

## 目 錄

	頁數
中文摘要	1
英文摘要	3
縮寫檢索表	5
第一章 緒論	6
第二章 實驗材料及方法	18
第三章 實驗結果	25
第四章 討論	32
附圖	38
參考文獻	51



## 縮寫檢索表

DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
Erk	extracellular signal-related kinase
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
IGF-IR	insulin-like growth factor receptor
IR	insulin receptor
IRS	insulin receptor substrate
JNK	c-jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
PBS	phosphate buffered saline
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PTP	protein tyrosine phosphatase

## 第一章 緒論

### 一、細胞外基質 ( Extracellular Matrix )

生物體細胞的發育及正常生理機能的運作仰賴細胞與其所處環境中的分子的交互作用 ( 1 , 2 )。負責調節功能的分子主要包括了生長及分化因子與細胞外基質的構成分子等。細胞外基質是由各種大分子的醣蛋白及蛋白多醣所組成，其構成分子有膠原蛋白 ( collagen )、蛋白多醣 ( proteoglycan )、構造性的醣蛋白 ( structural glycoprotein ) 及彈性蛋白 ( elastin ) 等 ( 3~8 )。目前已有十九種膠原蛋白的亞型被發現，而所有的膠原蛋白皆有共同的生物性和化學性特徵 ( 3~9 )。蛋白多醣是由一個核心蛋白質 ( core protein ) 與一個或多個用共價鍵和核心蛋白質結合的醣氨多糖 ( glycosaminoglycan , GAG ) 側鏈所組成的 ( 10 )。構造性的醣蛋白則有：纖維黏連蛋白 ( fibronectin )、海帶氨酸 ( laminin )、entactin/nidogen、tenascin、thrombospondin 及 SPARC/osteonectin 等分子 ( 11~14 )。

基底膜 ( basement membrane , 又稱為基板 : basal lamina ) 是細胞外基質的一種，主要是由 laminin、collagen IV、nidogen 及 proteoglycan 所組成的層狀構造 ( 15 )。體內直接與基底膜接觸的細胞有上皮細胞、內皮細胞、肝細胞與肌肉細胞等。基底膜的作用在提供機械性的支撐力、作為細胞移動的附著層 ( substratum )，並且是大分

子進出的屏障。後者的重要性對腎臟的生理機能上尤其明顯：腎小球微血管中的血液是通過與腎小管之間的基底膜來進行過濾作用的，而長期的罹患糖尿病會使得基底膜不正常的增厚，最後導致腎衰竭（16）。除此之外，基底膜亦調控組織的發育及細胞生理反應。將軟骨細胞或乳腺上皮細胞周圍的細胞外基質作酵素性分解後，細胞合成及分泌的功能就會大大地降低；如果將細胞外基質構成物質添加回培養盤中，細胞將可回復其原來分化的狀態，及製造細胞產物的能力（17）。由於細胞外基質本身特殊的結構，而使其具有支撐、黏附及細胞屏障等物理性作用。除此之外，細胞外基質也會藉由誘發細胞骨架重組以及活化一系列訊息傳遞路徑而影響細胞增殖、分化、移動與存活。

## 二、Integrin 及相關的訊息傳遞

Integrin 是細胞與細胞外基質蛋白質結合最主要的接受體，同時它在脊椎動物細胞與細胞之間的黏附作用上也扮演了重要的角色。除了調節細胞的黏附，integrin 亦穿過細胞膜而與細胞骨架有所聯繫及誘發許多細胞內的訊息傳遞路徑（18）。Integrin 與其配子（ligand）的作用對於生物的發育過程、免疫反應、白血球的運送及癌症的產生等皆扮演了關鍵的角色。除此之外，integrin 亦作為研發抗血栓與抗發炎藥物的對象（19）。

Integrin 是由一個 $\alpha$ 次單元體及一個 $\beta$ 次單元體所構成的異雙元穿膜接受體 ( heterodimeric transmembrane receptor )。目前在哺乳動物身上已知有十七個 $\alpha$ 次單元體及八個 $\beta$ 次單元體，而這些次單元體會雙聚合成二十二個不同的接受體 ( 20 , 21 )。Integrin 除了與細胞外基質結合外，某些 integrin 也可以與可溶性的配子像是血纖維蛋白原 ( fibrinogen ) 或是細胞膜上的黏附分子 ( ICAMs ) 結合 ( 21 )。

配子和 integrin 結合會促進 focal adhesion 的形成，導致許多構造型蛋白質或是訊息傳遞蛋白質聚集在此處。構造型蛋白質包括了細胞骨架蛋白質 actin、 $\alpha$ -actinin、talin、tensin、paxillin 及 vinculin；而訊息傳遞分子則有 focal adhesion kinase ( FAK )、c-Src、PKC 與 integrin-linked kinase ( ILK ) 等 ( 22~24 )。

FAK 之分子量為 125 KDa，其構造可分為中央的激酶區域 ( kinase domain ) 及其兩側的 N 端與 C 端區域。在 C 端有一 focal adhesion targeting ( F.A.T. ) 的序列，它的作用在調節 FAK 移往 focal contact。除此以外，F.A.T. 區域還包含了與 paxillin 及 talin 結合的位點 p130<sup>cas</sup> 和 Graf (GAP for Rho Associated with Focal adhesion kinase) 也會結合到 FAK 的 C 端，這是透過它們的 SH3 區域與 C 端上富含脯氨酸 ( proline ) 序列的作用所造成 ( 25 )。Integrin 與其配子的結合造成 FAK 在 Y397 的位置自我磷酸化，進而促使 Src 及 Fyn 結合到 FAK

上，導致 paxillin、 tensin、 p130<sup>cas</sup> 及 FAK 等分子的磷酸化。酪氨酸磷酸化的 FAK 可與多種訊息分子結合：Grb2/SOS 結合到 Y925，而 phosphatidylinositol 3-kinase ( PI3K ) 和 Src 結合到 Y397，因而活化多重的訊息傳遞路徑 ( 26 , 27 )。

由剔除 FAK 基因小鼠 ( knock-out mice ) 的研究，吾人對於 FAK 的生物性功能有了更多的瞭解。從基因剔除小鼠取出的胚胎纖維原細胞 ( embryonic fibroblast )，可以形成許多小的 focal contacts，但卻無法大規模地形成 focal adhesion，且其細胞的移動較正常細胞差 ( 28 )。反觀 FAK 過度表達 ( overexpression ) 的細胞，其細胞移動增加。因此，FAK 的主要功能之一在於調控細胞移動 ( 29 )。

### 三、乳腺上皮細胞

乳腺的發育開始於胚胎時期的外胚層，而乳腺上皮細胞與細胞外基質的交流也從此開始。包圍在乳腺周圍的間質 ( stroma ) 由兩種組成物構成：一是基底膜及纖維母細胞狀所組成的間質，另外則是從乳腺脂肪細胞產生的間質 ( 30 )。然而，乳腺的發育大部份是發生在出生後。在不同種的生物當中，新生兒的乳腺上皮細胞都是集中在乳頭的部分，一直到青春期之前 ( 反芻動物屬之 ) 或是在整個青春期階段 ( 嚙齒動物及人類屬之 ) 才開始因卵巢荷爾蒙的刺激或是生長荷爾蒙的作用而進入生長期 ( 31 )。雌雄兩性在青春期 ( puberty ) 開始之前，

乳腺的構造是相似的，使二者產生差異的原因是荷爾蒙的分泌：雄性的睪固酮（testosterone）作用在間質細胞，抑制乳腺的繼續生長；雌性的雌激素（estrogen）亦作用在間質細胞，促進乳腺的繼續生長，使得脂肪堆積，造成尺寸變大。在這個時期，乳腺的管狀上皮組織會迅速地增殖，使其呈分枝狀並延伸到乳腺脂肪墊（mammary fat pad, MFP）周圍的支持組織，形成一個管狀的網絡。在不同種的生物中，這些構造的發育是有相當的差異：小鼠的乳腺是由簡單的、延伸的腺管組成；而在反芻動物和人類則是以較為複雜的二歧分枝（dichotomously）生長。這些物種的生長差異是由於 MFP 的細胞組成的不同：小鼠的 MFP 是由白脂肪細胞及一些淋巴狀的物質構成；而反芻動物和人類的 MFP 則是以散佈在結締組織中的脂肪堆積所組成的（32）。因此，乳腺發育的過程是乳腺上皮細胞與其周圍間質複雜的交互作用所調節的。對發育成熟的個體而言，乳腺的構造是動態的，隨著年齡、生理週期和生殖的狀況而有改變，但可分為四個時期：未交配期（virgin）、懷孕期（pregnancy）、泌乳期（lactation）和衰退期（involution）（33）。乳腺在懷孕期間是細胞增殖最多且速度最快的階段，這是因為受到雌激素、黃體素、生長激素釋放抑制因子、泌乳激素及腎上腺皮質酮等荷爾蒙調控的影響。其中，雌激素作用在乳腺的管狀構造，黃體素則是促進腺體泡狀的發育。在妊娠的首三個月

( first trimester ), 末端的腺管會以樹枝狀的形態生長並延長, 幹細胞會分化成上皮細胞。在妊娠的次三個月, 末端的腺芽會分化成腺泡。腺泡有兩層細胞, 分別是管腔細胞 ( luminal cell ) 和基部 ( basal cell ) 細胞。在妊娠的末三個月, 腺泡成熟, 分泌的速率加快。到了分娩時, 血液中的雌激素、黃體素均大幅下降。這時候, 乳腺的功能就仰賴腦下腺分泌的泌乳激素來調控, 分泌性細胞被激活製造大量的乳汁, 導致腺泡膨大。在哺乳結束後, 泌乳期也停止。上皮細胞的數目減少, 腺泡和腺管都回復成休眠狀態。此狀態會一直維持到下一次懷孕才被激活起來 ( 33 )。乳腺的功能可以藉著初代乳腺上皮細胞在體外的培養而重建。初代乳腺上皮細胞是取自於懷孕中期的小鼠, 並將其培養在從 Engelbreth-Holm-Swarm ( EHS ) 腫瘤取出一種類似基底膜的基質 ( Matrigel ) 上。在此環境下, 乳腺上皮細胞會生長成與體內相似的泡狀結構 ( 34 )。除此之外, 當細胞以泌乳激素、胰島素及氫皮質酮刺激時, 則可產生乳蛋白如 $\beta$ -casein ( 35 )。相反地, 若將細胞培養在 collagen I 或是一般的塑膠培養盤上, 則無細胞分化及存活的現象, 儘管在培養期間加入所有催乳的激素 ( lactogenic hormones )。因此, 藉著初代乳腺上皮細胞在體外的培養來重建乳腺的功能至少需要兩種類型的訊號, 一是荷爾蒙或生長因子; 另外則是基底膜; 而這兩者間的交互作用 ( cross-talk ) 被認為是達成細胞最終生理反應的要因



(36)。實驗證明，泌乳激素在乳腺細胞中的訊息傳遞是需要細胞與基底膜的接觸，這主要是透過 laminin 與  $\alpha_6\beta_1$  integrin 的作用。胰島素的訊息傳遞也具此種特性，然而並非任何生長因子在乳腺細胞的訊息傳遞都需要基底膜。例如：干擾素的訊息傳遞完全不受細胞外基質的影響 (37)；而表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF) 則與泌乳激素和胰島素相反，培養在一般塑膠培養盤或 collagen I 上的細胞對表皮生長因子刺激所誘發的訊息傳遞要強過於培養在基底膜上的細胞。因此，乳腺上皮細胞提供了一種絕佳的實驗模式來研究細胞外基質與生長因子所誘發訊息傳遞路徑之間的交互作用。

#### 四、胰島素訊息傳遞網絡

胰島素是目前已知最有效的同化激素，由胰臟的 $\beta$ 細胞所分泌。它可以促進碳水化合物、脂肪及蛋白質的合成與貯存，並且抑制其降解，更能將它們釋放回血液循環系統。除此之外，胰島素還可以影響細胞的增殖、存活與基因的表達等。第一型類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor-I, IGF-I) 又稱為促生長因子 C (somatomedin C)，在肝臟及其他的組織中被合成。IGF-I 的分泌受到出生後的生長荷爾蒙及營養的狀態所調節，對於骨骼及軟骨的生長十分重要 (38)。

胰島素受體 (insulin receptor, IR) 與第一型類胰島素生長因子

受體 ( insulin-like growth factor-I receptor , IGF-IR ) 同屬於具有內在 ( intrinsic ) 酪氨酸激酶 ( tyrosine kinase ) 活性的受體。此二者在構造上相近且都是由兩個胞外 ( extracellular ) 的 $\alpha$ 次單元體 (  $\alpha$  subunit ) 與兩個穿膜 ( transmembrane ) 的 $\beta$ 次單元體 (  $\beta$  subunit ) 以雙硫鍵 ( disulfide bond ) 鍵結所構成 ( 39~41 )。當配子與受體的 $\alpha$ 次單元體結合之後，會造成其在構形上的改變，繼而刺激 $\beta$ 次單元體內在的酪氨酸激酶活性，導致 $\beta$ 次單元體在多個位置的自我磷酸化 ( autophosphorylation ) ( 39 , 42~45 )。IR 和 IGF-IR 的酪氨酸自我磷酸化的位置非常相近，例如：在 IR 的激酶水解區域 ( kinase catalytic domain ) 有三個酪氨酸殘基 ( tyrosine residue ) 被磷酸化，分別是 Y1146、Y1150 及 Y1151；在 IGF-IR 的相同區域則是 Y1131、Y1135 與 Y1136。而位於 IR 的近膜區域 ( juxtamembrane domain ) 有 Y960 被磷酸化；IGF-IR 的相同區域則有 Y950。IR 的 COOH 端包含兩個自我磷酸化的位置，Y1316 和 Y1322；而 IGF-IR 僅有 Y1316 一個自我磷酸化的位置。COOH 端的 tyrosine 所扮演的角色尚不清楚，但推測可能與胰島素和 IGF-I 兩者之間的訊息傳遞路徑有所不同有關 ( 39 , 46 )。目前已有大量的證據顯示 IR 及 IGF-IR 的酪氨酸激酶活性與自我磷酸化對於他們的生物活性與作用極為重要 ( 39 , 41 )。

目前已知的 IR 激酶的受質有胰島素受體受質 ( insulin receptor

substrate, IRS ): IRS-1 IRS-2 IRS-3 與 IRS-4; Src-homology-collagen ( Shc ); growth factor receptor bound-2 ( Grb2 ) associated binder-1 ( Gab1 ) 和 p62<sup>dok</sup> 等 ( 圖一 ) ( 47~53 )。 IRS 分子會與 PI3K、 SHP-2 及小的承接分子 ( adaptor molecule ), 如 Nck、 Grb2 連結。受胰島素刺激而活化的 PI3K 與葡萄糖的運輸、接受體的內吞 ( endocytosis ) 及胞飲作用 ( pinocytosis ) 基因的表達和細胞的? 殖有關 ( 54~58 )。 PI3K 將細胞膜上的肌甘酸 ( inositides ) 磷酸化之後 , 會導致 phosphoinositide-dependent kinase ( PDK ) 的活化 , 而 PDKs 又會去刺激多種的絲氨酸/蘇氨酸激? ( serine-threonine kinases ), 包括了 p70<sup>S6k</sup>、 Akt( 或 PKB ) 及兩個 PKC isoform , PKC 和 PKC ( 59~63 )。 此外 , PI3K 也會與 p21<sup>ras</sup>、 Rac 和 Rab4 等 GTP-binding proteins 結合並刺激他們的活性。 p21<sup>ras</sup>、 Rac 和 Rab4 與細胞生長、調控肌動蛋白 ( actin ) 的結構及細胞內泡囊的運送有關 ( 58 , 64~66 )。

Shc 有三種 , 其分子量各為 46 KDa、 52 KDa 及 66 KDa。 他們皆由 NH<sub>2</sub> 端的 PTB domain , 中段與膠原蛋白 ( collagen ) 的 α1 chain 相似且富含甘氨酸 ( glycine ) /脯氨酸 ( proline ) 的區域 , 以及 COOH 端的 SH2 domain 所組成。 被酪氨酸磷酸化的 Shc 分子會與 Grb2 結合 , 而 Grb2 又和 guanine nucleotide exchange factor , SOS 作持續性 ( constitutively ) 的連接 ( 67 , 68 )。 當 Grb2/SOS 複合體結合到 Ras

時，會誘發 Ras 分子中 GDP、GTP 的交換。被激活的 GTP-Ras 再刺激 Raf 分子並與其結合，之後再將 MEK 磷酸化，最後刺激 Erk 的活性( 69~71 )。Erk 的活化與細胞的增殖、移動與存活等生理現象有關，且可促進基因的表現。

Gab1 的分子量為 77 KDa，僅有 PH domain 而無 PTB domain。當以 Gab1 作 SDS-PAGE 電泳分析時可以看到其分子量出現在 115 KDa 與 120 KDa 之間，這種現象被認為是因為 Gab1 有極高的絲氨酸/蘇氨酸磷酸化 ( serine/threonine phosphorylation ) 所致 ( 52 )。p62<sup>dok</sup> 以 SDS-PAGE 電泳分析時其分子量為 62 KDa，它可以被許多酪氨酸激酶磷酸化，但是對於 p62<sup>dok</sup> 如何調控 IR 所產生的作用仍然不是很清楚 ( 53 )。

細胞表面除了 IR 或 IGF-IR 以同型四聚合體 ( homotramer ) 存在外，尚可以發現到有雜合受體 ( hybrid receptor ) 的存在，他們是由一個 IR 的 $\alpha$ 及 $\beta$ 次單元體的半複合體 ( hemicomplex ) 與 IGF-IR 的 $\alpha$ 及 $\beta$ 次單元體的半複合體所構成的 ( 72~74 )。曾有報告指出，這些雜合受體與 IGF-IR 較相像，因為這些受體對於 IGF-I 的親和力與 IGF-IR 相似，而與胰島素結合則較弱 ( 74 , 75 )。

## 五、細胞外基質調控胰島素訊息傳遞與實驗目的

對乳腺上皮細胞而言，合成乳蛋白為其在懷孕後期及哺乳期最主

要的功能。而刺激乳蛋白的合成需要至少兩種訊號；一是來自激素，包括了泌乳激素、胰島素和氫皮質酮，另一種則是細胞與基底膜的接觸，若缺少其中一種，乳蛋白的合成則大幅降低（76, 77）。同樣地，乳腺上皮細胞的存活需要胰島素與基底膜。若以其他的基質如膠原蛋白取代基底膜或將細胞培養在一般的塑膠培養盤上，細胞則會死亡（78）。因此，乳腺上皮細胞需要同時有基底膜和恰當的生長因子來推動其功能，而其中一種可能的機轉是基底膜所誘發的訊息會影響生長因子的訊息傳遞（2, 79）。

以胰島素而言，IR 的酪氨酸磷酸化並不受細胞外基質的影響；但是受體下游的訊息傳遞，如 IRS-1 的酪氨酸磷酸化及其與 PI3K 的結合、Akt 的活化則需要細胞與基底膜的接觸（圖二）（2）。我們推測有下列三種可能性可以解釋為什麼在缺乏基底膜時，胰島素在乳腺上皮細胞的訊息傳遞會被阻斷在 IR（圖三）：第一、酪氨酸去磷酸？（protein tyrosine phosphatase, PTP）的表現量及活性升高，進而抑制 IRS-1 的酪氨酸磷酸化；第二、一些抑制分子（inhibitory molecule）的存在阻斷 IRS-1 結合到 IR 上，因此 IRS 不能被磷酸化；第三、IRS-1 在細胞內的位置（location）改變，所以無法接近 IR。

在本篇論文中，我們將進一步探討胰島素在乳腺上皮細胞內的訊息傳遞，尤其是受體近端的訊息路徑。我們檢測（一）細胞骨架的

完整、細胞膜上的 lipid rafts 對胰島素訊息傳遞的影響 ;(二) 一些化學藥品 ( aspirin、 PGJ<sub>2</sub>、 wortmannin ) 是否可提高 IRS-1 的酪氨酸磷酸化 ;(三) 細胞內酪氨酸去磷酸? 的表現量。

## 第二章 實驗材料及方法

### 一、實驗試劑

F12 medium、fetuin、insulin、hydrocortisone、prolactin、EGF (epidermal growth factor)、HEPES (sodium salt)、Brilliant blue R-250、 $\beta$ -hydroxyl propyl cyclodextrin 及 anti-actin 抗體購自於 Sigma 公司；DMEM( Dulbecco's Modified Eagle Medium )/F12 medium 和 trypsin 購自於 Gibco 公司；collagenase A 購自於 Roche 公司；cytochalacin D、colchicine、ganglioside GD<sub>1a</sub>、ganglioside GM<sub>3</sub>、tyrphostin AG1024 及 genistein 購自於 Alexis 公司；okadaic acid 和 wortmannin 購自於 Calbiochem 公司；protein A-sepharose beads 購自於 Zymed 公司；anti-IGF-IR 和 anti-IR 抗體購自於 Santa Cruz 公司；anti-IRS-1 和 anti-phosphotyrosine 抗體購自於 UBI 公司；matrigel、anti-PI3-K、anti-SHP-2、anti-LAR、anti-PTP1B 與 anti-RPTP $\alpha$ 抗體購自於 Becton Dickinson 公司；細胞株 NMuMG 與 NMU 購自於食工所生物資源保存及研究中心。

### 二、懷孕小鼠的配種方法

本實驗是採取懷孕第十五天至第十八天的 ICR 系小鼠乳腺上皮細胞作為材料。懷孕的小鼠係使用購自於國科會動物中心的雄鼠與雌鼠在本校自行配種所得。其方法如下：將雄鼠與雌鼠（約為六週齡）

飼育在本校動物中心，待四週後再進行配種，配種時間共需四天。第一天下午將雄鼠與雌鼠共置一籠(通常一籠中放置五隻雌鼠及二隻雄鼠)，第二天上午將其分開，當日下午再把雄鼠與雌鼠共置一籠。以後按下午將雌雄合置，上午將雌雄分開的步驟再進行兩天，至第五天上午把雌雄分開後，配種程序即完成。配種後的小鼠在本校動物中飼育至實驗進行為止。配種前後的飼育條件為溫度維持在  $25 \pm 1$ ，濕度保持在  $55 \pm 5\%$ ，且光照(7:00~19:00)與黑暗的週期各為十二小時，其飼料及飲水均不加限制。

### 三、乳腺上皮細胞的製備

將懷孕第十五天至第十八天的小鼠以二氧化碳(CO<sub>2</sub>)氣體犧牲，取出其乳腺，剝碎後置於 collagenase mix 中，在 37 的震盪培養箱中劇烈搖晃一小時，再以 300 r.p.m.的速度離心一分鐘。離心後所得的沉澱物為未消化完全的組織，將其與 collagenase mix 混合，再繼續作用三十分鐘；而上清液則以 800 r.p.m.離心三分鐘。這次離心所得到的沉澱物多為乳腺腺泡，加入 F12 培養液置冰上備用。待第二次的消化作用完成後，以 800 r.p.m.離心三分鐘，再將兩次離心所得的細胞合併，加入 F12 培養液，清洗三次。最後，將細胞與含 10% Fetal Bovine Serum (FBS)、5  $\mu$ g/ml insulin、1  $\mu$ g/ml hydrocortisone、5 ng/ml EGF、100  $\mu$ g/ml streptomycin、100 U/ml



penicillin、250 ng/ml amphotericin B 及 50  $\mu$ g/ml gentamicin 的 F12 培養液混合，加到盤底塗有 Matrigel 或僅為塑膠的培養盤中，兩天後更換培養液。

#### 四、細胞株的培養

##### (一) 細胞來源

NMuMG 細胞株係來自成年的 NAMRU 系雌性小鼠之乳腺組織；NMU 細胞株則來自年齡約為 50 天的 Sprague-Dawley 系雌性大鼠的乳腺的腺瘤 (adenocarcinoma)，二者細胞株皆為貼附的上皮細胞。NMuMG 細胞株與 NMU 細胞株均購自於食工所生物資源保存及研究中心。兩株細胞株皆以含有 10% FBS，1 mM sodium pyruvate solution，0.1 mM non-essential amino acid solution，2 mM L-glutamine，100 U/ml penicillin 和 100  $\mu$ g/ml streptomycin 的 DMEM 培養，NMuMG 細胞株還需另加 10  $\mu$ g/ml 胰島素，每二至三天更換一次新的培養液。

##### (二) 細胞繼代培養

當細胞長到幾近全滿時，將培養液吸掉，以 1X PBS (含 137 mM NaCl，2.7 mM KCl，10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 沖洗二次，再加入 1X trypsin (含 0.25% trypsin，1 mM EDTA) 進行消化作用。待細胞和培養盤完全分離後，加入含有血清的培養液終止 trypsin 的反

應，將細胞打散，再以一比六的稀釋倍數將細胞分到新的細胞培養盤繼續培養。

### (三) 冷凍細胞

當細胞長到幾近全滿時，將培養盤中的培養液吸掉，以 1X PBS 沖洗二次，加入 trypsin 作用。消化後的細胞，以轉速 1200 r.p.m. 離心八分鐘，吸掉上清液，加入少量 freezing medium (含 30% FBS, 10% DMSO) 進行細胞計數。而後將  $1.5 \times 10^7$  / vial 的細胞加入冷凍小管，放入  $-70^\circ\text{C}$  的冰箱中二十四小時，再轉置於液態氮桶內儲存。

### (四) 解凍細胞

將細胞由液態氮中取出後，放在  $37^\circ\text{C}$  的水浴中回溫。而後與含 10% FBS 的培養液混合加入 10 公分的培養盤中，放入  $37^\circ\text{C}$  的細胞培養箱中進行細胞培養。六至八小時後觀察細胞貼附的情形以及存活的狀況，若大多數細胞已貼附，則更換新的細胞培養液。

## 五、製備細胞溶胞產物 ( cell lysates )

實驗前一天，以 F12 培養液清洗細胞兩次，再加入含  $1\mu\text{g/ml}$  hydrocortisone 的 DMEM/F12 培養液，並依實驗的目的作適當的刺激。刺激後將培養盤中的培養液吸取，以 PBS 沖洗兩次，加入 lysis buffer ( 50 mM Tris、pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM NaF,  $10\mu\text{g/ml}$  aprotinin,  $10\mu\text{g/ml}$  leupetin, 1 mM

phenylmethylsulfonyl fluoride , 1% Nonidet P-40 或 Triton X-100 ), 再以塑膠刮杓刮取細胞。將細胞與 lysis buffer 的混合液置於 1.5 ml 的離心管, 在 4 °C 下混合作用一至二小時, 接著以 14000 r.p.m. 的速度離心十五分鐘, 所得上清液即為細胞溶胞產物。取出部分的細胞溶胞產物與 SDS sample buffer( 15 mM Tris , pH 6.8, 10% glycerol, 0.5% SDS , 180 mM  $\beta$ -mercaptoethanol , 0.02% bromophenol blue ) 混合, 於 100 °C 的乾浴器中加熱五至十分鐘; 其餘的細胞溶胞產物則貯藏在-80 °C 冰箱。

## 六、SDS-PAGE 電泳 ( SDS-PAGE Electrophoresis ) 及 Commassie Blue 染色法

依實驗所需配製 6~12% 的下膠 ( 含 6~12% acrylamide : bisacrylamide ( 29 : 1 ), 375 mM Tris , pH 8.8 , 0.1% SDS )。將上述試劑與 10% ammonium persulfate、TEMED 混合均勻後, 加入直立式膠台座中, 靜置三十至六十分鐘。待下膠凝固後, 再加入 5% 上膠 ( 含 5% acrylamide : bisacrylamide ( 29 : 1 ), 125 mM Tris , pH 6.8 , 0.1% SDS ) 並將梳狀塑膠薄片 ( comb ) 置入, 待其凝固後取出, 所形成的凹槽可供樣本注入之用。下膠凝固之後便可將樣本注入凹槽。電泳時採固定電流, 每片膠約須 15~20 mA。

取出電泳完畢的膠片後, 浸漬於染色溶液 ( 含 0.2% 的 Brilliant blue R-250 , 50% 的 methanol 及 10% 的 acetic acid glacial ), 並輕微搖

晃四十至六十分鐘，再將膠片轉置於脫色溶液(含 10%的 methanol 及 10%的 acetic acid glacial)中，更換脫色溶液數次直到 band 出現。

## 七、西方墨點法 ( Western Blot )

依實驗所需配製 6~12% SDS-聚丙烯醯氨板膠，以固定電流進行電泳，待 dye front 跑至膠底部即可停止。在電泳停止前，先裁剪尺寸大小與膠片相仿的 PVDF membrane，將其以 methanol 浸漬一至二分鐘，而後用二次水浸洗五分鐘，重覆浸洗兩次後再將 PVDF membrane 浸漬於轉漬緩衝液 ( 含 25 mM Tris-HCl、192 mM Glycine 及 20% methanol ) 中備用。將電泳完畢的膠片，緊貼於 PVDF membrane，置於轉漬器中，並使用固定電壓 100 伏特轉漬兩小時。轉漬完畢的 PVDF membrane 以含 5%脫脂奶粉的 TBST( 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl 及 0.1% Tween-20 ) 浸泡，在室溫下震盪作用一小時，再與初級抗體作用。在室溫下，作用時間為兩小時；在 4℃ 則須隔夜 ( overnight )。作用完後以 TBST 浸洗三次，每次十分鐘。接著將 membrane 和二級抗體置於室溫作用一小時，同樣再以 TBST 浸洗三十分鐘。最後用 ECL 組裝試劑使蛋白質呈像在 X 光片上。

## 八、免疫沉澱法 ( Immunoprecipitation )

細胞依實驗所需做適當的刺激並收取細胞溶胞產物。將等量的細

胞溶胞產物加入 1~2  $\mu\text{g}$  的抗體及 50  $\mu\text{l}$  protein A-sepharose beads , 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下作用六至八小時 , 而後快速離心十五秒 , 將 sepharose beads 沉澱下來 , 抽掉上清液 , 加入 lysis buffer 清洗 beads 三至四次。最後一次清洗後 , 加入 2X sample buffer , 在 100  $^{\circ}\text{C}$  乾浴器中加熱十分鐘 , 取其上清液此即為免疫沉澱的樣品。

### 第三章 實驗結果

當胰島素與受體結合後，受體的自我磷酸化會促使 IRS 結合到受體上，並且將 IRS 磷酸化，進而激活下游的訊息傳遞分子，最終達到調控細胞生理的功用。細胞除了有 IR、IGF-IR 單獨存在外，尚發現有雜合受體，亦即各由一個 IR 與一個 IGF-IR 的 $\alpha$ 及 $\beta$ 次單元體的半複合體所形成的受體。我們從以往的實驗結果得知，乳腺上皮細胞中部分的 IR 與 IGF-IR 也會形成雜合受體，且胰島素的刺激可誘發 IRS-1 結合到 IR/IGF-IR。

#### 一、IR 酪氨酸激酶活性對於 IRS-1 結合到受體上的影響

以往的實驗結果顯示，在胰島素的刺激下，IRS-1、IR 和 IGF-IR 會被共同沉澱出來 (2)。因為 IRS-1 結合到 IR 主要是藉由 IRS-1 的 PTB domain 和 IR 上磷酸化的酪氨酸殘基 (phosphorylated tyrosine residue) 之間的交互作用，所以為了進一步驗證上述的結果，我們檢測 IR 酪氨酸激酶抑制劑 tyrphostin AG1024 對 IRS-1 結合到受體上的影響。將細胞培養在基底膜上，加入 0~30  $\mu$ M tyrphostin AG1024 作用一小時，再以 100 nM 胰島素刺激十五分鐘。收集的溶胞產物 (cell lysates) 以 IGF-IR、IR 及 IRS-1 抗體作免疫沉澱，再以西方墨點法檢測其酪氨酸磷酸化及與其他訊息傳遞分子結合的情形。

如同我們所預計，tyrphostin AG1024 會抑制 IR 的酪氨酸磷酸化 (圖四, A)。而胰島素所誘發的 IRS-1 酪氨酸磷酸化以及其與 PI3K

之間的結合也因此而降低（圖四，B）。此外，IRS-1 和 IGF-IR 的共同沉澱也因為使用 tyrphostin AG1024 的處理而被抑制（圖四，C）。因此，我們確定在胰島素的刺激下，IRS-1 會與 IGF-IR 結合。由於使用的胰島素濃度應不會和 IGF-IR 產生 cross-reaction 的情形，所以推測 IRS-1 是結合到 IR/IGF-IR 雜合受體上。

## 二、細胞骨架的完整性對胰島素訊息傳遞的影響

細胞骨架（cytoskeleton）不僅與細胞的構形有關，它也控制了許多細胞生理反應，例如增殖、移動及胞內腺泡的運輸等。除此之外，細胞骨架亦可作為訊息傳遞分子的支架（80）。因此我們探討細胞骨架的整體性對於胰島素訊號傳遞的影響。在此實驗，actin 和 microtubule 的聚合分別以 cytochalasin D 和秋水仙素（colchicines）抑制。將 5 $\mu$ g/ml cytochalasin D 和秋水仙素加入培養在基底膜的乳腺細胞，經過一個晚上的作用後，再以 100 nM 的胰島素刺激，最後收集溶胞產物進行免疫沉澱及西方墨點法的分析。結果顯示，破壞細胞骨架會抑制胰島素訊息傳遞，包括了 IR IRS-1 酪氨酸磷酸化以及 IRS-1 結合到 IGF-IR 的情形（圖五）。因此，細胞骨架的完整性對於胰島素的訊息傳遞是非常重要的。

## 三、Lipid raft 在 IRS-1 與受體結合的過程中所扮演的角色

訊息傳遞分子的分室化（compartmentalization）使得各分子間的

交互作用提高，因此影響了訊息的傳播 (81)。在細胞膜上有兩種不同的 lipid rafts，分別是富含膽固醇和 caveolin 的 caveolae 以及含有豐富的 ganglioside GM<sub>3</sub> 的 glycosphingolipid signaling domain (82)。曾有報告指出多種生長因子接受體和訊息傳遞分子位於 lipid raft，而且其訊號的傳遞會受其本身所在位置的影響 (81, 82)。因此，我們想探討在乳腺上皮細胞中，lipid raft 對胰島素訊息傳遞的重要性。首先針對的是 caveolae，我們以  $\beta$ -hydroxypropyl cyclodextrin 耗盡膽固醇，使得 caveolae 被破壞。將培養於基底膜上的細胞預先以 0~10  $\mu$ M  $\beta$ -hydroxypropyl cyclodextrin 作用一小時，再加入胰島素來刺激，然後將溶胞產物進行免疫沉澱分析。結果如圖六所示， $\beta$ -hydroxypropyl cyclodextrin 對 IRS-1 酪氨酸磷酸化以及 IRS-1 與 IGF-IR 的結合並無明顯的影響。由此，我們推測在乳腺上皮細胞中，胰島素的訊息傳遞可能不是發生在 caveolae。

其次討論到的是 glycosphingolipid signaling domain 對於胰島素訊息傳遞的影響。原本我們要用抑制 ganglioside 合成的藥物 (D-1-threo-1-phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol-HCl, PPPP) 破壞 glycosphingolipid signaling domain，但市面上現已停產，因此我們以外加 ganglioside 作為替代的方式，來檢測 glycosphingolipid signaling domain 在胰島素訊息傳遞中所扮演的角色為何。將培養在基底膜或塑膠盤上的細胞預先以 50  $\mu$ M 的 ganglioside GD<sub>1a</sub> 或 GM<sub>3</sub> 作用一至兩天，再加入 100 nM 胰島素刺激十



五分鐘，然後收集溶胞產物進行免疫沉澱分析。實驗結果顯示 ganglioside GD<sub>1a</sub> 和 GM<sub>3</sub> 對胰島素訊息傳遞並無明顯的影響（圖七、八）。

#### 四、阿斯匹靈和 15-deoxy-<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub>(15d-PGJ<sub>2</sub>)對於胰島素誘發的 IRS-1 的酪氨酸磷酸化的影響

我們實驗主要的目的之一便是要探討並闡明細胞外基質如何影響胰島素的訊息傳遞。除了在緒論中所提及的一些可能的機轉之外，我們也從第二型糖尿病所產生的“胰島素抗性”（insulin resistance）這個觀點著手，因為當乳腺細胞不與基底膜接觸而產生胰島素訊息傳遞失調的情形與第二型糖尿病的胰島素抗性有些類似。曾有報告指出，阿斯匹靈可以藉著抑制 IKK $\beta$ 來減輕因肥胖或飲食所造成的胰島素抗性（83, 84）。另外，15d-PGJ<sub>2</sub>能藉由修飾 p50 而抑制 NF- $\kappa$ B活性（85, 86）。因此，我們檢測阿斯匹靈和 15d-PGJ<sub>2</sub>是否可以使培養在塑膠盤上的乳腺細胞回復 IRS-1 酪氨酸磷酸化。將培養在基底膜或塑膠盤上的細胞預先以阿斯匹靈或 15d-PGJ<sub>2</sub>作用兩小時，再加入 100 nM 胰島素刺激十五分鐘，然後以免疫沉澱法與西方墨點法分析 IRS-1 酪氨酸磷酸化的程度。如同圖九所示，不論細胞是培養在塑膠盤或基底膜上都對上述藥物的處理沒有反應。另外，報導中指出因 calyculin（去磷酸？抑制劑）所造成 IRS-1 酪氨酸磷酸化下降的情形也可用阿斯匹靈處理而得以舒緩，所以我們也執行了類似的實驗（83, 84）。細胞先

以阿斯匹靈處理一小時，再加入 okadaic acid 繼續作用一小時，最後加入胰島素刺激十五分鐘。結果顯示阿斯匹靈仍舊毫無作用（圖九，C）。因此，我們推測脂肪、肝臟以及肌肉細胞所產生的胰島素抗性的機轉應該和乳腺上皮細胞的不同。

## 五、Wortmannin 對於胰島素訊息傳遞的影響

曾有文獻記載 IRS-1 的絲氨酸/蘇氨酸磷酸化（serine/threonine phosphorylation）對於其自身酪氨酸磷酸化產生抑制作用，可能的原因是當 IRS-1 產生絲氨酸磷酸化時，它在細胞內的位置會由近膜的 membrane compartment 轉到細胞質中，因此無法與 IR 接合，導致訊息中斷；或是它與酪氨酸去磷酸？太接近而被去磷酸化（87~90）。與 IRS-1 絲氨酸/蘇氨酸磷酸化有關的激？包括有 PKC、Erk、PI3K 及 JNK 等（91~93）。因此，我們想知道是否抑制了這些激？就可以使培養在塑膠盤上的乳腺細胞回復 IRS-1 酪氨酸磷酸化。

我們曾使用 PKC 與 Erk 的抑制劑，結果是無效的。由於市面上並無 JNK 的抑制劑，我們則使用可以活化 JNK 的藥劑 anisomycin，結果仍是沒有反應（實驗數據沒有標示出來）。最後我們以 PI3K 的抑制劑 wortmannin 來處理，並觀察它對於胰島素訊息傳遞的影響。將培養在基底膜或塑膠盤上的細胞預先以 10  $\mu$ M wortmannin 作用一小時，再加入胰島素刺激十五分鐘，然後以免疫沉澱法與西方墨點法分析胰島素訊息傳遞。對培養在塑膠盤上的細胞而言，此種處理提高

IRS-1 酪氨酸磷酸化及其與 PI3K 的結合，同時 IRS-1 與 IGF-IR 的結合也大幅提升（圖十）。後者的反應尤其明顯（圖十，C）。然而 IR 酪氨酸磷酸化卻不受影響。不過，有一分子量為 160 KDa 且被磷酸化的蛋白質和 IR 被共同免疫沉澱出來。根據其分子量，我們推測此蛋白質就是 IRS-1（圖十，A）。除了 IRS-1 與 IGF-IR 的結合有提高的情形之外，wortmannin 對培養在基底膜的細胞並無顯著影響（圖十一）。

## 六、酪氨酸去磷酸？在乳腺上皮細胞中的表現

細胞內蛋白質酪氨酸磷酸化的程度受到酪氨酸激？以及酪氨酸去磷酸？（protein tyrosine phosphatase, PTP）的調控。由以往的結果顯示，vanadate 可恢復培養在塑膠盤上的細胞其 IRS-1 酪氨酸磷酸化的情形，表示抑制細胞胰島素訊息傳遞的機轉可能是經由 PTP 的作用（121）。由文獻記載得知，數種酪氨酸去磷酸？會抑制胰島素的訊息傳遞。這些去磷酸？包括了 PTP1B、LAR、SHP-2 及 RPTPa 等（94, 95）。因此，我們以西方墨點法檢測 PTP1B、LAR、SHP-2 及 RPTPa 在以基底膜或塑膠作為附著層的乳腺細胞中的表現情形。實驗的結果顯示 PTP1B、SHP-2 與 RPTPa 的表現似乎不受附著層的影響，然而 LAR 的表現則因細胞與基底膜接觸而提高（圖十二）。這個結果並無法解釋為何當細胞培養在塑膠盤時，胰島素的訊息傳遞的程度較低。

## 七、檢測胰島素在乳腺細胞株所誘發的訊息傳遞

初代乳腺上皮細胞固然最能反映乳腺細胞在體內的生理狀況，然而其取得的成本高且僅能做數代繼代培養。除此之外，尚有不具轉染（transfection）的難題。因此我們尋找與初代細胞具相同表現型的乳腺細胞株，也就是在這些細胞中胰島素訊息傳遞會受細胞外基質調節。

我們檢測了兩株乳腺細胞株對於胰島素的刺激所誘發的訊息傳遞。NMuMG 為取自正常小鼠的乳腺細胞；NMU 則是取自大鼠的乳腺腺瘤細胞。將此二種細胞株培養在基底膜或塑膠盤中，並以 100nM 胰島素刺激十五分鐘，再觀察 IRS-1 酪氨酸磷酸化的情形（圖十三）。我們發現當 NMuMG 細胞株培養在基底膜時，會形成泡狀的結構；而 NMU 細胞株只形成細胞叢的形態。然而，NMuMG 細胞株不論是培養在塑膠盤或基底膜上，其 IRS-1 的酪氨酸磷酸化的程度並無差異；而 NMU 細胞株則需與基底膜接觸才能產生較高量的 IRS-1 磷酸化。

## 第四章 討論

胰島素的訊息是否可由接受體一直傳遞下去而產生生理反應端視在此過程中，訊息分子是否正確地被依序活化所致。胰島素與 IR 結合後，造成受體的自我磷酸化，接著吸引 IRS-1 與 IR 接合並被酪氨酸磷酸化，下游的分子繼之被依序活化，使得訊號被正確地傳遞。

在乳腺上皮細胞，胰島素的訊息傳遞會受細胞外基質影響，而調節點正位在 IRS-1 (2)。除了乳腺上皮細胞之外，其他細胞如 Rat-1、NIH3T3、CHO 及初代脂肪細胞也有類似的情形，但影響胰島素的訊息傳遞的基質為 fibronectin 或 vitronectin，且調節位點在 IR (96~100)。根據報導，細胞外基質影響胰島素的訊息傳遞是藉由 integrin 及其下游的訊息分子。在 Rat-1 及 NIH3T3 細胞株，胰島素的刺激會促進 IR、IRS-1 與  $\alpha_v\beta_3$  integrin 的結合，進而提高 IR 和 IRS-1 酪氨酸磷酸化 (96, 97)。即使在沒有胰島素的刺激的狀況下，活化的 pp125<sup>FAK</sup> 也曾被證實可以促使 IRS-1 磷酸化(101)。此外，pp125<sup>FAK</sup> 和 Src 的共同作用可以回復細胞因懸浮而降低的胰島素的訊息傳遞 (100)。乳腺上皮細胞主要是表現  $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$  integrin，但是並無 IRS-1 與  $\beta_1$  integrin 結合的情形 (102)。然而，最近一篇報導指出在眼球的水晶體中， $\alpha_6$  integrin 透過與 IGF-IR 的結合活化 Erk 而促進水晶體的發育(103)。所以接下來我們將檢視受體或 IRS-1 與  $\alpha$  integrin

結合的可能性。就目前所有的結果來看，pp125<sup>FAK</sup>和 Src 調節乳腺上皮細胞內胰島素訊息傳遞的可能性不大，因為當細胞不與基底膜接觸時，pp125<sup>FAK</sup>和 Src 的酪氨酸磷酸化反而比較高，且 Src 的抑制劑 PP1 對胰島素訊息傳遞的影響不大。

以訊息傳遞的角度來看，我們推測有下列三種可能性可以解釋為什麼在缺乏基底膜時，胰島素在乳腺上皮細胞的訊息傳遞會被阻斷在胰島素受體：第一、PTP 的表現量及活性升高，進而抑制 IRS-1 的酪氨酸磷酸化；第二、一些抑制分子（inhibitory molecule）的存在阻斷 IRS-1 結合到胰島素接受體上，因此 IRS 不能被磷酸化；第三、IRS-1 在細胞內的位置（location）改變，無法接近胰島素接受體。就 PTP 而言，曾被證實抑制胰島素訊息傳遞的有 PTP1B、LAR、SHP-1 及 RPTP $\alpha$ 等（94, 95）。這些 PTP 主要是作用在 IR，進而影響下游的訊息傳遞。目前所知作用在 IRS-1 上的 PTP 只有 SHP-2 和 PTP1B（104）。不過，SHP-2 的結合反而活化 Erk 路徑，因此是正向調節胰島素訊息傳遞。我們觀察 LAR、RPTP $\alpha$ 、SHP-2 及 PTP1B 在乳腺上皮細胞的表現情形，發現不論是以基底膜或塑膠作為附著層 PTP1B、SHP-2 與 RPTP $\alpha$ 的表現量並沒有差異。然而這並不表示這些 PTP 沒有參與乳腺細胞內調節胰島素訊息傳遞的機轉，檢測 PTP 與接受體或 IRS-1 結合的情形將是我們接下來的工作。比較令人驚訝的是 LAR

的結果。培養在基底膜的細胞其 LAR 的表現量較高。LAR 是穿膜型的 PTP，曾被證實是 laminin 的受體 (105)。多數 PTP 在懷孕或哺乳時期的乳腺中的表現量是下降的，但 LAR 卻維持不變 (106)。另外，LAR<sup>-/-</sup>的老鼠會有乳腺發育不全及功能失調的情形 (107)。因此在乳腺中，LAR 應與負向調節胰島素訊息傳遞無關。

IR/IGF-IR 和 IRS-1 在細胞內的位置 (localization) 並不相同；IR/IGF-IR 位在細胞膜上，而 IRS-1 在近膜的 membrane compartment (87, 88)。當他們的位置改變時，會使得二者的距離拉遠，訊息傳遞因而中斷。像是當 IRS-1 產生絲氨酸磷酸化時，它在細胞內的位置則由近膜的 membrane compartment 轉到細胞質中，因此無法與 IR 接合，導致訊息中斷 (89, 90)。目前已知能造成 IRS-1 絲氨酸磷酸化的藥品或因子有 PMA、okadaic acid、TNF- $\alpha$ 、PDGF、及胰島素的持續刺激，這些主要是藉由 PKC、JNK、Erk 或 PI3K 的作用 (91~93)。我們懷疑當乳腺細胞培養在塑膠盤上所產生胰島素訊息傳遞失調的情形也是經由上述的機轉，因此嚐試用各種絲氨酸/蘇氨酸激酶抑制劑處理細胞，並檢測胰島素訊息傳遞是否可因此而回復。大多數的抑制劑僅能造成 IRS-1 mobility 的改變卻無法提高 IRS-1 的酪氨酸磷酸化。然而，PI3K 抑制劑 wortmannin 可以大幅提高 IRS-1 接合到 IR/IGF-IR 的程度，以及 IRS-1 的酪氨酸磷酸化。此種效果又以培養

在塑膠盤上的細胞較顯著。我們也使用了另一個 PI3K 抑制劑 LY294002，所得結果與 wortmannin 相同。

PI3K 是胰島素訊息傳遞下游的一個分子。活化 PI3K 可促進代謝反應、細胞存活等作用；然而長時間的胰島素刺激會造成 PI3K 持久性的活化，導致 IRS-1 絲氨酸磷酸化提高，最後 IRS-1 經由 26S proteasome 降解 (108, 109)。這是胰島素訊息傳遞負回饋的一種機轉。所以，抑制 PI3K 可以拮抗此種負回饋作用，使訊息傳遞持續進行。在我們的實驗中，胰島素的作用時間僅有十五分鐘。在此情況下，抑制 PI3K 仍能提高 IRS-1 接合到 IR/IGF-IR 的程度以及 IRS-1 的酪氨酸磷酸化，表示細胞與附著層( substratum)的接觸誘發 PI3K 的活性。我們過去的實驗證實，細胞在未受胰島素刺激時，仍有少量的 Akt 被活化；且培養在塑膠盤或 collagen I 上的細胞，其 Akt 活化的程度比培養在基底膜上的細胞高 (110)。所以，缺乏基底膜時乳腺細胞對胰島素所產生的抗性，有可能是經由 PI3K 引發 IRS-1 絲氨酸磷酸化所造成。

第二型糖尿病病人的特徵是對胰島素產生抗性 (insulin resistance)。然而，造成此抗性的機轉仍未完全釐清，可能的原因是病人體內 TNF- $\alpha$ 提高，使得 IRS-1 產生絲氨酸磷酸化 (111)。除此之外，細胞內 ganglioside GM<sub>3</sub> synthase 的活性也會因此上升，進而抑制



IR 及 IRS-1 的酪氨酸磷酸化 ( 112 )。最近的文獻指出，阿斯匹靈或水楊酸 ( salicylate ) 可以減輕因肥胖、高脂飲食及 TNF- $\alpha$  所引發的胰島素抗性。另外，因 calyculin ( 去磷酸? 抑制劑 ) 所造成 IRS-1 酪氨酸磷酸化下降的情形也可因此而舒緩。這主要是因為阿斯匹靈抑制 IKK $\beta$  的緣故 ( 83 , 84 )。15d-PGJ<sub>2</sub> 是 PPAR $\gamma$  的配子，而活化 PPAR $\gamma$  的路徑可以提高脂肪細胞的分化及減低癌細胞癌化的情形 ( 113 , 114 )。此外，15d-PGJ<sub>2</sub> 也可抑制 NF- $\kappa$ B 的 DNA-binding 能力，以及改善胰島素抗性 ( 85 , 86 )。乳腺細胞因不與基底膜接觸而產生胰島素訊息傳遞失調的情形與第二型糖尿病的胰島素抗性有些類似，所以我們檢測阿斯匹靈、15d-PGJ<sub>2</sub> 以及 GM<sub>3</sub> 對胰島素訊息傳遞的影響。結果顯示這些處理都沒有作用，因此我們推測脂肪、肝臟以及肌肉細胞所產生胰島素抗性的機轉，似乎和乳腺上皮細胞不同。

訊息傳遞的分室化 ( compartmentalization ) 會造成局部分子的聚集，增加分子之間的交互作用 ( 81 )。這種情形可能發生在細胞各處，例如在支架蛋白 ( scaffold proteins ) 或細胞膜上。細胞膜上主要有兩種 lipid rafts ; 分別是 caveolae 和 glycosphingolipid signaling domain。Caveolae 富含膽固醇及 caveolin ; 而 glycosphingolipid signaling domain 則含有豐富的 ganglioside GM<sub>3</sub> ( 82 )。許多接受體及近膜的訊息分子位於這些區域，因而調節訊息傳遞。我們以藥物清除膽固醇或外加

ganglioside GD<sub>1a</sub> 和 GM<sub>3</sub> 來檢測這兩種 lipid rafts 對乳腺上皮細胞胰島素訊息傳遞的重要性，結果顯示這兩種處理方式都不會影響訊息傳遞。因此，我們推測在乳腺上皮細胞中，胰島素的訊息傳遞不是發生在 lipid rafts。這個結果並不意外，因為根據文獻，caveolae 內的蛋白不易以 Triton X-100 萃取出來，而我們卻能以此取得大多數的 IR 和 IRS-1，所以進一步確定上述的推論。Caveolae 對胰島素訊息傳遞的影響亦是眾說紛紜；有些報導證實 IR 位於 caveolae 且這種分布有助於訊息傳遞，但也有完全相反的發現（115~118）。這可能是因為所使用的細胞不同的緣故。而 ganglioside 對細胞及訊息傳遞的影響以 EGF 的研究較多。GD<sub>1a</sub> 促進人類真皮纖維母細胞的生長，其作用機轉在於刺激 Src 激酶活性及提高 EGFR 的自我磷酸化（119）；GM<sub>3</sub> 則是抑制 EGFR 的自我磷酸化和細胞生長（120）。如前段所述，GM<sub>3</sub> 抑制胰島素訊息傳遞，可能也是藉由提高 IRS-1 產生絲氨酸磷酸化的路徑（112）。

## 參考文獻

1. Alpin AE, Howe A, Alhari SK, Juliano RL. Signal transduction and modulation by cell adhesion receptors: the role of tyrosines, cadherines, immunoglobulin-cell adhesion molecules and selectins. *Pharmacol Rev* 1998; 50:197-263
2. Lee YJ, Streuli CH. Extracellular matrix selectively modulates the response of mammary epithelial cells to different soluble signaling ligands. *J Biol Chem* 1999; 274:22401-8
3. Piez KA, Reddi AH. *Extracellular matrix biochemistry* . 1984, Elsevier, New York.
4. Hay ED. *In cell biology of extracellular matrix*. 1991, Plenum Press, New York.
5. Royce PM, Steinmman B. *In connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic and medical aspects*. 1993, Wiley-Liss, Inc., New York.
6. Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix *FEBS Letters* 1990; 268:386-93
7. Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ. *Wound healing. Biochemical and clinical aspects*. 1992, W. B. Saunders, Philadelphia.
8. Zern MA, Reid LM. *In extracellular matrix: chemistry, biology and pathobiology with emphasis on liver*. 1993, Marcel Decker, Inc., New York.
9. Hay ED. *In cell biology of extracellular matrix*. 1991, Plenum Press, New York.
10. Kjell' en L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 1991; 60:443-75
11. Von der Mark K, Goodman S. *In connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic and medical aspects*. 1993, pp. 211-36 Wiley-Liss, Inc., New York.
12. Yamada KM. *In cell biology of extracellular matrix*. 1991, pp. 111-46 Plenum Press, New York.
13. Carlin B, Jaffe R, Bender B, Chung AE. Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J Biol Chem* 1981; 256:5209-14
14. Heinegard D, Oldberg A. *In connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic and medical aspects*. 1993, pp.189-209 Wiley-Liss, Inc., New York.
15. Harason MA, Harasell John R. *Extracellular Matrix*. 1995, IRL Press, USA.

16. Gerald Karp. *Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiments*. 1999, John Wiley & Sons, Inc., USA.
17. Prince Janine M, Klinowska Teresa CM, Marshman Emma, Lowe Emma T, Mayer Ulrike, Miner Jeff, Aberdam Daniel, Vestweber Dietmar, Gusterson Barry, and Streuli CH. Cell-matrix interactions during development and apoptosis of the mouse mammary gland in vivo. *Developmental Dynamic* 2002;223( 4 ):497-516
18. Hynes Richard O. Integrins: bi-directional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110:673-687
19. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Ann. Rev Cell Biol* 1996; 12:697-715
20. Hynes Richard O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25
21. Kumar Chandra. Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 1998; 17(11 Reviews):1365-73
22. Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* 1995; 270:16996-9
23. Brown MC, Perrotta JA, Turner CE. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol* 1996; 135:1109-1123
24. Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* 1995; 130:1181-87
25. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 71:435-78
26. Calalb M, Polte T, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for the Src family kinases. *Mol Cell Biol* 1995; 15:954-63
27. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by Grb2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 1994; 372:786-91
28. Ilic D, Damsky CH, Yamamoto T. Focal adhesion kinase: at the cross-roads of signal transduction. *J Cell Sci* 1997; 110:401-7

29. Hauck CR, Klingbeil CK, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase functions as a receptor-proximal signaling component required for directed cell migration. *Immunologic Research* 2000; 21(2-3):293-303
30. Sakakura T. New aspects of stroma-parenchyma relations in mammary gland differentiation. *Int Rev Cytol* 1991; 125:165-202
31. Topper YJ, Freeman CS. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 1980; 60:1049-1106
32. Hovey RC, Macfadden TB, Akers RM. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *J. Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4:53-68
33. [www.ana.ed.ac.uk/anatomy/database/mammbase/mamdev](http://www.ana.ed.ac.uk/anatomy/database/mammbase/mamdev)
34. Pullan S, Wilson J, Metcalfe A, Edwards GM, Goberdhan N, Tilly J, Hickman JA, Dive C, Streuli CH. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J Cell Sci* 1996; 109:631-42
35. Doppler W, Groner B, Ball RK. Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta-casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86(1):104-8
36. Barcellos-Hoff MH, Aggeler J, Ram TG, Bissell MJ. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development Supplement* 1989; 105(2):223-35
37. Numaguchi S, Okuno M, Moriwaki H, Muto Y. Modulation of collagen synthesis and degradation by retinoids and cytokines in 3T3 L1 preadipocytes. *Internal Medicine* 1994; 33(6):309-16
38. Ganong WF. Review of medical Physiology 2001, Mc Graw-Hill, USA.
39. Van Obberghen E. Signaling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. *Diabetologia* 1994; 37(Suppl. 2):S125-34
40. Kahn CR, White MF. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest* 1988; 82:1151-6
41. Yarden Y, Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:443-78
42. Baron V, Gautier N, Komoriya A, Hainaut P, Scimeca JC, Mervic M et al. Insulin binding to its receptor induces a conformational change in the receptor C-terminus. *Biochemistry* 1990; 29:4634-41
43. Baron V, Kaliman P, Gautier N, Van Obberghen E. The insulin receptor

- activation process involves localized conformational changes. *J Biol Chem* 1992; 267:23290-4
44. Lebrun C, Baron V, Kaliman P, Gautier N, Dolais-Kitabgi J, Taylao S et al. Antibodies to the extracellular receptor domain restore the hormone-insensitive kinase and conformation of the mutant insulin receptor valine 382. *J Biol Chem* 1993; 268:11272-7
  45. Kaliman P, Baron V, Gautier N, Van Obberghen E. Antipeptide antibody to the insulin-like growth factor-I receptor sequence 1232-1246 inhibits the receptor kinase activity. *J Biol Chem* 1992; 267:10645-51
  46. Tartare S, Mothe I, Kowalski-Chauvel A, Breittmayer JP, Ballotti R, Van Obberghen E. Signal transduction by a chimeric insulin-like growth factor-I(IGF-I) receptor having the carboxyl-terminal domain of the insulin receptor. *J Biol Chem* 1994; 269:11449-55
  47. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991; 352:73-7
  48. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Glasheen E et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature* 1995; 377:173-7
  49. Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. The 60 kD phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997; 272:11439-43
  50. Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. A novel 160-kD phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997; 272:21403-7
  51. Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G et al. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 1992; 70:93-104
  52. Holgado-Madruga M, Emler DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signaling. *Nature* 1996; 379:560-4
  53. Carpino N, Wisniewski D, Strife A, Marshak D, Kobayashi R, Stillman B et al. p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* 1997; 88:197-204

54. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994; 14:4902-11
55. Jhun BH, Rose DW, Seely BL, Rameh L, Cantley L, Saltiel AR, Olefsky JM. Microinjection of the SH2 domain of the 85-kD subunit of PI3-kinase inhibits insulin-induced DNA synthesis and c-fos expression. *Mol Cell Biol* 1994; 14:7466-75
56. Joly M, Kazlauskas A, Fay FS, Corvera S. Disruption of PDGF receptor trafficking by mutation of its PI3-kinase binding site. *Science* 1994; 263:684-7
57. Kotani K, Carozzi AJ, Sakaue H, Hara K, Robinson LJ, Clark SF, Yonezawa K, James DE, Kasuga M. Requirement for PI3-kinase in insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209:343-8
58. Kotani K, Hara K, Yonezawa K, Kasuga M. PI3-kinase as an upstream regulator of the small GTP-binding protein Rac in the insulin signaling of membrane ruffling. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208:985-90
59. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, Moscat J, Farese RV. Evidence for involvement of PKC-zeta and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology* 1997; 138:4721-31
60. Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ, Pilch PF. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* 1998; 273:7201-4
61. Cong LN, Chen H, Li Y, Zhou L, McGibbon MA, Taylor SI, Quon MJ. Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol Endocrinol* 1997; 11:1881-90
62. Kotani K, Ogawa W, Matsumoto M, Kitamura T, Sakaue H, Hino Y, Miyake K, Sano W, Akimoto K, Ohno S, Kasuga M. Requirement of atypical PKC lambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 1998; 18:6971-82
63. Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport.

*J Biol Chem* 1997; 272:30075-82

64. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endo Rev* 1995; 16:117-42
65. Cormont M, Van Obberghen E, Zerial M, Le Marchand-Brustel Y. Insulin induces a change in Rab5 subcellular localization in adipocytes independently of phosphatidylinositol-3 kinase activation. *Endocrinology* 1996; 137:3408-15
66. Toliás KF, Cantley LC, Carpenter CL. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem* 1995; 270:17656-9
67. Baltensperger K, Kozma LM, Cherniack AD, Klarlund JK, Chawla A, Banerjee U, Czech MP. Binding of the Ras activator SOS to IRS-1 signaling complexes. *Science* 1993; 260:1950-2
68. Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA. Association of SOS Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 1993; 363:45-51
69. Kyriakis JM, App H, Zhang X-f, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 1992; 358:417-21
70. O'Brien RM, Granner DK. Regulation of gene expression by insulin. *Biochem J* 1991; 278:609-19
71. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8:205-15
72. Moxham CP, Duronio V, Jacob S. Insulin-like growth factor-I receptor  $\beta$ -subunit heterogeneity. *J Biol Chem* 1989; 264:13238-44
73. Soos MA, Whittaker J, Lammers R, Ullrich A, Siddle K. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. *Biochem J* 1990; 270:383-90
74. Kasuya J, Paz BL, Maddux BA, Goldfine ID, Hefta SA, Fujita-Yamaguchi Y. Characterization of human placental insulin-like growth factor-I/insulin hybrid receptors by protein microsequencing and purification. *Biochemistry* 1993; 32:13531-6
75. Soos MA, Field CE, Siddle K. Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I but not insulin with high affinity. *Biochem J* 1993; 290:419-26
76. Streuli CH, Bailey N, Bissell M J. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of



- cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* 1991; 115:1383-95
77. Aggeler J, Ward J, Blackie LM, Barcellos-Hoff MH, Streuli CH, Bissell MJ. Cytodifferentiation of mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane reveals striking similarities to development in vivo. *J Cell Sci* 1991; 99:407-17
  78. Farrelly N, Lee YJ, Oliver J, Dive C, Streuli CH. Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling. *J Cell Biol* 1999; 144:1337-48
  79. Edwards GM, Wilford FH, Liu X, Hennighausen L, Djiane J, Streuli CH. Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 1998; 273:9495-9500
  80. Jamora C, Fuchs E. Intracellular adhesion, signaling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biology* 2002; 4(4):E101-8
  81. Pawson T, Scott JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 1997; 278(5346):2075-80
  82. Iwabuchi K, Handa K, Hakomori S. Separation of “glycosphingolipid signaling domain” from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. *J Biol Chem* 1998; 273(50):33766-73
  83. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK  $\beta$ . *Science* 2001; 293(5535):1673-7
  84. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Yuan M, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *JCI* 2001; 108(3):437-46
  85. Cernuda-Morollon E, Pineda-Molina E, Canada FJ, Perez-Sala D. 15-deoxy-<sup>12</sup>,<sup>14</sup>-PGJ<sub>2</sub> inhibition of NF- $\kappa$ B-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* 2001; 276(38):35530-6
  86. Yamaguchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) deficiency and PPAR $\gamma$  agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem* 2001; 276(44):41245-54
  87. Inoue G, Cheatham B, Emkey R, Kahn CR. Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes: Differential compartmentalization and trafficking of insulin

- receptor substrate-1 (IRS-1) and IRS-2. *J Biol Chem* 1998; 273(19):11548-55
88. Clark SF, Martin S, Carozzi AJ, Hill MM, James DE. Intracellular localization of phosphatidylinositol 3-kinase and insulin receptor substrate-1 in adipocytes: Potential involvement of a membrane skeleton. *J Cell Biol* 1998; 140(5):1211-25
89. Jullien D, Tanti JF, Heydrick SJ, Gautier N, Gremeaux T, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Differential effects of okadaic acid on insulin-stimulated glucose and amino acid uptake and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Biol Chem* 1993; 268(20):15246-51
90. Van Renterghem B, Morin M, Czech MP, Heller-Harrison RA. Interaction of insulin receptor substrate-1 with the sigma 3  $\alpha$  subunit of the adaptor protein complex-3 in cultured adipocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(45):29942-9
91. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser 307. *J Biol Chem* 2000; 275(12):9047-54
92. Clark SF, Melero JC, James DE. Release of insulin receptor substrate proteins from an intracellular complex coincides with the development of insulin resistance. *J Biol Chem* 2000; 275(6):3819-26
93. Peraldi P, Spiegelman B. TNF-alpha and insulin resistance: Summary and future prospects. *Molecular & Cellular Biochemistry* 1998; 182(1-2):169-75
94. Bousquet C, Delesque N, Lopez F, Saint Laurent N, Esteve JP, Bedecs K, Buscail L, Vaysse N, Susini C. sst 2 somatostatin receptor mediates negative regulation of insulin receptor signaling through the tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* 1998; 273:7099-7106
95. Goldstein BJ, Ahmad F, Ding W, Li PM, Zhang WR. Regulation of the insulin signaling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem* 1998; 182:91-99
96. Vuori K, Ruoslahti E. Association of insulin receptor substrate-1 with integrins. *Science* 1994; 266:1576-78
97. Schneller M, Vuori K, Ruoslahti E. Alphabeta 3 integrin associates with activated insulin and PDGF beta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J* 1997; 16:5592-9
98. Guilherme A, Torres K, Czech MP. Cross-talk between insulin receptor and integrin alpha 5 beta 1 signaling pathways. *J Biol Chem* 1998; 273:22899-903
99. Guilherme A, Czech MP. Stimulation of IRS-1-associated phosphatidylinositol

- 3-kinase and Akt/protein kinase B but not glucose transport by beta 1 integrin signaling in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1998; 273:33119-122
100. El Annabi S, Gautier N, Baron V. Focal adhesion kinase and Src mediate integrin regulation of insulin receptor phosphorylation. *FEBS Letters* 2001; 207(3):247-522
101. Lebrun P, Mothe-Satney L, Delahaye L, Van Obberghen M, Baron V. Insulin receptor substrate-1 as a signaling molecule for focal adhesion kinase pp125(FAK) and pp60(Src). *J Biol Chem* 1998; 273:32244-53
102. Delcommenne M, Streuli CH. Control of integrin expression by extracellular matrix. *J Biol Chem* 1995; 270:26794-801
103. Walker JL, Zhang L, Zhou J, Woolkalis MJ, Menko AS. Role of alpha 6 integrin during lens development: Evidence for signaling through IGF-IR and Erk. *Developmental Dynamics* 2002; 223(2):273-84
104. Myers MG, Mendez R, Shi P, Pierce JH, Rhoads R, White MF. The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. *J Biol Chem* 1998; 273:26908-14
105. O' Grady P, Thai TC, Saito H. The laminin-nidogen complex is a ligand for a specific splice isoform of the transmembrane protein tyrosine phosphatase LAR. *J Cell Biol* 1998; 141:1675-84
106. Aoki N, Kawamura M, Yamaguchi-Aoki Y, Ohira S, Matsuda T. Down-regulation of protein tyrosine phosphatase gene expression in lactating mouse mammary gland. *J Biol Chem* 1999; 274(4):669-75
107. Schaapveld RQ, Schepens JT, Robinson GW, Attema J, Oerlemans FT, Fransen JA, Streuli M, Wieringa B, Hennighausen L, Hendriks WJ. Impaired mammary gland development and function in mice lacking LAR receptor-like tyrosine phosphatase activity. *Developmental Biology* 1997; 188(1):134-46
108. Egawa K, Nakashima N, Sharma PM, Maegawa H, Nagai Y, Kashiwagi A, Kikkawa R, Olefsky JM. Persistent activation of phosphatidylinositol 3-kinase causes insulin resistance due to accelerated insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 2000; 141(6):1930-5
109. Lee AV, Gooch JL, Oesterreich S, Guler RL, Yee D. Insulin-like growth factor 1-induced degradation of insulin receptor substrate-1 is mediated by the 26S proteasome and blocked by phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. *Molecular*

*& Cellular Biology* 2000; 20(5):1489-96

110. Farrelly N, Lee YJ, Oliver J, Dive C, Streuli CH. Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling. *J Cell Biol* 1999; 144(6):1337-48
111. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271(5249):665-8
112. Tagami S, Inokuchi Ji J, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, Uemura S, Ogawa C, Ishii A, Saito M, Ohtsuka Y, Sakaue S, Igarashi Y. Ganglioside GM<sub>3</sub> participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem* 2002; 277(5):3085-92
113. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR $\gamma$  is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular Cell* 1999; 4(4):611-7
114. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR  $\gamma$ . *Molecular Cell* 1998; 1(3):465-70
115. Smith RM, Harada S, Smith JA, Zhang S, Jarett L. Insulin-induced protein tyrosine phosphorylation cascade and signaling molecules are localized in a caveolin-enriched cell membrane domain. *Cellular Signaling* 1998; 10(5):355-62
116. Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, Borg M, Lindroth M, Peterson KH, Magnusson KE, Stralfors P. Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB Journal* 1999; 13(14):1961-71
117. Hill MM, Clark SF, James DE. Insulin-regulatable phosphoproteins in 3T3-L1 adipocytes from detergent-insoluble complexes not associated with caveolin. *Electrophoresis* 1997; 18(14):2629-37
118. Parpal S, Karlsson M, Thorn H, Stralfors P. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J Biol Chem* 2001; 276(13):9670-8
119. Li R, Liu Y, Ladisch S. Enhancement of epidermal growth factor signaling and activation of Src kinase by gangliosides. *J Biol Chem* 2001; 276(46):42782-92

120. Miljan EA, Meuillet EJ, Mania-Farnell B, George D, Yamamoto H, Simon HG, Bremer EG. Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. *J Biol Chem* 2002; 277(12):10108-13
121. Paz K, Liu YF, Shorer H, Hemi R, LeRoith D, Quan M, Kanety H, Seger R, Zick Y. Phosphorylation of IRS-1 by PKB positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem* 1999; 274(40):28816-22