

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

碩士論文

Master Thesis

過量表現之雌性素受體  $\alpha$  透過非雌性素依賴方式活化人類腫瘤壞死  
因子  $\alpha$  基因表現導致 Hep 3B 肝癌細胞株凋亡之探討

The overexpressed estrogen receptor- $\alpha$  induce Hep3B cell  
apoptosis by increasing the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene  
expression in a ligand-independent manner

指導教授：黃志揚 博士 (Chih-Yang Huang, Ph. D.)

研究生：廖正容 (Chen-Rong Liao)

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

中山醫學大學醫學研究所兼任教授 吳誠中

吳誠中

陽明大學教授

王錫崗

王錫崗

成功大學教授

李碧雪

李碧雪

中山醫學大學生物化學研究所副教授

劉哲育

劉哲育

中山醫學大學生物化學研究所副教授

黃志揚

(論文指導教授)

黃志揚

中華民國九十二年六月

學生廖正容論文題目為「過量表現之雌性素受體 $\alpha$ 透過非雌性素依賴方式活化人類腫瘤壞死因子 $\alpha$ 基因表現導致 Hep 3B 肝癌細胞株凋亡之探討」，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：黃志揚

簽名：黃志揚

中華民國九十二年六月

## 致 謝

承蒙恩師 黃志揚博士在這兩年的指導與教誨，在此獻上最由衷的感謝。另外，還要感謝劉哲育老師、柯俊良老師、楊肇基老師、郭薇雯老師、謝易修老師在課業及實驗上給予的許多幫助與鼓勵。此外，還要感謝國立陽明大學 王錫崗教授、國立成功大學 李碧雪教授及台中榮總一般外科主任 吳誠中教授對於論文的審閱及斧正，提供許多寶貴的意見，得使此論文順利完成。

兩年研究生涯中，除了要感謝老師們的細心指導外，還要感謝逸憲、順發、獻平、忠榮、雅慧、慧美、星君、張伶、淑玲等學長姊在實驗及生活上給予的幫助。感謝戰友俊憲兩年來一起攜手奮鬥，以及適時心理諮商的提供。感謝正浩、珈寧、宜君、玉晴、伶芳、惠勵、小茜、曉豫等學弟妹給我的鼓勵和幫助。感謝苡琪、嘉慧、恆君、于芳、建宏、霏霓、俊嘉、淑琍、淑萍、宣竹等同學兩年來的相互扶持。感謝勝皇、宏睿、文通、玉蘭、裕娟、啟文、王禎、文信等學長姊對我的鼓勵和照顧。謝謝您們，有您們的陪伴讓我快樂的渡過兩年苦澀的研究生活，有您們的鼓勵和支持讓我遇到挫折還可以勇敢站起來，我會帶著兩年來快樂的回憶和您們的祝福，自信迎戰人生另一個新的階段。

最後，當然還要感謝一直支持我的親愛的家人-爸爸、媽媽、大哥、大嫂、二哥以及可愛的小姪女-思瑜，另外還有最好的朋友-欣蕙、暉慈、龍蟠、佩岑、美鳳，沒有您們的支持，我就無法安心的專注於課業和研究，謝謝您們這麼久以來給我的一切，謝謝您們!!

## < 目錄 >

一、中文摘要.....	1
二、英文摘要.....	3
三、背景介紹	
1、肝癌.....	5
2、凋亡反應.....	8
3、雌性素及雌性素受體.....	15
4、人類腫瘤壞死因子.....	18
四、動機.....	22
五、實驗方法	
1、細胞培養.....	23
2、嵌合 DNA 建構.....	24
3、Genomic DNA 萃取.....	25
4、膠質中 DNA 萃取.....	26
5、質體 DNA 萃取.....	26
6、轉化(Transformation).....	28
7、DNA 轉植(Transfection).....	29
8、DNA 斷裂.....	30
9、報告基因活性分析(Luciferase assay & $\beta$ -galactosidase	

activity assay).....	30
10、凋亡細胞之流式細胞儀分析.....	32
11、RT/PCR;PCR.....	33
12、細胞總蛋白萃取.....	35
13、蛋白質定量.....	35
14、西方點墨法.....	36
六、實驗材料.....	39
七、結果.....	46
八、討論.....	55
九、未來方向.....	61
十、Hypothesis.....	63
十一、參考文獻.....	64
十二、實驗結果附圖.....	73
十三、附表	
1、表一(台灣地區主要死亡原因).....	84
2、表二(人類腫瘤壞死因子啟動區序列).....	85
3、表三(人類腫瘤壞死因子啟動區所含反應區).....	85
4、表四(PCR 所使用之引子).....	86

## < 中文摘要 >

肝癌一直是全球高發生率和高死亡率的疾病，為一嚴重危害人類健康的惡性腫瘤，然而目前對肝癌的治療成效及早期診斷方法並不盡人意，因而從分子生物醫學的角度尋找有利肝癌治療或診斷的機制，是重要且正積極進行的課題。目前由許多統計資料及研究發表中，發現男性罹患肝癌之比例較女性高，除了生活型態等等的差異導致外，荷爾蒙的影響或許是很重要的一個因素，其中，雌性激素一直被推測可能對肝臟組織有保護的作用，因此我們採用了人類 Hep 3B 肝癌細胞株，來觀察雌性素以及其受體在肝癌細胞凋亡機制中所扮演的角色。在 DNA 斷裂以及流式細胞儀分析中，我們發現雌性素的確造成細胞 DNA 斷裂情形，同時對凋亡的標誌(Annexin V)有陽性反應。當我們以 DNA 轉殖技術，表現過量人類野生型雌性素受體  $\alpha$  於 Hep 3B 細胞中時，發現更明顯的凋亡現象產生，但再同時給予雌性素處理時，凋亡的現象並沒有顯著加成的效果。進一步，我們建構誘發肝癌細胞凋亡重要的人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 之啟動區及 Luciferase reporter 嵌合 DNA，並藉分析 Luciferase 酵素活性變化，探討 TNF- $\alpha$  啟動區的活化程度，發現在細胞中過量表現的雌性素受體  $\alpha$  可直接透過 Ligand-independent 的方式強化 TNF- $\alpha$  啟動區之活性。同時， RT-PCR/PCR 實驗中更證明了過量表現的雌性素受

體  $\alpha$ ，確實可造成 Hep 3B 細胞中之 TNF- $\alpha$  mRNA 表現增加。同時在西方點墨法實驗中發現，無論 LPS 的處理或雌性素受體  $\alpha$  的過量表現，均造成 Caspase8 及 Caspase3 的切割活化，但未造成 Caspase9 的改變。綜合以上結果，我們認為在人類 Hep 3B 肝癌細胞株中過量表現雌性素受體  $\alpha$ ，確可導致細胞走向凋亡。而其可能透過 Ligand-independent 的方式活化了人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  基因的表現，經由 Death receptor 的路徑，切割活化 Caspase8 及 Caspase3，進而導致 DNA 斷裂。



## < Abstract >

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the five most common cancers in the world. It's a serious problem to human healthy because of its high incidence and high fatality rates. Today, the diagnosis and the outcome of treatment are still not satisfied. Therefore scientists make efforts for finding the biologic mechanisms of hepatocarcinogenesis to resolve these problems. The results of epidemiological studies and many published papers show that the incidence of HCC in man is more frequently than that in women. In addition to the difference in living conditions, the hormonal difference between man and women might distinction of incidence. Therefore, estrogen ( $E_2$ ) is suggested to play a role to protect the liver tissue. In the present syudy, Hep3B human hepatoma cell line was used to investigate the relation among estrogen, estrogen receptor- $\alpha$  and apoptosis. First, the apoptosis identified by DNA fragmentation and flow cytometry was found in Hep 3B cells treated with estrogen ( $10^{-8}M$ ). Furthermore, without the presence of  $E_2$  the apoptosis was enhanced even higher than that of  $E_2$  treatment by the transfection of wt-ER- $\alpha$ . Interestingly, the enhancement was not further promoted by the adding of  $E_2$ . It has been shown that Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) may get involved in the mechanism of HCC apoptosis. Therefore, we

constructed the human TNF- $\alpha$  promoter -luciferase reporter gene construct; pGL3-hTNF $\alpha$ -luc. Then, we either transfected the pGL3-hTNF $\alpha$ -luc plasmid DNA with or without wt-ER $\alpha$  plasmid DNA into Hep 3B cell line, and luciferase activity was assayed. Surprisingly, we found that wt-ER $\alpha$  induced the luciferase activity in a ligand-independent manner. Simultaneously, we also found that overexpressed wt-ER- $\alpha$  promote the hTNF- $\alpha$  mRNA expression identified by RT-PCR/PCR and western blotting in Hep3B cell line. Additionally, both LPS treatment and ER- $\alpha$  overexpression can activate caspase8 and caspase3 which were cleaved to an active form without significant changes of caspase9 protein activity. Taken together, our data indicated that overexpressed wt-ER- $\alpha$  may induce cell apoptosis by increasing the hTNF- $\alpha$  gene expression in a ligand-independent manner, which may activate caspase8 and caspase3 via the death receptor signaling pathway, and lead to the DNA fragmentation and apoptosis of Hep 3B cells.

## < 背景介紹 >

### 一、肝癌(Hepatocellular carcinoma;HCC):

肝癌是全世界五大癌症之一(1)，根據統計，全球每年將近有一百萬人死於肝癌(2)，其中又以東南亞以及部分非洲地區尤其盛行(3-5)，以台灣地區來說，根據衛生署針對全台灣地區九十一年度主要癌症死亡原因的統計結果，肝癌死亡率亦高居第一位(男性→肝癌首位;女性→肝癌第二位)(附表 1)，由此可知肝癌的嚴重程度。然而由於在肝癌的檢測上一直缺乏有效的早期指標，且肝癌的進程非常快速，常常診斷發現時已經是中晚期，加上目前用於肝癌治療的許多方法其癒後不甚令人滿意，導致肝癌成為致死率極高的一種惡性腫瘤，從診斷發現到死亡平均只有六個月的時間(6)，也因此近年來許多科學家致力於肝癌成因機制的研究，到目前為止，亦有許多和肝癌發生相關的基因被找到，但是肝癌形成過程極其複雜，牽涉到太多基因的改變，因此仍然有許多未知或者不完全清楚的機制可能參與其中，急待釐清。

目前已知導致肝癌的危險因子包括:1. 病毒感染:B 型肝炎(Hepatitis B virus;HBV)及 C 型肝炎病毒(HCV)感染。2. 病理因素:例如一些慢性肝病、肝硬化等等。3. 飲食因素:長期攝入過多的黃麴毒素(Aflatoxin B1)、酒精攝取過多、鐵質攝取過量等等。4. 基因性:

基因突變、家族病史等等。5. 其他:其他如性別(男性)、年齡(>50 歲)等等也和肝癌的形成非常相關(7, 8)。當肝臟持續暴露於這些危險因子中，就會造成肝臟受損，進而引發一連串更嚴重的基因改變，最後使肝細胞走向癌變的過程(8)。

根據國際聯合癌症協會 1997 年出版之 TNM 癌症分期系統，將肝癌不同時期不同病徵給予明確的定義，可將肝癌大致分為四期，其各期的特徵分別為：

第一期:T1 N0 M0

第二期:T2 N0 M0

第三期-A:T3 N0 M0

-B:T1 N1 M0

T2 N1 M0

T3 N1 M0

第四期-A:T4 N M0

-B:T N M1

其中 T 代表腫瘤大小

T1 為只有單一的腫瘤，最大直徑 $\leq 2$ 公分，無血管浸潤現象

T2 為 T1 三項條件之一不符者

T3 為 T1 三項條件有兩項不符者

N 代表有無局部淋巴侵犯

N0 為無局部淋巴侵犯

N1 為有局部淋巴侵犯

M 代表有無遠端轉移

M0 為無遠端轉移

M1 為有遠端轉移情形

根據這樣的分期，對肝癌病人的癌況進行評估，是作為治療方法選擇的一個重要依據。

然而目前用於肝癌治療的方法主要可以分成幾大類，一類為利用外科手術切除的治療方法，這樣的方法適合較早期的肝癌病人，其肝癌細胞仍屬局部沒有侵犯且沒有合併肝硬化，或者合併肝硬化但肝功能仍然良好的情形。另一類為局部毒殺細胞的方法，例如局部冷凍療法、酒精注射法、雷射電燒法、肝門動脈栓塞法等等，即利用局部殺死細胞或者限制營養供給的方式來控制癌細胞的增生，但這樣的方法對癌細胞的控制其實是有限的，若在可行的狀況下，仍然以外科手術切除的方法為優先。還有一類為藥物的治療，例如傳統用來治療癌症常用的放療或者化療，但這樣的方法對肝癌的治療效果不佳，因此在肝癌治療及控制上較少採用，或者是採合併其他治療方法共同治療的方式使用。其他例如荷爾蒙療法，或者是免疫療法，也是較新興且正

開發中的方法。除了上述的方法之外，近年來也開始從分子生物醫學角度切入，對肝癌形成機制進行研究，企圖揭開肝癌形成過程的分子機轉，以利找到對肝癌更專一有效的治療方法，這或許是突破目前對肝癌控制之瓶頸的新契機。若以分子生物醫學的角度來看，當一個正常肝細胞走向癌化的過程，有許多基因參與其中，根據其影響的機制不同，可以大致將這些基因分為四大類，即：1. 調控受損 DNA 之修補相關的基因，例如 p53。2. 控制細胞周期進行相關的基因，例如 p53、RB、p16、Cyclin D1。3. 針對生長抑制或者程序性凋亡(Apoptosis)調控的相關基因，例如 TGF- $\beta$ 、SMAD、p53。4. 控制其他訊息傳遞或者細胞間交互作用相關的基因，例如 APC、 $\beta$ -catenin、E-cadherin 等等 (9)，而通常一個受損的細胞，常常就是透過影響這些機制，來逃過細胞的監控進而走向癌化。在這其中，凋亡作用是維持細胞生存與死亡之平衡的一個重要機制，在癌症的形成過程中，往往可以發現凋亡作用受到破壞或者抑制(10, 11)，所以在一些癌症的治療上，有很多方法即是利用活化或修復凋亡反應的原理，來達到最終治療的目的。因此凋亡反應對肝癌細胞之調控就是我們本篇研究的中心重點。

## 二、凋亡反應：

凋亡反應是在 1972 年首度由 Kerr 的實驗室提出的一個名詞

(12)，它是普遍存在於細胞的一種計畫性死亡程序，參與細胞內許多生理以及病理狀況的調控，例如胚胎發育過程中，當組織器官成形時，一些不必要的細胞就會利用凋亡作用而走向死亡。又例如一些老化或受損的細胞，也是透過凋亡作用將其汰換，以維持細胞新陳代謝平衡的狀態(10)。若當一些變因導致凋亡的狀況失衡時，就會導致許多疾病的發生，例如一些神經退化性疾病、免疫不全症候群，就和過量的凋亡現象有關。另外例如癌症的發生、自體免疫疾病、病毒感染等，就是和凋亡作用功能低下或者缺乏有關(13)。由此可知凋亡反應在調控正常生理平衡上的重要性。

細胞走向凋亡時，其細胞狀態和病理狀況下造成的細胞壞死(Necrosis)有明顯的不同。當細胞壞死時，細胞出現膨脹、細胞解體、胞器(如粒腺體)瓦解的情形，此時細胞中的內容物會自細胞釋出，進而引發嚴重的發炎反應，導致一群細胞同時死亡。相對的，當細胞走向凋亡時，會出現細胞皺縮、染色質濃縮以及斷裂的情形，但此時細胞的外膜以及粒腺體仍保持完整，接著細胞膜內陷將細胞內容物包圍形成含有完整包膜的凋亡小體，最後由鄰近細胞或者巨噬細胞吞噬清除，由於細胞內容物並沒有釋出，不會有發炎的現象發生，因此只有單一顆細胞的死亡(14)。

凋亡作用的執行，主要是由一系列稱為翹蛋白(Aspartate-

Specific Cysteine Protease;Caspase)的蛋白酶來完成(15, 16), 其中 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )converting enzyme;ICE, 又叫 Caspase-1, 是第一個被發現的創蛋白, 其作用可將 IL-1 $\beta$  的先質 (pro -IL-1 $\beta$ )切割成具有活性的 IL-1 $\beta$ (17, 18)。接著在腺蟲 (*C. elegans*)當中亦發現和 ICE 相似的基因, *ced-3*, 他的角色為參與在腺蟲發育過程凋亡的機制中(19-21), 然而陸陸續續截至今天, 在哺乳類動物中共有 14 種 Caspase 的基因被發現, 其中人類已知的有 11 種, 根據其功能大致可以分為兩類, 一類為相似於 Caspase-1, 屬與發炎反應相關的一群, 包括 Caspase1、4、5、13。另一類為相似於 *ced-3*, 屬與凋亡反應相關的一群, 包括 Caspase2、3、6、7、8、9、10(22)。

Caspase 平常以沒有活性的創蛋白酶先體(Procaspase)存在細胞中, 其結構主要包含三個區域, 一為氮端 Prodomain。二為大次單元 (Large subunit), 其上包含有可活化的胱氨酸(Cysteine)殘基位置, 以高度保留的功能序列:QACXG 存在。三為縮氨酸端小次單元 (Small subunit)。當 Caspase 被活化時, 過程中包含兩次的切割動作, 第一次先將兩個次單元分開, 接著再將氮端 Prodomain 切除, 最後就由兩個大次單元、兩個小次單元結合成具有活性的四聚體 Caspase(24), 這個活化的 Caspase 則會專一的針對其受質蛋白上天門冬氨酸殘基



之縮酸端進行切割(23)。而通常 Caspase 本身在三個主要區域間即帶有天門冬氨酸之殘基，就是作為 Caspase 自體切割(Auto-cleavage)或其他 Caspase 切割活化的位置。根據這樣的活化先後關係，又可將這群和凋亡相關的 Caspase 分成兩大類，一類為 Initiator caspase，包括 Caspase2、8、9、10。另一類為 Effector Caspase，包括 Caspase3、6、7。通常 Initiator Caspase 即作用在 Effector Caspase 上游將其活化，再由活化的 Effector Caspase 進一步將訊息傳遞(22, 25)。

Caspase 的活化主要經由兩個路徑，一個為透過粒腺體造成 (Receptor-independent)，另一個為透過 Death receptor 以及其 Ligand 而活化的路徑。而由粒腺體所參與的路徑，主要是由一群 Bcl-2 家族的蛋白來調控，至今在哺乳類動物中至少有 19 個 Bcl-2 家族成員被發現，它們均含有至少一個到四個高度相似的保留區域，稱為 Bcl-2 homology domain1-4;BH1-4。根據 Bcl-2 成員的功能及構造，可將其分為三大類，第一類為抗凋亡蛋白(Anti-apoptosis protein):常見的如 Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>等，其含有 BH1-4 四個區域。第二類為促凋亡蛋白(Pro-apoptosis protein):常見的如 Bax、Bak 等，其含有 BH1-3 三個區域。第三類是只含有 BH3 區域的一系列蛋白，這群蛋白也和促進凋亡的作用相關，常見的有 Bid、Bad、Bik 等(26, 27)。當壓力訊息刺激下，會透過例如磷酸化或者 Caspase 切割的方

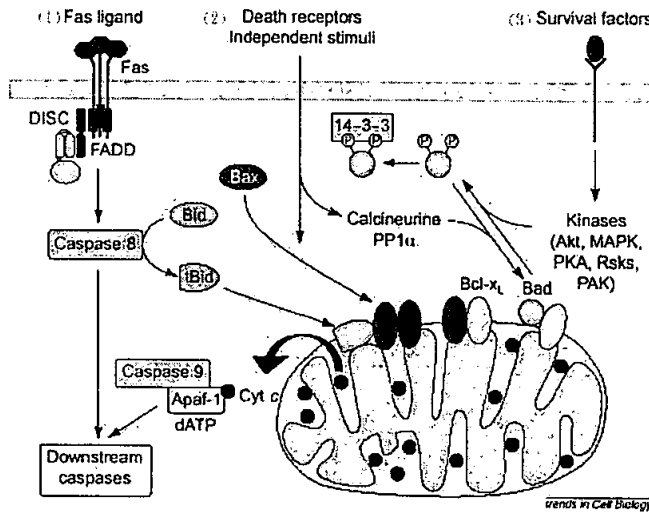
式讓 Bcl-2 家族 Pro-apoptosis 蛋白的 BH3 區域露出，使其轉位到粒腺體外膜上，進而影響粒腺體膜的穩定性(28-31)，造成粒腺體內外膜之間的 Cytochrome *c* 釋放到細胞質中，釋出的 Cytochrome *c* 就會和細胞質中的 Apoptotic Protease Activating Factor-1(Apaf-1) 以及 Caspase9 結合，形成 Apoptosome，而 Apoptosome 接著會進一步和 Caspase3 結合，由活化的 Caspase9 將其切割活化(32-34)，活化後的 Caspase3 就會繼續作用其下游的受質蛋白，最後導致細胞走向 Apoptosis。另一方面，相對於這群促進凋亡的蛋白，其他一系列 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白，平時即黏附在粒腺體上，扮演著維持粒腺體平衡、抑制 Cytochrome *c* 釋放的角色，相對於凋亡是讓細胞走向存活的路徑(32, 35)。因此，粒腺體即藉由這一系列角色多重的 Bcl-2 家族蛋白，來調控著細胞的存亡。

另一條活化 Caspase 的路徑，即透過 Death receptor 和其 ligand 結合而傳遞。Death receptor 屬於 Tumor necrosis factor receptor (TNFR) 家族，此家族包含 TNFR1、Fas(CD95)、DR3/WSL 及 TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)/APO2L receptor 等，這一系列的膜蛋白受體，在細胞膜外區域含有四到六個富含胱胺酸的重複區域(Cysteine-rich repeat)，此區域負責受體和 Ligand 之結合相關。而在細胞膜內的部分，含有一個高度保留之 Death domain(DD)，這

個區域可以和下游亦含有 Death domain 之其他蛋白結合並將訊息傳遞下去(26)。以 Fas receptor 為例，當 Fas-ligand(Fas-L)結合到 Fas receptor 時，很快的即形成一個 Death inducing signaling complex (DISC)的複合體，即被 Fas-L 結合活化的 Fas receptor 利用其膜內 Death domain 區域和下游一 Adapter protein: Fas-associated Death domain(FADD)結合，而 FADD 上含有一個 Death effector domain(DED)，可以和 Caspase8 上之 DED 產生交互作用，很快的，會有更多的 Caspase8 聚集上來，聚集的 caspase 就可以利用自體活化或者互相活化的方式進行切割活化動作，活化之 Caspase8 即可進一步將訊息傳遞下去，造成下游 Caspase3 活化，最後導致細胞凋亡(25)。

然而雖可將凋亡大致分為上述兩條路徑，但這兩條路徑並非完全獨立而是可以交互影響的。例如在某些細胞中發現，過量表現之 BCl-2 可以阻止由 Fas receptor 所導致的凋亡反應(35)，顯示這兩條路徑之間的關聯性，進一步的研究中即指出，這樣的作用是透過 BCl-2 家族中一個只含有 BH3 區域的蛋白:Bid 所造成。當經由 Death receptor 路徑將 Caspase8 活化後，由於 Bid 亦為 Caspase8 的受質，因此活化的 Caspase8 可以將 Bid 切割成有活性的形式，活化態的 Truncated-Bid 會轉位至粒腺體外膜上，和其他促進凋亡的蛋白，如 Bax 或 Bak

產生交互作用(28, 31, 36), 造成粒腺體內外膜間的 Cytochrome *c* 釋放(30, 37, 38), 因而促進了由 Death receptor 路徑所誘導的凋亡反應。



Solange Desagher. (2000) *Cell Biol* 10:369-377(62)

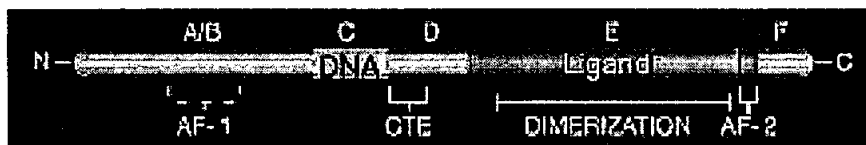
綜合以上介紹, 可知凋亡作用是決定細胞生死相當關鍵的一個機制, 又凋亡作用並不像壞死所造成的細胞死亡, 會引起一連串的發炎反應進而對組織造成更大的傷害, 而是一種單一細胞有計畫性的死亡過程。並且, 在許多已被發現的致癌機轉中, 常常涉及凋亡作用低落或者阻斷的情形, 因此近年來許多癌症治療的研究, 即針對凋亡機制的調控著手, 試圖透過促進或者修復癌細胞凋亡反應, 來達到癌症治療的目的(11)。

### 三、雌性素(Estrogen)及雌性素受體(Estrogen receptor:ER):

雌性素為一種固醇類荷爾蒙，主要由卵巢、子宮、睪丸、腎上腺等所分泌。雌性素在人體主要有三種形式，分別為雌一醇(Estrone;E1)、雌二醇( $17\beta$ -Estradiol;E2)、雌三醇(Estriol;E3)，其中以雌二醇含量最多，生理活性最強。雌性素在人體有許多生理功能，包括調控細胞生長分化、生殖系統發育(例如女性子宮、陰道、乳腺的發育，男性睪丸、副睪、前列腺的發育)、骨骼組織骨質維持、心血管系統的保護作用以及中樞神經系統的調控等(44)。在肝臟來說，則且具有活化肝細胞解毒酵素 Cytochrome P-450(45)及阻止脂肪氧化(46, 47, 48)，因而增強肝細胞抗氧化的能力(49)，亦可抑制致癌物對肝細胞癌化的誘導(50)，及抑制肝腫瘤的轉移(51)；此外，在動物實驗方面的研究上，發現雌性素具有抑制化學物質所導致的肝癌(52)等功能。

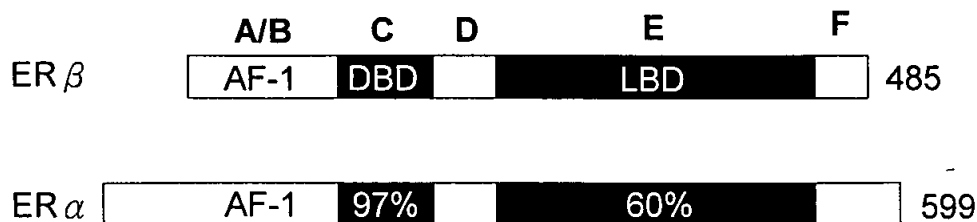
雌性素除了對組織的直接作用外，在細胞分子機制中主要是透過雌性素受體(Estrogen receptor;ER)將訊息傳遞下去。ER 屬於細胞核固醇類接受體家族(Steroid/thyroid hormone nuclear receptor superfamily)的一員(53)，也是一種轉錄因子，其結構上含有 6 個高度保留的功能區域，分別為 A、B、C、D、E、F 六個區域。AB 區域又稱為第一活化功能區域(Activation Functional domain-1;AF-1

domain)，在某些狀況下，不需要 Ligand 存在，可以透過活化此區域因而造成 ER 的活化。C 區域是負責 ER 和 DNA 結合以及形成二聚體 (Homodimer、Heterodimer) 的區域 (DNA binding domain; DBD)。D 區域是連結 C、E 兩個區域的一段序列。E 區域又稱為第二活化功能區域 (Activation Functional domain-2; AF-2 domain)，是被 Ligand 結合並活化的區域 (Ligand Binding Domain; LBD)，和 ER 二聚體形成亦有關係。F 區域目前功能尚不清楚 (54)。



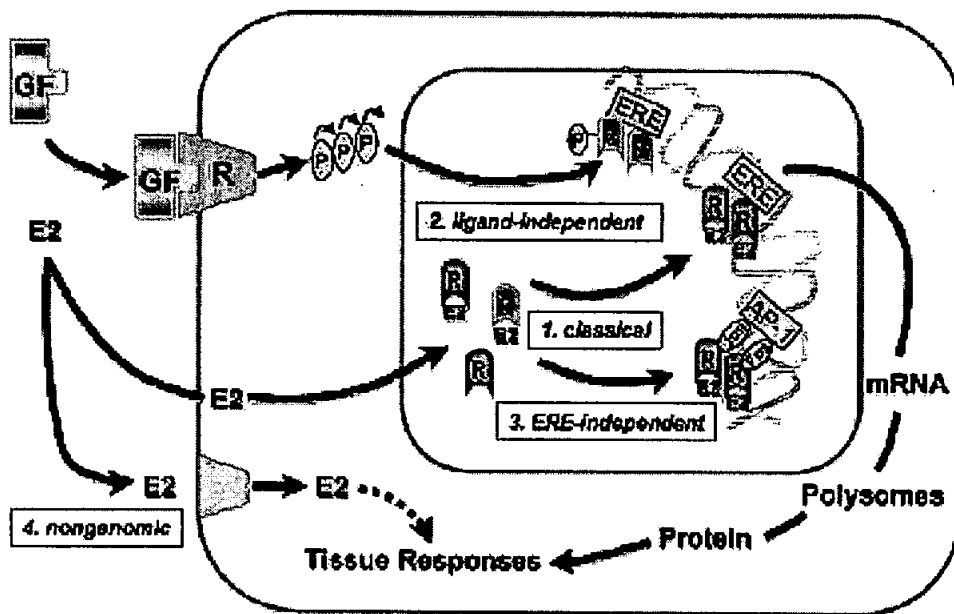
Jonathan G. Moggs. (2001). *EMBO* 2:775-781(54)

ER 主要有兩種形式 (Isoform)，分別為 ER $\alpha$  及 ER $\beta$ 。ER $\alpha$  由 599 氨基酸所組成，分子量為 66kDa，而 ER $\beta$  由 485 個氨基酸所組成，分子量為 54kDa。ER- $\alpha$  和 ER- $\beta$  在 C 區 (DBD) 有高達 97% 的相似度，在 E 區 (LBD) 亦有 60% 的相似度，相對的，A/B 區域 (AF-1) 是二者差異度最大的一個區域 (55, 56, 57)。



Vincent Giguere (1998). *Steroids* 63:335-339(57)

ER- $\alpha$  及 ER- $\beta$  在不同組織有不同的表現情形，例如 ER- $\alpha$  主要表現在乳房、子宮、陰道等等，ER- $\beta$  則主要在消化道、卵巢、前列腺、睪丸、脾臟、肺、下視丘及胸腺等地方，而在某些組織中可以同時發現兩者的表現，例如中樞神經系統、心臟、骨骼組織、尿道等等，然而在肝臟中，則主要是 ER- $\alpha$  明顯表現，ER- $\beta$  只有微量的表現。因此，視不同組織不同刺激下，ER- $\alpha$  及 ER- $\beta$  對基因的調控也不盡相同(58, 59)。而透過 ER 調控基因表現主要可以透過四個方式，第一類為傳統路徑，即 ER 受到雌性素活化後行成一個二聚體，接著轉位到核中，與目標基因啟動區之專一位置結合；Estrogen Response Element(ERE)，進而開啟基因表現。第二類為非雌性素依賴型(Ligand-independent)，為透過一些生長因子或者 cAMP 將細胞內的激酶路徑活化(如 MAPK pathway)，進而將 ER 磷酸化活化，活化後的 ER 則形成二聚體同樣結合到 ERE 的區域開啟基因表現。第三類為 ERE-independent 的路徑，當雌性素活化 ER 後，形成二聚體的 ER 並不直接結合到 DNA 上的 ERE 區域，而是透過和 AP-1(Fos/Jun)這個轉錄因子結合，進而透過 AP-1 蛋白結合到目標基因之 AP-1 site 上開啟基因的表現。第四類為非基因型的影響，主要是雌性素直接作用在細胞膜表面類似雌性素受體的膜蛋白，而引起的一系列急性組織反應(60)。



Julie M. Hall(2001) *J Biol Chem* 276:36869-36872

#### 四、人類腫瘤壞死因子:

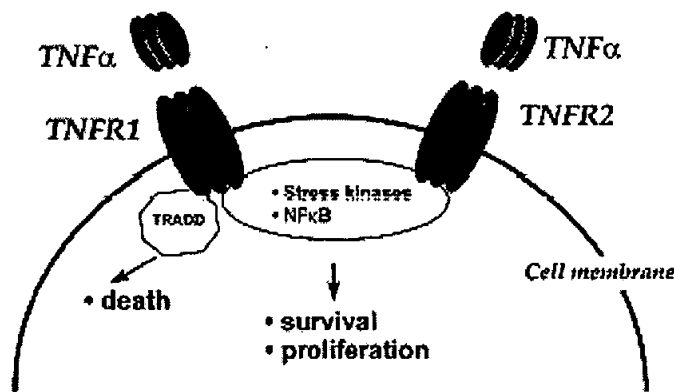
人類腫瘤壞死因子的發現，是早在 1893 年時，發現在一些癌症病人身上，若同時受到細菌感染時，可以看到腫瘤有壞死縮小的情形 (39, 40)，而初步發現這樣的蛋白存在，在 1975 年正式將這樣的蛋白命名為人類腫瘤壞死因子(hTNF)(39, 41)。人類腫瘤壞死因子包括兩種形式，分別為 TNF- $\alpha$  及 TNF- $\beta$ ，其基因皆坐落於人類第六對染色體之短臂上，在許多物種中發現，TNF- $\beta$  往往位於 TNF- $\alpha$  之 5' 方向，各自含有約三千個鹼基的長度，包含 4 個 Exons 和 3 個 Introns。在胺基酸序列上，兩者有 30%的相似度，分別包含 233 及



205 個氨基酸(42)。這兩種蛋白不同於其他 TNF 家族的成員，是屬於一種分泌型的蛋白，而 TNF- $\alpha$  主要由單核球(Monocyte)和巨噬細胞(Macrophage)所分泌，TNF- $\beta$  主要由淋巴細胞(T<sub>H</sub>、T<sub>C</sub>等)所產生。兩者的成熟形式(Mature form)蛋白，分別以分子量 17 kDa(157 個氨基酸)及 18 kDa(171 個氨基酸)的形式，結合成三聚體存在細胞中。而由於 TNF- $\alpha$  及 TNF- $\beta$  在其基因 5'-非轉譯區(5'-Untranslated region; 5'-UTR)之序列差異性非常大，因此造成兩者雖然結構相似，但調控因子或者活化後之訊息傳遞路徑差異卻很大，其中，TNF- $\alpha$  主要受到細菌之內毒素脂多糖(LPS)或巨噬細胞活化因子所活化，而 TNF- $\beta$  則受到一些抗原性刺激(Antigenic stimuli)或有絲分裂刺激因子(Mitogenic stimuli)活化。TNF 的生理功能和免疫系統的發育及免疫功能執行相關，當過量表現時會造成局部嚴重發炎、組織損傷、休克的情況等。當表現不足時，則會造成淋巴細胞以及免疫功能之紊亂低下，甚至引發自體免疫的疾病。其中 TNF- $\alpha$  除了免疫功能上的角色之外，在促進細胞凋亡的機制也是很重要且被廣泛研究的。

TNF 的作用主要透過其專一的受體 TNF-Receptor(TNFR)，TNFR 存在兩種型式，為 TNFR1 及 TNFR2，其分子量大小分別為 55kDa 及 75kDa，皆屬於嵌入細胞膜的受體蛋白，其細胞膜外的部分含有相似度高且高度保留之四到六個富含胱氨酸之重複區域(Cysteine-rich

repeat)，是負責和其 Ligand 結合的區域。而在細胞膜內的部分，主要是和下游蛋白產生交互作用且將訊息傳遞下去之功能相關，然而，這兩種形式的受體在細胞膜內的部分相似度則是很低、變異很大的，也由此推知經由兩種受體所傳遞的訊息或有很大的差異。例如，在 TNFR1 之細胞膜內區域，存在一個包含六十個氨基酸的高度保留區(亦存在 Fas-receptor)，稱為 Death Domain，當 TNFR1 受到 TNF- $\alpha$  活化時，會透過這個區域將凋亡的訊息傳遞下去，而在 TNFR2 則沒有 Death Domain，因此在受到 TNF- $\alpha$  刺激下，反而趨向活化下游的 NF- $\kappa$ B 或 AP-1 而有抑制凋亡的作用，由此可之二者在訊息傳遞角色上之差異(39, 43, 61)。



R. A. Roberts (2001) *Toxicology* 120:301-306(61)

由以上可知 TNF- $\alpha$  在調控凋亡作用中的重要角色，因此有許多癌症相關的研究，即針對 TNF- $\alpha$  與凋亡作用之關係進行探討。以肝

癌為例，有很多文獻指出 TNF- $\alpha$  可以促進肝癌細胞走向凋亡(11, 63, 64)，而也有應用 TNF- $\alpha$  或者其他 Death receptor 之 Ligand 來抑制肝癌的研究(65, 66, 67)，但是相對的，亦有文獻指出 TNF- $\alpha$  刺激下可以促進肝細胞生長，抑制凋亡反應(61)，因此 TNF- $\alpha$  在肝癌到底是保護亦或是更加成的作用，仍舊是很有爭議的問題，也是我們急欲釐清的目標之一。

## 〈 動機 〉

癌症一直高居國人十大死因之首，而肝癌更是現今國人的大患。根據衛生署統計資料，肝癌在男性癌症相關的死亡原因中，更是排名第一的惡性腫瘤，遠遠超過女性罹患肝癌之機率的數倍之多，這樣的性別差異，或許說明荷爾蒙及其受體在肝癌形成過程中扮演某些關鍵的角色。另外由於凋亡作用是決定細胞生死相當關鍵的一個機制，並且，在許多已被發現的致癌機轉中，常常涉及凋亡作用低落或者阻斷的情形，因此近年來許多癌症治療的研究，即針對凋亡機制的調控著手，試圖透過促進或者修復癌細胞凋亡反應，來達到治療的目的。其中在凋亡作用中很重要的一個因子，TNF- $\alpha$ ，已有許多文獻顯示其有促進肝癌細胞凋亡的作用，因此基於以上理由，給了我們一個靈感，想要了解女性肝癌罹患率低於男性的原因，是否因為雌性激素及其受體對肝細胞有保護的作用？且其機制是否是透過促進肝癌細胞走向凋亡而造成？若雌性激素及其受體的確可以造成肝癌細胞凋亡發生，那是否是透過肝癌細胞凋亡過程中非常重要的 TNF- $\alpha$  所導致？這就是我們以下實驗想要釐清的問題。

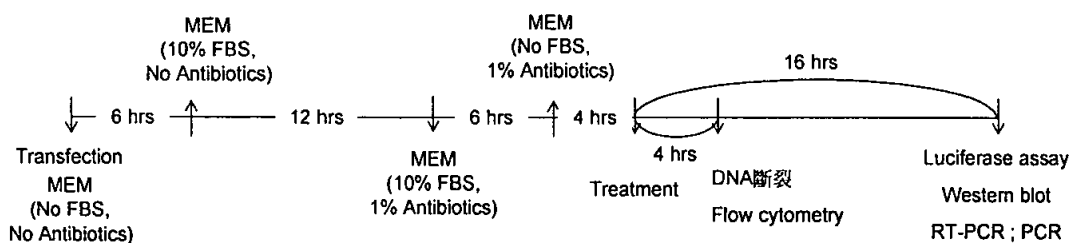
## < 實驗方法 >

### I. 細胞培養

#### 1. 細胞培養條件

Hep 3B 細胞株，以含有 10%胎牛血清、2mM L-glutamine、1.5 g/L Sodium bicarbonate、0.1 mM Non-esseneial amino acids、1.0 mM Sodium pyruvate 及 1%抗生素的 MEM 培養液培養在含有 5%二氧化碳、恆溫 37°C 的培養箱中，每兩天更換一次培養液。當細胞生長至九分滿，即以 0.05% Trypsine 將細胞游離下來，移至新的培養皿中重新貼覆生長。若細胞用作 DNA 斷裂、RNA 萃取、流式細胞儀凋亡百分比分析、西方點墨法則將細胞分至 6 公分培養皿中生長，待細胞生長至 6~7 分滿即進行轉殖的動作，接著分別做以上不同實驗分析。當細胞用作 Luciferase assay 分析時，則將細胞分至 6 孔盤中，一樣等到細胞 6~7 分滿即進行轉殖的動作並進一步分析。

#### 2. 藥劑處理時間點



## II. Construct

### 1. 得到目標基因

首先自 NCBI 資料庫(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中找到目標基因的序列，決定要建構的片段(附表)，設計兩股的引子(<http://workbench.sdsc.edu/>)，在引子的兩端分別包含兩個限制酶切位(附表)，再利用 Genomic DNA 當作模板進行 PCR 放大，PCR 產物利用膠質電泳確定片段大小，同時挖膠純化，即得到要建構的目標基因片段。

### 2. First-Clone

利用 yT&A Vector Kit(益生)，將跑膠純化過後的目標基因和 yT&A cloning vector(附圖九)混合，置於 4°C、12 小時，進行黏合(ligation)反應。將黏合好的一級重組子進行轉化(Transformation)反應，由於 yT&A cloning vector 上含有 LacZ 基因，當基因插入成功時，LacZ 基因就會被破壞掉，因此可以將轉化過後的菌株塗在含有 Ampicilin(50ug/ml)的培養基上，利用藍白篩選法挑出成功轉化的白色單一菌落。若重組轉化成功，即將菌落培養在 LB medium 中放大，萃取質體保存，或者加入等體積甘油，凍菌保存。

### 3. Second-Clone

萃取一級重組子以及二級載體(pGL3-Basic Vector)之質體(附圖十)，利用限制酶 37°C、2.5 小時進行切割，分別跑膠純化，置於 16°C、12 小時再進行第二次的黏合反應，再進行轉化反應。接著將轉化後的菌株塗在含有 Ampicilin 的培養基上，進行單一菌落的挑選。若重組轉化成功，即將菌落培養在 LB medium 中放大(此時可以進行 PCR 來確定二級重組子是否建構成功)，萃取質體保存(此步驟可以用限制酶切割來確定二級重組子是否建構成功)，或者加入等體積甘油，凍菌保存。

### III. Genomic DNA 萃取

將細胞培養在 MEM 生長培養液中(10 公分培養皿)，待細胞養至八分滿，以 PBS 清洗細胞兩次，加入適量 GenoMaker(1 ml/盤)，以細胞刮棒將細胞收集下來，加入 0.5 ml Phenol/Cloroform (24:1)充分作用，以 12000rpm、4°C 離心 5 分鐘，將含有 DNA 的水層容液(上層)抽到新的微量離心管中，加等量異丙酮(Isopropanol)輕輕搖勻將 DNA 沉澱，以 12000rpm、4°C 離心 10 分鐘，即可得到 Genomic DNA 的沉澱，DNA 在以 70%酒精洗兩次(12000rpm、4°C 離心 5 分鐘)，將沉澱

DNA 晾乾，最後以適量二次水回溶即可。

#### IV. 膠質(Agarose gel)中 DNA 萃取

跑完電泳的膠片以 Gelstar 染色，UV 燈照射切下我們所要的正確片段，以 VioGene Gel Extraction System Kit 來萃取。首先加入 0.5 ml GEX buffer(可作用 50~200 mg 的膠質)，於 60°C 反應 5~10 分鐘直至膠體完全溶解，放冷至室溫，加到架在 2 ml 微量離心管的 Column 中，以 12000rpm、室溫離心 1 分鐘，倒掉濾液，Column 以 700 ul WS buffer 清洗(12000rpm、室溫離心 1 分鐘)，倒掉濾液，在離心一次以除去殘餘的 Buffer，將 Column 移到新的微量離心管上，加入適量(30~50 ul)Elution Buffer，室溫作用 4 分鐘，以 12000rpm、室溫離心 2 分鐘，即可得到從膠質中萃取的 DNA 片段。

#### V. 質體萃取

##### 1. 小量質體萃取

挑菌養在 3ml 含有 Ampicillin 的 LB medium 中培養 16 小時放大，利用 QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit 萃取質體 DNA。首先



將菌液 3000 rpm、4°C 離心 5 分鐘，沉澱下來的菌體用 250 ul Buffer P1 回溶、打散，加 250 ul Buffer P2 輕搖數下、室溫作用 5 分鐘，再加入 350 ul Buffer N3 馬上輕搖 4~6 次，讓豆花狀 Genomic DNA 結聚，冰上作用 5 分鐘，以 12000 rpm、4°C 離心 10 分鐘，將上清液抽出置於 QIAprep spin column 中，14000rpm 離心 1 分鐘，到掉上離心下來通過 column 的液體，再加入 500 ml Buffer PB，14000rpm 離心 1 分鐘，到掉上離心下來通過 column 的液體，再加入 750 ml Buffer PE，14000rpm 離心 1 分鐘，到掉上離心下來通過 column 的液體，最後空的 column 再離心一次以排除所有殘餘的 Buffer，將 column 移到新的微量離心管上，加入適量 Buffer EB，作用 5 分鐘，14000rpm 離心 3 分鐘，離心下來的液體即含有質體 DNA。

## 2. 大量質體萃取

挑菌養在 3ml 含有 Ampicilin 的 LB medium 中培養 8 小時放大，接著繼續將小量的菌液加到 500 ml 含有 Ampicilin 的 LB medium 中培養 16 小時，利用 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 萃取質體 DNA。首先菌液以 6000 g、4°C 離心 30 分鐘，離心下來的菌再用 Buffer P1 打散回溶，加 10 ml Buffer P2 輕搖數下、室溫作用 5 分鐘，再加入 10 ml Buffer P3 馬上輕搖 4~6 次，讓豆花狀 Genomic DNA 結聚，冰

上作用 20 分鐘，以 20000 g、4°C 離心 30 分鐘，將上清液抽出同樣以 20000 g、4°C 離心 15 分鐘，上清液抽出置於已活化的 QIAGEN-tip 中，利用重力讓含有質體的上清液通過 Column，接著 Column 以 30 ml Buffer QC 洗兩次，再用 Buffer QF 將質體 DNA 沖出，加入 0.7 倍體積的異丙醇(Isopropanol)沉澱質體 DNA，以 15000 g、4°C 離心 30 分鐘，接著沉澱出的 DNA 再加入 5 ml 70%絕對酒精以 15000 g、4°C、10 分鐘洗兩次，最後將離心下來的質體 DNA 晾乾加入適量體積二次水回溶即可。

## VI. 轉化(Transformation)

將 NM522 培養在 2 ml LB medium 中(37°C、16 小時)，接著抽出 200 ul 菌液加到 10 ml LB medium 中 37°C 培養 1 小時，以 2500 g、4°C 離心 5 分鐘，將沉澱下來的細胞用 5 ml 50 mM 的 CaCl<sub>2</sub> 輕輕回溶，置於冰上作用 30 分鐘，再以 2500 g、4°C 離心 5 分鐘，沉澱的細胞同樣以 0.5 ml 50 mM 的 CaCl<sub>2</sub> 輕輕回溶，此時勝任細胞的製備已經完成。接下來將我們要轉化的 DNA(約 100~200 ng 即可)和勝任細胞混合，至於冰上作用 30 分鐘，每五分鐘輕拍一次離心管管壁，以防止細胞沉澱，之後再將混合物在 42°C 進行熱休克 2 分鐘，加入 1 ml LB

medium，置於 37°C 培養 1 小時，抽取 50~400 ul 以 L 型玻棒均勻塗在含有 Ampicilin 的培養基上，培養 16 小時觀察菌落的生長。

## VII. DNA 轉殖(Transfection)

將細胞培養在 MEM 生長培養液中，待細胞養至七分滿，以 PBS 將生長培養液洗掉，更換不含抗生素及血清之 MEM，選用 Invitrogen Lipofectamine 2000 transfection kit，利用 Lipofection 的原理進行轉殖的實驗。第一步先將質體 DNA 和適量無抗生素 MEM 混合，同時依外送 DNA 的量，抽取一比一比例之 Lipofectamin，和適量無抗生素 MEM 混合，室溫作用 5 分鐘。接著將分別與 MEM 混合的 DNA 和 Lipofectamin 加在一起，以 Tip 抽吸混合 100 次，置於室溫作用 20 分鐘之後，等量加入預先換好無抗生素及無血清之 MEM 培養皿中，在 37°C 培養箱中培養 6 小時，之後再加入等體積並含有 20% 血清之無抗生素 MEM (使最後血清濃度為 10%)，於 37°C 培養箱培養 12 小時後，再換回含有 10% 血清之生長培養液回養 6 小時，最後細胞以 PBS 沖洗兩次，並換成不含酚紅及血清之 MEM，分別處理相關藥劑，並於 37°C 培養，最後收集細胞並進行相關實驗分析。

## VIII. DNA 斷裂(DNA fragmentation)

經過處理的細胞(6 公分培養皿)，以 PBS 沖洗兩次將殘餘培養液清洗掉，加入適量 PBS(0.5~1 ml/dish)用細胞刮棒收集細胞，收集的細胞以 14000rpm 離心 10 秒，離心下來的細胞以適量(50 ul)Lysis buffer(1% NP40，20mM EDTA，50mM PH7.5 之 Tris-Hcl，溶於二次水中)作用 10 秒鐘，14000rpm、離心 15 分鐘，取上清液至新的微量離心管中，加 1% SDS 及 3.33 ug/ul 的 RNaseA，於 56°C 作用 2 小時，加入 2.5 ug/ul 的 Proteinase K，37°C 作用 2 小時，加 1/2 倍體積 3M Sodium acetate(pH 5.2)，以及 2.5 倍體積絕對酒精，於-70°C、1 小時沉澱 DNA，沉澱完的產物以 15000rpm、4°C 離心 15 分鐘，離心下來的 DNA 使其自然風乾，以適量二次水回溶，進行電泳分析，以 Gelstart 染劑染 DNA、照相觀察結果。

---

## IX. 報告基因活性分析(Luciferase assay、 $\beta$ -galactosidase activity assay)

### 1. Luciferase assay:

選用 Promega:Luciferase assay system kit 進行實驗分析。處理完之細胞(六孔盤中)，以 PBS 沖洗兩次將殘餘培養液洗淨，將 kit

中的 5 倍 cell culture lysis reagent(CCLR) 稀釋成一倍濃度，取適量(150 ul/well)加入培養皿中，作用數分鐘至細胞從原本貼壁的狀態變成懸浮，以細胞刮棒收集細胞，12000g、4°C 離心 15 秒，抽取上清液進行實驗，或可保存在-70°C 待測。

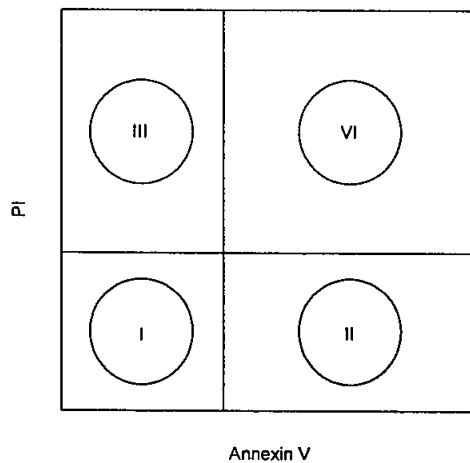
取 20 ul 檢體(上清液)置於 96 孔盤中，接著加入 80 ul 之 Luciferin 受質，Tip 抽吸混勻，去除泡泡，加入受質後 30 秒內以冷光測定儀分析冷光強度(37°C、20 秒延遲)即可。

## 2. $\beta$ -galactosidase activity assay:

抽取 30 ul 上述 luciferase assay 所萃取的細胞萃取物(上清液部分)，加入 1 ml 之  $\text{PO}_4$  buffer(60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，1 mM  $\text{MgCl}_2$ ，pH7.5)，以及加入 200 ul 之受質 ONPG(3 mg/ml in  $\text{PO}_4$  Buffer)，置於 37°C 培養箱震盪器上，反應 1.5 小時，此時反應物有透明變為黃色，加入 500  $\mu\text{l}$  之 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  終止反應，抽 150 ul 至 96 孔盤中，以 420 nm 波長測定吸光質，即可得知  $\beta$ -galactosidase 活性，也就反應出轉殖之效率。

## X. 凋亡細胞之流式細胞儀(Flow cytometry)分析

處理完之細胞(6 公分培養皿)，以 0.05% Trypsin 將細胞游離並收集，以 800g、4°C 離心，再以 PBS 洗細胞兩次，接著以 Binding buffer(0.01 M HEPES, 0.14 M NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.4)回溶細胞，使其細胞濃度約為 1x10<sup>6</sup> cell/ml，抽取 100 ul 之細胞進行實驗，加入 2 ul 濃度為 50 ug/ml 之 Propidium Iodide(PI)，以及 0.5 ul 之帶有綠色螢光之 Annexin V 抗體，室溫作用 15 分鐘，之後加入 400 ul 一倍之 Binding Buffer，即可上機(流式細胞儀)分析。



上圖是流式細胞儀分析結果模擬圖，當細胞分佈在 I 區(PI:-, Annexin V:-)，表示為活細胞，II 區(PI:-, Annexin V:+)為凋亡早期細胞，III 區(PI:+, Annexin V:-)為壞死之細胞，VI 區(PI:+, Annexin V:+)為凋亡晚期細胞，接著再經由特定軟體分析，可得知各區細胞之百分比，藉此分析實驗組處理後細胞之凋亡程度。實驗數

據以[實驗組(II區細胞%+IV區細胞%)-控制組(II區細胞%+IV區細胞%)]而得。

## XI. RT-PCR/PCR

### 1. RNA 萃取:

選用 ULTRAAPEC RNA isolation system 抽取 RNA。處理過後之細胞(6 公分培養皿)，以 PBS 沖洗細胞兩次清除殘留的培養液，加入 1 ml Ultraspec 至培養皿中，搖勻作用 30 秒~1 分鐘，用細胞刮棒收集細胞，加入 200 ul Chloroform 充分搖勻，置冰上靜置 5 分鐘，以 12000 rpm、4°C，離心 15 分鐘，抽上層液，加等量 Isopropanol(沉澱 RNA 用)正反輕輕搖勻，冰上靜置 10 分鐘，以 12000 rpm、4°C，離心 10 分鐘，離心下來的沉澱物以 75%絕對酒精，12000 rpm、4°C，離心 5 分鐘洗兩次，最後沉澱物自然風乾，以適量 0.1%之 DEPC 水回溶，接著將萃取出來的 RNA 置於 55~65°C 水浴加熱 10~15 分鐘使其變成一級結構，之後放入 4°C 隔夜，使其完全溶解，即可定量分裝保存。

### 2. RT-PCR:

#### (1)、試劑:

DEPC 水	}	共 59.5 ul
Total RNA 8ug (4 ug)		
RNase inhibitor (40 u/ul) ..... 0.5 ul		

5XRT buffer .....	20 ul
dNTP (10 mM) .....	8 ul
Oligo dT (5 uM/ml) .....	10 ul
RTase .....	2 ul
-----	
Total	100 ul

(2)、步驟：

- a) Mix sample (水加 RNA)
- b) Pre-RT (70°C, 5min)
- c) 置冰上, spindown
- d) 事先混合其他試劑, 再和 Pre-RT 過的 sample 混合
- e) 42°C, 5 min
- f) 42°C, 1hr
- g) 90°C, 5min

### 3. PCR:

1、試劑：

DEPC 水 .....	9.5 ul
cDNA .....	5 ul
10XRCR buffer .....	2.5 ul
dNTP (10 mM) .....	2.5 ul
5'primer (5 uM/ml) .....	2.5 ul
3'primer (5 uM/ml) .....	2.5 ul
Taq .....	0.5 ul
-----	
Total	25 ul

2、步驟：

- (1) Mix sample (所有試劑)
- (2) 94°C, 5min
- (3) 94°C, 1min



anneal Temp. (依 Primer 而定), 1 min

72°C, 2 min

(4) 72°C, 20 min

(5) 4°C

## XII. 細胞總蛋白萃取

細胞處理過後(6 公分培養皿)，加適量(150~200 ul/dish)Lysis Buffer(50 mM pH7.5 Tris-base, 0.5 M NaCl, 1 mM pH8 EDTA, 1 mM beta-mercaptoethanol, 1% NP40, 1% Glycerol, Protein kinase inhibitor 2 錠，溶於二次水中，總體積 20 ml)，以細胞刮棒收集細胞，收集的細胞置冰上反應 30 分鐘，每隔五分鐘震盪一次，接著以 10500 rpm、4°C，離心 10 分鐘，收取上清液即為細胞之總蛋白，置於-70°C 保存。

## XIII. 蛋白質定量(Lowry protein assay)

萃取好的蛋白以二次水作適量的稀釋(6 公分培養皿培養之細胞萃取出蛋白，以 200 ul Lysis Buffer 收集，約稀釋成 10~20 倍用以定量)，同時以 Bovine Serum Albumin(BSA)當作對照，分別稀釋成 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml 濃度且和待測蛋白同體積之標準

品，將來用作標準曲線製作，接著待測物和標準品(以總體積 50 ul 為例)分別加入 250 ul 之 Alkaline Copper reagent(2% Na-K tartrate, 1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0.1 N NaOH;三者以 1:1:98 之比例混合)，室溫作用 10 分鐘，接著加入 25 ul 之 Folin-Ciocalteu phenol reagent，室溫作用 30 分鐘，抽取 200 ul 至 96 孔盤中，以 750 nm 波長測定吸光值，待測蛋白之數值回歸到標準品所作出標準曲線，即可得知待測蛋白之濃度。

#### XIV. 西方點墨法(Western Blot)

##### 1. 製膠:

###### Solution B

2M Tris-Base (pH8.8).....	75 ml
10% SDS .....	4 ml
ddH <sub>2</sub> O .....	21 ml

###### Solution C

1M Tris-Base (pH6.8).....	50 ml
10% SDS .....	4 ml
ddH <sub>2</sub> O .....	46 ml

下膠/2片	10%	12%	15%	單位
40% Bis-Acrylamide	3.5175	4.5	5.625	ml
Solu.B	3.75			ml
10%APS	120			ul
ddH2O	7.5825	6.6	5.475	ml
Temed	30			ul
Total	15			ml

上膠/2片		單位
40% Bis-Acrylamide	937.5	ul
Solu.C	2.5	ml
10%APS	80	ul
ddH2O	6.5625	ml
Temed	20	ul
Total	10	ml

## 2. 跑膠:

以 100 福特，1.5 小時進行 SDS-PAGE 分析。

### Running Buffer

Tris-base ..... 1.5 g  
 Glycine..... 7.35 g  
 10% SDS..... 5 ml  
 Total..... 500 ml

## 3. 轉漬:

以 100 福特，1.5 小時進行轉漬。

### Transfer Buffer

Tris-base ..... 4.55 g  
 Glycine..... 21.6 g  
 Methanol..... 300 ml  
 Total..... 1500 ml

#### 4. Blocking:

5% 脫脂奶粉溶於 TBS 中(Blocking Buffer)，將轉漬完的 PVDF 膜浸於 Blocking Buffer 中，室溫反應 1 小時。

##### TBS buffer

Tris-base.....2.66 g  
NaCl.....18 g  
Tween 20.....1 ml  
Total.....2000 ml

#### 5. 一級、二級抗體雜合:

將專一之一級抗體以 1:500 之比例溶於 Blocking Buffer 中，使完全覆蓋住 Blocking 後之 PVDF 膜，4°C 作用隔夜。以 TBS Buffer 將一級抗體洗淨，專一之二級抗體以 1:500 之比例溶於 TBS Buffer 中，使完全覆蓋住一抗雜合後之 PVDF 膜，室溫作用 1 小時。

#### 6. 呈色:

二抗雜合後之 PVDF 膜，以 TBS Buffer 將殘餘二抗體洗淨，以適量 DAB、過氧化氫及 Substrate Buffer 呈色，搖至褐色 Band 出現即可將膜以二次水洗淨晾乾保存。

##### Substrate Buffer

Tris-base.....4.84 g  
NaCl.....2.33 g  
MgCl<sub>2</sub>.....0.19 g  
Total.....400 ml

## < 實驗材料 >

### I. 細胞培養:

- \* MEM (GIBCO, 61100-061)
- \* MEM (no phenol red; GIBCO, 51200-038)
- \* PBS (Gibco, 21600-010)
- \* FBS (Hyclone, Characterized Fetal Bovine Serum)
- \* Sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ; Sigma, S-5761)
- \* Sodium pyruvate (Gibco, 11360-070)
- \* Antibiotic-Antimycotic (Gibco, 15240-062)
- \* Trypsin-EDTA (Gibco, 25200-056)
- \* DMSO (Sigma, D-2650)
- \* 處理用藥:
  - ◎ Estradiol (Sigma, E-8518)
  - ◎ LPS (Sigma, L-2630)

### II. DNA 斷裂 (DNA fragmentation):

- \* PBS
- \* Lysis buffer
  - IGEPAL CA-630 (Sigma, I-3021) or NP40
  - EDTA (Sigma, E-5134)
  - Tris-HCl (USB, T-8650)
- \* SDS (Sodium dodecyl sulfate; Sigma, L-4509)
- \* RNase A (Roche, 109142)

- \* Proteinase K (Roche, 161519)
- \* Sodium acetate (Sigma, S-2889)
- \* Absolute ethanol (Merk, 1.00983.1000)
- \* DNA loading dye-
  - Bromophenol blue (Sigma, B-5525)
  - Sucrose (Merck, 1.07651.1000)
- \* 5X TBE
  - Tris-Base (USB, T-8600)
  - Boric acid (Amresco, 0588-1KG-PTM)
  - EDTA (Sigma, E-5134)

### III. Genomic DNA extraction:

- \* Genomaker (真興實業股份有限公司, GPD01)
- \* Phenol (Amresco, 0945-400ML)
- \* Chloroform (Merk, UN1888)
- \* Isopropanol (Sigma, I-9516)
- \* Absolute ethanol (Merk, UN4170)

### IV. Gel extraction system:

- \* Gel-M (Viogen, EG1002)

### V. Transfection:

- \* Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

## VI. Flow cytometry:

### A. Antibody

- \* Annexin V FITC Conjugate (Biosource, PHN1008)
- \* Propidium Iodide (Sigma, P-4170)

### B. PBS

### C. Binding Buffer

- \* HEPES (Sigma, H-3375)
- \* NaCl (Sigma, S-7653)
- \* CaCl<sub>2</sub> (昭和一级[SHOWA], 0305-2250)

## VII. Plasmid 抽取:

- \* QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, 12162)

## VIII. Construct:

- \* Hind III (Takara, 1060A)
- \* Kpn I (Takara, 1068A)
- \* Gel-M Gel extraction system (Viogene, EG1002)
- \* IPTG
- \* X-gal
- \* Ampicillin (Sigma, A-9393)

## IX. Luciferase assay:

- \* Luciferase assay system (Promega, E1500)

#### X. $\beta$ -Galactosidase activity assay:

- \* ONPG (Sigma, N-1127)
- \*  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Sodium Carbonate; 和光, 199-01585)
- \*  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma, S-0876)
- \*  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (林 純藥工業株式會社)
- \*  $\text{MgCl}_2$  (Sigma, M-8266)

#### XI. RT-PCR:

- \* RNase inhibitor (Promega, N-251B)
- \* 5X RT Buffer (Promega, M-531A)
- \* dNTP (Promega, U-1240)
- \* RTase (Promega, M-170A)
- \* Oligo-dT (生工有限公司)

#### XII. PCR:

- \* Taq (Finnzymes, F-501L)
- \* 10X Dyna PCR Buffer (Finnzymes, F-511L)
- \* dNTP (Promega, U-1240)
- \* Gelstar (BMA, 50535)

#### XIII. Lowry Protein assay (蛋白質定量):

- \* Na-K tartrate (Potassium Sodium Tartrate; Sigma, P-0165)
- \*  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Copper[II] Sulfate Pentahydrate; 和光,



030-04425)

\* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sodium Carbonate; 和光, 199-01585)

\* NaOH (Sigma, S-5881)

\* Folin-Ciocalteu reagent (和光, 279-08895)

#### XIV. Western blot (西方墨點法):

##### A. Cell lysis buffer

\* Tris-base (USB, T-8600)

\* NaCl (Sigma, S-7653)

\* EDTA (Sigma, E-5134)

\*  $\beta$ -mercaptoethanol (Pharmacia Biotech, 17-1317-01)

\* IGEPAL CA-630 (Sigma, I-3021) or NP40

\* Glycerol (Angus, 07-53205)

\* Proteinase K inhibitor (Protease inhibitor cocktail tablets; Roche, D-68298)

##### B. Loading dye

\* Tris-HCl (USB, T-8650)

\* Glycerol (Angus, 07-53205)

\* SDS (Sodium dodecyl sulfate; Sigma, L-4509)

\*  $\beta$ -mercaptoethanol (Pharmacia Biotech, 17-1317-01)

##### C. Western blot buffer

\* Acrylamide (Sigma, A-8887)

\* Bis-acrylamide (Amresco, 0172-100G)

\* Solution B

- Tris-base (USB, T-8600)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate; Sigma, L-4509)

\* Solution C

- Tris-HCl (USB, T-8650)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate; Sigma, L-4509)

\* APS (Ammonium Persulfate; Amresco, 0486-25G)

\* TEMED (Platinum Plus [CPG], P-E90051)

\* Glycine (USB, G-8165)

\* Methanol (TEDIA, MS-1922)

\* NaCl (Sigma, S-7653)

\* Tween-20 (Pharmacia Biotech, 17-1316-01)

\* 安佳脫脂即溶奶粉 (Anchor New Zealand Milk)

\* Ponceau S Solution (Sigma, P7170)

**D. Substrate buffer**

\* Tris-HCl (USB, T-8650)

\* NaCl (Sigma, S-7653)

\*  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (or  $MgCl_2$ ; Sigma, M-8266)

**E. Western blot 呈色**

\* DAB (3,3'-Diaminobenzidine Tablets; Sigma, D-5905)

\*  $H_2O_2$  (3% Hydrogen Peroxide; Sigma, H-6520)

## F. 抗體

- \* Caspase3 (Santa Cruz, sc-1225)
- \* Caspase8 (Santa Cruz, sc-6134)
- \* Caspase9 (Santa Cruz, sc-8355)
- \* Estrogen receptor- $\alpha$  (Affinity Biolreagent, PAI-308)
- \* A-tubulin (Neo Markers, #MS-581-P1ABX)

## < 結果 >

一、以 DNA 斷裂，觀察雌二醇是否造成人類肝癌細胞株(Hep 3B cell line)凋亡，而是否需透過雌性素受體  $\alpha$  來達成？

本實驗採 Hep 3B 肝癌細胞株培養於 6 公分培養皿中，利用 Lipofection 的方式，將空載體 DNA 或帶有野生型雌性素受體  $\alpha$  (wt-ER $\alpha$ ) 之質體 DNA 轉殖入細胞中，再分別於控制組中加入絕對酒精(EtOH)，實驗組中加入雌二醇(E<sub>2</sub>; 10<sup>-8</sup>M)，於 37°C 培養 4 小時後，收細胞並萃取 DNA，於跑膠後，再以 Gelstar 染色觀察 DNA 斷裂情形。

結果發現，當細胞單獨處理雌二醇時，較只處理絕對酒精之控制組有更明顯之 DNA 斷裂的情形。若當細胞單獨表現過量 wt-ER $\alpha$ ，亦比控制組有較明顯之 DNA 斷裂情形。若比較只單獨雌二醇處理或單獨表現過量雌性素受體  $\alpha$  的細胞，則雌性素受體  $\alpha$  過量表現的情況下 DNA 斷裂的情形增加較顯著。若同時表現過量雌性素受體  $\alpha$  又處理雌二醇時，則斷裂的情形與單獨過量表現雌性素受體  $\alpha$  的情形相當，未見明顯加成效果(圖一)。

實驗中並採用攜帶綠螢光蛋白基因(GFP)之質體 DNA 轉殖入肝癌細胞中，再以螢光顯微鏡觀察，藉以了解細胞轉殖的效率。根據計算之後的結果，轉殖效率約在 35~40%左右(圖二)。

二、以流式細胞儀觀察雌二醇是否造成人類肝癌細胞株(Hep 3B cell line)凋亡，而是否需透過雌性素受體  $\alpha$  來達成？

本實驗採 Hep 3B 肝癌細胞株培養於 6 公分培養皿中，利用 Lipofection 的方式，將空載體 DNA 或帶有野生型雌性素受體  $\alpha$  (wt-ER $\alpha$ ) 之質體 DNA 分別轉殖入細胞中，再分別於控制組中加入絕對酒精(EtOH)，實驗組中加入雌二醇(E<sub>2</sub>; 10<sup>-8</sup>M)，於 37°C 培養 4 小時後，收集細胞以 Propidium Iodide(PI) 及帶有綠色螢光(Fitc)之 Annexin V 抗體，置冰上避光 15 分鐘進行染色，最後加入 400 ul 之 Binding Buffer 稀釋，即可上機分析。

由實驗結果可以看到，當細胞單獨處理雌二醇(10<sup>-8</sup>M)時，凋亡細胞較只加入絕對酒精之控制組有 0.932% 的增加。當細胞過量表現雌性素受體  $\alpha$  時，凋亡細胞較控制組有 8.71% 的增加。若在過量表現雌性素受體  $\alpha$  的細胞同時給予雌二醇時，凋亡細胞較控制組有 8.46% 的增加。

三、建構人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ ) 啟動區及螢光蛋白基因之嵌合 DNA (pGL3-hTNF $\alpha$ -Luc)。

採人類肝癌細胞株(Hep 3B)抽取 Genomic DNA，並以其為模板，利用專一的引子進行 PCR 放大我們要的目標基因; hTNF- $\alpha$ 。PCR 產物

跑膠確認其位置，並進一步挖膠純化，將純化出來的 cDNA 送定序確認產物，同時將部份 DNA 和一級載體(T&A vector)在 4°C、12 小時進行黏合，黏合後的質體進一步轉殖進入 NM522 菌株中，以藍白篩選的方式，挑選轉殖成功的單一菌落回養至 LB medium 中，接著利用專一的限制酶(kpn I、Hind III)、或者菌液直接 PCR 的方法，確認轉殖成功。一級嵌合 DNA(pT&A-hTNF  $\alpha$ )建構成功之後，小量萃取其質體 DNA，萃取好的質體 DNA 以及二級載體(pGL3-Basic Vector)以專一的限制酶(kpn I、Hind III)進行切割(37°C、2.5 小時)，接著將二者切割完的產物、黏合酵素(T4 DNA ligase)以及黏合反應溶液(Ligation buffer)按比例混合，16°C、12 小時進行黏合。黏合好的二級嵌合 DNA(pGL3-hTNF  $\alpha$ -Luc)進一步轉殖入 NM522 菌株中，以抗生素(Ampicilin)篩選轉殖成功的菌株，再一次放大、萃取質體，利用專一的限制酶切割確認轉殖成功，或者直接用菌液進行 PCR 來確認。建構成功之嵌合 DNA(pGL3-hTNF  $\alpha$ -Luc)，將其轉殖進入 Hep 3B 人類肝癌細胞株中，並處理已知可以促進 TNF- $\alpha$  基因表現的 Lipopolysacchride (LPS)，收集細胞萃取物，測定其 Luciferase 酵素活性(Luciferase Assay System kit;Promega)。

由實驗結果可以看到，PCR 產物跑膠之後以 Gelstart 染色的結果，證實以專一的引子 PCR 出來的產物確實在正確分子量位置(圖

四 A)。且 PCR 產物定序的結果，其序列和 NCBI Data base 中人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  序列相同(圖四 B)。當二級嵌合 DNA 轉殖進入菌株後抽取質體、以限制酶切割後，切割產物跑膠的結果，可以看到專一限制酶的確切出目標基因，且其大小在正確分子量位置(圖四 C)。在二級嵌合 DNA 轉殖進入菌株後，以菌液利用專一引子 PCR 的結果，同樣可以看到正確分子量大小的產物出現(圖四 D)。以上的結果，確定了人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區及螢光蛋白基因之嵌合 DNA 建構成功。

同時在處理 hTNF- $\alpha$  之上游誘導因子 Lipopolysacchride (LPS) 後，確實可誘發 Luciferase 活性的增加，進一步證明此嵌合 DNA 確實具有 TNF- $\alpha$  promoter 活性(圖四 E)。

四、觀察雌二醇以及雌性素受體  $\alpha$  在 Hep 3B 人類肝癌細胞株中是否可調控人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  的啟動區(hTNF- $\alpha$  promoter)活性?

本實驗將 Hep3B 肝癌細胞株培養在 6 孔盤中，以 Lipofection 的方式，將空載體之質體 DNA、可表現  $\beta$ -gal 的質體 DNA、帶有野生型雌性素受體  $\alpha$  (wt-ER $\alpha$ ) 之質體 DNA、pGL3-hTNF $\alpha$ -Luc 的質體 DNA 或 pGL3-3\*ERE-Luc 的質體 DNA，分別或共同轉殖進入細胞中，再將控制組處以絕對酒精(EtOH)，實驗組處以雌二醇(E<sub>2</sub>;10<sup>-8</sup>M)，於 37°C 培養 16 小時，收集細胞萃取物，再分別測量 Luciferase 活性

(Luciferase Assay System kit; Promega) 或  $\beta$ -gal 活性 (ONPG 受質; 3 mg/ml, 37 °C, 1.5 小時)。

結果得知，單獨處理雌二醇時，並不會增加 Luciferase 的表現。當過量表現野生型雌性素受體  $\alpha$  時，Luciferase 表現可平均增加 8.78 倍。當同時表現過量野生型雌性素受體  $\alpha$  又處理雌二醇時，對 Luciferase 活性並沒有明顯加成效果 (圖五)。由此發現，過量表現野生型雌性素受體  $\alpha$ ，可以活化人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區 (hTNF- $\alpha$  promoter)，且這樣的活化過程，Ligand (雌性素) 非絕對必要存在。ER 乃透過 Ligand-independent 的方式，活化了人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區基因 (hTNF- $\alpha$  promoter)。結果為 Luciferase 活性除以  $\beta$ -Gal 活性 (即轉殖效率) 所得之相對值。

實驗中我們另外利用已知的雌性素受體結合區域 (Estrogen response element) 之報告基因與雌性素受體  $\alpha$  共同轉質進入細胞，發現在沒有雌二醇的狀況下可以增加 Luciferase 活性有 8 倍以上，在同時給予雌二醇的狀況，可以增加 Luciferase 活性有 22 倍以上，由此證實我們外送進入的雌性素受體的確含有正常的生理功能。



## 五、觀察雌二醇及雌性素受體 $\alpha$ 在 Hep 3B 人類肝癌細胞株中是否可影響人類腫瘤壞死因子 $\alpha$ (hTNF- $\alpha$ ) mRNA 的表現量?

本實驗將肝癌細胞株培養於 6 公分培養皿中，利用 Lipofection 的方式，將空載體之質體 DNA、或帶有野生型雌性素受體  $\alpha$  (wt-ER $\alpha$ ) 之質體 DNA 分別轉殖入細胞中，再分別於控制組中加入絕對酒精 (EtOH)，實驗組中加入雌二醇 ( $E_2$ ;  $10^{-8}M$ )，於  $37^{\circ}C$  培養 12 小時後，收集細胞，萃取 RNA。並以 Oligo-dT 當作引子，進行 RT-PCR，將 RNA 翻轉成 cDNA，並以專一的人類腫瘤壞死因子之引子進行 PCR 放大，將 PCR 產物跑膠以 Gelstart 染色照膠觀察。

結果發現，在沒有過量表現野生型雌性素受體  $\alpha$  的細胞中，處理 LPS 或者雌二醇時，人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  之 mRNA 較絕對酒精處理的控制組只分別有 1.16 及 1.69 倍的增加。但細胞若表現過量雌性素受體  $\alpha$  時，即使在無 Ligand(雌二醇)的情形下，人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  之 mRNA 表現量較控制組增加了 3.97 倍。但再同時處理雌二醇時，人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  之 mRNA 表現量與過量表現雌性素受體  $\alpha$  但無 Ligand 存在的情況下，並沒有差異。

可見雌性素受體  $\alpha$  主要是透過 Ligand-independent 的方式，可能透過 AF-1 的活化，影響人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  mRNA 表現量增加。

## 六、以西方點墨法(Western Blot)觀察雌二醇以及野生型雌性素受體 $\alpha$ 在 Hep 3B 人類肝癌細胞株中對創蛋白(Caspase)活性的影響?

本實驗將肝癌細胞株培養於 6 公分培養皿中，利用 Lipofection 的方式，將空載體之質體 DNA、或帶有野生型雌性素受體  $\alpha$  (wt-ER $\alpha$ ) 之質體 DNA 分別轉殖入細胞中，再分別於控制組中加入絕對酒精 (EtOH)，實驗組中加入雌二醇(E<sub>2</sub>; 10<sup>-8</sup>M)，於 37°C 培養 12 小時後，收集細胞，萃取總蛋白，進行蛋白質定量，接著以西方點墨法，以創蛋白專一抗體，觀察創蛋白先質(Procaspase)以及活化型之創蛋白 (Cleavaged Caspase) 表現量。

結果發現，過量表現雌性素受體  $\alpha$  基因之細胞中，雌性素受體  $\alpha$  之蛋白質含量有明顯增加的情形，顯示了轉殖的正確性。然而，在沒有過量表現雌性素受體  $\alpha$  之細胞中，當處理雌二醇時，相較於只處理絕對酒精之控制組，Caspase8 及 Caspase3 之活化態亦有增加的情形。相同的，在過量表現雌性素受體  $\alpha$  之細胞中，單純處理絕對酒精時，比沒有過量表現雌性素受體  $\alpha$  只處理絕對酒精之控制組，同樣可以看到 Caspase8 及 Caspase3 之活化態有增加的情形。而在過量表現雌性素受體  $\alpha$  之細胞中，同時給予雌二醇，相較於沒有給予雌二醇之細胞，活化態 Caspase8 及 Caspase3 的蛋白並沒有明顯加成的現象。對於 Caspase9 之蛋白，細胞在所有實驗處理中，對於

其原形(Procaspase)或者活化態(Cleavaged Caspase)皆沒有明顯影響(圖七)。同樣地,若外加 LPS(1 mg/ml)刺激下,亦可以看到 Caspase8 及 Caspase3 活化態蛋白有明顯增加的情形,但對 Caspase9 活化態蛋白亦沒有影響(圖八)。

由此可以了解雌二醇以及雌性素受體  $\alpha$  對 Hep 3B 人類肝癌細胞中創蛋白的影響,主要是透過 Death receptor 路徑(包含 TNF- $\alpha$ ),活化 Caspase3 及 Caspase8,但是並不會透過影響粒腺體的路徑,也就是不會透過 Caspase9 活化,來造成 Caspase3 之活化。

七、以 DNA 斷裂(DNA Fragmentation)的方法,觀察雌性素受體  $\alpha$  所導致的 Hep 3B 肝癌細胞凋亡,是否受到 TNF- $\alpha$  路徑阻斷而影響?

本實驗將肝癌細胞株培養於 6 公分培養皿中,利用 Lipofection 的方式,將空載體之質體 DNA、或帶有野生型雌性素受體  $\alpha$  (wt-ER $\alpha$ ) 之質體 DNA 分別轉殖入細胞中,再分別於控制組中加入絕對酒精(EtOH),實驗組中加入雌二醇(E<sub>2</sub>;10<sup>-8</sup>M)、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)或 TNF- $\alpha$  抗體(0.1 ug/ml),於 37°C 培養 4 小時後,收集細胞,萃取 DNA,跑電泳,以 Gelstar 染色分析。

結果發現,當細胞單獨處理雌二醇或 TNF- $\alpha$  時,較只處理絕對酒精之控制組有明顯之 DNA 斷裂情形。若當細胞單獨表現過量

wt-ER $\alpha$ ，亦比控制組有明顯之 DNA 斷裂情形。若比較單獨雌二醇處理或單獨表現過量雌性素受體  $\alpha$  的細胞，則雌性素受體  $\alpha$  過量表現的情況下 DNA 斷裂的情形增加較顯著。若同時表現過量雌性素受體  $\alpha$  又處理雌二醇時，則斷裂的情形與單獨過量表現雌性素受體  $\alpha$  的情形相當，未見明顯加成效果。若在過量表現雌性素受體  $\alpha$  之細胞中同時給予 TNF- $\alpha$  之抗體來阻斷 TNF- $\alpha$  之訊息傳遞，則發現由過量表現之雌性素受體  $\alpha$  所誘導的凋亡現象有被抑制的情形，由此可知過量表現之雌性素受體  $\alpha$  所誘導的凋亡的確是透過 TNF- $\alpha$  所導致(圖九)。

## < 討論 >

凋亡，在癌症生成的過程中扮演重要角色。以肝臟例，當正常肝細胞要癌化成肝癌細胞的過程，主要經歷 Initiation、Promotion、Progression 三步驟，有研究指出當肝細胞處於 Initiation 時期時，可以發現有大量細胞增生的情形，但同時亦可發現大量細胞凋亡現象，因此這時候雖然肝臟細胞處於高代謝狀況，但仍維持著一個動態的平衡，肝臟(總細胞數)並沒有增生的情形。當肝細胞處於 Promotion 狀況時，則發現肝細胞仍有大量增生的現象，但這時候細胞凋亡的程度卻是降低的，因此在這樣”生多損少”的狀態下，就讓肝臟有變大增生的現象，但若在這時後即時控制，例如給予抗癌藥物治療，讓增生的癌細胞凋亡程度增加，還是可以回復肝臟生理平衡，但是若沒有給予控制，肝臟就會走向 Progression，最後形成肝癌(10, 68)。另外在許多癌細胞中，亦可以發現凋亡作用被抑制的情況，可知凋亡不論在癌症生成或者是癌細胞生存的機制中，都佔有舉足輕重的角色。因此在這裡我們便以人類 Hep 3B 肝癌細胞株當作材料，觀察雌二醇及人類雌性素受體  $\alpha$  對 Hep 3B 細胞凋亡的影響。已知當細胞走向凋亡時，會有 DNA 斷裂情形發生，這時候若以電泳分析，則可看到 180 base pair(約一個 Nucleosome 的大小)及其倍數的斷裂 DNA，形成階梯狀的分部，即 DNA ladder 產生，因此首先我們以雌二醇、雌性素

受體  $\alpha$ 、或者兩者加成的處理，跑膠觀察 DNA 斷裂的情形。在結果中我們發現單獨處理雌二純就可以造成 Hep 3B 細胞有 DNA 斷裂的情形，若在 Hep 3B 細胞中過量表現雌性素受體  $\alpha$ ，則可以看到較前者更明顯的 DNA 斷裂情形，但在兩者加成處理後 DNA 段列的情形並沒有更加成的現象。從這裡我們或許可以推測，對於肝細胞的凋亡而言，雌性素受體  $\alpha$  透過非雌性素依賴的方式活化之後，再繼續開啟下游凋亡有關的訊息傳遞路徑，才是較主要導致 Hep 3B 肝癌細胞凋亡的方式。而在先前的文獻提到，細胞可以透過活化之 MAPK Pathway 等將雌性素受體 A/B Domain(AF-1;Ligand-independent activation functional domain)上之絲氨酸殘基位置磷酸化並造成雌性素受體的活化(57)，因此我們推測這些過量表現的 ER- $\alpha$  可能就是經由細胞內的特定激酶磷酸化而導致其活化並將訊息傳遞下去，但是細胞內究竟是哪些激酶造成這些現象，亦或是這些激酶究竟透過何種方式被活化，皆是需要更進一步的實驗加以證明。

然而又因為在細胞凋亡過程中，會有細胞膜上 Phosphatidylserine(PS)外翻的情形，此時可以用專一之 Avvexin V 抗體進行偵測，但是在壞死的細胞並沒有此特性，而是細胞膜出現破洞或瓦解，這時若以 Propidium Iodide(PI)進行染色，活細胞因為細胞膜完整所以 PI 無法進入細胞，相對的若壞死的細胞細胞膜不完整 PI 就

會進入細胞。所以藉由這兩種染劑進行雙重染色，以流式細胞儀進行分析，不但可以了解細胞死亡的程度，同時可以區分出細胞究竟是透過壞死或者凋亡的方式死亡。從結果可以得知，當我們處理雌二醇或者過量表現雌性素受體  $\alpha$ ，是造成細胞走向凋亡而不是壞死(Deta not shown)。同時可以看到當單獨處理雌性素時，凋亡細胞的比例相較於控制組並沒有差異，而在過量表現雌性素受體  $\alpha$  後，凋亡細胞有 8.71% 的增加，與控制組相比在統計上有極顯著的差異 ( $P < 0.001$ )，但是若同時給予以上兩種處理時，對凋亡的現象並沒有加成的作用。因此在流式細胞儀的實驗我們看到和 DNA 斷裂實驗中相同的結果，較主要造成 Hep 3B 肝癌細胞凋亡的途徑仍是透過 Ligand-independent 的方式活化過量表現之雌性素受體  $\alpha$  所致。可是從實驗結果看起來，凋亡細胞增加的比例並沒有很多，我們推測可能的原因是實驗流程中，例如收集細胞的過程或許造成某些程度的細胞傷害，導致背景值提高，另外抗體的敏感性及專一性不夠也可能是造成實驗數據差異不夠明顯的原因之一。

在初步確定過量表現的雌性素受體  $\alpha$  可以造成 Hep 3B 細胞走向凋亡，接著我們針對在肝癌細胞凋亡很重要的腫瘤壞死因子  $\alpha$ ，建構其啟動區報告基因嵌合 DNA (pGL3-hTNF  $\alpha$ -luc)，探討雌性素受體  $\alpha$  是否會活化其啟動區，因此我們將雌性素受體  $\alpha$  及腫瘤壞死因子

$\alpha$  一起轉殖到 Hep 3B 肝癌細胞中，偵測細胞中此報告基因表現情形 (Luciferase 酵素活性分析)，結果發現若單獨以雌二醇處理細胞，與只處理絕對酒精的控制組相比，並沒有明顯 Luciferase 活性增加的情形，而若在細胞中過量表現雌性素受體  $\alpha$ ，Luciferase 活性就有明顯的增加，但再同時給予雌二醇也沒有加成的效果。從這個實驗我們看到和之前相符的結果，雌性素受體  $\alpha$  對腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區的活化，亦是透過一個 Ligand-independent 的方式來影響，因此我們亦大膽推測，過量表現的雌性素受體  $\alpha$  造成 Hep 3B 細胞走向凋亡，可能就是透過活化腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區，繼而增加其基因表現，再透過 Death receptor 這條路徑造成細胞凋亡。但是，在腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區建構實驗中，我們以 LPS 當作實驗的正控制組 (Positive control)，發現在 LPS 的刺激下，細胞中 Luciferase 活性雖然有增加，但是倍數卻不如預期的高，然而在之前文獻中指出，腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區上有三個  $\kappa$  B-site，可能是 LPS 活化此基因所需的相關區域，其位置約在腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區基因序列上 -460~-1000 之間的位置(39, 42)，然而我們所建構的腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區嵌合 DNA 序列，是最靠近基因起始區的 400 個鹼基，並沒有包含這幾個  $\kappa$  B-site，因此或許 LPS 在我們所建構的系統中，並沒有辦法當做很好的正控制組使用。雖然如此，我們在實驗中仍然可



以看到過量表現雌性素受體  $\alpha$  後，的確可以造成 Luciferase 活性較只處理絕對酒精的控制組有明顯增加，且經過三次以上重複得到相同的結果趨勢，因此，對於雌性素受體  $\alpha$  對腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區活化的現象，應該是可以確定的。另外，由先前文獻中發現，在 MCF-7 人類乳癌細胞株中，雌性素活化的雌性素受體  $\alpha$ ，可以透過 SP1 蛋白而結合到黃體激素受體(Progesterone receptor)基因啟動區 DNA 序列的 SP1-site 上(69)，而在我們所建構的腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區嵌合 DNA 序列中亦包含有多個 SP1-site 存在，所以我們懷疑在 Hep 3B 細胞中過量表現的雌性素受體  $\alpha$ ，也有可能就是透過影響 SP1 蛋白進而結合到腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區嵌合 DNA 序列上的 SP1-site 而將基因開啟，未來或許可以透過 Foot printing、Gel shift assay 等的技術來回答這個問題。

接續我們前面的推測，我們也利用 RT-PCR/PCR 及西方點墨法，觀察細胞中相關基因之 mRNA 或蛋白的含量。由結果中我們看到腫瘤壞死因子  $\alpha$  基因的 mRNA，確實如我們預期的，受到過量表現之雌性素受體  $\alpha$  影響而表現增加，且同樣是透過一個 Ligand-independent 的方式。接下來我們又觀察到在過量表現雌性素受體  $\alpha$  後，可以將細胞中 Caspase8 及 Caspase3 活化，但並不影響 Caspase9 的表現。由此從這些結果，我們證明了在 Hep 3B 細胞中過量表現的

雌性素受體  $\alpha$ ，可以透過活化腫瘤壞死因子基因表現，進而經由 Death receptor 路徑，將 Caspase8 和 Caspase3 活化，最後即導致 Hep 3B 細胞凋亡發生。

## < 未來方向 >

因此，為延續我們以上的發現，在未來實驗中，將有以下幾個執行的重點：

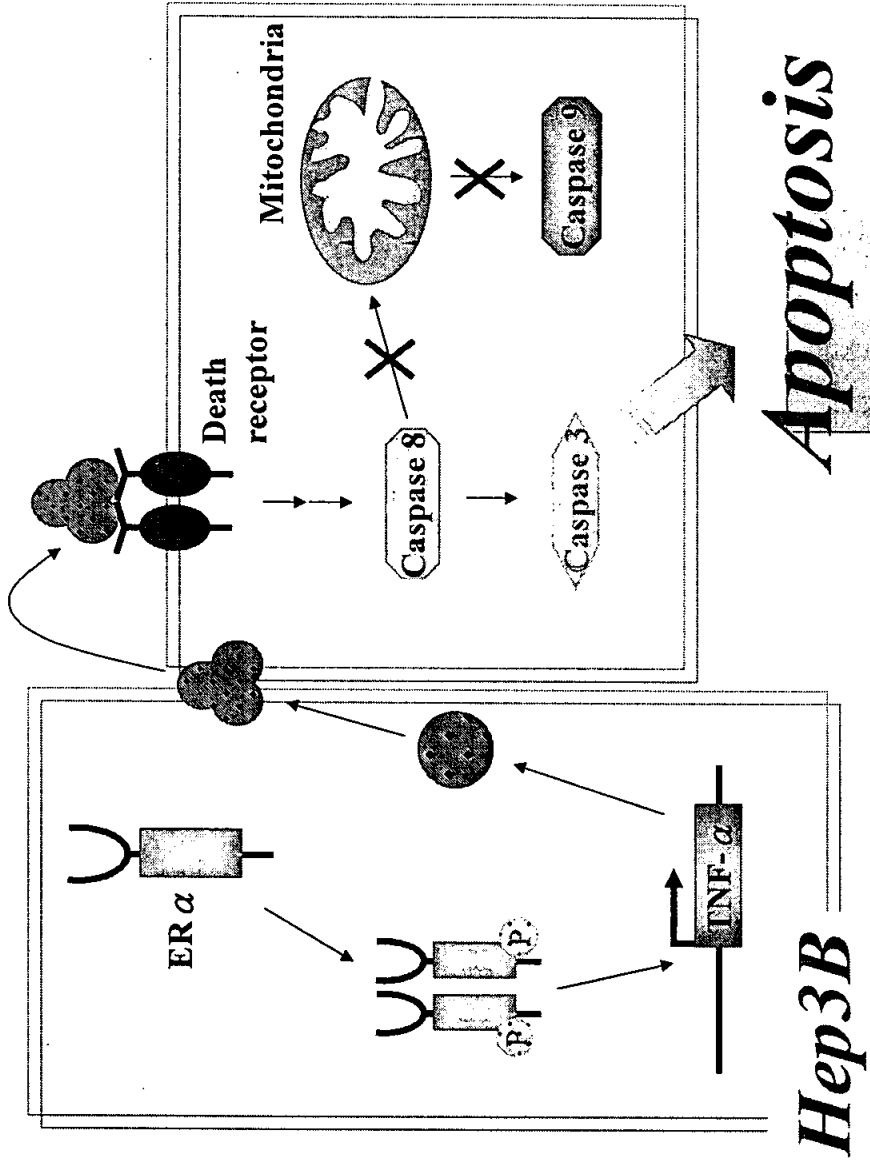
- 一、利用本實驗室正在建構的 Tet-On Stable expression system，以持續表現過量雌性素受體  $\alpha$  的細胞進行實驗，排除短暫轉殖可能造成的實驗缺失，看看在不同的系統中是否可以得到相同的結果。同時我們也在不同癌期肝癌細胞株中，建立 Tet-On 持續表現雌性素受體  $\alpha$  的系統，藉此觀察雌性素即雌性素受體對不同癌期的肝癌細胞株會否有不同的影響。
- 二、由於亦有許多證據顯示轉化生長因子  $\beta 1$  (Transforming growth factor- $\beta 1$ ; TGF- $\beta 1$ ) 也會造成肝癌細胞凋亡發生(70, 71, 72)，而我們亦以建構了轉化生長因子  $\beta 1$  啟動區報告基因嵌合 DNA (pGL3-hTGF- $\beta 1$ -luc)，因此接下來我們也要針對雌性素及雌性素受體  $\alpha$  對轉化生長因子  $\beta 1$  的影響，以及和凋亡之間的關係進行探討。
- 三、在細胞癌化過程，除了凋亡作用的影響之外，細胞週期的調控亦是調控細胞生長非常重要的機制。所以除了凋亡的探討，我們也會針對細胞週期的調控，觀察雌性素及雌性素受體是否參與在此機制中。而本實驗室亦以建構細胞週期調控之相關蛋白的啟動區

嵌合 DNA，例如 pp53-TA-luc、pMYC-TA-luc、pRb-TA-luc、pE2F-TA-luc 等等，將來亦可將這些嵌合 DNA 與雌性素受體共同轉殖到肝癌細胞中，或者轉殖入持續表現過量雌性素受體的肝癌細胞株，觀察它們之間的交互影響。

四、在先前的許多文獻中提到，雌性素受體兩種型式( $ER\alpha$  及  $ER\beta$ ) 在不同細胞中可能有相同或者相異的角色，而在近期的期刊中也提到雌性素受體  $\beta$  可以調控 Cyclin D1 的基因表現，因此除了雌性素受體  $\alpha$  之外，我們未來也要針對雌性素受體  $\beta$  與肝癌細胞凋亡以及細胞週期的影響作探討，或許有助我們更加了解雌性素及其受體在肝癌細胞癌化過程的角色。

五、更遠程的，我們可以利用 cDNA microarray 的技術，來更大範圍基因的搜尋，比較雌性素及/或其受體處理過後的細胞與控制組細胞，找出更多表現改變的基因，藉此必能更加釐清雌性素及其受體在肝癌細胞生理上的角色。

# Hypothesis



< 參考文獻 >

1. Pisani, P.; Parkin, D. M.; Bray F. and Ferlay J. (1999) Estimates of the worldwide mortality from 25 cancer in 1990. *Int J Cancer* 83:18-29
2. Cha, C.; DeMatteo, R. P. and Blumgart, L. H. (2002) Surgery and ablative therapy for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 35:S130-137
3. El-Serag, H. B. (2002) Hepatocellular carcinoma:an epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol* 35:S72-78
4. Murray, C. J.L. and Lopez, A. D. (1997) Mortality by cause for eight regions of the world:global burden of disease study. *The Lancet* 349:1269-1276
5. Dominguez-Malagon H, Gaytan-Graham S. (2001) Hepatocellular carcinoma:an update. *Ultrastruct Pathol* 25:497-516
6. Higashitsuji, H.; Higashitsuji, H.; Nagao, T.; Nonoguchi, K.; Fujii, S.; Itoh, K. and Fujita, J. (2002) A novel protein overexpressed in hepatoma accelerates export of NF-kB from the nucleus and inhibits p53-dependent apoptosis. *Cancer cell* 2:335-346
7. A Feitelson, M.; Sun, B.; Tufan, N L. S.; Liu, J.; Pan, J. and Lian, Z. (2002) Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 21:2593-2604
8. Staib, F.; Hussain, S. P.; Hofseth, L. J.; Wang, X. W. and Harris, C. C. (2003) TP53 and liver carcinogenesis. *Human Mut* 21:201-216
9. Rochen, C. and Carl-McGrath, S. (2001) Pathology and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 19:269-278
10. Kountouras, J.; Zavos, C. and Chatzopoulos, D. (2003) Apoptosis in hepatocellular carcinoma. *HepatoGastroenterology* 50:242-249

11. Kanzler, S. and Galle, P. R. (2000) Apoptosis and the liver. *Cancer Biol* 10:173-184
12. Kerr, Wyllie and Currie. (1972) Apoptosis:a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257
13. Katoch, B.; Sebastian, S.; Sahdev, S.; Padh, H.; Hasnain S.E. and Begum, R. (2002) Programmed cell death and its clinical implications. *Indian J Exp Biol* 40:523-524
14. Jacobson, M. D.; Weil, M. and Raff, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354
15. Martin, S. J. and Green, D. R. (1995) Protease activation during apoptosis:death by a thousand cuts?. *Cell* 82:359-352
16. Alnemri, E. S.; Livingston, D. J.; Nicholson, D. W.; Salvesen, G.; Thornberry, N. A.; Wong, W. W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3protease nomenclature. *Cell* 87:171
17. Cerretti, D. P.; Kozlosky, C. J.; Mosley, B.; Nelson, N.; Van Ness, K.; Greenstreet, T. A.; March, C. J.; Kronheim, S. R.; Druck, T.; Cannizzaro, L. A.; Huebner, K. and Black, R. A. (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256:97-100
18. Thornberry, N. A.; Bull, H. G.; Calaycay, J. R.; Chapman, K. T.; Howard, A. D.; Kostura, M. J.; Miller, D. K.; Molineaux, S. M.; Weidner, J. R.; Aunins, J.; Elliston, K. O.; Ayala, J. M.; Casano, F. J.; Chin, J.; Ding, G. J. F.; Egger, L. A.; Gaffney, E. P.; Limjuco, G.; Palyha, O. C.; Raju, S. M.; Rolando, A. M.; Salley, J. P.; Yamin, T. T.; Lee, T. D.; Shively, J. E.; MacCross, M.;

- Mumford, R. A.; Schmidt, T. A. and Tocci, M. J. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. **Nature** 356:768-774
19. Ellis, R. E.; Jacobson, D. M. and Horvitz, H. R. (1991) Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics** 129:79-94
20. Yuan, J.; Shaham, S.; Ledoux, S.; Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. **Cell** 75:641-652
21. Xue, D.; Shaham, S. and Horvitz, H. R. (1996) The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. **Genes Dev** 10:1073-1083
22. Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A. (1997) Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci** 22:299-306
23. Stennicke, H. R. and Salvesen, G. S. (1998) Properties of the caspases. **Biochim Biophys Acta** 1387:17-31
24. Wolf, B. B. and Green, D. R. (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. **J Biol Chem** 274:20049-20052
25. Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. **Science** 281:1305-1308
26. Zimmermann, K. C.; Bonzon, C. and Green, D. R. (2001) The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Therap** 92:57-70
27. Green, D. R. and Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. **Science**



281:1309-1312

28. Desagher, S.; Osen-Sand, A.; Nichols, A.; Eskes, R.; Montessuit, S.; Lauper, S.; Maundrell, K.; Antonsson, B. and Martinou, J. C. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144:891-901
29. Zha, J.; Harada, H.; Yang, E.; Jockel, J. and Korsmeyer, S. J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87:619-628
30. Li, H.; Zhu, H.; Xu, C. J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501
31. Desagher, S. and Martinou, J.C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trend in cell biol* 10:369-377
32. Yang, J.; Liu, X.; Bhalla, K.; Kim, C. N.; Ibrado, A. M.; Cai, J.; Peng, T. I.; Jones, D. P. and Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275:1129-1132
33. Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S. M.; Ahmad, M.; Alnemri, E. S. and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489
34. Zou, H.; Li, Y.; Liu, X. and Wang, X. (1999) An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274:11549-11556

35. Kluck, R. M.; Bossy-Wetzel, E.; Green, D. R. and Newmeyer, D. D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science** 275:1132-1136
36. Eskes, R.; Desagher, S.; Antonsson, B. and Martinou, J. C. (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. **Mol Cell Biol** 20:929-935
37. Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria response to activation of cell surface death receptors. **Cell** 94: 481- 490
38. Gross, A.; Yin, X. M.; Wang, K.; Wei, M. C.; Jockel, J.; Milliman, C.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P. and Korsmeyer, S. J. (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. **J Biol Chem** 274:1156-1163
39. Idriss, H. T. and Naismith, J. H. (2000) TNF $\alpha$  and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). **Microscopy Res Tecch** 50:184-195
40. Coley, W.B. (1893) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. **Am J Med Sci** 105:487-511
41. Carswell, E.A.; Old, L.J.; Kassel, R.L.; Green, S.; Fiore, N. and Williamson, B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 72:3666-3670

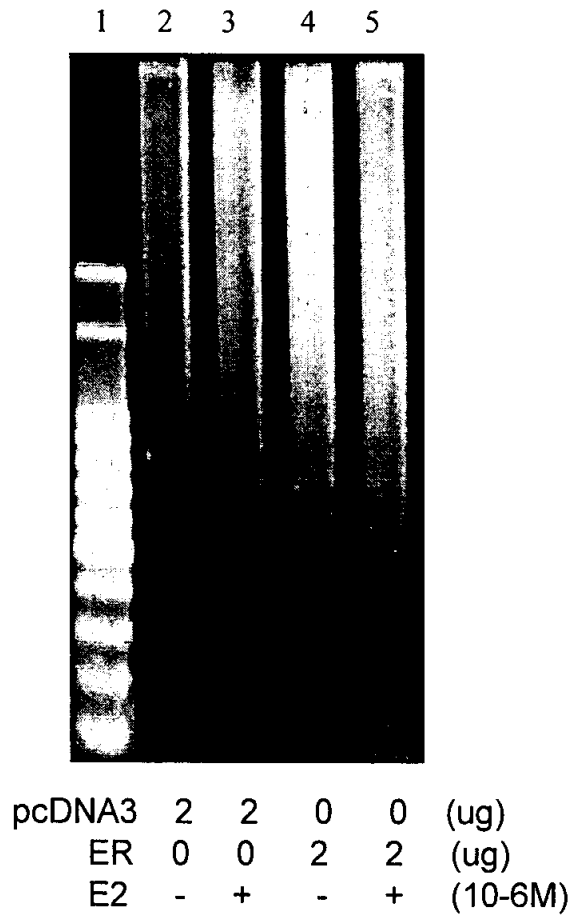
42. Vilcek, J. and Lee, T. H. (1991) Tumor necrosis factor: New insight into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266:7313-7316
43. Flier, J. S. and Underhill, L. H. (1996) The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *New Eng J Med* 334:1717-1725
44. Osborne, C. K.; Zhao, H. (Holly) and Fuqua, S. A. W. (2000) Selective Estrogen Receptor Modulators: Structure, Function, and Clinical Use. *J clin onco* 18:3172-3186
45. Guengerich, F.P. (1999) Cytochrome P 450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:1-17
46. Ruioz-Larrea, M.B.; Leal, A.M.; Martin, C and Lacort, M. (1997) Antioxidant action of estrogen in rat hepatocytes. *Rev Esp Fisiol* 53:225-229
47. Babenko, N.A.; Ruioz-Larrea, M.B. and Lacort, M. (1998) Inhibition by estrogens of the oxidant-mediated mobilization of arachidonic acid in hepatocytes. *J Physiol Biochem* 54:77-84
48. Szafran, H. and Smielak-Korombel, W. (1998) The role of estrogen in hormonal regulation of lipid metabolism in women. *Przegl Lek* 55:266-270
49. Keal, A.M. And Lacort, M. (1998) Cytoprotective Action of estrogens against tert-Butyl hydroperoxide-induced Toxicity in hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 56:1463-1469
50. Takada, T.; Yamamoto, T.; Koike, K. and Terada, N. (1997) Effects of prolactin and estrogen on cell proliferation of the mouse liver induced by partial hepatectomy. *In Vivo* 11:409-413
51. Shaindel, S.Y.; Farber, E, H. RK. and Mishkin, S. (1983) Evidence for the hormone dependency of hepatic hyperplastic nodules: inhibition of malignant transformation after estrogen 17 beta-estradiol and tamoxifen. *Hepatology* 3:308-316
52. Shimizu, Y. M. and Ito, S. (1998) Suppressive effect of oestradiol on

- chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Gut* 42:112-119
53. Olefsky, J. M. (2001) Nuclear Receptor Minireview Series. *J Biol Chem* 276:36863-36864
54. Moggs, J. G. and Orphanides, G. (2001) Estrogen receptor: orchestrators of pleiotropic cellular response. *EMBO* 2:775-781
55. Green, S.; Walter, P.; Kumar, V.; Krust, A.; Bornert, J.M.; Argos, P. and Chambon. (1986) Human oestrogen receptor cDNA sequence expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-139
56. Saunders, P. T. K. (1998) Oestrogen receptor beta (ER $\beta$ ). *Reviews of Reproduction* 3:164-171
57. Giguere, V.; Tremblay, A. and Tremblay, G. B. (1998) Estrogen receptor  $\beta$ : Re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* 63:335-339
58. Hall, J. M.; Couse, J. F. and Korach, K. S. (2001) The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J Biol Chem* 276:36869-36872
59. Couse, J. F.; Lindzey, J.; Grandien, K.; Gustafsson, J. A. and Korach, K. S. (1997) Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) and Estrogen Receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ER  $\alpha$ -Knockout Mouse. *Endocrinology* 138:4613-4621
60. Hall, J. M.; Couse, J. F. and Korach, K. S. (2001) The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling *J Biol Chem* 276:36869-36872
61. Roberts, R.A.; James, H.N.; Cosulich, S.; Hasmall, S.C. and Orphanides, G. (2001) Role of cytokines in non-genotoxic hepatocarcinogenesis: cause or effect? *Toxicol letters* 120:301-306
62. Desagher, S. and Martinou, J. C. (2000) Mitochondria as the central control

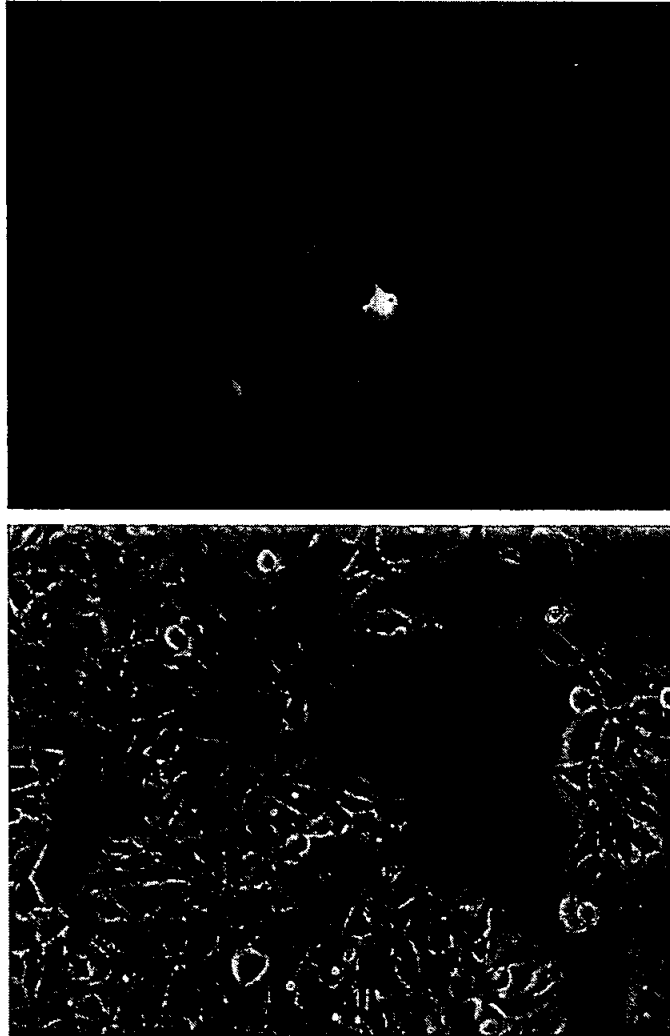
- point of apoptosis. *Cell Biol* 10:369-377
63. Schulte-Hermann R, Bursch W, Low-Baselli A, Wagner A and Grasl-Kraupp B. (1997) Apoptosis in liver and its role in hepatocarcinogenesis. *Cell Biol Toxicol* 13:339-348
  64. Li, J.; Zheng, R.; Li, J. and Wang, Z. (2001) Mechanisms of the induction of apoptosis in human hepatoma cells by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cell Biol Int* 25:1213-1219
  65. Yamashita, Y; Shimada, M; Tanaka, S; Okamamoto, M; Miyazaki, J. and Sugimachi, K. (2002) Electroporation-mediated tumor necrosis related apoptosis inducing ligand(TRAIL)/Apo2L gene therapy for hepatocellular carcinoma. 20:275-286
  66. Nakamoto, T.; Inagawa, H.; Takagi, K. and Soma, G. (2000) A new method of antitumor therapy with a high dose of TNF perfusion for unresectable liver tumors. *Anticancer Res* 20:4087-4096
  67. Fang, Y.; Jin, J.W. and Zha, X.L. (2001) Role of FAK in TNF-alpha / Cycloheximide -induced apoptosis of SMMC-7721 cells. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao(Shanghai)* 33:53-58
  68. R.Schulte-Hermann, W. Bursch, A. Low-Baselli, A. Wagner and B. Grasl-Kraupp. (1997) Apoptosis in the liver and its role in hepatocarcinogenesis. *Cell Biol Toxi* 13:339-348
  69. Schultz, J.R.; Petz, L.N. and Nardulli, A.M. (2003) Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 201:165-175
  70. Rossmanith, W. and Schulte-Hermann, R. (2001) Biology of transforming growthfactor beta in hepatocarcinogenesis. *Microsc Res Tech* 52:430-6
  71. Uneo, T.; Hashimoto, O.; Kimura, R.; Torimura, T.; Kawaguchi, T.; Nakamura, T.; Sakata, R.; Koga, H. and Sata, M. (2001) Relation of type II transforming factor-beta receptor to hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol* 18:49-55

72. Mullauer, L.; Grasl-Krsupp, B.; Bursch, W. and Schulte-Hermann, R. (1996)  
Transforming growth factor beta 1- induced cell death in preneoplastic foci  
of rat liver and sensitization by the antiestrogen tamoxifen. *Hepatology*  
23:840-7

< 附圖 >

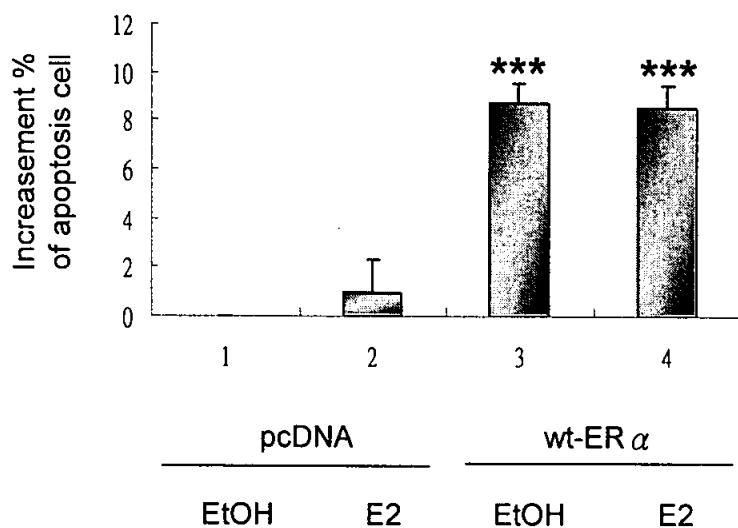


圖一、以 DNA 斷裂觀察雌二醇及雌性素受體對肝癌細胞株(Hep 3B) 凋亡的影響。Lane1 為分子量標誌。Lane2、3 為轉殖入空載體(pcDNA3) 之質體 DNA。Lane4、5 為轉殖入人類野生型雌性素受體  $\alpha$  之質體 DNA。 Lane3、5 為同時又處理雌二醇( $E_2:10^{-8}M$ )之細胞。

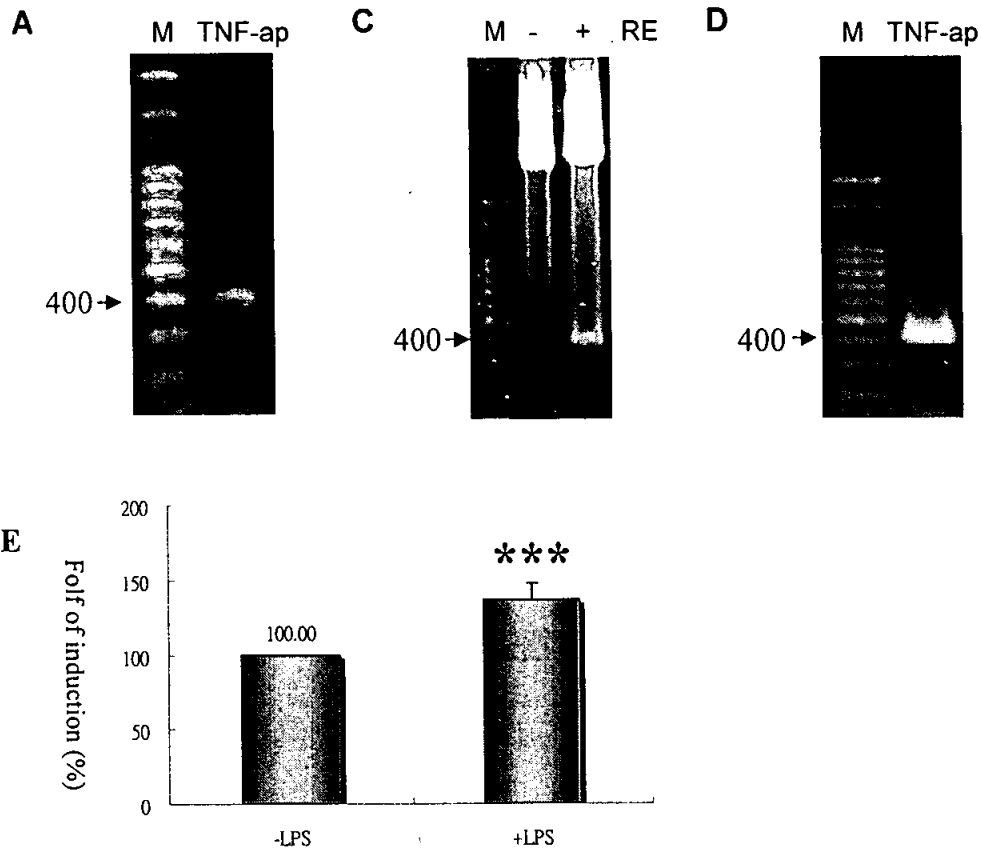


圖二、以綠螢光蛋白(Green Fluorescence Protein:GFP)基因轉殖入 Hep 3B 肝癌細胞株，幫助了解細胞轉殖的效率。由圖中可知轉殖效率約為 35~40%左右。





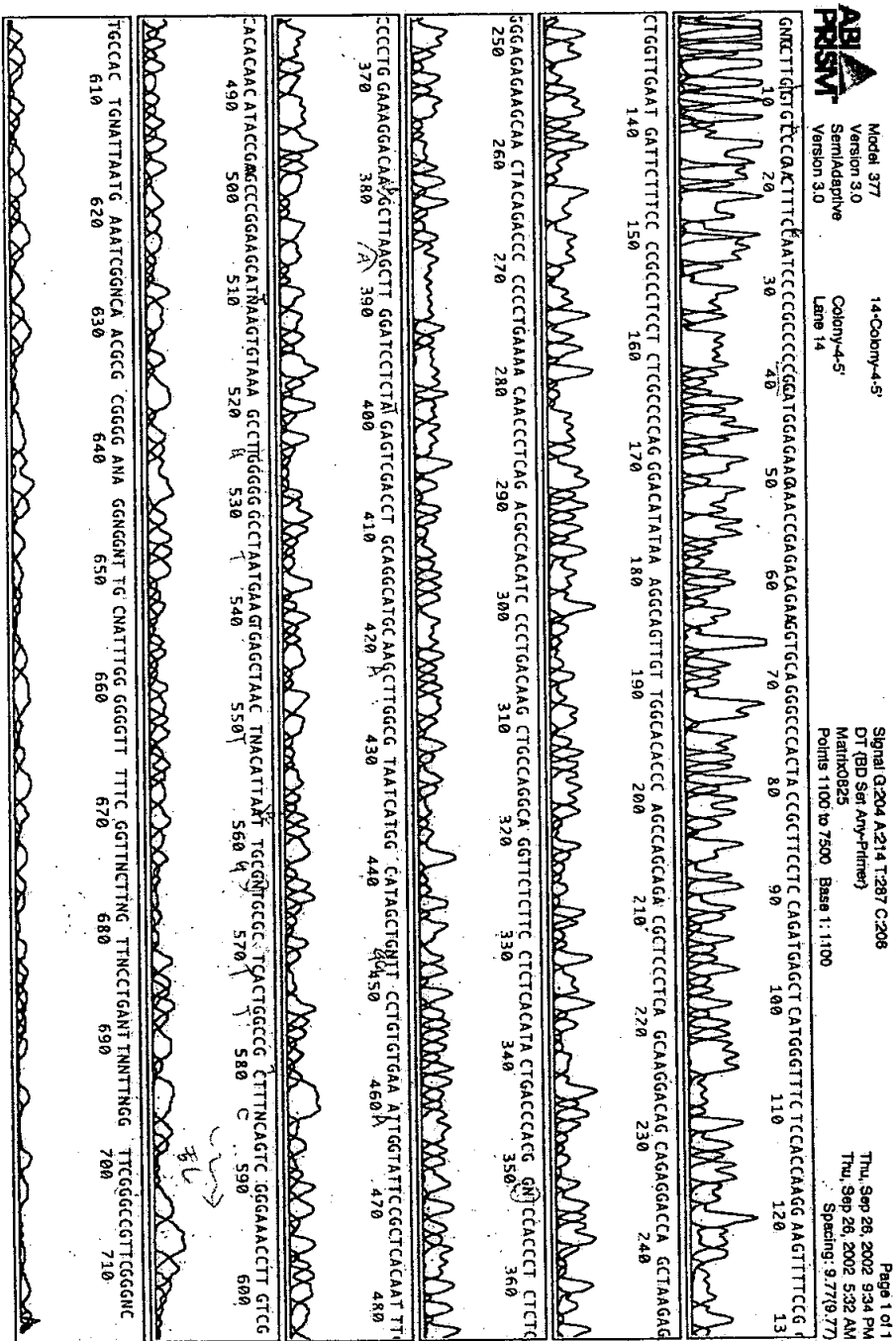
圖三、以流式細胞儀，觀察雌性素在有無雌性素受體 $\alpha$ 下對肝癌細胞株(Hep 3B)凋亡程度之影響。Bar1、2 為轉殖空載體(pcDNA3)之結果。Bar3、4 為在表現過量雌性素受體 $\alpha$ 之結果。Bar1、3 為只處理絕對酒精之控制組，而 Bar2、4 為處理雌性素( $10^{-8}M$ )之實驗組。\*\*\*表示在統計上有極顯著的差異( $P < 0.001$ )。

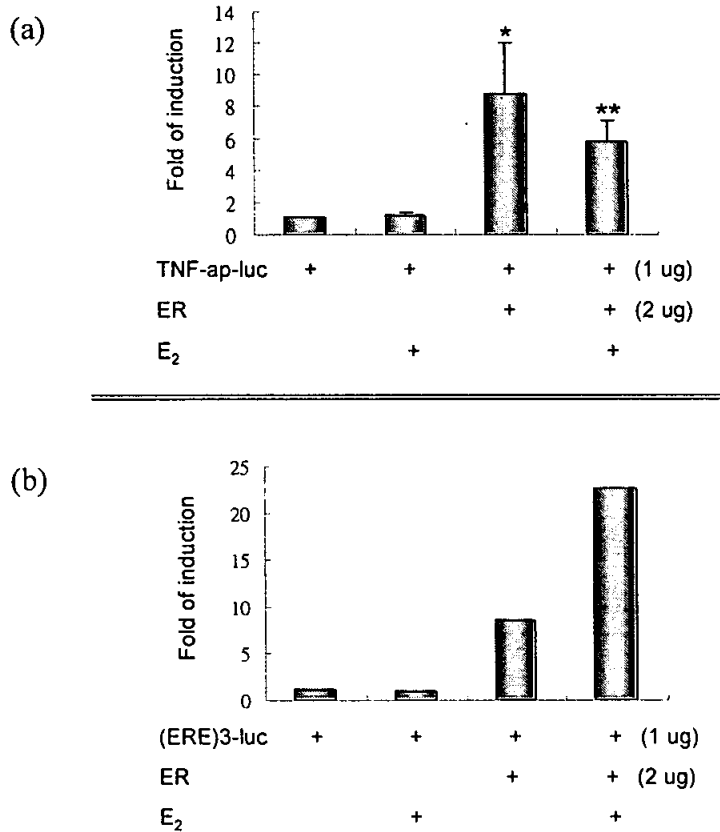


圖四、腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區及螢光蛋白基因嵌合 DNA (pGL3-hTNF  $\alpha$ -Luc) 建構。(A) PCR 產物跑膠的結果，引子為：5' ggT ACC ggg AgT gTg Agg ggT ATC CT, 3' AAg CTT gTC CTT TCC Agg ggA gAg Ag。(B) PCR 產物定序結果。(C) 二級嵌合 DNA 轉殖進入菌株後抽取質體、加 (Lane 2) 或不加 (Lane 1) 限制酶 (RE: Kpn I、Hind III) 切割，產物跑膠的結果。(D) 二級嵌合 DNA 轉殖進入菌株後，以菌液直接跑 PCR，PCR 產物跑膠以 Gelstart 染色照相結果。(E) Hep 3B 細胞轉殖入 pGL3-hTNF  $\alpha$ -Luc 質體 DNA，在處理或不處理 LPS 16 小時，收集細胞萃取物，分析其 Luciferase 活性。\*\*\* 為統計上有極顯著的差異 ( $p < 0.001$ )。

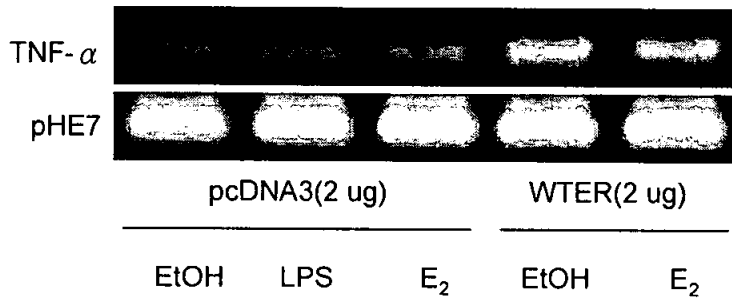
圖四、B

hTNF- $\alpha$  promoter 之 DNA 定序結果

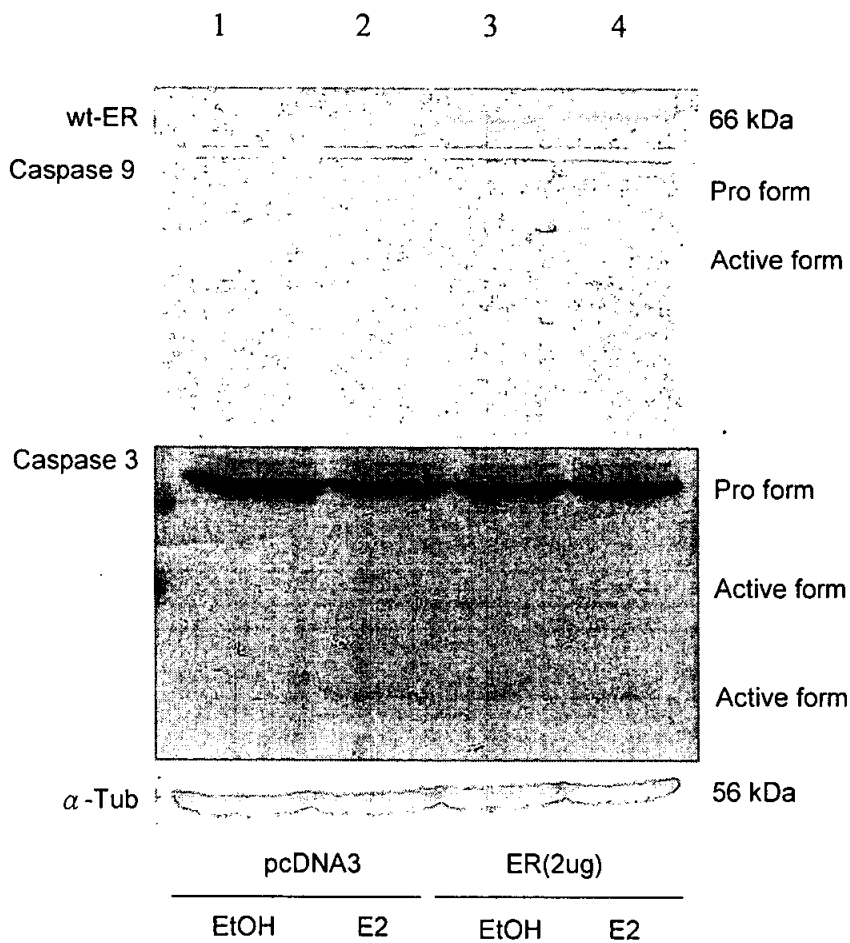




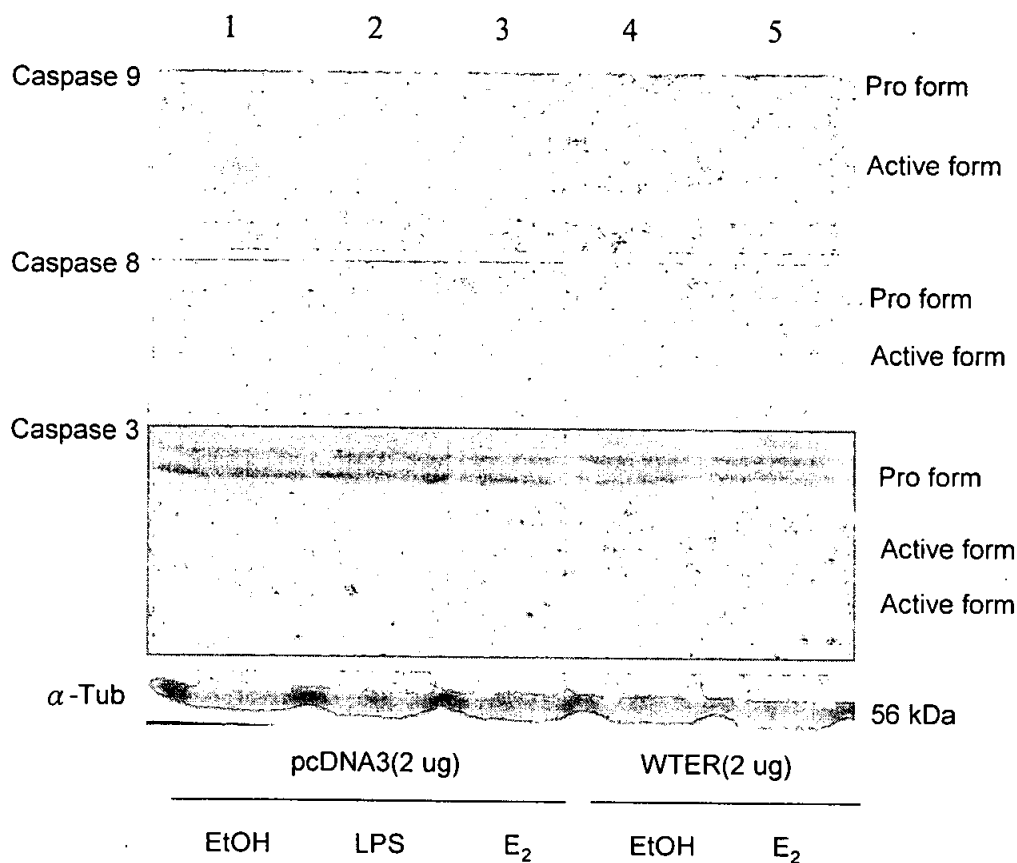
圖五、以 Luciferase 活性分析，觀察雌二醇以及雌性素受體  $\alpha$  在肝癌細胞株中，對腫瘤壞死因子  $\alpha$  啟動區(hTNF- $\alpha$  promoter)及雌性素受體反應區(Estrogen response element)活性的影響。(a)Bar1~4 皆轉殖 pGL3-hTNF  $\alpha$ -Luc。Bar3、4 再同時轉殖 wt-ER  $\alpha$ 。Bar1、3 只處理絕對酒精。Bar2、4 則處理雌二醇( $10^{-8}$ M)。(b)Bar1~4 皆有轉殖 pGL3-3\*ERE-luc。Bar3、4 同時在轉殖 wt-ER  $\alpha$ 。Bar1、3 只處理絕對酒精。Bar2、4 則處理雌二醇( $10^{-8}$ M)。本實驗為重複兩次之結果。  
\*表統計上有差異(P<0.05)，\*\*表統計上有顯著差異(P<0.005)。



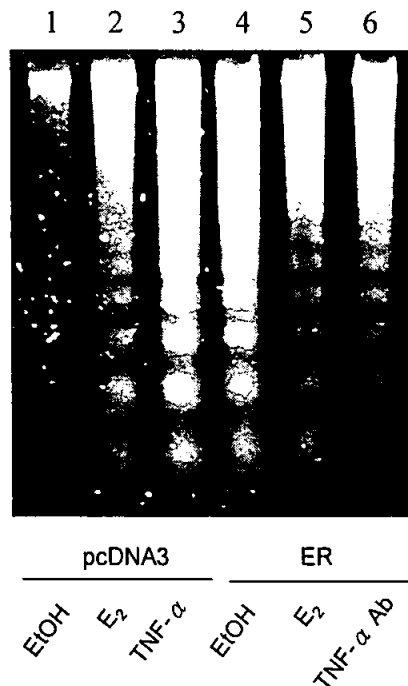
圖六、以 RT-PCR 及 PCR，觀察在雌二醇以及雌性素受體  $\alpha$  處理下，肝癌細胞株(Hep 3B)中人類腫瘤壞死因子  $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ ) 之 mRNA 含量的差異。(a) Lane1、2、3 為轉殖空載體(pcDNA3)之細胞的 mRNA 經 RT-PCR/PCR 放大之後的結果，Lane4、5 為過量表現雌性素受體  $\alpha$  之細胞的 cDNA 經 PCR 放大之後的結果，Lane1、4 為只處理絕對酒精之控制組，Lane2 處理 LPS(1 mg/ml)，Lane3、5 為處理雌二醇( $10^{-8}$ M) 之實驗組。本實驗為重複兩次之結果。



圖七、以西方點墨法，觀察雌性素以及雌性素受體  $\alpha$  在肝癌細胞株 (Hep 3B) 中，對創蛋白活化的影響。Lane1、2 為轉殖空載體 (pcDNA3) 之細胞蛋白，Lane3、4 為過量表現雌性素受體  $\alpha$  之蛋白，Lane1、3 為只處理絕對酒精之控制組，Lane2、4 則為處理雌二醇 ( $10^{-8}M$ ) 之實驗組。

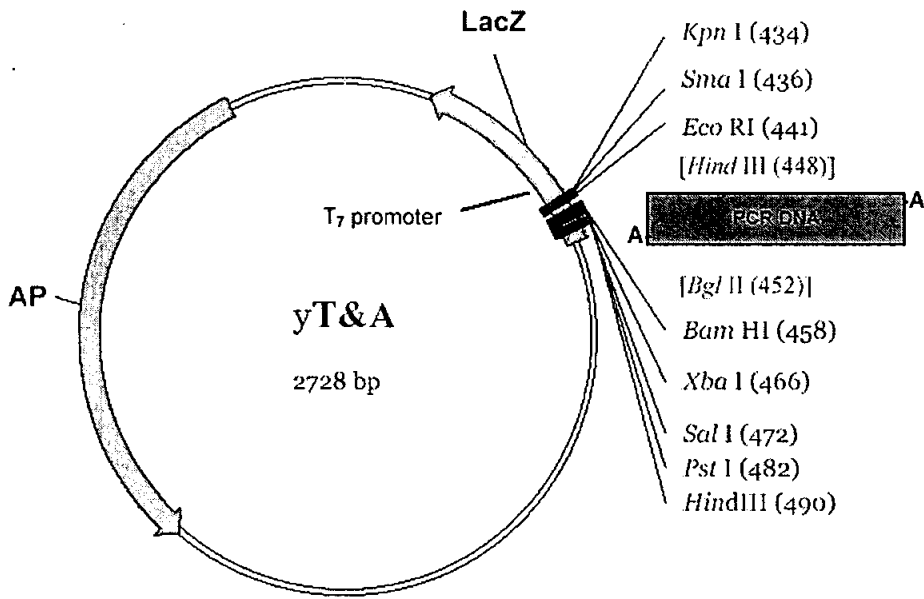


圖八、以西方點墨法，觀察 LPS 及雌二醇在有無雌性素受體  $\alpha$  下對肝癌細胞株(Hep 3B)中創蛋白活化的影響。Lane1、2、3 為轉殖空載體(pcDNA3)之結果。Lane4、5 為在表現過量雌性素受體  $\alpha$  之結果。Lane1、4 為只處理絕對酒精之控制組，Lane2 處理 LPS(1 mg/ml)，而 Lane3、5 為處理雌二醇( $10^{-8}$ M)之實驗組。



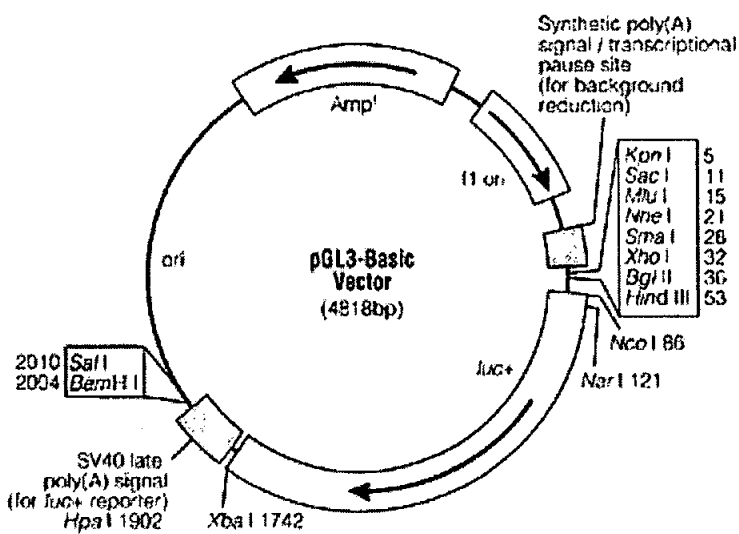
圖九、以 DNA 斷裂的方法，觀察雌二醇、雌性素受體  $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  及 TNF- $\alpha$  抗體對肝癌細胞株(Hep 3B)凋亡的影響。Lane1、2、3 為轉殖空載體(pcDNA3)之結果。Lane4、5、6 為在表現過量雌性素受體  $\alpha$  之結果。Lane1、4 為只處理絕對酒精之控制組，Lane2 為處理雌二醇 ( $10^{-8}$ M)之實驗組，而 Lane3 處理 TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)，Lane5 處理 TNF- $\alpha$  抗體(0.1 ug/ml)。本實驗為重複兩次之結果。





圖十、pT&A vector 的圖譜

([http://www.yeastern.com/chinese/ugC\\_Prnl-3.asp](http://www.yeastern.com/chinese/ugC_Prnl-3.asp))



圖十一、pGL3-luciferase vector 的圖譜

([http://www.promega.com/vectors/reporter\\_vectors.htm](http://www.promega.com/vectors/reporter_vectors.htm))

# 附表一、臺灣地區主要癌症死亡原因

民國九十一年

順位	合計			男			女					
	癌症死亡原因	死亡人數	每十萬人口死亡率	死亡百分比	癌症死亡原因	死亡人數	每十萬人口死亡率	死亡百分比	癌症死亡原因	死亡人數	每十萬人口死亡率	死亡百分比
				%				%				%
	所有癌症死亡原因	34,342	152.88	100.00	所有癌症死亡原因	22,020	192.09	100.00	所有癌症死亡原因	12,322	112.02	100.00
1	肝癌	6,943	30.91	20.22	肝癌	5,104	44.52	23.18	肺癌	2,132	19.38	17.30
2	肺癌	6,846	30.48	19.93	肺癌	4,714	41.12	21.41	肝癌	1,839	16.72	14.92
3	結腸直腸癌	3,649	16.24	10.63	結腸直腸癌	2,120	18.49	9.63	結腸直腸癌	1,529	13.90	12.41
4	女性乳癌	1,203	10.94 <sup>(1)</sup>	3.50	胃癌	1,641	14.31	7.45	女性乳癌	1,203	10.94	9.76
5	胃癌	2,433	10.83	7.08	口腔癌(含口咽及下咽)	1,501	13.09	6.82	子宮頸癌	941	8.55	7.64
6	子宮頸癌	941	8.55 <sup>(1)</sup>	2.74	食道癌	1,015	8.85	4.61	胃癌	792	7.20	6.43
7	口腔癌(含口咽及下咽)	1,613	7.18	4.70	攝護腺癌	750	6.54	3.41	膽囊癌	451	4.10	3.66
8	攝護腺癌	750	6.54 <sup>(2)</sup>	2.18	胰臟癌	646	5.64	2.93	非何杰金淋巴瘤	433	3.94	3.51
9	食道癌	1,090	4.85	3.17	非何杰金淋巴瘤	630	5.50	2.86	胰臟癌	423	3.85	3.43
10	胰臟癌	1,069	4.76	3.11	鼻咽癌	626	5.46	2.84	白血病	320	2.91	2.60
	其他	7,805	34.75	22.73	其他	3,273	28.55	14.86	其他	2,259	20.54	18.33
11	非何杰金淋巴瘤	1,063	4.73	3.10	膽囊癌	491	4.28	2.23	卵巢癌	308	2.80	2.50
12	膽囊癌	942	4.19	2.74	白血病	458	4.00	2.08	鼻咽癌	196	1.78	1.59
13	鼻咽癌	822	3.66	2.39	膀胱癌	391	3.41	1.78	腦癌	179	1.63	1.45
14	白血病	778	3.46	2.27	腎臟癌	254	2.22	1.15	膀胱癌	174	1.58	1.41
15	卵巢癌	308	2.80 <sup>(1)</sup>	0.90	腦癌	233	2.03	1.06	腎臟癌	165	1.50	1.34

附註：1.臺灣地區年中人口數計22,463,172人，男性11,463,530人，女性10,999,642人。

2. (1)每十萬女性人口死亡率。

(2)每十萬男性人口死亡率。

附表二、

◆ hTNF- $\alpha$  啟動區序列(NCBI-U42625):

gggAgTg TgAggggTAT CCTTgATgCT TgTgTgTCCC CAACTTTCCA AATCCCCgCC  
 CCCgCgATgg AgAAgAAACC gAgACAgAAg gTgCAgggCC CACTACCgCT TCCTCCAgAT  
 gAgCTCATgg gTTTCTCCAC CAAggAAgTT TTCCgCTggT TgAATgATTC TTTCCCCgCC  
 CTCCTCTCgC CCCAgggACA TATAAAggCA gTTgTTggCA CACCCAgCCA gCAgACgCTC  
 CCTCAgCAAg gACAgCAgAg gACCAgCTAA gAgggAgAgA AgCAACTACA gACCCCCCT  
 gAAAACAACC CTCAgACgCC ACATCCCCTg ACAAgCTgCC AggCAggTTC TCTTCCTCTC  
 ACATACTgAC CCACggCTCC ACCCTCTCTC CCCTggAAAg gACACCATgA gCACTgAAAg CA

附表三、

◆ hTNF- $\alpha$  啟動區所含反應區(response element)

名稱	Strand	Location
T-Ag	+	81
AP-2	-	90
AP-2	-	92
SIF	-	96
SP-1	+	224
AP-2	+	224
Early-SEQ1	+	224
SP-1	+	225
SP-1	+	226
EGR-2	+	226
AP-2	+	226
KROX24	+	227
EGR-1	+	227
SP-1	-	230
JCV repeated sequence	-	231
SP-1	-	231
SP-1	-	232
SP-1	-	233

附表四、

◆ PCR 所使用之引子:

基因	hTNF- $\alpha$ 啟動區
5'	ggTACC(Kpn I)-ggg AgT gTg Agg ggT ATC CT
3'	AAgCTT(Hind III)-gTC CTT TCC Agg ggA gAg Ag
條件	94°C、1 分鐘 → 60°C、30 秒 → 72°C、1 分鐘 (35 cycle)

基因	PHe7
5'	CTT CgA AAg gCA Agg Agg AA
3'	Tgg CTC TAC AAT CCT CAG CA
條件	94°C、1 分鐘 → 52°C、1 分鐘 → 72°C、1 分鐘 (25 cycle)

基因	hTNF- $\alpha$
5'	CTA AgA ggg AgA gAA gCA ACT A
3'	TCT Agg TgA ggT CTT CTC AAg T
條件	94°C、1 分鐘 → 48°C、1 分鐘 → 72°C、1 分鐘 (30 cycle)

# 博碩士論文授權書

(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) \_\_\_\_\_  
系所

組 九十一 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱： \_\_\_\_\_

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： 黃志揚 教授

研究生簽名： 廖正睿  
(親筆正楷)

學號： 9009012  
(務必填寫)

日期：民國      年      月      日

---