

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

蛋白激酶 C 與子宮蛻膜細胞增殖機制之研究

The investigation of protein kinase C and the mechanism of the proliferation of the uterine decidual cells

計畫編號：NSC89-2320-B-040-013-

執行期限：88 年 08 月 01 日至 89 年 07 月 31 日

主持人：劉哲育 中山醫學院生化所

一、中文摘要

我們過去的研究中已經發現，在蛻膜的形成過程中，不論是在真懷孕或假懷孕大鼠蛋白激酶 C (PKC) 異構體都參與其中蛻膜的形成，因此我們猜測 PKC 可能參與調節蛻膜細胞 (decidual cell) 的增殖。在本篇論文，藉由使用 zymography，來測定真懷孕和假懷孕大鼠的蛻膜組織金屬蛋白水解酶-2 (MMP-2) 的表現。結果顯示，在假懷孕大鼠蛻膜組織形成的第二天到第五天以及真懷孕大鼠的第七天到第九天，MMP-2 的表現都有顯著的增加。而這此結果與 PKC α 的蛋白表現正好一致。因此我們設計在蛻膜組織的培養過程中，加入 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate

(TPA) 或 diacylglycerol (DAG) 來看 MMP-2 的表現。結果發現 MMP-2 都被活化，而這活化的現象可以被 PKC 抑制劑 (H7)、PKC α 特殊抑制劑 (Go-6976)，以及轉譯抑制劑 (cycloheximide) 所抑制，但轉錄抑制劑 (actinomycin D) 和複製抑制劑 (mitomycin C) 則無此抑制功能。由這些證據顯示 PKC α 可能涉及調控蛻膜形成中蛻膜組織 MMP-2 的表現。利用細胞培養測試，也發現 MMP-2 會因助孕素 (progesterone) 的抑制而表現減少，同時也發現 PKC α 也會隨著改變，但若處理 TPA 則 MMP-2 恢復表現。另外我們也發現 PKC α 和 PKC ζ 在蛻膜形成中 mRNA 的表現增加，且抗組織胺 (diphenhydramine) 抑制蛻膜的形成與 PKC α 活化有關，可見當蛻膜形成中 PKC 可能扮演雙重調控的角色。

關鍵詞：蛋白激酶 C；金屬蛋白水解酶-2；蛻膜形成

Abstract

We have demonstrated that the expression of protein kinase C (PKC) isoform are associated with the development of deciduomata in the pseudopregnant and pregnant rats. It is suggested that PKC may modulate the proliferation of decidual cells. In this study, we measured the expression of matrix metalloproteinase (MMP-2) by using zymography during decidualization in the pseudopregnant and pregnant rats. The result showed that the expression of MMP-2 was significantly increased from day 2 to day 5 in the pseudopregnancy and from day 7 to day 9 in the pregnancy. The phenomenon were paralld with the expression of PKC α . Therefore, the effect of TPA or DAG on the expression of MMP-2 in the organotypic culture of decidual tissue was then determined. The enhanced expression and activation of MMP-2 was observed in the 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) or diacylglycerol (DAG)-treated cultures. This enhanced expression was inhibited by PKC inhibitor (H7), PKC α specific inhibitor (Go-6976) and translation inhibitor (cycloheximide), but no influence by transcription inhibitor (actinomycin D) and replication inhibitor (mitomycin C). These findings indicated that PKC α may be involved in the regulation of the expression of MMP-2 during decidualization.

Keywords: PKC; MMP-2; Decidualization

二、計畫緣由與目的

在我們的知識領域裡，子宮蛻膜

形成過程中有兩種作用，即轉化作用 (transformation) 和增殖作用 (proliferation)。轉化作用是將子宮基質細胞 (stromal cell) 轉化形成蛻膜細胞 (decidual cell)；增殖作用是指蛻膜細胞因為某些因素的刺激大量增殖。目前我們對於轉化作用的機制了解較多，而增殖作用的機制了解則有限。在轉化過程中子宮基質細胞經由胚胎著床作用和外力刺激活化使攝副腺素 (prostaglandin) 和組織氫 (histamine) 釋放，再經由血中助孕素 (progesterone; P) 和女性素 (estradiol; E) 的催化，使基質細胞轉化形成蛻膜細胞，即為轉化作用。如圖 1，攝副腺素或組織氫在 E 和 P 存在下會誘發產生 cAMP 增加，然後蛻膜細胞轉化形成(1)，故此過程與 cAMP 產生有關；利用 Foskolin 直接產生 cAMP 增加也會誘發蛻膜細胞形成(2)，所以轉化作用是透過 cAMP 的路徑形成。該路徑會被 TPA 或抗組織氫 (antihistamine) 所抑制(3,4)，但是否與抑制 cAMP 產生有關，目前未知。最近我們實驗發現抗組織氫的抑制作用可能與 TPA 的作用一樣，即活化蛋白激酶 C (protein kinase C; PKC) 造成蛻膜形成抑制。如圖 2-3，抗組織氫抑制蛻膜形成可被 staurosporine (PKC 抑制劑) 所抑制，而且如圖 4-7，PKC α 和 ζ 蛋白量在抗組織氫處理過程中有降低調節作用 (down-regulation) 的活化現象。所以 PKC 此時 (蛻膜形成初期) 可能扮演抑制調控的角色。

PKC 是一種鈣離子和磷脂依賴之蛋白激酶，在細胞內扮演訊息傳遞的角色。一種已知的細胞內傳遞訊息物質 diacylglycerol (DAG)，即是增強鈣離子和磷脂活化 PKC (5-7)。當細胞受到外在刺激 (external stimuli) 時，諸如生長因子 (growth factor)、荷爾蒙 (hormone) 和神經傳遞物質 (neurotransmitter)，DAG 由 phosphatidylinositol 分解形成，PKC 即

被活化，並進行細胞內訊息傳遞的工作 (8)。此外 PKC 亦能誘發許多細胞反應，包括細胞增殖 (cell proliferation)、分化 (differentiation)、基因表現 (gene expression) 和腫瘤促進形成作用 (tumor promotion) (9)。

最近我們的研究發現假懷孕與真懷孕的蛻膜組織形成過程中，PKC α 有降低調節作用 (down-regulation) 活化現象，而 PKC ζ 和 PKC δ 的表現增加(10,11)。然而這些現象是否只是同時出現在蛻膜細胞增殖期間，或是與蛻膜細胞增殖有關，仍然未知，值得我們深入探討。

當蛻膜細胞形成後，會分泌出 matrix metalloprotease (MMP) (12) 和生長激素 (growth factor) (13)。MMP 分解細胞周圍的膠質纖維 (collagen) 使細胞分散開，此作用可能使細胞活化而增殖。細胞培養實驗發現，細胞增殖活性也是密度低比密度高的強 (14)，細胞密度低時，PKC 也易被活化 (15)，故 MMP 誘發細胞增殖可能與 PKC 有關。另外蛻膜細胞分泌的生長激素如 IGF (insulin-growth factor) 等，也與誘發 PKC 表現有關。如 IGF 透過 PKC 活化路徑使老鼠星狀腦細胞 (astrocytes) 分裂增殖增加 (16)；IGF 使老鼠 3T3 纖維母細胞內的 PKC 轉移從細胞質到細胞核 (17,18)；IGF 透過 PKC δ 活化催化巨噬細胞 (macrophage) 分化作用(19)；IGF 透過 PKC ζ 活化誘發 NIH3T3 纖維母細胞轉化作用(20)。至於 MMP 和生長激素是否改變 PKC 異構體的表現，不得而知，等待我們深入研究。

本實驗計劃為了釐清 PKC 的表現是否與蛻膜細胞增殖有關，將利用利用大鼠的真、假懷孕，來做為實驗的材料，並配合組織培養及 zymography 的技術進行探討。故本論文共分二個方面：(一) 確認真、假懷孕大鼠的蛻膜組織是否表現金屬蛋白水解酶

素；(二) 蛻膜組織的金屬蛋白水解酵素是否經由蛋白激酵素 C 來調控。

三、結果與討論

結果

(一) 確認真、假懷孕大鼠的蛻膜組織是否表現金屬蛋白水解酵素

1. 假懷孕大鼠蛻膜組織中金屬蛋白水解酵素-2 表現：

藉由萃取不同天數的假懷孕蛻膜組織，以 zymography 測試其中金屬蛋白水解酵素的變化。因為假懷孕第 0、1、2 天無法分離蛻膜組織，因此萃取整個子宮作測試，而第 3、5、7、9 天就可以分離出蛻膜組織和肌肉組織。結果發現在假懷孕蛻膜組織的第二天到第五天中活化態的金屬蛋白水解酵素-2 顯著的增加，由圖 3 的量表可以知道活化態的金屬蛋白水解酵素-2 在蛻膜形成之後就開始表現，直到第二天達到最高表現量，雖然第三天到第五天表現量開始下降，但它們的量值依舊比沒有形成假懷孕蛻膜來的高。而金屬蛋白水解酵素-2 的總活性也是從蛻膜形成之後就開始表現，直到第二天達到最高表現量，到第三天就開始下降，而在第四天的量值就降到比沒有形成假懷孕蛻膜組織還來的低。

2. 真懷孕大鼠蛻膜組織中金屬蛋白水解酵素-2 表現：

萃取不同天數的真懷孕蛻膜組織，以 zymography 的方法來看金屬蛋白水解酵素的表現。因為真懷孕的前 8 天無法分離蛻膜組織，因此萃取整個子宮，而第 9 天之後就可以分離出蛻膜組織和肌肉組織。由結果發現在真懷孕蛻膜組織的第 7 天到第 9 天中活化態的金屬蛋白水解酵素-2 顯著的增加，特別是在 7、8 兩天，而子宮肌肉組織則是一直都有金屬蛋白水解酵素-2 表現著，並沒有太大的差異。由圖 4 的量表可以知道活化態的金屬蛋白水解酵素-2 在蛻膜形成的

第 7 到 9 天就顯著的增加，第 9 天後就開始下降，至於金屬蛋白水解酵素-2 的總活性在蛻膜組織的第 7、8 天達到最高量，第八天就快速的下降。

(二) 蛻膜組織的金屬蛋白水解酵素-2 是否經由蛋白激酵素 C 來調控

1. TPA、H7 影響蛻膜組織金屬蛋白水解酵素-2 之表現：

以假懷孕大鼠第三天的蛻膜組織作組織培養 (tissue culture)，並加入蛋白激酵素 C 的活化劑 (TPA) 和抑制劑 (H7 或 Cc)，看是否會影響蛻膜組織的金屬蛋白水解酵素-2 表現。結果發現蛻膜組織以 TPA 刺激後，不論是活化態的金屬蛋白水解酵素-2 或是金屬蛋白水解酵素-2 的總活性表現都會增加，並隨著劑量的增加表現也跟著增加；蛻膜組織以蛋白激酵素 C 抑制劑 (H7) 和 TPA 一起處理後，比起只處理 TPA 的組織其金屬蛋白水解酵素-2 活性和總活性都明顯減少，甚至比對照組還低，但只有金屬蛋白水解酵素-2 的總活性呈現劑量依賴。以另一種蛋白激酵素 C 抑制劑 (Cc) 和 TPA 一起處理後 (lane 7 和 8) 則沒抑制的效果。另外組織培養還選用了假懷孕第 5 天的蛻膜組織，發現所做出來的結果相似，但因為選用假懷孕第三天的結果比較明顯，因此往後的實驗都選用假懷孕第三天做為實驗材料。

2. H7 或 Cycloheximide 影響蛻膜金屬蛋白水解酵素-2 的表現：

在組織培養中加入 TPA 以及 H7 或轉譯抑制 (cycloheximide)、轉錄抑制劑 (actinomycin D) 和增殖抑制劑 (mitomycin C)，檢測蛻膜組織在培養液、細胞質和細胞膜上的金屬蛋白水解酵素-2 表現。結果發現在蛻膜組織以 TPA 刺激後，培養液中活化態的金屬蛋白水解酵素-2 或是金屬蛋白水解酵素-2 的總活性表現都增加，並隨著劑量的增加表現也跟著增加，但在細胞質和細胞膜上則只有總活性表現量增加；而蛻膜組織以 H7 或 cycloheximide 和 TPA 一起

處理後，發現金屬蛋白水解酵素-2 都有被抑制的現象產生，但以 actinomycin D 和增殖抑制劑 mitomycin C 處理則無此現象發現。

3. Gö-6976 影響蛻膜組織中金屬蛋白水解酵素-2 的表現：

在組織培養中加入 TPA 來活化蛋白激酵素 C，並同時加入不同劑量的蛋白激酵素 C α 抑制劑 (Gö-6976)，以 zymography 檢測金屬蛋白水解酵素-2 的表現是否受到影響。結果發現加入 Gö-6976 後會抑制分泌於培養液中金屬蛋白水解酵素-2 的活化表現，但隨著劑量增加活性反而緩慢增加，而總活性上就隨著劑量增加而降低。至於在細胞質或細胞膜的表現則只有在總活性有明顯抑制現象。

4. 助孕素 (Progesterone) 對於大鼠蛻膜細胞內金屬蛋白水解酵素-2 之影響：

將大鼠蛻膜細胞 (rat decidual cell) 處理或不處理 progesterone 後，細胞型態會因助孕素的加入而使細胞型態變長變細，然後再給予或不給予 TPA 的刺激，以 zymography 測試金屬蛋白水解酵素-2 的表現。結果發現經助孕素處理後的大鼠蛻膜細胞，其金屬蛋白水解酵素-2 不管是活化態或不活化態都幾乎消失，但如果再處理 TPA 則會使得金屬蛋白水解酵素-2 馬上表現。

討論

PKC 異構體參與蛻膜形成

假懷孕蛻膜組織形成的第二天到第五天中，活化態的金屬蛋白水解酵素-2 顯著的增加；真懷孕蛻膜組織的第 7 天到第 9 天中，活化態的金屬蛋白水解酵素-2 顯著的增加。在真、假懷孕中金屬蛋白水解酵素-2 活性的增加，可能是蛻膜組織為了持續擴張的結果。蛻膜組織除了提供將來胚胎著床後的保護外，也擔負起將來供給胚胎養分的功能，因此蛻膜在這段時期表現金屬蛋白水解酵素-

2 就是為了水解周圍的組織，以便使自己增殖，以便達到將來保護及提供養分的能力。

蛻膜組織的金屬蛋白水解酵素是否經由蛋白激酵素 C 來調控

根據之前實驗室得到的結果知道蛋白激酵素 C 參與蛻膜的 formed，而金屬蛋白水解酵素-2 一樣在蛻膜組織中也會表現，那麼蛋白激酵素 C 與金屬蛋白水解酵素-2 彼此間是否有關聯？結果得知蛻膜組織處理 PKC 的活化劑會使金屬蛋白水解酵素-2 增加，處理蛋白激酵素 C 抑制劑則會抑制，但只限於使用 H7 而非 Cc，而這可能與劑量有關。因此在蛻膜組織中蛋白激酵素 C 的活化可能是調節金屬蛋白水解酵素-2 的表現。由圖 5、7 已知蛋白激酵素 C 會參與金屬蛋白水解酵素-2 的表現，那麼蛋白激酵素 C 到底調控在轉譯作用或在轉錄作用呢？由圖 9 得知當蛻膜組織處理轉譯抑制劑 (Cycloheximide) 時，金屬蛋白水解酵素-2 的表現下降，但不被轉錄抑制劑 (actinomycin D) 所抑制，所以蛋白激酵素 C 應該是以轉譯層面調控蛻膜組織中金屬蛋白水解酵素-2 的活化。已知蛋白激酵素 C 會調控蛻膜組織中金屬蛋白水解酵素-2 的表現，那麼是蛋白激酵素 C 哪一種異構體中所參與的？由圖 9 可以知到當蛻膜組織處理蛋白激酵素 C α 的特殊專一抑制劑 (Gö-6976) 時，可以抑制蛻膜之金屬蛋白水解酵素-2 的表現。因此蛋白激酵素 C α 調控蛻膜組織中金屬蛋白水解酵素-2 的表現。

四、計畫成果自評

子宮蛻膜是子宮育胚預備的溫床。子宮蛻膜形成是由子宮內層組織內之基質細胞分化增殖而成 (Annals of the New York Academy of Sciences, 1994, 734: 19-25)。當受精卵在子宮著床時，刺激子宮內

皮細胞分泌某些因素，然後誘發基質細胞轉化形成蛻膜細胞，其細胞的增殖，被認為與荷爾蒙有關。有些學者指出泌乳素及助孕素在子宮蛻膜形成之初步機轉為增加 cAMP 的含量，故訊息傳遞物 cAMP 的表現與子宮蛻膜形成有關 (Endocrine, 1997, 6(3): 301-307.)。然而另一訊息傳遞物 PKC 在子宮蛻膜形成過程中所扮演的角色所知甚少。根據文獻報告，PKC 活化後，會引發一連串的細胞內訊息傳遞動作，最後誘發基因表現、蛋白合成和細胞增殖 (Nature, 1984, 308: 693-698.)。我們研究證實 PKC 異構體的變化在假孕鼠子宮蛻膜中發生，且 PKC α 可能有活化的現象 (Life Science 1998, 63: 721-730); 在真懷孕鼠子宮蛻膜中也證明亦有 PKC 異構體的變化 (Life Science 1999; 64: 2367-2373)。故我們認為在蛻膜細胞內 PKC 可能被某種未知因素所活化，進而觸動訊息傳遞鏈，催促細胞增殖作用。這種現象與肝臟再生或腎臟再生的機制相似 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, 182(3): 1333-9; Cancer Res., 1993, 53: 4542-4549)，但是這項發現卻是一項新的突破，令人興奮不已。

最近我們研究又發現 PKC α 活化與蛻膜組織 MMP-2 的表現有關 (此結果已在第十五屆生物醫學聯會發表)。MMP-2 的表現與細胞增殖有關已被証實 (Oral Biology and Medicine, 1993, 4: 197-250)，所以我們認為 PKC α 在子宮蛻膜形成中也扮演某種角色。往後將更進一步藉由動物和人類基質細胞做體外培養，繼續 PKC 角色之探討。盼由基礎研究發展到臨床應用，諸如不孕症之研究、子宮沾粘及早產機制之探討... 等等，以期早日解決。

五、參考文獻

1. Bark AK, Frank GR, Kessler CA,

- Cedars MI, and Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine* 1997;6(3):301-307.
2. Yee GM, and Kennedy TG. Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mediating the effect of prostaglandin E2 on decidualization in vitro. *Biol Reprod* (1991);45(1):163-171.
3. Pae E. The role of uterine inflammation in the inhibition of decidualization by intraluminal antihistamines. *Biol Reprod* (1969);1(3):258-263.
4. Feyles V and Kennedy TG. Inhibitory effect of the intrauterine infusion of phorbol 12-myristate 13-acetate and 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol on the decidual cell reaction in rats. *Biol Reprod* (1987);37(1):96-1041.
5. Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308: 693-698.
6. Berridge, M.J. (1987) Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.*, 56:159-193.
7. Ganong, B.R., Loomis, C.R., Hannun, Y. A., and Bell, R.M. (1986) Specificity and mechanism of protein kinase C activation by sn-1,2-diacylglycerols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 1184-1188.
8. Rozengurt, E. (1989) Signal transduction pathways in mitogenesis. *Brit. Med. Bull.*, 45: 515-528.
9. Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*, 334: 661-665.
10. Liu, J.Y., Shyu, J.C., Chang, C.L., Tsai, C.C., Chang, A.C., Yang, L.C., Lin, L.Y., and Hsieh, Y.S. (1998) Protein kinase C isoforms during the development of deciduomata in pseudopregnant rats. *Life*

- sci.(submit)
11. Shyu, J.C., Hsieh, Y.S., Chang, C.L., Tsai, C.C., Liu, H.C., Chang, A.C., Yang, L.C., Lin, L.Y., and Liu, J.Y. (1998) Protein kinase C isoforms during the development of deciduomata in pregnant rats.(review)
 12. Linda R., Suzanne A., and Bruce B. An in vitro system for the study of matrix metalloproteases during decidualization in the mouse. (1996) *Biochem. Cell Biol.* 74:911-919.
 13. Tang, B., Guller, S., and Gurdip, E. Mechanism of human endometrial stromal cell decidualization. *Annals New York Academy of Sciences.* 19-25.
 14. Duan, C., and Clemmons, David R. (1998) Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 273:16836-16842.
 15. Tranque, P.A., Calle, R., Naftolin, F., and Robbins, R. (1992) Involvement of protein kinase-C in the mitogenic effect of insulin-like growth factor-I on rat astrocytes. *Endocrinology* 131:1948-1954.
 16. Zini, N., Martelli, A.M., Neri, L.M., Bavelloni, A., Sabatelli, P., Santi, S., and Maraldi, N.M. (1995) Immunocytochemical evaluation of protein kinase C translocation to the inner nuclear matrix in 3T3 mouse fibroblasts after IGF-I treatment. *Histochem. Cell Biol.* 103:447-457.
 17. Neri, L.M., Billi, A.M., Manozoli, L., Rubbini, S., Gilmour, R.S., Cocco, L., and Martelli, A.M. (1994) Selective nuclear translocation of protein kinase C alpha in Swiss 3T3 cells treated with IGF-I, PDGF and EGF. *FEBS Lett.* 347:63-68.
 18. Li, W., Jiang, Y.X., Zhang, J., Soon, L., Flechner, L., Kapoor, V., Pierce, J.H. and Wang, L.H. (1998) Protein kinase C-delta is an important signaling molecule in insulin-like growth factor I receptor-mediated cell transformation. *Mol. Cell Biol.* 18:5888-5898.
 19. Liu, Q., Ning, W., Dantzer, R., Freund, G.G., and Kelley, K.W. (1998) Activation of protein kinase C-zeta and phosphatidylinositol 3'-kinase and promotion of macrophage differentiation by insulin-like growth factor-I. *J. Immunol.* 160:1393-1401.
 20. 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.