

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※ Tamoxifen 引起神經膠質瘤細胞凋亡時所造成的 ※
※ c-Jun N-terminal kinase 1 的下游訊息通路的變化 ※
※ The change of the down stream signaling ※
※ pathway of the c-Jun N-terminal kinase 1 in the ※
※ apoptosis of glioma cells induced by tamoxifen ※
※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC90-2314-B-002-418-

執行期間： 90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：林 瑞 明

共同主持人：曾 勝 弘

計畫參與人員：王 植 賢、陳 佳 康、陳 芸

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學醫學院附設醫院外科部

中 華 民 國 91 年 10 月 5 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

Tamoxifen 引起神經膠質瘤細胞凋亡時所造成的 c-Jun

N-terminal kinase 1 的下游訊息通路的變化

The change of the down stream signaling pathway of the c-Jun N-terminal kinase 1 in the apoptosis of glioma cells induced by tamoxifen

計畫編號：NSC 90-2314-B-002-418

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 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

計畫參與人員：王植賢、陳佳康、陳芸

一、中文摘要

我們先前的研究發現 tamoxifen 會引起神經膠質瘤細胞的凋亡，而且會使細胞的 c-Jun-N-terminal kinase 1 (JNK1) 的表現及活性增強，JNK 的活性與神經膠質瘤細胞的凋亡有關。在本計畫中，我們觀察 tamoxifen 處理後的神經膠質瘤細胞的 JNK1 訊息傳遞通路的下游的 activated transcriptional factor 2 (ATF2)、c-Jun、JunD 的磷酸化，bcl-2 family 及 p53 等的改變，並探討 caspase 9 是否受到刺激。另外我們也以 JNK1 的 antisense oligonucleotide 來抑制 JNK1 的表現，觀察前述各種蛋白質的表現是否不同。結果發現 tamoxifen 可使神經膠質瘤細胞 c-Jun 及 Jun D 的磷酸化增加，使 bax、p53 的表現增加，bcl-2 的表現減少，caspase 9 的活性提高，但對於 ATF-2 則沒有影響。以 JNK1 的 antisense oligonucleotide 抑制其 JNK1 的表現，可使 tamoxifen 對於上述各種蛋白質的表現及活性的作用受到抑制，這證明 JNK1 訊息傳遞通路在 tamoxifen 所引起的細胞凋亡過程中扮演重要的角色，而且此細胞凋亡與 bax、p53、bcl-2 的表現的改變，及 caspase 9 活性的提高有關。

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

Abstract

Our previous study had found

tamoxifen induces apoptosis of the glioma cells and increased the expression and activity of the c-Jun-N-terminal kinase 1 (JNK1). The activity of the JNK1 is related to the apoptosis of the glioma cells. In this project, we investigate the change of the downstream of the JNK1 signaling pathway and related factors (ATF-2, c-Jun, JunD, bcl-2, bax, p53, caspase 9) in the glioma cells after tamoxifen treatment. Also we study the change of the expression of these proteins whenever the JNK1 is suppressed by antisense oligonucleotide of JNK1. We found that tamoxifen increased the phosphorylation of c-Jun and Jun D, the expression of bax and p53, decreased the expression of bcl-2, enhanced the activity of caspase 9 in the glioma cells, however, it had no effect on ATF-2. Inhibition of JNK1 by antisense oligonucleotide suppressed the effects of tamoxifen on the proteins mentioned above except ATF-2. The results suggested that JNK1 signaling pathway played an important role in the tamoxifen-induced apoptosis of the glioma cells. In addition, this cellular apoptosis was related to the change of the expression of bax, p53, bcl-2, the activation of caspase 9.

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

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，其活性是正常神經膠細胞的千倍以上[8]。在神經膠質瘤，PKC 活性的提高與細胞的增殖分裂有關[7]，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[1,5,8,27]。這些現象顯示 PKC 系統在神經膠質瘤細胞的生長調節方面扮演重要的角色，而 PKC 抑制劑可能可以被用來治療神經膠質瘤。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[15,18,35]。由於 tamoxifen 有抑制 PKC 的作用[25,28,29]，而且 tamoxifen 可以通過 blood-brain barrier [33] 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 [1,3,13,31]。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，且其在神經膠質瘤細胞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[4]，將訊息從細胞表面傳遞至細胞核的重要媒介[2,4,9,16,24,26,37]。MAPK 至少包括四種 subtypes，包括 extracellular signal-regulated kinase

(ERK)、p38 MAPK、ERK5/big MAPK 1 (BMK1)、及 c-Jun N-terminal kinase (JNK) [30]。JNK 與細胞受到 stress 時的反應有關，又稱為 stress-activated protein kinase cascade [21,38]，JNK 可能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，與細胞凋亡有關[11]，而 Tamoxifen 會造成 leukemia, ovarian cancer, pituitary tumor, breast cancer 及 glioma 等腫瘤細胞的凋亡(apoptosis) [6,12,13,22,23,32]，所以 tamoxifen 所引起的神經膠質瘤細胞的凋亡可能與 JNK 的激發有關。JNK 的 gene family 相當複雜，從 3 個已發現的基因進行 alternative splicing 產生了至少 10 個 isoforms [10,17]，而 JNK 1、2、3 都存在於腦部[17,39]，所以 JNK 在腦組織中特別重要[14]。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[20]，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 [11]，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。我們先前的研究發現 tamoxifen 會引起神經膠質瘤細胞的凋亡，其作用與藥物濃度有關，而且 tamoxifen 會升高 JNK1 的活性，以 antisense oligonucleotide 抑制 JNK1 的活性會將神經膠質瘤細胞的凋亡比率由約 50% 降低一半，表示 JNK1 與 tamoxifen 引起神經膠質瘤細胞的凋亡有關。JNK1 的上游為 Rho family (包括 cdc42, rac, 及 rho 等)，p21-activated kinase (PAK)，MAPK kinase kinase (MEKK1)，MAPK kinase (MKK4/7)，下游則至少包括幾個途徑，例如 ATF-2，c-Jun，JunD 等 substrates 而發揮作用，然後再進一步經由 bcl-2 family, p53, caspase 等使細胞發生凋亡[10,19,30,34,36,40]。tamoxifen 作用在神經膠質瘤細胞時會刺激 JNK 的表現，但是當中經過什麼途徑並不清楚，目前文獻上尚沒有這方面的研究，因此在本計畫中，我們擬更進一步去探討 tamoxifen 所造成的 JNK 的下游相關的訊息通路的改變，希望能更深入的了解

相關的神經膠質瘤細胞的細胞內變化。如果進行順利，我們將在下一年進行 JNK 的上游相關的訊息通路的改變的研究。

三、結果與討論

在本計畫中，我們觀察 tamoxifen 處理後的神經膠質瘤細胞的 JNK1 訊息傳遞通路的下游的 activated transcriptional factor 2 (ATF2)、c-Jun、JunD 的磷酸化，bcl-2 family 及 p53 等的改變，並探討 caspase 9 的活性是否受到刺激，結果發現隨著 tamoxifen 濃度的增加，RT-2 神經膠質瘤細胞的 c-Jun 及 Jun D 的磷酸化程度也逐步增加，最高增加了 3.2 倍及 2.5 倍，此外其 bax、p53 的表現也跟著增加，相反的，bcl-2 的表現減少，也就是說 tamoxifen 使 bcl-2/bax ratio 降低，另外我們也發現經 tamoxifen 治療過的 RT-2 神經膠質瘤細胞的 caspase 9 的活性也提高為 1.7 倍，但是 tamoxifen 對於 ATF-2 的磷酸化則沒有作用。然後我們以 JNK1 的 antisense oligonucleotide 抑制 RT-2 神經膠質瘤細胞的 JNK1 的表現，結果發現可使 tamoxifen 對於上述各種蛋白質的表現及活性的作用受到抑制，這些結果證明 JNK1 訊息傳遞通路在 tamoxifen 所引起的細胞凋亡過程中扮演重要的角色，而且是經由 c-Jun 及 Jun D 的磷酸化進一步造成後續細胞凋亡，但與 ATF-2 無關。此外這種細胞凋亡與 bax、p53、bcl-2 的表現的改變，及 caspase 9 的活性的提高有關。這些結果銜接了去年的研究計畫所證明的 tamoxifen 在神經膠質瘤細胞所引起的細胞凋亡是經由 JNK1/caspase 3 訊息通路而發生的結果。

四、計畫成果自評

因經費問題，本計畫著重在 tamoxifen 對於 JNK1 下游的訊息通路及 p53, bcl-2, bax, 及 caspase 9 的影響，研究進行過程尚稱順利，結果發現 tamoxifen 可使神經膠質瘤細胞 c-Jun、及 Jun D 的磷酸化增加，使 bax、p53 的表現增加，bcl-2 的表現減少，caspase 9 及 caspase 3 的活性提高，但對於 ATF-2 則沒有影響。以 JNK1 的 antisense oligonucleotide 抑制其 JNK1 的表現，可使

tamoxifen 對於上述各種蛋白質的表現及活性的作用受到抑制，這證明 JNK1 訊息傳遞通路在 tamoxifen 所引起的細胞凋亡過程中扮演重要的角色，而且此細胞凋亡與 bax、p53、bcl-2 的表現的改變，及 caspase 9 活性的提高有關。目前正將研究結果整理寫成論文。

五、參考文獻

- 1.Baltuch GH, et al: Neurosurgery 33: 495-501, 1993.
- 2.Castagne V, et al: Brain Res 842:215-9, 1999.
- 3.Chen HM, et al: J Cell Biochem 61: 9-17, 1996.
- 4.Cobb MH, et al: J Biol Chem 270: 14843-6, 1995.
- 5.Couldwell WT, et al: Neurosurgery 31: 717-24, 1992.
- 6.Couldwell WT, et al: FEBS Letters 345: 43-6, 1994.
- 7.Couldwell WT, et al: Clin Cancer Res 2:619-22, 1996.
- 8.Couldwell WT, et al: Neurosurgery 29:880-7, 1991.
- 9.Davis RJ: J Biol Chem 268:14553-6, 1993.
- 10.Davis RJ: Cell 103:239-52, 2000.
- 11.Duh JL, et al: Pharm Res 14:186-9, 1997.
- 12.Etreby MFE, et al: Breast Cancer Res & Treat 51:149-68, 1998.
- 13.Ferlini C, et al: Br J Cancer 79:257-63, 1999.
- 14.Ferrer I, et al: NeuroReport 8:2483-7, 1997.
- 15.Gelmann EP: Semin Oncol 24 (suppl): S1-65-S1-70, 1997.
- 16.Gotoh Y, et al: Progress Cell Cycle Res 1:287-97, 1995.
- 17.Gupta S, et al: EMBO J 15:2760-70, 1996.
- 18.Harris JR, et al: N Engl J Med 327: 473-80, 1992.
- 19.Herlaar E, et al: Mol Med Today 5:439-47, 1999.
- 20.Komi J, et al: Scan J Immunol 48:254-60, 1998.
- 21.Kyriakis JM, et al: Nature 369:156-60,

- 1994.
- 22.Lee SY, et al: Neurosurgery 43:116-23, 1998.
- 23.Maccarrone M, et al: FEBS Lett 434: 421-4, 1998.
- 24.Marshall CJ: Opin Genet Dev 4:82-9, 1994.
- 25.Nakadate T, et al: Biochem Pharmacol 37:1541-5, 1988.
- 26.Nishida E, et al: Trends Biochem Sci 18:128-31, 1993.
- 27.Nishizuka Y: Science 258:607-14, 1992.
- 28.O'Brian CA, et al: Cancer Res 45: 2462-5, 1985.
- 29.O'Brian CA, et al: J Natl Cancer Inst 80:1628-33, 1988.
- 30.Ono K, et al: Cell Signal 12:1-13, 2000.
- 31.Osborne CK, et al: Cancer Res 43: 3583-5, 1983.
- 32.Ozaki I, et al: J Biol Chem 274:5310-7, 1999.
- 33.Pollack IF, et al: Cancer Res 50: 7134-8, 1990.
- 34.Stone AA, et al: Exp Cell Res 254:110-9, 2000.
- 35.Sunderland MC, et al: J Clin Oncol 9:1283-97, 1991.
- 36.Swiatecka J, et al: Neoplasma 47:15-24, 2000.
- 37.Tournier C, et al: Proc Natl Acad Sci USA 94:7337-42, 1997.
- 38.Yan M, et al: Nature 372:798-800, 1994.
- 39.Yang DD, et al: Nature 389:865-70, 1997.
- 40.Zhang GJ, et al: Clin Cancer Res 5: 2971-7, 1999.