叁、結果

一、含外源 B β 1 及 B β 2 之穩定 SK-N-SH 細胞株的表型變化

分別將 pcDNA3-B β 1 以及 pcDNA3-B β 2 質體轉殖送入人類神經腫瘤母細胞 SK-N-SH 後，經 G418 篩選後，可以漸次建立過度表現 B β 1 或 B β 2 的穩定細胞株，並可於含 10%血清的 DMEM 培養液中持續繼代培養。本實驗室所建立之細胞株，包括含有外源 B β 1 的穩定細胞株 B β 1，及含外源 B β 2 穩定的細胞株，B β 2 #1、B β 2 #3、B β 2 #5 和 B β 2 #8，實驗以母細胞作為對照組 (圖三 A)。

此兩種含外源基因的穩定細胞株的體積皆較原始母細胞 SK-N-SH 小。過度表現 B β 2 的細胞株，其中 B β 2 #1 形狀與 SK-N-SH 差異不大，但週邊呈稜角狀，其餘的三個 clone，包括 B β 2 #3、B β 2 #5 和 B β 2 #8 等細胞，其體積皆較母細胞小，並且出現細長的突出纖維，而且極易聚集。

為瞭解轉殖入的 B β 1 或 B β 2 的細胞是否確實會過度表現，由西方點墨法實驗的結果顯示，不論是含有 B β 1 或 B β 2 外源基因的細胞株所偵測得 B β 1 及 B β 2 的密度皆較原始細胞 SK-N-SH 為高 (圖三 B)。

二、 H_2O_2 和 tBHP 對過度表現 B β 1 或 B β 2 穩定細胞株的影響

(一) H_2O_2 對過度表現 PPP2R2B 穩定細胞株影響

1. H_2O_2 抑制 B β 2 細胞株的生長，其效應與 H_2O_2 濃度及反應時間相關

各種細胞株分別以 0、50 或 100 μ M H_2O_2 ，各處理 24 (圖四 A) 與 48 小時 (圖四 B)，再以 MTT 染色後，分析細胞的存活率。實驗結果顯示 H_2O_2 對各個細胞株的生長率有不同程度的抑制，對 B β 2 細胞株的抑制效應，隨濃度上升愈見明顯。實驗顯示，B β 2 #3、B β 2 #5 及 B β 2 #8 對藥物敏感性較高，且隨時間的增加，效應愈見明顯。而 B β 2 #1，對藥物敏感度較低。但是在實驗測試濃度下， H_2O_2 對原始母細胞 SK-N-SH 及 B β 1 細胞影響不顯著。

2. H_2O_2 對各個細胞株的細胞週期有不同的影響

為了要分析 H_2O_2 對各 clone 細胞週期分佈的影響，實驗經 PI 染色，由流式細胞儀觀察的細胞週期變化。由結果顯示 (圖五)，當 100 μ M H_2O_2 處理細胞 48 小時之後，分別有 2.4 與 5.3% 的 SK-N-SH 及 B β 1 的細胞位於 sub-G₁ 期，但 B β 2 的細胞株於 H_2O_2 處理之後，sub-G₁ 期細胞分別增至 21.3 至 70.0%。然而，由 50 μ M H_2O_2 處理的 B β 2 #8 細胞，48 小時之後，估計有 33.7% 的細胞停留在 sub-G₁ 期。

3. H₂O₂ 與細胞凋亡發生的關聯

為了要證實細胞凋亡與 H₂O₂ 有關，實驗再深入利用 Annexin V 與 PI 對 H₂O₂ 處理的細胞後雙重染色，再以流式細胞儀，由細胞於各象限的分佈，這可以對細胞凋亡的產生的時間，有更清楚的瞭解。由圖六的結果顯示，H₂O₂ 濃度的增加，細胞凋亡也隨之增加，由 Q2 象限分佈可以了解細胞凋亡發生於細胞週期的末期。

4. H₂O₂ 引起細胞株中的細胞自噬體產生

為了要更深入瞭解細胞凋亡產生的機制，實驗可利用轉殖 LC3 質體，檢視細胞自噬體的生成，並用 LysoTracker 證實溶酶體 (lysosome) 的相互重疊，可以證實細胞自噬體的存在。從圖七 A-E 可顯示未經處理之 B β 2 clone 中的細胞質即可見到微量的細胞自噬體。但當 H₂O₂ 濃度增加時，可以看出 SK-N-SH 和 B β 1 細胞株，細胞自噬體 (punctuate) 數量雖然會增加，但不如 B β 2 細胞株中所增加的細胞自噬體顯著。

5. 酸性液泡胞器分析

細胞自噬體 (autophagosome) 屬細胞內的酸性液泡的一種，這可以由所加入的 acridine orange，將酸性液泡胞器染成紅色小點，以其密度的多少，作為細胞自噬體產生的標的。實驗結果分別顯示 SK-N-SH、B β 1 和 B β 2 #1 細胞株中，於 50 及 100 μ M H₂O₂ 處理 48

小時之後；另外 B β 2 #3、B β 2 #5 和 B β 2 #8 細胞株經過 H₂O₂ 處理 24 小時後，其酸性液泡皆有明顯增加 (圖八)，這與轉殖 LC3 質體，其 punctuate 密度增加是有一致的結果，但 SK-N-SH 和 B β 1 細胞株中酸性液泡胞器的密度則不若 B β 2 細胞株顯著。實驗顯示，當 H₂O₂ 濃度增加時，B β 2 #3、B β 2 #5 及 B β 2 #8 的酸性液泡胞器為多。此外，B β 1 僅有少量的酸性液泡胞器的出現。

(二) tBHP 對過度表現 B β 1 及 B β 2 之穩定細胞株的影響

1. B β 2 clone 對 tBHP 的敏感度較 H₂O₂ 為高

將 B β 2 clone 分別以 50 或 100 nM tBHP 處理 24 小時之後，B β 2 #3、B β 2 #5 及 B β 2 #8 存活率皆降至 50% 以下 (圖九 A)，而處理 48 小時之後更降至 20% 以下 (圖九 B)，而母細胞株、B β 1 及 B β 2 #1 對 tBHP 敏感度較低，其存活率僅分別降至 80.6%-89.5% 之間。

2. tBHP 影響細胞週期分佈之分析

由流式細胞儀分析顯示 (圖十)，使用 100 nM tBHP 即會使 B β 2 #3 的 sub-G₁ 細胞分佈增至 66%，其他 B β 2 #5 及 B β 2 #1 則會增至 30% 以上。但是 B β 2 #8 於 50 nM tBHP 處理 48 小時後，其 sub-G₁ 細胞卻高於 40%。實驗也顯示，tBHP 對 SK-N-SH 與 B β 1 則沒有影響。

實驗也利用 Annexin V 與 PI 對細胞作雙重染色後，以流式細胞

儀深入瞭解 tBHP 誘導細胞凋亡的過程。由圖十一的結果可得知 B β 2 細胞株的 Q2 phase 的確有不同程度的顯著增加，在 50 nM tBHP 處理 48 小時後，其 Q2 phase 細胞皆超過 50%，這項結果確定了 B β 2 clone 的確是經由細胞凋亡所引發的凋亡，而且是於細胞週期的晚期產生。

3. tBHP 引發 B β 2 細胞株中細胞自噬體

為了更進一步瞭解細胞凋亡發生的原因，實驗利用轉殖 LC3 質體至各細胞株中，以標定細胞自噬體，並藉此可以觀察細胞自噬體是否與溶酶體相互結合。從圖十二 A-F 中顯示，tBHP 引發 B β 2 clone 會引發細胞自噬體，而且隨著濃度的增加，所觀測到細胞自噬體的數量也會隨之增加，但 SK-N-SH 或 B β 1 細胞株中，細胞自噬體的數量僅有微量增加，不同於 B β 2 之 clone 的急遽增加。其中 B β 2 #8 細胞株細胞自噬體表現更為顯著，當 tBHP 的濃度僅 10 nM 時，即可觀察到細胞自噬體的出現，而且隨濃度升至 25 nM，細胞自噬體密度會隨之增加 (圖十二 F)。

4. tBHP 對各細胞株內 LC3 的影響

細胞發生細胞自噬時，會由 18KD 的 LC3 I 會被切為 16 KD 的 LC3 II，而 LC3 II 便會與細胞自噬體的外膜結合。從西方點墨法實驗中 (圖十三)，可觀察到細胞經 tBHP 處理 48 小時後，LC3 I 皆有較未經 tBHP 處理之細胞為多的表現量，而 B β 1、B β 2 #1 以及 B β 2 #8 在

經 48 小時的 tBHP 處理後，LC3 II 有增加的趨勢。

5. 酸性液泡胞器分析

進一步對細胞內的酸性液泡胞器作分析，SK-N-SH、B β 1 和 B β 2 #1 細胞株中，經過 0、50 或 100 nM tBHP 處理 48 小時後，僅有少量酸性液泡胞器出現；而 B β 2 #3 和 #5 細胞株則僅處理 24 小時，而 B β 2 #8 則將濃度調整為 0、10 或 25 nM 處理 24 小時後，經 acridine orange 染色，可以發現 B β 2 細胞株的酸性液泡也皆有不同程度的增加，這樣子的結果與轉殖 LC3 質體表現的結果一致。同樣的，SK-N-SH 和 B β 1 細胞株中酸性液泡的密度也不若 B β 2 細胞株明顯 (圖十四)。此外，將細胞株經 50 nM tBHP 處理後，利用粒線體染劑 MitoTracker 與 LysoTracker 共同染色，觀察粒線體經氧化壓力後是否會被溶酶體所包裹。由結果顯示，B β 2 #3 和 B β 2 #5 細胞未經 tBHP 處理時，溶酶體密度便較 B β 1 高，而經過 tBHP 處理 48 小時後，可發現溶酶體密度提高並和粒線體的位置是相互疊合的，證實細胞自噬發生，溶酶體確實會將受到損壞的粒線體吞入 (圖十五)。

三、抑制細胞自噬作用對氧化壓力所引起之細胞凋亡

1. 細胞自噬之抑制劑 3-methyladenine (3-MA)，可以降低 tBHP 所引發增加 sub-G₁ 期細胞

為了確認 tBHP 所引起的細胞凋亡是否是經由細胞自噬途徑，實驗設計加入細胞自噬之抑制劑。先使用 20 μM 的 3-MA 前處理 24 小時後，再將 3-MA 移除，依細胞的敏感度不同，再加入不同濃度的 tBHP 作 48 小時處理。各細胞株的對應濃度分別是，B β 2 #1 和 B β 2 #5 使用 100 nM 的 tBHP、B β 2 #3 使用 50 nM 以及 B β 2 #8 使用 25 nM。實驗結果顯示，3-MA 會抑制 B β 2 #3 與 B β 2 #5 因 tBHP 所誘發增加 sub-G₁ 期細胞，其中 B β 2 #3 sub-G₁ 期細胞由 43.2 降至 24.8%，而 B β 2 #5 的 sub-G₁ 期細胞則由 24.0 降至 9.1%。此外經 tBHP 處理之 B β 2 #1 和 B β 2 #8，其 sub-G₁ 期細胞則分別自 22.1 與 14.7% 降至 13.7 與 13.0% (圖十六)。

2. 3-MA 對 H₂O₂ 所誘發的酸性液泡胞器的變化

各細胞株皆以 10 μM 3-MA 前處理 24 小時後，將 3-MA 洗去，再加入 50 μM H₂O₂。其中 SK-N-SH、B β 1 和 B β 2 #1 細胞株分別與 H₂O₂ 反應 48 小時，而 B β 2 #3、B β 2 #5 和 B β 2 #8 細胞株中則分別與 H₂O₂ 反應 24 小時之後，再各別使用 acridine orange 染色，以鑑定酸

性液泡胞器自噬體的出現。實驗結果顯示 (圖十七)，以 3-MA 作前處理的細胞會以不同程度抑制因 H_2O_2 對細胞所誘發的酸性液泡胞器，尤其是 B β 2 #3 和 B β 2 #5 細胞株經 3-MA 處理之後，其酸性液泡胞器密度有明顯降低，因此可以判定 3-MA 於 B β 2 細胞株中會抑制 H_2O_2 所誘發之酸性液泡胞器，此外也可判定 H_2O_2 所引發的細胞凋亡與細胞自噬的發生有關。

3. 3-MA 對 tBHP 所引發之酸性液泡胞器的影響

為了瞭解 tBHP 所引發酸性液泡胞器的變化，是否也會受到細胞自噬所調控，實驗也先以 10 μ M 3-MA 前處理細胞 24 小時後，再分別加入 0 或 50 nM tBHP。其中 SK-N-SH、B β 1 和 B β 2 #1 等細胞株中反應 48 小時，而 B β 2 #3 和 B β 2 #5 細胞株中則僅反應 24 小時後，再加入 acridine orange 將細胞染色，但細胞敏感性較強的 B β 2 #8 細胞株卻只以 25 nM 處理 24 小時，便予染色。實驗顯示 (圖十八)，與 H_2O_2 處理的結果相似，3-MA 也會抑制因 tBHP 所誘發產生的酸性液泡胞器。這個結果對 B β 2 #1 和 B β 2 #5 這兩種細胞株中最為明顯，但 3-MA 對 B β 2 #8 抑制效應較不明顯，這可能與 B β 2 #8 敏感度較高有關。

四、過度表現 PPP2R2B 的穩定細胞株於低濃度血清成分下的變化

1. 血清濃度降低影響細胞存活率

為了要模擬缺少養分對各式轉殖神經細胞的改變，可以利用遞減細胞培養液內血清濃度。實驗設計分別利用 0.5 及 0.1% 血清及不含血清狀態下，觀察細胞的生長變化，並與 10% 濃度正常生長狀況下作比較。

在正常狀態下培養之細胞，當血清濃度降低至 0.5、0.1% 直至完全沒有血清的情況培養 24 小時之後，細胞存活率會逐漸下降 (圖十九 A)，而延長至 48 小時之後 (圖十九 B)，僅 SK-N-SH 在不含任何血清狀況仍有大於 50% 存活率，其餘細胞存活率皆小於 50%。

2. 含有低血清培養液會引發 B β 1 但不是 B β 2 細胞株的凋亡

實驗分析顯示，當細胞於無血清狀態下 24 小時後 (圖二十 A)，除了 SK-N-SH 細胞株的 sub-G₁ 期仍維持在 3.2%，沒有顯著的變動外，其餘過度表現 B β 蛋白質的細胞株皆會隨血清的濃度下降，而 sub-G₁ 期細胞比例上升程度有不同的變化，其中 B β 1 細胞株於無血清狀況下，會增加至 24.1%，其他 B β 2 的細胞株，其 sub-G₁ 細胞則分佈於 12-21% 之間。但在無血清 48 小時之後 (圖二十 B)，實驗母細胞 SK-N-SH 的 sub-G₁ 期細胞比例改變不大，但 B β 1 細胞株的 sub-G₁ 期

細胞則有大幅的改變。其中血清濃度由 10%調降至 0.5 及 0.1%時，其 sub-G₁ 期細胞分別由 2.4 增至 21.3 及 31.0%，而在全無血清的狀態下，更是增至 65.7%，但反觀所有 B β 2 細胞株，其 24 與 48 小時 sub-G₁ 期的細胞分佈，並沒有顯著的差異，其 sub-G₁ 期細胞皆分佈在 9.0 與 23.4%之間。

3. 降低培養液中血清含量使得酸性液泡胞器增加

在完全血清狀態下培養之細胞，將血清濃度減少為 0.5，0.1%或完全無血清狀態下，經 48 小時培養後，可發現各細胞株之酸性液泡胞器因血清濃度降低而改變，由圖二十一可發現到 SK-N-SH、B β 1 B β 2 #1 等細胞株，當隨血清濃度遞減時，其酸性液泡胞器會先增加，且於血清濃度 0.1%時達最大數量，但是於無血清的狀態下，酸性液泡的表現量卻會降低，推測可能於 48 小時之後細胞已經進入凋亡。但 B β 2 其它 clone，如 B β 2 #3、B β 2 #5 和 B β 2 #8 細胞株中幾乎無法分辨其酸性液泡量的變化。