

R
008.8
8712

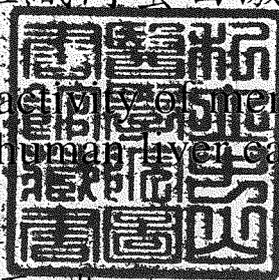
中山醫學院生物化學研究所 碩士論文

指導教授：劉哲育博士

第一部份：甲釋素刺激泌乳素分泌細胞分泌泌乳素與細胞內鈣離子釋放關係之研究
The investigation of the correlation between calcium release and prolactin secretion in female rat lactotrophs

第二部份：硝酸鉛影響 ATP 誘發大白鼠肝細胞內鈣離子釋放機制之探討
Effect of Lead-Nitrate on ATP-induced calcium release in rat hepatocyte

第三部份：人類肝癌組織內蛋白激酶 C 活性之探討
The altered activity of membrane-bound protein kinase C in human liver cancer



研究生：鄭至凱 (Cheng Chih-Kai) 撰

中華民國八十五年六月



授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 生物化學研究所
_____ 組 84 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 第一部份:甲釋素刺激密乳素分泌細胞分泌乳素與細胞內鈣離子釋放
關係之研究. 第二部份:硝酸鉛影響ATP誘發大白鼠肝細胞內鈣離子釋放
機制之探討. 第三部份:人類肝癌組織內蛋白激酶素C活性之探討.

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要, 授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院
國家科學委員會科學技術資料中心, 得重製成電子資料檔後收錄於該單位之
網路, 並與台灣學術網路及科技網路連線, 得不限地域時間與次數, 以光碟
或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料, 授予行政院國家科學委員科學技術資
料中心, 得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行, 並得享該中心微
縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰
元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請, 請將本論文全文延後至
民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

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

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行
權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 劉哲育

研究生簽名: 鄭至凱 學號: R8302111
(親筆正楷)

日期: 民國 ____ 年 ____ 月 ____ 日

- 備註: 1. 上述同意與不同意之欄立若未鈎選, 本人同意視同授權。
2. 授權第二項者, 請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：鄭至凱 聯絡電話：(06)5817629

地址：台南縣善化鎮復興街15號

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，
經中山醫學院生物化學研究所論文考試委員審查合格及口
試通過。

口試委員

國立陽明大學生理學研究所教授

王錫崗博士

王錫崗

私立中山醫學院生物化學所副教授

謝易修博士

謝易修

私立中山醫學院生物化學所副教授
(論文指導教授)

劉哲育博士

劉哲育

中華民國八十五年六月十七日

學生鄭至凱論文題目為(1) 甲釋素刺激泌乳素分泌細胞分泌泌乳素與細胞內鈣離子釋放關係之研究 (2) 硝酸鉛影響ATP誘發大白鼠肝細胞內鈣離子釋放機制之探討 (3) 人類肝癌組織內蛋白激酵素C活性之探討，其論文已經中山醫學院生化研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：劉哲育 博士

簽名：劉哲育

中華民國 85 年 8 月 16 日

誌 謝

由衷的感謝我的指導教授劉哲育博士耐心的指導，使我不斷成長與學習，謹在此致上我最深的敬意與謝意。另外感謝謝易修博士在實驗上，處處的幫忙並提供寶貴意見。感謝王錫崗教授對本論文的審閱及斧正，並對本論文提出建設性建議。同時要感謝陳凌雲博士在課業與實驗上熱心的賜教。

此論文的付梓，我感謝解剖學科鄭敏雄老師和王旭明老師在共軛焦顯微鏡觀測上的協助，及共同科黃俊明老師所提供的初代培養肝細胞。對於實驗室正忠學長、玉美、自君、繆珍、耀騰、秀如及麗娟的幫忙與支持在此一併感謝。

最後，謹以此論文獻給關懷、體諒我的父母與家人，你們的鼓勵與包容，使我得以完成此目標。

目錄

縮寫表 -----	1
第一部份：甲釋素刺激泌乳素分泌細胞分泌泌乳素與細胞內鈣離子 釋放關係之研究 -----	3
壹、中文摘要 -----	4
貳、英文摘要 -----	5
參、緒言 -----	6
肆、材料與方法 -----	7
伍、結果 -----	17
陸、討論 -----	20
第二部份：硝酸鉛影響 ATP 誘發大白鼠肝細胞內鈣離子釋放機制之探討	
第一章：硝酸鉛影響 ATP 誘發大白鼠肝細胞內鈣離子釋放之研究 ---	21
壹、中文摘要 -----	22
貳、英文摘要 -----	23
參、緒言 -----	24
肆、材料與方法 -----	25
伍、結果 -----	28
陸、討論 -----	29
第二章：硝酸鉛影響大白鼠肝細胞內蛋白激酵素 C 活性之研究 -----	30
壹、中文摘要 -----	31
貳、英文摘要 -----	32
參、緒言 -----	33

肆、材料與方法 -----	36
伍、結果 -----	42
陸、討論 -----	43
第三章：硝酸鉛影響 IP ₃ 誘發大白鼠肝細胞內 IP ₃ 接受器所誘發之細胞內鈣離子之研究 -----	44
壹、中文摘要 -----	45
貳、英文摘要 -----	46
參、緒言 -----	47
肆、材料與方法 -----	48
伍、結果 -----	51
陸、討論 -----	52
第三部份：人類肝癌組織內蛋白激酵素 C 活性之探討 -----	53
壹、中文摘要 -----	54
貳、英文摘要 -----	55
參、緒言 -----	56
肆、材料與方法 -----	58
伍、結果 -----	62
陸、討論 -----	64
參考文獻 -----	65
圖 表 -----	75

縮寫表

BCIP	: 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BSA	: Bovine serum albumin
DAG	: Diacylglycerol
DEAE	: DEAE-cellulose
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	: Ethylene glycol bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid
FBS	: Fetal bovine serum
HEPES	: N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid]
NBT	: Nitrobluetetrazolium
PKC	: Protein kinase C
aPKCs	: Atypical PKCs
cPKCs	: Conventional PKCs
nPKCs	: Novel PKCs
PMA	: Phorbol 12-mtristate 13-acetate (=TPA)
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluororide
PRL	: Prolactin
PSN	: Penicillin-streptomycine-neomycine
PVDF	: Polyvinylidene fluoride
SCIBA	: Sequential cell immunoblot assay

SDS : Sodium dodecyl sulfate
TCA : Trichloroacetic acid
TEMED : Tetramethyl ethylenediamine
TPA : 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
TRH : Thyrotropin releasing hormone
TSH : Thyroid stimulating hormone

第一部份

甲釋素刺激泌乳素分泌細胞分泌泌乳素
與細胞內鈣離子釋放關係之研究

壹、中文摘要

以前的研究已指出在以甲釋素 (TRH) 所誘發的泌乳素 (Prolactin) 分泌，可藉著細胞內鈣離子的釋放來調控。而我們以螢光共軛焦顯微鏡來測定細胞內鈣離子的釋放，和利用連續的細胞免疫墨點分析法 (SCIBA) 來測定泌乳素的釋放量。實驗結果發現在單獨的泌乳素分泌細胞 (Lactotroph) 以甲釋素刺激後，會增加泌乳素的分泌，但與細胞內鈣離子的釋放是沒有一致性，我們實驗證實鈣離子的釋放並不是影響泌乳素分泌的唯一路徑。我們也發現在一些泌乳素分泌細胞，在接受甲釋素刺激後並無鈣離子流動現象，仍然有泌乳素增強分泌的現象。

貳、英文摘要

The thyrotropin-releasing hormone (TRH) stimulated prolactin secretion by modulating intracellular calcium release was investigated. The release of intracellular calcium was measured by fluorescence confocus microscope, and the amount of prolactin secretion was determined by sequential cell immunoblot assay (SCIBA). The result have found that the increased secretion of prolactin from individual lactotroph stimulated by TRH was not correlated with the change of intracellular calcium release. It is confirmed that changes of calcium is not the sole final pathway of intracellular transduction systems for prolactin release. We also suggest that the prolactin secretion of some lactotrophs was stimulated by TRH, was not due to the mechanism of calcium mobility.

參、緒言

泌乳素(Prolactin, PRL)是一種由腦下垂體前葉嗜酸性細胞所分泌的激素，在生理上扮演著許多重要的角色。從魚類體內滲透度的調節，電解質的代謝，鵝乳的生成，以至於哺乳類的乳腺分化成長及促進雌雄性性腺的成熟等反應，都是泌乳素PRL的作用範圍。

泌乳素的分泌和其他腦下垂體前葉釋放的激素不同，主要是受到來自下視丘的抑制調節，目前已知的抑制因子(PIF)是度巴胺(Dopamine)。而泌乳素的分泌也會受到來自下視丘的釋放因子(PRF)所調控。現今知道的有甲釋素(Thyrotropin releasing hormone, TRH)，小腸升壓素(Vasoactive intestinal Polypeptide, VIP)，動情素(Estrogen)等。其中甲釋素是甲促素(Thyroid stimulin hormone, TSH)的釋放因子，同時可以影響泌乳素及生長激素(Growth hormone, GH)的分泌。

過去許多學者認為在細胞質內鈣離子濃度的改變對於泌乳素的釋放十分重要(1)，但最近研究指出細胞質內鈣離子濃度的改變並不是影響泌乳素分泌唯一的路徑(2)，然而他們的實驗方法皆是以群體細胞為測定的模式，並不能觀察到每個細胞內鈣離子濃度的改變與泌乳素釋放之關係。本論文利用一種改良的連續細胞免疫墨點分析法(3)，測定單一細胞內泌乳素的釋放，並配合螢光探針來觀察單一細胞內鈣離子濃度的變化。而我們的實驗結果顯示出細胞的泌乳素釋放與細胞內鈣離子濃度的變化似乎並不太一致，另外我們也發現到某些細胞其細胞內鈣離子濃度並無變化，但細胞的泌乳素有明顯的釋放。

肆、材料與方法

一、實驗材料

Male Wistar rat 購自台大醫學院動物中心。

Glycerol, SDS, Acrylamide, Glycine, Tween-20 購自德國 Merck公司。

Lead nitrate, Calcium chloride, Magnesium chloride, Potassium chloride 購自和光純藥工業株式會社。

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Leupeptine, Trypsin (type III), 1,2-Diolein(1,2-dioleoylglycerol), Glucose, Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), Tris(hydroxymethyl)-amino methane hydrochloride (Tris-HCl), Ethylene glycol bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), Dithiothreitol, Nitroblue tetrazolium (NBT), 5-bromo-4-chloro-3-indolylophosphate (BCIP), Bovine serum albumin (BSA), N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid] (HEPES) 均購自美國Sigma公司。

DMSO, Sodium chloride 購自聯工化學廠股份有限公司。

TEMED 購自美國Bio-Rad公司。

Ammonium persulphate 購自美國Serva公司。

Methanol 購自皓峰企業股份有限公司。

PSN antibiotic mixture, DMEM, FBS 購自美國Gibco BRL公司。

Anti-rabbit IgG 購自Promega公司。

Anti-PRL 為王錫崗教授惠贈

Fluo-3-AM, Fura RedTM-AM 購自美國 Molecular Probes 公司

二. 實驗動物與設計

本研究使用動物購自台大醫學院動物中心，為Wistar品系之雌性大白鼠，重約220-280g。

三. 大白鼠腦下垂體前葉細胞之初代培養(4)

以購自台大醫學院動物中心之Wistar品系雌性大白鼠(重約220-280g)斷頭犧牲，取其腦下垂體前葉進行酵素分解作用，將腦下垂體前葉浸在2ml DMEM 中切碎，至離心機 (Beckman GS-6R)在 4°C 離心 600rpm，去除上清液，加入 1ml 0.5% trypsin (type III, sigma, St. Louis, MO)在 37°C 作用 15 分鐘，後加入 1ml 0.004% Deoxyribonuclease 作用 1 分鐘，再加入 1ml 0.1% soybean trypsin inhibitor 作用 10 分鐘，至離心機在 4°C 離心 600rpm，去除上清液，加入 1ml 含 2mM EDTA 的 Ca²⁺ & Mg²⁺ free Hanks' Balanced Salt solution (NaCl 8g, KCl 0.4g, KH₂PO₄ 0.06g, NaHCO₃ 0.35g, Na₂HPO₄.H₂O 0.06g, Glucose 1g/l, pH 7.2) 作用 5 分鐘，同樣離心去除上清液，加入 1ml 含 1mM EDTA 的 Hanks' solution 作用 15 分鐘後離心去除上清液，在加入 10ml 含 0.1% BSA 之 DMEM，將沈澱物打散，培養於含有 10% 胎牛血清 (Calf bovine serum)、1% PSN antibiotic mixture、DMEM 培養基中，種細胞於 35 mm 培養盤中，每個培養盤約含 5 × 10³ 個細胞，將之置於 37°C，5% CO₂ 之培養箱中培養。以 10% FCS DMEM 進

行培養 96 小時 (每 24 小時更換一次培養基，最後 24 小時更換成不含 phenol red 的培養基)。

四. 腦下垂體前葉細胞內鈣離子釋放之觀察

培養 96 小時腦下垂體前葉細胞，將 5 μ g 螢光劑 Fluo-3 (圖 26) 或 Fura-Red (圖 27) 溶於 25 μ l DMSO 中，取 2 μ l 與等體積的 25% Pluronic acid 混合均勻後加入 0.5ml DME medium 中，以此置換細胞的培養基，於 37°C 二氧化碳培養箱培養細胞 30 分鐘，再以衝填過氧氣的等張溶液 (140mM NaCl, 2mM CaCl₂, 4.6mM KCl, 10mM glucose 及 10mM HEPES, pH 7.4)，清洗三次，最後以 1ml 該等張溶液覆蓋細胞，將培養皿固定於共軛焦電子顯微鏡觀察臺，先在可見光下調整焦聚及適當的視野，然後將光源固定固定系統轉換至雷射光波長 488nm 的條件，並設定光源每十秒掃瞄一次且連續觀測 150 秒，並直接將結果顯示於螢光幕，電腦條件設定完成後以直徑 1mm 塑膠管為針頭延長線，用 1ml 針筒先吸入前述等張緩衝液 30 μ l 再抽取微量空氣，接著吸入 10 μ M 的 TRH，將塑膠延長管接上事先固定於培養皿周圍可深入細胞液面中的小塑膠管上，啟動先前設定條件的同時以針筒小心的注入 TRH，並且以針筒反覆吸抽約 4、5 次，將連續掃瞄得到的影像存檔並以電腦直接照像。其螢光強度轉換成鈣離子濃度是參考 Burnier 等人的方式(5)，以 A23187 (10⁻⁵ M) 刺激後(圖 2)，造成鈣離子大量進入細胞質，而使細胞質內的螢光染劑達到飽和狀態時的螢光強度當作最大強度 (F_{max})，而以加入 5mM EDTA 所捉掉鈣離子後螢光染劑的螢光強度當作最小強度 (F_{min})。而我們所測到的螢光強度變化當作 (F)，將其帶入以下公式內計算既可將螢光強度轉換成鈣離子濃度：

$$[Ca^{2+}] = K_d (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

K_d 是解離常數，每個螢光染劑皆不同。

五. TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內鈣離子釋放之觀察

腦下垂體前葉細胞如上述方法，進行 TRH 誘發鈣離子釋放之實驗，第一次刺激與鈣離子釋放現象觀察結束後，細胞再繼續培養30分鐘，將培養液收集回收，並更換成新的衝填過氧氣的等張溶液(每30分鐘更換一次，收集更換下的溶液)，靜置 2 個小時後再置於共軛焦顯微鏡下，再一次進行 TRH 刺激腦下垂體前葉細胞鈣離子釋放的觀察及後續溶液的收集。

六. 西方墨點分析法(Western blot)(6, 7)

(1.) 樣本之處理：

將收集更換下的溶液，取400 ul 進行真空抽乾，加入處理緩衝液(treatment buffer) 60ul [5 M Tris-Cl (pH 6.8)，2% (w/v) SDS，10% sucrose，0.002% bromophenol blue]，混勻煮沸10分鐘後，迅速插入冰水浴中，以 Microcentrifuge spin-down，接下來即可進行 SDS-poly-acrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)。

(2.) SDS-聚丙烯醯胺板膠之製備

上層膠體：為4% Stacking gel，組成為4.5% Acrylamide，0.12% N,N-Bis-methylene acrylamide，0.125M Tris-HCl (pH 6.8)，1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)，0.025% Tetramethyl ethylenediamine(TEMED)，0.05% ammonium persulfate (AP)。

下層膠體：為10% Separating gel，組成為 10% Acrylamide，0.268% N,N'-Bis-methylene acrylamide，0.375M Tris-

HCl (pH 8.8), 0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.025% Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) 和 0.05% ammonium persulfate (AP)。

(3.) 電泳之操作

將做好的板膠固定到電泳裝置上，用 1× Tank buffer (25mM Tris-HCl, pH8.3, 0.192M Glycine, 0.1% SDS) 為電泳緩衝液注滿上下電泳槽，取經處理過的蛋白樣品溶液加入板膠上所形成的 U 型槽中，以 140 Voltage, 35mA 進行電泳。

(4.) 蛋白轉置

電泳完畢後，將膠體浸入冰冷的 Electrotransfer buffer [25 mM Tris-HCl (pH8.3), 0.192M glycine, 20% (v/v) methanol] 約 5-10 分鐘，之後將膠體平鋪在兩張浸濕的 Whatman 3M 濾紙上，然後再將預先浸濕的硝化纖維紙 (nitrocellulose paper) 蓋在膠體上面，依次再覆蓋兩張浸濕的 3M 濾紙，並以玻璃棒小心趕走其間的氣泡，然後裝入 Transfer holder 內，再置於 Electrotransfer tank (Hoefer) 以 4°C, 100mA 進行電轉移。

(5.) 蛋白雜交作用與顯色

電轉移過夜後，將硝化纖維紙取出浸入 1 ml/cm 的含 3% (w/v) FBS 之 TBST 緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20]，在室溫搖動 1 小時，然後以 TBST 緩衝液清洗兩次，每次 10 分鐘。加 20 μ g 抗 PRL 抗體 (Anti-PRL IgG, 購自 GIBCO BRL) 於 20ml 含 1% (w/v) FBS 的 TBST，然後與硝化纖維紙在室溫下作用

4小時，之後以TBST緩衝液清洗兩次，每次10分鐘。與Primary Antibody作用後硝化纖維紙，再進一步與加有 $20 \mu\text{g}$ Secondary Antibody (Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-rabbit IgG，購自 Promega) 含1% (w/v) FBS 的 TBST buffer 20ml，於室溫下作用1小時後，TBST 緩衝液清洗二次，每次10分鐘，最後將硝化纖維紙浸入 20ml 的受質溶液(substrate buffer) [即20ml受質緩衝液(100mM Tris-HCl, pH9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) 加上7mg的Nitroblue-tetrazolium (NBT)及5 mg的5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)]進行呈色反應，約5~10分鐘後可用去離子水終止呈色反應並清洗之。

七、連續細胞免疫墨點分析法(Sequential cell immunoblot assay, SCIBA)(3)

將種於35 mm培養盤培養 96小時腦下垂體前葉細胞，以充填過氧氣的等張溶液清洗三次，最後以1ml該等張溶液覆蓋細胞培養 5分鐘，取 $1.5 \times 1.3 \text{ cm}^2$ PVDF 膜先處理甲醇使其變成親水性，再將此膜浸入水中及等張溶液中，把覆蓋細胞的等張溶液吸乾，貼上一張含 20ul 等張溶液的 PVDF 膜作用15分鐘，緩緩加入 2 ml 的等張溶液使膜浮起，將此膜移出再將等張溶液吸乾，另外貼上一張含 20ul 等張溶液的 PVDF 膜作用15分鐘(測定其基礎分泌量)，亦緩緩加入 2 ml 的等張溶液使膜浮起，將此膜浸入冰冷的 Electrotransfer Buffer。將培養皿內等張溶液吸乾，另外貼上一張含 20ul 100 nM TRH 的 PVDF 膜作用15分鐘，亦將此膜浸入冰冷的 Electro-

transfer Buffer。將培養皿內等張溶液吸乾後置換成不含 phenol Red 的培養基，置於 37°C，5% CO₂之培養箱中培養 4 個小時後再取出重複上述步驟。

將浸在 Electrotransfer buffer 的 PVDF 膜取出浸入 1 ml 含 10% (w/v) BSA 之 Blocking 緩衝液 [20mM Tris-HCl (pH7.6) ， 0.9% NaCl ， 10%BSA] ， 在室溫搖動 1 小時，然後以沖洗緩衝液清洗兩次，每次 10 分鐘。加 20 μ g 抗 PRL 抗體 (Anti-PRL IgG，購自 GIBCO BRL) 於 1ml 含 3% (w/v) BSA 的 TBST，然後與 PVDF 膜在室溫下作用 4 小時，之後以 TBST 緩衝液清洗兩次，每次 10 分鐘。與 Primary Antibody 作用後的 PVDF 膜，再進一步與加有 20 μ g Secondary Antibody (Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-rabbit IgG，購自 Promega) 含 1% (w/v) BSA 的 TBST buffer 20ml，於室溫下作用 1 小時後，TBST 緩衝液清洗二次，每次 10 分鐘，最後將 PVDF membrane 浸入 1ml 的受質溶液 (Substrate Buffer) [即 20ml 受質緩衝液 (100mM Tris-HCl, pH9.5, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂) 加上 7mg 的 Nitroblue-tetrazolium (NBT) 及 5 mg 的 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)] 進行呈色反應，約 5~10 分鐘後可用去離子水終止呈色反應並清洗之。

八. TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內泌乳素分泌與鈣離子釋放之觀察

將種於 35 mm 培養盤培養 96 小時腦下垂體前葉細胞，以充填過氧氣的等張溶液清洗三次，最後以 1ml 該等張溶液覆蓋細胞培養 5 分鐘，取 1.5×1.3 cm² PVDF 膜先處理甲醇使其變成親水性，再將此膜浸入水中及等張溶液中

，把覆蓋細胞的等張溶液吸乾，貼上一張含 20ul 等張溶液的 PVDF 膜作用 15 分鐘，緩緩加入 2 ml 的等張溶液使膜浮起，將此膜移出再將等張溶液吸乾，另外貼上一張含 20ul 等張溶液的 PVDF 膜作用 15 分鐘，亦緩緩加入 2 ml 的等張溶液使膜浮起，將此膜浸入冰冷的 Electrotransfer Buffer。將培養皿內等張溶液吸乾，另外貼上一張含 20ul 100 nM TRH 的 PVDF 膜作用 15 分鐘，亦將此膜浸入冰冷的 Electrotransfer Buffer。將培養皿內等張溶液吸乾後置換成不含 phenol Red 的培養基，置於 37°C，5% CO₂ 之培養箱中培養 4 個小時後再取出，將 5 μg 螢光劑 Fura-Red 溶於 25 μl DMSO 中，取 2 μl 與等體積的 25% Pluronic acid 混合均勻後加入 0.5ml DMEM 緩衝液中，以此置換細胞的培養基，於 37°C 二氧化碳培養箱培養細胞 30 分鐘，再以衝填過氧氣的等張溶液 (140mM NaCl, 2mM CaCl₂, 4.6mM KCl, 10mM glucose 及 10mM HEPES, pH 7.4)，清洗三次，最後以 1ml 該等張溶液覆蓋細胞，將培養皿固定於共軛焦電子顯微鏡觀察臺，進行 TRH 刺激腦下垂體前葉細胞鈣離子釋放的觀察。

九. TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內泌乳素分泌之連續觀察

與方法七的實驗步驟大致相同，只有在貼上一張含 20ul 100 nM TRH 的 PVDF 膜作用 15 分鐘這步驟改成先作用 5 分鐘，再更換一張含 20 ul 100 nM TRH 的 PVDF 膜作用 15 分鐘，其餘皆同於方法七。

十. TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內泌乳素分泌與鈣離子釋放之合併觀察

將種於 35 mm 培養盤培養 96 小時腦下垂體前葉細胞，以衝填過氧氣的等

張溶液清洗三次，最後以1ml該等張溶液覆蓋細胞培養5分鐘，取 1.5×1.3 cm² PVDF膜先處理甲醇使其變成親水性，再將此膜浸入水中及等張溶液中，把覆蓋細胞的等張溶液吸乾，貼上一張含20ul等張溶液的PVDF膜作用15分鐘，緩緩加入2ml的等張溶液使膜浮起，將此膜移出再將等張溶液吸乾，另外貼上一張含20ul等張溶液的PVDF膜作用15分鐘，亦緩緩加入2ml的等張溶液使膜浮起，將此膜浸入冰冷的 Electrotransfer Buffer (測定其基礎分泌量)。將培養皿內等張溶液吸乾後置換成不含 phenol Red 的培養基，置於37°C，5% CO₂之培養箱中，將5 μg螢光劑 Fura-Red 溶於25 μl DMSO中，取2 μl與等體積的25% Pluronic Acid混合均勻後加入0.5ml DMEM 緩衝液中，以此置換細胞的培養基，於37°C二氧化碳培養箱培養細胞30分鐘，再以衝填過氧氣的等張溶液(140mM NaCl，2mM CaCl₂，4.6mM KCl，10mM glucose及10mM HEPES，pH 7.4)，清洗三次，最後以1ml該等張溶液覆蓋細胞，將培養皿固定於共軛焦電子顯微鏡觀察臺，進行TRH刺激腦下垂體前葉細胞鈣離子釋放的觀察。靜置5分鐘後以衝填過氧氣的等張溶液清洗三次後將等張溶液吸乾，貼上一張含20ul 100 nM TRH的PVDF膜作用15分鐘，亦將此膜浸入冰冷的 Electrotransfer Buffer。而後如前所述進行PVDF膜的免疫墨點分析。

十一. 大白鼠腦下垂體前葉 **Lactotrophs** 之初代培養(8)

將方法三所得的腦下垂體前葉細胞進行進一步的分離，加入一個含0.3-2.4% BSA 濃度梯度的DMEM 中進行細胞分離，在室溫靜置3.5小時，再將其分成十個部份由上層往下層逐層吸出，除第一、二部份為30ml外，其餘部份皆為20ml，將此十部份至離心機(Beckman GS-6R)在4°C離心2000rpm 10分鐘，將上清液去除，加入2ml含10%

FBS 之 DMEM，將沈澱物打散，將其種於35 mm培養皿中，置於 37 °C、5% CO₂之培養箱中培養。

十二. TRH 刺激腦下垂體前葉 **Lactotrophs** 內鈣離子釋放之觀察

此步驟請參考方法五。除了腦下垂體前葉全體細胞培養改成 lactotrophs 培養外，大致與方法五相同。

伍、結 果

一、TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內鈣離子釋放之觀察

我們利用甲釋素去刺激腦下垂體前葉細胞，並在共軛焦顯微鏡下利用鈣離子特異性的螢光探針 Fura-Red.AM 觀察細胞內鈣離子釋放情形，結果顯示在 100 nM 的甲釋素刺激下，大部份腦下垂體前葉細胞內鈣離子會由細胞外或胞器中流入細胞質中，Fura-Red 因與鈣離子結合亮度變弱，如圖 3A 表示未刺激前，如圖 3B 為刺激後，而且這些腦下垂體前葉細胞在靜置 2 個小時後再進行甲釋素刺激亦有相同的現象(圖3 C,D)。比較前後兩次甲釋素刺激所造成的螢光強度變化(圖4)，顯示兩次刺激的結果有相關性，所以由甲釋素去刺激腦下垂體前葉細胞內鈣離子釋放是可以重複一次以上。

二. 西方墨點法分析收集更換下的緩衝溶液內泌乳素含量

分析以甲釋素去刺激腦下垂體前葉細胞前後及在靜置2個小時後重複以甲釋素刺激，其前葉細胞分泌泌乳素至緩衝液內的情形(圖5)。由圖顯示在加入甲釋素去刺激腦下垂體前葉細胞時，泌乳素明顯增多，而後隨時間慢慢降低至2個小時後重複以甲釋素刺激又開始增多。顯示甲釋素去刺激腦下垂體前葉細胞分泌泌乳素也是可以重複一次以上。泌乳素出現在 23KDa 上，而且是單一帶(band)，顯示該抗體的專一性非常好，適合作以下的實驗(如 SCIBA)。

三、連續細胞免疫墨點分析法分析單一細胞泌乳素的分泌

此方法可測定單一細胞的分泌，我們將 PVDF 膜直接貼在細胞上，使細胞分泌的蛋白固著在膜上，將此膜進行免疫顯影，至 Density Meter (420oe & Quantity One) 定量其分泌。結果我們發現在不加甲釋素刺激的腦下垂體前葉細胞中有基礎泌乳素分泌(圖6A)，在加入甲釋素刺激後(圖6B)，部份有基礎泌乳素分泌的細胞泌乳素的分泌有增加，但

有些維持基礎泌乳素分泌，另外也有些無基礎泌乳素分泌的細胞也會出現泌乳素的分泌，而將此細胞置換成不含Phenol Red的培養基，置於 37 °C，5% CO₂之培養箱中培養 4 個小時後再去測定甲釋素刺激泌乳素的分泌(圖6 C,D)，亦可得到相似的結果。比較前後兩次基礎泌乳素分泌(圖7)和甲釋素刺激所造成的泌乳素的分泌增加(圖8)，顯示前後兩次的刺激所產生的反應有相關性(R值分別為 0.6963,0.7827)。

四. TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內泌乳素分泌與鈣離子釋放之觀察

由前面的結果我們得到一個結論，即TRH刺激腦下垂體前葉細胞內泌乳素分泌與鈣離子釋放可重複一次以上，固我們利用此特性設計了以下實驗，第一次以TRH刺激腦下垂體前葉細胞時，測定刺激前後泌乳素的分泌量(圖9 A,B)，在中間靜置 4 個小時後，第二次以TRH刺激腦下垂體前葉細胞時則測定細胞的鈣離子刺激前後的釋放情形(圖9 C,D)，將其螢光亮度變化換算成鈣離子濃度變化後(圖10)，比較單一細胞內泌乳素分泌與鈣離子釋放之情形(圖11,圖A為泌乳素的基礎分泌，圖B為刺激後泌乳素分泌，圖C為鈣離子的基礎釋放量，圖B為刺激後鈣離子的釋放量)，比較之間關係(圖12,圖A為受TRH刺激後真正的泌乳素分泌，圖B為受TRH刺激後真正的鈣離子的釋放情形)，顯示泌乳素分泌與鈣離子釋放並不一致(圖12 C)，R值為 0.2179 在統計學上相關性不顯著，而且有部份細胞雖無鈣離子釋放，仍然可以分泌泌乳素(圖12 No. 41,42)，可見鈣離子釋放並非泌乳素分泌唯一的機制。另外我們將 358 個泌乳素細胞分組分析，如表一，第一組為泌乳素與鈣離子都有反應的細胞，約佔 51%，TRH處理前泌乳素基礎釋放都集中在 0-5 Density 的範圍，TRH處理後，則轉移到 11-15 Density 的範圍。第二組約佔 17%，第三組約佔 22%，第四組約佔 10%，而第三組TRH處理後，則泌乳素的分泌量大都轉移到 16-20 Density 的範圍。從表一

的分析結果也顯示無鈣離子釋放，而仍然有泌乳素分泌的細胞佔22%(如第三組)，可見鈣離子釋放必非所有泌乳素細胞分泌泌乳素所必經訊息傳遞途徑。

五. TRH 刺激前5分鐘與後15分鐘腦下垂體前葉細胞內泌乳素分泌之觀察

因上個結果是由同一細胞在接受前後兩次刺激而得到的結果，故只能算是間接的結果，而爲了直接觀察在單一細胞接受一次刺激後細胞內泌乳素分泌與鈣離子釋放之觀察，我們先預作此實驗，觀察以 TRH 刺激時在前5分鐘與後15分鐘腦下垂體前葉細胞內泌乳素的分泌情形。結果尚在分析中，但我們可初步觀察到泌乳素在前5分鐘的分泌並不是很大量，而在後15分鐘則可測到明顯的泌乳素分泌。

六. TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內泌乳素分泌與鈣離子釋放之合併觀察

依上個實驗結果，我們合併觀察TRH 刺激腦下垂體前葉細胞的泌乳素分泌與鈣離子之釋放並分析所得到的結果(尚在分析中)，但我們初步發現與前面的結論相符。

七. TRH 刺激腦下垂體前葉 Lactotrophs 細胞內鈣離子釋放之觀察

依照圖 13 的實驗步驟，用0.3-2.4% BSA 濃度梯度的 DMEM 來分離細胞所得到的結果非預期的理想，因爲 Lactotrophs 細胞仍然散佈在多數的濃度梯度內，我們將各個濃度梯度內的細胞以 TRH 去刺激後，統計每個濃度梯度內細胞鈣離子濃度變化情形(圖14)。而且細胞分泌的物質利用西方墨點分析法分析(圖15)，所得到的結果無法明確表現抗體的專一性，顯然細胞已產生變化，分泌出某些無法猜測的蛋白，故我們下一步想利用 per-fusion 的方式來純化Lactotrophs 細胞。

陸、討 論

過去大多數學者都認為泌乳素的分泌與腦下垂體前葉泌乳細胞內鈣離子濃度的變化有很重要的關係(1)，但最近 Shin 等人指出細胞質內鈣離子濃度的改變並不是影響泌乳素分泌唯一的路徑。本論文利用改良的連續細胞免疫墨點分析法，配合螢光探針來探討單一細胞內泌乳素的分泌與細胞內鈣離子變化的相關性。實驗結果顯示出細胞的泌乳素釋放與細胞內鈣離子變化的相關性並不顯著(R值 0.2179)，與 Shin 等人的研究結果相符，即細胞質內鈣離子濃度的改變並不是影響泌乳素分泌唯一的路徑。另外我們也發現到一些細胞其細胞內鈣離子濃度並無變化，但細胞卻有明顯的泌乳素分泌。因此我們對結果做了幾點推測：(1) 是否因我們選用的螢光探針 Fura-Red 其靈敏度不夠，而造成細胞內細微鈣離子改變沒有偵測到，因此我們希望未來能使用靈敏度較高的螢光探針 Fura-2 進行更精細的偵測。(2) 若非螢光探針靈敏度的關係，則可能是另外有一個不依賴鈣離子而能使泌乳素分泌的路徑存在，而此點也可解釋為何細胞的泌乳素釋放與細胞內鈣離子變化的相關性並不顯著的原因，但此論點仍須進一步的研究探討。

第二部份

硝酸鉛影響 ATP 誘發大白鼠肝細胞內鈣 離子釋放機制之探討

第一章

硝酸鉛影響 ATP 刺激大白鼠肝細胞內鈣 離子釋放之研究

一、中文摘要

鉛是一種廣泛存在環境中的金屬毒性物質，會造成人們健康上的危害。在對幾種生物系統所作的研究調查中指出，鉛具有改變鈣離子所調控的反應。而本實驗以螢光共軛焦顯微鏡來觀察肝細胞在處理過硝酸鉛後，在 ATP 刺激下，細胞內鈣離子濃度改變的情形。實驗結果發現 50 μM 以上的硝酸鉛，經過 3 小時處理後，即具有降低 ATP 刺激細胞內鈣離子濃度改變的情形。我們推測鉛抑制 ATP 刺激老鼠肝臟細胞內鈣離子釋放之機制，可能與 P_2 -purinergic receptor 去敏感作用有關。

二、英文摘要

Lead is a toxic metal, widely distributed in the environment, that remains a significant health hazard. In several biological systems, lead alters calcium-mediated cellular processes. In this study, we investigated the effect of lead nitrate on calcium mediated cellular processes by ATP stimulation. The release of intracellular calcium was measured by fluorescence confocus microscope. The result showed that the ATP stimulated release of calcium from intracellular calcium stores was decreased after treatment with more than 50 μM concentration of lead nitrate for 3 hours . We suggest the inhibition of lead nitrate on ATP-induced cellular processes may be due to the desensitization of P₂-purinergic receptor.

參、緒 言

在眾多環境污染物裡，鉛是一種普遍存在環境當中的金屬污染物質(9,10)，曝露在鉛的污染下會產生一些毒發症狀(11-13)，例如神經系統紊亂、腎臟受損、心臟血管疾病、肝臟機能障礙等。鉛亦能促使已分化或未分化的組織（如腎小管細胞、淋巴細胞）細胞生長及產生增殖的現象，甚至是畸形增殖(14)。Krasovskii (1979) 發現，鉛可以造成肝臟腫大和重量的增加(15)。後來相關的研究也發現，注射硝酸鉛(lead nitrate)可以引發老鼠的肝臟增殖(hyperplasia) (16-18)，若以鉛處理肝細胞，也會增快細胞的分裂和增加 DNA 合成及蛋白質的含量(16)。目前的研究仍無法確切指出鉛存在活體內(*in vivo*) 真正的作用機轉。

以往所知在老鼠肝細胞上擁有兩種 P₂-purinergic receptor 分別是 P_{2y}-purinergic receptor 和 P_{2u}-purinergic receptor (21)，皆會受到 ATP 活化，而活化的 P₂-purinergic receptor 會活化 G 蛋白，在進一步活化磷酸脂解酵素 C，活化的磷酸脂解酵素 C 則會將 phosphatidylinositol 分解成 Inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) 和 Diacylglycerol (DAG)，而 IP₃ 會連接到胞器的接受器上，促使胞器內的鈣離子流入細胞質中(圖16)。因此本實驗擬以細胞模式來探討，在對環境污染物較敏感且沉積量也是最多的肝臟(19)，取肝細胞來探討硝酸鉛對其細胞內鈣離子分佈變化的關連性、以及使用 ATP 引發細胞內鈣離子濃度變化與硝酸鉛的加入是否有影響作進一步的研究。

肆、材料與方法

一、實驗材料

Male Wistar rat 購自台大醫學院動物中心。

Lead nitrate , Calcium chloride, Magnesium chloride , Potassium chloride 購自和光純藥工業株式會社。

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Leupeptine,, Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 2-Mercaptoethanol, Sodium bicarbonate , N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES) , Tris(hydroxymethyl)-amino methane hydrochloride (Tris-HCl), Ethylene glycol bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), Glutathione , Cysteine, Dithiothreitol, Nitroblue tetrazolium(NBT), 5-bromo-4-chloro-3-indolylophosphate (BCIP) , Triton X-100 均購自美國Sigma公司。

DMSO, Sodium chloride 購自聯工化學廠股份有限公司。

TEMED 購自美國Bio-Rad公司。

Ammonium persulphate 購自美國Serva公司。

Methanol 購自皓峰企業股份有限公司。

PSN antibiotic mixture, DMEM, FBS, Anti-PKC IgG 購自美國Gibco BRL 公司。

Anti-rabbit IgG 購自Promega公司。

Fluo-3-AM 購自美國 Molecular Probes 公司

二. 實驗動物與設計

本研究使用購自台大醫學院動物中心之Wistar品系大白鼠，首先選取重約220-280g的雄性Wistar大白鼠為實驗動物。

三. 肝細胞之初代培養(20)

初代肝細胞之培養是根據 Bonney 等人之方法以肝臟灌流方式取得 (Two stage liver perfusion method)。以購自台大醫學院動物中心之Wistar品系雄性大白鼠(重約220-280g)從腹腔注射給予 Pentobarbital (50mg/ml/500g) 麻醉，麻醉後打開腹腔以 20G 血管導管刺穿肝門靜脈，將之固定後打入添加 EDTA 而不含鈣、鎂離子的 Hanks'緩衝液 (Hanks' balanced salt solution) 灌流，同時剪斷下腔靜脈放血，等全身血液都被更換後，再更換以含有膠原酵素 (Collagenase) 之Hanks'緩衝液灌流，取下肝臟進行肝細胞分離，在依實驗需要將細胞數目培養於含有 10% 胎牛血清 (Calf bovine serum)、1% PSN antibiotic mixture、1%Glutamine 之 Williams E 培養基中，將之置於 37°C，5% CO₂之培養箱中培養。於 4 小時之後更換培養基除去未附著的細胞後當作以下各實驗之細胞材料。

四. ATP 刺激肝細胞內鈣離子釋放之觀察

種細胞於35 mm培養盤中，每個培養盤約含 5×10^3 個細胞，以10% FBS DMEM 進行培養 12小時，將5 μ g 螢光劑 Fluo-3 溶於25 μ l DMSO中並與等體積的25% Pluronic acid混合均勻，取2 μ l加入 0.5ml DMEM中，以此置換細胞的培養基，於37°C二氧化碳培養箱培養細胞30分鐘，再以衝填過氧氣的等張溶液(140mM NaCl，2mM CaCl₂，4.6mM KCl，10mM glucose及10mM HEPES，pH 7.4)，清洗三次，最後以1ml該等張溶液覆蓋細胞，將培養盤固

定於共軛焦電子顯微鏡觀察臺，先在可見光下調整焦聚及適當的視野，然後將光源固定固定系統轉換至雷射光波長488nm的條件，並設定光源每十秒掃瞄一次且連續觀測150秒，並直接將結果顯示於螢光幕，電腦條件設定完成後以直徑1mm塑膠管為針頭延長線，用1ml針筒先吸入前述等張緩衝液30 μ l再抽取微量空氣，接著吸入10 μ M的ATP，將塑膠延長管接上事先固定於培養皿周圍可深入細胞液面中的小塑膠管上，啓動先前設定條件的同時以針筒小心的注入ATP，並且以針筒反覆吸抽約4、5次，將連續掃瞄得到的影像存檔並以電腦直接照像。

五. 硝酸鉛影響ATP 刺激肝細胞內鈣離子釋放之觀察

種細胞於35 mm培養盤中，每個培養盤約含 5×10^3 個細胞，以添加不同濃度(10,5,1,0.5 mM)硝酸鉛的10% FCS DMEM 進行培養 12小時後，利用上述方法，測定鈣離子釋放的情形，。接著取硝酸鉛抑制ATP最佳的濃度，處理 0.5,3,4 和 15小時後，測定鈣離子釋放的反應，觀察硝酸鉛與ATP、鈣離子的關係。

伍、結果

從實驗的觀察中，我們發現加入 1mM ATP 可使肝細胞內部鈣離子產生變化(圖18,19 U,V,W)，此時透過螢光鈣離子探針 Fluo-3 亮度的變化可觀察到鈣離子集中到細胞質，也就是細胞外和胞器內的鈣離子流入細胞質內。而加入不同濃度 (0,1,10,50,100,200 uM)硝酸鉛培養 12 小時後，再加入 1mM ATP 去刺激 (圖20)。結果發現 50 uM 以上硝酸鉛培養 12 小時後的肝細胞，肝細胞內部鈣離子濃度變化的反應中會有明顯抑制(圖19 X,Y,Z)。顯示 50 uM 以上硝酸鉛的濃度會抑制ATP 刺激細胞外和胞器內的鈣離子流入細胞質內的反應。

而後我們處理不同時間硝酸鉛，觀察硝酸鉛抑制ATP 刺激細胞外和胞器內鈣離子流入細胞質內的反應關係，即在不同時間將50 uM 硝酸鉛加入肝細胞的培養基 DMEM 中，再從共軛焦顯微鏡觀察 1mM ATP 刺激肝細胞內部鈣離子產生變化的反應，並將鈣離子變化之濃度計算出來(圖21)。結果我們可發現硝酸鉛處理 3 小時以後就可抑制ATP 刺激細胞外和胞器內的鈣離子流入細胞質內的反應。

陸、討論

目前所知在老鼠肝細胞上擁有兩種 P₂-purinergic receptor 分別是 P_{2y}-purinergic receptor 和 P_{2u}-purinergic receptor (21)，皆會受到 ATP 活化，而活化的 P₂-purinergic receptor 會活化 G 蛋白，在進一步活化磷酸脂解酵素 C，活化的磷酸脂解酵素 C 則會將 phosphatidylinositol 分解成 Inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) 和 Diacylglycerol (DAG)，而 IP₃ 會連接到胞器的接受器上，促使胞器內的鈣離子流入細胞質中(圖16)。另外 ATP 也會活化細胞膜上 ATP-Gated ion channels 而使細胞外鈣離子流入。根據我們的實驗結果，我們發現硝酸鉛會抑制 ATP 刺激老鼠肝臟細胞內鈣離子的釋放，因此我們推測鉛抑制 ATP 刺激老鼠肝臟細胞內鈣離子釋放之機制，可能與抑制兩種 P₂-purinergic receptor 的訊息路徑中某一傳遞因子有關，因此我們考慮兩個途徑，(1) PKC 活性被活化，而造成 Receptor 去敏感作用(Desensitization)。(2) 鉛藉由與鈣離子相同的特性(都是二價陽離子)，接著在 IP₃ Receptor 上，而抑制 IP₃ 的反應。

第二章

硝酸鉛影響大白鼠肝細胞內蛋白激酶素 C 活性之研究

壹、中文摘要

鉛是一種廣泛存在環境中的金屬毒性物質，以前研究發現硝酸鉛會活化肝組織內蛋白激酶 C (PKC) 之活性，進而影響肝細胞增殖。本實驗想從細胞模式去探討鉛對肝細胞內 PKC 的活性影響及其細胞內 PKC 的含量變化。實驗結果已指出處理 40 μ M 硝酸鉛會活化細胞質內 PKC 的活性，同時其細胞質內 PKC 的含量也有增加的表現。但在細胞膜我們幾乎測不到 PKC 的活性與含量。因此我們推測鉛促使細胞質的 PKC 活性增加的原因，可能是鉛會誘使細胞內 PKC 的含量增加來達成。

貳、英文摘要

Lead is a toxic metal , widely distributed in the enviroment . That have been found lead nitrate would activate the PKC of liver and influence the proliferation of liver cell . This experiment was designed to invertigation the effect of lead on the PKC activity in liver cell . Our results showed that the activity of cytosolic PKC was activated by 40 uM concentration of lead nitrate , but not by 10 uM concentration of lead nitrate . And the protein level of cytosolic PKC was also increased after 14 hours of treatment with 40 uM concen-tration of lead nitrate . However , the activity of membranous PKC was not also changed in the treatment with 10 uM or 40 uM concentration of lead nitrate . Therefore , we suggested that the activated activity of cytosolic PKC by lead nitrate may be due to increased protein synthesis .

參、緒 言

本實驗室先前曾以實驗動物模式來探討鉛對肝臟其細胞內 PKC 活性變化的關連性探討，發現其蛋白激酶 C 的活性確實提高，證實鉛與 PKC 活性之間有某種層次上的關係。

PKC 於 1977 年首先被 Nishizuka 發現(22)，後即受到廣泛的重視及研究，是一種鈣和磷酸依賴的蛋白激酶素 (23)，進一步的發現，一種 Inositol phospholipid 的代謝產物 Diacylglycerol (DAG)，具有加強鈣與磷脂活化 PKC 的作用(24)，由於 DAG 是一種與細胞內傳遞訊息有關的物質(25)，因此當時認為 PKC 可能與細胞內傳遞訊息 (signal transduction) 的作用有關，此論點經由發現血小板所釋放的 Serotonin 可被 PKC 增強而得到證實(26)。爾後一連串對於 DAG 與 PKC 活性間的探討中，發現有一種非常強的腫瘤催化劑，12 - O - tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) 與 DAG 的結構相類似(27)，能夠取代 DAG 在體內及體外活化 PKC，並且認為 PKC 極可能是 TPA 的接受器 (receptor)。Nishizuka 及其同僚在一系列的研究中更指出，PKC 就是 TPA 在細胞膜上的接受器，同時 TPA 可以使 PKC 從細胞質轉移 (translocate) 到細胞膜，此時 PKC 即被活化(25,28)。而一旦 PKC 被活化，將進一步促使細胞內的許多蛋白質磷酸化，如 Histone (29), EGF receptor(30)，Insulin receptor (31)，Transferrin receptor (32)，轉譯作用 2 號起始因子(eIF2) (33)，ribosomal protein S6 (34) 等等，而引發一連串細胞內的訊息傳遞途徑。

而當 PKC 引發了與細胞開始進入分裂週期有密切關係的原致癌基因(proto-oncogenes) *c-jun*、*c-fos* 的表現(expression)，所產生的 Jun -Fos complex(AP-1) 便能促動多種基因的轉譯作用(transcription) (35)，而帶動整個細胞進入活躍狀態，使細胞產生增殖 (prolife-

ration)和分化 (differentiation) (36)。因此PKC被認為有促進細胞增殖、分化作用、基因表現和腫瘤催化作用。

截至目前我們對 PKC的了解，尚可歸納出至少約有12種的異構體(isoforms) (α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 、 ι 、 λ 和 μ)(26,37-41)，而各種異構體在細胞內負責不同訊息傳遞的工作，也具有不同調控基因表現和細胞增殖的能力 (42-45)。而依照參與PKC活化所需輔因子的 (cofactor) 的不同，可將異構體區分為三類(26,37-41,46-48)：第一類為鈣離子依賴性 (Ca^{2+} -dependent) 的異構體，如 α 、 β I、 β II和 γ ，稱為 cPKCs(conventional PKCs)；第二類為不需要鈣離子 (Ca^{2+} -independent) 參與活化反應的異構體，如 δ 、 ϵ 、 η 、 θ 和 μ ，稱為 nPKCs(novel PKCs)；第三類為不需要鈣離子 (Ca^{2+} -independent) 及磷脂類 (Diacylglycerol (DAG)或 Phosphatidylserine (PS))參與活化反應的異構體，如 ζ 、 λ 和 ι ，稱為 aPKCs(atypical PKCs)。cPKC及nPKC其活性能接受TPA的刺激而誘發，而低劑量的 PMA或其他 Activator也能引起未活化(inactive)形式的PKC，從細胞質轉位(translocate)到細胞膜(44,49-51)，長期暴露在高劑量 PMA ($<1 \mu\text{M}$)的細胞，則能造成這類 PKC isoforms的 down-regulation (44,49-51)。至於aPKCs這類的PKC並不會受到PMA的影響，其活性也不會被TPA所誘發(26,48,52)。

在細胞訊息傳遞中，PKC具有調節基因表現及細胞增殖等的作用，而不同的異構體間由於結構的不同，其酵素特性、活化方式及所表現出來的生理功能便有所不同 (28,53,54)。一些引發細胞增殖的刺激劑(mitogen)，例如Lead nitrate、Ethylene dibromide、Cyproterone acetate 和 Nafenopine 能直接誘發肝臟增殖(55)，而許多研究結果已經指出，鉛在各種生物系統的功能與鈣類似，可以取代鈣離子的作用而增加 PKC的活性 (56-59)。本實驗室先前有做過以實驗動

物模式來探討鉛對肝臟其細胞內 PKC 活性變化的關連性探討，發現其蛋白激酶 C 的活性確實提高，本論文擬進一步以細胞模式來探討，活體外(*in vitro*) 鉛對大白鼠肝臟其細胞內 PKC 活性變化的關連性作一逐步的研究。

肆、材料與方法

一、實驗材料

Male Wistar rat 購自台大醫學院動物中心。

Glycerol, DEAE, SDS, Acrylamide, Glycine, Tween-20 購自德國Merck公司。

Lead nitrate, Calcium chloride, Magnesium chloride 購自和光純藥工業株式會社。

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Leupeptine, Histone H1(type III-S), Phosphatidylserine, 1,2-Diolein(1,2-dioleoyl-glycerol), Sucrose, Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 2-Mercaptoethanol, Tris(hydroxymethyl)-amino methane hydrochloride (Tris-HCl), Ethylene glycolbis (β -amino ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), Glutathione, Cysteine, Dithiothreitol, Nitroblue tetrazolium, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, Triton X-100, Sodium bicarbonate, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid] (HEPES), Magnesium acetate, Sodium orthovanadate, Saponin, Aprotinin 均購自美國Sigma公司。

[γ -³²P]ATP (5000 Ci/mmol) 購自英國Amersham公司。

Dimethyl sulfoxide (DMSO), TCA 購自聯工化學廠股份有限公司
TEMED 購自美國Bio-Rad公司。

Ammonium persulphate 購自美國Serva公司。

Methanol 購自皓峰企業股份有限公司。

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), FBS, Anti-PKC IgG 購自美國Gibco BRL公司。

Anti-rabbit IgG 購自Promega公司。

二. 實驗動物與設計

本研究使用購自台大醫學院動物中心之Wistar品系大白鼠，選取重約220-280g 的雄性Wistar大白鼠為實驗動物。

三. 肝細胞之初代培養

與第一章的分離方法相同。

四. 蛋白激酶素C之抽取(extraction of PKC)(60)

種植適當數目的肝細胞於直徑100mm 的培養皿中,每三盤一組,加入不同濃度的硝酸鉛處理 0.5,3,14,18 小時,用PBS buffer洗兩次,再用研磨緩衝液 A (Tris 20mM,pH7.5, Na₃VO₄ 0.03mM ,MgCl₂.6H₂O 2mM , Dithiothreitol 1mM , EDTA 5mM, EGTA 2mM,Sucrose 250mM , PMSF 2mM , Aprotinin 1.0mg/ml , leupeptin 10 ug/ml) 將細胞刮下來,用均質機(Wheaton, homogenizer kontes tissue grind pestle 10ml)磨約20下,將所得萃取液經低速離心(Beckman GS-6R 1,000rpm, 4°C, 10min),將所得上清液經超高速離心(Hitachi P56A 220,000×g , 4°C,1hr),離心後之上清液(supernatant)即為細胞質蛋白激酶素C的部分;而先前經1,000×g 所得的沈澱物與後面超高速離心所得的沈澱物(pellet)再以1ml附加有0.1% Triton X-100 的研磨緩衝液 B (Tris 20mM,pH7.5, Na₃VO₄ 0.03mM , NaF 5mM , EDTA 5mM ,Mg(CH₃COO)₂.4H₂O 20mM , Dithiothreitol 1mM, EGTA 2mM, PMSF 2mM , Aprotinin 1.0mg/ml , leupeptin 10 ug/ml , 0.1% Tri-ton X-100)混合震盪均勻,於4°C下培育1小時,再次以超高速離心(Hitachi

P56A $220,000 \times g$, 4°C , 1hr), 離心所得之上清液(supernatant) 便為細胞核富含的部份與細胞膜部分蛋白激酶C的所在。將所萃取的樣本儲存在 -70°C 。

五. 蛋白激酶C之純化(partial purification of PKC)(60, 61)

上述萃取所得之樣本仍含有各種細胞質或細胞膜的酵素，及其他內在干擾物質，為使蛋白激酶C之純度提高，以利活性測定，我們採用DEAE-Cellulose chromatography來純化。純化的方法是先製備Cellulose column，以1公克之DEAE-cellulose與4ml之20mM Tris-HCl, pH 7.5，混合，通入塞以玻璃棉 $6 \times 100\text{mm}$ 之玻璃管柱中，再以0.75ml 組織緩衝液(tissue buffer) 沖洗三次。然後通入樣本，以0.75 ml 組織緩衝液再次沖洗四次和0.5ml含120 mM KCl之組織緩衝液沖洗一次，最後再一次通入1ml含有120mM KCl之組織緩衝液並收集之，此液即含有較高純度之蛋白激酶C。

六. 蛋白激酶C之活性測定

蛋白激酶C之活性測定係採用放射磷標記之腺核甘三磷酸($[\gamma\text{-}^{32}\text{p}]\text{ATP}$)作為磷酸根之供給者，而以組織蛋白(histone type II-S)作為磷酸根之接受者，藉測量蛋白激酶C將放射磷轉接至組織蛋白之多寡，來定量蛋白激酶C之活性。首先配製反應溶液，其中含有 $5 \mu\text{mol}$ Tris-HCl(pH 7.4)， $2 \mu\text{mol}$ MgCl_2 ， $40 \mu\text{g}$ Lysine-rich histone， $10 \mu\text{g}$ Phosphatidylserine， $0.75 \mu\text{g}$ 1,2-Diolein， $103 \mu\text{g}$ Leupeptine， $0.35 \mu\text{mol}$ CaCl_2 ， $0.12 \mu\text{mol}$ EGTA和 $5 \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{p}]\text{ATP}$ (5000 cpm/pmol)。整個反應之控制如下：在 4°C 下將 $100 \mu\text{l}$ 反應溶液與 $50 \mu\text{l}$ 之待測樣本於 $5 \times 60\text{mm}$ 試管混合，然後加入 $50 \mu\text{l}$ 之 $[\gamma\text{-}^{32}\text{p}]\text{ATP}$ 溶液，隨後將之置於 30°C 之水浴中，反應3分鐘之後，先

加入 $1 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ BSA $50 \mu\text{l}$ ，次加入 0.5ml 冰冷的 40% Trichloroacetic acid (TCA) 溶液以中止反應，再加入 2ml 冰冷之 1% TCA 溶液，使 phosphorylated histone 析出，最後利用離心方式 (Beckman GS-6R， 3000rpm ， 4°C ， 30min) 將析出之蛋白沈澱下來，小心移除上清液，保留沈澱部份再加入 2ml 冰冷之 1% TCA 溶液，經離心取沈澱部份加入閃爍液，再將整個試管放入偵測瓶，以 β -Counter 測放射量。反應結果扣除不加 Phosphatidylserine 和 $1,2\text{-Diolenin}$ 的空白樣本 (blank sample)，即為 PKC 真正活性，以 $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 表示。

七. 蛋白濃度測定 (84)

蛋白質的定量採用 "Bradford Protein Assay" 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白含量越高。測試的方法如下：首先以一系列已知濃度 BSA，加五分之一體積的 Bradford protein dye 以波長 595nm 可見光之吸光度作一標準關係線，次以同樣的方法測得樣品之 O.D. 值，即可根據標準關係線求得樣品蛋白之濃度。

八. 西方墨點分析法 (Western blot) (6,7)

1. 樣本之處理：

取適量之 PKC 萃取液，加入組織緩衝液 (tissue buffer) 使其最終體積達於一致，再與處理緩衝液 (treatment buffer) [0.0625M Tris-Cl ($\text{pH} 6.8$)， 2% (w/v) SDS， 10% sucrose， 0.002% bromophenol blue]，混勻煮沸 10 分鐘後，迅速插入冰水浴中，以 Microcentrifuge spin-down，接下來即可進行 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)。

2. SDS-聚丙烯醯胺板膠之製備

- 1) 上層膠體：為4% Stacking gel，組成為4.5% Acrylamide，0.12% N,N-Bis-methylene acrylamide，0.125M Tris-HCl (pH 6.8)，1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)，0.025% Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)，0.05% ammonium persulfate (AP)。
- 2) 下層膠體：為10% Separating gel，組成為10% Acrylamide，0.268% N,N'-Bis-methylene acrylamide，0.375M Tris-HCl (pH 8.8)，0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)，0.025% Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) 和0.05% ammonium persulfate (AP)。

3. 電泳之操作

將做好的板膠固定到電泳裝置上，用1×Tank buffer(25mM Tris-HCl, pH8.3, 0.192M Glycine, 0.1% SDS 為電泳緩衝液)注滿上下電泳槽，取經處理過的蛋白樣品溶液加入板膠上所形成的U型槽中，以140 Voltage, 35mA進行電泳。

4. 電泳完畢後，將膠體浸入冰冷的 Electrotransfer buffer [25 mM Tris-HCl (pH8.3), 0.192M glycine, 20% (v/v) methanol] 約5-10分鐘，之後將膠體平鋪在兩張浸濕的 Whatman 3M 濾紙上，然後再將預先浸濕的硝化纖維紙 (nitrocellulose paper) 蓋在膠體上面，依次再覆蓋兩張浸濕的3M濾紙，並以玻璃棒小心趕走其間的氣泡，然後裝入Transfer holder內，再置於 Electrotransfer tank (Hoefer) 以4°C, 100mA 進行電轉移。電轉移過夜後，將硝化纖

維紙取出浸入1 ml/cm 的含3% (w/v) FBS之TBST緩衝液〔10mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20〕, 在室溫搖動1小時, 然後以TBST緩衝液清洗兩次, 每次10分鐘。加50 μ g 抗PKC抗體(Anti-PKC IgG, 購自GIBCO BRL) 於20ml含1% (w/v) FBS 的TBST, 然後與硝化纖維紙在室溫下作用4小時, 之後以TBST緩衝液清洗兩次, 每次10分鐘。與Primary antibody作用後的硝化纖維紙, 再進一步與加有20 μ g Secondary antibody (alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG, 購自Promega) 含1% (w/v) FBS 的TBST buffer 20ml, 於室溫下作用1小時後, TBST緩衝液清洗二次, 每次10分鐘, 最後將硝化纖維紙浸入20 ml的受質溶液(substrate buffer) [即20ml受質緩衝液(100mM Tris-HCl, pH9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) 加上7mg的 Nitroblue-tetrazolium (NBT)及5 mg的5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)]進行呈色反應, 約5~10分鐘後可用去離子水終止呈色反應並清洗之。

伍、結果

在PKC的活性測定中(表2,3)，我們發現經40uM硝酸鉛處理0.5小時後的肝細胞，其細胞質內PKC的活性開始增加，在硝酸鉛處理3小時後其細胞質內PKC的活性達到最高，而在硝酸鉛處理14小時後的細胞，其細胞質內PKC的活性在我們兩次實驗中有不同結果，一次是些微下降另一是明顯下降。而在這些細胞的細胞膜部份的PKC活性則幾乎測不到。另外我們發現在細胞核富含部份的PKC活性則是在硝酸鉛處理14小時後的細胞中表現最高。此外我們以兩種不同濃度硝酸鉛來進行上述實驗，結果這些細胞的細胞質以外部份 (Particulate) 的PKC活性也幾乎測不到，而在處理10uM硝酸鉛的細胞其細胞質內PKC的活性則變化不大，而在處理40uM硝酸鉛的細胞其細胞質內PKC的活性則與前面實驗結果相似。

另外我們以西方墨點分析法來測定其PKC的蛋白量(圖22,23)，結果我們發現在Particulate部份觀察不到PKC的出現，而在細胞質內PKC的蛋白量則以硝酸鉛處理14小時後的細胞中表現最高。此外我們在Particulate部份觀察到一個約53 kDa的蛋白出現，尤其以硝酸鉛處理14小時後的細胞中表現最明顯。

陸、討論

本實驗室先前有做過以實驗動物模式來探討鉛對肝臟其細胞內 PKC 活性變化的關連性探討，發現其 Particulate 蛋白激酶 C 的活性確實提高。但本論文以細胞模式來探討活體外 (*in vitro*) 鉛對大白鼠肝臟其細胞內 PKC 活性變化的關連性研究之結果，卻發現在 Particulate 部份的 PKC 活性幾乎測不到。而在細胞質的 PKC 活性變化則在其起伏的曲線上似乎與活體內的實驗有點相似，我們推測可能因在活體內的組織內含有多種細胞，而干擾到我們的實驗結果。

至於鉛為何會促使細胞質的 PKC 活性增加呢？我們推測可能是鉛會誘使細胞內 PKC 的含量增加。或是鉛會促進細胞內 PKC 的受質大量增加。

另外我們在以西方墨點分析法來測定其 PKC 的蛋白量時，發現在細胞質以外 (Particulate) 部份觀察不到 PKC 的出現，但在分子量約 53 kDa 的位置卻有一環帶出現，且與實驗結果細胞核富含部份的 PKC 活性有一致性，因此我們推測這一環帶的蛋白可能是 PKC 活化後被分解的部份。故我們想以競爭試驗來測定這一環帶是否是 PKC 活化後被分解的部份。

第三章

硝酸鉛影響 IP_3 刺激大白鼠肝細胞內 IP_3 接受器所誘發之 細胞內鈣離子之研究

壹、中文摘要

鉛具有改變 IP_3 接受器的活性之能力。而本實驗以一新的實驗模式，利用螢光共軛焦顯微鏡觀察肝細胞內鈣離子濃度之變化。先用 Saponin 將細胞膜穿洞，然後處理 Calcium Green-1 dextran，在 IP_3 刺激下觀察細胞內鈣離子濃度改變的情形。實驗結果發現硝酸鉛確實具有抑制 IP_3 刺激細胞內鈣離子濃度改變的情形。我們推測鉛抑制 IP_3 刺激老鼠肝臟細胞內鈣離子釋放之機制，可能鉛藉由與鈣離子相同的特性(都是二價陽離子)，以抑制 IP_3 促使細胞內胞器中的鈣離子釋放至細胞質的反應。

貳、英文摘要

Recent reports have shown that lead alter the activity of IP₃ receptor . In this study , we used a new model to detect the release of intracellular calcium in liver cell .The cells were permeabilized by saponin , and then loaded with Calcium Green-1 dextran . Changes in the intracellular calcium were screened by confocus microscope . The result showed that the IP₃ stimulated the release of calcium from intracellular calcium pools stimulated by IP₃ was decreased after treatment with lead nitrate . Thus , we suggested that lead may mimic calcium in altering the response of IP₃ receptor .

參、緒 言

由先前兩章實驗的結果，顯示硝酸鉛在細胞模式的實驗確實會使肝細胞內蛋白激酶C的活性提高，而硝酸鉛會抑制 ATP所引發的肝細胞內鈣離子移動。而硝酸鉛會抑制 ATP所引發的肝細胞內鈣離子移動可能是由抑制兩種在老鼠肝細胞上 P₂-purinergic receptor 的訊息路徑中某一傳遞因子所造成，因為硝酸鉛在細胞模式的實驗確實會使肝細胞內蛋白激酶素C的活性提高，因此我們大膽推測是否在 P₂-purinergic receptor 的訊息路徑中。

因此本章實驗的目的是想直接測定鉛是否會抑制IP₃所引發的肝細胞內鈣離子濃度變化，但細胞膜上並無IP₃接受器，且IP₃並不能穿過細胞膜進入細胞內，所以本實驗是先用 Saponin 將細胞膜穿洞後，再以特殊的鈣離子親和性探針 Calcium GreenTM-1 dextran 來測定IP₃所引發的肝細胞內鈣離子濃度變化及鉛是否會抑制IP₃所引發的反應。實驗結果顯示鉛確實會抑制由IP₃所誘發之細胞內鈣離子由胞器中流至細胞質的反應。

肆、材料與方法

一、實驗材料

Male Wistar rat 購自台大醫學院動物中心。

Glycerol, DEAE, SDS, Acrylamide, Glycine, Tween-20 購自德國Merck公司。

Lead nitrate , Calcium chloride, Magnesium chloride, Potassium chloride 購自和光純藥工業株式會社。

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Leupeptine, Histone H1(type III-S) , Phosphatidylserine, 1,2-Diolein(1,2-diolroyl-rac-glycerol), Glucose, Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 2-Mercaptoethanol, Tris(hydroxymethyl)-amino methane hydrochloride (Tris-HCl), Ethylene glycol bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), Dithiothreitol, Inositol 1,4,5 triphosphate 均購自美國Sigma公司。

DMSO, Sodium chloride 購自聯工化學廠股份有限公司。

PSN antibiotic mixture, DMEM, FBS 購自美國Gibco BRL 公司。

Calcium GreenTM-1 dextran 購自美國 Molecular Probes 公司

二. 實驗動物與設計

本研究使用購自台大醫學院動物中心之Wistar品系大白鼠，選取重約220-280g的雄性Wistar大白鼠為實驗動物。

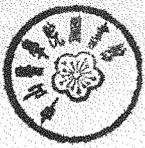
三. 肝細胞之初代培養

初代肝細胞之培養是與第一章的分離方法相同。

四. 硝酸鉛影響IP₃刺激肝細胞內鈣離子釋放之觀察

種細胞於35 mm培養盤中，每個培養盤約含 5×10^3 個細胞，以添加10% FBS DMEM進行培養12小時，加入80ug/ml Saponin溶液(NaCl 20mM, KCl 110mM, MgCl₂ 1.5mM, NaH₂PO₄ 1mM, HEPES 25mM, albumin 1mg/ml, CaCl₂ 0.55mM, EGTA 1mM, PMSF 0.2mM, leupeptin 10 ug/ml, sanponin 80ug/ml pH 7.4)在4°C反應20分鐘，去除溶液後再以衝填過氧氣的等張溶液(NaCl 20mM, KCl 110mM, MgCl₂ 1.5mM, NaH₂PO₄ 1mM, HEPES 25mM, albumin 1mg/ml, EDTA 1mM, EGTA 0.5mM pH 7.4)，清洗三次，添加1ml 1.4uM Ca²⁺ Green-dextran 溶液 C (NaCl 20mM, KCl 110mM, MgCl₂ 1.5mM, NaH₂PO₄ 1mM, HEPES 25mM, albumin 1mg/ml, EDTA 1mM, EGTA 0.5mM, PMSF 0.2mM, leupeptin 10 ug/ml pH 7.4)在4°C incubation 20 min，去除溶液後再添加1ml含1mM ATP的溶液 D(NaCl 20mM, KCl 110mM, MgCl₂ 1.5mM, NaH₂PO₄ 1mM, HEPES 25mM, EGTA 1mM, ATP 1mM pH 7.4)在室溫作用2 min後以充填過氧氣的等張溶液清洗三次，最後以1ml該等張溶液覆蓋細胞，將培養盤固定於共軛焦電子顯微鏡觀察臺，先在可見光下調整焦聚及適當的視野，然後將光源固定固定系統轉換至雷射光波長488nm的條件，並設定光源每十秒掃瞄一次且連續觀測150秒，並直接將結果顯示於螢光幕，電腦條件設定完成後以直徑1mm塑膠管為針頭延長線，用1ml針筒先

吸入前述等張緩衝液 $100\ \mu\text{l}$ 再抽取微量空細氣，接著吸入 $0.1\ \mu\text{M}$ 的 IP_3 ，將塑膠延長管接上事先固定於培養皿周圍可深入細胞液面中的小塑膠管上，啟動先前設定條件的同時以針筒小心的注入 IP_3 ，並且以針筒反覆吸抽約4、5次，將連續掃瞄得到的影像存檔並以電腦直接照像。接著以硝酸鉛抑制 IP_3 最佳的時間再以不同濃度硝酸鉛與細胞，觀察硝酸鉛與 IP_3 、鈣離子的關係。



伍、結果

我們以培養24小時的肝細胞，先用 Saponin Buffer 將細胞膜打洞後，以特殊的鈣離子親和性探針 Calcium GreenTM-1 dextran 來測定細胞質內鈣離子濃度的變化，結果我們可以觀察到在 5uM IP₃刺激下，胞器內鈣離子流入細胞質的現象，將其量化成鈣離子濃度的變化如圖24。另外比較以不同濃度硝酸鉛和其它二價陽離子處理後的肝細胞，再加入 IP₃並觀察IP₃所引發的細胞內鈣離子變化(圖25)。將細胞內鈣離子變化換算成鈣離子濃度的變化，實驗結果顯示鉛確實會抑制由IP₃所誘發之細胞內鈣離子由胞器中流至細胞質的反應。

另外我們也測定一些二價陽離子 (Ca²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺)對肝細胞的影響(圖25)，方法與硝酸鉛的處理方式相同，結果在我們測試的二價陽離子中，只有鉛和汞離子會有明顯抑制IP₃所誘發之細胞反應。

陸、討論

在 1990 年 Pietri 等人提出由 IP_3 所調控的鈣離子釋放，當鈣離子濃度提升後會形成回饋抑制，使 IP_3 Receptor 由低親和性的形式，轉變成高親和性但去敏感的形式 (81)。另外以前的研究已指出鉛會增加老鼠星型細胞 (Astrocyte) 內 IP_3 的濃度 (82)，最近 Vig 等人也提出鉛會改變 Inositol Polyphosphate Receptor 的活性 (83)，降低 IP_3 調控的鈣離子釋放，並增加 IP_3 與接受器鍵結能力，而根據我們實驗結果顯示，鉛離子確實會抑制由 IP_3 所誘發之細胞內鈣離子由胞器中流至細胞質的反應，即鉛可能藉由與鈣離子相同的特性(都是二價陽離子)，接著在 IP_3 Receptor 上，並增加 IP_3 與接受器鍵結能力，使接受器由低親和性的形式，轉變成高親和性但去敏感的形式，以抑制後來加入的 IP_3 促使細胞內胞器中的鈣離子釋放至細胞質的反應。

第三部份

人類肝癌組織內蛋白激酶素 C 活性之探討

壹、中文摘要

我們測定人類肝癌組織和連接的正常肝組織內蛋白激酶 C 的活性，在比較人類肝癌組織和連接的正常肝組織細胞膜上 PKC 的活性，結果發現人類肝癌組織細胞膜上 PKC 的蛋白活性是明顯的降低 (245.3 ± 49.3 versus 396.9 ± 82.4 pmol ^{32}P / min /mg protein, $P < 0.05$)，然而在細胞質部份的蛋白激酶 C 活性並無明顯不同 (50.6 ± 11.3 versus 40.0 ± 6.6 pmol ^{32}P / min /mg protein)。而在 9 個患者中有 8 個患者其肝癌組織細胞膜上 PKC 的蛋白活性是明顯的降低，而且比較這些組織中細胞膜上全部蛋白激酶 C 的活性，也顯示癌組織中整個細胞膜上蛋白激酶 C 的活性是明顯的降低 (163.1 ± 38.8 versus 433.8 ± 92.4 pmol ^{32}P / min /g tissue, $P < 0.005$)，而在整個細胞質部份的蛋白激酶 C 活性則並無明顯不同 (285.9 ± 58.8 versus 311.6 ± 44.0 pmol ^{32}P / min /g tissue)。這些結果指出細胞膜上蛋白激酶 C 的活性降低可能是導致人類肝癌的過程。

貳、英文摘要

The activity of protein kinase C (PKC) in human liver cancer and adjacent normal liver tissue was determined. It was found that the activity of the membrane-bound PKC was significantly decreased in cancer tissue as compared with that of the adjacent normal tissues (245.3 ± 49.3 versus 396.9 ± 82.4 pmol ^{32}P / min /mg protein $P < 0.05$); while the PKC activity in cytosolic fraction was not significantly different (50.6 ± 11.3 versus 40.0 ± 6.6 pmol ^{32}P / min /mg protein) concerning protein concentration. The reduced expression of membrane-bound PKC activity was observed at least on 8 of 9 patients . Moreover, the cancer tissue showed a significant decrease in total membranous PKC activity as compared with the adjacent normal tissue of each patient (163.1 ± 38.8 versus 433.8 ± 92.4 pmol ^{32}P / min /g tissue, $P < 0.005$) and no difference in total cytosolic PKC activity (285.9 ± 58.8 versus 311.6 ± 44.0 pmol ^{32}P / min /g tissue). These results indicate that the progression of the human liver cancer might be associated with the decrease of membrane-bound PKC activity.

參、緒言

一種鈣和磷酸酯依賴的蛋白激酶 C (Protein Kinase C, 簡稱PKC) 是於 1977年首先被Nishizuka發現(21)後即受到廣泛的重視及研究, PKC 在一些依賴鈣離子調控細胞功能的細胞中是扮演著重要角色 (25)。一種細胞內因受到外在因子刺激而導致 phosphatidylinositol 水解反應的代謝產物Diacylglycerol (DAG)和腫瘤促進劑 Phorbol esters 具有加強鈣離子活化PKC的作用(25,62,63)。在一些細胞外的訊息如生長因子(Growth factors), 荷爾蒙(Hormones), 和神經傳遞物質(neurotransmitters) 的傳遞穿過細胞膜的反應中, PKC 扮演一個重要角色(64,65)。並且發現PKC 能誘發許多細胞反應, 包括有細胞的增殖 (proliferation), 細胞的分化(Differentiation), 基因的表現和腫瘤的促進等 (66)。

肝癌在我國十大惡性腫瘤所造成的死亡率排名中始終高居不下, 而肝癌的形成原因至今還不是很明確, 至今醫療方式大多以外科手術切除為主, 而化學放射治療為輔的方式進行治療。其病理級數之辨別是以腫瘤大小來判斷, 但以腫瘤大小來判斷其病理級數似乎太粗糙。而今 Reifenberger 等人已將PKC的表現運用在神經腫瘤學中的腫瘤病理組織之分類(67), 其論點認為PKC 的表現在早期癌症的偵測可能是一個腫瘤標記(tumoral marker)。而在人類乳癌(breast tumor)及腦下垂體腫瘤(pituitary tumor)和惡性的神經膠質瘤(malignant gliomas)中可發現PKC的活性偏高的(68-70)。但是在人類大腸腺癌(colonic carcinoma)中發現腫瘤的大小和PKC的活性是呈現反比的結果, 即其PKC的活性是降低的(71,72)。相同的, 和控制組的皮膚切片做比較從失控的乾癬(psoriasis)患者增生的皮膚切片中也發現其PKC的活性是降低的(73)。所以在探討腫瘤細胞中PKC活性的變化時, 可能會出現PKC活性增加或降低的結果。

而在以前一些報告中指出經由化學致癌劑(carcinogens)所誘發的肝細胞

瘤(hepatoma)中，可發現蛋白質磷酸化(phosphorylation)和蛋白激酶活性明顯的變化(74,75)，然而在人類肝癌中 PKC 所扮演的角色至今不明。在本實驗中我們由外科手術取人類肝癌組織及鄰近的正常肝組織來測定它們的 PKC 活性，我們的結果指出在肝癌的細胞膜部份其PKC的活性是降低的，且隨著肝癌組織的惡化其細胞膜部份之 PKC 活性會隨之下降。

肆、材料與方法

一、實驗材料

Human liver cancer and adjacent normal human liver tissue

來自台大醫院外科手術房。

Bovine serum albumin (BSA), Adenosine triphosphate (ATP) Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Leupeptine, Histone H1(type III-S), Phosphatidylserine, 1,2-Diolein(1,2-diolroyl-rac-glycerol), Sucrose, Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 2-Mercaptoethanol, Tris(hydroxymethyl)-amino methane hydrochloride (Tris-HCl), Ethylene glycolbis (β -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraaceticacid (EGTA), Dithiothreitol, Triton X-100 均購自美國 Sigma公司。

[γ -³²p]ATP (5000 Ci/mmol) 購自英國Amersham公司。

TCA 購自聯工化學廠股份有限公司。

二. 蛋白激酶素C之抽取(extraction of PKC)

從外科手術所獲得的樣本須馬上置入液態氮中儲存，等至醫院取回後再從液態氮桶中移至-70°C冰箱儲存，秤取0.1g之肝組織，加入3ml含有20mM Tris-HCl pH7.5，5mMEDTA，0.5mM EGTA，0.3M sucrose，2mM phenyl-methylsulfonylfluoride，5mM ethyleneglycol bis(β -amino-ethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid，50mM 2-mercaptoethanol及10 μ g/ml leupeptin的組織研磨液A (homo-genization buffer A)，以研磨器 (Wheaton, homogenizer kontes tissue grind pestle 10ml) 研磨30次使細胞破碎，將所得萃取液經離心100g (Beckman GS-6R，1000 rpm，4°C, 10min) 移除細胞核後，將上清液經超高速離心(Hitachi P56A 100,000 \times g，4°C, 1hr)，離心後之上清液 (supernatant) 即為細胞質蛋白激酶素C的部分；而沈澱物(pellet)再以1ml附加有0.1% Triton X-100 的組織研磨液混合震盪均勻，於0°C下培育1小時，再次以超高速離心 (Hitachi P56A 100,000 \times g，4°C, 1hr)，離心所得之上清液 (supernatant) 便為細胞膜部分蛋白激酶素C的所在。將所萃取到的樣本儲存在-70°C下，酶素活性在一個月內是穩定的。

三. 蛋白激酶素C之純化(partial purification of PKC)

上述萃取所得之樣本仍含有各種細胞質或細胞膜的酶素，及其他內在干擾物質，為使蛋白激酶素C之純度提高，以利活性測定，我們採用DEAE-Cellulose chromatography來純化。純化的方法是先製備Cellulose column，以1公克之DEAE-cellulose與4ml之20mM Tris-HCl，pH 7.5，混合，通入塞以玻璃棉6 \times 50mm之玻璃管柱中，再以0.75ml含有20mM Tris-HCl pH7.5，2mMEDTA，0.5mM

EGTA, 2mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)及50mM 2-mercapto-ethanol組織緩衝液(tissue buffer) 沖洗三次。然後通入樣本, 以0.75 ml 組織緩衝液再次沖洗四次和0.25ml含120 mM KCl之組織緩衝液沖洗一次, 最後再一次通入0.5ml含有120mM KCl之組織緩衝液並收集之, 此液即含有較高純度之蛋白激酶C。

四. 蛋白激酶C之活性測定

蛋白激酶C之活性測定係採用放射磷標記之腺核甘三磷酸($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$)作為磷酸根之供給者, 而以組織蛋白(histone type II-S)作為磷酸根之接受者, 藉測量蛋白激酶C將放射磷轉接至組織蛋白之多寡, 來定量蛋白激酶C之活性。首先配製反應溶液, 其中含有 $5\ \mu\text{mol}$ Tris-HCl(pH 7.4), $2\ \mu\text{mol}$ MgCl_2 , $40\ \mu\text{g}$ Lysine-rich histone, $10\ \mu\text{g}$ Phosphatidylserine, $0.75\ \mu\text{g}$ 1,2-Diolein, $10\ \mu\text{g}$ Leupeptine, $0.35\ \mu\text{mol}$ CaCl_2 , $0.12\ \mu\text{mol}$ EGTA和 $5\ \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (5000 cpm/pmol)。整個反應之控制如下: 在 4°C 下將 $100\ \mu\text{l}$ 反應溶液與 $50\ \mu\text{l}$ 之待測樣本於 $5\times 60\text{mm}$ 試管混合, 然後加入 $50\ \mu\text{l}$ 之 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 溶液, 隨後將之置於 30°C 之水浴中, 反應10分鐘之後, 先加入 $1\ \mu\text{g}/1\ \mu\text{l}$ BSA $50\ \mu\text{l}$, 次加入0.5ml 冰冷的40% Trichloroacetic acid (TCA) 溶液以中止反應, 再加入2 ml冰冷之1% TCA溶液, 使phosphorylated histone析出, 最後利用離心方式(Beckman GS-6R, 3000 rpm, 4°C , 30min)將析出之蛋白沈澱下來, 小心移除上清液, 保留沈澱部份再加入2ml 冰冷之1% TCA溶液, 經離心取沈澱部份加入閃爍液, 再將整個試管放入偵測瓶, 以 β -Counter測放射量。反應結果扣除不加 Phosphatidylserine 和 1,2-Diolein 的空白樣本(blank sample), 即為PKC真正活性, 以 $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 表示。

五. 蛋白濃度測定

蛋白質的定量採用"Bradford Protein Assay"方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白含量越高。測試的方法如下：首先以一系列已知濃度BSA，加五分之一體積的Bradford protein dye以波長595nm可見光之吸光度作一標準關係線，次以同樣的方法測得樣品之O.D.值，即可根據標準關係線求得樣品蛋白之濃度。

伍、結果

我們測定 9 個來自外科手術樣本的自發性人類肝癌 (hepatocellular carcinoma) 組織和正常的肝組織，分別萃取其細胞質內和細胞膜上的蛋白激酶 C 活性的表現。肝癌患者的臨床病理級數是記錄在表 4，而在蛋白激酶 C (PKC) 活性的表現上我們發現在正常肝組織中細胞膜的部份，PKC 的活性 (表 5) 是明顯的高 ($396.9 \pm 82.4 \text{ pmol } ^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg protein}$)，而在肝癌組織細胞膜的部份，PKC 的活性是明顯的降低 ($245.3 \pm 49.3 \text{ pmol } ^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg protein}$)，且癌組織和正常肝組織其細胞膜的 PKC 活性之差異是具有統計學上的意義 ($p < 0.05$)。而我們測定這 9 個患者其癌組織細胞膜的 PKC 活性，發現有 8 個患者其癌組織細胞膜的 PKC 活性是降低的。另外我們比較癌組織和正常肝組織其細胞質內的 PKC 活性，在肝癌組織細胞質部份 PKC 的活性是 ($50.6 \pm 11.3 \text{ pmol } ^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg protein}$)，而在正常肝組織細胞質部份 PKC 的活性是 ($40.0 \pm 6.6 \text{ pmol } ^{32}\text{P}/\text{min}/\text{mg protein}$)，兩者 PKC 活性之差異並無統計學上的意義。

另外我們將其 PKC 的蛋白活性換算成組織的 PKC 活性 (表 6)，肝癌組織細胞膜部份全部的 PKC 活性是 $163.1 \pm 38.8 \text{ pmol } ^{32}\text{P}/\text{min}/\text{g tissue}$ ，而正常的肝組織細胞膜部份全部的 PKC 活性是 $433.8 \pm 92.4 \text{ pmol } ^{32}\text{P}/\text{min}/\text{g tissue}$ ，發現肝癌組織細胞膜部份全部的 PKC 活性是有明顯的降低 ($p < 0.005$)。而在細胞質部份全部的 PKC 活性在正常組織和肝癌組織分別是 $311.6 \pm 44.0 \text{ pmol } ^{32}\text{P}/\text{min}/\text{g tissue}$ 和 $285.9 \pm 58.8 \text{ pmol } ^{32}\text{P}/\text{min}/\text{g tissue}$ 。這結果與上述單獨的 PKC 蛋白的活性是一致的，此外以病理級數來分析我們先前的結果，發現在正常的肝組織細胞膜部份整個 PKC 活性是 $433.8 \pm 92.4 \text{ pmol } ^{32}\text{P}/\text{min}/\text{g tissue}$ ，而肝細胞癌病理級數為 II 的癌組織其細胞膜部份整個 PKC 活性是 $273.9 \pm 61.2 \text{ pmol } ^{32}\text{P}/\text{min}/\text{g tissue}$ ，肝細胞癌病理級數為 III 的癌組織其細胞膜部份整個 PKC 活性是 $100.3 \pm 38.0 \text{ pmol } ^{32}\text{P}/\text{min}/\text{g}$

tissue，從這些結果呈現出肝細胞的細胞膜部份之 PKC 活性在正常組織下是較高的，而隨著肝癌組織的惡化其細胞膜部份之 PKC 活性會隨之下降。

陸、討論

實驗結果第一次顯示出在比較人類肝癌組織與正常肝組織細胞膜部份的 PKC 活性後，發現在人類肝癌組織中其 PKC 活性是呈現降低的，而這兩種組織其細胞質部份的 PKC 活性則無顯著差異。我們發現在肝癌組織中其細胞膜部份的整個 PKC 活性是呈現急劇降低。這發現與 Kusunoki 等人發現大腸癌和大腸腺癌中其細胞質外 (particulate) 的 PKC 活性呈現降低是類似的 (72)，而大腸癌和大腸腺癌的這種情形可能是因為細胞內 ras 基因突變所造成 (76,77)，同樣地 Ogata 等人也發現在人類肝癌組織內其 ras 基因也發生突變 (78)。因此我們推測人類肝癌組織細胞膜部份的 PKC 活性之降低可能是因為突變的 ras 蛋白持續活化 PKC 而出現的 PKC 負調節作用 (down-regulation) 所造成的結果。

在最近的文獻中指出一種在人體外對成熟肝細胞會進行 PKC 調控分裂的分裂劑肝生長因子 (hepatocyte growth factor) 會抑制肝細胞瘤的細胞生長 (79,80)，同樣的結果也出現在加入適當量 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) 之肝細胞瘤的細胞 (79)，而 TPA 與 Diacylglycerol (DAG) 的結構相類似，能夠取代 DAG 在體內及體外活化 PKC，而在正常肝組織中會促進細胞生長。由以上這些發現強烈的暗示 PKC 的活化會抑制肝細胞瘤細胞的生長，因此我們認為在人類肝癌組織是否因 PKC 活性的降低而可能減少抑制作用。

參 考 文 獻

1. Lamberts, S.W.J. and Macleod, R.M. (1990) Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol. Rev.*, 70: 279-318.
2. Shin, S.H., Soukup, C., Pang, S.C., Kubiseski, T.J. and Flynn, T.G. (1993) Measurement of prolactin release and cytosolic calcium in estradiol-primed lactotrophs. *Life Sciences*, 53: 1605-1615.
3. Arita, J., Kojima, Y. and Kimura, F. (1992) Lactotrophs secreting small amounts of prolactin reveal great responsiveness to thyrotropin-releasing hormone: Analysis by the sequential cell immunoblot assay. *Endocrinology*, 130: 3167-3174.
4. Arita, J., Kojima, Y. and Kimura, F. (1991) Identification by the sequential cell immunoblot assay of a subpopulation of rat dopamine-unresponsive lactotrophs. *Endocrinology*, Vol 128, 1887-1894.
5. Burnier, M., Centeno, G., Burki, E. and Brunner, H. R. (1994) Confocal microscope to analyze cytosolic and nuclear calcium in cultured vascular cells. *Am. J. Physiol*, 266: C1118-C1127.
6. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
7. Brockenbrough, J. S., Meyer, S. A., Li, C. and Jirtle, R. L. (1991) Reversible and phorbol ester-specific defect of protein kinase C translocation in hepatocytes isolated from phenobarbital-treated rats. *Cancer Res.*, 51:130-136.
8. Hymer, C., Evans, W. H., Kraicer, J., Mastro, A., Davis L. and Grisword, E. (1973) Enrichment of cell type from rat adenohypophysis by sedimentation at unit Gravit. *Endocrinology*, 92:275-287.
9. Goyer, R. A. and Chisolm, J. J. (1972) Lead : metallic contaminants and human health. Edited by D.H.K. Lee. New York and London, Academic Press, PP. 57-95.
10. Goyer, R. A. and Rhyne, B. C. (1973) Pathological effects of lead. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 12: 2-78.

11. Klein, R. The pediatrician and the prevention of lead poisoning in children. *Pediat. Clin. N. Am.*, 21: 277-290.
12. Baloh, R. W. (1974) Laboratory diagnosis of increased lead adsorption. *Arch. Environ. Health*, 28: 198-208.
13. Lippmann, M. (1990) Lead and human health : background and recent findings. *Environ. Res.*, 51: 1-24.
14. Ferm, H. V. and Carpenter, S. J. (1967) Development formation resulting from the administration of lead salts. *J. Exp. Mol., Pathol.*, 7: 208-213.
15. Krasovskii, G. N., Vasukovich, L. Y. and Chariev, O. G. (1979) Experimental study of biological effects of lead and aluminium following oral administration. *Environ. Health Perspect.*, 30:47-51.
16. Columbano, A., Ledda, G. M., Sirigu, P. Perra, T. and Pani, P. (1983) Liver cell proliferation induced by a single dose of lead nitrate. *Am. J. Pathol.*, 110: 83-88.
17. Dessi, S., Batetta, B., Laconi, E., Ennas, C. and Pani, P. (1984) Hepatic cholesterol in lead nitrate induced liver hyperplasia. *Chem. Biol. Interactions*, 48: 271-279.
18. Dessi, S., Porcu, C., Andria, B., Batetta, A., Murgia, A., and Pani, P. (1981) Cholesterol HDL in phenobarbital treated Male and female Wistar rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 31: 375.
19. P'an, A. T. S. and Kennedy, C. (1989) Lead distribution in rats repeatedly treated with low doses of lead acetate. *Environ. Res.*, 48:238-247.
20. Bonney, V.R., Becker, J.E., Walker, P.R. et al. Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis in vitro. *Rochille* (1974) 9,399-413.

21. Okajima, F., Y, Tokumitsu, Y. Kondo, and M. Ui. P2-purinergic receptors are coupled to two signal transduction systems leading to inhibition of cAMP generation and to production of inositol trisphosphate in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 262: 13483-13490(1987).
22. Inoue, M., Kishimoto, A., and Takai, Y., (1977) Studies on a cyclic nucleotide - independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. proenzyme and its activation by calcium - dependent protease from rat brain. *J. Biol. Chem.*, 252: 7610-7616.
23. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawaahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) Calcium-dependent activation of a multi-functional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 254:3692-3695.
24. Michell, R. H. (1975) Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta.*, 415: 81-147.
25. Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308: 693-698.
26. Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258 : 607-614.
27. Castagna, M. Takai, Y., Kaibuchi, K. et al. (1982) Direct activation of calcium- activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, 257: 7847-7851.
28. Nishizuka, Y., (1984) Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science*, 225:1365-1370.
29. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, 252:7603 -7609.
30. Hunter, T., Ling, N. and Cooper, J. A. (1984) Protein kinase C

phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature*, 311:480-483.

31. Jacobs, S., Sahyoun, N. E., Saltiel, A. R. and Cuatrecasas, P. (1983) Phorbol ester stimulate the phosphorylation of receptors for insulin and somatomedin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80:6211-6213.
32. May, W.S., Jacobs, S. and Cuatrecasas, P. (1984). Association of phorbol ester-induced hyperphosphorylation and reversible regulation of transferrin membrane receptors in HL 60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:2016-2020.
33. Schatzman, R. C., Grifo, J. A., merrick, W. C. and Kuo, J. F. (1983) Phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protien kinase phosphorylates the beta subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2). *FEBS Lett.*, 159:167-170.
34. Le Peuch, C. J., Ballester, R. and Rosen, O. M. (1983). Purified rat brain calcium and phospholipid-dependent protein kinase phosphorylates ribosomal protein S6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80:6858-6862.
35. Curran, T., and Franza, B. R. (1988) Fos and Jun: the AP-1 concentration. *Cell*, 55:395-397.
36. Nishizuka, Y., (1989) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233:305-312.
37. Asaoka, Y., Nakamura, S., Yoshida, K. and Nishizuka, Y. (1992) Protein kinase C, calaium and phospholipid degradation. *Trends Biochem. Sci.*, 17:414-417.
38. Gschwendt, M., Kittstein W. and Marks, F. (1991) Protein kinase C activation by phorbol esters : do cysteine-rich regions and

- pseudosubstrate motifs play a role ? Trends Biochem. Sci., 16: 167-169.
39. Bell, R. M. and Burns, D. J. (1991) Lipid activation of protein kinase C. J. Biol. Chem. 266 : 4664-4664.
 40. Parker, P. J. et al. (1989) Protein kinase C--a family affair. Mol. Cell. Endocrinol., 65:1-11.
 41. Hug, H. and Sarre, T. F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? Biochem. J., 291 : 329-343.
 42. Zhou, G., Wooten, M. W. and Coliman, W. S. (1994) Regulation of atypical ξ -protein kinase C in cellular signaling. Epx. Cell Res. 214:1-11.
 43. Ohno, S., Akita, T., Hata, A., Osada, S., Kubo, K., Konno, Y., Aki-moto, K. Mizuno, K., Saido, T., Kuroki, T. and Suzuki, K. Adu. (1991) Enzyme Regul., 441: 287-303.
 44. Kraft, A. S. and Anderson, W. B. (1983) Phorbol esters increase the amount of Ca^{2+} , phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. Nature, 301: 621-623.
 45. Blumberg, P. M. (1991) Complexities of the protein kinase C pathway. Mol. Carcinogen. , 4 : 339-344.
 46. Nakanishi, H. and Exton, J. H. (1992) Purification and characterization of the ξ -isoform of protein kinase C from bovine kidney. J. Biol. Chem , 267:16347-16354.
 47. Nakanishi, H., Brewerm, K. A. and Exton, J. H. (1993) Activation of the ξ isoform of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J. Biol. Chem., 268:13-16.
 48. Selbie, L. A. Schmitz-Peiffer, C., Sheng, Y. and Biodent, T. J. (1993) Molecular cloning and characterization of PKC ι , and a typical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. J. Biol. Chem., 268 : 24296 -24302.

49. Bakdassare, J. J., Henderson, P. S., Burns, D., Loomis, C. and Fisher, C. J. (1991) Translocation of protein kinase C isozymes in thrombin stimulated human platelets correlation with 1,2-diaclycerol level. *J. Biol. Chem.*, 267 : 15585-15590.
50. Wolf, M., Cuatrecasas, P. and Sahyoun, N. (1985) Interaction of protein kinase C with membranes is regulated by Ca^{2+} , phorbol ester, and ATP. *J. Biol. Chem.*, 260 : 15718-15722.
51. TerBush, D. R. and Holz, R. W. (1986) Effects of phorbol esters, diglyceride, and cholinergic agonists on the subcellular distribution of protein kinase C in intact or digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 267 : 17099-17106.
52. Olivier, A. R. and Parker, P. J. J. (1992) Identification of multiple PKC isoforms in Swiss 3T3 cells: differential down-regulation by phorbol ester. *J. Cell. Physiol.*, 152 : 240-244.
53. Hug, H. and Sarre, T. F. (1993) Protein kinase C isoenzymes. *Biochem. J.*, 391:329-343.
54. Wetsel, W. C., Khan, W. A., Merchantler, I., Tiveria, H., Halpern, A. E., Phung, H. M., Negro-Vilar, A. and Hannun, Y. A. (1992) Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzyme. *Cell. Biol.*, 17:121-133.
55. Ledda-Columbano, G. M., Coni, P., Curto, M., Giacommini, L., Fa, G., Sarma, D. S. R. and Columbano, A. (1992) Mitogen-induced liver hyperplasia does not substitute for compensatory regeneration during promotion of chemical hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 13 : 373-379.
56. Markovac, J. & Goldstein, G. W. (1988) Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature*, 334: 71-73.
57. Pounds, J. G. and Mittelstaedt, R. A. (1983) Mobilization of cellular

- calcium-45 and lead-210 : Effect of physiological stimuli. *Science*, 220:308-310.
58. Pounds, J. G., Morrison, D., Wright, R., Casciano, D. A. and Shaddock J.G. (1982) Effect of lead on calcium-mediated cell function in the isolated rat hepatocyte. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 63:402-408.
59. Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1986) The role of protein kinase C in transmembrane signalling. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 2:149-178.
60. Thomas, T. P., Gopalakrishna, R. and Anderson, W. B. (1987) Hormone and tumor promoter-induced activation of membrane association of protein kinase C in intact cells. *Methods Enzymol.*, 141:399-411.
61. Masmoudi, A., Labourdette, G., Mersel, M., Huang, F. L., Huang, K. P., Vincendon, G. and Malviya, A. N. (1989) Protein kinase C located in rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.*, 264:1172-1179.
62. Sharkey, N. A., Leach, K.L. and Blumberg, P. M. (1984) Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 607-610.
63. Niedel, J.E., Kuhn, L.J. and Vandenberg, G.R. (1983) Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 36-40.
64. Berridge, M.J. (1987) Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 153-193.
65. Rozengurt, E. (1989) Signal transduction pathways in mitogenesis. *Brit. Med. Bull.*, 45: 515-528.
66. Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*, 334,661-665.
67. Reifemberger, G., Deckert, M., and Wechsler, W. (1989) Immuno-

- histochemical determination of protein kinase C expression and proliferative activity in Human Brain tumors. *Acta Neuropathol.*,78, 166-175.
68. O'Brian,C.A., Vogel, V.G., Singletary, S.E. and Ward, N.E. (1989) Elevated protein kinase expression in human breast tumor biopsies relative to normal breast tissue.*Cancer Res.*, 49: 3215-3217.
69. Alvaro,V., Touratine, P.H., Vozari, R.R., Bai-Grenier, F., Birman, P. and Joubert, D. (1992) Protein kinase C activity and expression in normal and adenomatous human pituitaries. *Int. J. Cancer*, 50: 724-730.
70. Coudwell, W.T., Antel, J.P., and Yong, V.W. (1992) Protein kinase C activity correlates with the growth rate of malignant gliomas. II. Effects of glioma mitogens and modulators of protein kinase C. *Neurosurgery*, 31,717-724.
71. Kopp, R., Noelke,B., Sauter, G., Schileberg, F.W., Paumgartner, G. and Pfeiffer,A. (1991) Altered protein kinase C activity in human colonic adenoma and Carcinomas. *Cancer Res.*, 51, 205-210.
72. Kusunoki, M., Sakanoue, Y., Yanagi, F., Tamamura, T. and Utsunomiya, J. (1992) Protein kinase C activity in human colonic adenoma and colorectal carcinoma. *Cancer*, 69: 24-30.
73. Horn, F., Marks,F., Fisher, G., Marcelo, C.L. and Voorhees, J.J. (1987) Decreased protein Kinase C activity in psoriatic versus normal epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 88: 220-222.
74. Vivier, J. and Schabort, J.CY.(1985) Aflatoxin B1 alters protein phosphorylation in rat livers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 129: 342-349.
75. Weber, A., Cottreau, D., Henry,J., Phan Kinh Tuy,F., Shala, H. and Kahn, A. (1983) Protein kinase of rat liver during hepatocarcino-

- genesis induced by an azo dye. *Eur. J. Biochem.*, 130,447-456.
76. Barbacid, M. (1987) Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 779-827.
77. Devivo, I. Marion, M.J., Smith, S.J., Carney, W.P. and Brandt-Rauf, P.W. (1994) Mutant c-Ki-ras p21 protein in chemical carcinogenesis in humans exposed to vinyl. *Cancer Causes and Control*, 5, 273-278.
78. Ogata, N., Kamimura, T. and Asakura, H. (1991) Point mutation, allelic loss and increased methylation of c-Ha-ras gene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 13, 31-37.
79. Shiota, G., Kawasaki, H., Nakamura, T. and Schmidt, E.V. (1994) Inhibitory effect of hepatocyte growth factor against FaO hepatocellular carcinoma cells may be associated with changes of intracellular signalling pathways mediated by protein kinase C. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 85,271-279.
80. Shiota, G., Rhoads, D.B., Wang, T.C., Nakamura, T. and Schmidt, E.V. (1992) Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 373-377.
81. France Pietri, Mauricette Hilly, and Jean-Pierre Mauger (1990) Calcium mediates the interconversion between two states of the liver inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *J. Biol. Chem.*, 265:17478-17485.
82. Vijendra Dave, Domenico Vitarella, Judy L. Aschner, Paul Fletcher, Harold K. Kimelberg and Michael Aschner (1992) Lead increases inositol 1,4,5-triphosphate levels but does not interfere with calcium transients in primary rat astrocytes. *Brain Research*, 618, 9-18.
83. Vig,P.J.S.,Pentyala, S. N.,Chetty, C.S.,Rajanna, B. and Desaiiah, D. (1994) Lead alters inositol polyphosphate receptor activities: Protection by ATP. *Pharmacology & Toxicology*. 75, 17-22.
84. Compton, S. J. and Jones, C. G. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.*, 151:369-374.

圖 表

Table 1. The percentage of the distribution of PRL secretion from single lactotroph in the response to TRH.

Group	calcium release	PRL secretion	Total	Treated	Density (INT x mm ²)			
					0 - 5	6 - 10	11 - 15	16 - 20
1.	+ ^a	+ ^b	51 ^c (183) ^d	-TRH ^e	72 ^f (131) ^g	28 (52)	0 (0)	0 (0)
				+TRH	0 (0)	29 (51)	61 (112)	11 (20)
2.	+	-	17 (59)	-TRH	37 (22)	39 (23)	24 (14)	0 (0)
				+TRH	37 (22)	39 (23)	24 (14)	0 (0)
3.	-	+	22 (78)	-TRH	85 (66)	15 (12)	0 (0)	0 (0)
				+TRH	0 (0)	19 (15)	29 (23)	52 (40)
4.	-	-	10 (37)	-TRH	35 (13)	65 (24)	0 (0)	0 (0)
				+TRH	35 (13)	65 (24)	0 (0)	0 (0)

a +/— : The release of intracellular calcium in the positive / negative response to TRH in lactotrophs.

b +/— : The PRL secretion in the positive / negative response to TRH in lactotrophs.

c Percent of the total cells which included group 1, 2, 3 and 4.

d Number of the total cells in the indicated group.

e -TRH / +TRH : PRL secretion from single lactotroph treated without / with TRH.

f Percent of the total cells in the indicated group.

g Number of lactotrophs in the indicated range of PRL secretion.

Table 2. The activity of PKC (pmol/mg/min) in lead nitrate-treated rat liver cells

hours	0	0.5	3	14	18
Experiment #1					
Cytosolic	139	148	187	117	135
Membranous	57	-	-	-	-
nuclear-rich	84	66	47	112	58
Experiment#2					
Cytosolic	148	158	187	180	165
Membranous	23	22	-	38	-
nuclear-rich	93	68	71	106	156

Table 3. The activity of PKC (pmol/mg/min) in lead nitrate-treated rat liver cells

hours	0	0.5	14	18
lead nitrate (10 μ M)				
Cytosolic	106.0	116.0	106.0	121.0
Particulate	-	-	-	9.5
lead nitrate (40 μ M)				
Cytosolic		140.0	123.0	136.0
Particulate		15.5	6.0	1.8

Table 4.
Clinical characteristics of nine patients with liver cancer

Patient No	AGE(yr)/sex ^a	Histology	Cancer grade ^b	Follow-up
1	31/M	Hepatocellular Carcinoma	II	Disease free at 16 mos
2	75/F	Hepatocellular Carcinoma	II	Disease free at 14 mos
3	44/M	Hepatocellular Carcinoma	II	Disease free at 13 mos
4	65/M	Hepatocellular Carcinoma	III	Disease free at 13 mos
5	73/M	Hepatocellular Carcinoma	III	Disease free at 17 mos
6	59/M	Hepatocellular Carcinoma	III	Disease free at 13 mos
7	53/M	Hepatocellular Carcinoma	III	Died at 4 mos
8	71/F	Hepatocellular Carcinoma	III	Disease free at 14 mos
9	66/M	Hepatocellular Carcinoma	IV	Disease free at 14 mos

^aM: male; F: female.

^bGrade classified by Edmondson and Steiner.

Table 5.

Protein kinase C activity in the cytosolic and membraneous fractions of human normal and cancer liver tissues

Patient No.	Protein Kinase C Activity (p mol ³² P/min/mg protein) ^a			
	Cytosol		Membrane	
	Normal	Cancer	Normal	Cancer
1	38.4	102.8	982.3	502.5
2	69.8	46.0	437.6	245.5
3	33.1	75.0	130.2	353.8
4	9.7	21.7	329.7	195.7
5	45.9	88.4	482.0	372.5
6	59.5	33.5	279.4	218.1
7	15.5	16.1	258.1	120.4
8	33.4	6.7	438.9	0.0
9	54.5	65.0	234.0	199.2
Mean ± SEM	40.0 ± 6.6	50.6 ± 11.3	396.9 ± 82.4	245.3 ± 49.3*

SEM: standard error of the mean.

^a Protein kinase C activity was assayed using either the cytosolic or membraneous fractions of each sample with purification on a mini DEAE-cellulose column. The values given in the Tables are averages obtained in Materials and Methods.

* Significantly different from the normal membrane fraction ($P < 0.05$) by paired t test.

Table 6.
Total of protein kinase C activity of human normal and cancer liver tissues

Patient No.	Ptoetin Kinase C Activity (p mol ³² P/min/g tissue) ^a			
	Cytosol		Membrane	
	Normal	Cancer	Normal	Cancer
1	290.7	596.2	939.8	396.1
2	510.7	314.1	728.7	219.3
3	300.4	402.7	126.7	206.4
4	112.9	143.9	435.2	208.4
5	317.6	396.2	632.6	162.0
6	463.1	168.6	173.7	86.5
7	161.0	155.4	277.9	44.4
8	241.8	25.0	354.8	0.0
9	406.4	371.1	234.4	145.1
Mean±SEM	311.6 ± 44.0	285.9 ± 58.8	433.8 ± 92.4	163.1 ± 38.8**

SEM: standard error of the mean.

^a Total protein kinase C activity in each of the samples was calculated from the respective cytosolic and membraneous activity per g tissue.

**Significantly different from the normal membrane fraction ($P < 0.005$) by paired *t* test.

Purification of Pituitary Cells

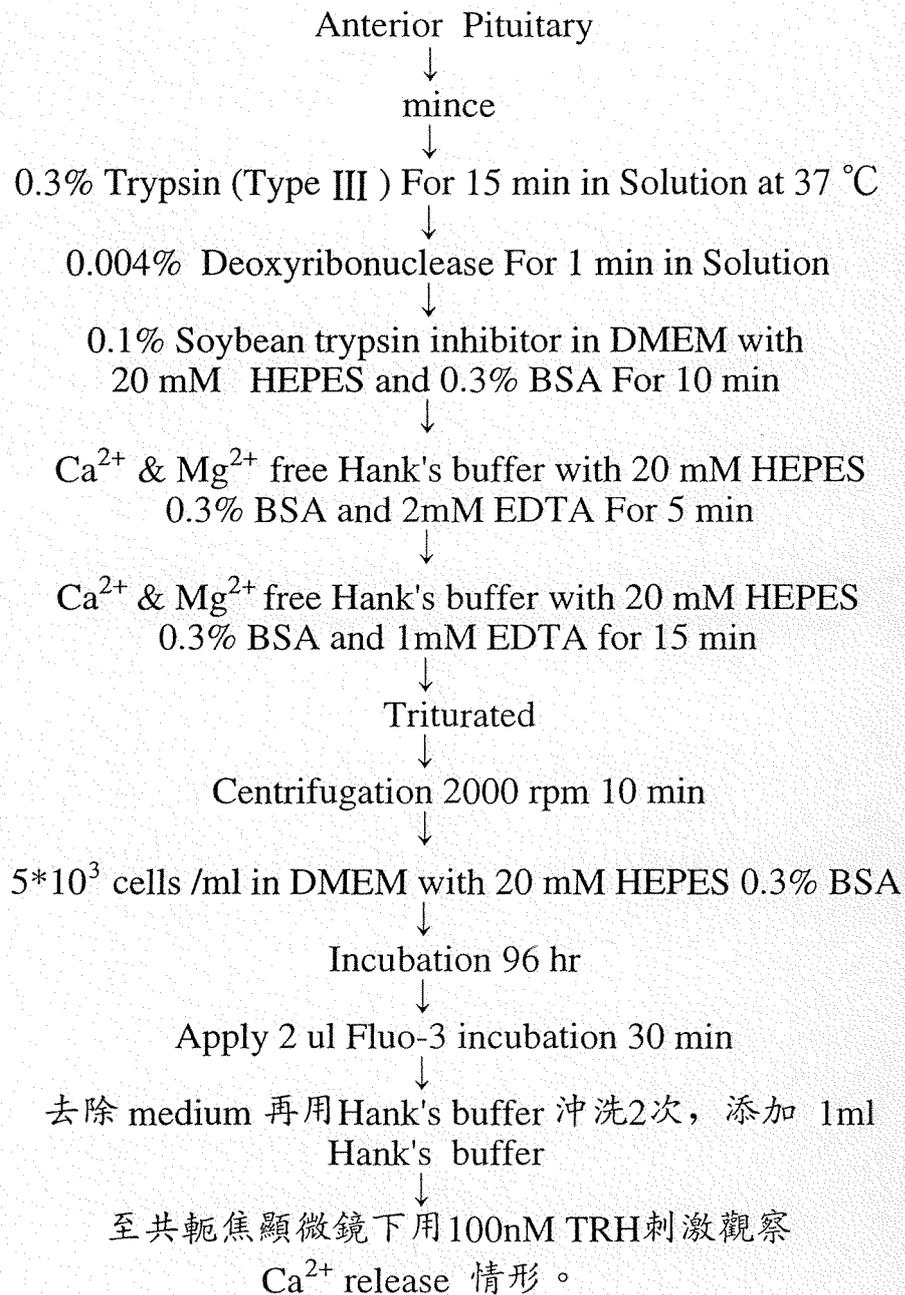


Fig 1. Schematic overview of the experimental protocol

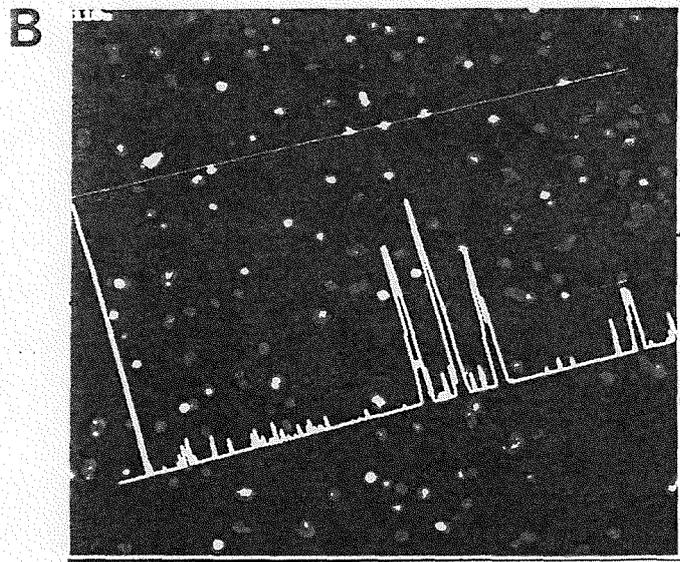
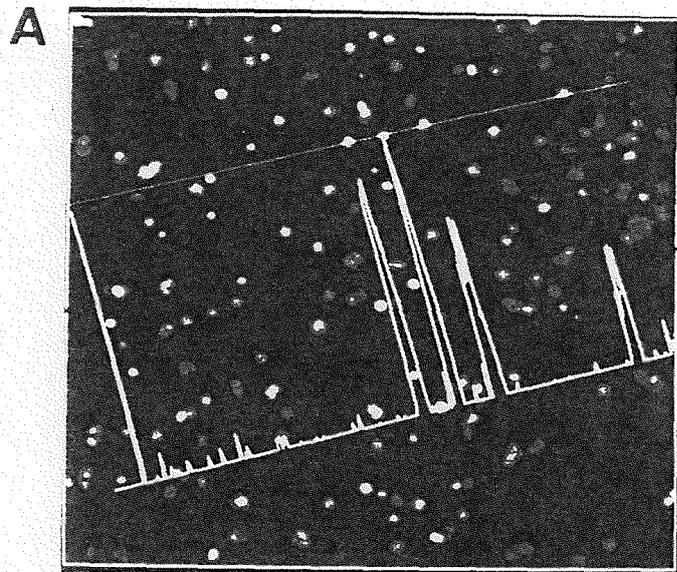


Fig 2. A23187 刺激細胞內鈣離子釋放之觀察，圖2A為腦下垂體前葉細胞在加入Fura-Red後，在共軛焦顯微鏡下觀察其細胞內鈣離子的分布情形，Fura-Red與鈣離子結合後其亮度會減弱，亮度以白色最強，黃色次之，紅色最弱。而圖中綠色線是由電腦去分析其線上亮度變化，而黃色線則是將電腦分析綠色線上亮度變化轉成曲線表達。圖2B為腦下垂體前葉細胞在加入Fura-Red後，在共軛焦顯微鏡下以A23187刺激，觀察其細胞內鈣離子的分布情形，再與圖2A比較其變化。

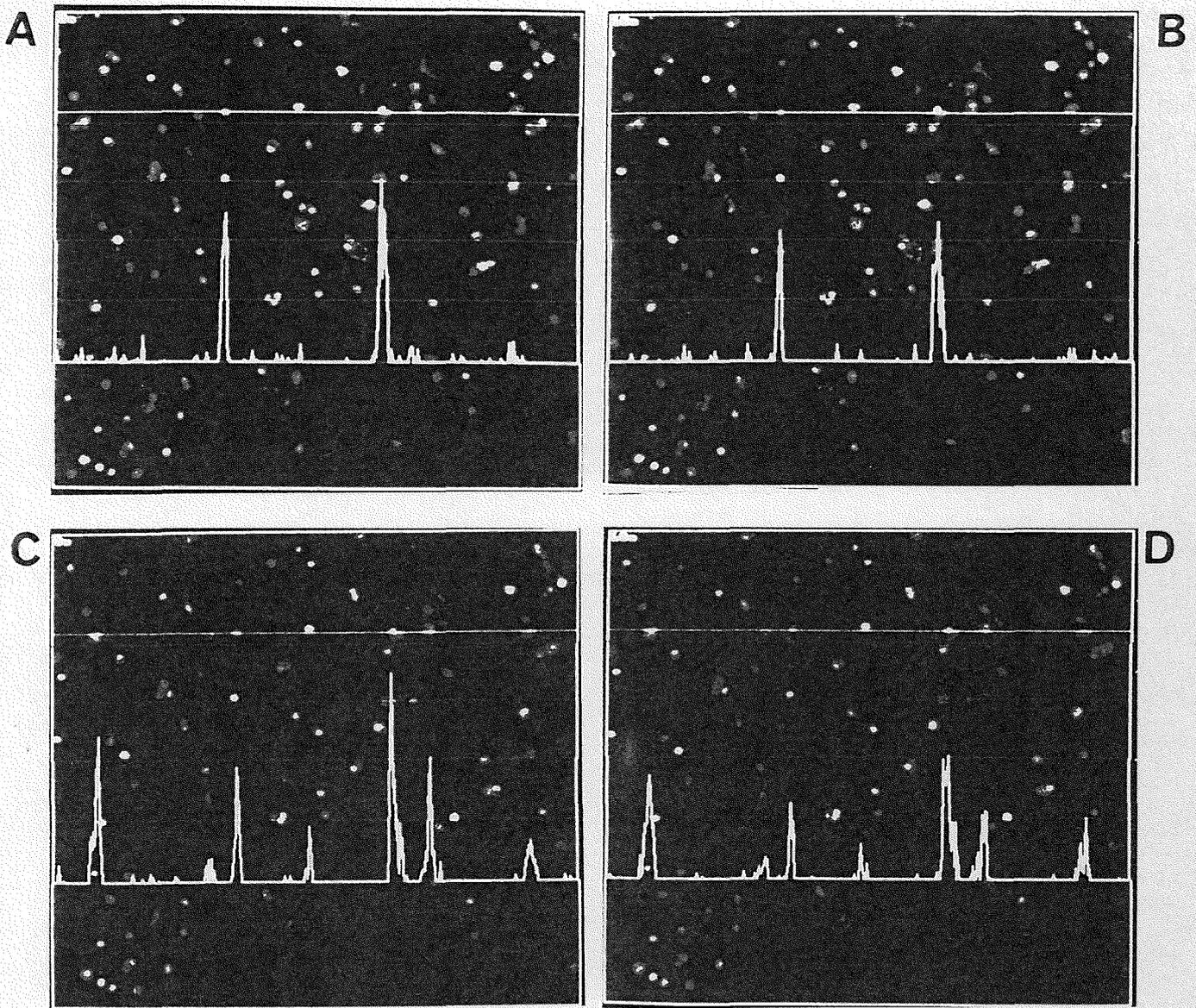


Fig 3. TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內鈣離子釋放之觀察，圖3A腦下垂體前葉細胞在加入Fura-Red後，在共軛焦顯微鏡下以TRH刺激後，觀察其0秒時細胞內鈣離子的分布情形。圖B則是加入TRH刺激後60秒時細胞內鈣離子的分布情形。圖C則是此細胞在靜置2小時後，再以TRH刺激其0秒時細胞內鈣離子的分布情形。而圖D則是再加入TRH刺激60秒時細胞內鈣離子的分布情形。

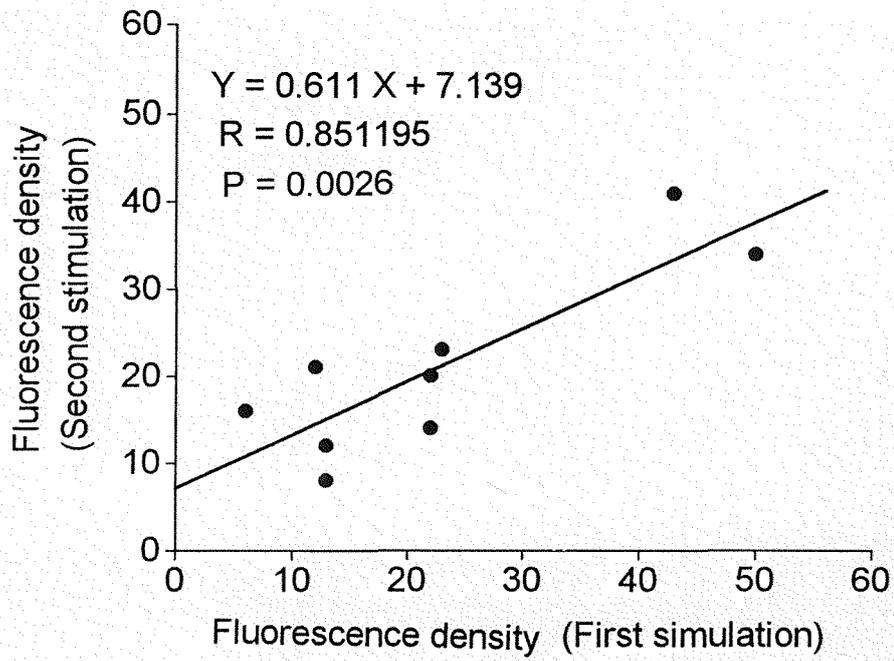


Fig 4. 前後兩次甲釋素刺激所造成的螢光強度變化之比較

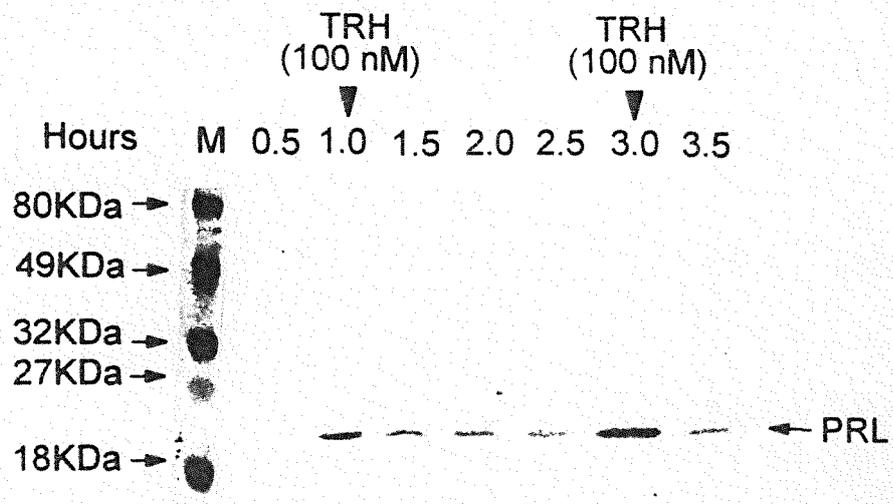


Fig 5. 西方墨點法分析緩衝溶液內泌乳素含量，分析以甲釋素去刺激腦下垂體前葉細胞前後及在靜置2個小時後重複以甲釋素刺激，其前葉細胞分泌泌乳素至緩衝液內的情形。

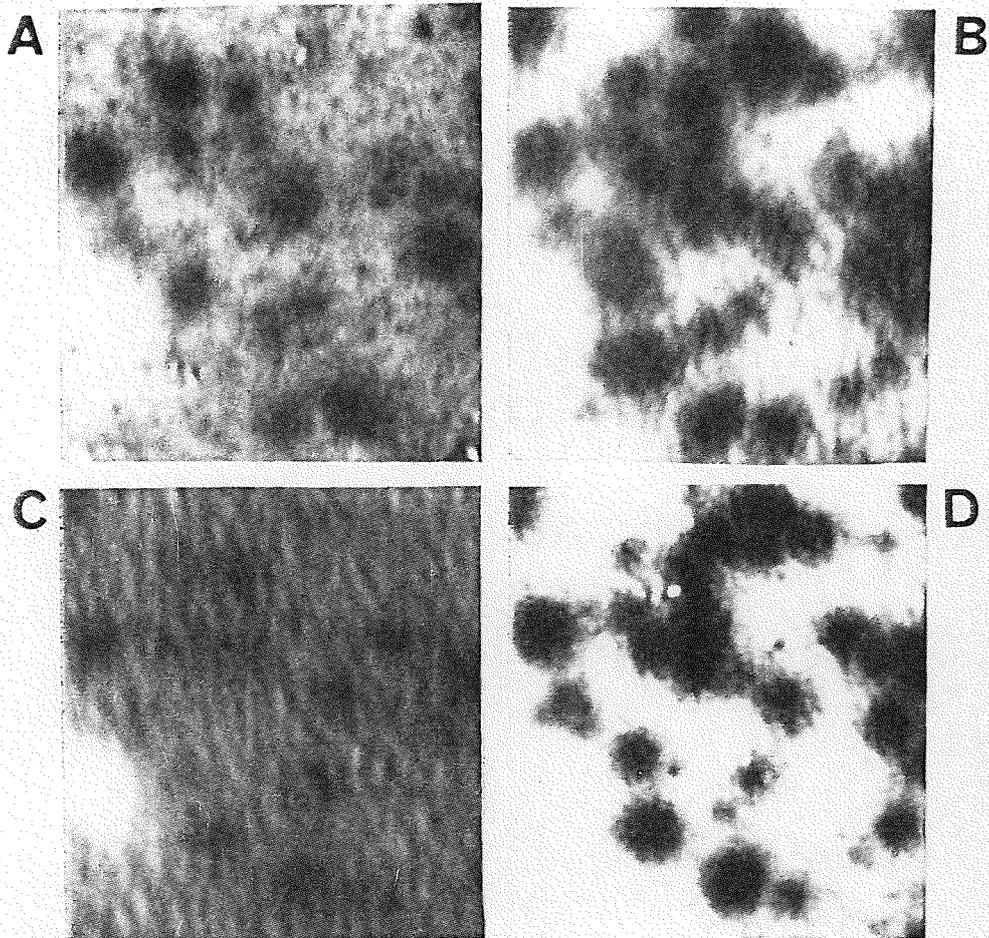


Fig 6. 連續細胞免疫墨點分析法分析單一細胞泌乳素的分泌，圖6A為腦下垂體前葉細胞中基礎泌乳素分泌，圖6B為腦下垂體前葉細胞在TRH刺激下，泌乳素的分泌。圖6C為此腦下垂體前葉細胞在靜置4小時後，其細胞中基礎泌乳素分泌，圖6D為此腦下垂體前葉細胞在TRH刺激下其泌乳素的分泌。

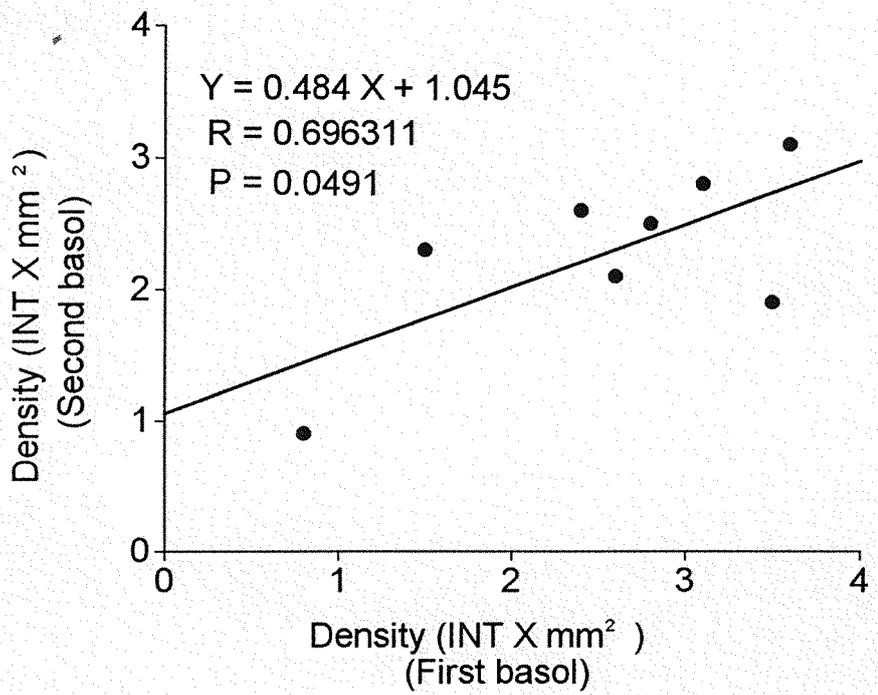


Fig 7. 前後兩次基礎泌乳素分泌量之比較

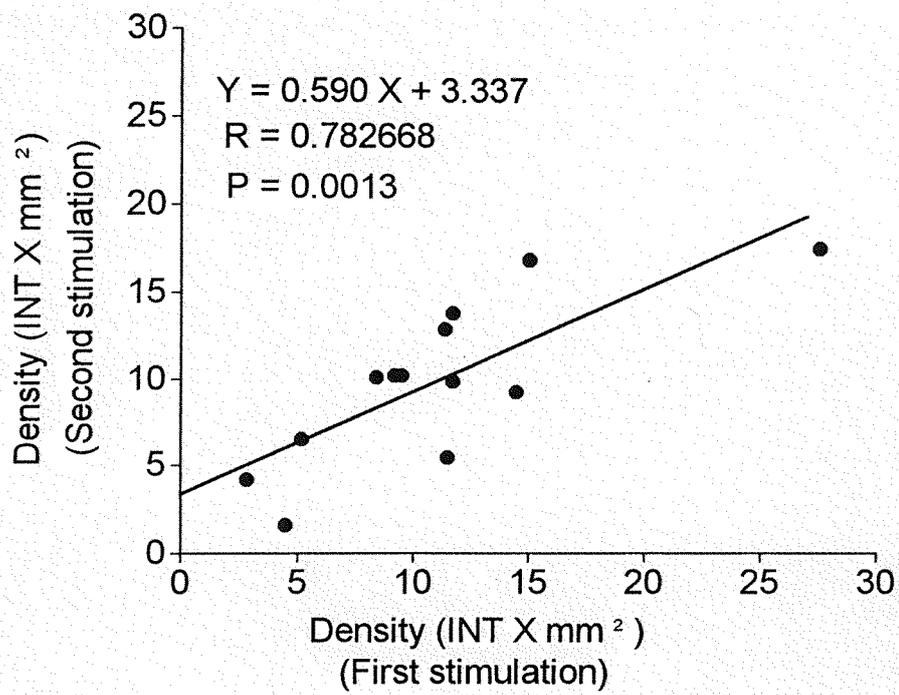


Fig 8. 前後兩次甲釋素刺激所造成的泌乳素分泌的量增加之比較

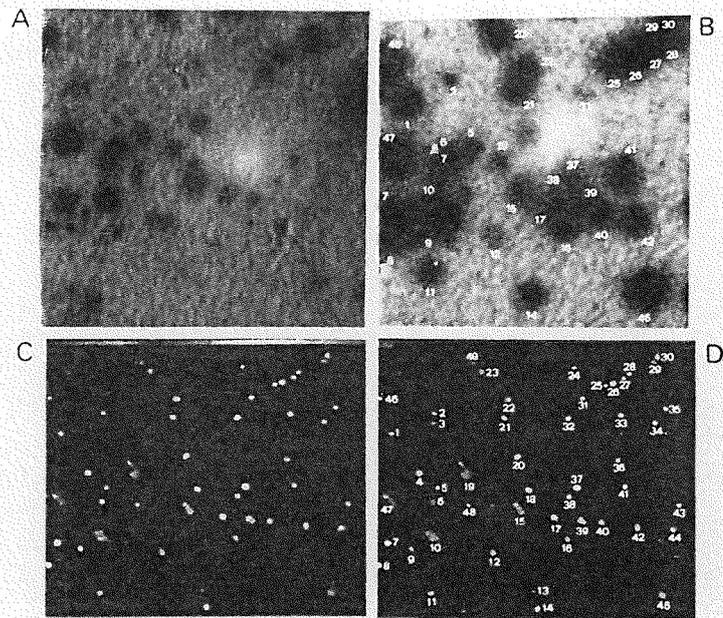


Fig 9. TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內泌乳素分泌與鈣離子釋放之觀察
 圖9 A,B是第一次TRH 刺激腦下垂體前葉細胞前後，泌乳素的分泌量，圖
 9 C,D則是在靜置 4 個小時後，第二次以TRH 刺激腦下垂體前葉細胞其
 刺激前後細胞內的鈣離子的釋放情形。

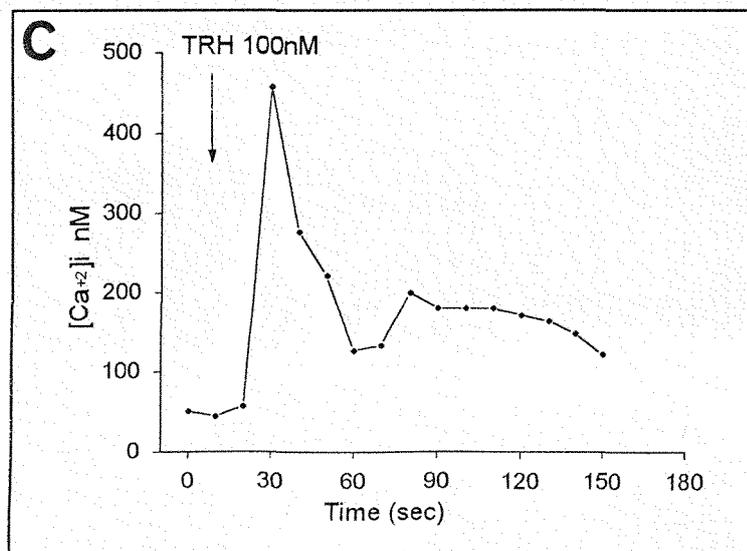
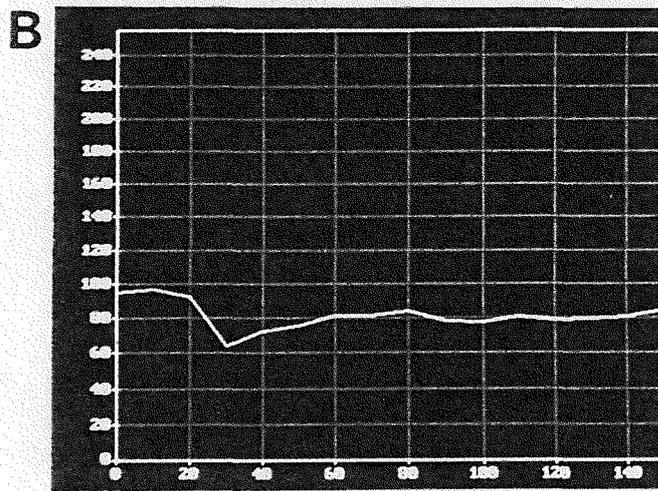


Fig 10. 將腦下垂體前葉細胞內螢光亮度變化換算成鈣離子濃度變化
 圖A為腦下垂體前葉細胞在共軛焦顯微鏡下，其細胞內Fura-Red的螢光亮度，而圖B則是圖A中箭頭所指的那顆細胞在加入TRH後150秒內其螢光亮度的變化，圖C則是將其螢光亮度的變化換算成鈣離子濃度變化。

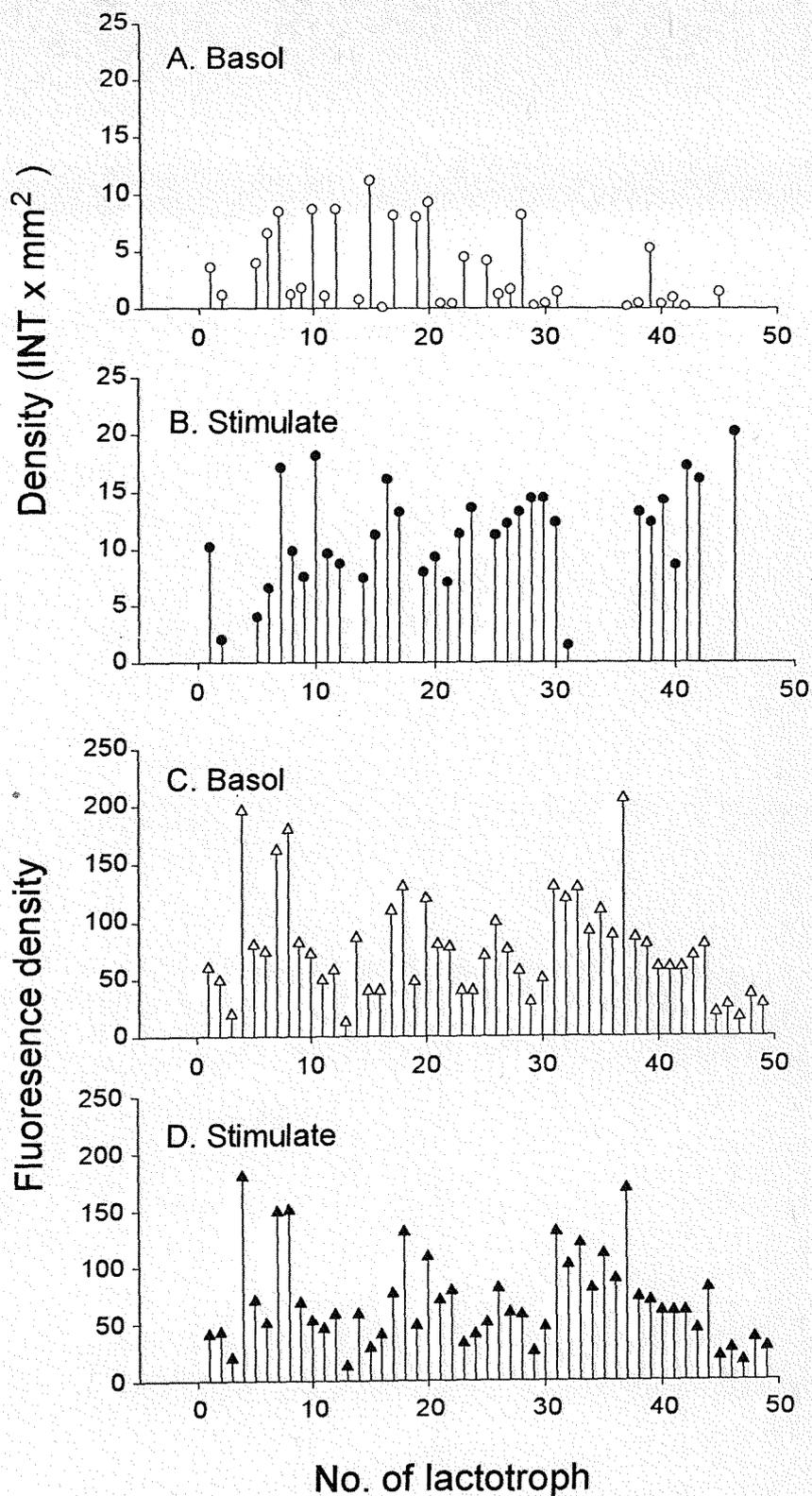


Fig11. 統計 TRH 刺激腦下垂體前葉細胞內泌乳素分泌與鈣離子釋放
圖A是圖9A中所標示的細胞在未加入TRH前其泌乳素分泌的分泌量
density 統計值，而圖B則是圖9B中所標示的細胞在加入TRH刺激後其泌
乳素分泌的分泌量density 統計值，圖C則是圖9C中所標示的細胞在在
未加入TRH前其鈣離子分布情形，圖D則是圖A中所標示的細胞在加入
TRH後其鈣離子釋放情形之統計圖。

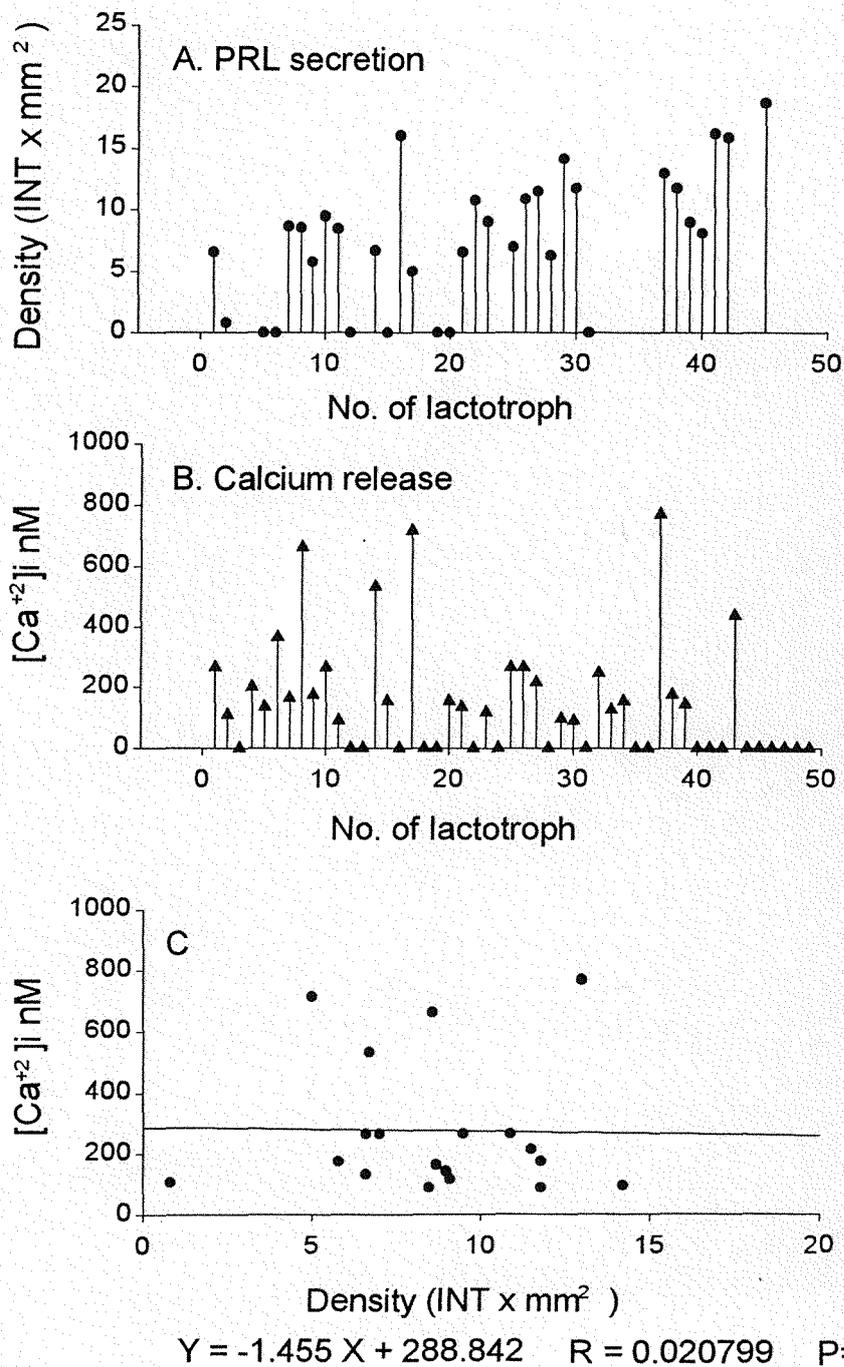


Fig 12. 比較單一細胞內泌乳素分泌與鈣離子釋放之相關性
 圖A是真正的泌乳素釋放細胞接受TRH刺激所分泌泌乳素的量，圖B則是泌乳素釋放細胞接受TRH刺激後其細胞內鈣離子釋放的情形，而圖C則是比較接受TRH刺激後，泌乳素的分泌量與細胞內鈣離子釋放情形兩者之間的相關性。

Purification of Pituitary Cells

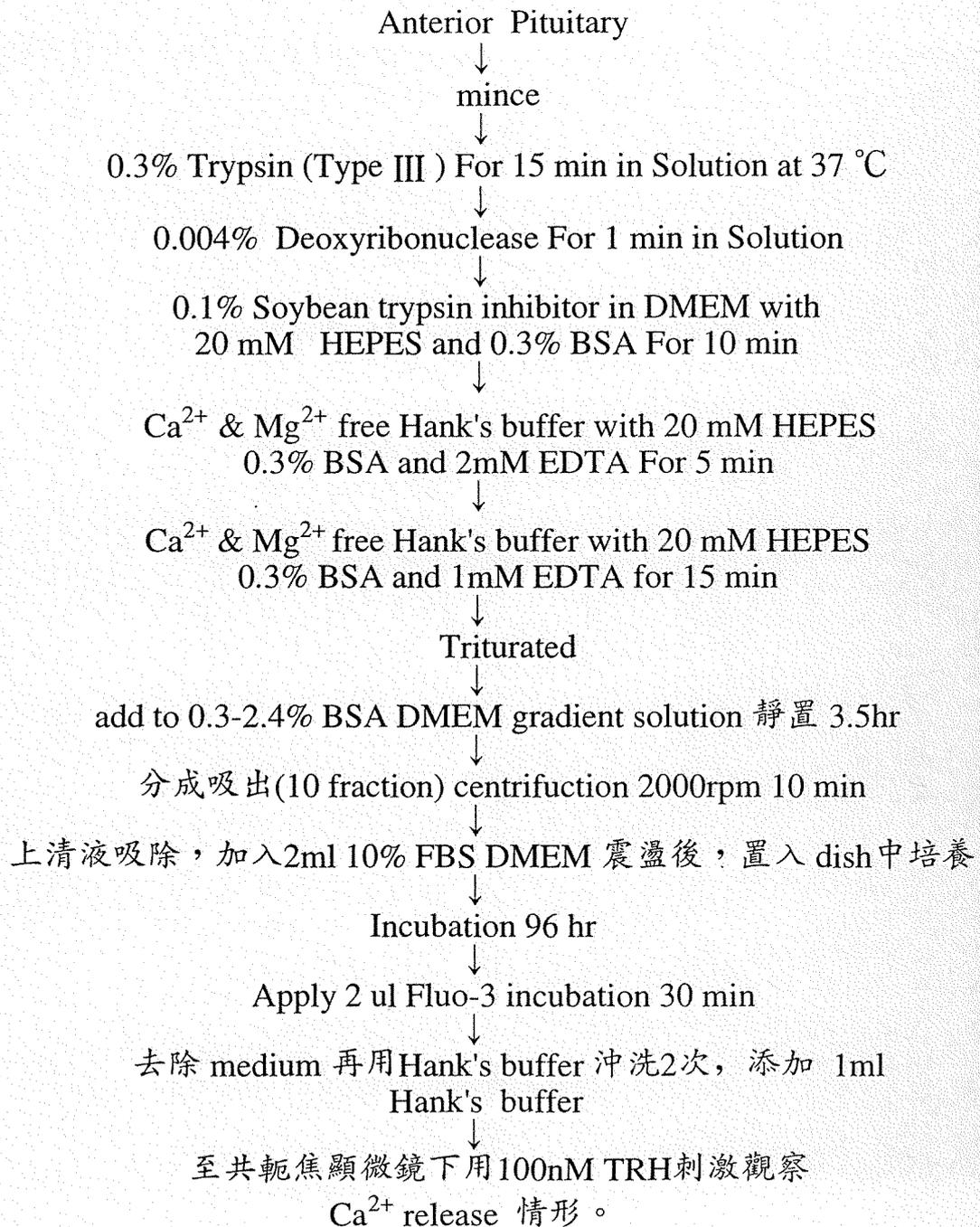


Fig 13. Lactotrophs 分離步驟流程圖

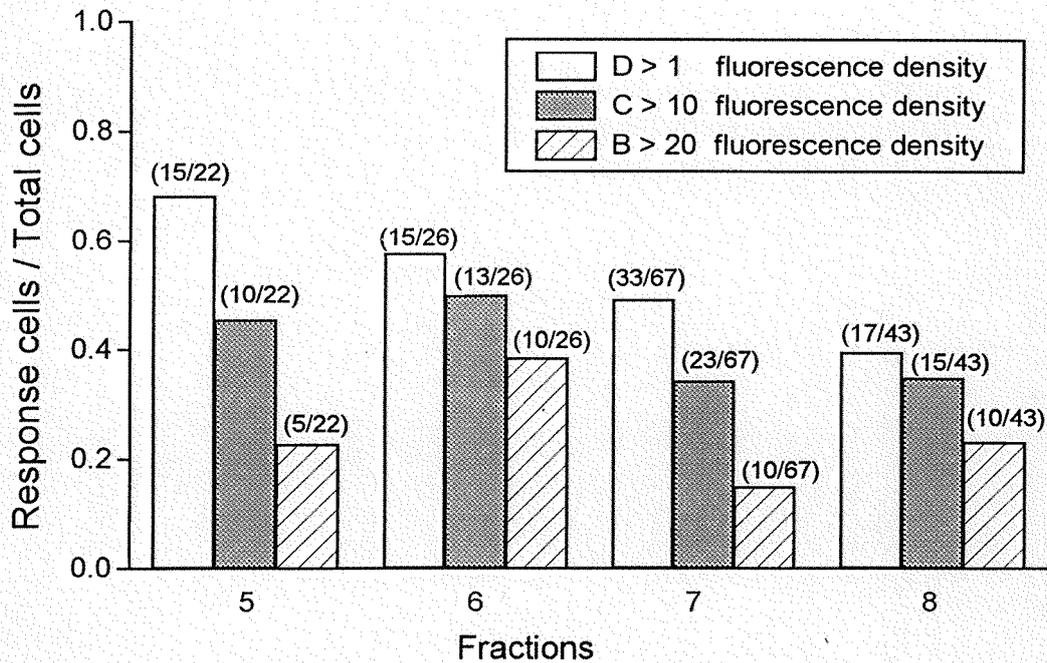


Fig 14. 每個濃度梯度內細胞鈣離子濃度變化情形之統計
 將經由濃度梯度所分離 lactotrophs 細胞，觀察不同梯度所分離的細胞
 在 TRH 刺激下，其細胞內鈣離子的變化情形。並依其鈣離子依賴螢光指
 示劑亮度變化大小做成三種柱狀統計圖。

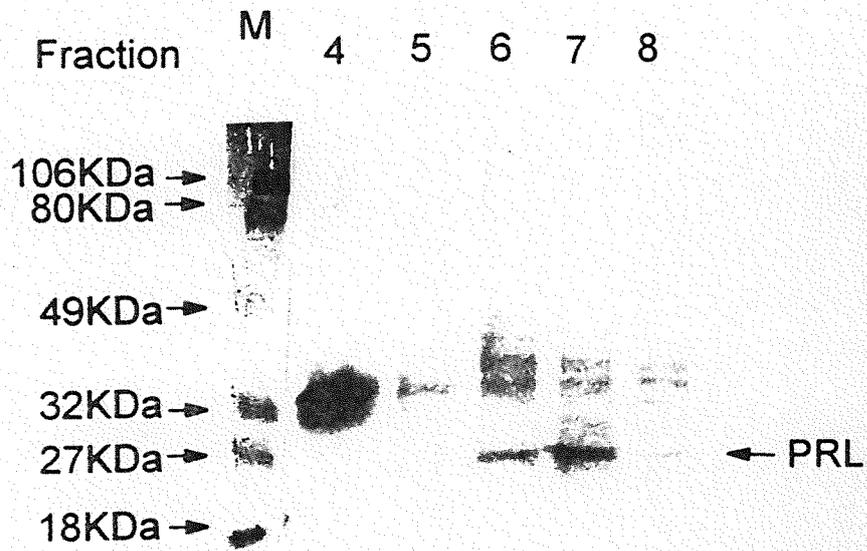


Fig 15. 西方墨點法分析不同濃度梯度所分離的細胞，在以TRH作用30分鐘後，其緩衝溶液內泌乳素的分泌量。

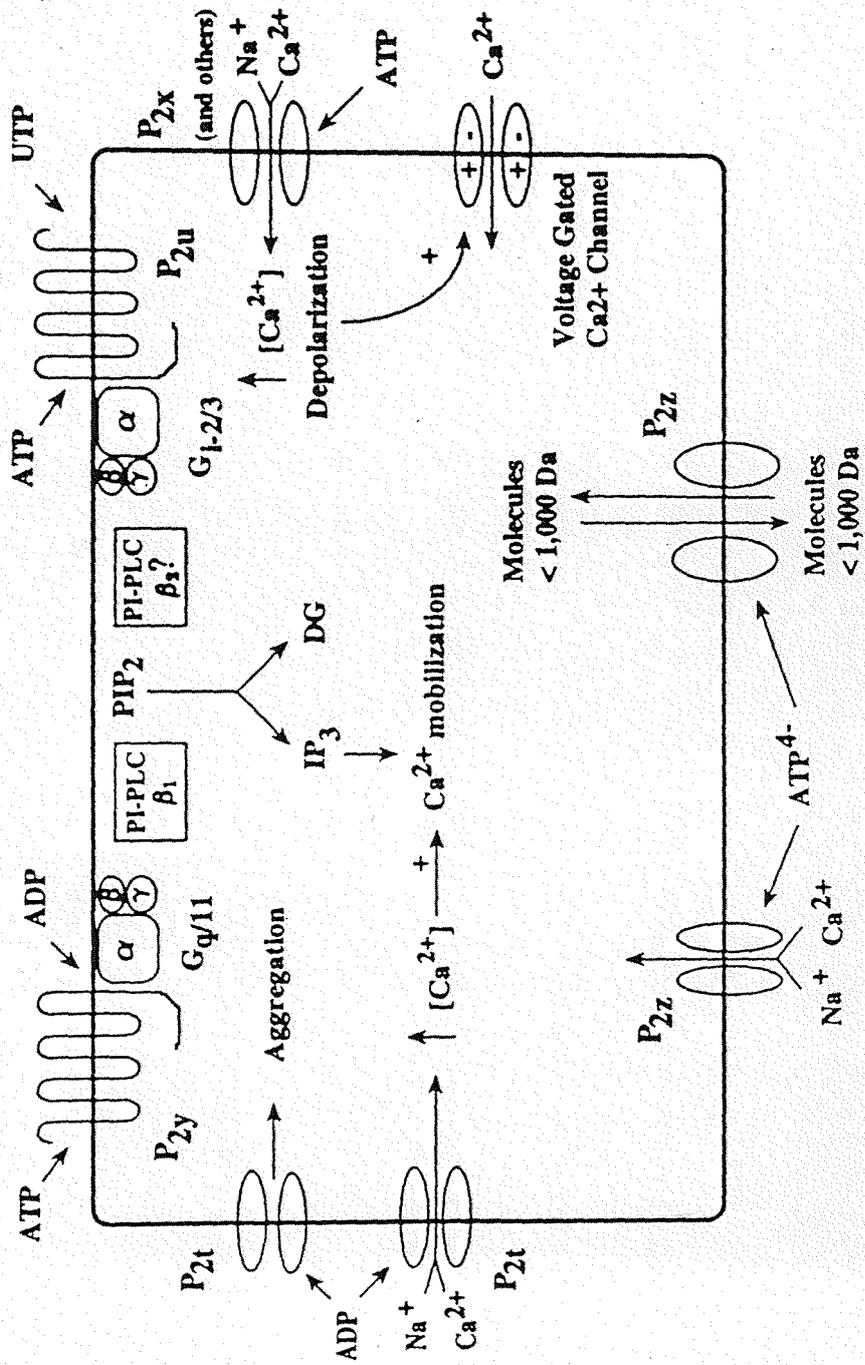


Fig 16. 細胞內鈣離子移動之機轉

Primary culture of hepatocyte

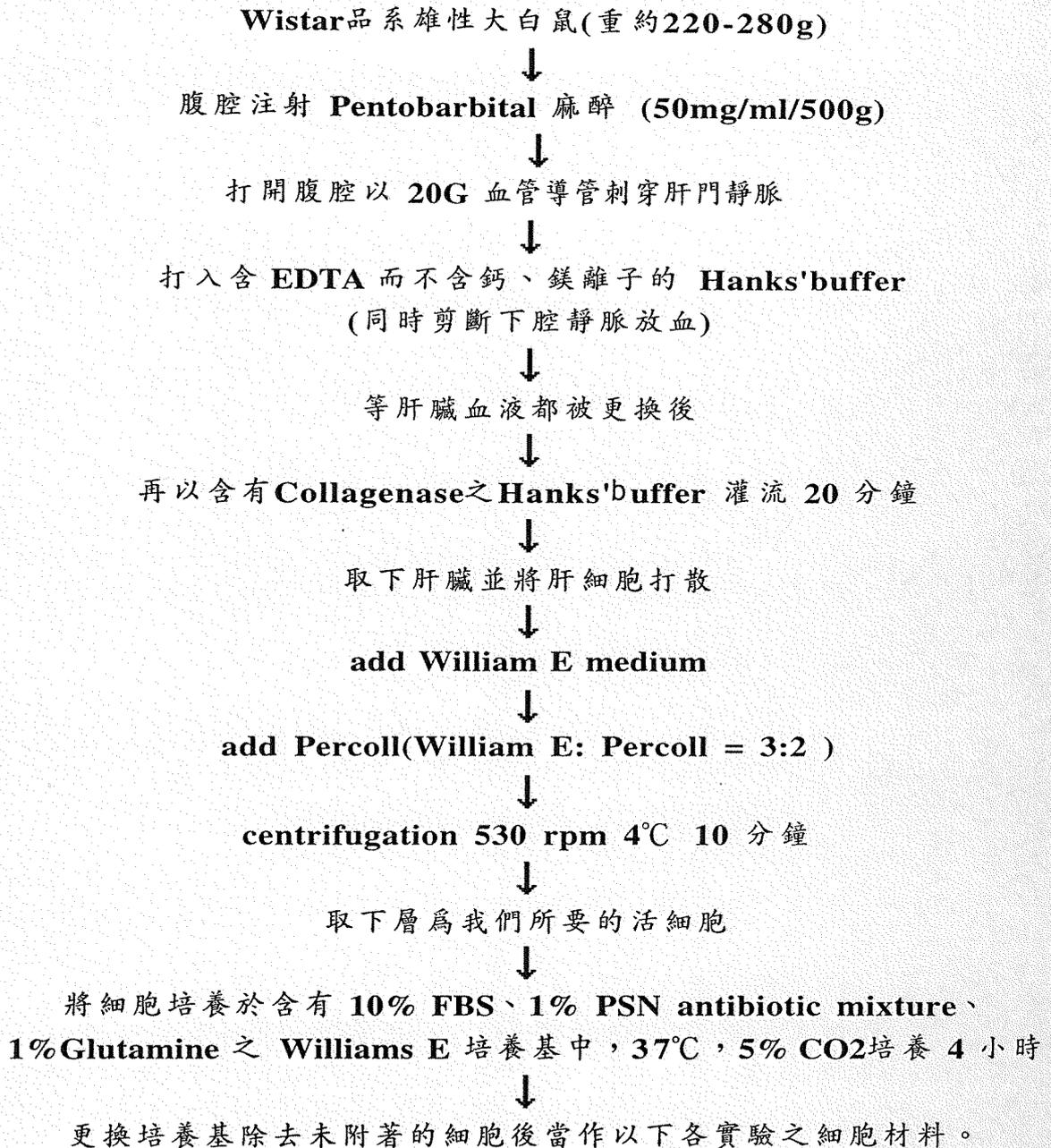


Fig 17. 肝細胞初代培養之步驟流程圖

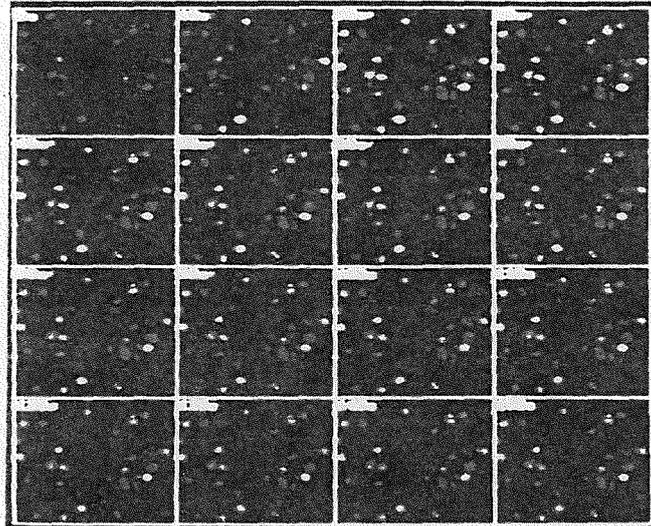


Fig 18. ATP 誘使肝細胞內部鈣離子產生變化之觀察，將細胞固定於共軛焦電子顯微鏡觀察臺，先在可見光下調整焦聚及適當的視野，然後將光源固定系統轉換至雷射光波長488nm的條件，並設定光源每十秒掃瞄一次且連續觀測150秒，並直接將結果顯示於螢光幕，觀察加入 $10 \mu\text{M}$ ATP 的肝細胞內部鈣離子變化之情形。

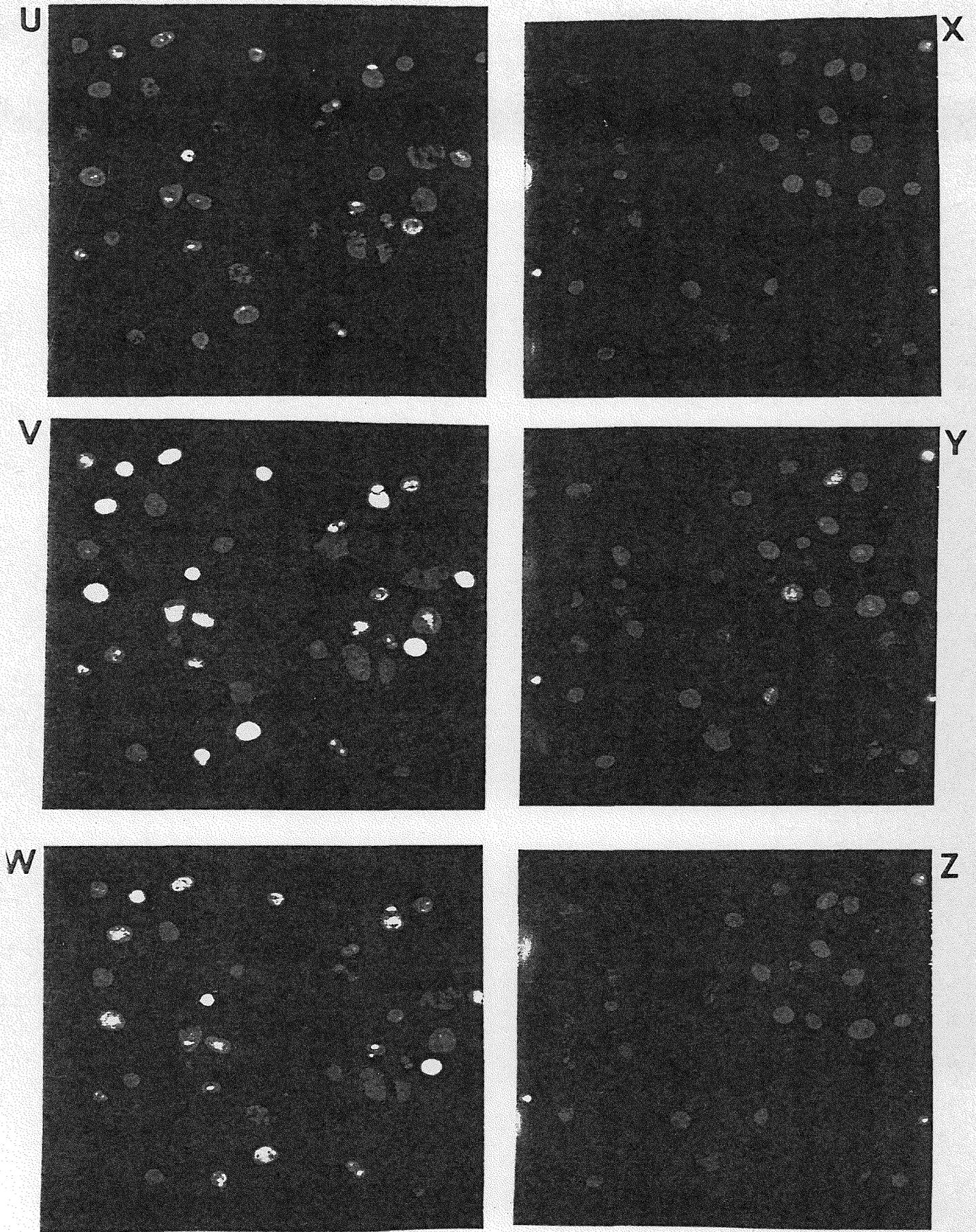


Fig 19. ATP 誘使控制組或處理過硝酸鉛肝細胞內部鈣離子產生變化之觀察

Fig 19. ATP 誘使控制組處理過硝酸鉛肝細胞內部鈣離子產生變化之觀察，圖 U,V,W 是正常肝細胞以 $10 \mu\text{M}$ ATP 刺激下，細胞內部鈣離子變化之情形，圖 U 是未刺激時細胞內鈣離子分布情形，圖 V,W 是受 TRH 刺激後 60, 150 秒時細胞內鈣離子分布情形。而圖 X,Y,Z 是以 $50 \mu\text{M}$ 硝酸鉛培養 12 小時後的肝細胞以 $10 \mu\text{M}$ ATP 刺激下，其細胞內部鈣離子的變化情形。圖 X 是未刺激時細胞內鈣離子分布情形，圖 Y,Z 是受 TRH 刺激後 60,150 秒時細胞內鈣離子分布情形。

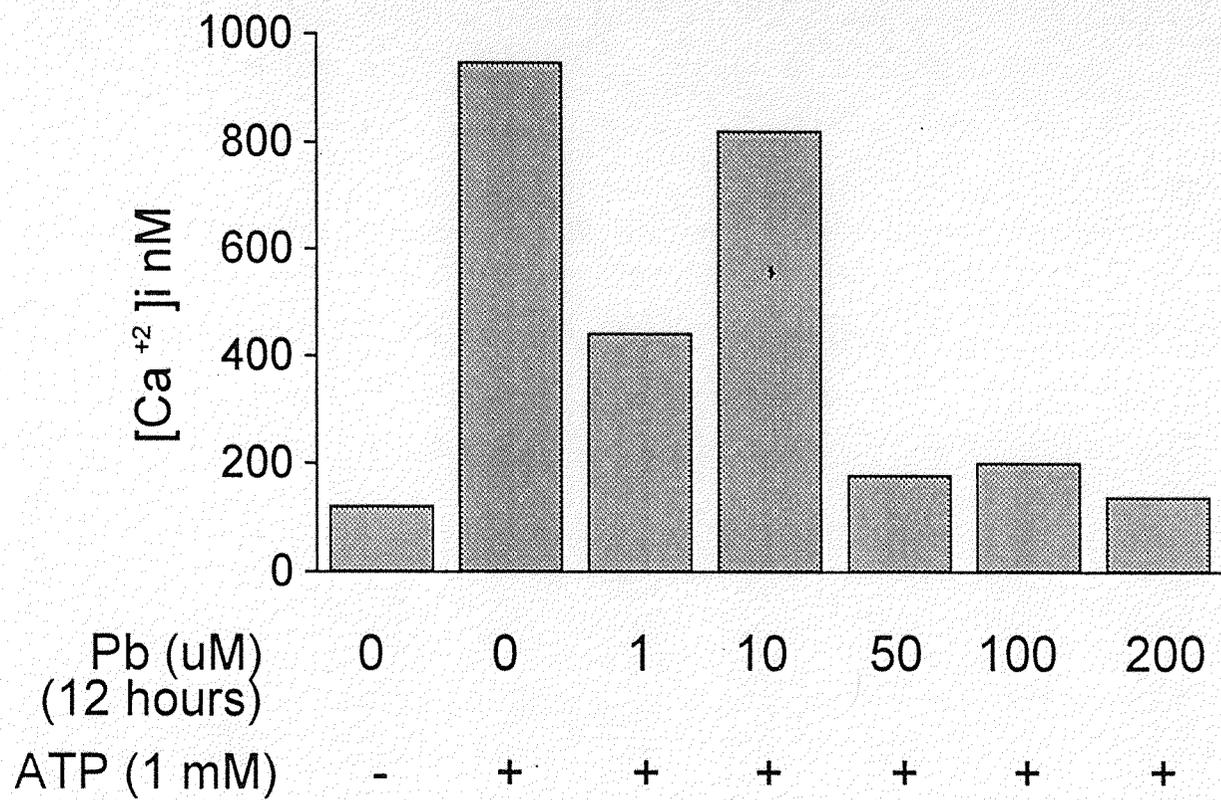


Fig 20. 不同濃度硝酸鉛影響肝細胞內部鈣離子產生變化之統計，將添加不同濃度 (200,100,50,10,1,0 uM)硝酸鉛的肝細胞進行培養 12小時後，以 10 μ M ATP 刺激下肝細胞內部鈣離子釋放情形。

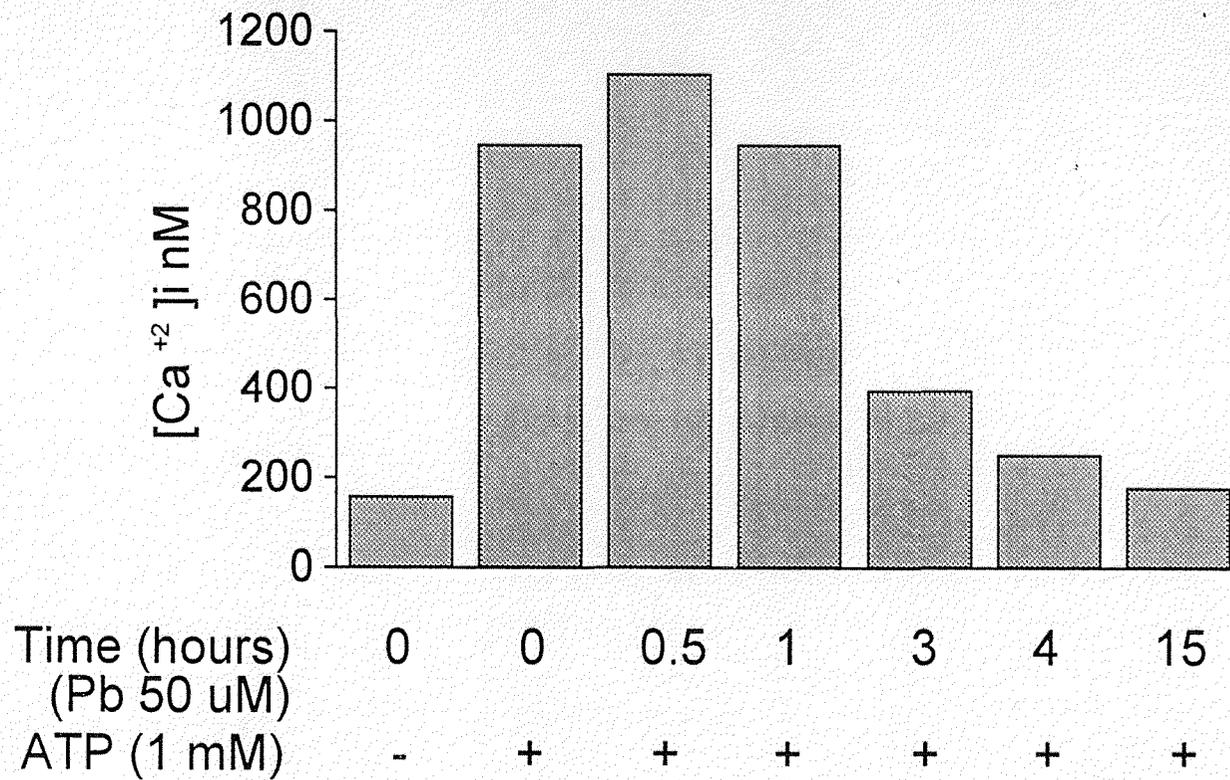


Fig 21. 不同時間硝酸鉛影響肝細胞內部鈣離子產生變化之統計，將添加50 μ M 硝酸鉛的肝細胞進行不同時間(0,0.5,1,3,4,15 hr)的培養後，觀察在10 μ M ATP 刺激下肝細胞內部鈣離子釋放情形，並統計之。

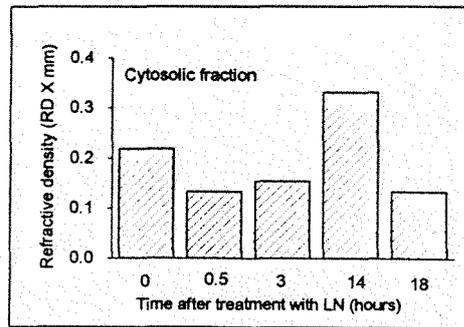
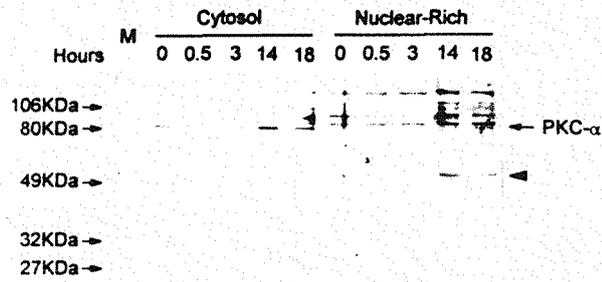


Fig 22. 西方墨點分析法測定處理過硝酸鉛肝細胞內 PKC 的蛋白量，將添加 40 uM 硝酸鉛的肝細胞進行不同時間(0,0.5,3,14,18 hr)的培養後，進行PKC 萃取，以 SDS-PAGE 將蛋白分離後，以西方墨點分析法測定細胞 cytosol 和 nuclear-rich 的 PKC 蛋白量。

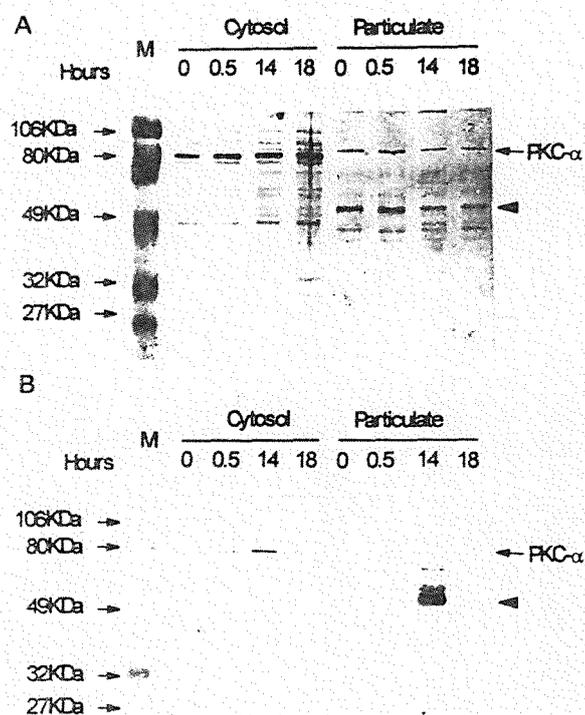


Fig 23. 西方墨點分析法測定處理不同濃度硝酸鉛肝細胞內 PKC 的蛋白量，將分別添加10,40 uM 硝酸鉛的肝細胞進行不同時間(0,0.5,3,14,18 hr)的培養後，進行PKC 萃取，以 SDS-PAGE 將蛋白分離後，以西方墨點分析法測定細胞 cytosol 和 particullar 的 PKC 蛋白量。

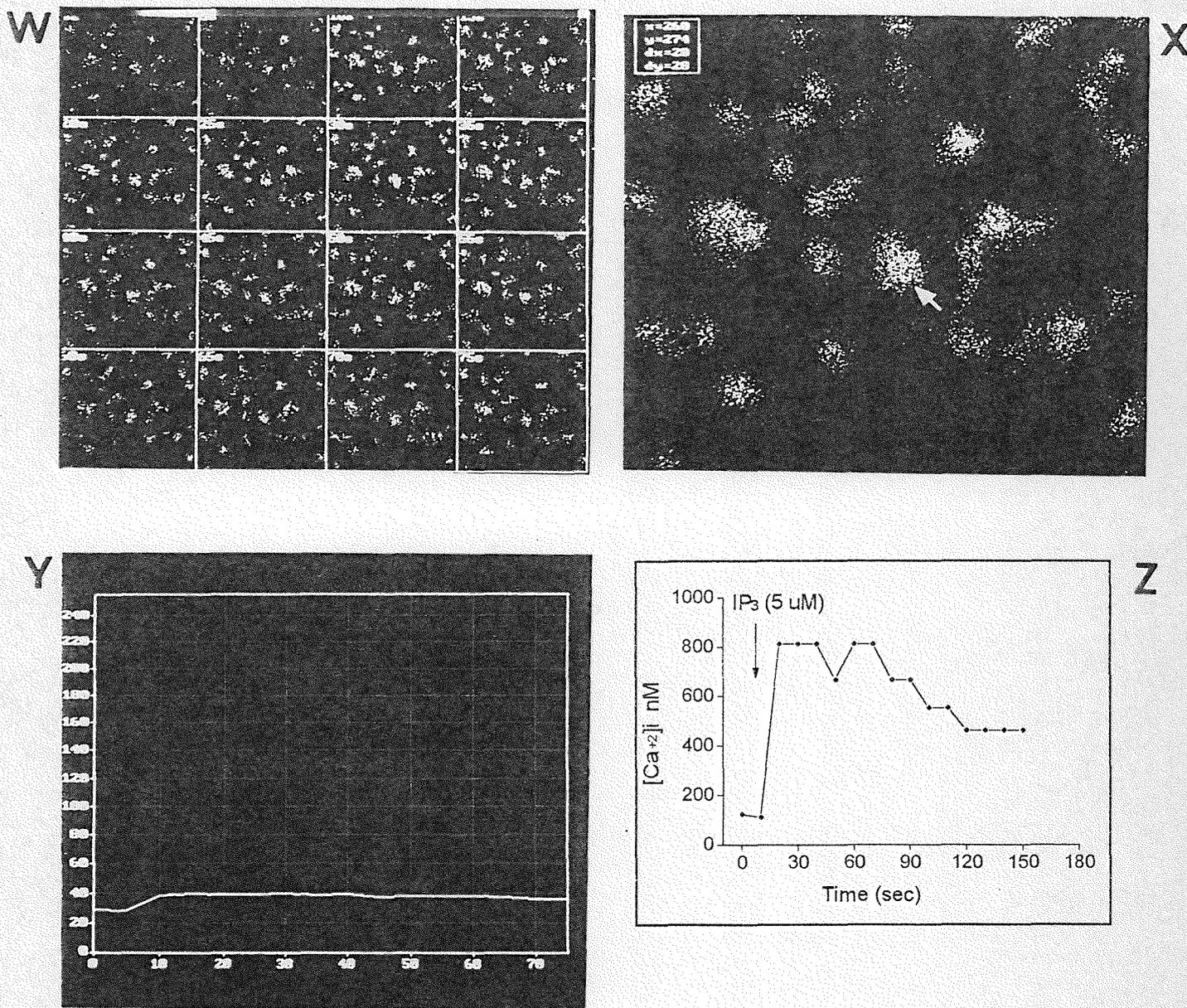


Fig 24. IP₃ 刺激肝細胞內鈣離子釋放之觀察與鈣離子濃度變化情形之統計，將培養 12 小時的肝細胞，加入 80ug/ml Saponin 溶液在 4°C 反應 20 分鐘，添加 1ml 1.4uM Ca²⁺ Green-dextran 溶液在 4°C 作用 20 分鐘，於共軛焦電子顯微鏡觀察 IP₃ 刺激肝細胞內鈣離子釋放之情形，圖 W 為加入 0.1 μM IP₃ 的肝細胞內部鈣離子在 75 秒內變化之情形，圖 W 則是標定單一細胞，而其亮度變化則由圖 Y 表示，圖 Z 則是將其亮度變化換算成鈣離子濃度變化。

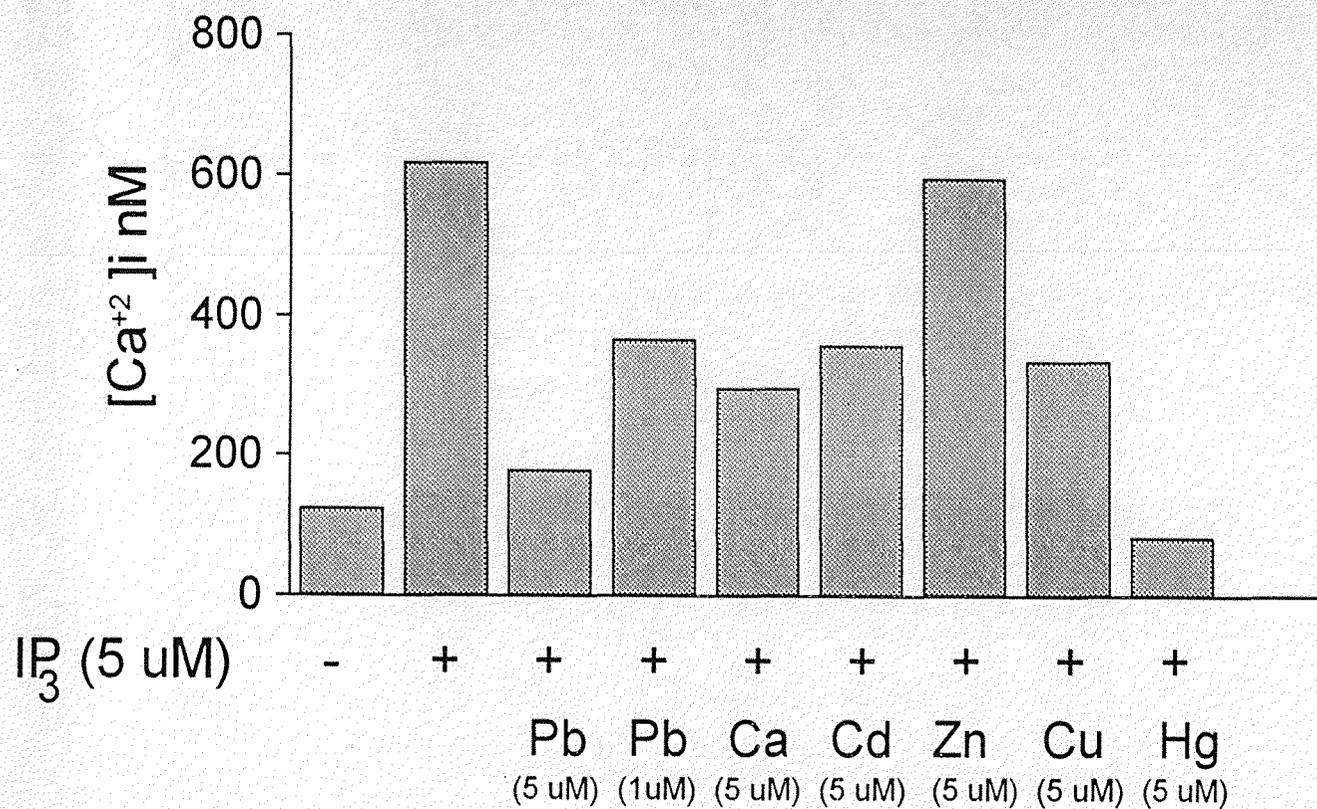
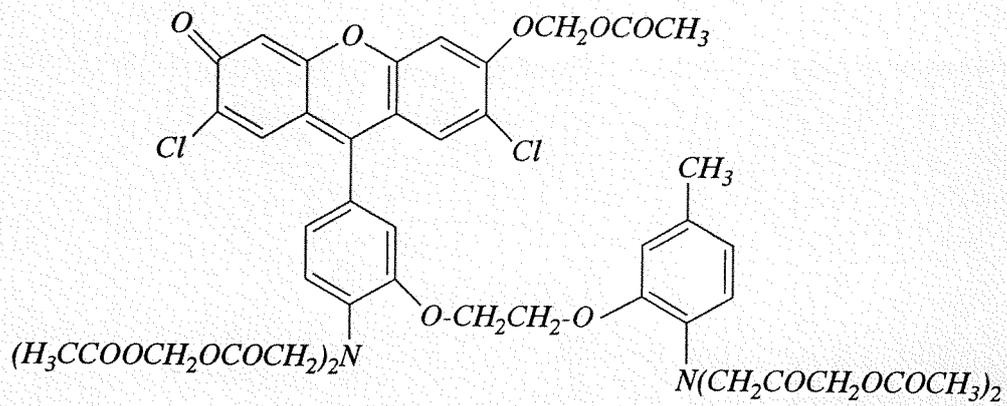
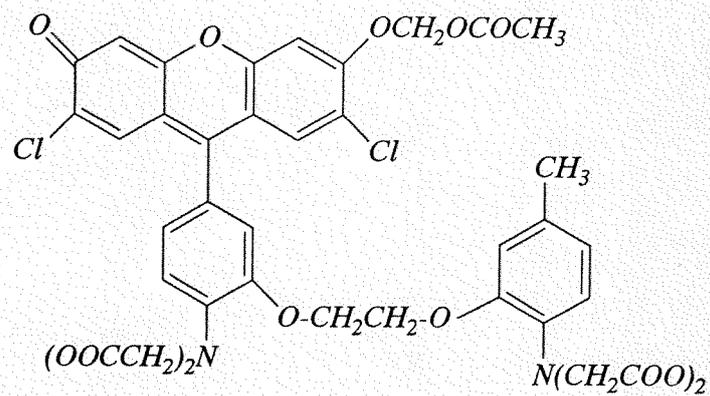


Fig 25. 一些二價陽離子影響IP₃刺激肝細胞內鈣離子濃度變化情形之統計，在了解IP₃刺激肝細胞內鈣離子濃度變化情形後，在加入IP₃前以各種不同的二價陽離子5uM加入，觀察二價陽離子對IP₃刺激肝細胞內鈣離子濃度變化情形之影響。

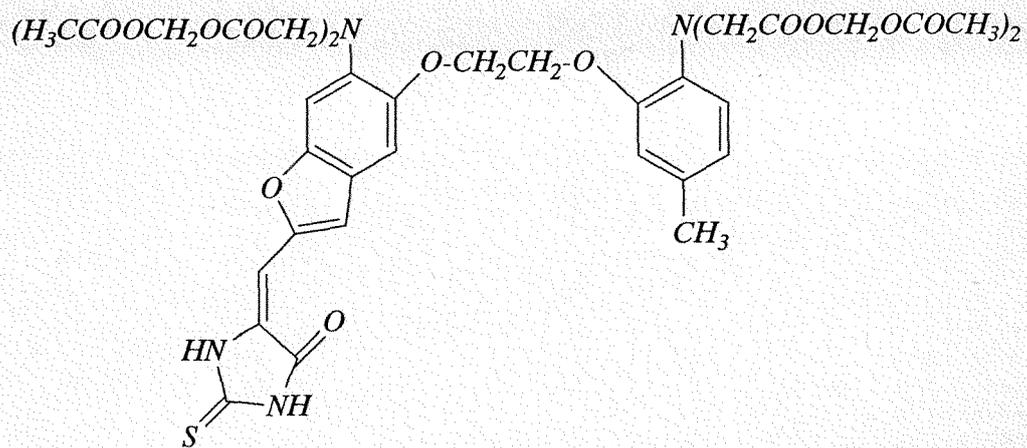


Fluo-3,AM

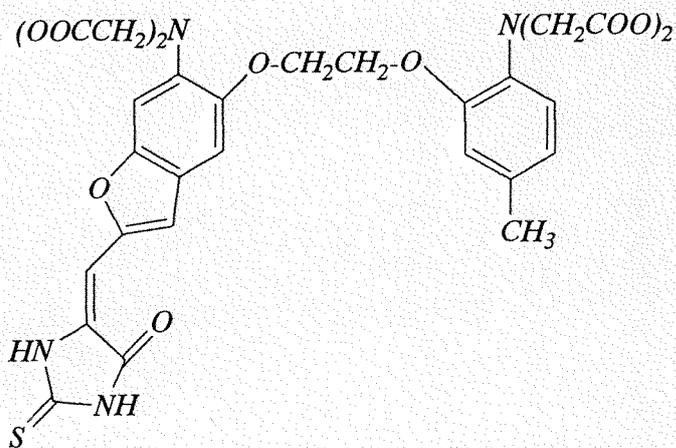


Fluo-3

Fig 26. Fluo-3 與 Fluo-3.AM 的分子結構圖



Fura Red , AM



Fura Red

Fig 27. Fura Red 與 Fura Red.AM 的分子結構圖