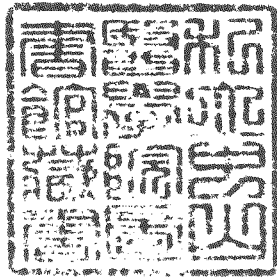


R
068.8
1121-2
87

中山醫學院生物化學研究所
碩士論文

探討腫瘤組織內蛋白激酵素 C 異構體之表現
Investigation of the expression of protein kinase C
isoforms in tumour tissues



指導教授：劉哲育 博士 (Jer-Yuh, Liu, ph. D.)

謝易修 博士 (Yih-Shou, Hsieh, ph. D.)

研究生：張愛琪 (Ai-Chi, Chang)

參考書恕不外借

中華民國八十七年六月

中山醫學院圖書館



C050028

授權書
(博碩士論文)

本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 86 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 探討腫瘤組織內蛋白激酵素C異構體之表現

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

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權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 劉哲育

研究生簽名: 張愛琪 學號: R85204
(親筆正楷)

日期: 民國 87 年 7 月 23 日

- 備註: 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。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予 UMI 公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10% 的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第 5 項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：張慶琪 聯絡電話：7225996

地址：高雄市建國一路123巷1弄16號5F

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院生物化學研究所論文考試委員審查合格及口試通過。

口試委員

國立陽明大學生理學研究所教授

王錫崗博士

王錫崗

國立成功大學生理學研究所教授

李碧雪博士

李碧雪

私立中台醫護技術學院食品衛生科副教授

朱淑珍博士

朱淑珍

私立中山醫學院生物化學所副教授
(論文指導教授)

謝易修博士

謝易修

私立中山醫學院生物化學所副教授
(論文指導教授)

劉哲育博士

劉哲育

中華民國八十七年六月二十六日

學生張愛琪論文題目為探討腫瘤組織內蛋白激酵素 C 異構體之表現，其論文已經中山醫學院生化研究所碩士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：劉哲育 博士

簽名：劉哲育

謝易修 博士

簽名：謝易修

中華民國 年 月 日

誌 謝

猶憶仲夏之日，初入中山學園的心情，是如此地忐忑、不安，而今在熟悉一切之後，卻又將揮手告別，我忽然瞭解，原來生命是一連串的交流，在陌生與熟悉之間，我們不斷的成長、茁壯。

感謝我的指導教授劉哲育博士及謝易修博士引領我進入生化殿堂，在此致上最深的謝意。同時感謝生理科主任張振隆教授、徐志誠老師及蔡金秋老師在動物實驗上的幫助，婦產科主任林隆堯醫師、林明德醫師、解剖科主任鄭敏雄教授、病理科楊連泉先生及彰化基督教醫院郭守仁副院長，由於你們的推動與協助，使此論文得以完成。另外感謝陳凌雲博士在實驗上的指導與建議；感謝陽明大學生理科王錫崗教授、成功大學生理科李碧雪教授與中台醫護技術學院食品衛生科主任朱淑珍博士對本論文的審閱及修正。

感謝實驗室的至凱學長、麗娟、秀琴、燕珠、惠珍、玉燕及海永在生活上與課業上的支持與幫助，當我們同在一起時，日子是快樂的。感謝陪伴我成長的岱祺，在無數的失意與落寞時，給予我最大的關懷與包容。

最後，僅將此論文獻給我的父母及家人，在你們的細心呵護與關照之下，我終能達成此一目標。

目 錄

第一部份：良性腫瘤—假懷孕鼠子宮蛻膜瘤的發生	1
壹、中文摘要	2
貳、英文摘要	3
參、縮寫	4
肆、前言	6
伍、實驗材料與方法	13
陸、實驗結果	22
柒、討論	31
第二部份：惡性腫瘤—人類肝癌組織	34
壹、中文摘要	35
貳、英文摘要	36
參、前言	37
肆、實驗材料與方法	40
伍、實驗結果	44
陸、討論	44
參考文獻	46
圖表	59
附錄一、PKC 結構圖	102
附錄二、實驗溶液配製	103
附錄三、已發表論文	108

第一部份：良性腫瘤

假懷孕鼠子宮蛻膜瘤的形成 與 PKC 異構體變化之探討

壹、中文摘要

胚胎著床與子宮蛻膜形成 (decidualization) 有關，目前我們對於子宮蛻膜的 formed 瞭解非常有限，因此子宮蛻膜形成的機制是一件值得研究的工作。

本篇實驗即研究假懷孕鼠子宮蛻膜瘤形成與蛋白激酶 C (PKC) 的關係。結果顯示 PKC 活性有減少的情形，至少有 5 種 PKC 異構體 (α 、 δ 、 ζ 、 ι 及 λ) 在子宮組織中表現。當蛻膜瘤形成時，PKC α 會 down-modulation，即細胞質內的 PKC α 含量下降，這種 down-modulation 的情形伴隨著細胞分裂的增加，而在第 2-3 天達最大，但在子宮肌層卻沒有此種情形。另外 PKC ζ 並沒有 down-modulation 的情形發生，反而隨著細胞分裂增加而增加，其在蛻膜瘤及子宮肌層的表現均相同。其他 PKC 異構體 δ 、 ι 及 λ 的表現也是增加的，但是它們與細胞分裂速率下降有關。實驗進一步以 immunohistochemistry 測定 PKC 在蛻膜細胞的位置，結果證實 PKC 異構體有不同的表現。

本篇結果說明了 PKC 在假懷孕鼠蛻膜瘤生成期間的表現及分佈，因此我們認為不同 PKC 異構體的表現可能與調控蛻膜瘤形成有關。

貳、英文摘要

It is well known that decidualization is correlated with the implantation. However, the mechanism of the decidualization remain understand. So, the investigating of the development of deciduomata is worth to do.

In this study, we investigated the correlation between decidualization and protein kinase C (PKC) expression. We determined the expression of PKC isoforms during trauma-induced decidualization. The findings revealed that at least five PKC isoforms (α , δ , ζ , ι and λ) were present in both control and decidualized tissue. After trauma-stimulation, PKC α was down-modulated in the deciduomata but not in the myometrium. Down-modulation was compatible with the increase in cell mitosis which reached a maximum at 2-3 days. On the other hand, PKC ζ was not down-modulated. It was increased both in the deciduomata and myometrium, and paralleled the frequency of decidual cell mitosis. The PKC isoforms of δ , ι and λ were also increased, but they were associated with the depression of cell mitosis. Immunohistochemistry assay confirmed the various expression of PKC isoforms. Therefore, these findings suggested that the variable expression of PKC isoforms in trauma-induced decidualizing tissue in pseudopregnant rats may be involved in the modulation of decidual cell growth.

參、縮寫表

BCIP	: 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BSA	: bovine serum albumin
DAB	: 3,3'-diamine benzidine
DAG	: diacylglycerol
DEAE	: DEAE-cellulose
EDTA	: ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	: ethylene glycol bis (β -aminoethylether) - N,N,N',N',-tetraacetic acid
FBS	: fetal bovine serum
HEPES	: N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid]
IP ₃	: inositol 1,4,5-trisphosphate phosphates
MSH	: β -mercaptoethanol
NBT	: nitroblue tetrazolium
NC	: 4-chloro-1-naphthol
PKC	: protein kinase C
aPKCs	: atypical PKCs
cPKCs	: conventional PKCs
nPKCs	: novel PKCs
PLC	: phospholipase C
PMA	: phorbol 12-mtristate 13-acetate (TPA)
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluroride
PRL	: prolactin
SDS	: sodium dodecyl sulfated

TCA : trichloroacetic acid

TEMED : tetramethyl ethylenediamine

肆、前言

近年來不孕症比率有增加的趨勢，自 1965 年到 1982 年美國增加率高達百分之 177，平均每六對夫婦中就有一對是不孕，而台灣約是十比一[1]。導致不孕增加的因素可能是：排卵時間不規則，子宮疾病，子宮頸疾病，輸卵管阻塞，著床時所需黃體荷爾蒙不足造成著床失敗，子宮內膜炎，男性精子不良症和男性不明原因等[2]。這些原因可能與緊張的生活壓力、環境毒害或職業婦女趨於晚婚致懷孕年齡延遲有關，不孕的問題漸漸形成夫妻生活上的問題。

所謂不孕症是指已婚夫妻在一年當中，沒有採取任何的避孕措施，有正常的性生活卻沒有達到懷孕目的，這種情況便稱為「不孕」[3]。因此若要達到成功的懷孕，必須要有成熟的卵子和健全的精蟲再加上一條可通往子宮的通路，讓卵子與精蟲能夠相遇而結合，所以懷孕須具備下列幾個要件：1、卵巢要能產卵，並經過排卵的過程進入輸卵管，2、要有足夠數量與健壯的精蟲，3、有足夠的宮頸管分泌作為輸送精子的媒介，4、正常的子宮內膜受到足夠的荷爾蒙刺激，可以接受著床，5、輸卵管要暢通無阻到子宮腔，使精蟲與卵子在輸卵管內完成受精，4、受精卵分裂成胚胎，移行到子宮腔內著床後繼續發育成胎兒[4]。上述 5 項是懷孕成功的基本條件，若有任一階段的不正常都可能導致不孕症的發生。

近年來「人工授孕」及「試管嬰兒」成為解決不孕症的最佳方法[3]。「人工授孕」是利用人為方式把射出體外的精液注入子宮腔內，讓精蟲自己游進輸卵管內進行體內受精，連續作六個月，成功率可達 50%，但若連續六次都失敗，則須改用體外受精的「試

管嬰兒」方式來作，此方法為將女性成熟的卵子由體內取出，放置在試管培養液中，加入處理過健壯的精蟲使其發生受精作用（體外受精），然後在模擬體內環境的培養箱中使其分裂。當胚胎分裂到4~8個細胞時（大約受精後2天），以特殊的導管將胚胎由子宮頸管植入子宮腔中，使其能繼續分裂，並且著床發育成胎兒[5]。

在臨床實驗報告顯示，不管是以人工授孕或試管嬰兒的方式來解決不孕症的問題，胚胎著床對於懷孕與否都是一項非常重要的步驟，任何影響該步驟的因素都可能造成著床失敗懷孕不成[6]。著床失敗一直是人工授孕技術失敗的主要原因，儘管取卵率、受精率和胚胎分裂率都可突破90%，但是著床成功的機會對每個胚胎而言卻只有15~20%。目前對於這個問題，有些可以利用荷爾蒙或胚胎助孵化術解決，有些在醫學上仍是盲點，所以解決的方法可能需要從其他方面著手，例如研究子宮蛻膜瘤形成之機制等相關問題。

子宮是一個外有厚壁，內呈中空的肌肉器官，其位於膀胱（在前方）與直腸（在後方）之間。它可分為兩個部份，即子宮體與子宮頸。測量子宮長度約為7.5公分，寬約5.5公分，深約2.5公分，其壁相當厚，約1.2公分，子宮腔則非常的小。子宮體的襯裡是子宮內膜層，屬於一種上皮細胞組織，其中有豐富的腺體及基質分佈；子宮內膜的表層細胞可隨每次月經週期而增生與剝落，而其基質部份則維持不變。子宮體的中層是一種肌肉細胞，稱為子宮肌層（myometrium）。子宮體的外層是非常薄的外漿膜（serosa）或稱子宮漿膜（perimetrium）[7]。

女性的子宮具有下列幾點功能：1、為受精卵準備一個適當著床的空間，2、在胚胎/胎兒發育成熟之前，可提供保護與營養

的功能，3、在分娩之際能夠使胎兒與胎盤娩出，4、藉著子宮肌層的肌肉收縮可使胎盤脫落部位不致流血過多[7]。子宮內膜可分為基層及功能層，功能層的子宮內膜會隨動情素與黃體素濃度的改變而會產生若干的變化。在月經週期過後，功能層在動情素的刺激下，自基層處不斷的生長，直到排卵為止，此時期稱為增殖期（proliferative phase）。增殖期中子宮內膜不斷增長，且有微小的血管生長，攜帶充分的血流。當排卵發生，黃體素增加，子宮內膜中的腺體開始作用，分泌黏液、肝醣及某種特殊物質，以助於受精卵的著床滋養，這時期就稱為分泌期（secretory phase）。在沒有懷孕的情況下，黃體有一定的生命期，會自行萎縮並停止荷爾蒙的製造，以致動情素濃度下降，子宮內膜的生長及分泌即會停止[8]。

一般正常「受孕」過程是男人產生正常的精子，輸送儲積到女人的子宮頸，活躍的精子經由子宮頸及子宮腔輸送到輸卵管的底端；同時卵巢內的濾泡發育成熟，排出卵子，並輸送到輸卵管底部，和精子相逢「受精」，「受精卵」再從輸卵管輸送到子宮腔內著床，由卵巢分泌足夠的荷爾蒙使「胚胎」發育生長[9]。

子宮蛻膜是子宮內膜的基底細胞（stromal cell）經由荷爾蒙（如 estrogen 和 progesterone）刺激誘發轉化形成[10]，它被認為在胚胎著床過程中扮演非常重要的角色，如調控胚胎侵入作用[11]，而且也是提供胚胎生長的溫床，如供應胚胎營養[12]、分泌內泌素[13]和保護胚胎免於母體的排斥作用[14]。因為子宮內膜的接受度是否良好有賴於子宮蛻膜形成正常，有良好的胚胎和足夠荷爾蒙，也要有健全良好的子宮蛻膜，胚胎才能順利著床發育，因此探討子宮蛻膜形成的機制有助於解決著床失敗的問題。

子宮蛻膜形成的好壞，在人工受孕過程中也常常用來判斷是

否進行胚胎移植手術。因此瞭解子宮蛻膜形成的機制有助我們作更好的辨別和瞭解胚胎與子宮內膜接合下最適當的環境。在我們的知識領域裡，對於瞭解子宮蛻膜形成的機制仍然有限；已知有幾種關於子宮蛻膜生長的報告出現，例如 Shelesnyak 提出組織胺（histamine）可激發蛻膜反應（decidual response），他發現在大白鼠中，全身性或直接注射抗組織胺（anti-histamine）可以阻止子宮蛻膜反應，子宮中肥大細胞（mast cell）是組織胺主要來源，這個就是為什麼會增加微血管滲透性和子宮內膜的蛻膜變化。另外在著床早期，著床的地方可發現前列腺素濃度增加，子宮內膜細胞很可能是前列腺素的來源。

子宮內膜基質細胞的蛻膜形成（decidulization）已知與荷爾蒙有關，包括泌乳素（prolactin；PRL）[15]、前列腺素（prostaglandin）、女性素（estradiol；E2）與助孕素（progesterone；P）[10]，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）[16]。Tabanelli et al.[17]曾經利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[18]。許多報告指出子宮蛻膜形成與荷爾蒙如 progesterone、estrogen、prostaglandin、histamine、TSH/LH、relaxin...等刺激 c-AMP 表現有關[10]，Tang et al.[19]指出泌乳素及助孕素在子宮蛻膜形成之初步會增加 cAMP 的含量。然而在其他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[20,21]，但是 PKC 是否參與子宮蛻膜形成作用至今尚未被證明。

PKC 是 1977 年由日本 Nishizuka 等人，從牛的小腦所發現之

異於蛋白激酶 A 的蛋白激酶[22]，隨後的研究發現此酶的活化需要細胞膜的磷脂和 diacylglycerol (DAG) [23,24]；因細胞受興奮後，荷爾蒙或神經傳遞物質作用於細胞表面之受體，經由受體之活化可進而活化磷脂酶 C (phospholipase C ; PLC)，將胞膜上的磷脂肌醇 (phosphatidyl inositol) 分解，產生第二訊息傳遞物 (second messengers) DAG 和 IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate phosphates)，DAG 進而活化 PKC，因此活化此激酶 C 之生理途徑已被確認，而陸續的研究也發現除了經由活化磷脂酶 C 之途徑外，由磷脂酶 D 和 A₂ 也可以分別活化或加強此激酶的活性。此外，tumor-promoting phorbol esters 如 TPA 也可以活化 PKC，並造成此酶由細胞質轉移至細胞膜 (translocation) [25,26]，但是 TPA 長時間之作用反而造成其 down-regulation。PKC 在調節需要 Ca²⁺ 的細胞功能上具有重要的角色[27]，它可以透過一些細胞外的訊號，例如：生長因子、荷爾蒙及神經傳導物質等[28,29]，在 trans-membrane 上扮演傳遞訊息的角色。PKC 也被發現可誘導許多細胞的反應，包括細胞的增殖、分化、基因的表現及腫瘤促進作用[30]。PKC 活性過度表現可能造成多數大白鼠的纖維母細胞生長不正常[31]。

已知 PKC 至少含有 12 種異構體 (isoenzyme)，若依其序列的差異大致可將其區分為三類型：1) 傳統型 (conventionalc , PKCs)— α 、 β I、 β II 及 γ ，需要負價的 phospholipids，diacylglycerol 或 phorbol ester，及鈣離子存在下才能夠活化[32,33]；2) 新型 (novel , nPKCs)— δ 、 ϵ 、 θ 、 η 及 μ ，需要負價的 phospholipids，diacylglycerol 或 phorbol ester 才能活化，但不需要鈣離子[32-34]；3) 異型 (atypical , aPKCs)— λ 、 ι 及 ζ ，只要負價的 phospholipids，不需鈣離子，diacylglycerol 或 phorbol ester 即可活

化[33] (附錄一)。PKC 是由 C1-C4 四個不同的區域 (domain) 所組成，C1 是 pseudosubstrate 及 phorbol ester 結合區，C2 是鈣離子結合區，C3 是 ATP 結合區，C4 是受質結合區，具有磷酸化轉移的功用[35,36]。PKC 異構體的差異在於具有或缺少某些區域而致使其表現不同，例如 nPKCs 及 aPKCs 缺少鈣離子結合區；cPKCs 及 nPKCs 在 phorbol ester 的結合位包含 2 個 zinc fingers 之作用部位，而 aPKCs 只具有一個 zinc finger 之作用部位；PKC μ 則缺乏 pseudosubstrate 區。

這三類型異構體之性質、分佈及受活化之方式不盡相同，因此不同的異構體可能各司不同功能[37-40]。最近報告指出個別的 PKC 異構體參與修復細胞的增殖，例如：以 carbon tetrachloride 誘導肝再生時，發現 PKC α 表現增加[41]。在部分的肝切除 (hepatectomy) 之後也可觀察到細胞核內的 PKC α 減少及 PKC δ 增加[42]。當肝再生期間 PKC 進行重新分佈，從可溶的細胞質部份轉移至微粒部分[43,44]。Folic acid 誘導腎臟再生會造成 PKC α 降低，但是 PKC δ 不會改變[45]。肝臟及腎臟的再生也會誘導初期反應基因的表現，而這些基因的表現直接或間接的透過 PKC 調控，例如：fos、myc、Tis1、Tis8 及 Tis11[46-49]。由以上資料顯示 PKC 的活化可發生在化學或機械式的誘導細胞增殖時期。

最初誘導蛻膜細胞在非懷孕狀態的子宮內膜生長，是由 Loeb 等人以豬及兔作為試驗所提出，接著被廣泛的被應用在大白鼠，狗及猴等動物[50]，此種動物實驗可模擬自然懷孕時蛻膜的生成作用，在缺少任何胚胎組織下，提供許多相關懷孕初期時功能之研究。假懷孕鼠動物實驗模式已被應用在研究蛻膜瘤的生成與荷爾蒙分泌之間的關係，其誘導方式有 1) 不能產子的交配，2)

利用一根玻璃棒去刺激子宮頸及 3) 讓養育一窩小動物去允吸等方法觸發泌乳素長時間持續的分泌以及黃體之保存，致造成正常性週期之恢復延遲了一些時間。假懷孕時間大致可維持二星期。當正常雌大白鼠處在發情前期或是發情期之際，若施予子宮頸的人工機械刺激則較容易誘發假懷孕，此乃因該時段的雌性素在血中濃度上升，使得該鼠對刺激變得敏感化。在子宮頸刺激後的第四天用針割傷子宮壁，子宮蛻膜會開始生長，並且在第 5-7 天達到最大。在假懷孕的大白鼠，蛻膜瘤細胞的增殖可利用多種刺激方法來達成，包括組織傷害（子宮內膜的刮傷或橫斷的夾住子宮）及組織氨的輸送注射[51]，但是，PKC 在這些人工誘導蛻膜生成作用中的角色還未被確認。

為了尋找組織受傷及管腔內組織氨在細胞內傳達訊息的共通進行方式，我們猜測活化的 PKC 可能參與此一訊息傳遞路徑。已知 histamine 有能力去活化磷脂酶 C（phospholipase C，PLC），使得聚磷酸肌醇（polyphosphoinositide）水解，造成細胞 diacylglycerol 的增加[20]。而此 diacylglycerol 可促進 PKC 活化及細胞生長[52,53]，因此，histamine 造成 PKC 活化並且接著影響 DNA 合成[20]。

本篇實驗的設計是利用假懷孕鼠子宮以人工刮傷方式誘導蛻膜瘤生成時觀察 PKC 活性及蛋白表現，並進一步偵測 PKC 存在的位置（localization）。實驗結果將有助我們瞭解子宮蛻膜瘤形成過程中 PKC 所扮演的角色。

伍、實驗材料與方法

一、藥品試劑

1. 實驗動物購自於國科會動物中心：

Sprague-Dawley 雌大白鼠。

2. 購自於美國 Sigma 公司：

Bovine serum albumin (BSA), Adenosine triphosphate (ATP), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Leupeptin, Histone H1 (type III-S), Phosphatidylserine, Sucrose, β -Mercaptoethanol, Tris (hydroxymethyl)-amino methane hydrochloride (Tris-HCl), Dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween-20), 3,3'-Diamine benzidine (DAB), 4-Chloro-1-naphthol, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), Nitro blue tetrazolium (NBT), Aprotinin, Sodium orthovanadate (Na_3VO_4), Poly (Glu-Tyr, 4:1).

3. 購自於英國 Amersham 公司：

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (5000Gi/mmol)。

4. 購自於聯工化學廠股份有限公司：

TCA, Sodium chloride (NaCl), Glycine, Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), Potassium chloride (KCl), Calcium chloride (CaCl_2), Sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Magnesium chloride (MgCl_2), Potassium phosphate, dibasic (K_2HPO_4), Hydrogen chloride (HCl)。

5.購自於和光純藥工業株氏會社：

Potassium phosphate, monobasic (KH_2PO_4)。

6.購自於美國 BIO-RAD 公司：

30% Acrylamide-bisacrylamide (29:1) solution, Protein assay dye,
Ammonium persulfate, TEMED。

7.購自於德國 E. Merck 公司：

DEAE-cellulose。

8.購自於美國 Transduction Laboratories 公司：

PKC- α mAb, PKC- β mAb, PKC- δ mAb, PKC- ϵ mAb, PKC- ι mAb,
PKC- λ mAb, PKC- μ mAb, PKC- θ mAb, PKC- ζ mAb, Brain cell
lysate。

9.購自於美國 Gibco/BRL 公司：

PKC- γ mAb、Fetal bovine serum。

10.購自於美國 Promega 公司：

Anti-mouse IgG (H&L) AP conjugate, Anti-rabbit IgG HRP
conjugate。

二、儀器

名稱	廠牌
Spectrophotometer	Beckman DU 640
Centrifuge	Beckman GS-6R
Ultracentrifuge	Beckman L-80
Ultracentrifuge	Hitachi himac CP 85 β
Power supply	Hoefer SX 250
Transphor power supply	Hoefer
Shaker	TKS
水浴加熱器	TKS WB201
單片垂直型電泳槽	OWL
Vortex	SI-2 Genie
homogenizer kontes tissue grind pestle	Wheaton

三、動物處理 (animal treatment)

Sprague-Dawley 雌大白鼠 (體重約 180-250 公克) 置於人工照明 [晝夜輪迴 12 小時光照，12 小時黑暗 (亮的週期為 05:00 ~ 17:00)]，溫控 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 之環境中，採自由進食方式。每日檢查其陰道塗抹液，藉以判斷雌大白鼠之動情週期，並挑選具二次以上規律之四日型動情週期雌大白鼠作為實驗動物。

四、假懷孕誘導法及子宮蛻膜形成

將具二次以上規律之四日型動情週期雌大白鼠於動情期當天上午以玻棒插入陰道內，在一分鐘內給予 200 次刺激子宮頸 (cervical stimulation)，刺激當天定為假懷孕期的第 0 天 [54,55]。在假懷孕期第 4 天，利用乙醚麻醉雌大白鼠，剖開其腹腔並將子

宮拉出，以特製長針頭僅輕刮其右邊子宮壁，另邊未刮之子宮作為對照組。手術完畢後，縫合並消毒再放回籠中繼續飼養。當假懷孕期達第 4、5、6、7、9、11 及 13 天時，分別將雌大白鼠斷頭犧牲，並取出二邊子宮以進行下列實驗。

五、PKC 之萃取 (extraction of PKC)

分別將有受子宮頸刺激 (實驗組) 及未受子宮頸刺激 (對照組) 的子宮剪開，秤重並記錄。以利剪先剪開子宮，並用玻棒輕輕地將內膜 (deciduomata ，蛻膜瘤部份) 刮下，藉以和外膜 (myometrium ，子宮基膜部份) 分開。外膜先以 1 ml Homogenization buffer A' (附錄二) 清洗 (此步驟內膜部份可省略)，然後將組織置於玻璃板上 (需在 4 °C 下)，滴入 0.5 ml Homogenization buffer A (附錄二)，以剪刀先將組織剪碎成泥狀，再放入研磨器內，加入 1 ml Homogenization buffer A，使用機械研磨 30 次使細胞破碎 (此研磨器需置於冰內)；萃取液倒入超高速離心管，補足 Homogenization buffer A 至 3 ml，經超高速離心 (40,000 rpm，4 °C，1 hr) 之後，可得上清液 (supernatant) 即為 PKC 的細胞質部份 (cytosolic fraction)，而沉澱物 (pellet) 再加入 1.5 ml Homogenization buffer B (附錄二)，並以超音波震盪器將沉澱物打散，然後在 4 °C 下培育 1 hr，並且每隔 10 mins 用力搖晃離心管，使 Triton-X 100 能充分作用；1hr 之後再次以超高速離心 (40,000 rpm，4 °C，1 hr) 此萃取液，離心所得之上清液即為 PKC 微粒部份 (particulate fraction，含細胞膜及細胞核之部份) [56]。經萃取得到的 PKC sample 分裝儲存在 -70 °C 下。

六、PKC 之純化 (partial purification of PKC)

上述萃取所得之樣本仍含有各種細胞質或細胞膜的酵素，及其他內在干擾物質，為使 PKC 之純度提高，以利活性測定，可採用 DEAE-cellulose chromatography 來純化[57]純化的方法是先製備 cellulose column，以 1 g 之 DEAE-cellulose 與 4 ml 之 20 mM Tris-HCl，pH 7.5 混合，通入塞以玻璃棉之玻璃管柱（6 × 50 mm）中，再以 0.75 ml Elution buffer（附錄二）沖洗三次，然後通入樣本，以 0.75 ml Elution buffer 再沖洗四次和 0.25 ml 含 120 mM KCl 之 Elution buffer 沖洗一次，最後通入 0.5 ml 含有 120 mM KCl 之 Elution buffer 並收集之，此液即含有較高純度之 PKC。

七、PKC 之活性測定（measurement of PKC activity）

PKC 之活性測定係採用放射磷標記之腺核甘三磷酸（ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ）作為磷酸根之供給者，而以組織蛋白（histone type II-S）作為磷酸根之接受者，藉測量 PKC 將放射磷轉接至組織蛋白之多寡，來定量 PKC 之活性。整個反應之過程如下：在 4 °C 下將 100 μl 反應溶液（附錄二）與 50 μl 之待測樣本於 5 × 60 mm 試管混合，然後加入 50 μl 之 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 溶液，隨後將之置於 30 °C 之水浴中，反應 10 分鐘之後，先加入 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA 50 μl ，次加入 0.5 ml 冰冷的 40 % trichloroacetic acid（TCA）溶液以中止反應，再加入 2 ml 冰冷之 1 % TCA 溶液，使 phosphorylated histone 析出，最後利用離心方式（Beckman GS-6R，3000 rpm，4 °C，30 min）將析出之蛋白沉澱下來，小心移除上清液，保留沉澱部份份再加入 2 ml 冰冷之 1 % TCA 溶液，經離心取沉澱部份加入閃爍液，再將整個試管放入偵測瓶，以 β -Counter 測放射量。反應結果扣除不加 phosphatidylserine 和 1,2-Diolein 的空白樣本（blank sample），即為 PKC 真正活性，以 pmol/min/mg protein 表示。

八、酪氨酸蛋白激酶之活性測定 (measurement of protein tyrosine kinase (PTK) activity)

測定細胞質及微粒質蛋白內生性的磷酸化作用是在總體積 100 μ l，包含 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)，20 mM magnesium acetate，5 mM NaF，1 mM EDTA，30 μ M sodium o-vanadate，及 1 mM DTT，在 20 $^{\circ}$ C 下加入 5 μ M [γ - 32 P]ATP (4000 cpm/pmol) 起始反應，20 分鐘之後加入 1 ml 20% (w/v) 的 TCA 終止反應。酪氨酸蛋白激酶之活性即以上述系統測定，但另加入 poly (Glu-Tyr，4 : 1) 當作受質。反應停止之後再加入 1 ml 20% 的 TCA，此時磷酸化產物被沉澱出，乾燥後定量。空白組則在沒有加入受質下反應。

九、蛋白濃度測定 (protein assay)

蛋白質的定量採用 Bradford protein assay 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白含量越高。測試方法首先以一系列已知濃度 BSA 加入 5 分之一體積的 Bradford protein dye，以波長 595 nm 可見光之吸光度作一標準曲線，再以同樣的方法測得樣品之 O.D. 值，即可根據標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

十、西方墨點分析法 (western blot)

樣本的處理是將 PKC 萃取液的細胞質部份取 30 μ g 及微粒部份取 15 μ g (大約 2 倍的比例)，分別加入 PBS 緩衝液 (附錄三) 後再與 Treatment buffer (附錄二) 混勻煮沸 10 分鐘，迅速置入冰浴中，再進行 SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳分析 [58]。SDS-聚丙烯

醃胺板膠電泳之上層膠體為 4 % Stacking gel，下層膠體為 10 % Separating gel（附錄二）。將作好之板膠固定到電泳裝置上，並將電泳緩衝液（1 × Tank buffer，附錄二）注滿上下電泳槽，然後將處理過之蛋白樣品溶液加入板膠上所形成之 U 型槽中，以 140 Voltage，35 mA 進行電泳。電泳結束後進行蛋白轉移[59]，將膠體浸入冰冷之 Electrotransfer buffer（附錄二）5 到 10 分鐘，將膠體平鋪在兩張浸溼的 Whatman 3M 濾紙上，此時將預先浸溼的硝化纖維紙蓋在膠體上面，依次再覆蓋兩張浸溼的 3M 濾紙，並以玻棒輕趕其間之氣泡後裝入 Transfer Holder，然後置於 Electrotransfer Tank 於 4 °C 下，進行 100 mA 電轉移，電轉移過夜後，取出硝化纖維紙浸入 10 ml/cm 含 3 % (w/v) FBS 之緩衝液（Blocking buffer，附錄二），在室溫下搖動 1 小時。然後加入抗體（PKC isoform Ab： α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 、 λ 、 μ 及 ι 或 Cell cycle protein Ab：Cdc2、Cdk2、Cdk4、Cip1、Cyclin A、Cyclin B、Cyclin D1、Cyclin D3、KAP 及 Kip1 或 signal transduction protein Ab：Raf、ERK-1、c-Jun 及 c-Fos 或 α -tubuline 或 Prolactin）於 20 ml 含 1 % (w/v) FBS 的 20 ml 緩衝液中，與硝化纖維紙在室溫下作用 3 小時，之後以緩衝液（Washing buffer，附錄二）清洗兩次，每次 10 分鐘，最後再清洗一次即可倒掉。接著再進一步以加有 20 μ g Secondary Ab 含 1 % (w/v) FBS 的 20 ml 緩衝液，於室溫下作用 1 小時，然後以緩衝液清洗 2 次，每次 10 分鐘，最後再清洗一次即可倒掉。最後將硝化纖維紙浸入 20ml 的受質溶液（Substrate buffer，附錄二），加上 7 mg 的 NBT 及 5 mg 的 BCIP 進行呈色反應，待硝化纖維紙上有明顯的 band 出現，即可以去離子水終止呈色反應，清洗乾淨後晾乾。

十一、免疫沉澱法 (immunoprecipitation)

取 400 μg 的檢體加入 2X 的 ip buffer (附錄二) 補足至 1 ml , 再加入 10 μl 的 phosphotyrosine antibody , 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 3 小時 , 之後以 10,000 rpm 的轉速在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下離心 4 分鐘 , 丟棄上清液 , 然後以 1 X ip buffer 清洗沉澱物 , 再以 10,000 rpm 的轉速在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下離心 4 分鐘 , 經過兩次後 , 去除上清液 , 加入 100 μl 的 PBS 溶解沉澱物即可。

十二、免疫螢光標定法 (immunofluorescence labeling)

將假懷孕不同天數的子宮組織以 10 % 福馬林處理 , 然後包埋固定在石蠟中 , 以 3 微米的厚度作切片 , 固定於載玻片上後 , 接著以二甲苯脫蠟 , 並透過一系列不同濃度的酒精重新水合 , 再以 0.1 % Triton X-100 / PBS 處理 20 分鐘 , 使其具有浸透性。接著將標本浸入含有 3 % 胎牛血清的 PBS 中使其阻止一些非特異性抗原的結合 , 經過 25 分鐘之後 , 以 PBS 清洗 , 然後在室溫下加入單株抗體 PKC α 及 ζ 作用 1 小時 (10 mg / 1 ml PBS-0.2 % BSA) 。 1 小時之後 , 以 PBS 清洗 3 次來移除抗體 , 每次 5 分鐘。接著加入含有 FITC 的 2 級抗體 , 在室溫下作用 45 分鐘。最後在標本上滴入 mounting media , 再以蓋玻片覆蓋固定。

十三、雷射掃描的共軛焦螢光顯微鏡 (laser scanning confocal fluorescence microscopy)

樣本以雷射掃描的共軛焦螢光顯示鏡 (LSM410 , Zeiss) 分析其螢光分佈 , 此顯微鏡使用 PI-Neofluar (2X 和 20X) 的物鏡 (NA=1.4) 。 取用相同的光學限定範圍 , Z 軸焦距為 1 μl , 影像

是由 Ar (188 nm)的雷射激發標定的樣本，取特定的濾過區段 (515-545 nm) 以觀測 FITC 螢光，和由氦/氬 (543 nm) 雷射去激發，取特定的濾過波段 (590 nm) 以觀察 LSM 傳遞出掃到的細胞結構。我們確定在不斷收集影像的過程並沒有機械性產生的移動。

十四、組織學檢查 (histology examination)

在共軛焦螢光顯示鏡分析之後，所有的樣本立刻以 hematoxylin 及曙紅 (eosin) 染色，計算細胞有絲分裂的數量。

十五、十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)

樣本的處理是將 PKC 萃取液的細胞質部份取 30 μ g 及細胞膜部份取 15 μ g，分別加入 PBS 緩衝液後再與 Treatment buffer 混勻煮沸 10 分鐘，迅速置入冰浴中，再進行 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳分析，然後以 Comassie brilliant blue 染色 1 小時，再以退色液退色。

陸、實驗結果

一、雌大白鼠動情週期的檢查

鼠類自有性週期開始，全年均表現動情週期之輪回，此謂多情週期（polyestrus-cycle）；利用陰道塗抹液觀察雌大白鼠細胞型態，來判定其生理週期，進而選擇至少有兩次以上連續正常週期之雌大白鼠作假懷孕的實驗。動物處理流程如圖 1 所示。

一般正常雌大白鼠的生理週期為四天一個循環，可分為下列四個時期：1.發情前期（proestrus），出現很多卵圓形或紡錘形之上皮細胞，並可見到其細胞內含有細胞核；2.發情期（estrus），陰道的細胞呈現極不規則、扁平角化，且有很多殘餘的上皮細胞；3.發情後期（metestrus），陰道的細胞呈現角化，並有白血球浸潤其中；4.間情期（diestrus），上皮細胞很少，但有很多白血球出現。

實驗設計在雌大白鼠的動情期當天以玻璃棒插入陰道內震動 1 分鐘，刺激子宮頸使其產生假懷孕狀態（刺激當天定為假懷孕的第 1 天），以便觀察子宮內膜以及 PKC 在假懷孕情況下的變化（圖 2）。

二、誘導蛻膜作用發生

在假懷孕的第四天，藉由刮傷這個動作來代替胚胎的著床。結果發現在刮傷的第 5 天（即假懷孕的第九天），有刮傷的子宮比沒有刮傷的子宮（對照組）變大許多（圖 3）。而且若將對照組與刺激組分開秤重，也可發現刺激組因有蛻膜瘤的形成而重量增加（表 1）。

三、測量發生蛻膜作用第 5 天時假懷孕鼠的 PKC 活性變化

PKC 活性測定之前通常會先經過純化的步驟，使純度提高以利活性測定。實驗將生成蛻膜第 5 天的假懷孕鼠以緩衝溶液 A 及 B 萃取，分別可得到細胞質及微粒質部份的萃取液，經過 DEAE-cellulose chromatography 的方式純化之後，測 PKC 的活性。在對照組-未處理的子宮組織中細胞質部份 PKC 的活性為 57.5 ± 4.0 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ ，有蛻膜生成的子宮組織為 1.5 ± 1.4 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ (表 2)，兩者之間有極顯著的差異性存在 ($p < 0.001$)。在微粒質的部份，對照組 PKC 的活性為 236.8 ± 88.6 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ ，有蛻膜生成的子宮組織為 124.8 ± 14.5 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ ，在統計學上的比較兩者之間並沒有顯著的差異性存在。以上結果已在雜誌上發表[60]。

四、測量發生蛻膜作用第 5 天時假懷孕鼠的酪氨酸蛋白激酶活性 (PTK) 變化

實驗同時也分析酪氨酸蛋白激酶活性在假懷孕鼠的變化。在對照組及有蛻膜的子宮細胞質部份，酪氨酸蛋白激酶活性分別為 20.6 ± 3.2 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ 及 20.1 ± 3.0 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ (表 3)。另外在微粒質部份對照組及有蛻膜的子宮其酪氨酸蛋白激酶活性分別為 36.8 ± 5.1 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ 及 42.5 ± 9.0 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ ；若以統計學的觀點來比較，當蛻膜生成時，不管是細胞質或微粒質部份都沒有顯著的差異存在。

五、確定假懷孕鼠中 PKC 異構體的存在

為了決定是否 PKC 異構體與蛻膜細胞的增殖有關聯，我們首先使用 Transduction Laboratory 所製備的 PKC 異構體抗體去分析未

處理的對照組子宮（圖 4A）與蛻膜瘤生成的第 2 天的子宮（圖 4B）中 10 種 PKC 異構體（ α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 θ 、 ι 、 λ 及 μ ）的表現。兩個子宮各加入每 10 ml 含有 1 g 組織的均質化溶液 B，以 Konetes homogenizer 研磨 30 次後，在 4 °C 下以超高速離心 1 小時。上清液被用來作西方墨點（western blot）分析。分析結果顯示在 ~80 KDa 有 PKC α 及 γ ，~78 KDa 有 PKC δ 及 ~72 KDa 有 PKC ζ 、 ι 及 λ 的出現，但是 PKC β 、 ϵ 、 θ 及 μ 則沒有任何免疫反應出現。在所有 PKC 異構體中，分別在 54 KDa，48 KDa，42 KDa 及 24 KDa 有四條 band 出現，與當作 maker 的 brain cell lysates 比較可視為 non-specific band。出現在 PKC ι 的 150 KDa 及 65 KDa 的兩條 band 及出現在 PKC μ 的 78 KDa，65 KDa 及 38 KDa 的三條 band 也是 non-specific band。其他方面，透過免疫沉澱的方法研究，anti-PKC α 的 antibody 並不能與 PKC γ 交互反應。因此，anti-PKC γ 的 antibody 並不是特異的針對 PKC γ ，但可以証實 PKC α 確實出現在子宮組織。根據結果顯示至少有 5 種 PKC 異構體（ α 、 δ 、 ζ 、 ι 及 λ ）出現在大白鼠子宮組織。

六、西方墨點分析 PKC 異構體的表現

根據上述結果得知 PKC 異構體在受刮傷刺激的假懷孕鼠中與未受刺激的對照組比較之下確實有改變，為更進一步確定，實驗接著分析受刮傷後第 2 天的三組不同隻大白鼠，並且針對表現較明顯的 PKC α 及 ζ 作西方墨點，結果發現在受刮傷的內膜細胞質部份 α 的表現比對照組低，而且 α 有極顯著差異（ $P < 0.01$ ），但 ζ 與對照組比較之下則表現量增高，且有顯著差異性（圖 5）。在內膜的微粒質部份，與對照組比較之下可發現 PKC α 仍表現較低，而且 α 有顯著差異。 ζ 與對照組比較之下表現量增高，並且有

極顯著差異性存在。

子宮在未懷孕的正常情況下，是不包含蛻膜部份的；所謂蛻膜是指當胚胎欲著床時，子宮內膜為包埋胚胎所生成的一種內膜，當妊娠結束，這層內膜便隨之排出，因而被命名為蛻膜。為了區分及瞭解蛻膜及其周圍子宮肌層內的 PKC 的表現，實驗將受刮傷刺激第 5 天的假懷孕鼠子宮分為子宮肌層及蛻膜兩部份，與對照組進行西方墨點分析。結果不管在子宮肌層或蛻膜瘤的細胞質部份，PKC α 的表現皆比對照組低，其中 α 有極顯著差異（圖 6）。PKC ζ 在子宮肌層的表現與對照組相似，但在蛻膜瘤部份則表現增加，與對照組有顯著的差異。另外微粒質部份，子宮肌層的 PKC α 與對照組比較有顯著的降低，在蛻膜瘤的部份雖較低，但卻不具統計上的意義。PKC ζ 則不管在子宮肌層或蛻膜瘤部份皆比對照組來得高，尤其在蛻膜瘤部份有極顯著的差異性。

七、假懷孕子宮在刮傷刺激後不同天數重量的變化

由上述實驗可知 PKC 在有蛻膜生成第 5 天的假懷孕鼠中有活性改變及不同異構體的表現，接著進一步觀察假懷孕且受刮傷刺激後的第 0、1、2、3、5、7、9 等不同天數子宮中 PKC 的變化。經過不同天數的處理，結果發現大白鼠子宮的重量增加很多，蛻膜生成的第 7 天子宮重量比對照組未處理的子宮組織重大約 10 倍，但在第 9 天時重量就明顯的下降（圖 7）；在前 7 天子宮重量的增加猜測可能是蛻膜瘤的生長及子宮肌層細胞肥大所造成。

八、子宮在蛻膜瘤組織成長週期時的變化

從圖 8 的第 0 天可以看到子宮的二個部份：外層是外膜組織，

裡面是內膜組織。隨著天數的增加，內膜組織的厚度也隨著增加，進而使內膜組織的子宮腔部份變得越來越小，到了第 9 天內膜組織幾乎要整個與外膜組織脫離而排出。

九、子宮蛻膜瘤細胞的細胞分裂情形

我們利用組織學方式檢查增殖的蛻膜細胞，結果觀察到有細胞分裂的情形。以第 2 天與對照組比較之下，細胞出現許多分裂現象（圖 9.A 及 9.B）。其實在第 1 天蛻膜細胞分裂的速率就已開始，並持續增加到第 7 天，而且在第 2 天及第 3 天之間達到最大值（圖 9.C；分別是 0.47 及 0.33 分裂細胞/ 10^4 細胞），然後很快的停止分裂。這個結果顯示為何第 7 天的子宮重量最重的原因，可能是因為細胞增殖和細胞腫大才造成子宮體積變大。

十、免疫組織化學分析（immunohistochemistry）假懷孕大白鼠蛻膜瘤的 PKC 異構體分佈位置

在外傷刺激之後，經過處理的子宮重量從第 1 天到第 7 天逐漸增加，然後在第 9 天復原，重量的增加是由於 hypersia 在子宮內膜的基質細胞轉化成蛻膜細胞，而子宮肌層細胞則有肥大作用。以 hematoxylin / eosin 染色顯示在受到刺激的子宮組織內膜部份有明顯的蛻膜細胞分佈（圖 10），即蛻膜瘤部份。細胞分裂速率從第 1 天增加到第 7 天，並且在第 2 天及第 3 天之間達到最大值。

為瞭解蛻膜瘤發展時，蛋白激酵素異構體參與時的位置分佈，因此以免疫組織化學法（immunohistochemistry）來分析。結果顯示在第 0 天時，以雷射掃描共軛焦螢光顯示鏡偵測 PKC α 的螢光分佈在子宮肌層，但在內膜部分沒有明顯的分佈（圖 10）。而且在蛻膜瘤生成作用期間，PKC α 的螢光在子宮肌層持續出

現，而且其表現量沒有改變（圖 11；箭頭標示處）。然而在內膜部分的蛻膜瘤也可偵測到 PKC α 存在，而且此螢光表現的區域隨著蛻膜瘤從第 1 天至第 7 天的增大而擴大。另外，在蛻膜瘤細胞的細胞核附近可觀察到 PKC α （圖 13），而且首先在第 2 天及第 3 天出現（圖 12）。

不像 PKC α ，PKC ζ 被分佈在細胞的整個區域（圖 13），而且若與第 0 天比較，可發現在蛻膜生成期間，PKC ζ 在蛻膜瘤與子宮肌層皆有增加的趨勢（圖 10），而與蛻膜細胞相比較也是如此。以上結果已在雜誌上發表[61]

十一、蛻膜生成作用中 PKC 異構體的變化

實驗下一步測試 5 種蛋白激酶素異構體在蛻膜生成作用中的表現。這些資料顯示 PKC α 蛋白量在第 2-5 天與第 0 天比較，蛻膜瘤的細胞質部分被減少了約 45%~65%（圖 14A 及 B），但是在微粒質部分則沒有改變（圖 15A 及 B），此種現象被稱為 down-regulation[45]。因為第 0-2 天的樣品萃取物是包含整個蛻膜瘤子宮組織，down-regulation 可能發生在第 1 天並且開始增加細胞分裂，而在第 2-3 天達到最大（圖 9C）。但是在子宮肌層中細胞質及微粒質部分 PKC α 的蛋白量並沒有改變（圖 14 及 15）。PKC ζ 被認為是 mitogen，並不是 down-modulation，在蛻膜瘤及子宮肌層兩個部位，不管是細胞質部分或是微粒質部份，PKC ζ 都會被增加（圖 14 及 15）。蛻膜瘤的微粒質部分，在第 2 到第 3 天之間與第 0 天比較，PKC ζ 的量被明顯的增加大約 200-300%（圖 15B），而這與其蛻膜瘤細胞的分裂速率相當。其他的 PKC 異構體像 δ 、 ι 及 λ 在蛻膜瘤及子宮肌層的細胞質及微粒質部分也可觀察到有增加的現象（圖 14 及 15），這些異構體在蛻膜瘤的

微粒質部分，若第 3 天到第 5 天之間與第 0 天比較起來，有被增加 200-300 % (圖 15B)，而這些異構體的表現可能與細胞分裂的降低有關。以上結果已被雜誌接受[62]。用不同廠牌 (Gibco) 的抗體測定 PKC γ ，結果發現在蛻膜瘤發生時並沒有 γ 的表現 (圖 16)。

雖然最初分析受刮傷刺激第 2 天的假懷孕鼠中未曾明顯的發現 PKC β 、 ϵ 及 μ 的表現，但實驗也以相同的西方墨點方式分析這三種異構體，結果 PKC β 表現不明顯，PKC ϵ 在第 2、3 天的細胞質表現增加，但是微粒質部份則在第 3、5 天表現增加，PKC μ 在細胞質部份每天均有表現，但在第 5、7 天表現略高，微粒質部份則在第 1、3、5 天表現增加。(圖 17 及 18)

十二、訊息傳遞蛋白 (signal transduction protein) 的分析

PKC 在細胞內扮演一個重要的二級訊息角色，透過 PKC 的作用可傳達細胞生長、增殖及分化。為瞭解假懷孕鼠蛻膜生成的機制是由經由哪些蛋白的傳遞而導致蛻膜的生長，故分析一些在訊息傳導上具功能表現的蛋白。c-Raf 是 PKC 的受質，可直接受到其調控，以本實驗的檢體進行 c-Raf 的西方墨點顯示其表現與 PKC α 相類似(圖 19)。增殖的細胞中會有 ERK-1、c-Fos 及 c-Jun 的表現，實驗結果也發現在第 2、3 天時，此三種蛋白表現量增加，而且透過 phosphotyrosine 的免疫沉澱也得知此時 ERK-1 有活化現象 (圖 20-23)。

十三、假懷孕鼠蛻膜生成時整體蛋白的表現

假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蛻膜瘤與子宮肌層個別研磨後，分別取細胞質 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 及微粒質 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢

體量跑變質的聚丙烯醯胺凝膠電泳，然後以 Comassie brilliant blue 染色，由此可觀察到在整個蛻膜中所有蛋白表現量（圖 24）。結果發現在蛻膜生成的第 7~9 天，蛋白表現量有明顯的降低，這有可能是因為此時的蛻膜細胞即將死亡而流出子宮所致。

十四、細胞週期蛋白（cell cycle protein）分析

因實驗所採用的假懷孕大白鼠受刮傷刺激後，在蛻膜生成期間細胞有明顯增殖的現象出現，尤其在第 2-3 天之間有許多細胞分裂情形出現，這表示在蛻膜生成期間細胞可能處在細胞週期的有絲分裂期，為了確定此一現象，實驗以西方墨點方式分析細胞週期內的十種蛋白表現，包括 Cdc2（34 KDa）、Cdk2（33 KDa）、Cdk4（33 KDa）、Cip1（21 KDa）、cyclin B（62 KDa）、cyclin D1（36 KDa）、cyclin D3（33 KDa）、p27^{kip1}（27 KDa）、Rb（110 KDa）及 Rb2（130 KDa）。首先實驗仍以對照組及受刮傷刺激第 2 天的假懷孕鼠比較這十種蛋白，結果發現只有 Cdc2、Cdk2 及 cyclin D3 三種蛋白表現，而且在第 2 天的表現比對照組有明顯增加的情形（圖 25）。確定有細胞週期蛋白表現之後，接著針對表現明顯的這三個蛋白進行受到不同天數刮傷刺激的假懷孕鼠分析。由實驗結果發現在細胞質部份，Cdc2、Cdk2 及 cyclin D3 三種蛋白從刮傷第 1 天起表現量開始增加，到第 3 天達到最大值，第 5 天開始下降，在第 7 及第 9 天時則幾乎沒有表現（圖 26）。而在子宮肌層部份三種蛋白表現大不相同；Cdc2 的表現與蛻膜瘤表現類似，但最大的差別在於第 9 天時蛋白又恢復表現；Cdk2 從第 3 天到第 9 天的表現並沒有很大的差異；cyclin D3 則在第 5 天表現最高，隨後下降，但在第 9 天時其表現仍能維持與第 3 天相同。另外微粒質部份，三種蛋白在蛻

膜瘤的表現與細胞質部份類似，但 Cdk2 及 cyclin D3 在第 5 天時表現突然降低（圖 27），一直到第 9 天時都沒有表現。在子宮肌層部份，三種蛋白表現皆相同，第 3 天表現最高，然後持續降低至第 7 天，第 9 天時突然表現增加，尤其是 Cdk2 及 cyclin D3，其增加的量甚至超過第 3 天的表現。

十五、荷爾蒙泌乳素的表現（prolactin）

實驗分析蛻膜生成時 prolactin 的表現，結果在蛻膜瘤的細胞質部份第 5-9 天有表現，而且以第 7 天表現最高（圖 28）。

柒、討論

利用子宮頸刺激造成假懷孕狀態後，在第 4 天用刮傷刺激誘發蛻膜瘤組織的增生，根據 PKC 在假懷孕鼠蛻膜生成第 5 天（即假懷孕第 9 天）的活性測定顯示，細胞質部分的 PKC 活性比對照組（未生成蛻膜）下降，但微粒質部分則無差異。這個結果與以葉酸誘導腎臟再生的情形類似[45]，細胞質的 PKC α 活性明顯下降，但微粒質的 PKC α 則沒有改變。另外在人類的直腸癌[63]或以化學方法誘導大白鼠發生直腸癌[64]時也有類似的 down-modulation 現象。因此，我們猜測蛻膜組織細胞質 PKC 降低可能是由於某種原因促使 PKC 持續活化，最後造成 PKC 的 down-regulation。

實驗分析 PTK 活性，結果在未處理的對照組及有蛻膜生成的組織，不管在細胞質或微粒質部分都沒有明顯的區別。Dubaybo 等人[65]的研究發現，當肺代償性生長期間，PTK 活性會提高很多。其結果與我們的實驗結果相反，可能是兩者使用之實驗模式不同所致。

觀察刮傷刺激後的第 0、1、2、3、5、7、9 天中子宮蛻膜和 PKC 的變化，結果顯示子宮蛻膜細胞不斷在增殖，其中以第 3 天的細胞分裂數目最多，第 5 天減緩。西方墨點分析結果顯示蛻膜瘤中細胞質部分的 PKC α 的減少與先前的活性表現有關，這暗示細胞質的 histone kinase 活性減少可能是因為細胞質中 PKC α 的表現量降低。

根據 immunohistochemistry 的結果指出，在第 2 天及第 3 天之間蛻膜作用發生時，PKC α 在蛻膜瘤的分佈主要存在核的表面，而西方墨點分析也顯示細胞質的 PKC α 在蛻膜瘤部分被降低，這

表示一些新合成的和舊的 PKC α 被轉位到蛻膜瘤的核周圍，以致造成細胞質的 PKC α 減少。PKC α 優先被轉位到形成蛻膜瘤的增殖蛻膜細胞，而不是肥大的子宮肌層，Chen C. S. 等人指出 PKC 轉位到核周圍時會有活化和 down-regulation 的現象發生[66]，而且相似的情形在其他組織亦可觀察到。例如以 folic acid 誘導腎臟再生時[45]，PKC α down-modulation 被發現在增殖的腎臟而不是肥大的腎臟；相同的情況也曾在增殖的肝臟中被提出[67]，因此我們認為 PKC α 重新分佈及 down-modulation 可能參與細胞的生長。

根據我們的結果，PKC ζ 在蛻膜瘤組織的含量有增加的情形，其增加的時間與蛻膜細胞的細胞分裂比較正好相對應，另外透過 immunohistochemistry 的螢光顯示蛻膜生成時 PKC ζ 有增加的現象，而且與蛻膜細胞的增殖是同時發生的。這種現象在許多實驗也有類似的發現。例如在 *Xenopus* 的卵母細胞及大白鼠的纖維母細胞中若過度表現 PKC ζ 會減少細胞增殖所需的細胞分裂劑[68]。此外，在 Rat-1 纖維母細胞瘤，若 PKC ζ 下降則抑制生長，此時由 platelet-derived growth factor 及 phosphatidylcholine-specific phospholipase C 所引起的 PKC ζ 過度表現會增加 mitogen-activated protein kinase 的活化而刺激細胞增殖[69]。

PKC ζ 的含量在子宮肌層也有增加，但是卻很少有細胞分裂的情形，所以我們猜測某些因子可能伴隨著 PKC ζ 而作用達成細胞增殖，例如 PKC α 活化，對於 PKC ζ 促進細胞增殖可能是必需的。

對照之下，過度表現的 PKC δ 可能被認為當作一個負調控者，Mischak et al. 聲明過度表現 PKC δ 會減少 NIH3T3 細胞的生長速率[70]。我們的結果顯示在蛻膜瘤組織的晚期高度表現 PKC δ

會減少蛻膜細胞的有絲分裂，這證明了 PKC δ 扮演一個負調控的角色。雖然 PKC ι 及 PKC λ 的氨基酸序列與 PKC ζ 有程度上的 homologous [71,72]，但此處這兩個異構體在蛻膜作用中所表現的增加模式與 PKC δ 相類似，這表示 PKC ι 及 PKC λ 可能也具負調控功能，但是，實際上這兩個異構體如何影響細胞生長仍是未知。

從我們的實驗結果，可以觀察到在發育的蛻膜細胞中 PKC down-modulation，而且，我們猜測不同 PKC 異構體表現可能調控蛻膜瘤的發育，雖然 PKC 異構體 mRNA 的含量還未測定。

子宮蛻膜瘤形成時與 PKC 的也反應出下游蛋白的表現；我們的結果顯示 c-Raf，ERK-1，c-Jun 及 c-Fos 在 PKC α down-modulation 時和子宮蛻膜細胞增殖旺盛時都表現增加，另外 ERK-1 經由磷酸化 tyrosine 的抗體所免疫沉澱下來的結果，也發現其活性表現增加，可見此時 PKC α 的 down-modulation 應可能代表是在活化狀態，而非只是量的下降而已。

蛻膜瘤生成之第 5-7 天，實驗觀察到有 prolactin 的表現，這與 Croze 等人之研究相似 [73]，但此處無法真實地確定此一蛋白即為 prolactin 的表現，可能需利用 radioimmunoassay (RIA) 或定序等方法來證實。

第二部份：惡性腫瘤

人類肝細胞癌中 PKC 異構體的表現

壹、中文摘要

我們先前的研究發現惡化的肝癌與細胞膜上的 PKC 活性減少有關，本次實驗進一步研究人類肝癌組織 PKC 異構體的表現。肝癌檢體得自彰化基督教醫院，合成細胞質部分及細胞膜部分，以西方墨點分析。結果顯示肝癌組織內細胞膜上的 PKC α 比鄰近正常組織明顯降低，但是細胞質的 PKC α 則沒有差異，這個結果與癌組織中 PKC 活性表現一致。但是，PKC ζ 及 PKC δ 在細胞質的及細胞膜的表現明顯增加。此外，全部 8 位患者皆可觀察到 PKC α 、PKC δ 及 PKC ζ 的不同表現。因此，我們猜測 PKC 異構體不同的表現可能與人類肝癌的發生有關。

貳、英文摘要

In our previous study, we had found that the reduced membrane-PKC activity was associated with the malignancy of liver cancer. This study was investigated the expression of PKC isoforms in human liver cancer tissue. The samples obtained from Department of surgery of Changhua Christian Hospital, were subfracted into cytosolic fraction and membrane fraction, and analyzed by western blot. The result showed that the membrane-PKC α in cancer tissue was significantly decreased as comparing with that in the adjacent normal tissue, while the cytosolic PKC α was not different. This data was paralleled with PKC activity in human liver cancer. Whereas, both PKC ζ and PKC δ were significantly increased in both cytosolic and membrane fractions. Moverover, these various expression of PKC α , PKC δ and PKC ζ were observed in all of 8 patients. Thus, we suggested that the various expression of PKC isoforms may be correlated with the development of the human liver cancer.

參、前言

一種鈣和磷酸酯依賴的蛋白激酶 C (protein kinase C , 簡稱 PKC) 是於 1977 年首先被 Nishizuka 發現 [22] 後即受到廣泛的重視及研究 , PKC 在一些依賴鈣離子調控功能的細胞中扮演著重要角色 [27] 。一種細胞內因受到外在因子刺激而導致 phosphatidylinositol 水解反應的代謝產物 diacylglycerol (DAG) 和腫瘤促進劑 Phorbol esters 具有加強鈣離子活化 PKC 的作用 [52,74,75] 。在一些細胞外的訊息如生長因子 (Growth factors) , 荷爾蒙 (hormones) , 和神經傳遞物質 (neurotransmitters) 的傳遞穿過細胞膜的反應中 , PKC 扮演一個重要角色 [76,77] 。 PKC 具有誘發許多細胞反應的能力 , 包括細胞的增殖 (proliferation) , 細胞的分化 (differentiation) , 基因的表現和腫瘤的促進等 [30] 。

東南亞地區是全世界肝癌發生率最高的一個地區 , 肝癌在我國十大惡性腫瘤所造成的死亡率排名始終高居榜首 , 根據 1996 年衛生署的統計顯示 , 肝癌死亡人數就有 5,794 人 , 即每十萬人中就有 27.02 人死亡 , 佔癌症總死亡人數的 20.72 % 。原發性肝癌分三種類型 : 肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma) , 膽管癌 (cholangiocarcinoma) , 及肝細胞膽管癌 (mixed hepatocholangio-carcinoma) 。在這三種原發性肝癌中 , 肝細胞癌的患患者數最多 , 約佔 80 % , 而其中 60 ~ 80 % 是自肝硬化轉變而來的 , 且根據統計 , 台灣 95 % 以上的肝癌患者都有 B—肝炎表面抗原 (HBsAg) , 另外食米中的黃麴黴 (flavacidin) 也被認為與肝癌的致病有關。

肝癌的形成機制還不是很明確 , 至今醫療方式大多以外科手術切除為主 , 而化學放射治療為輔的方式進行治療。其病理級數

之辨別是以腫瘤大小來判斷，但以腫瘤大小來判斷其病理級數似乎太粗糙。而今 Reifenberger 等人已將 PKC 的表現用在神經腫瘤學中的腫瘤病理組織之分類[78]，其論點認為 PKC 的表現在早期癌症的偵測可能是一個腫瘤標記 (tumoral marker)。而在人類乳癌 (breast tumor) 及腦下垂體腫瘤 (pituitary tumor) 和惡性的神經膠質瘤 (malignant glioma) 中可發現 PKC 的活性偏高的 [79-81]。但是在人類大腸腺癌 (colonic carcinoma) 中發現腫瘤的大小和 PKC 的活性是呈反比的結果，即其 PKC 的活性是降低的 [82,83]。相同的，和控制組的皮膚切片做比較失控的乾癬 (psoriasis) 患者增生的皮膚切片中也發現其 PKC 的活性是降低的 [84]。所以在探討腫瘤細胞中 PKC 活性的變化時，可能會出現 PKC 活性增加或降低的結果。

至今已確定有 12 種 PKC 異構體 (α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 θ 、 ι 、 λ 、 η 及 μ) 存在，這些異構體在不同的組織或細胞中有不同的分佈及功能。例如 PKC α 、 δ 及 ζ 普遍的存在許多細胞及組織中，但像 PKC γ 、 η 及 θ 則特異性的只存在一種或少數的組織中 [85]。此外，大部份的細胞會確實的出現某一些固定的 PKC 異構體，但其表現會受到不同的刺激而表現不同。例如在 Swiss 3T3 fibroblasts 中，有 PKC α 、 δ 、 ϵ 及 ζ 的存在，若受到 bombesin 的刺激後， PIP_2 水解成 DAG，在 30 小時後會誘導 PKC α 的表現，PKC δ 及 ϵ 快速的與細胞膜連結接著 down-regulation，但是 PKC ζ 並無反應。然而在相同的細胞中，若細胞受到 PDGF 的刺激，PKC α 並無反應，其他的異構體則表現相同。

已知一些腫瘤細胞的增殖與 PKC 異構體的表現有關，這些異構體具有促進或抑制腫瘤細胞生長的能力；例如在增殖狀態中的 C6 glioma cells 有很高的 PKC 酵素活性，而此活性是由於 PKC α

大量表現所致[86]。另外在大白鼠的 hepatoma cell line MH1C1 中，若以 PKC α anti-sense oligonucleotide 處理，會造成細胞生長停止[87]。若在 HT29 colon cancer cell line 中大量表現 PKC β II，會使腫瘤的生長受到抑制[88]。這些結果顯示 PKC 異構體在腫瘤形成機制中扮演重要的角色。

在以前一些報告中指出經由化學致癌劑（carcinogens）所誘發的肝細胞癌中，可發現蛋白質磷酸化（phosphorylation）和蛋白激酶活性明顯的變化[89,90]，然而在人類肝癌中 PKC 所扮演的角色至今不明。本實驗室先前曾針對九位患有肝細胞癌之患者進行研究，由外科手術取其肝癌組織及臨近的正常肝組織來測定它們的 PKC 活性，結果指出在肝癌的細胞膜部份其 PKC 的活性是降低的，且隨著肝癌組織的惡化其細胞膜部份之 PKC 活性會隨之下降。本篇實驗進一步以西方墨點觀察 PKC 異構體的表現。

肆、實驗材料與方法

1. 蛋白激酵素 C 之抽取 (extraction of PKC)

從外科手術所獲得的樣本須馬上置入液態氮中儲存，等至醫院取回後再從液態氮桶中移至 -70°C 冰箱儲存，秤取 0.1 克之肝組織，加入 3 ml 的組織研磨液 A (homogenization buffer A ，附錄二) ，以研磨器 (Wheaton ， homogenizer kontes tissue grind pestle 10 ml) 研磨 30 次使細胞破碎，將所得萃取液經離心 (Beckman GS-6R ， 1000 rpm ， 4°C ， 10 min) 移除細胞核後，再將上清液經超高速離心 (Hitachi P56A $100,000 \times g$ ， 4°C ， 1 hr) ，離心後之上清液 (supernatant) 即為細胞質蛋白激酵素 C 的部分；而沉澱物 (pellet) 再以 1.5 ml 附加有 0.1 % Triton X-100 的組織研磨液混合震盪均勻，於 0°C 下培育 1 小時，再次以超高速離心 (Hitachi P56A $100,000 \times g$ ， 4°C ， 1 hr) ，離心所得之上清液 (supernatant) 便為細胞膜部分蛋白激酵素 C 的所在，將萃取到的樣本儲存在 -70°C 下，酵素在一個月內是穩定的。

2. 蛋白激酵素 C 之純化 (partial purification of PKC)

實驗方法及步驟請參考前一部份之實驗材料與方法第六小節。

3. 蛋白激酵素 C 之活性測定

實驗方法及步驟請參考前一部份之實驗材料與方法第七小節。

4. 蛋白濃度測定 (protein assay)

實驗方法如及步驟請參考前一部份之實驗材料與方法第九小節。

5. 西方墨點分析法 (western blot)

實驗方法如及步驟請參考前一部份之實驗材料與方法第十小節。

6. 十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)

實驗方法如及步驟請參考前一部份之實驗材料與方法第十五小節。

伍、實驗結果

我們針對 8 位具有原發性人類肝癌 (hepatocellular carcinoma) 的患者，自外科手術上取得其肝癌樣本組織及其鄰近的正常肝組織，萃取細胞質內和細胞膜上的蛋白激酶 C，測定活性及蛋白的表現。8 位肝癌患者的臨床病理級數及相關資料記錄於表 4；在 PKC 活性的表現上我們發現正常肝組織中細胞膜的部分，PKC 的活性是 745.8 ± 88.5 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ protein，表現量較高，而在肝癌組織細胞膜部分，PKC 的活性明顯的降低，只有 539.7 ± 83.1 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ protein，且癌組織和正常肝組織其細胞膜的 PKC 活性之差異具有統計學上的意義 ($p < 0.01$) (表 5)。若針對各別比較，可發現 8 位患者中其癌組織細胞膜的 PKC 活性皆比其鄰近正常組織細胞膜的 PKC 活性較低。另外我們比較癌組織和正常肝組織其細胞質內的 PKC 活性，在肝癌組織細胞質部分 PKC 的活性是 64.5 ± 7.6 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ protein，而在正常肝組織細胞質部分 PKC 的活性是 65.4 ± 11.1 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg}$ protein，兩者 PKC 活性之差異並不具統計學上的意義。

另外我們將 PKC 的蛋白活性換算成組織的 PKC 活性(表 6)，肝癌組織細胞膜部分全部的 PKC 活性是 732.1 ± 94.0 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{g}$ tissue，而正常的肝組織細胞膜部分全部的 PKC 活性是 1041.5 ± 141.8 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{g}$ tissue，發現肝癌組織細胞膜部分全部的 PKC 活性是有明顯的降低 ($p < 0.05$)。而在細胞質部分全部的 PKC 活性在正常肝組織和肝癌組織分別是 431.0 ± 51.6 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{g}$ tissue 和 416.7 ± 50.1 pmol $^{32}\text{P}/\text{min}/\text{g}$ tissue，這結果與上述單獨的 PKC 蛋白的活性表現一致。

為瞭解肝細胞癌內 PKC 異構體蛋白的表現，故以西方墨點方

式分析，結果發現在人類正常的肝臟組織內至少有 PKC α 、 δ 及 ζ 三種異構體的表現（圖 29），而且在肝癌組織內這三種異構體的表現量與其鄰近正常組織內的 PKC 並不相同。PKC α 在肝癌組織中細胞膜部份的表現比鄰近正常組織來得低，具統計學上的意義（ $P < 0.05$ ）（圖 30,31）；為更進一步確定 PKC α 參與肝組織的變化，另外以購自 Amershma 的 PKC $\alpha\beta$ 抗體作相同的實驗（圖 32），結果與前者相符。另外 PKC δ 及 ζ 在肝癌組織內的細胞質及細胞膜部份都比正常組織表現來得高，PKC δ 有極顯著差異（ $P < 0.01$ ），而 PKC ζ 有顯著差異性存在（ $P < 0.05$ ）（圖 33,34）。實驗也以相同的方法分析 PKC β 、 γ 及 ϵ ，結果並無表現（圖 35）。最後以 SDS-PAGE 觀察整體蛋白表現量，確定每組樣本的 loading 量一致（圖 36）。

陸、討論

先前本實驗室第一次顯示出在比較人類肝癌組織與正常的肝組織細胞膜部分的 PKC 活性[91]，發現在人類肝癌組織中其 PKC 活性是呈現降低的，而這兩種組織其細胞質部分的 PKC 活性則無顯著差異。而根據本次實驗再次分析 8 位患者的結果顯示亦相同，我們發現在肝癌組織中其細胞膜部分的整個 PKC 活性是呈現急遽降低。這發現與 Kusunoki 等人發現大腸癌和大腸腺癌中其細胞質外 (particulate) 的 PKC 活性呈現降低是類似的[83]，而大腸癌和大腸腺癌的這種情形可能是因為細胞內 ras 基因也發生突變 [92,93]，同樣的 Ogata 等人也發現在人類肝癌組織內其 ras 基因也發生突變 (94)。因此我們推測人類肝癌組織細胞膜部分的 PKC 活性之降低可能是因為突變的 ras 蛋白持續活化 PKC 而出現負調節作用 (down-regulation) 所造成的結果。

在最近的文獻中指出一種在人體外對成熟肝細胞會進行 PKC 調控分裂的分裂劑肝生長因子 (hepatocyte growth factor) 會抑制肝細胞瘤的細胞生長[95,96]，同樣的結果也出現在加入適當量 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) 之肝細胞瘤的細胞 [95]，而 TPA 與 DAG 的結構相類似，能夠取代 DAG 在體內及體外活化 PKC，而在正常肝組織中會促進細胞生長。由以上這些發現強烈的暗示 PKC 的活化會抑制肝細胞瘤細胞的生長，因此我們認為在人類肝癌組織是否因 PKC 活性的降低而可能減少抑制作用。

實驗以西方墨點分析結果顯示肝癌組織細胞膜上的 PKC α 表現量顯著降低，可能是因為 PKC 活化之後 down-regulation 所造成。然而肝癌組織中的 PKC δ 及 ζ 不管在細胞質或細胞膜上的表現

都要比鄰近正常組織來得多，而且具統計上的意義，這暗示 PKC δ 及 ζ 可能參與增殖狀態中的肝癌組織。

根據本篇實驗結果指出肝癌組織中細胞膜部份的 PKC 活性顯著降低，但與其癌症病理級數並無相關性，與先前本實驗室所提出之 PKC 活性隨著腫瘤惡化程度而降低[91]有所差異，這可能是因為分析人數過於稀少所致，未來應收集更多患者檢體作進一步相關的分析與統計。

參 考 文 獻

1. 蔡泳杰 (1997) 治療不孕症最新情報. Mom Baby, 125:132-137.
2. 楊鈞 (1998) 不育與不孕諮詢問答. 浩園文化, p.11-p.21.
3. 詹益宏 (1977) 女性的醫學. 正中書局, p.56-68.
4. 吳香達 (1983) 臨床婦科學. 茂昌圖書有限公司, pp.533.
5. 劉崇賢、林隆堯 教你如何“做人” 中山醫學院附設醫院, pp.59.
6. 游士弘、金玉堂、簡利婷、溫慧勤和王鈴琪 (1997) 人工生殖之醫學與法律(上). 當代醫學雜誌, 24(7):89-94.
7. 陳彰惠、胡月娟、黃玉珠譯 (1997) 產科護理學(上). 華杏出版社, p.83-84.
8. 賴亮全、林則彬、林富美譯 (1997) 蓋統生理學—生理及疾病機轉(下), 華杏出版社, p.1284-1285.
9. 司馬珊譯 (1988) 女性醫學. 小暢書房, p.47-49.
10. Tang, B., Guller, S. and Gurdipe, E. (1994) Mechanism of human endometrial stromal cells decidualization[Review]. Ann. N. Y. Acad. Sci., 734:19-25.
11. Pijnenborg, R., Dixon, G., Robertson, W.B. and Brosens, I. (1980) Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. Placenta, 1:3-19.
12. Kearns, M. and Lala, P.K. (1983) Life history of decidual cells: a review. Am. J. Reprod. Immunol. Micobiol., 3:78-82.
13. Maslar, I. A., Kaplan, B. M., Luciano, A. A. and Riddick, D. H. (1980) Prolactin production by the endometrium of early human pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab., 51:78-83.
14. Golander, A., Zakuth, V., Shechter, Y. and Spirer, Z. (1981) Suppression of lymphocyte reactivity *in vitro* by a soluble factor

- secretion by explants of human decidua. *Eur. J. Immunol.*, 11:849-851.
15. Daly, D. H., Maslar, I. A. and Riddick, D. H. (1982) Prolactin production during *in vitro* decidualization of proliferative endometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 145:672-678.
 16. Sananes, N., Weiller, S., Baulieu, E. E. and Goascogne, C. (1978) *In vitro* decidualization of rat endometrial cells. *Endocrinology*, 103:86-95.
 17. Tabanelli, S., Tang, B. and Gurpide, E. (1992) *In vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 42:337-344.
 18. Tang, B. and Gurpide, E. (1993) Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 47:115-121.
 19. Tang, B., Guller, S. and Gurpide, E. (1993) Mechanisms involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *Acta. Eur. Fertil.*, 24:221-223
 20. Tilly, B. C., Tertoolen, L. G., Remorie, R., Ladoux, A., Verlaan, I., deLaat, S. W. and Moolenaar, W.H. (1990) 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.
 21. Niedel, J. E., Kuhn, L. J. and Vandenbark, G. R. (1983) Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:36-40.
 22. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y. (1977)

- Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, 252:7603-7609.
23. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipid. *J. Biol. Chem.*, 254:3692-3695.
 24. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91:1218-1224.
 25. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, 257:7847-7851.
 26. Kraft, A. S. and Anderson, W. B. (1983) Phorbol esters increases the amount of Ca^{2+} , phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature*, 301:621-623.
 27. Nishizuka, Y. (1987) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308:693-698.
 28. Berridge, M. J. (1987) Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.*, 56:159-193.
 29. Rozengurt, E. (1989) Signal transduction pathways in mitogenesis. *Brit. Med. Bull.*, 45:515-528.
 30. Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334:661-665.

31. Housey, G. M., Johnson, M. D., Hsiao, M. L., O'brain, C. A., Murrhy, J. P., Kirschmeier, P. and Weinstein, I. B. (1988) Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell*, 52:343-354.
32. Hug, H. and Sarre, T. F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction ? *Biochem. J.*, 291:329-343.
33. Jaken, S. (1996) Protein kinase C isoenzyme and substrates. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8:168-173.
34. Johannes, F. -J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P. and Pfizenmaier, K. (1994) PKC θ is a novel atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.*, 269:6140-6148.
35. Stabel, S. (1994) Protein kinase C — an enzyme and its relatives. *Semin. Cancer Biol.*, 5:277-284.
36. Azzi, A., Boscoboinik, D. and Hensey, C. (1992) The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Eur. J. Biochem.*, 208:547-557.
37. 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.
38. 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.*, 263:4523-4526.
39. Hocevar, B. A. and Fields, A. P. (1991) Selective translocation of beta II-protein kinase C to the nucleus of human promyelocytic

- (HL60) leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, 266:28-33.
40. Liyanage, M., Frith, D., Livneh, E. and Stabel, S. (1992) Protein kinase C group B members PKC-delta, -epsilon, -zeta and PKC-L(eta). *Biochem. J.*, 283:781-787.
 41. Sasaki, Y., Hayashi, N., Ito, T., Fusamoto, H., Sato, N. and Kamada, T. (1989) Heterogeneous activation of protein kinase C during rat liver regeneration induced by carbon tetrachloride administration. *FEBS Lett.*, 254:59-65.
 42. Alessenko, A., Khan, W. A., Wetsel, W. C. and Hannun, Y. A. (1992) Selective changes in protein kinase C isoenzymes in rat liver nuclei during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182:1333-1339.
 43. 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.
 44. 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 B lymphocytes in the presence of Brij 58. *Anal. Biochem.*, 207:304-310.
 45. 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.
 46. 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.

47. Carpenter, G. (1992) Receptor tyrosine kinase substrates: src homology domains and signal transduction. *FASEB J.*, 6:3283-3289.
48. Cowley, B. D., Chadwick, L. J, Grantham, J. J. and Calvet, J. P. (1989) Sequential protooncogene expression in regenerating kidney following acute renal injury. *J Biol Chem.*, 264: 8389-8393.
49. 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.
50. Shelesnyak, M. C. (1952) Inhibition of decidual cell formation in the pseudopregnant rat by histamine antagonists. *Am. J. Physiol.*, 170: 522-527.
51. Finn, C. A., and Keen. P. M. (1963) The induction of the deciduomata in the rat. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 11:673-682.
52. Niedel, J. E., Kuhn, L. J. and Vandenbark, G. R. (1983) Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 80:36-40.
53. Ashendel, C. L. (1985) The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 822:219-242.
54. Degeo, V. J. (1966) Vaginal-cervical vibration:A simple and effective method for the induction of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology*, 79:440-442.
55. Tobert, J. A. (1976) A study of the possible role of prostaglandins in decidualization using a nonsurgical method for the instillation of fluids into the rat uterine lumen. *J. Reprod. Fertil.*, 47:391

56. Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S. and Nishizuka, Y. (1982) Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain: subcellular distribution, purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 257:13341-13348.
57. Liu, J. Y., Lin, S. J. and Lin, J. K. (1993) Inhibitory effect of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) in NIH3T3 cells. *Carcinogenesis*, 14:857-861.
58. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
59. Brockenbrough, J. S., Meyer, S. A., Li, C. and Jirtle, R. L. (1991) Reversible and phorbol ester-specific defect of protein kinase C translocation in hepatocytes isolated from phenobarbital-treated rats. *Cancer Res.*, 51:130-136.
60. Shyu, J. C., Hsieh, Y. S., Chang, C. L., Tsai, C. C., Cheng, C. K. and Liu, J. Y. (1997) Change in protein kinase C activity on day 5 of decidualization in pseudopregnant rats. *Chinese. J. Physiol.*, 40:107-112.
61. 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. (1997) Localization of protein kinase C alpha and zeta during the decidualization in pseudopregnant rats. *Chinese. J. Physiol.*, 40:243-247.
62. Liu, J. Y., Shyu, J. C., Chang, C. L., Tsai, C. C., Chang, A. I., 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.* in press.
63. Kopp, R., Noelke, B., Sauter, G., Schildberg, F. W., Paumgartner, G. and Pfeiffer, A. (1991) Altered protein kinase C activity in biopsies of human colonic adenomas and carcinomas. *Cancer Res.*, 51:205-210.
 64. Wali, R. K., Baum, C.L., Bolt, M. J., Dudeja, P. K., Sitrin, M. D. and Brasitus, T. A. (1991) Down-regulation of protein kinase C activity in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colonic tumors. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1092:119-123.
 65. Dubaybo, B. A., Marwah, G. S., Fligiel, S. E., Hatfield, J. S. and Majumdar, A. P. (1990) Tyrosine kinase activation during lung injury, fibrosis, and compensatory lung growth. *Exp. Lung Res.*, 16:257-266.
 66. Chen, C. S. and Poenie, M. (1993) New fluorescent probes for protein kinase C synthesis, characterization, and application. *J. Biol. Chem.*, 268:15812-15822.
 67. Tessitore, L., Perletti, G. P., Sesca, E., Pani, P., Dianzani, M. U., and Piccinini, F. (1994) Protein kinase C isozyme pattern in liver hyperplasia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205:208-214.
 68. Berra, E., Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Municio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Chapkin, R. S. and Moscat, J. (1993) Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction *Cell*, 74:555-563.
 69. van Dijk, M., Muriana, F.J., van Der, Hoeven, P. C., de Widt, J., Schaap, D., Moolenaar, W. H. and van Blitterswijk, W. J. (1997) Diacylglycerol generated by exogenous phospholipase C activates

- the mitogen-activated protein kinase pathway independent of Ras- and phorbol ester-sensitive protein kinase C: dependence on protein kinase C-zeta. *Biochem. J.*, 323:693-699.
70. Mischak, H., Goodnight, J. A., Kolch, W., Martiny-Baron, G., Schaechtle, C., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Pierce, J. H. and Mushinski, J. F. (1993) Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.*, 268:6090-6096.
 71. Selbie, L. A., Schmitz-Peiffer, A., Sheng, Y. and Biden, T. J. (1993) Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.*, 268:24296-24302.
 72. Akimoto, K., Mizuno, K., Osada, S., Hirai, S., Tanuma, S., Suzuki K. and Ohno, S. (1994) A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J. Biol. Chem.*, 269:12677-12683.
 73. Croze, F., Kennedy, T. G., Schroedter, I. C. and Friesen, H. G. (1990) Expression of rat prolactin-like protein B in deciduoma of pseudopregnant rat and in decidua during early pregnancy. *Endocrinology*, 127:2665-2672.
 74. Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, 308:693-698.
 75. Sharkey, N. A., Leach, K. L. and Blumberg, P. M. (1984) Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester

- binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:607-610.
76. Berridge, M. J. (1987) Inositol triphosphate and diacylglycerol:two interacting second messengers. Annu. Rev. Biochem., 56:153-193.
 77. Rozengurt, E. (1989) Singal transduction pathways in mitogenesis. Brit. Med. Bull., 45:515-528.
 78. Reifenberger, G., Deckert, M. and Wechsler, W. (1989) Immunohistochemical determination of protein kinase C expression and proliferative activity in human brain tumors. Acta Neuropathol., 78:166-175.
 89. O'Brian, C.A., Vogel, V. G., Singletary, S. E. and Ward, N. E.(1989) Elevated protein kinase expression in human breast tumor biopsies relative to normal breast tissue. Cancer Res., 49:3215-3217.
 80. Alvaro, V., Touratine, P. H., Vozari, R. R., Bai-Grenier, F., Birman, P. and Joubert, D. (1992) Protein kinase C activity and expression in normal and adenomatous human pituitaries. Int. J. Cancer., 50:724-730.
 81. Couldwell, W. T., Antel, J. P. and Yong, V. W. (1992) Protein kinase C activity correlates with the growth rate of malignant gliomas. II. Effects of glioma mitogens and modulators of protein kinase C. Neurosurgery, 31:717-724.
 82. Kopp, R., Noelke, B., Sauter, G., Schileberg, F. W., Paumgartner, G. and Pfeiffer, A. (1991) Altered protein kinase C activity in human colonic adenoma and carcinomas. Cancer Res., 51:205-210.
 83. Kusunoki, M., Sakanoue, Y., Yanagi, F., Tamamura, T. and Utsunomiya, J. (1992) Protein kinase C activity in human colonic

- adenoma and colorectal carcinomas. *Cancer*, 69:24-30.
84. Horn, F., Marks, F., Fisher, G., Marcelo, C. L. and Voorhees, J. J. (1987) Decreased protein kinase C activity in psoriatic versus normal epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 88:220-222.
85. Hug, H. and Sarre, T.F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem. J.*, 291(Pt 2):329-343.
86. Baltuch, G. H., Dooley, N. P., Rostworowski, K. M., Villemure, J. G. and Yong, V. W. (1995) Protein kinase C isoform alpha overexpression in C6 glioma cells and its role in cell proliferation. *J. Neurooncol.*, 24:241-250.
87. Perletti, G.P., Smeraldi, C., Porro, D. and Piccinini, F. (1994) Involvement of the alpha isoenzyme of protein kinase C in the growth inhibition induced by phorbol esters in MH1C1 hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205:1589-1594.
88. Choi, P. M., Tchou-Wong, K. M. and Weinstein, I.B. (1990) Overexpression of protein kinase C in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. *Mol. Cell Biol.*, 10:4650-4657.
89. Vivers, J. and Schabort, J. CY. (1985) Aflatoxin B1 alters protein phosphorylation in rat livers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 129:342-349.
90. Weber, A., Cottreau, D., Henry, J., Phan Kinh Tuy, F., Shala, H. and Kahn, A. (1983) Protein kinase of rat liver during hepatocarcinogenesis induced by an azo dye. *Eur. J. Biochem.*, 130:447-456.
91. Chang, K. J., Lin, J. K., Lee, P. H., Hsieh, Y. S., Cheng, C. K. and

- Liu, J. Y. (1996) The altered activity of membrane-bound protein kinase C in human liver cancer. *Cancer Lett.*, 105:211-215.
92. Barbacid, M. (1987) Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.*, 56:779-827.
93. Devivo, I., Marion, M. J., Smith, S. J., Carney, W. P. and Brandt-Rauf, P. W. (1994) Mutant c-Ki-ras p21 protein in chemical carcinogenesis in humans exposed to vinyl. *Cancer Causes Contol*, 5:273-278.
94. Ogate, N., Kamimura, T. and Asakura, H. (1991) Point mutation, allelic loss and increased methylation of c-Ha-ras gene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 13:31-37.
95. Shiota, G., Kawasaki, H., Nakamura, T. and Schmidt, E. V. (1994) Inhibitory effect of hepatocyte growth factor against FaO hepatocellular carcinoma cells may be associated with changes of intracellular signalling pathways mediated by protein kinase C. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 85:271-279.
96. Shiota, G., Rhoads, D. B., Wang, T. C., Nakamura, T. and Schmidt, E. V. (1992) Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:373-377.

圖 表

表 1、刮傷刺激後的假懷孕鼠子宮重量變化

大白鼠編號	子宮相對重量(子宮/體重)(%)	
	對照組	刺激組
1	0.12	0.68
2	0.08	0.32
3	0.04	0.55
4	0.08	0.63
5	0.07	0.49

表 2、大白鼠子宮的蛋白激酶 C 活性變化

大白鼠編號	蛋白激酶 C (p mol ³² P/min/mg)			
	細胞質部份		微粒質部份	
	對照組	刺激組	對照組	刺激組
1	57.6	0.0	539.7	106.9
2	63.6	0.0	135.1	96.0
3	61.2	4.2	219.3	112.0
4	43.8	3.4	88.8	166.3
5	61.2	0.0	199.0	142.7
平均值±	57.5±4.0	1.5±1.4**	236.8±88.6	124.8±14.5
標準偏差 ^a				

^a 5 隻大白鼠的平均質±標準偏差

**為以 t 檢定中之配對法所計算出之極顯著差異 (p < 0.001)

表3、大白鼠子宮的酪氨酸蛋白激酶活性變化

大白鼠編號	酪氨酸蛋白激酶 (p mol ³² P/min/mg)			
	細胞質部份		微粒質部份	
	對照組	刺激組	對照組	刺激組
1	25.9	18.3	22.5	72.0
2	16.7	26.7	31.7	23.1
3	24.8	17.8	43.2	38.9
4	24.5	21.71	37.7	40.2
5	11.3	16.1	49.0	38.2
平均值±	20.6±3.2	20.1±3.0	36.8±5.1	42.5±9.0
標準偏差 ^a				

^a 5 隻大白鼠的平均質±標準偏差

表 4、肝癌患者的臨床資料

病患 編號	年齡/ 性別	病理名稱	癌症 級數 ^a	切除後 情形
1	46/男	肝細胞癌	II	存活，復發
2	59/男	肝細胞癌	II	存活
3	29/女	肝細胞癌	I	存活
4	44/男	肝細胞癌	III	存活，復發
5	59/男	肝細胞癌	III	存活
6	77/男	肝細胞癌	II	存活
7	61/男	肝細胞癌	III	死亡
8	74/男	肝細胞癌	II	存活

^a級數分類以 Edmondson 及 Steiner 方法為主

表 5、人類肝癌及其鄰近正常組織的蛋白激酵素 C 活性表現 (整體蛋白的表現)

蛋白激酵素 C 活性 (p mol ³² P/min/mg 蛋白)				
病患 編號	細胞質部份		細胞膜部份	
	正常組織	癌組織	正常組織	癌組織
1	35.4	70.9	877.1	732.6
2	42.7	99.1	940.2	783.3
3	76.6	40.0	830.4	659.5
4	55.6	48.9	1048.6	827.3
5	28.9	39.1	605.2	254.3
6	88.2	58.7	350.1	320.0
7	23.7	81.4	463.1	429.9
8	71.8	78.2	815.9	315.3
平均值± 標準偏差	65.4±11.1	64.5±7.6	745.8±88.5	539.7±83.1**

**為以 *t* 檢定中之配對法所計算出之極顯著差異 ($p < 0.001$)

表 6、人類肝癌及其鄰近正常組織的蛋白激酵素 C 活性表現 (整體組織的表現)

病患 編號	蛋白激酵素 C 活性 (p mol ³² P/min/g 組織)			
	細胞質部份		細胞膜部份	
	正常組織	癌組織	正常組織	癌組織
1	297.1	486.5	1382.1	571.4
2	288.4	702.5	977.9	914.7
3	559.2	337.4	1836.4	1103.6
4	473.9	317.7	973.2	1098.3
5	240.6	260.2	908.2	612.8
6	529.5	357.9	537.5	429.4
7	646.2	503.9	735.5	559.2
8	413.4	367.1	980.9	567.0
平均值±	431.0 ± 51.6	416.7 ± 50.1	1041.5 ± 141.8	732.1 ± 94.0*
標準偏差				

*為以 t 檢定中之配對法所計算出之顯著差異 (P < 0.05)

S.D.品種雌大白鼠(180-250 g)



陰道抹片檢查



2次正常生理週期之後



振動子宮頸
(誘導假懷孕發生)



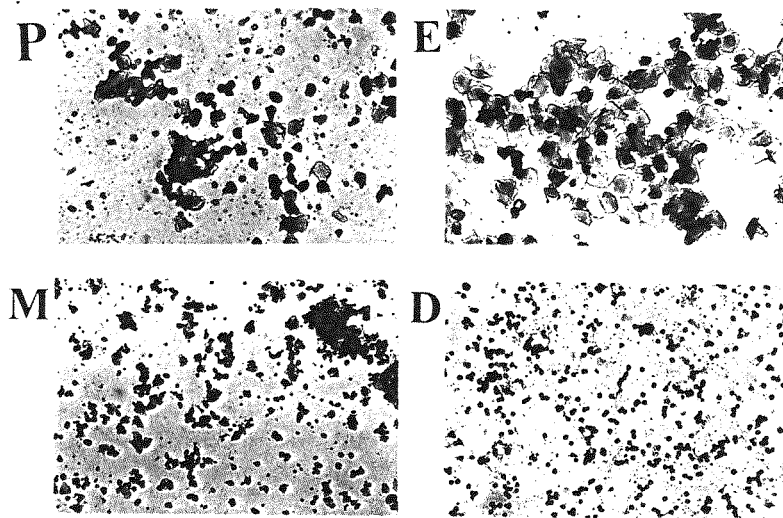
第4天之後

刮傷刺激
(誘導蛻膜瘤發生)



蛻膜瘤生長

圖 1、誘導蛻膜生成作用流程圖



陰道抹片檢查

圖 2、雌大白鼠的陰道抹片檢查

雌鼠的生理週期為四天一個循環，依其細胞表現不同可分為四個時期，選擇週期正常至少二次以上的雌大白鼠，在其發情期時以玻棒插入陰道內震動，刺激子宮頸使之產生假懷孕狀態。

P：Proestrus -發情前期

E：Estrus -發情期

M：Metestrus -發情後期

D：Diestrus -間情期

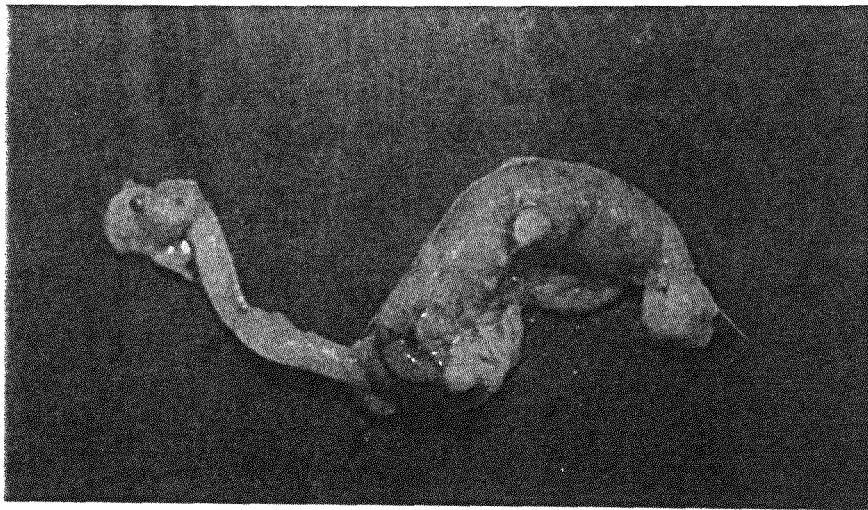


圖 3、假懷孕鼠受刮傷刺激後第五天的子宮圖

雌大白鼠子宮有兩個呈 V 字形狀，圖示的左邊為未經刮傷的子宮，當作對照組，右邊為經過針頭刮傷後第五天的子宮（即假懷孕的第九天）。結果發現有刮傷的子宮比無刮傷的子宮變大許多。

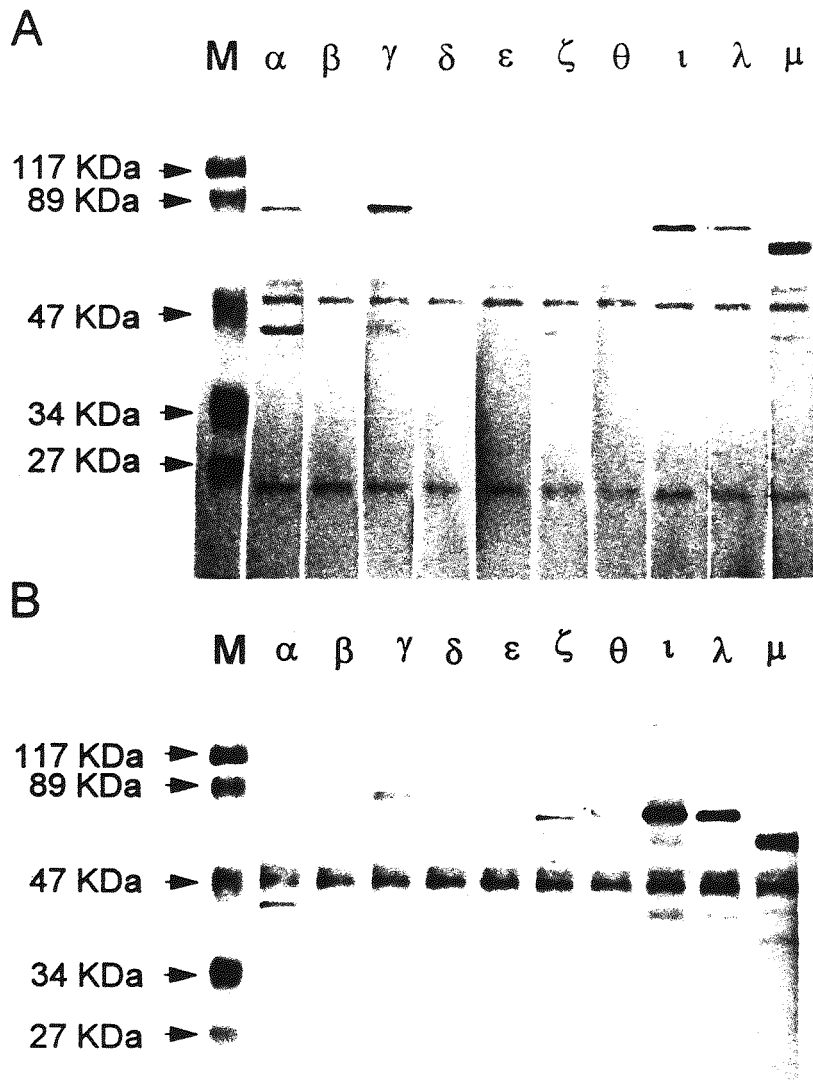


圖 4、PKC 異構體在假懷孕鼠子宮的表現

受刮傷刺激第 2 天的假懷孕鼠子宮進行 SDS-PAGE (10 % gel)，並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖 A 為未經刺激處理的子宮組織檢體，圖 B 為經刺激生成蛻膜第二天的子宮組織檢體。M：Maker，個別 PKC 異構體分子量為 α :82, β :80, γ :80, δ :78, ϵ :90, ζ :78, θ :79, ι :74, λ :74, μ :115 (單位：KDa)。

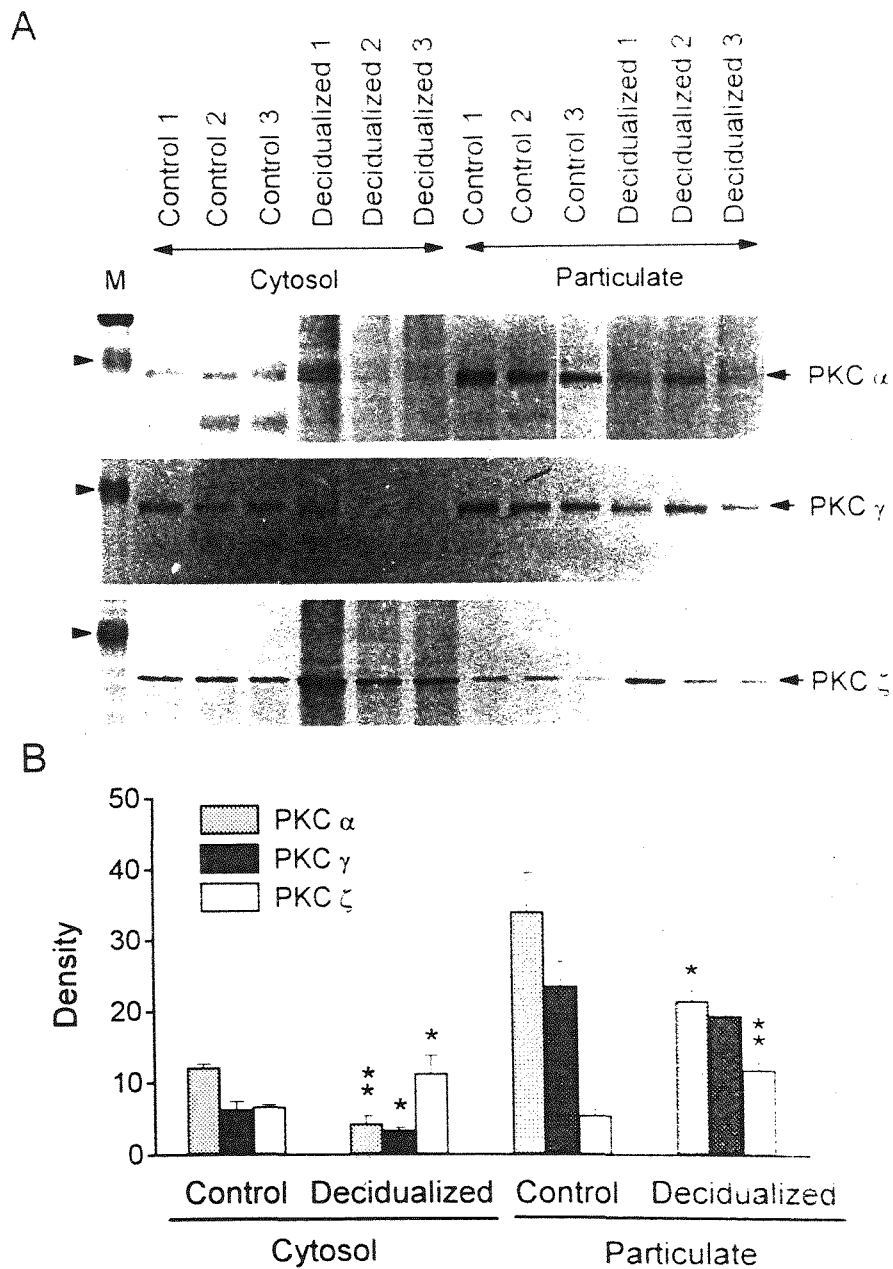


圖 5、PKC α 、 γ 及 ζ 在假懷孕鼠子宮的表現

未經刺激的對照組與受刮傷後第 5 天的假懷孕鼠子宮蛻膜個別研磨，並以 homogenization buffer A 萃取出細胞質部份，再以 homogenization buffer B 萃取微粒質部份，進行 SDS-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的 PKC α 、 γ 及 ζ 抗體。圖 A 為電泳圖；圖 B 為定量圖 (% of lysate)。M 代表分子量， \blacktriangleright 所指為分子量 89 KDa。*代表 $P < 0.05$ ，**代表 $P < 0.01$ 。

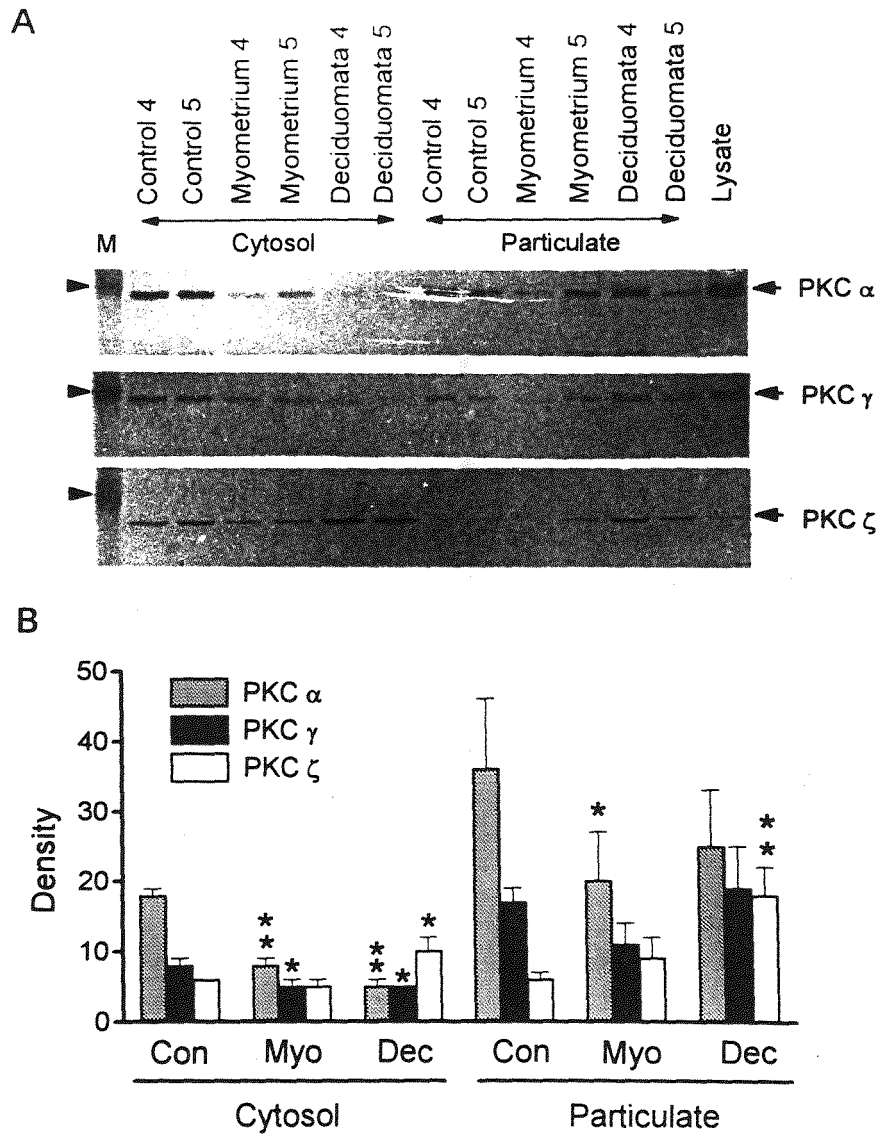


圖 6、PKC α 、 γ 及 ζ 在假懷孕鼠子宮蛻膜瘤及子宮肌層的表現
 未經刺激的對照組與受刮傷後第 5 天的假懷孕鼠子宮分出蛻膜與子宮肌層部份個別研磨，並以 homogenization buffer A 萃取出細胞質部份，再以 homogenization buffer B 萃取微粒質部份，進行 SDS-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的 PKC α 、 γ 及 ζ 抗體。圖 A 為電泳圖；圖 B 為定量圖 (% of lysate)。M 代表分子量， \blacktriangleright 所指為分子量 89 kDa。*代表 P < 0.05，**代表 P < 0.01。

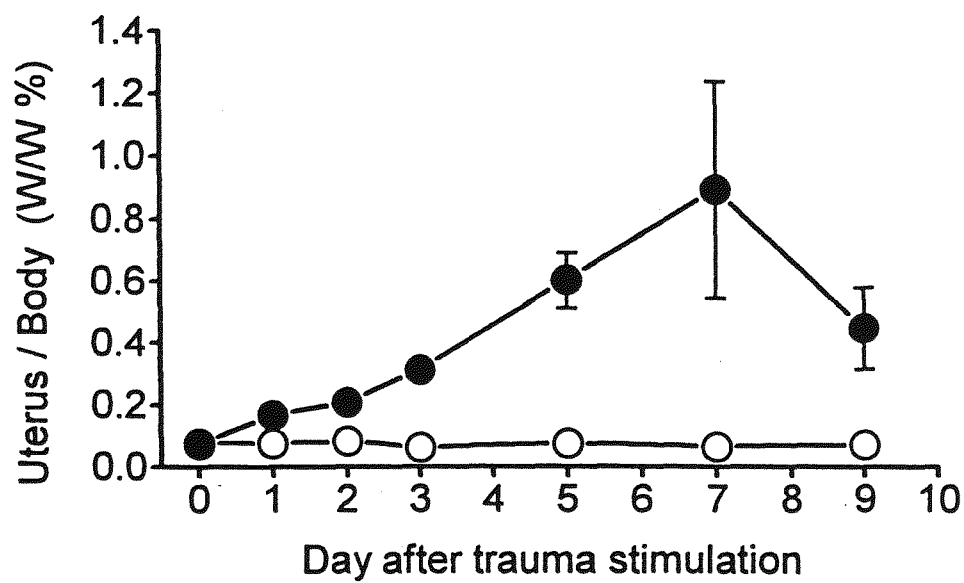


圖 7、假懷孕鼠受刺激後誘導蛻膜生成不同天數的子宮重量變化分析
 —○—代表未受刺激的對照組子宮；—●—代表有蛻膜生成的子宮組織。

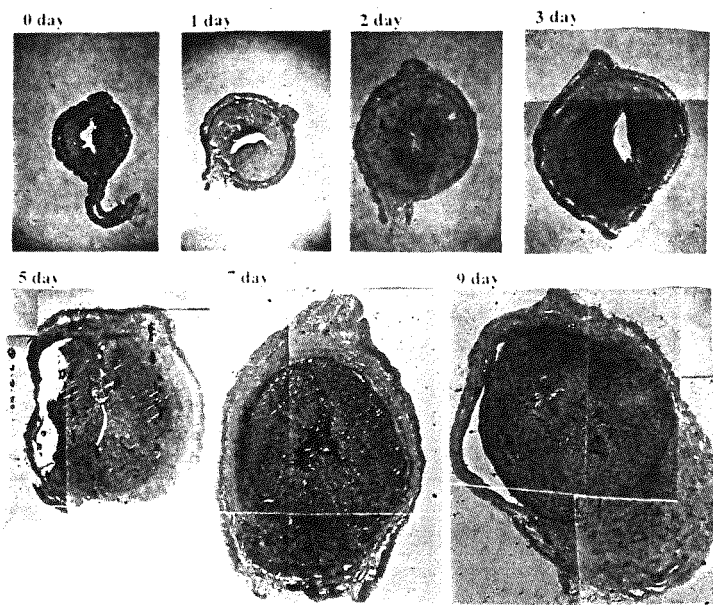
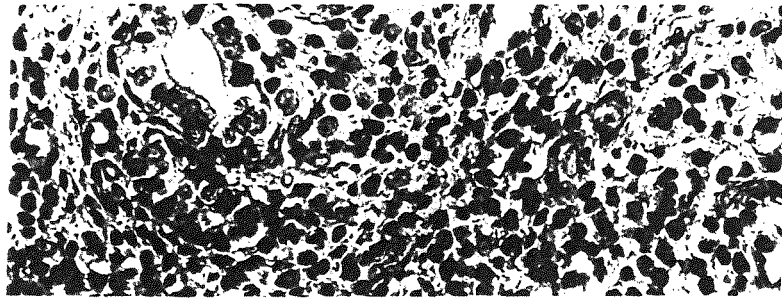
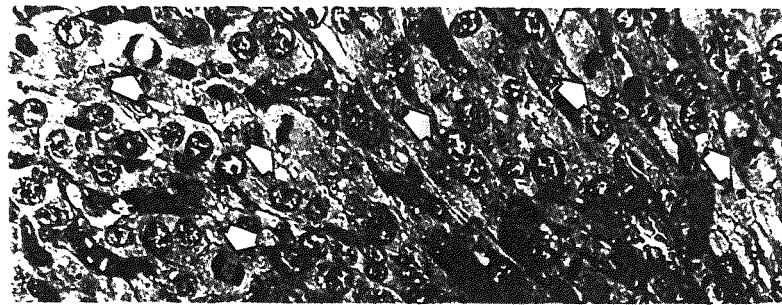


圖 8、假懷孕鼠受刺激後誘導蛻膜生成在不同天數時的子宮變化分析
 受刮傷刺激後的假懷孕鼠子宮體積隨著天數的增加而變大，而且在 hematoxyline-eosin 染色之後，子宮腔周圍（即蛻膜瘤部份）有濃染現象，表示此處細胞有分裂情形發生。

A.



B.



C.

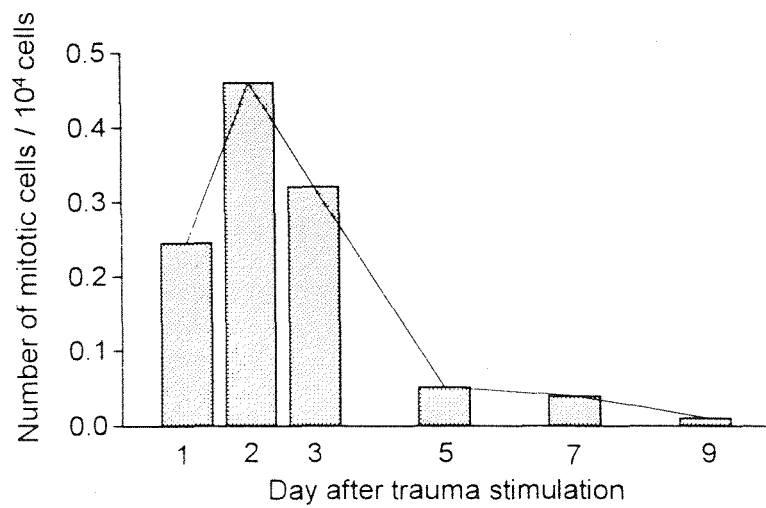


圖 9、蛻膜生成時組織切片分析

圖 A 為未經刺激處理的子宮組織；圖 B 為受刮傷刺激後生成蛻膜第二天的子宮組織；白色箭頭指出正在分裂的細胞；圖 C 為蛻膜生成期間細胞分裂數目變化圖。

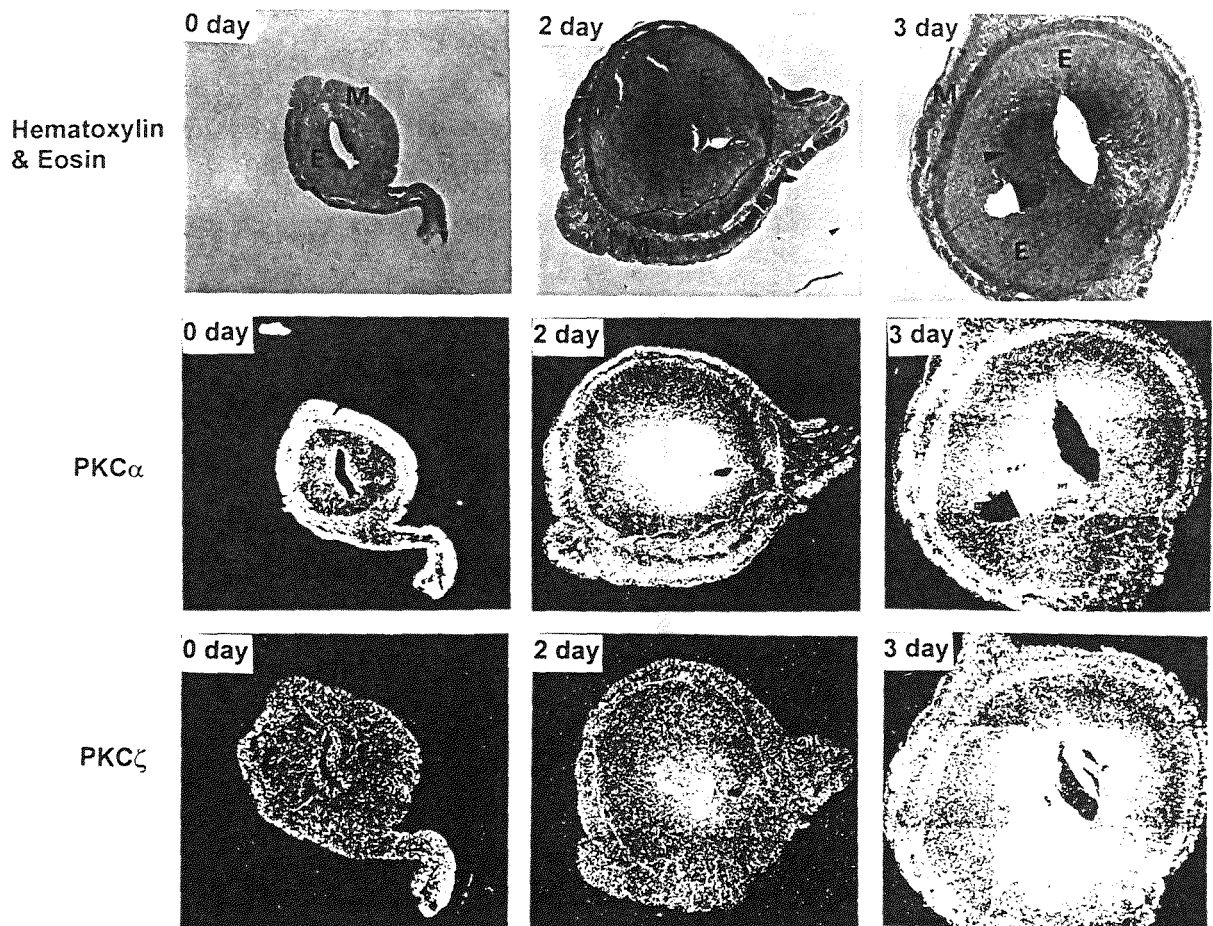


圖 10、免疫螢光法偵測蛻膜組織內 PKC α 及 ζ

子宮組織切片先染以 PKC α 或 ζ 單株抗體當作第 1 級抗體，接著再染以 FITC-conjugated anti-mouse IgG 的 2 級抗體，然後以螢光影像掃描；圖中螢光所顯現的亮點代表 PKC α 或 ζ 的表現。掃描之後的切片染以 hematoxylin-eosin。M：子宮肌層；E：子宮內膜。黑色箭頭指處為蛻膜瘤。（20x）

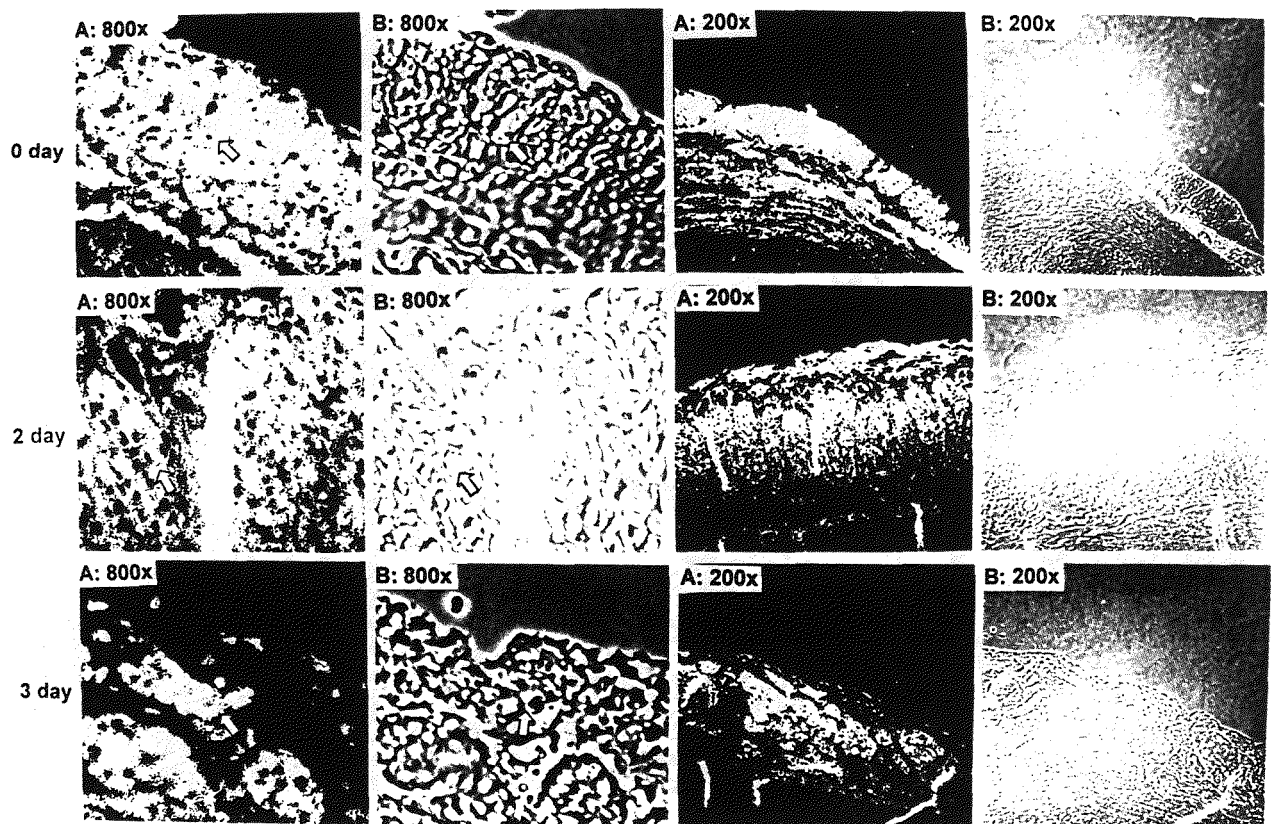


圖 11、雷射掃描的共軛焦螢光顯示鏡偵測蛻膜從第 0 天至第 3 天生成期間 PKC α 在子宮肌層的分佈

子宮組織切片先染以 PKC α 或 ζ 單株抗體當作第 1 級抗體，接著再染以 FITC-conjugated anti-mouse IgG 的 2 級抗體。首先以螢光影像掃描並照像 (A)，然後再以 LSM 傳送掃描並照像 (B)。白色箭頭指處為 PKC α 的分佈。

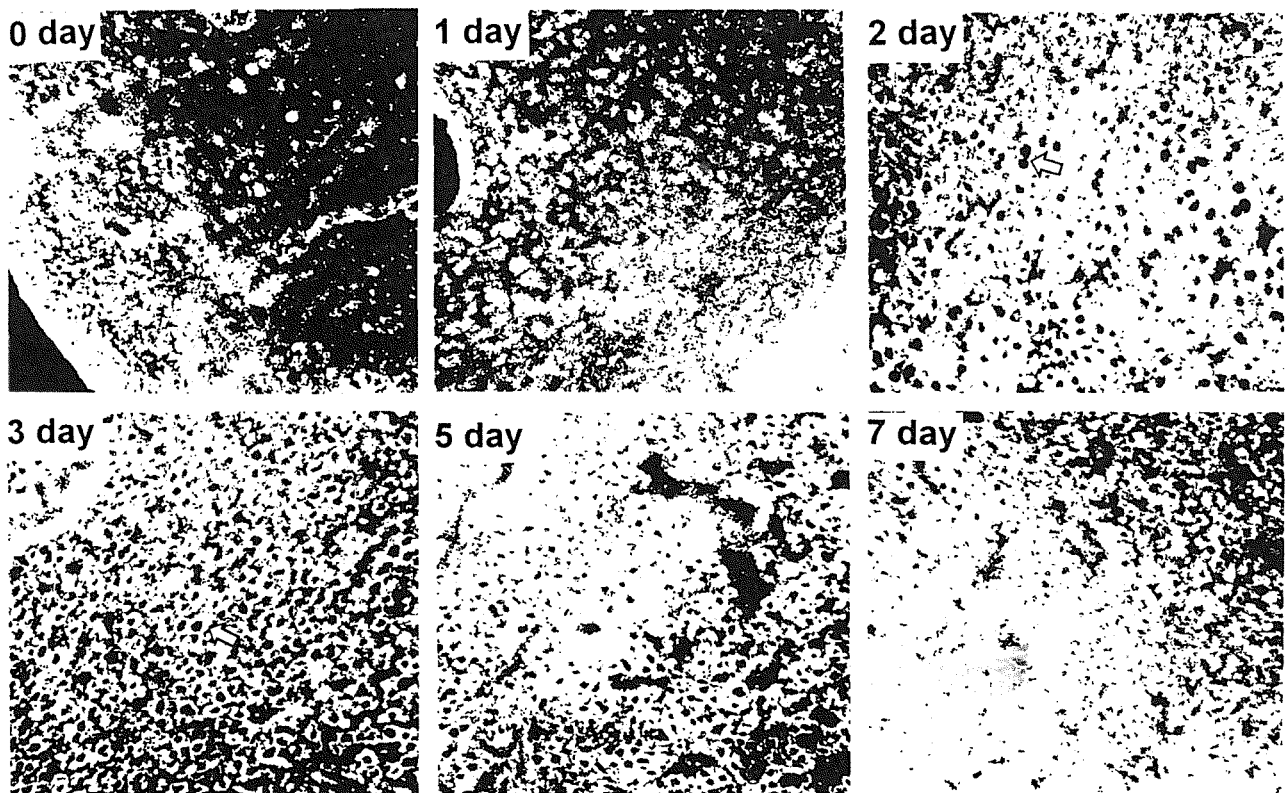


圖 12、雷射掃瞄的共軛焦螢光顯示鏡偵測蛻膜從第 0 天至第 7 天生成期間 PKC α 在蛻膜瘤的分佈

子宮組織切片先染以 PKC α 或 ζ 單株抗體當作第 1 級抗體，接著再染以 FITC-conjugated anti-mouse IgG 的 2 級抗體，然後以螢光影像掃描並照像。白色箭頭指處為分佈在核周圍的 PKC α 。(200x)

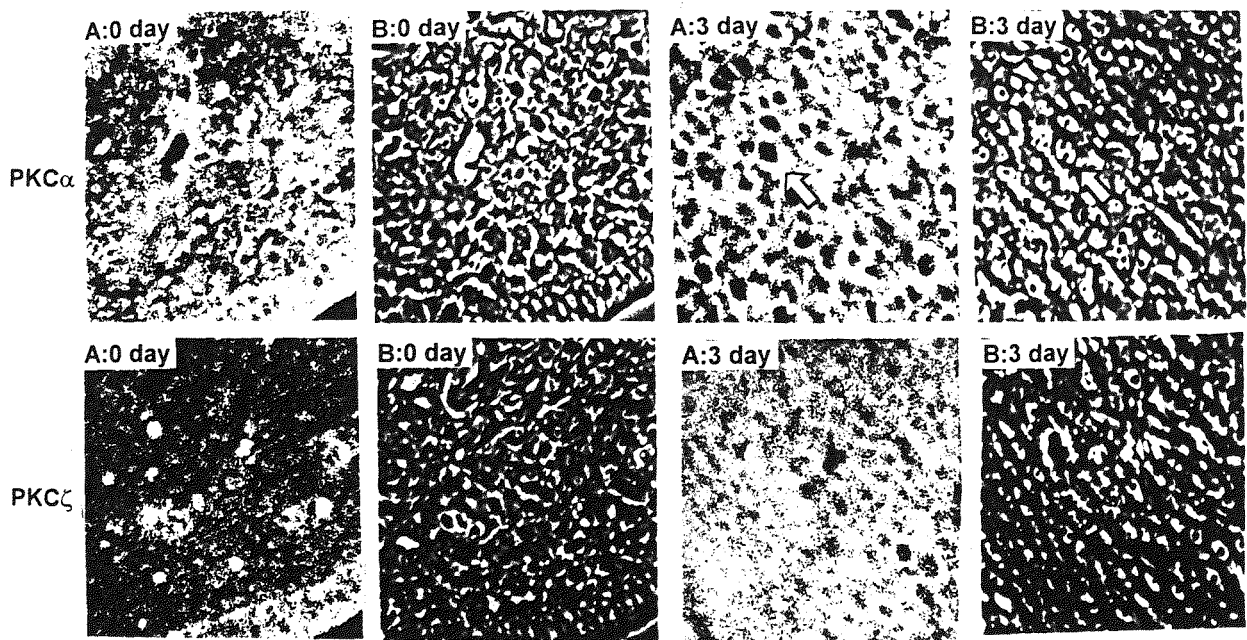


圖 13、雷射掃瞄的共軛焦螢光顯示鏡偵測蛻膜從第 0 天至第 3 天生成期間 PKC α 及 ζ 在蛻膜瘤的分佈
 子宮組織切片先染以 PKC α 或 ζ 單株抗體當作第 1 級抗體，接著再染以 FITC-conjugated anti-mouse IgG 的 2 級抗體。首先以螢光影像掃描並照像 (A)，然後再以 LSM 傳送掃描並照像 (B)。白色箭頭指處為分佈在核周圍的 PKC α 。(800x)

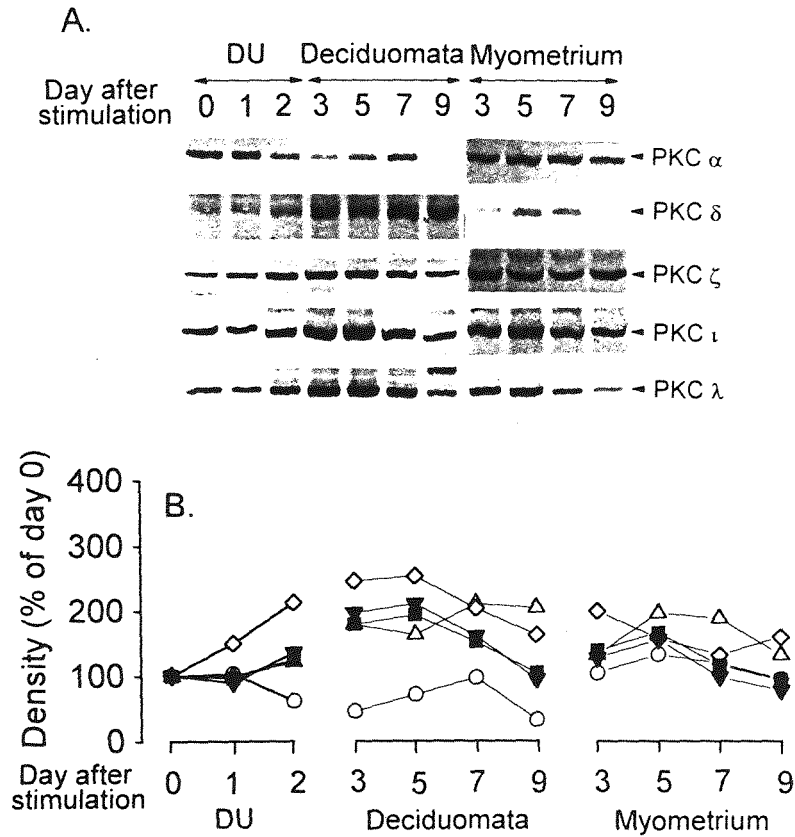


圖 14、西方墨點分析細胞質部份 PKC α , δ , ζ , ι 及 λ 異構體的表現
 假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蜕膜瘤與子宮肌層個別研磨，並以 homogenization buffer A 萃取出細胞質部份，以 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，再各別染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖 A 為電泳圖；圖 B 為定量圖。第 0, 1 及 2 天的檢體為整個蜕膜子宮組織 (DU)。第 0 天 PKC 異構體的定量值被當作 100%。—○—: PKC α , —■—: PKC δ , —◇—: PKC ζ , —△—: PKC ι , —▼—: PKC λ 。

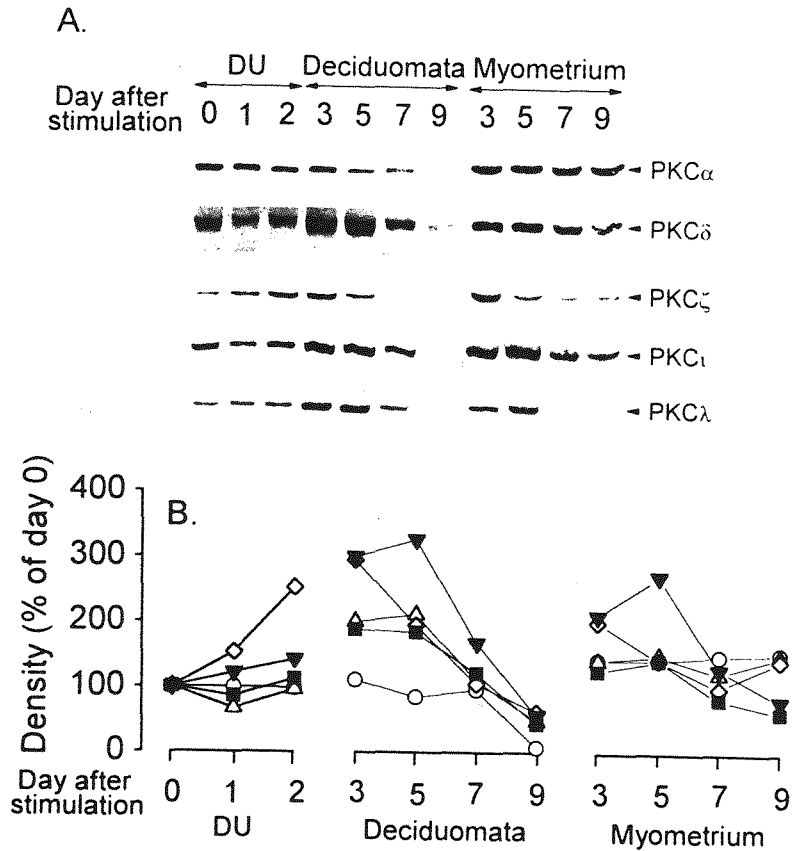


圖 15、西方墨點分析微粒質部份 PKC α , δ , ζ , ι 及 λ 異構體的表現
 假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蜕膜瘤與子宮肌層個別研磨，並以 homogenization buffer B 萃取出微粒質部份，以 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，再個別染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖 A 為電泳圖；圖 B 為定量圖。第 0, 1 及 2 天的檢體為整個蜕膜子宮組織 (DU)。第 0 天 PKC 異構體的定量值被當作 100%。—○—：PKC α ，—■—：PKC δ ，—◇—：PKC ζ ，—△—：PKC ι ，—▼—：PKC λ 。

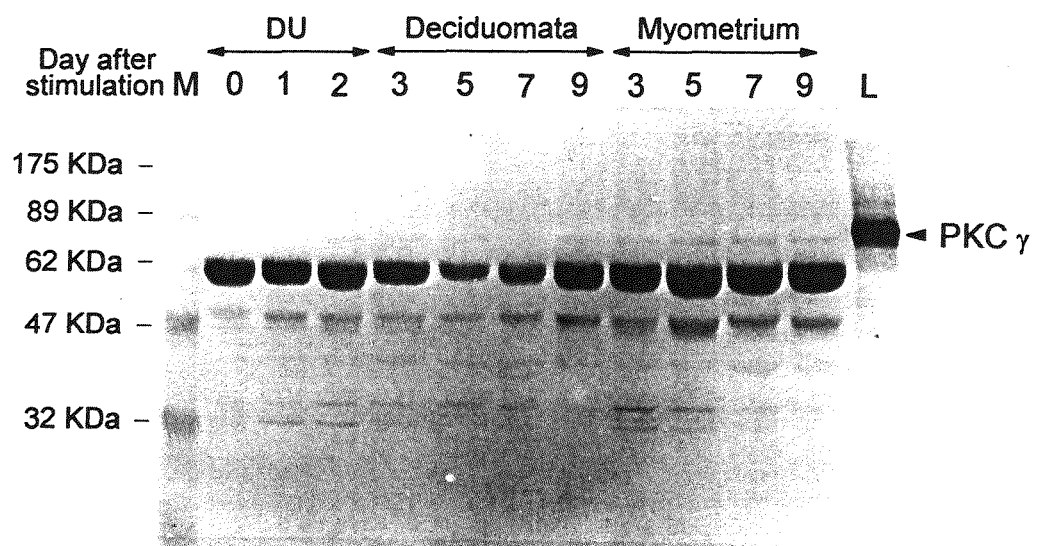


圖 16、確認 PKC γ 在子宮蛻膜瘤的表現

假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蛻膜瘤與子宮肌層個別研磨，並以 homo-genization buffer A 萃取細胞質部份，以 $30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體量進行 SDD-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，再染以 PKC γ 抗體。M：Maker；L：Brain lysate，當作 positive control。

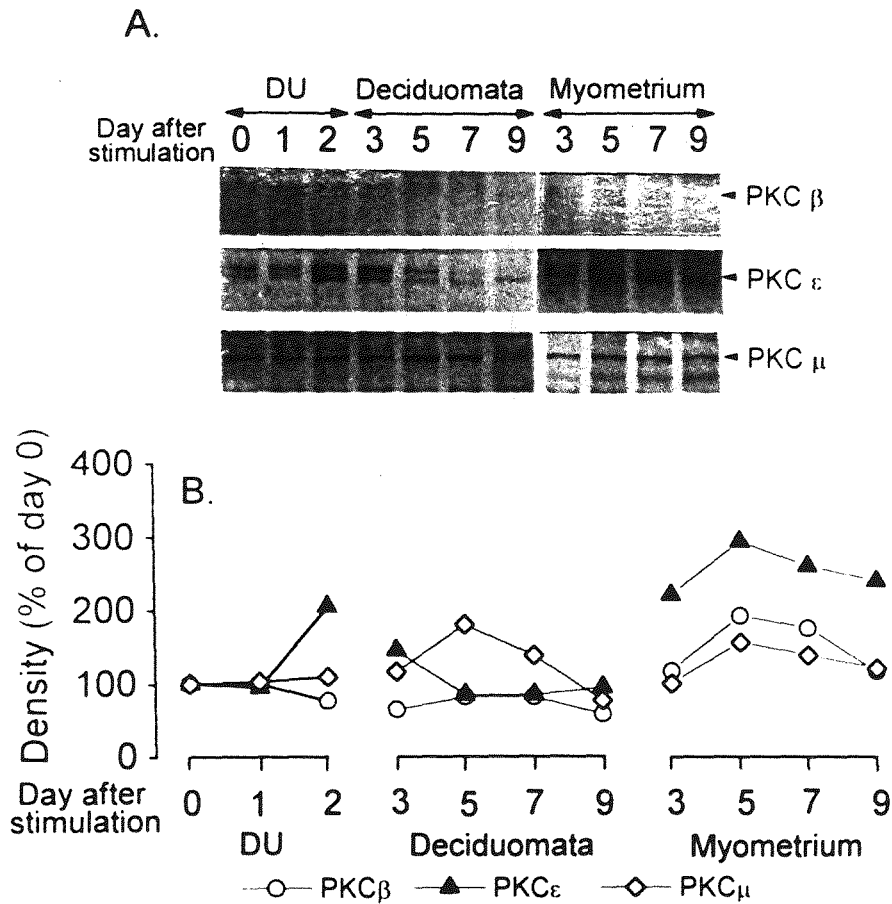


圖 17、西方墨點分析細胞質部份 PKC β , ϵ 及 μ 異構體的表現
 假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蜕膜瘤與子宮肌層個別研磨，並以 homogenization buffer A 萃取出細胞質部份，以 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，再個別染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖 A 為電泳圖；圖 B 為定量圖。第 0, 1 及 2 天的檢體為整個蜕膜子宮組織 (DU)。第 0 天 PKC 異構體的定量值被當作 100%。—○—: PKC β , —▲—: PKC ϵ , —◇—: PKC μ 。

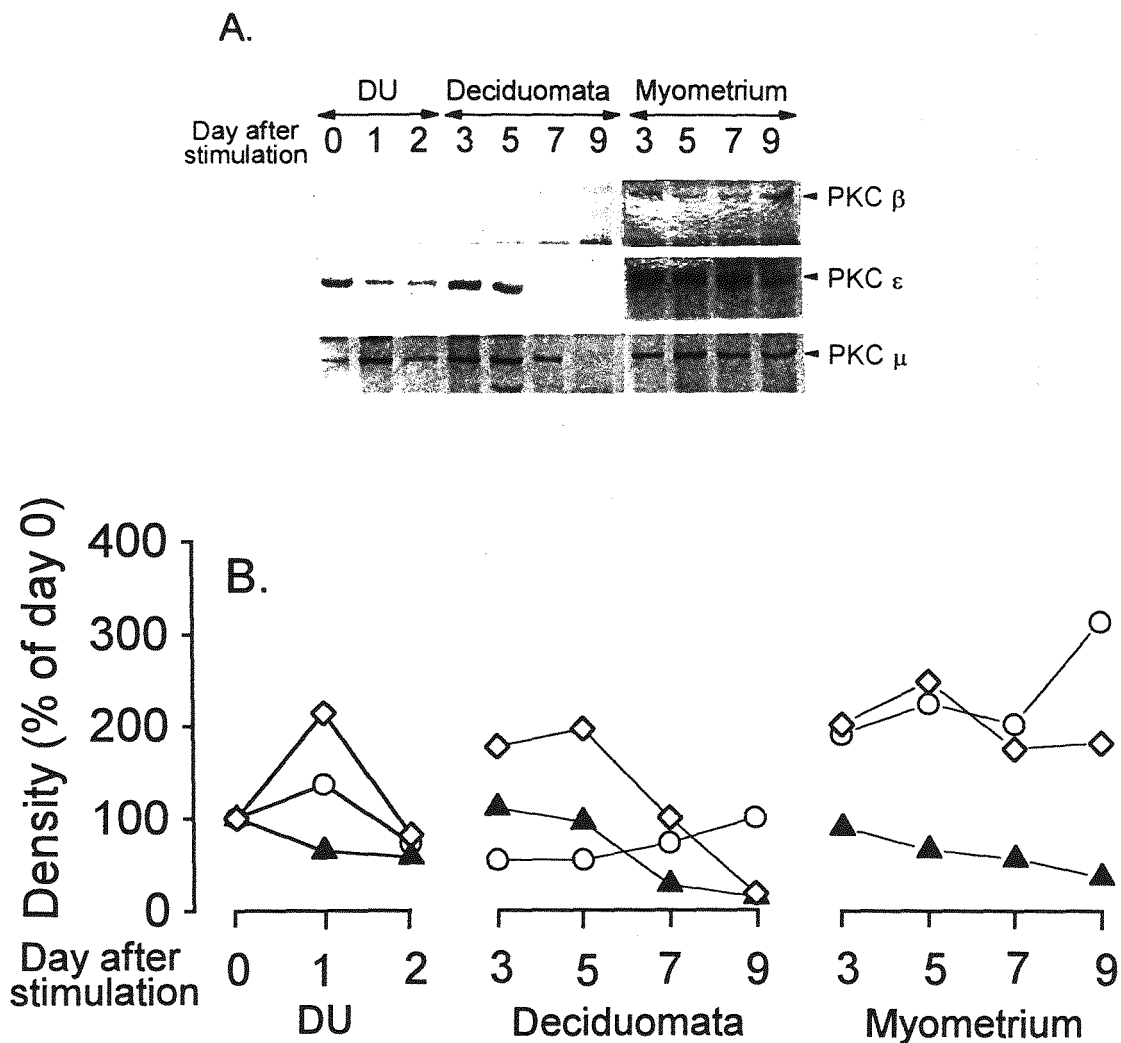


圖 18、西方墨點分析微粒質部份 PKC β , ϵ 及 μ 異構體的表現
 假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蜕膜瘤與子宮肌層個別研磨，並以 homogenization buffer B 萃取出微粒質部份，以 $15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，再個別染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖 A 為電泳圖；圖 B 為定量圖。第 0, 1 及 2 天的檢體為整個蜕膜子宮組織 (DU)。第 0 天 PKC 異構體的定量值被當作 100%。—○— : PKC β , —▲— : PKC ϵ , —◇— : PKC μ 。

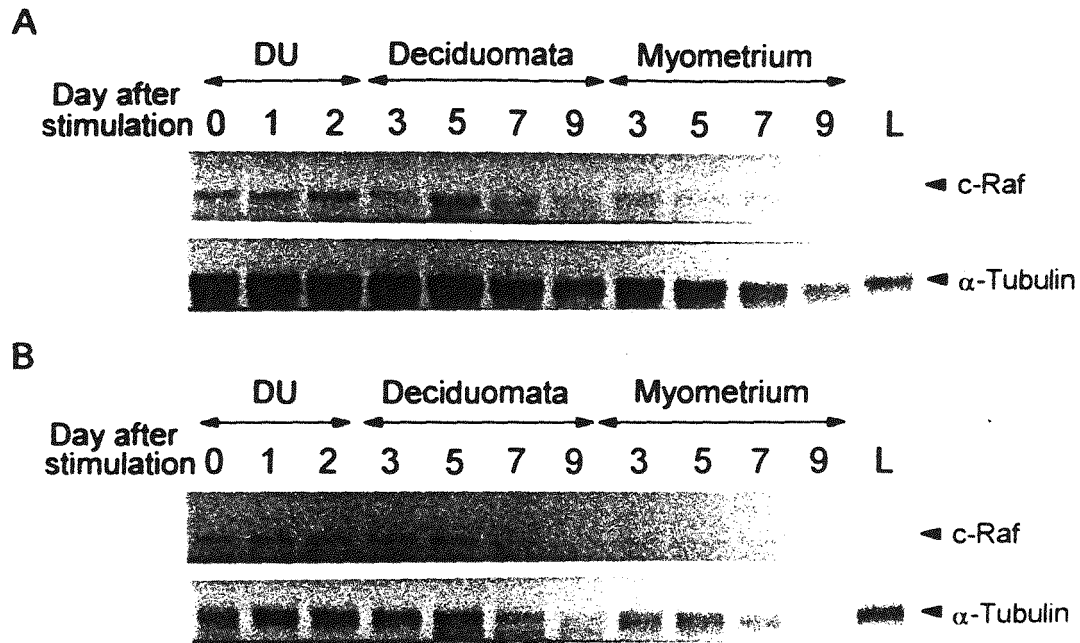


圖 19、西方墨點分析子宮蛻膜瘤生成期間 c-Raf 的表現
 假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蛻膜瘤與子宮肌層個別研磨後，進行 SDS-PAGE (10 % gel)，並轉移至硝化纖維紙，再染以 c-Raf 抗體 (74 KDa)；另染以 α -tubulin 抗體 (59 KDa) 當作 internal control。圖 A 為細胞質部份 (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)，圖 B 為微粒質部份 (15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。M : Maker ; L : Brain lysate，當作 positive control。

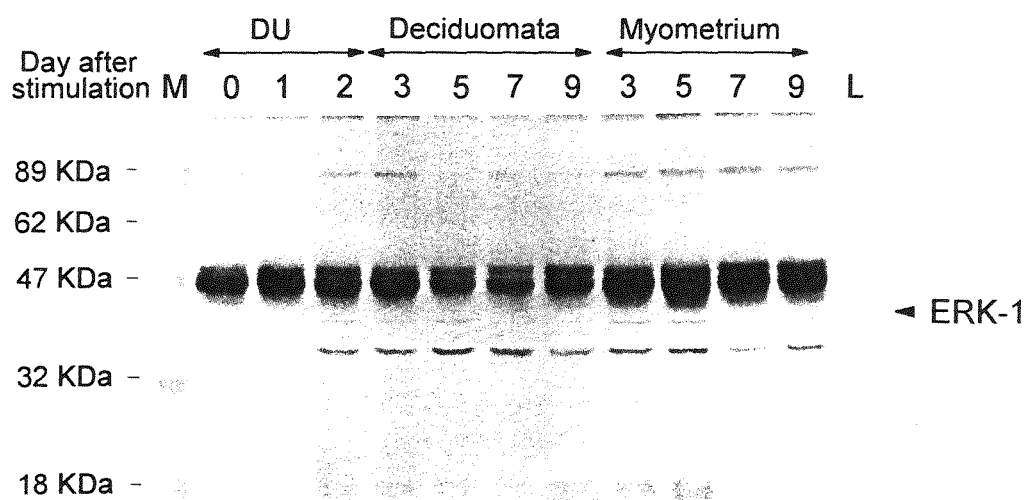


圖 20、西方墨點分析子宮蛻膜瘤生成期間 ERK-1 的表現
 假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蛻膜瘤與子宮肌層個別研磨後，取細胞質部份 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體進行 SDS-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，再染以 ERK-1 抗體 (44 KDa)。M：Marker；L：Brain lysate，當作 positive control。

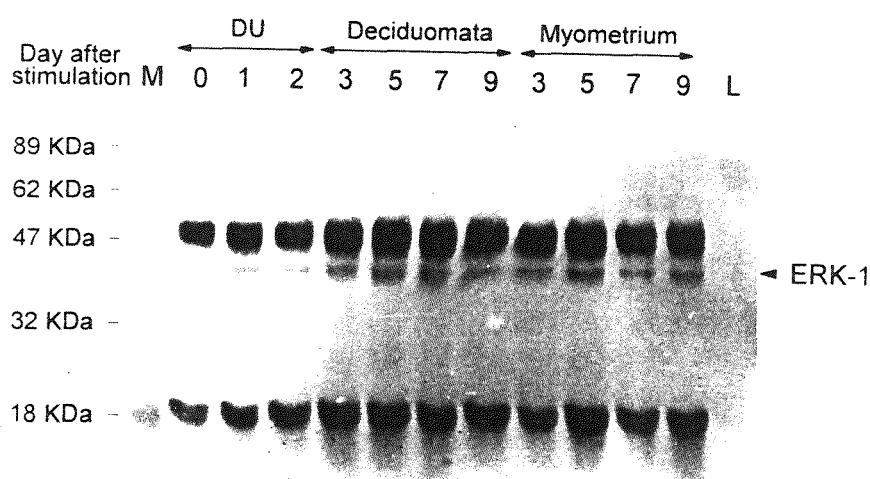


圖 21、西方墨點分析子宮蛻膜瘤生成期間 ERK-1 的表現

假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蛻膜瘤與子宮肌層個別研磨後，取細胞質部份 400 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ 的檢體以 phosphotyrosine 抗體作免疫沉澱，再將沉澱物溶解後進行 SDS-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，染以 ERK-1 抗體 (44 KDa)。M：Maker；L：Brain lysate，當作 positive control。

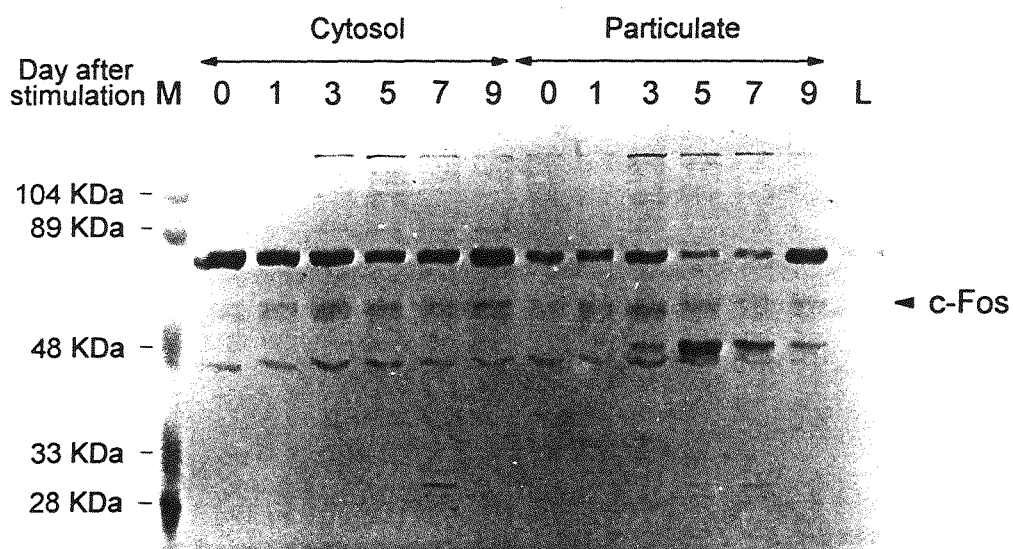


圖 22、西方墨點分析子宮蛻膜瘤生成期間 c-Fos 的表現

假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蛻膜瘤與子宮肌層個別研磨後，細胞質及微粒質部份各取 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，染以 c-Fos 抗體 (55 KDa)。M：Maker；L：Brain lysate，當作 positive control。

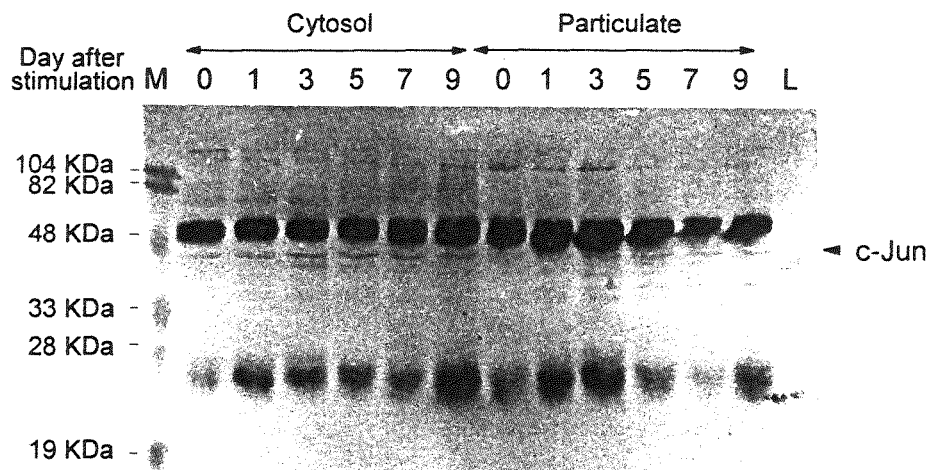


圖 23、西方墨點分析子宮蛻膜瘤生成期間 c-Jun 的表現

假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蛻膜瘤與子宮肌層個別研磨後，細胞質及微粒質部份各取 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體量進行 SDS-PAGE (12.5 % gel)，並轉移至硝化纖維紙，染以 c-Jun 抗體 (39 KDa)。M : Maker ; L : Brain lysate，當作 positive control。

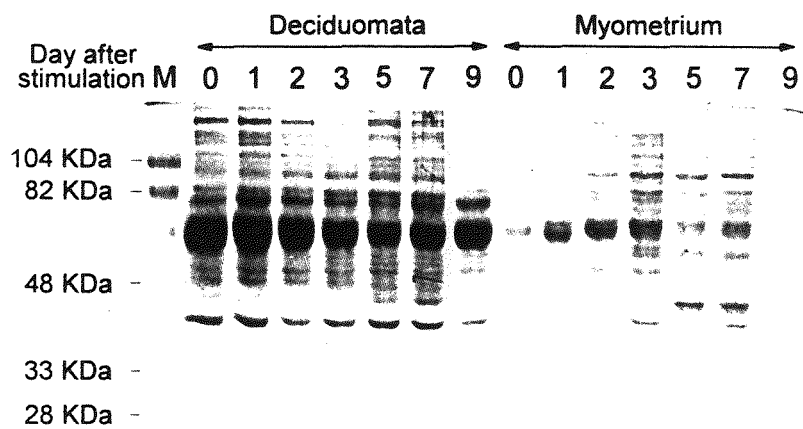


圖 24、假懷孕鼠蜕膜生成時整體蛋白的表現

假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蜕膜瘤與子宮肌層個別研磨後，取細胞質 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel)，然後以 Coomassie brilliant blue 染色 1 小時，再以退色液退色。M：Maker。

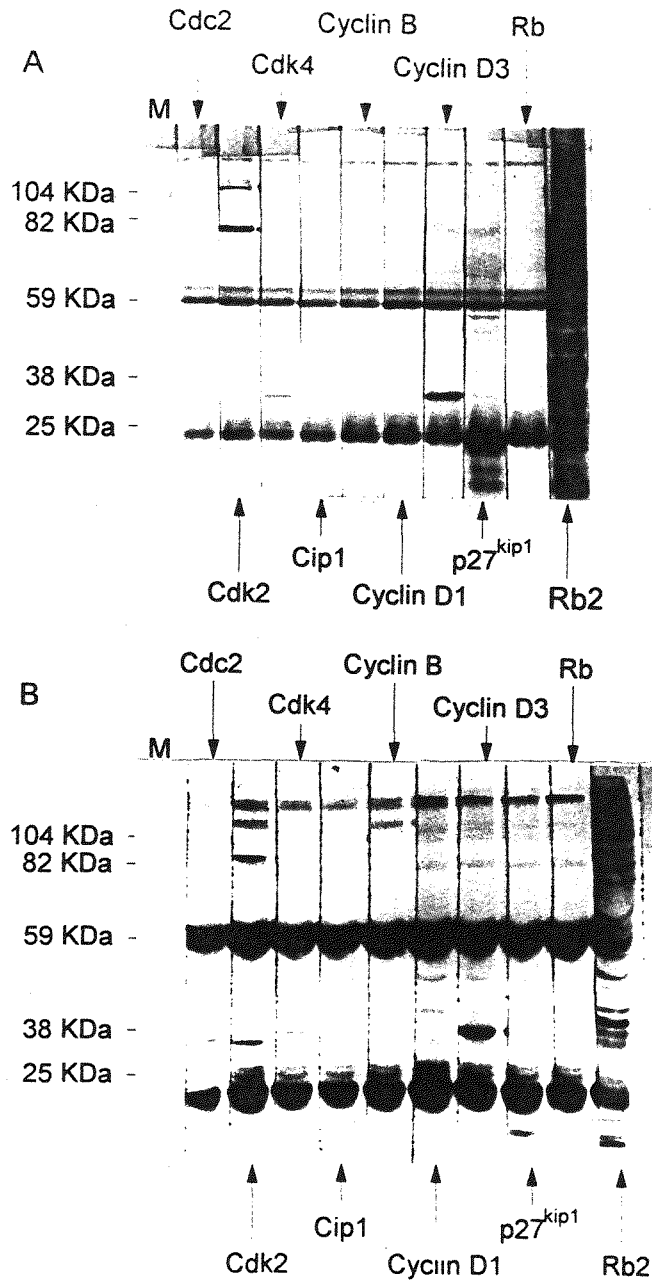


圖 25、確認細胞週期蛋白在蛻膜生成時的表現

受刮傷刺激第 2 天的假懷孕鼠子宮進行 SDS-PAGE (10 % gel)，並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的細胞週期蛋白抗體。圖 A 為未經刺激處理的子宮組織檢體，圖 B 為經刺激生成蛻膜第 2 天的子宮組織檢體。M：Maker，個別細胞週期蛋白分子量為 Cdc2-34, Cdk2-33, Cdk4-33, Cip1-21, Cyclin B-62, Cyclin D1-36, Cyclin D3-33, p27^{kip1}-27, Rb-110 及 Rb2-130 (單位：KDa)。

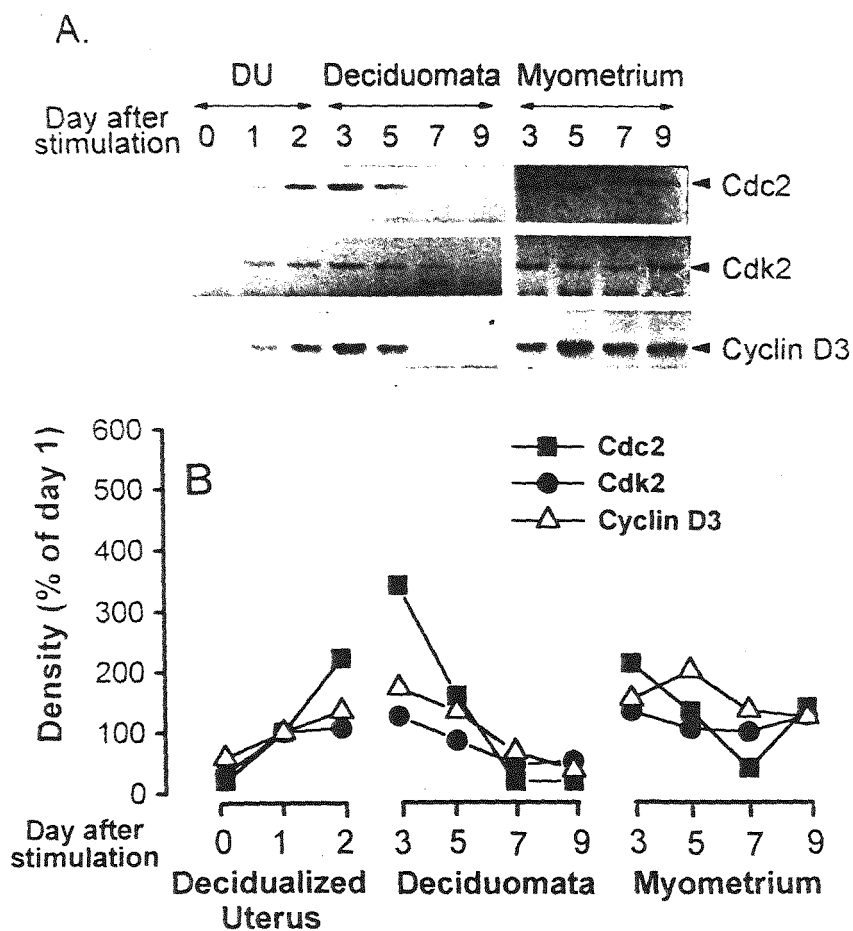


圖 26、西方墨點分析細胞質部份細胞週期蛋白的表現
 假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蜕膜瘤與子宮肌層個別研磨，並以 homogenization buffer A 萃取出細胞質部份，以 $30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，再個別染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖 A 為電泳圖；圖 B 為定量圖。第 0, 1 及 2 天的檢體為整個蜕膜子宮組織 (DU)。第 0 天的定量值被當作 100%。—■—: Cdc2, —○—: Cdk2, —△—: Cyclin D3。

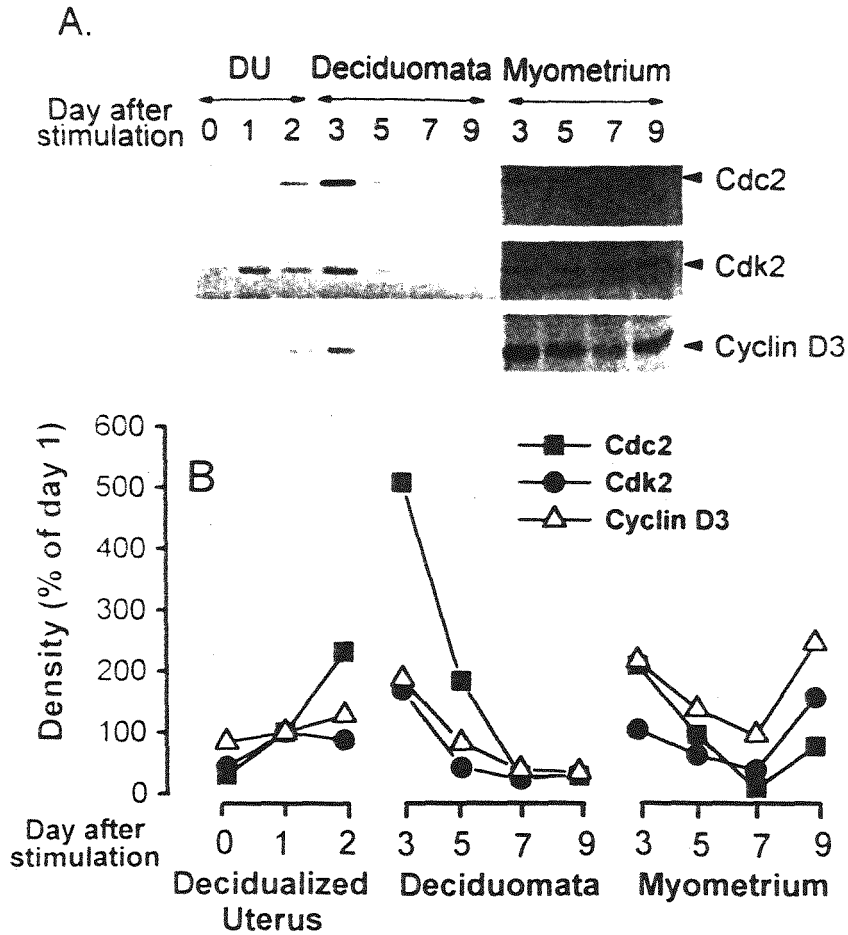


圖 27、西方墨點分析微粒質部份細胞週期蛋白的表現

假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蜕膜瘤與子宮肌層個別研磨，並以 homogenization buffer B 萃取出微粒質部份，以 $15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體量進行 SDS-PAGE (10% gel)，並轉移至硝化纖維紙，再個別染以專一性的細胞週期蛋白抗體。圖 A 為電泳圖；圖 B 為定量圖。第 0, 1 及 2 天的檢體為整個蜕膜子宮組織 (DU)。第 0 天的定量值被當作 100%。—■—：Cdc2, —○—：Cdk2, —△—：Cyclin D3。

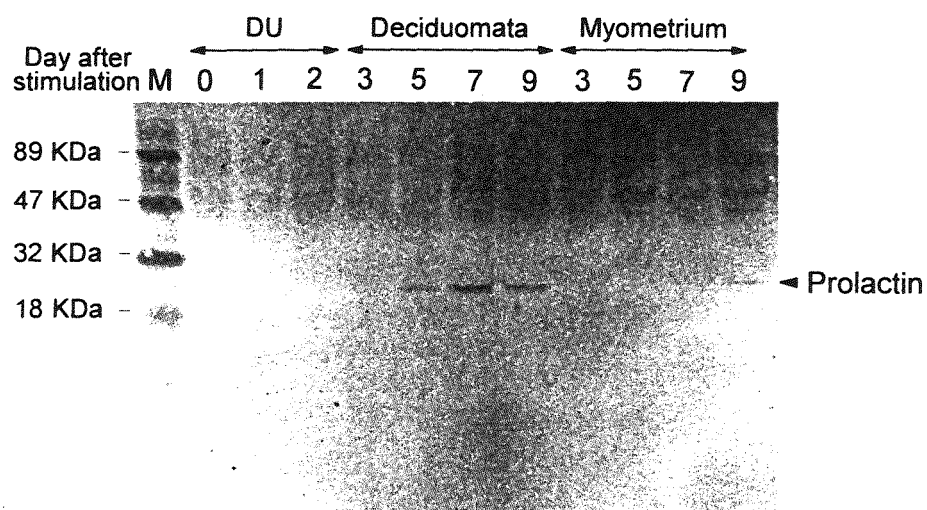


圖 28、西方墨點分析子宮蛻膜瘤生成期間 Prolactin 的表現
 假懷孕鼠受刮傷刺激後收集不同天數所生成之蛻膜瘤與子宮肌層個別研磨後，取細胞質部份 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的檢體進行 SDS-PAGE (12.5 % gel)，並轉移至硝化纖維紙，再染以 Prolactin 抗體 (26 KDa)。M：Maker。

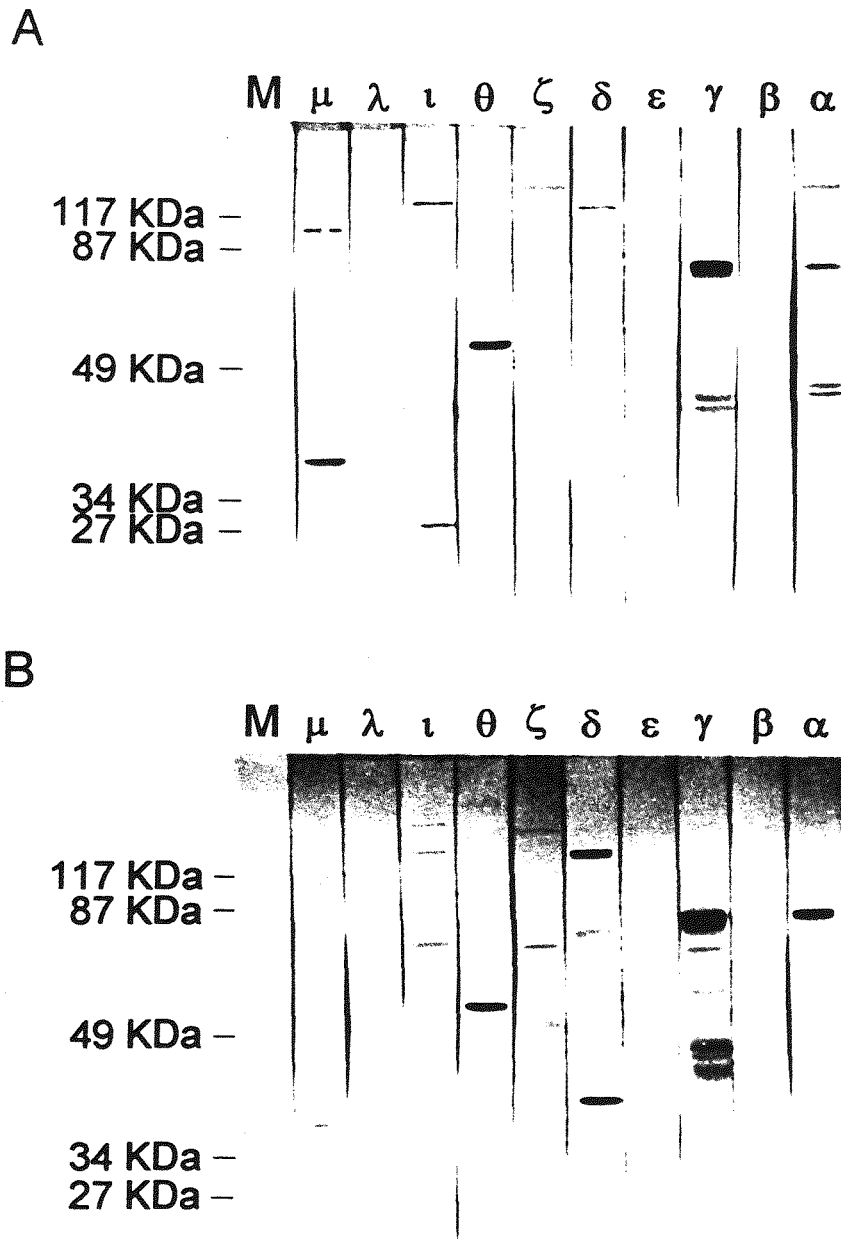


圖 29、確認 PKC 異構體在人類肝癌組織內的表現

人類肝癌組織經研磨萃取後進行 SDS-PAGE (10 % gel)，並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的 PKC 異構體抗體。圖 A 為肝癌組織鄰近的正常檢體作為對照組，圖 B 為肝癌組織檢體。M：Maker，個別 PKC 異構體分子量為 α -82, β -80, γ -80, δ -78, ϵ -90, ζ -78, θ -79, ι -74, λ -74, μ -115 (單位：KDa)。

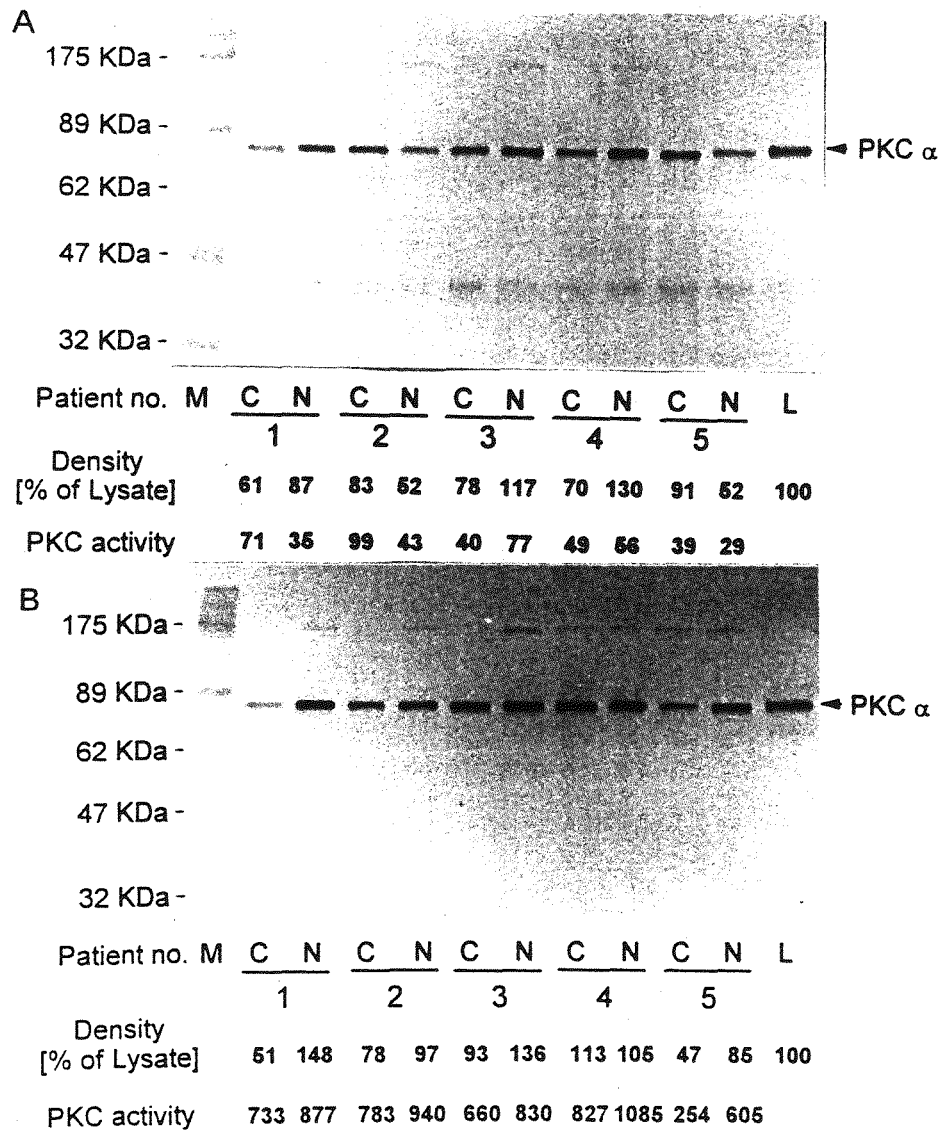


圖 30、西方墨點分析人類肝癌組織內 PKC α 表現

人類肝癌組織經研磨萃取後進行 SDS-PAGE (8 % gel) 並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的 PKC α 抗體。圖 A 為 1~5 號病人組織細胞質部份；圖 B 為細胞膜部份。M : Maker ; L : Brain lysate , 當作 positive control ; C : Cancer tissue ; N : Normal tissue 。

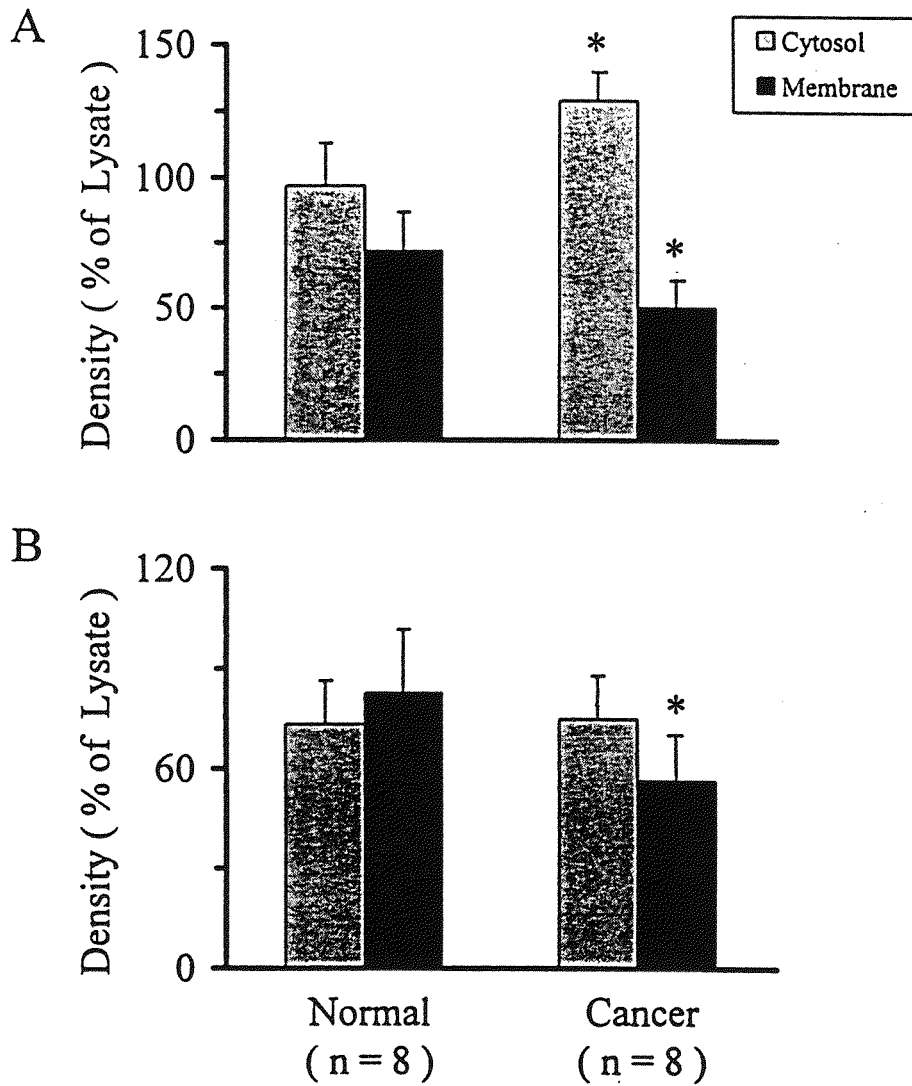


圖 31、人類肝癌組織內 PKC α 表現量化圖

經西方墨點分析後的 PKC α 定量後以 Brain lysate 當作 100%，將 8 位病人的肝癌組織及其鄰近正常組織的細胞質及細胞膜部份統計後，求其平均質及其標準偏差質。圖 A 為未經 PKC 純化的檢體；圖 B 為經純化的檢體。*代表 $P < 0.05$ 。

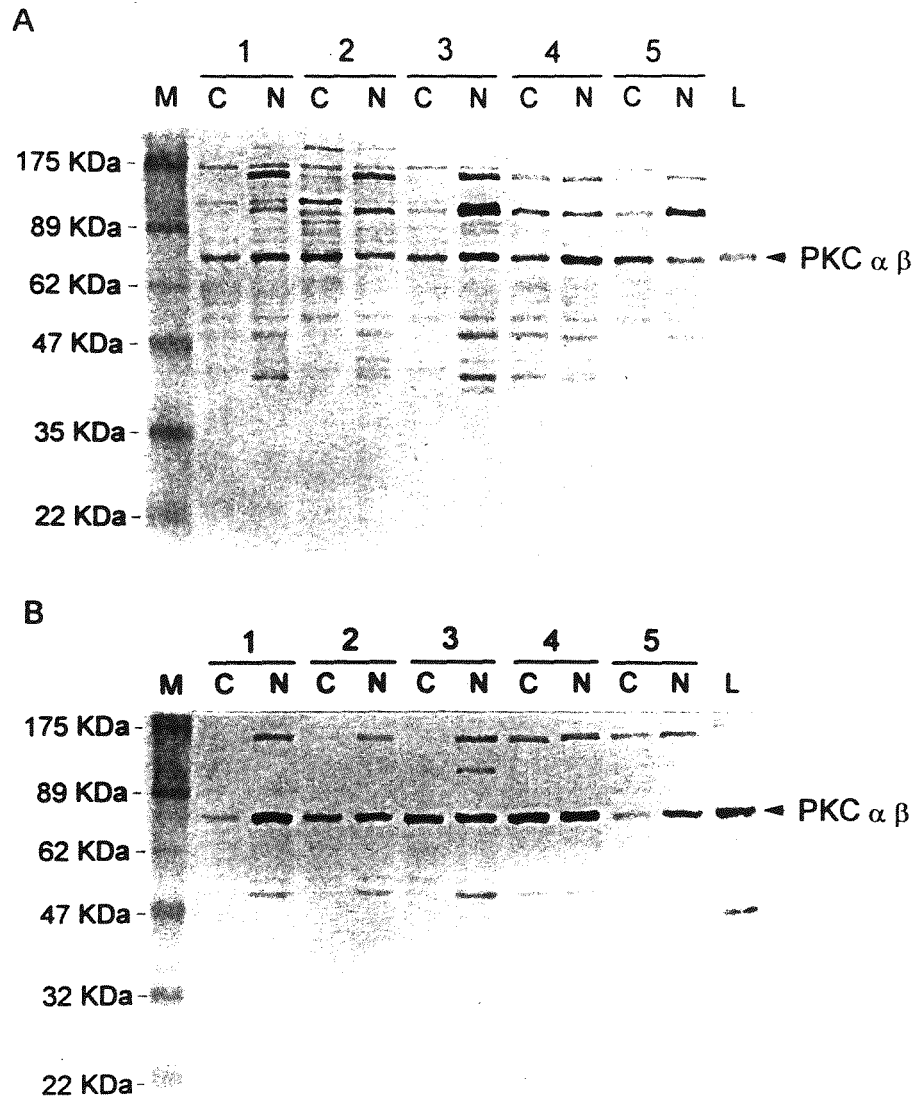


圖 32、確認人類肝癌組織內 PKC $\alpha\beta$ 的表現

人類肝癌組織經研磨萃取後，進行 SDS-PAGE (8% gel) 並轉移至硝化纖維紙，再染以 PKC $\alpha\beta$ 抗體。圖 A 為 1~5 號病人細胞質部份；圖 B 為細胞膜部份。M : Maker ; L : Brain lysate，當作 positive control。

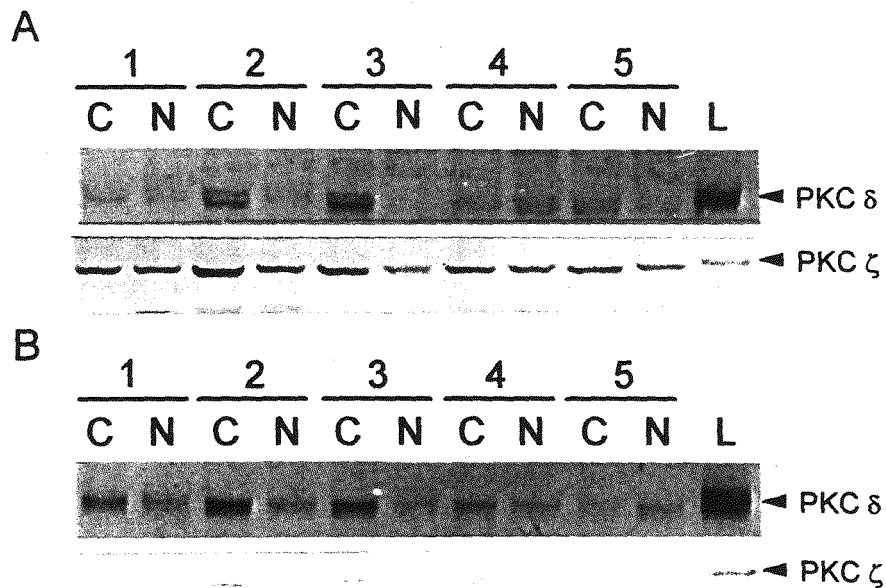


圖 33、西方墨點分析人類肝癌組織內 PKC δ 及 ζ 的表現

人類肝癌組織經研磨萃取後，經過 DEAE-cellulose chromatography 純化之後，進行 SDS-PAGE (8% gel) 並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的 PKC δ 及 ζ 抗體。圖 A 為 1~5 號病人組織細胞質部份，圖 B 為細胞膜部份。M : Maker ; L : Brain lysate，當作 positive control ; C : Cancer tissue ; N : Normal tissue。

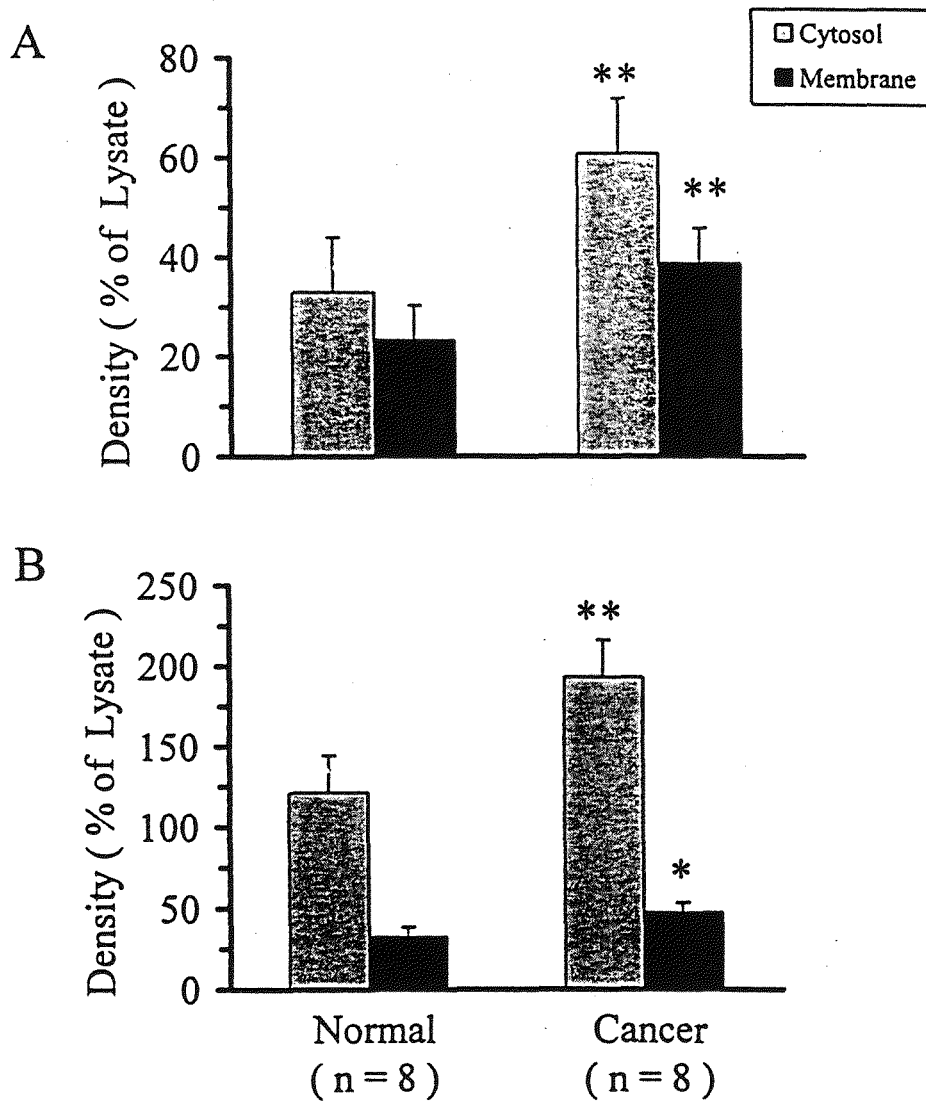


圖 34、人類肝癌組織內 PKC δ 及 ζ 表現量化圖

經西方墨點分析後的 PKC δ 及 ζ 定量後以 Brain lysate 當作 100%，將 8 位病人的肝癌組織及其鄰近正常組織的細胞質及細胞膜部份統計後，求其平均質及其標準偏差質。圖 A 為 PKC δ 的蛋白定量圖；圖 B 為 PKC ζ 的定量圖。*代表 $P < 0.05$ ，**代表 $P < 0.01$ 。

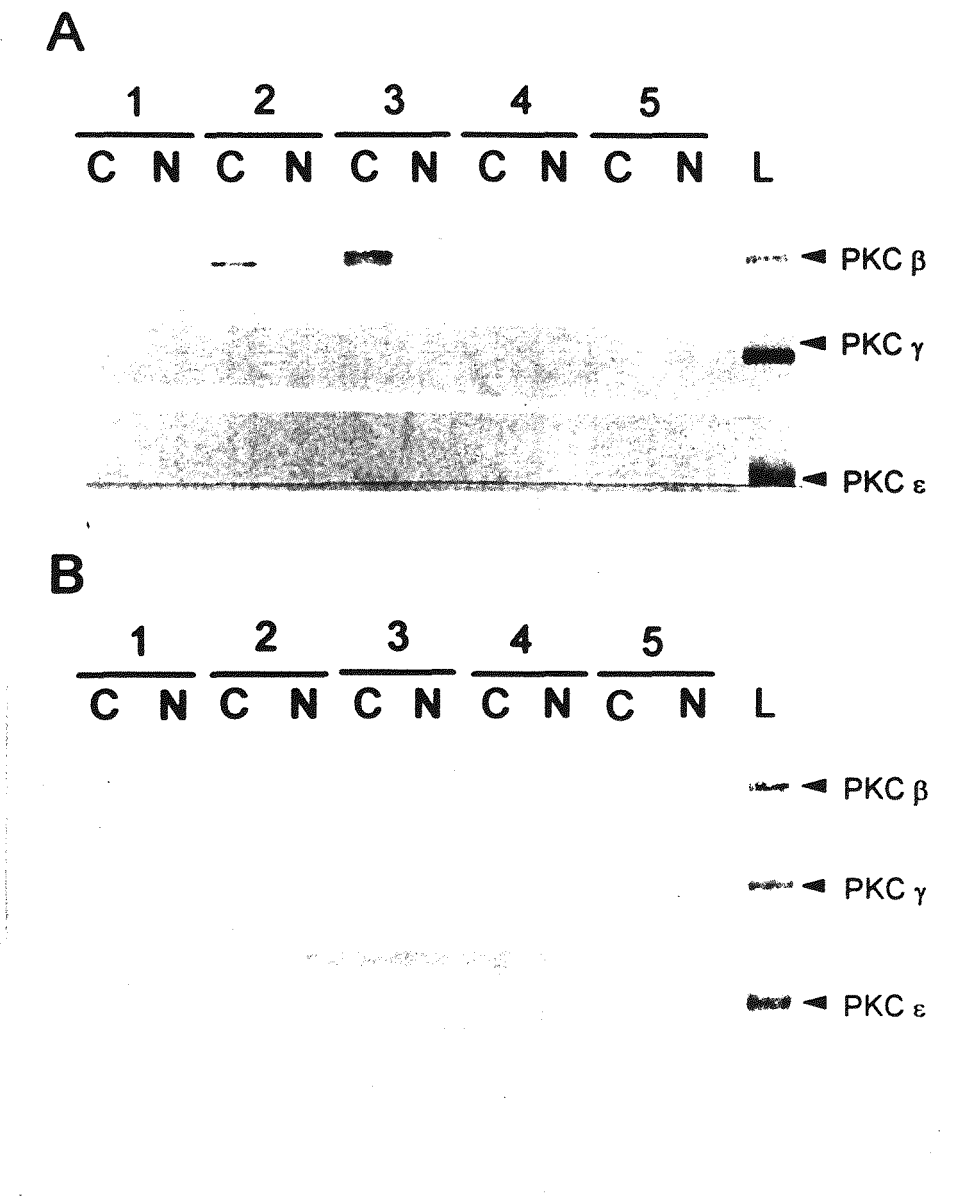


圖 35、西方墨點分析人類肝癌組織內 PKC β , γ 及 ϵ 的表現
 人類肝癌組織經研磨萃取後，經過 DEAE-cellulose chromatography 純化之後，進行 SDS-PAGE (8% gel) 並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的 PKC β , γ 及 ϵ 抗體。圖 A 為 1~5 號病人組織細胞質部份；圖 B 為細胞膜部份。M : Maker ; L : Brain lysate, 當作 positive control ; C : Cancer tissue ; N : Normal tissue 。

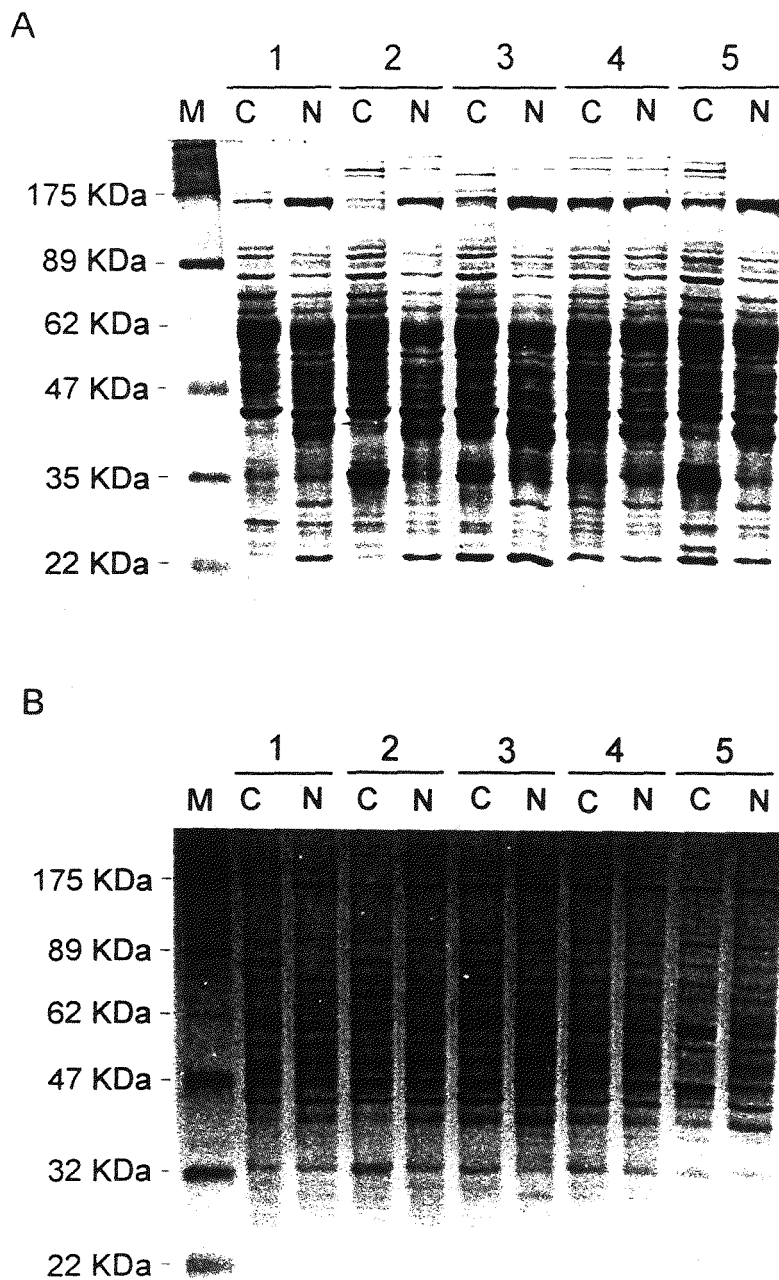
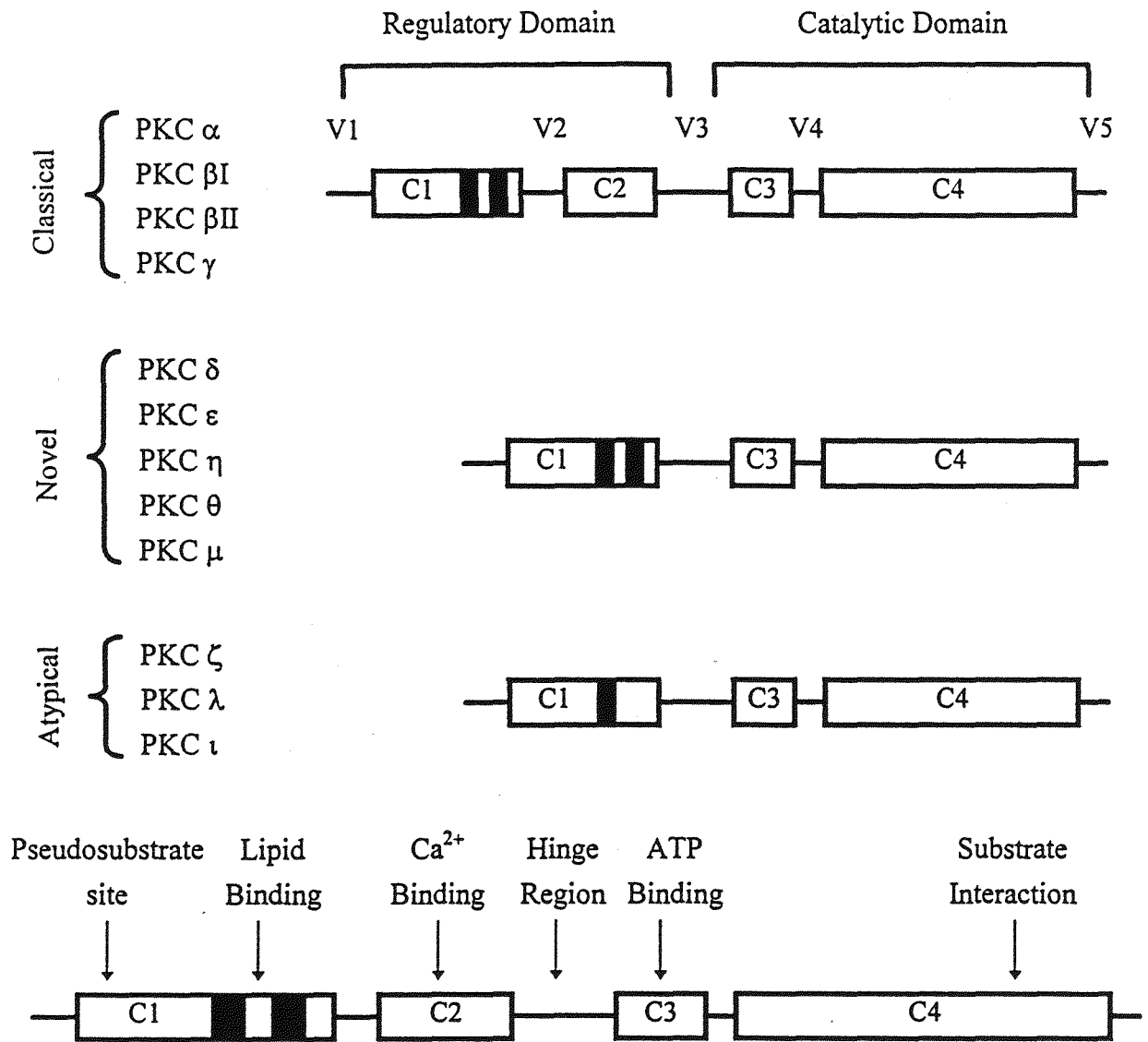


圖 36、人類肝癌組織內整體蛋白的表現

人類肝癌組織經研磨萃取後，進行 SDS-PAGE (8 % gel) ，然後以 Coomassie brilliant blue 染色 1 小時，再以退色液退色。圖 A 為 1~5 號病人的細胞質部份；圖 B 為細胞膜部份。M : Maker ; C : Cancer ; N : Normal 。

附錄一、PKC 結構圖



※圖形參考自 Cell signalling 一書所繪

附錄二、實驗溶液配製

Homogenization Buffer A', pH 7.4		Stock	30 ml
20 mM	Tris-HCl	200.0 mM	3.0 ml
0.03 mM	Na ₃ VO ₄	30.0 mM	0.03 ml
2 mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	100.0 mM	0.6 ml
2 mM	EDTA	100.0 mM	0.6 ml
0.5 mM	EGTA	100.0 mM	0.15 ml
2 mM	PMSF	200.0 mM	0.30 ml
1 mM	DTT	500.0 mM	0.06 ml

Homogenization Buffer A, pH 7.4		Stock	10ml
20 mM	Tris-HCl	200.0 mM	1.00 ml
0.03 mM	Na ₃ VO ₄	30.0 mM	0.01 ml
2 mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	100.0 mM	0.20 ml
2 mM	EDTA	100.0 mM	0.20 ml
0.5 mM	EGTA	100.0 mM	0.05 ml
2 mM	PMSF	200.0 mM	0.10 ml
1 mM	DTT	500.0 mM	0.02 ml
250 mM	Sucrose	342.3 M.W	0.86 g
10 µg/ml	Leupeptin	1.0 mg/ml	0.10 ml
10 µg/ml	Aprotinin	1.0 mg/ml	0.10 ml

Homogenization Buffer B, pH 7.5		Stock	10ml
20 mM	Tris-HCl	200.0 mM	1.00 ml
0.03 mM	Na ₃ VO ₄	30.0 mM	0.01 ml
5 mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	100.0 mM	0.50 ml
2 mM	EDTA	100.0 mM	0.20 ml
0.5 mM	EGTA	100.0 mM	0.05 ml
2 mM	PMSF	200.0 mM	0.10 ml
1 mM	DTT	500.0 mM	0.02 ml
5 mM	NaF	100.0 mM	0.50 ml
10 µg/ml	Leupeptin	1.0 mg/ml	0.10 ml
10 µg/ml	Aprotinin	1.0 mg/ml	0.10 ml
0.1 %	Triton X-100		10.0 µl

PKC activity reaction buffer		100 µl
200 mM	Tris-HCl, pH 7.4	20 µl
200 mM	MgCl ₂	10 µl
40 µg	Lysine-rich histone	25 µl
10 µg	Phosphatidylserine	10 µl
10 µg	Leupeptin	10 µl
25 mM	CaCl ₂	10 µl
24 mM	EGTA	5 µl
20 mM	Tris	10 µl

PBS, pH7.2	1 ℓ
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.2 g
任選一種 K ₂ HPO ₄	2.39 g
Na ₂ HPO ₄	1.95 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	2.44 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	3.68 g

Separating Gel	<u>8%</u>	<u>10%</u>	<u>12.50%</u>
1. 1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	5ml	5ml	5ml
2. Ammonium Persulfate (10 mg/ml)	1ml	1ml	1ml
3. 30% Acrylamide-0.8% Bisacrylamide	5.4ml	6.7ml	8.4ml
4. dd H ₂ O	8.4ml	7.1ml	5.4ml
5. 10% SDS	0.2ml	0.2ml	0.2ml
6. TEMED	6.7ul	6.7ul	6.7ul

Stacking Gel	<u>10ml</u>	<u>15ml</u>
1. 0.5M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5ml	3.75ml
2. Ammonium Persulfate (10 mg/ml)	0.5ml	0.75ml
3. 30% Acrylamide-0.8% Bisacrylamide	1.5ml	2.25ml
4. dd H ₂ O	5.4ml	8.1ml
5. 10% SDS	0.1ml	0.15ml
6. TEMED	25ul	37.5ul

20 mM	Tris-HCl	1.21 g
2 mM	EDTA	335 mg
0.5 mM	EGTA	95 mg
2 mM	PMSF	1.745 ml
50 mM	β -mercaptoethanol	5 ml

Loading Buffer 100 ml

Tris-HCl	7.56 g	
SDS	20 g	先溶，調至 pH 6.8
ddH ₂ O	50 ml	
2-mercaptoethanol		3.5 ml

Transfer Buffer , pH 8.3 5 l

Tris-HCl	15.12 g
glycine	72 g
methanol	1000 ml
ddH ₂ O	補至 5 l

Blocking Buffer , pH 7.4 500 ml

FBS	15 ml
NaCl	4.5 g
Tween 20	0.5 ml
Tris-HCl	6.05 g
ddH ₂ O	補至 500 ml

Washing Buffer , pH 7.4	5 l
Tris-HCl	60.54 g
Tween 20	5 ml
NaCl	45 g
ddH ₂ O	補至 5 l

Electrode Buffer , pH 8.3	5 l
Tris-HCl	15.13 g
Glycine	72 g
SDS	5 g
ddH ₂ O	補至 5 l

Substrate Buffer , pH 9.5	400 ml
Tris-HCl	4.84 g
NaCl	2.33 g
MgCl ₂	0.406 g
ddH ₂ O	補至 400 ml

Immunoprecipitation Buffer		2X (25ml)	1X (50ml)
1 %	Triton X-100	50ul	50ul
150mM	NaCl	438.3mg	438.3mg
10mM	Tris, pH 7.4	10ml	10ml
1mM	EDTA	0.5ml	0.5ml
1mM	EGTA	0.5ml	0.5ml
0.2mM	Na ₃ VO ₄	0.338ml	0.338ml
0.2mM	PMSF	50ul	50ul
0.5 %	NP-40	25ul	25ul

Localization of Protein Kinase C α and ζ during the Decidualization in Pseudopregnant Rats

Jyh-Cherng Shyu, Yih-Shou Hsieh¹, Chen-Lung Chang, Chin-Chiu Tsai, Ai-Chi Chang¹,
Lien-Chuan Yang², Ming-Te Lin³, Min-Hsiung Cheng⁴ and Jer-Yuh Liu¹

¹Department of Physiology, Institute of Biochemistry

²Department of Pathology

³School of Medicine

and

⁴Department of Anatomy

Chung Shan Medical and Dental College

Taichung 40203, Taiwan, ROC

Abstract

Our previous data showed that at least five PKC isoforms (α , δ , ζ , λ and ι) were present in the decidualization. In this study, we then localized the PKC α and ζ by immunohistochemistry in the decidualized uterine tissues. The decidualized uterine tissues were induced by trauma-stimulation and fixed in formalin. The immunofluorescence were photographed by confocal microscope. The data revealed that the fluorescence of PKC α was present in the deciduomata and myometrium. In the deciduomata, PKC α was mainly located in the surrounding nuclear. This phenomenon of localization was especially performed on day 2 and 3 of the decidualization, just on the time of higher frequency of cell mitosis. Since the myometrium with hypertrophy did not display the phenomenon of perinuclear localization, these suggested that the expression and localization of PKC α may be associated with the cell proliferation. On the other hand, the PKC ζ was also present and distributed broadly in the deciduomata and myometrium. This expression was increased and similar to the previous Western blot studies. Thus, the data confirmed that the various expression and localization of PKC isoforms may be correlated with the development of deciduomata.

Key Word : PKC isoforms, deciduomata

Introduction

PKC plays a crucial role in the regulation of calcium-dependent cellular functions (1). In response to extracellular signals such as growth factors, hormones, and neurotransmitters (2, 3), PKC may play an important role in trans-membrane signal transduction. It was also found to induce many cellular responses including cell proliferation, differentiation, gene expression and tumor promotion (4). Over-expression of PKC activity can result in multiple growth abnormalities in rat fibroblasts (5).

To date, twelve isoenzymes of PKC (α , β I, β II, γ , δ , ϵ , η , ζ , θ , λ , ι and μ) have been identified (6-9). These isoenzymes exhibit differences in function and localization (10-13). Recent reports indicated that individual PKCs was involved in restoring cell

proliferation. PKC α level was increased in carbon tetrachloride-induced liver regeneration (14). Selective decrease in nuclear PKC α and increase in nuclear PKC δ were observed after partial hepatectomy (15). Redistribution of PKC from soluble to particulate fractions occurred during liver regeneration (16, 17). Folic acid-induced kidney regeneration caused PKC α , but not PKC δ and PKC ϵ to decrease (18). Liver and kidney regeneration also induced primary response genes, *fos*, *myc*, TIS 1, TIS 8, and TIS 11 (19-22). From these data mentioned above, it is suggested that PKC activation occurs during chemical or mechanical-induced cell proliferation.

In pseudopregnant rats, cell proliferation of deciduomata was also provoked by various stimuli including tissue injury (endometrial scratching or transverse clamping of the uterus) and intraluminal

histamine (23). However, the role of PKC in these artificially-induced decidualization is ill defined.

Our previous data showed that the various expression of PKC isoforms (α , δ , ζ , λ and ι) were observed in the trauma-induced decidualization (24, 25). PKC α was decreased in the cytosolic fraction of the deciduomata as comparing with that of the control (day 0) uterine tissue. Whereas, the other isoforms of PKC δ , ζ , λ and ι were increased both in the deciduomata and the myometrium. It is suggested that the various expression of PKC isoforms were involved in the modulation of the development of deciduomata. However, the localization of these PKC isoforms during the decidualization remain undefined. This study was to further analysis the localization of PKC isoforms by use of immunohistochemistry in the deciduomata in pseudopregnant rats.

Materials and Methods

Chemicals

Triton X-100, bovine serum albumin (BSA) and FITC conjugated anti-mouse IgG were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The monoclonal antibodies to PKC α and ζ were purchased from Transduction Laboratories Union Biomedical Inc. (Taiwan)

Animal Treatment

The virgin Sprague-Dawley rats (National Science Council Animal Center, Taipei, Taiwan, ROC), weighing 180-200g were maintained in a temperature-controlled room (at 24°C) and illuminated for 12 hour per day (lights on from 5 AM to 5 PM). Vaginal smears were obtained daily and only those animals showing two consecutive 4-day cycles were used. Pseudopregnancy was induced by vagino-cervical vibration with a glass rod for 1 min on the morning of estrus (26). The day of estrus was designated as day 0 of pseudopregnancy. Uterine decidualization was induced unilaterally by endometrial scratching on the morning of day 4 of pseudopregnancy (23). Therefore, day 4 of pseudopregnancy was designated as day 0 of decidualization. On day 0, 1, 2, 3, 5, 7 and 9 of decidualization, both the uterus were removed, and fixed in 10% formalin.

Immunofluorescence Labelling

Three micron sections were prepared from paraffin-embedded tissue fixed in 10% formalin. After sectioning, the specimens were deparaffinized in

xylene and rehydrated through an alcohol series, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 20 minutes. Nonspecific antigen binding was prevented by incubating the specimens with 3% normal bovine serum in PBS. After 25 minutes, the specimens was washed by PBS and incubated for 1 hour at room temperature with the monoclonal antibodies to PKC α and ζ (10 mg per 1 ml PBS plus 0.2% BSA). The antibodies were then removed and the specimens were washed three times in PBS for 5 minutes each. The specimens were then immersed with second antibody solution containing FITC conjugated anti-mouse IgG, diluted 20 fold in PBS. Incubate at room temperature for 45 minutes. Finally, the specimens were washed again three times with PBS for 5 minutes each and then inverted the coverslip onto the specimens containing 10 μ l mounting media (PBS adjusted to pH 8.0, 50% glycerol) for confocal microscopy.

Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscopy

The three-dimensional distribution of fluorescent structures was analyzed using a laser scanning confocal microscope (LSM 410 from Zeiss) equipped with a PI-Neofluar (2x and 20x) objective (NA=1.4). Observations were made on single optical sections taken at 1 mm focus steps in the z-axis of the tissue sections. The image from labelled specimens were collected sequentially using an argon (488 nm) laser beam for excitation and a broad pass (515-545 nm) emission filter for FITC fluorescence and an helium/neon (543 nm) laser beam for excitation and a long-pass (590 nm) emission filter for LSM transmission scanning. We verified that there was not mechanically induced shift during the procedure of sequential image collection. The image dimensions were 512 \times 512 pixels with 3 \times 8 bits resolution.

Histology Examination

After confocal fluorescence microscopy analyses, all the specimens were immediately stained with hematoxylin and eosin for calculating the amount of the mitotic rate.

Results

After trauma-stimulation, the weight of the treated uterine horn was increased from day 1 to day 7, and then regressed on day 9. As our previous reports, the increased weight was due to the hypersia in the endometrium where the stromal cells were transformed to decidual cells, and the hypertrophy in the myometrium. Hematoxylin/Eosin staining showed that a region in the endometrium of the trauma-

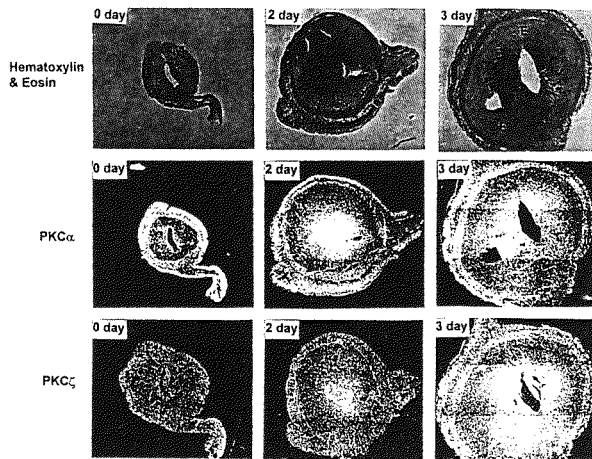


Fig. 1. Immunofluorescence detection of PKC α and ζ in the decidualized uterine tissue. Indirect immunofluorescence of PKC α or ζ using monoclonal antibody IgG as primary antibody and FITC conjugated anti-mouse IgG as secondary antibody. After fluorescence image scanning, the decidualized tissue was then stained by hematoxylin and eosin form parafilm-embedded sections. M: myometrium; E: Endometrium. The arrow point designated as deciduomata. (20x)

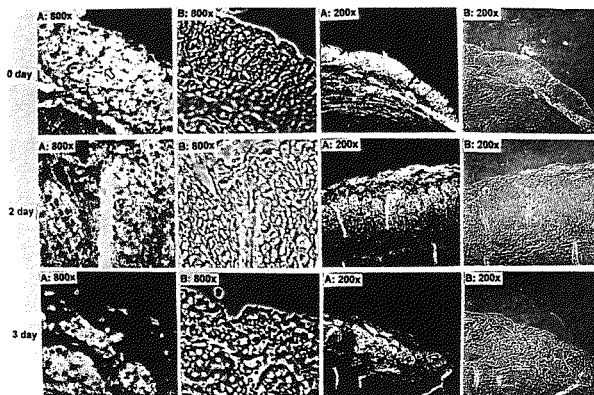


Fig. 2. Confocal microscope image of myometrium labelled with PKC α on day 0 to day 3 of decidualization. Indirect immunofluorescence of PKC α using monoclonal antibody IgG as primary antibody and FITC conjugated anti-mouse IgG as secondary antibody. The image of fluorescence was first acquired and photographed (image A). The corresponding image of LSM transmission scanning was then acquired and photograph (image B). Arrow point designated as the distribution of PKC α .

stimulated uterine tissue as arrow designed (Figure 1) was accumulated by more mitotic decidual cells. This area was designed as deciduomata. The mitotic rate was increased from day 1 to day 7, and maximal at between day 2 and day 3 (0.47 and 0.33 mitotic cells /10⁴ cells, respectively).

To localize the involvement of PKC isoforms in the development of deciduomata, immunohistochemistry was analysis. The data showed that on day 0, the fluorescence of PKC α detected by laser scanning confocal fluorescence microscopy was localized in the myometrium, but not significantly

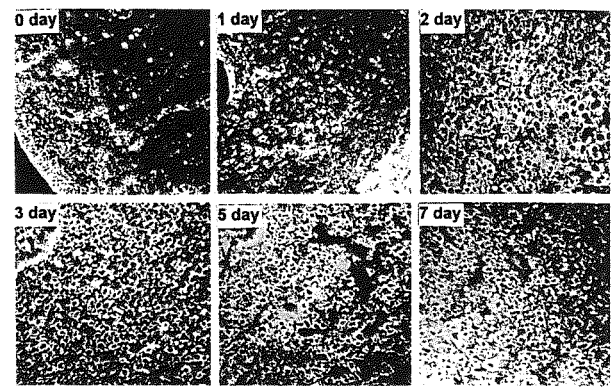


Fig. 3. Confocal microscope image of deciduomata labelled with PKC α from day 0 to day 7 of decidualization. Indirect immunofluorescence of PKC α using monoclonal antibody IgG as primary antibody and FITC conjugated anti-mouse IgG as secondary antibody. The image of fluorescence was acquired and photographed. Arrow point designated as the perinuclear distribution fo PKC α . (200x)

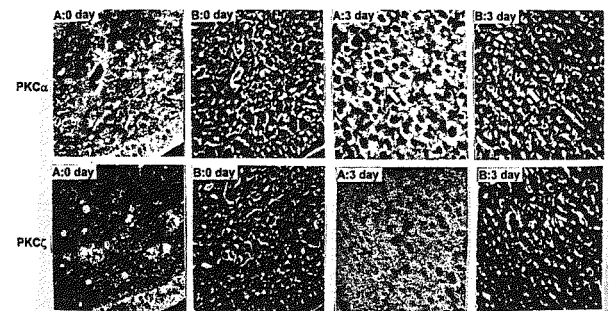


Fig. 4. Confocal microscope image of deciduomata labelled with PKC α and ζ on day 0 and day 3 of decidualization. Indirect immunofluorescence of PKC α or ζ using monoclonal antibody IgG as primary antibody and FITC conjugated anti-mouse IgG as secondary antibody. The image of fluorescence was first acquired and photographed (image A). The corresponding image of LSM transmission scanning was then acquired and photograph (image B). Arrow point designated as the perinuclear distribution fo PKC α . (800x)

observed in the endometrium. However, during the decidualization, although the fluorescence of PKC α was constantly present and the level was not change in the myometrium (Figure 2; as arrow pointed), the fluorescence was detected in the deciduomata of endometrium and gradually extended its area as the same as the deciduomata increased from day 1 to day 7 (Figure 1 and 3). In addition, PKC α localization was observed near the nuclear of the cells in the deciduomata (Figure 4). This phenomenon was predominantly present on day 2 and day 3 (Figure 3; as arrow pointed).

Unlike PKC α , PKC ζ was probably distributed all the field of the cells (Figure 4). It was also increased both in the deciduomata and myometrium during the decidualization as comparing to that on

day 0 (Figure 1), and was compatible with the growth rate of decidual cell.

Discussion

Our present results as shown in Figure 3 indicated that in the deciduomata the distribution of PKC α was predominantly located in the surface of the nuclear on day 2 and day 3 during the decidualization. In the previous study, Western blot analysis showed that the cytosolic PKC α was decreased in the deciduomata (25). These observations were suggested that the new and old synthesized PKC α translocated to the perinuclear fraction of the deciduomata may account for the reduction of the cytosolic PKC α .

According to Figure 2 and 4, PKC α was translocated predominately in the proliferative decidual cells of the deciduomata, but not in the hypertrophy of the myometrium. Chen C.S. et al. indicated that translocation of PKC to the perinuclear was consistent with the activation and down-regulation (27). So far, the similar phenomenon is also observed in other some tissues. PKC α down-regulation is found to be in hyperplasia of the folic acid-induced kidney regeneration and not in hypertrophy (18). In addition, PKC α down-regulation is also reported in liver hyperplasia (28). Therefore, we suggested that PKC α translocation may come to display cell proliferation.

On the other hand, we also found that PKC ζ was increased during the decidualization. It was also compatible with decidual cell proliferation. The similar results were reported. In *Xenopus* oocytes and in mouse fibroblasts, PKC ζ overexpression decreases the requirement of mitogens for cell proliferation (29). Furthermore, in Rat-1 fibroblast, dominant-negative PKC ζ inhibits, while overexpression of PKC ζ enhances mitogen-activated protein kinase activation by platelet-derived growth factor and phosphatidylcholine-specific phospholipase C (30).

In summary, the expression and localization of PKC α was observed in the development of decidual cell. Moreover, we suggested that the data may confirm the role of PKC isoforms in the development of the deciduomata, although the level of PKC isoforms mRNA have not been detected.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from Chung Shan Medical and Dental College (CSMC 85-OM-A-037 and CSMC 85-OM-B-020), Taichung, and the National Science Council (NSC 86-2314-B-040-010), Taipei, Republic of China.

References

1. Nishizuka, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308: 693-698, 1984.
2. Berridge, M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 159-193, 1987.
3. Rozengurt, E. Signal transduction pathways in mitogenesis. *Brit. Med. Bull.* 45: 515-528, 1989.
4. Nishizuka, Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* 334: 661-665, 1988.
5. Housey, G.M., M.D. Johnson, W.L. Hsiao, C.A. O'Brain, J.P. Murphy, P. Kirschmeier, and I.B. Weinstein. Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell* 52: 343-354, 1988.
6. Koide, H., K. Ogita, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka. Isolation and characterization of the ϵ subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1149-1153, 1992.
7. Wetsel, W.C., W.A. Khan, I. Merchtenthaler, H. Rivera, A.E. Halpern, H.M. Phung, A. Negro-Vilar, and Y.A. Hannun. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J. Cell Biol.* 117: 121-133, 1992.
8. Selbie, L.A., A. Schmitz-Peiffer, Y. Sheng, and T.J. Biden. 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, 1993.
9. Dekker, L.V., and P.J. Parker. Protein kinase C- α question of specificity. *Trends. Biochem. Sci.* 19: 73-77, 1994.
10. Huang, K.P., F.L. Huang, H. Nakabayashi, and Y. Yoshida. Biochemical characterization of rat brain protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 263: 14839-14845, 1988.
11. Hidaka, H., T. Tanaka, K. Onoda, M. Hagiwara, W. Watanabe, H. Ohta, Y. Ito, M. Tsurudomw, and T. Yoshida. Cell type-specific expression of protein kinase C isozymes in the rabbit cerebellum. *J. Biol. Chem.* 263: 4523-4526, 1988.
12. Hocevar, B.A., and A.P. Fields. Selective translocation of β II-protein kinase C to the nucleus of human promyelocytic (HL60) leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 266: 28-33, 1991.
13. Liyanage, M., D. Frith, E. Livneh, and S. Stabel. 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, 1992.
14. Sasaki, Y., N. Hayashi, T. Ito, H. Fusamoto, N. Sato, and T. Kamada. Heterogeneous activation of protein kinase during rat liver regeneration induced by carbon tetrachloride administration. *FEBS Lett.* 254: 59-65, 1989.
15. Alessenko, A., W.A. Khan, W.C. Wetsel, and Y.A. Hannun. Selective changes in protein kinase C isoenzymes in rat liver nuclei during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 1333-1339, 1992.
16. Okamoto, Y., K. Nishimura, M. Nakayama, M. Nakagawa, and H. Nakano. Protein kinase C in the regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 1144-1149, 1988.
17. Rush, J.S., J. Klein, P. Fanti, N.R. Bhat, and C.J. Waechter. Direct assay of membrane-associated protein kinase C activity in lymphocytes B in the presence of Brij-58. *Anal. Biochem.* 207: 304-310, 1992.
18. Dong, L., J.L. Stevens, D. Fabbro, and S. Jaken. Regulation of protein kinase C isozymes in kidney regeneration. *Cancer Res.* 53: 4542-4549, 1993.
19. Kondo, T., H. Inui, F. Konishi, and T. Inagami. Phospholipase D mimics platelet-derived growth factor as a competence factor in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 267: 23609-23616, 1992.
20. Carpenter, G. Receptor tyrosine kinase substrates-src homology domains and signal transduction. *FASEB J.* 6: 3283-3289, 1992.
21. Towley, B. D., L.J. Chadwick, J.J. Grantham, and J.P. Calvet. Sequentially protooncogene expression in regenerating kidney fol-

- lowing acute renal injury. *J. Biol. Chem.* 264: 8389-8393, 1989.
22. Kujubu, D.A., J.T. Norman, H.R. Herschman, and L.G. Fine. Primary response gene expression in renal hypertrophy and hyperplasia: evidence for different growth initiation processes. *Am. J. Physiol.* 260: F823-F827, 1991.
 23. Finn, C.A., and P.M. Keen. The induction of deciduomata in the rat. *J. Embryol. Exp. Morph.* 11: 673-682, 1963.
 24. Shyu, J.C., Y.S. Hsieh, C.L. Chang, C.C. Tsai, C.K. Cheng, and J.Y. Liu. Change in protein kinase C activity on day 5 of decidualization in pseudopregnant rat. *Chinese J. Physiol.* 40, 107-112, 1997.
 25. Liu, J.Y., J.C. Shyu, C.L. Chang, C.C. Tsai, A.C. Chang, L.C. Yang, L.Y. Lin., and Y.S. Hsieh. Protein kinase C isoforms during the development of deciduomata in pseudopregnant rats. submit for publication.
 26. Defeo, V.J. Vaginal-cervical vibration: A simple and effective method for the induction of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 79: 440-442, 1966.
 27. Chen, C.S., and M. Poenie. New fluorescent probes for protein kinase C synthesis, characterization, and application. *J. Biol. Chem.* 268: 15812-15822, 1993.
 28. Tessitore, L., G.P. Perletti, E. Sesca, P. Pani, M.U. Dianzani, and F. Piccinini. Protein kinase C isozyme pattern in liver hyperplasia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 208-214, 1994.
 29. Berra, E., M.T. Diaz-Meco, I. Dominguez, M.M. Municio, L. Sanz, J. Lozano, R.S. Chapkin, and J. Moscat. P protein kinase C ζ isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* 74, 555-563, 1993.
 30. van Dijk, M., F.J. Muriana, P.C. van Der Hoeven, J. de Widt, D. Schaap, W.H. Moolenaar, and W.J. van Blitterswijk. Diacylglycerol generated by exogenous phospholipase C activates the mitogen-activated protein kinase pathway independent of Ras- and phorbol ester-sensitive protein kinase C: dependence on protein kinase-zeta. *Biochem. J.* 323, 693-699, 1997.

PROTEIN KINASE C ISOFORMS DURING THE DEVELOPMENT OF DECIDUOMATA
IN PSEUDOPREGNANT RATS

Jer-Yuh Liu¹, Jyh-Cherng Shyu², Chen-Lung Chang², Chin-Chiu Tsai², Ai-Chi Chang¹,
Lien-Chuan Yang³, Long-Yau Lin⁴ and Yih-Shou Hsieh¹

Institute of Biochemistry¹ and Department of Physiology², Chung Shan Medical and Dental College,
and Department of Pathology³ and Obstetrics⁴, Chung Shan Medical and Dental College Hospital,
Taichung 40203, Taiwan, R.O.C.

Summary

In this study, we determined the expression of protein kinase C (PKC) isoforms during trauma-induced decidualization. The findings revealed that at least five PKC isoforms (α , δ , ζ , ι and λ) were present in both control and decidualized tissues. After trauma-stimulation, PKC α was down-modulated in the deciduomata but not in the myometrium. Down-modulation was compatible with the increase in cell mitosis which reached a maximum at 2-3 days. On the other hand, PKC ζ was not down-modulated. It was increased both in the deciduomata and myometrium, and paralleled the frequency of decidual cell mitosis. The PKC isoforms of δ , ι and λ were also increased, but they were associated with the depression of cell mitosis. Therefore, these findings suggested that the variable expression of PKC isoforms in trauma-induced decidualizing tissue in pseudopregnant rats may be involved in the modulation of decidual cell growth.

Key words: *protein kinase C, deciduomata*

Protein kinase C (PKC) plays a crucial role in the regulation of calcium-dependent cellular functions (1). In response to extracellular signals e.g. growth factors, hormones, and neurotransmitters (2,3), PKC may play an essential role in trans-membrane signal transduction. It is also found to induce many cellular responses including cell proliferation, differentiation, gene expression and tumor promotion (4). Over-expression of PKC activity can cause multiple growth abnormalities in rat fibroblasts (5).

To date, twelve isoenzymes of PKC (α , β I, β II, γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , λ and μ) have been identified (6-9). These isoenzymes exhibit differences in function and localization (10-13). Recent reports indicated that individual PKCs were involved in restoring cell proliferation. The PKC α level was increased in carbon tetrachloride-induced liver regeneration (14). Selective decreases in nuclear PKC α and increases in nuclear

Address for Correspondence: Ph.D. Yih-Shou Hsieh, Institute of Biochemistry, Chung Shan Medical and Dental College, No.110, Sec. 1, Chien Kuo N. Road, Taichung 40203, Taiwan. Tel: (886) 04-3896190-50815 Fax: (886) 04-3890964. E-mail: ysh@mercury.csmc.edu.tw.

PKC δ were observed after partial hepatectomy (15). Redistribution of PKC from soluble to particulate fractions occurred during liver regeneration (16,17). Folic acid-induced kidney regeneration caused PKC α , but not PKC δ and PKC ϵ , to decrease (18). Liver and kidney regeneration also induced primary response genes, fos, myc, TIS 1, TIS 8, and TIS 11 (19-22). These data suggest that PKC activation occurs during chemical or mechanical-induced cell proliferation. In pseudopregnant rats, cell proliferation of decidual tissue is provoked by various stimuli including tissue injury (endometrial scratching or transverse clamping of the uterus) and intraluminal histamine (23). However, the role of PKC in artificially-induced decidualization is ill defined.

In search of a common intracellular process mediating the effect of tissue injury and intraluminal histamine, we propose that activation of the enzyme PKC may be involved. Histamine is not only present in various stimuli including tissue injury (24), but also secreted from endometrium mast cells by both estrogen and progesterone stimulation, which are required for the development of decidual tissue (25,26). Histamine is also found to be a potent activator of phospholipase C, leading to polyphosphoinositide hydrolysis and subsequent increase in intracellular diacylglycerol (27). Diacylglycerol is well known to enhance PKC activity and cell growth (28,29). Therefore, histamine causes the protein kinase C activation, and subsequently affects DNA synthesis (27). Previous data showed that decrease of the cytosolic PKC activity was observed in trauma-induced decidualization (30). This study characterized the PKC isoforms during decidualization in pseudopregnant rats. The findings revealed that the altered expression of PKC isoforms may be involved in the stromal fibroblast proliferation and differentiation during decidualization in pseudopregnant rats.

Methods

Chemicals:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), sucrose, ethyleneglycol bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin, soybean trypsin inhibitor type I-S, β -mercaptoethanol, Triton X-100 and $MgCl_2$ were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Animal treatment:

Virgin Sprague-Dawley rats (National Science Council Animal Center, Taipei, Taiwan, R.O.C) weighing 180-300g were maintained in a temperature-controlled room (at 24 °C) and illuminated for 12 hours daily (lights on from 5 AM to 5 PM). Vaginal smears were obtained daily and only those animals showing two consecutive 4-day cycles were used. Pseudopregnancy was induced by vagino-cervical vibration with a glass rod for 1 min on the morning of estrus (31). The day of estrus was designated as day 0 of pseudopregnancy. Uterine decidualization was induced unilaterally by twice of endometrial scratching on the morning of day 4 of pseudopregnancy (23). Therefore, day 4 of pseudopregnancy was designated as day 0 of decidualization. On days 0, 1, 2, 3, 5, 7 and 9 of decidualization both the decidualized uterine horn and the untreated contralateral uterine horn were removed, weighed, and quickly frozen on dry ice for tissue extraction.

Preparation of cytosolic and particulate fractions:

All procedures were performed at 4°C. on days 3, 5, 7 and 9 of decidualization. The decidualized uterine tissues were slit open and the decidual tissue was removed from the myometrium by gentle scraping with a glass slide. Both decidual tissue and myometrium samples were homogenized by thirty strokes using a Konets homogenizer at a ratio of 1 g tissue/10 ml homogenization buffer A. The homogenization buffer A consisted of 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.3 M sucrose, 2 mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 25 μ g/ml soybean trypsin inhibitor type I-S and 50 mM β -mercaptoethanol at pH 7.5. On days 0, 1 and 2 of decidualization, the decidual tissue can not be removed individually. As a result, whole uterine tissues were homogenized as above. These homogenates were centrifuged at 100,000g for 1 hour at 4°C. The supernatant

was stored at -70°C for the cytosolic fraction and the pellet was suspended in buffer B (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 2 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soybean trypsin inhibitor type I-S, 50 mM β -mercaptoethanol and 0.1% Triton X-100 at pH 7.5.) and homogenized with thirty strokes. A 30 min exposure to 0.1% Triton X-100 at 0°C has been demonstrated to extract PKC from tissue suspensions of rat brain, liver, and kidney (32). This procedure was modified and the homogenates were incubated at 4°C in a rotating mixer for 1 hour. Centrifugation (100,000 g, 1 hour) was performed to remove any nonsolubilized material and the supernatant was then referred to as the particulate fraction and stored at -70°C . The enzyme was stable for at least 1 month. To identify which PKC isoenzymes were expressed in rat uterine tissue, the total protein of both day 2 decidualized uterine horn and the untreated contralateral uterine horn were extracted by buffer B and separated as above.

Electrophoresis and Western Blot:

Tissue extract samples were prepared as described above. Sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was carried out as described by Laemmli (33) using 10% polyacrylamide gels. After samples were electrophoresed at 140 V for 3.5 hour, the gels were equilibrated for 15 min in 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, containing 192 mM glycine and 20% (v/v) methanol, as described by Brockenbrough et al. (34). Electrophoresed proteins were transferred to nitrocellulose paper (Amersham, Hybond-C Extra Supported, 0.45 Micro) using a Hoefer Scientific Instruments Transphor Units at 100 mA for 14 hour. Nitrocellulose papers were incubated at room temperature for 2 hour in blocking buffer containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.9% (w/v) NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20 and 3% (v/v) fetal bovine serum. Monoclonal antibodies to PKC isoforms (Transduction Laboratories) were diluted 1:200 in antibody binding buffer containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.9% (w/v) NaCl, 0.1%(v/v) Tween-20 and 1% (v/v) fetal bovine serum. Incubations were performed at room temperature for 3.5 hour. The immunoblots were washed three times in 50 ml blotting buffer for 10 min and then immersed in the second antibody solution containing alkaline phosphatase goat anti-rabbit IgG (Promega) for 1 hour and diluted 1000-fold in binding buffer. The filters were then washed three times in blotting buffer for 10 min. Color development was presented in a 20 ml mixture consisting of 7 mg nitro blue tetrazolium, 5 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 100 mM NaCl and 5 mM MgCl_2 in 100 mM Tris-HCl, pH 9.5.

Histology examination:

After removal of the uterus, small portions were immediately fixed in 10% formalin and stained with

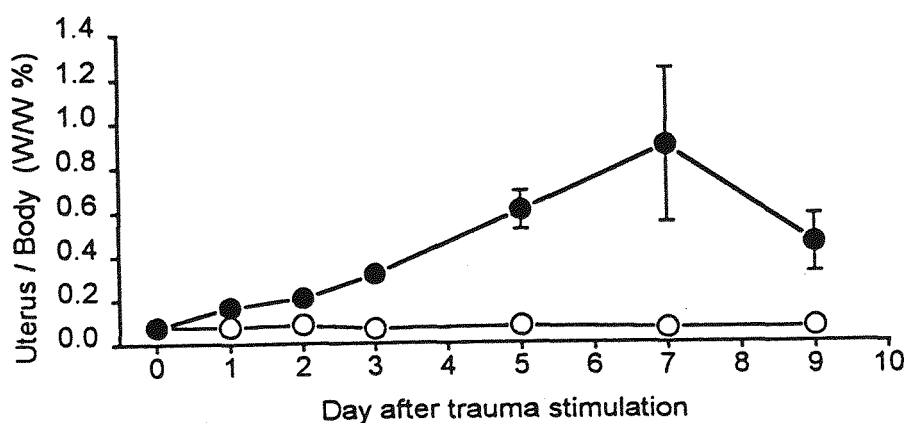


Fig. 1.

Change in uterine horn weight after induction of decidualization by uterine trauma stimulation. Values expressed are the mean \pm S.D. for 3-5 measurements. $\text{--}\circ\text{--}$: the untreated contralateral uterine horn; $\text{--}\bullet\text{--}$: the decidualized uterine horn .

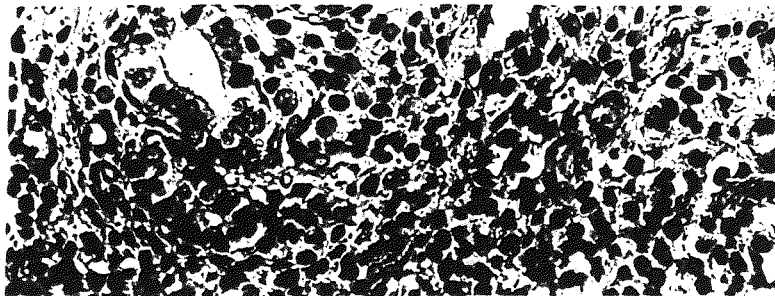
hematoxylin and eosin. For the mitotic index, at least 10000-15000 nuclei were scored for each time point.

Results

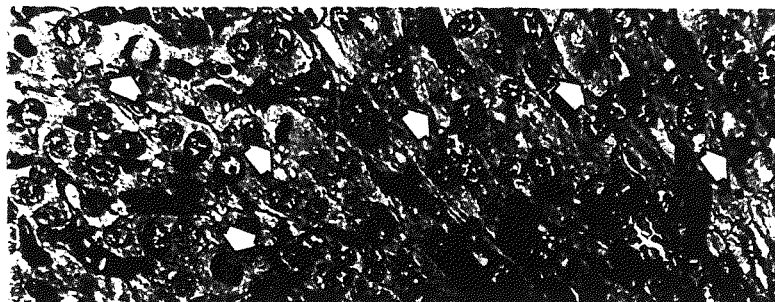
Evaluation of the Growth of the Deciduum in Rat Uterus:

As shown in previous reports (23,35), the rat uterine horn undergoes a large increase in weight, reaching

A.



B.



C.

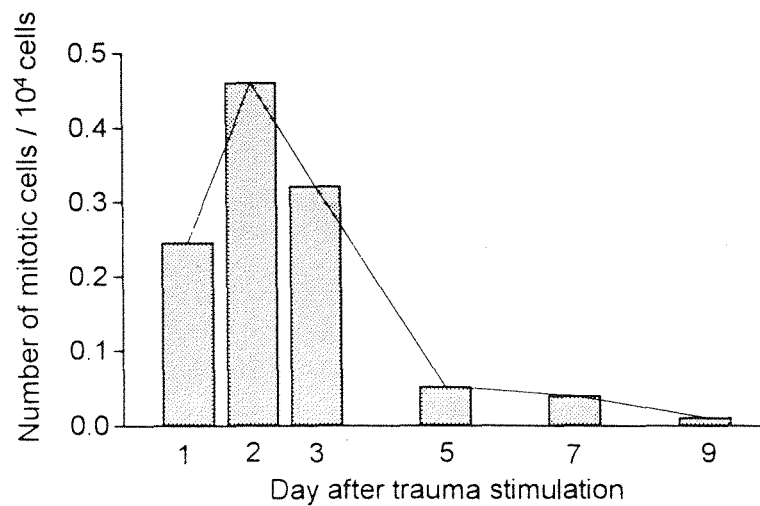


Fig. 2.

Histological examination during decidualization. A, the untreated contralateral uterine tissue; B, the decidualized uterine tissue on day 2, the arrow points designated as the mitotic cells; C, the rate of cell mitosis during decidualization. For the mitotic index, at least 10000-15000 nuclei were scored for each time point.

approximately ten times the weight of the contralateral untreated uterine tissue by the seventh day of decidualization (Fig. 1). The increased weight is attributed to growth of the deciduomata as well as hypertrophy of the myometrial cells. The proliferation of the decidual cell was evaluated by the histology examination (Fig. 2A and 2B). The mitotic cell was designated as the arrow point (Fig. 2B). The rate of the decidual cell mitosis was increased at 1 day (Fig. 2C), and reached a maximum (0.0047%) at 2-3 days, then quickly dropped down.

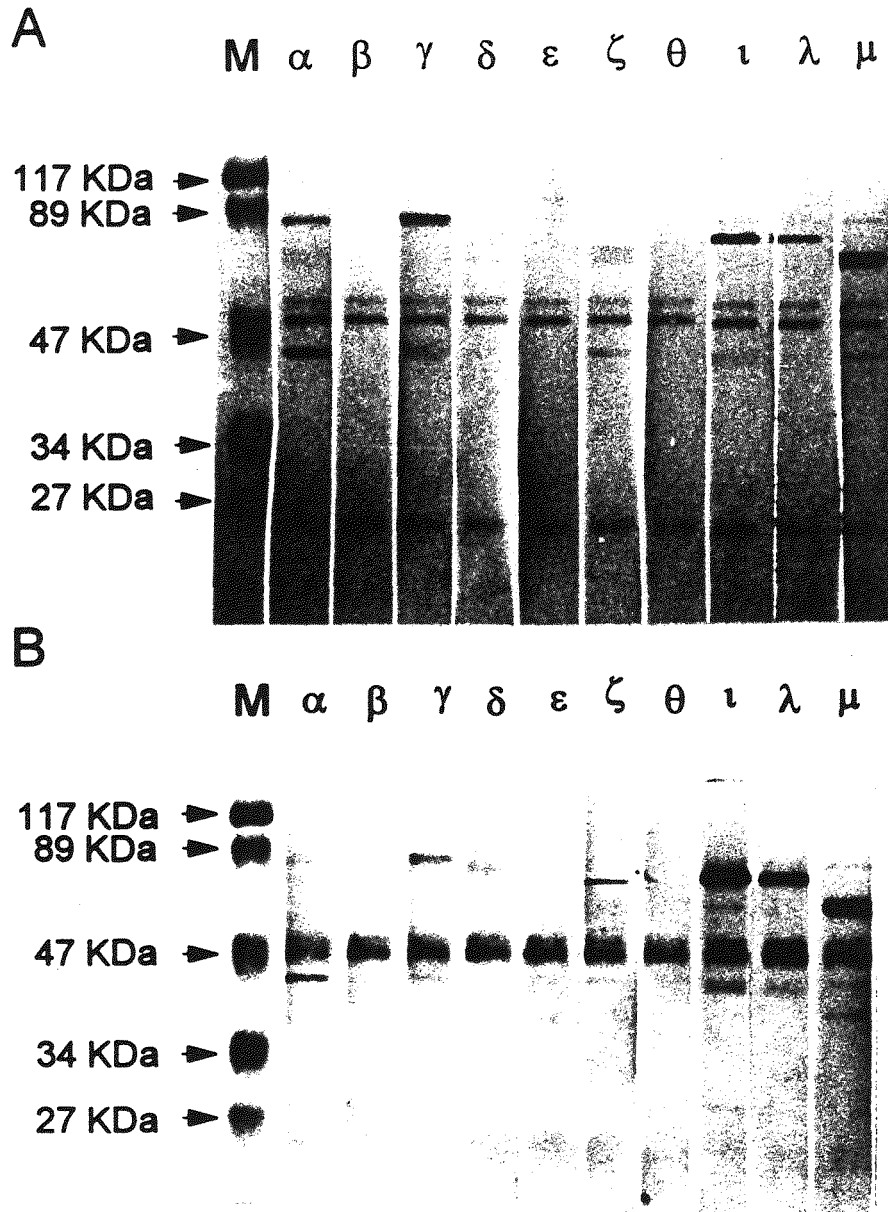


Fig. 3.

Identification of PKC isoenzymes in rat uterus. Aliquots of the uterus homogenates were separated on denaturing polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose paper. The blots were stained with PKC isoenzyme-specific antibodies. A, the untreated contralateral uterine horn; B, the decidualized uterine horn on day 2 of decidualization. M, the molecular weights are indicated on the left.

Immunochemical Characterization of PKC Isoforms both in the Untreated Contralateral Uterine Horn and in the Decidualized Uterine Horn:

To determine whether PKC isoforms were associated with the proliferation of the decidual cells, we scanned ten types of PKC isoforms (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , θ , ι , λ and μ) using the Transduction Laboratory antibodies in both the untreated contralateral uterine horn (Fig. 3A) and the decidualized uterine horn (Fig. 3B) on day 2 of decidualization. The homogenate was employed for the Western Blot analysis. Analysis revealed that significant immunostainings in both the uterine horns were detected with the PKC α and γ antibodies at ~ 80 KDa, PKC δ antibody at ~ 78 KDa, and PKC ζ , ι and λ antibodies at ~ 72 KDa, whereas the PKC β , ϵ , θ and μ antibodies did not show any immunoreactivity. Both the uterine horns in PKCs expression were not different. Four bands at 54 KDa, 48 KDa, 42 KDa and 24 KDa detected with all types of PKC isoforms were non-specific as compared with the marker of brain cell lysates (data not shown).

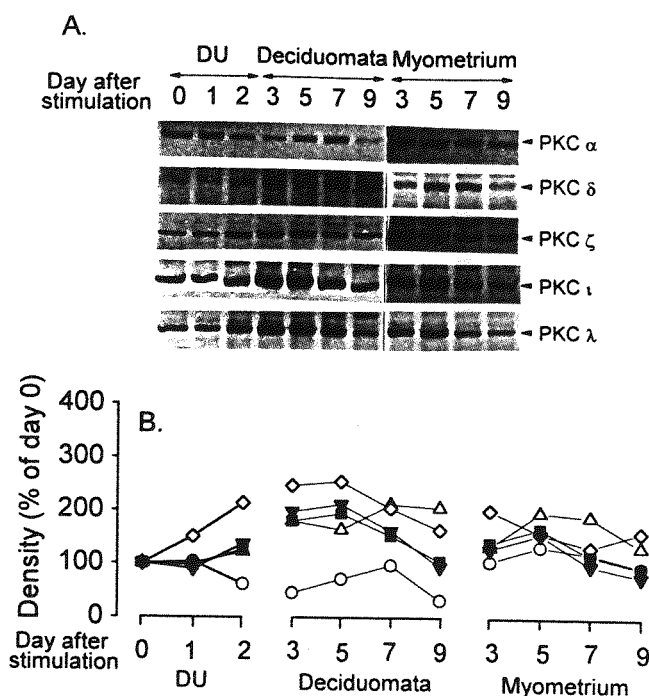


Fig. 4.

Immunoblot analysis of PKC α , δ , ζ , ι and λ isoenzymes in the cytosolic fraction. Uterine cytosolic fraction was prepared as described in "Materials and Methods". Aliquots of the uterus homogenates were separated on denaturing polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose paper. The blots were stained with PKC isoenzyme-specific antibodies. Samples in each lane were from individual rats in one experiment (A). Similar results were obtained in three additional experiments. The quantitative data of the cytosolic fraction from all experimental animals are presented (B). On days 3, 5, 7 and 9, the samples were the homogenates of the deciduomata or myometrium. On days 0, 1 and 2, samples were of the whole decidualized uterine tissue (DU). The levels of PKC isoforms on day 0 were defined as 100%. Values expressed were the mean for 3-5 measurements. —○— : PKC α , —■— : PKC δ , —◇— : PKC ζ , —△— : PKC ι , —▼— : PKC λ .

Two bands of 150 KDa and 65 KDa appearing in PKC ϵ immunostaining and three bands of 78 KDa, 65 KDa and 38 KDa in PKC μ immunostaining were also non-specific. The anti-PKC α antibody does not cross-react with PKC γ through immunoprecipitation studies (data not shown), while anti-PKC γ antibody does cross-react with PKC α . Therefore, the antibody of PKC γ is not specific for PKC γ but may confirm the presence of PKC α in the uterine tissue. These results suggest that at least five types of the PKC isoforms (α , δ , ζ , ϵ and λ) are present in rat uterine tissue.

Characterization of PKC Isoforms in decidualization:

We next examined the expression of the five PKC isoforms (α , δ , ζ , ϵ and λ) during the decidualization. These data revealed that PKC α content decreased 45%-60% in the cytosolic fraction of the deciduomata on day 2-5 as compared to day 0 (Fig. 4A and 4B), while there was no change in the particulate fraction (Fig. 5A

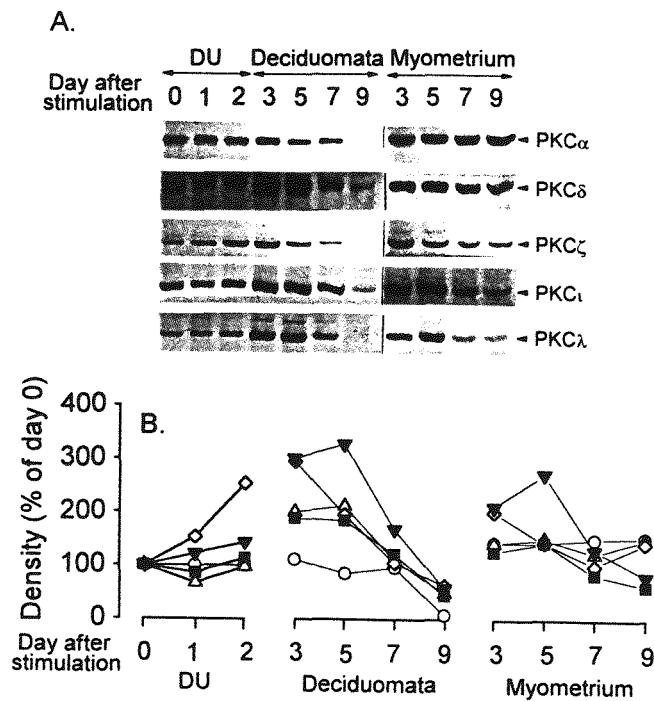


Fig. 5.

Immunoblot analysis of PKC α , δ , ζ , ϵ and λ isoenzymes in the particulate fraction. Uterine particulate fraction was prepared as described in "Materials and Methods". Aliquots of the uterus homogenates were separated on denaturing polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose paper. The blots were stained with PKC isoenzyme-specific antibodies. Samples in each lane were from individual rats in one experiment (A). Similar results were obtained in three additional experiments. The quantitative data of the cytosolic fraction from all experimental animals are presented (B). On days 3, 5, 7 and 9, the samples were the homogenates of the deciduomata or myometrium. On days 0, 1 and 2, samples were of the whole decidualized uterine tissue (DU). The levels of PKC isoforms on day 0 were defined as 100%. Values expressed were the mean for 3-5 measurements. —○— : PKC α , —■— : PKC δ , —◇— : PKC ζ , —△— : PKC ϵ , —▼— : PKC λ .

and 5B). This phenomenon was designated as down-modulation (18). Since the sample extracts on day 0-2 are composed of all the decidualized uterine tissue, down-modulation may begin at 1 day and precede the increase in cell mitosis which was maximal at 2-3 days (Fig. 2C). Both the cytosolic- and particulate-PKC α contents were not change in the myometrium (Fig. 4 and 5)

PKC ζ , which is considered a mitogen, was not down-modulated. It was increased both in the cytosolic and particulate fractions of both the deciduomata and myometrium (Fig. 4 and 5). The level of PKC ζ in the particulate fraction of deciduomata increased 200-300% between 2-3 days relative to day 0 (Fig. 4B) and paralleled with the mitotic rate of the decidual cell. The other isoforms of PKC δ , ϵ and λ were also increased both in the cytosolic and particulate fractions of both the deciduomata and myometrium (Fig. 4 and 5). The level of these isoforms in the particulate fraction of the deciduomata increased 200-320% between 3-5 days relative to day 0 (Fig. 4B), which was associated with the depression of the cell mitosis. On day 9, there was a decrease in most of PKCs in deciduomata, but not in myometrium (Fig. 4 and 5).

Discussion

The reduced levels of cytosolic PKC α in the deciduomata correlated with previous work (30). The reduction in histone kinase activity of the cytosolic fraction may be attributed to the decreased expression of the cytosolic PKC α . PKC α was down-modulated in the proliferating deciduomal tissue, but not in the hypertrophy of the myometrium. This finding resembles that observed for folic acid-induced kidney regeneration (18). PKC α down-modulation is found in renal hyperplasia and not hypertrophy. Similarly, PKC α down-modulation has also been reported in liver hyperplasia (36). Therefore, we suggest that PKC α activation and down-modulation may be involved in cell growth and differentiation.

PKC ζ content was increased in the deciduomal tissue during decidual cell mitosis. This observation is supported by a number of experimental evidences. In *Xenopus* oocytes and in mouse fibroblasts, overexpression of PKC ζ decreases the requirement of mitogens for cell proliferation(37). Furthermore, in Rat-1 fibroblast, dominant-negative PKC ζ inhibits, while overexpression of PKC ζ enhances mitogen-activated protein kinase activation by platelet-derived growth factor and phosphatidylcholine-specific phospholipase C (38). Since PKC ζ content was also increased in the myometrium with little mitotic event, we suggest that some other factors, such as PKC α , may be necessary to cooperate with PKC ζ for promoting cell proliferation.

In contrast, overexpression of PKC δ was considered a negative modulator. Mischak et al. demonstrated that overexpression of PKC δ caused the impairment of NIH 3T3 cell growth rate (39). It is also observed that overexpression of PKC δ cooperates to choline-induced growth delay by exerting a negative control on hepatocyte proliferation (40). Our data showed the higher expression of PKC δ after the peak of decidual cell mitosis. This supports the role of PKC δ in negative-modulation. Similar patterns of PKC ϵ and PKC λ expression were also observed. This suggests that PKC ϵ and PKC λ may be present as negative modulators, although their amino acid sequence were more homologous to PKC ζ (41,42). However, the role of the PKC ϵ and PKC λ in cell growth remains unknown.

The peak level of PKC α down-modulation and PKC δ , ζ , ϵ and λ coexisted on days 3 and 5 may result in the depression of the cell mitosis as described in figure 2. This data supported the hypothesis that the regulation of growth control was differently affected by the coexistence of multiple PKC isoforms (43). Otherwise, most of PKC decreased on day 9 in deciduomata may be correlated with the event of decidual cell death, but the mechanism is unknown.

In summary, PKC α down-modulation was observed in decidualization. Moreover, we suggest that the various expressions of PKC isoforms may modulate the development of the deciduomata, although the level of PKC isoforms mRNA have not been detected.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from Chung Shan Medical and Dental College (CSMC 85-OM-A-037 and CSMC 85-OM-B-020), Taichung, and the National Science Council (NSC 86-2314-B-040-009 & NSC 86-2314-B-040-010), Taipei, Republic of China.

References

1. Y. NISHIZUKA, *Nature*, **308** 693-698 (1987).
2. M.J. BERRIDGE, *Annu. Rev. Biochem.* **56** 159-193 (1987).
3. E. ROZENGURT, *Brit. Med. Bull.* **45** 515-528 (1989).
4. Y. NISHIZUKA, *Nature*, **334** 661-665 (1988).
5. G.M. HOUSEY, M.D. JOHNSON, M.L. HSIAO, C.A. O'BRAIN, J.P. MURPHY, P. KIRSCHMEIER and I.B. WEINSTEIN, *Cell* **52** 343-354 (1988).
6. H. KOIDE, K. OGITA, U. KIKKAWA and Y. NISHIZUKA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** 1149-1153 (1992).
7. W.C. WETSEL, W.A. KHAN, I. MERCHENTHALER, H. RIVERA, A.E. HALPERN, H.M. PHUNG, A. NEGRO-VILAR and Y.A. HANNUN, *J. Cell Biol.* **117** 121-133 (1992).
8. L.A. SELBIE, A. SCHMITZ-PEIFFER, Y. SHENG and T.J. BIDEN, *J. Biol. Chem.* **268** 24296-24302 (1993).
9. L.V. DEKKER and P.J. PARKER, *Trends. Biochem. Sci.* **19** 73-77 (1994).
10. K.P. HUANG, F.L. HUANG, H. NAKABAYASHI and Y. YOSHIDA, *J. Biol. Chem.* **263** 14839-14845 (1988).
11. H. HIDAKA, T. TANAKA, K. ONODA, M. HAGIWARA, W. WATANABE, H. OHTA, Y. ITO, M. TSURUDOMW and T. YOSHIDA, *J. Biol. Chem.* **263** 4523-4526 (1988).
12. B.A. HOCEVAR and A.P. FIELDS, *J. Biol. Chem.* **266** 28-33 (1991).
13. M. LIYANAGE, D. FRITH, E. LIVNEH and S. STABEL, *Biochem. J.* **283** 781-787 (1992).
14. Y. SASAKI, N. HAYASHI, T. ITO, H. FUSAMOTO, N. SATO and T. KAMADA, *FEBS Lett.* **254** 59-65 (1989).
15. A. ALESSENKO, W.A. KHAN, W.C. WETSEL and Y.A. HANNUN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182** 1333-1339 (1992).
16. Y. OKAMOTO, K. NISHIMURA, M. NAKAYAMA, M. NAKAGAWA and H. NAKANO, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151** 1144-1149 (1988).
17. J.S. RUSH, J. KLEIN, P. FANTI, N.R. BHAT and C.J. WAECHTER, *Anal. Biochem.* **207** 304-310 (1992).
18. L. DONG, J.L. STEVENS, D. FABBRO and S. JAKEN, *Cancer Res.* **53** 4542-4549 (1993).
19. T. KONDO, H. INUI, F. KONISHI and T. INAGAMI, *J. Biol. Chem.* **267** 23609-23616 (1992).
20. G. CARPENTER, *FASEB J.* **6** 3283-3289 (1992).
21. B. TOWLEY, L.J. CHADWICK, J.J. GRANTHAM and J.P. CALVET, *J. Biol. Chem.* **264** 8389-8393 (1989).
22. D.A. KUJUBU, J.T. NORMAN, H.R. HERSCHMAN and L.G. FINE, *Am. J. Physiol.* **260** F823-F827 (1991).
23. C.A. FINN and P.M. KEEN, *J. Embryol. Exp. Morph.* **11** 673-682 (1963).
24. H.P. FRIEDL, G.O. TILL, O. TRENTZ and P.A. WARD, *Am. J. Pathol.* **135** 203-217 (1989).
25. L. PADILLA, K. REINICKE, H. MONTESINO, F. VILLENA, H. ASENCIO, M. CRUZ and M.I. RUDOLPH, *Cell. Mol. Biol.* **36** 93-100 (1990).
26. M. TAKAYAMA and G.S. GREENWALD, *J. Endocrinol.* **53** 507-508 (1972).
27. B.C. TILLY, L.G. TERTOOLEN, R. REMORIE, A. LADOUX, I. VERLAAN, S.W. DELAAT and W.H. MOOLENAAR, *J. Cell. Biol.* **110** 1211-1215 (1990).
28. J.E. NIEDEL, L.J. KUHN and G.R. VANDENBARK, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** 36-40 (1983).
29. C.L. ASHENDEL, *Biochim. Biophys. Acta.* **822** 219-242 (1985).

30. J.C. SHYU, Y.S. HSIEH, C.L. CHANG, C.C. TSAI, C.K. CHENG and J.Y. LIU, *Chinese J. Physiol.* **40** 107-112 (1997).
31. V.J. DEFEO, *Endocrinology*, **79** 440-442 (1966).
32. U. KIKKAWA, Y. TAKAI, R. MINAKUCHI, S. INOHARA and Y. NISHIZUKA, *J. Biol. Chem.* **257** 13341-13348 (1982).
33. R.K. WALI, C.L. BAUM, M.J.G. BOLT, P.K. DUDEJA, M.D. SITRIN and T.A. BRASITUS, *Biochim. Biophys. Acta.* **1092** 119-123 (1991).
34. J.J. BROWN and V.E. PAPAIOANNOU, *Differentiation*, **52** 61-68 (1992).
35. D.J. TALLEY, J.A. TOBERT, E.G. ARMSTROGN and C.A. VILLEE, *Endocrinology* **101** 1538-1544 (1977).
36. L. TESSITORE, G.P. PERLETTI, E. SESCA, P. PANI, M.U. DIANZANI and F. PICCININI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205** 208-214 (1994).
37. E. BERRA, M.T. DIAZ-MECO, I. DOMINGUEZ, M.M. MUNICIO, L. SANZ, J. LOZANO, R.S. CHAPKIN and J. MOSCAT, *Cell* **74** 555-563 (1993).
38. M. VAN DIJK, F.J. MURLANA, P.C. VAN DER HOEVEN, J. DE WIDT, D. SCHAAP, W.H. MOOLENAAR and W.J. VAN BLITTERSWIJK, *Biochem. J.* **323** 693-699 (1997).
39. H. MISCHAK, J.A. GOODNIGHT, W. KOLCH, G. MARTINY-BARON, C. SCHAECHTLE, M.G. KAZANIETZ, P.M. BLUMBERG, J.H. PIERCE and J.F. MUSHINSKI, *J. Biol. Chem.* **268** 6090-6096 (1993).
40. L. TESSITORE, G.P. PERLETTI, E. SESCA, P. PANI, F. PICCININI and M.U. DIANZANI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214** 354-360 (1995).
41. L.A. SELBIE, C. SCHMITZ-PEIFFER, Y. SHENG and T.J. BIDEN, *J. Biol. Chem.* **268** 24296-24302 (1993).
42. K. AKIMOTO, K. MIZUNO, S. OSADA, S. HIRAI, S. TANUMA, K. SUZUKI and S. OHNO, *J. Biol. Chem.* **269** 12677-12683 (1994).
43. C. BORNER, S.N. GUADAGNO, D. FABBRO and I.B. WEINSTEIN, *J. Biol. Chem.* **267** 12892-12899 (1992).