

碩士論文中文摘要

鞘氨醇 1-磷酸鹽 (Sphingosine 1-phosphate; SIP) 是一個具有多種生物功能性的小型磷脂鹽類，SIP 可以和隸屬於 G 型蛋白耦合受器的專屬膜上受器結合，傳遞訊息並藉此廣泛地調控各種細胞的行為。目前已知在內皮細胞中受到 SIP 影響的生物功能包括細胞增生、附著、移行、傷口癒合、細胞基質切割、管狀結構的生成、黏著因子表現、細胞素與趨化因子的合成與分泌等等。血小板/內皮細胞附著因子-1 (PECAM-1) 是一個細胞膜上的糖蛋白，主要表現在內皮細胞、血小板及一些血液細胞上。內皮細胞層上的 PECAM-1 分子大多聚集在細胞側邊的邊界上，這些 PECAM-1 會利用其胞外的結構和鄰近細胞的 PECAM-1 形成連結，藉此協助細胞之間的聯繫並控制細胞上下兩側的通透性。除了結構上的功能外，PECAM-1 在胞內的分子結構組成包含了兩個特殊的免疫受體酪氨酸抑制基序 (immunoreceptor tyrosine inhibitory motifs; ITIM)，當細胞遭遇到某些特定的外來刺激後，會使基序內含的酪氨酸產生磷酸化，磷酸化後的區位結構即會引發下游訊息分子的接合及活化，並引發後續的訊息傳遞及細胞生理活性的改變，然而在不同的來源細胞與外來刺激下，會分別經由不同種類的磷酸激酶來負責 PECAM-1 的磷酸化。目前已知 PECAM-1 在內皮細胞的移行、生存、管狀結構的生成、及免疫細胞對內皮細胞層的穿過程程中都扮演了很重要的角色。本篇研究目的在探討 SIP 引發人類臍靜脈內皮細胞上 PECAM-1 磷酸化的機制，首先使用免疫沉澱與西方墨點法來偵測蛋白質磷酸化態與總量的比例，觀察到 SIP 可以直接引發人類臍靜脈內皮細胞中 PECAM-1 的磷酸化，並確定這個磷酸化的現象與 SIP 的處理時間及處理濃度有關。在使用 Gi 與 Src 家族磷酸激酶的化學抑制劑做前處理後，可以確定這兩種訊息傳遞分子參與了這個磷酸化的過程。此外，我們利用西方墨點法與共軛焦顯微鏡驗證在 SIP 處理過後，位於側邊細胞邊界的活化態 Src 磷酸激酶有明顯的增加。為了確定是哪一個 Src 家族的磷酸激酶參與了 PECAM-1 磷酸化的過程，我們把目標鎖定在 cSrc 和 Fyn 這兩種細胞內主要的 Src 磷酸激酶成員上，將針對 cSrc 和 Fyn 的小型干擾核酸使用電破法轉殖入臍靜脈內皮細胞來截斷 cSrc 和 Fyn 的蛋白質表現，轉殖結束後持續培養細胞 48 小時再進行 SIP 的處理並比較不同的干擾核酸對 SIP 誘發 PECAM-1 磷酸化的效果，結果顯示 cSrc 和 Fyn 同時具有調控 SIP 所引發之 PECAM-1 磷酸化的能力，其中 Fyn 只扮演了輔助的角色，主要還是由 cSrc 來負責傳遞 SIP 訊息並調控 PECAM-1 的磷酸化。