



中國醫藥大學
醫學研究所
碩士學位論文

黃芩素誘導人類肝癌細胞 (J5) 細胞凋亡及
抑制細胞轉移之分子機轉

The molecular mechanisms of baicalein-induced apoptosis and metastasis in
human hepatoma J5 cells

指導教授： 郭秀滿 副教授

共同指導教授： 鍾景光 教授

研究生：蔡宏劼

中華民國九十六年七月

中文摘要

黃芩素是一種抗氧化劑，並且已被證明可引起人類癌細胞株的凋亡。然而，黃芩素對人類肝癌細胞（J5 cell line）引起的凋亡，其確切的分子機轉並不清楚。本研究中，我們利用流式細胞儀分析偵測細胞週期變化及細胞凋亡（apoptosis），並利用DAPI螢光染色法、彗星試驗、共軛焦顯微鏡與西方墨點法等技術探究其分子機制。結果顯示細胞週期停滯G₂/M期是經由cdc25c與cdc2進行磷酸化阻滯cdc2-cyclin B1複合物。細胞活性氧化物（ROS）、鈣離子濃度的上升與粒線體膜電位下降。在凋亡的探討也證實，黃芩素促使粒線體膜上凋亡誘導因子（AIF）及核酸內切酶G（Endo G）釋放出來，並造成DNA的斷裂。且細胞色素（cytochrome *c*）釋放，啟動粒線體凋亡路徑，下游caspase-9與caspase-3隨之被活化。在本文中，NAC（ROS抑制劑）可以降低ROS的產生，降低細胞的死亡率，證明細胞凋亡與ROS產生有關。黃芩素也造成細胞的氧化壓力（oxidative stress），促使鈣離子從內質網釋放出來，導致細胞內鈣離子平衡遭受破壞，產生內質網壓力，且GRP78與GADD153蛋白表現上升，活化下游路徑造成細胞凋亡。

癌細胞轉移侵襲過程中會透過基質金屬蛋白水解酶（matrix metalloproteinase, MMPs）降解細胞基質extracellular matrix（ECM）。由研究結果中指出，黃芩素抑制人類肝癌細胞的轉移，透過降低MMP-9的表現，可以抑制細胞的移動及細胞侵入，而達到抑制腫瘤轉移的目的。

英文摘要

Baicalein is an antioxidant and had been demonstrated to induce apoptosis in human cancer cell lines. However, the exact molecular mechanism of apoptosis induced by baicalein in human liver cancer J5 cells is unclear. In this study, we investigated the cell cycle arrest and apoptosis occurrence in J5 cells after exposed to baicalein by flow cytometry. We also used DAPI stain、comet assay、confocal and western blot to detect the mechanisms. The result from flow cytometric analysis demonstrated that caused G₂/M-phase arrest by phosphorylation cdc25c and cdc2 inhibit activity of cdc2-cyclin B1 complex. Flow cytometric analysis indicated that baicalein promoted the increase of reactive oxygen species (ROS) and Ca²⁺ in J5 cells. Baicalein also decreased the levels of mitochondrial membrane potential from J5 cells. We also detect cytochrome *c*、AIF and endo G release from mitochondria, indicated that baicalein elicited a significant increase of DNA fragmentation in J5 cells and promote the cell apoptosis. We also detect increase expression of caspase-9 and caspase-3. In this study, we also used NAC (ROS inhibitor) to decrease ROS and apoptosis generation. Baicalein cause oxidative stress production and Ca²⁺ release from ER and promote GADD153 and GRP78 expression.

Matrix metalloproteinase (MMPs), one of the families of enzymes that degrade the extracellular matrix (ECM), are considered to play an important role of tumor invasion and spread. We have demonstrated that baicalein inhibits the invasion of human liver cancers by suppressing MMP-9 expressions.

謝 辭

在這兩年期碩士生涯中，由衷地感謝指導老師鍾景光老師與郭秀滿副老師在學術研究上的啟蒙與教導，並給予我這寶貴的機會，讓從對實驗懵懂無知的我能進入研究的大門。亦承蒙方世華老師、林雅玲老師、劉昭君老師、吳禮宇老師、楊家欣老師等人的不吝指教，讓學生在實驗上及生活上獲益良多，還有醫學系辦麗如姐及阿蔡姐在生活上的協助及照顧，滿心的感謝你們。

此外感謝學長姐：翁悅珊、徐素琴、楊鈞隆、林祐瑄、呂孔文、何永鑽、郭子靖、蔣宜蒼等；以及同學：啟誠、婉文、昇輝、珊瑩、健航、日昇、士欣、建良、蕙俐、亦瑾等，無論在實驗上或是生活上都給予無私的教導與協助。特別是亭靜、凱螢、惠雯、依倩等學妹，他們細心的教導與要求，讓我的實驗結果更加嚴謹；以及學弟妹：若華、家琪、羿霖、長霖、舒婷、雅婷...等，熱心為我的實驗分勞。感謝鍾老師實驗室的所有成員，因大家都願意幫忙彼此，而且都不自私，幫助我度過許多難關，得以順利的完成這篇研究。在此祝福各位未來順利，並希望這美好傳統能永遠傳承下去。

最後，感謝神及我的父母親、親戚、兄弟姊妹們，因為有你們無盡關愛在背後支持著我，讓我得以克服困難並面對更大的挑戰，願將所有的成功與喜悅分享給你們。

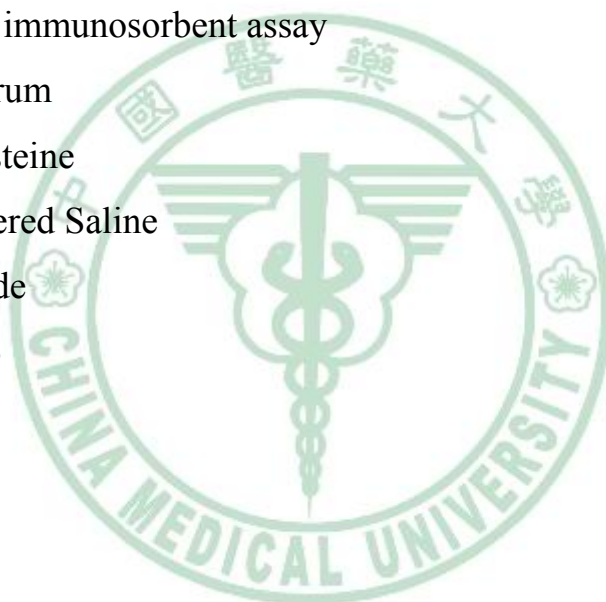
蔡宏劼 謹致於

中國醫藥大學 醫學研究所

中華民國九十六年七月

縮寫表

2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate	H ₂ DCFDA
3, 3'-dihexyloxocarbocyanine iodide	DioC6
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide	MTT
Acid acetoxymethyl ester	BAPTA/AM
Baicalein	BE
Dimethyl sulfoxide	DMSO
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM
Enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA
Fetal bovine serum	FBS
N-Acetyl-L-cysteine	NAC
Phosphate buffered Saline	PBS
Propidium iodide	PI
Rhodamine 123	Rh123



目 錄

頁次

目錄	v
圖目錄	viii
表目錄	x
第一章 前言	1
第一節 肝癌	2
第二節 黃芩素的藥理介紹	7
第三節 細胞週期	10
第四節 細胞凋亡	16
第五節 活性氧化物 (Reactive oxygen species ; ROS)	19
第二章 研究方法	20
第一節 研究材料	20
第二節 研究設計	24
第三節 研究方法	25
一、 冷凍細胞的活化	25
二、 細胞的冷凍保存	25
三、 細胞的培養	26
四、 藥品配製	27
五、 利用倒立式相位差顯微鏡檢測細胞形態的變化	28
六、 流式細胞儀分析測試	28
(一) 細胞存活率測定	29
(二) 細胞週期的影響	30
(三) 粒線體膜電位(MMP ; $\Delta\Psi_m$)的檢測	33
(四) 活性氧化物 (ROS) 的檢測	33
(五) 鈣離子釋放的檢測	34

(六) Caspase-3活性分析	35
(七) ROS抑制劑NAC(<i>N</i> -Acetyl-L-cysteine)的影響	36
七、 細胞內螢光染色	38
(一) DAPI (4',4'-diamidino-2-phenyl indole) 染色	38
(二) 彗星試驗 (comet assay)	39
八、 相關蛋白活性的表現	41
(一) 西方墨點法 (western blot)	41
九、 共軛焦顯微鏡 (confocal) 偵測凋亡蛋白的表現	47
十、 腫瘤轉移 (metastasis) 試驗	48
(一) 細胞移動試驗 (cell motility assay)	48
(二) 細胞侵入試驗 (cell invasion assay)	48
十一、 統計分析 (statistics analysis)	49
第三章 結果	50
第一節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) 形態的影響	50
第二節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) 存活率的影響	52
第三節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) 細胞週期的影響及 調控蛋白的變化	54
第四節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) 粒線體膜電位 (MMP ; $\Delta\Psi_m$) 的影響	57
第五節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) ROS的影響	59
第六節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) 鈣離子釋放 (calcium release) 之影響	61
第七節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) caspase-3活性的影響	63
第八節 ROS抑制劑NAC對經黃芩素處理人類肝癌細胞 (J5) ROS及存活率的影響	65

第九節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) DNA傷害的影響	67
第十節 共軛焦顯微鏡 (confocal) 探討粒線體內蛋白的表現	69
第十一節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) 移動及相關蛋白的影響	71
第十二節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) 細胞凋亡蛋白的影響	74
第四章 討論	77
第五章 結論	82
第六章 參考文獻及附錄	84
本校論文電子檔案上網授權書	



圖目錄

圖 1-1. 黃芩素的結構形狀	8
圖 1-2. 細胞週期圖	10
圖 1-3. Cyclin 的週期性變化	11
圖 1-4. 細胞週期檢查點	12
圖 1-5. Cell Cycle: G ₁ /S Checkpoint	13
圖 1-6. Cell Cycle: G ₂ /M Checkpoint	14
圖 1-7. 細胞凋亡與細胞壞死的形態區別	17
圖 2-1. 本實驗之研究架構	24
圖 2-2. DAPI 染劑與 DNA 雙股螺旋小溝 (minor groove) 鍵結	38
圖 2-3. 轉漬夾的三明治結構	46
圖 3-1-A. 以不同濃度黃芩素 (0、10、25、50、75、100 μ M) 培養人類肝癌細胞 (J5) 48 小時後形態的變化	51
圖 3-1-B. 人類肝癌細胞 (J5) 給予黃芩素 (75 μ M), 經不同 時間 (24、48、72 h) 培養後形態的變化	51
圖 3-2-A. 人類肝癌細胞 (J5) 以不同濃度黃芩素 (0、10、25、 50、75、100 μ M), 培養不同時間 (24、48、72 h) 存 活率	53
圖 3-2-B. 人類肝癌細胞 (J5) 以黃芩素 (75 μ M) 培養不同時 間 (6、12、24、48 h) 之存活率	53
圖 3-3-A. 人類肝癌細胞 (J5) 以不同濃度黃芩素 (0、10、25 、50、75、100 μ M) 培養 48 小時後細胞週期的變化	55
圖 3-3-B. 人類肝癌細胞 (J5) 以黃芩素 (75 μ M) 培養不同時 間 (6、12、24、48 h) 細胞週期的變化	55
圖 3-3-C. 人類肝癌細胞 (J5) 以黃芩素 (75 μ M) 培養不同時	

間 (6、12、24、48、72 h) 細胞週期調控蛋白的變化	56
圖 3-4. J5 細胞以黃芩素 (75 μ M) 培養不同時間後 MMP 的變化	58
圖 3-5. J5 細胞以黃芩素 (75 μ M) 培養不同時間後 ROS 的變化	60
圖 3-6. J5 細胞以黃芩素 (75 μ M) 培養不同時間後鈣離子釋放 之結果	62
圖 3-7. J5 細胞以黃芩素 (75 μ M) 培養不同時間後 caspase-3 的 活性的變化	64
圖 3-8-A. J5 細胞與黃芩素及 NAC 培養 6 小時後 ROS 的變化圖	66
圖 3-8-C. J5 細胞與黃芩素及 NAC 培養 24 小時存活率之結果	66
圖 3-9-A. 黃芩素與 J5 細胞培養 48 小時 DAPI 染色之觀	68
圖 3-9-B. 黃芩素對 J5 細胞培養 24 小時之 DNA 損傷分析	68
圖 3-10. 共軛焦顯微鏡探討粒線體內細胞凋亡蛋白 cytochrome <i>c</i> 、AIF、Endo G 之觀察	70
圖 3-11. 人類肝癌細胞 (J5) 以黃芩素不同濃度與不同時間 培養後轉移之影響	72
圖 3-12-A. 黃芩素對 J5 細胞相關凋亡蛋白的影響	75
圖 3-12-B. 黃芩素對 J5 細胞相關內質網蛋白的影響	76
圖 5-1. 黃芩素誘導 J5 細胞 G ₂ /M 期停滯與細胞凋亡總圖	83

表目錄

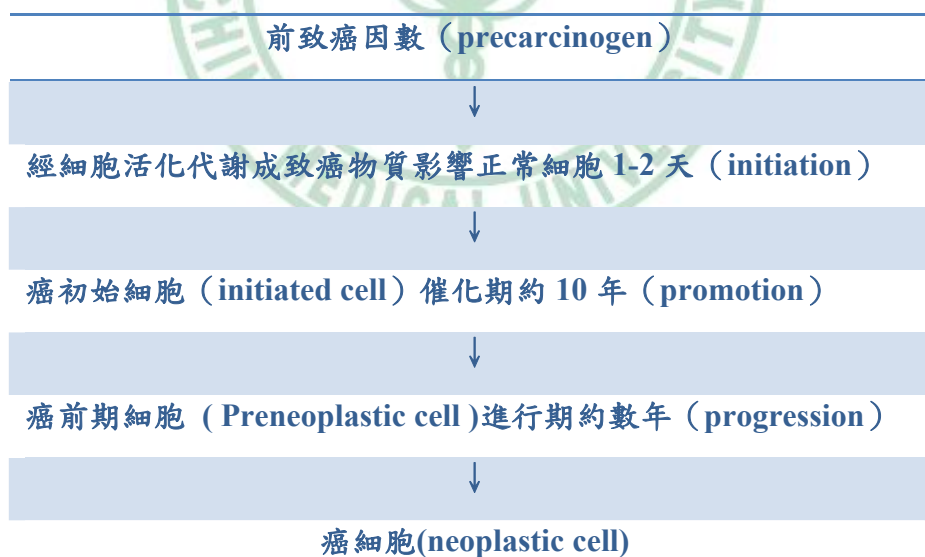
表1-1. 細胞致癌化過程	1
表1-2. 行政院衛生署發布95年十大死因排行榜	2
表1-3. 肝癌的分期	4
表1-4. 細胞凋亡與細胞壞死的生理區別	18
表 2-1. 黃芩素溶液之配製	28
表2-2. 存活率PI染劑之組成	32
表2-3. 細胞週期PI染劑之組成	32
表 2-4. 磷酸鹽緩衝鹽溶液 (PBS) 之組成	32
表2-5. NAC (分子量163.2) 溶液的配製	40
表 2-6. Comet assay 之 lysis buffer 配製	40
表 2-7. Alkaline buffer 之配製	40
表 2-8. Tris buffer 之配製	40
表 2-9. BSA 蛋白標準品的配製	41
表 2-10. 下層膠及上層膠的配製	43
表 2-11. 電泳緩衝液 (running buffer) 之組成	46
表 2-12. 轉印緩衝液 (transfer buffer) 之組成	46

第一章 前言

癌症目前為威脅人類健康的頭號敵人，雖然全世界各國都投入大量的資源進行研究，但仍存在許多困難：如許多化療藥物不能完全殲滅癌症細胞、對於一些轉移性及複發性的癌細胞發展出高度的抗藥性，造成治療的失敗。此外，透過血管新生的作用，癌細胞會經血行轉移至他處。致癌細胞快速擴散進而造成病人的死亡。

癌症的產生是因正常細胞基因變化而成，就目前所知有兩種基因與癌症的形成有關，其一是致癌基因（oncogene），另一種則是抑癌基因（suppressorgene）的缺失。癌症的產生常因環境中接觸前致癌因子（precarcinogen），將細胞活化、代謝形成致癌物質而影響正常細胞 DNA，促使致癌基因的活化或抑癌基因功能的喪失累積而成（表 1-1）。

表 1-1. 細胞致癌化過程



<http://www.canceraway.org.tw/Binformation/images/konw02.jpg>

第一節 肝癌

根據行政院衛生署統計數據顯示，自民國 71 年至民國 95 年，惡性腫瘤已連續 25 年蟬連臺灣地區死亡原因榜首⁽¹⁾（表 1-2），而年齡標準化死亡率逐年增加，其中每年有超過一萬人死於肝癌及相關疾病，近年雖被肺癌超越，在所有致死惡性疾病中退居第二。研究顯示，台灣至少有三百萬人為 B 型肝炎的帶原者，40 萬 C 肝帶原者，根據世界衛生組織，全球每年更有超過五十萬人死於原發性肝癌，而有多達 80% 的肝癌是亞洲 B 型肝炎所引起的，所以肝癌仍是傷害國人健康的頭號殺手之一⁽²⁾。

表 1-2. 行政院衛生署發布 95 年十大死因排行榜

全部十大死因排行	男性十大死因 排行	女性十大死因 排行	死亡人數 比率	癌症十大排名
1. 惡性腫瘤	惡性腫瘤	惡性腫瘤	28.1%	肺癌
2. 腦血管疾病	腦血管疾病	腦血管疾病	9.31%	肝癌
3. 心臟疾病	心臟疾病	糖尿病	9.1%	結腸直腸癌
4. 糖尿病	事故傷害	心臟疾病	7.2%	女性乳癌
5. 事故傷害	糖尿病	事故傷害	5.9%	胃癌
6. 慢性肝病及肝硬化	慢性肝病及肝硬化	腎炎、腎徵候群	4.0%	口腔癌（含口咽）
7. 肺炎	肺炎	肺炎	3.7%	攝護腺癌
8. 腎炎、腎徵候群	腎炎、腎徵候群 及腎變性病	慢性肝病 及肝硬化	3.5%	子宮頸癌
9. 自殺	自殺	自殺	3.3%	食道癌
10. 高血壓性疾病	結核病	高血壓性疾病 2	1.3%	胰臟癌

一、流行病學

全球每年有超過一百萬人死於肝癌及相關疾病，在亞洲感染 B 型肝炎的人口約佔全球的 75%，研究顯示約有 80% 慢性 B 型肝炎患者容易發展為肝癌。由肝炎及癌症的發生率隨著年齡增加而增加，且有年齡標準化下降的趨勢，依不同的地區也有不同的發生率。且肝癌是一種實質性的惡性腫瘤，癌症發生初期並無特殊徵兆，會出現上腹部不舒服、食慾差、容易疲勞等，若能及早發現有很高的治癒率。環境中容易發生相互間傳染、感染，而大多數人不知自己是否為肝病患者或帶原者，造成醫療的死角，又患病初期因為不容易發現，當發現硬塊的病灶時，大都進入到癌症末期了，因腫瘤浸潤轉移的特性，異位癌復發率高，治療不易，就算進行化學治療及手術切除，病人也只剩下幾個月的壽命。

二、病因學與病理生理學

肝癌的發生有 80% 來自 B 肝，國家衛生研究院與成大醫院發現 B 肝致癌機轉與 Pre-S 的突變蛋白有關，10 年內轉成肝癌的機率達到 56%，其罹癌機率是沒有突變蛋白的 3.5 倍⁽³⁾。而台灣又是 B 肝盛行的區域，國人飲食中易食用含黃麴毒素污染物、亞硝酸鹽[與胺類形成具強烈毒性的致癌物質的亞硝胺(nitrosamines)]，再加上酒、煙、避孕藥、微量元素等因素協同致癌作用而導致。此外，肝癌的發生還與 α -胎兒蛋白(α -fetoprotein; AFP)的調控失常有關，AFP 可用於診斷肝癌的指標⁽⁴⁾。

肝癌的組織類型有三種，分為肝細胞型、膽管細胞型和混合型肝癌⁽⁵⁾。其中肝細胞型肝癌占 90%，混合型肝癌為肝細胞癌及膽管細胞型並存或呈過渡型態，但不多見。

三、臨床表徵

(一) 症狀

初期的肝癌通常沒有明顯的症狀，常因患者本身不知道自己是否為帶原者，往往在晚期，或當局部症狀明顯時才被診斷出來，因此增加治療的困難度，所以定期檢查是很重要的。腫瘤初期只能靠影像檢查來偵測，而肝臟邊緣可能堅硬而不規則，肝腫大也可能發生，常見的症狀如肝區疼痛、肝腫大、黃疸，嚴重時，伴隨著腸胃道出血、肝衰竭、腫瘤破裂出血等症狀。

(二) 癌的分期

在台灣其實沒有明顯的分期標準，在臨床手術治療上，依據 TNM 系統及 AJCC/ UICC (美國腫瘤聯合會/國際抗癌聯盟) 原發性肝癌的分期法，將肝癌分成六期 (表 1-3)。

表 1-3. 肝癌的分期

TNM	UICC -2003
Stage 0	
Stage I	T1、N0、M0
Stage II	T2、N0、M0
Stage III A	T3、N0、M0
Stage III B	T4、N0、M0
Stage III C	T1~3、N1、M0
Stage IV	T1~4、N1、M1

註：T0 期表示沒有原發腫瘤的證據。T1 期表示單個腫瘤結節，無血管侵潤。T2 期表示單個腫瘤結節，並伴隨血管侵潤；或多個腫

瘤結節，最大徑均 ≤ 5 cm。T3 期表示多個腫瘤結節，最大徑 > 5 cm；或腫瘤侵犯門靜脈或肝靜脈的主要分支。T4 期表示腫瘤直接侵犯除膽囊以外的附近臟器；或穿破內臟腹膜。N0 期表示無局部淋巴結轉移。N1 期表示有局部淋巴結轉移。M0 無遠處轉移 M1 有遠處轉移，包括不同肺葉散播和除前斜角肌窩、鎖骨上區淋巴結轉移以外的其他部位的淋巴結轉移⁽⁶⁾。

(三) 診斷

若是出現上述症狀，最好能安排進一步的診斷，經由詳細的檢查，如：電腦斷層掃描 (Computed tomography；CT) 或核磁共振 (Magnetic resonance imaging；MRI) 確認肝腫瘤的發現，再加上 α -胎兒蛋白 (α -AFP) 的測定，若高於 500 ng/dl 或大於 200 ng/dl 持續兩個月以上，幾乎可以診斷為肝癌。其他的檢查如腹部超音波掃描或血管造影法等也可以幫忙確定診斷。

四、醫療現況及癌症治療的方法

治療肝癌的方法包括局部治療、全身性系統治療、多重複合療法、中藥治療等。

(一) 局部治療

包括開刀、放射治療、血管栓塞治療及局部腫瘤內注射治療。其中臨床上肝癌的治療仍以手術為主，若伴隨有肝硬化、嚴重黃疸或腹水等併發症，此類的病人並不適用外科切除的方式治療，可開刀者僅佔 15%；手術癒後不佳，其復發率約有 40%。肝腫瘤手術切除可能可以治癒肝癌，五年存活率可以超過 30% 以上。雖以侵入性的方式治療處理，但仍無法有效地對抗此一疾病⁽²⁾。

(二) 全身性系統治療

包括化學藥物、荷爾蒙及免疫治療。其中在化學藥物的治療上，

因腫瘤特異性及對藥物產生抗藥性，肝癌治療亦面臨了挑戰。目前所使用的抗癌藥仍以 5-氟尿嘧啶（5-FU）為主，治療肝細胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）的效果較獲得肯定，而另外絲裂黴素 C、阿黴素、表阿黴素也用於肝癌的化學治療，但其敏感性不高、效果不佳、副作用大，化學治療對肝癌而言成效不彰。免疫治療藥物輔酶 Q10 搭配抗癌藥物應用，可增強抗癌藥物的療效，減輕抗癌藥物的副作用。腫瘤壞死因子（TNF），分為 TNF- α 、TNF- β 兩種，體內應用時可引起腫瘤壞死，體積縮小甚至消失，體外試驗對腫瘤細胞有毒性，但對正常細胞無毒性。

（三）多重複合療法

目前較先進的療法都是合併局部治療及全身治療，在不同時間來組合，稱為「多重複合療法」。

（四）中藥治療

肝癌的中藥治療可調節機體免疫狀態，有利於綜合治療。例如小柴胡湯、龍膽瀉肝湯等中藥方劑，對肝病及肝癌有很好的治療效果。

什麼是最適當的治療方式，仍沒有很明確有效的方法，將視個體癌細胞的生物特性而有很大的差異性。所以，尋求一個能有效且安全的治療藥或是能預防手術後再發的有效藥物乃首要之務。

第二節 黃芩素的藥理介紹

自從1985年，發現利用太平洋紫杉萃取物紅豆杉醇(paclitaxel)，可作為治療肺癌⁽⁷⁾和乳癌⁽⁸⁾之應用，為醫學抗癌治療開闢一條嶄新的道路。植物中所含的化學成分，在生物體內往往具有不同的生物活性，隨著生化及分子醫學的進步，得以更深入探討藥物抗癌的作用機轉，以期在臨床上的應用與治療。

一、黃芩素的藥性及臨床用途

素有「藥中肯綮，如鼓應桴」的黃芩具有多種藥理作用，主要是因黃芩根含五種黃酮成分，包括黃芩素 (Baicalein)、黃芩甙 (Baicalin)、漢黃芩素 (Wogonin)、漢黃芩甙 (Wogonoside)、和黃芩新素 (Neobaicalein) 等。具有抗氧化⁽⁹⁾、清除自由基⁽¹⁰⁾、抗發炎⁽¹¹⁾、抗病毒等作用，此外黃芩素也可以降低心肌細胞的氧化壓力^(12, 13)，並對心、腦血管^(14, 15)、神經系統⁽¹⁶⁾等均有保護作用，同時也具有抗腫瘤活性。

二、黃芩素的化學特性^(17, 18)

(一) 來源：唇形科 Labiatae 植物黃芩 *Scutellaria baicalensis* GEORGI 的根，滇黃芩 *S. amoena* C. H. Wright 的根。

(二) 英文名：Baicalein

(三) 化學名：5,6,7-trihydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one;
5,6,7-trihydroxyflavone

(四) 異名：黃芩苷元；黃芩甙元；黃芩黃素；5,6,7-三羥基黃酮

(五) 分子式及分子量

$C_{15}H_{10}O_5$: mol. wt. 270.24

(七) 化學結構：(圖 1-1)

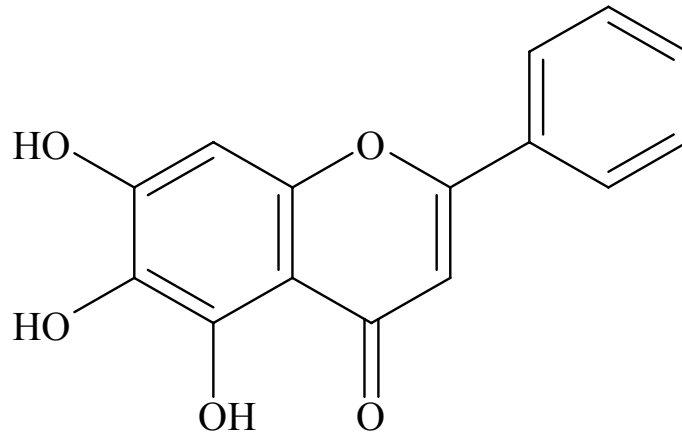


圖 1-1. 黃芩素的結構形狀

(八) 物理性質

分解點 264~265 °C (經乙醇再結晶得黃色針狀結晶)。

UV λ_{\max} (log ϵ) nm : 324, 276 (4.18, 4.42)。

可溶於乙醇、甲醇、乙醚、丙酮、乙酸乙酯和熱冰醋酸，微溶於硝基苯，幾乎不溶於水。溶於稀氫氧化鈉呈綠棕色，濃硫酸呈黃色並顯綠色螢光。遇光、遇熱易被氧化轉為 quinone 類衍生物而呈綠色。

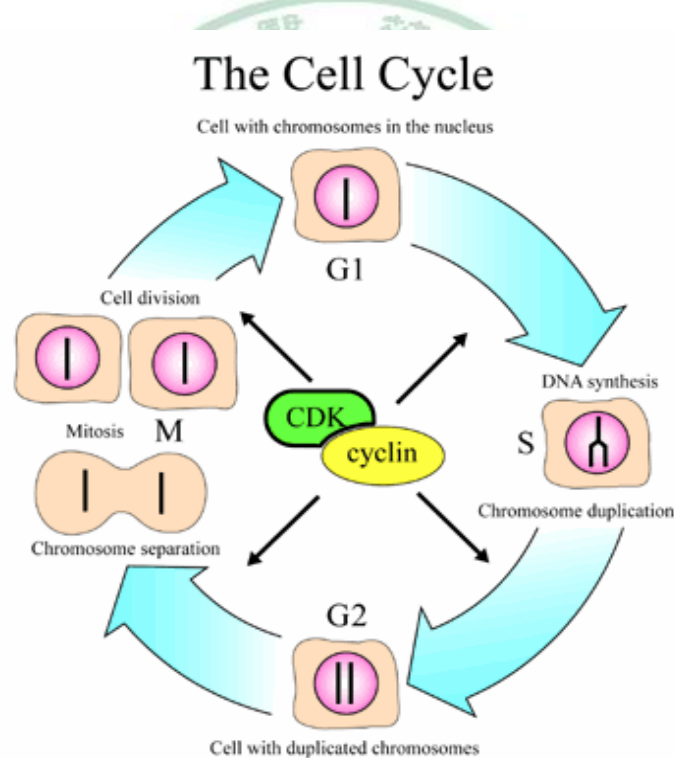
在人類血癌細胞 (HL-60 cells) 證實黃芩素引起細胞凋亡是經由產生活性氧 (ROS) 造成粒腺體訊號傳遞路徑的功能不良⁽¹⁹⁾。在人臍靜脈內皮細胞 (HUVECs) 亦證實黃芩素可以抗血管增生並抑制內皮細胞的增生轉移與分化經由降低 MMP-2 的活性⁽²⁰⁾。在多發性骨髓瘤 (MPC-1- immature myeloma cells) 證實黃芩素是經由降低 IL-6 跟 XIAP 基因表現並透過活化 caspase-9 and caspase-3 的路徑走向細胞凋亡⁽²¹⁾。黃芩素誘導人類肺纖維組織母細胞 (PBMCs) 跟免疫細胞走向細胞凋亡⁽²²⁾。研究上很多研究報告指出在前列腺癌 (DU145、PC-3)，大腸癌 (Caco-2) 與乳癌 (MDA-MB-435 and MCF-7) 黃芩素也可以抑制生長並導致細胞凋亡⁽²³⁻²⁵⁾。又黃芩素對肝癌細胞有很高的抗癌潛力⁽²⁶⁾，在人類肝癌 (Hep3B、HepG2) 亦證明黃芩素透過細胞週期停滯抑制細胞的生長是經由粒腺體路徑引發細胞凋亡^(27, 28)。

黃芩素是一個很有潛力的抗癌藥，但是，黃芩素對人類肝癌細胞（J5）的抗癌作用機制，還不是很清楚，因此本實驗探討黃芩素是否可以抑制人類肝癌細胞（J5）的生長及其凋亡分子機轉。



第三節 細胞週期

細胞週期包含四個階段，第一階段（G₁）為複製前期，細胞代謝活化，複製胞器以及一些細胞質的組成，提供第二階段（S）複製期複製染色體使用，此時細胞核內的去氧核糖核酸（DNA）、染色體會合成複製另一套染色體；到了第三階段（G₂）複製後期，細胞會檢查其複製工程是否完備，如果複製完成，就進入第四階段（M）有絲分裂期，是一個連續變化過程，由一個母細胞分裂成為兩個子細胞。分裂後的細胞有些會進入 G₀ 期，細胞暫不分裂呈休眠狀態，受刺激可重新進入 G₁ 期，複製及預備下一階段分裂所需物質⁽²⁹⁾。



http://nobelprize.org/nobel_prizes

圖 1-2. 細胞週期圖

一、週期調控蛋白

與細胞週期調控有關的細胞週期基因（cell division cycle gene；cdc），分為細胞週期蛋白（cyclin）、細胞週期蛋白依存性激酶（cyclin

dependent kinase ; CDK) 與細胞週期蛋白依存性激酶抑制劑 (cyclin dependent kinase inhibitor ; CKI) 三大類。細胞本身可以精確地調控週期素的表現，週期的前進由誘導訊息途徑的生長因子控制；而抑制蛋白可以抑制週期素的表現或在不同階段阻斷週期素前進所需的訊息。

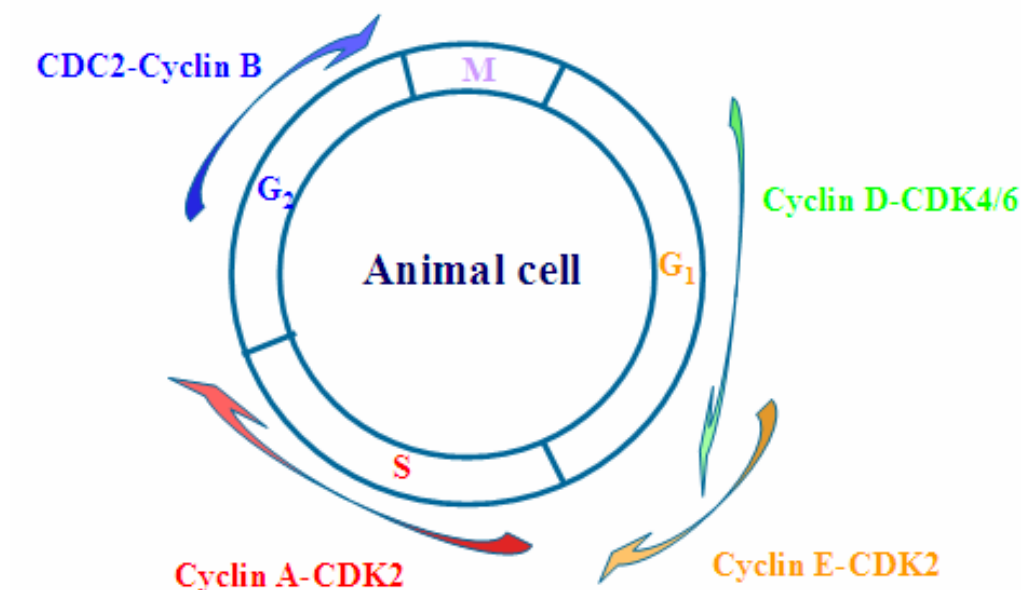


圖 1-3. Cyclin 的週期性變化

(一) CDK

CDK是一類依賴cyclin的蛋白激酶⁽³⁰⁾，CDK2可分別與cyclin E、cyclin A和cyclin D結合，分別在G₁/S期、S期和G₂期持續發揮作用(圖1-3)。研究說明細胞由G₁期進入S期需要cyclin E及CDK2的共同參與，當細胞進入S期後，cyclin E降解，CDK2轉而與cyclin A結合，促使細胞由S期越過限制點進入G₂期⁽³¹⁾。

CDC2 與細胞週期蛋白結合才具有激酶的活性，因此 CDC2 又被稱為 CDK1。研究說明活化的 CDK1-cyclin B 可將細胞週期 G₂ 期推入到 M 期。

(二) CKI

細胞週期蛋白依存性激酶抑制因子（CDK inhibitor, CKI）對細胞週期起負調控作用，分為兩大家族^(32, 33)：

1. Ink4 (Inhibitor of cdk 4)，如 p16^{ink4a}、p15^{ink4b}、p18^{ink4c}、p19^{ink4d}，特異性抑制 CDK4/cyclin D1、CDK6/cyclin D1 複合物⁽³⁴⁾。

2. Kip (Kinase inhibition protein)：包括 p21^{kip1} (cyclin inhibition protein 1)、p27^{kip1} (kinase inhibition protein 1)、p57^{kip2} 等，能抑制大多數 CDK 的激酶活性。

P21 幾乎能抑制所有的 cyclin-CDK 複合體，如：cyclin E-CDK2、cyclin D-CDK4、cyclin A-CDK2 等⁽³⁵⁾。大量增加之 p21 蛋白，一方面和週期素依存激酶及週期素之複合體接觸，另一方面直接抑制 DNA 的合成，而抑制細胞週期前進。

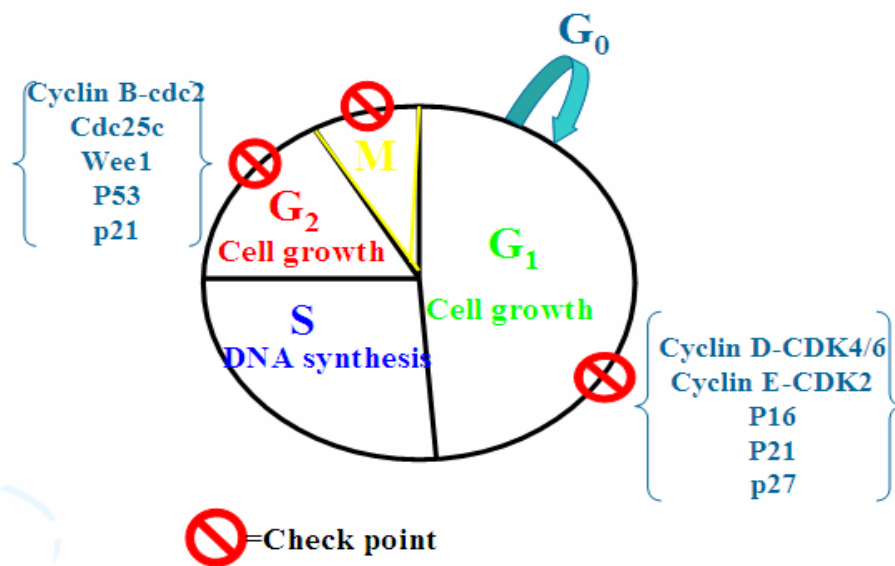


圖1-4. 細胞週期檢查點

二、細胞週期檢驗點

Leland Hartwell 提出了『check point，檢查點』的觀念^(36, 37)（圖 1-4），得知細胞週期的運行，是在一系列稱為檢驗點（check point）的嚴格檢控下進行的。由圖知道在真核細胞的細胞週期中，共有三個檢查點，若 DNA 有受損，細胞有自然的機制察覺，停止細胞生長的

週期，待 DNA 修復完畢，再進入下一階段。這樣的機制，確保細胞分化是依照正確的順序進行，若 DNA 無法修復，細胞則會進行細胞凋亡或死亡⁽³⁸⁾。

P53 是一種腫瘤抑制蛋白⁽³⁹⁾，會在 DNA 損壞、細胞不正常時大量出現，它會抑制 CDK 和週期素複合體的作用，使細胞週期停滯進行修復，若細胞無法修復，則會啟動凋亡機制，使細胞走向死亡；p53 腫瘤抑制因子的活性如果喪失，往往會導致腫瘤的形成⁽⁴⁰⁾。

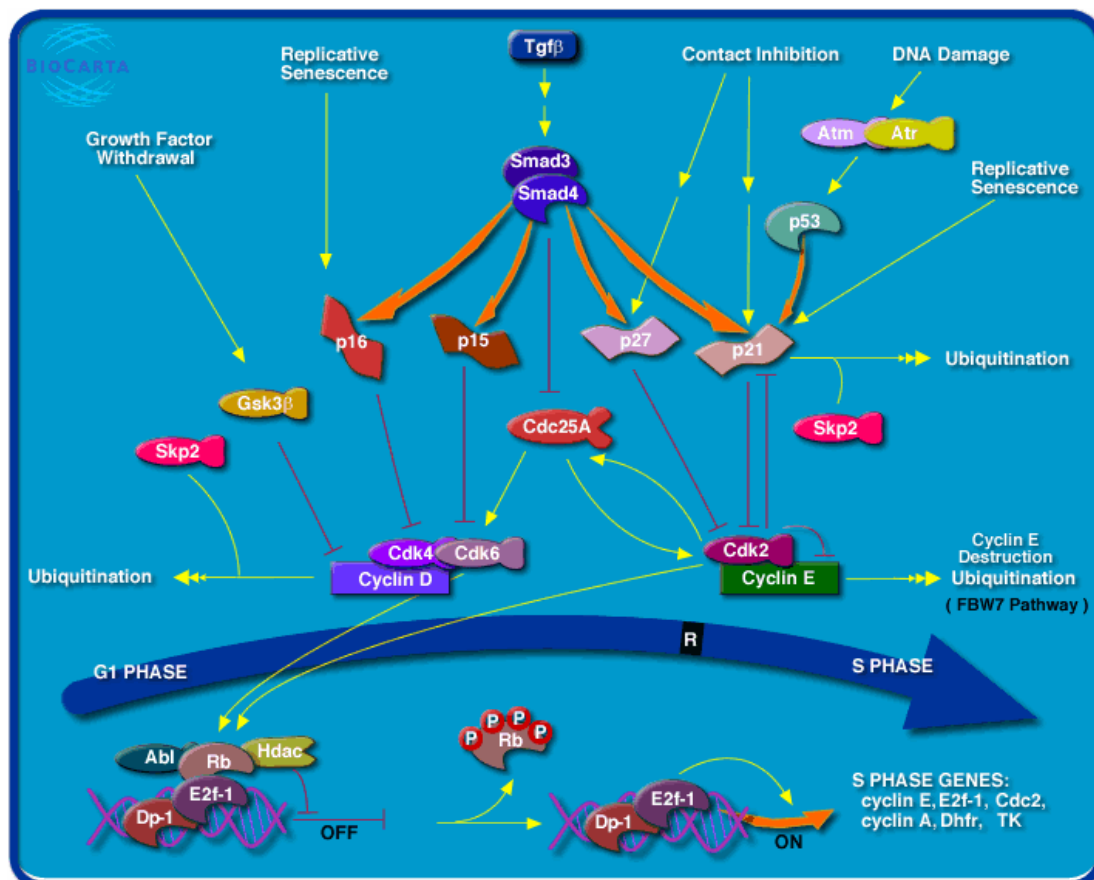


圖 1-5. Cell Cycle: G1/S Check Point

<http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/>

(一) G₁ checkpoint :

第一個檢查點在 G₁ phase 的晚期，也就是要進入 S phase 前的檢查點，稱之為 G₁ Checkpoint，它主要檢查細胞的大小、營養、生長因子，以及 DNA 是否受損。處於 G₀ 期的細胞在生長因子 (mitogen

activated protein kinase ; MAPK) 的刺激下，G₁ 早期 cyclin D 表達，並與 CDK4/6 結合，幫助活化 cyclin E-CDK2 複合物，被活化的 cyclin E-CDK2 複合物使 Rb 蛋白質磷酸化，釋放出轉錄因子 E2F⁽⁴¹⁾，促進許多基因的轉錄，如編碼 cyclin E、A 和 CDK1 的基因，使得 DNA polymerase 的合成增加，加速 DNA 合成，進入 S 期⁽⁴²⁾。在 G₁ 晚期 cyclin E 與 CDK2 結合，調控細胞越過 G₁ 期限限制點(check point) (圖 1-5) ^(43, 44)。

P21 與 p27 是能和 cyclin 及 CDK 結合，藉由活化 cyclin D-dependent kinase，使 cyclin D 活化，或是抑制 cyclin E-CDK2 活性，使 RB 去磷酸化而不能進入 S 期，停滯於 G₁ 期，使細胞生長停止⁽⁴⁵⁾。

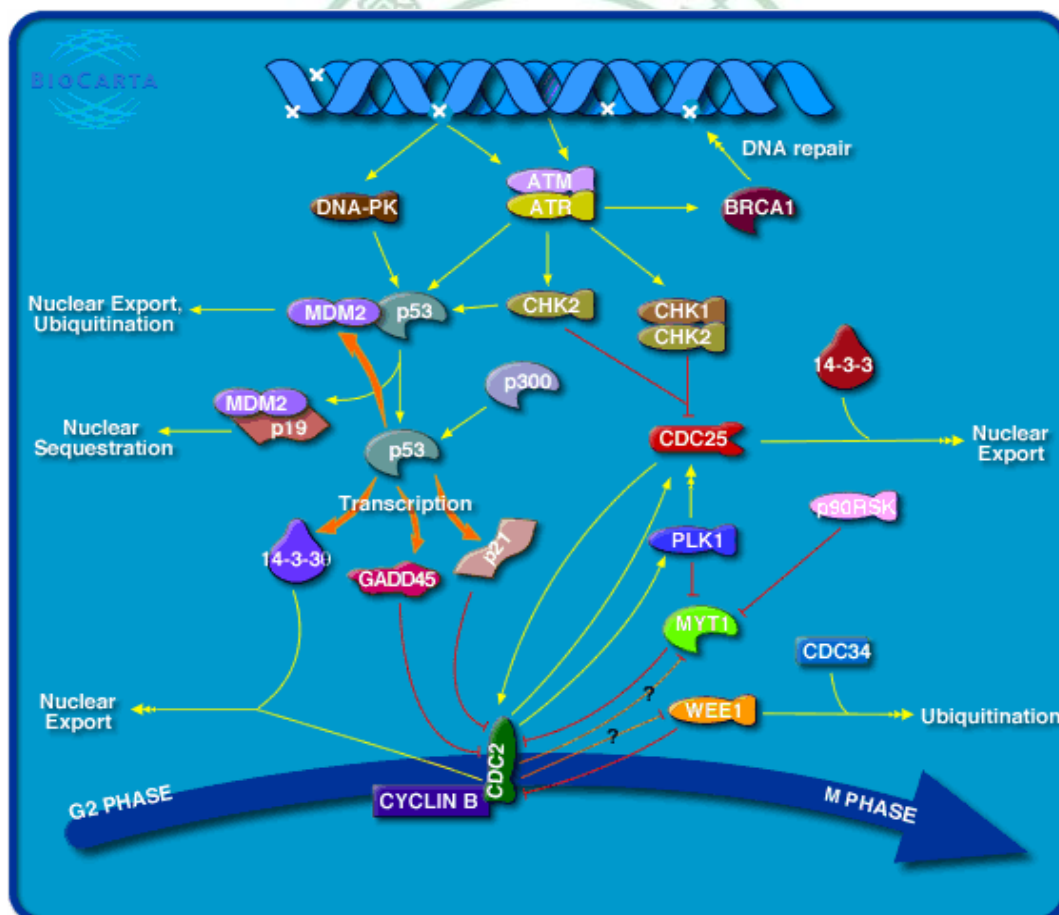


圖 1-6. Cell Cycle: G2/M Checkpoint

<http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/>

(二) G₂ checkpoint :

第二個檢查點在 G₂ 的晚期，也就是要進入 M 前的檢查點，稱之為 G₂ Checkpoint，它主要檢查細胞的大小和 DNA 的複製過程是否完全。參與 G₂ 期的 checkpoint 的細胞週期素(cyclins)有 cyclin A、cyclin B1，細胞週期依賴性激酶 (cyclin dependent kinases, CDK)、wee1 kinase、chk2 kinase、cdk1 (cdc2)、cdc25c，此外 cyclin dependent kinase inhibitors (CKIs) 有 p21、p27。

ATM (ataxia telangiectasia-mutated gene) 是與 DNA 損傷檢驗有關的一個重要基因。ATM 編碼一個蛋白激酶，結合在損傷的 DNA 上，能將蛋白磷酸化，停滯細胞週期。其信號通路有二，其一是啟動 Chk1 (checkpoint kinase) 引起 cdc 25 的 Ser²¹⁶ 磷酸化，通過抑制 cdc 25 的活性，抑制 CDK1 的活性，使細胞週期中斷。其二是啟動 Chk2，使 p53 被磷酸化而啟動，導致 p21 的表達，p21 抑制 CDK1 (cdc2) 的活性，從而使細胞週期停滯。活化的 chk2 能與 cdc25 的 216-serine 結合位結合，並使其磷酸化而失活。cdc25 的磷酸化及 wee1 kinase 於 cdc2 進行磷酸化阻滯 cdc2-cyclin B1 複合物的活化，從而阻滯細胞進入 M 期 (圖 1-6)。

(三) M phase checkpoint :

在 M phase 的過程中也有一個檢查點，稱之為 Spindle Assembly Checkpoint，它主要檢查染色體是否附著在紡垂體 (spindle) 上⁽⁴⁶⁾。

第四節 細胞凋亡

一、細胞凋亡的概念

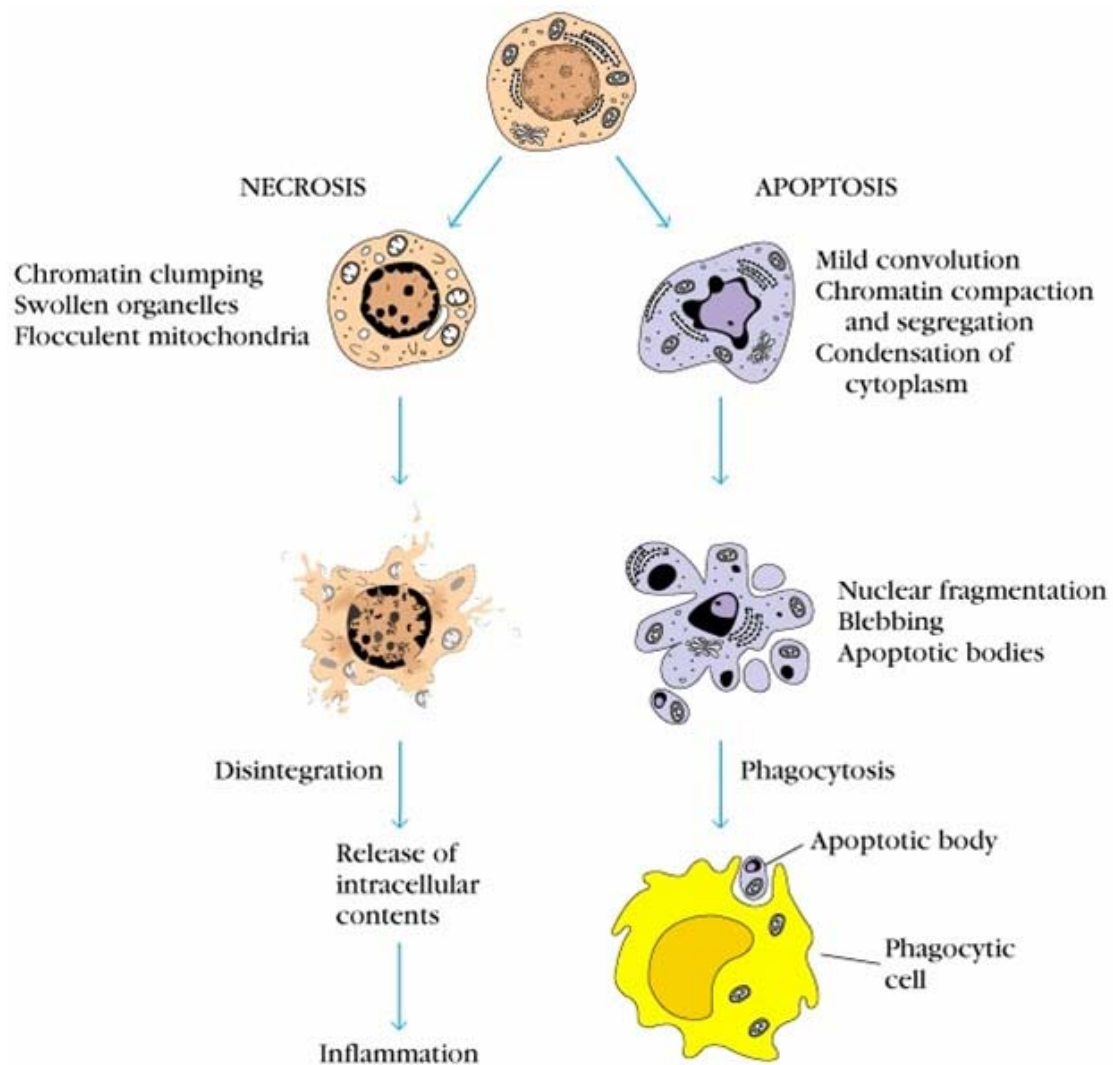
細胞凋亡 (cell apoptosis) 是借用古希臘語，細胞像秋天的樹葉一樣凋落的死亡方式⁽⁴⁷⁾。在 1972 年由病理學家 Kerr 等人，首先提出了有別於傳統細胞壞死 (necrosis) 的細胞特徵的概念，叫做細胞凋亡⁽⁴⁸⁾。在此之前，胚胎學家已觀察到動物發育過程中存在著細胞程式性死亡 (programmed cell death, PCD) 現象⁽⁴⁹⁾，它是胚胎正常發育所必需的。近年來 PCD 和細胞凋亡常被做為同義詞使用，兩者其實是有差異性的⁽⁵⁰⁾。PCD 是一個功能性概念，指在一個多細胞生物體中，某些細胞的死亡是個體發育中一個預定的，並受到嚴密的管控⁽⁵¹⁾；而凋亡是一個形態學概念，是與細胞壞死不同的⁽⁵²⁾死亡方式，是種受到基因控制的細胞死亡形式。第二，PCD 的最終結果是細胞凋亡，但細胞凋亡並非都是程式化的，可能是正常細胞受到外來傷害或產生突變時，生物體也會自動引起細胞凋亡的機制使突變的細胞死亡，避免突變基因的遺傳，藉以保護細胞的穩定。因此細胞凋亡在生物體內扮演相當重要的角色。

細胞凋亡的形態學特徵，一般可以分為早期 (early state) 跟晚期 (late state)。在細胞凋亡早期形態變得不規則，會出現染色質濃縮 (chromatin condensation)、細胞質濃縮 (cytosol condensation)、細胞皺縮等特徵⁽⁵²⁾；在晚期，因細胞核的崩解斷裂最後分解成許多具有完整細胞膜的凋亡小體 (apoptotic bodies)⁽⁵³⁾。由於凋亡小體細胞膜完整，分解後有毒物質並不會釋放出來，因此可避免週遭組織的發炎和傷害。凋亡小體很快會被週遭的吞噬細胞 (phagocytes) 或其他細胞吸收 (圖 1-7)。

有別於細胞凋亡的細胞死亡，稱為細胞壞死 (necrosis)。細胞壞

死也會發生在同群細胞或大片組織，同樣分為兩期，在細胞壞死早期細胞通透性發生改變而膨脹，到了晚期則會使細胞膜破裂並造成溶體（lysosome），釋放出各種分解酵素和細胞激素（cytokines）等物質，而使週遭組織受傷引起發炎反應（圖 1-7）。

細胞凋亡與壞死，不只形態上有差別，還有許多生理上的區別，其分別如下（表 1-4）。



www.bioon.com/biology/cellular/40103.shtml

圖 1-7. 細胞凋亡與細胞壞死的形態區別

表 1-4. 細胞凋亡與細胞壞死的生理區別^(52, 53)

區別點	細胞凋亡	細胞壞死
起因	生理或病理性，特異性	病理性，非特異性
範圍	少數細胞	成群細胞或組織
細胞膜	完整	破裂
染色質	凝聚在核膜下呈半月狀	呈絮狀
細胞器	仍具功能	腫脹、內質網崩解
細胞體積	皺縮變小	腫脹變大
凋亡小體	有，被鄰近細胞或巨噬細胞吞噬	無，細胞自溶，殘餘碎片被巨噬細胞吞噬
基因組 DNA	降解，電泳圖譜呈梯狀	隨機降解，電泳圖譜呈塗抹狀
蛋白質合成	有	無
調節過程	受基因調控	被動進行
炎症反應	無，不釋放細胞內容物	有，釋放內容物。

第五節 活性氧化物 (Reactive oxygen species ; ROS)

ROS，即 superoxide anion、radicals、hydrogen、peroxides 等，由細胞代謝反應而產生⁽⁵⁴⁾，近年文獻指出 ROS 與細胞凋亡有關，並指出主要是由粒線體產生⁽⁵⁵⁾，粒線體會釋放細胞凋亡誘導因子 (AIF)、內切酶 (Endo G) 裂解 DNA，且釋放 cytochrome *c* 誘導 caspase 活化⁽⁵⁶⁾；當大量的 ROS 產生，造成粒線體膜電位的改變，使得位於膜上的 cytochrome *c* 釋放出來，引發下游反應，活化 caspase-9 與 caspase-3，進而導致 apoptosis^(57, 58)。且指出 ROS 可以調節粒線體鈣離子的平衡⁽⁵⁹⁾，當鈣離子失調，會造成內質網壓力 (Endoplasmic Reticulum stress ; ER stress)，造成細胞死亡⁽⁶⁰⁾。產生的 ROS 會造成胞膜的破壞，並可引起細胞內鈣離子重新分佈和細胞外鈣離子的內流。致細胞內持續的鈣離子水準升高，造成細胞毒性⁽⁶¹⁾，活化下游路徑走向細胞凋亡。為了避免氧化壓力對細胞造成氧化傷害 (oxidative stress)，細胞的抗氧化防禦系統 (antioxidant defense systems) 會啟動⁽⁶²⁾，包含非酵素抗氧化劑 (non-enzymatic antioxidant) glutathion、thioredoxine 及酵素抗氧化劑 (enzymatic antioxidant) catalase、Cu/Zn SOD、Mn SOD 等⁽⁶³⁾。近來也有研究 Bcl-2 蛋白是 ROS 的清除劑，當粒線體膜上 bcl-2 基因大量表現時，會清除 ROS，並抑制細胞凋亡的發生^(64, 65)。

第二章 研究方法

第一節 研究材料

一、藥品試劑

1. 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine iodide (DioC6) Molecular Probes
2. 5 X TB buffer Amersco
3. 10 X SDS buffer (Sodium dodecyl sulfate) Amersco
4. Agarose-LE Amersco
5. Ammonium persulfate (APS) Amersco
6. Acrylamide/Bis 40% solution (ACRYL/BIS™29:1) Amersco
7. Baicalein Sigma-Aldrich Co.
8. BioMax Flim Kodak
9. Bovine serum albumin (BSA) Merck
10. Development reagent (顯影劑) Kodak
11. Dimethyl sulfoxide (DMSO) Sigma Chemical Co.
12. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) Merck
13. DMEM medium Gibco
14. DNA purification kit (核酸純化試劑組) Gene Mark
15. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit) Amersham
16. Ethanol TEDIA
17. Fetal bovine serum (胎牛血清, FBS) Gibco
18. Fix reagent(定影劑) Kodak
19. Formaldehyde Merck
20. Glycine Amersco
21. L-Glutamin (麩胺酸, LG) Gibco
22. Methanol TEDIA

23. Penicilllinm Streptomycin (PS)	Gibco
24. Potassium chloride (KCl)	Merck
25. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck
26. Propidium iodide(PI)	Sigma Chemical Co.
27. Protein assay-Dye reagent concentrate	Bio-Rad
28. Protein extraction solution (PRO-PREP)	iNtRON Biotechnology, INC.
29. Protein marker	Femantas
30. RNase A (Ribonuclease A)	Amersco
31. Sodium chloride (NaCl)	Merck
32. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine)	Amersco
33. Tris (Tris (hydroxymethyl) -aminomethane)	Amersco
34. Triton X-100	Sigma chemical Co.
35. Trypan blue	Sigma Chemical Co.
36. Trypsin-EDTA	Amersco
37. Tween-20	Amresco
38. Primary antibody (1°抗體) :	
(a). anti-actin	Oncogen
(b). anti-Bcl-2	upstate
(c). anti-Bax	upstate
(d). anti-caspase-3	upstate
(e). anti-caspase-8	upstate
(f). anti-caspase-9	upstate
(g). anti-Cytochrome C	Oncogen
(h). anti- NF kappa B Rel—α(p65)	upstate
(i). anti-p53	Oncongen
(j). anti-PARP	upstate

39. Secondary antibody (2°抗體) :

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

(b). goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody Chemic



二、儀器設備、器材

1. 75T 方形培養盒	Bio-Rad
2. 24 well Transwells	Bio-Rad
3. DNA 電泳槽	Mupid-2
4. Mini-3D Shaker	Boeco
5. PVDF membrane	Minipore
6. SDS-PAGE 電泳槽套組	Bio-Rad
7. Transfer Cell Blot 套組	Bio-Rad
8. 細胞培養皿	FALCON
9. 細胞培養盤	FALCON
10. 細胞培養箱	Nuaire
11. 細胞計數器 (Haemocytometer)	Boeco
12. 倒立式位像差顯微鏡 (phase-contrast microscope)	Olympus
13. 微量天平 (TE-200; MILLTER)	
14. 去離子水製造機	Minipore
15. 酸鹼值測定計 (C831)	Consort
16. 加熱板	Lab-Line
17. 流式細胞計數儀 (Flow cytometry)	Becton Dickinson
18. 高速離心機	HERMLE
19. 分光光度計	Beckman
20. 酵素免疫分析儀 (anthos 2020)	Anthos Labtec, Australia
21. 共軛焦顯微鏡 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM 或 LSCM)	

第二節 研究設計

本研究主要是探討具有明顯抗癌作用的黃芩素是否能夠抑制人類肝癌細胞（J5）的生長，及細胞凋亡路徑的分子機轉。

本實驗設計架構（圖2-1）：

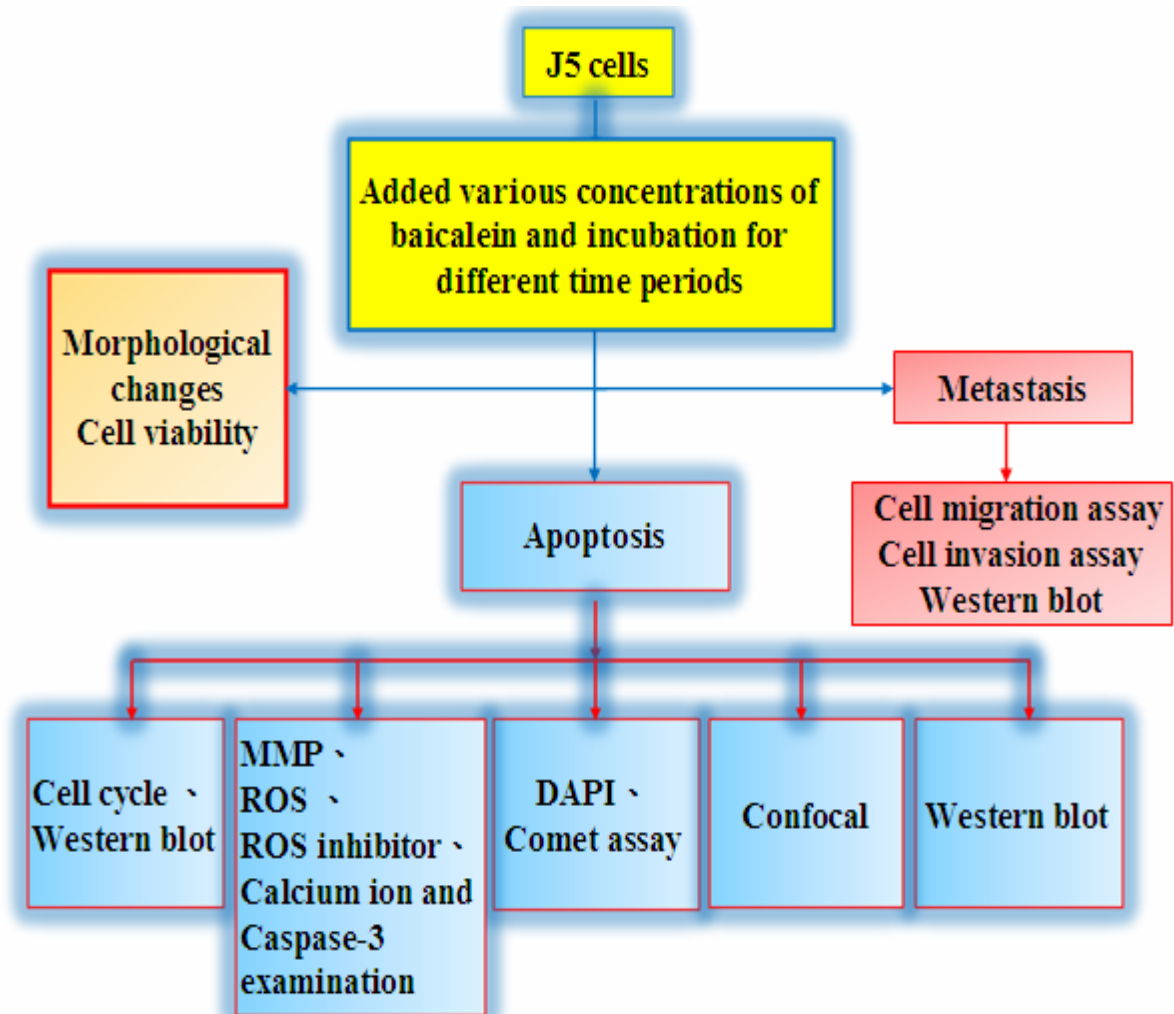


圖2-1. 本實驗之研究架構

第三節 研究方法

一、 冷凍細胞的活化：

冷凍細胞的活化原則為快速解凍，以避免冰晶對細胞造成傷害，影響細胞活性。細胞活化，約需數日，或繼代一至二代，以確保細胞的穩定性。

將新鮮培養基置於 37°C 水槽中回溫，回溫後以 70%ethanol 擦拭，在移入之前先以 70%ethanol 擦拭無菌操作臺內部。操作人員應戴防護手套，自液態氮或乾冰容器中取出冷凍管，防止冷凍管可能爆裂之傷害。取出冷凍管，隨即放入 37°C 水槽中快速解凍，水面高度不可接近或高過冷凍管之蓋沿，否則易發生污染。輕搖冷凍管使其在 1 分鐘內全部融化，以 70%ethanol 擦拭冷凍管外部，移入無菌操作臺內。依據細胞種類和濃度，於無菌操作臺內取適量培養基加至適當之培養瓶中，緩慢加入已解凍之細胞懸浮液（一般稀釋比例為 1:10~1:15），與培養基混合均勻後，放入培養箱培養，解凍後是否立即去除冷凍保護劑，例如：dimethyl sulfoxide (DMSO) 或 glycerol，依細胞種類而異。絕大多數細胞而言，在 1%以下之冷凍保護劑 DMSO 下，不需立即去除冷凍保護劑。若要立即去除，則將解凍之細胞懸浮液加入含有 5~10 ml 培養基之離心管內，1,000 rpm 離心 5 分鐘，移去上清液，加入新鮮培養基，混合均勻，放入培養瓶內，置於適當之培養箱培養。若不需立即去除冷凍保存劑，在解凍培養隔日，更換培養基即可。

二、 細胞的冷凍保存

欲冷凍保存之細胞應在生長良好 (log phase) 且存活率高之狀態下，約為 80–90% 的密度。冷凍前一日更換半量或全量培養基並觀察細胞生長情形。配製冷凍保存溶液(使用前配製，將 DMSO 加

入新鮮培養基中，調整其最終濃度為 7%，混合均勻，於室溫下待用。依細胞繼代培養之操作，收集培養之細胞，取少量細胞懸浮液（約 0.1 ml）計數細胞濃度，離心，去除上清液，加入適量冷凍保存溶液，使細胞濃度為 $1.5\sim 5\times 10^6$ cells/ml，混合均勻，分裝於已標好名稱、數目、冷凍日期之冷凍保存管中，1~1.5 ml/vial。

冷凍順序：先將冷凍管置於 4°C，10 分鐘→ -20 °C 30 分鐘→ -80°C 16 ~ 18 小時(或 overnight)→液態氮槽 長期儲存。可使細胞內的水分滲出細胞外，減少胞內形成冰結晶的機會，還能減少冰晶對細胞的損傷。

三、細胞的培養

（一）細胞株來源

本實驗所使用之細胞株 J5 為人類肝癌細胞株（human hepatoma cell line），由新竹食品工業研究所（Food Industry Research and Development Institute）購得。

人類肝癌細胞（J5）以 Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）培養基添加 10%胎牛血清（FBS）、5% L-glutamine（LG）及 5% Penicillin Streptomycin（PS）之培養液，置於 5% CO₂ 及 37°C 濕度為 95%以上的培養箱（incubator）中培養。約兩天更換一次培養液，待細胞長至八、九分滿時，將細胞做繼代培養或分盤以供實驗之用。

（二）繼代培養

待細胞長至八分滿時，在無菌操作臺內將吸出 flask 中培養液，以 PBS（phosphate buffer saline）清洗細胞兩次，洗淨後再加入 3 ml trypsin-EDTA 於每支 flask 中，於 37 °C 培養箱中作用約 2 分鐘後取出，並確認細胞漂浮情況，若細胞大部分已成漂浮狀態，再加入乾

淨培養液 6 ml 於每支 flask，中斷 trypsin-EDTA 之作用，將瓶中所有液體吸至離心管中以 1500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，將細胞彈散再加入適量新鮮培養液以電動吸量管反覆抽吸混和均勻。然後取 20 μ l 之細胞懸浮液加入 80 μ l trypan blue (0.4% w/v trypan blue) 溶液，以血球計數盤 (Haemocytometer) 計算細胞數目。

(三) 細胞計數：

步驟：取清潔計數板和專用蓋玻片，用拭鏡紙擦拭。取細胞懸液 20 μ l，加入 80 μ l trypan blue 染液混和 (稀釋 5 倍)，混勻後取 20 μ l 於血球計數板內，以充滿不外溢為宜。也可直接將細胞懸浮液從側面滴加到蓋玻片中，不要溢出，也不要過少或出現氣泡。在顯微鏡下用 100 X 計數四角大分格中的細胞數，從下式得出細胞密度。

$$\text{細胞數/ml} = (4 \text{ 大格細胞數之和} / 4) \times 10^4 \times \text{稀釋倍數}$$

細胞存活記數原理為 dye exclusion，利用染料進入細胞膜已破損的細胞內將細胞染色，而活細胞因細胞膜完整則不被染色。最常使用的 trypan blue 染液可使死細胞染成藍色，活細胞不著色。

依實驗目的所需細胞數，吸取所需細胞液置於不同培養皿中。

四、藥品配製

秤取 27.02 mg 黃芩素，溶於 10 ml DMSO，配製成 10 mM stock solution，貯存於 -20°C 冰箱中，實驗時取出溶解後，配製所需濃度。

配製濃度如下：

baicalein 分子式： $C_{15}H_{10}O_5$

分子量 = 270.24

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

$$270.24 \times 10^3 \text{ mg} / 1000 \text{ ml} = 1000 \text{ mM}$$

$$27.02 \text{ mg} / 10 \text{ ml} = 10 \text{ mM}$$

表 2-1. 黃芩素溶液之配製

Concentration of baicalein	10 mM of baicalein	DMSO
1.0 mM	100 μ l	900 μ l
2.5 mM	250 μ l	750 μ l
5.0 mM	500 μ l	500 μ l
7.5 mM	750 μ l	250 μ l
10.0 mM	1000 μ l	0 μ l

配製不同濃度的黃芩素，用來進行細胞存活率試驗 (Viability assay)，並從存活率試驗結果中選取細胞一半致死的濃度(IC_{50})，而 IC_{50} 的黃芩素濃度則為本論文完成相關實驗所用之濃度。本實驗最終濃度分別為 10 μ M、25 μ M、50 μ M、75 μ M、100 μ M。

五、利用倒立式相位差顯微鏡檢測細胞形態的變化

1. 將 J5 cells (2×10^5 cells/well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱待細胞完全貼附後，更換新鮮的培養液並給予不同濃度之 baicalein (0、10、25、50、75、100 μ M)，作三重複試驗。於 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的細胞培養箱，經 48 h 之後，分別於 200 X 倒立式相位差顯微鏡下觀察照相。

2. 將 J5 cells (2×10^5 cells/3 ml medium/well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱待細胞完全貼附後，更換新鮮的培養液後給予 75 μ M 之 baicalein，作三重複試驗。於 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的細胞培養箱培養，經 24 h、48 h、72 h 之後，分別於 200 X 倒立式相位差顯微鏡下觀察照相。

六、流式細胞儀分析測試

近年腫瘤生物醫學的基礎研究蓬勃發展，歸功於流式細胞儀廣泛的應用於腫瘤細胞樣品檢測及分析，是腫瘤生物學研究的重要工具之一。原理是利用雷射光激發，區分、定量已結合不同波長螢光

的細胞，使用適當的螢光抗體依接收的部位不同，即可同時分析多種細胞。此方法不僅快速、準確度高，還可以同時分析定量出不同的訊息，為篩選有效的抗癌藥提供重要早期的藥效評估資訊。

本實驗利用流式細胞儀來測定肝癌細胞經藥物處理後的變化。

(一) 細胞存活率測定

利用流式細胞儀來測定經藥物處理後癌細胞存活率，以評估黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) 的毒殺及抑制增生的能力。

1. 原理

本實驗是利用 propidium iodide (PI) 染劑來偵測藥物處理後癌細胞的存活率。PI 是一種核酸染劑，當細胞死亡時細胞膜會失去完整性，使得 PI 進入細胞內接在 DNA 雙股螺旋中之氫鍵上；經雷射光激發後，散射出的螢光，再以 Cell Quest 軟體分析細胞存活率。存活的細胞其細胞膜完整，且因通透性的關係，PI 無法進入細胞內與的 DNA 結合；若是細胞呈現凋亡、壞死，因細胞膜構造改變、破損且通透性改變，則 PI 染劑會進入細胞與 DNA 結合。經 PI 染色的死亡細胞經雷射光激發後，呈現較強的紅色螢光，活細胞則無，以此分析細胞的存活與否。

2. 步驟：

- 1) 將 J5 cells (2×10^5 cells/well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱，待細胞完全貼附後，更換新鮮的培養液並給予不同濃度之 baicalein (0、10、25、50、75、100 μ M)，作三重複試驗。於 37°C、5%CO₂ 的細胞培養箱中培養，經 24 h、48 h、72 h 之後，收取細胞，進行流式細胞儀檢測。
- 2) 將 J5 cells (2×10^5 cells/well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱，待細胞完全貼附後，更

換新鮮的培養液後並給予 IC_{50} 濃度 $75 \mu M$ 之 baicalein, 作三重複試驗。於 $37^{\circ}C$ 、 $5\%CO_2$ 的細胞培養箱中培養, 經 24 h、48 h、72 h 之後, 收取細胞, 進行流氏細胞儀檢測。

3) 收取細胞時, 先將上層液吸至離心管中, 瓶中的細胞以 PBS 清洗一次, 再吸回離心管中, 並加入 $300 \mu l$ 0.1% trypsin 處理細胞, 放入 $37^{\circ}C$ 培養箱中 2 分鐘後取出, 再加入 2 ml PBS 沖洗細胞, 並將所有液體移到離心管, 離心 (1500 rpm 、5 分鐘)。離心後倒掉上清液, 拍散後再加入 2 ml PBS 清洗細胞, 再以 1500 rpm 離心 5 分鐘, 去除上清液, 細胞拍散後加入 500 ml 的 PI 均勻混和, 移入 5 ml 的流氏細胞儀專用試管, 混勻後置於冰桶上, 即可進行流氏細胞儀分析, 固定收取細胞數 (10000 顆) 及流速 ($150\text{-}200$ 顆/s), 進行存活率的檢測, 記錄細胞存活百分比。

(二) 細胞週期的影響⁽⁶⁶⁾

1) 將 J5 cells (2×10^5 cells/well) 種於 6 well-plate 上, 每 well medium 總量為 3 ml, 放入細胞培養箱, 待細胞完全貼附後, 更換新鮮的培養液並給予不同濃度之 baicalein (0 、 10 、 25 、 50 、 75 、 $100 \mu M$), 作三重複試驗。於 $37^{\circ}C$ 、 $5\%CO_2$ 的細胞培養箱培養, 經 24 h、48 h、72 h 之後收取細胞, 進行流氏細胞儀檢測。

2) 將 J5 cells (2×10^5 cells /well) 種於 6 well-plate 上, 每 well medium 總量為 3 ml, 放入細胞培養箱, 待細胞完全貼附後, 更換新鮮的培養液後並給予 IC_{50} 濃度 $75 \mu M$ 之 baicalein, 作三重複試驗。於 $37^{\circ}C$ 、 $5\%CO_2$ 的細胞培養箱培養, 經 6 h、12 h、24 h、48 h 之後, 收取細胞, 進行流氏細胞儀檢測。

3) 分別收取不同組別的細胞至 15 ml 離心管, 離心 (1500 rpm 、5 分鐘)。倒掉上清液, 將細胞完全打散後, 再加入 2 ml PBS

清洗，離心（1500 rpm、5 分鐘）。倒掉上清液，將細胞完全打散後，再加入 4 °C、70%的冰酒精 2 ml 進行細胞固定（低速傾斜 vortex，並一滴滴的沿管壁加入離心管內），隨即將固定完成的細胞置於-20 °C 冰箱，隔夜（over night）後取出，一起進行分析。

- 4) 將固定的細胞從冰箱取出，離心（1500 rpm、5 分鐘），去酒精，將細胞完全打散後，加入 2 ml PBS 清洗，離心（1500 rpm、5 分鐘），重複清洗兩次，拍散細胞後加入細胞週期用的 500 μ l PI 混勻，避光 30 分鐘，將細胞移入流氏細胞儀專用管，固定收取細胞數（10000 顆）及流速（150~200 顆/s），以 Modifit LT[®] 軟體進行分析，紀錄 G₀/G₁、S、G₂/M phase 及 sub-G1 比率。



表 2-2. 存活率 PI 染劑之組成

成分	濃度	體積 (ml)
Propidium iodide	20 mg/dl	1
1× PBS	-	49
Total volume	-	50 ml

表 2-3. 細胞週期 PI 染劑之組成

成分	濃度	體積 (ml)
Propidium iodide	20 mg/dl	1
5% Triton X-100	-	10
1× PBS	-	36.5
Rnase	50ng/25 ml	2.5
Total volume	-	50

表 2-4. 磷酸鹽緩衝鹽溶液 (PBS) 之組成

Composition	Weight (g)
NaCl	8
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.44
KH ₂ PO ₄	0.24
added dd-Water to 1000 ml (pH 7.4)	

(三) 粒線體膜電位 (MMP; $\Delta\Psi_m$) 的檢測

1.原理：

當細胞通透性的改變，細胞膜電位探針，DioC₆ (3,3'-Dihexyloxacarbo-cyanine iodide) 可穿透細胞膜，結合堆積在細胞粒線體中，透過 DioC₆ 在細胞內外的分佈，可反應出細胞膜內外的電位差。以雷射光激發 DioC₆ 可發射出綠色螢光之陽離子 (cationic dye) 親脂性染劑，由螢光強度的改變就可顯示細胞膜電位改變的情形，偵測細胞粒線體膜電位⁽⁶⁷⁾。

2.步驟

- 1) 將 J5 cells (2×10^5 cells/well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱，待細胞完全貼附後，更換新鮮的培養液後並給予 75 μ M 之 baicalein，作三重複試驗。於 37 °C、5%CO₂ 的細胞培養箱培養，經 2 h、6 h、12 h、18 h、24 h 之後，收取細胞，進行流氏細胞儀檢測。
- 2) 分別收取不同組別的細胞至 15 ml 離心管，離心 (1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，將細胞完全打散後加入 2 ml 的 PBS，離心 (1500 rpm、5 分鐘) 同時準備 DioC₆ 試劑。倒掉上清液，打散後，各加入 500 μ l (10 μ l DioC₆/ 500 μ l PBS)，此時需避光操作，blank 不加藥也不加染劑，只加入 500 μ l PBS，於 37 °C 水浴避光 30 分鐘後，移入流式細胞儀專用管，固定收取細胞數 (10000 顆) 及流速 (150-200 顆/s)，使用 Cell Quest 軟體分析。

(四) 活性氧化物 (Reactive oxygen species; ROS) 的檢測

1.原理：

H₂DCF-DA (2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate) 會被細胞內的乙醯酯酶 (esterases) 去乙醯化 (deacetylated) 成非螢光性

的 DCFH⁽⁶⁸⁾，當 DCFH 會在細胞內或粒腺體中被 H₂O₂ 氧化成綠色螢光的 2,7-dichlorofluorencin (DCF)⁽⁶⁹⁾，所發散的螢光則可反應出細胞內 H₂O₂ 的濃度，透過流式細胞儀偵測細胞內的螢光即可代表細胞內的 ROS 含量⁽⁷⁰⁾。

2. 步驟：

1) 將 J5 cells (2×10^5 cells /well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱，待細胞完全貼附後，更換新鮮的培養液後並給予 75 μ M 之 baicalein，作三重複試驗。於 37 °C、5%CO₂ 的細胞培養箱培養，經 1 h、2 h、4 h、6 h、12 h 之後，收取細胞，進行流式細胞儀檢測。

2) 分別收取不同組別的細胞至 15ml 離心管，離心 (1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，將細胞完全打散後加入 2 ml/wells 的 PBS 緩衝液，離心 (1500 rpm、5 分鐘) 同時準備 ROS 試劑。倒掉上清液，拍散後，取 H₂DCF-DA 染劑 (1 μ l H₂DCF-DA /500 μ l PBS) 每管加入 500 μ l，blank 不加藥也不加染劑，只加入 500 μ l PBS，此時需避光操作。37°C 水浴避光 30 分鐘後，移入流式細胞儀專用管，固定收取細胞數 (10000 顆) 及流速 (150-200 顆/s)，使用 Cell Quest 軟體分析。

(五) 鈣離子釋放的檢測

1. 原理：

螢光染劑 Indo-1/AM 透過乙醯甲酯 (Acetatoxymethyl Ester；AE) 進入細胞後，Indo-1/AM 會與鈣離子特異性結合。在雷射光的激發下，Indo-1/AM 放射光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，透過流式細胞儀偵測細胞內的螢光量的變化，即可代表細胞內鈣離子的含量⁽⁷¹⁾。

2. 步驟：

- 1) 將 J5 cells (2×10^5 cells/well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱，待細胞完全貼附後，更換新鮮的培養液後給予 75 μ M 之 baicalein，作三重複試驗。於 37°C、5%CO₂ 的細胞培養箱培養，經 2 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 之後，收取細胞，進行流式細胞儀檢測。
- 2) 分別收取不同組別的細胞至 15 ml 離心管，離心 (1500 rpm、5 分鐘)，重複洗兩次。接下來的步驟要避光操作，倒掉上清液，拍散細胞。每支離心管加入 Indo-1/AM 1000 μ l，蓋好蓋子，blank 不加藥也不加染劑，只加入 1000 μ l PBS，移到 incubator 37°C、5%CO₂，每十分鐘拿出來上下搖動，再放回 incubator。
- 3) 40 分鐘後，離心 (1500 rpm、5 分鐘)，並加入 PBS 洗兩次，最後加入 600 μ l PBS 並移入流式細胞儀管，以流式細胞儀進行樣品分析，固定收取細胞數 (10000 顆) 及流速 (150-200 顆/s)，以 Cell Quest 軟體分析。

(六) Caspase-3 活性分析

1. 原理：

利用 PhiPhiLux-G₁D₁ kit 來檢測凋亡細胞 caspase-3 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 可以裂解胺基酸序列之特定位置，於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 越多⁽⁷²⁾。

2. 步驟：

- 1) 將 J5 cells (2×10^5 cells/well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱，待細胞完全貼附後，更

換新鮮的培養液後並給予 IC₅₀ 濃度 75 μM 之 baicalein，作三重複試驗。於 37°C、5%CO₂ 的細胞培養箱培養，經 24 h、48 h 之後，收取細胞，進行流氏細胞儀檢測。

2) 分別收取不同組別的細胞至 15 ml 離心管，離心 (1500 rpm、5 分鐘)，重複洗兩次。接下來的步驟要避光操作，倒掉上清液，刮散細胞。每管加入 25 μl 之 10 μM substrate (Phiphilux green for caspase-3) (Phiphilux red for mitochondria)，放入 37 °C 培養箱避光培養 1 小時後，加入 1 ml PBS，離心 (1500 rpm、5 分鐘)，重複洗兩次，倒掉上清液。每管加入上機專用的 PBS 500 μl，blank 不加藥也不加染劑，只加入 1000 μl PBS，移入流式細胞儀管中，固定收取細胞數 (10000 顆) 及流速 (150-200 顆/s)，以 Cell Quest 軟體分析。

(七) ROS 抑制劑 NAC (N-Acetyl-L-cysteine) 的影響

已知細胞凋亡和細胞的氧化還原狀態有關，如：巰基氧化、細胞 GSH 缺少和 ROS 的堆積密切相關。主要原因是 ROS 促使粒線體膜通透性改變，導致粒線體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 下降，釋放出凋亡因數所引起的。本實驗探討加入 ROS 抑制劑 NAC (N-Acetyl-L-cysteine) 是否能降低 ROS 所引起的細胞凋亡。共分兩部分：第一部份-偵測加入 ROS 抑制劑其 ROS 的變化；第二部分-偵測加入 ROS 後，抑制劑癌細胞的存活率。

1. 原理: 在藥物造成細胞的 ROS 產生之前，先透過 ROS 抑制劑 NAC 與細胞內的 ROS 結合，以減少因藥物作用 ROS 的產生⁽⁷³⁾。

2. 步驟：

1) 將 J5 cells (2×10^5 cells/well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱，待細胞完全貼附後，更

換新鮮的培養液後，此時需避光操作，加入的 500 mM 的 NAC 120 μ l（最終濃度為 20 mM），反應兩小時後，再加入 75 μ M 之 baicalein，作三重複試驗。於 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的細胞培養箱培養，經 6 h 之後，收取細胞，利用流氏細胞儀檢測 ROS 的產生，使用 CellQuest 軟體分析。

2) 分別收取不同組別的細胞至 15 ml 離心管，離心（1500 rpm、5 分鐘）。倒掉上清液，將細胞完全打散後加入 2 mL/wells 的 PBS 緩衝液，離心（1500 rpm、5 分鐘）同時準備 ROS 試劑。倒掉上清液，打散後，取 ROS 染劑 H₂DCF-DA 染劑（1 μ l H₂DCF-DA /500 μ l PBS）每管加入 500 μ l，blank 不加藥也不加染劑，只加入 500 μ l PBS，此時需避光操作。37 $^{\circ}$ C 水浴避光 30 分鐘後，移入流式細胞儀專用管，固定收取細胞數（10000 顆）及流速（150-200 顆/s），使用 Cell Quest 軟體分析。

3. 存活率的步驟：

1) 將 J5 cells (2×10^5 cells/well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱，待細胞完全貼附後，更換新鮮的培養液後，此時需避光操作，加入 500 mM 的 NAC（N-Acetyl-L-cysteine）120 μ l（最終濃度為 20 mM），反應兩小時後，再加入 75 μ M 之 baicalein，作三重複試驗。於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的細胞培養箱培養，經 24 h 之後，收取細胞，進行流氏細胞儀檢測。

2) 將上層液吸至離心管中，瓶中的細胞以 PBS 清洗一次，在吸回離心管中，並加入 300 μ l 0.1%trypsin 處理細胞，放入 37 $^{\circ}$ C 培養箱中 2 分鐘後取出，再加入 2 ml PBS 沖洗細胞，並將所有液體移到離心管，離心（1500 rpm、5 分鐘）。離心後倒掉上清液，

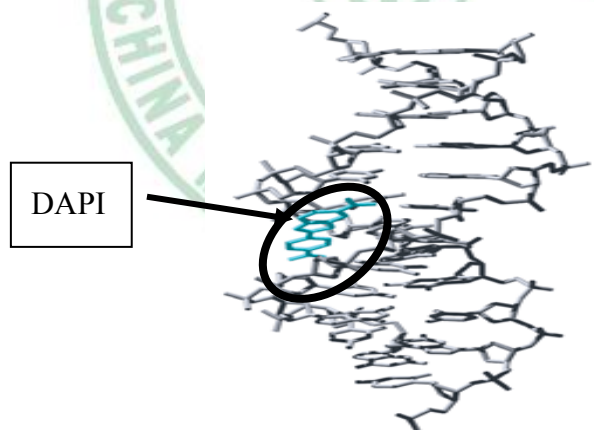
拍散後再加入 2 ml PBS 清洗細胞，再以 1500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後，細胞拍散後加入 500 μ l 的 PI 均勻混和，移入 5 ml 的流氏細胞儀專用試管，混勻後置於冰桶上，即進行流氏細胞儀分析，固定收取細胞數（10000 顆）及流速（150-200 顆/s），進行存活率的檢測，記錄細胞存活百分比。

七、細胞內分子螢光染色

（一）DAPI（4'-4-diamidino-2-phenyl indole）染色

1. 原理：

DAPI（4'-4-diamidino-2-phenyl indole）是種核酸螢光染劑，會 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 斷裂時，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⁽⁷⁴⁾。



<http://www.rcsb.org/pdb>

圖 2-2. DAPI 染劑與 DNA 雙股螺旋小溝（minor groove）鍵結

2. 步驟：

1) 將 J5 cells (2×10^5 cells /well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱，待細胞完全貼附後，更換新鮮的培養液後並給予濃度 75 μ M 之 baicalein。於 37°C、5%CO₂ 的細胞培

養箱培養，經 48 小時之後，吸去上清液，加入 PBS 洗三次（用吸的）。加入 3%formadehyde 1 μ l 固定細胞，置於 4 °C 冰箱反應 15 分鐘。以 PBS 洗兩次，離心（1500 rpm、5 分鐘），再加入 0.1% Triton X-100 1 ml 反應 15 分鐘，用 PBS 洗兩次，離心（1500 rpm、5 分鐘）。加入 300 μ l DAPI 染劑（1 μ g/ml），放入 37 °C 水浴槽，避光 30 分鐘，最後用 PBS 洗三次，以 200 X 的螢光顯微鏡觀察照相。

（二）彗星試驗（comet assay）

1. 原理：

單細胞電泳分析（single cell gel electrophoresis assay），可用來分析及定量 DNA 損傷（DNA damage）程度，是一個簡單、快速且敏感度高的技術。藉由電泳將斷裂的 DNA 拖出膜外，形成彗星狀而命名之，藉由拖尾的長短，觀察 DNA 的損傷情形⁽⁷⁵⁾。

2. 步驟

- 1) 將 J5 cells (2×10^5 cells/well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱，待細胞完全貼附後，更換新鮮的培養液後並給予濃度 75 μ M 之 baicalein。於 37°C、5%CO₂ 的細胞培養箱培養，經 24 h 之後，
- 2) 將 gel 先製備以微波溶解後放於 55 °C 水浴鍋中備用。分別將不同濃度的細胞收至離心管離心（1500 rpm、5 分鐘），去上清液後，彈散加入 200 μ l PBS，製成懸浮液備用。
- 3) 將 0.5%LMA(low melting agarose)和 0.5%NMA(normal melting agarose) 共 85 μ l 混合液置於在載玻片上以製備下層膠。取 10 μ l 細胞懸浮液，加入 75 μ l 之 0.5%LMA (low melting agarose) 混和均勻，在再加入到下層膠上，將蓋玻片以 45°角蓋上防止氣泡產生，

凝固後在將蓋玻片拿下，然後放入 lysis butter 中，經 1 小時後，用二次水洗二次，將膠移至 alkaline buffer 中 20 分鐘之後，將電泳槽放置於冰上，以 alkaline buffer 為電泳液跑 30 分鐘（25 V；300 mA）。將膠移至 0.4 M Tris buffer 使 pH 調回中性，再將膠置於 methanol 脫水，加入數滴 PI（2.5 μ g/ml）以螢光顯微鏡觀察。

表 2-5. NAC（分子量 163.2）溶液的配製

成分	單位
NAC	0.408 g
DDW	5 ml
配製成濃度 500 mM stock	

表 2-6. Comet assay 之 lysis buffer 配製

Lysis buffer	pH=8~10
5 M NaCl	100 ml
1 M Tris-HCl	2 ml
0.5 M EDTA	40 ml
1% Triton X-100	2 ml
DDW	56 ml
Total	200 ml

表 2-7. Alkaline buffer 之配製

Alkaline buffer (pH=13)	
NaOH	12 g
EDTA	0.3724 g
DDW	1000 ml

表 2-8. Tris buffer 之配製

0.4M Tris buffer (pH=7.5)	
Tris	48.456 g
DDW	1000 ml

八、相關蛋白活性的表現

(一) 西方墨點法 (Western blot)

1. 細胞蛋白抽取

1) J5 (2×10^5 cells /well) 種於 6 well-plate 上，每 well medium 總量為 3 ml，放入細胞培養箱，待細胞貼附完全貼附後，更換新鮮的培養液後並給予濃度 75 μM 之 baicalein，每個濃度作三重複試驗。於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的細胞培養箱進行培養，經 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 之後，依時間將不同組別的細胞分別收取至 15 ml 離心管，離心 (1500 rpm、5 分鐘)，倒掉上清液，再加入 PBS 清洗離心後，除掉上清液加 1 ml PBS 後移到微量離心管離心，除掉上清液後再用 pipetman 吸掉剩餘水分 (盡量吸乾避免影響 lysis)，加入 lysis buffer 200 μl ，用 pipetman 抽吸 10 次後且 vortex 1 分鐘，放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。待統一收齊後，劇烈震盪 5 分鐘，離心 (14000 rpm、20 分鐘) 收取上清液移入新的微量離心管，保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

2. 蛋白質定量

1) 蛋白質標準品檢量線製作

蛋白質標準品檢量線之製作：以胎牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin ; BSA) 為蛋白質標準品，依下列之配方製備不同濃度之蛋白標準品；

表 2-9. BSA 蛋白標準品的配製

濃度 (g/l) 組成	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
10 mg/BSA (μl)	0	2	4	6	8	10
二次水 (μl)	100	98	96	94	92	90
總體積 (μl)	100	100	100	100	100	100

先取 Bradford 染劑 2 ml 加 8 ml 二次水 (5 X 稀釋) 混合均勻備用，將上述不同濃度的蛋白質標準品 (BSA) 取 15 μ l 加入 735 μ l Bradford 染劑混合均勻，分別取 200 μ l 移入 96 well-plate，做六重複試驗，靜置 5 min 後，利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 在 O.D.595 nm 的波長下測定各蛋白質標準品之吸光值。將每個濃度所測的之吸光值取平均與相對濃度畫出標主檢量線，並求出趨勢線方程式及 R^2 值。(R^2 必須 ≥ 0.99 以上的準確度方可接受。)

2) 樣品蛋白質定量

先取 10 μ l 蛋白質與 90 μ l-DDW 混和 (10 X 稀釋)，從稀釋蛋白中取 15 μ l 加入 735 μ l Bradford 染劑混合均勻，分別取 200 μ l 移入 96well-plate，做六重複試驗，靜置 5 min 後，利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 在 O.D.595 nm 的波長下測定各蛋白質標準品之吸光值。將每個濃度所測的之吸光值取平均帶入趨勢線方程式中，再乘以稀釋倍數，則可求得檢體蛋白質之實際濃度。

3. 電泳膠片的製作

下層膠注入鑄膠台後，緩緩加滿 isopropanol 去除氣泡並壓平下層膠之上緣，約 30 分鐘後待膠片凝固，移去 isopropanol。隨即，注入上層膠並小心地插入電泳梳 (comb)，避免氣泡出現在 well 的下緣。待上層膠凝固後拔出電泳梳，並以二次水小心沖洗 well 內，避免雜質殘留。將鑄好的膠片移至電泳槽中，加入 running buffer。

表 2-10. 下層膠及上層膠的配製

組成	12%下層膠 (12% separating gel)		5%下層膠 (5% stacking gel)	
	四片量	六片量	四片量	六片量
DDW (ml)	8.6	12.9	4.06	6.09
1.5 M Tris (PH8.8)(ml)	5	7.5	-	-
0.5 M Tris (PH6.8)(ml)	-	-	1.66	2.49
10% SDS(μ l)	200	300	66	99
30%Acrylamide/Bis (29:1)(μ l)	6	9	1.02	1.53
10%Ammonium persulfate (APS)(μ l)	200	300	33.4	50.1
10% TEMED(μ l)	9	12	6	9
總體積(ml)	20	30	7	10.5

4.電白質電泳 (SDS-PAGE)

將鑄好的電泳膠片的移入電泳槽中，加入 running buffer (表 2-11)，用塑膠滴管以抽吸方式去除膠片下緣殘留的氣泡。鑄好的電泳膠片先以 100 V、300 mA 為條件預跑 20 分鐘。在 SDS-PAGE 系統中，除了整個電泳系統含有 0.1%SDS 外，電泳膠片的兩側也要加入 SDS 以平衡電壓。檢體事先用 100 °C 加熱處理 10 分鐘，蛋白質會解構成為一條直練狀分子；於加熱前，檢體必須與 0.1%SDS 混和，0.1%SDS 所需量依檢體體積不同而改變。取 3 μ l marker 和配置好的檢體 18 μ l 由左往又分別 loading 到 well 中，並以 running buffer 補滿整個電泳槽。跑膠設定為 100 V、400 mA，待 marker 完全展開 (約 80

分鐘)即可停止電泳,接著進行蛋白質樣本轉印。

5.蛋白質樣本轉印 (Immunoblotting)

1) 轉印步驟:

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; 表 2-12) 中,接著將裁好的 3 M 濾紙先浸泡在 transfer buffer 中備用,將轉漬夾打開後白色一面朝上,黑色一面朝下。依序在海綿墊上放入 3 M 濾紙、SDS-PAGE gel、PVDF membrane、3 M 濾紙,最後再放上一片海綿墊片後夾上轉漬夾(每一夾層中避免有氣泡產生),形成類似三明治夾層的構造(圖 2-3)。隨後放入已裝有 transfer buffer 的電泳槽中將黑夾朝負極,紅夾朝正極,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的狀態,以免 SDS-PAGE gel 因通電產熱溶解。以 400 mA 為電壓條件進行蛋白質轉漬,90 分鐘後。待轉漬完成後取出轉漬膜並裁去多餘的部分,然後於左上角做記號以利辨識。緊接著將轉漬膜浸泡於 0.05%Tween 20/1X PBS 清洗 10 分鐘。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,目的在於 blocking non-specific sites。取出轉印膜後再以 0.05 %Tween 20/1X PBS 清洗 5 分鐘共 6 次。緊接著進行免疫反應,以一級抗體(溶於新鮮配製之 blocking solution 中,不同品牌的抗體有不同的稀釋倍數),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 5 分鐘共 6 次。加入稀釋 5000 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洗清洗 5 分鐘共 6 次。清洗完後,浸漬於 0.05%Tween 20/1X PBS 中,等待壓片。

6. 壓片製作（暗房操作）：

將轉漬膜以濾紙吸乾後，浸泡於 ECL 試劑之混和液（每瓶各取 1mL 等比例混和）中反應 1 分鐘；以兩張投影片平整包覆轉漬膜，正面朝上放置於壓片卡夾（cassette）內，再用膠帶固定投影片；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。取出放入顯影劑中進行顯影步驟（所需時間依實際觀察而定）並輕微搖晃，以自來水沖使 30 秒後放入定影劑中，約 1 分鐘後即可取出，再以自來水沖洗乾淨，晾乾後即可看見 signal 於感光底片上呈現。

7. 軟體分析：

將成色完成之底片，以 Tatal-lab 軟體對每一個 band 的密度加以比較分析。



表 2-11. 電泳緩衝液 (running buffer) 之組成

組成	體積 (ml)
10 X SDS buffer (25 mM Tris、 192 mM glycine、0.1% SDS)	200
加 H ₂ O ₂ 到 2000 ml	

表 2-12. 轉印緩衝液 (Transfer buffer) 之組成

組成	重量 (g)
Tris	6
Glycine	28.8
100% Methanol	400 ml
加 H ₂ O ₂ 到總體積 2000 ml	

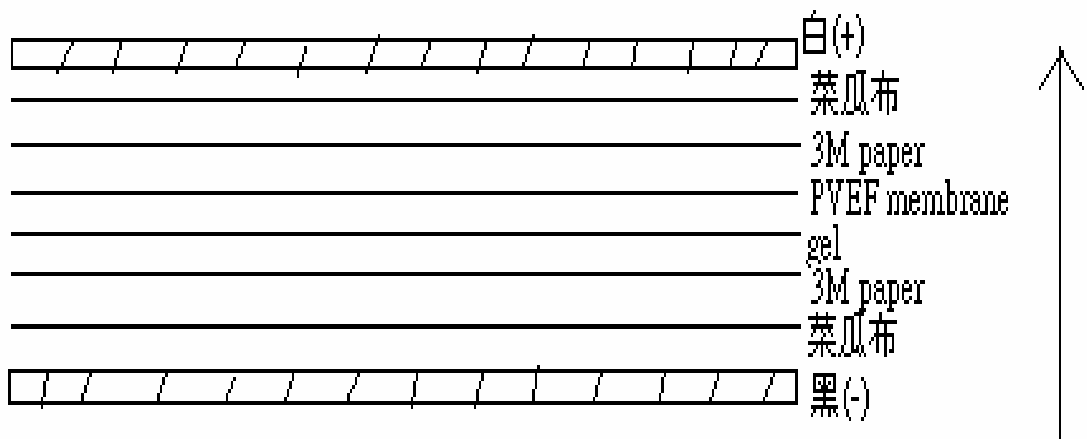


圖 2-3. 轉漬夾的三明治結構

九、共軛焦顯微鏡 (confocal) 偵測凋亡蛋白的表現

1. 原理：不同於光學顯微鏡，共軛焦顯微鏡可以觀察到更清晰的影像，利用不同的雷射光強度可以激發不同的螢光，並且可以將激發光影像結合判斷。依蛋白表現的特徵，加入細胞核或粒線體的染劑，評估蛋白的表現⁽⁷⁶⁾。

2. 步驟：

1) 依需要觀察的蛋白，每一個蛋白需有加藥組及控制組。利用 10 cm dish 與 coating 好負電的載玻片培養細胞，J5 cells(1×10^6 cells/12 ml medium)。待隔夜細胞貼附在載玻片上，更換新鮮的培養液，加入濃度 75 μ M 之 baicalein 培養細胞，培養 72 小時之後，將載玻片取下，並利用 PBS 清洗 5 分鐘 3 次，利用冰的 methanol 將細胞固定，放入 -20°C 冰箱中，作用 20 分鐘。以 PBS 清洗 5 分鐘 3 次，再利用 0.1% Triton X-100 作用 30 分鐘。以 PBS 清洗 5 分鐘 3 次，擦去周圍細胞，分別加入 (cytochrome *c*、AIF、EndoG) 50 μ l 一級抗體 (1:200 PBS 稀釋)，以 parafilm 蓋住要染的細胞，4 °C 下 overnight，並避免乾掉。

2) 隔夜從冰箱取出，將載玻片放入 PBS 中，將 parafilm 脫除。以 PBS 清洗 5 分鐘 3 次，接下來都要避光操作，再以同樣的方法染二級抗體 (1:100 PBS 稀釋)，37°C、2~2.5 小時。以 PBS 清洗 3 次 5 分鐘，再依所需要觀察的的部位染細胞核或粒線體，37 °C、1~1.5 小時。以 PBS 清洗 3 次 5 分鐘，風乾後，滴入封片膠，並蓋上蓋玻片，於蓋玻片周圍並用指甲油密封保存，以共軛焦顯微鏡觀察⁽⁷⁷⁾。

十、腫瘤轉移 (metastasis) 試驗

(一) 細胞移動試驗 (cell motility assay)

1. 步驟：

- 1) 先將 6 well plate 中央，貼上寬 1 cm 的膠帶，以紫外光照滅菌，待隔夜，種滿 J5 cells (約 5×10^6 cells/well)，每 well medium 總量為 3 ml，隔夜待細胞貼附後，將膠帶小心移除，更換新鮮培養液後，加上 baicalein (0、10、25、50、75 μ M)，於 37 °C、5%CO₂ 的細胞培養箱培養，經 12 h、24 h、48 h、72 h 之後，取出，於顯微鏡下觀察細胞移動的情形，並照相⁽⁷⁸⁾。

(二) 細胞侵入試驗 (cell invasion assay)

1. 步驟：

- 1) 在 24 well Transwells upper chamber 中 coating 一層 matrigel (以 1% 細胞培養液稀釋 1 倍)，loading 50 μ M matrigel，放於 37 °C 培養箱中，待 matrigel 凝固。
- 2) 收取細胞，調整細胞密度 5×10^5 cells/ml，將未含 FBS 的培養液注入 24 well Transwells 的 lower chamber 中，每 well 注入 800 μ l (含有 1 μ l 的趨化劑 fibronectin)。
- 3) 將整個 upper chamber 放入已加入 medium 的 lower chamber 中，在 upper chamber 的 well 中注入已調整密度的細胞，每 well 注入 200 μ l (共 1×10^5 cells)。分別加入不同濃度 (0、37.5 μ M) 黃芩素，將整個裝置放入 37 °C 培養箱中，經 48 小時後，
- 4) 將 upper chamber 自裝置上取下，將面朝下的那一面以甲醇 (methanol) 固定，放置在 -20 °C 的冰箱上。30 分鐘之後，取出用 PBS 洗兩次。加入 homocytin stain 染色一小時之後，用 PBS 清洗兩次。最後以棉花棒抹去 membrane 另一面未移動過去的細胞，

以顯微鏡（100 X）記數移動過去的細胞。計算三個視野，每一個視野二重複，平均每次的結果⁽⁷⁹⁾。

十一、統計分析（Statistics analysis）

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 $p < 0.01$ ，表示統計上具顯著差異）



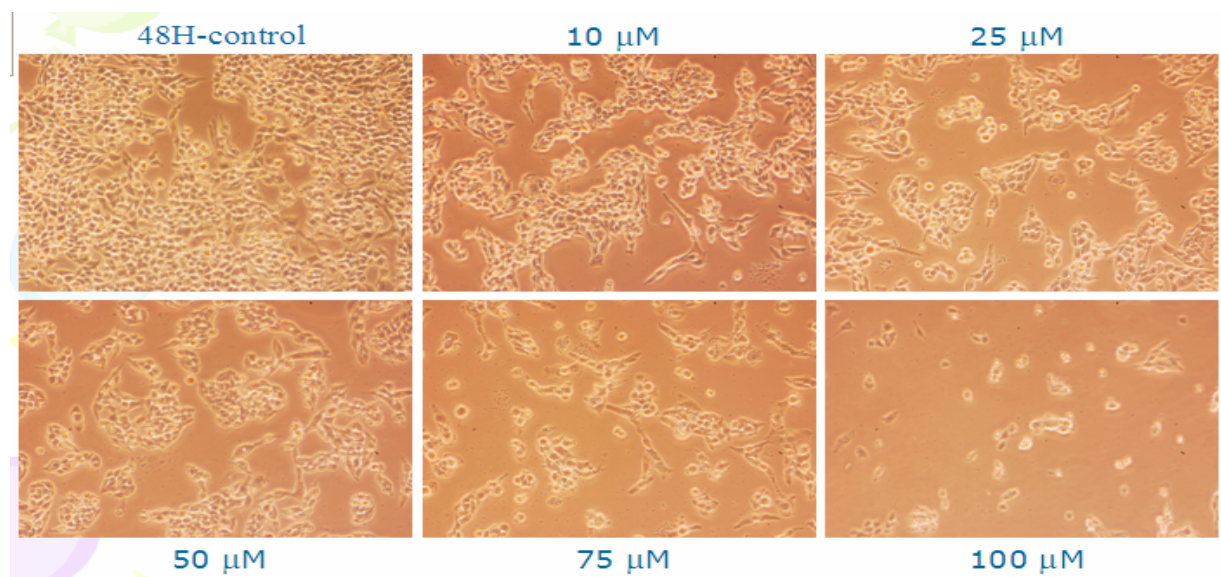
第三章 結果

第一節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) 形態的影響

以倒立式相位差顯微鏡觀察細胞形態，加藥組和控制組相比，發現黃芩素 (baicalein) 對人類肝癌細胞 (J5 cells) 有明顯的抑制效果，且與藥物劑量成依存性 (dose-dependent)。由細胞外觀形態來觀察，可以看到肝癌細胞變圓、核質皺縮，細胞膜起小泡 (bedding)，甚至可以看到一些已經死亡的漂浮細胞，隨著藥物濃度的增加，這樣的現象越趨明顯，可看到抑制細胞生長的現象 (圖 3-1-A)。以黃芩素 (75 μM) 處理的加藥組，可發現肝癌細胞隨時間增加細胞受損越嚴重，與時間成依存性 (time-dependent)，而控制組因沒有受到抑制而逐漸增生 (圖 3-1-B)。



(A)



(B)

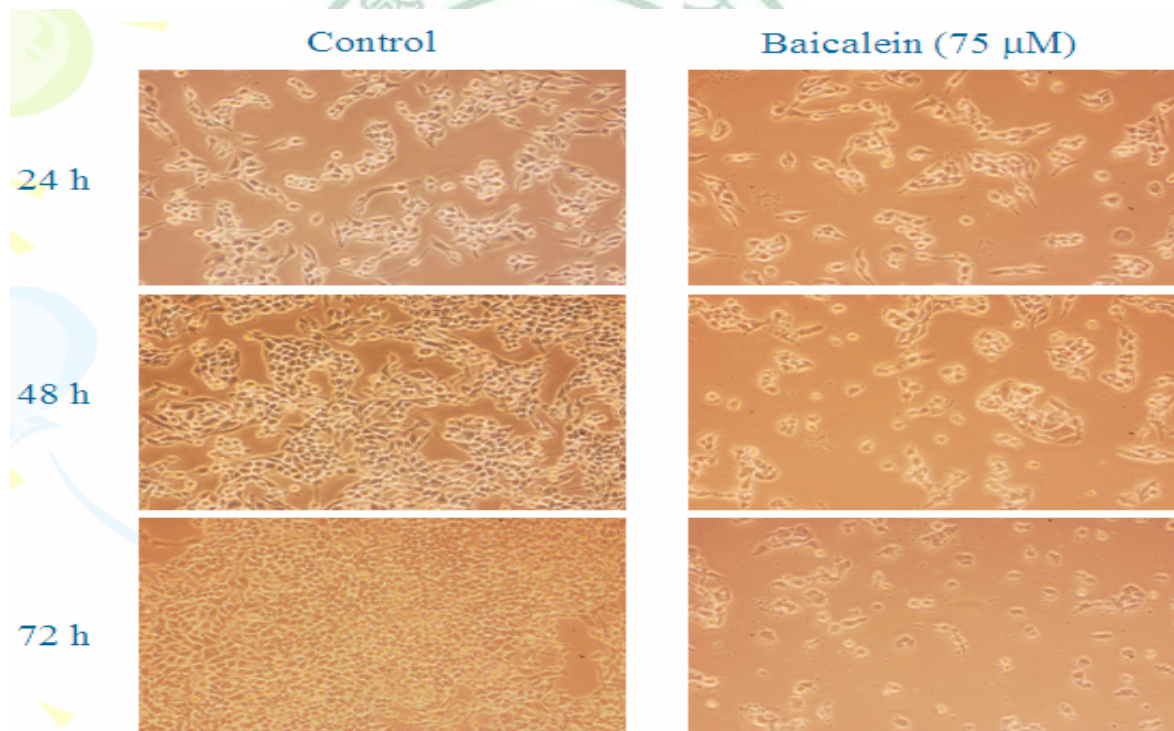


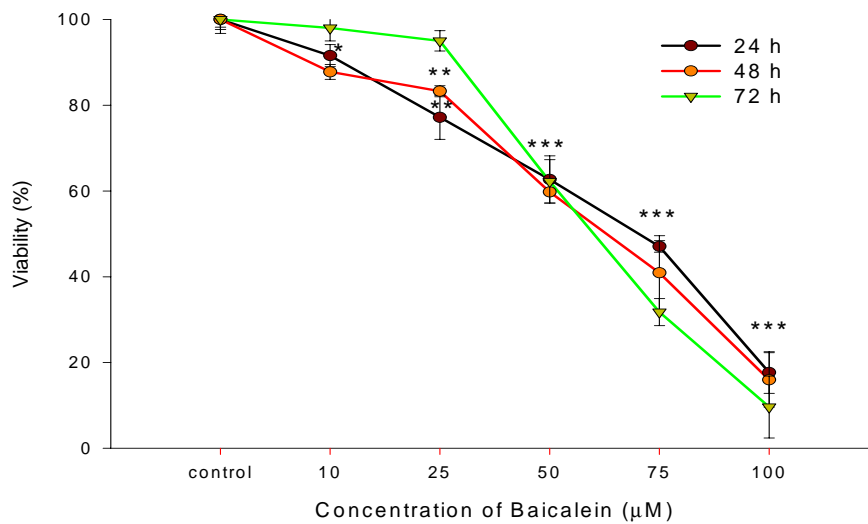
圖3-1. 倒立式顯微鏡觀察J5細胞的變化，(A)以不同濃度黃芩素（0、10、25、50、75、100 μM）培養人類肝癌細胞（J5）48小時後形態的變化。(B)人類肝癌細胞（J5）給予75 μM黃芩素，經不同時間（24、48、72 h）培養後形態的變化。顯微鏡倍數為200 X。

第二節 黃芩素對人類肝癌細胞（J5）存活率的影響

顯微鏡下觀察形態的結果，發現baicalein對細胞增生及存活有明顯影響，再以流式細胞儀評估baicalein對細胞的毒性作用，結果依兩個方向來探討，一為藥物劑量依存性（dose-dependent），另一個為時間依存性（time-dependent）。加藥培養24、48、72小時後，結果顯示，黃芩素毒殺細胞的效果，是隨藥物濃度（0、10、25、50、75、100 μM ）增加而漸強（圖3-2-A），與劑量呈依存性（dose-dependent）。另外，在黃芩素（75 μM ）作用下，細胞的存活率隨著時間的增加而降低，證實藥物跟時間呈依存性（time-dependent）（圖3-2-B）。



(A)



(B)

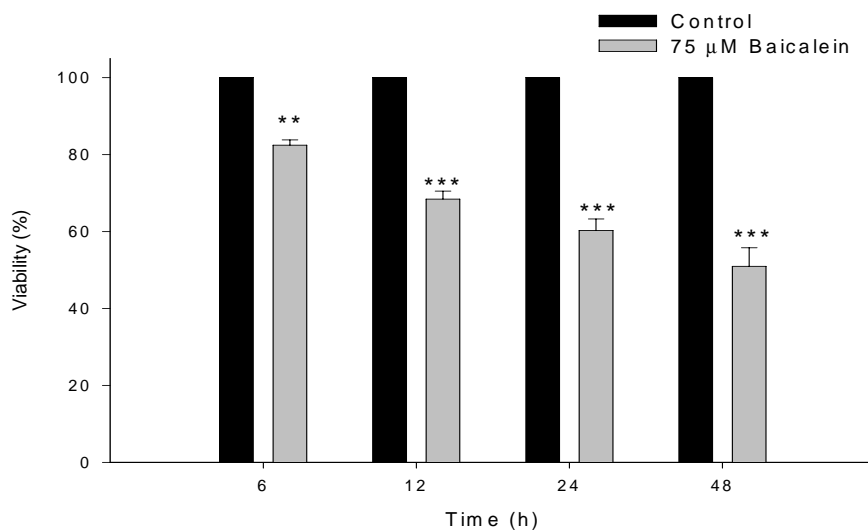


圖 3-2. 流式細胞儀偵測細胞存活率之結果，(A)人類肝癌細胞 (J5) 以不同濃度黃芩素 (0、10、25、50、75、100 μM)，培養不同時間 (24、48、72 h) 之存活率，(B) 人類肝癌細胞 (J5) 以黃芩素 (75 μM) 培養不同時間 (6、12、24、48 h) 之存活率。(n=3, *表示 p<0.05; **表示 p<0.01; *** p<0.001, 具有統計學上的差異)

第三節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) 細胞週期的影響及調控蛋白的變化

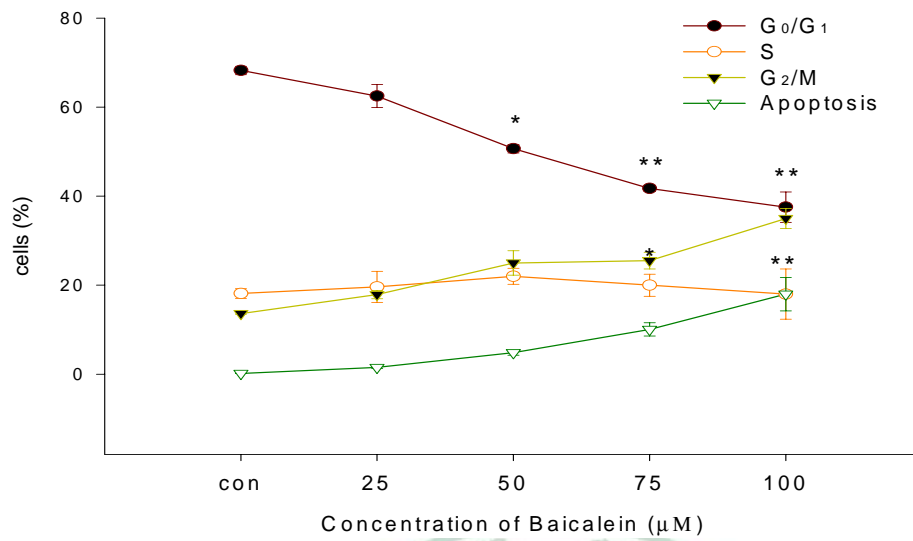
一、 利用流式細胞儀偵測 J5 cells 細胞週期的變化

黃芩素 (0、10、25、50、75、100 μM) 與人類肝癌細胞 (J5) 培養 48 小時後，以流式細胞儀檢測細胞週期的改變。結果顯示細胞週期 G_0/G_1 、S 期下降， G_2/M 上升，apoptosis 上升 (圖 3-3-A)。黃芩素 (75 μM) 與人類肝癌細胞 (J5) 培養 6、12、24、48 小時後，以流式細胞儀檢測細胞週期的改變，亦顯示細胞週期 G_0/G_1 與 S 期下降， G_2/M 與 apoptosis 上升 (圖 3-3-B)。

二、 西方墨點法檢測 J5 細胞週期相關蛋白活性的表現

經由流式細胞儀的檢測，我們知道 J5 cells 在經黃芩素處理後，細胞週期停滯在 G_2/M 期。因此，更進一步探討與細胞週期停滯相關蛋白活性的表現。藉由西方墨點法檢測黃芩素 (75 μM) 以不同時間點培養(0、6、12、24、48、72 h)相關蛋白的表現 (圖 3-3-C)。

(A)



(B)

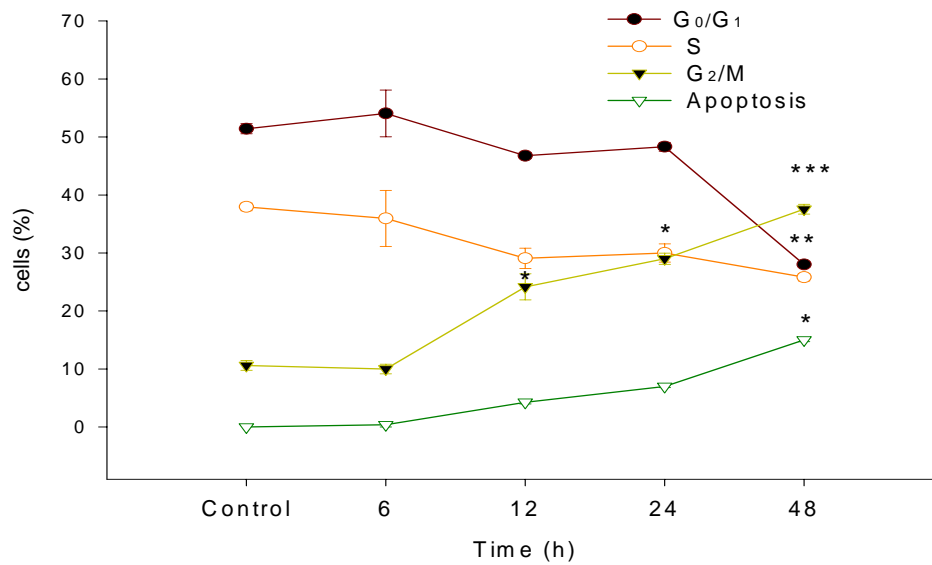


圖 3-3. 流式細胞儀偵測細胞週期之結果(A)人類肝癌細胞 (J5) 以不同濃度黃芩素 (0、10、25、50、75、100 μM) 培養 48 小時後細胞週期的變化, (B)人類肝癌細胞 (J5) 以黃芩素 (75 μM) 培養不同時間 (6、12、24、48 h) 細胞週期的變化。(n=3, *表示 $p < 0.05$; **表示 $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, 具有統計學上的差異)

(C)

Baicalein (75 μ M)

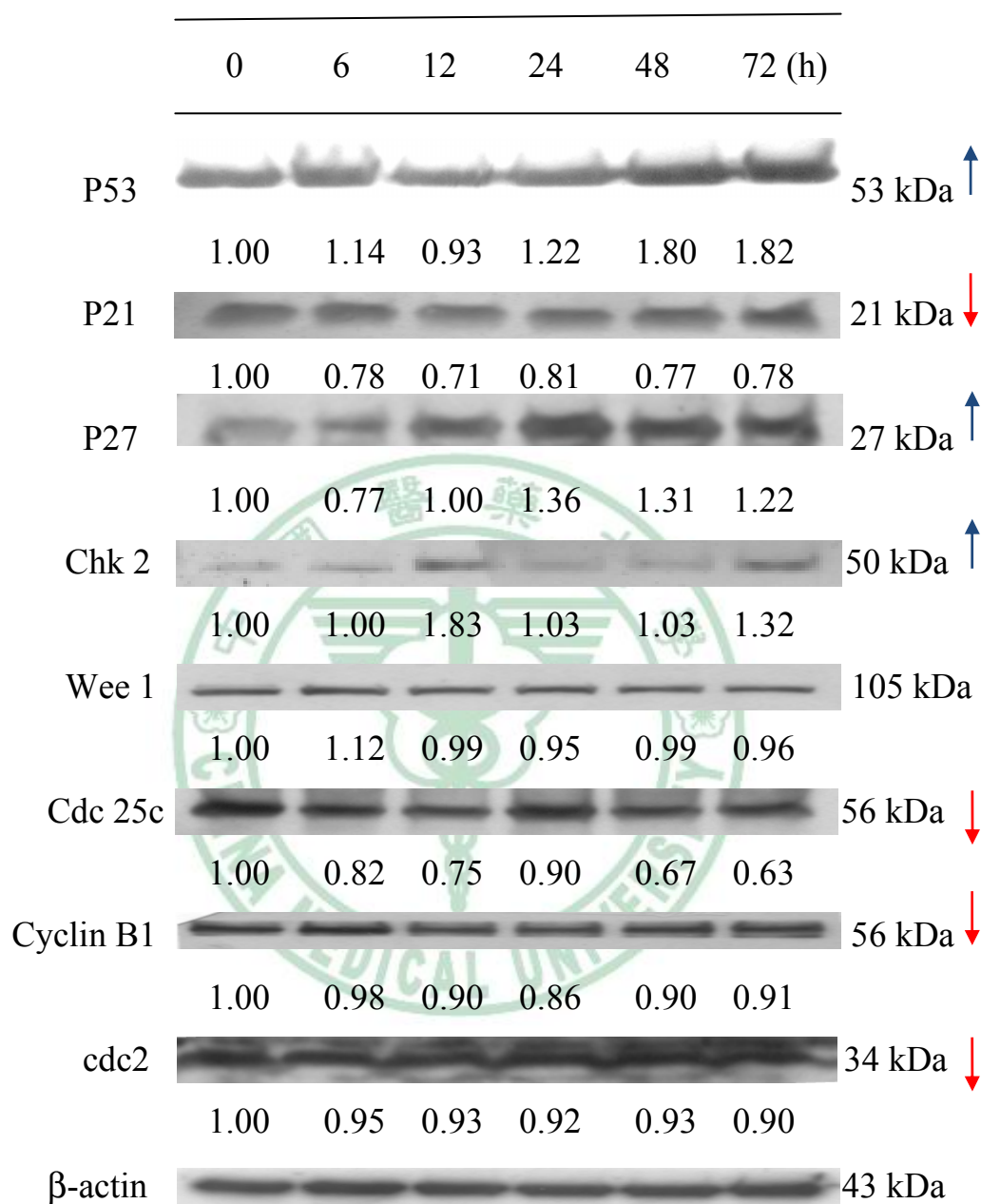


圖 3-3-C. 人類肝癌細胞 (J5) 以黃芩素 (75 μ M) 培養不同時間 (6、12、24、48、72 h) 細胞週期調控蛋白的變化 (如：p53、p21、p27、chk2、wee1、cdc25c、cyclinB1、cdc2) 之表現變化。

第四節 黃芩素對人類肝癌細胞(J5)粒線體膜電位(MMP; $\Delta\Psi_m$)的影響

在細胞凋亡過程中，粒線體的失調 (mitochondrial dysfunction) 扮演著一個重要的角色。粒線體與細胞凋亡的特徵有著高度的相關性，包括：粒線體膜電位的下降、電子傳遞鏈的瓦解及自由基的大量表現，導致氧化磷酸化的產生，細胞凋亡因數的釋放 (cytochrome *c*、AIF、Endo-G)，進而促使相關 caspase 路徑活化使得細胞凋亡。

實驗結果顯示，黃芩素對肝癌細胞之粒線體膜電位確實有影響，在短時間 2~6 小時有明顯的下降，在統計學上有顯著性的差異，而在 12 小時以後下降的程度減少，在統計學上還是有顯著性的差異，隨著時間的增加在 24 小時以後，膜電位已不再下降 (圖 3-4-A、圖 3-4-B)。



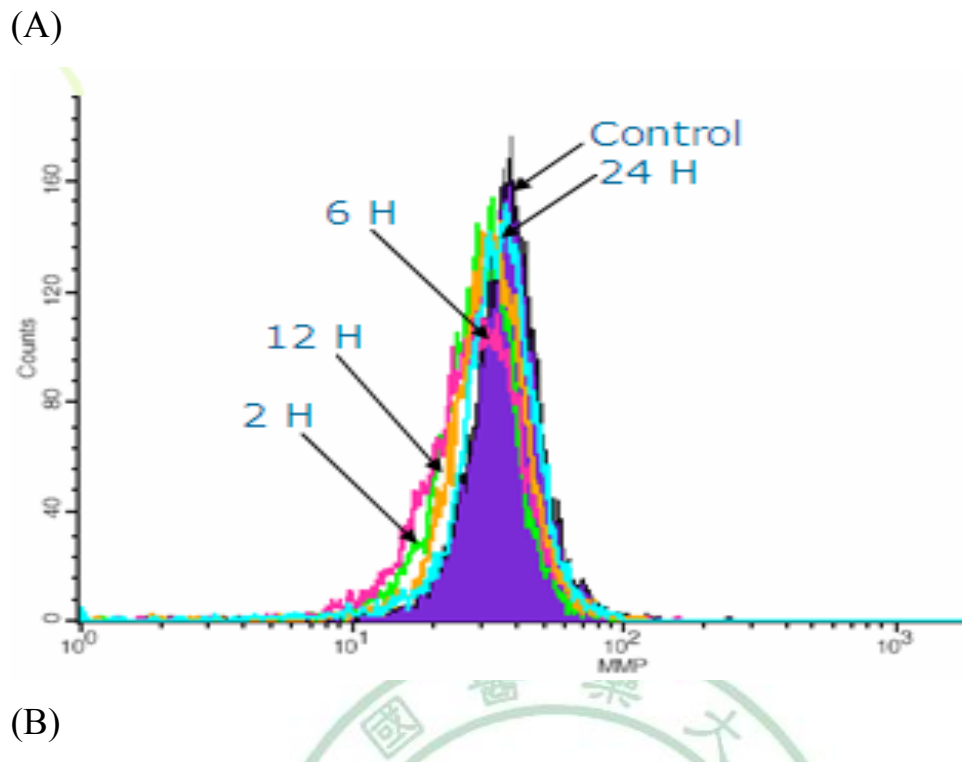


圖 3-4. J5 細胞以黃芩素 (75 μM) 培養不同時間後 MMP 的變化。(A) 為利用流式細胞儀偵測不同時間所產生之 MMP 圖，(B) 為 MMP 相對表現量之統計圖，* 為各實驗組與控制組數據比較後，於統計分析上有顯著差異。(n=3, * 表示 $p < 0.05$; ** 表示 $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ，具有統計學上的差異)

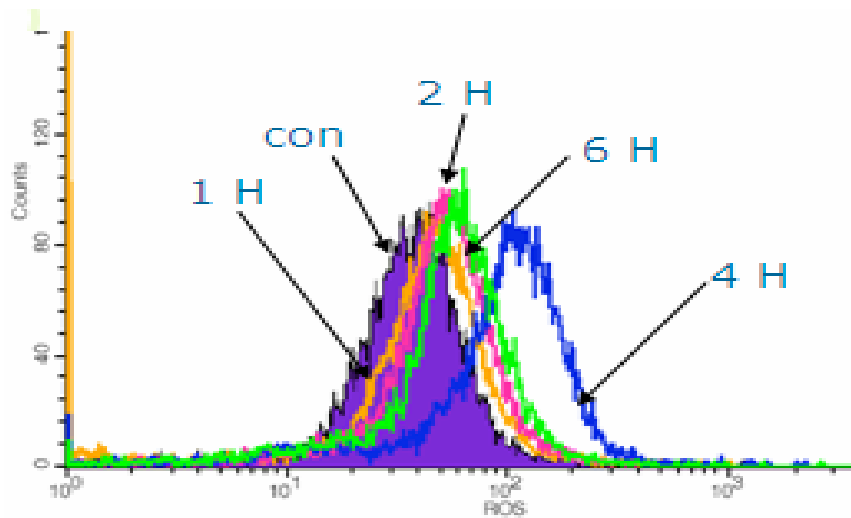
第五節 黃芩素對人類肝癌細胞（J5）ROS 的影響

研究指出，當大量的 ROS 產生時，會促使胞內的氧化壓力上升而引起細胞凋亡機制的連鎖反應。而造成粒腺體膜電位的改變，使得位於膜上的 cytochrome *c* 釋放出來，引發下游反應，活化蛋白激酶，進而造成 apoptosis。當 DNA 受損時，會啟動 p53 抑癌基因活化，進而促進一連串的促凋亡反應。

結果顯示：以黃芩素處理在短時間中（2~12 小時），細胞會產生大量的自由基，但是超過 12 小時後，自由基有下降的趨勢圖（3-5-A）。



(A)



(B)

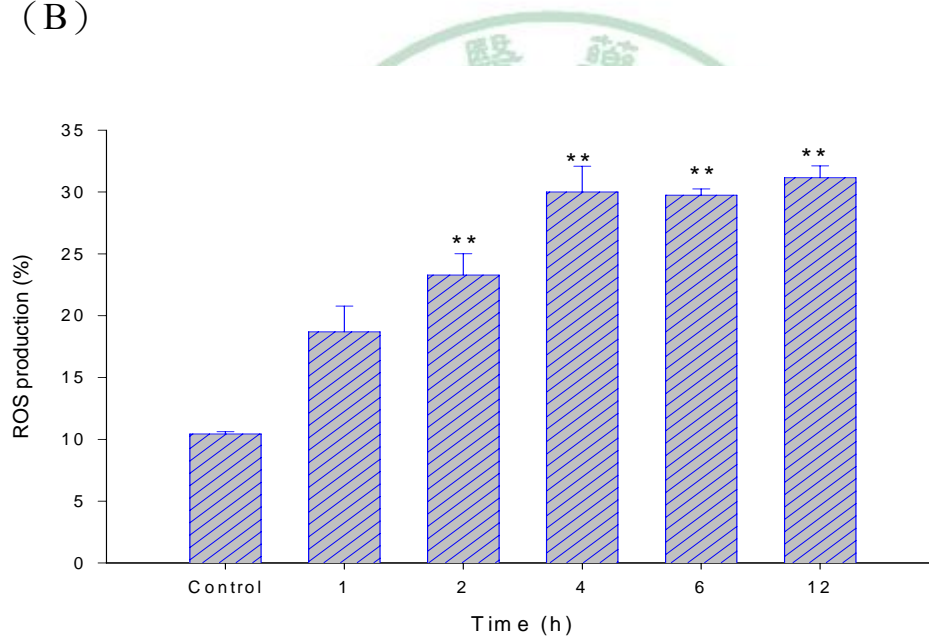


圖 3-5. J5 細胞以黃芩素 (75 μ M) 培養不同時間後 ROS 的變化。(A) 為利用流式細胞儀偵測不同時間所產生之 ROS 圖，(B)為 ROS 相對表現量之統計圖，*為各實驗組與控制組數據比較後，於統計分析上有顯著差異。(n=3，*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ ，具有統計學上的差異)

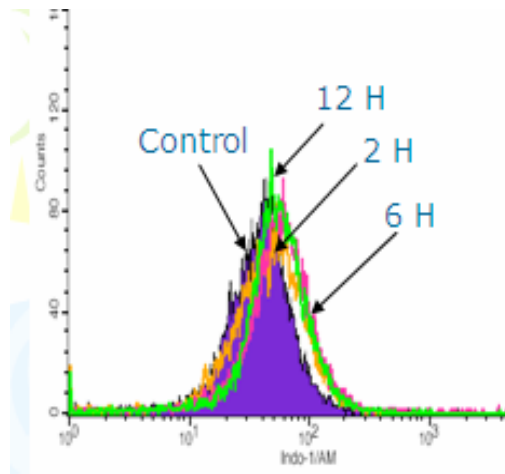
第六節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) 鈣離子釋放 (calcium release) 的影響

探討黃芩素造成細胞凋亡與細胞內鈣離子的釋放，我們以黃芩素 (75 μM)，培養不同的時間 (2、6、12、24、48、72 h) 後，收取細胞，加入鈣離子螢光染劑 Indo-1-AM。再以流式細胞儀偵測細胞內鈣離子釋放的情形。

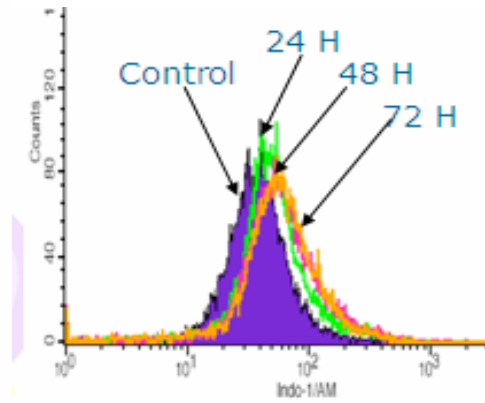
結果顯示，2~12 h 時細胞內鈣離子濃度隨時間的增加而上升，而在 24、48、72 h 中維持較高的濃度，鈣離子的釋放有顯著統計學上差異 (圖 3-6)。



(A)



(B)



(C)

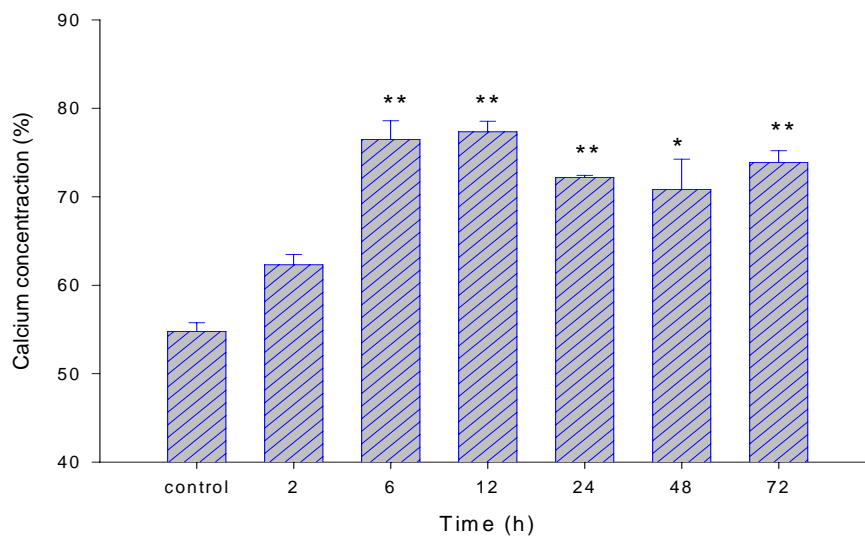


圖 3-6. J5 細胞以黃芩素 (75 μ M) 培養不同時間後鈣離子釋放之結果。(A)(B)為利用流式細胞儀偵測不同時間所產生之鈣離子，(C)為鈣離子相對表現量之統計圖，*為各實驗組與控制組數據比較後，於統計分析上有顯著差異。(n=3，*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ ，具有統計學上的差異)

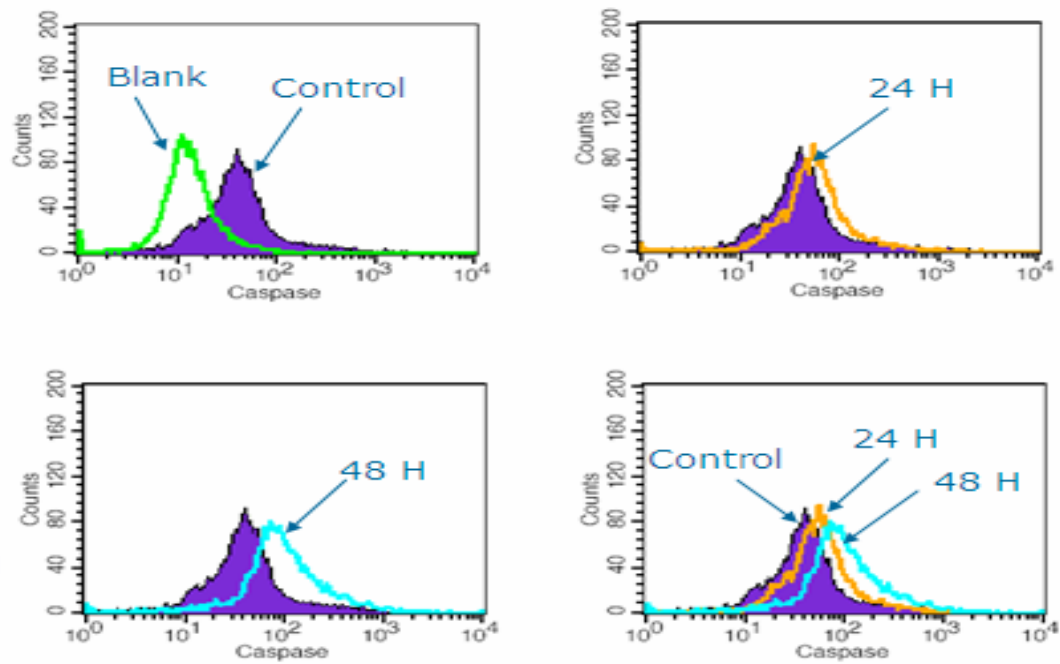
第七節 黃芩素對人類肝癌細胞（J5）caspase-3 活性的影響

探討黃芩素對 J5 細胞內 caspase-3 活性上升的影響，我們以黃芩素（75 μM ）培養不同的時間點（24、48 h）後，收取細胞，利用 PhiPhiLux-G₁D₁ kit 來檢測凋亡細胞內 caspase-3 之產生。再以流式細胞儀偵測細胞內 caspase-3 活性的變化。

結果顯示，經 24 小時培養後細胞內 caspase-3 活性上升，經 48 小時後 caspase-3 活性上升更加明顯。細胞內 caspase-3 活性上升有顯著的統計學意義（圖 3-7）。



(A)



(B)

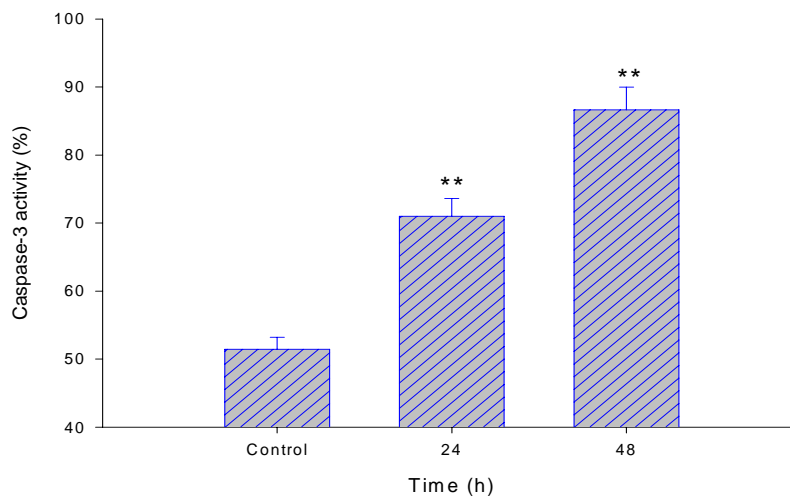


圖 3-7. J5 細胞以黃芩素 (75 μM) 培養不同時間後 caspase-3 活性的變化。(A)為利用流式細胞儀偵測不同時間細胞內 caspase-3 活性，(B)為 caspase-3 活性相對表現量之統計圖，*為各實驗組與控制組數據比較後，於統計分析上有顯著差異。(n=3，*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ ，具有統計學上的差異)

第八節 ROS 抑制劑 NAC 對經黃芩素處理人類肝癌細胞 (J5) ROS 及細胞存活率的影響

因為推測 ROS 的產生是黃芩素造成 J5 細胞氧化壓力的來源，故加入 NAC (ROS 抑制劑)，先清除細胞內 ROS，以探討是否能減低黃芩素對細胞的氧化傷害。

於加藥前兩小時，加入抑制劑，培養時間 6 小時，收取細胞，利用流式細胞儀分析 ROS 的量。另外偵測加入 ROS 抑制劑，培養 24 小時，用流式細胞儀分析細胞的存活率。

結果顯示，加入 NAC 後，用流式細胞儀偵測 ROS 的量，可以降低 ROS 的產生，且具有統計上的意義。另外，用流式細胞儀分析 24 小時之後的存活率，可以發現加入 NAC 的細胞存活率明顯上升。且具有統計學上的意義 (圖 3-8)。



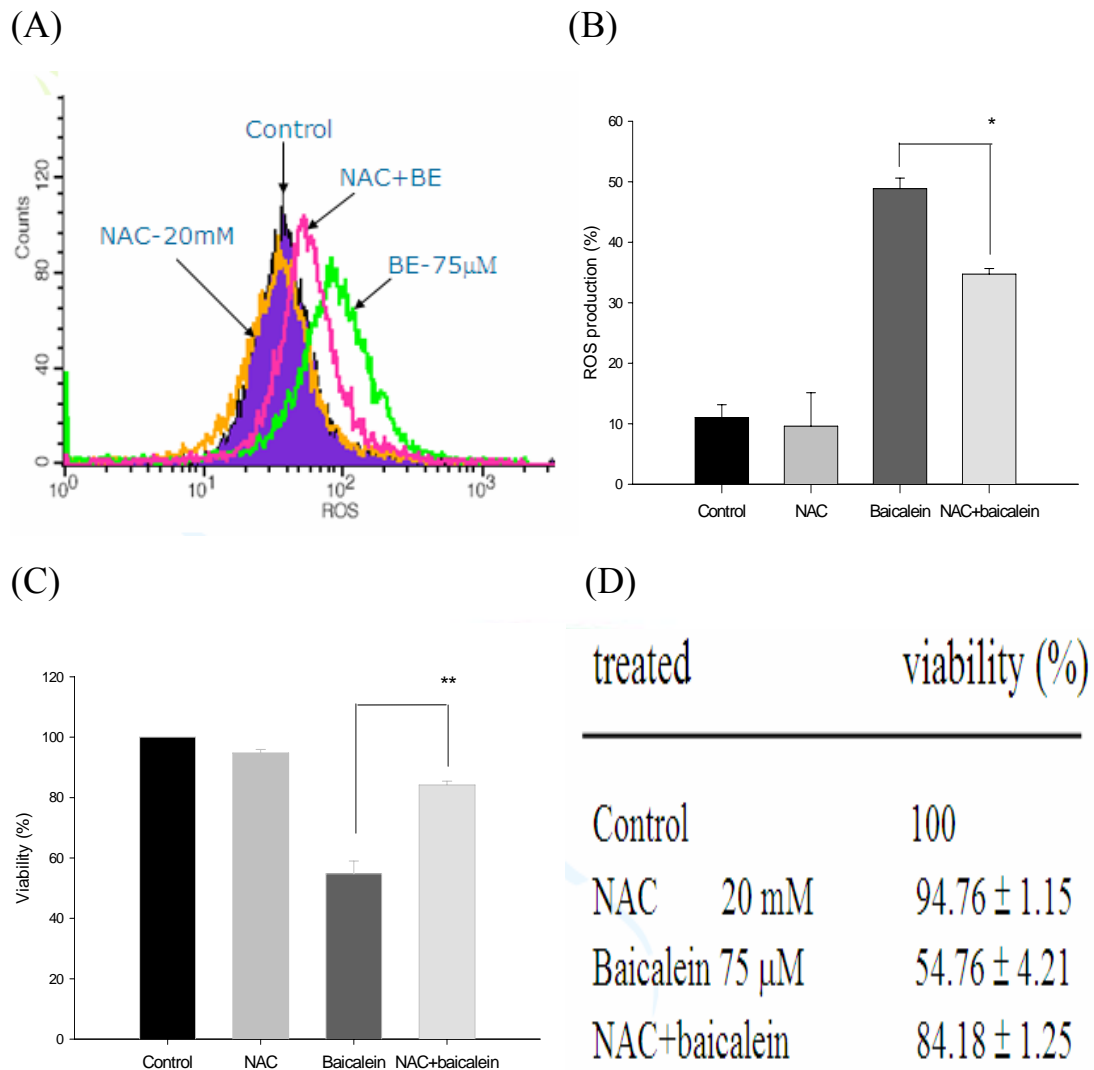


圖 3-8. J5 細胞與黃芩素及 NAC 培養後的結果。(A)流式細胞儀偵測培養 6 小時後 ROS 的變化圖，(B) ROS 相對表現量之統計圖，(C)(D) 細胞培養 24 小時存活率的統計圖*為各實驗組與控制組數據比較後，於統計分析上有顯著差異。(n=3，*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ ，具有統計學上的差異)

第九節 黃芩素對人類肝癌細胞 (J5) DNA 傷害的影響

一、利用 DAPI 染色檢測凋亡細胞

黃芩素不同濃度 (0、10、25、50、75、100 μM) 與人類肝癌細胞 (J5)，培養 48 小時後，收集細胞，以 DAPI 將細胞染色，在螢光顯微鏡下觀察。若細胞是經由細胞凋亡路徑，DAPI 染劑會接在 DNA 雙股螺旋小溝 (minor groove) 上，呈現白色螢光。

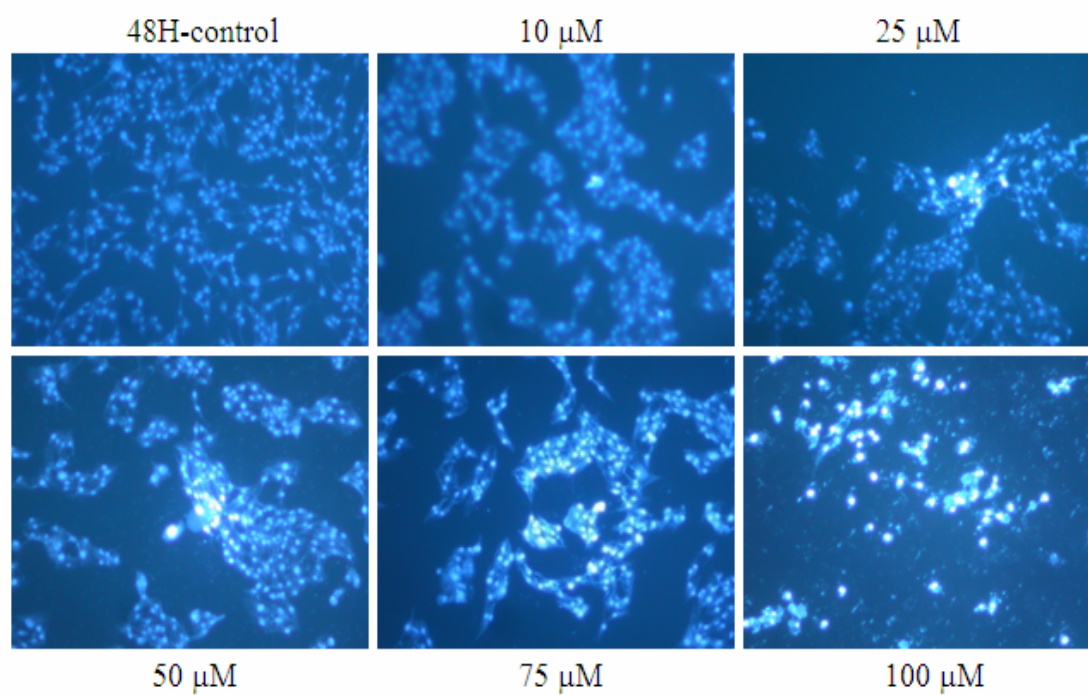
螢光顯微鏡下觀察結果，加藥組可以看見白色螢光，隨著黃芩素濃度的增加可發現螢光強度有增加的現象，而控制組沒有顯示螢光 (如圖 3-9-A)。

二、利用單細胞電泳分析 (single cell gel electrophoresis assay) 檢測細胞 DNA 損傷

黃芩素以不同濃度 (0、10、25、50、75、100 μM) 處理人類肝癌 J5 細胞，經 24 小時之後，藉由電泳將斷裂的 DNA 拖出膜外，以 PI 將細胞染色，在螢光顯微鏡下觀察斷裂 DNA，會呈現拖尾的現象，故又稱 Comet assay。

結果：對照組 (Control) 呈現完整圓形，DNA 沒有斷裂，拖出膜外；加藥組隨濃度增加發現 J5 細胞拖尾現象越明顯，即代表 DNA damage 更加受損 (如圖 3-9-B)。

(A)



(B)

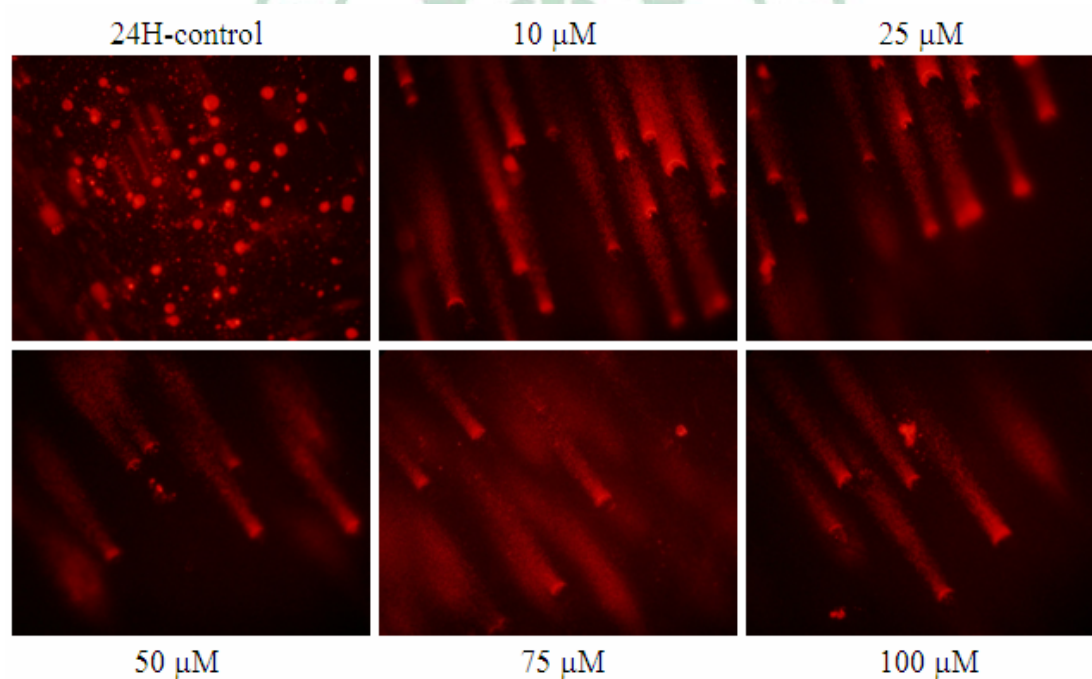


圖 3-9. DNA 傷害與細胞凋亡的結果(A)黃芩素 (baicalein) 與 J5 細胞培養 48 小時後 DAPI 染色之觀察。(B)黃芩素 (baicalein) 與 J5 細胞培養 24 小時後之 DNA 損傷分析。螢光顯微鏡為 100 X、200 X 照相。

第十節 共軛焦顯微鏡 (confocal) 探討粒線體內蛋白的表現

共軛焦顯微鏡可利用影像重建技術，依照不同的螢光，結合細胞之各項結構與分子，並將螢光離子流的影像擷取之後進行分析，也可以將影像重疊判斷。我們將特定蛋白分子結合上具有螢光 (FITC) 的二級抗體，在雷射光波長 488 nm 激發成綠色螢光。再依蛋白的表現特徵，加入 Rhodamine 123 (RH-123) 染粒線體，PI 染細胞核，雷射光波長 543 nm 激發成紅色螢光，觀察蛋白的表現。

探討經由 ROS 產生造成粒線體通透性改變，造成細胞凋亡啟動因子 cytochrome *c*、凋亡誘導因子 (AIF) 和核酸內切酶 endonuclease G (Endo G) 釋放；AIF 會進入核內 DNA 與 Endo G 作用，導致 DNA 斷裂 (約 50 kb)，引起 caspase independent pathway 的細胞凋亡，還可與 caspase 及 cytochrome *c* 協同引起細胞的凋亡。

因 cytochrome *c* 會進入到細胞質中，啟動細胞凋亡路徑，結果顯示加藥組的 cytochrome *c* 細胞質中的螢光表現量高於控制組；AIF、Endo G 則會進入細胞核內，促使 DNA 斷裂而引起細胞凋亡。顯示，若蛋白進入到細胞核內與 DNA 作用，在細胞核內看到紅光跟綠光的重疊光源呈現橘黃色，表示 AIF 或 Endo G 進入到細胞核中，造成 DNA 斷裂，並引發細胞凋亡，且綠色螢光明顯比控制組高。

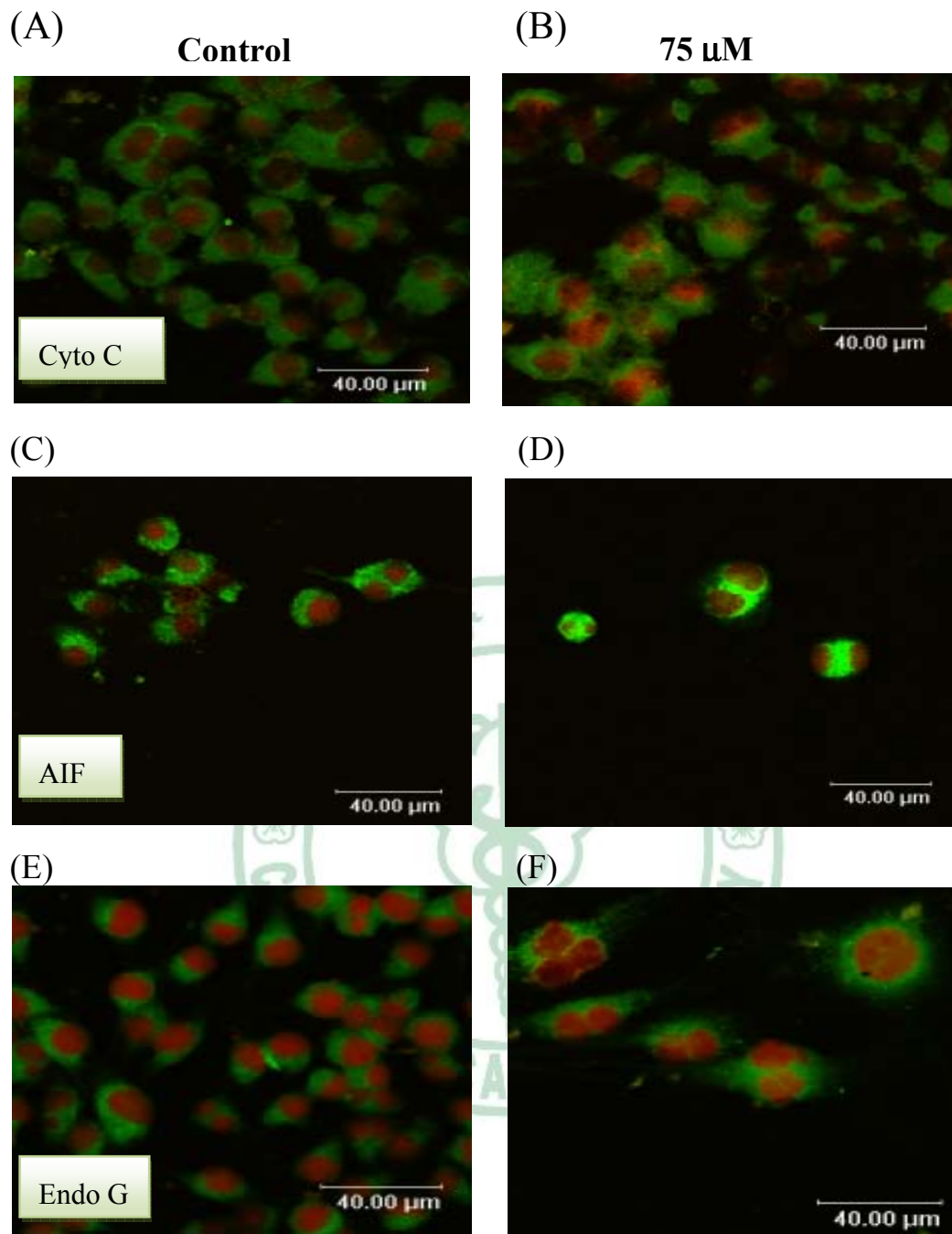


圖 3-10. 共軛焦顯微鏡探討粒線體內細胞凋亡蛋白 cytochrome *c*、AIF、Endo G 之觀察。(A)(C)(E)分別為之控制組，(B)(D)(F) J5 經黃芩素 (75 μM) 培養 72 小時之加藥組。

第十一節 黃芩素對人類肝癌細胞（J5）移動及相關蛋白的影響

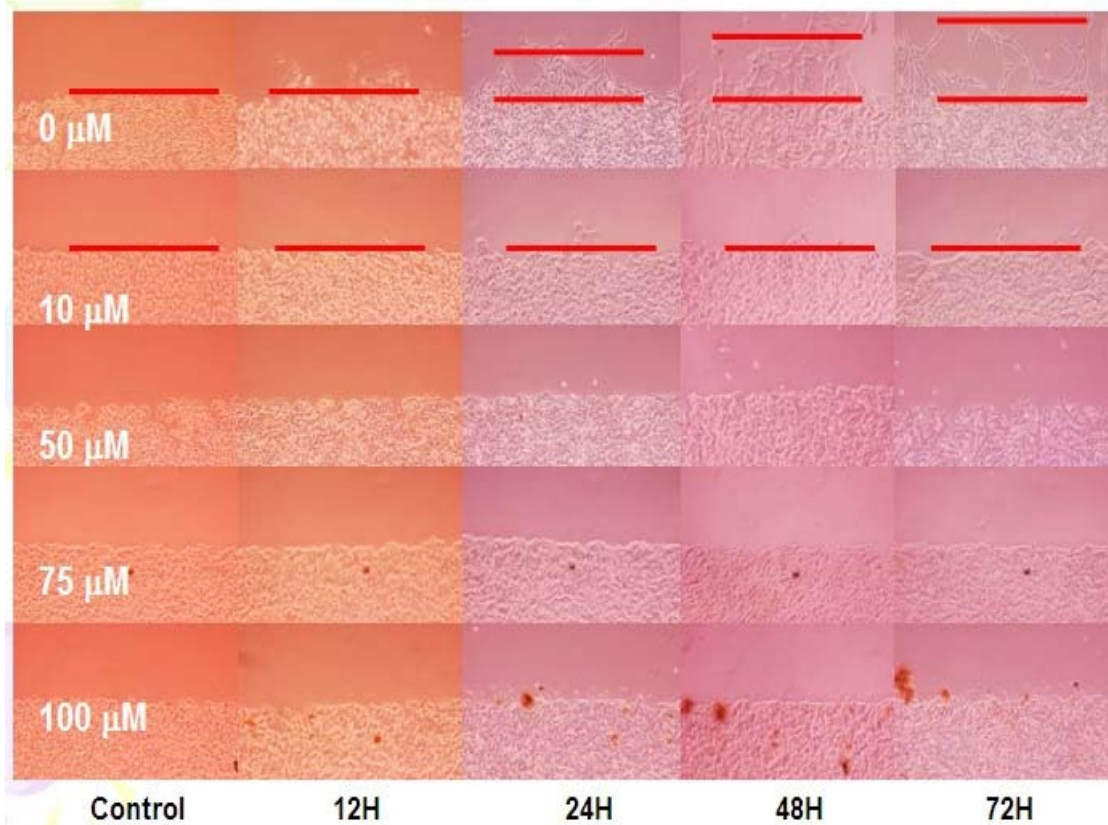
本實驗探討黃芩素是否能影響 J5 細胞的移動。其中由細胞移動試驗（cell motility assay）評估 J5 cells 移動的能力。實驗當中為避免因細胞的增生能力而有所誤差，故於加藥前置換不含 FBS 的培養液，進行觀察。發現控制組，於 12 小時，即有移動的現象，且隨著時間的增加，移動更明顯。而加藥組，有很明顯的抑制效果（圖 3-11-A）。

由結果顯示，黃芩素能有效抑制 J5 細胞的移行（migration），另外評估細胞侵入的能力，使用 Boyden chamber（細胞轉移分析器）系統偵察癌細胞侵入的能力，並計算侵入細胞數目。

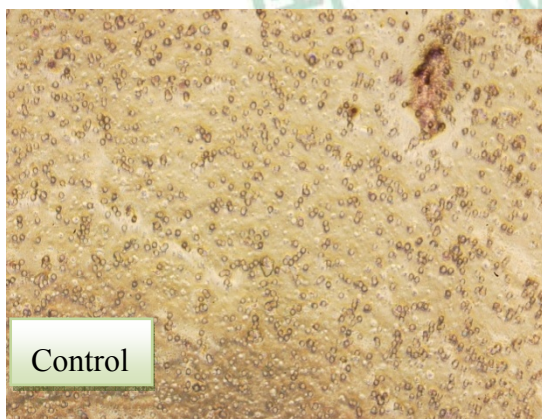
48 小時後由結果顯示，控制組穿透 membrane 的數目為 17 ± 5 cells，加藥組為 2 ± 1 cells（圖 3-11-B,C）。證實黃芩素的確可以抑制細胞的侵入。

轉移蛋白的影響，利用西方墨點法探討轉移蛋白的表現，結果顯示 MMP-9 的確也是受到抑制；因 COX-2 會刺激基質金屬蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs）的表現，結果顯示 COX-2 的表現也下降（圖 3-11-D）。

(A)



(B)



(C)

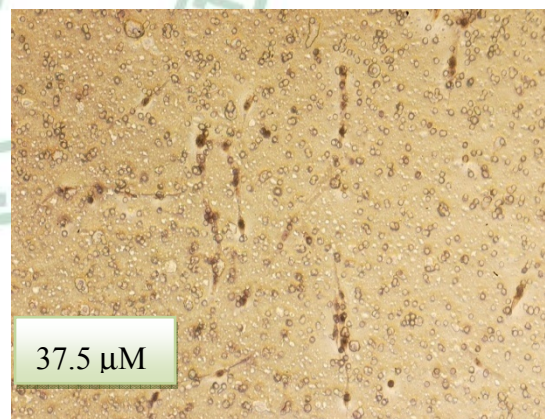


圖 3-11. 人類肝癌細胞 (J5) 以黃芩素不同濃度與不同時間培養後轉移之影響。(A) 黃芩素 (baicalein) 對 J5 細胞移行之結果, (B) 黃芩素 (37.5 μM) 抑制細胞侵入的結果 (2 ± 1 cells), (C) 控制組侵入的結果 (17 ± 5 cells)。

(D)

Baicalein (75 μ M)

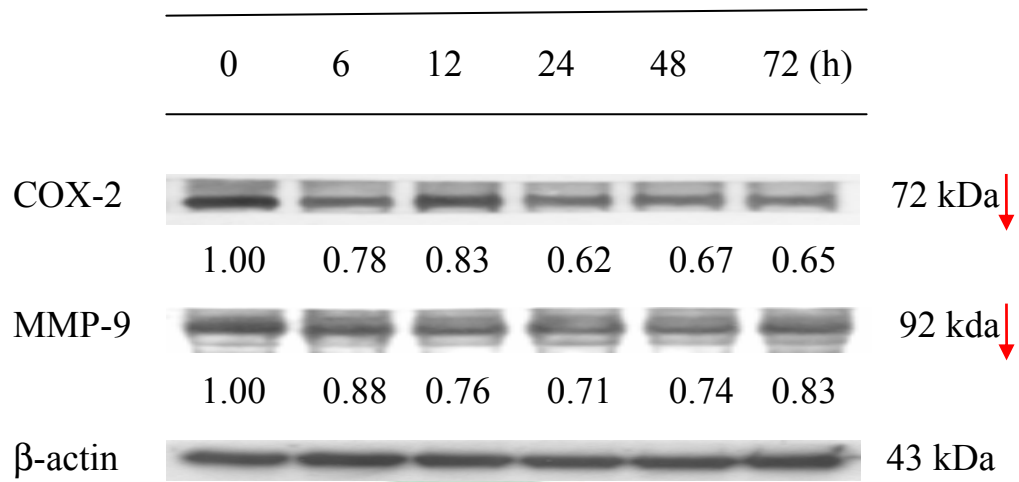


圖 3-11-D. 轉移蛋白的影響（如：COX-2、MMP-9）之表現變化。



第十二節 黃芩素對人類肝癌細胞（J5）細胞凋亡蛋白的影響

藉由西方墨點法檢測黃芩素（75 μ M）以不同時間點培養(0、6、12、24、48、72 h)相關蛋白的表現。在粒線體路徑蛋白的表現，促凋亡蛋白 Bax 上升，抑凋亡蛋白 Bcl-2 下降，促使膜間蛋白 Cytochrome *c* 與 Apaf-1 釋放，活化 caspase-9 與 caspase-3，導致細胞凋亡。凋亡誘導因子（AIF）及核酸內切酶 G（Endo G）表現上升，會進入到細胞核中，造成 DNA 的斷裂（圖 3-12-A）。

在內質網凋亡路徑蛋白的表現，GRP78 與 GADD153 表現上升（圖 3-12-B）。抗氧化酶蛋白的表現，清除 Catalase 下降，Mn-SOD 上升（圖 3-12-B）。



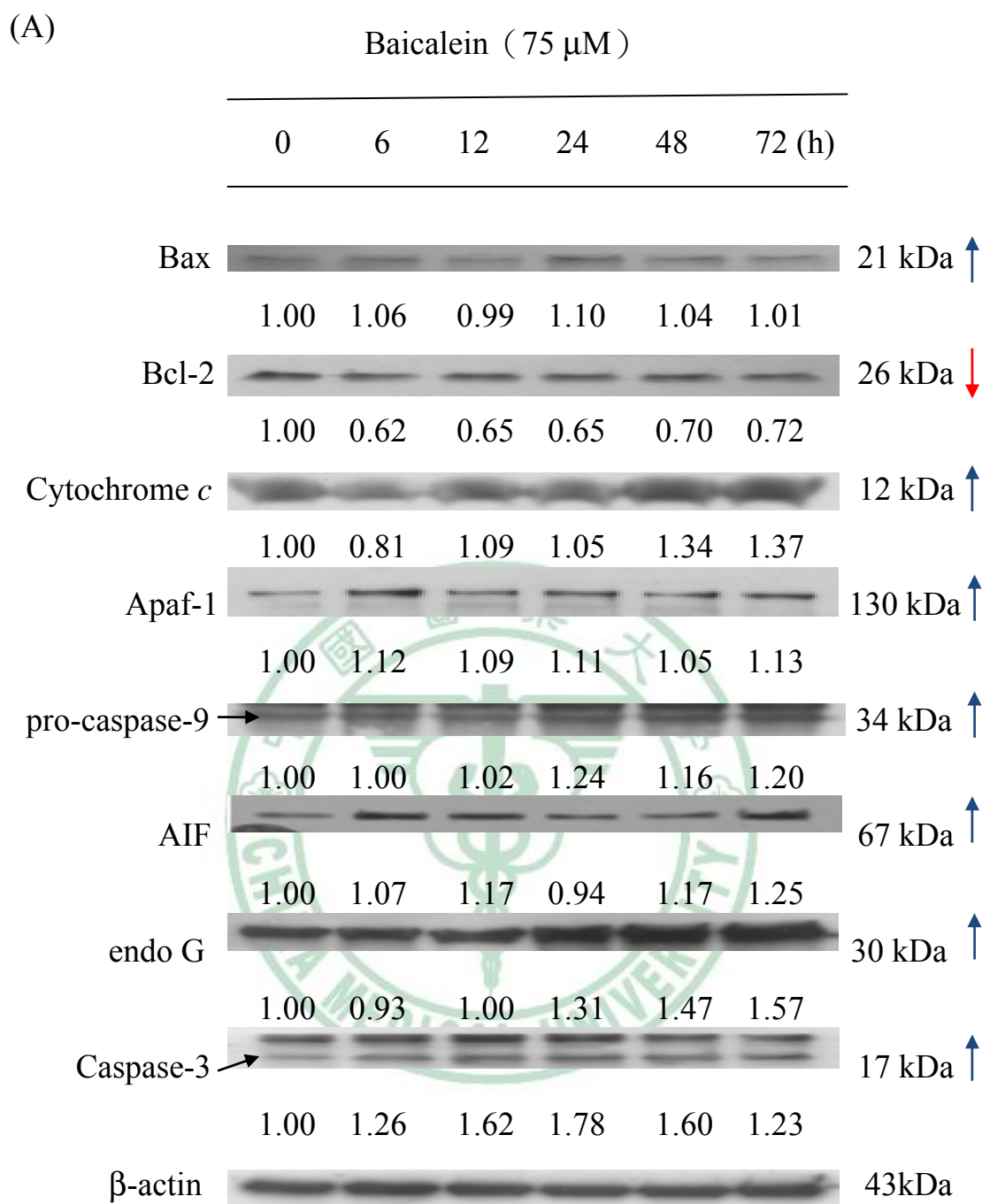


圖 3-12-A. 黃芩素對 J5 細胞相關凋亡蛋白的影響 (如: Bax、Bcl-2、cytochrome *c*、Apaf-1、pro-caspase-9、AIF、endo G、Caspase-3)。

(B)

Baicalein (75 μ M)

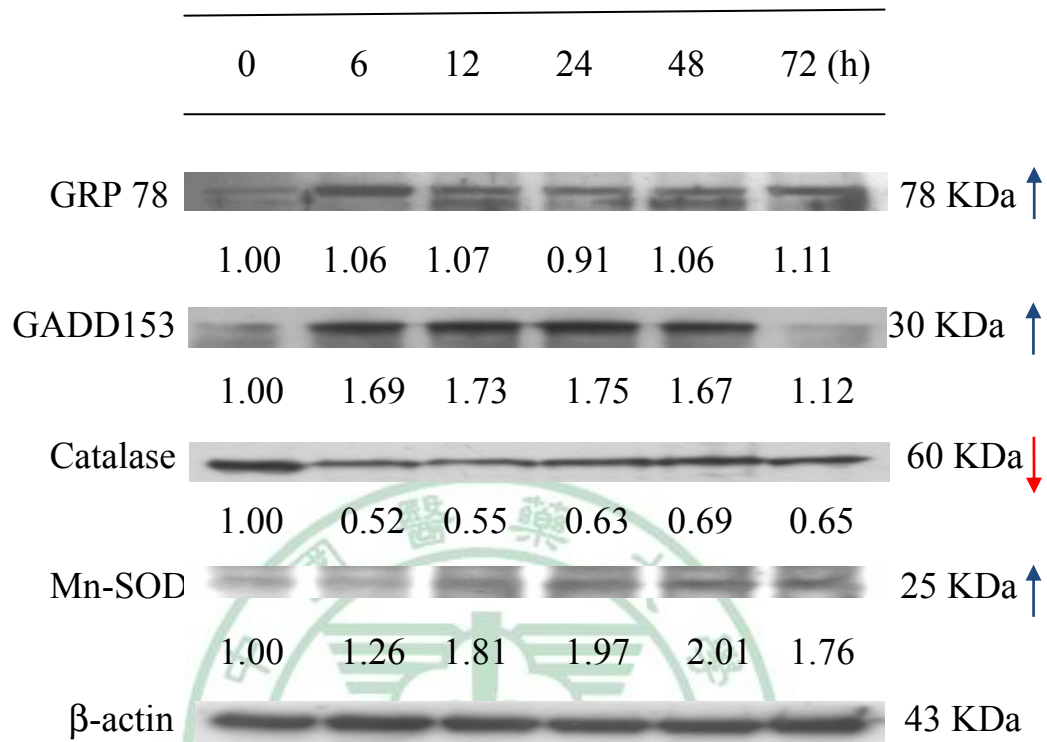


圖 3-12-B. 黃芩素對 J5 細胞相關內質網蛋白的影響（如：GRP78、GADD153）與抗氧化蛋白（Catalase、Mn-SOD）之表現。

第四章 討論

腫瘤醫學的快速發展，源於生命科學與分子生物學結合應用。從 2001 年諾貝爾生理醫學獎得主 (Dr. Lee Hartwell)，發現細胞週期調控以訊號傳遞來進行，並決定細胞的分裂、分化和凋亡等過程，有助於抗癌藥的研究，提供腫瘤治療一個新的指標，而其藥效的評估更有賴於各種科學方式的證明。

首先，將人類肝癌細胞 (J5) 於細胞培養盤中，給予黃芩素不同濃度及不同時間的培養，進行藥效功能評估，在顯微鏡下觀察細胞形態，發現黃芩素 (baicalein) 對人類肝癌細胞 (J5) 有明顯的抑制生長，且與時間及藥物劑量成依存性 (time-and-dose dependent) (圖 3-1)。同時利用流式細胞儀偵測其細胞存活率，證明黃芩素對 J5 細胞毒性的影響 (圖 3-2)，此結果與黃芩素對肺癌⁽⁸⁰⁾、大腸癌⁽²⁴⁾的作用是相同的。

細胞增生過程是由細胞週期的訊號傳導 (signal transduction) 來完成的，細胞週期共分為 G₁、S (DNA 合成)、G₂、M (有絲分裂) 四期。調控細胞週期的核心蛋白是細胞週期素 cyclin、細胞週期素依賴性蛋白激酶 CDK (cyclin-dependent kinase) 及 CDK 的抑制性蛋白 CDKI^(81, 82)，不同分子的 cyclin、CDK 和 CDKI，與其他相關調控蛋白，精準調控細胞週期的每一個時期，分子腫瘤學研究發現，細胞中抑癌基因大量表達時可誘導細胞發生凋亡⁽⁸³⁾。從實驗得知在黃芩素作用下，J5 細胞停滯在 G₂/M 期 (圖 3-3-B)。而參與 G₂/M 期的 checkpoint 的細胞週期素 (cyclins) 有 cyclin A、cyclin B1，細胞週期依存性激酶 (cyclin dependent kinases, CDK) wee1 kinase、chk2 kinase、cdk1 (cdc2)、cdc25 c，此外 cyclin dependent kinase inhibitors (CKIs) 有 p21。活化的 chk2 能與 cdc25c 上的 216-serine 處結合，

並使其磷酸化而失活。cdc25c 的磷酸化及 wee1 kinase 於 cdc2 進行磷酸化阻滯 cdc2-cyclin B1 complex 的活化，從而阻滯細胞進入 G₂/M 期（圖 4-1）。由西方墨點法確認週期蛋白的表現，chk2 表現上升，cdc25c、cyclin B1、cdc2 下降（圖 3-3-C）。然而 p53 抑癌基因被活化，可能會導致細胞凋亡⁽⁸³⁾，更證明黃芩素可誘導 J5 細胞凋亡。然而抑癌基因的活化跟 DNA 損傷有關，研究指出活性氧化物（ROS）會攻擊 DNA 誘導細胞死亡⁽⁸⁴⁾。先前文獻也有指出，黃芩素誘導血癌細胞^(19, 85)的凋亡是經由 ROS 產生造成粒線體功能失調。因而推論 J5 細胞凋亡和 ROS 產生有關。

本實驗為證明是否黃芩素會增加細胞內 ROS 的產生，因此利用流式細胞儀偵測細胞內 ROS 的表現，同時利用西方墨點法分析黃芩素對細胞內抗氧化酵素（catalase、SOD）的影響。結果，當 J5 cell 經黃芩素處理後，以流式細胞儀偵測得知 ROS 的量逐漸增加，但在 12 小時後有減緩趨勢（圖 3-5），推論黃芩素引起細胞內氧化傷害可能是經由大量的 ROS 產生。清除能力與抗氧化酵素有關，當 ROS 存在會由清除力最強的 catalase 所清除。又黃芩素本身也是很好的抗氧化劑，雖對 J5 細胞造成氧化壓力，但隨時間增加 ROS 被清除；同時利用西方墨點法檢測細胞內抗氧化酵素的表現，結果顯示 catalase 短時間下降但隨時間增加有回升的趨勢（圖 3-12-C）。這結果與細胞內 ROS 產生逐漸減弱的結果是相符的。另外 Mn-SOD 的蛋白表現是上升的（圖 3-12-C），過去有些研究指出某些細胞，細胞的 Mn-SOD 上升可以抑制細胞的生長⁽⁸⁶⁾。

細胞凋亡有兩種路徑，一為內在粒腺體路徑，另一為死亡接受器路徑，還有近年廣泛為人所探討的內質網壓力（Endoplasmic Reticulum stress；ER stress）路徑，此路徑為接受外來的死亡訊息或藥物刺激，

使得鈣離子從 ER 釋放出來，破壞鈣離子平衡，產生 ER stress，活化下游路徑造成細胞凋亡。

文獻指出 ROS 的產生會脂質過氧化，粒線體膜電位的改變，促使膜上的 cytochrome *c* 釋放，參與 caspases⁽⁵⁷⁾ 的活化，經連鎖反應導致細胞凋亡^(87, 88)。

本實驗為證實是否黃芩素可造成人類肝癌細胞粒線體膜電位的下降，由流式細胞儀偵測粒線體膜電位之變化，發現有顯著的下降(圖 3-4)，同時利用西方墨點法分析粒線體路徑相關凋亡蛋白的影響，結果顯示，促凋亡蛋白 Bax 的表現上升，抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表現下降，導致粒線體膜的通透性改變，使細胞凋亡啟動因子 (cytochrome *c*)，凋亡蛋白酶啟動因子 (Apaf-1) 和凋亡誘導因子 (AIF) 釋放，與 caspase-9 形成 apoptosome 並活化下游 caspase-3，進而引起細胞凋亡，由以上結果，再次確定黃芩素抑制 J5 細胞生長跟粒線體凋亡路徑有關。

為更加確定黃芩素抑制肝癌的生長會經由 caspase-3 活化，利用流式細胞儀偵測細胞內 caspase-3 活性的表現，得知細胞內 caspase-3 的活性明顯上升(圖 3-7)，這個結果與西方墨點法 caspase-3(17 KDa) 蛋白表現結果相符。

因為推測黃芩素引發 J5 細胞凋亡是藉由 ROS 的產生引起的，所以再藉由加入 NAC (ROS 抑制劑) 探討是否能阻斷黃芩素所引起之 ROS 的產生，及提高細胞存活率。結果顯示，NAC 的確是能夠減少肝癌細胞 J5 細胞 ROS 的產生 (圖 3-8-A)，並增加細胞存活率 (圖 3-8-B)，更加證明黃芩素造成 J5 細胞凋亡與 ROS 有關。

在 caspase independent pathway 探討中，本實驗證實，肝癌細胞經黃芩素處理後，AIF、Endo G 表現量上升。

為了更加確認黃芩素對人類肝癌細胞 J5 細胞的凋亡方式，進一步利用共軛焦顯微鏡觀察分析與細胞凋亡有關蛋白的表現，因為 cytochrome c 會從粒線體釋放到細胞質中，不會進到細胞核中，實驗結果發現加藥組 cytochrome c 的螢光強度比控制組高，顯示 cytochrome c 大量的表現，另外，與粒線體 caspase independent pathway 中有關蛋白，如 AIF、Endo G 等粒線體膜間蛋白。可能是因 anti-apoptosis 蛋白 Bcl-2 下降及 pro-apoptosis 蛋白 Bax 的表現，或一些協同作用，形成粒線體膜上的通道，造成膜通透性增加、膜電位下降，而促使膜間蛋白釋放出來，並直接進到細胞核中作用，造成 DNA 的損傷的結果。在整個凋亡路徑的探討，由於 AIF 與 endonuclease G 上升的結果，推測黃芩素對 J5 人類肝癌細胞株所誘導的凋亡路徑，是利用粒線體路徑與 caspase independent pathway 的誘導的結果。

另外利用 DAPI stain assay 與 comet assay 測定 DNA 損傷的程度，結果發現，DNA 受到損傷形成彗星拖尾的現象，與黃芩素有劑量上的依存性。這樣的結果與上述結果相符。

又研究指出，ROS 產生同時也會造成內質網（Endoplasmic Reticulum；ER）膜的破壞，讓 ER 內的鈣離子釋放^(55, 59)，因鈣離子持續累積，造成細胞毒性，也會引發細胞凋亡。當鈣離子不斷釋放時，造成內質網壓力（ER stress），因要處理過多的未折疊蛋白，促使 GADD153 和 GRP78 蛋白的表現^(89, 90)，當 ER 受到壓力時，caspase-7 會從細胞質轉移到 ER 表面，跟 procaspase-12 結合，形成具活性的 caspase-12，進而活化 caspase-3 以誘發細胞凋亡⁽⁹¹⁾。

細胞內貯存鈣離子的細胞器如：內質網（ER）、粒線體，在細胞凋亡過程中產生的 ROS 會造成胞膜的破壞，並可引起細胞內鈣離子重新分佈和細胞外鈣離子的內流，引起細胞內持續的鈣離子水準升

高，造成細胞毒性⁽⁶¹⁾。本實驗為證明是否黃芩素會增加細胞內鈣離子的產生，以流式細胞儀偵測細胞內鈣離子的表現，同時利用西方墨點法分析黃芩素對內質網相關蛋白的表現，結果得知當肝癌細胞經黃芩素處理後，利用流式細胞儀偵測鈣離子的量，短時間（2小時）沒有什麼變化，長時間（6~72小時）鈣離子逐漸上升。利用西方墨點法分析 ER stress 的相關表現蛋白，看到 GADD153、GRP78 的上升，證明氧化壓力的產生，導致細胞凋亡，透過以上的實驗亦可證明 J5 細胞凋亡與 ER stress 路徑有關。

癌細胞轉移侵襲過程中會透過基質金屬蛋白水解酶（matrix metalloproteinase, MMPs）降解細胞基質 extracellular matrix (ECM)。又文獻顯示，黃芩素亦有透過抑制癌細胞的侵襲、轉移與血管新生，而達到抑癌的效果，在膀胱癌⁽⁹²⁾、前列腺癌⁽⁹³⁾，尤其在肝癌(Hep3B、HepG2)⁽⁹⁴⁻⁹⁸⁾ 的部分，其中黃芩素對於肝癌細胞雖已被實驗證明是很有抑制生長作用的抗癌、抗轉移藥；然而，其作用機轉並不甚清楚，因此本研究檢測黃芩素 (baicalein) 是否能夠抑制人類肝癌細胞 (J5) 的轉移。由細胞移動及細胞侵入的結果，指出黃芩素對 J5 細胞有明顯抑制轉移的效果，且與濃度及時間成依存性；進而利用西方墨點法探討轉移蛋白的表現，結果顯示 MMP-9 的確也是受到抑制；COX-2 會刺激基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的表現，結果顯示 COX-2 的表現也下降。綜合上述，黃芩素抑制人類肝癌細胞 (J5) 的轉移，是透過降低 MMP-9 的表現，抑制細胞的移動與侵入，達到抑制腫瘤轉移的目的。

第五章 結論

本實驗使用具有抗癌作用的黃芩素，對人類肝癌細胞株 J5 cell line 探討其抑制癌細胞生長之相關分子機轉；結果顯示，黃芩素抑制人類肝癌細胞的生長是經由活化 p53 使細胞週期停滯在 G₂/M 期 (G₂/M phase arrest)。ROS 上升伴隨著細胞內鈣離子濃度上升，粒線體膜電位(MMP)去極化，釋放凋亡因子，活化粒線體凋亡路徑，使 caspase-3 活化，及造成染色體 DNA 裂解(DNA fragmentation)，導致凋亡。癌細胞轉移侵襲過程中會透過基質金屬蛋白水解酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 降解細胞基質 extracellular matrix (ECM)。結果指出，黃芩素抑制人類肝癌細胞(J5)的轉移，是透過降低 MMP-9 的表現，抑制細胞的移動與侵入，達到抑制腫瘤轉移的目的。

實驗總圖如下(圖 5-1)。



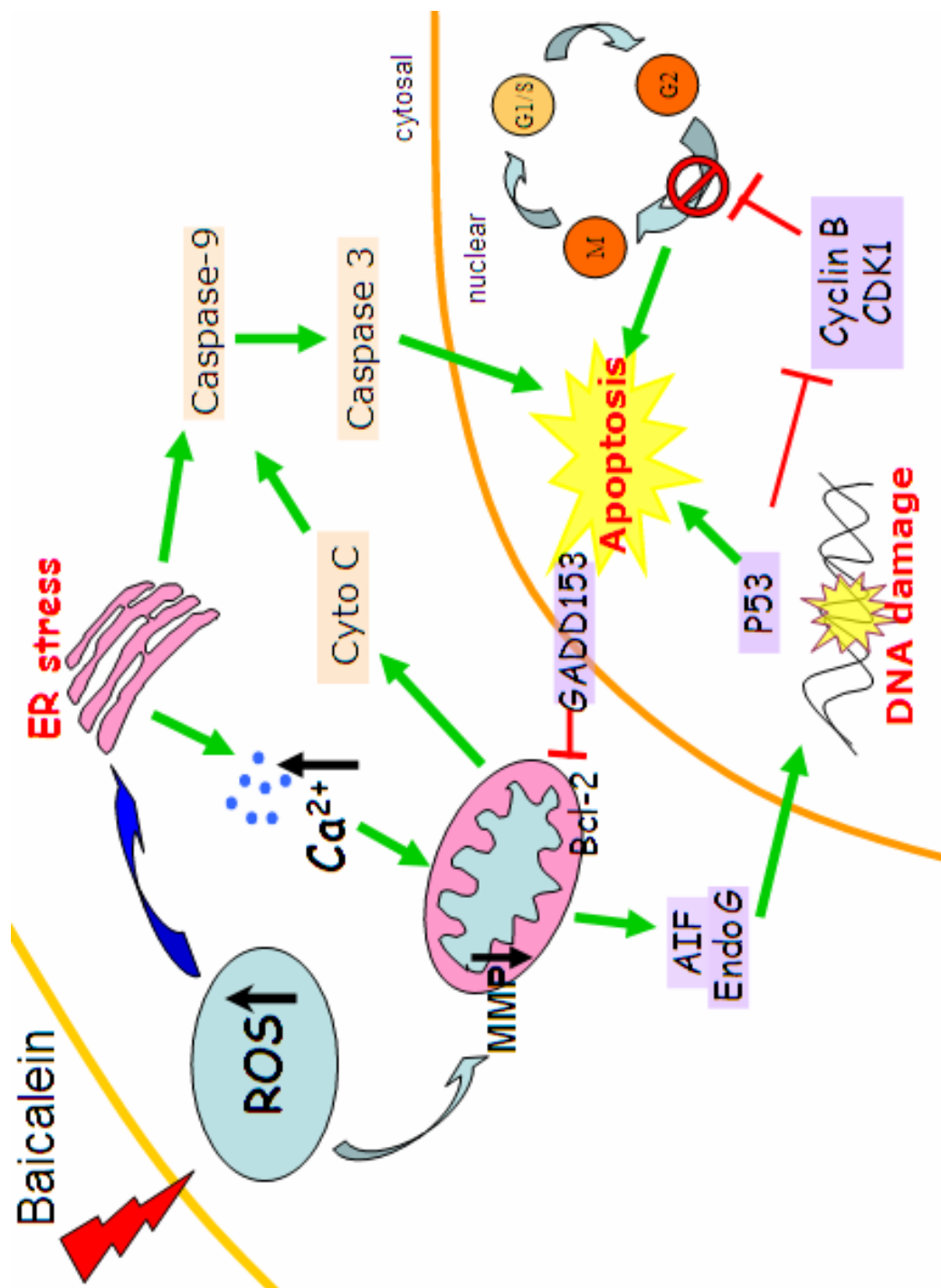


圖 5-1. 黃芩素誘導 J5 細胞 G₂/M 期停滯與細胞凋亡總圖

第六章 參考文獻及附錄

1. <http://www.doh.gov.tw/statistic/index.htm>.
2. 台灣醫學雜誌. 台灣醫學會; 2007. p. 153-61.
3. Journal of Biological Chemistry 2004: p . 443-6.
4. Johnson PJ, Leung N, Cheng P, *et al.* 'Hepatoma-specific' alphafetoprotein may permit preclinical diagnosis of malignant change in patients with chronic liver disease. Br J Cancer 1997;75(2):236-40.
5. 藥物性肝損害的臨床類型及診斷策略中國;2004;12 卷;445 頁.
6. 宋莉 吳. 《國際抗癌聯盟腫瘤 TNM 分期圖譜(第 4 版)(翻譯版)》: 科學出版社.
7. Yoshida M, Matsui Y, Ikarashi Y, Usui T, Osada H, Wakasugi H. Antiproliferating activity of the mitotic inhibitor pironetin against vindesine- and paclitaxel-resistant human small cell lung cancer H69 cells. Anticancer research 2007;27(2):729-36.
8. Alami N, Paterson J, Belanger S, Juste S, Grieshaber CK, Leyland-Jones B. Comparative analysis of xanafide cytotoxicity in breast cancer cell lines. British journal of cancer 2007.
9. Gabrielska J, Oszmianski J, Zylka R, Komorowska M. Antioxidant activity of flavones from *Scutellaria baicalensis* in lecithin liposomes. Zeitschrift fur Naturforschung 1997;52(11-12):817-23.
10. Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Biochimica et biophysica acta 1999;1472(3):643-50.
11. Butenko IG, Gladchenko SV, Galushko SV. Anti-inflammatory properties and inhibition of leukotriene C4 biosynthesis in vitro by flavonoid baicalein from *Scutellaria baicalensis* georgy roots. Agents and actions 1993;39 Spec No:C49-51.
12. Shao ZH, Vanden Hoek TL, Qin Y, *et al.* Baicalein attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. American journal of physiology 2002;282(3):H999-H1006.
13. Shao ZH, Li CQ, Vanden Hoek TL, *et al.* Extract from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. Journal of molecular and cellular cardiology 1999;31(10):1885-95.
14. Huang Y, Tsang SY, Yao X, Chen ZY. Biological properties of baicalein in cardiovascular system. Current drug targets 2005;5(2):177-84.
15. Chen ZY, Su YL, Lau CW, Law WI, Huang Y. Endothelium-dependent contraction and direct relaxation induced by baicalein in rat mesenteric artery. European journal of pharmacology 1999;374(1):41-7.
16. Li FQ, Wang T, Pei Z, Liu B, Hong JS. Inhibition of microglial

- activation by the herbal flavonoid baicalein attenuates inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons. *J Neural Transm* 2005;112(3):331-47.
17. 國家醫藥管理局中草藥情報中心站,植物藥有效成分手冊;北京;人民衛生出版社;p109-112; 1986.
 18. Budavari S. *The Merck Index*, Merck & Co. Inc., 13th ed., NJ, USA. 2001; p.165.
 19. Wang J, Yu Y, Hashimoto F, Sakata Y, Fujii M, Hou DX. Baicalein induces apoptosis through ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway in HL-60 cells. *International journal of molecular medicine* 2004;14(4):627-32.
 20. Liu JJ, Huang TS, Cheng WF, Lu FJ. Baicalein and baicalin are potent inhibitors of angiogenesis: Inhibition of endothelial cell proliferation, migration and differentiation. *International journal of cancer* 2003;106(4):559-65.
 21. Ma Z, Otsuyama K, Liu S, *et al.* Baicalein, a component of *Scutellaria radix* from Huang-Lian-Jie-Du-Tang (HLJDT), leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human myeloma cells. *Blood* 2005;105(8):3312-8.
 22. Liu ZL, Tanaka S, Horigome H, Hirano T, Oka K. Induction of apoptosis in human lung fibroblasts and peripheral lymphocytes in vitro by Shosaiko-to derived phenolic metabolites. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2002;25(1):37-41.
 23. Chan FL, Choi HL, Chen ZY, Chan PS, Huang Y. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer letters* 2000;160(2):219-28.
 24. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European journal of nutrition* 1999;38(3):133-42.
 25. So FV, Guthrie N, Chambers AF, Moussa M, Carroll KK. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutrition and cancer* 1996;26(2):167-81.
 26. Chen CH, Huang LL, Huang CC, Lin CC, Lee Y, Lu FJ. Baicalein, a novel apoptotic agent for hepatoma cell lines: a potential medicine for hepatoma. *Nutr Cancer* 2000;38(2):287-95.
 27. Chou CC, Pan SL, Teng CM, Guh JH. Pharmacological evaluation of several major ingredients of Chinese herbal medicines in human hepatoma Hep3B cells. *Eur J Pharm Sci* 2003;19(5):403-12.
 28. Chang WH, Chen CH, Gau RJ, *et al.* Effect of baicalein on apoptosis of the human Hep G2 cell line was induced by mitochondrial dysfunction. *Planta medica* 2002;68(4):302-6.

29. Nojima H. Cell cycle checkpoints, chromosome stability and the progression of cancer. *Hum Cell* 1997;10(4):221-30.
30. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411(6835):342-8.
31. Won KA, Reed SI. Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *The EMBO journal* 1996;15(16):4182-93.
32. Nakanishi M, Kagawa Y, Takahashi H, Matsushime H. Two different bindings of p21 Cdk inhibitor to cyclin/Cdk complex. *Leukemia* 1997;11 Suppl 3:356-7.
33. Harper JW. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer surveys* 1997;29:91-107.
34. Schwaller J, Pabst T, Koeffler HP, *et al.* Expression and regulation of G1 cell-cycle inhibitors (p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C, p19INK4D) in human acute myeloid leukemia and normal myeloid cells. *Leukemia* 1997;11(1):54-63.
35. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75(4):805-16.
36. Weinert T, Hartwell L. Control of G2 delay by the rad9 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science* 1989;12:145-8.
37. Hartwell L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992;71(4):543-6.
38. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science (New York, NY)* 1994;266(5192):1821-8.
39. Yonish-Rouach E, Grunwald D, Wilder S, *et al.* p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Molecular and cellular biology* 1993;13(3):1415-23.
40. Levine AJ. 11th Ernst Klenk Lecture. The p53 tumor suppressor gene and product. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 1993;374(4):227-35.
41. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development* 1999;13(12):1501-12.
42. Hatakeyama M, Weinberg RA. The role of RB in cell cycle control. *Progress in cell cycle research* 1995;1:9-19.
43. Takuwa N, Takuwa Y. Regulation of cell cycle molecules by the Ras effector system. *Molecular and cellular endocrinology* 2001;177(1-2):25-33.
44. Yan S, Wenner CE. Modulation of cyclin D1 and its signaling components by the phorbol ester TPA and the tyrosine phosphatase inhibitor vanadate. *Journal of cellular physiology* 2001;186(3):338-49.
45. Cheng M, Olivier P, Diehl JA, *et al.* The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in

- murine fibroblasts. The EMBO journal 1999;18(6):1571-83.
46. Weinert TA, Kiser GL, Hartwell LH. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes & development* 1994;8(6):652-65.
 47. Formigli L, Conti A, Lippi D. "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva medica* 2004;95(2):159-64.
 48. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 1972;26(4):239-57.
 49. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1998;78(8):893-913.
 50. Bowen ID. Apoptosis or programmed cell death? *Cell biology international* 1993;17(4):365-80.
 51. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 1992;119(3):493-501.
 52. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Archives of pathology & laboratory medicine* 1993;117(12):1208-14.
 53. Hiramane C. [Definition and morphological features of apoptosis]. *Rinsho byori* 1997;45(5):459-69.
 54. Fridovich I. Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. *Photochemistry and photobiology* 1978;28(4-5):733-41.
 55. Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Molecular and cellular biochemistry* 1997;174(1-2):305-19.
 56. Kanno S, Uwai K, Tomizawa A, *et al.* Trimidox induces apoptosis via cytochrome c release in NALM-6 human B cell leukaemia cells. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2006;98(1):44-50.
 57. Banki K, Hutter E, Gonchoroff NJ, Perl A. Molecular ordering in HIV-induced apoptosis. Oxidative stress, activation of caspases, and cell survival are regulated by transaldolase. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(19):11944-53.
 58. Carmody RJ, McGowan AJ, Cotter TG. Reactive oxygen species as mediators of photoreceptor apoptosis in vitro. *Experimental cell research* 1999;248(2):520-30.
 59. Richter C. Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and respiration. *Bioscience reports* 1997;17(1):53-66.
 60. Ermak G, Davies KJ. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Molecular immunology* 2002;38(10):713-21.
 61. Kass GE, Orrenius S. Calcium signaling and cytotoxicity.

- Environmental health perspectives 1999;107 Suppl 1:25-35.
62. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American journal of clinical nutrition* 1991;53(1 Suppl):194S-200S.
 63. Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *Journal of photochemistry and photobiology* 1991;8(2):211-8.
 64. Satoh T, Enokido Y, Aoshima H, Uchiyama Y, Hatanaka H. Changes in mitochondrial membrane potential during oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 1997;50(3):413-20.
 65. Distelhorst CW, Lam M, McCormick TS. Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca²⁺ pool depletion. *Oncogene* 1996;12(10):2051-5.
 66. Ormerod MG, Sun XM, Brown D, Snowden RT, Cohen GM. Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 1993;32(4):417-24.
 67. Petit PX, O'Connor JE, Grunwald D, Brown SC. Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. *European journal of biochemistry / FEBS* 1990;194(2):389-97.
 68. Sagara Y. Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. *Journal of neurochemistry* 1998;71(3):1002-12.
 69. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 1983;130(4):1910-7.
 70. Royall D, Allard JP, Baker JP, Jeejeebhoy KN, Greenberg GR. Consequences of enteral nutrition therapy on body composition changes in acute Crohn's disease. *Basic life sciences* 1993;60:225-8.
 71. Lopez M, Olive D, Mannoni P. Analysis of cytosolic ionized calcium variation in polymorphonuclear leukocytes using flow cytometry and Indo-1 AM. *Cytometry* 1989;10(2):165-73.
 72. Komoriya A, Packard BZ, Brown MJ, Wu ML, Henkart PA. Assessment of caspase activities in intact apoptotic thymocytes using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *The Journal of experimental medicine* 2000;191(11):1819-28.
 73. Manov I, Hirsh M, Iancu TC. Acetaminophen hepatotoxicity and mechanisms of its protection by N-acetylcysteine: a study of Hep3B cells. *Exp Toxicol Pathol* 2002;53(6):489-500.
 74. Collins JA, Schandi CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1997;45(7):923-34.

75. Gopalakrishna P, Khar A. Comet assay to measure DNA damage in apoptotic cells. *Journal of biochemical and biophysical methods* 1995;30(1):69-73.
76. Machaca K, Compton MM. Analysis of thymic lymphocyte apoptosis using in vitro techniques. *Developmental and comparative immunology* 1993;17(3):263-76.
77. Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell and tissue research* 1994;278(3):549-56.
78. Gildea JJ, Harding MA, Gulding KM, Theodorescu D. Transmembrane motility assay of transiently transfected cells by fluorescent cell counting and luciferase measurement. *BioTechniques* 2000;29(1):81-6.
79. Liotta LA. Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. Warner-Lambert Parke-Davis Award lecture. *The American journal of pathology* 1984;117(3):339-48.
80. Lee HZ, Leung HW, Lai MY, Wu CH. Baicalein induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *Anticancer Res* 2005;25(2A):959-64.
81. Jacks T, Weinberg RA. Cell-cycle control and its watchman. *Nature* 1996;381(6584):643-4.
82. Nasmyth K. Evolution of the cell cycle. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 1995;349(1329):271-81.
83. Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991;65(7):1097-8.
84. Blum-Degen D, Haas M, Pohli S, *et al.* Scavestrogens protect IMR 32 cells from oxidative stress-induced cell death. *Toxicology and applied pharmacology* 1998;152(1):49-55.
85. Makino T, Tsubouchi R, Murakami K, Haneda M, Yoshino M. Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis of HL60 cells by ingredients of traditional herbal medicine, Sho-saiko-to. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2006;98(4):401-5.
86. St Clair D, Zhao Y, Chaiswing L, Oberley T. Modulation of skin tumorigenesis by SOD. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2005;59(4):209-14.
87. Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *The Journal of cell biology* 1998;141(6):1423-32.
88. Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *European journal of biochemistry / FEBS* 1998;252(1):1-15.
89. Lai WL, Wong NS. ROS mediates 4HPR-induced posttranscriptional expression of the Gadd153 gene. *Free radical biology & medicine* 2005;38(12):1585-93.

90. Yu Z, Luo H, Fu W, Mattson MP. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Experimental neurology* 1999;155(2):302-14.
91. Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Maundrell K, Castilla J, Soto C. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *The EMBO journal* 2003;22(20):5435-45.
92. Yoshimura R, Matsuyama M, Tsuchida K, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Expression of lipoxygenase in human bladder carcinoma and growth inhibition by its inhibitors. *The Journal of urology* 2003;170(5):1994-9.
93. Nie D, Krishnamoorthy S, Jin R, *et al.* Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 2006;281(27):18601-9.
94. Tian B, Li Y, Ji XN, *et al.* Basement membrane proteins play an active role in the invasive process of human hepatocellular carcinoma cells with high metastasis potential. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131(2):80-6.
95. Ip YC, Cheung ST, Leung KL, Fan ST. Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11(40):6269-76.
96. Lee WJ, Wu LF, Chen WK, Wang CJ, Tseng TH. Inhibitory effect of luteolin on hepatocyte growth factor/scatter factor-induced HepG2 cell invasion involving both MAPK/ERKs and PI3K-Akt pathways. *Chem Biol Interact* 2006;160(2):123-33.
97. Hwang ES, Lee HJ. Inhibitory effects of lycopene on the adhesion, invasion, and migration of SK-Hep1 human hepatoma cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231(3):322-7.
98. Taras D, Blanc JF, Rullier A, *et al.* Pravastatin reduces lung metastasis of rat hepatocellular carcinoma via a coordinated decrease of MMP expression and activity. *J Hepatol* 2007;46(1):69-76.