

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 \*  
\* : Antizyme 對血癌細胞的死亡機制 \*  
\* 名 稱 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 周則明  
學生計畫編號： NSC 97-2815-C-040-015-B  
研究期間： 97年07月01日至98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，2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

98年03月30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 \*  
\* :Antizyme 對血癌細胞的死亡機制 \*  
\* 名稱 \*  
\*\*\*\*\*

執行計畫學生：周則明  
學生計畫編號：NSC97-2815-C-040-015-B  
研究期間：97年7月1日至 年2月底止，計8個月  
指導教授：劉光耀 副教授 Ph.D

執行單位：私立中山醫學大學免疫所

中華民國 97年 3月 30日

## 目錄

英文摘要	1
前言	2
研究目的及方向	3
材料與方法	6
結果	7
討論	8
參考文獻	10
圖表	16

## Abstract

Antizyme (AZ) plays an important role in inhibiting the growth of the normal cells and tumor cells, which could degrade the ornithine decarboxylase (ODC) by carrying it to the 26S proteasome, causing the inactivation of the ODC and inhibiting the intake of the polyamine. ODC, a key enzyme in the biosynthesis of the polyamine, is involved in the cell growth, differentiation and anti-apoptosis. However, the relationship between AZ and apoptosis is unclear. To understand the overexpression of AZ causing the programmed cell death (PCD), we have established a Doxycycline (Dox) induced Jurkat T cell Tet-On system to evaluate the phenomenon of DNA ladder, cell survival, apoptotic bodies and releasing the cell death signal “cytochrome *c*” from the mitochondria. At first, we found that with the increasing doses and the prolonging time of the transiently transfected AZ in the human leukemia cell (HL-60), human acute-phase leukemia T-cell (Jurkat T cells) and rat's macrophage (RAW264.7), showed that the cell survival rate and the apoptotic bodies were notoriously increased. Besides, AZ interfered the protein expressions of Bcl-2 family. Inducible AZ largely enters mitochondria resulting in cytochrome *c* release from mitochondria to cytosol following Bcl-xL decrease and Bax increase. To explain the relationship between AZ and Bcl-xL, we analyze: (1) *In vitro*: Ultracentrifuge for observing AZ and Bcl-xL interaction. (2) *In vitro/In vivo*: Pull-down assay for observing *In vitro/In vivo* AZ and Bcl-xL's interaction in the mitochondria level, to find out the interaction between AZ and Bcl-xL, these two hypothesis help us to clarify the apoptotic mechanisms of AZ.

Key words: Antizyme (AZ), Ornithine decarboxylase (ODC), Bcl-xL

## 前言

人們總是對未知的事物感到恐懼，尤其是『死亡』，但是我認為『無知』卻比死還要可怕。“Death is just the beginning”(這句話是出自電影『魔蝎大帝』裡的一句台詞)，或許死亡只是一個過程，如果我們了解它、面對它也許會發現一切不是終止而是即將開始。所以，藉由這次的主題:『Antizyme 對血癌細胞的死亡機制』讓我們一同來揭開生命的面紗。

AZ 和 ODC 以及 polyamine 之間的關係密不可分(Coffino et al.,2001)，可是她們之間的確切調控機制仍待釐清中。這次的計畫內容主要是針對 AZ 對細胞的死亡機制為何?其中，AZ 對於細胞多胺(Polyamine)的攝入佔有重要的角色(Coffino et al.,2001)。AZ 在分子與細胞性功能佔有重要的角色，其中包括分化調節、細胞週期、細胞生長、死亡、分化與腫瘤增生(Feith et al., 2006; Fong et al., 2003; Gritli-Linde et al., 2001;Newman et al., 2004; Tsuji et al., 2001)。而先前的研究顯示經 AZ 轉殖基因的老鼠其細胞生長減少，且曝入在致癌物質下易引起細胞死亡(Fong et al., 2003)。AZ 的信使 RNA (Messenger RNA; mRNA) 存在兩個起始端 (AUG) 和兩個結束端 (UGA; UAG) (Matsufuji et al., 1995)。當細胞內產生過多的多胺，將誘發 AZ 在轉譯時讀碼框跳過一個核苷酸 (+1 Ribosomal frame shift)，使得第一個結束端不被認識，造成兩種型態 (24.5 和 29 kDa) 全長且有功能的蛋白質(Matsufuji et al., 1995)。一般常為從第二個起始端轉譯出的 24.5 kDa AZ，而 29.5 kDa AZ 是來自轉譯第一個起始端且兩個起始端中間帶有粒線體標靶訊號序列 (Mitochondrial targeting signal sequence)。不過，AZ 對粒腺體的影響目前的研究尚未清楚理解。

此外，目前在治療癌症的藥物中很多都會經由破壞粒腺體的途徑，而讓癌症細胞走向細胞凋亡。先前的研究指出，AZ 具有對抗細胞增生及腫瘤的能力(Fong et al., 2003)，它直接和鳥胺酸去羧化酶 (Ornithine decarboxylase; ODC) 結合將其攜帶至 26S 蛋白質酶體 (Proteasome) 造成 ODC 的降解，導致 ODC 無法活化且抑制多胺的攝入(Asher et al., 2005)；ODC 為多胺生合成中的重要酵素，ODC 與多胺在細胞生長、分化、死亡、發育及腫瘤生成的調節扮演重要角色(Pegg et al., 1994)。因此，本計畫想要證實 AZ 能夠參與血球細胞死亡的機制，我們建立可以表現具有功能 AZ 蛋白質，觀察是否過度表現 AZ 能夠直接加強細胞凋亡的程度，以及其所調節之分子機制。

### 研究目的及方向

本研究將實驗證明 AZ 是否經調節 ODC 而直接影響粒線體的途徑，而誘發細胞凋亡。接下來利用 JK-Tet-On-vector 細胞與 JK-Tet-On-antizyme 分別處理 Dox 後，進行下列實驗證明 AZ 透過影響何種機制導致細胞凋亡：(1)利用基因轉入真核細胞表現載 (pCMV-Tag 2b-antizyme ; WT-antizyme)，將 WT-antizyme 載體以磷酸鈣方法暫時轉染(Transiently transfection)至 Jurkat T、HL-60 和 RAW 264.7 細胞後，觀察細胞的變化。(2)利用 AZ 基因轉入一個真核細胞誘導性表現載體 (pTRE2hyg-antizyme)，並將載體轉染 Jurkat T (JK)-Tet-On 系統細胞(3)利用 DNA fragmentation analysis 觀察有無染色體濃縮與 DNA 片段化等細胞凋亡的現象出現(4)利用 Acridine-orange staining 及螢光顯微鏡觀察 Jurkat T (JK)-Tet-On 系統細胞和 WT-AZ 與 M-AZ 的細胞型態及凋亡情形(5)並利用免疫點墨法觀察 cytochrome *c* 在 JK-Tet-On-antizyme 細胞的粒線體表現量。由上述實驗釐清 AZ 進入粒線體後，如何調控粒線體，而導致細胞凋亡。接著並利用:(6)超高速離心觀察在 *In vitro* 下 AZ 和 Bcl-xL 之間的交互作用(7)並利用 Pull-Down assay 觀察細胞內及細胞外 AZ 和 Bcl-xL 於粒線體之間的交互作用。

## 材料與方法

### 細胞培養及試劑

人類前骨髓白血球癌母細胞(Human promyelocytic leukemia HL-60 cell)生長在含有 10%的去活性胎牛血清(GIBCO BRL, Grand Island, NY)的 RPMI 1640 培養基培養於 37°C 下含 5% 二氧化碳培養箱。

### 免疫點墨法

為了分離細胞粒線體與細胞蛋白質，收集  $5 \times 10^6$  細胞利用冰的 PBS 洗滌一次並加入 50  $\mu$ l mitochondrial buffer (25 mM Tris , pH 6.8 , 1 mM EDTA , 1 mM DTT , 0.1 mM PMSF and 250 mM sucrose) , 12,000 rpm 離心 10 分鐘後吸取上層為細胞質；而下層為含粒線體之沉澱物，再利用 30  $\mu$ l mitochondrial buffer 使之在溶解而進行之後的實驗。此外，total proteins 則是利用冰的 gold lysis buffer (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, pH7.9, 100  $\mu$ M -glycerophosphate , 137 mM NaCl , 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 g/ml leupeptin) , 在 4°C 震盪 30 分鐘以均質化細胞，用 12,000 rpm 離心 4°C 30 分鐘，將上清液加入 loading buffer 於 95°C 10 分鐘，將蛋白質放入 SDS-PAGE 中跑電泳之後，轉移到 polyvinylidene fluoride (PVDF) ，用溶於 PBS-0.1% Tween 20 洗滌 3 次每次 10 分鐘，然後將第一抗體【anti-AZ(MDBio, TWN), anti-ODC, anti-p53, anti-p21, anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-Bcl-xL, anti-cyclin E, anti-cyclin D, anti-cyclin B, anti-cyclin A, anti-cyclin-dependent kinase (Cdk1), anti-Cdk2, anti-Cdk4, anti-cytochrome c, anti-caspase 9, anti-caspase 3, anti-Apaf-1, anti-PARP and anti-actin antibodies (Neomarkers)】 (1:10000 的稀釋，利用 PBS-0.1% Tween 20 與 0.1% 牛血清白蛋白當作稀釋液) 放入 blocking 後的 PVDF 反應 6 小時，再利用 PBS-0.1% Tween 20 洗滌 3 次每次 10 分鐘，之後將有標定 horseradish-peroxidase (HRP) 的第二抗體 (1:10000，利用 PBS-0.1% Tween 20 當作稀釋液) 作用 1 小時，用 PBS-0.1% Tween 20 洗滌 3 次每次 10 分鐘，最後抗體與抗原複合物使用增強化學冷光方法測定 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)。anti-AZ 多株抗體的獲得是藉由純化接在 pET-32a 載體的人類  $\Delta$ T205 AZ cDNA 的菌株，它表現 AZ 的蛋白質並且攜帶 N 端的 His-Tag 序列利用親合性管柱純化出蛋白質，之後免疫兔子取血清，純化獲得抗體。

### 螢光顯微鏡分析

2% 的 paraformaldehyde 固定細胞 ( $1 \times 10^6$ ) 在室溫 15 分鐘，利用 70% 的甲醇在 4°C 反應 1 小時將細胞打洞，細胞以 PBS 清洗利用 cytospin 離心在 coverslips 上，之後以 3% bovine serum albumin 在室溫下 blocking 2 小時。m-AZ 與 WT-AZ 細胞的染色是分別藉由抗 AZ 抗體 (1:50) 與抗 Bax 抗體 (1:100) 在 4°C 作用 16 小時，以 PBS 清洗後再加入 goat anti-rabbit IgG 聯結 fluorescein isothiocyanate (FITC) 與 goat



anti-mouse IgG conjugated 聯結 rhodamine (Santa Cruz) 的二抗在 37°C 反應 2 小時後 coverslips 放置在玻片上以螢光顯微鏡觀察。

#### 細胞存活的計算

首先在培養皿中溫和地 pipetting 並吸取懸浮的細胞，剩下的黏著細胞用 0.05% 的 trypsin 和 0.02% 的 EDTA 處理 5 分鐘後，劇烈地 pipetting。懸浮細胞與黏著細胞使用細胞計數器計算。

#### 去氧核糖核酸的片段化

細胞處理後，收集  $5 \times 10^6$  顆細胞進行分析。細胞利用 1 倍濃度 PBS 洗滌一次，1,000 rpm 離心取得沉澱的細胞，這些細胞加入 50  $\mu$ l 細胞 DNA ladder 溶解性溶液 (50 mM Tris-HCL, pH8.0, 10 mM EDTA 和 0.5% Sakosyl) 和 5  $\mu$ l 蛋白分解酶 K (0.5 mg/ml) 後，放入 55°C 水浴，隔夜後再加入 1  $\mu$ l RNase A (5  $\mu$ g/ml) 反應兩小時，之後萃取去氧核糖核酸加入等量的 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) 混合均勻後，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，將上清液加上 DNA loading 溶液 (10X; 20% Ficoll 400, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 1% SDS, 0.25% bromophenol blue 和 0.25% xylene cyanol)，使用 2% agarose 以 50 伏特進行電泳分析 (Liu et al., 1999)。

#### Pull-down assay

取  $1 \times 10^7$  的細胞，並用 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF 和 1% NP-40 溶之。接著將細胞萃取物在 90  $\mu$ g 的 His<sub>6</sub>-AZ 4°C 之下培養 1 小時，並和已準備好 30  $\mu$ l Ni-NTA-agarose 的珠子 (sigma, P6611, 15 mg/ml, HIS-Select™ Nickel Affinity Gel) 培養在室溫下 1 小時，然後用 1.5 ml, 10 mM Tris-HCl, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM imidazole 和 1% NP-40 (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 10% glycerol, 100 mM NaCl, 15 mM imidazole) 清洗之，將結合上的物質用 100°C Laemmli buffer 沖洗之之後用 anti-AZ 或 anti-Bcl-xL 的抗體藉由 western-blot 的技術分析之，最後再追加 anti-rabbit 或 anti-mouse IgG peroxidase。實驗套組來自 ECL kit (Amersham, Co)。

#### 超高速離心

為了觀察 AZ 與 Bcl-xL 結合的關係，在兩種蛋白質的不同濃度 (0.1~1.5 mg/ml) 下加入 50 mM Tris-HCl 與 250 mM NaCl，接著在其中一個管柱中注入 380  $\mu$ l 的樣本而另一管則注入 400  $\mu$ l, 50 mM Tris-HCl 當作 Blank。最後，蛋白質的吸收率經由波長 280 nm 的超高速離心 (42,000 rpm) 測之。sedimentation velocity 的光譜數據是藉由 Sedfit software 來計算 Svedberg value (S)。

#### 統計分析

統計資料利用 SPSS 10.0 版進行統計分析，當統計後數據 P value 值小於 0.05

或 0.01 時，則具有統計學上意義( $P < 0.05$  時以 \* 表示)。

## 結果

首先，為了建立AZ對細胞存活與死亡的機制，我們實驗室利用基因轉入真核細胞表現載體 (pCMV-Tag 2b-antizyme ; WT-antizyme)，將WT-antizyme載體以磷酸鈣方法暫時轉染 (Transiently transfection) 至Jurkat T、HL-60和RAW 264.7細胞後，觀察細胞的變化。初步結果發現，AZ造成細胞存活率下降，染色體濃縮 (Fig. 1)。隨著轉染AZ DNA的濃度提高，細胞的生存率也隨著減少。由於上述的研究得知WT-antizyme轉染細胞無法繼代培養，因此為了得到永久存活Antizyme細胞株，研究室將AZ基因轉入一個真核細胞誘導性表現載體 (pTRE2hyg-antizyme)，再將載體轉染Jurkat T (JK)-Tet-On系統細胞 (Fig.2)；即必須加入Dox才可使AZ基因表現。(Fig.3)如所示，AZ基因未表現的細胞與對照組 (JK-Tet-On-vector) 細胞存活率沒有差異，在加入Dox啟動AZ基因表現後，JK-Tet-On-antizyme的細胞呈現細胞存活率下降，染色體濃縮與DNA片段化等細胞凋亡的現象出現。AZ也會干擾Bcl-2家族的表現而誘導大量的AZ進入到粒腺體的結果，而造成cytochrome *c*從粒腺體釋放出至細胞質並且伴隨Bcl-xL 的減少與Bax 增加(Chao et al., 1998)根據這些結果，我們證實AZ引起的細胞凋亡主要是經由粒腺體與不相關細胞週期的路徑。進而，AZ 引起的細胞凋亡不僅藉由Bax的堆積、Bcl-2家族的減少、破壞粒腺體膜電位、釋出cytochrome *c* 至細胞質並且使得細胞凋亡體的Caspases連鎖活化。接著指出cytochrome *c*在JK-Tet-On-antizyme細胞的粒線體表現量減少與AZ的表現量增加 (Fig.4)，且是與以前的文獻對照尚未被提出證明的。從以上暫時性與永久性轉染AZ的實驗得知，AZ的確對細胞造成細胞凋亡。先前的研究顯示AZ能夠進入粒線體，卻不影響多胺攝入粒線體，且鮮少文獻指出其進入此胞器後的目的及功能(Hoshino et al., 2005)，而AZ減少細胞增生及抑制腫瘤產生可能與ODC (Newman et al., 2004) 具有相關性。然而多胺攝入粒線體造成粒線體cytochrome *c*釋出，與AZ並無關係 (Hoshino et al., 2005)。我們的實驗結果指出AZ進入到粒線體與cytochrome *c*釋出可能具有關聯性。此外，調控AZ基因在轉譯時需要讀碼框跳過一個核苷酸，產生全長具有功能的蛋白質之調節機制，也尚未完全釐清。以上的實驗已經證明AZ與ODC和粒線體cytochrome *c*釋出的絕對相關性。接著，為了瞭解AZ與Bcl-xL二者之間互相調控的機制與作用為何，我們實驗室建立了:(1)*In vitro*(2)*In vitro/In vivo*兩個假說，目的是釐清她們彼此之間在細胞內、外所扮演的作用及互相的關聯性。*In vitro*: 實驗室利用超高速離心的方式隨著不同濃度 (AZ:Bcl-xL=3:1, AZ:Bcl-xL=1:3)觀察並模擬出AZ與Bcl-xL在不同濃度高低的作用之下，發現AZ與Bcl-xL之間並無顯著的關聯性。(Fig.5)*In vitro/In vivo*:藉由Pull-down assay發現wild type AZ(1-228)與Bcl-xL在HL-60、Jurkat、K-562與U-537細胞內利用IB(Immuno-blotting assay)的方式觀察到AZ(1-68)的蛋白質序列與Bcl-xL不會鍵結而AZ(1-228)的蛋白質序列與Bcl-xL卻有互相鍵結的行為，因此可證明AZ和Bcl-xL的確有結合作用。

## 討論

簡單的說，AZ為調節ODC與多胺平衡的主要因子(Morris et al., 1991; Pegg et al., 1995; Shantz et al., 1999)。且AZ有24.5和29 kDa兩種形式(Pegg et al., 2006)，細胞內的AZ主要為24.5 kDa，那是因為RNA聚合酶較容易與第二個AUG附近的Kozak序列結合，促進mRNA轉錄成蛋白質(Gandre et al., 2003)。另一方面，29 kDa的AZ多了一段訊號序列，使之能夠進入粒線體。此外，多胺也會進入粒線體，但是多胺與AZ進入粒線體的機制是彼此截然不同，並且不會互相影響(Hoshino et al., 2005)。

而AZ在*in vivo*實驗中，也證實AZ與腫瘤細胞的發展有關(Tsuji et al., 1998)，更進一步證實直接過度表現AZ具有抑制腫瘤細胞生長的能力(Fong et al., 2003)。因此，為了釐清AZ如何進入粒線體和導致cytochrome *c*受到影響，或是干擾粒線體膜上蛋白質的分佈，而導致粒線體受損進而使得細胞死亡。以及，如何影響腫瘤細胞的生長、死亡與分化。我們建立了引起細胞凋亡在血液細胞的機制，發展特定條件誘導且永恆穩定轉染的Jurkat Tet-On細胞。不論我們短暫的轉染AZ至HL-60、Jurkat與RAW 264.7細胞或永久轉染AZ至Tet-On Jurkat T細胞在AZ表現的細胞與控制組細胞相比是顯著的增加細胞凋亡的特徵。由以上的實驗結果可大膽推估AZ進入到粒線體與的cytochrome *c*釋出可能具有關聯性，雖然我們沒有證明誘發AZ過度表現經由直接破壞粒腺體引起細胞凋亡，但是過度表現的AZ進入到粒腺體與AZ影響cytochrome *c*從粒腺體釋放至細胞質可能活化凋亡體且增加細胞死亡。這樣的結果AZ分子壓力所產生的。AZ過度表現如何引起細胞計畫性的死亡？以AZ在生理學功能而言，在這個研究有幾種可能的解釋。第一，AZ進入到粒腺體與干擾Bcl-2家族的分佈與表現，引起cytochrome *c*的釋放。第二，cytochrome *c*可能直接被誘導出的AZ擠出粒腺體。第三，AZ引發的細胞凋亡可能的結果來至ODC被26S蛋白質酶體降解。第四，過度表現AZ使得細胞多胺的攝入減少以至不能維持細胞正常的生理與ODC立即的被降解。

另外發現新的AZ相互作用的分子，與經由AZ過度表現使引起細胞凋亡的機制未來將是值得被研究的。舉例來說，AZ與Bcl-xL二者之間互相調控的機制與作用為何可以藉由(1)*In vitro*(2)*In vitro/In vivo*兩種不同的角度去切入，而研究發現在不同的環境之下此二者可以毫無作用(1)*In vitro*: AZ與Bcl-xL在不同濃度高低的作用之下，並無顯著的關聯性。甚至關係匪淺(2)*In vitro/In vivo*: WT-AZ(1-228)的蛋白質序列和Bcl-xL有互相鍵結的行為，而導致在真核系統下產生抑制細胞死亡的情形。

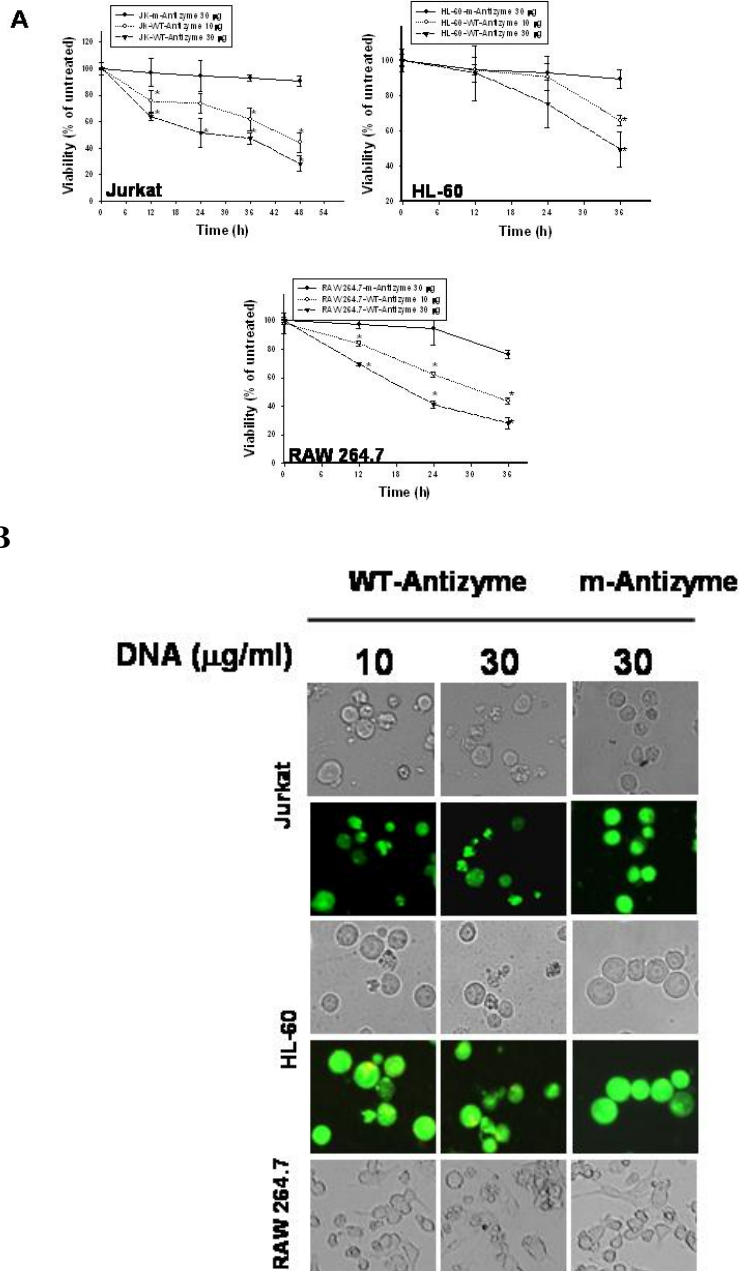
## 参考文献

- Asher, G., Z. Bercovich, et al. (2005). "20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1." Mol Cell 17(5): 645-55.
- Chao, D. T. and S. J. Korsmeyer (1998). "BCL-2 family: regulators of cell death." Annu Rev Immunol 16: 395-419.
- Coffino, P. (2001). "Regulation of cellular polyamines by antizyme." Nat Rev Mol Cell Biol 2(3): 188-94.
- Feith, D. J., S. Origanti, et al. (2006). "Tumor suppressor activity of ODC antizyme in MEK-driven skin tumorigenesis." Carcinogenesis 27(5): 1090-8.
- Fong, L. Y., D. J. Feith, et al. (2003). "Antizyme overexpression in transgenic mice reduces cell proliferation, increases apoptosis, and reduces N-nitrosomethylbenzylamine-induced forestomach carcinogenesis." Cancer Res 63(14): 3945-54.
- Gandre, S., Z. Bercovich, et al. (2003). "Mitochondrial localization of antizyme is determined by context-dependent alternative utilization of two AUG initiation codons." Mitochondrion 2(4): 245-56.
- Grentzmann, G., J. A. Ingram, et al. (1998). "A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals." Rna 4(4): 479-86.
- Hoshino, K., E. Momiyama, et al. (2005). "Polyamine transport by mammalian cells and mitochondria: role of antizyme and glycosaminoglycans." J Biol Chem 280(52): 42801-8.
- Ivanov, I. P., C. B. Anderson, et al. (2004). "Identification of a new antizyme mRNA +1 frameshifting stimulatory pseudoknot in a subset of diverse invertebrates and its apparent absence in intermediate species." J Mol Biol 339(3): 495-504.
- Ivanov, I. P., S. Matsufuji, et al. (2000). "Conservation of polyamine regulation by translational frameshifting from yeast to mammals." Embo J 19(8): 1907-17.
- Le Roy, F., T. Salehzada, et al. (2005). "A newly discovered function for RNase L in regulating translation termination." Nat Struct Mol Biol 12(6): 505-12.
- Liu, G. Y., Y. C. Hung, et al. (2005). "Ornithine decarboxylase prevents tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by decreasing intracellular reactive oxygen species." Apoptosis 10(3): 569-81.
- Liu, G. Y., Y. F. Liao, et al. (2006). "Overexpression of peptidylarginine deiminase IV features in apoptosis of haematopoietic cells." Apoptosis 11(2): 183-96.
- Mackintosh, C. A., D. J. Feith, et al. (2000). "Overexpression of antizyme in the hearts of transgenic mice prevents the isoprenaline-induced increase in cardiac ornithine decarboxylase activity and polyamines, but does not prevent cardiac hypertrophy." Biochem J 350 Pt 3: 645-53.
- Matsufuji, S., T. Matsufuji, et al. (1995). "Autoregulatory frameshifting in decoding

- mammalian ornithine decarboxylase antizyme." Cell 80(1): 51-60.
- Morris, D. R. (1991). "A new perspective on ornithine decarboxylase regulation: prevention of polyamine toxicity is the overriding theme." J Cell Biochem 46(2): 102-5.
- Newman, R. M., A. Mobascher, et al. (2004). "Antizyme targets cyclin D1 for degradation. A novel mechanism for cell growth repression." J Biol Chem 279(40): 41504-11.
- Pegg, A. E. (2006). "Regulation of ornithine decarboxylase." J Biol Chem 281(21): 14529-32.
- Pegg, A. E., L. M. Shantz, et al. (1994). "Ornithine decarboxylase: structure, function and translational regulation." Biochem Soc Trans 22(4): 846-52.
- Shantz, L. M. and A. E. Pegg (1999). "Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway." Int J Biochem Cell Biol 31(1): 107-22.
- Tsuji, T., R. Todd, et al. (1998). "Reduction of ornithine decarboxylase antizyme (ODC-Az) level in the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis model." Oncogene 16(26): 3379-85.
- Yang, D., H. Hayashi, et al. (1997). "Interleukin-1-induced growth inhibition of human melanoma cells. Interleukin-1-induced antizyme expression is responsible for ornithine decarboxylase activity down-regulation." J Biol Chem 272(6): 3376-83.

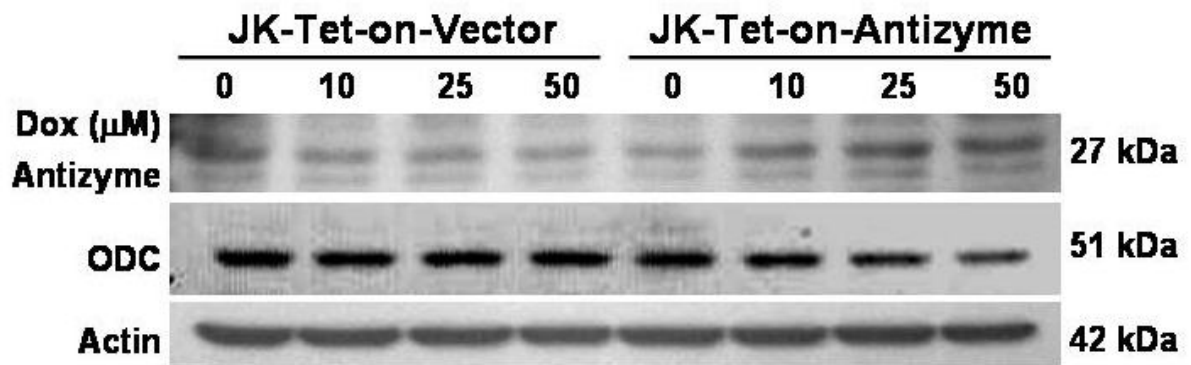
圖表

Fig. 1



圖一、暫時轉染 AZ 在 Jurkat T、HL-60 與 RAW 264.7 細胞引發細胞凋亡  
 (A) 30  $\mu\text{g}$  pCMV-2a-AZ(m-AZ) 或 10 與 30  $\mu\text{g}$  pCMV-2b-AZ (WT-AZ)，分別暫時性轉染至  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$  Jurkat T、 $1 \times 10^6/\text{ml}$  HL-60 與  $1 \times 10^6/\text{ml}$  RAW 264.7 細胞，在 0、12、24 與 36 小時存活細胞以 trypan blue 染色排除分析測定；(B) 細胞暫時性轉染 m-AZ 或 WT-AZ 36 小時在螢光顯微鏡下觀察計畫性凋亡細胞。

Fig. 2

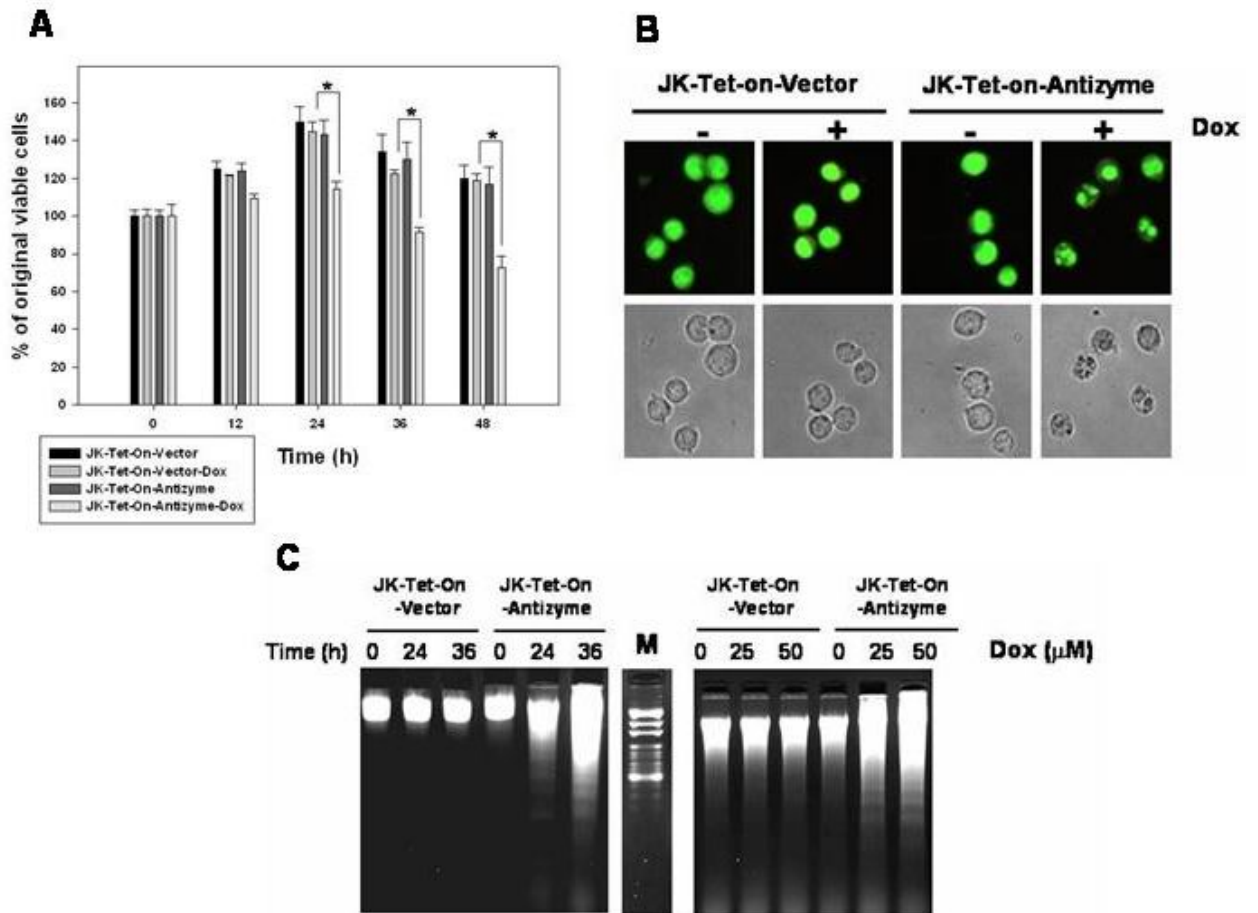


圖二、條件式誘發 AZ 抑制 ODC 蛋白質表現與酶的活性

JK-Tet-On-Vector 與 JK-Tet-On-AZ 細胞在不同的 Dox 濃度給予 24 小時，細胞總蛋白質分別以抗 AZ 與 ODC 的抗體以免疫點墨法測定出 AZ 與 ODC 表現量。



Fig. 3

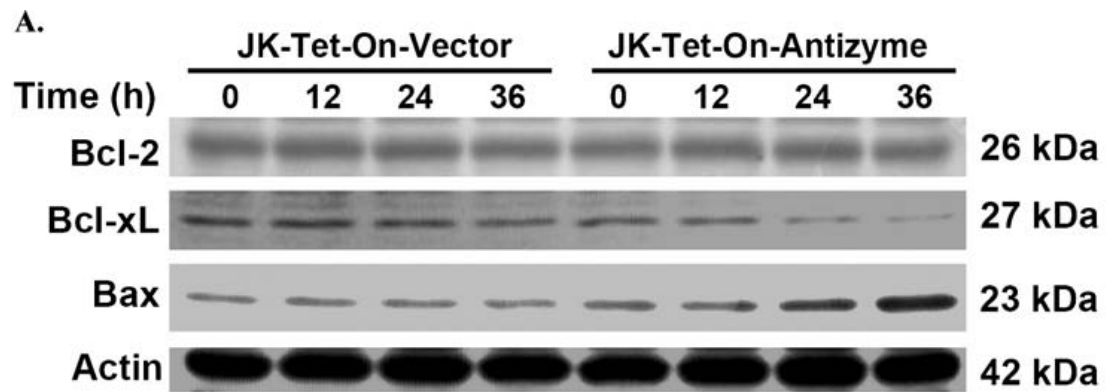


圖三、過度表現 AZ 使得 JK-Tet-On cells 存活率下降、形態改變，並導致 DNA ladder 現象的產生。

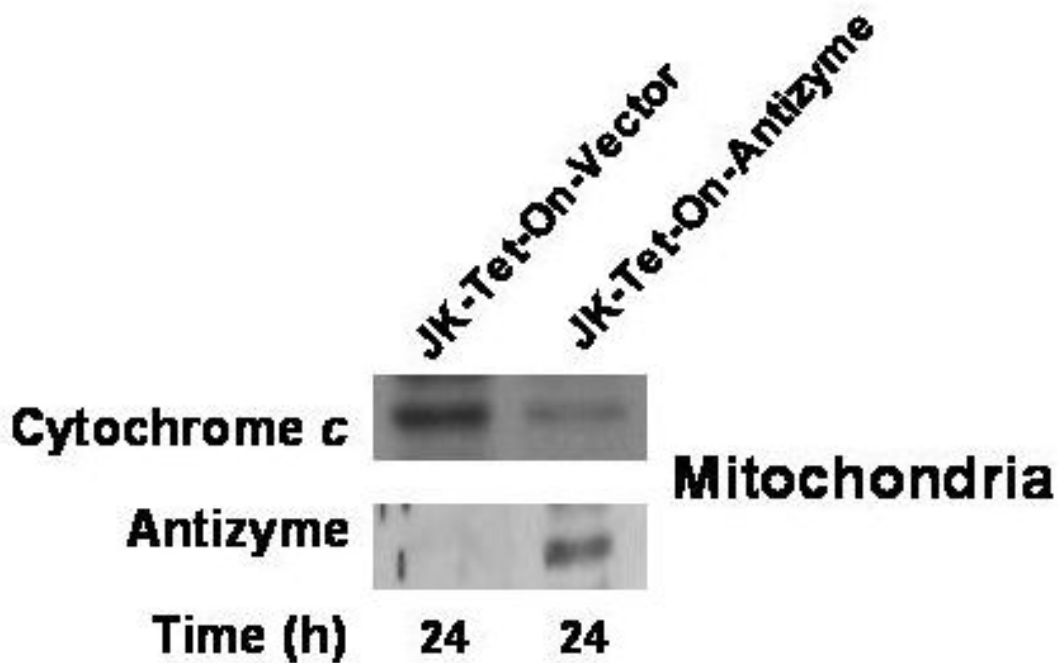
(A) 隨著時間增加觀察細胞的存活情形。

(B) 顯微鏡下觀察 JK-Tet-On-Vector 與 JK-Tet-On-AZ 細胞在分別有無加入 50  $\mu$ M Dox 36 小時細胞型態的改變。圖三 C、細胞加入 50  $\mu$ M Dox 於 0、24、36 小時或不同濃度的 Dox 在 36 小時，利用 DNA 膠體電泳測定 DNA 片段化。

Fig. 4



B



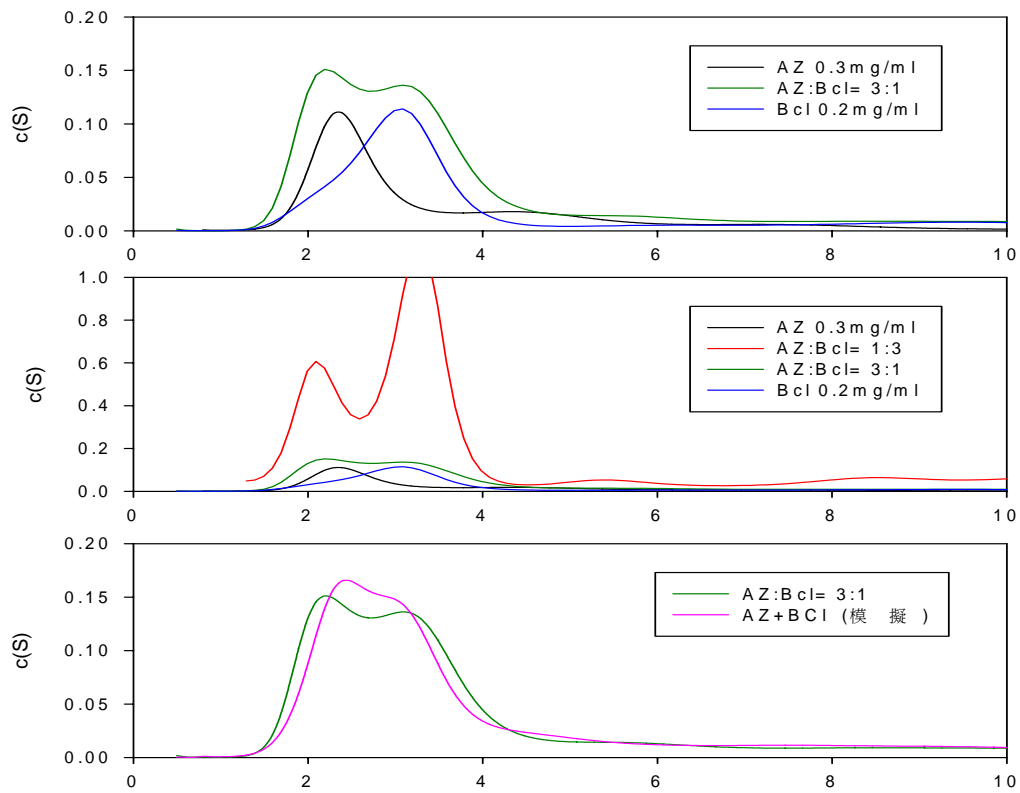
圖四、過度表現Antizyme引發Bax的蛋白質表現增加與Bcl-xL蛋白質表現

減少，且跑至粒腺體引起粒腺體cytochrome c釋放至細胞質

(A)JK-Tet-On-Vector 與JK-Tet-On-Antizyme 細胞加入50  $\mu$ M Dox 隨著時間點收細胞並且萃取細胞的總蛋白質藉由免疫點墨法測定Bcl-2、Bcl-xL 與Bax 蛋白質表現。

(B)JK-Tet-On-Vector 與 JK-Tet-On-Antizyme 細胞加入 50  $\mu$ M Dox 二十四小時後，分離粒線體蛋白質並利用免疫點墨法觀察 cytochrome c 與 AZ。

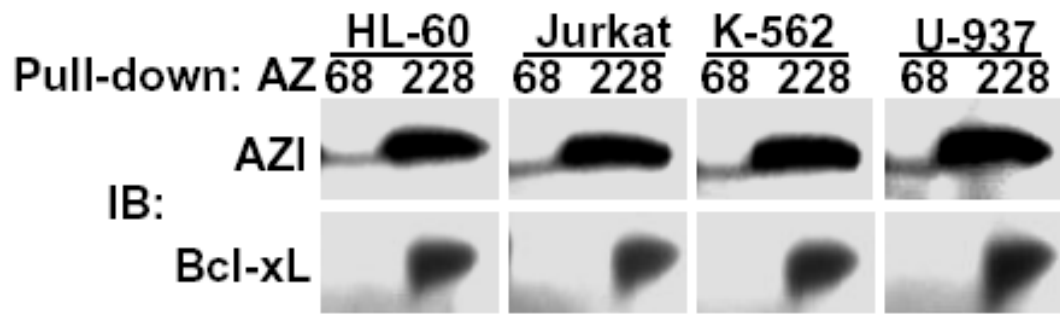
Fig.5



圖五、利用超高速離心觀察 AZ 與 Bcl-xL 在不同濃度下的關聯性

在不同濃度比例(AZ:Bcl-xL=3:1，AZ:Bcl-xL=1:3)下，評估 AZ 與 Bcl-xL 之間的結合性。

Fig.6



圖六、藉由 Pull-down assay 觀察 AZ(1-68)與 AZ(1-228)蛋白質序列的鍵結行為在 HL-60、Jurkat、K-562 與 U-537 此四種細胞內利用 Pull-down assay 觀察重組 AZ(1-68)或 WT-AZ(1-228)與細胞內 Bcl-xL 的結合作用。