

中山醫學大學生物化學研究所  
Institute of Biochemistry  
Chung Shan Medical University

碩士論文  
Master Thesis

第一部份 老化對於甲釋素有反應的腦下垂體前葉細胞亞族群之  
改變

Part 1 Subpopulation of the thyrotropin-releasing hormone-  
response anterior pituitary cells changed by aging

第二部份 低氧壓迫對於大鼠腦內蛋白激酵素 C 表現之影響

Part 2 Effect of hypoxia on the expression of protein  
kinase C in rat brain

指導教授：劉哲育 博士 (Jer-Yuh, Liu, Ph. D.)

研究生：潘建宏 (Chien-Hung, Pan)

中華民國九十二年六月

本論文為中山醫學大學授予學位之必備條件之一，經中山醫學大學醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

中山醫學大學生物化學研究所副教授 黃志揚

黃志揚

中興大學生命科學研究所副教授 劉英明

劉英明

中山醫學大學生物化學研究所副教授 劉哲育

(論文指導教授)

劉哲育

學生潘建宏論文題目為「第一部份 老化對於甲釋素有反應的腦下垂體前葉細胞亞族群之改變 第二部份 低氧壓迫對於大鼠腦內蛋白質激酵素 C 表現之影響」，其論文已經中山醫學大學醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授： 劉哲育

簽名：劉哲育

中華民國九十二年六月

## 致 謝

感謝國立陽明大學 王錫崗教授提供 Hypoxia 的腦部檢體。

在兩年的學習期間，感謝彥均學姊、逸憲學長、順發學長、忠榮學長、競爵學長、建元學長、佩珍學姊及應宗和醫師在實驗上的指導及幫助，同時也感謝實驗室夥伴婉齡、玉晴、豐淳、玉蓮、于芳、正容、俊憲、財興、佳瑜及霏霓的陪伴及鼓勵，讓我在實驗室的生活更多采多姿。因此向所有幫助過我的人敬上最崇高的謝意。

最後感謝我的祖父母、父母親、弟弟及娟娟在這兩年的研究路途中給予我支持及關愛，讓我能夠順利完成學業，僅以此論文獻給我的家人及所有關心我的朋友們。

# 目 錄

## 第一部分：老化對於甲釋素有反應的腦下垂體前葉細胞亞族群之改變

壹	中文摘要.....	2
貳	英文摘要.....	3
參	縮寫表.....	4
肆	前言.....	6
伍	研究動機.....	14
陸	實驗材料與方法.....	15
柒	實驗結果.....	19
捌	討論.....	22
玖	參考文獻.....	24
拾	圖表.....	32

## 第二部分：低氧壓迫對於大鼠腦內蛋白激酵素 C 表現之影響

壹	中文摘要.....	40
貳	英文摘要.....	41
參	縮寫表.....	42
肆	前言.....	43
伍	研究動機.....	56
陸	實驗材料與方法.....	57
柒	實驗結果.....	64
捌	討論.....	67
玖	參考文獻.....	71
拾	圖表.....	81
	附錄說明.....	100

## 第一部

### 老化對於甲釋素有反應的腦下垂體前葉細胞亞族群之改變

Subpopulation of the thyrotropin-releasing hormone-response anterior pituitary cells changed by aging

## 壹．中文摘要

使用甲釋素(TRH)誘發細胞內鈣離子上升的實驗模式，測試年輕和年老 Wstar 公鼠之腦下垂體前葉細胞亞群分佈情形可分成五種類型：A 型細胞對低、中、高劑量的 TRH 皆有反應；B 型細胞則對低和高劑量的 TRH 劑量有反應；C 型細胞只對低劑量 TRH 有反應；D 型細胞對中高劑量的 TRH 有反應；E 型細胞則只對高劑量的 TRH 有反應。而 A 型細胞在年輕和年老的族群中都佔有較高的比率，在 A 型和 B 型細胞中年輕族群（分別是  $73.6\pm 1.6\%$  和  $12.9\pm 1.2\%$ ）較年老族群（分別是  $68.3\pm 1.1\%$  和  $4.4\pm 1.0\%$ ）佔有顯著較高的比率分佈，反之在 D 型和 E 型細胞中年老族群（分別是  $13.2\pm 0.8\%$  和  $14.0\pm 1.9\%$ ）較年輕族群（分別是  $7.6\pm 1.2\%$  和  $4.7\pm 0.8\%$ ）則佔有顯著較高的比率。這些資料顯示出腦下垂體前葉細胞在老化的情況下可能有部份細胞會傾向於對 TRH 敏感度較低的細胞型態。

## 貳 . 英文摘要

The anterior pituitary cell subpopulations of young and old Wistar male rat were tested by an experimental model of thyrotropin-releasing hormone (TRH)-induced increase in intracellular  $Ca^{2+}$  and were divided into five types: Type A, the cells with the response to TRH in low, media and high doses; type B, the cells response to either low or high doses TRH; type C, the cells only response to TRH low dose TRH; type D, the cells response to both media and high doses TRH; and type E, the cells response to only high dose TRH. Both young and old groups with high percentage of type A cells. The highly type A and type B were exist in young group ( $73.6 \pm 1.6\%$  and  $12.9 \pm 1.2\%$ , respectively) compared with old group ( $68.3 \pm 1.1\%$  and  $4.4 \pm 1.0\%$ , respectively). However, the percentages of type D and type E were significantly higher in old group ( $13.2 \pm 0.8\%$  and  $14.0 \pm 1.9\%$ ; respectively) than in young group ( $7.6 \pm 1.2\%$  and  $4.7 \pm 0.8\%$ ; respectively). These data indicated that the anterior pituitary cells in response to thyrotropin-releasing hormone may be partly shifted to low-sensitive cell types in aging.



## 參 . 縮寫表

BSA	: Bovine serum albumin
DAG	: Diacylglycerol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	: Ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FBS	: Fetal bovine serum
HEPES	: N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid]
PRL	: Prolactin
PSN	: Penicillin-streptomycine-neomycine
TRH	: Thyrotropin releasing hormone
TSH	: Thyroid stimulating hormone
GH	: Growth hormone
ACTH	: Adrenocorticotropic hormone
CRH	:Corticotropin-releasing hormone
FSH	:Follicle-stimulating hormone
GHRH	:Growth hormone-releasing hormone
GnRH	:Gonadotropin-releasing hormone

LH :Lrteinizing hormone  
NGF :Nerve growth factor  
TSH :Thyroid-simulating houmone  
IP3 :Inositol 1,4,5-trisphosphate

## 肆．前言

### 一．腦垂腺 Pituitary gland (hypophysis)

內分泌賀爾蒙在身體各部為分泌，光是具有重要功能的就有 80 種。這些賀爾蒙的作用支配著我們的成長、防衛、復原和性等。這些賀爾蒙幾乎都是在腦部下視丘的指揮之下分泌而成的 (1)。簡單的說，內分泌賀爾蒙是照著這步驟而分泌的：

身體內外的刺激→下視丘→腦垂體→腎上腺、甲狀腺、睪丸、卵巢、副甲狀腺、胰臟、消化器官、心臟、腎臟、血管、免疫細胞 (2、3)。

身體接到刺激之後的第一個步驟是從下視丘傳送指令給腦垂體。第二個步驟是腦垂體向全身的賀爾蒙分泌器官傳達指令，而全身的器官便依照指令生產、分泌賀爾蒙或減少分泌。

對脊椎動物而言，下視丘和腦垂體的作用是當作神經內分泌控制系統控制中心。他們共同整合許多身體的活動。下視丘(hypothalamus)可監視內部器官並且影響與器官有關的行為形式。腦垂體 (pituitary) 是以一細長的莖懸掛在下視丘底部下方。人類腦垂體的大小與碗豆相同 (4)。

腦下垂體有神經組織葉和腺體組織葉。後葉 (posterior lobe) 是神經組織，他可分泌兩種神經激素，這兩種神經激素實際上是由下視丘產生，而儲存在後葉中。前葉 (anterior lobe) 大部分是腺體組織。他可以分泌產生六種激素以及控制更多其它的內分泌激素之釋出。許多脊椎動物 (但不包含人類) 的腦下垂體有是腺體組織的間葉。此分泌物可又發體表顏色的改變。(5)

### (一) Posterior Pituitary

腦下垂體後葉(垂體神經部)是直接由下視丘的神經組織延伸而來，在胚胎學上是來自第三腦室的神經外胚層組織。細胞體位於下視丘的 supraoptic 和 paraventricular nuclei，分泌 oxytocin 和 AVP (arginine vasopressin)。除了神經分泌之外，也有門脈循環，下視丘內的分泌以及分泌在 CNS 的其他部位等途徑 (6)。

在動物模式上還有其他的功能,包括調節性活動力、食慾、溫度、學習、記憶力和調節母體行為。

### (二) Anterior Pituitary

分泌主要的賀爾蒙釋放因子:FSH、LH、TSH、ACTH、GH 和 prolactin。每一種賀爾蒙都由一種特別的腦下垂體細胞所分泌。這些激素對代謝、生長、發育和生殖等有重要作用 (7)。

促甲狀腺激素細胞(Thyrotroph)(8):細胞形狀較長或呈多邊形，

胞質內顆粒最小，緻密度較低，多聚集在胞體周圍。這種細胞分泌促甲狀腺激素，能促進甲狀腺激素（TSH）的合成與分泌，還能使甲狀腺濾泡體積增大和數量增加。

促性腺激素細胞（Gonadotroph）（9）：細胞胞體較大，呈圓形。胞質內顆粒較小，但高基氏體和內質網均較發達。這種細胞分泌卵泡刺激素（FSH）（10）和黃體生成素（LH）（11）。前者對女性的主要功能是促進卵巢的卵泡發育，在男性則促進精子的形成。後者對女性的作用，是促進排卵和黃體的形成；在男性，主要通過刺激睪丸間質細胞分泌雄激素（12）。

促腎上腺皮質激素細胞（corticotroph）（13、14）：數量較少，細胞為不規則的星狀，胞質內顆粒呈泡狀，中心緻密，沿細胞四周排列。這種細胞分泌促腎上腺皮質激素，刺激腎上腺皮質分泌糖皮質激素（15）。

生長激素細胞（somatotroph）（16）：細胞質內質網和高基氏體發達，顆粒多而小，呈圓形。這種細胞分泌生長激素（GH），促進骨的生長發育。在現代，像籃球和排球選手身高超過兩百公分已經不稀奇了。有些家長希望小孩能夠當上運動選手，所以想拉高他的身高，也有些人希望自己的身高能夠長高十公分。如果還在青春前期，那些願望多多少少都能夠實現，因為生長激素會在性激素出現前持續分泌。

可是一旦竟入青春期，性腺開始分泌形成男性化或女性化的性激素時，生長的活動就會受到意志，結果骨頭就再也無法伸長了，也就是，一生的身高就已經決定了。因為性激素的作用，與骨頭生長有關的骨端線一封閉起來，身高就大致決定。從此只會分泌只夠保持骨骼和肌肉健康的分量，協助種種運動能力的的生成。但相反的，生長激素的分泌遲緩時，身體就會不斷拉高。這種現象多發生在男性身上，很有可能出現失去嗅覺、色盲、色弱等。

因此，過於早熟的話，身體會不長高。相反的，因為某種原因，使得第二性徵出現太晚，身體就會長的太高。因此，如果希望長高一點，就必須在青春期到來前想辦法。最好是在飲食、運動和睡眠方面下工夫，使生長激素發揮力量。

生長激素會在青春期之後，隨著年齡的增長而逐漸減少，導致肌肉和骨骼的衰頹。但在幼年分泌過多時，會產生巨人症，但身體比例會與一般人類相似；分泌過少時，會產生侏儒症；在成年後，突然生長激素增加，會發生末端肥大症（acromegaly）（17、18），頭、腳、下額增厚，皮膚的上皮組織亦會增厚。

催乳激素細胞（lactotroph）（19）：細胞質內顆粒少而大，形狀不規則。這種細胞分泌催乳激素（PRL），泌乳素（Prolactin，PRL）是由腦下垂體前葉嗜酸性細胞所分泌的一種激素。從低等魚類體內滲透

透度的調節、電解質的代謝、鴿乳的生成、哺乳類的乳腺分化、發育及雌雄性腺的成熟、至高等的人類乳腺生乳等效應，皆為泌乳素的作用範圍，因之泌乳素在生理任務上可說是扮演著多元化的角色。泌乳素分泌之調控與其他腦下垂體前葉激素分泌的調控有所不同，因泌乳素在平常主要是受到來自下視丘抑制性的調節，目前從許多證據已確知這個抑制性因子（PIF）是度巴胺（Dopamine）(20-21)。

## 二．甲釋素（Thyrotropin-releasing hormone，TRH）

腦部有一重要之結構，稱為下視丘，它分泌很多之荷爾蒙（激素），稱為「釋素」，釋素刺激下視丘下方之另一重要內分泌腺體——腦垂腺，分泌各種荷爾蒙（稱為促素），促素再分別作用於全身各內分泌器官以產生各種不同之荷爾蒙，後者再作用在全身各組織細胞（稱為標細胞）以維持人體之正常新陳代謝。如果作用於標細胞之荷爾蒙分泌過多，則反過來壓抑下視丘及腦垂腺，使釋素及促素分泌減少，以免更多之荷爾蒙產生。反之，如果作用在標細胞之荷爾蒙分泌過少，則會刺激釋素及促素之增加，終使荷爾蒙恢復正常。這種相互調節作用稱為「迴饋作用（Feedback）」，經此作用細胞功能乃得以維持正常（22）。

然而甲釋素（Thyrotropin-releasing hormone，TRH）是由下視丘的神經內分泌細胞所分泌，它的大小只有三個胺基酸大

(pGLU-HIS-PRO-NH<sub>2</sub>) (23)。甲釋素可通過腦下腺門脈系統，隨血流進入垂體前葉，促進 TSH 的釋放與合成。下視丘 TRH 的產生受中樞神經高級部位的影響。環境刺激（如寒冷、過度緊張等）通過腦的高級部位，沿下行神經纖維釋放單胺類遞質，而影響 TRH 的釋放 (24)。值得一提的是，TSH 不但促進 T3 及 T4 之產生，它尚有促進甲狀腺細胞生長及發育之功能，因此如果 TSH 分泌過多（例如缺碘地區、或甲狀腺先天性功能不足症、或甲狀腺細胞對 TSH 反應過度「例如一些不明原因性之甲狀腺腫大」，則病患會出現甲狀腺腫大現象 (Goiter) (25)。

甲釋素(TRH)不僅可使促甲狀腺激素細胞分泌促甲狀腺激素，能促進甲狀腺激素 (TSH) 的合成與分泌，並同時可以影響促性腺激素細胞分泌卵泡刺激素 (FSH) 和黃體生成素 (LH) (26)、促腎上腺皮質激素細胞分泌促腎上腺皮質激素 (ACTH) (27)、生長激素細胞分泌生長激素(GH) (28-29) 及催乳激素細胞分泌催乳激素 (PRL) (30-32)。

### 三．激素作用機轉與鈣離子

許多內分泌化學信號可以藉第二信使和蛋白激酵素來轉接和擴大，激素與特殊的 adenylyl cyclase 結合，刺激 ATP 產生環鏈 3',5'-adenophosphate，簡稱環腺甘酸 (cAMP)，又稱第二信使，因為它能



傳遞激素的訊息 (33-34)。在訊息的轉換上，會牽涉到 cAMP，激素 (第一信使) 會和表面的受體結合，活化 G 蛋白 (一個接替者) (35-36)，當這些 G 蛋白活化時，即刺激 phospholipase C 而促進 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP<sub>2</sub>) 水解為 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)與 diacylglycerol (DAG) (37-38)；IP<sub>3</sub> 與內質網(endoplasmic reticulum)膜上的 IP<sub>3</sub> 受體結合，開啟通道，釋放內質網中儲存的細胞內鈣離子到細胞質，接著誘發與鈣離子有關的反應 (例如:calmodulin kinase)；同時，DAG 會活化蛋白激酶 C(protein kinase cPKC)，緊接著 PKC 會去使某些酶磷酸化，引起細胞的許多反應(39-40)。而它又活化膜蛋白—腺苷酸環化酶(adenylyl cyclase) (一個效應者)，再產生 cAMP。接下來，cAMP 活化 cAMP—dependent protein kinase，這個酶可以把其它的酶磷酸化 (41)。

#### 四. 老化

下視丘是體內神經中樞。一些學者認為“老化鐘”位於下視丘，其功能衰退，使各種促激素釋放激素分泌減少或作用減低，接受下視丘調節的垂體及下屬目標腺體的功能也隨之發生全面減退，從而引起衰老的發生與發展。

腦下垂體隨增齡腦下垂體纖維組織和鐵沈積增多，下視丘—腦下垂體軸的回饋受體敏感性降低。

老年人垂體產生的胺類和肽類激素減少，使其調節功能減退，下視丘敏感閾值升高，對應激反應延緩。

在許多公和母大鼠的實驗模式中，已有證明老化會減少下視丘—腦下垂體軸分泌 LH、FSH 及 GH，但 PRL 的分泌是會上升，而 TSH 和 ACTH 的生物活性會下降 (42)。

## 伍．實驗動機

激素與其受體結合可活化 G 蛋白，G 蛋白又可促進膜上的酵素分裂膜上磷脂成 IP3 和二甘油二脂，而 IP3 可控制儲存在內質網之鈣離子的吸收及釋放。鈣離子可活化某些酵素，且鈣離子濃度變化又與某些蛋白質激酵素的活性改變有關(43-44)，所以藉測定細胞內鈣離子濃度的變化可能是了解激素分泌機轉最好的工具。過去文獻指出不同濃度的甲釋素可誘發不同鈣離子 spike 和 oscillations 的現象 (48)。文獻亦指出在單一催乳激素細胞和促甲狀腺激素細胞中 TRH 確能誘發鈣離子釋放 (45)，且 TRH 刺激腦下垂體前葉細胞會有 multi-responsiveness 的現象 (46)。而腦下腺荷爾蒙(PRL 和 TSH)濃度和年齡是有絕對相關性，年輕的細胞較容易被刺激而分泌荷爾蒙 (47)，且在許多公和母大鼠的實驗模式中，已有證明老化會減少下視丘—腦下垂體軸分泌 LH、FSH 及 GH，但 PRL 的分泌是會上升，而 TSH 和 ACTH 的生物活性會下降(42)。甲釋素並可誘發催乳激素細胞釋放鈣離子和泌乳素，於是本實驗室藉鈣離子釋放和泌乳素的關係，而將催乳激素細胞分類為 4 種亞族群 (49)。於是我們將此甲釋素(TRH)誘發細胞內鈣離子上升的實驗模式擴大測試，將年輕和年老 Wistar 公鼠之腦下垂體前葉細胞亞群分佈情形。

## 陸．實驗材料與方法

### 一、實驗材料

#### (1) 購自美國 Sigma 公司

Tris(hydroxymethyl)-amino methane hydrochloride(Tris-HCL)

Ethylene glycolbis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA)

Soybean Trypsin Inhibitor

Trypsin

Deoxyribonuclease I

Bovine serum albumin(BSA)

Fluo 3-AM

N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid](HEPES)

#### (2) 購自台大醫學院動物中心

Male Wistar rat

#### (3) 購自和光純藥工業株式會社

Lead nitrate

Calcium chloride

Magnesium chloride

Potassium chloride

Dithiothreitol

(4) 購自聯工化學廠股份有限公司

dimethyl sulfoxide (DMSO)

Ethylene Diaminete Triacetic Acid (EDTA)

Sodium chloride

(5) 購自皓峰企業股份有限公司

Methanol

(6) 購自美國 Gibco BRL 公司

PSN antibiotic mixture

DMEM

FBS

## 二．實驗方法：

### 大白鼠腦下垂體前葉細胞之初代培養 (50)

本研究所使用之實驗動物乃購自台大醫學院動物中心之 Wistar 品系、年輕 (3 個月) 及中老 (1 年 2 個月) 的雄性大白鼠，犧牲後取其腦下垂體前葉進行消化分解作用 (51)，將腦下垂體前葉浸在 2ml DMEM 中切碎，將其置於離心機 (Beckman GS-6R) 內，在 4°C 環境中以 600 rpm 進行離心後，加入 1ml 1% Trypsin (type III, Sigma, St.Louis, MO) 在 37°C 作用 15 分鐘，後加入 1ml 0.004% DNA

分解酵素(Deoxyribonuclease I)允許其作用 1 分鐘，再加入 1ml 0.1% Soybean Trypsin 抑制劑作用 10 分鐘，經離心 (600 rpm)，去除上清液，再加入 1ml 含 2mM EDTA 的 Hank's Balanced Salt 溶液 (NaCl 8g, KCl 0.4g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.06g, NaHCO<sub>3</sub> 0.35g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.06g, Glucose 1g/L, pH 7.2)，作用 5 分鐘，同樣離心去除上清液，加入 1ml 含 1mM EDTA 的 Hank's Balanced Salt 溶液，作用 15 分鐘後，離心去除上清液，最後加入 10ml 含 0.1% BSA 之 DMEM，將沈澱物打散，培養於含有 10% 胎牛血清 (Calf bovine serum, FBS) 及 1% PSN Antibiotic Mixture 的 DMEM 培養基中，每個培養盤 (35mm) 約含 5×10<sup>6</sup> 個細胞，將之置於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中培養。以 10% FBS 的 DMEM 進行培養 72 小時 (每 24 小時更換一次)。

### TRH 刺激下腦下垂體前葉細胞內鈣離子變動之觀察

將螢光劑 3ul 的 Fluo 3-AM，與等體積的 25% Pluronic Acid 混合均勻後加入 1ml DMEM 培養液中，以此置換細胞的培養液，於 37°C 二氧化碳培養箱培養細胞 30 分鐘，再以充填過氧氣的等張溶液 (配置物包括 140mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 4.6mM KCl, 10mM glucose 及 10mM HEPES，並保持 pH 7.4)，將其清洗三次，最後以 1ml 該等張溶液覆蓋細胞，如前所述將培養皿固定於共軛焦電子顯微鏡觀察臺，先在可見光下調整焦聚及適當的視野，然後將雷射光波長轉換至

488nm，吸收光為 510nm 以上，電腦條件設定完成後，以微量吸量器吸取 100ul 10Mm TRH 溶液小心注入，結果顯示於電腦螢光幕。每十秒掃描一次，且連續觀測 200 秒，在第 200 秒後再注入 100ul 10Mm TRH，接著再連續觀測 200 秒，最後在第 400 秒後再注入 100ul 10Mm TRH，並再連續觀測 200 秒，將連續掃描得影像存檔並以電腦分析。其螢光強度轉換成鈣離子濃度是參考 Burnier 等人的方式，以 A23178 (10<sup>-5</sup>M) 刺激後，造成鈣離子大量進入細胞質，而使細胞質內的螢光染劑達到飽和狀態時的螢光強度做最大強度 (F<sub>max</sub>)，而以加入 5mM EDTA 所捉掉鈣離子後螢光強度當作最小強度 (F<sub>min</sub>)。而我們所測到的螢光強度變化當作 (F)，將其帶入以下公式〔(Ca<sup>2+</sup>) = K<sub>d</sub>(F-F<sub>min</sub>)/(F<sub>max</sub>-F)，K<sub>d</sub> 是解離常數，(Ca<sup>2+</sup>) 是鈣離子濃度〕內計算既可將螢光強度轉換成鈣離子濃度。

## 柒．實驗結果

我們將大白鼠腦下垂體前葉細胞培養 3 天後，利用 3 種不同濃度的甲釋素去刺激腦下垂體前葉細胞，並在共軛焦顯微鏡下利用鈣離子特異性的螢光探針 Fluo 3-AM 觀察細胞內鈣離子釋放情形，結果顯示在甲釋素刺激下，大部份腦下垂體前葉細胞內鈣離子會由細胞外或胞器中流入細胞質中，Fluo 3-AM 因與鈣離子結合亮度會變亮。如圖 1a 表示未刺激前的螢光強度，而在受 10nM TRH 刺激後，圖 1b 顯示出有螢光強度上升反應的三種細胞型，分別是 A 型、D 型、C 型。圖 2a 表示受 10nM TRH 刺激後回復的螢光強度，而圖 2b 顯示受 100nM TRH 刺激後有螢光強度上升反應的二種細胞型，分別是 A 型和 D 型。圖 3a 表示受 100nM TRH 刺激後回復的螢光強度，而圖 3b 顯示受 1000nM TRH 刺激後有螢光強度上升反應的四種細胞型，分別是 A 型、B 型、D 型和 E 型。圖 1、2、3 的螢光強度以圖 4 螢光定量圖顯示後，可明顯看出大鼠之腦下垂體前葉細胞亞群分佈情形可分成五種類型：A 型細胞對 10、100、1000nM TRH 劑量皆有反應；B 型細胞則對 10 和 1000nM TRH 劑量有反應；C 型細胞只對 10nM 劑量 TRH 有反應；D 型細胞對 100 和 1000nM 劑量的 TRH 有反應；E 型細胞



則只對 1000nM 劑量的 TRH 有反應。圖 5 對 3 種濃度 TRH 有反應的腦下垂體前葉細胞，依螢光亮度變化之定量分析圖，年輕大鼠中 A 型細胞在高、中和低 TRH 劑量刺激下定量值分別為  $241\pm 8\%$ 、 $258\pm 8\%$  和  $365\pm 12\%$ ，年老大鼠中 A 型細胞在高、中和低 TRH 劑量刺激下定量值分別為  $267\pm 10\%$ 、 $244\pm 8\%$  和  $396\pm 13\%$ ；年輕大鼠中 B 型細胞在高、中和低 TRH 劑量刺激下定量值分別為  $137\pm 3\%$ 、 $90\pm 2\%$  和  $232\pm 21\%$ ，年老大鼠中 B 型細胞在高、中和低 TRH 劑量刺激下定量值分別為  $177\pm 19\%$ 、 $103\pm 2\%$  和  $300\pm 40\%$ ；年輕大鼠中 C 型細胞在高、中和低 TRH 劑量刺激下定量值分別為  $184\pm 27\%$ 、 $87\pm 8\%$  和  $85\pm 17\%$ ，年老大鼠中 C 型細胞在高、中和低 TRH 劑量刺激下定量值分別為  $158\pm 11\%$ 、 $93\pm 3\%$  和  $86\pm 4\%$ ；年輕大鼠中 D 型細胞在高、中和低 TRH 劑量刺激下定量值分別為  $97\pm 4\%$ 、 $172\pm 20\%$  和  $270\pm 29\%$ ，年老大鼠中 D 型細胞在高、中和低 TRH 劑量刺激下定量值分別為  $95\pm 2\%$ 、 $170\pm 8\%$  和  $246\pm 16\%$ ；年輕大鼠中 E 型細胞在高、中和低 TRH 劑量刺激下定量值分別為  $106\pm 2\%$ 、 $91\pm 4\%$  和  $191\pm 20\%$ ，年老大鼠中 E 型細胞在高、中和低 TRH 劑量刺激下定量值分別為  $90\pm 2\%$ 、 $88\pm 2\%$  和  $209\pm 15\%$ ，顯示年老和年輕大鼠比較兩者間的細胞內鈣離子釋放量並無差異；但從年輕大鼠細胞內鈣離子釋放量有隨 TRH 濃度愈高，細胞內鈣離子釋放量也愈高的現象，年老大鼠的細胞也有同樣的

現象。

在表 1 中我們將年老和年輕的 Wistar 大鼠，依照圖 4 中對 TRH 刺激後有鈣離子上升反應的腦下垂體細胞將其分為 A、B、C、D、E 五種亞群，再將年老和年輕的腦下垂體細胞計數歸類得知：A 型細胞在年輕和年老的族群中都佔有較高的比率，在 A 型和 B 型細胞中年輕族群(分別是  $73.6 \pm 1.6\%$  和  $12.9 \pm 1.2\%$ )較年老族群(分別是  $68.3 \pm 1.1\%$  和  $4.4 \pm 1.0\%$ )佔有顯著較高的比率分佈，反之在 D 型和 E 型細胞中年老族群(分別是  $13.2 \pm 0.8\%$  和  $14.0 \pm 1.9\%$ )較年輕族群(分別是  $7.6 \pm 1.2\%$  和  $4.7 \pm 0.8\%$ )則佔有顯著較高的比率。

## 捌．討論

許多實驗已證實 TRH 可以刺激腦下垂體前葉細胞 (26-32)，而使細胞內的鈣離子產生變動 (42-44)。在本實驗中使用共軛焦顯微鏡測定細胞內鈣離子技術，來觀察對 TRH 有反應的腦下垂體前葉細胞，依結果發現可將細胞分為 A、B、C、D、E 五種類型。A 型細胞可對低、中、高的 TRH 劑量有反應，並推測細胞可能持續活化著，也可能因隨著 TRH 劑量逐漸上升，細胞接受器有反應的數目也會隨之增多，當然在高 TRH 劑量下的反應會更強。B 型細胞可對低、高的 TRH 劑量有反應，可能是因為細胞接收器對原本低 TRH 劑量就有反應，而後產生了負調節機制，使得中 TRH 劑量無反應，最後對高劑量 TRH 有反應。也可能是細胞接受器對 TRH 產生了 multi-responsive (46)，已經不是先前所知的腦下垂體細胞、促甲狀腺細胞、促腎臟皮質腺細胞、促性腺細胞、泌乳素細胞、生長激素細胞皆是各有各的釋素來加以調節而是交叉反應代表細胞上的接受器不只接受一種激素，而是多種的激素。由此可知，原本不受 TRH 影響的細胞接受器，卻因為高 TRH 劑量而有反應。C 型細胞只對低的 TRH 劑量有反應，其原因可能是因為受刺激後的細胞已經死亡，或者是細胞出

現強烈的 down-regulation，使其對中高劑量 TRH 無反應，這和之前有文獻指出促性腺細胞在受 TRH 刺激後會產生 down-regulation 的現象相同 (28)。D 型細胞則對中高劑量的 TRH 有反應，可能是細胞對 TRH 有延遲反應現象，所以要等到中、高劑量加入後的時間點才有反應。E 型細胞則對高的 TRH 劑量有反應，原因可能是細胞上接受器對 TRH 的敏感度較低，所以只會對高劑量的 TRH 有反應。

另外，由 table I 可知在年輕族群較年老族群中 A 型和 B 型細胞佔有顯著較高的比率分佈，反之在年老族群較年輕族群中 D 型和 E 型細胞則佔有明顯較高的比率。這可能是因為細胞的接受器敏感度下降，也可能是各 TRH 接受器之密度減少有關 (50)，或者是鈣離子訊息的傳導發生了改變 (52)，真正的原因還需要進一步的研究才能了解。

## 玖．參考文獻

1. Amar AP and Weiss MH. (2003) Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 14: 11-23
2. 洪敏元、劉良慧、林育娟、何明聰、賴明華 (2000) 當代生理學，華杏出版股份有限公司，p343-362。
3. Leonard B. (2000) Stress, depression and the activation of the immune system. *World J. Biol. Psychiatry* 1: 17-25
4. 吳襄、林坤偉 (1997) 生理學大綱，藝軒圖書出版社，p309-310。
5. 王文憲 (1998) 人體生理學，合記圖書出版社，p358-363。
6. 吳襄、林坤偉 (1997) 生理學大綱，藝軒圖書出版社，p315-317。
7. 洪敏元、劉良慧、林育娟、何明聰、賴明華 (2000) 當代生理學，華杏初版股份有限公司，p349。
8. Beauvillain JC, Mazzuca M and Dubois MP. (1976) The thyrotropic cells of the guinea pig pituitary. Electron microscopic study after characterization by immunocytochemical means. *Cell Tissue Res.* 174: 233-244
9. Childs GV. (1997) Cytochemical studies of multifunctional gonadotropes. *Microsc. Res. Tech.* 39: 114-130
10. Miller WL, Shafiee-Kermani F, Strahl BD and Huang HJ. (2002) The nature of FSH induction by GnRH. *Trends. Endocrinol. Metab.*

13: 257-263

11. Shupnik MA and Fallest PC. (1994) Pulsatile GnRH regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 597-599
12. Billiard J. (1996) Functional heterogeneity of pituitary gonadotropes in response to a variety of neuromodulators. *Mol. Cell. Endocrinol.* 123: 163-170
13. Mohanty B, Tachibana T, Kwon OC, Hashimoto H, Nogami H, Ishikawa H and Naik DR. (1996) Immunoelectron microscopy of corticotropes and melanotropes in the pituitary gland of the European ferret, *Mustela putorius furo*. *Acta. Anat.* 157: 126-134
14. Hemming FJ, Begeot M, Dubois MP and Dubois PM. (1983) Ultrastructural identification of corticotropes of the fetal rat. In-vivo and in-vitro immunocytochemistry. *Cell Tissue Res.* 234: 427-437
15. Giraldi FP and Cavagnini F. (1998) Corticotropin-releasing hormone is produced by rat corticotropes and modulates ACTH secretion in a paracrine/autocrine fashion. *J. Clin. Invest.* 101: 2478-2484
16. Milosevic V, Brkic B, Velkovski SD, Sekulic M, Lovren M, Starcevic V and Severs WB. (1998) Morphometric and functional changes of rat pituitary somatotropes and lactotropes after central administration of somatostatin. *Pharmacology* 57: 28-34
17. Baum H, Ludecke DK and Herrmann HD. (1986) Carpal tunnel syndrome and acromegaly. *Acta. Neurochir.* 83: 54-55

18. Osella G, Orlandi F, Caraci P, Ventura M, Deandreis D, Papotti M, Bongiovanni M, Angeli A and Terzolo M. (2003) Acromegaly due to ectopic secretion of GHRH by bronchial carcinoid in a patient with empty sella. *J. Endocrinol. Invest.* 26: 163-169
19. Yin P and Arita J. (2000) Differential regulation of prolactin release and lactotrope proliferation during pregnancy, lactation and the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 72: 72-79
20. Malgaroli A, Vallar L, Elahi FR, Pozzan T, Spada A and Meldolesi J. (1987) Dopamine inhibits cytosolic Ca<sup>2+</sup> increases in rat lactotroph cells. Evidence of a dual mechanism of action. *J Biol. Chem.* 262: 13920-13927
21. Winiger BP, Wuarin F, Zahnd GR, Wollheim CB and Schlegel W. (1987) Single cell monitoring of cytosolic calcium reveals subtypes of rat lactotrophs with distinct responses to dopamine and thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 121: 2222-2228
22. 王文憲 (1998) 人體生理學，合記圖書出版社，p360-372。
23. Bilek R. (2000) TRH-like peptides in prostate gland and other tissues. *Physiol Res.* 49. Suppl 1: S19-26
24. Arancibia S and Tapia-Arancibia L. (1987) Effect of acute exposure to cold on SRIF release in unanesthetized rats and its temporal correlation with the cold induced TRH peak. *Exp. Clin. Endocrinol.* 6: 265-268
25. Cannavo S, Squadrito S, Finocchiaro MD, Curto L, Almoto B, Vieni

- A and Trimarchi F. (2000) Goiter and impairment of thyroid function in acromegalic patients: basal evaluation and follow-up. *Horm. Metab. Res.* 32: 190-195
26. Popovic V and Damjanovic S. (1998) The effect of thyrotropin-releasing hormone on gonadotropin and free alpha-subunit secretion in patients with acromegaly and functionless pituitary tumors. *Thyroid* 8: 935-939
27. Abraham RR, Campbell EA, Gillham B, Thody AJ, Altaher AR, Prysor-Jones A, Wynn V, Jones MT and Jenkins J. (1986) The effect of ovine corticotrophin releasing factor (oCRF), bromocriptine and TRH on the secretion of ACTH and alpha-MSH in Nelson's syndrome and Cushing's disease. *Clin. Endocrinol.* 25: 75-85
28. Harvey S and Baidwan JS. (1990) Desensitization of thyrotrophin-releasing hormone (TRH)-induced growth hormone secretion in chickens: coincident down-regulation of TRH binding to pituitary membranes. *J. Mol. Endocrinol.* 4: 223-230
29. Scanes CG, Harvey S and Bolaffi JL. (1985) TRH stimulation of in vivo GH release in the domestic fowl. Influence of TRH metabolites and effect of age on in vitro degradation of TRH. *Neuroendocrinology* 40: 33-38
30. Tashjian AH, Jr. Barowsky NJ and Jensen DK. (1971) Thyrotropin-releasing hormone: Direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem. Biophys.*



*Res. Commun.* 43: 516-523

31. Rivier C and Vale W.( 1974 )In vivo stimulation of prolactin secretion in the rat by thyrotropin releasing factor, related peptides and hypothalamic extracts. *Endocrinology* 95: 978-983
32. Mueller GP, Chen HJ and Meites J. ( 1973 ) In vivo stimulation of prolactin release in the rat by synthetic TRH. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144: 613-615
33. Urabe K. ( 1981 ) Effects of gonadotropin and LHRH on the cAMP levels, adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase activities in the endocrine organs of the female pubertal rabbits (author's transl). *Nippon. Sanka. Fujinka. Gakkai. Zasshi.* 33: 1675-1683
34. Brozmanova H, Langer P, Foldes O, Kolena J and Knopp J. ( 1980 ) In vitro effect of TRH on adenylate cyclase and cAMP in rat anterior pituitary and on TSH and PRL release into incubation medium. *Endocrinol. Exp.* 14: 291-296
35. Harder S, Lu X, Wang W, Buck F, Gershengorn MC and Bruhn TO. ( 2001 ) Regulator of G protein signaling 4 suppresses basal and thyrotropin releasing-hormone (TRH)-stimulated signaling by two mouse TRH receptors, TRH-R(1) and TRH-R(2). *Endocrinology* 142: 1188-1194
36. De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E and Farquhar MG. ( 2000 ) The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol.*

*Toxicol.* 40: 235-271

37. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipid. *J. Biol. Chem.* 254: 3692-3695
38. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 1218-1224
39. Yajima Y, Akita Y, Yamaguchi A and Saito T. (1990)  $Ca^{2+}$ -independent secretory mechanism of thyrotropin-releasing hormone (TRH) involves protein kinase C in rat pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 571-577
40. Klausen C, Chang JP and Habibi HR. (2002) Multiplicity of gonadotropin-releasing hormone signaling: a comparative perspective. *Prog. Brain Res.* 141: 111-128
41. 黃基礎、施河、史金壽 (1998) 人體生理學，合記圖書出版社，p154-137。
42. Meites J. (1982) Changes in neuroendocrine control of anterior pituitary function during aging. *Neuroendocrinology* 34: 151-156.
43. Cui ZJ, Gorelick FS and Dannies PS. (1994) Calcium/Calmidulin-dependent proteinkinase-II activation in rat pituitary cells in the presence of thyotropin-releasing hormone and dopamine.

44. Dufy-Barbe L, Bresson L, Vacher P, Odessa MF, San Galli F, Rivel J and Guerin J. ( 1993 ) Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin- releasing hormone-associated peptide modulation of  $[Ca^{2+}]_i$  in human lactotrophs. *Mol. Cell. Endocrinol.* 95: 67-74
45. Ashworth R and Hinkle PM. ( 1996 ) Thyrotropin-releasing hormone-induced intracellular calcium responses in individual rat lactotrophs and thyrotrophs. *Endocrinology* 137: 5205-5212
46. Villalobos C, Nunez L, Frawley LS, Garcia-Sancho J and Sanchez A. ( 1997 ) Multi-responsiveness of single anterior pituitary cells to hypothalamic-releasing hormones: a cellular basis for paradoxical secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 14132-14137.
47. Brown OA, Sosa YE, Bolognani F and Goya RG. ( 1998 ) Thymulin stimulates prolactin and thyrotropin release in an age-related manner. *Mech. Ageing Dev.* 104: 249-262.
48. Nelson EJ and Hinkle PM. ( 1994 ) Characteristics of the  $Ca^{2+}$  spike and oscillations induced by different doses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in individual pituitary cells and nonexcitable cells transfected with TRH receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 135: 1084-1092.
49. Chih-Yang Huang , Wei-Wen Kuo , Tsung-Po Tsai , Der-Jinn Wu, Yih-Shou Hsieh, Paulus S. Wang, Chih-Kai Cheng and Jer-Yuh Liu. ( 2002 ) Prolactin secretion and intracellular  $Ca^{2+}$  change in rat

- lactotroph subpopulations stimulated by thyrotropin-releasing hormone. *J. Cell. Biochem.* 87: 126-132
50. Arita J, Kojima Y and Kimura F. (1992) Lactotrophs secreting small amounts of prolactin reveal great responsiveness to thyrotropin-releasing hormone: Analysis by the sequential cell immunoblot assay. *Endocrinology* 130: 3167-3174
51. Ben-Jonathan N. (1985) Dopamine: a Prolactin inhibiting hormone. *Endocr. Rev.* 6: 564-589
52. Shin SH, Soukup C and Pang SC (1993) Measurement of prolactin release and cytosolic calcium in estradio-primed lactotrophs. *Life. Science* 53: 1605-1615

## 拾．圖表

**Table 1. Subpopulation of the TRH-response anterior pituitary cells in young and old Wistar rats**

Young Cell No.	Cell type				
	A	B	C	D	E
1 (n=46)	78 (36)	9 (4) <sup>a</sup>	0 (0)	11 (5)	2 (1)
2 (n=52)	71 (37)	12 (6)	2 (1)	10 (5)	6 (3)
3 (n=91)	69 (63)	15 (14)	1 (1)	8 (7)	7 (6)
4 (n=90)	74 (67)	14 (13)	1 (1)	4 (4)	6 (5)
5 (n=111)	75 (83)	15 (17)	1 (1)	5 (6)	4 (4)
Mean ±S.E.	73.6±1.6*	12.9±1.2*	1.0±1.6	7.6±1.2*	4.7±10.8*
Old Cell No.	Cell type				
	A	B	C	D	E
1 (n=141)	70 (99)	3 (4)	4 (6)	13 (18)	10 (14)
2 (n=141)	69 (97)	3 (4)	4 (6)	11 (16)	12 (17)
3 (n=85)	68 (58)	8 (7)	0 (0)	14 (12)	21 (8)
4 (n=149)	70 (104)	4 (6)	1 (2)	12 (18)	13 (19)
5 (n=70)	64 (45)	4 (3)	1 (1)	16 (11)	14 (10)
	68.3±1.1	4.4±1.0	2.3±0.9	13.2±0.8	14.0±1.9

<sup>a</sup>% (cell number)

\* Young versus Old; statistical analyses were performed by the unpaired student t-test; P < 0.05 was considered significant.

n : Total cell no.

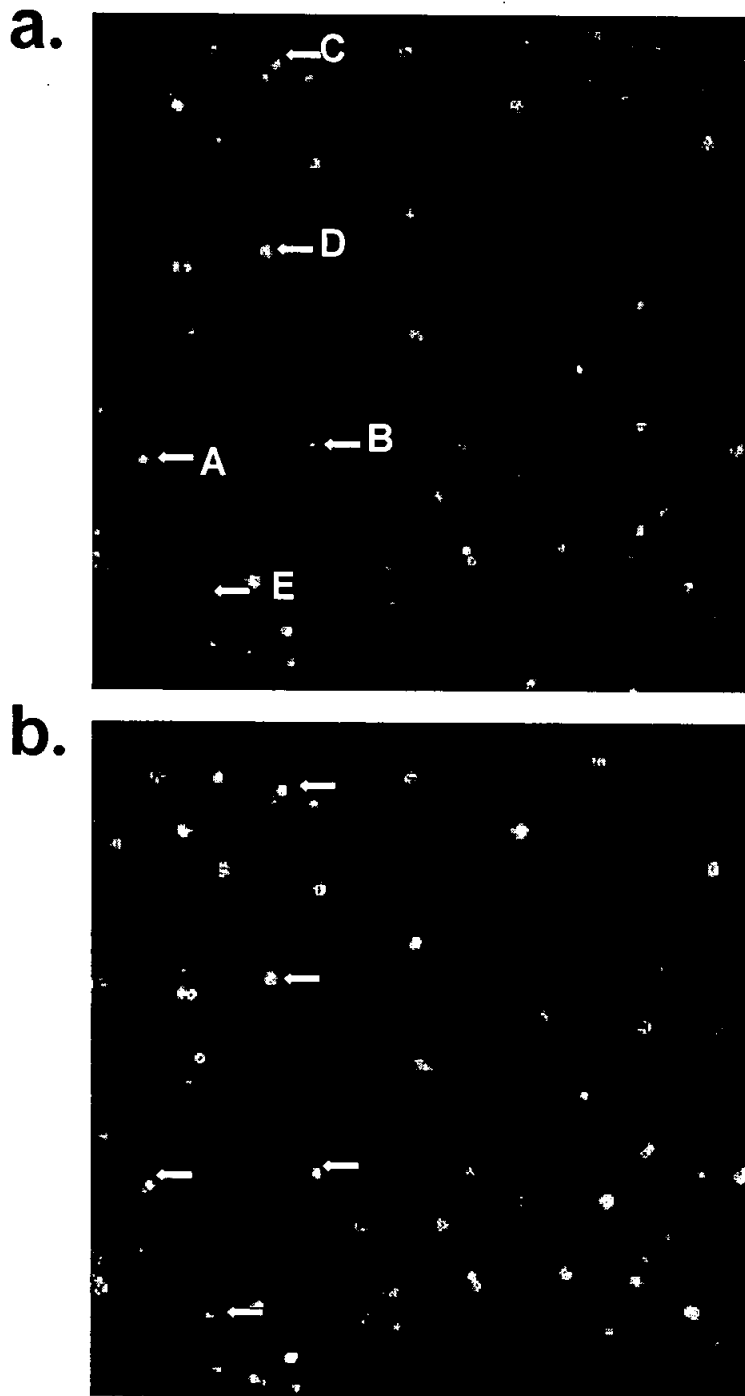


Fig-1 TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內鈣子釋放之觀察

利用甲釋素去刺激腦下垂體前葉細胞，並在共軛焦顯微鏡下利用鈣離子特異性的螢光探針 Fluo 3-AM 觀察細胞內鈣離子釋放情形。a.未經 TRH 刺激的螢光強度。b.10nM TRH 刺激的螢光強度。

A、B、C、D、E 代表五種細胞型態。

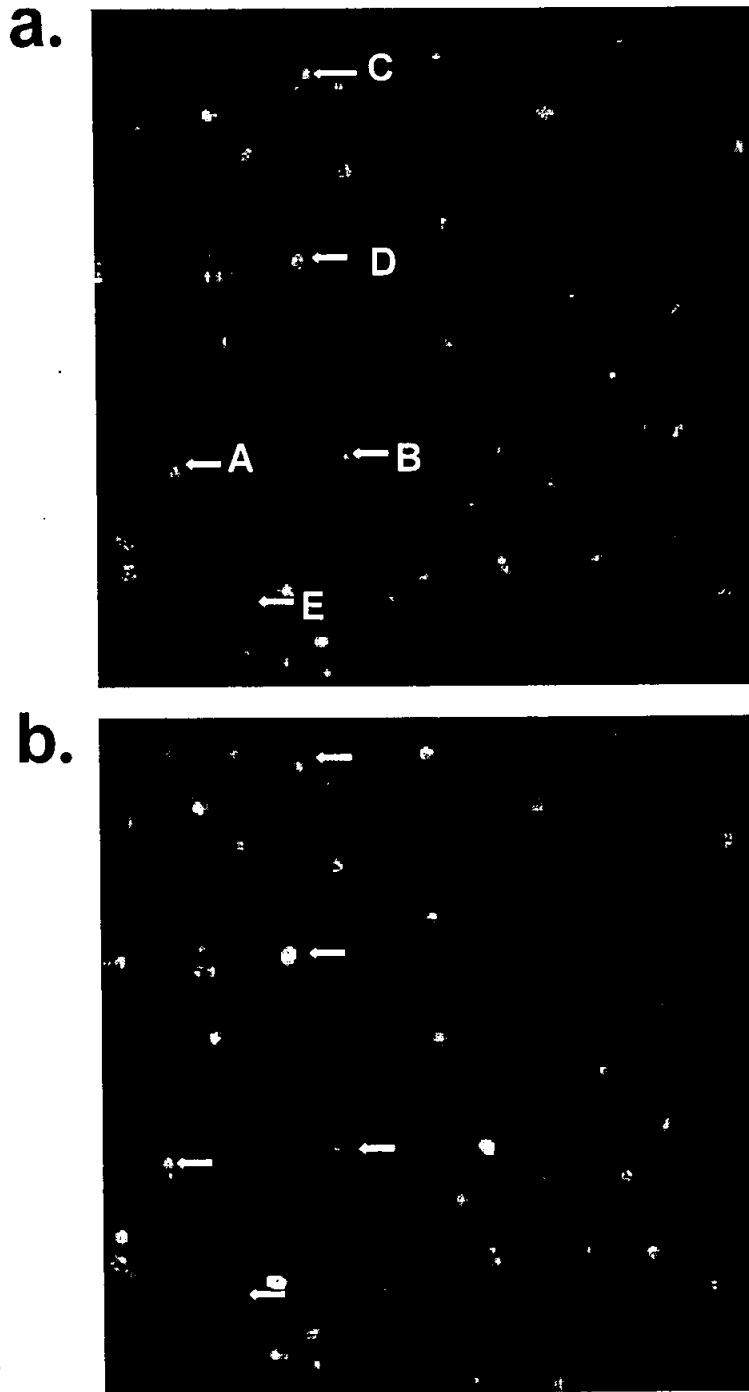


Fig-2 TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內鈣子釋放之觀察

利用甲釋素去刺激腦下垂體前葉細胞，並在共軛焦顯微鏡下利用鈣離子特異性的螢光探針 Fluo 3-AM 觀察細胞內鈣離子釋放情形。a. 10nM TRH 刺激後回覆的螢光強度。b. 100nM TRH 刺激的螢光強度。A、B、C、D、E 代表五種細胞型態。



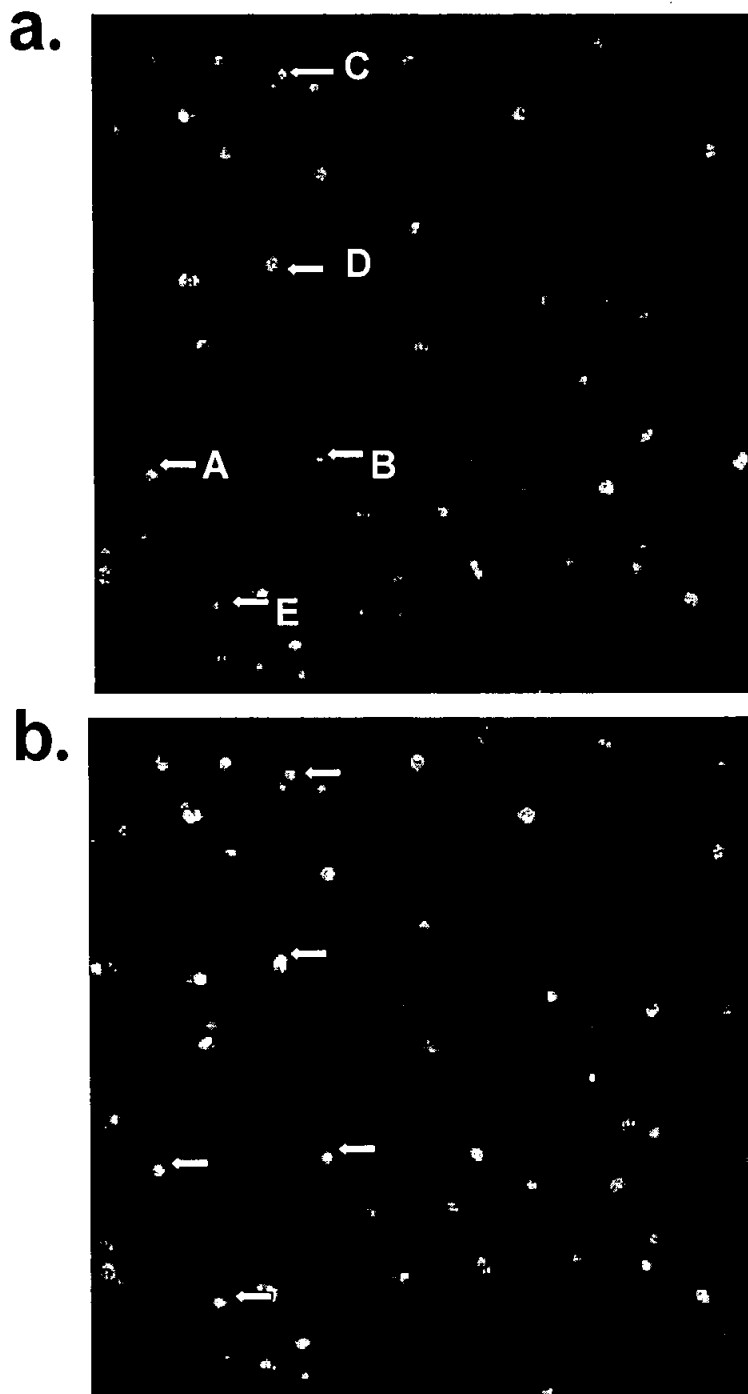


Fig-3 TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內鈣子釋放之觀察

利用甲釋素去刺激腦下垂體前葉細胞，並在共軛焦顯微鏡下利用鈣離子特異性的螢光探針 Fluo 3-AM 觀察細胞內鈣離子釋放情形。a. 100nM TRH 刺激後回覆的螢光強度。b. 1000nM TRH 刺激的螢光強度。A、B、C、D、E 代表五種細胞型態。

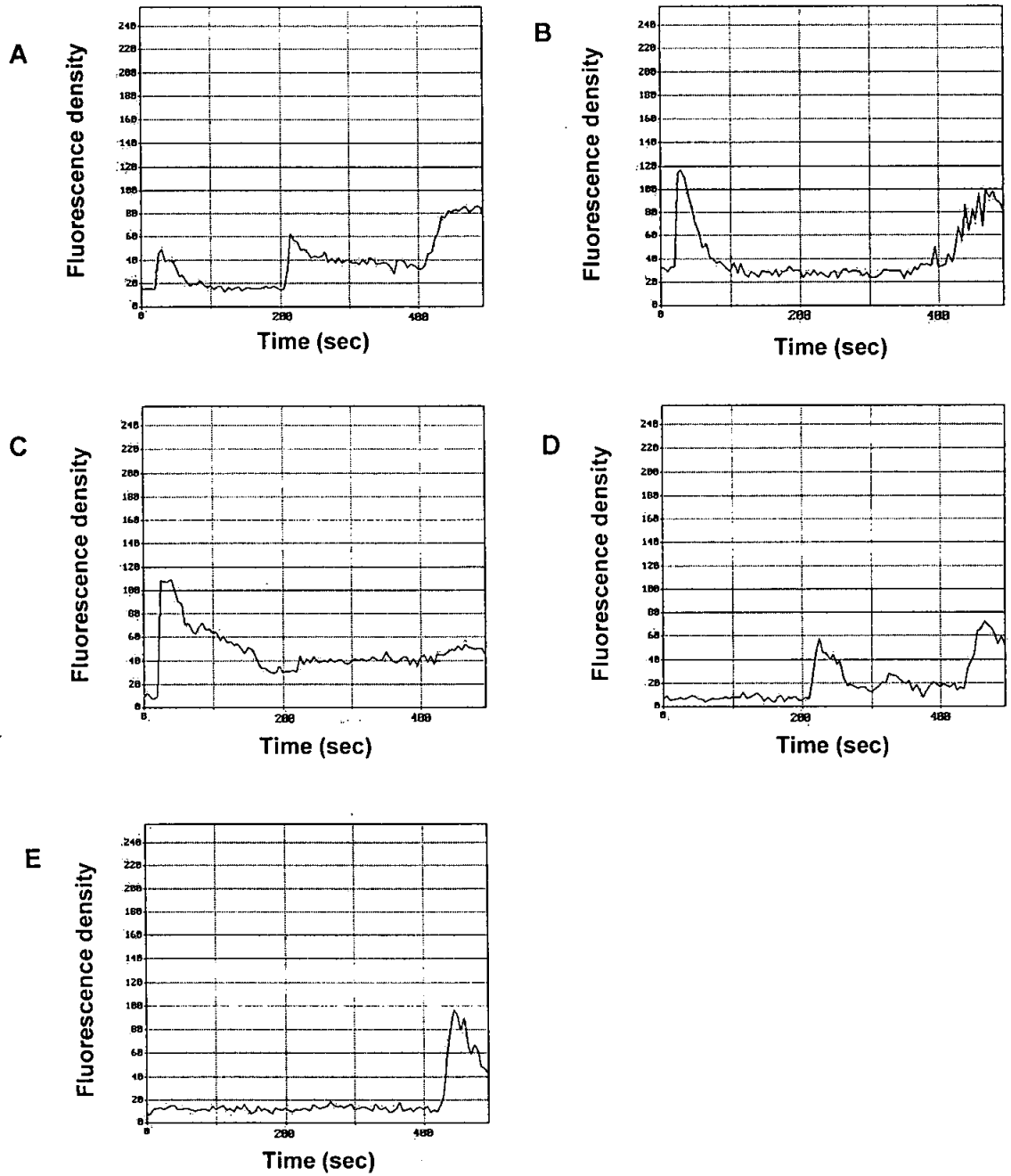


Fig-4 對 3 種濃度 TRH 有反應的腦下垂體前葉細胞，依螢光亮度變化圖，可以分為 A、B、C、D、E 5 種細胞型態。

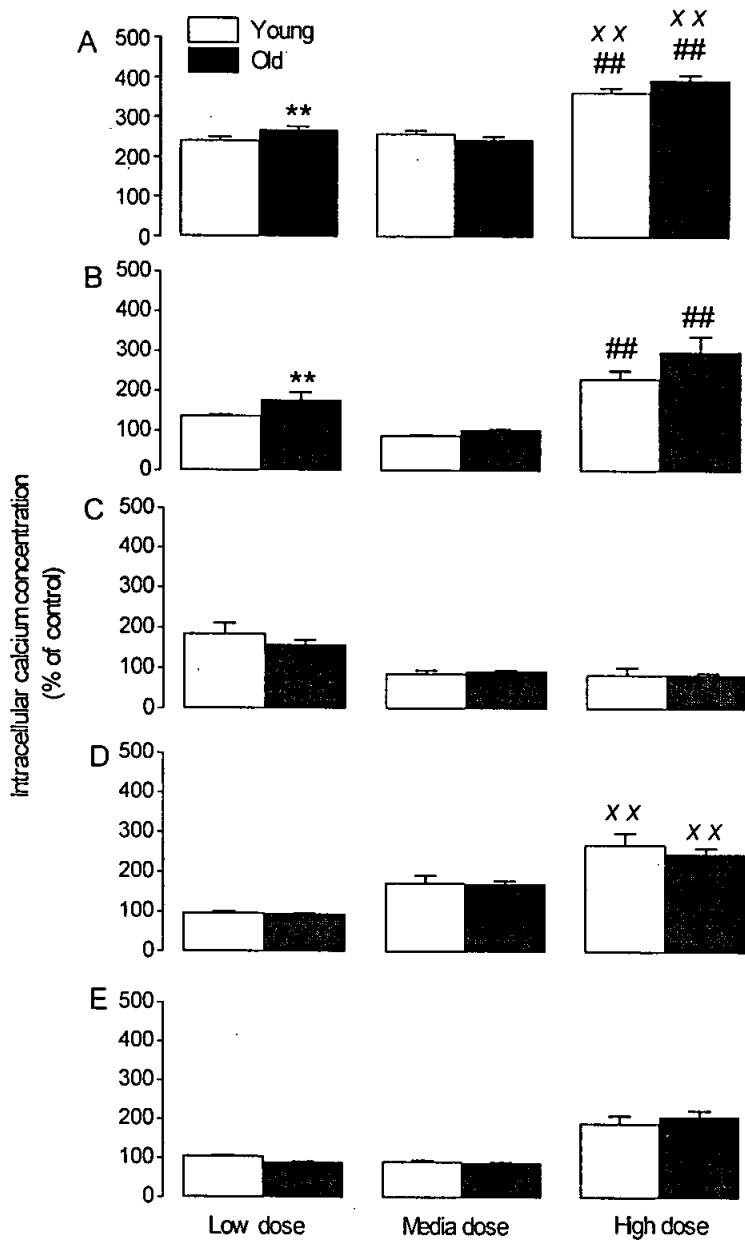


Fig-5 對 3 種濃度 TRH 有反應的腦下垂體前葉細胞，依螢光亮度變化之定量分析圖。(xx : High dose versus Media dose,  $P < 0.01$  ; ## : High dose versus Low dose,  $P < 0.01$  ; \*\* : Young versus Old,  $P < 0.01$  )

## 第二部份

# 低氧壓迫對於大鼠腦內蛋白激酵素 C 表現之 影響

Effect of hypoxia on the expression of protein kinase C  
in rat brain

## 壹．中文摘要

為了研究低氧壓迫對於有意識大鼠腦內蛋白激酵素 C (PKC) 表現之影響，本篇利用 RT-PCR (反轉錄-核酸連鎖反應) 的技術，來偵測大鼠腦中 PKC 異構物 mRNAs 的表現。方法是將 Sprague-Dawley 大鼠暴露於 12% 氧氣和 88% 氮氣之模擬低氧環境的箱子中，每天處理 8 小時，分別處理 1 天或連續處理 4 天。結果顯示暴露在缺氧狀態下 1 天和連續 4 天的大鼠腦內某些 PKCs 之 mRNA 表現有明顯下降的現象： $\alpha$  (分別是 50% 和 21%)， $\delta$  (分別是 40% 和 17%)， $\varepsilon$  (分別是 81% 和 23%)， $\theta$  (分別是 64% 和 12%) 和  $\lambda$  (分別是 88% 和 28%)。而 PKC  $\zeta$  只有在第 4 天有明顯下降 (74%)。PKC  $\beta$  和  $\eta$  在第 1 天和第 4 天的表現則都明顯上升， $\beta$  (分別是 309% 和 277%) 和  $\eta$  (分別是 241% 和 221%)。PKC  $\gamma$  的表現在第 1 天上升 (153%) 而第 4 天卻下降 (79%)。這些結果顯示多樣性的 PKC 異構體表現可能參與低氧壓迫造成大鼠腦內受損的調節作用。

## 貳 . 英文摘要

To study the differential expressions of PKC isoforms in brain under hypoxia in conscious rats, the mRNAs were measured by RT-PCR. The male Sprague-Dawley rats were exposed in a simulated hypobaric chamber at 12 % O<sub>2</sub> and 88% N<sub>2</sub> for 8 h per day for 1 day or 4 days. The result showed that after hypoxia exposure the mRNA levels of some PKC isoforms were significantly decreased on day 1 and day 4:  $\alpha$  (50% and 21%, respectively),  $\delta$  (40% and 17%, respectively),  $\varepsilon$  (81% and 23%, respectively),  $\theta$  (64% and 12%, respectively) and  $\lambda$  (88% and 28%, respectively), except PKC  $\zeta$  was also significantly decreased but only on day 4 (74%), whereas PKC  $\beta$  and  $\eta$  were significantly increased on day 1 and day 4 (309% and 277% for  $\beta$ , respectively; and 241% and 221% for  $\eta$ , respectively). Besides the PKC  $\gamma$  was increased on day 1 (153%) and then decreased on day 4 (79%). All these findings suggested that the various expressions of PKC isoforms may be involved in the modulation of rat brain damage during hypoxia by different manner.

## 參 . 縮寫表

**aPKCs : atypical PKCs**

**cPKCs : classical PKCs**

**nPKCs : novel PKCs**

**DAG : diacylglycerol**

**EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid**

**FBS : fetal bovine serum**

**IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-trisphosphate phosphates**

**MSH :  $\beta$ -mercaptoethanol**

**PKC : Protein Kinase C**

**PLC : phospholipase C**

**TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate**

## 肆．前言

### 一．缺氧 (hypoxia) 的概念

氧參與生物氧化(1)，是正常生命活動不可缺少的物質。成人在靜息狀態下，每分鐘耗氧量約 250 毫升。活動時，耗氧量增加，但人體內氧儲量極少，有賴於外界環境氧的供給和通過呼吸、血液不斷地循環完成氧的攝取和運輸，以保證細胞生物氧化之需要。當組織得不到充足的氧，或不能充分利用氧時，組織的代謝、機能、甚至形態結構都可能發生異常變化，這一病理過程稱為低氧 (hypoxia) (2)。

低氧是許多疾病所共有的一個基本病理過程。例如休克、呼吸功能不全、心功能不全、貧血等，都可以引起低氧 (3、4、5、6)。缺氧在軍事醫學中也是個非常重要的課題，例如高原適應不全症主要是個低氧的問題；高空飛行、潛水作業、密閉艙或坑道內作業，如果處理不當或發生意外，都可能發生低氧。所以研究低氧的發生、發展的規律以及缺氧所引起的病理生理變化，對低氧的防治、保障部隊戰鬥力等，具有重要的意義。



常用的血氧指標及其意義為 (7) - 氧分壓 ( $PO_2$ ): 是指以物理狀態溶解在血漿內的氧分子所產生的張力 (故又稱氧張力)。在 100 毫升、37 C 的血液內，以物理狀態溶解的氧，每 0.003 毫升可產生 1mmHg 的氧分壓。正常人在靜息狀態下，呼吸海平面空氣，以物理狀態溶解在動脈血內的氧約 0.3 毫升，動脈血氧分壓 ( $PaO_2$ ) 約 100mmHg；靜脈血氧分壓 ( $PvO_2$ ) 正常約 40mmHg。

$PaO_2$  主要取決於肺泡氧分壓 ( $PaO_2$ ) 的高低，氧通過肺泡膜彌散入血的量、肺泡通氣量與肺血流量的比例。如果外界空氣氧分壓降低或肺泡通氣減少，使肺泡氧分壓降低，或彌散障礙、通氣／血流比例失調，使肺動—靜脈血的功能性或解剖性分流增加，都可使  $PaO_2$  降低。

氧含量是指 100 毫升血液內所含的氧毫升數，包括實際與血紅蛋白結合的氧和溶解在血漿內的氧。正常動脈血氧含量約 19.3 毫升，混合靜脈血氧含量約 12 毫升。

血液氧含量主要取決於  $PaO_2$  與血紅蛋白的質和量。 $PaO_2$  明顯降低或血紅蛋白結合氧的能力降低，使血紅蛋白飽和度降低，或單位容積血液內血紅蛋白量減少，都可使氧含量減少。

氧容量指氧分壓為 100mmHg，二氧化碳分壓為 40mmHg，溫度 37 C，在體外 100 毫升血液內血紅蛋白所結合的氧量。正常血紅蛋白在上述條件下，每克能結合氧 1.34~1.36 毫升。若按每 100 毫升血液含量含血紅蛋白 15 克計算，動脈血和靜脈血氧容量約 20 毫升。

氧含量取決於單位容積血液內血紅蛋白的量和血紅蛋白結合氧的能力。如果血紅蛋白含量減少（貧血）或血紅蛋白結合氧的能力降低（如高鐵血紅蛋白、碳氧血紅蛋白），則氧容量減少，氧含量也隨之減少。如果單位容積血液內血紅蛋白的量和性質正常，只是由於氧分壓降低使血紅蛋白氧飽和度降低。此時氧含量減少，但氧容量是正常的（8）。

氧飽和度（9）：是指血紅蛋白與氧結合達到飽和程度的百分數。1 克血紅蛋白最多能與 1.36 毫升的氧結合，氧飽和度達到 100%。

氧飽和度高低主要取決於氧分壓的高低，由於血紅蛋白的生理特點，氧離曲線呈 S 形， $PO_2$  60mmHg 以下，才會使氧飽和度明顯降低，氧含量明顯減少，從而引起缺氧（10）。

血紅蛋白與氧親和力高低，常用  $P_{50}$  表示。 $P_{50}$  是指血液在 37 C，pH7.4， $PCO_2$ (40mmHg)的條件下，使氧飽和度達到 50%時的氧分壓。正常成人  $P_{50}$  約為 27mmHg。血液  $PCO_2$  升高、pH 降低、濕度升高或

紅細胞內 2,3-DPG 含量增加，都可使血紅蛋白氧親和力降低，氧離曲線右移， $P_{50}$  增大；反之，使血紅蛋白與氧親和力升高，氧離曲線左移， $P_{50}$  變小。血紅蛋白的結構與功能異常，不易與氧結合或不易解離氧，對  $P_{50}$  也有影響。

動靜脈血氧差 即動脈血氧含量減去靜脈血氧含量所得的毫升，說明組織對氧消耗量。由於各組織器官耗氧量不同，各器官動靜脈血氧差很不一樣。正常動脈血與混合靜脈血氧差約 6~8 毫升。

動靜脈血氧差變化取決於組織從單位容積血液內攝取氧的多少。 $PaO_2$  明顯降低，動脈血與組織氧分壓梯差變小；微循環動靜脈吻合支開放，使流經真毛血管的血量減少；紅細胞變形能力降低或紅細胞聚集，使血液流變性發生改變；細胞受損，利用氧的能力降低，都可使組織細胞從血液中的攝取的減少，動靜脈血氧減少變小。淤血，血流緩慢，雖然單位時間動脈血灌流減少，但由於血流緩慢和氧離曲線右移，組織從單位容積血液內攝取的氧增多，動靜脈血氧差加大。

## 二、低氧時生物體的機能代謝障礙

嚴重低氧，如低張性低氧者  $PaO_2$  低於 30mmHg 時，組織細胞可發生嚴重的低氧性損傷，器官可發生功能障礙甚而功能衰竭。

## (一) 低氧性細胞損傷

低氧性細胞損傷 (hypoxic cell damage) 主要為細胞膜、線粒體溶酶體的變化。

1、細胞膜的變化：在細胞內 ATP 含量減少以前，細胞膜電位已開始下降。其原因為細胞膜對離子的通透性增高，導致離子順濃度差透過細胞膜。

(1) 鈉離子內流： $\text{Na}^+$ 內流使細胞內  $\text{Na}^+$ 濃度增加，可啟動  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵以泵出  $\text{Na}^+$ ，從而消耗 ATP。ATP 消耗量增多可促使線粒體氧化磷酸化過程增強，嚴重低氧時，線粒體呼吸功能降低使 ATP 生成減少，以至  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵不能充分運轉，進一步使細胞內  $\text{Na}^+$ 增多。細胞內  $\text{Na}^+$ 的增多促使水進入細胞，導致細胞水腫。血管內皮細胞腫脹可堵塞微血管，加重微循環低氧 (10-13)。

(2) 鉀離子外流： $\text{K}^+$ 外流使細胞內缺  $\text{K}^+$ 。而  $\text{K}^+$ 為蛋白質包括酶等合成代謝所必需。細胞內缺鉀將導致合成代謝障礙，酶的生成減少，將進一步影響 ATP 的生成和離子泵的功能 (14-15)。

(3) 鈣離子的內流：細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度比胞漿中游離  $\text{Ca}^{2+}$ 高 1000 倍以上。細胞內  $\text{Ca}^{2+}$ 逆濃度外流和肌漿網、線粒體逆濃度差攝  $\text{Ca}^{2+}$

均為耗能過程。當嚴重低氧時使細胞膜對  $\text{Ca}^{2+}$  的對通透性增高量  $\text{Ca}^{2+}$  內流將增加；ATP 減少將影響  $\text{Ca}^{2+}$  的外流和攝取，使胞漿  $\text{Ca}^{2+}$  濃度增高。  $\text{Ca}^{2+}$  增多可抑制線粒體的呼吸功能；可啟動磷脂酶，使膜磷脂分解，引起溶酶體的損傷及其水解酶釋出；還可啟動一種蛋白酶，使黃嘌呤脫氫酶轉變為黃嘌呤氧化酶。由此增加自由基的形成，加重細胞的損傷（16）。

2、線粒體的變化：細胞內的氧約有 80—90% 在線粒體內用於氧化磷酸化生成 ATP，僅 10~20% 在線粒體外用於生物合成、降解及生物轉化作用等。輕度低氧或低氧早期線粒體呼吸功能是增強的。嚴重低氧首先影響線粒體外氧的作用，使神經介質的生成和生物轉化過程等降低，當線粒體部位氧分壓降到監界點  $< 1\text{mmHg}$  時，可降低線粒體的呼吸功能，使 ATP 生成減少。呼吸功能降低主要因脫氫酶活性下降，嚴重時線粒體可出現腫脹、脊崩解、外膜破裂和基質外溢等病變（17-18）。

3、溶酶體的變化：低氧時因糖酵解增強，乳酸生成增多，和脂肪氧化不全使其中間代謝產物酮體增多。導致酸中毒。pH 降低可引起磷脂酶活性增高，使溶酶體膜磷脂被分解，膜通透性增高，結果使

溶酶體腫脹、破裂，和大量溶酶體酶的釋出，進而導致細胞本身及其周圍組織的溶解、壞死（19）。

## （二）中樞神經系統的機能障礙

腦重僅為體重為 2% 左右，而腦血流量約占心輸出量之 15%，腦耗氧量約為總耗氧量的 23%，所以腦對缺氧十分敏感。腦灰質比白質的耗氧量多 5 倍，對低氧的耐受性更差。急性低氧可引起頭痛、情緒激動、思維力、記憶力、判斷力降低或喪失以及運動不協調等。慢性低氧者則有易疲勞、思睡、注意力不集中及精神抑鬱等症狀。嚴重低氧可導致煩躁不安、驚厥、昏迷甚而死亡。正常人腦靜脈血氧分壓約為 34mmHg，當降至 28mmHg 以下可出現神經錯亂等；降至 19mmHg 以下時可出現意識喪失；低達 12mmHg 時將危及生命。低氧引起腦組織的形態學變化主要是腦細胞變性、壞死、腦細胞腫脹及腦水腫（20）。

低氧可引起中樞神經系統機能障礙（21）。神經細胞膜電位的降低、神經介質的合成減少、ATP 的生成不足、酸中毒、細胞內游離  $\text{Ca}^{2+}$  增多（16）、溶酶體酶的釋放（19）以及細胞水腫等，均可導致神經系統的功能障礙，甚而神經細胞結構的破壞、當  $\text{PaO}_2$  低於 50mmHg 時，可使腦血管擴張。低氧與酸中毒還使腦微血管通透性增

高，從而導致腦水腫（22）。腦血管擴張、腦細胞及腦間質水腫可使顱內壓升高，由此引起頭痛、嘔吐等症狀。

### （三）外呼吸功能障礙

急性低張性低氧，如快速登上 4000m 以上的高原時，可在 1—4 天內發生肺水腫（23），表現為呼吸困難、咳嗽、咳出血性泡沫痰、肺部有濕性羅音、皮膚粘膜發紺等。

PaO<sub>2</sub> 過低可直接抑制呼吸中樞，使呼吸抑制，肺通氣量減少，導致中樞性呼吸衰竭。

### （四）循環功能障礙

嚴重的全身性低氧時，心臟可受累，如高原性心臟病、肺原性心臟病、貧血性心臟病等，甚而發生心力衰竭（24-25）。

除以上所述神經系統、呼吸與循環系統機能障礙外，肝、腎、消化道、內分泌等各系統的功能均可因嚴重低氧而受損害。

## 三．蛋白激酶 C（PKC）

蛋白激酶 C（protein kinase C，簡稱 PKC）是一種鈣和磷酸酯依賴的蛋白激酶，它是於 1977 年首先被日本 Nishizuka 等人，從

牛的小腦所發現之異於蛋白激酶 A 的蛋白激酶 (26)，之後即受到廣泛的重視及研究。結果發現此酶的活化需要細胞膜上的磷脂和 diacylglycerol (DAG) (27-28)；當細胞受刺激之後，細胞表面的受體接受外來的荷爾蒙或神經傳導物質，使得受體活化磷脂酶 C (phospholipase C；PLC)，接著磷脂酶 C 將細胞膜上的磷脂肌醇 (phosphatidyl inositol) 分解，產生第二訊息傳遞物 (second messages) DAG 和 IP<sub>3</sub> (inositol 1,4,5-trisphosphate phosphates)，DAG 進而活化蛋白激酶 C。因此蛋白激酶 C 的活化生理途徑已被確認，而在陸續的研究中也發現除了經由活化磷脂酶 C 之途徑外，磷脂酶 D 和 A<sub>2</sub> 也可以分別活化或加強此酶的活性。此外，tumor promoting phorbol esters (TPA:12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)，也可以活化蛋白激酶 C，並造成此酶由細胞質轉移至細胞膜 (translocation) (29-30)，但是 TPA 長時間之作用反而造成其下降調節 (down-regulation)。蛋白激酶 C 在調節需要 Ca<sup>2+</sup> 參與的細胞功能上具有重要的角色，它可以透過一些細胞外的訊息，例如：生長因子 (growth factor)、荷爾蒙 (hormone) 及神經傳導物質 (neurotransmitters) 等 (31-32)，在細胞膜上扮演傳遞訊息的角色。蛋白激酶 C 也被發現可誘導許多細胞的反應，包括細胞的增殖 (proliferation)、分化 (differentiation)、基因的表現及腫瘤促進作用。



蛋白激酵素 C 活性過度表現可能造成多數大白鼠的纖維母細胞生長不正常 (33)。

已知蛋白激酵素 C 至少含有 12 種異構體 (isoenzyme)，依其結構上的差異、序列的不同以及需要的活化因子不同，可將其區分成三種類型：1) 傳統型 (conventional, PKCs) —  $\alpha$ 、 $\beta$  I、 $\beta$  II 及  $\gamma$ ，需要負價的磷脂，diacylglycerol 或 phorbol ester，及鈣離子存在下才能夠活化 (34-35) 2) 新型 (novel, nPKCs) —  $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\theta$ 、 $\eta$  及  $\mu$ ，需要負價的磷脂，diacylglycerol 或 phorbol ester 才能活化，但不需要鈣離子 (34-36) 3) 異型 (atypical, aPKCs) —  $\lambda$ 、 $\iota$  及  $\zeta$ ，只要負價的磷脂，不需要鈣離子，diacylglycerol 或 phorbol ester 即可活化 (35)。

蛋白激酵素 C 是由 C1-C4 四個不同的區域 (domain) 所組成，C1 是假性受質 (pseudosubstrate) 及 phorbol ester 結合區，C2 是鈣離子結合區，C3 是 ATP 結合區，C4 是受質結合區，具有磷酸化轉移的功能 (36-37)。蛋白激酵素 C 異構體的差異在於具有或缺少某些區域而致使其表現不同，例如 nPKCs 及 aPKCs 缺少鈣離子結合區；cPKCs 及 nPKCs 在 phorbol ester 的結合位包含兩個 zinc fingers 之作用部位，而 aPKCs 只具有一個 zinc finger 之作用部位；蛋白激酵素 C  $\mu$  則缺乏 pseudosubstrate 區。

此三類型異構體之性質、分佈及受活化之方式。因此不同的異構

體可能各有不同功能 (38-41)。例如 PKC $\alpha$ 、 $\delta$  及  $\zeta$  普遍存在許多細胞與組織中，但像 PKC $\gamma$ 、 $\eta$  及  $\theta$  則有特異性的存在一種或少種的組織中。此外，大部分的細胞會內含某些固定的 PKC 異構體，但其表現會受到不同的刺激而有不同的表現。最近報告指出個別的蛋白激酶 C 異構體參與修復細胞的增殖，例如：以 carbon tetrachloride 誘導肝再生時，發現蛋白激酶 C $\alpha$  表現量增加 (42)。在部分的肝切除(hepateomy)之後也可觀察到細胞核內的蛋白激酶 C $\alpha$  減少及蛋白激酶 C $\delta$  增加 (43)。當肝再生期間蛋白激酶 C 進行重新分佈，從可溶的細胞質部分轉移至微粒部分 (44-45)。葉酸 (Folic acid) 誘導腎臟再生會誘導蛋白激酶 C $\alpha$  降低，但是蛋白激酶 C $\delta$  不會改變 (46)。肝臟及腎臟的再生也會誘導初期反應基因的表現，而這些基因的表現直接間接的透過蛋白激酶 C 的調控，例如：fos、myc、Tris1、Tris8 及 Tris11 (47-50)。由以上資料顯示蛋白激酶 C 的活化可能發生在化學或機械式的誘導細胞增殖時期。

#### 四．蛋白激酶 C (PKC) 與 Hypoxia 的關係

已知 hypoxia 與 PKC 異構體表現有關，而且 PKC 異構體也參與細胞內的訊息傳遞的路徑。例如：細胞增殖、基因表現、細胞凋亡、修飾細胞膜上的離子孔道及當任傳導者的工作等等，因此 PKC 異構

體在細胞內扮演重要角色。最近的文獻報告中提到 PKC 與 hypoxia 之間的關係如下幾點：

### (一) 肺臟

低氧會引起較廣泛的肺血管收縮，導致肺動脈壓升高時，肺上部的血流增加，肺上部的肺泡通氣能得到更充分的利用。有研究報告指出在豬的肺動脈平滑肌在低氧時會誘導蛋白激酶素 C $\alpha$  mRNA 表現上升，也許蛋白激酶素 C $\alpha$  在肺臟缺氧發展過程中扮演一個重要的角色 (51)。

### (二) 心臟

心肌組織需氧與供氧的不平衡，是冠心病最基本的病理生理基礎。已經發現，組織缺血、低氧會導致新生血管的增多，VEGF (52) 作為一種內皮細胞的有絲分裂原和促血管形成因數，直接特異地作用於血管內皮細胞，引起內皮細胞的增殖，在新生血管生成過程中起著“扳機”樣作用。因而有理由推測 VEGF 也參與了急性心肌缺血、低氧時的血管再生過程。以增加血流量，提高缺血組織的氧供。有研究報告指出在低氧誘導大鼠心肌細胞分泌產生 VEGF 蛋白，其信號傳導是通過 PKC $\epsilon$  通路完成的 (53)。

### (三) 腦部

正常新生兒腦血管以舒張和收縮來調節進入腦組織的血流量，當血流

量減少時腦血管舒張，而當血流量增加時腦血管則收縮，以這種功能保持進入腦組織的流量相對穩定、缺氧缺血時血壓波動大，血流量的變化多，但此時腦血管的調節功能卻已降低，當血壓降低，血流量減少時，腦血管未能及時舒張，形成腦的低灌注，待血壓升高，血流量增加時，腦血管又未能及時收縮，轉變成高灌注，在這轉變過程中最易發生腦水腫和顱內出血。而且低灌注本身也可引低氧血性腦病。腦低氧血後，PKC 活性很快下降。PKC 的快速失活是腦低氧血的特徵，也是 NMDA 受體介導神經元死亡的必需步驟 (54-56)。

## 伍．研究動機

已知道高山病 (Mountain Sickness): 人在高地, 因氧分壓下降而發生氧的不足而引起腦部低氧 (Hypoxia) (57)。所發生的情況, 包括作噁、嘔吐、頭痛、頻脈和失去胃口。是因為腦部缺氧而造成腦組織和中樞神經系統的損害。而先前已知 PKC 是細胞信號轉導過程中的一種蛋白激酶, 在神經系統主要存在於突觸前膜, 對神經的興奮性有調節作用, 可促進線粒體能量代謝 (58), 增強膜離子通道及 ATP 酶活性, 增強突觸效能。過去文獻指出在大鼠腦急性低氧 (5% O<sub>2</sub> 和 95% N<sub>2</sub>) 後, 由 Western blot 分析大鼠腦中, 可發現蛋白激酶  $\alpha$  和  $\gamma$  異構體有下降的趨勢, 作者推論可能與 neuronal degeneration 有關 (60), 但是在海拔 2400 公尺的高地, 氧量約 12% 和氮量約 88% 的環境下, 對於 PKC 異構體的變異和中樞神經系統的影響, 所知有限。所以本實驗係利用 RT-PCR 的方法探討其 mRNA 層面的蛋白激酶 C 異構體表現 (mRNA expression of PKC isoenzyme), 希望藉此實驗結果來了解慢性 Hypoxia 造成腦組織的損害時, 蛋白激酶 C 異構體所扮演的角色。

## 陸．實驗材料與方法

### 一、實驗材料

#### (1) 購自美國 Sigma 公司

2-Mercaptoethanol (MSH)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

Citric acid

Isoamyl alcohol

N-Lauroylsarcosine

Guanidine thiocyanate Sodium acetate (GNTC)

Isopropanol anhydrous.

3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid (MOPS)

Formamide

37% Formaldehyde

Diethyl pyrocabonate (DEPC)

Chloroform

Bovine serum albumin (BSA)

#### (2) 購自美國 Promega 公司

MMLV Reverse transcriptase

MMLV Reverse 5×buffer

Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor

dATP dCTP dTTP dGTP

(3) 購自美國 USB 公司

Sodium acetate

Phenol pH4.0

(4) 購自美國 Gibco/BRL 公司

Agarose

(5) 購自美國 Dyna 公司

DNA polymerase

10×PCR buffer

(6) 生工公司

TBE solution (5×)

(7) 購自聯工化學廠股份有限公司

Sodium chloride ( NaCl)

Potassium chloride ( KCl)

Calcium chloride ( CaCl<sub>2</sub>)

Sodium phosphate ( Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O)

Magnesium chloride ( MgCl<sub>2</sub>)

Potassium phosphate,dibasic ( K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Chloric acid ( HCl)

Potassium phosphate,monobasic ( KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

## 二、實驗儀器：

名稱	廠牌
GeneAmp PCR system 2400	Perkin Elmer
Spectrophotometer	Hitachi U-2001
Centrifuge	Kubota-1720
Centrifuge	Sigma-2K15
Millipore	Micon
PCR tube	Scientific Specialtie Incorporated
高壓殺菌釜	Tomin TM322
pH meter	Jenco microcomputer model 6200
天平	Mettler AE 240
加溫攪拌器	Corning
Ultravidet transilluminator	Ultra · LUM
DNA 電泳槽	Mupid-2
數位影像儀	Kodak
單片垂直型電泳槽	OWL
水浴加熱器	TKS WB201

## 三、實驗方法：

### 1. 檢體來源：

陽明大學生理所王錫崗老師實驗室。



## 2. 萃取組織 RNA

先取得大鼠腦組織約 100 毫克置入研磨管，加入 2ml solution D [4 M Guanidine thiocyanate (GNTC), 25 mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol] 研磨，研磨完後把組織連同 solution D 一起置入離心管，加入 50 $\mu$ l Sodium acetate (2 M, pH 4.0) 混合均勻，加入 100 $\mu$ l chloroform-isoamyl (49:1) 混合均勻，再加入 500 $\mu$ l phenol (pH 4.0) 混合均勻後在冰上靜置一分鐘，再拿起來用手均勻搖 30 秒，重複冰上靜置及用手搖 30 秒達 10 分鐘後，再放到冰上 5 分鐘後，離心 (12000 g, 4 $^{\circ}$ C, 30 分鐘)，取分層的上層水層到新的離心管，並加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，離心 (12000 g, 4 $^{\circ}$ C, 30 分鐘)，吸取分層的上層水層到新的離心管，再加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，重複此步驟直到分層中看不見白色沉澱後，將水層吸到新的離心管並加入等體積的 isopropanol，混合均勻後放到 -20 $^{\circ}$ C 冰箱靜置 1 小時，之後離心 (12000 g, 4 $^{\circ}$ C, 30 分鐘)，倒掉上清液，取沉澱物以 1 ml solution D 溶解後，再加入等體積的 isopropanol 混合完全後於 -20 $^{\circ}$ C 靜置 2 小時，之後再離心 (12000 g, 4 $^{\circ}$ C, 45 分鐘)，取沉澱物加入 1 ml 75% ethanol 混合完全，離心 (12000 g, 4 $^{\circ}$ C, 30 分鐘) 後取沉澱物，自然乾燥 1 小時，加入適量的 DEPC-H<sub>2</sub>O 溶解沉澱物，測量其吸光值 (OD<sub>260</sub>) 來換算 RNA 濃度。

RNA 濃度 ( $\mu$ g/ml) = 稀釋倍數  $\times$  RNA (OD<sub>260</sub> 值)  $\times$  (40 $\mu$ g/ml / OD<sub>260</sub>)

### 3.Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

#### 3-1. Reverse Transcriptase Reaction :

RT (reverse transcriptase) : 取 4 ug 的 RNA 加入 DEPC-H<sub>2</sub>O 17.75 ul , 以 70°C 處理 5 分鐘。加入 0.25 ul RNase inhibitor (Promega ; 40 U/ul) , 10 ul 5X RT buffer (Promega ; 50 mM Tris-HC , 75 mM KCl , 3 mM MgCl<sub>2</sub> 和 10 mM DTT) 以及 4 ul dNTP (Promega ; 2.5 mM) , 和 5 ul Oligo dT 後 , 於溫度循環機處理 42°C , 5 分鐘後加入 RT 酵素 (Promega) 1 μl , 繼續在 42°C 反應 , 1 小時之後再以 99°C 作用 5 分鐘後以 4°C 保存。

#### 3-2. 引子合成 (Primer synthesis) :

本實驗所需的引子 (primer) 皆由生工公司訂製 (Table 1 一、二)。

#### 3-3. 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)

取 10 ul cDNA 加入 39 ul DEPC-H<sub>2</sub>O , 加入 5 ul forward primer 和 5 ul reverse primer , 再加入 5 ul dNTP (10 mM) 以及 5ul 10X PCR buffer (DyNa ; 10 mM Tris-HCl , 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> , 50 mM KCl 和 0.1% Triton X-100) , 和加入 1 ul DNA polymerase (DyNa , 2U/ul) 於溫度循環機前處理 94°C , 5 分鐘後再進入第 1 個循環處理 94°C 1 分鐘 , annealing 溫度 1 分鐘 (視 primer 的 T<sub>m</sub> 值而定 , Table 2) , 並於 72°C 反應 2 分鐘 , 此循環次數視不同 primer 而定 (Table 2) , 最後再處理 72°C 反應 20 分鐘 , 4°C 保存。

#### 3-4. 競爭性聚合酵素連鎖反應 (competitive- Polymerase Chain Reaction) (59)

取 5 ul cDNA 加入 8. ul DEPC-H<sub>2</sub>O , 加入 2.5 ul forward primer 和

2.5 ul reverse primer，再加入 2.5 ul dNTP (10 mM)、2.5ul 10X PCR buffer (DyNa；10 mM Tris-HCl，1.5 mM MgCl<sub>2</sub>，50 mM KCl 和 0.1% Triton X-100)、1 ul 競爭性 cDNA，和加入 1 ul DNA polymerase (DyNa，2U/ul) 於溫度循環機前處理 94°C，5 分鐘後再進入第 1 個循環處理 94°C 1 分鐘，annealing 溫度 1 分鐘(視 primer 的 T<sub>m</sub> 值而定，Table 1)，並於 72°C 反應 2 分鐘，此循環次數視不同 primer 而定 (Table 1)，最後再處理 72°C 反應 20 分鐘，4°C 保存。

### 3-5 . DNA 電泳：

配置電泳膠片。加入 DNA marker 和取 10 μl 的 PCR 產物加入 2μl 的 6 倍 loading dye，加到電泳膠片。電壓 100 V，跑電泳膠片 30 分鐘，於 UV 光下對照 DNA marker 位置，檢查所要的位置是否有所表現。

### 4 . RNA 電泳

取 4μg RNA 加入 11.25μl Formamide、4μl 37% Formaldehyde 及 2.25 μl 10×MOPS，以 55°C 處理 15 分鐘，快速置入冰上 5 分鐘，離心 2 分鐘，加入 2.5μl loading dye，然後輕微振盪。取 25μl RNA 加入到電泳膠片。電壓 100V，跑電泳膠片 35 分鐘，於 UV 光下對照核糖體 RNA (ribosome RNA) 中的 28S 和 18S 的位置。檢查是否有 RNA 消失的現象。

### 5 . DNA 純化

取 PCR 的產物 50ul，加入到 DNA 電泳膠片，電壓 50V，跑電泳膠片 50 分鐘，將 DNA 電泳膠片放入 gel star 中染色 20 分鐘，於 UV 光下對照 DNA marker 位置，檢查所要的位置是否有所表現。利用美工刀切下電泳膠片上所要的位置，放入 millipore (Ultrafree-DA)，離

心 6000g，20 分鐘。將所離心下來的 DNA 產物，利用真空乾燥 2 小時後，加入二次水將濃縮後的 DNA 產物溶解。再置入 DNA 電泳膠片，電壓 100V，跑電泳膠片 25 分鐘，於 UV 光下對照 DNA marker 位置，檢查是否有得到純化後的 DNA 產物。

## 6. 統計分析

每個檢體 RT-PCR 結果都是三次以上實驗結果所做的分析，採用 ANOVA 分析， $P < 0.05$  表示顯著差異， $P < 0.01$  表示極顯著差異。

## 柒．結果

### 一、Competitive PCR 建立

我們實驗室擁有 Rat PKC  $\alpha$  及 GAPDH primer。於是，我們設計了一段引子（圖 1），可和原本實驗室中之 PKC  $\alpha$  及 GAPDH 的 5 端引子，夾出更短的 PKC  $\alpha$  及 GAPDH cDNA 產物，可做為競爭性內標準物。由圖 2、3 可得知，我們成功獲得 PKC  $\alpha$  的競爭性標準物（Competitive cDNA），其分別的分子量大小為 186bp。另外，由圖五則可看出不管 RT 產物是 0.5  $\mu$ g、1  $\mu$ g、2  $\mu$ g 和 4  $\mu$ g 都可應用於競爭性 PCR。也可知道隨著 RT 產物濃度愈低、再經由 2 倍稀釋後可看出有完全被抑制的情形（圖 4）。再來將 PKC  $\alpha$  的競爭性標準物和 PKC  $\alpha$  RT 之產物做 2 倍稀釋來做 PCR，結果發現 RT 產物濃度愈低，所產生的 Target cDNA（原本正常產生 PKC  $\alpha$  cDNA 分子量大小為 325bp）濃度愈低而 Competitive cDNA 濃度愈高（圖 5）。由此可知這是一種競爭性的抑制作用（圖 6）。

把先前實驗的 Hypoxia 之腦部萃取 mRNA 來做 competitive PCR，由 PKC  $\alpha$  部分（圖 7）來看，可發現當 PKC  $\alpha$  cDNA 表現量高時，competitor cDNA 的表現量就少；後來我們又繼續純化成功獲得

GAPDH 的競爭性標準物 (Competitive cDNA)，其分別的分子量大小為 144bp (圖 8、9)。再來將 GAPDH 的競爭性標準物和 GAPDH 的 RT 之產物做 2 倍稀釋來做 PCR，結果發現 RT 產物濃度愈低，所產生的 Target cDNA (原本正常產生 GAPDH cDNA 分子量大小為 309bp) 濃度愈低而 Competitive cDNA 濃度愈高 (圖 10)。

同樣把先前實驗的 Hypoxia 之腦部萃取 mRNA 來做 competitive PCR，由 GAPDH 部分 (圖 11) 來看，GAPDH mRNA 的表現量也一樣時，Competitive cDNA 的表現量也無明顯的變化。由此可知，我們的 Competitive PCR 方法是可行的。

## 二、Hypoxia 測試

我們針對 15 隻大白鼠來操作此實驗，分別為 5 隻為 Normoxia(不經過任何處理方式，而正常存活的健康公鼠)、5 隻為暴露於 12% 氧氣和 88% 氮氣之模擬低氧 (Hypoxia) 環境中，以一天暴露 8 小時的方式，處理 1 天，另外 5 隻則以同樣方式處理 4 天。並藉由萃取大鼠腦組織的 mRNA，以 RT-PCR 來偵測大鼠腦組織中 PKC 異構物 mRNA 的表現量，並以 GAPDH 當作 internal control。由 RT-PCR 發現大鼠腦組織中的 PKC  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\varepsilon$ 、 $\theta$  和  $\lambda$  之 mRNA 的表現量於暴露在缺氧環境下 1 天和 4 天都比 Normoxia 公鼠還低，而 PKC  $\xi$  表現量則僅於暴露 4 天之後才有下降的現象。然而 PKC  $\beta$  和  $\eta$  的 mRNA 表現

量卻在大公鼠缺氧後，跟 Normoxia 公鼠比起來則有上升的趨式。在 PKC  $\gamma$  之 mRNA 表現量於缺氧後第 1 天上升，而在第 4 天卻下降(圖、12、13)。再由定量圖(圖 14)顯示公鼠腦中 PKC  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\theta$  於暴露於低氧環境中 1 天的 mRNA 表現量有明顯上升的趨勢，其在統計學上屬於極顯著差異 ( $P < 0.01$ )；PKC  $\varepsilon$  和  $\lambda$  屬於顯著差異 ( $P = 0.02$  和  $P = 0.04$ )，而在暴露於缺氧環境中 4 天的 PKC  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\varepsilon$ 、 $\theta$ 、 $\lambda$  mRNA 之表現量則明顯上升，其統計學上的意義為屬極顯著差異；PKC  $\zeta$  與則屬於顯著差異 ( $P = 0.01$ )。然而 PKC  $\beta$  和  $\eta$  的 mRNA 在低氧環境 1 天或 4 天中，都有明顯下降的現象，其統計上是屬於極顯著差異。在 PKC  $\gamma$  之 mRNA 表現量於低氧 1 天後有明顯的上升，其有極顯著差異，然而在第 4 天後卻有下降，在統計學上屬於顯著差異。最後，PKC  $\mu$  則不論在低氧環境中 1 天或 4 天都無顯著的差異。

## 捌．討論

我們已經知道，習慣在平地生活的人，會因為某些原因而前往高海拔的山區活動。通常平地人會無法適應高山的低氧壓（Hypoxia）環境，於是便會產生頭痛、噁心、意識不清、昏迷，甚至於產生較嚴重的腦水腫現象，所以低氧壓的環境可能會造成腦部細胞嚴重損傷的影響（68）。而 PKC 分佈極為廣泛，各種異構物的分佈又各有其特殊性。在腦組織中至少已發現有 10 種同功酶存在，而 PKC $\gamma$  為腦和脊髓所獨有；PKC $\delta$ 、PKC $\epsilon$ 、PKC $\zeta$  等在腦組織中含量非常豐富（69）。因此本實驗室利用模仿低氧壓環境，使大白鼠的腦部細胞因低氧而產生損傷，再萃取受損傷的腦部組織，並利用 RT-PCR 的技術來探討其 PKC 異構物 mRNA 的表現。

結果顯示出在 Hypoxia 的狀態下，可發現 PKC $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\theta$ 、 $\lambda$  mRNA 的表現量有所降低，且具有統計學上的意義。這告訴我們於此六種 PKC 異構物處於不活化或下降調節的狀態中，也有可能是細胞已經開始走向細胞凋亡的現象（60-65）。因之前已有文獻指出，大鼠腦若在 Hypoxia 環境中受到損傷後，其受損腦細胞由西方墨點法



分析後，可觀察到 PKC  $\alpha$  活性有明顯下降的趨勢，作者推論為和 neuronal degeneration 有關 (60)。另外也有文獻指出 PKC  $\delta$ 、 $\epsilon$  跟神經組織的合成分化有關；PKC  $\delta$  是參與 neuritogenesis 的過程 (61-62)；PKC  $\epsilon$  則參與 neuronal differentiation 的過程 (63-65)。所以  $\delta$  和  $\epsilon$  mRNA 的表現量會明顯的下降的原因，可推論為是因為腦組織有受到損傷。而由此推論我們得以進一步的以 Nerve growth factor 來證明在低氧環境中時會產生 neuronal degeneration 的現象，是因為中樞神經受損傷後 Nerve growth factor 會有明顯上升現象 (66)。至於 PKC  $\xi$  mRNA 為何在第 4 天才會有明顯下降，目前並無任何文獻明確指出它於腦部，表現有何生物上的功能，其在低氧中有觀察此一現象，或許能做為在低氧環境中的指標。為何 PKC  $\gamma$  mRNA 表現量在第 1 天上升而在第 4 天卻下降代表何義，過去有文獻指出 PKC  $\gamma$  參與 neuronal development，的過程 (65)，是也否顯示細胞已經開始走向細胞凋亡的現象。而 PKC  $\beta$  和  $\eta$  在低氧環境中 mRNA 表現量有明顯的上升代表何義，過去文獻指出 PKC  $\beta$  在 Hypoxia 時會誘導 Egr-1 的表現，進而使血管纖維母細胞形成，來幫助肺組織去適應低氧環境 (67)。是否有可能是參與一些在 Hypoxia 後而產生的保護機制，則需要更進一步的研究。

接下來可真對 PKC  $\beta$  來研究，可將 PKC  $\beta$  的 antisense 或者 PKC

$\beta$  的抑制劑打入 Sprague-Dawley 大鼠的第三腦室，並且暴露於 12% 氧氣和 88% 氮氣之模擬低氧環境的箱子中，每天處理 8 小時，分別處理 1 天或連續處理 4 天，來觀察當 PKC  $\beta$  被抑制後，大鼠會發生何種生理變化；或者培養腦神經膠原母細胞利用同樣方法，也可以來觀察當 PKC  $\beta$  被抑制後，細胞會有何種變化，利用以上兩種方法來解釋在慢性 Hypoxia 狀態下 PKC  $\beta$  是否參與保護機制的調節。

分子生物學的發展與進步，聚合酶鏈反應(PCR)技術已成為分子生物學領域研究中不可缺少的核心技術。為滿足生物學特別是臨床醫學的要求,特異性核酸定量的研究近年有很大發展。PCR 過程是一種指數增長過程,反映參數(Taq 酶的活性、 $Mg^{2+}$  濃度、溫度及循環次數的選擇、引物二聚體形成和污染 DNA 的存在等)的任何一個微小變化都會顯著影響產物的量。在全部精確優化的條件下，試驗中還會由於試管效應而產生產物量上的差異。然而一般 RT-PCR 只能做到半定量，也就是說只能看到產物量上的差異，而無法知道真正檢體 mRNA 的表現量，於是就發展出競爭性 PCR 的方法，如此來實現全定量 PCR，此方法是將 Competitive 基因和 Target 基因競爭相同引物,須以相同效率擴增，多數反應是採用倍比稀釋的已知濃度參照，與恒定量 Target 基因一起擴增，檢測兩者擴增後，以 Competitive 基因的起始拷貝為橫軸，Competitive 基因/Target 基因產物比值為縱軸，作圖得

曲線，來推算檢體 mRNA 的表現量。我們仿照文獻的方法 (59) 來做競爭性 PCR，我們也成功建立了 Rat PKC $\alpha$  和 GAPDH 之競爭性 PCR，在此我們結果的 Competitive 基因濃度比文獻的方法的 Competitive 基因濃度低上 1000 倍以上，是否可能 Rat PKC $\alpha$  和 GAPDH mRNA 的表現量就比文獻中的 MMP mRNA 的表現量低，才會有此結果。我們結果也發現 Competitive 基因和 Target 基因一起擴增比只加 Competitive 基因擴增時 Competitor 基因產物量較多，這可能 Competitive 基因和 Target 基因一起擴增時，因為 2 種基因放在一起擴增會交互影響而出現加成的作用。

## 玖．參考文獻

1. Cabrera ME, Saidel GM and Kalhan SC. (1998) Role of O<sub>2</sub> in regulation of lactate dynamics during hypoxia: mathematical model and analysis. *Ann. Biomed. Eng.* 26: 1-27
2. 吳襄、林坤偉 (1997) 生理學大綱，藝軒圖書出版社，p183-184。
3. Bertges DJ, Fink MP and Delude RL. (2000) Hypoxic signal transduction in critical illness. *Crit. Care. Med.* 28: N78-86
4. Pierson DJ. (2000) Pathophysiology and clinical effects of chronic hypoxia. *Respir Care.* 45: 39-51
5. Bishopric NH, Andreka P, Slepak T and Webster KA. (2001) Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr Opin Pharmacol.* 1: 141-150
6. Matsuoka T, Saiki C and Mortola JP. (1994) Metabolic and ventilatory responses to anemic hypoxia in conscious rats. *J. Appl. Physiol.* 77: 1067-1072
7. 張振隆 (1991) 實用生理學 (上)，台光出版社，p12-61。
8. 吳襄、林坤偉 (1997) 生理學大綱，藝軒圖書出版社，p167-168。
9. 王瑞廷 (1998) 實用生理學，合記圖書出版社，P266-267。
10. 端木梁、李建雄、翁郁嘉、黃淑姿 (1996) 生物化學，藝軒圖書出版社，p67-80。

11. Matthay, M.A., Folkesson, H.G. and Verkman, A.S (1996) Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. *Am. J. Physiol.* 270: L487-L503
12. Factor P, Saldias F, Ridge K, Dumasius V, Zabner J, Jaffe HA, Blanco G, Barnard M, Mercer R, Perrin R and Sznajder JI. (1998) Augmentation of lung liquid clearance via adenovirus-mediated transfer of a Na,K-ATPase beta1 subunit gene. *J. Clin. Invest.* 102: 1421-1430
13. Sznajder JI. (2001) Alveolar edema must be cleared for the acute respiratory distress syndrome patient to survive. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 163: 1293-1294
14. Skou JC and Esmann M. (1992) The Na,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 249-261
15. Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, Pedemonte C, Bertorello AM and Sznajder JI. (2003) Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J. Clin. Invest.* 111: 1057-1064
16. Delivoria-Papadopoulos M, Akhter W and Mishra OP. (2003) Hypoxia-induced Ca<sup>2+</sup>-influx in cerebral cortical neuronal nuclei of newborn piglets. *Neurosci. Lett.* 342: 119-123
17. Chavez JC, Pichiule P, Boero J and Arregui A. (1995) Reduced mitochondrial respiration in mouse cerebral cortex during chronic hypoxia. *Neurosci. Lett.* 193: 169-172

18. Caceda R, Gamboa JL, Boero JA, Monge-CC and Arregui A. (2001) Energetic metabolism in mouse cerebral cortex during chronic hypoxia. *Neurosci. Lett.* 301: 171-174
19. Antonova II, Seredenko MM, Honchar OO, Koval' SB and Boiarchuk OD. (2000) The effect of hypoxia of different origins and of the degree of its severity on the functional activity of the lysosomal apparatus. *Fiziol. Zh.* 46: 45-51
20. Emerson MR, Nelson SR, Samson FE and Pazdernik TL. (1999) A global hypoxia preconditioning model: neuroprotection against seizure-induced specific gravity changes (edema) and brain damage in rats. *Brain Res. Protoc.* 4: 360-366
21. Nakajima W, Ishida A, Lange MS and Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, Blue ME, Johnston MV. (2000) Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J. Neurosci.* 20: 7994-8004
22. Swanson RA, Farrell K and Stein BA. (1997) Astrocyte energetics, function, and death under conditions of incomplete ischemia: a mechanism of glial death in the penumbra. *Glia.* 21: 142-153
23. Hohenhaus E, Paul A, McCullough RE, Kucherer H and Bartsch P. (1995) Ventilatory and pulmonary vascular response to hypoxia and susceptibility to high altitude pulmonary oedema. *Eur. Respir J.* 8: 1825-1833
24. Webster KA, Discher DJ, Kaiser S, Hernandez O, Sato B and

- Bishopric NH. ( 1999 ) Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *J. Clin. Invest.* 104: 239-252
25. Narula J, Hajjar RJ and Dec GW. ( 1998 ) Apoptosis in the failing heart. *Cardiol. Clin.* 16: 691-710
26. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y.( 1977 ) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissue. *J. Biol. Chem.* 252: 7603-7609
27. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y.( 1979 ) Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipid. *J. Biol. Chem.* 254: 3692-3695
28. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. and Nishizuka, Y. ( 1979 ) Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 1218-1224
29. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. ( 1982 ) Direct activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 257: 7847-7851
30. kraft, A. S. and Anderson W. B. ( 1983 ) Phorbol ester increase the amount of  $Ca^{2+}$ , phospholipid-dependent proteinase kinase associated with plasma membrane. *Nature* 301: 621-623

31. Berridge M. J. (1987) Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interaction second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 159-193
32. Rozengurt, E.(1989)Signal transduction pathway in mitogenesis. *Brit. Med. Bull.* 45: 515-528
33. Housey, G. M., Johnson, M. D., Hsiao, M. L., O, Brain, C.A., Murrhy, J. P., Kirschmerier, P. and Weistein, I. B. (1988) Overproduction of protein kinase C cause disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell* 52: 343-354
34. Hug, H. and sarre, T. F. (1993) Protein kinase C isoenzymes : divergence in signal transduction. *Biochemistry* 291: 329-343
35. Jaken, S. (1996) Protein kinase C isoenzyme and substrates. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 168-173
36. Johnnes, F.-J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P.and Pfizenmarier, K. (1994) PKC  $\theta$  is a novel atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* 269: 6140-6148
37. Stabel, S(1994)Protein kinase C-an enzyme and its relatives. *Semin. Cancer. Biol.* 5: 277-284
38. Azzi, A., Bosoboinik, D. and Hensey, C. (1992) The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Eur. J. Biochem.* 208: 547-557
39. Huang, K. P., Huang, F. L., Nakabayashi, H. and Yoshida, Y. (1988) Biochemical characterization of rat brain protein kinase C isoenzyme.



*J. Biol. Chem.* 263: 14839-14845

40. Hidaka, H., Tanaka, T., Onoda, K., Hagiwara, M., Watanabe, W., Ohta, H., Ito, Y., Tsurudomw, M. and Yoshida, T. (1988) Cell type-specific expression of protein kinase C isoenzyme in the rabbit cerebellum. *J. Biol. Chem.* 26: 4523-4526
41. Hocever, B. A., and Fields, A. P. (1991) Selective translocation of beta II-protein kinase C to the nucleus of human promyelocytic (HL60) leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 266: 28-33
42. Liyanage, M., Frith, D., Liveneh, E. and Stable, S. (1992) Protein kinase C group B members PKC-delta, -epsilon, -zeta and PKC-eta. *Biochem. J.* 283: 781-787
43. Sasaki, Y., Hayashi, N., Ito, T., Fusamoto, H., Dato, N. and Kamada, T. (1989) Heterogeneous activation of Protein kinase C during rat liver regeneration induced by carbon tetrachloride administration. *FEBS Lett.* 254: 59-65
44. Alessenko, A, Khan, W. A., Westel, W. W. and Hannun, Y. A. (1992) Selective changes in Protein kinase C isoenzymes in rat liver nuclei during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 1333-1339
45. Okamoto, A., Nishimura, K., Nakagawa, M and. Nakano, H. (1988) Protein Kinase C in the regeneration rat liver. *Biochemistry.* 207: 304-310
46. Rush, J. S., Klen, J., Fanti, P., Bhat, N. R. and Waechter, C.J. (1992)

- Direct assay of membrane-associated protein kinase C activity in B lymphocyte in the presence of Brij 58. *Anal. Biochem.* 207: 304-310
47. Dong, L., Stevents, J. L., Fabbro, D. and Jaken, S. (1993) Regulation of Protein kinase C isoenzymes in kidney regeneration. *Cancer Res.* 53: 4542-4549
48. Kondo, T., Inui, H., Konishi, F and. Inagami, T. (1992) Phosphatase D mimics platelet-derived growth factor as a competence factor in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 267: 23609-23616
49. Carpenter, G. (1992) Receptor tyrosine kinase substrate: src homology domain and signal transduction. *FASEB J.* 6: 3283-3289
50. Cowley, B. D., Chadwick, L. J, Grantham, J.J. and Calvet, J. P. (1989) Sequence protooncogene expression in regeneration kidney following acute renal injury. *J. Biol. Chem.* 264: 8389-8393
51. Ding Y, Xu Y, Zhang Z, Duan Q and Chen J. (2001) Effects of hypoxia on the expression of protein kinase C mRNA in pulmonary artery smooth muscle and endothelial cell. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 30: 202-206
52. Banai S, Jaklitsch M T and Shou M. (1994) Angiogenic induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by VEGF in dogs. *Circulation.* 89: 2183-2189
53. Hiroyuki Kawata, Ken-ichi Yoshida, Atsuhiko Kawamoto, Hideyuki Kurioka, Eiji Takase, Yasunobu Sasaki, Kazuhito Hatanaka, Masahiko Kobayashi, Takashi Ueyama, Toshio Hashimoto and

- Kazuhiro Dohi(2001 )Ischemic preconditioning upregulates vascular endothelial growth factor mRNA expression and neovascularization via nuclear translocation of protein kinase C epsilon in the rat ischemic myocardium. *Circ. Res.* 88: 696-704
54. Durkin JP, Tremblay R and Chakravarthy B.(1997 )Evidence that the early loss of membrane protein kinase C is a necessary step in the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J. Neurochem.* 68: 1400-1412
55. Tremblay R, Hewitt K and Lesiuk H. (1999 ) Evidence that brain-derived neurotrophic factor neuroprotection is linked to its ability to reverse the NMDA-induced inactivation of protein kinase C in cortical neurons. *J. Neurochem.* 72: 102-111
56. Pierce BT, Napolitano PG, Pierce LM, Apodaca CC, Hume RF Jr and Calhoun BC. (2001 ) The effects of hypoxia and hyperoxia on fetal-placental vascular tone and inflammatory cytokine production. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185: 1068-1072
57. Bartsch P, Swenson ER, Paul A, Julg B and Hohenhaus E. (2002 ) Hypoxic ventilatory response, ventilation, gas exchange, and fluid balance in acute mountain sickness. *High Alt. Med. Biol.* 3: 361-376
58. Vabe K, Tanonaka K and Koshimizn N. (2000 ) A role of PKC in improvement of energy metabolism in preconditioned heart. *Basic Res. Cardiol.* 95: 215-227
59. Chun-Shan Chou, Chen-Jei Tai,Colind. Maccalman, And Peter C. K.

- Leung (2003) Dose-Dependent Effects of Gonadotropin Releasing Hormon on Matrix Metalloproteinase (MMP) –2, andMMP-9 and Tissue Specific Inhibitor of Metalloproteinases-1 Messenger Ribonucleic Acid Levels in Human Decidual Stromal Cells in Vitro. *J. Clin. Endocrinol. Megab.* 87: 1427-1430
60. Yamaoka Y Shimohama S, Kimura J, Fukunaga R and Taniguchi T. (1993) Changes in protein kinase C isozymes in the rat hippocampus following transicmt hypoxia. *Neurosci. Lett.* 154: 20-22
61. Fagerstrom, S., Pahlman, S. and Nanberg, E. (1998) Protein kinase C-dependent tyrosine phosphorylation of p130cas in differentiating neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 273: 2336-2343
62. Hundle, B., McMahon, T., Dadgar, J. and Messing, R.O. (1995) Overexpression of epsilon-protein konase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 270: 30134-30140
63. O'Driscoll, K.R., Teng, K.K., Fabbro, D., Greene, L.A. and Weinstein, I.B. (1995) Selective translocation of protein kinase C- $\delta$  in PC12 cells during nerve growth factor-induced neuritogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 6: 449-458
64. Corbit, K.C., Foster, D.A. and Rosner, M.R. (1999) Protein kinase C  $\delta$  mediates neurogenic but not mitoginic activation of nitogin-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4209-4218

65. Yoshiko Akita<sup>1</sup> (2002) JB Minireview—Protein Kinase C Isotypes and Their Specific Functions *J. Biochem.* 132: 683-687
66. Lorez H, Keller F, Ruess G and Otten U. (1989) Nerve growth factor increases in adult rat brain after hypoxic injury. *Neurosci. Lett.* 98: 339-344
67. Yan SF, Lu J, Zou YS, Kisiel W, Mackman N, Leitges M, Steinberg S, Pinsky D and Stern D. (2000) Protein kinase C-beta and oxygen deprivation. A novel Egr-1-dependent pathway for fibrin deposition in hypoxemic vasculature. *J. Biol. Chem.* 275: 11921-11928
68. Hackett PH. (1999) High altitude cerebral edema and acute mountain sickness. A pathophysiology update. *Adv. Exp. Med. Biol.* 474: 23-45
69. Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K and Nishizuka Y. (1988) The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* 263: 6927-6932

## 拾．圖表

Table 1 Competitive primer

		Sequence	Size	Location
PKC $\alpha$	Upstream(5' end)	5'-TGAACCTTCAGTGGAAATGAGT-3'	325bp	875-896
	Downstream(3' end)	5'-GGCTGCTTCCTGCTCTTCTGAA-3'		1179-1199
	Competitor	5'-GGCTGCTTCCTGCTCTTCTGAACAACCTGGCTGGCATCT-3'	186bp	1179-1199, 1022-1136
GAPDH	Upstream(5' end)	5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	309bp	492-511
	Downstream(3' end)	5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'		780-799
	Competitor	5'-AGATCCACAACGGATACATTTGGCAGTGATGGCA-3'	144bp	780-799, 602-615

Table2 PKC primer sequence

PKC isoforms	Sequence	Location	Size	Cycles
PKC $\alpha$	5'-TGAACCTTCAGTGGAATGAGT-3' 5'-GGCTGCTTCCTGTCTTCTGAA-3'	875-1199	325bp	29
PKC $\beta$ I	5'-TGTGATGGAGTATGTGAACGGGGG-3' 5'-TCGAAAGTTGGAGGTGTCCTCGCTTG-3'	1344-1982	639bp	29
PKC $\delta$	5'-CACCATCTTCCAGAAAGAACG-3' 5'-CTTGCCATAGGTCCCGTTGTTG-3'	1013-1364	352bp	29
PKC $\epsilon$	5'-CGAGGACGACTTGTTGAATCC-3' 5'-CAGTTTCTCAGGGCATCAGGTC-3'	2026-2414	389bp	29
PKC $\eta$	5'-CCCCGAACCAACCCCTTCCTCA-3' 5'-AGCGCATGGTGGGTTCTTGGTC-3'	1257-1817	561bp	29
PKC $\mu$	5'-GCATCAGCAGACCCCTTCCCTCAG-3' 5'-TTCCAGCTCGCGTAAATCTAACCCAG-3'	10-423	414bp	29
PKC $\zeta$	5'-CGATGGGGTGGATGGGATCAAAA-3' 5'-GTATTCATGTACGGGTTGTCTG-3'	852-1532	681bp	29
PKC $\theta$	5'-CAAAGAGAATATGCTGGGAGATG-3' 5'-ACATCCGCCAGCATCCTTTG-3'	9-330	322bp	29



Table2 (續)

	Sequence	Location	Size	Cycles
PKC $\gamma$	5'-TTGATGGGGAAGATGAGGAGG-3'	1805-2151	347bp	29
	5'-CAGCATCGACCAAGCTGATTT-3'			
PKC $\lambda$	5'-ATACCGCGCTCCCTGTCTGTGAAA-3'	709-1116	408bp	29
	5'-ATGCTAACTGTGACCGGCTAACG-3'			
GAPDH	5-'TCCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	492-799	309bp	25
	5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'			

<sup>a</sup>Position of primer from the rat cDNA sequence deposited in GenBank.

Table 3 15 隻老鼠生日及體重的資料

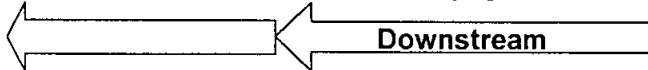
<b>Group</b>	<b>NO.</b>	<b>D.O.B</b>	<b>B.W.(g)</b>
Normoxia	1	90.7.6	340
	2	90.7.6	390
	3	90.7.6	350
	4	90.7.6	375
	5	90.7.6	380
Hypoxia 1-day	1	90.7.6	350
	2	90.7.6	380
	3	90.7.6	340
	4	90.7.6	320
	5	90.7.6	375
Hypoxia 4-day	1	90.7.6	330
	2	90.7.6	350
	3	90.7.6	345
	4	90.7.6	315
	5	90.7.6	380

## Rat PKCalpha

721 gtcacagatg aaaagctgca cgtcaccgta cgagatgcaa aaaatctaat ccctatggat  
 781 ccaaatgggc ttccggatcc ttacgtgaag ctgaaactta ttctgaccc caagaatgag  
 841 agcaaacaga aaaccaa~~aac~~ catccgatcc **acactgaacc ctcagtggaa tgagtccttc**

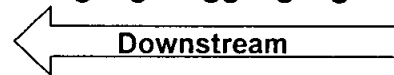


901 **acgttcaaat taaaaccttc agacaaagac cggcgactgt ccgtagaaat ctgggactgg**  
 961 **gatcggacga cacggaatga ctcatgggc tcccttcct tcggcgtctc agagctgatg**  
 1021 **aagatgccag ccagtggatg** gtacaagttg ctcaaccaag aggagggtga atactacaat



**Competitor**

1081gtgcccattc cagaaggaga tgaagaaggc aacgtggaac tcaggcagaa gttcgagaaa  
 1141gccaagctgg gccccgctgg aaacaaagtc atcagccctt **cagaagacaggaagcagcc**



## Rat GAPDH

421 tcatcatctc cgccccttcc gctgatgccc ccattgttgt gatgggtgtg aaccacgaga  
 481 aatatgacaa **ctccctcaag attgtcagca atgcatcctg caccaccaac tgcttagccc**



541 **ccctggccaa ggtcatccat gacaacttg gcatcgtgga agggctcatg accacagtcc**  
 601 **atgccatcac tgccactcag** aagactgtgg atggcccctc tgaaagctg tggcgtgatg



**Competitor**

661 gccgtggggc agcccagaac atcatccctg catccactgg tgctgccaag gctgtgggca  
 721 aggtcatccc agagctgaac gggaaagctca ctggcatggc ctccgtgtt cctacccccca  
 781 **atgtatccgt tgtggatctg** acatgccgcc tggagaaacc tgccaagtat gatgacatca

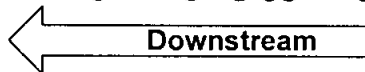


Fig-1. Rat PKCalpha 和 GAPDH primer 設計圖。

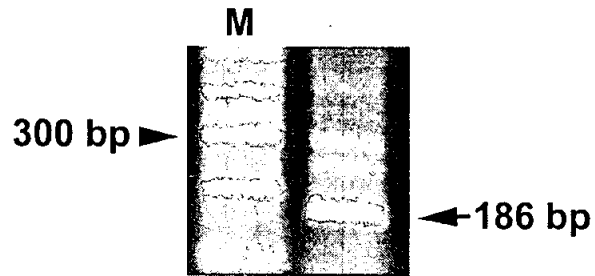


Fig-2. 未純化 PKCalpha competitive cDNA 電泳型態。PKCalpha competitive cDNA 分子量為 186bp。M:Maker。



Fig-3. 純化 PKCalpha competitive cDNA 電泳型態。將 PKCalpha competitive cDNA 以兩倍稀釋並定量得知 PKCalpha competitive cDNA 濃度為 200 fmol/ul。M:Marker。

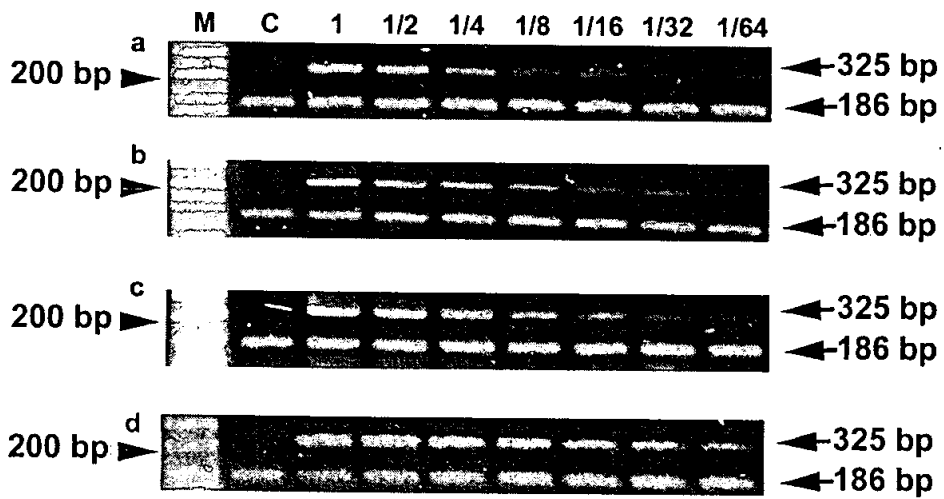


Fig-4. 不同濃度 RT 產物(a:0.5,b:1,c:2,d:4ug)做競爭性 PCR 的電泳形態。

頂端數值為檢體 cDNA 濃度的稀釋倍數。M:Mark。C:只有 competitor。

M:Marker。PKC $\alpha$  competitive cDNA 濃度為 0.00001fmol/ul。

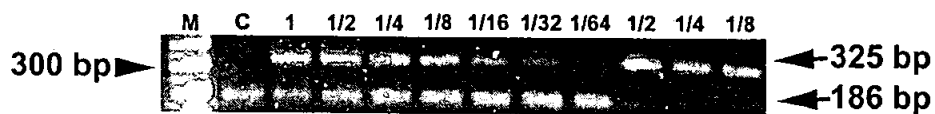


Fig-5. 測試 PKC $\alpha$  competitive cDNA 和檢體 cDNA (0.5ugRT 產物)

做競爭所需要的濃度，0.00001fmol/ul competitor cDNA 濃度為最佳。

C:只有 competitor。頂端數值為檢體 cDNA 濃度的稀釋倍數。前面 8

個 lane 加 competitive cDNA，後面 3 個 lane 無加 competitive cDNA。

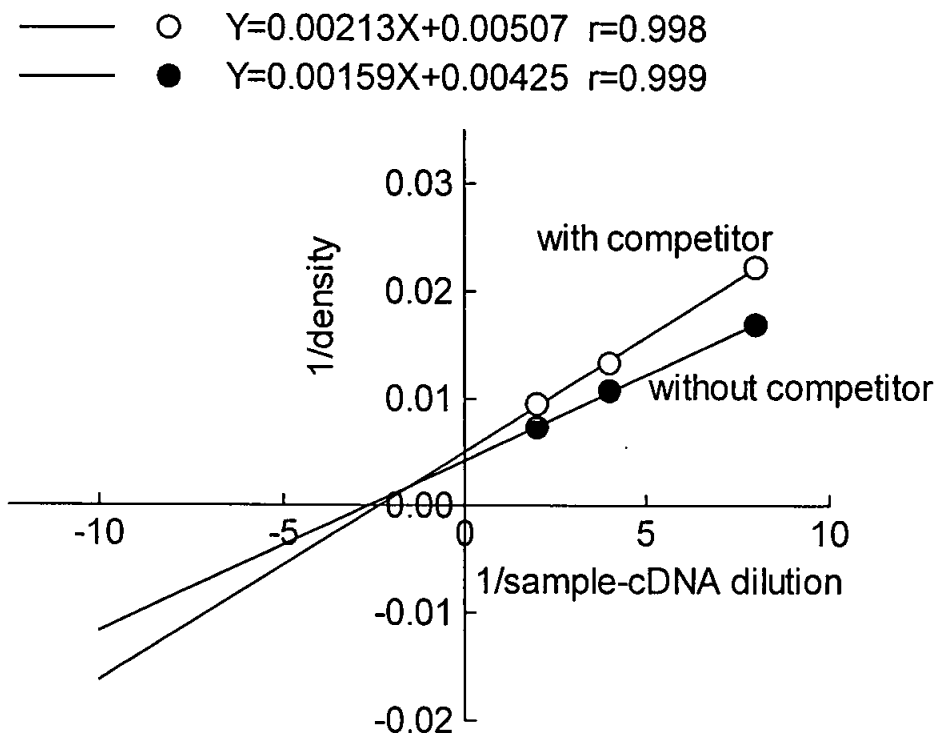


Fig-6. 競爭性 PCR 之 kinetic 是屬於 mix inhibition。Vmax = 235.018，  
 km = 0.37428，ki = 0.047103，kI = 0.025797



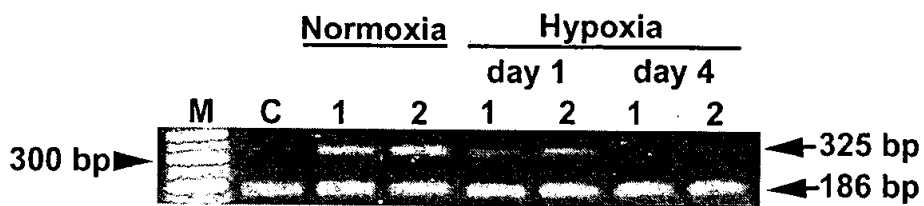


Fig-7. PKC $\alpha$  competitive cDNA 和 Hypoxia 檢體 cDNA(0.5ugRT 產物) 之競爭性 PCR 的電泳形態。M : Maker 。第 2 個 lane 只有 competitor 。第 3,4 個 lane 為正常大鼠腦部組織。第 5,6 個 lane 為 Hypoxia 1 天的大鼠腦部組織。第 7,8 個 lane 為 Hypoxia 4 天的大鼠腦部組織。

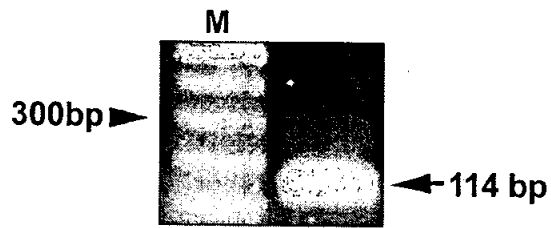


Fig-8. 未純化 GAPDH competitive cDNA 電泳型態。GAPDH competitive cDNA 分子量為 144bp。M:Maker。



Fig-9. 純化 GAPDH competitive cDNA 電泳型態。將 GAPDH competitive cDNA 以兩倍稀釋並定量得知 GAPDH competitive cDNA 濃度為 322 fmol/ul。

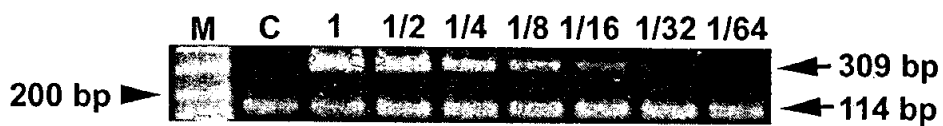


Fig-10. 測試 GAPDH competitive cDNA 和檢體 cDNA(0.5ugRT 產物)

做競爭所需要的濃度，0.0001fmol/ul competitive cDNA 濃度為最佳。

C:只有 competitor。頂端數值為檢體 cDNA 濃度的稀釋倍數。8 個 lane

都加 competitive cDNA。

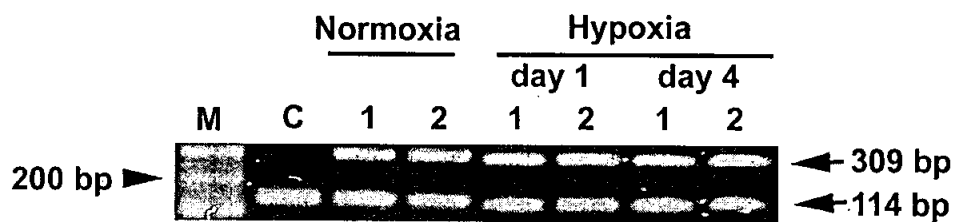


Fig-11. GAPDH competitive cDNA 和 Hypoxia 檢體 cDNA (0.5ugRT 產物) 之競爭性 PCR 的電泳形態。M : Maker 。第 2 個 lane 只有 competitor 。第 3,4 個 lane 為正常大鼠腦部組織。第 5,6 個 lane 為 Hypoxia 1 天的大鼠腦部組織。第 7,8 個 lane 為 Hypoxia 4 天的大鼠腦部組織。

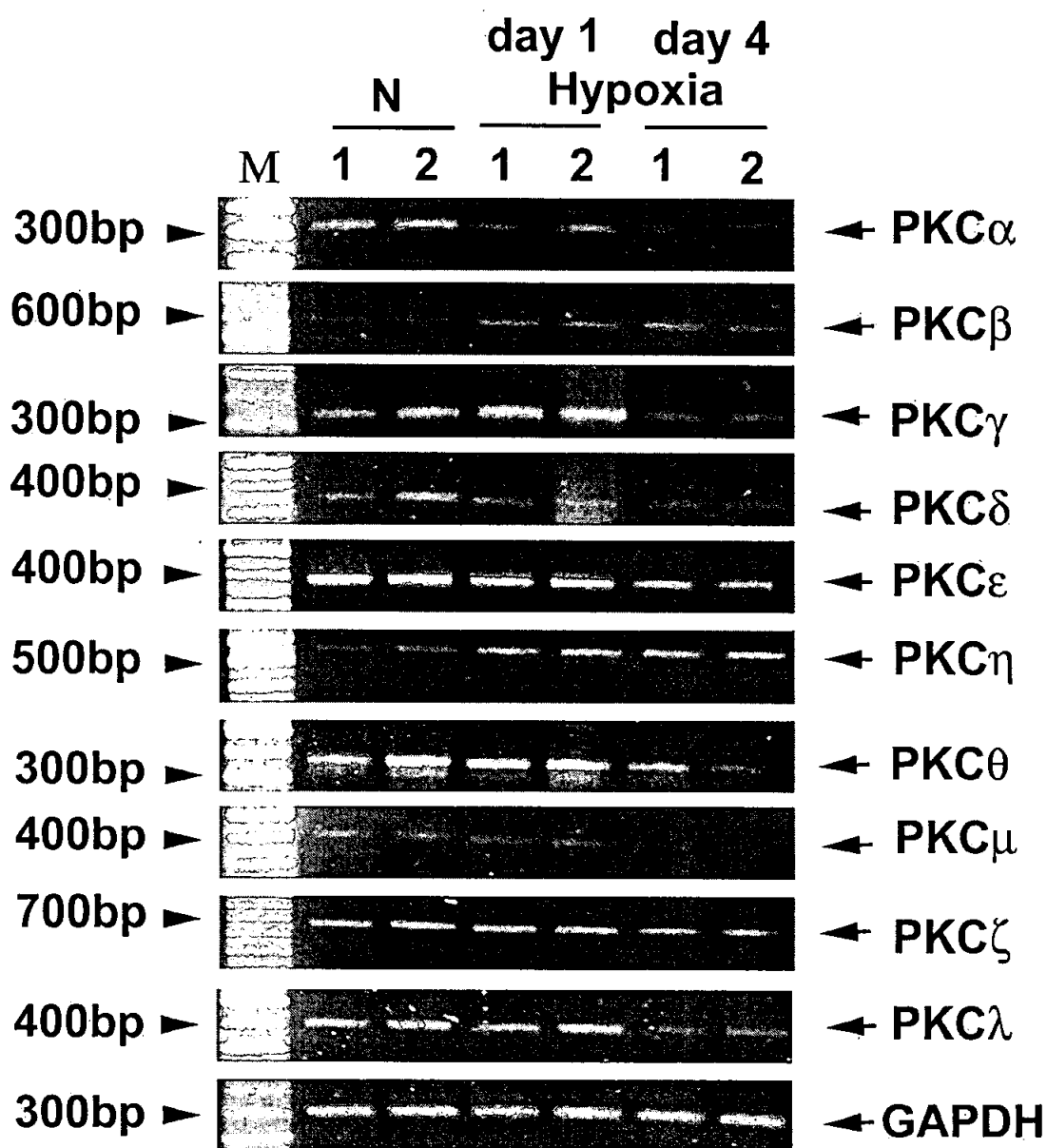


Fig-12. RT-PCR 分析低氧壓迫 (hypoxia) 對於大鼠腦部組織內 PKC 異構體 mRNA 的表現。M:Maker。第 2,3,個 lane 為正常大鼠腦部組織。第 4,5 個 lane 為 Hypoxia 1 天的大鼠腦部組織。第 6,7 個 lane 為 Hypoxia 4 天的大鼠腦部。▶ : Maker 的 base pair 數目。◀ : PKC isoform 的名稱。N : Normoxia。

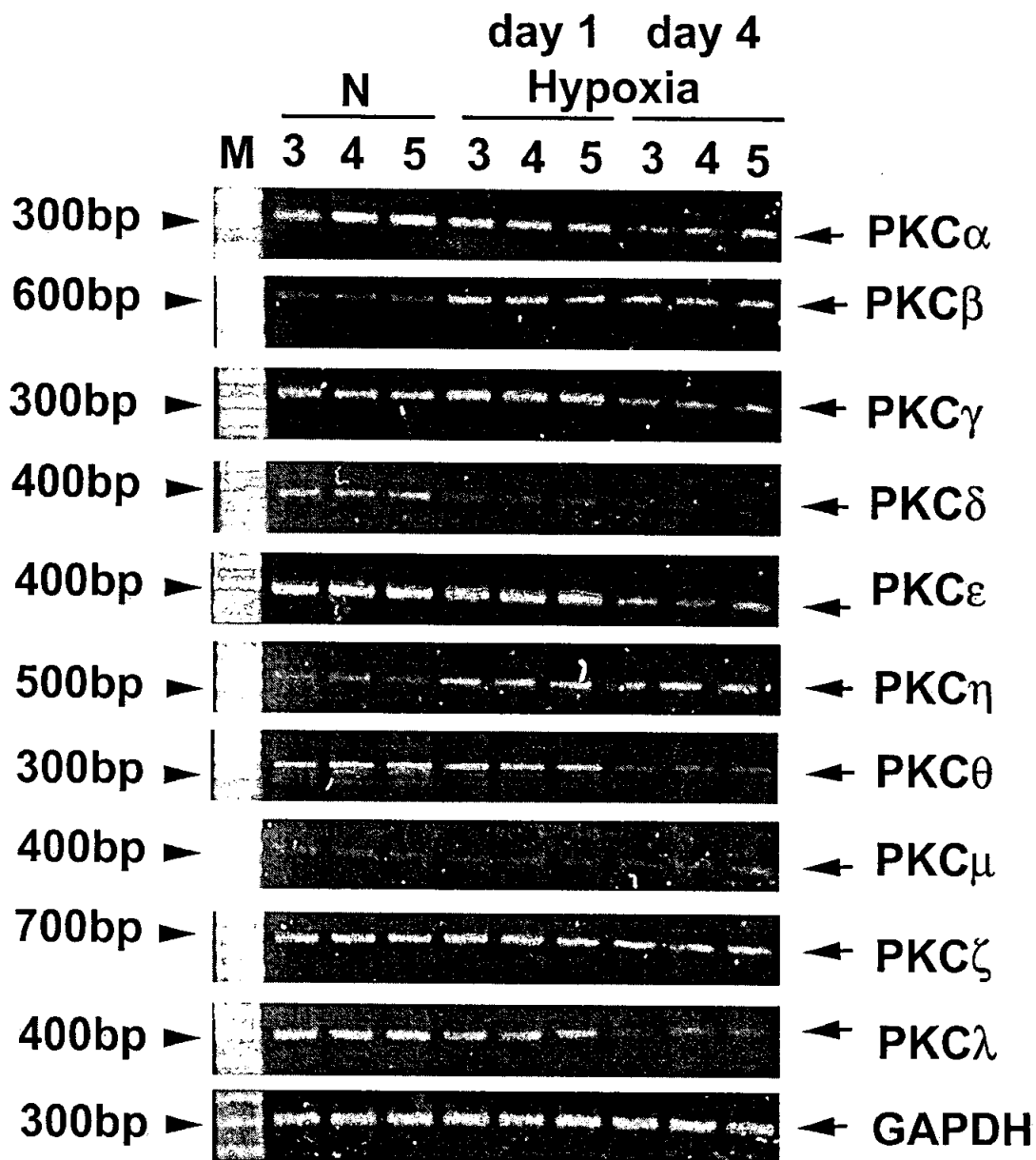


Fig-13. RT-PCR 分析低氧壓迫 (hypoxia) 對於大鼠腦部組織內 PKC 異構體 mRNA 的表現。M:Maker。第 2,3,4 個 lane 為正常大鼠腦部組織。第 5,6,7 個 lane 為 Hypoxia 1 天的大鼠腦部組織。第 8,9,10 個 lane 為 Hypoxia 4 天的大鼠腦部。▶ : Maker 的 base pair 數目。← : PKC isoform 的名稱。N : Normoxia。

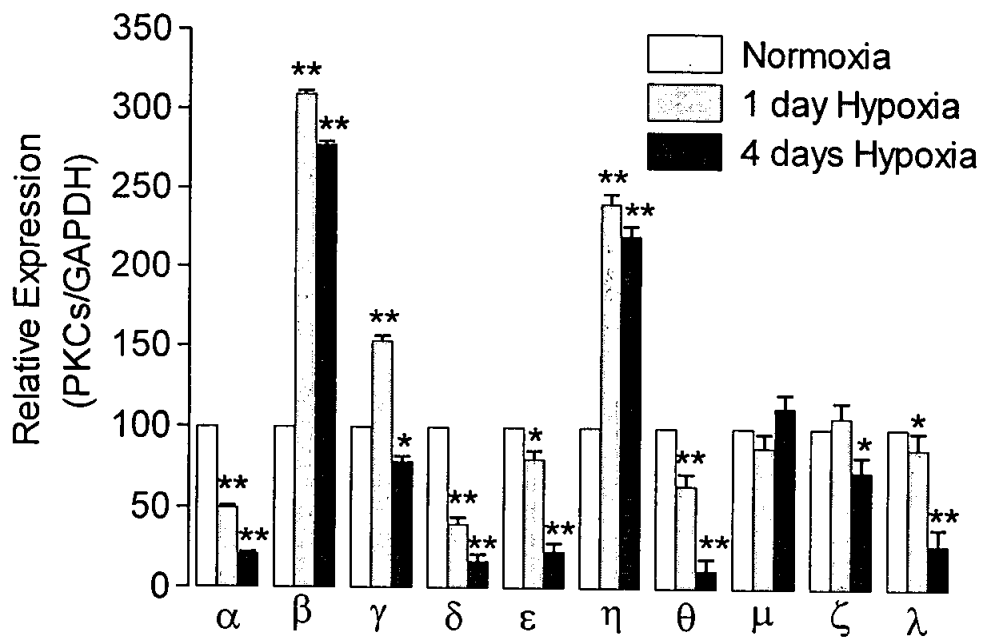


Fig-14. 定量 RT-PCR 分析低氧壓迫 (hypoxia) 對於大鼠腦部組織內 PKC 異構體 mRNA 的表現。\* , \*\* 分別表示顯著差異)  $P < 0.05$ ) 及極顯著差異。(  $P < 0.01$  )。



## 附錄一、DNA Gel 製備

	1%,20 ml	1%,40 ml	2%,20 ml	2%,40 ml
Agarose power	0.2 g	0.4 g	0.4 g	0.8 g
DEPC-H <sub>2</sub> O	16 ml	32 ml	16 ml	32 ml
5X TBE buffer	4 ml	8 ml	4 ml	8 ml

## 附錄二、實驗藥品及溶液配製

### 2M sodium acetate

ddH <sub>2</sub> O	100ml
Sodium acetate	16.406g
Acetic anhydride	調 pH 值=4
DEPC	0.1ml
滅菌	

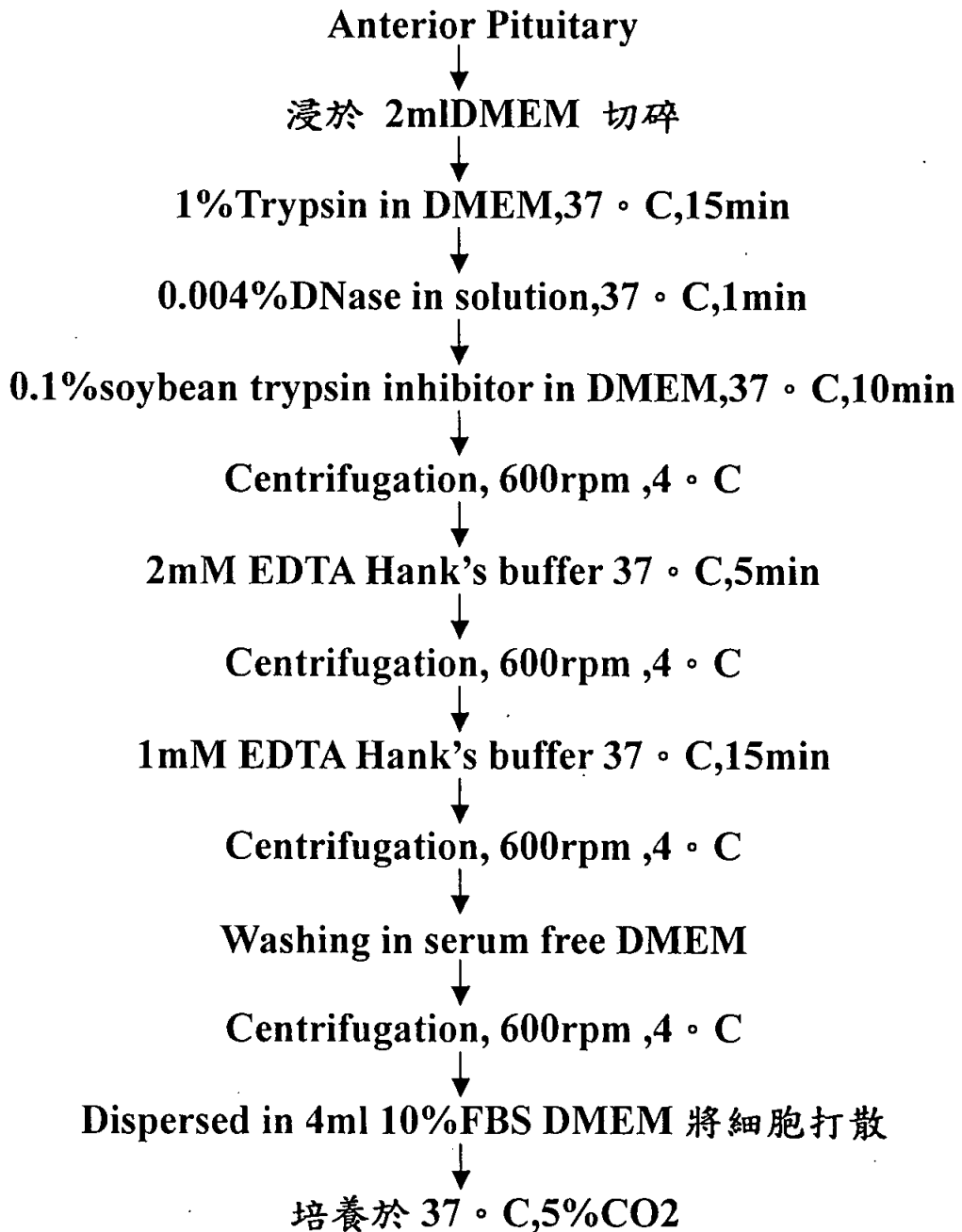
### Solution D

ddH <sub>2</sub> O	50ml	100ml
GNTC	23.64g	47.28g
Sodium citrate	0.368g	0.735g
N-Lauroylsarcosine	0.25g	0.5g
DEPC	0.05ml	0.1ml
PH=7		
滅菌		

### 10×MOPS

ddH <sub>2</sub> O	500ml	1000ml
MOPS	20.9g	41.8g
Sodium acetate	3.40g	6.80g
EDTA	1.86g	3.72g
DEPC	0.5ml	1ml
調 pH 值=7		
滅菌		

### 附錄三、Primary culture of Anterior Pituitary cell



# 碩 博士論文授權書

(國科會科學技術資料中心版本，92.6.17)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學 大學(學院) 生化 系所  
組 91 學年度第 2 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：一、老化對於甲釋素有反應的腦下垂體前葉細胞巨族群之改變  
二、低氧壓迫對於大鼠腦內蛋白激酶素C表現之影響

同意       不同意      (政府機關重製上網)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利（未申請者本條款請不予理會）的附件之一，申請文號為：\_\_\_\_\_，註明文號者請將全文資料延後半年後再公開。

同意       不同意      (圖書館影印)

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

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：劉哲育

研究生簽名：潘建宏  
(親筆正楷)

學號：9009002  
(務必填寫)

日期：民國 92 年 7 月 9 日