

行政院國家科學委員會
專題研究計畫成果報告

計畫名稱：

中文：自由基於 PC12 細胞分化所扮演角色之探討(2/2)

英文：Study on the Effect of Free Radicals on Cell
Differentiation in PC12 Cell Line

計畫編號：NSC 90-2316-B-038 -001

主持人：施純明

申請機關：台北醫學大學

申請系所：醫學系生化學科

執行期限：民國 89 年 07 月 01 日 起至民國 90 年 07 月 31 日

中文摘要

氧化還原狀態(redox status)與細胞生理過程息息相關，包括細胞增生、分化及凋亡。鈩化鈉(sodium orthovanadate ; Na_3VO_4)為一酪蛋白磷酸水解 (protein tyrosine phosphatase)抑制劑，作用類似生長因子，已證實可產生活性氧分子(reactive oxygen species; ROS)。因此本研究擬探討鈩化鈉誘導 PC12 細胞分化過程中，ROS 所扮演的角色及其調控機制。

經 $15 \mu\text{M}$ Na_3VO_4 處理 PC12 細胞 8 天可見神經突觸外生 (neurite outgrowth) 及神經細胞分化指標蛋白 neurofilament-L (NF-L) 的表現。利用抗氧化物進行細胞前處理，結果發現 *N*-acetylcysteine (NAC)、pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) 及 catalase (CAT) 可抑制 Na_3VO_4 誘導 PC12 細胞分化，說明了 ROS 參與之可能性。CAT 之活性於分化開始時，呈現下降趨勢，而於第 4 天逐漸恢復，至第 10 天才回到基礎值(basal level)。為了直接檢測胞內 H_2O_2 之變化，利用流式細胞儀配合 2',7'- dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 染色之相對量，發現鈩化鈉處理 2 分鐘時，胞內 H_2O_2 提升 1.47 倍左右，而 NAC 或 CAT，可有效清除 H_2O_2 ；續利用 di-hydroethidium (HET) 檢測 $\cdot\text{O}_2^-$ 的產生，未發現有明顯變化。推測 Na_3VO_4 誘導 PC12 細胞分化過程中， H_2O_2 可能扮演重要角色。

為了闡明 ROS 敏感性(ROS-sensitive) MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 是否參與分化過程，利用西方墨漬及蛋

白激 分析法進行分析，結果顯示 p38MAPK 在鈇化鈉處理 0-240 分鐘間呈現下降現象，並在 240 分鐘時活性僅有控制組的 58 %；JNK 則在 5-15 分鐘下降，在 15 分鐘時僅有 54 % 的活性，至 30 分鐘時少量回升到 71 %，但在 240 分鐘時僅有 14% 活性；ERK 維持一定活化量，在加藥 120 分鐘時達到活化峰值（171 倍），至 240 分鐘仍有控制組之（22.43 倍）；當 ERK 的活性維持基礎量時，p38MAPK 及 JNK 的活性卻受到抑制，推測此現象應為鈇化鈉造成 MAPK 彼此調控有關。利用 MEK 抑制劑 U0126 及不同濃度 NAC 處理細胞，均可有效減少由鈇化鈉所造成 ERK 的活化。綜合上述結果顯示，鈇化鈉可能藉由提升胞內 H_2O_2 濃度，並透過 ROS 敏感性 MAPKs 的作用，最後導致 PC12 神經細胞的分化，但其詳細機轉，仍有待進一步確認。

Abstract

The redox status has been shown to correlate with various biological processes including cell proliferation, differentiation and apoptosis. Sodium orthovanadate (Na_3VO_4) is a potent inhibitor of tyrosine phosphatase and can exert its cellular effects through mimic the function of growth factors. Tyrosine phosphorylation was demonstrated to be a pivotal factor of cell differentiation. In this report, Na_3VO_4 was used as a differentiation promoter and the rat pheochromocytoma cell line (PC12) was employed to investigate the roles of reactive oxygen species (ROS) during neuronal cell differentiation. About 80 % relative to NGF-induced differentiation was estimated by morphology of neurite outgrowth and immunoblot of neuron specific neurofilament-L (NF-L) after treatment with $15 \mu\text{M}$ Na_3VO_4 for 8 days. In order to investigate the effects of ROS during PC12 cells differentiation, several antioxidants, such as N-acetylcysteine (NAC), pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), mannitol, tiron, ascorbic acid or catalase, were incubated with PC12 cells and their neurite outgrowth was determined. Na_3VO_4 -induced differentiation of PC12 cells could be suppressed by NAC. PDTC and catalase had only slightly inhibitory effects. Nevertheless, mannitol, tiron and ascorbic acid had no effects. Furthermore, the activity of catalase, a major intracellular hydrogen peroxide scavenging enzyme, was decreased to about half of control cells on day 4 and recovered to basal level on day 10 in present of $15 \mu\text{M}$ Na_3VO_4 .

By flow cytometric analysis with 2', 7'- dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA), we demonstrated the production of intracellular H_2O_2 was elevated about 1.47 fold within 2 min in Na_3VO_4 -treated PC12 cells and such phenomena was suppressed by NAC and catalase.

ROS has been suggested as a signaling molecule to regulate the so-called ROS-sensitive MAPKs, such as extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), c-Jun *N*-terminal protein kinase (JNK) and p38MAPK. Therefore, the activities of ROS-sensitive MAPKs were analyzed by immuno-blot and kinase assay. During Na_3VO_4 -induced PC12 cells differentiation, the activities of p38MAPK and JNK were diminished slightly (58 % of control) and dramatically (14 % of control), respectively. Nevertheless, ERK activity was increased at 120 min time-point (171 folds of control) prolonged to 240 min time point (22.43 folds of control). After pre-treatment with MEK inhibitor U0126 and various concentration of NAC, the Na_3VO_4 -induced activation of ERK was suppressed, which suggested that ERK might be a down-stream molecule of H_2O_2 generated by Na_3VO_4 treatment. Based on these results, ROS, especially H_2O_2 , might play a pivotal role during Na_3VO_4 -induced differentiation of PC12 cells.

緒論

文獻指出，低濃度的活性氧分子(reactive oxygen species; ROS)與細胞的生理功能息息相關，如分化(differentiation)及增生(proliferation)(Gamaley and Klyubin, 1999; Kamata and Hirata, 1999; Dalton, 1999)，但在高濃度下會造成許多疾病產生，包括神經退化性疾病巴金森氏症(parkinson's disease)、阿茲海默症..等。自然界存在的金屬鉬化鈉(sodium orthovanadate; Na_3VO_4)，藉主動運輸進入細胞，由五價還原為四價，過程中產生一個游離電子，最後形成 $\cdot\text{O}_2^-$ (Shi, 1991)；同時抑制酪蛋白磷酸水解 (protein tyrosine phosphatase)，改變胞內蛋白質磷酸化程度，進一步影響胞內之訊息傳遞，其功能類似生長因子。PC12 細胞為廣泛應用於研究神經生物學(neurobiology)與神經化學(neurochemistry)的細胞株，鉬化鈉並已證實可促進PC12 細胞分化 (Rogers *et al.*, 1994)，但其機轉尚未明瞭。因此本研究擬探討ROS在鉬化鈉(Na_3VO_4)誘導PC12細胞分化過程中所扮演的角色，並進一步分析其可能之訊息傳導過程。以下進一步介紹本研究之相關背景：

一、活性氧分子 (reactive oxygen species; ROS)

Reactive oxygen species(ROS)泛指以氧為中心的自由基 (free radical)與其代謝產物，而在細胞內常見的包括過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2)、氫氧自由基(hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$)及超氧自由基(superoxide anion, $\cdot\text{O}_2^-$)等(Tab. 1)。

1、活性氧分子和生物體間之相關性

(1) 活性氧分子的生成：

當 O_2 經過一個電子還原後，便會產生 $\cdot O_2^-$ 。在二價鐵的存在下， $\cdot O_2^-$ 會與 H_2O_2 進行 Haber-Weiss 反應， H_2O_2 也會與二價鐵進行 Fenton 反應，均生成更具毒性的 $\cdot OH$ 。 H_2O_2 經由 CAT 或 GPx (glutathione peroxidase, GPx) 的作用還原成 H_2O 。(Fig. 1) (Gamaley and Klyubin, 1999)。 H_2O_2 不含未配對電子，因此較為安定，且可擴散通透細胞膜。

(2) 氧化傷害(oxidative injury)：

由於 ROS 具有高度的反應力，因此當大量的 ROS 產生時，會攻擊體內的巨分子物質，如 DNA、RNA、脂質、蛋白質等，造成細胞內的傷害；這種因 ROS 造成的細胞傷害，稱為氧化傷害或氧化壓力(oxidative stress) (Mates, 1999； reviewed by Allen and Tresini, 2000)。

自由基對生物巨分子的傷害，會造成許多疾病的產生，包括：動脈粥狀血管硬化(arteriosclerosis) (Witzum, 1994)、糖尿病(diabetes)、高血壓(hypertension)、癌症(cancer) (Beckman and Ames, 1997)、神經系統疾病(Jenner, 1994)、發炎反應(inflammation)(Grish, 1994)、自體免疫疾病(auto-immune disease)、關節炎(arthritis)、肝硬化(liver cirrhosis)、白內障(cataracts)等 (Floyd, 1999； review by Allen and Tresini, 2000； Ade, 2000)。

在神經系統方面，目前發現神經退化性疾病如巴金森氏(parkinson's disease)、阿茲海默症(alzheimer's disease)、老化(aging)

等，均與氧化壓力有極大的相關性(reviewed by Allen and Tresini, 2000)。

(3)抗氧化系統：

為了保持 ROS 之恆定(homeostasis)，胞內抗氧化系統有存在之必要，包括：(Mates, 1999)

A. 抗氧化劑：如維生素 E (α -tocopherol)、維生素 C (ascorbic acid)、胡蘿蔔素(β -carotene)、尿酸(uric acid)等等。

B. 抗氧化酵素：如超氧化物歧化 (superoxide dismutase, SOD)、穀胱甘氨酸過氧化 (glutathione peroxidase, GPx)、過氧化氫 (catalase, CAT)及穀胱甘氨酸還原 (glutathione reductase, GRx)。

除了胞內可見的抗氧化劑及抗氧化酵素外，尚有化學合成的抗氧化劑：(a) *N*-acetylcysteine (NAC)：為 GSH 的先驅物，可加速 GSH 之生合成；同時具有 sulfhydryl group 為一廣效性 ROS 清除劑 (Zandwijk, 1995 ; Kamata *et al.*, 1999)；(b) pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)：PDTC 因具有 sulfhydryl group 結構，且具螯合游離電子及銅離子的能力，而被認為具有廣泛性抗氧化作用，同時亦為 NF- κ B (nuclear factor - κ B)的抑制劑，在鋅離子存在下，可經由氧化 NF- κ B 而抑制其 DNA 結合能力 (Meyer *et al.*, 1993)；(c) mannitol：為目前常用

的 $\cdot\text{OH}$ 特異性清除劑之一；(d) *tiron*:藉由歧化作用(dismutation)清除 $\cdot\text{O}_2$ 。

2、活性氧分子參與細胞生理反應：

甚多文獻指出 ROS 會造成細胞傷害(reviewed by Allen and Tresini, 2000)，但是近年來愈來愈多的研究證實，在細胞可調控的情形下，低濃度 ROS 可能具有誘發或調節一些生理功能，包括細胞增生(proliferation)(Huang *et al.*, 1998)、分化(differentiation) (Rogers *et al.*, 1994)、發育(development)、附著(adhesion)、蛋白質合成、分泌與位移 (Gamaley and Klyubin, 1999)。推測 ROS 能夠調控這些作用的機制，可能經由活化胞內特殊的訊息傳遞分子(signaling molecule)或轉錄因子(transcription factor)所導致(Mielke *et al.*, 2000)。

3、活性氧分子對於訊息傳遞分子之調控：

許多胞內訊息傳遞分子可受到 ROS 的調控，包括蛋白激酶(protein kinase)、磷酸水解 (phosphatase)、Ras 蛋白或轉錄因子等 (Tab. 2)。具有調控上述訊息傳遞分子的 ROS 中，則以 H_2O_2 最為常見(Mukhopadhyay *et al.*, 2000；Mielke, 2000)。 H_2O_2 具有高度的膜通透性，是目前已知半生期最長的 ROS (大於 5 分鐘以上) (Rohrdanz and Kahl, 1998)。 H_2O_2 能夠藉由磷酸化作用調節胞內蛋白激酶的活性，包括 Tyr 或 Ser/Thr kinase (Mielke, 2000)；亦具有調控轉錄因子的能力，如 activator protein-1 (AP-1)、NF- κ B (reviewed by Allen and Tresini, 2000)。

活性氧分子對於 MAPKs 之調控

(1) MAPKs 訊息傳遞：

MAPKs 是細胞中重要的訊息傳遞分子，調控多種生理反應機制，同時是目前已知需雙磷酸化才具活性的酵素 (Holmstrom and Eriksson, 2000)。在哺乳類動物細胞中，MAPKs 主要有四大類：extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)、c-Jun N-terminal protein kinase (JNK，又稱為 stress-activated protein kinase, SAPK)、p38MAP kinase (又稱為 cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein, CSBP)及 Big MAP kinase (BMK，又稱為 ERK5) (Nagata *et al.*, 1998)。其中生長因子所活化 ERK-1 及 ERK-2 是細胞週期 (cell cycle) 進行及細胞存活 (cell survival) 所必需的，可經由活化某些轉錄因子進而調控細胞生長、增生、分化與凋亡，同時也是第一個被探討的酵素，通常被細胞膜上接受器所活化 (Grewal *et al.*, 1999; Schaeffer and Weber, 1999; Holmstrom and Eriksson, 2000)；而 JNK 與 p38MAPK 的活化，則常與外來壓力有關，如紫外線、X 射線，發炎物質 (inflammatory cytokine) 的刺激或環境壓力等等；JNK 包含三種基因：JNK1、JNK2 及 JNK3，造成轉錄因子 c-Jun、Elk-1、ATF-2 的活化，但 JNK 在細胞質中的接受者仍有待進一步的研究。p38MAPK 則有五種：p38、p38 β 、Mxi2、ERK6、p38-2，可進一步活化轉錄因子 MEF2C、ATF-2、MNK-1。甚多文獻指出，ERK、JNK 與 p38MAPK 的調控與細胞存活有關，Wang *et al.* 提出負回饋路徑 (negative loop)，指出 MAPK 之活化路徑，存在有 Mixed lineage

kinase-3(MLK-3) 及 mitogen-activated protein kinase kinases1-3 (MEKKs1-3)，而這些蛋白激酶抑制 p38MAPK 後會反而活化 JNK 及 ERK。甚多文獻也指出：p38MAPK 及 JNK 的活化可抑制增生，並導致細胞凋亡(Nagata, 1998；Robinson, 1999)，但也有研究指出 JNK 活化與細胞的存活有關(Nagata *et al.*, 1998)，而 p38MAPK 則與肌細胞分化有關 (Davidson and Morange, 2000)。

(2) ROS 參與 MAPKs 之調節作用：

在 MAPKs 中，ERK、JNK 及 p38MAPK 的活性受到 ROS 的調節。在神經細胞的分化上，發現 MAPKs 的活化是一必要的訊息傳導過程(Leppa *et al.*, 1998；Kolkova, 2000)；若給予 PC12 細胞 H₂O₂ 刺激，會導致細胞中 JNK1 及 JNK2 的活化，在其他的神經細胞 Neuro 2 及 SHSY5Y 中還可見到 JNK3 的活化 (Mielke *et al.*, 2000)；利用外加的 ATP 會造成 PC12 細胞氧化壓力增加，同時並活化 AP-1，而投與 NAC 則可有效抑制 AP-1 活化 (Chen and Sun, 1998)；利用 NAC 可以抑制由 NGF 所誘導 c-fos 表現及 AP-1 活化，並且抑制 MAPK 的活性 (Kamata *et al.*, 1996)；利用 Lysophosphatidic acid (LPA) 刺激 HeLa 細胞，可測得 MAPK 的活化，並且此現象可被 NAC 所抑制，顯示在 LPA 刺激 HeLa 細胞，經產生 ROS 而刺激 MAPK 的活性增加(Chen *et al.*, 1995)；以砷(Arsenite, As)處理 PC12 發現 ERK、JNK 及 p38MAPK 會被活化，而此現象可被 NAC 抑制，表示砷可能經由產生 ROS 而活化 MAPKs (Liu *et al.*,

1996); 綜合以上研究可知, MAPKs 的活性會受到 ROS 的調控。

二、鈳化鈉的特性

1、自然界的鈳化鈉

鈳化鈉於 1813 年由礦物學家發現, 在地球的表面約含 0.02 %, 主要存在於工廠排煙孔的灰燼中, 在食物中也少量含有 (<1 ng /g food), 多存在菌類(0.05-2 μ g/g)、有殼水生動物、菠菜 (0.5-0.8 μ g/g)、荷蘭芹 (1.8 μ g/g) 中 (Barceloux, 1999); 人體主要由食物中攝取鈳, 僅暴露工廠灰燼中, 是藉由呼吸系統吸收; 鈳目前在人體所扮演的角色尚不清楚; 本身為金屬, 是一種價數易轉變的物質, 有甚多種的鈳化合物存在 (Tab. 3); 因為鈳化鈉的不穩定性, 被純化相當不容易, 同時在人體的需要量通常極低 (<60 μ g/day), 僅在訓練運動員時, 利用攝食 Vanadyl sulfate (VOSO_4) 來增加體重 (Barceloux, 1999)。鈳化鈉存在有 -3, -1, 0, +1 ~ +5 價, 但主要接觸為 +5 價的鈳化鈉(sodium orthovanadate; Na_3VO_4)。自然界中以 +4 價 (2 %)、+5 價 (98 %) 居多, 血漿中可能同時存在 +4 及 +5 價。

2、鈳化鈉的生理特性

鈳化鈉化合物之氧化鈳離子 (VO_4^{3-}) 構造類似磷酸根 (PO_4^{3-}), 因此可抑制酪胺酸磷酸水解 (protein tyrosine phosphatase), 並可競爭 ATP 結合位(bing site), 因此可抑制 ATP 水解 (ATPase), 最後導致胞內磷酸化程度增加 (Huyer *et al.*,

1997; Barceloux, 1999), 此過程為可逆性反應 (Simons, 1979; Tracey *et al.*, 1986)。鈉化鈉存在許多影響生理功能的作用, 包括: (1) 增加胞內磷酸化程度, 其作用類似胰島素(insulin)或表皮生長因子(Epidermal growth factor; EGF), 會造成胰島素接受器(insulin receptor)磷酸化, 並促進肝糖合成(glycogen synthesis), 增加脂蛋白脂肪分解 (lipoprotein lipase) 的活性 (Cortizo and Etcheveyyy, 1995; Ueki *et al.*, 1997; Tojo *et al.*, 1987); (2) 對 ATPase 的影響: 鈉可抑制各種 phosphatase enzyme, 例如: 抑制肌漿質網中 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase (Swarup *et al.*, 1982)、 $\text{Ca}^{+2}\text{-ATPase}$, 影響 Ca^{+2} 釋放 (Nechay *et al.*, 1986); 抑制 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 而刺激平滑肌細胞收縮 (Salvo, 1993); 影響胃中 $\text{H}^+\text{-ATPase}$, 而改變胃酸釋放 (Swarup *et al.*, 1982; Nechay *et al.*, 1986; Salvo, 1993); (3) 促進肝糖合成: 同時給予老鼠脂肪細胞鈉化鈉及胰島素觀察脂肪生成作用的差別, 發現鈉化鈉比胰島素更快形成 Glucose-6-Phosphate, 故常作為研究糖尿病的試劑 (Sekaret *et al.*, 1999); 此外, 鈉化鈉亦可影響細胞週期, 使細胞停留在 G2/M 期。

鈉化鈉雖然吸收緩慢, 但是會造成結膜炎、咽喉炎、鼻炎及慢性咳嗽 (Sekar *et al.*, 1996), 經肺進入人體, 以尿液及糞便形式排出。若人體含量過高會造成腎動脈收縮, 抑制紅血球中鈣離子的運輸、眼壓過低, 肝血管阻塞, 刺激眼、鼻、喉、呼吸道黏膜 (Barceloux, 1999); 在飲水中, 0.2 – 1 mg/ml 的鈉化鈉會造成肝脂質過氧化增加 (Sekar *et al.*, 1996)。

3、釩化鈉產生自由基的過程

自然界中，五價的釩(+5)經由 NADPH oxidase 或 flavoenzymes 的作用轉變成釩(+4)，利用電子自旋偵測儀(ESR)發現 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成(Shi, 1991);釩(+4)在 GSH、硫醇(thiols)或糖(sugars)存在下，可再與 O_2 作用形成釩(+5)，並生成 $\cdot\text{O}_2^-$ (Liochev and Fridovich, 1987);另外，釩(+4)也會與 H_2O_2 作用轉變成釩(+5)生成 $\cdot\text{OH}$ (Shi, 1991; Shi and Dalal, 1993)。

將釩離子及銅離子分別處理 yeast (*Hansenula polymorpha*)，經釩離子處理的 yeast，利用 2D electrophoresis 發現 CAT 及 SOD 的活性高於經銅離子處理的 yeast (Mannazzu *et al.*, 2000)。將 0.15 mg/V/ml 釩加入水中餵食老鼠 14 天，證實老鼠可能藉釩化鈉造成 lipid peroxidation，而間接造成腎、肝臟中 CAT 及 GPx 的活性增加，但 SOD 活性並未改變 (Ruslanov *et al.*, 1994)。釩化鈉造成不同細胞間抗氧化酵素表現情況不同，並且對於是否造成脂質過氧化也不同，似乎說明釩化鈉在不同細胞中會有不同的表現。

Pervanadate，是一個混合了 vanadate 及 hydrogen peroxide 的混合物，亦為一酪蛋白磷酸水解 抑制劑，利用狒狒的平滑肌細胞所做的實驗中發現，在低濃度(1-10 μM)，則可見 MEK-1 活化，在高濃度 pervanadate (30-100 μM) 下造成 MEK-1 活性下降，因此作者推論在高濃度 pervanadate 下，會抑制 MEK-1 的活化。利用老鼠纖維母細胞表現人類胰島素接受器，胰島素及釩化鈉均可在 5 分鐘活化 ERK-1；而在 PC12 細胞中，釩化

鈎可在 15 分鐘時活化 ERK1/2 達到最高，且維持適當量持續 3 小時(Nguyen *et al.*, 1993)。利用老鼠 macrophages 發現鈎化鈉會經由產生自由基過程中，同時活化 NF- κ B 及產生 TNF α ，而此作用會被 NAC 所抑制 (Chen *et al.*, 1999 ; Ye *et al.*, 1999)。利用胰島素及鈎化鈉分別處理 SV40-transformed 3T3T(CSV3-1) 可見 *c-Jun*、*JunB* 的活化，並且此活化現象推測和細胞的增生調節有關(Wang *et al.*, 1997)。綜合以上可知，鈎化鈉證實可產生 ROS，並在不同細胞中，透過 ROS 活化 ROS-sensitive kinase MAPKs，而在鈎化鈉處理 PC12 細胞誘導分化過程中，是否也有 ROS 參與其中，是一值得研究的方向。

4、鈎化鈉與分化的關係

當給予類骨細胞 UMR106 鈎化鈉時，會呈現兩極化的影響，高濃度 vanadate(75-100 μ M)會刺激少許類骨細胞 UMR106 走向增生，但低濃度鈎化鈉 (5-25 μ M) 則會導致細胞分化，而此分化是經由改變鹼性磷酸水解 (alkaline phosphatase)的作用(Cortizo *et al.*, 1995)。進一步的研究指出，鈎化鈉經由合成 eNOS 及 iNOS 而導致骨細胞增生及分化(Cortizo *et al.*, 2000)。在人類正常骨細胞，利用鈎化鈉抑制 PTPase 活性，導致人類正常骨細胞走向分化，同時促進 ERK 活化及酪胺酸磷酸化增加 (Wu *et al.*, 1997 ; Yoon *et al.*, 1999)。

三、PC12 細胞

1、PC12 細胞的特性

PC12 細胞在 1976 年被 Greene 與 Tischler 所建立，為大鼠腎上腺之嗜鉻細胞瘤細胞 (rat adrenal pheochromocytoma cells)。未分化的 PC12 細胞經神經生長因子 (nerve growth factor, NGF) 刺激後，會開始進行分化作用 (differentiation)，而在外觀上具有神經突觸 (neurite) 外生與分枝現象。分化後的 PC12 細胞，可分泌且儲存兒茶酚胺類 (catecholamine) 神經傳導物質，包括多巴胺 (dopamine) 及正腎上腺素 (norepinephrine)。由於 PC12 細胞具有上述類似神經細胞的特性，因此，被廣泛應用於神經生物學 (neurobiology) 與神經化學 (neurochemistry) 的研究，為一甚佳的神經細胞研究模式 (Kamata *et al.*, 1996; Katoh *et al.*, 1997; Leppa *et al.*, 1998; Morooka and Nishida, 1998; Obin *et al.*, 1999)。

2、鈇化鈉誘導 PC12 分化之過程

鈇化鈉證實可促進 PC12 細胞分化產生突觸，但長度較神經生長因子處理者為短，且其促進 PC12 細胞外觀的變化推測是經由影響酪胺酸的磷酸化 (Rogers *et al.*, 1994)；利用 JB6⁺ 細胞觀察鈇化鈉產生 ROS 的情形，發現鈇化鈉經產生 $\cdot\text{O}_2^-$ 及 H_2O_2 而增加 AP-1 的表現，促進細胞走向分化 (Ding *et al.*, 1999)。單獨給予 CHO 及 COS-7 細胞鈇化鈉，並不會增加 PKC δ 的磷酸化，但卻會加成 H_2O_2 所誘導 PKC δ 磷酸化程度，而 PKC δ 磷酸化會更進一步造成 ERK 活化 (Li and Jaiswal,

1994); 另一方面, Laminin 為膜上的醣蛋白, 利用塗佈 Laminin 的培養皿培養 PC12 細胞, 會促進突觸生長, 但若同時加予鈇化鈉卻會抑制突觸的生長, 這是因為經由 Lamini 所刺激的 PC12 細胞分化, 是經由酪蛋白去磷酸化作用所造成, 與一般造成酪蛋白磷酸化增加是不一樣 (Weeks *et al.*, 1990)。因此鈇化鈉是否因增加磷酸化作用進而增加 PC12 細胞分化, 為一值得加以探討方向。

3、活性氧分子可能參與 PC12 之分化

生長因子與荷爾蒙訊息傳遞過程中, 伴隨著 ROS 產生 (Ginn-Pease and Whisler 1998; Ryter and Tyrrell, 1998)。將 PC12 培養於高氧 (Kato *et al.*, 1999) 及低氧環境下 (Hohle *et al.*, 1999) 使其產生 ROS, 發現 PC12 細胞開始進行分化; 外加 ATP 造成 PC12 細胞氧化壓力增加, 活化 AP-1, 而投與 NAC 可有效抑制 AP-1 的活化 (Chen and Sun, 1998); 由 NGF 所誘導 *c-fos* 表現及 AP-1 活化, 可被 NAC 抑制 (Kamata *et al.*, 1996); 由此可見, ROS 在 PC12 細胞的分化過程中, 可能具有相當重要的作用。

四、研究主題設計與目的

綜合前述文獻, 及實驗室先前發現利用 NGF 誘導 PC12 細胞分化過程中, 可產生 H_2O_2 並活化 ERK 而造成細胞分化, 提出 ROS 為 PC12 細胞分化之重要因子; 因此我們假設 Na_3VO_4 藉著主動運輸進入細胞內, 經由產生 ROS 活化 MAPKs, 最後造成特定轉錄因子活化, 最後誘導 PC12 細胞分化。因此本研

究試圖回答下列幾項問題：

- 1、 Na_3VO_4 是否可以誘導 PC12 細胞分化？而在分化的過程中是否產生 ROS？產生何種 ROS？
- 2、ROS 是否為 PC12 細胞分化所必需？
- 3、在 Na_3VO_4 誘導 PC12 細胞分化過程中 MAPKs 的表現情形？而 MAPKs 的表現是否受到 ROS 所調控？
- 4、 Na_3VO_4 誘導 PC12 分化過程中，抗氧化酵素的表現情形？

綜合上述，期望觀察在 Na_3VO_4 誘導 PC12 細胞分化過程中，ROS 產生的情形及其參與分化過程中訊息傳遞分子之調控機轉。希望藉此瞭解在神經分化的過程中 ROS 之重要性，進而在神經科學上能有所貢獻。

實驗材料與方法

I、細胞實驗

1、細胞培養皿之塗抹(coating)：

細胞培養皿先以 0.1 mg/ml 之 poly-L-lysine (購自 Sigma Chemical Co., cat. no. P-6282)進行塗抹，待乾後照射 UV 光 16 小時以上後備用，以利細胞黏著(Greene and Tischler, 1976)。

2、細胞培養：

PC12 細胞培養於含有 2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin G、100 μ g/ml streptomycin sulfate、0.25 μ g/ml fungizone (amphotericin B)、1 mM non-essential amino acid、5 % fetal bovine serum (FBS)和 10 % horse serum (HS)的 DMEM (Dulbucco's Modified Eagle Medium)培養液中，置於 5 % CO₂、90 %相對濕度的 37 °C 恆溫培養箱中。約九成滿時，以 PBS 溶液清洗細胞，將細胞均勻沖散，依實驗目的不同進行繼代培養(passage)。

3、Na₃VO₄ 刺激 PC12 細胞之分化：

Na₃VO₄(購自 Sigma Chemical Co., cat. no. S-6508) 溶於 1x PBS 中，以 100°C 的水煮沸 5 分鐘後利用 NaOH 調整 pH 值至 10，並經反覆煮沸調整 pH 值，直到煮沸後 pH 維持 10，存於 -20 度冰箱中備用，藉此確保鈮化鈉維持五價，並在加入細胞培養液時，測得加入鈮化鈉後的細胞培養液，pH 維持在 7.4-7.6 間。

Na₃VO₄ 誘導 PC12 細胞分化實驗如下：在直徑 10 公分的培養皿中種(seeding)約 1x10⁶ 個細胞，經過 serum starvation (1 % FBS, 10 mg/l insulin, 10.062 mg/l progesterone, 16.1 mg/l putrescine, 0.377 mg/l tri-iodo-thyronine)培養 24 小時，加入 15 μM 之 Na₃VO₄ 誘導其分化後，每隔 24 小時更換新的培養液，並重新添加 Na₃VO₄。

4、細胞裂解物(cell lysate)之收集：

(1)、試藥：

dipotassium hydrogen phosphate、ethylenedinitrilo-tetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA-Na₂)、potassium dihydrogen phosphate、sodium chloride、sodium cholate、sodium fluoride、Tris (hydroxymethyl)- aminomethane 購自 Merck Co.；sodium deoxycholate、sodium dodecyl sulfate (SDS)、sodium orthovanadate 購自 Sigma Chemical Co.；Nonidet P40 (NP-40) 購自 BDH Laboratory Supplies。

(2)、酵素活性分析相關實驗：

以 4°C 的 PBS 清洗細胞 2 次，續以 rubber policeman 將細胞自培養盤刮下，分別吸到 15 ml 離心管中，離心後以適量 NEP buffer (150 mM NaCl、0.5 mM EDTA pH 7.5、100 mM potassium phosphate buffer pH 7.4、0.25 % Na-cholate、protease inhibitor (購自 Roche molecular biochemicals, cat. no. 1697498)) 將細胞懸浮，再利用超音波劇烈振盪 10 秒鐘共 8 次，每次間隔 30 秒置冰上。最後經 12000 rpm 離心 10 min 後，收集上清

液後分裝儲存於-70°C。

II、酵素活性測定

1、試藥：

dipotassium hydrogen phosphate、hydrogen peroxide (H₂O₂)
購自 Merck Co.；bovine serum albumin (BSA)、sodium bicarbonate 購自 Sigma Chemical Co.；Bradford protein assay dye 購自 Bio-Rad (cat. no. 500-0006)。

2、蛋白質含量測定：

以牛血清白蛋白(BSA)為標準品，利用 Bradford 反應，偵測標準品與檢體在 595 nm 波長吸光值變化，繪製標準曲線，並利用檢體吸光值與標準曲線進行迴歸運算，檢測蛋白質的濃度。

3、Catalase (CAT)活性測定：

參考 Beers 的方法(Beers and Sizer, 1952)，在 0.5 ml 反應體積中含有 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)、17.44 mM H₂O₂ 及細胞裂解物，在 37°C 下檢測 240 nm 30 秒時的吸光值變化，CAT 可清除 H₂O₂ 導致吸光值下降，因此單位時間的 H₂O₂ 減少量可以代表細胞中 catalase 的活性。經計算後換算成 catalase 比活性(specific activity)，計算公式如下：

$$\text{Log} (A_0/A_1) \times [H_2O_2] / 0.5\text{min} / \text{mg protein} (\mu \text{mol}/\text{min}/\text{mg})$$

(A₀: 0 秒的 OD 值；A₁: 30 秒的 OD 值)

III、西方墨漬法(Western-blot)

1、一級抗體及二級抗體：

一級抗體：

(1)、MAPKs 相關抗體：

rabbit anti-phospho-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) Ab (9101S)

購自 New England Biolabs Inc. (NEB)

goat anti-total-p38MAPK Ab (C-20)

購自 Chemicon International Inc.

(2)、PC12 differentiation marker 抗體：

mouse anti-neurofilament 68 clone NR4 Ab (N5139)

購自 Sigma Chemical Co.

(3)、其他抗體：

mouse anti-GAPDH Ab (4699-9555)

購自 Biogenesis Ltd.

二級抗體：

HRP-conjugated goat anti-mouse IgG Ab (M15345)

購自 Transduction Lab. Inc.

HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (AP132P)

購自 Chemicon International Inc.

HRP-conjugated anti-goat IgG Ab (sc-2033)

購自 Santa Cruz Biotechnology Inc..

2、實驗方法：

根據 Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 1989)的方法，以 Bio-Rad Mini-Protean II cell (cat. no. 165-2940)進行西方墨漬法。

先製備 12 % SDS-polyacrylamide gel，取適當的細胞裂解

物檢體進行 SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)，續利用 Bio-Rad mini Trans-Blot Cell (cat. no. 1703930)進行蛋白質轉漬(electro-transfer)至 PVDF(polyvinylidene fluoride)上。

轉漬後的 PVDF 浸泡於以 TBS 緩衝溶液(11 mM Tris-base pH 7.4、154 mM NaCl)配製的 3 % 脫脂牛奶 (skim milk)中，溫和搖晃 30 分鐘。將適當稀釋倍數之 1 級抗體與 PVDF 在室溫中作用 4-6 小時，用 TBS-T 緩衝溶液(11 mM Tris-base pH 7.4、154 mM NaCl、0.1 % Tween-20) 清洗數次後，再與含適當稀釋倍數相對於 1 級抗體的 2 級抗體在室溫作用 2 小時，以 TBS-T 緩衝溶液清洗數次後，以 ECL (購自 Amersham Life Science Ltd., cat. no. RPN2106)或 ECL plus(購自 Amersham Life Science Ltd., cat. no. RPN2132,2133)進行呈色反應。

IV、蛋白激 分析

1、protein A-sepharose 前處理

以 NET buffer(50 mM Tris pH 7.4、150 mM NaCl、0.5 mM EDTA、0.5 % NP-40)配製適量 Protein A-sepharose (購自 Pharmacia Biotech cat. no. 17-0780-01)，4°C 下慢速旋轉反應 12-16 小時，以 NET buffer 清洗兩次，配製 50 % working solution 備用 (4°C 下保存)。

2、protein A-sepharose 與抗體反應

取 50 μ l 配製好 50 % working solution 的 protein A-sepharose 加入 10 μ l goat anti-p38MAPK Ab 及 NET buffer 至終體積為 250 μ l，4 °C 下慢速旋轉反應 12-16 小時，以 0.5 ml

NET buffer (外加 50 mM Na₃VO₄、1 mM NaF) 清洗兩次後，4°C 備用。

3、實驗方法

(1) p38MAPK：

取 50 μ l anti-p38MAPK Ab conjugated protein A-sepharose 與 100 μ g cell lysate 及 10 μ l proteinase inhibitor 均勻混合後，加入 NET buffer 使最終體積為 250 μ l，4 °C 下慢速旋轉反應 12-16 小時，以 0.5 ml 1x NET buffer 清洗兩次，再以 1x kinase buffer(w/o ATP)清洗一次，加入 25 μ l reaction kinase buffer (5 mM Hepes (pH7.5)、2.5 mM MgCl₂、5 mM β -glycerophosphate、10 μ Ci/ μ l γ -³²P-ATP、500 μ M ATP、100ug/ μ l MBP ((Myelin basic protein) 購自 Life cat. no. 13228-010) 30°C 反應 30 分鐘，加入 8 μ l 5x sampling buffer (1.9 g Tris base、25 ml 100 % Glycerol、173.3 mM SDS、2.5 ml β -mercaptoethanol、1.25mg bromophenol blue) 於 100°C 煮沸 7 分鐘，吸出上清液，進行 15 % SDS-PAGE 電泳，續將電泳片烘乾，進行放射性顯影 (autoradiography)。

(2) JNK：

取 20 μ l GST-c-Jun Fusion Protein (購自 Cell Signaling Co.,cat. no. 6093s) 與 100 μ g cell lysate 及 10 μ l proteinase inhibitor 混合，加入 Lysis buffer 至終體積為 250 μ l，4 °C 下慢速旋轉反應 12-16 小時，以 0.5 ml 1x lysis buffer 清洗兩次後，再以 1x kinase buffer (w/o ATP) 清洗一次，加入 25 μ l reaction kinase buffer (5 mM Hepes (pH7.5)、2.5 mM MgCl₂、5 mM β -glycerophosphate、

10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ γ - ^{32}P -ATP、500 μM ATP)30 $^{\circ}\text{C}$ 反應 30 分鐘，加入適量 5x sampling buffer 於 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 7 分鐘，吸出上清液，進行 12 % SDS-PAGE 電泳，續將電泳片烘乾，進行放射性顯影 (autoradiography)。

V、ROS 測定

1、 H_2O_2 測定

參考 Satoh 等人的方法 (Satoh *et al.*, 1999)，將細胞經過 24 小時的 serum starvation (1 % FBS, 10 mg/l insulin, 10.062 mg/l progesterone, 16.1 mg/l putrescine, 0.377 mg/l tri-iodo-thyronine) 後，以 PBS 清洗二次後將細胞沖散，經離心後用不含血清及酚紅(phenol red-free)的 RPMI 1640 (購自 Life Technologies Inc., cat. no. 13200-025)將細胞懸浮，通過 35 μm 的 nylon mesh 後備用。加入終濃度 10 μM 配製的 DCFH-DA (2',7'-dichlorodichlorofluorescein diacetate) (溶於 ethanol 中) 避光反應 15 分鐘，以 15 μM 之 Na_3VO_4 處理不同的時間後，利用 flowcytometry (FACscan)的方式，以 488 nm 雷射光激發，藉由 FL1 接收 526 nm 放射光，進而反應胞內 H_2O_2 的生成量。

2、 $\cdot\text{O}_2$ 測定

參考 Satoh 等人的方法(Satoh *et al.*, 1999)，將細胞經過 24 小時的 serum starvation (1 % FBS, 10 mg/l insulin, 10.062 mg/l progesterone, 16.1 mg/l putrescine, 0.377 mg/l tri-iodo-thyronine) 後，以 PBS 清洗二次後將細胞沖散，經離心後用不含血清及酚紅(phenol red-free)的 RPMI 1640 (購自 Life Technologies Inc.,

cat. no. 13200-025)將細胞懸浮，通過 $35\ \mu\text{m}$ 的 nylon mesh 後備用。加入終濃度 $5\ \mu\text{M}$ HEt (hydroethidium) (溶於 ethanol 中) 避光反應 15 分鐘，以 $15\ \mu\text{M}$ 之 Na_3VO_4 處理不同的時間後，利用流式細胞儀，以 $495\ \text{nm}$ 雷射光激發，藉由 FL2 接收 $637\ \text{nm}$ 放射光，進而反映胞內 $\cdot\text{O}_2^-$ 的生成量。

結果

一、 ROS 參與鈇化鈉誘導 PC12 細胞分化過程

ROS 在細胞生長及荷爾蒙調控的細胞生理過程扮演一重要角色。因此本研究以 PC12 神經細胞株為模式，探討鈇化鈉誘導其分化過程中，ROS 可能扮演角色。

1、鈇化鈉誘導 PC12 細胞的分化

未分化的 PC12 外觀類似膠原母細胞(fibroblast)，呈現圓形或橢圓形，只有極少部份的細胞會出現短小的突觸；而分化數天後在外觀上則可見其神經突觸外生(neurite outgrowth)的現象，此為觀察 PC12 細胞是否分化最簡便的方法(Greene and Tischler, 1976)。

文獻中指出，10-40 μM 鈇化鈉會促進 PC12 細胞分化 (Rogers *et al.*, 1994)，因此本研究以 0-50 μM 鈇化鈉分別處理細胞，發現 15 μM 鈇化鈉所造成的細胞分化最佳，並在給予藥物第 4 天開始，可以觀察到神經突觸生成，至第 8 天，神經突觸會隨著藥物處理時間增加，而有加長的情形 (Fig. 3)。

神經突觸在分化過程中，具有三種分化指標性蛋白：neurofilament-L (NF-L)、neurofilament-M (NF-M) 及 neurofilament-H (NF-H)，其中 NF-L、NF-M 在分化初期（第零天）即會表現，而 NF-H 則需到分化晚期（第 4 天）才有表現(Lindenbaum *et al.*, 1988)。因此，為了明確地判斷 PC12

之分化，本研究選用 NF-L 來判斷細胞分化的程度。

由 Fig. 4 可知，NF-L 蛋白表現與分化程度呈正比，利用影像密度分析儀加以量化，以未分化時為基準點，繪製不同分化天數下，NF-L 的相對表現圖。未分化的細胞 NF-L 幾乎不表現，而經鈇化鈉誘導分化後，前 4 天依然沒有明顯改變，而在分化後第 4 天開始大量表現，第 8 天時達到相當於 NGF 處理四天的 80%。由此可更加確定在本系統中鈇化鈉確實可誘導 PC12 分化。

2、ROS 參與鈇化鈉誘導 PC12 細胞之分化

為了瞭解 ROS 是否參與鈇化鈉所誘導 PC12 細胞之分化，利用多種抗氧化劑及抗氧化酵素前處理細胞 4 小時後，以鈇化鈉誘導細胞分化，並在 8 天後，觀察其分化情形是否被抑制。結果顯示，1-8 mM NAC 由外觀上均可有效抑制由鈇化鈉所誘導細胞分化(Fig. 5)；經由細胞毒性試驗，選用 5 μ M 的 ascorbic acid、10 mM 的 mannitol、0.375 mM 的 tiron、10nM PDTC 以及 500 U/ml 的 CAT(Fig. 6)處理細胞，也發現 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)、CAT 在外觀上，可見到神經突觸較短，但 \cdot OH 的特異性清除劑 mannitol 以及 \cdot O₂ 的特異性清除劑 tiron 則在外觀上無明顯地抑制作用(Fig. 7)。數種抗氧化劑或抗氧化酵素中，NAC 及 PDTC 屬於廣泛性抗氧化劑，CAT 則主要清除 H₂O₂，其中僅有 NAC 可幾乎完全抑制鈇化鈉誘導 PC12 之分化；因此推論，參與鈇化鈉誘導 PC12 的分化過程中，H₂O₂ 可能是主要的 ROS。

二、抗氧化酵素在鈎化鈉誘導細胞分化過程中的表現

由以上結果顯示，在鈎化鈉誘導 PC12 細胞分化中，似乎造成 ROS 的生成，並以 H_2O_2 最具可能性。而因 H_2O_2 會經由 CAT 及 GPx 的作用生成 H_2O ，因此我們續分析在鈎化鈉誘導 PC12 細胞分化過程中，CAT 之活性變化。

結果顯示細胞在分化初期 CAT 活性逐漸降低，至第 4 天開始上升，第 10 天恢復為基礎值 (Fig. 8)。

三、鈎化鈉誘導 PC12 分化過程中 ROS 的產生

為了更直接證明是否有 ROS 的生成，本研究利用流式細胞儀進行分析，包括：

1、以 DCFH-DA 檢測 H_2O_2 的產生：

為了直接證明是否有 H_2O_2 的生成，本研究以 DCFH-DA (Wang and Joseph, 1999)，利用流式細胞儀(flowcytometer)分析胞內 H_2O_2 的變化。DCFH-DA 因帶有 diacetate 結構，因此具有膜通透性，會被細胞質中的酯解酶(esterase)作用變成 dichlorodihydrofluorescein (DCFH)，DCFH 留在胞內並被過氧化物或 H_2O_2 氧化為 dichlorofluorescein (DCF)。利用流式細胞儀，以 488 nm 雷射光激發，藉由 FL1 接收 526 nm 放射光，進而反映胞內 H_2O_2 的變化量。

由 Fig. 9 中得知，在經過鈎化鈉處理 2 分鐘後(Na_3VO_4 ，

灰色)，大多數的細胞顯示其螢光含量在 FL1 數值 13 左右，而背景值則約 8 (control, 白色)，表示有將近 1.63 倍的 H_2O_2 在鈳化鈉處理 2 分鐘後生成；而在 5 分鐘後胞內的 H_2O_2 便不再產生。由此結果證明，在 PC12 分化中的確有 H_2O_2 產生，且僅出現於鈳化鈉開始誘導 PC12 分化極早期的時間。

為進一步證明 NAC 及 CAT 可能經由清除 H_2O_2 進而抑制 PC12 分化，我們以 2 mM 的 NAC 及 500 U/ml CAT 前處理細胞 1 小時後，再檢測鈳化鈉處理 2 分鐘後 H_2O_2 的產生。以控制組細胞(control, Fig. 10 (A), A)為基礎點，神經生長因子(NGF, Fig. 10 (A), C)或鈳化鈉(Na_3VO_4 , Fig. 10 (A), B)均可誘導產生 H_2O_2 。而 Fig. 10 (B) 加給 500 U/ml CAT (catalase, D)，可抑制鈳化鈉(Na_3VO_4 , Fig. 10 (B), B)所誘導 H_2O_2 生成，並使其回到與控制組相當(control, Fig. 10(B), A)；再利用 2 mM 的 NAC (Na_3VO_4 +NAC, Fig. 10 (C), E)處理細胞，胞內所產生 H_2O_2 可被 NAC 所清除，甚至低於控制組(control, Fig. 10 (C), A)。Tab.5 歸納鈳化鈉處理 2 分鐘後 H_2O_2 產生含量，約比控制組增加 1.47 倍，並隨時間增加 H_2O_2 不再產生。由以上結果顯示初期所產生的 H_2O_2 ，對於鈳化鈉誘導 PC12 分化可能具有相當重要的作用。

2、以 dihydroethidium (HEt) 檢測 $\cdot O_2^-$ 的產生：

採用偵測 $\cdot O_2^-$ 的螢光物質 HEt，檢測在鈳化鈉的處理下是否也產生了 $\cdot O_2^-$ 。HEt 可進入細胞中，當胞內有 $\cdot O_2^-$ 產生時，HEt 會與其反應生成 ethidium，並會進入細胞核內而嵌入 DNA

(Satoh *et al.*, 1999)。利用流式細胞儀，以 495 nm 雷射光激發，藉由 FL2 接收 637 nm 放射光，進而反映胞內 $\cdot\text{O}_2^-$ 的生成量。

由 Fig. 11 中發現，在鈎化鈉處理不同時間內，皆未有明顯 $\cdot\text{O}_2^-$ 產生。此結果同時驗證 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除劑 tiron 無法抑制鈎化鈉誘導 PC12 分化。

四、MAPKs 調控鈎化鈉誘導 PC12 分化的過程

MAPKs 可經由訊息傳遞調控多種生理過程，在 PC12 的分化中，MAPKs 亦扮演相當重要的角色 (Satoh *et al.*, 1999)。同時，MAPKs 的活性亦可受到 ROS 的調控(Liu *et al.*, 1996; Kamata and Hirata, 1999; Peus *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 1999)。因此，本研究希望進一步瞭解在 Na_3VO_4 誘導 PC12 分化過程中 MAPKs 的活化情形，以及此活化是否受到分化初期產生的 H_2O_2 調控。

1、MAPKs 於鈎化鈉誘導 PC12 分化初期之表現

首先觀察鈎化鈉誘導 PC12 分化初期，MAPKs 活化情形，包括 ERK、p38MAPK 及 JNK。MAPKs 的 Tyr/Thr 殘基經由被雙磷酸化(dual-phosphorylation)後而活化，因此可利用商賣的抗體，針對已被雙磷酸化的 MAPKs，進行西方墨漬及蛋白激分析，藉此反映其活性變化。ERK 包含 ERK1 與 ERK2 兩類蛋白，分子量分別為 44 kDa 及 42 kDa。當 Thr²⁰² 與 Tyr²⁰⁴ 被磷酸化後，ERK 便會活化。Fig. 12A 的上圖為不同時間鈎化鈉以及 NGF 處理細胞，活化態 ERK 表現情形，而下圖則為各檢體之 ERK 總量(包含活化態與不活化態)。利用影像密度分

析儀加以量化，以 ERK 總量為基準點，繪製不同時間下，ERK 的相對活化表現圖 (Fig. 12B)，顯示經鈇化鈉處理 0~240 分鐘，ERK 活性呈現一緩慢增加的現象，在 120 分鐘時增加 171 倍，而在 240 分鐘時仍有控制組 22.43 倍的活性；而 NGF 處理五分鐘，可見 82.54 倍的增加。

p38MAPK 的分子量為 38 kDa，經 Thr¹⁸⁰ 與 Tyr¹⁸² 雙磷酸化後被活化。Fig. 13A 為利用蛋白激 分析法檢測 p38MAPK 活化情形，Fig. 13B 為利用影像分析定量 p38MAPK 活性變化，結果顯示以鈇化鈉處理 PC12 細胞，p38MAPK 的活性呈現少許下降現象，且僅在 30 分鐘有較高點產生 1.06 倍，並在 240 分鐘時受到最大抑制，為控制組之 0.58 倍。

在 JNK 方面，分子量為 46 kDa 及 54 kDa，當 Thr¹⁸³ 與 Tyr¹⁸⁵ 被磷酸化後，JNK 便會活化。Fig. 14A 為利用蛋白激 分析法檢測 JNK 活化情形，Fig. 14B 為利用影像分析法定量，顯示 PC12 細胞經鈇化鈉處理活性隨時間下降，在 240 分鐘時達到最低點，為控制組之 0.14 倍。

2、ROS 調控 ERK 的活化

為了要確認 MAPKs 的活化與 ROS 的產生有關，因此我們續利用 ERK 上游 MEK1 蛋白抑制劑 U0126 及不同濃度 NAC，觀察 ERK 之活性變化。PC12 經 NAC 前處理 4 小時或 U0126 前處理 20 分鐘後，分析 ERK 經鈇化鈉處理 120 分鐘之活性變化。由 Fig. 15 中我們發現，lane 1 為控制組 (未處理鈇化鈉)，並沒有看到 ERK 磷酸化，lane 2 為鈇化鈉處理 120 分鐘，可

見到約 288.09 倍相對活化量，lane 8 為同時加入 DMSO 及鈇化鈉，以確認 U0126 溶於 DMSO 中，單獨 DMSO 並不會影響 ERK 的活化，發現也有近 282 倍的 ERK 活化量，lane 9 為單獨加入 NAC 2 mM，已確認單獨 NAC 並不造成 ERK 活化，lane 6 及 7 分別加入 1 μ M 及 2 μ M U0126，也未發現 ERK 活化，由結果可見此系統是正常的，因此本研究續利用不同濃度 NAC 觀察 ERK 變化，結果發現隨著 NAC 濃度增加(lane3-5)，ERK 的活性逐漸下降，表示 ERK 的活化可能受到 ROS 的調控。

合併之前的結果，PC12 細胞受到鈇化鈉處理後會在短時間內產生 H₂O₂，而 H₂O 會進一步活化 ERK，最後造成細胞分化。

六、綜合結論

綜合上述的結果，在鈇化鈉誘導 PC12 分化過程中，本論證實了以下數點：

- 1、NAC、CAT 可有效抑制鈇化鈉所誘導 PC12 分化，但[•]OH 的特異性清除劑 mannitol 以及[•]O₂的特異性清除劑 tiron 卻無明顯作用，顯示 H₂O₂ 可能是參與鈇化鈉誘導 PC12 分化過程中最主要的 ROS，且對分化具有極重要的作用。
- 2、分析胞內 CAT 活性變化，發現分化初期 CAT 活性逐漸降低，第 4 天才開始上升，至第 10 天恢復為基礎值。推測可能是因為鈇化鈉增加胞內 H₂O₂ 濃度，CAT 的活性因此隨著改變。
- 3、利用流式細胞儀技術，發現鈇化鈉在短時間 2 分鐘可提升胞內 1.47 倍左右的 H₂O₂ 相對量，而此現象可被 NAC 及

CAT 所緩解；此外證實胞內 $\cdot\text{O}_2^-$ 並無變化。此結果直接證明在鈇化鈉誘導 PC12 分化過程中的確有 H_2O_2 的產生。

4、觀察 ERK、p38MAPK 及 JNK 等 MAPK 在鈇化鈉誘導 PC12 分化中的表現情形，發現鈇化鈉處理前期，ERK 的活性沒有顯著改變，在 120 分鐘 ERK 活性達到活化峰值 171 倍，且呈現持續活化的狀態；而 p38MAPK 則受到調控呈現下降趨勢；JNK 的活性則顯著下降，在 240 分鐘與控制組相比，僅有 0.14 倍相對活化量。

5、利用抗氧化劑 NAC 可顯著減少由鈇化鈉所誘導 ERK 活化，顯示 ROS 可能參與活化 ERK 的過程。

討論

一、ROS 參與鈇化鈉誘導 PC12 細胞分化過程

本研究的結果顯示，NAC 可有效抑制鈇化鈉誘導 PC12 細胞分化，但 $\cdot\text{OH}$ 的特異性清除劑 mannitol 以及 $\cdot\text{O}_2^-$ 的特異性清除劑 tiron 則無明顯作用。利用流式細胞儀，本研究直接觀察 PC12 經鈇化鈉處理後產生 H_2O_2 ，且 $\cdot\text{O}_2^-$ 無明顯變化。由此推論 H_2O_2 可能是參與鈇化鈉誘導 PC12 細胞分化最重要的 ROS。

1、 H_2O_2 在胞內可能扮演之角色及重要性

H_2O_2 為最常見可調控許多胞內訊息傳遞分子的第二訊息者之一，在不同細胞中，會因所受刺激不同，而活化不同的轉錄因子，例如：在 PC12 細胞中，增加 H_2O_2 的含量，會進一步促進 DNA binding，並活化轉錄因子 AP-1 (Tong *et al.*, 1996)；在 HeLa 細胞中，會活化 ERK2 (Wang *et al.*, 1998; reviewed by Allen and Tresini, 2000)。而 H_2O_2 具有高度膜通透性，是目前已知半生期最長的 ROS (大於 5 分鐘以上) (Rohrdanz and Kahl, 1998)。

本研究利用 NAC、PDTC、catalase 皆可減少由鈇化鈉所誘導 PC12 細胞之分化，並以 NAC 效果最佳。推論 NAC 為一

廣泛性抗氧化劑可以直接清除 ROS，並為 GSH 的前驅物，可加速 GSH 之生合成，減少胞內 ROS 含量所造成的細胞傷害 (Chen and Sun, 1997)；而 H_2O_2 經擴散至細胞外，再藉由胞外 CAT 的作用，進而減少胞內 H_2O_2 的含量，而導致突觸變短。

2、鈳化鈉誘導 PC12 分化胞內抗氧化酵素 CAT 之改變

CAT 的活性在分化初期先下降，在第四天達最低點，而在第 10 天回到基礎值。探究其可能原因有：(1) 分化早期，鈳化鈉與 H_2O_2 在 CAT 作用下形成 Diperoxovanadate (DPV)，並釋放氧氣，以致於 CAT 的活性下降 (Ravishanker *et al.*, 1995；Rao *et al.*, 1998)；(2) 因為 H_2O_2 增加，而直接造成 CAT 的活性下降 (Yan *et al.*, 1998)。相反的，利用 Two-dimensional gel electrophoresis 的方法檢測 yeast (*Hansenula polymorpha*) 受到重金屬影響的反應，經實驗發現，當利用鈳化鈉處理 yeast 後，yeast 內 SOD 及 CAT 的活性均顯著增加，表示當鈳化鈉處理 yeast 時，必定造成 ROS 的增加，而促使抗氧化酵素的活性增加 (Mannazzu *et al.*, 2000)。因此， H_2O_2 在不同細胞間，對 CAT 所造成的影響也不一致，而在本研究中，是在分化初期先下降，而後再回到與控制組相當。

二、MAPKs 調控鈉化鈉誘導 PC12 分化過程

1、MAPKs 活性與分化相關性

利用鈉化鈉處理 PC12 細胞觀察 MAPKs 的表現，本研究發現，ERK 在加藥初期即維持一少量的活化，在 120 分鐘達到相對活性峰值 171 倍，在 240 分鐘時仍保持約控制組的 22.43 倍；p38MAPK 則維持一下降趨勢，並在 30 分鐘些微上升至控制組的 1.06 倍，240 分鐘降到活性最低點，僅控制組的 0.58 倍；JNK 的活性，則顯著下降，在藥物處理 240 分鐘時，活性僅剩控制組的 0.14 倍，並僅在加藥 30 分鐘時，有較高活性，但普遍屬活性下降；這是否因為在 MAPKs 的訊息傳導過程中，有其他激素參與其中，以調節彼此的活性？亦或是最下游轉錄因子間為達平衡，而彼此調控的結果？眾多文獻指出，不同細胞經不同試劑處理後，MAPKs 的活化情形差異極大 (Tab. 4)。

例如：(1) 神經細胞

(a) 在未給予任何藥物處理的 astrocyte 中，仍有基礎量 ERK 活化，但並不足以誘導分化，然而維持此基礎量的 ERK 活性是維持 astrocyte 外觀改變所必須的(Abe and Saito, 2000)

(b) 利用錳離子處理 PC12 細胞，觀察錳離子促進神經突觸生成過程中，在 12 小時 ERK1/2 達活化高峰，並維持 24 小時 (Traverse *et al.*, 1992; Walowitz

and Roth, 1999)

- (c) 利用 NGF、EGF 及鈳化鈉刺激 PC12，在 NGF 及 EGF 處理 2.5 分鐘時，可見 ERK 活性最大量，但此活性狀態是不同的，EGF 隨時間增長，其活性逐漸降到與控制組相當，NGF 所造成 ERK 活性增加則會維持高峰直到 180 分鐘，而 1mM 鈳化鈉在 15-50 分鐘時見到 ERK 的活化並持續 180 分鐘；續觀察 Thr/Tyr 磷酸化程度，發現由 NGF 所造成的磷酸化現象比鈳化鈉高，因此推論 NGF 所誘導 ERK 活性較鈳化鈉誘導者高 (Nguyen *et al.*, 1993)
- (d) 利用 NGF 及 IGF-1，刺激人類感覺神經原，可見 p38MAPK 的活化 (Kimpinski *et al.*, 2001)
- (e) 利用胰島素觀察新生雞細胞前腦神經原 (fetal chick forebrain neurons) MAPK 變化情形，發現 p38MAPK 強烈受到抑制 (80-90%)，而 JNK 及 ERK 則無變化。此抑制作用是因為胰島素降低酪胺酸磷酸水解 的活化量，因此若同時加入鈳化鈉，則可因增加酪胺酸磷酸水解 而緩解 p38MAPK 所受到的抑制 (Heidenreich and Kummer, 1996)
- (f) 利用 p42/p44 抑制劑 (PD98059) 及 p38 MAPK 抑制劑 (SB203580) 加予 oligodendrocyte，發現在細胞分化過中 p38MAPK 在分化初期扮演一重

要角色，而 p42/p44 則和分化進行較有關，同時給予抑制劑後，細胞分化明顯受到影響，尤以 p38MAPK 為最 (Baron *et al.*, 2000)

(2)肌細胞(muscle cells)

(a)在肌細胞原分化 (myogenic)過程中，分化最早期一定需 p38MAPK 活化 (Chun *et al.*, 2000; Puri *et al.*, 2000)，隨著分化進行，ERK 的活化就顯的較重要

(b)心肌細胞分化中，p38MAPK 在早期也是一必要的蛋白水解 (Davidson and Morange, 2000)，但 ERK 則在分化早期及分化晚期各有一活化高峰，分析 ERK 及 p38MAPK 對於分化的角色，則以 ERK 較重要 (Wu *et al.*, 2000)

(c)利用鈳化鈉處理狒狒血管平滑肌細胞，也會造成 ERK 活化 (Daum *et al.*, 1998)

(3)其他細胞

(a)利用 PMA 刺激 HL-60 會導致 ERK 在五分鐘時達到活化高峰，並維持 60 分鐘，此活化會被 ERK 上游 MEK1 抑制劑 PD98059 所抑制 (Das *et al.*, 2000)

(b)利用 TPA 刺激 macrophage 分化，ERK 及 p38MAPK 都沒有活化，而 JNK 才是扮演分化重要激素 (Schultz *et al.*, 1997; Katsuyama *et al.*, 2001)

(c) PMA 刺激 human myeloid leukemic cell line 也會造成 ERK 在 10 分鐘時達到活化高峰並維持 24 小時

(Hu *et al.*, 2000)

(d)retinoic acid 刺激 granulocytic 分化,在三種 MAPKs 中以 ERK 的活化最重要 (Ten *et al.*, 1999)

除了各種刺激所造成不同 MAPKs 的活化外,在 MAPKs 的下游亦有許多共同活化的轉錄因子,例如:c-Jun 可同時被 ERK 或 JNK 所活化;ATF-2 可同時被 p38MAPK 或 JNK 所活化...等;利用外加 ATP 會造成 PC12 細胞氧化壓力增加,並活化 AP-1,而投與 NAC 可有效抑制 AP-1 的活化(Chen and Sun, 1998);利用 NAC 可以抑制由 NGF 所誘導 c-fos 表現及 AP-1 活化,並且抑制 MAPK 的活化 (Kamata *et al.*, 1996);JNK、ERK 均會活化 c-Jun,但是利用 NGF 處理 PC12 細胞時,NGF 造成 ERK、c-Jun 活化,而促進突觸生成,在 c-Jun 活化過程中,JNK 僅提供磷酸化,並不會直接促進 c-Jun 生成 (Leppa *et al.*, 1998);利用 Lysophosphatidic acid (LPA)刺激 HeLa 細胞,見到 MAPK 的活化,並且此現象可被 NAC 所抑制(Chen *et al.*, 1995)。綜合以上可知,ROS 可活化 MAPK,而 MAPK 會再進一步活化轉錄因子。

更進一步研究指出在 MAPKs 的訊息傳導過程中,有相當多的激素參與其中,並且彼此之間互相有調控,利用 1,25-Dihydroxyvitamin D3 刺激人類淋巴瘤細胞 HL60 分化實驗中,加入 p38MAPK 專一性抑制劑 SB203580 卻不會抑制 p38MAPK 活化,反而促進活化,作者推論有 Mixed lineage kinase-3 (MLK-3)及 MEKKs 1-3 參與其中,因為 MLK-3 及

MEKKs 1-3 造成 JNK 及 ERK 活化，而推論可能與一負回饋路徑(Negative loop)有關 (Wang *et al.*, 2000)。MLK-3 包含一 Cdc 42 binding domain 的蛋白激酶，會造成 MLK-3 與 SEK 或與 MKK6 的結合，進而造成 JNK 及 p38MAPK 的活化，但作者同時發現僅有少許 ERK 活化 (Tibble *et al.*, 1996; Hartkamp *et al.*, 1999)。

由實驗中發現 ERK 活化峰值出現在 120 分鐘，而利用流式細胞儀卻在 2 分鐘時見到 H₂O₂ 生成最大量 1.47 倍，但在第 6 天才見到神經分化指標蛋白顯著增加，在時間點上似乎差距甚大，推測其可能原因是 MAPK 活化過程，透過一連串激素的活化(Ichijo, 1999; Tibbles LA and Woodgette JR, 1999; Chang L and Karin M, 2001)，首先外來刺激例如生長因子、發炎反應、X 光..等，藉由活化 MAPKKKKK、MAPKKK、MAPKK，最後造成 MAPK、轉錄因子活化，細胞內蛋白質合成增加；因此推論當鈎化鈉加入細胞後，在 2 分鐘內造成胞內 H₂O₂ 增加，藉由 H₂O₂ 活化 MAPK 一連串上游激素，最後造成 MAPK 彼此調控，第二訊息傳導因子活化，在第六天見到神經分化指標蛋白表現顯著增加，因此推論突觸生成與 MAPK 活化以及胞內 H₂O₂ 產生之時間差，是因為一連串活化所造成。

綜合以上結果得知，PC12 細胞受到鈎化鈉處理後可能在短時間內產生 H₂O₂，而 H₂O₂ 會進一步調控 ERK、p38MAPK 與 JNK 的活化，最後造成細胞分化。

三、本研究之未來方向與展望

本研究目前結果證明，鈎化鈉可能藉提升胞內 H_2O_2 濃度，並透過 ROS 敏感性 MAPKs 的作用，最後導致 PC12 神經細胞分化，但其間仍有許多疑點有待釐清：

- 1、外觀所見，加入抗氧化劑及抗氧化酵素所造成神經突觸變短，其分化指標蛋白表現情況如何？
- 2、內其他抗氧化酵素表現狀況？
- 3、目前僅發現 ERK 會受到鈎化鈉誘導產生 H_2O_2 所調控，p38MAPK 及 JNK 是否也同樣受 ROS 所調控？
- 4、PC12 細胞分化過程中，MAPKs 調控的轉錄因子為何？

若能釐清以上的問題，相信對於鈎化鈉誘導細胞分化的訊息傳導路徑，能有一更深入的瞭解。因此本研究可續利用西方墨漬法分析抗氧化劑(NAC、CAT、PDTC、ascirbic acid、tiron、mannitol) 分化指標 NF- κ B 的表現；利用酵素分析法分析 GPx、GRx、SOD 的表現；利用蛋白激 分析法 (kinase assay)，分析 JNK 及 p38MAPK 的活化是否和 ROS 相關；利用 EMSA(Electrophoretic Mobility Shift Assay)分析和細胞分化及存活具關係之 NF- κ B 以及 AP-1 的表現。

- 5、利用 microarray 的方法，藉此找出哪一些蛋白質在分化過程中，受到 ROS 的調控。

参考文献

- Abe JI, Okuda M, Huang Q, Yoshizumi M and Berk BC. Reactive oxygen species activate p90 ribosomal S6 kinase via Fyn and Ras. *J. Biol. Chem.* 275: 1739-48, 2000.
- Abe K and Saito H. The p44/p42 mitogen-activated protein kinase cascade is involved in the induction and maintenance of astrocyte stellation mediated by protein kinase C. *J. Neurosci. Res.* 36: 251-57, 2000.
- Adler V, Yin Z, Tew KD and Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogen* 18: 6104-11, 1999.
- Allen RG and Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 463-99, 2000.
- Barceloux D. Vanadium. *Clinical toxicol.* 37: 265-78, 1999.
- Baron W, Metz B, Bansal R, Hoekstra D and Vries H. PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways. *Mol. Cell Neurosci.* 15: 314-29, 2000.
- Beckman KB and Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* 272: 19633-36, 1997.
- Byrd JC and Alho H. Differentiation of PC12 pheochromocytoma cells by sodium butyrate. *Brain Res.* 428: 151-5, 1987.
- Chang L and Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 410: 37-40, 2001.

- Chen F, Demers LM, Vallyathan V, Ding M, Lu Y, Castranova V and Shi X. Vanadate induction of NF- κ B involves I κ B kinase β and SAPK/ERK kinase 1 in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 274: 20307-12, 1999.
- Chen Q, Olashaw N and Wu J. Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase kinase activation pathway. *J. Biol. Chem.* 270: 28499-02, 1995.
- Chen Y and Sun AY. Activation of transcription factor AP-1 by extracellular ATP in PC12 cells. *Neurochem. Res.* 23: 543-50, 1998.
- Chun YK, Kim J, Kwon S, Choi SH, Hong F, Moon KA, Kim JM, Choi SL, Kim BS, Ha J and Kim SS. Phosphatidylinositol 3-kinase stimulates muscle differentiation by activating p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 502-07, 2000.
- Cortizo AM and Etcheverry S. Vanadium derivatives act as growth factor-mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 145: 97-102, 1995.
- Dalton T, Shertzer HG and Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 67-101, 1999.
- Das D, Pintiucci G and Stern A. MAPK-dependent expression of p21^{WAF} and p27^{kip1} in PMA-induced differentiation of HL60 cells. *FEBS Letters.* 472: 50-2, 2000.
- Daum G, Kalmes A, Levkay B, Wang Y, Davies MG and Clowes AW. Pervanadate inhibits mitogen-activated protein kinase-1 in a

- p38^{MAPK}-dependent manner. *FEBS Letters*. 427: 271-74, 1998.
- Daum G, Levkau B, Chamberlain NL, Wang Y and Clowes AW. The mitogen-activated protein kinase pathway contributes to vanadate toxicity in vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 183: 97-103, 1998.
- Davidson S and Morange M. Hsp25 and p38 MAPK pathway are involved in differentiation of cardiomyocytes. *Dev. Biol.* 218: 146-60, 2000.
- Ding M, Li JJ, Leonard SS, Te JP, Shi X, Colburn NH, Castranova V and Vallyathan V. Vanadate-induced activation of activator protein-1: role of reactive oxygen species. *Carcino.* 20: 663-8, 1999.
- Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soci. Exp. Bio. Med.* 222: 236-45, 1999.
- Franco AA, Odom RS and Rando TA. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 1122-32, 1999.
- Gamaley IA and Klyubin IV. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int. Rev. Cytol.* 188: 203-55, 1999.
- Ginn-Pease ME and Whisler RL. Redox signal and NF-kappaB activation in T cells. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 346-61, 1998.
- Greene L and Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth

- factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 2424-28, 1976.
- Grewal SS, York RD and Stork PJS. Extracellular-signal-regulated kinase signaling in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 544-53, 1999.
- Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 344: 859-61, 1994.
- Hartkamp J, Troppmair J and Rapp UR. The JNK/SAPK activator mixed lineage kinase 3(MLK3) transforms NIH 3T3 cells in a MEK-dependent fashion. *Cancer Res.* 59: 2195-02, 1999.
- Heidenreich KA and Kummer JL. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase by insulin in cultured fetal neurons. *J. Biol. Chem.* 271: 9891-94, 1996.
- Hohle B, Lange B, Holzapfel B, Goldenberg A, Hanze J, Sell A, Testan H, Moller W and Kummer W. Hypoxic upregulation of tyrosine hydroxylase gene expression is paralleled, but not induced, by increased generation of reactive oxygen species in PC12 cells. *FEBS Letters* 457: 53-56, 1999.
- Hu X, Moscinski LC, Valkov NI, Fisher AB, Hill BJ and Zuckerman KS. Prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is required for macrophage-like differentiation of a human myeloid leukemic cell line. *Cell Growth Differ.* 11: 191-00, 2000.
- Huang ZZ, Li H, Cai J, Kuhlenkamp J, Kaplowitz N and Lu SC. Changes in glutathione homeostasis during liver regeneration in the rat. *Hepatology* 27: 147-153, 1998.

- Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsaprailis G and Gresser M. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatase by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* 272: 843-51, 1997.
- Ichijo H. From receptor to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* 18: 6087-93, 1999.
- Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* 344: 796-98, 1994.
- Kamata H and Hirata H. Redox regulation of cellular signaling. *Cell. Signal.* 11: 1-14, 1999.
- Kamata H, Tanaka C, Yagisawa H, Satoshi M, Gotoh Y, Nishida E and Hajime H. Suppression of nerve growth factor-induced neural differentiation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 271: 33018-26, 1996.
- Katoh S, Mitsui Y, Kitani K and Suzuki T. Hyperoxia induces the differentiated neuronal phenotype of PC12 cells by producing reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241: 347-51, 1997.
- Katoh S, Mitsui Y, Kitani K and Suzuki T. Hyperoxia induces the neuronal differentiated phenotype of PC12 cells *via* a sustained activity of mitogen-activated protein kinase induced by Bcl-2. *Biochem. J.* 338: 465-70, 1999.
- Katsuyama R, Morioka A, Oka S and Kawasaki T. Expression of macrophage asialoglycoprotein-binding protein is induced through

MAPK classical pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1269-73, 2001.

Kimpinski K and Mearow K. Neurite growth promotion by nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 in cultured adult sensory neurons: mitogen activated protein kinase. *J. Neurosci. Res.* 63: 486-99, 2001.

Kolkova K, Novitsjaya V, Pedersen N, Berezin V and Bock E. Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* 20: 2238-46, 2000.

Leppa S, Saffrich R, Ansorge W and Bohmann D. Differential regulation of c-jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J.* 17: 4404-13, 1998.

Li Y and Jaiswal AK. Human antioxidant-response –element-mediated regulation of type 1 NADPH :quinone oxido reductase gene expression effect of sulfhydryl modifying agents. *Euro. J. Biochem.* 226: 31-9, 1994.

Lindenbaum MH, Carbonetto S, Grosveld F, Flavell D and Mushynski WE. Transcriptional and post-transcriptional effects on nerve growth factor on expression of the three neurofilament subunits in PC-12 cells. *J. Biol. Chem.* 263: 5662-67, 1988.

Liochev and Fridovich. The oxidation of NADH by vanadate plus sugars. *Biochemica et Biophysica Acta* 924: 319-22, 1987.

- Liu Y, Guyton KZ, Gorospe M, Xu Q, Lee JC and Holbrook NJ. Differential activation of ERK, JNK/SAPK and p38/CSBP/RK MAP kinase family members during the cellular response to arsenite. *Free Radic. Biol. Med.* 21: 771-81, 1996.
- Malabu UH, Dryden S, Mccarthy D, Kilpatrick A and Williams G. Effects of chronic vanadate administration in the STZ-induced diabetic rat. *Diab.* 43: 9-15, 1994.
- Mannazzu I, Guerra E, Ferretti R, Pediconi D and Fatichenti. Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *Biochem. Biophys. Acta* 1475: 151-56, 2000.
- Marnett LJ. Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcino.* 8: 1365-72, 1987.
- Mates JM, Perez-Gomez C and Castro I. Antioxidant enzymes and human disease. *Clini. Biochem.* 32: 595-03, 1999.
- Meyer M, Schreck R and Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-κB and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* 12: 2005-15, 1993.
- Mielke K, Damm A, Yang DD and Herdegen T. Selective expression of JNK isoforms and stress-specific JNK activity in different neural cell lines. *Mol. Brain Res.* 75:128-37, 2000.
- Morooka T. and Nishida E. Requirement of p38 mitogen-activated protein

kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 273: 24285-88, 1998.

Mukhopadhyay A, Manna SK and Aggarwal BB. Pervanadate-induced nuclear factor- κ B activation requires tyrosine phosphorylation and degradation of I κ B. *J. Biol. Chem.* 275: 8549-55, 2000.

Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ and Todokoro K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* 92: 1859-69, 1998.

Nechay BR, Nanninga LB, Nechay PS, Nechay PS, Post RL, Grantham JJ, Macara IG, Kubena LF, Phillips TD and Nielsen FH. Role of vanadium in biology. *Federation proceedings* 45: 123-32, 1986.

Nguyen TT, Scimeca FC, Filloux C, Peraldi P, Carpentier JL and Obberghen EV. Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 9803-10, 1993.

Obin M, Mesco E, Gong X, Haas AL, Joseph J and Taylor A. Neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 274: 11789-95, 1999.

Parsadonian HK, Marchenko SM, Parsadonian KH and Barilyak IR. Vanadium as a factor that disturbs phosphorous metabolism in Nervous tissue. *Neurotoxicology.* 19: 561-64, 1998.

Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C and Pittelkow MR. UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 112:

751-56, 1999.

Poucheret P, Verma S, Grynpas MD, McNeill JH. Vanadium and diabetes. *Mol. Cell Biochem.* 188: 73-80, 1998.

Puri PL, Wu Z, Zhang P, Wood LD, Bhakta KS, Han J, Feramisco JR, Karin M and Wang J. Induction of terminal differentiation by p38 and extracellular signal-regulated kinases regulated the myogenic program at multiple steps. *Mol. Cell. Biochem.* 20: 3851-3964, 2000.

Rao A, Ravishankar H and Ramasarma T. Diperoxovanadate participates in peroxidation reaction of H₂O₂ in present of abundant catalase. *Bioch. Biophys Acta.* 1381: 249-55, 1998.

Ravishanker HN, Rao A and amasarma T. Catalase degrades diperoxovanadate and release oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 321: 477-84, 1995.

Reiter JR. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9: 526-33, 1995.

Robinson KA, Stewart CA, Pye QN, Nguyen X, Kenney L, Salzman S, Floyd RA and Hensley K. Redox-sensitive protein phosphatase activity regulates the phosphorylation state of p38 protein kinase in primary astrocyte culture. *J. Neurosci. Res.* 55: 724-32, 1999.

Rogers A, Buensuceso C, Montague F and Mahadevan L. Vanadate stimulates differentiation and neurite outgrowth in rat pheochromocytoma PC12 cells and neurite extension in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience.* 60:479-494, 1994.

- Rohardanz E and Kahl R. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radi. Biol. Med.* 24: 1520-34, 1998.
- Ross D and Moldeus P. Antioxidant defense system and oxidative stress. In: *Membrane Lipid Oxidation*, edited by C. Vigo-Pelfrey. BocaRaton FL: CRC 2: pp.151-70, 1991.
- Russanov E, Zaporowska H, Ivancheva E, Kirkova M and Konstantinova S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in vanadate-treated rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 107C: 415-21, 1994.
- Ryter SW and Tyrrell RM. Singlet molecular oxygen (1O_2): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 24: 1520-34, 1998.
- Salvo JD, Semenchuk LA and Lauer J. Vanadate-induced contraction of smooth muscle and enhanced protein tyrosine phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 304: 386-91, 1993.
- Satoh T, Yamagata T, Ishikawa Y, Yamada M, Uchiyama Y, and Hatanaka H. Regulation of reactive oxygen species by nerve growth factor but not Bcl-2 as a novel mechanism of protection of PC12 cells from superoxide anion-induced death. *J. Biochem.* 125: 952-59, 1999.
- Schaeffer HJ and Weber MJ. Mitogen-activating protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biolo.* 19: 2435-44, 1999.
- Schultz H, Engel K and Gaestel M. PMA-induced activation of the

p42/44^{erk} and p38^{rk} MAP kinase cascades in HL-60 cells in PKC dependent but not essential for differentiation to macrophage like phenotype. *J. Cell. Physiol.* 173: 310-18, 1997.

Sekar N, Li J, He Z and Shechter Y. Vanadium salts as insulin substitutes: mechanisms of action, a scientific and therapeutic tool in diabetes mellitus research. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31:339-59, 1996.

Sekar N, Li J, He Z, Gefel D and Shechter Y. Independent signal-transduction pathways for vanadate and for insulin in the activation of glycogen synthase and glycogenesis in rat adipocytes. *Endocrinology.* 140: 1125-31, 1999.

Shaver A, NG JB, Hall DA and Posner BI. The chemistry of peroxovanadium compounds relevant to insulin mimesis. *Mol. Cell Biochem.* 153: 5-15, 1995.

Shi X and Dalal NS. Flavoenzymes reduce vanadium (V) and molecular oxygen and generate hydroxyl radical. *Arch. Biol. Biophys.* 289: 355-361, 1991.

Shi X and Dalal NS. Vanadate-mediated hydroxyl radical generation from superoxide radical in the presence of NADH: Haber-Weiss vs Fenton mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 336-41, 1993.

Simons JB. Vanadate-a new tool for biologists. *Nature* 281:337-338, 1979

Swarup G, Cohen S and Garbers D. Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1104-09, 1982.

- Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutr.* 1: 716-8, 2000.
- Tibbles LA and Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 1230-54, 1999.
- Tibbles LA, Ing YL, Kiefer F, Chan J, Iscove N, Woodgett JR and Lassam NJ. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/ERK pathway via SEK1 and MKK3/6. *EMBO J.* 15: 7026-35, 1996.
- Tojo A, Kasuga M, Urabe A and Takaku F. Vanadate can replace interleukin 3 for transient growth of factor-dependent cells. *Exp. cell Res.* 171: 16-23, 1987.
- Tong L and Perezpolo JR. Effect of nerve growth factor on AP-1, NF- κ B, and Oct DNA binding activity in apoptotic PC12 cells-extrinsic and intrinsic elements. *J. Neurosci. Res.* 45: 1-12, 1996.
- Tracey AS and Gresser MJ. Interaction of vanadate with phenol and tyrosine: implications for the effects of vanadate on systems regulated by tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 609-13, 1986.
- Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C and Cohen P. Sustained activation of the mitogen-activated protein(MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. *Biochem. J.* 288: 351-55, 1992.
- Ueki H, Mitsugi S, Kawashima Y, Motoyashiki T and Morita T. Orthovanadate stimulates cyclic guanosine monophosphate-inhibited

cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase activity in isolated rat fat pads through activation of particulate myelin basic protein kinase by protein tyrosine kinase. *Endocrinology* 138: 2784-89, 1997.

Walowitz JL and Roth JA. Activation of ERK1 and ERK2 is required for manganese-induced neurite outgrowth in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Neurosci. Res.* 57: 847-54, 1999.

Wang H and Joseph J. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free radic. Biol. med.* 27: 612-16, 1999.

Wang H, Xie Z and Scott R. Induction of AP-1 activity associated with *c-Jun* and *JunB* is required for mitogenesis induced by insulin and vanadate in SV-40-transformed 3T3T cell. *Mol. Cell Biochem.* 168: 21-30, 1997.

Wang X, Martindale JL, Liu Y and Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influenced of mitogen activated protein kinase signaling pathways on cell survival. *Biochem J.* 333: 291-00, 1998.

Wang X, Rao J and Studzinski GP. Inhibition of p38 MAP kinase activity up-regulates multiple MAP kinase pathways and potentiates 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-induced differentiation of human leukemia HL60 cells. *Exp. Cell Res.* 258: 425-37, 2000.

- Weeks BS, Disalvo J and Kleinman HK. Laminin-mediated process formation in neuronal cells involves protein dephosphorylation. *J. Neurosci. Res.* 27: 418-26, 1990.
- Weeks BS, Wilson PJ and Heffernan CC. Laminin stimulates protein tyrosine dephosphorylation in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262: 713-19, 1999.
- Witztum JL. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 344: 793-95, 1994.
- Wooten M, Seibenhener L, Neidigh KB and Vandenplas M. Mapping of tyrosine phosphorylation within the Nerve growth factor signaling cascade: relationship to differentiation and survival of PC12 cells. *Mol. Cell Biol.* 20: 4494-04, 2000.
- Wu LW, Yoon HK, Baylink DJ, Graves LM and Lau K-HW. Fluoride at mitogenic doses induces a sustained activation of p44mapk, but not p42mapk, in human TE85 osteosarcoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 1126-35, 1997.
- Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, Tamura K, Wen F, Feramisco JR, Karin M, Wang JY and Puri PL. Constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes dev.* 574-84, 2000.
- Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, Tamura K, Wen F, Feramisco JR, Karin M, Wang JY and Puri PL. p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol. Cell Biol.* 20: 3951-64, 2000.

- Yan T, Jiang X, Zhang HJ, Li S and Oberley LW. Use of commercial antibodies for detection of the primary antioxidant enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 688-93, 1998.
- Ye J, Ding M, Zhang X, Rojanasakul Y, Nedospasov S, Vallyathan V, Castranova V and Shi X. Induction of TNF α in macrophages by vanadate is dependent on activation of transcription factor NF- κ B and free radical reaction. *Mol. Cell Biol.* 19: 193-200, 1999.
- Yoon HK, Baylink DJ and Lau W. Protein tyrosine kinase inhibitors block the stimulatory actions of phosphotyrosine phosphatase inhibitors to increase cell proliferation, alkaline phosphatase activity, and collagen synthesis in normal human bone cells. *Am. J. Nephrol.* 20: 153-62, 1999.
- Zandwijk NV. N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer. *J. Cell. Biochem.* 22: 24-32, 1995.

Table 1. Properties of some reactive oxygen species

Species	Symbol	Half-life at 37°C(sec)	Properties
Superoxide	$\cdot\text{O}_2^-$	1×10^{-6}	Good reductant, poor oxidant.
Hydroxyl	$\cdot\text{OH}$	1×10^{-9}	Extremely reactive (addition, abstraction and electron transfer reactions). Very low diffusion distance.
Alkoxy	$\text{RO}\cdot$	1×10^{-6}	Intermediate in their reactivity with lipid between $\text{ROO}\cdot$ and $\cdot\text{OH}$
Peroxy	$\text{ROO}\cdot$	1×10^{-2}	Low oxidizing ability relative to $\cdot\text{OH}$ but greater diffusibility.
Single oxygen	$^1\text{O}_2$	1×10^{-6}	Powerful oxidizing agent
Molecular oxygen	O_2	$>10^2$	
Perhydroxyl radical	$\text{HOO}\cdot$	unknown	Stronger oxidant and more lipid soluble than superoxide. May initiate lipid peroxidation.
Hydrogen peroxide	H_2O_2	>5 (min)	Oxidant but reactions with organic substrates are sluggish. High diffusion capability.

(adapted from Ross and Moldeus, 1991; Reiter *et al.*, 1995)

Table 2. Signaling molecules regulated by redox in the cells

Signaling molecule	Effects of oxidants
1. Protein tyrosine kinase EGFR, IR, PDGFR, Src, Lck, Fyn, ZAP-70, Syk, Lyn, Fgr, Hck, Btk, Ltk	Activation
2. Protein tyrosine phosphatase The reduced cysteine residues are essential.	Inactivation
3. Protein serine/threonine kinase MAPK, JNK, p38, BMK1, Akt, S6 kinase PKC	Activation (Activation/Inactivation)
4. Protein serine/threonine phosphatase PP1, PP2A, calcineurin	Inactivation
5. Small G protein Ras	Activation
6. Lipid signaling PLC, PLD, PLA ₂ , PI3K	Activation
7. Ca²⁺ signaling Ins (1,4,5) P ₃ receptor, ryanodine receptor Ca ²⁺ -ATPase, Ca ²⁺ /Na ⁺ exchanger	Activation
8. Transcription factors AP-1 (c-Fos, c-Jun), NF- κ B (p50), Rel, USF, TTF-1, GR, BPV1E2, NFI, Myb, NF-Y, p53, PEBP2/AML, Oct-2, Egr-1, BZLF1, Ets, GABP, Ah receptor, ATF, CREB, TTF-1, Ku	Activation/Inactivation

Abbreviations: EGFR, epidermal growth factor receptor; IR, insulin receptor; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; ZAP-70, ζ -associated polypeptide of 70kDa; JNK, c-Jun N-terminal protein kinase; BMK1, Big MAP kinase; PP, protein phosphatase; PLD, phospholipase D; PLA₂, phospholipase A₂; PI, phosphatidylinositol; Ins (1,4,5) P₃, inositol 1,4,5-triphosphate; AP-1, activator protein-1; USF, upstream stimulatory factor; TTF-1, thyroid transcription factor; GR, glucocorticoid receptor; BPV1E2, bovine papilloma virus type 1 E2; NF, nuclear factor; PEBP2/AML, polyoma virus enhancer-binding protein/acute myelogenous leukemia; BZLF1, a transcription activating protein encoded in Epstein-Barr virus; GABP, GA-binding protein; ATF, activating transcription factor; CREB, cAMP responsive element binding protein

(adapted from Kamata and Hirata, 1999)

Table 3 Vanadium and Vanadium Compounds

	Synonyms	Chemical formula
Vanadium	vanadium-51	V
Vanadium pentoxide	vanadic anhydride, divanadium pentoxide, vanadium oxide, vanadic acid	V ₂ O ₅
Vanadyl sulfate	vanadium oxysulfate, vanadium oxide sulfate, vanadium oxosulfate	VOSO ₄
Sodium metavanadate	vandic acid, monosodium salt	NaVO ₃
Sodium orthovanadate	vandic (II) acid, trisodium salt; sodium vanadate; Sodium vanadate oxide trisodium orthovanadate	Na ₃ VO ₄
Ammonium metavanadate	ammonium vanadate; vanadic acid, ammonium salt	NH ₄ VO ₃

Adapted from Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, CRC press, Inc, 1997.

Table 4 Redox-Sensitive Gene and Regulatory factors

Cell type	Factor	MAPK	Profile	Reference
1. Neuron cell				
Astrocyte	None	ERK	Activation	Abe and Saito, 2000
PC12	Mn ⁺²	ERK	activation	Traverse et al., 1992; Walowitz and Roth, 1999
PC12	NGF	ERK	activation	Traverse et al., 1992 ;
Oligodendrocyte	PDGF	* p38MAPK	activation	Walowitz and Roth, 1999;
	FGF-1	#ERK	activation	Baron et al., 2000
Adult sensory neuron	NGF IGF-1	p38MAPK	activation	Kimpinski et al., 2001
2. Muscle cell				
C2C12	None	p38MAPK JNK ERK	activation unchanged biphasic activation	Wu et al., 2000
Rhabdomyosarcoma	None	p38MAPK	activation	Chun et al., 2000; Puri et al., 2000
Cardiomyocytes	None	* p38MAPK #ERK	activation activation	Davidson and Morange, 2000
Smooth muscle cell	Na ₃ VO ₄	ERK	activation	Daum et al., 1998
4. Others				
Macrophage	PMA	ERK	activation	Das et al., 2000
Macrophage	TPA	JNK	activation	Schultz et al., 1997; Katsuyama et al., 2001
Myeloid leukemia cell	PMA	ERK	activation	Hu et al., 2000
Granulocytic	retinoic acid	ERK	activation	Ten et al., 1999
HeLa	PMA	ERK	activation	Chen et al., 1995

* p38MAPK was activated in the early differentiation stage.

ERK was activated in the late differentiation stage.

Table 5 Flow cytometric analysis of H₂O₂ generation

Time (min)	Relative folds (Na ₃ VO ₄ treatment / control)
1	1.28 ± 0.13 *
2	1.47 ± 0.10
3	1.18 ± 0.17
4	1.09 ± 0.19
5	0.95 ± 0.21

After overnight serum starvation, PC12 cells were collected and then pre-incubated with 10 μM DCFH-DA for 15 minutes before treatment with or without 15 μM Na₃VO₄ for indicated time. Subsequently, cells were subjected to flowcytometric analysis.

- The results were calculated by FL1 value of Na₃VO₄ treatment cells over FL1 value of control cells and presented as mean ± S.D. in three independent experiments.

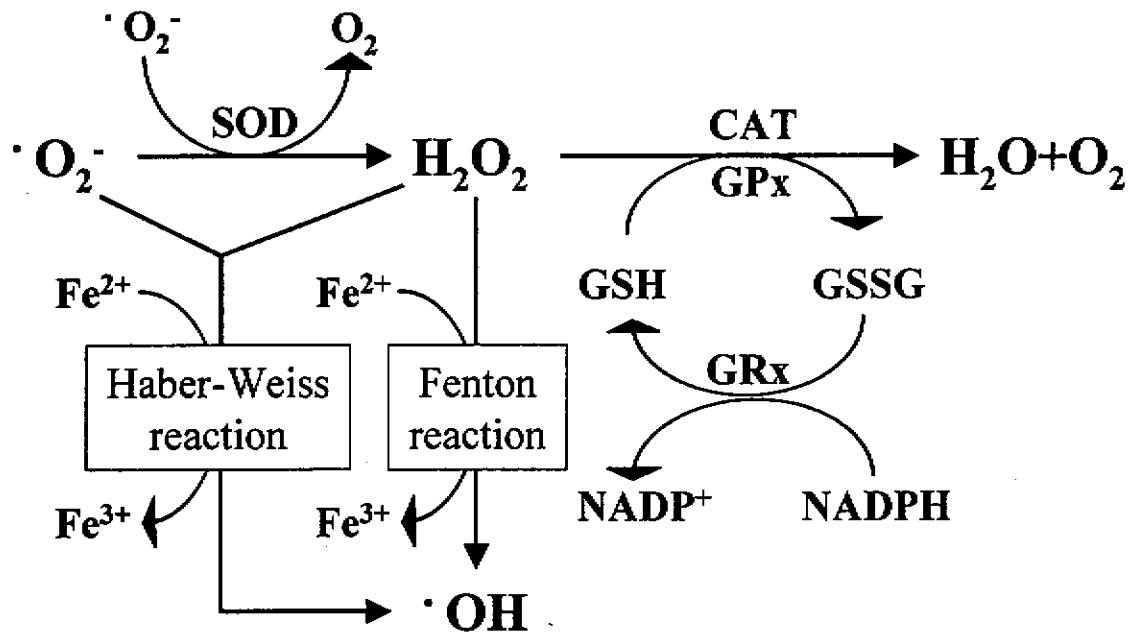


Figure 1. Metabolic pathway of reactive oxygen species (ROS)

ROS, such as H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{O}_2^-$ are generated in cells by several pathways. SOD converts $\cdot\text{O}_2^-$ into H_2O_2 , and then H_2O_2 is mostly degraded to H_2O by GPx and CAT. H_2O_2 produces a highly reactive radical $\cdot\text{OH}$ by the Fenton or Haber-Weiss reaction in the presence of Fe^{2+} .

Abbreviations: H_2O_2 , hydrogen peroxide; $\cdot\text{OH}$, hydroxyl radical; $\cdot\text{O}_2^-$, superoxide anion; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; GRx, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione

(adapted and modified from Gamaley and Klyubin, 1999)

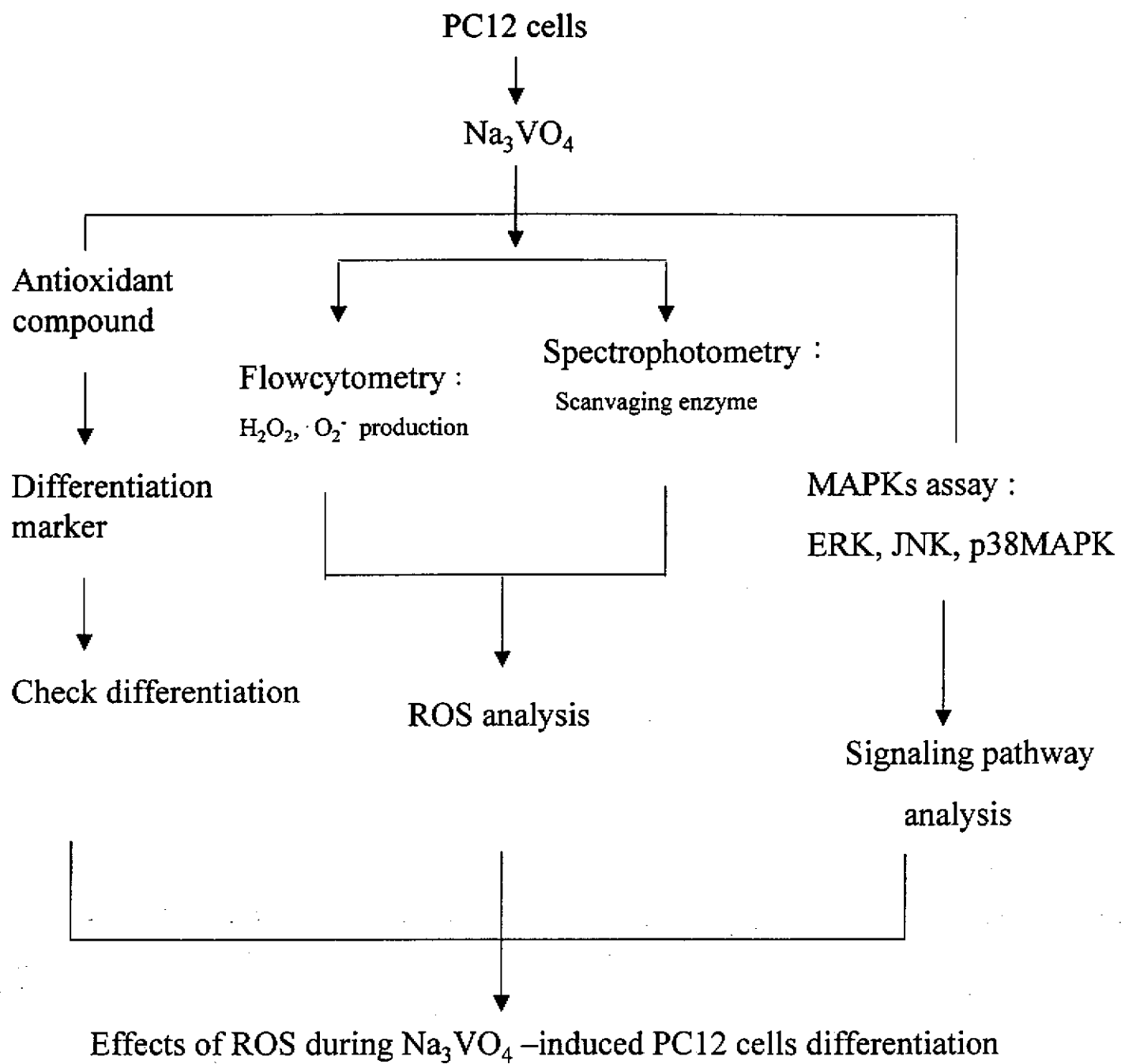
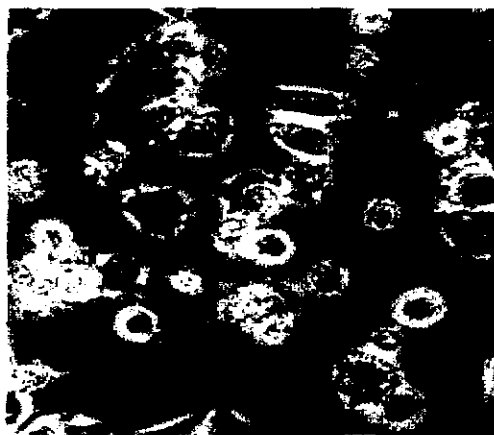


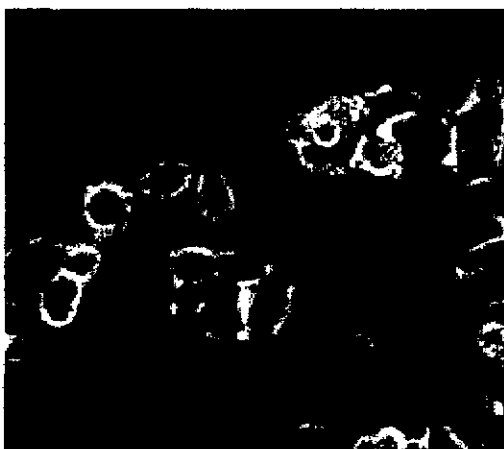
Figure 2. Flowchart of methodology



Control



Na₃VO₄, day 4



NGF, day 4



Na₃VO₄, day 6



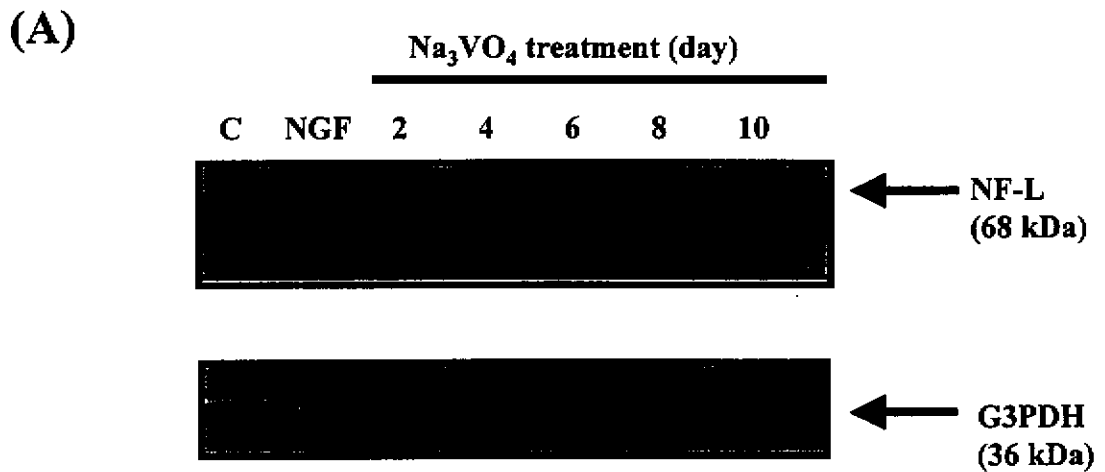
Na₃VO₄, day 2



Na₃VO₄, day 8

Figure 3. Induction of neurite extensions of PC12 cells treated with Na₃VO₄

After 24 hours serum starvation, PC12 cells were incubated with 15 μ M Na₃VO₄, and then photographed under phase contrast microscope.



(B)

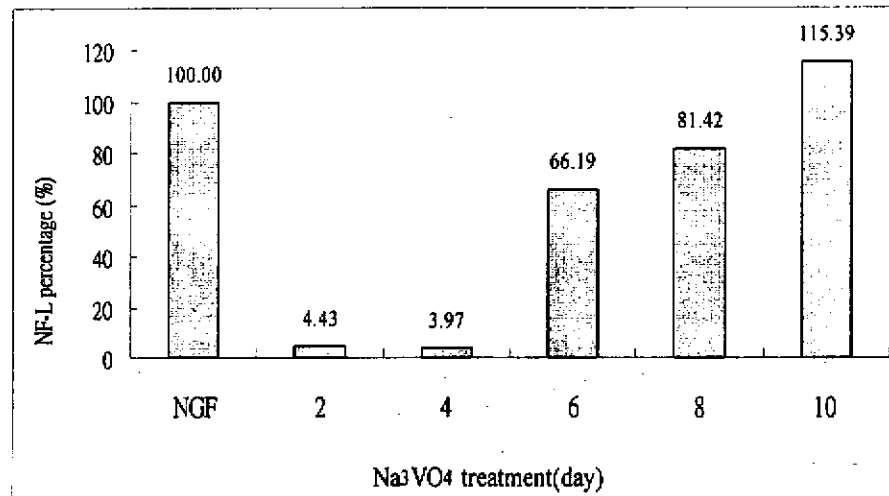


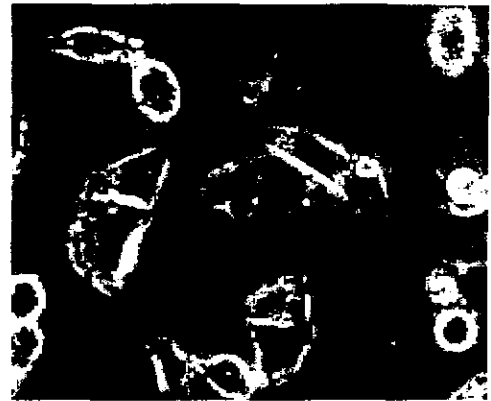
Figure 4. Expression of differentiation marker in Na_3VO_4 –induced PC12 differentiation

(A) PC12 cells were treated with $15\mu\text{M}$ Na_3VO_4 for the indicated period of days. Cell lysates were collected and estimated the expression of differentiation markers by western-blot using antibody against neurofilament-L (NF-L).

(B) Relative expression of NF-L were determined by densitometry (Bio-Rad, Gel Doc™2000, cat. NO 170-8100).



Control



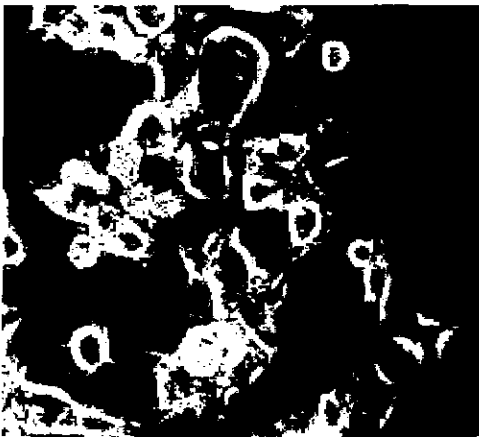
$\text{Na}_3\text{VO}_4 + 2 \text{ mM NAC}$



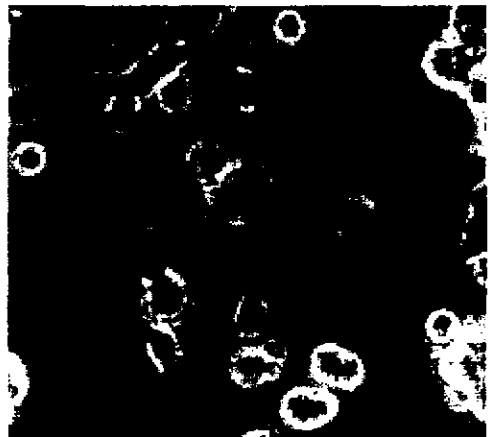
Na_3VO_4



$\text{Na}_3\text{VO}_4 + 4 \text{ mM NAC}$



$\text{Na}_3\text{VO}_4 + 1 \text{ mM NAC}$



$\text{Na}_3\text{VO}_4 + 8 \text{ mM NAC}$

Figure 5. Na_3VO_4 -induced PC12 differentiation was suppressed by NAC treatment (8 days)

After 24 hours serum starvation, PC12 cells were culture with or without various concentration of NAC for 4 hours. Subsequently, cells were cultured in presence of $15\mu\text{M Na}_3\text{VO}_4$ for another 8 days, and then photographed under phase contrast microscope.

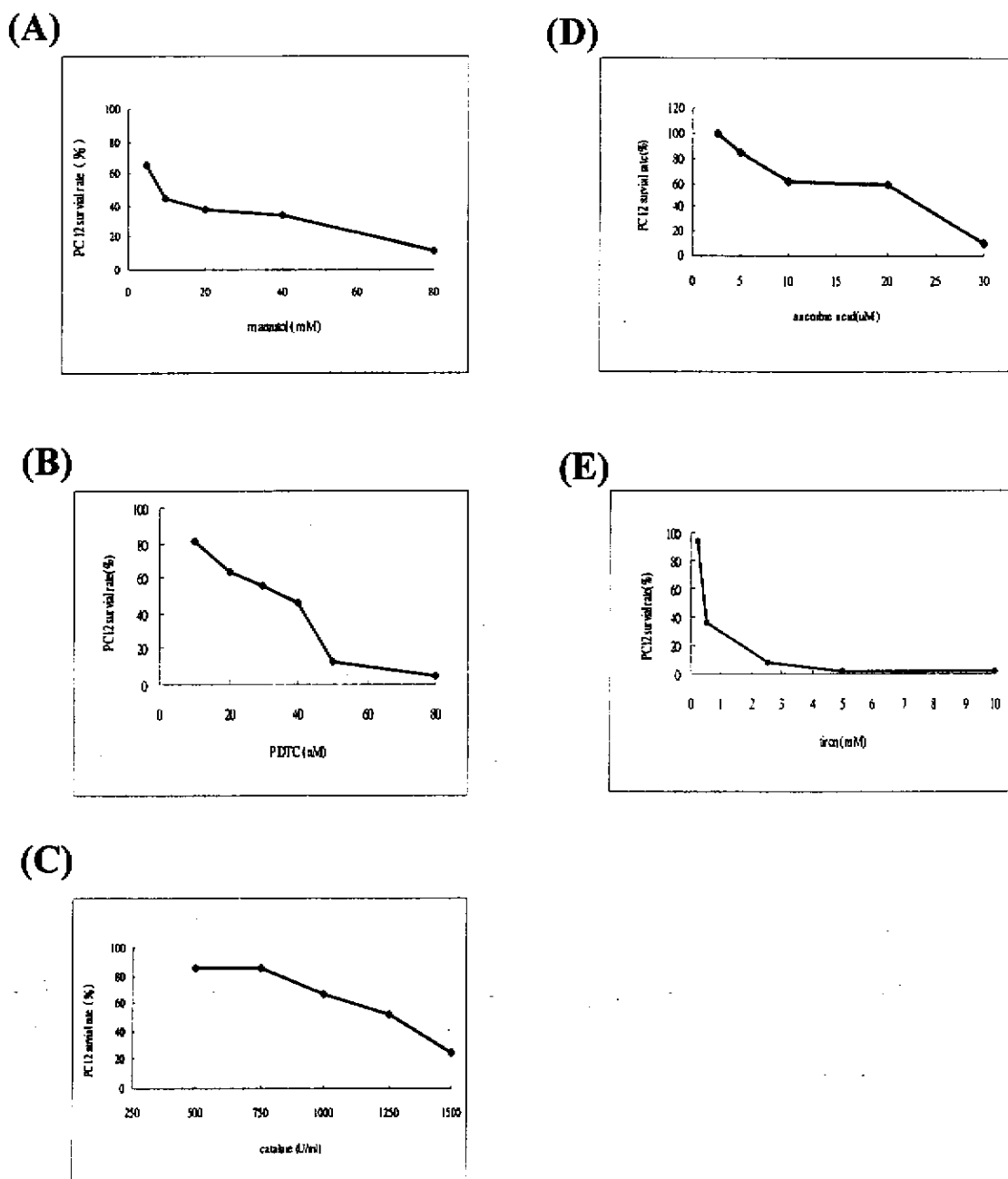
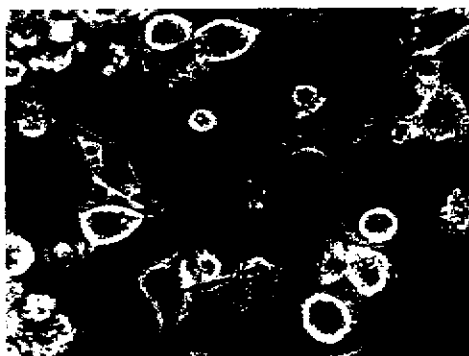


Figure 6. Relative survival rate of PC12 cells treated with antioxidant compounds and enzyme

After 24 hours serum starvation, PC12 cells were cultured with mannitol, PDTC, catalase, ascorbic acid or tiron for 8 days. Viabilities were measured by trypan-blue dye exclusion method including attached and suspended cell. Data were presented as percentage of viability in comparison to control cells. Each data represented the mean \pm S.D. of three independent experiment.



Na_3VO_4 + mannitol (10 mM)



Na_3VO_4 + ascorbic acid (5 μM)



Na_3VO_4 + PDTC(10 nM)



Na_3VO_4 + tiron (0.375 mM)



Na_3VO_4 + catalase (500U/ml)

Figure 7. The suppressive effects of antioxidant compounds or enzyme on PC12 differentiation (8 days) induced by Na_3VO_4

After 24 hours serum starvation, PC12 cells were cultured with PDTC, ascorbic acid, tiron or catalase for 4 hours. Subsequently, cells were cultured in presence of 15 μM Na_3VO_4 for another 8 days, and then photographed under phase contrast microscope.

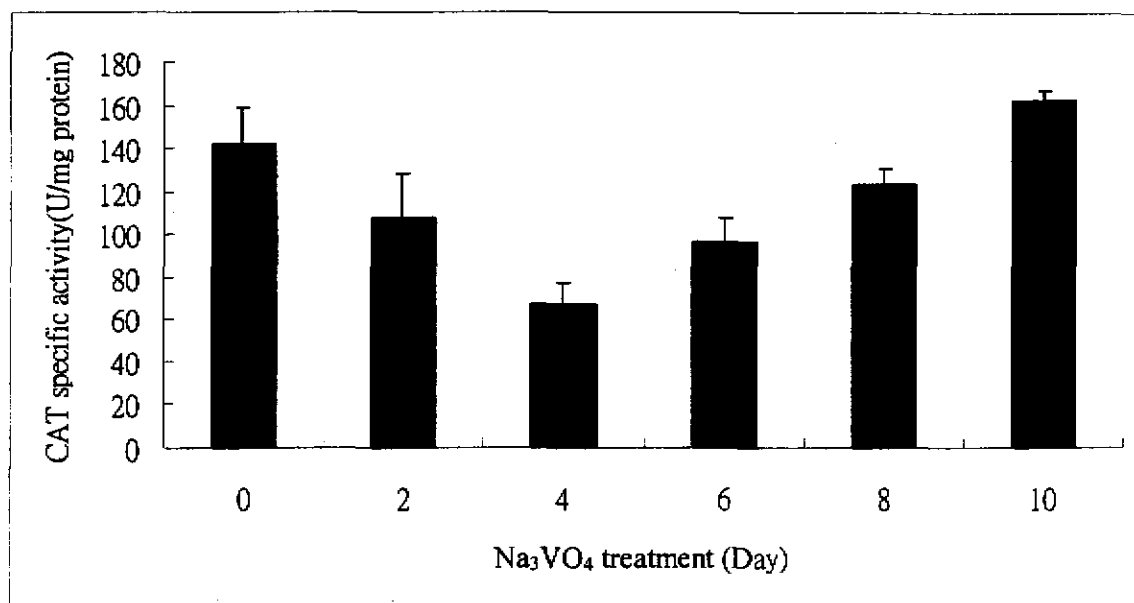


Figure 8. Analysis of catalase(CAT) activity during Na₃VO₄-induced PC12 differentiation.

PC12 cells were cultured with 15 μ M Na₃VO₄ for the indicated period of days. Cell lysates were collected on day 0 to day 10 to measure the activity of CAT. Specific activity of CAT was calculated as $\log(A_0/A_1) \times 14\text{mM} / 0.5 \text{ min/mg protein}$, where A_0 is the OD value of initiation and A_1 is the OD value of 0.5 min. The results were presented as mean \pm S.D in three independent experiments.

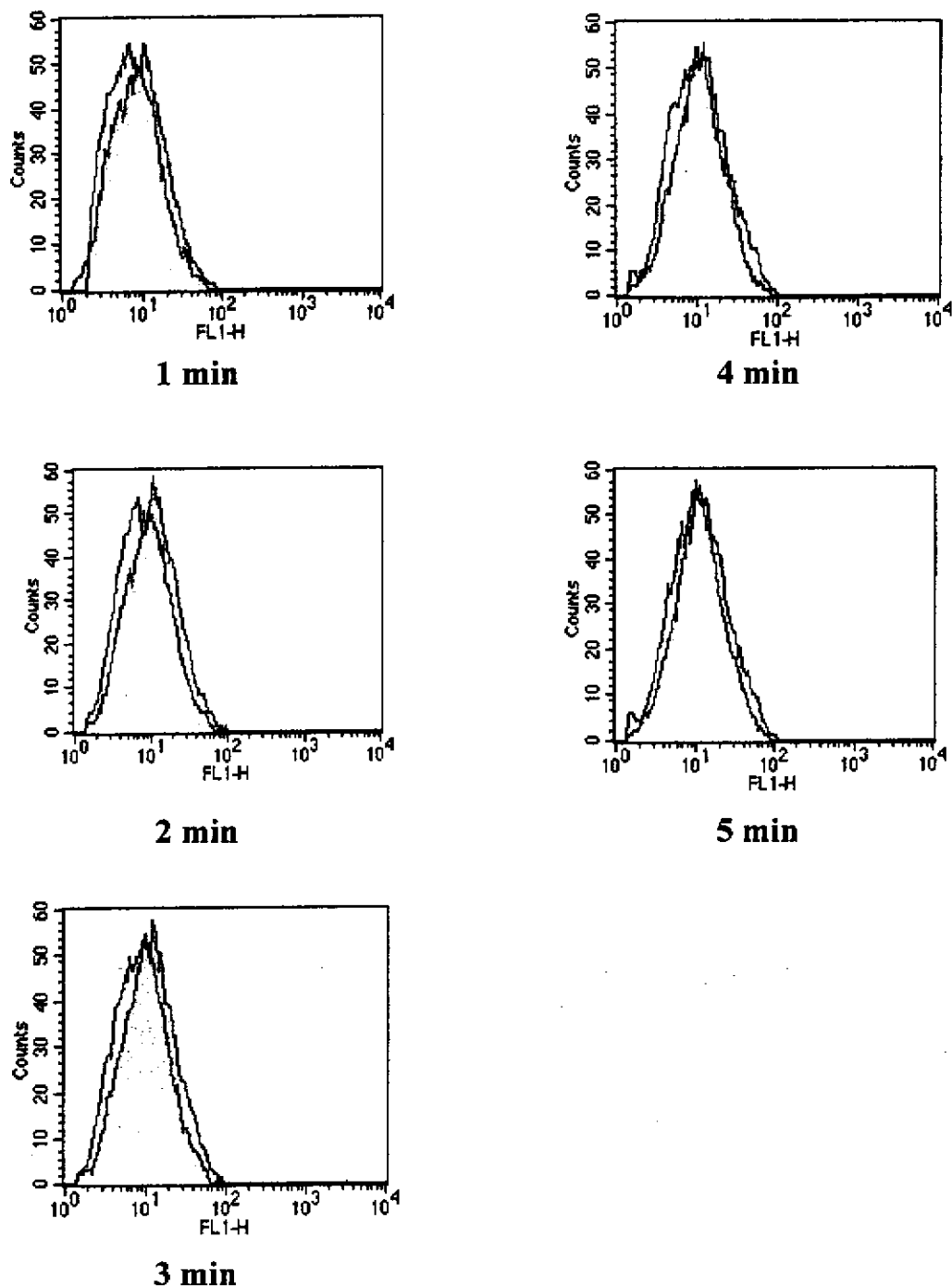


Figure 9. Time-course experiments of intracellular H_2O_2 production after Na_3VO_4 treatment

After overnight serum starvation, PC12 cells were collected and then pre-incubated with $10 \mu M$ DCFH-DA for 15 min before treatment with (gray peak) or without (white peak) $15 \mu M$ Na_3VO_4 for indicated time. Subsequently, cells were subjected to flow cytometric analysis.

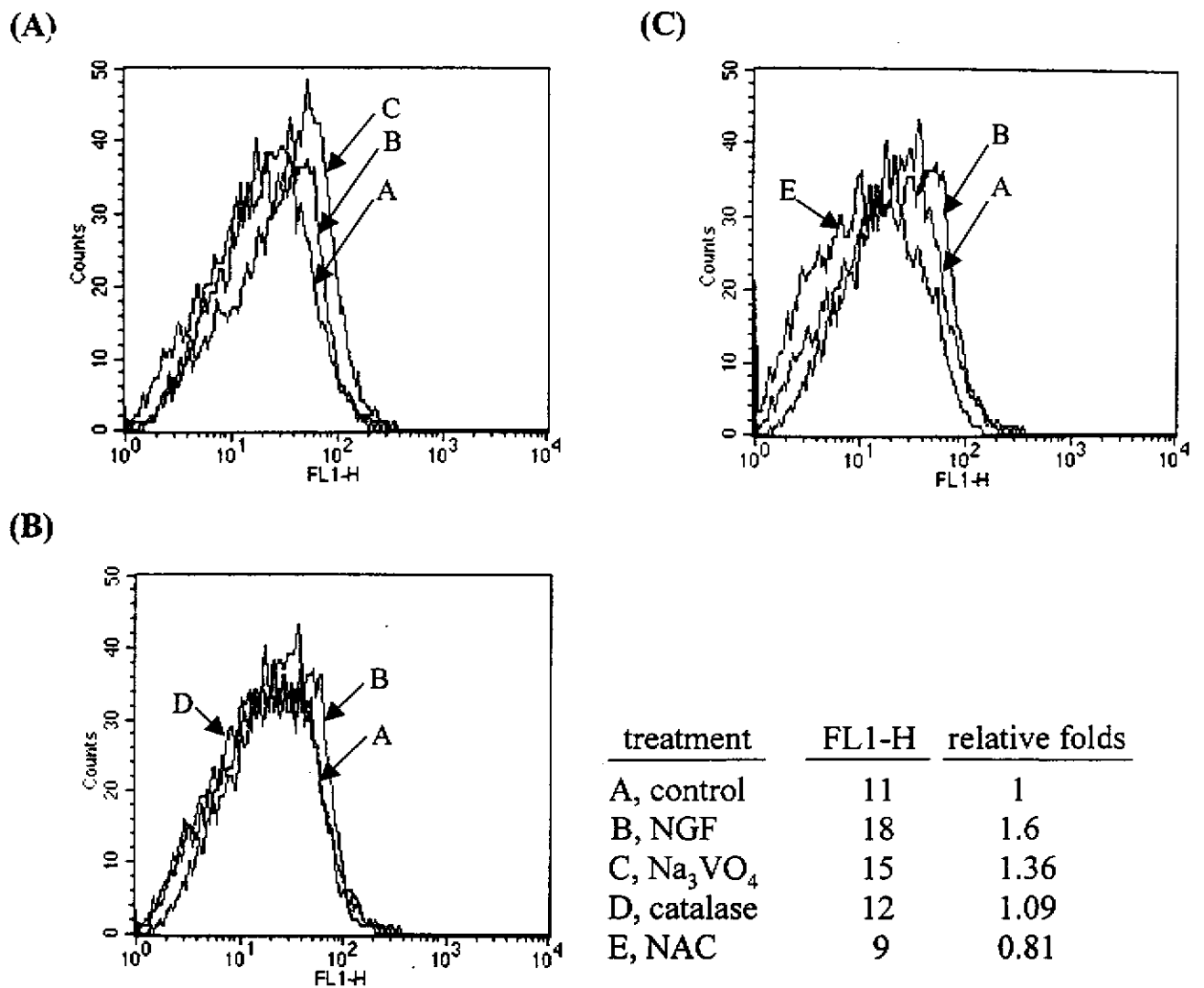


Figure 10. Suppression of Na₃VO₄-induced H₂O₂ production by antioxidant compound or antioxidant enzyme

After overnight serum starvation, PC12 cells were pre-treatment with 500 U/ml CAT (panel D) or 2 mM NAC (panel E) for 1 hour, and then incubated with 10 μM DCFH-DA for 15 min before treatment with (panel B) or without (panel A) 15 μM Na₃VO₄ or 100 ng/ml NGF(panel C) for 2 min. Subsequently, cells were subjected to flow cytometric analysis.

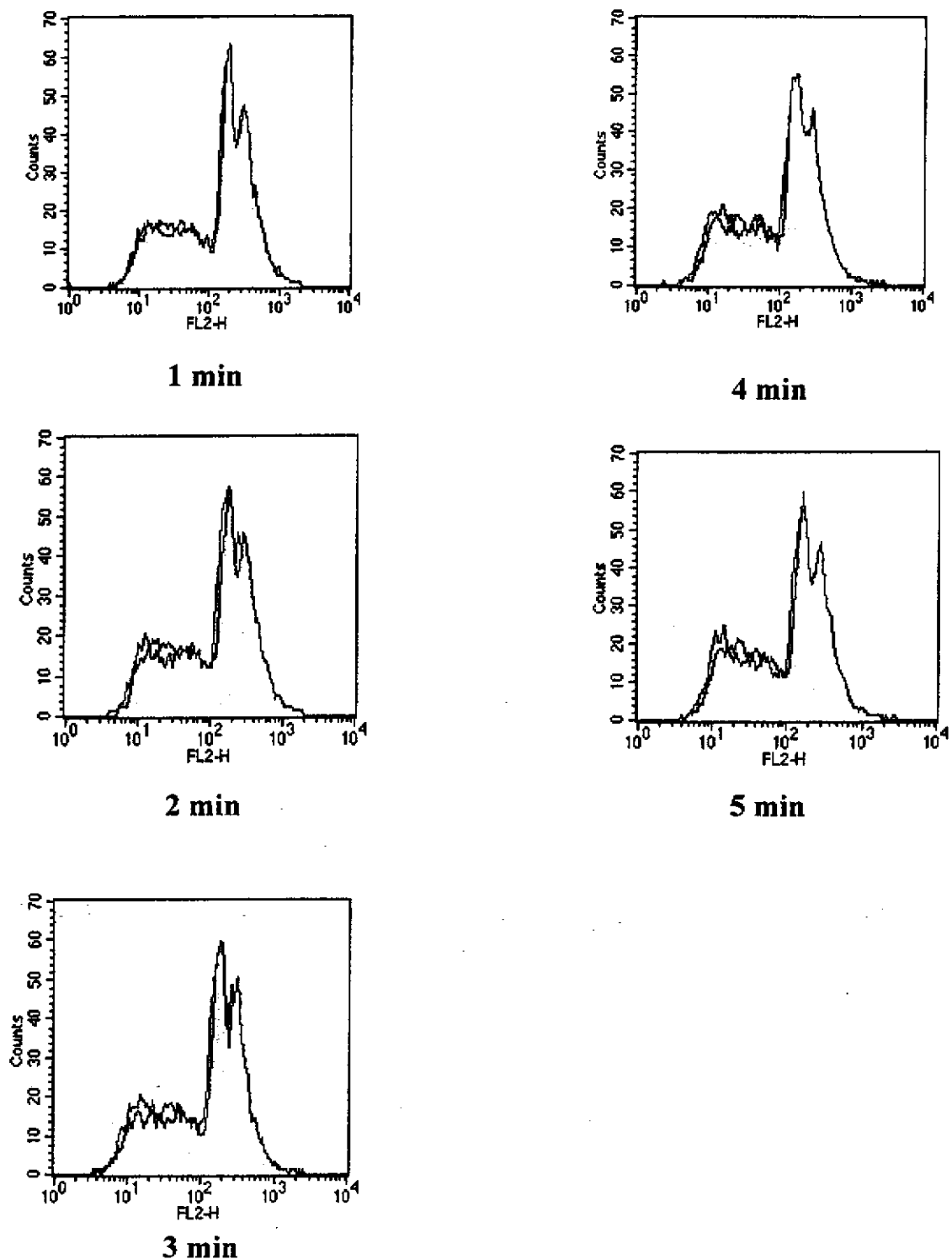


Figure 11. Time-course experiments of intracellular $\cdot\text{O}_2^-$ production after Na_3VO_4 treatment

After overnight serum starvation, PC12 cells were collected and then pre-incubated with $5 \mu\text{M}$ HET for 15 minutes before treatment with (gray peak) or without (white peak) $15 \mu\text{M}$ Na_3VO_4 for indicated time. Subsequently, cells were subjected to flowcytometric analysis.

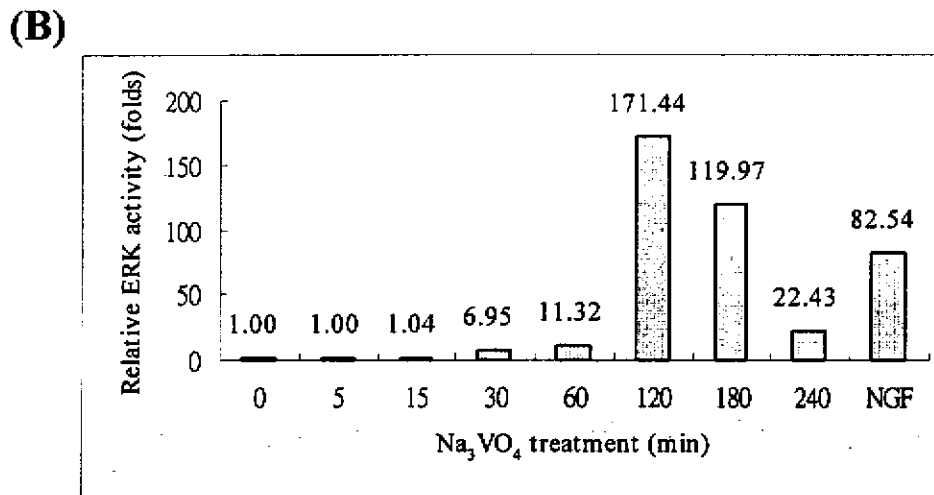
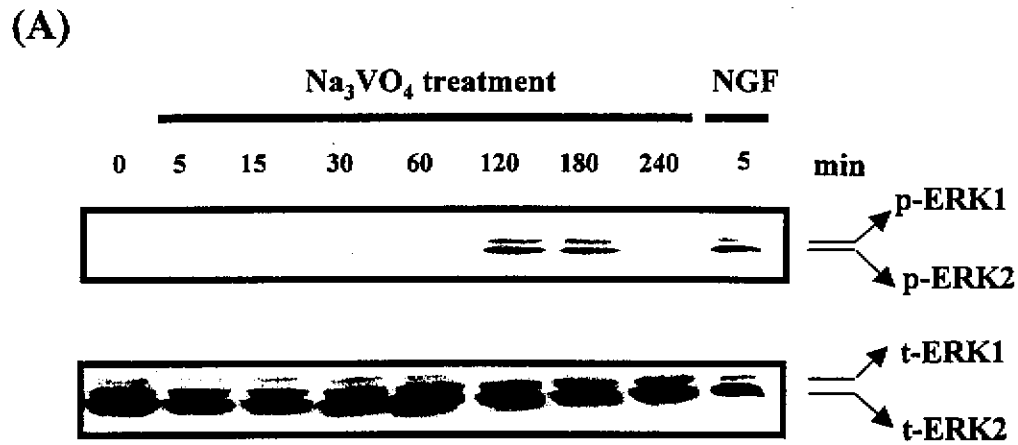
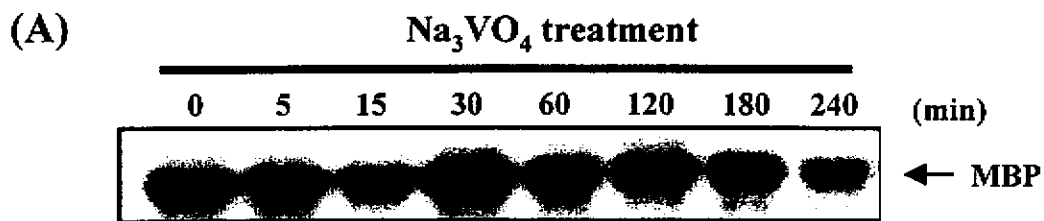


Figure 12. Activity profiles of ERK in Na_3VO_4 -induced PC12 differentiation

(A) PC12 cells were treated with $15 \mu\text{M}$ Na_3VO_4 and collected at the indicated time-points. The activities of ERK were examined by western-blot using antibody against dual-phospho-ERK1/2 (p-ERK1 and p-ERK2 indicated by arrow) or against ERK2 (t-ERK1 and t-ERK2 indicated by arrow). The positive control of PC12 cell was treated with 100 ng/ml NGF for 5 min.

(B) The relative intensities of the phospho-ERK bands shown in panel A were determined by densitometry (Bio-Rad, Gel DocTM2000, cat. No. 170-8100) and plotted relative to untreated cells (0, control). Each plot was normalized with total-ERK bands.



(B)

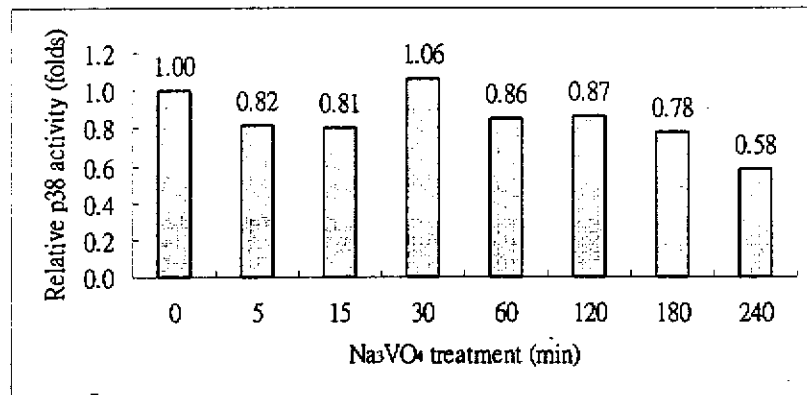


Figure 13. Activity profiles of p38MAPK in Na₃VO₄-induced PC12 differentiation

(A) PC12 cells were treated with 15 μM Na₃VO₄ and collected at the indicated time-points. The activities of p38MAPK were examined by kinase assay.

(B) The relative intensities of the phospho-p38 bands shown in panel A were determined by densitometry (Bio-Rad, Gel DocTM2000, cat. No. 170-8100) and plotted relative to untreated cells (0, control).

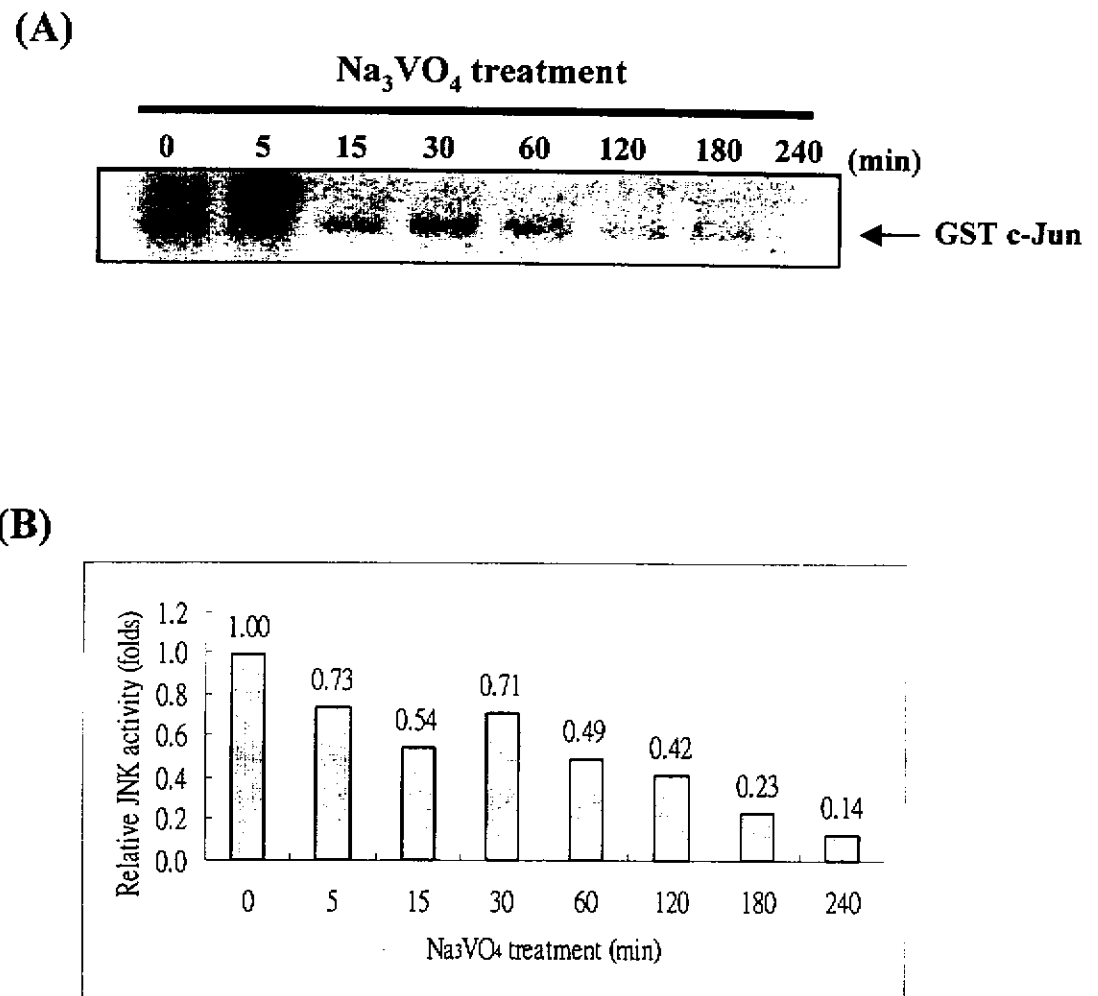


Figure 14. Activity profiles of JNK in Na₃VO₄-induced PC12 differentiation

(A) PC12 cells were treated with 15 μ M Na₃VO₄ and collected at the indicated time-points. The activities of JNK were examined by kinase assay.

(B) The relative intensities of the phospho-JNK bands shown in panel A were determined by densitometry (Bio-Rad, Gel Doc™2000, cat. No. 170-8100) and plotted relative to untreated cells (0, control).

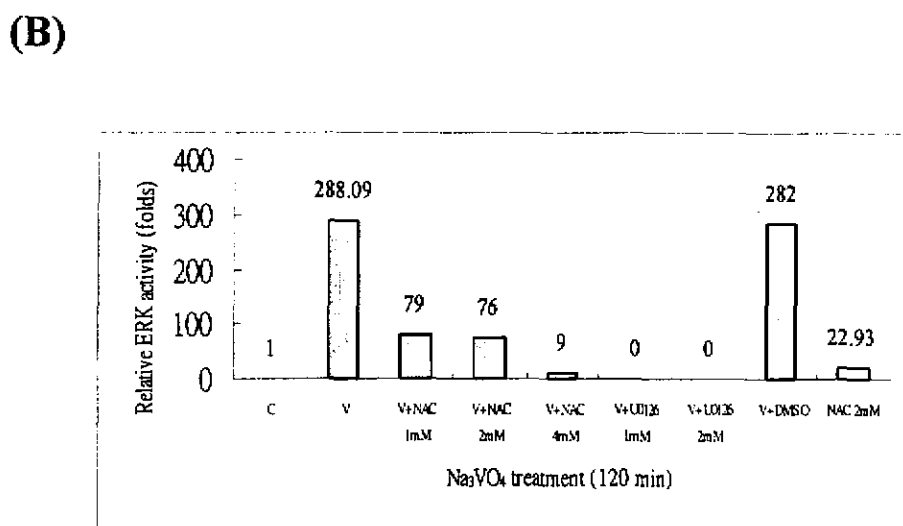
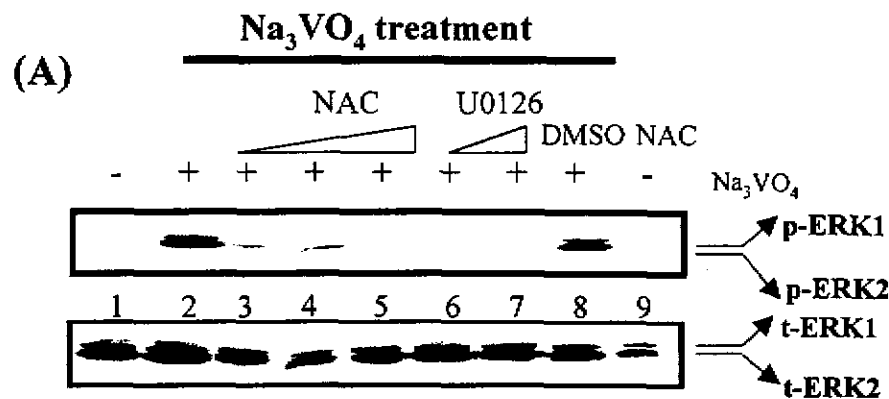


Figure 15. The Na₃VO₄-induced ERK activation was suppressed by NAC

(A) PC12 cells were incubated with various concentration of NAC (lane 3-5: 1, 2, 4mM, lane 9, 2mM, respectively) or UO126 (lane 6-7: 1, 2 μ M, respectively) for 30 min, and then cells were incubated with (lane 2-8) or without (lane 1, 9) Na₃VO₄ treatment for 120 min. The ERK activity was estimated by western-blot using antibody against dual-phospho-ERK1/2 (p-ERK1 and p-ERK2 indicated by arrow band, upper) or ERK1/2 (t-ERK1 and t-ERK2 indicated by arrow band, lower)

(B) Relative expression of ERK were determined by densitometry (Bio-Rad, Gel DocTM2000, cat. NO 170-8100).