

## 序言 (Introduction)

細胞計劃性死亡又稱為細胞凋亡 (apoptosis)，細胞計劃性死亡為調整生物體器官形成過程之重要機制，當細胞受到感染、DNA 發生突變或損傷時，生物體內即進行細胞計劃性死亡。當此機制出現問題時，受損的細胞未被分解，會導致細胞癌化形成腫瘤；當人類免疫系統發生細胞教育錯誤，讓無法判辨自我抗原之免疫細胞存活或者該死亡細胞未被清除 (Rosen, *et al.*, 2001) 而產生自體免疫性疾病。因此細胞凋亡在人體疾病形成上扮演極為重要的調節機制。

細胞凋亡主要分為兩個途徑 (1) 經死亡接受器傳遞死亡訊息的途徑：其接受器為 Fas (CD95)、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 接受器和腫瘤壞死因子相關性細胞凋亡刺激因子 (TNF-related apoptosis inducing factor, TRAIL) 接受器 (Walczak, *et al.*, 2000)。細胞接收外界的死亡訊息，刺激死亡接受器配體與其接受器結合，而傳遞訊息活化接受器細胞內的死亡區域 (death domain, 例如 FADD) 使得 procaspase 8 切割成 caspase 8，caspase 8 活化後促進 caspase 3 活化，而 Bid 也被切割成 tBid，走入經粒線體傳遞死亡訊息的途徑；(2) 經粒線體傳遞死亡訊息的途徑：牽涉到 Bcl-2 家族 (Bcl-2 和 Bcl-X<sub>L</sub> 等為對抗細胞凋亡的蛋白，Bax、tBid、Bad 和 Bik 等為促進細胞凋亡的蛋白) (Chao *et al.*, 1998) 與 cytochrome c 釋出有關。細胞內的 DNA 受損刺激修補性蛋白質如 p53 (一種基因轉錄因子) 活化修補性蛋白基因進行 DNA 修補，無法 DNA 修補情況下，p53 反而活化 Bax 的基因轉錄，造就蛋白表現增加 (Bates *et al.*, 1999)，Bax 嵌入粒線體細胞膜，改變細胞膜電位，促進 cytochrome c 由粒線體釋放至細胞質活化 caspase 9 (Desagher *et al.*, 2000)，再活化 caspase 3 導致細胞的 DNA 片段化、細胞蛋白被切割和產生細胞凋亡小體，最後由吞噬細胞吞噬分解。

多胺酸 (polyamine) 是具有正價氨基的小脂肪類分子群，包含 putrescine、spermine 及 spermidine，能夠與細胞大分子如 DNA、RNA、蛋白質及磷酸脂質相互作用，它們對

細胞生長、分化及細胞凋亡扮演一重要角色 (Tabr *et al.*, 1984)。多胺酸減少，造成細胞生長抑制、死亡 (Schipper *et al.*, 2000) 或分化發生改變，在合成多胺酸的過程中，鳥胺酸去羧化酶 (ornithine decarboxylase, ODC) 為起始與決定反應速度的酵素，其基因在第二對染色體 P25 上，蛋白質表現後主要分布在細胞質 (Schipper *et al.*, 2002)，它是約 51 kDa 分子量含 461 個氨基酸的蛋白質，活化需兩個鳥胺酸去羧化酶聚合以鳥胺酸去羧化酶的 N 端區域與另一個鳥胺酸去羧化酶的 C 端區域接觸而形成聚合，pyridoxal 5'-phosphate (維他命 B6) 結合到酶之 Lys-69 的位置進行催化反應，將結合於酶 Cys-360 之鳥胺酸 (ornithine) 轉換成 putrescine，並且釋放二氧化碳 (Jeffrey *et al.*, 2000)。

在研究細胞基因方面與生理現象中，了解細胞生長時鳥胺酸去羧化酶的表現是一個必需性酵素 (Pegg *et al.*, 1982)；生長促進因子如荷爾蒙、藥物、生長因子和腫瘤促進物 (Russell *et al.*, 1985) 能夠使此酶快速表現影響生理變化。鳥胺酸去羧化酶的活性受到下列機制之影響：(1) 基因轉錄的調節；(2) 基因轉譯的調節；(3) 後轉譯的修飾及 (4) 蛋白質穩定性的負回饋控制。原致癌基因 *c-myc* 是生長和分化關鍵性調節者，*myc* 家族為基因轉錄因子，*c-myc* 會與家族中其中一個形成複合體再與一段稱為 E-box (CACGTG) 特殊的 DNA 序列結合，具有 E-box 的基因受到 *c-myc* 調控；鳥胺酸去羧化酶基因的 intron 中有兩個相連之 *myc* 結合位子，它是 *c-myc* 結合位置，當 *c-myc* 表現提高，鳥胺酸去羧化酶基因的表現也跟著提高 (Bello-Fernandez *et al.*, 1993)。鳥胺酸去羧化酶基因被磷酸化在老鼠 RAW264.7 細胞 (Worth *et al.*, 1994)、Friend erythroleukemia 細胞 (Flamigni *et al.*, 1990)、老鼠 EXOD-1 細胞 (Kanamoto *et al.*, 1993)、653-1 myeloma、猴子 COS7 細胞 (Rosenberg-Hasson *et al.*, 1991) 及大白鼠 HTC 細胞 (Mitchell *et al.*, 1991) 都證實存在；casein kinase II (CK II) 能磷酸化鳥胺酸去羧化酶的氨基酸 303 位置的絲胺酸，但單點突變 303 氨基酸位置的絲胺酸轉變成丙氨酸，不會影響酵素的穩定性及活性；不過以酶整體磷酸化來說，是會影響到酶的穩定性與活性 (Reddy *et al.*, 1996)，由此可知，影響鳥胺酸去羧化酶磷酸化之蛋白激酶是非常重要的。鳥胺酸去羧化酶降解受到 antizyme 的調

節，多胺酸過多會使得 antizyme frame shifting 表現增加，造成 antizyme 與單體鳥胺酸去羧化酶結合，將鳥胺酸去羧化酶帶到 26S 蛋白體進行蛋白分解作用 (Murakami *et al.*, 2000)。

腫瘤治療過程中，引發腫瘤細胞死亡是其中的一種方法。科學家尋找有效抗癌藥物利用對鳥胺酸去羧化酶抑制效用當作評估，並且鳥胺酸去羧化酶也是一種腫瘤進展的標籤 (Sharma *et al.*, 1994)。Difluoromethylornithine (DMFO) 是鳥胺酸去羧化酶不可逆的抑制劑 (Poulin *et al.*, 1992)，在致癌物質刺激引發腫瘤的動物模型中，了解此藥物於直腸癌、肝癌與皮膚癌等具有抗癌及抗轉移效果 (Zou *et al.*, 2002)。Williams 等研究者於 1986 年認為多數自體免疫疾病是屬良性增生性疾病；在 MRL-lpr/lpr 母鼠 (一種自發性引起類似狼瘡病症動物模型) 利用 DMFO 進行實驗能夠提高老鼠之存活時間 (Thomas *et al.*, 1989)。胚胎形成至原腸時期前，此間段的鳥胺酸去羧化酶對細胞存活有著必要性角色 (Pendeville *et al.*, 2001)。細胞週期分為 G1：細胞 DNA 合成前檢查點；S：DNA 合成期；G2：細胞分裂前檢查點；M：細胞分裂時期。研究鳥胺酸去羧化酶，發現在後 G1 跟 G2/M 明顯鳥胺酸去羧化酶活性增加 (Balasundaram *et al.*, 1991)，利用 DFMO 刺激細胞，發現抑制鳥胺酸去羧化酶，而造成細胞增生下降，讓細胞週期停滯於 G1 時期，並且刺激細胞凋亡 (Nemoto *et al.*, 2001)；細胞受到放射線、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等損傷下，細胞接收訊息，而走向死亡，提高鳥胺酸去羧化酶表現防禦細胞死亡之情況 (Park *et al.*, 2002)。瞭解鳥胺酸去羧化酶的活性在防禦細胞凋亡中扮演重要角色，然而在細胞凋亡過程，鳥胺酸去羧化酶受到何者調控，尚未明瞭。

蛋白激酶 Cδ 為蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 家族的一員；蛋白激酶 C 所傳遞的訊息能夠影響細胞生長、分化及細胞凋亡 (Nishizuka *et al.*, 1984)；其屬於磷酸化絲胺酸/酰胺酸之蛋白激酶，目前為止有十三種的異構性激酶，以需輔助因子與蛋白結構的差異分成四族群：傳統性 (classical，包含蛋白激酶 Cα、βI、βII 和 γ)、新奇性 (novel，

包含蛋白激酶 C $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\theta$ 和 $\eta$ )、非典型性 (atypical, 包含蛋白激酶 C $\zeta$ 、和 $\iota/\lambda$ ) 蛋白激酶 C 及蛋白激酶 C 相關性激酶 (PKC-related kinase, PRK, 包含蛋白激酶 C 相關性激酶 1、2 和 3)。傳統性蛋白激酶 C 的活化需要鈣離子、二醯甘油脂 (diacylglycerol, DAG) 和卵磷脂 (phosphatidylserine, PS) 幫助, 新奇性蛋白激酶 C 的活化需要二醯甘油脂和卵磷脂, 但不需要鈣離子幫助; 非典型性蛋白激酶 C 的活化只需要卵磷脂幫助; 蛋白激酶 C 相關性激酶只需要卵磷脂幫助, 但主要因其結構與其他蛋白激酶 C 有所差異, 而分類為此群 (Da Rocha *et al.*, 2002)。蛋白激酶 C 的 N 端是調節區域為鈣離子、卵磷脂二或者醯甘油脂結合部位, 還有一段偽受質片段, 其能夠結合到 C 端中之受質作用位子; C 端是活化區域為 ATP 及受質作用位子。新奇性蛋白激酶 C 中蛋白激酶 C $\delta$ 研究瞭解最多, 於 1986 年被發現, 其胺基酸序列與蛋白激酶 C $\alpha$ 有 58% 相同性, 也是蛋白激酶 C 第一個被證實蛋白的酪胺酸磷酸化調控酶之活性 (Gschwendt *et al.*, 1999)。

細胞受到荷爾蒙、生長因子等刺激, 將 phosphoinositide-3-OH kinase (PI3K)與 phospholipase C 活化, 使得 phosphatidylinositol 磷酸化, 水解分裂成二醯甘油脂及 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) (Toker *et al.*, 1997), 而 IP<sub>3</sub> 移動到內質網跟鈣離子通道結合讓鈣離子釋出細胞內質網外, 而影響其受質; 蛋白激酶 C 需求不同, 利用二醯甘油與鈣離子進行活化蛋白激酶 C, 蛋白激酶 C 活化時, 能夠磷酸化自己與下游受質, 進而將接收的訊息傳遞細胞內各個地方, 影響細胞的生理現象。不同細胞與組織中的蛋白激酶 C 分佈有所差異的, 而造成不同途徑調節細胞。目前蛋白激酶 C 異構酶的功能仍然未明確瞭解, 蛋白激酶 C 所扮演重要生理過程的角色, 有待研究證明; 活化的蛋白激酶 C 可能促進細胞存活, 也可能抑制細胞凋亡。舉例說明: 高度表現蛋白激酶 C 可以提昇 PI3K/Akt 途徑活性作用消除壓力所引發之細胞凋亡 (Li *et al.*, 1999); 放射線引起細胞凋亡過程, 加入 basic fibroblast growth factor (bFGF) 可以經蛋白激酶 C 參與, 而對抗細胞凋亡 (Haimovitz-Friedman *et al.*, 1996)。蛋白激酶 C $\alpha$ 的研究, 已知它在不同刺激下能夠促進細胞凋亡, 也具抗細胞凋亡的作用。細胞蛋白激酶 C 活性增高在細胞處理

7-Hydroxystaurosporine、camptothecin 與 etoposide 引發細胞凋亡之過程 (Shao *et al.*, 1997); 細胞表現無活性蛋白激酶 C $\alpha$  引發細胞凋亡之情況 (Whelan *et al.*, 1998)。研究到現在, 蛋白激酶 C $\delta$  認為促進細胞凋亡的因子之一。細胞凋亡時 caspase 3 被活化時會將蛋白激酶 C $\delta$  切割產生活化的 40 kDa 蛋白激酶 C $\delta$  之活化片段; 研究構築 40 kDa 蛋白激酶 C $\delta$  之活化片段載體轉染到細胞內, 使得細胞走向細胞凋亡 (Ghayur *et al.*, 1996)。近年來, 研究發現蛋白激酶 C $\delta$  可能不只是參與細胞凋亡訊息過程的蛋白質, 而且防禦細胞凋亡也是一個重要角色。腫瘤壞死因子- $\alpha$  經其接受器 (p60TNFR) 傳遞訊息, 其有兩種訊息的途徑, 一個為促進細胞凋亡的訊息途徑, 另一個途徑為對抗細胞凋亡的訊息。自發性嗜中性白血球細胞凋亡時, 腫瘤壞死因子- $\alpha$  藉由蛋白激酶 C $\delta$  的訊息傳遞引發細胞死亡; 當嗜中性白血球細胞被活化時, 腫瘤壞死因子- $\alpha$  藉由蛋白激酶 C $\delta$  的訊息傳遞阻止自發性細胞凋亡 (Kilpatrick *et al.*, 2002)。不同環境下, 蛋白激酶 C $\delta$  傳遞不同訊息, 而影響細胞生理現象。非小細胞肺癌細胞株轉染無蛋白激酶 C $\delta$  激酶活性的載體與轉染正常蛋白激酶 C $\delta$  細胞比較蛋白激酶活性的差異, 發現無蛋白激酶 C $\delta$  激酶活性細胞不管是否處理抗腫瘤藥物, 都較容易走向細胞凋亡 (Clark *et al.*, 2003)。

12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 是蛋白激酶 C 的活化因子。7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-initiation 與 TPA-promotion 的方法使得皮膚腫瘤形成, 在這個過程中 TPA 能夠提高鳥胺酸去羧化酶活性。老鼠模式中, 將蛋白激酶 C 基因轉殖到老鼠, 發現轉殖的老鼠處理 TPA 後, 增加鳥胺酸去羧化酶活性比起未轉殖蛋白激酶 C 的老鼠高。進一步, 觀察蛋白激酶 C $\delta$  的轉殖鼠, 其鳥胺酸去羧化酶活性有提升現象 (Jansen *et al.*, 2001)。同樣地, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理細胞的實驗, 瞭解蛋白激酶 C 與鳥胺酸去羧化酶的活性有增高情況。蛋白激酶 C $\delta$  對鳥胺酸去羧化酶的調節, 轉染無蛋白激酶 C $\delta$  激酶活性載體的細胞, 以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 進行實驗, 發現細胞的鳥胺酸去羧化酶之活性較控制組有下降的趨勢 (Otieno *et al.*, 2000)。這些的研究瞭解蛋白激酶 C $\delta$  對鳥胺酸去羧化酶調控為正向的調節作用。

上述提到，觀察抗癌和防癌物質對鳥胺酸去羧化酶的抑制效果是一個重要實驗，顧慮這些物質的安全性，天然物質成份為最好做為抗癌與防癌藥物來源，我們針對一些天然化合物進行鳥胺酸去羧化酶活性抑制效果評估（圖一），發現 rottlerin 抑制鳥胺酸去羧化酶活性效果最好，因此想要瞭解 rottlerin 除了抑制鳥胺酸去羧化酶外，對細胞的影響之情況。Rottlerin 主要由粗糠柴（*Mallotus philippinensis*）的果實純化出來，能夠抑制蛋白激酶 C 家族的活性，6  $\mu\text{M}$  濃度下，蛋白激酶 C $\delta$  能夠被抑制 50% 活性，而其他蛋白激酶 C 被抑制 50% 活性需要 rottlerin 的濃度大於 20  $\mu\text{M}$ （Gshwendt *et al.*, 1994）。研究上，其視為一種特異性蛋白激酶 C $\delta$  抑制劑，廣泛應用。治療癌症研究方面，利用 phorbol ester 引發老鼠的耳朵水腫，rottlerin 治療抑制老鼠耳朵的水腫（Gshwendt *et al.*, 1984）。非小細胞肺癌細胞（H1155、H1703 與 H157 細胞株）利用 Rottlerin 處理，造成細胞邁向細胞凋亡。一般情況，癌症通常以合併藥物進行治療，rottlerin 合併其他藥物（trastuzumab、cisplatin 或 gemcitabine）能夠增高非小細胞肺癌細胞進行細胞凋亡（Clark *et al.*, 2003）。

最近發現 rottlerin 可以引發非小細胞肺癌細胞死亡（Clark *et al.*, 2003），但是刺激細胞凋亡的機制並未清楚。我們了解 rottlerin 是特異性蛋白激酶 C $\delta$  抑制劑，而蛋白激酶 C $\delta$  能夠調節鳥胺酸去羧化酶的活性，那麼 rottlerin 引發的細胞死亡，鳥胺酸去羧化酶是否扮演一個重要的角色，將是本研究之重點。

## 材料與方法 (Materials and methods)

### 冷凍細胞

將生長的細胞(貼底的細胞以 trypsin 作用,使得細胞脫離培養皿之底部)離心收集,於冰上加入 1 ml 4°C 的 10% DMSO (dimethylsulfoxide) /90% FBS 或 10% DMSO/20% FBS/70% medium 溫和混合均勻,置於 vial 中,於-20°C 結凍 1 小時,再放入-80°C 結凍 1 小時,最後移置於液態氮 (-176°C) 保存。

### 解凍細胞

從液態氮 (-176°C) 取出 vial,快速溶解,加入 9 ml 含 10% FBS 的培養基到 100 mm 培養皿中,培養 6 小時後,將培養基更換,避免 DMSO 傷害細胞。

### 配置細胞培養液

以每公升培養基加入碳酸氫鈉 2 公克到 RPMI 1640 培養基粉末以適量二次水溶解,溶解後調整 pH 置 7.2,以 0.45  $\mu$ m 過濾後 pH 轉變成 7.4,配置培養液需在兩小時內完成。

### 細胞計數

細胞均勻的分布培養液中,取 10  $\mu$ l 放入細胞計數載玻片中,觀察細胞是否均勻分散細胞計數器中區域,確定分布均勻後,計算細胞數目。

### 細胞培養與處理

人類白血病 HL60 細胞培養於無抗生素的 RPMI 1640 培養基含 10% 去活性胎牛血清 (GIBCO BRL, Grand Island, NY)。實驗時,細胞利用無抗生素的 RPMI 1640 培養基含 10% 去活性胎牛血清培養十二小時後,再加 2.5% 去活性胎牛血清培養基與不同濃度的 rottlerin (純度為 98% 以上) (Calbiochem, LaJolla, CA) 培養在 37°C 及 5% 二氧化碳之培養箱。對照組之細胞加上 rottlerin 的溶劑: DMSO (Sigma, USA)。

### 細胞存活分析與 Acridine orange 染色法

培養皿中每 ml 有  $2 \times 10^6$  顆細胞，處理 rottlerin 不同濃度及不同時間後收集並且以一倍濃度 PBS (phosphate buffered saline; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 洗滌一次，測定細胞存亡利用 trypan blue 排除法，Trypan blue 會直接進入死細胞，將死細胞染成藍色，而活細胞因細胞膜完整具選擇性通透性，Trypan blue 無法通過完整的細胞膜，因此活細胞無法被染上顏色；所以把細胞懸浮液先用 0.2% trypan blue 染色處理後，再來計算沒有被染上 trypan blue 的細胞數目，便可以得到活細胞及死細胞之數目，計算細胞存活。細胞懸浮液與等量的 acridine orange 溶液 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PBS) 混合均勻，放到玻片上並蓋上蓋玻片，利用綠色螢光 (500-525 nm) 在螢光顯微鏡上觀察是否細胞核產生濃縮以判斷為細胞凋亡的細胞並照相存檔。

### 去氧核糖核酸的片段化

細胞處理 rottlerin 後，收集  $5 \times 10^6$  顆細胞進行分析。細胞用一倍濃度 PBS 洗滌一次，1,000 $\times$ g 離心取得沉澱的細胞，這些細胞加入 50  $\mu\text{l}$  細胞溶解性溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA 和 0.5% Sarkosyl) 和 5  $\mu\text{l}$  蛋白分解酶 K (0.5 mg/ml) 後，放入 55 $^\circ\text{C}$  水浴，隔夜後再加入 3  $\mu\text{l}$  RNase A (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 反應兩小時，之後萃取去氧核糖核酸加入等量的 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) 混合均勻後，以 12,000 $\times$ g 離心十分鐘，將上清液加上 DNA loading 溶液 (10X; 20% Ficoll 400, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 1% SDS, 0.25% bromophenol blue 和 0.25% xylene cyanol)，使用 2% agarose 以五十伏特進行電泳分析。

### 流式細胞儀分析

細胞處理 rottlerin 後，收集  $2 \times 10^6$  顆細胞進行分析。細胞用一倍濃度 PBS 洗滌一次，1,000 $\times$ g 離心取得沉澱的細胞，這些細胞加入 150  $\mu\text{l}$  PBS 輕緩地混合均勻細胞，再加上 850  $\mu\text{l}$  冰的 95% 酒精輕緩地混合均勻，放到 -20 $^\circ\text{C}$  中，進行固定，隔夜離心取到細胞加入

1ml 流式細胞分析液 (0.5% Triton X-100 和 5  $\mu$ g/ml RNase A), 37°C 反應三十分鐘, 然後加上 1ml 的 propidium iodide (50  $\mu$ g), 4°C 反應三十分鐘, 利用 FACSCAN 雷射流式細胞儀 (Becton Dickenson, San Jose, CA) 進行分析。

### 萃取細胞 RNA

$10^7$  細胞使用一倍 PBS 洗滌一次去除培養基的干擾, 之後加入 1 ml 3-ZOL (MDBio Inc.) 溫和混合均勻 5 分鐘, 使得溶液盡量呈透明化, 再加 0.2 ml 氯仿搖勻約 15 秒, 使得溶液呈乳化狀, 離心 14,000 $\times$ g 15 分鐘, 離心後樣本分為三層, 最上層為清澈層 (含 RNA)、中間層為白色層 (含蛋白質與 DNA) 及最下層為有機層 (含酚和氯仿), 將清澈層吸出, 放入新的容器, 加入 0.5 ml isopropyl alcohol 溫和混合均勻 5 分鐘, RNA 沉澱出現白色沉澱, 離心 12,000 $\times$ g 10 分鐘, 上清液倒掉加入 75% 酒精搖勻, 離心 7,500 $\times$ g 5 分鐘, 讓酒精蒸發, RNA 會呈半透明化, 加入 50  $\mu$ l 含 DEPC 的二次水溶解 RNA 以備製作 cDNA 使用。

### 製備 cDNA

萃取的 RNA 取 14  $\mu$ l (約 1 ng-1  $\mu$ g) 與 3  $\mu$ l (0.5  $\mu$ g) oligo(dT)<sub>15</sub> 的引子一起於 70°C 水浴 5 分鐘讓核苷酸二級結構解開, 之後加入 5  $\mu$ l 五倍反轉錄酶反應溶液、2  $\mu$ l 的 10 mM dNTP 及 1  $\mu$ l 的 200U M-MLV 反轉錄酶 (Promega) 成分 (附註), 總體積為 25  $\mu$ l 並溫和混合均勻, 放入 PCR 的儀器依 40°C 兩個小時增倍 cDNA 進行實驗, 再用 70°C 15 分鐘讓反轉錄酶死亡避免干擾後續實驗。

### 製備鳥胺酸去羧化酶 cDNA

利用 165 ng ODC-F (5'-ATgAACAACTTTggTAATgAAgAgT-3')、165 ng ODC-R (5'-CTACACA TTAATACTAgCCgAAgCA-3' 引子)、2 mM MgCl<sub>2</sub>、400  $\mu$ M dNTP、10 ng DNA 模板、5 U *Tag* 聚合酶 (MDBio Inc.) 與一倍 PCR 反應溶液, 其總體積為 50  $\mu$ l, 溫

和混合均勻，放入 PCR 儀器中 95°C 反應五分鐘打開雙股的 DNA 模板，以 95°C 反應一分鐘、55°C 反應一分鐘和 72°C 反應一分鐘為一週期，循環三十二次，之後 72°C 反應十分鐘將未完成的 DNA 複製補齊，最後設定為 4°C 直到取出（附註）。

### 瓊脂糖凝膠中回收 DNA

跑完電泳後，確定是否有興趣的 DNA 帶，如果有興趣的 DNA 帶的話，將其位子的膠（50-100 mg）切割下加入 0.5 ml GEX 溶液於 60°C 水浴 5-10 分鐘，使得膠完全溶解，快速回到室溫，樣本放入 Gel-M™ 管柱中，離心 4500×g 30-60 秒，讓 DNA 可以結合到管柱的膜上，將通過管柱的樣本再放入 Gel-M™ 管柱中，離心 4500×g 30-60 秒，再一次讓 DNA 可以結合到管柱的膜上，倒掉通過管柱的樣本，加入 0.5 ml WF buffer 到 Gel-M™ 管柱，離心 4500×g 30-60 秒，倒掉通過管柱的樣本，以 0.7 ml WS buffer（含酒精）洗滌 Gel-M™ 管柱，離心 4500×g 30-60 秒，倒掉通過管柱的樣本，再以離心 12,000×g 3 分鐘，將酒精離乾，為了確保酒精蒸發，再放於 60°C 5-10 分鐘，之後加適量的二次水到管柱的膜，靜置 10 分鐘，離心 12,000×g 10 分鐘，離心後放置 -20°C 備用。

### 製備 competent cells

以 2 ml LB 培養液培養細菌十二個小時，再將 2 ml 含細菌 LB 培養液放入新的 40 ml LB 培養液培養到 OD550 等於 0.48（約兩小時），將 40 ml 含細菌 LB 培養液放於冰上 15 分鐘，離心 3500×g 5 分鐘，倒掉上清液，加入 0.4 體積（16 ml）的 Tfb I 溶液溫和混和均勻，靜置冰上 15 分鐘，離心 3500×g 5 分鐘，觀察細菌沉澱是否呈微笑狀，加入 0.04 體積（1.6 ml）的 Tfb II 溶液溫和混和均勻，進行分裝約每管 0.2 ml 存放於 -70°C。

### TENE 方法（快速、小量抽取質體 DNA，做為篩選用）

1 ml LB 培養液 37°C 振盪培養細菌十六個小時以上，取 100 µl 的培養液保種，離心 12,000×g 5 分鐘，倒掉上清液，留下約 100µl 的上清液混合均勻，加入 200 µl TENE 溶液

溫和混合，使得液體呈透明黏稠狀，再加入 100  $\mu$ l 3 M NaOAc (pH 5.2) 溫和混合，使得液體的蛋白變性呈現白色沉澱物，離心 12,000 $\times$ g 10 分鐘，將上清液放到新的容器，加入 300  $\mu$ l 100% 酒精混合均勻，沉澱 DNA，離心 12,000 $\times$ g 10 分鐘，倒掉上清液，加入 300  $\mu$ l 酒精混合均勻清洗沉澱的 DNA 與去除鹽類離心 12,000 $\times$ g 5 分鐘，確定酒精蒸乾，此時 DNA 幾乎變透明，加入二次水溶解 DNA。

### 磷酸鈣方法（細胞轉染）

20  $\mu$ g 質體 DNA 加入 0.2 ml 兩倍的 BBS 溶液混合超過一分鐘，使得溶液能夠均勻，再加入 0.2 ml 0.25 M  $\text{CaCl}_2$  於處理後的 BBS 溶液（含質體 DNA）混合超過一分鐘，使得溶液能夠均勻，靜置冰上約 15 分鐘，此時於顯微鏡觀察樣本是否有細沙狀磷酸鈣沉澱物，將其加入細胞約八分滿的情況（在細胞轉染兩小時前細胞更換培養液），細胞培養約十二小時後，更換培養液以預防  $\text{CaCl}_2$  對細胞的傷害，兩天後進行穩定轉染的篩選，G418 使用前做試驗決定其利用濃度，以 G418（400  $\mu$ g/ml）篩選轉染細胞。

### 大量蛋白質製備

將具 ODC-pGEX-6p-2 的 BL21 的大腸桿菌接種於含 100  $\mu$ g/ml ampicillin 的 LB 培養液 37 $^{\circ}$ C 振盪培養細菌十六個小時，取 10 ml 之菌液倒入 1L 含 100  $\mu$ g/ml ampicillin 的 LB 培養液 37 $^{\circ}$ C 振盪培養三小時，加入 500  $\mu$ l 20% 異丙基硫代半乳糖苷（誘導 GST-ODC 表現），並且將溫度調到 25 $^{\circ}$ C 振盪培養細菌十六個小時，4 $^{\circ}$ C 下離心 8000 $\times$ g 15 分鐘，倒掉上清液，加入 20 ml 緩衝液 A（1X PBS, 1% Triton x-100, 0.5 mM DTT）混合均勻，利用高壓破細胞儀器打破細菌，至少需七次高壓破菌，離心 9000 $\times$ g 30 分鐘 4 $^{\circ}$ C，將上清液移置新的試管中備用。

### 親和性交換層析管柱

使用的樹脂材質為 Glutathione sepharose<sup>®</sup> 4B（pharmacia），取 5 ml 樹脂裝於 20 ml

管柱 (Bio-Rad) 中，以 5 倍管柱體積的緩衝液 A 平衡管柱 (流速：1 ml/min)，接著將高壓打破的細菌之上清液載入層析管柱中，反應 30 分鐘，用緩衝液 A 以每分鐘一毫升流速沖洗約 100 ml，全程監測沖洗緩衝液之蛋白質含量 (OD280)。使用萃取溶液 (10mM reduced glutathione in 50mM Tris-HCl, pH 8.0) 沖提，並收集沖提過的萃取溶液，全程監測沖洗緩衝液之蛋白質含量。再以 PreScission™ 蛋白酶將麩胱甘肽硫轉換酶與鳥胺酸去羧化酶的鍵結切開，反應隔夜。

### 構築表達鳥胺酸去羧化酶載體分別轉染真核細胞與轉殖細菌內表現鳥胺酸去羧化酶蛋白

10<sup>7</sup> Hep2 細胞 (喉癌上皮細胞) 抽取 RNA 進行 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 得到 cDNA，之後利用設計的引子進行 PCR 以便得到鳥胺酸去羧化酶 cDNA，將 PCR 產物進行 0.8% agarose gel 電泳，確定 PCR 產物位置是否正確，並使用 Viogene gel extraction kit 純化 PCR 產物，將回收的 DNA 溶於水中，接下來先與 pUC-T 載體進行接合作用，轉殖於 competent cell 內，鳥胺酸去羧化酶 cDNA 進入 pUC-T 載體後進行藍白篩選細菌株。為了能在真核細胞表現，將鳥胺酸去羧化酶 cDNA 1,415 bp 用 *EcoRI* 與 *BamHI* 限制酶由 pUC-T 載體轉換到 pcDNA3 載體。使用磷酸鈣方法將 pcDNA3-ODC 載體轉染入 HL60 細胞，為了穩定性轉染實驗利用 G418 (400 µg/ml) 抗生素篩選大約三週時間，得到對 G418 抗性細胞株。穩定性轉染成功的 HL60 細胞用西方墨點法確定鳥胺酸去羧化酶表現。為了能在原核細胞表現，具有鳥胺酸去羧化酶 cDNA 的 pUC-T 載體，利用 *BamHI* 與 *EcoRI* 限制酶將鳥胺酸去羧化酶 cDNA 轉換到 pGEX-6p-2 載體，使得鳥胺酸去羧化酶蛋白 N 端多一個麩胱甘肽硫轉換酶以方便利用親和性管柱純化鳥胺酸去羧化酶蛋白，以蛋白質電泳與西方墨點法確定鳥胺酸去羧化酶表現。

### 西方墨點法

細胞用冰的溶解溶液 (10% v/v glycerol, 1% v/v Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 20 mM Tris, pH7.9,

100  $\mu$ M  $\beta$ -glycerophosphate, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml aprotinin 和 10  $\mu$ g/ml leupoptin), 在 4°C 三十分鐘來均質化細胞, 用 12,000 $\times$ g 離心 4°C 三十分鐘, 將上清液加入西方墨點法樣本溶液於 95°C 十分鐘, 將蛋白質放入 8% SDS-polyacrylamide gel 中跑電泳之後, 轉移到 polyvinylidene fluoride (PDVF), 用溶於 PBS-0.1% Tween 20 中的 5% 脫脂牛奶 blocking 一個小時, 再用 PBS-0.1% Tween 20 洗滌三次每次五分鐘, 然後將第一個抗體 (1:3000 的稀釋, 利用 0.1% 牛血清白蛋白當作稀釋液) 放入 blocking 後的 PDVF 反應六個小時, 再用 PBS-0.1% Tween 20 洗滌三次每次五分鐘, 之後將有標定 horseradish peroxidase (HRP) 之第二個抗體 (1:10000, 利用 PBS-0.02% Tween 20 當作稀釋液) 作用一個小時, 用 PBS-0.1% Tween 20 洗滌三次每次五分鐘, 最後抗體與抗原複合物使用增強化學冷光方法測定 (ECL detection system; Amersham)。

### 總蛋白質定量的標準曲線

利用 Coomassie brilliant blue G 250 在酸性環境下與蛋白質結合能夠使其吸光值由 465 nm 轉換至 595 nm, 再以分光光度計測定吸光值。定量蛋白質濃度首先製作牛血清白蛋白標準樣本之標準曲線, 作為蛋白質定量的依據(附註)。取出 10  $\mu$ l 待測樣本加入 1 ml 的 Coomassie protein assay 試劑 (Bio-Rad) 混合均勻放入塑膠測光管中, 以未加蛋白質樣本的 Coomassie protein assay 試劑當作空白組 (black), 測定 595 nm 波長之吸光值, 同時減去空白組的讀值作修正, 再比對標準曲線得到蛋白質濃度。

### SDS-PAGE 的染色

蛋白質於 SDS-PAGE 進行電泳後, 取下加入 Coomassie staining solution 進行染色 30 分鐘, 然後將已染色 SDS-PAGE 移到 Destaining solution 中, 緩慢搖動, 等到蛋白質色帶變清晰可見, 並且背景顏色退掉, 以玻璃紙覆蓋, 確定無氣泡後, 風乾保存。

### 免疫沉澱法

將處理後的細胞加入 500  $\mu$ l 的免疫沉澱法之溶解溶液 (10 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM EGTA), 作用三十分鐘使得細胞可以被均質化, 於 4°C 用 12,000 $\times$ g 離心三十分鐘, 上清液取出, 個別加入 anti-phosphoserine、anti-phosphothreonine、anti-phosphotyrosine 與 anti-ODC 等抗體, 旋轉作用一個小時於 4°C 中, 之後加入 10  $\mu$ l protein A/G agarose 再反應十六個小時, 於 4°C 用 6000 $\times$ g 離心十分鐘得到沉澱物, 沉澱物加入 30 $\mu$ l 的免疫沉澱法之溶解溶液, 之後利用西方墨點法分析蛋白質磷酸化的變化。

### 鳥胺酸去羧化酶活性測定法

細胞溶解後, 取 20  $\mu$ l 加入鳥胺酸去羧化酶活性測定法之溶液 (50  $\mu$ M EDTA, 25  $\mu$ M Pyridoxal phosphate, 2.5 mM Dithiothreitol 於 25 mM Tris HCl, pH7.1 中) 讓總體積為 50  $\mu$ l; 加入兩莫耳的 L-ornithine 於 37°C 反應一個小時, 之後放入 p81 phosphocellulose (10  $\times$  5 mm strips, Whatman, Maidstone, England), 將帶正價的胺基酸連結於 p81 phosphocellulose 上, 用 0.1M ammonium hydroxide 洗滌使得非特異性結合洗掉, 然後烘乾, 再將二氫的物質利用 500  $\mu$ l 分離溶液 (0.5 M magnesium chloride 在 0.2 M boric acid-borax buffer 中, pH 8.4) 於 37°C 反應一個小時, 由 p81 phosphocellulose 分離出, 取分離溶液作用後的 50 $\mu$ l 到測定冷光的 96-well 中, 96-well 在加入冷光測定試劑【11.7 mg/ml luminol、30 mg/ml peroxidase type II (EC 1.11.1.7) 與 67 mM glycine buffer, pH 8.6 (於 1:1:2.5, v/v)】在暗處反應三十分鐘, 最後加入二氫氧化酶作用, 利用 TR 717 Microplate Luminometer 測定。以 20、40、60 和 80 pmol 的 putrescine 作標準曲線 (Wang *et al.*, 2000)。

### 電泳移動遲滯分析法

轉錄因子 AP-1 與 NF- $\kappa$ B 之專一性 DNA 結合區乃分別由 decameric motifs TGACTCA 與 GGGRNNTYCC 所構成 (Muller *et al.*, 1993)。本實驗所設計之雙股 DNA 寡核苷酸探針 (AP-1 之合成序列為 5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGA-3', NF- $\kappa$ B 之合成序列為

5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') 乃由廠商合成 (MDBio Inc.)。雙股 DNA 寡核苷酸探針之 5' 的 biotin 標誌。先將單股 DNA 寡核苷酸與 TEN 溶液 (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA; 0.1 M NaCl) 以 1:1 的比例混合於 95°C 反應 10 分鐘, 讓溫度緩慢降下, 使得互補單股 DNA 寡核苷酸能夠結合。接下來的蛋白質與 DNA 結合實驗以一倍結合作用溶液、2.5% 甘油、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.05% NP-40、10 pmole Biotin-DNA 及 2 μg 細胞核萃取液總體積為 20 μl (附註), 混合均勻於冰上反應 20 分鐘 (使核質蛋白與轉錄因子之專一性 DNA 結合位結合), 樣本加入 loading buffer (6X, 125 mM Tris, pH 8.0, 25% glycerol, 4 mM EDTA) 於 6% non-denaturing polyacrylamide gel (附註), 條件為 100 伏特電壓下進行電泳 1 小時。此後, 電泳膠片以 90 伏特 1 小時轉移蛋白與 DNA 複合物到 nylon 膜上, 再將 nylon 膜用 120 mJ/cm<sup>2</sup> 反應 1 小時, 使用 1 倍洗滌溶液約 5 分鐘, 1% BSA 進行 blocking 5 分鐘, 加入 SA-HRP (稀釋 2000 倍) 反應 15 分鐘, 使用 1 倍洗滌溶液洗滌 5 分鐘進行兩次, 加入緩衝溶液反應 5 分鐘, 最後抗體與蛋白與 DNA 複合物使用增強化學冷光方法測定 (LightShift Chemiluminescent EMSA Kit, PIERCE)。

### 統計分析

實驗資料利用 student's *t test* 進行統計分析, 當統計後數據 P<0.05 及 0.01 以上機率是具有統計學上的意義。

## 結果 (Results)

### Rottlerin 引發 HL60 細胞走向細胞凋亡

HL60 細胞是一種人類前骨髓性白血病細胞株，不同濃度 rottlerin 與處理 rottlerin 後的各個時間下之細胞存活變化，利用 trypan blue 排除法觀察不同濃度和時間的細胞存活之情況（圖二）。實驗發現 HL60 細胞以 5  $\mu$ M rottlerin 處理二十四小時後造成 50% 以上細胞死亡。根據這樣的結果，接下來觀察 rottlerin 引起細胞走向死亡效應是否屬於細胞凋亡。當細胞走向細胞凋亡時，可以發現細胞凋亡的特徵：（1）細胞內 DNA 被切割形成核酸體片段之現象，稱為 DNA laddering；（2）核酸被片段化及提高染色體濃縮，使得細胞形態發生改變而形成細胞凋亡小體。我們暴露 HL60 細胞於 rottlerin 之後測試不同濃度及時間的細胞凋亡狀況（圖三）。隨著提升 rottlerin 濃度造成 DNA ladder 表現增加（圖三 A）。同樣地，rottlerin 加入濃度不變隨著時間增加也發現 DNA ladder 表現增加（圖三 B）。為了更確定細胞之 DNA 片段現象，利用 acridine orange 染色觀察細胞形態，與對照組比較發現實驗組的細胞核具有均質強烈螢光反應和較小直徑的特徵（圖三 C）。然後使用 propidium iodide 染細胞核激發螢光表現，並且利用細胞流式儀 (flow cytometry) 定量細胞的 DNA 之螢光強度分布，當細胞凋亡時細胞的 DNA 之螢光強度分布趨向 sub-G<sub>1</sub> 區域。處理 rottlerin 二十四小時後的細胞使用細胞流式儀測定細胞 sub-G<sub>1</sub> 區域得到 48  $\pm$  4.8% 細胞凋亡的情況（圖三 D）。藉由細胞之 DNA 片段、細胞形態的改變及細胞 sub-G<sub>1</sub> 等實驗結果確定 rottlerin 於 HL60 細胞中引發細胞的凋亡。

### Rottlerin 抑制蛋白激酶 C $\delta$ 蛋白質

Rottlerin 是一種特定蛋白激酶 C $\delta$  抑制劑，它的 IC<sub>50</sub> 約為 3–6  $\mu$ M (Gschwendt *et al.*, 1994)。實驗已知當 5  $\mu$ M rottlerin 處理 HL60 細胞於二十四小時後發現引發細胞凋亡。觀察 HL60 細胞內的蛋白激酶 C 家族之蛋白質 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  與  $\lambda$ ) 於加入 5  $\mu$ M rottlerin 後的變化，蛋白激酶 C $\alpha$ 、C $\beta$ 、C $\epsilon$  及 C $\lambda$  之蛋白質並無明顯的變化。非常驚訝地，只有蛋

白激酶 C $\delta$ 蛋白質於實驗組跟對照組比較發現十小時時蛋白質下降 80% 程度 (圖四)。

### **Rottlerin 抑制細胞內鳥胺酸去羧化酶的蛋白質合成、酵素活性與其磷酸化之作用**

細胞內的蛋白激酶 C $\delta$  能夠活化調節鳥胺酸去羧化酶之酵素活性 (Otien *et al.*, 2000)。了解 rottlerin 抑制蛋白激酶 C $\delta$  而導致細胞走向細胞凋亡，那麼 HL60 細胞以 rottlerin 處理後是如何調節鳥胺酸去羧化酶呢？觀察 rottlerin 處理 HL60 細胞後之不同時間的鳥胺酸去羧化酶之變化 (圖五)。在對照組細胞中鳥胺酸去羧化酶的蛋白質與酵素活性具有增加之趨勢，實驗組細胞處理 rottlerin 後的第十小時鳥胺酸去羧化酶蛋白質與對照組相較下降 78% (圖五 A)，而鳥胺酸去羧化酶酵素活性下降 70% 情況 (圖五 B)。文獻報告磷酸化的鳥胺酸去羧化酶提升蛋白質的穩定度及酵素活性 (Brown *et al.*, 1994)，因此測試細胞利用 rottlerin 處理後，鳥胺酸去羧化酶的酰胺酸、絲胺酸與酪胺酸等胺基酸磷酸化之變化狀況。將所有磷酸化蛋白質使用免疫沉澱法沉澱得到，再利用西方墨點法測定鳥胺酸去羧化酶的磷酸化，發現 rottlerin 處理第一小時後之實驗組與對照組細胞比較而觀察到實驗組鳥胺酸去羧化酶的酰胺酸磷酸化具有下降情形 (圖五 C； $P < 0.05$ )。

### **重組人類鳥胺酸去羧化酶活性於體外實驗不受 rottlerin 作用影響**

將具有鳥胺酸去羧化酶的 pGEX-6P-2 載體之 *E. coli* BL21 細菌利用 isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導細菌內載體表現鳥胺酸去羧化酶基因的蛋白質，可表現出一分子量約為 51 kDa 的融合蛋白質，使用親和性色層分析純化出此蛋白質 (圖六 A)。純化的人類鳥胺酸去羧化酶與 rottlerin 於試管內進行反應觀察鳥胺酸去羧化酶活化變化。已知 curcumin 能夠直接抑制鳥胺酸去羧化酶活性 (Lee *et al.*, 1999)，其結構類似鳥胺酸去羧化酶與鳥胺酸去羧化酶之輔酶結合時的結構，利用它當作陽性控制組，發現 rottlerin 無法抑制鳥胺酸去羧化酶的活性，因此瞭解在體外其並非鳥胺酸去羧

化酶的酵素活性抑制劑。

### 鳥胺酸去羧化酶對抗 rottlerin 引發之細胞凋亡

為了測定 rottlerin 引發細胞凋亡中鳥胺酸去羧化酶所扮演角色，HL60 細胞轉染攜帶鳥胺酸去羧化酶的載體 (HL60-ODC) 和空白載體 (HL60-pcDNA3)，經過三週的篩選，利用西方墨點法確定得到穩定性轉染之細胞，HL60-ODC 細胞的鳥胺酸去羧化酶蛋白質表現為 HL60-pcDNA3 細胞之 2.5 倍 (圖七 A)。以細胞形態來觀察 HL60-pcDNA3 細胞處理 rottlerin 後可以清楚見到細胞凋亡小體，而 HL60-ODC 細胞處理 rottlerin 後細胞凋亡小體幾乎觀察不到 (圖七 B)。穩定轉染鳥胺酸去羧化酶基因後的 HL60 細胞處理 rottlerin 之後測定 DNA ladder 有減少的情況 (圖七 C)。接下來，用 PI 染細胞的細胞核，將樣本使用細胞流式儀測定得到 HL60-pcDNA3 細胞處理 rottlerin 二十四小時後引起  $50 \pm 7.4\%$  細胞走向 sub-G1，而 HL60-ODC 細胞降低細胞凋亡約  $80 \pm 9.2\%$  (圖七 D)。HL60-pcDNA3 細胞與 HL60 細胞分別處理  $5 \mu\text{M}$  rottlerin 造成的細胞凋亡是類似，但 HL60-ODC 細胞卻能阻擋 rottlerin 導致的細胞凋亡。根據這樣的結果，瞭解鳥胺酸去羧化酶蛋白質質量增加，可以阻止 rottlerin 誘發的細胞凋亡，下一步進行穩定轉染細胞之鳥胺酸去羧化酶的酰胺酸磷酸化變化情況，處理 rottlerin 五小時後 HL60-pcDNA3 細胞和 HL60-ODC 細胞分別萃取蛋白質，利用免疫沉澱將鳥胺酸去羧化酶沉澱出來，再用抗酰胺酸磷酸化之抗體藉這西方墨點法測定鳥胺酸去羧化酶的酰胺酸磷酸化，可以觀察到處理 rottlerin 之 HL60-ODC 細胞的鳥胺酸去羧化酶與相同條件處理下的 HL60-pcDNA3 細胞的鳥胺酸去羧化酶比較有較高酰胺酸磷酸化情況 (圖八)。

### 在 rottlerin 引發細胞凋亡中胎牛血清對鳥胺酸去羧化酶之影響

血清是一種增加鳥胺酸去羧化酶表現的活化劑 (Flamigni *et al.*, 1999)。利用 1% 或 5% 胎牛血清和 rottlerin 一起處理 HL60-pcDNA3 細胞與 HL60-ODC 細胞，測定不同血清

濃度對鳥胺酸去羧化酶所產生之影響。Rottlerin 處理三小時後，1% 胎牛血清或 5% 胎牛血清處理下 HL60-pcDNA3 細胞與 HL60-ODC 細胞的鳥胺酸去羧化酶蛋白質並無明顯差異，但是鳥胺酸去羧化酶的酰胺酸磷酸化和 rottlerin 處理五小時後鳥胺酸去羧化酶就有顯著的差異，HL60-pcDNA3 細胞處理 rottlerin 後第三小時的鳥胺酸去羧化酶的酰胺酸磷酸化與處理 rottlerin 後第五小時的鳥胺酸去羧化酶蛋白質下降最為顯著（圖九 A；B）。然後測試細胞處理 rottlerin 後第五小時鳥胺酸去羧化酶活性，觀察到 HL60-pcDNA3 細胞與 HL60-ODC 細胞鳥胺酸去羧化酶活性降低趨勢（圖九 C）。轉染的 HL60 細胞同時處理 1% 或 5% 胎牛血清和 rottlerin 於二十四小時後，利用 PI 染色及細胞流式儀觀察細胞凋亡的情況，1% 胎牛血清跟 rottlerin 處理的 HL60-pcDNA3 細胞引起  $45 \pm 5.1\%$  細胞凋亡，而 HL60-pcDNA3 細胞於 5% 胎牛血清中處理 rottlerin 則降低  $51 \pm 6.3\%$  細胞凋亡。然而，HL60-ODC 細胞處理 1% 或 5% 胎牛血清和 rottlerin 造成細胞凋亡的情況都小於 10%（圖十）。

#### **鳥胺酸去羧化酶的誘導與抑制影響細胞週期的替換**

Rottlerin 處理二十四小時後細胞的細胞週期中各時期之分布利用 PI 染色與細胞流式儀測定。圖十和表一顯示 HL60-pcDNA3 細胞的 G0/G1、S 及 G2/M 時期之百分比，實驗組與對照組相較為下降的情況，因實驗組其細胞週期走向 sub-G1 階段的關係，HL60-ODC 細胞處理 rottlerin 後減少細胞週期邁向 sub-G1 時期。同時發現在胎牛血清處理下，血清能夠對抗 rottlerin 引發的細胞凋亡，並且讓處理過 rottlerin 的細胞之細胞週期停滯於 G1 時期。

#### **Rottlerin 影響 NF- $\kappa$ B 的表現與結合能力**

NF- $\kappa$ B 為轉錄因子 rel 家族成員之一，此類轉錄因子能夠調節關於增生和抗細胞凋亡途徑中的蛋白質基因之轉錄作用。多氨酸能加強 NF- $\kappa$ B 結合到 NF- $\kappa$ B 反應序列（NF- $\kappa$ B response elements；NREs）（Shah *et al.*, 1999）。測試在 HL60 細胞內 rottlerin 是否可以

抑制 NF- $\kappa$ B 活化作用，細胞處理 5  $\mu$ M rottlerin 後不同時間點觀察 NF- $\kappa$ B 結合能力、p65 蛋白質轉移至細胞核能力與 I $\kappa$ B $\alpha$  的表現。NF- $\kappa$ B 結合能力於處理後六小時有明顯下降趨勢，p65 蛋白質轉移至細胞核能力於處理後一小時輕微下降而於處理後三小時有明顯下降趨勢，實驗組的 I $\kappa$ B $\alpha$  的表現與對照組相較明顯提高（圖十一）。

### **Rottlerin 影響 p53、Bax 與 Bcl-X<sub>L</sub> 表現**

許多的因素可以引發細胞凋亡，而 p53 是一個參與其中調控之重要的蛋白質。藉著西方墨點法觀察 p53 蛋白質變化，處理 rottlerin 後 p53 蛋白質在六小時開始表現提高，於二十四小時有繼續增高情況，也發現 Bcl-X<sub>L</sub> 蛋白質減少及 Bax 蛋白質增加現象。有趣地，HL60 細胞處理 rottlerin 後，Bax 蛋白質幾乎於 p53 蛋白質表現增加後才有提高的狀況（圖十二）。p53 能夠加強 Bax 轉錄表現（Brady *et al.*, 1996）。

### **Rottlerin 促進粒線體的 cytochrome c 釋出及 caspase 3 與 caspase 9 的活化**

HL60 細胞死亡生化途徑：細胞暴露於 5  $\mu$ M rottlerin 中，觀察粒線體的 cytochrome c 釋出至細胞質及 procaspase 3（32 kDa）與 procaspase 9（48 kDa）被蛋白酶切割的情況。HL60 細胞走向細胞凋亡 caspase 3 分解成 19 kDa 和 17 kDa 的片段，caspase 9 分解成 35 kDa 和 18 kDa 的片段，然而 caspase 8 並無明顯被切割（圖十三 A）。由於 cytochrome c 從粒線體釋放至細胞質能夠活化一系列的蛋白質組合而活化 caspase。HL60 觀察細胞處理 rottlerin 後 cytochrome c 從粒線體釋放至細胞質的變化，發現以 rottlerin 處理後的實驗組之粒線體 cytochrome c 釋放到細胞質與對照組相較有提高情況（圖十三 B）。

## 討論 (Discussion)

實驗結果證實在 HL60 細胞處理 rottlerin 時促進細胞凋亡。根據這樣結果瞭解蛋白激酶 C $\delta$  可能參與對抗細胞凋亡的一種上游的蛋白質。Rottlerin 是一特異性蛋白激酶 C $\delta$  抑制劑，已經廣泛應用對蛋白激酶 C $\delta$  的反應途徑有關的研究。Rottlerin 主要與蛋白激酶 C $\delta$  的 ATP 結合位相互作用造成蛋白激酶 C $\delta$  活性抑制 (Gschwendt *et al.*, 1994)，但 Rottlerin 除了能夠抑制蛋白激酶 C $\delta$  之外還能抑制鈣離子/攜鈣素依賴性蛋白激酶 III (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase III)、p38 調節/活性化蛋白激酶 (p38-regulated/activated protein kinase) 和促分裂因子激活蛋白激酶之活性化蛋白激酶 2 (MAPK-activated protein kinase 2) 等蛋白激酶的活性。Rottlerin 抑制蛋白激酶活性效果受到 ATP 的濃度，因為 rottlerin 與 ATP 競爭蛋白激酶的 ATP 結合位，而影響酵素活性 (Daivies *et al.*, 2000)。蛋白激酶 C $\delta$  提高其酪胺酸磷酸化促使其酵素活性上升，rottlerin 造成細胞內 ATP 的量下降，引發間接性抑制蛋白激酶 C $\delta$  的酪胺酸磷酸化的變化 (Soltoff *et al.*, 2001)。Daivies 等研究者發現 20  $\mu$ M rottlerin 與低 ATP 濃度下無法抑制蛋白激酶 C $\delta$  的活性，可能原因之一是 rottlerin 的純度不足，進而促使 LC Laboratories 停止販賣 rottlerin，因為 Daivies 等研究者利用 LC Laboratories 所提供的 rottlerin，近年利用 rottlerin 研究蛋白激酶 C $\delta$  相關的途徑使用 Cabiochem 提供的 rottlerin (Soltoff *et al.*, 2001; Leitges *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2003)；可能原因之二為蛋白激酶 C $\delta$  有許多的磷酸化的位置，在不同細胞純化的蛋白激酶 C $\delta$  對 rottlerin 具有不同的敏感度，所以造成 rottlerin 無法抑制蛋白激酶 C $\delta$  的活性；可能原因之三為蛋白激酶 C 受到 ubiquitination 而降解導致其活性下降，rottlerin 可能抑制 ubiquitination 而影響蛋白激酶 C $\delta$  蛋白質的降解。Rottlerin 促進細胞凋亡，蛋白激酶 C $\delta$  是否扮演主要角色需要加以確定，可以利用能表現蛋白激酶 C $\delta$  酵素活性的載體或無蛋白激酶 C $\delta$  酵素活性的載體轉染 HL60 細胞，瞭解 HL60 細胞走向細胞凋亡蛋白激酶 C $\delta$  參與其中的影響。

視處理和細胞種類而定，蛋白激酶 C $\delta$  較屬於促進細胞凋亡的蛋白質而不是抗細胞凋

亡的蛋白質 (Gschwendt *et al.*, 1999)。細胞凋亡中 lamina 磷酸化與 caspase 活化是重要機制。蛋白激酶 C $\delta$ 促進 lamina 磷酸化使得 lamina 無法組合，活化的 caspase 切割蛋白激酶 C $\delta$ 產生活化區的 40 kDa 片段 (Cross *et al.*, 2000)。對雄性激素具有敏感性之前列腺癌 (LNCaP) 細胞中處理 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 引發細胞死亡過程蛋白激酶 C $\delta$ 活性增加的趨勢 (Fujii *et al.*, 2000)。不過，近年來也有一些研究支持蛋白激酶 C $\delta$ 具有對抗細胞凋亡的功能。PC12 細胞中 basic fibroblast growth factor (bFGF) 經由蛋白激酶 C $\delta$ 傳遞對抗細胞凋亡訊息 (Wert *et al.*, 2000)。活化嗜中性白血球以 TNF- $\alpha$ 延緩細胞自發性死亡，當蛋白激酶 C $\delta$ 的作用被抑制而徹底破壞 TNF- $\alpha$ 抑制 caspase 3 活性功能 (Kilpatrick *et al.*, 2002)。然而，蛋白激酶 C $\delta$ 也是一個 TNF- $\alpha$ 調控促進細胞凋亡之重要成員。另一研究證據：藉著轉染外生性蛋白激酶 C $\delta$ 與主要活化區域突變 (K376R) 成無活性的蛋白激酶 C $\delta$ 載體至非小細胞肺癌細胞，發現蛋白激酶 C $\delta$ 扮演細胞凋亡的抑制劑，提升非小細胞肺癌細胞之存活，而主要活化區域突變 (K376R) 成無活性的蛋白激酶 C $\delta$ 促使 H1355、H1155 與 H157 等非小細胞肺癌細胞走向細胞凋亡 (Clark *et al.*, 2003)。

神經細胞處於惡劣環境如暫時性低血糖、腦外傷造成細胞死亡，鳥胺酸去羧化酶蛋白質與 putrescine 增加的情況 (Schipper *et al.*, 2000)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成許多得細胞走向細胞凋亡。PE 細胞處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後提高鳥胺酸去羧化酶的活性 (Otieno *et al.*, 2000)。人類胃癌 (SNU638) 細胞中提高鳥胺酸去羧化酶表現延遲 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起之細胞凋亡 (Park *et al.*, 2002)。有趣地，許多研究顯示不管正常或腫瘤細胞和組織快速生長時多氨酸的濃度提高，而多氨酸合成受到鳥胺酸去羧化酶調節。抑制鳥胺酸去羧化酶活性可以造成多氨酸的總量、DNA 合成及多種腫瘤癌化情況下降 (Kingsnorth *et al.*, 1983)。TPA 可以活化蛋白激酶 C，因為蛋白激酶 C 是 TPA 主要細胞內接受器。蛋白激酶 C $\delta$ 轉殖鼠以 TPA 處理其上皮，觀察到上皮的鳥胺酸去羧化酶活性增加的現象 (Wheeler *et al.*, 2002)。在 SNU638 細胞中提高鳥胺酸去羧化酶表現抑制 $\gamma$ -放射線引發的細胞凋亡 (Park *et al.*,

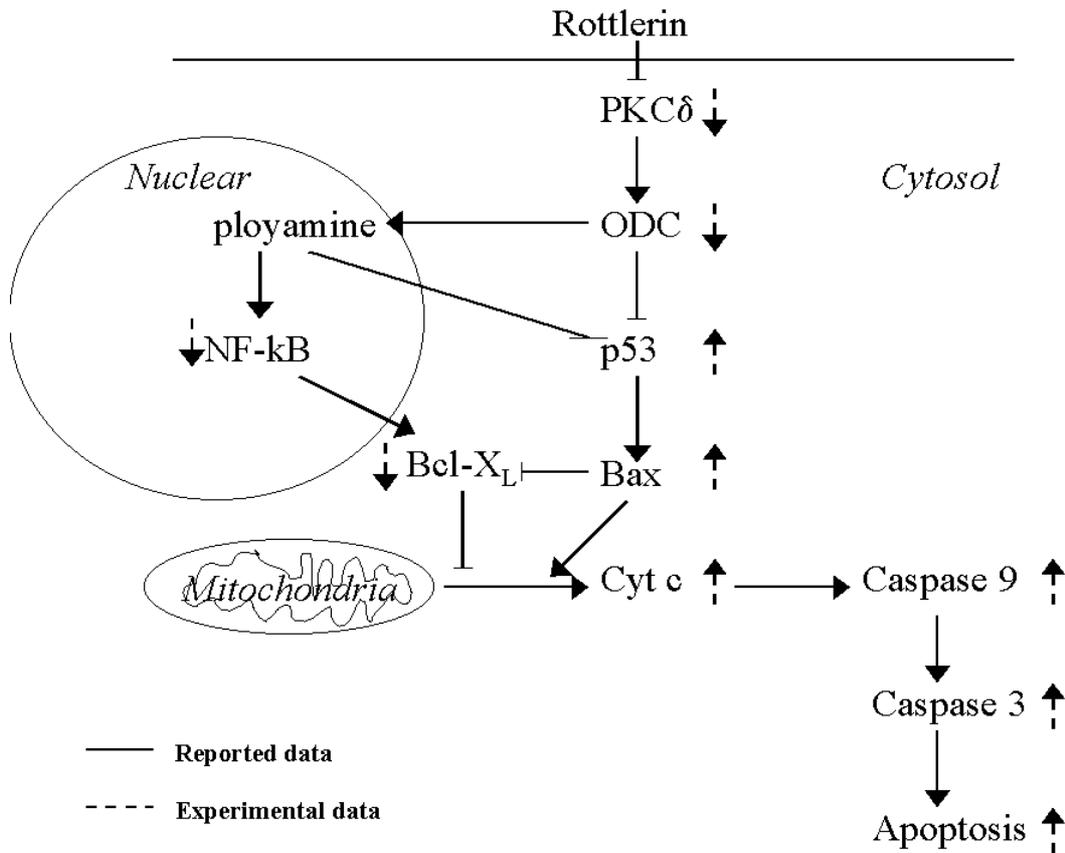
2002)。PE 細胞轉染無活性蛋白激酶 C $\delta$ 的載體阻擋鳥胺酸去羧化酶誘發 (Otieno *et al.*, 2000)。治療癌症中促進細胞凋亡是其中一個重要角色。臨床研究團體正在尋找或設計抑制蛋白激酶 C 和鳥胺酸去羧化酶方法以達到治療腫瘤的目的。本實驗發現 rottlerin 能夠抑制鳥胺酸去羧化酶的活性，因此建議鳥胺酸去羧化酶活性下降可能與 rottlerin 引起細胞凋亡有關。

細胞受到各種壓力下高度表現鳥胺酸去羧化酶提高細胞存活與防禦細胞凋亡，而瞭解鳥胺酸去羧化酶是細胞存活的必要蛋白質 (Park *et al.*, 2002)。本實驗觀察鳥胺酸去羧化酶的酰胺酸磷酸化下降進而影響鳥胺酸去羧化酶活性，因為 rottlerin 是一種蛋白激酶 C 專一性抑制劑而調節鳥胺酸去羧化酶磷酸化。鳥胺酸去羧化酶屬於磷酸化蛋白質，磷酸化的鳥胺酸去羧化酶具有較高穩定性與酵素活性 (Reddy *et al.*, 1996)。在防禦 rottlerin 引發的細胞凋亡中瞭解鳥胺酸去羧化酶是必要蛋白質藉著調節鳥胺酸去羧化酶轉錄作用，但是鳥胺酸去羧化酶的後轉譯作用如經由蛋白激酶 C $\delta$ 直接或間接活化鳥胺酸去羧化酶磷酸化可能也是一個調節蛋白酵素活性重要階段。研究知道一些蛋白激酶如 cAMP 依賴性蛋白激酶無法直接磷酸化鳥胺酸去羧化酶，這些蛋白激酶可能磷酸化其他的蛋白激酶而使得鳥胺酸去羧化酶磷酸化 (Tipinis *et al.*, 1990)。因此，了解此類蛋白激酶屬於活化鳥胺酸去羧化酶的磷酸化之階層較高的蛋白激酶。

血清與 TPA 兩者都能夠促進鳥胺酸去羧化酶活性上升 (Mar *et al.*, 1995)。TPA (5 ng/ml) 與 5  $\mu$ M rottlerin 一起處理細胞觀察鳥胺酸去羧化酶的抑制情況，得到與血清/rottlerin 處理細胞的情況有類似結果。在實驗過程中以血清刺激鳥胺酸去羧化酶活化，觀察 rottlerin 對細胞的鳥胺酸去羧化酶之影響。細胞週期的 G1 階段主要是細胞增生和細胞 DNA 複製前的檢查哨。鳥胺酸去羧化酶為細胞週期 G1-S 轉變參與其中作用蛋白質之一 (Fuller *et al.*, 1977)。實驗結果支持鳥胺酸去羧化酶被抑制導致細胞週期停滯於 G1 時期、提高細胞凋亡或兩者都發生。當提高鳥胺酸去羧化酶表現使得細胞停滯於 G1 階段，

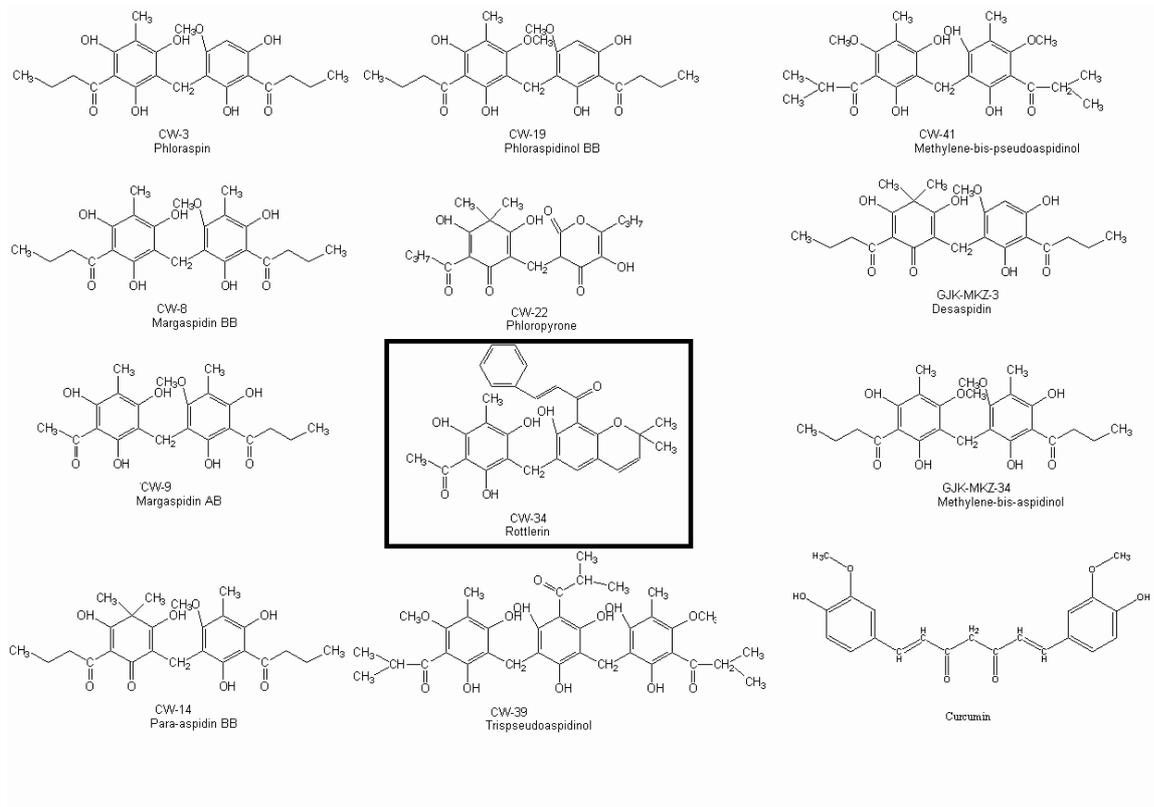
這樣的結果延遲或防止細胞凋亡。實驗使用不同濃度的血清刺激鳥胺酸去羧化酶表現，更加證實鳥胺酸去羧化酶抑制 rottlerin 引發的細胞凋亡與讓細胞停留於 G1 時期。多氨酸減少的时候，細胞會停滯於細胞週期 G1 時期，也能促進細胞走向細胞凋亡（Nitta *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2001）。因此細胞選擇走向細胞凋亡或選擇細胞週期滯留藉著調節鳥胺酸去羧化酶活性變化來進行抉擇。

## 結論 (Conclusion)

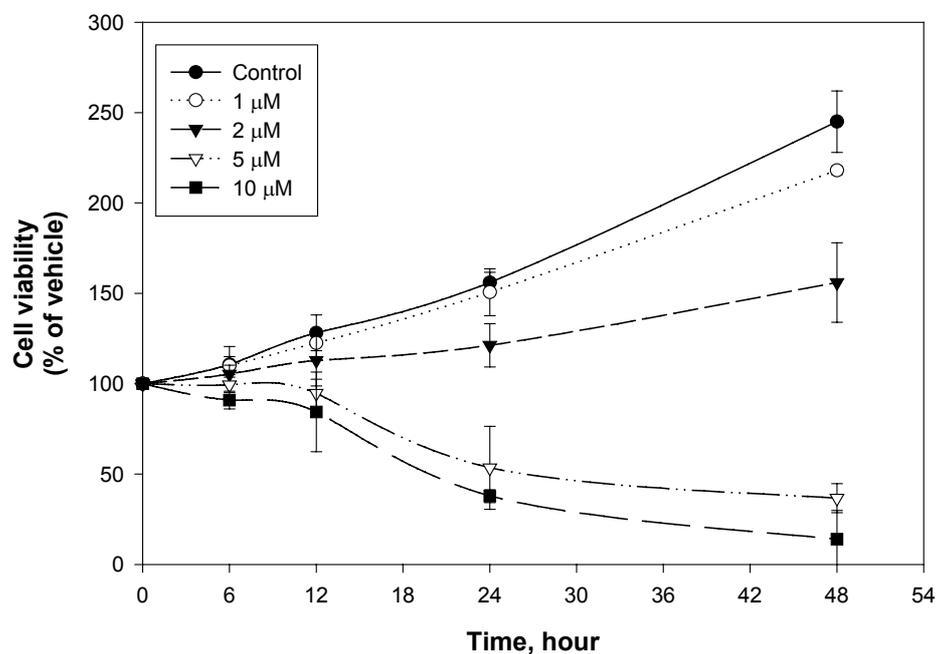


本篇的結論，證實在 HL60 細胞 rottlerin 藉著抑制蛋白激酶 C $\delta$ 造成鳥胺酸去羧化酶活性下降使得細胞走向細胞凋亡。Rottlerin 引發細胞凋亡是屬於 caspase 依賴性造成細胞死亡的途徑，此外，使得鳥胺酸去羧化酶酰胺酸磷酸化下降影響蛋白質穩定性與其酵素活性的減少。未來將繼續探討鳥胺酸去羧化酶那些的酰胺酸磷酸化影響蛋白質穩定性與其酵素活性，及與細胞凋亡的關係。

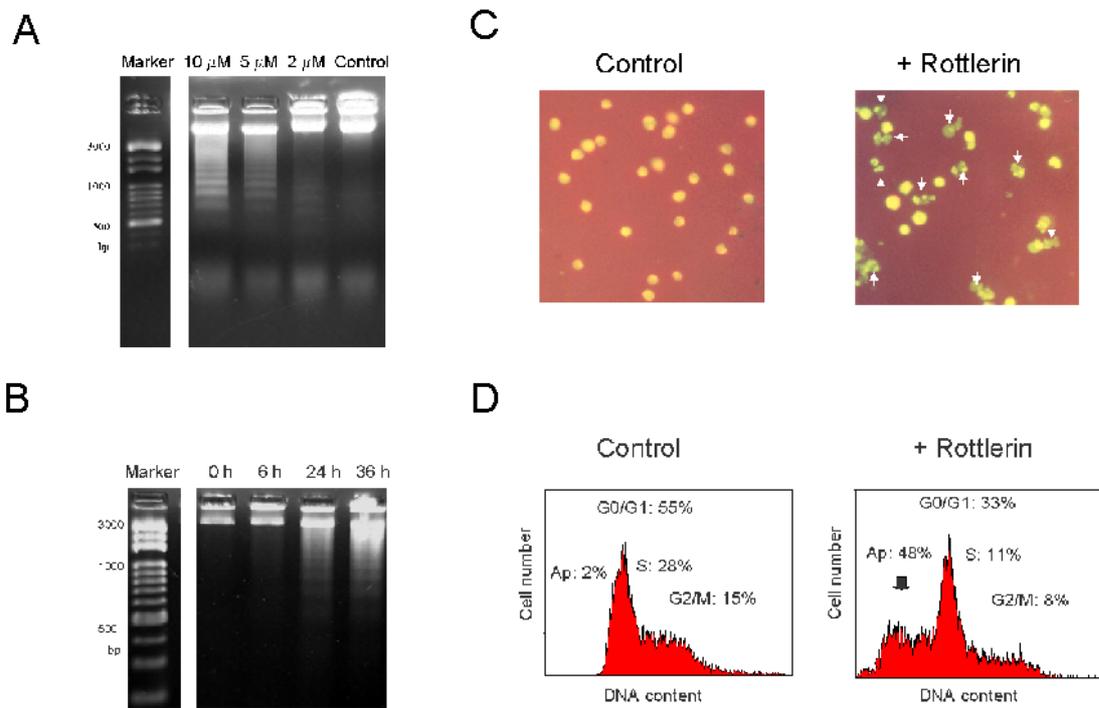
圖 (Figure) 與表 (Table)



圖一. Structure of some natural compounds. Rottlerin was used in this study.

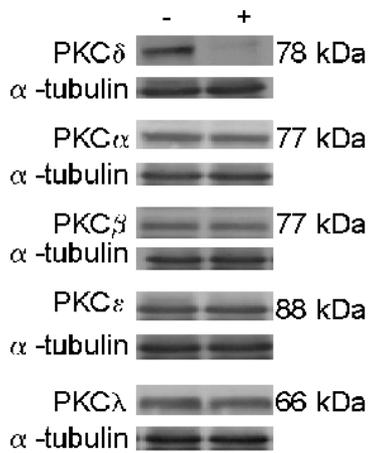


**圖二. Effect of rottlerin on HL60 cell proliferation.** Exponentially growing HL60 cells were exposed to DMSO (●) and 1 μM (○), 2 μM (▼), 5 μM (▽), 10 μM (■) of rottlerin. HL60 cells were seeded at  $2 \times 10^6$  /ml in 60 mm petri dishes. Cell numbers and viability were determined by trypan blue dye exclusion by using a hemocytometer chamber at the indicated times. Data are represented as means  $\pm$  SD of three individual experiments.

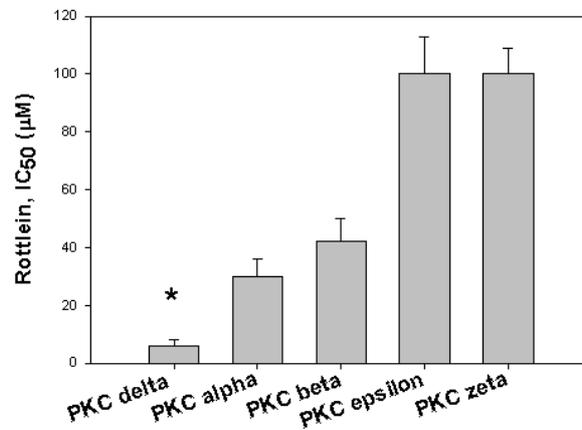


**圖三. Rottlerin-induced apoptosis of HL60 cells.** (A) Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from HL60 cells that were treated with dimethyl sulfoxide (DMSO, control), 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M or 10  $\mu$ M rottlerin ,respectively, for 24 h. (B) Cells were each exposed to 5  $\mu$  M rottlerin for 0, 6, 12, 24, 36 h. (C) Acridine Orange-stained condensed chromatin was detected in HL60 cells treated with 5  $\mu$  M rottlerin for 24 h. (D) The appearance of cell apoptosis (Ap) using PI staining and flow cytometry was determined in cells treated with DMSO or 5  $\mu$ M rottlerin for 24 h. Data are represented as means  $\pm$  SD of three individual experiments.

A

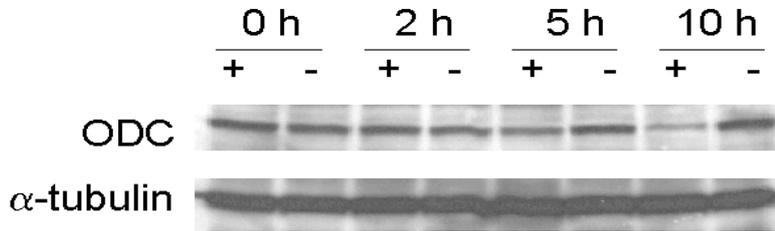


B

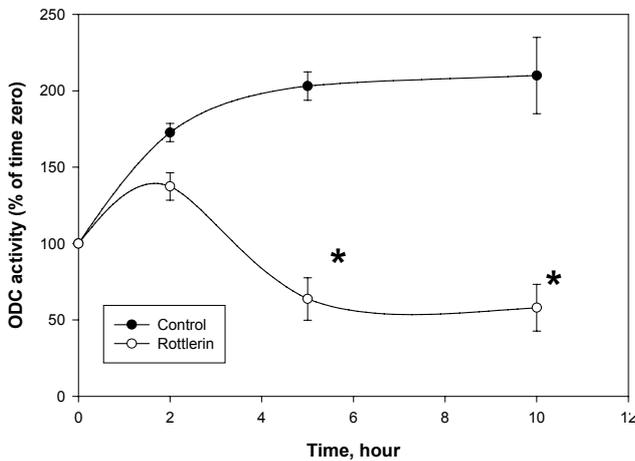


**圖四. Change in the levels of PKC isoforms following rottlerin treatment.** (A) HL60 cells were left untreated (-) or were treated with 5  $\mu$ M rottlerin (+) for 10 h and were detected PKC isoforms by immunoblotting analysis. (B) Protein kinase C families were suppressed with IC<sub>50</sub> values as described in reference. \* Indicate the concentration <10  $\mu$ M.

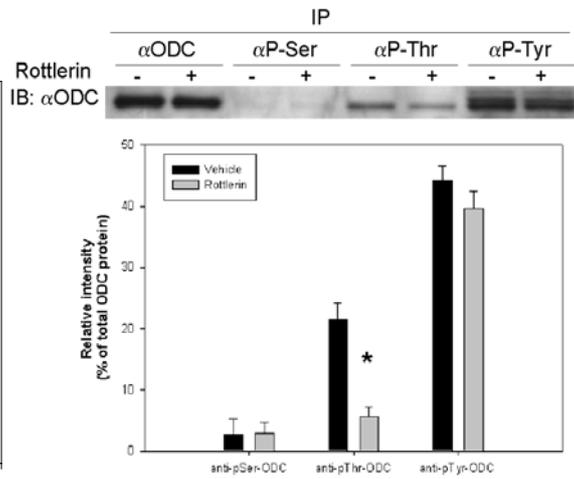
A



B

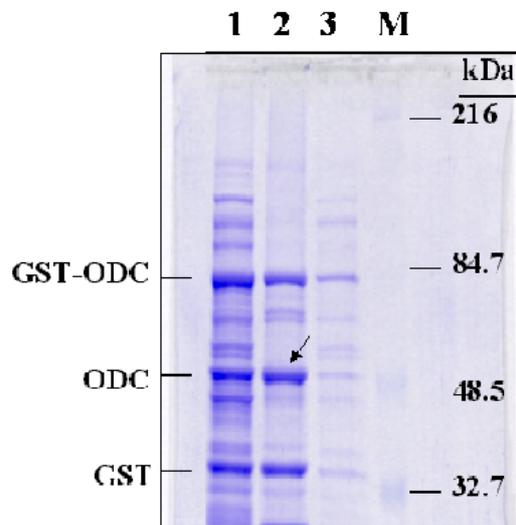


C

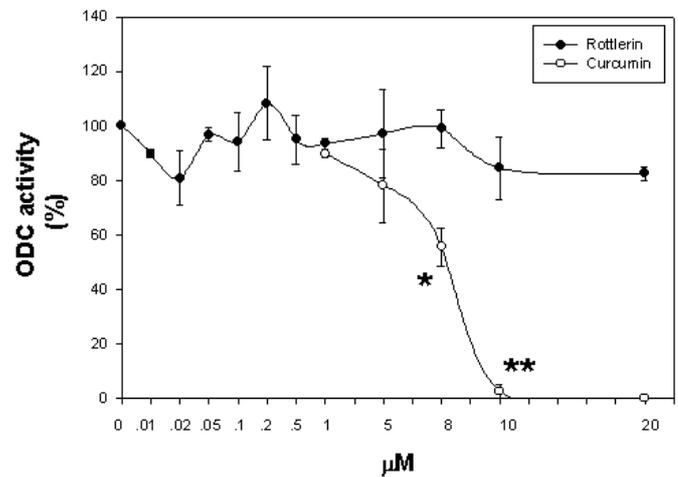


**圖五. Change in the levels of ODC following rottlerin treatment. HL60 cells were treated for the indicated times with 5  $\mu$ M rottlerin. (A) ODC protein was determined by immunoblot analysis. (B) ODC activity was determined using assay of chemiluminescence. (C) HL60 cells were treated with 5  $\mu$ M rottlerin for 3 h. Lysates from HL60 cells were subjected to immunoprecipitation with either anti-phosphoserine ( $\alpha$  P-Ser), anti-phosphothreonine ( $\alpha$  P-Thr), anti-phosphotyrosine ( $\alpha$  P-Tyr), or anti-ODC ( $\alpha$  ODC) antibodies. Immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with anti-ODC antibody. \*  $P < 0.05$  as compared to cell treatment without rottlerin. Data are means  $\pm$  SD of three experiments.**

A

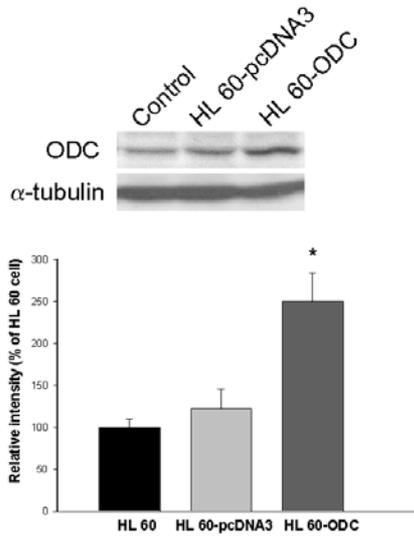


B

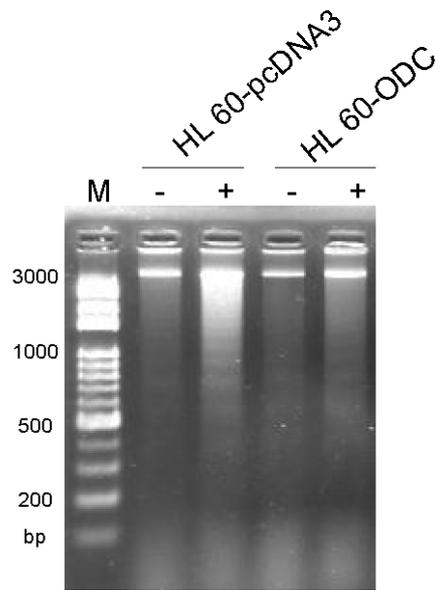


**圖六. Expression of recombinant GST-ODC (rODC) fusion protein and the activity of ODC after rottlerin treatment.** (A) Several bands are present in the lysates of *E. coli* BL21 cells containing a pGEX-6P-2 plasmid coding GST-ODC. Lane 1, Bacterial lysates. Lane 2, Elute with 10 mM glutathione (GSH) buffer. Lane 3, after elution, column wash. (B) Different concentrations of rottlerin regulated *in vitro* ODC activity. Curcumin is a positive control. \*  $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  as compared to rODC treatment without curcumin.

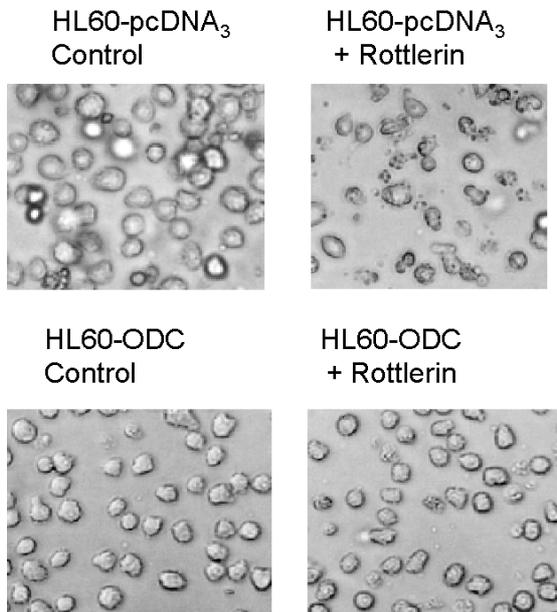
A



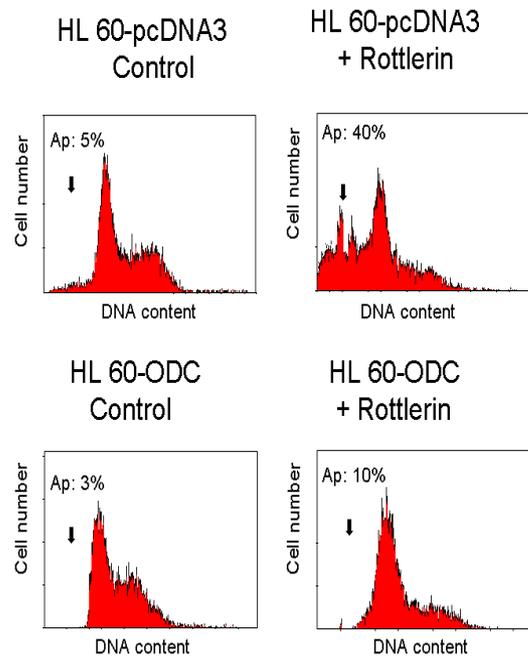
C



B

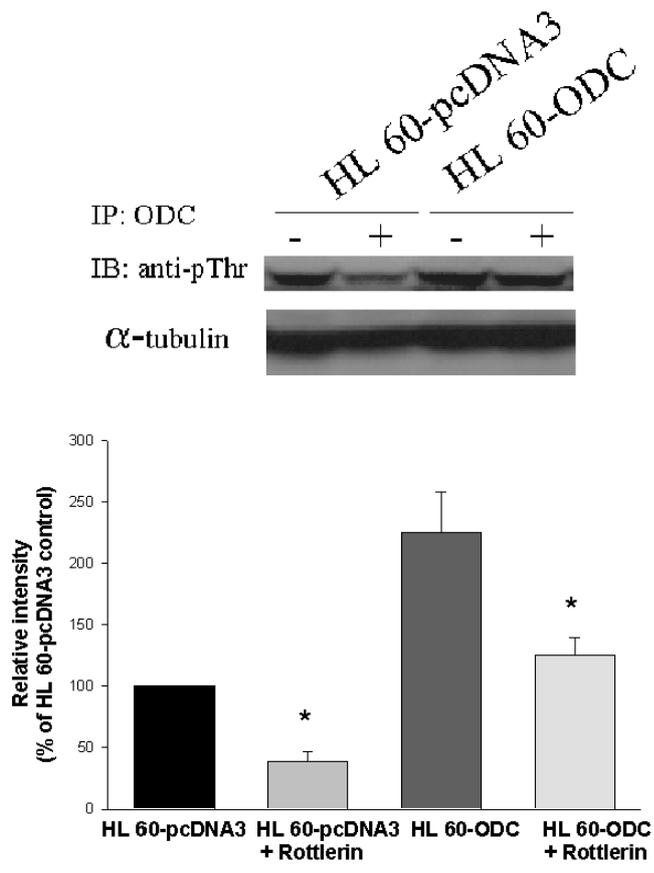


D



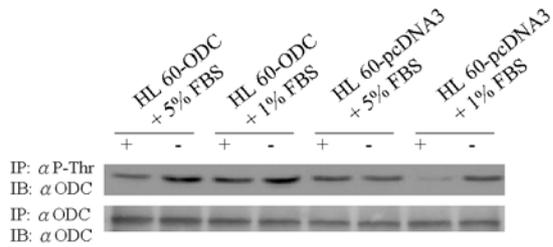
**圖七. HL60-pcDNA3 and HL60-ODC cells were treated with 5  $\mu$ M rottlerin for 24 h. (A)**

Charaterization of cell overexpressing ODC. Equal amounts of denatured protein (60  $\mu$ g) from parental HL60 cell and cells transfected with vector only or ODC cDNA were resolved by SDS-PAGE (8%), transferred proteins were immunoblotted with anti-ODC antibody. \*  $p < 0.05$  as compared to HL60 or HL60-pcDNA3 cells. (B) Morphology change of cells observed under 200x magnification. (C) Low-molecular weight DNA was isolated from HL60-pcDNA3 and HL60-ODC cells and sample were subjected to electrophoresis. DNA fragmentation was visualized as oligonucleosome-sized fragmentation in ethidium bromide after DNA agarose gel electrophoresis. (D) Cell apoptosis was detected by PI staining and flow cytometry in cells treated with DSMO or rottlerin for 24 h.

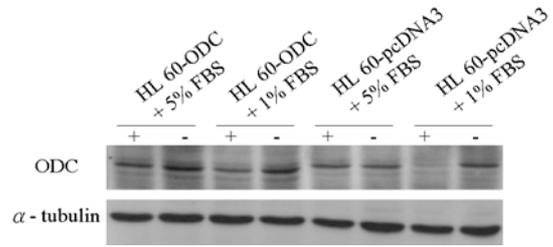


**圖八. Induction of threonine phosphorylation in HL60-ODC cells.** HL60 pcDNA3 and HL60-ODC were stimulated with (+) or without (-) 5  $\mu$ M rottlerin. After 3 h of stimulation, the cells were lysed and the proteins in each lysate were immunoprecipitated and separated by SDS-PAGE before being transferred onto a nitrocellulose membrane. \* P<0.05 as compared to HL60 or HL60-pcDNA3 cells

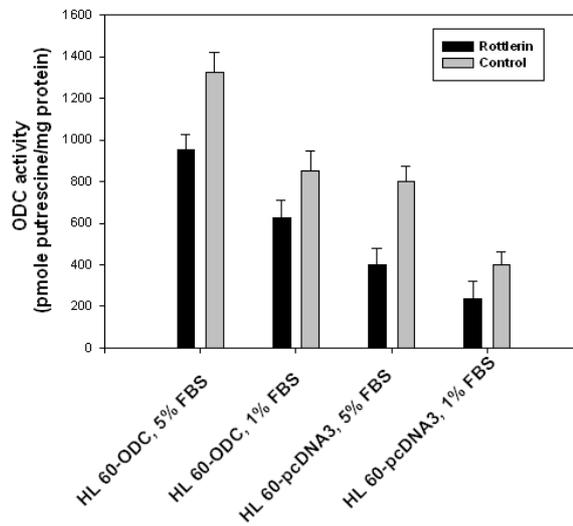
A



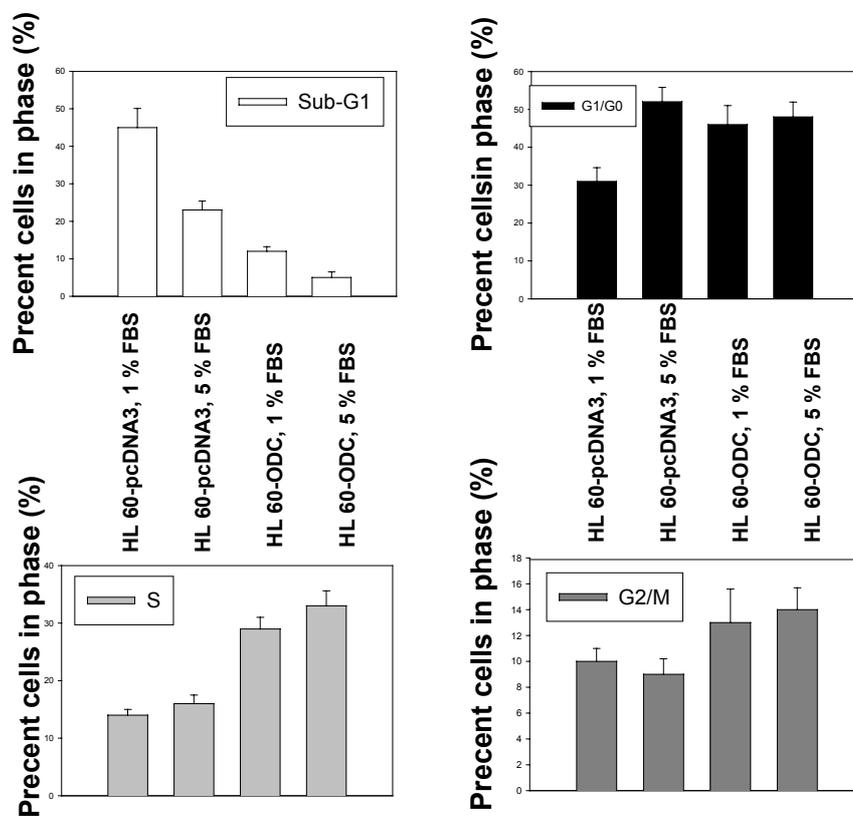
B



C

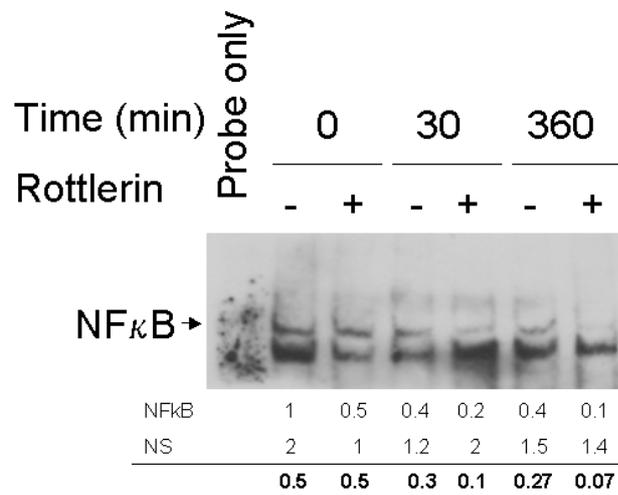


**圖九. Rottlerin inhibits the induced change of ODC in different concentration of fetal bovine serum (FBS).** (A) Cells were treated for 3 h and phosphothreonine of ODC proteins were measured in phosphothreonine or ODC immunoprecipitates (IP) by using anti-ODC antibody immunoblotting analysis. (B) After 5 h incubation, rottlerin-treated HL60-pcDNA3 and HL60-ODC cells were examined the levels of ODC protein and (C) assayed for ODC activity. data are means  $\pm$  SD of three experiments.

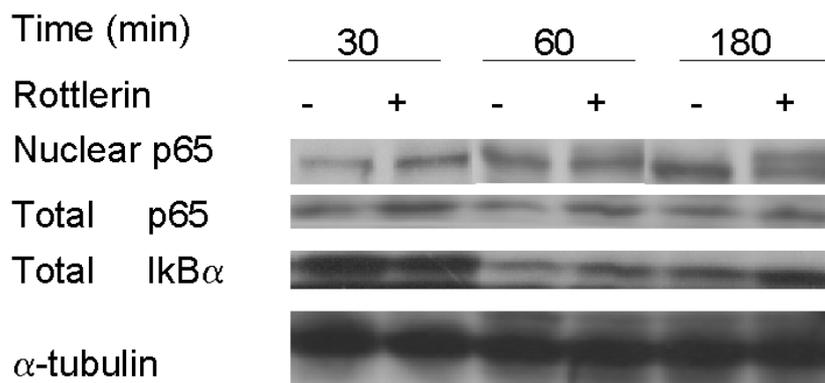


**圖十. Cell cycle distribution after serum treatment on rottlerin-treated transfected HL60 cells.** HL60-pcDNA3 and HL60-ODC cells were cultured under RPMI 1640-10% FBS for 12 h and added 1% FBS or 5% FBS before treatment with 5  $\mu$ M rottlerin. Cells were stimulated with rottlerin for 24 h. The cell cycle profile was measured using PI staining and flow cytometry. Data are means  $\pm$  SD of three experiments.

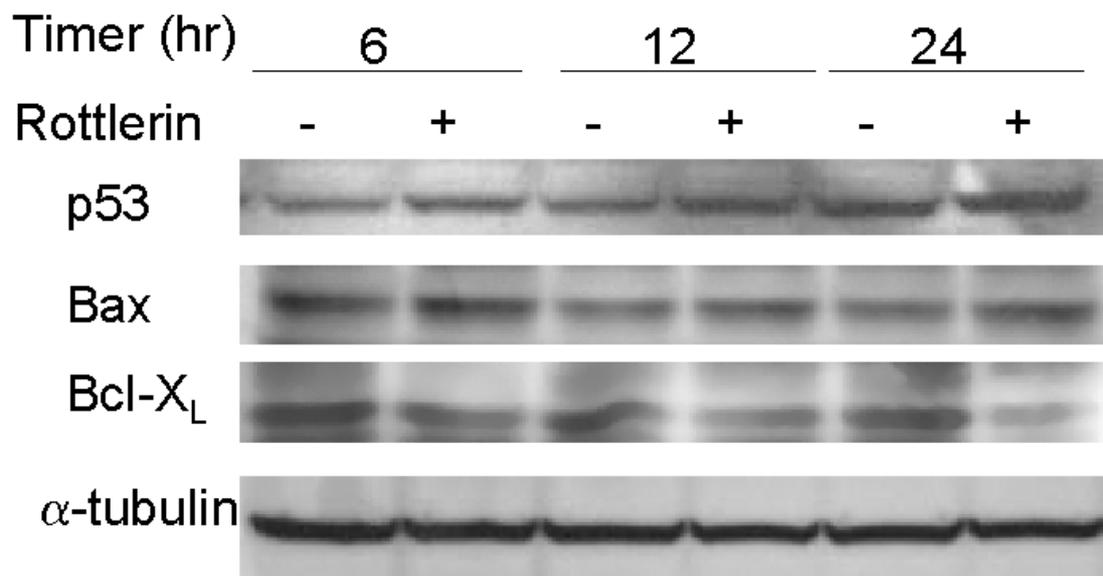
A



B

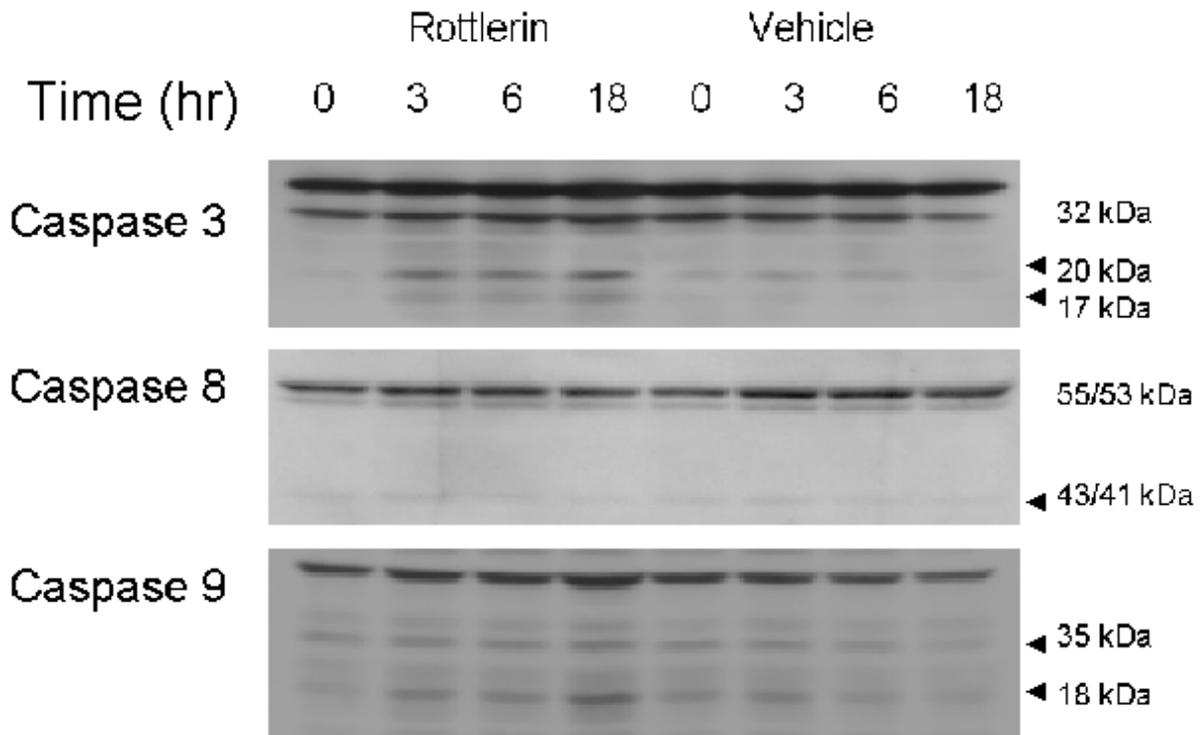


圖十一. (A) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) showing the effects of rottlerin on NFκ-B activation and Ap1 activation. (B) Immunoblotting of cell lysates using p65 and IκBα antibodies showing the fate of p65 and IκBα after stimulation with rottlerin (5 μM). NS, non specific.

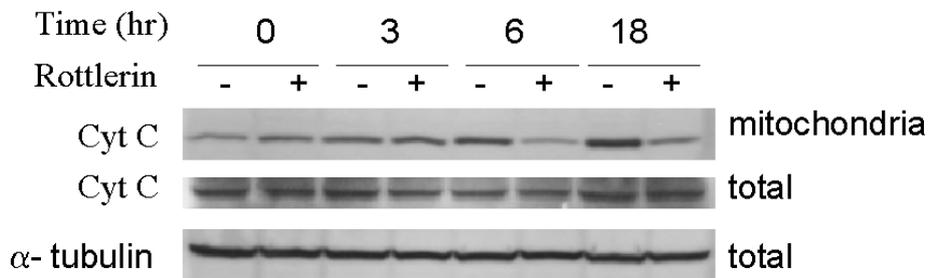


**圖十二. Rottlerin treatment leads to increase of p53, bax and decrease of Bcl-XL protein levels.** Immunoblot depict the level of p53, Bax and Bcl-XL proteins in total protein extracts prepared from untreated cells and HL60 cells at different times after exposure to 5  $\mu$ M rottlerin.

A



B



**圖十三. Effect of rottlerin on caspase processing and cytochrome c release.** HL60 cells were treated with 5 mM rottlerin for 0, 3, 6, 18 h. (A) Analysis of the processing of caspase 3, caspase 8 and caspase 9. Whole cell extracts were analyzed by western blot with antibodies against caspase 3, 8 and 9. The migration position of precursor forms and the cleavage products caspase 3 (20 and 17 kDa), 8 (43/41 kDa) and 9 (35 and 18 kDa).

表一. Cell cycle profile of HL60-pcDNA3 and HL60-ODC cells in response to rottlerin.

Cell	Inhibitor	Distribution of cell cycle profile (%)			
		Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
HL 60-pcDNA3	-	10 ± 2.3	43 ± 5.6	33 ± 3.7	14 ± 2.2
HL 60-pcDNA3	Rottlerin	50 ± 7.4*	25 ± 4.1*	19 ± 1.4*	6 ± 1.6*
HL 60-ODC	-	3 ± 1.9	50 ± 7.8	38 ± 2.5	9 ± 1.8
HL 60-ODC	Rottlerin	10 ± 3.0#	65 ± 9.9#	17 ± 1.8*	8 ± 1.2

The cells were harvested at 24 h after treatment with 2.5% FBS and 5 μM rottlerin. Harvested cells were fixed in 80% ethanol on ice then resuspended in DNA prep stain containing propidium iodide to allow analysis by flow cytometry. Results are expressed as means ± SD of three individual experiments. \*P<0.05, compared to the corresponding untreated group. #P<0.05, Comparison between HL60-pcDNA3 and HL60-ODC cells under same treatment condition.

## 参考文献 (References)

Almud JJ, Oliveira MA, Kern AD, Grishin NV, Phillips MA, and Hackert ML. Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *J Mol Biol* 295: 7-16, 2000.

Balasundaram D and Tyagi AK. Polyamine--DNA nexus: structural ramifications and biological implications. *Mol Cell Biochem* 100: 129-140, 1991.

Bates S and Vousden KH. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 55: 28-37, 1999.

Bello-Fernandez C, Packham G, and Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7804-7808, 1993.

Chao DT and Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16: 395-419, 1998.

Clark AS, West KA, Blumberg PM, and Dennis PA. Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells: PKCdelta promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res* 63: 780-786, 2003.

Cross T, Griffiths G, Deacon E, Sallis R, Gough M, Watters D, and Lord JM. PKC-delta is an apoptotic lamin kinase. *Oncogene* 19: 2331-2337, 2000.

da Rocha AB, Mans DR, Regner A, and Schwartzmann G. Targeting protein kinase C: new therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas? *Oncologist* 7: 17-33, 2002.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, and Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351: 95-105, 2000.

Desagher S and Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10: 369-377, 2000.

Flamigni F, Facchini A, Capanni C, Stefanelli C, Tantini B, and Caldarera CM. p44/42 mitogen-activated protein kinase is involved in the expression of ornithine decarboxylase in leukaemia L1210 cells. *Biochem J* 341 ( Pt 2): 363-369, 1999.

Flamigni F, Marmiroli S, Meggio F, Guarnieri C, and Pinna LA. Phosphorylation of ornithine decarboxylase in intact erythroleukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1052: 345-347, 1990.

Fuller DJ, Gerner EW, and Russell DH. Polyamine biosynthesis and accumulation during the G1 to S phase transition. *J Cell Physiol* 93: 81-88, 1977.

Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, Ratnofsky S, Quinlan C, Emoto Y, Pandey P, Datta R, Huang Y, Kharbanda S, Allen H, Kamen R, Wong W, and Kufe D. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med* 184: 2399-2404, 1996.

Gschwendt M. Protein kinase C delta. *Eur J Biochem* 259: 555-564, 1999.

Gschwendt M, Kittstein W, Furstenberger G, and Marks F. The mouse ear edema: a quantitatively evaluable assay for tumor promoting compounds and for inhibitors of tumor promotion. *Cancer Lett* 25: 177-185, 1984.

Gschwendt M, Muller HJ, Kielbassa K, Zang R, Kittstein W, Rincke G, and Marks F. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 93-98, 1994.

Haimovitz-Friedman A, Kolesnick RN, and Fuks Z. Modulation of the Apoptotic Response: Potential for Improving the Outcome in Clinical Radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* 6: 273-283, 1996.

Jansen AP, Dreckschmidt NE, Verwiebe EG, Wheeler DL, Oberley TD, and Verma AK. Relation of the induction of epidermal ornithine decarboxylase and hyperplasia to the different skin tumor-promotion susceptibilities of protein kinase C alpha, -delta and -epsilon transgenic mice. *Int J Cancer* 93: 635-643, 2001.

Kanamoto R, Kameji T, Iwashita S, Igarashi K, and Hayashi S. Spermidine-induced destabilization of ornithine decarboxylase (ODC) is mediated by accumulation of antizyme in ODC-overproducing variant cells. *J Biol Chem* 268: 9393-9399, 1993.

Kilpatrick LE, Lee JY, Haines KM, Campbell DE, Sullivan KE, and Korchak HM. A role for PKC-delta and PI 3-kinase in TNF-alpha-mediated antiapoptotic signaling in the human neutrophil. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C48-57, 2002.

Kingsnorth AN, McCann PP, Diekema KA, Ross JS, and Malt RA. Effects of alpha-difluoromethylornithine on the growth of experimental Wilms' tumor and renal adenocarcinoma. *Cancer Res* 43: 4031-4034, 1983.

Lee SK and Pezzuto JM. Evaluation of the potential of cancer chemopreventive activity mediated by inhibition of 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity. *Arch Pharm Res* 22: 559-564, 1999.

Leitges M, Elis W, Gimborn K, and Huber M. Rottlerin-independent attenuation of pervanadate-induced tyrosine phosphorylation events by protein kinase C-delta in hemopoietic cells. *Lab Invest* 81: 1087-1095, 2001.

Li W, Zhang J, Flechner L, Hyun T, Yam A, Franke TF, and Pierce JH. Protein kinase C-alpha overexpression stimulates Akt activity and suppresses apoptosis induced by interleukin 3 withdrawal. *Oncogene* 18: 6564-6572, 1999.

Mar PK, Kumar AP, Kang DC, Zhao B, Martinez LA, Montgomery RL, Anderson L, and Butler AP. Characterization of novel phorbol ester- and serum-responsive sequences of the rat ornithine decarboxylase gene promoter. *Mol Carcinog* 14: 240-250, 1995.

Mitchell JL, Hoff JA, and Bareyal-Leyser A. Stable ornithine decarboxylase in a rat hepatoma cell line selected for resistance to alpha-difluoromethylornithine. *Arch Biochem Biophys* 290: 143-152, 1991.

Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi S, Tanahashi N, and Tanaka K. Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 1-6, 2000.

Nemoto T, Kamei S, Seyama Y, and Kubota S. p53 independent G(1) arrest induced by DL-alpha-difluoromethylornithine. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 848-854, 2001.

Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308: 693-698, 1984.

Nitta T, Igarashi K, and Yamamoto N. Polyamine depletion induces apoptosis through mitochondria-mediated pathway. *Exp Cell Res* 276: 120-128, 2002.

Otieno MA and Kensler TW. A role for protein kinase C-delta in the regulation of ornithine decarboxylase expression by oxidative stress. *Cancer Res* 60: 4391-4396, 2000.

Park JK, Chung YM, Kang S, Kim JU, Kim YT, Kim HJ, Kim YH, Kim JS, and Yoo YD. c-Myc exerts a protective function through ornithine decarboxylase against cellular insults. *Mol Pharmacol* 62: 1400-1408, 2002.

Pegg AE and McCann PP. Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 243: C212-221, 1982.

Pendeville H, Carpino N, Marine JC, Takahashi Y, Muller M, Martial JA, and Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Mol Cell Biol* 21: 6549-6558, 2001.

Poulin R, Lu L, Ackermann B, Bey P, and Pegg AE. Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *J Biol Chem* 267: 150-158, 1992.

Ray RM, McCormack SA, and Johnson LR. Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and Caco-2 cells by different mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G37-43, 2001.

Reddy SG, McLlheran SM, Cochran BJ, Worth LL, Bishop LA, Brown PJ, Knutson VP, and Haddox MK. Multisite phosphorylation of ornithine decarboxylase in transformed macrophages results in increased intracellular enzyme stability and catalytic efficiency. *J Biol Chem* 271: 24945-24953, 1996.

Rosen A and Casciola-Rosen L. Clearing the way to mechanisms of autoimmunity. *Nat Med* 7: 664-665, 2001.

Rosenberg-Hasson Y, Strumpf D, and Kahana C. Mouse ornithine decarboxylase is phosphorylated by casein kinase-II at a predominant single location (serine 303). *Eur J Biochem* 197: 419-424, 1991.

Russell DH. Ornithine decarboxylase: a key regulatory enzyme in normal and neoplastic growth. *Drug Metab Rev* 16: 1-88, 1985.

Schipper RG, Penning LC, and Verhofstad AA. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin Cancer Biol* 10: 55-68, 2000.

Schipper RG and Verhofstad AA. Distribution patterns of ornithine decarboxylase in cells and tissues: facts, problems, and postulates. *J Histochem Cytochem* 50: 1143-1160, 2002.

Shao RG, Cao CX, and Pommier Y. Activation of PKC $\alpha$  downstream from caspases during apoptosis induced by 7-hydroxystaurosporine or the topoisomerase inhibitors, camptothecin and etoposide, in human myeloid leukemia HL60 cells. *J Biol Chem* 272: 31321-31325, 1997.

Sharma S, Stutzman JD, Kelloff GJ, and Steele VE. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res* 54: 5848-5855, 1994.

Soltoff SP. Rottlerin is a mitochondrial uncoupler that decreases cellular ATP levels and indirectly blocks protein kinase Cdelta tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 276: 37986-37992, 2001.

Sumitomo M, Shen R, Goldberg JS, Dai J, Navarro D, and Nanus DM. Neutral endopeptidase promotes phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells by inhibiting neuropeptide-induced protein kinase C delta degradation. *Cancer Res* 60: 6590-6596, 2000.

Tabor CW and Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53: 749-790, 1984.

Thomas TJ and Messner RP. Beneficial effects of a polyamine biosynthesis inhibitor on lupus in MRL-lpr/lpr mice. *Clin Exp Immunol* 78: 239-244, 1989.

Tipnis UR and Haddox MK. Phosphorylation of ornithine decarboxylase by casein kinase II from RAW264 cells. *Cell Mol Biol* 36: 275-289, 1990.

Toker A and Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673-676, 1997.

Walczak H and Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256: 58-66, 2000.

Wang Y and Bachrach U. A luminescence-based test for determining ornithine decarboxylase activity. *Anal Biochem* 287: 299-302, 2000.

Wert MM and Palfrey HC. Divergence in the anti-apoptotic signalling pathways used by nerve growth factor and basic fibroblast growth factor (bFGF) in PC12 cells: rescue by bFGF involves protein kinase C delta. *Biochem J* 352 Pt 1: 175-182, 2000.

Wheeler DL, Reddig PJ, Dreckschmidt NE, Leitges M, and Verma AK. Protein kinase Cdelta-mediated signal to ornithine decarboxylase induction is independent of skin tumor suppression. *Oncogene* 21: 3620-3630, 2002.

Whelan RD and Parker PJ. Loss of protein kinase C function induces an apoptotic response. *Oncogene* 16: 1939-1944, 1998.

Williams RC, Jr., Sibbitt WL, Jr., and Husby G. Oncogenes, viruses, or rheumogenes? *Am J Med* 80: 1011-1016, 1986.

Worth LL, Cochran BJ, and Haddox MK. Phosphorylation of ornithine decarboxylase at both serine and threonine residues in the ODC-overproducing, Abelson virus-transformed RAW264 cell line. *Cancer Res* 54: 3967-3970, 1994

Zou C, Vlastos AT, Yang L, Wang J, Nishioka K, and Follen M. Effects of difluoromethylornithine on growth inhibition and apoptosis in human cervical epithelial and cancerous cell lines. *Gynecol Oncol* 85: 266-273, 2002.

## 附錄

LB (1 L), pH 7.5 :

10 g tryptone

5 g yeast extract

5 g NaCl

LB plate (1 L), pH 7.5 :

10 g tryptone

5 g yeast extract

5 g NaCl

15 g agar

Temp. → 55 °C to distribute plate (25 ml/per)

Ps: Work ampicillin (100 µg/ml) 或 kanamycin (30 µg/ml)

Stab agar (nutrient agar, 200 ml) :

1.6 g nutrient broth

1.2 g agar

Temp. → 55 °C to distribute 1 ml tube

TENE buffer (100 ml), pH 8.0 :

1 ml 1 M Tris

2.5 ml 20% SDS

0.5 ml 200 mM EDTA, pH 8.0

94 ml ddH<sub>2</sub>O

3 M NaOAc, pH 5.2 with acetic acid

TfbI (200 ml) :

30 mM Potassium acetate (KOAc)

100 mM KCl

10 mM Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

250 mM Manganese chloride ( $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

15% glycerol

pH 5.8 with acetic acid

TfbII (100 ml) :

10 mM MOPS

75 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

10 mM KCl

15% glycerol

pH 6.5 with dilute NaOH

Coomassive staining solution :

50% (v/v) methanol

0.05% (v/v) coomassive brilliant blue R-250

10% (v/v) acetic acid

40%  $\text{H}_2\text{O}$

Destaining solution :

50% methanol

10% acetic acid

40% H<sub>2</sub>O

0.5 M Tris-Cl/SDS, pH 6.8 :

To 40 ml H<sub>2</sub>O add:

6.05 g Tris base

0.4 g SDS (0.4% final)

pH 6.8 with 1N HCl

add H<sub>2</sub>O to 100 ml

1.5 M Tris-Cl/SDS, pH 8.8 :

To 300 ml H<sub>2</sub>O add:

91 g Tris base

2 g SDS

pH 8.8 with 1N HCl

Add H<sub>2</sub>O to 500 ml

Western sample buffer, 6X :

7 ml 0.5 M Tris-Cl/SDS, pH 6.8

3 ml glycerol (30%)

1g SDS (10%)

0.6 ml β-mercaptoethanol (6%)

1.2 mg bromophenol blue

Add H<sub>2</sub>O to 10 ml



Western running buffer (1000 ml), 5X :

15.1 g Tris base

72 g glycerol

5 g SDS

Western transfer buffer (4000 ml), pH 8.1-8.4 :

12.1 g 25 mM Tris base

57.6 g 192 mM glycine

800 ml 20% methanol

add H<sub>2</sub>O to 4000 ml

BES-buffered solution (BBS), 2X :

50 mM N, N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (BES, Calbiochem)

280 mM NaCl

1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.95

800 ml H<sub>2</sub>O

pH 6.95 with 1N NaOH

Add H<sub>2</sub>O to 1000 ml

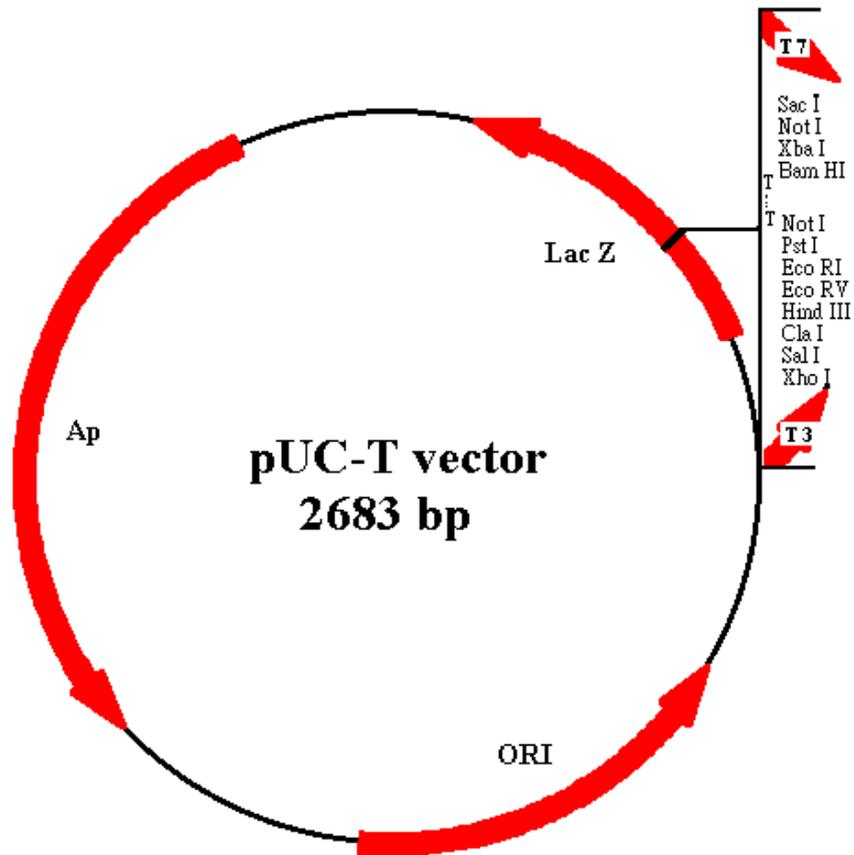
Filter sterilize through 0.45 μm nitrocellulose filter (Nalgene)

CaCl<sub>2</sub>, 2.5 M :

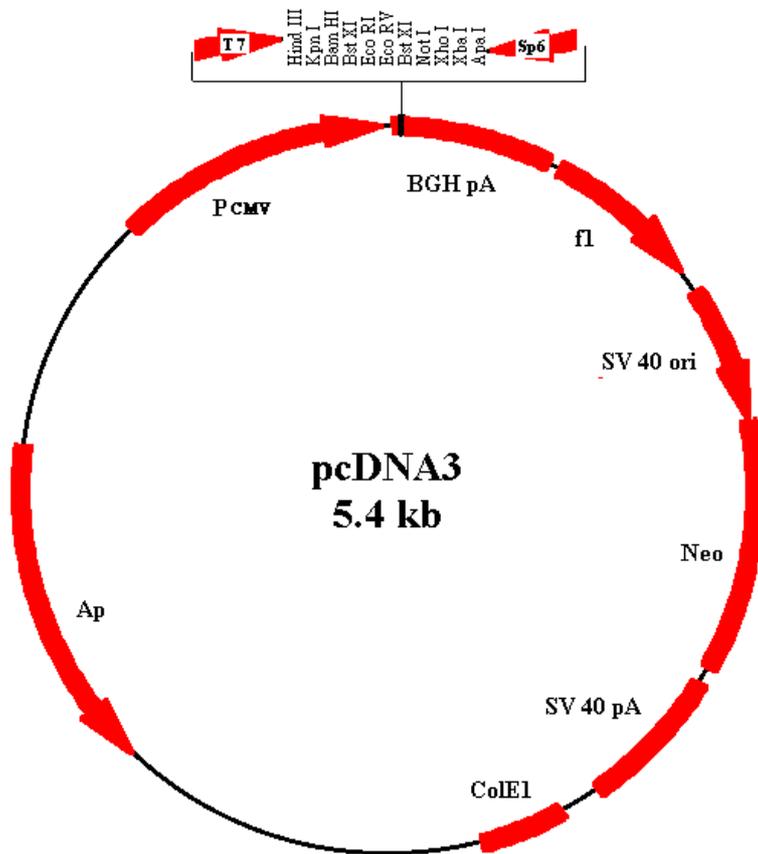
183.7 g CaCl<sub>2</sub> dihydrate (Sigma)

Add H<sub>2</sub>O to 500 ml

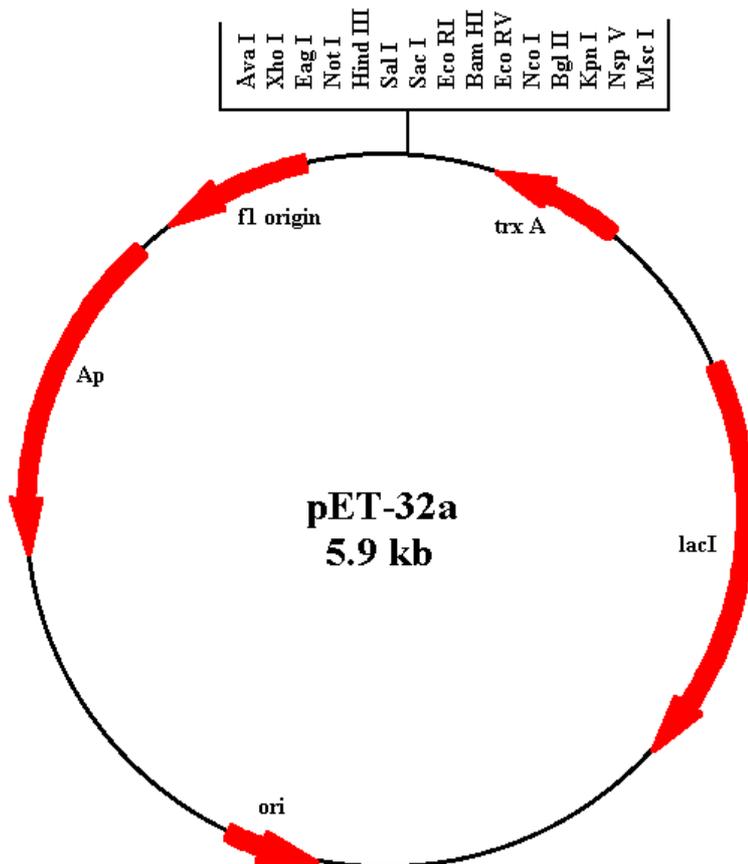
Filter sterilize through 0.45 μm nitrocellulose filter (Nalgene)



pUC-T vector map



pcDNA3 vector map



pET-32a vector map

製備 cDNA 的條件：

	體積 (μl)
RNA + oligo(dT) <sub>15</sub>	17
反轉錄酶的 5 倍反應溶液	5
dNTP (10 mM)	2
M-MLV 反轉錄酶(Promega, 200 U/μl)	1
總體積	25

製備鳥胺酸去羧化酶 cDNA 的條件：

	體積 (μl)	最後濃度
H <sub>2</sub> O	35	
10X PCR buffer	5	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4	2 mM
10 mM dNTP	2	0.4 mM
Primer-R	1	165 ng
Primer-F	1	165 ng
模板	1	10 ng
<i>Tag</i> 聚合酶(MDBio Inc.)	1	5 U
總體積	50	
95°C, 5 分鐘 → 95°C, 1 分鐘; 55°C, 1 分鐘; 72°C, 1 分鐘; 32 個循環 → 72°C, 10 分鐘 → 4°C 直到取出跑電泳		

蛋白質與 DNA 結合作用的條件：

	最終濃度	體積 (μl)
H <sub>2</sub> O		9
10X binding buffer	1X	2
50% glycerol	2.5%	1
100mM MgCl <sub>2</sub>	5mM	1
1% NP-40	0.05%	1
Biotin-DNA	10 pmole	1
Nuclear extract	2 μg	5
總體積 (μl)		20

**Standard curve**

	volumes (μl)					
Dye (Bio-Rad)	200	200	200	200	200	200
H <sub>2</sub> O	800	799	798	795	790	780
Bovine serum albumin (μg/μl)	0	1	2	5	10	20
Conc. (μg/ml)	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>

## Solutions for preparing resolving gels

Solution components	component volumes (ml) per gel mold volume of							
	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%								
H <sub>2</sub> O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% acrylamide mix	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%								
H <sub>2</sub> O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% acrylamide mix	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.09	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%								
H <sub>2</sub> O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% acrylamide mix	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%								
H <sub>2</sub> O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% acrylamide mix	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%								
H <sub>2</sub> O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% acrylamide mix	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

## Solutions for preparing 5% stacking gels

Solution components	component volumes (ml) per gel mold volume of							
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H <sub>2</sub> O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% acrylamide mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
0.5 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% ammonium persulfate	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Harlow and Lane (1988)

Non-denaturing polyacrylamide gel (6% ); pH 8.0; for 10x10x0.1 gel

30% Acrylamide solution	2ml
5X TBE buffer	1ml
Glycerol	0.5ml
ddH <sub>2</sub> O	6.35ml
1% APS(10mg/ml)	0.15ml
TEMED	15 $\mu$ l
<b>Total volume</b>	<b>10ml</b>