

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告
C-Jun N-terminal kinase 在 Tamoxifen 所引起神經膠質瘤細胞的
凋亡中所扮演的角色

Role of the c-Jun-N-terminal Kinase in the Apoptosis of the
Glioma Cells Induced by Tamoxifen

計畫編號：NSC 89-2314-B-002-278

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：林瑞明 國立台灣大學醫學院附設醫院外科部

共同主持人：曾勝弘 國立台灣大學醫學院附設醫院外科部

一、中文摘要

本研究主要探討 c-Jun-N-terminal kinase-1 (JNK1)及 caspase 3 在 Tamoxifen 所引起的神經膠質瘤細胞的凋亡中的角色。以 tamoxifen 治療大鼠 RT-2 神經膠質瘤細胞，然後進行 cytotoxicity assay，結果發現 tamoxifen 對於神經膠質瘤細胞有細胞毒性，而其 IC50 (殺死 50%細胞的 tamoxifen 濃度)在 micromolar 範圍。Flow-activated cell sorter (FACS) 分析發現 tamoxifen 造成神經膠質瘤細胞的凋亡與其濃度及用藥時間有關。Western blot analysis 證明 tamoxifen 增加神經膠質瘤細胞的 phospho-specific JNK1 且較高濃度的 tamoxifen 會有較強的 phospho-specific JNK1 的表現，以 50 μ M tamoxifen 治療 4 小時會使 phospho-specific JNK1 的表現增強為 3 倍。Caspase activity assay 發現 tamoxifen 也會增加神經膠質瘤細胞的 caspase 3 的活性。在 tamoxifen 治療前以 JNK1 的 antisense oligonucleotide 治療會抑制 caspase 3 的活性，且會將細胞凋亡程度由 51%降至 28%。在 tamoxifen 治療前以 caspase 3 抑制劑(DEVD-CHO)治療會將細胞凋亡程度由 51%降至 19%。此結果顯示 tamoxifen 所造成的神經膠質瘤細胞的凋亡與 JNK1/caspase 3 訊息通路的刺激有關。

關鍵詞：Tamoxifen，c-Jun N-terminal kinase，神經膠質瘤，凋亡，caspase

Abstract

The mechanisms of the antitumor effects of tamoxifen upon the gliomas are still unclear. In this study, we investigated the role of the c-Jun-N-terminal kinase-1 (JNK1) and caspase 3 in the tamoxifen-induced apoptosis of glioma cells. Rat RT-2 glioma cells were treated with tamoxifen. A cytotoxicity assay revealed that tamoxifen exerted cytotoxic effects upon glioma cells, with the IC50 (the concentration of tamoxifen at which 50% of the glioma cells were killed) lying in the micromolar range. Flow-activated cell sorter (FACS) analysis revealed that tamoxifen induced apoptosis of the glioma cells in a concentration- and time-dependent manner. Western blot analysis demonstrated that tamoxifen increased the expression of phospho-specific JNK1 in glioma cells, and an increasing concentration of tamoxifen induced an increasing expression of phospho-specific JNK1. Four-hour 50 μ M tamoxifen treatment increased the expression of phospho-specific JNK1 to three times that of the control level in glioma cells. A caspase activity assay demonstrated that tamoxifen also increased the activity of caspase 3 in glioma cells. Pretreatment of glioma cells with the antisense oligonucleotide of JNK1 immediately prior to tamoxifen treatment suppressed the activity of caspase 3. The apoptosis fraction of glioma cells induced by four-hour treatment with 50 μ M tamoxifen was decreased from 51% to 28% by pretreatment

with the antisense oligonucleotide of JNK1, and to 19% by pretreatment with caspase 3 inhibitor (DEVD-CHO). The results suggest that the tamoxifen-induced apoptosis of glioma cells is related to the activation of the JNK1/caspase 3 signaling pathway.

Keywords: Tamoxifen, c-Jun N-terminal kinase, glioma, apoptosis

二、緣由與目的

神經膠質瘤是惡性腦瘤中最常見的一種，神經膠質瘤細胞會表現較高的 protein kinase C (PKC) 的活性，在神經膠質瘤，PKC 活性的提高與細胞的增殖分裂有關[4]，而且 PKC 的細胞內訊息傳遞系統的抑制劑會抑制神經膠質瘤細胞的增殖分裂，引起細胞凋亡[1,3,5,16]。Tamoxifen 是一種非類固醇類的抗動情激素藥(anti-estrogen drug)，可抑制有荷爾蒙依賴性(hormone-dependent)的癌細胞的生長，而且除了應用在有荷爾蒙依賴性的癌症的治療外，也逐漸被應用在無荷爾蒙依賴性的癌症，目前其臨床上的應用範圍包括乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、肝癌、胰臟癌、腎癌、黑色素瘤、及 desmoid tumor 等的治療[8,9,22]。由於 tamoxifen 有抑制 PKC 的作用，影響其 catalytic subunit 的活性[15,17,18]，而且 tamoxifen 可以通過 blood-brain barrier[21]，所以近年來也被嘗試用來治療神經膠質瘤。

雖然 tamoxifen 可以抑制細胞的增殖分裂，但是 tamoxifen 在神經膠質瘤細胞的作用機轉並不清楚。Tamoxifen 對於乳癌細胞的增殖分裂的影響與所使用的濃度有關，nanomolar 的濃度只有 anti-estrogen 的作用，對於乳癌細胞會引起 G0/G1 arrest，是 cytostatic 的作用，甚至在低濃度下 tamoxifen 可能有輕微促進細胞分裂的作用；相對的，較高的 micromolar 的濃度才能產生與 estrogen receptor 無關的 cytotoxic 的作用，引起細胞凋亡，也就是說 tamoxifen 是作用在 cell cycle progression 及凋亡之間的 checkpoint [1,2,7,19]。至於 tamoxifen 應用在無荷爾蒙依賴性的癌症的治療，其作用機轉可能

與抗動情激素的作用無關，但是真正的作用機轉仍不清楚。

各種不同的外來刺激可能會經由 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 作訊息傳遞，MAPK 是 serine/threonine kinase family 的一種，不同的 MAPK 受到不同的刺激會引起不同的反應。JNK 是 MAPK 的一種，是各種不同刺激的共同訊息傳遞途徑，會和其他的訊息整合 [6]。MAPK 是細胞凋亡的細胞內訊息傳遞的重要媒介，其中 JNK 在 nerve growth factor-deprived PC12 細胞所發生的凋亡扮演重要的角色，會抑制細胞生長，使細胞死亡[20,23,24]。有關 tamoxifen 對於 JNK 的作用的研究報告很少，曾有報告發現 tamoxifen 會抑制周邊血液的 T 細胞的 JNK 的表現[12]，但另有報告指出 tamoxifen 會刺激 cervical cancer cell line 的 JNK 的表現，而且 JNK 對於 tamoxifen 引起的基因表現的調節扮演重要的角色 [6]，這些結果並不一致，所以 tamoxifen 造成細胞的凋亡是否與 JNK 的激發有關仍不清楚，而文獻上亦未有關於 tamoxifen 作用在神經膠質瘤細胞所引起的細胞凋亡與 JNK 的變化的相關性的研究。本計畫針對 tamoxifen 對於神經膠質瘤細胞的作用，是否引起細胞的凋亡，是否會刺激神經膠質瘤細胞的 JNK 的表現，細胞的凋亡是否與 JNK 的表現有關等方面做深一層的探討，希望能進一步了解 tamoxifen 對於神經膠質瘤細胞的作用及細胞內的訊息傳遞等作用機轉。

三、結果與討論

本研究主要探討 c-Jun-N-terminal kinase-1 (JNK1) 及 caspase 3 在 Tamoxifen 所引起的神經膠質瘤細胞的凋亡中的角色。以 tamoxifen 治療大鼠 RT-2 神經膠質瘤細胞，然後進行 cytotoxicity assay，結果發現 tamoxifen 對於神經膠質瘤細胞有細胞毒性，而其 IC50 (殺死 50% 細胞的 tamoxifen 濃度) 在 micromolar 範圍，此結果與其他腫瘤例如 hepatoblastoma、pituitary tumor、leukemia 相近 [10,11,13]，表示可能是經由 hormone-independent mechanism

發揮作用。Flow-activated cell sorter (FACS) 分析發現 tamoxifen 造成神經膠質瘤細胞的凋亡與其濃度及用藥時間有關，較長時間較高濃度的 tamoxifen 治療引起明顯的細胞凋亡。Tamoxifen 會抑制 T 細胞的 JNK 的表現[12]，但是卻會刺激 cervical 及 breast cancer cells 的 JNK 的表現[6,14]。文獻上只有一篇報告證明 JNK1 訊息通路在 tamoxifen 引起的 breast cancer cells 凋亡中扮演重要角色[14]。在本研究中，Western blot analysis 證明 tamoxifen 增加神經膠質瘤細胞的 phospho-specific JNK1 且較高濃度的 tamoxifen 會有較強的 phospho-specific JNK1 的表現，以 50 μ M tamoxifen 治療 4 小時會使 phospho-specific JNK1 的表現增強為 3 倍。Caspase activity assay 發現 tamoxifen 也會增加神經膠質瘤細胞的 caspase 3 的活性。在 tamoxifen 治療前以 JNK1 的 antisense oligonucleotide 治療會抑制 caspase 3 的活性，且會將細胞凋亡程度由 51% 降至 28%。在 tamoxifen 治療前以 caspase 3 抑制劑(DEVD-CHO)治療會將細胞凋亡程度由 51% 降至 19%。此結果顯示 tamoxifen 所造成的神經膠質瘤細胞的凋亡與 JNK1/ caspase 3 訊息通路的刺激有關。文獻上未有論文報告證明 tamoxifen 在神經膠質瘤細胞所引起的細胞凋亡是經由 JNK1/ caspase 3 訊息通路而發生的。

四、計畫成果自評

本計畫的進度及內容大致與原計畫相符，結果發現 tamoxifen 會刺激 JNK1 及 caspase 3 的活性，並引起 RT-2 細胞的凋亡。而 JNK1 的 antisense oligonucleotide 會抑制 caspase 3 的活性，並減少 RT-2 細胞的凋亡，證明 tamoxifen 引起 RT-2 細胞的凋亡是經由 JNK1/caspase 3 訊息通路。目前文獻上並無論文探討 tamoxifen 作用在神經膠質瘤細胞時，細胞之 JNK 及 caspase 的變化，現已將研究結果整理寫成論文，投稿至外國醫學雜誌。

五、參考文獻

1. Baltuch GH, et al: Neurosurgery 33:495-501, 1993.

2. Chen HM, et al: J Cell Biochem 61:9-17, 1996.
3. Couldwell WT, et al: Neurosurgery 31:717-724, 1992.
4. Couldwell WT, et al: Clin Cancer Res 2:619-622, 1996.
5. Couldwell WT, et al: Neurosurgery 29:880-887, 1991.
6. Duh JL, et al: Pharm Res 14:186-189, 1997.
7. Ferlini C, et al: Br J Cancer 79:257-263, 1999.
8. Gelmann EP: Semin Oncol 24 (suppl):S1-65-S1-70, 1997.
9. Harris JR, et al: N Engl J Med 327:473-480, 1992.
10. Hayon T, et al: Anticancer Res 19:2089-2094, 1999.
11. Kim JA, et al: Cancer Lett 147:115-123, 1999.
12. Komi J, et al: Scan J Immunol 48:254-260, 1998.
13. Lee SY, et al: Neurosurgery 43:116-123, 1998.
14. Mandlekar S, et al: Cancer Res 60:5995-6000, 2000.
15. Nakadate T, et al: Biochem Pharmacol 37:1541-1545, 1988.
16. Nishizuka Y: Science 258:607-614, 1992.
17. O'Brian CA, et al: Cancer Res 45:2462-2465, 1985.
18. O'Brian CA, et al: J Natl Cancer Inst 80:1628-1633, 1988.
19. Osborne CK, et al: Cancer Res 43: 3583-3585, 1983.
20. Park DS, et al: J Biol Chem 271:21898-21905, 1996.
21. Pollack IF, et al: Cancer Res 50:7134-7138, 1990.
22. Sunderland MC, et al: J Clin Oncol 9:1283-1297, 1991.
23. Verheij M, et al: Nature 380:75-79, 1996.
24. Xia Z, et al: Science 270:1326-1331, 1995.