thurston et al., 2012; Li et al., 2008)

由於 **galectin-4** 在人類的腸道上皮細胞中有著高度表現，對於 **galectin** 家族中的 **galectin-4** 在腸道內面對沙門氏菌感染過程中所扮演的角色目前還未有相關研究，因此本研究將探究 **galectin-4** 是否參與腸道感染的機轉。

二、研究背景

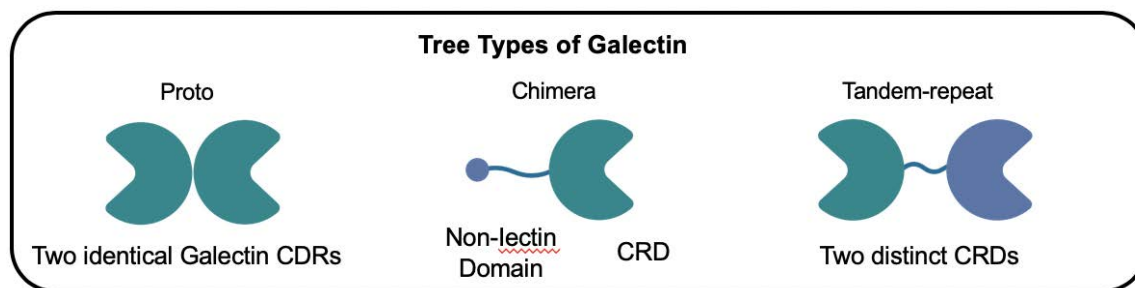
(一) 半乳糖凝集素 (**galectin**)

人體中共有 12 種半乳糖凝集素 (**galectin**)，其中可以分為三大類，原型 (**prototype**)，嵌合型 (**chimeric**)，以及串連重複型 (**tandem-repeat type**)。Prototype **galectin** 由兩個相同蛋白質組成二聚體 (**dimer**)，兩端各有一個碳水化合物識別區 (**carbohydrate recognition domain, CRD**)。Chimeric **galectin** 由一個 CRD，以及一個 N terminal domain 組成。Tandem-repeat **galectin** 則是由單一多肽鏈在 N 端和 C 端摺疊成兩個 CRD，中間由一段 **small peptide domain** 連接。**Galectin-4** 是屬於 tandem-repeat **galectin**，它兩端的 CRD 能夠連接兩個相異的配體 (**ligand**)，

因此可以藉由蛋白質、聚糖的相互作用 (**protein-glycan interaction**) 調控許多不同的生理反應 (Cao et al., 2016)。

半乳糖凝集素在演化上被高度保存下來並在調控細胞功能及人類健康上扮演重要角色。前人研究發現，許多細菌在進入宿主細胞後會破壞 **PCV (pathogen containing vacuole)** 的完整性，而 **galectin-8** 能夠偵測到受損 **vacuole** 內部膜上的 **glycan**，並且與之結合。接著 **galectin-8** 會與 **autophagy** 的上游蛋白 **NDP52** 結合，再由 **NDP52** 與 **autophagosome** 上的 **LC3** 結合，入侵的細菌會被細胞的自噬作用 (**autophagy**) 所摧毀 (Thurston et al., 2012)。另一篇文獻則指出，**galectin-3** 會防止小鼠在受到沙門氏菌感染時發生內毒素休克 (**endotoxic shock**)。有 **galectin-3** 的小鼠相較缺乏 **galectin-3** 的小鼠表現出較少的細胞激素 (**IL-12, IL-6**)，且透過和細菌表面的脂多醣 (**Lipopolysaccharide, LPS**) 作用，**galectin-3** 也會阻礙信號向下游的類鐸受體 (**Toll-like receptors, TLR**) 傳遞，因此缺乏 **galectin-3** 的小鼠較容易產生脂多醣誘發的內毒素休克 (**endotoxic shock**) (Li et al., 2008)。這兩個研究都指向 **galectin** 可能導致自噬作用。除此之外，**galectin-3** 也被發現會促進 **inflammasome** 的活化 (Lo et al., 2021)。微生物表面的 **LPS** 會刺激 **caspase4** 和 **11** 的聚集，形成 **inflammasome** 後促使 **pyroptosis** 發生，**galectin-3** 能夠使 **caspase4** 和 **11** 的活化和聚集的現象更明顯，提升 **inflammasome** 活化的情形，**Inflammasome** 的活化增加也代表著 **pyroptosis** 發生情形增

加。



Galectin 種類

Galectin 分為 **prototype**，**chimera**，以及 **tandem-repeat** 三種種類。**Galectin-4** 屬於 **tandem-repeat type**。

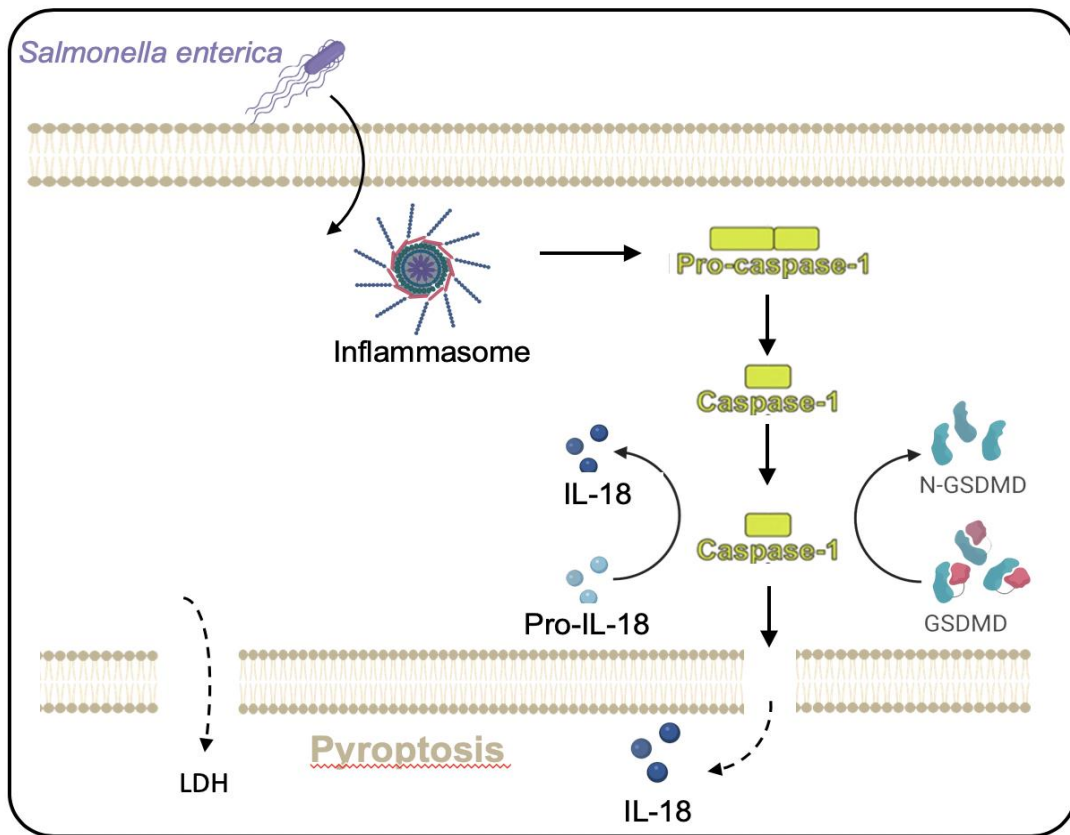
(二) 沙門氏菌與感染變化

腸道沙門氏菌 (*Salmonella enterica*, *S. enterica*) 是一種格蘭氏陰性菌 (gram-negative bacteria) , 外膜的成分具有脂多醣 (lipopolysaccharide) 。它通常經由人們食入被污染的食物而感染消化道, 常見的症狀有發燒, 腹瀉以及腹痛。腸道沙門氏菌 (本篇中簡稱沙菌) 需經由腸道上皮細胞 (intestinal epithelium) 才能進入細胞內。沙門氏菌入侵宿主的場所主要位於腸道上皮細胞 (epithelial cell) , 因此腸道上皮細胞是宿主組織和病原體間極為重要的一道防護。 *Salmonella enterica* 感染宿主細胞的第一步是先破壞細胞骨架來改變細胞膜的型態。依照沙門氏菌改變細胞膜型態的方式又能分成 **trigger** 和 **zipper** 兩種機制。兩者的差別在於 **trigger** 機制是指細菌藉由在宿主細胞內注入效應分子 (effector) , 從內部調控細胞膜的形狀, 而 **zipper** 機制是指細菌由外活化宿主細胞的受體 (receptor) 來調控細胞膜型態。藉著細胞膜的變形, *S. enterica* 得以進入宿主細胞並且在細胞內形成病原液胞 (pathogen containing vacuole, PCV) (Velge et al., 2012) 。進入細胞後, *S. enterica* 會完全或是部分的破壞 PCV 的完整性, 以此增加其複製的效率 (Brumell et al., 2002) 。

(三) 發炎體 (inflammasome)

先天免疫系統 (innate immune system) 以辨識病原相關分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 來區分「外來」和「自己」。而辨識 PAMPs 的受體包含位於膜上的類鐸受體 (TLRs) 和細胞植中的類短鏈核苷酸結合及聚合區塊受體 (NLRs) 。NLR 上通常包含 N 端, 負責自我聚合的核苷酸結合寡聚域 (nucleotide-binding oligomerization [NOD] domain) , 以及富亮氨酸重複 (leucine-rich repeat) 的 C 端。N 端包含些和下游信號傳遞極為相關的單元 (modules) , 像是 caspase 募集結構域 (caspase recruitment domain [CARD]) , pyrin 結構域 (pyrin domain [PYD]) , 或是凋亡域抑製劑 (baculovirus inhibitor repeat [BIR]) 。這些單元藉由集結轉接分子 (adaptors molecule) 和效應分

子 (effector molecule) 來傳遞細胞信號。接著透過諸如 CARD-CARD 或 PYD-PYD 的蛋白質間相互作用 (protein-protein interactions)，這些蛋白質會組成一個巨大的複合體，成為將胱天蛋白酶-1 (caspase-1) 活化的平台，此複合體亦被稱為發炎體 (inflammasome)。活化的胱天蛋白酶-1 (caspase-1) 會接著切割其他像是 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 的蛋白質，使它們為成熟型態的 IL-1 β 和 IL-18。IL-1 β 和 IL-18 會再開啟其他的免疫反應，像是吸引免疫細胞以及釋出干擾素 (Franchi et al., 2009)。



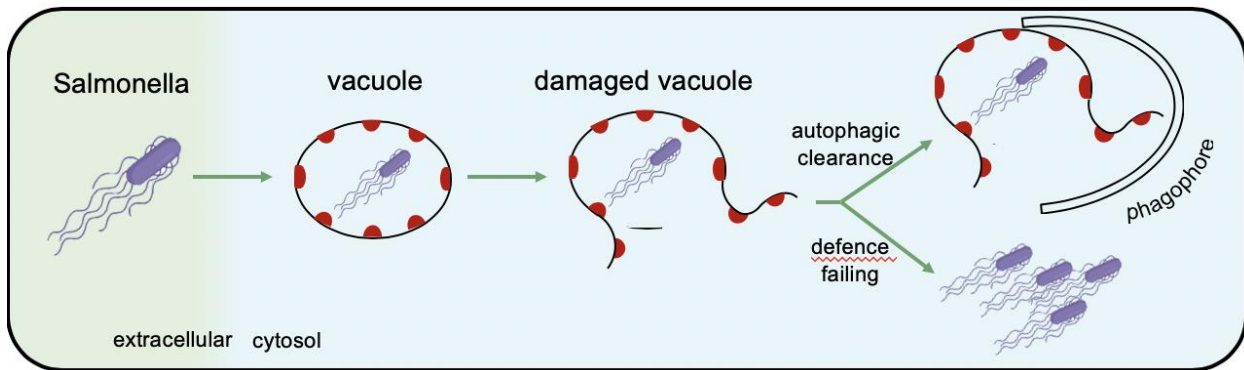
Inflammasome 活化過程圖

細菌表面的分子會與細胞中的受體結合，促進 inflammasome 的活化，inflammasome 會將 pro-caspase-1 切割成 caspase-1，由 caspase-1 活化 pro-IL-18 和 GSDMD，使細胞進行 pyroptosis。

(四) 細胞自噬作用

細胞自噬是細胞分解胞內的蛋白質，胞器以維持細胞生長、恆定的一種機制。細胞在飢餓、受到輻射，或受到氧化壓力時都有可能誘發自噬作用

的發生。然而，近期的研究發現，在受到病原體的入侵時，細胞也會開啟自噬作用。當細菌從 PCV 露出時，細胞內的泛素 (ubiquitin) 會標記細菌，以此為中心，再與其他受體如 p62 和 NDP52 結合。同時，細胞中的一種雙層膜構造 (phagophore) 上的類泛素蛋白 (LC3) 會再和這些受體結合，形成自噬小體 (autophagosome)。自噬小體會與溶體 (lysosome) 結合，形成自噬溶酶體 (autolysosome)，並分解細菌 (Frontiers et al., 2018)。



細胞自噬機轉流程圖。

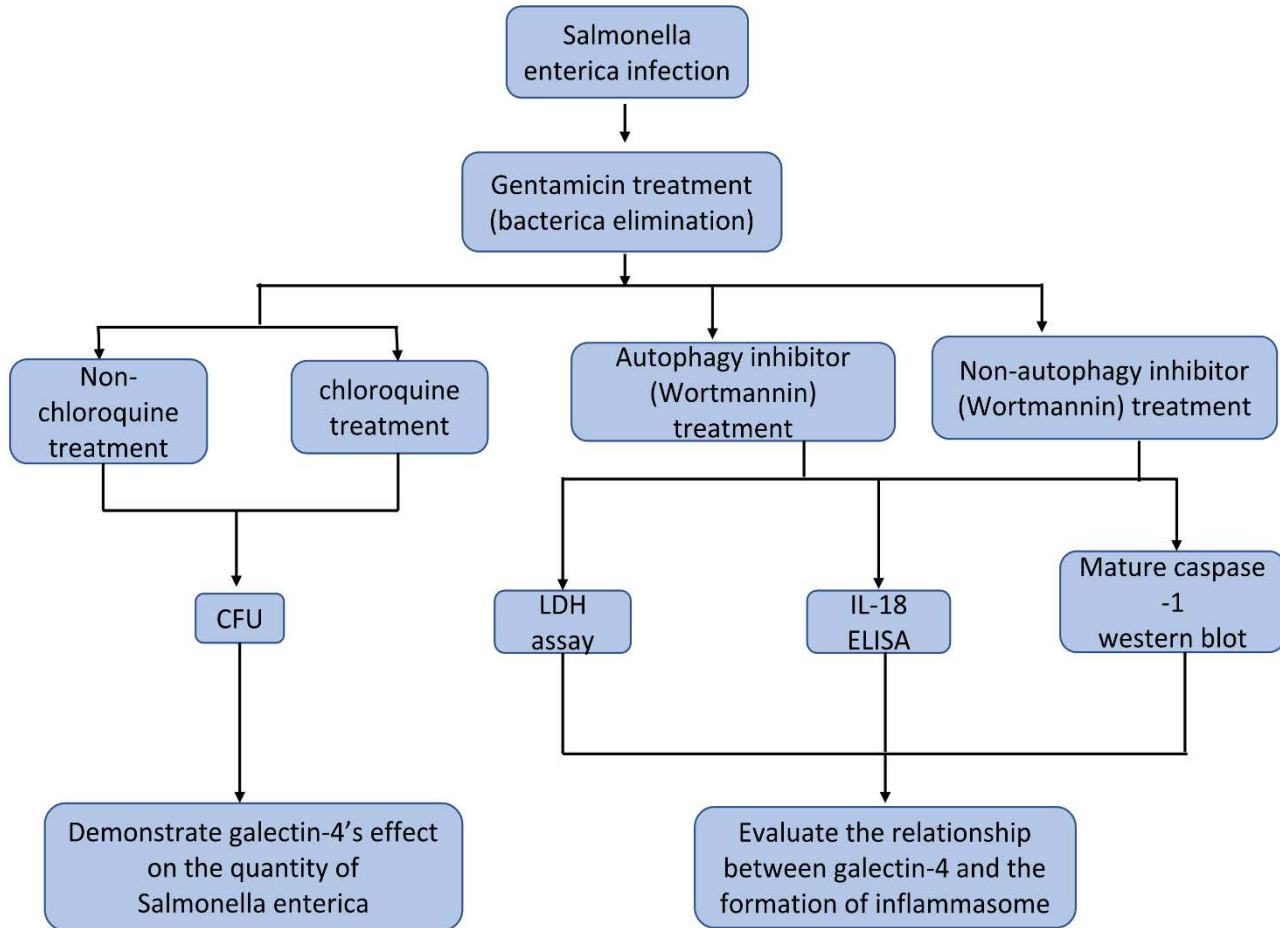
在沙門氏菌劑進入細胞後，細菌會形成 **salmonella containing vacuole (SCV)**。而在細菌從 **SCV** 逃脫後，細胞會啟動自噬作用把細菌清除。

(五) 細胞焦亡 (Pyroptosis)

細胞的死亡途徑分為多種，當細胞受到微生物感染時，細胞會啟動程序性的死亡 (Programmed cell death, Apoptosis)，特別因微生物感染而引起的細胞死亡又被稱為細胞焦亡 (pyroptosis)。細胞遭受細菌感染後，會形成發炎體 (Inflammasome)，被活化的 caspase-1 會切割並活化稱為 **gasdermin D (GSDMD)** 的蛋白質。GSDMD 會在細胞膜上穿孔，使細胞內的物質如乳酸脫氫酶 (Lactic dehydrogenase, LDH) 則會流出，此過程稱為 **Pyroptosis**。LDH 是一種存在於細胞質中的酵素，當細胞膜的完整性受到破壞時，便會被釋放出。焦亡最終細胞會破裂，並且釋出促炎性細胞因子 (proinflammatory cytokine) 來刺激更多的免疫反應的發生 (Bergsbaken et al., 2009)。

貳、研究方法或過程

一、實驗流程圖



二、研究藥品與設備

REAGENT	SOURCE
Experimental models: Cell lines	
HT-29 wild-type	Laboratory of Dr. Fu-Tong Liu
HT-29 galectin-4 knockout	Laboratory of Dr. Fu-Tong Liu
Bacterial strains	
<i>Salmonella enterica</i> worthington	BCRC 15574

<i>Salmonella enterica typhimurium</i>	Laboratory of Dr. Jr-Wen Shui
Chemicals	
DMEM 配養液 (DMEM 10% FBS 1% HEPES, 1% non-essential amino acid, 1% Penicillin/ Streptomycin)	Gibco
PBS (Phosphate buffered saline)	Gibco
Trypsin	Gibco
Opti-MEM	Gibco
wortmannin	Sigma cat#W3144
gentamicin	Carbosynth cat#AG29671
chloroquine	Sigma cat#C6628
RIPA buffer (RIPA 2x)	Omics Bio cat#RB4475
Protease inhibitor cocktail	MCE cat#HY-K0010P
Western HRP substrate	Millipore cat#WBLUR0500
Critical commercial assays	
Cytotoxicity LDH assay kit-WST	Dojindo cat#CK12
IL-18 ELISA kit	Invitrogen cat#BMS267-2MST
Pierce BCA protein assay kit	Thermo cat#23225
Antibodies	
Rabbit anti-human galectin-4 antibody	GeneTex cat#90264, customized
Rabbit anti-LC3 antibody	MBL cat#PM036
Rabbit anti-tubulin	Proteintech cat#11224-I-AP
Mouse anti-caspase-1 antibody	Santa Cruz cat#SC-56036
Software	
GraphPad Prism v.8	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/

三、細胞繼代培養

本實驗所使用的細胞株是人類大腸癌細胞株 (HT-29) , 用 DMEM 培養基培養, 放置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱中培養。依細胞生長狀況平均 3 天左右需要更換一次培養基或進行繼代培養。繼代培養時首先將細胞盤從 37°C, 5% CO₂ 的培養箱取出, 將盤中的培養液吸出, 在加入 PBS 把殘餘的培養液清洗掉。接著加入 2-3 ml 的胰蛋白酶 (trypsin) , 並搖晃使 trypsin 均勻覆蓋盤面後, 將盤放回 37°C, 5% CO₂ 的培養箱中 10 分鐘, 使 trypsin 能充分活化並切割細胞間的連結。接著加入 3 ml 的 DMEM 配養液, 抑制 trypsin 的作用, 將溶液倒入離心管中離心 (350 g, 5 min) 。再來移除上清液, 加入 5 ml PBS 清洗細胞, 再離心 (350 g, 5 min) , 接著加入 10ml 的 DMEM 配養液。另取一個新的 96 盤, 取出 20 μ l 的細胞溶液和 20 μ l 的 trypan blue solution 加入孔中 (96 孔盤) , 並且讀取其中的細胞數量。根據此濃度, 將溶液稀釋成下一步驟中的目標濃度, 剩餘的溶液取出一定的量, 加入新的培養盤, 完成繼代。

四、*Salmonella enterica* 感染 HT-29 cells 前置作業

(一) cell culture

從管中取出細胞溶液, 加至 6 孔盤, 24 孔盤, 96 孔盤中, 且同盤之每孔中的細胞數量需相同。在 6 孔盤中每孔加入 2×10^6 , 24 孔盤中每孔加入 5×10^5 , 96 孔盤中每孔加入 1×10^5 個細胞, 並且每盤一半的孔中加入 galectin-4 WT, 另一半加入 galectin-4 基因剔除的細胞株 (gene knock-out, 縮寫為 KO) 細胞。

(二) bacteria culture

感染前 15 小時, 從 -80°C 中取出少量 *Salmonella enterica* 放入 2 毫升的 LB 培養液, 放置於 37°C 的培養箱中並以 200 RPM 的搖晃速率培養。感染前 3 小時, 將菌液以 LB 培養液稀釋 20 倍, 放回 37°C 的培養箱搖晃培養。

(三) 感染複數 (multiplicity of infection, MOI) 測量

取出感染前三小時重新培養的細菌，以 **14500 g, 10 min** 離心，用 **PBS** 清洗後再次離心。吸出上清液，將沈澱在下方的菌回溶在 **Opti-MEM** 中，取出 **800 μ l** 加入 **cuvette** 中，以 **Opti-MEM** 為背景值，測量菌液的吸光值。將得出的數值乘上常數 **8.8×10^8** 便可以得到約略的細菌濃度 (菌數/毫升)，再根據此濃度計算各個 **well** 需多少體積的菌液才符合各自所需細菌量。

五、CFU

(一) 感染細胞

此實驗的目的為在相同感染程度下，比較 **galectin-4 KO** 或 **WT cells** 以及 **vacuole** 內的細菌被清除後細胞中細菌的存活量。將盤中的 **medium** 吸出，以 **MOI=50** 感染 **24** 孔盤中的 **HT-29 cell**，使得此 **24** 孔盤中有 **$5 \times 10^5 \times 50$** 個細菌，最後再以 **Opti-MEM** 將各 **well** 體積加至 **1 ml**。

(二) 感染後一小時

將盤中的 **medium** 吸出，在所有 **well** 中加入 **100 μ g/ml** 的 **gentamicin**，最後再以 **DMEM** 培養液將各 **well** 體積加至 **1 ml**。

(三) 感染後一個半小時

將盤中的 **medium** 吸出，在所有 **well** 中加入濃度較低的 **10 μ g/ml** **gentamicin**，最後再以 **DMEM** 培養液將各 **well** 體積加至 **1 ml**。

(四) 裂解細胞前一小時進行 **chloroquine treatment**

將 **24** 孔盤中溶液替換成 **DMEM** 配養液，在半數的 **well** 中加入 **chloroquine 200 μ g/ml** 及 **10 μ g/ml** **gentamicin** 的 **DMEM** 培養液。

(五) 裂解細胞

在 24 孔盤中的每個 well 加入 1 ml 的十倍稀釋 lysis buffer (1% Triton-100+0.2% Tween20 in PBS) , 此步驟目的在於破壞細胞完整性, 將胞內的細菌釋放出來。

(六) 細胞溶液稀釋

將 24 孔盤中各個孔中含有細胞殘骸的 lysis buffer 各自收集至 1.5 ml 的微型離心管。接著從 1 ml 的溶液中吸出 100 μ l 加入含有 900 μ l PBS 的微型離心管, 形成原液的十倍稀釋。再從此管中吸出 100 μ l 加入另一個有 900 μ l PBS 的微型離心管, 形成原液的一百倍稀釋。此連續稀釋的步驟目的在於使 CFU 塗盤時的細菌量不會太多導致計算失準, 影響實驗準確度。

(七) 製作 LB-Agar 培養基

培養基中的 agar 和 LB broth 濃度為分別 15 g/L 和 25 g/L, 再加入二次水 (ddH₂O) 調整至適當體積, 最後再將裝有培養基的血清瓶高溫滅菌。取 48 個直徑十公分的培養皿, 在每盤中加入 20 ml 滅菌過的培養基溶液, 並將培養皿靜置等待培養基凝固。

(八) 細菌溶液塗盤

將培養皿標示上組別, 並且在每個培養皿中加入 5-6 個滅菌後的小鋼珠。從先前收集的十倍、一百倍稀釋的細胞溶液中抽取 100 μ l 加入培養皿中, 再沿著前後、左右的方向搖晃培養皿, 使含有細菌的溶液被鋼珠均勻的搖開。將菌液搖開後, 倒出其中的鋼珠, 並將培養皿倒置, 放回 37°C 的培養箱。隔日即可計算每盤之菌落數, 並根據稀釋濃度回推原本細菌數。

六、西方點墨法 (Western blot)

(一) 感染前一小時進行 wortmannin pre-treat

將需要進行 wortmannin treatment 的 well 內的 medium 替換成含有 500 nM 的 wortmannin 的 DMEM 培養液。

(二) 感染細胞

此實驗的目的為比較 **galectin-4 KO** 或 **WT cells** 在受到感染以及相同 **cell line** 比較下有感染和沒感染時的細胞內蛋白質的表現。先將盤中的 **medium** 吸出，再以 **MOI=50** 感染 6 孔盤中的 **HT-29** 細胞，使 6 孔盤每個 **well** 有 $2 \times 10^6 \times 50$ 個細菌。而 **pre-treat** 時有加入 **wortmannin** 的 **well** 在此步驟也需再加入 **500 nM wortmannin**，最後再以 **Opti-MEM** 將各 **well** 體積加至 **2 ml**。

(三) 感染後一小時

將盤中的 **medium** 吸出，在所有 **well** 中加入 **100 $\mu\text{g/ml}$** 的 **gentamicin** 和 **pre-treat** 時有加入 **wortmannin** 的 **well** 中加入 **500 nM wortmannin**，最後再以 **DMEM** 培養液將各 **well** 體積加至 **1 ml**。

(四) 感染後一個半小時

將盤中的 **medium** 吸出，在所有 **well** 中加入 **10 $\mu\text{g/ml}$** **gentamicin** 和 **pre-treat** 時有加入 **wortmannin** 的 **well** 中加入 **500 nM wortmannin**，最後再以 **DMEM** 培養液將各 **well** 體積加至 **1 ml**。

(五) 裂解細胞

在 6 孔盤中每個 **well** 中加入 **200 μl** 的 **RIPA buffer**，此步驟目的在於破壞細胞完整性，使接下來的步驟中能偵測到細胞裡的各種蛋白質。

(六) 離心

收集兩個六孔盤（分別為有無 **galectin-4** 存在於細胞中）中每孔的 **RIPA buffer-細胞混合液** 至 **1.5 ml** 的離心管中。將 3 離心機的設定調為 **4°C, 14500 g** 後，離心各管 **10 分鐘**。接著把上清液抽出，收集至另一離心管。此時 **12 個** 樣本需存放於 **4°C** 下。

(七) 蛋白定量方法 (**bicinchoninic acid, BCA**)

此步驟目的為定量樣本中的蛋白質。在 96 孔盤中加入 **10 μl** 的 **10 倍** 稀釋樣本，每個樣本二重複，再來加入已知濃度的 **standard**，同樣也是二重複。最後在每孔加入 **200 μl** 的呈色劑 (**A:B=50:1**)。將盤放置在 **37°C** 中

半小時後，便可以讀取盤中各孔在受到波長 **562 nm** 的光照射時的吸光值。藉由已知濃度的 **standard**，我們能夠知道所得數值和真實蛋白質濃度間的關聯，並且用電腦繪出 **standard curve** 和得到兩者間的公式。接著，可以由公式回推各樣本的濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)，並算出進行電泳時每個樣本需要稀釋多少才能含有相同量的蛋白質。

(八) 蛋白質定量、變性 (denature)

操作過程中需將樣本放於冰上，避免蛋白質降解 (**degrade**)。每個樣品注入槽需要 **30 μg** 的蛋白質，電泳樣本中需加入 **protein sample dye**，再以 **PBS** 將樣本體積調整至 **30 μl** 。最後再將樣本以 **95°C** 加熱 **5 分鐘** 使蛋白質變性 (**denature**)。

(九) 配置凝膠電泳

實驗使用的凝膠為十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (**sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE**)。因為 **SDS** 會破壞蛋白質的二、三級結構，並且去除各蛋白質的電性和電量差異，因此蛋白質的分離僅根據蛋白質的分子量。先配置 **12%** 的下膠 (**stacking gel**)，一片凝膠需加入 **7.5 ml** 的下膠溶液，下膠在靜置約半小時後就會凝固，接著再配置上膠。每片凝膠需加入 **2.5 ml** 的上膠溶液，並且在上膠凝固前放入齒梳，使上膠靜置一小時後凝固，形成樣本槽。

(十) 進行 SDS-PAGE

將膠放入電泳槽內，並倒入 **running buffer**。以吸量管 (**pipette**) 把樣本注入膠體的樣品槽 (**well**)，取 **5 μl** 的 **protein marker** 加入樣品槽，以作為蛋白質大小的判斷依據。連接電源插頭，將電壓設定為 **100 volt**，此時蛋白質會因為 **SDS** 的關係而表面帶有均勻的負電，從負極移向正極。當最小 **size** 的 **marker** 移動到膠底部時即可停止電泳。

(十一) 轉印 transfer

因為膠體本身較為脆弱，所以此步驟將膠體上的蛋白質轉印到另一個較為堅固的膜上。**PVDF (polyvinylidene-Fluoride)** 膜使用前須先

將其浸泡在甲醇 (**Methanol**) 中，以活化膜表面的正電基團，以吸附蛋白質。將濾紙、膠體和膜浸在緩衝液中，放入卡夾中，且膜需要在靠近正極一側，如此一來蛋白質才會成功轉印到膜上。最後以 **100 volt** 進行轉印，時間一個半小時，且過程中要將轉印箱置於冰上以避免緩衝液因為電阻的關係而溫度上升。

(十二) **blocking**

膜上有許多空間未轉印到凝膠的蛋白質，因此在接上與樣本蛋白質有專一性的抗體時，同為蛋白質的抗體可能會吸附於膜上，造成背景值增加，因此須先將這些空間封住 (**blocking**)。在 **PBST** 中加入 **2%** 的無脂奶粉，以奶粉中的蛋白質吸附於膜上，使接下來的步驟中抗體只會與樣本蛋白質發生專一性結合。

(十三) 接上一級抗體 (**primary antibody**)

一級抗體的用途是偵測目標蛋白質。加入抗體溶液後，需將抗體置於 **4°C** 下過夜，且緩慢搖晃使溶液與整張膜均勻反應。

(十四) 接上二級抗體 (**secondary antibody**)

二級抗體的用途是與一抗結合，並且因為其帶有 **HRP**，之後可以呈色因此能夠作為將目標蛋白質做相對定量的依據。在加入二級抗體前，需先將前一步驟中的一抗回收，再以 **PBST** 清洗三次。接著以 **20000** 倍稀釋二抗，並且在室溫下緩慢搖晃一小時，使二抗溶液與膜均勻的反應。

(十五) 目標蛋白質量測定

將二抗溶液倒出，以 **PBST** 清洗膜。接著在吸出 **1ml** 的 **ECL western Substrate** 均勻的滴在膜上，使 **substrate** 與二抗上的酵素反應並呈色，再用儀器偵測各個 **band** 發散出的光後照相，由照片顏色的深淺能夠知道各個樣本間 **target protein** 的相對多寡。

七、**LDH assay** (乳酸脫氫酶, **Lactic dehydrogenase**)

(一) 感染前一小時進行 **wortmannin pre-treat**

將需要進行 **wortmannin treatment** 的 **well** 內的 **medium** 替換成含有 **500 nM** 的 **wortmannin** 的 **DMEM** 配養液。

(二) 感染細胞

此實驗的目的為比較 **galectin-4 KO** 或 **WT cells** 在受到感染以及比較相同 **cell line** 有感染和沒感染時的細胞死亡情形。先將 **96** 孔盤中的 **medium** 吸出，再以 **MOI=50**、**MOI=100**、**MOI=300** 感染 **96** 孔盤中的細胞，使 **96** 孔盤中的細菌數有 **1x10⁵x50**，**1x10⁵x100**，**1x10⁵x300** 三種。而 **pre-treat** 時有加入 **wortmannin** 的 **well** 中在此步驟也需再加入 **500nM wortmannin**，最後再以 **Opti-MEM** 將各 **well** 體積加至 **100ul**。

(三) 感染後一小時

將盤中的 **medium** 吸出，在所有 **well** 中加入 **100 µg/ml** 的 **gentamicin** 和 **pre-treat** 時有加入 **wortmannin** 的 **well** 中加入 **500 nM wortmannin**，最後再以 **DMEM** 培養液將各 **well** 體積加至 **100 µl**。

(四) 感染後一個半小時

將盤中的 **medium** 吸出，在所有 **well** 中加入 **10 µg/ml** **gentamicin** 和 **pre-treat** 時有加入 **wortmannin** 的 **well** 中加入 **500 nM wortmannin**，最後再以 **DMEM** 培養液將各 **well** 體積加至 **100 µl**。

(五) 分析 **LDH** 釋出的比例

Pyroptosis 時，**LDH** 會被釋放至細胞培養液，將 **lactose** (乳酸) 氧化成 **pyruvate** (丙酮酸)，**NAD⁺** 還原成 **NADH**。經過酵素作用後，**NADH** 會氧化回 **NAD⁺**，而 **NADH** 釋出的 **H⁺** 則會與 **tetrazolium salt** 化合，形成紅色 **Formazan** (甲臈)，再以波長 **490 nm** 的光就能讀取各樣本呈色的強弱，同時得知各樣本細胞死亡的比例。首先，取部分孔作為正控制 (**positive control**)，而沒受到感染的細胞為負控制 (**negative control**)。作為正控制的孔中加 **20 µl** 的 **lysis buffer** 將細胞裂解，使細胞中所有的 **LDH** 被釋放至溶液中。從原塑膠孔盤中每孔取出 **100 µl** 加入

另一個塑膠孔盤，每個孔再加入 **working solution 100 μ l**，並且在室溫避光處靜置 **30 分鐘**。每孔加入 **50 μ l stop solution** 呈色反應，讀取盤中各孔的吸光值，接著根據 **(樣本的吸光值 - 負控制) / (正控制 - 負控制) *100** 便可以得到各細胞在不同感染程度時釋出的 **LDH** 比例。

八、IL-18 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

(一) 感染前一小時進行 **wortmannin pre-treat**

將需要進行 **wortmannin treatment** 的 **well** 內的 **medium** 替換成含有 **500nM** 的 **wortmannin** 的 **DMEM** 配養液。

(二) 感染細胞

此實驗的目的為比較 **gal4 KO** 或 **WT cells** 在受到感染以及比較相同 **cell line** 有感染和沒感染時的細胞死亡情形。先將 **96** 孔盤中的 **medium** 吸出，再以 **MOI=50**、**MOI=100**、**MOI=300** 感染 **96** 孔盤中的 **HT-29** 細胞，使 **96** 孔盤中的細菌數有 **$1 \times 10^5 \times 50$** ， **$1 \times 10^5 \times 100$** ， **$1 \times 10^5 \times 300$** 三種。而 **pre-treat** 時有加入 **wortmannin** 的 **well** 中在此步驟也需再加入 **500nM wortmannin**，最後再以 **Opti-MEM** 將各 **well** 體積加至 **100 μ l**。

(三) 感染後一小時

將盤中的 **medium** 吸出，在所有 **well** 中加入 **100 μ g/ml** 的 **gentamicin** 和 **pre-treat** 時有加入 **wortmannin** 的 **well** 中加入 **500 nM wortmannin**，最後再以 **DMEM** 培養液將各 **well** 體積加至 **100 μ l**。

(四) 感染後一個半小時

將盤中的 **medium** 吸出，在所有 **well** 中加入 **10 μ g/ml** **gentamicin** 和 **pre-treat** 時有加入 **wortmannin** 的 **well** 中加入 **500 nM wortmannin**，最後再以 **DMEM** 培養液將各 **well** 體積加至 **100 μ l**。在每個孔中加入濃度較低的 **10 μ g/ml gentamicin**。

(五) 分析 **IL-18** 釋出的比例

以三明治法 (**sandwich**) 偵測細胞釋出的 **IL-18** 的量和感染的程度有無關聯。首先取一個塑膠孔盤，將與 **IL-18** 結合的抗體固定於盤底，等一段時間，再以 **wash buffer** 洗去沒有成功結合的抗體和雜質。將多餘的 **wash buffer** 去除，加入 **blocking buffer** 將盤底未與抗體結合的區域封住，避免其與蛋白質結合。清除 **blocking buffer** 後，加入樣本，使樣本的抗原與盤底抗體結合，再以 **wash buffer** 洗去沒有成功結合的抗體。加入一次抗體，使抗體與抗原結合，清洗後，再加入與一次抗體結合的二次抗體。二次抗體上帶有酵素，因此在加入酵素受質後，會使溶液呈色，再以吸光值測目標蛋白質的含量。另外，加入重組的 **IL-18** 蛋白質，藉由連續 **2** 倍稀釋，得出 **IL-18** 的 **standard**。

參、研究結果與討論

一、確認 **galectin-4 KO/ WT cells** 中 **galectin-4** 的量是否符合實驗設定

將細胞裂解後定量白質的含量，以 **western blot** 確認細胞中 **galectin-4** 的表達，並以 **tubulin** 作為內部標準品。圖一結果顯示，**galectin-4 KO cells** 中不含 **galectin-4**，使本實驗的前提成立。

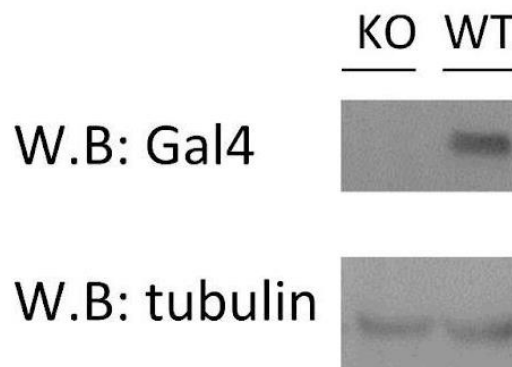


圖 (一) 實驗以 **tubulin**，細胞骨架的成分，作為內部標準品 (**internal control**)，以 **gal4** 代表 **galectin-4**，在剔除組 (**KO**) 細胞中無表現，無剔除 (**WT**) 有 **galectin-4** 蛋白質表現。

二、galectin-4 對細胞內細菌量的影響

WT 和 galectin-4 KO HT-29 cells 以 *Salmonella enterica* 的兩種血清型 worthington 和 typhinurium 進行感染。另外，因為奎寧 (chloroquine) 能將 PCV (pathogen containing vacuole) 中的細菌降解，使細胞中僅有細胞質中存在活細菌，所以我們也進行了在 WT 和 galectin-4 KO cells 中加入 chloroquine 的感染實驗，以此來判斷 galectin-4 是否也會對 cytosolic bacteria 的數量有影響。

根據實驗結果可以看出，在沒任何 treatment 下，galectin-4 WT cells 與 galectin-4 KO cells 相比之下有較少的細菌量，不論是 *Salmonella enterica* worthington 或是 *Salmonella enterica* typhinurium。這說明細胞中的 galectin-4 能夠使 HT-29 cells 在被 *Salmonella Enterica* 感染後，細胞內的活細菌數量降低。

而進行 chloroquine treatment 後，galectin-4 WT cells 內的活細菌量均比 galectin-4 KO cells 的活細菌量還少 (圖二及圖三)。此結果說明了 galectin-4 會對 cytosolic bacteria 進行調控，減少胞內細菌量。

這項結果顯示 galectin-4 會在細菌感染細胞的某些環節中對細菌進行調控。我們推測的可能機制為 (一) galectin-4 藉由調控細胞膜使 *Salmonella Enterica* 在進入細胞時無法順利改變細胞膜的型態，因此更難進入細胞。(二) galectin-4 可調控位於 vacuole 或 cytosol 的 *Salmonella Enterica* 的增生 (proliferation) 速度，使細菌增生較慢。(三) galectin-4 可殺死細菌，此三種機轉皆可導致 WT cells 裡的細菌量較少，但要證實是哪個假說仍需更多研究結果證據。

**bacterial count of HT-29 cell galectin-4 KO/WT
after *S.worthington* 4hr infection**

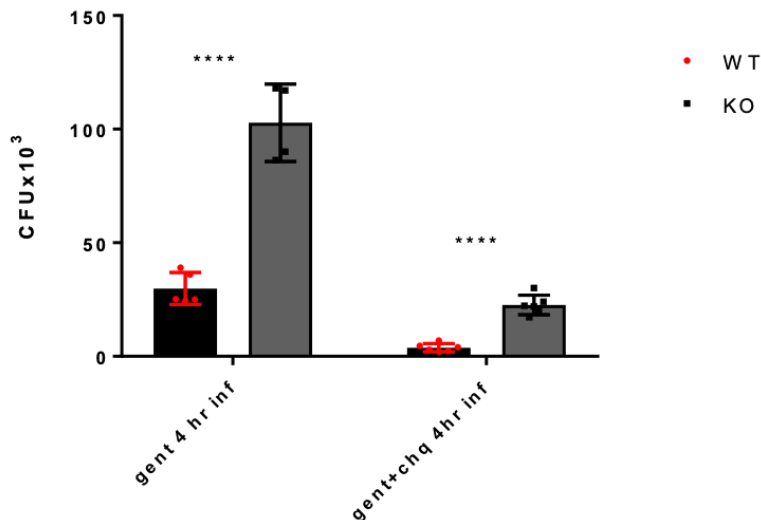


圖 (二) 圖為以 *Salmonella enterica* worthington 感染 HT-29 細胞 4 小時後細胞內的活細菌數量比較圖。圖的柱高為培養基上的菌落數量乘上各組的稀釋倍率，而加入 gentamicin 的組別以 gent 表示，加入 chloroquine 的則標示 CHQ。圖的左邊兩組是以 *S enterica* worthington 感染的 gal4 WT, KO cell。右邊兩組是以 *S enterica* worthington 感染並加入 CHQ treatment 的 gal4 WT, KO cell。

圖中兩數據相比若 p value < 0.05, 0.001, 0.005, 0.001, 分別以 *, **, ***, **** 表示，可以看出以 *S enterica* worthington 感染時，在無 CHQ treatment 下的 galectin-4 WT 和 KO cells 內的菌量有顯著的差別。而加入 CHQ 清除 vacuole 中的細菌後，細胞內的細菌也仍有顯著差別。

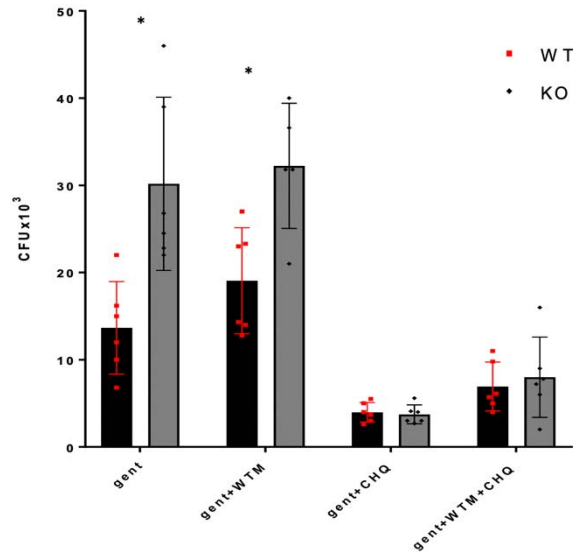


圖 (三) 圖為以 *Salmonella enterica typhimurium* 感染 HT-29 細胞 4 小時後細胞內的活細菌數量比較圖。柱高為培養基上的菌落數量乘上各組的稀釋倍率，而加入 gentamicin 的組別以 gent 表示，加入 chloroquine 的則標示 CHQ。圖的左邊兩組是以 *S enterica typhimurium* 感染的 gal4 WT, KO cell，並且一組有 WTM treatment，另一組沒有。右邊兩組是以 *S enterica typhimurium* 感染的 gal4 WT, KO cell，加入 CHQ 清除 vacuole 的細菌，並且一組有 WTM treatment，另一組沒有。

圖中兩數據相比若 p value < 0.05, 0.001, 0.005, 0.001，分別以 *, **, ***, **** 表示。可以看出以 *S. enterica typhimurium* 感染時，沒有 CHQ treatment 的 galectin-4 WT 和 KO 細胞內的菌量有顯著的差別。

三、Gal4 對 inflammasome 形成的影響

由先前實驗得知，galectin-4 與細胞內的細菌感染有關連。而根據文獻 (Lo et al., 2021)，我們知道細菌感染會引起細胞的 inflammasome 活化，且 inflammasome 會使細胞進行 pyroptosis，導致細胞膜形成孔且釋出細胞激素 (cytokine)。因此此實驗以 LDH 的釋出作為細胞膜破裂的指標，試圖了解 galectin-4 在細菌感染後對細胞破裂的影響。並且以 pyroptosis 時會釋出一種 cytokine, IL-18 作為 pyroptosis 發生的指標。

圖四結果顯示，隨著感染程度的加劇，WT 和 KO cells 也跟著釋出更多的 LDH，說明此實驗結果為 dose-dependent。而在相同感染程度下，

galectin-4 WT cells 相較 KO cells 釋出較少的 LDH。因此此結果說明 galectin-4 能夠降低細胞釋出的 LDH 量，也意味著細胞破裂的情況較不嚴重。

我們以 ELISA 分析細胞經過感染後釋出胞外的 IL-18 (圖五)，發現釋出的 IL-18 也隨著感染程度增加而上升，說明了 IL-18 的釋出也是 dose-dependent。且而在相同感染程度下，galectin-4 WT cells 相較 KO cells 釋出較少的 IL-18。

細胞釋出了 LDH 和 IL-18 代表 HT-29 細胞在被 *Salmonella enterica* *worthington* 感染後細胞膜會破裂以及會釋出 cytokine，說明細胞可能進行了 pyroptosis。

LDH released percentage of HT-29 cell galectin 4 wildtype/ K.O under different multiplicity of infection

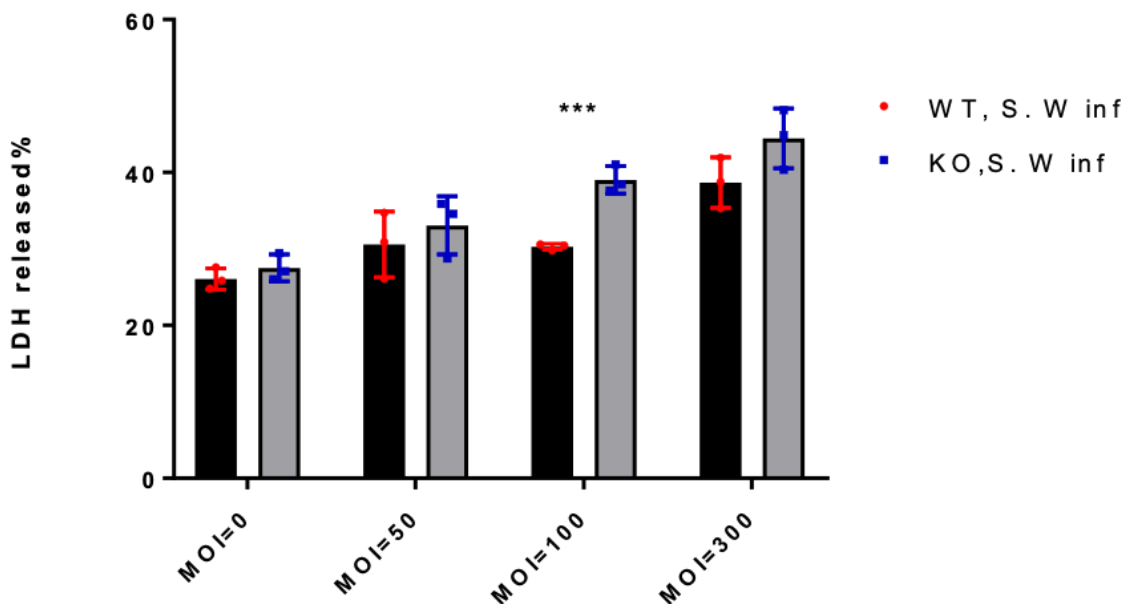


圖 (四) 細胞受沙菌感染後釋出胞外的 LDH%比較圖。圖中的 y 軸代表樣本釋出的 LDH 相對於將所有細胞裂解所釋出的 LDH 的比例。在感染複數 MOI=50, 100, 300 時 galectin-4 KO cell 都釋出相對於 galectin-4 WT 較高比例的 LDH。

HT-29 cell galectin 4 wildtype/ K.O
IL-18 released under different multiplicity of infection

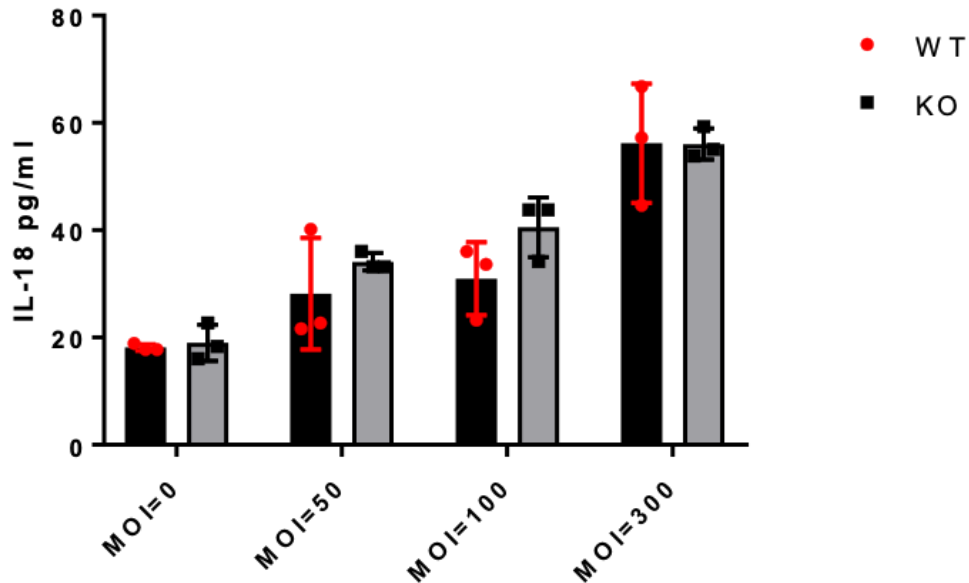


圖 (五) 細胞受沙菌感染後釋出細胞外的 IL-18 量的比較圖。在感染複數 MOI=50, 100 時 galectin-4 KO 的細胞都釋出相對於 galectin-4 WT 較高比例的 IL-18。

四、抑制 autophagy 後，分析 galectin-4 對 inflammasome formation 的影響

由先前實驗結果，我們知道感染後，galectin-4 knockout cells 釋出的 LDH 和 IL-18 量都較 galectin-4 WT cells 多。但因為細菌感染細胞後經常會引起細胞的 autophagy (自噬作用)，所以我們懷疑我們無法觀察到足夠量的活化 caspase-1，是由於 autophagy 的機制可將細菌清除。因此我們在細胞中加入 autophagy inhibitor (wortmannin)，試圖釐清 galectin-4 是否能活化 inflammasome 形成。在進行 wortmannin treatment 後，gal4 KO 就釋出比 WT 少的 LDH (圖七) 和 IL-18 (圖八)。也就是說受到感染且 autophagy 被抑制的情況下，原

先 **gal4 knockout** 細胞釋出較多 LDH 和 IL-18 的現象也隨之消失，變成 **wild type cells** 釋出的 LDH 和 IL-18 比 **knockout cells** 少。

另外因為 **mature caspase-1** 是 **inflammasome** 形成的指標性蛋白質，所以我們也以 **western blot** 分析細胞外的培養液中有沒有成熟的 **caspase-1** 被釋出細胞。圖九結果顯示 **galecitn-4 knockout cells** 中不論有無抑制 **autophagy**，**inflammasome** 都沒被活化，而 **wildtype cells** 中加入了 **autophagy inhibitor** 的有 **mature caspase-1** 被釋出，此結果顯示細胞中有 **inflammasome** 形成。

LDH released percentage of HT-29 cell galectin 4 wildtype/ K.O under different multiplicity of infection with wortmannin treatment

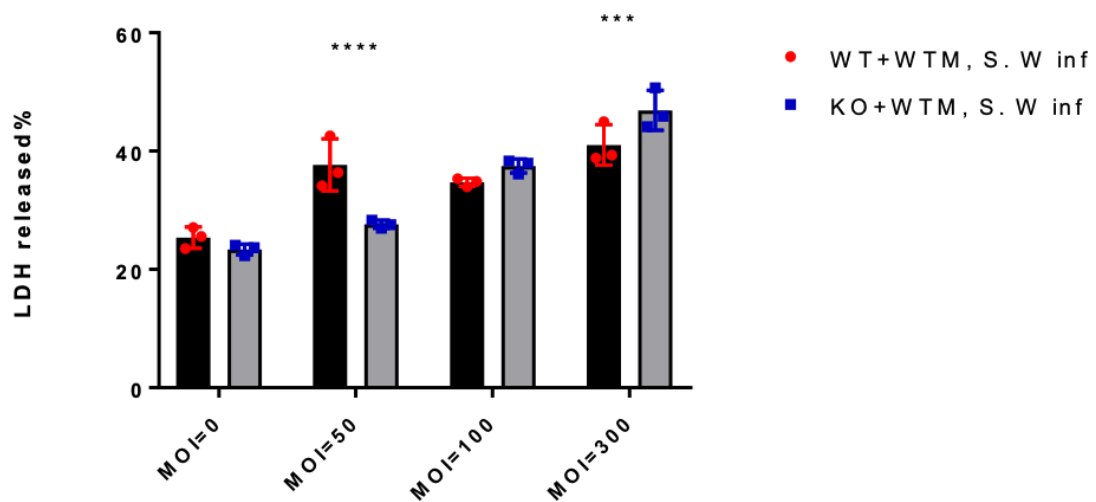


圖 (七) 細胞受沙菌感染後釋出細胞外的 LDH 量的比較圖。在有 WTM treatment 時，MOI=50 時 **galectin-4 KO** 的細胞都釋出相對於 **galectin-4 WT** 有較少比例的 LDH。

HT-29 cell galectin 4 wildtype/ K.O
IL-18 released under different multiplicity of infection with wortmannin treatment

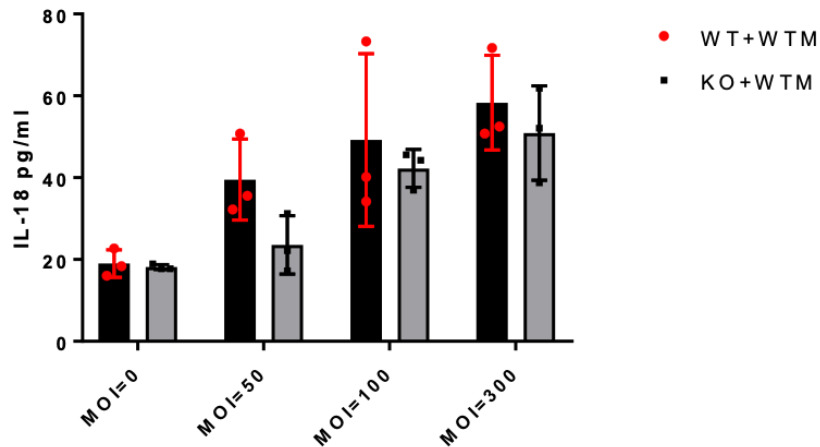


圖 (八) 細胞受沙菌感染後釋出細胞外的 IL-18 量的比較圖。在有 wortmannin (WTM) treatment 時, MOI=50, 100, 300 時 galectin-4 KO cell 都釋出相對於 galectin-4 WT 較少比例的 IL-18。

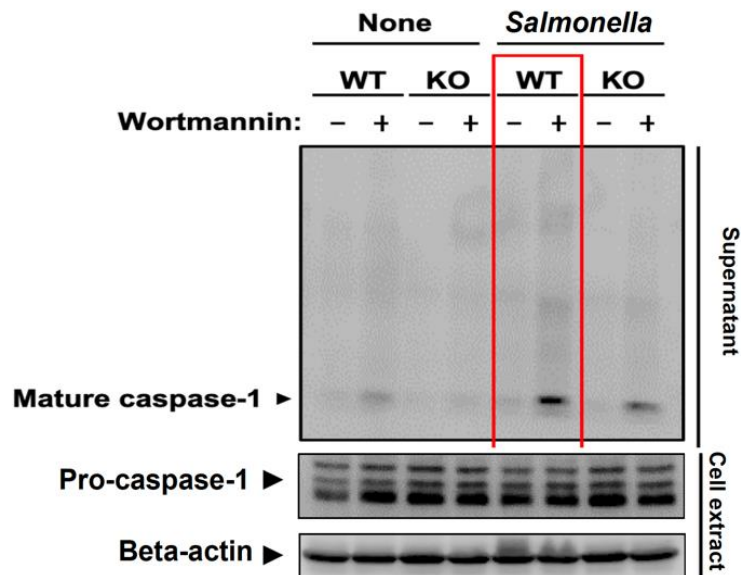


圖 (九) 細胞受沙菌感染後釋出細胞外的 cleaved caspase-1 量的比較圖。在沒加 wortmannin 時 wild-type cells 和 galectin-4 knockout cells 以 western blot 分析結果都不會釋出 mature caspase-1。autophagy inhibitor

(wortmannin) treatment 下, wildtype cells 和 galectin-4 knockout cells 相比釋出較多的 mature caspase-1。

肆、結論與應用

一、結論

本研究發現, galectin-4 能夠在 *Salmonella enterica* 感染 HT-29 細胞後使 WT cells 內的活細菌數量比 galectin-4 KO cells 少, 且能夠促進 inflammasome 的活化。

在以 *Salmonella enterica* 感染細胞後, 我們以酵素來分析細胞是否會釋出 LDH, 也以抗體抗原間的專一性分析在細胞有無釋出 caspase-1 和 IL-18, 研究 galectin-4 的有無是否會對 inflammasome 的活化造成影響。結果發現, LDH 與 IL-18 的實驗有相似的結果, galectin-4 會使細胞釋出的 LDH 和 IL-18 較少。但透過先前文獻, 我們已經知道 *Salmonella enterica* 進入細胞時會刺激細胞進行 autophagy, 因次我們想探討若 autophagy 被抑制時, inflammasome 的活化情形是否會有不同, 而 wild-type cells 和 galectin-4 knockout cells 的情形又有無不同。結果顯示, 若抑制細胞的 autophagy, wild-type cells 會釋出比 galectin-4 knockout cells 多的 IL-18 和 LDH, 且 wild-type cells 會釋出 mature caspase-1。這個結果說明 galectin-4 在細胞 autophagy 的能力被抑制時, 會刺激 inflammasome 的活化。

藉由此研究我們知道有 galectin-4 的 wild-type cells 能夠在受到 *Salmonella enterica* 感染時活化 inflammasome, 且以等量的菌感染 wild type 和 galectin-4 knockout cells 後, wild-type cells 中的活細菌量也較少。這兩個現象間可能存在因果關係, galectin-4 能夠活化 inflammasome, 因此導致 wild-type cells 的免疫反應較強烈, 導致 wild-type cells 的活菌量較少。galectin-4 真正參與對抗沙門氏菌的感染的機轉和扮演角色仍需未來繼續更一步的研究。

二、未來應用

galectin-4 能夠抑制 *Salmonella enterica* 的數量，若能了解到其抑菌的機轉，未來對感染防治的藥物開發或是臨床上的治療有莫大幫助。尤其是在一些衛生觀念較不普及，下水道系統不健全容易誤食到受污染食物的地區更有助益，對於受到沙門氏菌感染的病人來說，有較精準的藥物治療症狀也會較輕微。

伍、參考文獻

1. Thurston, T. L., Wandel, M. P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., & Randow, F. (2012) . Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature*, 482 (7385) , 414–418.
<https://doi.org/10.1038/nature10744>
2. Li, Y., Komai-Koma, M., Gilchrist, D. S., Hsu, D. K., Liu, F. T., Springall, T., & Xu, D. (2008) . Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) , 181 (4) , 2781–2789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2781>
3. Velge, P., Wiedemann, A., Rosselin, M., Abed, N., Boumart, Z., Chaussé, A. M., Grépinet, O., Namdari, F., Roche, S. M., Rossignol, A., & Virlogeux-Payant, I. (2012) . Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *MicrobiologyOpen*, 1 (3) , 243–258.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.28>

4. Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz–Planillo, R., & Nuñez, G. (2009) . The inflammasome: a caspase–1–activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nature immunology*, *10* (3) , 241–247.
<https://doi.org/10.1038/ni.1703>
5. *Autophagy and Ubiquitination in Salmonella Infection and the Related Inflammatory Responses*. (2018, March 14) . Frontiers.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00078/full>
6. Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009) . Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology*, *7* (2) , 99–109.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>
7. Cummings RD, Liu FT. Galectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY) : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1944/>
8. Cao, Z. Q., & Guo, X. L. (2016) . The role of galectin–4 in physiology and diseases. *Protein & cell*, *7* (5) , 314–324.
<https://doi.org/10.1007/s13238-016-0262-9>
9. Swanson, K.V., Deng, M. & Ting, J.PY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* **19**, 477–489 (2019) . <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
10. Brumell, J. H., Tang, P., Zaharik, M. L., & Finlay, B. B. (2002) . Disruption of the Salmonella–containing vacuole leads to

increased replication of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the cytosol of epithelial cells. *Infection and immunity*, 70 (6) , 3264–3270. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3264-3270.2002>

11. Lo, T. (2021, July 27) . *Galectin-3 Promotes Noncanonical Inflammasome Activation through Intracellular Binding to Lipopolysaccharide Glycans*. PNAS.

【評語】 090012

由於 galectin-4 在人類的腸道上皮細胞中有著高度表現，對於 galectin 家族中的 galectin-4 在腸道內面對沙門氏菌感染過程中所扮演的角色目前還未有相關研究，因此本研究將探究 galectin-4 是否參與腸道感染的機轉。作者邏輯與思路清晰，但研究成果還屬於初步階段。 The molecular mechanisms of whether and how galectin-4 functions differently from other galectin members are still unclear. The presentation of figures could be better; for example, the marker is missing in the statistics. The label and form of the constitution should be consistent. The WT control group and experimental condition need more repeats and it's better to use more than one cell line to confirm the findings.

其他意見：

1. WT 和 KO 的細胞也跟著釋出更多的 LDH，說明此實驗結果為 dose-dependent。而在相同感染程度下，galectin-4 WT 細胞相較 KO 細胞釋出較少的 LDH. WT 和 KO 釋出 LDH 兩者的差異不大應該再重複(Fig 4).
2. WT 和 KO 釋出 IL8 兩者的差異不大(Fig 5) 也沒有統計分析。
3. Gal 4 的表現似乎恢復了， Autophagy 的數據也過於初步，應該設計更多的實驗來證實(Fig 6)