

R  
008.8  
1041-1  
88

中山醫學院生化研究所  
碩士論文

研究生：王燕珠 (Yen-Chu, Wang)

壹、蛋白酵素 C 異構體在乳癌與正常組織之間  
相關性的研究

Investigation of the expression of protein kinase  
C isoforms in the human breast cancer and  
normal breast tissues.

貳、蛋白酵素 C 異構體在正常表皮皮膚與人類  
燒燙傷後皮膚之間相關性的研究

Protein kinase C isoforms in the epidermal  
tissues of normal and postburn human skin

指導教授：劉哲育博士 (Jer-Yuh, Liu, ph. D.)

中華民國八十八年一月

中山醫學院圖書館



C054586



## 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，請分別在兩種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。我國博碩士論文八十二學年度以前摘要資料庫及八十四學年度以後全文資料微片目錄資料庫已上載於行政院國家科學委員會科學技術資料中心網站 [www.stic.gov.tw](http://www.stic.gov.tw)，八十一學年度以後摘要資料庫已上載於教育部國家圖書館網站 [www.ncl.edu.tw](http://www.ncl.edu.tw)。

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，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可授權其他法人或自然人上述的行為。

3. 全國博碩士論文全文資料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。

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院生化研究所論文考試委員審查合格及口試通過。

口試委員

私立中山醫學院生化研究所副教授

劉哲育博士

劉哲育

---

私立中山醫學院生化研究所副教授

謝易修博士

謝易修

---

私立中臺醫護技術學院食品衛生科副教授

朱淑珍博士

朱淑珍

---

中華民國八十八年一月二十二日

學生王燕珠論文題目為(壹)蛋白酵素 C 異構體在乳癌與正常組織之間相關性的研究、(貳)蛋白酵素 C 異構體在正常表皮皮膚與人類燒燙傷後皮膚之間相關性的研究，其論文已經中山醫學院生化研究所論文考試委員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

中華民國 88 年 2 月 4 日

## 誌 謝

感激與感恩環於周圍之朋友、同事、老師等。

兩年前考入中山醫學院生化研究所，本非自己生活規劃中的；但在一連串衝擊下逼得重拾課業但在考上之際接踵而至是上班、值班、上課、做實驗、請公假等重重困難；但感謝的是同事吳美玲、王京霞不斷鼓勵幫助得能在阻境下完成碩士課程。

而最感謝的是指導教授劉哲育博士的教導引我進入生化研究，連繫醫檢與生化的世界及能在遵規重條下努力不懈的協助，讓學生得以順利畢業。同時感謝彰化基督教醫院郭守仁副院長、臺中榮總整形外科主任唐友文不吝麻煩提供檢體及病程資料。另外感謝馬明琪博士在課程與生活上指導及建議。

再之感謝實驗室謝易修博士不但教導書上找不到的技術方法，更提供 803 實驗室方便完整的實驗器材；而難忘的是與至凱、麗娟、愛琪、秀琴、惠珍、玉燕、海永及意維，在實驗室內的相伴、技術切磋、買便當及下課後打牙祭。

總之僅此，仍感激、感恩的說：我終於畢業了！

## 目 錄

壹. 蛋白酵素 C 異構體在乳癌與正常組織之間相關性的研究 .....	1
一、中文摘要 .....	2
二、英文摘要 .....	3
三、縮寫 .....	4
四、前言 .....	5
五、實驗材料與方法 .....	9
六、實驗結果 .....	15
七、討論 .....	17
貳. 蛋白酵素 C 異構體在正常表皮皮膚與人類燒燙傷後皮膚之間相關性的研究 .....	20
一、中文摘要 .....	21
二、英文摘要 .....	22
三、前言 .....	23
四、實驗材料與方法 .....	27
五、實驗結果 .....	31
六、討論 .....	32
參考文獻 .....	34
圖表 .....	42
附錄一、已在 BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL 雜誌接受稿件之文稿 <u>Protein kinase C isoforms in the epidermal tissues of normal and postburn human skin</u> ..	55

## 第一部份:乳癌組織

蛋白酵素 C 異構體在乳癌與  
正常組織之間相關性的研究



## 一、中文摘要

蛋白酵素 C 是一種經由外來的激素、神經傳導物和生長因子來刺激細胞產生訊息傳遞的途徑<sup>(1,2,3)</sup>。本實驗是經由外科乳房切除術來獲得人類女性乳癌及鄰近正常組織的檢體。利用西方墨點分析法(Western blot)，來測定組織中蛋白酵素 C 異構體 (protein kinase C isoform) 的表現。實驗證實有四種蛋白酵素 C 異構體  $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\iota$ 、 $\lambda$ ，在乳癌組織中的表現有顯著增加。而比較蛋白酵素 C 的活性增加與蛋白酵素 C  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) 的表現亦有相符的結果。另外測定四十二個女性乳癌的組織，發現相同的四種蛋白酵素 C 異構體  $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\iota$ 、 $\lambda$  有意義增加。這些結果顯示人類女性乳房組織的轉形和生長調控喪失之機轉，可能與訊息傳遞途徑中因細胞內和細胞外刺激的作用，造成蛋白酵素 C 活性增加及其異構體的表現有關。

## 二、英文摘要

Recent report had shown that the activity of PKC in human breast cancer tissue was increased as compared with that in normal breast tissue. In this study, we screened the expression of PKC isoforms in breast normal and cancer tissues from 42 patient. The data shown that at least four isoforms ( $\alpha, \zeta, \iota, \lambda$ ) of PKC were detected both in the cancer and normal tissues. The expressions of these four isoforms in cancer tissues were increased as compared with that in the adjacent normal tissue. When compared with the PKC activity, the PKC $\alpha$  expression may mainly contribute the result.

These findings clearly indicate that the expression of each isoform of PKC may display a characteristic mode of regulation, which can be perturbed during the course of cell transformation. The specificity of the results obtained suggests that the higher expression of PKC isoform may affect the growth control and cell transformation.

### 三、縮寫表

BCIP	: 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BSA	: bovine serum albumin
DAB	: 3,3-diaminebenzidine
DAG	: diacylglycerol
EDTA	: ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	: ethylene glycol bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N',- tetraacetic acid
ER	: estrogen receptor
FBS	: fetal bovine serum
HEPES	: N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N' -[2-ethane sulfonic acid]
IP <sub>3</sub>	: inositol 1,4,5-triphosphate phosphates
MDR	: multidrug resistance
MSH	: $\beta$ -mercaptoethanol
NBT	: nitroblue tetrazolium
4CN	: 4-chloro-1-naphthol
PKC	: protein kinase C
aPKC	: atypical PKCs
cPKC	: conventional PKCs
nPKC	: novel PKCs
PL	: phospholipid
PLC	: phospholipase C
PMA	: phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
PR	: progesterone receptor
SDS	: sodium dodecyl sulfate
TEMED	: tetra-methyl ethylenediamine
TPA	: 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate

#### 四、前言

乳癌是一種人類女性乳房細胞異常分化和增生的惡性腫瘤。好發於乳房上側。其發生主要因素有激素(progesterone、estrogen、diethylstilbestrol、prolactin)波動性及長期接觸、家族性遺傳、月經初經過早、停經過遲、未曾懷孕、第一胎過晚懷孕者、病毒感染和飲食習慣上喜好攝取高脂肪、體重過重之婦女體內因腎上腺男性素(adrenal androgen)會轉變為雌激素(estrogen)，使其濃度升高而增加罹犯乳癌機會<sup>(1,24)</sup>。曾有實驗發現 PKC 的過度表現會產生癌化現象<sup>(21,22)</sup>。而在人類乳癌組織的檢體是發現 PKC 活性(activity)會顯著增加<sup>(23)</sup>。亦即證明 PKC 的產生是具有調控前致癌原(protooncogene)和致癌原(oncogene)的功能。而乳癌致癌原(oncogen)作用機轉是包括了 c-myc、Ha-ras、erb13、HER-2/neu 等<sup>(23)</sup>的過度表現和受 PKC 所磷酸化的致癌原產物(oncogene product)，例如 pp60<sup>src</sup><sup>(25)</sup>、Ki-ras protein<sup>(26)</sup>。

蛋白酵素 C (PKC)是在 1977 年，由日本 Nishizuka 及其工作夥伴在牛腦(bovine brain)發現與 PKA 不同，其活化需要細胞膜的磷脂質(phospholipid)和 diacylglycerol (DAG)，因為當細胞興奮後，激素或神經傳遞物質作用於細胞表面之受體(receptor)，而受體可分為 G protein-coupled receptor、tyrosine kinase receptor、non-tyrosine kinase receptor<sup>(18)</sup>；經由受體的活化，可進而活化磷脂酶 C (phospholipase C；PLC)，將細胞膜上不同的磷脂質(phospholipid)水解(hydrolysis)，產生第二訊息傳遞物(second messengers)，IP<sub>3</sub> (inositol 1,4,5 phosphates)和 DAG<sup>(12)</sup>；而 DAG 是一種 PKC 活化劑，會活化 PKC 等蛋白酵素的一連串

活化途徑 (casecade pathway)<sup>(5)</sup>；而 IP<sub>3</sub> 的產生則會造成細胞內鈣離子 (Ca<sup>++</sup>) 增加<sup>(6)</sup>，而鈣離子促使 PKC 活化是經由酵素與細胞膜雙層酯質 (lipid bilayer)，因此產生酸性磷酯質 (acidic phospholipid) 和 DAG<sup>(7)</sup>。這種細胞膜相關性 (association) 的活化作用是可逆性且瞬間快速生成 IP<sub>3</sub> 和 DAG<sup>(7,8)</sup>。另有磷酯酶 D 和 A2 也會以較慢速的持續維持活化 PKC<sup>(12)</sup>。另外 TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate) 在體內是強烈且穩定的 (stability)，會造成 PKC 的活化<sup>(9,10)</sup> 是經由細胞質轉位 (translocation) 至細胞膜，是一種不可逆性的活化；反之 TPA 累積長時間的刺激作用，卻會造成 PKC 下降 (down regulation)<sup>(2-4,8)</sup>。

目前 PKC 家族至少有 12 種異構體 ( $\alpha$ 、 $\beta$ I、 $\beta$ II、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$  and  $\mu$ )，而依 PKC 活化所需輔因子 (cofactor) 的不同可區分為三類<sup>(12,13)</sup>：第一類為鈣離子依賴性 (Ca<sup>++</sup>-dependent) 異構體包括  $\alpha$ 、 $\beta$ I、 $\beta$ II、 $\gamma$  等稱為 cPKCs (conventional PKCs)；第二類為鈣離子不依賴性 (Ca<sup>++</sup>-independent) 異構體包括  $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 、 $\mu$  等稱為 nPKCs (novel PKCs)；第三類為鈣離子不依賴性 (Ca<sup>++</sup>-independent) 及非磷酯類 (DAG、phosphatidylserine) 活化的異構體包括  $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$  等稱為 aPKCs (atypical PKCs)；而不同 PKC 異構體是以唯一 (only) 或遍及 (universal) 存在於各種組織；然而同一 PKC 異構體存在不同組織，卻有不同功能。例如 PKC $\delta$ 、 $\alpha$  參與 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 所引發 32D cells 的骨髓性分化 (myeloid differentiation)<sup>(14)</sup>；而在乳癌細胞是 PKC $\delta$  會加強致癌性和在其他系統則是促使癌症進行<sup>(15)</sup>。另一方面發現老鼠纖維母細胞 (fibroblast) 中不同的 PKC 異構體經由特殊的 oncogenes (eg. c-H-ras, v-fos) 作用，會促成細胞的癌化作用

(transformation)<sup>(16)</sup>。綜合上述歸納出 PKC 在生物性的功能 (biological function) 包括有受體易感性下降 (desensitization)、調節細胞膜結構、調控轉錄作用 (transcription)、調控細胞生長、促成免疫反應和學習、記憶其他功能<sup>(11,12,13,17,18,19)</sup>。因此 PKC 的活化會誘發許多細胞反應，包括有細胞增殖 (proliferation)、細胞分化 (differentiation)<sup>(18)</sup>、基因表現 (gene expression) 和促進腫瘤形成 (tumor promotion) 等等功能<sup>(20)</sup>。

人類乳癌細胞內 estrogen receptor (ER) 的存在，會改變 PKC 的表現量<sup>(27)</sup>；並且知道 ER 存在 (positive) 的患者通常會有較好預後、細胞少有未分化表現、對荷爾蒙治療有良好反應、易轉移、少再發，且 PKC 表現的量會比 ER 不存在 (negative) 的低；另外在 ER negative 則會增加 PKC 活性及細胞未分化程度更多。

Tamoxifen 是一種治療乳癌強力抗 estrogen 藥物，目前於市面上為停經婦女預防乳癌或再生的抗癌藥物，會直接抑制 PKC、TPA，DAG 等的作用，進而促使在體外的乳癌細胞分化、減少分裂<sup>(28-31)</sup>，因此 TPA 是 PKC 的活化劑。但是乳癌細胞株 MCF7 長期曝露在 TPA 下會引起 PKC 的下降 (down regulation) 和其他 phorbol ester 的癌症促進劑也是會產生一種生長的抑制作用<sup>(29,32,33)</sup>。故 TPA 抑制分裂和其促癌作用和 PKC 活化能力是有爭議性<sup>(34)</sup>。

在前面的實驗以經證實乳癌病人 PKC 活性會比正常乳房組織高。故本實驗擬探討研究人類乳癌是否與 PKC 異構體表現有關？接著用統計學來分析 PKC 異構體的表現是否與轉移有相關性？而實驗中是利用西方墨點方法來測定乳癌組織檢體與正常乳房組織中 PKC 異構體的表現為何？再經定量及統計分析其

差異性。

## 五、實驗材料與方法

材 料：

Leupeptin:購自 Sigma chemical co.

Dithiothreitol (DTT):購自 Sigma chemical co.

Aprotinin:購自 Sigma chemical co.

Sodium orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ):購自 Sigma chemical co.

Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF):購自 Sigma chemical co.

Ethylene glycol-bis ( $\beta$ -amino ethyl ether) (EGTA):購自 Sigma chemical co.

Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt:購買自聯工試藥公司

N-[2Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES):購自 Sigma chemical co.

Sucrose:購自 Sigma chemical co.

Sodium fluoride:購自 Sigma chemical co..

Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris):購自 Sigma chemical co.

Magnesium chloride:購買自聯工試藥公司

Magnesium acetate:購自 Sigma chemical co.

Bovine serum albumin (B S A) : 購自 Sigma chemical co.

Potassium phosphate dibasic:購買自 Bio Ray Laboratories

Bradford protein assay dye:購自 Bio Rad Laboratories

Lauryl Sulfate (SDS) :購買自季勗試藥公司

Ammonium persulfate (APS):購自 Bio Rad Laboratories

30% acrylamide-0.8% N N methylene Bis- acrylamide:購自 Bio Rad Laboratories

Tetramethyl ethylenediamine (TEMED):購買自 Bio Ray Laboratories

Glycine:購買自聯工試藥公司

Methanol:購買自皓峰企業股份有限公司



Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20):購買自 Sigma chemical co.  
Fetal bovine serum (FBS):購買自 Gibco/BRL 試藥公司  
Glyceol:購買自 聯工試藥公司  
2-mercaploethanol (MSH):購買自 Sigma chemical co.  
Bromophenol blue:購買自 Merck chemical co.  
Nitro-blue tetrazolium (NBT):購買自 Sigma chemical co.  
5-Bromo-4-chloro-3Indolyl phosphate (BCIP):購買自 Sigma chemical co.  
First antibody(from mouse) 250ug/ml:購買自 Tranduction Laboratories  
Secondary antibody , anti-mouse IgG (H&L) AP conjugate :購買自 Promega  
Laboratories  
Marker (prestained SDS page standard) Low range:購買自 Bio-Rad Laboratories

儀 器:

Wheatopan Apparatus Corporation  
Beckman DU640 spectrophotometer  
pH meter , Jenco 6200  
Dry bath incubator, Fisher Scientific Laboratories  
Eppendorf centrifuge 5415C  
Sigma 2K15  
Power supply: EC Apparatus Corporation EC135  
Electro-transfer tank, Hoefer Apparatus Corporation  
Mix Shaker: Sun Chion Corporation  
Beckman GS-6R centrifuge ; Hitachi P56A  
Amersham, Hybond-C Extra Supported, 0.45m , Nitrocellulose  
paper  
Alphamager 2000 densitometer Alpha Innotech Corporation



## 檢體收集

由彰化基督教醫院及中山醫院這兩家教學醫院開刀房提供：外科腫瘤乳房切除手術所獲得的人類乳癌組織檢體和相對部分是鄰近的正常乳房組織。檢體冷凍於 $-70^{\circ}\text{C}$ 貯存。檢體是按照正常的手術處置方式所獲得，對病人並無任何的危險性。但由於需使用病人的資料來解釋生化和分子生物數據，所以採取匿名的方式。

### 乳房及乳癌組織萃取細胞中 PKC 的方法：

乳房及乳癌組織磨碎過程；本實驗所有操作均於 $4^{\circ}\text{C}$ 。將乳房及乳癌組織切小塊，取組織秤重約 $100\text{mg}$ 置於收集瓶(vial)，用均質緩衝液 A` (homogenized buffer A`)，洗淨組織及研磨器將切碎組織放入研磨器內，加入 $200\mu\text{l}$ 均質緩衝液 B (homogenized buffer B 不含 triton-x-100)，研磨組織後收集至收集瓶(vial)；再加入 $200\mu\text{l}$ 均質緩衝液 B (homogenized buffer B 不含 triton-X-100)研磨組織收集至收集瓶(vial)；加入均質緩衝液 B 至 $660\mu\text{l}$ ，再加入 $330\mu\text{l}$ 均質緩衝液(homogenized buffer B with 0.3% triton-x-100)；置於冰上( $4^{\circ}\text{C}$ ) 完全混合(incubation) 1 小時；每隔 5-10 分鐘搖一搖在高速離心機中 $4^{\circ}\text{C}$   $15000g$  (Sigma 2K15;13786rpm)離心 3 小時，取 supernatant 約 $1.5\text{ml}$ 裝入收集瓶(vial) 貯存於 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰櫃。

### 蛋白質濃度測定：

蛋白質濃度的定量採用 Bradford protein Assay 方法，其原理為蛋白質會與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色愈深表示蛋白質濃度愈高，而測出其吸光度(OD 值)。測定方法：首先以已知標準濃度的 BSA 做一連續稀釋，加入五分之一體積的 Bradford protein dye，利用波長 595nm 測出吸光度做一標準曲線圖；再以同樣的測定方法測出檢體的吸光度，並對照標準曲線圖求出蛋白質的濃度。

### 西方墨點分析法：

1) 取已定量欲測檢體之 PKC 萃取液，以 PBS 緩衝液來標準化 PKC 萃取液的濃度，使所有欲測檢體之最終體積相同。各加入 1:5X treatment buffer 混合均勻煮沸 10 分鐘，迅速置入冰浴，用離心機 spin-down 混合液後，再次混合均勻進行 SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳分析。

#### 2) 配製 SDS-聚丙烯醯胺板膠：

上層膠體為 4% stacking gel [0.125M Tris-HCl (pH6.8), 0.05% ammonium persulfate, 4.5% acrylamide-0.12% N,N-bis-methylene acrylamide, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.025% tetra-methyl ethylenediamine (TEMED)]。

下層膠體為 10% separating gel [0.375M Tris-HCl (pH6.8), 0.05% ammonium persulfate, 10% acrylamide-0.268% N,N-bis-methylene acrylamide, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.025% tetra-methyl ethylenediamine (TEMED)]。

3) 將做好 SDS-聚丙烯醯胺板膠固定到電泳裝置上，加入電

泳緩衝液(25mM Tris-HCl pH8.3, 0.192M glycine, 0.1%SDS)注滿上下電泳槽；然後將處理過之檢體萃取液加入板膠上的 U 形膠槽，以 140 Voltage、35mA 進行電泳，約三小時三十分。

電泳結束後進行蛋白質轉移(transfer)，將膠體(gel)浸入冰冷之轉漬緩衝液(transfer buffer)，利用兩張 whatman 3M 濾紙撈起膠體，使膠體平鋪於濾紙上，且置於 transfer holder 上，再將預先浸濕的硝化纖維紙蓋在膠體上面，依序再覆蓋兩張浸濕的 3M 濾紙，並以玻璃試管壓趕氣泡；再將 transfer holder 放入 electro-transfer tank (Hoefer) 於 4<sup>0</sup>C、100mA 下，進行電轉移過夜。隔日取出硝化纖維紙用洗滌緩衝液(washing buffer)洗一次，再加入 50ml 3% FBS blocking buffer (3%FBS, 10mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 0.05% tween 20)於室溫下搖動一小時。然後加入泡製於 20ml 3% FBS blocking buffer 之初級抗體(PKC first antibody; 1:100 dilute)於室溫下作用三小時。再以洗滌緩衝液洗三次，每次十分鐘。加入泡製於 20ml 3% FBS blocking buffer 之次級抗體(second antibody; 1:1000 dilute)，再以洗滌緩衝液洗三次，每次十分鐘。

4)將 20ml 顯像受質溶液加入 700 $\mu$ l nitrobluetetrazolium (NBT) (50mg/ml)及 780 $\mu$ l 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (10 mg/ml)；倒入硝化纖維紙顯像，計時其呈色所需時間後，以去離子水終止呈色反應。

5)將顯像之硝化纖維紙用 Alphamager 2000 densitometer 定量。

### 統計分析：

利用電腦中 SAS 統計軟體及 paired student's t-test 程式來統計分析 PKC 異構體的表現情形，在淋巴結轉移、癌症期數、癌症發生年齡層、雌激素接受體存在與否等等臨床徵候下，其平均值、標準差、P-value 的數據及相關性的差異是否有意義？

## 六、實驗結果

實驗中利用 PKC 單株抗體(monoclonal antibody)來測定比較所有(all)的乳癌切片檢體與正常乳房組織其十種 PKC 異構體表現的差異性? 結果發現 PKC 異構體中 cPKC $\alpha$  (conventional PKC)及 aPKC $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$  (atypical PKCs)等四種有顯著表現。由圖一 A、B 顯示正常乳房組織或乳癌切片檢體內至少有四種 PKC 異構體表現(PKC $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$ )。然而 PKC 異構體 $\gamma$ 是唯一會表現在腦部的異構體，且其抗體與 PKC Isoform  $\alpha$ 抗體會產生交叉反應(cross-reaction)，所以實驗上測得 PKC  $\gamma$ 異構體的結果，實際上是不存在。

接著測試有表現的 PKC 異構體 $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$ ，在五個乳癌組織檢體及其乳房正常組織之間的差異為何?結果證實四種 PKC 異構體在乳癌組織是比其正常乳房組織有明顯的表現。而在 PKC 異構體 $\alpha$ 的表現與 PKC 的活性，有顯著的相對應結果(圖二)。

實驗再篩選四十二個乳癌組織檢體，來觀察不同檢體在 PKC 異構體的表現為何? 亦發現在四十二個乳癌組織檢體中四種 PKC 異構體  $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$ ，經統計學分析每個乳癌組織檢體，雖是不同檢體卻有一致性表現(圖三)。

為了分析方便，我們以任選方式取第十六個乳癌組織檢體的四種 PKC 異構體的表現，為 100%基準值(base-data)，再將各檢體經由 densitometer 測得的結果與其比，取得一致性四十二個乳癌組織 PKC 異構體統計數值(Table 1)。

再利用 SAS 統計分析出四種 PKC 異構體 $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$ 之間的

表現有顯著相關性，也就是在 PKC $\alpha$  異構體表現較強檢體在其他三種 PKC 異構體( $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$ )也有較強表現的相關性(Table 2)。

接著用 t-test 來分析乳癌組織檢體中淋巴結轉移陽性或陰性、癌症期數的第二期和第三期、癌症發生年齡層分為 45 歲以下和 45 歲以上、雌激素接受體存在與否等等來分析其平均值標準差、P-value、分析數目(Table 3)。結果發現四種 PKC 異構體 $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$ 的表現，在淋巴結轉移、癌症期數、癌症發生年齡層、雌激素接受體存在與否等等臨床徵候下，其平均值、標準差、P-value 的數據差異在四種 PKC 異構體 $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$ 的表現沒有意義。但在癌症發生年齡層中，發現人類婦女乳癌發生年齡層 45 歲以上之數目佔 29 個，年齡層 45 歲以下之數目只佔 9 個，因此此次受檢婦女乳癌發生年齡層屬於高年齡且趨向於停經後發生乳癌。

再將乳癌組織檢體中淋巴結轉移陽性或陰性分為兩組各別與癌症期數的第二期和第三期做統計學上比較或癌症發生年齡層分為 45 歲以下和 45 歲以上兩組各別與淋巴結轉移陽性或陰性做統計學上比較或雌激素接受體存在否分為陽性和陰性兩組各別與淋巴結轉移陽性或陰性做統計學上比較及 p value。而分析比較其四種 PKC 異構體 $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$ 的表現的平均值、標準差、分析檢體數目(Table 4)，顯示出淋巴結之轉移與癌症期數、癌症發生年齡層與淋巴結轉移、雌激素接受體存在與否與淋巴結之轉移等，各組在 PKC 異構體的表現上並無統計上差異性的結果。

## 七、討 論

在 1989 年 Catherine A. O'Brian 等作者在實驗中曾比較乳癌切片與乳房正常組織其 PKC 活性的差異？證實了乳癌檢體中 PKC 活性有顯著增加。因此我們重複上述實驗亦顯示出乳癌中 PKC 活性有意義增加。因此利用西方墨點分析方法來證明乳癌組織檢體與乳房正常組織之間 PKC 異構體特異性的表現與分佈上的差異性為何？結果證實乳癌檢體中有四種內生性 PKC 異構體( $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$ )的表現被改變。且在四十二個乳癌檢體中一致顯著表現出內生性 PKC 異構體。這些結果顯示 PKC 的異構體在乳癌細胞的生長調控和促癌形成是具有重要功能。

MCF-7 乳癌細胞中轉植入 PKC 異構體 $\alpha$ 會直接或間接的導致 PKC 異構體 $\beta$ 表現和 PKC $\eta$ 、 $\delta$ 降低，促使產生更具侵犯性的癌瘤基因形態<sup>(35)</sup>。因此乳癌檢體中 PKC 異構體 $\alpha$ 的過度表現，可能是促使乳癌生成的原因之一，是否引起其它 PKC 異構體的變化是值得我們深思。

PKC $\zeta$ 被認為是一種與細胞分裂增殖有關的異構體，因此同樣的 PKC 異構體 $\zeta$ 的表現，可能也說明是造成乳癌增生現象的主要證據。

而乳癌檢體中 PKC 異構體 $\lambda$ 與 $\zeta$ 有 72%相似性，同屬於第三種 Atypical PKC 異構體，廣泛存在各種組織和細胞中。而以前實驗證實老鼠胚胎腫瘤細胞株-P19 cells 在未分化時期大量表現 PKC 異構體 $\lambda$ ，而分化後則 PKC 異構體 $\alpha$ 、 $\varepsilon$ 表現增加和 PKC 異構體 $\lambda$ 降低<sup>(36)</sup>。此與我們實驗中 PKC 異構體 $\lambda$ 過度表現，會導致未分化乳癌細胞的生成是相同結果。也就是說分化不好的乳癌



檢體中會大量表現 PKC 異構體 $\lambda$ 。

近年來實驗中發現 PKC 異構體 $\iota$ ，雖然不是作用於細胞的增殖上，但卻對藥物具有抵抗作用。也就是 PKC $\iota$ 在白血病細胞 (leukemia cells) 中具有對抗藥物所引發的自然凋謝死亡 (apoptosis)<sup>(37)</sup>，因此與我們實驗發現乳癌檢體中會大量表現 PKC 異構體 $\iota$ ，也可能是為了對抗自然界中可能存在的可食植物或藥物的抑癌作用 (chemoprevention)，間接讓腫瘤得以繼續生長。

然而在年齡對 PKC 異構體表現的影響，曾有報告說在腎臟生長和分裂的發展過程中，年齡依賴型 (age-dependent) 的 PKC 異構體 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\zeta$ 、 $\lambda$  等蛋白酵素會表現<sup>(38)</sup>。因此顯示不同年齡的乳癌患者可能表現出不同的 PKC 異構體，來調控癌症細胞的生長與分裂，因此想利用統計學的分析來區分不同年齡層是否會對 PKC 異構體產生不同的影響？但卻沒有顯示出有意義統計學上差異。可能與活體組織具有較大變異性有關；因此在乳癌病人的 PKC 異構體 $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$  的表現上雖然比正常乳房組織增加，卻與癌症期數、發病年齡、淋巴結數目及有無雌激素接受體 (estrogen receptor) 或黃體激素接受體 (progesterone receptor, PR) 的存在等臨床表徵，無直接相關性。從飲食習慣及用藥情形來討論影響人體之變異性；一. 在飲食方面以前實驗發現經由食物中脂肪和纖維的攝取，會調控作用在結腸的 (colonic) PKC 異構體的表現，而產生致癌原 (carcinogen)。所以利用化學防禦 (chemoprevention) 方法，藉由食物中攝取魚油或纖維素會改變或阻斷 PKC 異構體 $\lambda$  蛋白質的表現<sup>(39)</sup>。因此証實飲食會直接或間接影響人體各器官組織中表現不同的 PKC 異構體。故為影響人體 PKC 異構體表現改變的主因之一。

二.藥物方面曾有實驗證實在人類小細胞肺癌的不同細胞株，因對藥物(cisplatin)敏感或抵抗性，而在 PKC 訊息傳遞上產生不同 PKC 異構體的表現<sup>(40)</sup>。另一方面研究訊息傳遞調控癌細胞對化學治療藥物的敏感度，發現造成 DNA 損傷的藥物，會活化訊息傳遞過程中種種蛋白酵素包括有 PKC 的活化和產生一種保護性功能<sup>(41)</sup>。因此得知乳癌患者開刀前抗癌藥物之使用，會直接或間接影響人體 PKC 異構體不同的表現(升高或降低)。

綜合上述知道人體各器官組織所發生癌症並非短期間內所造成；乃是長期致癌原的刺激作用所導致。因此飲食、環境的習慣和用藥情形都會造成癌瘤不同發展過程。至於個體體內對癌化反應如何？則是無法控制其惡性程度一致性，故易造成活體組織採樣的偏差性，不易有良好統計結果。

本篇實驗結果可能可以提供診斷乳癌惡性損傷的臨床意義和表徵。在最初乳癌是經由一系列 PKC 異構體的表現，當作轉移上潛力和生物學上侵犯的評估指標。特別是這些資料亦可作為在使用 X 光照射的適當級數和化學藥物治療的參考；尤其在腋下淋巴結陰性-未轉移前的乳癌患者。另一方面，如果 PKC 異構體的表現是造成乳癌生成的主要因素，則表示經由直接抑制 PKC 異構體的表現或功能，可作為一種新的治療模式。例如利用 antisense 或 ribozyme 的治療方式直接對抗個別的 PKC 異構體 或者經由 PKC 抑制劑(bryostatin-1)的治療，使 PKC down regulation<sup>(42,43)</sup>，得以治療乳癌；進而經由阻斷 PKC 異構體訊息傳遞來防禦乳癌的發生及再發。

## 第二部份:燒傷皮膚

蛋白酵素 C 異構體在正常表皮皮膚與  
人類燒燙傷後皮膚之間相關性的研究

## 一、中文摘要

蛋白酵素 C 是一種經由外來的激素、神經傳導物和生長因子來刺激細胞產生訊息傳遞的途徑<sup>(1,2,3)</sup>。本實驗是經由外科腐痂切開術來獲得人類燒燙傷後增生及植皮之正常皮膚組織的檢體。利用西方墨點分析方法(western blot)來測定檢體中蛋白酵素 C 異構體(protein kinase C isoform) $\alpha$ 、 $\zeta$ 的表現。實驗証實此二種蛋白酵素 C 異構體 $\alpha$ ，在檢測燒燙傷檢體組織中的表現有顯著增加且發現蛋白酵素 C 異構體 $\alpha$ 有轉移作用(translocation)。另一方面實驗發現在燒燙傷後未用藥患者，蛋白酵素 C 異構體 $\alpha$ 、 $\zeta$ 的表現比已用藥患者強。這些結果顯示人類燒燙傷後組織的增生和細胞生長調控之機轉，可能與訊息傳遞途徑中，經由細胞內和細胞外刺激的作用，造成蛋白酵素 C 異構體 $\alpha$ 的表現及其轉移作用，而連續活化下游蛋白酵素的訊息傳遞有關。

## 二、英文摘要

Because the expression of the isoforms of protein kinase C (PKC) in human basal keratinocytes is not understood, the expression of PKC isoforms were screened in specimens of epidermal tissue from postburn skin and normal locations for skin grafts in patients with second or higher degrees of flame injury. The expressions of individual isoforms were determined by Western blot technique. Only PKC  $\alpha$  and  $\zeta$  were detected in the epidermal tissues of normal and postburn skin and translocation occurred in PKC  $\alpha$ . Patients without antibiotic treatment after flame injury had higher expression in PKC  $\alpha$  and  $\zeta$ . These findings indicate that the mechanisms of cellular differentiation and growth in postburn epidermal tissue may be related to the expression and translocation of PKC  $\alpha$  induced by intra- and extracellular stimulation. These changes in PKC  $\alpha$  further activate the DAG/PKC signal transduction pathways.

### 三、前言

燒傷(burns)又稱為熱傷害(thermal injuries)其發生原因包括：受熱、冷凍、化學藥劑、電氣灼傷等等傷害。在西方工業化國家，每年每百萬人口約有 300-400 人因燒傷而住院治療，半數以上患者年齡均為二十歲以上之年輕人，約有 10%患者因此死亡；由於治療時期冗長且疤痕和外貌變形，僥倖不死的患者常常因此花費殆盡造成國家社會經濟上負擔。

燒傷種類可分為下列六種：一.曬傷(solar burns)是陽光、紫外線引起光學反應。二.火傷(flame burns):75%患者是火燒傷引起，易發生者為 3-14 歲小孩及 60 歲老人因吸煙造成房屋失火。三.燙傷(scald burns)是死亡率與火傷相同，燒傷面積小於體表三分之一；易發生者為 3 歲以下小孩。四.熱接觸傷(heat contact burns)是金屬熱接觸引起，範圍小但傷口深需植皮，易發生者為 15-60 歲因工業意外灼傷。五.化學性燒傷(chemical burns)是因食進、局部接觸化學物質，易發生在工廠的意外事件，傷害程度依化學物性質、濃度、接觸時間、穿透力而定。六.電傷(electrical burns)是電流引起熱傷害，其接觸點會因累積而炸穿皮膚，形成點狀壞死性傷口或心跳猝死、器官壞死。

熱傷害易發生地點在家裡是廚房、浴室、車房等場所，發生率比工業意外多 15 倍，而屋外是娛樂場所、院子、工作場所。熱傷害易發生的人是年幼、年老、精神或體力衰弱。在病理生理學上皮膚是由鱗狀上皮及真皮網狀膠元纖維所支持的上皮附屬物毛囊、皮脂腺、汗腺及汗管等所組成，其具轉化成鱗狀上皮的能力，稱為鱗狀化性(squamous metaplasia)的過程。熱會引

起痛是 47.5°C。細胞傷害是 45°C。蛋白質凝固是 65°C。瞬間曝露是 72°C 會產生水泡為二度燒傷及全層皮膚燒傷。

在燒傷組織外觀上表淺紅腫、水泡、焦黑、棕色皮膚狀、死屍般蒼白之深部燒傷、全層皮膚燒傷：凝固靜脈、強烈長期曝露會使皮膚裂開露出皮下脂肪。

而灼傷程度可分為：(1)一度灼傷燒傷範圍是表皮組織，會有疼痛、輕微水腫等徵狀，其癒後在 5-10 天表皮脫屑，無疤痕。(2)二度灼傷燒傷範圍是表皮、真皮，會有水泡、皮下水腫等徵狀，其癒後在 5-35 天會生一層薄上皮，而機械性損傷、細菌侵害轉變為三度灼傷。(3)三度灼傷燒傷範圍是皮膚全層至皮下脂肪，會有皮下脂肪凝固壞死、血栓、皮膚自溶化膿等徵狀，其癒後需施行皮膚移植，否則產生很厚肉芽組織會使構造變形結疤。

影響預後的主要因素有燒傷深度方面是燒傷愈深則患者，死亡率愈大。在患者年齡上是以嬰兒及年齡愈大之死亡率愈高。在患者性別上，對熱傷害的耐受性是以女性較男性差。在燒傷的表面積則以被燒傷的體表面愈大，其死亡率愈高。而在呼吸道損傷方面，由煙和一氧化碳引起吸入性傷害是影響年老患者存活的主要因素。另外燒傷面積的快速估計是利用[九定律]或 Lund、Browder 法。燒傷的主要併發症，有水腫現象是因燒傷會產生發炎性反應造成組織充滿液體而腫脹。在四肢易導致血管遭壓迫，進而造成神經、骨骼肌永久性傷害；治療方式是做腐痂切開術。而在頭頸則會導致上呼吸道阻塞、缺氧；治療方式是做頸部腐痂切開術、氣管內導管或氣管切開術。在吸入性傷害方面是火燄傷早期的破壞性併發症，會增加死亡率。而當密閉空間內吸入煙霧時，刺激性有毒氣體會引起吸入性煙霧

徵候群。在感染方面燒傷病人最易產生死因是感染肺炎、敗血症。而侵入感染的危險性，依燒傷範圍和年齡而異；當燒傷範圍超過 30% 易產生敗血症。

在臨床發現燒燙傷病人因燙傷傷口骨骼肌循環休克產生，會造成病人復原時間的延長。利用立體向量分析在腹背燙傷傷口 20 和 50% 的老鼠與 0% (control 組) 比較其骨骼肌壓力與 polyinositol 衍生物的變化是有意義的相關性。因此實驗證實 secondary messenger ( $IP_3$ ) 與骨骼肌生理上壓力 (tension) 的表現有關<sup>(44)</sup>。

目前 PKC 家族至少有 12 種異構體 ( $\alpha$ 、 $\beta I$ 、 $\beta II$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$  and  $\mu$ )，而 PKC 在生物性的功能 (biological function) 包括有受體易感性下降 (desensitization)、調節細胞膜結構、調控轉錄作用 (transcription)、調控細胞生長、促成免疫反應和學習、記憶其他功能<sup>(11,12,13,17,18,19)</sup>。因此 PKC 的活化會誘發許多細胞反應，包括有細胞增殖 (proliferation)、細胞分化 (differentiation)<sup>(18)</sup>、基因表現 (gene expression) 和促進腫瘤形成 (tumor promotion) 等等功能<sup>(20)</sup>。而在發現 TPA 會活化 PKC 之前，便已知在動物模式中 TPA 會促使皮膚癌的產生。而經 PMA 前處理的老鼠也會引發皮膚癌和 PKC 的下降 (down regulation)<sup>(45)</sup>。然而未來研究 PKC 應不只限於皮膚癌，也應包括上皮 (epithelium) 的正常生長和分化的過程。而角質細胞 (keratinocyte) 通常占皮膚上皮的 99%，會不斷生長及分化來提供新的上皮。因此在表皮 (epidermal) 和真皮 (dermal) 連接處的基底細胞會不停的分裂去提供上皮細胞的來源，並移到表面其過程是經由刺狀細胞變為顆粒狀再轉變為角質化的角質細胞<sup>(46)</sup>。也有實驗發現利用培養重



組的多層上皮組織中 PKC 活性在已分化會比未分化的高，而且 PKC $\delta$ 、 $\eta$  的表現會促成角質細胞自發性的分裂作用<sup>(47)</sup>。

而有實驗證實在腹背燙傷傷口約 0、20、50% 的老鼠，其傷口壓力下的骨骼肌內發現 polyinositol 衍生物變化及共同調控鈣離子的改變，可利用立體向量分析可清楚得知在燙傷傷口復原時 IP<sub>3</sub> 及 Ca<sup>++</sup> messenger system 的存在有極大相關性<sup>(45)</sup>。

而在實驗上利用立體向量分析研究發現在大面積體表的燙傷傷口，其骨骼肌內細胞之 polyinositol 衍生物改變的性質，作為評估系統作用稱為 the alpha study。是期以利用藥物來改變 IP<sub>3</sub>，提供骨骼肌生理上有效的燙傷照護<sup>(48)</sup>。

在老鼠燒傷、外傷和腐敗等傷害，會造成 T cell 訊息傳遞的功能是大大的降低。這現象顯示出大面積的燒傷會造成 Ca<sup>++</sup> mobilization 之機轉和蛋白酵素 C(PKC)活化之步驟<sup>(49)</sup>。

綜之上述各種實驗結果皆與 PKC 上游之 Ca<sup>++</sup> mobilization 和蛋白酵素 C(PKC)活化有關，故利用本實驗來偵測 PKC 異構體表現來研究燒燙傷病人臨床上種種反應？

另外有實驗發現一個六十一歲的外國婦女，因胸部有 18% 體表面積之燒傷，而在經過 6.5 個月治療後發現其左乳乳房皮膚植皮後，因持續性發炎而轉變為乳癌<sup>(50)</sup>。此與先前實驗證實乳癌的發生是與訊息傳遞中蛋白酵素 C 的活性增加<sup>(23)</sup>，可能有密切的相關性。故想證實燒傷患者其皮膚修護過程是否透過傳遞的方式，而與 PKC 異構體表現有關？

## 四、實驗材料與方法

### 材 料：

材料、試劑配方與第一部份實驗相同。

### 儀 器：

儀器與第一部份實驗相同。

### 檢體收集

由榮民醫院臺中分院開刀房提供；燒燙傷患者經整型外科腐痂切開術和植皮手術所獲得的人類燒燙傷組織檢體和相對部分是植皮用的正常皮膚組織。檢體冷凍於 $-70^{\circ}\text{C}$ 貯存。檢體是按照正常的手術處置方式所獲得，對病人並無任何的危險性。但由於需使用病人的資料來解釋生化和分子生物數據，所以採取匿名的方式。

### 燒燙傷及正常皮膚檢體萃取細胞中 PKC 的方法：

燒燙傷及正常皮膚檢體磨碎過程，本實驗所有操作均於 $4^{\circ}\text{C}$ 。將燒燙傷及正常皮膚檢體切小塊，取組織秤重約取 80mg，homogenized buffer A` (without leupeptin) 200ul wash 1-2 times，放入研磨 Tube 各加 1ml 或 0.5ml homogenized buffer A (with leupeptin)，研磨 60 次，後倒入離心瓶，再用 1ml homogenized buffer A 洗研磨 Tube 後亦倒入離心瓶，用 buffer A 各補足 3ml 及 1.5ml；在超高速離心機中，用 40000rpm  $4^{\circ}\text{C}$  離心 1hr

5min 後，收集上清液 (supernatant 含 cytosol) 約 3ml 和 1.5ml 分裝入 3vial 和 1vial，於冷凍  $-70^{\circ}\text{C}$  貯存。再將 particular (含 membrane) 各加入 1.5ml、0.5ml 之 homogenized buffer B (0.1% triton x-100) 後；在  $4^{\circ}\text{C}$  incubation 1hr，每隔十分鐘超音波震盪器 sonicator 十秒鐘。再於超高速離心機中用 40000rpm  $4^{\circ}\text{C}$  離心 1hr 5min。取 supernatant (含 membrane) 約 1.5 ml 和 0.5ml，分裝入 2vial/1vial，於冷凍  $-70^{\circ}\text{C}$  貯存。取蛋白質量各為 24 和  $15\mu\text{g}$  做 Western blot 測定 PKC isoform  $\alpha$ 、 $\zeta$  表現？

#### 蛋白質濃度測定：

蛋白質濃度的定量方法與試劑與第一部份實驗相同。

#### 西方墨點分析法：

1) 取已定量欲測檢體之 PKC 萃取液，以 PBS 緩衝液來標準化 PKC 萃取液的濃度，使所有欲測檢體之最終體積相同。各加入 1:5X treatment buffer 混合均勻煮沸 10 分鐘，迅速置入冰浴，用離心機 spin-down 混合液後，再次混合均勻進行 SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳分析。

#### 2) 配製 SDS-聚丙烯醯胺板膠：

上層膠體為 4% stacking gel [0.125M Tris-HCl (pH6.8), 0.05% ammonium persulfate, 4.5% acrylamide-0.12% N,N-Bis-methylene acrylamide, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.025% tetra-methyl ethylenediamine (TEMED)]。

下層膠體為 10% separating gel [0.375M Tris-HCl (pH6.8),

0.05% ammonium persulfate, 10% acrylamide-0.268% N,N-bis-methylene acrylamide, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.025% tetra-methyl ethylenediamine (TEMED)]。

3)將做好 SDS-聚丙烯醯胺板膠固定到電泳裝置上，加入電泳緩衝液(25mM Tris-HCl pH8.3, 0.192M glycine, 0.1% SDS)注滿上下電泳槽；然後將處理過之檢體萃取液加入板膠上的 U 形膠槽，以 140 Voltage、35mA 進行電泳，約三小時三十分。

電泳結束後進行蛋白質轉移(transfer)，將膠體(gel)浸入冰冷之轉漬緩衝液(transfer buffer)，利用兩張 whatman 3M 濾紙撈起膠體，使膠體平鋪於濾紙上，且置於 transfer holder 上，再將預先浸濕的硝化纖維紙蓋在膠體上面，依序再覆蓋兩張浸濕的 3M 濾紙，並以玻璃試管壓趕氣泡；再將 transfer holder 放入 electro-transfer tank (Hoefer) 於 4<sup>0</sup>C、100mA 下，進行電轉移過夜。隔日取出硝化纖維紙用洗滌緩衝液(washing buffer)洗一次，再加入 50ml 3% FBS blocking buffer (3%FBS, 10mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 0.05% tween 20)於室溫下搖動一小時。然後加入泡製於 20ml 3% FBS blocking buffer 之初級抗體(PKC first antibody; 1:100 dilute)於室溫下作用三小時。再以洗滌緩衝液洗三次，每次十分鐘。加入泡製於 20ml 3% FBS blocking buffer 之次級抗體(second antibody; 1:1000 dilute)，再以洗滌緩衝液洗三次，每次十分鐘。

4)將 17ml 顯像受質溶液加入顯像 1ml 3,3'-Diamine benzidine (DAB)及 2ml 4-chloro-1-Naphthol (4CN)；倒在硝化纖維紙顯像盒內，並計時其呈色所需時間後，以去離子水終止呈色反應。

5)將顯像之硝化纖維紙用 Alphamager 2000densitometer 定

量。

#### 統計分析：

利用電腦中 paired student's t-test 程式來統計分析 PKC 異構體的表現情形與在燒燙傷病人中是由腐痂切除術所獲得的增生組織之蛋白酵素 C 異構體的表現在細胞膜、核(particular)或細胞質上，經統計學計算是否比正常植皮皮膚有意義增加？

## 五、實驗結果

首先我們測定所有十二種 PKC 異構體是否存在於正常皮膚或燒燙傷上皮組織發現會表現出 PKC $\alpha$ 、 $\zeta$ 這兩種異構體。再將燒燙傷病患之編號、年齡、燒傷部位、植皮部位、燒傷比例、燒傷後植皮日數、使用藥品有無等相關資料詳細收集記錄並依實驗順序編號排列在 Table 5 中。

而圖四是實驗中利用西方墨點法來測定蛋白酵素 C 異構體  $\alpha$ ，結果證實在燒燙傷病人中，經腐痂切除術所獲得的增生組織之蛋白酵素 C 異構體  $\alpha$  的表現比正常植皮皮膚明顯的增加且發現蛋白酵素 C 異構體  $\alpha$  會在細胞膜、核(particular)上有顯著增加。Table 6 是將正常皮膚或燒燙傷上皮組織其細胞膜、核(particular)部分，經統計學計算發現是有意義的增加(paired student's t-test:  $P < 0.05$ )，而且細胞膜、核(particular)部分與細胞質蛋白酵素 C 異構體  $\alpha$  的表現其比值(ratio)也是有意義的增加(paired student's t-test:  $P < 0.01$ )。

但在圖五與 Table 7 則發現蛋白酵素 C 異構體  $\zeta$  的表現及統計學計算是沒有有意義的增加。

## 六、討論

在上皮細胞分化過程之模式是經由增加細胞外鈣離子濃度來促成 PI-specific PLC 的活化增加，接著增加 DAG 和 IP<sub>3</sub> 和細胞內鈣離子濃度，而改變 PKC 活性<sup>(51,52)</sup>或 PKC 的局部化 (localization) 及改變分化的標的物，例如 Fos 的表現。這些研究顯示活化 DAG/ PKC pathway 是跟分化有關。在完整的表皮其 PKC 的活化是與刺狀到顆粒狀細胞的過度時期有關<sup>(46)</sup>。而近年來研究發現臨床外科醫師在燒傷照護上，利用機械式外力拉緊 (strain) 來增加角質細胞生長、蛋白質合成和改變細胞型態等等現象。因此利用拉緊會刺激訊息傳遞是透過 PKC 的活化和轉位作用來促成新的皮膚增生<sup>(53)</sup>。

通常 PKC 異構體可分為 12 種異構體 ( $\alpha$ 、 $\beta$ I、 $\beta$ II、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$  and  $\mu$ )，這些異構體會顯現出不同的局部化作用 (localization) 及生物性功能。而在老鼠 (murine) 體外試驗中發現基底膜 (basal) 和分化時的角質細胞會表現 PKC $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$  等四種 PKC 異構體<sup>(46,47)</sup>。但是卻沒有任何實驗去證明 PKC 異構體會存在於人類的角質細胞。而本實驗是証實在燒燙傷病人腐痂切除術所獲得的增生組織之蛋白醇素 C 異構體  $\alpha$  的表現在細胞核、膜會顯著增加，且細胞核、膜與細胞質之比值也有意義增加，顯示 PKC $\alpha$  可能處於活化狀態，且在皮膚修護規則中扮演一個重要角色會經由促成細胞的分化 (mitogenesis) 或增殖 (proliferation) 作用來修護燒燙傷病人的上皮組織。

總之，在上皮組織的細胞分裂或生長的機轉，可能與 PKC $\alpha$  的轉位作用和表現有關，且會引發細胞內或細胞外的刺激作用

。這些 PKC 變化會更進一步活化 DAG/PKC 一連串的訊息傳遞路徑。



## 參 考 文 獻

1. Raymond, W., Ruddon, (1996) in *Cancer biology* Oxford University Press Inc.
2. Bishop, J., M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64: 235-248.
3. Weinstein, I., B. (1988) The origins of human cancer : Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment-twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Research*, 48: 4135-4143.
4. Slaga, T., J. (1984) in *Mechanism of Tumor Promotion* (Slaga, T.J. ed) Vol. II, pp.1-16, 189-196, CRC Press, Inc Raton, FL.
5. Michll, R., H. (1975) Inositol phospholipid and cell surface receptor function. *Biochem. Biophys. Acta.* , 415:81-147.
6. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikkawa, U., and Nishzuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, 257: 7847-7851.
7. Hunter, T. (1991) Cooperation between oncogenes. *Cell*, 64: 249-270.
8. Cantley, L. C. Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., and Soltoff, S. (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 64: 281-302.
9. Schechter, A., L., Stern, D., F., Vadyanathan, L., Weinberg, R. A., Yang-feng, T., Francke, U., Ullrich, A., and Coussens, L. (1985) The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science*, 229: 976-978.
10. Bargmann, C., I., Hung, M., C., and Weinberg, R., A. (1986) The neu oncogene encodes an epidermal growth factor

- receptor-related protein. *Nature*, 319: 226-230.
11. Dekker, L., V., and Parker, P., J. (1994) Protein kinase C-a question of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 19: 73-77.
  12. Assoka, Y., Nakamura, S., -I, Yoshida, K., and Nishizuka, Y. (1992) Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem. Sci.*, 17: 414-417.
  13. Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258: 607-614.
  14. Mischak, H., Pierce, J. H., Goodnight, J., Kazanietz, M., G., Blumberg, P., M., and Mushinski, J.F. (1993) Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and delta and not by protein kinase C-betaII, -epsilon, -zeta, and -eta. *J. Biol. Chem.*, 268: 20110-20115.
  15. Kiley, S., Goodnough, M., Clark, D., and Jaken, S. (1997) Abstracts of the 88th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego, CA, April 12-16.
  16. Christoph, Borner, Sarah, Nichols, Guadagno, Wendy, W., -L., Hsiao, Dorian, Fabbro, Maureen, Barr, I., Bernard, Weinstein (1992) Expression of Four protein kinase C Isoform in Rat Fibroblast. *J. Biol. Chem.*, 267: 12900-12910.
  17. Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb. J.*, 9: 484-496.
  18. Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspective of protein kinase C. *Science*, 233: 305-312.
  19. Alexandra, C., Newton (1995) Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *J. Biol. Chem.*, 270: 28495-28498.
  20. Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein

- kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*, 334: 661-665.
21. Housey, G., Johnson, M., Hsiao, W., O'Brian, C., Murphy, J., Kirscheier, P., and Weinstein, I., B. (1988) Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblast. *Cell*, 52: 343-354.
  22. Krauss, R., Housey, G., Johnson, M., and Weinstein, I., B. (1989) Disturbances in growth control and Gene expression in a C3H10T1/2 cell line that stably overproduces protein kinase C. *Oncogene*, 4: 991-998.
  23. Catherine, A., O'Brian, Victor, G., Vogel, S., Eva, Singletary, and Nancy, E., Ward (1989) Elevation Protein Kinase C Expression in Human Breast Tumor Biopsies Relative to Normal Breast Tissue. *Cancer Research*, 49: 3215-3217.
  24. Fisher, B., Osborne, C., K., Margolese, R., Bloomer, W. (1993) Neoplasms of the breast. In Holland J. F, Frei E., Bast, R., C., Kufe D. W., Morton D. L., Weichselbaum R. R. (eds) *Cancer Medicine*, Lea & Febiger, Malvern, PA, pp1706-1774.
  25. Gould, K., L., Woodgett, J., R., Cooper J., A., Buss JE, Shalloway, D., Hunter, T. (1985) protein kinase C phosphorylation pp60<sup>src</sup> at novel site. *Cell*, 42: 849-857.
  26. Ballester, Furth, M., E., Rosen, O., M. (1987) Phorbol ester and protein kinase C mediated phosphorylation of cellular kirsten ras gene product. *J. Biol. Chem.*, 262: 2688-2695.
  27. Borner, C., Wyss, R., Regazzi, R., Eppenberger, U., Fabbro, D. (1987) Immunological quantitation of phospholipid /Ca<sup>++</sup>-dependent protein kinase of human mammary carcinoma cell: Inverse relationship to estrogen receptors. *Int. J. Cancer*,

- 40:344-348.
28. Fabbro, D., Regazzi, R., Costa, S., D., Borner, C., Eppenberger, U. (1986) Protein kinase C desensitization by phorbol esters and its impact on growth of Human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 135: 65-73.
  29. Darbon, J-M, Valette, A., Bayard, F. (1986) Phorbol esters inhibit the proliferation of MCF-7 cells: possible implication of protein kinase C. *Biochem. Pharmacol.*, 35: 2683-2686.
  30. O'Brian, C.A., Liskamp, R., M., Solomon, D., H., Weinstein, I., B. (1985) Inhibition of protein kinase C by tamoxifen. *Cancer Research.*, 45: 2462-2465.
  31. Issandou, M., Bayard, F., Darbon, J-M (1988) Inhibition of MCF-7 cell growth by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol: distinct effects of protein kinase C activity. *Cancer Research*, 48: 6943-6950.
  32. Regazzi, R., Fabbro, D., Costa, S., D., Borner, C., Eppenberger, U. (1986) Effects of tumor promoters on growth and on cellular redistribution of phospholipid/ $Ca^{++}$ -dependent protein kinase in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer*, 37: 731-737.
  33. Fabbro, Regazzi, R., Costa, S., D., Borner, C., Eppenberger, U. (1986) protein kinase C desensitization by phorbol esters and its impact on growth of human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 135: 65-73.
  34. Gerard, C., Blobe, Lina, M., Obeid and Yusuf, A., Hannun (1994) Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 13: 411-431.
  35. Kirk Ways, Cynthia, A., Kukoly, James, deVente, Jerry, L.,

- Hooker, Winifred, O., Bryant, Karla, J., Posekany, Donald, J., Fletcher, Paul, P., Cook, and Peter, J., Parker (1995) MCF-7 Breast Cancer Cells Transfected with Protein Kinase C- $\alpha$  Exhibit Altered Expression of other Protein Kinase C isoforms and Display a More Aggressive Neoplastic Phenotype. *J. Clin. Invest.* , 95: 1906-1915.
36. Akimoto, K., Mizuno, K., Osada, S., Hirai, S., Tanuma, S., Suzuki, 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.
37. Murray, N., R., Field, A., P. (1997) Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 272: 27521-27524.
38. Serlachius, E., Svenilsson, J., Schalling, M., Aperia, A. (1997) Protein kinase C in the developing kidney: isoform expression and effects of ceramide and PKC inhibitors. *Kidney Int.*, 52: 901-910.
39. Jiang, Y., H., Lupton, J., R., Chapkin, R., S. (1997) Dietary fat and fiber modulate the effect of carcinogen on colonic protein kinase C lambda expression in rats. *J. Nutr.* , 127: 1938-1943.
40. Basu, A., Weixel, K., Saijo, N. (1996) Characterization of the protein kinase C signal transduction pathway in cisplatin-sensitive and -resistant human small cell lung carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* , 7:1507-1512.
41. Christen, R., D, Isonishi S., Jones, J., A., Jekunen, A., P., Hom, D., K., Kroning, R., Gately, D., P., Thiebaut, F., B., Los, G.,

- Howell, S., B. (1994) Signaling and drug sensitivity. *Cancer Metastasis Rev.*, 13: 175-189.
42. Prendiville, J., D., Crowther, N., Thatcher, P., Woll, B., Fox, A., McGowan, N. Testa, P., Stern, R., McDermott, M., Potter, and G., Pettit (1993) A phase one study of intravenous bryostatin-1 in patients with advanced cancer. *Br. J. Cancer*, 68: 418-425.
43. Philip, P., D., Rea, P., Thavasu, J., Carmichael, N., Stuart, H., Rockett, D., Talbot, T., Ganesan, G., Pettit, F., Balkwill, and A., Harris (1993) phase one study of bryostatin-1: assessment of interleukin 6 and tumor necrosis factor  $\alpha$  induction in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 1812-1818.
44. Tomera, J., F., Lilford, K, et (1993) Multiple regression of skeletal muscle tension on inositol phosphates: crosstalk between signal transduction mechanisms in burn trauma. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* ; 15(5): 255-265.
45. Fournier, A., Murray, A., W. (1987) Application of phorbol ester to mouse skin causes a rapid and sustained loss of protein kinase C. *Nature*, 330: 767-769.
46. Fuchs, E. (1989) Epidermal differentiation: the bare essential. *J. Cell Biol.*, 111: 2807-2814.
47. Dlugosz, A., A., Yuspa, S., H. (1993) Coordinate change in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J. Cell Biol.*, 120: 217-225.
48. Tomera, J., F., Lilford, K. et (1993) The alpha study: Multiple regression of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction

- mechanisms in burn trauma. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* ; 15(6): 395-406.
49. Sayeed, M., M. et (1996) Alterations in cell signaling and related effector function in T lymphocyte in burn/trauma/septic injuries *Shock*; 5(3): 157-166.
  50. Vogelin, E., Feichter, G., and Luscher, N., J. (1997) Breast cancer in previously burn skin: a postburn skin adnexal malignancy? *Burn*, Vol 23, No 4, 336-368.
  51. Catherine, A., O'Brian, Victor, G., Vogel, S., Eva, Singletary, and Nancy, E., Ward (1989) Elevation protein kinase C expression in human breast tumor biopsies relative to normal breast tissue. *Cancer Research*, 49: 3215-3217.
  52. Blobe, G., C., Stribling, S., Obeid, L., M. and Hannun, Y., A. (1996). Protein Kinase C isoenzymes: regulation and function *Cancer Survey*, 27: 213-248.
  53. Dlugosz, A., A., Mischak, H., Mushinski, J., F., Yuspa, S., H. (1992). Transcripts encoding protein kinase C-alpha, -delta, -epsilon, -zeta, and -eta are expressed in basal and differentiating mouse keratinocyte in vitro and exhibit quantitative changes in neoplastic cells. *Mol. Carcinog.* , 5: 286-292.
  54. Takei, T., Mills, I., Arai, K., Sumpio, B., E. (1998) Molecular basis for tissue expansion: clinical implications for surgeon. *Plast. Reconstr. Surg.*, 102: 247-258.



圖

表

Table 1: 四十二個乳癌 PKC 異構體統計資料表

乳癌組織萃取後，標準化其濃度為 20 $\mu$ g/20 $\mu$ l 做西方墨點分析，每一 SDS-PAGE 轉漬至 NC-paper，利用各種不同抗體去 immunoblot；而其一級抗體和二級抗體各別為 1:100、1:1000 倍稀釋，顯影後用 densitometer 測定。再任選第十六檢體為 100%，各檢體與其比求出一致的統計結果。

<i>number</i>	<i>alpha</i>	<i>gamma</i>	<i>zeta</i>	<i>lambda</i>	<i>iota</i>	<i>lym.N</i>	<i>Grade</i>	<i>ER</i>	<i>PR</i>	<i>Age</i>
1	256	135	163	159	166	+	3	-	-	55
2	235	58	163	196	181	+	3			83
3	246	115	124	153	154	-	3			40
4	214	55	163	116	133		2	+	+	63
5	107	26	101	104	133		1	+	+	56
6	256	64	147	294	217		2	-	-	58
7	150	106	202	165	136		2			46
8	150	81	240	116	102		3	+	+	74
9	65	60	63	18	30	1	3	-	-	46
10	175	173	188	200	144	1	2	+	+	63
11	104	118	169	36	52	1	3	-	-	46
12	91	118	200	100	106	1	3	+	+	75
13	78	49	94	5	29	1	3	-	-	48
14	58	42	19	5	16	0	2	-	-	67
15	150	129	194	232	163	0	3	+		
16	100	100	100	100	100	1	2	+	+	82
17	71	44	88	45	57	0	2	+		57
18	136	109	119	141	88	0	2	+	-	49
19	80	53	125	255	132	1	2	+		43
20	129	84	131	86	57	1	2	-	-	58
21	85	101	169	67	88	1	2	+		40
22	85	69	219	153	101					51
23	85	84	183	92	105	0	2	-		45
24	111	134	219	55	92	0	2	-	-	66
25	170	108	261	123	123	1	2	+		64
26	196	126	233	233	167	0	2	-		55
27	179	161	268	86	107					63
28	60	40	106	61	78	0	3	+		49
29	119	114	219	37	53	0	3	+		55
30	94	59	176	4	25	0	3	+		55
31	196	138	226	110	94	1	3	-		76
32	94	106	247	104	96	1	2	+	+	48
33	238	116	261	199	136	1	3	-	-	31
34	162	100	220	164	99	1	2	-	-	56
35	264	148	318	216	123	0	3	+	+	26
36	153	128	153	150	102	0	3	-	-	38
37	102	46	148	66	45	0	2			58
38	221	118	294	258	163	0	1	+		72
39	187	116	85	94	60	0	2	-		23
40	340	155	245	251	154	0	2	+		62
41	179	135	148	129	93	0	3	+		40
42	102	107	107	52	45	1	2			43

Table 2 : 各檢體在 PKC $\alpha$ 、PKC $\zeta$ 、PKC $\iota$ 、PKC $\lambda$ 之間的相關係數統計分析表

將 Table1 PKC 異構體 densitometer 結果做 SAS 統計分析出每個 PKC 異構體與 PKC 異構體之間的相關係數。

	PKC $\alpha$	PKC $\zeta$	PKC $\iota$	PKC $\lambda$
PKC $\alpha$ (n=42)	0.0	0.0013	0.0001	0.0001
PKC $\zeta$ (n=42)	0.0013	0.0	0.0039	0.0025
PKC $\iota$ (n=42)	0.001	0.0039	0.0	0.0001
PKC $\lambda$ (n=42)	0.001	0.0025	0.0001	0.0

\* 相關係數 : 越小越有相關性

Table 3 : 將 Lymphonode、Grade、Age、ER 與各檢體 PKC $\alpha$ 、PKC $\zeta$ 、PKC $\iota$ 、PKC $\lambda$ 的相關性統計分析表

將 Table1 PKC 異構體 densitometer 結果做 T-test 統計分析出每個 PKC 異構體在不同 Lymphonode、Grade、Age、ER 等等條件的平均數、標準差、統計數目等分析結果。

		PKC $\alpha$	PKC $\zeta$	PKC $\iota$	PKC $\lambda$
Lym. N	+ (n=15)	124.4 $\pm$ 13.7	170.6 $\pm$ 17.4	108.0 $\pm$ 19.0	88.7 $\pm$ 10.2
	- (n=17)	148.4 $\pm$ 19.1	173.3 $\pm$ 19.5	121.7 $\pm$ 22.0	93.3 $\pm$ 12.0
Grade	3 (n=15)	146.2 $\pm$ 18.2	181.9 $\pm$ 17.8	104.8 $\pm$ 20.5	99.2 $\pm$ 12.5
	2 (n=17)	144.3 $\pm$ 18.9	163.9 $\pm$ 16.9	126.8 $\pm$ 19.5	102.6 $\pm$ 10.6
Age	>45 (n=29)	138.2 $\pm$ 12.4	175.9 $\pm$ 13.1	111.6 $\pm$ 14.9	96.4 $\pm$ 9.1
	<45 (n=9)	152.4 $\pm$ 24.5	172.2 $\pm$ 26.3	139.4 $\pm$ 25.0	98.4 $\pm$ 10.9
ER	+ (n=20)	144.8 $\pm$ 16.5	185.0 $\pm$ 15.6	133.0 $\pm$ 17.7	107.7 $\pm$ 8.5
	- (n=15)	151.5 $\pm$ 18.3	157.7 $\pm$ 18.6	113.3 $\pm$ 23.0	94.8 $\pm$ 15.4
P value		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

Table 4 : 將 Lymphonode、Grade、Age、ER 之間互相配合與各檢  
體 PKC $\alpha$ 、PKC $\zeta$ 、PKC $\iota$ 、PKC $\lambda$  相關性統計分析表

將 Table1 PKC 異構體 densitometer 結果做 T-test 統計分析每個 PKC 異  
構體在 Lymphonode、Grade、Age、ER 之間互相配合的平均數、標準差、  
統計數目、P-value 等分析結果。

	PKC $\alpha$	PKC $\zeta$	PKC $\iota$	PKC $\lambda$
Lym.N +				
Grade 3 (n=6)	128.4 $\pm$ 31.7	168.6 $\pm$ 34.5	78.0 $\pm$ 32.8	74.2 $\pm$ 19.7
2 (n=9)	121.7 $\pm$ 13.5	171.9 $\pm$ 21.4	127.9 $\pm$ 23.4	98.4 $\pm$ 11.5
Lym.N -				
Grade 3 (n=7)	145.3 $\pm$ 26.8	187.6 $\pm$ 27.7	118.4 $\pm$ 36.0	91.2 $\pm$ 18.5
2 (n=9)	142.8 $\pm$ 31.1	148.8 $\pm$ 27.4	109.1 $\pm$ 29.8	87.2 $\pm$ 17.5
Age>45				
Lym.N +(n=11)	123.7 $\pm$ 14.1	172.5 $\pm$ 21.1	95.1 $\pm$ 18.6	84.4 $\pm$ 11.9
-(n=11)	136.9 $\pm$ 26.9	169.6 $\pm$ 25.8	105.1 $\pm$ 31.1	85.3 $\pm$ 17.1
Age<45				
Lym.N +(n=4)	126.1 $\pm$ 43.4	165.5 $\pm$ 39.8	143.3 $\pm$ 57.2	100.4 $\pm$ 24.6
-(n=6)	169.5 $\pm$ 26.1	180.2 $\pm$ 34.6	152.2 $\pm$ 26.8	107.9 $\pm$ 15.2
ER +				
Lym.N +(n=7)	113.4 $\pm$ 16.7	184.3 $\pm$ 24.1	135.5 $\pm$ 27.2	112.7 $\pm$ 8.4
-(n=10)	163.2 $\pm$ 29.8	190.6 $\pm$ 26.2	137.5 $\pm$ 32.4	99.8 $\pm$ 16.4
ER -				
Lym.N +(n=7)	138.6 $\pm$ 25.9	166.1 $\pm$ 30.1	88.4 $\pm$ 30.3	70.9 $\pm$ 16.3
-(n=6)	131.6 $\pm$ 25.0	148.7 $\pm$ 36.9	104.7 $\pm$ 35.3	90.6 $\pm$ 22.5
P value	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

Table 5 : 燒燙傷病人之編號、年齡、燒傷部位、燒傷比例、植皮部位、燒傷後植皮日數、使用藥品有無等相關資料

Case No.	Sex	Age	Burn Trauma		Origin of skin graft	Skin graft after injury (days)	Antibiotic treatment
			Location	%			
1	M	36	Whole body	35		46	+
2	M	40	Upper limbs	35		27	+
3	M	27	Whole body	90	Wrist	100	+
4	F	19	Limbs, chest and wrist	30		22	+
5	M	42	Whole body	90		35	+
6	F	69	Left leg	20	Right leg	29	-
7	M	3	Trunk, left upper limb and lower limbs	56		0	+
8	F	34	Upper body	24		28	+
9	M	26	Left upper limb	58	Left lower limb	25	+
10	F	21	Left axial region	37		26	+
11	F	43	Right upper limb	15	Right leg	7	+

Table 6 : 蛋白酵素 C 異構體  $\alpha$  之西方墨點分析定量值

組織萃取後，標準化其濃度 cytosol 為 24 $\mu$ g、particulate 為 15 $\mu$ g/50 $\mu$ l 做西方墨點分析，每一 SDS-PAGE 轉漬至 NC-paper，利用各種不同抗體去 immunoblot；而其一級抗體和二級抗體各別為 1:100、1:1000 倍稀釋，顯影後用 densitometer 測定。再以 lysate 為 100%，各檢體與其比求出一致標準化的統計結果。而再將 cytosol 與 particulate 求其比值。

Case no.	cytosolic fraction		particular fraction*		Ratio of particular to cytosolic fractions(%)**	
	Normal	Postburn	Normal	Postburn	Normal	Postburn
1	17.9 <sup>a</sup>	14.3 <sup>a</sup>	10.7 <sup>a</sup>	14.3 <sup>a</sup>	59.8	100.0
2	17.9	14.3	14.3	16.3	79.9	114.0
3	10.7	14.3	14.3	21.4	133.6	149.7
4	27.9	20.0	16.0	16.0	57.3	80.0
5	17.8	20.0	24.0	25.7	134.8	128.5
6	16.0	16.0	16.0	40.0	100.0	250.0
7	17.5	17.2	12.0	24.0	68.6	139.5
8	18.8	21.3	15.0	22.9	79.8	107.5
9	36.0	15.0	26.4	17.2	73.3	114.7
10	11.6	11.0	11.0	13.2	94.8	120.0
11	19.9	33.1	22.1	41.9	111.1	126.6
Mean $\pm$ SEM	19.3 $\pm$ 2.1	17.9 $\pm$ 1.8	16.5 $\pm$ 1.6	23.0 $\pm$ 2.9	90.3 $\pm$ 8.2	130.0 $\pm$ 13.3

Paired Student's t-test : \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

<sup>a</sup>Values are percent of lysate.

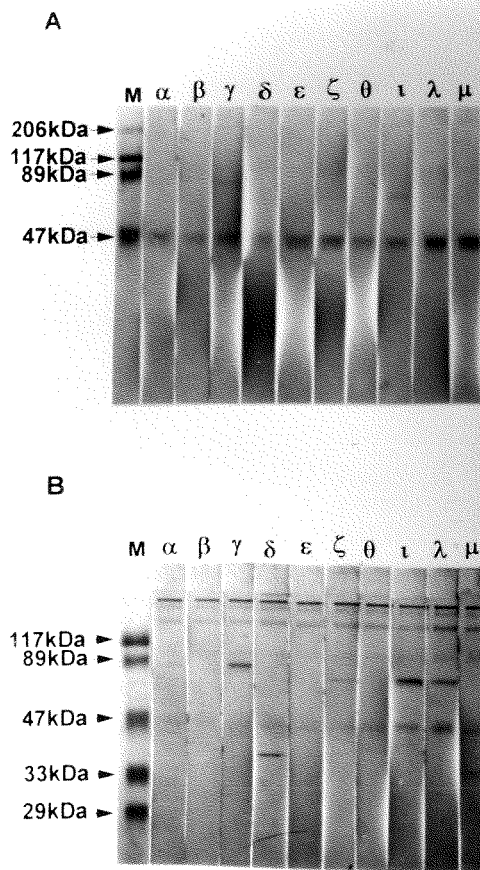
Table 7: 蛋白酵素 C 異構體 $\zeta$ 之西方墨點分析定量值

組織萃取後，標準化其濃度 cytosol 為 24 $\mu$ g、pellet 為 15 $\mu$ g/50 $\mu$ l 做西方墨點分析，每一 SDS-PAGE 轉漬至 NC-paper，利用各種不同抗體去 immunoblot；而其一級抗體和二級抗體各別為 1:100、1:1000 倍稀釋，顯影後用 densitometer 測定。再以 lysate 為 100%，各檢體與其比求出一致標準化的統計結果。而再將 cytosol 與 particulate 求其比值。

Case no.	cytosolic fraction		particular fraction		Ratio of particular to cytosolic fractions(%)	
	Normal	Postburn	Normal	Postburn	Normal	Postburn
1	40.0 <sup>a</sup>	60.0 <sup>a</sup>	40.0 <sup>a</sup>	40.0 <sup>a</sup>	100.0	66.7
2	50.0	51.4	40.0	42.2	80.0	82.1
3	40.0	61.2	50.0	50.0	125.0	81.7
4	85.0	64.8	62.1	47.3	73.1	73.0
5	80.0	64.8	62.1	64.8	77.6	100.0
6	75.6	95.1	56.2	98.9	74.3	104.0
7	40.4	19.2	28.9	28.9	71.5	150.5
8	21.2	28.8	28.9	26.9	136.3	93.4
9	38.5	65.4	23.1	23.1	60.0	35.3
10	26.6	27.5	10.7	16.0	40.2	58.2
11	86.9	16.0	26.6	10.7	30.6	66.9
Mean $\pm$ SEM	53.1 $\pm$ 7.3	50.4 $\pm$ 7.4	39.0 $\pm$ 5.1	40.8 $\pm$ 7.5	79.0 $\pm$ 9.6	82.9 $\pm$ 9.0

<sup>a</sup>Values are percent of lysate.

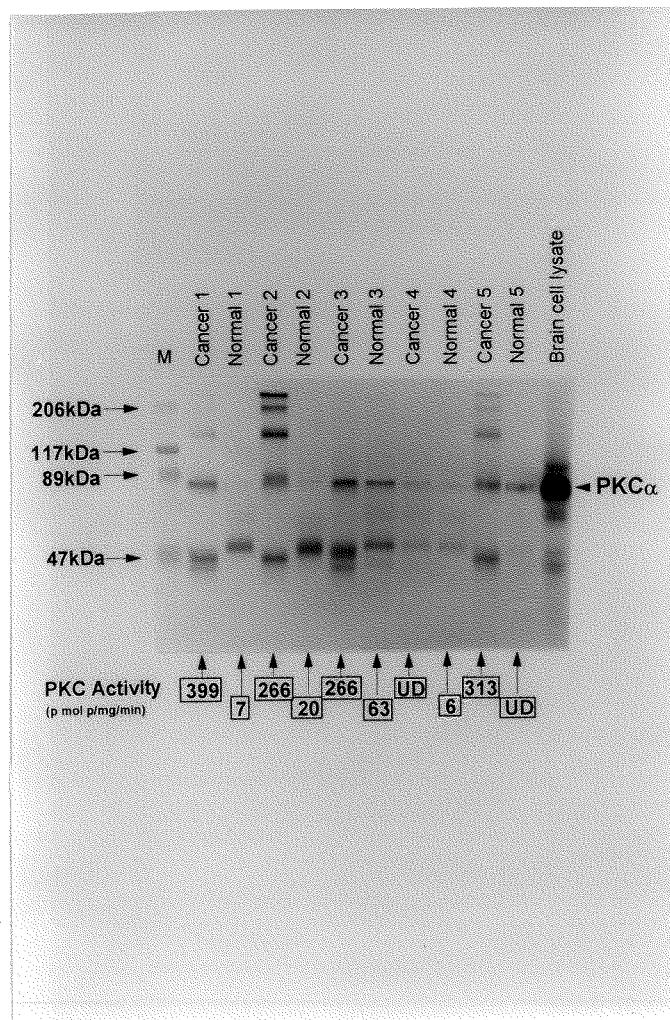




圖一 A：乳房組織內 PKC 異構體電泳分析圖；

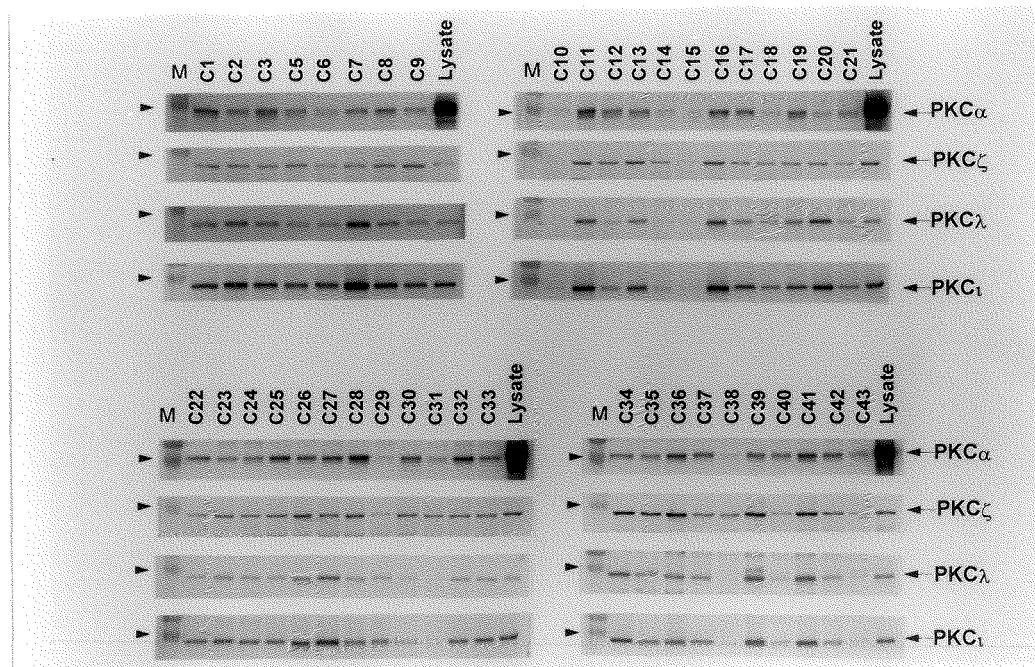
圖一 B：乳癌檢體內 PKC 異構體電泳分析圖。

是各將乳房組織和乳癌檢體的組織萃取液(10 $\mu$ g/20 $\mu$ l protein)混合，用 SDS-PAGE 分離後，轉漬至 NC-paper，剪開十條各加入十種一級抗體均為 1:100 倍稀釋，再加入二級抗體為 1:1000 稀釋後，顯色用 densitometer 定量。



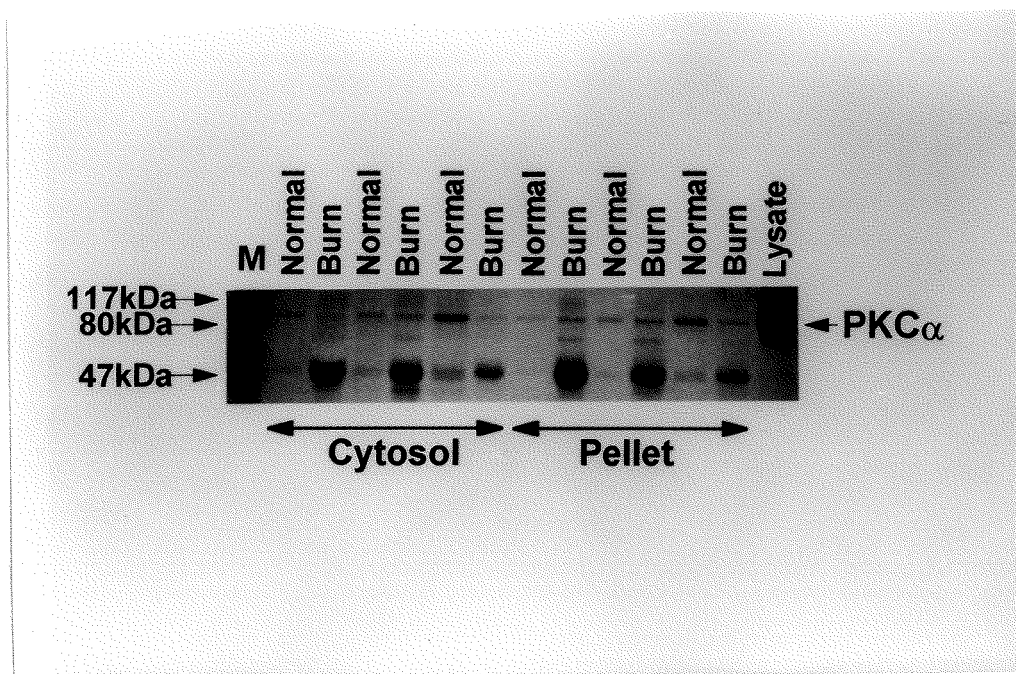
圖二：乳房組織和乳癌檢體內 PKC $\alpha$ 異構體電泳分析圖  
與 PKC 活性對照表。

是將各 5 個乳房組織和乳癌檢體的組織萃取液(20 $\mu$ g/20 $\mu$ l protein)，用 SDS-PAGE 分離後轉漬至 NC-paper，加入 PKC 異構體 $\alpha$ 之一級抗體為 1:100 倍稀釋，再加入二級抗體為 1:1000 稀釋後，顯色用 densitometer 定量。相同檢體再與 PKC 活性做對照比較。



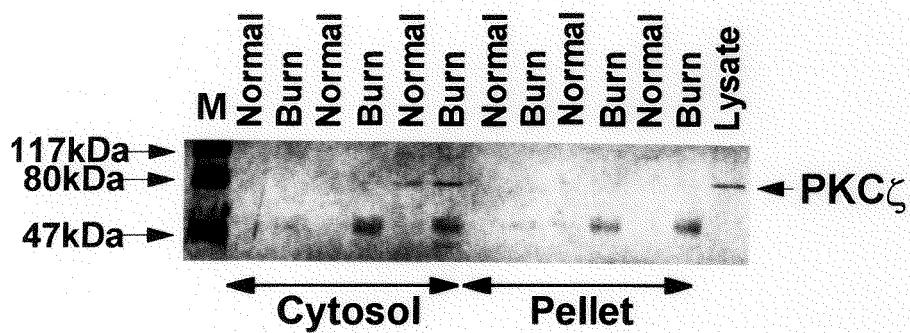
圖三：四十二個乳癌檢體內 PKC $\alpha$ 、PKC $\zeta$ 、PKC $\iota$ 、PKC $\lambda$ 異構體  
電泳分析圖。

是將乳癌檢體的組織萃取液(20 $\mu$ g/20 $\mu$ l protein)，用 SDS-PAGE 分離後轉漬至 NC-paper，加入 PKC 異構體( $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\iota$ )之一級抗體均為 1:100 倍稀釋，再加入二級抗體為 1:1000 稀釋後，顯色用 densitometer 定量。



圖四： PKC $\alpha$ 及其片段之異構體電泳分析圖。

是將組織萃取後，標準化其濃度 cytosol 為 24 $\mu$ g、pellet 為 15 $\mu$ g/50 $\mu$ l 做西方墨點分析，每一 SDS-PAGE 轉漬至 NC-paper，利用各種不同抗體去 immunoblot；而其一級抗體和二級抗體各別為 1:100、1:1000 倍稀釋，顯影後用 densitometer 測定。圖片由左邊開始 Normal、Burn 為一組，依序為第七、八、九個檢體。



圖五： PKC $\zeta$ 及其片段之異構體電泳分析圖。

是將組織萃取後，標準化其濃度 cytosol 為 24 $\mu$ g、particular 為 15 $\mu$ g/50 $\mu$ l 做西方墨點分析，每一 SDS-PAGE 轉漬至 NC-paper，利用各種不同抗體去 immunoblot；而其一級抗體和二級抗體各別為 1:100、1:1000 倍稀釋，顯影後用 densitometer 測定。圖片由左邊開始 Normal、Burn 為一組，依序為第七、八、九個檢體。

## 附錄一

在 BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL  
雜誌已接受稿件之文稿： Protein kinase C isoforms in the  
epidermal tissues of normal and postburn human skin

## **Protein kinase C isoforms in the epidermal tissues of normal and postburn human skin**

Yen-Chu Wang<sup>a</sup>, Yih-Shou Hsieh<sup>a</sup>, Yu-Wen Tang<sup>b</sup> and Jer-Yuh Liu<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biochemistry, Chung Shan Medical College, No. 110, Section 1, Chien-Kuo North Road, Taichung 40203, Taiwan, and <sup>b</sup>Division of Plastic and Reconstructive surgery, Department of Surgery, Taichung Veterans General Hospital, No. 160, Section 3, Chung-Gang Road, Taichung 40705, Taiwan.

### **SUMMARY:**

Because the expression of the isoforms of protein kinase C (PKC) in human basal keratinocytes is not understood, the expression of PKC isoforms were screened in specimens of epidermal tissue from postburn skin and the normal locations for skin grafts in patients with second or higher degrees of flame injury. The expression of individual isoform was determined by Western blot technique. Only PKC  $\alpha$  and  $\zeta$  were detected in the epidermal tissues of normal and postburn skin and translocation occurred in PKC  $\alpha$ . Patients without antibiotic treatment after flame injury had higher expressions of PKC  $\alpha$  and  $\zeta$ . These findings indicate that the mechanisms of cellular differentiation and growth in postburn epidermal tissue may be related to the expression and translocation of PKC  $\alpha$  induced by intra- and extracellular stimulation. These changes in PKC  $\alpha$  further activate the DAG/PKC signal transduction pathways.

Key words: protein kinase C, postburn skin

### **INTRODUCTION:**

In normal skin, DNA synthesis and mitosis occur only in the innermost basal layer of epidermal cells. These cells move up to the skin surface after a series of morphological and biochemical changes. The outermost dead, flattened, enucleated squames are continually sloughed from the surface and replaced by the inner differentiating ones [1].

---

**Abbreviations:** PKC, protein kinase C; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid; Tris-HCl, tris(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride; EGTA, ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; TCA, trichloroacetic acid.

\*corresponding author (e-mail [jyl@mercury.csmc.edu.tw](mailto:jyl@mercury.csmc.edu.tw); Tel: (886)04-2896190-50815; Fax: (886) 04-3890964).

Although the trigger for epidermal differentiation is unknown, protein kinase C (PKC) has been reported to be a regulator for the coordinate change in gene expression of the spinous to granular cell transition in the epidermis. The level of PKC elevates in the differentiated cells and the expression of PKC  $\delta$  or  $\eta$  stimulate the spontaneous division of keratinocytes [2]. Moreover, PKC is activated and translocated in keratinocytes subjected to strain in an isoform-specific manner [3].

Large body area burns may cause a wide range of physiological changes to multiple organ systems. A significant relationship between the secondary messenger system ( $IP_3$ , cAMP, and  $Ca^{++}$ ) and skeletal muscle tension has been demonstrated in mice with burn trauma to 20% and 50% of their body area [4, 5]. In mice with burns, trauma, or septic injuries, the function of the T-cell signaling pathway is greatly reduced. These phenomena indicate that the mechanisms of  $Ca^{++}$  mobilization as well as PKC activation are severely affected after large body area burns [6].

In addition to physiological changes, cancers may arise in burn scars [7]. Breast cancer has been recorded in a woman with previously burnt skin on the chest [8]. Although PKC plays a critical role in cellular growth regulation [9-14], it also takes part in tumor promotion [15]. Moreover, elevation of protein kinase C expression has been noted in human breast biopsies [16]. In order to understand whether PKC activation occurs in postburn skin, the isoforms of PKC in skin specimens from the trauma and normal tissues for skin graft were investigated.

## **MATERIALS AND METHODS:**

### Specimens

Specimens of epidermal tissue from postburn trauma patients and from the normal locations for skin graft (control) were obtained from 11 patients of the Department of Plastic Surgery of the Veterans General Hospital - Taichung. These patients had flame



injuries of second or higher degree (Table 1). These specimens were kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  for PKC extraction and assay.

#### PKC extraction

PKC extraction was performed by a modification of the method described in [17]. All operations were carried out at  $4^{\circ}\text{C}$ . Each sample of normal or postburn epidermal tissue (80 mg) was washed twice with homogenization buffer A (20 mM, tris(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride (Tris-HCl), 2 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), 50 mM phenylmethylsulfonyl flouride (PMSF), 10% glycerol and 50 mM  $\beta$ -mercaptoethanol at pH 7.5) with leupeptin and homogenized in homogenization buffer A without leupeptin by 60 stokes using a Wheatopan homogenizer. The homogenates were centrifuged at 100,000 g for 1.5 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant fluid containing the cytosolic fraction was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The pellet was resuspended in buffer B (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 50 mM PMSF, 10% glycerol and 0.1% Triton X-100 at pH 7.5) and incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 hr. During the incubation, the homogenates were shaken with a sonicator for 10 s every 10 min. After centrifugation at 100,000 g for 1 h, the supernatant fluid containing the membranous fraction was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for Western blot analysis.

#### Determination of Protein Contents

The Bradford protein assay was employed to determine protein concentrations in the cytosolic and particulate fraction [18]. Protein assay reagents were from Bio-Rad Lab (Richmond, CA, USA). Coomassie brilliant blue G-250 was used for staining and bovine serum albumin (BSA) was employed as a standard. The change in optical density was monitored at 595 nm.

#### Electrophoresis and Western Blot Procedures

The extracts were standardized to the same volume with PBS. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out on 10% polyacrylamide gels using a modified Laemmli buffer system [19].

After electrophoresis at 140 V and 35 mA for 3.5 h, the gels were equilibrated in cold transfer buffer for 30 min. The electrophoretically resolved proteins were transferred to nitrocellulose paper (Amersham, Hybond-C Extra Supported, 0.45 m) using a Hoefer Scientific Instruments Transphor Unit at 100 mA overnight. After washing with a washing buffer, the nitrocellulose papers were incubated in 50ml 3% FBS blocking buffer (3% FBS, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) at room temperature for 1 h. Firstly the antibody of each of the individual PKC isoforms (Transduction Laboratories; 1:100 dilution) in 20 ml 3% FBS blocking buffer was added and incubated at room temperature for 3 h. The nitrocellulose papers were washed in the washing buffer for 10 min in triplicate and then immersed in the second antibody of the corresponding isoform (1:1,000 dilution) containing 20 ml 3% FBS blocking buffer. The papers were washed three times again with the washing buffer for 10 min. Color was developed using 17 ml of the color developing substrate and the color reagents (1 ml 3,3'-diamine benzidine and 2 ml 4-chloro-1-naphthol). The reaction was terminated with deionized water. A densimeter (Alphamager 2000, Alpha Innotech Corporation) was used to determine the degree of change in the optical density of the nitrocellulose papers.

## **RESULTS**

Only PKC  $\alpha$  and  $\zeta$  were detected in normal and postburn epidermal tissues (data

not shown). Fig. 1 shows that the expression of PKC  $\alpha$  in both the cytosolic and the particulate fractions was increased in the postburn tissue. Moreover, significantly higher expression was found in the particulate fraction (paired Student's t-test:  $P < 0.05$ ) and in the ratio of the expression in the particulate to the cytosolic fractions (paired Student's t-test:  $P < 0.01$ ) (Table 2). However, no significant elevation in the expression of PKC  $\zeta$  was noted (Fig. 2, Table 3). In addition, the particulate to cytosolic fraction ratio was also found to be higher in patients that did not receive antibiotic treatment (cases 6 and 11).

#### **DISCUSSION:**

In the division of epidermal cells, extracellular  $\text{Ca}^{++}$  is an important mediator in the activation of PI-specific PLC. The activation of PLC in turn catalyzes the generation of DAG and  $\text{IP}_3$  as well as the increase in intracellular  $\text{Ca}^{++}$ . Both DAG and intracellular  $\text{Ca}^{++}$  increase the activity or localization of PKC and the differentiation target of PKC, such as Fos [2, 20]. The findings reported here suggest that the DAG/PKC pathways may be related to the transition of spinous to granular cells in epidermis. Although 12 isoforms of PKC ( $\alpha$ ,  $\beta\text{I}$ ,  $\beta\text{II}$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ , and  $\mu$ ) have been identified [21], these isoforms exhibit differences in localization and function [22]. In murine basal and differentiating keratinocytes in vitro, PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  and  $\eta$  are expressed [23]. However, there is no resolution of the isoforms of PKC present in human basal keratinocytes. In this study, only the expressions of PKC  $\alpha$  and  $\zeta$  were detected in normal as well as postburn epidermal tissues.

In this study, it was shown that the expression of PKC  $\alpha$  was significantly elevated in the cytosolic and particulate fractions of the postburn epidermal tissue. Moreover, the

ratio of the expressions in the particulate to cytosolic fractions was also significantly increased. These findings suggest that PKC  $\alpha$  is in an active state and may play an important role in skin repair by increasing mitogenesis or proliferation in postburn epidermal tissue.

In conclusion, the mechanisms of cellular differentiation and growth in postburn epidermal tissue may be related to the expression and translocation of PKC  $\alpha$  induced by intra- and extracellular stimulations. These changes in PKC  $\alpha$  further activate the DAG/PKC signal transduction pathways.

#### **ACKNOWLEDGEMENT:**

This study was supported by a grant from National Science Council (NSC 87-2314-B-040-007), Taipei, Republic of China, and Public Medicine Research grant, Taiwan provincial Taichung Hospital.

#### **REFERENCES:**

1. Fuchs, E. (1990) *J. Cell Biol.* 111, 2807-2814.
2. Dlugosz, A.A. and Yuspa, S.H. (1993) *J. Cell Biol.* 120, 217-225.
3. Takei, T., Mills, I., Arai, K. and Sumpio, B.E. (1998) *Plastic and Reconstruction Surg.* 102, 247-258.
4. Tomera, J.F., Lilford K. et al. (1993) *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 15, 255-265.
5. Tomera, J.F., Lilford K. et al. (1993) *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 15, 395-406.
6. Sayeed, M.M. et al. (1996) *Shock* 5, 157-166.
7. Bartle, E.J., Sun, J.H., Wang, X.W. and Schneider, B.K. (1990) *J. Burn Care and Rehabilitation* 11, 46-49.
8. Vogelin, E., Feichter, G. and Luscher N.J. (1997) *Burn* 23, 336-368.
9. Dekker, L.V. and Parker, P.J. (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19, 73-77.
10. Assoka, Y., Nakamura, S.I., Yoshida, K. and Nishizuka, Y. (1992) *Trends Biochem. Sci.* 17, 414-417.
11. Nishizuka, Y. (1992) *Science* 258, 607-614.
12. Nishizuka, Y. (1995) *Faseb J.* 9, 484-496.
13. Nishizuka, Y. (1989) *Science* 233, 305-312.
14. Newton, A.C. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 28495-28498.
15. Nishizuka, Y. (1988) *Nature* 334, 661-665.
16. O'Brian, C.A., V.G., Vogel, S.E. Singletary and Ward, N.E. (1989) *Cancer Research* 49, 3215-3217.
17. Liu, J.Y., Lin, S.J. and Lin, J.K. (1993) *Carinogenesis* 14, 857-861.

18. Bradford, M.M. (1976) *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
19. Laemmli, U. (1970). *Nature* 227, 680-685.
20. Fournier, A. and Murray, A.W. (1987) *Nature* 330, 767-769.
21. Blobe, G.C., Stribling, S., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. (1996) *Cancer Survey* 27, 213-248.
22. Dekker, L.V. and Parker, P.J. (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19, 73-77.
23. Dlugosz, A.A., Mischak, H., Mushinski, J.F., Yuspa, S.H. (1992) *Mol. Carcinog.* 5, 286-292.

## Legend

- Fig. 1. Immunoblot analysis of protein kinase C (PKC)  $\alpha$  in the cytosolic and particulate (pellet) fractions. After tissue extraction, cytosol were standardized to 24  $\mu\text{g}$  and pellet to 15  $\mu\text{g}$ . Aliquots of the fractions were then prepared on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transfer to nitrocellulose paper. The blots were stained with PKC  $\alpha$ -specific antibodies. The primary and secondary antibodies were diluted to 1:100 and 1:1000, respectively. After staining, color changes were determined using densimeter. From left, case 7, 8, and 9 (normal and postburnt epidermal tissues). Lysate, the extract of rat brain cells.
- Fig. 2. Immunoblot analysis of PKC  $\zeta$  in the cytosolic and particulate (pellet) fractions. After tissue extraction, cytosol were standardized to 24  $\mu\text{g}$  and pellet to 15  $\mu\text{g}$ . Aliquots of the fractions were then prepared on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transfer to nitrocellulose paper. The blots were stained with PKC  $\zeta$ -specific antibodies. The primary and secondary antibodies were diluted to 1:100 and 1:1000, respectively. After staining, concentrations were determined using densimeter. From left, case 7, 8, and 9 (normal and postburnt epidermal tissues). Lysate, the extract of rat brain cells.

**Table 1.** Clinical characteristics of 12 patients with second or higher degree of flame injury

Case No.	Sex	Age	Burn Trauma		Origin of skin graft	Skin graft after injury (days)	Antibiotic treatment
			Location	%			
1	M	36	Whole body	35		46	+
2	M	40	Upper limbs	35		27	+
3	M	27	Whole body	90	Wrist	100	+
4	F	19	Limbs, chest and wrist	30		22	+
5	M	42	Whole body	90		35	+
6	F	69	Left leg	20	Right leg	29	-
7	M	3	Trunk, left upper limb and lower limbs	56		0	+
8	F	34	Upper body	24		28	+
9	M	26	Left upper limb	58	Left lower limb	25	+
10	F	21	Left axial region	37		26	+
11	F	43	Right upper limb	15	Right leg	7	-

**Table 2.** Comparison of the expression of PKC  $\alpha$  in cytosolic and particulate fractions of epidermal tissue from postburnt and normal skin

Case no.	Cytosolic Fraction		Particulate fraction*		Ratio of particulate to cytosolic fractions(%)**	
	Normal	Postburnt	Normal	Postburnt	Normal	Postburnt
1	17.9 <sup>a</sup>	14.3 <sup>a</sup>	10.7 <sup>a</sup>	14.3 <sup>a</sup>	59.8	100.0
2	17.9	14.3	14.3	16.3	79.9	114.0
3	10.7	14.3	14.3	21.4	133.6	149.7
4	27.9	20.0	16.0	16.0	57.3	80.0
5	17.8	20.0	24.0	25.7	134.8	128.5
6	16.0	16.0	16.0	40.0	100.0	250.0
7	17.5	17.2	12.0	24.0	68.6	139.5
8	18.8	21.3	15.0	22.9	79.8	107.5
9	36.0	15.0	26.4	17.2	73.3	114.7
10	11.6	11.0	11.0	13.2	94.8	120.0
11	19.9	33.1	22.1	41.9	111.1	126.6
Mean±SEM	19.3±2.1	17.9±1.8	16.5±1.6	23.0±2.9	90.3±8.2	130.0±13.3

Paired Student's t-test: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

<sup>a</sup>values are percent of lysate.

**Table 3.** Comparison of the expression of PKC  $\zeta$  in cytosolic and particulate fractions of epidermal tissue from postburnt and normal skin

Case no.	Cytosolic fraction		Particulate fraction		Ratio of particulate to cytosolic fractions(%)	
	Normal	Postburnt	Normal	Postburnt	Normal	Postburnt
1	40.0 <sup>a</sup>	60.0 <sup>a</sup>	40.0 <sup>a</sup>	40.0 <sup>a</sup>	100.0	66.7
2	50.0	51.4	40.0	42.2	80.0	82.1
3	40.0	61.2	50.0	50.0	125.0	81.7
4	85.0	64.8	62.1	47.3	73.1	73.0
5	80.0	64.8	62.1	64.8	77.6	100.0
6	75.6	95.1	56.2	98.9	74.3	104.0
7	40.4	19.2	28.9	28.9	71.5	150.5
8	21.2	28.8	28.9	26.9	136.3	93.4
9	38.5	65.4	23.1	23.1	60.0	35.3
10	26.6	27.5	10.7	16.0	40.2	58.2
11	86.9	16.0	26.6	10.7	30.6	66.9
Mean±SEM	53.1±7.3	50.4±7.4	39.0±5.1	40.8±7.5	79.0±9.6	82.9±9.0

<sup>a</sup>values are percent of lysate.



Fig. 1

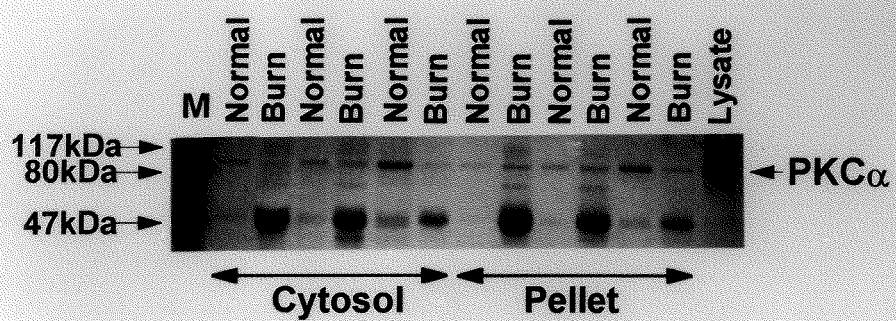


Fig. 2

