

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 *
* : 腫瘤促進因子 ODC 干擾免疫吞噬之研究 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生： 邱冠穎
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-023-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 劉光耀

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學系

中華民國 99年03月31日

目錄

英文摘要	1
前言	2
研究目的及方向	5
材料與方法	6
結果	11
討論	13
參考文獻	15
圖與表	20

Abstract

Ornithine decarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17), the first and rate-limiting enzyme of polyamine synthesis pathway, has been known as a marker of carcinogenesis and tumor progression. At the early stage of oncogenesis, cancer cells acquire capabilities of self-sufficiency in growth signals, insensitivity to anti-growth signals, overriding apoptosis, limitless replicative potential, sustained angiogenesis, tissue invasion and metastasis, as well as evasion from the immunosurveillance. The phagocyte systems consisting of neutrophils, monocytes, macrophages and dendritic cells derived from myeloid progenitor cells in the bone marrow perform the critical roles in innate and adaptive immunity. These cells display a functional diversity, allowing them to execute multiple defense mechanisms. They can recognize, attack and eliminate pathogens and tumor antigens by phagocytosis. Human acute promyelocytic leukemia cell line HL-60 is a cancer cell itself and has the potential to differentiate into a neutrophil-like cell through appropriate activation *in vitro*. Hence, the HL-60 cell line is the well-known model in understanding the mechanisms by which cancer cells escape and suppress the immune system. The preliminary reports of Professor Liu's lab show that ODC provokes proliferation, interferes with differentiation and prevents death in cancer cells, yet the molecular mechanisms involved are still unclear. Here, I focus on the role ODC plays in the differentiation, activation and immunosurveillance capacity of the HL-60 cells. After induction of differentiation with dimethyl-sulfoxide (DMSO), neutrophil-like cells express CD11b, a well-known marker of neutrophil, in mRNA and/or protein level. CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) and PU.1, essential transcription factors for leukocytes, may be functionally affected by ODC. The specific aim of the study is to comprehend preliminarily the molecular mechanisms and signaling pathways regulated by ODC in human acute promyelocytic leukemia cells.

前言

關於身體抵抗外來病原體或清除自身癌化組織的能力，先天性免疫反應（Innate immunity）與適應性免疫反應（Adaptive immunity）孰輕孰重，一直是免疫學家爭論不休的議題。支持適應性免疫反應較重要的學者認為，適應性免疫反應具備高度專一性，能夠更有效率地執行防禦作用。但愈來愈多證據顯示先天性免疫反應與適應性免疫反應是相輔相成的，缺一不可。甚至有人認為，先天性免疫反應提供身體迅速清除有害物質的能力，避免產生更嚴重的傷害。

先天性免疫反應的作用機制包含發炎反應、補體系統（Complement system）和吞噬細胞體系等。吞噬細胞體系包括嗜中性球（Neutrophil）、單核球（Monocyte）、巨噬細胞（Macrophage）及樹突細胞（Dendritic cell），均在先天性免疫與適應性免疫反應扮演關鍵角色（Hume *et al.*, 2002; Medzhitov & Janeway, 2000）。造血性細胞分化為骨髓性先驅細胞，爾後經過一連串型態和功能上的分化過程才形成嗜中性球與單核球。單核球可再進一步分化，組成巨噬細胞和樹突細胞群。在整個分化過程的不同階段，這些細胞由特定的轉錄因子調控而表現特定基因。此類轉錄因子包含CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) 家族，旗下的四個成員：C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 與C/EBP ϵ 於骨髓性先驅細胞表現，在細胞的分化與成熟過程中分別扮演不同角色（Clarke and Gordon, 1998; Tenen *et al.*, 1997）。C/EBP α 的表現對於顆粒性白血球的分化是不可或缺的（Zhang *et al.*, 1997）；而C/EBP β 和C/EBP δ 的功能則主要在於發炎反應時，調控巨噬細胞的細胞素基因表現（Hu *et al.*, 1998）。C/EBP ϵ 的功能首先被發現與C/EBP α 相關（Williams *et al.*, 1991），且不表現在未分化的造血性先驅細胞，反而是成熟的嗜中性球與巨噬細胞有大量表現的情形（Morosetti *et al.*, 1997）。此外，也有研究報告指出一些急性骨髓性白血病（Acute myeloid leukemia, AML）患者的轉錄因子*PU.1*存在著基因突變（Mueller *et al.*, 2002）。以放射線誘發小鼠急性骨髓性白血病後，*PU.1*的基因缺失或突變是其罹病主因（Suraweera *et al.*, 2005）。

吞噬細胞系統的功能具多樣性，以展現多種不同的防禦機制。舉凡抗原辨識、攻擊並行吞噬作用以清除病原體或凋亡細胞（Apoptotic cells）與活化抗原特異性T細胞相

關的免疫反應。巨噬細胞是最常被拿來研究的吞噬細胞，它的細胞膜表面具有特殊分子，可部署作為結合並攝取凋亡細胞之用。這些膜表面分子包含CD14、Phosphatidylserine receptor (PSR)、Integrin $\alpha\beta3$ 、CD36、Scavenger receptor class A (SRA)、ATP-binding cassette transporter (ABC-1)、Receptor tyrosine kinase (MER) 和 α -2-Macroglobulin receptor (CD91)。其他中介因子如Thrombospondin、C1q、C reactive protein、Collectins和Calreticulin可調理 (Opsonise) 凋亡細胞，或作為巨噬細胞與凋亡細胞膜表面之間的連結橋樑。舉例來說，一般認為CD14是巨噬細胞在吞噬革蘭氏陰性 (Gram-negative) 細菌或凋亡細胞時所需的表面蛋白分子。CD14是一種接合糖化磷脂酰肌醇 (Glycosyl phosphatidylinositol) 的膜蛋白，表現在單核球與巨噬細胞上，藉由結合Lipopolysaccharide (LPS) 或LPS-binding protein complex，表現其促發炎反應功能 (Pro-inflammatory function)。在CD14與細菌成分結合後，便啟動與Toll-like receptors (TLRs) 4和2相關的訊息傳遞路徑 (Stuart and Ezekowitz, 2005)。

儘管嗜中性球與巨噬細胞共同擁有一些細胞膜表面蛋白，例如CD14和調理素受器 (FcR-I、FcR-II、FcR-III、C3b)，但真正讓嗜中性球執行其免疫功能的成分卻與巨噬細胞大相逕庭。嗜中性球表面具有 β_2 插入素 (β_2 -integrin) CD11/CD18，是一種細胞黏附蛋白，當局部組織感染發炎時，會與血管內皮細胞所表現的ICAM-1結合，並藉由血球滲出作用 (Diapedesis) 穿出血管壁，到達組織間隙進行其殺菌功能。 β_2 插入素家族成員對於嗜中性球的功能是不可或缺的，除了前述作為黏附蛋白之外，它還與後續的吞噬作用相關，因此可視作骨髓性先驅細胞分化後，並活化成為功能性嗜中性球的分子標誌。若人類CD18基因缺損，將導致嗜中性球無法被發炎訊息招攬至感染部位，造成重複性的細菌感染。這種疾病稱作第一型白血球黏力缺失症 (Leukocyte adhesion deficiency type I, LAD I)。儘管是罕見疾病，LAD I卻提供了免疫學家研究CD11/CD18參與嗜中性球分化及活化過程的分子機制之重要依據。(Schymeinsky *et al.*, 2007)

鳥胺酸去羧化酶 (Ornithine decarboxylase; ODC; EC 4.1.1.17) 為多胺生物合成途徑中起始與速率決定步驟之酵素。多胺類包括腐胺 (Putrescine)、亞精胺 (Spermidine) 及精胺 (Spermine)。在後轉譯階段 (Post-translational level) 細胞主要藉由一種稱為Antizyme (AZ) 的蛋白質家族控制其內部ODC的活性。Antizyme為調控ODC與多胺

平衡的主要因子 (Morris *et al.*, 1991; Pegg *et al.*, 1995; Shantz *et al.*, 1999)。ODC具有酵素活性的形式為同型雙體 (Homodimer)，AZ與ODC結合為異型雙體 (Heterodimer) 後不但抑制了ODC的活性，還促使ODC進入26S proteasome降解途徑。此途徑不需泛素 (Ubiquitin) 之參與。此外，AZ還抑制了多胺類的攝取，並刺激細胞排泄多胺。同樣地，AZ的功能也受到另一種抑制蛋白所調控，稱為Antizyme inhibitor (AZI) (Mangold and Leberer, 2005)。AZI與ODC享有同源區 (Homology)，但缺乏任何酵素活性。AZ與AZI結合的親和力高於AZ與ODC結合，因此當AZI出現時，AZI會緊密地抓住AZ，致使ODC脫離AZ的束縛而恢復其活性。

在細胞癌化過程的早期階段，有六個細胞內源性現象已被證實可作為指標，分別是：(一) 提供癌細胞自身的生長訊號；(二) 忽略抑制生長的訊息；(三) 避免細胞死亡；(四) 無限制複製；(五) 持續性的血管新生作用 (Angiogenesis)；(六) 可穿過基底膜 (Basement membrane) 和微血管壁而侵入組織。近期研究指出，癌細胞從免疫系統監控中逃脫的現象可作為細胞癌化的第七項特徵 (Zitvogel *et al.*, 2006)。因此，治療癌症必須同時由癌細胞生成的細胞內源性與外源性機制著手。

有研究指出，細胞接受癌化刺激後，ODC的活性提高 (Shantz and Levin, 2007)。但若抑制ODC的活性，則可防止細胞轉型，並減緩腫瘤的增生現象 (Auvinen *et al.*, 1992; O'Brien, 1976)。由此可知，抑制細胞內ODC的過量表現應是壓制腫瘤生成的方法之一。本實驗室先前的研究發現，ODC會防止外在性刺激如腫瘤壞死因子- α (TNF- α) 及內在性刺激如抗腫瘤藥物Methotrexate所導致的細胞凋亡 (Huang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005)。在所有腫瘤和非惡性直腸瘻瘤 (Nonmalignant colon polyposis) 患者的腦脊液與血液中，多胺類和ODC的濃度明顯較高 (Linsalata *et al.*, 1999)。多胺類可抑制多核性白血球聚集在病灶處 (Walters *et al.*, 1995)，並減弱單核球的吞噬作用 (Linsalata *et al.*, 1999)。多胺的堆積亦會遏制巨噬細胞而影響先天性免疫反應 (Bussiere *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1999)。Bowlin等人於1990年發表的活體實驗中顯示，DFMO和 α -Fluoromethyldehydroornithinemethyl ester作為ODC抑制劑，可增強巨噬細胞毒殺腫瘤細胞的活性。本實驗室先前的研究顯示，TPA誘發的巨噬細胞分化過程中，過度表現ODC會壓制細胞吞噬作用。此外，Putrescine可直接參與降低老鼠巨噬

細胞株RAW264.7吞噬作用的機制 (Liao *et al.*, 2008)。然而，ODC在調控嗜中性球執行其免疫功能上所扮演的角色尚待釐清。

研究目的及方向

利用本實驗室先前所建立的二個細胞株：Dominant-negative ODC (mutant ODC, mtODC) 與 Overexpressing ODC (wild-type ODC, WT-ODC)，探討 ODC 作為細胞的早期表現蛋白，如何影響人類急性原骨髓性白血病細胞 (Human acute promyelocytic leukemia cell, HL-60) 在體外的基因表達與細胞分化、活化能力，並從轉錄、轉錄後與轉譯作用等層級，試著釐清在 ODC 下游的細胞分化與活化之分子機制。研究方向有以下幾點：(I) 以免疫點墨法 (Immunoblotting) 與 ODC 酵素活性測定法 (Enzyme activity assay) 分析在骨髓性細胞分化過程中，ODC 的表現與活性之變化情形；(II) 利用 RT-PCR 與免疫點墨法分別分析 ODC 對骨髓性細胞分化過程中，CD14 與 CD11b 等分化標誌的 mRNA 及蛋白質表現變化之影響；(III) 以螢光顯微鏡或流式細胞儀分析 ODC 對於嗜中性球吞噬細菌或凋亡細胞之影響；(IV) 設計 CD11b 啟動子序列 PCR 引子對，目標序列同時包含 C/EBPs 與 PU.1 之結合位，放大目標序列後純化，進行 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 及 Luciferase reporter assay 以檢測 C/EBPs 與 PU.1 對 CD11b 基因轉錄的啟動活性。

材料與方法

Cell culture

The human promyelocytic leukemia HL-60 cell line was grown in suspension culture of RPMI 1640 medium and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at a temperature of 37 °C in a humidified and 5% CO₂ atmosphere. The cells were incubated with 1.25% dimethyl sulfoxide (DMSO) to induce the neutrophil differentiation.

Construction of ODC-expressing cell lines

The ODC-expressing plasmid was constructed by inserting the *Bam*HI-*Eco*RI 1,415 bp coding region fragment into the *p*CMV-Tag vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA). By means of the calcium phosphate-mediated method, parental cells were transfected with WT-ODC and m-ODC plasmids as the ODC-overexpressed model and the nonsense mutant one by frame-shift, respectively. Stably transfected cells were selected with the antibiotic G418 in the concentration of 400 µg/ml. After three weeks, G418-resistant clones were isolated and analyzed individually for ODC expression. The individual clones were examined for ODC expression by RT-PCR, immunoblotting and the enzyme activity assay.

Liu's staining

Liu's staining is to monitor the extent of cellular differentiation. Cells were cytospun onto ethanol-cleaned glass slides, added with Liu's A buffer (2.8 mM Eosin Y and 1.3 mM methylene blue in 100% methanol) at room temperature for 30 seconds and mixed with Liu's B buffer (91.8 mM KH₂PO₄, 27.5 mM Na₂PO₄ and 3.7 mM methylene blue) at room temperature for 90 seconds according to the manufacturer's instructions (ASK Biotech, Taiwan).

Cell viability

Cell numbers were counted by means of the trypan blue exclusion assay. The extent of cell viability was calculated by viable cell numbers of the experimental groups in comparison with those of the untreated control groups.

DNA fragmentation analysis

Cells (5×10^6) were harvested in PBS and lysed overnight in a digestion buffer (0.5% sarkosyl, 0.5 mg/ml proteinase K, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 10 mM EDTA) at 55°C. Subsequently, cells were treated with 0.5 μ g/ml RNase A for 2 hours. The genomic DNA was extracted by phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction and analyzed by gel electrophoresis in 2% agarose at 50 volts for 30 min. Approximately 20 μ g of genomic DNA was loaded in each well, visualized under ultraviolet (UV) light and photographed.

Apoptotic assay by flow cytometry

For apoptotic sub-G1 analysis, 1×10^6 cells were harvested and washed with PBS, resuspended in 0.2 ml of PBS and fixed in 0.8 ml of ice-cold 99% ethanol at -20°C overnight. The cell pellets were collected by centrifugation, resuspended in 1 ml of hypotonic buffer (0.5% Triton X-100 in PBS and 0.5 μ g/ml RNase A), and incubated at 37°C for 30 minutes. 1 mL of Propidium iodide (PI) solution (50 μ g/ml) was added and the mixture was allowed to stand on ice for 30 minutes. The nuclei were analyzed in the FACSCAN laser flow cytometer (Becton Dickenson, San Jose, CA).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from 1×10^6 cells by Trizol (MDBio, Taiwan) according to the manufacturer's instructions. Synthesis of cDNA was performed by using mRNA templates, reverse transcriptase and 500 ng of random primers. The reaction mixture was incubated at 42°C for 90 minutes. For PCR assay, cDNA was added to 40 μ L buffer mixture containing 75 mM Tris-Cl (pH 8.8), 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Tween-20, 1 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs, 0.5 μ M forward and reverse primers, and 1 U *Taq* DNA polymerase (MDBio). PCR was set at the condition of 2 minutes at 95 °C, 36 cycles (30 seconds, 95°C; 30 seconds, 48–60°C; 90 seconds, 72°C) and 10 minutes at 72°C by a Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), and products were analyzed in a 2% agarose gel. The following primer pairs were used:

Genes	Length of the PCR product (bps)	Primer sequences (Forward/Reverse)
<i>β-Actin</i>	309	5'-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3' 5'-CAGGGTACATGGTGGTGC-3'
<i>C/EBPα</i>	255	5'-AAGGTGCTGGAGCTGACCAG-3' 5'-AATCTCCTAGTCCTGGCTCG-3'
<i>C/EBPβ</i>	195	5'-ACAGCGACGAGTACAAGATCC-3' 5'-GCAGCTGCTTGAACAAGTTCC-3'
<i>C/EBPδ</i>	262	5'-ACATAGGAGCGCAAAGAAGC-3' 5'-GCTTTATTCTTACAAATACTG-3'
<i>C/EBPϵ</i>	305	5'-AGTCTGGGGAAGAGCAGCTTC-3' 5'-ACAGTGTGCCACTTGGTACTG-3'
PU.1	334	5'-ATGTGCCTCCAGTACCCATC-3' 5'-TCTTCTGGTAGGTCATCTTC-3'
CD11b	570	5'-ATGGCTCTCAGAGTCCTTCTGTAA-3' 5'-CATCAAAGAGAACAAGGTTTTGGAC-3'

Immunoblotting

To purify total cellular proteins, cells were harvested and lysed in Gold lysis buffer (10% v/v glycerol, 1% v/v Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 1mM sodium pyrophosphate, 20 mM Tris, pH 7.9, 100 μ M β -glycerophosphate, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin and 10 μ g/ml leupeptin), homogenized and centrifuged. The supernatant was boiled in loading buffer and an aliquot of 100 μ g proteins was resolved by SDS-PAGE. After transferred to PVDF membranes in 800 mA at 4 °C for 3 hours, the membranes were blocked with 5% non-fat milk for 2 hours and then incubated with anti-CD14 and anti- β -actin antibodies (Santa Cruz) for 24 hours. Washed with the buffer containing 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 0.1% Tween20 (v/v), the membranes were incubated with secondary antibodies labeled with horseradish-peroxidase at room temperature for 2 hours. The antigen–antibody complexes were visualized by the enhanced chemiluminescence (Perkin-Elmer).

Genomic DNA extraction

Collect cultured cells in a dry pellet in the 1.5 mL eppendorf. Resuspend the cell pellet in 200 μ L nuclei lysis buffer (0.2 M Tris-Cl, pH 8.0, 0.3 M NaCl, and 20 mM EDTA). Freeze and thaw the sample for 3 repeats. Mix the solution gently and thoroughly. Add 10 μ L 20% SDS and 10 μ L Proteinase K (stock prepared in 10 mg/mL) to the sample and incubate it at 55°C overnight. Add 80 μ L of 6N NaCl and vortex to mix well for one minute. Centrifuge the sample at 14,000 rpm for 10 minutes. Transfer the supernatant into a new eppendorf and add 500 μ L of 95% ethanol. Gently mix the sample, use the hooked glass stick to pick up the filose DNA and transfer it to a new eppendorf containing 50 μ L sterile and distilled H₂O. Continue inverting the eppendorf at 4°C for 24 hours to dissolve DNA.

Primer design

The pair of primers is designed according to the sequence of ITGAM integrin α M isoform 2 precursor on chromosome 16p11.2 in *Homo sapiens* from the NCBI database *Gene*. The original sequence is 91,157 bps in length, with 31 exons. Blasting with 450 bps upstream of the start codon, I focus on the proximal region of CD11b promoter in 9,300 bps. (Moeenrezakhanlou *et al.*, 2008) The PU.1 consensus binding site 5'-CTGCCTCCTACTTCTCCTTTTCTGC-3' (F. Brugnoli *et al.*, 2009) and C/EBP consensus binding site 5'-TGCTGCAAT-3' (Hashimoto *et al.*, 2006) are both included in the target sequence of CD11b promoter. The PU.1- and C/EBP-binding sites are on -35/-11 and -1832/-1823 upstream of the start site of *CD11b* gene, respectively. Forward primer: 5'-TCACATTGGCGGTACATAA-3'; Reverse primer: 5'- AAAGCAAAGAAGGGCAGAA-3'. The length of target sequence is 1,923 bps, with one proximal PU.1-binding site and one distal C/EBP-binding site theoretically. The very proximal end of the target sequence also includes three nucleotides extensively downstream of the start site to ensure that the PU.1-binding site will not be excluded.

Statistical analysis

Data shown represent means \pm standard deviation (S.D.). Statistical analyses for detection of significant differences between the control and experimental groups were carried out using Student's *t*-test.

結果

根據我所屬實驗室先前建立的 HL-60 細胞分化實驗結果，過度表現 ODC 會壓抑 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 所誘發的類巨噬細胞分化作用 (圖一)。在類巨噬細胞分化的過程中，藉由抑制 TNF- α 居間調控的 NF- κ B 活化路徑，ODC 會阻斷 Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 的基因表現。過度表現 ODC 並配合加入 TPA 前處理，則會減弱細胞黏附能力，降低類巨噬細胞型態的產生，減少 CD14 表現量，並削弱 MMP-9 的蛋白表現與分泌量，及其酵素活性。更甚者，以 TPA 處理後的轉染野生型 ODC 細胞株，若使用 ODC 不可逆的抑制劑 D,L- α -difluoromethylornithine (DFMO) 抑制 ODC 活性並加入外生性 TNF- α 則會重新活化 MMP-9 (Liao *et al.*, 2008)。

我們已了解過度表現 ODC 能夠干擾類巨噬細胞分化，然而 ODC 對於 HL-60 細胞株分化為類嗜中性球的機制仍未臻清晰，因此吾等初步以 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 刺激 HL-60 細胞株分化成類嗜中性球。在光學顯微鏡下觀察發現，ODC 能減低或減緩 DMSO 所誘導的細胞分化後之細胞凋亡現象 (圖二)。細胞計數的結果顯示，儘管細胞數量仍減少，以 DMSO 處理後的野生型 ODC 細胞株仍保有相對較多的細胞數，而以 1 μ M 維生素 A (Retinoic acid, RA) 處理後，三株細胞數量均大幅減少，表示 ODC 並不能干擾 RA 所誘發的細胞分化途徑 (圖三)。在細胞處理 DMSO 後的第一天，轉染野生型 ODC 細胞株與其他二種細胞株開始有數量上的顯著差異，隨著時間增加，差距漸漸增大 (圖四)。由於分化後細胞會走向死亡，首先比較其對有無轉染 ODC 基因的細胞株之細胞凋亡情形，發現不論是利用 DNA 片段化鑑定或流式細胞儀分析，ODC 確實可減低細胞凋亡之比率，分化後第二天減低了約 24%，第四天則減低了將近 50% (圖五與圖六)。由上述實驗結果可知，在以 DMSO 作為分化誘導劑的模式中，ODC 的表現確實影響著骨髓性先驅細胞分化與細胞凋亡的進程。

我們已知 ODC 在轉染野生型細胞株生長的極早期便大量表現，因為其高量表現時間點的特殊性，我們推論 ODC 作為上游因子，可能影響細胞內早期或較晚期表達的基因，包括一些廣泛且重要的轉錄因子，進而調控特定基因的表現。C/EBP 家族和

PU.1 是免疫吞噬細胞內的轉錄因子，PU.1 可導引造血幹細胞分化為淋巴與骨髓性前驅細胞 (Lymphoid-myeloid progenitor, LMP)，並與 GATA-binding protein 1 一起作用於抑制造血細胞分化為巨核細胞與紅血球前驅細胞的過程。C/EBP α 接著導引 LMP 分化為顆粒性白球與單核球前驅細胞，同時抑制淋巴細胞的分化 (Friedman, 2007)。經過 DMSO 誘導分化後，我們以 RT-PCR 檢測 HL-60、轉染突變型 ODC 和轉染野生型 ODC 三株細胞的全細胞 mRNA，比較 C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、C/EBP ϵ 和 PU.1 的表現情形 (圖七)。我們發現 C/EBP δ 和 C/EBP ϵ 分別在此三株細胞的表現情形差異甚小，在剛開始加入 DMSO 時即有 mRNA 存在。C/EBP β 的 mRNA 表現量低於其他四種轉錄因子，轉染野生型 ODC 細胞株在誘導分化後 12 小時才有 C/EBP β 的 mRNA 訊號，相對於 HL-60 和突變型 ODC 細胞株，表現量仍較低，且 48 小時後幾乎沒有訊號。類似的情形也出現在 C/EBP α ，不過 C/EBP α 表現量高於 C/EBP β 。另外，雖然轉染野生型 ODC 細胞株在誘導分化起始時就已表現 PU.1 的 mRNA，但隨著時間增加至 48 小時，相對應於各偵測點，其表現量皆明顯低於 HL-60 與突變型 ODC 細胞株。ODC 對於 C/EBP α 、C/EBP β 和 PU.1 的基因表達，可能有某種程度上的影響。

本實驗室先前的研究指出，以 TPA 誘發 HL-60 朝向類巨噬細胞分化，CD14 可作為其分化標誌。我們在以 DMSO 誘導分化的模式下，使用免疫點墨法檢測 HL-60、轉染突變型 ODC 和轉染野生型 ODC 三株細胞的 CD14 表現情形 (圖八)。CD14 在這三株細胞的表現情形幾乎一致。即使缺乏 DMSO 的誘導，仍有幾乎等量的表現。然而，CD14 雖是單核球與顆粒球共同表現的膜表面蛋白，卻不是嗜中性球最佳的分化標誌。因此我們首先使用免疫螢光染色法檢測在分化後 24 小時，轉染突變型 ODC 和轉染野生型 ODC 細胞株的 CD11b 表現情形 (圖九)。轉染突變型 ODC 細胞株在經過誘導分化後，有較明顯的 CD11b 訊號產生；而儘管仍有微量表現，轉染野生型 ODC 細胞株的 CD11b 表現量則明顯低於前者。接著我們使用 RT-PCR 偵測 CD11b mRNA 的表現情形 (圖十)。在誘導分化後 12 小時，轉染突變型 ODC 細胞株有訊號產生 (570 bps)，而轉染野生型 ODC 細胞株的訊號則相對較弱。誘導分化後 24 與 48 小時均不見 CD11b mRNA 訊號。

CD11b 基因包含啟動子 (Promoter)、5'端無轉譯序列 (5'-untranslated sequence) 及起始密碼子之後的基因序列 (圖十一)。以人類第 16 對染色體短臂 (*p*-arm) 11.2 位置上的 CD11b isoform 2 precursor 序列為例，理論上其啟動子的近端-35/-11 bp 處有一個 PU.1 結合位，較遠端-1832/-1823 bp 則有一個 C/EBP 結合位。為了得到這段 CD11b 基因啟動子上的特殊序列，我設計一對 PCR 引子：目標序列的近端包含部分 5'端無轉譯序列；遠端則全部包含 C/EBP 結合位，引子的尾端與此結合位仍有約 200 bps 之距離。設計目的在於確保 PU.1 和 C/EBP 結合位全部都包括在 PCR 放大後的序列上，兩者相距夠遠，且沒有第三個結合位。以 PCR 檢測 HL-60、轉染突變型 ODC 和轉染野生型 ODC 三株細胞基因體 DNA 的目標序列，黏合溫度 (Annealing temperature) 設定在 47°C (圖十二)。僅轉染突變型 ODC 有目標序列 (1,923 bps) 訊號，但包括轉染突變型 ODC，所有組別都出現非特異性序列 (Non-specific sequences)，因此調整黏合溫度為 48°C，並提高 Mg²⁺ 濃度至 3 mM (前項實驗為常用之濃度 1 mM)。結果發現其中三組有目標序列大小的訊號，但仍有出現非特異性序列 (圖十三)。

討論

由實驗可知，ODC 對於 HL-60 細胞接受 DMSO 誘導分化的影響，是抑制性的，包括延緩細胞分化為類嗜中性球及抑制細胞分化後的凋亡現象。我所處的實驗室亦發現 DMSO 誘導轉染突變型 ODC 之細胞分化後，除了細胞型態類似嗜中性球之外，若加入 TPA 活化細胞並給予螢光標定之細菌，可看見將近 15% 的細胞進行吞噬作用，而轉染野生型 ODC 細胞株則不到 5%。細胞釋放氧化性顆粒 (Oxidative burst) 的實驗亦符合具有吞噬作用的細胞比例。因此我們推論，轉染野生型 ODC 細胞株維持細胞增殖能力、保有癌細胞特性的原因之一在於其大量表現之 ODC。轉染野生型 ODC 之細胞，在細胞增殖分裂後的生長階段早期即大量表現，並維持一段時間。細胞內高濃度的 ODC 給細胞帶來的影響，應是非常快速的，且可能影響著其他一些早期表現的基因。

分化後的嗜中性球，細胞膜表面具有 CD11b，其與 CD18 形成異型雙體 (Heterodimer)，功能在使細胞趨向發炎部位。目前我們使用免疫螢光染色法和 RT-PCR 證明 ODC 影響誘導分化後 CD11b 的表現。值得注意的是，CD11b mRNA 在誘導分化後 12 小時即有表現，但隨即在 24 小時後消失；雖然尚無證據顯示 CD11b protein 在何時開始表現，但其 mRNA 出現時間短暫的特性，或可反映免疫螢光染色結果，CD11b 訊號不夠強。作為一個適當的嗜中性球分化標誌，CD11b 的表現情形應是可預期的，並且訊號應該強而持續。重現這項實驗並予以修正實驗步驟內容是接下來必須完成的工作。

ODC 的高量表現影響 C/EBP α 、C/EBP β 和 PU.1 的基因表達。C/EBP α 和 PU.1 與白血病形成 (Leukogenesis) 的轉錄調控有關 (Kirstetter *et al.*, 2008; Pabst T and Mueller BU, 2007)，C/EBP β 可導致細胞週期停止 (Sebastian T and Johnson PF, 2006)。Myeloid differentiation factor 2 (MD-2) 的基因表現需要 C/EBP β 和 PU.1 共同作用在其啟動子上 (Tissières *et al.*, 2009)，而 MD-2 對革蘭氏陰性菌脂多醣體 (Lipopolysaccharide, LPS) 具有高度親和力，在 Toll-like receptor 4 相關的訊息傳遞路徑是不可或缺的。因為 C/EBPs 和 PU.1 密不可分的關係，在設計 CD11b 啟動子的 PCR 引子對時，便同時考慮兩者的結合位。不論是設定黏合溫度 47 或 48°C，或合併提高 Mg²⁺ 濃度，都尚未獲得有效放大的片段。獲得 CD11b 啟動子部分序列的用意在接下來的實驗，我們試著證明 C/EBPs 和 PU.1 可結合在 CD11b 啟動子，並且具有轉錄活性。分別使用 Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) 和 Luciferase reporter assay 來證明 C/EBPs 和 PU.1 對於 CD11b 的轉錄活性。

ODC 原本的功能是參與多胺類合成，可穩定細胞生長與促進細胞分裂。一但過量表現，則可能導致細胞癌化。我們以人類急性原骨髓性白血病細胞 HL-60 作為實驗模式，利用分化前後的基因表現順序，試著釐清從 DMSO 誘導分化以降的細胞內訊息傳遞路徑 (圖十四)。HL-60 本身即為癌細胞，卻保有分化為吞噬細胞的潛力，而愈來愈多研究指出吞噬細胞也與腫瘤免疫有關。設計實驗釐清 ODC 在吞噬細胞分化、活化的角色是必須延續下去的工作。

参考文献

- Auvinen M, Paasinen A, Andersson LC, Holta E (1992): Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* **360**:355-8.
- Bowlin TL, Hooper BJ, Rosenberger AL, Davis GF, Sunkara PS (1990): Effects of three irreversible inhibitors of ornithine decarboxylase on macrophage-mediated tumoricidal activity and antitumor activity in B16F1 tumor-bearing mice. *Cancer Res* **50**:4510-4.
- Brugnoli F, Lambertini E, Varin-Blank N, Piva R, Marchisio M, Grassilli S, Miscia S, Capitani S, Bertagnolo V (2010): Vav1 and PU.1 are recruited to the CD11b promoter in APL-derived promyelocytes: role of Vav1 in modulating PU.1-containing complexes during ATRA-induced differentiation. *Exp Cell Res*. **316**(1):38-47.
- Bussiere FI, Chaturvedi R, Cheng Y, Gobert AP, Asim M, Blumberg DR, Xu H, Kim PY, Hacker A, Casero RA, Jr., Wilson KT (2005): Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. *J Biol Chem* **280**:2409-12.
- Clarke S, Gordon S (1998): Myeloid-specific gene expression. *J Leukoc Biol* **63**:153-68.
- Friedman AD (2007): Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* **26**(47):6816-28.
- Hashimoto K, Sonoda Y, Yamakado M, Funakoshi-Tago M, Yoshida N, Rokudai A, Aizu-Yokota E, Kasahara T (2006): C/EBPalpha inactivation in FAK-overexpressed HL-60 cells impairs cell differentiation. *Cell Signal*. **18**(7):955-63.

- Hu HM, Baer M, Williams SC, Johnson PF, Schwartz RC (1998): Redundancy of C/EBP alpha, -beta, and -delta in supporting the lipopolysaccharide-induced transcription of IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol* **160**:2334-42.
- Huang CC, Hsu PC, Hung YC, Liao YF, Liu CC, Hour CT, Kao MC, Tsay GJ, Hung HC, Liu GY (2005): Ornithine decarboxylase prevents methotrexate-induced apoptosis by reducing intracellular reactive oxygen species production. *Apoptosis* **10**:895-907.
- Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T (2002): The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* **72**:621-7.
- Kirstetter P, Schuster MB, Bereshchenko O, Moore S, Dvinge H, Kurz E, Theilgaard-Mönch K, Månsson R, Pedersen TA, Pabst T, Schrock E, Porse BT, Jacobsen SE, Bertone P, Tenen DG, and Nerlov C (2008): Modeling of C/EBPalpha mutant acute myeloid leukemia reveals a common expression signature of committed myeloid leukemia-initiating cells. *Cancer Cell*. **13**(4):299-310.
- Liao YF, Hung HC, Hsu PC, Kao MC, Hour TC, Tsay GJ, Liu GY (2008): Ornithine decarboxylase interferes with macrophage-like differentiation and matrix metalloproteinase-9 expression by tumor necrosis factor alpha via NF-kappaB. *Leuk Res*. **32**(7):1124-40.
- Linsalata M, Amati L, Caradonna L, Caccavo D, Jirillo E, Di Leo A (1999): Relationship among red blood cell polyamine content, phagocytic activities and plasma endotoxins in untreated colorectal cancer patients. *Oncol Rep* **6**:1411-6.
- Liu GY, Hung YC, Hsu PC, Liao YF, Chang WH, Tsay GJ, Hung HC (2005): Ornithine decarboxylase prevents tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by decreasing intracellular reactive oxygen species. *Apoptosis* **10**:569-81.

- Mangold U, Leberer E (2005): Regulation of all members of the antizyme family by antizyme inhibitor. *Biochem J* **385**:21-8.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000): Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* **173**:89-97.
- Moeenrezakhanlou A, Shephard L, Lam L, Reiner NE (2008): Myeloid cell differentiation in response to calcitriol for expression CD11b and CD14 is regulated by myeloid zinc finger-1 protein downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol.* **84**(2):519-28.
- Morosetti R, Park DJ, Chumakov AM, Grillier I, Shiohara M, Gombart AF, Nakamaki T, Weinberg K, Koeffler HP (1997): A novel, myeloid transcription factor, C/EBP epsilon, is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. *Blood* **90**:2591-600.
- Mueller BU, Pabst T, Osato M, Asou N, Johansen LM, Minden MD *et al.* (2002): Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* **100**: 998–1007.
- O'Brien TG (1976): The induction of ornithine decarboxylase as an early, possibly obligatory, event in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* **36**:2644-53.
- Pabst T and Mueller BU (2007): Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. *Oncogene* **26**(47):6829-37.
- Schymeinsky J, Mócsai A, Walzog B (2007): Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb. Haemost.* **98** (2): 262–73.

- Sebastian T, Johnson PF (2006): Stop and go: anti-proliferative and mitogenic functions of the transcription factor C/EBPbeta. *Cell Cycle* **5**(9):953-7.
- Shantz LM, Levin VA (2007): Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential. *Amino Acids* **33**:213-23.
- Stuart LM, Ezekowitz RA (2005): Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* **22**:539-50.
- Suraweera N, Meijne E, Moody J, Carvajal-Carmona LG, Yoshida K, Pollard P (2005). Mutations of the PU.1 Ets domain are specifically associated with murine radiation-induced, but not human therapy-related, acute myeloid leukaemia. *Oncogene* **19**: 3678–3683.
- Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE (1997): Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**:489-519.
- Tissières P, Araud T, Ochoda A, Drifte G, Dunn-Siegrist I, Pugin J (2009): Cooperation between PU.1 and CAAT/enhancer-binding protein beta is necessary to induce the expression of the MD-2 gene. *J Biol Chem.* **284**(39):26261-72.
- Walters JD, Miller TJ, Cario AC, Beck FM, Marucha PT (1995): Polyamines found in gingival fluid inhibit chemotaxis by human polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. *J Periodontol* **66**:274-8.
- Williams SC, Cantwell CA, Johnson PF (1991): A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers *in vitro*. *Genes Dev* **5**:1553-67.

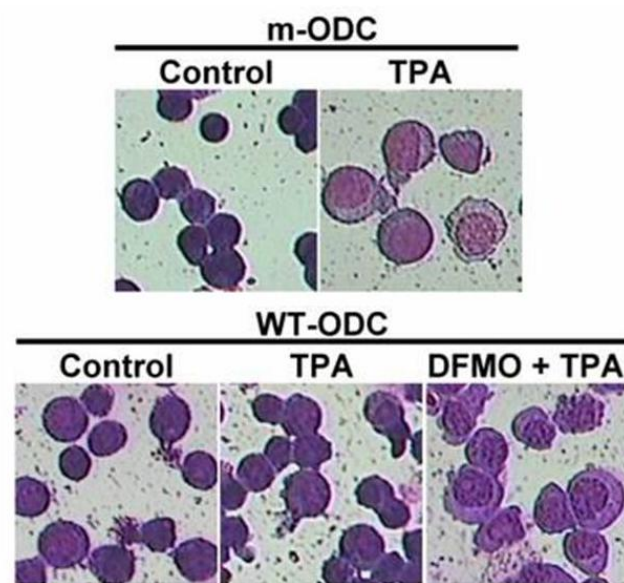
Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG (1997): Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:569-74.

Zhang M, Borovikova LV, Wang H, Metz C, Tracey KJ (1999): Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation. *Mol Med* **5**:595-605.

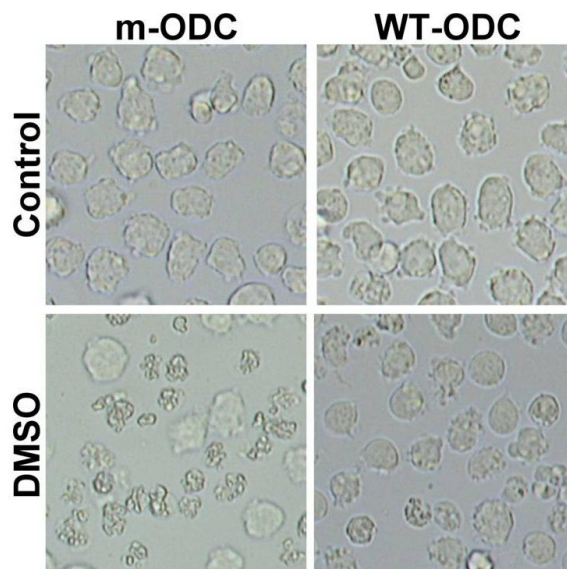
Zhang M, Wang H, Tracey KJ (2000): Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. *Crit Care Med* **28**:N60-6.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G (2006): Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* **6**:715-27.

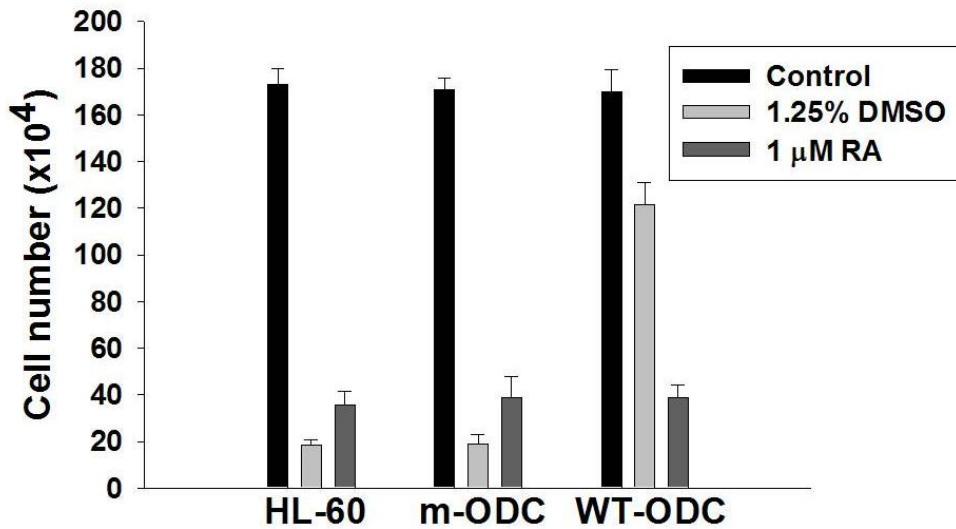
圖與表



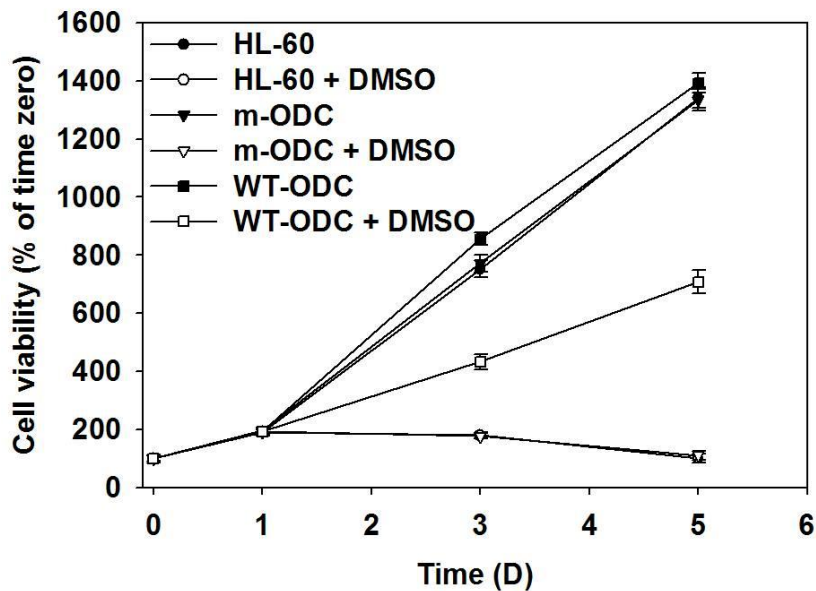
圖一、ODC 蛋白表現對於 TPA 所誘發血球分化作用之影響，DFMO 為 ODC 抑制劑。Liu's staining，光學顯微鏡。



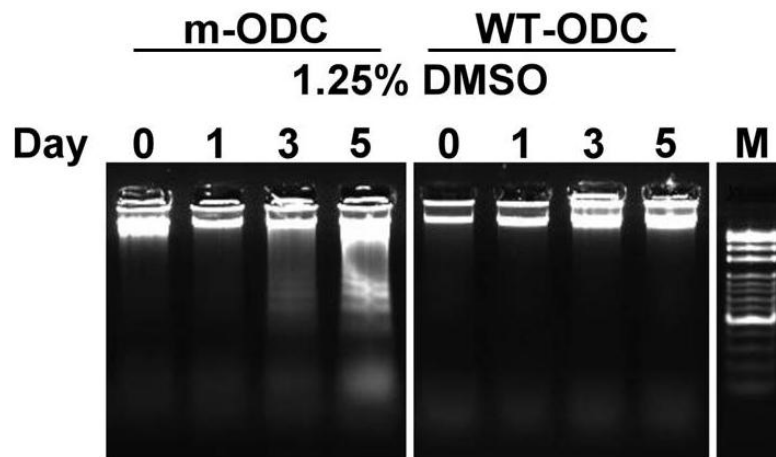
圖二、ODC 蛋白表現對於 1.25 % DMSO 所誘發血球分化作用之影響。m-ODC 指轉染突變型 ODC 細胞株，WT-ODC 則是轉染野生型 ODC 細胞株。相位差顯微鏡。



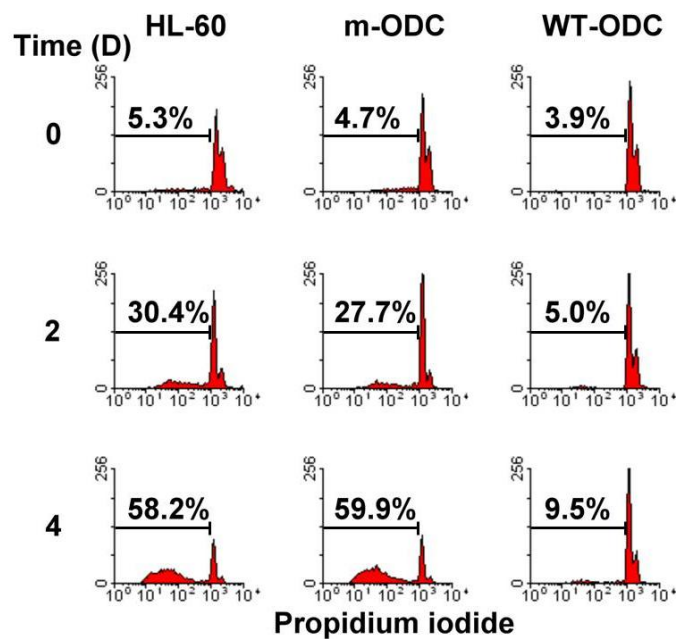
圖三、分別以 1.25% DMSO 與 1 μ M Retinoic acid 誘導細胞分化，比較三株細胞分化後細胞數量的變化。m-ODC 指轉染突變型 ODC 細胞株，WT-ODC 則是轉染野生型 ODC 細胞株。



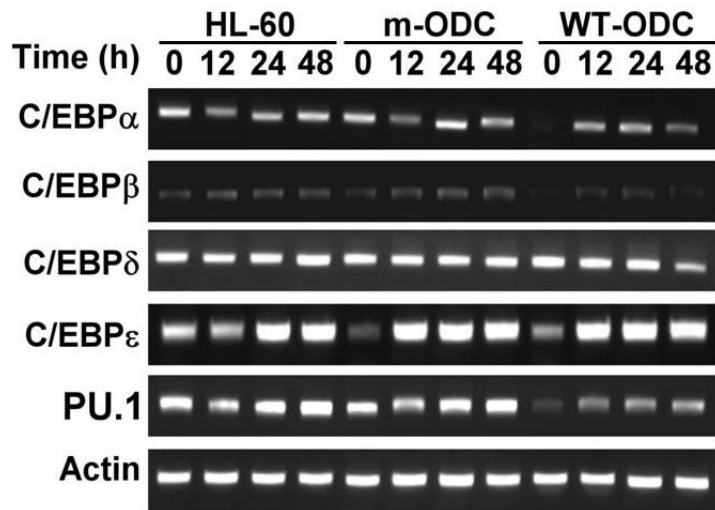
圖四、以 1.25% DMSO 誘導細胞分化，比較三株細胞分化後細胞存活數量的變化。m-ODC 指轉染突變型 ODC 細胞株，WT-ODC 則是轉染野生型 ODC 細胞株。



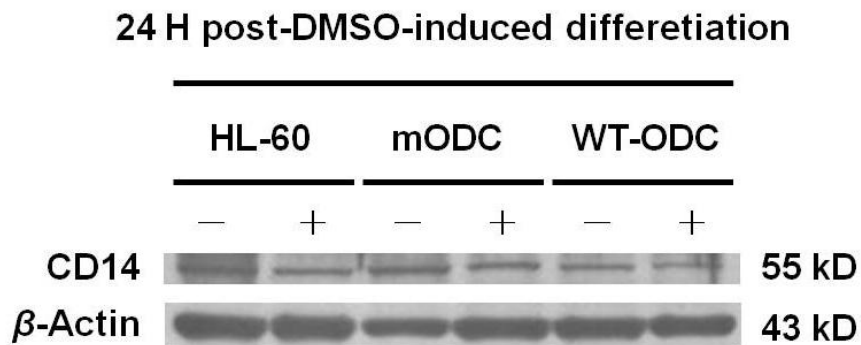
圖五、DNA 片段化實驗 (DNA fragmentation)：加入 1.25% DMSO 處理後，ODC 基因轉染對 HL-60 細胞凋亡之影響。m-ODC 指轉染突變型 ODC 細胞株，WT-ODC 則是轉染野生型 ODC 細胞株。



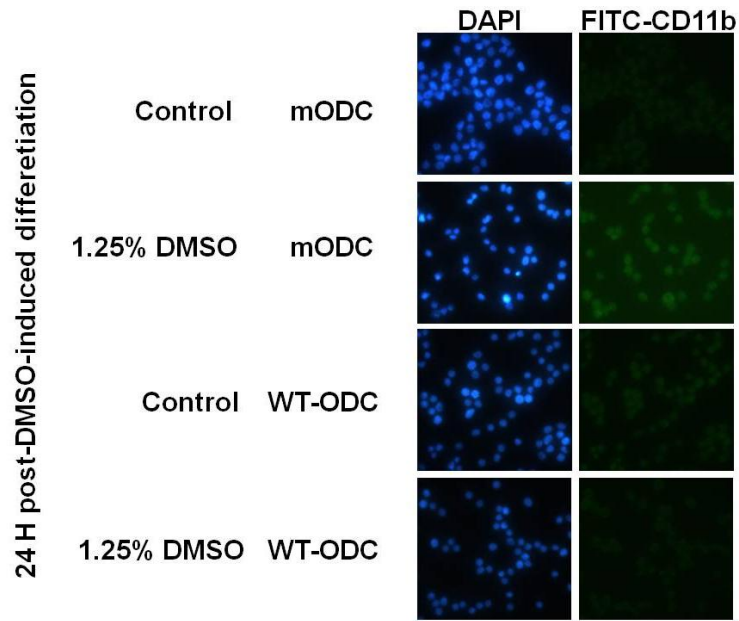
圖六、流式細胞儀分析：加入 1.25% DMSO 處理後，ODC 基因轉染對 HL-60 細胞凋亡之影響。m-ODC 指轉染突變型 ODC 細胞株，WT-ODC 則是轉染野生型 ODC 細胞株。



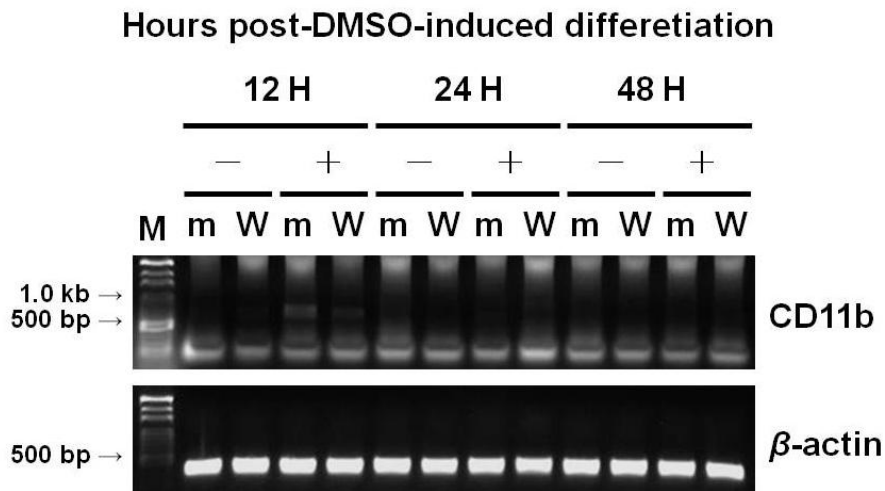
圖七、RT-PCR 檢測 HL-60、轉染突變型 ODC (m-ODC) 和轉染野生型 ODC (WT-ODC) 三株細胞的全細胞 mRNA，比較 C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、C/EBP ϵ 和 PU.1 的表現情形。 β -actin 作為 Internal control。



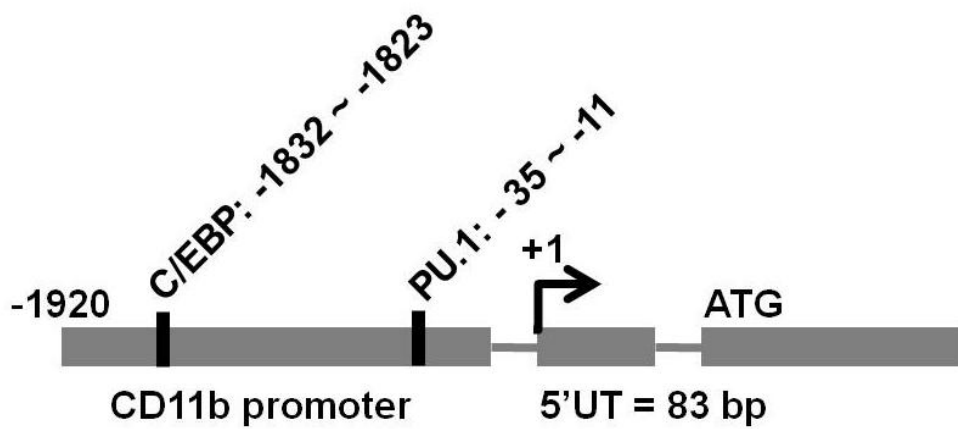
圖八、Western blotting 檢測 HL-60、轉染突變型 ODC (m-ODC) 和轉染野生型 ODC (WT-ODC) 三株細胞的 CD14 表現情形。



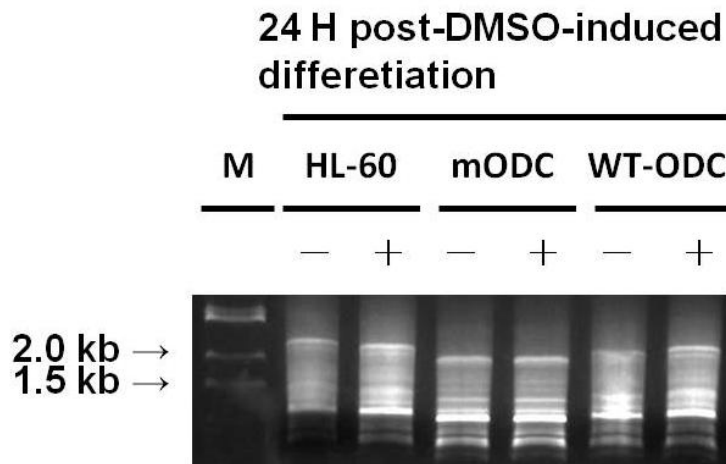
圖九、免疫螢光染色法檢測在分化後 24 小時，轉染突變型 ODC (mODC) 和轉染野生型 ODC (WT-ODC) 細胞株的 CD11b 表現情形。DAPI, 細胞核染色。



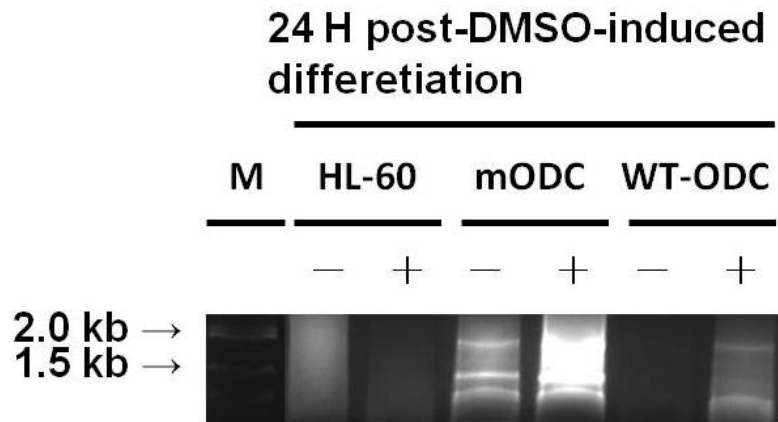
圖十、RT-PCR 檢測在分化後 12、24、48 小時，轉染突變型 ODC (m) 和轉染野生型 ODC (W) 細胞株 CD11b mRNA 的表現情形。



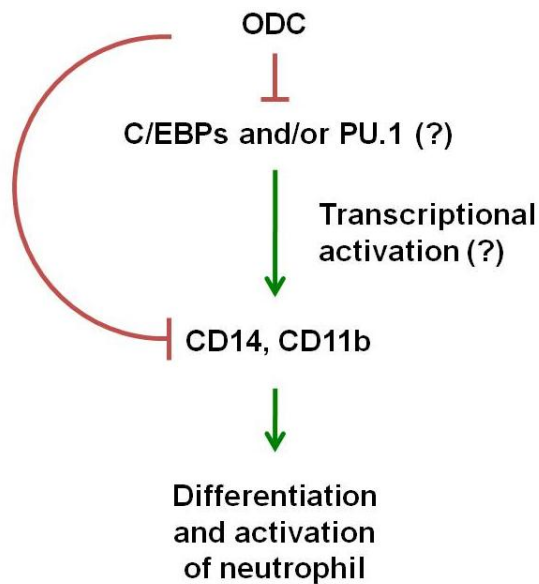
圖十一、CD11b 基因包含啟動子 (Promoter)、5'端無轉譯序列 (5'-untranslated sequence) 及起始密碼子之後的基因序列。啟動子上分別有 C/EBPs 和 PU.1 高度表留性的結合位。



圖十二、以 PCR 檢測 HL-60、轉染突變型 ODC (mODC) 和轉染野生型 ODC (WT-ODC) 三株細胞基因體 DNA 的目標序列，黏合溫度 (Annealing temperature) 設定在 47°C，Mg²⁺ 濃度 1 mM。



圖十三、以 PCR 檢測 HL-60、轉染突變型 ODC (mODC) 和轉染野生型 ODC (WT-ODC) 三株細胞基因體 DNA 的目標序列，黏合溫度 (Annealing temperature) 設定為 48°C，Mg²⁺ 濃度 3 mM。



圖十四、DMSO 誘導分化後，ODC 所參與細胞內訊息傳遞路徑示意圖。