



中國醫藥大學
基礎醫學研究所
碩士學位論文

PA-42 誘導人類口腔癌鱗狀細胞 (HSC-3)
細胞凋亡與抑制細胞轉移之分子機轉

The molecular mechanisms of apoptosis and cell metastasis
by PA-42 in human oral squamous cancer cells (HSC-3)

指導教授：謝文聰 副教授

共同指導教授：鍾景光 教授

研究生：陳怡婷

中華民國九十七年六月

總目錄

| | |
|------------------|-----|
| 總目錄 | I |
| 圖目錄 | V |
| 表目錄 | VII |
| 第一章 前言 | 1 |
| 第二章 緒論 | 3 |
| 第一節 口腔癌 | 3 |
| 第一項 流行病學、成因、危險因子 | 3 |
| 第二項 症狀、分期 | 4 |
| 第三項 治療、預後 | 5 |
| 第二節 苦蕒 | 7 |
| 第三節 細胞凋亡 | 8 |
| 第一項 細胞凋亡之定義 | 8 |
| 第二項 細胞週期之調控 | 9 |
| 第三項 細胞凋亡分期之特徵 | 10 |
| 第四項 細胞凋亡路徑 | 10 |
| 第四節 細胞轉移及侵襲 | 15 |
| 第五節 實驗目的及實驗設計 | 17 |
| 第三章 材料與方法 | 19 |

| | |
|----------------------|----|
| 第一節 實驗材料 | 19 |
| 第一項 藥品試劑 | 19 |
| 第二項 設備、器材 | 22 |
| 第二節 實驗方法 | 24 |
| 第一項 藥物之萃取、藥品配製 | 24 |
| 第二項 人類口腔癌細胞培養 | 24 |
| 第三項 MTT 細胞活性分析 | 28 |
| 第四項 倒立式位相差顯微鏡檢測細胞形態 | 29 |
| 第五項 流式細胞儀分析細胞週期及細胞凋亡 | 29 |
| 第六項 流式細胞儀分析粒線體膜電位 | 30 |
| 第七項 流式細胞儀分析細胞內鈣離子濃度 | 31 |
| 第八項 DAPI 細胞螢光染色分析 | 32 |
| 第九項 DNA 裂解電泳分析 | 32 |
| 第十項 單細胞凝膠電泳分析 | 33 |
| 第十一項 西方墨點法分析 | 34 |
| 第十二項 細胞轉移試驗分析 | 40 |
| 第十三項 細胞侵襲試驗分析 | 41 |
| 第十四項 共軛焦顯微鏡分析蛋白表現 | 42 |
| 第三節 統計分析 | 42 |

| | |
|--|----|
| 第四章 結果..... | 43 |
| 第一節 以 MTT 細胞活性分析評估 PA-42 對口腔癌細胞 (Ca9-22、CAL27、SCC-4、SAS、HSC-3) 之增生影響 | 43 |
| 第二節 觀察 PA-42 對人類口腔癌 HSC-3 細胞形態影響 | 45 |
| 第三節 以流式細胞儀分析 PA-42 對人類口腔癌 HSC-3 細胞週期影響..... | 47 |
| 第四節 以流式細胞儀分析 PA-42 造成 HSC-3 細胞之粒線體膜電位變化 | 49 |
| 第五節 以流式細胞儀分析 PA-42 誘導 HSC-3 細胞內鈣離子釋放情形 | 51 |
| 第六節 以 DAPI 細胞染色法分析 PA-42 對 HSC-3 細胞染色質濃縮影響 | 53 |
| 第七節 以單細胞凝膠電泳法分析 PA-42 對 HSC-3 細胞 DNA 損傷 | 53 |
| 第八節 以 DNA 裂解電泳法分析 PA-42 對 HSC-3 細胞 DNA 裂解..... | 55 |
| 第九節 以西方點墨法分析 PA-42 誘導 HSC-3 細胞產生細胞週期停滯及細胞凋亡相關蛋白質表現 | 56 |
| 第十節 以細胞轉移試驗分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞移動..... | 58 |
| 第十一節 以細胞侵襲試驗分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞侵襲..... | 60 |

| | |
|--|----|
| 第十二節 以西方點墨法分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞轉移蛋白表現 | 62 |
| 第十三節 以共軛焦顯微鏡分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞轉移蛋白表現 | 63 |
| 第五章 討論..... | 65 |
| 第六章 結論..... | 72 |
| 第七章 文獻參考..... | 74 |



圖目錄

| | |
|---|----|
| 圖一、苦蕒 <i>Phsalis angulata L.</i> 植物外觀 | 7 |
| 圖二、細胞計數盤 | 27 |
| 圖三、三明治轉漬法 | 39 |
| 圖四、以 MTT 法評估 PA-42 對口腔癌細胞株 (Ca9-22、CAL27、SCC-4、SAS、HSC-3) 之增生影響 | 44 |
| 圖五、分析 PA-42 對人類口腔癌 HSC-3 細胞形態學影響 | 46 |
| 圖六、分析 PA-42 對人類口腔癌 HSC-3 細胞週期影響 | 48 |
| 圖七、以流式細胞儀偵測 PA-42 誘導細胞粒線體膜電位之改變情形 | 50 |
| 圖八、以流式細胞儀檢測 PA-42 誘導細胞內鈣離子釋放情形 | 52 |
| 圖九、以 DAPI 細胞染色法分析 PA-42 對 HSC-3 細胞之染色質皺縮影響 | 54 |
| 圖十、以單細胞凝膠電泳法分析 PA-42 對 HSC-3 細胞 DNA 損傷 | 54 |
| 圖十一、以 DNA 裂解電泳法分析 PA-42 對 HSC-3 細胞 DNA 裂解 | 55 |
| 圖十二、以西方點墨法分析 PA-42 誘導 HSC-3 細胞產生細胞週期停滯及細胞凋亡相關蛋白質表現 | 57 |

圖十三、以細胞轉移試驗分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞移動59

圖十四、以細胞侵襲試驗分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞侵襲61

圖十五、以西方點墨法分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞轉移蛋白表現62

圖十六、以共軛焦顯微鏡分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞轉移蛋白表現
.....64

圖十七、PA-42 作用於人類口腔癌 HSC-3 細胞誘導細胞週期停滯與
細胞凋亡，以及抑制細胞轉移作用機轉推論圖.....73



表目錄

| | |
|---|----|
| 表一、Bcl-2 家族蛋白分類····· | 11 |
| 表二、Matrix metalloproteinases 基質金屬蛋白酶分類····· | 16 |
| 表三、實驗中所選用的人類口腔癌細胞株列表····· | 27 |
| 表四、1X Phosphate buffer saline (1X PBS)····· | 30 |
| 表五、Propidium iodide (PI) 染劑配製····· | 30 |
| 表六、Lysis buffer 配製····· | 34 |
| 表七、Alkaline buffer 配製····· | 34 |
| 表八、0.4 M Tris-base buffer 配製····· | 34 |
| 表九、製蛋白質標準品配製····· | 35 |
| 表十、配製SDS-PAGE····· | 37 |
| 表十一、1x Running buffer 配製····· | 38 |
| 表十二、6X Sample buffer 配製····· | 38 |
| 表十三、Transfer buffer 配製····· | 39 |

中文摘要

口腔癌在台灣地區是竄升最快的癌症，近十五年來行政院衛生署統計數據顯示由癌症死因的第十位上升到第六位。

PA-42 是從中草藥植物苦蕒中所萃取出來的抗癌活性成份；而苦蕒以往有文獻報導能對血癌、肺癌、直腸癌、子宮頸癌、肺癌和肝癌細胞產生細胞毒性的作用。截至目前為止的研究，我們率先研究 PA-42 對於人類口腔癌細胞株 HSC-3 是否有生長抑制的能力及其機轉，本篇研究目的為探討 PA-42 對於調控人類口腔癌 HSC-3 細胞增生、細胞週期及細胞凋亡，來評估是否有化學保護抗癌作用的能力。

實驗結果中發現，PA-42 有效抑制口腔癌 HSC-3 細胞生長。而低劑量 1.6 μ g/ml PA-42 促使細胞DNA受損後，誘導細胞產生 G2/M 期停滯，影響 p53、Wee1 蛋白表現增加及降低 Cdc2、Cyclin B1 等相關蛋白表現；PA-42 導致 HSC-3 細胞鈣離子釋放及粒線體膜電位下降；PA-42 促使 AIF、Bax 及 Bcl-2 從粒線體釋放出來，並且會造成 caspase-3 裂解以及 DNA 的斷裂，最後導致細胞凋亡；同時，PA-42 也增加 HSC-3 細胞中的 Fas 蛋白表現量。由上述結果可知，PA-42 是透過內在路徑 (粒線體路徑)、外在路徑 (死亡接受器路徑) 兩種方式導

致細胞凋亡。

在我們的研究結果中亦指出，藉由細胞傷口轉移及細胞侵襲試驗證實 PA-42 可抑制細胞轉移及侵襲，同時抑制 α -smooth muscle actin、MMP-3、MMP-9 及 GRB2 蛋白表現，但增加 E-cadherin 的表現；並在共軛焦顯微鏡下觀察到 PA-42 將細胞骨架由間質型轉成上皮型。由上述結果得知 PA-42 可抑制細胞的轉移侵襲。

綜合上述結果，PA-42 誘導人類口腔癌HSC-3細胞細胞凋亡與抑制細胞轉移，開拓未來人類口腔癌化學保護新藥物治療及預防的指標。

關鍵字: 口腔癌、苦蕒、細胞凋亡、細胞轉移



英文摘要

The oral cancer is the most incident cancer, with the place rate rising fast from 10th forward 6th most common cause of cancer death in past fifteen years in Taiwan.

PA-42 is an anticancer active compound and isolated from a Chinese medicine herb, *physalis angulata*. *Physalis angulata* has been reported to exhibit anti-tumor effect in several human cancers such as leukemia, lung, colon, cervix, hepatoma and melanomas cancers. In our preliminary studies, we first investigated the influence of PA-42 in human oral squamous carcinoma cancer (OSCC) cell lines HSC-3. We evaluate the chemopreventive role of cancer of PA-42 in vitro by studying the regulation of proliferation, cell cycle, and apoptosis with dose- and time-dependent manner by MTT assay, flow cytometry, nuclear DAPI stain assay, comet assay, and DNA fragmentation assay.

In the results, the data shown that PA-42 has exhibited effective cells growth inhibition in HSC-3 cells. Low dose of PA-42 induced DNA damage and then led to undergo G2/M phase arrest, with an increase in

p53 and weel and a decrease in cdc2 and Cyclin A/B1 and protein. PA-42 induced the Ca^{2+} production release and a decrease in the mitochondrial membrane potential in HSC-3 cells. PA-42 induced apoptosis by releasing AIF、Bax and Bcl-2 from mitochondria, and cleavage caspase-3 and then caused DNA fragmentation. PA-42 also increased the expression of Fas in HSC-3 cells. The conclusion of the results is that PA-42 induced apoptosis through both the intrinsic and extrinsic pathways in HSC-3 cells.

In our study, PA-42 has revealed that the migration and invasion of HSC-3 cells was suppressed by wound healing assay, transwell migration assay, and matrigel invasion assay. PA-42 has also suppressed MMP-3 and GRB2 expressions with western blot and reversed cytoskeleton from mesenchymal-like to epithelial-like with confocal image in HSC-3 cells.

The conclusion of the results is that PA-42 suppressed metastasis in HSC-3 cells.

These results indicate that PA-42 induced apoptosis and suppressed metastasis in HSC-3 cells. PA-42 is a novel candidate agent for the chemoprevention of human oral squamous cancer in the future.

Key word: oral cancer, *Physalis angulata*, apoptosis, and metastasis.

致謝詞

終於到了這一刻，寫致謝詞應該是所有進行論文寫作的研究生最期待的事吧！雖然不能說這段間全然是痛苦的，但是苦多於樂卻是實話，特別是這段期間經歷了一些生活的轉變，從離開工作回到校園唸書，有幾度更是面臨著想放棄的狀態，也因此當我有幸能在自己預期的時間內完成這項任務時，著實更要感謝身邊許多給予協助的師長及親友們。

首先要感謝我的指導教授—謝文聰副教授及共同指導教授—鍾景光教授，在完成碩士論文這段過程中提供我無數的協助，感謝您們總是耐心地與我討論有關論文的總總問題，不厭其煩的一字一句修改我生澀的文句，更讓我學習到您們嚴謹的治學態度，很感謝您們兩年來的悉心教導，謝謝您們！

此外，更要感謝林松水副教授及楊家欣老師撥空擔任本篇論文的口試委員，提供我諸多寶貴的意見與建議；也要感謝沈立言教授對於理論及文獻的提醒，讓我思索了研究過程中所忽略的盲點，感謝三位老師的參與讓這篇論文能更臻完善。

同時亦要感謝藥理學科蔡輝彥老師、陳玉芳老師、林文川老師、譚思濉老師、湯智昕老師、柯毅文先生等，在研究和生活上的指導與關心。

當然更要感謝一票與我一起渡過研究生涯的好朋友們。感謝學長姐：王舒芳、粘巧鈴、李冠鼎、張傳平、李東岳、王思婷、劉曉霞、梁鈞雅、許玉龍、楊鈞隆、賴婉文、呂啟誠、許日昇，同學：靜怡、如玉、立仁、祐瑄、錫鈺、郁芸、家佳、正守、雅榕、柏言、若華等，給予我的幫助及關懷。

最後，感謝我重要的父母，默默全力支持、陪伴更是我前進的動力。要感謝的人實在太多了，族繁不及備載，僅以此論獻給我最愛的親人、師長與朋友們，不要再問我畢業沒～因為，我真的畢業了。

學生 陳怡婷 謹致於

中國醫藥大學基礎醫學研究所

中華民國九十七年六月

第一章 前言

根據 Parkin, DM 發表 2002 年全球癌症統計資料顯示，口腔癌在全球惡性腫瘤中第六位，2002 年大概有二十七萬四千左右的人口罹患口腔癌，西歐、南歐、中南非等地是發生率較高的地區，在開發中國家，口腔癌的發生率很高，也導致高度的死亡率，男女好發比例為 3:2，好發年齡為 40~60 歲¹。

口腔癌的治療方式有很多種，但在決定最佳的治療方式前必須考慮很多因素，包括腫瘤大小，病患年齡及整體健康狀況等。然截至目前為止，第三期及第四期病人儘管在接受外科手術切除、放射線治療及化學治療等治療，治癒率仍偏低 ($<30\%$)²，目前治療面臨相當程度之瓶頸。因此研發有效的治療及化學預防藥物實為刻不容緩之要務。

本研究的目標為尋求開發更好療效的天然治療藥物，在眾多天然藥物篩選實驗中，發現在台灣民間常被當作苦茶使用，利用作為青草茶，有清熱、利尿、降壓、止痛、消炎、鎮咳、行血、調經及解毒等功效；苦蕒以往有文獻報導能對血癌³、子宮頸癌⁴、肺癌⁵和肝癌⁶細胞產生細胞毒性的作用，但其詳細的作用機轉仍不明確。本先期研究發現，苦蕒抽出物能有效抑制乳癌細胞株增殖及促進細胞週期停滯效

果⁷。進一步萃取出 PA-42，對人類口腔癌細胞有生長抑制、細胞週期停滯及誘發細胞凋亡，以及抑制細胞轉移、侵襲等作用。



第二章 緒論

第一節 口腔癌

第一項 流行病學、成因、危險因子

根據 Parkin, DM 發表 2002 年全球癌症統計資料顯示，口腔癌在全球惡性腫瘤中第六位，2002 年大概有二十七萬四千左右的人口罹患口腔癌，西歐、南歐、中南非等地是發生率較高的地區，在開發中國家，口腔癌的發生率很高，也導致高度的死亡率，男女好發比例為 3:2，好發年齡為 40~60 歲¹。

根據衛生署資料顯示，十大死因中，近多年來皆以惡性腫瘤為榜首⁸。民國九十五年衛生署公佈口腔癌現位居癌症死亡原因的第六位，在男性中更高達第四名⁸；一年內 (91~92年) 男性約成長了 17%，人口數增加最快⁸，而 25~44 歲年齡層的男性口腔癌發生率為第一位⁸，這表示口腔癌發生率有年輕化的趨勢；近十五年來的衛生署統計數據顯示在台灣地區口腔癌由民國八十年位居癌症死因的第十位，上升到民國九十五年的癌症死因第六位，並且自民國八十一年以後，口腔癌的發生率及死亡率已超過鼻咽癌成為台灣頭頸部癌症的第一位⁸，這表示口腔癌發生率有逐年增加的趨勢。

口腔癌顧名思義為發生在口腔的惡性腫瘤之總稱，可能出現在口腔的任何部位，包括唇、口底、齒齦、齶部、上顎竇、頰粘膜及顎骨等部位⁹。而根據 2002 年美國癌症聯合委員會 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 即國際抗癌聯合會 (International Union Against Cancer, UICC) 的分類，口腔包括 (1) 頰黏膜、(2) 上齒齦、(3) 下齒齦、(4) 硬顎、(5) 舌、(6) 口腔底¹⁰。從組織學上區分，包括鱗狀細胞癌、疣狀癌、肉瘤及惡性黑色素瘤等，其中鱗狀細胞癌約佔有 90%¹¹。

許多研究顯示多重因素會導致口腔癌的發生，例如：嚼食檳榔、吸煙、喝酒、紫外線照射、營養缺乏、不良的口腔衛生等都可能與口腔癌的發生有關¹。

第二項 症狀、分期

口腔癌一如其他疾病，出現的症狀並非一成不變，而是多樣化的；症狀有：口腔疼痛、喉嚨痛、耳痛、口腔出血、頸部腫塊、口腔麻木、舌頭或下顎移動困難、口腔白斑及紅斑、口腔潰瘍、口腔腫塊或是腫大等¹²。

臨床上依據美國聯合癌症委員會 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 於 2002 年修訂 TNM 系統，將口腔癌分五期如下¹⁰：

第零期及原位癌：癌細胞侷限於口腔黏膜上皮內。

第一期:病灶小於 2 公分，無頸部淋巴節及全身轉移。

第二期:病灶大於 2 公分小於 4 公分，無頸部淋巴節或全身轉移。

第三期:病灶大於 4 公分或任何大小，且有單側 (同側) 1 個小於或等於 3 公分頸部淋巴節轉移。

第四期:病灶侵犯鄰近組織或任何大小之病灶有超過 3 公分之頸部淋巴結轉移，或有多個淋巴結轉移或有遠端轉移之病灶。

第三項 治療、預後

大致說來口腔癌的治療方式主要有三種:外科手術，放射治療與化學治療¹³。一般依據臨床檢查與癌症分期的結果來建議病人選擇適當的治療方式，有時僅採其中一種，有時會合併使用。大略介紹如下:

1.外科手術治療:

外科手術切除對口腔癌病人是治療的主力，特別第三期及第四期的口腔癌¹³；而依腫瘤位置的不同，採取的手術方式也會稍有不一樣，除了將口腔腫瘤切除外，通常也會將附近的組織與淋巴移除掉。

2.放射治療:

口腔癌首選治療方法仍以手術切除為優先考慮，其次是放射線照射¹³。放射治療是利用儀器將放射源釋出的輻射線或粒子集束，照射在癌症病灶，殺死癌細胞達到治療的目的，或在於來預防可能存在的顯微轉移，以及癌細胞局部復發生長，甚至是腫瘤的遠處轉移。於第三期及第四期的病人，則視情形可能需要合併手術及放射治療。手術後如有危險因素，如：手術切口邊緣仍有殘存腫瘤細胞、淋巴結轉移、淋巴結膜外侵犯、神經周圍或淋巴血管侵犯者，需行手術後放射治療。

3.化學治療:

近年來，第三期及第四期、復發性、有轉移性等的頭頸部癌病患使用化學治療合併放射線治療或外科手術治療成為新趨勢，雖然，口腔癌病患治療後的存活率改善仍有限¹³。隨著對腫瘤的了解，醫界使用的藥物也逐漸有所共識，目前是以 5-FU 為主，再加上其他種藥物¹⁵，至於注射方法及時間間隔多久也無絕對標準，這些仍有待更多的研究結果。

口腔癌治療效果，然截至目前為止，第三期及第四期病人儘管在接受外科手術切除、放射線治療及化學治療等治療，治癒率仍偏低 ($<30\%$)²；而長期存活率在過去三十年間大約維持在 30% ¹⁴。

第二節 苦蕒

為茄科酸漿屬植物苦蕒 *Physalis angulata* L. (如下圖一) ，以根或全草入藥。苦蕒莖葉含多種的酸漿苦味素 (*Physalins*)⁴ ，例如: *Physalins* B、D、F³。別名:炮仔燈、燈籠草、天泡子、天泡草、黃姑娘、小酸漿。味苦，性寒。全草具清熱解毒，消腫利尿及祛風、止痛、鎮咳、行血、調經及解毒之效。主治:咽喉腫痛，腮腺炎，急慢性氣管炎，肺膿瘍，痢疾，睪丸炎，小便不利；外用治膿泡瘡。

最近幾年，苦蕒在世界各國的藥用研究，苦蕒成分具有抗腫瘤活性；發現對多種人類腫瘤細胞株，如血癌³、子宮頸癌⁴、肺癌⁵及肝癌⁶，均有細胞毒性的反應。本先期研究發現，苦蕒抽出物能有效抑制乳癌細胞株增殖及促進細胞週期停滯效果⁷。現在，更進一步萃取出 PA-42，為證實 PA-42 對於抑制人類口腔癌細胞，造成口腔癌 HSC-3 細胞死亡，產生細胞凋亡，及抑制細胞轉移、侵襲作用，將就這些範圍進行分子細胞學研究，探討其抗癌作用原理。

圖一、苦蕒 *Physalis angulata* L. 植物外觀



第三節 細胞凋亡

第一項 細胞凋亡之定義

細胞凋亡一詞意指花瓣或樹葉的脫落、凋零，是在 1971 年由病理學家 John Kerr 所提出¹⁶。細胞凋亡 (Apoptosis) 又稱為計畫性死亡 (programmed cell death, PCD)，而細胞凋亡在生物體內扮演相當重要的角色，在正常細胞受到傷害而發生基因突變時，也會自動引起細胞凋亡的機制使突變的細胞死亡，避免突變的遺傳¹⁷。

細胞複製後，逐漸成熟、執行其功能，再進行細胞分裂，產生新的子細胞，到最後老化而走向死亡，一連串的過程都由體內嚴謹而精密的機制調控，但是，若有部份的細胞因為受到致癌物的破壞或是自行產生突變，造成基因體改變，使細胞產生變性的現象，這會造成細胞不正常地大量且快速得增生，這些生長不受到限制的細胞就稱為癌細胞¹⁸，癌細胞與正常細胞的不同，主要是失去了生長增殖的調控，也就是癌細胞的細胞週期失去了控制；失去細胞凋亡的控制，也就是細胞並不會進行計畫性的死亡過程，而有不死的現象¹⁸。

在過去的二十五年間，由分子生物學家以及細胞生物學家的研究，已經對於細胞週期¹⁹之調控以及細胞凋亡²⁰的機制已有相當的了解，接下來將介紹細胞週期以及細胞凋亡的調控機制。

第二項 細胞週期¹⁹之調控

一個完整的細胞週期包含了 G₀/G₁ 期、S 期、G₂ 期及 M 期，其中有三個檢查點，調控著細胞由 G₀/G₁ 期向 S 期、M 期及 G₂ 期，參予的蛋白質分子包 Cyclins、Cyclin dependent kinases (CDKs)、Cyclin dependent kinase inhibitors (CDKI)。CDKs 的活化狀態是屬於 serine/threonine kinase，活化的 CDKs 可以和 Cyclins 形成複合物來調控細胞週期的進行。在正常細胞的細胞週期中，細胞內主要調控細胞 G₂/M 期的推移的蛋白質為 Cyclin B1 以及 Cdc2 (Cdk1)²¹；平時其活性是受到抑制的，這是為了阻止 DNA 受到損傷，或是 DNA 未複製完成的細胞由一分裂成二，而形成不正常的細胞。Cdc2 蛋白會在 threonine-14 (T14) 以及 tyrosine-15 (Y15) 的位置磷酸化，以抑制其活性。而可以抑制活化的 Cdc2 蛋白(磷酸化)的蛋白質為 Wee1。Wee1 活化時，會將 Cdc2 磷酸化後降抑制活化，活化的 Cdc2 會與 Cyclin B1 結合形成複合物，讓細胞進行細胞分裂的過程²²，而之，無法活化 Cdc2 蛋白無法與 Cyclin B1 結合形成複合物，導致細胞滯留在 G₂ 期²²。

另外，p53 蛋白具有個調節轉錄作用的功能，使 p21^{WAF1/Cip1} 大量表現，p21^{WAF1/Cip1} 會阻止 Cdc2 蛋白進入細胞核中，使 Cyclin B1/Cdc2 滯留在細胞質中，無法進入核中作用，而阻止細胞進行分裂¹⁹。當細胞 DNA

受損時，細胞會透過上述機制來阻止變性細胞進行分裂，因具有檢查，篩檢的功能，在此稱為 G2 check point¹⁹。分裂完成的細胞會回到細胞週期的 G1 期，若無 mitogen 的刺激，細胞會停留在 G1 或是 G0 期，而呈現休止狀態，若此時有生長因子的再度刺激時，則會再次進行細胞週期，複製產生新細胞¹⁹。

第三項 細胞凋亡²⁰分期之特徵

細胞凋亡主要分為兩個時期，為早期 (early stage) 及晚期 (later stage)。在細胞凋亡早期時，會出現染色質皺縮、細胞質皺縮以及細胞皺縮等特徵；晚期的細胞核會開始發生裂解，最後形成凋亡小體 (apoptotic bodies)，而凋亡小體會被周圍的細胞吞噬，在整個細胞凋亡的過程中，細胞所含的物質不會釋放到細胞外毒害鄰近之細胞，故不會造成發炎反應或危害到周圍組織^{20、23}。

第四項 細胞凋亡路徑^{24、25}

凋亡過程的產生莫非是一種壓力的刺激，經由訊息的傳導作用，來達到細胞凋亡之目的。而目的的達成有兩種不同的路徑，分別為內在路徑 (intrinsic pathway)，又稱之為粒線體路徑 (mitochondria pathway)²⁴；

及外在路徑 (extrinsic pathway) ，又稱死亡接受器路徑 (death-receptor pathway)²⁴ 。

1. 內在路徑 (intrinsic pathway):

在內在路徑 (intrinsic pathway) 中， Bcl-2 家族蛋白為一重要的調節蛋白²⁴。它的組成包含兩大類:促細胞凋亡蛋白 (pro-apoptosis)²⁴ 及抗細胞凋亡蛋白 (anti-apoptosis)²⁴ 如表一所列。

表一、Bcl-2家族蛋白分類

| 功能 | 分類 |
|----------------|--|
| Anti-apoptosis | Bcl-2 、 Bcl-xL 、 Bcl-w 、 Mcl-1 、 A1/Bfl-1 、 Boo/Diva 、 Bcl-B/Bcl-2L-10/Nrh |
| Pro-apoptosis | Bax 、 Bak 、 Bok/Mtd 、 Bcl-xs 、 Bcl-GL 、 Bad 、 Bid 、 Bik/Nbk 、 Blk 、 Hrk/DP5 、 Bim/Bod 、 Bmf 、 Nip3/BNIP3 、 Nix/Bnip3L 、 Noxa/APR 、 PUMA 、 MAP-1 、 Bcl-Gs |

就粒線體凋亡路徑而言，粒線體功能的調節與維持，在細胞存活與凋亡過程扮演重要的角色²⁴。在整個凋亡過程中 pro-apoptosis 蛋白 (Bax 、 Bak 、 Bid) 對粒線體的作用可以讓膜內蛋白，例如 AIF ，釋放到細胞質，隨即進入細胞核，有些可以調控 p53 蛋白，有些直接使核內染色質皺縮及造成 DNA 斷裂²⁴。

隸屬 Bcl-2 家族這些調控細胞凋亡蛋白 (Bax 、 Bid 、 Bad) 功能活化，主要經由三種不同的轉譯後修飾機轉來傳達凋亡訊息到粒線體²⁴。

第一型:為構型上的改變。如當細胞質的pH值上升、或是其它促凋亡蛋白 (Bid) , 則會影響 Bax 的構造, 讓蛋白質的 c 端產生一個疏水性構造, 這構造的形成有助於 Bax 結合到粒線體外膜上, 得以傳遞凋亡訊息²⁴。第二型:是須由 Caspase 裂解, 如 Bid , 一般正常存在細胞質中。當死亡接受器 Fas 或 TNF-R1 活化, 傳遞凋亡訊息到 Caspase-8 , 此時被活化 Caspase-8 能將 Bid 裂解成 15kDa 的 tBid²⁴。使 tBid 鑲嵌在粒線體膜上。第三種轉譯後修飾為磷酸化作用與去磷酸化作用。舉例來說, 當有生長因子或經由 Akt/PKB 與 cAMP 的磷酸化作用可以將 Bad 磷酸化, 當 Bad 磷酸化時它會結合在細胞質蛋白 (14-3-3) 上, 而凋亡訊息刺激 (如鈣離子) 之時, 去磷酸化的作用隨即產生, 而被去磷酸化的 Bad 便從 14-3-3 脫離, 並移到粒線體上, 與粒線體上的 Bcl-2、Bcl-xL 結合, 使 Bcl-2、Bcl-xL 功能喪失, 而造成細胞凋亡²⁴。雖然不同方式, 但主要目的就是使粒線體功能喪失。

而位於粒線體內外膜間的蛋白從粒線體釋放到細胞質如: AIF、endonuclease G、Smac/DIABLO、HtrA2/Omi, 是整個粒線體路徑過程的關鍵²⁴。其中AIF是直接進入細胞核, 並將核內 DNA 裂解切斷。另一類蛋白如: Smac/DIABLO、HtrA2/Omi, 蛋白從粒線體釋放出來後會與抑制凋亡蛋白 (inhibitor of apoptosis proteins, IAP) 結合, 使得

IAP 無法去抑制 Caspase 的活化與活性作用。且 HtrA2/Omi 也可阻斷細胞內 Bcl-2 過度表現²⁴。

AIF 是一個非經由 Caspase 的活化作用來促進細胞凋亡的蛋白²⁴。當 AIF 從粒線體內膜釋放出至細胞質後，隨即會進入到核內。與核內 DNA 結合，引起染色體的皺縮，將切成 DNA fragmentation²⁴，因此，AIF 與細胞凋亡的活化是有相關聯的。

2. 外在路徑 (extrinsic pathway):

在細胞凋亡的過程產生除了粒線體路徑外，另一重要的路徑為外在路徑 (extrinsic pathway)，又稱死亡接受器路 (death-receptor pathway)²⁵。死亡接受器位於細胞表面上，當刺激與 death ligands 結合時，凋亡訊息隨即被傳遞至下游²⁵。而這些相關的 death receptor 包括了 Fas (Apo1 or CD95)、TNFR1, TRAIL-R1 (DR4)、TRAIL-R2 (DR5)、DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMP, or LARD)、DR6²⁴。

Fas (CD95/APO-1) 是一個位於細胞表面的糖基化蛋白，其組成包含 325~335 胺基酸，分子量約為 45~52kDa。Fas 廣泛的存在許多組織中，特別在心臟、胸腺、肝臟、及腎臟²⁴。而 Fas Ligand (FasL/CD95L) 是分子量為 40 kDa 的 type II 的transmembrane protein。表現在細胞

的表面，其功能可以維持 T 細胞與 B 細胞的平衡，以及毒殺有害的細胞如發炎細胞或是其他的癌細胞²⁴。在生理性的細胞凋亡 Fas/FasL 扮演主要的角色如：(1) 在免疫反應後，清除週邊活化的成熟 T 細胞；(2) 毒殺藉由被 T 毒殺細胞所辨識的標的細胞，例如病毒感染的細胞或是癌細胞；(3) 還有例如在眼睛這些未有免疫環境的地方，也可藉由 Fas/FasL 的作用去對抗發炎細胞²⁴。然而對於生理上需要利用 Fas 來調節細胞凋亡的細胞，通常都是增加接受器 (receptor) 的濃度，而原本在細胞質與高爾基氏體 (golgi complex) 的 Fas 刺激後，並會移至細胞表面以增加接受器的濃度²⁶，同時，可以經由 Fas 接受器的醣化作用來調節細胞凋亡²⁴。

3. Caspase與凋亡作用：

凋亡過程中 caspase (cysteine aspartyl-specific protease) 是一群具有專一性的cysteine protease²⁷，而這些水解蛋白酶是以未活化的形式 pro-caspase 存在於細胞質。這些未活化型態依作用可分為 initiator caspase 與 effector caspase。其中 initiator caspase 包含 caspase-2、8、9、10；effector caspase 包括 caspase-3、6、7。其作用無論 caspase-3 的活化是來自於 caspase-8或 caspase-9，皆能使修復受損 DNA 的蛋白

PARP 裂解，而喪失功能。同時也會切除 ICAD (inhibitor of CAD) 的抑制作用，使 CAD (caspase-activated DNase) 移至核內造成 DNA fragmentation，導致細胞凋亡²⁷。

第四節 細胞轉移與侵襲

腫瘤轉移是一個極為複雜的多步驟過程，首先，癌細胞與原發瘤的分離，腫瘤間質細胞和基質黏附改變，原位癌細胞會脫離原來發生位置，而游離的癌細胞會破壞細胞外基質基底膜，穿過血管或淋巴管中，在體內循環流動，到達器官周邊的微血管、淋巴球及單核球等凝集成血栓塊²⁸。而血栓塊會緊附貼於血管內皮細胞，存活的血栓癌細胞可穿透內皮細胞的空隙，並貫穿基底膜再游走到新生組織中繼續增殖，形成第二區的癌細胞²⁸。癌細胞游出管腔，與管腔內皮基底膜的黏附是由 E-cadherin 調控²⁸，因此，E-cadherin 與腫瘤轉移侵襲過程的關係成為近年來研究的熱點。

而過程中游離的癌細胞會破壞細胞外基質基底膜 (extracellular matrix, ECM)，則是由基質金屬蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, MMPs) 扮演著重要調控的腳色²⁹。在廣泛性的惡性腫瘤中，一般都可發現 MMPs 的表現²⁹。且經過研究證實當 MMPs 過量的表現，通常對於腫瘤的侵襲程度極不良的預後都有相關性³⁰。MMPs 家族是一群含有鋅

結構的基質金屬離子，目前了解已有超過二十種，分別就依結構及受質的特異性來分及 MMP 編號命名³¹，如下表二。

表二、Matrix metalloproteinases 基質金屬蛋白酶分類

| MMP family | Enzyme | | Principal substrates |
|---------------|--------------------------|---------|---|
| | Descriptive name | No. | |
| collagenases | Interstitial collagenase | MMP-1 | Fibrillar collagens, types I, II, III |
| | Neutrophil collagenase | MMP-8 | |
| | Collagenase-3 | MMP-13 | |
| | Xenopus collagenase | MMP-18 | |
| Gelatinases | Gelatinases A | MMP-2 | Nonfibrillar collagens, types IV V |
| | Gelatinases B | MMP-9 | |
| stromelysins | Stromelysins-1 | MMP-3 | Proteoglycans, laminin, fibronectin collagens |
| | Stromelysins-2 | MMP-10 | |
| | Matrilysin | MMP-7 | |
| Elastase | Stromelysins-3 | MMP-11 | Serine protease inhibitors |
| | Metalloelastase | MMP-12 | Elastin, nonfibrillar collagen |
| Membrane type | | | Progelatinase A, undefined |
| | | MT1-MMP | |
| | | MT2-MMP | |
| | | MT3-MMP | |
| | | MT4-MMP | |
| | | MT5-MMP | |
| Unclassified | enamelysin | MMP-14 | Undefined |
| | | MMP-15 | |
| | | MMP-16 | |
| | | MMP-17 | |
| | | MMP-21 | |
| | | MMP-19 | |
| | | MMP-23 | |
| | | MMP-24 | |

第五節 實驗目的及實驗設計

實驗研究方向及設計為探討 PA-42 抑制人類口腔癌細胞株 (HSC-3)

其生長及造成細胞凋亡之效果，其可分為下列幾個階段:

第一階段:探討 PA-42 對於人類口腔癌細胞株 (HSC-3) 是否有增生

的抑制及藥物毒性造成形態學上的影響與細胞凋亡產生。

實驗設計:人類口腔癌細胞株給予 PA-42 經由不同時間與濃度處理

後

1. 利用倒立式位像差顯微鏡在視野下觀測，藥物對於細胞型態上的影響及增生抑制情形。
2. 利用 MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 檢測藥物對細胞的毒性與存活率抑制之結果。
3. 以流式細胞儀分析藥物對於細胞週期的影響

第二階段:探討造成細胞損傷及細胞凋亡相關因子之表現

實驗設計:1. 以流式細胞儀偵測造成細胞傷害之相關因子，如細胞內

鈣離子釋放及細胞粒線體膜電位 (mitochondria

membrane potential, MMP, $\Delta\Psi$) 之影響與變化。

2. 利用 nuclear DAPI stain、單細胞凝膠電泳 (Comet assay) 及洋菜糖膠體電泳 (agarose gel

electrophoresis) 檢測藥物對於 DNA 破壞及染色體損傷之程度。

3. 利用西方點墨法 (Western blotting) 探討 PA-42 誘導細胞凋亡之路徑細胞內蛋白表現。

第三階段:探討 PA-42 抑制細胞轉移、侵襲作用之效果

實驗設計:1. 使用倒立式位像差顯微鏡觀察視野下，針對藥物 PA-42

給予後是否有抑制細胞移動 (wound healing assay) 情形。

2. 利用 transwell 觀察，針對藥物 PA-42 給予後是否有抑制細胞移動 (transwell migration assay) 及細胞侵襲 (matrigel invasion assay) 情形。

3. 使用共軛焦顯微鏡觀察視野下，針對藥物 PA-42 給予後是否有改變細胞骨架。同時利用西方點墨法測定基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 的表現情形。

第三章 實驗材料與方法

第一節 實驗材料

第一項 藥品試劑

- [1] DULBECCO' S MEM (1X) (購自 BIOCHROM AG)
- [2] Fetal Bovine serum (購自 GIBCO)
- [3] Penicillin-Streptomycin (購自 BIOCHROM AG)
- [4] L-glutamine (購自 GIBCO)
- [5] Dimethyl Sulfoxide (購自 Sigma)
- [6] Trypan blue (購自 Sigma)
- [7] Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 ; 購自 Merck)
- [8] Sodium chloride (NaCl ; 購自 Merck)
- [9] Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 ; 購自 Merck)
- [10] Potassium chloride (KCl ; 購自 Merck)
- [11] PI (Propidium iodide ; 購自 Sigma)
- [12] RNase A (Ribonuclease A ; 購自 CLONTECH)
- [13] Triton X-100 (購自 Sigma)
- [14] Ethanol (購自 TEDIA)
- [15] APS (Ammonium persulfate ; 購自 Amresco)
- [16] Acrylamide/Bis 40% solution (ACRYL/BISTM29: 1 ; 購自 Amresco)
- [17] Bovine serum albumin (BSA ; 購自 Merck)
- [18] Glycine (購自 Amresco)
- [19] Methanol (購自 TEDIA)
- [20] ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit ; 購自 Amersham)
- [21] GelCode® commassie blue (購自 PIERCE)

- [22] Glycerol (購自 Scharlau)
- [23] Hydrochloric acid (購自 Merck)
- [24] Protein assay-Dye reagent concentrate (購自 Bio-Rad)
- [25] Protein maker (購自 Femantas)
- [26] SDS (Sodium dodecyl sulfate ; 購自 Amresco)
- [27] TEMED (N, N, N, N-Tetramethyl-ethylenediamine ; 購自 Amresco)
- [28] Tris (Tris (hydroxymethyl) -aminomethane ; 購自 Amresco)
- [29] Tween 20 (購自 Amresco)
- [30] 脫脂奶粉 (安佳)
- [31] 顯影劑 (購自 Kodak)
- [32] 定影劑 (購自 Kodak)
- [33] Super RX (購自 FUJIFILM)
- [34] 10X BlueJuice (Gel loading buffer ; 購自 Invitrogen)
- [35] Agarose I (購自 Amresco)
- [36] 核酸純化試劑組 (Tissue & cell genomic DNA purification kit ; 購自 GeneMark)
- [37] 蛋白質萃取試劑 (PRO-PREP protein extraction solution ; 購自 iNtRON Biotechnology)
- [38] 5X TBE buffer (購自 Amresco)
- [39] 10X SDS-PAGE running buffer (TG-SDS buffer ; 購自 Amresco)
- [40] TE buffer (購自 Amresco)
- [41] Transwell (購自 Corning Corstart)
- [42] Matrigel (購自 Becton Dickinson)
- [43] 人類口腔癌細胞株 (SCC-4、CAL27、SAS、Ca9-22、HSC-3 , Human oral squamous carcinoma cancer cells line)
- [44] BD BioCoat cultureslide (購自 BD Falcon™)
- [45] 一級抗體:

- 
- (a) anti-Cyclin A (Upstate)
 - (b) anti-Cyclin B1 (Upstate)
 - (c) anti-Cdk1/Cdc2 (Upstate)
 - (d) anti- β -actin (Chemicon)
 - (e) anti-p53 (Upstate)
 - (f) anti-p27^{Kip1} (NeoMarkers)
 - (g) anti- p21^{WAF1/Cip1} (Upstate)
 - (h) anti-Cdc25A (Upstate)
 - (i) anti-Cdc25C (Upstate)
 - (j) anti-Wee1 (Upstate)
 - (k) anti-Chk2 (Upstate)
 - (l) anti- α -tubulin (Santa cruz)
 - (m) anti-Erk (Upstate)
 - (n) anti-C-jun (Upstate)
 - (o) anti-MMP-3 (Upstate)
 - (p) anti-caspase-3 (Upstate)
 - (q) anti-GAPDH (Upstate)
 - (r) anti-MMP-1 (Upstate)
 - (s) anti-Bax (Santa cruz)
 - (t) anti-Bcl-xs (Santa cruz)
 - (u) anti-Bcl-2 (Santa cruz)
 - (v) anti-Bcl-xl (Santa cruz)
 - (w) anti-cytochrome c (Santa cruz)
 - (x) anti-AIF (Upstate)
 - (y) anti-MMP-9 (Upstate)
 - (z) anti- α -smooth muscle actin (abcam)
 - (aa) anti-E-cadherin (abcam)
 - (ab) anti-GRB2 (abcam)

[44] 二級抗體

- (a) Goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody (購自 Chemicon)
- (b) Goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody (購自 Chemicon)
- (c) Rhodmine (TRITC)-conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG (購自 永馥)
- (d) Fluorescein (FITC)-conjugated affinipure goat anti-mouse IgG (購自 永馥)

第二項 設備、器材

- [1] 無菌操作台 (購自 Lian Shen)
- [2] 細胞培養箱 (購自 Nuaire)
- [3] 細胞培養皿 (購自 FALCON)
- [4] 細胞培養盤 (購自 FALCON)
- [5] 細胞計數器 (Haemocytometer ; 購自 Boeco)
- [6] 倒立式像位差顯微鏡 (phase-contrast microscope ; 購自 Olympus)
- [7] 冷凍管 (購自 TPP)
- [8] 離心機 (購自 Beckman)
- [9] Dispensor (購自 TPP)
- [10] 微量離心管 (購自 季勗)
- [11] Pipetment (購自 Costar)
- [12] 熱板 (購自 Lab-Line)
- [13] 酵素免疫分析儀 (anthos 2020 ; 購自 Anthos Labtec, Australia)
- [14] 微量天平 (GR-200 ; 購自 A&D)
- [15] 去離子水製造機 (購自 Minipore)
- [16] 乾浴槽 (Model 110001 ; 購自 Boekel)
- [17] 電源供應器 (購自 Amersham)
- [18] 酸鹼值測定計 (C831 ; 購自 Consort)

- [19] PVDF membrane (購自Minipore)
- [20] Mini-3D Shaker (購自Boeco)
- [21] SDS-PAGE電泳槽套組 (購自Bio-Rad)
- [22] Transfer Cells Blot套組 (購自Bio-Rad)
- [23] 流式細胞儀 (Flow cytometry ; 購自Becton Dickinson)
- [24] DNA電泳槽 (購自Mupid-2)
- [25] 高速離心機323K (購自Hermle); Avente 30™ (購自Beckman)
- [26] Eyela coolace
- [27] Eyela N-11 rotary vacuum evaporat



第二節 實驗方法

第一項 藥物之萃取、藥品配製

將10 kg的乾燥苦蕒植物放於甲醇水浴桶中，室溫浸漬三天/一次，將甲醇萃出液倒出，苦蕒再於甲醇水浴桶中室溫浸漬一次，再將甲醇萃出液倒出，苦蕒最後再於甲醇水浴桶中 70°C 浸漬一次，再將甲醇萃出液倒出，合併甲醇萃出液於 Eyela rotary vacuum evaporator 於 50°C 進行減壓濃縮，經冷凍乾燥後，得 950 g 粗抽出物於 -30°C 冷凍備用，再經色層分析法純化出分離成分 PA-42。

利用微量天平取出 PA-42 重量10 mg，放置於微量離心管 (eppendorf) 中，再加入 DMSO 1 ml，配成濃度 100 μ g/ml，存放於 -20°C 冰箱中。實驗時再將取出溶解後，以 DMSO 稀釋成實驗所需的濃度。經由生物檢定法 (Biassay) 本次實驗最終濃度分別為 0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5 μ g/ml。

第二項 人類口腔癌細胞培養

1. 冷凍細胞活化

原理:冷凍細胞活化原則為快速解凍，如此可避免冰晶重新結晶而對細胞造成傷害，導致細胞死亡。細胞經由解凍後培養數日，或繼代一至二代，待細胞恢復原有活性，使細胞生長或其特性恢復正常時

才作為細胞實驗的樣本。

步驟:將操作環境及細胞所需之培養基準備完善後，並將培養基至於 37°C 的水浴槽中回溫，回溫後噴以 70% 酒精後，擦拭並移入無菌操作台內。自乾冰容器或液態氮中取出冷凍小管，首先檢查蓋子是否旋緊，由於熱脹冷縮的過程，此時蓋子容易鬆脫。移出冷凍小管後，迅速移入 37°C 的水浴槽中快速解凍，融化後，以 70% 酒精擦拭冷凍小管外部，並將移入無菌操作台內。取出解凍之細胞懸浮液，緩慢加入含有培養基之培養容器內 (稀釋比例為 1: 10~1: 15)，混合均勻，放入 CO₂ 培養箱培養。並在解凍後次日更換培養基。

2. 細胞冷凍保存

原理:將健康細胞繼代後存放於液態氮中以供應實驗所需之細胞。欲冷凍保存之細胞需為生長良好且存活率約為 80~90% 之狀態。冷凍保護劑 DMSO 應為試劑級等級，且無菌無色 (0.22 micro FGLP Teflon 過濾或是直接購買無菌產品)。冷凍保存之細胞濃度: 1~5×10⁶ cells/ml。

步驟:冷凍前一日更換半量或全量的培養基，觀察細胞生長情形。配製冷凍保存溶液 (使用前配製):將 DMSO 加入新鮮的培養基中，最後濃度為 7%，混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞懸浮液 (約0.1 ml) 計算細胞濃度及冷凍前存活率。離心後，依細胞數的數

量加入適量的冷凍保存液，使細胞濃度為 $1\sim5\times 10^6$ cells/ml，混合均勻，分裝於標示清楚之冷凍保存管中，1 ml/vial。冷凍保存方法:冷凍管置於 4°C 中 10 分鐘，轉至 -20°C 中 30 分鐘，轉至 -80°C 中 16~18 小時 (或隔夜)，最後以液氮槽長期儲存。

3. 人類口腔癌細胞培養

無菌操作台使用前先讓其抽氣運轉 10 分鐘，再以 70% 酒精擦拭操作台面。所有進入無菌操作台的器物均需先噴灑 70% 酒精，有蓋容器旋開瓶蓋前均需過火，培養基若使用量少，則盡量置於室溫下回溫，以避免 pH 值變化。

以 HSC-3 細胞為例，培養在 10% FBS-DMEM/F12 培養基中 (含10% fetal bovine serum、100 units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin、2 mM L-glutamine)，置於 37°C、5% CO₂ 的 75T 方形培養盒於培養箱中培養。

當細胞密度長至 80~90% 滿時則進行分盤，首先將舊培養基吸乾淨，接著以 10 ml 1×PBS 緩衝液 (pH=7.4) 清洗兩次，清洗完後加入 trypsin-EDTA 1~2 ml 約2分鐘，再加入 5 ml 10% FBS-DMEM/F12 中斷 trypsin 作用，將培養基內細胞移置離心管中以轉速 1500 rpm 離心 5 分鐘，將細胞離心後除去上清液，加入適量的培養基，並取部份利用血球計數盤 (hemocytometer) 計數細胞數

目，剩餘細胞進行分盤培養。

表三、實驗中所選用的人類口腔癌細胞株列表

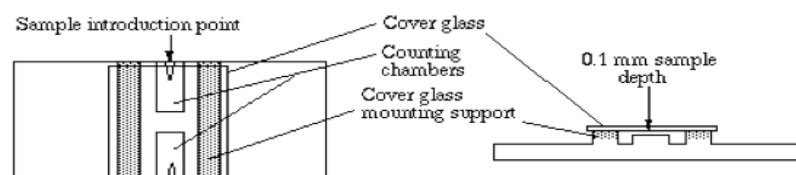
| Cells | SCC-4 | CAL27 | SAS | Ca9-22 | HSC-3 |
|----------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
| Organ | tongue | tongue | tongue | gingiva | tongue |
| Maintain | DMEM/F12 | DMEM | DMEM | MEM | DMEM/F12 |
| Differentiated | | | Poorly | Moderately | Poorly |
| Reference | From ATCC | From ATCC | From JCRB | From JCRB | From JCRB |

註: ATCC: American Type Culture Collection

JCRB: Japanese Collection of Research Bioresources

4. 細胞計數技術

原理: 計算數目是利用是用血球計數盤，血球計數盤一般有兩個 chamber，每個 chamber 中細刻成九個 1 mm^2 大正方形其中九宮格周圍的正方形再細刻 16 小格，深度均為 0.1 mm 。當 chamber 上方蓋上玻片後，每各大正方形體積為 $1\text{ mm}^2 \times 0.1\text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4}\text{ ml}$ 。使用時，計數每各大正方形內之細胞數，乘以稀釋倍數，再乘以 10^4 ，即為每 ml 中的細胞數，如下圖一。



圖二、細胞計數盤

步驟:取稀釋後含有細胞的培養基約 10 μ l，自血球計數盤chamber 上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，接著在 100 倍倒立式顯微鏡下觀察及計數。在計數之時，細胞若位於線上，則只計上限與右線 (或計下線與左線之細胞)，如所含細胞密度過高，則算出的細胞數目誤差較大 (每一大格超過50個細胞)，需要再加入更多的培養基稀釋。

第三項 MTT細胞活性分析³²

原理: MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 呈色法是依據 Mosmann 所發表方法，因 MTT 本身是一種黃色的 tetrazolium salt，當 MTT 被粒線體中含有的 succinate dehydrogenase 還原後則轉變為藍紫色之 formazan，在 570 nm 下具有吸光值。因此法除了可偵測粒線體之還原能力外，也可代表細胞存活數目，故當吸光值越高表示細胞活性越強。

步驟:將 HSC-3 細胞，接種於 24 孔培養盤中，其每孔所含細胞數為 1×10^4 個，細胞培養於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時，再分別給予不同濃度之 PA-42 (0.39~12.5 μ g/ml)，經不同培養時間其藥物培養時間為 24 小時、48 小時及 72 小時，培養後將培養基吸出，用 1X PBS 洗兩次，避光操做每孔加入 200 μ l MTT (0.5 mg/ml)，放置 37°C、5% CO₂ 之培養箱反應 4 小時後，將 MTT 吸

出，每孔再加入 500 μ l DMSO，放置 shaker 30 分鐘後，每孔吸出 200 μ l DMSO 移至 96 孔培養盤中，以 ELISA reader 測定在 570 nm 的吸光值。

第四項 倒立式位相差顯微鏡檢測細胞形態

步驟:口腔癌 HSC-3 細胞種入 12 孔培養盤，每孔口腔癌細胞數為 1.5×10^5 個，放置隔天，投予 0.39~12.5 μ g/ml PA-42，在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱進行 24 小時培養後，於倒立式像位差顯微鏡下照相分析。

第五項 流式細胞儀分析細胞週期及細胞凋亡³³

原理: Propidium iodide (PI) 是核酸的螢光染劑，具專一性可與核酸鍵結。正常情況下細胞膜呈現完整，所以 PI 染劑是無法穿透細胞膜，而當利用酒精固定細胞膜後，帶有正電荷的 PI 可進入細胞膜嵌入 DNA 上，經由流式細胞儀偵測 PI 激發之螢光，則可反應細胞內 DNA 狀態及進行細胞週期分析。

步驟:口腔癌細胞種入 12 孔培養盤，每孔細胞數為 1.5×10^5 個，放置隔天給予 0.39~12.5 μ g/ml PA-42，的口腔癌細胞種入 12 孔培養盤，擺進 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱進行培養，在培養 24 小時後，以 70% 酒精進行細胞固定，置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱隔夜存放。

隔天，收取細胞至 5 ml 的流式細胞儀專用管，混合均勻後，即

可進行流式細胞儀分析，加入 500 μ l 的 PI 染劑，避光反應 30 分鐘，最後以流式細胞儀 (Flow cytometry) 進行樣品分析，一秒細胞數不超過 300 顆細胞，每次收集 10000 顆細胞，檢測細胞週期改變的情形。數據以 Modfit LT[®] 軟體進行處理分析。

表四、1X Phosphate buffer saline (1X PBS)

| 組成 | 重量 (g) |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 8.0 |
| KCl | 0.2 |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.44 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.24 |
| 加 DDW 到總體積 1000 ml | |

表五、Propidium iodide (PI) 染劑配製

| 組成 | 最終濃度 | 初濃度 | 體積 (ml) |
|----------------------|-----------|---------|---------|
| Propidium iodide(PI) | 0.4 mg/dl | 2 mg/dl | 5 |
| Triton | 1% | 5% | 5 |
| RNase A | 0.1 mg/ml | 2 mg/ml | 1.25 |
| 1X PBS | - | - | 13.75 |
| 總體積 | | | 25 ml |

第六項 流式細胞儀分析粒線體膜電位³⁴

原理: DiOC₆ (3,3-dihexyloxacarbocyanine iodide) 為陽離子脂溶性染劑，易嵌入帶負電荷之粒線體內膜，當粒線體受刺激去極化而失去內膜之負電荷時，內膜被標定 DiOC₆ 會減少，因此螢光強度會降低，

可作為檢測粒線體膜電位 (MMP) 之指標。

步驟:口腔癌細胞種入 6 孔培養盤，每孔細胞數為 5×10^5 個，放置隔天後，給予 1.56、6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42，分別培養 0、3、6、12 及 24 小時後收取細胞，取細胞至 5 ml 的流式細胞儀專用管，加 DiOC₆ (3 $\mu\text{g/1 ml}$) 1 ml，而 blank 加 1 ml PBS，移到細胞培養箱 37°C、5% CO₂，避光 30 分鐘後，以流式細胞儀分析。

第七項 流式細胞儀分析細胞內鈣離子濃度³⁵

原理: Indo-1/AM 為螢光染劑，可與鈣離子特異性結合，熬合鈣離子，熬合鈣離子之螢光染劑會有光學特性上的改變，並且隨著細胞內鈣離子濃度的改變，而發散出不同強度的螢光，來偵測細胞內鈣離子濃度的變化。

步驟:口腔癌細胞種入6孔培養盤，每孔細胞數為 5×10^5 個，放置隔天後，給予 1.56、6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42，分別培養 0、1、6、12、18 及 24 小時後收取細胞，取細胞至 5 ml 的流式細胞儀專用管，加 Indo-1/AM (3 $\mu\text{g/1 ml}$) 1ml，而 blank 加 1 ml PBS，移到細胞培養箱 37°C、5% CO₂，避光 40 分鐘後，1500 rpm 離心 5 分鐘，以 PBS 清洗再離心二次，加 500 μl PBS，以流式細胞儀分析。

第八項 DAPI 細胞螢光染色分析³⁶

原理: DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 是一種核酸螢光染劑，會專一性的結合在 DNA 雙螺旋之小溝上的 AT 區，當細胞產生凋亡時，會有染色質皺縮、DNA 斷裂現象；因此當凋亡現象越嚴重，DNA 斷裂越多，此時小溝上的 AT 區也或裸露越多，使更多的 DAPI 染劑結合上，在螢光顯微鏡下觀察，可觀察到凋亡細胞所產生的螢光強度會比正常細胞來的強。

步驟: 口腔癌細胞種入 6 孔培養盤，每孔細胞數為 3×10^4 個，放置隔天，加入 0.39、0.78、1.56、3.13、6.25 及 12.5 $\mu\text{g/ml}$ PA-42，培養 24 小時後，移除上層培養基，加入 PBS 洗三次，以 4% Formadehyde 固定 15 分鐘，再加入 0.1% Triton X-100/PBS 作用 15 分鐘，移除後以 PBS 洗二次後，加 DAPI 染劑 (1 $\mu\text{g}/1 \text{ ml}$) 300 μl ，置於 37°C 細胞培養箱避光 30 分鐘，最後再以 PBS 洗三次，使用螢光顯微鏡 F 200X 照相觀察。

第九項 DNA 裂解電泳分析³⁷

原理: 當細胞凋亡產生時，會有 DNA 裂解片段的產生，細胞核內的 DNA 會裂解成 180~200 bp，藉由將細胞中的 DNA 抽出，在紫

外燈下觀察洋菜糖膠體電泳後是否有 DNA 裂解片段而導致階梯狀現象產生。

步驟:將 5×10^5 個細胞種於 10 公分培養皿上，於 37°C 培養隔夜後，加入所需藥物作用 24 小時，使用 Tissue & cell genomic DNA purification kit 將 DNA 抽出後，進行 2% agarose gel 電泳分析。

第十項 單細胞凝膠電泳分析³⁸

原理: 當細胞凋亡產生時，會有 DNA 裂解片段的產生，藉由電泳將細胞內的 DNA 因分子量不同而導致分離拖曳出細胞外後，染上核酸染劑 PI，在螢光顯微鏡下觀察，則 DNA 受損情形越嚴重時，拖曳情形越明顯而成彗星狀，因而命名彗星試驗，最後電泳拖尾的長短影像，可利用 cometscoreTM 軟體分析及定量損傷之程度。

步驟:口腔癌細胞種入 6 孔培養盤，每孔口腔癌細胞數為 3×10^4 個，放置隔天，給予 0.39、0.78、1.56 $\mu\text{g/ml}$ PA-42，陰性對照組給予等體積的 DMSO，陽性對照組給予 5 μM H_2O_2 ，在培養 24 小時後，收取細胞置於 PBS 緩衝液。另外，在磨砂載玻片上以鉛筆標上號碼，置 80 μl 0.5% LMA + 0.5% NMA 於載玻片上，將蓋玻片以 45° 傾斜蓋上防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片。取 10 μl 細胞液加上 70 μl 35% LMA 加在第一層膠上，將蓋玻片以 45 傾

斜蓋上防止氣泡產生，凝固後拿下蓋玻片，移至 lysis buffer 1 小時，以 alkaline buffer(0.3 M NaOH，1 mM EDTA) 為電泳液進行電泳，然後將膠移至 0.4 M Tris buffer 使 pH 回到中性，緊接著將膠置於甲醇中脫水。最後，以加入 PI 染劑 (2.5 μ g/ml) 於膠上，以螢光顯微鏡觀察有無 DNA 受損。

表六、Lysis buffer 配製

| Lysis buffer(需新鮮配置) pH=8~10 | |
|--------------------------------|--------|
| 5 M NaCl | 100 ml |
| 1 M Tris-HCl | 2 ml |
| 0.5 M EDTA | 40 ml |
| Triton-x | 2 ml |
| DDW | 56 ml |
| Total | 200 ml |

表七、Alkaline buffer 配製

| Alkaline buffer pH=13 | |
|--------------------------|----------|
| NaOH | 12 g |
| EDTA | 0.3724 g |
| DDW | 1000 ml |

* 0.5 M EDTA 需加入NaOH幫助溶解

表八、0.4 M Tris-base buffer 配製

| 0.4 M Tris-base buffer(以HCl調pH=7.5) | |
|-------------------------------------|----------|
| Tris | 48.456 g |
| DDW | 1000 ml |

第十一項 西方點墨法分析³⁹

原理: 細胞內蛋白質的分析是利用西方點墨法 (Western blot) ，把待測細胞之蛋白質，利用電泳方式依照其分子量的差異性將其分

開，接著在利用免疫螢光技術，把螢光訊號呈現在底片上，最後再將底片利用分析軟體分析其變化。

步驟:

1. 細胞蛋白質抽取

將口腔癌細胞種入 10 公分細胞培養盤，給予0.39~12.5 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 培養 24 小時，收取細胞後加入 200 μl 的 Lysis buffer。劇烈震盪後，置於冰上 30 分鐘處理樣品，再經10,000 rpm、 4°C 離心 10 分鐘，取出上清液即含細胞蛋白質。

2. 蛋白質定量

蛋白質標準品檢量線製作:以胎牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA) 為蛋白質標準品，依下面表九製作蛋白質標準品樣品:

表九、製蛋白質標準品配製

| 濃度($\mu\text{g/ml}$) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
|---------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 組成 | | | | | | |
| 0.1 mg/ml BSA (μl) | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| DDW (μl) | 1000 | 950 | 900 | 850 | 800 | 750 |
| 總體積 1000 μl | | | | | | |

取 Bradford 染劑 2 ml 加入 8 ml 二次水稀釋備用，取 15 μl 的蛋白質標準品與稀釋過的 Bradford 染劑 735 μl 混合，混勻 5 分鐘後，將配製好的蛋白質標準品樣品以每個樣品放在 3 個孔的方

式依序放入 96 孔細胞培養盤中，利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 在 595 nm 測定各蛋白質標準品吸光值之平均值。以蛋白質標準品吸光值與濃度畫出標準品檢量線，並求出趨勢線方程式及 R^2 值。 $(R^2$ 值必須有 ≥ 0.99 以上的準確度，否則需重新製作檢量線)

3. 樣品蛋白質定量:

取 Bradford 染劑 2 ml 加入 8 ml 二次水稀釋備用，取 15 μ l 的蛋白質樣品與稀釋過的 Bradford 染劑 735 μ l 混合，混勻 5 分鐘後以每個樣品放在 3 個孔的方式依序放入 96 孔細胞培養盤中，利用酵素免疫分析儀在 595 nm 測定其吸光值平均值。將樣品吸光值平均值代入趨勢線方程式，則可算出稀釋後樣品之蛋白質濃度，最後再乘上稀釋倍數，則可求得實際蛋白質樣品濃度。

4. 變性電泳 (SDS-PAGE)

依照下面表十依序配製下層膠和上層膠:

表十、配製 SDS-PAGE

| 組成 | 下層膠 (10% Separation gel) | | 上層膠 (5% Stacking gel) | |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| | 一片量 | 兩片量 | 一片量 | 兩片量 |
| DDW | 4.75 ml | 9.5 ml | 3.04 ml | 6.08 ml |
| 1.5 M Tris (pH 8.8) | 2.5 ml | 5.0 ml | - | - |
| 0.5 M Tris (pH 6.8) | - | - | 1.25 ml | 2.5 ml |
| 10% SDS | 100 μ l | 200 μ l | 50 μ l | 100 μ l |
| 40% Acrylamide/Bis (29: 1) | 2.5 ml | 5.0 ml | 610 μ l | 1.22 ml |
| 10% Ammonium persulfate (APS) | 50 μ l | 100 μ l | 50 μ l | 100 μ l |
| TEMED | 10 μ l | 20 μ l | 6 μ l | 12 μ l |

下層膠注入鑄膠台後，緩緩加滿二次水去除氣泡並壓平下層膠之上緣，等約 30 分鐘待膠體凝固。隨後，將上層膠注入後小心地插入樣品槽梳子到未凝固的膠體中，避免氣泡出現於樣品槽下緣。等待約 30 分鐘上層膠凝固後拔出樣品槽梳子，並以二次水小心沖洗樣品槽內避免雜質殘留。將鑄好的膠體放入電泳槽中，加入 Running buffer。用塑膠滴管以抽吸方式去除膠體下緣殘留的氣泡。將樣品與樣品緩衝液 (6X Sample buffer) 混合後總體積為 20 μ l (蛋白質濃度約為 2 μ g/ μ l)，經加熱 5 分鐘後立刻冰上冷卻 30 秒以上。取 5 μ l 分子量標準品 (maker) 和配製好的樣品由左至右分別注入樣品槽

中，以 110 伏特電泳 2 小時。

表十一、1x Running buffer 表十二、6X Sample buffer配製

| 組成 | 重量 (g) | 組成 | 最終濃度 | 初濃度 | 體積 (ml) |
|--------------|--------|---------------------|---------|-------|---------|
| Tris | 30 | Tris-HCl pH 6.8 | 62.5 mM | 0.5 M | 5 |
| Glycine | 144 | SDS | 2% | 10% | 8 |
| SDS | 10 | Glycerol | 60% | 100% | 24 |
| 加 DDW 到 10 L | | Bromophenol blue | 0.6% | - | 0.24 g |
| 加DDW到總體積 | | | | | 40 ml |

5. 轉漬步驟

將轉漬夾打開後黑色面朝下放，取出一片海綿墊片浸泡轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 後放於其上面，並依序在海綿片上放上 3M 濾紙、SDS-PAGE gel、PVDF 轉漬膜 (先用 100% 甲醇濕潤15秒、再放於轉漬緩衝液中浸泡 1 分鐘以上)、3M 濾紙，最後再放上一片海棉墊片後夾上轉漬夾 (夾層中間切勿有氣泡)，形成類似三明治夾層的構造，如下圖三。

圖三、三明治轉漬法



表十三、Transfer buffer 配製

| 組成 | 重量 (g) |
|-------------------|--------|
| Tris | 3 |
| Glycine | 14.4 |
| 100% Methanol | 200 ml |
| 加 DDW 到總體積1000 ml | |

將轉漬夾放入電泳槽中，放入冰盒並加滿轉漬緩衝液。於電泳槽外圍放入足夠的冰塊，使整個系統保持低溫狀態。以 400 毫安培為條件，進行 1 小時蛋白質轉漬步驟。轉漬完成後取出轉漬膜裁去多餘部分，緊接將轉漬膜以 5% 脫脂奶粉 (溶於 0.1% PBS/Tween 中) 在室溫下進行 1 小時 blocking。取出轉漬膜後於小盒中以 0.1% PBS/Tween 清洗 5 分鐘，共 6 次。取封口袋放入 2 ml 的一級抗體 (溶於 0.1% PBS/Tween 中)，再將轉漬膜以鑷子放入，並將封口袋中

的汽泡趕去後用封口機封住，移至 4°C 隔夜進行。隔天取出轉漬膜後置於小盒中以 0.1% PBS/Tween 清洗 5 分鐘，共 6 次。取封口袋加入 2 ml 的二級抗體溶於 1% PBS/Tween 中，用鑷子將轉漬膜放入其中，再將封口袋中的汽泡趕去後用封口機封住，於室溫下搖盪進行 1 小時，最後取出轉漬膜後以 0.1% PBS/Tween 於小盒中清洗 5 分鐘，共 6 次。

6. 壓片步驟:(暗室中進行)

將轉漬膜浸泡於 ECL 試劑之混合液(每瓶各取 500 μ l 等比例混合) 中反應 1 分鐘。以投影片平整包覆好轉漬膜並正面朝上放置於壓片卡匣 (Cassette) 內，再用膠帶固定投影片。以 Super RX 軟片進行壓，感光時間依轉漬膜上螢光亮度決定，時間約 5 秒~30 分鐘不等。感光完成後放入顯影劑進行顯影步驟，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，底片晾乾後，以 ImageJ 軟體分析。

第十二項 細胞轉移試驗分析^{40、41}

原理:觀察細胞轉移填滿缺口或是移動到下層培養盤的情形。

步驟:將口腔癌細胞養滿在 10 公分的培養盤上，將培養基置換成無血清的培養基，進行培養 24 小時，做缺口處理，之後給予

0.39~1.56 μ g/ml PA-42 培養 24~72 小時，觀察細胞轉移到缺口的情形。

另外，使用 Transwell 觀察細胞移動情形。Transwell 為上下兩層的培養盤，上層的底部為含有孔洞的聚苯乙烯膜，細胞可以移動穿透此膜到達下層。因此，將口腔癌細胞種於膜的上層，及加入 0.39~1.56 μ g/ml PA-42，下層則放入含 10% FBS 的培養基，進行培養 24 小時，移動至下層的細胞經結晶紫染色後，以 ImageJ 分析軟體進行細胞計數。

第十三項 細胞侵襲試驗分析⁴¹

原理:觀察細胞穿透人工基質 (matrigel) 移到下層培養盤的情形。

步驟:在 Transwell 上層的底部為含有孔洞的聚苯乙烯膜上先行覆蓋上一層人工基質 (matrigel)，用以模擬細胞間質，將口腔癌細胞種於膜的上層，及加入 0.39~1.56 μ g/ml PA-42，下層則放入含10% FBS的培養基，進行培養 24 小時，侵襲至下層的細胞經結晶紫染色後，以 ImageJ 分析軟體進行細胞計數。

第十四項 共軛焦顯微鏡分析蛋白表現⁴²

原理:把待測細胞之蛋白質，利用免疫螢光技術，把螢光訊號直接呈現在細胞本身上，最後利用共軛焦顯微鏡進行觀察並拍照。

步驟:口腔癌細胞種入載玻片上培養，放置隔天，加入 1.56 $\mu\text{g/ml}$ PA-42，培養 24 小時後，移除培養基，以 4% Formadehyde 固定 15 分鐘，再加入 0.1% Triton X-100/PBS 作用 15 分鐘，加入一級抗體於室溫作用 2 小時，再加入二級抗體於室溫避光作用1小時後，最後加入 DAPI 染劑 (1 $\mu\text{g}/1\text{ ml}$) 300 μl 置於室溫避光作用 1 分鐘，即可使用共軛焦顯微鏡 630 X 照相觀察。

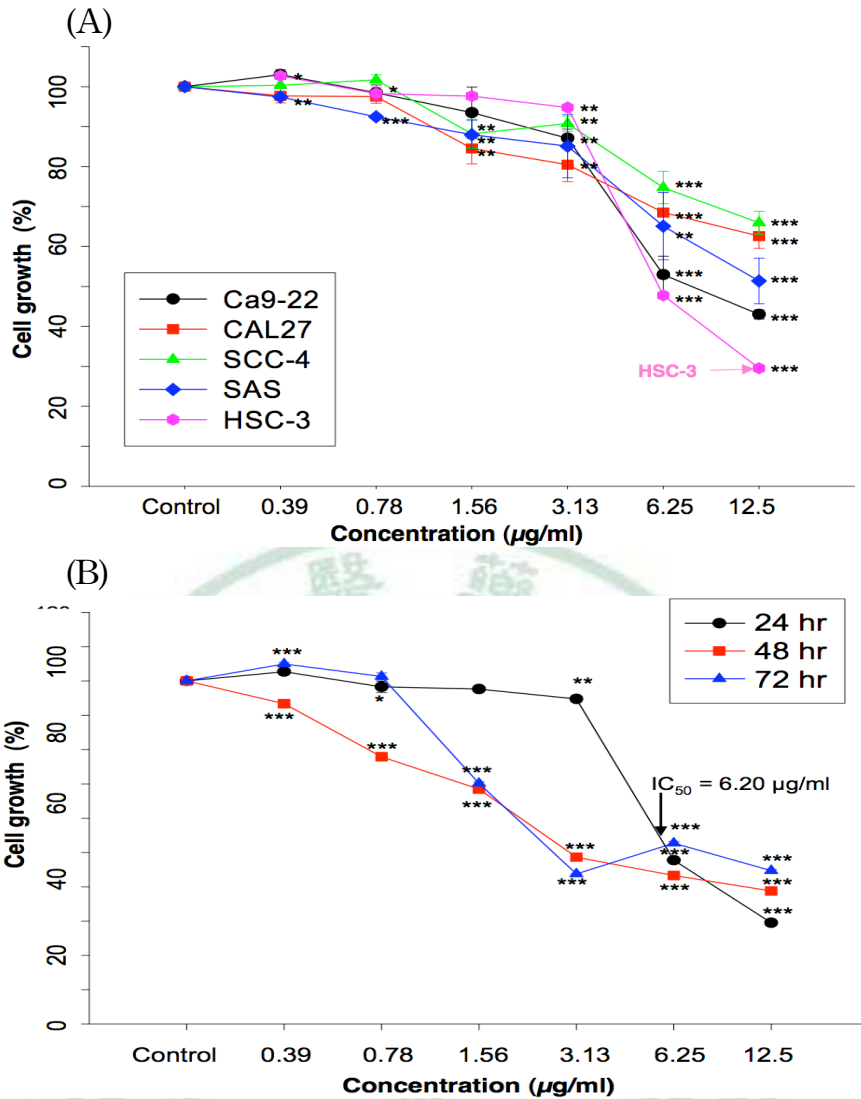
第三節 統計分析

數據結果以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) 表示，各組與對照組間之數據分析以 unpaired Student's *t*-test 進行統計比較，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，*** 表示 $P < 0.001$ 。當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異。

第四章 結果

第一節 以 MTT 細胞活性分析評估 PA-42 對口腔癌細胞 (Ca9-22、CAL27、SCC-4、SAS、HSC-3) 之增生影響

選擇 Ca9-22、CAL27、SCC-4、SAS、HSC-3 等五株細胞株，給予 PA-42 處理 24 小時後，以 MTT 細胞活性分析³³評估細胞增生及存活率影響。其結果顯示，在 Ca9-22、CAL27、SCC-4、SAS、HSC-3 細胞的存活率會隨著濃度的增加而降低，特別在 HSC-3 細胞株中最明顯(圖四A)。同時，分別以 PA-42 處理 24、48、72 小時後的濃度差，以 MTT 細胞活性分析評估的實驗結果指出，在人類口腔癌細胞 HSC-3，其細胞的增生會隨著時間及濃度增加而下降；且以 PA-42 處理 24 小時，IC₅₀濃度為 6.20 μ g/ml，在給予濃度 6.25 μ g/ml 時，對於 HSC-3 造成約 50% 細胞的增生抑制及細胞的死亡。(圖四B)

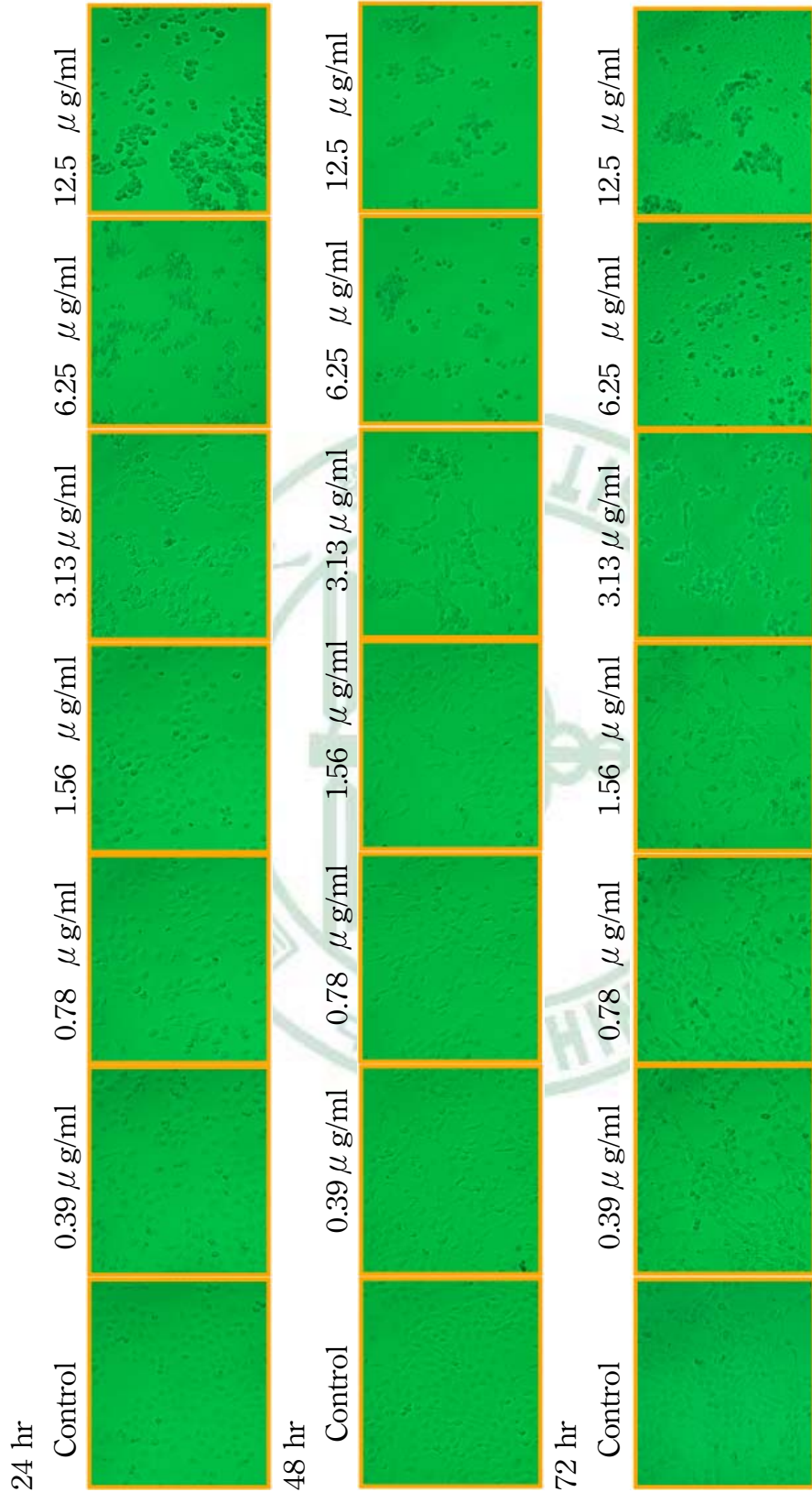


圖四、以 MTT 法評估 PA-42 對口腔癌細胞株 (Ca9-22、CAL27、SCC-4、SAS、HSC-3) 之增生影響。(A) 給予苦蕒 PA-42 不同濃度 (0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5 $\mu\text{g/ml}$)，經 24 小時處理，利用 MTT assay 分析其細胞存活。(B) HSC-3 口腔癌細胞株分別給予不同濃度 (0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5 $\mu\text{g/ml}$)，經 24、48、72 小時，利用 MTT assay 分析其細胞存活率，發現 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 抑制細胞存活率接近約 50%。數據結果分析以 unpaired Student's *t*-test 進行統計比較，各組細胞以平均值±標準差表示，實

驗組與控制組相比，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，*** 表示 $P < 0.001$ ，當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異。

第二節 觀察 PA-42 對人類口腔癌 HSC-3 細胞形態影響

為了評估 PA-42 是否會對 HSC-3 口腔癌細胞株，造成生長抑制及誘導細胞死亡。實驗給予 PA-42 不同濃度 (0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5 $\mu\text{g/ml}$) 依不同時間點 (24、48、72 小時) 在顯微鏡下觀察細胞型態。我們可以發現給予 PA-42 濃度 6.25 $\mu\text{g/ml}$ ，在 24 小時細胞數以顯微鏡 200 倍放大視野下有明顯的減少情形，細胞形態外觀，其細胞膜變得模糊，漂浮且死亡的細胞也有增加(圖五)。



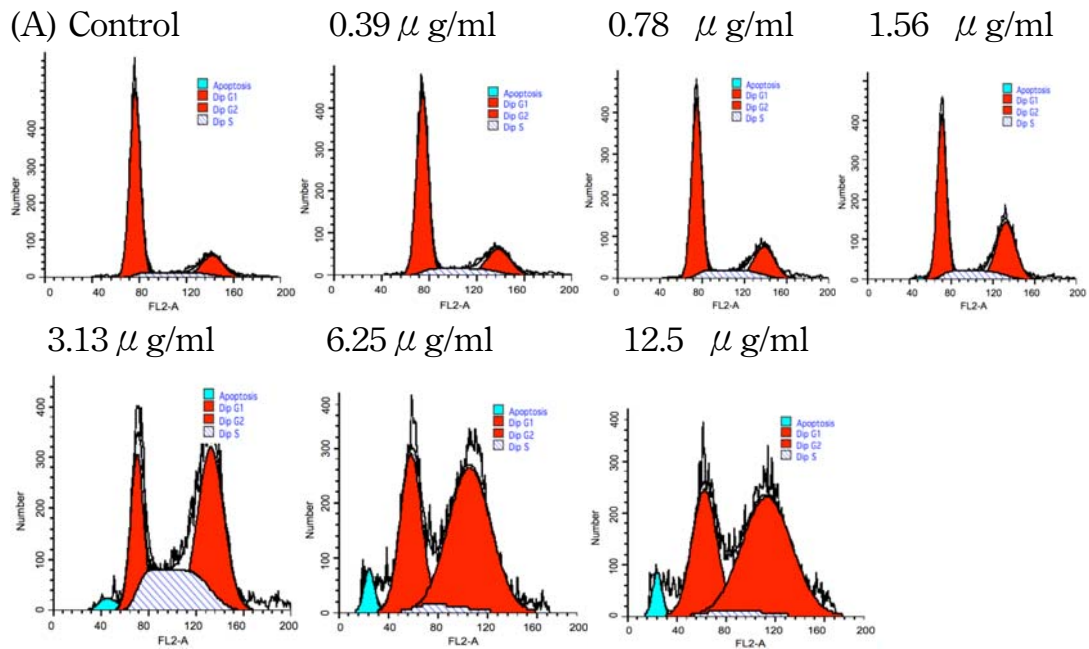
圖五、分析 PA-42 對人類口腔癌 HSC-3 細胞形態學影響。分別以不同濃度 PA-42 濃度 (0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5 $\mu\text{g/ml}$) 依不同時間點 (24、48、72 hr) 利用倒立式顯微鏡 200 倍觀察細胞型態。

第三節 以流式細胞儀分析 PA-42 對人類口腔癌

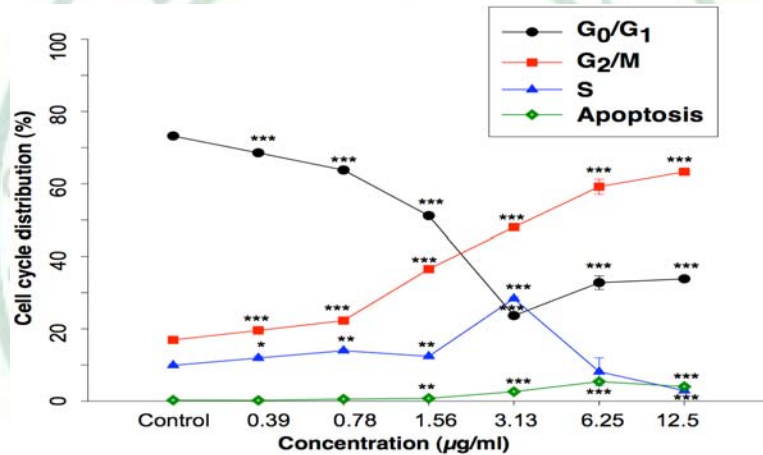
HSC-3 細胞週期影響

HSC-3 口腔癌細胞株種入 12 孔培養盤，於 37 °C、5% CO₂ 的培養箱，經同步化孵育培養後，給予 0.39~12.5 μg/ml PA-42 處理，經 24 小時後分別取出細胞，利用流式細胞儀來檢測細胞週期改變的情形。於 1.56 μg/ml PA-42 時就發生 G2/M 細胞週期停滯，隨著濃度增加而越明顯 (圖六A)，將數據統計分析後有顯著差異 (圖六B)。





(B)

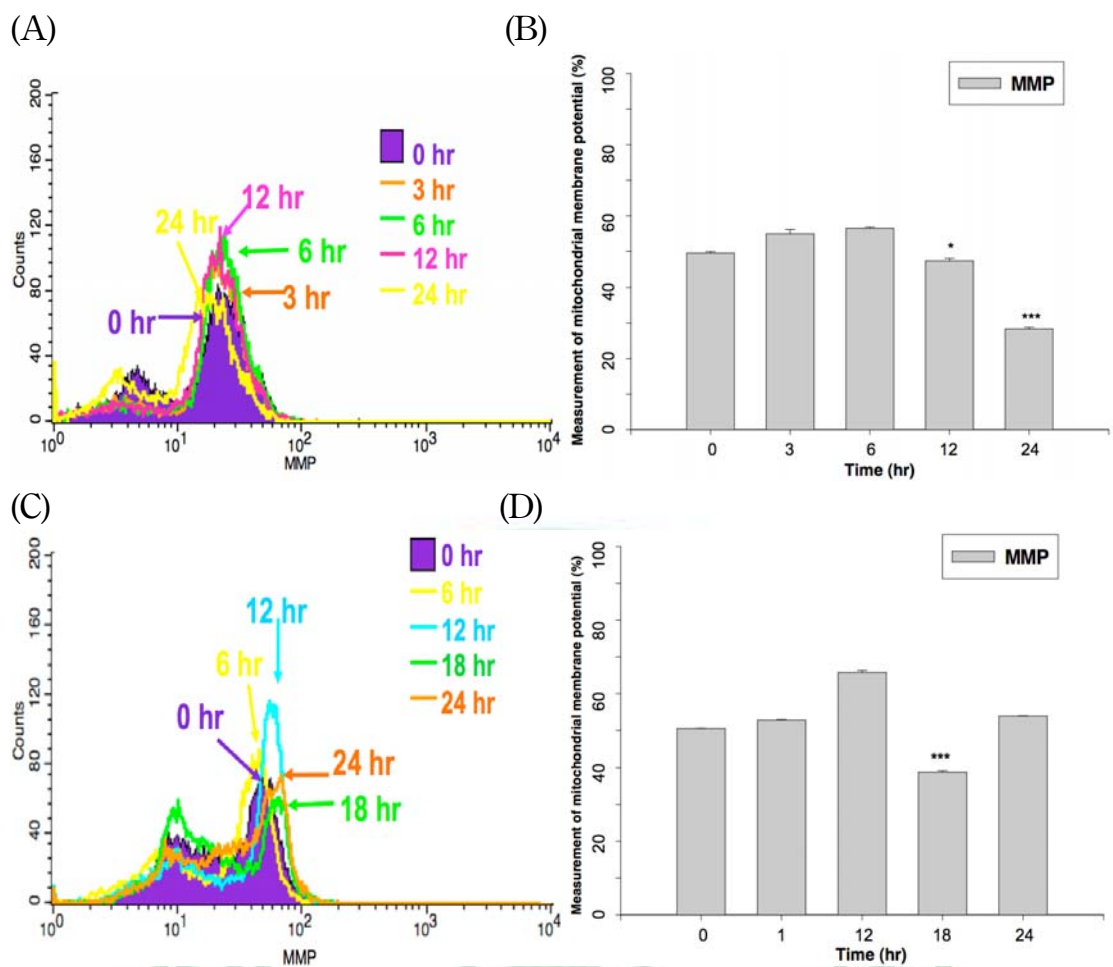


圖六、分析 PA-42 對人類口腔癌 HSC-3 細胞週期影響。HSC-3 口腔癌細胞株分別以不同濃度 PA-42 不同濃度 (0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5 $\mu\text{g/ml}$) 處理 24 小時，(A)經酒精固定細胞，以 Propidium iodide 染色後，以流式細胞儀分析 HSC-3 細胞週期改變。(B)將數據結果分析以 unpaired Student's *t*-test 進行統計比較，各組以平均值±標準差表示，實驗組與控制組相比，* 表示 $P<0.05$ ，** 表示 $P<0.01$ ，*** 表示 $P<0.001$ ，當 $p<0.05$ 表示在統計學上具差異。

第四節 以流式細胞儀分析 PA-42 造成 HSC-3 細胞之粒線體膜電位變化

證明 PA-42 造成細胞凋亡與粒線體是否有相關聯性，我們將培養好的細胞以 5×10^5 個細胞分別種入 6 孔培養盤上，放入符合培養條件之培養箱培養 24 小時後，將細胞取出並更置新鮮培養基，並加入濃度 1.56 及 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42，收集不同時間點處理之細胞，加入 DiOC₆ 試劑。最後以流式細胞儀 (flow cytometry) 偵測細胞粒線體膜電位之改變情形。

實驗結果顯示，加入 1.56 及 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 處理後，分別在 24 及 18 小時的平均螢光強度明顯減弱到最低點，表示細胞之粒線體膜電位確實會受其影響而明顯下降(圖七)。

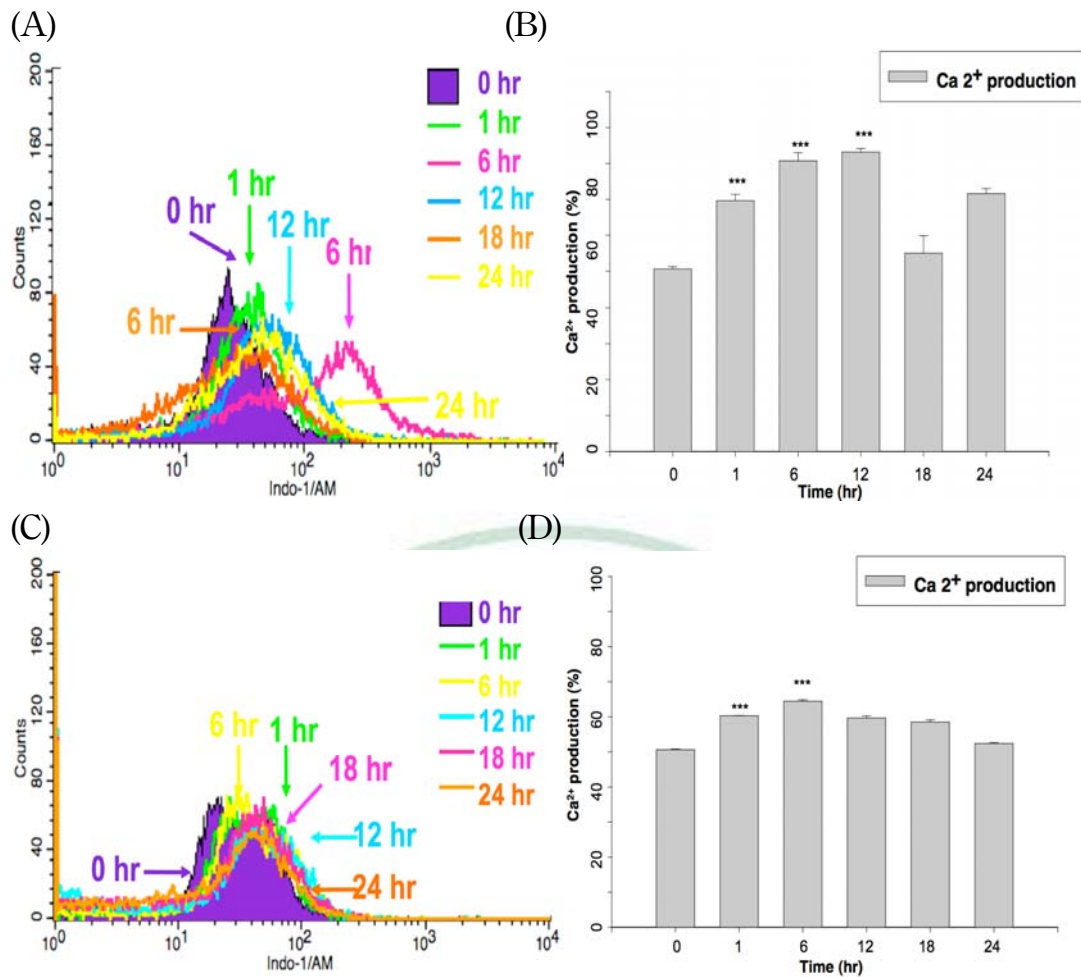


圖七、以流式細胞儀偵測 PA-42 誘導細胞粒線體膜電位之改變情形。(A)加入 1.56 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 處理後，其結果顯示在 24 小時的平均螢光強度明顯減弱到最低點，表示細胞之粒線體膜電位明顯下降，(B)為量化統計結果；(C)加入 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 處理後，其結果顯示在 18 小時的平均螢光強度明顯減弱到最低點，表示細胞之粒線體膜電位明顯下降，(D)數據結果分析以 unpaired Student's *t*-test 進行統計比較，各組以平均值±標準差表示，實驗組與控制組相比，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，*** 表示 $P < 0.001$ ，當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異。

第五節 以流式細胞儀分析 PA-42 誘導 HSC-3 細胞內鈣離子釋放情形

欲證明 PA-42 造成細胞凋亡與細胞內鈣離子的釋放有無關聯，我們先將培養好的細胞分別種入 6 孔培養盤上，放入符合培養條件之培養箱培養 24 小時後，將細胞取出並更置新鮮培養基，並加入濃度 1.56 及 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 的 PA-42 藥物，收集不同時間點處理之細胞，加入 Indo-1/AM 試劑，最後以流式細胞儀 (flow cytometry) 偵測細胞內鈣離子釋放情形。

其結果顯示加入 1.56 及 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 處理後，分別在 12 及 6 小時的平均螢光強度明顯增加到最高點，表示細胞內鈣離子明顯呈現較高濃度狀態 (圖八)。



圖八、以流式細胞儀檢測 PA-42 誘導細胞內鈣離子釋放情形。(A)加入 1.56 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 處理後，其結果顯示在 12 小時的平均螢光強度明顯增加到最高點，表示細胞內鈣離子明顯呈現較高濃度狀態，(B)為量化統計結果；(C)加入 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 處理後，其結果顯示在 6 小時的平均螢光強度明顯增加到最高點，表示細胞內鈣離子明顯呈現較高濃度狀態，(D)為量化統計結果。數據結果分析以 unpaired Student's *t*-test 進行統計比較，各組以平均值±標準差表示，實驗組與控制組相比，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，*** 表示 $P < 0.001$ ，當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異。

第六節 以 DAPI 細胞染色法分析 PA-42 對 HSC-3

細胞之染色質皺縮影響

藉由 DAPI 可以與細胞受損之 DNA 結合，利用螢光顯微鏡觀察染色質明顯有皺縮的現象。在實驗設計我們將人類口腔癌 HSC-3 細胞以不同濃度 (0.39~12.5 μ g/ml) PA-42 處理 24 小時後，利用 DAPI 染色法，在螢光顯微鏡下觀察染色質皺縮程度有濃度依循性 (圖九)。

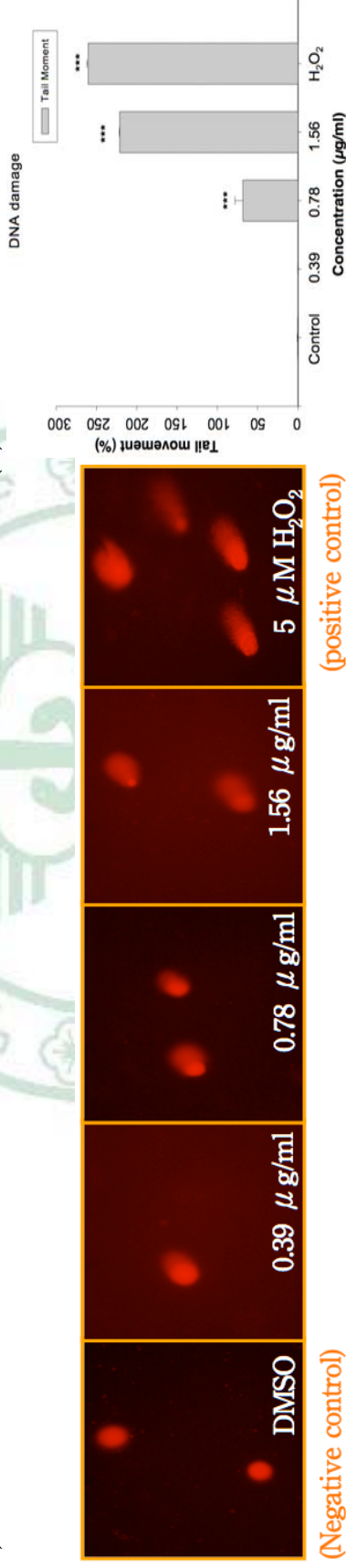
第七節 以單細胞凝膠電泳法分析 PA-42 對 HSC-3 細胞 DNA 損傷

檢視 PA-42 是否造成 DNA 損傷，在實驗設計我們將人類口腔癌 HSC-3 細胞依不同濃度 PA-42 刺激外，同時也利用 H_2O_2 及未加藥之組別處 24 小時，分別做為陽性與陰性對照組。結果在未給予 PA-42 處理的組別中，在顯微鏡視野下看到細胞呈現完整圓形，即 DNA 沒有受到損傷現象。而在給予 H_2O_2 的組別中我們可以看到細胞有明顯拖尾的現象(圖十A)。同時結果顯示當給予 PA-42 濃度不同時拖尾的現象也會依濃度的增加而有愈嚴重的現象 (圖十B)。因此顯示 PA-42 會造成人類口腔癌 HSC-3 細胞之 DNA 損傷。



圖九、以 DAPI 細胞染色法分析 PA-42 對 HSC-3 細胞之染色質皺縮影響。以不同濃度 (0.39~12.5 $\mu\text{g/ml}$) PA-42 處理 24 小時後，利用 DAPI 染色法，在螢光顯微鏡下觀察染色質皺縮程度有濃度依循性。

(A)

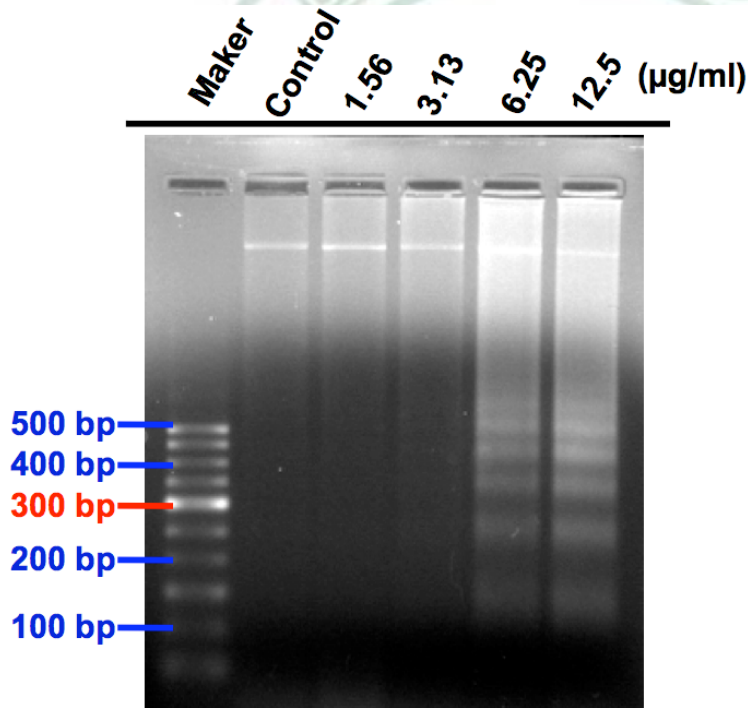


圖十、以單細胞凝膠電泳法分析 PA-42 對 HSC-3 細胞 DNA 損傷。(A) 以不同濃度 (0.39~1.56 $\mu\text{g/ml}$) PA-42 及 5 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 處理 24 小時後，用螢光顯微鏡觀察 DNA 損傷程度(B) 以 cometscore™ 分析細胞 DNA 拖尾程度，以 unpaired Student's *t*-test 進行統計，各組以平均值±標準差表示，實驗組與控制組相比，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，*** 表示 $P < 0.001$ ，當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異。

第八節 以 DNA 裂解電泳法分析 PA-42 對 HSC-3

細胞 DNA 裂解

當DNA損傷的情形產生時，通常也伴隨DNA裂解的形成。因此利用洋菜醣膠體電泳觀察DNA裂解表現。其結果說明給予依不同濃度PA-42 (1.56~12.5 $\mu\text{g/ml}$) 刺激並經 24 小時後，其DNA裂解表現明顯於6.25、12.5 $\mu\text{g/ml}$ (圖十一)。

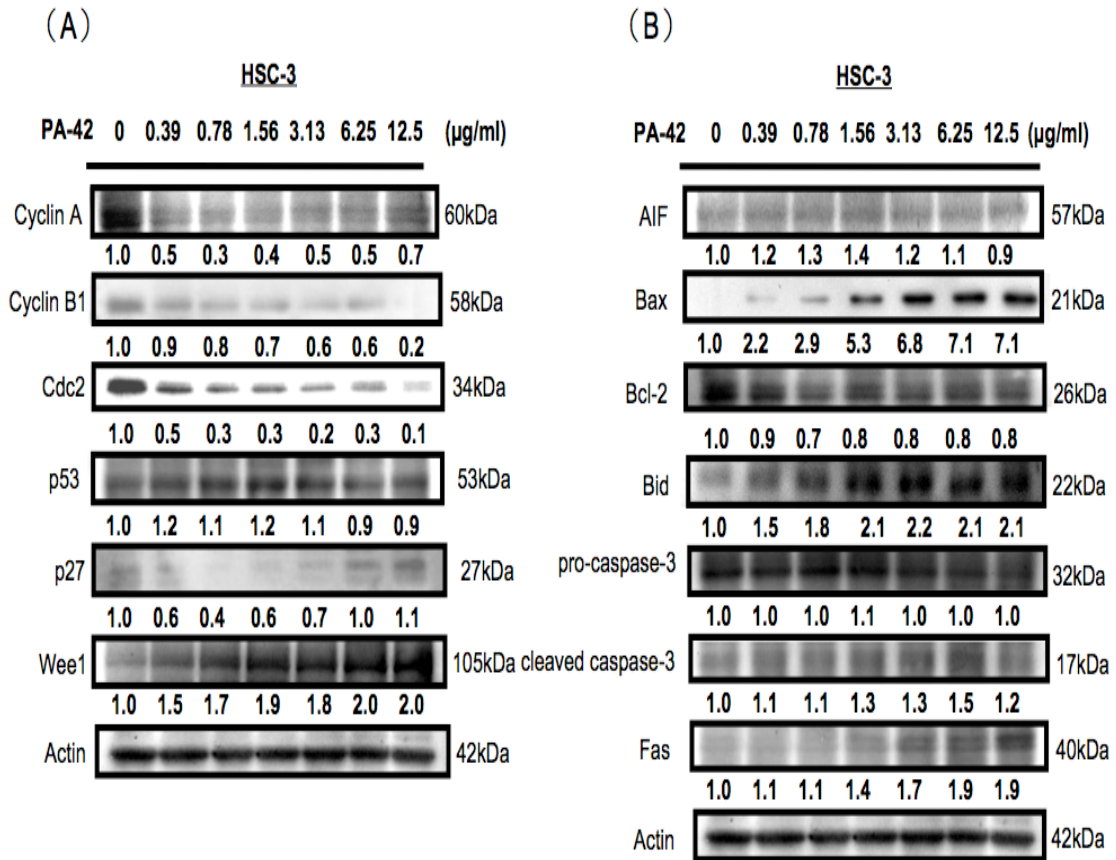


圖十一、以 DNA 裂解電泳法分析 PA-42 對 HSC-3 細胞 DNA 裂解。HSC-3 口腔癌細胞株以 1.56~12.5 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 處理 24 小時，收集其細胞 DNA，利用洋菜醣膠體電泳分析其 DNA 斷裂情形。其 DNA 裂解表現明顯於 6.25、12.5 $\mu\text{g/ml}$ 。

第九節 以西方點墨法分析 PA-42 誘導 HSC-3 細胞產生細胞週期停滯及細胞凋亡相關蛋白質表現

蛋白質為細胞內具有執行功能的分子，在整個訊息傳導，及細胞間的溝通都有賴於蛋白的作用。因此探討細胞週期停滯及細胞凋亡路徑中的相關性及其影響，我們利用西方點墨法來檢測相關蛋白質的表現。經西方點墨法於 β -actin 比對下檢測細胞週期中 G2/M 期停滯相關的 Cyclins (Cyclin B1、Cyclin A)、CDK (Cdc2) 及 Wee1、p53 蛋白表現，結果發現 6.25 μ g/ml PA-42 對 HSC-3 口腔癌細胞株抑制 Cyclin B1、Cyclin A、Cdc2 蛋白表現，增加 Wee1 蛋白表現；PA-42 在濃度 1.56 μ g/ml 時，增加 HSC-3 口腔癌細胞株 p53 蛋白表現 (圖十二A)。

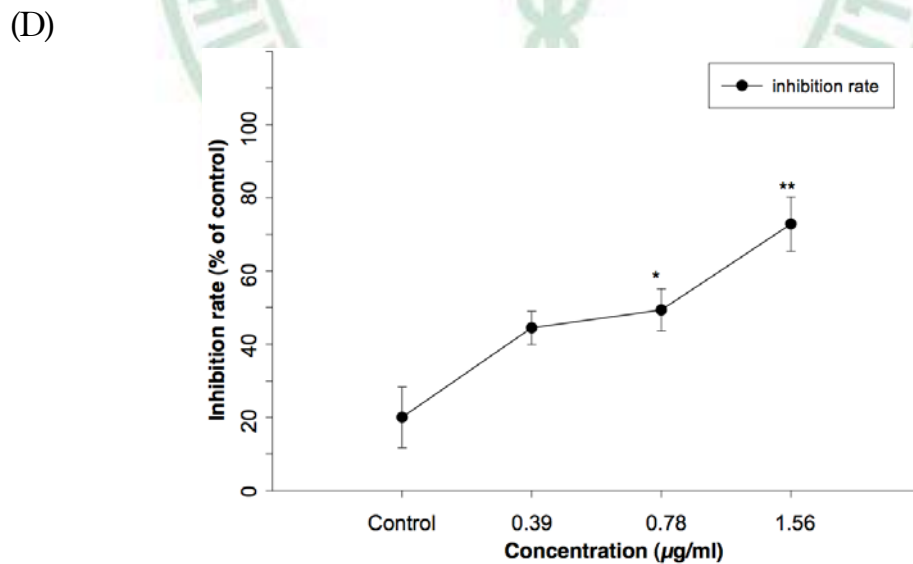
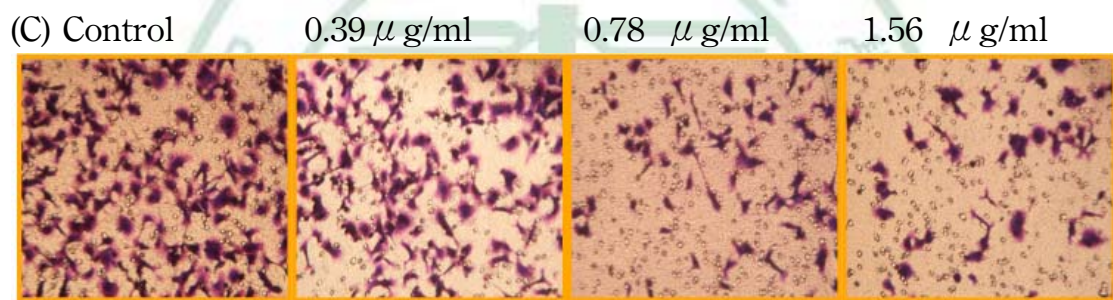
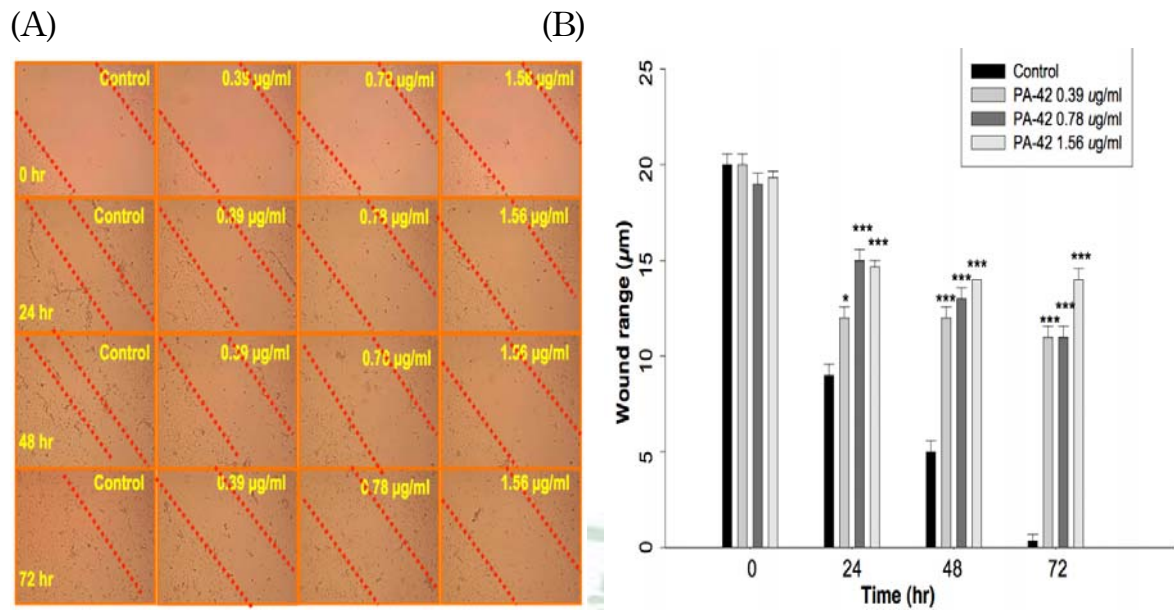
結果中顯示，在凋亡接受器 Fas 以及 cleaved caspase-3 表現量隨著時間增加都有上升的趨勢。而在粒線體凋亡路徑中我們發現 Bax、Bid 都是增加的情形。位在粒線體膜上的蛋白 AIF 隨著濃度增加表現上升，Bcl-2 表現量則降低 (圖十二B)。



圖十二、以西方點墨法分析 PA-42 誘導 HSC-3 細胞產生細胞週期停滯及細胞凋亡相關蛋白質表現。給予不同濃度 PA-42 處理 24 小時後，數據結果以 ImageJ 進行分析，各組實驗組與控制組相比。(A) 在 PA-42 1.56 μg/ml 時，增加 p53 表現量；而隨 PA-42 濃度升高，降低 Cyclin A、Cyclin B1 及 Cdc2，增加 Wee1 及 p27 表現量；(B) 增加 Bax、Bid、AIF、cleaved caspase-3 及 Fas 表現量，降低 Bcl-2。

第十節 以細胞轉移試驗分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞移動

我們將人類口腔癌 HSC-3 細胞以不含血清的培養培養基 24 小時，以 tip 製造缺口後，並給予不同濃度 (0.39、0.78 及 1.56 $\mu\text{g/ml}$) 之 PA-42 處理，再培養 24 小時，在相同視野下觀察缺口改變。我們發現給予不同濃度 PA-42 依濃度的增加，可以觀察到細胞轉移到缺口情形有受到抑制的結果 (圖十三A)，加以測量缺口寬度結果 (圖十三B)，並以 unpaired Student's *t*-test 進行統計比較，各組細胞以平均值士標準差表示，實驗組與控制組相比，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，*** 表示 $P < 0.001$ ，當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異；另外，使用 Transwell 將口腔癌 HSC-3 細胞培養於上層，我們發現給予不同濃度 PA-42，隨濃度增加，可以觀察到細胞轉移到下層情形有受到抑制 (圖十三C)，以 ImageJ 分析軟體進行細胞計數，並以 unpaired Student's *t*-test 進行統計比較，各組細胞以平均值士標準差表示，實驗組與控制組相比，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，*** 表示 $P < 0.001$ ，當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異 (圖十三D)。



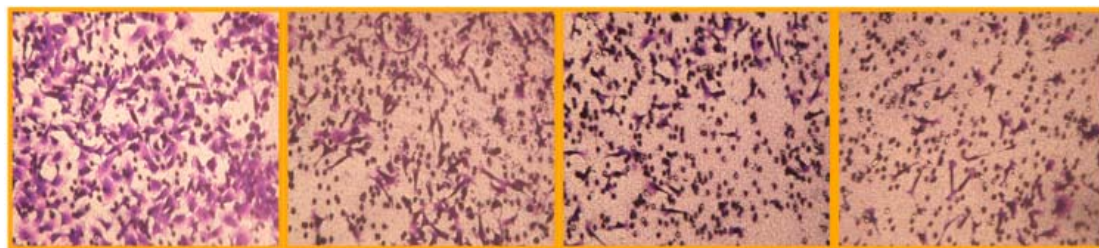
圖十三、以細胞轉移試驗分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞移動。(A)在相同視野下觀察缺口改變，隨 PA-42 濃度的增加，可以觀察到細胞轉移到缺口情形有受到抑制；(B)加以測量缺口寬度結果，並以

unpaired Student's *t*-test 進行統計比較，各組細胞以平均值±標準差表示，實驗組與控制組相比，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，*** 表示 $P < 0.001$ ，當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異；(C)使用 Transwell 將口腔癌 HSC-3 細胞培養於上層，隨 PA-42 濃度的增加，可以觀察到細胞轉移到下層情形減少；(D)以 ImageJ 分析軟體進行細胞計數，並以 unpaired Student's *t*-test 進行統計比較，各組細胞以平均值±標準差表示，實驗組與控制組相比，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，*** 表示 $P < 0.001$ ，當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異。

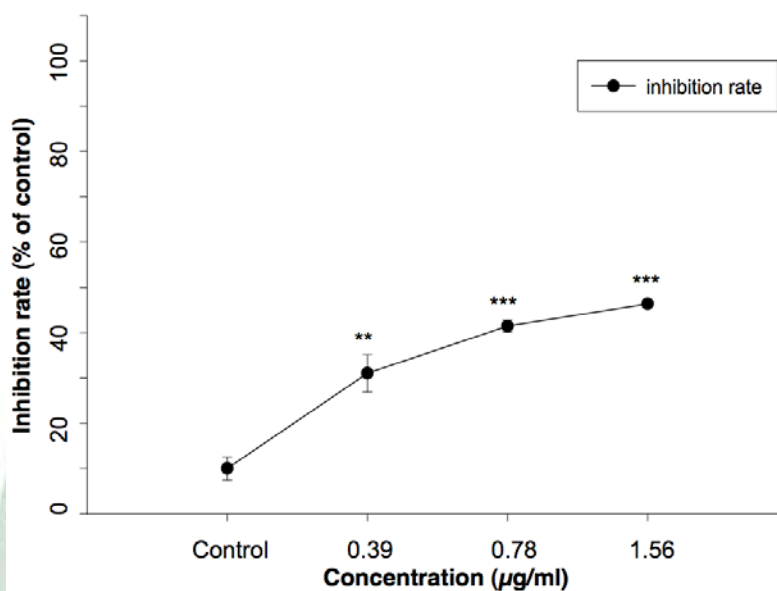
第十一節 以細胞侵襲試驗分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞侵襲

使用有先行覆蓋人工基質的 Transwell，將口腔癌 HSC-3 細胞培養於上層，依不同濃度 (0.39、0.78 及 1.56 $\mu\text{g/ml}$) 之 PA-42 處理培養 24 小時，隨 PA-42 濃度的增加，可以觀察到細胞侵襲到下層情形減少，並以 ImageJ 分析軟體進行細胞計數量化結果。

(A) Control 0.39 μ g/ml 0.78 μ g/ml 1.56 μ g/ml



(B)

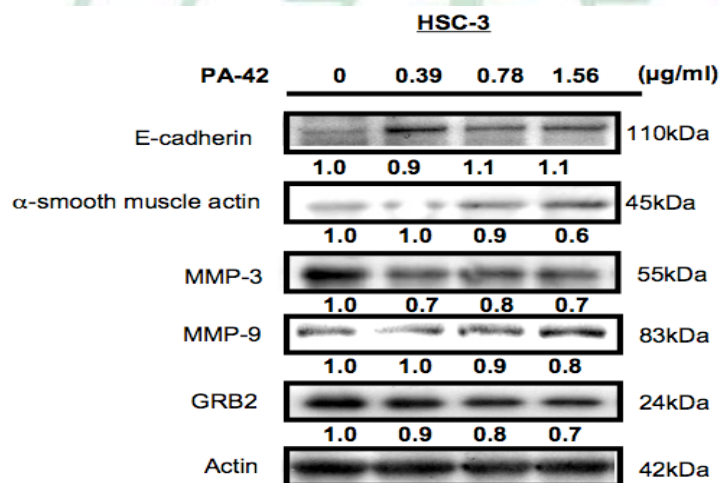


圖十四、以細胞侵襲試驗分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞侵襲。(A)使用有覆蓋人工基質的 Transwell，將 HSC-3 細胞培養於上層，隨 PA-42 濃度的增加，可以觀察到細胞侵襲到下層情形減少；(B)以 ImageJ 分析軟體進行細胞計數，並以 unpaired Student's *t*-test 進行統計比較，各組細胞以平均值±標準差表示，實驗組與控制組相比，* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ ，*** 表示 $P < 0.001$ ，當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異。

第十二節以西方點墨法分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞

轉移蛋白表現

口腔癌 HSC-3 細胞處理 0.39~1.56 μ g/ml PA-42，培養 24 小時，抽取細胞內蛋白質，利用西方點墨法分析相關蛋白表現方面，其實驗結果顯示 E-cadherin 的表現增加，而 α -smooth muscle actin 的表現減少；另外，基質金屬蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, MMPs) 中 MMP-3、MMP-9 及生長因子結合蛋白 (growth factor binding protein, GRB) 中 GRB2 表現量下降 (圖十五)。



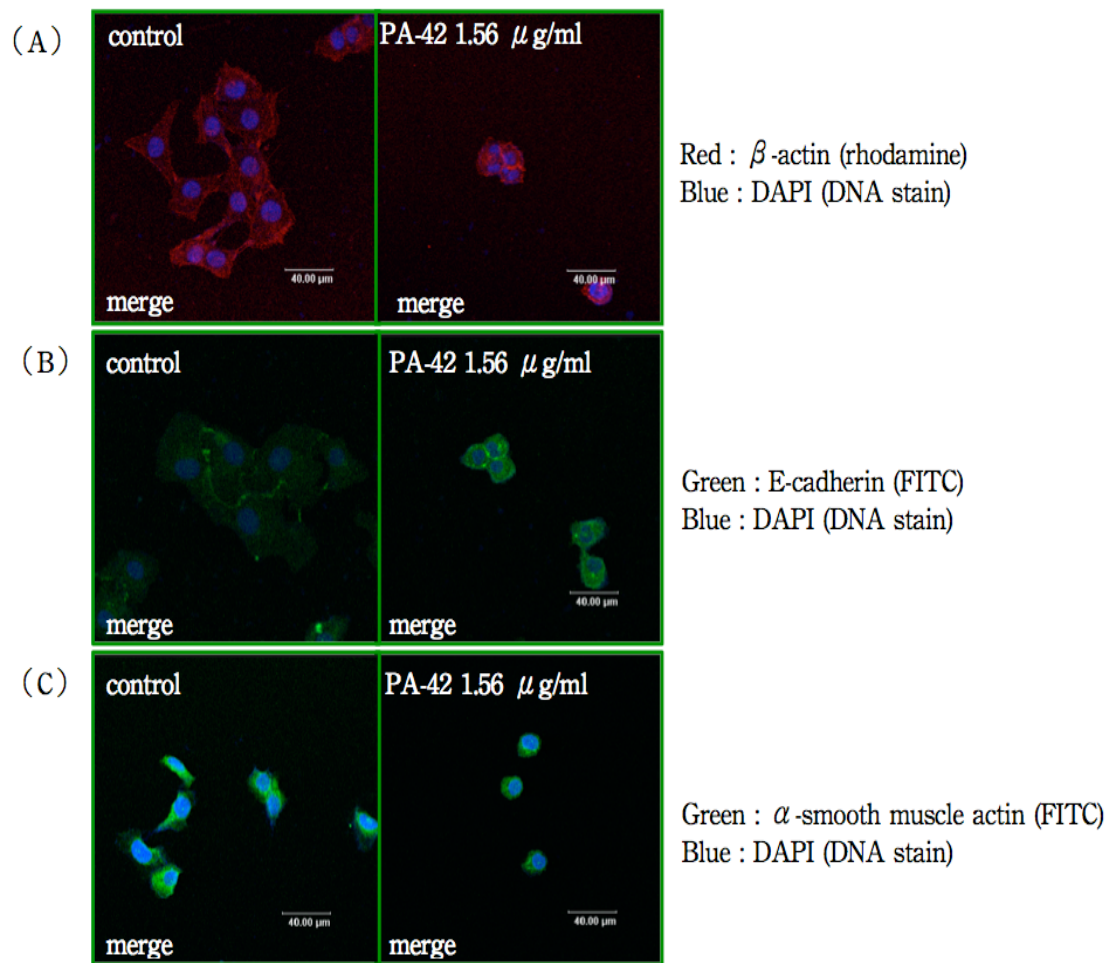
圖十五、以西方點墨法分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞轉移蛋白表現。

給予不同濃度 PA-42 處理 24 小時後，數據結果以 ImageJ 進行分析，各組實驗組與控制組相比。其實驗結果顯示，E-cadherin 的表現增加，而 α -smooth muscle actin、MMP-3、MMP-9 及 GRB2 表現量下降。

第十三節 以共軛焦顯微鏡分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞轉移蛋白表現

口腔癌 HSC-3 細胞處理 1.56 $\mu\text{g/ml}$ PA-42，培養 24 小時，利用免疫螢光技術，把螢光訊號直接呈現在細胞本身上，利用共軛焦顯微鏡進行觀察並拍照，其實驗結果，由 β -actin 的表現，觀察細胞骨架由間質細胞型 (mesenchymal-like) 反轉成上皮細胞型 (epithelial-like)；另外，E-cadherin 的表現增加，而 α -smooth muscle actin 的表現減少。





圖十六、以共軛焦顯微鏡分析 PA-42 抑制 HSC-3 細胞轉移蛋白表現。口腔癌 HSC-3 細胞處理 1.56 μ g/ml PA-42，培養 24 小時，(A) β -actin 的表現，觀察細胞骨架由間質細胞型 (mesenchymal-like) 反轉成上皮細胞型 (epithelial-like)；(B) E-cadherin 的表現增加；(C) α -smooth muscle actin 的表現減少。

第五章 討論

根據文獻指出，苦蕒成分抗腫瘤活性對多種人類腫瘤細胞株，如血癌³、子宮頸癌⁴、肺癌⁵、肝癌⁶及乳癌⁷，均有細胞毒性的反應。本次的研究，發現 PA-42 對人類口腔癌 HSC-3 細胞抑制作用也隨劑量與濃度增強。經 24、48 及 72 小時細胞培養後，PA-42 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 導致細胞無法貼壁現象，已經有明顯的抑制增殖作用與細胞數目明顯減少，細胞凋亡體產生，空泡化現象。以 MTT 細胞活性分析³³評估存活細胞數，發現 PA-42 對人類口腔癌 HSC-3 細胞，伴隨著濃度及時間增加有明顯的抑制效果。給予 0.39、0.78、1.56、3.13、6.25 及 12.5 $\mu\text{g/ml}$ PA-42，經 24 小時，分別取出細胞，利用 PI 染色，經流式細胞儀分析細胞週期³³改變的情形，於 3.13 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 時就發生細胞 G2/M 期停滯；於 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 時更加明顯，並且產生細胞凋亡的現象，其比例隨著濃度增加而明顯。

因此，確定 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 可以同時產生細胞 G2/M 期停滯與細胞凋亡表現，細胞存活率抑制約 50% (HSC-3 細胞以 PA-42 處理 24 小時的 IC_{50} 半數致死劑量濃度為 6.20 $\mu\text{g/ml}$)，接續後面實驗多以不同

濃度 PA-42 處理 24 小時來觀察。

經西方點墨法測定細胞週期相關蛋白質的影響，進而探討分子作用機轉。以西方點墨法於 β -actin 比對下測定發現，PA-42 對細胞週期中調控 G2/M 期進行的 Cyclin A/B1與 Cdc2 蛋白複合物¹⁹，具有抑制作用。測定與細胞週期中的 G2/M 期相關檢查點的相關因子及 G2/M 期相關的 CDKIs¹⁹，而隨 PA-42 藥物劑量升高，增加 Wee1 表現量，抑制 Cyclin A/B1與 Cdc2 蛋白複合物的活化¹⁹；另外，發現 1.56 μ g/ml PA-42 處理 24 小時後，增加 p53 表現量，但 p53 表現量則隨 PA-42 濃度升高卻有下降趨勢；因此，從上述結果，我們的結論苦蕒會誘導口腔癌細胞產生週期 G2/M 停滯: (1) p53 及 Wee1 的表現增加，Wee1 量增加，導致 Cdc2 無法去磷酸化而失去活性 抑制 Cdc2 活性；(2) Cyclin A/B1表現下降，與 Cdc2 形成複合物減少。

雖然已有許多研究發現，苦蕒對於多種癌細胞能抑制增生^{3、4、5、6、7}，但是能否有干擾細胞週期的運轉沒有詳細探討。於本研究中證明苦蕒對於人類口腔癌細胞，隨著濃度增加，細胞週期有 G2/M 期停滯。另一方面，在低濃度 1.56 μ g/ml PA-42 時，可觀察到 p53 蛋白表現量增加，反而隨 PA-42 濃度升高有下降趨勢，故推論 PA-42 可能最先起動

p53 蛋白，扮演著抑制 Cdc2 的角色和細胞 G2 期停滯， p53 也許是調控促使人類口腔癌細胞發生細胞週期停止在 G2/M 期的主要因子。

在正常細胞週期的運轉， Cdc2 要與 Cyclin A/B1 結合成複合物並去磷酸化才会有作用，具活性的 Cdc2 與 Cyclin A/B1 複合物，可以使細胞週期的 G2 期進入 M 期¹⁹。而導致 G2/M 滯留的控制因子就是細胞週期的檢查點 (check point)⁴³，也是由許多的蛋白所調控，其中， Wee1 促使檢查點 Cdc2 上的 Y-15 磷酸化，所以使細胞滯留 G2 期，無法進入 M 期¹⁹。而此論點跟我們結果吻合(圖十二)。

在實驗結果中，藉由單細胞凝膠電泳分析³⁸，給予 0.78 μ g/ml PA-42 後，觀察到代表 DNA 受損情形的彗星狀拖尾明顯，表示可導致口腔癌 HSC-3 細胞DNA受損(圖十)。故推論 PA-42 可能最先導致口腔癌 HSC-3 細胞 DNA 受損，隨即起動 p53 蛋白，扮演著抑制 Cdc2 的角色和細胞 G2 期停滯。

抑制細胞增生的機制，除了阻斷細胞週期之外，也會促進細胞凋亡機制²⁷，細胞凋亡與細胞壞死為兩種截然不同的細胞死亡型式。先前的研究中，歸納出誘導腫瘤細胞走向細胞凋亡的死亡途徑，可避免細胞發炎反應的發生，相較於誘導細胞壞死的途徑而言，可以表現出更佳的癌

症治療效果⁴²。在細胞凋亡中不容置疑的，在細胞粒線體膜電位扮演著一個重要的角色¹⁹。有時引起細胞凋亡的特徵與粒線體功能有著高度的相關性，包括有粒線體膜電位的下降¹⁹，及促細胞凋亡因子的釋放 (如 AIF等)¹⁹，進而促進相關 caspase 路徑活化使得細胞凋亡¹⁹。在實驗結果中，發現給予 PA-42 培養 24 小時，經流式細胞儀分析粒線體膜電位³⁴及細胞內鈣離子濃度³⁵，給予 1.56 及 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 處理口腔癌 HSC-3 細胞，分別在 12 及 6 小時，先觀察到 PA-42 導致細胞內鈣離子明顯呈現較高濃度 (圖八)，隨即，分別在 24 及 18 小時，PA-42 使粒線體膜電位下降，改變粒線體的安定(圖七)。

許多細胞凋亡的特徵已經被研究證實與細胞壞死有截然不同的表現，如凋亡小體的產生¹⁹、DNA 裂解¹⁹、染色體的皺縮¹⁹等；在實驗結果中，發現給予 PA-42 培養 24 小時，利用 PI 染色，經流式細胞儀分析細胞內 Sub-G1 的比例³³，給予 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 的口腔癌 HSC-3 細胞，可以看到 Sub-G1 的比例增加約 5%，統計已具差異性 (圖六)；經由DAPI細胞螢光染色分析³⁷觀察，給予 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 的口腔癌 HSC-3 細胞，確實可觀察代表染色質皺縮的螢光亮點增多 (圖九)；經由DNA 裂解電泳分析³⁷觀察，給予 6.25 $\mu\text{g/ml}$ PA-42 的口腔癌 HSC-3 細

胞，確實觀察到細胞凋亡特徵的 DNA 裂解形成明顯階梯狀(圖十一)。

細胞凋亡可能是透過兩條路徑被誘導，分別是由粒線體所誘發的內在路徑²⁴ 與死亡接受器所誘發的外在途徑²⁶。粒線體所引導的細胞凋亡反應，來自於 p53 蛋白活化 Bax 蛋白濃度所引起²⁰，然後啟動 caspase 的連串反應，使 pro-caspase-3 裂解活化為 cleaved caspase-3，導致細胞凋亡⁴⁴，同時， PA-42 影響及改變粒線體膜電位的安定，而促使粒線體釋放誘導因子 AIF²⁰，然後導致 DNA 斷裂²⁰及細胞凋亡¹⁹；另一方面，細胞表面的死亡接受器 Fas 是屬於腫瘤壞死因子受體 (TNFR) 家族的跨膜蛋白，啟動 caspase 的連串反應，使 pro-caspase-3 裂解活化 cleaved caspase-3，導致細胞凋亡⁴⁴(圖十二)。

在細胞轉移抑制方面，給予低劑量 1.56 μ g/ml PA-42 培養 24 小時後，經由細胞轉移試驗分析^{40、41}在光學微鏡下觀察口腔癌 HSC-3 細胞，細胞移動能力被 PA-42 藥物所抑制(圖十三)；另一方面，經由細胞侵襲試驗分析⁴¹在光學微鏡下觀察口腔癌 HSC-3 細胞，細胞侵襲能力亦被 PA-42 藥物所抑制(圖十四)。

在廣泛性的惡性腫瘤中，一般都可發現 MMPs 的表現²⁹。而轉移過程中游離的癌細會破壞細胞外基質基底膜(extracellular matrix, ECM)，則

是由基質金屬蛋白酶 (Matrix metalloproteinases , MMPs) 扮演著重要調控的腳色²⁹。實驗結果中，給予低劑量 1.56 μ g/ml PA-42，培養 24 小時後，經西方點墨法證實可以抑制口腔癌 HSC-3 細胞中 MMP-3 及 MMP-9 (圖十五)。

GRB2 (Growth factor receptor-bound 2, GRB2) 是一個廣泛表現蛋白，在與細胞表面的生長因子接受器 (growth factor receptors) 及 Ras 訊息路徑中提供重要連結，因此，其功能對於癌症形成很重要⁴⁵，除此之外，在細胞移動及血管新生過程中促成癌症增生、侵犯、轉移等功能，也扮演十分重要的功能⁴⁵。實驗結果中，給予低劑量 1.56 μ g/ml PA-42，培養 24 小時後，經西方點墨法證實可以抑制口腔癌 HSC-3 細胞中 GRB2 的表現(圖十五)。

癌細胞游出管腔，與管腔內皮基底膜的黏附是 E-cadherin 調控²⁸。另外，上皮細胞-間葉細胞轉變 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是胚胎發育的關鍵步驟，現在是對於腫瘤進展及癌症轉移也扮演重要步驟⁴⁶。當 EMT 活化時，原來呈圓形飽滿的表皮細胞會轉變成游離的細胞，且型態呈梭狀類似纖維組織母細胞 (fibroblast) 的細胞⁴⁰。

實驗結果中，給予低劑量 1.56 μ g/ml PA-42，培養 24 小時，在共

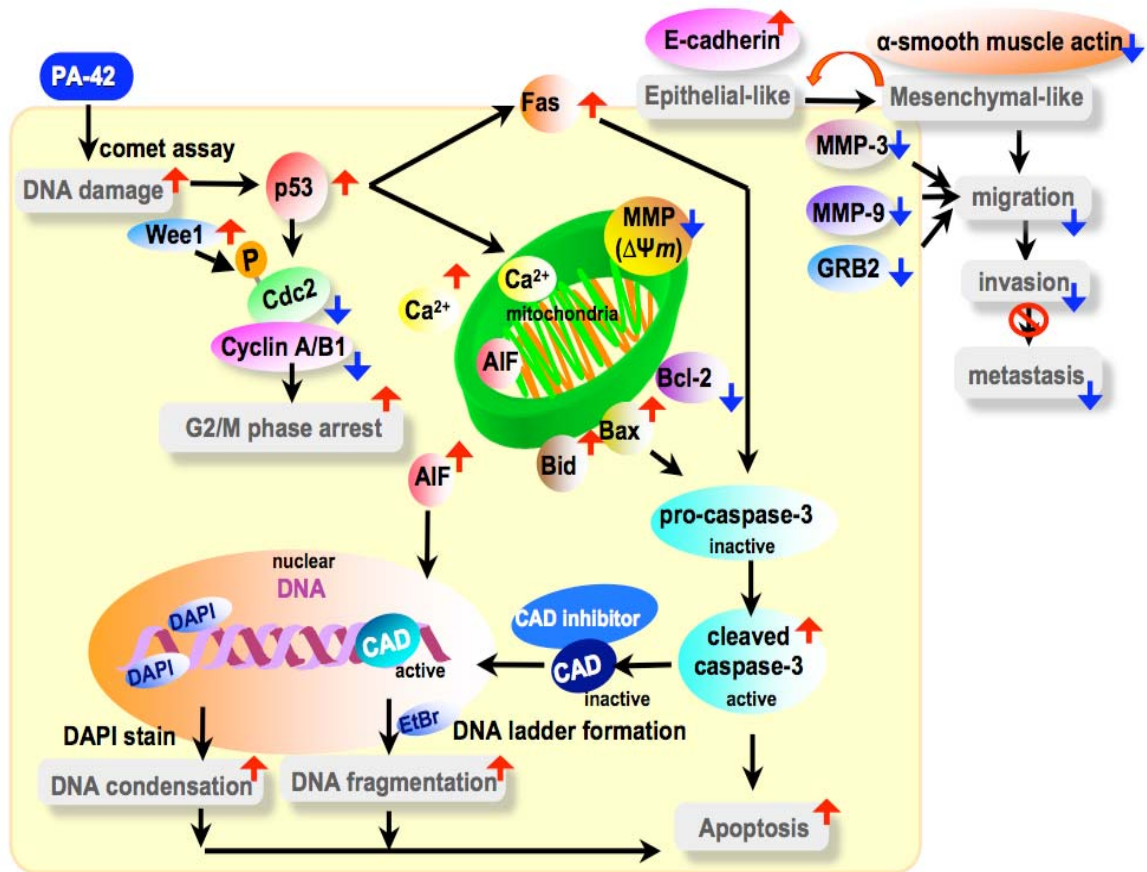
軛焦顯微鏡下觀察到 在共軛焦顯微鏡下觀察口腔癌 HSC-3 細胞中 epithelial marker (E-cadherin)⁴⁷及 mesenchymal marker (α -smooth muscle actin)⁴⁷的表現，發現 E-cadherin 增加及 α -smooth muscle actin 下降之結果，且觀察由細胞骨架 β -actin 所構成的細胞外觀，由間質細胞型 (mesenchymal-like) 反轉成上皮細胞型 (epithelial-like) (圖十六)；同時，以西方點墨法分析，PA-42 能夠增加 E-cadherin 的表現，並降低 α -smooth muscle actin 表現(圖十五)。



第六章 結論

綜合以上論點得知，PA-42 對於人類口腔癌細胞的抗癌角色與抑制轉移機轉，是經由引起 DNA 損傷，促使細胞內 p53 蛋白表現，並抑制細胞增生及造成細胞週期停滯；然而同時也促進經由死亡接受器 Fas 蛋白的表現，而活化與傳遞引發下游 pro-caspase-3 的裂解；以及 Bid 的活化與 Bax 作用，使粒線體上 AIF 及鈣離子釋放造成細胞凋亡的進行。

在抑制轉移機轉方面，PA-42 能夠降低 α -smooth muscle actin、MMP-3、MMP-9 及 GRB2 表現量，而增加 E-cadherin 的表現增加；同時，也在共軛焦顯微鏡下觀察到，與轉移表現蛋白 E-cadherin 增加及 α -smooth muscle actin 下降之結果，且細胞骨架 β -actin 由間質細胞 (mesenchymal-like) 反轉成上皮細胞型 (epithelial-like) 作用來達到抑制細胞轉移之結果。



圖十七、 PA-42 作用於人類口腔癌 HSC-3 細胞誘導細胞週期停滯與細胞凋亡，以及抑制細胞轉移作用機轉推論圖。

第七章 參考資料

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin.* 55 (2): 74-108 (2005)
2. Kler CG, Teknos TN, Islam M, Marcus B, Lee JS, Pan Q, Merajver SD. RhoC GTPase expression as a potential marker of lymph node metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 12(15): 4485-4490 (2006)
3. Chiang HC, Jaw SM, Chen PM. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro. *Anticancer Res.* 12(4): 1155-1162 (1992)
4. Chiang HC, Jaw SM, Chen CF, Kan WS. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata L.* *Anticancer Res.* 12(3): 837-843 (1992)
5. Lokshin A, Mayotte JE, Levitt ML. Mechanism of interferon beta-induced squamous differentiation and programmed cell death in human non-small-cell lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst.* 87(3): 206-212 (1995)
6. Wu SJ, Ng LT, Lin DL, Huang SN, Wang SS, Lin CC. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. *Cancer Lett.* 215(2): 199-208 (2004)

7. Hsieh WT, Huang KY, Lin HY, Chung JG. *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 44(7): 974-83 (2006)
8. Available at: <http://www.doh.gov.tw/statistic/index.htm>
9. de Silva GK, Jayamaha JM, Gabriel A. Pattern and prevalence of oral carcinoma in a surgical unit at cancer institute maharagama. *Ceylon Med J.* 40(4): 146-7 (1995)
10. Sobin, LH; Wittekind, CH, eds. 6th edn. New York: Wiley-Liss; 2002. UICC TNM Classification of Malignant Tumors.
11. Barasch A, Safford M and Eisenberg E. Oral cancer and oral effects of anticancer therapy. *Mt Sinai J Med.* 65(5-6): 370-377 (1998)
12. Scott S, McGurk M, Grunfeld E. Patient delay for potentially malignant oral symptoms. *Eur J Oral Sci.* 116(2): 141-147 (2008)
13. Day TA, Davis BK, Gillespie MB, Joe JK, Kibbey M, Martin-Harris B, Neville B, Richardson MS, Rosenzweig S, Sharma AK, Smith MM, Stewart S, Stuart RK. Oral cancer treatment. *Curr Treat Options Oncol.* 4(1): 27-41 (2003)
14. Reis L, Eisner M, Kosary C. Cancer statistics review, 1973-1998. Bethesda (MD): National Cancer Institute (2001)
15. Hoff PM, Pazdur R, Benner SE, Canetta R. UFT and leucovorin: a

- review of its clinical development and therapeutic potential in the oral treatment of cancer. *Anticancer Drugs*. 9(6): 479-490 (1998)
16. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol*. 105(1): 13-20 (1971)
17. Reed J C. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol*. 11:68-75 (1999)
18. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1): 57-70 (2000)
19. Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, Wong DT. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med*. 13(1): 51-61 (2002)
20. Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med*. 32(3): 125-38 (2003)
21. Porter LA, Donoghue DJ. Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog Cell Cycle Res*. 5:335-347 (2003)
22. Takizawa CG, Morgan DO. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol*. 12: 658-665 (2000)
23. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell

- cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways.
Nature 370: 650-652 (1994)
24. Zhaoyu Jin, Wafik S. El-Deiry. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 4(2): 139-163. Epub 2005 Feb 27 (2005)
25. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res.* 256(1): 42-49 (2000)
26. Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P, Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science.* 282:290-293 (1998)
27. Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27:199-214 (2003)
28. Jing Y, Sendurai AM, Robert AW. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res.* 66(9): 4549-4552 (2006)
29. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol.* 18:1135-1149 (2000)
30. Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:20-27 (2006)
31. Scurry WC Jr, Stack BC Jr. Role of metalloproteins in the clinical management of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.*

- 29(12): 1144-55 (2007)
32. Lee HS, Jung SH, Yun BS, Lee KW. Isolation of chebulic acid from *Terminalia chebula* Retz and its antioxidant effect in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol.* 81:211-218 (2007)
33. Chen HC, Hsieh WT, Chang WC, Chung JG. Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem Toxicol.* 42:1251-1257 (2004)
34. John GB, Shang Y, Li L, Renken C, Mannella CA, Selker JM, Rangell L, Bennett MJ, Zha J. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell.* 16:1543-1554 (2005)
35. Chen GZ, Luo BD, Chen XH, Zhao QP, Zou F, Li TL. Mechanism of Ca^{2+} on the hyperthermia-induced apoptosis of rat hippocampal neurons in vitro. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 23:185-187 (2005)
36. Ustundag Y, Bronk SF, Gores GJ. Proteasome inhibition-induces endoplasmic reticulum dysfunction and cell death of human cholangiocarcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 13:851-857 (2007)
37. Yin JQ, Shen JN, Su WW, Wang J, Huang G, Jin S, Guo QC, Zou CY, Li HM, Li FB. Bufalin induces apoptosis in human osteosarcoma U-2OS and U-2OS methotrexate 300-resistant cell lines. *Acta Pharmacol Sin.* 28: 712-720 (2007)
38. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A,

- Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 35:206-221 (2000)
39. Roberts EC, Hammond K, Traish AM, Resing KA, Ahn NG. Identification of G2/M targets for the MAP kinase pathway by functional proteomics. *Proteomics.* 6:4541-4553 (2006)
40. Lee TK, Poon RT, Wo JY, Ma S, Guan XY, Myers JN, Altevogt P, Yuen AP. Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappaB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res.* 67(18): 8800-9 (2007)
41. Shunsuke Kon, Kenji Tanabe, Toshio Watanabe, Hisataka Sabe, Masanobu Satake. Clathrin dependent endocytosis of E-cadherin is regulated by the Arf6GAP isoform SMAP1. *Exp Cell Res.* 314(7): 1415-28 (2008)
42. Cain K, Freathy C. Liver toxicity and apoptosis: role of TGF-beta1, cytochrome c and the apoptosome. *Toxicol Lett.* 120:307-315(2001)
43. Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC. Checkpoints in the Cell Cycle. *Nat Genet.* 30:285-289 (2002)
44. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687 (1998)
45. Dharmawardana PG, Peruzzi B, Giubellino A, Burke TR Jr, Bottaro

DP. Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy. *Anticancer Drugs*. 17(1):13-20 (2006)

46. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*. 17(5): 548-58 (2005)

47. Rees JR, Onwuegbusi BA, Save VE, Alderson D, Fitzgerald RC. In vivo and in vitro evidence for transforming growth factor-beta1-mediated epithelial to mesenchymal transition in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res*. 66(19): 9583-9590 (2006)

