

誌 謝

本著終身學習的理念，進入中山醫學院生化所進修，期盼能在職場中求取新知，服務社會。感謝生理科主任張振隆教授、徐志誠老師及蔡金秋老師在動物實驗上的幫助，使我在研究的領域中獲益良多。同時感謝陳凌雲博士及謝易修博士在實驗及課業上的賜教，使得論文得以順利完成。感謝實驗室的夥伴愛琪、燕珠、海永、秀琴、玉燕、蕙玲、意維、逸憲、順發、瑞良、啟芳等在實驗及課業上的互相幫助，分享研究的心得與快樂，將是我在求學階段中令人難忘的日子。更感謝家人的體恤，鼓勵，使我無後顧之憂得以全力以赴。

最後將此論文獻給關心我的師長、朋友以及親愛的家人。

壹、中文摘要

先前研究指出假懷孕鼠子宮蛻膜形成與蛋白激酵素 C 異構體的表現有關。本篇實驗乃進一步以真懷孕鼠探討子宮蛻膜形成與蛋白激酵素 C 異構體表現之相關性。結果顯示在懷孕期間 PKC α 在子宮蛻膜有調節降低的現象 (down- modulation) , 而在子宮肌層並無差異, 此現象在懷孕第 8 至第 9 天最為明顯。而 PKC ζ 並沒有調節降低的現象, 反隨著細胞分裂增加而在蛻膜細胞質與微粒質部份有明顯增加情形, 相同的情形, 也發生在 PKC δ 的表現上, 其可能與細胞分裂速率下降有關。實驗並進一步以組織免疫化學分析法(immunohistochemistry) 測定 PKC 在蛻膜細胞的位置, 結果發現 PKC α 的表現, 多分佈在胚胎的周圍外環的部份, 而 PKC α 異構體大都集中於該部份的細胞核周圍區域, 並呈現活化狀態。實驗另外並採抗組織胺藥物 (diphenhydramine) 抑制假懷孕鼠子宮蛻膜形成, 同時觀察 PKC 異構體表現。結果顯示 PKC α 及 ζ 的表現, 在刺激後第 4 及 8 小時有下降現象, 並呈現劑量依賴情形; 而當以 PKC 抑制劑 (staurosporine, H 7) 處理假懷孕鼠則其蛻膜反而有恢復形成的現象。故本篇結果說明了不同 PKC 異構體的差異性表現可能參與調控蛻膜的形成, 而 PKC 可能參與 diphenhydramine 抗組織胺藥物抑制蛻膜的形成。

貳、英文摘要

we previous found that the PKC isoforms was involved in the development of the deciduomata in pseudopregnant rats .Therefore, in this study ,we determined the expression of protein kinase C (PKC) isoforms during pregnancy . The result showed that PKC α was down-modulation in the decidual cells but not in the myometrium . Down- modulation and were activation compatible with the increase in cell mitosis , which reached a maximum at 8-9 days. Contradictorily, PKC ζ was not down-modulated. It was increased both in the cytosolic and particulate fractions of the decidual cell , and paralleled with the frequency of decidual cells mitosis. The other PKC isoform of δ was also increased , but it was associated with the cell regression . Immunohistochemistry assay confimed the activation of PKC α , with the perinuclear location but only on the extra circycle regien of the implantation site. Moreover, after the treated of diphenhydramine, it reduced the decidualization, and depleted the PKC and PKC after 4 and 8 hour operation. But it was reversed by cotreated with PKC inhibitor, staurosporine and H7. Therefore, these findings suggested that the variablel expressions of PKC isoforms in decidualization tissue might be involved in the modulation of decidual cells growth, and the PKC isoforms were also associated with the inhibitory effect of diphenhydramine.

參、縮寫表

BCIP	: 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BSA	: bovine serum albumin
DAB	: 3,3'-diamine benzidine
DAG	: diacylglycerol
DEAE	: DEAE-cellulose
EDTA	: ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	: ethylene glycol bis (β -aminoethylether) -N,N,N',N',-tetraacetic acid
FBS	: fetal bovine serum
HEPES	: N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid]
IP ₃	: inositol 1,4,5-trisphosphate phosphates
MSH	: β -mercaptoethanol
NBT	: nitroblue tetrazolium
NC	: 4-chloro-1-naphthol
PKC	: protein kinase C
aPKCs	: atypical PKCs
cPKCs	: conventional PKCs
nPKCs	: novel PKCs
PLC	: phospholipase C
PMA	: phorbol 12-mtristate 13-acetate (TPA)
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluororide

PRL : prolactin

SDS : sodium dodecyl sulfate

TCA : trichloroacetic acid

TEMED : tetramethyl ethylenediamine

TPA : 12-O- tetradecanoyln- phorbol-13-acetate

肆、前言

在臨床實驗報告顯示，不管是以人工授孕或試管嬰兒的方式來解決不孕症的問題，胚胎著床對於懷孕與否都是一項非常重要的步驟，任何影響該步驟的因素都可能造成著床失敗而無法懷孕[2]。著床失敗一直是人工授孕技術失敗的主要原因，儘管取卵率、受精率和胚胎分裂率都可突破 90%，但是著床成功的機會對每個胚胎而言卻只有 15~20%。目前對於這個問題，有些可以利用荷爾蒙或胚胎助孵化術解決，有些在醫學上仍是盲點，所以解決的方法可能需要從其他方面著手，例如研究子宮蛻膜形成之機制等相關問題。

子宮蛻膜 (deciduas) 是子宮內膜的基底細胞 (stromal cell) 經由荷爾蒙如雌性素 (estrogen) 和黃體素 (progesterone) 刺激誘發轉化形成[3]，它被認為在胚胎著床過程中扮演非常重要的角色，如調控胚胎侵入作用[4]，而且也是提供胚胎免於母體排斥作用[5]。當受精作用發生後胚胎的滋養層 (trophoblasts) 即附著於子宮的前壁以獲得進一步的養份，而後胚囊 (blastocyst) 沉入子宮內膜完全被覆蓋住，完成著床，整個著床的過程分為三個步驟：(1) 依附 (attachment)；(2) 滲透 (penetration)；(3) 植入 (invasion)。胚囊會植入子宮腔內層，並穿透母體的微血管，直到完全被埋沒而完成著床，經過著床後的子宮內膜稱為蛻膜，由於著床致使附近的蛻膜細胞充血並含有肝醣及酯質此反應稱為蛻膜反應 (decidual reaction)，蛻膜由三部份所組成 (1) 包蛻膜 (decidua capsularis)：

圍繞並覆蓋胚胎的黏膜。(2)基底蛻膜 (decidual basalis)：位於胚胎正下方的膜，以後可以形成胎盤的母體部份。(3)真蛻膜 (decidua versa)：位於子宮腔內其它的蛻膜。蛻膜反應的作用可限制胚胎穿透的範圍，使胚胎不至於一直穿透下去，且蛻膜可以供給胎盤發育初期的營養。胎盤的成熟可以供給胎兒營養和移去胎兒體中的廢物，以及提供氣體交換作用，也可以合成荷爾蒙的作用[1]，若胎盤發育不良，則可能造成前置胎盤 (placenta previa) 即是胎盤著床位置全部或部份位於子宮下段，或是造成胎盤早期剝離 (abruptio placenta) 即是部份或是全部的胎盤過早與子宮壁分離，而引起出血，這些症狀可能使胎兒死亡而造成流產[1]。故有良好的胚胎和足夠的荷爾蒙及建全的子宮，胚胎才能順利著床發育，因此探討子宮蛻膜形成的機制有助於解決著床失敗而導致流產不孕的問題。

子宮蛻膜形成 (decidualization) 已知與諸多荷爾蒙有關，其中包括泌乳素 (prolactin ; PRL) [6]、前列腺素 (prostaglandin)、女性素 (estradiol ; E2)、及黃體素 [3]。除體外培養的模式証實助孕素可促進基質細胞轉變為蛻膜細胞外 [7]。Tabanelli et al. 也曾利用體外培養人類子宮內膜基質細胞並對卵巢荷爾蒙 (ovarian hormone) 促進蛻膜細胞形成加以探討[8]。而報告更指出性腺刺激激素 (gonadotropin) 可直接影響人類子宮內膜基質細胞的轉形作用[9]。此外 Shelesnyak 等也提出組織胺 (histamine) 可激發蛻膜反應 (decidual response)，並發現在大白鼠中直接注射抗組織胺 (anti-histamine) 可以阻止子宮蛻膜反應[10]，而已知子

宮中肥大細胞 (mast cell) 是組織胺主要來源，因而造成微血管滲透性增加和子宮內膜的蛻膜變化。此外因為在著床早期的著床部位可發現前列腺素的濃度增加，所以子宮內膜細胞亦可能是前列腺素的來源。

另有許多報告指出子宮蛻膜形成與荷爾蒙如 progesterone、estrogen、prostaglandin、histamine、TSH/LH、relaxin...等刺激 c-AMP 表現有關[3]，Tang et al 指出泌乳素及助孕素在子宮蛻膜形成之初步會增加 cAMP 的含量 [11]。然而在其他細胞也被證實荷爾蒙 (如 histamine、TSH/LH、relaxin) 的作用與蛋白激酶 C (protein kinase C ; PKC) 活化有關[12,13]，但是 PKC 是否參與子宮蛻膜形成作用至今尚未被證明。

PKC 是 1977 年由日本 Nishizuka 等人，從牛的小腦所發現之異於蛋白激酶 A 的蛋白激酶 [14]，隨後的研究發現此酵素的活化需要細胞膜的磷脂和 diacylglycerol (DAG) [15,16]；因細胞受刺激後，經荷爾蒙或神經傳遞物質作用於細胞表面之受體，經由受體之活化進而活化磷脂 C (phospholipase C ; PLC)，將細胞膜上的磷脂肌醇 (phosphatidyl inositol) 分解，產生第二訊息傳遞物 (second messengers) DAG 和 IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate phosphates)，DAG 進而活化 PKC，因此活化 PKC 之生理途徑已被確認，而陸續的研究也發現除了經由活化磷脂 C 之途徑外，由磷脂 D 和 A₂ 也可以分別活化或加強此激酶的活性。此外，tumor-promoting phorbol esters 如 TPA 也可以活化 PKC，並造成此酶由細胞質轉移至細胞膜 (translocation) [17,18]，但是 TPA 長時間之作用反而造

成其 down-regulation。PKC 在調節需要 Ca^{2+} 的細胞功能上具有重要的角色[19]，它可以透過一些細胞外的訊號，例如：生長因子、荷爾蒙及神經傳導物質等[20,21]，在 trans-membrane 上扮演傳遞訊息的角色。PKC 也被發現可誘導許多細胞的反應，包括細胞的增殖、分化、基因的表現及腫瘤促進作用[22]。PKC 活性過度表現可能造成多數大白鼠的纖維母細胞生長不正常[23]。

PKC 至少含有 12 種異構體（isoenzyme），依其序列的差異大致可將其區分為三類型：(一)傳統型（classical, cPKCs）- α 、 β I、 β II 及 γ ，需要負價的 phospholipids，diacylglycerol 或 phorbol ester，及鈣離子存在下才能夠活化[24,25]；(二)新型（novel, nPKCs）- δ 、 ϵ 、 θ 、 η 及 μ ，需要負價的 phospholipids，diacylglycerol或 phorbol ester 才能活化，但不需要鈣離子[24,26]；(三)異型（atypical, aPKCs）- λ 、 ι 及 ζ ，只要負價的 phospholipids，不需鈣離子，diacylglycerol或 phorbol ester 即可活化[25]。

PKC 是由 C1-C4 四個不同的區域（conserved regions）所組成，C1 是 pseudosubstrate 及 phorbol ester 結合區，C2 是鈣離子結合區，C3 是 ATP 結合區，C4 是受質結合區，具有磷酸化轉移的功用[27,28]。PKC 異構體的差異在於具有或缺少某些區域而使其表現各不同，例如 nPKCs 及 aPKCs 缺少鈣離子結合區；cPKCs 及 nPKCs 在 phorbol ester 的結合位包含 2 個 zinc fingers 之作用部位，而 aPKCs 只具有一個 zinc finger 之作用部位；PKC μ 則缺乏 pseudosubstrate 區。

這三類型異構體之性質、分佈及受活化之方式不盡相同，因

此不同的異構體可能各具不同功能[29-32]。有報告指出個別的 PKC 異構體參與修復細胞的增殖，例如：以 carbon tetrachloride 誘導肝再生時，發現 PKC α 表現增加[33]。在部分的肝切除（hepatectomy）之後也可觀察到細胞核內的 PKC α 減少及 PKC δ 增加[34]。當肝再生期間 PKC 進行重新分佈，從可溶的細胞質部份轉移至微粒部分[35,36]。Folic acid 誘導腎臟再生會造成 PKC α 降低，但是 PKC δ 不會改變[37]。肝臟及腎臟的再生也會誘導初期反應基因的表現，而這些基因的表現直接或間接的透過 PKC 調控，例如：fos、myc、Tis 1、Tis 8 及 Tis 1[38-41]。由以上資料顯示 PKC 的活化可發生在化學或機械式的誘導細胞增殖時期。

在假懷孕的大白鼠，蛻膜瘤細胞的增殖可利用多種刺激方法來達成，包括組織傷害（子宮內膜的刮傷或橫斷的夾住子宮）及組織氨的輸送注射[42]。先前我們的研究已証實 PKC 活性的變化在假懷孕鼠之子宮蛻膜瘤形成中發生[43]，子宮蛻膜形成之第五天，子宮蛻膜瘤組織與對照之子宮組織比較，細胞質中 PKC (cytosolic PKC) 活性在統計上有顯著減少，在微粒成分 (particulate fraction) 之 PKC 活性也有降低，但並無統計上之差異。顯示子宮蛻膜組織之生長可能與細胞質的 PKC 活性減少有關。至於 PKC 異構體的改變，12 種 PKC 異構體中，以 PKC α 、 δ 、 ζ 、 ι 、 λ 與假懷孕鼠之子宮內膜增殖有密切關聯[44]，PKC α 減少造成降低調節 (down – regulation) 現象，但 PKC ζ 增加，且增加的時間與蛻膜細胞的細胞分裂比較正好相對應。PKC δ 的含量在子宮肌層也有增加但卻很少有細胞分裂的情形，可能被認為是當作負

調控角色。而 PKC α 、 λ 異構體在蛻膜作用中有增加的現象也可能具負調控功能，推論 PKC 異構體的表現可能調節蛻膜瘤的形成。故本篇實驗進一步以正常懷孕鼠取其蛻膜組織偵測 PKC 異構體的表現。

已知 histamine 能活化磷酸酯 C 使得聚磷酸肌醇水解造成細胞 DAG 的增加[13]，而 DAG 可促進 PKC 活化及細胞生長[45,46] 故本篇實驗進一步利用抗組織胺（antihistamine）藥物及 PKC 抑制劑抑制假懷孕鼠之子宮蛻膜瘤形成，而確定 PKC 是否透過 histamine 活化。實驗結果將有助於我們了解子宮蛻膜形成過程中 PKC 所扮演的角色，而這些資訊將有助於我們將來研究子宮厚度增加和胚胎著床率提高的參考，以提供某些不孕症病患適當的治療，對於整體受孕率可望提高，且有助於減少醫藥上的支出和降低國人對於不孕症的精神壓力。

伍、實驗材料與方法

一、藥品試劑

1. 實驗動物購自於國科會動物中心：

Sprague-Dawley 雌大白鼠。

2. 購自於美國 Sigma 公司：

Bovine serum albumin (BSA), Adenosine triphosphate (ATP), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Leupeptin, Histone H1 (type III-S), Phosphatidylserine, Sucrose, β -Mercaptoethanol, Tris (hydroxymethyl)-amino methane hydrochloride (Tris-HCl), Dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween-20), 3,3'-Diamine benzidine (DAB), 4-Chloro-1-naphthol, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), Nitro blue tetrazolium (NBT), Aprotinin, Sodium orthovanadate (Na_3VO_4), Poly (Glu-Tyr, 4:1).

3. 購自於英國 Amersham 公司：

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (5000Ci/mmol)。

4.購自於聯工化學廠股份有限公司：

TCA, Sodium chloride (NaCl), Glycine, Ethylene diamine, tetraacetic acid (EDTA), N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), Potassium chloride (KCl), Calcium chloride (CaCl₂), Sodium phosphate (NaH₂PO₄·2H₂O), Magnesium chloride (MgCl₂), Potassium phosphate, dibasic (K₂HPO₄), Chloric acid (HCl)。

5.購自於和光純藥工業株氏會社：

Potassium phosphate, monobasic (KH₂PO₄)。

6.購自於美國 BIO-RAD 公司：

30% Acrylamide-bisacrylamide (29:1) solution, Protein assay dye, Ammonium persulfate, TEMED。

7.購自於德國 E. Merck 公司：

DEAE-cellulose。

8.購自於美國 Transduction Laboratories 公司：

PKC- α mAb, PKC- β mAb, PKC- δ mAb, PKC- ϵ mAb, PKC- ι mAb, PKC- λ mAb, PKC- μ mAb, PKC- θ mAb, PKC- ζ mAb, Brain cell lysate。

9.購自於美國 Gibco/BRL 公司：

PKC- γ mAb、 Fetal bovine serum。

10.購自於美國 Promega 公司：

Anti-mouse IgG (H&L) AP conjugate, Anti-rabbit IgG HRP conjugate。

二、儀器

名稱	廠牌
Spectrophotometer	Beckman DU 640
Centrifuge	Beckman GS-6R
Ultracentrifuge	Beckman L-80
Ultracentrifuge	Hitachi himac CP 85 β
Power supply	Hoefer SX 250
Transphor power supply	Hoefer
Shaker	TKS
水浴加熱器	TKS WB201
單片垂直型電泳槽	OWL
Vortex	SI-2 Genie
homogenizer kontes tissue grind pestle	Wheaton

三、動物處理 (animal treatment)

Sprague-Dawley 雌大白鼠 (體重約 250-300 公克) 置於人

工照明[12 小時光照，12 小時黑暗（光照週期為 05:00 17:00）]，溫控 22 ± 2 之環境中，採自由進食方式。每日檢查其陰道塗抹液，藉以判斷雌大白鼠之動情週期，並挑選具二次以上規律之四日型動情週期雌大白鼠作為實驗動物。

四、大白鼠懷孕誘導法

挑選具二次以上規律之四日型動情週期雌大白鼠於動情前期當天下午(17:00-18:00)置一性活潑雄鼠配對進行交配，成功與否藉由雌鼠陰道口塗抹液觀察精子之存在作為依據。第一批交配後分別於懷孕第 1、5、11、13 和 15 天分別將雌鼠斷頭犧牲並將子宮取下分別稱重。第二批交配後分別在懷孕第 5、8、9、11 天分別將雌鼠斷頭並將子宮取下分別稱重，待進行實驗。

五、假懷孕鼠誘導法及抑制蛻膜形成

將具二次以上規律之四日型動情期雌大白鼠於動情期當天上午以玻棒插入陰道內，在一分鐘內給予 200 次刺激子宮頸 (cervical stimulation) 刺激當天為假懷孕期第 0 天[47,48]。在假懷孕期第四天利用乙醚麻醉雌鼠，剖開其腹腔並將子宮拉出，以特製長針頭輕刮其兩側子宮壁並在右側子宮注射各種劑量的抗組織胺 diphenhydramine (1 mg/0.1ml, 0.5 mg/0.1ml 和 0 mg/0.1ml)，左側則注射生理鹽水為對照組，然後縫合消毒。手術完畢後，逢合並消毒再放入籠中繼續飼養。分別於注射抗組織胺之第 0、4、8、48、72 小時將此鼠斷頭犧牲並將其子宮取下，分別稱重後貯存於 -70

, 待進行實驗。

六、假懷孕鼠子宮蛻膜之藥物處理

大白鼠子宮擢傷處理（即假懷孕子宮蛻膜瘤形成誘發）後於第一天之假懷孕鼠之右側子宮分別注射抗組織胺 1mg/0.1ml diphenhydramin 及 0.5 mg/0.1ml promethazin , 及腎上腺素 epinephrine 0.38 mg/0.1ml , PKC 抑制劑 staurosporine 10 n mole/0.1ml , 25 n mole/0.1ml 及 calphostin C 0.08 n mole/0.1ml , 1 n mole/0.1ml, sangi 600 n mole/0.1ml, H7 200 n mole/0.1ml 以及 PKC 的活化劑 TPA 100 ng/0.1ml ; 左側子宮則注射生理鹽水為對照組, 然後縫合消毒並再放回籠中繼續飼養, 於第 72 小時後將此鼠分別斷頭犧牲, 並將子宮取下後稱其重量並記錄。

七、PKC 之萃取 (extraction of PKC)

將取得大白鼠之子宮組織分別稱重並記錄, 以利剪先剪開子宮, 並用玻棒輕輕地將內膜 (decidual, 蛻膜部份) 刮下, 藉以和外膜 (myometrium, 子宮基膜部份) 分開。再以 1 ml homogenization buffer A' (附錄二) 清洗 (此步驟內膜部份可省略), 然後將組織置於玻璃板上 (需在 4 °C 下), 滴入 0.5 ml homogenization buffer A (附錄二), 以剪刀先將組織剪碎成泥狀, 再放入研磨器內, 加入 1 ml homogenization buffer A, 使用機械研磨 30 次使細胞破碎 (此研磨器需置於冰內); 萃取液倒入超高速離心管, 以 homogenization buffer A 加至 3 ml, 經超高速離心 (40,000

rpm, 4 °C, 1 hr) 之後, 可得上清液 (supernatant) 即為 PKC 的細胞質部份 (cytosolic fraction), 而沉澱物 (pellet) 再加入 1.5 ml homogenization buffer B (附錄二), 並以超音波震盪器將沉澱物打散, 然後在 4 °C 下培育 1 hr, 並且每隔 10 mins 用力搖晃離心管, 使 Triton-X 100 能充分作用; 1hr 之後再次以超高速離心 (40,000 rpm, 4 °C, 1 hr) 萃取此液, 離心所得之上清液即為 PKC 微粒部份 (particulate fraction, 含細胞膜及細胞核之部份) [49]。經萃取得到的 PKC sample 分裝儲存在 -70 °C 下。

八、蛋白濃度測定 (protein assay)

蛋白質的定量採用 Bradford protein assay 方法, 其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物, 當藍色越深表示蛋白含量越高。測試方法首先以一系列已知濃度 BSA 加入 5 分之一體積的 Bradford protein dye, 以波長 595 nm 可見光之吸光度作一標準曲線, 再以同樣的方法測得樣品之 O.D. 值, 即可根據標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

九、西方墨點分析法 (western blot)

樣本的處理是將 PKC 萃取液的細胞質部份取 30 µg 及微粒部份取 15 µg (大約 2 倍的比例), 分別加入 PBS 緩衝液 (附錄二) 後再與 treatment buffer (附錄二) 混勻煮沸 10 分鐘, 迅速置入冰浴中, 再進行 SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳分析 [50]。SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳之上層膠體為 4 % stacking gel, 下層膠體為 10 % separating gel (附

錄二)。將作好之板膠固定到電泳裝置上，並將電泳緩衝液（1 × tank buffer，附錄二）注滿上下電泳槽，然後將處理過之蛋白樣品溶液加入板膠上所形成之 U 型槽中，以 140 Voltage，35 mA 進行電泳。電泳結束後進行蛋白轉移[50]，將膠體浸入冰冷之 electrotransfer buffer（附錄二）5 到 10 分鐘，將膠體平鋪在兩張浸溼的 Whatman 3M 濾紙上，此時將預先浸溼的硝化纖維紙蓋在膠體上面，依次再覆蓋兩張浸溼的 3M 濾紙，並以玻棒輕趕其間之氣泡後裝入 transfer holder，然後置於 electrotransfer tank 於 4 °C 下，進行 100 mA 電轉移，電轉移過夜後，取出硝化纖維紙浸入 20 ml/cm 含 3 %（w/v）FBS 之緩衝液（blocking buffer，附錄二），在室溫下搖動 1 小時。然後加入抗體 PKC isoform Ab：α、δ、ζ、η、θ、ι、κ、λ、μ、ν、ξ、π、ρ、σ、τ、υ、φ、χ、ψ、ω、含 3 %（w/v）FBS 的 20 ml 緩衝液中，與硝化纖維紙在室溫下作用 3 小時，之後以緩衝液（washing buffer，附錄二）清洗兩次，每次 10 分鐘，最後再清洗一次即可倒掉。接著再加 1：1000 secondary Ab 含 3 %（w/v）FBS 的 20 ml 緩衝液，於室溫下作用 1 小時，然後以緩衝液清洗 2 次，每次 10 分鐘，最後再清洗一次即可倒掉。最後將硝化纖維紙浸入 17ml 的受質溶液（substrate buffer，附錄二），加上 30% DAB 2ml，及 30% H₂O₂ 5 μl 進行呈色反應，待硝化纖維紙上有明顯的 band 出現，即可以去離子水終止呈色反應，將顯像之硝化纖維紙用 Alphamager 2000 densitometer 定量。

十、細胞免疫化學呈色法（immunohistochemistry）

將懷孕不同天數的子宮組織以 10% 福馬林處理，然後包埋定

在石蠟中，以 3 微米的厚度作切片，固定於載玻片上後，接著以二甲苯脫蠟，並透過一系列不同濃度的酒精重新水合，再放入 1% H_2O_2 處理 5 分去除內生性的過氧化 活性。再以 PBS 清洗兩次，每次 5 分鐘。接著將標本浸入含有 3%胎牛血清的 PBS 中使其阻止一些非特異性抗原的結合，經過 30 分鐘之後，在室溫下加入單株抗體 PKC α 、Cdc2 (1:100)作用 1 小時後以 PBS 清洗 2 次來移除抗體，每次 5 分鐘。接著加入 2 級抗體 (Anti-rabbit Ig-G 1:1000)，在室溫下作用 1 小時。然後以 PBS 沖洗兩次，每次 5 分鐘。再加入 avidin-biotinylated horseradish peroxidase 溶於 PBS 反應 45 分鐘後以 PBS 清洗兩次，每次 5 分鐘。然後以 DAB (0.05%DAB 溶於 0.05M Tris buffer) 及 0.1% H_2O_2 呈色約 20 分鐘，再以 tris buffer 沖洗後以 hematoxylin 對比染色約 40 秒，接著以去離子水去除染劑，再以不同濃度酒精脫水後，在標本上滴入 mounting media，以蓋玻片覆蓋固定。

十一、組織學檢查 (histology examination)

將懷孕不同天數的子宮組織以 10% 福馬林處理，以 hematoxylin 及曙紅 (eosin) 染色，再顯微鏡下計算細胞有絲分裂的數量，每個視野至少記算 10000-15000 細胞核中有絲分裂的數量。將抗組織胺藥物處理假懷孕鼠的子宮組織分別取不同時數的實驗組與對照組的組織以 10% 福馬林處理，以 hematoxylin 及 eosin 染色，再以顯微鏡觀察。

陸、實驗結果

一、懷孕鼠子宮蛻膜之細胞分裂與重量之變化

當大白鼠交配後其子宮重量開始增加，利用組織學方式檢查增殖蛻膜細胞結果有細胞分裂的情形，在懷孕第 8-9 天其蛻膜細胞分裂的速率達到最高值，約 0.0101% 然後很快的停止分裂，而在第 13 天時則蛻膜細胞停止分裂。子宮重量在懷孕第 8 天即開始增加此時即為蛻膜細胞開始分裂增殖的時間。如圖 2 所示。

二、懷孕鼠子宮蛻膜組織生成期之變化

懷孕鼠的子宮內膜組織隨著天數的增加而其厚度也隨著增厚，表示蛻膜組織隨著生成，而到懷孕第 10 天蛻膜組織開始逐漸減少(圖 3)。

三、蛻膜形成作用中 PKC 異構體的變化

因為在先前假懷孕鼠的實驗結果顯示 PKC α 、 δ 、 ζ 三種異構體有顯著的差別[44]，故在本篇實驗進一步以真懷孕鼠作此三種異構體的表現。結果顯示 PKC α 在懷孕第 9-13 天與懷孕第 1 天比較其蛻膜組織在細胞質部分減少約 50%-72% (圖 4A,4B,4C)，而微粒質部份在第 8-9 天與第 1 天相比較亦降低 23%-50% (圖 5A,5B,5C)。在懷孕第 8 天其組織萃取液中包含有子宮肌層及蛻膜組織而此時 PKC α 有顯著的降低，此現象即是 down-regulation 現象，因為在組織學檢查懷孕第 8-9 天其細胞分裂的比率亦達最高

值，而在子宮肌層部份 PKC α 在細胞質與微粒質部份與第 1 天相比較均有輕微上升的現象 (圖 4,5)。

PKC ζ 的結果與假懷孕鼠之結果相似，即沒有 down-regulation 的現象，在蛻膜組織與子宮肌層部份，不管是細胞質或微粒質部份均有增加的現象，蛻膜組織在懷孕第 9 天與第 1 天相比較其細胞質部份及微粒質部份明顯增加約 201%-221%，而這與蛻膜細胞分裂增殖的速率相當 (圖 4,5)。

PKC δ 異構體在懷孕第 13 天與第 1 天相比較在蛻膜組織之細胞質與微粒質部份也有增加 170%-180 %現象，PKC δ 異構體的增加可能與細胞分裂降低有關。以上結果已被雜誌期刊接受刊登出。而 PKC ι 、 λ 在蛻膜生成期間也有增加的現象，且細胞質與微粒質部份均比子宮肌層組織增加 (圖 6)。

四、免疫組織化學分析 (immunohistochemistry) 懷孕大白鼠蛻膜組織 PKC 異構體分佈位置

懷孕鼠子宮重量在第 8 天即開始增加，而組織學檢查發現此時蛻膜細胞開始分裂增殖，而 PKC α 在子宮肌層和蛻膜組織的細胞質及微粒質均有顯著將低。故進一步以免疫組織化學法來分析，結果顯示在第 1 天時以顯微鏡觀察 PKC α 分佈在子宮肌層，但在內膜部份沒有明顯表現 (圖 7)。而在第 8、9 天蛻膜增殖期，PKC α 出現在胚胎外圍靠外層的蛻膜細胞上，且在細胞核附近。

五、大白鼠蛻膜形成作用中細胞週期蛋白 (cell cycle protein) 之表

現

由先前的實驗得知在蛻膜生成期間有明顯增殖的現象，表示蛻膜生成期間細胞可能處於細胞週期的有絲分裂期，先前以假懷孕鼠模式得知 cdc2、cdk2、cyclin D₃ 三種細胞週期蛋白有表現，本實驗以 cdc2 蛋白作西方墨點分析，結果懷孕鼠在蛻膜組織形成後，其蛻膜組織之細胞質與微粒質均有 cdc2 的表現 (圖 8)。

六、免疫組織化學分析 (immunohistochemistry) 懷孕鼠與假懷孕鼠之蛻膜組織 cdc2 分佈

在前一實驗得知 cdc2 細胞週期蛋白在蛻膜生成期間其表現量增加，故實驗進一步以免疫組織化學分析細胞週期蛋白 cdc2 在懷孕鼠與假懷孕鼠子宮組織參與分佈的位置，結果顯示在蛻膜生成期間 cdc2 的分佈也隨著增加明顯。假懷孕鼠在第 5 天蛻膜瘤部份分佈最明顯，懷孕鼠在第 8 天有增加的情形，至第 9 天時蛻膜部份也達最大量，而第 10 天有減少的情形，此時蛻膜已開始逐漸退化期 (圖 9)。

七、假懷孕鼠以抗組織胺藥物處理之子宮重量圖

假懷孕鼠之子宮刮傷後以抗組織胺藥物 1 mg/0.1ml diphenhydramine 注射右側子宮，左側注射生理鹽水為對照組，分別於注射後第 0、4、8、72 小時將其子宮取下並稱重，則右側實驗組之子宮重量均比對照組輕，即抗組織胺藥物處理會抑制蛻膜瘤的形成 (圖 10)。而以 0.5 mg/0.1ml diphenhydramine 注射右側子

宮，左側注射生理鹽水為對照組，分別於注射後 0、4、72 小時取其子宮並稱重，則右側子宮重量比對照組輕，也顯示有抑制蛻膜瘤的形成但與注射 1 mg/0.1ml diphenhydramine 實驗組相比則抑制現象較弱(圖 11)。

八、假懷孕鼠以抗組織胺藥物處理之子宮蛻膜生成變化

假懷孕鼠之子宮刮傷後以抗組織胺藥物 1 mg/0.1ml diphenhydramine 注射右側子宮，左側注射生理鹽水為對照組，於第 0、4、8、48、72 小時之子宮組織學檢查，發現右側子宮內膜組織並無增大的情形，表示並無蛻膜生成的作用，而左側對照組子宮內膜組織隨著時間增加而有蛻膜生成的作用且變大的情形(圖 12)。而以 0.5mg/0.1ml diphenhydramine 處理之實驗組，也有相同的現象(圖 13)。

九、假懷孕鼠以抗組織胺藥物處理其 PKC 異構體的變化

由前一實驗得知注射抗組織胺藥物會抑制蛻膜瘤形成的現象，而 PKC 是否參與抑制的作用？故實驗進一步在假懷孕鼠之子宮右側注射 1mg/0.1ml diphenhydramine，左側注射生理鹽水當對照組，於第 4、8、48、72 小時取其內膜及蛻膜瘤組織作 PKC α 、 ζ 西方墨點分析，結果發現右側實驗組與左側對照組相比較在微粒質與細胞質部份均有降低的現象(圖 14,15)。以 1 mg/0.1ml 及 0.5 mg/0.1ml 不同濃度的 diphenhydramine 處理假懷孕鼠之右側子宮於第 4、72 小時其內膜及蛻膜瘤中 PKC α 、 ζ 在微粒質與細胞質

部份與左邊對照組之子宮蛻膜瘤比較均有減少的現象，且抗組織胺藥物劑量較低的其 PKC α 、 ζ 的含量有上升的情形 (圖 16,17)。為了須確定電泳分析中檢體蛋白量的標準性,必須作內在標準,故以 α -tubulin 蛋白作西方點墨分析已確定蛋白含量的一致性 (圖 18)。

十、抗組織胺藥物影響大鼠蛻膜形成中 cdc2 之表現

抗組織胺藥物處理假懷孕鼠子宮會抑制蛻膜組織生長，而在假懷孕鼠處理抗組織胺藥物其右側實驗組子宮組織均無 cdc2 蛋白表現,只有在左側對照組第 24, 48, 72 小時有 cdc2 蛋白表現,即抗組織胺藥物處理假懷孕鼠子宮會抑制蛻膜組織生長 (圖 19)。

十一、假懷孕鼠之子宮以 PKC 抑制劑共同處理後其重量之變化

根據上述結果得知 PKC 異構體在抗組織胺藥物處理假懷孕鼠中與對照組比較之下確實有改變，為更進一步確定 PKC 是否被活化，實驗接著以 PKC 的抑制劑 staurosporine, calphostin C., sangi, H7 各不同的濃度合併抗組織胺藥物 diphenhydramine 處理後第 3 天取其子宮稱重與左側處理生理鹽水對照組比較，結果顯示以 PKC 的抑制劑 (staurosporine, H7) 加抗組織胺藥物處理右側子宮重量有增加的情形，而以 PKC 抑制劑 (calphostin C., sangi) 加抗組織胺藥物處理右側子宮，則重量並無增加的情形，推測抗組織胺藥物 diphenhydramine 抑制蛻膜的生成作用，可能與 PKC 的活化作用有關 (圖 20)。為了更進一步確定是否其他的抗組織胺

藥物也透過 PKC 的活化作用，實驗以另一種抗組織胺藥物 promethazine 處理右側子宮，其子宮重量也減少表示抑制蛻膜生長，以 PKC 的活化劑 TPA 處理及腎上腺素處理也抑制子宮生長，以 PKC 的抑制劑 staurosporine 處理，其子宮重量有增加的情形，而以 staurosporine 合併 promethazine 其重量並無增加，以 staurosporine 及 TPA 處理右側子宮，則重量有增加的情形(圖 21)，推測抗組織胺藥物 promethazine 抑制蛻膜生長可能不是透過 PKC 的活化作用。

柒、討論

先前在在我們利用假懷孕鼠的模式,得知在假懷孕時蛻膜瘤的生成期間與 PKC 異構體的表現有關[44], 在 12 種 PKC 異構體中以 PKC α 、 ζ 、 δ 的變化最為明顯, 故本篇進一步以真懷孕鼠的模式去印證假懷孕鼠的模式是否一致, 以期能進一步往下探討蛻膜組織的生成機制。本篇針對 PKC α 、 ζ 、 δ 異構體所作的西方點墨分析結果中在懷孕第 9 天時其蛻膜細胞不論在細胞質及微粒質部份表現量均降低, 而在子宮肌層均無明顯變化, 而此時正是蛻膜細胞分裂速率達最大狀態, 即蛻膜組織在增殖時期, 而 PKC α 的表現量降低即為 down-modulation 現象, 這個結果與以葉酸誘導腎臟再生的情形類似[37], 另外在人類的直腸癌或以化學方法誘導大白鼠發生直腸癌時也有類似的 down-modulation 現象 [52,53]。而在 immunohistochemistry 的結果指出, 在第 8、9 天蛻膜形成時期, PKC α 集中在蛻膜周圍組織的細胞核周圍, 而此時 PKC α 總表現量是降低, 可能是因為蛻膜組織中間部分 PKC α 含量較低所致。曾有報告指出 PKC 轉位到核周圍時會有活化和 down-regulation 現象發生[54], 在葉酸誘導腎臟再生時也有此現象 [37], 故在蛻膜的 formed 中 PKC α 試扮演 down-modulation 的角色, 這與假懷孕鼠的結果一致[44], 而以組織切片染色觀察在蛻膜生成後有空泡的形成, 推測可能有 apoptosis 現象, 但須進一步探討和

其相關的蛋白才可確定。

PKC ζ 在懷孕鼠第 9 天蛻膜組織中不管細胞質或微粒質的表現量均有增加的現象，而其高度表現量的時期正是蛻膜細胞分裂的期間，即 PKC ζ 增加時與蛻膜細胞增殖是同時發生的，此現象在其他報告也有類似情形，例如在 *Xenopus* 的卵母細胞及大白鼠的纖維母細胞中若過度表現突變的 PKC ζ 會減少細胞成熟所需的 DNA 合成作用[55]。其他如 Rat-1 纖維母細胞瘤若由 PDGF 及 PC-PLC 刺激會活化 PKC ζ 進而引起 MAPK 活化路徑而造成細胞的分裂轉形[56]。此結果與假懷孕鼠之結果也是一致[44]。

PKC δ 在懷孕鼠第 13 天達高度表現，此時是蛻膜組織形成的晚期，而此時蛻膜細胞的分裂已經下降，曾有報告指出若過度表現 PKC δ 會減少 NIH3T3 細胞的生長速率[57]，故 PKC δ 扮演的角色是負調控的角色，這可能是一種與細胞生長的生理平衡有關，而此結果與假懷孕鼠的結果也是一致的。

由以上之結果我們觀察到在懷孕期間，蛻膜組織的形成過程中不同 PKC 異構體的表現是扮演不同的調控角色。而我們進一步以假懷孕鼠的模式觀察在懷孕初期蛻膜瘤的形成，是否也與 PKC 的異構體的表現有關，本實驗以抗組織胺藥物刺激假懷孕鼠，結果假懷孕鼠之子宮重量有減少的現象，即有抑制子宮蛻膜的形成，以組織學染色可以觀察出在抗組織胺藥物處理之子宮在肌層部分有變厚的情形而在內層組織並無增大，即沒有蛻膜瘤的生成作用，這與先前有報告指出以抗組織胺藥物處理可以阻止子宮蛻膜反應相應證[10]。而 PKC 異構體 α , ζ 在抗組織胺藥物處理後

與對照組比較均有減少的情形，此代表的意義有可能為 PKC down-regulation 現象[17,18]而參與抑制子宮蛻膜的形成，而當我們以 PKC 抑制劑 calphostin C.及 staurosporine、H7、sangi 抑制 PKC 活性，結果以 staurosporine 及 H7 處理後可以抑制抗組織胺抑制蛻膜的形成，因為其子宮重量有恢復增加的情形；而以 calphostin C.、sangi 處理後並無法使其重量恢復增加，可能是 PKC 已被活化而無法抑制 calpain 的分解作用，推測抗組織胺藥物 diphenhydramine 抑制蛻膜組織的形成可能與 PKC 的活化有關，但當我們以另種抗組織胺藥物 promethazine 處理也會抑制子宮蛻膜生長，以 TPA，epinephrine 處理假懷孕鼠其重量均減少，表示都會抑制蛻膜的形成，而以 PKC 的抑制劑 staurosporine 合併這些藥物處理只有 staurosporine 加 TPA 這一組其重量有增加，表示在懷孕初期若 PKC 受到活化作用則會抑制蛻膜的生長，而我們也發現並不是各種抗組織胺藥物均會透 PKC 的活化而抑制蛻膜瘤的形成，因為 promethazine 加 staurosporine 處理並沒有使其蛻膜恢復生長，表示抗組織胺藥物 promethazine 並不透過 PKC 的活化作用而抑制蛻膜瘤的形成。但仍須進一步以 m-RNA 的測定才可確定 PKC 是否活化而參與調控抑制子宮蛻膜的形成。

根據我們的結果在大鼠子宮蛻膜形成機制所得的探討，即在子宮內膜的基底細胞 (stromal cell) 經由荷爾蒙 (如 estrogen、progesterone、prostaglandin、histamine 等) 刺激誘發細胞轉形成蛻膜細胞，而 PKC 異構體參與調控使其蛻膜細胞可以增殖成蛻膜組織，但在蛻膜形成初期若 PKC 活化可能會抑制蛻膜的形成。蛻膜組織可以使胚胎著床供給胚胎營養而可以保護胚胎使其可以繼續

發育成熟。故有良好健全的子宮蛻膜，胚胎才能順利著床發育。
因此探討子宮蛻膜形成的機制有助於解決著床失敗，而導致不孕
的問題。

參考文獻

1. 黃景泰譯 (1988) 實用產科學.
2. 游士弘、金玉堂、簡利婷、溫慧勤和王鈴琪 (1997) 人工生殖之醫學與法律(上). 當代醫學雜誌, 24(7): 89-94.
3. Tang, B., Guller, S. and Gorpide, E. (1994) Mechanism of human endometrial stromal cells decidualization[Review]. Ann. N. Y. Acad. Sci., 734: 19-25.
4. Pijnenborg, R., Dixon, G., Robertson, W.B. and Brosens, I. (1980) Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. Placenta, 1: 3-19.
5. Golander, A., Zakuth, V., Shechter, Y. and Spierer, Z. (1981) Suppression of lymphocyte reactivity *in vitro* by a soluble factor secretion by explants of human decidua. Eur. J. Immunol., 11: 849-851.
6. Daly, D. H., Maslar, I. A. and Riddick, D. H. (1982) Prolactin production during *in vitro* decidualization of proliferative endometrium. Am. J. Obstet. Gynecol., 145: 672-678.
7. Sananes, N., Weiller, S., Baulieu, E. E. and Goascogne, C. (1978) *In vitro* decidualization of rat endometrial cells. Endocrinology, 103: 86-95.
8. Tabanelli, S., Tang, B. and Gorpide, E. (1992) *In vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 42: 337-344.
9. Tang, B. and Gorpide, E. (1993) Direct effect of gonadotropins on

- decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 47: 115-121.
10. Dey, SK. Villanueva, C. Chien SM Crist, RD. (1978) The role of histamine in implantation in the rabbit, *J. Report Fertil.*, 53: 23-26.
 11. Tang, B., Guller, S. and Gurside, E. (1993) Mechanisms involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *Acta. Eur. Fertil.*, 24: 221-223.
 12. Tilly, B. C., Tertoolen, L. G., Remorie, R., Ladoux, A., Verlaan, I., deLaat, S. W. and Moolenaar, W.H. (1990) Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: action through Ca²(+)-mobilizing H₁ receptors. *J. Cell. Biol.*, 110: 1211-1215.
 13. Niedel, J. E., Kuhn, L. J. and Vandebark, G. R. (1983) Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 36-40.
 14. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, 252: 7603-7609.
 15. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipid. *J. Biol. Chem.*, 254: 3692-3695.
 16. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. and Nishizuka, Y.

- (1979) Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91: 1218-1224.
17. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, 257: 7847-7851.
 18. Kraft, A. S. and Anderson, W. B. (1983) Phorbol esters increase the amount of Ca^{2+} , phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature*, 301: 621-623.
 19. Nishizuka, Y. (1987) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308 : 693-698.
 20. Berridge, M. J. (1987) Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 159-193.
 21. Rozengurt, E. (1989) Signal transduction pathways in mitogenesis. *Brit. Med. Bull.*, 45: 515-528.
 22. Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334: 661-665.
 23. Housey, G. M., Johnson, M. D., Hsiao, M. L., O'brain, C. A., Murrhy, J. P., Kirschmeier, P. and Weinstein, I. B. (1988) Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell*, 52: 343-354.
 24. Hug, H. and Sarre, T. F. (1993) Protein kinase C

- iso-enzymes:divergence in signal transduction ? Biochem. J., 291 :329-343.
25. Jaken, S. (1996) Protein kinase C isoenzyme and substrates. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8: 168-173.
 26. Johannes, F. -J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P. and Pfizenmaier, K. (1994) PKC θ is a novel atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.*, 269: 6140-6148.
 27. Stabel, S. (1994) Protein kinase C - an enzyme and its relatives. *Semin. Cancer Biol.*, 5: 277-284.
 28. Azzi, A., Boscoboinik, D. and Hensey, C. (1992) The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Eur. J. Biochem.*, 208: 547-557.
 29. Huang, K. P., Huang, F. L., Nakabayashi, H. and Yoshida, Y. (1988) Biochemical characterization of rat brain protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.*, 263: 14839-14845.
 30. Hidaka, H., Tanaka, T., Onoda, K., Hagiwara, M., Watanabe, W., Ohta, H., Ito, Y., Tsurudomw, M. and Yoshida, T. (1988) Cell type-specific expression of protein kinase C isozymes in the rabbit cerebellum. *J. Biol. Chem.*, 263: 4523-4526.
 31. Hocevar, B. A. and Fields, A. P. (1991) Selective translocation of beta II-protein kinase C to the nucleus of human promyelocytic (HL60) leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, 266: 28-33.
 32. Liyanage, M., Frith, D., Livneh, E. and Stabel, S. (1992) Protein

- kinase C group B members PKC-delta, -epsilon, -zeta and PKC-L(eta). *Biochem. J.*, 283: 781-787.
33. Sasaki, Y., Hayashi, N., Ito, T., Fusamoto, H., Sato, N. and Kamada, T. (1989) Heterogeneous activation of protein kinase C during rat liver regeneration induced by carbon tetrachloride administration. *FEBS Lett.*, 254: 59-65.
 34. Alessenko, A., Khan, W. A., Wetsel, W. C. and Hannun, Y. A. (1992) Selective changes in protein kinase C isoenzymes in rat liver nuclei during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182: 1333-1339.
 35. Okamoto, Y., Nishimura, K., Nakayama, M., Nakagawa, M. and Nakano, H. (1988) Protein kinase C in the regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151: 1144-1149.
 36. Rush, J. S., Klein, J., Fanti, P., Bhat, N. R. and Waechter, C. J. (1992) Direct assay of membrane-associated protein kinase C activity in B lymphocytes in the presence of Brij 58. *Anal. Biochem.*, 207: 304-310.
 37. Dong, L., Stevens, J. L., Fabbro, D. and Jaken, S. (1993) Regulation of protein kinase C isozymes in kidney regeneration. *Cancer Res.*, 53: 4542-4549.
 38. Kondo, T., Inui, H., Konishi, F. and Inagami, T. (1992) Phospholipase D mimics platelet-derived growth factor as a competence factor in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*,

267: 23609-23616.

39. Carpenter, G. (1992) Receptor tyrosine kinase substrates: src homology domains and signal transduction. *FASEB J.*, 6: 3283-3289.
40. Cowley, B. D., Chadwick, L. J, Grantham, J. J. and Calvet, J. P. (1989) Sequential protooncogene expression in regenerating kidney following acute renal injury. *J Biol Chem.*, 264: 8389-8393.
41. Kujubu, D. A, Norman, J. T., Herschman, H. R. and Fine, L. G. (1991) Primary response gene expression in renal hypertrophy and hyperplasia: evidence for different growth initiation processes. *Am. J. Physiol.*, 260: F823-F827.
42. Finn, C. A., and Keen. P. M. (1963) The induction of the deciduomata in the rat. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 11: 673-682.
43. Shyu, J. C., Hsieh, Y. S., Chang, C. L, Tsai, C. C., Cheng, C. K. and Liu, J. Y. (1997) Change in protein kinase C activity on day 5 of decidualization in pseudopregnant rats. *Chinese. J. Physiol.*, 40: 107-112.
44. Liu, J. Y., Shyu, J. C., Chang, C. L., Tsai, C. C., Chang, A. I., Yang, L. C., Lin, L. Y. and Hsieh, Y. S. (1998) Protein kinase C isoforms during the development of deciduomata in pseudopregnant rats. *Life Sci.*, 63(9): 721-730.
45. Niedel, J. E., Kuhn, L. J. and Vandenbark, G. R. (1983) Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U S A, 80: 36-40.

46. Ashendel, C. L. (1985) The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 822: 219-242.
47. Degeo, V. J. (1966) Vaginal-cervical vibration: A simple and effective method for the induction of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology*, 79: 440-442.
48. Tobert, J. A. (1976) A study of the possible role of prostaglandins in decidualization using a nonsurgical method for the instillation of fluids into the rat uterine lumen. *J. Reprod. Fertil.*, 47: 391.
49. Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S. and Nishizuka, Y. (1982) Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain: subcellular distribution, purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 257: 13341-13348.
50. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
51. Brockenbrough, J. S., Meyer, S. A., Li, C. and Jirtle, R. L. (1991) Reversible and phorbol ester-specific defect of protein kinase C translocation in hepatocytes isolated from phenobarbital-treated rats. *Cancer Res.*, 51: 130-136.
52. Kopp, R., Noelke, B., Sauter, G., Schildberg, F. W., Paumgartner, G. and Pfeiffer, A. (1991) Altered protein kinase C activity in biopsies of human colonic adenomas and carcinomas. *Cancer Res.*, 51: 205-210.

53. Wali, R. K., Baum, C.L., Bolt, M. J., Dudeja, P. K., Sitrin, M. D. and Brasitus, T. A. (1991) Down-regulation of protein kinase C activity in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colonic tumors. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1092: 119-123.
54. Chen, C. S. and Poenie, M. (1993) New fluorescent probes for protein kinase C synthesis, characterization, and application. *J. Biol. Chem.*, 268: 15812-15822.
55. Berra, E., Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Municio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Chapkin, R. S. and Moscat, J. (1993) Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction *Cell*, 74: 555-563.
56. Van Dijk, M., Muriana, F.J., van Der, Hoeven, P. C., de Widt, J., Schaap, D., Moolenaar, W. H. and van Blitterswijk, W. J. (1997) Diacylglycerol generated by exogenous phospholipase C activates the mitogen-activated protein kinase pathway independent of Ras- and phorbol ester-sensitive protein kinase C: dependence on protein kinase C-zeta. *Biochem. J.*, 323: 693-699.
57. Mischak, H., Goodnight, J. A., Kolch, W., Martiny-Baron, G., Schaechtle, C., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Pierce, J. H. and Mushinski, J. F. (1993) Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.*, 268:6090-6096.

圖 表

S.D.品種雌大白鼠(250-300 g)



陰道抹片檢查



2 次正常生理週期之後



振動子宮頸

(誘導假懷孕發生)



第 4 天之後

刮傷刺激

(誘導蛻膜瘤發生)



蛻膜瘤生長

1、誘導蛻膜生成作用流程圖

圖 2. 懷孕鼠著床後蛻膜生成不同天數的子宮重量變化分析，及蛻膜細胞分裂速率的比值。 - + - 代表蛻膜細胞分裂速率的比值；
- ● - 代表子宮重量與體重之比值。

圖 3、懷孕鼠在懷孕不同天數時的子宮變化分析。懷孕鼠子宮體積隨著天數的增加而變大。M：子宮肌層；E：子宮內層；D：蛻膜；Em：胚胎。(10x)

圖 4、西方墨點分析細胞質部份 PKC α 、 δ 、 ζ 異構體的表現。懷孕鼠收

集不同天數之子宮蛻膜組織與子宮肌層組織分別磨，並以 homoge-

nization buffer A 萃取出細胞質部份，進行 SDS-PAGE (10% gel) 電泳，並轉移至硝化纖維紙，再各別染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖 A 與圖 B 為電泳圖，圖 C 為定量圖，結果為兩次實驗之平均值。第 1、5、8 天的檢體為整個子宮組織 (Ut)，而第 9、11、13、15 天的檢體分別為蛻膜部份 (De) 及肌層部份 (My)。

以第 1 天檢體 PKC 異構體的定量值當作 100%。 - - : PKC α ,

- - : PKC ζ , - - : PKC δ 。

圖 5、西方墨點分析微粒質部份 PKC α 、 δ 、 ζ 異構體的表現。

懷孕鼠收集不同天數之子宮蛻膜組織與子宮肌層組織分別研磨，並以 homogenization buffer B 萃取出微粒質部份，進行 SDS-PAGE (10% gel) 電泳，並轉移至硝化纖維紙，再各別染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖 A 與圖 B 為電泳圖，圖 C 為定量圖，結果為兩次實驗之平均值。第 1、5、8 天的檢體為整個子宮組織 (Ut)，而第 9、11、13、15 天的檢體分別為蛻膜部份 (De) 及肌層部份 (My)。以第 1 天檢體 PKC 異構體的定量值當作 100%。- - : PKC α ，- - : PKC ζ ，- - : PKC δ 。

圖 6、西方墨點分析細胞質及微粒質部份 PKC δ 、 ζ 、 ι 、 λ 異構體的表現。

懷孕鼠收集不同天數之子宮蛻膜組織與子宮肌層組織分別研磨，並以 homogenization buffer 萃取出細胞質與微粒質部份，進行 SDS-PAGE (10% gel) 電泳，並轉移至硝化纖維紙，再各別染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖上為細胞質部份，圖下為微粒質部份。

M : marker

圖 7、免疫組織化學分析偵測蛻膜組織內 PKC α 異構體的表現。懷孕
鼠

子宮組織切片先染 PKC α 單株抗體當作 1 級抗體,接著染以 anti-rabbit IgG 的 2 級抗體及 avidin-biotinylated horseradish peroxidase 以 DAB 及 H₂O₂ 染色,再以 hematoxylin 作對比染色,以顯微鏡觀

察 (10x) ; 另由放大 100 倍圖觀察 PKC α 分佈在胚胎周圍靠外層的蛻膜組織(A) ; 胚胎為中心靠內層蛻膜組織為 (C) ; 胚胎為(B)。

圖 8. 西方墨點分析懷孕鼠細胞週期蛋白 cdc2 表現。懷孕鼠收集不同天數之子宮蛻膜組織與子宮肌層組織分別研磨，並以 homogenization buffer 萃取出細胞質與微粒質部份，進行 SDS-PAGE (10% gel) 電泳，並轉移至硝化纖維紙，再各別染以專一性抗體。Ut：整個子宮組織，De：為蛻膜部份，My：為肌層部份

圖 9、免疫組織化學分析偵測蛻膜組織細胞週期蛋白 Cdc2 的表現。
假懷孕鼠及懷孕鼠子宮組織切片先染以 cdc2 單株抗體當作 1 級抗體，接著染以 anti-rabbit IgG 的 2 級抗體及 avidin-biotinylated horseradish peroxidase 以 DAB 及 H₂O₂ 染色，再以 hematoxylin 作對比染色，以顯微鏡觀察。(10x)

圖 10、假懷孕鼠受刺激後誘導蛻膜生成及抗組織胺藥物處理後不同時間的子宮重量變化分析。 - O - 代表左邊子宮以生理鹽水處理當對照組子宮； - ● - 代表右側子宮以 1 mg/0.1ml diphenhydramine 處理後子宮重量為實驗組。

圖 11、假懷孕鼠受刺激後誘導蛻膜生成及抗組織胺藥物處理後不同時間的子宮重量變化分析。 - O - 代表左邊子宮以生理鹽水處理當對照組子宮； - ● - 代表右側子宮以 0.5 mg/0.1ml diphenhydramine 處理後子宮重量為實驗組。

圖 12、假懷孕鼠以抗組織胺藥物處理後在不同時數時的子宮變化。上排代表右側子宮以 1 mg/0.1ml diphenhydramine 處理後在 0、4、8、48、72 小時子宮體積並無增大現象;下排代表左側子宮以生理鹽水處理當對照組，其子宮體積隨著時間增加而變大。M：子宮肌層；E：子宮內層；D：蛻膜瘤組織。(10 X)。

圖 13 假懷孕鼠以抗組織胺藥物處理後在不同時數時的子宮變化分析。

上排代表右側子宮以 0.5 mg/0.1ml diphenhydramine 處理後在 0、4、72 小時子宮體積有稍微變大;下排代表左側子宮以生理鹽水處理當對照組，其子宮體積隨著時間增加而變大(10 x)。

M：子宮肌層；E：子宮內層；D：蛻膜瘤組織。

圖 14. 假懷孕鼠之子宮蛻膜瘤及子宮內層以西方墨點分析細胞質部份，PKC α 、 ζ 異構體的表現。假懷孕鼠在左側子宮以生理鹽水處理當對照組，右側子宮以 1 mg/0.1ml diphenhydramine 處理當實驗組，收集不同時數之蛻膜瘤與子宮內層個別研磨，並以 homogenization buffer A 萃取出細胞質部份，並以 15 μ g/ μ l 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel) 電泳，並轉移至硝化纖維紙，再個別染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖 A 為電泳圖；圖 B 為 PKC α 異構體的定量圖；圖 C 為 PKC ζ 異構體的定量圖；第 0 小時的 PKC 異構體的定量值當作 100%。結果為兩次實驗之平均值。—○—為實驗組檢體；—◇—為對照組檢體。M：Marker；Ly：Brain lysate。

圖 15、假懷孕鼠之子宮蛻膜瘤及子宮內層以西方墨點分析微粒質部份 PKC α , ζ 異構體的表現。假懷孕鼠在左側子宮以生理鹽水處理當對照組，右側子宮以 1 mg/0.1ml diphenhydramine 處理當實驗組，收集不同時數之蛻膜瘤與子宮內層個別研磨，並以 homogenization buffer B 萃取出微粒質部份，並以 15 μ g/ μ l 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel) 電泳，並轉移至硝化纖維紙，再個別染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖 A 為電泳圖；圖 B 為 PKC α 異構體的定量圖；圖 C 為 PKC ζ 異構體的定量圖；第 0 小時的 PKC 異構體的定量值當作 100%。結果為兩次實驗之平均值。-○-為實驗組檢體；-◇-為對照組檢體。M: Marker；Ly: Brain lysate。

圖 16、假懷孕鼠之子宮蛻膜瘤及子宮內層以西方墨點分析 PKC α 異構體的表現。假懷孕鼠在左側子宮以生理鹽水處理當對照組，右側子宮以 1 mg/0.1ml 及 0.5 mg/0.1ml diphenhydramine 處理當實驗組，收集不同時數之蛻膜瘤與子宮內層個別研磨，並以 homogenization buffer 分別萃取出細胞質及微粒質部份，並以 15 μ g/ μ l 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel) 電泳，並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖上 為電泳圖；圖中為細胞質 PKC α 異構體的定量圖；圖下為微粒質 PKC α 異構體的定量圖；第 0 小時的 PKC 異構體的定量值當作 100 %，結果為兩次實驗之平均值。M : Marker ; Ly : Brain lysate。

圖 17、假懷孕鼠之子宮蛻膜瘤及子宮內層以西方墨點分析 PKC ζ 異構體
的表現。假懷孕鼠在左側子宮以生理鹽水處理當對照組，右側子宮以 1 mg/0.1ml 及 0.5 mg/0.1ml diphenhydramine 處理當實驗組，收集不同時數之蛻膜瘤與子宮內層個別研磨，並以 homogenization buffer 分別萃取出細胞質及微粒質部份，並以 15 μ g/ μ l 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel) 電泳,並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖上為電泳圖;圖中為細胞質 PKC ζ 異構體的定量圖；圖下為微粒質 PKC ζ 異構體

的
定量圖；第 0 小時的 PKC 異構體的定量值當作 100%，結果為
兩
次實驗之平均值。 M: Marker; Ly: Brain lysate。

圖 18、假懷孕鼠之子宮蛻膜瘤及子宮內層以西方墨點分析 α -tubulin 蛋白表現。假懷孕鼠在左側子宮以生理鹽水處理當對照組，右側子宮以 1 mg/0.1ml 及 0.5 mg/0.1ml diphenhydramine 處理當實驗組，收集不同時數之蛻膜瘤與子宮內層個別研磨，並以 homogenization buffer 分別萃取出細胞質部份，並以 15 μ g/ μ l 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel) 電泳，並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性抗體。 M: Marker; Ly: Brain lysate。

圖 19.西方墨點分析假懷孕鼠細胞週期蛋白 cdc2 表現。假懷孕鼠在左側子宮以生理鹽水處理當對照組，右側子宮以 1 mg/0.1ml 處理當實驗組，收集不同時數之蛻膜瘤與子宮內層個別研磨，並以 homogenization buffer 分別萃取出細胞質及微粒質部份，並以 15 μ g/ μ l 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel)電泳，

並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的抗體。M: Marker

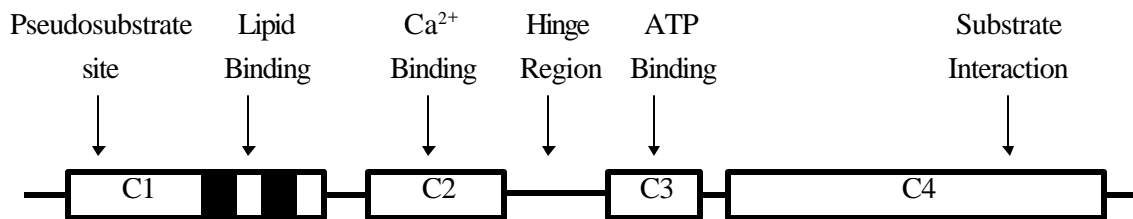
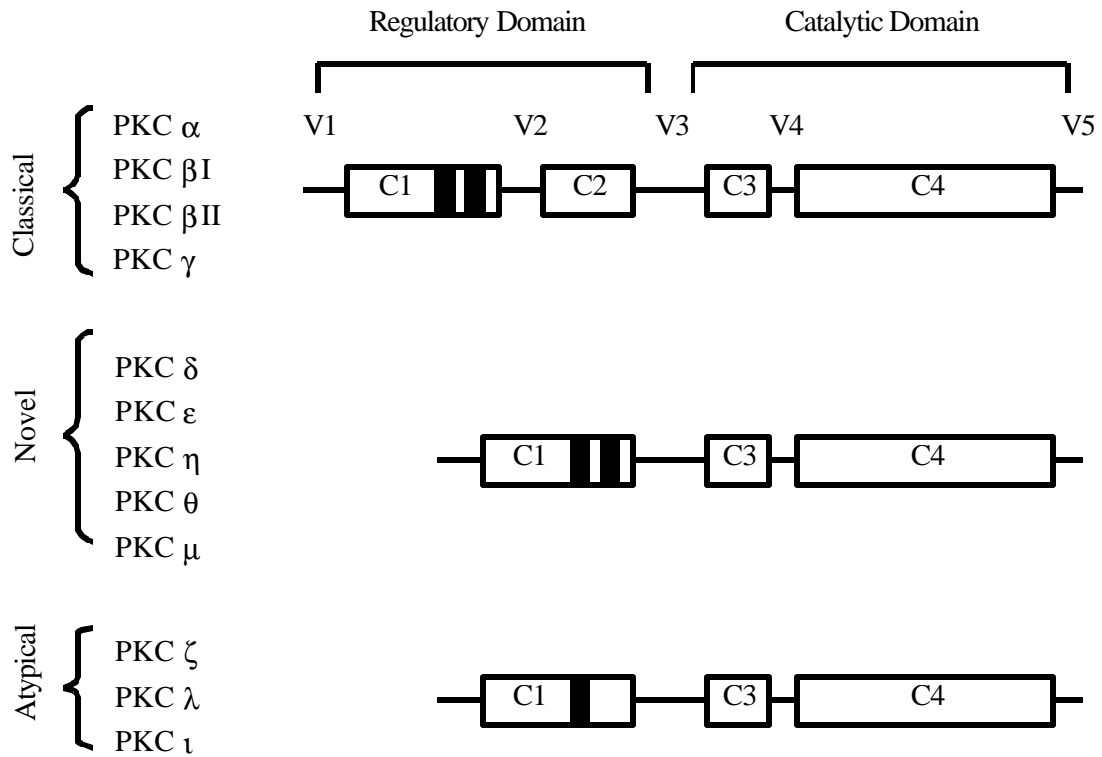
圖 20、假懷孕鼠子宮以不同藥物處理後其重量變化。假懷孕鼠受刮傷

刺激後分別於右側子宮處理不同藥物,左側子宮處理生理鹽水當對照組分別於 72 小時取其子宮重量分析。AH1：代表處理 1 mg/0.1ml diphenhydramine ; S 代表處理 staurosporine ; CC :

代表處理 calphostin C ; Sa : 代表處理 sangi。結果為兩次實驗之平均值。

圖 21. 假懷孕鼠子宮以不同藥物處理後其重量變化。假懷孕鼠受刮傷
刺激後分別於右側子宮處理不同藥物，左側子宮處理生理鹽水
當對照組分別於 72 小時取其子宮重量分析。AH2：代表處理 0.5 mg/0.1ml promethazine；S：代表處理 staurosporine；E：代表處理 epinephrine；TPA：代表處理 PKC 的活化劑。結果為兩次實驗之平均值。

附錄一、PKC 結構圖



圖形參考自 Cell signalling 一書所繪(P.J. Parker, T.Pawson.,1996)

二、實驗溶液配製

Homogenization Buffer A_C , pH 7.4		Stock	30 ml
20 mM	Tris-HCl	200.0 mM	3.0 ml
0.03 mM	Na ₃ VO ₄	30.0 mM	0.03 ml
2 mM	MgCl ₂ ×6H ₂ O	100.0 mM	0.6 ml
2 mM	EDTA	100.0 mM	0.6 ml
0.5 mM	EGTA	100.0 mM	0.15 ml
2 mM	PMSF	200.0 mM	0.30 ml
1 mM	DTT	500.0 mM	0.06 ml

Homogenization Buffer A , pH 7.4		Stock	10ml
20 mM	Tris-HCl	200.0 mM	1.00 ml
0.03 mM	Na ₃ VO ₄	30.0 mM	0.01 ml
2 mM	MgCl ₂ ×6H ₂ O	100.0 mM	0.20 ml
2 mM	EDTA	100.0 mM	0.20 ml
0.5 mM	EGTA	100.0 mM	0.05 ml
2 mM	PMSF	200.0 mM	0.10 ml
1 mM	DTT	500.0 mM	0.02 ml
250 mM	Sucrose	342.3 mM	0.86 g
10 μg/ml	Leupeptin	1.0 mg/ml	0.10 ml

10 $\mu\text{g/ml}$

Aprotinin

1.0 mg/ml

0.10 ml

Homogenization Buffer B , pH 7.5		Stock	10ml
20 mM	Tris-HCl	200.0 mM	1.00 ml
0.03 mM	Na ₃ VO ₄	30.0 mM	0.01 ml
5 mM	MgCl ₂ ×6H ₂ O	100.0 mM	0.50 ml
2 mM	EDTA	100.0 mM	0.20 ml
0.5 mM	EGTA	100.0 mM	0.05 ml
2 mM	PMSF	200.0 mM	0.10 ml
1 mM	DTT	500.0 mM	0.02 ml
5 mM	NaF	100.0 mM	0.50 ml
10 µg/ml	Leupeptin	1.0 mg/ml	0.10 ml
10 µg/ml	Aprotinin	1.0 mg/ml	0.10 ml
0.1 %	Triton X-100		10.0 µl

PKC activity reaction buffer		100 µl
200 mM	Tris-HCl , pH 7.4	20 µl
200 mM	MgCl ₂	10 µl
40 µg	Lysine-rich histone	25 µl
10 µg	Phosphatidylserine	10 µl
10 µg	Leupeptin	10 µl
25 mM	CaCl ₂	10 µl
24 mM	EGTA	5 µl
20 mM	Tris	10 µl

PBS , pH7.2	1 l
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	0.2 g
任選一種 K ₂ HPO ₄	2.39 g
Na ₂ HPO ₄	1.95 g
Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	2.44 g
Na ₂ HPO ₄ ×7H ₂ O	3.68 g

Separating Gel	<u>8%</u>	<u>10%</u>	<u>12.50%</u>
1. 1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	5ml	5ml	5ml
2. Ammonium Persulfate (10 mg/ml)	1ml	1ml	1ml
3. 30% Acrylamide-0.8% Bisacrylamide	5.4ml	6.7ml	8.4ml
4. dd H ₂ O	8.4ml	7.1ml	5.4ml
5. 10% SDS	0.2ml	0.2ml	0.2ml
6. TEMED	6.7µl	6.7µl	6.7µl

Stacking Gel	<u>10ml</u>	<u>15ml</u>
1. 0.5M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5ml	3.75ml
2. Ammonium Persulfate (10 mg/ml)	0.5ml	0.75ml
3. 30% Acrylamide-0.8% Bisacrylamide	1.5ml	2.25ml
4. dd H ₂ O	5.4ml	8.1ml
5. 10% SDS	0.1ml	0.15ml
6. TEMED	25µl	37.5µl

Elution Buffer , pH 7.4		500 ml
20 mM	Tris-HCl	1.21 g
2 mM	EDTA	335 mg
0.5 mM	EGTA	95 mg
2 mM	PMSF	1.745 ml
50 mM	β -mercaptoethanol	5 ml

Loading Buffer		100 ml
Tris-HCl	7.56 g	
SDS	20 g	先溶 , 調至 pH 6.8
ddH ₂ O	50 ml	
2-mercaptoethanol		3.5 ml

Transfer Buffer , pH 8.3	5 l
Tris-HCl	15.12 g
glycine	72 g
methanol	1000 ml
ddH ₂ O	補至 5 l

Blocking Buffer , pH 7.4	500 ml
FBS	15 ml
NaCl	4.5 g

Tween 20	0.5 ml
Tris-HCl	6.05 g
ddH ₂ O	補至 500 ml

Washing Buffer , pH 7.4	5 l
Tris-HCl	60.54 g
Tween 20	5 ml
NaCl	45 g
ddH ₂ O	補至 5 l

Electrode Buffer , pH 8.3	5 l
Tris-HCl	15.13 g
Glycine	72 g
SDS	5 g
ddH ₂ O	補至 5 l

Substrate Buffer , pH 9.5	400 ml
Tris-HCl	4.84 g
NaCl	2.33 g
MgCl ₂	0.406 g
ddH ₂ O	補至 400 ml

Immunoprecipitation Buffer	2X (25ml)	1X (50ml)
1% Triton X-100	50 μ l	50 μ l
150mM NaCl	438.3mg	438.3mg

10mM	Tris, pH 7.4	10ml	10ml
1mM	EDTA	0.5ml	0.5ml
1mM	EGTA	0.5ml	0.5ml
0.2mM	Na ₃ VO ₄	0.338ml	0.338ml
0.2mM	PMSF	50ìl	50ìl
0.5%	NP-40	25ìl	25ìl

附錄三、已發表論文

Life Sciences

**Protein kinase C isoforms during the development of
deciduomata in pregnant rats**

-68- -69- -70- -71- -72- -73- -74-