

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫 : 鳥胺酸去羧化?對類嗜中性白血球分化及活化機制之研 *
* 名 稱 : 究 *
* *****

執行計畫學生： 林正偉
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-017-B
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授： 劉光耀

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 100年03月31日

摘要

鳥胺酸去羧化酶 (Ornithine decarboxylase ; ODC : EC 4.1.1.17) 為多胺(Polyamine)起始合成與速率限制之酵素(rate-limiting enzyme)，其促使鳥胺酸(ornithine)去羧化形成腐胺(putrescine)，爾後 putrescine 經過一連串酵素反應生成亞精胺(spermidine)以及精胺(spermine)。在致癌早期中，癌細胞透過免疫逃脫與免疫抑制等機制迴避免疫系統的攻擊，因此了解癌症對於免疫負調節和逃避免疫系統攻擊的機制，有助於癌症之預防與治療。癌症產生的原因可分類為三種：(一)由致癌基因(oncogenes)所產生的蛋白質引起，其會誘導細胞不斷地增生。(二)由腫瘤抑制基因(tumor suppressor genes)突變所引起，其腫瘤抑制基因會遭受抑制而造成細胞無限制地增生。(三)由細胞程式性凋亡(apoptosis)遭受抑制所引起，細胞不受死亡控制而不斷地累積增生。在過去的研究發現，ODC 在生物功能上扮演著重要的角色，在人類腫瘤細胞中，ODC 能夠持續高度表現而造成細胞不斷增生，但正常細胞中則無此現象，這對於區分腫瘤細胞及正常細胞間的差異提供一項重要指標。ODC 在細胞的生長、分化以及 apoptosis 等等生物功能上扮演著重要的角色，先前研究指出過量的 ODC 與 Polyamine 會影響前骨髓性細胞(promyelocyte)分化成巨噬細胞且抑制巨噬細胞的免疫反應。本篇探討前骨髓性細胞分化成嗜中性白血球時，是否會因為 ODC 的過量表現而影響了類嗜中性白血球的分化、功能以及死亡。首先吾們使用 dimethyl sulfoxide (DMSO) 促進人類前骨髓性白血病細胞株(HL-60)分化成類嗜中性白血球，再利用劉氏染色、RT-PCR 等實驗確定過量表現 ODC 確實會抑制 HL-60 之分化，接著利用吞噬試驗觀察到過量表現 ODC 也會抑制類嗜中性白血球之吞噬作用，因此吾們認定 ODC 的過度表現抑制了類嗜中性白血球的分化與功能。在細胞凋亡方面，吾們觀察細胞凋亡的特徵，如凋亡小體的形成、染色質的片斷化以及細胞周期中 SubG1 peak 的形成，皆觀察到過量表現 ODC 會延緩細胞的死亡。人類嗜中性白血球是經由 Fas 訊息傳導路徑而走向凋亡，吾們也發現是 ODC 干擾 Fas 的表

現使細胞不走向凋亡，而 Fas 下游蛋白 caspase 8, t-bid, Bax, caspase 9, caspase 3 的表現也因為鳥胺酸去羧化酶的表現而有被抑制的現象。於是，我們想進一步知道是否因 ODC 影響 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBPs) 與 PU.1 等轉錄因子而進一步影響 HL-60 的分化與死亡，我們實驗後發現 C/EBP α 、C/EBP β 與 PU.1 表現量下降，因此確定 ODC 確實透過 C/EBP α 、C/EBP β 與 PU.1 影響分化與死亡。因此，本篇實驗推論，ODC 透過 C/EBP α 、C/EBP β 與 PU.1 與 Fas 細胞凋亡路徑影響細胞的分化與死亡，這已達成癌症的產生因子。

前言

白血病 (leukemia) 是血液或是骨髓病變所形成的癌症，特徵是造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) 分化到某階段時，停止分化並不正常的增生，而形成血癌。造成白血病的原因很多也很複雜，一般認為幅射線傷害、化學藥劑傷害、病毒 (HTLV-1 和 HIV) 感染、治療癌症的化學治療藥劑、基因異常、電磁波傷害以及唐氏症等等都可能是白血病的致病因子。白血病以急性、慢性、骨髓性以及淋巴性四種性質而分為急性淋巴性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL)、急性骨髓性白血病 (acute myelogenous leukemia; AML)、慢性淋巴性白血病 (chronic lymphocytic leukemia; CLL) 和慢性骨髓性白血病 (Chronic myelogenous leukemia; CML) 四種型態的血癌。據統計，白血病發生率每十萬人中就有 2.3 個人會發病，平均發病年齡在 63 歲，成人與小孩比例為 9 比 1，男性多於女性為 1.3 比 1。白血病的治療方式以化學治療、血液幹細胞移植以及放射線治療為主，不同型態的白血病，治療方式也不同。根據統計，不同型態的白血病經過治療後病人都可以獲得緩解，但五年存活率因為白血病型態的不同而不同，其中以慢性淋巴白血病最高，平均可存活約六年，慢性骨髓性白血病經過造血幹細胞移植後五年存活率約 40~60%，急性骨髓性白血病以及急性淋巴性白血病的五年存活率約 20~30%。使細胞凋亡及分化為血癌細胞目前最有效的治療方式，也是科學研究癌症所關注的議題。

多胺 (polyamines) 為小脂肪類分子群且具有兩個或多個正價胺基，其中包含腐胺 (putrescine)、亞精胺 (spermidine)、精胺 (spermine) 和屍胺 (cadaverine) 等。polyamines 在細胞內因其帶正電能夠與帶負電之 DNA 等分子相互作用，在細胞生長、分化和死亡上有著重要地位 (Holttta et al., 1993; Pegg et al., 1982; Tabor and Tabor, 1984; Thomas and Thomas, 2001)。

多胺的起始合成和速率限制之酵素 (rate-limiting enzyme) 為鳥胺酸去羧化酶 (ornithine decarboxylase, EC 4.1.1.17; ODC)，其位在人

類第二對染色體 P25 上。ODC 在蛋白質的表現上主要分布在細胞質，活化之結構以雙體 (dimer) 存在，其一 ODC 單體以 N 端區域與另一 ODC 單體之 C 端區域相互結合。ODC 活化須以維他命 B6 (pyridoxal 5-phosphate; PLP) 為輔因子，其結合至酵素之 Lys-69 上並進行催化反應，將結合於酵素 Cys-360 上的鳥胺酸 (ornithine) 轉換成 putrescine，並釋放出二氧化碳 (Grishin et al., 1999; Pegg et al., 1994; Tabor and Tabor, 1984)。ODC 合成研究中，以致癌基因 *c-myc* 研究最多，*c-Myc* 結合到 ODC 的內含子進行作用 (Packham and Cleveland, 1997)，當 *Myc/Max* 轉錄複合體活性增加能夠造成 ODC 之 mRNA 增加。有研究指出淋巴細胞以及神經細胞中 *Myc* 調控失衡而使 ODC 的表現上升，進而使細胞癌化形成淋巴瘤以及神經母細胞瘤 (Nilsson et al., 2005; Rounbehler et al., 2009) 過去的研究指出 ODC 已經成為細胞癌化以及腫瘤進展的指標 (O'Brien et al., 1997)。

ODC 的作用在細胞凋亡 (apoptosis) 這方面，過去研究發現 spermine 為內生性的活性氧清除者 (ROS scavenger) 具有抗氧化的效果 (Ha et al., 1998)，另外 ODC 過度表現會降低細胞活性氧 (reactive oxygen species) 的表現，防止抗癌藥物 methotrexate 以及 TNF-alpha 所引起的細胞凋亡 (Huang et al., 2005; Liu et al., 2005)。ODC 的作用在細胞生長這方面，提高 ODC 的活性會刺激去氧核糖核酸 (DNA) 的合成以及細胞的複製以利於細胞生長，然而先前研究指出細胞過度表現 ODC 其 apoptosis 會下降以及增加細胞的生長速度，在這樣的情況下便可能使細胞走向癌化 (Gerner and Meyskens, 2004)，而 difluoromethylornithine (DFMO) 可以抑制因 ODC 過度表現所造成的癌化現象，使癌症細胞的生長停滯，在臨床試驗階段中，結腸癌以及前列腺癌的治療已使用 DFMO 當作化療藥劑來減緩癌症的發展 (Meyskens et al., 2008; Simoneau et al., 2008)。ODC 在影響細胞分化這方面，利用 TPA (12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) 或 IL-6 (interleukin-6) 誘發人類前骨髓性白血病細胞株 (HL-60) 分化時，ODC 基因的轉錄以及酵素的活性有下降的情況，在誘導 HL-60 分化

成巨噬細胞的實驗中，polyamines 產物之一的 spermidine 加入細胞會降低細胞的分化，而此研究也認為在人類的白血球細胞中降低 spermidine 表現可以增加某些白血病細胞的分化 (Gavin et al., 2004)。ODC 的過度表現影響了白血病細胞分化成巨噬細胞，也干擾巨噬細胞釋放金屬蛋白酶 9 (Matrix metalloproteinase 9, MMP9) 的能力 (Liao et al., 2008)。而 ODC 的抑制劑 DFMO 也被指出能夠刺激老鼠 Friend's 白血病細胞進行分化 (Choudhary et al., 1999)。因此白血病的治療與干預方面，ODC 的表現可當作一個重要的標的。

單元骨髓系幹細胞 (CFU-GEMM) 經由細胞素 (cytokines)、聚落刺激因子 (colony stimulating factor; CSF) 以及轉錄因子 (transcription factor) 等互相調控，分化成各種品系細胞，如紅血球、嗜中性白血球、嗜鹼性白血球、嗜酸性白血球、單核球、巨噬細胞、血小板。各品系細胞在不同分化階段，其特定因子的表現量不同會影響其分化路線。先前研究發現一些天然物或化合物能夠誘發骨髓性血液前驅細胞分化，當中維生素 A、次黃嘌呤和二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide; DMSO) 刺激人類前骨髓細胞分化為顆粒球 (Breitman and Gallo, 1981)，維生素 D₃ 能促進前骨髓細胞分化為單核球 (Polli et al., 1985)，文獻也指出 DMSO 可能短暫的在 DNA 合成時出現，進而使細胞走向分化 (Tanaka et al., 1975)，在 HL-60、Erythroleukemia 之研究也顯示 DMSO 是非常強而有力的分化血液細胞刺激者 (Collins et al., 1978)。

嗜中性白血球的分化過程中，發現其和 core-binding factor (CBFs)、CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) 家族、c-Myb 以及 PU.1 等轉錄因子有關 (Clarke and Gordon, 1998; Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998; Tenen et al., 1997)。C/EBP 家族是一群有相似結構及功能的轉錄因子，至今有六個 C/EBP 家族成員被發現，分別是 C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP γ 、C/EBP δ 、C/EBP ϵ 以及 C/EBP ζ 。C/EBP α 是第一個由 C/EBP 家族分離出來的成員，發現為造血以及脂肪細胞分化的必要角色，且在剔除 C/EBP α 的老鼠被證實出有缺少造

血以及脂肪細胞分化的現象 (Flodby et al., 1996; Wang et al., 1995)。先前研究發現 C/EBP α 在 myeloblast 有高度的表現並且在分化過程中逐漸減少 (Scott et al., 1992)，也發現 C/EBP α 、CBFs 和 PU.1 的共同表現會啟動骨髓過氧化物酶 myeloperoxidase (MPO)、granulocyte-monocyte CSF (GM-CSF) receptor、macrophage CSF (M-CSF) receptor 等和 myeloid 的基因表現 (Ford et al., 1996; Hohaus et al., 1995)。C/EBP β 和 C/EBP δ 的主要功能則在於發炎反應時，調控巨噬細胞的細胞素基因表現 (Hu et al., 1998)。C/EBP ϵ 的功能首先被發現與 C/EBP α 相關 (Williams et al., 1991)，且不表現在未分化的造血性先驅細胞，反而是在成熟的嗜中性球與巨噬細胞有大量表現的情形 (Morosetti et al., 1997)，在動物實驗上也發現 C/EBP ϵ 的缺乏，造成嗜中性白血球中的二級顆粒 (secondary granules) 和三級顆粒 (tertiary granules) 蛋白的缺失，而因此促使其在殺菌反應時能力下降 (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1999)。

spi-1 (PU.1) 基因轉錄出的蛋白質 PU.1 是 Ets 轉錄因子家族成員，其蛋白質會結合在富含 U(PU) 的 DNA 序列上 (Chen et al., 1996; Ray et al., 1990)。PU 序列常位於目標基因的 promoter 附近，具有調控基因表現之功能。在骨髓細胞的發育成熟上，轉錄因子 PU.1 為重要調控者 (Nerlov and Graf, 1998; Nutt et al., 2005; Voso et al., 1994)。在顆粒性白血球、單核球與巨噬細胞中，PU.1 具有高度表現 (Back et al., 2005; Chen et al., 1995; Hromas et al., 1993)，而且在 PU.1^{-/-} 老鼠上，也發現會有缺少成熟骨髓細胞的現象 (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994)。嗜中性白血球在缺少 PU.1 的情況下，會無法完成後期的成熟與分化或形成無功能性細胞 (Anderson et al., 1998)。相關研究者發現，在一些有急性骨髓白血症的病患身上，其 PU.1 基因序列有一些突變而造成 PU.1 的合成遭受抑制 (Mueller et al., 2006)。在造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) 中，文獻也提到 PU.1 與一些轉錄因子互相調節，於是 PU.1 表現量不一，會造就出不同系列的血球細胞 (Takai et al., 2006)。

血液中嗜中性白血球的含量佔白血球細胞的 50~60 %，在發炎初期為第一個反應並前往發炎位置的細胞，特別是細菌以及癌症所造成的發炎反應 (Waugh and Wilson, 2008)，嗜中性白血球受介白素-8 (IL-8) 以及補體 5a 等訊息誘導物質誘導，而穿過血管和組織的縫隙以進行趨化作用。人類未活化的嗜中性白血球一天大約產生 $1-2 \times 10^{11}$ 顆細胞，在沒有外來物侵襲時生命週期大約是 24-36 小時，而後進入細胞凋亡 (Savill et al., 1989)。而發炎反應過後的嗜中性白血球將走向細胞凋亡或經由巨噬細胞吞噬而不影響正常生理功能的表現，人類嗜中性白血球透過 Fas (APO-1) 訊息傳導路徑使細胞走向細胞凋亡 (Bhattacharya et al., 2010)。關於功能方面，嗜中性白血球利用三種方法來直接抵抗外來病原體，分別是吞噬作用、釋放顆粒球的蛋白以及產生 neutrophil extracellular traps (NETs) (Hickey and Kubes, 2009)。吞噬作用是指嗜中性白血球攝入微生物或小分子並與細胞內吞噬小體結合，吞噬小體釋放出活性氧分子以及水解酵素來殺死微生物，而消耗氧所產生活性氧分子的過程稱為氧爆作用 (oxidative burst)，但此作用與呼吸作用以及能量的產生並無關係。氧爆作用包含透過 NADPH 氧化酶的活化而產生大量的過氧化物，以及超氧化歧化物 (Superoxide dismutates) 自發性或是透過超氧化物歧化酶 (Cu/ZnSOD 和 MnSOD) 形成的過氧化氫 (hydrogen peroxide)，例如次氯酸 (HClO) 是藉由骨髓過氧化酶 (MPO) 的催化所產生，次氯酸產生後，嗜中性白血球吞噬細菌再藉由次氯酸殺菌的特性以達到消除外來病原體的效果。嗜中性白血球亦會釋放許多不同類型的顆粒球來抵禦外來的病原體 (Faurischou and Borregaard, 2003)。

研究動機與方向

白血病 (leukemia) 俗稱血癌，其成因是因造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) 在分化過程中遭受癌化，而造成其停止分化且無限增殖，導致全身骨髓及組織浸潤著血癌細胞，患者因此無法正常造血來完善抵抗外來入侵物與維持身體內在平衡，所以對於了解血癌細胞之形成機制與治療方法有其必要性。先前文獻指出c-Myc在人類血癌細胞有大量表現的現象，而ODC的轉錄受到c-Myc所參與，並且在癌細胞中發現ODC有高度表現，在過去研究指出ODC已經成為細胞癌化以及腫瘤進展的指標 (Collins and Groudine, 1982; O'Brien et al., 1997; Wagner et al., 1993)，於是我們想觀察ODC是否在血球細胞分化上與執行功能上造成影響，利用人類前骨髓性白血病細胞株 (HL-60) 及轉染ODC基因 (Dominant-negative ODC與wild-type ODC) 之HL-60細胞株在二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide; DMSO) 刺激誘導分化成類嗜中性白血球模式下，探討ODC對於類嗜中性白血球所扮演的角色。

材料與方法

細胞培養與處理

將人類前骨髓性白血病細胞株 (HL-60) 和從健康人類血液 (作者本人) 中分離之嗜中性白血球培養於無抗生素的 RPMI1640 培養液，其中含有 10% 已去活性的胎牛血清 (GIBCO BRL, Grand Island, NY)，並置於溫度 37°C 且含有 5% CO₂ 一大氣壓之培養箱中。實驗時，以 1.25 % 的二甲基亞砷 (DMSO) 誘導 HL-60 分化成類嗜中性白血球 (Reuben et al., 1976)。

分離人類嗜中性白血球

從健康人類 (作者本人) 身上抽取靜脈血，並置入含 EDTA 抗凝血劑試管中混和均勻。在 15 ml 離心管內先加入 3 mL HISTOPAQUE[®]-1119 (Sigma, St Louis, MO)，再緩慢加入 3 mL ISTOPAQUE[®]-1077 (Sigma, St Louis, MO)，使 ISTOPAQUE[®]-1077 與 HISTOPAQUE[®]-1119 達到分層，再將 6 mL 含 EDTA 之全血沿管壁緩慢加入，並於室溫下以 700 × g 離心 30 分鐘。離心後，離心管中可由上至下分層血漿、單核球、HISTOPAQUE-1077、顆粒球細胞、HISTOPAQUE-1119 以及紅血球，小心抽去血漿、單核球以及 HISTOPAQUE-1077 各層，並將顆粒球細胞移至新的 15 mL 離心管且加入 10 mL 等滲透壓磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (phosphate buffered saline; PBS)，於室溫下以 200 × g 離心 10 分鐘。離心後，抽去上清液並加入 5 mL RPMI1640 培養基洗滌細胞，再一次以 200 × g 離心 10 分鐘。離心後，去掉上清液並加入含有 10% 已去活性的胎牛血清之 RPMI1640 培養液進行實驗。

細胞計數與存活分析

細胞均勻分布於培養液中，取 10 μL 與 10 μL 之 trypan blue 均勻混合，再取與 trypan blue 混和之細胞液 10 μL 打入細胞計數器 (hemacytometer)，先觀察細胞是否有均勻分散於計數區域，確定後利用 trypan blue 只會染上死亡細胞，顯微觀察只能觀察到存活細胞的原理計數之。

冷凍細胞

將細胞離心收集並加入 1 mL 4°C 的 90% 去活性的胎牛血清 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) 和 10% DMSO (dimethylsulfoxide) 溫和混和均勻，置於抗凍試管中，於 -20°C 結凍 1 小時，再置於 -80°C 過夜，最後移置於液態氮桶 (-176°C) 保存。

解凍細胞

從液態氮桶 (-176°C) 取出抗凍試管，快速溶解並將全部取到含有 10% 已去活性的胎牛血清之 RPMI1640 培養液進行洗滌，離心收集後再加入含有 10% 已去活性的胎牛血清之 RPMI1640 培養液培養。

吖啶橙染色

細胞懸浮液與等量的吖啶橙 (acridine-orange) 溶液 (10 µg/mL PBS) 混合均勻，放到玻片上並蓋上蓋玻片，利用綠色螢光 (500-525 nm) 在正立螢光顯微鏡 (ZEISS; AXioskop2) 上觀察細胞核是否產生濃縮，以此判斷細胞為細胞凋亡並照相存檔。

劉氏染色

細胞進行劉氏染色 (Liu' s stain) 後可觀察其型態。細胞利用推片方法進行細胞抹片製作，製好的抹片待乾燥後滴上 Liu' s A buffer (2.8 mM Eosin Y 和 1.3 mM methylene blue 溶在 100% methanol) 室溫下 30 秒，再接著加上 Liu' s B buffer (91.8 mM KH₂PO₄、27.5 mM Na₂PO₄ 和 3.7 mM methylene blue) 混合均勻，室溫下作用 120 秒，再以溫和流水沖洗玻片背面，使多餘之染劑被沖洗掉，放陰涼處自然晾乾。利用正立螢光顯微鏡 (AXioskop2; ZEISS) 觀察並且存檔。

去氧核糖核酸片段化的檢測

離心收集 5×10⁶ 顆細胞後，使用等滲透壓之 PBS 洗滌，並以 1,000 × g 離心 10 分鐘取得沉澱的細胞，再加入 50 µL 細胞溶解性溶液 (0.5% sarkosyl、50 mM pH 8.0 Tris-HCl 和 10 mM EDTA) 和 5 µL 蛋白分解酶 K (proteinase K) (0.5 mg/ml)，放入已設定好 55°C 的水浴 16

個小時。16小時後加入 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的 RNase A 作用 2 個小時。Genomic DNA 加入 phenol-chloroformisoamyl alcohol 後以 12000 rpm 離心 10 分鐘。離心後取最上層液體加上 DNA loading dye，使用 2% 的瓊脂糖凝膠 (agarose) 以 50 伏特 30 分鐘電泳分析並利用數位化影像處理系統 (Alpha imager 2000; Alpha Imager) 照相存檔。

流式細胞儀分析

細胞凋亡之 sub-G1 分析：收集 1×10^6 顆細胞進行分析，用等滲透壓之 PBS 洗滌後以 $1000 \times g$ 離心取得沉澱之細胞，再加入 $200 \mu\text{L}$ 等滲透壓之 PBS 以及 1 mL 100% 酒精溫和混合均勻，並放到 -20°C 以進行固定。隔夜，離心取得沉澱的細胞加入 1 mL 流式細胞分析液 (0.5% Triton X-100 溶在 PBS 和 $0.5 \mu\text{g/mL}$ RNase A)，放置 37°C 反應 30 分鐘，再加入 1 mL 的 propidium iodide (PI) solution ($50 \mu\text{g/mL}$)，放置冰上反應 30 分鐘。利用 FACSCAN 雷射流式細胞儀 (Becton Dickenson, San Jose, CA) 和 WinMDI 軟體來進行分析。

硝基藍四氮唑分析

利用 TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) 100 ng 刺激細胞活性 30 分鐘，再加入 1 mg/ml nitroblue tetrazolium (NBT) 作用 10 分鐘，因為 NBT 被過氧化離子 (O_2^-) 還原而使得細胞會呈現藍黑色的 formazan 沉澱，利用正立螢光顯微鏡 (AXioskop2; ZEISS) 觀察並計數。

吞噬作用

細胞經過三天 1.25% DMSO 的處理後，更新培養液並將細胞和會表現綠色螢光蛋白的大腸桿菌 (GFP-*E. coli*) (詹明修老師實驗室所給予，台中，台灣) 一起培養，可觀察到類嗜中性白血球的吞噬作用 (phagocytosis)。挑出單一的菌株含有綠色螢光蛋白的大腸桿菌經由 Luria - Bertani (LB) 以及 $100 \mu\text{g/ml}$ ampicillin 培養後，用 PBS 洗滌兩次並加入不含血清以及抗生素的 RPMI 培養液來調和細菌的濃度。類嗜中性白血球和每毫升含有 1×10^5 細菌培養兩個小時，使用

正立螢光顯微鏡 (AXioskop2; ZEISS) 觀察、照相並計數細胞吞噬的活性。

免疫螢光染色

將 HL-60 細胞利用 4% 的 paraformaldehyde Solution 固定後，使用細胞離心機 (cytospin) 將細胞附著在玻片上，再利用 0.25% Triton X-100 溶液浸泡細胞玻片 5 分鐘且放在溫度 4°C 之冰箱，使細胞膜通透性增加。接著去掉 Triton X-100 溶液，並用 blocking solution 浸泡細胞玻片 1 小時，並放置在 4°C 之冰箱。1 小時後接著分別加入 CD11B 的抗體 (ab6332; abcam) 以及 Fas (sc-715; santa cruz biotechnology, inc.)，並放置在 4°C 冰箱，兩天後用 PBST 清洗，清洗三次每次 30 分鐘，接著加入 200 μ l 的 PBST 以及 1 μ l 含有 FITC 的二級抗體，室溫下兩個小時，再用 PBST 洗去多餘含有 FITC 的二級抗體，清洗三次每次 30 分鐘，利用正立螢光顯微鏡 (ZEISS; AXioskop2) 觀察並照相。

Luciferase reporter 分析

利用磷酸鈣 (CaCl_2) 將 15 μ g pGL4.21-hFasp 和 5 μ g pGL4.74 的質體轉染到 m-ODC 以及 WT-ODC 細胞株中，並置於溫度 37°C 且含有 5% CO_2 一大氣壓之培養箱中 12 小時。置換細胞的培養基再加入 1.25% DMSO，並收集培養 24 小時以及 48 小時的細胞做實驗分析。使用 Relina luciferase 活性測試做為 internal control。Luciferase assay 運用了 renilla 和 firefly luciferase 分析系統 (Promega)，而活性測試則是利用 TR 717 microplate luminometer 來分析。

反轉錄聚合酵素鏈鎖反應 (RT-PCR)

收集 1×10^6 顆細胞加入 Trizol (MDBio, Taiwan) 分離出核糖核酸。用訊息核糖核酸 (mRNA) 作為模板加入反轉錄酶以及 500 ng 的 dT primer，作用時間為 90 分鐘溫度設定在 42 °C。PCR 實驗，cDNA 加入 40 μ l 混合緩衝溶液其中包含了 75 mM Tris-HCl pH 8.8、20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.01% Tween-20 (v/v)、1 mM MgCl_2 、0.2 mM dNTPs、

0.5 μ M 正向和反向引子以及 1 U Taq 去氧核酸聚合酶 (MDBio)。聚合酶鏈鎖反應條件為：DNA 分開溫度及時間設定在 95 °C 作用兩分鐘，引子與模板煉合溫度以及時間設定在 48-60 °C 作用 30 秒，引子延伸作用溫度及時間設定在 72 °C 作用 90 秒，一共 25-36 個循環，使用 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) 之後產物利用 2% 的瓊脂糖凝膠進行分析並利用數位化影像處理系統 (Alpha imager 2000; Alpha Imager) 照相存檔。本實驗所用的引子如下：

Genes	Length of the PCR product (bps)	Primer sequences (Forward/Reverse)
β -Actin	309	5'-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3' 5'-CAGGGTACATGGTGGTGC-3'
CD11b	570	5'-ATGGCTCTCAGAGTCCTTCTGTAA-3' 5'-CATCAAAGAGAACAAGGTTTTGGAC-3'
C/EBP α	255	5'-AAGGTGCTGGAGCTGACCAG-3' 5'-AATCTCCTAGTCCTGGCTCG-3'
C/EBP β	195	5'-ACAGCGACGAGTACAAGATCC-3' 5'-GCAGCTGCTTGAACAAGTTCC-3'
C/EBP δ	262	5'-ACATAGGAGCGCAAAGAAGC-3' 5'-GCTTTATTCTTACAAATACTG-3'
C/EBP ϵ	305	5'-AGTCTGGGGAAGAGCAGCTTC-3' 5'-ACAGTGTGCCACTTGGTACTG-3'
PU.1	334	5'-ATGTGCCTCCAGTACCCATC-3' 5'-TCTTCTGGTAGGTCATCTTC-3'
Fas	635	5'-ATAAGCCCTGTCCTCCAGGT-3' 5'-TGATGCCAATTACGAAGCAG-3'

免疫點墨法 (Immunoblotting)

收取細胞後用 lysis buffer (溶液包含 10% v/v glycerol、1% v/v Triton X-100、1 mM sodium orthovanadate、1 mM EGTA、10 mM NaF、1 mM sodium pyrophosphate、20 mM Tris pH 7.9、100 μ M β -glycerophosphate、137 mM NaCl、5 mM EDTA、1 mM PMSF、10 μ g/ml aprotinin 和 10 μ g/ml leupeptin) 來溶解細胞以收集全部的蛋白質。使用離心機 12000 rpm 離心 30 分鐘後，收取上清液並加入 loading buffer 於 95°C 加熱 10 分鐘，計算各個樣本的蛋白質濃度並將濃度控制在 50 μ g 再利用膠體電泳 (SDS-PAGE)。蛋白質轉漬到 PVDF 膜後加入一級抗體，並放置於 4°C 之冰箱 48 小時。之後，使用 wash buffer (溶液包含 50 mM Tris-Cl pH 7.5、150 mM NaCl and 0.1% Tween20 (v/v)) 洗滌三次，每次 5 分鐘，之後加入含有 horseradish-peroxidase (HRP) 的二級抗體 (1:1000，利用 wash buffer 當作稀釋液) 作用兩小時，再用 wash buffer 洗滌三次每次 5 分鐘，最後再利用化學冷光 (Perkin-Elmer) 增強抗原抗體複合物的訊號以利觀察。

結果

先前吾所屬實驗室利用已建立的過度表現 ODC 之 HL-60 (wild-type ODC, WT-ODC) 細胞株實驗，發現 HL-60 遭受 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 誘導分化成類巨噬細胞時，過度表現之 ODC 會抑制其分化，且在類巨噬細胞執行功能上，ODC 會藉由抑制腫瘤壞死因子- α (TNF- α) 及 NF- κ B 影響類巨噬細胞釋放 Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) (Liao et al., 2008)。根據先前研究者發現利用 1.25% 二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide; DMSO) 會刺激誘導 HL-60 分化成類嗜中性白血球，於是吾等利用 HL-60、Dominant-negative ODC (mutant ODC; m-ODC)、WT-ODC 三株細胞在 1.25 % DMSO 刺激下，觀察 ODC 是否也會抑制 HL-60 分化成類嗜中性白血球，結果利用劉氏染色 (Liu's stain) 後發現 HL-60 與 m-ODC 細胞株加入 DMSO 後，細胞核會有開始分葉，其為分化現象 (圖一、A) 並計算其分化數量 (圖一、B)。CD11b 為嗜中性白血球分化標誌，為了更明確證明在 DMSO 刺激下過量表現 ODC 會抑制 HL-60 分化成類嗜中性白血球，利用 RT-PCR 測定其 CD11b 之 m-RNA 表現量 (圖二) 與免疫螢光染色觀察 CD11b 在細胞分佈情形 (圖三)，在 WT-ODC 細胞株上明顯看到無 CD11b 分化標誌出現。

先前文獻提到 C/EBPs 與 PU.1 轉錄因子會影響嗜中性白血球的分化，於是我們利用 RT-PCR 偵測 HL-60、m-ODC 與 WT-ODC 細胞株在 DMSO 刺激下 C/EBPs 與 PU.1 之 RNA 表現量，探討 HL-60 在分化成類嗜中性白血球時，ODC 是否經由影響 C/EBPs 與 PU.1 再進而影響其分化，結果在 0、12、24 和 48 小時觀察到過量表現 ODC 對 C/EBP α 、C/EBP β 與 PU.1 有明顯抑制的現象 (圖四)，因此我們認為 ODC 造成 HL-60 不分化成類嗜中性白血球是經由抑制 C/EBP α 、C/EBP β 與 PU.1 來達成。

嗜中性白血球利用吞噬作用以及氧爆作用對付外來入侵物，因此嗜中性白血球活化後的功能是人體重要的防禦線 (Nordenfelt et al., 2009)。實驗中，我們想了解過度表現 ODC 是否也影響細胞分化後的

功能，我們使用 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 促使細胞活化，分別以吞噬及氧爆作用做為嗜中性白血球活化的標準，可以發現誘導分化的 m-ODC 以及 WT-ODC 分別加入 TPA 誘發活性後，加入會表現綠色螢光蛋白的大腸桿菌 (GFP-*E.coli*) 培養並觀察類嗜中性白血球的吞噬能力 (圖五)，結果顯示過度表現 ODC 的細胞會影響細胞的吞噬能力。接著利用 Nitroblue tetrazolium (NBT) 觀察細胞氧爆的情形，氧爆反應時 NBT 會因為活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 的增加而改變結構，同時也改變了吸光值，被誘導分化後的 m-ODC 以及 WT-ODC 加入 TPA 促使細胞活化，結果顯示過度表現 ODC 也影響了細胞氧爆作用的產生 (圖六)，因此吾們確定過度表現 ODC 會影響類嗜中性白血球分化後的功能。

有關於細胞存活，吾們觀察了 HL-60、m-ODC 以及 WT-ODC 分別加入 DMSO 後，隨著時間的增加對於細胞存活率的影響 (圖七)，利用 Trypan blue exclusion assay 可以觀察到 HL-60 和 m-ODC 加入 DMSO 誘導細胞分化後第三天細胞生長開始停滯，而鳥胺酸去羧化酶過度表現的 HL-60 細胞呈現緩慢的生長。於是，吾們想知道細胞死亡是否為 apoptosis，利用 HL-60、m-ODC 以及 WT-ODC 經過 DMSO 誘導分化後，HL-60 以及 m-ODC 細胞第三天出現了 DNA 的片段化 (圖八) 以及 Sub-G1 期的現象 (圖九)，而鳥胺酸去羧化酶過量表現的 HL-60 細胞未產生以上的現象，因此確定細胞是走 apoptosis 路徑死亡，並且過量表現 ODC 也抑制細胞之 apoptosis。吾們對於細胞死亡的型態做更進一步觀察，藉由使用 acridine orange 螢光染色來觀察細胞凋亡的型態是否有凋亡小體的產生，誘導 HL-60、m-ODC 以及 WT-ODC 細胞分化後，染上 acridine orange 後觀察到 HL-60 以及 m-ODC 的細胞型態改變而且有凋亡小體的產生，過量表現 ODC 的 HL-60 細胞可以觀察到細胞型態和未加入 DMSO 的細胞型態相同 (圖十)，因此實驗結果和先前研究的結果相同，過量表現 ODC 會影響細胞之 apoptosis。

先前研究指出人類嗜中性白血球的死亡是經由 Fas 細胞凋亡路徑

(Liles and Klebanoff, 1995)，於是吾們想探討過量表現 ODC 抑制細胞凋亡是否經由抑制 Fas 細胞凋亡路徑所以引起，吾們利用 RT-PCR 檢測 Fas 的 RNA 表現量（圖十一）以及利用免疫點墨法檢測 Fas 影響之下游蛋白 caspase 8、t-Bid、Bax 以及 caspase 9 的表現（圖十二），結果顯示 HL-60 以及 m-ODC 這兩株細胞經過誘導分化後，細胞走向粒線體死亡的訊息傳遞路徑，透過 caspase 8 將 Bid 切割成 t-Bid，以及 Bax 的生成使得 cleaved caspase 9 形成，而活化的 caspase 9 將死亡訊息傳給下游蛋白 caspase 3，使 caspase 3 活化進而促使細胞凋亡，而過度表現 ODC 之細胞株其 Fas 表現及其下游表現蛋白都有被抑制的現象。為了更明顯了解 Fas 在細胞上的表現形態，利用免疫螢光染色觀察細胞膜上 Fas 蛋白質接受器的表現（圖十三），結果明顯的顯示過量表現 ODC 具有抑制 Fas 接受器的現象。

先前研究指出 ODC 具有抑制 Fas 與 PU.1 之 RNA 表現，於是吾們進一步的利用 luciferase assay 測定 *hfas promoter* 的活性（圖十四），結果顯示 WT-ODC 細胞株中 *hfas promoter* 的活性沒有增加現象，因此推論 ODC 透過干擾 *fas* 的轉錄過程使其表現下降。經過確定 ODC 是干擾 Fas 啟動子，然而吾們卻不知道 ODC 如何調控 Fas 基因的表現，在文獻中指出 Fas 與 PU.1 基因受到 NF- κ B 調控，當 NF- κ B 受到抑制會導致 Fas 與 PU.1 表現減少 (Bonadies et al., 2010; Chan et al., 1999)，文獻也指出 C/EBP α 會調控 PU.1 基因進而促進之 (Kummalue and Friedman, 2003)。於是，吾們推論四種可能性（圖十五）：（一）ODC 經由抑制 NF- κ B 而進一步達到抑制 PU.1 與 Fas 的生成；（二）ODC 經由抑制 C/EBP α 而進一步達到抑制 PU.1 與 Fas 的生成（三）ODC 透過抑制 PU.1 的產生，而 Fas 遭受 PU.1 所調控，因此 ODC 透過 PU.1 抑制 Fas 的生成。（四）ODC 純粹單純控制 PU.1 與 Fas 基因，PU.1 在 HL-60 分化成類嗜中性白血球遭到 ODC 抑制，雖然 Fas 的啟動子上有 PU.1 結合位，但 PU.1 的減少對調控 Fas 的基因微乎其微。於是，吾們要確定 PU.1 啟動子與調控序列是否受到 ODC 調控，吾們將文獻所提供 PU.1 啟動子序列與 NCBI 所提供的 PU.1 基因序列 (NT_0092371.18) 做交叉比對，並設計 PCR 引

子：正股5'-CTATGCTGAAGACCCTACACCT-3'；反股
5'-CCAGCACAAGTTCCTGATTT-3'，欲從HL-60、m-ODC 和
WT-ODC三株細胞之Genomic DNA 夾出PU.1啟動子（從序列
47340602處至47340018處，共525 bp）。其PU.1適合的黏合溫度
（Annealing temperature）設定在51°C（圖十六）。

討論

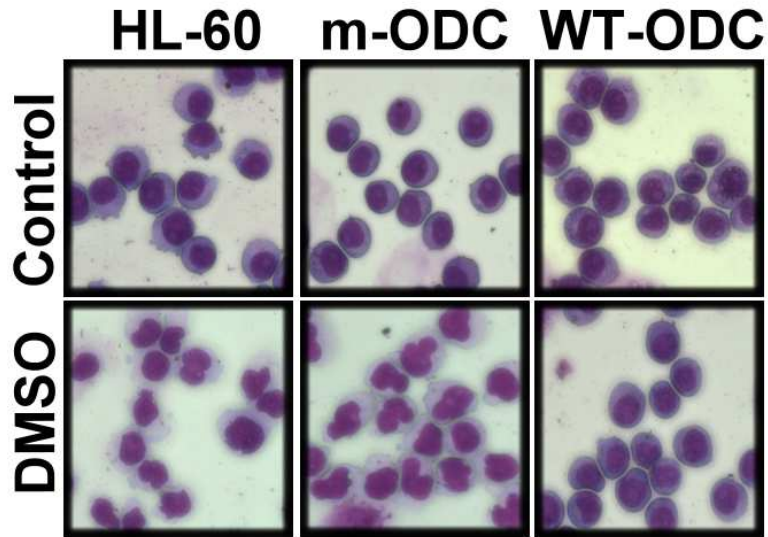
ODC 在前骨髓性細胞分化成嗜中性白血球中扮演者重要的角色，其能抑制細胞分化、活化後功能與細胞凋亡。ODC 若在細胞中過度表現，易讓細胞走向癌化，所以 ODC 的生物功能不可忽視。本篇參考先前研究，過量表現之 ODC 與 Polyamine 會抑制巨噬細胞的免疫反應和影響前骨髓性細胞 (promyelocyte) 的分化，於是我們利用 DMSO 刺激 HL-60 分化成類嗜中性白血球時，探討 ODC 對其影響。

實驗證明過量表現 ODC 之 HL-60 細胞株確實不受 DMSO 影響而分化，且 ODC 也抑制類嗜中性白血球的功能。人體中嗜中性白血球的細胞凋亡是走 Fas 細胞凋亡途徑，我們也證明 HL-60 受到 DMSO 刺激分化後死亡也是經由 Fas 細胞凋亡途徑，而且也證明過量表現 ODC 會抑制 Fas 表現，使細胞免於死亡。於是，我們進一步想知道 HL-60 分化成類嗜中性白血球時，其中 ODC 影響分化與細胞凋亡之分子機制，因此我們證明了 ODC 確實是有影響 Fas 啟動子，之後我們再從文獻尋找啟動 Fas 基因的相關機制。在文獻中指出 Fas 的啟動子上有 PU.1 結合位，且 Fas 與 PU.1 基因受到 NF- κ B 調控，當 NF- κ B 受到抑制會導致 Fas 與 PU.1 表現減少 (Bonadies et al., 2010; Chan et al., 1999)，文獻也指出 C/EBP α 會調控 PU.1 基因進而促進其表現 (Kummalu and Friedman, 2003)。於是，我們推論以下幾點可能 (圖十五)：(一) ODC 經由抑制 NF- κ B 而進一步達到抑制 PU.1 與 Fas 的生成；(二) ODC 經由抑制 C/EBP α 而進一步達到抑制 PU.1 與 Fas 的生成(三) ODC 透過抑制 PU.1 的產生，而 Fas 遭受 PU.1 所調控，因此 ODC 透過 PU.1 抑制 Fas 的生成。(四) ODC 單純控制 PU.1 與 Fas 基因，PU.1 在 HL-60 分化成類嗜中性白血球時遭到 ODC 抑制，雖然 Fas 的啟動子上有 PU.1 結合位，但 PU.1 的減少對於調控 Fas 基因是微乎其微。於是，欲想證明以上幾點，我們首先要證明 ODC 確實影響 PU.1 之調控序列，再進一步證明各個的可能性。

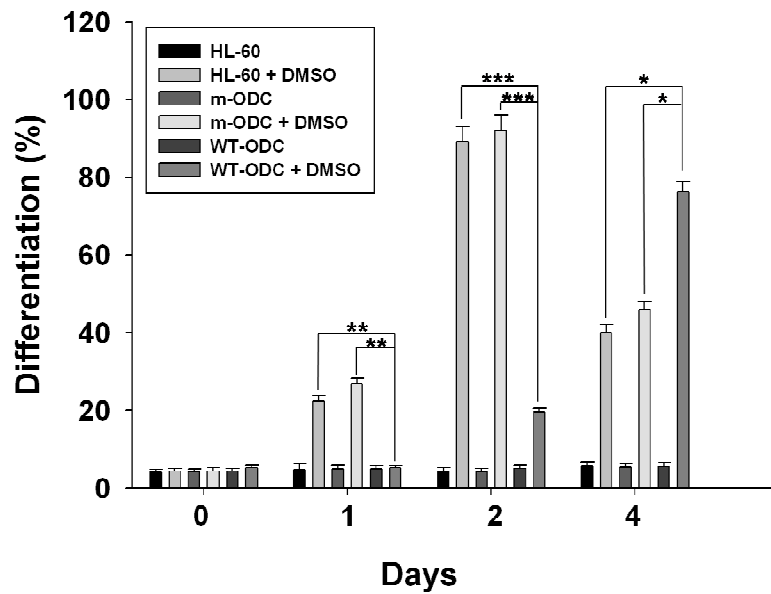
總結之，ODC 對於細胞影響甚大，其過度表現會引起細胞癌化，因此我們可以朝向找出有效標靶藥物，針對因 ODC 引起之癌症做 ODC 抑制，而不會造成抑制正常細胞之 ODC。

圖表

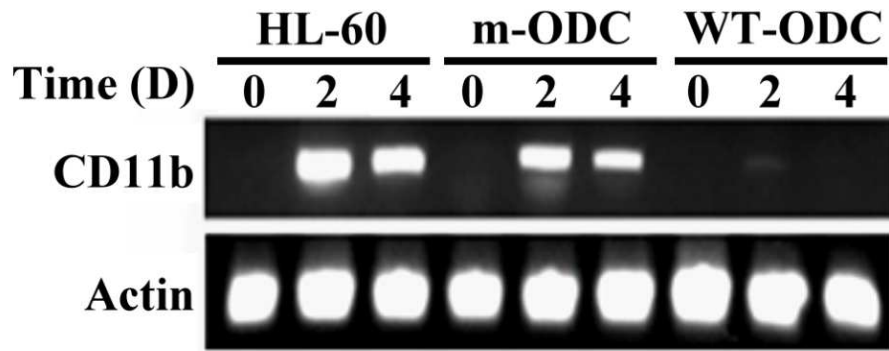
(A)



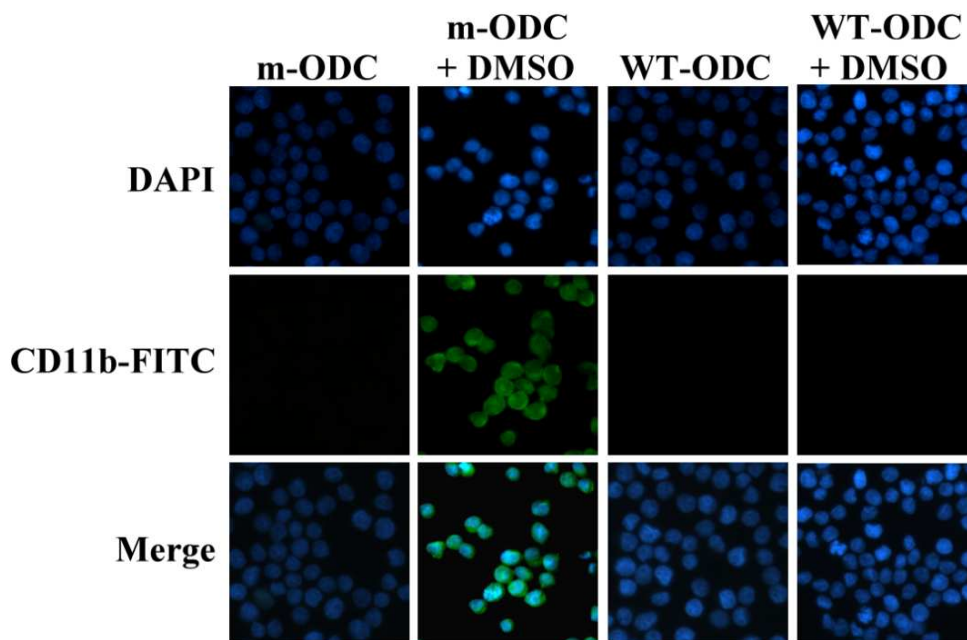
(B)



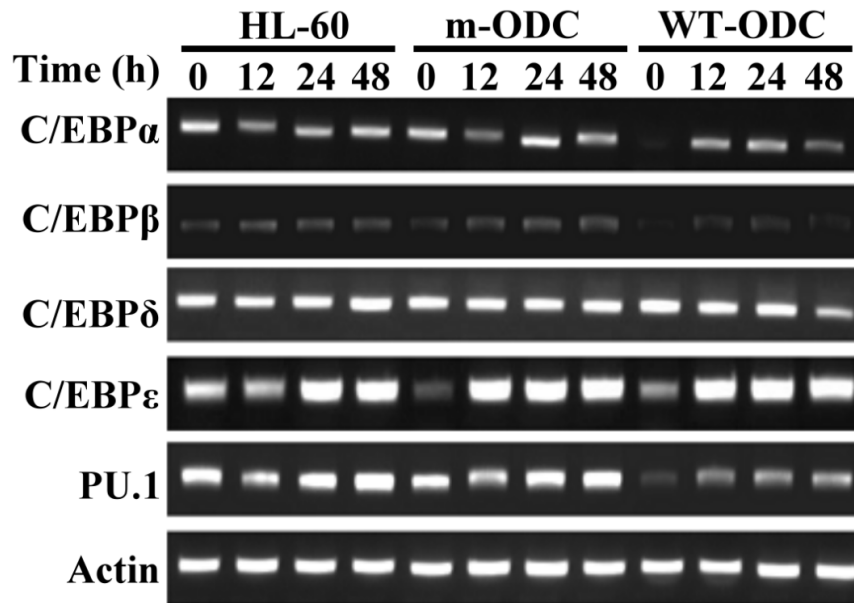
圖一、(A) (B) 人類前骨髓性白血病細胞株 (HL-60)、轉染突變型 ODC 細胞株 (m-ODC) 以及轉染野生型 ODC (WT-ODC) 分別加入 1.25% DMSO 後，利用劉氏染色 (Liu's stain) 以及顯微鏡在不同時間點下拍照以及計數細胞分化的情形。



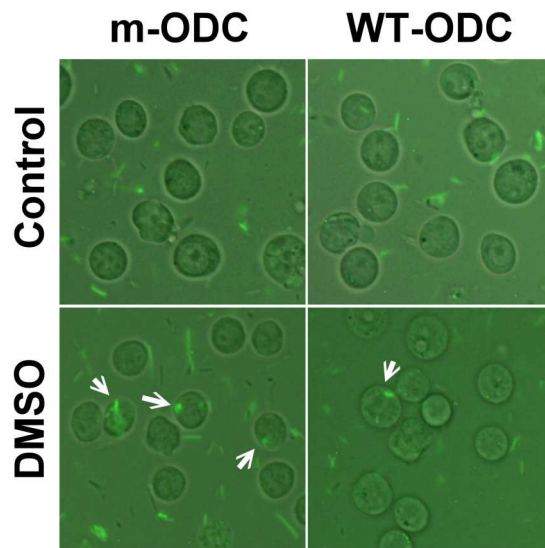
圖二、HL-60, m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25% DMSO 後利用反轉錄聚合酵素連鎖反應(RT-PCR)在不同時間點下觀察 CD11b 之 RNA 表現量。



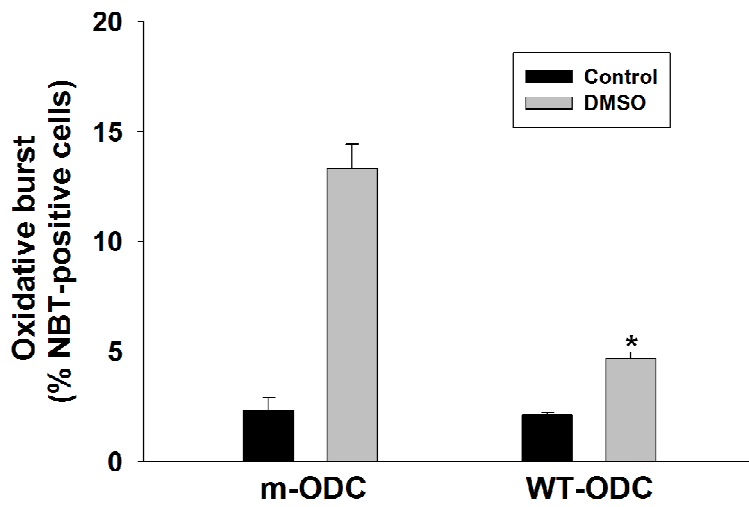
圖三、HL-60, m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25% DMSO 後運用免疫螢光染色來觀察細胞核 (DAPI, 藍色) 以及細胞膜上蛋白 Fas (FITC, 綠色) 的表現。



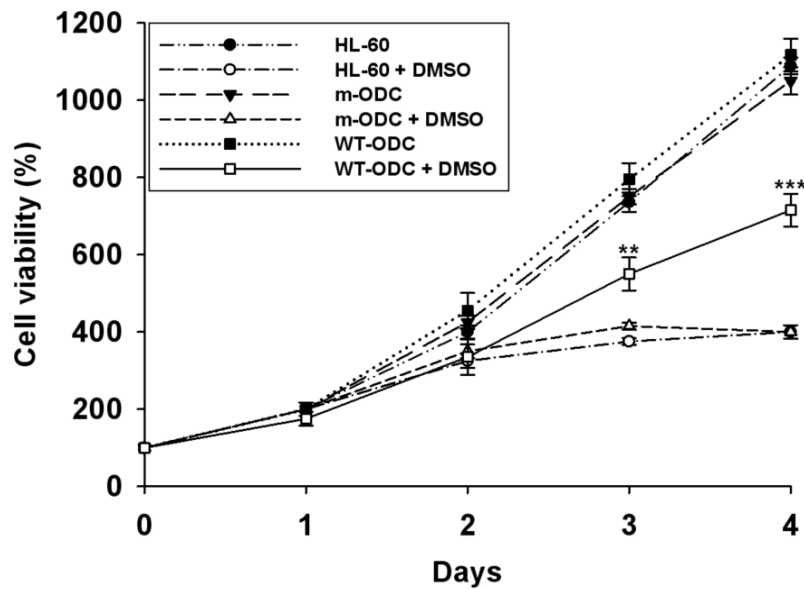
圖四、HL-60, m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25%DMSO 後利用反轉錄聚合酵素鏈鎖反應(RT-PCR)在不同時間點下觀察 C/EBPs 以及 PU.1 之 mRNA 表現。



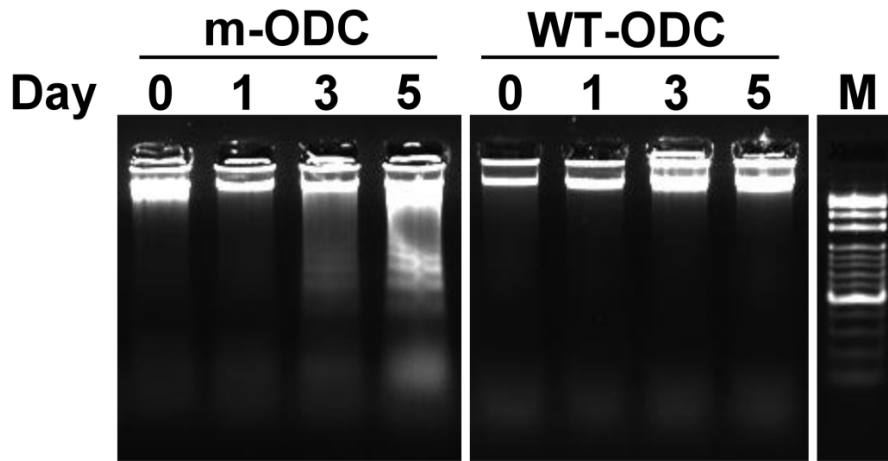
圖五、m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25%DMSO 後兩天再加入含有綠色螢光蛋白的大腸桿菌 (GFP-*E.coli*)，培養兩個小時後利用正立螢光顯微鏡觀察。含有綠色螢光蛋白的大腸桿菌可在類噬中性白血球中被觀察到。



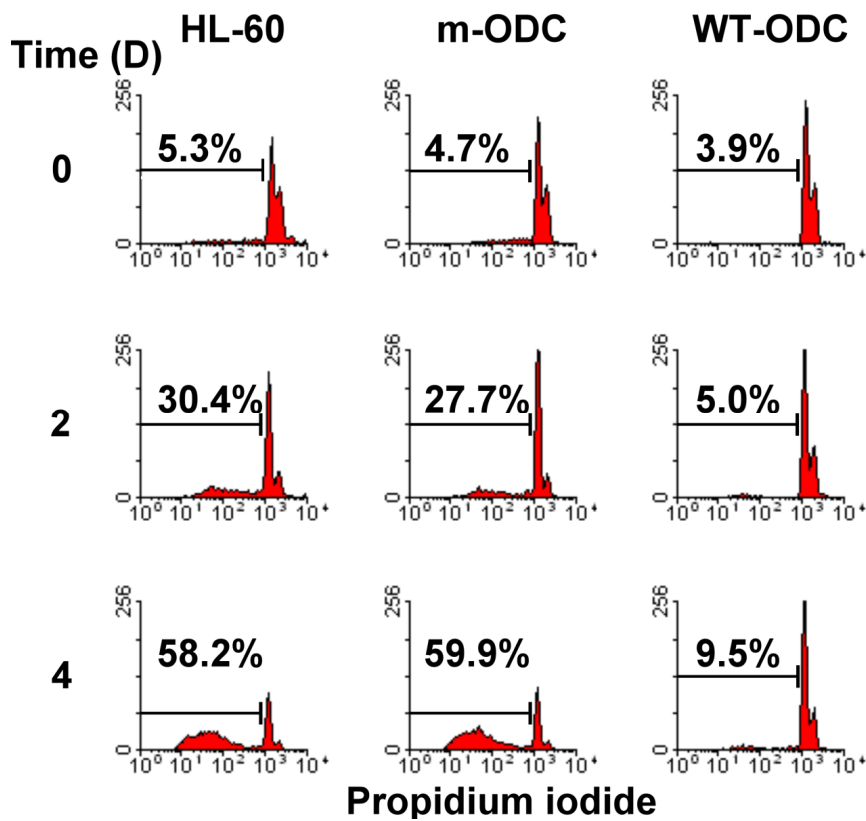
圖六、m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25%DMSO 後兩天加入 100ng 的 12-鄰-四葵酸-佛波醇-13-乙酸 (12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate; TPA) 刺激細胞活化 30 分鐘再加入 Nitroblue tetrazolium (NBT) 來進行呈色反應。



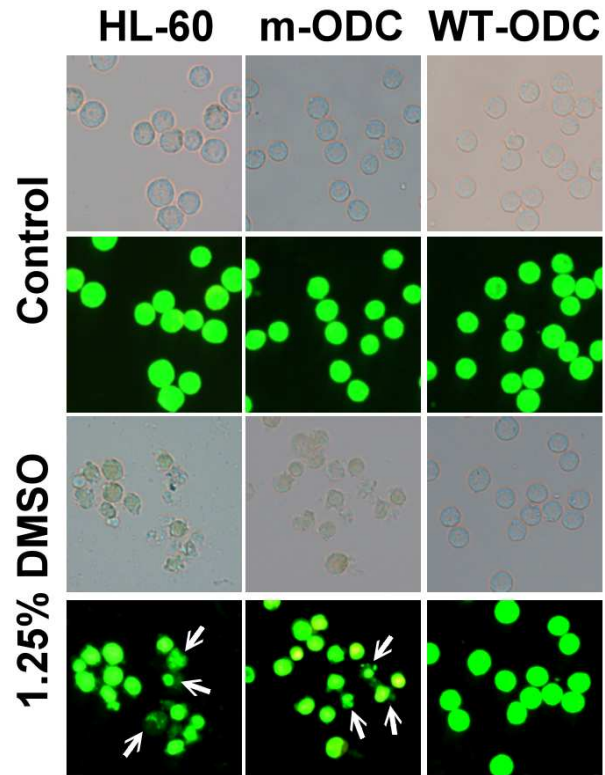
圖七、HL-60, m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25%DMSO 後利用 trypan blue 排除法計數細胞數目。



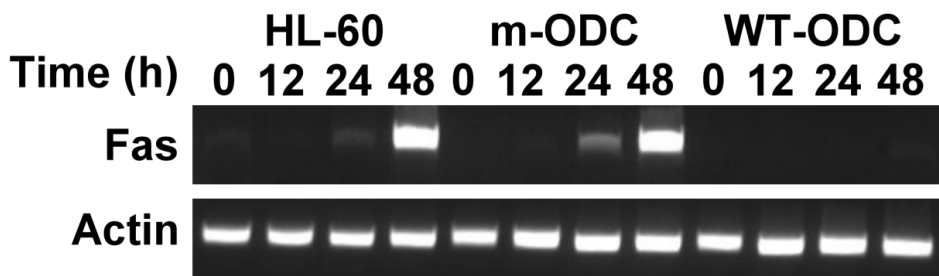
圖八、HL-60, m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25%DMSO 後觀察去氧核糖核酸 (DNA) 片段化的情形，利用 DNA 膠體 (agarose) 電泳對不同時段做分析。



圖九、HL-60, m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25%DMSO 後利用 PI 染色以及流式細胞儀分析各個細胞的細胞週期在不同時間點停滯在 sub-G1 的比例。

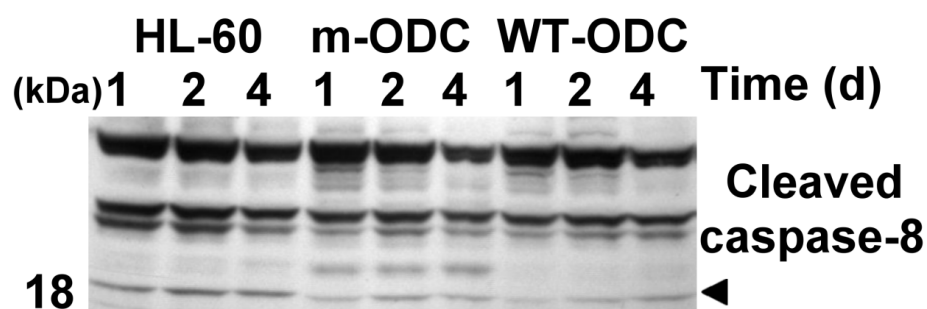


圖十、HL-60, m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25%DMSO 三天後利用吡啶橙 (acridine orange) 以及螢光顯微鏡來進行照相。

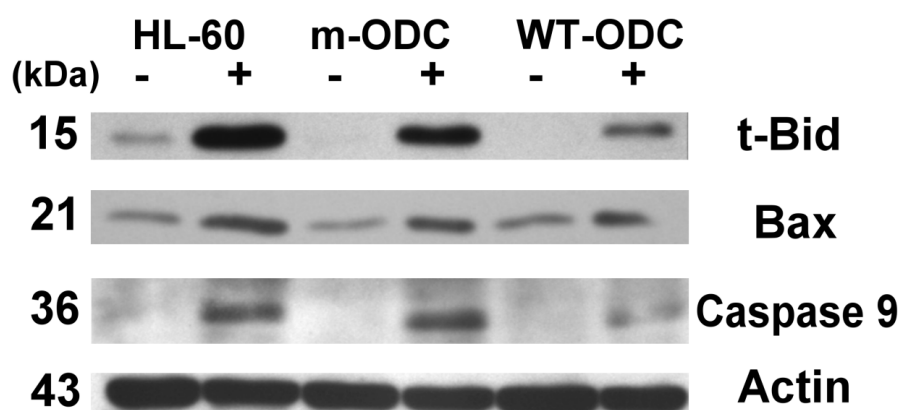


圖十一、HL-60, m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25%DMSO 後利用反轉錄聚合酵素鏈鎖反應(RT-PCR)在不同時間點下觀察 Fas 之 RNA 表現。

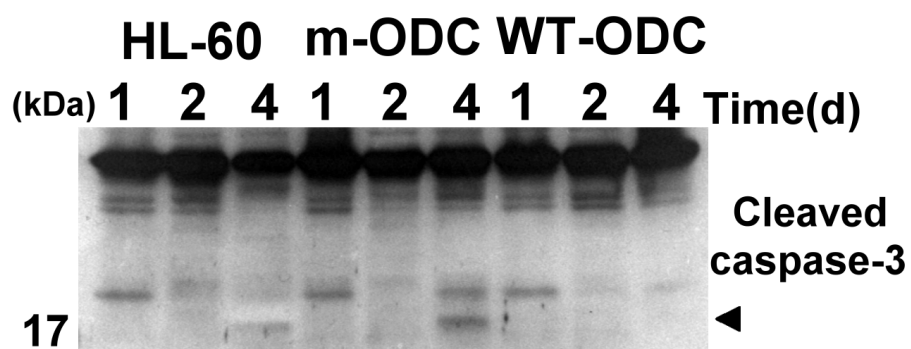
(A)



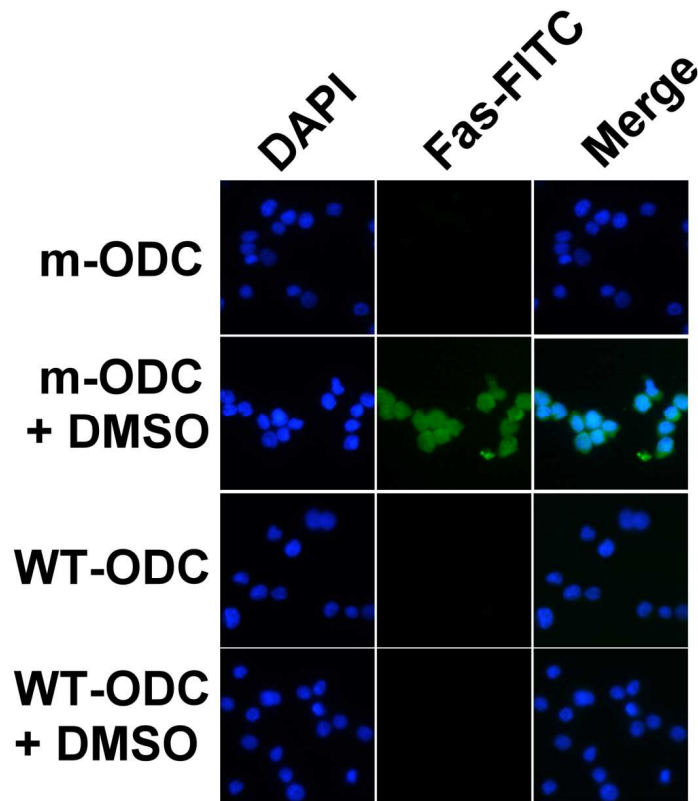
(B)



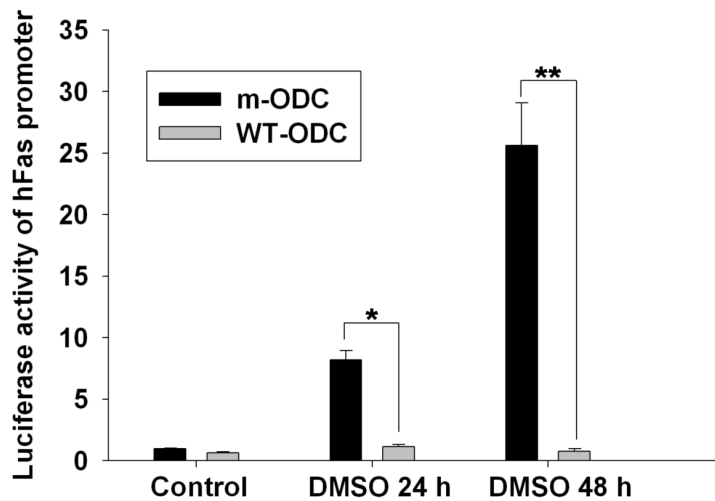
(C)



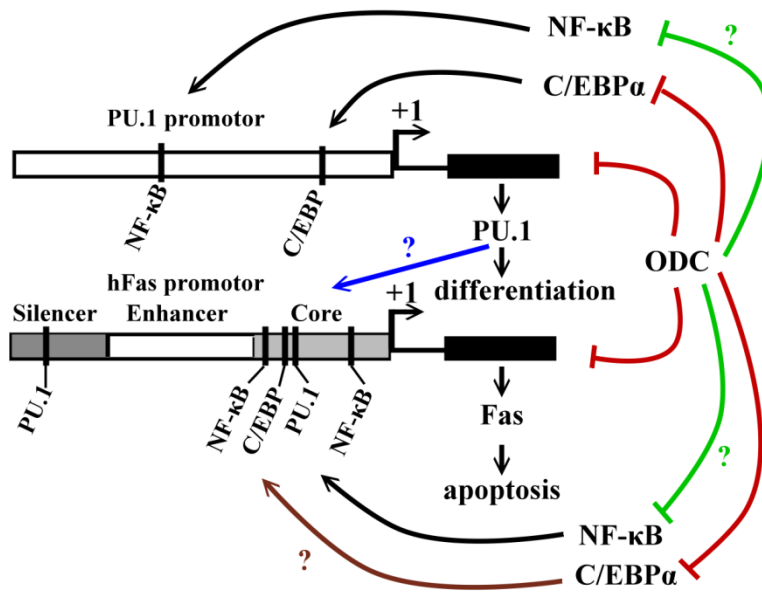
圖十二、HL-60, m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25%DMSO 誘導細胞分化後依時間利用免疫點墨法 (Immunoblotting) 觀察 (A) caspase 8、(B) t-Bid、Bax、caspase 9 以及 (C) caspase 3 的蛋白質表現。



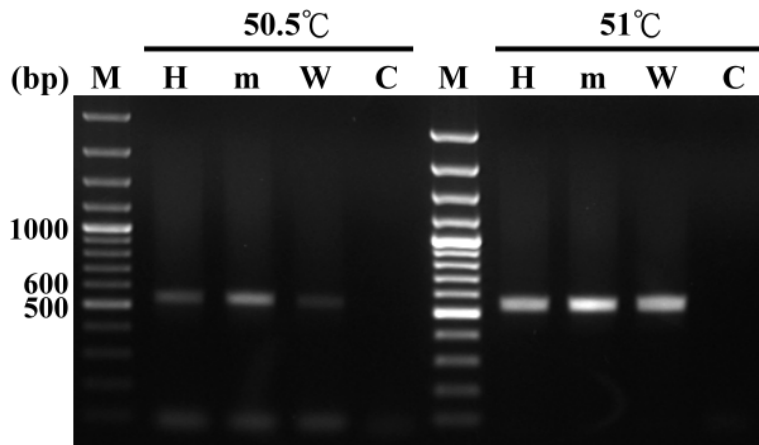
圖十三、HL-60, m-ODC 以及 WT-ODC 三種細胞株加入 1.25%DMSO 誘導細胞分化後運用免疫螢光染色來觀察細胞核 (DAPI, 藍色) 以及細胞膜上蛋白 Fas (FITC, 綠色) 的表現。



圖十四、將 m-ODC 以及 WT-ODC 兩株細胞株轉染入含有冷光基因 (luciferase reporter gene) 的質體 (plasmid) 而此質體含有 Fas 啟動子。這些被轉染的細胞加入 1.25%DMSO 誘導細胞的分化後進而死亡，從中測量啟動子的表現



圖十五、對於 ODC 調控 PU.1 與 Fas 基因之推論，紅線為本篇實驗結果，綠線為經由調控 NF-κB 來達到抑制 PU.1 與 Fas 基因，藍線為透過抑制 PU.1 來進一步達到抑制 Fas 表現，褐線為透過抑制 C/EBPα 來進一步抑制 PU.1 與 Fas 基因。



圖十六、以PCR方式，欲從HL-60(H)、mODC(m)和WT-ODC(W)三株細胞基因體DNA之Genomic DNA夾出PU.1啟動子（從序列47340602處至47340018處，共525 bp）。其PU.1黏合溫度（Annealing temperature）設定在50.5°C與51°C， Mg^{2+} 濃度1 mM，而以黏合溫度為51°C效果最好。圖中C為control，M為marker。

参考文献

- Anderson, K. L., Smith, K. A., Pio, F., Torbett, B. E., Maki, R. A., 1998. Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood*. 92, 1576-85.
- Back, J., Allman, D., Chan, S., Kastner, P., 2005. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp Hematol*. 33, 395-402.
- Bhattacharya, K., Samanta, S. K., Tripathi, R., Mallick, A., Chandra, S., Pal, B. C., Shaha, C., Mandal, C., 2010. Apoptotic effects of mahanine on human leukemic cells are mediated through crosstalk between Apo-1/Fas signaling and the Bid protein and via mitochondrial pathways. *Biochem Pharmacol*. 79, 361-72.
- Bonadies, N., Neururer, C., Steege, A., Vallabhapurapu, S., Pabst, T., Mueller, B. U., 2010. PU.1 is regulated by NF-kappaB through a novel binding site in a 17 kb upstream enhancer element. *Oncogene*. 29, 1062-72.
- Breitman, T. R., Gallo, R. C., 1981. New facts and speculations on human myeloid leukemias. *Blood Cells*. 7, 79-89.
- Chan, H., Bartos, D. P., Owen-Schaub, L. B., 1999. Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment. *Mol Cell Biol*. 19, 2098-108.
- Chen, H., Zhang, P., Radomska, H. S., Hetherington, C. J., Zhang, D. E., Tenen, D. G., 1996. Octamer binding factors and their coactivator can activate the murine PU.1 (spi-1) promoter. *J Biol Chem*. 271, 15743-52.
- Chen, H. M., Zhang, P., Voso, M. T., Hohaus, S., Gonzalez, D. A., Glass, C. K., Zhang, D. E., Tenen, D. G., 1995. Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood*. 85, 2918-28.
- Choudhary, S. K., Sharma, D., Dixit, A., 1999. D,L-alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, induces differentiation in MEL cells. *Cell Biol Int*. 23, 489-95.
- Clarke, S., Gordon, S., 1998. Myeloid-specific gene expression. *J Leukoc Biol*. 63, 153-68.
- Collins, S., Groudine, M., 1982. Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature*. 298, 679-81.
- Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., Gallo, R. C., 1978. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75, 2458-62.
- Faurschou, M., Borregaard, N., 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 5, 1317-27.
- Flodby, P., Barlow, C., Kylefjord, H., Ahrlund-Richter, L., Xanthopoulos, K. G., 1996. Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in

- CCAAT/enhancer binding protein alpha. *J Biol Chem.* 271, 24753-60.
- Ford, A. M., Bennett, C. A., Healy, L. E., Towatari, M., Greaves, M. F., Enver, T., 1996. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 10838-43.
- Gavin, I. M., Glesne, D., Zhao, Y., Kubera, C., Huberman, E., 2004. Spermine acts as a negative regulator of macrophage differentiation in human myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 64, 7432-8.
- Gerner, E. W., Meyskens, F. L., Jr., 2004. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer.* 4, 781-92.
- Grishin, N. V., Osterman, A. L., Brooks, H. B., Phillips, M. A., Goldsmith, E. J., 1999. X-ray structure of ornithine decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: the native structure and the structure in complex with alpha-difluoromethylornithine. *Biochemistry.* 38, 15174-84.
- Ha, H. C., Sirisoma, N. S., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Woster, P. M., Casero, R. A., Jr., 1998. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 11140-5.
- Hickey, M. J., Kubes, P., 2009. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol.* 9, 364-75.
- Hohaus, S., Petrovick, M. S., Voso, M. T., Sun, Z., Zhang, D. E., Tenen, D. G., 1995. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol.* 15, 5830-45.
- Holttä, E., Auvinen, M., Andersson, L. C., 1993. Polyamines are essential for cell transformation by pp60v-src: delineation of molecular events relevant for the transformed phenotype. *J Cell Biol.* 122, 903-14.
- Hromas, R., Orazi, A., Neiman, R. S., Maki, R., Van Beveran, C., Moore, J., Klemsz, M., 1993. Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood.* 82, 2998-3004.
- Hu, H. M., Baer, M., Williams, S. C., Johnson, P. F., Schwartz, R. C., 1998. Redundancy of C/EBP alpha, -beta, and -delta in supporting the lipopolysaccharide-induced transcription of IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol.* 160, 2334-42.
- Huang, C. C., Hsu, P. C., Hung, Y. C., Liao, Y. F., Liu, C. C., Hour, C. T., Kao, M. C., Tsay, G. J., Hung, H. C., Liu, G. Y., 2005. Ornithine decarboxylase prevents methotrexate-induced apoptosis by reducing intracellular reactive oxygen species production. *Apoptosis.* 10, 895-907.
- Kummaluru, T., Friedman, A. D., 2003. Cross-talk between regulators of myeloid development: C/EBPalpha binds and activates the promoter of the PU.1 gene.

- J Leukoc Biol. 74, 464-70.
- Lekstrom-Himes, J., Xanthopoulos, K. G., 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem.* 273, 28545-8.
- Lekstrom-Himes, J., Xanthopoulos, K. G., 1999. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is critical for effective neutrophil-mediated response to inflammatory challenge. *Blood.* 93, 3096-105.
- Liao, Y. F., Hung, H. C., Hsu, P. C., Kao, M. C., Hour, T. C., Tsay, G. J., Liu, G. Y., 2008. Ornithine decarboxylase interferes with macrophage-like differentiation and matrix metalloproteinase-9 expression by tumor necrosis factor alpha via NF-kappaB. *Leuk Res.* 32, 1124-40.
- Liles, W. C., Klebanoff, S. J., 1995. Regulation of apoptosis in neutrophils--Fas track to death? *J Immunol.* 155, 3289-91.
- Liu, G. Y., Hung, Y. C., Hsu, P. C., Liao, Y. F., Chang, W. H., Tsay, G. J., Hung, H. C., 2005. Ornithine decarboxylase prevents tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by decreasing intracellular reactive oxygen species. *Apoptosis.* 10, 569-81.
- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., Maki, R. A., 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* 15, 5647-58.
- Meyskens, F. L., Jr., McLaren, C. E., Pelot, D., Fujikawa-Brooks, S., Carpenter, P. M., Hawk, E., Kelloff, G., Lawson, M. J., Kidao, J., McCracken, J., Albers, C. G., Ahnen, D. J., Turgeon, D. K., Goldschmid, S., Lance, P., Hagedorn, C. H., Gillen, D. L., Gerner, E. W., 2008. Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 1, 32-8.
- Morosetti, R., Park, D. J., Chumakov, A. M., Grillier, I., Shiohara, M., Gombart, A. F., Nakamaki, T., Weinberg, K., Koeffler, H. P., 1997. A novel, myeloid transcription factor, C/EBP epsilon, is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. *Blood.* 90, 2591-600.
- Mueller, B. U., Pabst, T., Fos, J., Petkovic, V., Fey, M. F., Asou, N., Buergi, U., Tenen, D. G., 2006. ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. *Blood.* 107, 3330-8.
- Nerlov, C., Graf, T., 1998. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 12, 2403-12.
- Nilsson, J. A., Keller, U. B., Baudino, T. A., Yang, C., Norton, S., Old, J. A., Nilsson, L. M., Neale, G., Kramer, D. L., Porter, C. W., Cleveland, J. L., 2005. Targeting

- ornithine decarboxylase in Myc-induced lymphomagenesis prevents tumor formation. *Cancer Cell*. 7, 433-44.
- Nordenfelt, P., Bauer, S., Lonnbro, P., Tapper, H., 2009. Phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* by all-trans retinoic acid-differentiated HL-60 cells: roles of azurophilic granules and NADPH oxidase. *PLoS One*. 4, e7363.
- Nutt, S. L., Metcalf, D., D'Amico, A., Polli, M., Wu, L., 2005. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med*. 201, 221-31.
- O'Brien, T. G., Megosh, L. C., Gilliard, G., Soler, A. P., 1997. Ornithine decarboxylase overexpression is a sufficient condition for tumor promotion in mouse skin. *Cancer Res*. 57, 2630-7.
- Packham, G., Cleveland, J. L., 1997. Induction of ornithine decarboxylase by IL-3 is mediated by sequential c-Myc-independent and c-Myc-dependent pathways. *Oncogene*. 15, 1219-32.
- Pegg, A. E., Seely, J. E., Poso, H., della Ragione, F., Zagon, I. A., 1982. Polyamine biosynthesis and interconversion in rodent tissues. *Fed Proc*. 41, 3065-72.
- Pegg, A. E., Shantz, L. M., Coleman, C. S., 1994. Ornithine decarboxylase: structure, function and translational regulation. *Biochem Soc Trans*. 22, 846-52.
- Polli, N., O'Brien, M., Tavares de Castro, J., Rodriguez, B., McCarthy, D., Catovsky, D., 1985. Monocytic differentiation induced by 1,25 dihydroxyvitamin D3 in myeloid cells: an ultrastructural immunocytochemical study. *Leuk Res*. 9, 259-70.
- Ray, D., Culine, S., Tavitain, A., Moreau-Gachelin, F., 1990. The human homologue of the putative proto-oncogene Spi-1: characterization and expression in tumors. *Oncogene*. 5, 663-8.
- Reuben, R. C., Wife, R. L., Breslow, R., Rifkind, R. A., Marks, P. A., 1976. A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73, 862-6.
- Rounbehler, R. J., Li, W., Hall, M. A., Yang, C., Fallahi, M., Cleveland, J. L., 2009. Targeting ornithine decarboxylase impairs development of MYCN-amplified neuroblastoma. *Cancer Res*. 69, 547-53.
- Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., Henson, P. M., Haslett, C., 1989. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest*. 83, 865-75.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., Singh, H., 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*. 265, 1573-7.

- Scott, L. M., Civin, C. I., Rorth, P., Friedman, A. D., 1992. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood*. 80, 1725-35.
- Simoneau, A. R., Gerner, E. W., Nagle, R., Ziogas, A., Fujikawa-Brooks, S., Yerushalmi, H., Ahlering, T. E., Lieberman, R., McLaren, C. E., Anton-Culver, H., Meyskens, F. L., Jr., 2008. The effect of difluoromethylornithine on decreasing prostate size and polyamines in men: results of a year-long phase IIb randomized placebo-controlled chemoprevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 17, 292-9.
- Tabor, C. W., Tabor, H., 1984. Polyamines. *Annu Rev Biochem*. 53, 749-90.
- Takai, T., Mizuuchi, E., Kikuchi, Y., Nagamune, T., Okumura, K., Ogawa, H., 2006. Glycosylation of recombinant proforms of major house dust mite allergens Der p 1 and Der f 1 decelerates the speed of maturation. *Int Arch Allergy Immunol*. 139, 181-7.
- Tanaka, M., Levy, J., Terada, M., Breslow, R., Rifkind, R. A., Marks, P. A., 1975. Induction of erythroid differentiation in murine virus infected erythroleukemia cells by highly polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72, 1003-6.
- Tenen, D. G., Hromas, R., Licht, J. D., Zhang, D. E., 1997. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*. 90, 489-519.
- Thomas, T., Thomas, T. J., 2001. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*. 58, 244-58.
- Voso, M. T., Burn, T. C., Wulf, G., Lim, B., Leone, G., Tenen, D. G., 1994. Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 7932-6.
- Wagner, A. J., Meyers, C., Laimins, L. A., Hay, N., 1993. c-Myc induces the expression and activity of ornithine decarboxylase. *Cell Growth Differ*. 4, 879-83.
- Wang, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., Taylor, L. R., Wilson, D. R., Darlington, G. J., 1995. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science*. 269, 1108-12.
- Waugh, D. J., Wilson, C., 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 14, 6735-41.
- Williams, S. C., Cantwell, C. A., Johnson, P. F., 1991. A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev*. 5, 1553-67.