

國立臺灣大學醫學院生理學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Physiology

College of Medicine

National Taiwan University


Master Thesis

在人類臍靜脈內皮細胞中 NF- κ B 在黃體素誘導 p53 向

上調節的角色

Role of NF- κ B in regulating the progesterone-induced

p53 up-regulation in HUVEC

The seal of National Taiwan University is a circular emblem. It features a central bell (the 'University Bell') flanked by two traditional Chinese lanterns. The seal is surrounded by the university's name in Chinese characters: '國立臺灣大學' at the top and '醫學院' on the sides. The name '楊和慶' is printed across the center of the seal.

楊和慶

Ho-Ching Yang

指導教授：李文森 博士

胡孟君 博士

Advisor: Wen-Sen Lee, Ph.D.

Meng-Chun Hu, Ph.D.

中華民國 100 年 1 月

January, 2011

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

在人類臍靜脈內皮細胞中 NF- κ B 在黃體素誘導 p53 向上
調節的角色

Role of NF- κ B in regulating the progesterone-induced p53
up-regulation in HUVEC

本論文係楊和慶君 (R96441013) 在國立臺灣大學醫學院生理學
研究所完成之碩士學位論文，於民國一百年一月二十六日承下列考試
委員審查通過及口試及格，特此證明。

口試委員： 李文森 (指導教授)

胡孟君 (指導教授)

何元順

系主任、所長 吳廷玲

(是否須簽章依各院系所規定)

縮寫表

Amp	Ampicillin
Bax	Bcl-2-associated X protein
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
CDK	Cyclin-dependent kinase
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
Δ	Deletion
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
E. coli	Escherichia coli
EBPβ	CCAAT/enhancer binding protein β
ECGS	Endothelial cell growth supplement
ECL	Enzymatic chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetate
ER	Estrogen receptor
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
G ₀ /G ₁	Gap 0/Gap 1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Hc	Antibody heavy chain
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HLH factor 1 (USF-1)	Basic helix-loop-helix leucine zipper family or upstream stimulatory factor 1 (USF-1)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IgG	Immunoglobulin G
IκBα inhibitor, alpha	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IKK	IκB kinase
IL-1β	Interleukin-1 beta
IP	Immunoprecipitation
kDa	Kilo dalton

LB	Lysogeny broth
M199	Medium 199
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDM2	Murine double minute 2
mRNA	Messenger RNA
myc	Myelocytomatosis viral oncogene
MyoD	Myogenic differentiation 1
NaOAc	Sodium acetate
NCBI	National center for biotechnology information
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nM	Nano molarity
P	Probability
P21	Protein 21 or cyclin-dependent kinase-inhibitor 1A or CDK-interacting protein 1 (Cip1) or wild-type p53-activated fragment 1 (Waf1)
P27	Protein 27 or cyclin-dependent kinase inhibitor 1B or kinase-interacting protein 1 (Kip1)
P53	Tumor protein 53
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PR	Progesterone receptor
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RLA	Relative luciferase activity
RNA	Ribonucleic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SH3	Src homology 3 domain
TBE	Tris-borate-EDTA buffer
TBST	Tris-buffered saline Tween-20

誌謝

「人因夢想而偉大，因痛苦而茁壯。」夢想是我們人生的目標，可以驅動我們朝向目標前進，即使途中遇到挫折，也能甘之如飴，成功固然欣喜，學會面對失敗更是難能可貴，從失敗中找出正確的方向，才能化夢想為未來。這一路走來，有著夢想實現的喜悅，也有失敗挫折的躊躇，努力是做研究必經的過程，但是能夠得到師長指導，才能使我在做研究的過程中往正確的方向前進。很感謝在我就讀研究所的這段生活中，有老師與優秀的學長姐指導，生活上的支持與鼓勵，使我學習擁有研究的態度與要求，懂得處理事情的安排與取捨，統整零散資料的分析與判讀，思考不同結果的討論與方向，使我在面對過去所未知的問題時，能夠分析並改進實驗上的技巧與細節，才能完成這一份論文。

首先我要感謝我的指導教授李文森老師，提供我研究方向、實驗結果的分析與處理、指導我論文編寫的過程，並給予我最大的包容與鼓勵。同時感謝指導教授胡孟君老師能夠擔任我的共同指導教授與口試委員，提供我在論文上的指導與見解。感謝何元順老師能夠擔任我的口試委員，在我讀研究所的過程中也提供許多實驗上的幫助，並給予我論文修改上的建議。感謝曾經在臺大與北醫教導過我的所有老師，有各位老師的諄諄教誨，才能使我在學習上受益良多。

在此要感謝我的實驗室同仁，特別是松柏學長，感謝學長給予我大部分在實驗技術與方法上面的指導與修正，以及實驗步驟規劃與設計的建議。感謝莉菁學姐帶我操作質核蛋白分離與染色質免疫沈澱實驗，以及其他實驗上面的幫助。同時感謝我們實驗室的正哲、栩禎、俊婷學姐、慧珍學姐、伯涵、國瑋、大學部的天崎，除了實驗上的討論之外，更帶給我們許多的活力與歡樂，讓我在實驗室的生活能有不一樣的回憶。

謹謝我的家人對我無限的關懷與支持。並祝大家實驗順利，前程似錦。

中文摘要

內皮細胞參與多樣化的生理過程，包括血管生成、止血及發炎。在本實驗室先前研究指出，黃體素在生理濃度下(500 nM)會抑制人類臍靜脈內皮細胞的增生，此種抑制作用是透過增加 p53 的表現來達成。在給予黃體素處理後的十分鐘內就可觀察到細胞內磷酸化的 ERK 蛋白質量的增加，但是黃體素處理後所誘導的 p53 增加則在給藥後二十三小時才會出現。使用 NCBI 資料庫分析，發現 p53 基因啟動子上面有 NF- κ B、HLH 及 EBP β 等轉錄因子結合位置，在許多細胞內轉錄因子當中，NF- κ B 被認為與血管細胞血管增生功能有密切關係，本篇的研究主題是觀察 NF- κ B 在黃體素誘導 p53 向上調節所扮演的角色。經由分析細胞中蛋白質表現量發現，黃體素並不會刺激細胞內 NF- κ B 的總量增加，但是在黃體素誘導 p53 蛋白表現量增加之前的時間點可觀察到 I κ B α 有被磷酸化的現象，之後 NF- κ B 經由細胞質進入細胞核，增加 NF- κ B 與 p53 基因的結合，影響 p53 的表現。使用 NF- κ B 抑制劑 Bay11-7082 可以減少黃體素增加 p53 的表現。本實驗室的先前研究結果顯示黃體素是透過活化 ERK 路徑，增加 p53 蛋白的表現。本研究給予 ERK-1/2 抑制劑 U0126 或 PD98059 會減少 I κ B α 的磷酸化作用，顯示黃體素增加 I κ B α 的磷酸化作用是透過活化 ERK。利用基因序列刪除法，我們的實驗結果顯示 NF- κ B 結合位置對於黃體素誘導 p53 啟動子活性具有決定性的角色，而 HLH 及 EBP β 結合位置對於 p53 基因啟動子也提供部份調節的作用。我們的研究亦發現黃體素受器 PR-A，在經過黃體素刺激後會進入細胞核內，而 PR-B 沒有出現這種現象；從免疫共沈澱的實驗結果中，發現到 NF- κ B 與 PR-A 的結合有增加的現象，而這二者因子結合增加的現象，暗示 PR-A 可能會調節 NF- κ B 的作用來調控 p53 的表現，進而抑制血管內皮細胞的增生。

中文關鍵字：黃體素、黃體素受器、NF- κ B、I κ B α 、p53

ABSTRACT

Endothelial cells are involved in a diversity of physiologic processes including angiogenesis, hemostasis, and inflammation. Previously, our laboratory has demonstrated that progesterone at a physiological concentration (500 nM) inhibited proliferation of human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) through a p53-dependent pathway and the ERK-mediated pathway is involved in the progesterone-induced increase of p53. The progesterone-induced increase of the level of phosphorylated ERK was observed at 10 min after treatment, while the increased p53 level was not observed until 23 h after treatment. Based on the NCBI database, the human p53 gene promoter contains three transcription factor binding sites including NF- κ B, HLH, and EBP β . It has been indicated that NF- κ B might be involved in the regulation of angiogenesis. Accordingly, the aim of this study is to investigate how NF- κ B regulates p53 in HUVEC. Our data showed that the total protein levels of NF- κ B in progesterone-treated HUVEC were not changed significantly. However, progesterone increased I κ B α phosphorylation as well as NF- κ B nuclear translocation and binding onto the p53 promoter. Treatment of HUVEC with NF- κ B inhibitor, Bay11-7082, reduced the progesterone-induced increase of p53, suggesting that progesterone induced increase of p53 through increase of I κ B α phosphorylation, which in turn increased NF- κ B nuclear translocation and binding onto the p53 promoter. Treatment of HUVEC with an ERK inhibitor, U0126 or PD98059, reduced the progesterone-induced increase of I κ B α phosphorylation, suggesting that progesterone increased I κ B α phosphorylation through the ERK pathway. Using gene deletion, our data suggest that the NF- κ B

binding site on the p53 gene promoter is essential for progesterone-induced p53 up-regulation, whereas the HLH and EBP β binding sites might also play important roles in regulating the p53 promoter activity. Progesterone receptor-A (PR-A), but not PR-B, translocated into the nucleus after treatment with progesterone.

Immunoprecipitation showed that progesterone increased the binding between NF- κ B and PR-A. These results suggested that PR-A might participate in NF- κ B-regulated p53 expression and further inhibited the proliferation of vascular endothelial cells.

Key words : Progesterone, Progesterone receptor, NF- κ B, I κ B α , p53.



目錄

口試委員會審定書.....	i
縮寫表.....	ii
誌謝.....	iv
中文摘要.....	v
ABSTRACT.....	vi
目錄.....	viii
圖目錄.....	x
表目錄.....	xi
一 緒論.....	-1-
1.1 血管生成的概念.....	-1-
1.2 黃體素受器的作用.....	-4-
1.3 黃體素的非基因體效應.....	-6-
1.4 NF- κ B 複合物的作用.....	-8-
1.5 NF- κ B 與 p53 的交互作用.....	-11-
二 實驗材料與方法.....	-13-
2.1 溶液與藥品的配製.....	-13-
2.2 常用儀器.....	-23-
2.3 實驗方法.....	-25-

三	實驗結果	-37-
3.1	黃體素誘導 NF- κ B 由血管內皮細胞的細胞質進入細胞核。	-37-
3.2	黃體素透過 NF- κ B 的活化來增加血管內皮細胞 P53 的表現。	-37-
3.3	黃體素增加 I κ B α 的磷酸化並且減少 I κ B α 與 NF- κ B 的結合。	-38-
3.4	黃體素增加 I κ B α 的磷酸化作用是透過活化 ERK 的途徑。	-38-
3.5	黃體素可以增加 NF- κ B 與 p53 gene 的結合。	-39-
3.6	p53 gene 啟動子上面具有轉錄因子 NF- κ B、HLH、EBP β 的結合位置。	-39-
3.7	移除 p53 gene 啟動子上的 NF- κ B 結合位置幾乎完全阻斷黃體素對於 p53 gene 的啟動子活性。	-41-
3.8	黃體素增加 PR-A 由內皮細胞的細胞質進入細胞核。	-41-
3.9	黃體素可以增加 NF- κ B 與 PR-A 的結合。	-42-
四	討論.....	-43-
	參考資料.....	-68-

圖目錄

圖一	黃體素誘導 NF- κ B 由血管內皮細胞的細胞質進入細胞核。	-50-
圖二	黃體素透過 NF- κ B 的活化來增加血管內皮細胞 P53 的表現。	-51-
圖三	黃體素可以增加內皮細胞 I κ B α 的磷酸化作用。	-52-
圖四	黃體素可以降低內皮細胞 NF- κ B 與 I κ B α 的結合。	-53-
圖五	黃體素增加 I κ B α 的磷酸化作用是透過活化 ERK 的途徑。	-54-
圖六	黃體素可以增加 NF- κ B 與 p53 gene 的結合。	-55-
圖七	p53 gene 啟動子上面具有轉錄因子 NF- κ B、HLH、EBP β 的結合位置。	-56-
圖八	p53 gene deletion construct 建構。	-57-
圖九	確認 NF- κ B 以及相關轉錄因子結合位置在 p53 啟動子上的重要性。	-58-
圖十	黃體素可以增加 PR-A 由內皮細胞的細胞質進入細胞核。	-59-
圖十一	黃體素可以增加 NF- κ B 與 PR-A 的結合。	-60-
圖十二	黃體素可以增加細胞質與細胞核 NF- κ B 與 PR-A 的結合。	-61-
附圖一	黃體素透過 NF- κ B 調節 p53 的表現。	-63-

表目錄

表一	染色質免疫沈澱實驗所使用的引子。.....	-64-
表二	p53 gene deletion construct 所使用的引子。.....	-65-
表三	p53 gene deletion construct 插入子序列。.....	-66-



一、緒論

1.1 血管生成的概念(Concept of angiogenesis)

血管生成(angiogenesis)是許多正常生理變化中所必需的功能，是經由已經存在的血管長出新微血管的複雜過程，發生在一些正常生理功能，比如說胚胎發育、傷口癒合、骨質重組、女性月經週期；同時血管生成在一些病理狀況下也扮演重要的角色，包括腫瘤生長、動脈粥狀硬化、糖尿病性視網膜病變、乾癬、類風濕性關節炎等等(1)。另一個類似的作用，血管新生(vasculogenesis)只發生在胚胎時期的血管系統，指的是血管母細胞(angioblasts)分化成內皮細胞。血管生成的過程對於血管生長因子與生長抑制因子的濃度平衡非常敏感，如果濃度失衡就可能導致疾病。在胚胎時期，血管提供發育中器官氧氣，也會提供生長訊息促進型態發生，血管起源於內皮細胞前驅物，這些前驅物組成最原始的微血管迷路，這過程就是血管新生(vasculogenesis)，在這個時期的血管未來特化成動靜脈的過程已經被決定(12)。在成人時期，不太會出現明顯的血管新生情形，在生理或是病理性過程以微血管新生(microvasculature)發生情形較多，靜置(quiescence)與活化(activation)時期常常交替發生(21)。

特定器官的血管分佈至少受到兩個不同的機制影響。第一，初期的血管網路是經由抑制特定血管分枝(specific branch regression)的隨機過程，這種血管重新定型的機制很可能是在內皮細胞層級經由周圍血管平滑肌(vascular smooth muscle)或是周邊細胞(pericytes)所分泌的血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF-A)以及其他訊息分子所決定(16)。第二，血管生成的出芽(sprouting)與融合(fusion)是用以形成初期特定的血管模型。例如：中樞神經系統發育的血管導引似乎是經由固定的血管出芽形式；哺乳動物視網膜就是初期血管叢重疊在

已經存在的星狀細胞叢而形成的。在其他的器官形成也涉及特化細胞的血管導引，經由吸引或排斥力的軸突導引已經被證實，也用於形成昆蟲的氣管系，這種結構功能上類似於脊椎動物的血管新生，就是依據現有的管道細胞或次細胞的導引(14)。

內皮細胞前驅物其中之一的血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在調節血管形成、內皮細胞生長與分化扮演很重要的角色。胚胎形成時期血管開始形成，血液血管母細胞(hemangioblasts)形成血島聚集物，分化形成最原始的造血和血管內皮前驅細胞(angioblasts, endothelial precursor cells), angioblasts 的分化與化學趨向性(chemotaxis)需要 VEGF-A 作用，周邊細胞(pericytes)與血管平滑肌細胞涉及血管組成架構，這是經由血管生成素-1 (angiopoietin-1, Ang-1)以及與它同源的酪胺酸激酶受器 Tie-2 的作用，血管生成素-1 可以穩定內皮細胞並減少血管通透性(11)。另一個有潛力的訊息分子血管生成素-2 (angiopoietin-2, Ang-2)被發現是血管生成素-1 的拮抗劑(antagonist)，它與血管生成素-1 共同競爭 Tie-2 受器，可以進一步調節血管成熟與控制血管靜置(vessel quiescence)，血管生成素-2 可以增加血管通透性。血管通透性與 Tie-2 受器與 VEGFR-2 受器之間的交互作用有關(crosstalk or even heterodimerization)(10)。

從新形成微血管的週邊細胞分泌的血管生長因子 VEGF 與血管生成素 Ang-1，會共同合作進一步延長血管長度(13, 15)，此時會有 VEGF receptors (VEGFR-1/2)出現並隨時間消長，成人時期的 VEGFR-1/2 表現量依不同組織而有不同；在低氧環境下，VEGF 在 HUVEC 的表現可以經由低氧誘導因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)影響而活化，HIF-1 α 會與芳香烴核內轉位子(aryl hydrocarbon nuclear translocator)形成異構二聚體(heterodimer)，促進 VEGF 轉錄

表現上升。the von Hippel–Lindau complex 可以藉由泛素化作用(ubiquitination)來降解 HIF-1 α ，如果 von Hippel Lindau 腫瘤抑制基因出現突變或缺損，即使細胞不是在缺氧狀態，VEGF、HIF-1 α 仍然會持續表現，會導致血管瘤(hemangiomas) (6, 11)。

VEGF 是一種會與肝素(heparin)結合的血管生成生長因子，可以藉由增強囊泡器器的活性來增加內皮細胞的通透性，促進新陳代謝物質運輸，VEGF 經由 mitogen-activated protein kinase (MAPK)訊號傳遞重排 cadherin /catenin complexes 來鬆開內皮細胞的黏附接合(adhering junctions)。VEGF 也藉由誘導整合素(integrins)表現來展現出血管生成效應，可以促進細胞遷移、增生、基質再組合(4)。

血管生成是由四個分期組成：初始期、進展期、分化期、成熟期。初始期會有血管舒張現象，這涉及一氧化氮的作用，而血管通透性增加是經由血管內皮生長因子(VEGF)的作用，血漿蛋白質會滲漏到附近移動的內皮細胞形成的暫時骨架，使一些自泌/旁泌素能夠影響內皮細胞；進展期，內皮細胞釋放蛋白水解酶(proteases)降解基底膜與細胞外間質，細胞遷移到組織間隙以形成新的管腔與新的細胞外基質；分化期，內皮細胞會改變形狀形成新的血管壁；成熟期，會徵召周圍細胞以及平滑肌細胞，並使新的基質蛋白沈積，使新血管具有功能(2, 5)。在血管新生作用的過程，活化的內皮細胞重組它們的細胞骨架，表現細胞表面黏合分子(cell surface adhesion molecules)，像是整合素(integrins)與選擇素(selectins)，分泌蛋白水解酵素，並重新排列鄰近的細胞外基質。自泌/旁泌血管生成因子必須出現才會誘導內皮細胞遷移、增生、伸展、定位、分化，導致基底膜的重新形成，管腔出現，形成新的/預存的血管(3)。

內皮細胞屬於間質細胞的一種，可以經過長時間的靜置(quiescence)，但是如果額外的血管生成刺激，內皮細胞仍然可以進行遷移、侵犯、形成血管管腔。

此外，發生感染或發炎的區域，或是接觸到細胞激素(cytokines)，也會刺激內皮細胞分泌各種不同的附著訊息分子吸引並且幫助免疫作用細胞(immune effector cells)附著(7)。

內皮細胞參與多樣化的生理過程，包括止血、發炎和血管生成。人類臍靜脈內皮細胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)可以作為一種廣泛使用的體外模型，來研究類固醇激素(steroid hormones)對血管內皮細胞的生理效應(29)。

1.2 黃體素受器的作用(Role of progesterone receptor)

黃體素(助孕酮，progesterone，P₄ or Pg)屬於類固醇激素，黃體素主要的生理作用發生在子宮與卵巢，與女性月經週期的黃體週期、排卵、著床、維持懷孕、抑制子宮平滑肌收縮、乳腺發育、分娩前抑制乳蛋白合成、人類胚胎發育生成有關(21, 27)。動情素與黃體素對於子宮內膜有允許作用(permissive effect)，大量的動情素，會藉由動情素受器進行後續活化(transactivation)，使子宮內黃體素受器分泌增加，可以增強黃體素對子宮內膜的作用。黃體素在子宮週期的分泌期會促進子宮內膜分泌黏液，拮抗動情素對子宮平滑肌的收縮作用，減少陰道表皮細胞增生。

黃體素通常會結合到標的細胞的黃體素受器(PR, PGR or hPGR)，傳統上認為的黃體素受器是屬於與 DNA 結合的核內受器，也就是細胞核黃體素受器(genomic progesterone receptor or nuclear progesterone receptor, gPR or nPR)，這類的黃體素受器本身就是細胞核轉錄因子，平時以不活化態的形式存在於細胞質，並且與熱休克蛋白(heat-shock proteins)結合，當黃體素穿過細胞膜並且與基因組黃體素受器結合，黃體素受器會脫離熱休克蛋白並且轉位(translocate)進入細胞核內，影響後續的基因轉錄(134, 135)；研究發現，還有一類黃體素受器會出現在

細胞膜上，並受到黃體素的作用，被認為是細胞膜黃體素受器(membrane progesterone receptor)，但是機制並未清楚了解(53)。黃體素受器是屬於配體誘導核內 DNA 結合轉錄因子大家族的一種，也叫做 nuclear receptor subfamily 3 group C member 3 (NR3C3)。黃體素受器蛋白質，包括 PR-A、PR-B、PR-C 及其變體 (variants)這幾種亞型(isoforms)。人類的 PR-B (116 kDa)黃體素受器基因總共有八個表現子(exons)，分別被七個插入子(introns)分開，exon1 編碼黃體素受器的 N 端區域、三個活性區之一的 AF-3 (activation function domains，只有 PR-B 有此區域)，exon2、3 編碼 AF-1 以及包含二個鋅手指的 DNA 結合域(DNA-binding domain, DBD)，exon4-8 編碼 AF-2 以及配體結合域(ligand-binding domain, LBD)，同時也編碼鉸鍊區(hinge region)，是一種核內定位信號(nuclear localization signal, NLS)，是已知的受器二聚體化區域(receptor dimerization)以及熱休克蛋白(heat-shock proteins)、免疫素(immunophilins)的結合位置；經由多樣性轉錄後修飾，在這裡指的是 splicing，N-terminal truncation，C-terminal modification，再經由不同的啟動子作用，會分別表現不同的黃體素受器蛋白質；PR-A(94 kDa)經過 N-terminal truncation，比 PR-B 少了 164 amino acids (AF-3 domain)；PR-C(60 kDa)比 PR-B 少了 exon1 以及大部分的 exon2；其他的黃體素受器變體會出現一個或數個 exons 刪除，或是經由 splicing 在 5' 序列接入全新的 exon(不屬於黃體素受器基因)，但是保留剩餘的 exon4-8；這些缺少 LBD 或是 DBD 變體的黃體素受器可能也會影響 PR-B 的作用(35-38)。

黃體素受器亞型(PR-A 及 PR-B)mRNA 之間的比例取決於黃體素濃度的高低，PR-A 被認為是 PR-B 的抑制劑(dominant repressor)，而 PR-B 則是強力的轉錄活化子，促進乳腺細胞的增生效應(33)。高濃度的黃體素會誘導 PR-A mRNA 表現，進而抑制 PR-B mRNA 轉錄，降低標的細胞的黃體素效應(progesterone

effect)；低濃度的黃體素會抑制 PR-A mRNA 表現，進而增加 PR-B mRNA 轉錄，增強標的細胞的黃體素效應(43-45)。PR-C isoform 可以在人類子宮肌層 (myometrium)、胎盤(placenta)中被發現，PR-C 缺少 DNA 結合域的第一個鋅手指，但是仍能與黃體素結合。PR-C 可以結合到 PR-B，進而減少 PR-B 當作轉錄因子的能力，並降低其轉錄能力(46)。

之前有一些研究指出，黃體素對於卵巢功能的作用，研究對象包括馴養動物、人類、靈長類，黃體素對不同的卵巢細胞(granulosa, theca, epithelium cell, corpus luteum, etc.)會受到黃體素濃度變化而有不同的作用。Picomolar 黃體素濃度下，幾秒鐘就會刺激細胞內鈣離子、三磷酸肌醇(IP3)、protein kinase C β 1 上升，而且不會被黃體素抑制劑(anti-gestagens)抑制；而在長期效應(類固醇生成、細胞凋亡、增生、促進蛋白質/mRNA 合成)，要在更高的黃體素濃度(nanomolar、micromolar)才能被觀察到，而且可以被黃體素抑制劑抑制(34)。

1.3 黃體素的非基因體效應(Non-genomic effect of progesterone)

黃體素在生理上的效應，標的細胞黃體素與細胞核黃體素受器(gPR or nPR)結合所產生的後續效應，稱為黃體素的基因體效應(Genomic effect of P₄)；黃體素還可以在幾秒或數分鐘短時間內激發細胞的反應，此種效應被稱為黃體素的非基因體效應(Non-genomic effect of P₄)，此效應在多種女性生殖組織中被發現，但此機制的本質還沒有完全理解。黃體素可以與特異性細胞膜黃體素受器結合，至少有三種不同的蛋白質可以當作潛在的細胞膜黃體素受器：membrane progestin receptor (mPR)、RDA 288 protein (plasminogen activator inhibitor RNA binding protein (PAIRBP1 or RDA288))、progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1)(49, 50, 53)。此外，黃體素還可以藉由暫時性修飾或削弱某些配體 (ligand，這裡是指 oxytocin)結合到對應的受器(oxytocin receptor)的結合能力(47,

48)，或是經由改變細胞膜的通透性而影響到其他配體(這裡是指 oxytocin)結合到對應受器的親和力(54, 55)。

在不同種類的細胞中，黃體素與細胞膜黃體素受器結合的作用有：(1)位於細胞膜或細胞膜內面的細胞核黃體素受器，與黃體素結合會活化 Src family kinases。(2)黃體素結合到細胞膜黃體酮受器(membrane progesterin receptor)會活化抑制性 G protein(Gi/o)，抑制腺苷酸環化酶(adenylyl cyclase)，降低細胞內 cAMP 含量以及增加 MAPK 3/1 的活性。(3) RDA 288 結合到穿膜蛋白(transmembrane protein) PGRMC1 形成膜上的複合物，當黃體素結合時，會活化 protein kinase G，降低細胞內的 Ca^{2+} 濃度，抑制顆粒細胞與黃體細胞(granulosa and luteal cell)的有絲分裂與細胞凋亡(49)。

細胞核黃體素受器(nuclear progesterone receptor, nPR)分佈於細胞核、細胞質、細胞膜內面，主要有二種潛在的機制，第一種是配體(ligand)結合黃體素受器誘導基因轉錄活性，這機制過去已被詳細討論過(134, 135)；第二種是黃體素結合到黃體素受器的 N 端上面具有 proline-rich motif (polyproline)的區域，可以與 Src 的 SH3 domain 直接作用，依次增強與 Src kinase 的結合作用，並進一步活化 Src kinase，此種反應是藉由 PR-B 的作用，經由活化 Src kinase，黃體素能夠影響許多訊息傳遞路徑，進而調節特定基因的后續活化(cascades)(52, 58, 59)。

細胞膜黃體酮受器(membrane progesterin receptor, mPR)具有七個穿膜域(transmembrane domain)，這些蛋白可能是 G-protein coupled receptors (GPCR)，可以活化抑制性 G protein。種系發生學(phylogenetic)分析 mPR 分類成三個小群(subgroups)： α 、 β 、 γ subgroup，mPR 的表現具有高度的組織特異性，在人類的組織中，mPR α 主要發現在生殖系統，mPR β 主要發現於神經系統，mPR γ 發現於消化系統(51)。在大鼠(rat)的組織中，mPR β 、mPR γ 也有相似的組織分佈。黃

體素結合到細胞膜黃體素受器，導致腺苷酸環化酶活性減少與 MAP kinase 活性增加；這暗示了細胞內 cAMP 減少會抑制固醇生成(steroidogenesis)，而 MAP kinase 活性增加，在許多種類的大鼠(rat)細胞中，會參與部份細胞凋亡的作用(49)，因此在不同的組織中，黃體素經由作用在 mPR 可以增加細胞凋亡的作用。

Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1)具有一個穿膜域(transmembrane domain)，以及一個很短的細胞質域(cytoplasm domain)並包含三個 Src homology domains，但是這些 domains 的作用仍未被確認。PGRMC1 分佈於細胞膜與內質網膜上，會活化 protein kinase G，降低細胞內的 Ca^{2+} 濃度，參與顆粒細胞與黃體細胞的 anti-mitotic 與 anti-apoptic 作用(56, 57)。

1.4 NF- κ B 複合物的作用(Role of NF- κ B complexes)

核轉錄因子- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)是一種轉錄因子，可以藉由結合位在啟動子與加強子(promoters and enhancers)的 DNA 序列，如：已知的 κ B elements，進行基因表現的誘導或抑制現象。在哺乳動物細胞中已知有五種 NF- κ B 家族成員：RelA (p65)、RelB、c-Rel、p50/p105 (NF- κ B1)、p52/p100 (NF- κ B2)。所有的 NF- κ B 蛋白質成員在 N-terminus 都有約 300 個胺基酸長的 Rel-homology domain (RHD)，可以與 DNA 或是 I κ B 結合以及調節 NF- κ B 二聚化(dimerization)，並且具有核內定位序列(nuclear localization sequence, NLS)，參與活化的 NF- κ B 從細胞質快速移動到細胞核(62)；根據 NF- κ B 的結構、功能與合成形式，可以分成二類(Class)，第一類(Class I)包括 NF- κ B1 (precursor 是 p105，活化態是 p50)、NF- κ B2 (precursor 是 p100，活化態是 p52)，前驅物(p105 及 p100)經過磷酸激酶或是泛素化過程形成 p50 及 p52，在 C-terminus 包含錨定重複序列(ankyrin-repeat motifs, ANK)，此序列類似於 I κ B 上面發現的序列，也有文獻將 Class I 這些蛋白歸類於 I κ B 家族(60)；第二

類(Class II)與第一類不同之處在於不需要經過酵素作用，包括 RelA、RelB 及 c-Rel，在 C-terminus 包含不同作用與構造的轉錄活化區(transcriptional activation domains，TAD)。

NF- κ B 是由二個 Rel 家族次單位以同源二聚體(homodimers，相同的 class) 或異源(heterodimers，class I + class II)二聚體所組成。不同的 NF- κ B 二聚體有不同的轉錄特性，如：p50-p52 同源二聚體可以與 BCL-3 作用，BCL-3 不同於其他抑制性蛋白 I κ Bs 的作用，可以當作轉錄活化子(co-activator)(60)；p50-p52 同源二聚體會躲避 I κ Bs 的調節，造成持續(constitutively)在細胞核作用；但是異源二聚體會受到 I κ Bs 的抑制作用而留在細胞質，除了因為 RelB-p52 與 I κ B α 結合能力 (affinity)較低，造成可以迴避 I κ B α 的抑制性調節(64)。一般常見可被調節的組合是 RelA-p50 異源二聚體，平時被 I κ B α 所抑制，經由不同刺激可以進入細胞核調控不同的基因，可以是促進(pro-effects)或是抑制效應(anti-effects)。

未受刺激或是非病因性的哺乳動物細胞，可以在細胞質中發現 Rel 次單位與抑制性蛋白 I κ B 家族蛋白結合，一般是以 NF- κ B-I κ B α (p65-p50- I κ B α)的形式存在，I κ B 家族包含 I κ B α 、I κ B β 、I κ B γ (p105 的 C-terminus 部份)、I κ B ϵ 、BCL-3，它們的功能是部份遮蔽 NF- κ B 的 RHD 上面的 NLS。在一般情況下，NF- κ B-I κ B α 複合物的 I κ B α 對於 NF- κ B 的 NLS 只會有部份的遮蔽效應，即使細胞未受到刺激，複合物也可以在細胞質、核之間穿梭。I κ B α 上面也有包含核內輸出序列 (nuclear export sequence，NES)，可以將複合物從細胞核輸出到細胞質(62)。

NF- κ B 至少會受到四種路徑活化，最常見的標準路徑(classical/canonical pathway)，NF- κ B 會受到各種發炎刺激所誘導，包括 pro-inflammatory cytokines 的 tumour necrosis factor- α (TNF α)、interleukin-1 (IL-1)作用在 T-cell receptor (TCR) 或是接觸到細菌的 lipopolysaccharide (LPS)。接觸到這類刺激會導致 IKK 複合物

(I κ B kinase complex)的活化，IKK 複合物是由三個核心次單位所組成：催化次單位 IKK α (IKK1)、IKK β (IKK2)，以及調節次單位 NF- κ B essential modifier (NEMO, IKK γ)。基因實驗指出在標準路徑下，IKK β 作為主要的 I κ B α 磷酸激酶 (65, 66)。受到刺激後，IKK 複合物會快速磷酸化 I κ B α 的 Ser32、Ser36 位置，磷酸化的 I κ B α 會脫離 NF- κ B 並且被泛素化(Lys48-linked ubiquitylation)，然後被 26S proteasome 分解；在許多細胞中，I κ B β 、I κ B ϵ 也會受到磷酸化作用而被分解，但是速度較慢(slower kinetics)(67)。

第二種是非標準路徑(non-canonical or alternative pathway)，可以受到 CD40、lymphotoxin- β receptors (LT β R)、B-cell-activating factor of the TNF family (BAFF)、LPS 以及 EB 病毒(Epstein-Barr virus)的 latent membrane protein-1 (LMP1) 的刺激所誘導，經由 NF- κ B-inducing kinase (NIK)活化 IKK α homodimers (IKK α -IKK α)，IKK α 磷酸催化 p100 形成 p52，p100 被泛素化而被 26S proteasome 分解，最後形成 p52-RelB heterodimers 活化形式，這對於 κ B elements 有較高結合能力(affinity)，可以經由調節個別的 NF- κ B 影響目標基因的表現，這對於次級淋巴器官的發育與維持有關(65)。

E3 ubiquitin ligase 可以直接作用並催化目標蛋白泛素化(ubiquitylation)。Lys48-linked ubiquitylation 會造成蛋白質被 26S proteasome 分解，但是 Lys63-linked ubiquitylation 可以促進具有泛素結合區(ubiquitin-binding domains)蛋白的作用，NEMO (IKK γ)就具有泛素結合區。Lys63-linked 泛素化的 NEMO 可以吸引(recruitment) transforming growth factor- β (TGF β)-activated kinase-1 (TAK1)，TAK1 可以在 IKK 複合物裡面的 IKK β 活化區(activation loop)的 Ser177 及 Ser181 磷酸化(68-70)。還有二種屬於非典型路徑(atypical pathway)：IKK-dependent、IKK-independent。IKK-dependent pathway 也就是 NEMO-dependent IKK β 活化作

用(71)，主要經由 genotoxic stresses 的刺激所引發，首先 NEMO 進入細胞核後，先經過 sumoylation (61)，然後被毛細血管擴張失調症突變蛋白-細胞週期檢查點激酶(ataxia telangiectasia mutated checkpoint kinase, ATM)磷酸化，NEMO sumoylation 的位置被 mono-ubiquitylation 取代，導致 NEMO-ATM 複合物從細胞核進入細胞質(nuclear export)，可以與 IKK-associated protein (ELKS, a protein that is rich in glutamate (E), leucine (L), lysine (K) and serine (S))一起活化 IKK 複合物(72)。

IKK-independent pathway 受到某些刺激：缺氧(hypoxia)、復氧(reoxygenation)、過氧化氫(hydrogen-peroxide)的作用，給予細胞神經生長因子(nerve growth factor, NGF)或是酪胺酸磷酸酶抑制劑(tyrosine phosphatase inhibitor) pervanadate，會導致 NF- κ B 複合物上面 I κ B α 的 Tyr42 磷酸化，磷酸化的 I κ B α 與 NF- κ B 分開然後被分解(67, 73)，最後 NF- κ B (RelA-p50)會進入細胞核。如果受到紫外光照射(ultraviolet light)或是乳癌細胞本身 Her2 (erbB-2 or Neu)致癌基因的表現，酪蛋白激酶 II (casein kinase-II, CK2)會磷酸化 I κ B α 的 C-terminal PEST domain (domain rich in proline (P), glutamate (E), serine (S) and threonine (T))(67)；此時活化的 IKK α -IKK β 也會磷酸化 RelA，指出 IKK-independent pathways 具有誘導分化經過修飾的 NF- κ B 次單位的潛力。

1.5 NF- κ B 與 p53 的交互作用(Interaction of NF- κ B and p53)

P53 (tumor suppressor)對於細胞遭受基因傷害(genotoxic damage)以及致癌基因活化(oncogene activation)時常當作第一線的防禦機制，p53 具有 pro-apoptosis 的作用，遭受刺激後會誘導細胞凋亡(apoptosis)或是細胞週期停滯(cell cycle arrest)(74)。細胞中 p53 蛋白的總量受到 HDM2 (known as MDM2 in mice, 功能是當作 E3 ubiquitin ligase)調控，誘導 p53 蛋白水解。許多研究指出，經過不同

的刺激與調控，NF- κ B 與 p53 之間的作用可以是拮抗性的(antagonistic effects)、促進性的(agonistic effects)、協同性的(cooperative effects)，這些結果暗示 NF- κ B 與 p53 之間有不同互相調控的機制，在特定狀況下協調細胞作出不同的決定(83)。

拮抗性的作用，細胞受到游離輻射、daunorubicin 化療藥物刺激，會抑制 NF- κ B 的活化，增加 p53 表現以增強細胞死亡的過程(75)；在 B cells，抑制持續表現的 NF- κ B 也會造成細胞死亡(76)；在 T cells 中，Tax (viral transcriptional activator protein)可以經由誘導 NF- κ B，抑制 p53 的表現(77)；RelA (p65，NF- κ B 次單位)會經由阻礙 p300、CBP 這些 co-activators 在 p53 gene 上面的作用，拮抗 p53 的後續活化(83)。

促進性的作用，受到 doxycycline 作用會增加過氧化物的生成，活化 NF- κ B，向上調節 p53 的表現，以及增加 p53 與 DNA 結合的活性(85)；神經細胞遭受到 DNA 損傷會藉由 NF- κ B 的活化，增加 p53 表現以增強受到 p53 調控的 apoptosis (86)；prolactin 對於血管內皮細胞可以經由 NF- κ B 誘導 p53 調節的 apoptosis，具有抗血管增生的作用(79)；TNF α -induced apoptosis 所造成的 p53 向上調節是經由 NF- κ B 的作用(80, 82)；NF- κ B 引起的 p53 過度活化是藉由抑制 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)基因啟動子的作用(81)；在 HeLa-Lf 細胞中(會穩定表現乳鐵蛋白(Neutrophil lactoferrin, Lf)的子宮頸癌細胞)，會大量表現 mdm2、p21、p53，這是經由活化 NF- κ B 所引起(102)。

協同性的作用，p53 可以增加 RSK1 (p90 ribosomal protein S6 kinase (p90S6K)) 的活性，RSK1 可以磷酸化 RelA 的 Ser536 位置，增強 NF- κ B 在核內定位的作用(78)；在某些情況下，RelA 以及 p53 會共同誘導 apoptosis (84-86)，這是經由誘導 pro-apoptotic target genes 所導致，如：death receptor-5 (DR5) gene，因為上面同時包含了 p53 與 NF- κ B response elements (87)。

二、實驗材料與方法

2.1 溶液與藥品的配製(Preparation of solution and reagents)

2.1.1 藥品試劑(Chemicals and reagents)

1. 藥品購自 AMRESKO
Agarose I , Phenol:Chloroform
2. 藥品購自 Bio Basic Inc.
Bromophenol blue (BPB)
3. 藥品購自 Biomedical Technologies, Stoughton, MA
Endothelial cell growth supplement (ECGS)
4. 藥品購自 Bio-Rad (Bio-Rad, Alfred Nobel Drive Hercules, California, U.S.A.)
Protein assay dye reagent, BSA
5. 藥品購自 BioShop (BioShop Canada Inc., Burlington, ON. L7L 4Y8)
Glycine
6. 藥品購自 Boehringer Mannheim GmbH
(Ethylenedinitrilo)tetraacetic acid disodium salt (EDTA-2Na • 2H₂O)
7. 藥品購自 CalBioChem
 β -Mercaptoethanol (β -ME)
8. 藥品購自 Fluka (Fluka Chemie AG CH-9471 Buchs)
Paraformaldehyde
9. 藥品購自 Gibco (Gibco Laboratory Life Technology, Inc., Grand Island, New York, U.S.A.)
M199 medium, Kanamycin sulfate, Trypsin-EDTA
10. 藥品購自 Hyclon (Hyclon, UT, USA)
Fetal bovine serum (FBS)
11. 藥品購自 Jackson ImmunoResearch Laboratories
Anti-mouse IgG, Anti-rabbit IgG, GAPDH antibody
12. 藥品購自 J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, Inc. Phillipsburg, NJ 08865)

HEPES-free acid, Sodium chloride (NaCl), Sodium dodecyl sulfate (SDS),
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-base)

13. 藥品購自 Merck (E Merck D-6100, Darmstadt, F.R., Germany)

Boric acid (H_3BO_3), Glycerol, Potassium chloride (KCl), Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

14. 藥品購自 Osaka 島久藥品株式會社

Methanol (CH_3OH)

15. 藥品購自 Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Normal mouse IgG

16. 藥品購自 Sigma (Sigma Chemical Co. St Louis Mo. 63178, U.S.A.

/Sigma-Aldrich)

Activated charcoal, Ammonium persulfate (APS), Aprotinin, Calcium chloride ($CaCl_2$), Dextran T-70, Dimethyl-sulfoxide (DMSO), Disodium phosphate (Na_2HPO_4), Dithiothreitol (DTT), DNase-free RNase, Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), Gelatin, Heparin sodium salt, Leupeptin, Magnesium chloride ($MgCl_2$), Phenylmethanesulfony fluoride (PMSF), Progesterone, Proteinase inhibitor cocktail, Sodium azide (NaN_3), Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$), Sodium fluoride (NaF), Sodium orthovanadate (Na_3VO_4), Sodium pyruvate, Sucrose, Tween-20

17. 藥品購自 USB

[3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT), NP-40, Tris-HCl, Triton X-100

2.1.2 西方墨點法相關溶液(Solutions for western blotting)

1. Total cell protein lysis buffer (cell lysis buffer)

製備 cell lysis buffer (50ml)

	Concentration	Addition
HEPES	pH 7.0	595.8mg
NaCl		730.5mg
EDTA		46.5mg
Glycerol 5%	50%	5ml

NP-40 1%	500 μ l
ddH ₂ O	44.5ml

外加 100 \times proteinase inhibitor cocktail (PI) , 50 \times NaF (phosphatase inhibitor)

2. Ammonium persulfate (APS)

製備 10% APS : APS 1g 溶於 10ml ddH₂O , 分裝成 1ml eppendorf , 存放於-20 $^{\circ}$ C 。

3. Separating gel buffer

製備 12% separating gel (15ml)

	Concentration	Addition
ddH ₂ O		6.525ml
Tris-HCl	1.5M (pH 8.8)	3.75ml
Bis/Acrylamide	40%	4.5ml
SDS	10%	150 μ l
APS	10%	75 μ l
TEMED		7.5 μ l

製備 10% separating gel (15ml)

	Concentration	Addition
ddH ₂ O		7.275ml
Tris-HCl	1.5M (pH 8.8)	3.75ml
Bis/Acrylamide	40%	3.75ml
SDS	10%	150 μ l
APS	10%	75 μ l
TEMED		7.5 μ l

製備 7.5% separating gel (15ml)

	Concentration	Addition
ddH ₂ O		8.2125ml
Tris-HCl	1.5M (pH 8.8)	3.75ml
Bis/Acrylamide	40%	2.8125ml

SDS	10%	150 μ l
APS	10%	75 μ l
TEMED		7.5 μ l

4. Stacking gel buffer

製備 8% stacking gel (3ml)

	Concentration	Addition
ddH ₂ O		2.175ml
Tris-HCl	1M (pH 6.8)	375 μ l
Bis/Acrylamide	40%	375 μ l
SDS		30 μ l
APS		30 μ l
TEMED		3 μ l

製備 4% stacking gel (5ml)

	Concentration	Addition
ddH ₂ O		3.18ml
Tris-HCl	1M (pH 6.8)	1.26ml
Bis/Acrylamide	40%	500 μ l
SDS	10%	50 μ l
APS	10%	25 μ l
TEMED		5 μ l

5. Bovine serum albumin (BSA) solution

製備 1% BSA solution : BSA 1g (1%) + NaN₃ 0.2g (0.2%) 溶於 100ml TBST

6. Protein loading dye

製備 4 \times protein loading dye (10ml)

	Concentration	Addition
Tris-HCl 250mM (pH 6.8)	1.5M	1.67ml
SDS 8%		800mg

Glycerol 40%	4ml
Dithiothreitol(DTT) 400mM	616.8mg
Bromophenol blue(BPB) 0.2%	20mg
ddH ₂ O	4.33ml

4× dye 存放於-20℃冰箱。

製備 1× dye：4× dye 用 ddH₂O 稀釋 4 倍

7. PAGE buffer (running buffer)

製備 10× PAGE buffer (1 liter)

	Addition
Tris-base	30.25g
Glycine	144.25g
SDS	10g
ddH ₂ O	add to 1 liter

製備 1× PAGE buffer：10× PAGE buffer 100ml + ddH₂O 900ml

8. Towbin buffer (transfer buffer)

製備 10× Towbin buffer (800ml)

	Addition
Tris-base	30.25g
Glycine	144.25g
ddH ₂ O	add to 800ml

製備 1× Towbin buffer (1 liter，含 20% methanol)：

10× Towbin buffer 80ml + ddH₂O 720ml + CH₃OH 200ml

9. Tris-buffered saline Tween-20 (TBST)

製備 20× TBST (500ml)

	Addition
Tris-base } pH 7.5	12.14g
NaCl }	58.44g
Tween-20	10ml

ddH₂O add to 500ml

製備 1× TBST : 20× TBST 100ml + ddH₂O 1900ml

10. Stripping buffer

製備 Stripping buffer (100ml)

	Concentration	Addition
SDS	10%	20ml
Tris-HCl	0.5M (pH 6.8)	12.5ml
ddH ₂ O		67.5ml
β-Mercaptoethanol		0.8ml

2.1.3 細胞培養相關溶液(Solutions for cell culture)

Phosphate buffered saline (PBS)

製備 20× PBS stock (1 liter)

	Concentration	Addition
NaCl	2.74M	160g
KCl	54mM	4g
Na ₂ HPO ₄	200mM	28.4g
KH ₂ PO ₄	36mM	4.8g
ddH ₂ O (pH 7.4)		add to 1 liter

溶於 ddH₂O 1 公升，測 pH 7.4。20× PBS 用 ddH₂O 稀釋，滅菌後使用。

Fetal bovine serum (FBS)

將 FBS 從冰箱拿到室溫解凍之後，放到水浴槽 56°C 加熱 30 分鐘去補體，分裝後保存於-20°C 冰箱。

Trypsin-EDTA

製備 0.25% trypsin-1mM EDTA : Trypsin 2.5g + EDTA 0.36g 溶於 1 liter PBS，以 0.22 μm filter 過濾後，分裝至 15ml 離心管，存放於-20°C 冰箱。

M199 medium

製備 M199 medium (blank, 1 liter)

	Addition
M199 powder (Gibco®)	1 vial
NaHCO ₃	2.2g
ddH ₂ O	add to 1 liter (pH 7.1~7.2)

先加入 800~900ml ddH₂O，加入 M199 和 NaHCO₃，再測量 pH 7.1~7.2，最後加水到 1 liter，在 laminar flow 使用 0.22 μm filter 過濾 medium 並分裝。

製備 M199 medium (serum-free, 450ml)

	Addition
M199 medium (blank)	438ml
Kanamycin 1%	5ml
HEPES 1%	5ml
Heparin 0.2%	1ml
ECGS 0.2%	1ml

製備 M199 medium (10% FBS)：450ml medium(serum-free)外加 50ml FBS

製備 M199 medium (2% FBS)：450ml medium(serum-free)外加 9.184ml FBS

Charcoal-stored solution

製備 charcoal-stored solution

	Addition
Sucrose 250mM	85.575g
HEPES 10mM	2.383g
MgCl ₂ 1.5mM	0.1428g
ddH ₂ O	add to 1 liter (pH 7.4)

Solution 加入 charcoal 2.5g (0.25%) + dextran T-70 25mg (0.0025%)，混和搖勻後放 4°C 一天，滅菌釜滅菌後存放於 4°C 冰箱。

Charcoal-stripped FBS (CS-FBS)

製備 CS-FBS：取出與要準備 stripping 的 FBS 等量 charcoal solution。charcoal

solution 以 3000rpm, 5min, 4°C 離心, 去除上清液後加入等量的 FBS, 混和搖勻後放 4°C 一天, 隔天以 3000rpm, 5min 離心, 取上清液就是 CS-FBS。

2.1.4 聚合酶鏈鎖反應相關溶液(Solutions for polymerase chain reaction)

Tris/Borate/EDTA (TBE) buffer

製備 5× TBE buffer (1 liter)

	Concentration	Addition
Tris-base		54g
Boric acid		27.5g
EDTA	0.5M (pH 8.0)	20ml
ddH ₂ O		add to 1 liter

製備 0.5× TBE buffer : 5× TBE buffer 100ml + ddH₂O 900ml

2.1.5 質核蛋白質分離溶液(Solutions for separation of cytosolic and nuclear proteins)

Cytosolic extraction buffer (buffer A)

製備 cytosolic extraction buffer (100ml)

	Concentration	Addition
Sucrose 300mM	pH 7.4, NaOH 100mM (2.383g/100ml ddH ₂ O)	10.27g
HEPES 10mM		10ml
KCl 50mM		372.8mg
EGTA 5mM		190.2mg
MgCl ₂ 5mM		47.6mg
ddH ₂ O		add to 100ml

使用前取 1ml buffer A, 加入 50mM PMSF 4 μl + 1M DTT 1 μl

Nuclear extraction buffer (buffer B)

製備 nuclear extraction buffer (100ml)

	Concentration	Addition
HEPES 20mM (pH 7.4, KOH)	100mM (2.383g/100ml ddH ₂ O)	20ml
NaCl 420mM		2.455g
EDTA 0.2mM		7.45mg
MgCl ₂ 1.5mM		14.3mg
ddH ₂ O		add to 100ml

使用前取 0.75ml buffer B，加入 glycerol 0.25ml + 50mM PMSF 4 µl + 1M DTT 0.5 µl

2.1.6 染色質免疫沈澱溶液(Solutions for chromatin IP)

PBS wash buffer

製備 PBS wash buffer (10ml)

	Concentration	Addition
1× PBS		9.69ml
PMSF 1mM	50mM	200 µl
Aprotinin	2 µg/ml	10 µl
Leupeptin	10 µg/ml	100 µl

Glycine

製備 2.5M Glycine：93.84g glycine in 500ml ddH₂O (或 2.81g in 15ml ddH₂O)，存放在-20°C 冰箱。使用前要先置於 4°C 回溫。

IP buffer

製備 IP buffer (10ml)

	Concentration	Addition
Tris 10mM (pH 7.4)		
NaCl 150mM		

Triton X-100 1%

NP-40 0.5%

EDTA 1mM

EGTA 1mM

使用前加 100mM sodium orthovanadate 20 μ l, 50mM PMSF 40 μ l, 2mg/ml aprotinin 50 μ l, 10mg/ml leupeptin 1 μ l

ChIP lysis buffer

製備 ChIP lysis buffer (500ml)

	Concentration	Addition
HEPES 50mM (pH 7.5)	1M (pH 7.5)	25ml
NaCl 140mM	4M	18ml
Triton X-100 1%	10%	50ml
Sodium deoxycholate 0.1%	10%	5ml
ddH ₂ O		add to 500ml

外加 100 \times proteinase inhibitor cocktail (PI)

ChIP lysis buffer (high salt)

製備 ChIP lysis buffer (high salt, 500ml)

	Concentration	Addition
HEPES 50mM (pH 7.5)	1M (pH 7.5)	25ml
NaCl 500mM	4M	62.5ml
Triton X-100 1%	10%	50ml
Sodium deoxycholate 0.1%	10%	5ml
ddH ₂ O		add to 500ml

外加 100 \times proteinase inhibitor cocktail (PI)

ChIP wash buffer

製備 ChIP wash buffer (500ml)

	Concentration	Addition
Tris-HCl 10mM (pH 8.0)	1M (pH 8.0)	5ml

LiCl 250mM		5.3g
EDTA 1mM	0.5M (pH 8.0)	1ml
NP-40 0.5%	10%	25ml
Sodium deoxycholate 0.5%	10%	25ml
ddH ₂ O		add to 500ml

外加 100× proteinase inhibitor cocktail (PI)

TE buffer

製備 TE buffer (100ml)

	Concentration	Addition
Tris-HCl 10mM (pH 8.0)	1M (pH 8.0)	1ml
EDTA 1mM (pH 8.0)	0.5M (pH 8.0)	0.2ml
ddH ₂ O		add to 100ml

ChIP elution buffer

製備 ChIP elution buffer (10ml)

	Concentration	Addition
Tris-HCl 50mM (pH 8.0)	1M (pH 8.0)	0.5ml
SDS 1%	10%	1ml
EDTA 10mM	0.5M (pH 8.0)	0.2ml
ddH ₂ O		add to 10ml

2.2 常用儀器(General instruments)

1. 細胞培養盤：Corning/Falcon
2. 離心管：BD/Corning
3. 倒立式光學顯微鏡：Olympus
4. 細胞培養箱(Incubator)：Thermo CO₂ water-jacketed incubator
5. 無菌操作台(Laminar flow)：Thermo
6. 小型離心機：EZ-lab, EZ centrifuge

7. 離心機/高速離心機：KUBOTA, KUBOTA 1820
8. 乾浴槽(Dry bath)：Multi-Block Heater (Lab-Line)
9. 水浴槽(Water bath)：YIHDERN BT-150
10. 振盪器：Scientific Industries, Inc. Vortex-Genie[®] 2, G560
11. 烘箱：Cherng Huei
12. 垂直式電泳槽：GE
13. 酸鹼測定儀(pH meter)：MeterLab, Radiometer Copenhagen PHM210
14. 電源供應器(Power supply)：OWL, OSP-105
15. 膠膜轉印槽(Electrotransfer tank)：GE
16. 光譜分光光度計(Spectrophotometer)：Thermospectronic
17. 高壓滅菌釜(Autoclave)：Tomin
18. 攪拌/加熱板：Corning stirrer/hot plate
19. 微量天平：Mettler Toledo, AB204-S/FACT
20. 等臂天平：AND EK-120A
21. 震盪器(Orbital shaker)：Digisystem laboratory instrument, Inc. DSR2800V
22. 超低溫冷凍櫃(-80°C freezer)：Puffer Hubbard (Harris Manufacturing Company)
23. 聚合酶鏈鎖反應器(PCR machine)：Whatman Biometra T3000 Thermocycler machine
24. 膠體照相系統(Gel imaging system)：Kodak Scientific Imaging System
25. 冷螢光影像分析系統(Luminescence/fluorescence imaging system)：Berthold Technologies, Inc. NightOWL LB981 Imaging System
26. 螢光光度計(Luminometer)：Promega, GloMax[®] 20/20 Single Tube Luminometer

2.3 實驗方法(Methods)

2.3.1 細胞培養(Cell culture)

本實驗使用人類臍靜脈內皮細胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)培養在被覆著 1% gelatin 的 10 cm 培養皿，使用含有 10% FBS 的 Medium 199 培養液 (1% HEPES, 1% Kanamycin, 2500 U/ml Heparin, 2500 U/ml ECGS)，置於培養箱，在溫度 37°C，95% 相對濕度，5% 二氧化碳濃度條件下培養。培養液每三天更換一次。細胞滿度達到八~九分滿時，將細胞分盤繼代，水浴槽 37°C 預熱培養液、PBS、0.25% Trypsin-EDTA。吸去培養液，加入約 5ml PBS 清洗一次後吸去，加入 0.25% Trypsin-EDTA 1ml，等到細胞都不貼附後加入些許培養液終止 trypsin 作用，移到滅菌離心管，以 3000rpm，5min 離心，吸去上清液，加入新的培養液輕輕打散細胞，取適量細胞液至培養皿，搖勻後置於培養箱。本實驗使用細胞繼代數介於第五~十代之間。

2.3.2 西方墨點法(Western blotting)

1. 準備細胞(Lysate preparation)－全細胞蛋白萃取(Whole cell protein extracts)

依實驗需求決定蛋白質萃取液。以全細胞蛋白質萃取為例，取出培養皿先觀察細胞狀況，確定細胞狀況之後，倒掉培養液，先用 PBS 清洗二次，倒掉 PBS 並盡量吸乾，加入約 1ml PBS，使用乾淨的刮棒將細胞刮下收到乾淨的 1.5ml 離心管，以 4000 rpm，5 分鐘離心，此時配製 1ml cell lysis buffer，外加 100× proteinase inhibitor cocktail，50× NaF。離心後吸掉 PBS 上清液，依照細胞塊(pellet)大小決定加入 buffer 的量，用 pipetman 打散細胞後(resuspend)，每隔 5 分鐘 vortex 一次，強度控制在 7~8，持續約 40 分鐘，以 12500 rpm，30min，4°C 離心。離心後取上清液到新的 1.5ml 離心管，進行下一步蛋白質定量，剩下的存放於-80°C。

2. 蛋白質濃度定量(Quantitation of protein concentration)

使用分光光度計測定吸光值，波長設定 595nm，以 2mg/ml BSA 當標準值，稀釋成標準組 1→0.5→0.25→0.125 mg/ml。1× protein assay reagent 用濾紙過濾，每個 cuvette 加入 1ml，標準組加入 20 μl，樣本組加入 2 μl，vortex 均勻後等 5 分鐘回溫，測定吸光值，計算並配製 loading sample 總量(依實驗需求調整)。用乾浴機加熱到 100~105°C，10~15 分鐘(蛋白質變性成一級結構)。

3. SDS-PAGE 電泳(Electrophoresis)

先製備 SDS-PAGE gel。架好膠體加入 sample 後，power supply 先設定 80V，等到 sample 完全穿過上層膠體後(stacking gel)，再改成 60~80V 跑膠。

4. 蛋白質轉印(Transfer of proteins onto a membrane)

準備好 transfer tank、冷卻裝置，裁剪適當 PVDF，PVDF 先用 methanol 潤濕 1~2 分鐘，再放入 Towbin buffer 潤濕數分鐘，小心取下膠體，用 Towbin buffer 潤濕 gel，準備三明治夾，依照黑→白(負到正)放入：海綿→濾紙→gel→PVDF→濾紙→海綿。注意：Gel 放置要左右顛倒。架好 tank，倒入 1× Towbin buffer，水位必須在 min~max 之間，設定 power supply 80mA，跑 transfer 約 20 小時(建議值 1500<mAh<1900)。Transfer 結束後將 PVDF membrane 取下觀察 marker、protein 是否都有轉印完全。

5. 免疫染色(Immunostaining)

準備 5%脫脂奶粉(0.5g/1× TBST，染非磷酸化的蛋白)或 1%BSA(blocking reused，染磷酸化蛋白)，使用 1× TBST wash PVDF 2 次，加入 blocking buffer 在室溫下 blocking 1 小時(或 4°C overnight)，倒掉牛奶(或回收 1%BSA)，使用 1× TBST 清洗 15 分鐘，將 PVDF 上欲觀測的蛋白位置裁切，以特定的一級抗體(1:500~1000)在室溫下染 30 分鐘，再放入 4°C overnight。使用 1× TBST 清洗 15 分鐘，以二級抗體(1:5000~10000)在室溫下染 1 小時，使用 1× TBST 清洗 1 小時，

以 ECL kit 進行冷光壓片。

2.3.3 細胞質核蛋白萃取(Cytoplasm and nuclear extract preparation)

方法一

使用 Thermo NE-PER[®] nuclear and cytoplasmic extraction reagents 進行質核蛋白分離，維持 CER I : CER II : NER 體積比在 200 : 11 : 100，取適量 CER I、NER、PBS 加入蛋白酶抑制劑(protease inhibitor)。先以 trypsinization 收細胞，吸取部份培養液到 15ml 離心管，每組樣本各 2~3 盤 10cm 培養皿用 PBS 清洗二次後吸乾，加入 1ml trypsin-EDTA 作用，等到細胞懸浮後，移到 15ml 離心管，以 3500rpm，5min 離心，去除 PBS 上清液。加入約 700 μ l PBS 把細胞塊沖下來移到 1.5ml 離心管，以 2500rpm，5min 離心，去除上清液後加入 50 μ l CER I，以 pipetman 沖散細胞塊，放冰上 5min，重複沖散動作 4 次，持續 20min，加入 2.75 μ l 預冷的 CER II，用力 vortex 5sec，放冰上 5min，vortex 5sec，以 12500rpm，8min，4 $^{\circ}$ C 離心，取上清液到新的 1.5ml 離心管，即為細胞質萃取液。Pellet 加入 1ml PBS，vortex 5sec，以 3000rpm(2000~4000rpm)，5min，4 $^{\circ}$ C 離心，去除上清液後加入 25 μ l NER，用力 vortex 15sec，每 10min vortex 一次，持續 40min，以 15000rpm，10min，4 $^{\circ}$ C 離心，取上清液到新的 1.5ml 離心管，即為細胞核萃取液。存放於-80 $^{\circ}$ C。

方法二

使用 trypsinization 收細胞。吸取部份培養液到 15ml 離心管，每組樣本各 2~3 盤 10 cm 培養皿用 PBS 清洗二次後吸乾，加入 1ml trypsin-EDTA 作用，等到細胞懸浮後，移到 15ml 離心管，以 2500rpm，5min 離心，去除 PBS 上清液。加入約 700 μ l PBS 把細胞塊沖下來移到 1.5ml 離心管，以 2500rpm，5min 離心，此時

製備 1ml 細胞質萃取溶液(Buffer A, cytosolic extraction buffer), 去除上清液後加入約 100~200 μ l buffer A, 以 pipetman 沖散細胞塊, 放冰上 5min, 重複沖散動作持續 30min, 以 3000g, 5min, 4°C 離心, 收集上清液到新的 1.5ml 離心管, 此為細胞質萃取液。剩下的細胞塊加入 200 μ l buffer A, 沖散細胞後每次抽取 100 μ l 到 Dounce homogenizer, 垂直/水平研磨各 25 次, 移到新的 1.5ml 離心管, 重複此步驟直到收集完畢。以 3000g, 5min, 4°C 離心, 此時製備 1ml 細胞核萃取溶液(Buffer B, nuclear extraction buffer), 離心完後去除上清液, 加入 30~40 μ l buffer B, 此為細胞核萃取液, 同時在細胞質萃取液加入 1% NP-40, 以 pipetman 沖散細胞用力 vortex, 放冰上 20min。細胞質/核萃取液, 以 15000rpm, 10min, 4°C 離心後, 上清液分別移到新的 1.5ml 離心管。進行蛋白質定量, 剩下的存放於 -80°C。

2.3.4 免疫沈澱法(Immunoprecipitation)

將蛋白質樣本進行濃度定量, 取蛋白質含量 200 μ g 以上當樣本組, 剩下的部份取固定量當作 negative control, 取適量 protein A agarose (beads), 取用時需先將 200p tip 尖端剪除, 以 8000~9000rpm, 30sec, 4°C 離心, 去除上清液, 加入與上清液同體積的 PBS(或是滅菌水), 分裝的抗體/beads 每組加入 20 μ l beads、2 μ l 一級抗體, 用食指輕輕 tapping, 室溫作用 0.5~1 小時後, 放冰上。Pre-clear cell lysate 步驟, 取 10 μ l beads、2 μ l mouse IgG 加入 sample, 室溫作用 30min 後, 以 8000rpm, 30sec, 4°C 離心, 取上清液加入分裝的抗體/beads, 放在自轉儀(rotator) 旋轉, 4°C, overnight。

隔天以 6000rpm, 5min, 4°C 離心, 去掉上清液, 不要吸到 beads, 加入 1ml PBS(washing), 以 6000rpm, 5min, 4°C 離心, 去掉上清液, 重複二次。剩下的 beads 每組加入約 10 μ l 的 2x protein loading dye, 用乾浴機(可加一點水在乾浴機)

加熱到 100~105°C，10~15 分鐘，之後進行西方墨點法後續步驟。

2.3.5 染色質免疫沈澱法(Chromatin immunoprecipitation)

1. 染色質免疫沈澱(ChIP)

以培養皿內的培養液計算 1% formaldehyde 需要加入的 37% formaldehyde 體積(例：7ml 培養液加入 37% formaldehyde 189 μ l)，搖勻後放室溫 15min。以培養皿內的培養液計算 0.125M glycine 需要加入的 2.5M glycine 體積(例：7ml 培養液加入 2.5M glycine 350 μ l)，搖勻後放室溫 5min，終止 formaldehyde 作用。使用 4°C PBS(含有 protease inhibitor)清洗二次後。吸乾 PBS，每盤加入 100 μ l ChIP lysis buffer，用刮棒收下細胞到新的 1.5ml 離心管。強力 vortex，放冰上 30min，重複 vortex 動作約 3 次持續 90min。Sample 放冰上，使用超音波振盪器(sonicator)，以低強度 20%，震盪 10 秒，停止 5 秒，重複三次。以 12000rpm，30min，4°C 離心，離心後取上清液到新的 1.5ml 離心管。進行蛋白質定量，取蛋白質含量 300~500 μ g 當樣本組，剩下的部份取固定量當作 input，存放於-80°C。Pre-clear cell lysate。依樣本數配製 IP buffer，每 500 μ l 含有 0.2mM PMSF，10 μ g/ml aprotinin，1 μ g/ml leupeptin，放 4°C。每個樣本(蛋白質含有 300~500 μ g)加入 500 μ l IP buffer，2 μ l 一級抗體，40 μ l protein A/G agarose (for salmon sperm DNA，beads)，放在自轉儀 (rotator)旋轉，4°C，overnight。

隔天以 6000rpm，5min，4°C 離心，去掉上清液，不要吸到 beads，留下約 100 μ l。進行清洗步驟，加入 1ml ChIP lysis buffer (no proteinase inhibitor)，同時將 pellet 打漩沖散細胞，以 6000rpm，5min，4°C 離心，重複二次。加入 1ml ChIP lysis buffer (high salt)，以 6000rpm，5min，4°C 離心，重複二次。加入 1ml ChIP lysis buffer (wash buffer)，以 6000rpm，5min，4°C 離心，重複二次。加入 1ml TE buffer，以 6000rpm，5min，4°C 離心，重複二次。清洗的最後一步，去掉上清液留下的

100 μ l，用 pipetman 小心吸乾上清液。加入 75 μ l ChIP elution buffer，放在 65°C 水浴 10min，以 6000rpm，1min，4°C 離心。吸取上清液移到新的 1.5ml 離心管，剩下的 pellet 加入 75 μ l ChIP elution buffer 再重複一次，拋棄剩下的 pellet。上清液放在 65°C 水浴 overnight。隔天再加入 150 μ l ChIP elution buffer，65°C 水浴 overnight。

隔天取出 input 與 sample 一起進行 DNA 萃取。每個樣本加入 500 μ l phenol，放在自轉儀旋轉，4°C，10min，以 12000rpm，5min，4°C 離心，吸取上清液移到新的 1.5ml 離心管。每個樣本加入 500 μ l phenol/chloroform(1:1)，重複上述步驟一次。每個樣本再加入 500 μ l chloroform，重複步驟一次，記住上清液體積，加入 0.1 \times 3M sodium acetate (NaOAc)，2 \times cold 99.9% ethanol，混合均勻後放 -20°C，overnight (或 -80°C，2hr)。

以 14000rpm，10min，4°C 離心，去掉上清液(看不到 pellet)，加入 cold 75% ethanol，混合均勻後，以 10800rpm，5min，4°C 離心，去掉上清液(看不到 pellet)，等乾燥後加入 15 μ l ddH₂O，37°C 水浴 10min。結束後進行 PCR。

2. 聚合酶鏈鎖反應(PCR)

四組 primer 設計分別位在 human p53 gene 轉譯起始位置下游的 +12~+415，以及上游的 +35~-153，-610~-935，-1925~-2383。

每組 25 μ l PCR sample mix 成份如下：

DNA sample	1.5 μ l
ddH ₂ O	7 μ l
50% glycerol	2.5 μ l
Taq mastermix (2 \times)	12.5 μ l
Forward primer	0.75 μ l

Reverse primer 0.75 μ l

PCR cycling profiling 如下：

1. 95°C 5min
2. 95°C 30sec
3. Tm 30sec (40 cycles)
4. 72°C 45sec
5. 72°C 10min
6. 4°C pause

2.3.6 經由聚合酶鏈鎖反應刪去目標基因(Gene deletion by PCR)

1. 引子設計(Primer design)

在此使用實驗室先前設計的 pGL3-Basic plasmid (vector)，包含 tumor protein 53 的 P1 啟動子，作為藍本，設計一對引子，引子包含 P1 啟動子、特定的限制酶切位，其中一條引子包括預定刪去的 NF- κ B binding site；另外設計三組長序列的互補引子，互補引子預先去除目標基因序列，保留其餘序列，依此原則設計三組引子，分別設計不刪去目標基因序列、刪去 USF-1 site (HLH)、刪去 NF- κ B binding site，用以製作出三組插入子(inserts)。

2. 聚合酶鏈鎖反應(PCR-mediated gene disruption)

每組 50 μ l PCR sample mix 成份如下：

Vector	0.5 μ l
ddH ₂ O	20 μ l
DMSO	1.5 μ l
Taq mastermix (2 \times)	25 μ l

Forward primer	1.5 μ l
Reverse primer	1.5 μ l

PCR cycling profiling 如下：

1. 95°C 5min
2. 95°C 30sec
3. 68°C 60sec (40 cycles)
4. 72°C 45sec
5. 72°C 10min
6. 4°C pause

3. DNA 純化(DNA clean up)

準備 50 μ l 以上的 DNA 樣本，不足 50 μ l 則用 ddH₂O 補至 50 μ l，加入與樣本等量體積的 phenol/chloroform(1 : 1)，以 12000rpm，5min，10°C 離心，取上清液到新的 1.5ml 離心管，記住上清液體積，加入 0.1 \times 3M sodium acetate (NaOAc)，2 \times cold 99.9% ethanol，1 μ l glycogen，混合均勻後放 -80°C，5~30min。以 12500rpm，10min，4°C 離心，去掉上清液(看不到 pellet)，加入 cold 75% ethanol，混合均勻後，以 10800rpm，5min，4°C 離心，去掉上清液，等乾燥(air dry)後加入約 20 μ l ddH₂O，37°C 水浴 10min 後，保存於 -20°C。

4. 製造限制酶切位(Restriction enzyme digestion)

將 vector、insertion 以限制酶切出切位，分二次切出 KpnI、XhoI 二個切位，

將 Vector/insertion 製造 KpnI 切位(100 μ l)：

Vector/insertion	4 μ l /25 μ l
ddH ₂ O	84 μ l /63 μ l
10 \times NEBuffer	10 μ l

100× BSA	1 μl
KpnI	1 μl

放在 37°C 水浴 2 小時，之後進行 DNA 純化。DNA 純化完畢後，再製造第二個 XhoI 切位，37°C 水浴 2 小時後，進行純化 DNA 或是 DNA 電泳膠體純化。

5. DNA 電泳膠體純化(DNA gel clean up)

使用 TBE buffer 跑 DNA 電泳。使用 Geneaid Gel/PCR DNA fragments extraction kit，切下感興趣的膠體片段放到 1.5ml 離心管，加入 500 μl DF buffer，用力 vortex，55~60°C 水浴 10~15min，每 2~3min vortex 一次，直到膠體完全溶解，放在室溫下冷卻。準備 DF column 放在 2ml collection tube，將 800 μl 的 sample 加到 DF column，以 12500rpm，30sec，4°C 離心，倒掉過濾液，重複此步驟直到 sample 收完。加入 400 μl W1 buffer 到 DF column，以 12000rpm，30sec，4°C 離心，倒掉過濾液，加入 600 μl Wash buffer 到 DF column，等待 1 min，以 12000rpm，30sec，4°C 離心，倒掉過濾液，再以 12000rpm，3min，4°C 離心加速乾燥。將 DF column 移到新的 1.5ml 離心管，加入 15~50 μl Elution buffer，對準膜中央滴，放室溫 3 分鐘，以 12500rpm 室溫離心 2 分鐘，保存於-20°C 冰箱。

6. 接合反應(Ligation)

將切出二個切位的 vector、insert 取 1 μl 進行 DNA 電泳，比對 marker 亮度，估計 vector、insert 相對質量，取質量比 insert : vector = 5 : 1 (或是 insert (μg)/insert (kb) : vector (μg)/ vector (kb) = 5 : 1~10 : 1)。

Vector/insertion 接位接合 (20 μl) :

Insertion	5× mass
Vector	1× mass
ddH ₂ O	補到 20 μl

10× T4 DNA ligase buffer	2 μl
10× PEG	2 μl
T4 DNA ligase	1 μl

放在 16°C 培養 14~16 小時，之後保存於 4°C 冰箱。

7. 轉殖反應(Transformation)

使用 Fast-Trans™ competent E. coli DH5α cells，各取 15 μl 到二個 1.5ml 離心管，取接合後的 vector 5 μl 加到 competent cells，放在冰上 20min，heat-shock the tube at 42°C for 45sec，放在冰上至少 2min，準備二個 Amp^R LB agar plate，取出二管 cell 分別加到二盤 Amp^R LB agar plate，倒入滅菌過的 beads 將 cell 均勻塗佈於 plate，之後回收 beads。將 LB agar plate 倒置置於 37°C 烘箱培養 12 小時以上，直到長出的菌落直徑達 1mm，再進行菌落挑選，或是使用石蠟封存於 4°C 冰箱保存。

8. 菌落挑選(Colony selection)

等到 plate 長出數個菌落達 1mm，挑選較大的菌落塗在作有標記的 Amp^R LB agar plate，等待 3~6 小時直到菌落長出，個別挑選菌落，並使用 Amp^R LB medium 置於 37°C 烘箱培養 12 小時(步驟與製備少量質體 DNA 相同)，取每管菌液取 500 μl 進行抽取質體，跑 DNA 電泳膠體。選取可能的菌落質體使用限制酶切出切位，跑 DNA 電泳膠體確認有 insert 嵌入後，即可送定序確認序列。

2.3.7 製備少量質體 DNA(Preparation of little amount of plasmid)

LB medium 在使用前先加入 1000×稀釋的 ampicillin 抗生素，取菌液 10~15 μl，加到含有 ampicillin 的 LB medium 黃色養菌管，蓋子不要旋緊讓空氣能夠進出，置於 37°C，230rpm 震盪器搖晃約 14~16 小時，等到 LB medium 混濁略為透光的狀態，不要等到 LB 顏色變黃，可以取 600 μl 菌液加入 50% glycerol 257 μl (最

終濃度為 15%)，保存於-80°C。剩下的菌液收集到新的 1.5ml 離心管，在室溫下以 5500 rpm 離心 1~2min 之後，輕輕倒掉上清液，用 pipetman 吸乾殘液，使用 Viogene Mini-M plasmid DNA extraction kit，加入 250 µl MX1 buffer，用 vortex 或 pipetman 打散 pellet 之後，加入 250 µl MX2 buffer，輕微上下小心倒置離心管 4~6 次，計時 1 分鐘，直到 lysate 變清澈，此時加入 350 µl MX3 buffer 中和 lysate，小心混和溶液會形成白色沈澱，以 13000 rpm /10000g 室溫離心 5~10 分鐘，準備 collection tube 放好 Mini-M™ column，取上清液加到 column，以 9000rpm/7000g 離心 1 分鐘，倒掉過濾液，取 500 µl WF buffer 到 column，以 9000rpm/7000g 離心 1 分鐘，倒掉過濾液，取 700 µl WS buffer 到 column，以 9000rpm/7000g 離心 1 分鐘，倒掉過濾液，再以 13000rpm/10000g 離心 3 分鐘，column 放室溫 3~5 分鐘讓酒精揮發，取上面的 Mini-M™ column 到新的 1.5ml 離心管，對準膜中央滴，放室溫 3 分鐘，加入 50 µl Elution buffer (可以分二次 25 µl 操作)，以 13000rpm/10000g 室溫離心 2 分鐘，使用 Nanodrop 測定濃度，保存於-20°C 冰箱。

2.3.8 細胞轉染(Transfection)

使用 24-well plate，每 well 種 20000 個細胞，每個設計組別使用 4 wells。隔天等到細胞貼附之後，以 Opti-MEM 清洗二次，每 well 加入 500 µl DMEM-GlutaMax (含有 2% FBS，0.2% ECGS)，外加 50 µl plasmid DNA/Renilla luciferase/jetPEI-HUVEC™ mixture，mixture 混和過程只能從 jetPEI-HUVEC™ (每格 150mM NaCl 25 µl，加入 1 µl jetPEI™)慢慢滴到 DNA solution (每格 150mM NaCl 25 µl，加入 10ng Renilla luciferase 與 0.5 µg DNA)混和，混和後放室溫 20~30 分鐘再加入 plate，加完之後將 plate 混和均勻。反應作用 4 小時後吸掉試劑，每 well 加入 1ml M199 with 10% FBS，等待 22~24 小時，再進行後續加藥反應。

2.3.9 螢光素試驗(Luciferase assay)

將 5× passive lysis buffer (PLB)使用二次水稀釋成 1×。收細胞倒掉培養液，用 PBS 清洗一次，每 well 加入 1× PLB 40 μl 用刮棒刮下細胞，可以繼續操作或保存於-80°C。使用 GloMax[®] 20/20 Single Tube Luminometer 測定螢光表現，開機後選擇 Protocol→Run Promega Protocol→DLR-0-INJ→按 OK，測量時要先避光，收下來的細胞(sample)先回溫到室溫，取新的 1.5ml 離心管分兩段式測讀值，先取 sample 35 μl，加入 luciferase assay buffer (LAB) 30 μl 混和均勻，按 Measure 進行第一段測量；等到出現 OK 畫面，加入 Stop&Glo[®] buffer 30 μl (預先混和 substrate)，按 OK 進行第二段測量，重複此步驟測完所有樣本。



三、實驗結果

3.1 黃體素誘導 NF- κ B 由血管內皮細胞的細胞質進入細胞核

由實驗室先前的研究可以知道，黃體素可以抑制人類臍靜脈內皮細胞 (HUVEC) 的增生，此種機制是藉由增加 P53 表現所導致，為了了解 NF- κ B 對於 P53 表現的影響，使用相同條件與黃體素的劑量，當細胞滿度達到七分滿時換成 2% charcoal-stripped FBS M199 media，quiescence 24h 後，換成 10% charcoal-stripped FBS M199，加入最終濃度是 500 nM 的黃體素，選擇在 P53 表現增加之前的時間點(23 小時以前)，分別於 20 及 22 小時收取質/核蛋白質，在 22 小時有觀察到 NF- κ B 在細胞質/核中的變化，而 20 小時 NF- κ B 沒有明顯的變化，圖一(B)顯示經過黃體素處理，HUVEC 的細胞質 NF- κ B 總量有略為減少，而在細胞核 NF- κ B 總量有明顯增加的現象， 3.81 ± 0.87 ($P < 0.03$ 相對於細胞核控制組)，但是整體的 NF- κ B 總量並沒有因為黃體素作用而有明顯變化(圖一(A))，指出 NF- κ B 從細胞質移動到細胞核，出現轉位現象(translocation)，這些進入細胞核的 NF- κ B 可能會影響後續的基因轉錄。

3.2 黃體素透過 NF- κ B 的活化來增加血管內皮細胞 P53 的表現

為了知道 NF- κ B 是否會影響 P53 的表現，在這裡利用 NF- κ B 抑制劑 (IKK 特異性抑制劑) Bay11-7082 可以阻斷 NF- κ B 的作用來觀察 P53 表現量的變化。在給予 500 nM 黃體素之前一小時投以 10、50 及 100 nM 不同濃度的 Bay11-7082，預先阻斷 NF- κ B 的作用，再選擇 P53 表現有增加的時間點收取全部的細胞蛋白質；圖二顯示出，單獨以黃體素處理的組別會有 P53 表現增加達到 1.7 倍 ($P < 0.03$ 相對於對照組)，10 nM Bay11-7082 組別開始有出現抑制 P53 表現的現象 ($P < 0.05$ 相對於單獨以黃體素處理的實驗組)，50 及 100 nM Bay11-7082 組別則完全阻斷

黃體素對 P53 表現的作用($P < 0.05$ 相對於單獨以黃體素處理的實驗組)。這指出血管內皮細胞需要活化的 NF- κ B 作用來增加 P53 的表現。

3.3 黃體素增加 I κ B α 的磷酸化並且減少 I κ B α 與 NF- κ B 的結合

活化的 NF- κ B 與血管內皮細胞中的 P53 表現增加有關。NF- κ B 平時是以 NF- κ B-I κ B α 的複合物形式存在於細胞質中，一旦出現其他訊息分子的刺激，I κ B α 會被磷酸激酶(IKK complex)磷酸化，並且脫離 NF- κ B。為了了解黃體素對於 NF- κ B 複合物的作用，在 NF- κ B 還沒從細胞質進入細胞核之前，先觀察 I κ B α 的磷酸化以及 NF- κ B-I κ B α 的結合情形。圖三顯示出 I κ B α 在 21 小時就有 p-I κ B α 增加的現象，說明黃體素的確可以增加內皮細胞 I κ B α 的磷酸化作用；圖四藉由免疫共沈澱法呈現 NF- κ B-I κ B α 的結合情形，而在 21.5 小時就可以觀察到 NF- κ B 與 I κ B α 結合下降的情形，可以知道經過黃體素作用後會導致 NF- κ B 與 I κ B α 分離，增加 NF- κ B 單體與 p-I κ B α 在血管內皮細胞中的含量。

3.4 黃體素增加 I κ B α 的磷酸化作用是透過活化 ERK 的途徑

實驗室之前的研究指出，給予黃體素之後，可以在短時間內活化 ERK (MAPK) 的作用，同樣可以影響後續 P53 表現量增加。在這裡想要了解 NF- κ B 與 ERK 途徑之間的關係，利用 ERK1/2 inhibitor 阻斷 MAPK 的作用來觀察對於 NF- κ B 複合物的影響。透過 ERK1/2 抑制劑：U0126 或 PD98059 的作用，可以在圖五看出，單獨給予 U0126 或 PD98059 的組別相對於對照組其 I κ B α 及 p-I κ B α 並沒有明顯量的變化；在給予黃體素之前一小時給予 U0126 或 PD98059 的組別，觀察到 p-I κ B α 在細胞內的總量減少，但是並沒有影響 I κ B α 量的變化；可以說明經由抑制 ERK1/2 可以減少黃體素引起的 I κ B α 磷酸化，指出 MAPK 路徑對於 NF- κ B 複合物的變化有一定的影響。

3.5 黃體素可以增加 NF- κ B 與 p53 gene 的結合

NF- κ B 經過黃體素誘導可以從細胞質進入細胞核，要了解進入細胞核的 NF- κ B 是否會影響 p53 gene 的轉錄活性，要先觀察 NF- κ B 與 p53 gene 的結合情形。為了了解 NF- κ B 在 p53 gene 的結合情形，在這裡選取四段區域，分別位於 human p53 gene 轉譯起始位置下游的+12~+415，以及上游的+35~-153，-610~-935，-1925~-2383，這些區域都有包含 NF- κ B 可能的結合位置。經由搜尋 NCBI nucleotide 找出 p53 gene sequence (tumor protein 53, TP53)，設計適合的引子，再選擇 Blast 分析以確定引子的專一性，選擇 NF- κ B 進入細胞核之後的時間點(22 小時)，使用染色質免疫沈澱法觀察 NF- κ B 與 p53 gene 之間的結合。結果發現，在 p53 gene 這些區域，經過黃體素處理 22 小時之後，會增加 NF- κ B 與 p53 gene 的結合，但是在 20 小時則沒有結合增加的情形(圖六)，顯示進入細胞核的 NF- κ B 與 p53 gene 有結合增加的現象。

3.6 p53 gene 啟動子上面具有轉錄因子 NF- κ B、HLH、EBP β 的結合位置

參考之前的文獻，指出 p53 gene 上面具有三個潛在的啟動子活性，第一個啟動子位於 p53 gene exon1 以及其上游區域，可以轉錄出完整的 p53 mRNA，轉譯出具有完整功能的 53kDa 或 46 kDa 的 P53 蛋白(91, 92, 100)以及轉錄出少掉 40 nucleotides 的 p53 mRNA，轉譯出 48 或 41 kDa 的 P53 蛋白(96, 97, 100)，第二個啟動子位於 p53 gene intron1，具有轉錄活性，但是不能轉譯出具有功能的 P53 蛋白，屬於一個偽基因(pseudogene)(93)，第三個啟動子位於 p53 gene intron4，可以轉錄出少掉 133 nucleotides 的 p53 mRNA，轉譯出 35 或 25 kDa 的 P53 蛋白，此種蛋白不具有 N-terminus 的 transactivation、proline domain，但是仍保有大部

分的 DNA binding domain (96, 97, 100)。

根據上述，能轉錄、轉譯出具有完整功能的 P53 蛋白的啟動子位於 p53 gene exon1 以及上游區域，因此在此參考文獻的啟動子設計區域(101, 102, 103)，exon1 第 118 bp 具有 Xba I 的限制酶切位，exon1 上游 232 bp 位置具有 HindIII 的限制酶切位，選取此段序列進行分析，使用 MOTIF Search (<http://motif.genome.jp/>)、Transcription Element Search System (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) 尋找可能的因子結合位置，發現 p53 gene promoter 上面具有轉錄因子 NF- κ B、HLH (basic helix-loop-helix leucine zipper family or upstream stimulatory factor 1，USF-1)、EBP β (CCAAT/enhancer binding protein β) 的結合位置。為了分析 NF- κ B 以及其他轉錄因子在 p53 gene 上面的啟動子活性，設計五組 gene construct，刪去特定的結合位置，五組 construct 分別是：完整的整段 325bp 的 p53 啟動子 (p53GL3，原始序列 5' 有 HindIII、3' 有 Xba I 限制酶切位，實驗室提供)、整段 325bp 刪除 NF- κ B 結合位置 (p53GL3-delNF κ B)、80bp 的 minimum p53 啟動子 (p53GL3-80，缺少 -81~-325 區域)、移除 HLH domain 的 minimum p53 啟動子 (p53GL3-80delHLH，位於 NF- κ B 結合位下游 5 bp) 及移除 NF- κ B 結合位的 minimum p53 啟動子 (p53GL3-80delNF κ B)，接合到 pGL3-Basic plasmid (圖七)。

為了製作 p53 gene construct，以實驗室所提供的 p53GL3 plasmid 為藍本，設計四組引子用來建構 p53 gene deletion construct 的插入子，一組使用 PCR 做出的插入子，另外三組利用互補引子對互黏 (annealing) 製作出 minimum p53 promoter 的插入子，做好的插入子接合到 pGL3-Basic plasmid，經由質體轉殖到勝任細胞放大質體，抽取質體後再使用限制酶來篩選菌落，最後選擇適當的菌落進行定序確認，挑選正確序列的 constructs (圖八)。

3.7 移除 p53 gene 啟動子上的 NF- κ B 結合位置幾乎完全阻斷黃體素對於 p53 gene 的啟動子活性

為了確認 NF- κ B 以及相關轉錄因子結合位置在 p53 啟動子上的重要性，將五組 constructs 轉染送入細胞後，再以黃體素處理 22 小時進行螢光素試驗，測得數據以 Firefly/Renilla luciferase 相對螢光素活性(RLA)表示，結果發現以黃體素處理的 p53GL3-delNF κ B 組別的啟動子活性遠小於 p53GL3 組別，活性剩下 $7.9 \pm 1.3\%$ ($P < 0.001$)，同樣的情形，以黃體素處理的 p53GL3-80delNF κ B 組別的啟動子活性小於 p53GL3-80 組別，剩下 $15.2 \pm 1.5\%$ ($P < 0.001$)，如果相對於 p53GL3 組別，啟動子活性就只剩下 $6.0 \pm 0.6\%$ ($P < 0.001$)，說明移除 NF- κ B 結合位置之後，可以幾乎完全阻斷黃體素對於 p53 gene 的啟動子活性；以黃體素處理的 minimum p53 promoter (p53GL3-80) 啟動子活性只有完整的 p53 啟動子(p53GL3)的 $40.0 \pm 4.7\%$ ($P < 0.001$)，可以推測位於 -81~-325 的 EBP β 轉錄因子會影響 p53 gene 的啟動子活性；移除位於 NF- κ B 結合位下游 5 bp 的 HLH domain (p53GL3-80delHLH)，黃體素誘導啟動子活性僅為 p53GL3-80 的 $46.0 \pm 9.5\%$ ，指出 HLH 也有參與 p53 gene 的啟動子作用(圖九)，說明 NF- κ B 結合位置對於黃體素誘導 p53 啟動子活性具有決定性的角色，HLH、EBP β 結合位置對於 p53 啟動子也會提供部份的 p53 啟動子活性。

3.8 黃體素增加 PR-A 由內皮細胞的細胞質進入細胞核

在人類臍靜脈內皮細胞中可以偵測到二種黃體素受器亞型：PR-A 及 PR-B，以及這二者 mRNA 的表現(88)，一般認為黃體素會與細胞內的黃體素受器結合，進一步誘導基因的轉錄活性，但是這種作用在這裡有待釐清。有文獻指出，在人類臍靜脈內皮細胞中，給予黃體素刺激可以誘導 PR-A 的表現量增加，給予動情

素可以增加 ER β 的表現量，但是對於 PR-B 及 ER α 的表現則沒有影響(29)。為了解在經過黃體素刺激之後，對於 PR 的作用為何，以及要觀察是否對於 NF- κ B 轉錄作用有影響，在此先使用細胞質/核分離來看 PR 的變化；結果發現，經過黃體素處理，HUVEC 的細胞質 PR-A 總量有明顯減少 42.5 \pm 4.9% (P<0.01 相對於細胞質對照組)，而在細胞核 PR-A 總量也有明顯增加的現象，44.6 \pm 2.8% (P<0.01 相對於細胞核對照組)，細胞核 PR-A 增加的量大約接近於細胞質 PR-A 減少的量，而細胞質與細胞核的 PR-B 總量在黃體素處理前後並沒有任何變化(圖十)，指出 PR-A 會從細胞質移動到細胞核，出現轉位現象(translocation)，但是對於 PR-B 則沒有顯著的影響。

3.9 黃體素可以增加 NF- κ B 與 PR-A 的結合

PR-A 經過黃體素誘導可以從細胞質進入細胞核，要了解進入細胞核的 PR-A 是否會影響 NF- κ B 對於 p53 gene 的轉錄活性，為了確認 PR-A 是否會與 p53 gene 的啟動子結合，使用 NCBI nucleotide 搜尋，由於 human p53 gene 上面並沒有任何 PR 的結合位置，可以知道 PR 不會直接與 p53 gene 結合，但是 PR 仍可能與 NF- κ B 結合，影響 NF- κ B 的轉錄活性，所以要先觀察 NF- κ B 與 PR 之間的結合情形。根據上一段敘述，在黃體素的作用下，會促使 PR-A 由細胞質移動到細胞核，圖十一的免疫共沈澱結果顯示，黃體素的確會增加 PR-A 與 NF- κ B 之間的結合，相反地，PR-B 與 NF- κ B 之間並沒有出現結合的現象，圖表結果是使用雙向免疫共沈澱以確定 NF- κ B 與 PR 之間的結合情形。我們進一步想確認黃體素對於 PR-A 與 NF- κ B 之間的結合的作用是發生在細胞質還是細胞核。從圖十二的結果發現，細胞質與細胞核都有出現 PR-A 與 NF- κ B 結合增加的現象。

四、討論

黃體素(progesterone)在女性生理上扮演很重要的角色，會影響生殖組織的生長分化以及維持必要的功能。許多研究已經證實黃體素是經由細胞核內黃體素受器(genomic progesterone receptor, gPR)影響下游的基因表現，核內黃體素受器是屬於類固醇/核內受器(steroid/nuclear hormone receptor)大家族的一員，黃體素經由此路徑調節的效應所需時間較久。對於黃體素的快速效應，也被認為是經由黃體素受器所引發(34)，黃體素受器受到 progestin 直接調節，並作用於細胞質中含有 SH3 domain 的訊息分子，c-Src 酪胺酸激酶，影響下游的 MAPK 活性(52, 114)，此類效應與黃體素所影響的各種下游訊息傳遞相關。同樣的，黃體素在不同的組織或器官的作用也各有不同，就目前所知，會受到體內黃體素濃度影響所產生的現象，包括排卵、黃體化、濾泡閉鎖、母體懷孕辨識等等，已經有一定程度的研究，但是黃體素對於血管分化及增生的相關研究仍然較少。許多研究已證實動情素能降低動脈粥狀硬化的風險，給予動情素可以使人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)即使暴露在 TNF α 下仍具有保護作用(111)。黃體素與動情素在正常生理情況下會有協同作用，比單獨給予動情素對心血管更有益處(1-4, 28)。如果單獨給予黃體素，經由黃體素受器作用，對於血管內皮細胞以及血管平滑肌細胞的增生會有抑制作用，使血管修復再生過程受損(5-7, 28)。因此我們認為黃體素對於血管內皮細胞具有抗血管增生的作用。

根據本實驗室先前的研究成果，在生理範圍內的黃體素濃度(5~500 nM)，可以抑制人類以及大鼠的動脈平滑肌細胞的增生，而指出黃體素可能具有抗動脈硬化(antiatherosclerosis)的作用(113, 130)。黃體素可藉由增加 p53 的蛋白表現來抑制細胞週期的進行，而此作用是透過增加下游的 p21 及 p27 蛋白表現使細胞停留在 G₀/G₁ 期。p21 及 p27 的增加會減少 CDK2 的激酶活性，阻止細胞週期的進行，

減少內皮細胞的增生現象(112)。黃體素作用於人類臍靜脈血管內皮細胞，藉由黃體素受器誘導 Src 活性，並經由 MAPK 路徑影響 p53 表現，會使 K-Ras/p-Raf/p-Erk1/2 的表現量上升，進而影響後續訊息分子活化(127)。為了了解黃體素如何誘導 p53 表現增加，要先尋找會影響 p53 gene 功能的轉錄因子，在許多細胞內轉錄因子當中，NF- κ B 被認為與血管細胞的血管生成功能有密切關係；HUVEC 細胞增生與 NF- κ B 的持續活化有關，高濃度的 melatonin 可以抑制 NF- κ B 的表現以及其結合到 DNA 上的能力，可能是經由抑制 ERK/Akt /PKC 路徑所導致 melatonin 對於 HUVEC 有抗細胞增生的作用(117)；在活體外實驗，氧化性自由基造成血管內皮細胞的血管生成型態改變，可能與 NF- κ B 與 IL-8 有關(118)，這些結果指出 NF- κ B 對於調節內皮細胞存活、細胞凋亡、型態生成上扮演著重要的訊息傳遞作用。在未受刺激的哺乳動物細胞中，一般是以 NF- κ B-I κ B α (p65-p50- I κ B α)的形式存在在細胞質，NF- κ B 平時被 I κ B α 所抑制，經由不同刺激可以脫離 I κ B α 的抑制而進入細胞核調控不同的基因，而 NF- κ B 對於 p53 的作用會因為受到不同的刺激而有截然不同的結果。之前的研究已證實在內皮細胞中，黃體素會誘導 p53 的表現，進而抑制內皮細胞的增生，但是黃體素對於 NF- κ B 的作用及 NF- κ B 與 p53 之間的關係仍然不清楚。本文內容主要在證實 NF- κ B 在黃體素誘導 p53 向上調節所扮演的角色。

由本文結果可以知道，經由黃體素的刺激的確可以使 NF- κ B 從細胞質進入細胞核，進一步給予 NF- κ B 抑制劑(IKK 特異性抑制劑，Bay11-7082)作用，可以抑制黃體素對於 p53 向上調節的作用，說明 NF- κ B 受到刺激之後會對 p53 有影響；NF- κ B 在要進入細胞核之前，必須使 I κ B α 被磷酸化，之後被泛素化 (ubiquitylation)而降解，NF- κ B-I κ B α 要有脫離分開的現象；因此利用免疫共沈澱法來檢視 I κ B α 在 NF- κ B-I κ B α 複合物中的變化，間接推測 NF- κ B 的活化情形，

而結果也的確指向這個假設。

為了連接 ERK 與 NF- κ B 之間的作用，根據之前的研究結果指出，黃體素可以在短時間內提昇 ERK 的活性(十分鐘內)，與 p53 表現增加的時間相比起來(23 小時)，出現了長時間的空檔；實驗結果說明，在這段時間內也會發生 NF- κ B 的變化，從細胞質進入到細胞核，指出 ERK 與 NF- κ B 複合物之間有特定的機制作用，在此使用了二種 Erk1/2 inhibitor 來阻斷 ERK，觀察對於 NF- κ B 複合物的變化，說明阻斷 ERK 在黃體素處理下可以減少 NF- κ B 複合物之中的 I κ B α 磷酸化，進一步引導 NF- κ B 進入細胞核，減少 p53 的表現；單獨給予 U0126 或 PD98059 的組別相對於對照組並沒有明顯 I κ B α 、p-I κ B α 量的變化，但是給予黃體素之前一小時給予 U0126 或 PD98059 的組別，卻觀察到由黃體素所造成 p-I κ B α 在細胞內增加的總量減少，total I κ B α 沒有明顯的變化；顯示出黃體素並不會影響 I κ B α 或是 NF- κ B 在內皮細胞內的表現量，在未受到黃體素刺激的內皮細胞中，已經有存在受到 ERK 路徑影響而持續活化的 NF- κ B，經由抑制 ERK 再受到黃體素刺激後反而使 I κ B α 磷酸化下降，也就是 NF- κ B 的活化有下降的趨勢；從 ERK 活性增加到 NF- κ B 的變化，也就是在 ERK 活化到 I κ B α 磷酸化作用的這段時間，仍然存在著長時間的空檔，究竟 ERK 如何透過 NF- κ B 影響 p53 的作用，在這裡並沒有作更進一步的探討與說明。

NF- κ B 進入細胞核之後對於 p53 gene 如何作用，首先先對 p53 gene 序列進行分析，經由 NCBI nucleotide 資料庫搜尋，指出 p53 gene 上面有許多的 NF- κ B 結合位置。此外，一些研究也有指出 p53 gene 上面的啟動子與活化子區域在 p53 gene 上面的作用。經由染色質免疫沈澱實驗可以觀察到 NF- κ B 在 p53 gene 這四個區域都有結合上升的現象，這些區域位於轉譯起始位置的上游區域與下游區域，但是引子設計時並沒有涵蓋所有 p53 gene，而且有在啟動子/活化子以外區

域觀察到 NF- κ B 與 p53 gene 的結合增加，因此說明經由黃體素處理可以增加 NF- κ B 與 p53 gene 的結合情形；NF- κ B 與可能的 p53 gene 啟動子/活化子結合增加，NF- κ B 對於 p53 gene 啟動子/活化子的作用，會增加 NF- κ B 對於 p53 gene 的轉錄活性，但是對於 NF- κ B 結合到 p53 gene 啟動子/活化子以外區域的作用，功能仍然不清楚。

從過去的文獻指出，到目前為止的研究指出，human p53 gene 具有後續活化作用的啟動子只有一個，可以轉錄出三個 mRNA variants (96, 97, 98, 100)，編碼出全長 p53 (FLp53、wild type p53)、p53i9、 Δ 40p53 的蛋白質；wild type p53 會經由活化 pro-apoptosis 分子，影響細胞週期的運作，使細胞停留在 G₀/G₁ 期(G₀/G₁ arrest)，具有 anti-proliferation 與增加 apoptosis 的作用；p53i9 會經過 intron 9 的選擇性剪接(alternative splicing)，再轉譯出切除 C-terminus 60 個胺基酸的 p53 isoform (46kDa)，這種 p53 蛋白不具有轉錄活性，也缺少 DNA 結合的活性，沒有證據指出內生性的 p53i9 isoform 可以表現出蛋白質； Δ 40p53 (又名 p47、 Δ Np53)會經過 intron 2 的 alternative splicing，或是轉譯起始位置的選擇性轉譯(alternative initiation of translation)，再轉譯出切除 N-terminus 40 個胺基酸的 p53 isoform， Δ 40p53 可以調整 p53 在細胞內的核內定位，以及經由 MDM2 來抑制 p53 的分解(105)；內生性的 p53 β protein isoform 如果結合到可被 p53 誘導的啟動子時，可以特別增強 p53 在 Bax 啟動子上面的轉錄活性而不是作用於 p21 啟動子，Bax 啟動子是 p53 蛋白對於誘導細胞凋亡相關的目標基因(119)；在人類腫瘤細胞中，不同的 p53 isoforms 表現，或許可以提供某些對於 p53 狀態與癌症預後相關性差異的一種解釋(100)，這說明了 p53 的多種異構蛋白，可能對於 p53 的作用具有調節功能。在這裡黃體素對於 p53 表現增加，進而影響 p21 及 p27 表現，抑制內皮細胞的增生；由於 p53 的多種異構蛋白，對於增加 pro-apoptosis 分子表

現影響後續的細胞增生與細胞凋亡的作用，只有 wild type p53 的主要功能有此種作用，因此在這裡以 p53 啟動子序列為研究對象進行探討。

文獻指出了 p53 gene 啟動子的區域與序列(92, 94)，在 p53 基因的轉錄調節區中，並不像大部分的基因啟動子是經由 RNA polymerase II (RNAP II)所轉錄，因為在轉錄起始位置的上游區域(upstream of the transcription start site)，p53 啟動子並沒有任何的 TATA-like sequence (91, 121, 125)；參考文獻的啟動子設計區域(101, 102, 103)，啟動子位於 p53 gene exon1 以及上游區域，此區域具有完整的 p53 啟動子活性(95)，將啟動子序列使用 MOTIF Search 基因資料庫搜尋 p53 gene 啟動子上面可能的轉錄因子結合位置。在 p53 gene 啟動子上面確實有找到轉錄因子 NF- κ B、HLH、EBP β 的結合位置，尤其是 HLH 位於 NF- κ B 結合位下游 5 bp，十分接近 NF- κ B 結合位，對於 NF- κ B 可能會有直接或間接的作用，雖然本篇研究並沒有特別指出 HLH 的作用，但是在此仍然考慮此區域的作用；HLH (basic helix-loop-helix leucine zipper family)是一種可以被具有 helix-loop-helix 區域的轉錄因子所辨識的保留性辨識序列，這類的轉錄因子包括 Myc/MyoD 家族的轉錄活化子(121, 122, 126)，有研究指出 NF- κ B 可以活化 c-myc 基因的表現(124)，表現 c-myc 基因可以向上調節 p53 基因的表現(123)；核內因子結合到 HLH 區域與提升 p53 啟動子活性有關，在轉型細胞中，這與 p53 啟動子達到最大後續活化有關(121)。EBP β (CCAAT/enhancer binding protein β)序列同時包含 CCAAT 與 enhancer binding protein β (EBP β) motifs，是一種可以被具有 leucine zipper (basic region-leucine zipper, bZIP)蛋白質所辨識的保留性辨識序列(116)，包括 C/EBP β 蛋白，這對於巨噬細胞(macrophages)的抗菌能力(antibacterial activity)很重要(109)；IL-1 β 可以刺激 C/EBP β 的表現，使 C/EBP β 結合到 C/EBP β motif。此外，給予 IL-1 β 對於化學刺激素(chemokines)的向上調節也涉及 NF- κ B 的作用。在人

類的軟骨細胞中(human chondrocytes)，NF- κ B 與 C/EBP β 共同參與 IL-1 β 在增加 chemokine genes 的表現(115)；動情素可以經由鈣-攜鈣素調節的蛋白激酶IV (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV, CaMKIV)的非基因體路徑而增加 p53 表現，這過程涉及了 p65 與 CCAAT-binding transcription factor-1 的共同作用(128)；指出 NF- κ B 與 C/EBP β 可能會共同調控包括 p53 gene 在內的某些基因的表現。

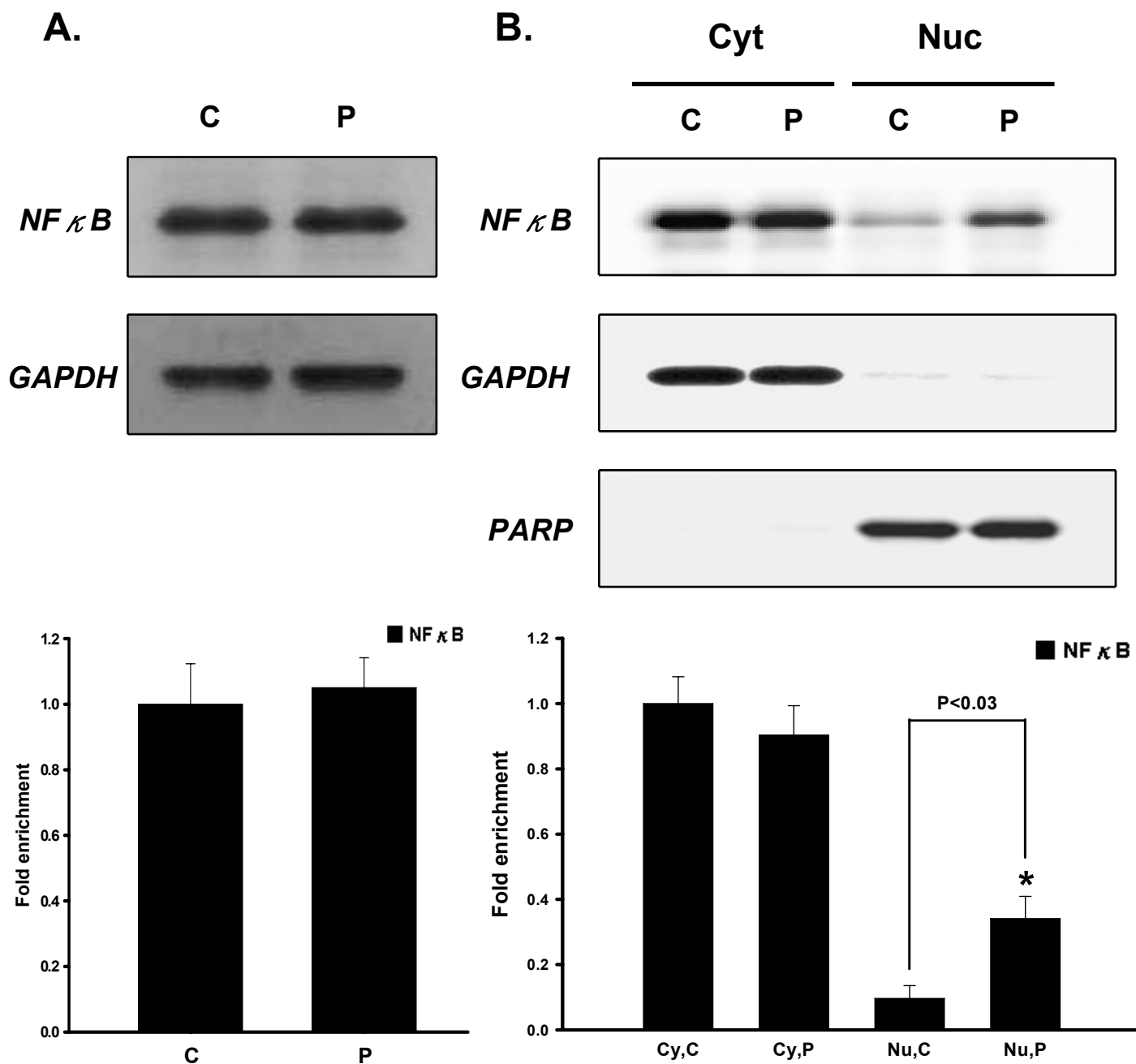
由實驗結果知道，p53 啟動子失去 NF- κ B 結合位幾乎失去啟動子的活性。p53 gene 上面的 NF- κ B 結合位置對於黃體素誘導 p53 啟動子活性具有決定性的角色。NF- κ B 對於 p53 有促進性的作用。黃體素刺激下，移除 p53 gene 啟動子的其他轉錄因子 HLH、EBP β 結合位置，會部份失去 p53 啟動子活性，可以知道 HLH 及 EBP β 相關蛋白也會對於 p53 gene 啟動子提供部份的 p53 啟動子活性，說明 NF- κ B 會與這些蛋白共同調節 p53 gene 的活性。

由於黃體素會與黃體素受器結合，影響標的細胞的後續反應，在這裡我們探討黃體素-黃體素受器結合後，是否會對於 p53 gene 具有額外的作用。黃體素受器的 N 端上面具有 proline-rich motif (polyproline)區域，可以與 Src 的 SH3 domain 直接作用，增強與 Src kinase 的結合作用，並進一步活化 Src kinase，此種反應是藉由 PR-B 的作用，經由活化 Src kinase，進而調節特定基因的後續活化(52, 58, 59)。在乳癌細胞中，大部分受到黃體素受器所調節的基因大多是由 PR-B 所調控，很少被 PR-A 或是 PR-A 與 PR-B 共同所調控(129, 133)。但是過度表現 PR-A 比起過度表現 PR-B 的乳癌細胞還要更常見(131, 132)，過度表現 PR-A 的乳癌細胞會出現明顯的細胞型態改變以及失去細胞貼附的特性(133)。PR-A 及 PR-B 可能經由不同作用來影響細胞的生長型態。

本實驗室之前的研究指出，黃體素是經由結合細胞膜上的黃體素受器，在短

時間內經由活化 ERK 激發細胞的反應，此種作用指向黃體素的非基因體效應。由於黃體素受器主要分佈的位置在細胞質內，同樣地，黃體素也會穿過脂溶性的細胞膜進入細胞質，並且與黃體素受器結合。在人類臍靜脈內皮細胞中可以偵測到二種黃體素受器亞型：PR-A 及 PR-B，以及這二者 mRNA 的表現(88)。由結果可以知道，在人類臍靜脈內皮細胞中，黃體素受器 PR-A，在經過黃體素刺激後會進入細胞核內；從免疫共沈澱的實驗結果中，發現到 NF- κ B 與黃體素受器的 PR-A 結合情形有增加的現象，相對於 PR-B 就沒有出現與 NF- κ B 的結合作用。PR-A 與 NF- κ B 受到黃體素刺激同樣都有出現 translocation，代表這二個因子可能與後續的基因表現有關。而這二者因子結合增加的現象，暗示黃體素受器 PR-A 可能會調節 NF- κ B 的作用，進而調控 p53 的表現，抑制血管內皮細胞的增生，而這種現象未來仍需要作進一步的證實與探討。

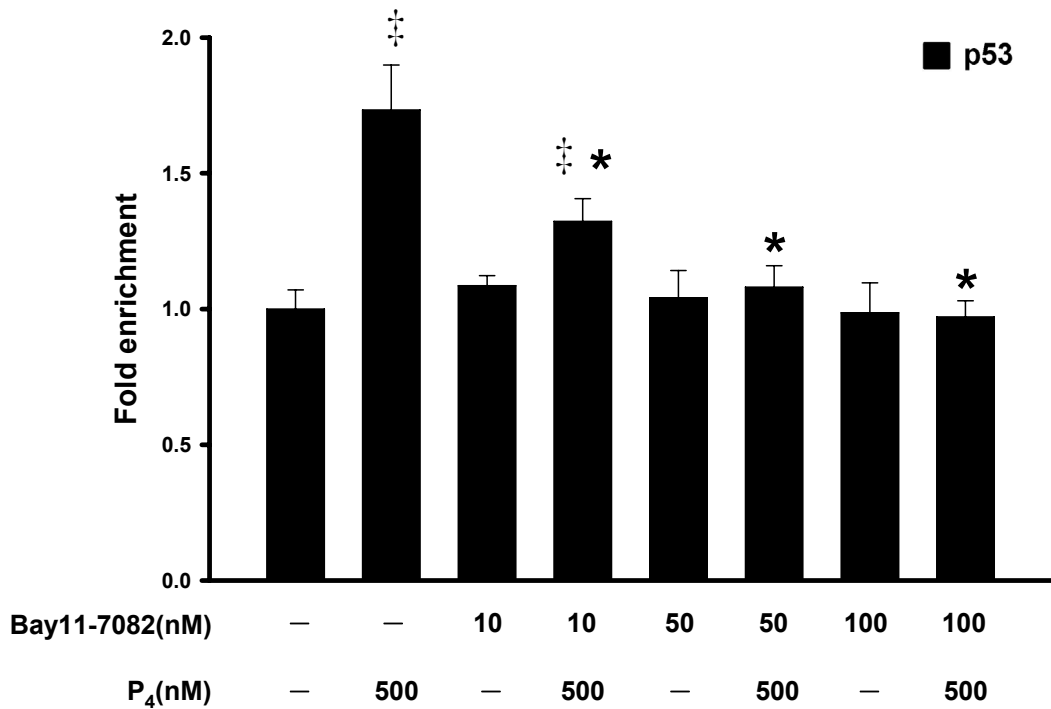
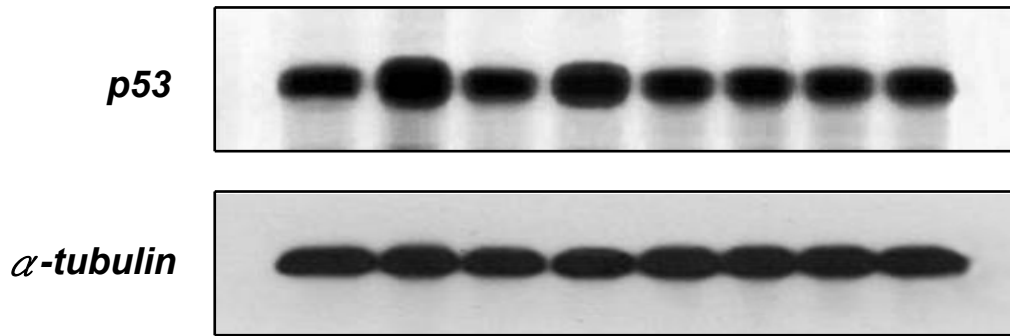
本研究的結果顯示黃體素可透過活化 ERK 所傳遞的途徑增加 I κ B α 的磷酸化，進而降低 NF- κ B 與 I κ B α 的結合，而引起 NF- κ B 進入細胞核內，並與 p53 gene 的啟動子作用結合，最後造成血管內皮細胞內的 P53 的 mRNA 及蛋白質表現量增加。本研究的發現讓我們對於黃體素如何引起內皮細胞內 P53 的增加及血管增生的抑制作用之分子機轉有更進一步的了解。



圖一、黃體素誘導NF κ B由血管內皮細胞的細胞質進入細胞核

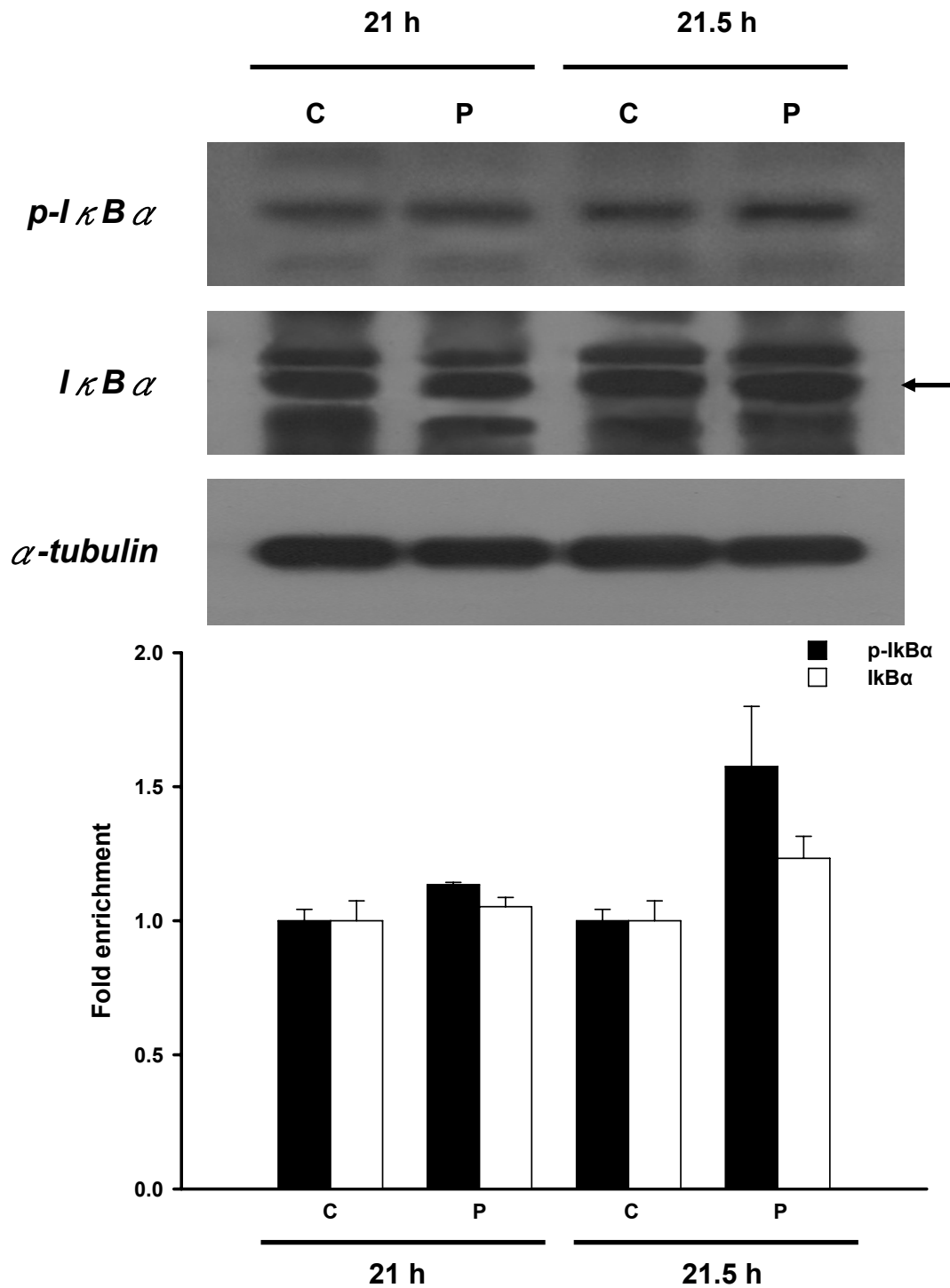
HUVEC細胞培養於含有10% FBS M199 media，當細胞滿度達到七分滿時換成2% charcoal-stripped FBS M199 media，quiescence 24h後，換成10% charcoal-stripped FBS M199，加入最終濃度是500nM progesterone處理22h之後收細胞。(A)抽取全部的細胞蛋白質。(B)進行細胞質/核蛋白質分離，以西方墨點法分析，使用total NF κ B一級抗體，以GAPDH或 α -tubulin當作細胞質internal control (內部控制組)，以PARP當作細胞核internal control。Cyt: cytoplasm proteins; Nuc: nuclear proteins; C: control; P: treatment with progesterone。數據所顯示的是平均值 \pm 標準差 (n =3)，*P value <0.03 細胞核實驗組相對於細胞核對照組。

Bay11-7082(nM)	—	—	10	10	50	50	100	100
P ₄ (nM)	—	500	—	500	—	500	—	500



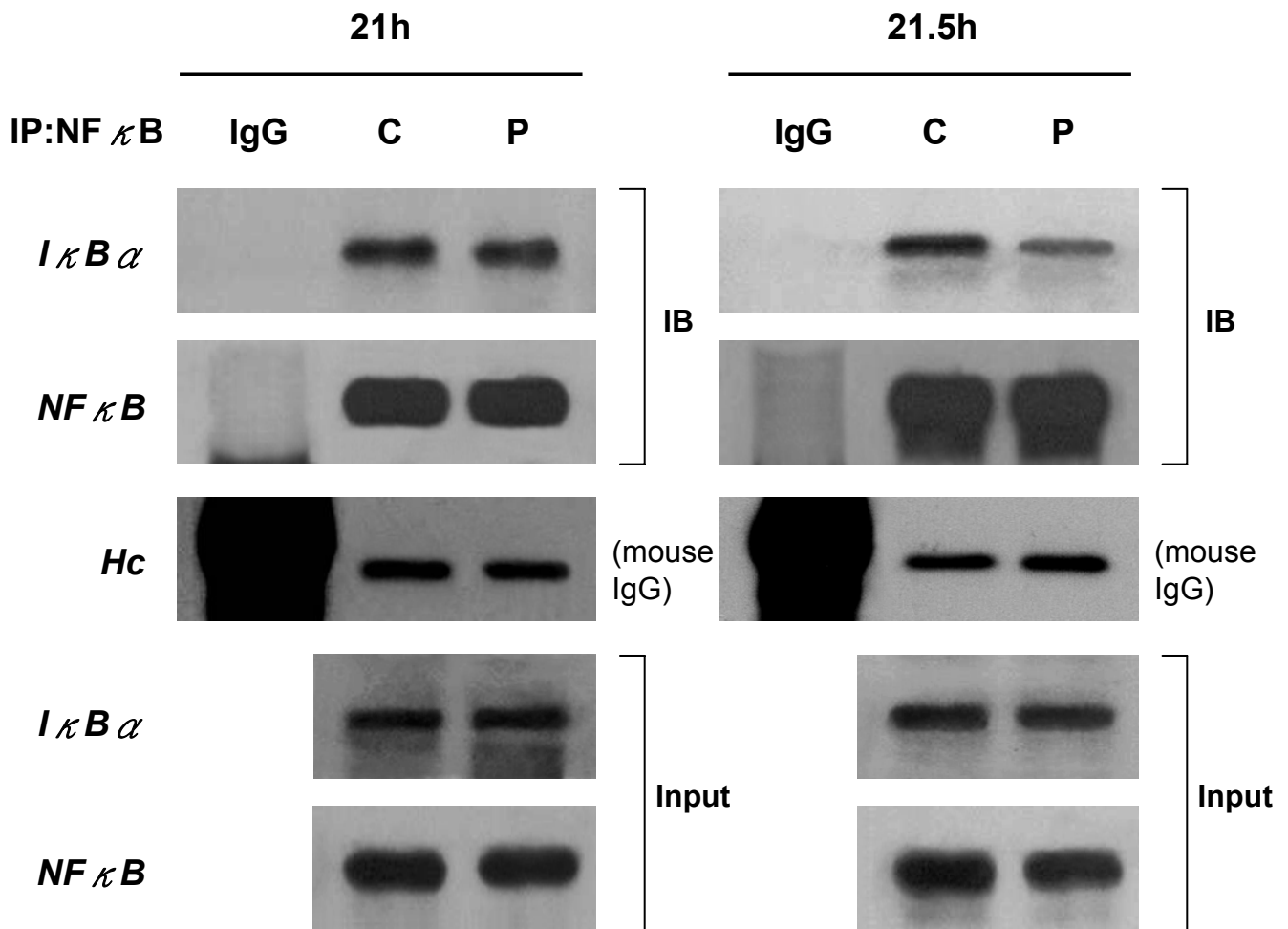
圖二、黃體素透過NF κ B的活化來增加血管內皮細胞P53的表現

HUVEC細胞培養於含有10% FBS M199 media，當細胞滿度達到七分滿時換成2% charcoal-stripped FBS M199 media，quiescence 24 h後，換成10% charcoal-stripped FBS M199，在加入progesterone之前預先以最終濃度10、50、100 nM Bay11-7082處理1 h之後，換成最終濃度是500 nM progesterone，或同時以Bay11-7082共同處理23 h之後收細胞，以西方墨點法分析，使用p53一級抗體，以 α -tubulin當作細胞internal control。數據所顯示的是平均值 \pm 標準差 (n=3)，‡P value<0.03 相對於對照組，*P value<0.05 相對於單獨黃體素處理的實驗組。



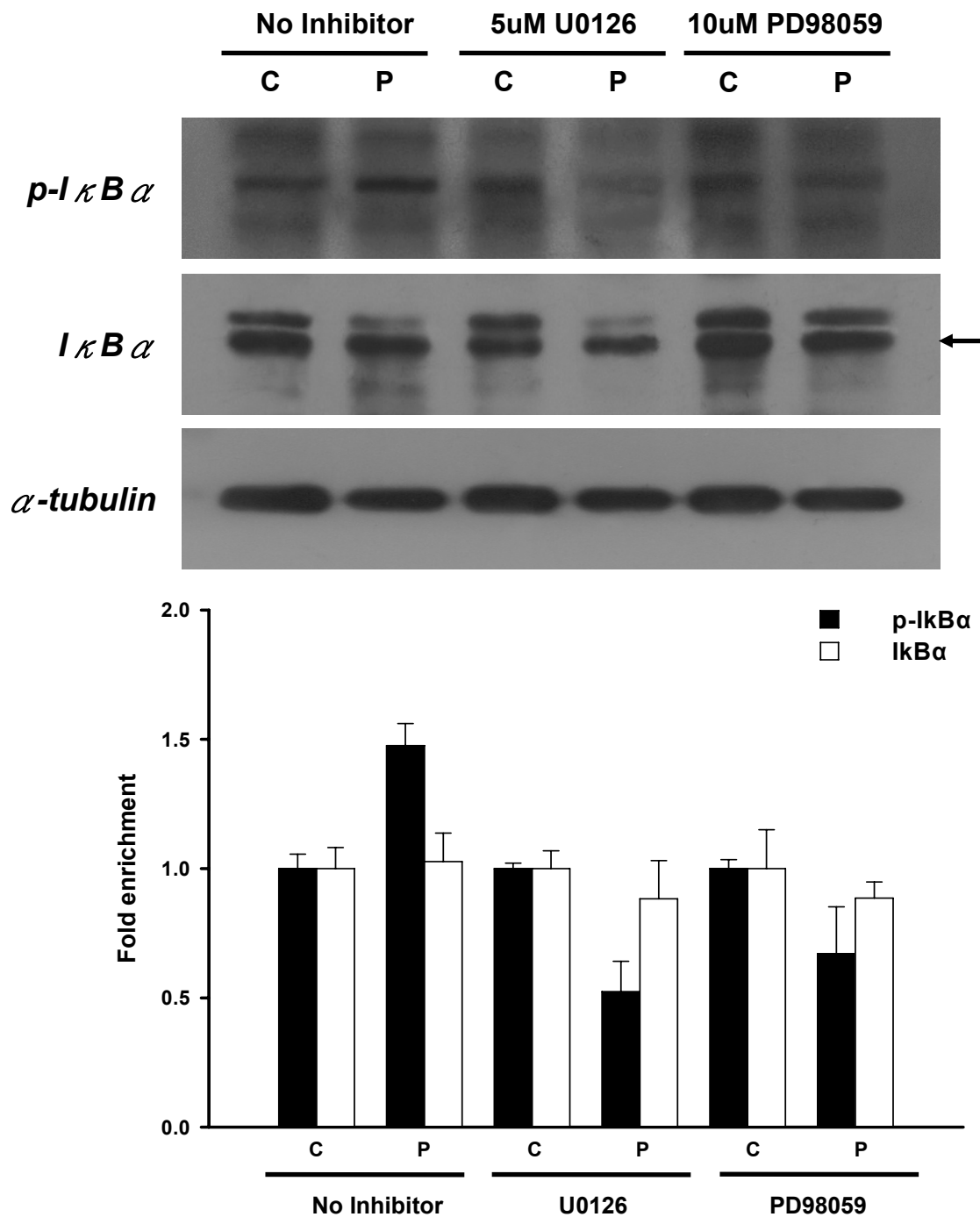
圖三、黃體素可以增加內皮細胞IκBα的磷酸化作用

HUVEC細胞培養於含有10% FBS M199 media，當細胞滿度達到七分滿時換成2% charcoal-stripped FBS M199 media，quiescence 24 h後，換成10% charcoal-stripped FBS M199，加入最終濃度是500 nM progesterone處理21h及21.5h之後收細胞，使用西方墨點法，以p-IκBα及IκBα一級抗體進行分析，α-tubulin當作internal control。箭號代表specific band。數據所顯示的是平均值±標準差(n=2)。



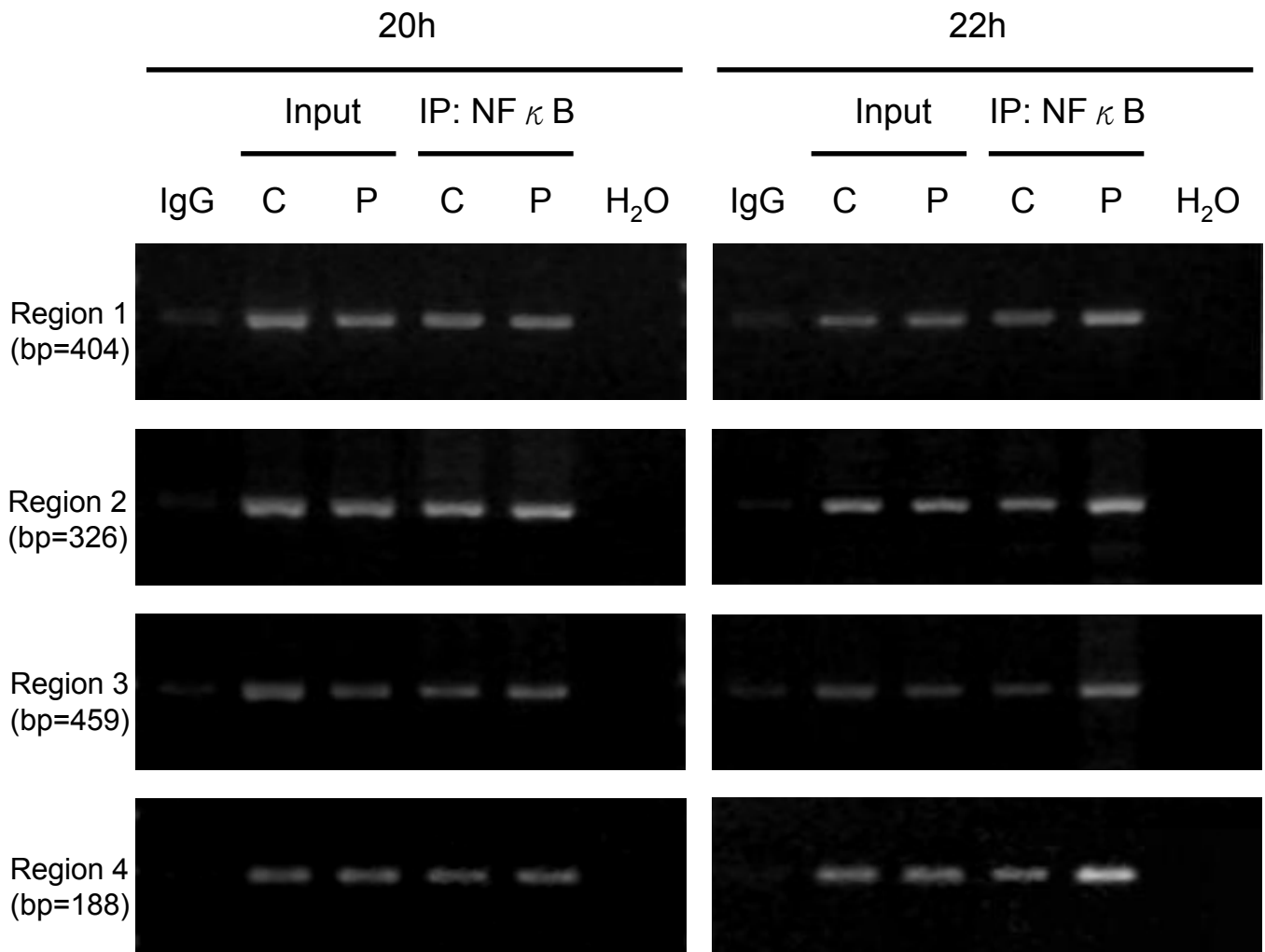
圖四、黃體素可以降低內皮細胞NF κ B與I κ B α 的結合

HUVEC細胞培養於含有10% FBS M199 media，當細胞滿度達到七分滿時換成2% charcoal-stripped FBS M199 media，quiescence 24 h後，換成10% charcoal-stripped FBS M199，加入最終濃度是500 nM progesterone處理21h及21.5h之後收細胞，使用NF κ B一級抗體(mouse IgG)、normal mouse IgG進行免疫沈澱試驗，使用西方墨點法，以NF κ B及I κ B α 一級抗體進行分析。IgG: normal mouse IgG (negative control); Input: positive control; Hc: antibody heavy chain; C: control; P: treatment with progesterone。實驗數據組別n=2。



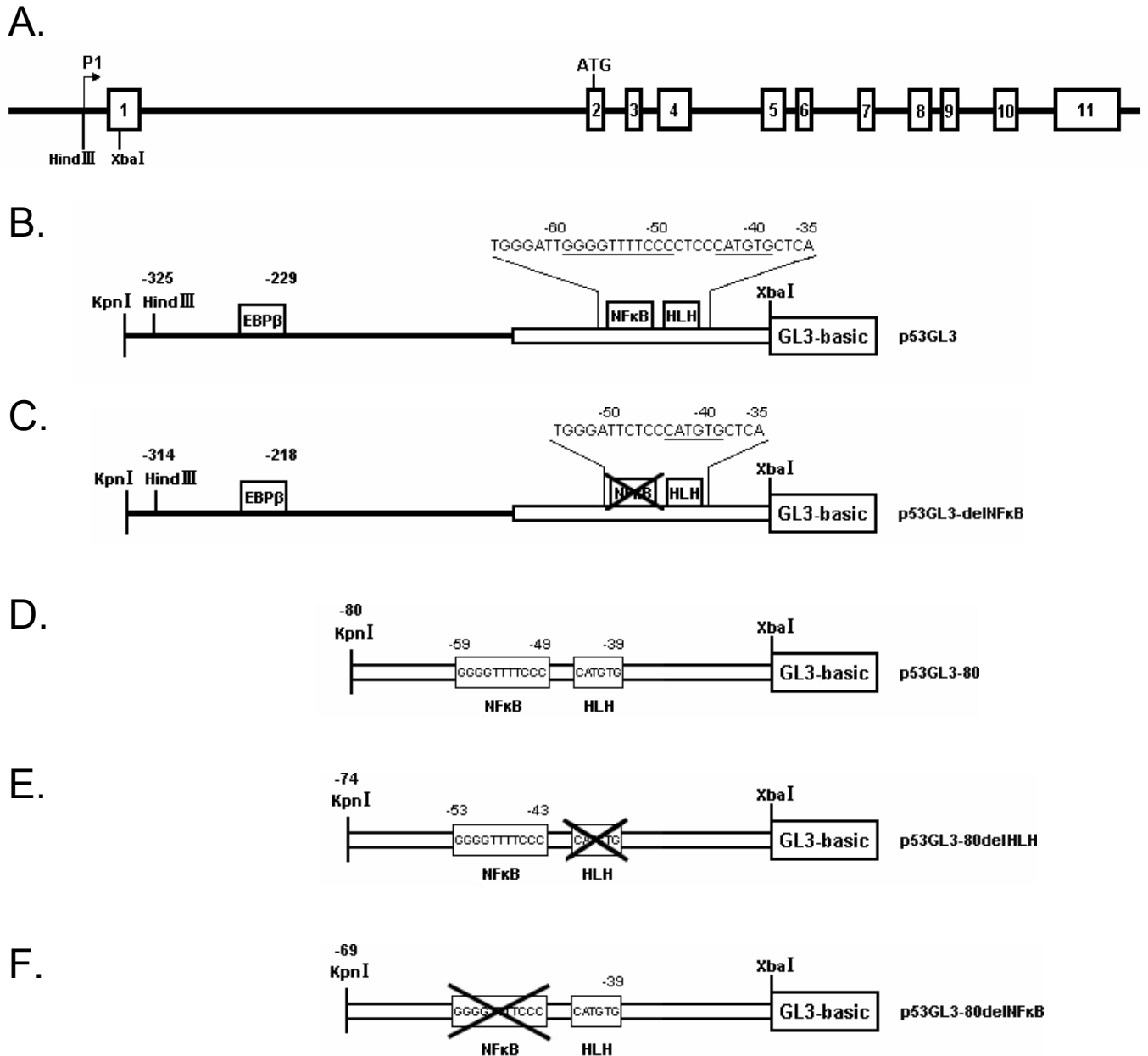
圖五、黃體素增加IκBα的磷酸化作用是透過活化ERK的途徑

HUVEC細胞培養於含有10% FBS M199 media，當細胞滿度達到七分滿時換成2% charcoal-stripped FBS M199 media，quiescence 24h後，換成10% charcoal-stripped FBS M199，加入最終濃度是500nM progesterone處理22h之後收細胞，其他組別使用ERK1/2 inhibitor，以最終濃度5 μM U0126、10 μM PD98059預先處理1 h，以西方墨點法分析，使用p-IκBα及IκBα一級抗體，以α-tubulin當作internal control。箭號代表specific band。數據所顯示的是平均值±標準差(n=2)。



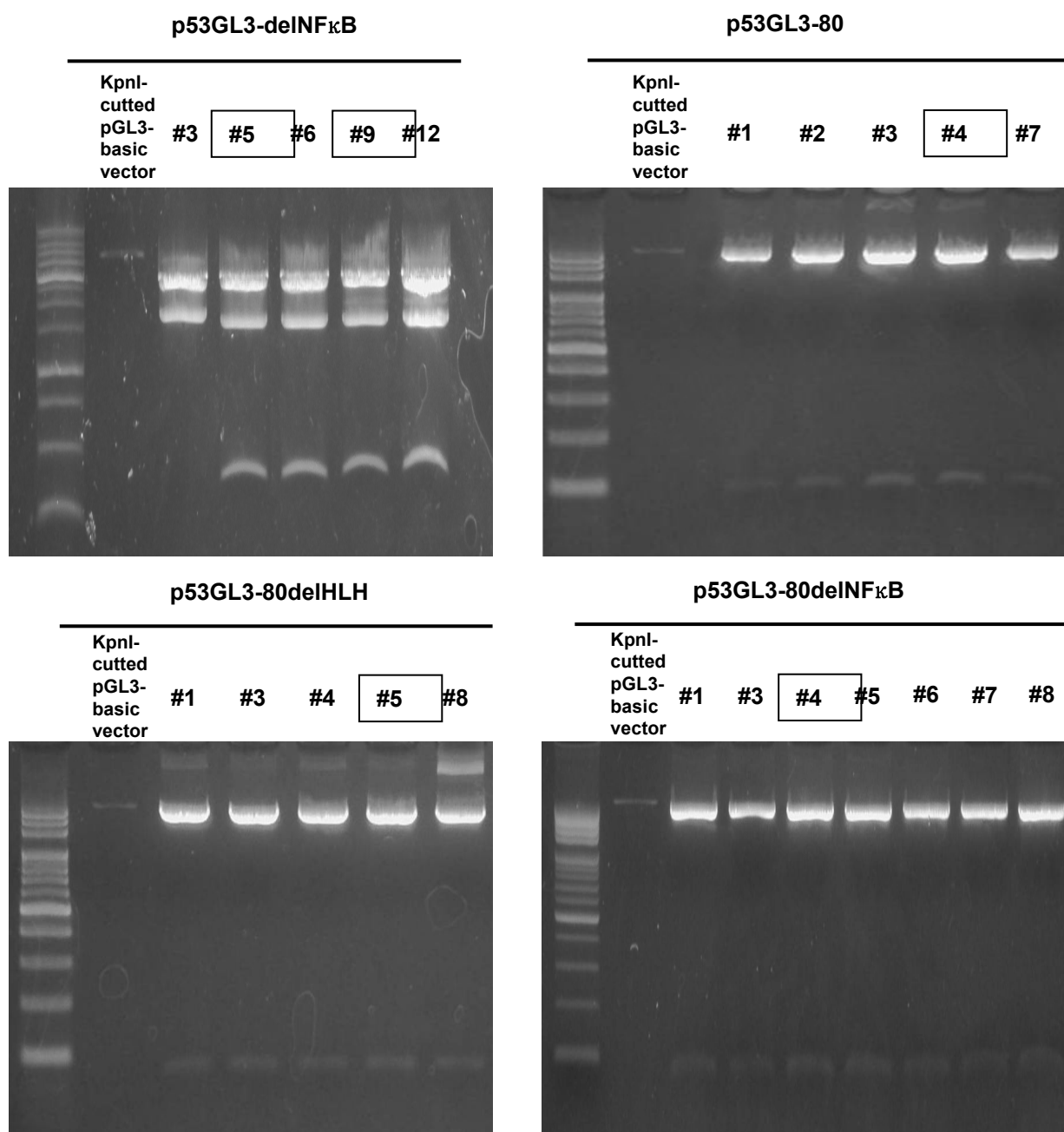
圖六、黃體素可以增加NF κ B與p53 gene的結合

HUVEC細胞培養於含有10% FBS M199 media，當細胞滿度達到七分滿時換成2% charcoal-stripped FBS M199 media，quiescence 24 h後，換成10% charcoal-stripped FBS M199，加入最終濃度是500 nM progesterone處理20 h及22 h之後收細胞，使用NF κ B一級抗體(mouse IgG)及normal mouse IgG進行染色質免疫沈澱分析，設計不同位置的p53 gene primer進行PCR，觀察NF κ B在p53 gene不同位置上面的結合情形。實驗結果顯示在給予黃體素22 h後會增加NF κ B與p53 gene的結合，實驗數據組別n=3。IgG: normal mouse IgG (negative control); Input: positive control; H₂O: as the background; Hc: antibody heavy chain; C: control; P: treatment with progesterone。



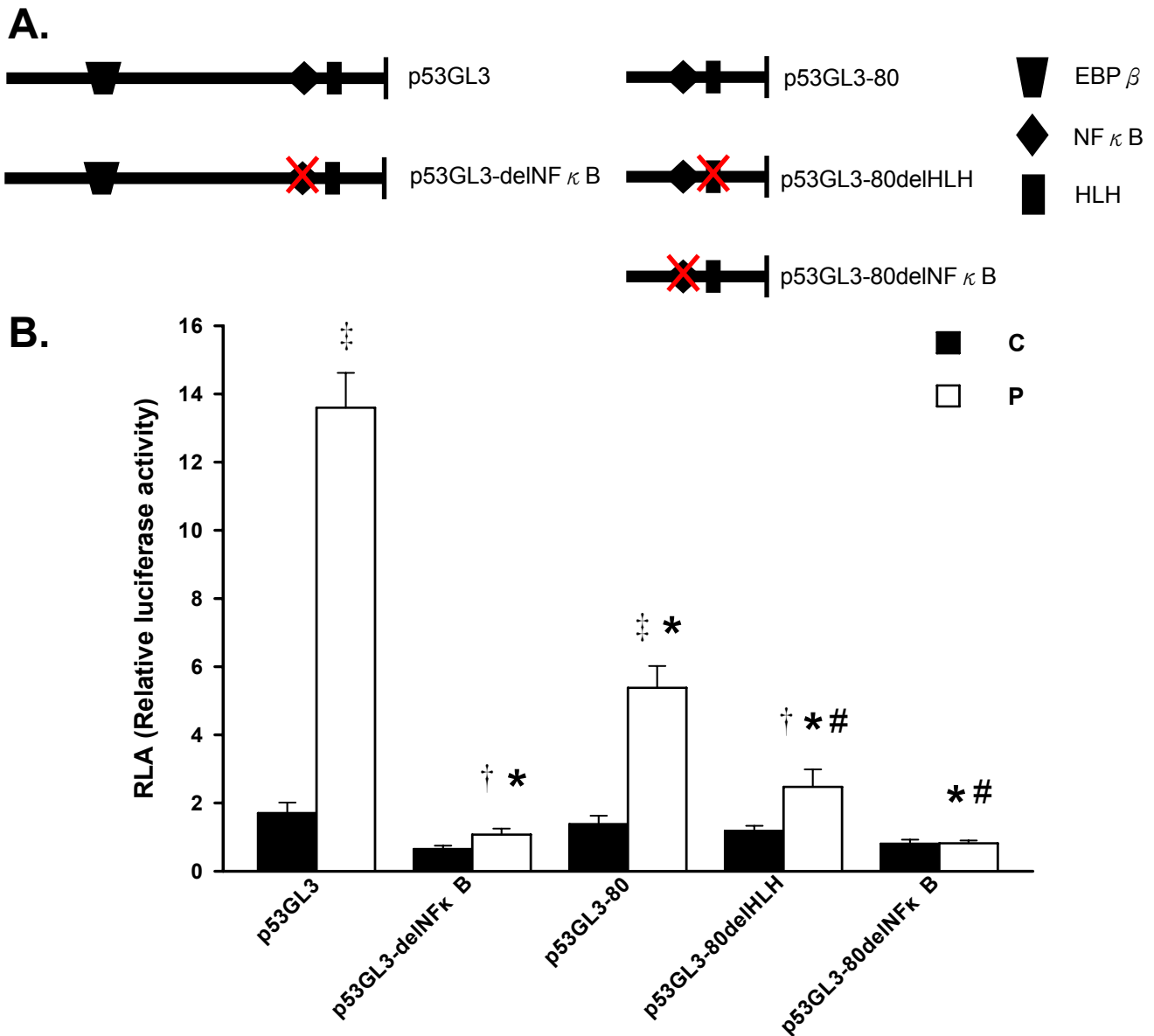
圖七、p53 gene 啟動子上面具有轉錄因子NFκB、HLH、EBPβ的結合位置

(A) Human p53 gene sequence. (B, C, D, E, F) 選擇p53 gene 上面會轉錄轉譯完整p53 protein的啟動子序列，5'與3'各設計一個限制酶切位點，設計完整的整段325bp的p53啟動子 (p53GL3，原始序列5'有HindIII、3'有Xba I 限制酶切位，實驗室提供)、整段325bp刪除NFκB結合位置(p53GL3-delNFκB)、80bp的p53啟動子、80bp刪除HLH domain (位於NFκB結合位下游5bp)、80bp刪除NFκB結合位的啟動子，接合到pGL3-basic plasmid (vector)。NFκB: NFκB binding site; HLH: basic helix-loop-helix leucine zipper family or upstream stimulatory factor 1 (USF-1); EBPβ: Motif C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding protein β)。



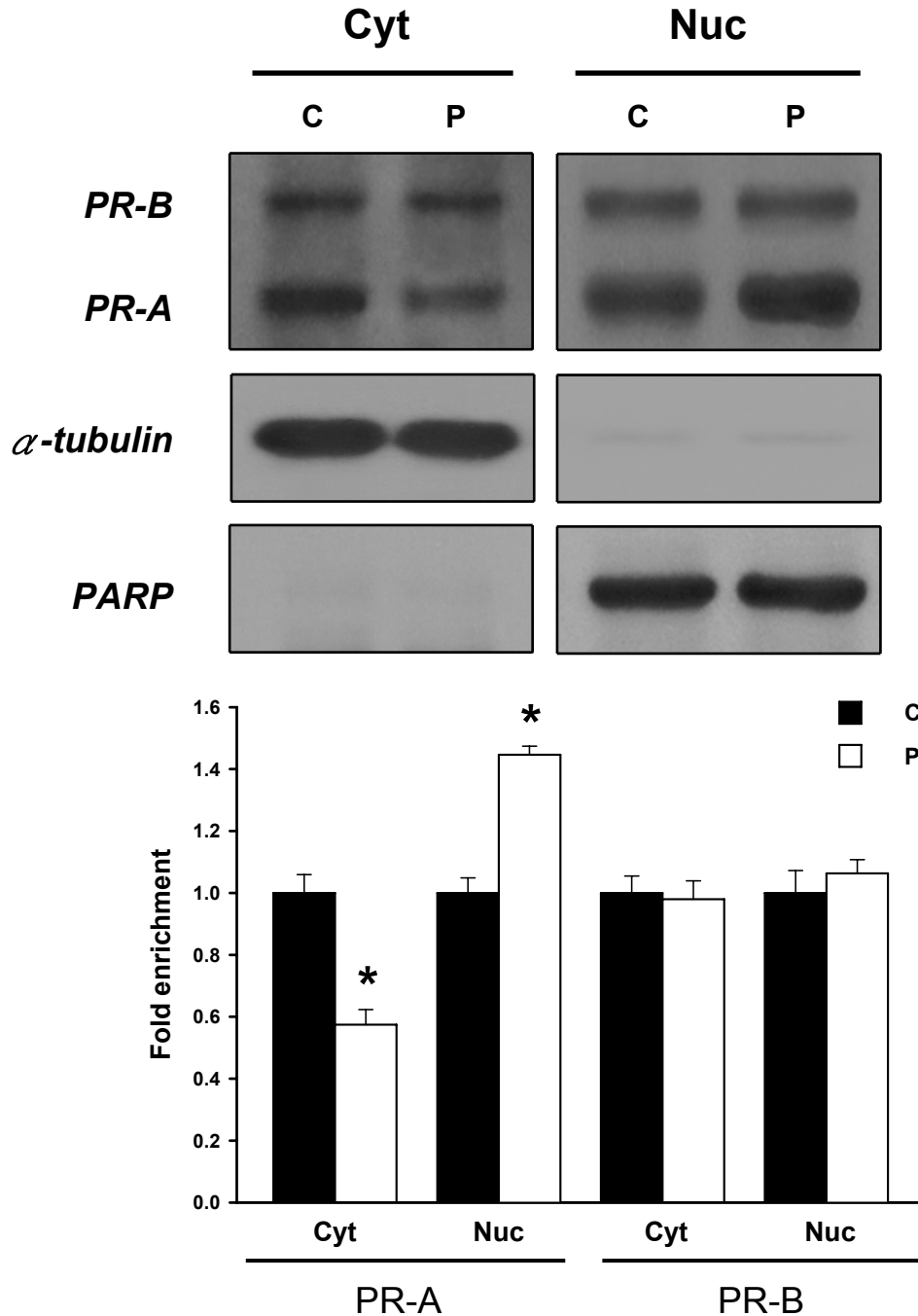
圖八、p53 gene deletion construct 建構

設計四組引子用來建構p53 gene deletion construct的插入子，做好的插入子接合到pGL3-Basic plasmid (vector)，經由質體轉殖到勝任細胞放大質體，抽取質體後再使用限制酶來篩選菌落，選擇適當的菌落進行定序確認，construct包含完整的整段325bp的啟動子 (p53GL3，實驗室提供)、整段325bp刪除NFκB結合位置(p53GL3-delNFκB)、80bp的啟動子、80bp刪除HLH domain (位於NFκB結合位下游5bp)、80bp刪除NFκB結合位的啟動子。#: colony number。方框表示定序後所挑選的正確序列菌落。



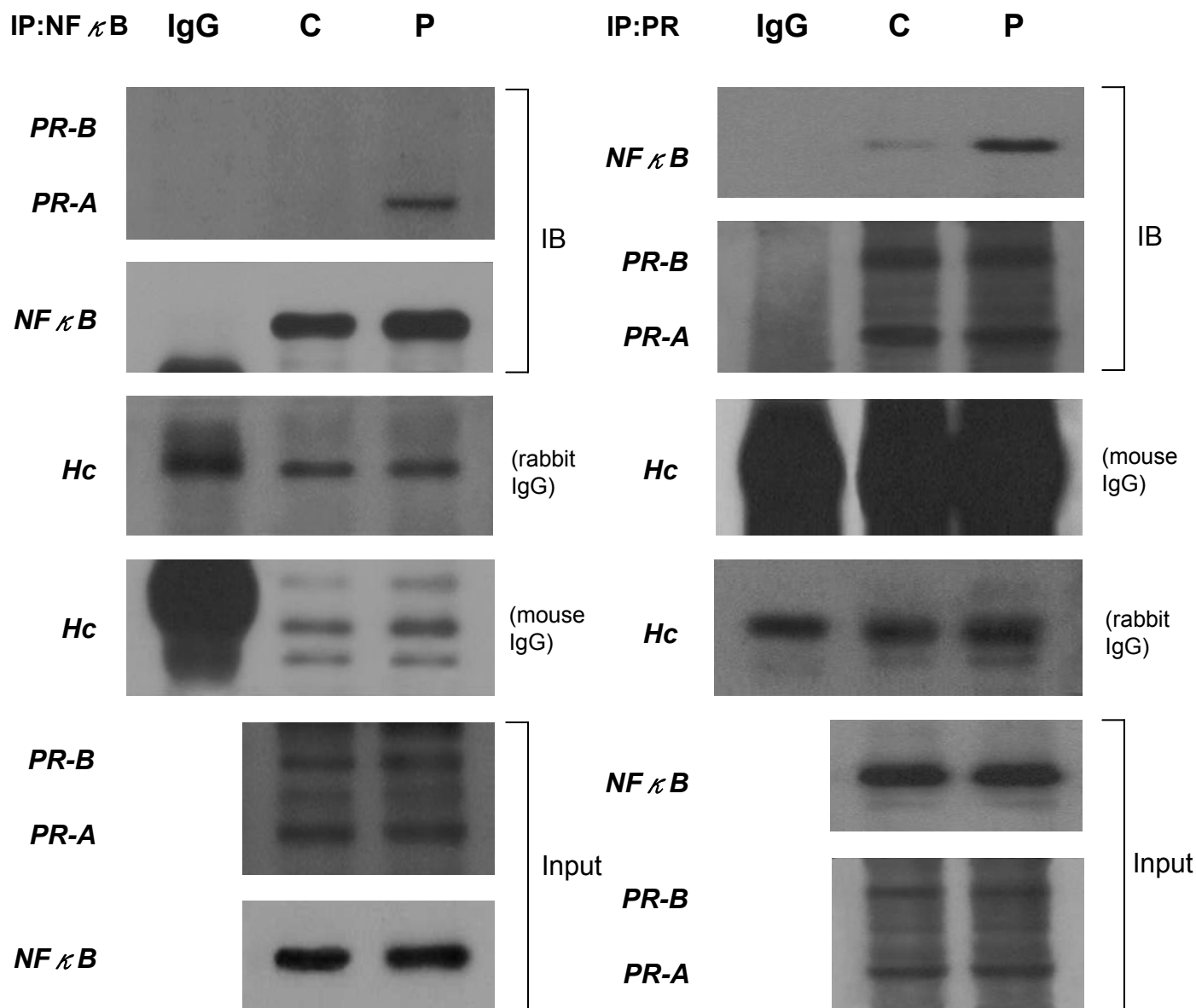
圖九、確認NF κ B以及相關轉錄因子結合位置在p53啟動子上的重要性

將HUVEC細胞培養在24-well plate，每well種20,000 cells，以含有10% FBS M199 media培養，等細胞狀態穩定後，將P53 promoter gene deletion construct轉染細胞(1 μ l jetPEI/well)，隔天換成2% charcoal-stripped FBS M199 media進行quiescence 24 h後，換成10% charcoal-stripped FBS M199，加入最終濃度是500 nM黃體素處理22 h之後收細胞，使用Promega luciferase assay進行螢光素試驗。(A)相關轉錄因子結合位置在p53啟動子上的相對位置。(B)測得數據以Firefly/Renilla luciferase相對螢光素活性(RLA)表示，數據所顯示的是平均值 \pm 標準差 (n=3)，‡P value<0.001、†P value<0.05 相對於個別的對照組，*P value<0.001 相對於黃體素處理的p53GL3實驗組，#P value<0.01 相對於黃體素處理的p53GL3-80實驗組。p53GL3: 整段325 bp的p53啟動子; p53GL3-delNF κ B: 整段325 bp啟動子但是刪除NF κ B結合位置; p53GL3-80: 80 bp的p53啟動子; p53GL3-80delHLH: 80bp啟動子但是刪除HLH domain; p53GL3-80delNF κ B: 80 bp啟動子但是刪除NF κ B結合位的啟動子。



圖十、黃體素可以增加PR-A由內皮細胞的細胞質進入細胞核

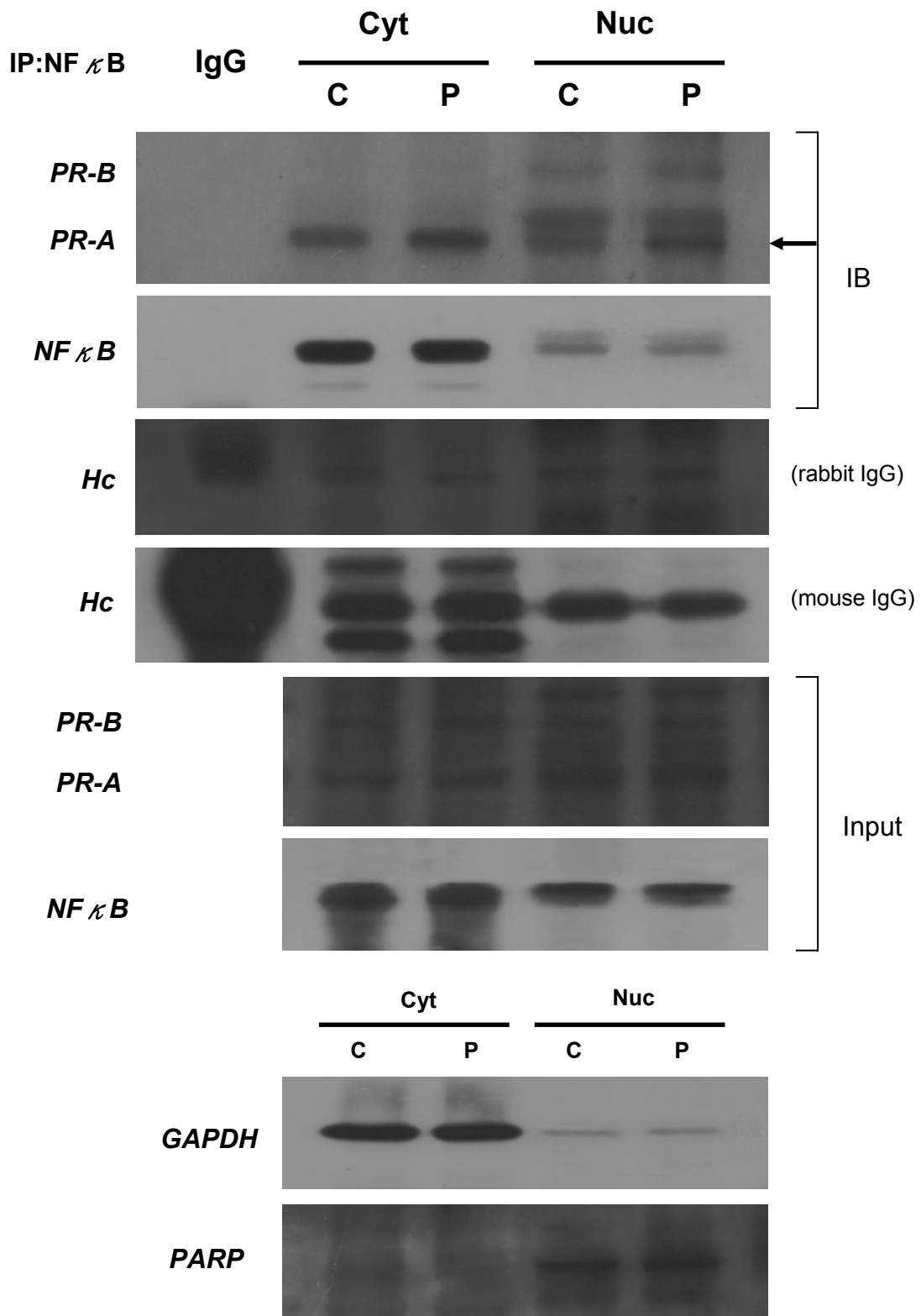
HUVEC細胞培養於含有10% FBS M199 media，當細胞滿度達到七分滿時換成2% charcoal-stripped FBS M199 media，quiescence 24 h後，換成10% charcoal-stripped FBS M199，加入最終濃度是500 nM黃體素，處理22 h之後收細胞，進行細胞質/核蛋白質分離，以西方墨點法分析，使用PR一級抗體，以 α -tubulin當作細胞質internal control，以PARP當作細胞核internal control。黃體素可增加PR-A由細胞質進入細胞核，但對PR-B則無影響。數據所顯示的是平均值 \pm 標準差(n=3)，*P value<0.01 相對於對照組。Cyt: cytoplasm proteins; Nuc: nuclear proteins。

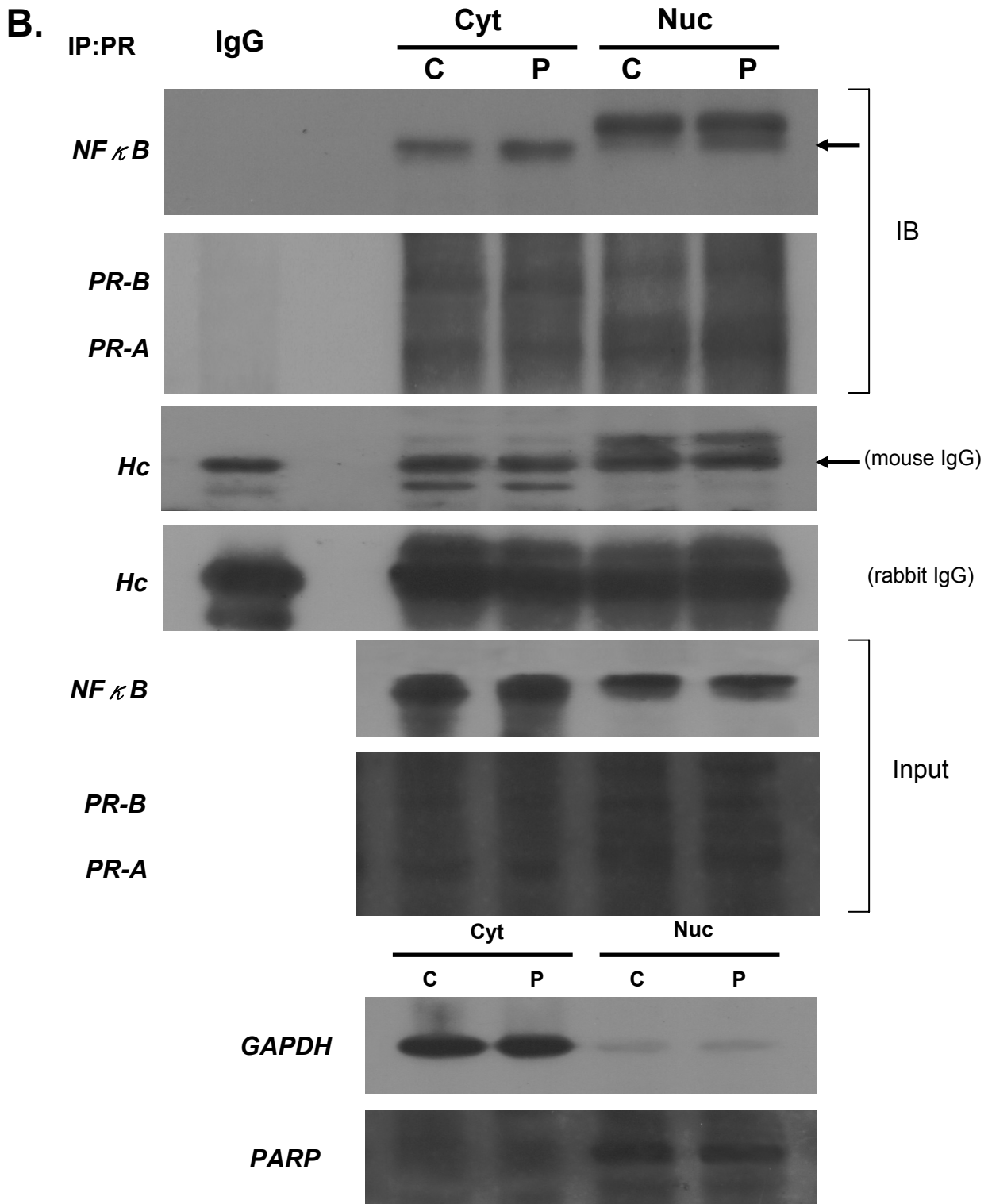


圖十一、黃體素可以增加NF κ B與PR-A的結合

HUVEC細胞培養於含有10% FBS M199 media，當細胞滿度達到七分滿時換成2% charcoal-stripped FBS M199 media，quiescence 24h後，換成10% charcoal-stripped FBS M199，加入最終濃度是500 nM progesterone處理22.5 h之後收細胞，使用NF κ B及PR一級抗體、mouse/rabbit IgG進行免疫沈澱試驗，使用西方墨點法，以NF κ B及PR一級抗體進行分析。黃體素可增加NF κ B與PR-A的的結合，但NF κ B與PR-B則無結合現象。實驗數據組別n=2。IgG: normal mouse/rabbit IgG (negative control); Input: positive control; Hc: antibody heavy chain; C: control; P: treatment with progesterone。

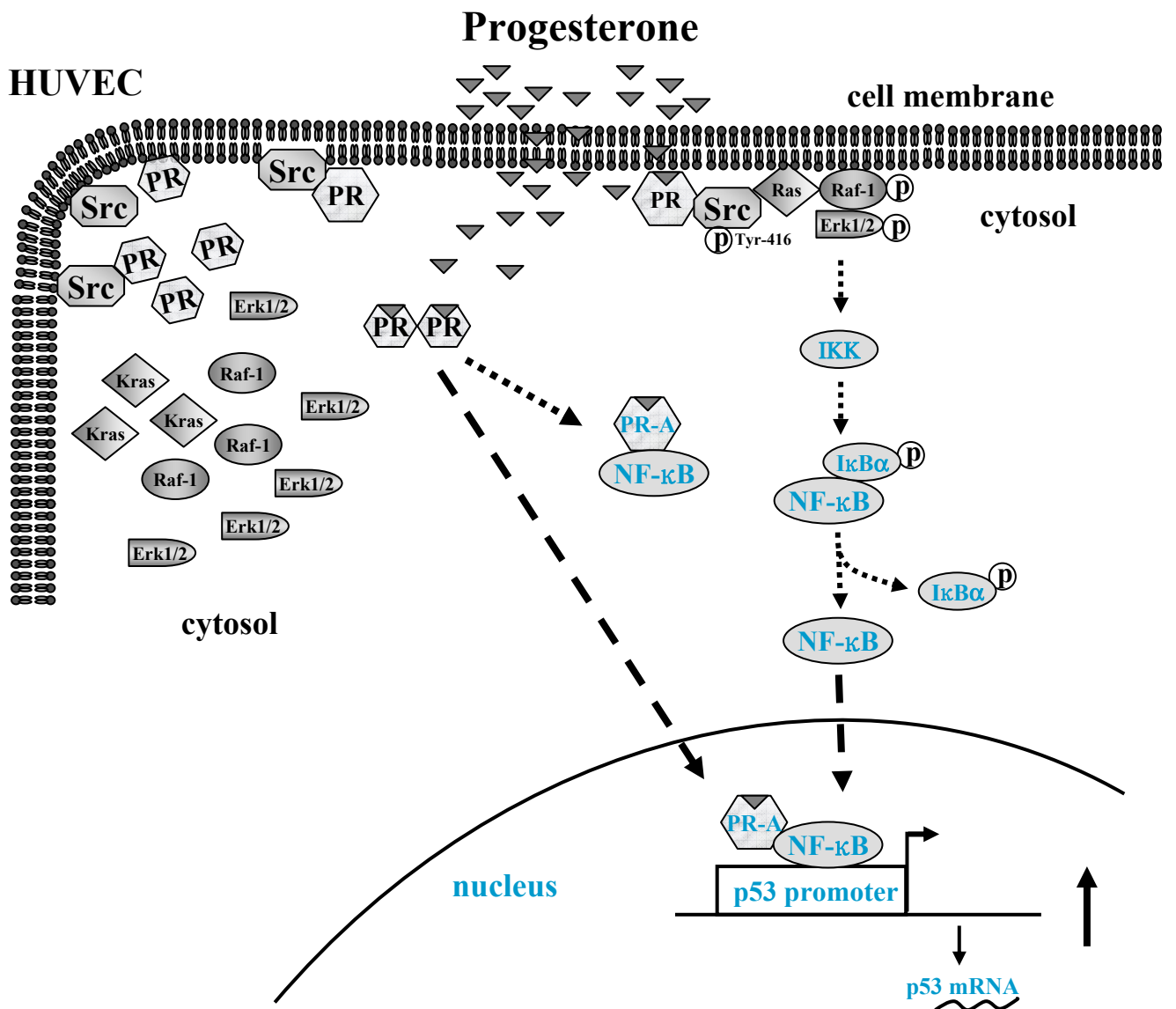
A.





圖十二、黃體素可以增加細胞質與細胞核NFκB與PR-A的結合

HUVEC細胞培養於含有10% FBS M199 media，當細胞滿度達到七分滿時換成2% charcoal-stripped FBS M199 media，quiescence 24h後，換成10% charcoal-stripped FBS M199，加入最終濃度是500 nM progesterone處理22.5 h之後收細胞。(A)(B)使用NFκB及PR一級抗體進行免疫沈澱試驗，使用西方墨點法，以NFκB及PR一級抗體進行分析。箭號代表specific band。黃體素可增加細胞質與細胞核NFκB與PR-A的結合，但NFκB與PR-B則無結合現象。實驗數據組別n=1。



附圖一、黃體素透過NF-κB調節p53的表現

根據本實驗室之前的研究，黃體素作用於人類臍靜脈內皮細胞，是藉由黃體素受器誘導 Src 活性，經由MAPK路徑影響p53的表現，這段過程會使K-Ras/p-Raf/p-Erk1/2的表現量上升，進而影響後續訊息分子活化，抑制內皮細胞的增生。從實驗結果可以知道，黃體素透過磷酸化IκBα，使NF-κB從NF-κB-IκBα複合物脫離出來，NF-κB從細胞質進入細胞核，與p53 gene結合，作用於p53 gene啟動子上的NF-κB結合位置，與其他轉錄因子共同調節，增加p53的表現量。同時也發現NF-κB在細胞質與細胞核之中會與PR-A作結合，可能因此而調節p53的表現，這種現象未來仍需做進一步的研究與探討。

表一、染色質免疫沈澱實驗所使用的引子

p53 gene	Name	Strand	Primer sequence (5'→3')
Region 1	p53P Nf_ 12 F	F'	GCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCC
	p53P Nf_ 415 R	R'	AGCTTCATCTGGACCTGGGTCTTCAG
Region 2	p53P Nf_ -935 F	F'	GGCAGCCAGTCTAGCTAGAGCTTTTGG
	p53P Nf_ -610 R	R'	AAGATTACAGGTGTGAGCTACCGTGCCC
Region 3	p53P Nf_ -2383 F	F'	CCATTGCACTCCAGCCTGGACGAGAGCA
	p53P Nf_ -1925 R	R'	CTCGACTCACTGTAACCTCCACCTCCCA
Region 4	p53P Nf_ -153_F	F'	TCCACAGGAAGCCGAGCTGTCTCA
	p53P Nf_ 35_R	R'	GGCTCGACGCTAGGATCTGACTGC

表二、p53 gene deletion construct 所使用的引子

Construct	Name	Strand	Primer sequence (5'→3')
p53GL3-del NFκB	p65del_ p53P1_F	F'	ATAGGTACCGAGCTCGGATCCAGC
	p65del_ p53P1_R	R'	AGCTCTAGACTTTTGAGAAGCTCAAAACT TTTAGCGCCAGTCTTGAGCACATGGGAGA ATCCCATCAAC
p53GL3-80	nodel_ p53P1_pF	F'	CAGGTACCGGGGTTGATGGGATTGGGGTT TTCCCCTCCCATGTGCTCAAGACTGGCGCT AAAAGTTTTGAGCTTCTCAAAGTCTAGA CTCGAGGC
	nodel_ p53P1_pR	R'	GCCTCGAGTCTAGACTTTTGAGAAGCTCA AAACTTTTAGCGCCAGTCTTGAGCACATG GGAGGGGAAAACCCCAATCCCATCAACCC CGGTACCTG
p53GL3-80 delHLH	HLHdel_ p53P1_pF	F'	CAGGTACCGGGGTTGATGGGATTGGGGTT TTCCCCTCCCTCAAGACTGGCGCTAAAAG TTTTGAGCTTCTCAAAGTCTAGACTCGAG GC
	HLHdel_ p53P1_pR	R'	GCCTCGAGTCTAGACTTTTGAGAAGCTCA AAACTTTTAGCGCCAGTCTTGAGGGAGGG GAAAACCCCAATCCCATCAACCCCGGTAC CTG
p53GL3-80 delNFκB	p65del_ p53P1_pF	F'	CAGGTACCGGGGTTGATGGGATTCTCCCAT GTGCTCAAGACTGGCGCTAAAAGTTTTGA GCTTCTCAAAGTCTAGACTCGAGGC
	p65del_ p53P1_pR	R'	GCCTCGAGTCTAGACTTTTGAGAAGCTCA AAACTTTTAGCGCCAGTCTTGAGCACATG GGAGAATCCCATCAACCCCGGTACCTG

表三、p53 gene deletion construct 插入子序列

(A) p53GL3

Kpn I **HindIII**
...ATA **GGTACC** GAGCTC **GGATCC** AGCTGAGAGCAAACGCAAAAGCTTTCTT

CCTTCCACCCTTCATATTTGACACAATGCAGGATTCCTCCAAAATGATTTC

EBPβ
ACCAATTCTGCCCTCACAGCTCT **GGCTTGCAGAA** TTTTCCACCCCAAATG

TTAGTATCTACGGCACCAGGTCGGCGAGAATCCTGACTCTGCACCCTCCTC

CCCAACTCCATTTCTTTGCTTCTCCGGCAGGCGGATTACTTGCCCTTACT

TGTCATGGCGACTGTCCAGCTTTGTGCCAGGAGCCTCGCAGGGGTTGATGG

NF-κB **HLH**
GATT **GGGGTTTTCCC** CTCC **CATGTG** CTCAAGACTGGCGCTAAAAGTTTTGA

 +1 **Xba I**
GCTTCTCAAAG **TCTAGA** GCT...

(B) p53GL3-delNFκB

Kpn I **HindIII**
...ATA **GGTACC** GAGCTC **GGATCC** AGCTGAGAGCAAACGCAAAAGCTTTCTT

CCTTCCACCCTTCATATTTGACACAATGCAGGATTCCTCCAAAATGATTTC

EBPβ
ACCAATTCTGCCCTCACAGCTCT **GGCTTGCAGAA** TTTTCCACCCCAAATG

TTAGTATCTACGGCACCAGGTCGGCGAGAATCCTGACTCTGCACCCTCCTC

CCCAACTCCATTTCTTTGCTTCTCCGGCAGGCGGATTACTTGCCCTTACT

TGTCATGGCGACTGTCCAGCTTTGTGCCAGGAGCCTCGCAGGGGTTGATGG

HLH

GATTCTCC**CATGTG**CTCAAGACTGGCGCTAAAAGTTTTGAGCTTCTCAAAA

+1 **Xba I**

G**TCTAGA**GCT...

(C) p53GL3-80

Kpn I

NF-κB

HLH

...ATA**GGTACC**GGGGTTGATGGGATT**GGGGTTTTCCC**CTCC**CATGTG**CTCAA

+1 **Xba I** **Xho I**

GACTGGCGCTAAAAGTTTTGAGCTTCTCAAAAAG**TCTAGA****CTCGAG**ATC...

(D) p53GL3-80delHLH

Kpn I

NF-κB

...ATA**GGTACC**GGGGTTGATGGGATT**GGGGTTTTCCC**CTCCCTCAAGACTG

+1 **Xba I** **Xho I**

GCGCTAAAAGTTTTGAGCTTCTCAAAAAG**TCTAGA****CTCGAG**ATC...

(E) p53GL3-80delNFκB

Kpn I

HLH

...ATA**GGTACC**GGGGTTGATGGGATTCTCC**CATGTG**CTCAAGACTGGCGCTA

+1 **Xba I** **Xho I**

AAAGTTTTGAGCTTCTCAAAAAG**TCTAGA****CTCGAG**ATC...

參考資料

1. Lin KT, Lien JC, Chung CH, Kuo SC, Huang TF. A novel compound, NP-184, inhibits the vascular endothelial growth factor induced angiogenesis. *Eur J Pharmacol* 2010; 630: 53-60.
2. Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 251-6.
3. Gupta MK, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1144-55.
4. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 13): 1853-65.
5. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-95.
6. Perry BN, Arbiser JL. The duality of angiogenesis: implications for therapy of human disease. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2160-6.
7. Cerimele F, Battle T, Lynch R, et al. Reactive oxygen signaling and MAPK activation distinguish Epstein-Barr Virus (EBV)-positive versus EBV-negative Burkitt's lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 175-9.
8. Covello KL, Simon MC, Keith B. Targeted replacement of hypoxia-inducible factor-1alpha by a hypoxia-inducible factor-2alpha knock-in allele promotes tumor growth. *Cancer Res* 2005; 65: 2277-86.
9. Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 1999; 209: 254-67.
10. Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci* 2005; 118: 771-80.
11. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001; 2001: re21.
12. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932-6.
13. Kuwano M, Fukushi JI, Okamoto M, et al. Angiogenesis factors. *Intern Med* 2001; 40: 565-72.
14. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003; 161: 1163-77.
15. Yung YC, Chae J, Buehler MJ, Hunter CP, Mooney DJ. Cyclic tensile strain triggers a sequence

of autocrine and paracrine signaling to regulate angiogenic sprouting in human vascular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 15279-84.

16. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999; 103: 159-65.
17. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 464-78.
18. Smith SK. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 509-19.
19. Smith SK. Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 147-51.
20. Djonov V, Makanya AN. New insights into intussusceptive angiogenesis. *EXS* 2005; 17-33.
21. Vamesu S. Angiogenesis and progesterone receptor status in primary breast cancer patients: an analysis of 158 needle core biopsies. *Rom J Morphol Embryol* 2007; 48: 267-74.
22. Vazquez F, Rodriguez-Manzaneque JC, Lydon JP, Edwards DP, O'Malley BW, Iruela-Arispe ML. Progesterone regulates proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 2185-92.
23. Alkhalaf M, El-Mowafy AM. Overexpression of wild-type p53 gene renders MCF-7 breast cancer cells more sensitive to the antiproliferative effect of progesterone. *J Endocrinol* 2003; 179: 55-62.
24. Dunphy KA, Blackburn AC, Yan H, O'Connell LR, Jerry DJ. Estrogen and progesterone induce persistent increases in p53-dependent apoptosis and suppress mammary tumors in BALB/c-Trp53^{+/-} mice. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R43.
25. Bu SZ, Yin DL, Ren XH, et al. Progesterone induces apoptosis and up-regulation of p53 expression in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer* 1997; 79: 1944-50.
26. Candolfi M, Jaita G, Zaldivar V, et al. Progesterone antagonizes the permissive action of estradiol on tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of anterior pituitary cells. *Endocrinology* 2005; 146: 736-43.
27. Kurita T, Lee K, Saunders PT, et al. Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol Reprod* 2001; 64: 272-83.
28. Rinard GA. Effects of estrogen and progesterone on acute activation of uterine phosphorylase. *Biochimica ET Biophysica ACTA* 1972; 286: 416-25.

29. Toth B, Saadat G, Geller A, et al. Human umbilical vascular endothelial cells express estrogen receptor beta (ERbeta) and progesterone receptor A (PR-A), but not ERalpha and PR-B. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 399-405.
30. Park BC, Park SY, Lee JS, et al. The anti-angiogenic effects of 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone are mediated through the suppression of both VEGF production and VEGF-induced signaling. *Vascul Pharmacol* 2009; 50: 123-31.
31. Wehling M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 365-93.
32. Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 1998; 19: 3-17.
33. Boonyaratanakornkit V, McGowan E, Sherman L, Mancini MA, Cheskis BJ, Edwards DP. The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 359-75.
34. Bramley T. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 2003; 125: 3-15.
35. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1244-55.
36. Wei LL, Norris BM, Baker CJ. An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 62: 287-97.
37. Hodges YK, Richer JK, Horwitz KB, Horwitz LD. Variant estrogen and progesterone receptor messages in human vascular smooth muscle. *Circulation* 1999; 99: 2688-93.
38. Misao R, Sun WS, Iwagaki S, Fujimoto J, Tamaya T. Identification of various exon-deleted progesterone receptor mRNAs in human endometrium and ovarian endometriosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 302-6.
39. Bramley TA, Menzies GS, Rae MT, Scobie G. Non-genomic steroid receptors in the bovine ovary. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23: 3-12.
40. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 513-56.
41. Tung L, Abdel-Hafiz H, Shen T, et al. Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate

transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 2656-70.

42. Abdel-Hafiz H, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB. The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J Biol Chem* 2002; 277: 33950-6.

43. Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 8356-64.

44. Ottander U, Hosokawa K, Liu K, Bergh A, Ny T, Olofsson JI. A putative stimulatory role of progesterone acting via progesterone receptors in the steroidogenic cells of the human corpus luteum. *Biol Reprod* 2000; 62: 655-63.

45. Horwitz KB, Tung L, Takimoto GS. Novel mechanisms of antiprogestin action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53: 9-17.

46. Condon JC, Hardy DB, Kovacic K, Mendelson CR. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 764-75.

47. Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 1998; 392: 509-12.

48. Bishop CV, Stormshak F. Non-genomic actions of progesterone and estrogens in regulating reproductive events in domestic animals. *Vet J* 2008; 176: 270-80.

49. Peluso JJ. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. *Biol Reprod* 2006; 75: 2-8.

50. Wehling M, Schultz A, Losel R. To be or not to be (a receptor). *Steroids* 2007; 72: 107-10.

51. Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2237-42.

52. Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, et al. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* 2001; 8: 269-80.

53. Rekawiecki R, Kowalik MK, Slonina D, Kotwica J. Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 9: 75-89.

54. Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 2001; 81: 629-83.
55. Gimpl G, Fahrenholz F. Cholesterol as stabilizer of the oxytocin receptor. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1564: 384-92.
56. Peluso JJ, Pappalardo A, Fernandez G, Wu CA. Involvement of an unnamed protein, RDA288, in the mechanism through which progesterone mediates its antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells. *Endocrinology* 2004; 145: 3014-22.
57. Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, Wehling M. Expression and function of PAIRBP1 within gonadotropin-primed immature rat ovaries: PAIRBP1 regulation of granulosa and luteal cell viability. *Biol Reprod* 2005; 73: 261-70.
58. Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays Biochem* 2004; 40: 105-20.
59. Shupnik MA. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene* 2004; 23: 7979-89.
60. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004; 18: 2195-224.
61. Muller S, Ledl A, Schmidt D. SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* 2004; 23: 1998-2008.
62. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 49-62.
63. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 2001; 293: 1495-9.
64. Dobrzanski P, Ryseck RP, Bravo R. Differential interactions of Rel-NF-kappa B complexes with I kappa B alpha determine pools of constitutive and inducible NF-kappa B activity. *EMBO J* 1994; 13: 4608-16.
65. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280-8.
66. Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ* 2006; 13: 861-72.
67. Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 2006; 25: 6717-30.
68. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 758-65.

69. Krappmann D, Scheidereit C. A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. *EMBO Rep* 2005; 6: 321-6.
70. Burns KA, Martinon F. Inflammatory diseases: is ubiquitinated NEMO at the hub? *Curr Biol* 2004; 14: R1040-2.
71. Janssens ST, J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF- κ B response. *Cell Death Differ* 2006; 13: 773-84.
72. Wu ZH, Shi, Y., Tibbetts, R. S. & Miyamoto, S. . Molecular linkage between the kinase ATM and NF- κ B signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* 2006; 311: 1141-6.
73. Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 2006; 13: 759-72.
74. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 594-604.
75. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996; 274: 784-7.
76. Wu M, Lee H, Bellas RE, et al. Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J* 1996; 15: 4682-90.
77. Pise-Masison CA, Mahieux R, Jiang H, et al. Inactivation of p53 by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax requires activation of the NF-kappaB pathway and is dependent on p53 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3377-86.
78. Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC. p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J Biol Chem* 2004; 279: 26115-25.
79. Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, et al. The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 1815-23.
80. P. Wang WQ, C Dudgeon, H Liu, C Huang, GP Zambetti, J Yu and L Zhang. PUMA is directly activated by NF- κ B and contributes to TNF- α -induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 2009; 16: 1192-202.
81. Mudipalli A, Li Z, Hromchak R, Bloch A. NF-kappaB (p65/RelA) as a regulator of TNF α -mediated ML-1 cell differentiation. *Leukemia* 2001; 15: 808-13.
82. Kawauchi J, Zhang C, Nobori K, et al. Transcriptional repressor activating transcription factor 3 protects human umbilical vein endothelial cells from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis

- through down-regulation of p53 transcription. *J Biol Chem* 2002; 277: 39025-34.
83. Webster GA, Perkins ND. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 3485-95.
84. Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 2000; 404: 892-7.
85. Fujioka S, Schmidt C, Sclabas GM, et al. Stabilization of p53 is a novel mechanism for proapoptotic function of NF-kappaB. *J Biol Chem* 2004; 279: 27549-59.
86. Aleyasin H, Cregan SP, Iyirhiaro G, et al. Nuclear factor-(kappa)B modulates the p53 response in neurons exposed to DNA damage. *J Neurosci* 2004; 24: 2963-73.
87. Shetty S, Graham BA, Brown JG, et al. Transcription factor NF-kappaB differentially regulates death receptor 5 expression involving histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 5404-16.
88. Tatsumi H, Kitawaki J, Tanaka K, Hosoda T, Honjo H. Lack of stimulatory effect of dienogest on the expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 by endothelial cell as compared with other synthetic progestins. *Maturitas* 2002; 42: 287-94.
89. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999; 20: 435-59.
90. Kalkhoven E, Wissink S, van der Saag PT, van der Burg B. Negative interaction between the RelA(p65) subunit of NF-kappaB and the progesterone receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 6217-24.
91. Lamb P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 1379-85.
92. Tuck SP, Crawford L. Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 2163-72.
93. Reisman D, Balint e, Loging WT, Rotter V, Almon E. A novel transcript encoded within the 10-kb first intron of the human p53 tumor suppressor gene (D17S2179E) is induced during differentiation of myeloid leukemia cells. *Genomics* 1996; 38: 364-70.
94. Reisman D, Greenberg M, Rotter V. Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 5146-50.
95. Sun X, Shimizu H, Yamamoto K. Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4489-96.
96. Mills AA. p53: link to the past, bridge to the future. *Genes Dev* 2005; 19: 2091-9.
97. Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to

- harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 2006; 13: 962-72.
98. Muller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat* 2006; 9: 288-306.
99. Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008; 27: 6507-21.
100. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 2005; 19: 2122-37.
101. Pei XH, Nakanishi Y, Takayama K, Bai F, Hara N. Benzo[a]pyrene activates the human p53 gene through induction of nuclear factor kappaB activity. *J Biol Chem* 1999; 274: 35240-6.
102. Oh SM, Pyo CW, Kim Y, Choi SY. Neutrophil lactoferrin upregulates the human p53 gene through induction of NF-kappaB activation cascade. *Oncogene* 2004; 23: 8282-91.
103. Bonofiglio D, Aquila S, Catalano S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 3083-92.
104. Flaman JM, Waridel F, Estreicher A, et al. The human tumour suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. *Oncogene* 1996; 12: 813-8.
105. Ghosh A, Stewart D, Matlashewski G. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 7987-97.
106. Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature* 2008; 452: 225-9.
107. Wolf D, Harris N, Goldfinger N, Rotter V. Isolation of a full-length mouse cDNA clone coding for an immunologically distinct p53 molecule. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 127-32.
108. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983; 304: 596-602.
109. Tanaka T, Akira S, Yoshida K, et al. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 1995; 80: 353-61.
110. Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, et al. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 1998; 17: 2008-18.
111. Spyridopoulos I, Sullivan AB, Kearney M, Isner JM, Losordo DW. Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation* 1997; 95: 1505-14.

112. Hsu SP, Ho PY, Juan SH, Liang YC, Lee WS. Progesterone inhibits human endothelial cell proliferation through a p53-dependent pathway. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 3839-50.
113. Lee WS, Liu CW, Juan SH, Liang YC, Ho PY, Lee YH. Molecular mechanism of progesterone-induced antiproliferation in rat aortic smooth muscle cells. *Endocrinology* 2003; 144: 2785-90.
114. Boonyaratanakornkit V, McGowan E, Sherman L, Mancini MA, Cheskis BJ, Edwards DP. The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 359-75.
115. Zhang Z, Bryan JL, DeLassus E, Chang LW, Liao W, Sandell LJ. CCAAT/Enhancer-binding protein β and NF- κ B mediate high level expression of chemokine genes CCL3 and CCL4 by human chondrocytes in response to IL-1 β . *J Biol Chem*; 285: 33092-103.
116. Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, et al. A CREB-C/EBP β cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 17475-80.
117. Cui P, Yu M, Luo Z, et al. Intracellular signaling pathways involved in cell growth inhibition of human umbilical vein endothelial cells by melatonin. *J Pineal Res* 2008; 44: 107-14.
118. Shono T, Ono M, Izumi H, et al. Involvement of the transcription factor NF- κ B in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4231-9.
119. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-9.
120. Stein B, Yang MX. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF- κ B and C/EBP β . *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4971-9.
121. Ronen D, Rotter V, Reisman D. Expression from the murine p53 promoter is mediated by factor binding to a downstream helix-loop-helix recognition motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 4128-32.
122. Hermeking H, Eick D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 1994; 265: 2091-3.
123. Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D, et al. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 1989; 58: 823-31.

124. La Rosa FA, Pierce JW, Sonenshein GE. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1039-44.
125. Brigitta Bienz-Tadmor RZ-H, Stephanie Libresco, David Givol and Moshe Oren. The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *The EMBO Journal* 1985; 4: 3209-13.
126. Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 1989; 56: 777-83.
127. Hsu SP, Lee WS. Progesterone Receptor Activation of Extranuclear Signaling Pathways in Regulating p53 Expression in Vascular Endothelial Cells. *Mol Endocrinol* 2011; 25: 0000-0000.
128. Qin C, Nguyen T, Stewart J, Samudio I, Burghardt R, Safe S. Estrogen up-regulation of p53 gene expression in MCF-7 breast cancer cells is mediated by calmodulin kinase IV-dependent activation of a nuclear factor kappaB/CCAAT-binding transcription factor-1 complex. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 1793-809.
129. Cork DM, Lennard TW, Tyson-Capper AJ. Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008; 10: 207.
130. Lee WS, Harder JA, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E. Progesterone inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Nat Med* 1997; 3: 1005-8.
131. Graham JD, Yeates C, Balleine RL, et al. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5063-8.
132. Graham JD, Yager ML, Hill HD, Byth K, O'Neill GM, Clarke CL. Altered progesterone receptor isoform expression remodels progestin responsiveness of breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2713-35.
133. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 5209-18.
134. Demarzo AM, Beck CA, Onate SA, Edwards DP. Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 72-6.
135. Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 2004; 128: 139-46.