

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 細胞分化和細胞凋亡對胚胎細胞生長的調控

計畫類別： 個別型計畫          整合型計畫  
計畫編號：NSC 90 - 2314 - B - 002 - 189 -  
執行期間：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：李建南 主治醫師

共同主持人：

計畫參與人員：

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婦產科

中 華 民 國 九 十 年 十 月 二 十 八 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

### Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 90-2314-B-002-189

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：李建南 國立台灣大學醫學院婦產科

#### 一、中文摘要

根據文獻指出，當細胞或組織處在缺氧狀態下，一些促細胞凋亡分子如 Bax、Bak 有大量表現的情形，進而導致細胞凋亡現象增加。根據 1990 年 Laurini *et al.* 報告指出在子宮內缺氧的病例中有超過三分之一皆表現出胚胎缺血病變 - 絨毛組織缺血的病理變化，其主要的變化為在妊娠囊的絨毛組織發生出血或缺血反應，可能造成原因為子宮胎盤血流不良，進一步影響胎兒發育。

本研究以人類臍靜脈血管內皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) 及小鼠幹細胞株 (Mouse Embryonic Stem Cell line) 及類胚胎體 (Embryoid Body) 培養，來模擬胎盤血管內皮細胞及胚胎發育。結果顯示人類臍靜脈內皮細胞，隨缺氧時間增加至 48 小時，而小鼠類胚胎體在缺氧時間增加至 96 小時，細胞凋亡的數目在人類臍靜脈內皮細胞及小鼠類胚胎體兩組均有增加，尤其在人類臍靜脈內皮細胞更明顯增加 17.04±3.52%，而小鼠類胚胎體增加至 2.15±0.66% (p<0.01)，顯示缺氧確實會誘導人類臍靜脈內皮細胞及類胚胎體發生細胞凋亡。缺氧是生物體內胎盤發育重要的訊息媒介，包括發炎、免疫反應以及細胞的生長與分化，都需要缺氧參與其中，因此也廣泛的受到科學家們的注意。在我們的實驗中證實，缺氧會誘導包括人類臍靜脈內皮細胞與小鼠類胚胎體發生細胞凋亡作用，並且利用專一性的 p53 抗體，能有效偵測缺氧所誘發的細胞死亡時 p53 蛋白表現量變化的情形。

**關鍵詞：**人類臍靜脈血管內皮細胞、小鼠幹細胞株、類胚胎體、缺氧、細胞凋亡。

#### 二、英文摘要

HUVECs and mouse Embryoid bodies are presented as vascular endothelial cells and embryo in vitro. They are put in hypoxic jar mimicking hypoxic condition. DNA fragmentation, Proapoptotic & anti-apoptotic proteins and p53 by Western blot and TUNEL staining by FACS are performed to identify apoptosis.

Typical DNA fragmentation demonstrated increased DNA fragmentation in HUVECs and mouse EBs cell exposed to hypoxia by time (Figure 1 and Figure 4). TUNEL staining by FACS analysis confirmed that in HUVECs there was a significant increase in the rate of apoptosis proportionally hypoxic period from 0 h to 48 h (0.18±0.03% vs 17.04±3.52%, respectively) (Figure 3). TUNEL staining by FACS analysis confirmed that in mouse EBs cell there was a increase in the rate of apoptosis proportionally hypoxic period from 0 h to 96 h (0.32±0.10% vs 2.15±0.66%, respectively) (Figure 6). By multiple regression analysis, the percentage of apoptotic cells significantly elevated and changed by time (ANOVA, p < 0.01) in hypoxia. To elucidate the involvement of Bcl-2-like proteins in hypoxia-induced apoptosis in HUVECs and mouse EBs cell in vitro, Western blot analysis was performed after 0, 6, 12, 24 and 48 h of hypoxia. Bcl-2 protein expression was not significantly affected. In contrast, the expression of the proapoptotic protein Bax was increased upon hypoxia. Moreover, p53 expression also was increased in both groups (Figure 2 and Figure 4).

We concluded that HUVECs and mouse Embryoid Body exposed to hypoxia showed an increased rate of apoptosis. The induction of apoptosis in HUVECs and mouse

Embryoid Body correlated with increase of p53 & Bax protein expression.

**Keywords:** HUVECs, Embryoid bodies, Hypoxia, Apoptosis.

## 二、計畫緣由與目的

根據文獻指出，當細胞或組織處在缺氧狀態下，一些促細胞凋亡分子如 Bax、Bak 有大量表現的情形，進而導致細胞凋亡現象增加。根據 1990 年 Laurini *et al.* 報告指出在子宮內缺氧的病例中有超過三分之一皆表現出胚胎缺血病變 - 絨毛組織缺血的病理變化，其主要的變化為在妊娠囊的絨毛組織發生出血或缺血反應，可能造成原因為子宮胎盤血流不良，進一步影響胎兒發育。推論於早期懷孕時若發生子宮胎盤血流減少可能造成胎盤組織及胎兒發育不良，其可能原因為缺氧狀態下導致細胞凋亡現象增加所造成。初期子宮胎盤血流減少，引起組織缺氧，血管內皮細胞首先受到影響，Bcl-2/Bax 比例變小，進行細胞凋亡，核內核 DNA 斷裂增加。假若缺氧狀態不改善，則更進一步影響胚胎發育，甚而造成胚胎死亡。

以人類臍靜脈血管內皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cell)及小鼠幹細胞株(Mouse Embryonic Stem Cell line)及類胚胎體(Embryoid Body)培養，來模擬胎盤血管內皮細胞及胚胎發育，作為本研究的實驗模式。在實驗室中，給予培養細胞缺氧狀態，藉以觀察缺氧情形下對人類臍靜脈血管內皮細胞及小鼠類胚胎體之影響，並研究抗細胞凋亡分子及促細胞凋亡分子之表現。

## 三、結果與討論

### 結果

以人類臍靜脈內皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVECs)及小鼠類胚胎體(Mouse Embryoid body)之細胞模式，DNA 片段分析證明細胞隨缺氧天數的增加，細胞凋亡現象亦增加(Figure 1,4)。利用西方點墨法分析人類臍靜脈內皮細胞及小鼠類胚胎體在缺氧狀態下所造成的細胞凋亡蛋白質變化(Figure 2,5): 結果顯示 p53 蛋白質隨缺氧時間的增加，其表現

量也明顯提高；而 Bax 蛋白質在缺氧 6 小時開始至 48 小時，其表現特別明顯增加；但 Bcl-2 蛋白質於缺氧 0 小時、6 小時、12 小時、24 小時及 48 小時，均沒有明顯的改變。由此我們推論缺氧時，人類臍靜脈內皮細胞及小鼠類胚胎體隨缺氧時間增加，p53 和 Bax 蛋白質亦明顯增加，但 Bcl-2 蛋白質於缺氧 0 小時、6 小時、12 小時、24 小時及 48 小時，並沒有明顯的改變，顯示缺氧時，細胞會誘導 p53 蛋白質表現，經由 Bax 蛋白質調控，進一步誘導細胞凋亡。另外我們以流式細胞技術儀(FACS analysis)，以 TUNEL assay 分析測定細胞凋亡，結果顯示人類臍靜脈內皮細胞，隨缺氧時間增加至 48 小時，而小鼠類胚胎體在缺氧時間增加至 96 小時，細胞凋亡的數目在人類臍靜脈內皮細胞及小鼠類胚胎體兩組均有增加，尤其在人類臍靜脈內皮細胞更明顯增加  $17.04 \pm 3.52\%$ ，而小鼠類胚胎體增加至  $2.15 \pm 0.66\%$  ( $p < 0.01$ )，顯示缺氧確實會誘導人類臍靜脈內皮細胞及類胚胎體發生細胞凋亡(Figure 3,6)。在正常培養下，取相同時間點作分析，兩者細胞凋亡之數目，並沒有明顯變化。人類臍靜脈內皮細胞在缺氧狀態下，發生細胞凋亡的數目比小鼠類胚胎體多且所需的時間短，其原因可能為人類臍靜脈內皮細胞為成熟及單一形式之細胞對缺氧的變化較敏感，細胞較容易發生細胞凋亡；小鼠類胚胎體為未成熟及多種形式細胞，對缺氧的反應可能不是只有發生細胞凋亡，可能誘發其他存活因子的作用，進一步抑制細胞發生細胞凋亡，所以小鼠類胚胎體在較長時間缺氧下發生細胞凋亡的百分比比較少。

綜合以上所述，我們提出了一個結論：當細胞受到缺氧的刺激而引發細胞凋亡的過程中，受到 HIF-1 $\alpha$  轉錄因子的活化，進一步的促使細胞內 p53 的表現發生改變，藉以增加促細胞凋亡蛋白 Bax 的改變。在原本決定細胞生存或死亡的 Bcl-2/Bax 的平衡發生改變後，便進一步的刺激包括粒腺體 Cytochrome c 釋出，進一步活化 caspase 3，最後細胞凋亡的現象便開始發生。

### 討論

缺氧是生物體內胎盤發育重要的訊息媒介，包括發炎、免疫反應以及細胞的生長與分化，都需要缺氧參與其中(2)，因此也廣泛的受到科學家們的注意。雖然先前已有研究報告顯示，缺氧會誘導人類子宮頸癌、乳癌等發生細胞凋亡(3, 4)，但其真正的機轉到現在仍然不是很清楚。在我們的實驗中證實，缺氧會誘導包括人類臍靜脈內皮細胞與小鼠類胚胎體發生細胞凋亡作用，並且利用專一性的 p53 抗體，能有效偵測缺氧所誘發的細胞死亡時，p53 蛋白表現量變化的情形。因此，其所透過的機轉與 p53 蛋白有密切而直接的關係，同時也看到抗細胞凋亡蛋白 Bax 隨著細胞缺氧 24 小時後亦有表現量增加的情形。Bcl-2 家族的成員是細胞凋亡過程中重要的調控者，Bcl-2 與 p53 兩種蛋白之間的關係雖然還不是非常清楚，但在稍早研究中曾指出 M1 人類血癌細胞，若使其大量表現 p53 會促使 Bax 蛋白量顯著增加。研究人員之前就曾經指出缺氧可能會藉由誘導 Bcl-2 蛋白的表現，增加細胞的抗性(5, 6)，但我們的研究結果顯示 Bcl-2 蛋白的似乎沒有包含在缺氧誘導人類臍靜脈內皮細胞與小鼠類胚胎體細胞，產生抗細胞凋亡能力的機轉中，反而是 Bax 蛋白會受到 hypoxia 的影響大量表現。雖然實驗結果顯示，Bax 蛋白可能是在缺氧下引起細胞凋亡的重要因子，但 Bax 基因起始位置的調控區至今尚未完全研究清楚，究竟 Bax 如何受到缺氧的調控，以及其真正的作用機轉，仍需要更多的研究才能瞭解。

缺氧被證明具有促進細胞凋亡的能力(7, 8)，它促進細胞凋亡的模式可能是藉由 HIF-1 $\alpha$  直接調控 p53 的活性，進而抑制細胞凋亡現象的發生，而非像抗癌藥物或 ionising radiation (IR)，radio-mimetic drugs，ultraviolet light (UV) 是藉由造成 DNA damage 或調控死亡訊號以達成控制細胞凋亡的情形。一般而言，缺氧引起 P53 基因表現量的增加與其他 DNA-damage agents 造成 p53 表現量改變的情形類似，都能發現在 cell cycle 的運作上受到了改變，並會造成細胞週期停留在 G<sub>2</sub>/M phase。另外，缺氧本身並不會攻擊損傷 DNA，但它卻同樣能影響許多種類的蛋白酵素

(protein kinases)，例如 protein kinase C 及 Phosphatidylinositol 3-kinase 等酵素的活化(9-12)。因此，在透過缺氧所誘發的 p53 是否就遵循著 HIF-1 來執行其訊息傳遞路徑仍不得而知。

在先前的研究報導中指出，在受到缺氧的刺激下，除了在 Bcl-2 家族蛋白的表現量發生改變之外，也可以見到 p53 的下游基因 p21<sup>CIP/WAF-1</sup> 及 Gadd45 蛋白量確實也會隨著 p53 蛋白的變化而有相似的變化情形。然而，這部份的研究結果與其他實驗室所得結果不盡相同，稍早的研究曾指出對於細胞 DNA 有傷害的藥物，誘導 p53 大量表現的機轉是透過轉錄後的作用機轉(post-transcriptional mechanism)(13, 14)，這與本實驗的發現不一致，這樣的差異與選擇的細胞或藥物不同可能有關連性。無論如何，釐清缺氧究竟是如何去調控細胞內 p53 蛋白變化的機轉，有待更多的研究。

一般而言增加 p53 蛋白在細胞內的聚積量，會促使細胞走向凋亡(8)。研究報告指出：降低 p53 蛋白的量，同時也會抑制細胞內包括 Bax、Bcl-X、Cip 等蛋白的產生(15, 16)。將細胞暴露在抗癌藥物如 cisplatin 下會促使 p53 蛋白大量產生，但是在一些沒有促細胞凋亡蛋白如 Bax 表現的細胞中，即使用 cisplatin 處理，不但不會有 p53 蛋白的表現，細胞凋亡作用亦不會發生(17)。在我們的實驗材料中人類臍靜脈內皮細胞與胚胎體細胞中是否有其他類似 p53 的蛋白與 Bcl-X、Cip 等蛋白產生包含在缺氧所誘導的死亡路徑中，有待更進一步的瞭解。

綜合以上所討論的各點，我們提出了一個結論：當細胞受到缺氧的刺激而引發細胞凋亡的過程中，受到 HIF-1 轉錄因子的活化，進一步的促使細胞內 p53 的表現發生改變，藉以增加促細胞凋亡蛋白 Bax 的改變。在原本決定細胞生存或死亡的 Bcl-2/Bax 的平衡發生改變後，便進一步的刺激包括 caspase 3 的活化，最後細胞凋亡的現象便開始發生。

#### 四、參考文獻

1. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Itoh, Y., Hasegawa, J., Yamabe, K., Otsuki, Y., Matsuda, H., and Tsujimoto,

- Y. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res*, 56: 2161-2166, 1996.
2. Caniggia, I. and Winter, J. L. Adriana and Luisa Castellucci Award Lecture 2001 Hypoxia Inducible Factor-1: Oxygen Regulation of Trophoblast Differentiation in Normal and Pre-eclamptic Pregnancies-A Review. *Placenta*, 23 Suppl A: S47-57, 2002.
  3. Formigli, L., Zecchi Orlandini, S., Capaccioli, S., Poupon, M. F., and Bani, D. Energy-dependent types of cell death in MCF-7 breast cancer cell tumors implanted into nude mice. *Cells Tissues Organs*, 170: 99-110, 2002.
  4. Haensgen, G., Krause, U., Becker, A., Stadler, P., Lautenschlaeger, C., Wohlrab, W., Rath, F. W., Molls, M., and Dunst, J. Tumor hypoxia, p53, and prognosis in cervical cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 50: 865-872, 2001.
  5. Jung, F., Weiland, U., Johns, R. A., Ihling, C., and Dimmeler, S. Chronic hypoxia induces apoptosis in cardiac myocytes: a possible role for Bcl-2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 286: 419-425, 2001.
  6. Riva, C., Chevrier, C., Pasqual, N., Saks, V., and Rossi, A. Bcl-2/Bax protein expression in heart, slow-twitch and fast-twitch muscles in young rats growing under chronic hypoxia conditions. *Mol Cell Biochem*, 226: 9-16, 2001.
  7. Lakin, N. D. and Jackson, S. P. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, 18: 7644-7655, 1999.
  8. Shen, Y. and White, E. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res*, 82: 55-84, 2001.
  9. Arsham, A. M., Plas, D. R., Thompson, C. B., and Simon, M. C. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Is Neither Required for Hypoxic Stabilization of HIF-1alpha nor Sufficient for HIF-1-dependent Target Gene Transcription. *J Biol Chem*, 277: 15162-15170, 2002.
  10. Gozal, D., Gozal, E., and Simakajornboon, N. Signaling pathways of the acute hypoxic ventilatory response in the nucleus tractus solitarius. *Respir Physiol*, 121: 209-221, 2000.
  11. Jiang, B. H., Jiang, G., Zheng, J. Z., Lu, Z., Hunter, T., and Vogt, P. K. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ*, 12: 363-369, 2001.
  12. Song, M. S., Park, Y. K., Lee, J. H., and Park, K. Induction of glucose-regulated protein 78 by chronic hypoxia in human gastric tumor cells through a protein kinase C-epsilon/ERK/AP-1 signaling cascade. *Cancer Res*, 61: 8322-8330, 2001.
  13. Chang, J. T., Shevach, E. M., and Segal, B. M. Regulation of interleukin (IL)-12 receptor beta2 subunit expression by endogenous IL-12: a critical step in the differentiation of pathogenic autoreactive T cells. *J Exp Med*, 189: 969-978, 1999.
  14. Kren, B. T., Trembley, J. H., and Steer, C. J. Alterations in mRNA stability during rat liver regeneration. *Am J Physiol*, 270: G763-777, 1996.
  15. Burger, H., Nooter, K., Boersma, A. W., Kortland, C. J., and Stoter, G. Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer*, 73: 592-599, 1997.
  16. Burger, H., Nooter, K., Boersma, A. W., Kortland, C. J., van den Berg, A. P., and Stoter, G. Expression of p53, p21/WAF/CIP, Bcl-2, Bax, Bcl-x, and Bak in radiation-induced apoptosis in testicular germ cell tumor lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 41: 415-424, 1998.
  17. Zhang, L., Yu, J., Park, B. H., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*, 290: 989-992, 2000.

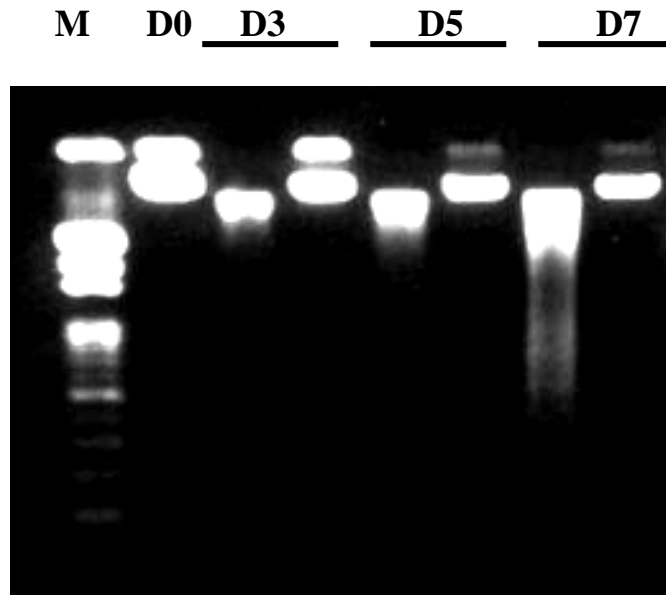


Figure1. 我們將人類臍靜脈內皮細胞放在缺氧培養筒中，Hypoxia Jar 中並置入 Anaerobic Gas Pak 模擬缺氧狀態，分別收集第 0 天、3 天、5 天及 7 天的懸浮液，取約  $1 \times 10^6$  個細胞結果顯示隨缺氧天數的增加 DNA fragmentation 現象增加，表示人類臍靜脈內皮細胞隨缺氧天數的增加，細胞凋亡現象增

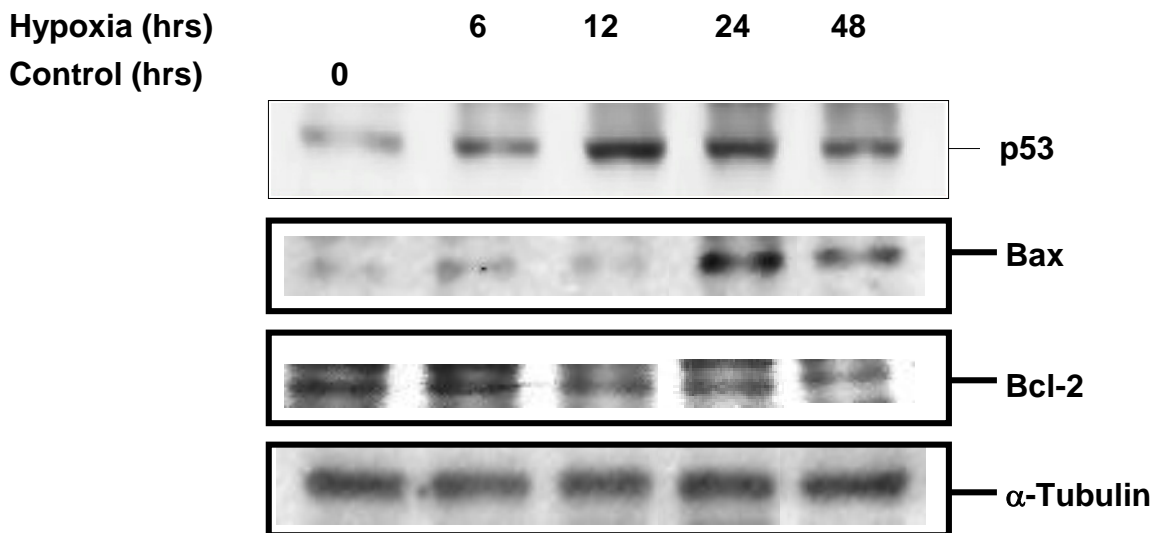


Figure 2. 人類臍靜脈內皮細胞缺氧 0, 6, 12, 24, 48 小時以西方點墨法測 p53、Bax、Bcl-2 蛋白質的表現，以  $\alpha$ -tubulin 為 internal control。結果顯示 p53 蛋白質隨缺氧時間從 6 小時開始，其表現增加，尤其在 12 小時及 24 小時 p53 蛋白質表現特別明顯；而 Bax 蛋白質在人類臍靜脈內皮細胞缺氧 24 小時及 48 小時，其表現明顯增加；Bcl-蛋白質於缺氧 0 小時至

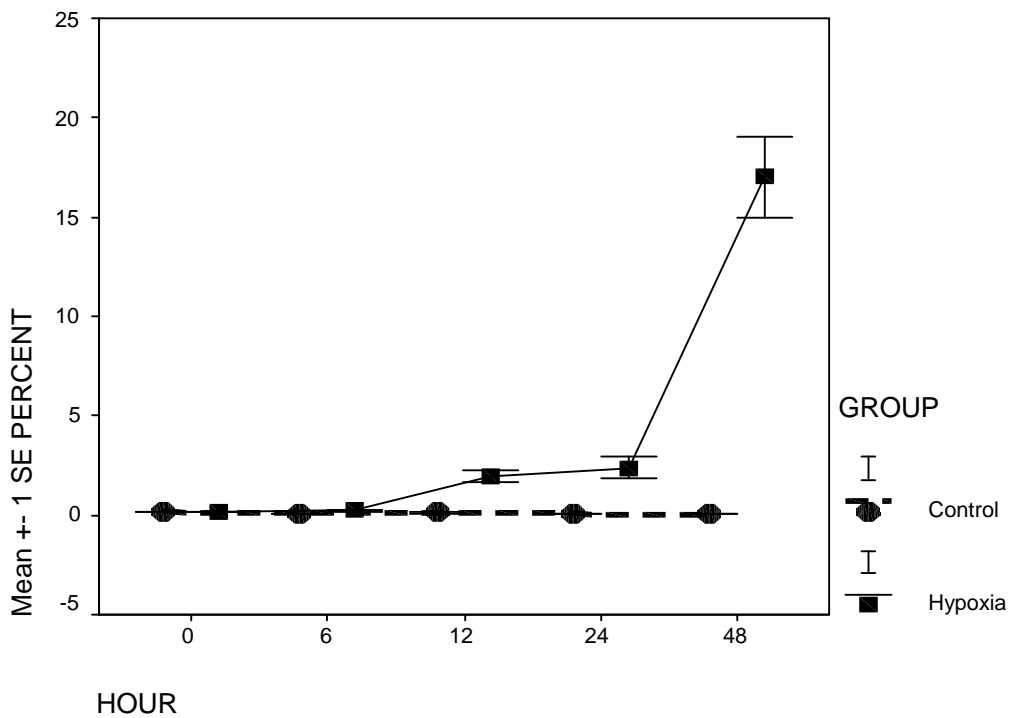
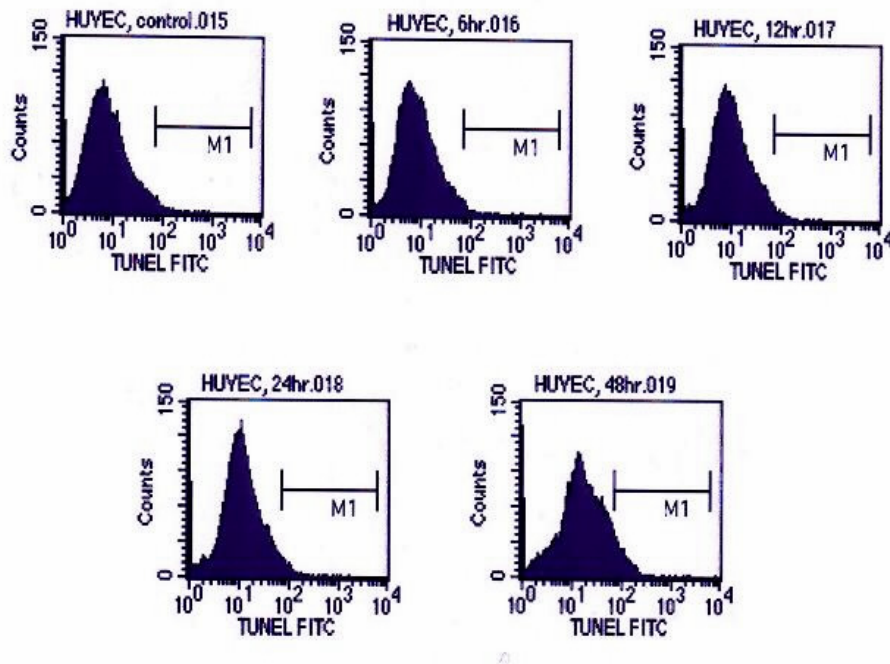


Figure3. 以 TUNEL assay 測定細胞凋亡，結果顯示人類臍靜脈內皮細胞，隨缺氧時間增加至 48 小時，細胞凋亡的數目由  $0.18 \pm 0.03\%$  增加至  $17.04 \pm 3.52\%$ ，以 ANOVA test  $p < 0.01$ ，統計學上有顯著差異；缺氧確實會誘導人類臍靜脈內皮細胞發生細胞凋亡。

M P D0 D3 D5 D7

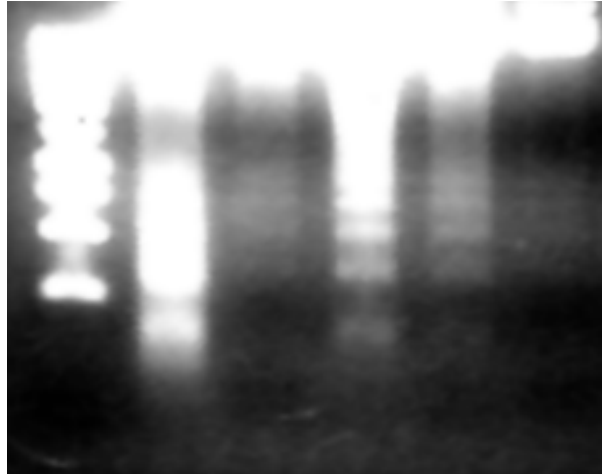


Figure 4. 類胚胎體 DNA Fragmentation 我們將類胚胎體放在缺氧培養筒中，分別收集第 0 天、3 天、5 天及 7 天的懸浮液，取約  $1 \times 10^6$  個細胞顯示隨缺氧天數的增加 DNA fragmentation 現象增加，尤其在第 3 天 DNA fragmentation 特別明顯，但在第 5 天及第 7 天 DNA fragmentation 反而變淡，經推測其中可能原因為缺氧時間太久，凋亡細胞已完全溶解，DNA 片段並沒有在離心過程收集下，所以在第 7 天 DNA fragmentation 反而變淡；表示人類胚胎體隨缺氧天數的增加，細胞凋亡現象增加；M：Marker，P：Positive

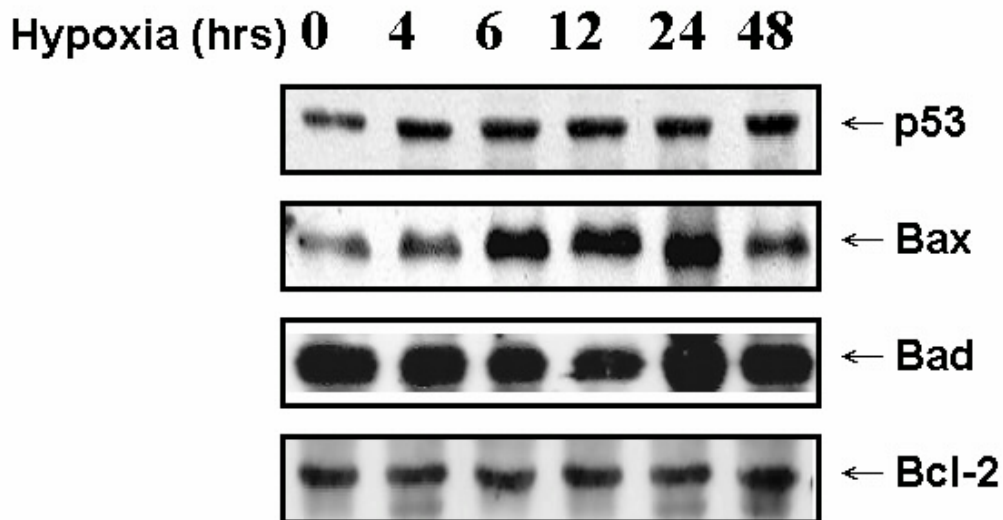


Figure5. 類胚胎體缺氧 0, 4, 6, 12, 24, 48 小時以西方點墨法測 p53、Bax、Bcl-2 蛋白質的表現，以 Bad 為 internal control。結果顯示 p53 蛋白質隨缺氧時間的增加，其表現增加；而 Bax 蛋白質在類胚胎體缺氧 6 小時、12 小時及 24 小時，其表現特別明顯增加；但 Bcl-2 蛋白質於缺氧 0 小時至 48 小時，並沒有明顯的改變，顯示缺氧時，細胞會誘導 p53 及 Bax 蛋白質



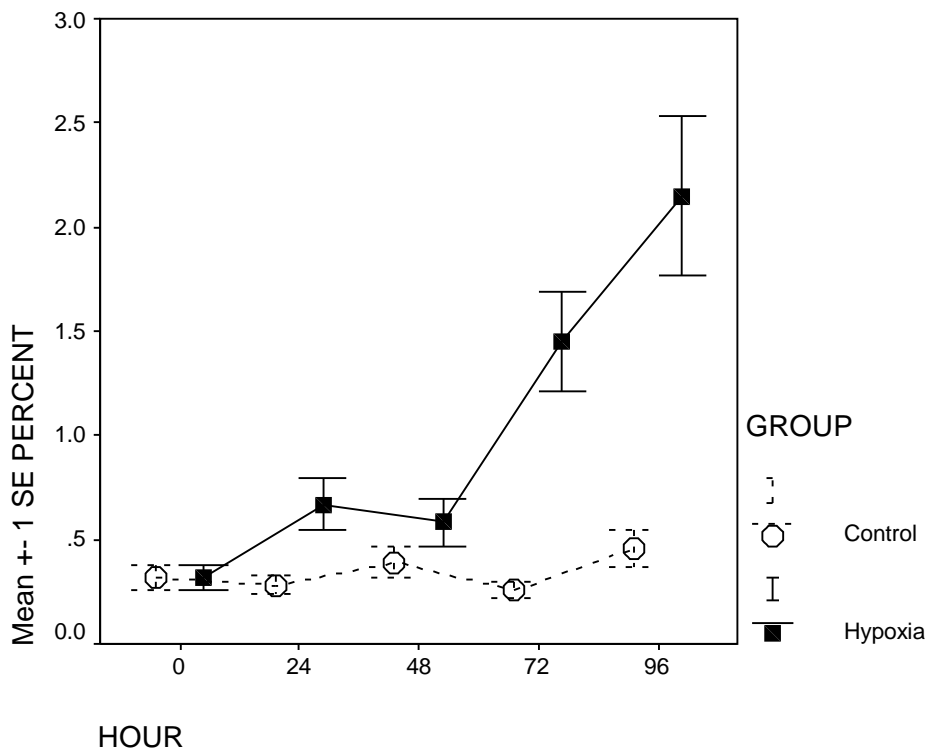
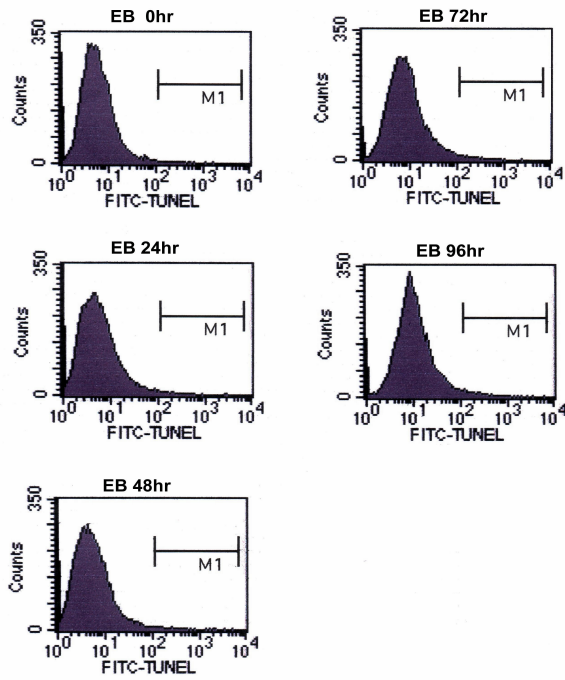


Figure 6. TUNEL assay 以流式細胞技術儀(FACS analysis)測定細胞凋亡，結果顯示類胚胎體，隨缺氧時間增加至 96 小時，細胞凋亡的數目由  $0.32 \pm 0.10\%$  增加至  $2.15 \pm 0.66\%$ ，以 ANOVA test 統計  $p < 0.01$ ，統計學上有顯著差異；缺氧確實會誘導類胚胎體發生細胞凋亡。