

摘要

在人體正常的免疫系統中，血液中的單核細胞在進駐到組織時會分化成巨噬細胞。然而在急性前骨髓細胞白血病 (Acute promyelocytic leukemia, 簡稱 APL) 的病人體內則存在大量未分化的骨髓細胞且會伴隨凝血因子缺陷的臨床症狀。由於此疾病是因 15 號染色體上的 *pml* 及 17 號染色體上的 *rara* 這兩個 gene 重組在一起所造成，因此目前此疾病的控制方式是以 *All-trans* retinoic acid (ATRA) 將 PML-RAR α fusion protein 釋放出來並且活化與 retinoic acid 有關下游 gene 的轉錄作用，促使未成熟 myeloid 細胞的分化達到治療效果，然而有關分子的調控機制目前仍不清楚。本篇即利用 U937 這株人類骨髓單核血球細胞株以 1 μ M ATRA 誘導分化，探討參與細胞分化的基因。U937 細胞以 ATRA 處理不同時間 0、1、4、12 及 24 小時，收集細胞純化 mRNA，隨後利用 cDNA 晶片做 microarray hybridization，分析分化過程中基因表達的差異性。我們發現有 46 個基因表達有變化，其中 14-3-3 ϵ 、c-myc、Egr-1、FRAP2、Hsp90 及 Uracil-DNA glycosylase 等為表達下降的基因，而 CD14、HCK、BNip3、PI3K α 及 STC 等為表達上升的基因。實驗發現加入 BNip3 antisense oligonucleotide 可使 ATRA 誘導 U937 細胞分化有減少的現象，同時，CD14 (monocyte/macrophage 分化的標記) 的 mRNA 表達也下降。這些結果可推測 BNip3 在 U937 細胞的分化過程中，佔有重要功能。BNip3 與 Bcl-2 會形成 heterodimer，誘導細胞死亡，故在 ATRA 刺激 U937 細胞分化的結果 BNip3 基因表達上升也許代表著細胞即將進入死亡。在 ATRA 誘導 U937 細胞分化的過程中其他因細胞分化而基因表達有差異的基因，是否也佔有重要的地位，則有待進一步實驗來證明之。

Abstract

The acute promyelocytic leukemia (APL) is characterized by a genetic rearrangement between the promyelocytic leukemia (PML) gene on chromosome 15 and the retinoic acid receptor α gene (RAR α) on chromosome 17 t (15:17). In differentiation therapy, this has been highlighted by the use of all-*trans* retinoic acid (ATRA) in the treatment of APL. ATRA is known to stimulate the growth inhibition and the differentiation of human myelomonocytic U937 cells to macrophage-like phenotype. To understand the molecular mechanisms controlling the differentiation and proliferation of the cells, we have applied cDNA microarray technology to profile the gene expression patterns of U937 cell differentiation induced with ATRA. For this, the cells were treated with ATRA (1.0 μ M) for 0, 1, and 4, 12, 24 hours, followed by cellular mRNA purification and hybridization individually to the cDNA-chips (Millennia-Chip version 2). We thus identified 46 cellular genes whose expressions were induced or repressed during U937 cell differentiation and their expression patterns were later confirmed by RT-PCR. Among the identified genes, the expression levels for the Egr-1, FRAP2, Hsp90, BNip3, and Stanniocalcin genes were substantially altered.

Anti-BNip3 oligonucleotide demonstrated the inhibition of ATRA-induced U937 cell differentiation. RT-PCR also confirmed the gene expression of BNip3 and CD14 (monocyte/macrophage differentiation marker) were downregulated, these results suggest BNip3 may play an important role in differentiation of U937 cell. BNip3 is a pro-apoptotic, mitochondrial protein, BNip3 formed heterodimer with Bcl-2 and induces cell death. The up-regulated of BNip3 expression during ATRA-induced U937 cell differentiation may also represent the program of cell death. The physiological roles of the other genes in mediating the growth inhibition and differentiation processes warrant further investigation.

誌謝

兩年前，懵懵懂懂地進入中山醫學院生物化學研究所。經由兩年來謝碧慧老師辛苦的教導，在實驗上及學術上獲得不少知識，讓學生在未來的道路上不再徬徨且找到自己的方向及興趣。因此，兩年的研究生涯最要感謝的莫過於是學生的指導老師—謝碧慧老師。辛苦老師也謝謝老師。

在論文研究期間幫助過學生的老師有許多，在此謝謝馬明琪老師、謝易修老師以及所有中山醫學院生化所的老師們，謝謝您們對學生的栽培。謝謝黎慶老師及吳梨華老師在口試時的指導。

此外，同學們的合作及鼓勵，還有大家相知相惜的情感，是支持我度過這兩年歲月的動力，感謝宜鈞這兩年來的照顧及配合，使我的實驗可以順利進行；感謝旭華、順發及逸憲等生化所全體同學在實驗上適時給與建議，謝謝你們。也謝謝實驗室的學長學弟們，實驗室的歡笑皆是因為有你們的參與。

最後感謝最初教導我實驗的學姊與好友—淑娟學姊與懿德以及默默在背後支持我的父母，沒有您們，就沒有現在的我。謝謝您們，謹以本論文獻給所有關心及支持我的老師、家人及朋友們。

目錄

<u>項目</u>	<u>頁數</u>
授權書.....	i
考試合格證明.....	iii
指導教授簽名.....	iv
中文摘要.....	v
英文摘要.....	vi
誌謝.....	vii
目錄.....	viii
圖目錄.....	x
表目錄.....	xi
緒論.....	1
一、免疫簡介.....	1
(一) 單核細胞.....	1
(二) 巨噬細胞.....	2
二、急性前骨髓細胞白血病.....	3
三、細胞株的介紹.....	4
四、研究目的及實驗策略.....	4
材料與方法.....	9
一、材料.....	9
(一) 細胞株.....	9
(二) 試劑.....	9
二、方法.....	9
(一) 細胞培養.....	10
(二) 刺激 U937 細胞.....	10
(三) 純化 total RNA.....	10

(四) 由 total RNA 萃取 mRNA.....	11
(五) Microarray hybridization.....	12
(六) Microarray 的分析.....	15
(七) RT-PCR.....	16
(八) 細菌培養.....	19
(九) 純化 plasmid DNA.....	20
(十) Lipofectamine transfection	21
(十一) 收集細胞萃取物.....	22
(十二) Luciferase reporter gene assay.....	22
(十三) Antisense assay	23
(十四) NBT reduction assay.....	24
結果.....	26
一、U937 細胞分化的分析.....	26
(一) NBT reduction assay	26
(二) 單核球 / 巨噬細胞分化標記 –CD14 基因表達的分析	26
二、U937 細胞的 microarray hybridization.....	27
三、Microarray hybridization 數據分析及比較	27
四、RT-PCR	28
五、基因的功能分析.....	29
(一) Antisense assay	30
(二) Egr-1 luciferase assay.....	31
討論.....	33
一、Microarray hybridization 的誤差	33
二、U937 細胞分化的基因表達	33
參考文獻.....	39
自述.....	65

圖目錄

	<u>頁數</u>
圖 1. M-chip (version 2) cDNA 生物晶片 1199 基因點的座標圖。 ...	47
圖 2. 以 NBT reduction assay 觀察細胞的分化。	48
圖 3. U937 細胞株受 ATRA 刺激後在每個時間點取等量 mRNA 做 RT-PCR 的結果, CD14 基因表達在 4 小時達到最高量。	49
圖 4. Microarray hybridization 分析 ATRA 刺激 U937 細胞株基因表達的變化。	50
圖 5. ATRA 刺激 U937 細胞分化的基因表達變化結果。	51
圖 6. ATRA 刺激 U937 細胞後在每個時間點取等量 mRNA 做 14-3-3eta、 c-myc 、 FRAP2 、 Hsp90 及 Uracil-DNA glycosylase RT-PCR 的結果。	52
圖 7. ATRA 刺激 U937 細胞後在每個時間點取等量 mRNA 做 Hemopoietic cell kinase、 BNip3、 PI3K 及 STC RT-PCR 的結果。	53
圖 8. ATRA 刺激 U937 細胞後在每個時間點取等量重複收集之 mRNA 做 RT-PCR 的結果。	54
圖 9. U937 細胞株受 ATRA 刺激後在每個時間點取等量 mRNA 做 Egr-1 RT-PCR 的結果。	55
圖 10. 以 NBT reduction assay 觀察細胞的分化。細胞加或不加 BNip3 antisense oligonucleotides 再以 ATRA 刺激 24 小時。	56
圖 11. BNip3 antisense oligonucleotide 抑制 ATRA 誘導 U937 細胞的分化。
圖 12. Egr-1 promoter constructs。	58
圖 13. Transfect Egr-1 promoter construct 進入 U937 細胞中加或不加 ATRA, 以 luciferase 觀察 Egr-1 promoter 的活性。	59

表目錄

	<u>頁數</u>
表 1. Control gene 點的座標位置	60
表 2. ATRA 刺激 U937 細胞 microarray hybridization 數據分析 後的部分結果.....	61
表 3. ATRA 刺激 U937 細胞 microarray hybridization 數據分析基因表 達變化的 patterns	63

緒論

一、免疫簡介

免疫學的發展源於個體遭疾病感染痊癒後，終身不再受同種病原感染，免疫學研究的領域為人體的免疫系統。免疫系統是一種可保護脊椎動物免於病原體侵入的防禦系統，包含各式各樣可以專一辨認和去除入侵者的細胞和分子⁽¹⁾。

免疫反應在功能上可分成兩個相關的行為—辨認及反應。免疫辨認是專一性的，即使有很細微的化學差異，都可以分辨出不同的病原體。除了辨識外來物外，還可以辨別自己的細胞和蛋白質。免疫系統一旦發現外來物，會啟動數種細胞和分子產生適當的反應來消滅或中和它，此為免疫系統的 effector function。所以免疫系統可以將辨認的結果轉換成不同的反應來針對個別的病原。如果再度碰到相同的病原，免疫系統所具有的記憶可以增強免疫反應而殺死病原。在體內具有免疫能力的血球細胞皆由骨髓幹細胞分化產生，骨髓幹細胞在骨髓中經由自體更新、活化態的巨噬細胞或 T_H 細胞或者是不同的細胞激素刺激之下會分化成不同血球細胞的先驅細胞，然後再由不同的細胞激素刺激進一步分化成具有免疫能力的血球細胞。而在本篇論文中，主要探討的是單核細胞分化成巨噬細胞早期基因表達的研究，因此將

重點放在單核細胞及巨噬細胞的介紹。

(一) 單核細胞 (Mononuclear Cells) :

在血液中循環的單核球和組織中的巨噬細胞組成了單核細胞吞噬系統。在骨髓之造血活動中，顆粒球—單核球之先驅細胞 (granulocyte-monocyte progenitor cells) 分化成前單核球 (promonocytes)，離開骨髓進入血液，再進一步分化為成熟單核球。單核球在血液中循環約 8 小時，在此期間會逐漸長大，然後移入組織分化成特殊組織巨噬細胞。

(二) 巨噬細胞 (Macrophage) :

單核球要分化成組織巨噬細胞前需有幾項的改變：細胞長大 5-10 倍；胞內胞器之數目及複雜性增加及增加細胞吞噬能力，產生更多的溶解酵素，分泌許多可溶因子。

巨噬細胞分佈全身，有一些存在於特殊組織中聚集成固定所，成為固定之吞噬細胞；另一些保持移動的稱為自由移動之吞噬細胞，在組織中以改變細胞型態來變形移動。而固定之吞噬細胞在不同組織中有不同功能，以其所在位置命名。例如在肝中稱為 kupffer cells；在結締組織中稱為 histocytes；在肺中稱為 alveolar macrophages；在腎中稱為 mesangial cells；在腦中則稱為 microglial cells。

巨噬細胞平時處於休眠狀態，但在免疫反應中，許多刺激會活化

巨噬細胞。最初的活化刺激是細胞吞噬特殊抗原後活化 T_H 細胞分泌細胞激素，可當作發炎反應的媒介者，細菌細胞壁產物也能促進巨噬細胞的活化；最有效的活化者之一是活化的 T_H 細胞所分泌的干擾素 Interferon gamma (IFN- γ)⁽¹⁾。與休止狀態相比，活化的巨噬細胞增加了吞噬能力、殺微生物能力、發炎調節物之分泌及活化 T 細胞的能力。這些能力的增加使巨噬細胞能更有效地去除潛在的病原，此外，活化的巨噬細胞分泌各種細胞毒殺蛋白 (cytotoxic proteins)，使巨噬細胞能除去大範圍的病原，包括受病毒感染之細胞、腫瘤細胞及胞內細菌。活化的巨噬細胞會表現更多的 MHC class II 分子，使其作為抗原呈現細胞的功能更強。因此巨噬細胞與 T_H 細胞在免疫反應中存在著相互激發活性的交互關係。

二、急性前骨髓細胞白血病 (Acute promyelocytic leukemia, 簡稱 APL)

APL⁽²⁾在 1977 年發現有 80% ~ 100% 的病人是因染色體 15 及 17 發生結構重組的現象所導致，使得在 17 號染色體上 RAR α (retinoic acid receptor α) 基因及 15 號染色體上 PML (growth suppressor promyelocytic leukemia protein gene) 基因融合在一起^(3,4)，此融合基因是重新組合在 15 號染色體上，保留了 PML 的 5' 端及 RAR α 的 DNA binding domain 與 retinoic acid binding domain，此 PML- RAR α 複合體形成一個不知功能的異常細胞核內的區域 (novel nuclear domain)。當

利用 *All-trans* retinoic acid 治療 APL 時，會使 PML- RAR α 融合蛋白 (fusion protein) 釋放出來且活化與 retinoic acid 有關下游 gene 的轉錄作用，進而導致 APL 細胞的分化^(5, 6)。因此目前 APL 皆是利用 *All-trans* retinoic acid 來治療，但病人必須定期追蹤，因為病情只能獲得控制。而追蹤的方法很簡單，當 PML- RAR α 融合基因一旦形成，利用 PCR 或 FISH 的方法即可診斷及追蹤病人的情況。APL 病人的血液中，白血球類型以非典型的前骨髓細胞佔多數，這種血癌由於凝血因子缺陷而伴隨血管內凝血的臨床症狀。本論文的研究即針對有何基因可使 APL 細胞分化，也許將來可以應用在臨床上的基因療法，使病人的病情可以達到治療完全的效果。

三、細胞株的介紹⁽⁷⁾：

本篇論文的實驗所使用的細胞為 U937。U937 細胞是 1974 年 Sundstrom 及 Nilsson 由組織細胞淋巴瘤的胸膜滲出物所獲得，在 1979 年的研究中發現經由 phorbol ester、vitamin D₃、gamma interferon、tumor necrosis factor (TNF) 或 *All-trans* retinoic acid 的刺激會引發 U937 細胞產生末端的單核球分化。本實驗室所使用的 U937 細胞株是由財團法人食品工業發展研究中心提供的，屬於 ATCC (American Type Culture Collection) 編號 CRL-1593.2。

四、研究目的及實驗策略：

生物體大多數的生理現象都與基因表現有著密不可分的關係，例如：酵素、賀爾蒙及各種蛋白質的產生與否或產量的多寡，甚至細胞的分化、分裂以及生物體的其他生化反應，都是由相關的基因表現來控制。因此可以藉由研究其相關的基因而對於生物體複雜的分子機轉有更進一步的認識。過去，研究基因表現的方法不外乎是建構基因庫後再利用 RT-PCR、Northern 或 RNase protection assay 找尋重要的基因，或是對前人所發現的基因做進一步的分析。但是這些方法都無法快速並全面性的探討大量基因表達的改變，而 microarray hybridization 一次的實驗過程可以觀察成千上萬的基因表現變化，因此利用 microarray hybridization 的分析方式克服以上的缺點真正達到全面性探討基因表達的變化⁽⁸⁾。

cDNA-chip 是生物晶片(Bio-chip) 之一。所謂的生物晶片就是將與生物有關的大分子，如 DNA、Oligonucleotide、Polypeptide、抗體、甚至於細胞等，以微面積及高密度方法精確的點製在玻璃片或 Nylon 膜等固體材料上排列點製而成，因此又稱為 Microarray。目前是以 cDNA 晶片(cDNA-chip) 及多短聚核甘酸晶片(Oligonucleotide chip)的技術較為成熟。Oligonucleotide chip 所使用的 Oligonucleotide 除了可以合成外也可以利用半導體晶片製成類似的光顯影技術結合光化學反應所製造⁽⁹⁾。在過去傳統分析基因的方法一次只能研究最多十幾個

基因的表現，對於人類近 4 萬多個基因而言，要找出相關的基因的確是猶如大海撈針一般沒有效率，使用基因晶片研究基因表現，可以同時觀察成千上萬個基因的表達。此外，由於人類基因定序計劃 (HGP) 已在今年初 (西元 2001 年) 完成⁽¹⁰⁾，所以基因晶片之科技及基因功能性的探討可能會成為研究複雜基因系統與疾病最有力的工具之一。

截至目前為止，有許多的研究室利用 U937 細胞研究單核球分化成巨噬細胞的基因調控路徑，但都只限於單一基因的發現及研究，為了要全面性瞭解 U937 細胞分化的早期基因表現變化，本實驗是利用 ATRA 誘導 U937 細胞分化再以 microarray hybridization 技術來分析基因表現變化。我們實驗室所用的晶片來源為黎慶老師實驗室所提供，點的直徑約為 100 μm ，點之間的距離約 150 ~ 200 μm 。點製完成的 cDNA 晶片命名為千禧晶片 (Millennia chip 簡稱 M-chip)，本實驗所使用的晶片為 version 2，包含有 1173 個人類重要的基因以及 13 個控制組基因 (control gene) 共 1199 個基因點。這 1173 個人類重要的基因種類包含 221 個 kinases、83 個 proteases、226 個 surface proteins、85 個 oncogene/tumor suppressors、112 個 apoptosis and cell cycle-related proteins、89 個 angiogenesis-related proteins、51 個 DNA damage regulators、92 個 cytokines、73 個 transcription factors、7 個 EST gene、

2 個 house keeping gene 及 132 個其他的基因。至於控制組基因⁽¹¹⁾則包含 8 個植物基因 *rbcL*, *rca* 和 *lhc* 以及 ATPs, ASA1, GA4, HAT4, HAT22, 2 個 噬菌體 DNA (*Pst* 1.0 kb 及 *Pst* 1.1 kb) 以及 3 個人類的 house keeping genes ($\hat{\alpha}$ -actin、G3PDH 及 actin-related protein)。

在本實驗我們發現 ATRA 誘導 U937 細胞分化時，在早期基因表達有變化的共有 46 個基因，而其中如 *hsp90*⁽¹²⁾、phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, *gamma*⁽¹³⁾、*c-myc*^(14, 15)、*HCK*⁽¹⁶⁾ 等基因也已被證實與單核球的分化有關，其他基因的功能與 U937 細胞分化之關係則有待進一步的探討^(17, 18)。

另外，在 ATRA 誘導 U937 細胞分化過程中，*BNip3* 基因表達為上升趨勢，加入 *BNip3* antisense oligonucleotide 時，ATRA 誘導的 U937 細胞分化則明顯減少。*BNip3* 基因在許多前人的報導中 *BNip3* 並無與細胞分化相關的功能性被發現，大多數研究的方向性皆與細胞的凋亡有關。*BNip3* (nineteen kD interacting protein-3)⁽¹⁹⁾ 是 E1B 19K / Bcl-2 binding protein，存在於粒腺體中，在 *in vivo* 及 *in vitro* 中有 60kD 及 30kD，且兩者有相當高的同源性。根據研究 *BNip3* 是一種粒腺體蛋白，屬於細胞的前凋亡因子 (pro-apoptotic members)，與其相關的基因還有 *Nip1* 及 *Nip2*⁽²⁰⁾。

還有在 ATRA 誘導 U937 細胞分化過程中 *Egr-1* 基因表達為下降

趨勢，因此在本實驗，我們也想知道 ATRA 所誘導 U937 細胞分化過程中 Egr-1 基因的表達是如何受調控的。Egr-1 基因在許多前人的報導中對於其功能性研究相當多樣化，對於細胞的分化也佔有一席之地，但還未知其具有功能的區域為何。Egr-1 (Early growth response gene 1)⁽²¹⁾ 是早期生長反應基因 (Early growth response gene) 的家族成員之一，此家族成員包含有 Egr-1、Egr-2、Egr-3 及 Egr-4。Egr-1 在細胞中扮演的角色目前已知的有細胞發展、生長控制及幾種細胞的生存包含有 T 細胞、B 細胞、神經元細胞及骨髓細胞等。更有報導證實，Egr-1 在骨髓細胞分化的初期反應具有非常重要的地位⁽²²⁾。因此 Egr-1 基因的表達對於骨髓細胞的分化具有調節功能。除了以上兩者，還有許多基因在本實驗中被發現其基因表達有明顯變化，未來若經過進一步的證實，也許可作為日後研究 U937 細胞分化的重要參考依據。

材料與方法

一、材料

(一) 細胞株：

人類骨髓單核血球細胞株 (Monocyte-like histiocytic lymphoma)：U937(由財團法人食品工業發展研究中心所提供)

(二) 試劑：一些常用的試劑大多購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)或

Amresco、Merck，其他試劑則詳列如下：

1. REzol™ C & T (PROtech Technology Ent.Co., Ltd.)
2. Oligotex™ mRNA kit (Qiagen; Valencia CA, USA)
3. M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)
4. Protein Assay kit (BIO-RAD; Hercules, CA, USA)
5. Daul-Light Reporter Gene Assay (TROPIX; PE Biosystems, USA)
6. LIPOFECTAMINE™ 2000 Transfection Reagent (Gibco RBL, USA)
7. Nitro blue tetrazolium chloride (AMRESCO)
8. JETSTAR Plasmid kits (GENOMED)
9. Diethyl pyrocarbonate (DEPC, Fluka chemika)
10. ESCORT™ Transfection Reagent (Sigma)
11. Random hexamer (生工有限公司)
12. Easiseal (Hybaid)
13. Super-Therm DNA Polymerase (伯昂實業有限公司)
14. dNTP (Promega)
15. Biotin-16-dUTP (Roche)
16. Primers (生工有限公司)
17. All-*trans* retinoic acid (Sigma)

二、方法：

論文中的實驗主要是以 microarray hybridization 相關的方法為主，詳細步驟詳列如下：

(一) 細胞培養：

U937 細胞以含有 25mM Hepes 與 0.2% NaHCO₃ 的 RPMI-1640(Gibco BRL, USA) 加入 10% 的 FBS 及 1% Penicillin-Streptomycin 放置於 37 °C 含 5% CO₂ 的培養箱中生長。

(二) 刺激 U937 細胞：

由於 all-trans Retinoic acid (簡稱 ATRA, Sigma, St. Louis, USA) 可使 U937 細胞自單核球分化成巨噬細胞，在細胞分化的過程中會影響到許多基因的表現，因此為了探討 U937 細胞分化早期基因表達的變化，將 U937 細胞以 T-75 的 Flask 培養至 70ml (細胞密度為 1×10^6 / ml), 加入 10mM 的 ATRA 7 μ l (最終濃度 1 μ M)⁽⁴⁾ 避光培養 0 小時、1 小時、4 小時、12 小時及 24 小時，收集細胞純化 Total RNA。

(三) 純化 Total RNA：

將 70ml 的細胞液離心後，以 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ / ml 細胞液對 1ml REzolTM C & T (PROtech Technology Ent.Co., Ltd.) 的比例加入 REzolTM C & T 至離心管中，以吸管上下沖散細胞後，將混合液體移到新的 15ml 離心管，放於室溫 5 分鐘 以 1ml REzolTM C & T 對 0.2ml Chloroform (AMRESCO) 的比例加入 Chloroform，劇烈搖晃 15 秒，靜置室溫 2 分鐘。接著在 4 °C 下以 8000rpm 離心 15 分鐘，取出上層液到新的 15ml 離心管中，以 1ml REzolTM C & T 對 0.6ml Isopropyl

alcohol (Arch chemicals)的比例加入 Isopropyl alcohol , 輕微混合均勻後, 置冰上(4 °C) 10 分鐘, 接著在 4 °C 下以 10000rpm.離心 15 分鐘。

去除上清液後, 以 1ml REzol™ C & T 對 1ml 75% Alcohol (Merck) 的比例清洗 Total RNA 二次, 在 4 °C 下以 7000rpm.離心 5 分鐘, 用抽氣幫浦去除上清液, 風乾 Total RNA 後, 以 DEPC (Fluka chemika)水溶解 Total RNA , 用分光光度儀 (Spectrophotometer) OD₂₆₀ 測量 Total RNA 的濃度,再以膠體電泳法 (2% agarose) 偵測 Total RNA 的品質。

(四) 由 Total RNA 萃取 mRNA :

利用 Oligotex™ mRNA kit (Qiagen; Valencia CA, USA)萃取 mRNA ; 依產品使用方法將所需 RNase-free water (DEPC 水)、 OBB buffer (2×binding buffer)以及 Oligotex suspension 的比例加入後, 混合均勻, 於 70 °C 反應 5 分鐘, 靜置室溫中反應 15 分鐘。以 13000rpm. 室溫離心 2 分鐘, 將上清液取出放到新的 1.5ml eppendorff (確定 mRNA 有萃取出來才可丟棄), 上清液放在冰上。沉澱物加入 OW2 buffer (wash buffer), 以 13000rpm.室溫離心 2 分鐘, 去除上清液, 再加入 OW2 buffer 重複洗一次後, 沉澱物置於 70 °C, 加入 70 °C 的 OEB buffer (elution buffer), pipetting 均勻後在 70 °C 10 秒鐘, 以 13000rpm. 室溫離心 2 分鐘, 取上清液至新的 0.5ml eppendorff 中, 將沉澱物再置於 70 °C, 加入前步驟之上層液 10µl, pipetting 均勻後在 70 °C 10 秒

鐘，13000rpm.離心 2 分鐘，取上層液至 0.5ml eppendorff 中，裡面即含有所需之 mRNA。取 mRNA 出來，利用分光光度儀 (Spectrophotometer) OD₂₆₀ 及膠體電泳法(2% agarose)定性及定量，分裝貯藏於-80 。

(五) Microarray hybridization :

實驗所使用之 membrane (M-chip, version2)由黎慶老師實驗室提供，所有 membrane 上的基因：1173 個人類基因及 13 個 control gene^{註一}皆經核酸定序化分析確定其序列正確性，而 membrane 基因座標請參考圖 1，control 基因點的座標位置請參考表 1。

註一：

(1) 3 個人類 housekeeping genes : α -actin、G3PDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 及 actin-related protein。

(2) 8 個植物基因：例如 *rbcL*、*rca* 和 *lhc* 以及 ATPs、ASA1、GA4、HAT4 及 HAT22。

(3) 2 個 λ phage 基因： λ phage *PstI*-1.0 及 λ phage *PstI*-1.1。

1. Biotin 標定:取 1-2 μ g 的 mRNA 加入 3 μ g random primer (6-mer)及 1 μ l control RNA(含有 2 個植物基因 *rbcL*、*rca* 及 2 個 phage DNA 片段經 in vitro transcription 的 RNA)混合均勻加 DEPC 水使體積達到 14 μ l，置於 70 反應 5 分鐘，迅速置於冰上。在 5 分鐘的反應時間內

將 5 μ l 5 \times RT buffer、0.375 μ l dNTP (100mM dATP、dCTP、dGTP 各 0.125 μ l)、0.1 μ l 10mM dTTP、1 μ l 1mM Biotin-dUTP、2.5 μ l 10mM DTT、0.5 μ l RNase inhibitor (40U/ μ l, Promega)、1.5 μ l Reverse Transcriptase (200U/ μ l, Promega), 混合均勻後與已反應完 5 分鐘的 mRNA 混合均勻, 靜置於室溫 10 分鐘。再於 42 $^{\circ}$ C 反應 90 分鐘 (反轉錄作用) 後, 以 95 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘終止反應。接著純化 Biotin labeled 之 cDNA 加入 5.5 μ l 3M NaOH 於 50 $^{\circ}$ C 中反應 30 分鐘 (開始準備 Pre-hybridization), 再加入 5.5 μ l 3M CH₃COOH 於 50 $^{\circ}$ C 中反應 30 分鐘。依序加入 38 μ l ddH₂O, 1 μ l glycogen (20mg/ml), 50 μ l 7.5M NH₄OAc 及 375 μ l 100% alcohol, 混合均勻後, 置於-80 $^{\circ}$ C 中 30 分鐘。在 4 $^{\circ}$ C 下以 12,000rpm 離心 15 分鐘, 接著以 800 μ l 75% alcohol 清洗 Biotin labeled-cDNA 沉澱物一次 (在 4 $^{\circ}$ C 下以 12,000rpm 離心 5 分鐘), 再以 500 μ l 75% alcohol 清洗 Biotin labeled-cDNA 沉澱物一次。將 Biotin labeled-cDNA 風乾後, 溶於 6.8 μ l ddH₂O 中。

2. Pre-hybridization: 將 membrane 放入含 1ml 的 1 \times Hybridization buffer (簡稱為 HB: 含 0.1% SDS、5X SSC、0.1% N-lauroylsarcosine、及 1% Blocking Reagent) 及 12.5 μ l 的鮭魚精子 DNA (800 μ g/ml, sigma, USA: 事先以 100 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後, 置於冰上待用) 溶液中, 60 $^{\circ}$ C 水浴反應 1.5 小時。

3. Hybridization (雜交): 將 6.8 μ l Biotin labeled-cDNA 加入 8 μ l 2 \times HB、1 μ l poly A (3 μ g/ μ l)及 1 μ l 以 Biotin 標定的 GA4 之 PCR 產物 (10ng), 混合均勻後, 以 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘, 並置於冰上 5 分鐘。接著將此溶液與已 pre-hybridized 的 membrane 進行雜交 (於玻片上, 並將之密封), 再置於 63 $^{\circ}$ C 水浴槽反應過夜。
4. 清洗 membrane: 取出雜交完成的 membrane, 於室溫下, 以含 2 \times SSC 及 0.1% SDS 的溶液 5ml 搖晃清洗 5 分鐘 2 次。接著於 58 $^{\circ}$ C 下, 以含 0.1 \times SSC 及 0.1% SDS 的溶液 5ml 搖晃清洗 15 分鐘 3 次。
5. Blocking: 將 membrane 放入含 4ml buffer I (0.1M Maleic acid、0.15M NaCl; pH=7.5)、0.5ml 20% Dextran sulfate 及 0.5ml 10% Blocking buffer (Roche, Mannheim, Germany)的溶液中, 並於室溫中搖盪 1.5 小時。
6. 加入抗體: 將 membrane 放入含 4.5ml 1 \times TBS (含 10mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.3% BSA)、0.5ml 10% Blocking buffer 及 8.4 μ l streptavidin β -galactosidase (Gibco)的溶液中, 並在室溫中搖盪 1 小時。
7. 清洗 membrane: 於室溫下, 以 1 \times TBS (不含 BSA)清洗 membrane 3 次(每次 10 分鐘)。
8. 加入受質(substrate)呈色 membrane: 將已清洗的 membrane 放入含 4.95ml X-gal substrate buffer (0.3mM $K_4Fe(CN)_6$ 、0.3mM $K_3Fe(CN)_6$ 、

1mM MgCl₂ 及 1×TBS 不含 BSA)及 50μl 120mM X-gal 的溶液中，於 37 培養箱中避光下搖晃 1 小時。將 membrane 取出，以 ddH₂O 清洗 membrane 3 次(每次 5 分鐘)，membrane 放於室溫中風乾 (若避光風乾 membrane，則呈色效果較好，但限於無背景顏色的 membrane)。

(六) Microarray 的分析

將風乾之後的 membrane 用 UMAX PowerLook 3000 的掃描器以 3000dpi 的解析度掃描成 *.tif 的圖檔，利用 Stanford University Partick O. Brown 研究室所發展的 ScanAlyze 2 軟體⁽¹¹⁾將 membrane 上的 signal 量化，量化數據再以黎慶老師研究室所研發的 Gsp 軟體⁽¹¹⁾將不同時間點的 chip 比較基因的強度再取三次實驗交集的結果來決定要探討的基因。此外，Gsp 軟體分析的結果可利用 Stanford University 所製作的 Cluster 及 Tree view 軟體將結果以圖示的形式呈現出來。軟體下載的網址為<http://www.microarrays.org/>。

(七) RT-PCR

取 0.5μg 的 mRNA 依序加入 Random primer(3μg/μl) 0.5μl oligo dT(0.5μg/μl) 0.5μl，補 DEPC 水至 32μl。置於 70 中，反應 10 分鐘後，置於冰上 30 秒。在 mRNA 反應 10 分鐘的時間內將 5×RT buffer 10μl、0.1M DTT 5μl、10mM dNTP 2μl、RNase inhibitor(RNasin，Promega)混合均勻，待 mRNA 冰上 30 秒鐘反應完成後再與 5×RT

buffer 10 μ l、 0.1M DTT 5 μ l、 10mM dNTP 2 μ l、 RNase inhibitor 的混合物混合均勻, 42 反應 5 分鐘後, 再加入 Reverse transcriptase(MMLV RTase , Promega) 1 μ l , 42 反應 1 小時後 , 取出置於 94 作用 5 分鐘終止反應 , 每 5 μ l 分裝成一管 , 保存於-80 中備用。做 PCR 時 , 各組間每個時間點 , 先各取 1 μ l cDNA 做 β -actin 的產物定量 , 再以所定出來之量為基準去做各組不同基因的 PCR。各基因的 PCR primers 序列及 PCR program 如下 :

PCR primers 序列 :

Primers 的名稱	核酸序列	產物長度
β -actin	Forward : ATC ATG TTT GAG ACC TTC AA Reverse : CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA	318bp
14.3.3eta	Forward : GGA GAA GAT TGA GAA GGA GC Reverse : TTG TGG CAA GGA AGA ATC GG	553bp
c-myc	Forward : CTC GCT GTA GTA ATT CCA GC Reverse : TGG TGA AGC TAA CGT TGA GG	432bp

FRAP2	Forward : ACT CCGAGA GAT GAG TCA AG Reverse : TGC TGG AAG AAG AAG GTA GG	404bp
HCK	Forward : ACA ACA AGC ACA CCA AGG TG Reverse : CGT GTA CTC GTT GTC CTC AA	394bp
Hsp90	Forward : TGG TAC TAT CGC CAA GTC TG Reverse : CCA GTC ATT GGT CAA GCT CT	639bp
BNip3	Forward : TAC TGC TGG ACG CAC AGC AT Reverse : AGA GCA GCA GAG ATG GAA GG	377bp
PI3K	Forward : GAT TGG CTA TGA CGT CAC TG Reverse : TGG TAA GCT GCT CAT GGT AG	550bp
STC1	Forward : GAC ACA GTC AGC ACA ATC AG Reverse : GAG GCA GAA TGA TCA CAT GG	449bp
UDNAg	Forward : TTG GAG AGA GCT GGA AGA AG Reverse : AAG GAG AAC ACC TTG CTT GG	352bp
Egr-1	Forward : CTG CAC GCT TCT CAG TGT TC Reverse : AGC AGC ATC ATC TCC TCC AG	260bp
CD14	Forward : TCT GCA ACT TCT CCG AAC CT Reverse : GGC AAT GCT CAG TAC CTT GA	428bp

PCR program :

14.3.3eta、FRAP2、HCK、Hsp90、PI3K、STC1、UDNAg 及 CD14

所使用的 PCR program 為：

Stage	Step	Temp ()	Time	Cycle
1	1	94	1 分鐘	1
2	1	94	30 秒鐘	30
	2	55	30 秒鐘	
	3	72	30 秒鐘	
3	1	72	5 分鐘	1
Hold		4		

c-myc 所使用的 PCR program 為：

Stage	Step	Temp ()	Time	Cycle
1	1	94	1 分鐘	1
2	1	94	30 秒鐘	40
	2	55	30 秒鐘	
	3	72	30 秒鐘	
3	1	72	5 分鐘	1
Hold		4		

BNip3 所使用的 PCR program 為：

Stage	Step	Temp ()	Time	Cycle
1	1	94	1 分鐘	1
2	1	94	30 秒鐘	30
	2	65	30 秒鐘	
	3	72	30 秒鐘	
3	1	72	5 分鐘	1
Hold		4		

Egr-1 所使用的 PCR program 為 touch down program , annealing 溫度每 2 個循環下降 1 度 , 由 63 到 56 , 最後 16 個循環其 annealing 溫度為 55 。

Stage	Step	Temp ()	Time	Cycle
1	1	94	5 分鐘	1
2	1	94	50 秒鐘	2
	2	63	50 秒鐘	
	3	72	50 秒鐘	
3~9	1	94	50 秒鐘	2
	2	62~56	50 秒鐘	
	3	72	50 秒鐘	

10	1	94	50 秒鐘	16
	2	55	50 秒鐘	
	3	72	50 秒鐘	
Hold		4		

而所有的 PCR 試劑的比例為

10 × Taq enzyme buffer	5μl
2.5mM dNTP	1μl
20μM forward primer	1μl
20μM reverse primer	1μl
PCR H ₂ O _(aq)	41μl
Taq enzyme	0.1μl
cDNA	以 $\hat{\alpha}$ -actin 定量之後的量為基準
<hr/>	
50μl	

(八) 細菌培養：

Egr-1 promoter deletion constructs 是由黎慶老師研究室所提供。首先在培養皿中分別挑一個帶有不同 Egr-1 promoter constructs 的單一菌落種入 3ml 的 LB (Luria-Bertaini) medium (含有 1% 的 Bacto-tryptone、0.5% 的 Bacto-yeast extract 及 0.5% 的 NaCl 與以 1ml medium: 3μl Ampicilline (50mg/ml) 的比例加入 9μl 的 Ampicilline) 在 37 培養 14~16 hours 後, 取 0.5ml 種至 TB medium (1 升的 TB medium 內含有 900ml 的營養物質及 100ml 的鹽類: 900ml 的營養物質有 12 克的 Bacto-tryptone、24 克的 Bacto-yeast extract 及 4ml 的 Glycerol; 100ml 的鹽類有 0.17M 的 KH₂PO₄ 及 0.72M 的 K₂HPO₄; 與以 1ml

medium : 3 μ l Ampicilline (50mg/ml)的比例加入 3ml 的 Ampicilline) 在 37 培養 14~16 hours 後 , 純化 plasmid DNA。

(九) 純化 plasmid DNA

根據產品使用方法先加入 10ml 的 Equilibrium buffer (含有 600mM 的 NaCl 100mM 的 Sodium acetate pH=5.0 及 0.15% 的 Triton X-100) 進入 column 中 , 利用重力讓液體自動流出。菌液以 5000rpm. 離心 10 分鐘後移除上清液 , 加入 Suspension buffer (含有 50mM 的 Tris/HCl pH=8.0 10mM 的 EDTA 及 0.1mg/ml 的 RNase , 保存於 4) 4ml, 將 pellet 打散均勻(可 Vortex)後, 加入 Lysis solution (含有 200mM 的 NaOH 及 1.0% 的 SDS) 4ml , 立即輕微翻轉 tube 5 次後 , 放置室溫 10 分鐘 , 加入 Neutralization buffer (含有 3.2M 的 Potassium acetate/acetic acid pH=5.5) 4ml~4.4ml 後立即輕微翻轉 tube 5 次 , 4 離心 18000rpm. 20 分鐘兩次 , 將上清液迅速倒入已處理過的 column 中 , 利用重力讓液體自動流出 , 加入 Wash solution (800mM 的 NaCl 及 100mM 的 Sodium acetate pH=5.0) 10ml 到 column 中洗兩次 , 利用重力讓液體自動流出 , 加入 Elution solution (1250mM 的 NaCl 及 100mM 的 Tris/HCl pH=8.5) 5ml 到 column 中 , 用 15ml 離心管盛裝引流出的 DNA , 將引流出的 DNA 溶液加入總體積 0.7 倍的 Isopropanol (約 3.5ml), 輕微翻轉 tube 5 次, 室溫放置 30 分鐘; 4 離心 10000rpm. ,

30 分鐘。酒精沉澱(75% Ethanol 要洗三次) , 晾乾 pellet , 以適量的 TE buffer 溶解 , 利用分光光度儀 (Spectrophotometer) OD₂₆₀ 及膠體電泳法(0.8% ~ 1% agarose)定性及定量。將濃度調成 1 μ g/1 μ l , 30 μ l 分裝 1 管 , -20 貯存。

(十) Lipofectamine transfection^(21, 22)

調整細胞數為 4~6 \times 10⁵ 個 / 500 μ l / well (24well 的 plate) , 將細胞濃縮在含有 10% FBS 及不含 Penicillin-Streptomycin 的 RPMI-1640 培養液中 ; 將 1 μ l (1 μ g/ μ l)的 Egr-1 promoter constructs 加 1 μ l (0.2 μ g/ μ l) 的 Lac-Z (-gal)再加 48 μ l 不含 10% FBS 及 1% Penicillin-Streptomycin 的 RPMI-1640 培養液 ; 將 1.5 μ l 的 LF2000 (Lipofectamine 2000 transfection reagent) 加 48.5 μ l 不含 10% FBS 及 1% Penicillin-Streptomycin 的 RPMI-1640 培養液 , 混合均勻放置室溫 5 分鐘後 , 在 5 分鐘內將含有 Egr-1 promoter constructs 的培養液及含有 LF2000 的培養液混合均勻共 100 μ l , 放置室溫 20 分鐘後 , 將含有 Egr-1 promoter constructs 及 LF2000 的培養液 100 μ l 加入各個 well(100 μ l/well) , 輕微搖晃混合均勻 , 培養在 37 , 5% CO₂ 的培養箱中 4 小時後 , 加 1mM 的 ATRA 0.6 μ l (最終濃度 1 μ M) 刺激細胞 , 避光培養 48 小時後 , 收 cell extract。

(十一) 收集細胞萃取物

將 cell 由 24 well-plate 取出到 1.5 eppendorff 中，以 4 的 1×PBS 1ml，4 離心 1000rpm. 5 分鐘洗細胞兩次，移除上清液，將 pellet 震散開後，加入 Lysis solution (Dual-Light 試劑組) 80μl，4 離心 13000rpm. 3 分鐘，取上清液到新的 1.5ml eppendorff 中，33μl 分裝 1 管(細胞萃取物須維持 4)，細胞萃取物須立刻使用或貯存在-70 。

(十二) Luciferase reporter gene assay (Daul-Light reporter gene assay system)

依商品使用方法將 Buffer A 及 Buffer B 放室溫溶解。以 1:100 的比例用 Buffer B 稀釋 Galacton-Plus substrate。取 2~10μl cell extract 到乳白色的 96well-plate，加入 12.5μl 的 Buffer A 混合均勻，在 10 分鐘之內加入 50μl 含有 Galacton-Plus substrate 的 Buffer B 混合均勻，1~2 秒後，在 0.1~10 秒內測 Luciferase signal (用 EG&G BERTHOLD MiniLumat LB 9506 儀器測量，豐記儀器公司代理)，將混合液室溫放置 50 分鐘後，加入 50μl 的 Light emission accelerator- 混合均勻，1~2 秒後，在 0.1~10 秒內用同一台儀器測 -galactosidase signal。

(十三) Antisense assay

Antisense assay 所使用的 oligodeoxynucleotide (ODNs)都是經過硫代基 (phosphothioate)處理的，其序列如下 (S 代表 phosphothioate 的位置)：

ODN S	核酸序列
BNip3	Antisense : CsGsCsTsCsCsGsTTCTsGsCsGsAsCsAsT Control : GsTsCsGsCsAsCsGCGTGCsGsAsGsGsAsGsG

以不含 10% FBS 及 1% Penicillin-Streptomycin 的 RPMI-1640 培養液先配 Thio-ODNs stock 1mM , Thio-ODNs 需先與 ESCORT transfection reagent 室溫反應 15min 後, 數細胞, 離心細胞移除 culture medium , 利用 1ml 含不同濃度的 Thio-ODNs medium 調整細胞數為 2×10^5 個

以配 10 μ M Thio-ODNs 1ml 為例:

Step :

1mM Thio-ODNs stock	10 μ l
Transfection reagent	25 μ l
Media(serum free)	250 μ l
先反應 15min(室溫)	
補 media(with serum)	715 μ l
	1000 μ l

8 小時後, 再加 1mM ATRA d 0.2 μ l (最終濃度 1 μ M) , 收刺激 24 小時後的細胞, 以 NBT reduction assay 觀測細胞 differentiation 的情形, 並以統計方法 Two-way ANOVA 分析之。

(十四) NBT reduction assay

NBT (Nitro blue tetrazolium chloride) 還原反應是因 U937 細胞分化為 macrophage 後, 會產生過氧化氫和超氧離子使 NBT 還原, 產生

deformazan⁽²⁷⁾ (藍紫色沉澱粒)。只有成熟的單核 / 巨噬細胞及顆粒細胞才能還原 NBT，他們的未成熟態細胞則無法還原 NBT。而 U937 細胞不能分化成顆粒細胞⁽²⁵⁾，所以選用 NBT 還原反應作為 U937 細胞分化的標記。一開始必須先數細胞，細胞離心移除 culture medium，調整細胞數為 5×10^4 個 / 100 μ l / well (96well 的 plate)，將細胞濃縮在含有 20% FBS 及 1% P-S 的 RPMI-1640 培養液裡，加入事先配製好的 100 μ l NBT solution (1mg/ml in 1 \times PBS pH=7.4) 混合均勻，避光培養在 37 $^{\circ}$ C，5% 的 CO₂ 中 45 分鐘後⁽²⁶⁾，避光置於 4 $^{\circ}$ C 12~14 小時；細胞離心移除上清液，將細胞濃縮在 20 μ l 的 1 \times PBS 中，數總細胞數 200 個細胞以上再數含有 deformazan 沉澱的細胞數，算帶有 deformazan 沉澱細胞數佔總細胞數的百分比，將不同時間點的細胞數百分比畫出量化圖，以統計方法 (t-test 或 Two-way ANOVA) 分析之。

結果

根據之前的研究指出，ATRA 會促進單核球分化成巨噬細胞，所以我們在此利用此藥物刺激 U937 細胞，研究血球細胞分化的基因表達變化。

一、 U937 細胞分化的分析：

(一) NBT reduction assay：

當單核球分化成巨噬細胞時會產生過氧化氫和超氧離子使 NBT 還原而在細胞內部有淺藍(青)紫色 deformedazan 的沉澱物，可作為細胞分化的標記，此沉澱物的表現可用光學顯微鏡來觀察⁽²⁷⁾。由圖 2.的結果可以很明顯的比較有加入 ATRA 及未加入 ATRA U937 細胞的變化。發現加入 ATRA 刺激後的 U937 細胞帶有淺藍(青)紫色 deformedazan 沉澱物細胞的百分比有因培養時間增長而增加，可知細胞的確是有分化的；而未加入 ATRA U937 細胞帶有淺藍(青)紫色 deformedazan 沉澱物細胞的百分比並沒有因培養時間的增長而增加，造成此現象的產生可能是因未加入 ATRA 刺激，使細胞無分化現象所導致。由此可知 ATRA 的確可促進 U937 細胞分化成巨噬細胞。

(二) 單核球 / 巨噬細胞分化標記—CD14 基因表達的分析⁽²⁸⁾

巨噬細胞的表面會帶有 CD14 的表面蛋白，可作為單核球分化成巨噬細胞的標記，因此利用 RT-PCR 來分析 CD14 基因表達的變化如圖 3。由結果顯示加入 ATRA 刺激 U937 細胞，CD14 的 mRNA 表達

在 1 小時就出現，到 4 小時達最高量，因此 U937 細胞的確是有分化的現象。

二、 U937 細胞的 microarray hybridization

由於希望能夠探討單核球分化為巨噬細胞早期基因表達變化的情形，因此利用 U937 細胞加入 ATRA (最終濃度為 $1\mu\text{M}$)⁽⁴⁾ 培養，收 0 小時、1 小時、4 小時、12 小時及 24 小時的 mRNA 作 microarray hybridization，分析 U937 細胞分化時基因表現的差異性。本次實驗為重複三次獨立的實驗操作，結果如圖 4。

三、 Microarray hybridization 數據分析及比較

首先將 microarray hybridization 實驗的結果利用 microarray 分析軟體分析(軟體下載的網址為<http://www.microarrays.org/>)，將排名前 10% 的基因取交集 (取交集的目的是為了去除不同次實驗的個別差異)，最後偵測到 46 個基因的變化如表 2 及表 3。接著將這些基因利用 Cluster 軟體進行分類如圖 5 所示。圖 5 可以很明顯的觀察出 46 個基因在各個 ATRA 刺激時間下基因表達變化的情形，紅色代表基因的表現量上升，反之綠色代表基因的表現量下降，而顏色的深淺則代表上升或下降的程度。圖中所示經由 ATRA 的刺激後大部分的基因呈現下降的趨勢，只有部分基因為上升的情形，這些基因表達的變化有可能與 U937 分化成巨噬細胞的調節有關，值得進一步深入的探討與研究。

四、RT-PCR：

Microarray 分析取交集後所呈現的 46 個基因，從中分別挑選了 14-3-3 eta subtype mRNA、myc proto-oncogene (c-myc)、protein rapamycin associated protein (FRAP2) gene、Hemopoietic cell kinase (簡寫為 HCK)、HSP90 Nip3 phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, gamma (簡寫為 PI3K α)、stanniocalcin precursor (簡寫為 STC) mRNA、uracil-DNA glycosylase 1 precursor 等 9 個基因利用 RT-PCR 的方式做進一步的確認。如圖 6 及圖 7 所示，14-3-3 eta subtype mRNA、myc proto-oncogene (c-myc)、protein rapamycin associated protein (FRAP2) gene、HSP90 及 uracil-DNA glycosylase 1 precursor 此 5 個基因表達變化為下降趨勢的基因(圖 6)，HCK、BNip3、PI3K α 及 STC mRNA 此 4 個基因表達變化為上升趨勢的基因 (圖 7)，各基因的上升與下降皆和 microarray hybridization 的結果相同，且 9 種基因表達變化皆十分明顯。而根據先前報導已知 Hsp90⁽¹²⁾及 PI3K α ⁽¹³⁾ 的基因表達亦與 U937 細胞分化有關，也與我們 microarray hybridization 的分析結果有一致性。

在許多的細胞經由加藥物刺激後，其 Early growth response protein-1 (Egr-1) 會因藥物的刺激而有所變化，Egr-1 是屬於 zinc-finger transcription factor，含有 GC rich 的 DNA binding

motifs⁽²⁹⁾，在許多的纖維母細胞中，Egr-1 是一種 immediate-early growth response gene，因此細胞早期含有大量 Egr-1 表示細胞正在進行分裂及生長⁽³⁰⁾，而在細胞分化的過程中，Egr-1 會快速減少，可能是細胞停止生長進行分化的緣故。雖然在 microarray hybridization 分析取交集的結果中，前百分之十基因強度的基因並無 Egr-1 的出現，但我們還是想探討 Egr-1 在 ATRA 刺激 U937 細胞分化的過程中究竟是如何變化的？RT-PCR 的實驗證實在 ATRA 刺激 U937 細胞 0 小時時，即有大量 Egr-1 mRNA 的表達，刺激 4 小時後則漸減，如圖 9。

為了確認實驗的精確性，有關 RT-PCR 的實驗我們也分別再次重複，收集不同梯次的 mRNA 檢體做 protein rapamycin associated protein (FRAP2) gene、HSP90、BNip3 及 STC 4 個基因的 RT-PCR，結果與之前的皆相符合，如圖 8 由以上實驗，可確定 microarray hybridization 實驗的結果有再現性，也是正確的。

五、基因的功能分析

在 4 個上升趨勢的基因中，PI3K α 在 1999 有報導⁽¹³⁾指出當 U937 細胞經由 ATRA 刺激而分化，細胞 PI3K α 基因的表達會上升；STC 基因則有報導指出與肌胚細胞 (myoblast) 所有形式的分化有關⁽³¹⁾；HCK 在骨髓細胞中會表達，當造血細胞 (hematopoietic cell) 要分化成骨髓細胞 (myeloid cell) 時，HCK 基因的表達是呈現上升趨勢的

⁽¹⁶⁾ ; 因此還未與細胞分化有關被報導出來的基因即為 BNip3。BNip3 全名為 nineteen kD interacting protein-3, 屬於 E1B 19K / Bcl-2-binding protein , 為 Bcl-2 次家族的成員。最早將 BNip3 基因之序列定出是在 1997 年⁽¹⁹⁾時, 當時對 BNip3 的功能尚未有深入的瞭解, 在 1998 年之後^(32, 33), 陸續就有針對 BNip3 功能性研究的文獻發表出來, 研究的方向大都著重於細胞凋亡的調控, 因此目前所知的 BNip3 基因皆與細胞凋亡的訊息傳遞路徑 (apoptotic signaling pathways) 有關, 並無與分化有關的資訊被發現。

而最近有文獻指出 Egr-1 在單核球及生長抑制中扮演非常重要的角色⁽²²⁾, 為了想瞭解 Egr-1 在單核球的細胞分化中究竟是如何調控? 因此就進一步探討 Egr-1 在 ATRA 刺激 U937 細胞分化的過程中與 ATRA 之間的交互作用及 BNip3 基因在細胞分化中是否有其重要的相關性。

(一) Antisense assay :

本實驗想探討 BNip3 除了 proapoptosis 的功能外, 對於細胞的分化是否也有相關的功能存在。於是設計一段 BNip3 antisense oligonucleotides 抑制 BNip3 基因的表達, 觀察對 U937 的分化是否有影響。結果如圖 10, 將 BNip3 antisense oligonucleotides 以 0 μ M、0.1 μ M、5 μ M 及 10 μ M 不同的濃度 transfect 進入 U937 細胞, 再加入

ATRA 使細胞進行分化，發現 BNip3 antisense oligonucleotides 的濃度愈高，NBT positive 的細胞百分比愈低 ($P < 0.0001$)，而 control 組則無此現象。將 BNip3 antisense oligonucleotides 以 $0\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 及 $10\mu\text{M}$ 不同的濃度 transfect 進入 U937 細胞，再加入 ATRA 使細胞進行分化，收集細胞萃取 total RNA 做 RT-PCR，發現 BNip3 及 CD14 的 mRNA 有減少的現象如圖 11。此結果可以推測 BNip3 與 U937 細胞的分化有相關性。

(二) Egr-1 luciferase assay：

本實驗想觀察 Egr-1 對於 ATRA 誘導 U937 細胞分化所扮演的角色，因此 transfect 具有不同 deletion 的 Egr-1 promoter construct (圖 12) 進入 U937 細胞利用 luciferase activity 觀察 Egr-1 promoter 的調控機制。將具有不同 deletion 的 Egr-1 promoter construct $1\mu\text{g}$ 及 Lac-Z (帶有 β -galactosidase) $0.2\mu\text{g}$ co-transfect 進入 U937 細胞，培養 4 小時後加或不加 ATRA，再培養 48 小時，收集細胞萃取物，以 Dual-Light reporter gene assay system 偵測 luciferase 的活性。由結果發現，加入 ATRA 刺激含有不同 deletion 之 Egr-1 promoter construct 的 U937 細胞，除了 pGL3-Egr-1/-129 (圖 13) 沒有變化，其餘含有不同 deletion 之 Egr-1 promoter construct 的 U937 細胞 luciferase 的活性皆因加入 ATRA 而降低，雖無法得知哪段序列與 ATRA 有交互作用，但可以推

測 Egr-1 promoter 在-550~-712 區域具有 Egr-1 promoter 的 repressor ,
而在-239~-550 區域具有 Egr-1 promoter 的 activator, 至於與 ATRA 有
相關性的區域應在 Egr-1 promoter -129~-550 區域。

討論

綜合 U937 細胞以 ATRA 刺激分化早期基因表達變化的實驗結

果，來做進一步的討論：

一、Microarray hybridization 的誤差：

由於 Microarray hybridization 發展的時間並不算長，因此可能無法像其他行之有年的技術那般已經有豐富的數據及經驗，可以知道實際上的誤差所造成的實驗數據可信的程度為何。除此之外，升降的倍數和實際的操作有很大的關係，如果操作得當可能就具有生物上的意義，反之如果操作不好則實驗的誤差就更大，可信的範圍就愈小。而經由軟體的分析後，基因表達強度的誤差值為 1.6 ± 0.6 (1~2.2)，而分析出來的前 10% 基因的基因強度皆在此數值之上 (表 2)，所以代表這些基因表達的改變是具有可信度的。

二、U937 細胞分化的基因表達：

U937 細胞分化之 Microarray hybridization 的實驗數據利用分析軟體取交集後，偵測到 46 個基因表達有變化 (圖 5)。依基因的特性可分成 kinase、surface protein、transcription factor、apoptosis and cell cycle、protease、angiogenesis、cytokine、DNA damage、oncogene、及 tumor suppressor 等種類的基因 (表 3)，牽涉十分的廣泛。而有類似特性的基因其表達卻未必見得有相同上升或下降的趨勢，可見在單核球分化成巨噬細胞的基因表達是十分複雜的。

根據報導，BNip3 有多方面的功能性，經由粒腺體功能失調及

滲透膜打開，BNip3 會使類壞死細胞 (necrosis-like cell) 死亡⁽³⁴⁾；當體內局部缺血時所導致與缺氧有關的細胞凋亡病程發展和 BNip3 也有相關⁽³⁵⁾。而 BNip3 在主導細胞凋亡的過程中不需依賴 Bcl-2 homology 3 (BH3) domain⁽³⁶⁾，它會與 Bcl-2/Bcl-X_L heterodimerizes 形成另一個 heterodimer⁽³⁷⁾，BNip3 也會與 Nix 形成一個新的次家族來調控細胞的凋亡；而當 Bcl-X_L 過度表達時會抑制細胞的凋亡⁽³⁸⁾，因此這四者的關係到目前為止尚未釐清。但在眾多的文獻當中，沒有提出 BNip3 與細胞的分化有相關性，可能是因為還未將 BNip3 如何扮演細胞的前凋亡因子之研究詳細探討清楚的緣故。在本實驗中發現 BNip3 基因表達在 ATRA 刺激 4 小時後逐漸上升，可能是由於 BNip3 屬於前凋亡因子的基因，讓細胞完全分化之後準備走向凋亡，或者是與 U937 的分化也有相關性？而當加入的 BNip3 antisense oligonucleotides 濃度愈高 (~10 μ M)，U937 細胞分化的程度卻愈低，顯示 BNip3 是與 U937 細胞的分化具有十分密切的相關性，也許更可進一步探討 BNip3 與細胞分化作用的關鍵性功能區域究竟是何區域？

在 Microarray hybridization 的分析數據中有許多值得探討的基因，例如已知與 U937 細胞分化有關的基因 c-myc、Hsp90、PI3K α 及 HCK 是近幾年被發現的。myc proto-oncogene (c-myc) 會影響細胞的

分化在 1993 年以前就被提出^(14, 15)，因此 c-myc 會抑制細胞的分化已是眾所皆知，抑制分化的機制為直接影響 cell-cycle progression 使細胞持續分裂而不進行分化，因此在細胞分化進行中，c-myc 是呈現下降趨勢的。而 Hsp90 與 U937 細胞分化的關係則是在 1996 年被提出⁽¹²⁾，當時發現 Hsp90 含量低時，會使 U937 細胞的增生停止，而促進 U937 細胞的分化。PI3K 許多的 isoform 如 PI3K α 及 PI3K β 皆不會被 ATRA 刺激 U937 細胞而基因表現量有所影響，只有 PI3K γ 會因 ATRA 刺激 U937 細胞分化或停止生長，使 PI3K γ 表現量上升而活化 MAPK，經由一連串的訊息傳遞到達粒腺體引發細胞的凋亡⁽¹³⁾，這樣的現象似乎與 BNip3 有異曲同工之妙，因此細胞在完成分化之後通常是走向凋亡。還有另一個基因 Hematopoietic cell kinase (HCK)，在骨髓細胞中會表達，是屬於 src 家族的 protein tyrosine kinase，當造血細胞 (hematopoietic cell) 要分化成骨髓細胞 (myeloid cell) 時，HCK 基因的表達是呈現上升趨勢的，由文獻中指出^(16, 39, 40)，HCK protein 會與眾多骨髓細胞的特殊接受器交互作用並催化這些特殊接受器的活性且 HCK 基因在造血細胞分化時的基因表達變化是經由轉錄因子 Sp1 所調控的，而在 U937 細胞分化過程中其轉錄因子 Sp1 就會調控 HCK 基因的表達上升使細胞分化，以上基因表達的變化皆與 microarray hybridization 的結果一致。STC (stanniocalcin) 基因與肌胚

細胞 (myoblast) 的分化有相關性已經被證實⁽³¹⁾，而在 U937 分化的過程中，也呈現出上升的趨勢，因此 STC 基因有可能也與 U937 的分化有某種程度的相關性。而也有報導指出，tyrosine-protein kinase syk 的活性在顆粒細胞 (granulocyte) 的分化中有增加的趨勢，但在 U937 細胞中則無此現象⁽⁴¹⁾，可是在我們的 microarray hybridization 分析數據中 (表 2) 顯示，U937 細胞的分化中，tyrosine-protein kinase syk 基因的確是有上升的趨勢，因此由此點，往後或許還可以再做進一步探討 tyrosine-protein kinase syk 基因在單核球分化的過程中其功能性為何？

目前還未有人報導過 14-3-3 eta (14-3-3 ζ) 及 protein rapamycin associated protein gene (FRAP2) 與 U937 細胞分化的相關性，此兩者細胞在本實驗中皆屬於下降趨勢的基因。14-3-3 protein 有五種 isoform⁽⁴⁰⁾，分別是 ζ 、 η 、 α 、 δ 及 θ ，而研究較多的為 ζ 、 η 及 α 三者，現已知此三者染色體的位置⁽⁴³⁾，也瞭解此三者會被 Sphingosine-dependent protein kinase (SDK1) 磷酸化，而此磷酸化會造成 14-3-3 蛋白雙體構形的改變，導致與其他 kinase 之間的關聯性發生變化影響體內的訊息傳遞路徑⁽⁴⁴⁾。Protein rapamycin associated protein gene (FRAP2) 是屬於 FK506 binding protein-rapamycin-associated protein，為 immunophilin，是否與調節

Hsp90 有關目前還未有研究指出，但經由 rapamycin 與 FRAP2 的結合可以抑制 4E-binding proteins (4E-BPs) 的磷酸化，而使 eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) 可與 4E-BPs 結合而活化，eIF4E 是 mRNA 5' cap binding protein，對於 translation 的控制扮演十分重要的角色^(45, 46, 47, 48)。在 Microarray hybridization 的分析中顯示 (表 2) FRAP2 與 eIF4E 基因，在 U937 細胞分化的過程中其基因表達皆是下降的，由此可知此時轉譯作用是停滯的，細胞的確是處於生長停止的狀態。14-3-3 eta 與 FRAP2 是否與 U937 細胞的分化有關則需待進一步的研究。

根據 microarray hybridization 分析結果往百分之十後推，的確有查到 Egr-1 基因為下降趨勢的基因，由 RT-PCR 及 Egr-1 luciferase assay 可很明確的證實。Egr-1 luciferase assay 的結果中雖無法得知是何區域與 ATRA 有交互作用，但可推測 Egr-1 promoter 在-550~-712 區域具有 Egr-1 promoter 的 repressor，而在-239~-550 區域具有 Egr-1 promoter 的 activator。至於與 ATRA 有相關性的區域應在 Egr-1 promoter -129~-550 區域。

綜合以上的分析與討論，讓我們對參與 U937 細胞的分化的基因差異性表達初步瞭解^(49, 50)，也許有朝一日將血癌病人不斷增生的白血球利用基因調控的方式^(51, 52)，將血球引導走向分化的路徑，使血癌的

病情可以獲得控制或甚至於治療，這都將是未來可以應用的方向，也期待對全體大眾有更好的貢獻。

參考文獻

1. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, *Kuby Immunology*. page 1-59, 1999
2. Vincent T. Devita, Jr. Samuel Hellman Steven A. Rosenberg, *Cancer*. volumn 1: page 103-119, 1997
3. Sharon Y. James, Marc A. Williams, Adrian C. Newland and Kay W. Colston, **Leukemia cell differentiation: Cellular and molecular interactions of retinoids and vitamin D**. *Gen. Pharmac.* 32(1): 143-154, 1999
4. Francesco Grignani, Pier Francesco Ferrucci, Ugo Testa, Giampaolo Talamo, Marta Fagioli, Myriam Alcalay, Amedea Mencarelli, Fausto Grignani, Cesare Peschle, Ildo Nicoletti, and Pier Giuseppe Pelicci, **The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR α fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells**. *Cell* 74: 423-431, 1993
5. Martin Ruthardt, Annette Orleth, Lucia Tomassoni, Elena Puccetti, Daniela Riganelli, Myriam Alcalay, Roberta Mannucci, Ildo Nicoletti, Francesco Grignani, Marta Fagioli and Pier Giuseppe Pelicci, **The acute promyelocytic leukemia specific PML and PLZF proteins localize to adjacent and functionally distinct nuclear bodies**. *Oncogene* 16:1945-1953, 1998
6. Timothy R. P. Brown, Timothy J. Stonehouse, Joel S. Branch, Paul M. Brickell, and David R. Katz, **Stable transfection of U937 cells with sense or antisense RXR α in the control of monoblastic differentiation induced by retinoic acid and vitamin D**. *Experimental cell research* 236: 94-102, 1997
7. Sundstrom C., Nilsson K., **Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)**. *Int. J. Cancer* 17: 565-577, 1976
8. 張維懋 ; 生物晶片研發概況。 *科學月刊* , 9: 716-719, 1999
9. 許志瑛 ; DNA 微陣列。 *科學月刊* , 9: 720-725, 1999

10. Venter JC., Adams MD., Myers EW., Li PW., Mural RJ., Sutton GG., Smith HO., Yandell M., Evans CA., Holt RA., Gocayne JD., Amanatides P., Ballew RM., Huson DH., Wortman JR., Zhang Q., Kodira CD., Zheng XH., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas PD., Zhang J., Gabor Miklos GL., Nelson C., Broder S., Clark AG., Nadeau J., McKusick VA., Zinder N., Levine AJ., Roberts RJ., Simon M., Slayman C., Hunkapiller M., Bolanos R., Delcher A., Dew I., Fasulo D., Flanigan M., Florea L., Halpern A., Hannenhalli S., Kravitz S., Levy S., Mobarry C., Reinert K., Remington K., Abu-Threideh J., Beasley E., Biddick K., Bonazzi V., Brandon R., Cargill M., Chandramouliswaran I., Charlab R., Chaturvedi K., Deng Z., Di Francesco V., Dunn P., Eilbeck K., Evangelista C., Gabrielian AE., Gan W., Ge W., Gong F., Gu Z., Guan P., Heiman TJ., Higgins ME., Ji RR., Ke Z., Ketchum KA., Lai Z., Lei Y., Li Z., Li J., Liang Y., Lin X., Lu F., Merkulov GV., Milshina N., Moore HM., Naik AK., Narayan VA., Neelam B., Nusskern D., Rusch DB., Salzberg S., Shao W., Shue B., Sun J., Wang Z., Wang A., Wang X., Wang J., Wei M., Wides R., Xiao C., Yan C., Yao A., Ye J., Zhan M., Zhang W., Zhang H., Zhao Q., Zheng L., Zhong F., Zhong W., Zhu S., Zhao S., Gilbert D., Baumhueter S., Spier G., Carter C., Cravchik A., Woodage T., Ali F., An H., Awe A., Baldwin D., Baden H., Barnstead M., Barrow I., Beeson K., Busam D., Carver A., Center A., Cheng ML., Curry L., Danaher S., Davenport L., Desilets R., Dietz S., Dodson K., Doup L., Ferriera S., Garg N., Gluecksmann A., Hart B., Haynes J., Haynes C., Heiner C., Hladun S., Hostin D., Houck J., Howland T., Ibegwam C., Johnson J., Kalush F., Kline L., Koduru S., Love A., Mann F., May D., McCawley S., McIntosh T., McMullen I., Moy M., Moy L., Murphy B., Nelson K., Pfannkoch C., Pratts E., Puri V., Qureshi H., Reardon M., Rodriguez R., Rogers YH., Romblad D., Ruhfel B., Scott R., Sitter C., Smallwood M., Stewart E., Strong R., Suh E. Thomas R., Tint NN., Tse S., Vech C., Wang G., Wetter J., Williams S., Williams M., Windsor S., Winn-Deen E., Wolfe K., Zaveri J., Zaveri K., Abril JF., Guigo R., Campbell MJ., Sjolander KV., Karlak B., Kejariwal A., Mi H., Lazareva B., Hatton T., Narechania A., Diemer K., Muruganujan A., Guo N., Sato S., Bafna V., Istrail S., Lippert R., Schwartz R., Walenz B., Yooseph S., Allen D., Basu A., Baxendale J., Blick L., Caminha M., Carnes-Stine J., Caulk P., Chiang YH., Coyne M., Dahlke C., Mays A., Dombroski M., Donnelly M., Ely D., Esparham S., Fosler C., Gire H., Glanowski S., Glasser K., Glodek A.,

Gorokhov M., Graham K., Gropman B., Harris M., Heil J., Henderson S., Hoover J., Jennings D., Jordan C., Jordan J., Kasha J., Kagan L., Kraft C., Levitsky A., Lewis M., Liu X., Lopez J., Ma D., Majoros W., McDaniel J., Murphy S., Newman M., Nguyen T., Nguyen N., Nodell M., Pan S., Peck J., Peterson M., Rowe W., Sanders R., Scott J., Simpson M., Smith T., Sprague A., Stockwell T., Turner R., Venter E, Wang M., Wen M., Wu D., Wu M., Xia A., Zandieh A., Zhu X., **The sequence of the human genome.** *Science* 291(5507): 1304-51, 2001

11. Chin-Chuan Chen, Biehuoy Shieh, Ying-Tai Jin, Yun-Er Liao, Chia-Hui Huang, Ji-Tzung Liou, Li-Wha Wu, Wenya Huang, Kung-Chia Young, Ming-Derg Lai, Hsiao-Sheng Liu and Ching Li, **Microarray profiling of gene expression patterns in bladder tumor cells treated with genistein.** *Journal of Biomedical Science* 8: 214-222,2001

12. Joanna Galealauri, David S. Latchman, and David R. Katz, **The role of the 90-kDa heat shock protein in cell cycle control and differentiation of the monoblastoid cell line U937.** *Experimental cell research* 226: 243-254, 1996

13. Reinhard Baier, Tzvetanka Bondeva, Reinhard Klinger, Andrey Bondev, and Reinhard Wetzker, **Retinoic acid induces selective expression of phosphoinositide 3-kinase α in myelomonocytic U937 cells.** *Cell Growth & Differentiation* 10: 447-456, 1999

14. Ryan KM., Birnie GD., **Cell-cycle progression is not essential for c-Myc to block differentiation.** *Oncogene* 14(23): 2835-2843, 1997

15. Skerka C., Zipfel PF., Siebenlist U., **Two regulatory domains are required for downregulation of c-myc transcription in differentiation U937 cells.** *Oncogene* 8(8): 2135-2143, 1993

16. Martin Hauses, Ralf R. Tonjes, and Manuel Grez, **The transcription factor Sp1 regulates the Myeloid-specific expression of the human hematopoietic cell kinase (HCK) gene through binding to two adjacent GC boxes within the HCK promoter-proximal region.** *The Journal of Biological Chemistry* 273(48): 31844-31852, 1998

17. Moulding DA., Giles RV., Spiller DG., White MR., and Tidd DM. Edwards SW., **Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells.** *Blood* 96(5): 1756-1763, 2000
18. Wang KY., Arima N. Higuchi S., Shimajiri S., Tanimoto A., Murata Y., Hamada T., and Sasaguri Y., **Switch of histamine receptor expression from H2 to H1 during differentiation of monocytes into macrophages.** *FEBS Letters* 473(3): 345-348, 2000
19. By Gao Chen, Reena Ray, Don Dubik, Lianfa Shi, Jeannick Cizeau, R. Chris Bleackley, Satya Saxena, R. Dan Gietz, and Arnold H. Greenberg, **The E1B 19k/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis.** *J. Exp. Med.* 186(12): 1975-1983, 1997
20. Boyd JM., Malstrom S., Subramanian T., Venkatesh LK., Schaeper U., Elangovan B., D' Sa-Eipper C., Chinnadurai G., **Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins.** *Cell* 79(2): 189-192, 1994
21. M. Dron, L. Hameau, L. Benboudjema, J. Guymarho, C. Cajean-Feroldi, P. Rizza, C. Godard, C. Jasmin, M. G. Tovey, and M.-C. Lang, **Cloning of a long HIV-1 readthrough transcript and detection of an increased level of early growth response protein-1 (Egr-1) mRNA in chronically infected U937 cells.** *Archives of Virology* 144: 19-28, 1999
22. Kandasamy Krishnaraju, Barbara Hoffman, and Dan A. Liebermann, **Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages.** *Blood* 97(5): 1298-1305, 2001
23. Gerhard Behre , Laura T. Smith and Daniel G. Tenen, **Use of a promoterless Renilla luciferase vector as an internal control plasmid for transient co-transfection assays of Ras-mediated transcription activation.** *BioTechniques* 26(1): 24-28, 1999
24. G. S. Harrison, Y. Wang, J. Tomczak, C. Hogan, E. J. Shpall, T. J.

Curiel and P. L. Felgner, **Optimization of gene transfer using cationic lipids in cell lines and primary human CD4⁺ and CD34⁺ Hematopoietic cells.** *BioTechniques* 19(5): 816-823, 1995

25. 昊炯、王明佗、徐贊、邱沙絡、朱劍琴、朱德煦；TNF- α 在 PMA 和 IFN- α 誘導 U937 細胞生長和分化過程中的作用。 *實驗生物學報* , 27(3): 307-313, 1994

26. Bahram Goliaei, Abdolkhalegh Deizadji, **Effects of hyperthermia and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the differentiation of human leukemic cell line U937.** *Leukemia Research* 22: 705-710,1998

27. Naoyulci Taniguchi and John M. C. Gutteridge, **Histochemical staining of ROS: NBT and O₂⁻/H₂O₂ and cerium methods.** *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species.* page 119-125, 2000

28. Fredrik Oberg, Johan Botling and Kenneth Nilsson, **Functional antagonism between vitamin D₃ and retinoic acid in the regulation of CD14 and CD23 Expression during monocytic differentiation of U937 cells.** *The Journal of Immunology* 150(8): 3487-3495, 1993

29. Candace Shelly, Lilli Petruzzelli and Roman Herrera, **K562 cells resistant to phorbol 12-myristate 13-acetate-induced growth assest: Dissociation of Mitogen-activated protein kinase activation and egr-1 expression from megakaryocyte differentiation.** *Cell Growth & Differentiation* 11: 501-506, 2000

30. Steven B. McMahon and John G. Monroe, **The role of early growth response gene 1 (egr-1) in regulation of the immune response.** *Journal of Leukocyte Biology* 60: 159-166, 1996

31. Jiang WQ. Chang AC. Satoh M. Furuichi Y. Tam PP. Reddel RR., **The distribution of stanniocalcin 1 protein in fetal mouse tissues suggests a role in bone and muscle development.** *Journal of Endocrinology* 165(2): 457-466, 2000

32. JA Vrana, RH Decker, CR Johnson, Z Wang, WD Jarvis, VM Richon, M Ehinger, PB Fisher and S Grant, **Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-X_L, c-Jun, and p21^{CIP1}, but independent of p53.** *Oncogene* 18: 7016-7025, 1999
33. Mieko Matsushima, Tsutomu Fujiwara, Ei-ichi Takahashi, Takeo Minaguchi, Yutaka Eguchi, Yoshihide Tsujimoto, Kaoru Suzumori and Yusuke Nakamura, **Isolation, Mapping, and Functional Analysis of a Novel Human cDNA(BNIP3L) Encoding a Protein Homologous to Human NIP3.** *Genes, Chromosome & Cancer* 21: 230-235, 1998
34. C. Vande Velde, J. Cizeau, D. Dubik, J. Alimonti, T. Brown, S. Israels, R. Hakem and A. H. Greenberg, **BNIP3 and Genetic Control of Necrosis-Like Cell Death through the Mitochondrial Permeability Transition Pore.** *Molecular and Cellular Biology* 20(15): 5454-5468, 2000
35. Richard K. Bruick, **Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(16): 9082-9087, 2000
36. Reena Ray, Gao Chen, Chriatine Vande Velde, Jeannick Cizeau, Jae Hoon Park, John C. Reed, R. Daniel Gietz and Arnold H. Greenberg, **BNIP3 Heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X_L and Induces Cell Death Independent of a Bcl-2 Homology 3 (BH3) Domain at Both Mitochondrial and Nonmitochondrial Sites.** *The Journal of Biological Chemistry* 275(2): 1439-1448, 2000
37. Tetsuo Imazu, Shigeomi Shimizu, Shinji Tagami, Mieko Matsushima, Yusuke Nakamura, Tsuneharu Miki, Akihiko Okuyama and Yoshihide Tsujimoto, **Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with Bcl-2/Bcl-x_L and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability.** *Oncogene* 18: 4523-4529, 1999
38. Gao Chen, Jeannick Cizeau, Chriistine Vande Velde, Jae Hoon Park, Gracjan Bozek, James Bolton, Lianfa Shi, Don Dubik and Arnold

Greenberg, Nix and Nip3 From a Subfamily of Pro-apoptotic Mitochondrial Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 274(1): 7-10, 1999

39. Arold S. O' Brien R. Franken P. Strub MP. Hoh F. Dumas C. Lasbury JE, **RT loop Flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef.** *Biochemistry* 37(42): 14683-91, 1998

40. Quintrell N. Lebo R. Varmus H. Bishop JM. Pettenati MJ. Le Beau MM. Diaz MO. Rowley JD., **Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic.** *Molecular & Cellular Biology* 7(6): 2267-75, 1987

41. Suofu Qin and Hirohei Yamamura, **Up-regulation of Syk Activity during HL60 Cell Differentiation into Granulocyte but Not into Monocyte/Macrophage-Lineage.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236: 697-701, 1997

42. Tamar Megidish, Jonathan Cooper, Lixin Zhang, Haiyan Fu and Sen-itiroh Hakomori, **A Novel Sphingosine-dependent Protein Kinase (SDK1) Specifically Phosphorylates Certain Isoforms of 14-3-3 Protein.** *The Journal of Biological Chemistry* 273(34): 21834-21845, 1998

43. Niels Tommerup and Henrik Lefferst, **Assignment of the human genes encoding 14-3-3 eta (YWHAH) to 22q12, 14-3-3 zeta (YWHAZ) to 2q25.1-p25.2, and 14-3-3 beta (YWHAAB) to 20q13.1 by in situ Hybridization.** *Genomics* 33: 149-150, 1996

44. Ishiguro H., Saito T., Shibuya H., Arinami T., **Association study between genetic polymorphisms in the 14-3-3 eta chain and dopamine D4 receptor genes and alcoholism.** *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 24(3): 343-7, 2000

45. Khaleghpour K., Pyronnet S., Gingras AC., Sonenberg N., **Translational homeostasis: eukaryotic translation initiation factor 4E control of 4E-binding protein 1 and p70 S6 kinase activities.** *Molecular & Cellular Biology* 19(6): 4302-10, 1999

46. Kleijn M., Welsh GI., Scheper GC., Voorma HO., Proud CG., Thomas AA., **Nerve and epidermal growth factor induce protein synthesis and eIF2B activation in PC12 cells.** *Journal of Biological Chemistry* 273(10): 5536-41, 1998
47. Pedersen S., Celis JE., Nielsen J., Christiansen J., Nielsen FC., **Distinct repression of translation by wortmannin and rapamycin.** *European Journal of Biochemistry* 247(1):449-56, 1997
48. Annabelle Grolleau, Nahum Sonenberg, Juana Wietzerbin and Laura Beretta, **Differential regulation of 4E-BP1 and 4E-BP2, two repressors of translation initiation, during human myeloid cell differentiation.** *The Journal of Immunology* 162: 3491-3497, 1999
49. Nozomi Niitsu, Masanori Umeda, Yoshio Honma, **Myeloid and monocytoid leukemia cells have different sensitivity to differentiation-inducing activity of deoxyadenosine analogs.** *Leukemia Research* 24: 1-9, 2000
50. Hidehiko Kikuchi, Taku Fujinawa, Futoshi Kuribayashi, Akira Nakanishi, Shinobu Imajoh-Ohmi, Miki Goto and Shiro Kanegasaki, **Induction of essential components of the superoxide generating system in human monoblastic leukemia U937 cells.** *Journal of Biochemistry* 116: 742-746, 1994
51. H. Obermeier, A. Sellmayer, U. Danesch, M. Aepfelbacher, **Cooperative effects of interferon- α on the induction of NADPH oxidase by retinoic acid or 1,25 (OH) $_2$ -vitamin D $_3$ in monocytic U937 cells.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1269: 25-31, 1995
52. Tetsuya Ohtsuki, Kiyohiko Hatake, Masayuki Ikeda, Hiroshi Tomizuka, Yasuhito Terui, Masaya Uwai and Yasusada Miura, **Expression of Src-like adapter protein mRNA is induced by all-trans retinoic acid.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 230: 81-84, 1997

自述

姓名：謝佩珊

籍貫：台灣省屏東縣

出生日期：西元 1976 年 5 月 12 日

住址：高雄市前鎮區實業路 50 號

學歷：

私立中山醫學院生物化學研究所 (2001)

私立實踐大學食品營養學系 (1998)

私立道明高級中學 (1994)

高雄市立前鎮國民中學 (1991)

高雄市立明正國民小學 (1988)

