

臺北醫學大學醫學科學研究所醫學檢驗暨生物技術組碩士論文

Taipei Medical University
Graduate Institute of Medical Science for School of Medical
Laboratory Science and Biotechnology
Master Thesis

Mitochondrial ER β mediated cytoprotection in the endometriotic cell

粒線體雌激素受體 β 調控子宮內膜細胞的細胞保護作用

研究生：王宜珮(Yi-Pei Wang)

指導教授：高淑慧 博士(Shu - Huei Kao, Ph.D.)

中華民國九十七年六月

June, 2008

致謝

論文口試完成後，覺得一切輕飄飄的，似乎是完成了一件不可能的任務。在醫技所學習的這兩年，由衷感謝高淑慧老師無時無刻的關心和鼓勵，使我在實驗上遇到挫折時還能夠再接再勵，甚至奇蹟似的完成了論文。同時非常感謝魏耀揮老師、曾啟瑞院長、趙湘台主任，謝榮鴻老師撥冗給予論文的指正，使我受益良多，今後才能繼續在研究的道路上精益求精。

能完成碩士學業要感謝的人很多，謝謝高家學姊們，不管你們在哪裡，希望大家平安快樂，還有安安、怡娟、顛珊、明芳、子瑜、珉君及項詒，你們是上天的恩賜！小朱學長、文瀚學長及我最親愛的夥伴怡蓉，我們一起培養了被老師追著要 data 跟論文的那種革命情感，謝謝你們的鼓勵，我才能夠有驚無險的過關。還有感謝醫技組的所有同學們，阿達、乃琦，家慧，我的好鄰居小花學姊、梅真學姊、淑瑀學姊和許多學長姐們的關心和打氣，還有感謝邱奕華小姐、郁慧、宇捷在實驗上給予的幫助。衷心感謝大家的幫忙，才有今天這本論文的誕生。

最後，感謝我的家人，爸爸不辭勞苦送我上下學，媽媽的愛心便當，弟弟招待的電影票，以及男友的專屬電腦維修服務，謝謝你們讓我無後顧之憂完成學業，謹將此論文獻給你們，致上我深深的感謝。今後我會好好利用這兩年學習到的獨立思考及解決問題的能力，期許自己能讓你們以我為榮。

宜珮 2008.07

目錄

目錄.....	I
表目錄.....	III
圖目錄.....	IV
中文摘要.....	1
Abstract.....	3
第一章 文獻回顧.....	7
一、子宮內膜異位症(Endometriosis).....	8
1.簡介.....	8
2.機轉.....	8
3.子宮內膜異位與荷爾蒙的關係.....	10
二、雌激素受體(Estrogen Receptor).....	10
三、粒線體在細胞中所扮演的角色.....	12
1.粒線體的功能與構造.....	12
2.粒線體 DNA(mtDNA).....	13
四、活性氧分子(Reactive oxygen species, ROS).....	14
第二章 實驗方法.....	18
藥品試劑.....	19
一、檢體收集 (Tissue collection).....	21
二、人類子宮內膜細胞(human endometriotic cell)培養.....	21
三、細胞蛋白質製備(Preparation of cell lysate).....	21
四、粒線體的分離 (Mitochondrial fraction).....	22
五、粒線體 DNA 免疫沉澱法(MitoDNAIP).....	22
六、蛋白質定量法(Protein assay).....	23
七、西方墨點法(Western blotting).....	24
1.SDS-PAGE gel preparation.....	24
2.電泳(electrophoresis).....	24
3.轉印(transfer).....	25
4.Immunoblot.....	25
八、Scratch wound assay.....	25
九、細胞存活率(Cell viability).....	26
十、ATP 含量測定.....	26
十一、以 Lowry 方法測定蛋白質含量.....	27
十二、測定粒線體 DNA 拷貝數(mtDNA copy number).....	27
1.DNA 的抽取與純化.....	27
2.寡核酸引子(oligonucleotide primer)合成.....	28
3.聚合酵素鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR).....	28
4. Real-time Quantitative PCR.....	29
5.電泳(electrophoresis).....	29

十三、流式細胞儀(Flow cytometry)分析.....	29
1.細胞處理.....	29
2.粒線體數量(mitochondrial mass)偵測.....	30
3.細胞凋亡(apoptosis)測定.....	30
4.活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)的測量.....	31
5.粒線體膜電位分析.....	31
十四、雷射共軛焦顯微鏡.....	32
1.雷射共軛顯微鏡(confocal microscopy).....	32
2.Transfection.....	32
3.螢光染劑及細胞免疫螢光染色.....	33
十五、統計分析.....	34
第三章 實驗結果與分析.....	35
一、子宮內膜異位症及子宮肌腺症異位處的內膜細胞有大量粒線體 ER β 的表現.....	36
二、DPN 對子宮內膜異位細胞(Hec-1A)的移行作用.....	36
三、Hec-1A 細胞中 DPN 會促使粒線體 ER β 的表現量增加.....	36
四、DPN 降低 oligomycin 或 CCCP 所造成的細胞傷害.....	37
五、DPN 保護細胞抵抗 oligomycin 或 CCCP 所引起的細胞凋亡.....	37
六、DPN 可減少 oligomycin 或 CCCP 所誘發的活性氧自由基(ROS)增加.....	38
七、DPN 對 oligomycin 或是 CCCP 造成粒線體膜電位降低的影響.....	39
八、DPN 增進經由 oligomycin 或是 CCCP 刺激細胞內粒線體的 ATP 形成能力.....	39
九、DPN、oligomycin、CCCP 對粒線體質量(mitochondrial mass)及粒線體融合(fusion)與分裂(fission)的影響.....	39
十、子宮內膜異位症及子宮肌腺症異位處內膜細胞與 Hec-1A 細胞的粒線體 DNA copy number 大量增生.....	41
十一、子宮內膜異位症、子宮肌腺症異位處的內膜細胞與 Hec-1A 細胞粒線體 ER β 與粒線體 DNA 的交互作用.....	41
第四章 討論.....	43
第五章 參考文獻.....	49

表目錄

Table 1 Oligonucleotides used in the study.....60



圖目錄

Fig. 1 Membrane structure and intra-organellar organization of mitochondrion.....	62
Fig. 2 Histogram of human mitochondrial DNA.....	63
Fig. 3 Structure of the human ER β protein and functional domains.....	64
Fig. 4 The chemical structure of diarylpropionitrile (DPN).	65
Fig. 5 Flow chart of experiment	66
Fig. 6 Persence of mitochondrial ER β was demonstrated in the endometiotic tissues.....	67
Fig. 7 Effect of estradiol (E ₂) and DPN (ER β agonist) on cell migration.	68
Fig. 8 Translocation of ER β into mitochondria by DPN treatment.	69
Fig. 9 Confocal images of ER β localization followed DPN treatment.	72
Fig. 10 Rescue of the Hec-1A cells from oligomycin or CCCP-induced cell death.....	73
Fig. 11 Apoptosis assay by flow cytometry after treatment of the cells with DPN, oligomycin, or CCCP.	74
Fig. 12 Effect of DPN, oligomycin, and CCCP on ROS generation.....	75
Fig. 13 Effect of DPN, oligomycin, and CCCP on mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$).	76
Fig. 14 DPN attenuated the ATP depletion by Oligomycin or CCCP treatment.....	77
Fig. 15 Differential effects of DPN, oligomycin, and CCCP on mitochondrial mass.	78
Fig. 16 Confocal images of mitochondrial morphology in the Hec-1A cells treated with DPN, oligomycin, or CCCP.....	79
Fig. 17 Determination of mitochondrial DNA (mtDNA) copy number in human endometiotic tissues by real-time PCR.	80
Fig. 18 Alteration of mtDNA copy numbers in the DPN, oligomycin, CCCP treatment. .	81
Fig. 19 Differential mitochondrial mRNA levels in the DPN, Oligomycin, CCCP-treated Hec-1A cells.	82
Fig. 20 Physical interaction of mitochondrial ER β with mtDNA.....	83
Fig. 21 Physical interaction of mitochondrial ER β with mtDNA in Hec-1A cell.....	84
Fig. 22 The putative role of ER β on mitochondrial transcription and cell survival/cell apoptosis.....	85

中文摘要

子宮內膜異位症是女性常見的疾病，並已被證實是女性不孕有關。迄今，子宮內膜異位症被認為是一種因為荷爾蒙不平衡所引起的疾病，但其真正的致病機制仍未知。子宮內膜異位生長被證實需要高量的雌激素。雌激素被證實可以刺激粒線體呼吸鏈蛋白質的增加，並且影響粒線體 DNA 的生合成。我們推測粒線體 ER β 可以維護並調節粒線體功能，供應子宮內膜異位生長所需，進而增進細胞的存活。在本研究中，我們發現子宮內膜異位症及子宮腺肌症異位處的內膜細胞中，粒線體 ER β 含量比正常的子宮內膜組織多出約 2.5 倍，同時於病灶組織發現粒線體 DNA 拷貝數(mitochondrial DNA copy number)增加為對照組的 3 倍。進而推測粒線體雌激素受體 β 對子宮內膜細胞(Hec-1A)有細胞保護的作用。我們以 diarylpropionitrile (DPN，一種雌激素 ER β agonist)處理子宮內膜細胞，發現 DPN 可以保護並減緩細胞受粒線體 ATP synthase 抑制劑 oligomycin 或粒線體去偶合劑(uncoupler, carbonyl cyanide m-chlorophylhydrazone, CCCP)刺激後所引發的粒線體功能受損及細胞凋亡，都可將細胞存活率恢復至 50%。我們發現 DPN 可以減緩 oligomycin 或 CCCP 所造成的氧化性傷害(oxidative damages)及 ATP 減量，並維持粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)。我們進一步觀察利用共軛焦螢光顯微鏡觀察到 DPN 會使 ER β 轉位至粒線體並且造成粒線體型態的改變，使細胞呈現大型網狀粒線體分佈，並且可減緩由 oligomycin 引發的粒線體 fragmentation。而 DPN 的添加處理可增加 1.3 倍的粒線體 DNA 拷貝數和

mRNA 的轉譯效能。此外，我們進一步以粒線體基因免疫沉澱技術(mtDNA immunoprecipitation assay)檢測 ER β 是否與粒線體基因結合，結果顯示 ER β 與粒線體基因 D-loop 可產生結合，在子宮內膜異位症患者組織中 ER β 與粒線體基因 D-loop 區域的結合量是對照組的 2.6 倍；在體外內膜細胞中發現 ER β -D-loop 的結合量於 DPN 添加後則增加為對照組的 1.3 倍。因此我們推測粒線體 ER β 可能經由結合到粒線體 DNA 的 D-loop 區域進而調控粒線體生合成並提升粒線體功能，進而幫助細胞對抗細胞凋亡。藉由釐清粒線體 ER β 在子宮內膜異位症所扮演的角色，希望可作為治療子宮內膜異位症的藥物治療的理論基礎，也可作為未來發展以粒線體 ER- β 為主要治療標的新子宮內膜異位治療方式之參考。

關鍵字：子宮內膜異位症、雌激素受體 β 、粒線體

Abstract

Endometriosis is a common disorder presented with infertility, and often affects young women in the childbearing age. However, the precise etiology of endometriosis remains elusive. It is generally considered secondary to the hormonal imbalance. Recently, mitochondrial estrogen receptor (mtER β) was found in several tissues and the putative function is suggested to enhance respiratory chain function of mitochondria. We hypothesize that mtER β promotes the endometriotic cell survival by enhancing mitochondrial respiration capacity and changing its susceptibility to apoptosis. In this study, we found that the proportion of ER β inside mitochondria and the mtDNA copy number were 2.5 times and 3 times increased in the endometriotic tissues. Diarylpropionitrile (DPN, an mtER β agonist) could attenuate the oligomycin (inhibitor of ATP synthase) or mitochondrial uncoupler (carbonyl cyanide *m*-chorophylhydrazone, CCCP)-induced mitochondrial dysfunction and cell death in the endometriotic cells. The cell viability was maintained to 50% in the cells co-treated DPN and oligomycin or CCCP. MtER β was found to regulate mitochondrial morphology (fusion and fission). The predominantly large tubular form was observed in the DPN supplemented cells. It was also demonstrated to attenuate the proportion of fragmented mitochondria followed oligomycin treatment. DPN at 10 nM could reduce the generation of

reactive oxygen species (ROS) and ATP depletion in the oligomycin-treated Hec-1A cells, maintain mitochondrial membrane potential, regulate mitochondrial biogenesis, increase 1.3 times mtDNA copy number and mRNA transcripts, and decrease cell apoptosis. MtER β -mediated maintenance of mitochondrial function was suggested to attenuate cell apoptosis induced by proapoptotic stimuli. Furthermore, the interaction of mtER β and mtDNA was found to be augmented in the endometriotic tissue. The mitochondrial DNA immunoprecipitation (mtDNAIP)-PCR method was performed to examine the mtER β and mtDNA interaction. There were 2.6 times or 1.3 times increase augmented interaction found in the endometriotic tissue from the patients with adenomyosis or endometriotic cells with treatment of DPN, respectively. The results will unravel the causal role of mtER β in the regulation of endometriotic cell growth, which may promote the development of mtER β directed therapies for patients with endometriosis.

Key words : endometriosis 、 estrogen receptor β (ER β) 、 mitochondria

研究目的

子宮內膜異位症(endometriosis)是一種與雌激素相關的女性常見疾病，許多患者從年輕時便開始有嚴重經痛之症狀，還有很多人因而造成不孕(van der Linden, 1996)。目前被廣泛認為是月經週期中產生的經血逆流現象所引起(Ishimaru & Masuzaki, 1991)，有可能導致脫落的子宮內膜細胞隨著逆流的經血異位至子宮以外的其他地方，如卵巢、輸卵管、腹腔、肺臟等，而這些散佈於其他位置的子宮內膜異位細胞也具有生理週期(Starzinski-Powitz *et al*, 1998)。有文獻指出子宮內膜異位症是經由荷爾蒙不平衡所引起，子宮內膜異位細胞的生長被證實需要高量的雌激素，雌激素可以刺激子宮上皮細胞及子宮內膜異位處細胞的增生與分化(Acconcia *et al*, 2006)。而子宮內膜異位症患者病灶處具有較高的雌激素濃度，所以我們推測雌激素可能與子宮內膜異位疾病的形成有關。

雌激素具有調控細胞的發育，生長、移行、存活的能力，並且藉由雌激素受體(estrogen receptor, ER)活化來發揮其功能(Pearce & Jordan, 2004)。雌激素受體目前有雌激素受體 α (ER α)及雌激素受體 β (ER β)兩種型態，主要被認為存在細胞質中，接受雌激素刺激後會轉位進入細胞核中，調控基因的轉錄進而使細胞增殖和激素分泌(Pavao & Traish, 2001; Wada-Hiraike *et al*, 2006)，另外在細胞膜上及粒線體中也有發現 ER 的存在(Levin, 2005)。同時在粒線體本身的基因上發現類似 estrogen responsive element (ERE)的 DNA 序列(Chen *et al*, 2004b)。雌激素也被證實可以調節粒線體功能，增加呼吸傳遞鏈的活性並減少細胞凋亡(Chen *et*

al, 2003)。子宮內膜含有雌激素受體，參與雌激素代謝與調節子宮內膜生長。雌激素與雌激素受體結合之後，會活化細胞生長基因的轉錄。

研究顯示，異位處子宮內膜細胞雌激素受體的表現與正常的內膜細胞不同 (Mosselman *et al*, 1996)。Matsuzaki 等人證明雌激素受體 α 對於子宮內膜異位的生長是必需的 (Matsuzaki *et al*, 2001)。Fujimoto 等人指出子宮內膜異位處細胞雌激素受體 β 的 mRNA 比正常的內膜細胞高；而子宮內膜異位處細胞雌激素受體 α 的 mRNA 比正常內膜細胞為低 (Fujimoto *et al*, 1999)。進一步的研究顯示，異位處內膜細胞雌激素受體 β 的 mRNA 與蛋白表現皆較雌激素受體 α 高 (Matsuzaki *et al*, 2001; Matsuzaki *et al*, 2000)。同時粒線體中的雌激素受體 β 可能是雌激素作用的一個重要訊息傳遞的媒介，可調控粒線體的功能 (Demonacos *et al*, 1996; Psarra *et al*, 2006)，所以我們認為粒線體內的雌激素受體 β 與子宮內膜異位形成有關。

在本實驗中，我們分析子宮內膜異位症及子宮肌腺症 (adenomyosis) 異位處的子宮內膜細胞，另外並使用子宮內膜異位細胞 Hec-1A 細胞，作為本實驗的細胞模式，藉此觀察粒線體 ER β 的分子機制。

第一章 文獻回顧



一、子宮內膜異位症(Endometriosis)

1. 簡介

子宮內膜異位症(endometriosis)是女性常見的疾病之一，其特徵為子宮內膜組織異位生長於子宮腔以外及子宮肌肉層(myometrium)的地方，例如輸卵管、卵巢及腹腔壁，常引起婦女腹痛，經痛及不孕(Farquhar, 2002; Matarese *et al*, 2003)。生殖年齡的婦女大約有 10-15%患有子宮內膜異位症(Ryan & Taylor, 1997)，而不孕症患者約有 30-50 %伴隨有子宮內膜異位症。此疾病除了造成婦女的不適並且常引發不孕症，因此對於子宮內膜異位症的形成機制的研究可增加其治療方針。子宮內膜異位症常見的症狀是經痛(dysmenorrhea)，其次為不孕症(Infertility)、性交疼痛(dyspareunia)、下腹及下背痛。子宮內膜異位症可發生在身體任何器官(Markham *et al*, 1987)，疾病若發生在肺部，月經週期時會有咳血或是氣胸的現象(Rachagan *et al*, 1996)，若發生在泌尿道則會有血尿或是輸尿管阻塞(Hyler *et al*, 1994)，發生在胃腸道時會有血便、腸阻塞等現象(Scarmato *et al*, 2000)。臨床研究指出，子宮內膜異位症主要發生在生育年齡的婦女，而青春前期及停經後女性較少子宮內膜異位症的發生(Thomas & Prentice, 1992)。

2. 機轉

造成子宮內膜異位的原因機轉並不清楚，目前有幾種假設，一、主要是子宮內膜組織細胞不正常的移行至子宮腔以外的地方生長，包括卵巢、輸卵管及腹腔。大部分是以 1927 年 Sampson 植入學說(Implantation theory)為主，他認為子宮內膜細胞和碎片會經由逆流的經血，而跑到子宮以外的地方生長，例如：腹

膜腔 (peritoneal cavity)，異位的子宮內膜細胞會貼附到腹腔壁，增生後形成子宮內膜異位的損傷(Zhang *et al*, 2006)。目前，已經有文獻指出子宮內膜細胞和碎片經由逆流的經血容易貼附 (adhesion)、侵入 (invasion) 於一些組織中。二、是與化生(Coelomic metaplasia theory)相關的假說，有一些子宮內膜異位的病患，因為對性荷爾蒙有依賴性，而導致腹膜細胞經由內分泌或發炎反應的刺激，而化生成為 Müllerian-type epithelium(Koninckx *et al*, 1999)，在 2001 及 2003 年也有學者提出子宮內膜異位和自體免疫或是自然的免疫失能有關，可能是子宮內膜細胞異位至腹膜腔後，產生發炎反應，經由樹突細胞 (dendritic cells, DCs) 呈現而產生自體抗體 (autoantibodies)，而毒殺細胞(nature killer cells, NK cells) 也會降低毒殺異位的子宮內膜細胞(Matarese *et al*, 2003)，最後形成了自體免疫。

三、直接擴張學說(Direct extension theory)：子宮內膜細胞由子宮腔內直接穿透進入子宮肌層生長，稱為子宮肌瘤 (Myoma)，而子宮內膜細胞直接侵入子宮肌肉層，局部、擴張或是集中於某一區域的都稱為子宮腺肌症 (adenomyosis)(Dueholm & Lundorf, 2007)，有的子宮內膜細胞甚至會擴張侵入膀胱、輸尿管、尿道或腸子。四、淋巴管和血管轉移學說(Lymphatic and vascular metastasis theory)：子宮內膜組織經由淋巴液和血液，轉移至遠方的器官(Van Schil *et al*, 1996)。五、也有可能是因開刀或生產而形成子宮內膜異位症 (Mechanical transplantation theory)(Metzger *et al*, 1991)。有學者認為是由以上機轉所共同形成，非單一學說可完整解釋此疾病。以上以植入學說較被接受且有動物實驗證明。月經週期中剝落的子宮內膜與經血由陰道排出體外，但亦有部分

子宮內膜之經血逆流至腹腔。雖然大部分婦女有經血逆流至腹腔的現象(Halme *et al*, 1984)，但只有 10-15%婦女患有子宮內膜異位症(Liu & Hitchcock, 1986)，這表示大部分逆流至腹腔之子宮內膜組織被 macrophage 消除而未存活，但少部分婦女腹腔中的環境反而使得逆流的內膜組織得以存活，因而發展成子宮內膜異位症。

3. 子宮內膜異位與荷爾蒙的關係

子宮內膜異位組織的生長被認為與雌激素(estrogen)的存在有密切關係，可稱為是一個“estrogen-dependent”的病症，雌激素可刺激子宮內膜異位組織的生長。相對地，抑制雌激素的產生，會造成異位組織的萎縮。雌激素對子宮內膜生長的具多方面影響，它可以刺激子宮內膜表皮細胞及間質細胞的增生外，也可能影響到血管增加及免疫細胞的反應(Kayisli *et al*, 2004a; Kayisli *et al*, 2004b)。此外，異位處子宮內膜細胞中雌激素受體的表現比正常的內膜細胞高(Mosselman *et al*, 1996)。Matsuzaki 等人證明雌激素受體 α 對於子宮內膜異位的生長是必需的(Matsuzaki *et al*, 2001)。Fujimoto 等人指出子宮內膜異位處細胞雌激素受體 β 的 mRNA 比正常的內膜細胞高；而子宮內膜異位處細胞雌激素受體 α 的 mRNA 比正常內膜細胞為低(Fujimoto *et al*, 1999)。進一步的研究顯示，異位處內膜細胞雌激素受體 β 的 mRNA 與蛋白表現皆較雌激素受體 α 高(Matsuzaki *et al*, 2001)。

二、雌激素受體(Estrogen Receptor)

目前人類發現有兩種雌激素受體的存在，estrogen receptor alpha (ER α) 以及

estrogen receptor beta (ER β)。ER α 由 595 個胺基酸所組成，其蛋白質分子量為 66 kD(Green *et al*, 1986)。1996 年，Mosselman 從人類週邊白血球細胞 (human peripheral blood leukocytes) 發現了 ER β ，ER β 由 530 個胺基酸組成，其蛋白質分子量為 59 kD(Mosselman *et al*, 1996)。ER α 和 ER β 都屬於細胞核受體 (nuclear receptor) 的一員，大多認為可經由 Estrogen 對 ER 結合與活化來調控細胞的發育、生長、移行與增生(Pearce & Jordan, 2004)，未活化態的 ER 主要位在細胞核中與 heat-shock proteins 結合。當與 estrogen 結合之後，活化的 ER 會形成 ER 雙體(homodimer)，並與含有 estrogen responsive element (ERE)序列的基因結合，並調控下游基因的轉錄活性(Chen *et al*, 2004a)。研究顯示，ER α 與 ER β 在不同組織或不同細胞中可協同或是分別調控下游基因轉錄活動，利用不同的路徑影響細胞的生物活性及生理功能(Zhao *et al*, 2008)。

在人體內有 ER 表現的地方包括有骨 (bone)、免疫系統 (immune system)、循環系統 (cardiovascular system)、泌尿系統 (urogenital system)、中樞神經系統 (CNS, central nervous system)，ER α 在子宮 (uterus) 表現量最多，ER β 表現量不如 ER α 多，但可以在肺 (lung)、乳腺 (mammary gland)、腎臟 (kidney)、小腸 (intestinal tract) 及結腸 (colon) 中發現(Gustafsson, 2000)。

研究發現，當以 estrogen 刺激母鼠，其肝臟粒線體 DNA 所製造的粒線體呼吸鏈蛋白有增加的趨勢(Chen *et al*, 1998; Chen *et al*, 1996)，並且 estrogen 可調節粒線體的功能，包括增加電子傳遞鏈的活性、粒線體與細胞核中 glutathione 的分佈，並且減少細胞凋亡(Chen *et al*, 2003)。最近的研究顯示，於兔子子宮與卵

巢(Monje & Boland, 1999; Monje & Boland, 2001)及 MCF-7 細胞(Chen *et al*, 2004a)及 HepG2 細胞中(Chen *et al*, 2004a)，可於粒線體內發現 ER α 與 ER β 。另外，在人類水晶體上皮細胞粒線體(Cammarata *et al*, 2004; Cammarata *et al*, 2005)、心肌細胞及老鼠的海馬迴神經細胞粒線體中(Hsieh *et al*, 2006; Yang *et al*, 2004)，也發現有不同的 ER β isoform 出現。E2 可抑制 MCF-7 乳癌細胞經由 UV 輻射所造成的傷害，如 cytochrome *c* 釋放，粒線體膜電位的降低與細胞的凋亡 (Pedram *et al*, 2006)。

三、粒線體在細胞中所扮演的角色

1. 粒線體的功能與構造

粒線體藉由氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 的過程產生人體細胞賴以維生的能量—ATP，在構造方面主要分為內膜 (inner membrane)、外膜 (outer membrane)、間質 (matrix) 以及膜間腔 (intermembrane space) 等四大部分 (Fig. 1)，其中內膜上鑲嵌有負責執行電子傳遞鏈的五個呼吸酵素複合體 (respiratory enzyme complex)，分別是 Complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase)、Complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase)、Complex III (ubiquinol- cytochrome *c* oxidoreductase)、Complex IV (cytochrome *c* oxidase) 和 Complex V (ATP synthase)(Taanman, 1999)。除了五個呼吸酵素複合體外，在電子傳遞鏈上尚有對於維持正常電子傳遞鏈相當三個重要的蛋白質，包括 dihydroorotate:CoQ-oxidoreductase; electron transfer flavoprotein:CoQ oxidoreductase 及 adenine nucleotide translocator (Wallace, 1992)，電子傳遞鏈大

多是由細胞核 DNA 在細胞質中合成，再經由訊號胜肽 (signal peptide sequence)，輸送至粒線體內膜與其它 13 條由粒線體 DNA 在粒線體間質所合成的多胜肽，共同組裝成具有功能的呼吸酵素複合體。

2. 粒線體 DNA(mtDNA)

粒線體有自己的基因(genome)，粒線體 DNA 帶有 16,569 個鹼基對(base pair, bp)的粒線體(Anderson *et al*, 1981); 每個粒線體中均帶有 2~10 組拷貝(copy)的雙股環狀的粒線體 DNA; 粒線體 genome 含有 37 個基因，包含 13 條參與呼吸酵素複合體的多肽鏈基因，2 個 rRNA 基因及 22 個 tRNA 基因。因為缺乏內插子(intron)，所以粒線體的基因攜帶的遺傳訊息的密度很高，除了負責轉錄 13 條多肽鏈、22 個 tRNA 及 2 個 rRNA 的基因以外，還含有大約 1.1 kb 的非轉錄基因區，稱為 displacement loop (簡稱 D-loop 區) (Fig. 2)。此區域為粒線體 DNA 複製及轉錄的控制區域，其間包含了粒線體 DNA 的複製起點(origin of replication)(Leonard & Schapira, 2000)，以及 RNA 合成的起動子部位 (promoter region)。其他參與粒線體內氧化磷酸化蛋白的合成者，如 DNA 聚合酶 γ (polymerase γ)、RNA 聚合酶、核糖體蛋白(ribosomal protein)，及粒線體 DNA 調節因子(mtDNA regulatory factors)，則均由細胞核 DNA 所轉譯合成(Chinnery & Turnbull, 2000)。

3. 粒線體的動態融(fusion)與分裂(fission)

粒線體是動態(Mitochondrial dynamics)的胞器，在不同的細胞或是不同的外界刺激下，其型態跟數量都是可變的。粒線體在細胞內會進行頻繁的融合(fusion)

與分裂(fission)，形成絲狀或是點狀形態的粒線體(Chen & Chan, 2004)。粒線體可利用融合作用進行膜電位的傳遞及交換粒線體基質的內容物，透過粒線體基因組交換，有效的修補突變的粒線體 DNA(Nakada *et al*, 2001)，而絲狀的粒線體連結成網路也有利於能量(ATP)在其中傳遞(Skulachev, 2001)。粒線體可利用分裂作用增加粒線體的數量，分散在細胞內不同的區域執行不同的功能(Collins *et al*, 2002)，而在細胞分裂的過程中，粒線體的分裂作用可以使粒線體平均分配到子代細胞中(Barni *et al*, 1996)。另外有文獻指出，粒線體的融合分裂與細胞凋亡有密切的關係(Karbowski & Youle, 2003)。研究發現，增加負責粒線體分裂的 Drp1 或 Fis1 蛋白的表達，可以促進粒線體分裂，同時誘導細胞凋亡；而抑制 Drp1 或 Fis1 則可以抑制細胞凋亡(Lee *et al*, 2004)。與此一致的是，大量表達負責粒線體融合的 OPA1 或 Mfn1/2 蛋白可以促進粒線體融合，同時抑制 cytochrome c 的釋放與細胞凋亡；反之則可促進細胞凋亡(Lee *et al*, 2004; Sugioka *et al*, 2004)。大量研究顯示，在細胞凋亡的早期，粒線體型態會呈現明顯的片斷狀(fragmentation)(Desagher & Martinou, 2000; Frank *et al*, 2001; Jagasia *et al*, 2005)，但在某些研究中發現粒線體 fragmentation 會晚於粒線體膜電位的下降(Esseiva *et al*, 2004)，因此粒線體型態 fragmentation 也有可能是細胞凋亡的結果，另外粒線體 fragmentation 也可能是粒線體功能代償的一種表現(Karbowski & Youle, 2003)。由此可看出粒線體的融合(fusion)與分裂(fission)與細胞凋亡間的關係非常複雜，詳細的分子機制尚未清楚(Chan, 2006; Suen *et al*, 2008)。

四、活性氧分子(Reactive oxygen species, ROS)

氧化壓力(oxidative stress)是指組織或細胞中過氧化物(oxidants)大量產生，或是抗氧化物(antioxidant)降低，造成體內狀態不平衡(Gutteridge & Halliwell, 1989)。活性氧自由基是由以氧為中心所組成的分子，包括氫氧自由基(hydroxyl radical, OH)、超氧陰離子(superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)和過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)(Fridovich, 1999)。正常的化學物質係由穩定的原子及分子(電子成對)組成，而自由基則是指外層電子軌道具有未共用電子對之不完全化學結構，會藉由搶奪其他物質(尤其是小分子量的物質)的電子與本身的單一電子湊成對，使自己趨於穩定達到電場平衡，而被搶奪電子的物質也變得不穩定，於是自由基引發一連串的連鎖反應，使得被搶奪電子的物質遭受破壞(Fubini & Hubbard, 2003)。

ROS 會在氧化代謝及能量代謝的過程中產生，在人體中扮演重要角色。在所有耗氧生物體(aerobic organisms)內，約有 95%的氧氣應用在粒線體內膜的呼吸鏈(Cadenas & Davies, 2000)，在 ATP 的過程中約有 1~2%的氧會轉變成超氧陰離子、過氧化氫及其他活性氧自由基。正常的生理狀況下，ROS 維持細胞的正常功能，包括氧化還原調節以及細胞內的訊息傳遞等。有研究證據顯示，ROS 在體內扮演次級訊息傳遞者(second messengers)，活化轉錄因子(transcription factor)如 AP-1 及 nuclear factor- κ B (NF- κ B)，並誘導免疫發炎相關基因表現(Desagher & Martinou, 2000)。在免疫系統中，白血球可藉由製造大量的自由基執行清除入侵者與保護細胞的功能，T 細胞的數量恆定與凋亡也藉由 ROS 來進行調節(Tripathi & Hildeman, 2004)。

ROS 會在氧化磷酸化中不斷的形成及分解，而體內亦有防禦和清除自由基的系統來抵禦自由基的攻擊，並具有修補系統來修復受到自由基攻擊的組織 (Nordberg & Arner, 2001)。正常狀態下，細胞中的 ROS 可調節訊息傳遞與生理狀態 (Fleury *et al*, 2002)，過多的 ROS 則透過體內抗自由基氧化系統中超氧化物歧化酶(SOD)，如粒線體中的 Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD)、細胞質中的 $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -SOD、氧化氫酵素(catalase)和穀胱甘肽過氧化酵素(glutathione peroxidase, GPX)等來清除，若抗自由基氧化系統與自由基的產生出現失衡現象，便會造成細胞的氧化壓力(Wei, 1998)。ROS 所進行的氧化還原反應也會對蛋白結構產生破壞性傷害，破壞細胞的正常生理狀態。而粒線體是細胞內主要的氧氣濃度感受器官，不同的氧氣濃度也會影響 ROS 的生成，氧氣濃度過高會促使 ROS 的增加，對細胞產生毒性；過低的氧氣濃度則會造成細胞中 ATP 產量減少，甚至影響細胞的存活率(De Marco & Caniggia, 2002)。

ROS 過度產生，可能導致細胞中 DNA、脂質與蛋白質等分子過度氧化，造成細胞傷害(Wei, 1998)。細胞新陳代謝的過程需要氧，當細胞處於嚴重缺血、缺氧環境下也會釋放大量的自由基，據估計有百分之四的氧氣可能會形成超氧自由基。此外，ROS 可能參與早期調節細胞凋亡過程，當細胞中產生 ROS 時，可能抑制抗凋亡分子 Bcl-2 分子出現，促使粒線體膜的去極化與 $\Delta\psi$ 下降，釋放出 cytochrome *c*，活化下游的 caspase，促使細胞趨向凋亡(apoptosis)(Nishimura *et al*, 2001)。而氧化壓力可能造成細胞內訊息傳遞混亂、細胞膜的損害、細胞離子溝通損傷、引發細胞膜脂質過氧化(Halliwell & Chirico, 1993)、影響細胞內所有含

SH 基的分子(sulfhydryl-containing molecules)，包含蛋白質、DNA 等皆會受到影響而減少(Cadenas & Davies, 2000; Finkel & Holbrook, 2000; Nordberg & Arner, 2001)。

五、Oligomycin

Oligomycin 作為抑制粒線體氧化磷酸化功能的藥物，oligomycin 可結合粒線體 Complex V 的 Fo domain 上的第六個和第九個 subunit，造成構形改變而阻擋了質子的傳導，抑制 ATP 的合成(Penefsky, 1985)，短時間內會影響呼吸鏈正常功能，進而使細胞內 ROS 產生增加，長時間處理則會使細胞內 ROS 降低，粒線體膜電位降低，而造成細胞凋亡的結果。

六、CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)

CCCP 是一種粒線體膜電位破壞劑，藉由 CCCP 所帶的負電與粒線體呼吸鏈所產生的氫離子結合，破壞粒線體膜上的質子梯度(proton gradient)，減少了質子的傳導，進而抑制 ATP 的合成，會刺激細胞內 ROS 升高，粒線體膜電位降低，當以 20 μ M CCCP 處理時，常被發現可造成細胞凋亡。

七、DPN (2, 3-bis(4-Hydroxyphenyl)- propionitrile)

2, 3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN)是雌激素 β 的促進劑(agonist)，DPN 與雌激素受體 β 的親合力是雌激素受體 α 的 170 倍，研究顯示，在 DPN 10 nM 的濃度下，對雌激素受體 β 有最高的親合力(Meyers *et al*, 2001) (Fig. 4)。



第二章 實驗方法

藥品試劑

廠商	藥劑
Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)	Ammonium persulfate (APS)
	Enhanced chemiluminescence (ECL)
	N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED)
	Polyvinylidene difluoride membrane (PVDF membrane)
Amresco (Solon, OH)	Agarose
	Phenol
	Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol, 25:24:1, v:v:v
Ambion (Lakewood, NJ)	Proteinase K
Ambion (Austin, TX)	RNaseZAP
Bio-Rad (London, UK)	Protein assay dye reagent
Fluka (Buchs, CH)	40% Acrylamide/bis solution (N',N'-methylene-bis-acrylamide solution)
Gibco (Grand island, NY)	Antibiotic-antimycotic
	Penicillin-streptomycin
	Trypan bule
	Trypsin-EDTA
Invitrogen (Carisbad, CA)	SeeBlue [®] Plus2 prestained protein standard
J.T.Baker (Phillipsburg, NJ)	1,4-dithiothreitol, DTT
	Acetic acid, CH ₃ COOH
	Chloroform
	Citric acid, HOC(COOH)(CHCOOH) ₂ •H ₂ O
	Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, Na ₂ HPO ₄
	EDTA
	Glycerol
	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES
	Hydrogen chloride, HCl
	Isoamylalcohol
	Magnesium Chloride, MgCl ₂
	Methanol, CH ₃ OH
	Phosphoric acid, H ₃ PO ₄
J.T.Baker (Phillipsburg, NJ)	Potassium chloride, KCl
	Sodium acetate, (NH ₄) ₂ SO ₄
	Sodium bicarbonate, NaHCO ₃
	Sodium carbonate, Na ₂ CO ₃
	Sodium chloride, NaCl
	Sodium hydroxide, NaOH

	Sodium tartrate
	Sucrose
	Tris-HCl
Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA)	Anti- mouse IgG conjugated alkaline phosphatase (AP)
Kirkegard Perry Laboratories (Seoul, KR)	Bromo-chloro-indoryl phosphate / nitro blue tetrazolium (BCIP / NBT)
Lab Vision Corporation (Fremont, CA)	Mouse monoclonal anti- prohibitin antibody (Clone II-14-10)
Life Technologies (Gaithersburg, MD)	Fetal bovine serum (FBS)
Molecular Probes (Leiden, NL)	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1)
	ATP Determination Kit (A-22066)
	MitoTracker [®] Red COXRos
Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)	Mouse anti- α -tubulin antibody
	Rabbit anti- ER β antibody
Sigma (St. Louis, MO)	Butylated hydroxytoluene (BHT)
	Bovine serum albumin(BSA)
	Dimethylsulfide oxide (DMSO)
	Ethidium bromide (EtBr)
	Ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)tetraacetic acid (EGTA)
	Glutamic acid
	Glycine
	Glyoxylic acid
	High glucose DMEM medium (D5648)
	Nonindent P-40 (NP-40)
Sigma (St. Louis, MO)	Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)
	Oligomycin
	Potassium phosphate monobasic, KH ₂ PO ₄
	Sodium cyanoborohydride, NaCNBH ₃
	Sodium dodecyl sulfate (SDS)
	Triton X-100

一、檢體收集 (Tissue collection)

檢體收集依照台北醫學大學人體試驗委員會規定(案號為 P950046)。本研究從台北醫學大學附設醫院收集帶有子宮肌瘤(myoma) (n=14)、子宮肌腺症(adenomyosis) (n=9)、與巧克力囊腫(chocolate cyst) (n=7)及子宮內膜增生(endometrium hyperplasia) (n=3)的患者正位及異位子宮內膜組織，子宮組織檢體先用 PBS 清洗，將組織上的紅血球清洗去除，冰凍於-20°C 冰箱保存。

二、人類子宮內膜細胞(human endometriotic cell)培養

人類子宮內膜細胞(human endometriotic cell, Hec-1A cell)需培養於含有 10% 胚胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、100 unit/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycine 之 Dulbecco's modified Eagle's medium- high glucose (DMEM)培養液，置於 5% CO₂、37°C 恆溫之培養箱中，直至細胞生長至八、九分滿時，再進行繼代培養。

三、細胞蛋白質製備(Preparation of cell lysate)

將培養於 10cm 培養皿中的細胞以無酚紅(phenol red-free)培養液 starvation 及給予不同藥物刺激不同時間之後，吸去培養液，再以冰的 PBS 清洗兩次，均勻加入 60 μ l 至 100 μ l 的 protein lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 125 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 25 mM β -glycerophosphate, 100 μ M PMSF, 1% Triton, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate)，置於冰上作用 30 分鐘待細胞膜溶解後，用 sonication 均質打破細胞，以 8500 \times g 於 4°C，離心 30 分鐘，收集上清液為蛋白質萃取液，經過蛋白質定量後取出等量的蛋白

進行西方墨點法測定蛋白質表現的變化。

四、粒線體的分離(Mitochondrial fraction)

本實驗利用粒線體分離技術觀察細胞經藥物刺激後，粒線體中雌激素受體 β 的表現情形。將細胞加藥處理後，以 PBS 沖洗二次，將細胞從培養皿中刮下，收集細胞液至 15 ml 離心管， $600\times g$ 於 $4^{\circ}C$ 離心 5 分鐘後，丟棄上清液，將細胞與五倍體積的 mitochondrial isolation buffer (2 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 2 mM 1,4-dithiothreitol (DTT), 250 mM sucrose, 5 $\mu g/ml$ leupeptin, 5 $\mu g/ml$ aprotinin, 100 mM PMSF) 均勻混合後，置於冰上作用 30 分鐘待細胞膜溶解，用 sonication 均質打破細胞，以 $600\times g$ 於 $4^{\circ}C$ 離心 10 分鐘，收集上清液。再將上清液以 $8500\times g$ 於 $4^{\circ}C$ 離心 10 分鐘，得到的離心產物(pellet) 即為粒線體。將 mitochondrial pellet 與 30~60 μg 的 protein lysis buffer 均勻混合，置於冰上作用 30 分鐘後，再以 $9000\times g$ 於 $4^{\circ}C$ 離心 15 分鐘，收集之上清液即為粒線體蛋白質萃取液(mitochondrial fraction extracts)。經蛋白定量後，取出等量之粒線體與細胞質蛋白萃取液，以西方墨點法測定細胞經藥物刺激後，蛋白質表現的變化。

五、粒線體 DNA 免疫沉澱法(MitoDNAIP)

本實驗可用來觀察ER β 與粒線體DNA之間是否有結合。將純化後的粒線體 fraction 以 1% formaldehyde 使粒線體DNA與蛋白質於 $4^{\circ}C$ 反應30分鐘交聯反應 (cross-linking)，以PBS沖洗，15000 rpm離心15分鐘後，丟棄上清液，加入125 mM glycine 中和 formaldehyde 的 cross-link 作用，以 sonication 均質打破粒線體，

8500×g離心15分鐘後，取上清液(內含mtDNA與結合蛋白)，將上清液十分之一作為PCR的input control，剩下的上清液再加入四倍體積的IP buffer(20 mM Tris (pH8.0)，150 mM NaCl，2 mM EDTA，0.1% NP-40，0.5% Triton X-100，0.1 M pMSF)，45°C反應30分鐘，以600×g離心5分鐘後，取上清液與2mg ERβ抗體於4°C隔夜作用，再與protein G-conjugated agrose beads於4°C作用1小時後，以600×g，離心5分鐘，收集beads，以Wash buffer I (20mM Tris, pH 8.0, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100)，buffer II (buffer I containing 500mM NaCl)，buffer III (10mM Tris, pH 8.0, 0.25M LiCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 1% deoxycholate)，及buffer IV (10mM Tris, pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA)依序清洗，將非特異性抗體及雜質去除。清洗後的beads與PCR input control加入elution buffer(1% SDS, 0.1M sodium bicarbonate)，於65°C反應15分鐘將特定蛋白與mtDNA從beads上elute出來，3000 rpm，離心5分鐘，收取上清液與5 M NaCl於65°C作用一個晚上，移除蛋白質與mtDNA的cross-link。再加入25mM EDTA，10mM Tris (pH 6.8)，10 ml of 2 mg/ml proteinase K，於45°C反應1小時後，以phenol-chloroform-isoamyl alcohol純化抽取mtDNA。最後使用 D-loop primer pair進行聚合酵素鏈鎖反應(PCR)(Achanta *et al*, 2005)。

六、蛋白質定量法(Protein assay)

定量的原理是利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 和蛋白質結合的特性。當G-250與蛋白質結合後，其顏色會從紅色轉變成藍色，以光源 595 nm 波長進行偵測，蛋白質濃度愈高，得到的吸光值愈高。Bio-Rad protein assay dye 先以去離

子水依 1:4 之比例稀釋五倍後，用 Whatman No.1 濾紙過濾後，於每一試管中加入 1 ml 過濾液。以 0.2 mg/ml、0.4 mg/ml 及 0.8 mg/ml 之 BSA 作為標準液，測量各點吸光值後用來製定吸光值與蛋白質濃度的標準曲線。在裝有過濾液之試管中加入 1~3 μ l 待測物並紀錄添加體積，經震盪混合後，待測物之顏色深淺須介於 standard 0.2~0.8 mg/ml BSA 標準液間，以 595 nm 波長測定吸光值，比對標準曲線計算待測物之蛋白質濃度。

七、西方墨點法(Western blotting)

1.SDS-PAGE gel preparation

Gel 分為兩層，上層為 stacking gel，配置方法為 3.94 ml ddH₂O 中，分別加入 0.5 ml 的 40% 的 acrylamide/bis、0.5 ml 的 1.5 M Tris-HCl (pH6.7)、50 μ l 的 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)、50 μ l 的 10% ammonium persulfate (APS) 及 10 μ l 的 N,N,N',N'-tetramethylenediamine (TEMED)後，待 gel 凝固。下層為 10% separating gel，配置方法為在 12.2 ml ddH₂O 中，分別加入 2.5 ml 的 3 M Tris-HCl (pH8.9)、5 ml 的 40% acrylamide/bis、200 μ l 的 10% SDS、100 μ l 的 10% APS 及 20 μ l 的 TEMED。

2. 電泳(electrophoresis)

將電泳膠片置於電泳槽中並填滿電泳緩衝液(running buffer)，取 60 μ g 量的待測蛋白質萃取液與 0.35 M protein loading dye 混合後，於 95 $^{\circ}$ C 下加熱 5 分鐘，進行蛋白質的變性作用(denature，作用後隨即置於冰上冷卻，以 10% SDS-PAGE gel 調整電壓至 80 voltage 進行電泳分析。約 3 小時後停止電泳，並進行蛋白質的轉

印。

3. 轉印(transfer)

剪裁適當大小之 PVDF membrane，以 methanol 潤濕後，以去離子水洗淨浸泡備用。電泳結束後將 SDS-PAGE gel 由玻片上取下放在 3 M paper 上，再將 PVDF membrane 覆蓋於 SDS-PAGE gel 上，以油性筆在 PVDF membrane 上將 marker 的位置及所需分子量標示清楚，再蓋上一層 3 M paper，以塑膠棒趕走其間之氣泡後置於轉印槽，於 4°C 低溫環境以 400 mA 之電流轉印 100 分鐘即完成。

4. Immunoblot

轉印完成後，將 PVDF membrane 以含 5%脫脂奶粉的 TBST (tris buffered saline with Tween-20) blocking buffer 作用 1 小時後，倒掉 blocking buffer，以 1×TBST 清洗三次，每次 5 分鐘。清洗完畢之後，加入 primary antibody，如 ERβ、Actin、VDAC 特異性抗體作用 2 小時，再以 1×TBST 清洗三次，每次 5 分鐘，接著加入 secondary antibody，如 anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase (AP)及 anti-mouse IgG conjugated horse radish peroxidase (HRP)等特異性抗體作用 1 小時，再以 1×TBST 清洗三次，每次 5 分鐘，最後分別以 bromo-chloro-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT)或 enhanced chemiluminescence (ECL) 做呈色。利用 ECL 呈色的方式，在 PVDF membrane 上覆蓋 ECL buffer 作用 30 秒至數分鐘(依抗體不同而定)，再放入含有 X-film 的卡匣以底片曝光顯影。

八、 Scratch wound assay

將 1×10^6 細胞培養於 6 well culture dish 24 小時後，細胞貼附於培養皿上約七、八分滿時，吸掉上清液，使用滅菌後的 pipette tip 於 well 中間劃一條線，再用

PBS 清洗 well 兩次，接著加入不含 10% FBS 和 no phenol red 的 DMEM/F12 medium 3 ml，加入待測物 (chemoattractant) 如 DPN，E₂ 刺激，經培養不同的時間點，再到顯微鏡下觀察細胞是否會經由待測物的刺激而產生移行。

九、細胞存活率(Cell viability)

將 3×10^5 個細胞培養於 6 cm 培養皿中，再分別以無酚紅培養液 starvation 及給予不同藥物刺激不同時間之後，依照細胞收集程序收集細胞。Trypan blue 是一種常用於細胞染色的染劑，染劑呈現藍色無法穿透活細胞的細胞膜，但當細胞受傷或死亡時，其細胞膜破損出現孔洞，trypan blue 則可穿透細胞膜進入細胞內將細胞染成藍黑色，在顯微鏡底下則以染色結果來區分活細胞與死細胞。取 20 μ l 的 0.4% trypan blue 和 20 μ l 的細胞液混合，使用細胞計數盤(hemocytometer chamber)在顯微鏡下進行計數後，計算細胞的存活率。

十、ATP 含量測定

本實驗利用 ATP Determination Kit (A-22066)，依據 recombinant firefly luciferase 催化受質 D-luciferin 產生冷光(emission maximum 為 560 nm, pH 7.8)的過程需要 ATP 的原理，來偵測細胞內 ATP 的能力。將 1×10^6 個細胞培養於 10 cm 培養皿中 24 小時後，分別給與藥物刺激特定時間後收集細胞。以 PBS 沖洗一次，加入 1 ml trypsin-EDTA 作用 1 至 3 分鐘，收集細胞液至 15 ml 離心管，3000 rpm 離心 5 分鐘後將上清液吸除丟棄，再取適量的 PBS 沖洗細胞，以 $600 \times g$ 離心 5 分鐘丟棄上清液，再加入 100 μ l ATP 的 cell lysis buffer，4°C 作用 15 分鐘， $8500 \times g$ 離心 2 分鐘，依據 ATP Determination Kit 所提供的試劑與操作說明，取上清液

利用多功能微盤分析儀(HIDEX Chameleon Microplate Reader, Finland, Turku)偵測冷光含量，檢測每一個標本產生的 ATP。每一標本 ATP 除以蛋白質定量濃度所得到的比值，即是標本的 specific ATP 含量。

十一、以 Lowry 方法測定蛋白質含量

泡製 Solution A：2% sodium carbonate, 0.4% sodium hydroxide, 0.16% sodium tartrate, 1% SDS; Solution B：4% copper sulfate (V); 將 Solution A 與 Solution B 以 100：1 新鮮配製成 Solution C; Solution D 為 1 N Folin-Ciocaltean phenol reagent。取 40 μ l sample 加入 160 μ l 二次水配製成 200 μ l 的待測液，加入 solution C 作用 10 分鐘，再加入 solution D 60 μ l 作用 45 分鐘後，於波長 660 nm 測定吸光值，以濃度 5 μ M ~ 250 μ M BSA 當作標準液，測量各點吸光值製備吸光值與蛋白質濃度的標準曲線，比對標準曲線計算待測物之蛋白質濃度。

十二、測定粒線體 DNA 拷貝數(mtDNA copy number)

1. DNA 的抽取與純化

將 1×10^6 個細胞培養於 10 cm 培養皿中 24 小時後，分別給與藥物刺激特定時間後收集細胞。先吸去培養液後以 PBS 清洗兩次，加入含有 10mM Tris-HCl EDTA (pH 8.0)、1.5% SDS、10 mM RNase A 及 2 M butylated hydroxytoluene (BHT) 的分解液在 37°C 下作用 1 小時後，再加入 10 mM proteinase K 的分解液在 56°C 下作用 2~12 小時，取等體積的酚(phenol) 與標本混合均勻，以 8500 \times g 離心 5 分鐘後，萃取上清液，再取等體積的酚-氯仿(phenol:chloroform:isoamylalcohol, 25:24:1, v:v:v) 均勻混合，以 8500 \times g 離心 5 分鐘後萃取上清液，重複此步驟 1

至 3 次，之後再取等體積的氯仿(chloroform : isoamylalcohol , 24:1 , v:v) 均勻混合，以 8500×g 離心 5 分鐘後萃取上清液，以去除蛋白質等雜質。完成以上步驟的萃取液，再與等體積的異丙醇(isopropanol)及 1/10 (v/v)的 3 M 醋酸鈉(sodium acetate, (NH₄)₂SO₄, NaOAc, pH 5.4)混合後，置於-20°C 沉澱(precipitation) 8~12 小時。在 4°C 下 8500×g 離心 10 分鐘，除去上清液後，以 75%酒精洗去沉澱物中的殘留鹽類，4°C 下 8500×g 離心 10 分鐘，經低溫真空抽乾後，將 DNA 溶於適量的二次水或 TE buffer 中。測量 DNA 吸光值 OD₂₆₀ 與 OD₂₈₀ 的比值，計算並定量 DNA 濃度。

2. 寡核酸引子(oligonucleotide primer)合成

合成引子(oligonucleotide primer)進行 mtDNA、cDNA 聚合鏈鎖反應。所用之引子 DNA 列於 Table 1。

3. 聚合酵素鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)

本實驗以 10~100 ng DNA 在 50 µl 反應混合液，最終反應混合液包括四種 dNTP mixture 200 µM、引子各 0.8 µM、1.0 U Super-therm DNA Polymerase 與 1 倍 PCR reaction buffer (0.01% gelatin, 0.1% Triton X-100, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and 10 mM Tris-HCl, pH 9.0)。反應的溫度及時間設定為 95°C 變性(denaturation) 5 分鐘，95°C 變性 30 秒、53°C 引子接合(annealing) 30 秒與 72°C 引子延伸(primer extension) 30 秒，以 Mini cycleTM PCR machine (MJ Research, Watertown, MA) 進行 25 個循環反應(其循環週期依增生的 DNA 片段及 Primer 來決定)，而後以 72°C 引子延伸 5 分鐘，最後溫度設定在 15°C。所用之引子 DNA 列於 Table 1。

4. Real-time Quantitative PCR

取 50 ng/ μ l DNA 1 μ l 和下列試劑混合：10 pmole target-specific primer 2 μ l、SYBR Green I 1 μ l、MgCl₂ 1.2 μ l、H₂O 4.8 μ l。Real-time quantitative PCR 設定條件如下：Heart start 94°C 5 分鐘，接下來為 31 個循環週次的設定條件，94°C 30 秒、62°C 30 秒、72°C 30 秒、79°C 2 分鐘。結果使用 LightCycler Analysis 分析。

5. 電泳(electrophoresis)

取 6 μ l PCR 產物，以 1.2%或 2.5% agarose gel、100 伏特電壓下，在 Mupid-2J 迷你水平電泳槽(Cosmo Bio, Tokyo, Japan)，使用 0.5 倍 TBE 緩衝液(0.1 M Tris, 0.1 M boric acid, 2 mM EDTA-Na₂, pH 8.0)進行瓊膠電泳。再以 ethidium bromide (50 μ g/ml)進行 5~10 分鐘的染色，於紫外光線透視燈(Viber Lourmat photo-print 008-SD, Cedex, France)下檢視 DNA 的長度。結果再利用 Photo-captMW 定量系統(UniEquip, Fraunhoferstrasse, Germany)分析 DNA 量。

十三、流式細胞儀(Flow cytometry)分析

1.細胞處理

將子宮內膜異位細胞 Hec-1A 培養於 10 cm 培養皿，以無酚紅培養液 starvation 及給予不同藥物刺激不同時間之後，以 PBS 沖洗一次，加入 1ml trypsin-EDTA 作用 1 至 3 分鐘，收集細胞液至 15 ml 離心管，600 \times g 離心 5 分鐘，丟棄上清液後再以 PBS 沖洗，於 600 \times g 離心 5 分鐘後，丟棄上清液並以 1ml PBS 均勻打散細胞，加入染劑後使用流式細胞儀(Becton Dickinson FACScan system, Mountain View, CA)進行分析。

2. 粒線體數量(mitochondrial mass)偵測

MitoTracker Green FM 是常用來偵測粒線體生合成數量(mitochondrial mass)的螢光染劑，因 MitoTracker Green FM 含有 thiol-reactive chloromethyl moiety 可以在粒線體膜上形成肽和蛋白質的穩定結合物(peptide and protein conjugates)，不需藉助粒線體膜電位，染劑即可堆積在粒線體的 lipid environment(Oubrahim et al, 2001)。將細胞以 1%的 paraformaldehyde 固定 5 分鐘，PBS 清洗 2 次，加入染劑反應 15 分鐘，在一小時內以流式細胞儀偵測螢光反應。

3. 細胞凋亡(apoptosis)測定

細胞膜的基本成分主要有三種磷脂質，分別為磷脂醯乙醇胺(phosphatidylethanolamine)、磷脂醯膽鹼(phosphatidylcholine)與磷脂醯絲胺酸(phosphatidylserine, PS)。在正常狀態的細胞中，PS 是存在於細胞膜的雙層磷脂質內葉(inner leaflet)的蛋白質，當細胞凋亡機制被啟動時，細胞凋亡初期(early apoptosis) DNA 尚未斷裂，細胞膜雙層磷脂質的不對稱性分佈消失，細胞膜的塌陷、崩解造成 PS 由細胞膜內側轉移至外葉(outer leaflet)，而 Annexin-V 對 PS 具有極高親和力，在鈣離子存在下(Ca^{2+} dependent)可與細胞表面的 PS 緊密結合，藉由 Annexin-V 與螢光物質 FITC 的結合，可用於偵測早期細胞凋亡的發生。Propidium iodide (PI)是核酸(nucleic acid)的特異性染劑，常用於區別細胞存活與否，在細胞核崩解、DNA 斷裂成片段的細胞凋亡後期(late apoptosis)，可藉由觀察同時染上 Annexin-V 與 PI 的細胞進行測定。以無酚紅培養液 starvation 及給予

不同藥物刺激不同時間處理細胞之後，移除細胞培養液，以 PBS 清洗細胞兩次，再依據 TACS™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kits (R&D Systems, Inc., Minneapolis, State)的作用，完成後 Annexin-V incubation reagent 需放置在冰上並避光。將加藥處理後收集下來的細胞與 reagent 在室溫下避光作用 15~30 分鐘進行結合反應(binding reaction)，最後以 1×結合緩衝液(binding buffer)洗去未與細胞結合上的染劑兩次之後，並在 1 小時內以流式細胞儀完成偵測。

4.活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)的測量

2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA)是用於測量細胞內 ROS 含量的螢光染劑。2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)具有兩個親脂性基團，故可通透細胞膜進入細胞，DCFH-DA 在細胞內會被酯酶(esterase)分解成無法穿過細胞膜的 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH)，當細胞中有 ROS 存在時，ROS 會與 DCFH 反應，生成具有綠色螢光的 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)化合物。螢光化合物 DCF 藉由 488 nm 的雷射光源激發(excitation)，並且在 520 nm 處能放射(emission)最大的螢光值，藉流式細胞技術與螢光強度來偵測細胞內 ROS 含量變化，評估細胞整體氧化壓力的程度。將加藥處理後收集下來的細胞，加入 1 ml PBS 均勻拍散細胞，避光環境下加入 5 μM H₂DCFDA，作用 15 分鐘，在 1 小時內以流式細胞儀進行偵測。

5.粒線體膜電位分析

使用 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1)偵測細胞中粒線體 $\Delta\psi$ 的變化。粒線體在呼吸及氧化磷酸化過程中，將產

生的能量以電化學位能儲存於粒線體 IM(約 250mV)，稱之為 mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$)，為外正內負的形式。JC-1 螢光染劑為親脂性的陽離子化合物，加入細胞染色後，會和粒線體 IM 的負電荷結合，當 $\Delta\psi$ 在低膜電位(< 100mV)時會以 monomer 的形式存在，excitation 在光源 488 nm 處，emission 在 525 nm 放出綠色螢光；而當 $\Delta\psi$ 逐漸升高，JC-1 會行聚合作用(polymerization) 在粒線體 IM 形成的 J-aggregates，在 590 nm 放出橘紅色螢光。以紅綠螢光強度的比值，便可算出細胞中粒線體膜電位差的高低(Smiley *et al*, 1991)。JC-1 因較傳統粒線體膜電位的染劑有更高的敏感性和解析分辨能力。將加藥處理後收集下來的細胞，加入 1 ml PBS 均勻拍散細胞後，避光環境下加入 5 μ M JC-1，作用 15 分鐘，於一小時內以流式細胞儀進行偵測。

十四、雷射共軛焦顯微鏡

1. 雷射共軛顯微鏡(confocal microscopy)

本實驗使用共軛焦顯微鏡(TCS SP5 AODS, Leica, Germany)來觀察 ER β 在細胞內的分布情形。共軛焦顯微鏡原理與光學顯微鏡相似，主要差別在於共軛焦顯微鏡以不同波長雷射光作為光源，由於雷射光波長較可見光長短，使得共軛焦顯微鏡的解析力介於光學與電子顯微鏡之間，解析度達 0.18 μ m，可以讓我們穿透細胞的表層組織，運用多次及多面的切片式掃描，可進行胞器體積的測量，觀察細胞中的胞器功能與位置分佈，深入了解細胞內部的三度空間結構。

2. Transfection

在 6 well 中種入 5×10^5 細胞，分別取 Lipofectamine 2000 12 μ l 與 5 μ g target

DNA 與 OPTIMEM 作用靜置 5 分鐘，各別加入細胞中，6-8 小時後在換回新的 culture medium，72 小時後篩藥(取 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 篩選)，篩選完後取 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 繼續培養。

3. 螢光染劑及細胞免疫螢光染色

在 6-well 的培養盤上放入滅過菌的 cover glass (直徑 22 mm)，將 Hec-1A 細胞培養於 cover glass 上，第二天細胞約四成滿時，分別加藥後移除細胞培養液，以 4°C PBS 清洗 2 次停止細胞週期，加入 50 nM 的 MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes)於 37°C 下避光反應 30 分鐘，以 HEPES buffer (20mM)洗滌 10 分鐘，重複 2 次後，再以 4% paraformaldehyde 室溫作用 30 分鐘固定細胞，用 PBS 清洗細胞 2 次，之後加入含有 0.2% Triton X-100 之 PBS 作用 10 分鐘，目的是將細胞膜打洞。再以 PBS 清洗 2 次後，加入 blocking solution (3% BSA in PBS) 在 37°C 作用 1 小時。去除 blocking solution 後，加入一級抗體 rabbit anti-ER β Ab、Mouse anti-cytochrome *c* 4°C 反應一個晚上。移去一級抗體後，以 PBS 清洗細胞 5 分鐘，重複 3 次。再加入二級抗體 FITC-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit IgG、FITC-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG 37°C 反應 2 小時。移去二級抗體後，以 PBS 清洗細胞 5 分鐘，重複 3 次。取 8 μl 的螢光抗退劑 VECTASHIELD[®] Mounting medium 滴於載玻片上，延緩螢光隨時間減退(photobleaching)的速度，維持螢光至少在 50%以上。將 cover glass 覆蓋於上，把周圍的水分吸乾，避免氣泡產生，周圍用透明指甲油封片。MitoTracker[®] Red 主要用來標記粒線體的位置，以雷射共軛顯微鏡觀察，可瞭解其細胞內分佈，

為常見的粒線體螢光標定物質。MitoTracker[®] Red 激發波長為 588nm，放射波長為 622nm，在細胞內觀察到的絲狀或點狀的紅色螢光，即為粒線體。利用雷射掃瞄共軛焦顯微鏡觀察紅光的粒線體再對照免疫螢光染色後的綠光 FITC，觀察 ER β 及 Cytochrome *c* 在細胞內粒線體中分佈的情形。

十五、統計分析

以 Student's paired t test 作分析， $p < 0.05$ 表示具有統計意義。實驗結果以 mean \pm standard error mean (S.E.M.) 表示。



第三章 實驗結果與分析

一、子宮內膜異位症及子宮肌腺症異位處的內膜細胞有大量粒線體ER β 的表現

將病人的檢體磨碎分離出粒線體，檢測在細胞內或是粒線體中的ER β 蛋白表現是否有增加的現象。細胞內及粒線體的internal control各為 α -tubulin及COX IV。結果顯示，肌腺症(adenomyosis)及巧克力囊腫(chocolate cyst)的子宮內膜檢體中發現粒線體ER β 表現量都明顯高於對照組(control)及子宮肌瘤症(myoma)的患者。Control組的粒線體ER β 表現量為 1.28 ± 0.14 ，myoma為 1.61 ± 0.16 ，chocolate cyst的表現量最高，是 3.56 ± 0.28 ，adenomyosis則是 2.34 ± 0.24 。而組織內ER β 的總量也有增加的現象，Control組為 1.06 ± 0.11 、myoma為 1.25 ± 0.09 、chocolate cyst是 1.27 ± 0.32 、adenomyosis是 1.38 ± 0.19 (Fig. 6)。

二、DPN對子宮內膜異位細胞(Hec-1A)的移行作用

將子宮內膜異位細胞分別加入10 nM的estradiol及10 nM的DPN處理24及48小時，觀察細胞移行的現象。結果如Fig. 7所示，細胞在加入estradiol後，有明顯的移行，而DPN則無此一現象。故推測DPN所驅動的ER β 在細胞當中所扮演的角色與ER α 有所不同。因此接下來將觀察ER β 在子宮內膜異位細胞中所扮演的角色。

三、Hec-1A細胞中DPN會促使粒線體ER β 的表現量增加

將子宮內膜異位細胞分別以八種加藥方式處理(Fig. 5)，收取全細胞或是純化粒線體來偵測ER β 含量，細胞內及粒線體內的internal control各為 β -actin及VDAC。發現在加入DPN後，無論是細胞內的ER β 或是粒線體ER β 都比control組有顯著的增加(1.4倍)；而加入粒線體ATP抑制劑(oligomycin)則是造成細胞內或

是粒線體ER β 沒有差異(Fig.8)，而粒線體呼吸鏈去偶合劑(CCCP)實驗組中，粒線體ER β 含量比control組增加1.3倍。為了驗證以上結果，我們另外使用雷射共軛焦顯微鏡來觀察，經由DPN處理後，細胞所產生的ER β 會轉位到粒線體中。結果如Fig.9所示，加藥處理後，利用MitoTracker[®] Red COXRos (Fig. 9紅色螢光)標定粒線體位置以及ER β 的抗體與帶有FITC(Fig. 9綠色螢光)的二級抗體標定出ER β 在細胞中的位置。我們發現control組的ER β 會均勻的分布在細胞核、細胞質及粒線體內；以DPN處理後，ER β 會大量轉移到粒線體內(Fig. 9橘色螢光)；在oligomycin處理的細胞中，粒線體及細胞質內都可觀察到ER β ；而以CCCPC處理後，發現ER β 與粒線體影像位置相同並且重疊(橘色螢光)，ER β 會大量出現在粒線體中。

四、DPN降低oligomycin或CCCPC所造成的細胞傷害

將細胞以八種不同加藥方式處理(Fig. 5)，利用0.4% trypan blue染色和dye exclusion方法測定細胞存活率。實驗結果如Fig. 10所示，以control組的細胞存活率為74.47% \pm 2.45%存活率的對照組，DPN處理的細胞存活率為69.26% \pm 3.42 (n=3, $p < 0.01$)，與control組大致相同，其中以oligomycin的細胞存活率43.35% \pm 7.83% (n=3, $p < 0.01$)及CCCPC的細胞存活率36.47% \pm 7.85% (n=3, $p < 0.01$)為最低，但加入DPN co-treat時，細胞存活率有回復的情形，DO組為51.09% \pm 8.78% (n=3, $p < 0.05$)，OD組為48.07% \pm 9.15% (n=3, $p < 0.05$)，DCp組是48.07% \pm 8.6% (n=3, $p < 0.01$)，CpD組則是43.77% \pm 6.00% (n=3, $p < 0.01$)。

五、DPN保護細胞抵抗oligomycin或CCCPC所引起的細胞凋亡

為探討DPN是否經由抑制細胞凋亡機制，造成保護細胞不被oligomycin或

CCCP所傷害，進而減緩細胞存活率下降。我們將 3×10^5 在分別以八種不同加藥方式處理後，以TACSTM Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kits染色，利用流式細胞移進行細胞凋亡偵測。結果如Fig. 11所示，象限右下區域的百分比代表細胞凋亡初期(early apoptosis)，而左上區域的百分比是代表細胞凋亡後期(late apoptosis)。實驗結果與control對照組比較發現，加入oligomycin或是CCCP都會造成明顯的細胞凋亡甚至細胞壞死現象。Control組中因為有一小時starvation的刺激，所以大約有 $11.88\% \pm 0.33\%$ 開始有細胞凋亡現象，DPN則有 $22.75\% \pm 0.37\%$ ，而在加入oligomycin ($59.51\% \pm 0.56\%$)或是CCCP ($33.41\% \pm 0.7\%$)的刺激之後，細胞凋亡的現象更趨明顯。另外在DO ($32.98\% \pm 0.52\%$)、OD ($31.5\% \pm 0.51\%$)、DCp ($18.17\% \pm 0.97\%$)、CpD ($24.25\% \pm 0.42\%$)四組中，DPN則是可以保護細胞，減緩oligomycin或是CCCP造成細胞凋亡的傷害。

六、DPN可減少oligomycin或CCCP所誘發的活性氧自由基(ROS)增加

為觀察DPN是否經由減少細胞粒線體及細胞內的氧化性傷害來保護細胞，因此進行細胞中ROS的測定。將細胞以藥物處理過後，收集細胞立即進行分析。以 $5 \mu\text{M}$ H₂DCFDA染色後，利用流式細胞儀偵測細胞內ROS含量，以control組作為100%的對照組，實驗結果如Fig. 12所示，當以oligomycin處理時，細胞內ROS的含量最高，是control的 $205.14\% \pm 29.78\%$ (n=3)，CCCP的ROS含量則是control的 $144.54\% \pm 21.59\%$ (n=3)。當加入DPN時，細胞內ROS的含量會降低為control的 $81.79\% \pm 10.07\%$ (n=3)；而DO是control的 $142.51\% \pm 6.94\%$ (n=3, $p < 0.05$)、OD是 $175.88\% \pm 1.83\%$ (n=3, $p < 0.001$)、DCp是 $113.17\% \pm 14.49\%$ (n=3)、CpD是 129.81%

$\pm 3.11\%$ ($n=3$, $p < 0.05$)。結果可證實，DPN可有效降低細胞中ROS的表現。

七、DPN對oligomycin或是CCCP造成粒線體膜電位降低的影響

本實驗以JC-1染色來觀察細胞經過藥物刺激後粒線體膜電位的變化。實驗結果如Fig. 13所示，經過DPN的處理，粒線體膜電位增加為control的 $117.69\% \pm 2.85\%$ ($n=3$, $p < 0.05$)，而在oligomycin或是CCCP的刺激之下，粒線體膜電位有明顯下降的趨勢，各降為control的 $23.67 \pm 1.09\%$ ($n=3$, $p < 0.001$)和 $30.96 \pm 1.54\%$ ($n=3$, $p < 0.001$)。在co-treat DPN的另外四組，粒體膜電位則有回復的情形，DO為control的 $66.17\% \pm 4.65\%$ ($n=3$, $p < 0.05$)，OD為 $52.93\% \pm 4.87\%$ ($n=3$, $p < 0.01$)，DCp是 $72.06\% \pm 1.95\%$ ($n=3$, $p < 0.01$)，CpD是 $69.50\% \pm 7.03\%$ ($n=3$, $p < 0.05$)

八、DPN增進經由oligomycin或是CCCP刺激細胞內粒線體的ATP形成能力

為了探討DPN是否影響細胞中粒線體的功能，進一步分析經DPN、oligomycin或是CCCP處理後細胞內ATP含量的變化。使用冷光測定儀和ATP Determination Kit偵測八組細胞的ATP含量。實驗結果如Fig. 14所示，以control組為100%，DPN為 $96.14\% \pm 1.02\%$ ($n=3$)，經oligomycin或CCCP處理後細胞內ATP含量有明顯下降趨勢，各為 $20.09\% \pm 1.67\%$ ($n=3$, $p < 0.001$)， $34.96\% \pm 3.58\%$ ($n=3$, $p < 0.01$)。而在co-treat DPN的組別中，粒線體ATP的含量有回復的情形。DO組是control的 $66.33\% \pm 3.10\%$ ($n=3$, $p < 0.01$)，OD是 $62.13\% \pm 2.18\%$ ($n=3$, $p < 0.01$)，DCp為 $67.91\% \pm 6.30\%$ ($n=3$, $p < 0.05$)，CpD為 $63.99\% \pm 5.46\%$ ($n=3$, $p < 0.05$)。我們由實驗結果證實，DPN會提升受傷細胞內ATP的含量，彌補粒線體功能的缺損。

九、DPN、oligomycin、CCCP對粒線體質質量(mitochondrial mass)及粒線體融合

(fusion)與分裂(fission)的影響

本實驗以Mitotracker Green™染色，利用流式細胞儀分析觀察細胞內粒線體質量的改變，如Fig. 15以control組為100%，DPN為 $63.20\% \pm 7.48$ (n=3, $p < 0.05$)，oligomycin的粒線體質量則明顯的增加為control的 $167.40\% \pm 53.26\%$ (n=3)，CCCP組則下降為 $80.48\% \pm 5.54\%$ (n=3, $p < 0.05$)，DO是 $120.21\% \pm 15.45\%$ (n=3)，OD是 $109.71\% \pm 20.64\%$ (n=3)，DCp是 $95.35\% \pm 11.78\%$ (n=3)，CpD是 $104.18\% \pm 13.68\%$ (n=3)。為了驗證以上結果，我們另外使用雷射共軛焦顯微鏡來觀察粒線體在細胞內的形態與數量，如Fig. 16，control組的粒線體以dynamic平衡的方式存在於細胞中，絲狀(tabular)、中間型(intermediated)、點狀(fragmented)的型態比例各為 $47.33\% \pm 5.36\%$ (n=3)， $24.00\% \pm 5.68\%$ (n=3)， $30.66\% \pm 2.02\%$ (n=3)；加入DPN處理後，粒線體型態明顯變成大型絲狀(large tubular)，絲狀、中間型、點狀的型態比例各為 $53.33\% \pm 6.35\%$ (n=3)， $14.66\% \pm 2.90\%$ (n=3)， $32.00\% \pm 6.00\%$ (n=3)；oligomycin則是會影響細胞出現大量的點狀粒線體，絲狀、中間型、點狀的型態比例各為 $5.33\% \pm 1.20\%$ (n=3)， $7.33\% \pm 0.66\%$ (n=3)， $87.33\% \pm 0.88\%$ (n=3)；而在CCCP組則出現相反的情形，粒線體以細長絲狀(thin tubular)的方式存在於細胞中，絲狀、中間型、點狀的型態比例各為 $66.00\% \pm 4.58\%$ (n=3)， $14.66\% \pm 4.09\%$ (n=3)， $12.66\% \pm 2.40\%$ (n=3)。另外co-treat DPN的四組細胞，DO組的粒線體絲狀、中間型、點狀的型態比例各為 $24.66\% \pm 6.06\%$ (n=3)， $12.00\% \pm 2.51\%$ (n=3)， $56.66\% \pm 5.89\%$ (n=3)；OD組為 $28.00 \pm 7.57\%$ (n=3)， $21.33\% \pm 5.48\%$ (n=3)， $64.66\% \pm 3.92\%$ (n=3)；DCp組為 $59.33\% \pm 7.44\%$ (n=3)， $23.33\% \pm 5.36\%$ (n=3)，

18.66% \pm 2.84% (n=3)，CpD組為67.33% \pm 7.31% (n=3)，13.33% \pm 3.52% (n=3)，29.33% \pm 3.17% (n=3)。

十、子宮內膜異位症及子宮肌腺症異位處內膜細胞與 Hec-1A 細胞的粒線體 DNA copy number 大量增生

我們進一步分析病人病灶組織的粒線體 DNA copy number，以 real-time PCR 來偵測粒線體 DNA 序列中較不容易突變的一段序列 ND1，再藉由 house-keeping gene (β -globin) 的 normalization 後，得到相對比值。由結果可看出(Fig. 17)，以 myoma 作為對照組，adenomyosis 為 control 的 3.03 倍 (n=4, $p < 0.05$)，chocolate cyst(-GnRHa, GnRH agonist 治療之前)為 control 的 3.74 倍 (n=4, $p < 0.05$)，顯示患者病灶處細胞的粒線體 DNA copy number 有明顯增生的趨勢，但是在患者接受治療(+GnRHa, 經 GnRH agonist+治療之後)後，粒線體 DNA copy number 降為 2.56 倍 (n=4, $p < 0.05$)，增加的情形較少。而在 Hec-1A 細胞當中(Fig. 18)，加入 DPN、oligomycin、或是 CCCP 都會增加粒線體 DNA copy number。另外粒線體內 ND1 的 RNA level 也有相同增加的情形 (Fig. 19)。

十一、子宮內膜異位症、子宮肌腺症異位處的內膜細胞與 Hec-1A 細胞粒線體 ER β 與粒線體 DNA 的交互作用

確認 DPN、oligomycin、及 CCCP 都會造成粒線體 DNA copy number 大量增加後，我們進一步分析患者組織中粒線體 ER β 與粒線體 DNA D-loop 區域的結合情形。純化粒線體後運用 mtDIP assay，將與 mtER β 結合的 mtDNA 序列純化出來並分析其表現情形，如 Fig. 20 所示，以 myoma 作為對照組，adenomyosis 患

者組織內 mtER β 與 mtDNA 的 D-loop 區域結合情形有大量增加，是 myoma 患者的 2.56 倍 (n=7)。另外在 Hec-1A 細胞中，加入 DPN 處理後的粒線體 ER β 也比 control 組多增加了 1.3 倍 (n=3, $p < 0.05$)，如 Fig. 21。





第四章 討論

在目前的研究當中，ER β 被證實存在許多細胞中，例如：rat primary neurons (Chen *et al*, 2005), rat primary cardiomyocyte (Yang *et al*, 2004), a murine hippocampal cell line (HT-22), neurons and glia in rat hippocampus (Herrick *et al*, 2006), human breast cancer lines (MCF-7, MCF-10F), immortal human breast epithelial cells (HBEC)(Chen *et al*, 2004a), human lens epithelial cell lines (nHLE and HLE-B3)(Cammarata *et al*, 2005), human osteosarcoma cells (SaOS-2), hepatocarcinoma cells (HepG2)(Solakidi *et al*, 2005)等。

而ER β 在細胞中所扮演的角色非常多樣化，除了少部分在細胞核內進行 genomic transcription，其餘大部份分布在細胞核外(Herrick *et al*, 2006)。在細胞質內ER β 被證實可以經由non-genomic mechanisms執行細胞內一些快速的生理反應。本次實驗結果中，首先我們發現在子宮內膜異位症及子宮肌腺症患者的組織上可偵測到組織中的ER β 增加，與之前的研究發現異位處內膜細胞雌激素受體 β 的mRNA與蛋白表現皆較雌激素受體 α 高相符合(Matsuzaki *et al*, 2001)，當我們進一步觀察粒線體內ER β 的表現，我們發現在子宮內膜異位症及子宮肌腺症的粒線體內ER β 的表現是正常內膜組織的2.7倍(Fig. 6)。

近年來研究顯示，在不同組織或細胞內，estradiol (E₂)可經由調控 ER α 或ER β ，產生不同的細胞功能變化(Dahlman-Wright *et al*, 2006; Harris, 2007)。而我們在細胞移行實驗中分別使用 ER β 的 agonist, DPN 與 E₂觀察子宮內膜異位細胞的移行能力，發現 DPN 無法使細胞產生移行的能力 (Fig. 7)，因此我們推測，ER β 在子宮內膜異位的細胞中所應無法直接調控引發細胞移行，而是扮演另外的角色。本實驗使用子宮內膜異位細胞 Hec-1A 作為我們的細胞模式。在短時間內，

加入 DPN 後，細胞內的粒線體 ER β 的表現有增加的情形(Fig. 8)；而經由 oligomycin 刺激後，短時間內 ER β 的表現量可能因為細胞凋亡而無法增加；相較於 CCCP 作用之後，則可偵測到大量 ER β 會轉位進入粒線體中，我們推測可能是因為 oligomycin 破壞粒線體製造 ATP 的功能，對細胞所造成的傷害比 CCCP 使粒線體做虛功(futile fuction)嚴重，導致細胞趨向細胞凋亡以至於無法完整觀察到粒線體 ER β 的表現量的變化。而 CCCP 的影響主要在非偶合氧化磷酸化反應，其電子傳遞鏈仍持續運作(Kwong *et al*, 2007)。在經由 oligomycin 或 CCCP 並且添加 DPN 處理的四組細胞中，ER β 在細胞核、細胞質及粒線體中都會出現，所以我們推測在粒線體受到傷害的情形之下，DPN 會增加細胞內 ER β 的表現，其所製造的 ER β 可在細胞質中觀察到，而一部分的 ER β 則進入細胞核內調控下游基因的表現，同時也會大量轉位至粒線體內(Fig. 8 and Fig. 9)，進而調控粒線體功能來保護細胞。目前最新的研究顯示，細胞內 ROS 增加會造成 ER β 轉位到粒線體內(Chang *et al*, 2008)，而 ER β 轉位到粒線體中可能藉由粒線體外膜上的 transmembrane protein，其中一種是利用粒線體外膜上的 Tom20/Tom22 辨認 ER β N端上的 presequence(LXXLL)；另一種是細胞質內的 chaperone 蛋白，Hsp90/70 與 ER β 形成 complex 後，再利用 Hsp90/70 可結合在粒線體外膜 transmembrane protein，Tom70 的 TRP 位置(tetratricopeptide repeat motifs)後再利用內膜蛋白 Tim complex 完成轉位進入粒線體的程序(Simpkins *et al*, 2008)。

接下來我們進一步分析 DPN 對粒線體功能的影響，本次實驗發現 DPN 可以幫助細胞對抗由 oligomycin 或 CCCP 對細胞所造成的細胞凋亡現象(Fig. 10 and

Fig. 11)。另外在 Fig. 12、Fig. 13 及 Fig. 14 中，我們觀察到在一小時處理內 oligomycin 與 CCCP 都因為阻斷 ATP 的生成(Nieminen *et al*, 1994; Suzuki *et al*, 1999)，而增加細胞內生成 ROS 及造成粒線體膜電位的降低(Barstow *et al*, 2004)。但在添加 DPN 時，不論是前處理或是後處理，則會減緩細胞內 ROS 的生成及回復粒線體膜電位。我們推測是因為粒線體可以經由 mtER β 的幫助下恢復粒線體膜電位並且開始製造 ATP (Nilsen & Diaz Brinton, 2003; Yang *et al*, 2004; Zhao *et al*, 2004)。

進年來的研究顯示，粒線體的融合(fusion)、分裂(fission)會影響粒線體功能(Chan, 2006)，同時與細胞凋亡及細胞能量需求有密切的關係(Karbowski & Youle, 2003)，因此當我們進一步觀察 DPN、oligomycin 及 CCCP 對細胞內粒線體型態的改變。同時利用流式細胞儀偵測 Mitotracker Green™ 螢光(Fig. 15)與雷射共軛焦顯微鏡(Fig. 16)觀察發現，DPN 會引起粒線體融合成為大型絲狀，CCCP 則會促使粒線體成為細長的絲狀，我們推測細胞可能是利用粒線體融合作用進行膜電位的傳遞及交換粒線體基質的內容物，增強粒線體的功能(Nakada *et al*, 2001)，而絲狀的粒線體也有利於能量(ATP)在其中傳遞(Skulachev, 2001)。在之前對粒線體功能缺損的測試中，我們發現 oligomycin 對細胞所造成的傷害都大於 CCCP，而在 oligomycin 刺激下的粒線體型態呈現分裂的點狀，推測可能是正在走向細胞凋亡或是粒線體功能代償而增生的一種表現(Karbowski & Youle, 2003)。而在 co-treat DPN 之後粒線體的型態都可觀察到會趨向大型絲狀。

Simpkin 等人推測，ER β 可與粒線體 DNA 結合調控下游基因的轉錄作用，強化粒

線體功能進而保護細胞抵抗細胞凋亡傷害(Simpkins et al, 2008)。其他文獻中也指出，粒線體DNA上有類似ERE(estrogen response element)的序列(Chen *et al*, 2004a)，而ER β 所調控的基因大都是參與粒線體氧化磷酸化反應的基因(O'Lone *et al*, 2007)。當我們進一步利用real-time PCR偵測子宮內膜異位患者的組織及Hec-1A 細胞中mtDNA及mt mRNA的含量，我們發現DPN不但可促使粒線體DNA copy number(Fig. 17 and Fig. 18)，也會增加粒線體mRNA的轉錄(transcription, RNA level) (Fig. 19)。所以我們推測ER β 進入粒線體後會與mtDNA有結合的作用，因此我們應用粒線體DNA免疫沉澱聚合酵素鏈鎖反應(mitochondrial DNA immunoprecipitation -PCR method)及real-time quantitative PCR偵測mtDNA-mtER β 是否有相互作用。在子宮內膜患者組織上的實驗結果可以發現粒線體ER β 與mtDNA D-loop 區域(nt 15997-640)會大量結合(Fig. 20)。另外在Hec-1A的細胞中發現粒線體ER β 會結合在mtDNA D-loop 區域(nt 15997-640)，而在DPN 刺激細胞之後，結合的mtDNA有增加的趨勢(Fig. 21)，但確實的結合位置必須再進一步證實。

綜合以上的實驗結果，可知粒線體ER β 確實參與子宮內膜異位症的形成並且藉由保護粒線體功能來促進子宮內膜異位的細胞生存，並且我們也推測粒線體ER β 可以藉由促進粒線體功能提供子宮內膜異位細胞的細胞移行及入侵的能量來源。粒線體ER β 在子宮內膜異位症的生理功能與角色，或許可作為治療子宮內膜異位症的藥物治療理論基礎。此外，粒線體ER β 不僅適用於子宮內膜異位症，未來更可以延伸至腫瘤細胞、腦部神經細胞、眼細胞、心肌細胞及骨細胞等。

釐清粒線體ER β 在細胞中的生物活性與角色，對於上述各項相關疾病的致病機轉及藥物治療基礎提供重要的資訊。在未來計畫中，我們預定分析粒線體DNA的D-loop區域與粒線體ER β 結合的DNA正確序列以及在粒線體中是否有與粒線體ER β 交互作用調控mtDNA transcription的夥伴蛋白質。



第五章 參考文獻

Acconcia F, Barnes CJ, Kumar R (2006) Estrogen and tamoxifen induce cytoskeletal remodeling and migration in endometrial cancer cells. *Endocrinology* **147**(3): 1203-1212

Achanta G, Sasaki R, Feng L, Carew JS, Lu W, Pelicano H, Keating MJ, Huang P (2005) Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J* **24**(19): 3482-3492

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**(5806): 457-465

Barni S, Sciola L, Spano A, Pippia P (1996) Static cytofluorometry and fluorescence morphology of mitochondria and DNA in proliferating fibroblasts. *Biotech Histochem* **71**(2): 66-70

Barstow KL, Locknar SA, Merriam LA, Parsons RL (2004) The modulation of action potential generation by calcium-induced calcium release is enhanced by mitochondrial inhibitors in mudpuppy parasympathetic neurons. *Neuroscience* **124**(2): 327-339

Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* **29**(3-4): 222-230

Cammarata PR, Chu S, Moor A, Wang Z, Yang SH, Simpkins JW (2004) Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta subtypes in cultured human lens epithelial cells. *Exp Eye Res* **78**(4): 861-871

Cammarata PR, Flynn J, Gottipati S, Chu S, Dimitrijevic S, Younes M, Skliris G, Murphy LC (2005) Differential expression and comparative subcellular localization of estrogen receptor beta isoforms in virally transformed and normal cultured human lens epithelial cells. *Exp Eye Res* **81**(2): 165-175

Chan DC (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**(7): 1241-1252

Chang S, Jiao X, Li CH, Gong XQ, Chen WZ, Wang CX (2008) Amino acid network and its scoring application in protein-protein docking. *Biophys Chem* **134**(3): 111-118

Chen H, Chan DC (2004) Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr Top Dev Biol* **59**: 119-144

- Chen J, Delannoy M, Odwin S, He P, Trush MA, Yager JD (2003) Enhanced mitochondrial gene transcript, ATP, bcl-2 protein levels, and altered glutathione distribution in ethinyl estradiol-treated cultured female rat hepatocytes. *Toxicol Sci* **75**(2): 271-278
- Chen J, Gokhale M, Li Y, Trush MA, Yager JD (1998) Enhanced levels of several mitochondrial mRNA transcripts and mitochondrial superoxide production during ethinyl estradiol-induced hepatocarcinogenesis and after estrogen treatment of HepG2 cells. *Carcinogenesis* **19**(12): 2187-2193
- Chen J, Schwartz DA, Young TA, Norris JS, Yager JD (1996) Identification of genes whose expression is altered during mitosuppression in livers of ethinyl estradiol-treated female rats. *Carcinogenesis* **17**(12): 2783-2786
- Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD (2004a) Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**(6): E1011-1022
- Chen JQ, Eshete M, Alworth WL, Yager JD (2004b) Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements. *J Cell Biochem* **93**(2): 358-373
- Chen JQ, Yager JD, Russo J (2005) Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta* **1746**(1): 1-17
- Chinnery PF, Turnbull DM (2000) Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease. *Mol Med Today* **6**(11): 425-432
- Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2002) Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* **21**(7): 1616-1627
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA (2006) International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* **58**(4): 773-781
- De Marco CS, Caniggia I (2002) Mechanisms of oxygen sensing in human trophoblast cells. *Placenta* **23 Suppl A**: S58-68
- Demonacos CV, Karayanni N, Hatzoglou E, Tsiriyiotis C, Spandidos DA, Sekeris CE (1996) Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids* **61**(4): 226-232

Desagher S, Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **10**(9): 369-377

Dueholm M, Lundorf E (2007) Transvaginal ultrasound or MRI for diagnosis of adenomyosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* **19**(6): 505-512

Esseiva AC, Chanez AL, Bochud-Allemann N, Martinou JC, Hemphill A, Schneider A (2004) Temporal dissection of Bax-induced events leading to fission of the single mitochondrion in *Trypanosoma brucei*. *EMBO Rep* **5**(3): 268-273

Farquhar C (2002) Endometriosis. *Clin Evid* (8): 1864-1874

Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**(6809): 239-247

Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* **84**(2-3): 131-141

Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* **1**(4): 515-525

Fridovich I (1999) Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* **893**: 13-18

Fubini B, Hubbard A (2003) Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med* **34**(12): 1507-1516

Fujimoto J, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T (1999) Expression of oestrogen receptor-alpha and -beta in ovarian endometriomata. *Mol Hum Reprod* **5**(8): 742-747

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**(6058): 134-139

Gustafsson JA (2000) An update on estrogen receptors. *Semin Perinatol* **24**(1): 66-69

Gutteridge JM, Halliwell B (1989) Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin*

Haematol **2**(2): 195-256

Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* **57**(5 Suppl): 715S-724S; discussion 724S-725S

Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM (1984) Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* **64**(2): 151-154

Harris HA (2007) Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol* **21**(1): 1-13

Herrick SP, Waters EM, Drake CT, McEwen BS, Milner TA (2006) Extranuclear estrogen receptor beta immunoreactivity is on doublecortin-containing cells in the adult and neonatal rat dentate gyrus. *Brain Res* **1121**(1): 46-58

Hsieh YC, Yu HP, Suzuki T, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH (2006) Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J Mol Cell Cardiol* **41**(3): 511-521

Hylar DS, Baluch JD, Taylor RR (1994) Intramural vesical endometriosis. A case report. *J Reprod Med* **39**(10): 832-834

Ishimaru T, Masuzaki H (1991) Peritoneal endometriosis: endometrial tissue implantation as its primary etiologic mechanism. *Am J Obstet Gynecol* **165**: 210-214

Jagasia R, Grote P, Westermann B, Conradt B (2005) DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* **433**(7027): 754-760

Karbowski M, Youle RJ (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**(8): 870-880

Kayisli UA, Guzeloglu-Kayisli O, Arici A (2004a) Endocrine-immune interactions in human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* **1034**: 50-63

Kayisli UA, Luk J, Guzeloglu-Kayisli O, Seval Y, Demir R, Arici A (2004b) Regulation of angiogenic activity of human endometrial endothelial cells in culture by ovarian steroids. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(11): 5794-5802

Koninckx PR, Barlow D, Kennedy S (1999) Implantation versus infiltration: the Sampson

versus the endometriotic disease theory. *Gynecol Obstet Invest* **47 Suppl 1**: 3-9; discussion 9-10

Kwong JQ, Henning MS, Starkov AA, Manfredi G (2007) The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis. *J Cell Biol* **179(6)**: 1163-1177

Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* **15(11)**: 5001-5011

Leonard JV, Schapira AH (2000) Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* **355(9200)**: 299-304

Levin ER (2005) Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* **19(8)**: 1951-1959

Liu DT, Hitchcock A (1986) Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol* **93(8)**: 859-862

Markham SM, Parmley TH, Murphy AA, Huggins GR, Rock JA (1987) Cervical agenesis combined with vaginal agenesis diagnosed by magnetic resonance imaging. *Fertil Steril* **48(1)**: 143-145

Matarese G, De Placido G, Nikas Y, Alviggi C (2003) Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends Mol Med* **9(5)**: 223-228

Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Canis M, Sasano H, Okamura K (2001) Expression of estrogen receptor alpha and beta in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* **75(6)**: 1198-1205

Matsuzaki S, Uehara S, Murakami T, Fujiwara J, Funato T, Okamura K (2000) Quantitative analysis of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acid levels in normal endometrium and ovarian endometriotic cysts using a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Fertil Steril* **74(4)**: 753-759

Metzger DA, Lessey BA, Soper JT, McCarty KS, Jr., Haney AF (1991) Hormone-resistant endometriosis following total abdominal hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy: correlation with histology and steroid receptor content. *Obstet Gynecol* **78(5 Pt 2)**: 946-950

Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA

(2001) Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem* **44**(24): 4230-4251

Monje P, Boland R (1999) Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus. *Mol Cell Endocrinol* **147**(1-2): 75-84

Monje P, Boland R (2001) Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J Cell Biochem* **82**(3): 467-479

Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters* **392**(1): 49-53

Nakada K, Inoue K, Ono T, Isobe K, Ogura A, Goto YI, Nonaka I, Hayashi JI (2001) Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* **7**(8): 934-940

Nieminen AL, Saylor AK, Herman B, Lemasters JJ (1994) ATP depletion rather than mitochondrial depolarization mediates hepatocyte killing after metabolic inhibition. *Am J Physiol* **267**(1 Pt 1): C67-74

Nilsen J, Diaz Brinton R (2003) Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2842-2847

Nishimura G, Proske RJ, Doyama H, Higuchi M (2001) Regulation of apoptosis by respiration: cytochrome c release by respiratory substrates. *FEBS letters* **505**(3): 399-404

Nordberg J, Arner ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* **31**(11): 1287-1312

O'Lone R, Knorr K, Jaffe IZ, Schaffer ME, Martini PG, Karas RH, Bienkowska J, Mendelsohn ME, Hansen U (2007) Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol* **21**(6): 1281-1296

Oubrahim H, Stadtman ER, Chock PB (2001) Mitochondria play no roles in Mn(II)-induced apoptosis in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9505-9510

Pavao M, Traish AM (2001) Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in

- detection, localization and analyses of estrogen receptor alpha and beta. *Steroids* **66**(1): 1-16
- Pearce ST, Jordan VC (2004) The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**(1): 3-22
- Pedram A, Razandi M, Wallace DC, Levin ER (2006) Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol Biol Cell* **17**(5): 2125-2137
- Penefsky HS (1985) Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship to ATP synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(6): 1589-1593
- Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE (2006) The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Mol Cell Endocrinol* **246**(1-2): 21-33
- Rachagan SP, Zawiah S, Menon A (1996) Extra pelvic endometriosis and catamenial pneumothorax. *Med J Malaysia* **51**(4): 480-481
- Ryan IP, Taylor RN (1997) Endometriosis and infertility: new concepts. *Obstet Gynecol Surv* **52**(6): 365-371
- Scarmato VJ, Levine MS, Herlinger H, Wickstrom M, Furth EE, Tureck RW (2000) Ileal endometriosis: radiographic findings in five cases. *Radiology* **214**(2): 509-512
- Simpkins JW, Yang SH, Sarkar SN, Pearce V (2008) Estrogen actions on mitochondria-Physiological and pathological implications. *Mol Cell Endocrinol*
- Skulachev VP (2001) Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* **26**(1): 23-29
- Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD, Jr., Chen LB (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9): 3671-3675
- Solakidi S, Psarra AM, Sekeris CE (2005) Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ERalpha in the nucleoli and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Biochim Biophys Acta* **1745**(3): 382-392

Starzinski-Powitz A, Gaetje R, Zeitvogel A, Kotzian S, Handrow-Metzmacher H, Herrmann G, Fanning E, Baumann R (1998) Tracing cellular and molecular mechanisms involved in endometriosis. *Hum Reprod Update* **4**(5): 724-729

Suen DF, Norris KL, Youle RJ (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* **22**(12): 1577-1590

Sugioka R, Shimizu S, Tsujimoto Y (2004) Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* **279**(50): 52726-52734

Suzuki S, Higuchi M, Proske RJ, Oridate N, Hong WK, Lotan R (1999) Implication of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome C and caspase-3 in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *Oncogene* **18**(46): 6380-6387

Taanman JW (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* **1410**(2): 103-123

Thomas ET, Prentice A (1992) The aetiology and pathogenesis of endometriosis. *Reprod Med Rev* **1**: 21-36

Tripathi P, Hildeman D (2004) Sensitization of T cells to apoptosis--a role for ROS? *Apoptosis* **9**(5): 515-523

van der Linden PJ (1996) Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod* **11 Suppl 3**: 53-65

Van Schil PE, Vercauteren SR, Vermeire PA, Nackaerts YH, Van Marck EA (1996) Catamenial pneumothorax caused by thoracic endometriosis. *Ann Thorac Surg* **62**(2): 585-586

Wada-Hiraike O, Hiraike H, Okinaga H, Imamov O, Barros RP, Morani A, Omoto Y, Warner M, Gustafsson JA (2006) Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18350-18355

Wallace DC (1992) Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* **256**(5057): 628-632

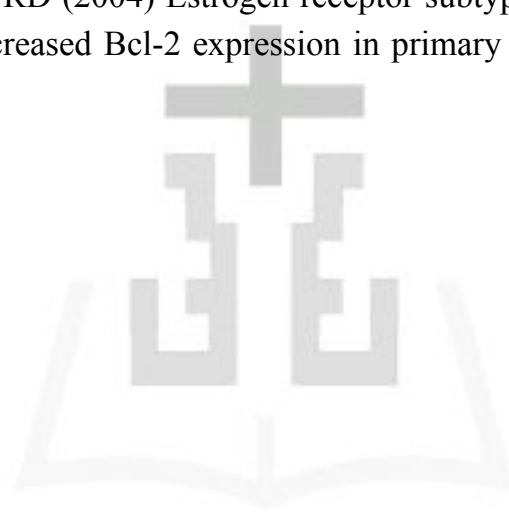
Wei YH (1998) Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* **217**(1): 53-63

Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM, Jr., Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P, Simpkins JW (2004) Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(12): 4130-4135

Zhang H, Niu Y, Feng J, Guo H, Ye X, Cui H (2006) Use of proteomic analysis of endometriosis to identify different protein expression in patients with endometriosis versus normal controls. *Fertil Steril* **86**(2): 274-282

Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA (2008) Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal* **6**: e003

Zhao L, Wu TW, Brinton RD (2004) Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res* **1010**(1-2): 22-34



附表

Table 1 Oligonucleotides used in the study.

Name	DNA sequences
Nuclear DNA	
β -actin sense	5'-CATGTGCAAGGCCGGCTTC-3'
β -actin antisense	5'-CTGGGTCATCTTCTCGCGGT-3'
β -globin sense	5'-GATCCTGAGACTTCCACACT-3'
β -globin antisense	5'-ACCTGACTGAGGAGAAG-3'
Mitochondrial DNA	
ND1 (3079-3096)	5'-TGGGTACAATGAGGAGTAGG-3'
ND1 (3343-3324)	5'-GGAGTAATCCAGGTCGGT-3'
D-loop (15997-16017)	5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3'
D-loop (640-621)	5'-GGGGTGATGTGAGCCCGTCT-3'



附圖

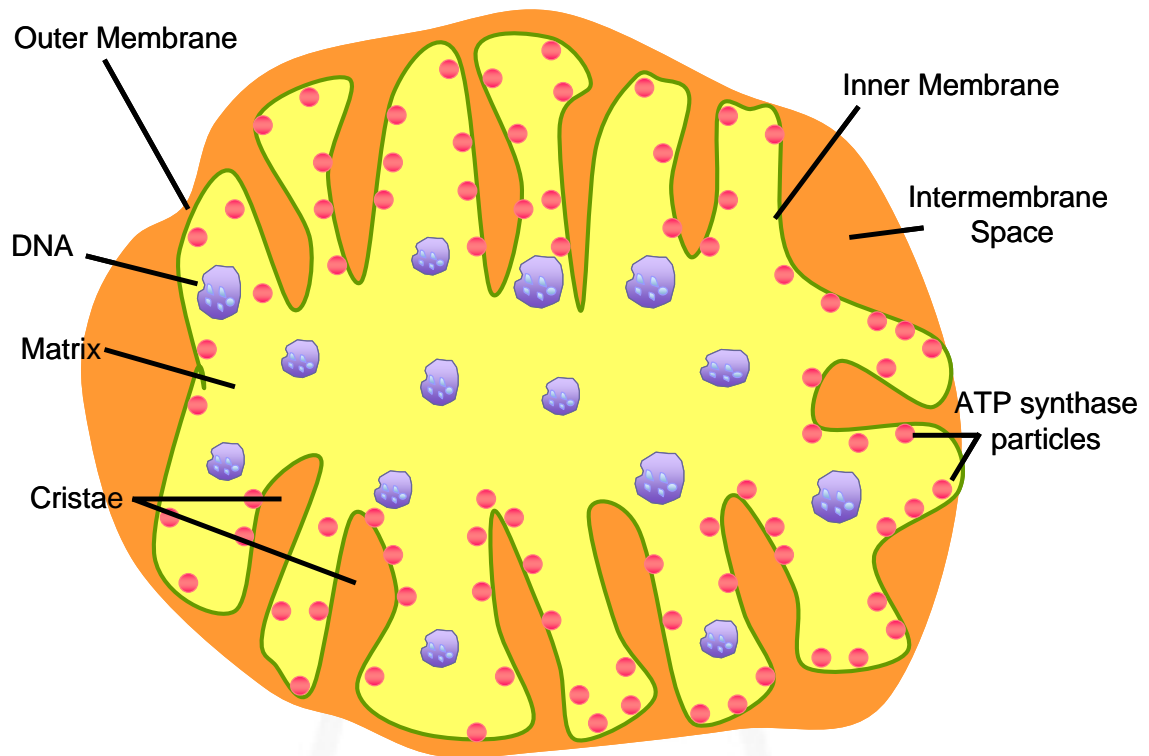


Fig. 1 Membrane structure and intra-organelle organization of mitochondrion.

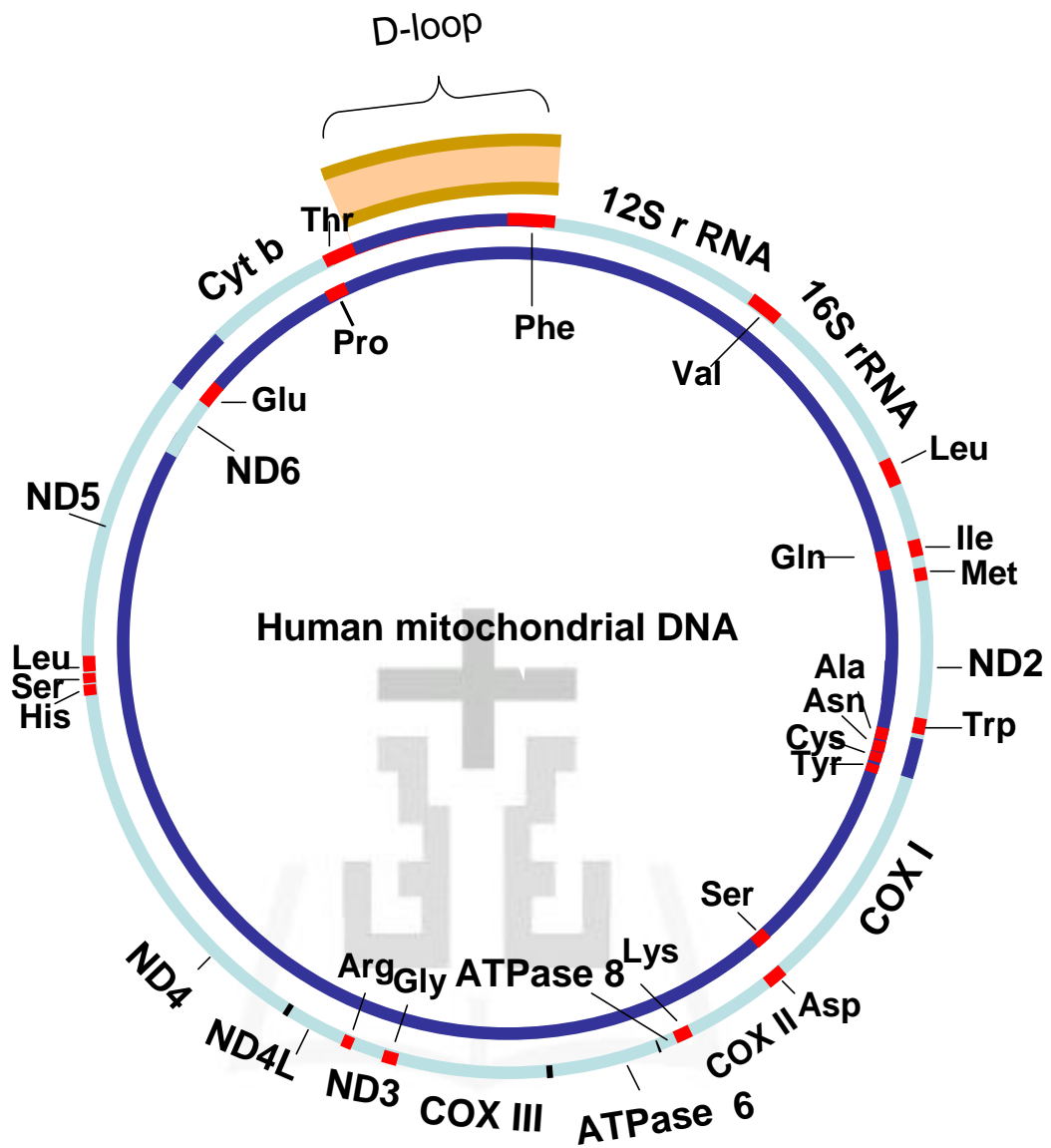


Fig. 2 Histogram of human mitochondrial DNA.

Structural domains of the human ER β

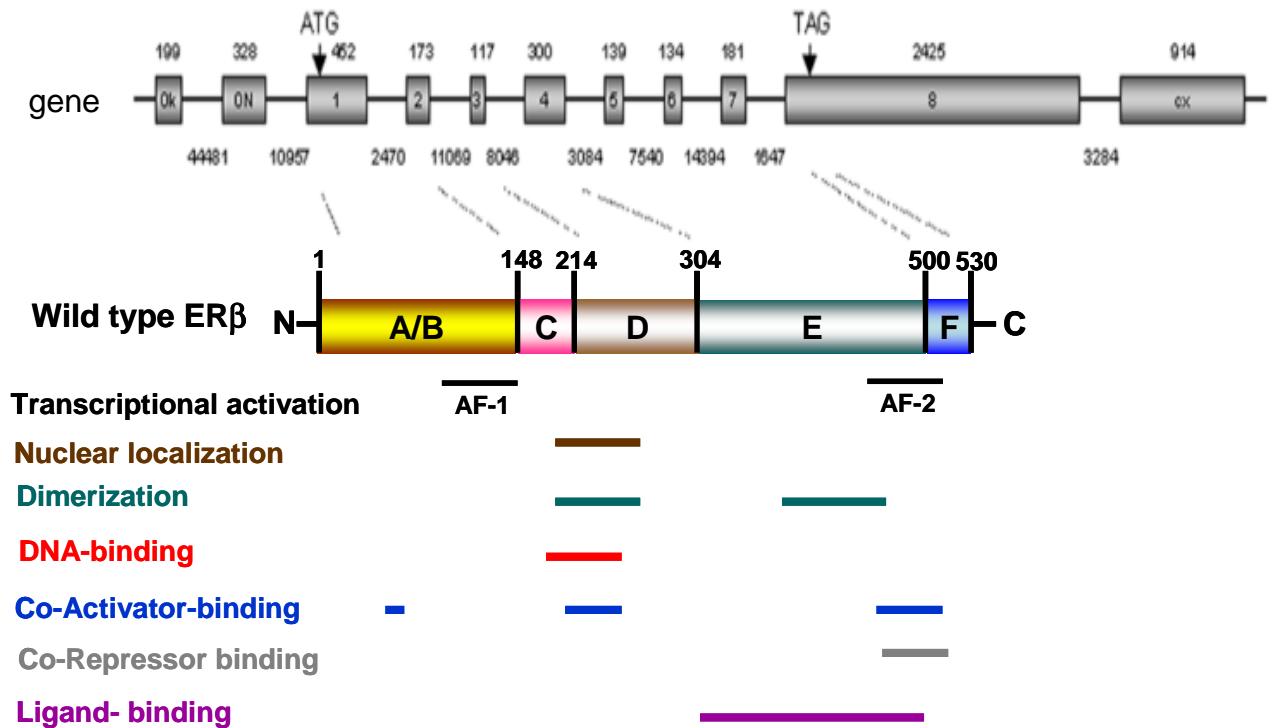


Fig. 3 Structure of the human ER β protein and functional domains.

ER β has five distinguishable domains. They are named the A/B, C, D, E and F domains, respectively. The N-terminal A/B domain is the most variable region and may contribute to ER subtype-specific actions on target genes. This region harbors an activation function (AF-1) that is ligand-independent and shows promoter- and cell-specific activity. The central C-domain is the DNA-binding domain (DBD), which is involved in specific DNA binding and receptor dimerization. The D-domain works as a flexible hinge between the DBD and the ligand-binding domain (LBD), and is thus referred to as the hinge domain. This domain appears to be important for nuclear translocation and has been reported to contain a nuclear localization signal. The E-domain is referred to as the LBD contains a hormone-dependent activation function (AF-2) and is important for ligand binding and receptor dimerization. The function of F-domain still remains undefined.

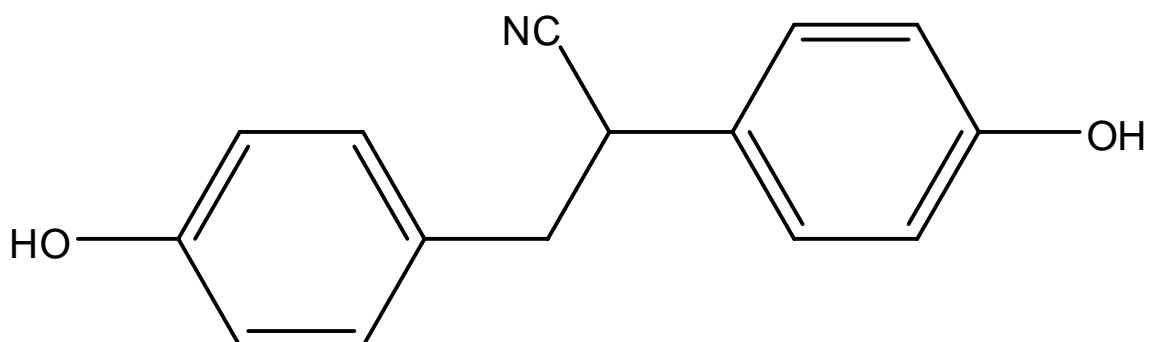


Fig. 4 The chemical structure of diarylpropionitrile (DPN).

2,3-bis(4-hydroxyphenyl)propionitrile (DPN) is an estrogen receptor β (ER β) selective agonist. DPN exhibits a 70-fold higher relative binding affinity for ER β versus ER α . DPN is commonly used a tool to evaluate the biological role of ER β .

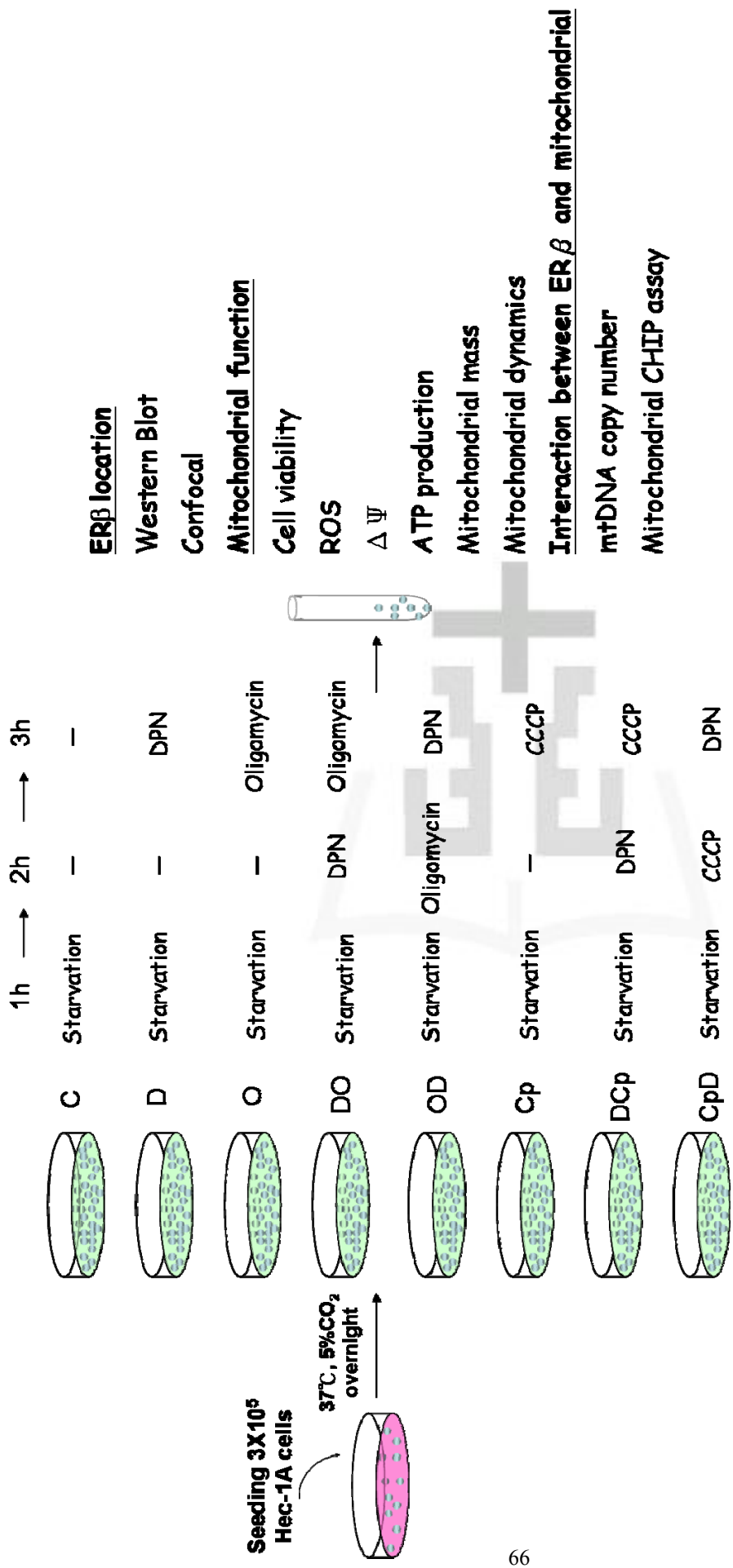


Fig. 5 Flow chart of experiments.

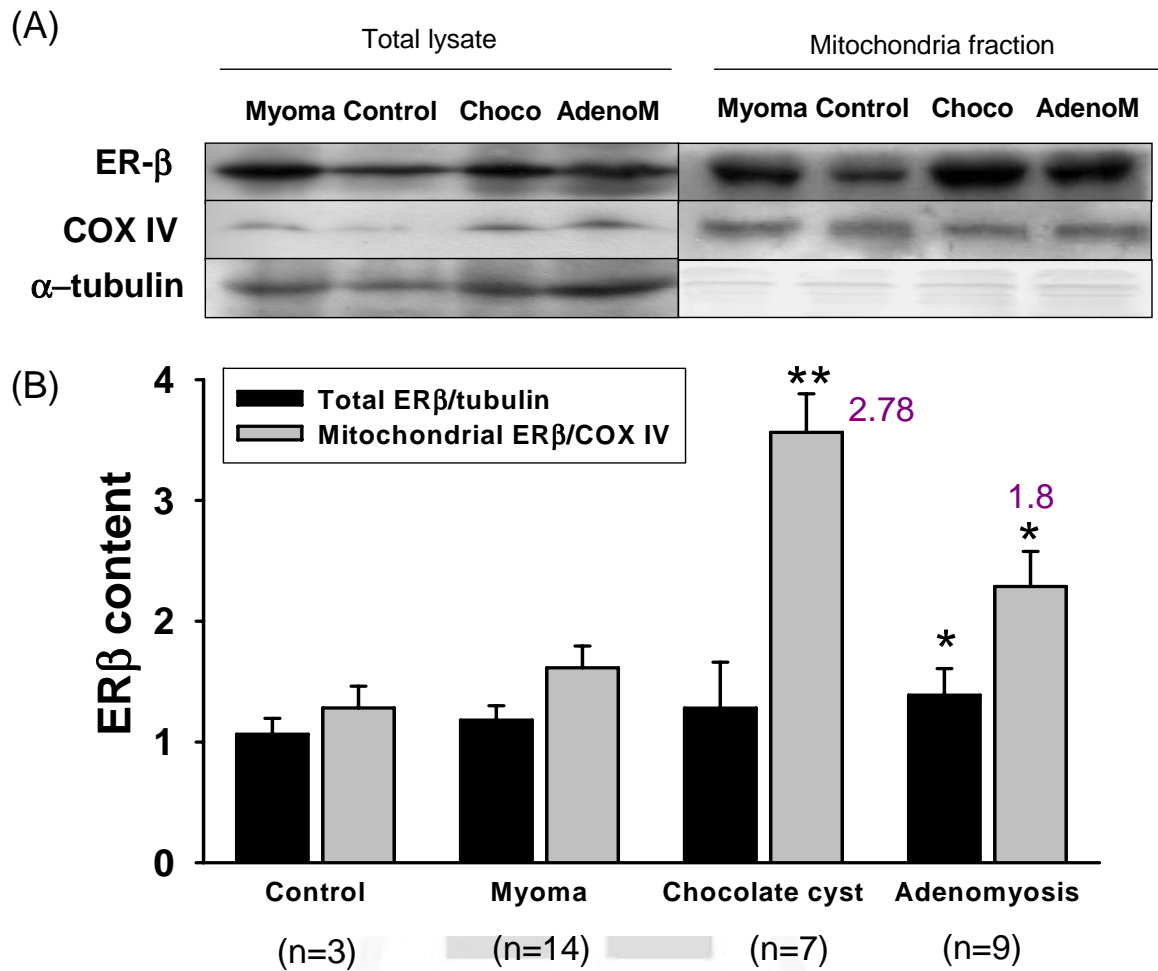


Fig. 6 Persence of mitochondrial ER β was demonstrated in the endometiotic tissues.

Mitochondrial ER β was detected in the total lysate or mitochondrial fraction of the endometiotic tissues by Western Blot. (A) The immunoblots were performed with anti-ER β antibody, and the mitochondrial fractionation of each endometrial or endometiotic tissue was prepared by sucrose gradients and checked for the purity with mitochondrial marker protein-COX IV and cytoplasmic protein, α -tubulin. Control, endometrium from endometrial hyperplasia, Choco, chocolate cyst, AdenoM, adenomyosis. (B) The values of ER β content were presented as percentage of the control. Plots are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) . *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ compared with the control.

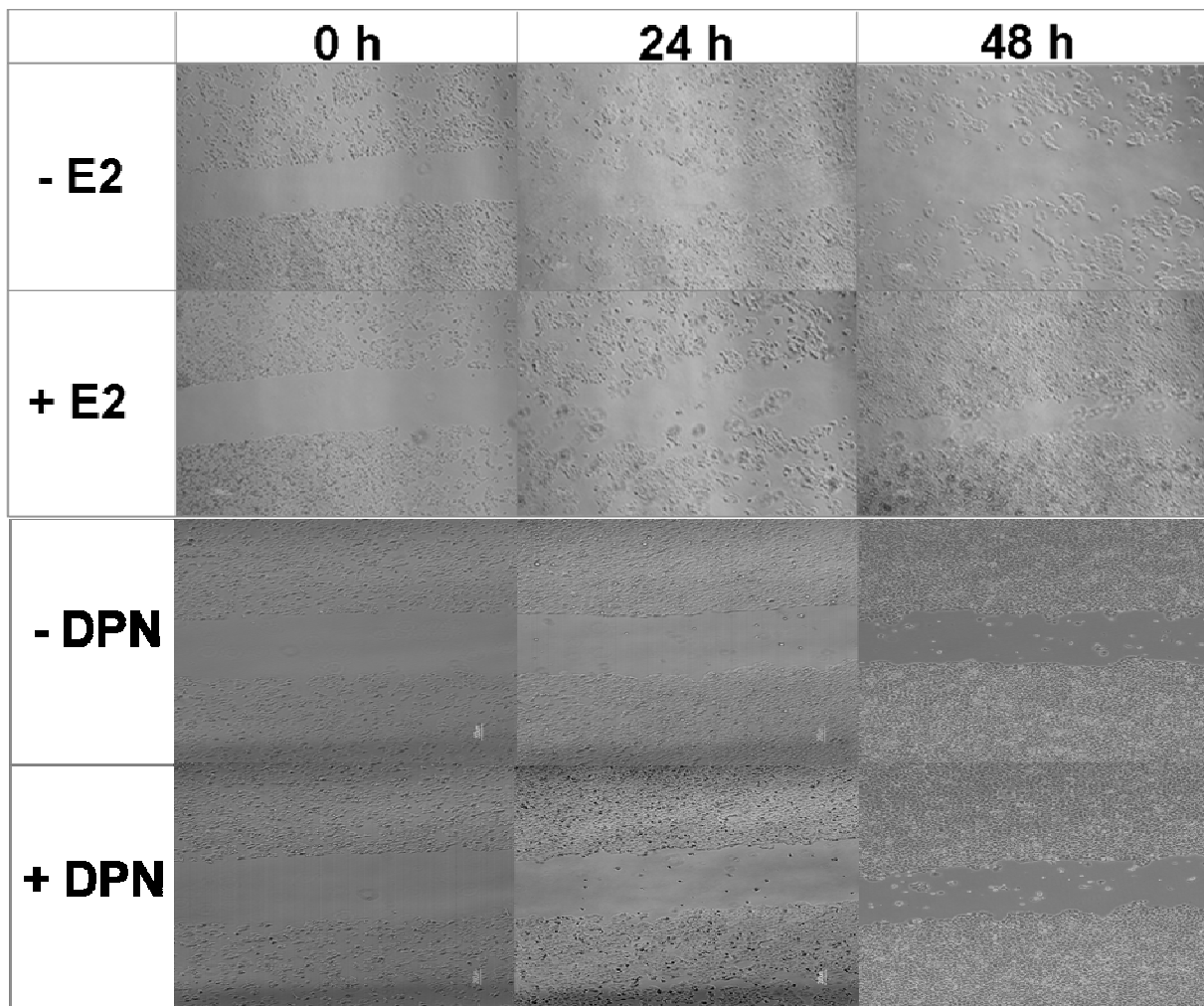


Fig. 7 Effect of estradiol (E₂) and DPN (ERβ agonist) on cell migration.

By scratch-wound assay, about 2×10^5 Hec1A cells were cultured in the medium containing 10nM estradiol or 10 nM DPN for 24 hr or 48hr. Estradiol was shown to promote endometriotic cell migration, but not promoted by DPN. Twelve randomly selected high-power fields were counted.

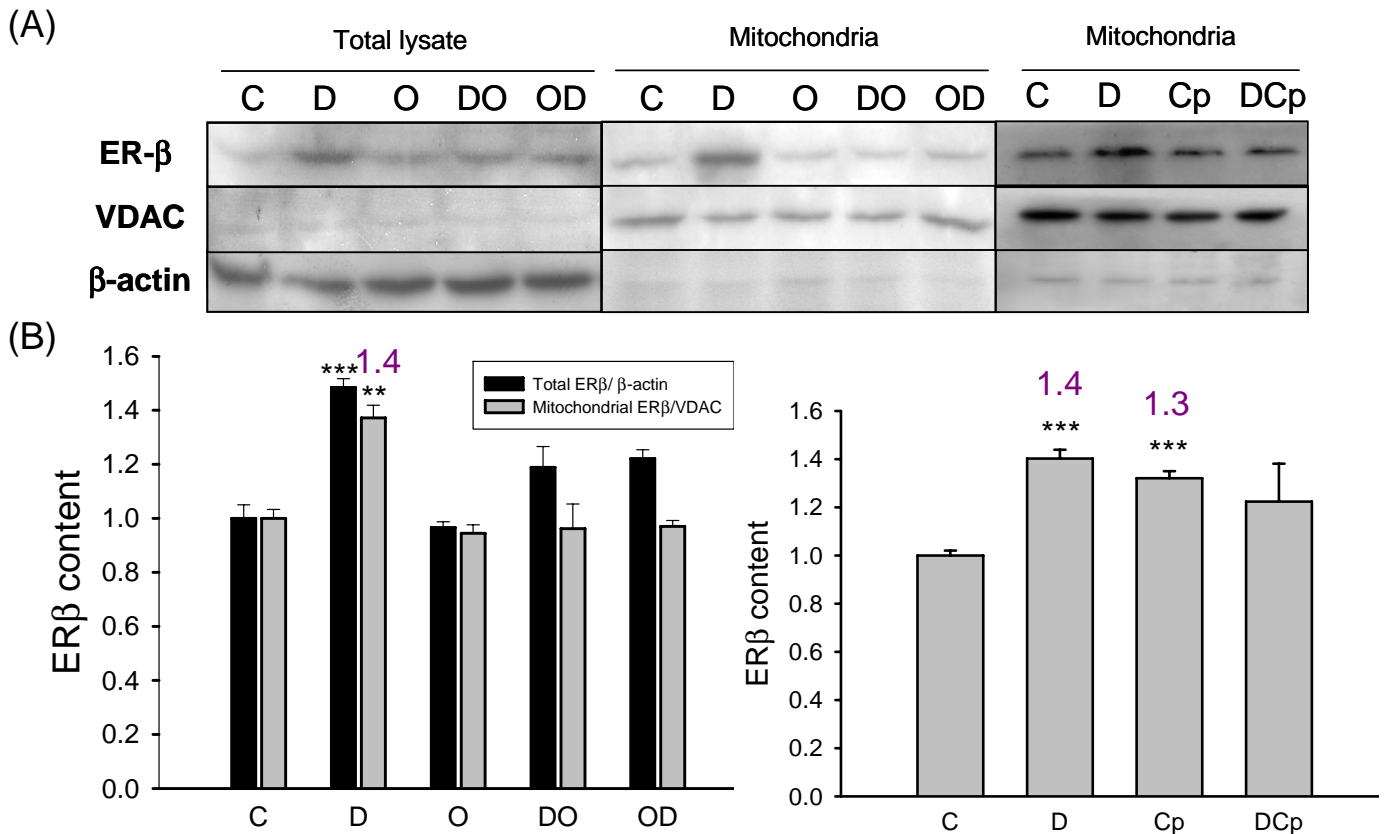
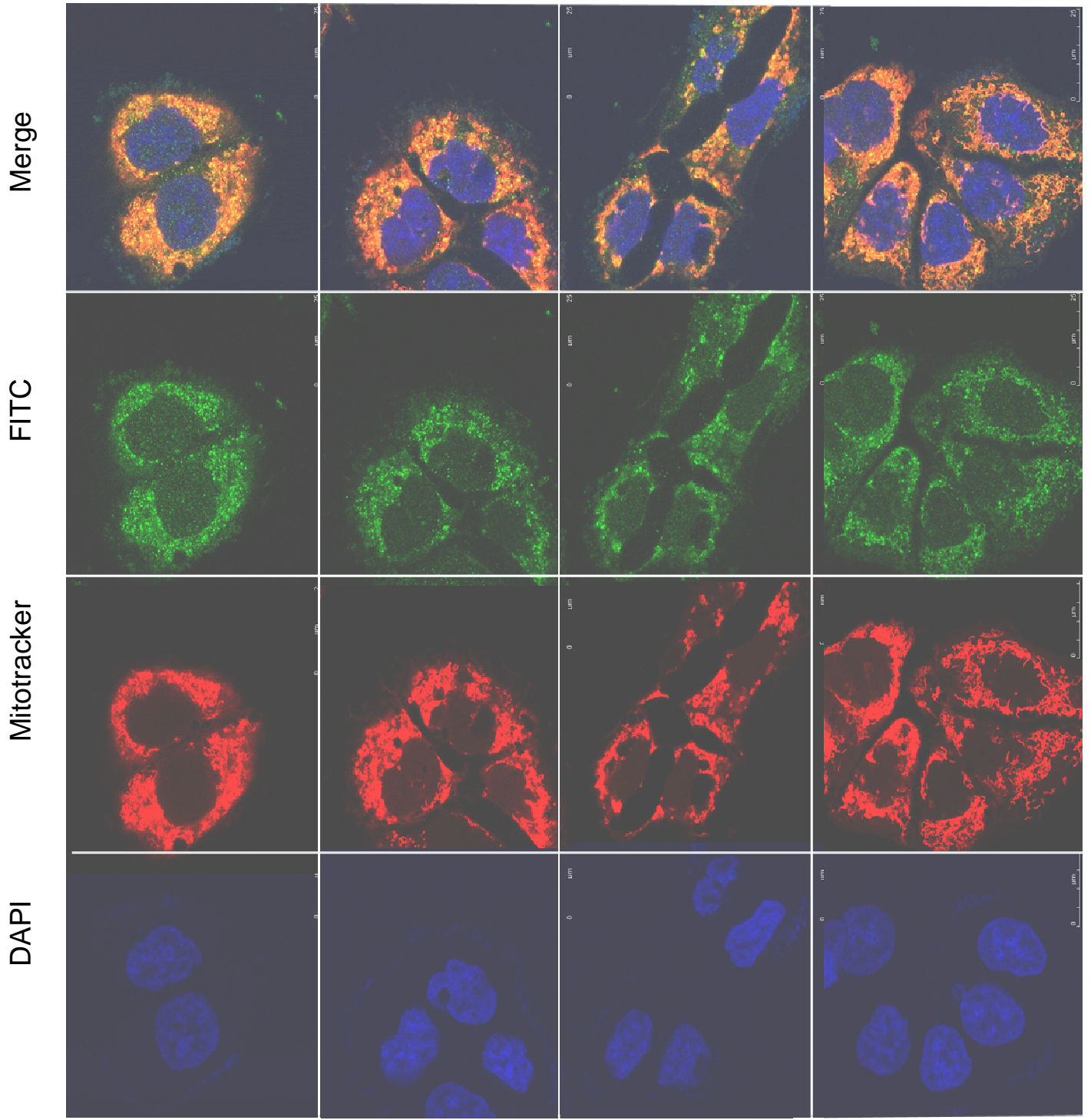


Fig. 8 Translocation of ER β into mitochondria by DPN treatment.

Hec-1A cells were cultured under differential conditions. C, control group, serum free and phenol red-free medium; D, DPN group, 10 nM DPN for 1hr; O, oligomycin group, 5 μ g/ml oligomycin (the mitochondrial ATP synthase inhibitor) for 1hr; DO group, pre-treated with 10 nM DPN for 1hr and then 5 μ g/ml oligomycin for 1hr; OD group, pre-treated with oligomycin for 1hr and then DPN for 1hr; Cp, CCCP group, 2 μ M CCCP (the mitochondrial uncoupler) for 1hr; DCp group, pre-treated with DPN for 1hr and then CCCP for 1hr. Following the differential treatment, the mitochondrial fraction was purified. The mitochondrial ER β was found to be induced with DPN treatment for 1 h. Mitochondrial ER β was found to be decreased by ATP synthase inhibitor treatment but increased under mitochondrial uncoupler treatment. The reduction was partially recovered by the pre-incubation with DPN. Data are presented as mean \pm S.E.M.(n=3); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ compared with the control.

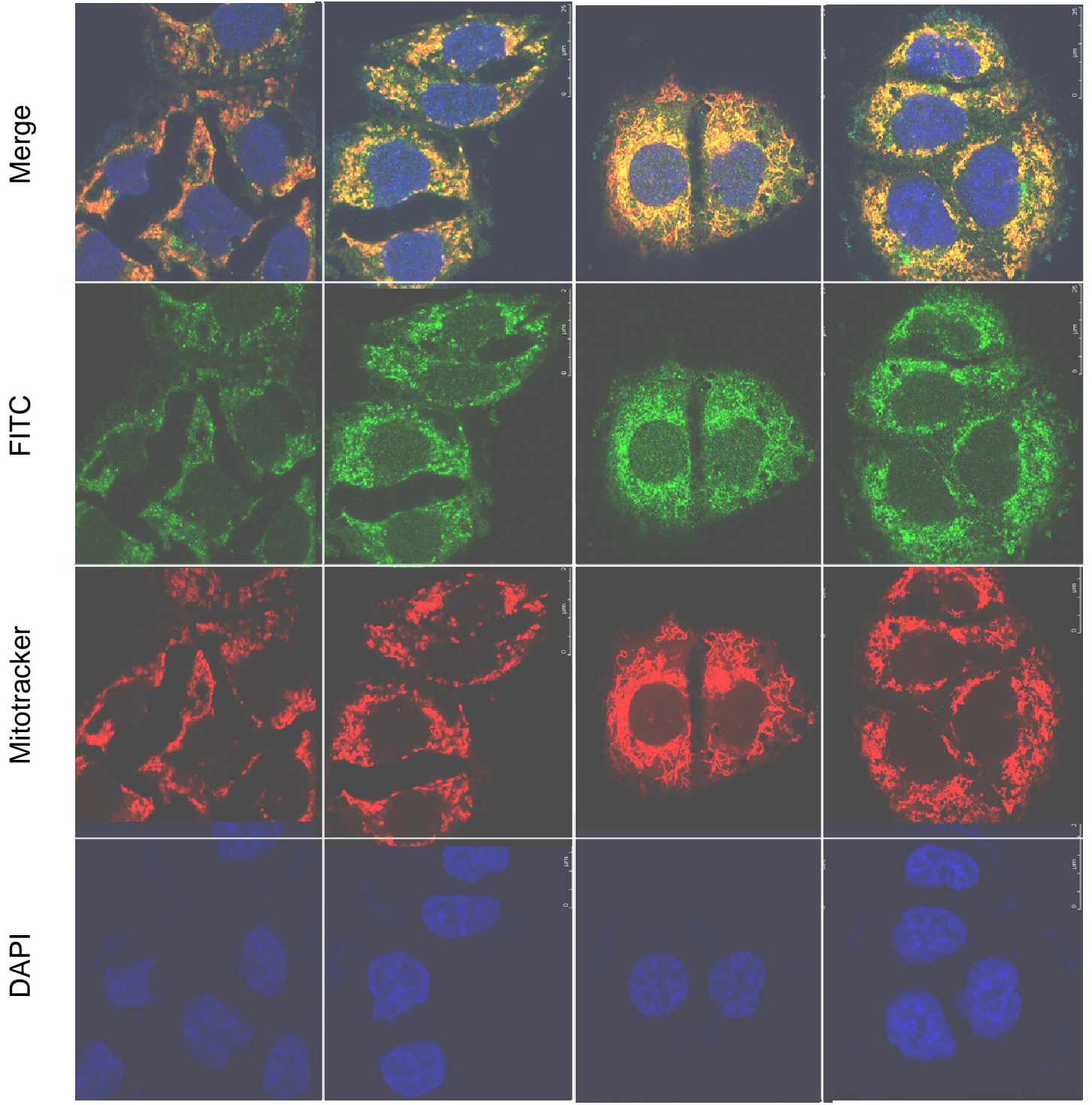


Ctrl

D

O

Cp



DO

OD

DCp

CpD

Fig. 9 Confocal images of ER β localization followed DPN treatment.

Cells were cultured under eight conditions, (A) C, ER β was localized in nucleus, cytoplasm, and mitochondria. (B) D, mitochondrial localization of ER β was observed followed DPN treatment. (C) O, (D) DO and (E) OD, ER β was found to be localized in mitochondria and cytoplasm followed oligomycin treatment. (F) Cp, followed CCCP treatment, ER β was predominantly found in mitochondria. (G) DCp and (H) CpD, ER β was observed in mitochondria, cytoplasm, and nucleus. In these pictures, the green fluorescent images were ER β by immunostaining with anti-ER β -FITC. The red fluorescent images were mitochondria labeled with MitoTracker Red COXRos. The blue fluorescence was nucleus by DAPI staining.



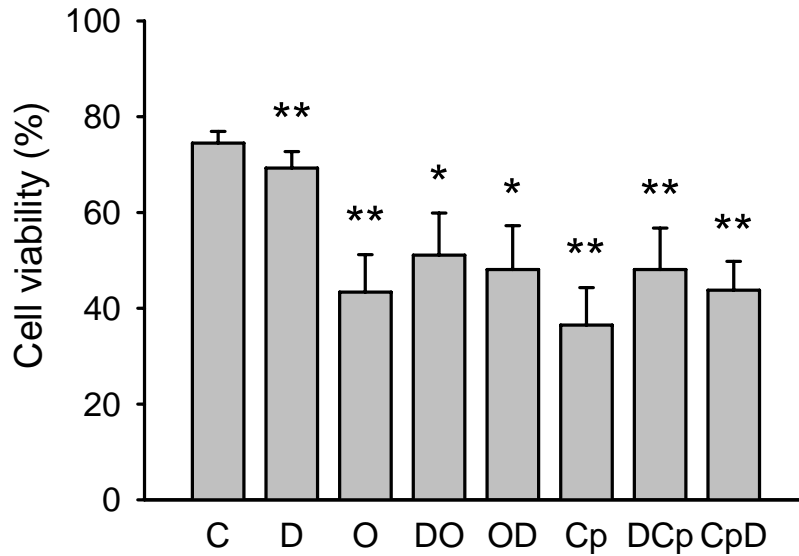


Fig. 10 Rescue of the Hec-1A cells from oligomycin or CCCP-induced cell death.

In this assay, Hec-1A cells were cultured under eight conditions, (1)C, control group, serum free and phenol red-free medium, (2)D, DPN group, 10 nM DPN for 1hr, (3)O, oligomycin group, 5 μ g/ml oligomycin (the mitochondrial ATP synthase inhibitor) for 1hr, (4)DO group, pre-treated with 10 nM DPN for 1hr and then oligomycin for 1hr, (5)OD group, pre-treated with oligomycin for 1hr and then DPN for 1hr, (6) Cp, CCCP group, 2 μ M CCCP (the mitochondrial uncoupler) for 1hr, (7)DCp group, pre-treated with 10 nM DPN for 1hr and then CCCP for 1hr, (8)CpD group, pre-treated with CCCP for 1hr and then DPN for 1hr were detected cell viability by dye exclusion method. The results from three independent experiments were normalized to the control group. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=3); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ compared with the control.

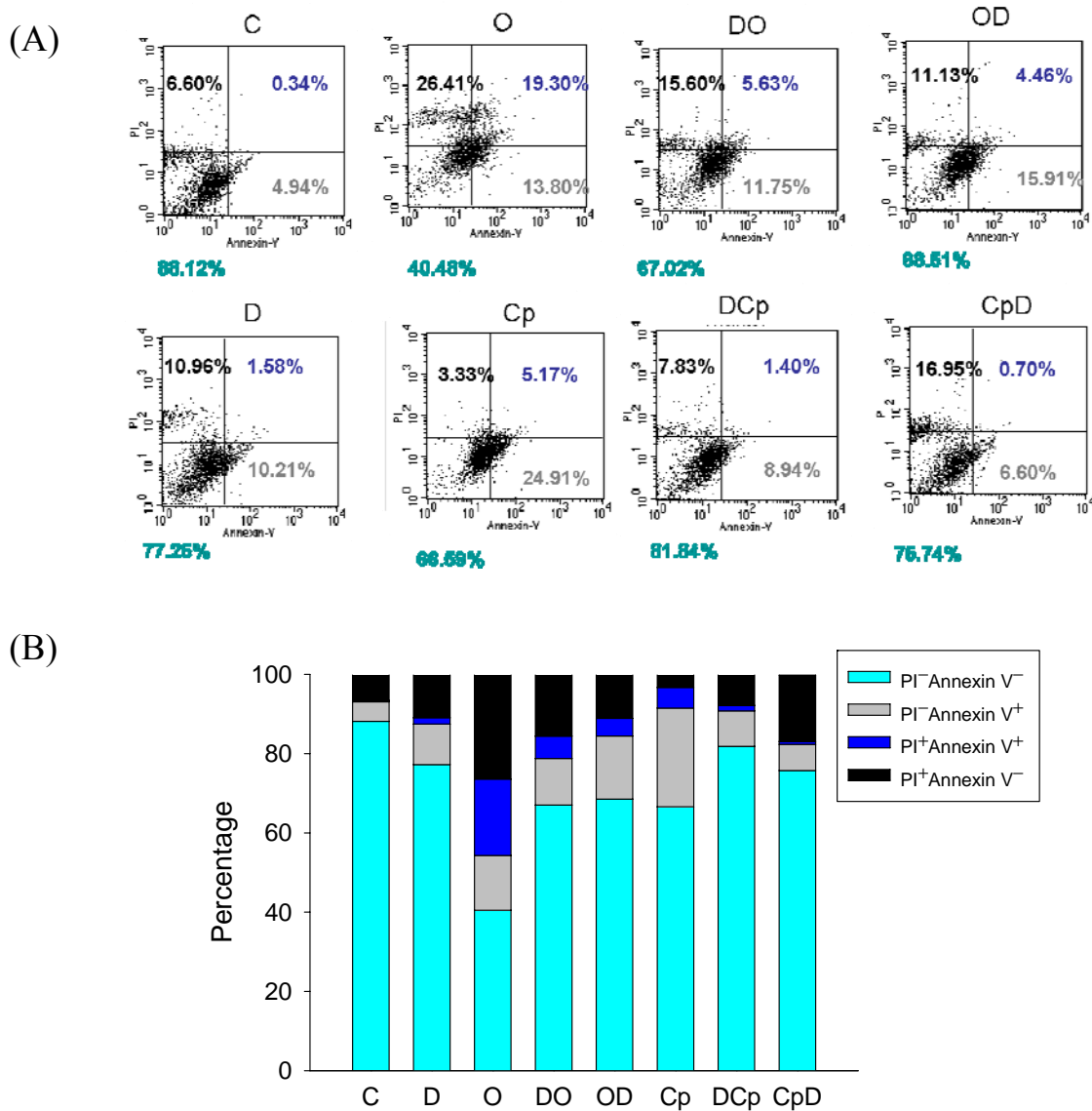


Fig. 11 Apoptosis assay by flow cytometry after treatment of the cells with DPN, oligomycin, or CCCP.

(A) Dot plots of cell apoptosis by flow cytometry were shown in eight groups. The eight groups were obtained and the relative percentages of cells at the differential cell apoptotic stages were presented. The lower-left field is indicated as viable cells, the lower-right field is the early apoptotic (AV-FITC positive), and the upper-left is the late apoptotic (PI-positive) cells. (B) Flow data expressed as stack diagram, the data were presented of three experiments, in which the induction of apoptosis by oligomycin or CCCP, and the cytoprotection by DPN treatment.

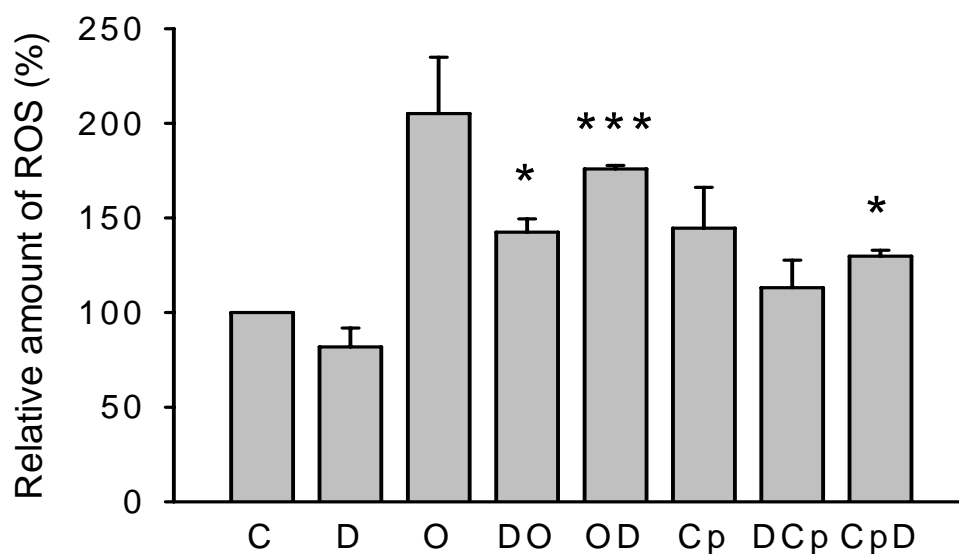


Fig. 12 Effect of DPN, oligomycin, and CCCP on ROS generation.

Cells were cultured under eight conditions as previously described. Intracellular reactive oxygen species (ROS) were stained with H₂DCFDA and detected by flow cytometry. DPN was shown to reduce intracellular ROS generation. The results from independent experiments were normalized to the control group. Data are presented as mean \pm S.E.M.(n=3). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ compared with the control.

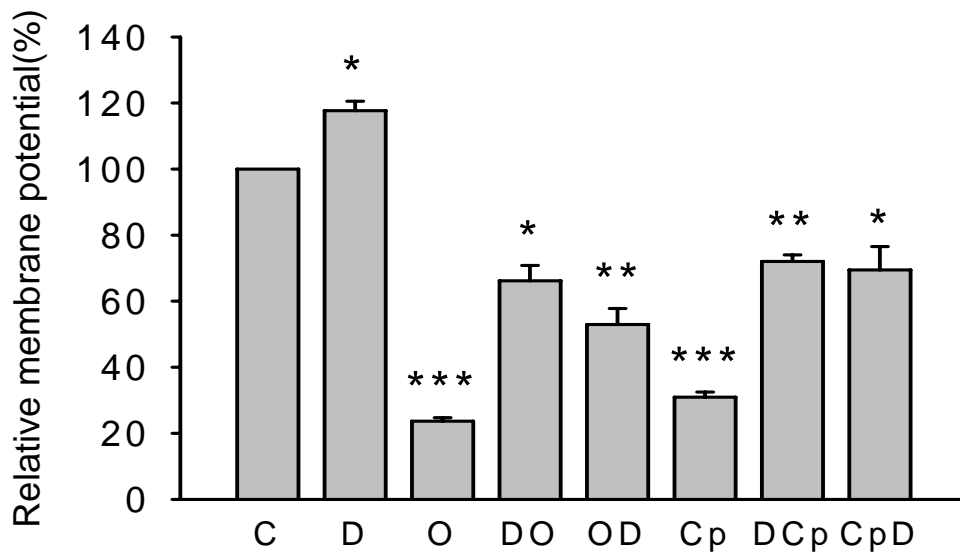


Fig. 13 Effect of DPN, oligomycin, and CCCP on mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$).

Cells cultured under eight conditions and stained with bivariate JC-1 was analyzed by flow cytometry. Oligomycin or CCCP caused perturbation of mitochondrial membrane potential. The declined membrane potential was attenuated by DPN supplementation. The results from independent experiments were normalized to the control group. Data are presented as mean \pm S.E.M.(n=3); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared with the control.

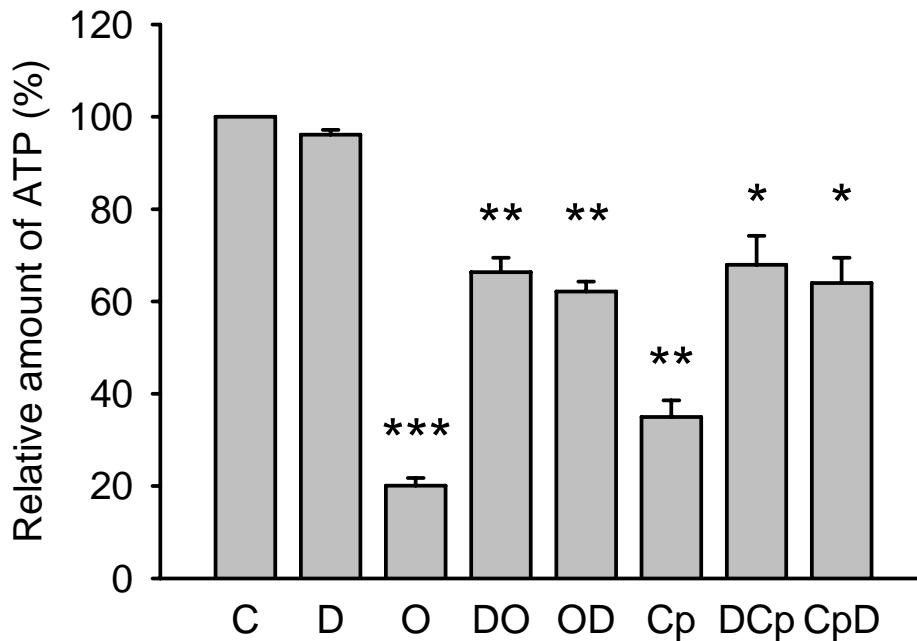


Fig. 14 DPN attenuated the ATP depletion by Oligomycin or CCCP treatment.

Hec-1A cells were cultured under eight conditions as previously described. ATP content was detected by the ATP-luciferase assay. Results indicated that DPN supplementation before or after the treatment of mitochondrial inhibitors, attenuated the decrease in ATP levels by oligomycin or CCCP. The results from independent experiments were normalized to the control group. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=3); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared with the control.

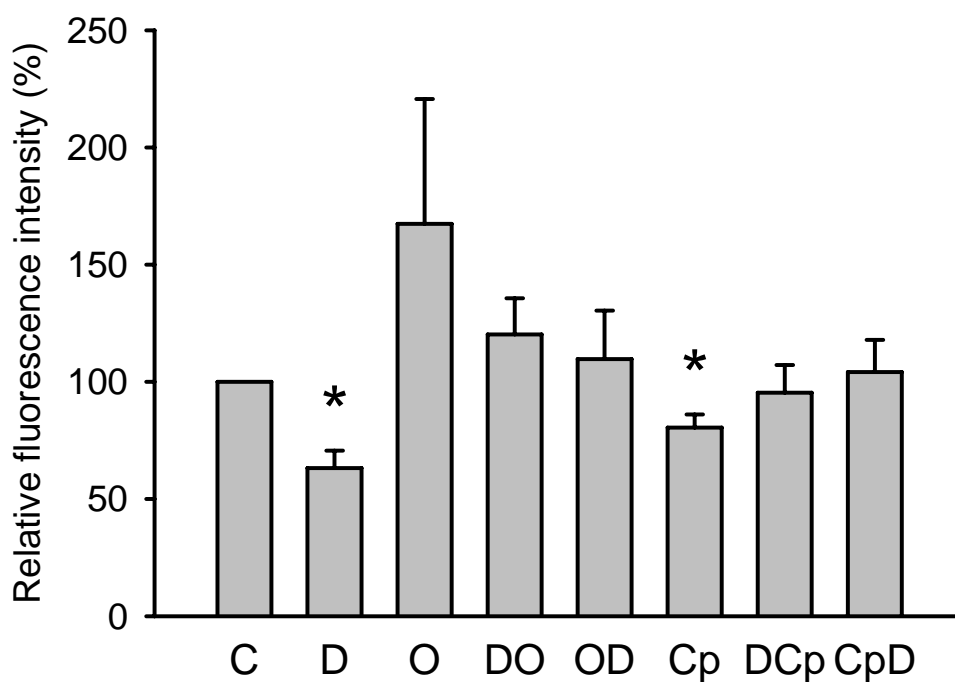


Fig. 15 Differential effects of DPN, oligomycin, and CCCP on mitochondrial mass.

Cells were cultured under eight conditions as previously described. The fluorescence intensity of mitochondrial mass was measured by Mitotraker Green™ staining and flow cytometry analysis with excitation and emission at 490 nm and 516 nm. The results from independent experiments were normalized to the control group. Data are presented as mean \pm S.E.M.(n=3); *, $p < 0.05$ compared with the control.

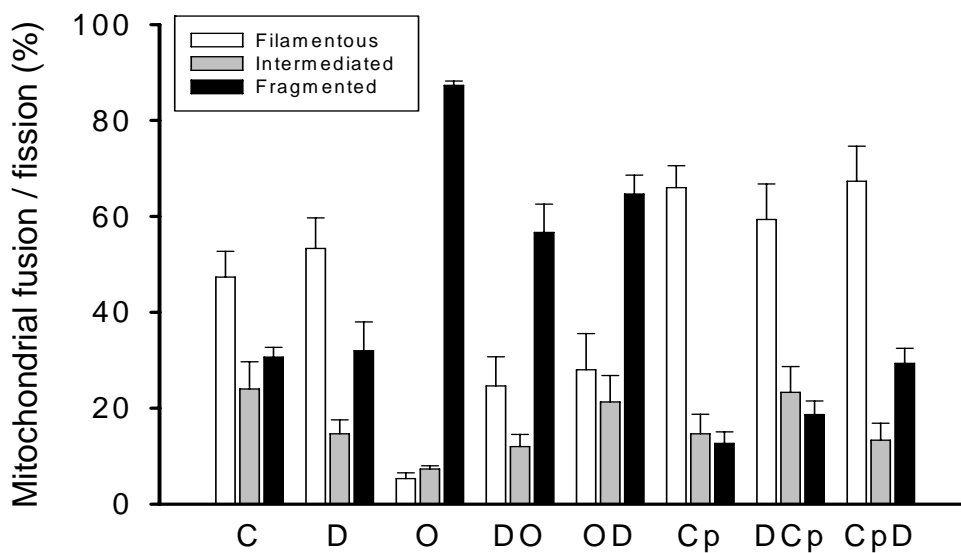
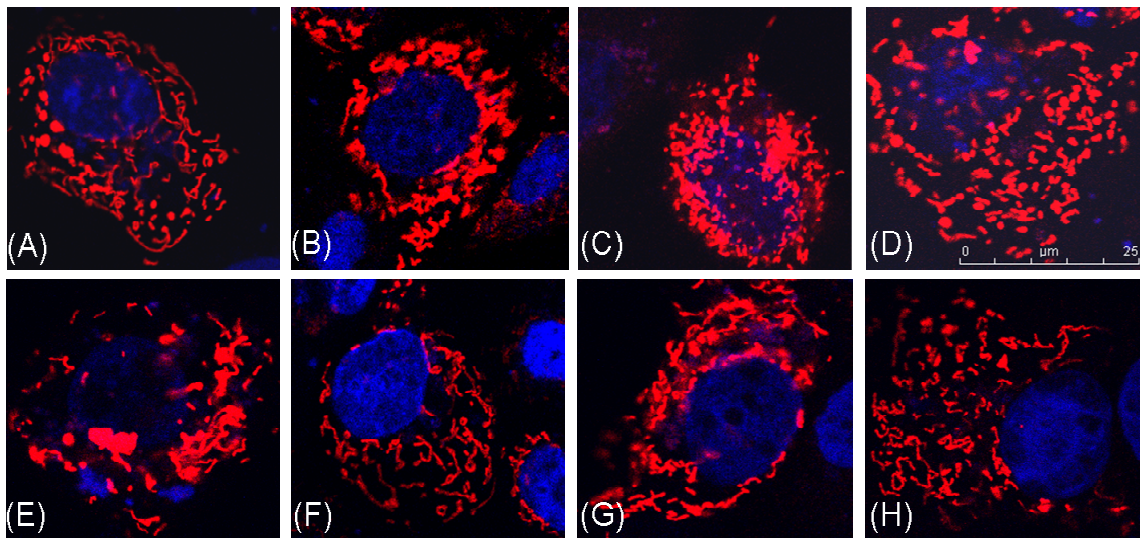


Fig. 16 Confocal images of mitochondrial morphology in the Hec-1A cells treated with DPN, oligomycin, or CCCP.

Cells were transfected with Mito-DsRed, and cultured under eight conditions as previous described. On the upper panel, (A) Control cells showed balanced mitochondrial dynamics. (B) The tubular mitochondrial network was demonstrated in the 10 nM DPN-treated cells (large tubular), (C), (D) and (E) the formation of punctiform and fragmented mitochondria was found in the oligomycin-treated cells (small dot). In contrast, (F), (G) and (H) the filamentous form of mitochondria was shown followed CCCP treatment. On the lower panel, percentage of cell population with elongated (white bar), intermediated (gray bar), fragmented (black bar) mitochondria in the cells. Data are presented as mean \pm S.E.M.(n=3).

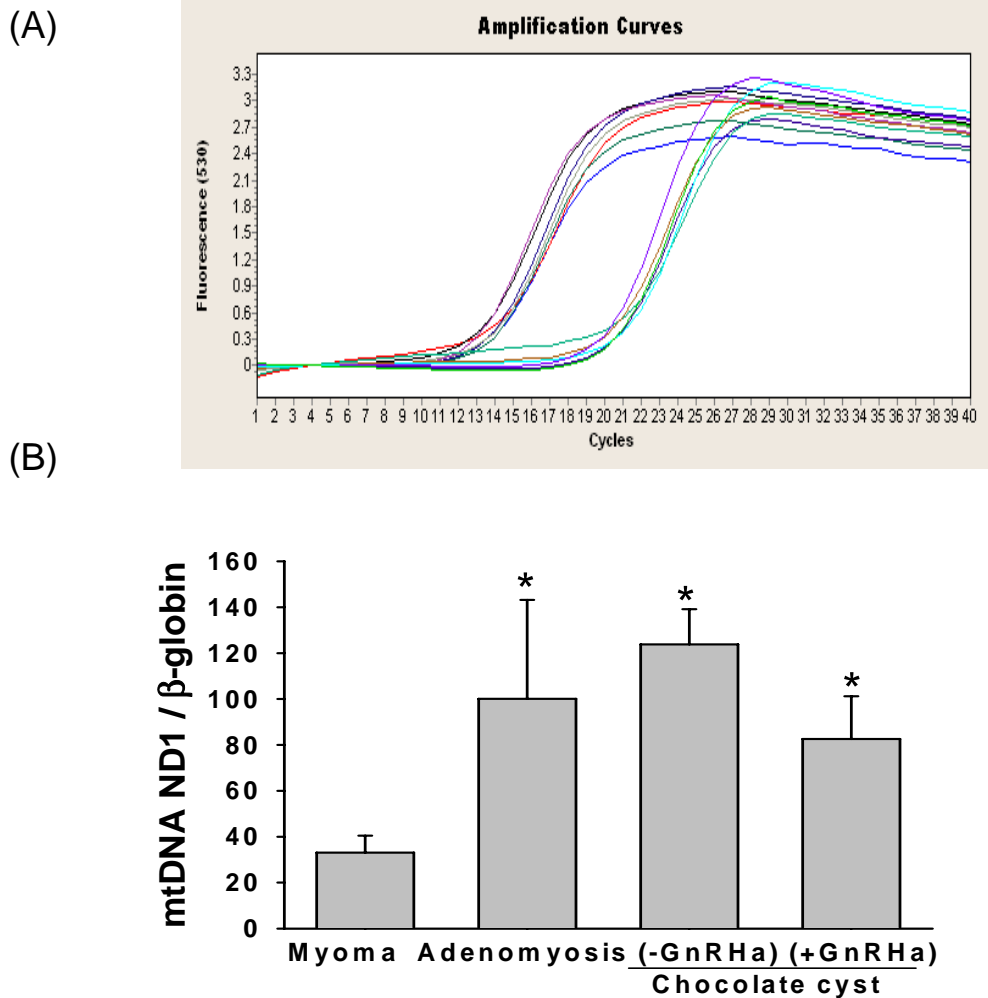


Fig. 17 Determination of mitochondrial DNA (mtDNA) copy number in human endometriotic tissues by real-time PCR.

Mitochondrial DNA (*ND-1*) and nuclear DNA (*β -globin*) of human endometriotic tissues were detected by quantitative real-time PCR. The amplification curves of real-time PCR were shown in (A). MtDNA copy number was presented as *ND-1* divided by *β -globin*. The mtDNA copy number of myoma was used as control group. -GnRHa, before GnRH Agonist therapy, +GnRHa, after GnRH agonist therapy. Data are presented as mean \pm S.E.M.(n=4).*, $p < 0.05$ compared with the control group.

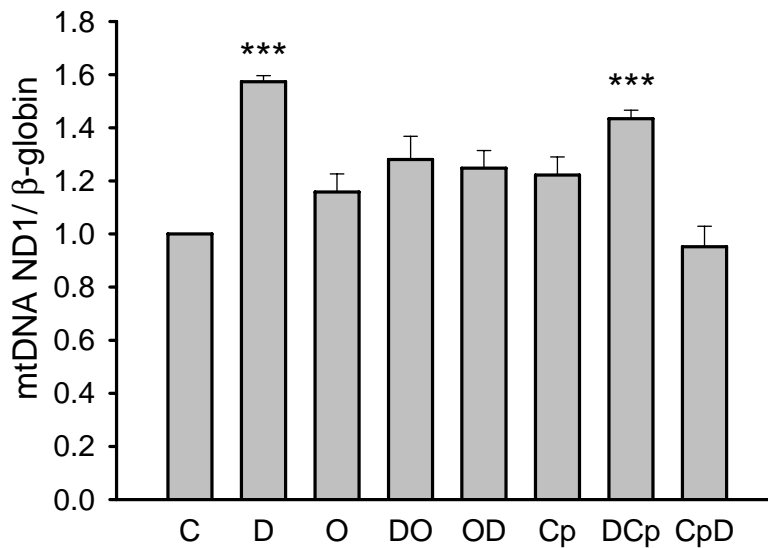


Fig. 18 Alteration of mtDNA copy numbers in the DPN, oligomycin, CCCP treatment.

Cells were cultured under eight conditions. MtDNA (*ND-1*) and nuclear DNA (*β-globin*) of the Hec1A cells were detected by quantitative real-time PCR. In the upper panel, the agarose gel electrophoretogram of *ND-1* and *β-globin* was shown. In the lower panel, MtDNA copy number was presented as *ND-1* divided by *β-globin*. Data are presented as mean ± S.E.M.(n=3).***, $p < 0.001$ compared with the control group.

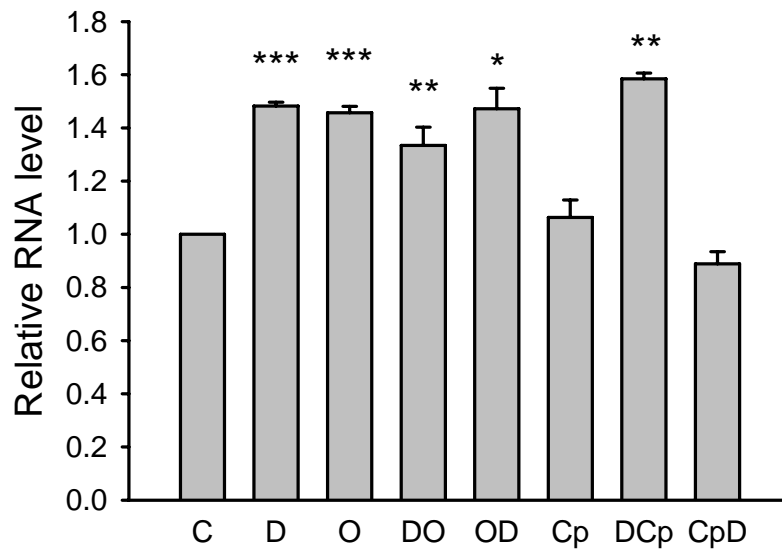


Fig. 19 Differential mitochondrial mRNA levels in the DPN, Oligomycin, CCCP-treated Hec-1A cells.

Cells were cultured under eight conditions and the levels mitochondrial mRNA were analyzed by reverse transcription and real-time PCR. Relative mitochondrial RNA levels of eight condition cells were detected by real-time PCR and presented as *ND-1* divided by *β-actin*. Data are presented as mean ± S.E.M.(n=3). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared with the control group.

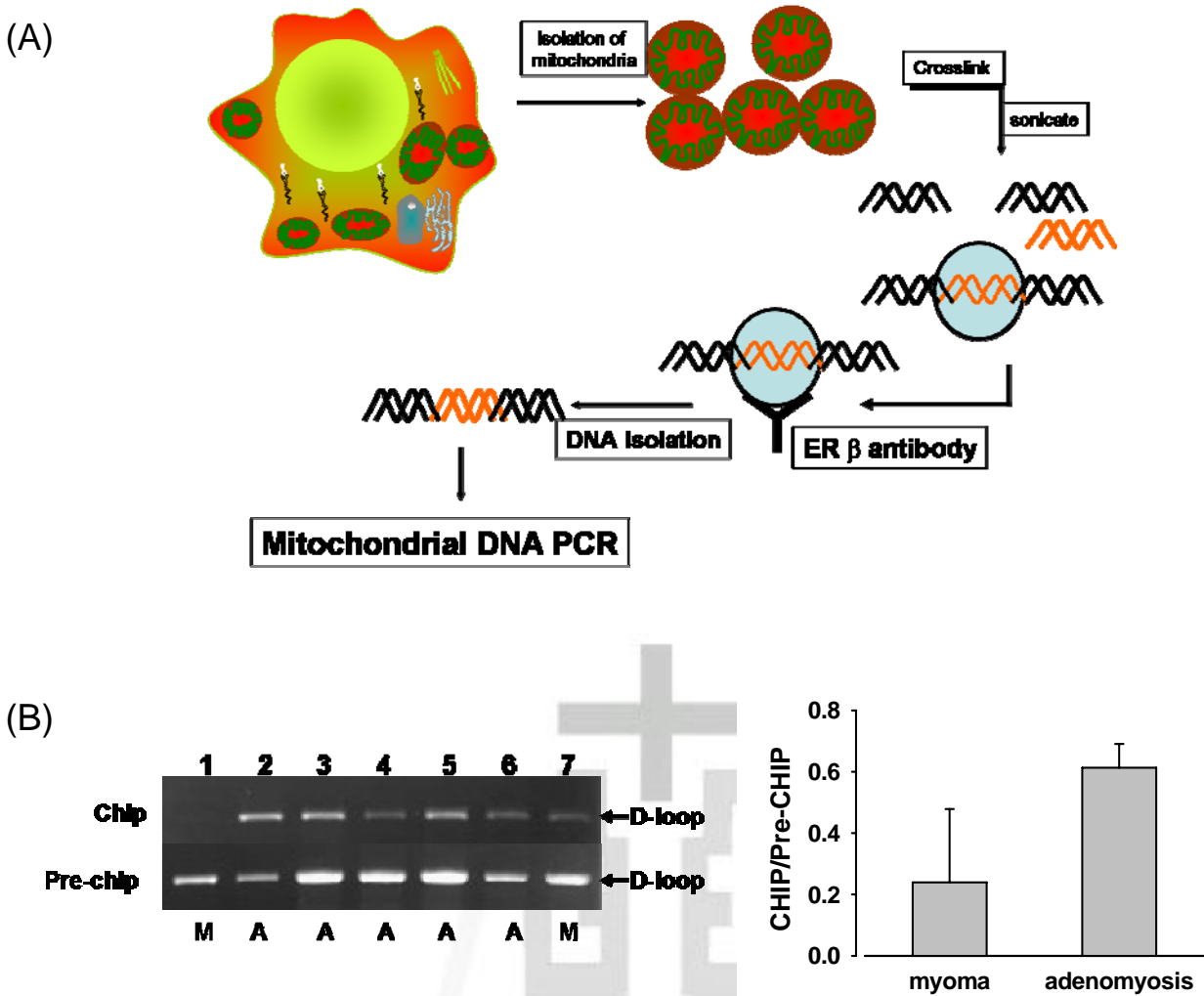


Fig. 20 Physical interaction of mitochondrial ER β with mtDNA.

The interaction between mtER β and mtDNA was detected by the mitochondrial DNA immunoprecipitation (mtDIP)-PCR method and quantitative real-time PCR to assess the alteration of mtDNA-mtER β interaction. The interacted mtDNA (after mtDIP) and total mtDNA (pre-mtDIP) was augmented in the tissue from adenomyosis and myoma. The mtER β proteins were directly interacted with mtDNA D-loop region (nt15997-640). (B)The proportion of the interacted mtER β was presented as the mtDIP fraction divided by the total mtDNA(pre-mtDIP). Data are presented as mean \pm S.E.M.(n=7). M, myoma, A, adenomyosis. Pre-mtDIP, the PCR products were generated from the mitochondrial fraction without mtDIP.

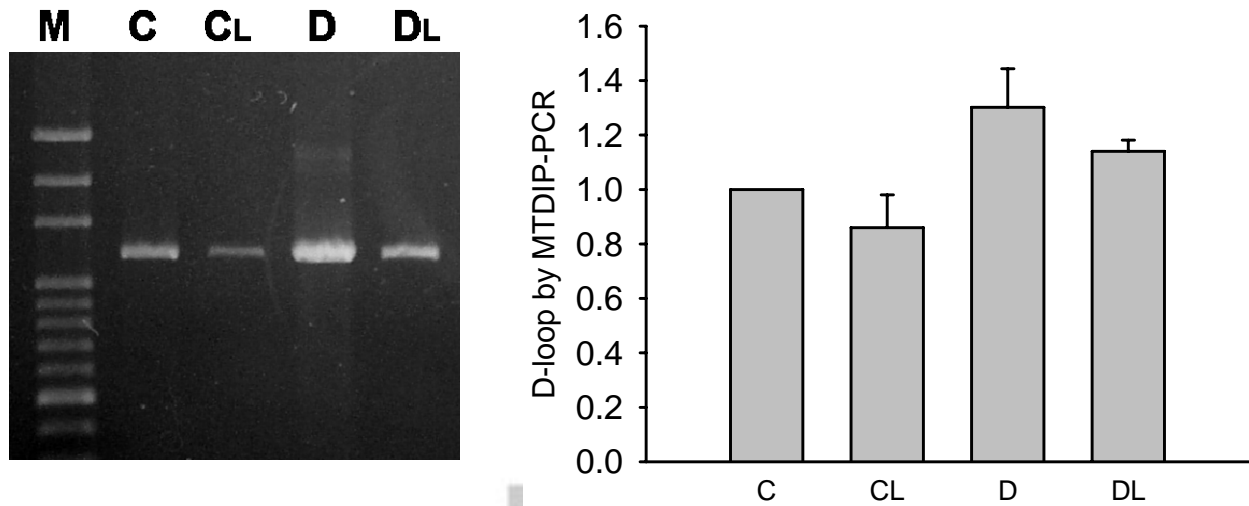


Fig. 21 Physical interaction of mitochondrial ER β with mtDNA in Hec-1A cell.

The interaction between mtER β and mtDNA was detected by the mitochondrial DNA immunoprecipitation(mtDIP)-PCR method and quantitative real-time PCR to assess the alteration of mtDNA-mtER β interaction. The interacted mtDNA and total mtDNA was augmented in the cells and the mtER β proteins were directly interacted with mtDNA D-loop region (nt15997-640). The values of D-loop content were reported as percentage of the control. Pre-mtDIP, the PCR products were generated from the mitochondrial fraction without mtDIP. Data are presented as mean \pm S.E.M.(n=3). *, $p < 0.05$ compared with the control group

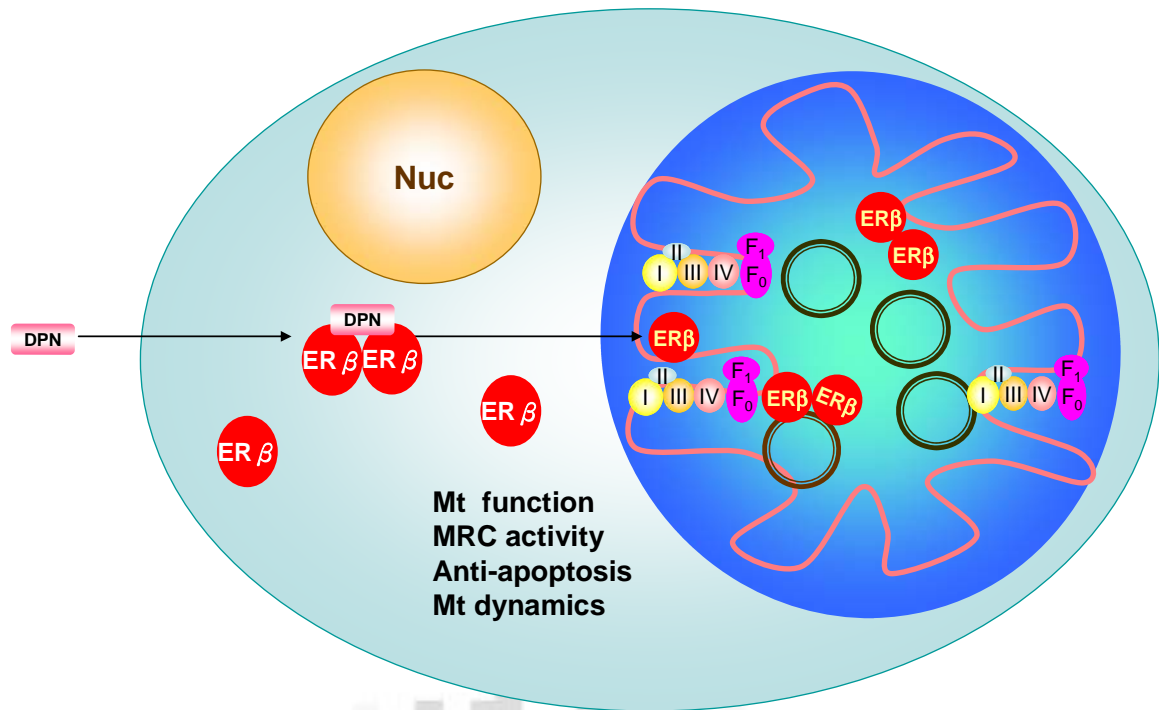


Fig. 22 The putative role of ERβ on mitochondrial transcription and cell survival/cell apoptosis.