

臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學科

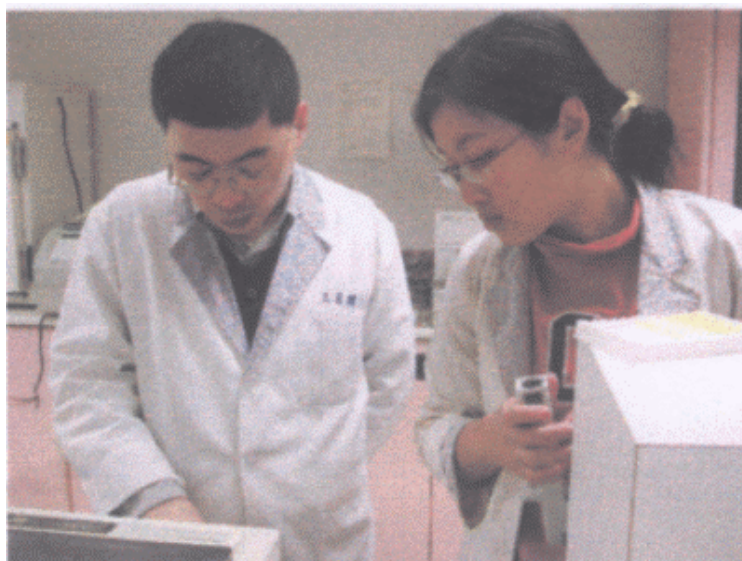
作品名稱：突變 ras 基因造成過度表現在骨髓間質幹細胞啓
動氧自由基誘導細胞凋亡

得獎獎項：醫學與健康科學科第二名

學 校：高雄市立高雄女子高級中學

作 者：楊媿涵

作者簡介



作者: 楊媿涵 高雄女中二年級
指導老師: 高雄長庚醫院 王逢興博士
高雄女中 劉亮吟、黃昆輝老師

我是楊媿涵，來自有草根性的南部。父母親都是老師，還有一個就讀國小的妹妹以及四個月大的弟弟。去年很幸運的有機會代表台灣出國參賽，這激起了我對研究更大的興趣。這一次我們試著了解氧自由基和細胞生長與凋亡的關係 我們發現了一些很有趣的結果，卻也發現了更多等待解答的問題。這是在課本上知識所沒有的！課本上的知識大多已有結論或歸納過得知識，然而研究結果有許多都和一開始的假說有出入，而且前因後果一下子也分不太出來。這樣的研究經驗，使得我行事作為以及思緒更加的周密;更叫人相信 21 世紀必定有許多有趣生物科技與健康科技等著我們去開發。

突變 ras 基因造成過度表現在骨髓間質幹細胞啟動氧自由基誘導細胞凋亡

Overexpression of ras dominant mutant induces an oxygen radical-mediated cell apoptosis in bone marrow mesenchymal HS-5 cells

中文摘要：

特定基因的表現與不同氧自由基的產生，已知會影響細胞的生長和死亡。我個人有興趣利用間質幹細胞體外培養擴充，以為筋骨組織再生的可能應用。因此利用轉植(transfect)突變 ras 基因(Glu61Leu)進入骨髓間質細胞株(HS-5 cells)，來控制 ras 基因表現的高低，進而研究這些間質細胞隨著 Ras 蛋白質表現的高低，對氧自由基引導細胞生長與死亡之影響。結果發現 ras 基因高度表現的間質細胞生長減緩；相較於原生株平均減少 62.4%。進一步研究其生長減少是否與細胞凋亡有關，發現 ras 基因高度表現的間質細胞凋亡確實比原生株高 22.6%。探究其凋亡原因，發現與 caspase-3 有關但和粒腺體功能無關：因為 caspase-3 有活化，但是以粒腺體膜電位螢光追蹤劑 JC-1 測得的膜電位卻沒有改變。追蹤 ras 基因高度表現的間質細胞其細胞內氧自由基的產量，發現 Ras 高度表現株其細胞內氧自由基明顯增加。當細胞外加入超氧根轉化酵素(SOD, 500 U/ml)去清除超氧根時，對 Ras 高度表現細胞的凋亡沒有影響；但是外加觸化酵素(catalase, 500u/ml)於培養液中，卻可以抑制 ras 基因高度表現的間質細胞內 caspase-3 活化和細胞凋亡；並且增加細胞生長循環促進分子 Cyclin D1 的表現。從這些研究我們歸結出兩點重要新發現: 1) ras 基因突變造成 Ras 高度表現時，會促成細胞內特定氧自由基產生，使得細胞生長減緩並進行細胞凋亡，只有特定抗氧化酵素(catalase)才能恢復其異常； 2) Ras 蛋白高度表現而引導氧自由基產生的細胞凋亡與 caspase-3 活化有關，但與粒腺體功能無關。根據這些發現，未來我們或許可以朝調節特定氧化還原反應或使用 caspase-3 抑制劑去調控間質幹細胞的生長，以供筋骨組織再生的應用。

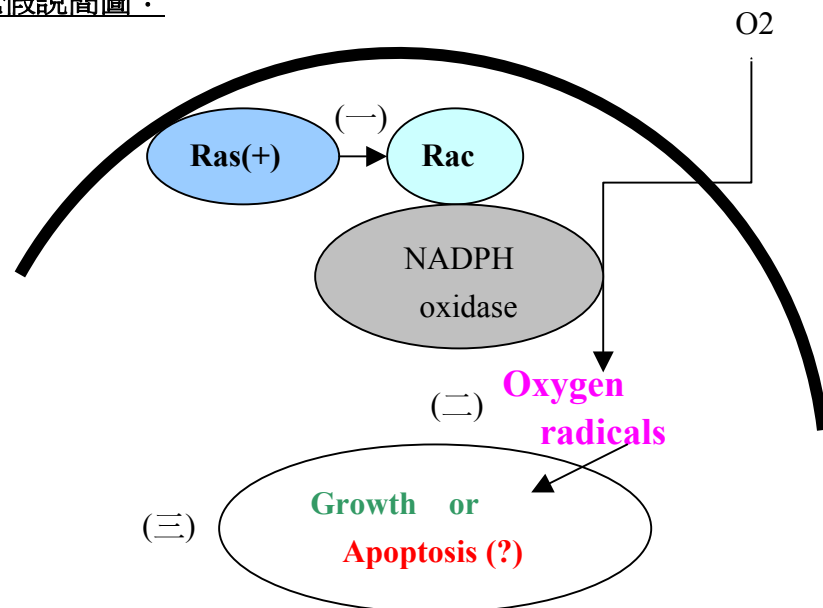
English Abstract:

Certain gene's expression as well as different species of oxygen radicals can affect cell growth and apoptosis. We are interested in amplifying mesenchymal progenitor cells for the application of musculoskeletal tissue regeneration. Thus, we transfected a mutant ras gene (61Glu/Leu) to change Ras protein expression in the mesenchymal progenitor cell line (HS-5 cells) and studied how ras expressing levels influenced intracellular oxygen radicals, and its relationship to cell growth and apoptosis. Results showed that Ras over-expressing HS-5 cells grew slower than those with wild type ras HS-5 cells and revealed a higher apoptosis rate. The higher apoptosis in Ras over-expressing cells was not related to mitochondrial dysfunction since mitochondrial membrane potential was normal as determined by flow cytometric analysis of JC-1 fluorescent staining assay. The higher apoptosis was related to higher caspase-3 activation. Further studies showed that Ras over-expressing HS-5 cells revealed a higher production of intracellular oxygen radicals in comparison to those with wild type ras HS-5 cells. Addition of catalase (500 u/ml) but not superoxide dismutase (SOD; 500 u/ml) specifically revived the cell growth associated with increase of cyclin D1 expression, but decrease of apoptosis associated with lower caspase-3 activation. Results from these studies demonstrated two important findings: 1) the ras gene over-expressing in a ras-mutant HS-5 cell line triggers a higher production of intracellular oxygen radicals resulting in higher cell apoptosis; and 2) the higher oxygen radicals related cell apoptosis is mediated by caspase-3 but not mitochondrial dysfunction. Based on these findings, we may propose to regulate mesenchymal progenitor cell growth for musculoskeletal tissue regeneration via modulation of redox reactions or caspase-3 inhibitors in the future.

一、研究動機：

利用骨髓間質幹細胞，人們已經可以在體外將其培養成骨骼(含軟骨)、肌肉、血管與神經等細胞(1,2)。然而如何控制間質幹細胞生長與死亡，則仍不甚清楚。愈來愈多的證據顯示，細胞生長時不同基因的表現和不同氧自由基的增減與其生長和死亡相關 (3,4)。由於細胞生長時會因為耗用氧氣，而產生多種氧自由基。那些特定氧自由基會影響細胞生長或死亡很值得我們去探討。當某些氧自由基在特定基因因為突變而表現增減時，是否對細胞生長或死亡有影響也值得進行研究。因此本實驗乃使用轉植(transfect)突變 ras 基因(Glu61 to Leu) 或未含突變 ras 的質體，來研究 ras 基因表現的高低如何影響細胞內與氧自由基相關的訊息傳遞；進而研究這些與氧自由基相關的訊息傳遞變化，對細胞生長與細胞凋亡的影響(如下列假說圖)。

研究假說簡圖：



我們期待透過這個研究可以尋找如何調節氧化還原反應或改造基因的表現來控制間質細胞生長與計劃死亡。

二、研究目的：

爲了解如何控制間質幹細胞生長與死亡，以便日後對筋骨退化性疾病提供較好的再生重建之基礎。根據上述假說(如假說圖)，我們利用轉植(transfect)突變 ras 基因(61Glu to Leu)進入骨髓間質細胞株(HS-5 cells) ，進而研究如圖所示的三項研究目標:

- (一)、研究如何將突變的 ras 基因轉植(transfect)進去人類骨髓間質細胞(HS-5) ，並觀察其 Ras 蛋白表現如何影響細胞生長和凋亡的訊息傳遞。
- (二)、研究 Ras 基因表現是否透過特定氧自由基去影響間質細胞生長與死亡。
- (三)、研究在不同 Ras 蛋白表現的間質細胞在不同抗氧化酵素的作用下，其細胞內訊息傳遞的變化，如何改變氧自由基影響的細胞生長與死亡。

透過這些研究結果，將可以幫助我們了解不同基因表現的細胞其細胞氧化還原的變化，如何影響細胞內信息傳遞和調控細胞生長與死亡。利用這些調控原理，我們或許可以對不同基因體質的人，藉由氧化還原的調控來促進間質細胞的再生，達到促進筋骨退化性疾病再生重建的目的。

三、研究材料與方法：

(一)、*間質細胞的培養*：本研究使用人類骨髓間質細胞株(HS-5, CRL-11882; ATCC, Manassas, VA)來研究。細胞的培養是以每毫升 5×10^4 細胞培養於含 10% 胎牛血清的特定調整的培養基(Dulbecco modified Eagle medium; DMEM)中，每三天換一次培養基來進行。

(二)、*以突變 ras 基因調節 Ras 蛋白表現(Transfection of Ras-dominant mutant)*：正常原生株細胞株帶有正常的 ras 基因表現。但在我們把一種帶有突變 ras 基因 (ras61 glutamine to leucine, Upstate Inc., Waltham, MA); 以及另一種未帶有突變 ras 基因的質體(plasmid)，以油脂體(liposome; FuGENE™; Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN, USA)將其帶有 G418 抗藥基因的質體分別植入原生株 HS-5 細胞後，可經過含 G418 培養基的篩選出個別強勢持續活化的 ras 基因高度表現突變株。這樣不同程度的 ras 基因表現，可以造成間質細胞內氧自由基的不同產量與細胞生長與死亡的改變，則可推論 ras 基因表現與間質細胞生長和死亡的作用。

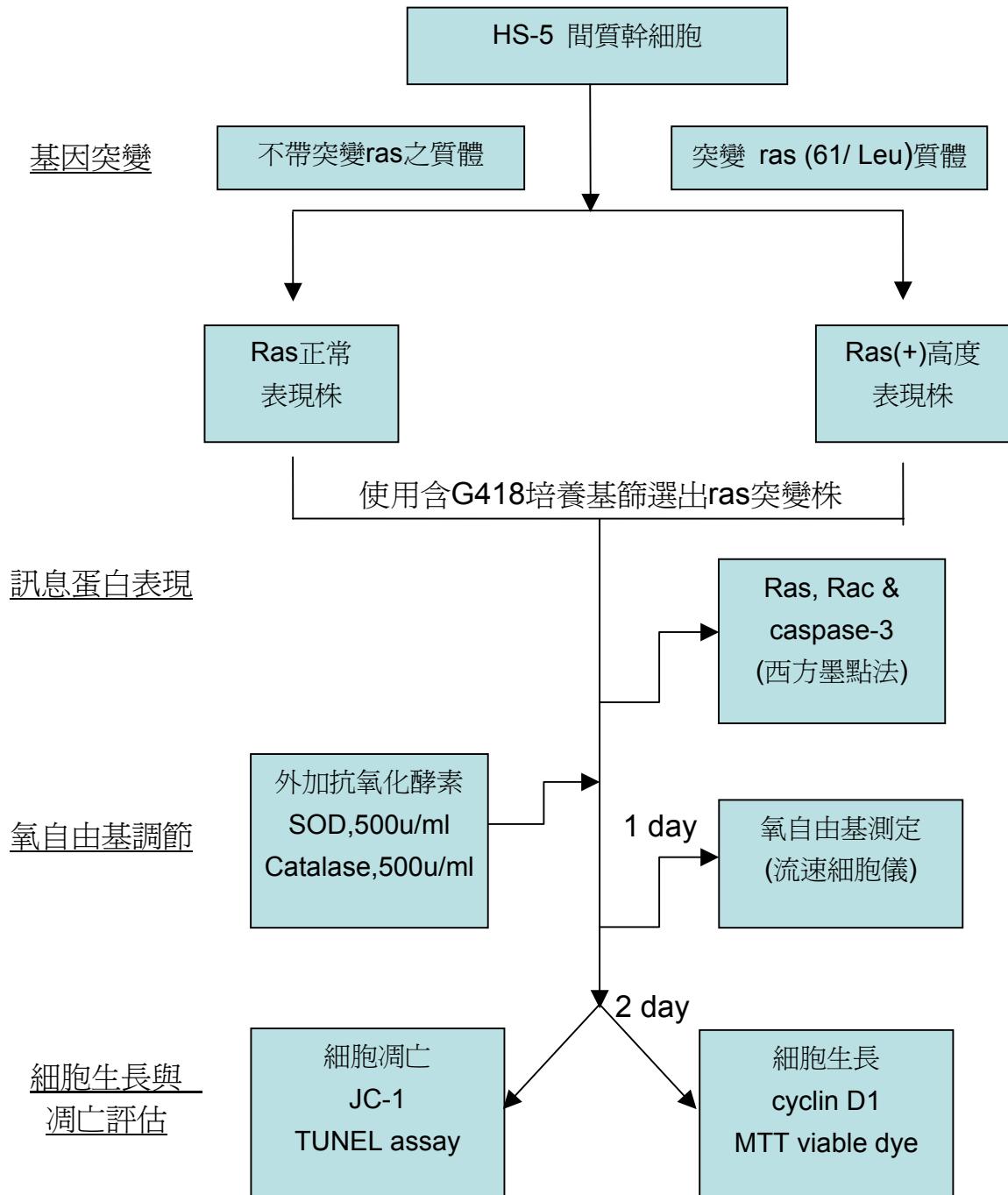
(三)、*監控細胞內氧自由基之產生與氧自由基酵素(NADPH oxidase)活性測定*：本研究測定細胞內氧自由基的產生是利用 hydroethidium(HE)與氧自由基形成 ethidium 時可發出螢光，因此可以在流速細胞儀內測得(5)。氧自由基酵素活性測定，則是取細胞粹取液(50 μ g)混合氧化化學光觸化劑(lucigenin, 500 μ M)，於 100 μ M NADPH 存在下，每 15 秒追蹤其氧化化學光的釋放量，來反應其氧自由基酵素活性 (6)。

(四)、*外加不同抗氧化酵素調控間質細胞的生長與死亡*：研究所用抗氧化酵素作用是以外加超氧根轉化酵素(superoxide dismutase, SOD: 500 U/ml)或接觸酵素(catalase, 500U/ml)於細胞培養液中進行。這些抗氧化酵素作用於細胞的結果，可以由研究其細胞內訊息傳遞，和細胞的生長與死亡改變測得。

(五)、*間質細胞生長與計劃死亡的測定*：細胞生長是利用活細胞染劑(MTT; methylthiazol tetrazolium)可在活細胞內被代謝為可在 550nm 光譜吸光度的 Formazan 來定量其生長數 (7)。細胞計劃死亡的測定方式包括：用其特定螢光追蹤劑 JC-1 於流速細胞儀內測定細胞內粒腺體膜電位改變(8)；以及用 TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)方法(購自 Roche Molecular Biochemicals 公司, Mannheim, Germany)測定凋亡細胞其核內的 DNA 斷裂(9)。

(六)、*細胞內訊息傳遞蛋白質測定*：訊息蛋白質的測定是將培養於不同情況的細胞(2×10^6 /ml)，以磷酸鹽緩衝液(PBS)清洗後，在 4°C 低張的細胞分解液(10mM Tris buffer, 含 2 mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.1 mM EDTA 和 0.7% NP-40)分解細胞 30 分鐘。這些分解後的細胞內蛋白質可以用高度離心的方法(12,000 g)10 分鐘沉澱取得，並用標準測定蛋白質濃度測定組(Bio-Rad assay kit)定量濃度。進行測定 Ras 蛋白質活化，是用具親和力的受質 Raf-1 瓊脂偶合去沉澱活化的 Ras 蛋白質，再進行西方墨點電泳分析其活化的量(10)。測定活化 Rac 是用 PBD(p21 binding domain)偶合瓊脂去沉澱活化的 Rac；再進行西方墨點法測定 Rac 活化量。活化 caspase-3 會由分子量 35kd 分解成 19kd 和 17kd 的片段，用特定抗體進行西方墨點法分析其 19kd 片段含量測定。Cyclin D1 蛋白的表現，也是以其特定抗體用西方墨點電泳分析；步驟是用取自細胞粹取來的蛋白質 (20 μ g)來跑電泳後，把電泳膠的蛋白質轉印到尼龍膜(Nylon membrane)，再用帶有化學光受質的特殊抗體去尋找其表現含量。

(七)、總合研究流程：



四、研究結果：

轉植 ras 突變質體於 HS-5 間質細胞可強勢增加 Ras 蛋白質表現：

使用人類骨髓間質細胞株 HS-5 細胞，分別將 ras61Leu 突變或未突變質體，用脂肪體基因攜帶媒介(FuGENE™; Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN, USA) 植入間質細胞去調節 ras 基因表現。之後細胞被置於含有抗生素(G418)的篩選培養基培養，可以選擇出 Ras 蛋白高度表現的 ras⁽⁺⁾突變株（圖一）。使用這些原生株與突變株，我們可以進行細胞內氧自由基與細胞生長與計劃死亡的研究。

圖一 轉植突變 ras⁺質體與未突變(WT)後其活化的 Ras 明顯不同



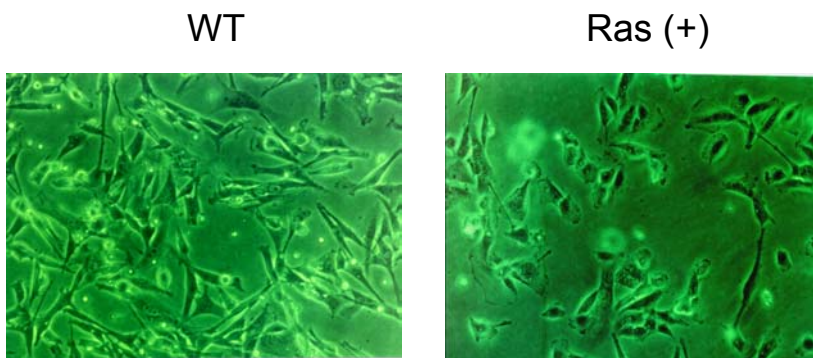
註：取細胞粹取物 0.5 mg 於 Raf-1 偶合瓊脂去沉澱活化的 Ras，然後進行西方墨點電泳分析其活化的含量。

Ras 蛋白高度表現 ras⁽⁺⁾ 株間質細胞生長減緩並且凋亡細胞增加：

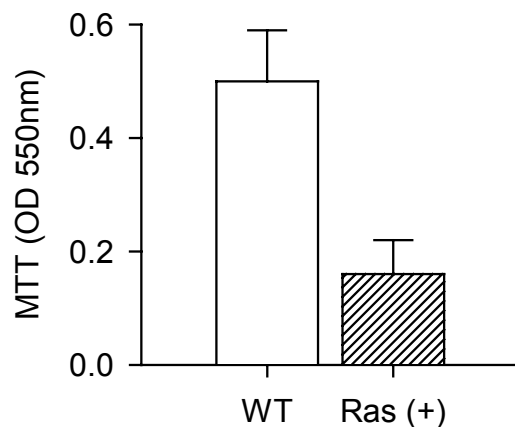
將 Ras 蛋白高度表現細胞(ras⁽⁺⁾突變株)與 ras 未突變原生株於體外培養 2 天，可見其細胞生長型態雖變化不大(圖二、A);但其細胞生長數量比原生未突變株來得少得許多(圖二、B)，平均減少 62.4%生長數。

圖二 ras⁽⁺⁾突變與未突變株(WT)細胞形態與細胞生長

(A) ras⁽⁺⁾突變細胞形態



(B) ras⁽⁺⁾突變細胞生長減少

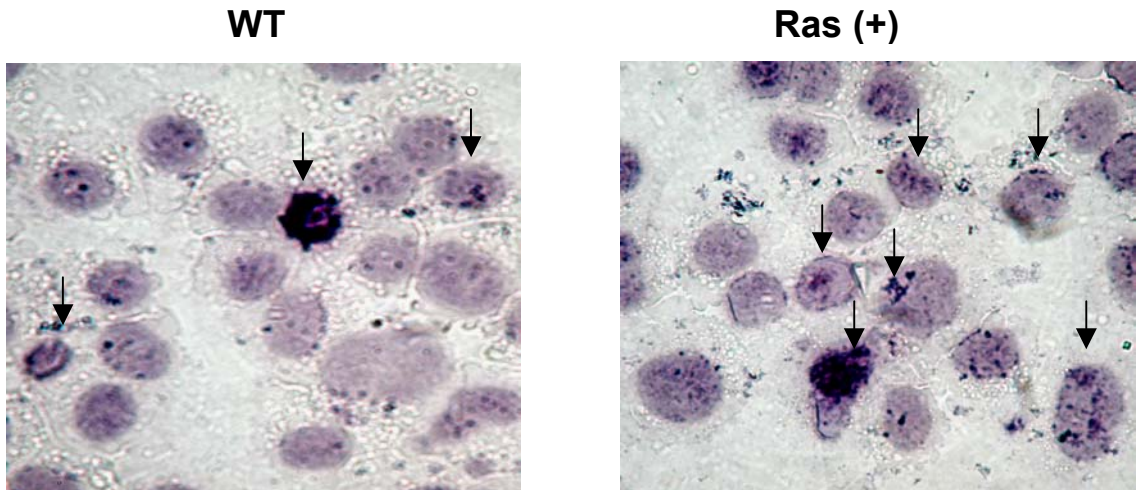


利用抗體測定 HS-5 細胞核內 DNA 斷裂染色(TUNEL)，發現 Ras 高度表現株其細胞核內呈 DNA 間隔斷裂染色的細胞明顯增加(圖三、A)。經過每次雙套的

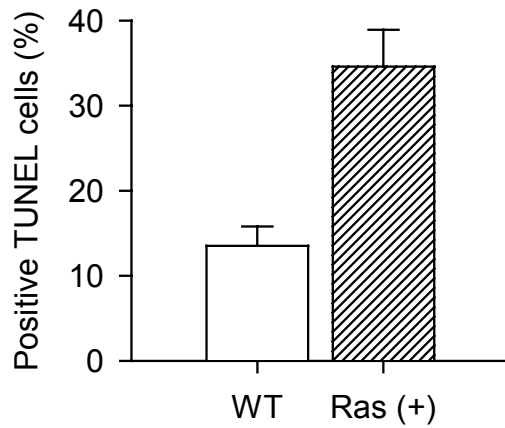
三重覆實驗，發現 Ras 高度表現的細胞凋亡數目明顯增加 22.6 % (圖三、B)。

圖三 ras⁽⁺⁾突變與未突變株(WT)細胞凋亡數量

A) 凋亡細胞 TUNEL 染色形態



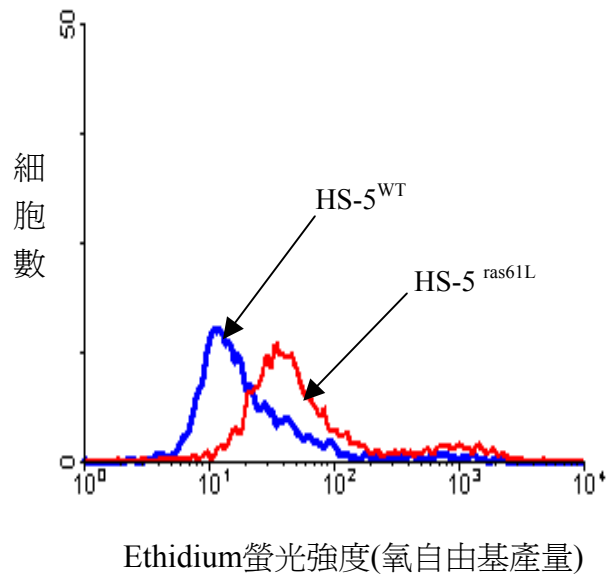
B) 平均凋亡細胞數目



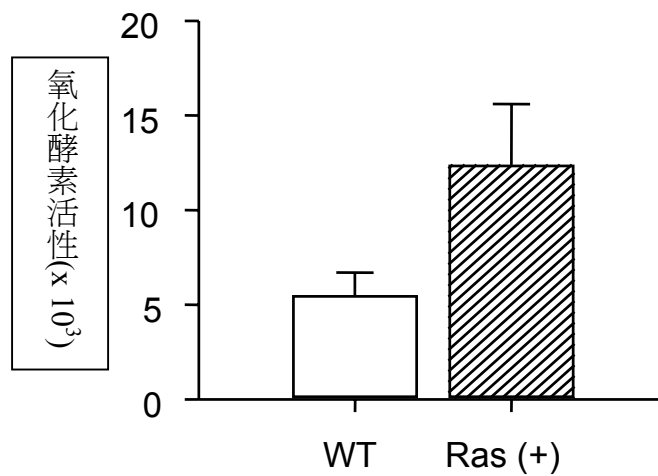
骨髓間質細胞 Ras 蛋白高度表現細胞其細胞內氧自由基產量增加：

Ras 蛋白質高度表現的 HS-5 細胞，其細胞內以 hydroethidium(HE)測得的氧自由基產量明顯比原生株高許多(圖四、A)；而且用氧化 Lucigenin 的化學光所測得的氧化酵素(NADPH oxidase)活性也明顯增加(圖四、B)。

圖四. A) ras61L之突變HS-5細胞其細胞內氧自由基產生增加



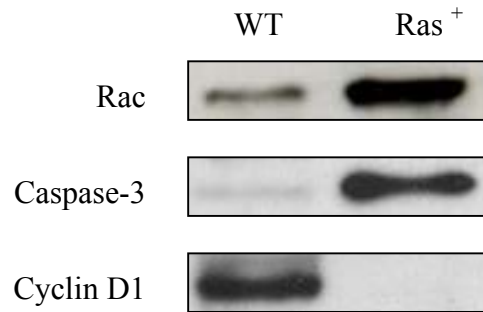
B) ras61L之突變HS-5其細胞內NADPH 氧化酵素活性明顯增加



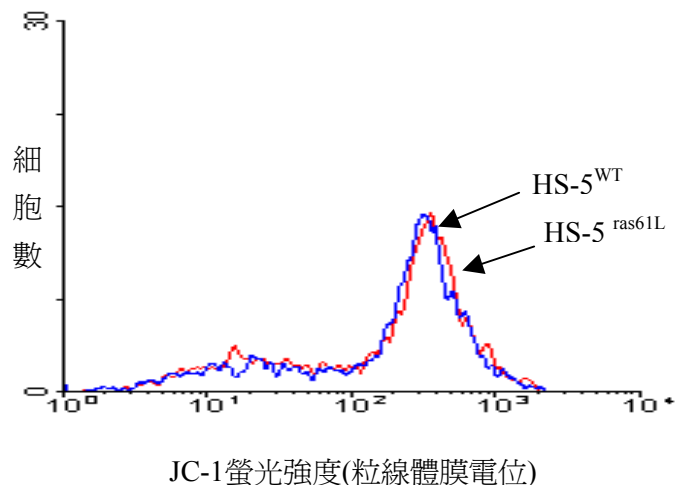
高度 Ras 蛋白表現間質細胞，其細胞生長與死亡相關訊息蛋白表現不同：

Ras 蛋白質高度表現的 HS-5 細胞，其 Ras 蛋白下游的訊息分子，可能與氧自由基有關的是 Rac 蛋白明顯比原生株表現高(圖五、A:上行)；而且與其相關的生長與凋亡分子：cyclin D1 與 caspase-3 則有互為消長之現象(圖五、A:中下行)。但是與另一種細胞凋亡有關的粒腺體膜電位改變，以 JC-1 粒腺體膜電位追蹤劑測得結果則不受影響(圖五、B)。

圖五、A) Ras 蛋白質高度表現株之下游訊息因子表現



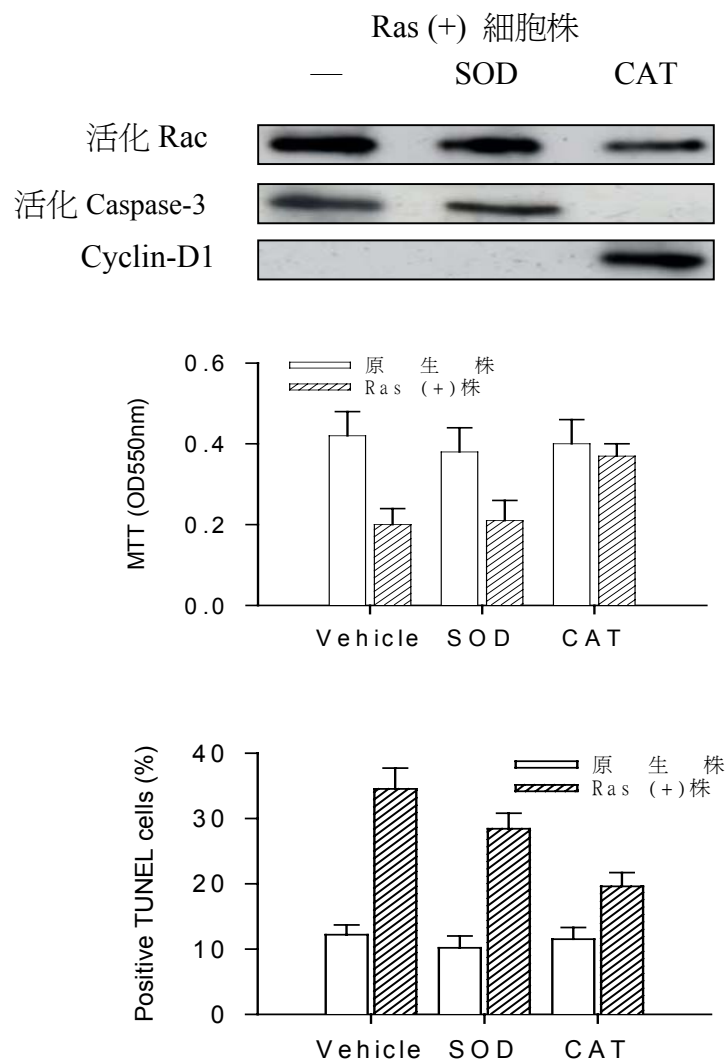
B) Ras 蛋白質高度表現株粒腺體膜電位不受影響



不同抗氧化酵素對 Ras 蛋白高度表現間質細胞生長與凋亡影響不同：

進一步研究 Ras 蛋白高度表現的間質細胞在抗氧化酵素作用下的生長與凋亡訊息變化。發現高度 ras 基因表現的間質細胞在觸化酵素(catalase; 500u/ml)清除 H₂O₂作用下，會降低細胞內活化 Rac 蛋白含量和降低 caspase-3 的活化,並增加細胞生長有關的 cyclin D1 表現 (圖六，上圖)；以 MTT 測得的細胞生長數也增加(圖六，中圖)。這些作用，在加入抗超氧根酵素(superoxide dismutase; SOD, 500 u/ml) 清除 O₂⁻ 作用下，則不受影響。相對的細胞凋亡的數目，也只有觸化酵素的加入有抑制作用(圖六，下圖)。顯然 Ras 蛋白表現的細胞訊息傳遞是確定由 Ras-Rac-NADPH oxidase - O₂⁻ - H₂O₂- 到細胞凋亡。而外加觸化酵素可以抑制 H₂O₂ 產生，進而減少細胞的生長與凋亡。

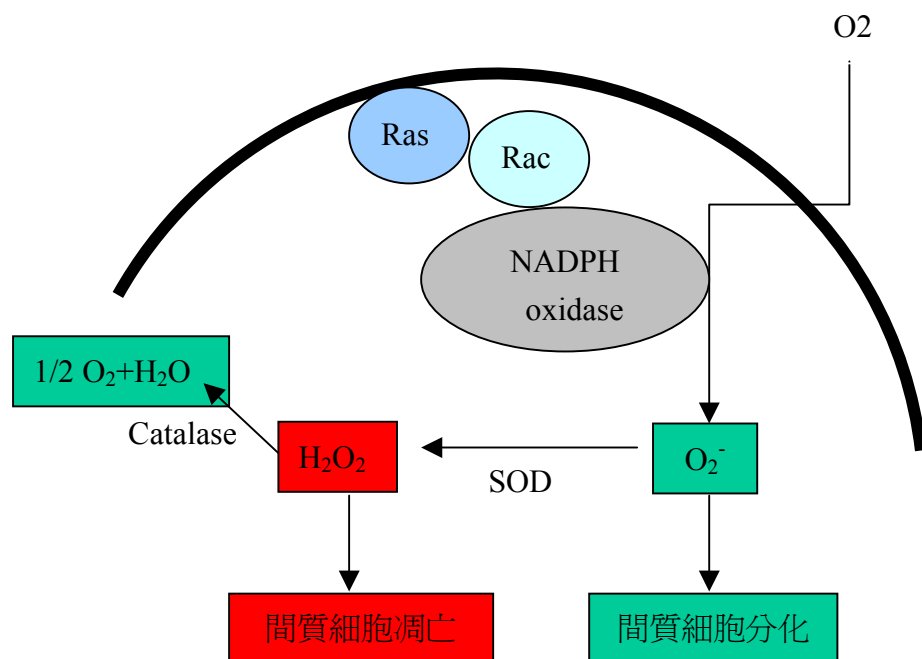
圖六、抗氧化酵素對 Ras 蛋白高度表現間質細胞生長與凋亡影響



五、研究討論：

利用人類骨髓間質幹細胞體外培養，去研究間質細胞生長與死亡的模式，是我們未來使用間質細胞促進組織再生的重要基礎研究。我們發現 ras 基因的表現與氧自由基的產生有關；而特定氧自由基又與間質細胞生長、分化、和死亡有關。去年我們發現超氧根與間質幹細胞朝骨質分化有關；今年我們發現過氧化氫與間質幹細胞凋亡有關。最近也有文獻報告：不同氧自由基具有促進不同細胞生長或細胞凋亡的作用(4,5,6,10)。這些有趣的發現有助於提醒人們：使用抗氧化劑來清除氧化壓力，必須針對不同自由基和不同基因體質的人有所不同，才能真正見效。

研究中也發現高度 Ras 蛋白表現的 HS-5 細胞，因為持續氧自由基產生而促成細胞凋亡的分子機轉與粒腺體功能無關；但與 caspase-3 的活化有關。由於外加抗氧化酵素(SOD, 500 u/ml)，對 Ras 蛋白高度表現細胞的生長或死亡沒有影響時；然而外加觸化酵素(catalase; 500u/ml)後，則有減少 Ras 蛋白高度表現細胞凋亡的作用。顯然 O_2 產生沒有壞處；但 H_2O_2 則是造成間質細胞凋亡的訊息。根據以上這些分析，我的研究結果可以推論出下列簡圖來表示：



從以上的簡圖，我們可以推論一些簡要的方向去進一步操控間質細胞生

長與細胞凋亡供筋骨組織再生的應用。例如增減 ras 或 rac 基因的表現；或操控氧化還原去調節 O_2^- 與 H_2O_2 的含量等方法，都是值得進一步研究的方法。

研究致謝：

感謝我的指導老師和實驗室裡的阿好以及譚真大姊，有他們指導培養細胞和實驗操作技巧，才得持續研究興趣。也謝謝爸爸、媽媽、妹妹雅涵和弟弟富丞，你們給我的支持、鼓勵和督促！我現在仍努力轉植 wingless(wnt)基因去操控臍帶血間質幹細胞生長與分化，希望下次仍有機會再向大家報告好成果。

參考資料：

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143-147.
2. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF. (2000) Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *Journal Biological Chemistry*. 275:9645-9652.
3. Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, Chang DLF, Pagano PJ, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. (1999) Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circulation Research*. 85:147-153.
4. Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*. 86:494-501.
5. Vergun O, Sobolevsky AI, Yelshansky MV, Keelan J, Khodorov BI, Duchon MR. (2001) Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurones in culture. *Journal of Physiology*. 531:147-163.
6. Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Murphy TM,

- Chitano P, Hoidal JR. (2002) NADPH oxidase promotes NF-kappaB activation and proliferation in human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology*. 282:L782-L795.
7. Suzuki K, Namiki H. (1998) Phorbol 12-myristate 13-acetate induced cell death of porcine peripheral blood polymorphonuclear leucocytes. *Cell Structure & Function*. 23:367-372.
 8. Yang MY, Chuang H, Chen RF, Yang KD. (2002) Reversible and irreversible phosphatidylserine expression on blood granulocytes related to plasma but not mitochondrial membrane potential changes. *Journal of Leukocyte Biology* 71:231-237.
 9. Hewitson TD, Bisucci T, Darby IA. (2000) *In situ* end-labeling of fragmented DNA and the localization of apoptosis. *Methods in Molecular Biology*. 123:157-164.
 10. Wang FS, Wang CJ, Shyr-Chen SM, Chen RF, Yang KD. (2002) Superoxide as an early signal for non-invasive shockwave promotion of bone marrow stromal cell growth and osteogenic differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 277:10931-10937.

評語

本著作使用骨髓間質幹細胞，以 ras 基因突變（Glu61 Leu）轉殖細胞，其細胞比單生株減少 62.4% 生長。其凋亡增加 22.62%，其 Caspase 3 有活化，用粒腺膜電位螢光追蹤 JC-1，電位無關，而 Cyclin D1 表現也上升，本著作具創新。