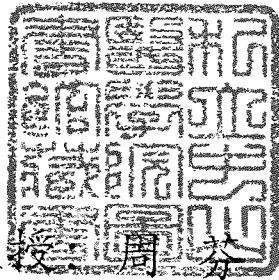


R
008.8
4444-4

中山醫學院生物化學研究所 碩士論文

藏紅酸阻斷癌細胞細胞訊息傳遞
作用之探討

Study of the effect of Crocetin on the
mitogenic signal of C6 glioma cell



指導教授 **周芬** 碧 博士

研究生：林華彬 撰

參考書恕不外借

中華民國八十六年八月

中山醫學院圖書館



C046160

授權書
(博碩士論文)

授權書所授權之論文為本人在中山醫學院生物化學研究所
組 85 學年度第 2 學期所撰碩士學位論文。

文名稱：藏紅酸阻斷癌細胞細胞訊息傳遞作用之探討

同意 本國家網路或
不具人網
有學科，本
同著委與製
意作員台發
財產科學
權之學術
論之技術
文資及路
提要中心
，授予得重
予國重製
家圖成得
館子資不
、本資地
人檔時
畢後與
業收錄
校於數
及該，以
行單位
政單以
院之

同意 本資微佰至
人料縮元
具中小之
不有組服
同著製務
意作得本
財產限研
權地究文
之域報因
論時涉再
文間、及
全與獎專
資數代等
料以表智
，授予博
予、博產
行光碩權
政碟士之
院重論申
國製文請
家後三，
科發檔請
學行資將
委，料本
員並等論
會得值全
科學該台
學享新文
技中幣延
術心伍後

同意 本業人
具學以
不有校各
同著圖種
意作書方
財產館法
權為製
之學，重
論術不
文研限
全之問
資目與
料的地
，授各，
予種方
教有部指
育方重製
部重以
指製一
定，份
送或為
繳為限
之圖述
上書館
及再
本授
人權

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行
利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

導教授姓名：周芬碧

究生簽名：林萃林 學號：R84205
(筆正楷)

期：民國 86 年 8 月 28 日

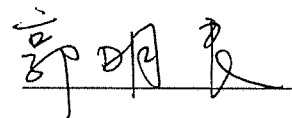
注：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

本論文為中山醫學院授予生化（理學）碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

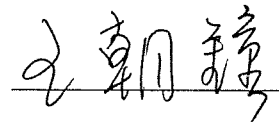
台灣大學醫學院毒理研究所副教授

郭明良 博士



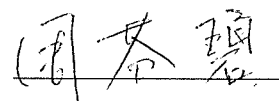
私立中山醫學院生物化學研究所教授兼所長

王朝鐘 博士



私立中山醫學院生物化學研究所副教授
(論文指導教授)

周芬碧 博士



中華民國八十六年七月

學生林華彬，論文題目為藏紅酸阻斷癌細胞細胞分裂訊息作用之探討，其論文已經中山醫學院生物化學研究所論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：

周芬碧 副教授

簽名：

周芬碧

中華民國八十六年八月

中文摘要

Crocetin(藏紅酸)是類胡蘿蔔素的衍生物，普遍存在於水果及蔬菜。過去發現Crocetin可以經由PKC的路徑抑制TPA的癌促進作用，並且抑制TPA誘導fos, jun RNA的表現。許多正常細胞其訊息傳遞蛋白表現不正常，而使細胞趨向癌化。利用C6老鼠腦腫瘤細胞，加入EGF來刺激其細胞生長，再以Crocetin處理細胞，觀察是否對細胞EGF訊息傳遞路徑蛋白產生影響，進而影響細胞週期的進行，而改變癌細胞的生長狀況。本實驗指出，在EGF的存在之下，高濃度Crocetin(>0.05mM)對於C6細胞的生長有較大的抑制作用。並且在同時10% FCS處理時，細胞的DNA合成也有稍微的抑制現象。但是，Crocetin對於EGF所誘發的細胞週期改變並無影響。此外，Crocetin對MAPK訊息傳遞路徑蛋白也不具有影響性。

Abstract

Crocetin is derivative of carotenoids. It exist in fruit and vegetables. Previous study revealed that crocetin can inhibit tumor promotion and the expression of fos and jun. When the proteins play roles in signal transduction in normal cells become abnormal, the normal cells will transform. To study whether crocetin can affect the signal transduction induced by EGF, We pretreated C6 glioma cell with EGF to stimulate cell to grow, then treating cell with crocetin. The results showed that high concentration crocetin(>0.05mM) had more inhibition in C6 cell growth. And when the C6 cell was treated with 10% FCS and crocetin, DNA synthesis was also inhibited. But crocetin didn't affect cell cycle induced by EGF. In addition, crocetin also didn't affect the protein of MAPK pathway.

第一章：緒論

一. 藏紅酸(Crocetin)的介紹:

中藥當中的梔子(*Gardenia jasminoids* Eills)是茜草科Rubiaceae植物的果實(附圖一)。果實所含的主要成份為 Carotenoids (Crocic acid, α -Crocetin)、Genipin 及其配醣體 Geniposide、Gentiobioside、Nonacosane、 β -Sitosterol、D-mannitol 等(1-4)。梔子在中藥的應用甚多，廣泛使用於黃蓮解毒湯、茵陳蒿湯、梔子乾羌湯、加味道遙散等約 47 劑(5, 6)。其性寒、味苦、入心肺，可達清熱解火，抗發炎之功效。另一方面，研究發現，梔子的萃取物可以降低 CCl₄ 所引起的急性肝損傷(7)。由水製品及乙醇提取物，經口投予在總膽管結紮的家兔中，發現對於血中及末梢淋巴中之 Bilirubin 上升具有抑制作用，而且提取物的劑量越大則效果越大且水製品作用大於乙醇提取物。但對於梔子藥理學上的作用仍不清楚。

梔子的主成分之一藏紅酸(Crocetin) (附圖二)，是類胡蘿蔔素的衍生物。類胡蘿蔔素是一種植物色素，普遍存在於水果及蔬菜(8)。在早期，藏紅酸廣泛應用於食用色素，添加於冰棒、飲料、酒、糖果當中。關於早期的研究，藏紅酸可抑制由乳突狀病毒感染所引起的雞腫瘤(9)，且另有研究顯示藏紅酸透過抑制 RNA Polymerase II 的活性來抑制多種惡性腫瘤細胞內的核酸及蛋白質的合成(10)。

本實驗室在藏紅酸的研究方面，以 B[a]P 為 Initiator，TPA 當 Promotor，塗抹在 CD-1 mice 的皮膚身上，結果發現，Ornithine Decarboxylase 活性增加，而且發現皮膚乳頭狀腫瘤的出現，且藏紅酸可以抑制 70-80% 的癌促進作用(11)。以老鼠肝細胞為研究模式，

發現藏紅酸會降低 Alfatoin B1 致癌物所誘導產生的致肝癌作用(12)，並有效的提高肝細胞中 GST 解毒酵素的活性，抑制 Alfatoin B1-DNA 加成物的形成(13, 14)。其對於肝臟受到氧化性的傷害亦具保護的作用(15)。至於在藏紅酸抑制促癌作用的分子機制方面，則以 TPA 為誘發因子，發現藏紅酸是經由 PKC 的路徑抑制 TPA 的癌促進作用，且會抑制 TPA 誘導 fos，jun RNA 的表現(16)。

二. 上皮細胞生長因子(Epidermal Growth Factor, EGF):

EGF 是一個從 Mouse 的 Submaxillary Gland 所純化出來的一個 6kD polypeptide (17,18,19)。已知道 EGF 可以刺激不同上皮以及表皮細胞生長，包括纖維母細胞株(Fibroblast)、 Glial cells、 Mammary epithelial cell、 Vascular & Corneal endothelial cells、 Bovine granulosa、 Rabbit chondrocytes、 HeLa 以及 SV40-3T3 cells (20)。EGF 所引起的細胞代謝作用包括有刺激 Ion fluxes (21)、 Glucose transport (22)、 Glycolysis (23)、以及 DNA、 RNA & 蛋白質之合成。

人類 EGF 最初是由尿液中所分離出的 Beta-Urogastrone，是一種胃酸分泌的抑制劑。老鼠(Mouse)以及人類兩者的 EGF 在 53 個胺基酸序列中有 70%的相似性(Homologous)，並且可以作用在同一 EGF receptor，這點引出 EGF 在不同物種間其生物作用的相似性(24-27)。

EGF 在結構上與人類的 Transforming Growth Factor-Alpha (TGF- α) 具有相似性，並經由 EGF receptor 產生作用(28)。人類 EGF 可以在許多體液中發現到，包括尿液、乳汁、唾液、汗液以及精液(29, 30)，並且在血小板的 α -顆粒中呈現高度濃縮的狀態(31)。

EGF 在生物學上的角色包括:

1. 抑制胃酸分泌。
2. 胚胎發育時期的生長及分化(32)。
3. 中樞神經系統(CNS)的調節(33)。
4. 刺激表皮的生長以及角質化作用(Keratinization) (19), 因此臨床上可以用基因工程方法產生的 Recombinant EGF 來加速傷口的癒合(34)。

三. 上皮細胞生長因子受體(EGFR):

EGF receptor 是一個 170kD 的 Glycoprotein。屬於 PTK (Protein Tyrosine Kinase) 家族中的一員(subfamily), 而且是最早被純化(35)並且 cloned(36)出來的 PTK receptor。

目前已經有 11 種不同類型的 PTKR 被分離及鑑定出來(附圖三): 分別為 1. EGF receptor、2. Insulin receptor、3. Platelet Drived Growth Factor (PDGF) receptor、4. Fibroblast Growth Factor (FGF) receptor、5. Neurotrophin receptor、6. Hepatocyte Growth Factor receptor、7. Vascular Endothelial Growth Factor receptor、8. Eph Like receptor、9. Axl/Ark/Ufo receptor、10. Tie receptor 以及 11. 其他: 例如 Ros、Ltk 以及 Ret 等。

EGFR subfamily 尚包含有 ErbB2/Neu、ErbB3 以及 ErbB4(37)。目前已知的其結構包含有兩個 Cysteine rich domain (細胞膜外)、Transmembrane domain、以及一個 PTK domain (細胞膜內)。可以與 EGFR 結合的蛋白質有 Epidermal Growth Factor (EGF)、Transforming Growth Factor-Alpha (TGF- α)、Neu differentiation

factor (Heregulin)以及 amphiregulin 等具有與 EGF 相似 domain 的 ligands 。而這些 Ligand 中的數個可以誘發 EGFR 形成 homo- & hetero-dimeric receptor complex (38) 。Ligands 會引發 PTK receptor dimerization 以及 oligomerization 而導致 receptor 活化(39) 。其機制是利用 receptor 在細胞質並排的 PTK domain 部份相互磷酸化。而此 autophosphorylation 的作用在訊號傳遞(Signal Transduction)中扮演相當重要的角色，它可以提供結合位置給具有 Src Homology (SH2) domain 或是具有 phosphotyrosine binding (PTB) domain 的訊息傳遞蛋白。而這種結合動作會啟動活化數個細胞內訊息傳遞路徑。

四. MAP Kinase Cascade:

EGF 在 binding 至 EGFR 之後，要如何將這個訊息傳遞至細胞內，以發揮其作用? 目前已知比較重要的為 MAP Kinase pathway 。

在總和果蠅(Drosophila)以及酵母菌(Caenorhabditis)的基因研究實驗後，目前歸納出一個從 RTK (Receptor Tyrosine Kinase)所沿伸出來的訊息調控路徑。這個路徑已知包含 Ras small GTPase (H. N. K.-Ras) 以及會活化 Ras 進入 GTP-bound 狀態的調控蛋白: GRB2/SEM5/DRK , Shc 以及 Ras exchange factor: Sos1 & Sos2 。而後連接一連串的 protein kinase cascade ; 其中包含 Raf (serine kinase) (40, 41) , MEKs (dual specificity protein kinase) (42)以及 ERKs (serine/threonine kinase) (附圖四)。

其間的過程為: 在受體互相耦合及磷酸化之後，具有 SH2 domain 的調節蛋白 (SHC & GRB2) 會與受體 PTK domain 上的 phosphotyrosine 結合。SHC 會被受體上的 PTK domain 所磷酸化，提

供 phospho-tyrosine 再與 GRB2 的 SH2 domain 結合，而 GRB2 則利用其兩個 SH3 domain 與 Sos guanine nucleotide exchange factor 結合，造成 Sos 活化 Ras，使 Ras 由 GDP 轉換成 GTP-bound 的狀態。Raf (Protein-serine/threonine kinase, MAPKKK) 是 Ras 的一個重要的受質，活化的 Ras (GTP-bound) 以自身的 effector domain 與 Raf 的 amino-terminal regulation domain 結合形成複合體(43)，而活化 Raf 的 kinase domain 使其對 MAPKK 進行磷酸化作用。當 MEKs (MAPKK) 的 serine 被 Raf kinase domain 所磷酸化之後，MEKs 的 Threonine/Tyrosine kinase 的活性便會開啟，並將 ERKs (MAPK) 的 Threonine、tyrosine 接上磷酸根而活化 MAPK (例如: ERK2 的 threonine-183 & tyrosine-185)。而活化的 MAPK 其 Serine/threonine kinase 直接對轉錄因子或是另一個蛋白: RSK 進行磷酸化而傳遞訊息 (附圖五)。

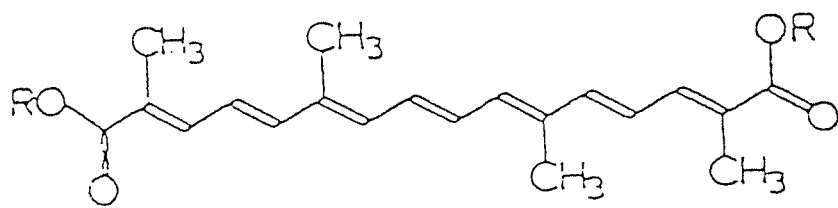
最後，MAPK pathway 會將訊息傳遞至細胞核中(44)，將細胞核中的 transcription factor 磷酸化；例如: JNKs 及 ERKs 磷酸化 Elk-1 (45,46)、JNKs 磷酸化 Jun (47,48)、以及 JNKs 及 p38 會磷酸化 ATF-2 (49-51) 等轉錄因子，進而促進某些生長或分化相關基因的活化轉錄以及蛋白質的產生。因此，MAPK cascades 提供了一個由細胞膜上面的訊息影響細胞核基因轉錄的連接。此外，根據研究(52)，在不同的細胞種類、以及同種細胞不同環境下、和 receptor 種類及量的不同，其 MAPK cascades 所產生的結果會有所不同。

第二章：研究動機

癌症的發生其主要的因素是宿主體內的正常細胞失去原來該有的生長調控。而細胞生長及分化的調控是由許多的蛋白所控制，其中生長因子的訊息傳遞便是其中一項。當細胞的受體基因不正常表現、或是正常表現但卻不正常活化，以及訊息傳遞蛋白不正常表現及功能不正常，都有可能使正常細胞失去調節而趨向癌化。本實驗室希望利用天然植物之萃取物來觀察是否對已經癌化的細胞其 EGF 生長因子所調控之訊息傳遞路徑有影響，進而研究其機制。並可評估其在癌症藥物治療(Chemotherapy)之可行性。

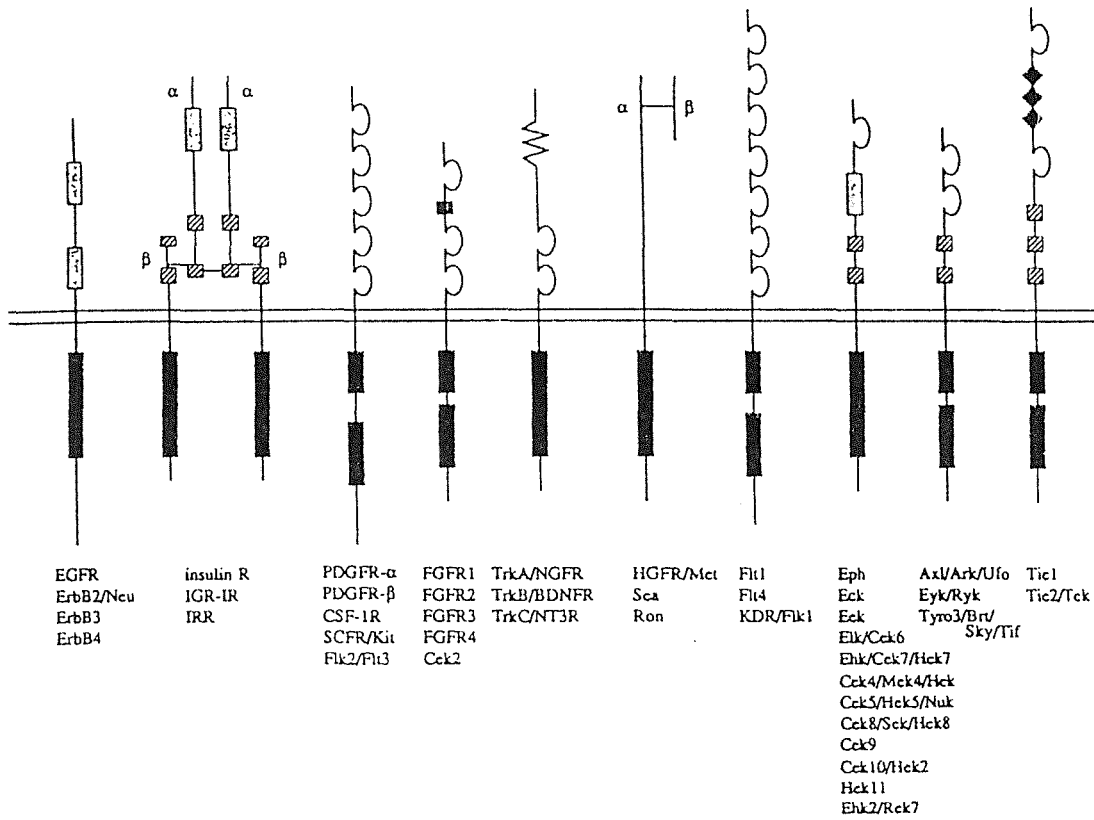
所以，我們利用 C6 這個老鼠腦腫瘤細胞，加入 EGF 來刺激其細胞生長，再以梔子果實萃取物 Crocetin 處理細胞，觀察是否對細胞的訊息傳遞路徑的蛋白產生影響，進而影響細胞週期的進行，而改變癌細胞的生長狀況。

附圖一：梔子(*Gardenia Jasminoides* Ellis 之果實)

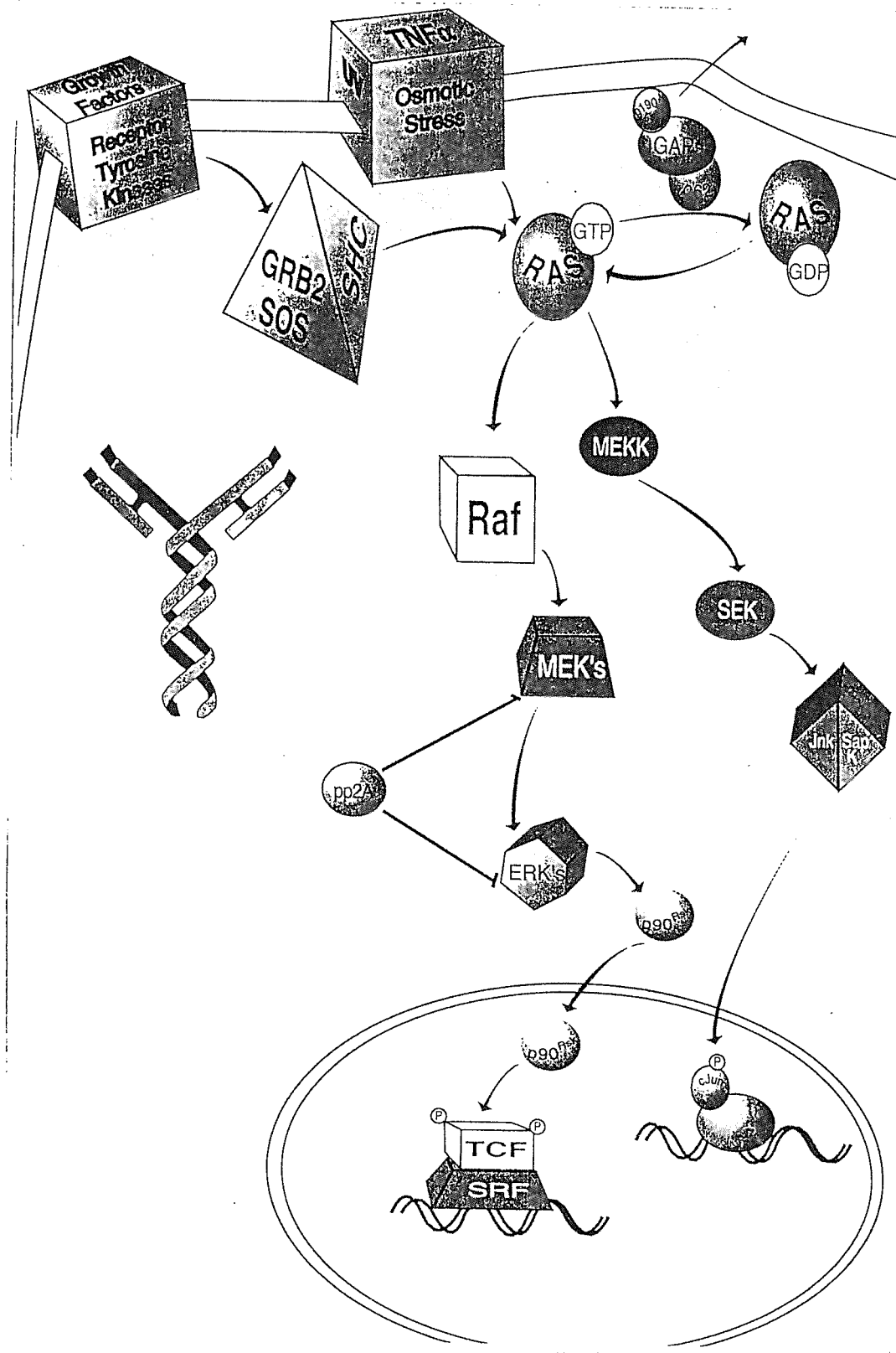


Crocetin R = H (CCT)

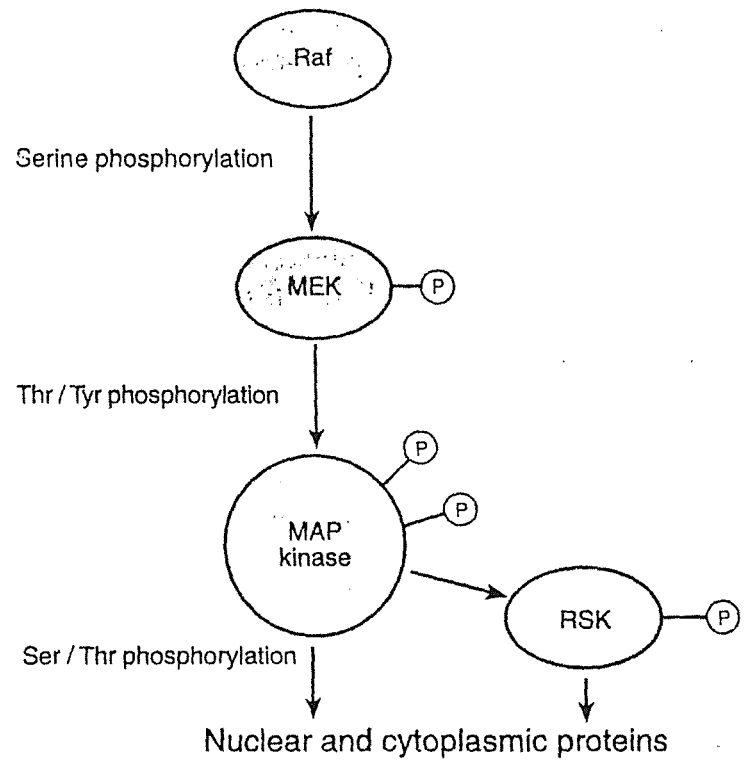
附圖二: Crocetin 之結構式



附圖三：目前已知 PTKR 的分類及其成員，



附圖四：訊息傳遞路徑之簡圖。



附圖五: MAPK 路徑之簡圖。

第三章：實驗材料及方法

壹. 實驗材料

一. 常用緩衝溶液及培養液之配製:

1. Phosphate buffer saline (PBS):

NaCl	20 g
KCl	0.5 g
Na ₂ HPO ₄	3.6 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g

先加入 2000 ml 的去離子水，調整 pH 值至 7.4，再加去離子水至 2500 ml。

2. Minimal essential medium (MEM):

取出可以配製 1 公升的 MEM 粉末 (Gibco)，加入 2.2 g Na₂HCO₃，先溶解於小於 800 ml 的去離子水中，調整 pH 值至 7.25。再補充去離子水至 800 ml，過濾滅菌後使用。依照實驗的需要加入 0.5% FCS (Fetal Bovine Serum，胎牛血清，Gibco) 或者是 10% FCS MEM。

3. Epidermal Growth Factor (EGF): 依照實驗所需的濃度，將 EGF 粉末溶解在 0.2% BSA 溶液。

二. 常用儀器:

1. 倒立式顯微鏡: NIKON Diaphot 300
2. 細胞培養箱: NAPCO Model 6100
3. 無菌操作台: 海天 Laminar Flow
4. 乾浴槽: Termolyne Type 17600 Dri-Bath
5. 光譜儀: Hitachi Spectiphotometer U-3210
6. 組織均質機: EYELA MAZELA Z
7. 震盪水浴槽: TIHDERN Water Bath, Model BT-15
8. 超音波洗淨機: Branson 8200
9. 加熱攪拌器: Corning Stirrer/Hot Plate
10. 烘箱: Memmert
11. 離心機: Beckman CS-15R Centrifuge
12. 微量離心機: Eppendorf centrifuge 5415 C
13. 蛋白質電泳槽: Hoefer, Mighty Small II SE250
14. 電源供應器: Bio-Rad Model 200/2.0
15. pH meter: JENCO Model 6200
16. 閃爍計數儀: PACKARD, Tri-AARB 2100TR
17. X 光感光軟片: Kodak X-OMAT
18. -70 °C 冰箱: SANYO Ultra Low
19. 硝化纖維紙: MSI PVDF-Plus
20. Flowcytometer: Becton Diskinson FACScan
21. 水平振盪器: Orbital Shaker OS701
22. 電泳轉印槽(Electrotransfer Tank): Hoefer TE22
23. 共軛焦雷射掃描顯微鏡: Zeiss LSM 410

貳. 實驗方法:

A. 細胞培養

C6 老鼠神經膠腫瘤細胞株是以 N-nitrosomethylurea 來誘發大白鼠產生大腦腫瘤所得(53)。培養於 10% FCS-MEM (Minimal essential medium)的 25 cm² 培養瓶中(培養液中含有 100 units/ml penicillin 和 100 µg/ml streptomycin)。培養瓶放置在 37 °C、濕度 9.8%以及含 5% 二氧化碳的培養箱中。在細胞長滿後，抽乾培養基，以 PBS 清洗兩次後加入 1 ml 0.05% Trypsin/0.04% EDTA，置入 37 °C 培養箱中作用 10 分鐘之後，取出並輕拍打使細胞分開，再加入 5 ml MEM 將細胞均勻沖散後離心(2000 rpm、5 分鐘)，移除上清液(含 Trypsin)，再加入培養液均勻打散已沈澱細胞。依實驗需求均勻分配至不同大小的培養皿或培養瓶中培養。

B. 細胞毒性測定:

試劑:

- a. MTT dye (5 mg/ml in PBS) ([3-[4,5-Dimethylthiazol-2-γ 1]-2,5-diphenyltetrazolium bromide]; MTT)
- b. DMSO

方法:

根據 Michael, C. A. 的研究得知(54,55)，活細胞會將 Trtrazolium 代謝成藍紫色的結晶，而此藍紫色結晶可以溶解於異丙醇中，並可以在 563nm 波長偵測到最大吸光值。依此，我們可以以吸光值來得知

活細胞數目。

種植 5×10^4 /well 個細胞至 12 well-plate 中，於 10% FCS-MEM 培養 24 小時，再換成 0.5% FCS-MEM starvation 24 小時。依照實驗的需求加入不同濃度的 crocetin 以及 30 nM EGF 溶液，並以 0.02% DMSO 當控制組。繼續培養 18-24 小時後，吸乾培養液，以 PBS 清洗兩次。換上 2 ml 新鮮培養液，再加入 20 μ l tetrazolium 培養四小時後，移除培養液，加入 2 ml isopropanol，以 pipetiman 來回打散均勻，直接吸取 1 ml 至 cuvette 中，以 563nm 波長偵測其吸光值。

C. DNA 合成的偵測(Thymidine incorporation):

種植 1×10^4 cells/well 至 96 well-plate (Nunc)，以 10% FCS-MEM 培養 24 小時後，換上 0.5% FCS 培養液 starvation 培養 24 小時，依照實驗需要加入不同濃度 crocetin 以及 30 nM EGF 處理，在不同時間收集細胞。每個 well 內含有 200 μ l 培養液以及 10 μ l、0.1 μ Ci/mmmol 的 Methyl-3H-Thymidine (ICN，specificity 6.7 Ci/mmol)。移除放射性培養液，並以 PBS 清洗兩次，以終止細胞繼續攝入放射性物質，加入 5% TCA 200 μ l，4 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘。再以 5% TCA 清洗三次，然後加入 200 μ l lysis buffer，將細胞溶解，吸取 100 μ l cell lysate 到閃爍計數瓶中(counting vial)，並加入閃爍計數液(scintillating fluid，Aquisol-2，Du Pont)，用 Aloka 閃爍計數儀 LSC-900 計數放射線活性。測定 3H-Thymidine 併入細胞中的量即代表 DNA 的合成。此法乃採用 West, D. C.(56)等人所提出的 fluorometric method 測定 DNA 合成。

D. 西方墨點(Western Blot):

1. 細胞溶解物(Cell Lysate)的萃取
2. 蛋白質定量以及 Loading 前處理
3. 蛋白質電泳(SDS PAGE)
4. 蛋白質樣本轉漬(Electrotransfer)
5. 免疫墨點(ImmunoBlot)

1. C6 細胞溶解物的萃取(Cell lysate preparation):

試劑:

Solution A:

方法:

將細胞培養在 100 mm 培養皿 8-9 分滿，抽掉培養液，用 PBS 清洗兩次。吸乾 PBS，加入 300 μ l solution A，用 scraper 刮取細胞至均質管中(2 ml 容量)，上下研磨 20 次，之後吸取已均質化的細胞溶解物至 eppendorff tube，保存至 -70 $^{\circ}$ C 冰箱待用。以上各步驟均需在冰上操作。

2. 蛋白質的定量:

蛋白質定量的原理乃是利用蛋白質可以與 Commassie Brilliant blue G-250 形成藍色的複合物質，而這個藍色的複合物在波長 595nm 會有一個較大的吸光值。利用此原理，我們可以拿來當作蛋白質的定量。

偵測的方法如下：首先製備以 BSA (Bovine Serum Albumin) 為標準

液的蛋白質溶液，以換算各個樣本 cell lysate 的蛋白質濃度。取 10 μ l 之 C6 cell lysate，加入蛋白質定量試劑組(Protein assay dye，BioRad) 2.5 ml，在室溫反應 5 分鐘之後，用 595 nm 波長偵測吸光值。

3. 蛋白質 loading 前處理:

試劑:

Protein Loading Buffer:

1.0 ml	0.5 M Tris-HCl，pH6.8
1.6 ml	glycerol (10% w/v)
1.6 ml	10% SDS
0.4 ml	β -mercaptoethanol
0.4 ml	0.5% bromophenol blue (in d_2H_2O)
3.0 ml	Distilled water

方法:

取 80 μ g cell lysate，加入等體積的 loading buffer，於 100 $^{\circ}$ C Dri-Bath 機器上加熱五分鐘使蛋白質變性，之後迅速放回冰上五分鐘，再經過 Microcentrifuge 低速離心將凝集的水蒸氣 spin down，混合均勻後，置回冰上，等待 loading。此製備的樣本可以 loading 四次，每次 20 μ g。

4. 蛋白質電泳(SDS PAGE):

器材:

a. 蛋白質電泳槽: Hoefer，Mighty Small II SE250

b. 電源供應器: Bio-Rad Model 200/2.0

試劑:

a. 7.5% Separating Gel:

2.502 ml	Acrylamide/bis (30%/0.8%)
4.858 ml	去離子水
1.25 ml	1.5M Tris-HCl pH 8.8
100 μ l	10% SDS
100 μ l	10% Ammonium persulfate
4.5 μ l	TEMED

b. 4.0% Stacking Gel:

0.78 ml	Acrylamide/bis (30%/0.8%)
3.66 ml	去離子水
1.5 ml	0.5 M Tris-HCl pH6.8
60 μ l	10% SDS
60 μ l	10% Ammonium persulfate
6 μ l	TEMED 0.1%

c. Coomassie Blue

1.0 g	Coomassie Blue G-250
100 ml	acetic acid
400 ml	Methanol

加 distilled water 至 1000 ml，待 coomassie blue 完全溶解後，再過濾後即可以使用。

d. 脫色液:

75 ml	acetic acid
100 ml	Methanol

加 distilled water 至 1000 ml 。

e. 1x Electrode Running Buffer:

7.59 g	Glycine
1.59 g	Tris-base
0.53 g	SDS
去離子水	500 ml

方法:

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) 電泳分析方法，主要是參照 Laemmli 在 1970 年所建立的模式。使用 7.5 x 10 cm 大小的電泳片進行蛋白質電泳，Stacking gel 濃度為 4%，Seperating gel 濃度為 10%。其作法先將電泳片洗淨、烘乾、擦乾淨之後，用 spacer 將兩片玻片間隔開，先製備 7.5% 的下層膠(sperating gel)，成份如上所述，混合均勻後迅速倒入電泳片中，每片約 3.5 ml，再加入去離子水覆蓋液面。等膠體凝固之後，除去上層的去離子水。繼續製備上層膠體(stacking gel)，成份如上所述，混合均勻後倒入電泳片中，將電泳齒梳(Comb)插入上層膠體中，若有氣泡，需設法將氣泡移除。待上層膠體凝固之後，拔掉齒梳，用去離子水清洗 well 數次，則可以 loading sample 。

將已經定量的蛋白質樣本，用 Tip 取 20 μ g，小心的加到每個 well 中，並加 protein standard marker (Bio-Rad，High-MW，Prestained marker) 5 μ l 至其中的一個 well 中，用塑膠滴管取 1x 的 SDS electrode buffer 小心的將每個 well 填滿，過程中盡量避免樣本被激出，並將上下電泳槽各加入 1x 的 SDS electrode buffer 至電導線被蓋過為止。

將電源供應器與電泳槽相連，打開電源。上層膠以 110V 電壓跑約 15 分鐘，直到染色線跑至 stacking gel 與 seperating gel 的交界處。再調整電壓至 130V，直到染色線跑至 seperating gel 底部時，才停止電泳。

電泳完畢之後，取出膠體，用 spacer 切除上層的 stacking gel，下層膠則切取 52 kD 以下的部份，其餘則以 coomassie blue 染色，再以脫色液脫色，觀察 loading protein 的量是否一致。

5. 蛋白質樣本的轉漬(Electrotransfer):

器材:

電泳轉印槽(Electrotransfer Tank): Hoefer TE22

電源供應器: Bio-Rad，Model 200/2.0

PVDF membrane: MSI PVDF-Plus

試劑:

Electrotransfer buffer:

2.43 g Tris-base

11.25 g Glycine

200 ml MeOH (甲醇)

去離子水加至 1000 ml。

方法:

裁剪適當大小的 PVDF membrane，以及 4 張 3MM 濾紙，以及欲轉漬的膠體置入 electrotransfer buffer 浸潤 30 分鐘、4 °C。然後於海

棉網上先放置兩張濾紙，濾紙上再放置 PVDF membrane，其上再放置要轉漬的膠體，在膠體上面再放置兩張濾紙，最後再蓋上另外一張海棉網。注意以上各步驟其各層間不得有氣泡存在，如有必須設法趕走。將轉漬夾蓋上並夾緊，置入轉漬槽中以 100V 電壓轉印 3 小時。

6. 免疫墨點(Immunoblot):

試劑:

a. PBS-T: PBS-0.1% Tween20 (wash buffer)

NaCl	20 g
KCl	0.5 g
Na ₂ HPO ₄	3.6 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g

先加入 2000 ml 的去離子水，調整 PH 值至 7.4，再加去離子水至 2500 ml，之後再加入 2.5 ml 的 Tween 20。

b. Blocking Solution: 2.5 g 安佳脫脂奶粉/50 μl Tween 20，50 ml PBS

c. ECL Kit (Amersham)

d. Primary Antibody: 將各個 first Ab (Transduction Laboratories)依照 product sheet 以 PBS-T 稀釋其濃度，分別是:

Phosphotyrosine-PY54:	1:1000
MEK-1:	1:1000
ERK-1:	1:5000
ERK-2:	1:5000

e. Secondary Antibody: 統一使用 Peroxidase conjugated Rat Anti-Mouse Ab，同樣使用 PBS-T 稀釋其濃度至 1:10000。

方法:

將轉漬完成的 PVDF membrane 從轉漬夾中取出，放至 Blocking solution 中處理一小時(室溫)，再用 PBS-T 清洗三次、每次五分鐘、100 rpm，然後將 PVDF membrane 封裝至塑膠套中，加入 Primary Ab 處理一小時，再以 PBS-T 清洗五次(15 分鐘一次、5 分鐘四次、125rpm)，再將 membrane 封裝入塑膠套中，加入 Secondary Ab 處理一個小時，之後再以 PBS-T 清洗五次 15 分鐘一次、5 分鐘四次、125 rpm)，最後將 PVDF membrane 置入透明度高的塑膠套中，擠乾剩餘的 PBS-T，再加入 ECL substrate(1:1 混合)，慢慢蓋上塑膠膜以形成一層水膜以進行反應，待 1 分鐘後，再擠乾膠套中的多餘的 substrate，將膠套放置至 Cassette 中，以 X-ray film 顯影即可。一般而言，壓片 3-6 分鐘即可顯影。

E. 細胞週期分析(Cell-cycle analysis):

儀器:

離心機: Himac CR5B2

流式細胞測定儀(Flow cytometer): B. D. FACScan

試劑:

- a. 1x PBS
- b. 0.5% Triton-X 100 in 1x PBS
- c. 0.05% RNase A
- d. 80% Ethanol-PBS
- e. 50 µg/ml Propidium Iodide (in 1x PBS)

方法:

種植 $3-5 \times 10^5$ cells 至培養皿中，依實驗需要與不同藥物，以及不同的時間，用 Trypsin-EDTA 將細胞打下，並以離心機離心將細胞收下，以 PBS 清洗兩次，再以 80% Ethanol 固定，均勻打散細胞，置於 -70°C 冰箱待用。

將樣本從冰箱中取出，用離心機離心並除去 80% Ethanol，以 PBS 清洗二次，然後各樣本加入 $400\ \mu\text{l}$ 0.5% Triton-X 100 (in 1x PBS)，以及 RNase A $3\ \mu\text{l}$ (final 0.05%)，水浴 37°C 反應 30 分鐘，然後加入 $400\ \mu\text{l}$ $50\ \mu\text{g/ml}$ Propidium Iodide (in 1x PBS，final $25\ \mu\text{g/ml}$)，用 B.D. FACScan 分析。並依實驗目的計算 G0/G1、S、M phase 所佔的細胞比例。

F. 細胞內鈣離子釋放的觀察:

儀器:

共軛焦雷射掃描顯微鏡

方法:

種 10^4 個細胞於 35mm 的培養皿中，以 0.5% FCS MEM 預先進行 Serum Starvation 24 小時，將螢光劑 Fluo-3 $50\ \mu\text{g}$ 溶解於 $25\ \mu\text{l}$ DMSO 中，並與等體積的 25% Pluronic acid 混合均勻，取 $2\ \mu\text{l}$ 加入 $0.5\ \text{ml}$ 的 MEM 中，置換細胞之培養基，在 37°C 、5% CO_2 培養箱中培養 30 至 50 分鐘，在以填充過氧氣的等張溶液清洗三次，最後以 $1\ \text{ml}$ 該溶液覆蓋細胞，即可進行實驗。

將培養盤固定於共軛焦顯微鏡載物台，先在可見光下調整對焦焦距以及適當的視野，然後將光源系統轉換至雷射光波，波長 488nm 的條件，並且設定光源每十秒鐘掃描一次並連續觀測 150 秒，將結果顯示於螢光幕上。待一切條件完成後，加入 EGF，觀察其結果。

第四章：實驗結果

一. 細胞毒性:

以不同濃度的 Crocetin(DMSO , 0.1 、 0.05 、 0.02 、 0.01 、 0.005mM)處理細胞 18 個小時之後，再以 MTT assay 來測量細胞毒性。以 563nm 波長測定其吸光值，以各組 DMSO 為控制組，其餘加藥者與之比較，結果發現 Crocetin 濃度在 0.05mM 與 0.1mM 時，細胞存活率在添加 EGF 組分別下降 41.08%、 52.56%，不加 EGF 組下降 30.49%、 41.72%，在 10% FCS 組，則是分別下降 21.14%、 27.90%。很明顯 C6 細胞在添加 EGF 之後，Crocetin 對細胞的影響更大在 0.1mM 以及 0.05mM，加入 EGF 處理下降程度較不處理 EGF 多。在 DMSO 控制組，可以發現三組不同處理 (10%FCS 、 0.5% FCS 、 0.5% FCS+EGF 30nM)的細胞，其細胞的存活率分別是 10% FCS > 0.5% FCS+EGF > 0.5% FCS，因此，我們推論 EGF 對於 C6 細胞確實會有生長作用(Fig 1 、附表 1)。

二. 對 DNA 合成的影響:

在 10% FCS 的情況下，將 C6 細胞處理不同濃度 Crocetin(0.02 、 0.05 、 0.1mM)以及 1 、 2 、 3 、 6 、 9 、 12 、 24 、 48 小時。發現在 0-12 小時，DNA 合成有稍微受到 Crocetin 抑制的現象，但在 12-24 小時就無此現象，而在 24-48 小時達最大的 DNA 抑制

比例(Fig 2)。

三. 對細胞週期的影響:

以不同濃度 Crocetin 處理 C6 細胞不同時間, 然後收集以酒精固定的細胞, 以 FACScan 來分析其細胞週期的比例。在 Fig 3A(G1 phase)、3B(S phase)、3C(M phase)以及 Fig4A(G1 phase)、4B(S phase)、4C(M phase)中, 我們發現: C6 細胞在處理 0.5% FCS 加上 EGF 30nM 這組, 在 0-3 小時之間, 其 G1 phase 呈現上升後再下降的趨勢相對再 M phase 呈現先下降再上升的趨勢, 但是在其他加藥處理 Crocetin 的 C6 細並沒有這個現象。不論在 10% FCS 或是 0.5% EGF 30nM 的情況下, Crocetin 對於細胞週期並沒有產生顯著的影響。

四. 對 MAPK pathway 蛋白質的影響:

1. Phosphotyrosine:

磷酸化的 Tyrosine 目前已知跟細胞的訊息傳遞有關, 包括 EGF receptor 的 autophosphorylation 也與此相關。因此, 了解 Tyrosine 被磷酸化的情形來得知訊息傳遞是否可以被 Crocetin 阻斷。實驗使用 0.05mM Crocetin 處理 C6 細胞 10、20、30 分鐘以及 1、2、3 小時後。結果發現 C6 細胞 phosphotyrosine 的量以及 fraction 並沒有受到 Crocetin 的影響。

2. MEK-1(MAPKK):

MEKs 屬於 MAPK pathway 的上游分子, 可以被 Raf 所活化。因

此，我們檢視 MEK-1 的表現量是否會受到 Crocetin 影響。實驗使用 0.05mM Crocetin 處理 EGF(30nM) C6 細胞 10、20、30 分鐘以及 1、2、3 小時後。結果，MEK-1 的表現並沒有受到影響。

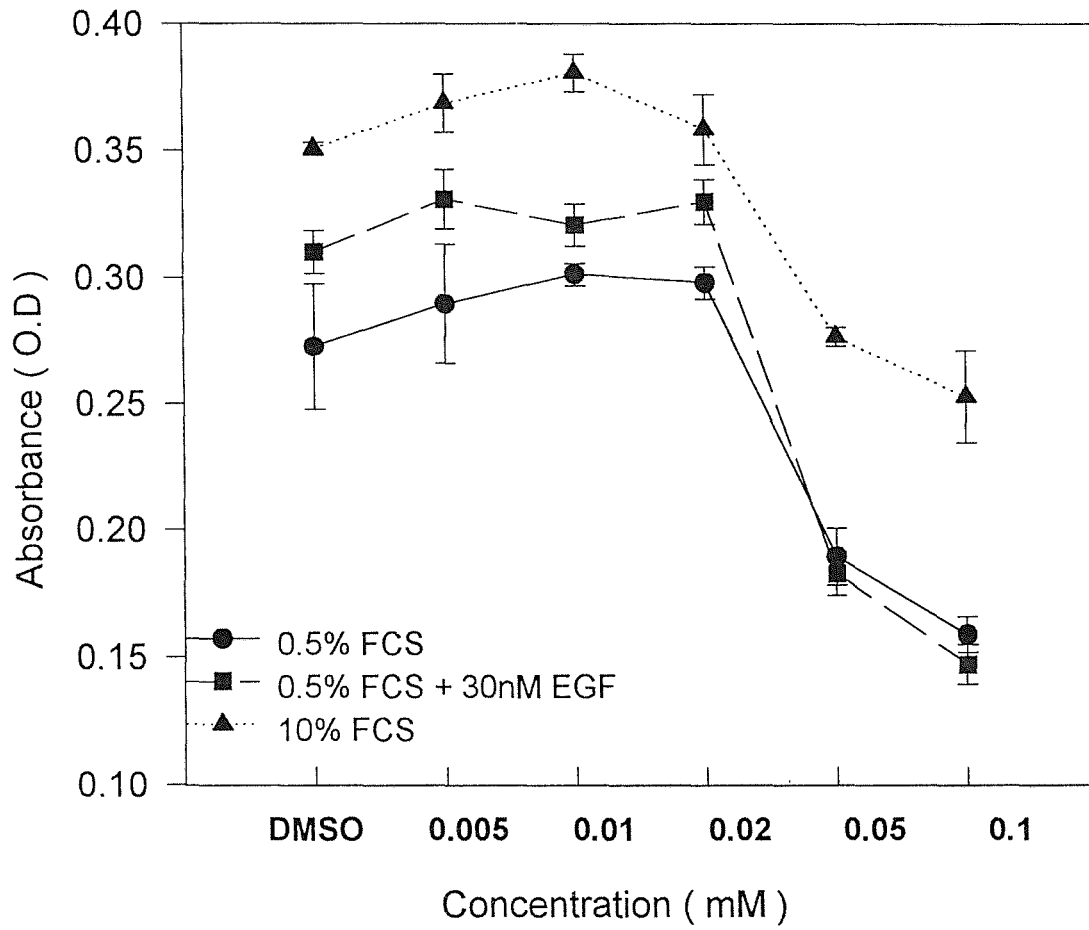
3. ERK-1 以及 ERK-2(MAPK):

ERKs 可以被 MAPKK(MEK-1)所磷酸化，因此，我們也檢視了是否 ERKs 的表現量在處理 Crocetin 之後有無改變？實驗使用 0.05mM Crocetin 處理 EGF(30nM) C6 細胞 10、20、30 分鐘以及 1、2、3 小時後。結果發現 ERK-1 及 ERK-2 的表現量隨著時間的增長而稍微減少。

五. 鈣離子的釋放:

利用共軛焦雷射顯微鏡加上螢光染劑，可以用來觀察鈣離子的移動情形，例如從內質網(ER)釋放出來鈣離子。目前已知 RTK 會活化 PLC γ 然後再活化 PIP2，PIP2 可以分解成 DAG 以及 IP3，而 IP3 會導致鈣離子的移動進而與鈣離子調節蛋白結合調控其他的細胞功能。

將細胞實驗前預先使用 0.5% Starvation Medium 處理細胞 24 小時後，再加入 EGF 觀察是否 EGF 刺激 C6 細胞活化 PLC 路徑？結果發現 EGF 加入細胞 medium 並不會刺激鈣離子的釋放。



圖一: Crocetin 對 C6 glioma cell 的毒性分析, 種植 4×10^4 個細胞至 12-well 的培養盤, 依不同濃度 Crocetin 處理 18 小時, 再以 MTT 方法偵測存活的細胞數

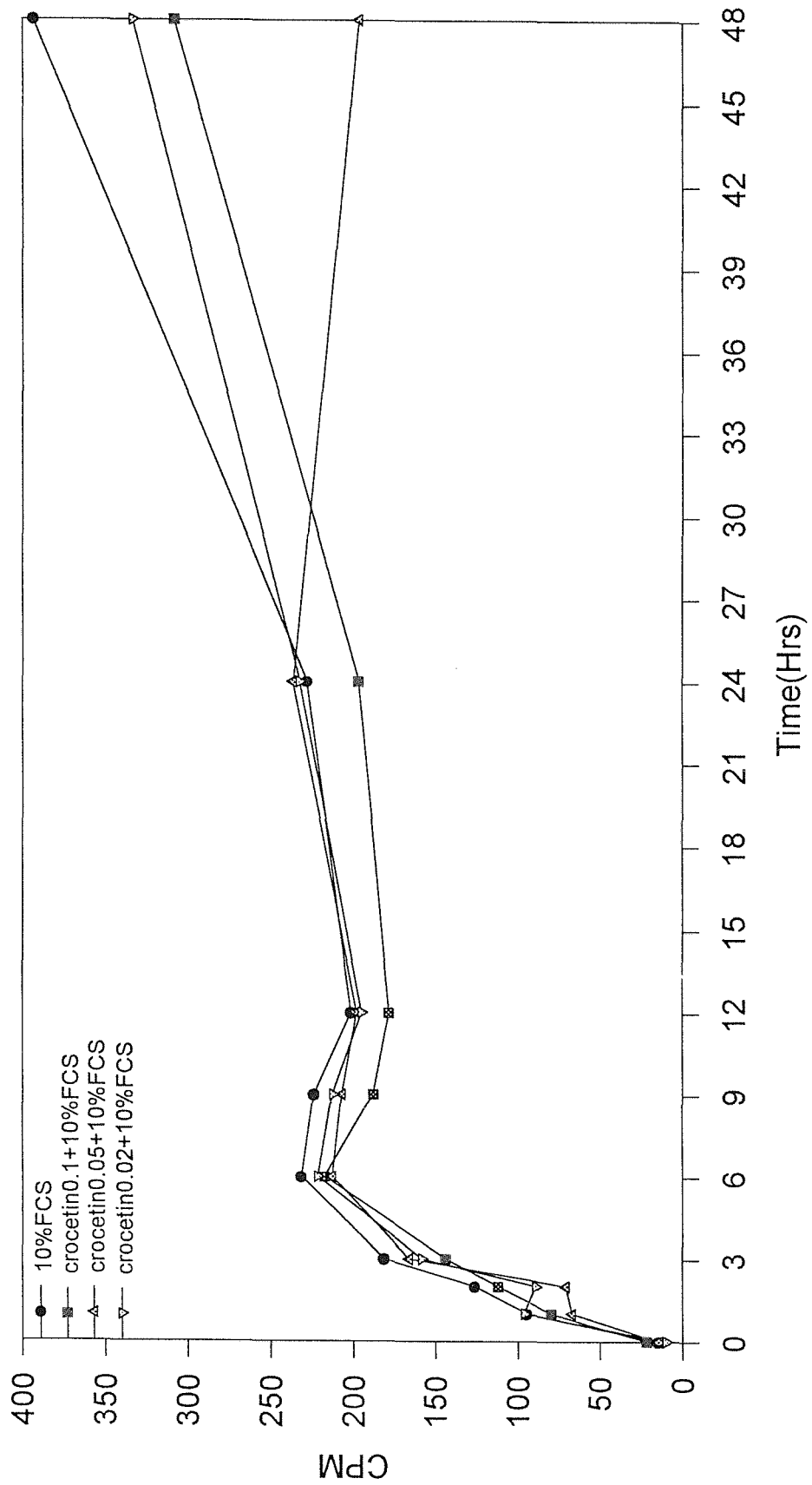


Fig 2: Crocetin 對 C6 細胞 $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation 的影響。將細胞分別處理 10% FCS 以及不同濃度 Crocetin(0.02、0.05、0.1mM)培養 1-48 小時，收集 cell lysate 後測量放射量。

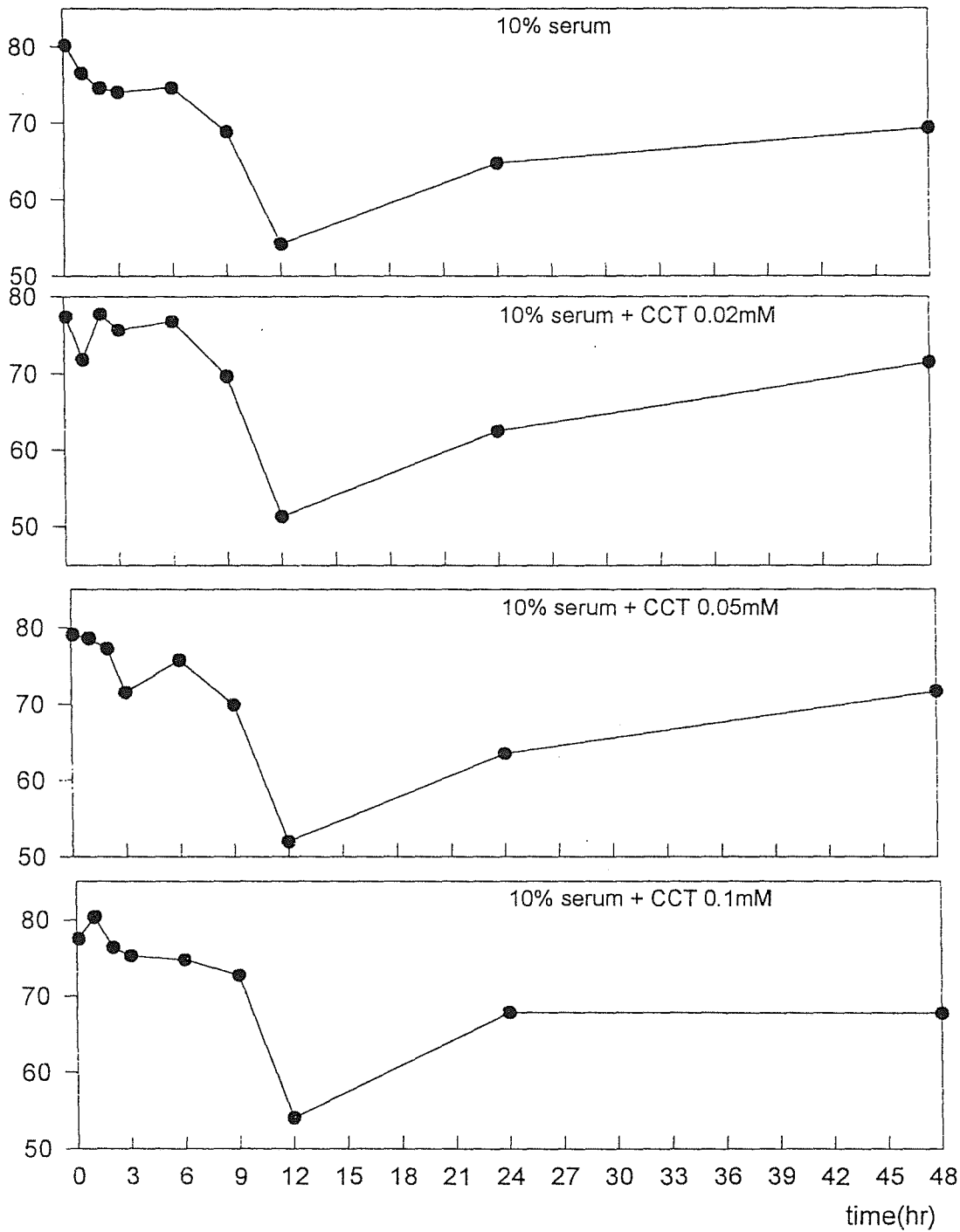


Fig 3A: 細胞週期分析，10% FCS 的 C6 細胞處理不同濃度的 Crocetin，經酒精固定後，以流式細胞儀分析其 G1 phase 所佔的比例。

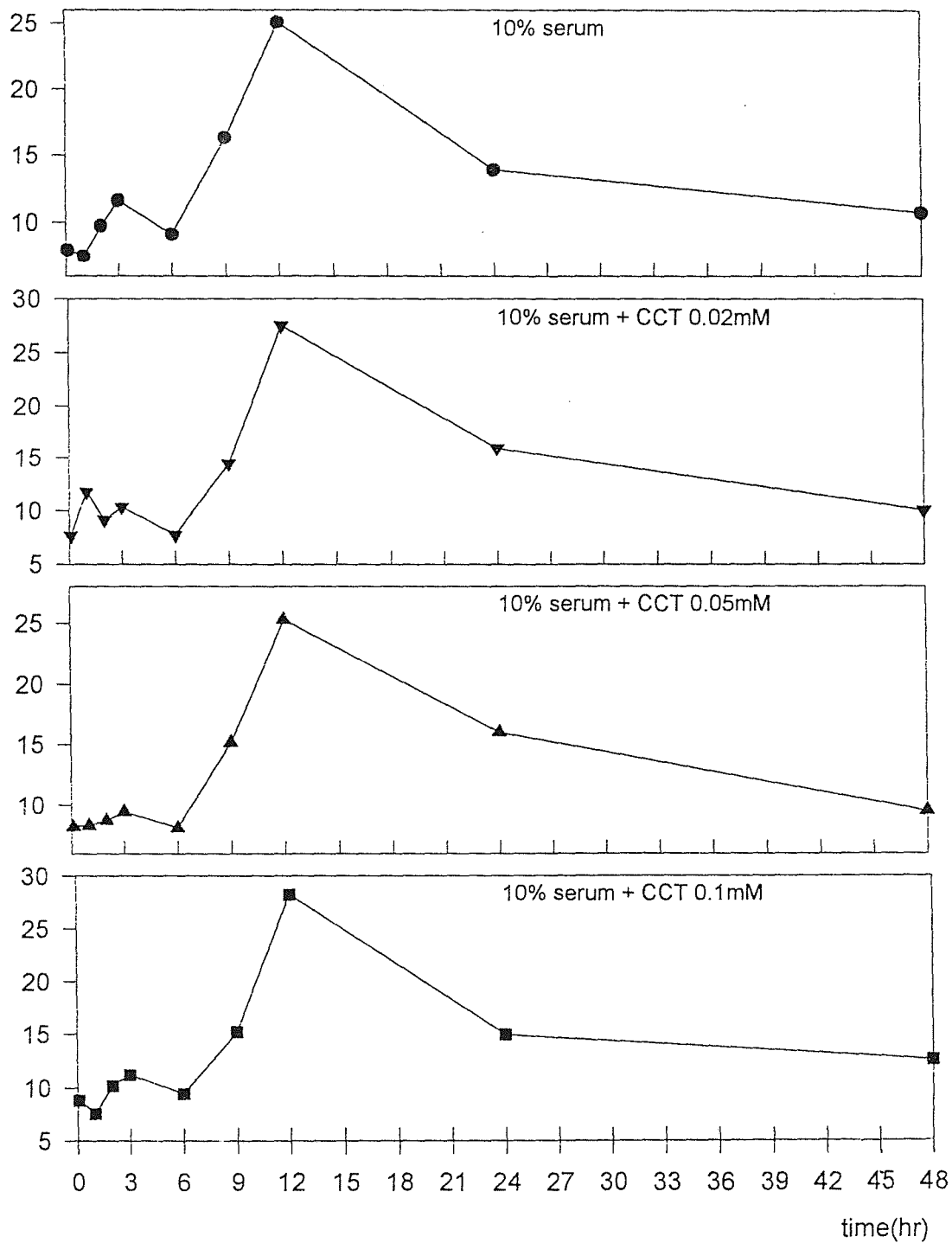


Fig 3B: 細胞週期分析，10% FCS 的 C6 細胞處理不同濃度的 Crocetin，經酒精固定後，以流式細胞儀分析其 S phase 所佔的比例。

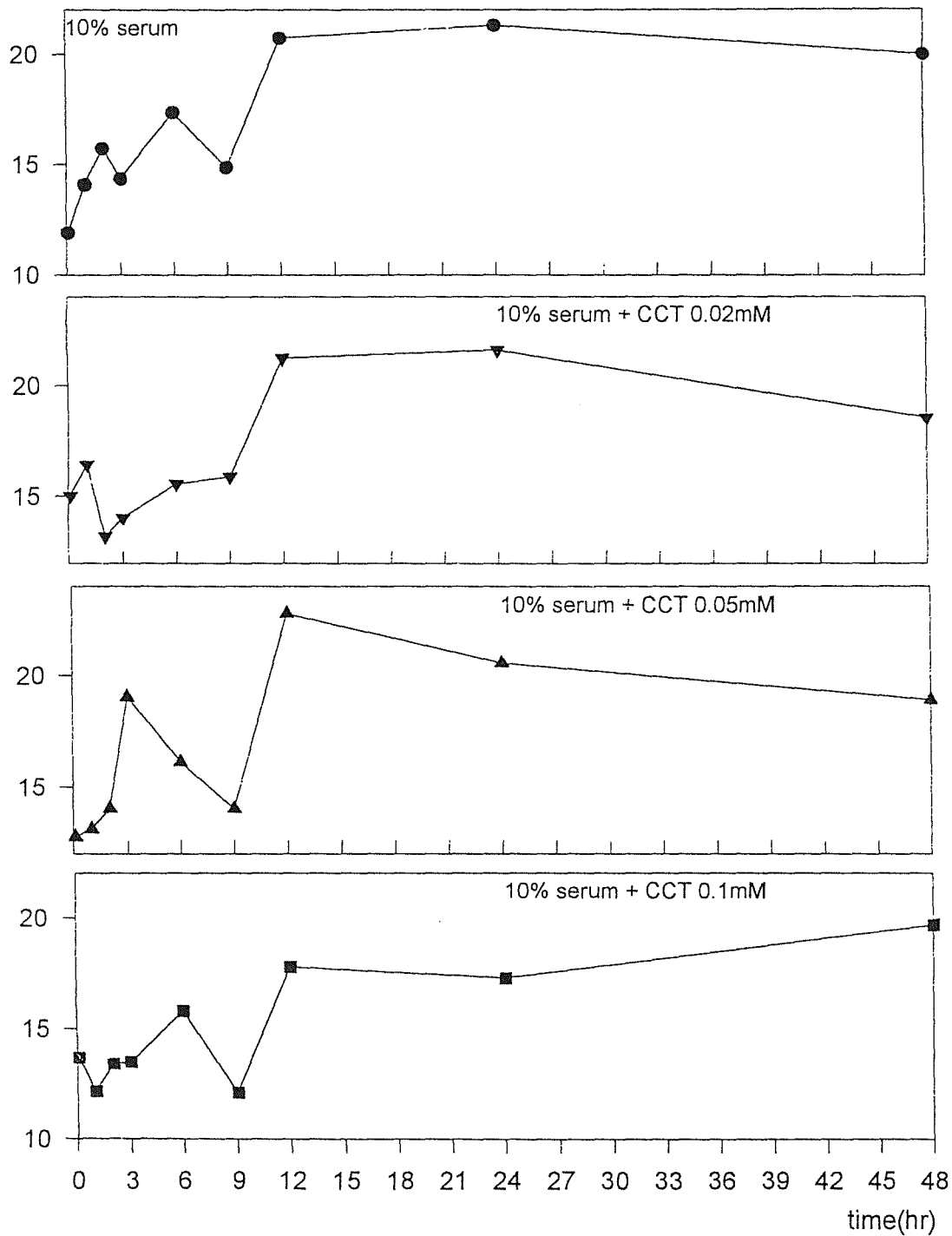


Fig 3C: 細胞週期分析，10% FCS 的 C6 細胞處理不同濃度的 Crocetin，經酒精固定後，以流式細胞儀分析其 M phase 所佔的比例。

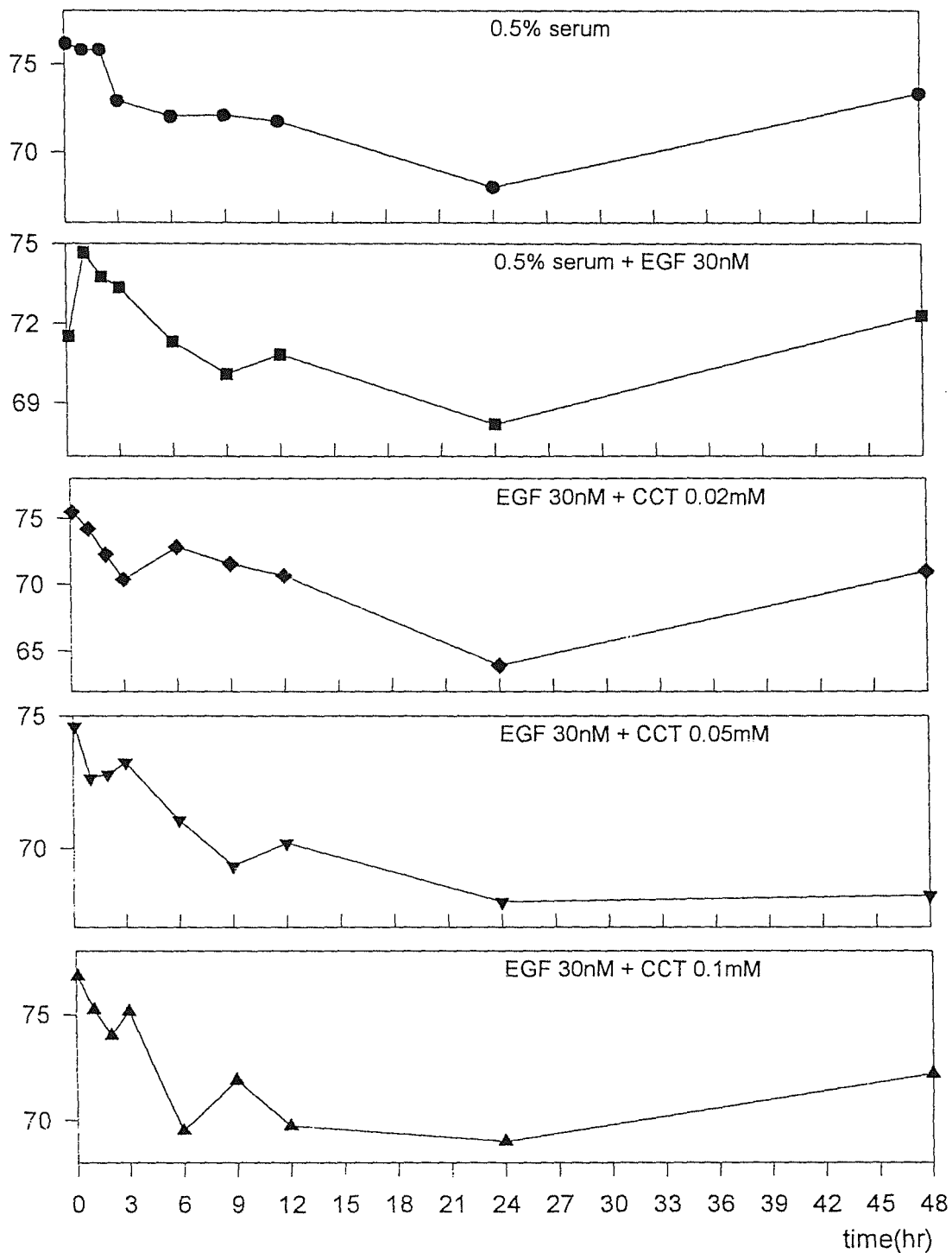


Fig 4A: 細胞週期分析，0.5% FCS + 30nM EGF 的 C6 細胞處理不同濃度的 Crocetin，經酒精固定後，以流式細胞儀分析其 G1 phase 所佔的比例。

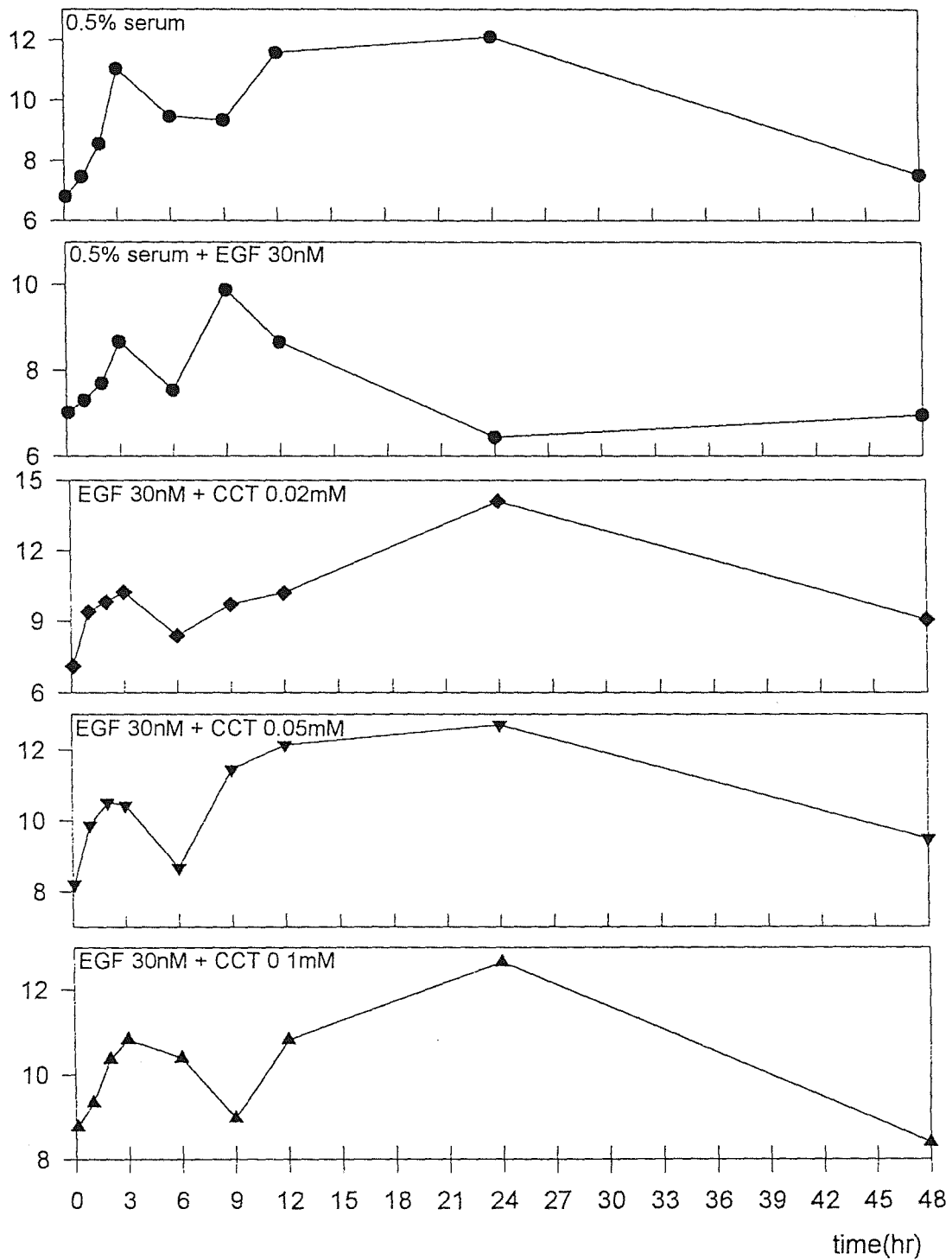


Fig 4B: 細胞週期分析，0.5% FCS + 30nM EGF 的 C6 細胞處理不同濃度的 Crocetin，經酒精固定後，以流式細胞儀分析其 S phase 所佔的比例。

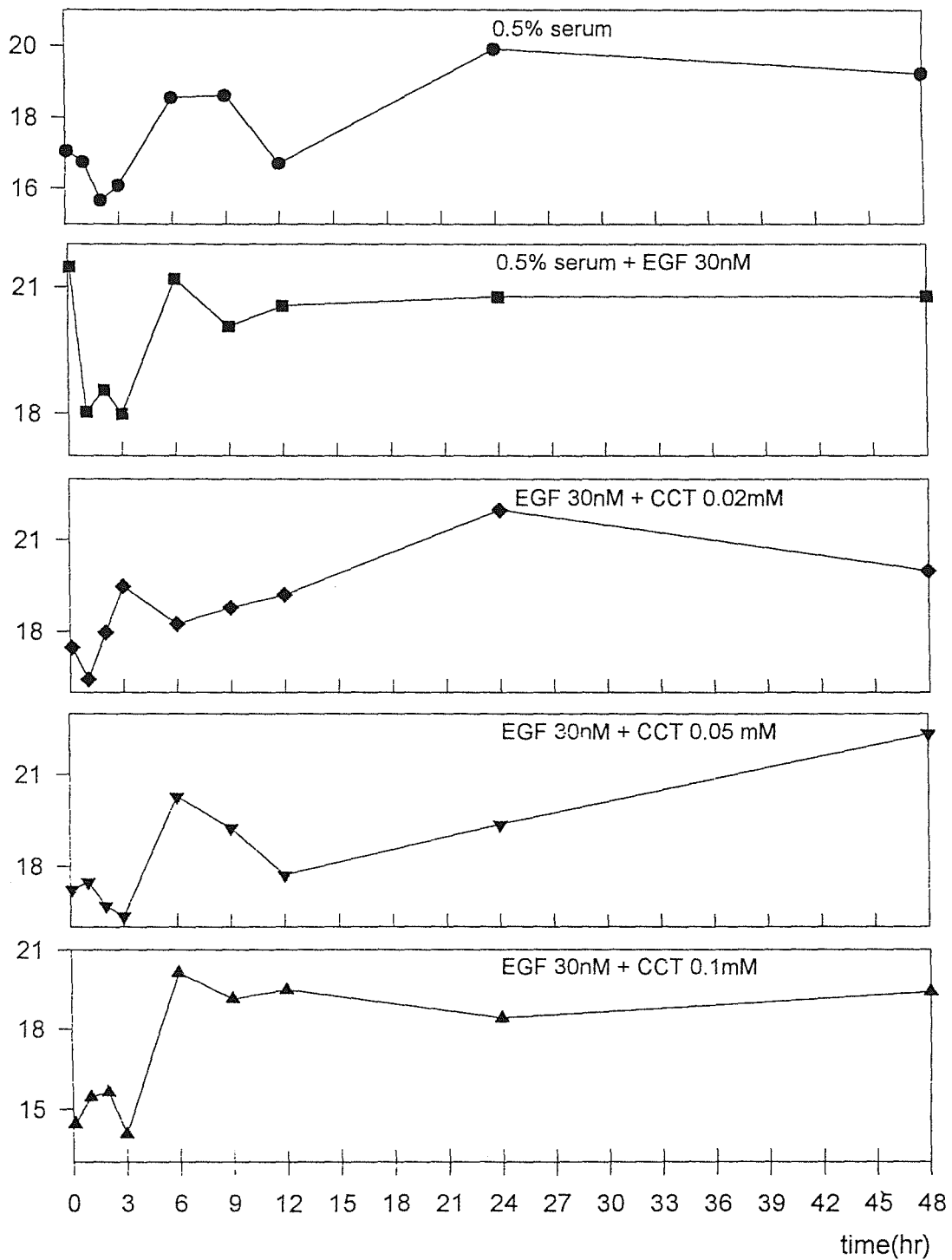


Fig 4C: 細胞週期分析，0.5% FCS + 30nM EGF 的 C6 細胞處理不同濃度的 Crocetin，經酒精固定後，以流式細胞儀分析其 M phase 所佔的比例。

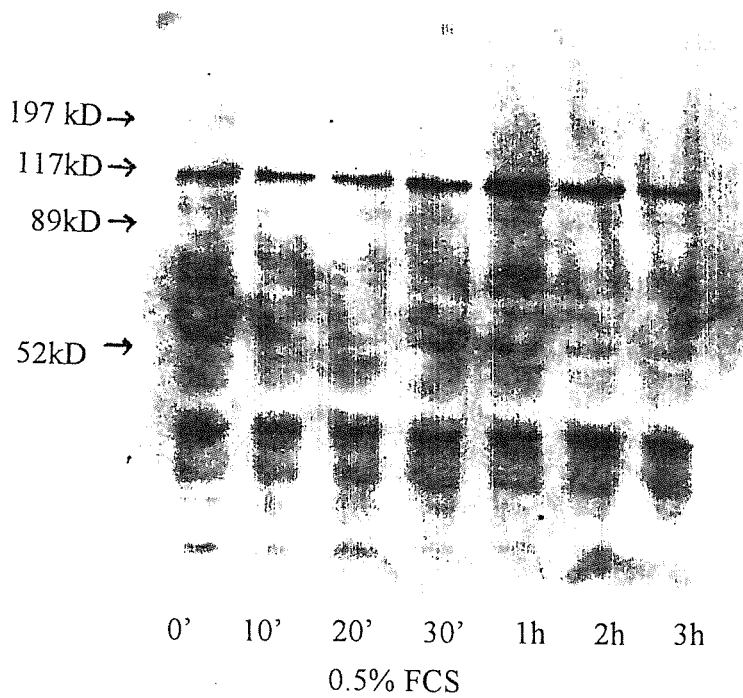
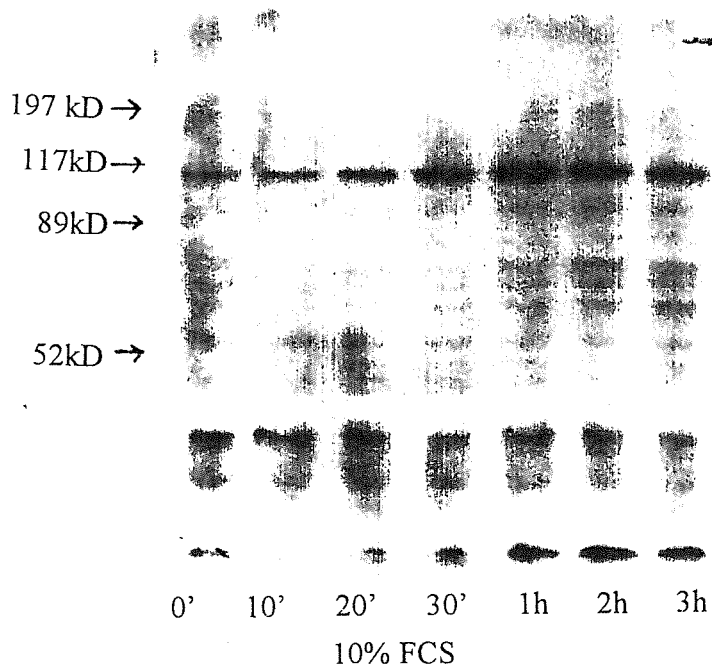


Fig 5A: 胎牛血清對於 C6 細胞 Tyrosine 磷酸化的影響。將細胞分別處理 10% FCS 以及 0.5% FCS，依照不同時間(10'、20'、30'、1、2、3hr)收集細胞，取出蛋白質以西方墨點法分析。

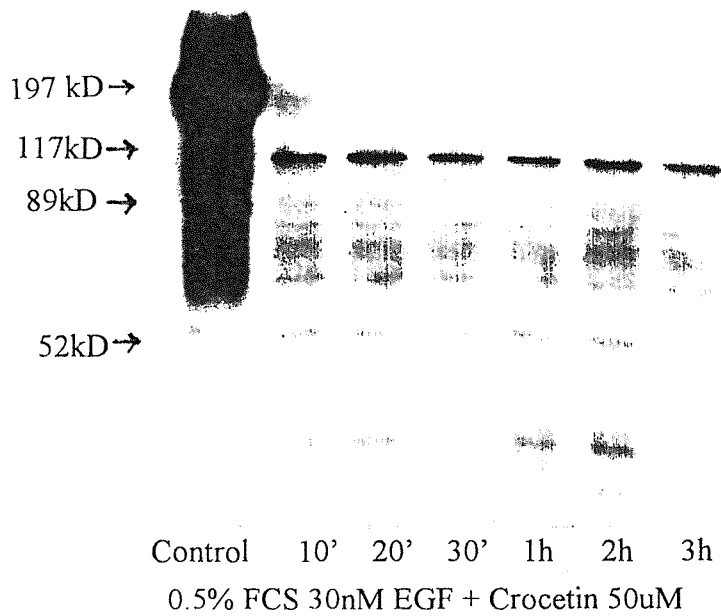
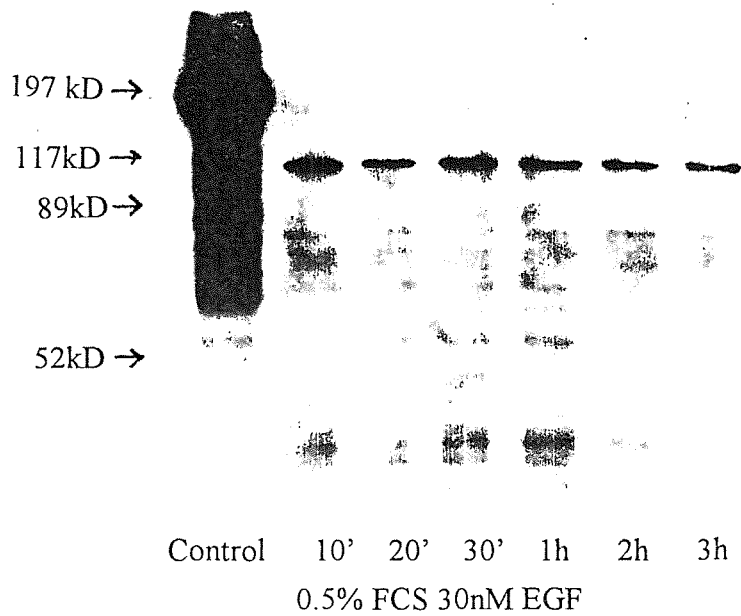


Fig 5B: Crocetin 對於 C6 細胞 Tyrosine 磷酸化的影響。將細胞分別處理 EGF 30nM、0.5% FCS 以及 0.05mM Crocetin，依照不同時間(10'、20'、30'、1、2、3hr)收集細胞，取出蛋白質以西方墨點法分析。

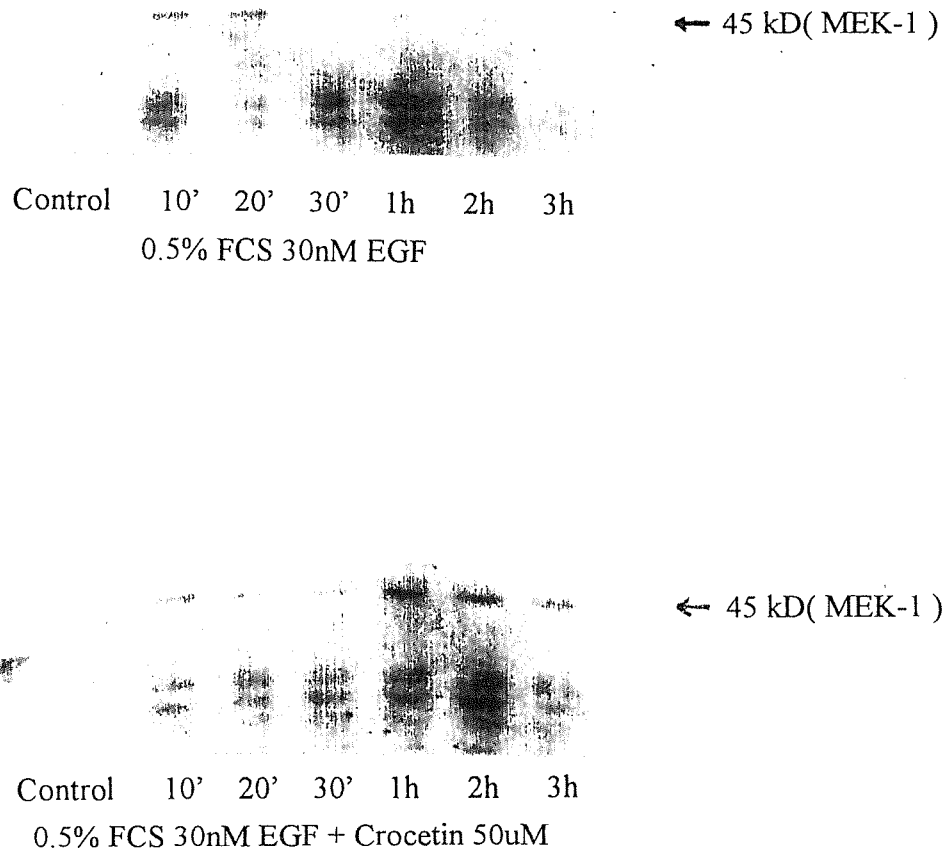


Fig 6: Crocetin 對於 MEK-1 蛋白表現量的影響。以 0.5% FCS 、 30nM EGF 處理細胞, 加入 0.05mM Crocetin 依照不同時間(10', 20', 30', 1、2、3hr)收集細胞, 萃取蛋白質進行西方墨點分析。

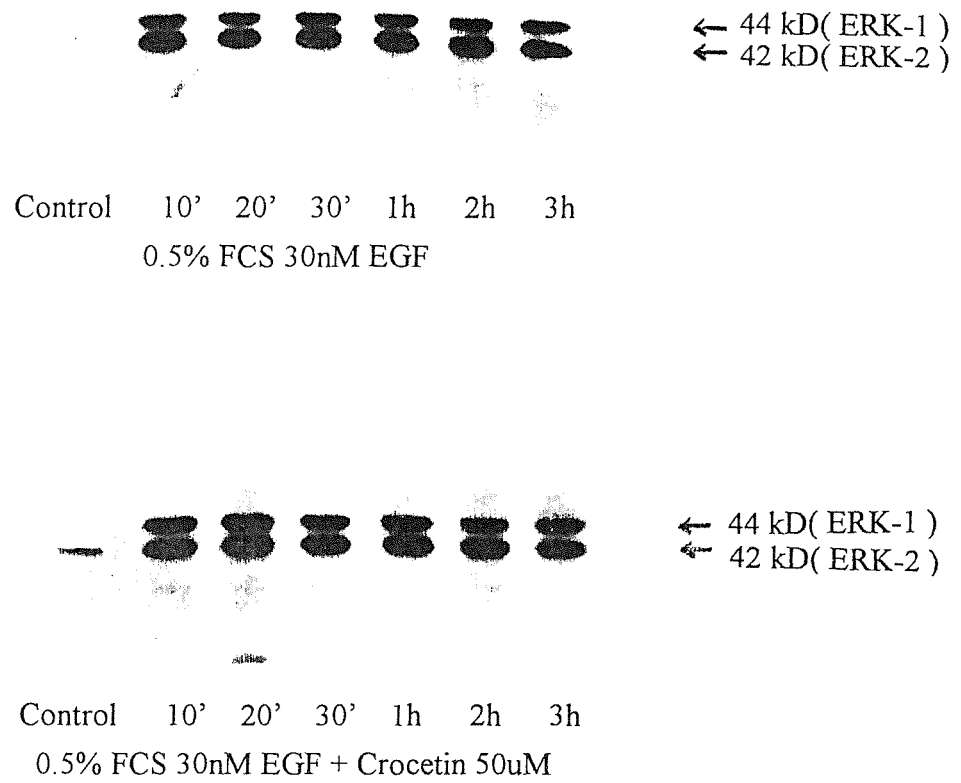


Fig 7: Crocetin 對於 ERK-1 & ERK-2 蛋白表現量的影響。以 0.5% FCS、30nM EGF 處理細胞，加入 0.05mM Crocetin 依照不同時間(10'、20'、30'、1、2、3hr)收集細胞，萃取蛋白質進行西方墨點分析。

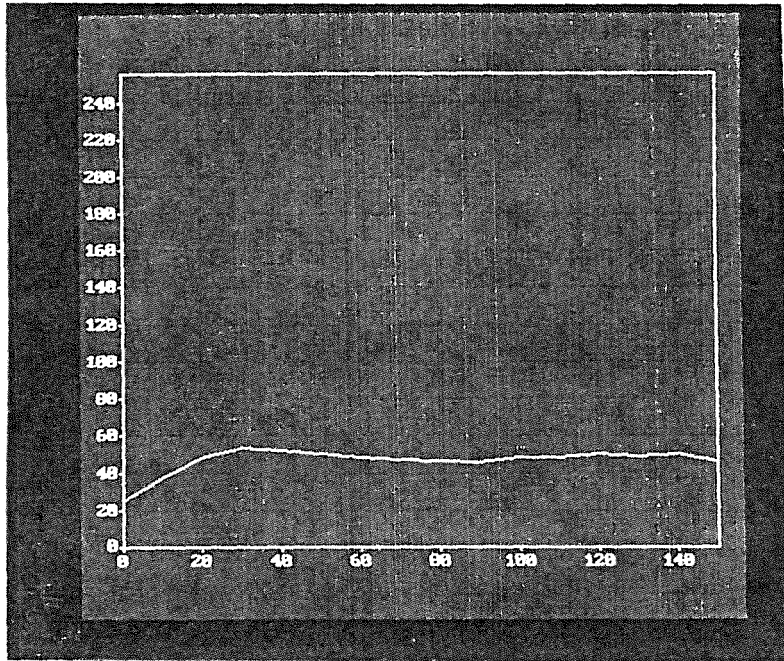
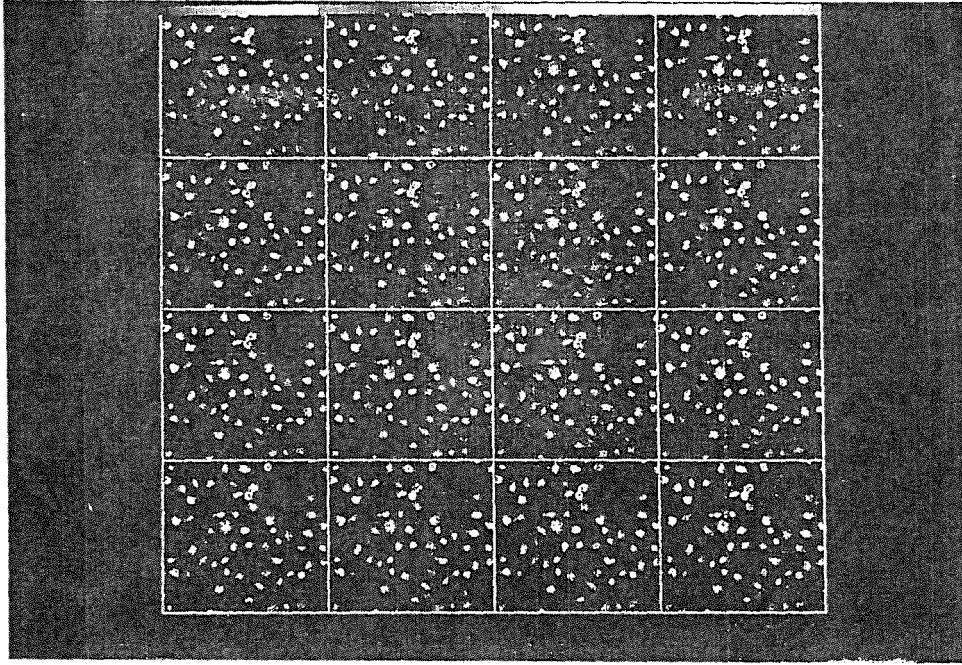


Fig 8: 鈣離子釋放偵測， a. C6 細胞以 0.5% FCS starvation 之後，加 EGF 30nM 10ul 至 MEM 中，觀察鈣離子的釋放。 b. 以方框將細胞圈起，利用電腦程式量化螢光在 0-150 秒之間的變化強度。

第五章：討論

在本論文中，我們採用 C6 細胞來當成主要實驗材料。但 Gaya L.(57) 等人的報告中提出，PDGF 以及 Insulin 在 *in vitro* 培養時可以促進後期 C6(續培養 134 代)細胞的生長，但不影響前期 C6 細胞(續培養 26 代)的生長。而 EGF 以及 TGF- α 對於兩種不同代數的 C6 細胞生長都沒有顯著的影響。另外，在 McClure DB.(58)等人的報告中提到，從老鼠的 Submaxillary gland 提煉出保有生物活性的 EGF 以及 NGF 的萃取物，也就是本實驗所採用的材料，加入到 C6 細胞中並不會刺激細胞生長。因此，在 submaxillary gland 中，對於 C6 細胞而言，可刺激其生長的活性物質並非 EGF 或者是 NGF，而可能是其他的物質。因此，有可能實驗中所添加的 EGF 並無法對 C6 產生刺激作用，致使我們無法觀察到 Crocetin 是否會影響 MAPK pathway。

然而，在我們以 10% FCS 培養細胞，再以不同濃度 Crocetin(0.02、0.05、0.1mM)處理，在 DNA 合成方面，有稍微抑制細胞生長的情形(Fig2)。但觀察其細胞週期(Fig3A)，發現對於細胞週期又並無受到 Crocetin 的影響。因此，有可能 Crocetin 影響 C6 細胞並非是經由影響細胞週期，而是利用其他的方法達成。

目前已知 C6 細胞中 EGF receptor 有 amplification 的現象。而 TGF- α 也是 EGF receptor ligand 之一。在 Kanno H.(59)等人實驗中提到，分析 C6 細胞株的培養液之後，發現含有大量的 Transforming Growth Factor(TGFs)的活性；而分別屬於 TGF- α 以及 TGF- β 。在我們培養的過程中，確實也發現 C6 可以在 Starvation medium 中也能持續生

長，只是速度較緩慢。因此，C6 細胞可能藉由 TGF- α 的 autocrine(自體分泌)作用，與 EGF 競爭 EGF receptor 結合達成細胞生長的需求。而 TGF- β 已知會增加 EGF receptor 在細胞膜的數量而達到細胞生長目的，但在某些特定情形下，TGF- β 又可以抑制細胞生長。

同樣的，最近 Minghetti L.(60)等人，鑒定出另外一種新的生長因子: GGF(Glial Growth factor)，分別有 GGF-I(34kD)、GGF-II(59kD)以及 GGF-III(45kD)；是 Schwann cell mitogens(許旺氏細胞，包裹住神經纖維，可以幫助神經傳導)。GGF 可以刺激 C6 細胞其 DNA 合成，同樣在 SK-BR-3 細胞株(p185neu/erbB2 overexpression)也是一樣。因此 GGF 可能也是 EGF receptor 的一個 ligand。而這點，或許也可以解釋 10%胎牛血清在 Crocetin 存在下 DNA 合成稍微受到抑制的現象，但其影響面也並不在細胞週期的部份。

EGF Receptor 之後所傳遞的訊息途徑並非只有 Shc 以及 Grb2 一種，還有其他可能的替代路徑。就目前所知而言，RTK 在被生長因子活化後，尚可以利用 PI₃K/85 與 PI₃K/100 活化 PIP₃，然後再活化 PKC ζ ，而 PKC ζ 可以活化 Raf 進入 MAPK pathway。另外還有 RTK 也可以磷酸化 PLC γ ，然後活化 PIP₂，PIP₂ 分解成 IP₃ 以及 DAG，而 DAG 可以再活化 PKCs，IP₃ 則可以促進 Ca⁺的移動，而後 PKCs 再活化 Raf 同樣進入 MAPK pathway。在 Couldwell WT(61)等人所提出的文獻指出，在人類 glioma cell 以及 rat glioma cell C6，其 PKCs 的活性相較於其他非癌化的 glial cell 為高。因此，glioma cell C6 的生長或許是經由 PKC 的訊息傳遞路徑，我們之前的實驗得知 C6 細胞對於 EGF 的反應並無經由 IP₃ 活化 Ca²⁺的流動(Fig.8)。

總括而言，Croctin 到目前為止我們發現對於 C6 細胞的增長並無顯著的影響，但是在低劑量時會有保護細胞增進 C6 細胞增長的作用，而且在許多的細胞都有這樣的相關發現。但是在高劑量所呈現的存活細胞數下降(Fig.1)，則有可能是 Croctin 本身的毒性所致。

第六章：參考資料

1. Fantone JC and Ward PA: Role of oxygen derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Path.*, 107: 397-418, 1982.
2. Vercellotti GM, Van Asbeck BS and Jacob HS: Oxygen radical-induced erythrocyte hemolysis by neutrophils; critical role of iron and lactoferrin. *J. Clin. Invest.*, 76:956-962, 1985.
3. Goldstein BD, Witz G, Amoruso M and Troll W: protease inhibitors antagonize the activation of polymorphonuclear leukocyte oxygen consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 88: 854-860, 1979.
4. Badway JA and Karnovsky ML: Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *A. Rev Biochem.*, 49: 695-726, 1980.
5. Miyasita, S., A historical study of Chinese drugs for the treatment of jaundice. *Am. J. Chin. Med.*, 4, 239-243, 1976.
6. Wu, Y. Y., Clinical efficiency of capillaries combination as main therapy for the launice. *Chin. Med. J.*, 10, 930-932, 1956.
7. Chiu, H. F., Lin C.C., Yang F., (1989) The pharmacological and Pathological studies on several hepatic protective crude drug from Taiwan. *American Journal of Chinese Medicine*. 17: 17-23
8. Baghdiguian, S., pichon, J., Marvaldi, J., and Fantini, J., Suramin inhibits the proliferation and stimulates the differentiation of tumoral cell lines HT29-D4 and C6. *Bull Cancer*, 78(9), 807-817, 1991.
9. Gainer, G. J., Wallis, D. A. and Jones, J.R., (1976) The effect of crocetin on skin papillomas and Rous sarcoma. *Oncology*, 33, 222-226
10. Abdullaev, F.I. (1994) Inhibitory effect of crocetin on intercellular

nucleic acid and protein synthesis in malignant cells. *Toxicology Letter*. 70: 243-251

11. Wang, C. J., Lee, M. J., Cheng, M. C., Lin, J. K., (1995) Inhibition of tumor promotion in benzo[a]pyrene-initiated CD-1 mouse by crocetin *Carcinogenesis*, 16:187-91
12. Wang, C. J., Shiah, H. S. and Lin, J. K., (1991) Modulatory effect of crocetin on aflatoxin B1 cytotoxicity and DNA adduct formation in C3H10T1/2 fibroblast cells. *Cancer Lett*. 56: 1-10
13. Wang, C. J., Shioh, S. J. and Lin, J. K., (1991) Effects of crocetin on the hepatotoxicity and hepatic DNA Binding of aflatoxin B1 in rats. *Carcinogenesis*, 12: 459-462
14. Wang, C. J., Hsu, J.D., and Lin, J. K., (1991) Suppression of aflatoxin B1-induced hepatotoxic lesions by crocetin (a natural carotenoid). *Carcinogenesis* 12: 1807-1810.
15. Tseng TH., (1995) Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Cancer Lett*. 97(1), 61-67.
16. Wang CJ., (1996) Inhibition of protein kinase C and proto-oncogene expression by crocetin in NIH/3T3 cells. *Mol. Carcinog*. 17(4), 235-240.
17. Cohen, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46, 302, 1960.
18. Levi-Montalcini, R., and Cohen, S., *Ann. NY Acad Sci.*, 85, 324, 1960.
19. Cohen, S., *J. Biol. Chem.*, 237, 1555, 1962.
20. Carpenter, G., and Cohen, S., *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 193, 1979.
21. Rozengurt, E., and Heppel, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1317, 1975.
22. Barnes, D., and Colowick, S., *J. Cell. Physiol.*, 89, 633, 1976.
23. Diamond, I., et al., *J. Biol. Chem.*, 253, 866, 1978.

24. Gregory, H., *Nature*, 257, 325, 1975.
25. Hollenberg, M., and Gregory, H., *Life Sci.*, 20, 267, 1976.
26. Carpenter, G., and Zendegui, J., *Exp. Cell Res.*, 164, 1, 1986.
27. George-Nascimento, C., *Biochemistry*, 27, 797, 1988.
28. Todaro, G., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5258, 1980.
29. Hirata, Y., and Orth, D., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48, 673, 1979.
30. Oka, Y., and Orth, D., *J. Clin. Invest.* 72, 249, 1983.
31. Carpenter G., *J. Cell Sci., Suppl.*, 3, 1, 1985.
32. Thorburn, G., et al., *Growth and maturation Factors*, Vol. 3 (G. Guroff, ed.) Wiley and Sons, NY, p175, 1985.
33. Fallon, J., et al., *Science*, 224, 1107, 1984.
34. Brown. G., et al., *N. Engl. J. Med.*, 321, 76, 1989.
35. Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, J. W., Schlessinger, J., Jaye, M., and Dionne, C. A., High-affinity binding and activation of a truncated FCF receptor by both aFCF and bFCF. *Oncogene* 6, 2255-2262, 1991.
36. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., et al., Human epidermal growth factor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells, *Nature*, 309, 418-425, 1984.
37. Carraway II K. L., and Cantley, L. C., A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell*, 78, 5-8, 1994.
38. Groenen, L. C., Nice, E. C., and Burgess, A. W., Structure-function relationship for the EGF/TCF- α family of mitogens. *Growth Factors*, 11, 235-256, 1994.
39. Heldin, G. H., Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80, 213-223, 1995.

40. Lange-Cater, C. A., Pleiman, C. M., Gardner, A. M., Blumer, K. J., and Johnson, G. L. 1993. A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260: 315-319.
41. Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P., and Marshall, C. J. 1992. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase Raf. *Cell* 71:335-342.
42. Crews, C. M., Alessandrini, A., and Erikson, R. L. 1992. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258: 478-480.
43. Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J., and Wolfman, A. 1993. Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260: 1658-1661.
44. Blenis, J. 1993. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5889-5992.
45. Marais, R., Wynne, J., and Treisman, R., The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*, 73, 381-393, 1993.
46. Whitmarsh, A. J., Shore, P., Sharrocks, A. D., and Davis, R. J., Integration of MAP kinase signal transduction pathway as the serum response element, *Science*, 269, 403-407, 1995.
47. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M., Identification of an oncoprotein and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-jun activation domain. *Genes and Development*, 7, 2135-2148.
48. Sanchez, I., Hughes, R. T., Mayer, B. J., et al., Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature*, 372, 794-798, 1994.

49. Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., and David, R. J., Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, 267, 389-393, 1995.
50. Van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P., and Angel, P., ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinase to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents, *EMBO journal*, 14, 1798-1811, 1995.
51. Livingstone, C., Patal, G., and Jones, N., ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO Journal*, 14, 1785-1797, 1995.
52. Marshall, C. J., Specificity of receptor tyrosine kinase signalling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80, 179-185, 1995.
53. Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., and Sweet, W., Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161, 370-371, 1968.
54. Alley M. C., Scudiero D. A., Monks A., Hursey M. L., Czerwinski M J., Fine D L., Abbott B. J., Mauo J. G., Shoemaker R. H. and Boyd M. R., (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48, 589
55. Alley M.C., Pacula-Cox C. M., Hursey M. L., Rubinstein R. and Boyd M.R., (1991) Morphometric and colorimetric analyses of human tumor cell line growth and drug sensitivity in soft agar culture. *Cancer Res.* 51, 1247.

56. West, D. C., Sattar, A. and Kumar, S., A simplified in situ solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue culture mammalian cells. *Anal Biochem.* 39, 289-295, 1985.
57. Goya, Y., Feng, P. T., Aliabadi, S., and Timiras, P. S., Effect of growth factors on the in vitro growth and differentiation of early and late passage C6 glioma cells. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 14(4), 409-417, 1996.
58. McClure, D. B., Ohasa, S., Sato, G. H., Factors in the rat submaxillary gland that stimulate growth of cultured glioma cells: identification and partial characterization. *J. Cell Physiol* 107, 195-207, 1981.
59. Kanno H., Shinonaga, M., Kuwabara, T., and Umeda, M., Growth factors produced by rat glioma cells: activities of transforming growth factors. *No. To. Shinkei*, 41, 905-909, 1989.
60. Minghetti, L., Goodearl, A. D., Mistry, K., and Stroobant, P., Glial growth factors I-III are specific mitogens for glial cells. *J. Neurosci. Res.* 43, 684-693, 1996.
61. Couldwell, W. T., Antel, J. P., and Yong, V. W., Protein kinase C activity correlates with the growth rate of malignant gliomas: Part II. Effects of glioma mitogens and modulators of protein kinase C. *Neurosurgery*, 31(4), 717-724, 1992.