

探討人類子宮基質細胞蛻膜轉形作用與 PKC 異構體表現之關係 Investigation
of the correlation between the decidualization and PKC isoforms expression in
human endometrial stromal cells

計畫編號：NSC 88-2314-B-040-041

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：林隆堯 中山醫學院醫學係

一、中文摘要

先前我們應用假孕鼠研究初步結果顯示，蛻膜瘤組織形成期間與對照之子宮組織比較時，細胞質的 PKC 活性在統計上有顯著減少 (3)，並且發現 PKC 異構體 (α , δ , ζ , ι , λ) 與假孕鼠之子宮內膜增殖有密切關聯 (4,5)，推論 PKC 異構體的表現可能伴隨蛻膜瘤組織生長的調節。故本實驗計劃擬進一步深入應用體外培養模式探討人類子宮內膜基質細胞 (Endometrial stromal cell) 增殖形成蛻膜細胞期間 PKC 所扮演的角色，以進一步了解蛻膜細胞形成之機制。結果顯示經由 progesterone 處理的人類子宮內膜基質細胞分化成蛻膜細胞後，細胞質的 PKC α 含量有明顯下降的現象，這種現象可能與活化下降調節作用 (activation and down-regulation) 有關。另外利用 Zymography 的檢測 MMP 分泌的情形，發現在 progesterone 處理組中

MMP-2 的分泌也比對照組的細胞少。可見蛻膜細胞內 MMP-2 的分泌可能與 PKC 的表現有關。

Abstract

Our previous data showed that the activity of cytosolic PKC was significantly decreased in the deciduomata as comparing with that in the control uterine tissue (5), and that the various expression of PKC isoforms (α , δ , ζ , ι and λ) were observed in the trauma-induced decidualization. It is suggested that the various expression of PKC isoforms were involved in the modulation of the development of deciduomata. In this study, we established in vitro system for confirming PKC commitment. we separated epithelial and stromal cell cultures from normal human endometrium to test the expression of PKC isoforms in the decidualization. The results showed that the decreased expression of PKC α was observed in the progesterone-treated group as compared to the control group. Moreover, the decreased secretion of MMP-2 was also detected in the progesterone-treated group. Thus, we suggested that the decreased expression of PKC α may be correlated with the reduction of the MMP-2 secretion in the decidualization of human

endometrial stromal cell.

二、緣由與目的

根據臨床調查報告顯示，在人工受孕方面，因胚胎著床不良而告失敗約有 80-85% (1)。其失敗原因可能與胚胎或子宮增厚不良有關，而子宮增厚不良可能為最主要的原因，因為有許多案例都是在胚胎確定正常下，仍然著床失敗，因此突破子宮接受度的問題仍唯一解決的途徑。子宮接受度與子宮蛻膜瘤形成 (Decidualization) 有關，目前我們對於子宮蛻膜瘤形成了解非常有限，對於尋求解決胚胎著床失敗的問題是一件不易的工作，因此研究子宮蛻膜瘤形成的機制是一件首要的工作。

人類子宮內膜基質細胞 (Stromal cell) 的蛻膜形成 (Decidualization) 已知與荷爾蒙有關，包括泌乳素 (Prolactin; PRL) (6)、女性素 (Estradiol; E_2) 與助孕素 (Progesterone; P) (2)，體外培養的模式亦證實助孕素促進基質細胞轉變為蛻膜細胞 (Decidual cell) (7)。Tabanelli et al. (8) 曾經應用體外培養人類子宮內膜基質細胞針對卵巢荷爾蒙 (Ovarian hormone) 促使蛻膜細胞形成有所探討。性腺刺激激素 (Gonadotropins) 對於人類子宮內膜基質細胞的轉形作用為直接作用亦被指出 (9)。許多報告指出子宮蛻膜瘤形成與荷爾蒙如 Progesterone, Estradiol、Histamine、TSH/LH、Relaxin... 等刺激 cAMP 表現有關 (2)，Tang et al. (10) 指出泌乳素及助孕素在子宮蛻膜形成之初步機轉為增加 cAMP 的含量。然而在其它細胞

也被證實荷爾蒙 (如 Histamine, TSH/LH, Relaxin) 的作用與蛋白激酶 C (Protein Kinase C; PKC) 活化有關 (11,12)，此外 PKC 也被認為與許多細胞分化增殖有關，但是 PKC 是否參與子宮蛻膜形成作用至今尚未被證明。

PKC 是一種鈣離子和磷脂依賴之蛋白激酶，在細胞內扮演訊息傳遞的角色。一種已知的細胞內傳遞訊息物質 Diacylglycerol (DAG)，即是增強鈣離子和磷脂活化 PKC (13-15)。當細胞受到外在刺激 (External Stimuli) 時，諸如生長因子 (Growth Factor)、荷爾蒙 (Hormone) 和神經傳遞物質 (Neurotransmitter)，DAG 由 Phosphatidylinositol 分解形成，PKC 即被活化，並進行細胞內訊息傳遞的工作 (16)。此外 PKC 亦能誘發許多細胞反應，包括細胞增殖 (Cell Proliferation)、分化 (Differentiation)、基因表現 (Gene Expression) 和腫瘤促進形成作用 (Tumor Promotion) (17)。

目前所知 PKC 12 種異構體 (α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 、 λ 、 μ and ι) (18-21)，在功能上和分佈上有其特殊性 (22-25)。如近期的研究報告顯示某些 PKC 異構體可能與組織再生 (Tissue Regeneration) 有關：部份肝臟切除後肝細胞再生時，細胞內 PKC 呈現重新分配的現象，PKC 從細胞質的部份轉移到細胞膜的部份 (26,27)，細胞核內 PKC α 含量減少，而 PKC δ 則增加 (28)；在 Carbon Tetrachloride 誘發肝臟再生時，PKC α 呈現增加 (29)；在 Folic Acid 誘發

腎臟再生時，則 PKC α 呈現減少，但是 PKC δ 和 PKC ϵ 不變 (30)。另外尚有報告顯示初級反應基因 (Primary Response Gene) 如 c-fos、c-myc、TIS1、TIS8 和 TIS11 的活化也與肝臟和腎臟兩者之再生有關 (31-34)。

在子宮蛻膜形成過程中 PKC 所扮演的角色所知甚少，先前我們研究已證實 PKC 活性的變化在假孕鼠與懷孕鼠之子宮蛻膜瘤形成中發生 (3)，子宮蛻膜形成之第 5 天，子宮蛻膜瘤組織與對照之子宮組織比較時，細胞質中 PKC (Cytosolic PKC) 活性在統計上有顯著減少，在微粒成份 (Particulate Fraction) 之 PKC 活性也有降低，但並無統計上之差異。顯示子宮蛻膜組織之生長可能與細胞質的 PKC 活性減少有關。至於 PKC 異構體的改變，吾等亦已得知初步結果，12 種 PKC 異構體中，尤其 PKC α 、 δ 、 ζ 、 λ 、 ι 與假孕鼠之子宮內膜增殖有密切關聯，PKC α 減少，但 PKC ζ 增加，確定 PKC 活性降低與 PKC α 減少有關 (4,5)，此結果與肝臟和腎臟再生結果相類似。因此推論 PKC 異構體的表現可能調節蛻膜瘤形成。

本實驗計劃擬進一步深入探討 PKC 異構體表現與人類子宮蛻膜瘤形成之關係，故利用體外細胞培養系統研究蛻膜細胞形成期間 PKC 活性與異構體表現之變化，以了解子宮內膜基質細胞轉變為蛻膜細胞期間 PKC 所扮演的角色。實驗過程以外科手術摘取具有正常月經週期婦女之子宮肌瘤週圍正常內膜組織為實驗樣本，進行體外培養，然後處理荷爾

蒙 (progesterone)，觀察人類子宮基質細胞蛻膜形成作用與 PKC 異構體表現之相關性

三、結果與討論

我們的結果顯示經由 progesterone 處理的人類子宮內膜基質細胞，14 天後會轉型成較大分化的蛻膜細胞，但其生長速率不變。利用 Western blot 檢測，發現在 progesterone 處理組中細胞質的 PKC α 含量有明顯下降的現象，這種現象是否與活化下降調節作用 (activation and down-regulation) 有關，目前還不能確定，但是可以確定的是與過去研究結果相同 (4, 5)，即在蛻膜細胞中細胞質內的 PKC α 的含量較基質細胞低。另外利用 Zymography 的檢測 MMP 分泌的情形，結果卻意外發現在 progesterone 處理組中 MMP-2 的分泌也比對照組的細胞少，而且細胞內的含量也較少。可見蛻膜細胞內 MMP-2 的分泌可能與 PKC 的表現有關。

四、計畫成果自評

研究結果較預期結果超出許多，且對於 PKC 在人類子宮基質細胞蛻膜形成作用有突破性的發現。結果將在學術期刊發表。

五、參考文獻

1. 葉文榮 (1997) 不孕症治療新趨勢。Mom Baby, 128: 93-97.
2. Tang, B., Guller, S. and Gurdipe, E. Mechanism of human endometrial stromal cells decidualization [Review]. Annals of the New York Academy of Sciences 734: 19-

- 25,1994.
3. Shyu, J.C., Hsieh, Y.S., Chang, C.L., Tsai, C.C., Cheng, C.K. and Liu, J.Y. (1996) Change in protein kinase C activity on day 5 of decidualization in pseudopregnant rat. *Chinese Journal of Physiology*, 40:107-112.
 4. Shyu, J.C., Hsieh, Y.S., Chang, C.L., Tsai, C.C., Chang, A.C., Yang, L.C., Lin, M.T., Cheng, M.H. and Liu, J.Y. (1996) Localization of protein kinase Ca and ? during the decidualization in pseudopregnant rats. *Chinese Journal of Physiology*, 40:243-247.
 5. Liu, J.Y., Shyu, J.C., Chang, C.L., Tsai, C.C., Chang, A.C., Yang, L.C., Lin, L.Y., and Hsieh, Y.S. (1998) Protein kinase C isoforms during the development of deciduomata in pseudopregnant rats. *Life sci.*(submit)
 6. Daly, D.H., Maslar, I.A. and Riddick, D.H. Prolactin production during in vitro decidualization of proliferative endometrium. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 145:672-678, 1982.
 7. Sananes, N., Weiller, S., Baulieu, E.E., and Goasogne C. (1978) In vitro decidualization of rat endometrial cells. *Endocrinology* 103: 86-95.
 8. Tabanelli, S., Tang, B., and Gurdip, E. (1992) In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42: 337-344.
 9. Tang, B., and Gurdip, E. (1993) Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47: 115-121.
 10. Tang, B., Guller, S., and Gurdip, E. (1993) Mechanisms involved in the decidualization of human endometrial stromal cell. *Acta Eur Fertil* 24: 221-223.
 11. Tilly, B.C., L.G. Tertoolen, R. Remorie, A. Ladoux, I. Verlaan, S.W. deLaat, and W.H. (1990) Moolenaar. Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: action through Ca²⁺(+)-mobilizing H1 receptors. *J. Cell. Biol.* 110: 1211-1215.
 12. Niedel, J.E., L.J. Kuhn, and G.R. Vandenberg. (1983) Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 36-40.
 13. Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308: 693-698.
 14. Berridge, M.J. (1987) Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.*, 56:159-193.
 15. Ganong, B.R., Loomis, C.R., Hannun, Y. A., and Bell, R.M. (1986) Specificity and mechanism of protein kinase C activation by sn-1,2-diacylglycerols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 1184-1188.
 16. Rozengurt, E. (1989) Signal transduction pathways in mitogenesis. *Brit. Med. Bull.*, 45:

- 515-528.
17. Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*, 334: 661-665.
 18. Koide, H., Ogita, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1992) Isolation and characterization of the ϵ subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 1149-1153.
 19. Wetsel, W.C., Khan, W.A., Merchenthaler, I., Rivera, H., Halpern, A.E., Phung, H.M., Negro-Vilar, A. and Hannun, Y.A. (1992) Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J. Cell Biol.*, 117: 121-133.
 20. Selbie, L.A., Schmitz-Peiffer, A., Sheng, Y. and Biden, T.J. (1993) Molecular cloning and characterization of PKC ι , and atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.*, 268: 24296-24302.
 21. Dekker, L.V. and Parker, P.J. (1994) Protein kinase C-a question of specificity. *Trends. Biochem. Sci.*, 19: 73-77.
 22. Huang, K.P., Huang, F.L., Nakabayashi, H. and Yoshida, Y. (1988) Biochemical characterization of rat brain protein Kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.*, 263:14839-14845.
 23. Hidaka, H., Tanaka, T., Onoda, K., Hagiwara, M., Watanabe, W., Ohta, H., Ito, Y., Tsurudomw, M. and Yoshida, T. (1988) Cell type-specific expression of protein kinase C isozymes in the rabbit cerebellum. *J. Biol. Chem.*, 263: 4523-3426.
 24. Hocevar, B.A. and Fields, A.P. (1991) Selective translocation of β II-protein kinase C to the nucleus of human promyelocytic (HL60) leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, 266: 28-33.
 25. Liyanage, M., Frith, D., Livneh, E. and Stabel, S. (1992) Protein C group B members PKC- δ , - ϵ , - ζ and PKC-L(η). Comparison of properties of recombinant proteins in vitro and in vivo. *Biochem. J.*, 283: 781-787.
 26. Alessenko, A., Khan, W.A., Wetsel, W.C. and Hannun, Y.A. (1992)
 27. Okamoto, Y., Nishimura, K., Nakayama, M., Nakagawa, M. and Nakano, H. (1988) Protein kinase C in the regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151: 1144-1149.
 28. Rush, J.S., Klein, J., Fanti, P., Bhat, N.R. and Waechter, C.J. (1992) Direct assay of membrane-associated protein kinase C activity in lymphocytes B in the presence of Brij-58. *Anal. Biochem.*, 207: 304-310.
 29. Sasaki, Y., Hayashi, N., Ito, T., Fusamoto, H., Sato, N. and Kamada, T. (1989) Heterogeneous activation of protein kinase during rat liver regeneration induced by carbon tetrachloride administration. *FEBS Lett.*, 254: 59-65.
 30. Dong, L., Stevens, J.L., Fabbro, D.

- and Jaken, S. (1993) Regulation of protein kinase C isozymes in kidney regeneration. *Cancer Res.*, 53: 4542-4549.
31. Kondo, T., Inui, H., Konishi, F. and Inagami, T. (1992) Phospholipase D mimics platelet-derived growth factor as a competence factor in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 267: 23609-23616.
32. Carpenter, G. (1992) Receptor tyrosine kinase substrates-*src* homology domains and signal transduction. *FASEB J.*, 6: 3283-3289.
33. Towley, B. D., Chadwick, L.J., Grantham, J.J. and Calvet, J. P. (1989) Sequentially protooncogene expression in regenerating kidney following acute renal injury. *J. Biol. Chem.*, 264: 8389-8393.
34. Kujubu, D.A., Norman, J.T., Herschman, H.R. and Fine, L.G. (1991) Primary response gene expression in renal hypertrophy and hyperplasia: evidence for different growth initiation processes. *Am. J. Physiol.*, 260: F823-F827.