



中國醫藥大學
臨牀醫學研究所
碩士學位論文

五倍子酸誘發大細胞肺癌細胞株
NCI-H460 凋亡之機轉研究

The mechanism(s) of gallic acid-induced apoptosis in large cell
carcinoma (NCI-H460)

指導教授：徐武輝教授

共同指導教授：鍾景光教授

研究生：紀炳銓

中華民國九十七年七月

致 謝

時光荏苒，二年的碩士班學業即將告一段落，臨牀醫學研究所的學習豐富了我基礎與臨牀醫學的知識，廣闊了自己生活上的領域，讓我的行醫生涯得以更加充實而甜美。

論文的完成，首先要感謝徐武輝教授，不嫌棄我的笨拙而願意擔任我的指導老師；以及鍾景光教授，在我徬徨無助時及時伸出援手，願意指導我初期不成熟的研究及提供實驗技術上的支援。此外，感謝臨牀醫學研究所 林清淵所長，雖然所長只教我一年「雜誌論文討論」的課程，卻讓我體會到身為一位醫學中心的臨牀醫師，應該不限領域，時時充實學術知識，並巧妙的將醫師與老師的角色合而為一。因為資質駑鈍，以致需老師們花費更多時間與精神來教導；感謝碩士班同學詠証、念騫與莘華醫師在研究上的相互啟發，或是生活點滴上的彼此關心，與適時提供自己寶貴的意見。

因為在職的關係，須在此特別感激彰化基督教醫院與胸腔科林慶雄主任，同意我這兩年來的在職進修；胸腔科全體同仁，在我修業時願意分擔我臨牀上的工作，特別銘感在心。

最後，感謝親愛的老婆的支持與鼓勵，謝謝YoYo與MoMo在這段時間都很乖。相信沒有你們，這篇論文與學業無法順利完成。

謹以此篇論文獻給所有關心我的人，並獻上最虔誠的祝福。

紀炳銓 謹致於

中國醫藥大學 臨牀醫學研究所

中華民國九十七年六月十日

目錄

	頁次
致謝	0
目錄	1
圖表目次	3
符號與縮寫	6
中文摘要	7
英文摘要	9
第一章 前言	11
第一節 研究背景	11
第二節 研究目的	42
第二章 研究方法	44
第一節 研究材料	44
第二節 研究設計	49
第三節 統計方法	65
第三章 研究結果	66
第一節 五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞株的增生抑制與細胞型態改變	66
第二節 五倍子酸在人類大細胞肺癌細胞株對細胞週期 (cell cycle)的影響	66
第三節 檢測五倍子酸在人類大細胞肺癌細胞株是否產生活性氧化物(Reactive oxygen species)	67
第四節 五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞膜電位 (Mitochondrialmembrane potential)的影響	67
第五節 五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞之鈣離子釋出影響	68

第六節 利用慧星試驗(Comet assay)觀察五倍子酸對人類大細胞 肺癌細胞之 DNA 傷害程度	68
第七節 利用DAPI染色觀察五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞之細 胞凋亡	69
第八節 利用流式細胞儀檢測五倍子酸對大細胞肺癌細胞之細胞 凋亡相關蛋白質Caspase-3、Caspase-8及Caspase-9	70
第九節 利用西方墨點法檢測五倍子酸在人類大細胞肺癌細胞中 對 caspase 蛋白與細胞凋亡調控蛋白表現量的影響	70
第四章 討論	73
第五章 結論與建議	78
參考文獻	79



圖表目次

	頁次
圖 1.1 羅氏鹽膚木上的角倍類蟲癭（五倍子）	15
圖 1.2 藥材五倍子(肚倍)	15
圖 1.3 單寧酸之結構式	16
圖 1.4 五倍子酸之結構式	17
圖 1.5 細胞凋亡路徑	32
圖 2.1 五倍子酸 gallic acid 對人類大細胞肺癌 NCI-H460 細胞存活率及誘導細凋亡和細胞週期停滯實驗架構	50
圖 2.2 MMP 軟體的分析圖	56
圖 2.3 ROS 軟體分析圖	58
圖 2.4 鈣離子軟體分析圖	60
圖 2.5 Caspase-3 軟體分析圖	61
圖 3.1 不同濃度之五倍子酸 gallic acid 處理 NCI-H460 細胞 24 小時存活率	87
圖 3.2 不同濃度之五倍子酸 gallic acid 處理 NCI-H460 細胞 48 小時存活率	87
圖 3.3 利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的型態	88
圖 3.4 不同濃度之五倍子酸 gallicaicd 對 NCI-H460 細胞細胞週期分佈影響-12 小時	90
圖 3.5 不同濃度之五倍子酸 gallicaicd 對 NCI-H460 細胞細胞週期分佈影響-48 小時	92

圖 3.6	利用流式細胞計數儀評估人類大細胞肺癌細胞經由給予 250 μ M 之五倍子酸在不同時間所造成 ROS 產生的影響	94
圖 3.7	人類大細胞肺癌細胞經由給予濃度 250 μ M 之五倍子酸所造成粒腺體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 變動之量化圖	96
圖 3.8	人類大細胞肺癌細胞經由給予濃度 250 μ M 之五倍子酸所造成鈣離子濃度上升的量化圖	98
圖 3.9	經由不同濃度的五倍子酸處理人類大細胞肺癌細胞 48 小時後，以彗星試驗分析其對細胞 DNA 傷害的程度	99
圖 3.10	不同濃度的五倍子酸處理人類大細胞肺癌 NCI-H460 細胞 24 小時後 DAPI 染色觀察	100
圖 3.11	五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞 caspase-3 活性之影響	101
圖 3.12	五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞 caspase-8 活性之影響	103
圖 3.13	五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞 caspase-9 活性之影響	104
圖 3.14	利用西方墨點法觀察與 apoptosis 有關的 Fas、Fas-L、FADD 的蛋白表現量變化	105
圖 3.15	利用西方墨點法觀察與 apoptosis 有關的 cytochrome c、AIF、Apaf-1 及 caspase-9 的蛋白表現量變化	105
圖 3.16	利用西方墨點法觀察與 apoptosis 有關的 GADD153、GRP78	

蛋白表現量變化	106
圖3.17 利用西方墨點法觀察與 apoptosis 有關的 caspase family 蛋白表現量變化	106
圖 3.18 利用西方墨點法觀察與 apoptosis 有關的 Bcl-2 family 蛋白表現量變化	107
圖 3.19 五倍子酸誘導人類大細胞肺癌 NCI-H460 細胞株細胞週期停滯及細胞凋亡之路徑圖	108
表 1.1 調控細胞週期之週期蛋白及其激酶	20
表 1.2 細胞凋亡與細胞壞死之區別	23
表 1.3 外在途徑之死亡受體 (death receptors)	26
表 2.1 五倍子酸之配製	51



符號與縮寫

AIF: apoptosis inducing factor
Apo2L: apoptosis-inducing ligand 2
APAF1: apoptotic peptidase activating factor 1
BAD: BCL2-antagonist of cell death
BAX: BCL2-associated X protein
BCL2: B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 2
BCLXL: (BCL2L1)BCL2-like 1
BID: BH3 interacting domain death agonist
CAD: (DFFB)DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide
CHOP: C/EBP homologous protein
GADD153: growth arrest and DNA damage-inducible gene 153
DAXX: Death-associated protein 6
DIABLO: direct inhibitor of apoptosis protein
DISC: death-inducing signal complex
FADD: Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
FAS: CD95
FAF1: Fas (TNFRSF6) associated factor 1
FLIP: FLICE (FADD-like interleukin 1 β -converting enzyme) inhibitory protein
GRP78: glucose regulated protein 78
IAP: inhibitor of apoptosis
PUMA, p53-upregulated modulator of apoptosis
Smac: second-mitochondria-derived activator of caspase
TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

中文摘要

癌症一直是近十年國人十大死因的第一位，由於癌細胞的高突變性、血管新生特性與高轉移性，使得癌症具有相當難的痊癒性，也因此許多癌症相關的研究者均積極尋找更有效且更安全的抗癌藥物。今天，一個在昔日被認為具有中度致癌性的化合物-五倍子酸，透過了一些研究顯示其可能為一個具有潛力的抗癌藥物，它可以導致人類肺腺癌細胞的死亡，但至今尚無研究將五倍子酸(gallic acid)應用於大細胞肺癌(large cell carcinoma)的研究上，而且其抗癌活性的機轉也尚未被清楚的報導過。

本篇研究為利用天然植物中的五倍子酸處理人類大細胞肺癌 NCI-H460 細胞株的作用機轉。以流式細胞計數儀來偵測細胞的存活率，發現隨著藥物濃度的上升和加藥時間的延長，確實會抑制細胞存活率。以倒立式位相差顯微鏡來觀察細胞型態上的改變，結果發現有細胞型態不完整、細胞膜皺縮、與空泡化的現象。以流式細胞計數儀來偵測細胞週期，發現在 G₀/G₁ 期的細胞比例上升，故五倍子酸會造成細胞週期的 G₀/G₁ 期的停止，並有細胞凋亡(apoptosis)的現象產生。以流式細胞計數儀來偵測粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)，發現粒線體膜電位下降，故推測五倍子酸會誘發細胞膜孔道的打開，而導致粒線體膜電位下降。以流式細胞計數儀來偵測鈣離子(Ca²⁺)濃度，發現鈣離子濃度升高，故推測五倍子酸會經由粒線體釋出鈣離子進入內膜，造成鈣離子濃度升高。以彗星試驗偵測細胞的 DNA 損傷(damage)，發現在高濃度五倍子酸處理後，造成細胞拖尾的比例最為明顯，表示有 DNA 損傷的現象。而後以西方墨點法(Westernblotting)來偵測蛋白表現量的改變，發現 Fas、Fas-L、caspase-3、Bax、Cytochrome c 蛋白表現量增加，而 Bcl-2、Bcl-xl、蛋白表現量減少。

綜合以上結果發現：以五倍子酸處理人類大細胞肺癌 NCI-H460 細胞，會

導致 DNA 損傷，進而活化 p53，進而使細胞停止在 G₀/G₁ 期。Fas 與 Fas-L 鍵結，並活化下游的 caspase-8、caspase-3，誘發細胞凋亡。粒線體內的 Bcl-2 家族蛋白減少，包括 Bcl-2 與 Bcl-xl，並刺激粒線體 Bax 增加，此時細胞內質網會釋出鈣離子，並造成粒線體膜電位下降，而粒線體亦會釋出 cytochrome c，並活化下游的 caspase-9、caspase-3，造成 DNA 裂解，最終造成細胞死亡，進而抑制大細胞肺癌細胞的存活率。



Abstract

Cancer is the leading cause of death for decades in Taiwan. Due to the genomic instability, cancer cells acquire many malignant characteristics including high growth ability, high metastatic property and inducement of angiogenesis, which may lead to the poor cure of cancer. As a result, more and more investigators are trying to discover anti-cancer drugs with high effective and low toxicity. Today, a compound called gallic acid is found to exhibit anti-cancer activity. It can induce human lung adenocarcinoma cells apoptosis. However, gallic acid is not applied to the study of large cell carcinoma yet and its molecular mechanism(s) of anti-cancer effect is also not well-investigated.

In this study, we have addressed the cytostatic and apoptosis effects of gallic acid on human large cell carcinoma cell lines (NCI-H460). Treatment of NCI-H460 cells with gallic acid resulted in the inhibition of cell proliferation, arrest of cell cycle in G₀/G₁ phase and commitment to apoptosis. Inhibition of cell proliferation was examined by flow cytometry. The inhibition effect is dose-dependent manner. The effects on cell cycle phases were determined at 50-300 μ M of gallic acid using flow cytometry detected by morphological cell changes, sub-G₁ peak occurrence. Gallic acid also induced the levels of Ca²⁺ concentration and decreased the levels of mitochondria membrane potential in NCI-H460 cells. The DNA damage of NCI-H460 cells induced by gallic acid was observed by Comet assay. The results also demonstrated that gallic acid up-regulate the expression of apoptotic factors Fas, Fas-L and cytochrome c. The active form of apoptosis key enzyme caspase-3 was increased and the apoptosis inhibitors Bcl-2 and Bcl-xl were down-regulated. The apoptosis inducer Bax were up-regulated.

Overall, we proved gallic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in

human large cell carcinoma cells in our study. This suggest a plausible utilization of this compound as an anti-proliferative agent in cancer therapy.



第一章 前言

第一節 研究背景

肺癌一般指的是肺實質部的癌症，通常不包含其他如肋膜起源的中胚層腫瘤（mesothelioma），或者其他惡性腫瘤如類癌（carcinoid）、惡性淋巴瘤（malignant lymphoma），或是轉移自其他來源的腫瘤。因此以下我們所說的肺癌，是指來自於支氣管（bronchial）或細支氣管（bronchiolar）表皮細胞（epithelial cell）的惡性腫瘤，佔了肺實質惡性腫瘤的 90-95%（Merck Manual Professional Edition）。抗癌藥物對非小細胞肺癌效果不夠好（常用的抗癌藥物以單劑治療對小細胞與非小細胞肺癌的反應率有一倍以上的差異，混合使用的療效更相差達四倍之多），再加上抗癌藥物有抑制造血功能（如紅、白血球及血小板數目降低，造成貧血、感染及出血）及損傷其他器官（如噁心、嘔吐、掉髮、食慾不振、疲倦無力、口腔潰瘍等）的明顯副作用，嚴重時甚至會危害到生命的安全（Hamilton et al., 2005）。由於化療效果有限，又得付出相當的代價（副作用），以往考慮到化療時不但有時病人裹足不前，連醫生也會覺得力不從心（Clegg et al., 2002）。因此，找出或研發出一種能夠抑制肺癌細胞並使其自行細胞凋亡（apoptosis），且不會產生過多副作用的藥物，是必然的趨勢，也是刻不容緩的一項工程。

以下就肺癌、五倍子酸、細胞週期與細胞凋亡機轉作背景分析介紹：

一、肺癌

肺癌目前是世界癌症死因的第一名，1995 年全世界有 60 萬人死於肺癌，而且每年人數都在上升。以美國為例，2005 年死於肺癌的人數約 163,500，這比大腸癌、乳癌、前列腺癌三種癌症的死亡人數總和 127,500 還要高（WHO, 2006）。而女性得到肺癌的發生率尤其有上升的趨勢（National Lung Cancer Partnership, 2006）。

根據行政院衛生署公布「2006年國人十大死因」統計，惡性腫瘤（癌症）的死亡人數占率超過百分之二十八，第二十五年蟬聯榜首，平均每十三分五十五秒就有一人死於癌症。2006年國人主要十大死因依序為：癌症（百分之二十八點一）、腦血管疾病（百分之九點三）、心臟疾病（百分之九點一）、糖尿病（百分之七點二）、事故傷害（百分之五點九）、肺炎（百分之四）、慢性肝病及肝硬化（百分之三點七）、腎炎（百分之三點五）、自殺（百分之三點三）及高血壓性疾病（百分之一點三）。國人因癌症死亡總人數達三萬七千九百九十八人，前十大主要癌症順位為肺癌、肝癌、結腸直腸癌、女性乳癌、胃癌、口腔癌、攝護腺癌、子宮頸癌、食道癌、胰臟癌，順位排名與2005年相同（衛生署全國衛生統計資訊網 2005-2006）。

世界衛生組織的統計，最近二十年來全世界的癌症死亡率正快速上升，其中以肺癌的死亡率增加最快(WHO, 2006)。對於肺癌發生的真正原因，目前尚未完全明瞭，但對導致肺癌之危險因素；如外來因素(抽煙、空氣污染)及遺傳因子已有相當的了解(Vaporciyan et al., 2000)。

肺癌的成因可能不是單一因素，而是多因素造成的：如抽菸、二手菸、家族史、曝露於環境中的致癌物質。在男性中，抽菸是導致肺癌的最主要成因，90%的肺癌是因抽菸而引起的。在女性中，80%的肺癌是因抽菸而引起的，男、女性平均是87%。不抽菸，卻長期吸入“二手菸”的人也同樣會遭受傷害，根據統計死於肺癌的約有4%的男性以及22%的女性，其肺癌主因乃係與吸入二手菸有關。抽菸者的妻子死於肺癌的機率為非抽菸者妻子的兩倍至三倍之間。而吸入二手菸者其肺癌罹患率要比沒吸入二手菸的人高出30%。外界環境致肺癌因素，如空氣污染，吸入石棉、鎘、砷、放射性氬氣等，也都可能導致肺癌。中國食物喜歡油炸、燒、煎所產生的空氣污染，可能與肺癌發生有關。另一空氣污染是所使用燃料所產生室內空氣污染有關(Chiu et al., 2006)。

肺癌形成的過程中，最早由致癌因子引發基因傷害後到衍成癌細胞時間相當漫長。由一個癌細胞衍生到一個癌細胞群所需時間亦相當漫長，但是一旦

繁衍成一個癌細胞群則擴散速度就非常快，治療效果非常不好，所以預防肺癌的方法，只有在預防其形成上努力-減少空氣污染、禁煙、減少其他環境污染。

肺癌的細胞種類 肺癌通常分成兩大類型：小細胞肺癌與非小細胞肺癌。 1. 小細胞肺癌：多發生於男性，且與抽菸息息相關，佔全部肺癌的 12%到 25%。小細胞肺癌生長得很快，且容易很快的擴散到其它器官。 2.非小細胞肺癌：比小細胞肺癌常見，佔全部肺癌的 75%到 88%。非小細胞肺癌的生長較慢，其擴散轉移的發生也較慢。根據腫瘤細胞的型態可分成三種：腺癌、鱗狀細胞癌及大細胞癌。 肺癌通常會很快的擴散到肺門、縱膈腔的淋巴結或胸腔附近的其它組織，也容易很快的擴散轉移到身體的其它器官，例如腦部、肝臟或骨頭、骨髓等。

肺癌依組織型態被分成小細胞肺癌(small cell lung cancer)與非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer)兩大類型，前者約佔百分之十五，後者則包括腺癌(adenocarcinoma) (約佔 30-40%)、鱗狀細胞癌(squamous cell carcinoma)(約佔 20-30%)及大細胞癌(large cell carcinoma)(約佔 10-15%)三種主要類型，共約佔百分之八十五。分成這兩大類型的主要原因是無論在生物特質、臨床表現與對治療的敏感度方面，它們之間都有很大的差異(Travis et al.,1995)。

小細胞肺癌的第一線治療是以化療為主(Murray et al., 2006)。與小細胞肺癌相比，非小細胞肺癌的增生、擴散較慢，對化療敏感度低，根治的辦法是趁早把腫瘤完全切除(Clegg et al., 2002)。可惜的是可以開刀完全切除的早期病患(第一、二期及第三期早期)不到三成，而手術後的復發率也不低(Strand 2007)；第一期(肺局部之小腫瘤)約有四分之一；第二期(肺腫瘤較大，或小腫瘤但漫延到肺門淋巴結)可能超過一半；第三期早期(肺腫瘤雖大，但沒有侵犯到主要血管及內臟，並可能超越肺門漫延到同側的縱隔淋巴結)更高，達四分之三。這些復發的病例，不論期別高低，其中八成均有遠處轉移，而這些轉移在手術之前應已發生，卻因為太小而偵測不出來。依此看來，不管是小

細胞或是非小細胞肺癌，都應該被當作全身性的疾病來考慮病人的治療，而要改善肺癌的治療率，局部與全身性的治療一樣的重要，都不能忽視。

二、五倍子酸

五倍子酸是單寧酸的水解產物，而單寧酸是中藥的五倍子(gallnut)的主要成份，因此在介紹五倍子酸之前，先說明五倍子與單寧酸。

(一) 五倍子

五倍子又稱沒食子，約在兩千年前，「山海經」即有記載中國祖先對於五倍子的利用。由綿癭蚜科 (Pemphigidae) 的倍蚜蟲刺激漆樹科 (Anacardiaceae) 漆樹屬 (Rhus) 植物組織，所形成的蟲癭稱為五倍子。五倍子的形成除了需有夏寄主 (漆樹屬植物) 外，還需要在產癭植物的生育地附近有冬寄主 (特定蘚類) 的存在。五倍子按蟲癭的形態可概分為角倍、肚倍及倍花類。五倍子富含單寧酸，可廣泛應用於醫藥、機械、國防及食品等產業。中國大陸已研發人工培育技術，提高五倍子產量以改善農村經濟。分布於臺灣全島山麓的羅氏鹽膚木，亦可發現為數不少的五倍子，早年曾有中藥商少量採集，惟其利用潛能尚待開發。人類對於蟲癭的利用，始於民俗用途。在十七世紀，英國為了慶祝君主政體的恢復，於每年的櫟癭節 (oak apple day)，人民會配戴蟲癭，並以癭內生物的各项表徵占卜未來一年農事的吉凶。十九世紀初，歐洲更由中東大量進口蟲癭，以提煉癭體所含之單寧酸，製造墨水、染料及醫藥。此外，單寧酸尚有殺菌及加速形成癒傷組織的功用，北美印地安人切開薔薇上的蟲癭，置於木本植物的切口上，以利癒傷組織的形成。中國利用蚜蟲於鹽膚木類植物上所形成的蟲癭「五倍子」當作收斂劑，也有近兩千年的歷史(楊淑燕等著，臺灣的植物癭)。



圖 1.1 羅氏鹽膚木上的角倍類



圖 1.2 藥材五倍子(肚倍)

蟲癭(五倍子)(新世紀網絡課程建設工程 中藥學)(楊淑燕等著：臺灣的植物癭)

(二)單寧酸

單寧酸，又稱單寧或丹寧，英文名 Tannin 鞣酸或鞣質，是植物中一種防衛用化學成分，用來封鎖蚜蟲的口腔以收防止蚜蟲的攻擊之效。單寧酸主要可以分為可水解的單寧酸與聚合的單寧酸兩種。

異名：鞣酸、單寧、五倍子單寧酸。

性狀：淡黃色至淺棕色粉末，有特殊氣味，味極澀。溶於 1 份的水或乙醇，溶於丙酮，不溶於氯仿或乙醚。做咖啡因萃取時，加入醋酸鉛的原因，其目的是為了除去單寧酸這類的有色雜質。

單寧是葡萄酒中所含有的二種酚化合物其中的一種物質，尤其在紅葡萄酒中含量較多，有益於心臟血管疾病的預防。葡萄酒中的單寧一般是由葡萄籽、皮及梗浸泡發酵而來，或者是因為存於橡木桶內而萃取橡木內的單寧而來。單寧的多少可以決定酒的風味、結構與質地。缺乏單寧的紅酒質地輕薄，沒有厚實的感覺，薄酒萊紅酒就是典型代表。單寧豐富的紅酒可以存放經年，並且逐漸醞釀出香醇細緻的陳年風味。當葡萄酒入口後口腔感覺乾澀，口腔黏膜會有褶皺感，那便是單寧在起作用。

結構式：

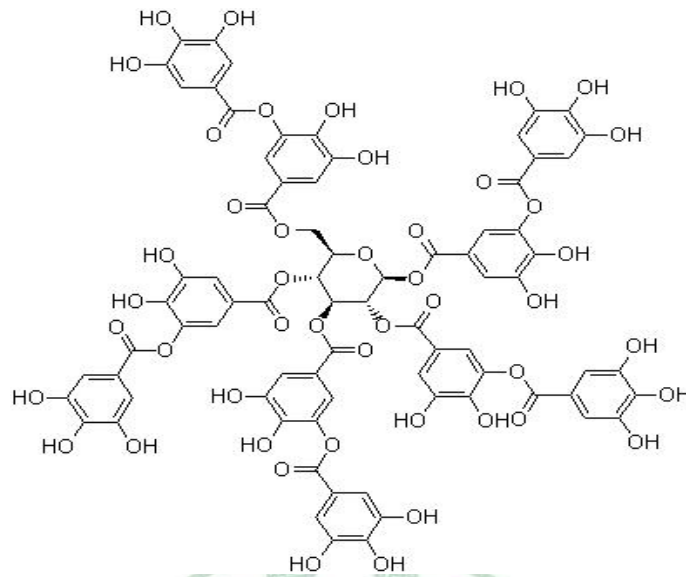


圖 1.3 單寧酸之結構式

(三) 五倍子酸

五倍子酸在臨床上可做為止血的收斂劑，許多治療牛皮癬及痔瘡藥膏的成份皆含有五倍子酸。五倍子酸具有抗氧化的作用，能幫助細胞抵抗氧化的損壞，此外研究也顯示五倍子酸能抑制癌細胞的細胞毒性，但卻不會傷害到正常的細胞。

英文名 gallic acid monohydrate

別名：沒食子酸

化學名：3,4,5-trihydroxybenzoic acid monohydrate

分子式： $C_6H_2(OH)_3COOH$

分子量：188.14

熔點：251°C

水溶性：15 g/l (20°C)

結構式：

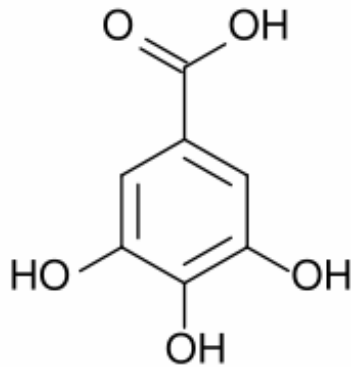


圖 1.4 五倍子酸之結構式

植物來源：大部份的植物皆含有五倍子酸，其中富含五倍子酸的植物有五倍子 (gallnuts)、茶葉、葡萄、蛇麻草(hops)、榛果(witch hazel)、漆樹(sumac)與橡樹皮(oak bark)。

二、細胞週期與細胞週期調控因子

從原始親代細胞進行細胞分裂，分裂形成兩個子代細胞的過程時間，稱為：細胞週期。簡單來說就是分裂細胞從有絲分裂結束到下次有絲分裂結束的過程。當中可分為三個時期：細胞生長期、DNA複製期、細胞分裂期。細胞週期可分為Interphase(G₀、G₁、S和G₂)及Mitosis(M)phase。

休止期(G₀期)：細胞處於靜止的狀態，可能是暫時休眠或者是永久性休眠，需要適當的訊息，使細胞進入細胞週期或分化G₁期。

分裂後期(G₁期)：細胞開始正常代謝並且生長，並產生RNA及蛋白質，細胞體積會增加，G₁期的染色體數目是2N。而在進入S(synthesis)時期之前會檢查染色(chromosome)DNA是否受到破壞已進行修補的工作，此時期需要花十到十二小時。此為合成前期。

DNA合成期(S期)：細胞進行六到八小時DNA合成及將原本的二十三對染色體複製另一份。此染色體數目2N~4N之間。分

裂前期(G₂期)：細胞進入G₂期需要花三到四小時，染色體從2N變4N。除了繼續生長並且合成蛋白質之外，在細胞要進入M期之前會負責檢查染色體DNA的複製是否完整以利進行有絲分裂 (mitosis)。

有絲分裂期 (M期)：此時期只有一小時。會停止細胞生長及蛋白質合成。由一個母細胞變成兩個子細胞，複製完成的染色體會各自分配到子細胞內，使子細胞內的染色體與母細胞完全一樣，新細胞在此期完成。

在細胞週期中，每個階段或時期交界都有所謂的「檢查點 (checkpoint)」，當DNA damage時，則cell cycle無法通過檢查點而造成停滯 (arrest)，此時會造成DNA修復，當修復完時才得以進入下一個時期。G₁階段所監測的為細胞個體的大小，在細胞成長過程中，細胞核遺傳物質若有受外界高能輻射線或化學物質的影響而突變，則啟動修復系統。S階段則是在進行DNA複製，而G₂階段主要在檢查所有染色體DNA是否都被複製且限於一次，若一切都正常才能進入最後細胞分裂M期。但若是遇到無法修補的錯物時，細胞則會走向計畫性凋亡 (apoptosis)。

真核的細胞週期中能使細胞正常規律的進行，當中有個調控系統。此調控系統由依賴性蛋激酶CDKs(cyclin dependent kinases)及週期蛋酶(cyclins)調控 因子。可以正向調控細胞週期。但是當DNA damage、分化和老化時，會促使 Cdk 的抑制者有向負向調控細胞週期，而造成抑制細胞增生 (Senderowicz, 2004)。

(一) 週期蛋白 (cyclins)

在 cyclin 家族其成員已知有8種，分別為：A、B₁、2、3、D₁、2、3、E、F、G、H。不同的週期蛋白，在細胞週期的不同時期所表現的量有所不同，其

執行的功能也有所不同，如與G1 phase相關之cyclin為cyclin D及E，S phase是cyclin A，而與G2/M phase相關的則為cyclin A及B。而cyclin A與B被稱為mitotic cyclins，其穩定的存在於interphase，但在mitosis期時會迅速分解。所有的週期蛋白在結構上都含有一段相似的胺基酸序列，稱為cyclin box，負責辨認不同的cyclin-dependent kinases (Cdks) 並與之結合，形成cyclin-Cdk複合體，在細胞週期的不同時期表現出不同的活性。

(二) Cyclin-dependent kinases (Cdks)

Cdks為serine/threonine protein kinase，其結構上可分為catalytic subunit及cyclin regulatory subunit，可藉由與週期蛋白之結合來調節其活性。Cdks在細胞週期的各個時期表現量是一致的，但必須與特定時期的週期蛋白結合後才會具有活性，所以在不同的時期，Cdks的活性則不同 (Morgan, 1997)。Cdks可透過對其特定受質的磷酸化來調控細胞週期之進行。Cdk家族已發現並命名的有7種，分別為:Cdh1(cdc2)、Cdk2、3、4、5、6、7。週期蛋白D與Cdk4/6形成之複合體，週期蛋白E與Cdk2形成之複合體與G1期的進行有關，而週期蛋白E的表現及其與Cdk2的結合則是細胞週期進入S期所必須的，週期蛋白A與Cdk2則主導S期之進行，而週期蛋白B與Cdk1則和細胞進入M期的調控有關 (Sherr, 1996 ; Sherr, 2000 ; Ho and Dowdy, 2002)。

(三) Cyclins-dependent kinases inhibitors (CdkIs) and p53

CdkIs能與Cdks結合形成穩定結構而可抑制Cdks之活性，為對Cdks的作用進行負向調控的蛋白質。CdkIs主要可分為兩大類：

第一類為 KIP/CIP(CdK inhibitory protein)family，成員包含有 p21^{Cip1/Waf1/Sdi1/Sap20}、p27^{Kip1}及p57^{Kip2} (Sherr and Roberts,1999)，此類蛋白質可同時抑制cyclin E-Cdk2、cyclin A-Cdk2、cyclin D-Cdk4的作用，進而抑制細胞週期之進行，而p57^{Kip2}主要是與細胞分化較具相關性。而p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}是由tumor suppressor gene p53於DNA受損時誘導出來，主要會抑制cyclin E-Cdk2之活性而使細胞停滯於G1期。由於這三個蛋白結構中的胺基酸末端有特定構型能與cyclin-Cdk結合，形成cyclin-Cdk-CdkI的穩定形式，因而無法活化下游因子而抑制細胞週期。

另一類蛋白質為INK4 (inhibitors of kinase 4) family，包含p16^{INK4a}、p15^{INK4b}、p18^{INK4c}及p19^{INK4d} (Sherr and Roberts, 1999)，對Cdk4及6具有選擇性抑制作用，會與cyclin D競爭結合，使cyclin D無法活化Cdk4及6，進一步抑制Rb (retinoblastoma) 的磷酸化，而使得細胞週期停滯於G1之早期至中期 (McConnell et al., 1999)。p53為腫瘤抑制因子，能夠防止細胞癌化，而於人類的癌症中，有80%的癌症與p53的突變有關。

表 1.1 調控細胞週期之週期蛋白及其激酶

Cell cycle stage	Cyclins	CDKs
G0 /G1 phase	Cyclin D	Cdk4, Cdk6
Late G1 phase	Cyclin E	Cdk2
S (synthesis) phase	Cyclin A	Cdk2
G2/M phase	Cyclin B	Cdk1

(四) pRb及E2F families

pRB (retinoblastoma protein 或 pocket protein) families 包含 pRB (pRB1, P110)、pRB2/p130與p107三者，而E2F (early gene 2 factor) families 則包含E2F-1至E2F-6 (Dyson 1998)。

E2F為轉錄因子 (transcription factor)，當其與Rb蛋白質結合時不具有活性，但當Rb被cyclin-Cdk複合體磷酸化時，則會脫離E2F，使得具有E2F活性。pRB是與E2F-1,2,3結合，而pRb2/p130與p107是與E2F-4,5結合在一起，但E2F-6則是與polycomb group proteins (PcG) 結合。

一般認為E2F-4,5與pRB2/p130及E2F與PcG之結合，於G₀及early G₁期扮演transcription repressors角色，但E2F-1,2,3則為transcription activators，作用於late G₁及S期 (Stevaux and Dyson, 2002)。

三、細胞凋亡 (apoptosis)

細胞死亡有兩種途徑，一種為細胞壞死 (necrosis)，另一種為細胞凋亡。

細胞遭受外來刺激如局部缺血、缺氧或化學毒性等所引起之細胞死亡，主要是經由細胞壞死之途徑，此過程會造成細胞粒腺體腫脹，內質網產生水泡、細胞膜之完整性被破壞而失去生理機能，細胞因而崩解，此過程會釋放出趨化性細胞內容物，引起周圍細胞炎性反應。

「細胞凋亡」(apoptosis) 一詞最早是在1972年由病理學家John Kerr所提出。細胞凋亡又被稱為生理上的細胞死亡(physiological cell death) 或是細胞計畫性的死亡(programmed cell death)，是一種正常生理性細胞死亡，一種自然的生命現象，目的為除去不要的或已無用的細胞；過程中由特定的蛋白質及酵素調控，循序漸進使細胞死亡。其特徵為細胞萎縮 (shrinkage)、細

胞膜形成空泡狀 (membrane blebbing)、細胞核之染色質濃染且緻密 (chromatin condensation)、DNA斷裂成小片段 (internuclear fragmentation)，進而細胞膜內陷將細胞分割為多個有包膜包覆之凋亡小體 (apoptotic body)，最後由鄰近之吞噬細胞吞噬，而出現細胞凋亡現象之細胞則分散於組織中，其細胞膜並不會破裂，故不會引起炎症反應。

一般認為誘導細胞進行細胞凋亡是較好的抗癌機制，可藉此減少藥物可引起的副作用。若生物體不能正常進行細胞凋亡，則會引起不正常的增生或導致癌細胞的發生。另一方面，細胞凋亡是細胞對外來病毒的攻擊或破壞的一種死亡模式，當細胞凋亡失調時，包括不恰當的活化或抑制皆會導致疾病的發生，像是阿茲海默症 (Alzheimer disease) (Behl et al., 2000)、AIDS、自體免疫疾病等。



表1.2 細胞凋亡與細胞壞死之區別 (呂志宏 碩士論文, 2003)

Necrosis 壞死	Apoptosis 凋亡
Morphological features	
<ul style="list-style-type: none"> ·細胞膜完整性喪失 ·細胞及粒線體脹大 ·整個細胞分解 ·無細胞小泡形成 ·胞器分解 	<ul style="list-style-type: none"> ·維持完整性，細胞膜發泡現象 ·細胞核 chromatin 聚集凝縮 ·細胞膜皺縮及核凝縮 ·細胞核分葉作用形成小體 ·核膜邊緣小泡形成 (apoptotic bodies) ·粒線體形成裂縫(bcl-2 family 相關)
Biochemical features	
<ul style="list-style-type: none"> ·離子平衡喪失 ·無需能量 ·DNA 隨意切斷 (smear) ·細胞溶解後 DNA fragmentation (死亡晚期) 	<ul style="list-style-type: none"> ·控制過程涉及活化作用及 enzymatic steps ·需能 Energy (ATP)-dependent ·單一或多倍的核小體長度 DNA 片段(ladder pattern) ·細胞溶解前 DNA fragmentation ·粒線體釋放蛋白進入細胞質 (cytochrome C, AIF) ·caspase cascade 活化 ·細胞膜對稱性改變 (phosphatidylserine 反轉)
Physiological significances	
<ul style="list-style-type: none"> ·影響鄰近整群細胞 ·引起非生理性混亂 (補體攻擊, 病毒溶解, 缺氧, 代謝毒物產生) ·macrophages 執行吞噬作用 ·引起發炎反應 	<ul style="list-style-type: none"> ·影響個別細胞 ·誘導生理性刺激 (growth factors 不足, hormonal environment 改變) ·相鄰細胞 or macrophages 均可行吞噬作用 ·不引起發炎反應

(一) 細胞凋亡的特徵

細胞凋亡的運作，包含著特定的生物化學變化，也與細胞的壞死截然不同。因此，一些型態學或生物化學的特徵，可用來作為探討藥物是否造成細胞凋亡的指標，例如凋亡過程中會有，細胞型態改變 (cellular morphology change)、細胞膜內層的 phosphatidylserine (PS) 的外翻、細胞萎縮 (Shrinkage)、DNA 斷裂 (oligonucleosomal DNA cleavage)、細胞核皺縮 (nuclear shrinkage) 及染色質凝結 (chromatin condensation)，進而細胞膜內陷將細胞分割為多個包膜包覆之凋亡小體 (apoptotic body)，再被鄰近的吞噬細胞所吞噬，並無炎症反應產生。故一般認為誘發細胞進行 apoptosis 是一種較好的抗癌機制，藉此減少藥物可能引起的副作用。於體外培養因無巨噬細胞，凋亡細胞最終仍會走向壞死 (necrosis) (Fadok et al., 1992)。活化凋亡相關的蛋白質及酵素，它們有的參與改變粒腺體膜的完整性使粒腺體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 下降，有的執行分解蛋白質或經特殊調控活化核酸酵素以水解 DNA 使染色體斷裂，可以進行 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase UTP NickEnd Labeling)、DAPI staining assay、comet assay 及 DNA 電泳分析檢測，這些型態學或生物化學的變化上的檢測都是研究 apoptosis 的基礎。此外，細胞凋亡也會啟動一系列的訊息傳遞串聯 (signal transduction cascade) 影響各階段的進行，精密地調控程序性死亡的效果。

(二) 細胞凋亡之路徑

A. 外在途徑—死亡受體啟動路徑 (Death receptor initiated pathway)

細胞膜上死亡受體路徑則是經由活化細胞膜上 Fas、TNFR-1 或 TRAIL receptor 等死亡受體與細胞膜上的 surface receptor 結合，釋放細胞凋亡訊號後開啟。細胞凋亡啟動後會直接活化 caspase cascade，而使細胞很快得走向凋亡。

1. Fas/FasL (CD95/CD95L)

Fas屬於TNF (tumor necrosis factor) receptor superfamily中type I膜蛋白，而FasL為TNF receptor superfamily中type II膜蛋白，當Fas與FasL結合，會活化Fas receptor，並進行trimerization，並吸引FADD (Fas-associated death domain) 結合至receptor 位於細胞質中的domain；另一方面，FADD會進一步吸引多分子的procaspase-8 形成的DISC (death-inducing signaling complex)，此時procaspase-8會因構形的改變和濃度的提高而活化成caspase-8，具有完整活性的caspase-8 可活化caspase-3 和caspase-7，而caspase-3會再活化caspase-6，這些effector caspase (包括caspase-3、6、7) 會進一步去影響一連串的caspase substrate (Bratton et al.,2000)；或者caspase-8的活化促使Bcl-2家族成員Bid的裂解，tBid位移至粒線體，促使粒線體釋放出cytochrome c 接著活化caspase-9 和caspase-3 最後使細胞mm apoptotic death (Budihardjo et al., 1999)。

2. TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1)

TNF是由活化的巨噬細胞或感染反應生成的T細胞所產生的，TNF和細胞膜表面的TNFR1結合後，會吸引TRADD (TNFR-associated death domain) 結合至receptor膜內的doman，進而活化caspase-8，致使細胞凋亡；另一方面，會吸引RIP (receptor interacting protein) 及TRAF2 (TNF-associated factor 2) 與之結合，活化NF-κB促使細胞存活 (Derradji and Baatout, 2003)。

表1.3 外在途徑之死亡受體 (death receptors)

	Receptors	Ligands
	CD95(Fas, Apo1)	CD95L
	TNFR1(p55, CD120a)	TNF/ lymphotoxin
TNF gene super family	DR3(Apo3, WS-L1, TRAMP, LARD)	Apo3L(TWEAK)
	DR4	Apo2L(TRAIL)
	DR5(Apo2, TRAIL-R2, TRICK2,KILLER)	Apo2L(TRAIL)

3. TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)

TRAIL 所造成的apoptosis 路徑和Fas 很相似，唯一跟Fas 機制不太一樣的是FasL 的表現要T cell 與NK cell 的活化，而TRAIL 的活化可以藉由許多組織刺激來表現。TRAIL 的receptor 是DR4 或DR5，當TRAIL 與DR4 或DR5 結合後會吸引DR4/DR5 Death domain 結合，進而活化caspase-8、10，而進行細胞凋亡反應 (Marsters et al., 1997)。

而細胞膜上有兩種receptor 會與DR4/DR5 競爭TRAIL 的結合位置，就是DcR1 與DcR2，當TRAIL 與DcR1 或DcR2 結合後，則不會啟動細胞凋亡反應。

B. 內在途徑—粒腺體路徑 (Mitochondrial pathway)

另外一種細胞凋亡路徑則是經由粒線體之改變而引發的凋亡。這些引起粒線體的死亡訊息可以是DNA 的受損、鈣離子濃度的不平衡、ROS (reactive oxygen species) 的產生，或是承接來自於死亡接受體活化所傳遞的訊號等。當粒線體接收到死亡訊息之後，粒線體的膜通透性可能會變大 (mitochondrial membrane permeabilization, MMP)，粒線體膜電位差 (mitochondrial transmembrane potential)也有可能喪失，促使許多粒線體內的物質釋放至細

胞質當中，其中包括許多促凋亡的蛋白，例如：(1) cytochrome c、(2) caspases、(3) Smac/DIABLO (Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with Low pI)、(4) HtrA2/Omi、(5) AIF (apoptosis inducing factor)、及 (6) Endo G (endonuclease G)。這些蛋白可直接或間接促進細胞凋亡之形成。

Cytochrome c 是由細胞核內基因經轉錄、轉譯而合成的蛋白，在初形成時為一個不具活性的前驅物，稱為apo-cytochrome c。Apo-cytochrome c 在合成後很快地會被運送到粒線體內，而在進入粒線體的同時，apo-cytochrome c 會經由 cytochrome c lyase 的催化而和 hem moiety 結合，進一步地形成 holo-cytochrome c，並存在於粒線體的內外膜之間 (intermembrane space)。

Cytochrome c 的正常功能為電子之攜帶者，可以傳遞電子於電子傳遞鏈中 complex III 和 complex IV 之間。但是 Liu 等人在1996年發現在一個cell-free 的系統中，caspase-3 需要有dATP以及 holo-cytochrome c 的存在才能夠被活化。在後續的文獻當中很快地就被證實，當cytochrome c 從粒線體被釋放到細胞質中時，會跟 Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) 以及 caspase-9 結合並形成複合物。在dATP 存在之狀況下，caspase-9 可以被截切而活化並進一步截切下游的caspase-3 使其活化，促使細胞進入凋亡。除了 cytochrome c 之外，caspase 也可能位於粒線體內，直至細胞邁入凋亡前才被釋放至細胞質中。1998年Mancini 等人以免疫染色之方法，利用共軛焦顯微鏡 (confocal microscope) 以及電子顯微鏡 (electron microscope)，觀察以 UVB、C2-ceramide 以及 saturosporine 等物質引起細胞凋亡後，caspase-3 前驅物的分佈位置。結果發現在正常情況下，caspase-3 前驅物位於粒線體內外膜之間，隨著細胞凋亡的產生，粒線體內的caspase-3 前驅物便會隨之減少。他們因此推論，caspase-3 前驅物可能在細胞凋亡的過程當中，會從粒線體被釋放至細胞質內，並被活化而導致細胞凋亡。在其他人的研究中可以發現到 caspase-9 以及 caspase-2 也有類似的活化過程。當 caspase 在細胞質出現的

時候，並不代表細胞一定會邁向凋亡的不歸路。因為有一群統稱為IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) 的蛋白，可以藉由和caspase 結合並抑制 caspase 活性而阻止細胞凋亡。這一類的蛋白有XIAP、c-IAP1以及c-IAP268-71。這些蛋白都含有一個以上稱為BIR (baculovirus IAP repeat) 的區塊，是主要和caspase 做鍵結進而抑制caspase 活性的區域，但是其確切的機制目前仍未十分清楚。目前已知BIR 分佈位置之不同，對不同的caspase 具不同程度之專一性。以XIAP 為例，第三個BIR 區域主要是抑制caspase-9 之活化，而在第一個和第二個BIR 區域之間，則可以抑制caspase-3 的活化⁶⁹。反之，一些來自粒線體內的凋亡分子，如：SMAC/DIABLO以及HtrA2/Omi，卻能抑制IAPs而使得caspase 被活化，進而使細胞進入凋亡。SMAC/DIABLO在合成後會經由N 端MLS (mitochondrial localization sequence) 的帶領而轉移到粒線體的內外膜間，並經由酵素截切將MLS 移除。在死亡訊息之刺激下，SMAC /DIABLO會從粒線體當中被釋放到細胞質內，並可以和IAPs 結合而移除IAPs 對caspase 活性的抑制。以XIAP 為例，當SMAC /DIABLO 和XIAP 結合時，可以抑制XIAP和 caspase-9 結合的能力，並促進細胞凋亡⁷²。HtrA2/Omi 和 smac/DIABLO 有許多的類似點：(1) 合成後同樣經由N 端的MLS 帶領而轉移到粒線體的內外膜之間，並經由酵素截切將MLS 移除；(2) 兩者之N 端序列非常相近；(3) 在死亡訊息的刺激之下，會從粒線體當中被釋放到細胞質內，並可以和IAPs 結合而抑制IAPs 的作用。但比較特別的是，在粒線體外HtrA2/Omi 的過度表現(overexpression)往往會造成一種和細胞凋亡略為不同的死亡現象。死亡的細胞仍然和凋亡的細胞一樣，細胞質會收縮而使得細胞變圓，雖然仍然保有細胞膜的完整性，但是細胞膜不會產生皺摺，也不會產生細胞凋亡小體，甚至細胞核的變化也都完全消失。除此之外，即使是在缺乏Apaf-1 以及 caspase-9 的細胞當中過度表現HtrA2/Omi，一樣也可以造成細胞死亡，這表示HtrA2/Omi 可以不經由抑制IAPs 的方式便能促使細胞進入凋亡。Suzuki 等

人發現，若要完全消除HtrA2/Omi 促進細胞凋亡的活性，除了移除其N 端序列 (具抑制IAP 活性之區域)之外，還需要將具有serine-protease 活性的序列移除掉⁷⁴。因此，HtrA2/Omi 可能經由兩種方式促進細胞凋亡，一種是經由抑制IAPs 而活化caspase，另一種則是和其本身具serine-protease 的活性有關。

AIF 以及Endo G 是比較特別的促凋亡蛋白，它們可以從粒線體釋出並直接進入細胞核當中，截切DNA 而使細胞進入凋亡。因此，它們本身便具有DNA 截切酵素 (nuclease) 的功能，並不需要經過活化caspase 的步驟來促進細胞凋亡。AIF 和SMAC /DIABLO 及HtrA2/Omi 相同，一樣在合成後，經由MLS 帶領進入粒線體的內外膜間；而Endo G 則是由粒線體內的基因經轉錄、轉譯而合成的。AIF 以及Endo G 和caspase 相比同樣可以引起粒線體膜電位的喪失，及細胞膜上PS (phosphatidylserine) 的外翻，以及染色質的凝聚等現象。Endo G 截切所形成之DNA 片段和caspase 活化間接所造成之DNA 片段大小差不多，然而AIF截切所形成的DNA 片段明顯較大，大約有50 kb^{61,80}。

(三) 細胞凋亡之調控機轉

A. Caspase 酵素家族

Apoptosis過程中，會活化一群蛋白水解酶 (protease) 來執行凋亡之動作。即caspase (cysteine aspartyl-specific protease) 是具有專一性的cysteine protease，專門切割aspartic acid residues (Alnemri et al., 1996)。Caspase 蛋白系列均具有相似的氨基酸序列、結構和專一性，都是經非活化態的pro-caspase (約30-50 kDa) 之裂解所致。這些pro-caspase 包含三個主要的部位 (domain)：NH2 terminal、large subunit、small subunit。Pro-caspase活化時必須先經由其他caspases 進行一連串蛋白分解，裂解這些domain，移除pro-domain 和linker region，使得大、小subunit結合形成複合體，成為活化態的caspase (Nicholson et al., 1997)。Caspase又可分為initiator caspase和effector caspase，initiator caspase受到外

來或細胞內凋亡訊息傳遞活化後，在進一步活化effector caspase。initiator caspase包含有caspase-2、8、9、10；而effector caspase包含有caspase-3、6、7。於粒線體路徑中，cytochrome c釋出與Apaf-1結合，活化caspase-9，進而活化caspase-3、6、7。結果造成細胞核膜蛋白（lamin）的分解、PARP（poly（ADP-ribose）polymerase）裂解，PARP具有修復受損DNA的作用，當caspase-3活化會裂解PARP，則會由116 kDa裂解成85kDa，而失去修復功能。以及活化的caspase-3會將ICAD（Inhibitor of CAD）切除放出CAD（caspase-activated Dnase），而造成DNA fragmentation，進而導致細胞凋亡。

B. Bcl-2 家族蛋白之調控

由於近期的研究當中，開始發現在有些凋亡的細胞中，其粒線體並不一定會出現漲大破裂的現象，因此有了第三種推論，認為在細胞凋亡過程當中，會有物質聚集在粒線體外膜上並形成孔洞，因此粒線體內外膜之間的物質便得以釋出到細胞質當中。Bcl-2 家族蛋白（Bcl-2 family protein）便是一群可以聚集在粒線體外膜並形成孔洞的重要分子。根據結構以及功能的不同，Bcl-2 家族蛋白分為三種：

- (1) 抗凋亡蛋白群（anti-apoptotic subfamily）
- (2) 多區塊促凋亡蛋白群（multi-domain pro-apoptotic subfamily）
- (3) 單區塊促凋亡蛋白群（BH3 only protein subfamily）。

抗凋亡蛋白群包含Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1 以及A1(Bfl-1)；這些蛋白皆含有4 個Bcl-2 homology (BH) 區塊 (BH1 到BH4)。多區塊促凋亡蛋白群包含Bax、Bak、Mtd (Bok) 以及Bcl-rambo；它們含有3 個BH 區塊 (BH2 到BH4)。而單區塊促凋亡蛋白群則包含Bik (Nbk)、Bad、Bid、Bim(Bod)、Hrk (DP5)、Noxa、Blk、Bnip3 (Nix)、Bnip3L、Puma、p193、Bmf 以及Bcl-G 等；結構中只含有BH3 區塊，但依然具有促凋亡之功能。比較兩個促凋亡蛋白群之促凋亡性時，多區塊促凋亡蛋白似乎扮演直接之調控角色。因

為缺乏Bax 以及Bak 的老鼠，對於細胞凋亡訊息的刺激十分不敏感，即使是直接給予Bid 或Bim 這些只具有BH-3 區塊的蛋白，這些老鼠仍然不會進行細胞凋亡88-89。Bax 平常是以單體 (monomer) 的形式停留在細胞質當中90-91，而Bak 則是原本就位於粒線體的外膜上；當細胞受到凋亡刺激時，Bax 便會從細胞質中移至粒線體外膜上92，和Bak 相同地，改變原本的結構93-94 並聚集形成寡合體 (oligomer)95-97。此寡合體可以嵌入粒線體外膜，而進一步的在粒線體外膜上形成孔洞，導致粒線體內外膜中間的蛋白得以釋出至細胞質中98-99。也有文獻指出Bax 可以降低磷脂質極性 (polarity) 的穩定度，導致外膜受損，因此，Bax可能本身並不一定需要以形成通道之形式，造成粒線體外膜通透性之增加。另外也有一些文獻指出，Bax 或是Bak 可以和VDAC 結合，並經過某些未知的機制促使VDAC 打開進一步使粒線體內的物質釋出。然而VDAC 之開合並不一定決定於Bax 之存在與否，因為有研究顯示即使在Bax 沒有從細胞質轉移到粒線體的情況下，ROS 亦可以直接促進VDAC 打開並使得粒線體內的物質被釋出。單區塊促凋亡蛋白群的功能和凋亡訊息之接收與傳遞有關。這些蛋白平常都位於細胞質中，直到受到死亡訊息的刺激時才會產生改變並移動至粒線體附

近。以Bid 為例，其必須經由caspase-8 或granzyme B 將其N 端移除之後才會有移動到粒線體的動作。Bad 在正常時候會被磷酸化並跟14-3-3 結合而停留在細胞質當中，去磷酸化後才會和14-3-3 分開而移動到粒線體。而Bim 以及Bmf 則分別會和細胞骨架中的微小管 (microtubule) 以及肌動蛋白 (actin) 結合而停留在細胞質當中。有些單區塊促凋亡蛋白則是在接受到死亡訊息刺激之後才會合成，例如當DNA 受損而活化p53 的時候，Noxa 以及Puma 才會能經由傳遞訊息給多區塊促凋亡蛋白，活化多區塊促凋亡蛋白並導致細胞進入凋亡。Desagher 等人在1999 年發現：在HeLa 細胞中，以staurosporine 引起細胞凋亡時，Bid 會從細胞質當中移動到粒線體上，和Bax 鍵結並進一步地活化Bax 暴露其N 端結構，而後使得粒線體內的cytochrome c 被釋出。而Wei 等

人在2000年的研究發現Bid對Bak也具有相類似的作用。抗凋亡蛋白群之功能可能是經由和多區塊促凋亡蛋白群或是單區塊促凋亡蛋白群結合，並抑制這些蛋白原本促進細胞凋亡的功能。有研究顯示Bax要產生結構上的改變並活化之後，才會和Bcl-2有結合的動作，因此，抗凋亡蛋白群可能只會和活化的多區塊促凋亡蛋白群（例如：Bax）結合。此外，如將Bcl-xL和Bax鍵結的區域破壞，Bcl-xL依然可以抑制細胞的凋亡，因此，抗凋亡蛋白群的功能可以不藉由和多區塊促凋亡蛋白群鍵結而發揮。抗凋亡蛋白群的功能可能還和單區塊促凋亡蛋白群結合有關，藉由抑制單區塊促凋亡蛋白群傳遞訊息給多區塊促凋亡蛋白群之方式，進而抑制細胞凋亡。此外，抗凋亡蛋白群也可以不經由和多區塊促凋亡蛋白群或是單區塊促凋亡蛋白群結合便具有抑制細胞凋亡的能力，其可能和抑制VDAC的打開有關，因為Huang等人發現將Bcl-2的BH4 region突變會令Bcl-2抑制細胞凋亡的功能完全瓦解掉，但是由於其BH3 region仍然存在，因此還是會和Bax、Bak、Bik、Bid、Bim以及Bcl-2結合。被轉錄、轉譯而表現。目前對於單區塊促凋亡蛋白的作用機轉並不清楚，初步認為可

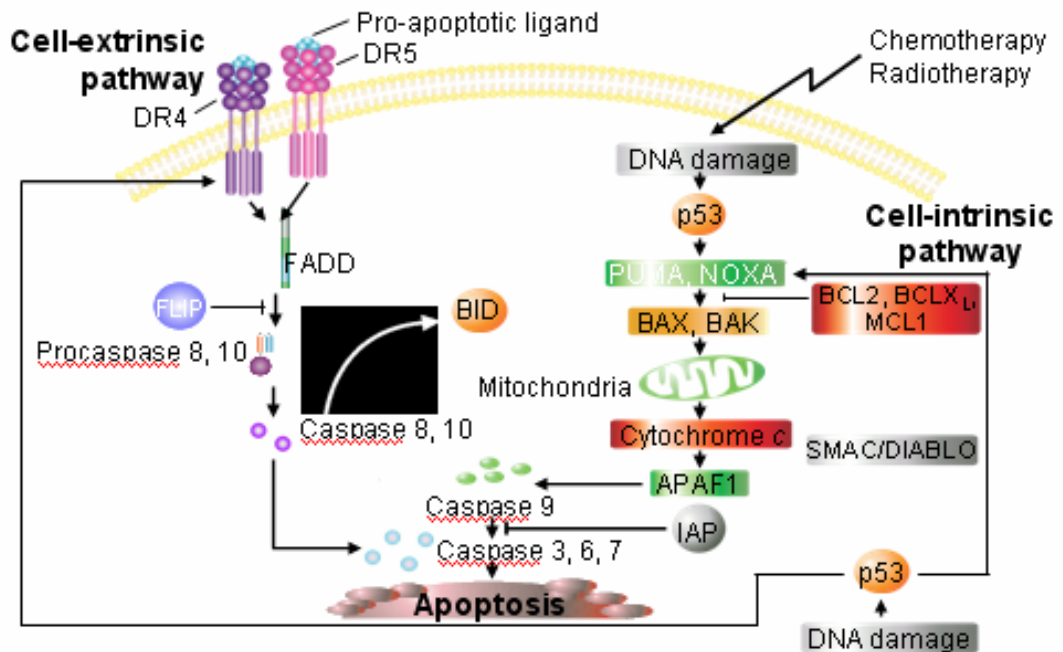


圖1.5 細胞凋亡路徑

(Ashkenazi A, 2002)

C. 粒線體通透性的改變及其調控

由於粒線體通透性之改變在細胞邁入凋亡過程中，不但關鍵且具指標性，因此有關為何其通透性會改變進而導致細胞凋亡之研究非常多。目前所提出之假說有下列幾種。

1. VDAC (voltage-dependent anion channel)

最早提出的假說認為在細胞凋亡過程當中，VDAC (voltage-dependent anion channel) 會關閉而導致粒線體內的ATP 無法和細胞質當中的ADP 交換，因此F1F0-ATPase 的活性便會被抑制，並使得H⁺聚集於粒線體之內外膜間，無法回到粒線體的基質 (matrix) 當中，而導致粒線體內膜的膜電位過極化(hyperpolarization)，同時H₂O 分子亦會因為基質 (matrix) 中之高滲透壓而向內回流，導致粒線體的基質漲大並促進粒線體的內膜被撐開。由於粒線體的內膜含有許多的皺摺 (cristae)，因此當它被撐開時便有足夠的表面積可以將粒線體的外膜漲破，使得粒線體內外膜中間的物質得以釋出到細胞質當中。

2. PTP (permeability transition pore)

另有一種說法認為，粒線體膜上另有一個有別於VDAC 的通道，名為PTP(permeability transition pore)，也同樣具有調節粒線體通透性的功能。PTP 的正確組成成分目前尚未完全確立。但已確知至少有ANT (adenylate translocator)、VDAC 以及cyclophilin D 這三種成分。初步認為PTP 可藉由這些組成橫跨粒線體的內外膜間，並在粒線體的內外膜間形成一個通道⁸³⁻⁸⁵。由於PTP 是一個對於進出物質不具有選擇性的通道，因此一但打開，許多分子量小於1.5 kDa 的物質便可湧入粒線體基質內，導致粒線體膜電位差降低，及H₂O 分子回流到基質中，進而導致粒線體的基質漲大並促進粒線體的內膜被撐開，及外膜被漲破，而釋出粒線體內外膜之間的物質。

D. 活性氧化物 (Reactive oxygen species)

科學家在探討老化和年齡之間的關係，於是有人提出代謝所產生一種活性大的副產物稱「活性氧化物」(ROS, reactive oxygen species)，認為ROS 會傷害細胞，造成DNA 傷害，並可能會導致老化。ROS 如超氧根陰離子 (superoxide anion)、一氧化氮 (nitric oxide)，皆與生命的現象有關。例如NO (nitric oxide)，會與調控血壓有關，故難以界定ROS 是好或是不好，後來發現取決於ROS 對於人體產生反應的好壞在於氧化壓力 (oxidative stress)，而利用過氧化歧異酶 (superoxide dismutase)，和催化酶 (catalase) 可以對抗氧化壓力而延長生命。而無脊椎動物的基因突變常由於試圖延長生命週期和加強抵抗環境中的氧化壓力像是ultraviolet light 或是reactive oxygen species 而發生的。對於哺乳動物而言，調節壓力反應的了解還不夠透徹並且無已知的基因能延長生命週期。而有科學家發現老鼠的p66shc 基因能作為標的突變基因並誘發抵抗壓力並延長生命。p66shc 是一種p52shc/p46shc 疊接變異 (splice variant)，細胞質液的訊號傳遞包括來自於活化受器至Ras 的細胞分裂信號的傳輸，當遇到hydrogen peroxide (H₂O₂) 或是放射線ultraviolet light 時，p66shc 的serine 磷酸化會上升。而p66shc 為信號傳輸路徑的一部分可能會調節細胞凋亡的壓力並能延長哺乳動物的生命。而氧會接受其他分子的電子而形成氧化自由基，很多細胞內的反應包括呼吸反應，需要還原氧變成superoxide (O₂⁻) 是過氧化氫，這些分子會調節生物體內分子間的反應。當他們有高度的反應時會形成ROS 而造成氧化性傷害 (oxidative damage)。究竟細胞凋亡的產生是否需要活性氧化物(ROS) 呢?科學家做了三點推測：(1) 當ROS 或是內源性抗氧化機制缺失時會誘發細胞凋亡的產生。(2) 細胞凋亡可能有時候會去抑制內源性或是外源性的抗氧化機制。(3) 細胞凋亡有時候會幫助細胞內ROS 的增加。而大蒜精成份的diallyl disulfide(DADS) 會誘發細胞凋亡，並會使癌細胞的抗氧化機制缺失掉，進而抵抗氧化壓力，故可能作為癌症治療的

抗腫瘤增生的試劑。而活性氧化物(reactive oxygen species) 會調節多種細胞的死亡，而高濃度的活性氧化物會導致脂質過氧化、細胞膜損傷、caspase 酵素的未活化和細胞壞死。相反的，低濃度的活性氧化物會活化蛋白質激酶和磷酸酶、鈣離子儲存、活化或未活化轉錄因子和導致細胞凋亡的現象。高濃度的活性氧化物會直接損傷細胞並殺死細胞，相反地，低濃度的活性氧化物會間接的經由蛋白質激酶和磷酸酶、轉錄因子和分子中基因表現而誘發細胞凋亡。而活性氧化物在細胞中誘發的細胞凋亡的基因表現正被研究中，如Bcl-2 過度表現藉由活性氧化物會誘發細胞凋亡而保護細胞，然而，藉由Bcl-2 防止活性氧化物誘發細胞凋亡的機制仍是未知的，需進一步探討，而後發現Bcl-2 down-regulation 使活性氧化物去活化T細胞，而且需要兩種信號模式才能活化T 細胞的細胞凋亡現象。第一個信號是活性氧化物使Bcl-2 down-regulation，而第二個訊號是Bim 的表現。

先前提到造成細胞凋亡的兩個路徑，外在路徑是經由細胞表面受器導致活化起始者(如caspase-8) 和反應者(如caspase-3) 蛋白水解酵素，而內在路徑主要是指粒線體，其會釋出cytochrome *c* 和活化起始者caspase，如caspase-9，隨後活化反應者(caspase-3)，而內在路徑主要是粒線體的標的直接活化，或是間接經由外在路徑caspase-8 分解未活化的蛋白BID。當活化BID 後，BID會轉移到粒線體並刺激cytochrome *c* 的釋放。而Bcl-2為一種抗細胞凋亡的蛋白，它在粒線體上扮演防止cytochrome *c* 釋放的角色。活性氧化物為氧的化學反應之衍生物，它包括自由基(free radicals) 像是超氧離子(O₂^{•-})、氫氧自由基(•OH)、過氧化氫(H₂O₂)。它們的高化學反應會使得DNA、蛋白質、碳水化合物和脂質遭受破壞。細胞利用抗氧化防禦系統去對抗活性氧化物，經由直接或是間接去對抗氧化性傷害。當活性氧化物去克服這些防禦系統，結果產生氧化壓力(oxidative stress)。氧化壓力包括病理引起的疾病如AIDS, 杭汀頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、阿滋海默症

(Alzheimer's disease)和一些退化性神經性疾病。氧化壓力主要的來源為活性氧化物，故調節活性氧化物對於調控氧化壓力扮演著重要的角色，亦可以使用技術去調控細胞凋亡有關的氧化壓力。

E. Ca^{2+} 離子釋放

一般鈣離子會儲存在內質網 (endoplasmic reticulum ; ER) 中，當死亡訊息或藥物刺激下，會促使鈣離子從內質網釋放出來，導致細胞內鈣離子恆定 (intracellular calcium homostasis) 改變 (Beyersmann et al., 1997; Shen et al., 2001)，近來研究指出，鈣離子會影響粒線體膜電位的消散，致使cytochrome *c* 釋出以及大量ROS產生，而導致細胞凋亡 (Lemairié et al., 2004 ; Bae et al., 2003)。鈣離子(Ca^{2+})對細胞存活率的調節扮演一重要角色，而鈣離子亦與誘發細胞凋亡反應有關。而以大蒜中的成份Diallyl disulfide去處理血癌細胞並經由caspase-3依賴型路徑而誘發細胞凋亡。而Diallyl disulfide在血癌細胞中會產生鈣離子和caspase-3的活化。故偵測鈣離子(Ca^{2+})可以進一步探討細胞凋亡的機制。

造成DNA損傷(DNA damage) 的原因包括紫外線、離子化輻射(ionizing radiation) 及DNA 複製抑制物氫氧基尿素(hydroxyurea) 等基因毒性壓力(genotoxic stress)。而當DNA 損傷的細胞為了再繼續DNA複製及細胞分裂等過程，此時就需要DNA 修補的動作來維持細胞複製時的正確性，並防範細胞癌化的情形。與毛細血管擴張性失調有關之ATM (ataxia telangiectasia mutated) 蛋白質在DNA 損傷反應中扮演極為重要的角色。ATR 及ATM 與磷酸肌醇激酶家族(phospho-inositide kinase family)的結構較為相似，與p53、BRCA1 等蛋白質的磷酸化反應有關。科學家發現當人類的Rad17 蛋白質必須被ATR/ATM 激酶磷酸化後，才會引發基因毒性壓力反應。故因此，藉由訊息傳遞途徑的調控，DNA 損傷與訊息傳遞路徑調控有相關性，與細胞週期停止(cell-cycle arrest)、細胞凋亡、特定基因之轉

錄與DNA 修補等基因毒性壓力反應(genotoxic stress responses)是有關的，故需要進一步探討造成DNA損傷之機制。而一氧化氮(nitric oxide)是由一氧化氮合成酶(iNOS)的正向調節反應所造成的，其會造成缺血性的壓力，亦會造成細胞凋亡，通常伴隨以下的路徑：

- (1) 粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)的下降。
- (2) 經由粒線體釋出 cytochrome *c*。
- (3) 活化caspase-9和-3使得產生低濃度NO的保護機制而去抵抗神經細胞死亡。

故一氧化氮(NO)與一些退化性神經疾病有關，如杭汀頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、阿滋海默症(Alzheimer's disease)，故值得我們進一步探討。

F. NF- κ B (Nuclear factor kappa B) 的調控

NF- κ B 為細胞核中重要轉錄因子，一般位於細胞質中會與其抑制劑I κ B (Inhibitor of κ B) 結合，並不具有活性的，當細胞受 proinflammatory cytokines、growth factor、oxidative stress 及ultraviolet light 刺激時，會活化I κ B kinase (IKK) complex，繼而將I κ B 磷酸化，接著會被E3 ubiquitin ligase 進行ubiquitination，並且I κ B 會被proteasome 降解，而釋出NF- κ B，游離的NF- κ B 即可translocate 至細胞核中，影響相關基因轉錄作用。細胞中最主要的NF- κ B 是由Rel-A(p65)、NF- κ B(p50)形成之heterodimer(Suh and Rabson, 2004)。受NF- κ B 所調控的相關基因有，與抑制細胞凋亡有關之Bcl-xL、Bcl-2 (Chiao et al., 2002 ; Lemarie et al.,2004 ; Li et al., 1999)，與細胞生長有關之IL-6 (Zerbini et al., 2004)及c-myc (Suhand Rabson, 2004) 以及cyclin D1 (Albanese et al., 1995) 等基因都是受NF- κ B 所調控。

G. p53 抑癌基因

1. p53 基因

p53基因，位於人體第17對染色體短臂17p13.1的位置，為一由一萬六仟到兩萬個鹽基對〔即16-20 kilobase (kb)〕所組成的細胞去氧核糖核酸(DNA)分子，是調控細胞增殖的基因。人類的p53基因，在進化過程保存下來的基因區段，也是在人類許多癌症中，最常被發現發生突變的位置，主要由11個表現序列所組成，其第一表現序列為非密碼區，位於距第2-11表現序列8-10kb的位置，惡性腫瘤約超過90%的置換性突變(substitution mutations)，串集於表現序列5-8。p53蛋白質有5個高頻率(>90%)保留區段，分別位於氨基酸13-19, 117-142, 171-181, 234-258以及270-286，其中氨基酸175、248、273及282等位置，又為突變發生頻率最高的"四個熱點" (hotspots) 或氨基酸248、273、175、245、249、282、176、179、220及213等位置，為突變發生頻率最高的"十個熱點" (IARC, 2002)。發生於這些"熱點"密碼的突變佔所有p53突變之大部份。在大多數的腫瘤，p53的對偶基因皆同時發生突變，可能一個發生點突變，另一個則發生刪減性突變。人類大多數的p53突變部屬於誤意突變(missense mutation)，以致產生一個結構及性質都改變了的蛋白質，p53的這十個熱點之任一區段一旦發生突變，p53鍵結區即喪失其鍵結能力，進而失去其活化轉錄基因的生化功能。

2. p53蛋白質

p53基因的產物為一含393個氨基酸的核磷蛋白質，分子量約五萬三千道耳頓[即53kilodalton (kd)]，簡稱p53蛋白質，於1979年被確認其為可和SV-40的大T抗原形成緊密的複合物的細胞蛋白質，因此，可以和由SV40轉型細胞形成的抗T抗體，共同形成免疫沉澱物。p53蛋白質在正常細胞的含量非常低，而在體外培養或人類腫瘤的變形細胞，p53蛋白質的含量可高於正常達5至100倍之

多。文獻報告所示，原始p53基因在細胞增殖時，主要調節細胞週期由G1期過渡到S期，且決定細胞是否經由細胞凋亡(apoptosis: programmed cell death)自殺而亡。生物學上的分析顯示，在調控正常細胞週期的運轉上，p53基因扮演著並不太重要的角色。但在調控承受壓力細胞(stressed cells)的生長上，卻扮演著舉足輕重的角色；種種證據亦顯示：正常情況下，p53基因的主要功能在監控DNA是否受到傷害。因此，正常的p53蛋白質猶如"分子警探"(molecular policeman)監視染色體基因組的完整性，如果細胞經對DNA能產生傷害的因子如紫外線、藥物的處理，或 γ 放射線等的照射，p53蛋白質會被大量的誘發，其蓄積量及穩定度皆大量增加，並停止染色體複製，以提供細胞修復機轉較充裕的時間，它的責任是要確定在DNA複製前，所有的DNA修補工作都已完畢。因為，當細胞DNA受到傷害，此時如果細胞週期不停止，DNA還會繼續進行複製，那麼受損的遺傳資訊就會傳到子代細胞。因此，P53蛋白質被誘發的目的是要先控制細胞週期進行，讓DNA有機會修補完全後，才再進行複製。一旦修復失敗，p53蛋白質即令細胞經由細胞凋亡自殺而死亡。p53蛋白質可以抑制一種致癌基因-MDM-2的表現，一旦MDM-2發生基因增幅而和p53蛋白質鍵結會使p53蛋白質失效，MDM-2致癌基因會大量表現，大約在30%軟骨組織肉瘤，發現MDM-2基因會大量複製，因此p53蛋白質與MDM-2間的調控，可能與肉瘤的形成有關。p53蛋白質亦可以刺激其它基因的表現，如WAF1。WAF1基因會製造一種分子量為21 kd的蛋白質，這種蛋白質會與控制細胞週期進行的關鍵酵素結合，並讓它們失去活性。如此一來，細胞週期無法推進，DNA不複製，細胞生長自然就得中斷。除了控制細胞生長外，在某些特殊的細胞，如淋巴細胞，p53蛋白質如果大量表現，不僅細胞不會繼續生長，嚴重的還會誘發細胞凋亡。p53蛋白質還會增加一些與DNA修補相關的基因(GADD-45)的表現。遺傳性毛細血管擴張失調症(ataxia telangiectasia: AT)的特徵即為DNA修補有問題，患者很容易罹患皮膚癌，同時這些患者身上的細胞，受放射線照射後，其p53基

因被誘發的反應很差，GADD45基因的產生自然也就受到影響。p53基因可因點突變、對偶基因喪失、基因重排、基因刪減等基因的突變，再綜合其它致癌基因、抑癌基因的突變，交織成突變基因網路，經多項因子多重步驟的致癌機轉導致人類癌症的發生。

正常情況下，調控細胞生長的基因具有一個p53鍵結區，原始p53蛋白質和p53鍵結區鍵結，形成一個三度空間的四面體立體結構，並且活化啟動此鍵結區之後的基因表現，而此鍵結區之後的基因產物可以抑制細胞的過度或侵襲性生長。p53基因本身發生突變改變影響p53蛋白質的生化途徑：p53基因發生突變，除了共同喪失與p53蛋白質鍵結區鍵結的能力，有些突變尚且改變了p53蛋白質的球狀體結構及功能，例如有些突變在基因密碼213-217的位置，出現一個特化的表面抗原，使其可以和單株抗體240作用。有些突變性p53蛋白質則可以和熱休克蛋白質結合。有些則改變了氮端的酸性區段，失去了和GAL4的DNA鍵結的能力，進而失去其活化功能。又p53蛋白質形成的四面體複合物，只要其中一個p53對偶基因發生誤意突變，經有絲分裂的基因重組，往往造成另一對偶基因也發生刪減性突變，而其餘正常的原始p53蛋白質也會跟著發生結構和轉錄功能上的改變，它們的立體結構和表現會和突變性p53蛋白質一致。且突變性p53較原始p53穩定而其較長的半衰期，使突變性p53具較優勢的操控狀況持續惡化。例如發生於大腸、腦、肺、肝和膀胱的腫瘤，p53基因之一或二對偶基因發生一大段缺損成局部的刪減，即降低了原始p53蛋白質四面體的濃度，致無法完全抑制細胞異常的增殖。體內及體外的實驗皆證明，原始p53蛋白質和突變性p53蛋白質形成的四面體複合物，其所有正常或突變的p53蛋白質皆喪失和p53鍵結區鍵結及啟動轉錄作用的能力。由突變性p53和原始p53鍵結即改變其活化及轉錄的功能，或可推論p53的突變基因可以移轉傳遞給原始p53蛋白質，進而操控、轉化、抑制原始p53蛋白質的功能。如果突變的發生是將進行寡合作用的碳端截斷，此操控與轉化的作用便不復進行。例如某些腫瘤，p53基因發生無意義(nonsense)突變，其碳端與p53鍵結區進行寡合作用

的結合部位被截斬，使突變p53蛋白質無法形成四面體的結構。



第二節 研究目的

肺癌的治療，在今日仍然是個棘手的問題，因為有百分之七十以上的患者，往往診斷出肺癌時已是疾病較末期，而無法使用手術或放射治療等局部療法加以根治。以 cisplatin 為主的化學治療在過去二十年來以廣泛使用在小細胞及非小細胞的肺癌患者，然而其成效只是一般。為改善化學治療的成效，許多新的化學治療藥物(如: gemcitabine, decetaxel)被研發出來，且與 cisplatin 合併使用，發現其治療肺癌的效果比單用 cisplatin 更為顯著，且能延長肺癌患者的生命。然而，由於這些化學治療藥物的毒性強、副作用大，劑量上不能過量，臨床使用必須遵照醫師指示，因而許多患者承受不了副作用的影響而不得不放棄化學治療。因此，找出或研發出一種能夠抑制肺癌細胞並使其自行細胞凋亡 (apoptosis)，且不會產生過多副作用的藥物，是必然的趨勢，也是刻不容緩的一項工程，畢竟一旦肺癌惡化至末期時，存活時間往往僅剩短短數個月。一般認為傳統中藥發揮作用的效果較慢，但副作用少且效果顯著，因此許多傳統的中藥的成份被加以科學化分析並且被應用在抗癌效果的研發與應用上。例如：黃樟素雖具有肝毒性和致癌性，但是，一個黃樟素的衍生物稱為氧化黃樟素 (safrole oxide) 已證實具有明顯的抗癌活性，對於非小細胞肺腺癌細胞株 A549 氧化黃樟素可誘使細胞大量表達 Fas 和 FasL，進一步活化下游的 caspase-3、8 及 9，最後使的細胞走向凋亡 (apoptosis)，再者，氧化黃樟素亦具有明顯抑制血管新生 (angiogenesis) 之作用，其機轉則可能是透過誘導細胞的凋亡，在氧化黃樟素處理的動脈內皮細胞 (vascular endothelial cells)，其可增加 Fas、p53 與 integrin β 4 的表現量。由相關研究發現，黃樟素最近已被由一個具有致癌性的化合物，轉而成為一個可能有潛力的抗癌藥物。

五倍子酸 (gallic acid; 3,4,5-trihydroxybenzoic acid)，一種由單寧酸中粹取出的天然植物酚，白芍等中藥含有五倍子酸，身體可以經食用而獲得五倍子酸，因此與有毒性的化學治療藥物相比，算是相當的安全。先前的研究發現其

能夠抑制乳癌及攝護腺癌細胞的增長及並促使癌細胞走向凋亡。但是目前其應用於肺癌治療的研究仍相當稀少，僅少數研究有發表其對於人類小細胞肺癌與肺腺癌細胞，具有使細胞走向凋亡的效果，至於其對於對於其它類型的肺癌細胞，如：大細胞肺癌、類癌(carcinoid)及惡性間皮瘤的影響，至今仍未有人研究探討過。因此，在本研究中我們想要測試五倍子酸對於大細胞肺癌細胞株 (NCI-H460) 的抗癌活性，肺癌細胞因為基因的不穩定會一直不斷的突變，這樣的突變所導致抗藥性一直是抗癌藥物所要面臨的最嚴重課題，所以，研究開發新的作用方式與機轉的抗癌藥物確實是刻不容緩的。於是，我們欲將五倍子酸應用在大細胞肺癌細胞的抗癌研究上，再者，五倍子酸之抗癌作用機轉並未被完整的研究過，我們希望了解五倍子酸是經由細胞凋亡的途徑或是細胞壞死 (Necrosis) 的方式去導致細胞的死亡，亦或者是透過其他的方式如 autophagy 和 cell cycle arrest 等路徑來達到其抗癌活性，當然，五倍子酸也有可能像是 Herceptin 或是 STI-571 一樣是作用在某一個特殊的細胞標的上，這樣的標的可能是一個致癌基因、腫瘤抑制因子 (tumor suppressors)、生長受體 (growth receptors) 或是轉移因子等，使他們不活化或是能執行正常的功能，而透過我們這樣的研究，可以使我們認知到五倍子酸應用到癌症治療的可行性。

第二章 研究方法

第一節 研究材料

一、細胞株來源

本實驗所使用之細胞株NCI-H460為人類大細胞肺癌細胞株（human large cell carcinoma），由新竹食品工業研究所（Food Industry Research and Development Institute）購得。

二、細胞株特性

NCI-H460

- Tissue: human; lung; large cell carcinoma ; pleural effusion
- Morphology: epithelial
- Description: derivated from the pleural fluid of a patient with large cell carcinoma prior to therapy; the cells express easily detectable p53 mRNA at levels comparable to normal lung tissue, and exhibit no gross structural DNA abnormalities; the cells stain positively for keratin and vimentin but are negative for neurofilament triplet protein; the line express some properties of neuroendocrine cell, is relatively chemosensitive and can be clones in soft agar (with or without serum).

三、藥品試劑

1. 4,5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid (Rhein)：購自Sigma Chemical Co.
2. Dimethyl sulfoxide (DMSO)：購自Sigma Chemical Co.
3. RPMI1640 medium：購自Gibco
4. Fetal bovine serum (胎牛血清, FBS)：購自Gibco

5. L-Glutamin (麩胺酸 , LG) : 購自 Gibco
6. Penicillium Streptomycin (PS) : 購自 Gibco
7. 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide (DioC6) : 購自 Molecular Probes
8. propidium iodide (PI) : 購自 Sigma Chemical Co.
9. Trypsin-EDTA : 購自 Amersco
10. Trypan blue : 購自 Sigma Chemical Co.
11. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) : 購自 Merck
12. Sodium chloride (NaCl) : 購自 Merck
13. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) : 購自 Merck
14. Potassium chloride (KCl) : 購自 Merck
15. Propidium iodide (PI) : 購自 Sigma Chemical Co.
16. PhiPhiLux®-G1D1 kit : 購自 OncoImmunin (Gaithersburg, MD, USA)
17. RNase A (Ribonuclease A) : 購自 Amersco
18. Triton X-100 : purchase from Sigma chemical Co.
19. Ethanol : 購自 TEDIA
20. Ammonium persulfate (APS) : 購自 Amersco
21. Acrylamide/Bis 40% solution (ACRYL/BIS™29:1) : 購自 Amresco
22. Bovine serum albumin (BSA) : 購自 Merck
23. Glycine : 購自 Amresco
24. Methanol : 購自 TEDIA
25. formaldehyde : 購自 Merck
26. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit) : 購自 Amersham
27. Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad

28. Protein marker : 購自 Femantas
29. 10X SDS buffer (Sodium dodecyl sulfate) : 購自 Amresco
30. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine) : 購自 Amresco
31. Tris (Tris (hydroxymethyl) -aminomethane) : 購自 Amresco
32. Tween 20 : 購自 Amresco
33. 顯影劑 : 購自 Kodak
34. 定影劑 : 購自 Kodak
35. BioMax Flim : 購自 Kodak
36. Agarose I : 購自 Amresco
37. 核酸純化試劑組 (DNA purification kit) : 購自 Gene Mark
38. 蛋白質萃取試劑 (protein extraction solution) (PRO-PREP) : 購自 iNtRON Biotechnology, INC.
39. 5× TBE buffer : 購自 Amresco
40. Primary antibody (1°抗體) :
 - (a). anti-actin : 購自 Oncogen ; cat # cp47
 - (b). anti-p53 : 購自 Sata cruz Biotechnology ; Lot# k1102
 - (c). anti-p21 : 購自 Calbiochem ; cat# op68
 - (d). anti-p27 : 購自 Sata Cruz Biotechnology ; Lot: G222
 - (e). anti-caspase-3 : 購自 upstate ; cat# 05-654
 - (f). anti-caspase-8 : 購自 Calbiochem ; cat# AM46
 - (g). anti-caspase-7 : 購自 upstate
 - (h). anti-caspase-9 : 購自 upstate
 - (i). anti-cdc25A : 購自 Oncogen ; Lot# D19466-1
 - (j). anti-cyclin E : 購自 upstate
 - (k). anti-cdk2 : 購自 upstate cat#5-596

- (l). anti-cyclin D3 : 購自 upstate
- (m). anti-cdk4 : 購自 upstate ; cat# 06139
- (n). anti-cdk6 : 購自 upstate
- (o). anti-Fas : 購自 upstate
- (p). anti-NF-kb p50 : 購自 Zymed ; Lot: 30979746
- (q). anti-NF-kb p65 : 購自 Zymed ; Lot: 30577746
- (r). anti-bcl-2 : 購自 upstate ; cat# 05729
- (s). anti-bax : 購自 upstate
- (t). anti-cytochrome c : Calbiochem ; cat#PC323

41. Secondary antibody (2°抗體) :

- (a). goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody : 購自 Chemicon ; AP124P
- (b). goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody : 購自 Chemicon

四、儀器設備、器材

1. 細胞培養皿 : 購自 FALCON
2. 細胞培養盤 : 購自 FALCON
3. 細胞培養箱 : 購自 Nuair
4. 細胞計數器 (Haemocytometer) : 購自 Boeco
5. 倒立式位像差顯微鏡 (phase-contrast microscope) : 購自 Olympus
6. 微量天平 (TE-200; MILLTER)
7. 去離子水製造機 : 購自 Minipore
8. 電源供應器 : 購自 Amersham
9. 酸鹼值測定計 (C831) : 購自 Consort
10. PVDF membrane : 購自 Minipore

11. Mini-3D Shaker：購自 Boeco
12. SDS-PAGE 電泳槽套組：購自 Bio-Rad
13. Transfer Cell Blot 套組：購自 Bio-Rad
14. 加熱板：購自 Lab-Line
15. 流式細胞計數儀（Flow cytometry）：購自 Becton Dickinson
16. 高速離心機：購自 HERMLE
17. 分光光度計：from Beckman
18. 光學顯微鏡（Olympus CH2）
19. 光學顯微鏡（Nikon LABOPHOT-2）
20. 酵素免疫分析儀（anthos 2020）：購自 Anthos Labtec, Australia
21. DNA 電泳槽：購自 Mupid-2



第二節 研究設計

一、實驗架構

本實驗以細胞模式來探討，觀察五倍子酸gallic acid 對人類大細胞肺癌細胞株（NCI-H460）生長之影響，並探討五倍子酸是否具有誘導H460細胞凋亡作用及細胞週期的調控作用(如圖2.1)。

（一）探討五倍子酸gallic acid對H460細胞生長之影響

本實驗為將不同濃度之五倍子酸gallic acid，直接加入H460 細胞之培養液中，於37°C、5% CO₂ 及充分溼度下，於6、12、24、48、72 小時後，收集細胞。評估五倍子酸對H460細胞生長或是存活之影響。

（二）探討五倍子酸gallic acid 對H460細胞週期影響及細胞凋亡之機制

經由存活率之實驗可得之五倍子酸gallic acid 會抑制H460細胞株之生長，並會誘導細胞進行細胞凋亡作用，故本實驗將以流式細胞儀檢測H460細胞之細胞週期，並探討五倍子酸gallic acid 誘導細胞凋亡之機制。

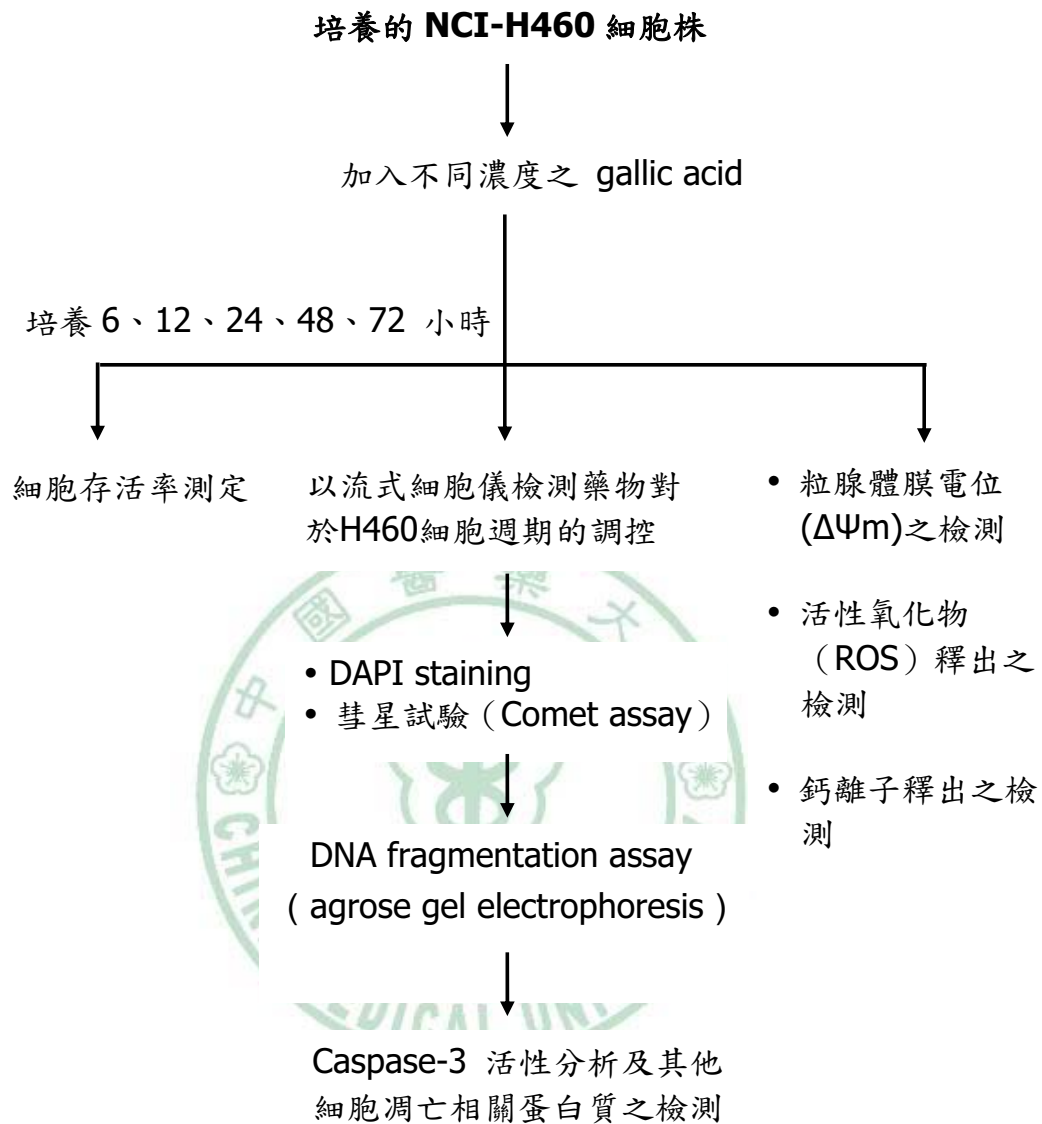


圖2.1 五倍子酸gallic acid 對人類大細胞肺癌NCI-H460細胞存活率及誘導細胞凋亡和細胞週期停滯實驗架構

二、實驗方法

(一) 藥品配製

將購自sigma chemical Co.之3,4,5-trihydroxybenzoic acid monohydrate 五倍子酸(gallic acid)純化物，秤取5.6846 mg，溶於1ml DMSO，配製成20 mM stock solution，從stock solution 分別取不同濃度配製所需濃度，配製濃度如下：

化學名：3,4,5-trihydroxybenzoic acid monohydrate

分子式： $C_6H_2(OH)_3COOH$

分子量=188.14

$$\text{莫耳濃度 (M)} = \text{分子量} / \text{體積 (L)}$$

$$188.14 \times 10^3 \text{ mg} / 1000 \text{ ml} = 1000 \text{ mM}$$

$$0.18814 \text{ mg/ml} = 1 \text{ mM}$$

$$20 \text{ mM} = 3.7628 \text{ mg/ml}$$

表 2.1 五倍子酸之配製

	20 mM of gallic acid	DMSO
0.5 mM	25 μ l	975 μ l
1 mM	50 μ l	950 μ l
2.5 mM	125 μ l	875 μ l
5 mM	250 μ l	750 μ l
10 mM	500 μ l	500 μ l

將配製好不同濃度之五倍子酸用來進行細胞增生及細胞週期試驗，以及細胞凋亡測試（DAPI staining and Comet assay）以及利用西方點墨法（western blot）觀察蛋白質表現等分析。

（二）細胞培養

A. 培養條件

人類大細胞肺癌細胞株（NCI-H460）以RPMI1640 培養基添加10%胎牛血清、1%L-glutamine 及1% Penicillin Streptomycin 之培養液，置於5% CO₂ 及充分溼度下的37 °C的細胞培養箱（incubator）中培養，約二天更換一次培養液至細胞長滿。

B. 細胞冷凍保存

NCI-H460細胞株經大量培養後，可利用液態氮冷凍保存，欲冷凍保存之細胞應在生長旺盛且存活率高之狀態下進行。細胞冷凍保存方法為，冷凍前應注意細胞生長情形，並在前一日更換培養基。凍細胞前需先配製冷凍保存溶液：將DMSO（dimethyl sulfoxide）加入新鮮培養基中，使其最終濃度為7%，混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞懸浮液（約100 μl），計數細胞濃度及凍前存活率。離心後倒掉上清液，加入事前配製好的冷凍保存液，使其細胞數在 $2 \times 10^6 \times \sim 5 \times 10^6$ cells/ml，混合均勻後置於以標示好名稱、數目及冷凍日期之冷凍管中，1 ml/管。

冷凍保存方法：冷凍管置於4 °C，10 min → -20 °C，30 min → -80 °C，16~18 小時 → 液態氮槽長期保存。

C. 繼代培養

待細胞長至八分滿時，將培養液取出丟棄，先以PBS（phosphate buffer saline）清洗細胞1~2 次，再加入3 ml trypsin，置於37°C培養箱中處理2 分

鐘後，加入乾淨培養液以中和trypsin 之作用，再將瓶中所有液體裝到離心管中以1500 rpm 離心5 分鐘，離心後倒掉上清液，加入20 ml 新鮮培養液，再使用電動吸量管反覆抽吸使均勻混和，取20 μ l 之細胞懸浮液加入80 μ l trypan blue 溶液，以血球計數盤（Counting chamber）計算細胞數目（死細胞會被 trypan blue 染成藍色，而活細胞則不被染色）。

細胞數計算：

χ (為所計數的細胞數) $\times 20$ (20 ml 培養液) $\times 5$ (trypan blue 5倍稀釋) $\times 10^4$ ，依實驗目的不同，計算所需細胞液置於不同培養皿中。

E. 藥物處理

重新繼代的細胞經24 小時培養後，待貼壁細胞貼覆瓶底後，依實驗所需不同的時間長短選擇是否加藥前置換培養液，若24 小時內可不需置換培養液，若超過48 小時則先置換培養液再加入藥物處理。microplate 每well 加入培養液體積2 ml，則加20 μ l 藥物；3 ml，則加30 μ l，則藥物濃度被稀釋100 倍為最終濃度。

(三) 流式細胞儀分析測定

流式細胞儀廣泛的應用於癌細胞臨床樣品檢測當中，是腫瘤生物學研究的重要工具之一，為癌細胞的早期的藥效評估提供重要資訊。流式細胞分析技術的發展提供一快速檢測且可靠的方法定量細胞懸浮液，若配合適當的染劑，則可以對藥物處理細胞後做不同的效果評估，具有準確及快速的優點。

A. 細胞存活率測定

Propidium iodide (PI) 是一種核酸染劑，當細胞死亡時會進行壞死或細胞凋亡的路徑，死亡的細胞膜會失去完整性，使得PI 可進入細胞內與核酸結合，PI 會與DNA 雙股螺旋中之A=T、C≡G鍵結的氫鍵（hydro bond）接在一起；存活的細胞因其細胞膜完整PI 無法和細胞內的核酸結合，經PI 染色完成的細

胞可由流式細胞儀於488 nm 的雷射光激發後死亡的細胞會呈現較強紅色螢光，存活細胞會成較弱的紅色螢光以CellQuest 軟體分析細胞存活率。

【實驗步驟】

將細胞種植於12 well plate 中，細胞依照 2×10^5 /well 種植於培養皿中，經過24 小時靜置培養後，待細胞貼附後加入不同濃度的gallic acid (0.5 mM、1 mM、2.5 mM、5 mM、10 mM)，分別持續培養12、24、48 及72 小時。加藥時間後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS 清洗細胞一次後，再將細胞以trypsin 處理，置於37°C 培養箱中處理2 分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS以中和trypsin 之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm 離心5 分鐘，去除上清液，再加入1 ml PBS 清洗細胞，1500 rpm 離心5 分鐘，去除上清液，加入PI 染劑350 μ (1 350~550 μ l，可依照細胞數做調整)，均勻混合後，transfer至FACS 管中，以流式細胞儀進行樣品分析，固定秒數及流數，紀錄細胞增殖率gate%存活百分比。

B. 細胞週期分析

Cell cycle Propidium iodide (PI) 是一種螢光染劑，可專一的鍵結的核酸而廣泛的應用於流式細胞儀技術中，正常情況下細胞膜維持完整PI 無法穿透細胞之細胞膜，故可以併入其他實驗（如：與FITC 標記之annexinV 共同偵測，以區別存活壞死或凋亡細胞）或者與其他染劑共同使用，評估細胞存活狀態若以酒精將細胞膜打洞固定後，進入細胞內之PI 可與核酸進行鍵結，利用流式細胞儀(Flow cytometry; FACS)偵測PI 所貢獻之螢光，則可以反應細胞內之DNA 狀態或進行細胞週期分析 (Darzynkiewicz et al., 1992)。

【實驗步驟】

將細胞種植於12 well plate 中，細胞依照 2×10^5 /well 種植於培養皿中，經過24 小時靜置培養後，待細胞貼附後加入不同濃度的gallic acid(0.5 mM, 1 mM, 2.5mM, 5 mM, 10 mM)，分別培養12、24、48 及72 小時。加藥時間後，收

細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS 清洗細胞一次後，再將細胞以trypsin 處理，置於37 °C 培養箱中處理2 分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS 以中和trypsin之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm 5 分鐘的離心(重複此步驟一次)，去除上清液，置於震盪器輕輕震盪再加入70% EtOH/PBS，一滴一滴滴入離心管中以固定細胞，使細胞完全均勻分散於70% EtOH/PBS 中，靜置-20 °C至少一小時，取出細胞後離心(1500 rpm 5 分鐘)，倒掉上清液加入PBS 3ml

清洗細胞，離心去除上清液，加入cycle PI 染劑350 μ l，將細胞團打散，避光30 分鐘，以流式細胞儀行樣品分析，所得之結果以Modfit LT 軟體分析。

C. 粒腺體膜電位 (Mitochondria membrane potential; $\Delta\Psi_m$) 之檢測

細胞膜電位探針，DioC6 (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide) 是一種可穿透細胞膜，可專一性的結合並累積在細胞粒腺體中，DioC6在細胞內外的分佈可反應出細胞膜內外的電位差，其螢光強度的改變就可顯示細胞膜電位改變的情形，可發射出綠色螢光 (green-fluorescent) 之陽離子 (cationic dye) 親脂性染劑；在不需要固定細胞或其他處理的情況下可以即時、快速的偵測活細胞內粒腺體膜電位。粒腺體膜功能不良 (mitochondrial dysfunction) 通常伴隨早期細胞凋亡發生，而細胞粒腺體膜電位的改變也因此當作早期凋亡偵測上的指標 (Petit et al., 1990)。

【實驗步驟】

將細胞種植於12 well plate中，細胞依照 2×10^5 /well種植於培養皿中，經過24 小時靜置培養後，待細胞貼附後加入5 mM gallic acid, 20 μ l/well到12 well plate當中 (最終濃度為50 μ M)，經不同時間培養 (1、3、6、12及24 h)，加藥時間後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS清洗細胞一次後，再將細胞以trypsin處理，置於37°C培養箱中處理2分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS以中和trypsin之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm離心5分

鐘，去除上清液，再加入1 ml PBS清洗細胞，1500 rpm離心5分鐘，去除上清液，取 MMP ($\Delta\Psi_m$) 染劑 (10 μ l DioC6/500 μ l PBS) DioC6 (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide) 染劑每管加入500 μ l，需有一管blank不加藥也不加染劑，於37 $^{\circ}$ C培養箱避光培養30 min後，transfer至FACS管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每樣品收集10000顆細胞以CellQuest軟體分析。將blank (格線的peak) 調在 $10^0\sim 10^1$ 之間，control (斜線的peak) 調在 $10^1\sim 10^2$ 之間，M1 gated約75% peak，以上sample上機後，分析MMP (peak往右不產生apoptosis，往左產生apoptosis) 。

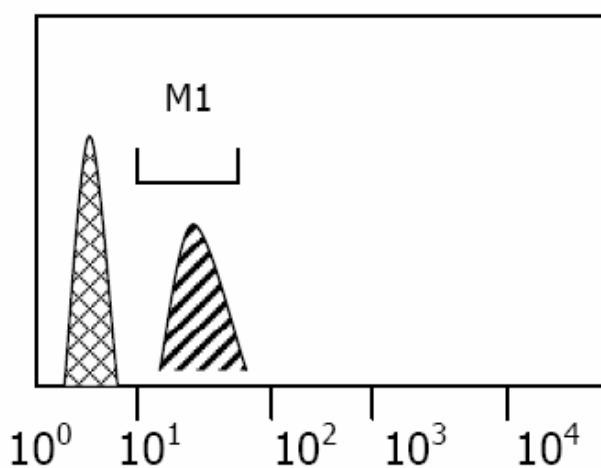


圖2.2 MMP 軟體的分析圖

D. 活性氧化物產生之檢測

免疫細胞進行需氧性滅菌過程中，會在細胞內啟動一連串的氧化還原反應，因而產生一些Oxidative Metabolites，如 H_2O_2 ， O_2 - free radical。如欲以流式細胞儀測量這些代謝物的產量，可用Dihydrorodamine 123、2',7'-dichlorofluorescein (for H_2O_2) 或hydroethidine (for O_2 - free radical) 等螢光染劑，對細胞進行染色，藉由2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCF -DA) 產生螢光來測量ROS的產生， H_2DCF -DA是一種具有螢光性質，可滲透細胞膜特異性的追蹤評估ROS的產生。 H_2DCF -DA會被細胞內的乙醯酯酶 (esterases) 去乙醯化 (deacetylated) 成非螢光性的DCFH，DCFH會在

細胞內被H₂O₂氧化成螢光性質的DCF，並聚集在粒腺體中，所發散螢光則可反映出細胞內H₂O₂的濃度（Royall et al., 1993）。

【實驗步驟】

將細胞種植於12 well plate中，細胞依照 2×10^5 /well種植於培養皿中，經過24小時靜置培養後，待細胞貼附後加入5 mM gallic acid，20 μ l/well到12 well plate當中（最終濃度為50 μ M），經不同時間培養（0.5、1、2、4及6 h），加藥時間後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS清洗細胞一次後，再將細胞以trypsin處理，置於37°C培養箱中處理2分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS以中和trypsin之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm離心5分鐘，去除上清液，再加入1 ml PBS清洗細胞，1500 rpm離心5分鐘，去除上清液，取ROS染劑H₂DCF-DA染劑（1 μ l H₂DCF-DA /500 μ l PBS）每管加入500 μ l，需有一管blank不加藥也不加染劑，只加入500 μ l PBS，在置於37 °C培養箱避光培養30 min後，transfer至FACS管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每樣品收集10000顆細胞以CellQuest軟體分析。將blank(格線的peak)調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，control(斜線的peak)調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，M1 gated約75% 以上，sample上機後，分析ROS（peak往右是產生自由基，往左是抗氧化）。

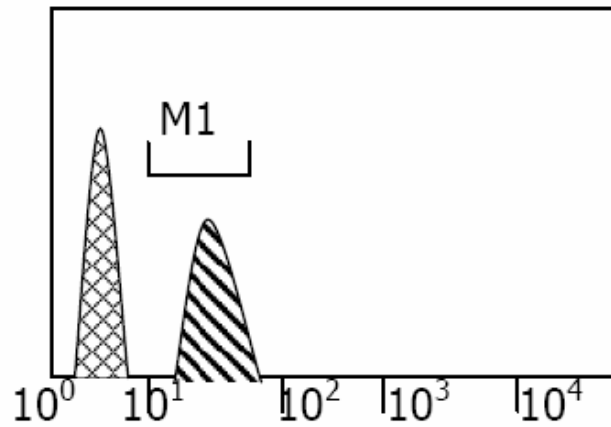


圖2.3 ROS 軟體分析圖

E. 鈣離子釋出之檢測

胞內鈣離子作為細胞信號傳遞的信差，是細胞激活過程中重要的功能參數。螢光染劑（如Fura-Red、Fluo-3和Indo-1等）通過乙醯甲酯（Acetoxymethyl Ester；AE）導入細胞後，Indo-1會與鈣離子特異性結合。這些螢光染劑的結構式，一般與EDTA相似，可螯合鈣離子，螯合鈣離子之螢光染劑會有光學特性上的改變，在（紫外光）UV的激發下，Indo-1放出光（emission）的強度會隨著細胞內鈣離子濃度的改變，而發散出不同強度的螢光，故可用比例法測得或直接測得的螢光強度得到鈣離子濃度的相對值，實際濃度需經校對後獲得。

【實驗步驟】

將細胞種植於12 well plate中，細胞依照 2×10^5 /well種植於培養皿中，經過24小時靜置培養後，待細胞貼附後加入5 mM gallic acid，20 μ l/well到12 well plate當中（最終濃度為50 μ M），經不同時間培養（0.5、1、2、4及6 h），加藥時間後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS清洗細胞一次後，再將細胞以trypsin處理，置於37°C培養箱中處理2分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS以中和trypsin之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm離心5分鐘，去除上清液，再加入1 ml PBS清洗細胞，1500 rpm離心5分鐘，去除上清液，取Indo-1-AM染劑每管加入1000 μ l，需有一管blank不加藥也不加染劑，只加入

1000 μ l PBS，在置於37°C培養箱避光培養1h，每10 min上下混合一次，1h後加入PBS洗2次，1500 rpm離心5 min，倒掉上清液，每管加入400 μ l PBS，再transfer至FACS管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每樣品收集10000顆細胞以CellQuest軟體分析。將blank(格線的peak)調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，control(斜線的peak)調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間，M1 gated約0%，以上sample上機後，分析calcium release(peak往右為鈣離子釋出)。



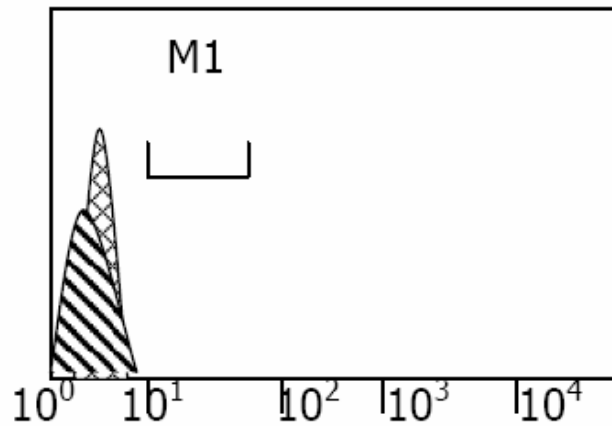


圖2.4 鈣離子軟體分析圖

F. Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 活性分析

利用PhiPhiLux-G1D1 kit 來檢測凋亡細胞caspase-3、caspase-8、caspase-9 之產生，PhiPhiLux- G1D1 kit 基質是種含有螢光物質之胺基酸序列(amino acid sequence)，而活化之caspase-3、caspase-8、caspase-9 可以裂解胺基酸序列之特定位置，而是螢光物質釋放出來，再經由流式細胞儀分析，可得知若螢光產量越多則產生活性之caspase-3、caspase-8、caspase-9 越多 (Komoriya et al., 2000)。

【實驗步驟】

將細胞種植於12 well plate 中，細胞依照 2×10^5 /well 種植於培養皿中，經過24 小時靜置培養後，待細胞貼附後加入5 mM gallic acid 20 μ l/well 到12 well plate 當中(最終濃度為50 μ M)，經不同時間培養(6、12、24、48 及72 h)；加藥時間後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入PBS 清洗細胞一次後，再將細胞以trypsin 處理，置於37°C 培養箱中處理2 分鐘後，將細胞打下來，加入1 ml PBS 以中和trypsin 之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm 離心5 分鐘，去除上清液，再加入1 ml PBS 清洗細胞，1500 rpm 離心5 分鐘，

去除上清液，取10 μ M substrate (Phiphilux green for caspase-3) (Phiphilux red for mitochondria) 每管加入25 μ l，在置於37 $^{\circ}$ C 培養箱避光培養1 h，1 h 後加入1 ml PBS 洗1 次，1500 rpm 離心5min，倒掉上清液，每管加入500 μ l PBS，再transfer 至FACS 管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每樣品收集10000 顆細胞以CellQuest 軟體分析。將blank (格線的peak) 調在 $10^0 \sim 10^1$ 之間control (斜線的peak) 調在 $10^1 \sim 10^2$ 之間，M1 gated 約75%，以上sample上機後，分析caspase-3 活性 (peak 往右為caspase-3 產生)。

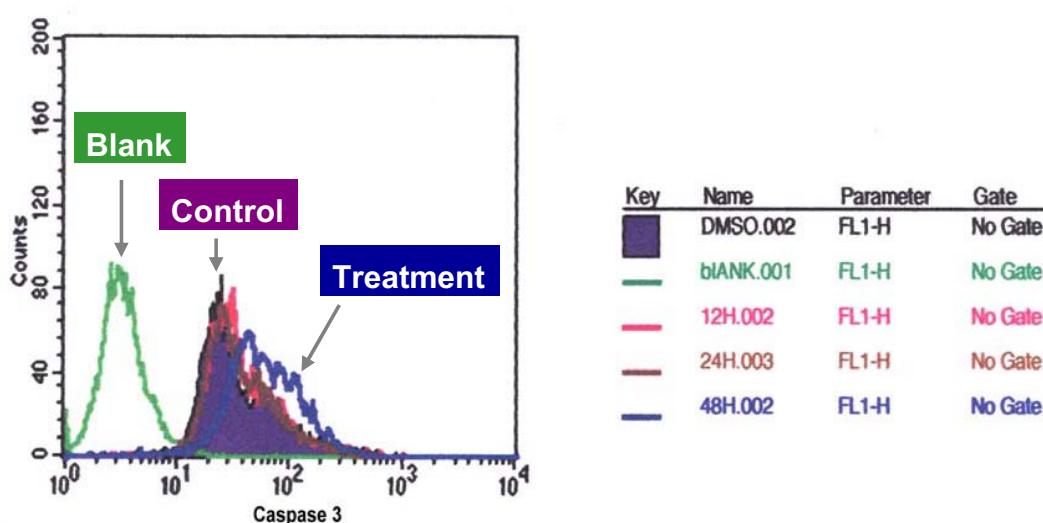


圖2.5 Caspase-3 軟體分析圖

(四) DNA 損傷檢測

A. DAPI (4'-6-diamidine-2-phenyl indole) 染色

DAPI (4'-6-diamidine-2-phenyl indole) 是種核酸螢光染劑，其會專一性的binding 在DNA 雙股螺旋之小溝 (minor groove) 上，當細胞凋亡時會出現染色質凝結 (chromosomes condensation)、DNA 斷裂 (DNA fragmentation) 情形發生，若細胞凋亡越嚴重，則DNA 斷裂越多而DAPI 染劑就會染上越多，在顯微鏡，下可觀察到白色螢光強度就越亮。

【實驗步驟】

NCI-H460 細胞分盤，種於6 well plate 當中，每well 種 1×10^4 /ml (通常會種 3 ml)，隔日，待細胞貼附後加入不同濃度的gallic acid (0.5 mM、1 mM、2.5 mM、5 mM、10 mM)，分別培養12 和24 小時。加藥時間後，收細胞，吸取上層液丟棄，加入PBS 洗3 次，加入3%Formaldehyde/PBS 固定10~15 分鐘，再加入PBS 洗2 次後，再加入0.1% TritonX-100/PBS (1 ml) 15 分鐘，再用PBS 洗2 次，《接下來步驟要避光處理》加入DAPI 染液 (1 μ l/ml) 300 μ l，置於37°C 水浴槽避光30 分鐘後，取出，用PBS 洗3 次後，於螢光顯微鏡F200 照相。

B. 彗星試驗 (Comet assay)

單細胞電泳分析 (single cell gel electrophoresis assay) 就是所謂的彗星試驗 (comet assay)，可用來分析及定量DNA 損傷 (DNA damage) 程度，是一個簡單、快速以及敏感度高的技術。利用DNA damage 後發生斷裂，藉由電泳將斷裂的DNA 拖出膜外，形成彗星狀而命名之，由此可藉由拖尾的長短，觀察DNA 的損傷情形。

【實驗步驟】

NCI-H460 細胞分盤，種於6 well plate 當中，每well 種 1×10^6 /3ml，隔日，待細胞貼附後加入不同濃度的gallic acid (0.5 mM、1 mM、2.5 mM、5 mM、10 mM)，分別培養12 和24 小時，加藥前須先置換新鮮medium，陰性對照組加入DMSO；陽性對照組加入3 μ M H₂O₂ (加入體積為1%)，將 gel 以微波溶解後放於 55 °C 水浴鍋中備用，以 0.1% trypsin 200 μ l digestion 2 min，加入1 ml PBS 中和 trypsin 作用後將 cell 吸至 1.5 ml 離心管，以 1500 rpm 離心 5 min 去上清液，彈散 pellet 加入 1×PBS 200 μ l (體積依細胞量調整)，在磨砂載玻片上以鉛筆標上號碼，置 70 μ l 0.5% Normal-melting-point agarose (NMA) + 0.5% low-melting-point agarose (LMA) 於載玻片上，

將蓋玻片以 45° 角蓋上防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片，取 10 μ l 細胞液加上 60 μ l (80-10) 0.5% LMA 加在第一層膠上，將蓋玻片以 45° 角蓋上防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片，配置 lysis buffer。將做好的膠置於 lysis buffer 1 hr，置於冰上，將膠移至 alkalin buffer 中 20 min，將電泳槽置於冰上，以 alkalin buffer 為電泳液跑 30 min (25 V ; 300 mA)。將膠移至 0.4 M Tris buffer 使 pH 回到中性，再將膠置於 methanol 脫水，加 PI (2.5 μ g/ml) 以螢光顯微鏡觀察，數 100 顆細胞打價數。

C. DNA 斷裂分析 (DNA fragmentation assay)

當細胞 apoptosis 時會有 DNA 斷裂現象發生，其細胞核內 DNA 會裂解成 180~200 bp，可藉由抽取 DNA 後，再經由電泳跑膠，看出是否有 DNA 斷裂現象，要是斷裂則電泳跑膠照相後會出現階梯狀 (ladder)，可藉由 marker 來得知其斷裂鹼基對 (base pair)。

【實驗步驟】

將細胞種植於 10cm plate 中，細胞依照 2×10^6 /well 種植於培養皿中，每 well medium 總量為 10 ml，經過 24 小時靜置培養後，待細胞貼附後加入 5 mM gallic acid，100 μ l/well 到 6 well plate 當中，經不同時間培養 (24、48 及 72 h)；加藥時間後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入 PBS 清洗細胞一次後，再將細胞以 trypsin 處理，置於 37°C 培養箱中處理 2 分鐘後，將細胞打下來，加入 1 ml PBS 以中和 trypsin 之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，再加入 1 ml PBS 清洗細胞，1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 200 μ l PBS 混合均勻將細胞移至 eppendorf，14000 rpm 離心 1 分鐘，小心移去上清液，加入 200 μ l PBS or TE buffer，將細胞懸浮均勻，再加入 4 μ l RNase A (10 mg/ml)，室溫靜置 5 min，將細胞中 RNA 溶解，再加入 Proteinase K 20 μ l，及 Binding solution 200 μ l，置於 70°C 水浴，10 min，再加入 100% EtOH 200 μ l，vortex 均勻 (若此時液體呈現濃稠白色黏液狀，則

細胞數過多，會降低DNA 抽取的效果），transfer 至Spin column，14000 rpm 離心1 分鐘（離心後DNA 會binding 到spin column 中間白色那層），再加入300 μ l Binding solution，14000 rpm 離心1 分鐘，再以700 μ l Washing solution 清洗兩次（14000 rpm 離心1 分鐘），最後一次將column 中所有液體都離下來，不加任何solution 直接14000rpm 離心5min，再置於烘箱3~5 min，將column由烘箱中取出後，加入100 μ l Elution solution（Elution solution 需先置於70°C水浴加熱，可增加DNA 溶解性，直到欲使用前再取出），室溫靜置2 分鐘後，14000rpm離心5min，離下液體即是含有DNA 之solution。將DNA 與6 \times DNA loading dye 混合（10 μ l DNA solution+2 μ l 6 \times DNA loading dye）loading 至2% agarose（1g agarose、50ml 0.5 \times TBE buffer、10 μ l Eithidium bromide）中。進行電泳，最後放入UV light 下檢查並照相儲存。

（五）西方點墨法（Western blotting）

【轉漬步驟】

先將PVDF membrane裁剪好，再以methanol短暫濕潤後，再浸入轉印緩衝液（transfer buffer）中，接著將裁好的濾紙先浸泡在transfer buffer中備用，將轉漬夾打開後，黑色面朝下，將海綿墊片先以transfer buffer潤濕並鋪在黑夾上，再將3M濾紙鋪上，接下來裁剪下層膠（separation gel）中所要轉漬的區域後，將SDS-PAGE gel小心的鋪於3M濾紙上，可在濾紙上加入多量的transfer buffer，再鋪上 SDS-PAGE gel時勿陷入任何氣泡，再依序放上 PVDF membrane，同樣避免氣泡產生，及3M濾紙，最後再放上一片海綿墊片，即可把整個轉漬夾裝好，形成似三明治夾層狀之構造。置入已裝有transfer buffer 的電泳槽中將黑夾朝負極，紅夾朝正極，電泳槽外圍放置足夠冰塊，使整各系統維持低溫狀態。以400 mA、2小時的條件下進行蛋白質轉漬步驟。轉印完成後取出轉印膜裁去多餘部分，轉印膜後以0.05% tween 20/1X PBS 清洗10分鐘共3次。緊接將轉印膜以2% FBS（溶於0.05 % tween 20/1X PBS 中）進行

blocking 步驟，以室溫1小時為條件進行。取出轉印膜後於小盒中以0.05 % tween 20/1X PBS 清洗10分鐘共3次。倒掉清洗液，加入8 ml的一級抗體（溶於新鮮配製之blocking solution中，稀釋倍數依不同抗體有所不同），4 °C 隔夜進行搖盪。隔天取出，回收一級抗體，以0.05% tween 20/1X PBS 清洗轉印膜10分鐘共3次。加入8ml稀釋10000倍的goat anti IgG (HRP) horseradish peroxidaseconjugated antibody 二級抗體（溶於含2% FBS的0.05% tween 20/1X PBS中），於室溫下搖盪進行1小時，最後取出轉印膜後以0.05% tween 20/1X PBS 洗清洗10分鐘共3次。

【壓片步驟】（暗房中進行）

將轉印膜浸泡於ECL 試劑之混合液（每瓶各取1.5 ml等比例混合）中1分鐘反應。以兩張投影片黏貼固定於cassette 內，轉印膜並正面朝上放置於壓片卡匣（cassette）兩張投影片中間，以Hyperfilm 軟片置於上層投影片上，對準轉印膜進行壓片，感光時間依轉印膜上螢光亮度決定時間長短，約5 秒至1 小時不等。感光完成後放入顯影劑進行顯影步驟（時間依實際觀察決定），再以清水沖洗30秒後放入定影劑中，過30 秒後再以清水沖洗30 秒。

第三節 統計方法

實驗結果以平均值標準差（mean ± SD）表示，使用Student's t-test 來決定實驗組與對照組之差異。*表示 $p < 0.05$ ，表示統計上具顯著差異。

第三章 研究結果

本實驗以探討五倍子酸 (gallic acid) 對人類大細胞肺癌 NCI-H460 細胞之影響，首先測試五倍子酸對 NCI-H460 細胞之生長抑制率及存活率之影響，及藉由型態 (morphology) 上觀察細胞之變化，再更進一步利用 DAPI 染色及單細胞凝膠電泳 (single cell gel electrophoresis; Comet assay) 觀察細胞是否有細胞損傷 (DNA damage) 情形發生及細胞凋亡 (apoptosis) 現象。接下來再探討五倍子酸對 NCI-H460 細胞細胞週期影響，並利用 DNA 斷裂分析 (DNA fragmentation)、粒線體膜電位 ($\Delta\Psi_m$)、活性氧化物產生 (ROS products)、鈣離子釋放 (calcium release)、以及凋亡蛋白 caspase-3、caspase-8、caspase-9 活性之檢測，來做凋亡路徑探討，最後再以 Western blot 來檢測凋亡蛋白質表現。

第一節 五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞株的增生抑制與細胞型態改變

利用流式細胞計數儀 (flow cytometry) 評估細胞存活率，結果發現加入不同濃度的五倍子酸之後，細胞的存活率隨著藥物濃度的上升而下降，在圖 3.1、3.2 中可以發現大細胞肺癌細胞經由藥物濃度的上升，使得細胞存活率下降，且隨著時間點的延長，亦使得細胞存活率下降，而加藥 24 與 48 小時後 gallic acid 對 NCI-H460 細胞的存活率 50% 抑制濃度 (IC₅₀) 分別為 250 及 300 μM 。利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的型態，加入不同濃度的五倍子酸處理 24 小時後，發現細胞數目有明顯下降的情形，且有細胞型態不完整、細胞膜皺縮、與空泡化的現象 (如圖 3.3)。由此可知五倍子酸於人類大細胞肺癌細胞有引起細胞計畫性死亡作用，在倒立式相位差顯微鏡，可看到凋亡小體及空泡化現象，此外亦有細胞皺縮變形、空泡化、裂解等特徵。

第二節 五倍子酸在人類大細胞肺癌細胞株對細胞週期 (Cell cycle) 的影響

利用流式細胞計數儀評估不同濃度的五倍子酸處理24及48小時後，加入PI，並觀察其細胞週期的表現。發現隨著藥物濃度的增加，G₀/G₁期之細胞比例有越來越多的趨勢，當gallic acid濃度大於200μM時，G₀/G₁期的細胞比例上升。由此可知，五倍子酸可以使人類大細胞肺癌細胞引起細胞週期在G₀/G₁期的停止(G₀/G₁ arrest)，而且會引起細胞計畫性死亡作用，在圖中可見sub-G₁ peak。(如圖3.4、圖3.5)

第三節 檢測五倍子酸在人類大細胞肺癌細胞株是否產生活性氧化物 (Reactive oxygen species)

活性氧化物 (reactive oxygen species ; ROS) 在誘導細胞凋亡當中扮演一個重要的角色 (Jung et al., 2001)。粒線體是ROS產生的主要位置而這又和細胞的死亡有關 (Fleury et al., 2002)。粒線體中ROS的大量產生 (ROS burst) 會造成粒線體的功能不良 (mitochondrial dysfunction)。為了檢測五倍子酸誘導之細胞凋亡是否和ROS的產生有關，在此利用流式細胞儀分析細胞中ROS的產生。利用流式細胞計數儀評估濃度250 μM的五倍子酸處理不同時間1、3、6、12、24小時，再加入H₂DCFDA，並觀察其產生活性氧化物的情形。結果發現隨著時間的延長，曲線相對地有左移的趨勢 (如圖3.6)，表示細胞並沒有活性氧化物產生增加的情形，這結果可能與五倍子酸本身具有抗氧化的特性有關。本實驗推測五倍子酸並不經由細胞活性氧化物產生增加而造成細胞的DNA 傷害。

第四節 五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞膜電位(Mitochondrial membrane potential)的影響

粒線體功能不良 (Mitochondrial dysfunctions) 包括粒線體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 的降低、通透性的轉變 (permeability transition) 以及cytochrome c 由粒線體中釋出到細胞質中，而誘導細胞凋亡的產生，皆是與細胞凋亡 (apoptosis) 有

關 (Xia et al., 1999)。本實驗是以流式細胞儀檢測染有DioC6之NCI-H460細胞，若粒腺體膜電位降低，則DioC6染劑就會結合較少，由此來檢測粒線體膜電位是否會因五倍子酸的處理後有降低的現象，進而誘導細胞凋亡作用的發生。

利用流式細胞計數儀評估濃度250 μM 的五倍子酸分別處理1、3、6、12及24小時之後，加入DioC6，並觀察其產生膜電位變動的情形。結果發現隨著時間的延長(第12小時之後)，曲線相對地有左移的趨勢，表示細胞粒線體膜電位的降低 (Mitochondria depolarization)，進而誘導細胞凋亡的發生 (如圖3.7)。

第五節 五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞之鈣離子釋出影響

已知內質網中鈣離子釋出會造成粒線體膜電位 ($\Delta\Psi\text{m}$) 之下降，前述結果得知粒線體膜電位在24小時內即有下降之現象發生，為探討先前發現之粒線體膜電位在短時間即下降之原因，在此以Fluo-3/AM 會特異性的和鈣離子結合之特性，利用流式細胞儀分析鈣離子的釋出，Fluo-3 會與鈣離子特異性結合，螯合鈣離子之螢光染劑會有光學特性上的改變，在 (紫外光) UV 的激發下，Fluo-3 放出光 (emission) 的強度會隨著細胞內鈣離子濃度的改變，而發散出不同強度的螢光，故可用比例法測得或直接測得的螢光強度得到鈣離子濃度的相對值，實際濃度需經校對後獲得。

利用流式細胞計數儀評估濃度250 μM 的五倍子酸分別處理1、3、6、12及24小時之後，加入Fluo-3/AM，並觀察其產生鈣離子的情形。結果發現隨著時間的延長，曲線相對地有右移的趨勢，表示五倍子酸會促使細胞內鈣離子濃度增加 (如圖3.8)。

第六節 利用彗星試驗(Comet assay)觀察五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞之DNA 傷害程度

單細胞電泳分析 (single cell gel electrophoresis assay) 就是所謂的彗星試驗 (Comet assay)，可用來分析及定量DNA 損傷 (DNA damage) 程度，是一個簡單、快速以及敏感度高的技術。利用DNA damage 後發生斷裂，藉由電泳將斷裂的DNA拖出膜外，形成彗星狀而命名之，由此可藉由拖尾的長短，觀察DNA 的損傷情形。

將濃度分別為50、100、250、500 μM 五倍子酸對NCI-H460細胞作用48小時後，所造成細胞DNA 單股斷裂的程度。在陰性對照組加入1%DMSO，陽性對照組加入5 μM H₂O₂。以彗星試驗偵測，觀察細胞拖尾的情形，隨機選取100顆細胞觀察拖尾情況。結果由圖3.9發現：當五倍子酸濃度愈高，其DNA 拖尾的情況愈嚴重，亦表示其DNA 損傷的程度也愈高。

第七節 利用DAPI染色觀察五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞之細胞凋亡

DAPI (4 -6-diamidine-2-phenyl indole) 是種核酸螢光染劑，其會專一性的binding 在DNA 雙股螺旋之小溝 (minor groove) 上，當細胞凋亡時會出現染色質凝結 (chromosomes condensation)、DNA 斷裂 (DNA fragmentation) 情形發生，若細胞凋亡越嚴重，則DNA 斷裂越多而DAPI 染劑就會染上越多，在螢光顯微鏡下可觀察到白色螢光強度就越亮。

人類子大細胞肺癌NCI-H460細胞以不同濃度 (50、100、200、300、400 μM) 之五倍子酸處理後，收集細胞以DAPI 染劑將細胞染色，利用位像差顯微鏡，觀察螢光強度。我們更進一步檢視細胞死亡是否是經由細胞凋亡路徑，我們由DAPI staining assay，將DNA 雙股螺旋小溝 (minor groove) 上接上DAPI 螢光，在螢光顯微鏡下觀察，與對照組比較，大黃酸處理組螢光明顯增加，結果於48小時五倍子酸給予下，隨著的濃度增加可發現螢光強度有增加的現象，白色螢光明顯比控制組亮且增強的趨勢出現，可明顯看出凋亡小體 (apoptotic body) 的細胞出現 (如圖3.10)。顯示五倍子酸會造成大細胞肺癌NCI-H460細胞DNA fragmentation 而造成凋亡。

第八節 利用流式細胞儀檢測五倍子酸對大細胞肺癌細胞之細胞凋亡相關蛋白質 Caspase-3、Caspase-8及Caspase-9

由前述實驗結果顯示，以五倍子酸處理NCI-H460細胞，會造成細胞週期的停滯，並誘導細胞走向細胞凋亡途徑。Caspase-3、Caspase-8及Caspase-9為cysteine protease family之成員，是參與細胞凋亡之主要作用蛋白。Caspase-3的活化會促使PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) 分解，進而造成DNA fragmentation 之產生，造成細胞凋亡之現象。

本實驗利用PhiPhiLux-G1D1 kit (OncoImmunitin, Inc., Maryland, USA) 檢測caspase-3、Caspase-8及Caspase-9之活性。以250 μ M 濃度之五倍子酸投予NCI-H460細胞經6~72小時後收集細胞，加入PhiPhiLux-G1D1 kit 中之基質反應，以探討五倍子酸是否誘導Caspase-3、Caspase-8及Caspase-9活性產生。實驗結果顯示，以五倍子酸處理之人類大細胞肺癌NCI-H460細胞6小時後，即可明顯發現caspase-3及Caspase-8活性明顯增加，而Caspase-9則於12小時後發現活性明顯增加的情形。由此可知，五倍子酸可誘導人類大細胞肺癌NCI-H460細胞之caspase-3、Caspase-8及Caspase-9 活性增加，進而促使細胞凋亡發生（如圖3.11、3.12、3.13）。

第九節 利用西方墨點法檢測五倍子酸在人類大細胞肺癌細胞中對

caspase 蛋白與細胞凋亡調控蛋白表現量的影響

先前的實驗結果顯示，五倍子酸會導致大細胞肺癌細胞凋亡，為探究其機制，故接著以西方墨點法偵測參與調控細胞凋亡相關蛋白的表現，包括細胞膜死亡受體凋亡路徑相關的 Fas、Fas-L 及 FADD (Fas-associated death domain)；粒線體路徑相關的 cytochrome C、AIF 及 Apaf-1；內質網刺激傳遞路徑相關的 GADD153(growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153, 又名 CHOP)與 GRP78 (glucose-regulated protein 78, 又名 BiP)；負責執行細

胞凋亡的 caspase family 蛋白包括 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9，觀察其蛋白表現量變化；調控細胞凋亡的 Bcl-2 family 蛋白，包括促進細胞凋亡 (pro-apoptotic) 的 Bax 和 Bad，與抑制細胞凋亡 (anti-apoptotic) 之 Bcl-2 和 Bcl-xl。以 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 為 housekeeping gene 及 β -actin 作為 internal control。

一、細胞膜死亡受體凋亡路徑的相關蛋白表現

以濃度 250 μ M 五倍子酸處理人類大細胞肺癌細胞株 NCI-H460 24 小時，利用西方墨點法觀察發現，隨著時間的延長，Fas、Fas-L 及 FADD 蛋白表現量增加（如圖 3.14）。

二、粒線體路徑的相關蛋白表現

當細胞凋亡經由粒線體路徑啟動時，會經由粒線體會釋出 cytochrome c 與 Apaf-1，進而造成細胞凋亡，並活化下游路徑 caspase-9 蛋白表現。以濃度 250 μ M 五倍子酸處理人類大細胞肺癌細胞株 NCI-H460 24 小時，利用西方墨點法觀察發現，隨著時間的延長，結果發現 cytochrome c 蛋白表現量增加，而 Apaf-1 及 caspase-9 蛋白表現量先增加而後遞減。而抑制細胞凋亡的 AIF 蛋白表現量亦隨著時間的延長有增加的趨勢（如圖 3.15）。

三、內質網刺激傳遞路徑的相關蛋白表現

以濃度 250 μ M 五倍子酸處理人類大細胞肺癌細胞株 NCI-H460 24 小時，利用西方墨點法觀察發現隨著時間的延長，GADD-153 與 GRP-78 蛋白表現量上升（如圖 3.16）。

四、執行細胞凋亡的 caspase family 蛋白表現

以濃度 250 μ M 五倍子酸處理人類大細胞肺癌細胞株 NCI-H460 24 小時，利用西方墨點法觀察 caspase family 蛋白的表現量，結果發現隨著時間的

延長，caspase-3 蛋白表現量上升，caspase-8 蛋白表現量下降，caspase-9 蛋白表現量下降（如圖 3.17）。

五、調控細胞凋亡的 **Bcl-2 family** 蛋白表現

以濃度 250 μ M 五倍子酸處理人類大細胞肺癌細胞株 NCI-H460 24 小時，利用西方墨點法觀察 Bcl-2 family 蛋白的表現量，結果發現隨著時間的延長，Bcl-2 和 Bcl-xl 蛋白表現量下降，Bad 和 Bax 蛋白表現量增加（如圖 3.18）。



第四章 討論

五倍子酸是一種具多羥基酚物質 (polyhydroxyphenolic compound)，存在許多自然植物與水果當中，像綠茶、葡萄、草莓與香蕉等[Sun J, 2002]。先前的研究證實，五倍子酸可以清除自由基[Inoue M,1994]，而且對白血症、肺癌與大腸腺癌細胞的細胞株有抑制增生的效果[Kawada M, 2001; Salucci M,2002]，及保護正常淋巴球細胞 DNA 避免凋亡[Sohi KK, 2003]。因此五倍子酸具有保護正常細胞，防止細胞癌化的效果[Taraphdar AK, 2001]。大細胞肺癌 (Large cell carcinoma) 雖然發生率僅佔所有費癌細胞的 10%，但因其具有神經內分泌細胞的特性，臨床表現與一般肺癌較不同，其預後也是所有非小細胞中最差的。先前的研究並未探討過五倍子酸對於抑制大細胞肺癌細胞的效果，因此本研究以五倍子酸處理細胞，試圖找出五倍子酸和人類大細胞肺癌 (NCI-H460) 兩者之間的關係，並探討五倍子酸誘發大細胞肺癌細胞(NCI-H460) 凋亡可能之機轉。

五倍子酸之抗腫瘤作用不僅造成人類大細胞肺癌 (NCI-H460) 細胞生長抑制、存活率降低、細胞週期停滯，也促使 NCI-H460 細胞凋亡，五倍子酸對人類大細胞肺癌 (NCI-H460) 細胞生長抑制的影響 (圖 3.1-3.2)，可以看出處理不同濃度之五倍子酸皆會抑制人類大細胞肺癌細胞生長，NCI-H460 細胞在處理 50 到 500 μ M 的 galic acid，經過 24 及 48 小時後發現培養的細胞數目減少，細胞死亡的現象發生，且也可以明顯從型態上發現凋亡小體。

細胞 apoptosis 時，會有型態 (morphology) 上的改變，細胞會圓起、染色質濃縮 (chromatin condensation)，死亡的細胞漂起，我們可由圖 3.3 看到細胞數減少，細胞型態上改變，因此，五倍子酸對人類大細胞肺癌 (NCI-H460) 細胞之作用包括細胞生長抑制，及造成細胞的自體凋亡 (apoptosis)。

以 PI 染色利用流式細胞儀 (Flow cytometer ; FACS) 分析五倍子酸對人類大細胞肺癌 (NCI-H460) 細胞 DNA 含量的分佈情形，得知細胞週期分佈情形。結

果發現，以不同濃度之五倍子酸處理24及48小時後，細胞DNA分佈，隨著濃度的增加於24小時後就有發生顯著的G₀/G₁ phase arrest而S phase及G₂/M phase有減少的趨勢發生，甚至只剩下G₀/G₁及sub-G₁ peak而已，此現象似乎是細胞無法進入S phase而使細胞週期停滯在G₁ phase。上述這些結果說明了五倍子酸會明顯造成人類大細胞肺癌細胞cell cycle arrest。

除此之外，五倍子酸所造成人類大細胞肺癌NCI-H460細胞的這些作用也會造成細胞型態上的改變，這些改變是否符合細胞凋亡的型態標準，可以藉由DAPI染色來確認。結果發現，於五倍子酸處理48小時200 μM濃度下可以看見，以DAPI染色後之典型的凋亡小體（圖3.10）。文獻指出，細胞凋亡型態上會有細胞質空泡狀（cytoplasmic blebbing）、細胞核皺縮（nuclear shrinkage）、染色質凝結（chromatin condensation）、細胞外型不規則（irregularity in shape）以及收縮的過程[Cohen, 1993]。

此外，本實驗更進一步利用單細胞凝膠電泳（Comet assay），檢測五倍子酸對人類大細胞肺癌細胞DNA是否造成損傷進而導致細胞apoptosis，結果發現，同樣在五倍子酸濃度50μM作用在NCI-H460細胞48小時即可看見DNA damage所產生之斷裂拖尾現象，由此可知，五倍子酸對NCI-H460細胞在短時間內即可造成傷害。因此，從本實驗DAPI staining以及單細胞凝膠電泳分析檢測細胞凋亡的情形，發現五倍子酸會造成人類大細胞肺癌NCI-H460細胞的apoptosis。

接下來我們進行細胞凋亡途徑的探討，已知粒腺體功能不良（Mitochondrial dysfunction）包括粒線體膜電位（ $\Delta\Psi_m$ ）的降低、通透性的轉變（permeability transition）以及cytochrome c由粒線體中釋出到細胞質中，而誘導細胞凋亡的產生，皆是與細胞凋亡（apoptosis）有關（Xia et al., 1999）。由流式細胞儀檢測五倍子酸對人類大細胞肺癌NCI-H460粒線體膜電位之影響，結果發現mitochondria membrane potential（ $\Delta\Psi_m$ ）在24小時內有明顯下降（圖3.7），顯示五倍子酸會使人類

大細胞肺癌NCI-H460損傷而導致粒線體膜電位的降低，進而誘導細胞凋亡的發生。

近來研究指出，癌症化學預防試劑誘導之細胞凋亡某部分和活性氧化物（reactive oxygen species；ROS）的產生以及氧化還原反應的平衡破壞有關（Xia et al., 1999; Kluck et al., 1997）。粒線體是ROS產生的主要位置，並且ROS在誘導細胞凋亡當中扮演一個重要的角色（Jung et al., 2001; Fleury et al., 2000）。粒線體中ROS的大量產生（ROS burst）會造成DNA的損傷，而促使細胞凋亡。但在我們的實驗結果發現ROS在五倍子酸處理後並未如預期中大量產生，因此，ROS的產生與粒線體膜電位（ $\Delta\Psi_m$ ）的關西需進一步的實驗探討。ROS未如預期中大量產生甚至下降可能是被細胞本身之抗氧化酵素所清除，或是因五倍子酸本身抗氧化的特性有關，所以ROS逐漸降低。而在Lin的研究中，曾以不同之抗氧化劑給予子宮頸癌細胞與大黃酸一起處理，結果依然導致癌細胞的凋亡，由此可以說明ROS並非是造成細胞凋亡的唯一路徑，因在ROS釋出的同時有可能cytochrome c也會由粒線體中流出而造成凋亡的訊息傳遞，雖然ROS可以被抗氧化劑所清除，但cytochrome c所造成凋亡訊息，仍是會使細胞進行apoptosis。

有文獻指出，內質網中鈣離子的釋出與粒線體膜電位（Mitochondrial membranes potential； $\Delta\Psi_m$ ）的降低有關，因此我們利用Fluo-3/AM鈣離子探針（calcium probe）以流式細胞儀檢測五倍子酸對人類大細胞肺癌NCI-H460細胞鈣離子的釋出的影響。結果發現鈣離子在第12小時有明顯釋出的現象（圖3.8），但之後逐漸恢復平衡，這似乎也與粒線體膜電位（ $\Delta\Psi_m$ ）在24小時內下降有關，因此我們推測，在一開始前期所發現之DNA damage（由comet assay得知）可能是由calcium的釋放去影響粒線體膜電位的降低後，造成粒線體cytochrome c的釋出而使得細胞發生凋亡的反應。

Caspase-3 為cysteine protease family 之一員，是參與細胞凋亡之主要

作用蛋白。Caspase-3 的活化會促使PARP【poly (ADP-ribose) polymerase】分解；以及ICAD kinase (Inhibitor of CAD kinase) 活化，而將ICAD切除放出CAD (caspase-activated Dnase)，進而造成DNA fragmentation 之產生，造成細胞凋亡之現象。因此我們探討五倍子酸對人類人類大細胞肺癌 (NCI-H460) 細胞caspase-3活性之作用，發現caspase-3 活性在6小時即有上升的現象。Li 等人，以ellagic acid 處理膀胱癌T24 細胞，發現Ellagic acid 會活化caspase-3 之產生，進而誘導細胞凋亡 (Li et al.,2005)。

一般細胞凋亡有兩種主要途徑：粒線體路徑 (Mitochondrial-initiated pathways) 以及細胞膜死亡受體路徑 (Cell surface death receptor pathway) (Li et al., 2005)。先前研究顯示，五倍子酸會導致人類大細胞肺癌NCI-H460 細胞粒線體膜電位下降，使細胞循藉著粒線體途徑而凋亡，於大五倍子酸處理後， pro-apoptotic protein—bax 蛋白表現量有增加的現象；Anti-apoptotic protein—bcl-2蛋白表現量有降低的現象，與先前研究發現p53 的表現增加，會轉錄活化調節bax 基因的產生 (Miyashita and Reed, 1995) 之結果是相符的，而bax會與bcl-2結合而造成粒線體膜電位的降低促使cytochrome c 流出至細胞質，cytochrome c 會與Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) 結合，然後活化caspase-9。Cytochrome c 也有增加的現象，而活化型態 caspase-9、caspase-3 蛋白表現逐漸增加。表示五倍子酸誘導人類大細胞肺癌NCI-H460 細胞apoptosis 之途徑與經由粒線體的凋亡路徑有關。

另外，本實驗發現五倍子酸誘發人類大細胞肺癌NCI-H460細胞凋亡的過程中CD95/Fas 及活化的caspase-8 表現量增加，表示五倍子酸誘導人類子宮頸癌Ca Ski 細胞的凋亡路徑應該不只單一路徑，顯示五倍子酸誘導Ca Ski 細胞的凋亡路徑或許也和細胞膜上Fas 有關 (圖3-14)。細胞膜上死亡受體路徑則是活化細胞膜上Fas、TNFR1 及TRAIL 等死亡受體，接著會吸引細胞內的Fas-associated death domain (FADD) 與之結合，並且會吸引pro-caspase-8 形

成DISC (death-inducing signaling complex)，進而活化caspase-8，而後直接活化caspase-3、caspase-6和caspase-7，或者活化的caspase-8 會將細胞質中Bid 裂解成tBid 位移至粒線體造成膜電位降低，而發生粒線體途徑的凋亡反應 (Budihardjo et al., 1999)。

綜合本研究五倍子酸所造成人類大細胞肺癌NCI-H460細胞細胞凋亡的現象，我們推論五倍子酸可能透過兩種不同的細胞反應機制來抑制人類大細胞肺癌NCI-H460細胞的增生，五倍子酸可以藉由p53 活化p21 的路徑而使人類大細胞肺癌NCI-H460細胞細胞週期停滯於G₀/G₁ 期；另外，五倍子酸一方面會藉由鈣離子的釋出，影響粒線體的膜電位進而使cytochrome c 流出細胞質中造成細胞凋亡的發生，另一方面藉由細胞膜死亡受體Fas 的表現增加，而活化caspase-8，進而造成Bid 的裂解轉變成tBid，也會影響粒線體膜電位的降低，這些是五倍子酸造成人類大細胞肺癌NCI-H460細胞粒線體膜電位降低之綜合原因。活化的caspase-8 也可進而活化caspase-3，激起caspase瀑布，使得lamins (一種核內蛋白) 被降解，染色質濃縮、核膜被分解，DNA被切割成180-200bp小片段，造成細胞凋亡。

第五章 結論與建議

本研究中以五倍子酸處理人類大細胞肺癌NCI-H460細胞，探討五倍子酸的抗腫瘤活性及調控之分子機制。結果得知，五倍子酸具有明顯抑制人類大細胞肺癌NCI-H460細胞生長作用以及誘導細胞週期停滯在G₀/G₁期和細胞凋亡作用。深入探討分子機制，發現五倍子酸影響及調控的分子層面相當廣，包括一些鈣離子的平衡、粒線體膜電位的降低、細胞膜死亡受體Fas一系列的死亡傳訊以及轉錄因子等。仔細分析這些受影響的分子間相互的關聯性，由實驗結果可得知，五倍子酸給予人類大細胞肺癌NCI-H460細胞12小時內就發現鈣離子的釋出，而影響粒線體的膜電位進而使cytochrome *c* 釋出造成細胞凋亡的發生，並且造成DNA損傷，促使p53蛋白的表現活化進而使細胞停滯於G₀/G₁期；另一方面使得粒線體凋亡路徑的進行；且我們也發現細胞膜死亡受體Fas的表現增加，促使pro-caspase-8 活化，而直接活化caspase-3而造成細胞凋亡(如圖3.19)。

本研究中，我們確實證明了五倍子酸的抗人類大細胞肺癌NCI-H460細胞株腫瘤活性，是經由誘導細胞凋亡的發生，及細胞週期的停滯。因此，五倍子酸雖尚未能立即應用於臨床癌症治療上，但仍具有發展成新一類癌症化學預防試劑的潛力。

參考文獻

衛生署全國衛生統計資訊網(Health and National Health Insurance Annual Statistics Information service)(2005-2006): 民國94-95年國人主要死因統計資料 (<http://www.doh.gov.tw/statistic/index.htm>)

楊淑燕, 陳明義, 楊正澤(2000), 臺灣的植物癭, 行政院農業委員會、中華民國環境綠化協會編印。(<http://subject.forest.gov.tw/species/gall/>)

呂志宏, (2003), 中國醫藥大學, 中國藥學研究所, 碩士論文。The molecular mechanism of extracts of *Solanum lycopersicum* THUNBERG induced cytotoxicity and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines (Colo 205).

Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., and Pestell, R.G. (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable, regions. *J. Biol. Chem.* 270, 23589-23597.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.

Ashkenazi A. (2002). *Nat Rev Cancer* 2: 420–430.

Bae, J.H., Park, J.W., and Kwon, T.K. (2003). Ruthenium red, inhibitor of mitochondrial Ca^{2+} uniporter, inhibits curcumin-induced apoptosis via the prevention of intracellular Ca^{2+} depletion and cytochrome c release. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun. 303, 1073-1079.

Behl, C. (2000). Apoptosis and Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 107, 1325-1344.

Beyersmann, D., and Hechtenberg, S. (1997). Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 247-261.

Bratton, S.B., MacFarlane, M., Cain, K., and Cohen, G.M. (2000). Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* 256, 27-33.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269-290.

Cohen, J.J. (1993). Apoptosis. *Immunol. Today* 14, 126-130.

Chiao, P.J., Na, R., Niu, J., Sclabas, G.M., Dong, Q., and Curley, S.A. (2002). Role of Rel/NF-kappaB transcription factors in apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer* 95, 1696-1705.

Chiu, HF; Cheng MH, Tsai SS et al. (2006). Outdoor air pollution and female lung cancer in Taiwan. *Inhalation Toxicology* 18 (13): 1025–1031.

Clegg, A; Scott DA, Hewitson P et al. (January 2002). "Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in

non-small cell lung cancer: a systematic review". *Thorax* 57 (1): 20–28.

Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., and Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13, 795-808.

Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245-2262.

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992).

Derradji, H., and Baatout, S. (2003). Apoptosis: a mechanism of cell suicide. *In Vivo* 17, 185-192.

Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131-141.

Hamilton, W; Peters TJ, Round A, Sharp D (2005). What are the clinical features of lung cancer before the diagnosis is made? A population based case-control study. *Thorax* 60 (12): 1059–1065.

Ho, A., and Dowdy, S.F. (2002). Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 47-52.

Inoue M, Suzuki R, Koide T, Sakaguchi N, Ogihara Y and Yabu Y: Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 898-904, 1994.

Jung, U., Zheng, X., Yoon, S.O., and Chung, A.S. (2001). Se-methylselenocysteine induces apoptosis mediated by reactive oxygen species in HL-60 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 479-489.

Kawada M, Ohno Y, Ri Y, *et al*: Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs* 12: 847-852, 2001.

Kerr, J.F., Winterford, C.M., and Harmon, B.V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.

Komoriya, A., Packard, B.Z., Brown, M.J., Wu, M.L., and Henkart, P.A. (2000). Assessment of caspase activities in intact apoptotic thymocytes using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *J. Exp. Med.* 191, 1819-1828.

Lemarie, A., Lagadic-Gossmann, D., Morzadec, C., Allain, N., Fardel, O., and Vernhet, L. (2004). Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1517-1531.

Li, N., and Karin, M. (1999). Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* 13, 1137-1143.

Li, T.M., Chen, G.W., Su, C.C., Lin, J.G., Yeh, C.C., Cheng, K.C., and Chung, J.G. (2005). Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Res.* 25, 971-979.

Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A.D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.* 7, 1003-1006.

McConnell, B.B., Gregory, F.J., Stott, F.J., Hara, E., and Peters, G. (1999). Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1981-1989.

Merck Manual Professional Edition, Online edition. Lung Carcinoma: Tumors of the Lungs.

(<http://www.merck.com/mmpe/sec05/ch062/ch062b.html#sec05-ch062-ch062b-1405>)

Murray, N; Turrisi AT (2006). A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 1 (3): 270–278.

National Lung Cancer Partnership (2006). Lung Cancer Facts (Women)

(<http://www.nationallungcancerpartnership.org/index.cfm?page=factsWomen>)

Petit, P.X., O'Connor, J.E., Grunwald, D., and Brown, S.C. (1990). Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. *Eur. J. Biochem.* 194, 389-397.

Royall, J.A., and Ischiropoulos, H. (1993). Evaluation of

2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. Arch. Biochem. Biophys. 302, 348-355.

Salucci M, Stivala LA, Maiani G, Bugianesi R and Vannini V: Flavoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). Br J Cancer 86: 1645-1651, 2002.

Senderowicz, A.M. (2004). Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. Curr. Opin. Cell Biol. 16, 670-678.

Shen, H.M., Dong, S.Y., and Ong, C.N. (2001). Critical role of calcium overloading in cadmium-induced apoptosis in mouse thymocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 171, 12-19.

Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. Science 274, 1672-1677.

Sherr, C.J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. Cancer Res. 60, 3689-3695.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. Genes Dev. 13, 1501-1512

Sohi KK, Mittal N, Hundal MK and Khanduja KL: Gallic acid, an antioxidant, exhibits anti apoptotic potential in normal human lymphocytes: a Bcl-2 independent mechanism. J Nutr Sci Vitaminol 49: 221-227, 2003.

Stevaux, O., and Dyson, N.J. (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. Curr. Opin. Cell Biol. 14, 684-691.

Sun J, Chu YF, Wu X and Liu RH: Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 50: 449-454, 2002.

Strand, TE; Rostad H, Damhuis RA, Norstein J (June 2007). "Risk factors for 30-day mortality after resection of lung cancer and prediction of their magnitude". *Thorax*.

Suh J., and Rabson, A.B. (2004). NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J. Cell. Biochem.* 91, 100-117.

Taraphdar AK, Roy M and Bhattacharya RK (2001). Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Curr Sci* 80: 1387-1396.

Travis, WD; Travis LB, Devesa SS (1995). Lung cancer. *Cancer* **75** (Suppl. 1): 191–202.

Vaporciyan, AA; Nesbitt JC, Lee JS et al. (2000). *Cancer Medicine*. B C Decker, 1227–1292.

World Health Organization (WHO, February 2006). *Cancer*. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>)

Xia, Z., Lundgren, B., Bergstrand, A., DePierre, J.W., and Nassberger, L. (1999). Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects

on these changes by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Biochem. Pharmacol.* 57, 1199-1208.

Zerbini, L.F., Wang, Y., Czibere, A., Correa, R.G., Cho, J.Y., Ijiri, K., Wei, W., Joseph, M., Gu, X., and Grall, F. et al. (2004). NF-kappa B-mediated repression of growth arrest-and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13618-13623.



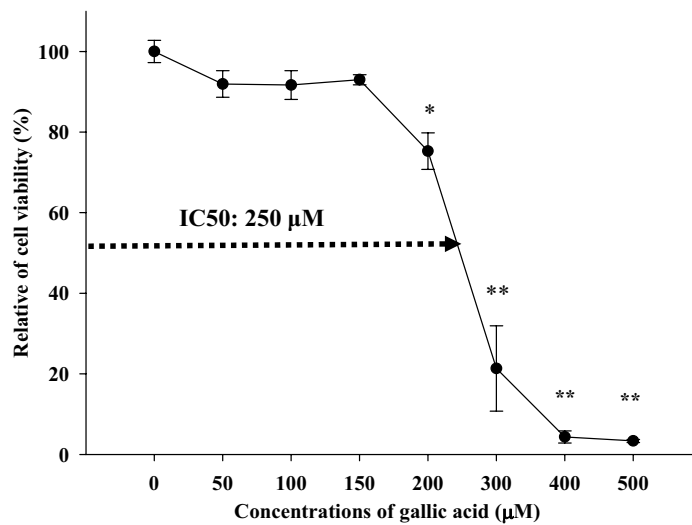


圖3.1 不同濃度之五倍子酸gallic acid處理NCI-H460細胞24小時存活率。使用不同濃度的五倍子酸分別處理24小時後，在人類大細胞肺癌細胞株所檢測到的存活率情形。數據結果以mean±SD值表示，n=3 (* p< 0.05, ** p< 0.01)。

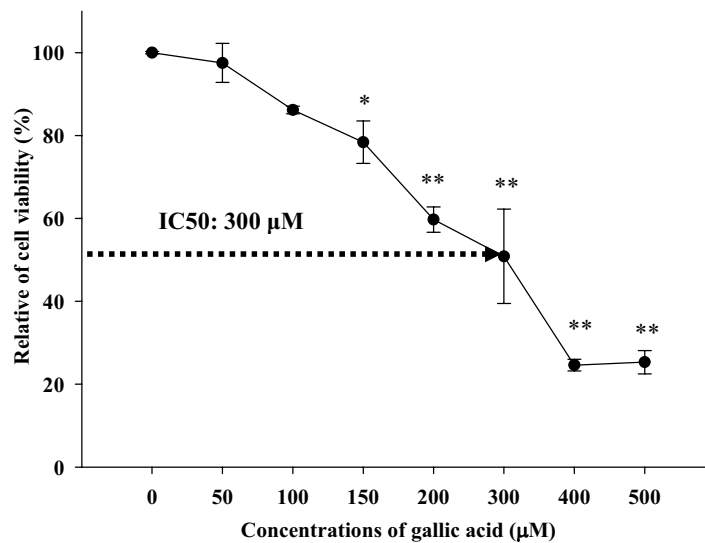


圖3.2 不同濃度之五倍子酸gallic acid處理NCI-H460細胞48小時存活率。數據結果以mean±SD 值表示，n=3 (* p< 0.05, ** p< 0.01)。

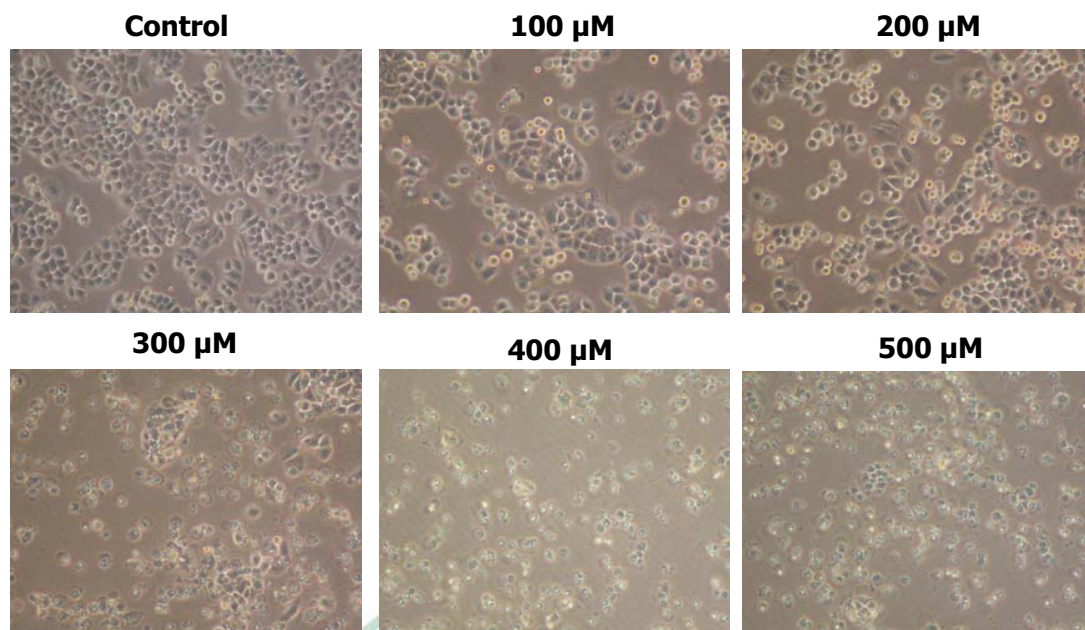
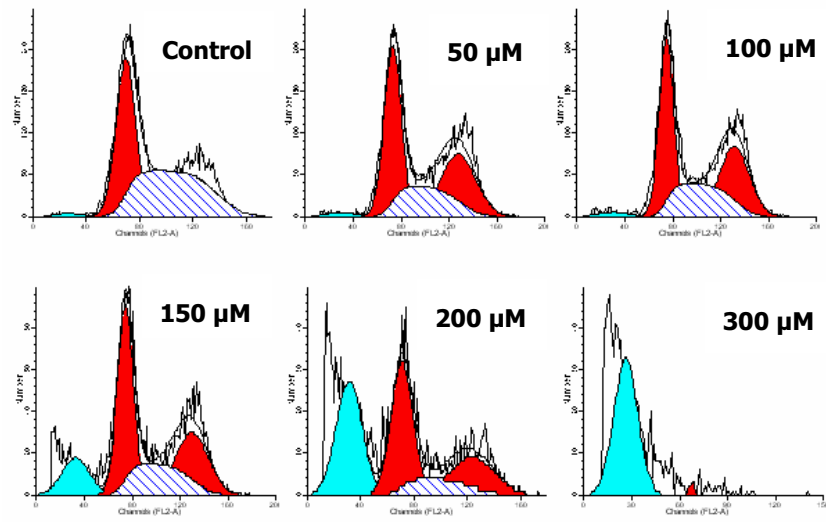
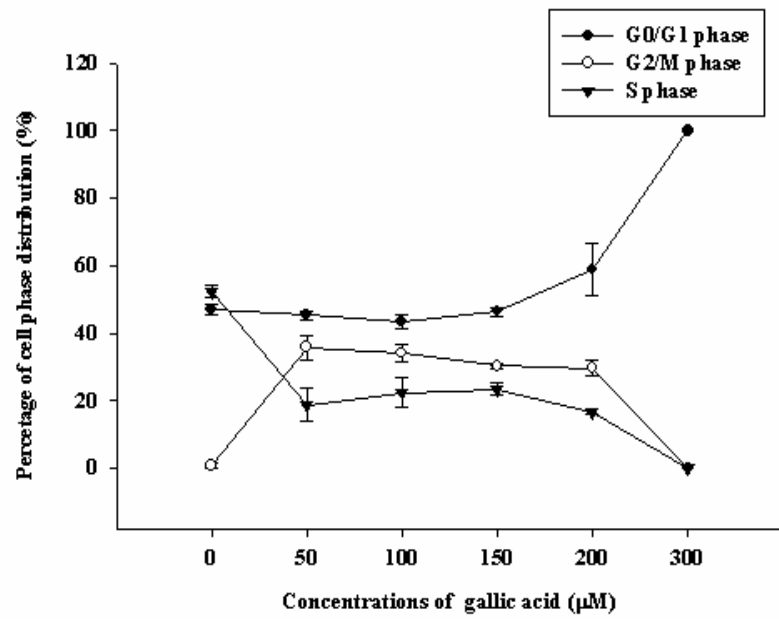


圖3.3 利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的型態。加入不同濃度的五倍子酸處理24 小時後，發現隨著藥物濃度的上升，細胞數目有明顯下降的趨勢，且有細胞型態不完整、細胞膜皺縮與細胞空泡化的現象，放大倍率200 X。mm

A.



B.



C.

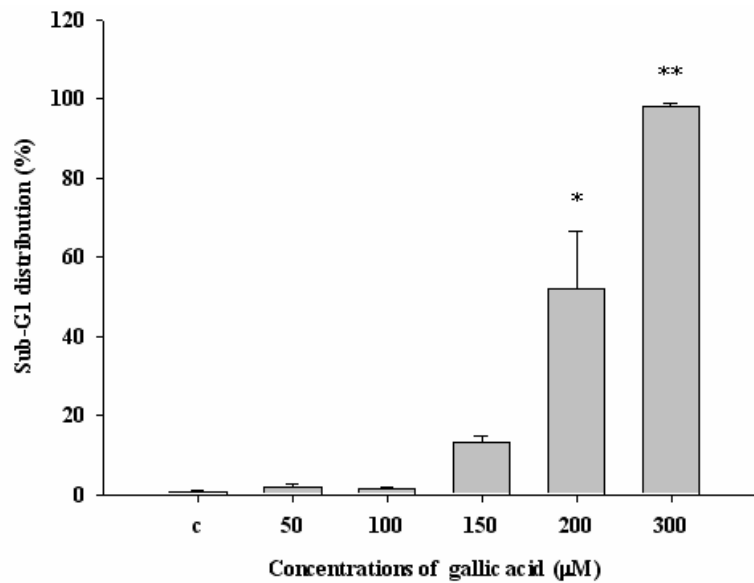
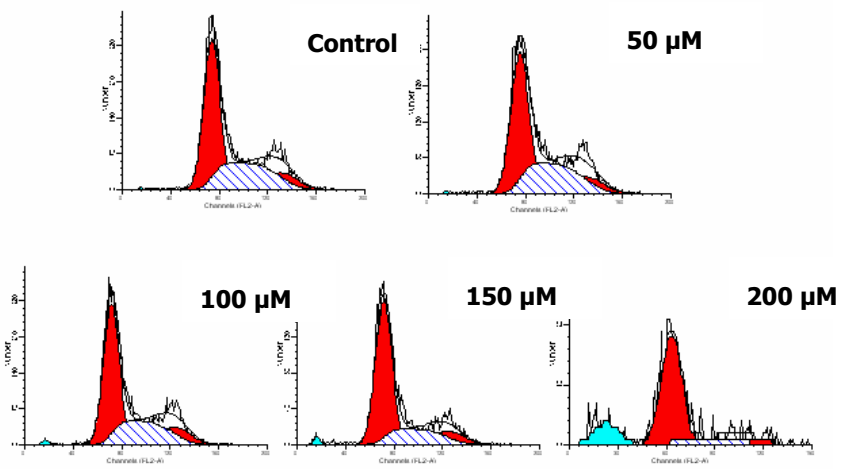


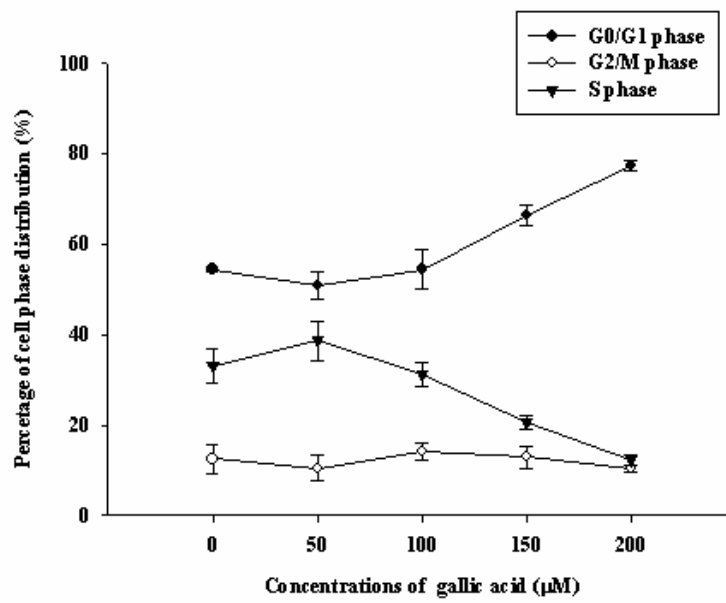
圖3.4 不同濃度之五倍子酸gallic acid對NCI-H460細胞細胞週期分佈影響-12小時。數據結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 值表示， $n=3$ (* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$)。



A.



B.



C.

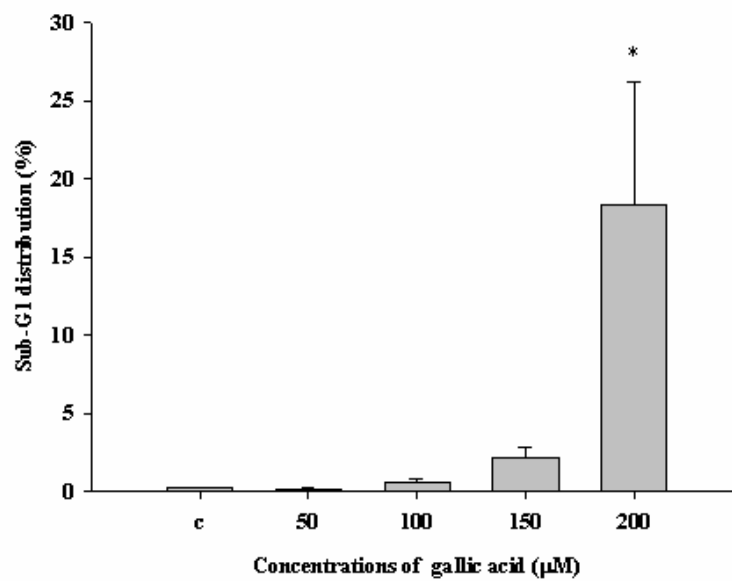
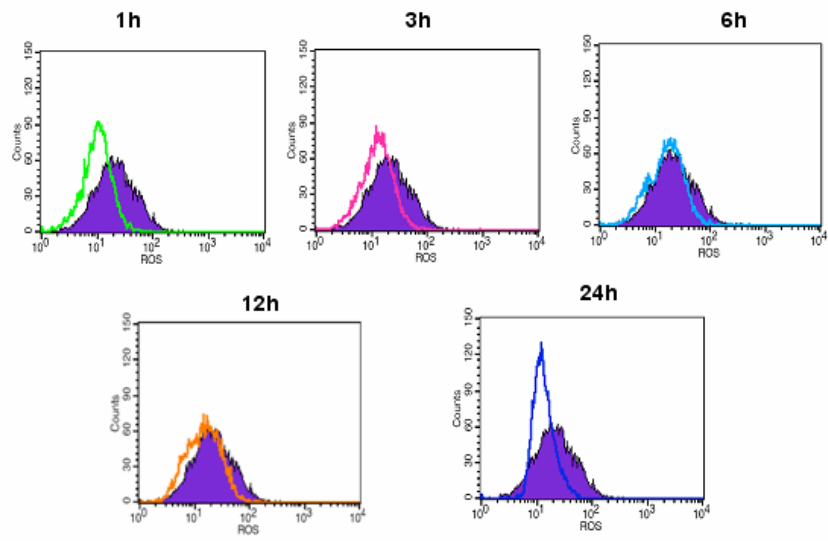


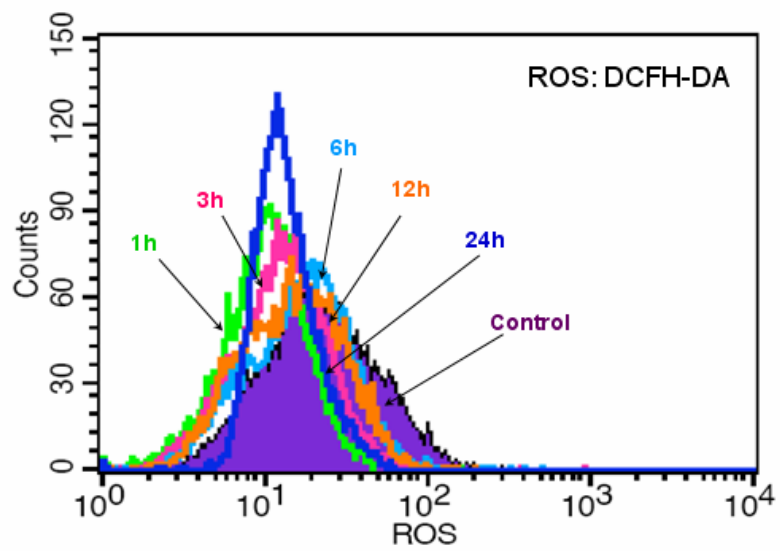
圖3.5 不同濃度之五倍子酸gallic acid對NCI-H460細胞細胞週期分佈影響-48小時。數據結果以mean±SD 值表示，n=3 (* p< 0.05)。



A.



B.



C.

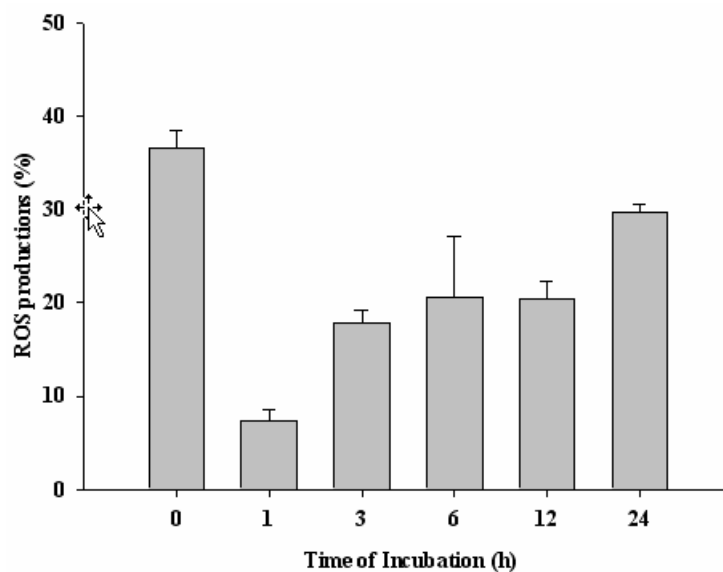
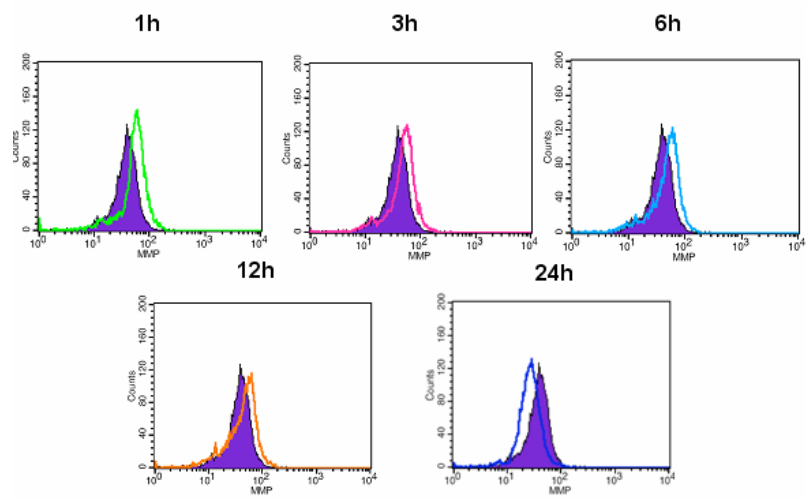
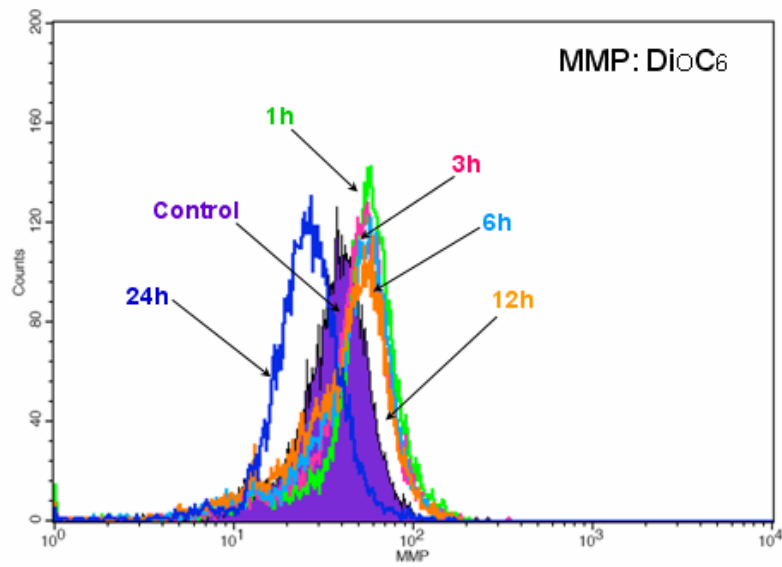


圖3.6 利用流式細胞計數儀評估人類大細胞肺癌細胞經由給予250 μ M之五倍子酸在不同時間所造成ROS 產生的影響。結果發現曲線有左移的趨勢(圖A、B)，表示並沒有活性氧化物ROS產生增加的現象(圖C)。

A.



B.



C.

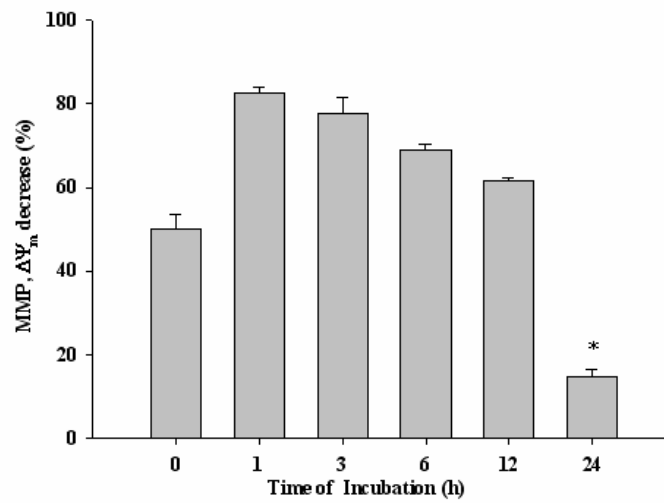
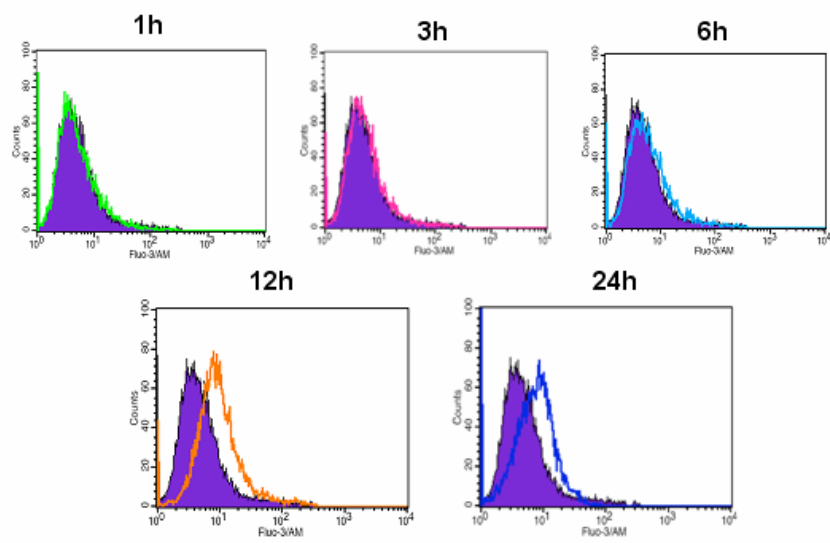
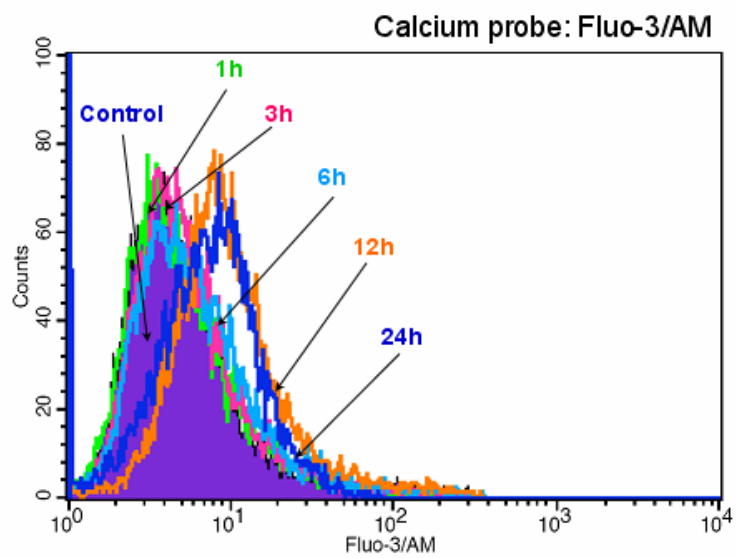


圖3.7 人類大細胞肺癌細胞經由給予濃度 $250\mu\text{M}$ 之五倍子酸所造成粒腺體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 變動之量化圖。結果發現隨著時間點的延長，MMP 數值也隨之下降，在24小時時，細胞粒線體膜電位的降低最明顯。數據結果以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 值表示， $n=3$ (* $p < 0.05$)。

A.



B.



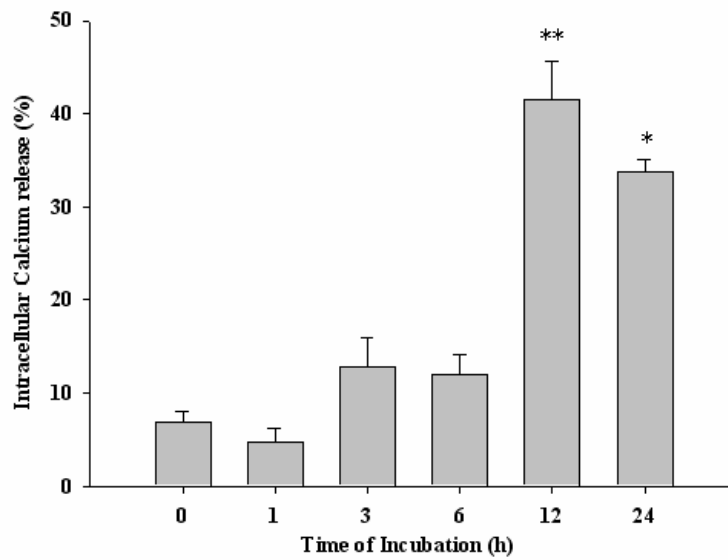


圖3.8 人類大細胞肺癌細胞經由給予濃度 $250\mu\text{M}$ 之五倍子酸所造成鈣離子濃度上升的量化圖。結果發現隨著時間點的延長， Ca^{2+} 數值也隨之上升，表示鈣離子濃度增加。數據結果以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 值表示， $n=3$ 。（* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ）。

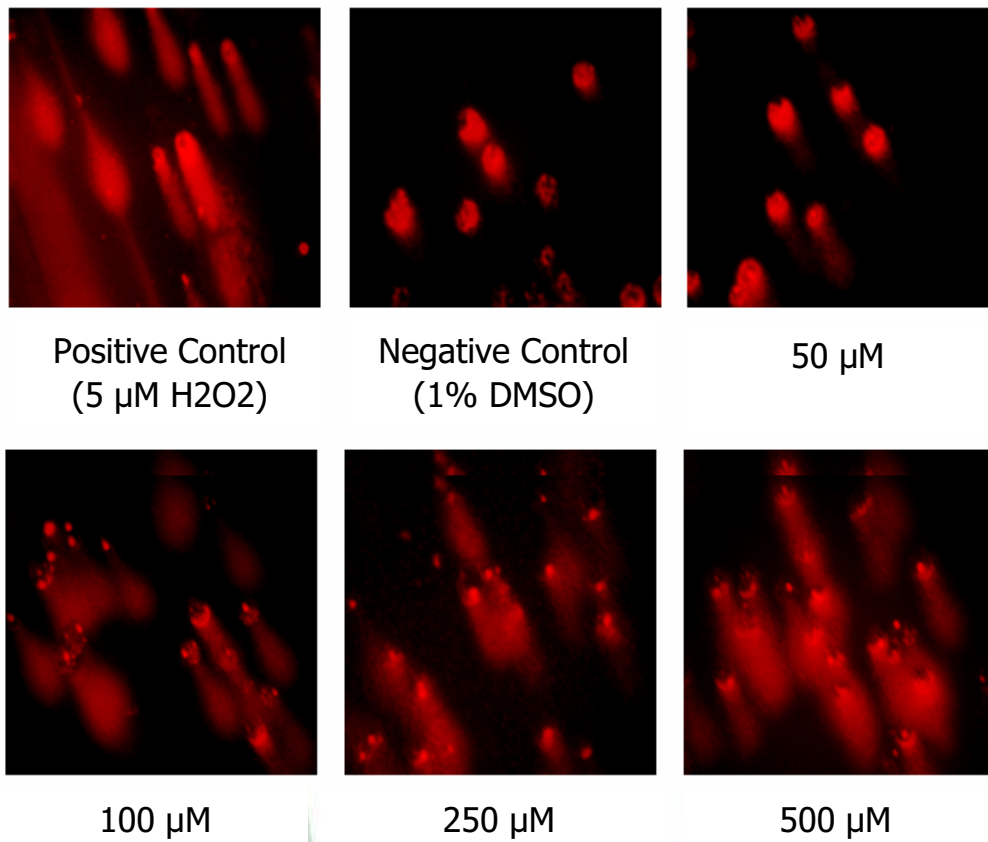


圖3.9 經由不同濃度的五倍子酸處理人類大細胞肺癌細胞48小時後，以慧星試驗分析其對細胞DNA 傷害的程度。陰性對照組加入1%DMSO，陽性對照組加入5 μM H₂O₂，作用24 小時。

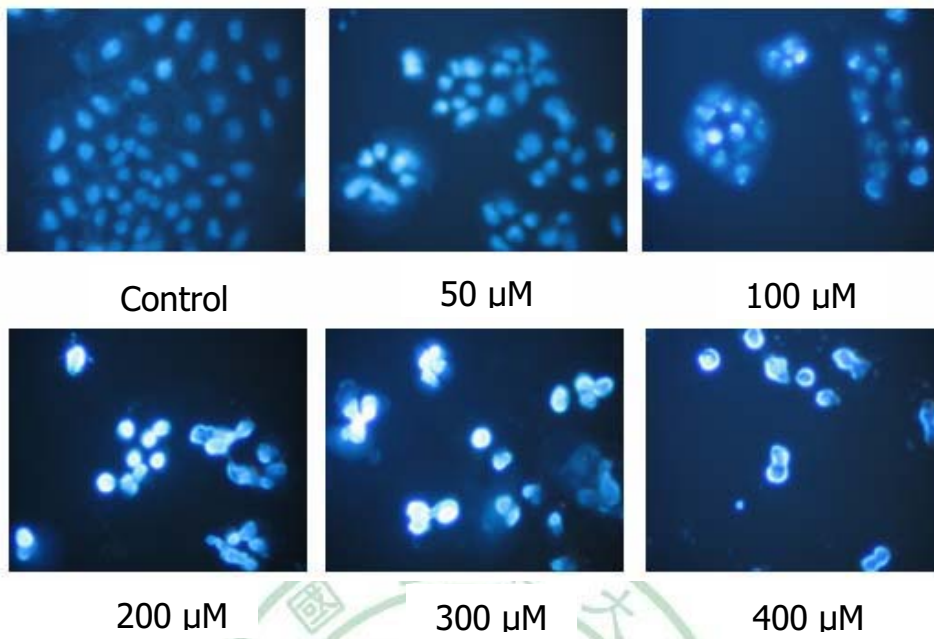
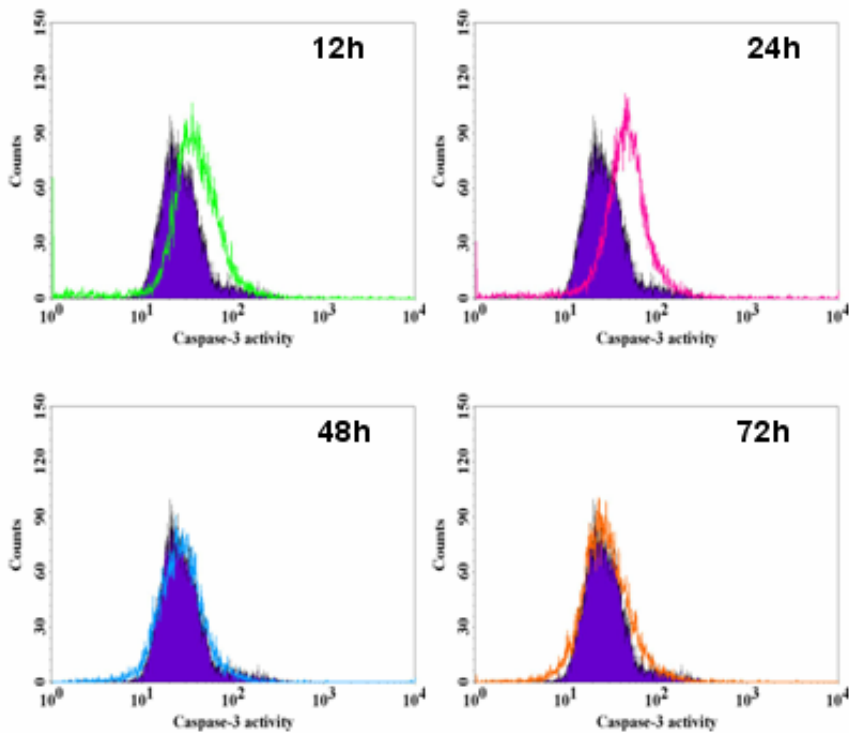
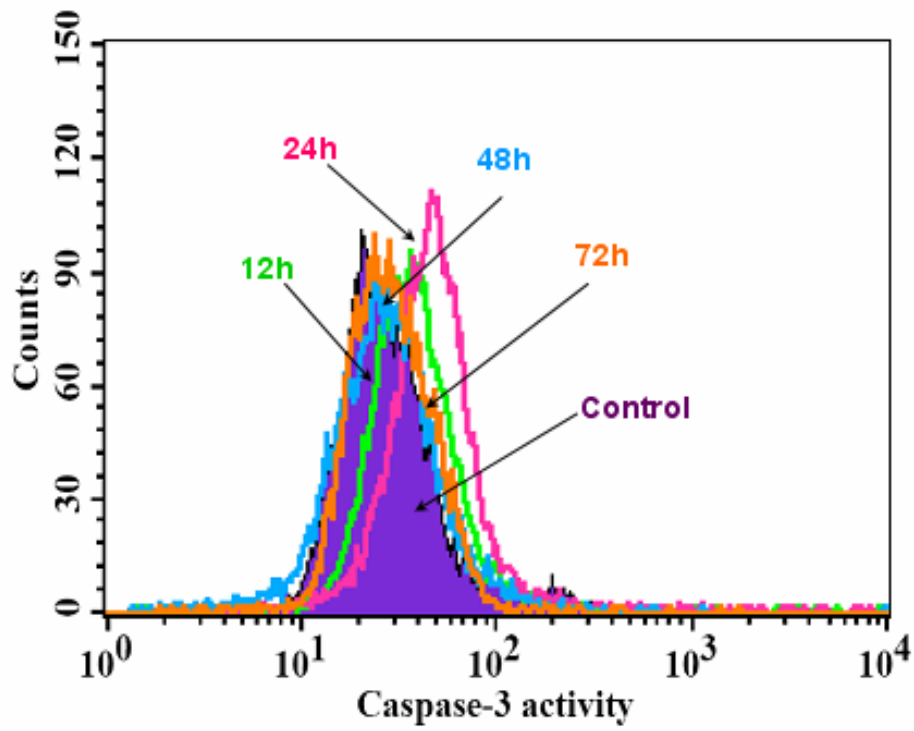


圖3.10 不同濃度的五倍子酸處理人類大細胞肺癌NCI-H460細胞
24小時後DAPI染色觀察

A.



B.



C.

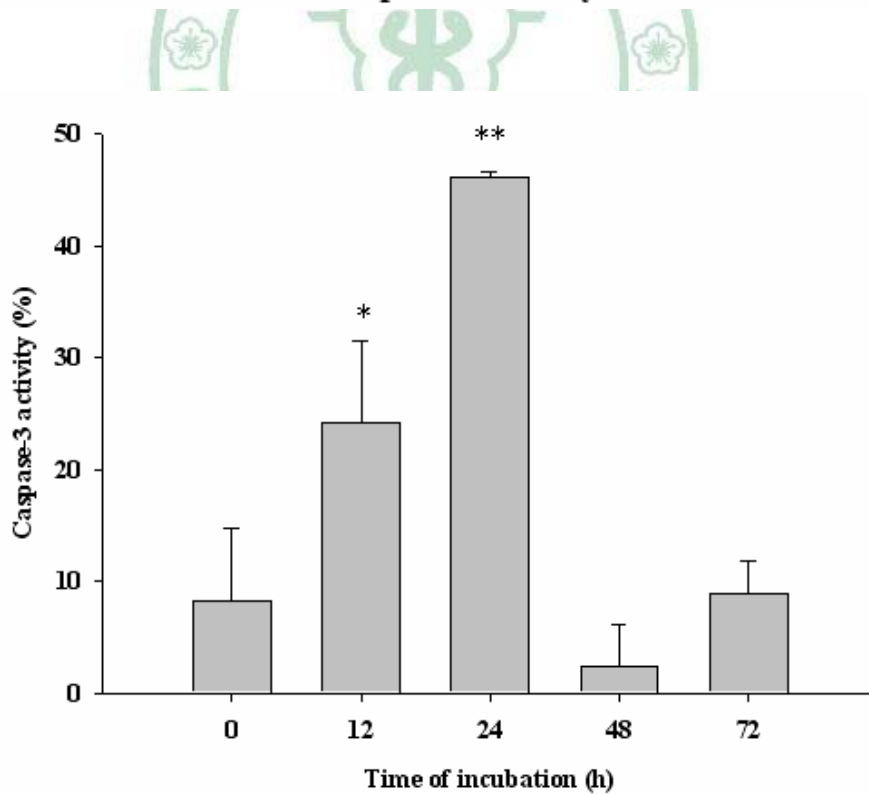
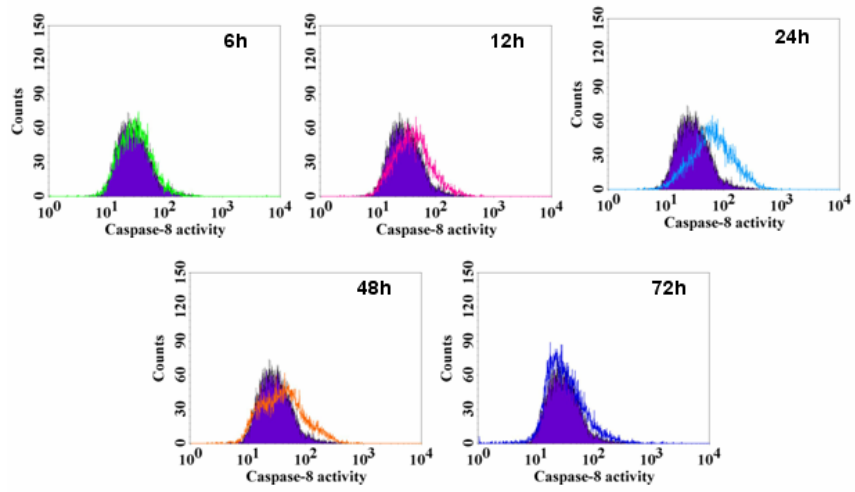
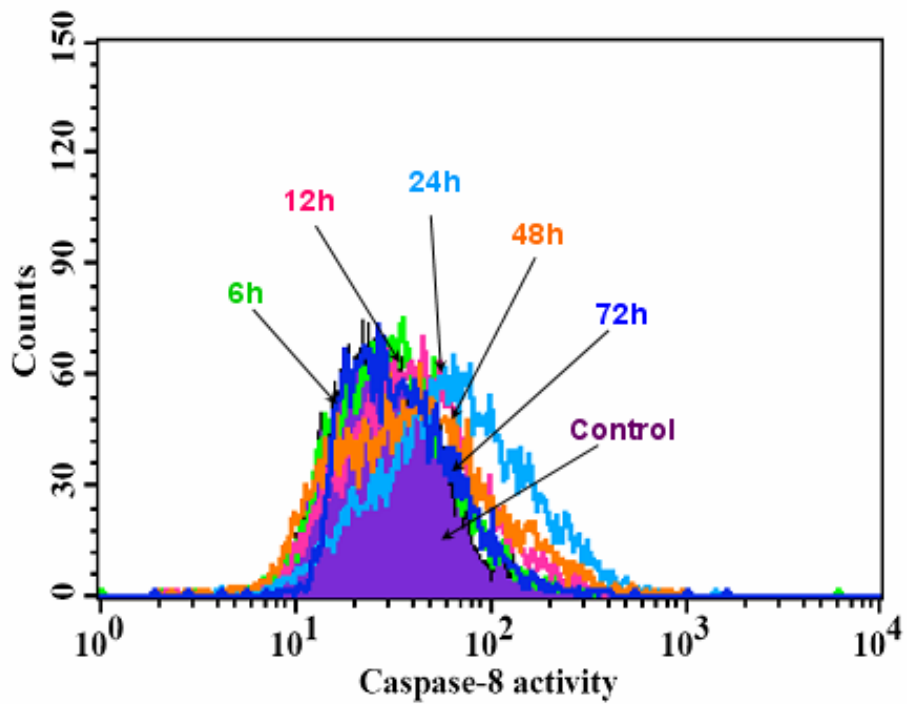


圖3.11 五倍子酸對對人類大細胞肺癌細胞caspase-3活性之影響

A.



B.



C.

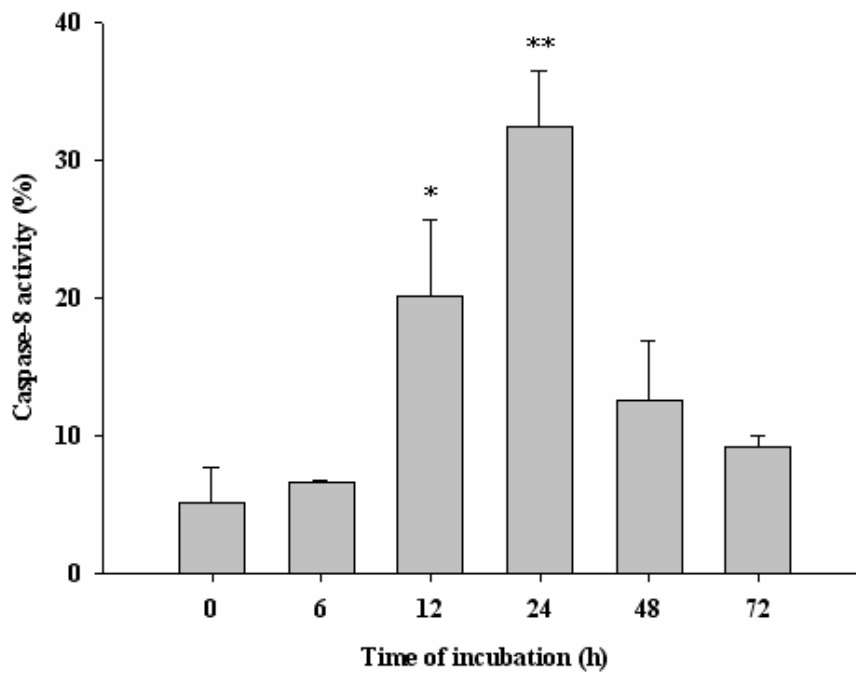
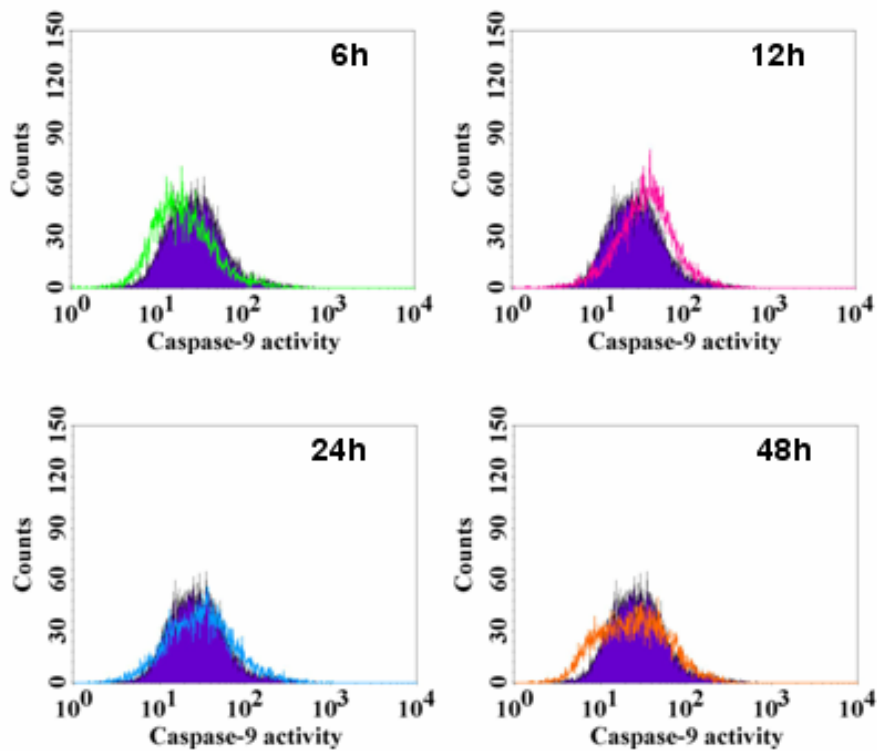
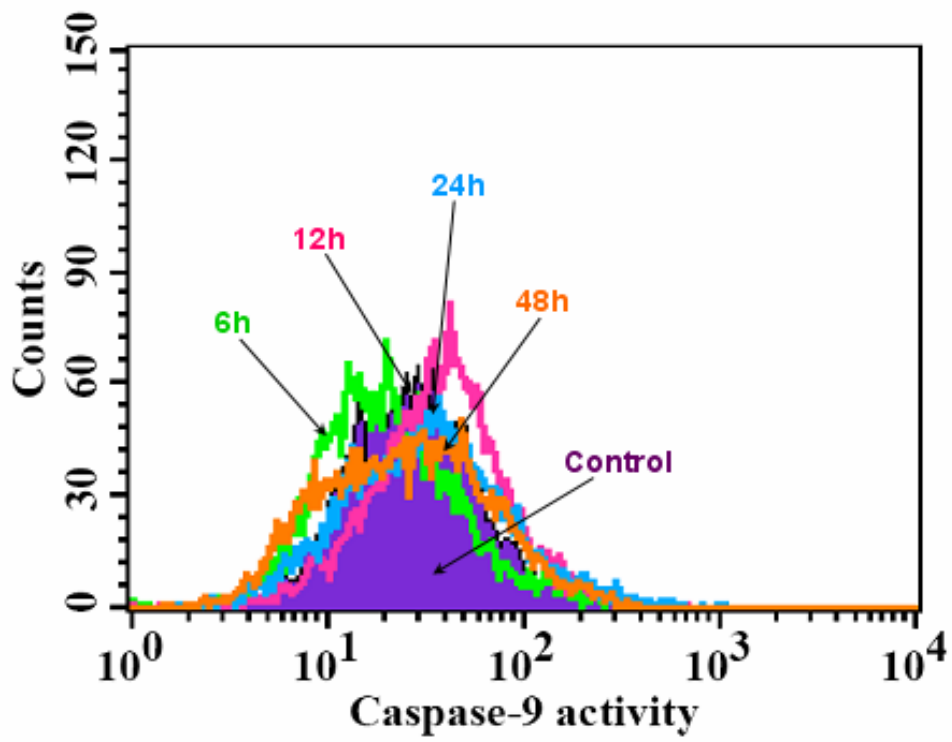


圖3.12 五倍子酸對對人類大細胞肺癌細胞caspase-8活性之影響

A.



B.



C.

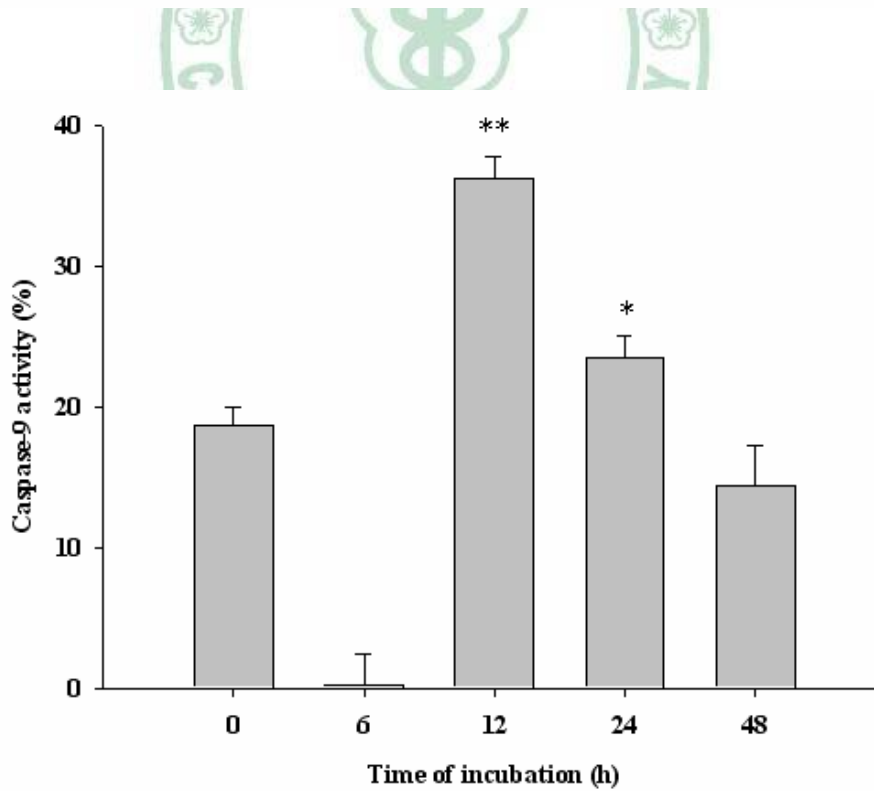


圖3.13 五倍子酸對對人類大細胞肺癌細胞caspase-9活性之影響

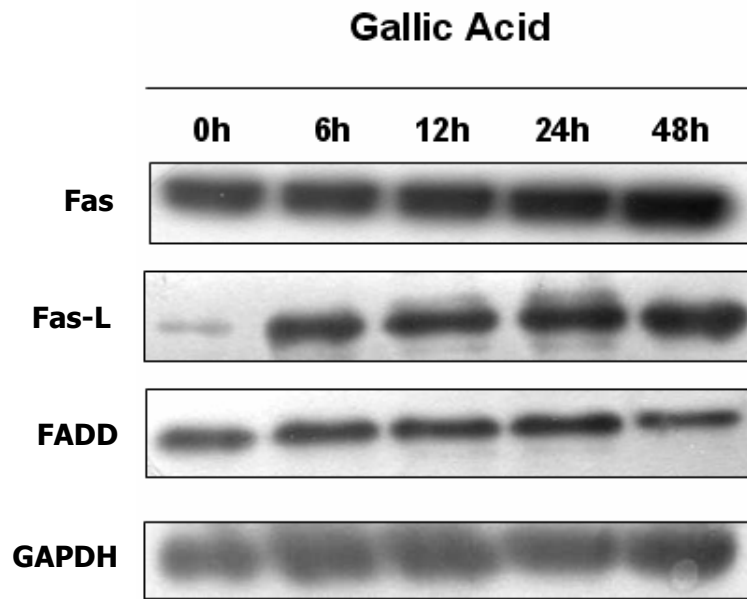


圖3.14 利用西方墨點法觀察與apoptosis有關的Fas、Fas-L、FADD的蛋白表現量變化，以GAPDH當作internal control。

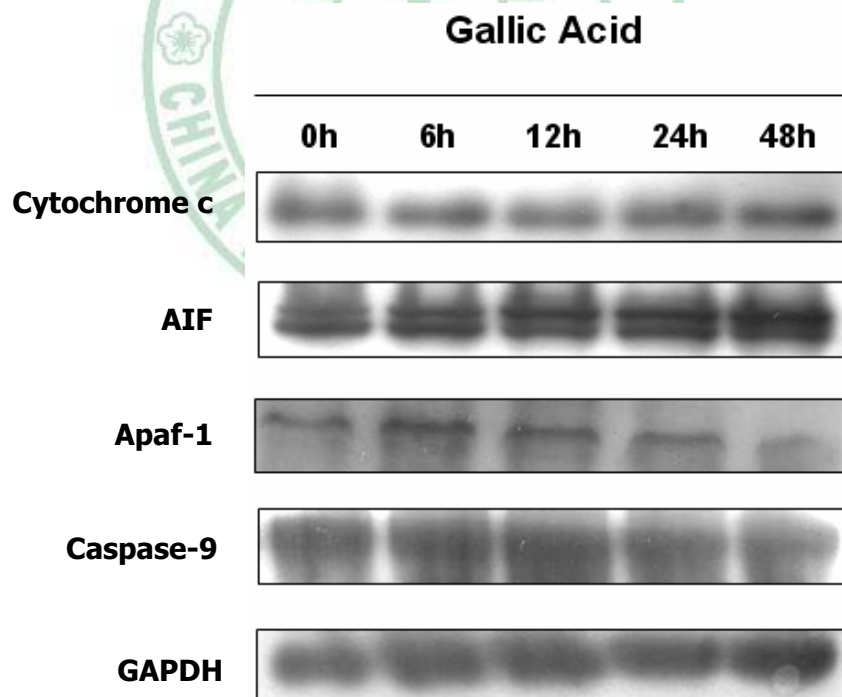


圖3.15 利用西方墨點法觀察與apoptosis有關的cytochrome c、AIF、Apaf-1及caspase-9蛋白表現量變化，以GAPDH當作internal control。

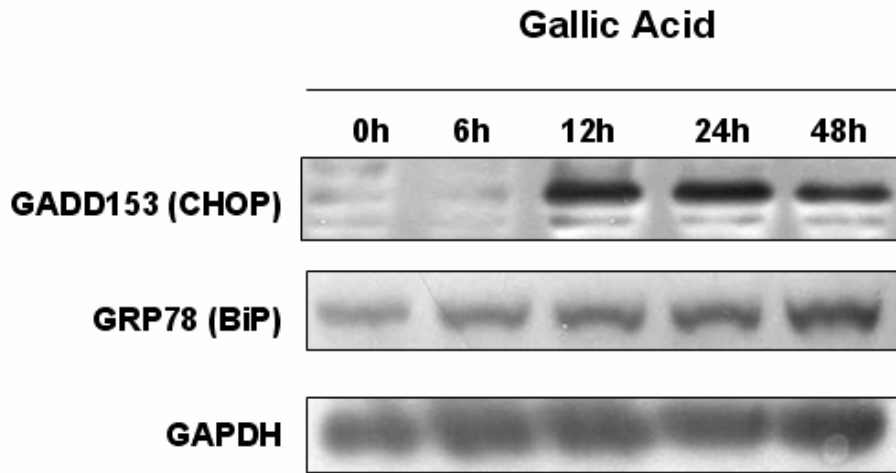


圖3.16 利用西方墨點法觀察與apoptosis 有關的GADD153、GRP78蛋白質表現量變化，以 GAPDH 當作 internal control。

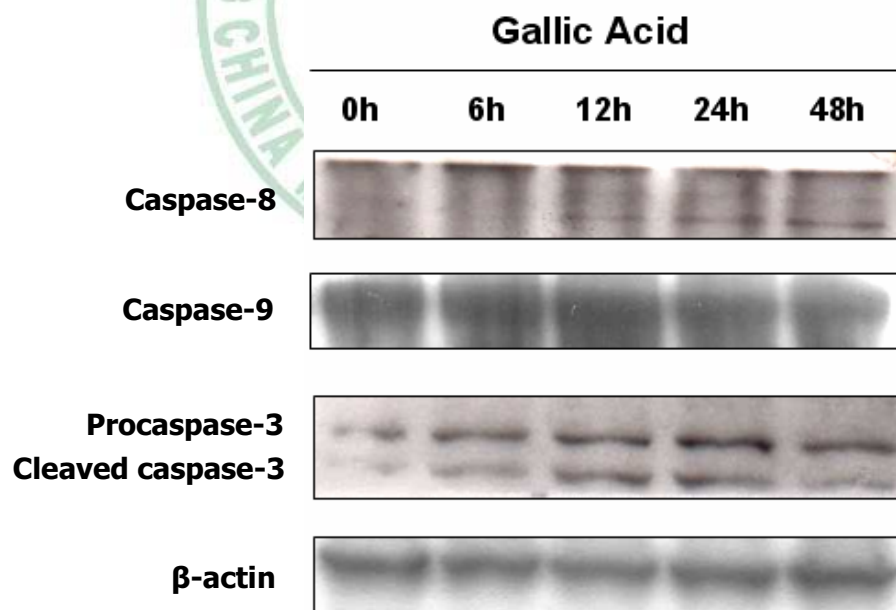


圖3.17 利用西方墨點法觀察與apoptosis 有關的caspase family蛋白質表現量變化，以 β -actin 當作 internal control。

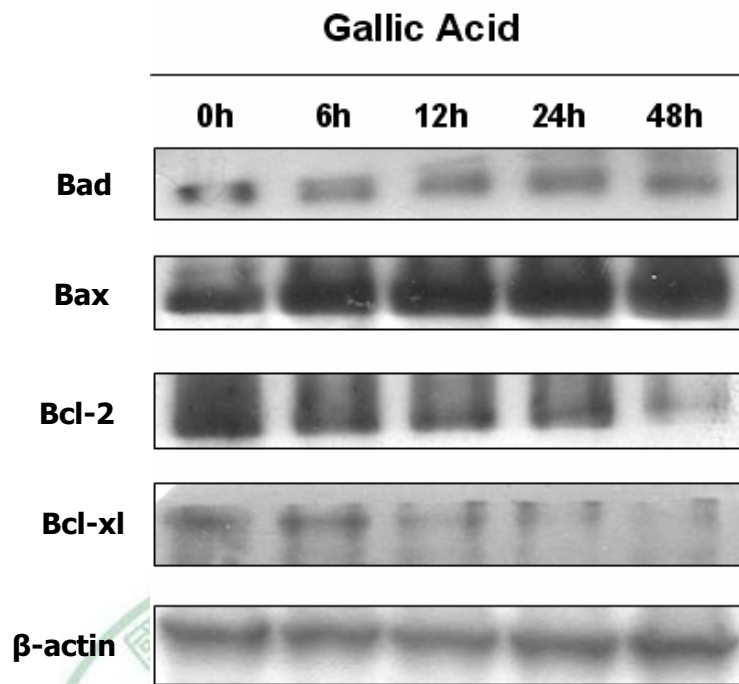


圖3.18 利用西方墨點法觀察與apoptosis 有關的Bcl-2 family 蛋白質表現量變化，以 β-actin 當作 internal control。

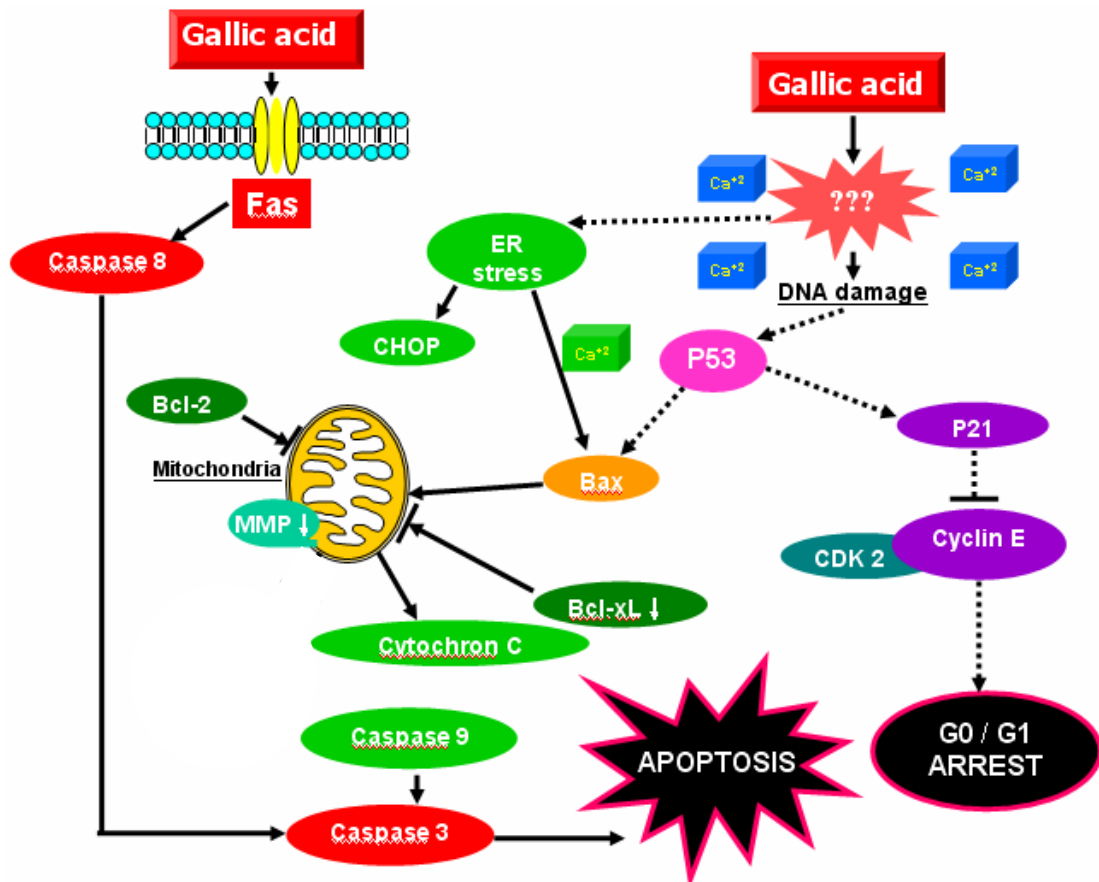


圖 3.19 五倍子酸誘導人類大細胞肺癌 NCI-H460 細胞株細胞週期停滯及細胞凋亡之路徑圖 (虛線部份尚未實驗證實)