

九十年國科會專題研究題目：經鑑別顯示探測人類大腸癌細胞受 diallyl sulfide

影響新基因表現的成果報告

主持人：鍾景光

計劃編號：NSC 90-2320-B-039-014

執行時間：90 年 8 月 1 日到 91 年 7 月 31 日

<p>一、 摘要(中文)</p> <p>人類大腸癌細胞用來有否加入 diallyl sulfide 共同培養 24 小時後經抽取 RNA 再經由鑑別顯示 RNA 聚合酵素反應(differential display:DD RT-PCR)檢測發現 diallyl sulfide 減低 cytochrome C oxidase subunit I 和 II 基因的表現,這現象可能是導致 diallyl sulfide 引起人類大腸癌細胞死亡的原因。</p> <p>(英文) Human colon tumor cells (colo 205) was selected for co-treated with (experimental group) or without (control group) diallyl sulfide for 24 hr. Then total RNA was extracted and used for differential display RT-PCR to human gene expression. The results demonstrated that cytochrome C oxidase subunit I and II gene were down-regulated. This phenomena may be lead to cell death that caused by diallyl sulfide.</p> <p>二、 緣由和目的</p> <p>我們先前研究發現大蒜的成分之一 diallyl sulfide 能降低大白鼠由化學致癌 DHMA 所引起的大腸癌,接著就用人類大腸癌細胞株和進一步加入不同濃度的 diallyl sulfide 培養,結果發現 diallyl sulfide 能引起人類大腸癌細胞計劃性的死亡(apoptosis),濃度高達 5mM 時則會引起細胞的壞死(necrosis),這些現象與其他學者發現 diallyl sulfide 能引起人類血癌細胞的計劃性死亡相似,但是真正引起細胞死亡的機轉並不清楚,因而本研究計劃的目的就是經進一步了解有什麼新的相關基因出現及是否受到此 diallyl sulfide 的影響因而導致人類大腸癌細胞的死亡,所以經由新竹食品工業研究所取得人類大腸癌細胞株(colo 205)培養於培養基(CAD)導致 DNA fragmentation 的產生,造成細胞的</p>	<p>1640)再分別加入有無不同濃度的 diallyl sulfide 然後共同培養 24 小時再抽取 RNA 再複製成 cDNA,經由 cDNA 再作 DD RT-PCR 先後跑膠壓 X 光片後,經由找出相同基因的表現,再經膠片上取出 mRNA 再去 reamplify 這些基因的產物,最後再作 DNA 定序,結果再與網路上的 Gene Bank 比對發現細胞內粒腺體內的基因(經由重複即四次得到相同的結果) cytochrome C oxidase subunit I and II 受到抑制。</p> <p>三、 結果與結論</p> <p>由上面結果經由重複多次實驗得到相同一致也就是 Diallyl sulfide 在濃度高達 50 mM 能抑制 cytochrome C oxidase subunit I 和 II 基因的表現。接著我們也利用 Flow cytometric 分析法利用購買的抗體(anti-cytochrome C oxidase subunit I or II)來染色,人類大腸癌細胞內蛋白再經由分果析百分比結有降低。同時我們也經由西方點墨法(Westrn blotting)獲得相同的結果。細胞目前死亡有兩種一為細胞壞死((necrosis),由於外面藥物增高而影響細胞的膜破壞導致細胞壞死,也可由抽取該細胞的 DNA 再跑電泳,可發現無數的 DNA 小片段整條 gel 都是。另一種為細胞計劃性死亡(apoptosis),也就是藥物引起 DNA fragmentation 的產生,有關 apoptosis(計劃性細胞死亡),目前有兩種路線,一為依賴 caspase dependent,另一為不依賴 caspase independent。Caspase dependent 經由細胞上面 receptor 接受到外來物質或訊息然後活化導致粒腺體內 cytochrome C 的釋放,而最後活化 caspase 9 和 caspase 3 再活化 Caspase activated DNase)</p>
--	---

導致 DNA fragmentation 的產生，造成細胞的 apoptosis。目前我們發現 diallyl sulfide 則可能經由特別非上面的兩種路線而引發細胞的死亡因為經由 DD RT-PCR 無數次的驗證和 Flow cytometric analysis 都一致發現 diallyl sulfide 引發抑制基因的表現 (Down regulation) RPM1，接也可以說抑制 cytochrome C oxidase subunit I 和 II 的表現引起粒線體呼吸作用無法正常進行，因而無法產生足夠能量 (ATP) 和導致細胞的死亡。