

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 以細胞模式探討雙同源箱基因 Duxbl 影響神經細胞增 *
* 名稱 : 生與分化的分子機制 *
* ***** *

執行計畫學生： 石政弘

學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-034-B

研究期間： 106年07月01日至107年02月28日止，計8個月

指導教授： 王淑紅

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： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國

107年03月30日

目錄

壹、期刊發表與生醫年會論文	p. 2
貳、大專生計畫研究成果	
一、摘要	p. 4
二、研究背景及目的	p. 4
三、材料與方法	p. 6
四、結果	p. 7
五、討論	p. 19
六、參考文獻	p. 20

一、期刊發表與生醫年會論文

1. 期刊發表

Toxicology and Applied Pharmacology 329 (2017) 128–139

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/taap

Galangin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation and cell death in mice through inhibition of ERK and NF-kappaB signaling

Yu-Ching Huang^{a,b,1}, Ming-Shiun Tsai^{a,1}, Pei-Chi Hsieh^c, **Jheng-Hong Shih^c**, Tsu-Shing Wang^c, Yi-Chun Wang^c, Ting-Hui Lin^c, Sue-Hong Wang^{c,d,*}

^a Department of Biotechnology, Da-Yeh University, Taiwan, Republic of China
^b Department of Neurology, Tainan General Hospital, Ministry of Health and Welfare, Executive Yuan, Taiwan, Republic of China
^c Department of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University, Taiwan, Republic of China
^d Department of Medical Research, Chung Shan Medical University Hospital, Taiwan, Republic of China

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 22 February 2017
 Revised 21 May 2017
 Accepted 26 May 2017
 Available online 27 May 2017

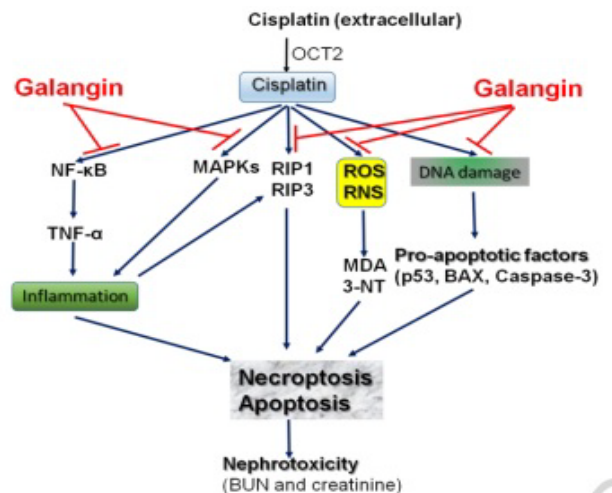
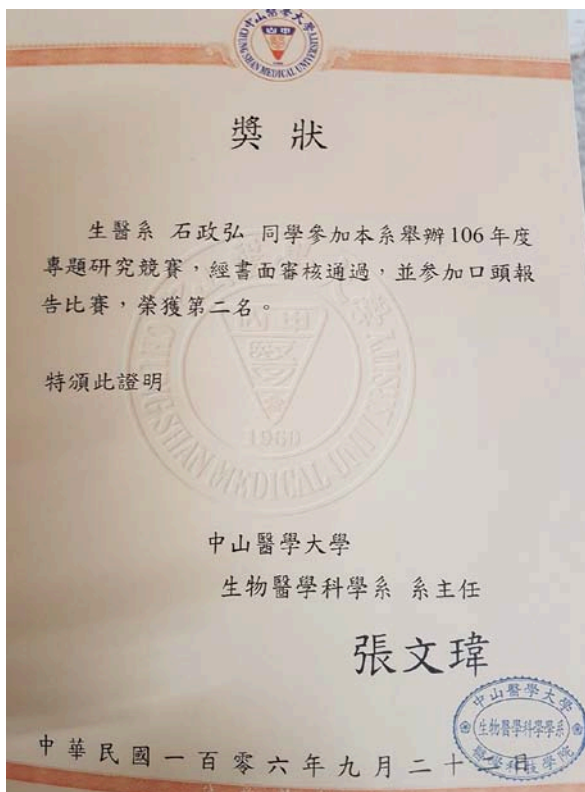
Keywords:
 Cisplatin nephrotoxicity
 ERK
 Galangin
 Inflammation
 NF-κB
 Oxidative stress

ABSTRACT

Cisplatin is a chemotherapeutic agent widely used in the treatment of various cancers. However, cisplatin can induce nephrotoxicity and neurotoxicity, limiting its dosage and usage. Galangin, a natural flavonol, has been found to exhibit anti-oxidant and anti-inflammatory effects *in vivo*. Here, we investigated the effects of galangin on cisplatin-induced acute kidney injury (AKI) and its molecular mechanisms in mice. Galangin administration reduced the cisplatin-induced oxidative stress by decreasing renal MDA and 3-NT formations. Galangin administration also increased renal anti-oxidative enzyme activities (SOD, GPx, and CAT) and GSH levels depleted by cisplatin. Furthermore, galangin administration inactivated stress-induced Nrf2 protein and its downstream products, HO-1 and GCLC. In terms of the inflammatory response, galangin administration reduced IκB phosphorylation, NF-κB phosphorylation and nuclear translocation, and then inhibited cisplatin-induced secretions of pro-inflammatory TNF-α, IL-1β and IL-6. In addition, cisplatin-induced ERK and p38 phosphorylations were inhibited by galangin administration. In terms of cell death, galangin administration reduced levels of p53, pro-apoptotic Bax and activated caspase-3 to inhibit the cisplatin-induced apoptosis. Galangin administration also reduced the expression levels of RIP1 and RIP3 to inhibit cisplatin-induced RIP1/RIP3-dependent necroptosis. Therefore, galangin administration significantly ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation, and cell death through inhibitions of ERK and NF-κB signaling pathways. Galangin might be a potential adjuvant for clinical cisplatin therapy.

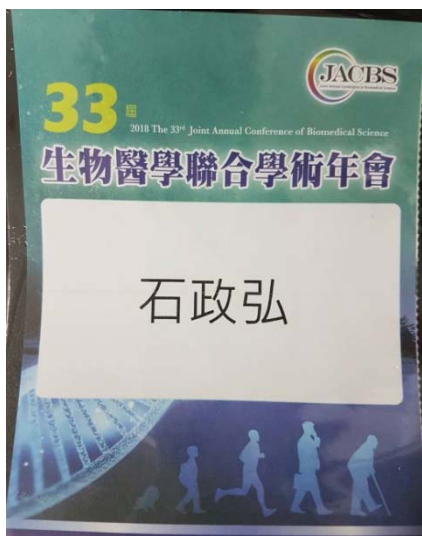
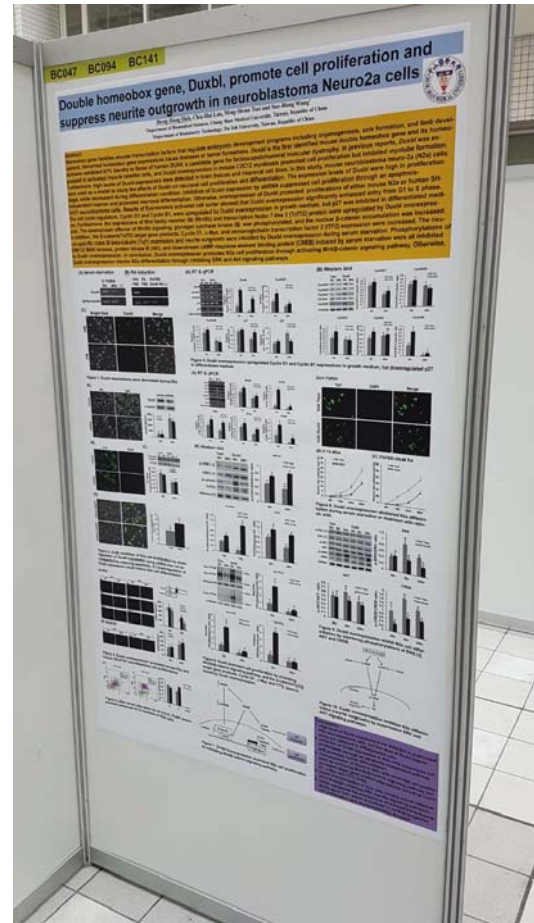
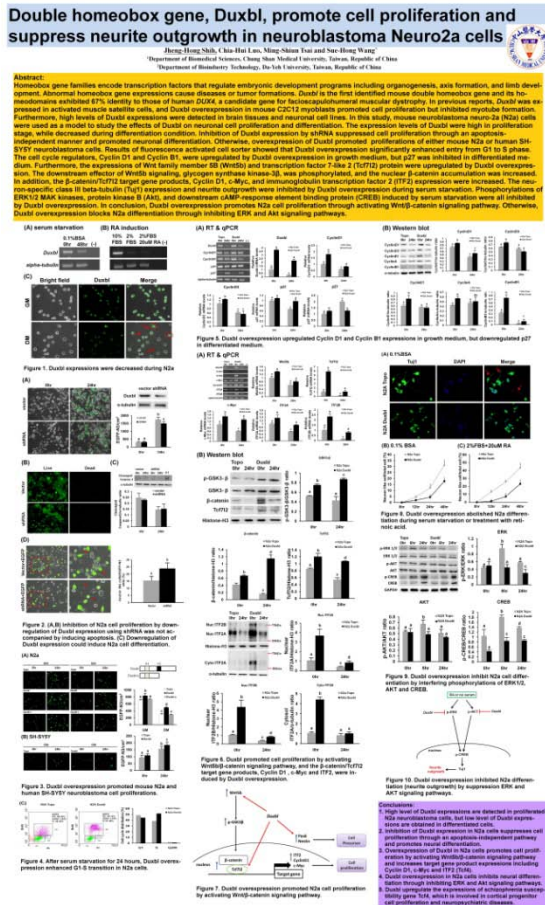
© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

2. 106 年度生醫系上專題研究競賽



3. 生醫年會論文

第 33 屆生醫年會海報論文



貳、大專學生研究計畫研究成果報告

計畫名稱:

以細胞模式探討雙同源箱基因 *Duxbl* 影響神經細胞增生與分化的分子機制

(一) 摘要

同源箱基因是一群轉錄因子，除了影響胚胎發育及器官形成之外，異常的表現也會造成疾病的生成。*Duxbl* 這個基因是在小鼠中第一個發現的雙同源箱基因，而且與人類 *DUX4* 基因具有同源性，同源箱區高達 67% 的相似度。然而 *DUX4* 是造成人類顏面及肩胛肱肌肉失養症 (FSHD) 的候選基因。在過去的研究顯示，*Duxbl* 表現於活化的衛星細胞 (肌肉幹細胞)，而且過量表現 *Duxbl* 會促進 C2C12 細胞增生但抑制肌小管的形成。又根據我們分析成鼠在各組織 *Duxbl* 的表現分佈發現，在成鼠腦組織中有大量 *Duxbl* 的表現，又在細胞株的分析上也發現了在神經相關細胞株如 N2a (mouse neuroblastoma N2a cells) 及 NSC34 (mouse motor neuron like cell line) 有大量 *Duxbl* 基因的表現。因此，本研究主題將以 N2a 細胞株為模式來研究 *Duxbl* 對於神經細胞增生與分化的影響。在本次研究中我們發現，在 N2a 中 *Duxbl* 的表現會隨著分化時間而減少。當我們以 shRNA 抑制 *Duxbl* 的表現時，N2a 的增生會受到抑制且促進其走向分化，同時我們也證明其抑制增生與細胞死亡無關。相反地，當我們過量表現 *Duxbl* 時，會促進 N2a 的增生並且抑制神經突觸的生長。然而我們也發現，只有 *Duxbl* (L form) 會促進 N2a 細胞增生，*Duxbl*-s (S form) 則無法促進 N2a 增生，並且在 SH-SY5Y 細胞也證實 *Duxbl* 會促進細胞的增生。我們也透過 FACS (流式細胞儀) 分析發現，過量表現 *Duxbl* 促進 N2a 增生是透過促進 cell cycle G1 phase 進入 S phase。我們透過 real-time PCR 以及 western blot 分析特定 cell cycle regulator 的表現發現，在含血清條件下 *Duxbl* 主要是透過促進 CyclinD1 和 CyclinB1 的表現，而在無血清條件 24hr，*Duxbl* 會抑制 p27 的表現。我們也發現過量表現 *Duxbl* 會促進 Wnt family member 5B (Wnt5b) 和 transcription factor 7-like 2 (Tcf712) 蛋白。*Duxbl* 也促使 Wnt 下游 glycogen synthase kinase-3 β (GSK3- β) 的磷酸化，進而促使細胞核中 β -catenin 的累積。除此之外， β -catenin/Tcf712 的目標基因，Cyclin D1, c-Myc 和 immunoglobulin transcription factor 2 (ITF2) 的表現也被促進。在無血清條件下，過量表現 *Duxbl* 會抑制 class III beta-tubulin (Tuj1) 以及神經突觸的生長。我們也發現過量表現 *Duxbl*，會透過抑制 ERK、AKT 以及 CREB 的磷酸化來抑制神經突觸的生長。總結所有發現，*Duxbl* 在 N2a 中會透過活化 β -catenin 路徑促進神經細胞的增生；並且透過抑制 ERK、AKT 以及 CREB 磷酸化來抑制神經突觸的生長。

(二) 研究背景及目的:

同源箱基因家族(homeobox gene families)普遍存在高等及低等動物中，不同的同源箱基因藉高度保留的同源箱區(homeodomain)60個胺基酸，形成 helix-turn-helix 的結構和特定 DNA 序列結合，來調節下游基因之表現(Gehring et al., 1994)，影響細胞增生與分化，最終影響胚胎發育與器官組織的發育。同源箱基因異常的表現除了造成個體發育的異常之外，也會造成腫瘤及疾病的形成。我們正在研究中的 *Duxbl* 蛋白具兩個同源箱區，屬雙同源箱基因家族(double homeobox gene:DUX)。因為具有兩個可以調控下游基因表現的同源箱區，目前兩個同源箱區是共同或分別調控哪些基因的表現並不清楚，因此雙同源箱基因在發育上的生理功能還並不清楚。過去的研究一直認為雙同源箱基因是屬於靈長類特有的基因，雖然根據生物資訊學及演化的分析，發現 DUX 家族包含 intronless，也就是不包含 intron 的 *DUX4* 及鼠類的 *Dux* (Clapp, et al., 2007) 及有 intron 的 *DUXA*, *DUXB*, *DUXBL* 及 *DUXC* 次家族(Leidenroth and Hewitt, 2010)。但真正了解其基因分子結構及證實有基因產物存在的雙同源箱基因只有人類的 *DUX4* 及鼠類 *Duxbl*，其他次家族是否真的存在並不清楚。*Duxbl* 同源箱區與人類 *DUX4* 有高達 67% 的相似度，*DUX4* 是造成人類顏面及肩胛肱肌肉失養症(FSHD)的候選基因，由於受限於人類組織取得不易，及人類 *DUX4* 表現量低並且只在疾病及腫瘤組織中發現，因此無法以人類 *DUX4* 來研究哺乳動物發育上，雙同源箱基因對其產生的生理功能，因此本研究以鼠類雙同源箱基因 *Duxbl* 探討雙同源箱基因家族在哺乳類動物發育上的正常生理功能，小鼠 *Duxbl* 功能分析，將可以協助我們了解人類 *DUX4* 造成 FSHD 或腫瘤生成的可能分子機制。人類 *DUX4* 表現於 mES cell 促進神經細胞的分化(Dandapat et al., 2013)，因為 P19 細胞(癌化的胚胎幹細胞)分化出的神經細胞的功能與 primary neural cell 是一樣的，因此分析 *Duxbl* 基因表現量對於神經細胞分化的影響，也間接可以了解 *Duxbl* 與人類 *DUX4* 在早期胚胎發育是否扮演一樣的角色。由目前我們的研究結果顯示，以 P19 細胞做體外神經分化，*Duxbl* 會促進神經前驅細胞的標記基因，*nestin* 的表現但抑制 postmitotic neuron cell 的標記基因 *MAP2* 的表現，因此我們推測是否 *Duxbl* 會透過增加神經前驅細胞的增生，因而抑制神經細胞的分化，所以 *MAP2* 表現才會減少。根據我們分析成鼠在各組織 *Duxbl* 的表現分佈發現，在成鼠 brain 組織中有大量 *Duxbl* 的表現，又在細胞株的分析上也發現了在神經相關細胞株如 N2a (mouse neuroblastoma N2a cells) 及 NSC34(mouse motor neuron like cell line) 有大量 *Duxbl* 基因的表現。因此，本研究主題為以 N2a 細胞株(小鼠來源神經瘤母細胞)為模式來研究 *Duxbl* 對於神經細胞增生與分化的影響。N2a 細胞株又可以稱為 Neuro-2a，它是小鼠來源神經瘤母細胞，常用於研究神經細胞的分化、neurite 的生長突觸形成與訊號傳遞路徑的研究 (Tremblay et al., 2010)。誘導 N2a 進行分化的速度很快，讓 N2a 細胞在 0.1% BSA medium 培養進行分化(Evangelopoulos et al., 2005)，24 小時內大部分的細胞都可以形成突觸，同時也可以發現分化早期階段 p-ERK

1/2 和 pAKT 會大量表現，推測 ERK1/2 和 AKT 的表現對於 N2a 在無血清環境下進行分化是必需的。而且由於 N2a 細胞株有大量 *Duxbl* 基因的表現。根據先前在其他細胞株的結果顯示，*Duxbl* 會促進細胞的增生。因此，我們將探討 *Duxbl* 是否促進 cell cycle 的進行，另外我們也將探討 *Duxbl* 是否影響 ERK 及 AKT 訊號傳遞路徑因而影響分化。

(三) 材料與方法

1. N2a cell 以無血清(0.1% BSA)分化

先種 1×10^6 N2a cells in 10cm dish，在 10% FBS medium 中培養 overnight，用 PBS wash 兩次，將 medium 更換成 no serum(0.1% BSA) medium，使其分化 24hr，48hr，照相分析細胞形態與數目。

2. N2a transfection

首先將 transfection reagent 和現有的表現載體稀釋於 Opti-MEM 中後靜置 5 分鐘，再將此兩種溶液混和均勻，在室溫下靜置反應 25 分鐘，之後再將此混和液加入細胞中培養 6hr，換成在 10% FBS medium 中培養 overnight。

3. N2a stable clone 建立

首先將 CAG-Topo-v5 和 CAG-*Duxbl*-v5 分別 transfect 到 N2a cell 中，接著以抗生素 G418 篩選大約 14 天，挑選 single clone 將其培養放大並儲存起來。

4. Immunoflorescence

將細胞培養液倒掉，用 PBS wash 3 次，加入 4% paraformaldehyde 固定細胞，用 PBS wash 3 次，加入 1% BSA+0.1% Triton buffer 進行 blocking 及穿孔，之後 PBS wash 3 次，加入一抗反應 overnight，隔天 PBS wash 3 次，加入螢光二抗，PBS wash 3 次，加入 DAPI 後封片，隔天照相分析螢光訊號。

5. RT-PCR & Real-time PCR

將 N2a cell 透過 tri-reagent 將細胞刮下，透過液態氮冷凍裂解，接著 37 °C 乾浴槽回溶，加入 chloroform 使無機相與有機相分離，離心提取上清後，加入 isopropanol 沉澱 RNA，進行 DNase 處理。將處理好的 RNA 定量後透過反轉錄酶反轉錄成 cDNA，之後透過設計好的 primer 進行 PCR 將目標基因放大，跑膠分析表現情況。或是將反轉錄好的 cDNA，根據 SYBR green kit 進行 Real-time PCR。

6. N2a 全蛋白萃取

N2a 細胞用 PBS 清洗兩次，加入 5X RIPA+50XPIM 混合液在冰上作用 5 分鐘，用細胞刮勺將細胞刮下來，進行 sonication 後，放置冰上作用 10~20 分鐘，使細

胞破裂融出蛋白。之後離心 12,000rpm、4°C、20 分鐘, 取其上清液, 其蛋白使用 Bradford Protein Assay 利用胎牛血清蛋白(bovine serum albumin; BSA) 來定量。

7. N2a 核質蛋白萃取

N2a 細胞用 PBS 清洗兩次, 加入 200 ul buffer A, 用細胞刮勺將細胞刮下來, vortex 打散, 放置冰上作用 15 分鐘, 加入 16ul 10% NP-40, vortex 打散, 放置冰上作用 10 分鐘, 離心 12,000rpm、4°C、10 分鐘, 取上清(質蛋白)。將剩餘 pellet 加 200 ul buffer A, 離心 14000 g、4°C、2 分鐘進行 wash, 去除 buffer A, 加入 200 ul buffer C, 進行 sonication, 放置冰上作用 10~分鐘, 離心 12,000rpm、4°C、10 分鐘, 取上清(核蛋白)。

8. Western blot

將定量過後的 N2A 細胞蛋白以 SDS-PAGE 分離蛋白質樣品中不同分子量的蛋白質, 然後將蛋白轉印至 PVDF 轉漬膜上, 再以利用 TBST 緩衝液泡製而成的 5% 安佳脫脂奶粉進行 Blocking 一小時, 之後加入不同抗體作為一級抗體, 在 4°C 下靜置 overnight。隔天取出後使用 Goat anti mouse 或 Goat anti rabbit 作為二級抗體, 之後透過冷光儀分析訊號。

9. Live/Dead assay

透過 LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit 進行活細胞與死細胞的螢光分析。

10. FACS

先種 1×10^6 N2a cells in 10cm dish, 在 10% FBS medium 中培養 overnight, 用 PBS wash 兩次, 將 medium 更換成 no serum(0.1% BSA) medium 進行 starvation 24hr, 加入 10% FBS medium restimulate 48hr, 接著 BrdU 染色, 進行 FACS 分析 cell cycle 各 phase 的表現分布。

(四) 結果

Duxbl 表現會在 N2a 分化過程中下降

為了先了解 *Duxbl* 在 N2a cell 中的表現情形, 我們將 N2a cell 分別培養在 10% FBS、no serum(0.1% BSA)、2% FBS+20uM RA 的 medium 中, 抽取 RNA 分析 *Duxbl* 在 RNA 層次的表現以及 IF 螢光染色分析 *Duxbl* 在蛋白層次的表現情形。從 Fig. 1A, B 可以知道, N2a cell 在 10% FBS 生長條件下, 內生性高度表現 *Duxbl*, 然而當減少 FBS 濃度或是 no serum 又或是以 RA 誘導分化條件下, 內生性 *Duxbl* 表現會顯著減少。從 Fig. 1C 的 IF 螢光染色也顯示, 在 10% FBS 正常生長條件

下，N2a cell 高表現 *Duxbl* 蛋白，當在 no serum(0.1% BSA)條件下進行分化可以發現，已分化的 N2a cell 的 *Duxbl* 蛋白表現減少，而還尚未分化完全的細胞的 *Duxbl* 蛋白表現相對較高。

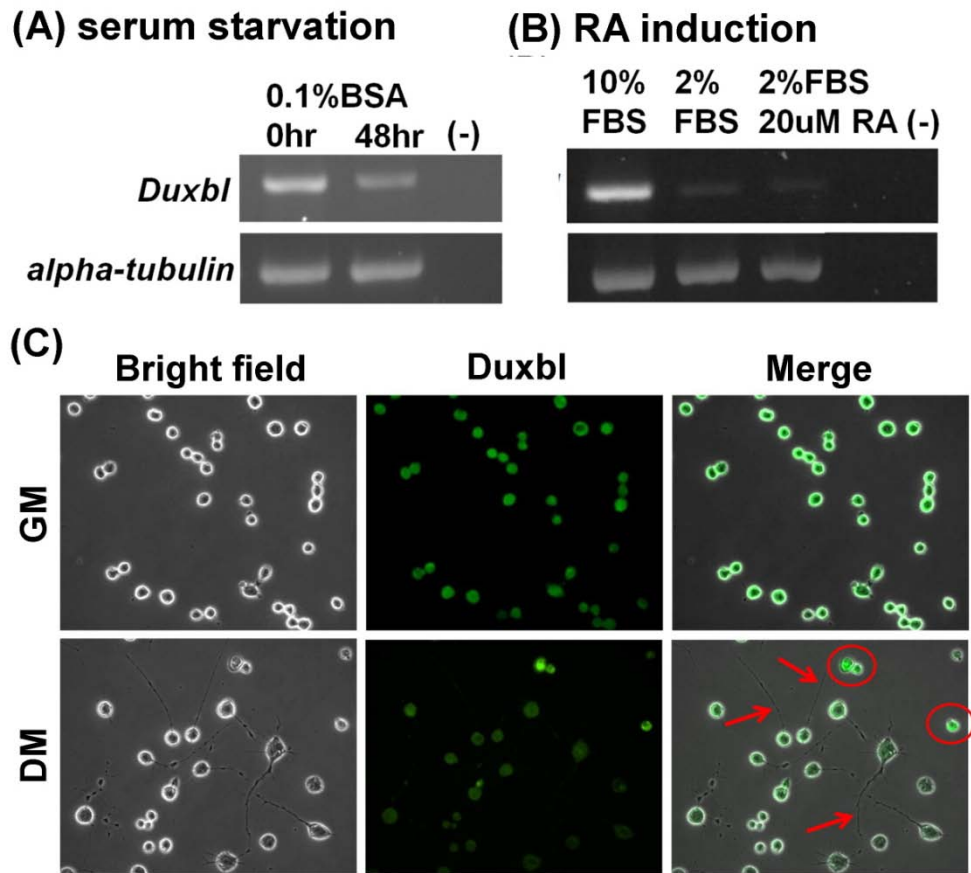


Fig. 1 A: 將在 0.1% BSA medium 分化 48hr 的 N2Aa cell, 收取其 RNA 後進行 RT-PCR 觀察 *Duxbl* 基因的表現。B: 在三種不同 medium 下分化 4 天後 RT-PCR 的結果。C: GM 時期與 DM 時期 *Duxbl* IF 染色結果。(箭頭: 分化定義為突觸長度需超過細胞本體的兩倍長度。圓圈: 未分化細胞 *Duxbl* 表現仍高度表現。)

下調 *Duxbl* 表現會抑制 N2a 細胞的增生，且不會造成細胞死亡；下調 *Duxbl* 表現會促使 N2a 細胞分化比例增加

為了瞭解 *Duxbl* 對於 N2a cell 增生的影響，我們利用 shRNA 抑制 N2a cell 的 *Duxbl* 表現。從 Fig. 2A 可以知道，當我們透過 shRNA 抑制了 N2a cell 的 *Duxbl* 表現時，從細胞圖以及統計圖都顯示會抑制 N2a cell 的增生數目。由於抑制 *Duxbl* 表現會抑制 N2a cell 的增生數目，接著我們利用 live/dead assay 去分析其細胞增生數目減少是否因細胞死亡所造成的。從 Fig. 2B 可以知道，shRNA 組別的細胞死亡數目(紅螢光)與 vector 組別是無差異的。我們也抽取蛋白分析了 cleaved-caspase3 的表現。從 Fig. 2C 可以知道，shRNA 組別的 cleaved-caspase3 的表現與 vector 組別是無差異的。由 Fig. 2B, C 的結果證明抑制 *Duxbl*

表現所造成的增生數目減少並非因為細胞死亡所造成的。接著，由於抑制 Duxbl 表現會抑制 N2a cell 的增生，是否會竟而促進 N2a cell 走向分化。我們將 shRNA 組在 no serum(0.1% BSA)條件下進行分化。從 Fig. 2D 可以知道，在細胞型態上，shRNA 組的神經突觸更加延長，統計上也顯示 shRNA 組分化比例有顯著上升。

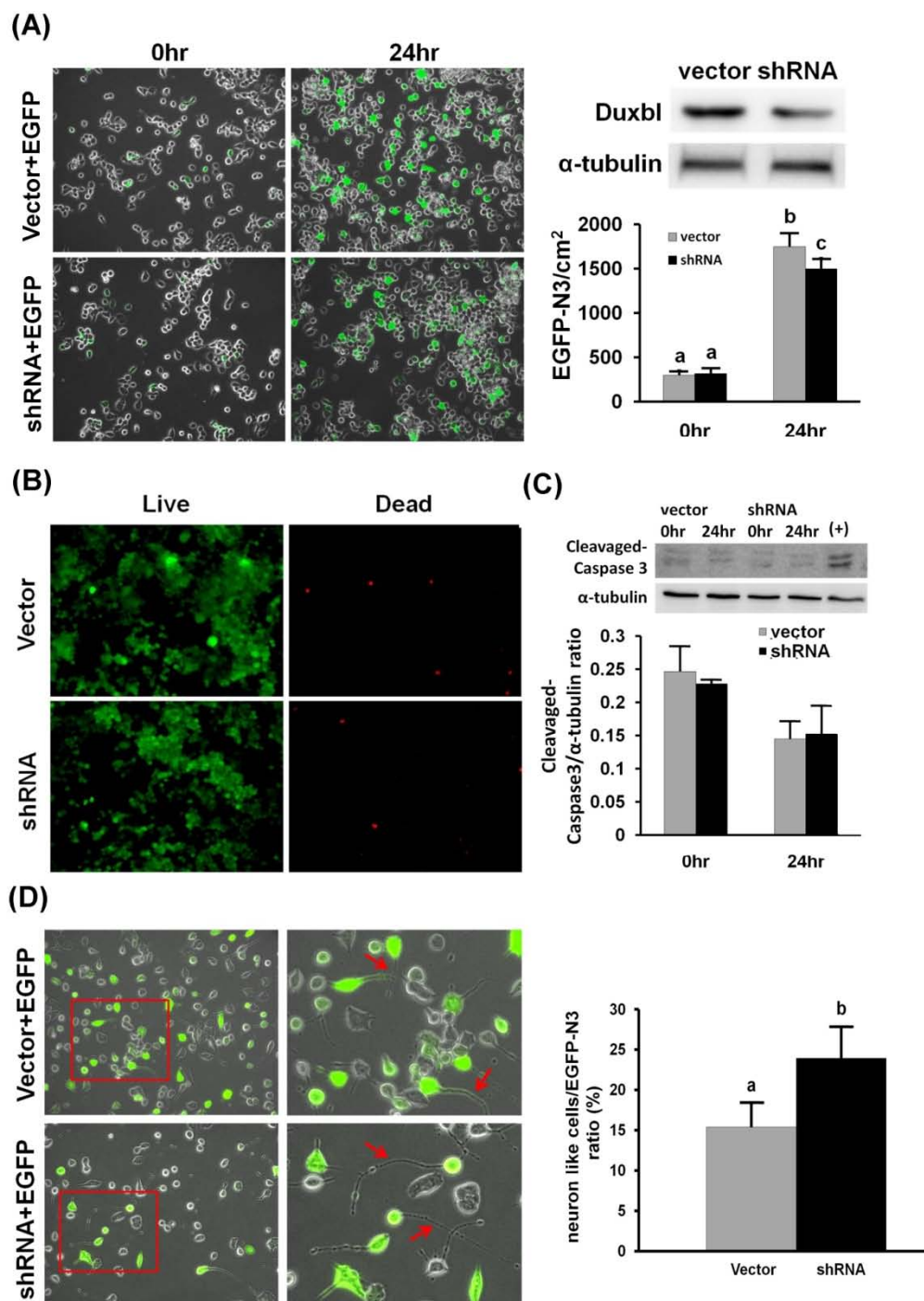


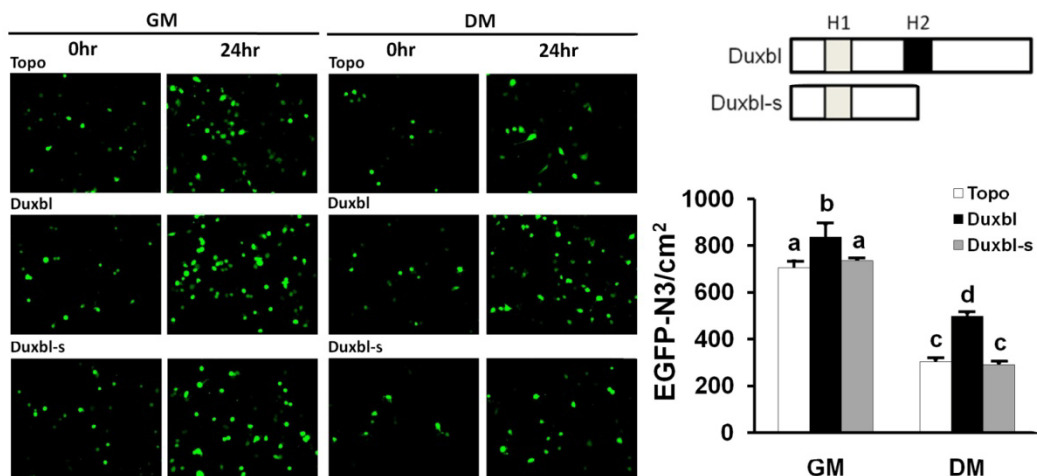
Fig. 2 A: transfect shRNA 及 EGFP-N3 至 N2a 中，並將 GM 培養 0hr 及 24hr 的 vector 及 shRNA 細胞的 EGFP-N3 螢光數目做統計。B: transfect shRNA 至 N2a 中，並在 GM 條件下培養 24hr，進行 live/dead assay 分析存活與死亡的情況。C: transfect

shRNA 至 N2a 中，在 DM 條件下分化 24hr 並抽取蛋白跑 western blot 分析 cleaved-caspase3 的表現(平均±SD, n=3, 英文字母間不共享為有顯著差異, $P < 0.05$)。D: transfect shRNA 至 N2a 中，在 DM 條件下分化 24hr 並統計 EGFP-N3 中有多少細胞為已分化細胞。(平均±SD, n=10, 英文字母間不共享為有顯著差異, $P < 0.05$ 。)

過量表現 *Duxbl* 會促使 *N2a* 及 *SH-SY5Y* 細胞的增生

接著我們探討過量表現 *Duxbl* 對增生所造成的影響。我們首先透過 transfect *Duxbl* plasmid 到 *N2a* cell 和 *SH-SY5Y* cell 去探討細胞增生的情況，與此同時，*Duxbl* 具有一個 isoform, *Duxbl-s* (S form)，相較 *Duxbl* (L form) 有兩個 homeodomain, *Duxbl-s* (s form) 只有一個 homeodomain。因此，我們也會 transfect *Duxbl-s* plasmid 到 *N2a* cell 和 *SH-SY5Y* cell 去探討細胞增生的情況。從 Fig. 3 可以知道，不管在 GM 條件或是 DM 條件下培養，過量表現 *Duxbl* 會促使 *N2a* cell 和 *SH-SY5Y* cell 的增生，但過量表現 *Duxbl-s* 卻對增生不造成影響。

(A) *N2a*



(B) *SH-SY5Y*

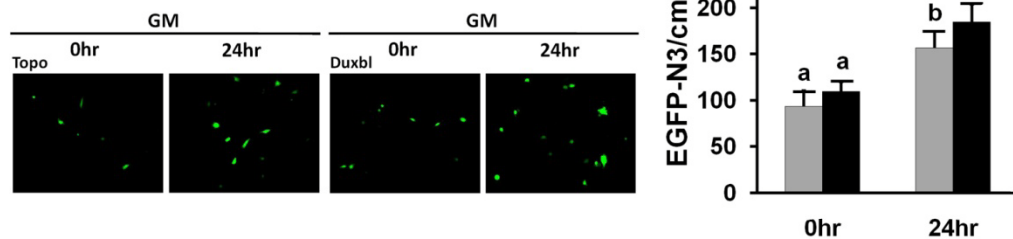


Fig. 3 A, B: transfect *Duxbl* or *Duxbl-s* 及 EGFP-N3 至 *N2a* 和 *SH-SY5Y* 中，在 GM 及 DM 條件下培養 24hr，觀察細胞增生數目並進行螢光訊號統計。(平均±SD, n=5, 英文字母間不共享為有顯著差異, $P < 0.05$ 。)

過量表現 *Duxbl* 會促使 *N2a* 細胞從 *G1* 走向 *S phase*

由於知道過量表現 *Duxbl* 會促使 *N2a* cell 的增生，我們篩選了過量表現 *Duxbl* 的 stable clone 進行之後的探討。首先為了瞭解 *Duxbl* 對於 cell cycle 的影響，我們透過 starvation 的方式讓 *N2a* cell 的 cell cycle 回歸 *G0* phase，再 restimulate 重新啟動 cell cycle，並透過 BrdU 染色，之後以流式細胞儀進行分析。從 Fig. 4 可以知道，在 restimulate 後，過量表現 *Duxbl* 會促使 *N2a* cell 從 *G1* 進入 *S phase* 的比例增加。

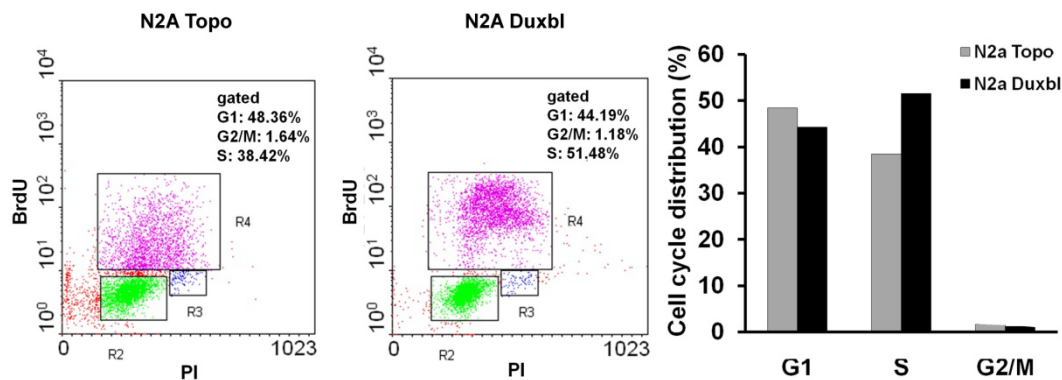
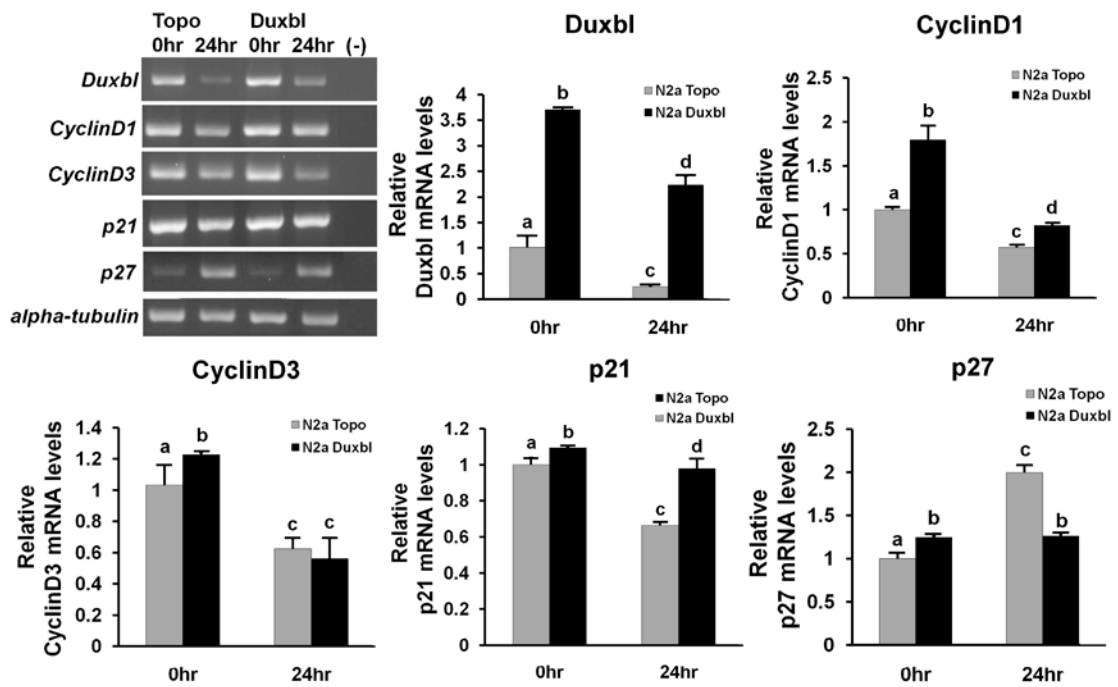


Fig. 4 將 *N2a* stable clone 在 no serum 條件下培養 24hr，再給予 10% FBS 培養 48hr 後，進行 BrdU 染色並透過流式細胞儀進行分析。

過量表現 *Duxbl* 會促使 *GM* 時期的 *CyclinD1* 和 *CyclinB1* 增加；但卻會抑制 *DM* 時期 *p27* 的表現

接著我們透過抽取 RNA 進行 real-time PCR 分析 cell cycle regulator 的表現情形。從 Fig. 5A 可以知道，在 *GM* 條件下，過量表現 *Duxbl* 會促使 *CyclinD1*, *D3*, *p21* 以及 *p27* 的表現增加，然而在 no serum (0.1% BSA) 條件下分化 24hr，過量表現 *Duxbl* 會使 *CyclinD1* 及 *p21* 下降幅度減少，並且抑制 *p27* 的表現。接著我們也透過 western blot 分析不同 *Cyclin* 蛋白的表現情形。從 Fig. 5B 可以知道，在 *GM* 條件下，過量表現 *Duxbl* 會促使 *CyclinD1*, *D3*, *E1*, *A* 以及 *B1* 的表現增加，推測可能是由於 *Duxbl* 會使 *CyclinD1* 表現上升，加速 cell cycle 的進行，使得其他 *Cyclin* 蛋白表現跟著上升，促進整個 cell cycle 的循環。

(A) RT & qPCR



(B) Western blot

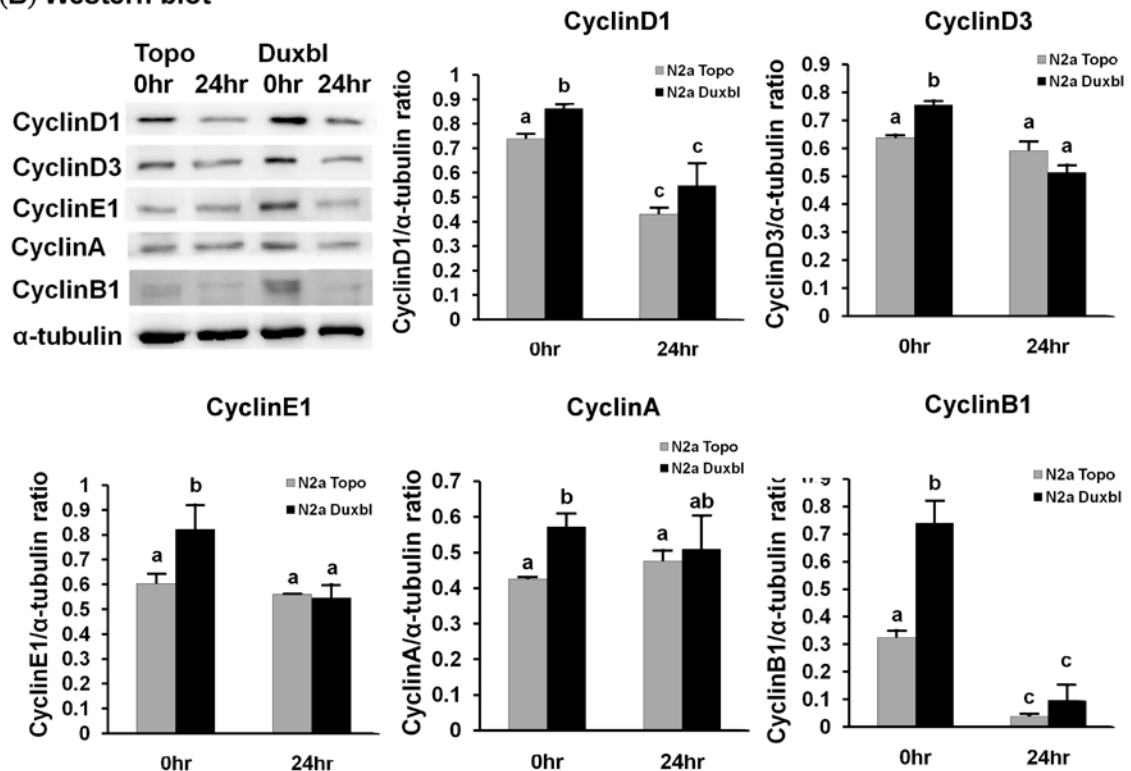
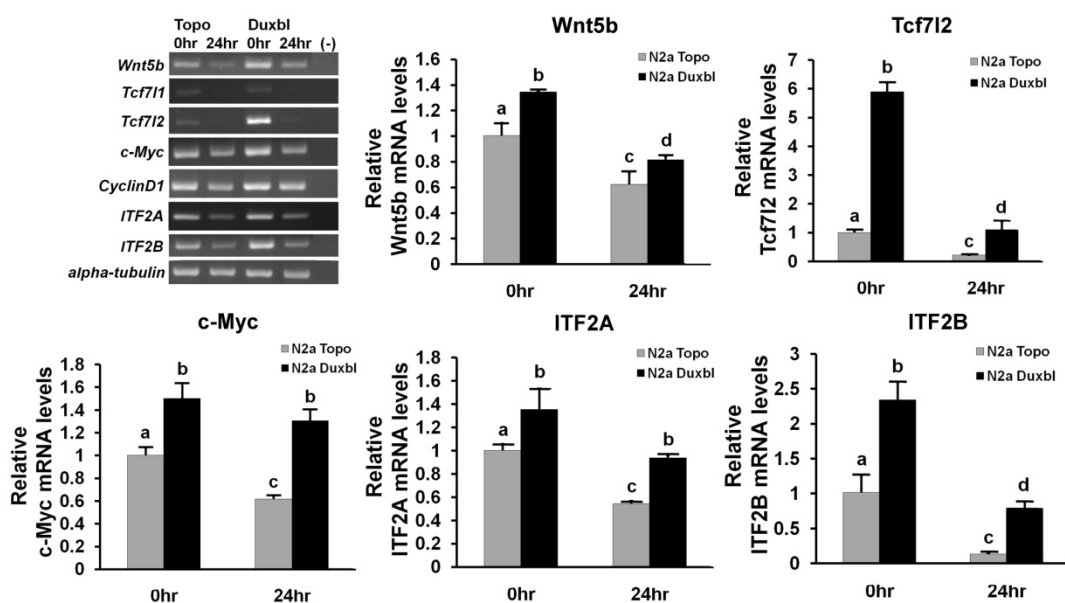


Fig. 5 A:將 N2a stable clone 在 no serum 條件下培養 24hr，收取 RNA 進行 real-time PCR 分析。B:將 N2a stable clone 在 no serum 條件下培養 24hr，收取蛋白進行 western blot 分析。(平均 \pm SD, n=3, 英文字母間不共享為有顯著差異, P<0.05。)

**Duxbl 會透過活化 Wnt5b/ β -catenin 信號途徑促進 N2a 細胞增生；
過量表現 Duxbl 會促使 β -catenin/Tcf712 目標基因產物增加**

有 paper 顯示透過活化 Wnt/ β -catenin pathway 會促使 N2a cell 維持在 neuroblastoma 的階段而不走向分化(Feng Zhi, et al., 2012)。我們在 C2C12 cell 的 RNA 定序中也發現，過量表現 Duxbl 會促使 Wnt5b 表現。因此，我們將探討過量表現 Duxbl 對於 N2a cell 中 Wnt/ β -catenin pathway 的影響。我們透過抽取 RNA 進行 RT-PCR 及 real-time PCR 分析 Wnt5b、Tcf712、c-Myc 及 ITF2 的表現。Wnt5b/ β -catenin pathway 的下游會與 transcription factor 7-like 2 (Tcf712) 結合並活化 target gene，例如:CyclinD1，c-Myc 及 immunoglobulin transcription factor 2 (ITF2)。從 Fig. 6A 可以知道，RT-PCR 及 real-time PCR 結果都顯示，在 GM 條件下，過量表現 Duxbl 會促使 Wnt5b、Tcf712、c-Myc、ITF2a 和 ITF2b 的表現，而當分化 24hr 後，Wnt5b、Tcf712、c-Myc、ITF2a 和 ITF2b 的表現仍顯著高於 control 組。接著我們透過蛋白核質分離探討 glycogen synthase kinase-3 β (p-GSK3- β)、 β -catenin、Tcf712 及 ITF2 的表現。從 Fig. 4B 可以知道，在 GM 條件下，過量表現 Duxbl 會促使 GSK3- β 磷酸化、 β -catenin 及 Tcf712 的表現，而當分化 24hr 後，過量表現 Duxbl 仍然會促使 GSK3- β 磷酸化、 β -catenin 及 Tcf712 的表現。我們也分析了細胞質及細胞核中 ITF2 的表現。ITF2 具有兩種 isoform，ITF2b 會編譯出長片段蛋白，而 ITF2a 則會編譯出較短的蛋白片段。ITF2b 因為具有 nuclear localization signal(NLS)，因此表現分布會在細胞核中。然而，ITF2a 會在細胞質及細胞核中分布，雖然其不具有 NLS，但能藉由與其他因子作用進入細胞核中(Mari Sepp, et al., 2011)。從 western blot 的結果可以知道，過量表現 Duxbl 會促使細胞質和細胞核 ITF2a 的表現以及促使細胞核中 ITF2b 的表現。



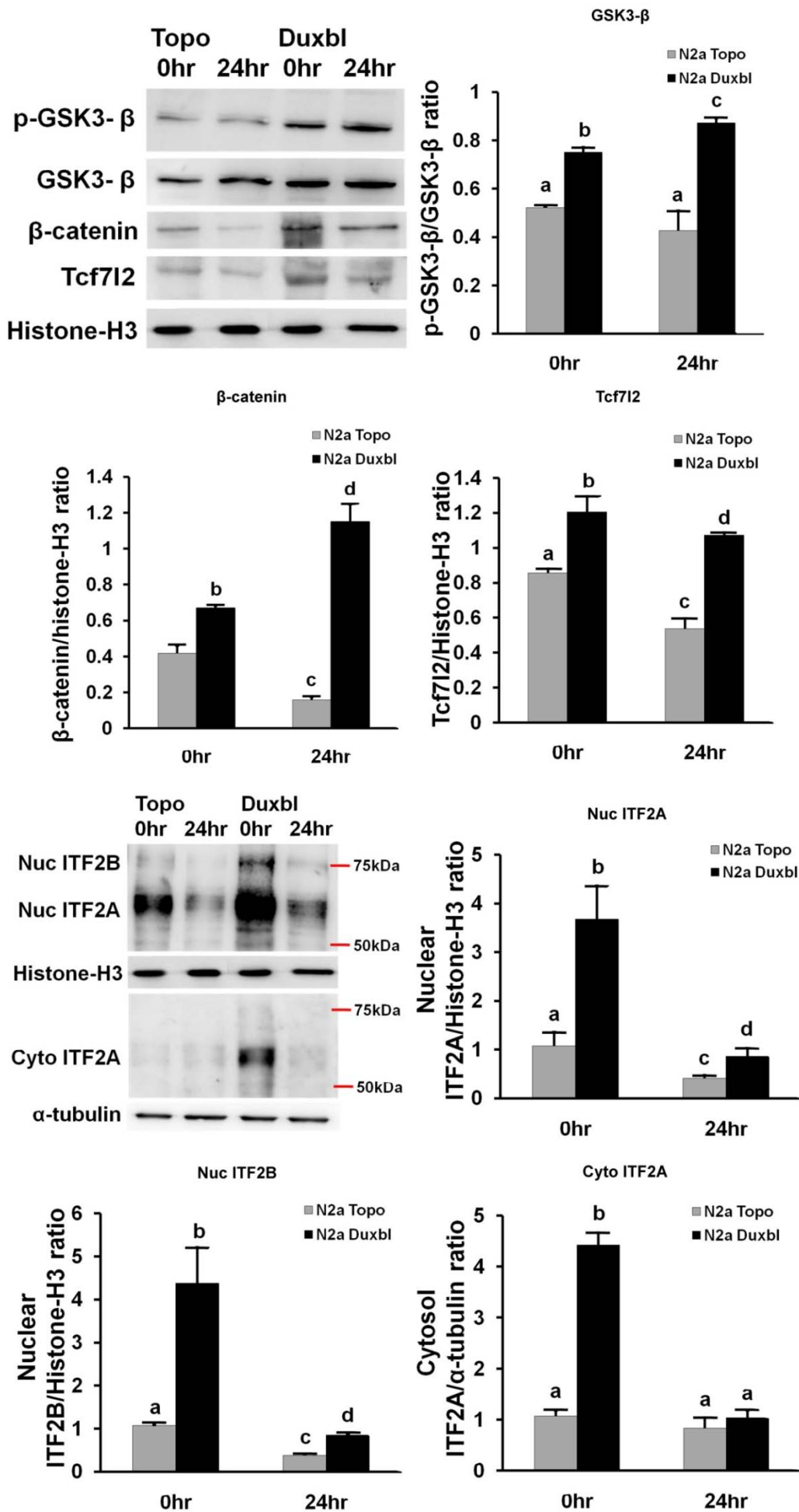


Fig. 6 A: 將 N2a stable clone 在 no serum 條件下培養 24hr, 收取 RNA 進行 RT-PCR 及 real-time PCR 分析 Wnt5b, Tcf712, c-Myc 及 ITF2。B: 將 N2a stable clone 在 no serum 條件下培養 24hr, 進行蛋白核質分離後透過 western blot 分析磷酸化 GSK3- β 、 β -catenin、Tcf712 及 ITF2 的表現。(平均 \pm SD, n=3, 英文字母間不共享為有顯著差異, P<0.05。)

過量表現 *Duxbl* 會促使 *N2a* 細胞走向神經前期階段

過量表現 *Duxbl* 會促使 β -catenin 的表現使細胞維持在 neuroblastoma 的階段, 因此我們接著分析了 Pax6 和 Nestin 的表現, 探討 *Duxbl* 是否能促使 *N2a* cell 走向神經前期的階段。Pax6 是一種 homeodomain transcription factor, 是 neuron precursors 的 marker gene。Nestin 為神經外胚層的 marker gene。從 Fig. 7A 可以知道, 不管是在 GM 或是 DM 條件下, 過量表現 *Duxbl* 都會促使 Pax6 和 Nestin 的表現上升。從 Fig. 7B 可以知道, 過量表現 *Duxbl* 會促使 *N2a* 細胞的 Pax6 表現量上升。因此, 過量表現 *Duxbl* 會促使 *N2a* cell 更走向神經前期的階段。

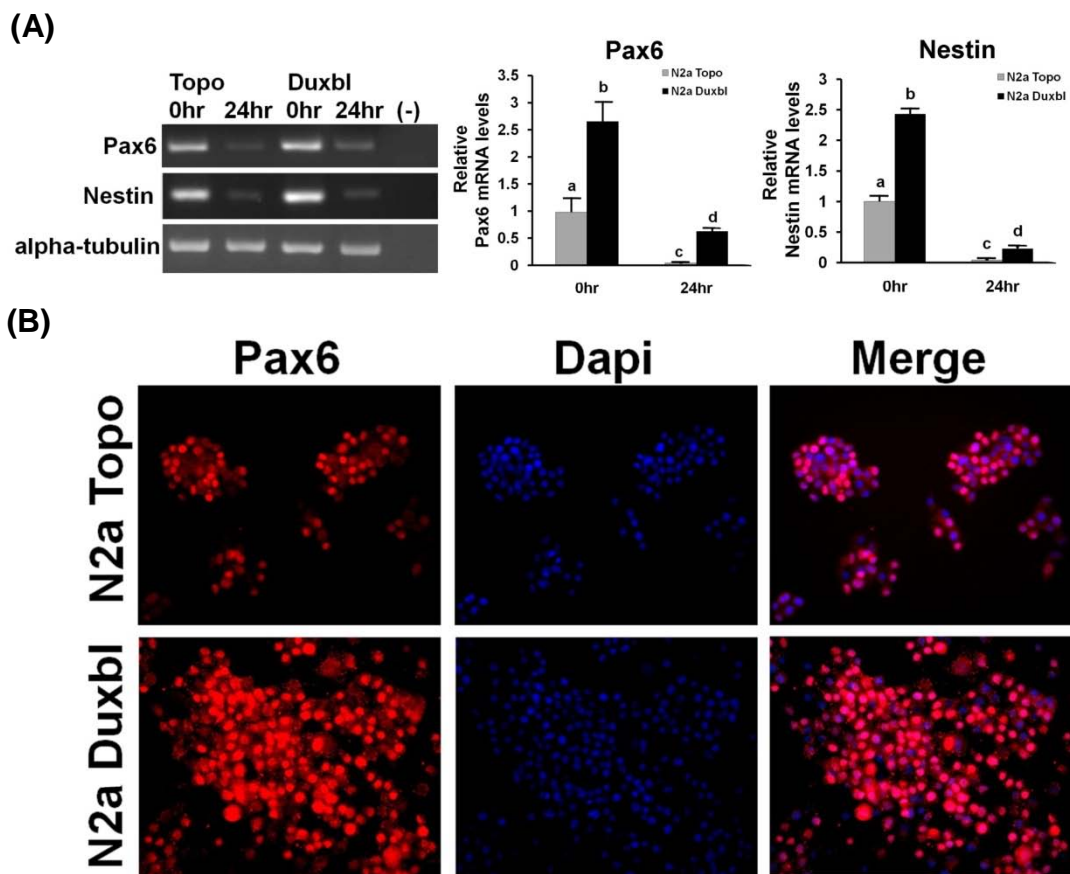


Fig. 7 A: 將 N2a stable clone 在 no serum 條件下培養 24hr, 收取 RNA 進行 RT-PCR 及 real-time PCR 分析 Pax6 及 Nestin。(平均 \pm SD, n=3, 英文字母間不共享為

有顯著差異， $P < 0.05$ 。） B: GM 時期 Pax6 IF 染色結果。

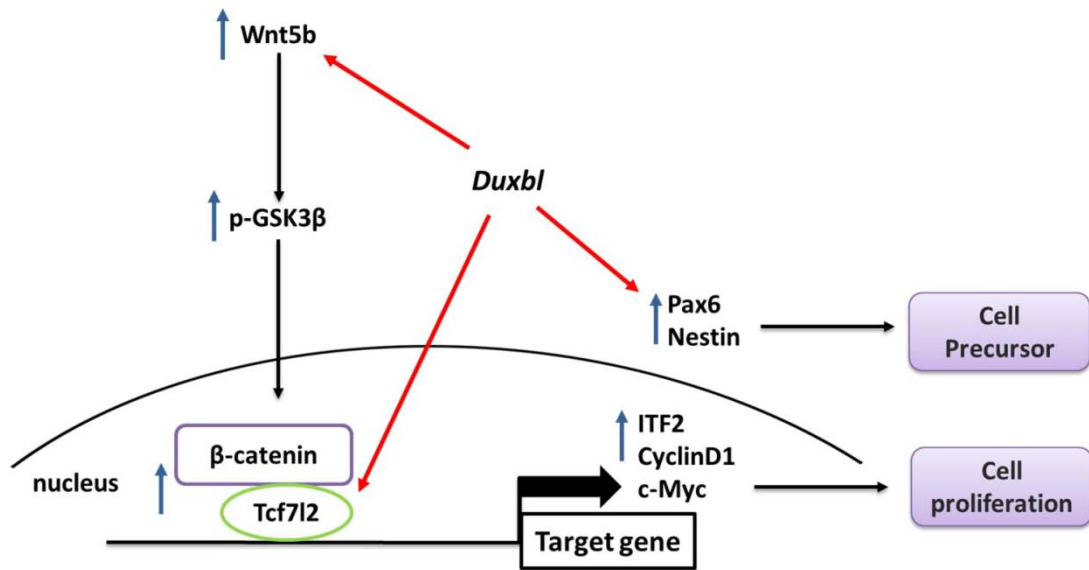


Fig. 8 整合前面的結果，*Duxbl* 會透過活化 Wnt5b 促使下游 GSK β 磷酸化，進而釋放 β -catenin 進入細胞核中與 Tcf712 結合並活化 target gene，ITF2、c-Myc 和 CyclinD1 促使 N2a 細胞的增生。*Duxbl* 也會促使 Pax6 和 Nestin 表現使 N2a 細胞更走向神經前期階段。

在無血清或是 RA 誘導下，過量表現 *Duxbl* 會抑制 N2a 的分化

目前已經知道過量表現 *Duxbl* 會促使 N2a cell 的增生。接著我們將探討過量表現 *Duxbl* 對於 N2a cell 的分化會造成什麼影響。因此，我們將 N2a cell 在 no serum (0.1% BSA) 以及 2% FBS + 20 μ M RA 條件下分化 24hr 後，進行 IF 螢光染色透過 class III beta-tubulin (Tuj1) 觀察神經突觸的生長情況。從 Fig. 9A 可以知道，N2a cell 在 no serum (0.1% BSA) 條件分化時，會有神經突觸產生 (紅色箭頭)，但當過量表現 *Duxbl* 時明顯抑制神經突觸的生長。接著我們去統計兩種分化條件下的 N2a cell 的分化比例。從 Fig. 9B 可以知道，在兩種分化條件下，過量表現 *Duxbl* 會抑制 N2a 細胞分化的數量。

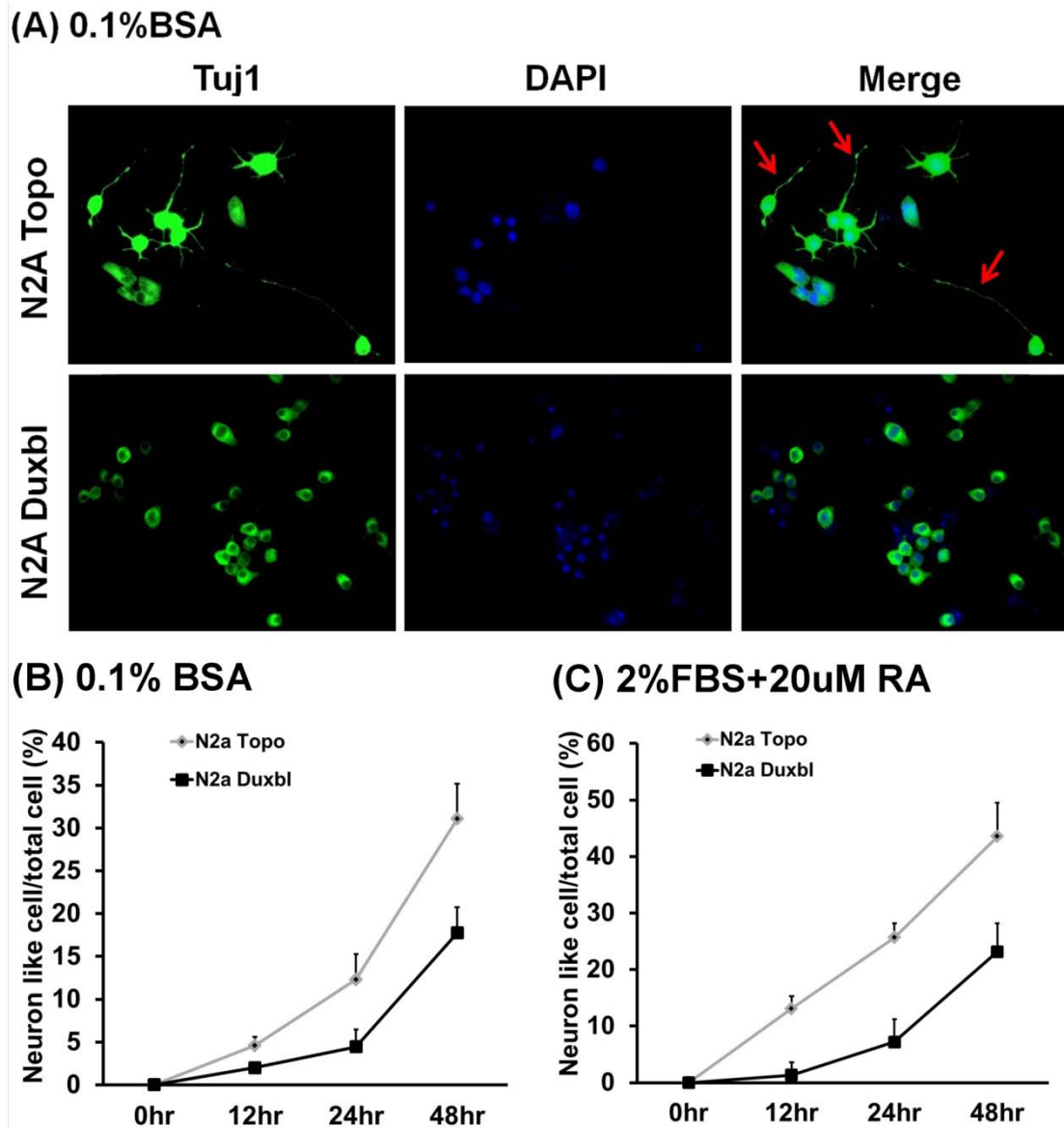


Fig. 9 A: 將 N2a stable clone 在 no serum(0.1% BSA)條件下培養 24hr，進行 IF 螢光染色透過 Tuj1 分析神經突觸的生長情形。B, C: 統計兩種分化條件下，N2a cell 的分化比例。(平均±SD, n=10, 英文字母間不共享為有顯著差異, P<0.05。)

過量表現 *Duxbl* 主要透過抑制 *ERK*、*AKT*、*CREB* 磷酸化來影響 N2a 細胞分化

我們發現過量表現 *Duxbl* 會抑制 N2a cell 神經突觸的生長，接著我們將分析 N2a 分化上的分子機制。誘導 N2a cell 進行分化時，在 24hr 小時內細胞可以形成突觸，同時也可以發現分化早期階段 p-ERK 1/2 和 pAKT 會大量表現，推測 ERK1/2 和 AKT 的表現對於 N2a 在無血清環境下進行分化是必需的 (Evangelopoulos et al., 2005)。因此，我們將 N2a stable clone 在 no serum(0.1% BSA)條件下培養 24hr 後，收取 total 蛋白分析 ERK 及 AKT 的磷酸化。

從 Fig. 10 可以知道，N2a cell 正常分化情況下，在分化 6hr 左右，ERK 及 AKT 磷酸化會顯著上升。然而過量表現 Duxbl 會抑制 ERK 及 AKT 磷酸化。接著，我們分析了 cAMP response element binding protein(CREB)的磷酸化。ERK 及 AKT 的活化會促使其下游基因 CREB 的磷酸化，而 CREB 的磷酸化會活化 target gene，例如:Tuji1，去促使神經突觸的產生。從 western 結果可以知道，N2a cell 正常分化情況下，在分化 6hr 及 24hr，CREB 磷酸化會顯著上升。然而過量表現 Duxbl 會抑制 CREB 磷酸化。

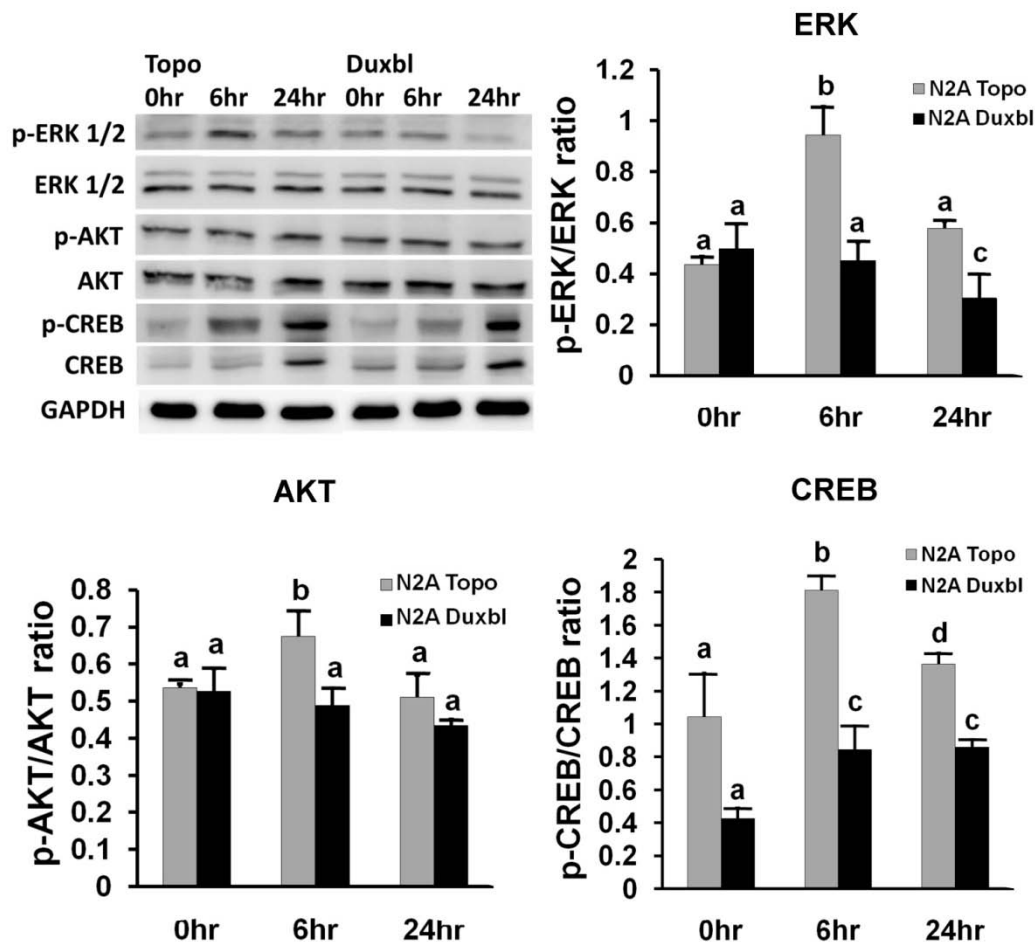


Fig.10 將 N2a stable clone 在 no serum(0.1% BSA)條件下培養 24hr，收取蛋白，透過 western blot 分析 ERK, AKT 以及 CREB 的磷酸化。(平均±SD, n=3, 英文字母間不共享為有顯著差異, P<0.05。)

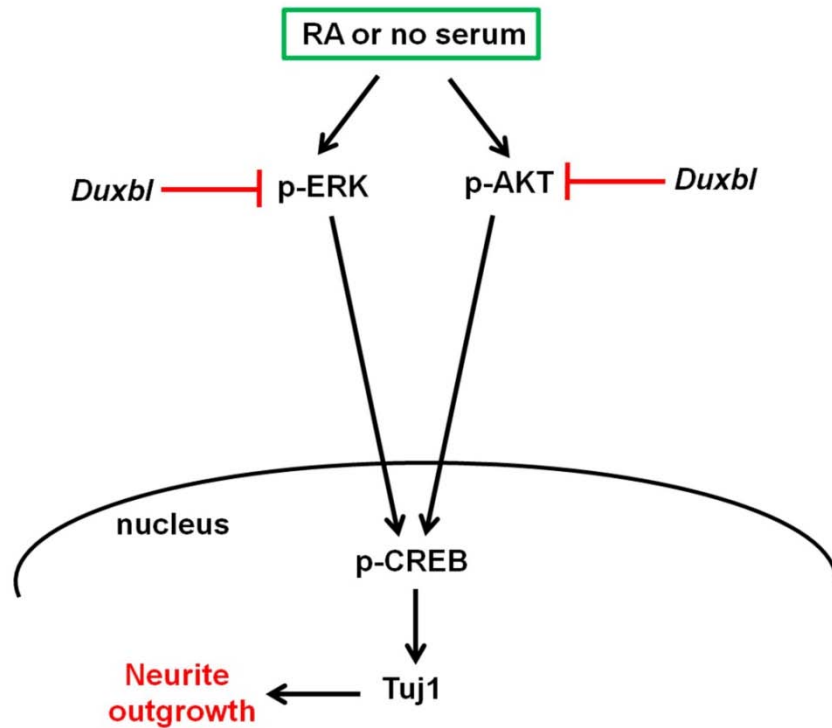


Fig. 11 整合前面結果，*Duxbl* 主要會透過抑制 ERK 和 AKT 信號途徑來減少 CREB 磷酸化使下游基因 *Tuj1* 表現下降，抑制神經突觸的生長。

(五) 討論

本次研究中我們發現，在 N2a 中 *Duxbl* 的表現會隨著分化時間而減少。我們以 shRNA 抑制 *Duxbl* 的表現時，N2a 的增生會受到抑制且促進其走向分化，同時我們也證明其抑制增生與細胞死亡無關。相反地，當我們過量表現 *Duxbl* 時，會促進 N2a 的增生。然而我們也發現，只有 *Duxbl*(L form) 會促進 N2a 細胞增生，其 isoform，*Duxbl*-s(S form) 則無法促進 N2a 增生。我們也透過 FACS(流式細胞儀) 分析發現，過量表現 *Duxbl* 促進 N2a 增生是透過促進 cell cycle G1 phase 進入 S phase。我們透過 real-time PCR 分析特定 cell cycle regulator 的表現發現，過量表現 *Duxbl* 會促使 *CyclinD1*, *D3*、*p21* 以及 *p27* 的表現增加，然而在 no serum(0.1% BSA) 條件下分化 24hr，過量表現 *Duxbl* 會使 *CyclinD1* 及 *p21* 下降幅度減少，並且抑制 *p27* 的表現。接著我們也透過 western blot 分析不同 *Cyclin* 蛋白的表現情形。在 GM 條件下，過量表現 *Duxbl* 會促使 *CyclinD1*, *D3*, *E1*, *A* 以及 *B1* 的表現增加，推測可能是由於 *Duxbl* 會使 *CyclinD1* 表現上升，加速 cell cycle 的進行，使得其他 *Cyclin* 蛋白表現跟著上升，促進整個 cell cycle 的循環。我們也發現 *Duxbl* 會透過活化 *Wnt5b* 使 glycogen synthase kinase-3 β (*GSK3- β*) 磷酸化，進而促使 β -catenin 進入細胞核中與 transcription factor 7-like 2 (*Tcf7l2*) 結合，促進下游基因 *CyclinD1*、*c-Myc* 及 *ITF2* 的表現來影響 N2a cell 的增生。最近我們透過 blast 分析 *Duxbl* 與 *ITF2*、*Pax6*、*Wnt5b* 之間的關係發現，*Duxbl* 分別會和 *ITF2*、*Pax6*、*Wnt5b* 的 promoter 高度結合，因此

推測 Duxbl 除了透過活化上游 Wnt5b 之外，可能可以直接與 ITF2 和 Pax6 結合直接活化下游基因的表現。我們之後將以 ChIP assay 分析 Duxbl 與 ITF2、Pax6 及 Wnt5b 之間是否有相互作用。以無血清或 retinoic acid(RA)可以誘導 N2a 細胞分化形成突觸，其主要透過活化 ERK1/2 及 AKT 訊號傳遞路徑，促使細胞核中 cAMP response element binding protein(CREB)磷酸化，進而影響分化基因的表現。我們發現過量表現 Duxbl，會透過抑制 ERK、AKT 以及 CREB 的磷酸化來抑制神經突觸的生長。總結所有發現，Duxbl 在 N2a 中會透過活化 β -catenin 路徑促進神經細胞的增生；並且透過抑制 ERK、AKT 以及 CREB 磷酸化來抑制神經突觸的生長。

(六)參考文獻

- Clapp JI, Mitchell LM, Bolland DJ, Fantes J, Corcoran AE, Scotting PJ, Armour JA, Hewitt JE., 2007. Evolutionary conservation of a coding function for D4Z4, the tandem DNA repeat mutated in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*, 81, 264-279.
- Dandapat AI, Hartweck LM, Bosnakovski D, Kyba M., 2013. Expression of the human FSHD-linked DUX4 gene induces neurogenesis during differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 22, 2440-2448.
- Evangelopoulos, M.E., Weis, J., Kruttgen, A., 2005. Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR. *Oncogene* 24, 3309-3318.
- Franc Llorens, Patricia Carulla, Ana Villa, Juan M. Torres, Puri Fortes, Isidre Ferrer, José A. del Rio., 2013. PrP(C) regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells. *J Neurochem*, 127, 124-138.
- Feng Zhi, Guangming Gong, Yan Xu, Yan Zhu, Die Hu, Yilin Yang, and Yiqiao Hu., 2012. Activated β -catenin Forces N2A Cell-derived Neurons Back to Tumor-like Neuroblasts and Positively Correlates with a Risk for Human Neuroblastoma. *International Journal of Biological Sciences*, 8(2): 289 - 297.
- Gehring WJ1, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wüthrich K., 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, 78, 211-223.
- Leidenroth AI, Hewitt JE., 2010. A family history of DUX4: phylogenetic analysis of DUXA, B, C and Duxbl reveals the ancestral DUX gene. *BMC Evol Biol*, 10:364.

- Mari Sepp, Kaja Kannike, Ave Eesmaa, Mari Urb, Tõnis Timmusk., 2011. Functional Diversity of Human Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor TCF4 Isoforms Generated by Alternative 59 Exon Usage and Splicing. *PLoS ONE*6(7):e22138.
- Tremblay RG1, Sikorska M, Sandhu JK, Lanthier P, Ribocco-Lutkiewicz M, Bani-Yaghoub M., 2013. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *J Neurosci Methods*, 186, 60-67.