

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 : 橘黴素在動物細胞株中對於 ERK 及其下游基因的調控 *
* 名 稱 : 機轉 *
* ***** *

執行計畫學生： 王麗婷
學生計畫編號： NSC 97-2815-C-040-030-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： 劉秉慧

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

中華民國 98年03月27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 *
* : 橘黴素在動物細胞株中對於 ERK 及其下游基因的調控機轉 *
* 名稱 *

執行計畫學生：王麗婷

學生計畫編號：NSC 97-2815-C-040-030-B

研究期間：97年7月1日至98年2月底止，計8個月

指導教授：劉秉慧

執行單位：中山醫學大學

中華民國

98年

3月

27日

(一) 摘要

橘黴素Citritrin(CTN)是一種在食物及飼料中常見的天然黴菌次級代謝物，在許多動物細胞實驗中指出其具有肝腎毒性，而且能造成多種哺乳動物細胞株的細胞毒性。為了探討CTN在細胞毒性上的分子機制，我們主要選用人類胚胎腎臟細胞株(HEK293)為材料進行研究。研究結果顯示，CTN能活化人類胚胎腎臟細胞株HEK293中的ERK1/2，並促使下游轉錄因子Egr-1在核內的表現；同時，我們也觀察到在promoter region 中具有Egr-1 binding element 的基因-*gadd45β*(與細胞凋亡相關之基因)，其mRNA的表現量也在處理CTN之後有上升的趨勢。在本實驗中，我們利用啟動子刪除方法建構質體，經不同時間點及濃度的CTN處理後，發現轉殖入HEK293細胞株最長片段的*gadd45β* promoter序列其luciferase活性增加為控制組的1.5倍；而目前已經設計抑制Egr-1的siRNA，觀察knockdown Egr-1之後Egr-1與*gadd45β*之間的關係，之後系統若穩定，即進一步探討*gadd45B*此基因影響HEK293細胞株細胞凋亡的情形，藉此可更清楚了解CTN對於HEK293細胞的毒性影響。

另一方面，我們利用MAPKs的專一性抑制劑以偵測Caspase-3活性與LDH assay方式觀察到MAPKs訊息傳遞途徑會參與在CTN所造成的細胞凋亡當中，但不會參與在CTN所造成的細胞存活率下降。

此外，我們還以 GeneFishing 的方式挑選明顯被 CTN 調控的基因片段，並將其以序列分析的方式搜尋出其因 CTN 處理而被誘發的基因為 ACADVL (acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain)，利用全定量 PCR 也確認了 CTN 所調控此基因表現量的可信度，未來我們還會挑選更多因 CTN 被誘發之基因做後續研究，藉此來更了解 CTN 所造成對於細胞的致毒影響與機制。

(二) 研究動機與研究問題

目前對於CTN的致毒機轉的研究並不多，且仍處於零碎、片段的研究，因此無法真正了解CTN的致毒及致癌途徑。由於腎臟細胞為CTN的主要作用標的器官，因此本計劃主要利用人類胚胎腎臟細胞 (human embryonic kidney 293 cell line, 簡稱HEK293) 作為研究材料；此外，也利用人類子宮頸癌上皮細胞(HeLa cell) 來探討CTN在癌細胞中訊息傳遞的機轉。

目前本實驗室的研究成果已知CTN會對HEK293細胞株產生毒性影響，即隨著CTN處理劑量的上升而造成細胞的存活率下降；另外在MAPKs訊息傳遞路徑中的ERK1/2的磷酸化現象亦隨著CTN處理劑量的增加而上升(在人類子宮頸癌上皮細胞-HeLa與周邊血液單核球細胞-PBMC皆可觀察到此情形)。此外，由RT-PCR與質核分離實驗的結果得知，ERK1/2之下游Egr-1的表現量也會上升。利用生物資訊的分析，我們找到一些promoter中含有Egr-1 binding site之基因做進一步測試。其中與細胞週期停滯及細胞凋亡的作用機制相關的基因-*gadd45 β* 在real-time PCR的結果顯示其mRNA有表現量上升的情況。

為了了解CTN所誘導的此訊息傳遞途徑是否在其他細胞株中有相類似的情形，我們利用了人類子宮頸癌上皮細胞-HeLa做研究。結果發現細胞經CTN處理後，Egr-1不論是在mRNA或蛋白層次均未有所表現，但是Egr-1上游ERK1/2的磷酸化、*gadd45 β* 基因的mRNA表現量是有上升的。針對此結果，在HEK293細胞株中，我們利用promoter deletion analysis探討Egr-1與*gadd45 β* 的關係，目前也擬利用siRNA去抑制Egr-1的蛋白表現，來進一步證實*gadd45 β* 的表現是否與Egr-1有所相關。

接著，我們探討MAPKs訊息傳遞途徑是否會參與在CTN所造成的細胞凋亡或參與在CTN所造成的細胞存活率下降當中。

最後，為了要更了解CTN所造成對於細胞的致毒影響與機制，我們利用

GeneFishing的方式挑選會受CTN處理之後誘發或抑制的重要調控基因。

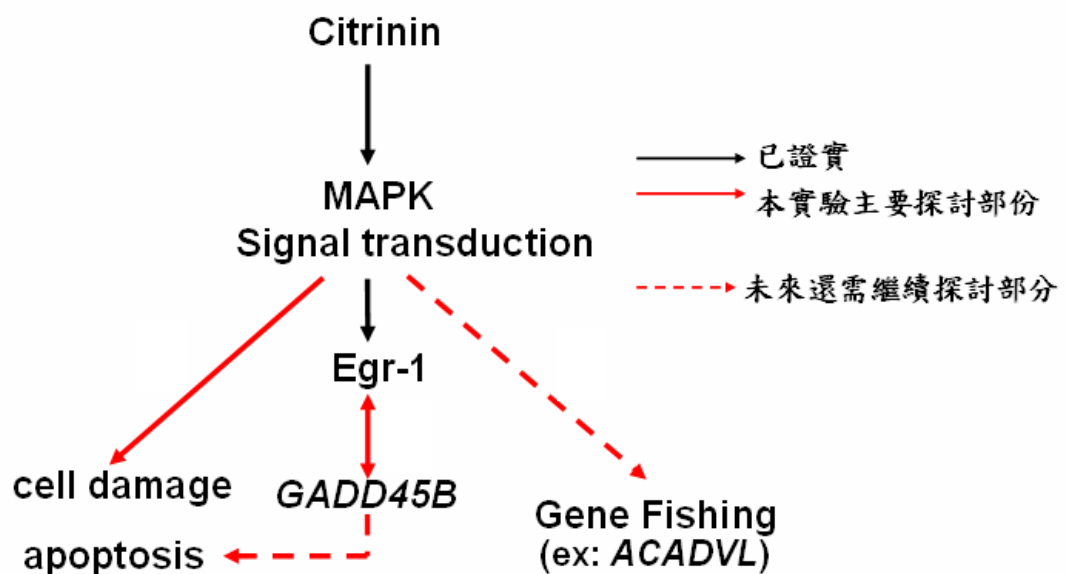
因此以下將我們欲研究之問題歸類為四個子目標：

【子目標一】 利用ERK專一性抑制劑觀察HEK293細胞中，ERK與 *gadd45 β* 之間的關係。

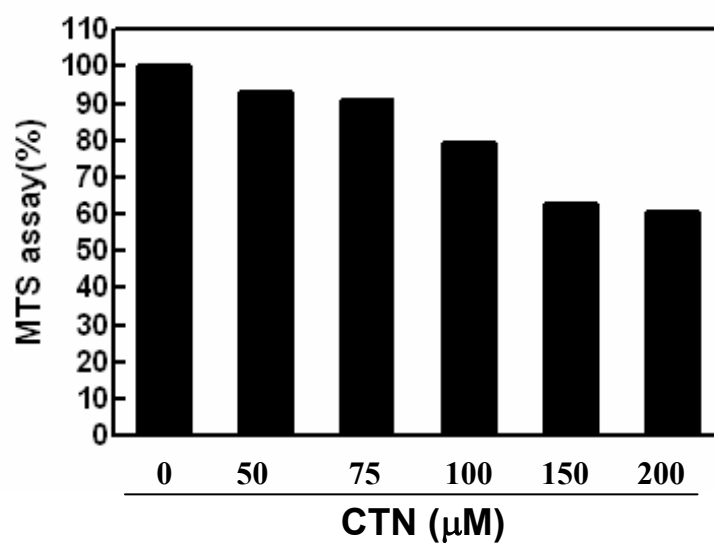
【子目標二】 利用 promoter deletion analysis 找出經 CTN 誘發後影響 *gadd45 β* 此基因之調控因子。

【子目標三】 MAPK的訊號傳遞途徑是否參與在CTN所造成HEK293細胞株產生的細胞凋亡與細胞毒性？

【子目標四】 CTN 是否可以誘發或抑制某些重要基因的表現？

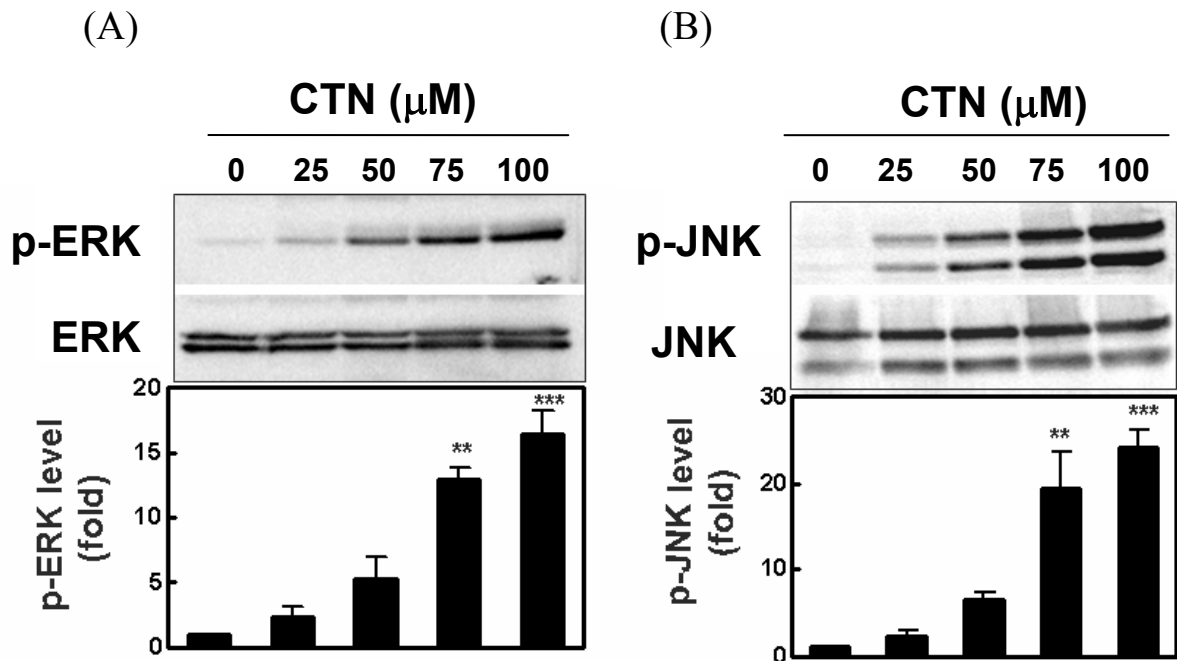


(三) 先前研究成果



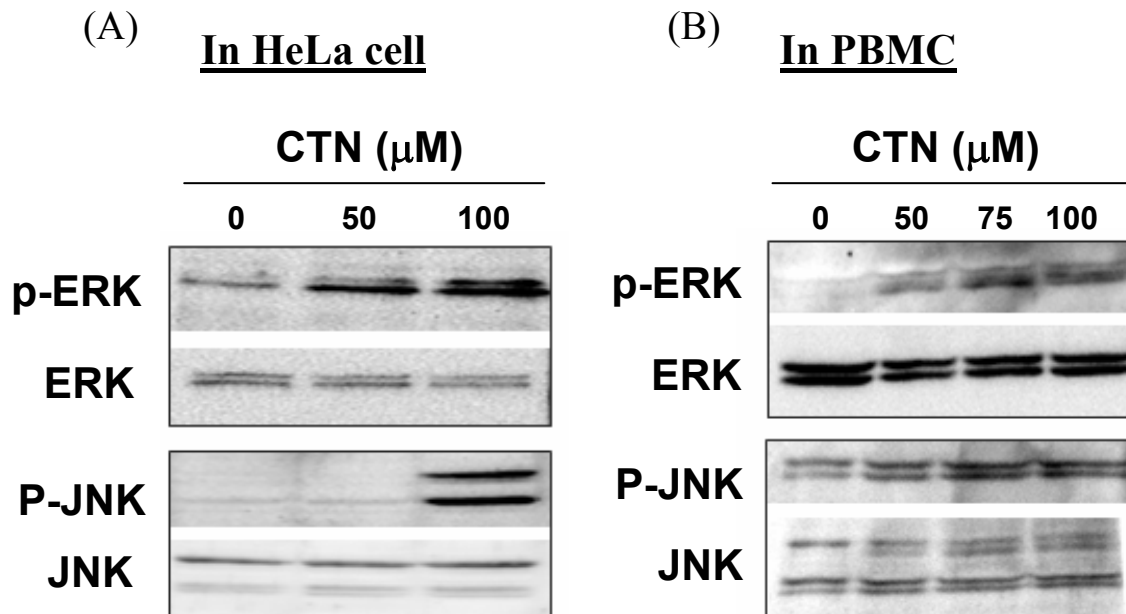
圖一、不同濃度的 CTN 在哺乳動物細胞中引起的細胞毒性

將 HEK293 細胞株培養 24 個小時後，更換為含 1% 血清之培養基再培養 16 小時，接著以溶劑（25 % ethanol 與 75 % PBS）或不同濃度的 CTN 處理細胞 24 小時後，使用 MTS assay 偵測細胞存活率。以溶劑處理的控制組設為 100%，並且和實驗組進行相對比較。實驗結果顯示，隨著 CTN 處理 HEK293 細胞株的劑量上升，可以觀察到細胞存活率有明顯下降的趨勢。



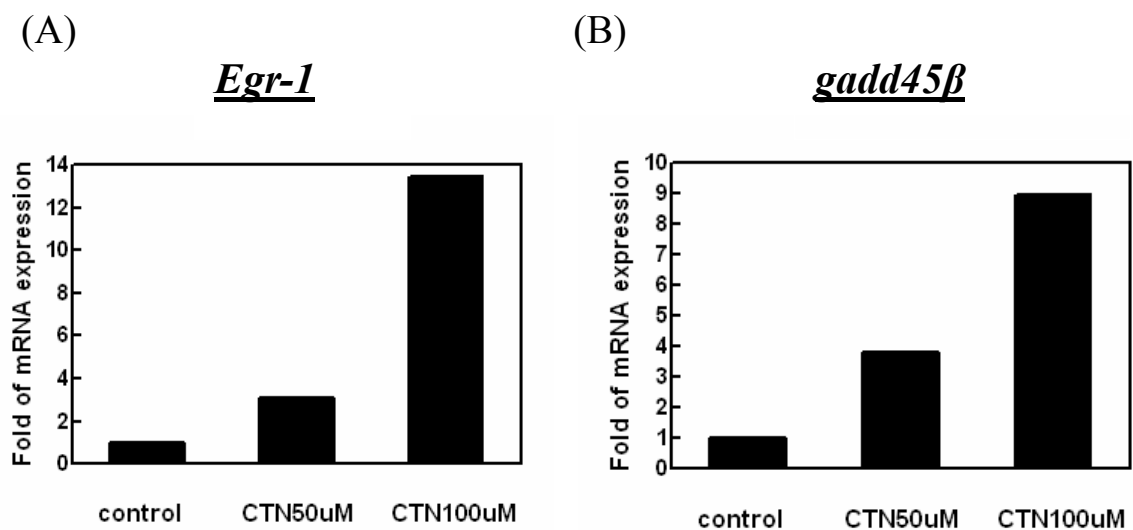
圖二、CTN 活化 HEK293 細胞株 MAPKs 訊息傳遞路徑中的 ERK1/2 及 JNK

將 HEK293 細胞株培養 3 天後，更換為含 1% 血清之培養基再培養 18 小時，接著以不同濃度之 CTN 處理細胞 6 小時後，萃取出細胞的全蛋白，取 40 μg 蛋白跑 10% SDS-PAGE 電泳，而後進行西方墨點法。所採用的專一性抗體為 phospho-ERK1/2 或 phospho-JNK，以偵測內生性之 ERK1/2 或 JNK 的蛋白表現量做為內部控制組，經由冷光呈色後以電腦軟體分析各項處理訊號的強度。實驗結果顯示，隨著 CTN 處理 HEK293 細胞株的劑量上升，可以觀察到 MAPKs 訊息傳遞路徑中的 ERK1/2(A 圖)及 JNK(B 圖)磷酸化現象有明顯增加的趨勢。



圖三、CTN 活化 HeLa 細胞株與 PBMC 細胞 MAPKs 訊息傳遞路徑中的 ERK1/2 及 JNK

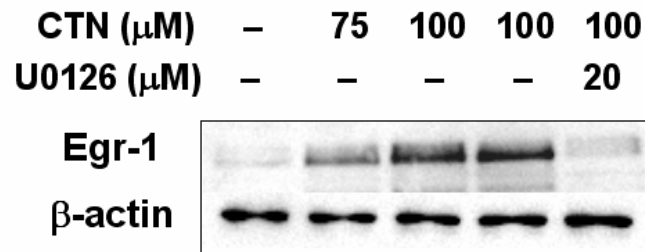
將人類子宮頸癌細胞株 (HeLa) 與人類周邊血液單核球細胞(PBMC)培養3天後，更換為含1%血清之培養基再培養18小時，接著以不同濃度之CTN處理細胞6小時(HeLa細胞)或24小時(PBMC)後，萃取出細胞的全蛋白，取40 μg蛋白跑10% SDS-PAGE 電泳，而後進行西方墨點法。所採用的專一性抗體為phospho-ERK1/2或phospho-JNK，以偵測內生性之ERK1/2或JNK的蛋白表現量做為內部控制組，經由冷光呈色後以電腦軟體分析各項處理訊號的強度。實驗結果顯示，隨著CTN處理HeLa細胞株(A圖)與PBMC細胞(B圖)的劑量上升，可以觀察到MAPKs訊息傳遞路徑中的ERK1/2及JNK磷酸化現象也明顯有增加的趨勢。



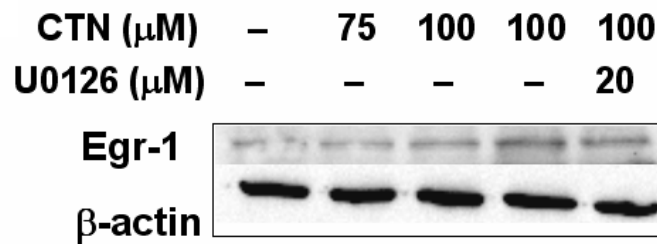
圖四、CTN 誘發 ERK1/2 下游早期基因的表現

將 HEK293 細胞株培養 3 天後，更換為含 1% 血清之培養基再培養 16 小時，接著以溶劑或不同濃度之 CTN 處理細胞 24 小時後，萃取出細胞的 RNA，經定量後取 2 μ g 的 RNA 樣品反轉錄成 cDNA，將 cDNA 分別與 *Egr-1*、*gadd45 β* 及 *gapdh* 的 primer 作同步的定量聚合連鎖反應，並以 *gapdh* 的表現量當作內部控制組。分別將 *Egr-1* 或 *gadd45 β* 的基因表現量除以 *gapdh* 表現量後予以百分比量化。由以上實驗結果得知 CTN 會誘發 *Egr-1*(A)和 *gadd45 β* (B)的 mRNA 表現量上升。

(A)



(B)



圖五、CTN促使核內轉錄因子-Egr-1的蛋白量增加

將 HEK293 細胞株培養 3 天後，更換為含 1% 血清之培養基再培養 16 小時，接著以溶劑或不同濃度之 CTN 處理細胞 6 小時（在抑制劑的部份，以 MEK1/2 的專一性抑制劑(U0126)前處理 1 個小時後，再加入 CTN 處理 6 個小時）後，分別萃取出細胞的核蛋白 (A) 與質蛋白 (B)，各取 10 μg 的蛋白跑 10% SDS-PAGE 電泳，而後進行西方墨點法。所採用的專一性抗體為 Egr-1，並以 β -actin 做為內部控制組。經由冷光呈色後以電腦軟體分析各項處理訊號的強度。實驗結果顯示，CTN 確實會促使核內轉錄因子-Egr-1 的蛋白量增加。

(四) 文獻回顧與探討

CTN是一種主要由*Aspergillus* 及*Penicillium* 所產生的黴菌毒素，此種二級代謝物普遍存在於受黴菌污染的穀類製品中 (Chu, F.S., 1996)。此外，CTN也是伴隨著紅麴菌(*Monascus spp.*)發酵過程中所產生的代謝產物。紅麴菌是一種傳統的釀造菌株，一直受到相當的重視及利用，近年來紅麴發酵的相關產品主要以調節血脂、預防心臟血管疾病的保健食品而受到注目。然而，目前國內外以發酵食品包裝販售之紅麴產品幾乎皆含有自0.1 至17 ppm 不等之CTN，所以保健食品中CTN的毒性以及含量實為公共健康安全的隱憂之一。

哺乳動物細胞的mitogen-activated protein kinases (MAPKs)訊號傳遞包括了下列三條途徑：extracellular signal-regulated kinase (ERK)，c-JUN N-terminal kinase (JNK)，以及p38。這些MAPKs的訊號途徑已知會受到包括如成長因子和cytokines及內在一些oxidative stress等各種環境刺激而活化 (Kyriakis and Avruch, 1996；English *et al.*,1999)。目前已知數種黴菌毒素包括fumonisin B1 以及trichothecenes皆會誘導細胞中MAPKs 途徑的活化(Wattenberg *et al.*, 1996; Gekle *et al.*, 2000)。

一般而言，MAPKs磷酸化後會translocation至細胞核內調控下游immediate-early genes的表現。例如*egr-1*、*c-fos*、*c-jun*、*junB*及*fosB*等基因的轉錄表現(Hill and Treisman, 1995)。而些基因轉譯後的蛋白，通常作為轉錄因子，進而去活化調控其他基因的表現。

*Egr-1*為一轉錄因子調控其他基因的表現 (Treisman, R. 1996；Stuart *et al.*, 1999)，屬於一個易受到環境影響的因子。文獻指出，許多生理的功能包括神經生長(Harada *et al.*,2001)，傷口修復(Khachigian *et al.*, 1996)，生長調控(Perez-Castillo *et al.*, 1993; Hofer *et al.*, 1996) 和細胞凋亡(Muthukkumar *et al.*, 1995; Ahmed *et al.*, 1996; Virolle *et al.*,2001) 等都與*Egr-1*的表達有關。

Gadd45β(growth arrest and DNA-damage-inducible, beta)，此基因的表現會在DNA受損後增加，並且導致生長停滯；在許多研究中也認為是與細胞週期

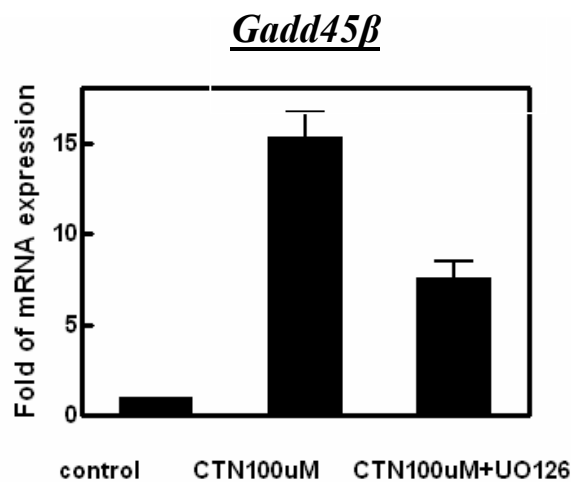
停滯、細胞凋亡及分化有關係(Dennis Bruemmer *et al*, 2003)。

由於目前對於CTN的毒性機轉之研究尚未整合出黴菌毒素的致毒及致癌途徑，因此本計劃除了利用人類胚胎腎臟細胞作為材料，也利用子宮頸癌上皮細胞(HeLa cell)來做為對照，進行CTN在基因毒性及細胞毒性上的研究。由此所得到的資訊不只有助於將來對於CTN的毒性及生化機轉有更進一步的了解，亦可藉由毒素劑量與生化反映之間的關係，對於這種毒素進行安全性評估，以期維護食品安全及大眾健康。

(五) 結果

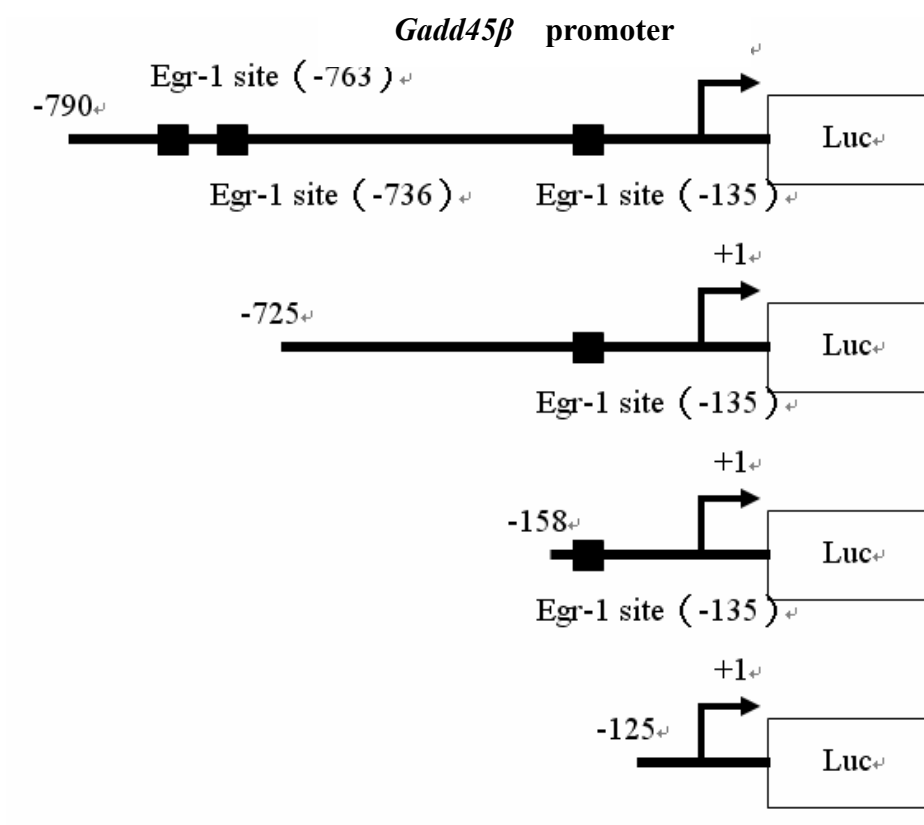
CTN 會經由活化 ERK 而誘發 *Gadd45β* 基因的表現

當 HEK293 細胞株處理 100 μ M CTN 後，其 *gadd45β* mRNA 表現量會明顯被誘發為控制組的 15 倍左右；而將細胞前處理 MEK1/2 的專一性抑制劑(U0126)，再加入 CTN 後，其 *gadd45β* mRNA 表現量則會被抑制，由此實驗結果我們得知 CTN 會經由活化 ERK 而誘發 *Gadd45β* 基因的表現。



圖一. CTN在HEK293細胞株中活化MAPKs訊號傳遞途徑與下游基因-*gadd45β*的關係

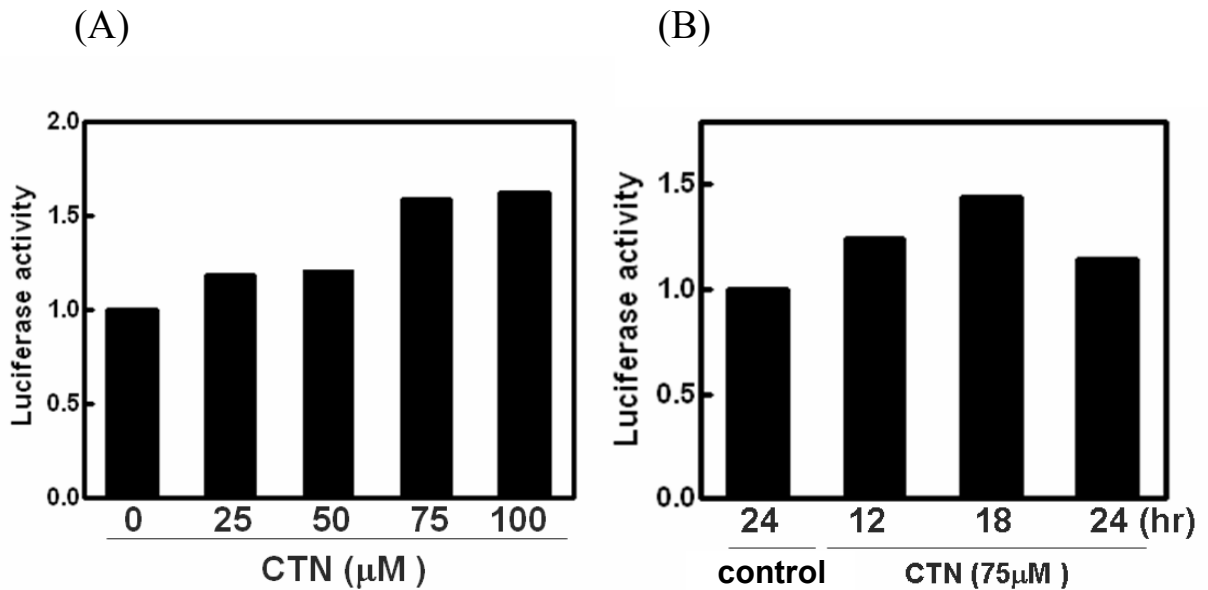
首先，我們先利用 ERK 專一性抑制劑觀察 HEK293 細胞中，ERK 與 *gadd45β* 之間的關係。將 HEK293 細胞株培養 3 天後，更換為含 1% 血清之培養基再培養 16 小時，接著以溶劑或不同濃度之 CTN 處理細胞 24 小時後（在抑制劑的部份，以 MEK1/2 的專一性抑制劑(U0126)前處理 1 個小時後，再加入 CTN 處理 24 個小時），萃取出細胞的 RNA，經定量後取 2 μ g 的 RNA 樣品反轉錄成 cDNA，將 cDNA 分別與 *gadd45β* 及 *gapdh* 的 primer 作同步的定量聚合連鎖反應，並以 *gapdh* 的表現量當作內部控制組。分別將 *gadd45β* 的基因表現量除以 *gapdh* 表現量後予以量化。由以上實驗結果得知 CTN 會經由活化 ERK 而誘發 *gadd45β* 的表現量。



***Gadd45β* 基因 Promoter 建構簡圖**

利用偵測 luciferase 活性來觀察轉錄因子 Egr-1 與下游基因- *Gadd45β* 的關係

為了了解轉錄因子 Egr-1 與下游基因- *Gadd45β* 的關係，我們由 A 圖可以觀察到當 HEK293 細胞處理至 75 μM 的 CTN，偵測到 luciferase 的活性為控制組的 1.5 倍。由實驗結果得知，CTN 會增加 *Gadd45β* promoter 的活性，並且在處理 75 μM CTN 的濃度條件下，18 小時是活性增加最為明顯的時間點(圖 B)。



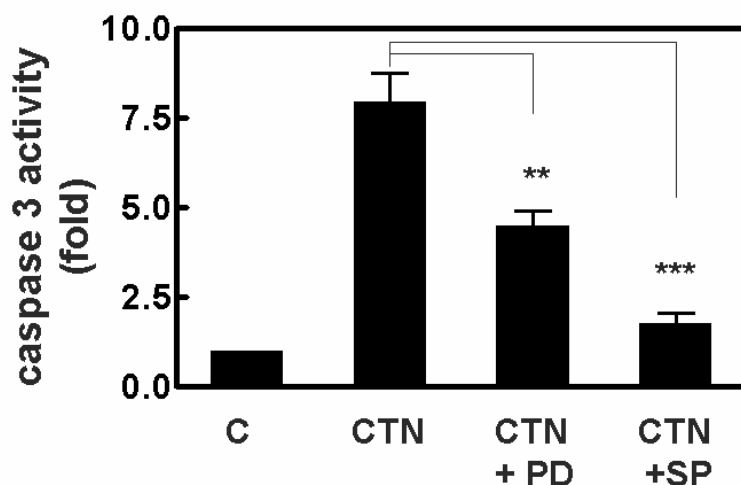
圖二. CTN 在 HEK293 細胞株中活化 MAPKs 訊號傳遞途徑之轉錄因子-Egr-1 與下游基因- *Gadd45β* 的關係

由於已有數據證實 CTN 會誘發細胞中 Egr-1(轉錄因子)蛋白質的表現，並且也會進一步增加其下游基因 *Gadd45β* mRNA 量。所以在本實驗中，我們利用 promoter deletion 方法建構出含有不同片段大小的 *Gadd45β* promoter 序列(含有三個 Egr-1 結合位)的 luciferase reporter plasmid，接著將建構好的質體(最長片段-含有三個 Egr-1 結合位)轉殖至 HEK293 細胞株中。以溶劑或不同濃度的 CTN 處理 24 小時(A 圖)或以 75 μM CTN 處理不同時間(B 圖)後，收集細胞並且經由冷光分析系統偵測 luciferase 受質訊號之強度，由此判定細胞內該 promoter 的活性。由實驗結果得知，CTN 會增加 *Gadd45β* promoter 的活性，而在 75 μM 的濃度處理條件下，18 小時是活性增加最明顯的時間點。

MAPKs 訊息傳遞路徑會參與 CTN 造成的細胞凋亡現象但不會參與 CTN 造成的細胞毒性傷害

首先，我們先以 ERK 專一性抑制劑-PD98059、JNK 專一性抑制劑-SP600125 前處理細胞後，再加入 75 μ M 的 CTN，其後偵測 caspase-3 活性，觀察到不管是加入 PD98059 還是 SP600125 都可以明顯抑制細胞受 CTN 所導致的細胞凋亡，在此，我們發現 MAPKs 訊息傳遞路徑會參與 CTN 造成的 HEK293 細胞凋亡現象。

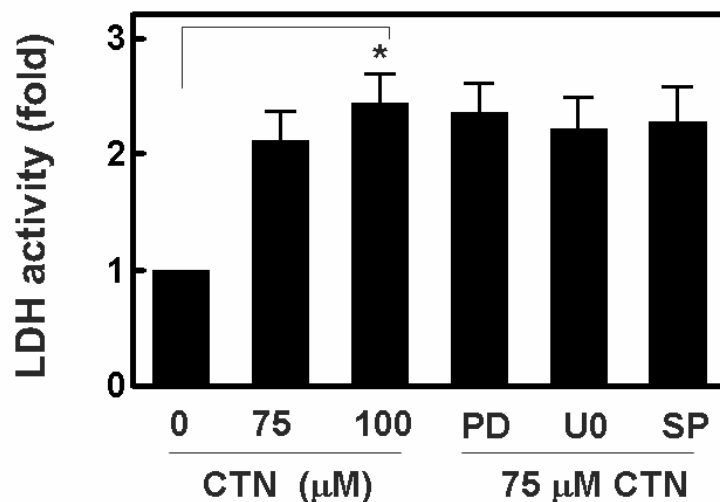
接著，我們同樣將細胞處理 75 μ M 的 CTN，並且前處理 MAPKs 抑制劑，之後利用 LDH assay 偵測細胞破損程度，我們觀察到有加入抑制劑後的細胞受損程度並沒有減緩的情形，因此我們推測 MAPKs 訊息傳遞路徑不會參與在 CTN 所造成 HEK293 細胞株的細胞毒性傷害。



圖三. MAPKs 訊息傳遞路徑會參與 CTN 造成的細胞凋亡現象

將 HEK293 細胞株培養 3 天後，更換為含 1% 血清之培養基再培養 18 小時，接著以溶劑或不同濃度之 CTN 處理細胞 24 小時（在抑制劑的部份，以不同的 MAPKs 專一性抑制劑前處理 1 個小時後，再加入 CTN 處理 24 個小時）後，隨後將細胞 lysis 掉，最後加入 substrate (Ac-DEVD-AFC)，在避光之條件下，以 37°C 反應 1 小時之後，再以螢光測定儀測其 Excitation 波長 405 nm 及 Emission 波長 535 nm 之吸光值。實驗結果顯示，經 75 μ M 之 CTN 處理的 HEK293 細胞中，加入 20 μ M 的 ERK 專一性抑制劑(PD98059)及 JNK 專一性

抑制劑(SP600125)後，可觀察到 Caspase-3 的活性有明顯降低的情形。因此我們推測 MAPKs 訊息傳遞路徑會參與 CTN 造成的細胞凋亡現象。

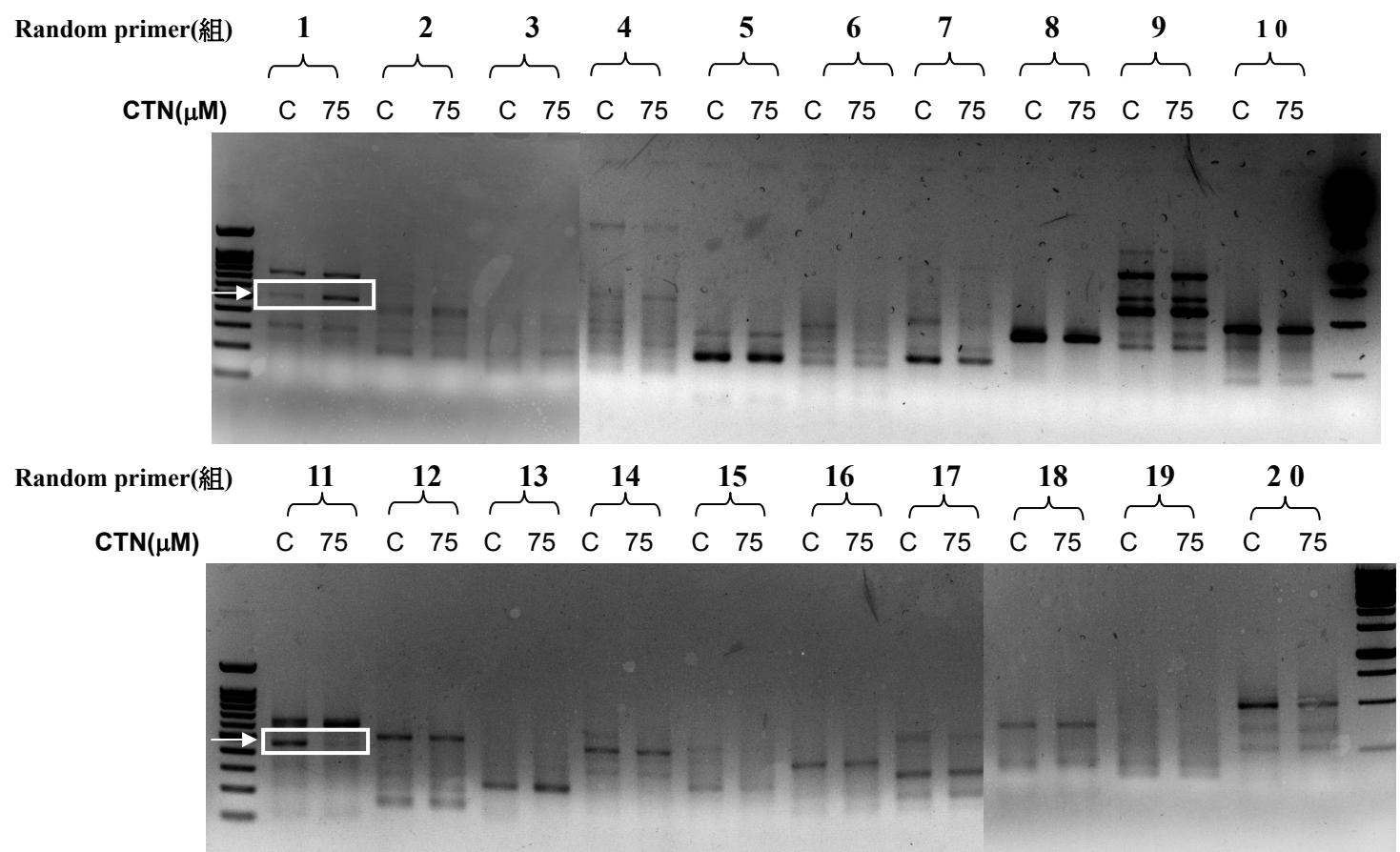


圖四. MAPKs 訊息傳遞路徑不會參與 CTN 造成的細胞毒性傷害

將 HEK293 細胞株培養 24 個小時後，更換為含 1%血清之培養基再培養 18 小時，接著以溶劑或不同濃度之 CTN 處理細胞 24 小時（在抑制劑的部份，以不同的 MAPKs 專一性抑制劑前處理 1 個小時後，再加入 CTN 處理 24 小時）後，使用 LDH assay 偵測細胞破損程度，藉由波長設定在 490 nm 扣掉背景波長 650 nm 的 ELISA 測定儀來定量乳酸去氫酶(lactate dehydrogenase，簡稱 LDH)含量。實驗結果顯示，經 75 μ M 之 CTN 處理的 HEK293 細胞中，加入 20 μ M 的 ERK 專一性抑制劑(PD98059 或是 U0126)及 JNK 專一性抑制劑(SP600125)後，我們觀察到細胞釋放乳糖去氫酶(Lactate dehydrogenase，LDH)至上清的情況並沒有減少的現象，代表受損的程度並沒有減緩的情形。因此我們推測 MAPKs 訊息傳遞路徑不會參與在 CTN 所造成 HEK293 細胞株的細胞毒性傷害。

CTN 誘發 HEK293 細胞 *ACADVL* 基因的表現

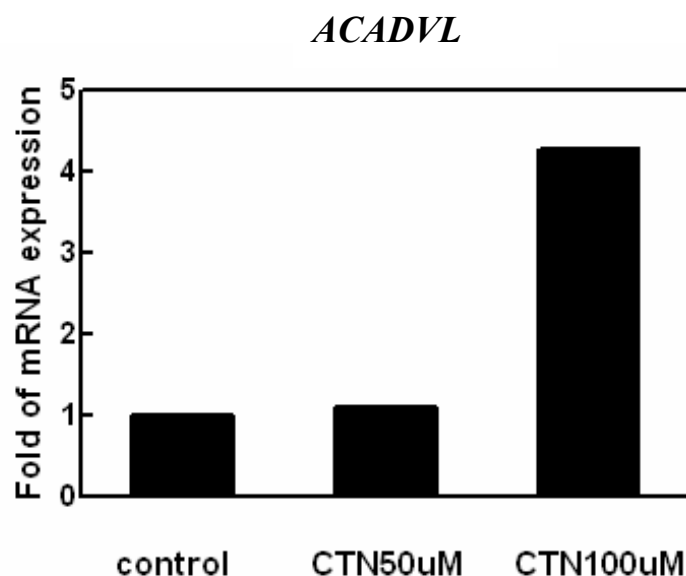
為了更了解 CTN 對於 HEK293 細胞株的致毒影響，我們擬利用 GeneFishing 方式，觀察當 HEK293 細胞株經處理 CTN 之後，是否會有重要基因被隨機引子誘發或抑制。其中，我們挑出了最為明顯被誘發的基因-*ACADVL* (acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain)來做初步研究，並且也利用 Real-time PCR 來確認 *ACADVL* 被 CTN 誘發的可信度。未來還會挑選其他具有差異性表現的基因繼續探討 CTN 所影響細胞中不同的基因表現，來進一步了解 CTN 所造成對於細胞的致毒影響與機制。



圖五：觀察細胞經CTN處理後所調控之重要的基因表現

將 HEK293 細胞株培養 3 天後，更換為含 1% 血清之培養基再培養 18 小時，接著以 75 μ M 濃度之 CTN 處理細胞 24 小時後，萃取出細胞的 RNA，而後進行反轉錄與 GeneFishing PCR (利用 20 組 random primers 放大基因片段)，待作用完成後，取 2 μ l 產物跑含有溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 的 2% agarose gel，

經 UV 照射後以數位影像系統分析。在長波 UV 光照射下，觀察顯現於膠體上 band 的表現量差異，先挑選其中有明顯差異的兩組 band，將其挖膠、純化、轉型至大腸桿菌，而後挑出菌落培養，再抽其質體送定序即推知此基因為何。目前我們已經發現了因 CTN 處理造成表現量不同的基因-ACADVL (acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain)，未來還會挑選其他具有差異性表現的基因繼續探討 CTN 所影響細胞中不同的基因表現來進一步了解 CTN 所造成對於細胞的致毒影響與機制。



圖六: HEK293 細胞株經 CTN 處理後的 *ACADVL* 基因表現。

將 HEK293 細胞株分別培養 3 天後，更換為含 1% 血清之培養基再培養 16 小時，接著以溶劑或不同濃度之 CTN 處理細胞 24 小時後，萃取出細胞的 RNA，經定量後取 2 μ g 的 RNA 樣品反轉錄成 cDNA，將 cDNA 分別與 *ACADVL* 及 *gapdh* 的 primer 作同步的定量聚合連鎖反應，並以 *gapdh* 的表現量當作內部控制組。將 *ACADVL* 的基因表現量除以 *gapdh* 表現量後予以量化。由實驗結果發現 CTN 確實會誘發 *ACADVL* 基因的表現量上升。

(六) 參考文獻

- Ahmed MM, Venkatasubbarao K, Fruitwala SM, Muthukkumar S, Wood Jr DP, Sells SF, Mohiuddin M, Rangnekar VM, Nair P, Maddiwar NG, Jacob RJ (1996) EGR-1 induction is required for maximal radiosensitivity in A375-C6 melanoma cells. Role of EGR-1 in thapsigargin-inducible apoptosis in the melanoma cell line A375-C6. *J Biol Chem* 271:29231–29237
- Chu, F.S., 1991. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mut. Res.* 259, 291-306.
- Dennis Bruemmer, Fen Yin, Joey Liu, Joel P. Berger, Toshiyuki Sakai, Florian Blaschke, Eckart Fleck, Andre J. Van Herle, Barry M. Forman, Ronald E. Law .2003. Regulation of the Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Gene 45 (GADD45) by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res.* 93:e38-e47
- English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., Cobb, H.M. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell Res.* 253, 255-270.
- Hill, C.S. and Treisman, R., 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell.* 80, 199– 211.
- Harada T, Morooka T, Ogawa S, Nishida E. 2001. ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nat Cell Biol* 3: 453–459
- Hofer G, Grimmer C, Sukhatme VP, Sterzel RB, Rupperecht HD. 1996. Transcription factor Egr-1 regulates glomerular mesangial cell proliferation. *J Biol Chem* 271: 28306–28310
- Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, Collins T .1996. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* 271: 1427–1431
- Kyriakis, J.M. and Avruch, J., 1996. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays.* 18, 567-577.
- Muthukkumar S, Nair P, Sells SF, Maddiwar NG, Jacob RJ, Rangnekar VM .1995. Role of EGR-1 in thapsigargin-inducible apoptosis in the melanoma cell line A375-C6. *Mol Cell Biol* 15:6262–6272
- Perez-Castillo A, Pipaon C, Garcia I, Alemany S .1993. NGFI-A gene expression is necessary for T lymphocyte proliferation. *J Biol Chem* 268: 19445–19450
- Stuart, T., Louis, C.M., Alison, L.C. 1999. MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 205-214.
- Treisman, R. 1996. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215. 270, 1326-1331.

Virolle T, Adamson ED, Baron V, Birle D, Mercola D, Mustelin T, de Belle I .2001.
The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol* 3:1124–1128

(七) 需要指導教授指導內容

- 一. 對於實驗目標基本概念之建立與相關資料的查詢。
- 二. 毒性分析及基本分生操作技術。
- 三. 實驗結果的探討與邏輯性的思維。