

R
00818
4464
88

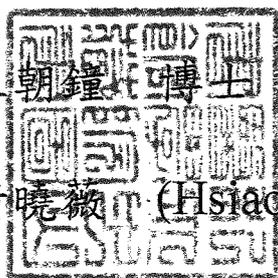
私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文

戊乙醯去氫梔子甘抑制神經膠瘤細胞生長藉由 p53 蛋白調
控細胞凋亡及細胞週期停滯之作用

Penta-acetyl geniposide inhibit C-6 glioma cells' proliferation
through the activation of p53-regulated apoptosis and cell cycle
arrest.

指導教授：王 朝 鐘 (Chau-Jong Wang)

研究生：黃 曉 薇 (Hsiao-wei Huang)



中華民國八十八年七月

中山醫學院圖書館



C055192

參考書恕不外借

本論文為中山醫學院授予以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碩士論文考試委員會審查合
格及口試通過。

考試委員

國立台灣大學醫學院
生化研究所教授

林仁混 教授

林仁混

私立中山醫學院
生化研究所教授

曾翠華 教授

曾翠華

私立中山醫學院
生化研究所教授兼所長
(本論文指導教授)

王朝鐘 教授

王朝鐘

中華民國 88 年 7 月

學生黃曉薇論文題目為戊乙醯去氫梔子甘抑制神經膠瘤細胞生長藉由 p53 蛋白調控細胞凋亡及細胞週期停滯之作用，其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授何閱後無誤。

指導教授：王朝鐘 博士

簽名：王朝鐘

中華民國八十八年七月

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 大學(學院) 生化 系所
組 八十七 學年度第 四 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱: 戊乙醯去氨酶子昔抑劑神經膠瘤細胞生長藉由 p53 蛋白

同意

不同意

調控細胞增殖及細胞週期停滯之作用

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號:)

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，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

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

指導教授姓名:

研究生簽名: 黃曉敏
(親筆正楷)

學號: R86209
(務必填寫)

日期: 民國 88 年 7 月 日

1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄台北市 10636 和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 江守田、王淑貞。(本授權書諮詢電話: 02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請經濟部智慧財產局修正定稿。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

致謝

轉眼間，研究所兩年的時光匆匆的流走了。本以為這兩年應該是很艱辛的。幸運的，在這裡受到許多老師、學長姐及學弟妹的照顧，大家就向大家庭般的和睦相處。因此這兩年來日子，就向春天的微風，在清涼中渾然不覺的就過了。過去的許多酸甜苦辣，未來都將是一段美好的回憶。

既然受到大家的照顧，就不可以忘恩啦！在此首先要感謝本家庭的大家長也就是我的指導老師王朝鐘老師。他對於學生不僅在課業上以及在生活上的照顧，帶動了我們這個家庭的風氣，叫人想要不和樂也難啊！其次也要感謝曾翠華老師、周芬碧老師、林玉玲老師及黃俊銘老師的照顧及指導，並且特別感謝妙真學姊不厭其煩的給我實驗上及生活上的指導及建議。另外，非常感謝學長姐，元志、育英、玉娟及育津、煥昌、滄澤、雪君、舜傑在生活上與實驗上的支持及照顧。還有實驗室的其他夥伴們，沒有大家的照顧，曉薇是不會如此順利的完成這兩年的學業的。

除此之外，還要感謝林偉隆醫師、劉哲育老師及意維學弟在實驗上的幫助。另外特別感謝台大醫學院林仁混老師對於本論文的審閱及指導。

最後僅將此論文獻給我的父母及我的家人，由於他們的細心呵護及照顧之下，使得我能充滿信心的完成此學業。

目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
緒論.....	3
動機.....	9
材料.....	11
方法.....	14
結果.....	23
討論.....	27
附圖.....	30
參考文獻.....	68



中文摘要

戊乙醯去氫梔子甘 [pental-acetyl geniposide, (AC)₅GP] 是從山梔子 (*Gardenia fructus*) 萃取出來的一種糖甘(glycoside)，再經乙醯化(acetylation)而得到的。本實驗室之前的研究指出，(AC)₅GP 可以抑制老鼠體內 C-6 神經膠瘤細胞的生長。本篇實驗進一步利用 C-6 神經膠瘤細胞株，處理(AC)₅GP 後發現，在處理(AC)₅GP 之後，會造成 C-6 細胞的死亡、DNA 階梯狀的斷裂及細胞的週期停在 G0/G1 期，因而判定細胞(AC)₅GP 造成細胞的死亡，是一種細胞凋謝死亡的形式。探討結果發現，(AC)₅GP 會導致 C-6 細胞內 p53 及 c-Myc 蛋白的增加，進而活化下游的 Bax，並抑制 Bcl-2 的表現，來導致細胞的凋亡。另外也會經由促進 p53 的表現，進一步促進下游 p21 蛋白表現並抑制 RB 蛋白，來導致細胞週期停留在 G0/G1 期。另外也發現有 PKC 轉位活化的情形，但 PKC 下游的一些訊息傳遞蛋白卻不受 (AC)₅GP 的影響。而同時給予 TPA 及 H7 處理之後，卻未發現(AC)₅GP 造成 C-6 細胞週期停滯的情形有受到抑制。因此推斷 PKC 並沒有參與(AC)₅GP 抑制細胞週期的路徑中。

Abstract

Penta-acetyl geniposide, (AC)₅GP, was generated by acetylation of a glycoside isolated from extracts of *Gardenia fructus*. In previous study, we reported that (AC)₅GP could inhibit the growth and development of C-6 glioma cells in rats. In this study, we found that cell growth of C-6 glioma cells could be inhibited by (AC)₅GP treatment. The (AC)₅GP induced cell death was examined in rat C-6 glioma cells. Treatment of C-6 glioma cells with the (AC)₅GP caused formation of internucleosomal DNA ladder and cell cycle arrest at G₀/G₁ phase. These phenomenon indicated that (AC)₅GP-induced cell death appeared to be mediated by apoptosis. In addition, the results also showed that p53 protein was accumulated by treated with (AC)₅GP and cause apoptosis by upregulation of Bax and downregulation of Bcl-2. On the other hand, (AC)₅GP-independent p53 expression could also induce p21 expression while RB expression was inhibited and cause cell arrest at G₀/G₁ phase. In addition, PKC could also be activated in this pathway, but there is no effect in PKC downstream protein expression. Treating cell with TPA or H7 finding that TPA or H7 can't inhibit the effect of cell cycle arrest by (AC)₅GP. So we suggest that PKC was not involved in (AC)₅GP inhibiting pathway of cell arrest.

緒論

一、 戊乙稀去氫梔子甘的背景介紹

山梔子或稱梔子(*Gardenia Fructus*)，是茜草科山梔(*Gardenia jasminoides* Ellis)的果實，來自印度支那、中國、日本西南部、琉球、菲律賓、台灣全省海拔 1600 公尺上下之闊葉林內。為廣泛自生或栽培之長綠小喬木或灌木。一直被廣泛的應用在於食品色素及酒的香料上，在中國的醫學上，曾被使用於消炎、抗出血、利膽、解熱、鎮靜等用途，在臨床上常被使用來治療肝膽方面的疾病、肝炎急性黃疸等 (1)。梔子主要成分有兩大類：一為類葫蘆蘆素及其衍生物(α -Crocetin, α -Crocetin)，另一類為梔子甘 (iridoid glycosides)。之前的也報告指出，梔子對於 aflatoxin B₁ (AFB₁)所造成的肝毒性有保護作用 (2)。

去氫梔子甘 (Geniposide, GP)為 iridoid 型之配醣體，是由梔子的果實中分離出來的 (3,4)。之前報告指出，去氫梔子甘可以促進 α -naphthylisothiocyanate 或其有毒的代謝物的結合及膽排泄(5)。而本實驗室也發現，去氫梔子甘也可以抑制 aflatoxin B₁ 的肝毒性 (6)。

戊乙稀去氫梔子甘，penta-acetyl genipposide，(AC)₅GP，(Fig. 1)，是本實驗室進一步將氫梔子甘加上五個乙醯基而得 (7)。全名為 1-(β -D-2', 3', 4', 6'-tetraacetylglucopyrannosyloxyl)-1,4a,5,7a-tetrahydro-7-(acetomethyl) - cyclopentapyran-4-carboxylic acid methyl ester。(AC)₅GP 也可以抑制 AFB₁ 對老鼠的肝毒性 (8)，及抑制老鼠中 C-6 神經膠瘤細胞的生長 (9)。

二、 有關凋謝死亡

*何謂凋謝死亡

再過去二十年來，利用大腸直腸癌致癌機轉的研究為致癌的分

子機轉樹立了良好的典範。研究的重點在於致癌基因(oncogenes)的活化和抑制基因(tumor suppressor genes)的去活化。而在1993年，Kolodner和Vogelstein二大研究群又提出了核酸誤配修復基因(DNA mismatch repair genes)的突變與人類遺傳非息肉性大腸癌的致癌有關(10)。然而在正常的生理狀態下，人體細胞必需於增殖(proliferation)、生長停止(growth arrest)，以及細胞的設定性死亡(programmed cell death、apoptosis)之前維持著動態的平衡，亦即細胞的數目必須經過嚴密的調控，使細胞數目不至於太少或過度增生甚或失控地生長。細胞的凋謝死亡(apoptosis)也就是細胞設定性死亡(programmed cell death)，目的就再確保與維持體內任何一特定部份之實際大小及組成，使其不超過生理所需的上限。這種現象可能發生於生理成長階段，如生物體於變態時期之幼體器官退化；另一則是在外力刺激下所引起的細胞反應，如在細胞受到嚴重傷害，禍患有免疫缺乏症候群，及老化或退化疾病出現時。當細胞進行凋謝死亡時，其特徵為細胞核與細胞質會聚合(condense)、DNA退化分解或斷裂，而後細胞分裂為數個由細胞膜所包含的小體(apoptotic bodies)(11)。一般來說，當淋巴球細胞受到病毒感染、細胞數目過高或發生自體反應時，細胞便會啟動這個程序。但就另一方面來說，不當的活化凋謝死亡程序，卻往往導致諸如 ischemic stroke 與 AIDS 等疾病。其終極的生理意義在於消除多餘的、老化的、已失去功能的或突變的不正常細胞。

* 細胞凋亡與癌症的關係

根據一些觀察發現，許多人類的癌症細胞的確比一些正常的細胞較不會發生凋亡的反應，這一點特別以最具又侵襲性的轉移性癌最為明顯(。大部份的正常細胞必須仰賴環境中的特殊因子來維持其存活，此種依賴狀態使得正常細胞在非生理狀態下便不能存活。不過一些轉移性腫瘤細胞卻能克服此種因素，因此可想而知，腫瘤細胞必定具有對抗細胞凋亡的能力。

太多的細胞死亡會導致發展的不平衡及一些退化性疾病的產生，然而太少的細胞死亡，則會導致癌症的形成。凋謝死亡(apoptosis)會受到一連串基因(gene)的調控，有一些是凋謝死亡的促進因子，有些則是抑制因子。如此一來可經由腫瘤細胞與正常細胞含有不同的基因主成及對一些化學藥劑有不同的敏感度來殺死腫瘤細胞，同時把對正常細胞的傷害減到最低。目前一些研究已證實化學抗癌藥物 cisplatin、camptothecin、amsacrine、etoposide 或 teniposide 等，能誘使腫瘤走向凋謝死亡(12)，雖然這些外在因子的刺激能控制細胞的存活，但細胞本身的基因組合也是一決定細胞死活不可忽略的因素。例如：p53，為一腫瘤抑制基因，在很多的腫瘤細胞內其 p53 基因已經被突變(mutation)或刪除(deletion)，這些含有突變 p53 的細胞都較具有抗細胞凋亡的能力，而且有強的增生能力及擴散(Metastasis)能力。因此如何抑制腫瘤細胞增生的速度，及同時誘導其走向死亡，是癌症治療的重要指標。

* Bcl-2 蛋白

Bcl-2 基因是第一個被發現與細胞凋謝死亡有關的基因 (13)，但是 Bcl-2 基因與一般的致癌基因不同，在於它不會刺激細胞的增生，而是維持細胞的存活(14)。Bcl-2 會大量表現於一般胚胎生長的過程中(15)，以及一些必需長期存活的細胞。有報告指出，再淋巴系統中(lymphoid system) Bcl-2 的過度會促進一些免疫球蛋白持續分泌(16),阻止 B 細胞的發展(17)及造成 B 細胞淋巴瘤的產生(18)。對於 Bcl-2 在各種細胞株中延長細胞存活及預防細胞死亡的重要性，推測 Bcl-2 及 Bcl-2 族群分子必定也在細胞凋謝死亡中扮演著重要的角色。

Bcl-2 並非單獨存在的分子，而是一個包含不同相似基因的族群。而每個 Bcl-2 家族成員皆在細胞的凋謝死亡中扮演重要角色。除了 Bcl-2 本身，尚有 Bcl-xl, Bcl-xs, Mcl-1, Bak 及 Bax。其中 Bcl-XL, Mcl-1 與 Bcl-2 相同，皆具有抑制細胞凋謝死亡的能力，然而其他，

如 Bcl-xs, Bak 及 Bax 則會促進細胞的凋謝死亡。至於 Bcl-2 家族分子如何來調控細胞的凋謝死亡一直是一個重要的課題。

目前發現, Bcl-2 家族成員間的交互作用及其存在細胞內的相對量是決定細胞死亡與否的關鍵因素之一。Bcl-2 蛋白(Bcl-XL)能與 Bax (Bak)形成二合體, 制於此二合體如何抑制(或促進)仍然沒有一個定論。一些研究對此現象有不同的解釋: (1) Bcl-2 或 Bcl-XL 能經由扮演類似抗氧化酶的角色來保護細胞活化存活的途徑(19), 當 Bcl-2-Bax 或 Bcl-XL-Bak 形成複合體時, 則會破壞 Bcl-2 本身的保護效應而促使細胞死亡; (2)另一種解釋剛好相反, Bax 或 Bak 本身含有死亡的調控區, 所以能誘使細胞死亡, 當 Bcl-2-Bax 或 Bcl-XL-Bak 形成複合體時, 則會遮蔽 Bax/Bak 的死亡訊息傳遞而增加細胞的存活(20)。這些結果顯示在細胞內 Bcl-2 與 Bax 的相對量是十分重要的。在正常情形下, $Bcl-2/Bax=1$, 若 Bcl-2 蛋白大量表現, 則細胞內會有自由的 Bcl-2 蛋白存在, 如此會使細胞存活下來且增加其對一些外在壓力的抵抗性; 反之, 若 Bax (Bak)蛋白大量表現則會有 Bax (Bak) 存在, 如此會促使細胞走向死亡。所以細胞內 Bcl-2 與 Bax 的相對量為一決定細胞是否會凋謝死亡的重要因子。

* p53 蛋白

p53, 為分子量 53 KDa 的蛋白質, 可以調控 DNA 傷害及一些基因毒物壓力所造成的反應, 是維持基因穩定的重要因子。在一些癌症的發展過程中, 時常會出現 p53 的功能喪失或 p53 突變的情形(21)。將 p53 殖入已經發生變性 (transformed) 的細胞中, 可以造成細胞的生長停滯(cell growth arrest) 及細胞的凋謝死亡。因此可知 p53 可以導致細胞生長停滯及細胞的凋謝死亡。至於應該走生長停滯或細胞的凋謝死亡, 則必須仰仗環境及細胞的種類而定。

在正常的情況下, p53 蛋白的表現量很低, 但是當發生 DNA 傷害時會活化 p53, 它不僅會增加 p53 的量, 並且會使得 p53 活化, 去當一個轉錄因子, 去活化下游一些在目標元素(target element)上具

有 p53 反應促進子的基因(22)。

P53 下游可以調控細胞去走兩個路徑：細胞生長週期停滯(cell cycle arrest)及細胞的凋謝死亡(apoptosis)。在 cell cycle arrest 方面，p53 可以藉由調控 p21^{WAF1}，p16 cyclin D1，cdk4 及 Rb 來導致 cell cycle arrest. 在 apoptosis 方面，則是利用 bax 及 IGF-BP3 來決定 p53 所調控細胞之凋謝死亡途徑(23,24)。過度表現 Bcl-2 可以抑制 p53 導致的 apoptosis. 而 Bax 可以與 Bcl-2 結合而產生拮抗作用。所以由 p53 所調控的 Bax 的生成可以促使細胞走向 apoptosis。

*c-Myc 蛋白

c-Myc 在一般的細胞中屬於一個原致癌基因(proto-oncogene)，與細胞的增生及變性(transform)有關。1991 年首篇報告指出，c-myc 會導致細胞 apoptosis(25). 促癌基因 c-myc 與抑癌基因 p53 一樣，皆與細胞的增生，分化及細胞的凋謝死亡有關(26,27)。c-Myc 的表現在一般的細胞呈現了兩極化的現象，它可以同時促進細胞增生變性，又可以導致細胞的凋亡。其中的機制關係到其下游的目標基因(target gene)的調控路徑不同，誘使細胞走向不同的命運，除此之外，一些其它的基因蛋白對 c-Myc 的調控也會導致細胞有不同的反應。報告指出，活化 c-Myc 會造成 p53 蛋白的累積，並且會促進 p53 所調控之 apoptosis(28)。而 Bcl-2 則會阻止 c-Myc 過度表現的細胞因缺乏血清所導致之 apoptosis(29)。因此推測，wild p53 及 c-Myc 的喪失與癌細胞的發展有正相關。

*Protein Kinase C

Protein kinase C (PKC)，是一種 serine-threonine kinase，被認為是調節細胞功能的重要因子。PKC 一直以來都被視為是一種 histone protein kinase，必須有 phospholipid 及 calcium 的參與才能活化。除此之外，它還需要 diacylglycerol (DAG)。PKC 的訊息傳遞路徑，影響非常廣泛，其中包括了分泌系統，cytoskeleton 的功能，細胞與細

胞之間的接觸，基因表現及細胞的生存。

在一般的情形下，PKC 是不活化態 (inactive)，位於細胞質中，當其受到活化時，會使得 PKC 重新分佈且結合到細胞內膜 (intracellular membrane) 上。這個過程稱之為轉位 translocation。

PKC 可以使下游一些不同的受質磷酸化，其中包括了一些與訊息傳遞有關的蛋白(ex:Raf-1)及一些可以調節 DNA 合成的蛋白等。PKC 也可以調控 cell cycle 及 apoptosis，有一些報告指出，PKC α 與細胞週期生長停滯在 G1/S phase 有關 (30)。利用 PKC 的促進劑(TPA) 及 PKC 抑制劑(staurosporine)研究發現，TPA 會導致 thymocytes 的細胞凋謝死亡(31)。在 Promyeloid U937 細胞中，PKC β 可以增加一些 apoptotic bodies 的產生(32)。相對的，在缺乏 PKC β 的 HL60 PET 細胞中，TPA 無法導致細胞的凋謝死亡。TBT 在引起 trout hepatocyte 凋謝死亡的過程中，會造成 PKC γ 及 PKC δ 的轉位活化 (33)。雖然有許多的報告指出 PKC 與細胞的凋謝死亡有關，但其下游的路徑及其機制尚不清楚，仍有待進一步的研究。

研究動機

由最近行政院衛生署八十五年的台灣地區國人十大死亡原因調查，癌症仍為十大死因之首。這顯示了癌症的可怕，因此如何預防及延緩癌症的發生實為刻不容緩的事。癌症的形成是透過許多複雜且多重的過程，其中形成的原因只有少數被了解，而治療的效果更是有限。且目前的治療不論是化學治療或是投予抗癌藥物，皆會對人體造成極大的傷害。目前許多研究趨向以天然藥物來達到抑制癌細胞的增長及惡化，因此本實驗室致力於開發天然物中所含的抗癌成分，希望可以由攝取食品來達到預防癌症的發生。本篇計劃以中國藥材中常見的成分山梔子的衍生物(AC)₅GP，來探討其對人類癌細胞的影響及其可能造成的死亡機制。

山梔子或稱梔子(*Gardenia Fructus*)是茜草科山梔(*Gardenia jasminoides* Ellis)的果實，為中藥的一種，用於治療各種發炎性及肝臟的疾病。但此藥的藥理機制尚不清楚，而本實驗室之前的研究發現它有抑制腫瘤生成的效用。

戊乙醯去輕梔子甘的結構式為(Fig. 1.)，是由山梔子萃取物分離得到 Geniposide(一種 iridoid glycoside)後，再由以醯化作用而得。本實驗室先前曾報導過(AC)₅GP 能抑制培養中及大白鼠身上的 C-6 神經膠瘤細胞(9)，且(AC)₅GP 也能抑制大白鼠經 aflatoxin B₁ 所導致的基因毒性(8)。

目前世界上許多國家及研究單位皆發現，癌細胞與正常細胞最大的差別，在於癌細胞無法進行一般細胞所執行的凋謝死亡(apoptosis)，因此生長無法控制且易產生轉移。然而凋謝死亡的詳細機制尚不是很清楚，目前已知是經由一些特殊的基因活化及一些蛋白質的調控所致。本實驗室之前研究確定，(AC)₅GP 會抑制細胞培養及大白鼠身上惡性細胞的生長，但其確切的機制仍不清楚。本研

究設計利用癌細胞株的細胞模式來做 $(AC)_5GP$ 促進癌細胞凋謝死亡
及其分子機制之探討。

材料與方法

壹、材料

一、藥品試劑

1. 購自美國 Sigma 化學公司

Phenylmethylsulfonyl , Sodium citrate, 2-mercaptoethanol, Sodium acetate, Formaldehyde, Fomamide, Ethidium Bromide, Bromophenol blue, Xylene cyanol, Glycerol, Ficoll (Type 400 pharmacta), Sucrose, Triton X-100, Leupeptin, Histon H1 (Type III -S), N, N, N, N'-tetramethyl ethylenediamide (EGTA), 12-0-tetradoconylphorbol-13-acetate (TPA), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Rnase A (Ribonuclease A), Tris base, ethylenediamine -tetraacetic acid (EDTA)

2. 購自德國 GIBCO 公司

Fetal calf serum, penicillin-streptomycine-meomycine (PSN), Non-essential amino acid , Sodium pyruvate , DMEM, L-glutamin, Trypsin-EDTA,

3. 購自美國 Amersham 公司

paraflim, [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP,

4. 購自德國 BIO-RAD 公司

Protein assay dye reagent, Acrylamide, Bis-acrylamide, Ammonium persulfate, N, N, N, N-tetramethyl ethylenediamide (TEMED), Glycine, Sodium dodecyl sulfate (SDS), N-C paper, Tris-HCl,

5. 購自 Transduction laboratories

PKC Sample Kit, MEK, Raf, ERK1, ERK2, Jun mouse monoclonal antibody

6. 購自 Senta Cruz

Bcl-2, Bax, 及 c-Fos Rabbit polyclonal antibody ;c-Myc, p21^{WAF1} 及 RB

mouse monoclonal antibody

7. 購自 Oncogene

p53 mouse monoclonal antibody; Bcl-2 及 Bax Rabbit polyclonal antibody.

二、常用儀器

天秤: Mettler AE 240

微量天秤: Mettler Toledo AB104

水平式電泳槽: BIO-RAD DNA sub Cells

迷你直立式電泳槽: BIO-RAD Protein II xi

電泳轉印槽: BIO-RAD

電源供應器: BIO RAD computer power supply Model 3000 Xi

加熱攪拌器: CORNING Stirrer/Hot platte

微量高速離心機: Eppendorf centrifuge 5415C

迷你離心機: NATIONAL LABNET CO, C-1200

高速離心機: Sigma 2K15

超高速離心機: HITACHI, himac CP 85 β

分光光度計: HITACHI, V-3210 Spectrophotometer

pH meter: JENCO microcomputer moedl 6200

無菌操作台: HIGH TEN SCIENTIFIC CORPORATION, Laminar
Flow

細胞培養箱: NAPCO Model 6100

幫浦: Micro tube pump MP-3

烘箱: MEMMERT

超音波震盪器: BRANSON 8200

水浴槽: YIHDERN shaker bath BT 150

水平式搖晃器: Orbital shaker OS701

3D 電泳震盪器: SUN CHINO CO. Rocher-3D gyratory model-SH306

組織均質機: EYELA MAZELAX

倒立式顯微鏡: NIKON Diaphot 300

高壓殺菌釜: TOMIN TM 322

感光夾: Okamoto 8X102

X 光感光底片: KODAK X-OMAT

-70°C 冰箱: SANYO Ultra 6100

數位影像分析儀: Alphar Imager 2000

貳、方法

一、細胞培養

C-6 腦神經膠瘤細胞是利用 N-nitrosomethylurea 來誘發大白鼠產生大腦腫瘤所得(34)。將此細胞株培養在添加 10% fetal bovine serum 及 1% PSN 的 minimal essential medium 中,再放入 37°C 恆溫,含 5% CO₂ 的培養箱中培養。每週更換二~三次培養基。

待細胞長滿,將培養基吸乾,先以 PBS 清洗細胞表層兩次後,加入 1 ml 1x Trypsin-EDTA,把細胞從培養瓶打下,用 1000 rpm 離心,再將其平分到不同的培養瓶中繼續培養。

二、藥的配製

(AC)₅GP 的化學結構如 Fig 1.所示,根據本實驗室之前研究方法,從 Gardenia fructus 萃取所得 geniposide 後,再乙醯化使其接上五個乙醯基。所得之 (AC)₅GP 溶於 DMSO 配成保存液,避光置於 -20°C 備用。

三、細胞週期測定

將細胞於不同時間分別收集, PBS wash 後,加入 trypsin 打下後,再以 PBS wash 後離心, pallete 以 80% ethanol 將細胞固定,放置於 -20°C over night。之後再以 PBS wash、離心,加入 Rnase /PI (10 μg /ml propidium iodide、40 μg /ml Rnase)染色, 37°C 30 分鐘,放置於冰上以 flow cytometer (FACS)分析

四、蛋白質抽取

Cell 用 1X trypsin-EDTA 打下後,以 900 rpm 離心,10 分鐘去除上清液, PBS wash, 去除上清液,置 -80 °C 冰箱中。待要抽取蛋白質時,加入 400-600 μl RIPA buffer,同時加入 proteinase inhibitors,於 0 °C 充分震盪細胞 30 分鐘。再一次加入 PMSF 10 μl/ml 後,離心

10,000 g 4°C，10 分鐘，取上清液即是全部的 protein。

相關之溶液配製如下：

1. RIPA buffer (pH 7.5)

150 mM NaCl

1 % NP-40

0.5 % deoxycholic acid

0.1 % SDS

2. proteinase inhibitors

sodium orthovanadate 10 µl/ml stock: 100 mM

leupeptin 17 µl/ml stock: 10 mg/ml

PMSF 10 µl/ml (isopropanol) stock: 10 mg/ml

五、西方點墨法(Western blotting)

取約 30-40 ug 蛋白質與 5 x loading dye 以 4:1 比例混合，於 95 °C 加熱 10 分鐘，將 sample 放入 well 以上層膠 70V，下層膠 120V 跑電泳，之後再進行膠轉漬到一張 Nc paper 上。轉漬後的 membrane 以含 5% 脫脂奶粉的 PBS buffer blocking 30 分鐘，之後分別 hybridization 一級抗體及二及抗體，在加入 ECL 反應 1 分鐘後壓片，後沖片觀察。

相關溶液的配製：

1. SDS page

Acrylamide/Bis solution (100 ml)

Acrylamide: 29.2 g

Bis: 0.8 g

溶於 100 ml 的 distilled water 中，避光儲存於 4°C 冰箱

1.5 M Tris-HCL, pH 8.8 (100 ml)

Tris base : 18.15 g

溶於 pH 8.8, 100 ml distilled water, 4 °C 儲存

1.0 M Tris-HCl , pH 6.8 (100 ml)

Tris base : 12 g

溶於 pH 6.8 , 100 ml distilled water , 4 °C 儲存

2. 5X electrode buffer (1L)

Tris base: 15 g

Glycine: 72 g

SDS: 5 g

溶於 1 L distilled water , 4 °C 儲存

3. Transfer buffer (4L)

Tris : 12.4 g

Glycine : 57.6 g

Methanol : 800 ml

加入 distilled water 調成 4L , 4 °C 儲存

4. PBS (1L)

NaCl : 8 g

KCl : 0.2g

KH₂PO₄ : 2.59 g

加入 distilled water 調成 pH 7.4 1L , 4 °C 儲存

5. Washing buffer

0.1% Tween-20 in PBS

6. Blocking buffer

5% 脫脂奶於 washing buffer

六、DNA 片段之純化及膠體電泳分析

A. DNA 片段之純化

取 5×10^7 個細胞，置於微量離心管中，已 1200 rpm 離心 10 min。倒掉上清液，充分打散細胞並加入 500 μ l 細胞溶解緩衝液(20 mM Tris , 10 mM EDTA , 0.2 % Triton X-100 pH 7.4 , 4 °C 儲存備用)，上下輕搖數次後即置冰上作用 10 分鐘。溶解的細胞經高速離

心(12,000 rpm, 15 min) 後，收集含有 DNA 片段之上清液到新的離心管中，並加入 2.5 μ l proteinase K (20 μ g/ml)，於 50 $^{\circ}$ C 水浴作用至隔天。第二天，在加入 2.5 μ l Rnase A (20 μ g/ml)，再 37 $^{\circ}$ C 下作用至少 2 小時。加入飽和的 phenol (pH 8.0)，上下震盪數次，高速離心 (12,000 rpm， 15 分鐘)，將含 DNA 片段之水層與含蛋白質之 phenol 層確實分開。吸取水層上清液到新的微量離心管中，再以飽和的 phenol，重複萃取過程一次。最後改以 500 μ l chloroform/ isoamylalcohol (24:1) 萃取 DNA 片段。加入 500 μ l isopropanol (-20 $^{\circ}$ C 儲存備用) 及 1 μ l (20 mg/ml) glycogen，置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中至少 3 小時以沉澱 DNA。經高速離心(12,000 rpm， 15 分鐘)後，倒掉上清液，於室溫下自然風乾。加入 10 μ l TE 緩衝液 (10 mM Tris， 1 mM EDTA， pH 8.0， 4 $^{\circ}$ C 儲存備用)溶解 DNA 後，保存於 4 $^{\circ}$ C，將用於膠體電泳分析。

B.DNA 片段之膠體電泳分析

以 1X TBE buffer 配製 1% 電泳膠片，將之前所得之 DNA 片段樣品，加入 2 μ l 6x 膠體裝填緩衝液，混合均勻後加到電泳膠片中。另取 5 μ l 100bp DNA ladder marker 作為 DNA 分子大小對照標準。再以 100 V， 1x TBE buffer 進行電泳，約 30-60 分鐘後終止電泳。完成後取出電泳膠片，置於 ethidium bromide 中進行染色，而後轉放入 500 ml 水中脫色。最後，以 UV 光激發並拍照。

溶液的配置方法

1. 10X TBE buffer

Tris base	108 g
boric acid	55 g
0.5M EDTA (pH 8.0)	40 ml
ddH ₂ O	960 ml

2. 6X loading dye

bromophenol blue	0.25%
------------------	-------

xylene cyanole FF	0.25%
glycerol	30%
H ₂ O	69.5%

七、DNA 片段的 ELISA

利用免疫分析法的 KIT，將 C-6 神經膠瘤細胞與 10 $\mu\text{mol} / \text{l}$ 的 Brdu 在 37⁰C 培養過夜。經標定之後，接著將細胞以 250 x g 下離心 10 分鐘，再懸浮於培養液。將細胞濃度調整到 1 x 10⁵ cells / ml，然後取 10 $\mu\text{l} / \text{well}$ 加到 microtiter plate，再於每個 well 分別加入 (AC)₅GP 溶液，最後每個 well 的體積為 200 μl 。經 37⁰C 培養 6 小時後，以 250 x g 離心 10 分鐘，再將每個 well 吸掉上清液 100 μl ，用 450 nm 波長測定。

八、PKC 之萃取

將細胞加入 1 ml homogenization buffer A 後刮下，放入研磨器中研磨約 30 次，將萃取液以倒入超高速離心管中，經超高速離心 (40,000 rpm, 4⁰C, 1 小時) 之後，得上清液即為 PKC 的細胞質部份，而沉澱物在加入 0.5 ml homogenization buffer B，4⁰C 下每隔 10 分鐘下震盪一次，使 Triton-X 100 能充分作用；1 小時之後再次以超高速離心 (40,000 rpm, 4⁰C, 1 小時)，離心所得之上清液即為 PKC 的微粒部份 (含細胞膜及細胞核之部份) (35)。經萃取所得之 PKC sample 分裝儲存在 -70⁰C 冰箱。

九、PKC 之純化

利用 DEAE-cellulose chromatography 來純化 (36)。方法是先製備 cellulose column，以 1 g 之 DEAE-cellulose 於 20 mM Tris-HCL，pH 7.5，通入塞以玻璃棉之玻璃管柱中，再以 0.75 ml Elution buffer (附錄一) 沖洗三次，然後通入樣本，以 0.75 ml Elution buffer 再沖洗四次和 0.25 ml 含 120 mM KCl 之 Elution buffer 沖洗一次，最後通入 0.5

ml 含有 120 mM KCl 之 Elution buffer 並收集。

溶液的配置:

1. Homogenized buffer A (pH 7.4)

	分子量	Stock 濃度	10 ml	40 ml
20 mM Tris	121.1	200.0 mM	1.00 ml	4.00 ml
0.03 mM Na ₃ VO ₄	183.9	30.0 mM	0.01 ml	0.04 ml
2 mM MgCl ₂ .6H ₂ O	203.30	100.0 mM	0.20 ml	0.80 ml
2 mM EDTA	372.24	100.0 mM	0.20 ml	0.80 ml
0.5 mM EGTA	380.4	100.0 mM	0.05 ml	0.20 ml
2 mM PMSF	174.2	200.0 mM	0.10 ml	0.40 ml
1 mM(DTT)		500.0 mM	0.02 ml	0.08 ml
250 mM Sucrose	342.3		0.860 g	3.423 g
10 ug/ml Leupetin		1.0 mg/ml	0.10 ml	0.40 ml

2. Homogenized buffer B (pH 7.5)

	分子量	Stock 濃度	10 ml	24 ml
20 mM Tris	121.1	200.0 mM	1.00 ml	2.40 ml
0.03 mM Na ₃ VO ₄	183.9	30.0 mM	0.01 ml	0.024 ml
5 mM MgCl ₂ .6H ₂ O	203.30	100.0 mM	0.50 ml	1.20 ml
2 mM EDTA	372.24	100.0 mM	0.20 ml	0.48 ml
0.5 mM EGTA	380.4	100.0 mM	0.05 ml	0.12 ml
2 mM PMSF	174.2	200.0 mM	0.10 ml	0.24 ml
1 mM (DTT)		500.0 mM	0.02 ml	0.048 ml
5 mM NaF	41.99	100.0 mM	0.50 ml	1.20 ml
10 ug/ml Leupetin		1.0 mg/ml	0.10 ml	0.24 ml
0.1 % Triton X-100			10.00 ul	24.00 ul

十、PKC 活性之測定

PKC 之活性測定係採用放射磷標記支腺核甘三磷酸 ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) 作為磷酸根之供給者，而以組織蛋白 (histone type II-S) 作為磷酸根之供給者，藉測量 PKC 將放射磷轉接至組織蛋白之多寡，來定量 PKC 之活性。整個反應之過程如下：再 4°C 下將 $100\ \mu\text{l}$ 反應溶液(附錄一)與 $50\ \mu\text{l}$ 之待測樣本於試管混合，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 分鐘後，先加入 $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA $50\ \mu\text{l}$ ，次加入 $0.5\ \text{ml}$ 冰冷的 40% trichloroacetic acid (TCA) 溶液以終止反應，在加入 $2\ \text{ml}$ 冰冷之 1% TCA 溶液，使 phosphorylated histone 析出，最後利用離心方式將析出的蛋白沉澱下來，小心移除上清液，保留沉澱部份。再加入 $2\ \text{ml}$ 冰冷之 1% TCA 溶液，經離心取沉澱部份加入閃爍液，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，即為 PKC 真正活性，以 $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg protein}$ 表示。

十一、北方點墨法

A. DNA 探針的備製

c-jun mRNA 的 DNA 探針是從 pHJ19 質體經限制酵素 PstI 及 EcoRI 切取的約 $1.1\ \text{kb}$ 的片段。此段 DNA 乃相對於 c-jun 蛋白的 DNA binding region(37,38)。c-fos mRNA 的探針則是由 pfos-1 質體以 PstI 切取的 DNA 片段(39)。GAPDH mRNA 的 DNA 探針是由 pIB130 質體經 PstI 切下的 $1.25\ \text{kb}$ 片段，作為此實驗的 internal control (40)。

利用英國幅矇公司出品的 QIAGEN plasmid DNA 抽取系統。三種質體 DNA 經上述限制酵素分別切割後，以 agarose gel 檢測反應是否完全，在以 DEAE cellulose membrane 回收 DNA 片段(41)。

探針的製備是利用 Amersham 公司出品的 Multiprime DNA labeling system 製造。經 ^{32}P 標幟的 DNA 探針的分離是利用 gel

filtration 的原理(42)。

相關溶液配製如下：

1. 10 X RNA running buffer

Guanidinium thiocyanate 4 M

Sodium Citrate (pH 7.0) 25 mM

Sarcosyl 0.5 %

2-Mercaptoethanol 0.1 M

將 250 g Guanidinium thiocyanat 溶於 293 ml 的 SEPC 水加入 1M Sodium citrate 13.2 ml 在加入 10 % Sarcosyl 26.4 ml, 65 °C 溶解後於室溫儲存 3 個月，使用時再加 2-mercaptoethanol。

2. 20 X SSC buffer/每公升

NaCl 173.5 g

Sodium citrate 88.2 g

3. 50X Denhart's reagent (50X) /每 100 ml

Ficoll 400 5 g

Polyvinylpyrrolidone 5 g

BSA 5 g

以上成分均勻溶解後以 0.45 μm 的 filter 過濾一次，在以 0.22 μm 的過濾膜過濾一次，分成小包裝，存於 -70 °C。

B. RNA 電泳

以 1.2 % 的 agarose gel 進行 RNA 電泳，跑完的 gel 浸泡 50 mM NaOH/10 mM NaCl 中 30 分鐘，在放入 100 mM Tris-HCl 中 30 分鐘，以除去 RNA 上的 formaldehyde。將 gel 轉漬到 NC paper 後，於 80°C 烘烤 2 小時後存於乾燥處。

C. 雜交反應

將烘烤好的 NC paper 以 2X SSC buffer 浸濕，捲入 hybridization tube 中，加入 prehybridization solution (6X SSC, 10X Denhart's reagent,

0.1% SDS , 50 % formamide, 50 μg / ml denatured salmon sperm DNA), 經 42 °C 反應 4-24 小時, 取適量探針於 95 °C 加熱 5 分鐘, 置於冰上 5 分鐘, 在加入 prehybridization solution 中, 繼續於 42 °C 下反應 16-24 小時。將 hybridization solution 倒出, 依序加入 2X SSC / 0.1% SDS ; 0.5X SSC / 0.1 % SDS 及 0.1X SSC / 0.1% SDS 各於 42 °C 漂洗 20 分鐘, 直到游離的同位素洗乾淨為止。在將雜交成功的 NC paper 包好壓片。

結果

(AC)₅GP 對 C-6 細胞存活率的影響

將 C-6 神經膠瘤細胞，處理 (AC)₅GP 24 小時之後，利用 MTT 分析細胞的存活率，來觀察 (AC)₅GP 對 C-6 神經膠瘤細胞的影響 (Fig. 2.)。發現，(AC)₅GP 對此細胞的毒性有 dose-dependent effect。再給予 0.45 mM (AC)₅GP 24 小時之後，細胞的存活率只剩 52 %。

(AC)₅GP 會導致 C-6 細胞 DNA 的斷裂

以 0.15-0.6 mM 的 (AC)₅GP 處理 C-6 cell 24 小時之後，可以看見 DNA fragmentation 的現象 (Fig. 3.)。將 C-6 細胞處理 0.15 至 0.6 mM 的 (AC)₅GP，當 (AC)₅GP 大於 0.3 mM 時，會發現 DNA 有約 180 bp 或整倍數大小的階梯狀片段產生。利用 ELISA 方法也發現，隨著處理 (AC)₅GP 的溶度增加，DNA 片段有明顯的增加，從 7.5 % 增加到約 27.5 % 左右，且其關係呈現 dose-dependent 結果 (Fig. 4.)。因此判斷 (AC)₅GP 可以導致 C-6 細胞的凋謝死亡。

(AC)₅GP 導致 C-6 細胞的 pro-apoptotic body 的產生

為了進一步確定 (AC)₅GP 確實會造成 C-6 細胞的凋謝死亡。於是利用流式細胞儀來觀察細胞內 pro-apoptotic body 的量 (Fig. 5.)，結果發現在處理 (AC)₅GP 24 小時之後，發現細胞有明顯的 pro-apoptotic body 的產生。

(AC)₅GP 會導致細胞的生長停滯

利用流式細胞儀來觀察細胞內 DNA 的含量比，細胞處理 (AC)₅GP (0.3 mM) 0-48 小時之後，發現細胞 G0/G1 期的 DNA 含量由 58.95 % 增加到 80.14 %，增加了約 35%。因此可知，(AC)₅GP 會造成 C-6 細胞的 G0/G1 arrest (Fig. 6.)。

(AC)₅GP 會造成 C-6 細胞內一些蛋白的磷酸化

C-6 細胞處理(AC)₅GP 0-24 小時後，取所有的蛋白來觀察其中 tyrosine 磷酸化的情形。結果發現，有許多的蛋白有磷酸化的現象。其中在分子量約 53 kDa 的地方 (標示處)，似乎有磷酸化的變化。推測其可能為 p53 蛋白 (Fig. 7.)。

(AC)₅GP 會促進 C-6 細胞內 c-Myc 蛋白及 p53 蛋白的表現

為了探究 (AC)₅GP 如何造成 C-6 細胞的凋謝死亡，於是利用西方點墨法來觀察一些與 apoptosis 相關蛋白的表現。之前一些相關的報導指出，c-Myc 蛋白的表現，會導致細胞的 apoptosis，且這個過程需要 wild p53 的參與(43)。因此首先觀察 c-Myc 蛋白的表現 (Figs. 8 and 9)。發現處理 0.45 mM (AC)₅GP 1-5 小時之後，c-Myc 蛋白表現增加約 3 倍左右，且其關係呈現 dose-dependent 的現象。同樣的，當處理 (AC)₅GP 4 小時之後，p53 蛋白有明顯的增加約 2.5 倍左右，且呈現了 dose-dependent 的現象(Figs. 10. and 11.)

(AC)₅GP 對 C-6 細胞內 Bcl-2 蛋白及 Bax 蛋白的影響

許多研究報告指出，Bcl-2 家族蛋白會調控細胞到凋謝死亡，因此我們找出了兩個 Bcl-2 家族的蛋白，分別是 Bcl-2 (anti-apoptosis) 及 Bax (pro-apoptosis) 來探討 Bcl-2 家族蛋白是否有參與(AC)₅GP 引起 C-6 細胞死亡機轉的路徑中。分別將細胞處理 0, 2, 4, 6, 8, 及 24 小時之後，取蛋白分別觀察 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表現。結果發現，隨著處理(AC)₅GP 的時間增加，Bcl-2 蛋白有明顯的減少，在處理 24 小時之後，Bcl-2 的表現量只剩約 20 % (Figs. 12. And 13.)。相反的 Bax 卻因受到(AC)₅GP 而增加，在處理 8 小時之後，蛋白量增加約 5 倍左右(Figs. 14. and 15.)。

(AC)₅GP 也會影響與細胞週期有關的蛋白

利用 C-6 細胞處理 0.3 mM (AC)₅GP 0 至 24 小時之後，抽取所

有的細胞蛋白質，來觀察(AC)₅GP對一些與 p53 導致 cell cycle 下游蛋白(p21 及 RB)的表現 (Figs.16. and 17.)。結果發現，p21 的確會受到的(AC)₅GP 影響表現增加，在處理後 6 小時有約 1.8 倍的增加。並且觀察 hyper-RB 的蛋白質，發現 hyper-RB 在處理(AC)₅GP 6- 8 小時後，蛋白表現量減少至 40%。因而證實了 p21 的表現增加會進而抑制 CDK 來抑制 RB 的磷酸化。

(AC)₅GP 會促進 Protein kinase C 的轉位活化

利用 C-6 細胞處理 (AC)₅GP 0.3 mM 0 至 24 小時之後，分別抽取細胞膜及細胞質的蛋白質,觀察 PKC 不同 isoform 的表現情形.發現 PKC- α β γ 皆有從細胞質轉位到細胞膜的情形發生(Figs. 18 - 20.)及 (Figs.21.-23.)

進一步將 C-6 細胞分別處理 (AC)₅GP 0 至 8 個小時之後，取細胞核、膜蛋白後，通 column 純化 PKC 蛋白之後，測定 PKC 蛋白的活性。結果發現，當細胞處理(AC)₅GP 6 小時之後，PKC 蛋白轉位活化的情形最明顯。由此可知在此細胞中 PKC 可受到(AC)₅GP 的轉位活化(Fig. 24.)

(AC)₅GP 對 Protein kinase C 下游 Raf·MEK·ERK1 及 ERK2 蛋白的表現的影響

進一步探討 PKC 下游蛋白的表現情形，同樣的時間點，取所有的蛋白來探討 Raf、MEK、ERK1/2 的表現量。發現 Raf 及 MEK 的表現並不會受到(AC)₅GP 的影響 (Figs.25. and 26.)，而下流的 MAP kinase ERK1/2 亦不受抑制 (Fig.27.)。

(AC)₅GP 對一些細胞的生長因子(c-Jun/c-Fos)及一些上游的酵素(JNK)的影響

一些 PKC 的促進劑(ex:TPA)通常會活化細胞訊息傳遞下游的生長因子(ex: c-Jun 及 c-Fos)，因此在此利用蛋白質來觀察(AC)₅GP 對

c-Jun 及 c-Fos 蛋白的影響。結果發現，(AC)₅GP 不會影響 c-Fos (Fig. 28.) 的表現，但是卻會抑制 c-Jun 的表現(Fig. 29.)，由結果可以看見 c-Jun 在處理(AC)₅GP 8 小時之後，c-Jun 的蛋白表現量減少至 20%。再進一步觀察 c-Jun 上游的蛋白 JNK，利用 C-6 細胞處理(AC)₅GP 0-8 小時之後，發現 JNK2 蛋白亦有明顯減少的情形 (Fig.30.)。

(AC)₅GP 無法抑制由 TPA 及血清促進的 c-Fos 及 c-Jun mRNA

本篇發現了(AC)₅GP 會抑制 c-Jun 蛋白的表現。因此進一步想要探討(AC)₅GP 與一些 c-Fos 及 c-Jun 的促進劑之間的相互關係為何? 因此利用了 TPA (100 ng/ml)及血清來當 c-Fos 及 c-Jun 的促進劑，來觀察(AC)₅GP 對 c-Fos 及 c-Jun mRNA 的影響。結果發現，(AC)₅GP 無法抑制由 TPA 及血清所促進之 c-Fos 及 c-Jun mRNA 的表現(Figs. 31 and 32.)。

TPA 及 H7 皆無法抑制(AC)₅GP 所造成的 cell arrest

為了想知道 PKC 在(AC)₅GP 的作用中是否扮演著重要的較色，在此分別給予 PKC 促進劑 (TPA)及抑制劑 (H7)來觀察其是否會影響 (AC)₅GP 對 C-6 細胞的作用。細胞組別分別為，正常組、(AC)₅GP 處理、TPA 處理及(AC)₅GP 與 TPA 處理 24 小時，另外有 H7 處理 4 小時及 TPA 處理 20 小時後再處理 H7 4 小時後，將細胞收下後去做 flow cytometry(Fig. 33.)。結果發現不論共同處理 TPA 或 H7，皆無法抑制(AC)₅GP 對 C6 細胞細胞週期抑制。

討論

(AC)₅GP 是從 *Gardenia fructus* 萃取物分離的 glycoside，在經乙醯化而得到的 (7)。(AC)₅GP 與 GP 在結構上的比較，由於 (AC)₅GP 比 GP 多了五個乙醯基，其在結構上比較穩定，且在備製及保存上比較容易，因此在藥物的開發上較具有價值。雖然 (AC)₅GP 的分子大且不易溶解於水溶液中，但其親脂性相對也較高，與其它化合物競爭時，將更容易靠近細胞膜而進入細胞。

再本實驗室之前的研究指出，(AC)₅GP 不論是在培養的或在大白鼠身上的 C6 細胞，在給予 (AC)₅GP 後，其生長都有明顯受到抑制(7,9)。也就是說，(AC)₅GP 具有抗腫瘤的活性，但是其中的機轉尚不清楚。本實驗進一步利用 C6 神經膠瘤細胞株，直接觀察 (AC)₅GP 抑制 C6 細胞生長的機轉。

Apoptosis 是一種細胞死亡的形式，apoptosis 包含有一些共同的特徵，如外型的變化、染色質的濃縮以及 DNA 的斷裂等等(11)。之前結果發現，當 C6 細胞處理 (AC)₅GP 之後，其細胞的外形有明顯的變化，並且看見 DNA 有邊緣化的現象出現。本篇結果顯示，(AC)₅GP 會使 C6 細胞產生 DNA fragmentation 的現象，並且利用 flow cytometer 也看見 cell cycle arrest 及 pro-apoptotic bodies 的產生，因此可知 (AC)₅GP 會造成 C6 細胞的 apoptosis。

p53 基因在某些抗癌試劑所誘導的 apoptosis 過程中扮演重要的角色，並且會導致細胞週期停滯在 G0/G1 期 (44)。在一般 apoptosis 發生的過程中 p53 蛋白量會增加而累積於核。在本篇發現，(AC)₅GP 導致 C6 細胞走向 apoptosis 的過程中，其細胞內的 wild type p53 蛋白會有明顯的堆積現象發生，而 c-Myc 的表現量也明顯增加。並且會造成 Bax 的堆積及 Bcl-2 的抑制。研究指出，在 c-Myc 導致纖維母細胞的 apoptosis 中，p53 與 c-Myc 的表現同時增加 (45)。而 p53 會抑制 IGF-1 接受體(receptor)的表現，因而阻止 c-Myc 導致細胞走向增生的路徑而改走 apoptosis (46)。初步認為，c-Myc 在本實

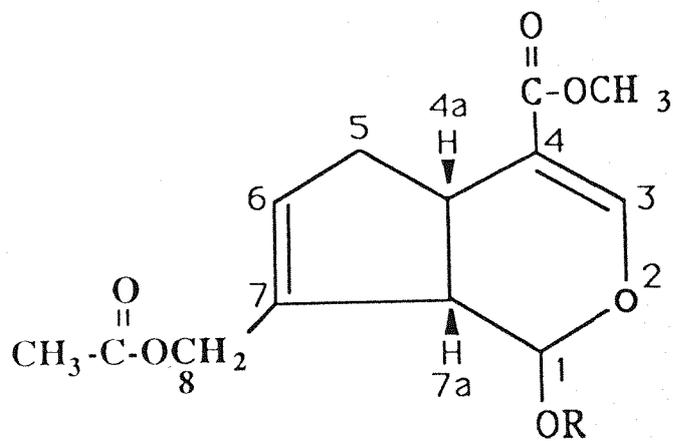
驗中的確參與了 p53 的蛋白所引起的 apoptosis。過度表現的 Bcl-2 會抑制 p53 所導致的 apoptosis (23,24)，而 p53 會促進 Bax 蛋白的合成，Bax 可以與 Bcl-2 產生拮抗作用來抑制 Bcl-2 的抗 apoptosis 作用。本篇中，(AC)₅GP 活化了 p53，導致 Bax 的合成相對增加，並同時抑制 Bcl-2 的表現，來達到雙重促進細胞 apoptosis 的效果。

P53 的另一個主要作用會導致細胞的生長停滯，以便進行 DNA 的修補，許多的報告都指出，p53 會導致細胞的生長週期停滯在 G0/G1 期。一些會與 p53 C 端結合的抗體，會阻止血清刺激 fibroblast 進入 S 期。p53 抑制細胞週期的作用，主要是利用蛋白本身具有轉路活化(transcriptional activator)的角色來達成。p53 會誘導下游基因 p21^{WAF1} 的活化(48)，p21 蛋白會更進一步去抑制 cyclin-kinase complexes，並阻止 RB 蛋白的磷酸化，來阻斷細胞週期的進行。本篇結果發現，(AC)₅GP 的確會造成 C6 細胞的 cell arrest 在 G0/G1 期，因此推斷，p53 可能在(AC)₅GP 所導致之 apoptosis 中扮演重要的角色。並利用蛋白的偵測，來探討 p21 及 RB 的表現量。發現 p21 蛋白的確會因受到 p53 的促進而增加，進而阻止 RB 蛋白的磷酸化。而導致細胞週期停留在 G0/G1 期。

PKC 在 C-6 腦神經膠瘤細胞中大量表現，且調控著 C-6 細胞的生長發育，其扮演著極為重要的角色。PKC 可以藉由活化及抑制一些特殊的酵素來調控細胞的生理功能。已知 PKC 也可以調控細胞的 apoptosis。報告指出，PKC 同時具有促進及抑制 apoptosis 的功能(47)，藉由活化或抑制下游一些酵素，來決定其調節的功能。PKC 可以使其下游的蛋白磷酸化，例如 Raf-1，及一些與細胞功能有關的蛋白。在本篇我們觀察了一般腦神經膠瘤細胞中主要表現的幾個 PKC 亞型 (PKC α 、PKC β 及 PKC γ)。發現這幾個 PKC 的亞型的蛋白質，都可以觀察到有程度不一的轉位活化的情形，並且由 PKC 的活性也看到轉位活化的現象。為了觀察 PKC 下游的受質為何？探討了 Raf-MEK-ERK 的這條路徑的蛋白影響。發現(AC)₅GP 對 PKC 的影響，似乎不是走 Raf 及其下游的蛋白路徑。

12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)是一種 PKC 的促進劑，它可以導致分離的胸腺細胞的 apoptosis (31)。而(AC)₅GP 也會活化 PKC，因此我們將(AC)₅GP 與 TPA 做了相同的聯想，而已知 TPA 會促進 c-Fos 及 c-Jun 的表現(49)。因此觀察 c-Fos 及 c-Jun 的蛋白表現，結果發現，(AC)₅GP 會抑制 c-Jun 的蛋白，但不影響 c-Fos 的蛋白量，結果與 TPA 相反。因此進一步分別同時處理 TPA 及(AC)₅GP 與血清及(AC)₅GP，發現(AC)₅GP 不會抑制 TPA 及血清所促進的 c-Fos 及 c-Jun mRNA 的表現。而利用流式細胞儀測定細胞週期的變化。TPA 及 H7 (PKC 的抑制劑)皆不會抑制 (AC)₅GP 造成 C-6 細胞週期的停滯作用。由此可以判定，PKC 的活化，在此細胞的 cell arrest 過程中，似乎並不重要。

因此初步斷定，(AC)₅GP 造成 C-6 神經膠瘤細胞的凋亡及細胞週期抑制作用，應該是經由 p53 及 c-Myc 的調控途徑。而 PKC 對於其細胞週期的調控沒有影響。而 (AC)₅GP 對於 C-6 細胞的作用，也不同於 TPA 的作用。至於，PKC 是否與 (AC)₅GP 所造成的 apoptosis 有關，以及是經由何種調控方式則不得而知，而有待進一步的探討。另外我們也發現 (AC)₅GP 會造成 c-Jun 及其上游的 c-Jun N-terminal Kinase 2 (JNK2)蛋白的抑制，推測 (AC)₅GP 可以藉由對 JNK2 及 c-Jun 的抑制，來達到抑制細胞增生的結果。



R= β -D-2, 3, 4, 6-tetra-acetyl-glucose

Fig. 1. The structure of penta-acetyl geniposide , (AC)₅GP

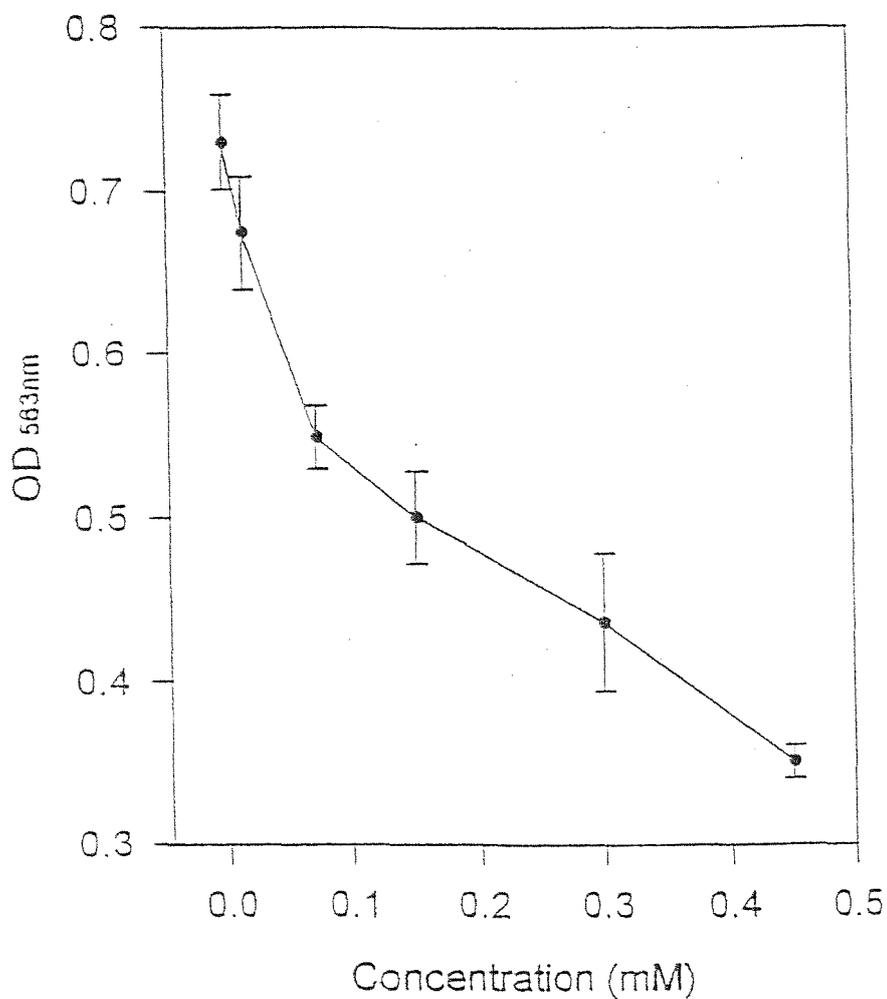


Fig. 2. Dose-response curve of C-6 glioma cells exposed to (AC)₅GP was determined by the MTT assay. The culture was exposed to indicated concentration of (AC)₅GP for 24 h, then the medium was removed and isopropanol was added to dissolve the formazan crystal. The viable cell number is directly proportional to the production of formazan.

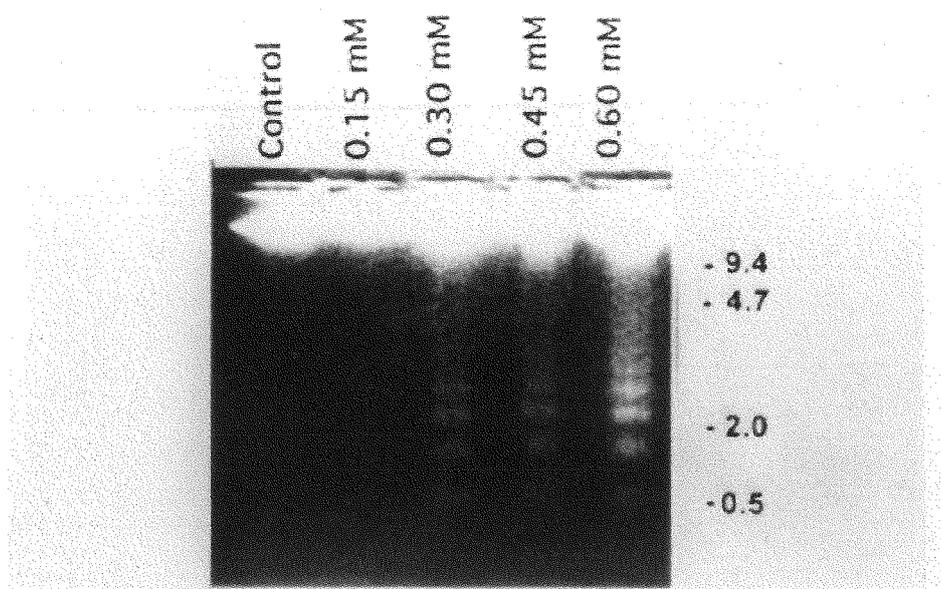


Fig. 3. Agarose gel electrophoretic analysis of the fragmented and intact DNA from (AC)₅GP-treated and control C-6 glioma cells. Cells were incubated for 24h in the presence of indicated concentration of (AC)₅GP

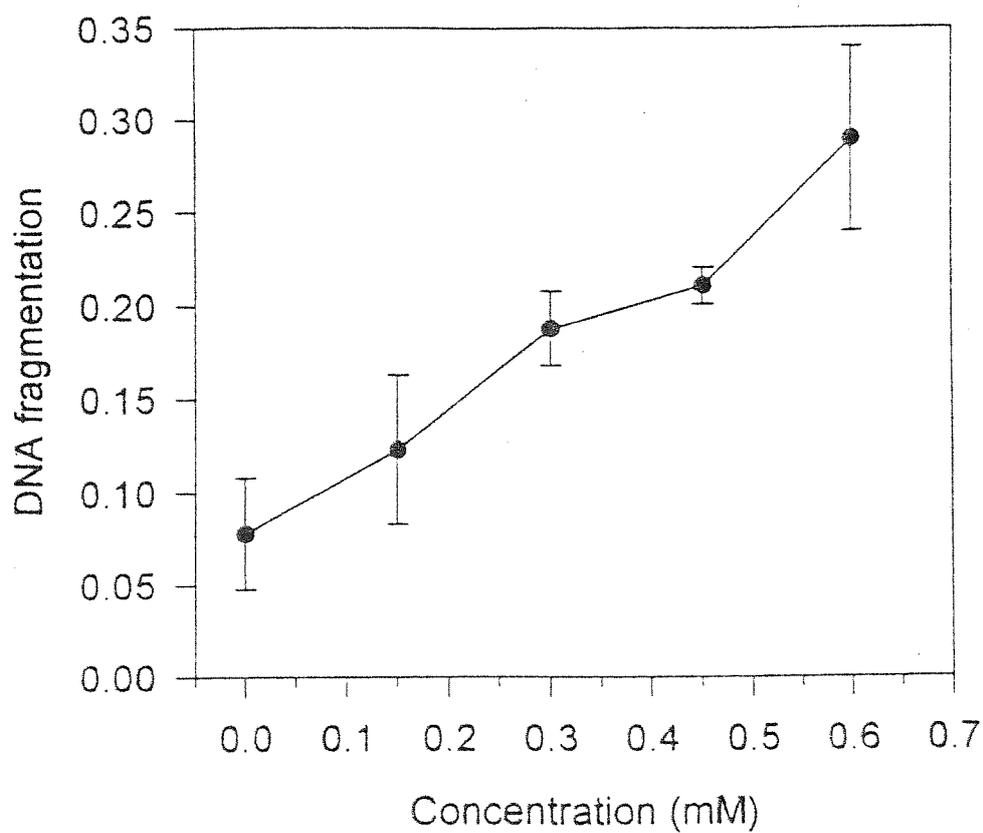


Fig. 4. Dose-response of (AC)₅GP-induced DNA fragmentation in C-6 glioma cells. Cells were incubated in the presence of indicated concentration of (AC)₅GP for 24 h. DNA fragmentation is directly proportional to absorbance at 450 nm.

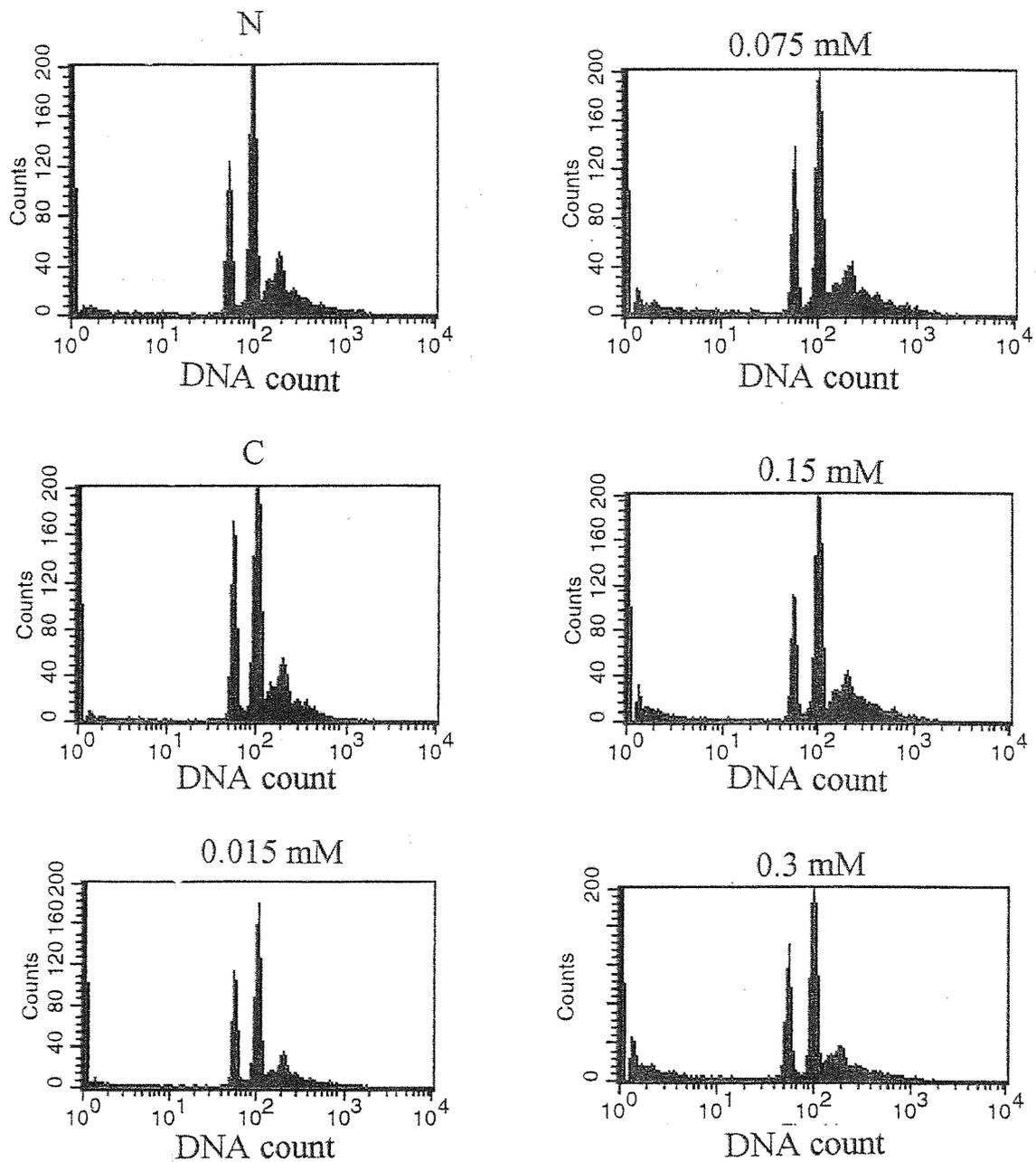
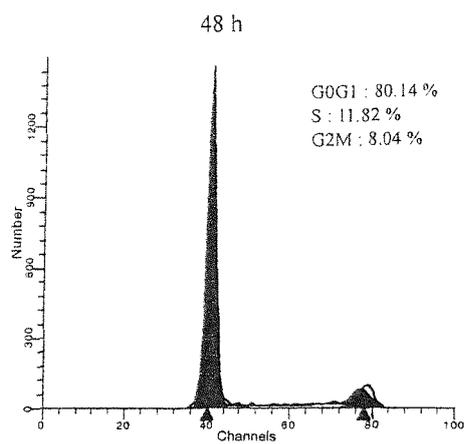
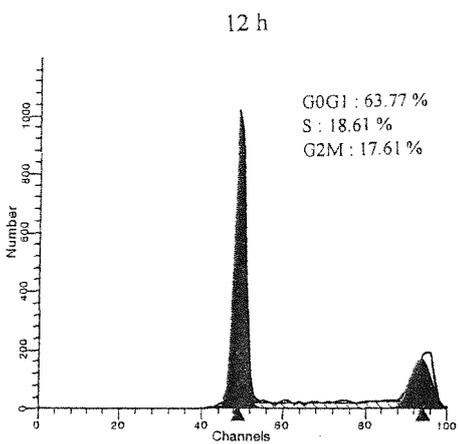
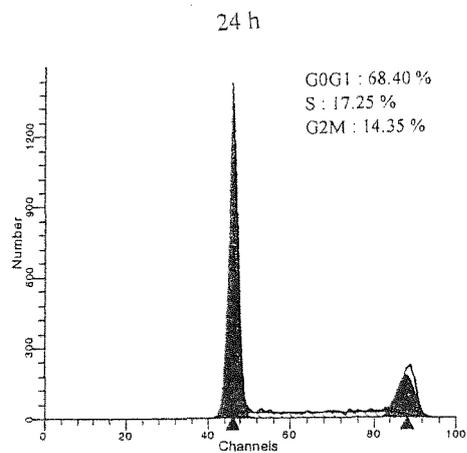
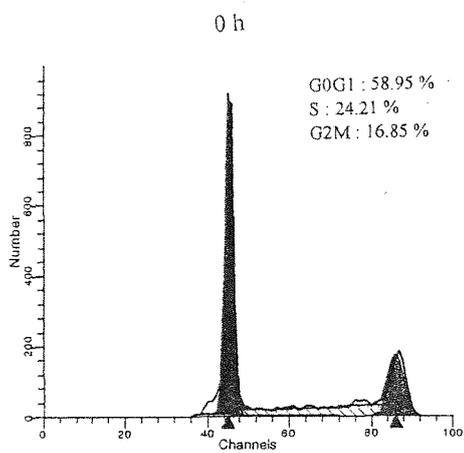


Fig. 5. Determination of pro-apoptotic bodies in control and $(AC)_5GP$ treated C6 cell by flow cytometry. Cells were incubated with $(AC)_5GP$ as indicated concentration of $(AC)_5GP$ for 24h.



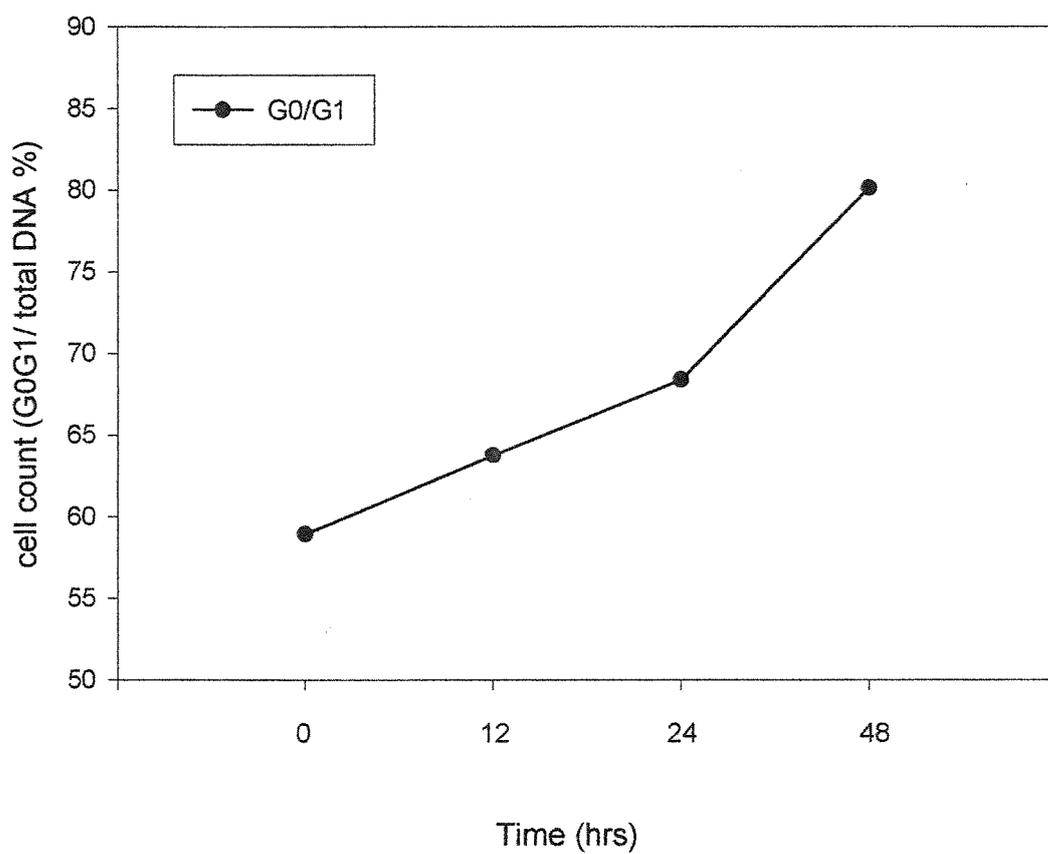
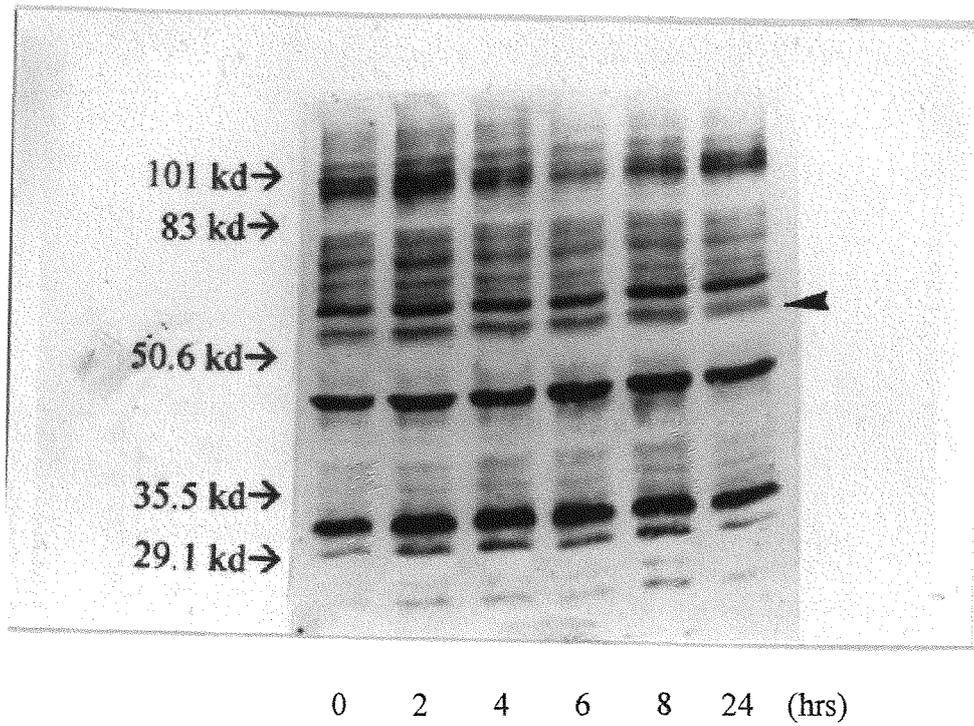


Fig. 6. Determination of cell cycle distribution in control and (AC)₅GP treated C6 cell by flow cytometry. Cells were incubated with (AC)₅GP (0.075mM) as indicated time.

A



B

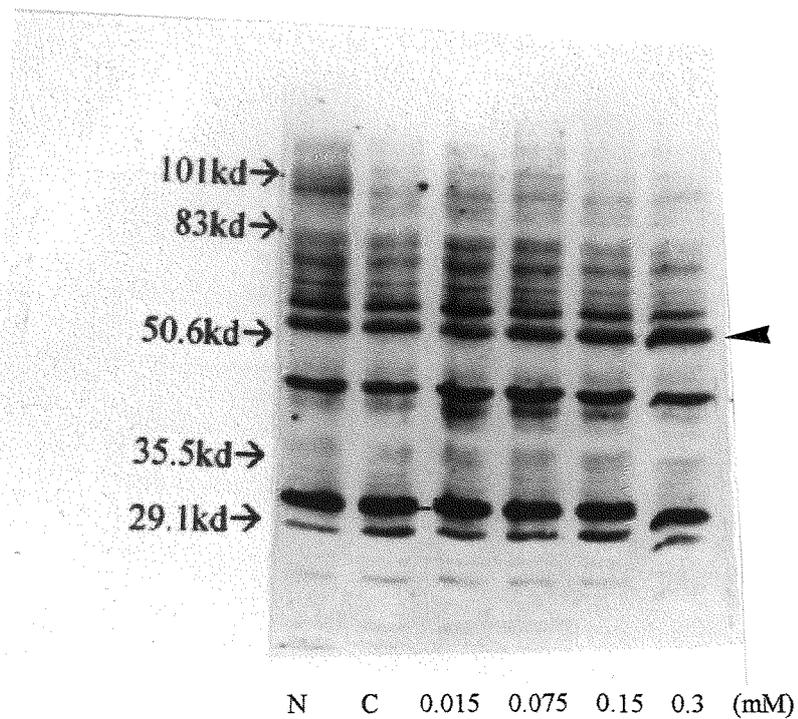


Fig.7. The effect of (AC)₅GP on tyrosine phosphorylated protein expression. Cultured cells were treated with (AC)₅GP 0.3 mM for indicated time (A).and cultured cells were treated with (AC)₅GP for 4 hrs as indicated concentration (B).Lysates were analyzed by immunoblotting.

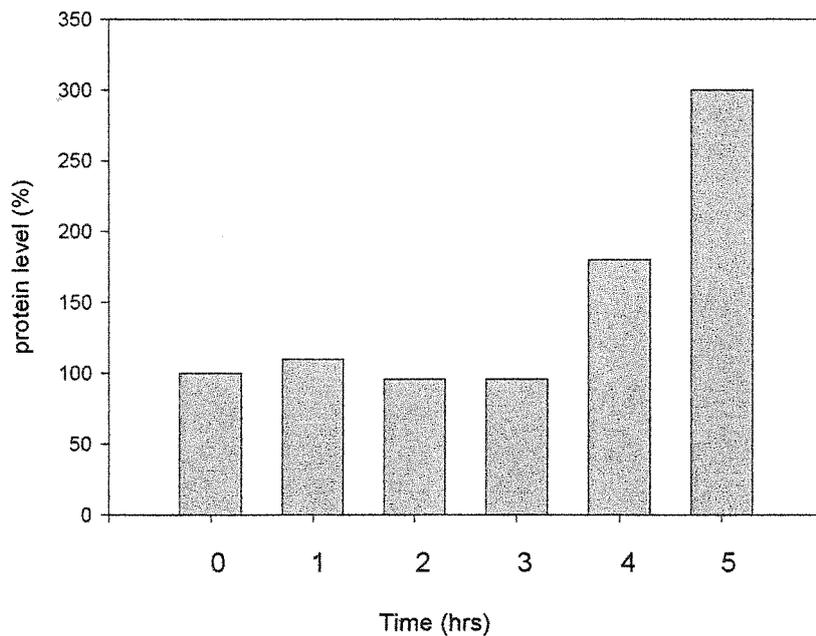
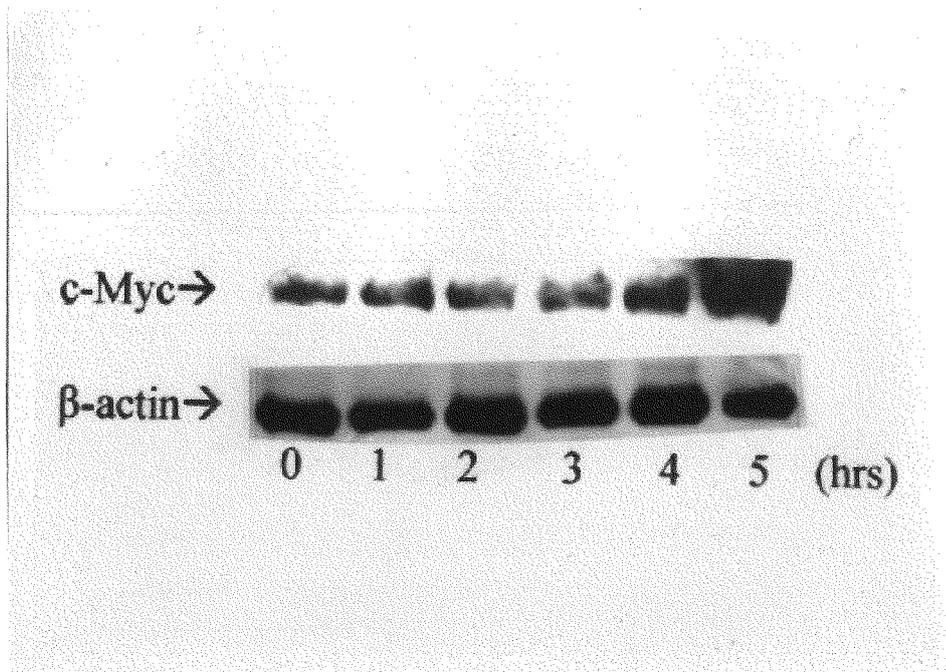


Fig. 8. Time course of $(AC)_5GP$ treatment on c-Myc protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with $(AC)_5GP$ 0.075 mM for indicated time. The c-Myc protein was analyzed by the immunoblotting.

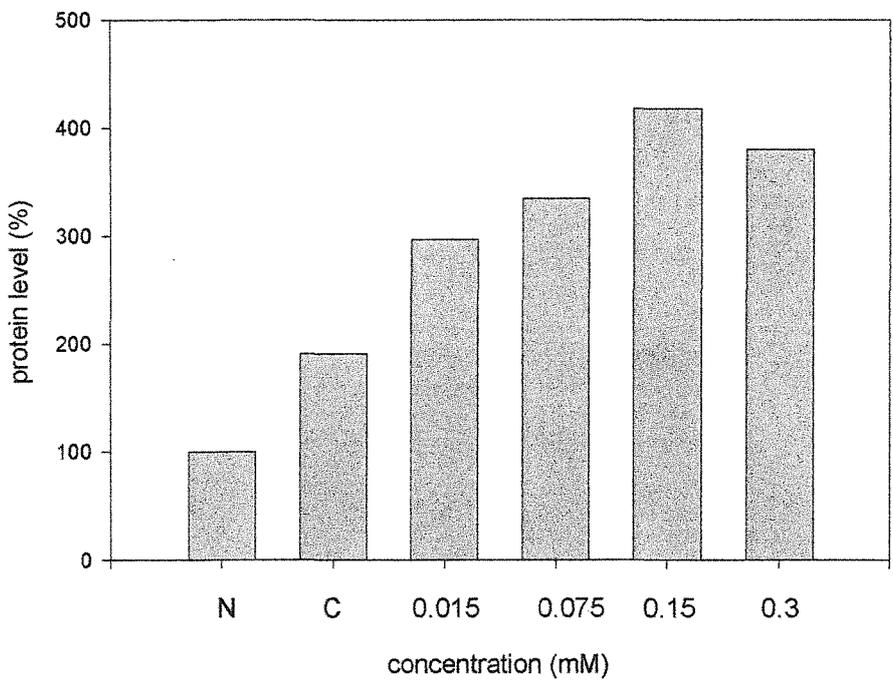
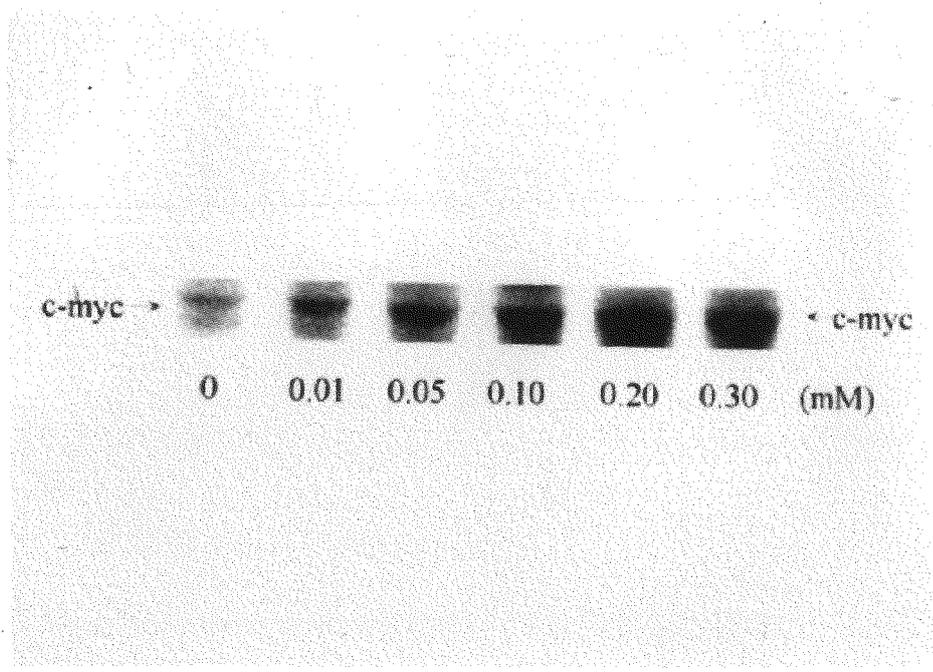


Fig. 9. Dose response of (AC)₅GP treatment on c-Myc protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅GP as indicated times for 4 hours. The c-Myc protein was analyzed by the immunoblotting.

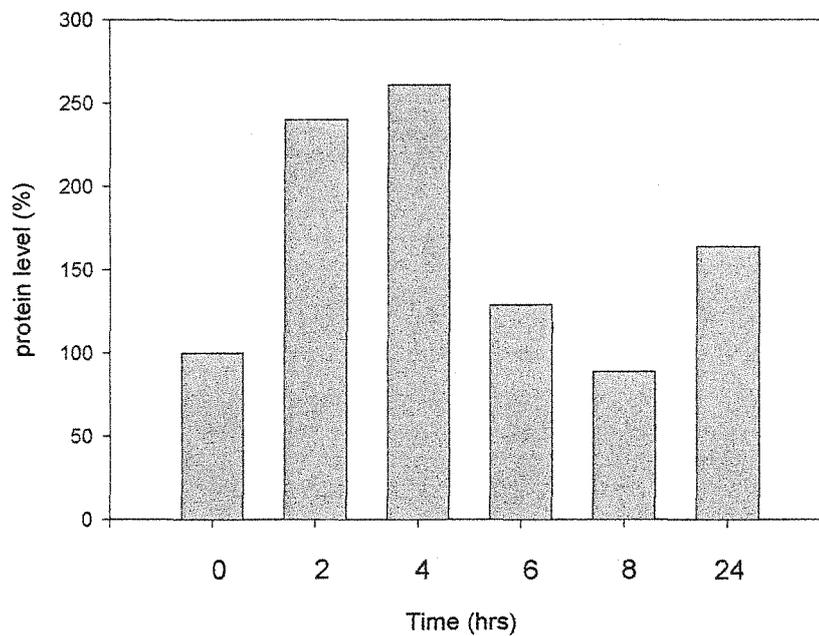
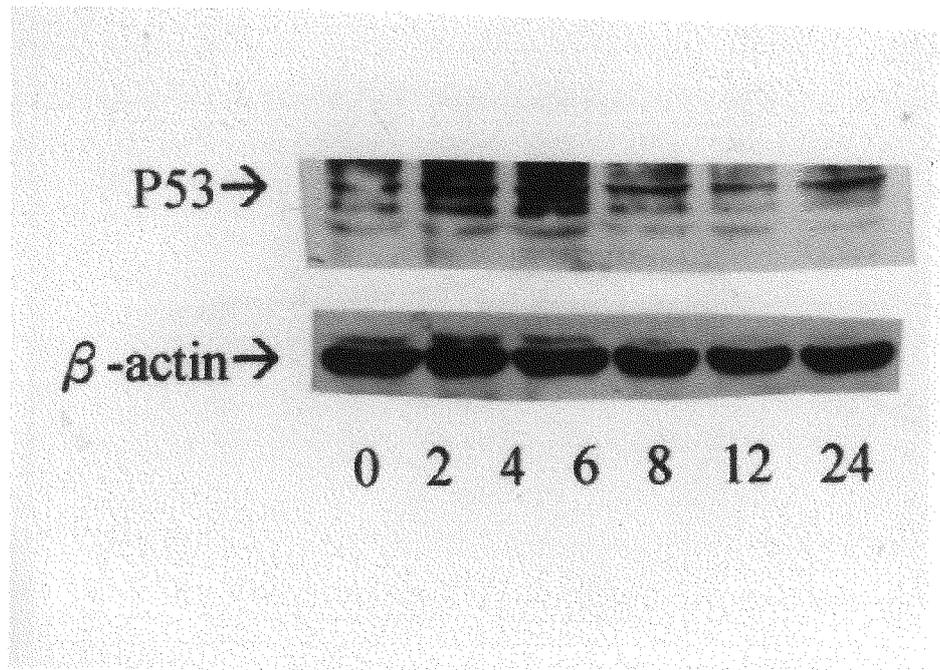


Fig. 10. Time course of (AC)₅GP treatment on p53 protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅GP 0.3 mM for indicated time. The p53 protein was analyzed by immunoblotting.

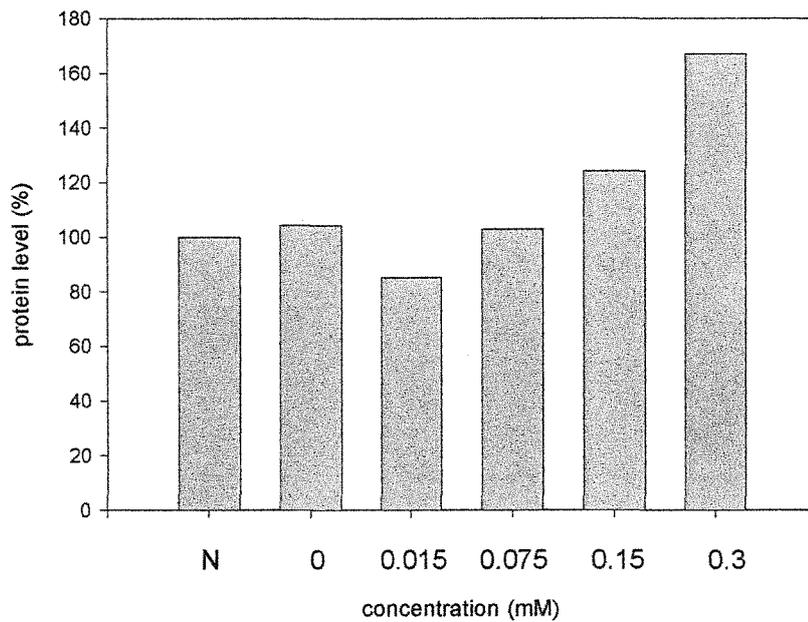
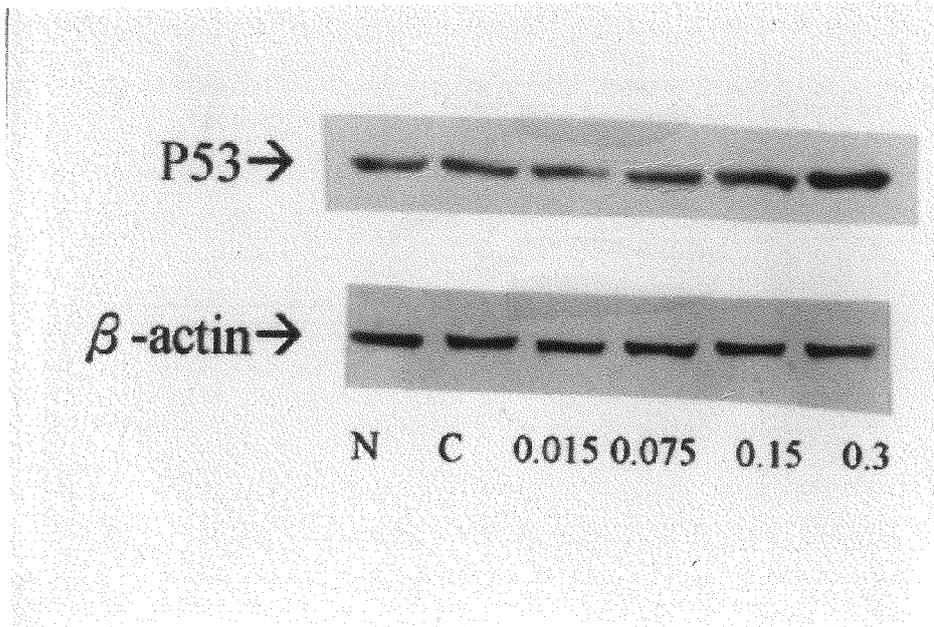


Fig. 11. Dose response of (AC)₅GP treatment on p53 protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅GP as indicated concentration for 4 hrs. The p53 protein was analyzed by the immunoblotting.

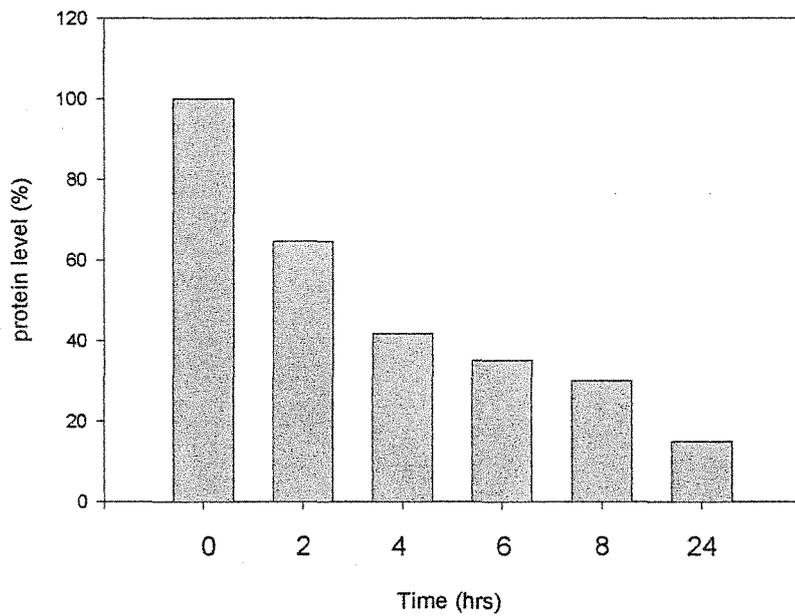
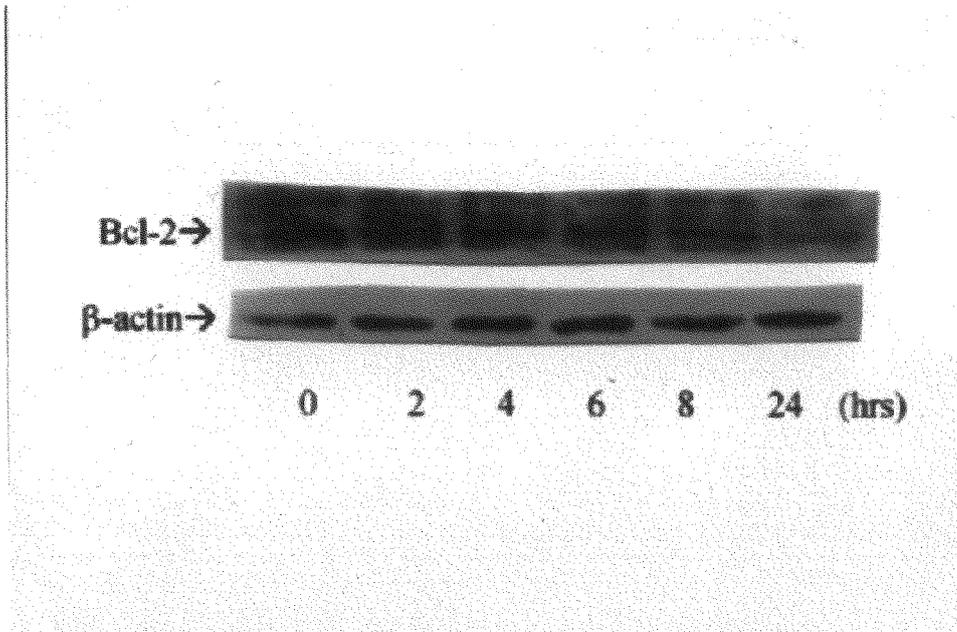


Fig. 12. Time course of (AC)₅GP treatment on Bcl-2 protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅GP 0.3 mM for indicated time. The Bcl-2 protein was analyzed by immunoblotting.

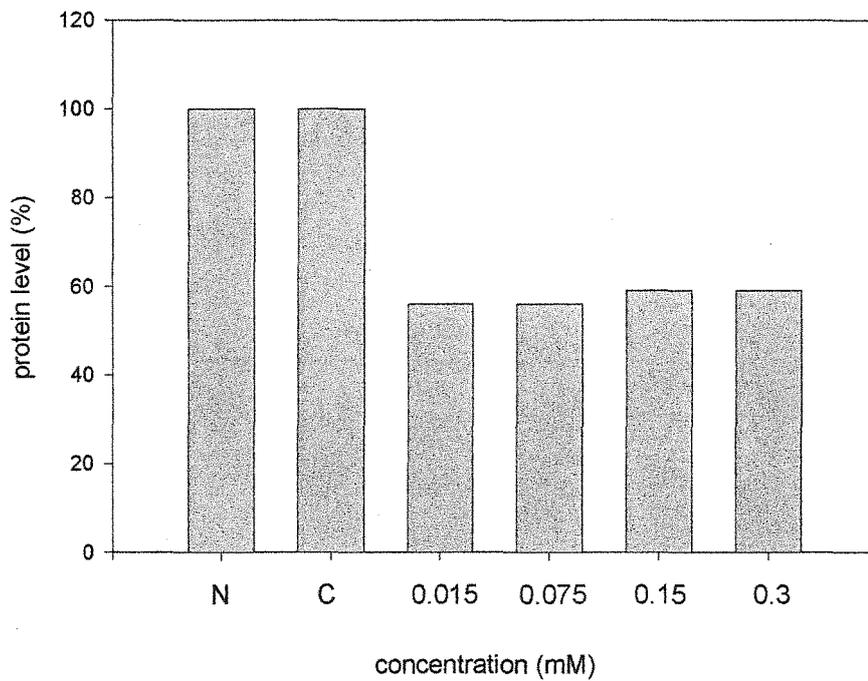
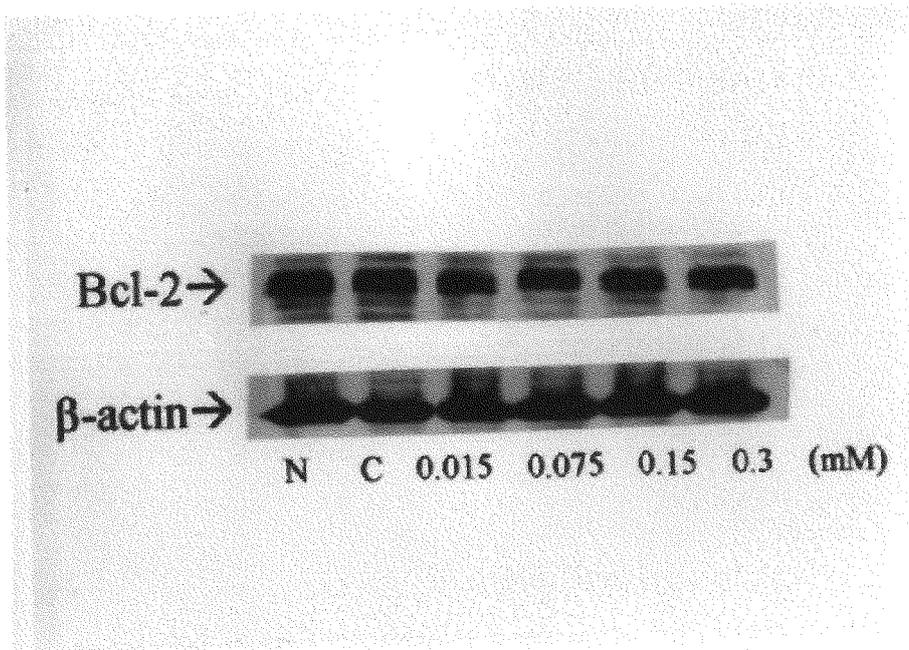


Fig.13. Dose response of (AC)₅GP treatment on Bcl-2 protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅GP as indicated concentration for 4 hrs. The Bcl-2 protein was analyzed by the immunoblotting.

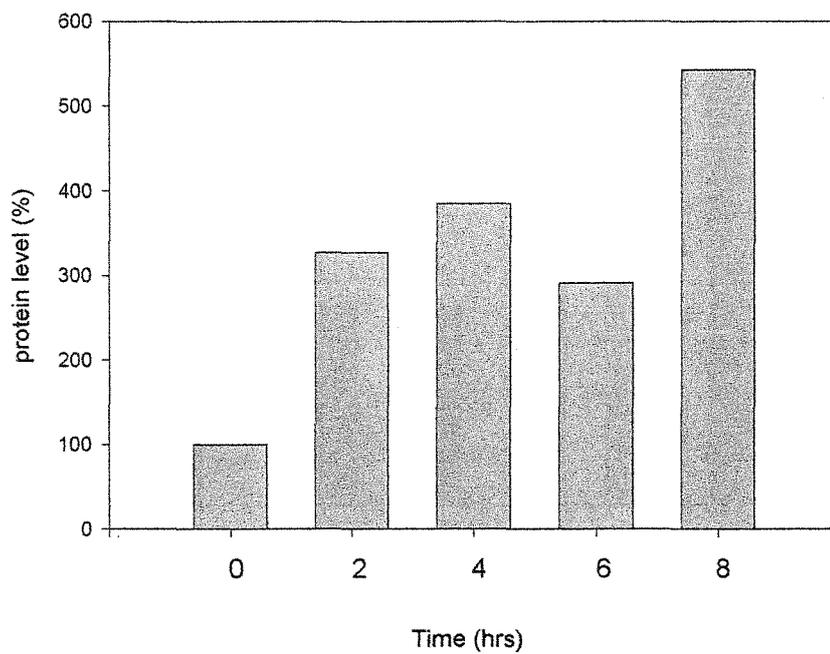
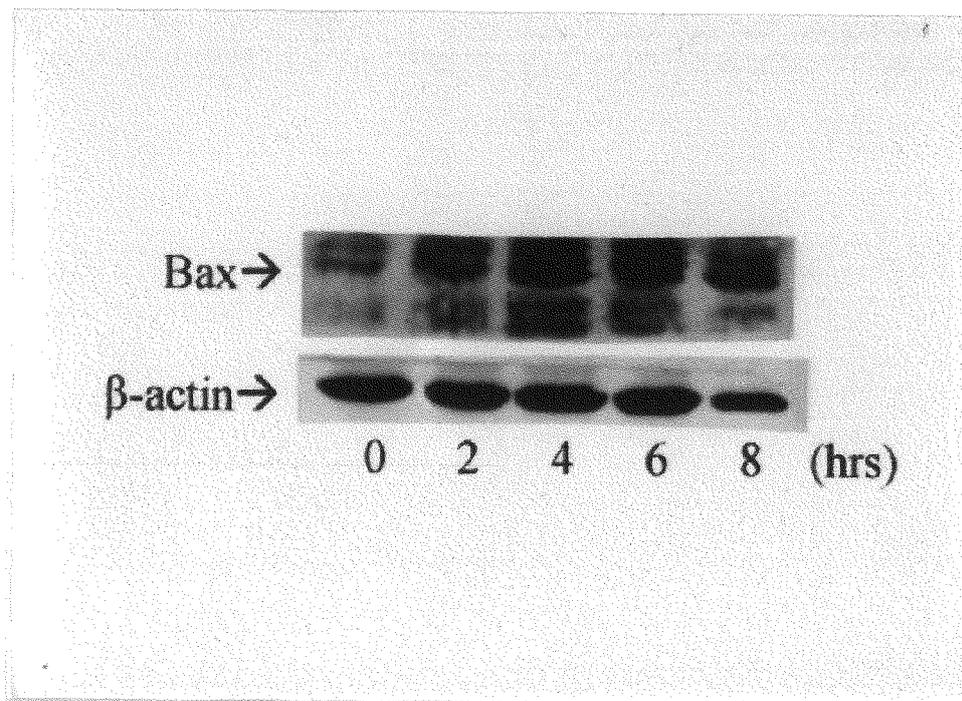


Fig.14. Time course of $(AC)_5GP$ treatment on Bax protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with $(AC)_5GP$ 0.3 mM for indicated time. The Bax protein was analyzed by immunoblotting.

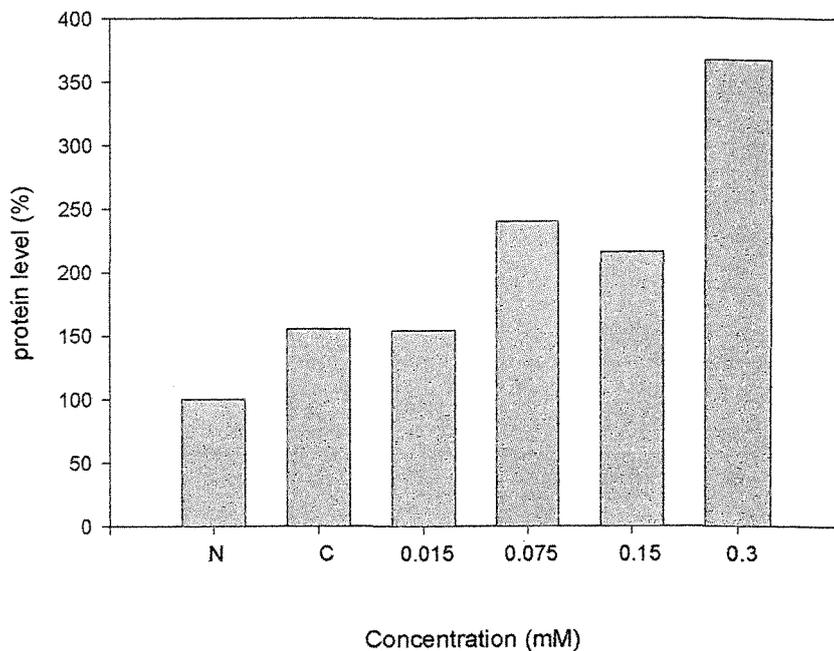
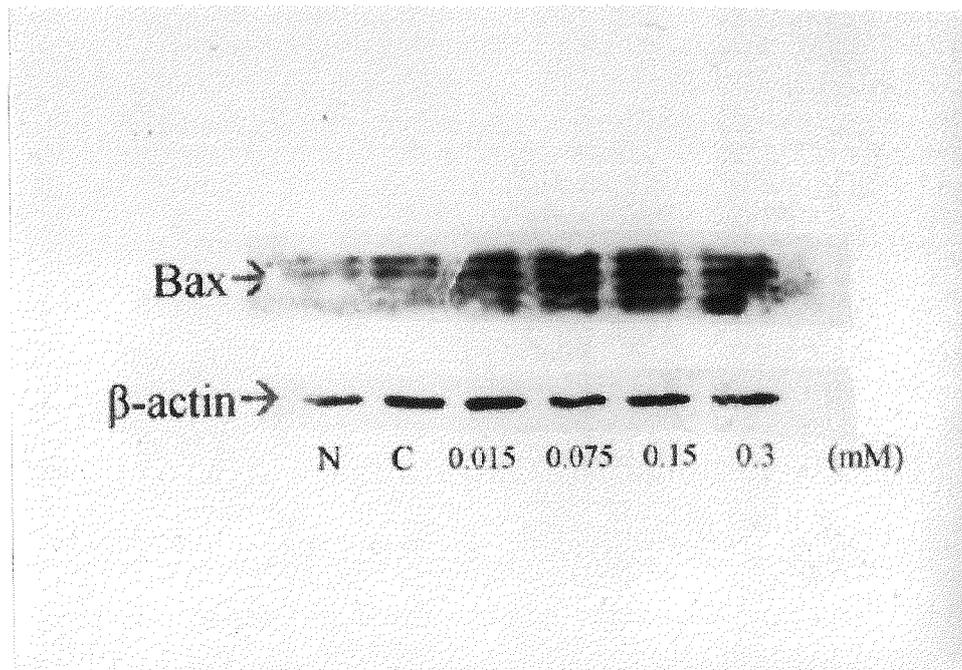


Fig. 15. Dose response of (AC)₅GP treatment on Bax protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅GP as indicated concentration for 4 hrs. The Bax protein was analyzed by the immunoblotting.

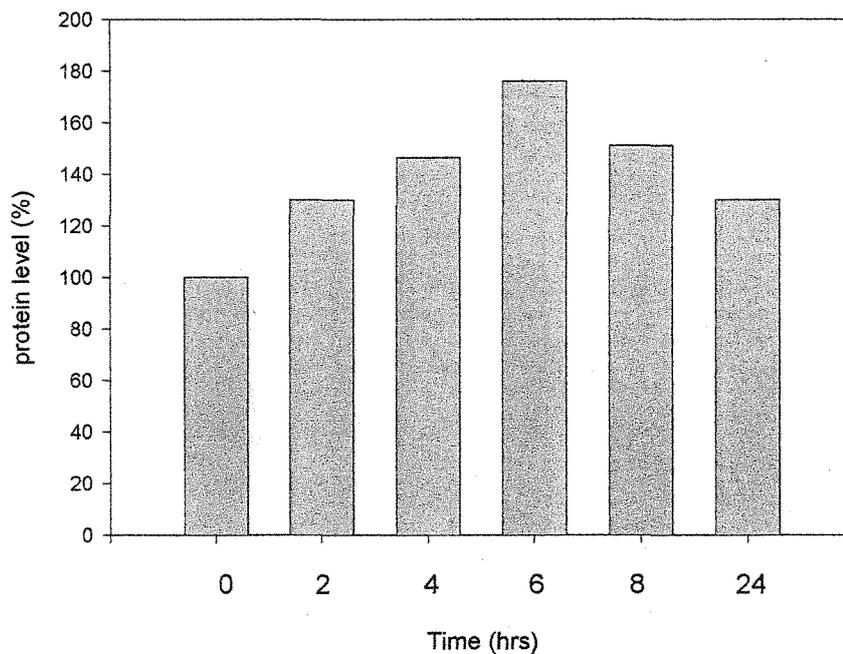
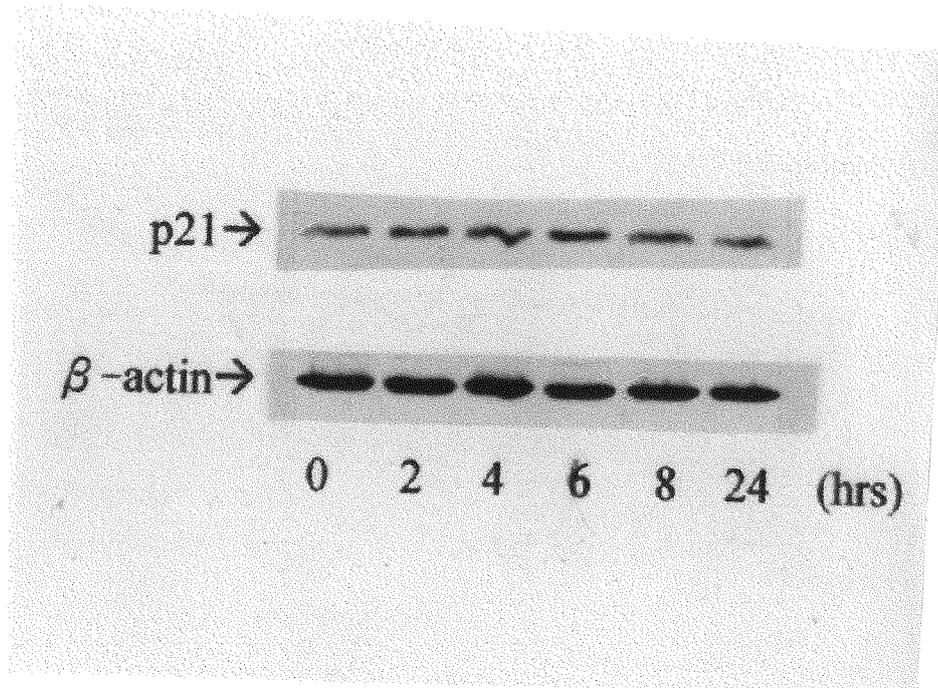


Fig. 16. Immunoblot analysis of the expression of p21 protein in (AC)₅GP treated C-6 cell. Cells from each time point following (AC)₅GP (0.3mM) treatment were analyzed. The p21 were detected by anti-p21 antibody and were visualized using an ECL system.

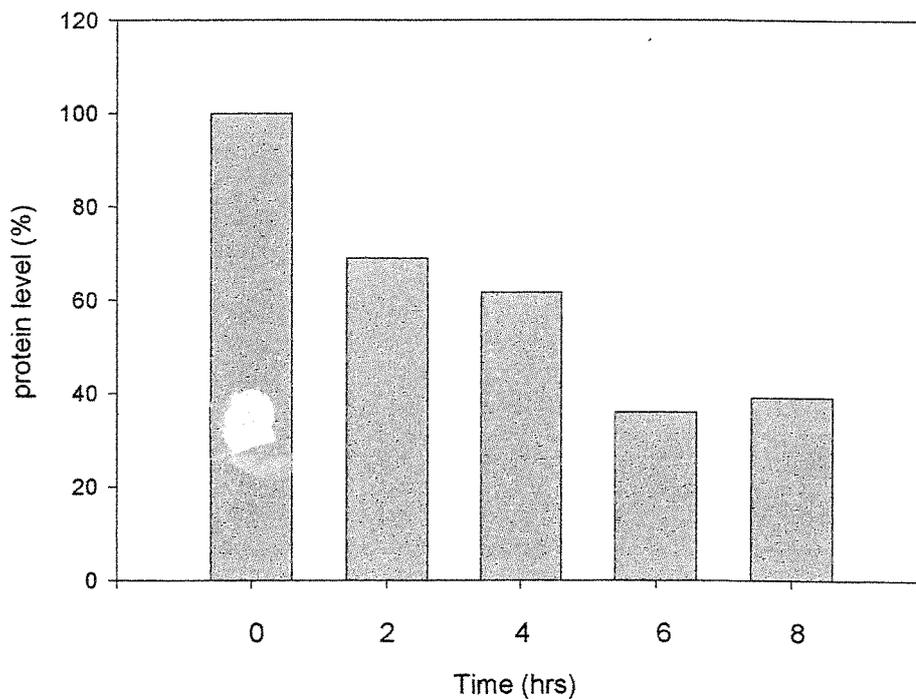
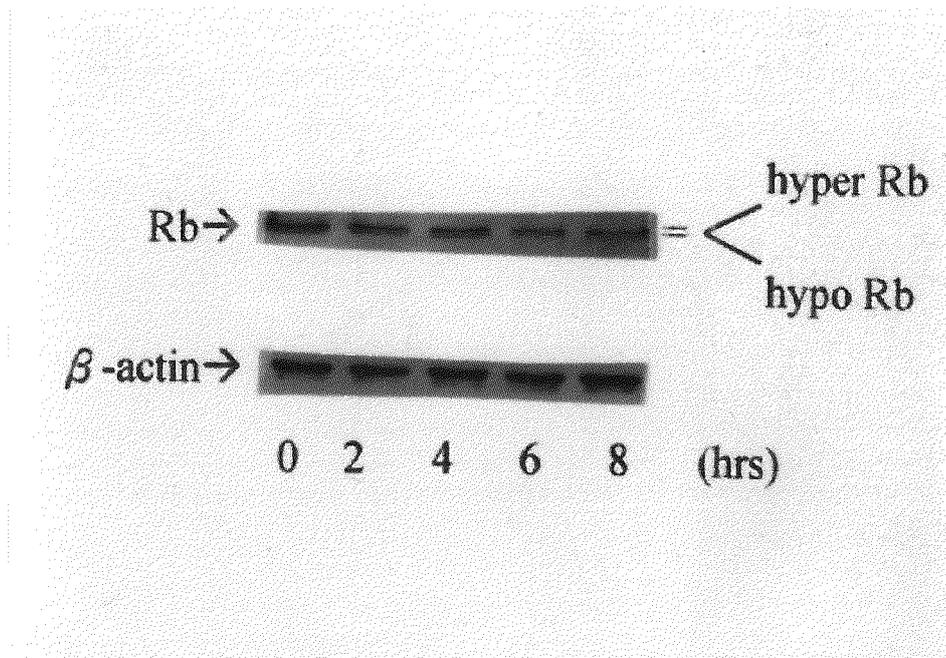


Fig. 17. Immunoblot analysis of the expression of RB in (AC)₅GP treated C-6 glioma cell. Cells from each time point following (AC)₅GP (0.3mM) treatment were analyzed. The RB were detected by anti-Rb antibody and were visualized using an ECL system.

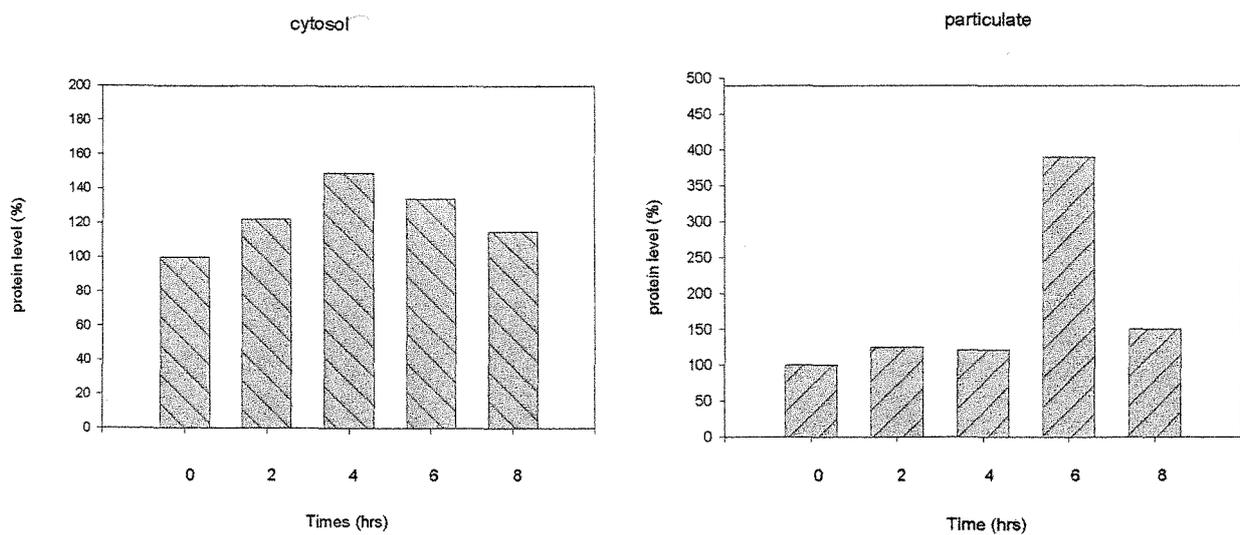
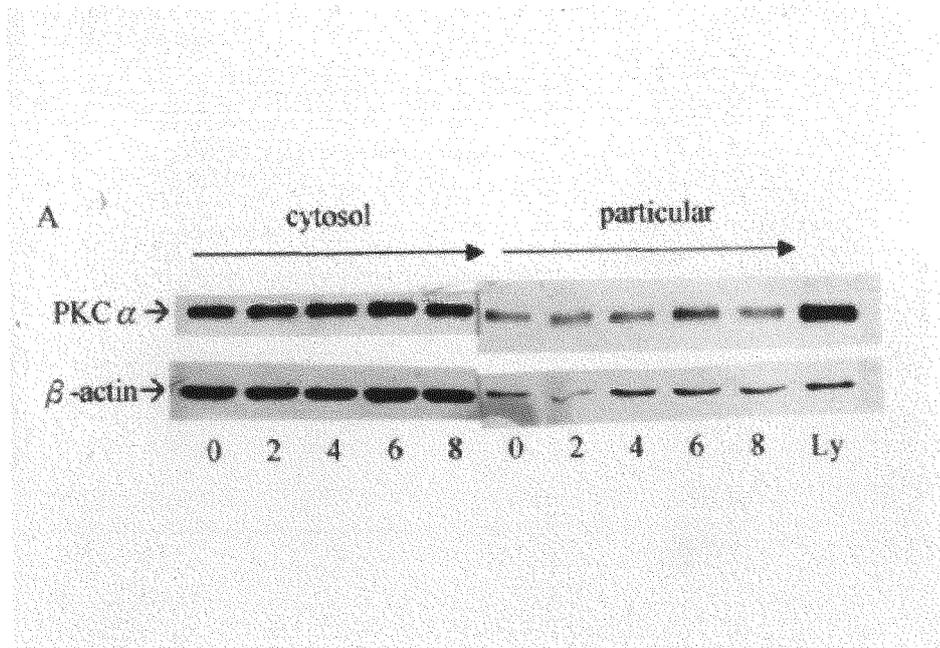


Fig. 18. Time course of $(AC)_5GP$ treatment on PKC- α protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with $(AC)_5GP$ 0.3 mM for indicated time. The PKC- α protein was extracted from cytosolic and particulate fractions and analyzed by immunoblotting.

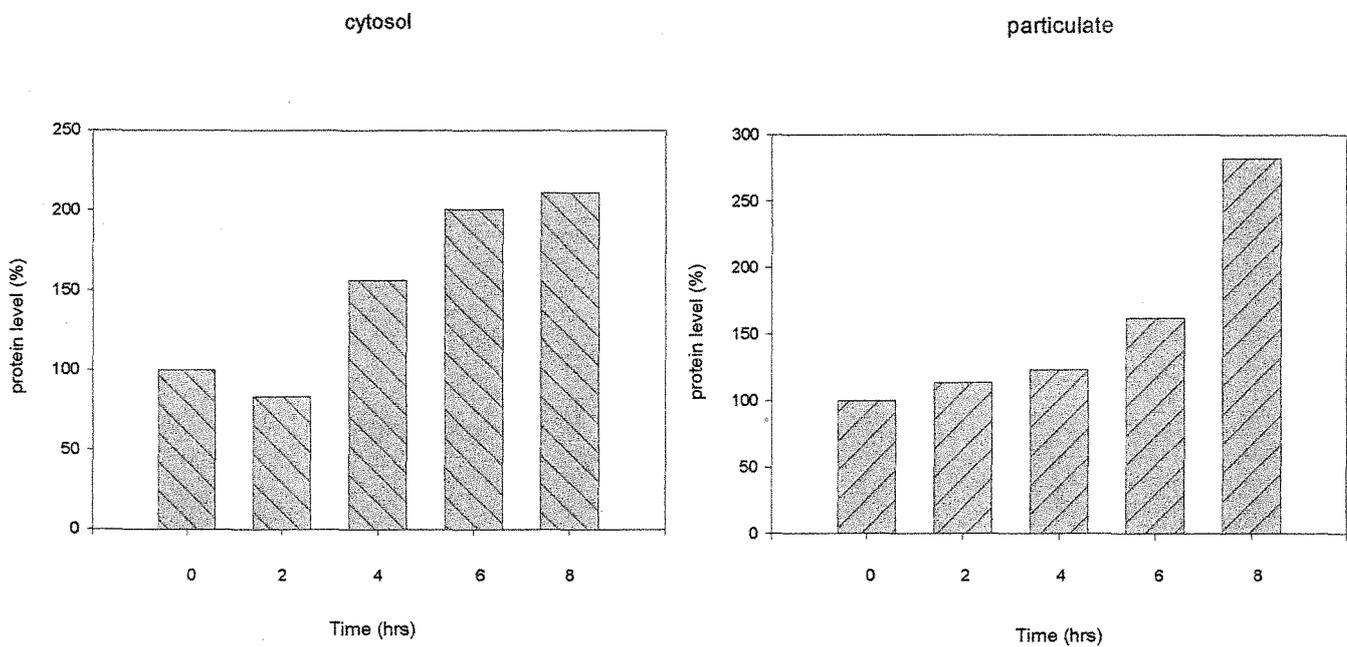
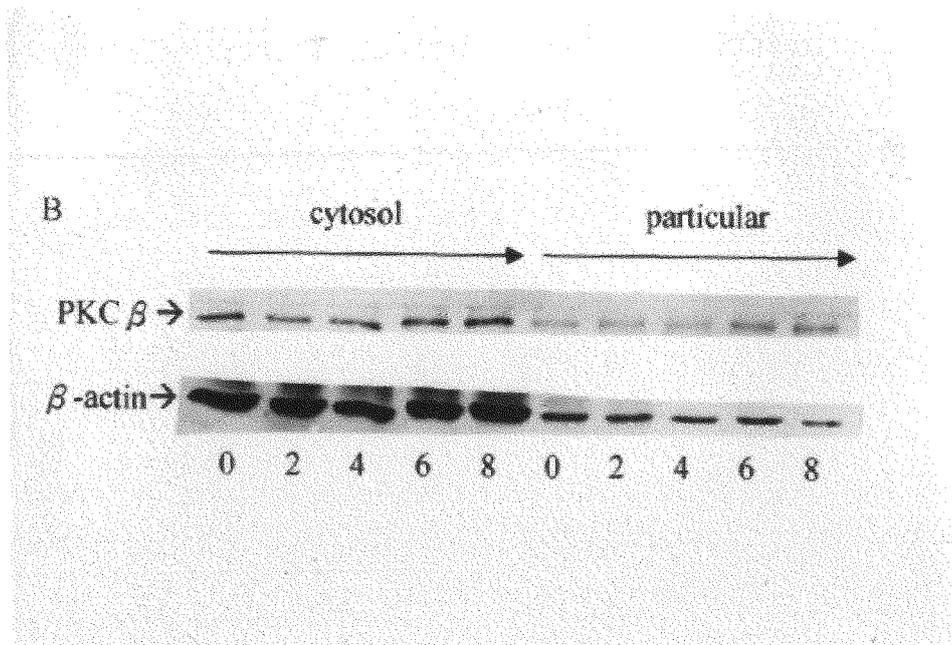


Fig. 19. Time course of $(AC)_5GP$ treatment on PKC- β protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with $(AC)_5GP$ 0.3 mM for indicated time. The PKC- β protein was extracted from cytosolic and particulate fractions and analyzed by immunoblotting.

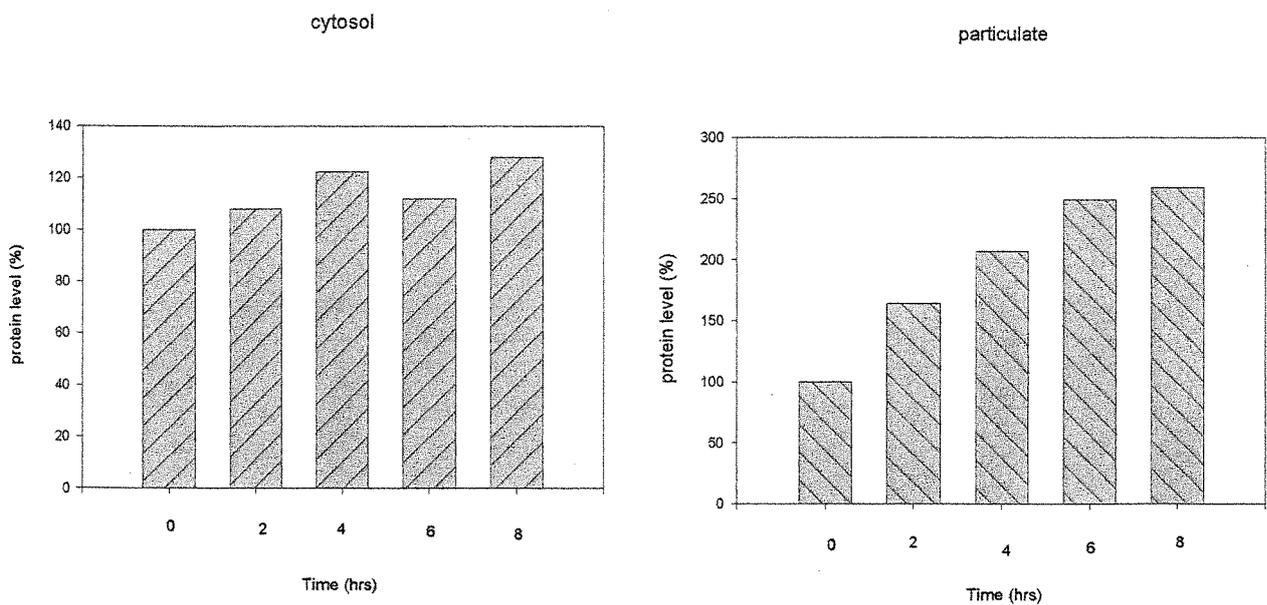
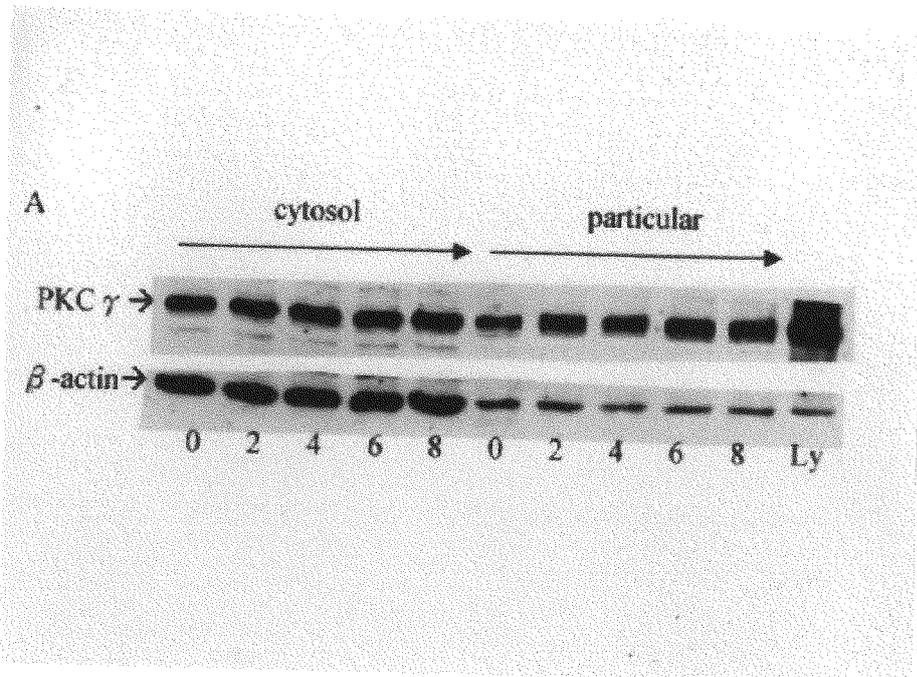


Fig.20. Time course of $(AC)_5GP$ treatment on PKC- γ protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with $(AC)_5GP$ 0.3 mM for indicated time. The PKC- γ protein was extracted from cytosolic and particulate fractions and analyzed by immunoblotting.

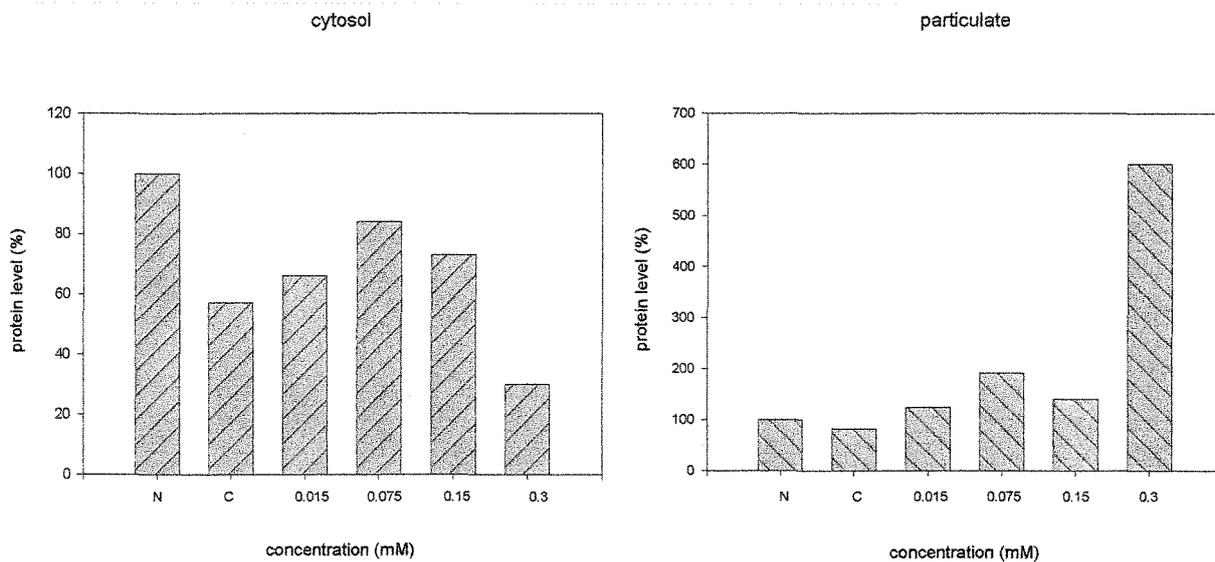
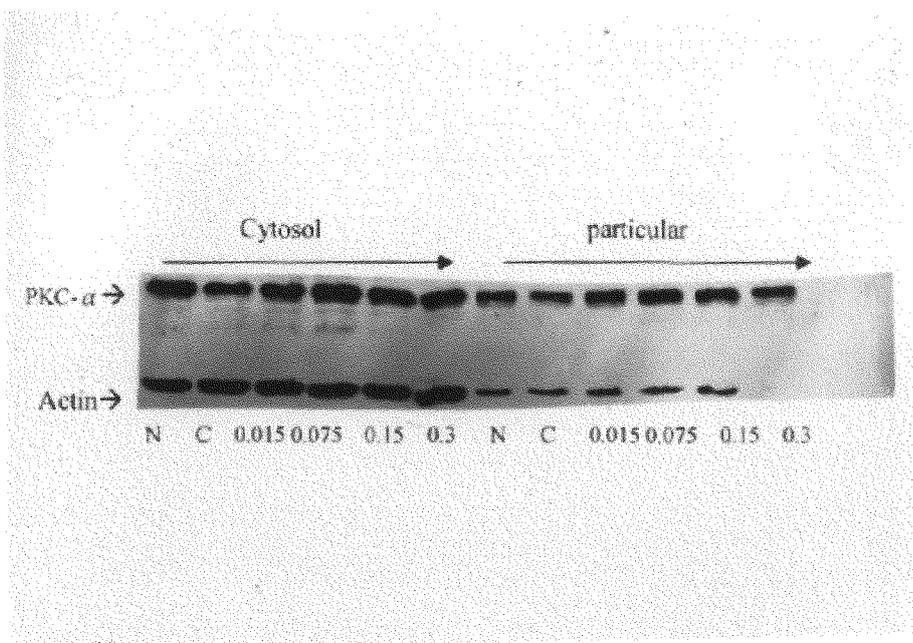


Fig. 21. Dose response of (AC)₅GP treatment on PKC-α protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅GP as indicated concentration for 6 hrs. The PKC-α protein was extracted from cytosolic and particulate fractions and analyzed by immunoblotting.

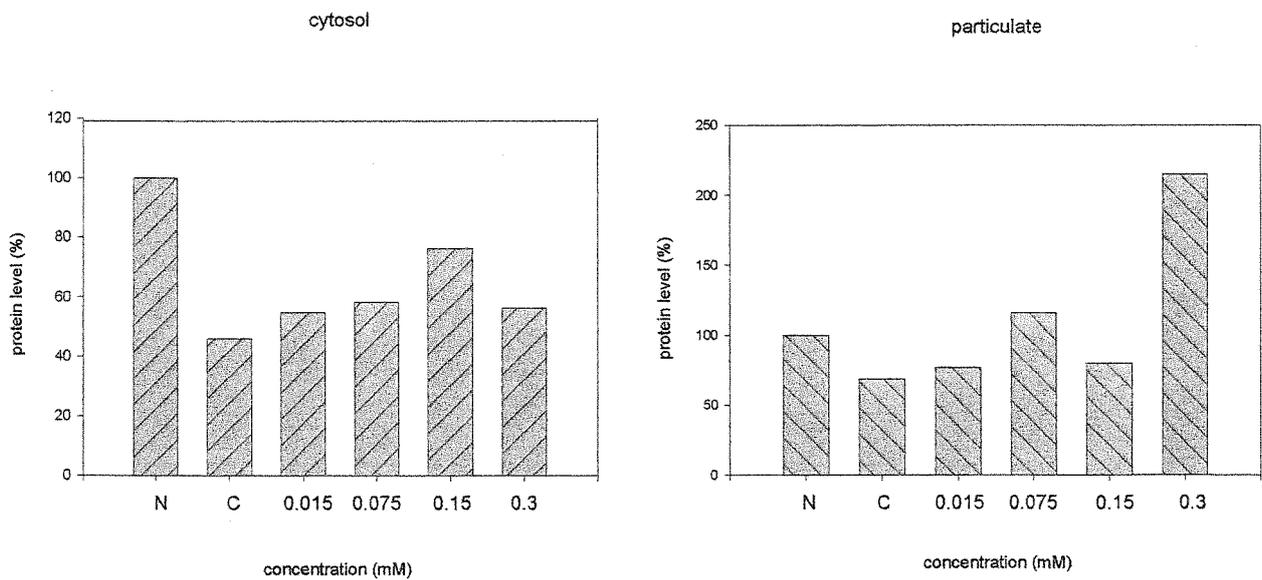
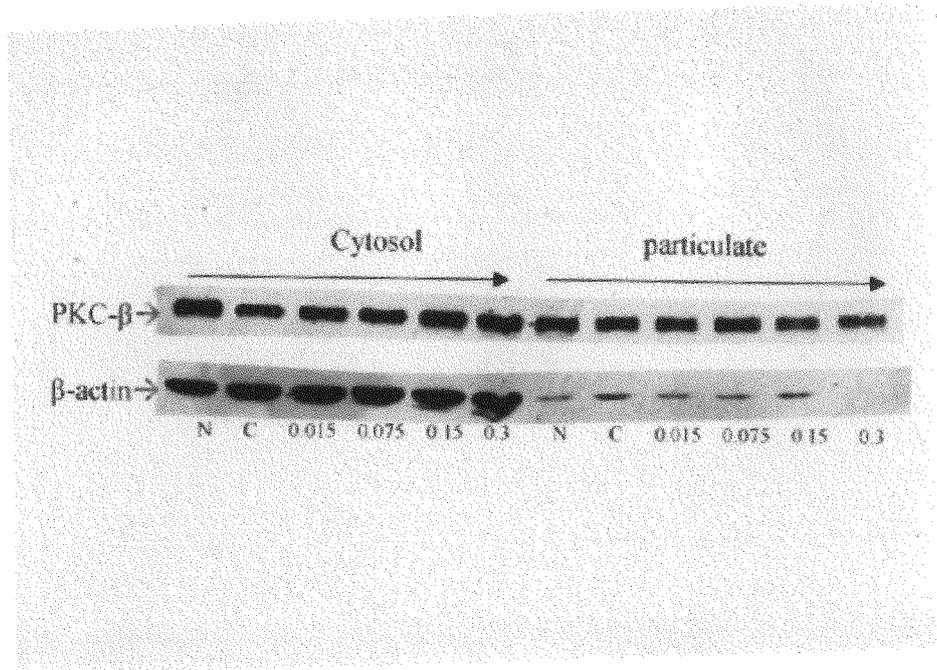


Fig. 22. Dose response of $(AC)_5GP$ treatment on PKC- β protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with $(AC)_5GP$ as indicated concentration for 6 hrs. The PKC- β protein was extracted from cytosolic and particulate fractions and analyzed by immunoblotting.

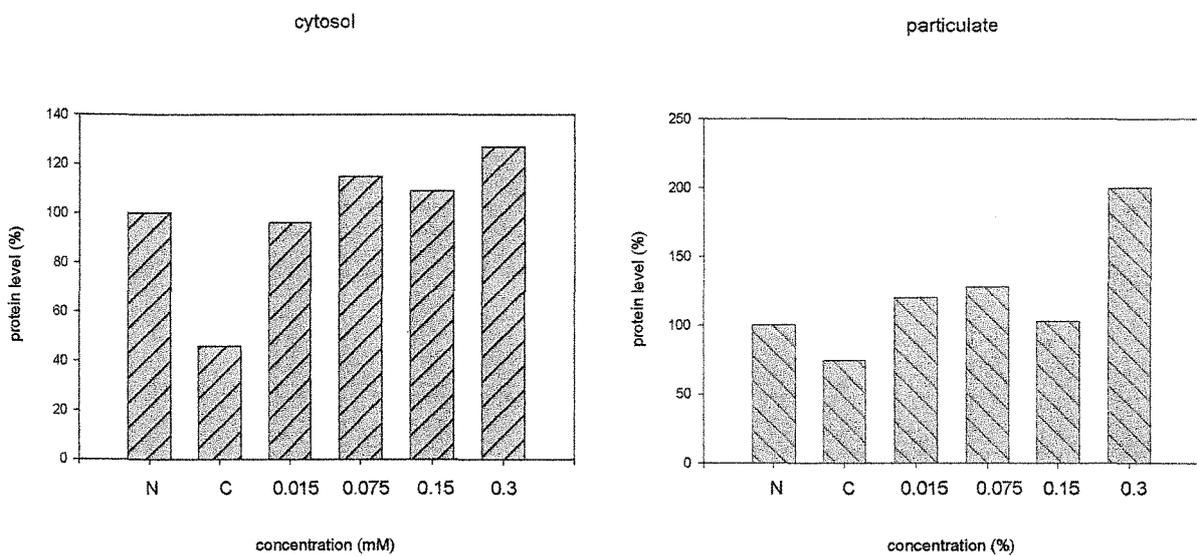
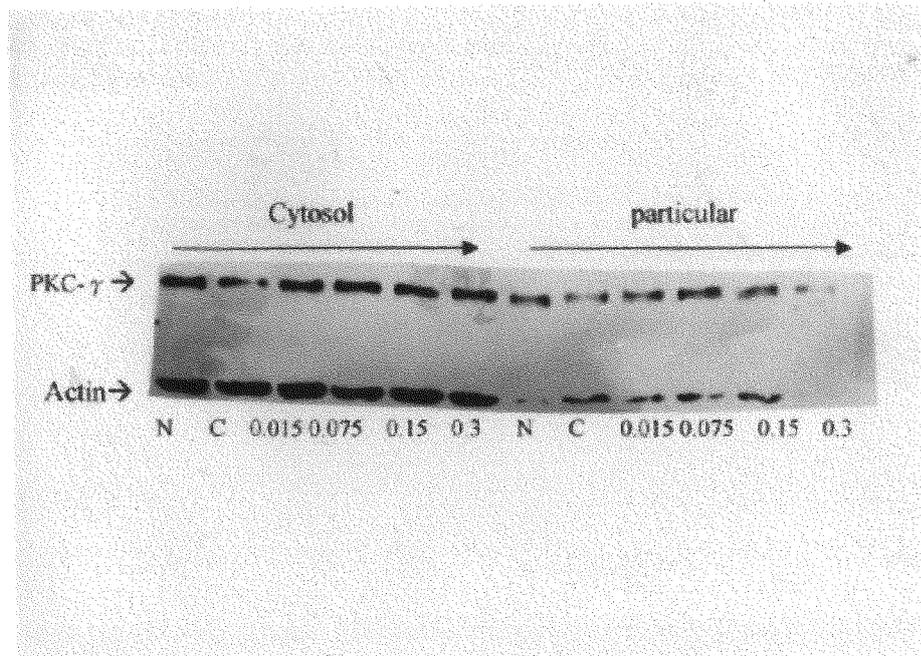


Fig. 23. Dose response of (AC)₅GP treatment on PKC-γ protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅GP as indicated concentration for 6 hrs. The PKC-γ protein was extracted from cytosolic and particulate fractions and analyzed by the immunoblotting.

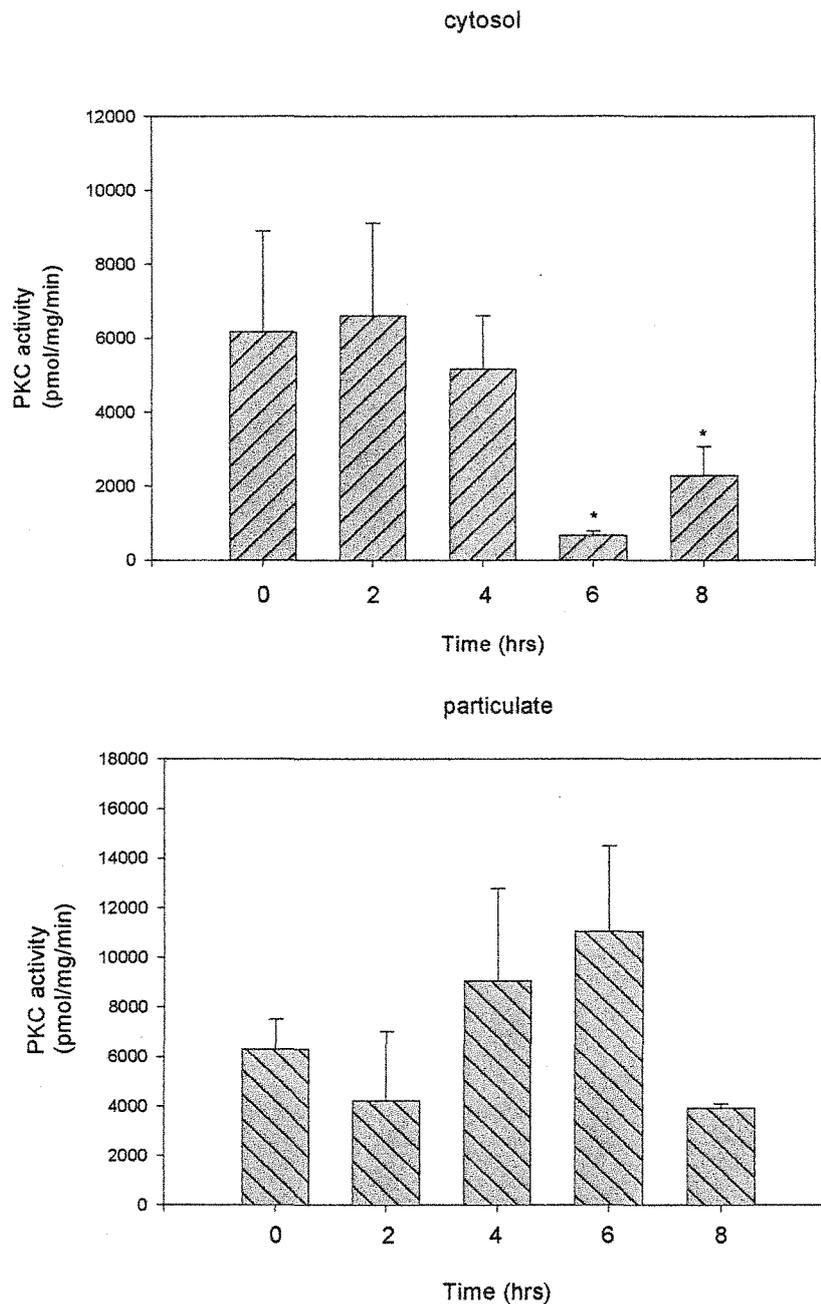


Fig. 24. Activity assay of PKC protein in (AC)₅GP treated C-6 glioma cell. PKC were extact from cytosolic(A) and particulate (B) fraction following DEAE-cellulose chromatography as amount of P incorporation into histone noted in the absence of added phospholipids from the amount of P incorporation noted in the presence of phospholipids as described in materials and methods. Deta are mean \pm SE of five independent experiment. * P < 0.05

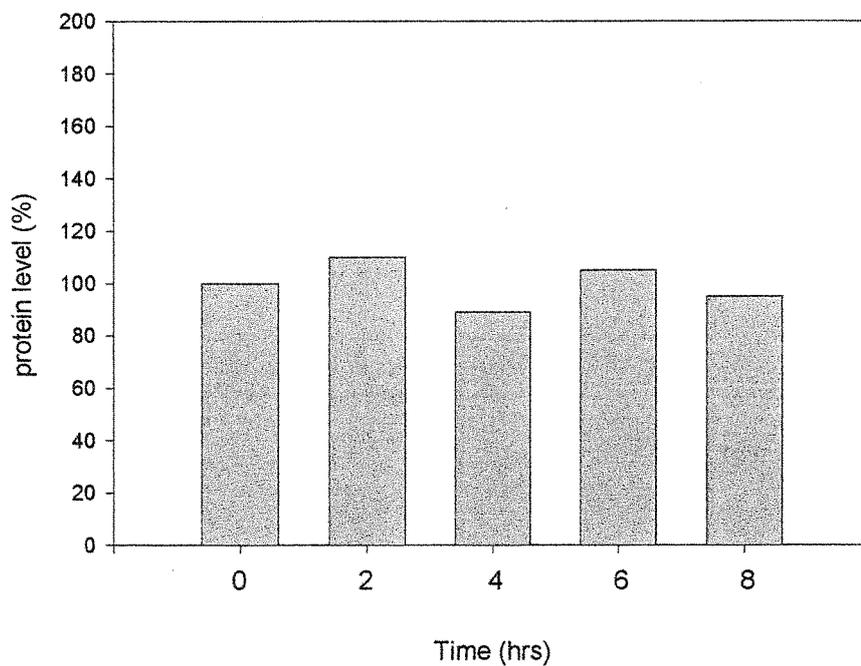
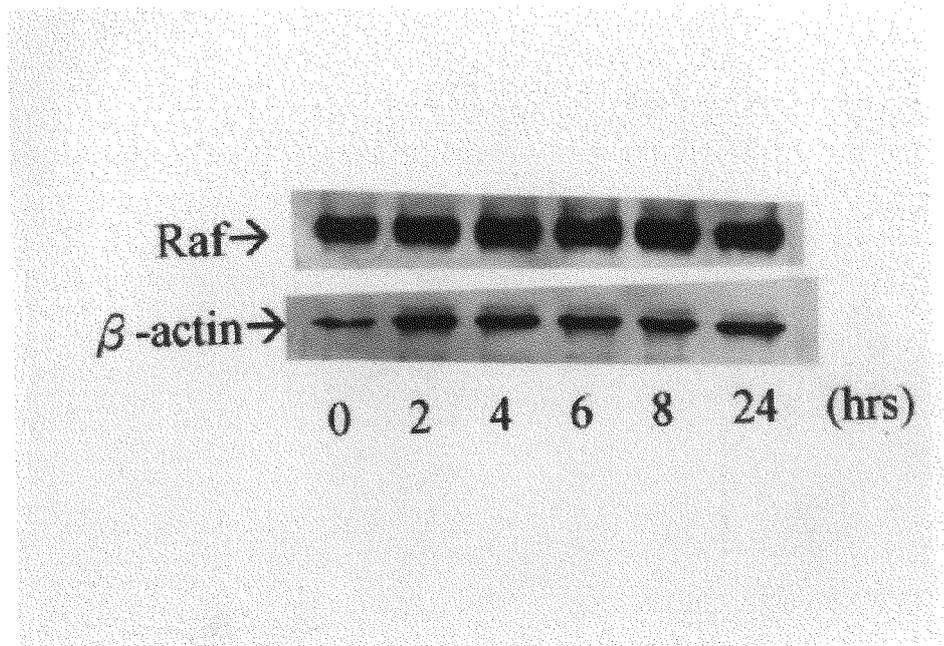


Fig. 25. Immunoblot analysis of the expression of Raf in (AC)₅GP treated C-6 glioma cell. Cells from each time point following (AC)₅GP (0.3mM) treatment were analyzed. The Raf were detected by anti-Raf antibody and were visualized using an ECL system.

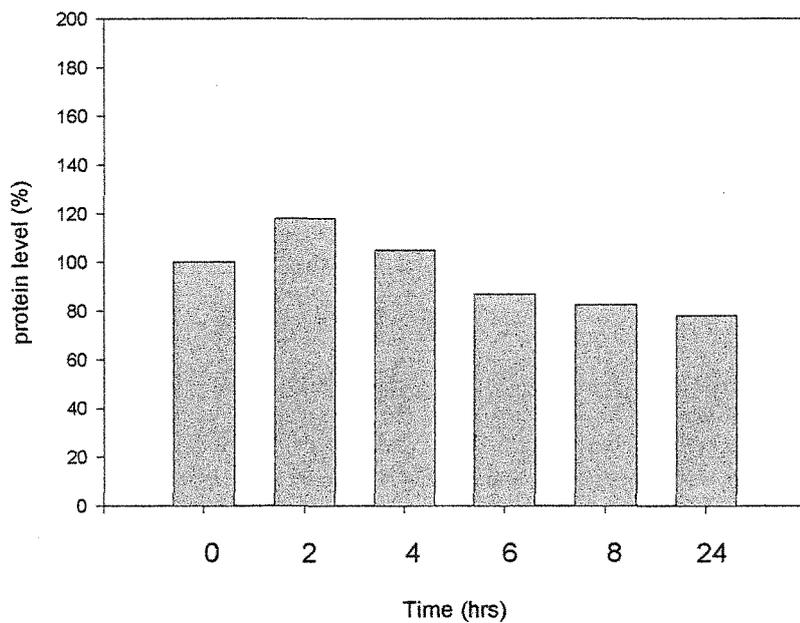
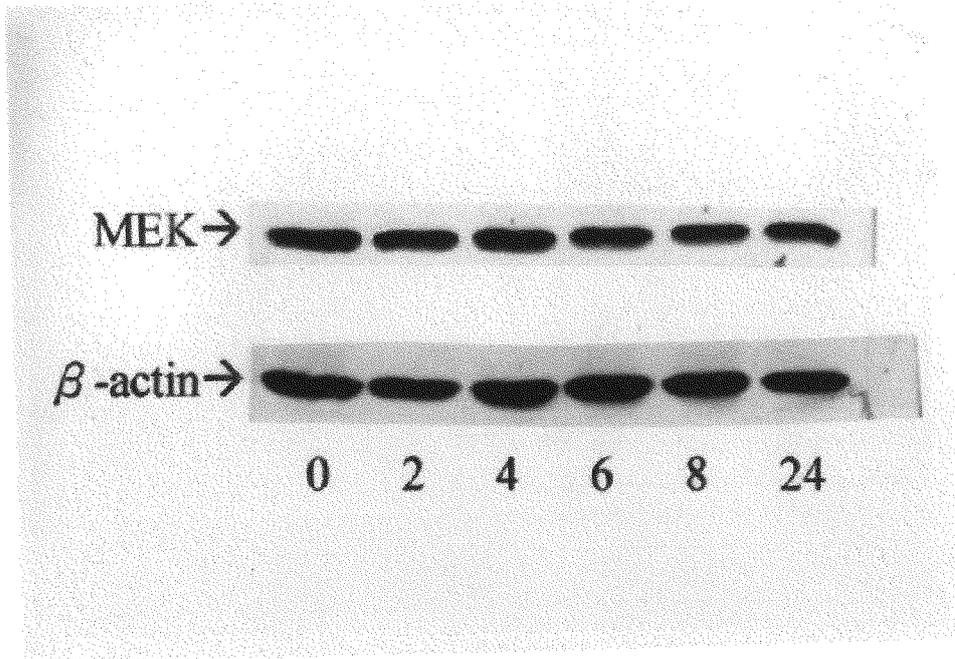


Fig. 26. Immunoblot analysis of the expression of MEK in (AC)₅GP treated C-6 glioma cell. Cells from each time point following (AC)₅GP (0.3mM) treatment were analyzed. The MEK were detected by anti-MEK antibody and were visualized using an ECL system.

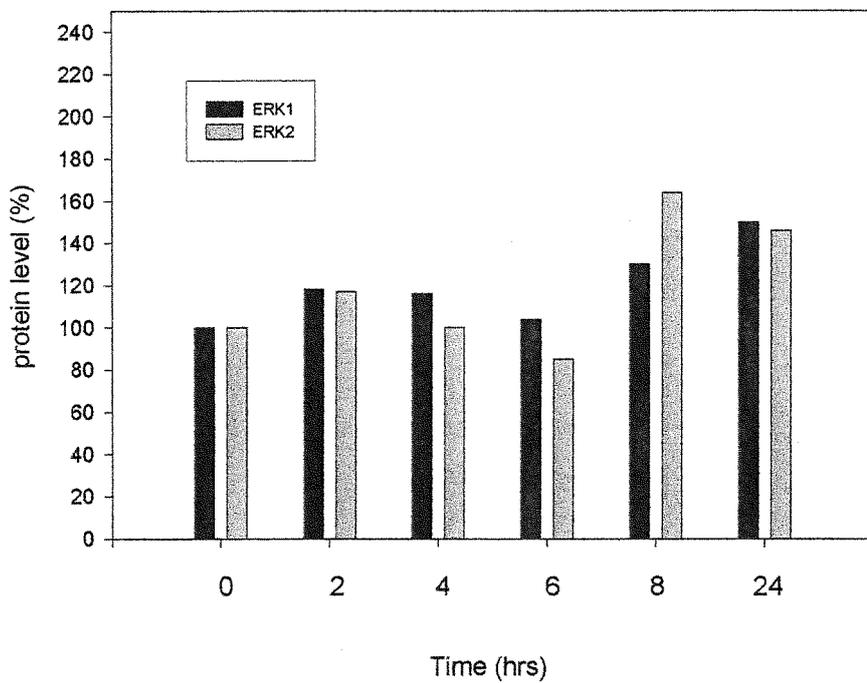
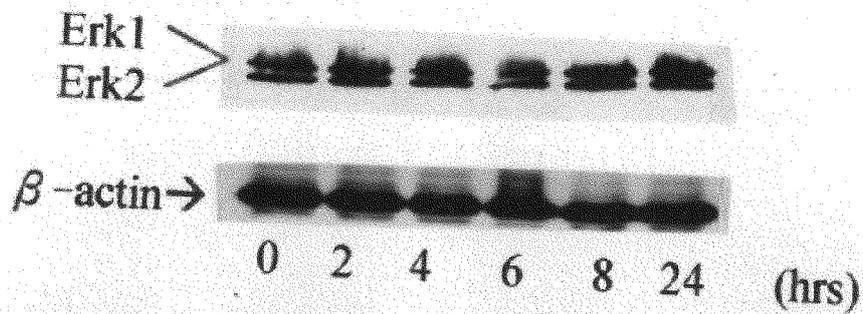


Fig. 27. Immunoblot analysis of the expression of Erk1/Erk2 in (AC)₅GP treated C-6 glioma cell. Cells from each time point following (AC)₅GP (0.3mM) treatment were analyzed. The MEK were detected by anti-MEK antibody and were visulized using an ECL system.

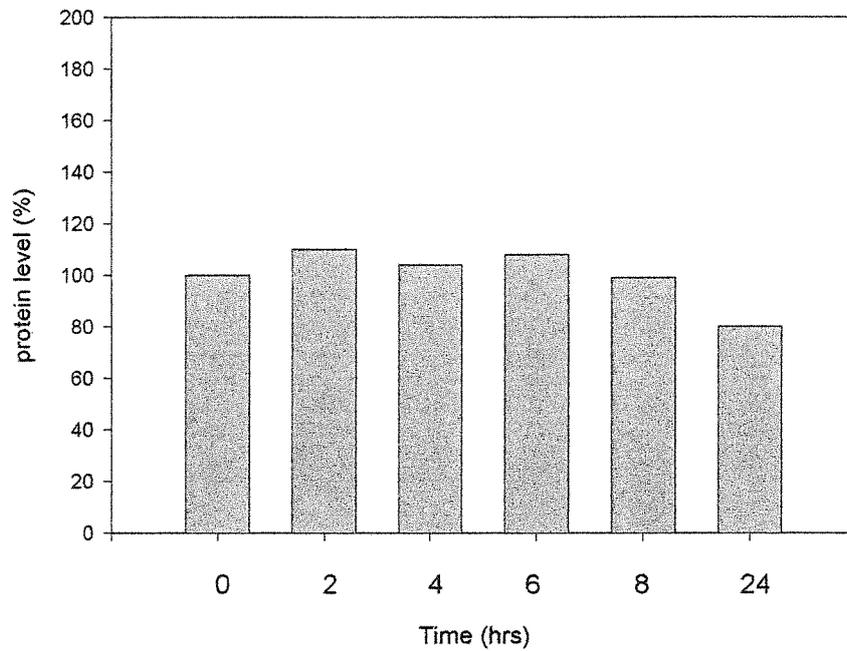
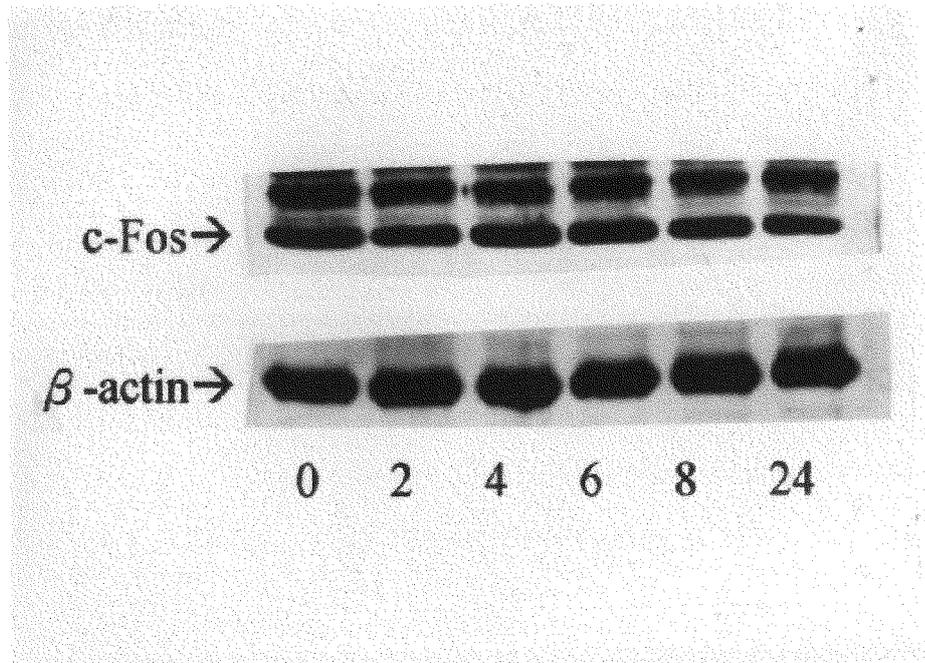


Fig. 28. Immunoblot analysis of the expression of c-Fos in (AC)₅GP treated C-6 glioma cell. Cells from each time point following (AC)₅GP (0.3mM) treatment were analyzed. The c-Fos were detected by anti-Fos antibody and were visualized using an ECL system.

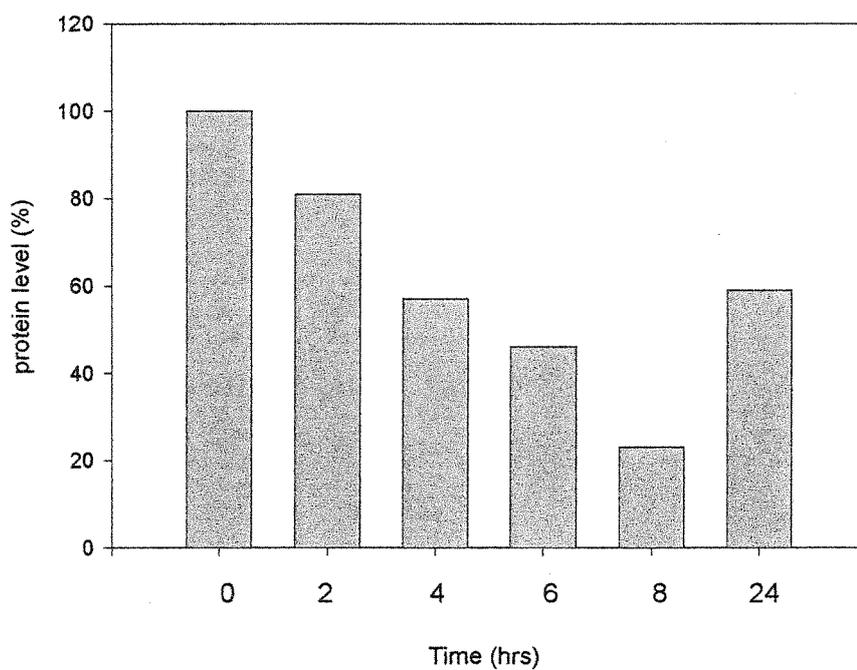
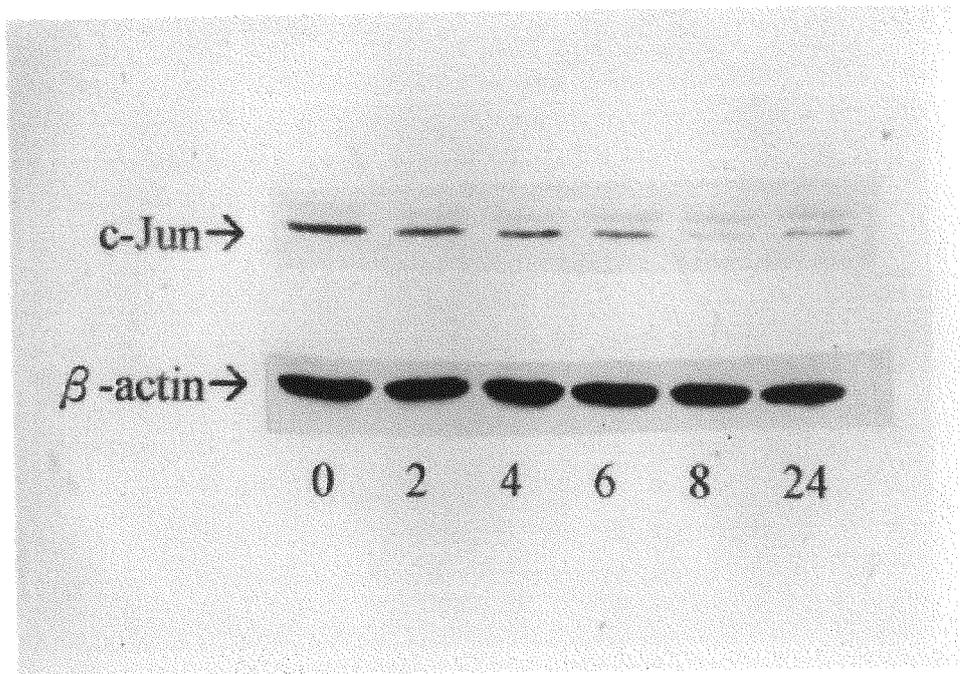


Fig. 29. Time course of (AC)₅GP treatment on c-Jun protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅GP 0.3 mM for indicated time. The c-Jun protein was analyzed by immunoblotting.

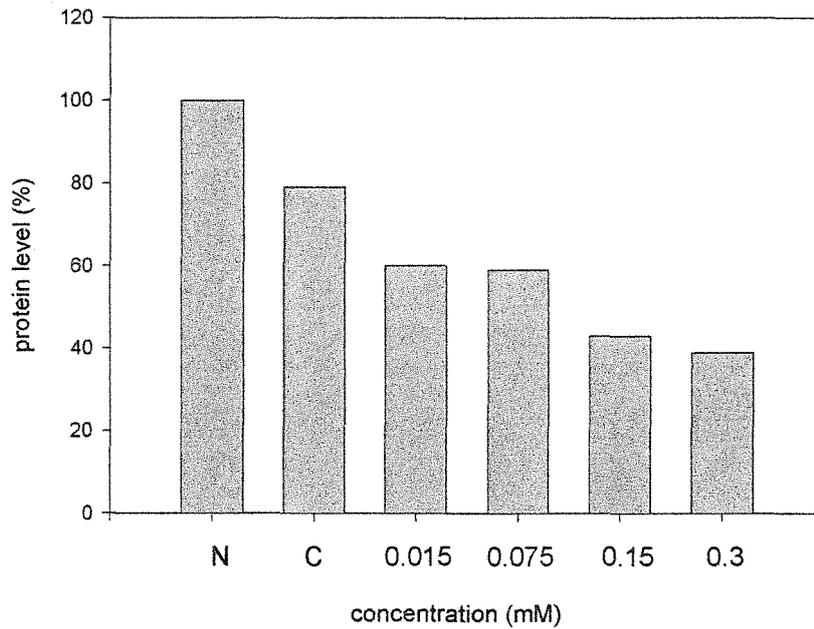
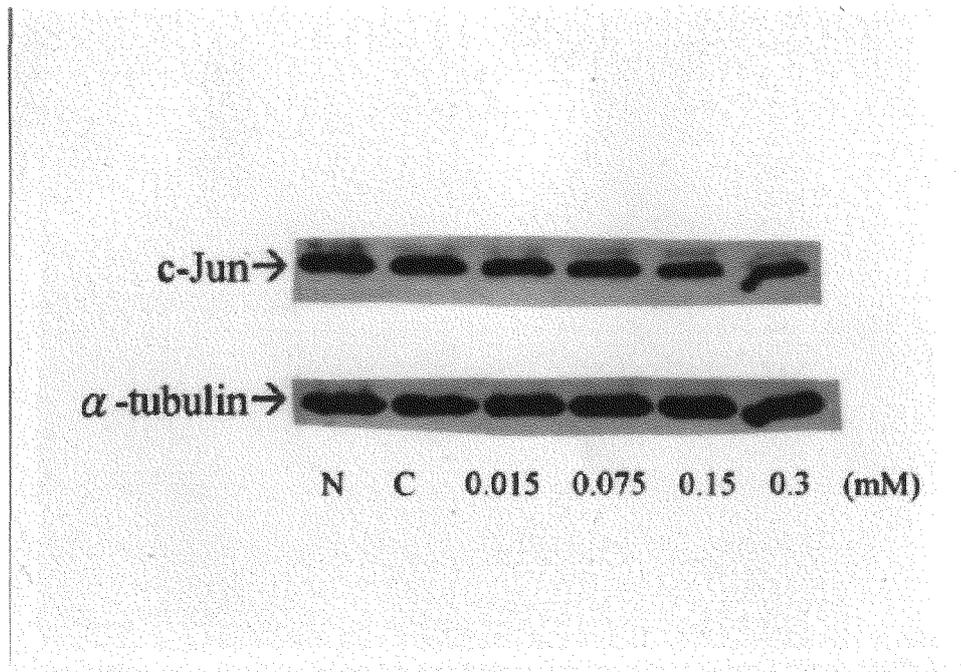


Fig. 30. Dose response of (AC)₅GP treatment on c-Jun protein expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (AC)₅GP as indicated concentration for 4 hrs. The c-Jun protein was analyzed by the immunoblotting.

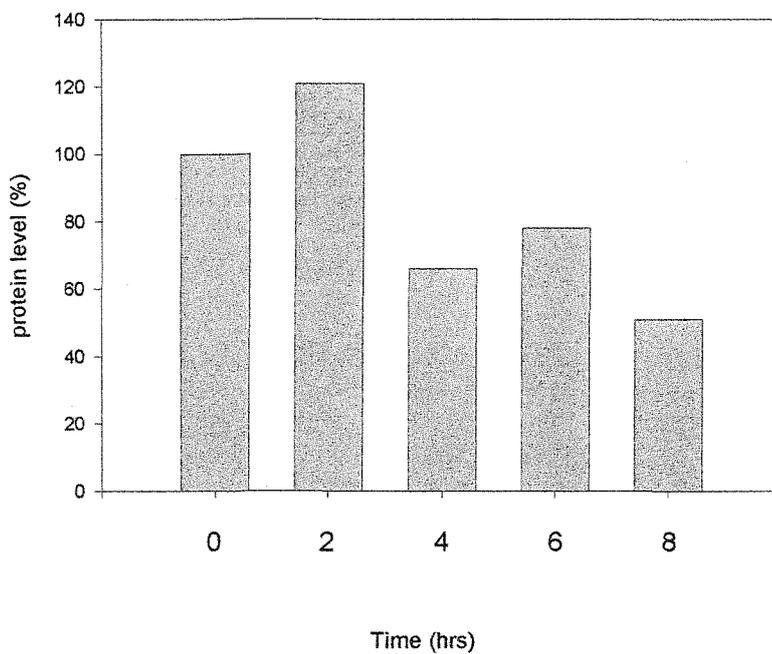
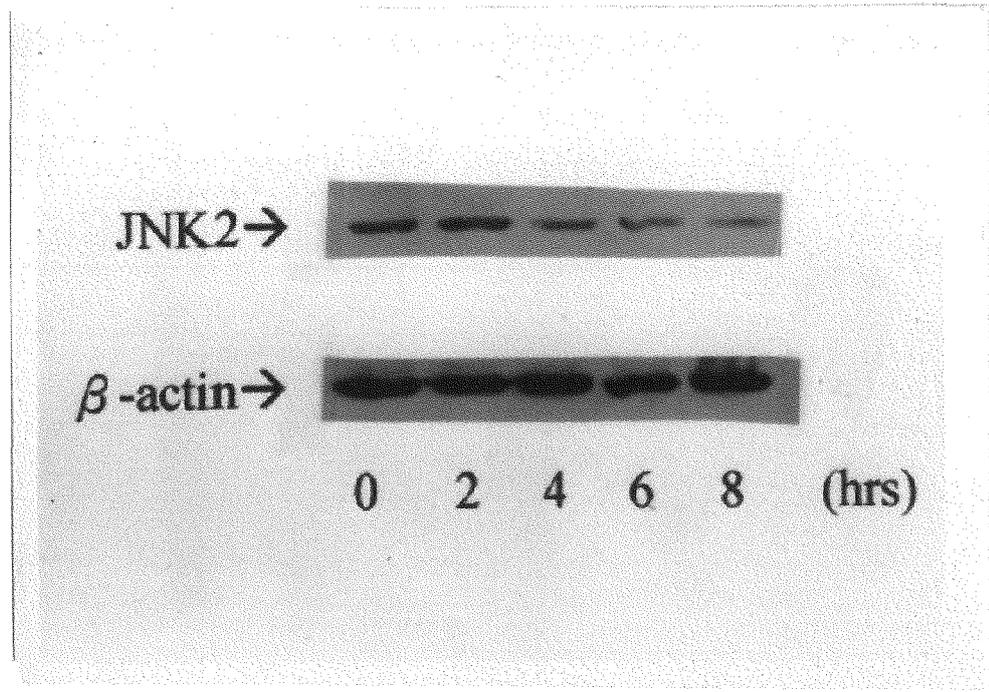


Fig. 31. Immunoblot analysis of the expression of JNK in (AC)₅GP treated C-6 glioma cell. Cells from each time point following (AC)₅GP (0.3mM) treatment were analyzed. The JNK were detected by anti-JNK antibody and were visualized using an ECL system.

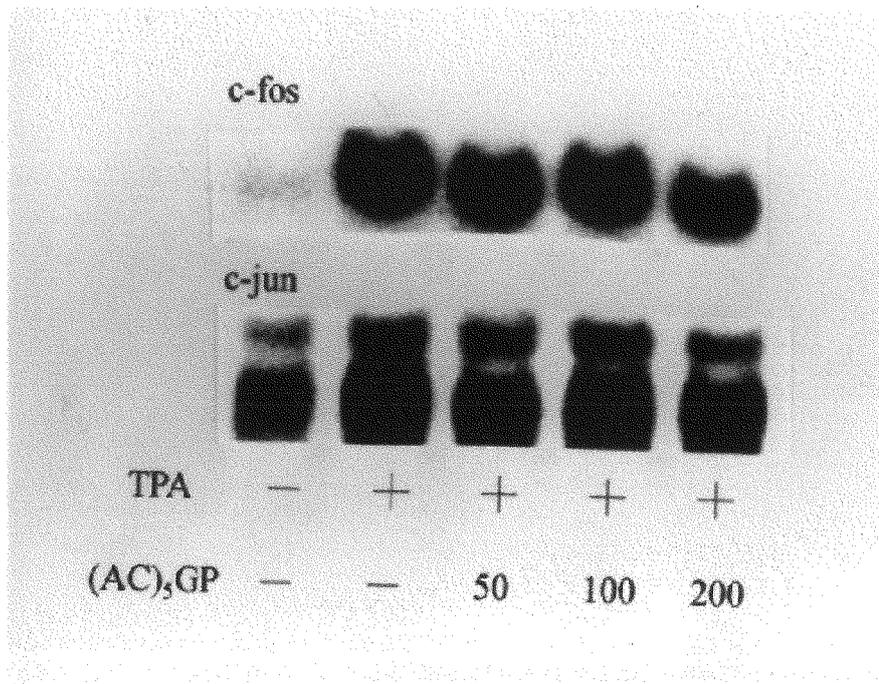


Fig. 32. Effects of (AC)₅GP on c-fos and c-jun expression in TPA stimulated C-6 glioma cells. Cultured cells were stimulated by TPA (100ng/ml), then treated with (AC)₅GP at indicated concentrations. The c-fos and c-jun mRNA were analyzed by the Northern blotting.

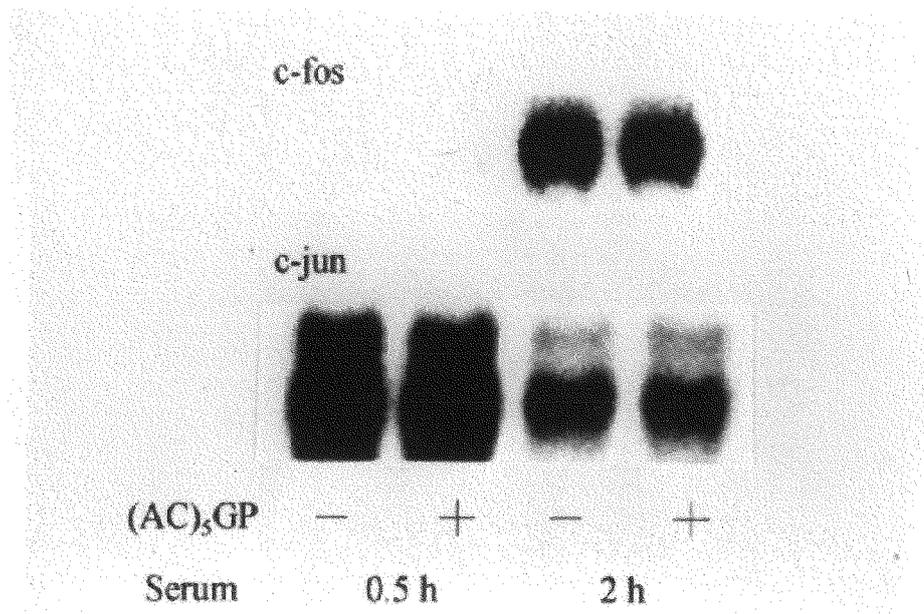
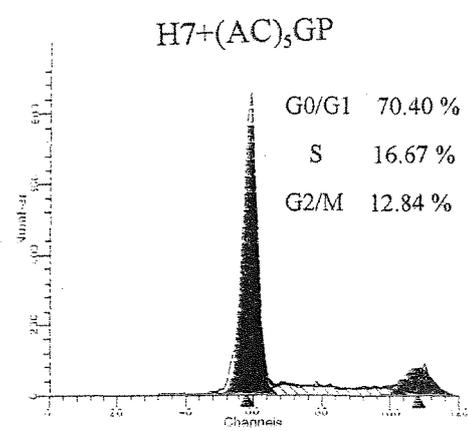
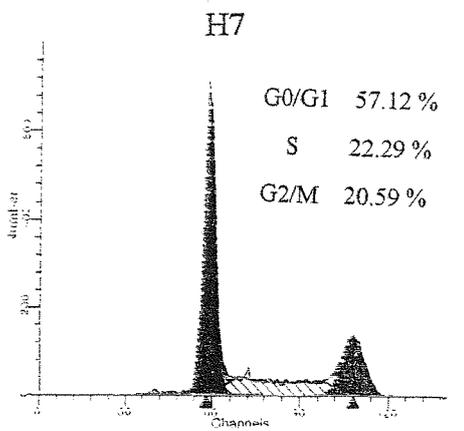
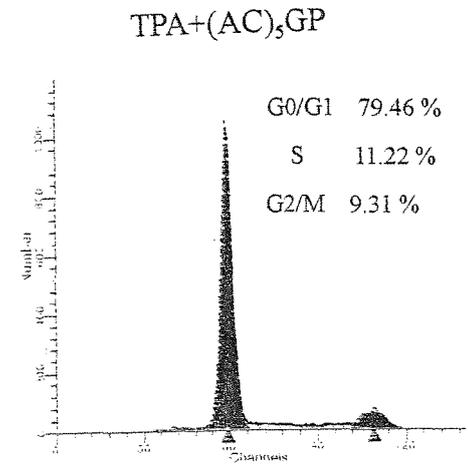
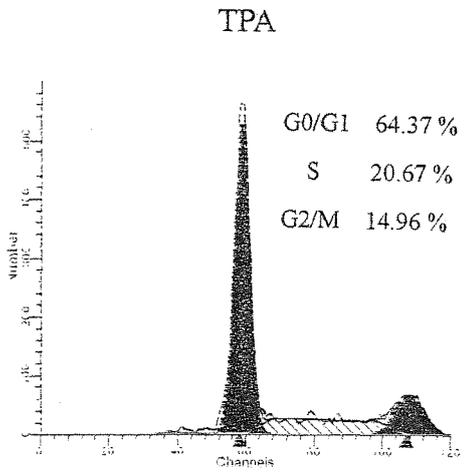
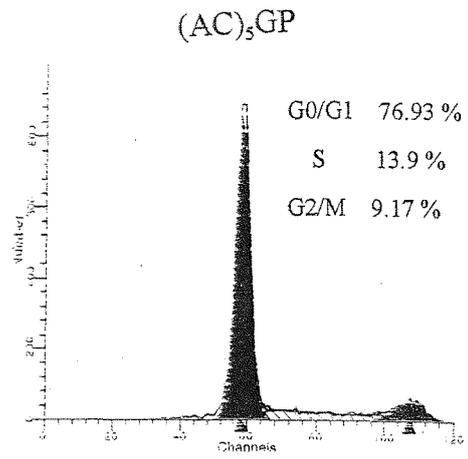
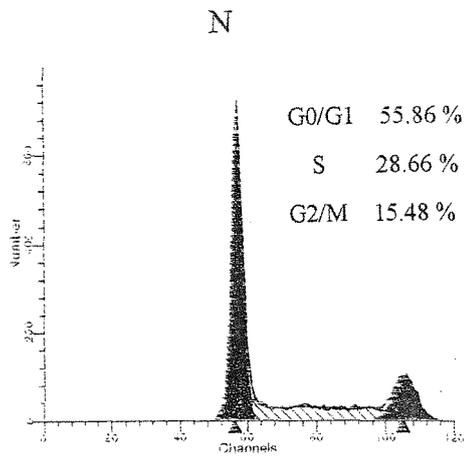


Fig. 33. Effects of (AC)₅GP on c-fos and c-jun mRNA expression in serum-induced C-6 glioma cells.



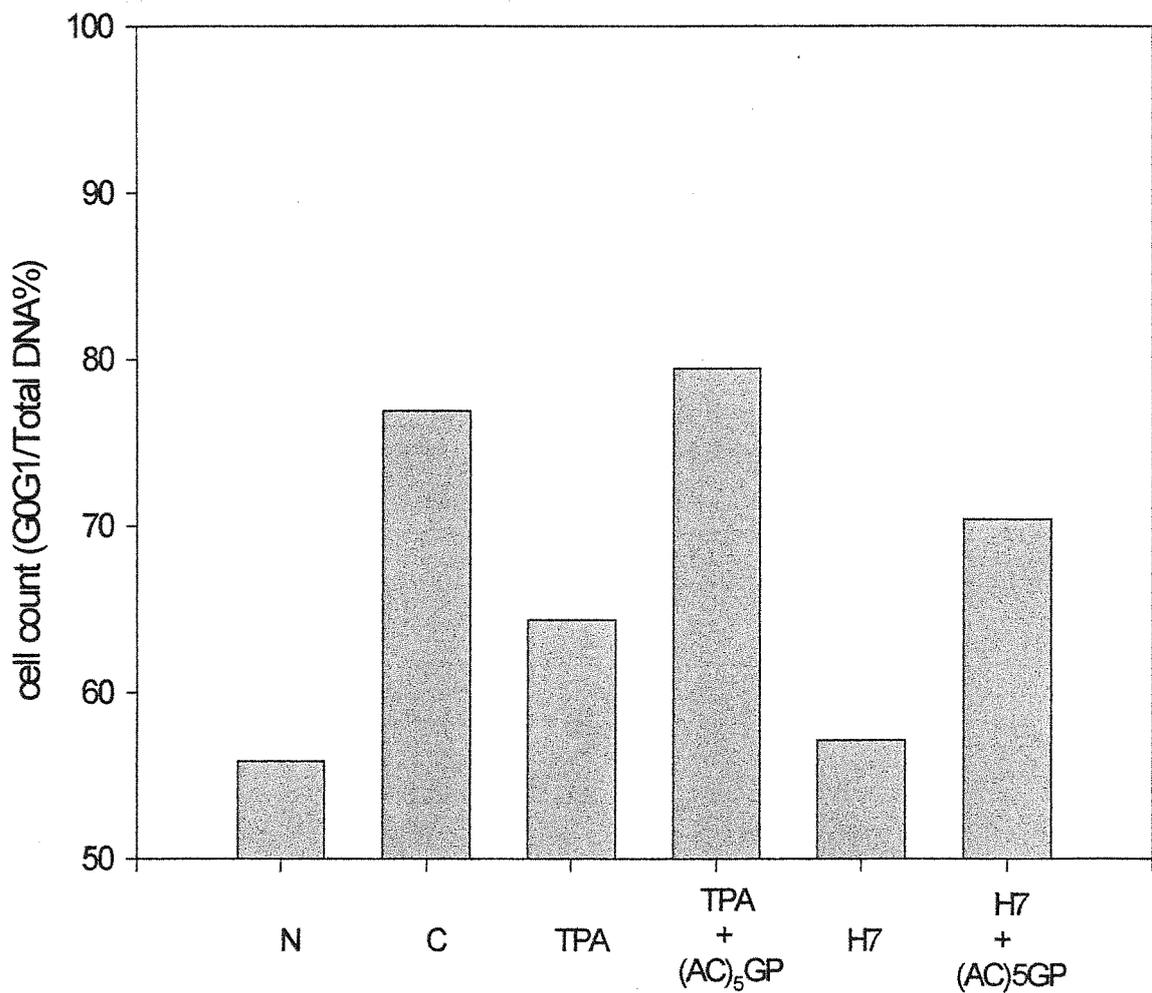


Fig. 34. Effect of PKC activator (TPA) and inhibitor (H7) on (AC)₅GP-induced cell cycle arrest in C-6 glioma cells. Cells were treated with (AC)₅GP (0.3mM), TPA (100 ng/ml), TPA and (AC)₅GP, H7(1 mM), H7 and (AC)₅GP 24hrs, and cell cycle was analyzed by flow cytometry

Table. 1.

		結果
Apoptosis	DNA fragmentation	+
	Flow cytometer	+
	p53	+
	c-Myc	+
	Bax	+
	Bcl-2	-
Cell cycle arrest	Flow cytometer (G0/G1 phase)	+
	p21	+
	RB-p	-
Singaling protein	PKC isoform	+
	Raf	N
	MEK	N
	ERK1/ERK2	N
	c-Fos	N
	c-Jun	-
	JNK	-

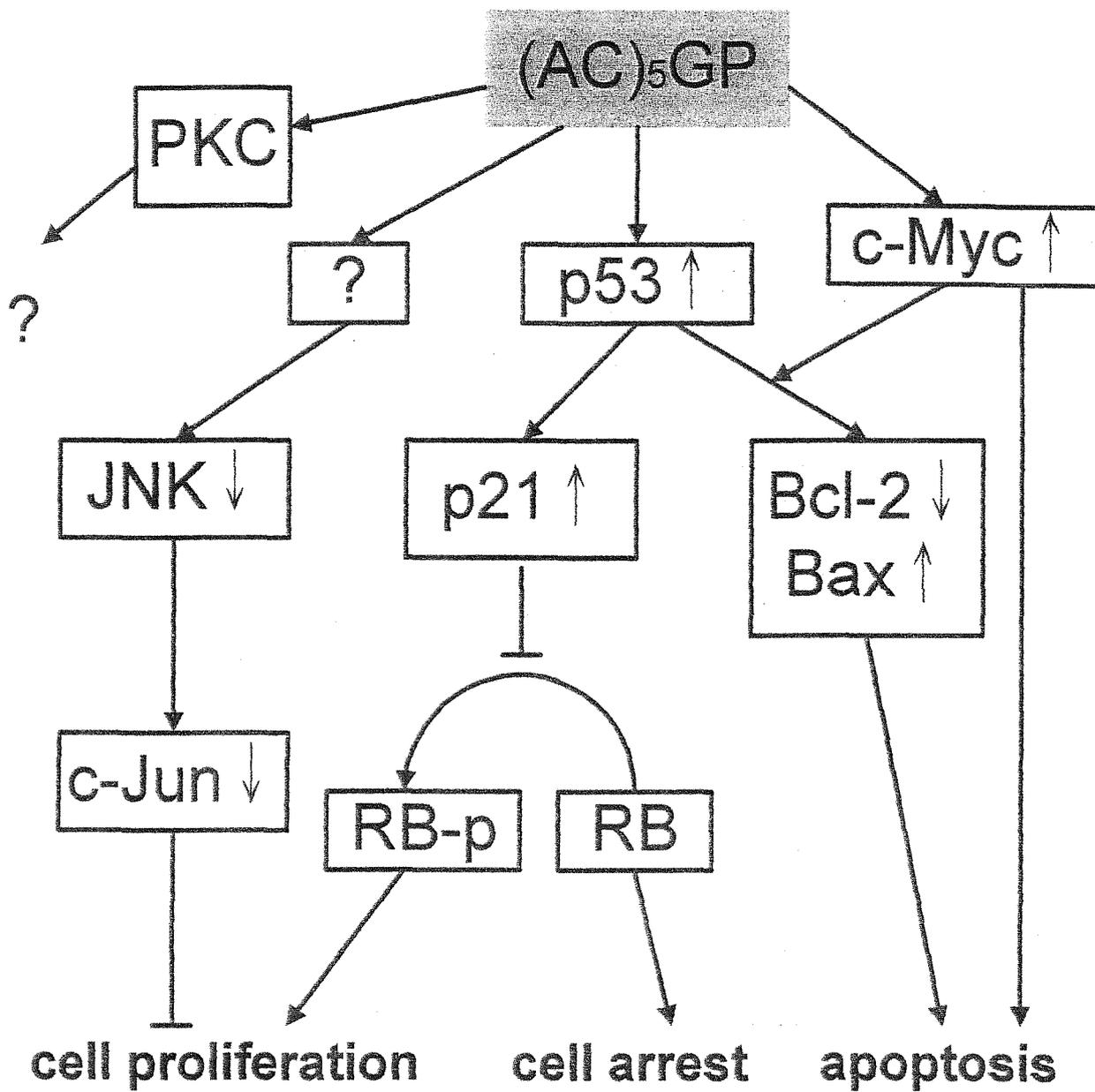


Fig. 35. Scheme depicting the effect of (AC)₅GP on C-6 glioma cells.

參考文獻

1. Miyasita, S. (1976) A historical study of chinese drugs for the treatment of Jaundice. *AM. J. Chin Med.*, 4(3), 239-243
2. Lin, J. K. and Wang, C. J. (1986) Protection of crocin dyes on the acute hepatic damage induced by aflatoxin B1 and dimethylnitrosamine in rats. *Carcinogenesis*, 7, 595-599
3. Inouye, H., Takeda, Y., Saito, S., Nishimura, H. and Sakuragi, R. (1974) Studies on monoterpene glucosides and related natural products. XXV. On the iridoid glucosides of *Gardenia jasminoides*. *Yskugaku Zasshi*, 94, 577-586.
4. Endo, T. and Taguchi, H. (1973) The constituents of *Gardenia jasminoides*: geniposide and genipin gentiobioside. *Chem. Pharm. Bull.*, 21, 2684-2688
5. Lau, F.T.K. and Pak, R.C.K. (1986) Effect of *Gardenia jasminoides* and geniposide on hepatic drug-metabolizing enzyme activities implications for α -naphthylisothio-cyanate-induced hepatotoxicity. *Asia Pac. J. Pharmacol.*, 1, 91-98
6. Wang, C. J., Wang, S. W. and Lin J. K. (1991) Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats.
7. Wang, C. J., Tseng, T. H. and Lin, J. k. (1992) Penta-acetyl geniposide: isolation, identification and primary effect on anti-C6 glioma cell in vitro. *Anticancer Res.*, 12, 911-916
8. Tseng, T.H., Chu, C.Y. and Wang, C. J. (1992) Inhibition of penta-acetyl geniposide on AFB1-induced genotoxicity in C3H10T1/2 cells. *Cancer Lett.*, 62, 233-242
9. Wang, C. J., Chu, C. Y., Tseng, T. H. and Lin, J. K. (1993) Penta-acetyl geniposide inhibits the growth and development of C-6 glioma cells in rats. *Cancer Lett.*, 70, 113-118
10. Arai T et al,(1995) Role of apoptosis in modulation of the growth of human colorectal tubular and vilious adenomas. *J Pathology*, 176, 37-

11. Yonish-Rouach E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. and Oren, M. (1991) Wild type p53 induce apoptosis in myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 352, 345-347
12. Eischen C.M., Kottke, T.J., Basi, G.S., Tung, J.A., Earnshaw, W.C., Leibson, P.J. and Kaufmann, S.H. (1997) Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood*, 90(3), 935-943.
13. Bakhshi, A., J. P. Jensen, P. Goldman, J.J. Wright, O. W. McBride, A. L. Epstein, and S.J. Korsmeyer. 1985, Cloning the chromosomal breakpoint of the t (14:18) human lymphomas: Clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*, 41, 889-906
14. Vaux, D.L., Cory, S. and Adams, R.M. (1988) Bcl-2 promotes the survival of haemopoietic cells and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335, 440-442
15. LeBrun, D.P., Warnke, R.A. and Cleary. M.L. (1993) Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests role in morphogenesis. *Am. J. Pathol.* 142, 743-753
16. Nunez, G., Hockenbery, D. McDonnell, T.J. Sorensen, C.M. and Korsmeyer, S.J. (1991) Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature*, 353, 71-73
17. Strasser, A., Harris, A.W. Corcoran, L.M. and Cory, S. (1994) Bcl-2 expression promotes B- but not T-lymphoid development in scid mice. *Nature*, 368, 457-460
18. McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P. and Korsmeyer, A.J. (1989) Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, 57, 79-88
19. Steinman, H.M. The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant (1995) *J. of biol. Chem.*, 270(8), 3487-3490
20. Hunter, J.J. and Parslow, T.G. (1996) A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. *J. of Biol. chem.*, 271(15), 8521-8524

21. Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., and Harris, C.C. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 22, 3551-3555
22. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825
23. Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299
24. Buckbinder, L., Talbott, R., Valesco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B.R., and Kley, N. (1995) Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 377, 646-649
25. Askew, D.S., Ashmun, R.A., Simmons, B.C. and Cleveland, J.L. (1991) Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6, 1915-1922
26. Marcu, K.B., Bossone, S.A., and Patel, A.J. (1992) myc function and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 809
27. Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Drenth, L.Z. and Hancock, D.C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblast by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128
28. Hermeking, H. and Eick, D. (1994) Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science*, 265, 2091-2093
29. Bissonette, R., Echeverri, F., Mahboubi, A. and Green, D. (1992) Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 359, 552-554
30. Lee, J.Y., Hannun Y.A. and Obeid, L.M. (1996) Ceramide inactivates cellular protein kinase C- α . *J Biol. Chem.* 272, 13169-13174
31. Moore, N.C., Jenkinson, E.J. and Owen, J.J. (1992) Effects of the thymic microenvironment on the response of thymocytes to

stimulation. *Eur J Immunol* , 22, 2533-2537

32. Pongracz, J., Tuffley, W., Johnson, G.D., Deacon, E.M., Bbumett, D. and Stockley, R.A. (1995) Changes in protein kinase C isoenzyme expression associated with apoptosis in U937 myelomonocytic cells. *Exp. Cell Res.*, 218, 430-438
33. Reader, S., Moutardier, V. and Denizeau, F. (1999) Tributyltin triggers apoptosis in trout hepatocytes: the role of Ca^{+} , protein kinase C and proteases. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1448, 473-485
34. Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. and Sweet, W. (1968) Differentiated rat glioma cell strain in tissue culture. *Science*, 161, 370-371
35. Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S. and Nishizuka, Y. (1992) Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain: subcellular distribution, purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 257, 13341-13348
36. Liu, J.Y., Lin, S.J. and Lin, J.K. (1993) Inhibitory effect of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) in NIH3T3 cells. *Carcinogenesis*, 14, 857-861
37. Ausubel, F.M., Breat, R., Kingston, R.E., More, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., (1987) *Current protocols in Molecular Biology*
38. Bohmann, D., Bos, T.T., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K. and Tjian, R., (1987) Human protooncogene c-Jun encodes a DNA binding protein with structure and functional properties of transcription factor AP-1, *Science*, 1238, 1386-1392
39. Curran, T., (1988) Fos in the oncogene hand book. (Reddy, E.P., et al eds.) Elsevier Science publisher, The Netherland, 307-326
40. Piechaczyk, M., Blanchard, J.M., Marty, L., Dary, C., Panabiere, F., Sabouty, S., Fort, P.H. and Jeanteur, P.H., (1984) Posttranscriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in rat tissue. *Nucleic Acid Res.*, 12, 6851-6853
41. Sambrook, J., Eritsh, E.F., Maniatis, T., (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd ed. Cold spring Harbor Laboratory Press, cold

spring Harbor.

42. Pieter, C., and Nicolatte, S., (1987) Single-stepp method of RNA isolation by acid guanidinum thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159
43. Hermeking, H. and Eick, D., (1994) Mediation of c-Myc –induced apoptosis by p53. *Science*, 265, 2091-2093
44. Shao Z. M., Dawson M.I., Li, X.S., Rishi, A.K., Sheikh, M.S., Han, Q.X., Ordonez, J.V., Shroot, B. and Fontana, J.A. (1995) p53 independent Go/G1 arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast cancer cells. *Oncogene* 11(3), 493-504.
45. Hermeking, H., and Eick, D. (1994) Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 265(5181), 2091-2093
46. Amati, B., Littlewood, T.D., Evan, G.I. and Land H. (1993) The c-Myc protein induced cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *EMBO J.* 12,5083—5087
47. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1/cyclin-dependent Kinases. *Cell* 75 (4), 805-816
48. Deacon, E.M., Pongracz, J., Griffiths, G. and Lord, J.M. (1997) Isoenzyme of protein kinase C: different involvement in apoptosis and pathogenesis. *Mollecular Pathology* 50, 124-131
49. Henttu, P. and Vihko, P. (1998) The protein kinase C activator, phorbol ester, elicits disparate functional responses in androgen-sensitive and androgen-independent human prostatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 (1) 167-171