

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

* *****
* 計畫名稱：探討馬兜鈴酸在人類胚胎腎臟細胞中調控 BLCAP 基因之機轉 *
* *****

執行計畫學生：張詠傑
學生計畫編號：NSC 100-2815-C-040-034-B
研究期間：100年07月01日至101年02月28日止，計8個月
指導教授：劉秉慧

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：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 101年03月26日

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 *
* :探討馬兜鈴酸在人類胚胎腎臟細胞中調控 BLCAP 基因之機轉 *
* 名稱 *

執行計畫學生：張詠傑

學生計畫編號：NSC 100-2815-C-040-034-B

研究期間：2011年7月1日至2012年2月底止，計8個月

指導教授：劉秉慧

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

中華民國 100 年 3 月 日

摘要 (Abstract)

馬兜鈴酸 (Aristolochic acid, 簡稱 AA) 為馬兜鈴科植物萃取物之一, 馬兜鈴酸可以分為 Aristolochic acid I 及 Aristolochic acid II, 已知馬兜鈴酸具有腎毒性及致癌性, 但是馬兜鈴酸調控細胞內腫瘤抑制基因的相關機制還不清楚; Bladder cancer-associated protein (BLCAP) 基因是腫瘤抑制基因, 與膀胱腫瘤的進程相關, 由於部分研究指出服用馬兜鈴酸可能導致膀胱腫瘤的形成, 但是 BLCAP 在細胞中的調控及被調控的機制尚不明確。所以本研究以人類胚胎腎臟細胞 (HEK 293 cell) 探討馬兜鈴酸抑制 BLCAP 基因表達的機轉。

利用不同濃度的馬兜鈴酸 (50 μ M 至 200 μ M)處理 HEK293 細胞 24 小時後, 會使 BLCAP mRNA 表現量顯著的減少。接著為了探討馬兜鈴酸是否在轉錄層次影響 BLCAP 基因的表達, 我們把建構 BLCAP 啟動子的冷光報導基因質體, 轉染到 HEK293 細胞中, 並利用不同濃度的馬兜鈴酸 (50 μ M 至 200 μ M)處理後, 發現馬兜鈴酸會抑制 BLCAP 啟動子的活性。發現此現象後, 於是本研究進一步分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的調控區, 實驗結果顯示, 隨著 BLCAP 啟動子長度的縮短, 馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的比例相似, 所以本研究無法利用該實驗方法分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的調控區域。

但是本研究也發現在溶劑環境中當剔除位於 BLCAP 啟動子 -66 至 -31 片段的 GC box 序列時, BLCAP 啟動子的活性明顯的下降, 因此本研究認為 BLCAP 基因的表達與 GC box 的啟動有關。

序論 (introduction)

1. 馬兜鈴酸 (Aristolochic acid, AA)

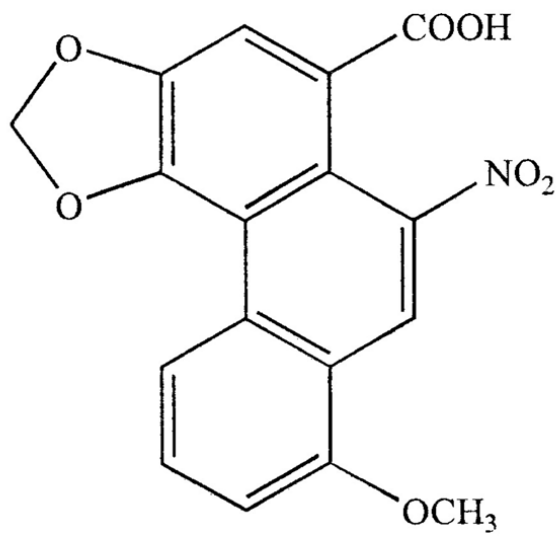
1.1 馬兜鈴酸的基本介紹

自古以來，中藥材的應用對中國醫學而言一直是很重要的主軸，中藥材絕大部分來自天然的植物，包括馬兜鈴酸科植物、冬蟲夏草及當歸等；馬兜鈴酸科植物 (*Aristolochia species*) 是分布於熱帶及亞熱帶的多年生雙子葉植物，其主要分為馬兜鈴酸亞科 (Subfam. Aristolochioideae) 及細辛亞科 (Subfam. Asaroideae)，例如：廣防己、關木通及馬兜鈴等植物。馬兜鈴酸科植物大多味道辛且苦，其具有消腫、止痛、止咳及利尿的功能，所以過去常用以治療痛風、風濕熱及蛇咬傷等發炎相關症狀的中藥材，但是服用過量時可能引起腹痛、噁心及嘔吐等症狀。

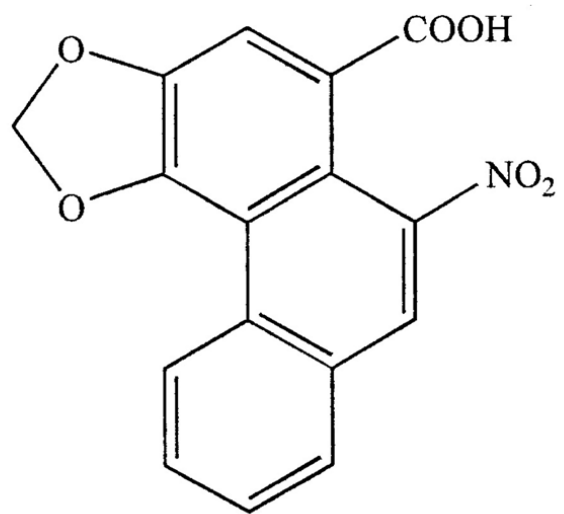
馬兜鈴酸 (Aristolochic acid, 簡稱為 AA) 是一種由馬兜鈴酸科植物中萃取出天然混合物，主要以 Aristolochic acid I (簡稱為 AA I) 8-methoxy-6-nitro-phenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-carboxylic acid ($C_{17}H_{11}NO_7$, 分子量 341.27) 及 Aristolochic acid II (簡稱為 AA II) 6-nitro-phenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-carboxylic acid ($C_{16}H_9NO_6$, 分子量 311.2) 組成 (附圖一) (Arlt, V. M. *et al.* 2001; Stiborova *et al.*, 2008)，其中 AA I 的毒性較強，是馬兜鈴科植物中主要的致癌物質 (Shibutani, S. *et al.* 2007)。本實驗使用的馬兜鈴酸 (Sigma Chemical Company, USA) 為 Aristolochic Acid I，溶液呈金黃色。

1.2 馬兜鈴酸引起的腎臟病變

於 1950 年代歐洲許多人罹患慢性腎小管 (chronic tubulointerstitial) 病變，其病徵是腎小管纖維化等，由於大部分的病患居住在巴爾幹地區，所以又將這類的腎病變稱為巴爾幹腎病變 (Balkan endemic nephropathy, BEN)，早期對於巴爾幹腎病變的起因並不清楚，在 2008 年 Bamias 等人觀察其病徵與馬兜鈴酸引起的腎病變非常相似，因此推測巴爾幹腎病變與長期攝取含有馬兜鈴酸的植物有關 (Bamias and Boletis, 2008)。於西元 1993 年的文獻中直接證實馬兜鈴酸與腎病變之間的關係，在比利時地區，約一百多人因長期服用減肥藥而有腎病變的產生，如：腎衰竭及腎小管退化等，所以 Vanherweghem 醫生著手調查此事件，結果發現病患服用的減肥藥中因誤用廣防己 (*Aristolochia fangchi*) 取代漢防己 (*Stephania tetrandra*)，而導致減肥藥中含有大量的馬兜鈴酸，因此直接證明了馬兜鈴酸會導致腎病變的產生，所以往後將馬兜鈴酸引起的腎臟相關病變稱為 Aristolochic acid nephropathy (AAN) (Vanherweghem *et al.*, 1993; Debelle *et al.*, 2008)。



Aristolochic acid I



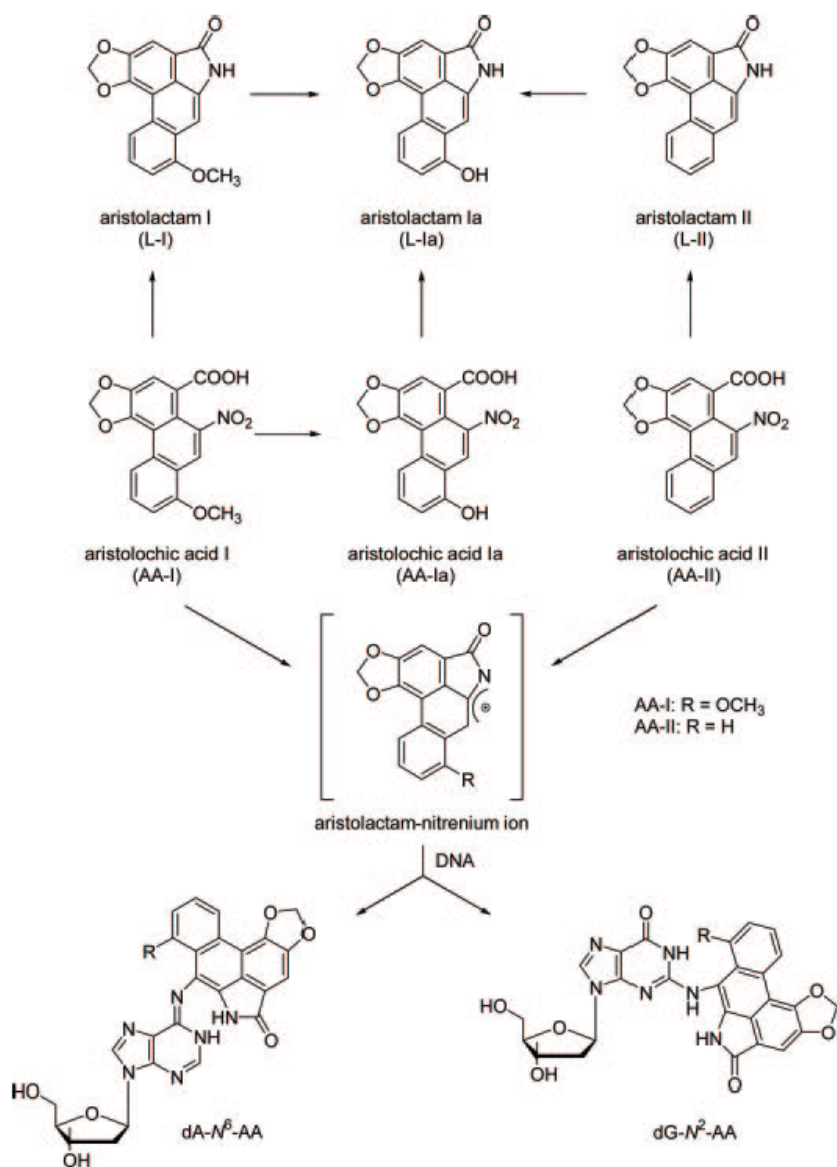
Aristolochic acid II

附圖一、Aristolochic acid I 與 II 的化學結構

1.3 馬兜鈴酸的腎毒性及致癌性

近 30 年在細胞及動物模式研究中發現，馬兜鈴酸具有腎毒性及致癌性；在細胞實驗中發現，豬腎小管上皮細胞株 (LLC-PK1 cells) 隨著馬兜鈴酸劑量的提高，細胞出現染色質濃縮的現象，並且導致細胞週期停滯並進入細胞凋亡 (apoptosis) 及細胞壞死 (necrosis) (Wang and Zhang, 2008)；在動物模式中發現，經皮下注射 38~86 mg/kg 或餵食 150~300 mg/kg 馬兜鈴酸處理的小鼠中，觀察到小鼠的近端腎小管產生細胞壞死的現象 (Mengs, 1987)，此外，在連續餵食 1~10 mg/kg 馬兜鈴酸 35 天的大白兔實驗中發現，有近端腎小管萎縮及纖維化的現象產生 (Debelle *et al.*, 2002)。由此可見馬兜鈴酸具有腎毒性及導致腎病變產生的可能性。

比利時事件中，病患於 1990 年到 1992 年間誤服用含有馬兜鈴酸的減肥藥，在 1994 年 3 人因腎衰竭接受腎臟移植手術時，意外發現腎臟泌尿上皮細胞變異 (cellular atypia) 的發生，而且其中兩人更進展成泌尿上皮癌 (urothelial carcinoma)，此外，在其他服用該減肥藥後產生腎衰竭的患者中發現，約 46% 的病患者有上泌尿道變形細胞癌 (transitional cell carcinoma of the upper urinary tract) 的產生。而且，經動物實驗證實，在持續餵食 3 個月 10 mg/kg 馬兜鈴酸的小鼠中，在胃及膀胱有腫瘤的形成 (Mengs, 1988; Schmeuser *et al.*, 1988)。而關於馬兜鈴酸致癌性機轉的研究，在 BEN 病患的腎臟組織中發現，馬兜鈴酸與去氧核糖核酸 (DNA) 形成共價的核酸鍵結物 (DNA-adduct)，造成基因發生突變，其主要以 7- (deoxyadenosin- N⁶ - yl) aristolactam (dA-AA) 及 7 - (deoxyguanosin - N²- yl) aristolactam (dG-AA) 的形式存在 (附圖二)，造成去氧核糖核酸中出現 AT-TA transversion 突變 (Shibutani, S. *et al.* 2007)。另外，過去文獻也指出，馬兜鈴酸會與 p53 基因形成 DNA-adduct，使原先 AAG 的序列發生突變，而造成 p53 基因喪失功能 (Lord *et al.* , 2004)。因為許多研究結果證實馬兜鈴酸與癌症進成有關，所以西元 2002 年國際癌症研究中心 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 將馬兜鈴酸分類為可能對人類致癌但對動物確定致癌之 2A 分類 (IARC, 2002)。因此美國及歐盟陸續禁用含有馬兜鈴酸的產品，台灣衛生署在西元 2003 年公告禁止含有馬兜鈴酸藥品的使用，並撤銷相關的中草藥藥品證。



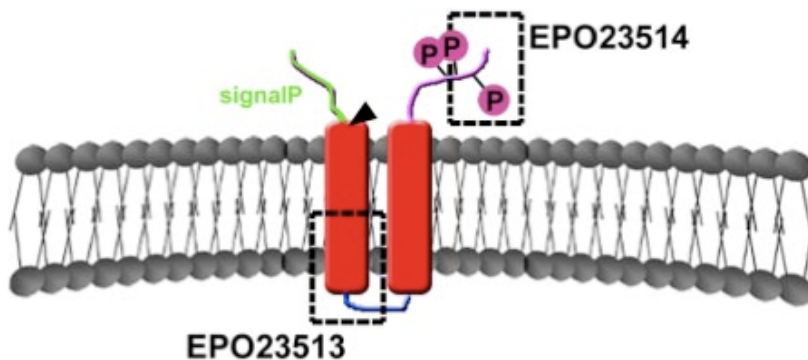
附圖二、馬兜鈴酸與 DNA 形成 DNA-adduct 之結構 (Shibutani, S. *et al.* 2007)

2. 膀胱癌相關蛋白質 (Bladder cancer associated protein, BLCAP)

2.1. BLCAP 的基本介紹

Bladder Cancer-Associated Protein (BLCAP) 基因位於人類第 20 號染色體 q11.2 ~ 12 上，其 DNA 約 10,513 bp，RNA 約 2,087 bp，且 coding sequence (CDS) 位於 + 316 bp ~ + 579 bp，大小為 264 bp (NM_006698)。BLCAP 基因是一段高度保留的基因，在許多物種如：果蠅、斑馬魚、老鼠、牛及黑猩猩中，皆發現與 BLCAP 基因同源的基因 (Evans *et al.*, 2001)。因為 BLCAP 基因的 DNA 序列上含有兩個 exon，因此文獻指出 BLCAP 基因至少有四種轉錄形式，但是最終皆以第二個 exon 轉譯出相同胺基酸序列的 BLCAP 蛋白質。

BLCAP 蛋白質由 87 個胺基酸組成，所以其分子量是 9.8 KD，因此又可將 BLCAP 稱為 BC10，在人類蛋白質中沒有發現與 BLCAP 蛋白質相似的序列，因此 BLCAP 蛋白質是一個獨立的蛋白質家族。目前文獻利用 Hydropathy 分析 BLCAP 胺基酸序列發現，在第 19-39 及第 43-68 胺基酸序列為疏水區域，因此預測此兩區域是 transmembrane helices，此外也利用 Netphos 及 KinasePhode 預測 BLCAP 蛋白質的 C 端含有三個與磷酸鍵結的位置，分別是：Ser⁷¹、Ser⁷³ 及 Ser⁷⁸，且透過同源比對分析出 BLCAP 蛋白質 N 端的序列與 src kinase 的結合位 (binding site) 的序列相似，因此推測 BLCAP 蛋白質的 N 端序列具有訊息傳遞的功能，由以上的預測結果，文獻推測 BLCAP 蛋白質在細胞中是一個具有訊息傳遞功能的穿膜蛋白質 (transmembrane protein)(附圖三)(Gromova *et al.*, 2002；Moreira *et al.*, 2010)。目前文獻指出 BLCAP 蛋白質表現在人類的子宮頸、膀胱、睪丸、胎盤、脾臟等組織及周邊白血球細胞中。(Clutterbuck *et al.*, 2005)，顯示 BLCAP 蛋白質在人類組織器官中可能扮演重要的角色。



附圖三、BLCAP 蛋白質的預測結構。(Moreira *et al.*, 2010)

2.2. BLCAP 的功能

近十年的研究中發現，BLCAP 具有抑制腫瘤生成的功能，1990 年文獻中，利用 differential-display PCR 比較侵入性及非侵入性膀胱癌檢體中是否有基因表達的差異，而在侵入性膀胱癌的檢體中有一未知基因的 mRNA 表現量明顯的減少，由於此基因在膀胱癌中發現，加上該蛋白質的分子量約 10 kDa，所以將此基因命名為 BC10，後來則改稱為 Bladder cancer-associated protein (BLCAP)。其它文獻中利用 BLCAP 蛋白質作為轉移性腫瘤 transitional cell carcinoma (TCC) 的指標 (Gromova *et al.*, 1999)，而且在侵入性膀胱癌細胞中發現，BLCAP 基因座中 DNA 沒有發生重組的現象，因此推測導致侵入性膀胱癌細胞中 BLCAP mRNA 表現量降低的原因，可能為轉錄層次及 mRNA 衰變所造成的。(Gromova *et al.*, 2002)。

體內的器官皆有 BLCAP 基因的表達，如子宮頸、舌及膀胱等。在初期子宮頸癌組織中發現，BLCAP 基因的表達量明顯的減少，而文獻中將 BLCAP cDNA 轉染到子宮頸癌細胞 (HeLa cell)，使細胞內 BLCAP 基因過度表達 (overexpression)，結果發現細胞有生長停滯及細胞凋亡的現象，將轉染完成的 HeLa 細胞注射到小鼠時發現，小鼠的腫瘤生成有減少的現象 (Zuo *et al.*, 2006)，此外如果讓舌癌細胞 (Tca8113 cell) 的 BLCAP 基因過度表達時，觀察到 Tca8113 細胞停滯在 S 期而導致進行細胞凋亡，而達到抑制細胞生長的效果。

而關於 BLCAP 基因抑制細胞生長的機制，在文獻中指出是藉由向上調節 (unregulate) p21^{WAF1/CIP1} 的表現，及向下調節 (downregulate) Bcl-XL 和 Bcl-2 的表現，但不是藉由調節 p53 及 NF- κ B 的表現，而導致細胞凋亡現象 (Yao *et al.*, 2007)。目前文獻發現，在 BLCAP 蛋白質的轉錄後修飾中 A-to-I edition 扮演重要的角色，在膀胱癌、直腸癌及星狀細胞瘤中發現，BLCAP A-to-I edition 有減少的趨勢，因此未來可將 BLCAP A-to-I edition 的程度，以做為偵測癌症的指標。(Galeano *et al.*, 2010)

研究目的 (Motive)

過去的研究中證實馬兜鈴酸是一種致癌物質，文獻指出馬兜鈴酸會導致膀胱癌及肺癌的進程，但是馬兜鈴酸在細胞影響腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) 表達的相關機制還不清楚；然而目前的研究中指出 BLCAP 基因，是一個腫瘤抑制基因，文獻指出 BLCAP 基因的表達與抑制腫瘤生成息息相關，但是細胞中調控 BLCAP 基因表達的機制也不清楚。所以本研究利用人類胚胎腎臟細胞 (Human embryonic kidney cell, 簡稱 HEK293 cell) 探討細胞內馬兜鈴酸調控 BLCAP 基因表達的作用機制。因此本研究分為下列目標進行。

目標一：探討馬兜鈴酸是否抑制 BLCAP mRNA 的表達。

目標二：探討馬兜鈴酸是否抑制 BLCAP 啟動子的活性及分析馬兜鈴酸在啟動子上的調控區域。

材料與方法 (Materials and Methods)

1. 細胞培養 (Cell culture)

人類胚胎腎臟細胞 (Human Embryonic Kidney 293 cells, 簡稱 HEK 293 cell), 購自食品工業發展研究所菌種中心。細胞培養於含 10 % 馬血清 (HS)、100 U/ml penicillin 及 0.1 mg/ml streptomycin 的 MEM 培養基中。細胞培養環境設定為 37°C, 5 % CO₂, 待細胞生長至約七、八分滿盤時依實驗給予不同處理或繼代培養。

2. 細胞冷凍保存

將 HEK 293 細胞培養在 10 cm 培養盤中, 待細胞生長約至八成時, 利用 0.05% TE buffer (Trypsin and EDTA buffer) 將細胞從盤中分離下來, 將分離的細胞移到 15 ml 離心管中, 以 1,000 rpm 離心 5 分鐘使懸浮的細胞沉澱下來, 接著移除上清液, 並緩緩加入含有 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO)(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) 的培養基, 並以每管約 1×10^7 顆細胞分裝入 500 μ l 冷凍管中, 接著將細胞直接凍入 -80°C 中, 隔日再移至液態氮桶中保存。

3. 細胞存活率測試 (MTT assay)

將 HEK 293 細胞培養於 96 微孔盤中, 每一微孔中約有 8×10^3 顆細胞, 置於含 5% CO₂ 之 37°C 培養箱培養 24 小時後, 以不同濃度之 AA (50、100 及 200 μ M) 處理 24 小時後, 於每個微孔中加入 100 μ l 的 MTT reagent 後, 將 96 微孔盤置於細胞培養箱中培養約 4 小時, 接著移除 MTT reagent 並加入 100 μ l isopropanol 反應 30 分鐘, 並接著將上清移至另一個 96 微孔盤中, 以吸收光波長 570 nm 進行偵測 (Analyzed by ELISA Reader), 藉此得知細胞存活率。

4. 核糖核酸萃取 (RNA extraction)

將 HEK 293 細胞培養在 35 mm 盤中 (每盤約有 6×10^5 顆細胞) 在細胞培養箱中培養 24 小時後, 在依不同濃度的馬兜鈴酸 (50、100 及 200 μ M) 培養 24 小時, 隨後將培養液移除並加入 1 ml 的 Tri-reagent 作用 5 分鐘, 接著將含有細胞溶出物的 Tri-reagent 移至微量離心管中, 並分別加入 200 μ l 的 Chloroform 將核糖核酸與蛋白質分離, 接著 13,000 rpm 且 4°C 環境下離心 15 分鐘, 接著將上清液 (150 μ l) 移至新的微量離心管中, 並加入等體積 (150 μ l) 的 Isopropanol 反應 10 分鐘,

接著 13,000 rpm 且 4°C 環境下離心 15 分鐘，再將上清液移除並置於室溫中使 isopropanol 自然揮發後，即可加入 10 µl DEPC 水並置於 56°C 水浴槽中 10 分鐘使核糖核酸溶解，利用測量吸光值的方式定出樣品中核糖核酸的濃度，並取 2 µg 的核糖核酸進行反轉錄聚合反應。

5. 反轉錄作用 (Reverse transcription (RT) reaction)

取 2 µg 的 RNA，加入 10 µM oligo-d T₁₈ 與 10 mM dNTP 於 70°C 下作用 10 分鐘，再加入 Revert Aid™ Reverse Transcriptase (Fermentas) 進行反轉錄作用，反轉錄後的 cDNA 即可繼續進行聚合連鎖反應實驗或保存於 -20°C 中。

6. 半定量聚合連鎖反應 (Semi-quantitative PCR)

取 cDNA 1 µl 當作模板，分別加入 2 µl 的 10 X DreamTaq™ 緩衝液、0.4 µl 的 10 µM 正股引子、0.4 µl 的 10 µM 反股引子(引子詳細序列見附表一)、0.4 µl 的 10 mM dNTP 混合物及 0.2 µl 的 5u/µl DreamTaq™ DNA Polymerase (MBI Fermentas, Hanover, Md.)，最後加入 d₂H₂O 至反應總體積為 20 µl，以 GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, California, USA) 機器設定反應條件：94°C 作用 5 分鐘，接著以 94°C 進行變性作用 (denaturation) 30 秒、視引子不同之黏合 (annealing) 溫度作用 30 秒，再以 72°C 進行延長作用 (elongation) 30 秒，再依不同基因表現量差異將此循環重複 26-30 次不等，結束後再以 72°C 反應 10 分鐘。待作用完成後，取 10 µl 產物利用含有溴化乙錠(ethidium bromide, EtBr) 之 1.5% 瓊膠電泳分離不同大小之核酸序列，經 UV 照射後以數位影像系統分析。

Gene		Sequence(5' to 3')
BLCAP	F	5'-TAATGTATTGCCTCCAGTGGCTGCTG-3'
	R	5'-TATAGCAGATAAGGAACAGGGCTGC-3'
GAPDH	F	5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'
	R	5'-GAGGCAGGGATGATGTTC-3'

附表一、半定量聚合連鎖反應的引子序列表

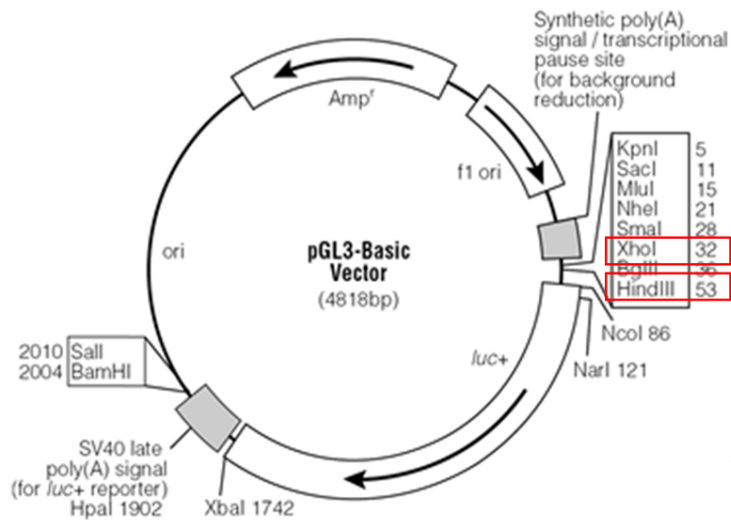
7. 冷光酵素報導基因試驗之質體建構

分別利用聚合酶鏈鎖反應製備不同長度的 BLCAP 啟動子片段 (分別為-1941、-419 bp、-172 bp、-90 bp、-66 bp、-419 Δ 66/32 及 -419 Δ 31/1)，聚合酶鏈鎖反應所使用的引子兩端分別含有 *Xho* I 及 *Hind*III 的限制酶切位，接著將 BLCAP 啟動子片段和 pGL3-Basic vector 質體 (含有 luciferase 冷光報導者基因)(附圖四)(實驗室建構)分別以 *Xho* I 及 *Hind*III 限制酶於 37°C 作用 2 小時後，以 1.5% 瓊膠電泳分離樣品，接著在 UV 光照射下將膠體上的正確片段取下，再利用 QIAquick® Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Valencia, CA)回收雙股 DNA 片段及 pGL3 質體，接著將經過酵素切割完成的質體與雙股 DNA 片段以 1:3 的莫耳數比混合後，再加入 1 μ l 的 10 \times T4 DNA ligase reaction buffer、1 μ l 10 mM ATP、1 μ l 的 T4 DNA ligase (promega)，最後利用二次滅菌水將反應體積補至 10 μ l，在 16°C 下反應 16 至 18 小時，使雙股 DNA 片段建構到質體中，接著進行大腸桿菌質體轉型作用。

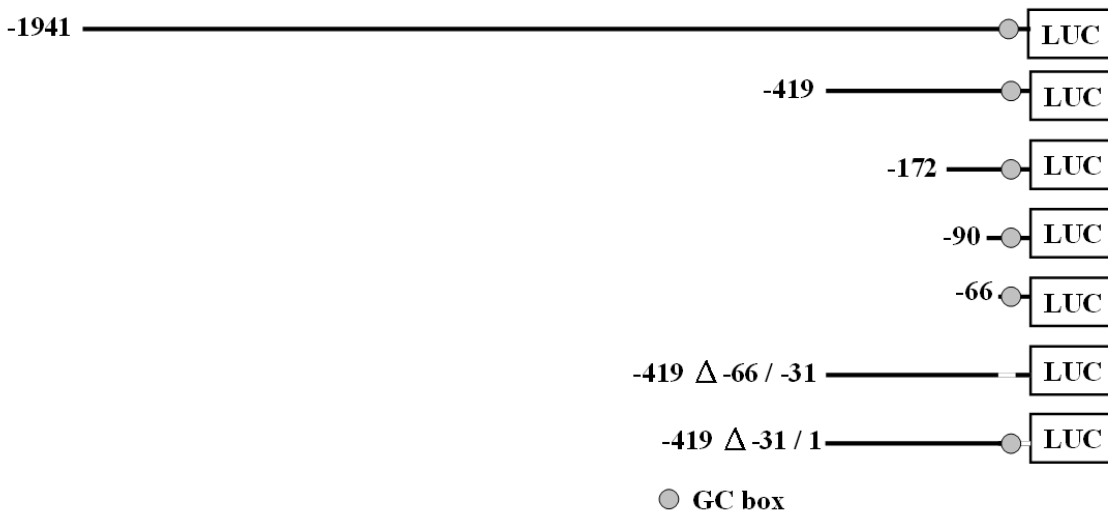
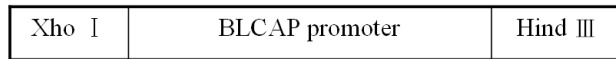
8. 大腸桿菌之基因轉殖 (*E.coli* Transformation)

使用由益生生技公司所購入的大腸桿菌 (DH5 α)，轉殖前取出冷凍之大腸桿菌置於冰上解凍，將大腸桿菌及建構好的質體混合均勻後，置於 42°C 45 秒使 *E. coli* 熱休克，接著將轉形 (transformation)完成的大腸桿菌均勻的塗在含有抗生素 (50 μ g/ml Ampicillim) 的固態 Luria-Bertani 培養基 (LB agar)上培養 16 至 18 小時，再挑取 2 到 4 個單一菌落在液態培養基 (LB) 中培養 16 至 18 小時，接著利用 Genemark® plasmid miniprep purification Kit II (Genemark) 從大腸桿菌中分離出質體，接著利用限制酵素切割及 1.5% 瓊膠電泳進行 DNA 片段大小的初步確認，再交由基龍米克斯公司以 ABI-3730 定序儀進行 DNA 的定序，確認 DNA 序列無誤後。另外取出 750 μ l 菌液加上 250 μ l 60% glycerol 作為保存用，並保存在 -80°C 冰箱中。

Vector : pGL3-Basic vector



Insert:



附圖四、BLCAP 啟動子建構至 pGL3-Basic vector 的建構圖。

9. 微脂體法之基因轉殖 (Liposome Transfection)

將 HEK 293 細胞培養在 35 mm 培養盤中，每一盤細胞約 8×10^5 顆細胞，利用 lipofectamineTM 2000 (invitrogen) 將建構完成的質體送入細胞中；首先將微脂體與質體 (含 2 μ g 建構好的質體與 1 μ g pSV-galactosidase control vector (由中山醫學大學毒理所 柯俊良 老師提供)) 分別利用無血清的 MEM 培養基混合均勻，室溫靜置 5 分鐘後，再將微脂粒及質體混和均勻，然後靜置於室溫中反應 20 分鐘使質體包裹進入微脂體中，將含有微脂體及質體的無血清 MEM 培養基加入培養盤中取代原有血清的 MEM 培養基，使細胞在無血清及抗生素的環境下培養 4 至 6 小時進行基因轉染，最後以含有血清的 MEM 培養基取代含有微脂體及質體的培養基培養 16 至 18 小時，再依照實驗的需求將細胞處理不同濃度的馬兜鈴酸。

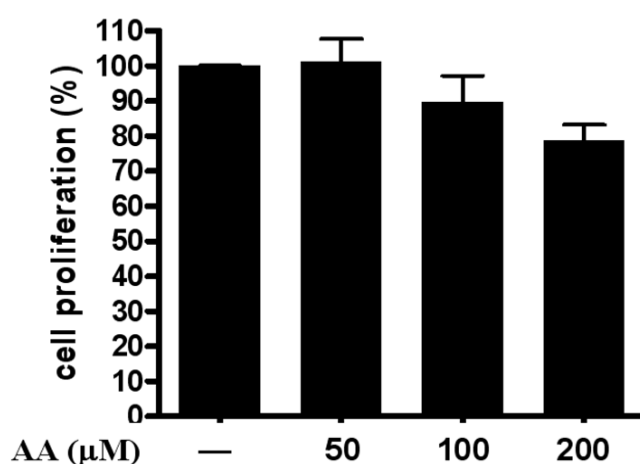
10. 冷光酵素報導基因活性分析 (Luciferase reporter gene assay)

將完成基因轉染的細胞加藥處理 24 小時後，移除培養基，並以 0.01 M PBS 清洗 2 次，加入 Luciferase assay kit (Promega, Madison, WI) 的細胞萃取液 (Lysis buffer) 100 μ l 後在室溫中作用 15 分鐘，接著將細胞從培養盤上刮下連同萃取液一併移入微量離心管中，以 Vortex machine 將細胞與萃取液充分混合均勻，接著以 13,000 rpm 及 4 $^{\circ}$ C 的環境中離心 5 分鐘，將細胞殘渣與細胞萃取液分離，取 100 μ l 細胞萃取液移到新的微量離心管中，分別進行兩種測試。第一，取 10 μ l 的細胞萃取液加至 96 微孔盤中，並加入 60 μ l 的 Luciferase assay buffer 進行反應，利用五合一測定儀以動態的方式 (每 30 秒偵測一次，共偵測 6 分鐘)進行冷光偵測；第二，取 50 μ l 的細胞萃取液到 96 微孔盤中，並加入 50 μ l 的 2 \times β -galactosidase buffer (200 mM Sodium phosphate buffer, PH 7.3、2 mM MgCl₂、100 mM β -mercaptoethanol、1.33 mg/ml ONPG) 在 37 $^{\circ}$ C 的環境下利用五合一測定儀以動態偵測(每 1 分鐘偵測一次，共偵測 20 分鐘)的方式進行波長 420 nm 的吸光值測定。

實驗結果 (Result)

1、馬兜鈴酸對 HEK293 人類胚胎腎臟細胞存活率的影響

為了避免過高的馬兜鈴酸劑量導致細胞凋亡進而影響後續實驗的結果分析，所以本研究首先利用 MTT assay 分析處理不同濃度下的細胞存活率。實驗結果顯示 (圖一)，隨著馬兜鈴酸劑量的提高，HEK293 細胞的存活率沒有顯著性的差異，在前人的研究中發現經 500 μM 馬兜鈴酸劑量處理的 HEK293 細胞在，其細胞存活率顯著性降低 (數據未發表)，因此本研究以 200 μM 馬兜鈴酸為最高劑量的條件下，探討馬兜鈴酸調控 BLCAP 基因表達的機轉。

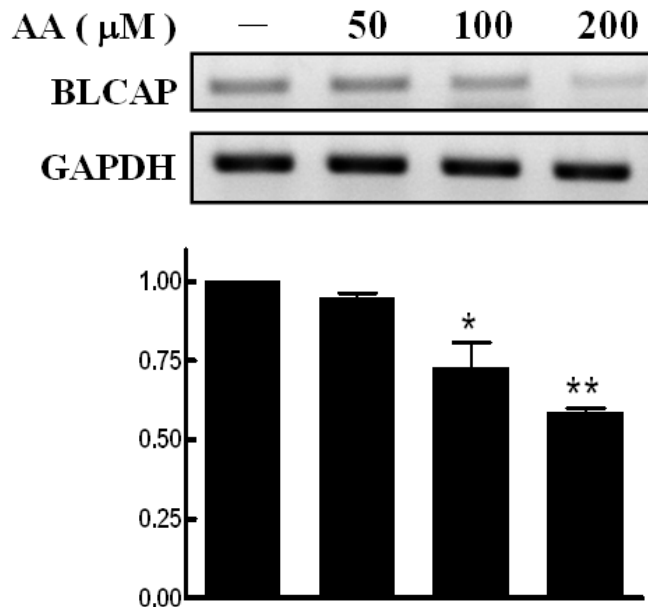


圖一、不同濃度的馬兜鈴酸對 HEK293 細胞存活率之影響

將 HEK 293 細胞在 96 微孔盤中 (約 8×10^3 顆/well) 培養 24 小時，以不同濃度的馬兜鈴酸處理 24 小時，接著利用 MTT assay 偵測細胞存活率，已加入溶劑 50% ethanol 組為控制組，將控制組的細胞存活率當作 100% 與實驗組進行比較。收集三次獨立實驗數據統計分析後以 mean \pm SEM 的方式表示。

2、馬兜鈴酸抑制 BLCAP mRNA 的表達

由於前人研究中發現，人類近曲小管上皮細胞 (Proximal tubule epithelial cell, 簡稱 HK2 cell) 經處理 200 μM 馬兜鈴酸後，其細胞 BLCAP mRNA 表現量有降低的現象，所以本研究推測 HEK293 細胞的 BLCAP mRNA 也會受到馬兜鈴酸的抑制，因此本研究利用半定量 PCR 以偵測馬兜鈴酸對 BLCAP mRNA 的影響。本實驗將 HEK 293 細胞處理不同濃度的馬兜鈴酸 24 小時後，接著萃取細胞內的 RNA 並反轉錄為 cDNA，最後利用半定量 PCR 分析。實驗結果顯示，隨著馬兜鈴酸劑量提高的情況下，BLCAP mRNA 的表現量有顯著的降低，且細胞在 100 μM 及 200 μM 馬兜鈴酸濃度下，BLCAP mRNA 的表現量明顯的被抑制，分別降低至 75 % 及 60 % (圖二)。由實驗結果證實，馬兜鈴酸具有抑制 HEK293 細胞 BLCAP mRNA 的表達的效果。

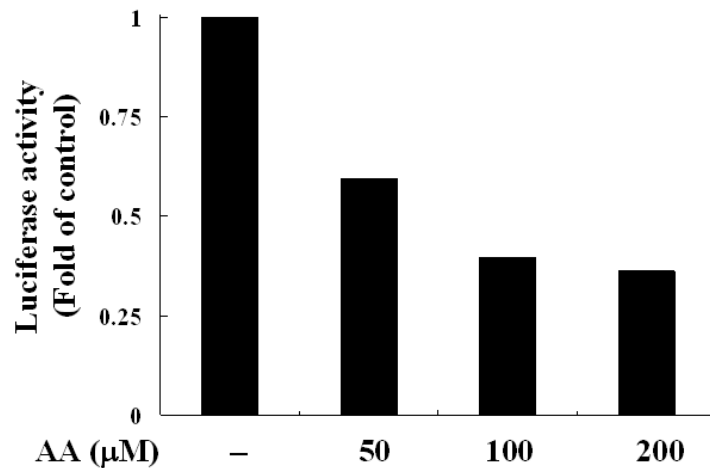


圖二、馬兜鈴酸抑制 BLCAP mRNA 的表現量

將 HEK 293 細胞在 35 mm 盤中 (約 5×10^5 顆細胞 / 盤) 培養 24 小時後，以不同濃度的馬兜鈴酸處理 24 小時，接著萃取 RNA 並將其反轉錄為 cDNA，接著進行半定量 PCR，其中以 GAPDH 為內部控制組，以溶劑組的 BLCAP 表現量設定為 1 與實驗組進行比較。收集三次獨立實驗數據統計分析後以 mean \pm SEM 的方式表示，*表示與控制組具有顯著差異 * $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ 。

3、馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子的活性

由於 BLCAP mRNA 的表現量受馬兜鈴酸抑制，因此本研究進一步利用 BLCAP promoter 進行冷光活性分析以探討馬兜鈴酸是否影響轉錄層次的調節，導致下游的 BLCAP mRNA 的表現量降低。首先將 BLCAP 的啟動子 (約 1941 bp) 建構到帶有 luciferase 冷光報導基因的載體 (pGL3 Basic vector) 中，並將建構完成的質體轉染入 HEK293 細胞中，並以不同濃度的馬兜鈴酸處理細胞 24 小時後，接著萃取細胞內的蛋白質並進行冷光酵素分析。實驗結果顯示，BLCAP 啟動子的活性隨馬兜鈴酸濃度的提高，而有降低的趨勢，在 100 μ M 及 200 μ M 的馬兜鈴酸劑量下，BLCAP 啟動子的活性皆降低至 5 成以下 (圖三)，因此由結果推測馬兜鈴酸藉由抑制 BLCAP 基因轉錄層次，而使得 BLCAP mRNA 表現量降低。

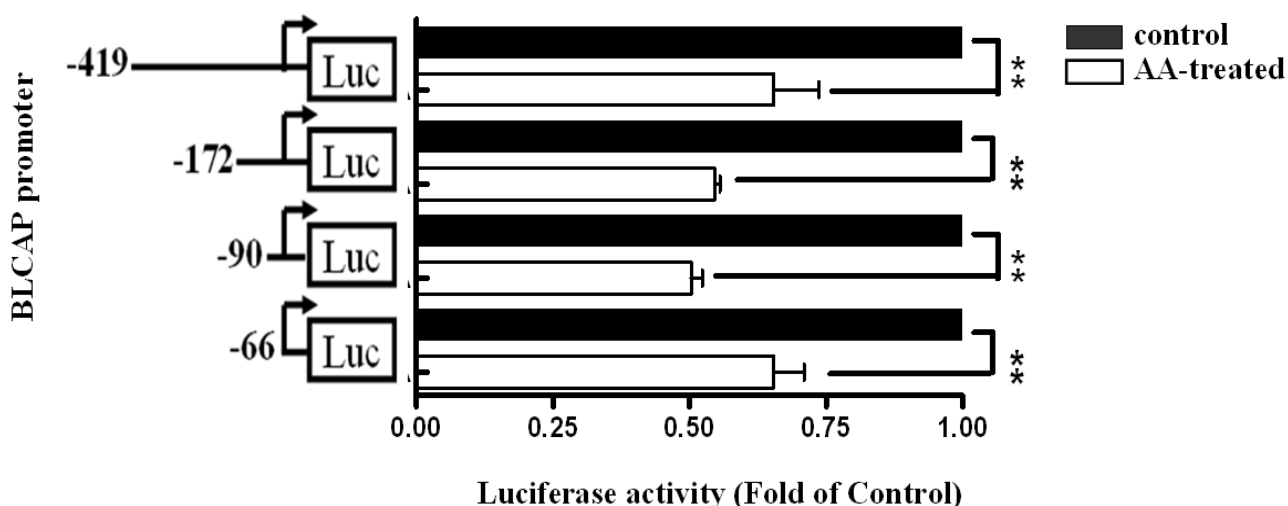


圖三、馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子的活性

將 HEK 293 細胞在 35 mm 盤中 (約 5×10^5 顆細胞 / 盤) 培養 24 小時後，將建構好 BLCAP 啟動子的冷光報導基因質體，轉染到細胞中並以不同濃度的馬兜鈴酸處理細胞 24 小時，接著萃取細胞的蛋白質進行冷光酵素活性分析及 β -galactosidase 酵素活性分析，以 β -galactosidase 酵素的活性為內部控制組。以溶劑組的冷光酵素活性設定為 1 與實驗組進行比較。此為單一次實驗的結果。

4、馬兜鈴酸調控 BLCAP promoter 活性之調控區域

由於 BLCAP promoter 活性受到馬兜鈴酸的抑制，所以本研究進一步將 BLCAP promoter 縮短以分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP promoter 活性的區域。前人的研究中顯示馬兜鈴酸抑制 -1941 及 -412 的 BLCAP promoter 活性的比例相似（數據未發表），所以本研究將由轉錄起始點往前算含有 -412、-172、-90、-66 的 BLCAP promoter 序列建構到帶有 luciferase 冷光報導基因的載體 (pGL3 Basic vector) 中，並將建構完成的質體轉染入 HEK293 細胞中；因為在探討馬兜鈴酸抑制 BLCAP promoter 活性的結果中顯示 BLCAP promoter 活性在馬兜鈴酸 100 μ M 及 200 μ M 的情況下沒有顯著的差異，所以本實驗以馬兜鈴酸 100 μ M 處理細胞 24 小時後，接著萃取細胞內的蛋白質並進行冷光酵素分析。實驗結果顯示，隨著 BLCAP promoter 的減短，馬兜鈴酸皆使 BLCAP promoter 的活性降低約 50 % (圖四)。所以推測此實驗方法，無法找出馬兜鈴酸抑制 BLCAP promoter 活性的調控區域。

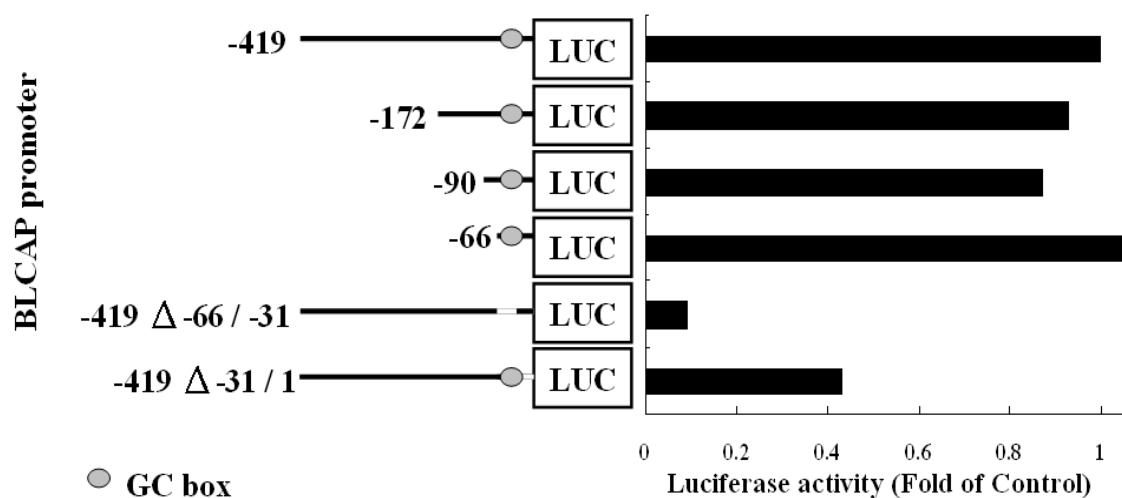


圖四、馬兜鈴酸調控 BLCAP promoter 活性的調控區域

將 HEK 293 細胞在 35 mm 盤中 (約 5×10^5 顆細胞 / 盤) 培養 24 小時後，將建構好 BLCAP 啟動子的冷光報導基因質體，轉染到細胞中並以馬兜鈴酸 100 μ M 處理細胞 24 小時，接著萃取細胞的蛋白質進行冷光酵素活性分析及 β -galactosidase 酵素活性分析，以 β -galactosidase 酵素的活性為內部控制組。以溶劑組的冷光酵素活性設定為 1 與實驗組進行比較。收集三次獨立實驗數據統計分析後以 mean \pm SEM 的方式表示，*表示與控制組具有顯著差異 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

五、細胞中調控 BLCAP promoter 活性之區域

雖然以冷光活性分析的實驗無法分析出馬兜鈴酸調控 BLCAP promoter 活性的區域，但是本研究發現在沒有馬兜鈴酸處理的情況下，在 -419 Δ -66/-31 組別中發現 BLCAP promoter 的活性有降低的趨勢（圖五），而本研究利用 Transcription Element Search Software (Schug., *et al* 1998) 分析 BLCAP promoter，而分析結果顯示被剔除的片段中含有 GC BOX 的序列，因此本研究推測細胞中是藉由與 GC box 結合之相關轉錄因子而啟動 BLCAP 基因轉錄的進行。



圖五、馬兜鈴酸調控 BLCAP promoter 活性的調控區域

將 HEK 293 細胞在 35 mm 盤中 (約 5×10^5 顆細胞 / 盤) 培養 24 小時後，將建構好不同長度 BLCAP 啟動子的冷光報導基因質體，轉染到細胞中並以溶劑處理細胞 24 小時，接著萃取細胞的蛋白質進行冷光酵素活性分析及 β -galactosidase 酵素活性分析，以 β -galactosidase 酵素的活性為內部控制組。以 -419 BLCAP promoter 的冷光酵素活性設定為 1 與實驗組進行比較。此為單一次實驗的結果。

討論 (Discussion)

馬兜鈴酸為馬兜鈴科植物的萃取物之一，從比利時事件後，科學家們著手於馬兜鈴酸毒性的研究，目前文獻指出，馬兜鈴酸是一種致癌物質，在連續餵食 3 個月高劑量馬兜鈴酸的老鼠中發現，具有泌尿上皮癌及胃癌等癌症的形成 (Mengs, 1988; Schmeiser *et al.*, 1988)。由於前人研究中發現馬兜鈴酸會降低人類近曲小管細胞 (proximal tubule epithelial cell, 簡稱 HK2) BLCAP mRNA 的表現量 (數據未發表)，因為目前的文獻指出 Bladder cancer-associated protein (BLCAP) 基因是一種腫瘤抑制基因 (Gromova *et al.*, 1999)，所以本研究將以人類胚胎腎臟細胞 (HEK293 cell lines) 探討馬兜鈴酸抑制 BLCAP 基因表達的機制，以研究馬兜鈴酸調控細胞生長的機制。

為了探討馬兜鈴酸是否對 HEK293 細胞產生細胞傷害，本研究首先將 HEK293 細胞以不同濃度的馬兜鈴酸處理 24 小時後，接著進行 MTT assay 分析細胞的存活率，實驗結果顯示細胞存活率不會因為處理不同劑量的馬兜鈴酸，而有顯著性的差異，因為在 200 μ M 馬兜鈴酸處理組別的細胞存活率沒有顯著的差異 (圖一)。所以在本研究中將以馬兜鈴酸 200 μ M 為最高實驗劑量。

接著本研究在不傷害 HEK293 細胞的馬兜鈴酸劑量下，觀察馬兜鈴酸是否影響 BLCAP 基因的表達。實驗結果顯示，BLCAP mRNA 表現量隨著馬兜鈴酸劑量的提高而有降低的趨勢，而且在馬兜鈴酸 100 μ M 及 200 μ M 的濃度中，HEK293 細胞的 BLCAP mRNA 表現量顯著的減少 (圖二)，此外過去的文獻中指出馬兜鈴酸會藉由抑制 Tsc1 及 WWOX1 等腫瘤抑制基因，而導致細胞處於不正常增生的狀態 (Kerstin *et al.*, 2007)，加上前人的實驗結果發現，馬兜鈴酸具有抑制 HK2 細胞 BLCAP mRNA 表現的效果，與本研究的結果相似，因此本研究推測馬兜鈴酸可能藉由抑制泌尿相關細胞中 BLCAP mRNA 的表現量，而導致泌尿系統病變的形成及細胞不正常的增生。

本研究已得知，馬兜鈴酸會使細胞的 BLCAP mRNA 表現量降低，因此本研究推測馬兜鈴酸可能藉由抑制 BLCAP 基因轉錄層次而導致此現象發生，為了證實此假設，因此本研究利用 Luciferase assay 以分析馬兜鈴酸是否影響 BLCAP 啟動子的活性，首先本研究建構 BLCAP promoter 之質體，接著將質體轉染入細胞中，並在不同劑量的馬兜鈴酸情況下進行活性分析，實驗結果顯示，隨著馬兜鈴酸劑量增加，BLCAP promoter 活性也隨之降低 (圖三)，所以本研究推測馬兜鈴酸藉由抑制 BLCAP 啟動子活性，而導致 mRNA 表現量降低。

於是本研究進一步分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的調控區域，於是建構不同長度 BLCAP 啟動子片段之質體，實驗結果發現隨著 BLCAP 啟動子的減短，馬兜鈴酸顯著的抑制 BLCAP 啟動子活性，但是抑制的比例相似 (圖四)，所以本研究推測該實驗方法無法分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的調控區域；但是從此次的實驗數據中我們分析出，在沒有馬兜鈴酸的情況下，當剔除 BLCAP promoter 中 GC box 位於的 -66 至 -31 片段時，BLCAP promoter 的活性明顯的降低 (圖五)，而過去文獻指出 house keeping 基因及腫瘤抑制基因的啟動子中含有 GC box 的頻率較高，此外過去研究也指出 GC box 在調控細胞生長及分化相關基因轉錄中扮演重要的角色 (Philipsen and Suske., 1999)，因此本研究推測 GC box 在調控 BLCAP 表達中扮演重要的角色。

綜合本研究的實驗結果發現，在 HEK293 細胞中馬兜鈴酸藉由抑制 BLCAP promoter 的活性，而抑制 BLCAP mRNA 的表現量，因為 BLCAP 基因是腫瘤抑制基因，因此本研究認為馬兜鈴酸可能藉由抑制 BLCAP 基因的表達，而導致細胞異常的增生，最後造成腫瘤或癌症的形成，所以本研究認為馬兜鈴酸為一種天然的致癌毒素。

未來研究方向 (Future Work)

由於 BLCAP 基因是一個新穎的基因，所以關於 BLCAP 基因的調控機制還不清楚，而目前的文獻指出 BLCAP 基因可能是腫瘤抑制基因，且具有調控細胞週期及細胞凋亡的作用 (Yao *et al.* 2007； Fan *et al.* 2011)，此外 BLCAP 基因在許多物種中階高度的保留其序列，由此推測 BLCAP 基因在細胞中扮演舉足輕重的角色，因此了解 BLCAP 基因在細胞中的功能及調控機轉有其必要，所以本研究未來將分為兩個方向進行研究：

第一，本研究希望探討細胞中調控 BLCAP 基因表達的機制，因為在本研究中發現 BLCAP 基因的表達與 GC box 息息相關，而目前文獻指出 Sp 蛋白質家族，例如 Sp1，與 GC box 專一的結合而調控下游基因的表達，所以本研究將首先利用 EMSA 以探討 Sp1 等蛋白質是否與 BLCAP promoter 的 GC box 結合，接著再篩選可能影響 Sp1 活性的訊息傳遞路徑，以分析細胞中調控 BLCAP 基因表達的訊息傳遞路徑。

第二，本研究希望探討 BLCAP 基因在細胞中的功能，所以將探討被 BLCAP 調控的基因及蛋白質等，因此本研究將利用 RNAi 的方式抑制 BLCAP 基因的表達，並利用 Microarray 分析可能被影響的基因，並利用 Microarray 的結果分別探討各個被影響的基因在細胞中的功能，藉此推測 BLCAP 在細胞中的功能，並進行功能的分析。

由於 BLCAP 可能是腫瘤抑制基因，所以希望透過本研究的結果以剖析 BLCAP 的調控機轉，以作為未來製備抗癌藥物過程中的基礎，並期望提升大眾的健康福祉。

參考文獻 (Reference)

- Arlt, V. M., Stiborova, M., and Schmeiser, H. H. (2001). Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis* **17**(4), 265-277
- Bamias, G., and Boletis, J. (2008). Balkan nephropathy: evolution of our knowledge. *Am J Kidney Dis* **52**, 606-616
- Clutterbuck, D.R., Leroy, A., O'Connell, M.A., Semple, C.A. (2005). A bioinformatic screen for novel A-I RNA editing sites reveals recoding editing in BC10. *Bioinformatics (Oxford, England)* **21**, 2590-2595.
- Debelle, F. D., Nortier, J. L., De Prez, E. G., Garbar, C. H., Vienne, A. R., Salmon, I. J., Deschodt-Lanckman, M. M., and Vanherweghem, J. L. (2002). Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *Journal of the American Society of Nephrology* **13**, 431-436.
- Evans, H. K., Wylie, A. A., Murphy, S. K., Jirtle, R. L. (2001). The neuronatin gene resides in a "micro-imprinted" domain on human chromosome 20q11.2. *Genomics* **77**, 99-104
- Fan, D. G., Zhao, F., Ding, Y., Wu, M. M., Fan, Q. Y., Shimizu, K., Dohjima, T., Nozawa, S., Wakahara, K., Ohno, T., Guo, Y. S., Ma, B. A., and Jiang, J. L. (2011). BLCAP induces apoptosis in human Ewing's sarcoma cells. *Experimental Biology and Medicine* **236**. 1030-1035.
- Galeano, F., Leroy, A., Rossetti, C., Gromova, I., Gautier, P., Keeqan, L P., Massimi, L., Di Rocco, C., O'Connell, M. A., and Gallo, A. (2010). Human BLCAP transcript: new editing events in normal and cancerous tissues. *Int J Cancer* **127**(1), 127-137.
- Gromova, I., Gromov, P., Celis, J.E. (1999). Identification of true differentially expressed mRNAs in a pair of human bladder transitional cell carcinomas using an improved differential display procedure. *Electrophoresis* **20**, 241-248.
- Gromova, I., Gromov, P., Celis, J.E. (2002). bc10: A novel human bladder cancer-associated protein with a conserved genomic structure downregulated in invasive cancer. *International journal of cancer* **98**, 539-546.
- Kerstin, S., Heidrun, E. Z., Ahr, H. J., and Daniel, R. D. (2007). Carcinogen-Specific Gene Expression Profiles in Short-term Treated Eker and Wild-type Rats Indicative of Pathways Involved in Renal Tumorigenesis. *Cancer Research* **67**, 4052-4068
- Lord, G. M., Hollatein, M., Arlt, V. M., Roufosse, C., Pusey, C. D., Cook, T., and Schmeiser, H. H. (2004). DNA adducts and p53 mutation in a patient with aristolochic acid-associated nephropathy. *American journal of kidney diseases* **43**. e11-17.
- Mengs, U. (1987). Acute toxicity of aristolochic acid in rodents. *Archives of toxicology* **59**, 328-331.

- Mengs, U. (1988). Tumor induction in mice following exposure to aristolochic acid. *Archives of toxicology* **61**, 504-505.
- Moreira, J.M., Ohlsson, G., Gromov, P., Simon, R., Sauter, G., Celis, J.E., Gromova, I. (2010). Bladder cancer-associated protein, a potential prognostic biomarker in human bladder cancer. *Mol Cell Proteomics* **9**, 161-177.
- Philipsen, S., and Suske, G. (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factor. *Nucleic Acid Research* **27**, 2991-3000.
- Schmeiser, H. H., Schoepe, K.B., and Wiessler, M. (1988). DNA adduct formation in aristolochic acid I and II in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* **9**, 297-303
- Schug, J., and Overton, G. C. (1998). Transcription Element Search Software on the WWW.
- Shibutani, S., Dong, H., Suzuki, N., Ueda, S., Miller, F., and Grollman, A. P. (2007) Selective toxicity of Aristolochic Acids I and II. *Drug Metabolism And Disposition* **35**, 1217-1222.
- Stiborova, M., Frei, E., Arlt, VM., and Schmeiser, H. H. (2008). Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy. *Mutation research* **658**, 55-67
- Vanherweghem, J. L., Depierreux, M., Tielemans, C., Abramowicz, D., Dratwa, M., Jadoul, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R. (1993). Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 341-391
- Wang, W., and Zhang, J. (2008). Protective effect of erythropoietin against aristolochic acid-induced apoptosis in renal tubular epithelial cells. *European journal of pharmacology* **588**, 135-140.
- Yao, J., Duan, L., Fan, M., Yuan, J., Wu, X. (2007). Overexpression of BLCAP induces S phase arrest and apoptosis independent of p53 and NF-kappaB in human tongue carcinoma : BLCAP overexpression induces S phase arrest and apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry* **297**, 81-92.
- Zuo, Z., Zhao, M., Liu, J., Gao, G., Wu, X. (2006). Functional analysis of bladder cancer-related protein gene: a putative cervical cancer tumor suppressor gene in cervical carcinoma. *Tumour Biol* **27**, 221-226.