

中國醫藥大學
醫學檢驗生物技術學系碩士班
碩士學位論文

利用蛋白質體學技術分析凝血酶調節素基因靜默對角質
細胞株 HaCaT 的影響

Comparative Proteomic Analysis of Differentially Expressed
Proteins between HaCaT and TM deficiency HaCaT Cells

指導教授：黃蕙君 副教授

Huey-Chun Huang

研究生：顏志殷

Jhieh-Yin Yan

中華民國 98 年 7 月

中文摘要

凝血酶調節素(Thrombomodulin；簡稱 TM)是位於內皮細胞表面的糖蛋白，其功能包含調控血液凝集、細胞間黏附及抑制發炎反應等。除了存在內皮細胞，凝血酶調節素被發現存在血小板、巨核細胞、單核球細胞、嗜中性球、骨骼肌細胞以及皮膚上皮組織的角質細胞。但是在這細胞的功能尚未釐清。為了探討凝血酶調節素在角質細胞的功能，我們比較了 HaCaT 角質細胞株及靜默凝血酶調節素基因的 HaCaT 角質細胞株 (HaCaT-siTM) 後發現，凝血酶調節素會影響 HaCaT 細胞的型態、生長速率及爬行的能力。運用相對定量蛋白質體技術：螢光二維差異性電泳(2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis, 2D-DIGE) 來剖析 HaCaT 細胞及 HaCaT-siTM 細胞所表現的蛋白質體差異，由膠體顯現約 1100 個蛋白點，其中有 25 個蛋白點是有意義的差異點($P < 0.05$, ratio > 1.5)，經過質譜儀成功的鑑定出 17 個蛋白點的身分，其中在 HaCaT-siTM 表現量會上升的蛋白有 RAD23 homolog B, elongation factor 1-delta, dUTPase, and proteasome subunit alpha type-1 等 13 點，而 annexin A3 及 procathepsin D 等分子表現量則會下降。進一步用西方墨點法確認 annexin A3 及 procathepsin D 之表現下降，我們認為凝血酶調節素的失調影響角質細胞的型態，然而 annexin A3 及 procathepsin D 扮演的角色則需再進一步的探究。

Abstract

Thrombomodulin (TM) is an endothelial cell surface glycoprotein that performs anticoagulant, cell-cell adhesion, and anti-inflammatory functions in various tissues. TM has been detected in platelets, megakaryocytes, monocytes, neutrophils, smooth muscle cells, it is also expressed in epithelial keratinocyte. But the function of thrombomodulin in epithelial tissue remains unclear. In this thesis, TM deficiency HaCaT (HaCaT-siTM) cell line was used to study the biological effects of TM on epithelial tissue. We found that TM regulated the cell morphology, proliferation and migration in HaCaT cells. Altered protein expressions between HaCaT keratinocytes and TM deficiency HaCaT (siTM) cells were identified by 2D-DIGE (2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis) coupled with mass spectrometry. Difference gel electrophoresis (DIGE) is a form of gel electrophoresis where up to three different protein samples can be labeled with fluorescent dyes (Cy3, Cy5, Cy2) prior to two-dimensional electrophoresis. Total 1100 spots were detected by typhoon 9200. Total of 25 proteins were significantly ($P < 0.05$, ratio > 1.5) changed in abundance between HaCaT and HaCaT-siTM cells. Seventeen proteins were successfully identified by MALDI-TOF/TOF. We showed that knock down TM expression could lead to the increased expression of RAD23

homolog B, elongation factor 1-delta, dUTPase, and proteasome subunit alpha type-1, whereas Annexin A3 and procathepsin D were being down-regulated the expression of. Annexin A3 and procathepsin D were further confirmed by Western blotting. In conclusion that TM could lead to keratinocytes transformation but the role of annexin A3 and procathepsin D in this process remains to be further studied.



致謝

本論文的完成首先先感謝我的指導教授黃蕙君老師，提供了一個良好的實驗環境及實驗器材。另外還感謝口試委員成功大學醫技系的林尊湄老師及本校生物科技系的鄭志鴻老師在百忙之中撥空前來，提供專業的知識及經驗，使得本論文更臻完善，由衷誠摯的感謝。

回首研究生生活，酸甜苦辣在心頭，首先要感謝指導教授黃蕙君老師對我的教導，在遇到問題時能夠給我指引，在此感謝實驗室的學弟妹：映菘、毛毛、花花、佳璇、淳媛及惠羽，還有我的同學奕偉及心元，你們陪我度過這兩年並分享我的喜悅及哀愁，在我遇到困難時更有力量去面對，並且為研究生活增添許多色彩，讓我有難忘的回憶。

衷心感謝我的父母、弟弟、朋友們，一路走來，你們給我最大的鼓勵及支持，也因為有你們讓我的碩士學能夠順利取得。

最後，將此論文獻給所有關心我及協助我的每一個人，願與你們一同分享這份成果與喜悅。

目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
致謝	IV
目錄	V
第一章、前言	1
第一節 研究背景	1
一、人類凝血酶調節素	1
二、人類凝血酶調節素的構造和功能	1
三、人類凝血酶調節素的分布	3
四、蛋白質螢光二維差異性電泳的應用	4
第二節 研究目的	6
第二章、研究方法	6
第一節 研究設計	6
第二節 研究材料	6
一、細胞株	6
二、試劑及藥品	7
三、儀器	10
四、抗體	11
第三節 實驗方法	12
一、人類角質細胞細胞培養	12
二、蛋白質收取	16
三、凝血酶調節素siRNA的轉殖	17
四、二維蛋白質電泳分析	18
五、質譜儀蛋白質鑑定	25
六、蛋白濃度定量	25
七、西方墨點法	26
八、細胞免疫螢光染色	30
九、細胞生長能力分析	31
十、細胞爬行分析	32
第三章、研究結果	33
一、凝血酶調節素基因靜默影響 HaCaT 細胞的型態	33
二、靜默凝血酶調節素影響HaCaT上皮細胞的生長	33
三、HaCaT-siTM 細胞的爬行能力增加	33
四、DIGE 分析 HaCaT 及 HaCaT-siTM	34
五、Annexin A3 及 procathepsin D 差異蛋白的表現	35
六、Annexin A3 及 procathepsin D 蛋白位於 HaCaT 細胞之細胞質中	35

七、HaCaT 角質細胞的凝血酶調節素 siRNA 基因轉殖	35
第四章、討論	37
參考文獻	40
圖表	45
附錄	55



第一章 前言

第一節 研究背景

一、人類凝血酶調節素介紹

人類凝血酶調節素(Thrombomodulin; TM)最早被發現位在血管的內皮細胞，是一個表現在細胞膜上的醣蛋白，具有拮抗血液凝固的功能[1]。凝血酶調節素結合凝血酶(thrombin)形成一個非共價的複合物後，會活化蛋白質 C(Protein C)，而活化型的蛋白質 C(activated protein C)會在蛋白質 S(Protein S)協助下[2]，水解活化型第五凝固因子(coagulation factor Va)和第八凝固因子(coagulation factor VIIIa)，阻斷凝固因子活化路徑(coagulation cascade)[3]；凝血酶調節素和凝血酶的複合物也會活化纖維蛋白溶解抑制子(thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor; TAFI)，活化的 TAFI 能切除纖維蛋白(fibrin)的 C 端離胺酸(Lys)殘基，降低纖維蛋白溶解酶(plasmin)對纖維蛋白的分解作用，穩定血液凝塊(blood clot)，所以凝血酶調節素也扮演抑制血塊溶解的角色[4-6]；此外，凝血酶調節素也會加強抗凝血酶 III(antithrombin III)對凝血酶的結合，使凝血酶失去凝血的能力[7]，所以凝血酶調節素是血液凝固過程中一個重要的調節者。

二、人類凝血酶調節素的構造和功能

人類凝血酶調節素的基因位在第二十號染色體的短臂上，全長約

3300 鹼基對(base pair) [8]，人類凝血酶調節素基因表現出來的是一個約 75 kDa 的醣蛋白，含有 575 個胺基酸，N 端含有 18 胺基酸的訊息胜肽 (signal peptide)，將訊息胜肽移去後，從 N 端到 C 端主要可以分成五個結構功能區：(一)lectin like domain (第一功能區, 胺基酸 1~223)；(二)epidermal growth factor(EGF)-like repeats (第二功能區, 胺基酸 224~462)；(三)Ser/Thr-rich domain (第三功能區, 胺基酸 463~497)；(四)transmembrane domain (第四功能區, 胺基酸 498~521)；(五)cytoplasmic domain (第五功能區, 胺基酸 522~557)[9-12]。

凝血酶調節素的 lectin like domain 的命名起因於胺基酸排列類似 C 型 lectin(C-type lectin)[13-15]，目前認為可能和細胞間的黏附[16]、調控腫瘤細胞生長[17]，及抑制發炎反應有關[18]；而在 lectin like domain 和 EGF-like domain 之間有段疏水性的區域(155~122)，其功能尚未確定，推測其功能為附著於細胞膜，以利細胞胞噬(endocytosis)凝血酶調節素反應的進行[19]。EGF-like domain 中，第 5 個和第 6 個 EGF-like motif 與凝血酶有相當高的親和力，與凝血酶結合後，會使得凝血酶對受質的特異性改變[7]，而第 4 個 EGF-like motif 則與蛋白質 C(Protein C)的結合和活化有關係[20]，EGF-like domain 被指出有刺激血管新生的活性[21]。

Ser/Thr-rich domain 含有 sulphated glycosaminoglycan 醣基可與抗凝血酶 III(antithrombin III)結合，藉此抑制凝血酶的活性，凝血酶調節素若不含

此 glycosaminoglycan，其抑制凝固的活性會下降[22, 23]。第四個功能區 transmembrane domain 為穿膜區。最後一段功能區 cytoplasmic domain 由 36 個胺基酸組成，目前未被指出有參予任何的訊息傳遞或結合細胞內的其他分子。

三、人類凝血酶調節素的分布

儘管凝血酶調節素最早被發現存在於血管的內皮細胞上，但是陸續的研究發現，在上皮細胞(epithelial cells)、平滑肌細胞(smooth muscle cell)[24]、角質細胞(keratinocytes)[25]、滑液束細胞(synovial lining cells)[26]、腦脊膜細胞(meningeal cells)[27]、眼角膜上皮細胞(corneal epithelial cells)、嗜中性白血球(neutrophils)[18]、單核球(monocytes)[28]…等中亦有發現凝血酶調節素的存在，如此廣泛的分布，顯示凝血酶調節素參與抗凝固外的其他功能。除了表現於正常細胞之外，凝血酶調節素也在癌症組織中呈現與疾病發展負相關之表現情況[24]；凝血酶調節素表現量下降會增加口腔癌細胞的轉移、癌細胞的侵襲和蔓延[29]，相反的研究人員証實在肝癌及乳癌中凝血酶調節素表現量較高時，患者會有較好的存活率[30, 31]。此外，凝血酶調節素被當作皮膚上皮細胞分化的一個指標，皮膚上皮組織中從底層到表層主要可分成五層，基底層(stratum basale)、棘狀層(stratum spinosum)、顆粒層(stratum granulosum)、透明層(stratum lucidum)及角質層(stratum

corneum)，角質細胞(keratinocyte)位在基底層占了細胞數量約九成，角質細胞會由基底膜(basal layer)生長後向外分化，最終角質化形成死細胞[32]，Mizutani 等人利用免疫組織染色的方法觀察到，比較惡化的皮膚上皮細胞癌分化程度較差，凝血酶調節素的表現量相對降低[33]；並且有學者觀察到正常老鼠皮膚的凝血酶調節素表現量並不高，但老鼠受傷後的表皮傷口癒合會大量表現凝血酶調節素[34]。表現於上皮細胞的凝血酶調節素功能並未被充分了解。

四、蛋白質螢光二維差異性電泳(2-D Fluorescence Difference Gel

Electrophoresis,2D-DIGE)的應用

蛋白質體的技術可以觀察細胞內蛋白質表現的變化，目前最常採用的工具是蛋白質二維電泳及質譜儀的分析。雖然二維電泳分析已經廣泛的被應用在蛋白質體研究，但是沒有任何兩片蛋白質膠片是完全一樣的，使得不同膠片間很難做正確的比較。螢光二維差異性電泳(2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis ,2D-DIGE)是可以彌補上述的缺點的實驗方法之一，這個技術主要是基於使用Cy2、Cy3與Cy5這三種不同的螢光物[35]，Cy3與Cy5分別標幟實驗組與對照組中蛋白檢體，至於Cy2是用來標定實驗之internal control，internal control的來源是所有要比較蛋白的平均配出，理論上每片膠之間的Cy2所偵測出的蛋白點是一樣的，藉此可校正膠體間差異，另一方面，Cy2標定可以做為相對定量功能，

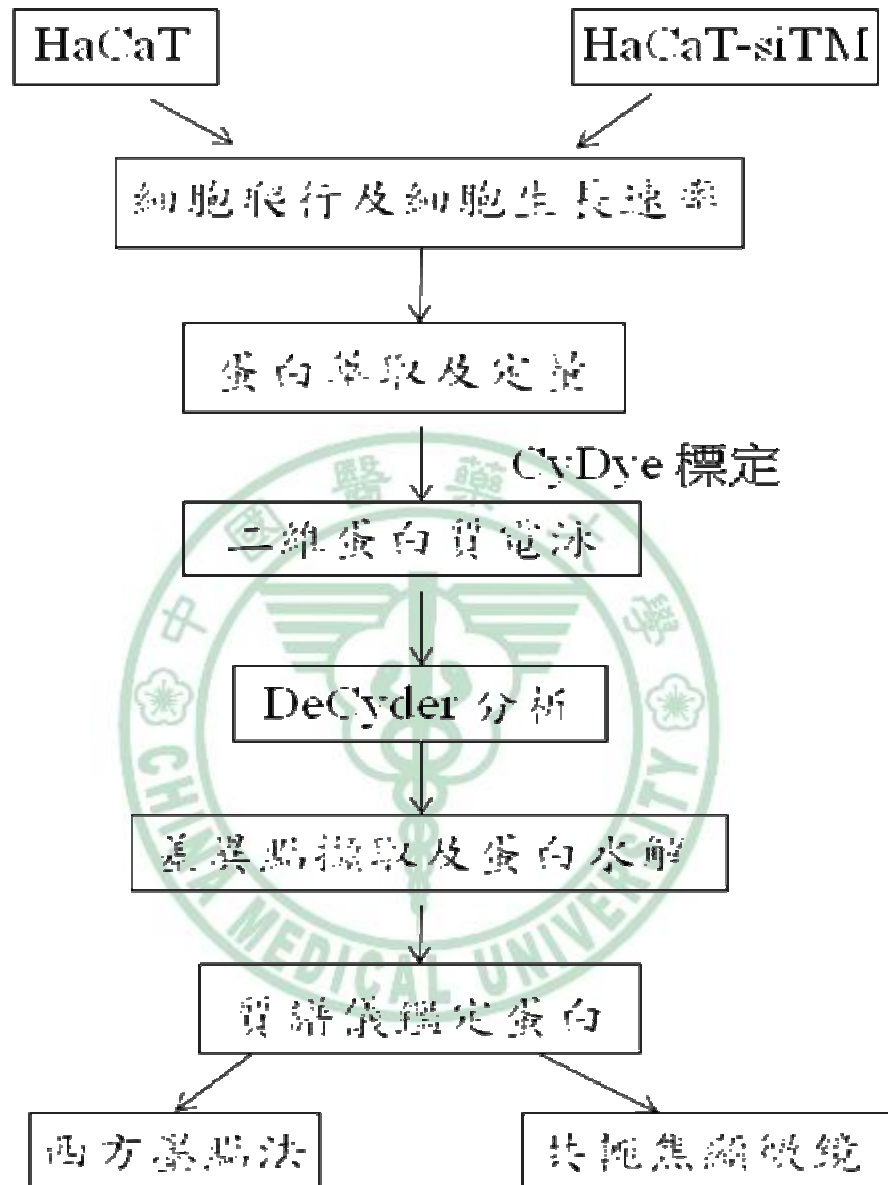
Cy3或Cy5先與之檢體Cy2換算比值再進行相互比對，是為相對定量的原理由來；然後將3種螢光標定兩種蛋白質體在同一片膠上跑電泳，接著再用GE Healthcare電腦軟體分析以Cy2校正後，Cy3、Cy5的螢光強度差異，定量出蛋白質的差異表現，最後用質譜儀測定蛋白質質量及分析胺基酸序列，鑑定出差異蛋白質的身分[36]。

第二節 研究目的

凝血酶調節素大量表現於皮膚上皮組織的功能尚未充分了解。為了探討凝血酶調節素在角質細胞的生理功能，我們選擇人類正常皮膚角質細胞株 HaCaT 細胞，利用 shRNA 降低 HaCaT 細胞上凝血酶調節素的表現，除了觀察凝血酶調節素對 HaCaT 細胞生長及爬行的作用，並利用 DIGE 找尋兩者間的差異蛋白，以探討 TM 及這些差異蛋白在角質細胞執行功能時所扮演的角色。

第二章 研究方法

第一節、 研究設計



第二節、 研究材料

一、 細胞株

本論文所使用的細胞株共兩種，人類正常皮膚角質細胞株 HaCaT 細胞以及用 TM shRNA 降低 HaCaT 細胞上凝血酶調節素的表現 (HaCaT-siTM)(附錄 1)，這兩株細胞為國立成功大學生物化學暨

分子生物學研究所吳華林老師實驗室提供。

二、試劑及藥品

藥品

品名	廠牌	用途
Tris	Usb	蛋白質電泳
Glycine	Bio-rad	蛋白質電泳
Sodium dodecyle sulfate(SDS)	Sigma	蛋白質電泳
Acrylamide	Sigma	蛋白質電泳
Ammonium persulfate	Sigma	蛋白質電泳
N, N, N, N-Tetramethyl ethylene diamine(TEMED)	Sigma	蛋白質電泳
2-mercaptoethaol	Sigma	蛋白質電泳
Acetic acid	Merck	蛋白質電泳
Glycerol	Merck	蛋白質電泳
Bromophenol blue (BPB)	SERVA	蛋白質電泳
Sodium chloride	Usb	蛋白質電泳
Hydochloric acid	Merck	蛋白質電泳
Methanol	Merck	西方墨點法

脫脂奶粉	安佳	西方墨點法
Tween 20	Sigma	西方墨點法
ECL	Millipore	西方墨點法
顯影劑	Kodak	西方墨點法結果呈現
定影劑	Kodak	西方墨點法結果呈現
Scientific Imaging Film	Kodak	西方墨點法結果呈現
DMEM medium	Hyclone	細胞培養
Trypsin-EDTA	Hyclone	細胞培養
PBS	Hyclone	細胞培養
Fetal bovine serum (FBS)	Biological Industries	細胞培養
Penicillin-Streptomycin solution	Biological Industries	細胞培養
Phosphatase inhibitor cocktail I	Sigma	蛋白酶抑制劑
Phosphatase inhibitor cocktail II	Sigma	蛋白酶抑制劑
Protease inhibitor cocktail III	A.G. Scientific	蛋白酶抑制劑
Trypan Blue	Serva	計數細胞
DMSO	Merck	抗凍劑
Sucrose	National diagnostics	二維電泳
Urea	Usb	二維電泳

CHAPS	CALBIOCHEM	二維電泳
Agrose	Amresco	二維電泳
Iodoacetamide (IAA)	Sigma	二維電泳
Dithiothreitol (DTT)	Usb	二維電泳
Silvernitrate	Sigma	蛋白質染色
Sodium carbonate	Sigma	蛋白質染色
Sodium thiosulfate	Sigma	膠體蛋白萃取
Potassium ferricyande	Merck	膠體蛋白萃取
Acetonitrile	Merck	膠體蛋白萃取
Trifluoroacetic acid	Merck	膠體蛋白萃取
Ammonium bicarbonate	Sigma	膠體蛋白萃取
Trypsin	Promega	膠體蛋白萃取
Isopropanol	Merck	蛋白鑑定
HCCA	Bruker	蛋白鑑定
Formaldehyde (37%)	Merck	固定細胞

試劑套組

品名	廠牌	用途
Micro BCA Kit	Pierce	蛋白質定量

2-D Quant Kit	GE Healthcare	蛋白質定量
2-D Clean-up Kit	GE Healthcare	蛋白質去鹽
2-D DIGE	GE Healthcare	蛋白質螢光標定

三、儀器

名稱	廠牌
細胞培養箱	Form-Scientific
倒立式螢光顯微鏡	IX70/Olympus
無菌操作台	VCM-620
直立式電泳組	Bio-Rad
乾式轉漬槽	Bio-Rad
壓片夾	Amersham Life Science
電源供應器	MAJOR SCIENCE
酸鹼值測定器	Mettler Toledo
分光光度計	Beckman
RO 純水製造機	Millipore
ELISA 測讀儀	Dynatech Max Reader
水浴槽	Deng yng
超音波震盪器	Misonix

天秤	Mettler Toledo
二維電泳組	GE Heathcare
等電點電泳儀	GE Heathcare
影像掃描器	GE Heathcare (Typhoon 9200)
影像掃描器	GE Heathcare (Image Scanner)
質譜儀	Bruker
雷射共軛焦顯微鏡	Leica
離心機	Hitachi-CF-15R
離心機	Hitachi himac LR 21F
離心機	KuBoTA6800
離心機	KuBoTA5100
-80°C 冷凍櫃	REVCO
-20°C 冰箱	Frigidaire

四、抗體

品名	廠牌	用途
Monoclon Rabbit anti-Human Annexin A3	Abcam	西方墨點法 免疫染色
Monoclon Mouse anti-Human	Santa Cruz	西方墨點法

Procathepsin D		免疫染色
Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate conjugate from Amanita phalloides	Sigma	免疫染色
Monoclonal Mouse anti-Human Cathepsin D	Abcam	西方墨點法
Monoclonal Rabbit anti-Human GAPDH	Cell Signaling	西方墨點法
Monoclonal Mouse anti-Human RCN1	Abcam	西方墨點法
Monoclonal Mouse anti-Human TM	Santa Cruz	免疫染色
TRITC-conjugated goat-anti-rabbit antibody	Molecules Probe	免疫染色
TRITC-conjugated goat-anti-mouse antibody	Santa Cruz	免疫染色

第三節 實驗方法

一、人類皮膚角質細胞(HaCaT 及 HaCaT-siTM)細胞培養

1、 冷凍細胞活化

材料：

(1) PBS (25×)

KCl	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
NA ₂ HPO ₄	23.13 g
NaCl	200 g
<hr/>	
調 pH 至 7.4	1 L

(2) DULBECCO'S-MEM(DMEM)細胞培養基

DMEM medium powder	21.08 g
NaHCO ₃	4.8 g
<hr/>	
	2 L

調 pH 至 7.2，經 0.22μm 濾膜過濾後，使用時加入濃度 10%FBS，如果是培養 HaCaT-siTM 細胞需額外添加 Puromycin dihydrochloride(1 μg/ml)

(3) Trypsin EDTA(0.25%)

(4) Dimethyl Sulfoxide(DMSO)抗凍劑

(5) 三合一抑菌劑

(6) 10 cm 培養皿

方法：

將培養基至於 37°C 水槽中回溫，回溫後以 70%酒精噴拭移入無菌操作台內，在無菌操作台內取 8 ml 培養基於培養皿中。取一乾淨燒杯裝有 37°C 的水，接著取出冷凍管立即放入，輕

搖冷凍管使其全部融化，以 70%酒精噴拭冷凍管外部，移入無菌操作台內。取出 1 ml 凍管細胞懸浮液，加入裝有培養基的培養皿內，混合均勻，放入細胞培養箱培養，第二天在觀察細胞生長情形，並更換新鮮培養基以去除 DMSO。

2、 細胞(HaCaT 及 HaCaT-siTM)繼代培養

材料：

(1) PBS

(2) Trypsin-EDTA(0.25%)

(3) DMEM

方法：

吸出培養皿中舊的培養基，用 PBS 洗滌細胞兩次後，加入 1 ml Trypsin-EDTA，37°C 細胞培養箱作用 3 分鐘後，輕拍培養皿始貼附在培養皿底部的細胞脫落，加入適量新鮮培養基終止 trypsin 作用。以 pipet 吸至 15 ml 離心管，離心 1000 rpm，3 分鐘。去除上清液，加入 3 ml 的細胞培養基均勻混合，在新的培養皿中加入 8 ml 培養基，並加入 1 ml 細胞懸浮液，搖晃均勻後放入 37°C 細胞培養箱中，約 2 天繼代培養一次

3、 細胞計數

材料：

(1) trypan blue(0.4%)

(2) 血球計數器(Hemocytometer)

(3) Trypsin-EDTA(0.25%)

方法：

吸出培養皿中舊的培養基，用 PBS 洗滌細胞兩次後，加入 1 ml Trypsin-EDTA，37°C 細胞培養箱作用 3 分鐘後，輕拍培養皿始貼附在培養皿底部的細胞脫落，加入適量新鮮培養基終止 trypsin 作用，以 pipet 吸至 15 ml 離心管，離心 1000 rpm，3 分鐘，去除上清液，加入 1 ml 的細胞培養基均勻混合。取 20 μ l 細胞懸浮液與 80 μ l trypan blue 混合均勻(稀釋 5 倍)。藉由血球計數盤在顯微鏡觀察下，計數細胞數目，每 1 ml 的細胞數目=(3 大格細胞數目 \div 3) \times 10⁴ \times 5(稀釋倍數)。

4、 細胞(HaCaT 及 HaCaT-siTM)冷凍保存

材料：

(1) PBS

(2) 胎牛血清(FBS)

(3) DMEM

(4) Trypsin-EDTA(0.25%)

(5) DMSO

方法：

吸出培養皿中舊的培養基，用 PBS 洗滌細胞兩次後，加入 1 ml Trypsin-EDTA，37°C 細胞培養箱作用 3 分鐘後，輕拍培養皿始貼附在培養皿底部的細胞脫落，加入適量新鮮培養基終止 trypsin 作用，以 pipet 吸至 15 ml 離心管，離心 1000 rpm，3 分鐘。去除上清液，加入 1 ml 的細胞培養基(930 μ l 細胞培養基+70 μ l DMSO)均勻混合，裝於冷凍管中，將凍管先至於-20°C 冰箱，2 小時，再將凍管至於-80°C 冰箱放至隔夜，再將凍管移入液態氮中，可長期保存。

二、蛋白質收取

材料：

- (1) Cell lysis buffer(Urea 8 M，CHAPS 4%(w/v)，Pharmalyte 3-10 2%，ddH₂O 40ml)
- (2) Phosphatase inhibitor cocktail I (1%)
- (3) Phosphatase inhibitor cocktail II(1%)
- (4) Protease inhibitor cocktail III(0.1%)
- (5) PMSF(1%)
- (6) PBS

方法：

將培養皿內培養基倒掉，用 PBS 洗滌 2 次後，每盤培養皿加

入 800 μ l Cell lysis buffer(新鮮添加 Phosphatase inhibitor cocktail I(1%)、II(1%)、III(0.1%)及 PMSF(1%))，放置冰上反應 20 分鐘後，將細胞刮下，收集到微量離心管中，接著將微量離心管插置冰中，利用超音波震盪 30 秒(震 10 秒，停 10 秒)，離心 15000 rpm、4°C、20 分鐘，吸取上清液至新的微量離心管，並分裝放置-80°C 冷凍櫃保存。

三、凝血酶調節素 siRNA 的轉殖(transfection)

材料：

- (1) TM siRNA(Invitrogen)
- (2) Lipofectamine 2000(Invitrogen)
- (3) OPTI
- (4) 6 孔培養盤
- (5) 培養基(DMEM,10%FBS)

方法：

培養 5×10^5 HaCaT 細胞於 6 孔培養盤，每孔放置 2 ml 培養基。隔天先取 siRNA(6 pmole)放進 100 μ l OPTI 在室溫反應 5 分鐘，再取 1 μ g/ μ l lipofectamine 放進 100 μ l OPTI，接著將 siRNA 和 lipofectamine(200 μ l)混合均勻後，在室溫反應 20 分鐘。用 OPTI 補至 1 ml，並加入 6 孔培養盤，置 CO₂ 培養箱 6

小時後，換上正常的培養基，在轉錄後 108 小時後收取細胞蛋白。

四、二維蛋白質電泳分析

1、蛋白質定量

材料：

(1) 2-D Quant Kit

(2) Eppendorf

(3) Cuvette

方法：

標準品 BSA 依序取 0 μg , 10 μg , 20 μg , 30 μg , 40 μg , 50 μg 製備標準曲線，分別加入 500 μl 沉澱劑(precipitant)震盪後，於室溫反應 2 分鐘(白色混濁無顆粒)，再加入 500 μl 共沉澱劑(co-precipitant)並震盪(白色混濁，細顆粒)，離心 13000 rpm、4°C、15 分鐘，接著製備 Working reagent (reagent A : reagent B=100:1) 移除上清液後，加 100 μl 銅離子溶液(copper solution)及 400 μl 二次水震盪約 30 秒，加 1 ml 反應劑(working reagent)，置於室溫 15 分鐘接著使用 ELISA 取波長 480 nm 之吸光值，計算並繪出標準樣品之曲線，以內插法換

算樣品實際濃度。

2、蛋白質純化

材料：

(1) 2-D Clean-up Kit

(2) Eppendorf

方法：

樣品每 100 μg 分裝到一個微量離心管，分別加入 300 μl 沉澱劑(precipitant)震盪後，於冰上反應 15 分鐘，再加入 300 μl 共沉澱劑(co-precipitant)並震盪(白色混濁，細顆粒)，離心 22000 g、 4°C 、15 分鐘，移除上清液後，加入 40 μl 共沉澱劑，斜躺在冰上反應 5 分鐘，再離心 22000 g、 4°C 、15 分鐘，移除上清液後，加入 40 μl 二次水，並將沉澱物給沖散再加入 1 ml wash buffer 及 5 μl wash additive，置放在 -20°C 冰箱，每 15 分鐘振一次，共 6 小時，離心 32000 g、 4°C 、30 分鐘，移除上清液後，加入 10 μl 的 lysis buffer 於冰箱反應至隔夜，最後再次做蛋白質定量。

3、蛋白質等電點電泳

材料：

(1) Rehydration buffer

Urea

12 g

CHAPS	0.5 g
IPG Buffer	500 μ l
1% BPB stock solution	50 μ l
Double-distilled water	補滿
<hr/>	
	25 ml

(2) pH4-7 strip (GE)

(3) DTT

(4) 等電點電泳儀

(5) 2-D DIGE Kit

(6) 礦物油(mineral oil)

方法：

分別取兩種樣品各 50 μ g 以進行 Cy3 或 Cy5 螢光標定，及各取 25 μ g 混合再一起當作 internal standard 進行 Cy2 標定，各別加入 1 μ l 的 Cy3,Cy5,Cy2(400 pmole/ μ l)，和樣品混合均勻後，避光置於冰上反應 30 分鐘，接著加入 1 μ l 的 lysine(10 mM)終止螢光染劑的結合，避光置於冰上反應 10 分鐘後，將三種樣品混合均勻後，用 Rehydration buffer 補至 250 μ l，將樣品放進 holder，取出 pH 4-7 strip(將膠體朝下)，加入 400 μ l 礦物油，最後將 holder 放進等電點電泳儀，進行 IEF。

條件(process)：

Step1	stp	30V	12hr
Step2	stp	500V	1hr
Step3	stp	1000V	1hr
Step4	grd	8000V	3hr
Step5	stp	8000V	60000V/hr
Step6	stp	3000V	5hr

4、蛋白質 SDS-PAGE 電泳

材料：

(1)10%分離膠片(2片)

ddH ₂ O	48.5 ml
4× resolving gel buffer	25 ml
40% acrylamide/bis acrylamide	25 ml
10% SDS	1 ml
12% APS	500 μl
TEMED	50 μl
<hr/>	
	100.05 ml

(2)4× resolving gel buffer

Tris base	181.7 g
-----------	---------

DDW	750 ml
HCl	滴定至 pH 8.8

補滿 1 L

(3) 10% APS (Ammonium persulfate)

APS	0.02 g
ddH ₂ O	200 μl

200 μl

(4) Agarose sealing solution

Running buffer	100 ml
Agarose	1 g
1% BPB	200 μl

100 ml

(5) Running buffer (1X)

125 mM tris	15 g
960 mM glycine	72 g
0.5% SDS	5 g
ddH ₂ O	補滿

5 L

(6) SDS equilibration buffer (平衡溶液)

Urea	72.1 g
Tris	10.0 ml
Glycerol	69 ml
SDS	4 g
1%BPB	400 μ l
DDW	200 ml

(7)DTT(10 mg/ml)

(8)IAA(25 mg/ml)

方法：

取出IEF strip，以二次去離子水將表面的礦物油沖洗掉。依序放進裝有平衡溶液 (DTT、IAA)的管子中各平衡15分鐘，接著將IEF strip橫放入10 % SDS-PAGE 的上方，使strip與SDS-PAGE 緊密接觸，並覆蓋Agarose sealing solution溶液固定strip 的位置。將整個裝置架設到電泳槽上，加滿running buffer，在4 °C以50 V的電壓跑電泳，一直到達膠的底部為止 (約5 小時)

5、軟體分析

利用 Typhoon 9200 分別擷取對 Cy2、Cy3、Cy5 三種不同螢光波長(Excitation/Emission wavelengths : 488 nm/520 nm、532 nm/580 nm、633 nm/670 nm)的影像，並且總共進行三組檢體

之三片膠比對，三組檢體蛋白質點強度差異需使用 DeCyder 處理分析兩種樣品間螢光的相對差異，差異 1.5 倍以上，T-test < 0.05 定為差異點。

6、Coomassie Blue 染色

材料：

- (1) Methanol
- (2) Coomassie Blue
- (3) Glacial acetic acid

方法：

將跑好的二維電泳膠片，加入固定液(50%methanol、10% glacial acetic acid)固定膠片至隔夜，加入 Coomassie 染劑(0.1% Coomassie blue、50% methanol、10% glacial acetic acid)染色 20 分鐘，退染劑(40% methanol、10% glacial acetic acid)退染至膠體的背景透明為止。

7、膠體蛋白水解

材料：

- (1) Acetonitrile(ACN)
- (2) Ammonium bicarbonate(ABC,25mM)
- (3) Trypsin

方法：

將差異點取下後，加入 100 μ l ABC(25mM)，在室溫震盪

15 分鐘後移除上清液，再加入 25 μ l 100% CAN，使膠體脫水，震盪 5 分鐘，再加入 100 μ l ABC(25mM)使膠體復水，震盪 5 分鐘，再加入 25 μ l 100% CAN，使膠體脫水，至 Coomassie blue 的藍色消除為止，加入 Trypsin(30 ng)，置 4 $^{\circ}$ C 2 小時後，37 $^{\circ}$ C 反應 16 小時，分別加入 50%ACN 及 80%ACN 萃取 peptide。

五、質譜儀蛋白質鑑定

此實驗是使用中國醫藥大學貴重儀器中心的蛋白質分析鑑定質譜儀 (MALDI-TOF/TOF)，蛋白經由 trypsin 水解，利用 Mascot 軟體進行分析，質量誤差可容忍範圍為 ± 100 ppm，錯誤切割位置數目 ≤ 1 ，經過蛋白質序列資料庫 (Swissport) 中人種蛋白質模擬由酵素消化所演算出的胜肽群質量作數據比對，並且利用二次飛行質譜 (TOF/TOF) 鑑定胜肽織胺氨基酸序列。

六、蛋白濃度定量

材料：

- (1) BCATM Protein Assay Kit
- (2) 96 孔培養盤
- (3) Eppendorf

方法：

標準品 BSA 依 2 倍序列稀釋濃度範圍為 2 -0.125 mg/ml，取標準品與待測樣品各 10 μ l 分別稀釋五倍及十倍進行濃度定量，標準品與待測樣品取至 96 孔盤中，配置 working reagent(A:B=1:50)每 well 加入 100 μ l，於 37°C 反應 30 分鐘，接著使用 ELISA 讀取波長 570 nm 之吸光值，計算標準樣品之吸光曲線並換算樣品實際濃度。

七、西方墨點法

材料：

(1) 10%分離膠片(2片)

ddH ₂ O	9.7 ml
1.5 M Tris-HCl(pH 8.8)	5 ml
40% acrylamide/bis acrylamide	5 ml
10% SDS	200 μ l
12% APS	150 μ l
TEMED	20 μ l
<hr/>	
	20.07 ml

(2) 3.6%聚焦膠片(2片)

ddH ₂ O	6.45 ml
--------------------	---------

0.5 M tris(pH 6.8)	630 μ l
40% acrylamide/bis acrylamide	900 μ l
10% SDS	100 μ l
12% APS	100 μ l
TEMED	10 μ l
	<hr/>
	8.42 ml

(3) Running buffer (5X)

125 mM Tris	15 g
960 mM glycine	72 g
0.5% SDS	5 g
ddH ₂ O	補滿
	<hr/>
	1 L

(4) Transfer buffer

25 mM Tris	2.1 g
0.2 mM glycine	10.5 g
20% methanol	140 ml
ddH ₂ O	補滿
	<hr/>
	700 ml

(5) PBST

PBS (25X)	80 ml
Tween 20	2 ml

ddH ₂ O	補滿
<hr/>	
	1 L
(6) Blocking buffer (新鮮泡製)	
PBST (1X)	80 ml
5% milk	4 g
<hr/>	
	80 ml
(7) 10%APS(Ammonium persulfate)	
APS	0.02 g
ddH ₂ O	200 μl
<hr/>	
	200 μl
(8) 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8)	
Tris-base	90.85 g
ddH ₂ O	450 ml
<hr/>	
	500 ml
(9) 0.5 M Tris-HCl(pH 8.8)	
Tris-base	30.3 g
ddH ₂ O	450 ml
<hr/>	
	500 ml

(10) 4X sample buffer	
0.5 M Tris-HCl	10 ml
Glycerol	6 ml
SDS	2 g
2-ME	4 ml
Bromophenol	0.004 g
<hr/>	
pH=6.8	20 ml

- (11) 一級抗體
- (12) 二級抗體
- (13) 顯影劑與定影劑(Kodak)
- (14) 底片(Kodak)
- (15) Millipore Chemilluminescent HRP Substrate
- (16) PVDF 膜(polyvinylidene difluoride)

方法：

先於膠臺上架好玻璃，配置下層分離膠加至玻璃內 (1.5mm)，以 95%酒精壓平，約 30 分鐘後，將 95%酒精倒掉，配置上層聚焦膠加至玻璃，插入樣品梳(無氣泡)，約 30 分鐘後配置完成，取下放至 4°C 保存，分別取 50 μg sample 與 4X sample buffer 等比例混合，以沸水加熱 5 分鐘使蛋白變性，冷卻後將 sample 加入槽內，以 100 伏特電壓進行電泳約兩個小

時，先將蛋白轉印紙(PVDF membrane)泡至 methanol 中 5 分鐘，之後浸至 transfer buffer，而 2 張濾紙和電泳膠也浸至 transfer buffer 中，依序依序放置濾紙、轉漬膜、電泳膠、濾紙，小心移去氣泡，轉漬電泳膠片 10 伏特電壓約 75 分鐘，轉漬完後，將 PVDF membrane 以 PBST 清洗一次/10 分鐘，轉漬完後膜浸泡 Blocking buffer，室溫 2 小時後，加入一級抗體，放至 4°C 反應隔夜，隔天以 PBST 清洗 6 次，每次 10 分鐘，加入二級抗體，室溫反應一小時後，以 PBST 清洗 6 次，每次 10 分鐘，最後加入 ECL 試劑至暗房壓片，壓片時間約 1-10 分鐘，以顯影劑顯色再以定影劑固定，再以清水清洗，底片自然晾乾，標出蛋白標準品分子量，利用 AlphaImager 2000 軟體定量分析計算相對於 loading control 蛋白增減倍數。

八、細胞免疫螢光染色

材料：

- (1) 玻片
- (2) 載玻片
- (3) 雷射共軛焦顯微鏡
- (4) 3.7% formalin
- (5) 抗體

(6) FBS

(7) PBS

方法：

先用 PBS 清洗種好在玻片上的細胞，加入 3.7% formalin 在室溫固定 15 分鐘，再用 PBS 清洗四次，如果要染細胞質的蛋白，加入 Triton X-100(0.25%) 在室溫反應 10 分鐘，再用 PBS 清洗四次，加入 FBS(10%) 在 37°C 反應 30 分鐘，再用 PBS 清洗四次，接著加入一抗(Monoclonal Rabbit anti-Human Annexin A3、Monoclonal Mouse anti-Human Procathepsin D、Phalloidin)，置於 4°C 至隔夜再用 PBS 清洗，再加入二抗(tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated goat-anti-rabbit antibody、TRITC-conjugated goat-anti-mouse antibody)，在室溫避光反應 90 分鐘，再用 PBS 清洗，最後避光封片。

九、細胞生長能力分析

材料：

- (1) 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)
- (2) 24 孔培養盤

(3) 96 孔培養盤

方法：

培養 2×10^4 HaCaT 與 HaCaT-siTM 細胞於 24 孔培養盤，每 well 400 μ l DMEM，分別在 16、24、48、72 小時，加入 300 μ l MTT(5mg/ml) 放置 37°C，5% CO₂ 培養箱中培養 2 小時，接著將 MTT 吸出，加入 100 μ l DMSO 於室溫反應 1 小時，之後吸至 96 孔培養盤，以波長 570 nm 至於 ELISA 測讀吸光值，以 16 小時為基礎點，換算出每個時間點的相對倍數。

十、細胞爬行分析

材料：

(1) 6 孔培養盤

方法：

在 6 孔培養盤中，分別接種 HaCaT 及 HaCaT-siTM 細胞 $1.5 \times 10^6 / 2$ ml 於培養液培養，隔夜將培養液吸出，以 10 μ l white tip 在長滿細胞的底面畫出 3 條傷口，換上新的培養液，使用倒立式顯微鏡觀察，每個 well 選擇標示不同之 3 個視野，追蹤記錄 0、8、16 小時之細胞爬行，計算爬行程度表示方式如下：

$(\text{總傷口面積} - \text{爬行面積}) / \text{總傷口面積}$

第三章 研究結果

一、凝血酶調節素基因靜默影響 HaCaT 細胞的型態

首先先以西方墨點法來偵測凝血酶調節素在 HaCaT、HaCaT-siTM 細胞間的表現量。結果顯示相對在基因靜默的 HaCaT-siTM 細胞，凝血酶調節素蛋白的表現為 HaCaT 二分之一(圖一)。此外，由倒立式螢光顯微鏡觀察下可以發現到 HaCaT 之上皮細胞型態，生長的也比較緊密，在 HaCaT-siTM 細胞則相對比較細長，細胞形狀有些改變。從 TRITC-phalloidin 結合 actin 的染色結果觀察細胞骨架，可發現 HaCaT 細胞和細胞間長的很緊密，相對的可以看到 HaCaT-siTM 細胞細胞和細胞間相對地鬆散(圖二)。

二、靜默凝血酶調節素影響 HaCaT 上皮細胞的生長

凝血酶調節素除了影響細胞的型態外，還發現會影響 HaCaT 細胞的生長速率，以 MTT 分析 HaCaT 細胞在四十八小時之後生長的速率逐漸高於 HaCaT-siTM 細胞，在七十二小時之後高達約 1.4 倍(圖三)，結果顯示靜默凝血酶調節素的表現在 72 小時內會減緩 HaCaT 細胞的生長能力。

三、HaCaT-siTM 細胞的爬行能力增加

利用 Wound migration assay 分析細胞爬行的能力，計算細胞所爬行的面積(圖四 A)，HaCaT-siTM 細胞所爬行的面積遠快於 HaCaT 細胞，約八小時時，HaCaT-siTM 細胞已經爬行將近整個面積，十六小時後，已經爬滿整個面積。相對的，正常 HaCaT 細胞在八小時只爬行 32%的傷口面積，十六小時後，只爬行了 38%的傷口面積(圖四 B)，結果顯示凝血酶調節素的表現下降會增加 HaCaT 角質細胞爬行的能力。

四、DIGE 分析 HaCaT 及 HaCaT-siTM

本研究利用螢光二維差異性電泳(DIGE)的方法分析HaCaT細胞與HaCaT-siTM細胞的蛋白質；二維膠電泳是採用酸鹼度範圍4-7 線性的IPG strip(wide range 4-7 linear immobilized pH gradient)進行第一維的蛋白質等電點分離，接續以10%的凝膠電泳(SDS-PAGE)進行第二維的蛋白質分子量分離；以影像掃描器(Typhoon 9200)利用不同波長將蛋白質顯色(圖五)，我們觀察到圖譜上約有1500個左右的蛋白質點被解析出來，分子量分布範圍在14-110 kDa，總共約1100個點可同時出現在三組膠片中，符合率約73.3%，圖譜中分析出有差異的蛋白質點總共有25個(箭頭所示)，再藉由質譜儀及資料庫比對鑑定出16個差異蛋白質點(Table 1)，其中點16及18分別為Annexin A3、procathepsin D。

五、Annexin A3 及 procathepsin D 差異蛋白的表現

從二維膠電泳圖譜發現 Annexin A3 及 procathepsin D 在 HaCaT-siTM 細胞的蛋白表現量是下降的，Annexin A3 及 procathepsin D 約為 HaCaT 細胞的 77% 及 45%，進一步以西方墨點法來偵測 Annexin A3 (圖六) 及 procathepsin D (圖七) 在兩株細胞中蛋白的表現量差異。結果顯示 Annexin A3 及 procathepsin D 於 HaCaT-siTM 細胞表現量有明顯下降，分別為 78% 及 62%，與 DIGE 定量之減量結果吻合。

六、Annexin A3 及 procathepsin D 蛋白位於 HaCaT 細胞之細胞質中

以螢光染色的方式，觀察細胞中 Annexin A3 及 procathepsin D 表現的位置 (圖八)，HaCaT 與 HaCaT-siTM 細胞我們都可以看到 Annexin A3 及 procathepsin D 主要分布部位於細胞質中，但是無法以此定量比較兩者細胞差異。

七、HaCaT 角質細胞的凝血酶調節素 siRNA 基因轉殖

HaCaT-siTM 是持續穩定表現 TM shRNA 的細胞株，我們另外購置寡核酸之干擾 RNA 片段轉入進 HaCaT 細胞，以西方墨點法先偵測凝血酶調節素的蛋白表現量，確定 TM 在 108 小時時，仍可有效被干擾 RNA 抑制 (圖九)，再以西方墨點法偵測 Annexin A3、procathepsin D 及 cathepsin D 的表現，cathepsin D 為 procathepsin D 的成熟型。結果顯示 Annexin A3

及 procathepsin D 於 TM 干擾的 HaCaT 角質細胞表現量也會下降(圖九)，
相反的，cathepsin D 則在 TM 干擾的 HaCaT 角質細胞表現上升。



第四章 討論

從凝血酶調節素最早被發現在內皮細胞表面和拮抗血液凝固的功能有關，隨後陸續對凝血酶調節素的研究，發現凝血酶調節素還存在我們人體其他的組織中，也依序發現除了拮抗血液凝固的其他功能，一直到现在我們相信凝血酶調節素還有許多功能值得進一步研發探討。

本論文主旨在探討凝血酶調節素在上皮組織的功能，所以我們先觀察了凝血酶調節素所影響的 HaCaT 細胞型態，還有所影響細胞的爬行能力及生長速率，並研究凝血酶調節素在 HaCaT 細胞所造成的蛋白質變化，實驗中選用了螢光二維差異性電泳技術，期待能夠找出受凝血酶調節素影響的 HaCaT 角質細胞功能蛋白。在細胞型態方面，可以發現 HaCaT-siTM 細胞變得細長，藉由細胞骨架觀察發現細胞間相對鬆散，顯示凝血酶調節素會造成 HaCaT 細胞構造改變；而在細胞爬行能力，發現 HaCaT 細胞的爬行速度遠慢於 HaCaT-siTM 細胞，除了可能是降低凝血酶調節素調降了細胞間的黏附，導致 HaCaT-siTM 細胞的爬行速度加快，我們認為細胞由上皮細胞型態轉變為纖維型，會增加細胞移型的能力 [37-40]。

我們從螢光二維差異性電泳找出了 16 個蛋白差異點，經由資料庫蛋白功能搜尋發現大部分和代謝以及細胞骨架有關，其中比較有興趣的是 Annexin A3 及 procathepsin D 這兩個蛋白；Annexin A3 是屬於 Annexins

這個家組的成員之一，與鈣離子結合存在於細胞質[41]，其許多家族成員陸續被研究出和發炎反應、細胞凋亡、細胞增生及細胞分化都有相關[42-45]，至於 Annexin A3 是屬於比較後期才被重視的蛋白，此蛋白的功能範圍很廣，可做為攝護腺的生物標記，當表現量上升時其癌症的轉移能力增加[46]；Annexin A3 也是一個新發現的血管新生因子，主要會經由 HIF-1 這個途徑促使 VEGF 的產生[47]；Annexin A3 也會由大腦中的小神經膠細胞(microglia cell)所分泌，和大脑受損時的修有關[48]；Annexin A3 還會促進小鼠肝細胞的新生[49]，這裡可能意味著 Annexin A3 的表現量上升可能和細胞的增生有關，HaCaT-siTM 細胞之 Annexin A3 被調降。cathepsin D 為 procathepsin D 的成熟型，procathepsin D(52 kDa) 在送入溶小體的過程中會經由酵素切割成 cathepsin D(34 kDa)[50, 51]，cathepsin D 的功能範圍更為廣大，procathepsin D/cathepsin D 最早被提到與乳癌的轉移和存活率有關[51]，procathepsin D 也陸續被指出和癌細胞的增生[52-56]以及血管新生[57, 58]；在阿茲海默症(Alzheimer's disease) 的病人身上可以發現 cathepsin D 會異常的升高[58, 59]；另外，cathepsin D 在皮膚功能上也有些相關研究，當 cathepsin D 異常增加時，會造成皮膚異常增生、傷口癒合速度加快及上皮組織分化[60-62]。還發現到 procathepsin D 會促使 HaCaT 細胞增生[63]，綜合以上結論，procathepsin D/cathepsin D 會影響上皮組織的分化及癒合，因此我們推測凝血酶調節

素下降所造成的 procathepsin D 表現量下降，會影響上皮組織的分化、癒合功能，此外，procathepsin D 的下降我們推測是轉換成成熟型 cathepsin D 所造成。另外，為了觀察凝血酶調節素下降不同時間對上皮細胞的影響，植入了凝血酶調節素 siRNA，從結果中可以發現在凝血酶調節素下降在 108 小時後，Annexin A3、procathepsin D 有比較明顯的下降，因此推測可隨著凝血酶調節素長時間的低量表現，HaCaT 細胞受到的影響更明顯。

雖然我們目前尚未確定凝血酶調節素在上皮組織所扮演的生理角色，但是經由蛋白質二維電泳、細胞爬行能力及細胞生長速率的實驗，可以確定凝血酶調節素在上皮組織可能扮演不同於抗凝血的功能，至於經由何種機制，產生何種訊息傳遞，還更需進一步研究與探討。



五、參考文獻

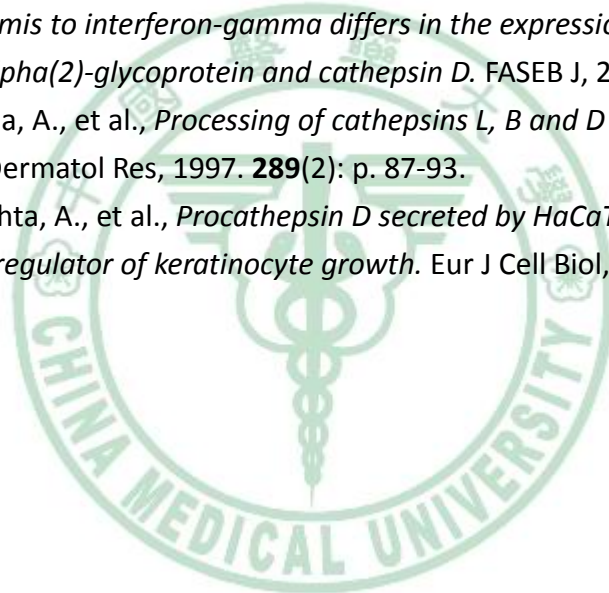
1. Esmon, C.T. and W.G. Owen, *Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(4): p. 2249-52.
2. Hayashi, T. and K. Suzuki, *Monoclonal antibodies for human thrombomodulin which recognize binding sites for thrombin and protein C*. J Biochem, 1990. **108**(5): p. 874-8.
3. Esmon, C.T., N.L. Esmon, and K.W. Harris, *Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation*. J Biol Chem, 1982. **257**(14): p. 7944-7.
4. Broze, G.J., Jr. and D.A. Higuchi, *Coagulation-dependent inhibition of fibrinolysis: role of carboxypeptidase-U and the premature lysis of clots from hemophilic plasma*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3815-23.
5. Nesheim, M., et al., *Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 386-91.
6. Bajzar, L., *Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. 2511-8.
7. Kurosawa, S., et al., *Proteolytic formation and properties of functional domains of thrombomodulin*. J Biol Chem, 1987. **262**(5): p. 2206-12.
8. Wen, D.Z., et al., *Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene*. Biochemistry, 1987. **26**(14): p. 4350-7.
9. Jackman, R.W., et al., *Characterization of a thrombomodulin cDNA reveals structural similarity to the low density lipoprotein receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(23): p. 8834-8.
10. Wood, M.J., B.A. Sampoli Benitez, and E.A. Komives, *Solution structure of the smallest cofactor-active fragment of thrombomodulin*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(3): p. 200-4.
11. Fuentes-Prior, P., et al., *Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex*. Nature, 2000. **404**(6777): p. 518-25.
12. Sadler, J.E., et al., *Structure-function relationships of the thrombin-thrombomodulin interaction*. Haemostasis, 1993. **23 Suppl 1**: p. 183-93.
13. Christian, S., et al., *Molecular cloning and characterization of endosialin, a C-type lectin-like cell surface receptor of tumor endothelium*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7408-14.
14. Petersen, T.E., *The amino-terminal domain of thrombomodulin and pancreatic*

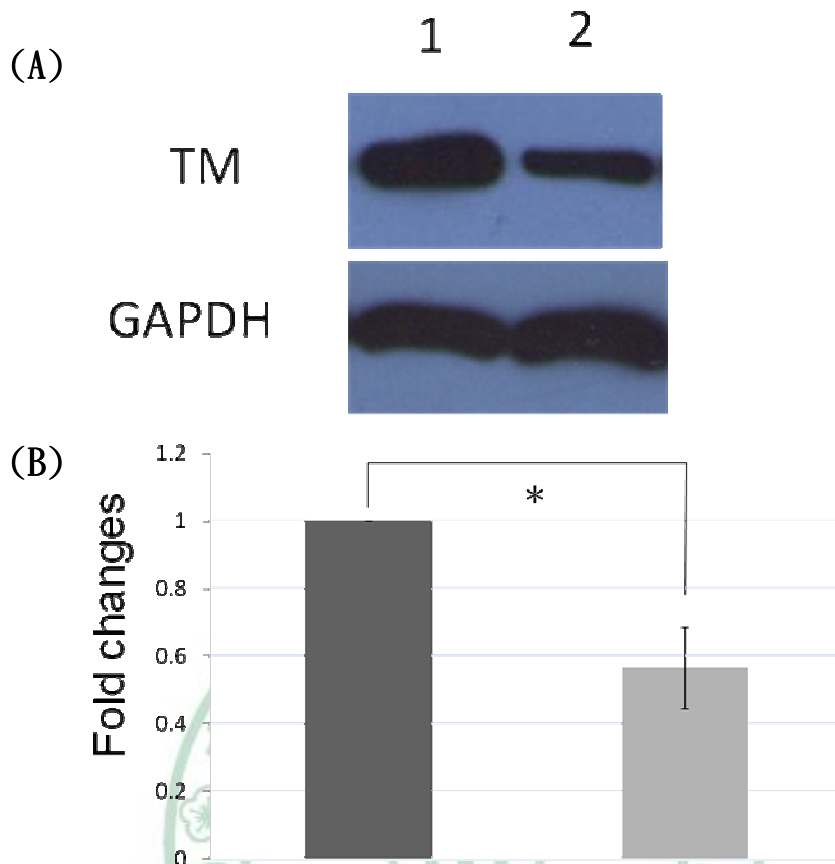
- stone protein are homologous with lectins. FEBS Lett, 1988. **231**(1): p. 51-3.
15. Dean, Y.D., et al., *Molecular and cellular properties of the rat AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor with structural homology to thrombomodulin*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34382-92.
 16. Huang, H.C., et al., *Thrombomodulin-mediated cell adhesion: involvement of its lectin-like domain*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46750-9.
 17. Zhang, Y., et al., *Thrombomodulin modulates growth of tumor cells independent of its anticoagulant activity*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1301-9.
 18. Conway, E.M., et al., *The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways*. J Exp Med, 2002. **196**(5): p. 565-77.
 19. Conway, E.M., et al., *The amino terminal lectin-like domain of thrombomodulin is required for constitutive endocytosis*. Blood, 1997. **89**(2): p. 652-61.
 20. Zushi, M., et al., *The last three consecutive epidermal growth factor-like structures of human thrombomodulin comprise the minimum functional domain for protein C-activating cofactor activity and anticoagulant activity*. J Biol Chem, 1989. **264**(18): p. 10351-3.
 21. Shi, C.S., et al., *Evidence of human thrombomodulin domain as a novel angiogenic factor*. Circulation, 2005. **111**(13): p. 1627-1636.
 22. Parkinson, J.F., J.G. Garcia, and N.U. Bang, *Decreased thrombin affinity of cell-surface thrombomodulin following treatment of cultured endothelial cells with beta-D-xyloside*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **169**(1): p. 177-83.
 23. Koyama, T., et al., *Relationship between post-translational glycosylation and anticoagulant function of secretable recombinant mutants of human thrombomodulin*. Br J Haematol, 1991. **78**(4): p. 515-22.
 24. Lager, D.J., et al., *Cellular localization of thrombomodulin in human epithelium and squamous malignancies*. Am J Pathol, 1995. **146**(4): p. 933-43.
 25. Raife, T.J., et al., *Thrombomodulin expression by human keratinocytes. Induction of cofactor activity during epidermal differentiation*. J Clin Invest, 1994. **93**(4): p. 1846-51.
 26. Boffa, M.C., B. Burke, and C.C. Haudenschild, *Preservation of thrombomodulin antigen on vascular and extravascular surfaces*. J Histochem Cytochem, 1987. **35**(11): p. 1267-76.
 27. Maruno, M., et al., *Expression of thrombomodulin in astrocytomas of various malignancy and in gliotic and normal brains*. J Neurooncol, 1994. **19**(2): p.

- 155-60.
28. McCachren, S.S., et al., *Thrombomodulin expression by human blood monocytes and by human synovial tissue lining macrophages*. *Blood*, 1991. **78**(12): p. 3128-32.
 29. Tabata, M., et al., *An immunohistochemical study of thrombomodulin in oral squamous cell carcinoma and its association with invasive and metastatic potential*. *J Oral Pathol Med*, 1997. **26**(6): p. 258-64.
 30. Suehiro, T., et al., *Thrombomodulin inhibits intrahepatic spread in human hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 1995. **21**(5): p. 1285-90.
 31. Kim, S.J., et al., *Thrombomodulin is a new biological and prognostic marker for breast cancer: an immunohistochemical study*. *Anticancer Res*, 1997. **17**(3C): p. 2319-23.
 32. Pelfini, C., S. Sacchi, and G. Carosi, [*Ultrastructural notes on solar keratosis. I. Basal layer of epidermis*]. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 1970. **46**(4): p. 194-6.
 33. Mizutani, H., et al., *Functional thrombomodulin expression on epithelial skin tumours as a differentiation marker for suprabasal keratinocytes*. *Br J Dermatol*, 1996. **135**(2): p. 187-93.
 34. Peterson, J.J., et al., *Expression of thrombomodulin and consequences of thrombomodulin deficiency during healing of cutaneous wounds*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(5): p. 1569-75.
 35. Unlu, M., M.E. Morgan, and J.S. Minden, *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. *Electrophoresis*, 1997. **18**(11): p. 2071-7.
 36. Marouga, R., S. David, and E. Hawkins, *The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology*. *Anal Bioanal Chem*, 2005. **382**(3): p. 669-78.
 37. Boyer, B., et al., *Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells*. *J Cell Biol*, 1989. **109**(4 Pt 1): p. 1495-509.
 38. Boyer, B., A.M. Valles, and J.P. Thiery, *Model systems of epithelium-mesenchyme transitions*. *Acta Anat (Basel)*, 1996. **156**(3): p. 227-39.
 39. Valles, A.M., et al., *Alternative patterns of mitogenesis and cell scattering induced by acidic FGF as a function of cell density in a rat bladder carcinoma cell line*. *Cell Regul*, 1990. **1**(13): p. 975-88.
 40. Valles, A.M., et al., *Acidic fibroblast growth factor is a modulator of epithelial plasticity in a rat bladder carcinoma cell line*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(3): p. 1124-8.

41. Raynal, P. and H.B. Pollard, *Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1197**(1): p. 63-93.
42. Caohuy, H., M. Srivastava, and H.B. Pollard, *Membrane fusion protein synexin (annexin VII) as a Ca²⁺/GTP sensor in exocytotic secretion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(20): p. 10797-802.
43. Perretti, M. and F.N. Gavins, *Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein*. *News Physiol Sci*, 2003. **18**: p. 60-4.
44. Gerke, V. and S.E. Moss, *Annexins: from structure to function*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(2): p. 331-71.
45. Gerke, V., C.E. Creutz, and S.E. Moss, *Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(6): p. 449-61.
46. Wozny, W., et al., *Differential radioactive quantification of protein abundance ratios between benign and malignant prostate tissues: cancer association of annexin A3*. *Proteomics*, 2007. **7**(2): p. 313-22.
47. Park, J.E., et al., *Annexin A3 is a potential angiogenic mediator*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **337**(4): p. 1283-7.
48. Kessler, C., et al., *Annexin A3 expression after stroke in the aged rat brain*. *Rom J Morphol Embryol*, 2008. **49**(1): p. 27-35.
49. Niimi, S., et al., *Expression of annexin A3 in primary cultured parenchymal rat hepatocytes and inhibition of DNA synthesis by suppression of annexin A3 expression using RNA interference*. *Biol Pharm Bull*, 2005. **28**(3): p. 424-8.
50. Takeshima, H., et al., *Intracellular targeting of lysosomal cathepsin D in COS cells*. *J Biochem*, 1995. **118**(5): p. 981-8.
51. Thorpe, S.M., et al., *Association between high concentrations of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer*. *Cancer Res*, 1989. **49**(21): p. 6008-14.
52. Bazzett, L.B., et al., *Modulation of proliferation and chemosensitivity by procathepsin D and its peptides in ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 1999. **74**(2): p. 181-7.
53. Fusek, M. and V. Vetvicka, *Mitogenic function of human procathepsin D: the role of the propeptide*. *Biochem J*, 1994. **303 (Pt 3)**: p. 775-80.
54. Vetvicka, V., J. Vektvickova, and M. Fusek, *Effect of human procathepsin D on proliferation of human cell lines*. *Cancer Lett*, 1994. **79**(2): p. 131-5.
55. Vetvicka, V., J. Vetvickova, and M. Fusek, *Effect of procathepsin D and its activation peptide on prostate cancer cells*. *Cancer Lett*, 1998. **129**(1): p. 55-9.
56. Vetvicka, V., J. Vetvickova, and M. Fusek, *Role of procathepsin D activation peptide in prostate cancer growth*. *Prostate*, 2000. **44**(1): p. 1-7.

57. Losch, A., et al., *Cathepsin D in ovarian cancer: prognostic value and correlation with p53 expression and microvessel density*. *Gynecol Oncol*, 2004. **92**(2): p. 545-52.
58. Cataldo, A.M., et al., *Lysosomal hydrolases of different classes are abnormally distributed in brains of patients with Alzheimer disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(24): p. 10998-1002.
59. Cataldo, A.M., et al., *Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system*. *Neuron*, 1995. **14**(3): p. 671-80.
60. Egberts, F., et al., *Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 11): p. 2295-307.
61. Chen, S.H., et al., *Response of keratinocytes from normal and psoriatic epidermis to interferon-gamma differs in the expression of zinc-alpha(2)-glycoprotein and cathepsin D*. *FASEB J*, 2000. **14**(3): p. 565-71.
62. Kawada, A., et al., *Processing of cathepsins L, B and D in psoriatic epidermis*. *Arch Dermatol Res*, 1997. **289**(2): p. 87-93.
63. Vashishta, A., et al., *Procathepsin D secreted by HaCaT keratinocyte cells - A novel regulator of keratinocyte growth*. *Eur J Cell Biol*, 2007. **86**(6): p. 303-13.

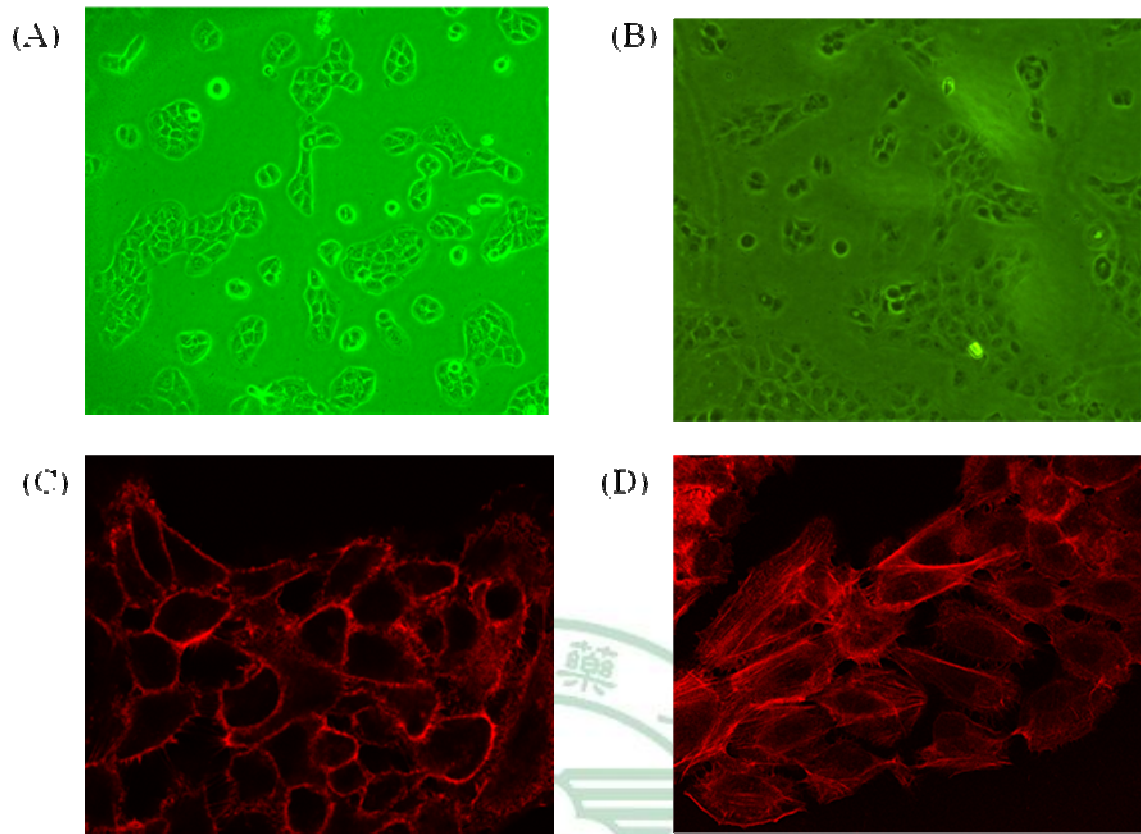




圖一、西方墨點法分析凝血酶調節素(TM)蛋白在 HaCaT 細胞及 HaCaT-siTM 細胞的蛋白表現量

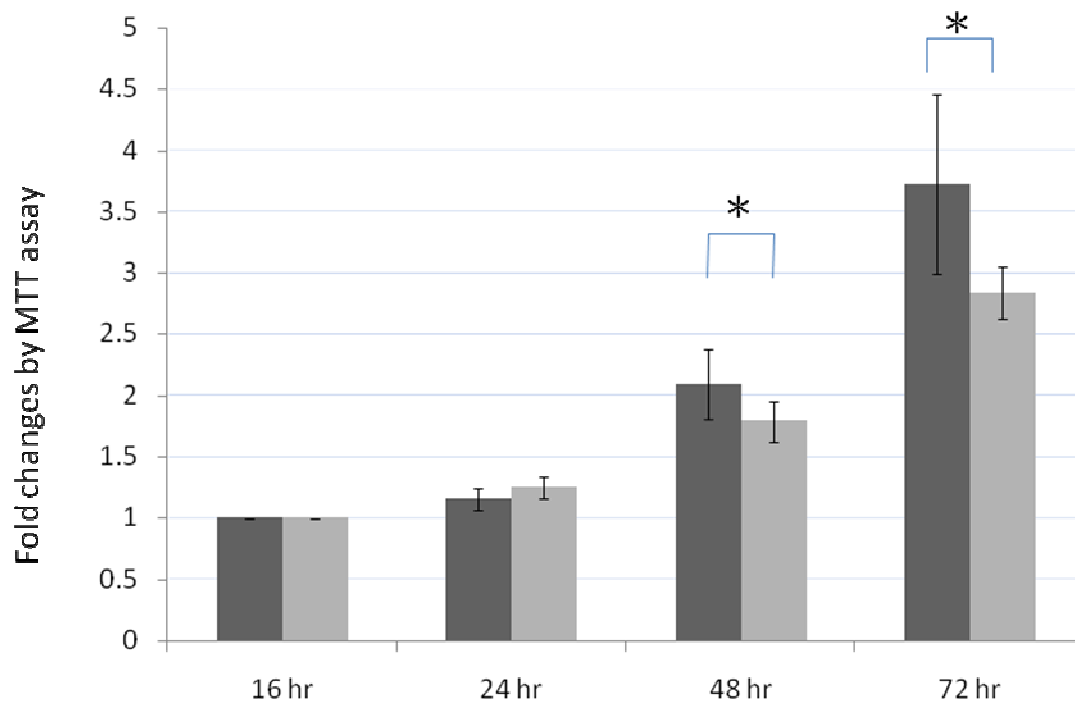
(A)取定量50 μ g的蛋白，以anti-TM抗體進行西方墨點反應，lane 1、lane 2分別為HaCaT及HaCaT-siTM細胞的蛋白質，GAPDH作為電泳internal control。

(B)AlphaImage 2000軟體定量電泳色帶強弱，與GAPDH比較後，將HaCaT細胞(■)之TM/GAPDH比值定為1，HaCaT-siTM細胞(■)TM/GAPDH相對表現量與之比較，檢體數有3組，*：P<0.05。



圖二、鏡檢及免疫染色去觀察 HaCaT 及 HaCaT-siTM 之型態

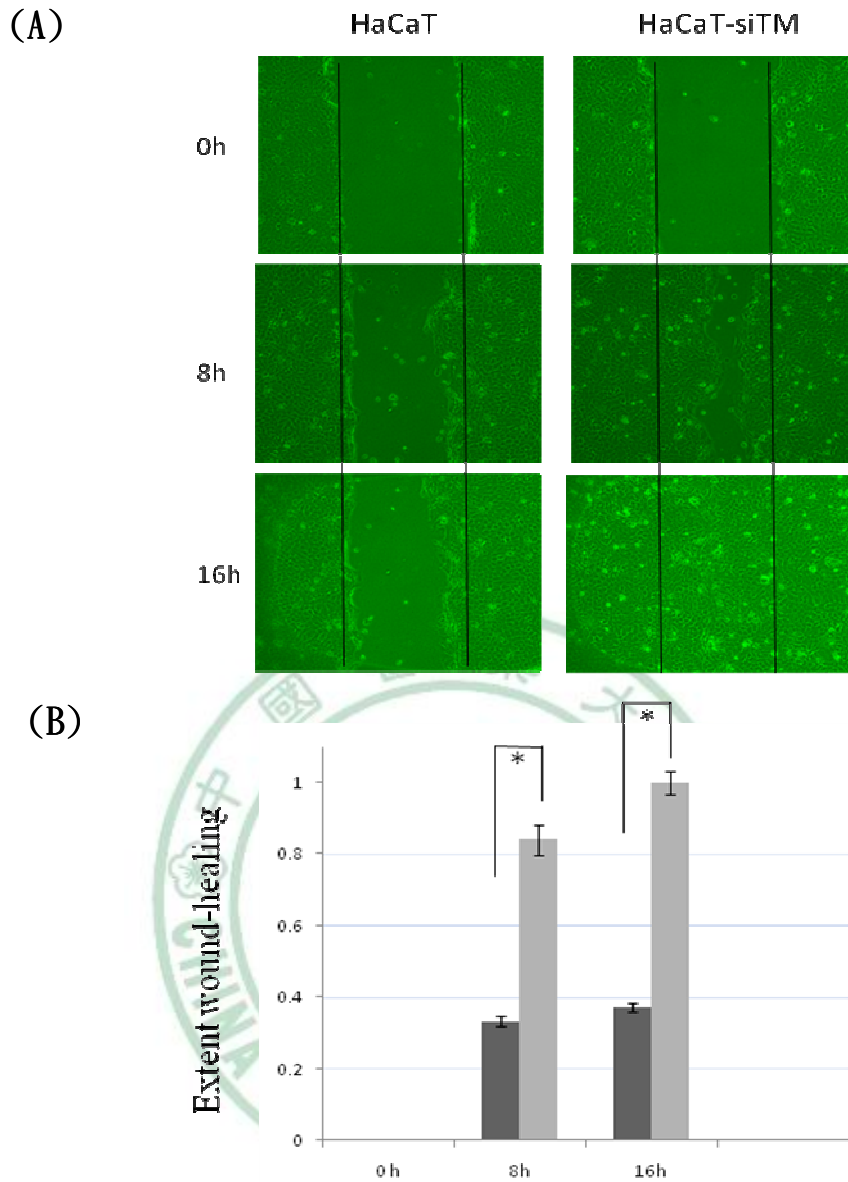
- (A) 倒立式顯微鏡觀察 HaCaT 細胞型態，物鏡 20X。
- (B) 倒立式顯微鏡觀察 HaCaT-siTM 細胞型態，物鏡 20X。
- (C) TRITC-phalloidin 染出 actin，以共軛焦顯微鏡觀察 HaCaT 細胞中 actin 骨架的分布。
- (D) 共軛焦顯微鏡觀察 HaCaT-siTM 之 actin 細胞骨架。



圖三、MTT 法分析 HaCaT 及 HaCaT-siTM 之細胞生長

每 24 小時測定 2 種細胞數目，將 MTT 分析測讀之吸光值與 16 小時比較倍數差異，檢體數有 4 組，*：P<0.05。

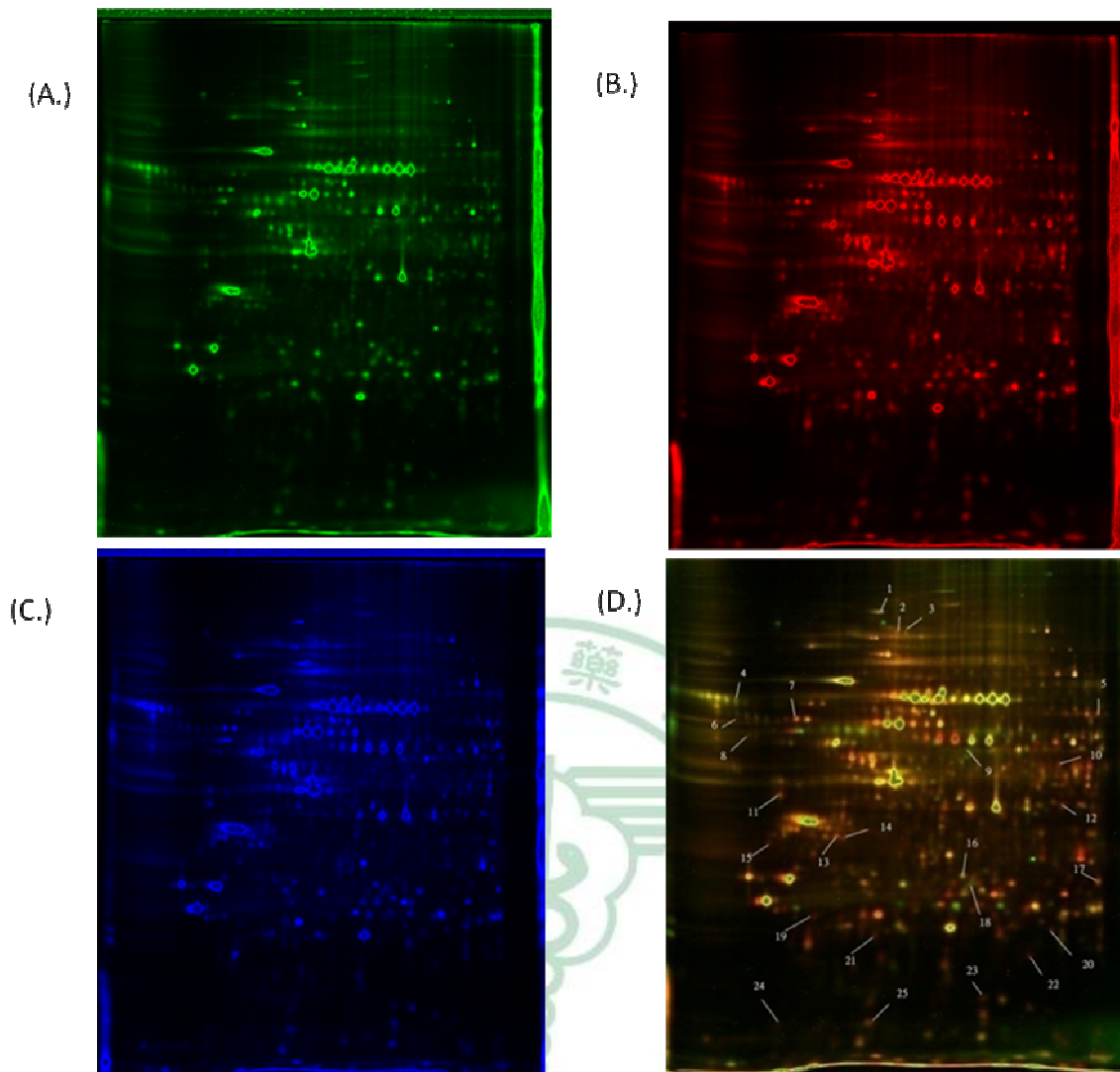
■ 表示 HaCaT 細胞生長情況，■ 表示 HaCaT-siTM 生長情況



圖四、分析 HaCaT 與 HaCaT-siTM 細胞之爬行能力

(A) 利用 Wound migration assay，每八小時用倒立式顯微鏡在同一位置照相，觀察記錄 HaCaT 及 HaCaT-siTM 細胞的爬行能力。

(B) AlphaImage 2000 軟體分析 HaCaT(■)及 HaCaT-siTM(■)細胞爬行程度，0 小時當作對照組，8、16 小時換算出爬行程度，檢體數有 4 組，*：P<0.05。



圖五、螢光二維差異性電泳(2D-DIGE)分析 HaCaT 與 HaCaT-siTM 細胞的蛋白質。

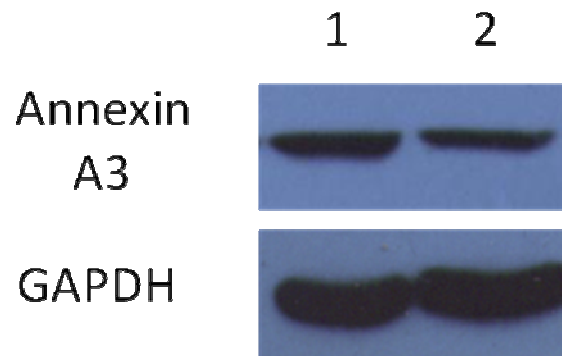
(A) 50 μg HaCaT 細胞蛋白利用 Cy3 標記之二維電泳膠圖

(B) 50 μg HaCaT-siTM 細胞蛋白利用 Cy5 標記之二維電泳膠圖

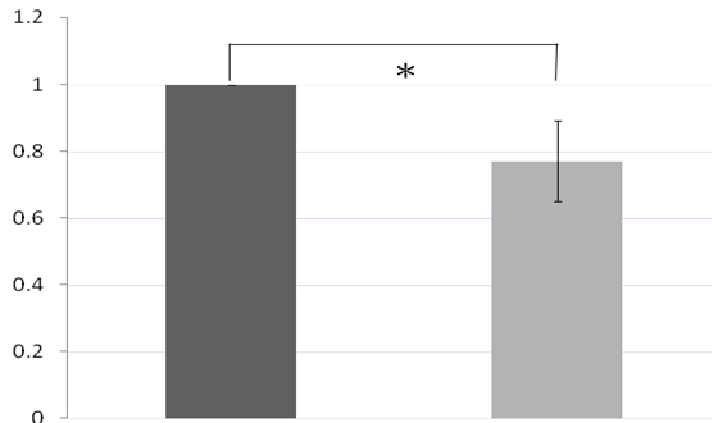
(C) 標幟 Cy2, 50 μg 蛋白(25 μg HaCaT+25 μg HaCaT-siTM), 以 Cy2 標幟作為 DIGE 之 internal control。

(D) HaCaT 與 HaCaT-siTM 細胞的差異蛋白點(箭頭)

A)



(B)

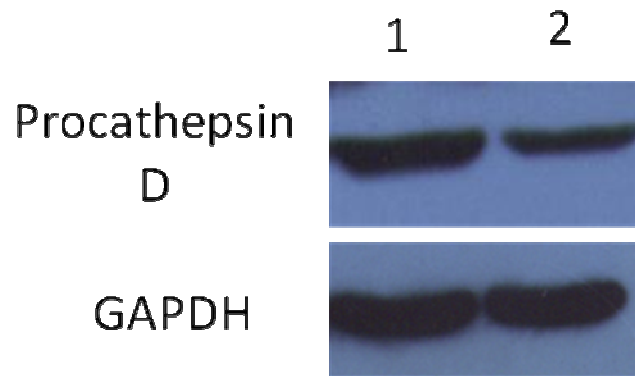


圖六、西方墨點法分析 Annexin A3 在 HaCaT 細胞及 HaCaT-siTM 細胞蛋白的表現量

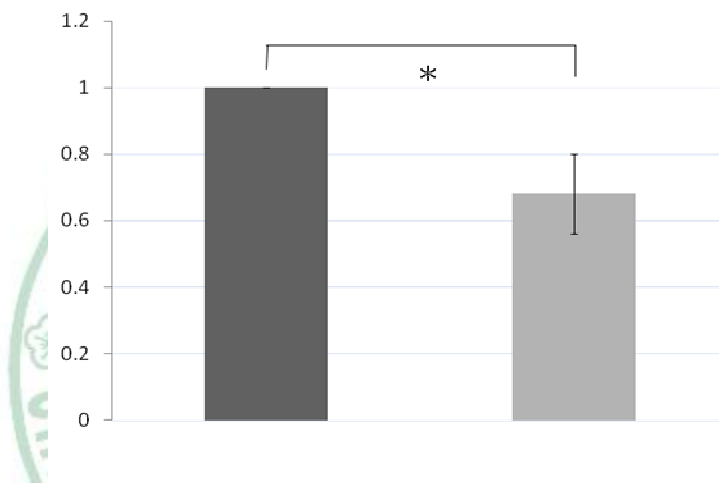
(A)取定50 μ g的蛋白，以anti-Annexin A3抗體進行西方墨點反應，lane 1、lane 2分別為HaCaT及HaCaT-siTM細胞的蛋白質 GAPDH作為電泳internal control。

(B)與internal control比較後，將HaCaT細胞(■)之Annexin A3/GAPDH表現量定為1，HaCaT-siTM細胞(■)中Annexin A3/GAPDH相對量化，檢體數有3組，*：P<0.05。

(A)



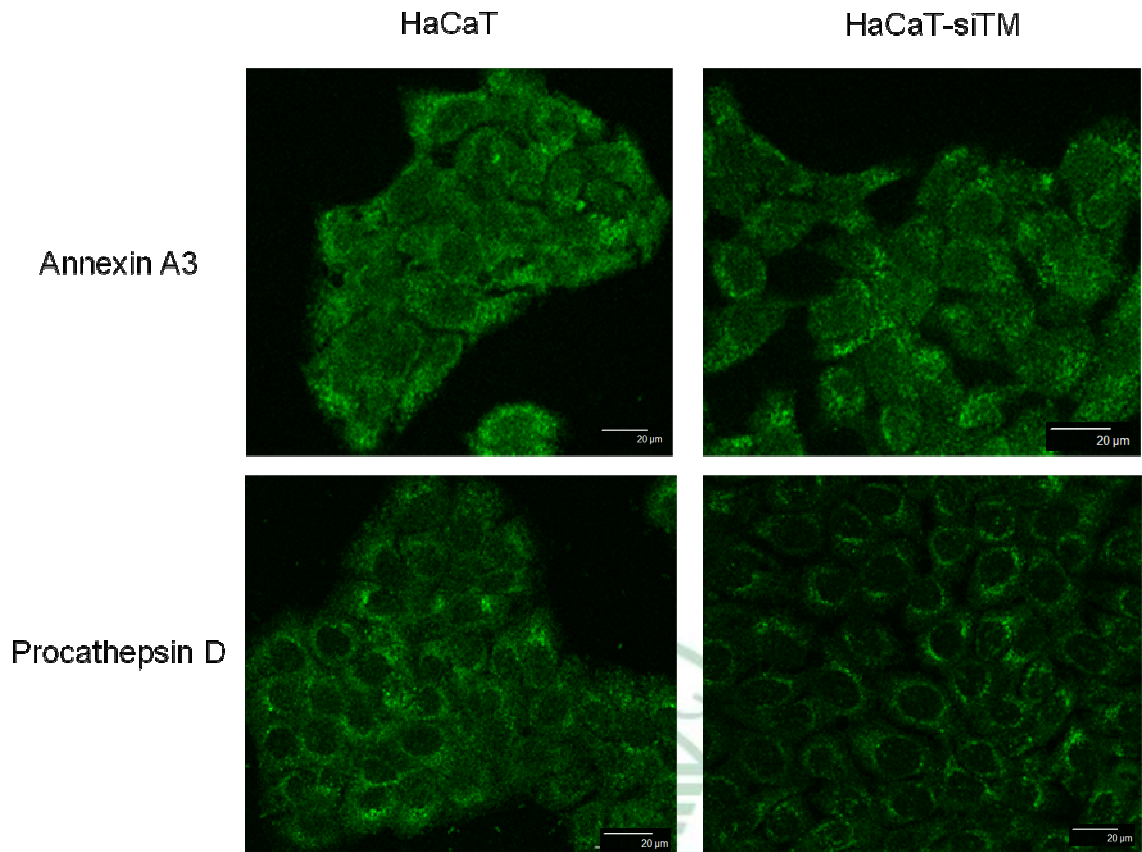
(B)



圖七、西方墨點法顯示 Procathepsin D 在 HaCaT 細胞及 HaCaT-siTM 細胞蛋白的表現量

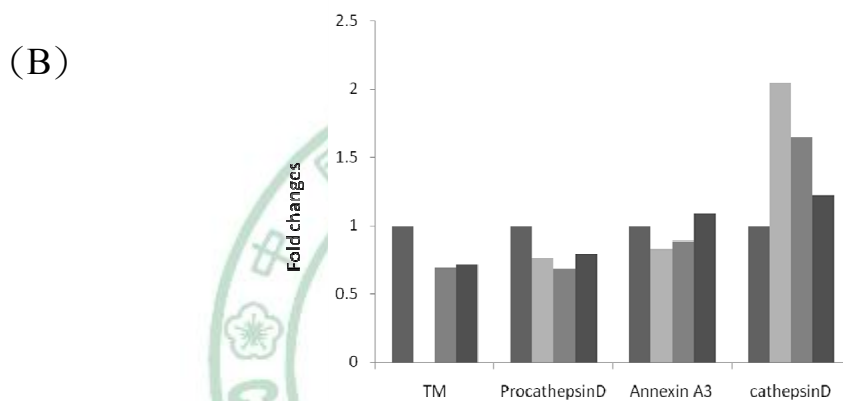
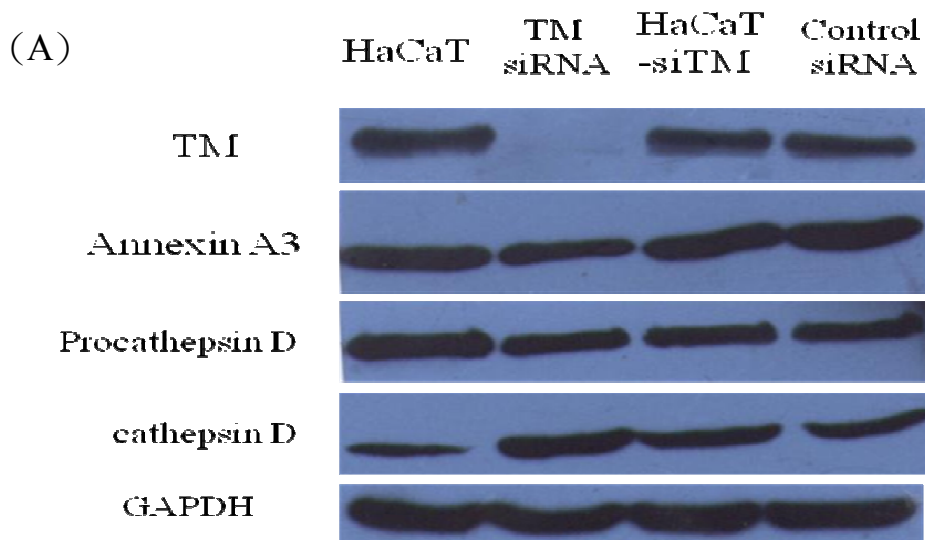
(A) 取定 50 μg 的蛋白，以 anti-Procathepsin D 抗體進行西方墨點反應，lane 1、lane 2 分別為 HaCaT 及 HaCaT-siTM 細胞的蛋白質 GAPDH 作為電泳 internal control。

(B) 與 internal control 比較後，將對 HaCaT (■) 細胞之 Procathepsin D/GAPDH 表現量定為 1，HaCaT-siTM 細胞 (■) Procathepsin D/GAPDH 相對量化，檢體數有 3 組，*：P < 0.05。



圖八、細胞免疫染色分析 Annexin A3 及 Procathepsin D 在 HaCaT 及 HaCaT-siTM 細胞的位置

共軛焦顯微鏡觀察 HaCaT 及 HaCaT-siTM 細胞中 Annexin A3 及 procathepsin D 表現的位置



圖九、西方墨點法分析 HaCaT 細胞及 TM siRNA 基因轉殖 HaCaT

細胞 108 小時後，Annexin A3、Procathepsin D 及 cathepsin D 蛋白的表現量

(A) 取定量 50 μ g 的蛋白，以 anti-Annexin A3、anti-Procathepsin D 及 anti-cathepsin D 抗體進行西方墨點反應，GAPDH 作為電泳 internal control。

(B) 與 internal control 比較後，將 Annexin A3、Procathepsin D 及 cathepsin D/GAPDH 於相對量化

■ HaCaT ■ TM siRNA ■ HaCaT-siTM ■ control siRNA

Table 1、HaCaT細胞與HaCaT-siTM細胞間的差異蛋白質點

Spot no.	Protein identity	SwissProt No.	Relative spot intensity % (BioCAD, 100) HaCaT-TM	Experimental value (theoretical values) pI/KDa	Masscot score	Sequence coverage	Location	Molecular function
2	Uncharacterized protein C6orf	Q9D887	137**	5.5/ (8.35/1.258) 6.7/	43	58%	Membrane	unknown
5	Serpin B5 precursor ^a	P36952	167**	(5.41/4256) 4.35	98	37%	Cytoplasm	Select regulatory molecule
6	Angiotensin-2 ^a	O15123	-140*	(4.45/8739) 4.8/	61	30%	Cytoplasm	Select regulatory molecule
7	UV excision repair protein RAD23 homolog B ^b	P84727	154*	(4.79/43202) 5.8/	60	40%	Cytoplasm	Nucleic acid binding
9	Keratin, type I cytokeletal	P02533	-151*	(5.09/5187) 4.75/	117	44%	Nucleus	Cytoskeletal protein
11	Reticulocalbin-1 ^b	Q15293	165*	(4.8/38866) 6.7/	90	47%	Nucleus	Select calcium binding protein
12	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta ^a	O14920	159*	(5.58/4733.5) 4.93/(1.90/3.1217)	42	30%	Cytoplasm	kinase
13	Elongation factor 1-delta ^b	P29692	150*	5/	188	35%	Nucleus	Nucleic acid binding
14	Thioredoxin-like protein	O43396	160*	(4.84/32630) 4.5/	102	43%	Cytoplasm	Oxidoreductase
15	Proliferating cell nuclear antigen ^a	P12004	170**	(4.57/29092) 5.3/	72	51%	Nucleus	Nucleic acid binding
16	Annexin A3 ^b	P12429	-137*	(5.63/36524) 6.7/(6.15/2822)	53	37%	Cytoplasm	Select calcium binding protein
17	Proteasome subunit alpha type-1 ^b	P25786	159*	5.75/(5.36/43037)	28	40%	Cytoplasm	Protease
18	Cathepsin D precursor ^b	P07339	-232*	5.3/	53	37%	Lysosome	Protease
21	Uncharacterized protein C2orf	Q7Z7B3	163*	(5.28/44271) 6.48/	52	33%	unknown	unknown
22	US small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase ^a	O75643	205**	(5.73/246006) 4.4/(4.69/26975)	52	46%	Nucleus	hydrolase
23	Deoxyuridine-5'-triphosphate nucleosidohydrolase ^b	P33316	221	5.1/	125	48%	Nucleus	hydrolase
25	Uncharacterized protein C2orf	Q7Z7B3	155*	(5.28/44271)	36	38%	unknown	unknown

**p<0.05, *p<0.01 compared with normal control group

^a possible PTMs.

^b identify confirmed by MS/MS

附錄一：pSM2C 載體的簡譜

TM1.9 (specific target to sh-TM2 and -3)	<p>TGCTGTTGACAGTGAGCGACCCAATTAGGGCCTAG</p> <p><u>CCTTATAGTGAAGCCACAGATGTATAAGGCTAGGC</u></p> <p><u>CCTAATTGGGCTGCCTACTGCCTCGGA</u></p>
---	--

The mir-30 loop construct sequence in the hairpin (bold). Anti-sense/target sequence 19 mer (real underline). Sense/target sequence 19 mer (dotted underline).

