

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用 DDRT-PCR 和 Flow Cytometry 來偵測 DADS 引發不同信號傳遞而導致人類大腸癌細胞計劃性的死亡

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-039-028-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：中國醫藥大學微生物學科

計畫主持人：鍾景光

計畫參與人員：陳宜珊

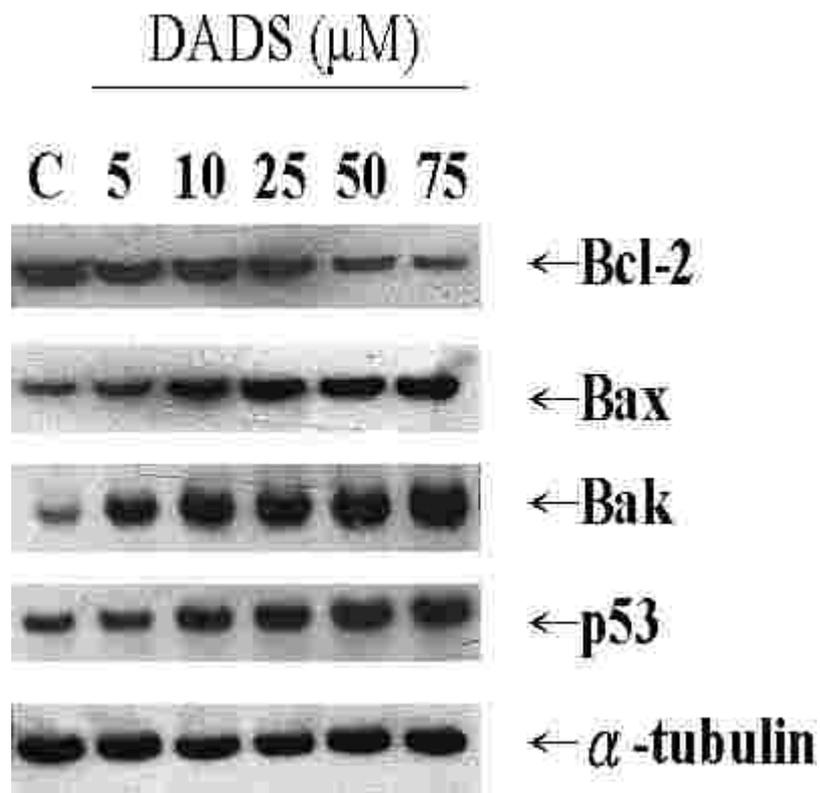
報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

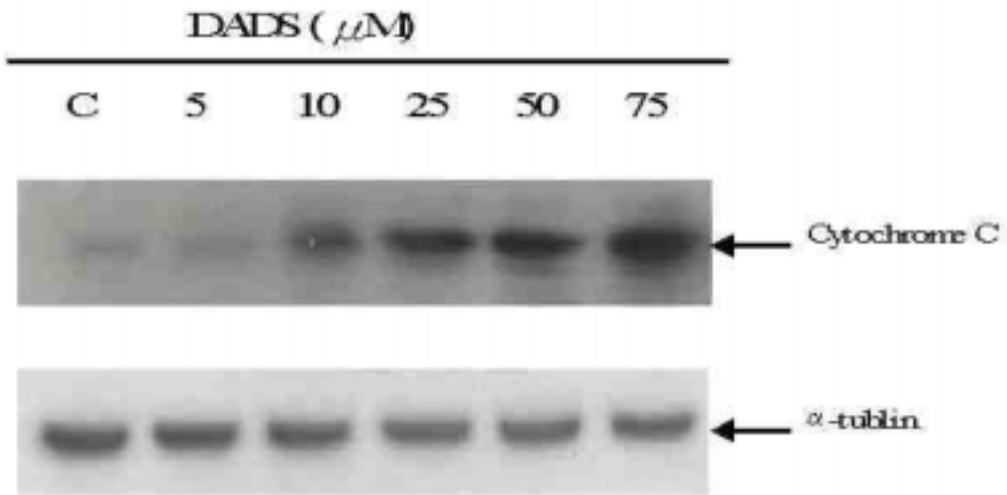
中 華 民 國 92 年 10 月 24 日

Diallyl disulfide (DADS)用來檢測對人類大腸癌細胞影響，導致此癌細胞的細胞週期停留於 G2 / M phase (G2 / M arrest)，同時也引起讓癌細胞計劃性的死亡 (Apoptosis)。由圖一顯示此 DADS 引起細胞週期停止和計劃性死亡是經過 p53 上升，引發 Bak, Bax 上升，而 Bcl 2 下降，因而影響於粒腺體，導致粒腺體釋放大量 Cytochrome C 而活化 Caspase-9，導致活化 Caspase-3，而引起 Apoptosis (圖二、三)。

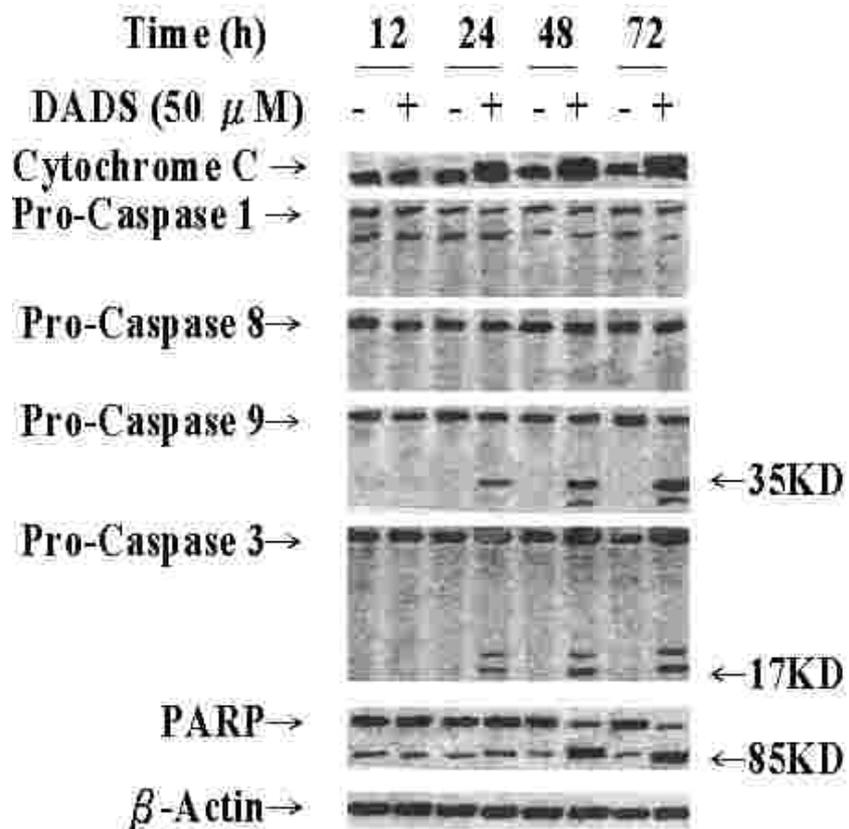
* 圖一



* 圖二

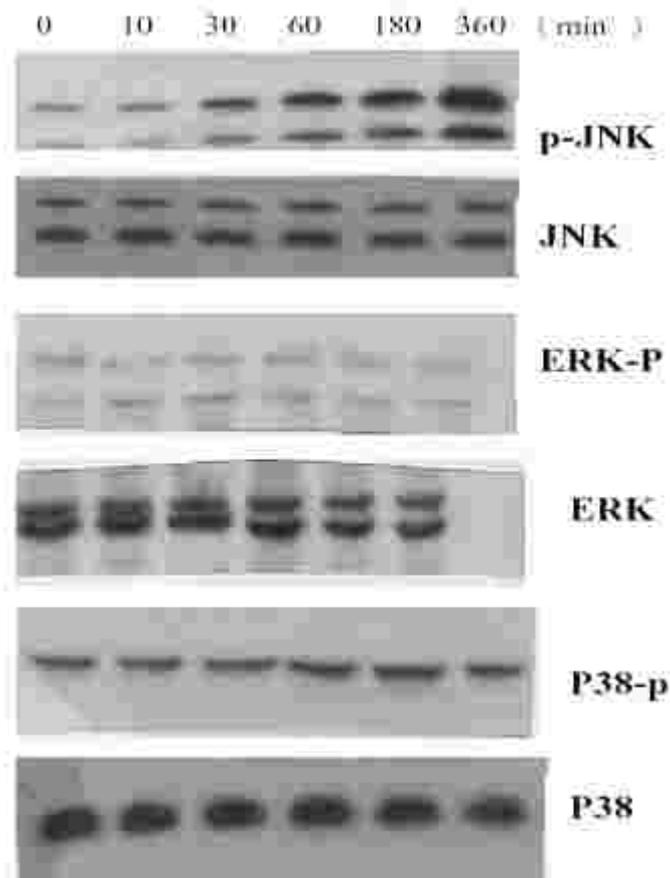


* 圖三

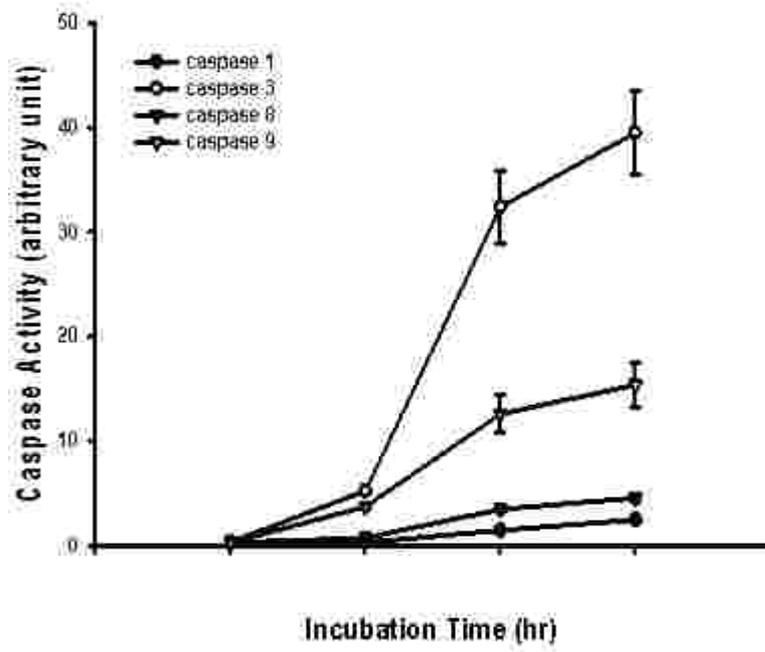


以上的結果都來自於 PCR 反應和 Western blotting 的檢測。同時也經由 DDRT-PCR 發現 DADS 引發大腸癌細胞(colo 205)的計劃性死亡，經由引發 Fas 的表現，再經由可能的兩條路線，一為引發 Caspase-8 後直接引發 Caspase-3(圖三)，另一為引發 Caspase-8 活化後促進 STAT1 表現，再促進 JNK(圖四)表現誘發 Bcl-2 下降、Bax 上升而引發粒腺體釋放 Cytochrome C，導致 Caspase-9 活化引發 Caspase-3 活化，導致 Apoptosis 發生(圖一、二、三)。這些現象也經由 polymerase chain reaction (PCR)和 Western blotting 發現相關基因表現受影響，因而導致相關的蛋白質表現也受到影響，這些因素就導致 DADS 引發 Apoptosis。同時也經由利用檢測 Caspase-1,3,8,9 活化的活性是否有受到 DADS 的影響，結果由圖五顯示 Caspase-3 和 9 有明顯的增強活性，Caspase-1 和 8 沒有受到 DADS 的影響。以上這些結果經由交叉比對和分析發現 DADS 影響人類大腸癌細胞 Colo 205 有 Dose-dependent and time-course dependent effects (圖六、七、八)。

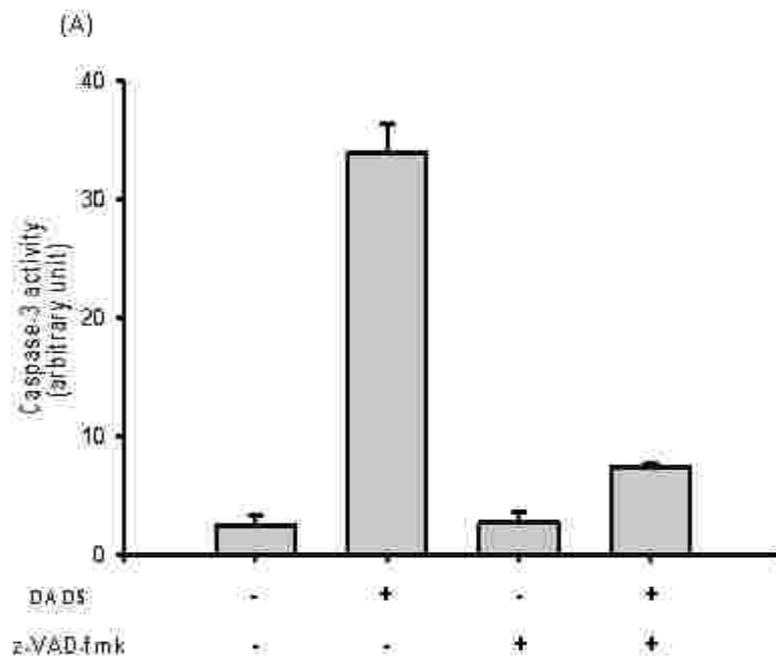
* 圖四



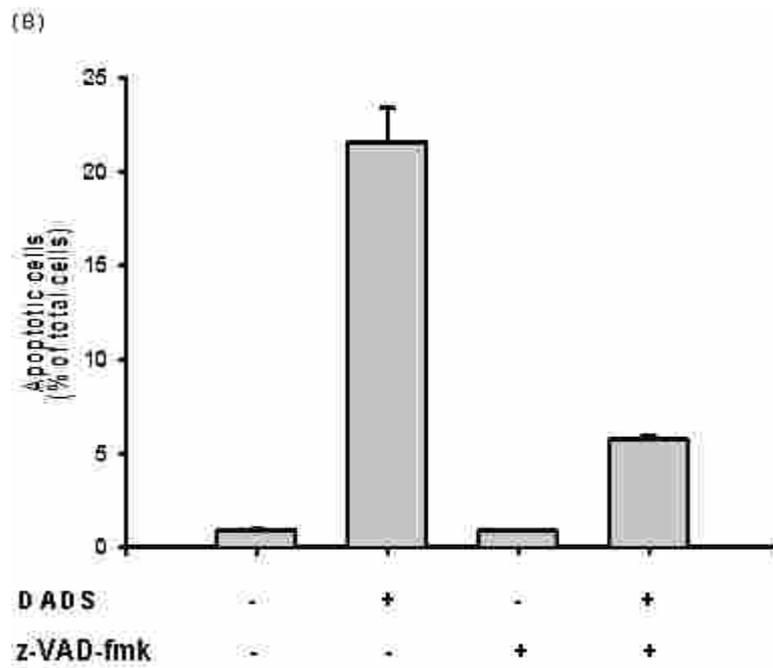
* 圖五



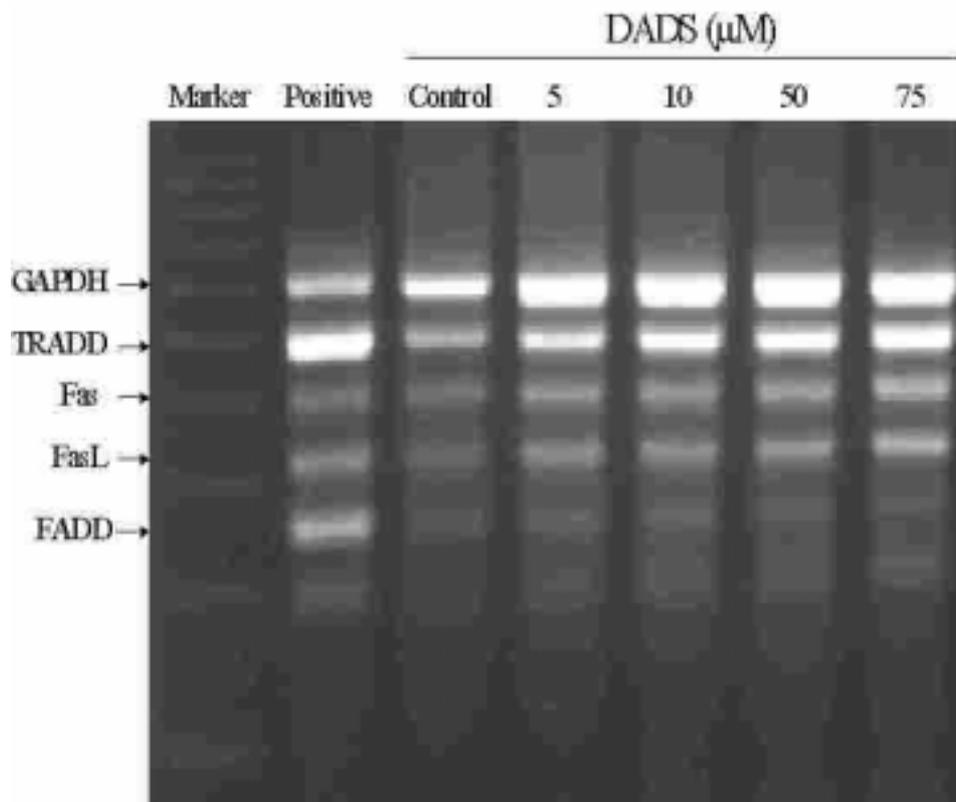
* 圖六



* 圖七



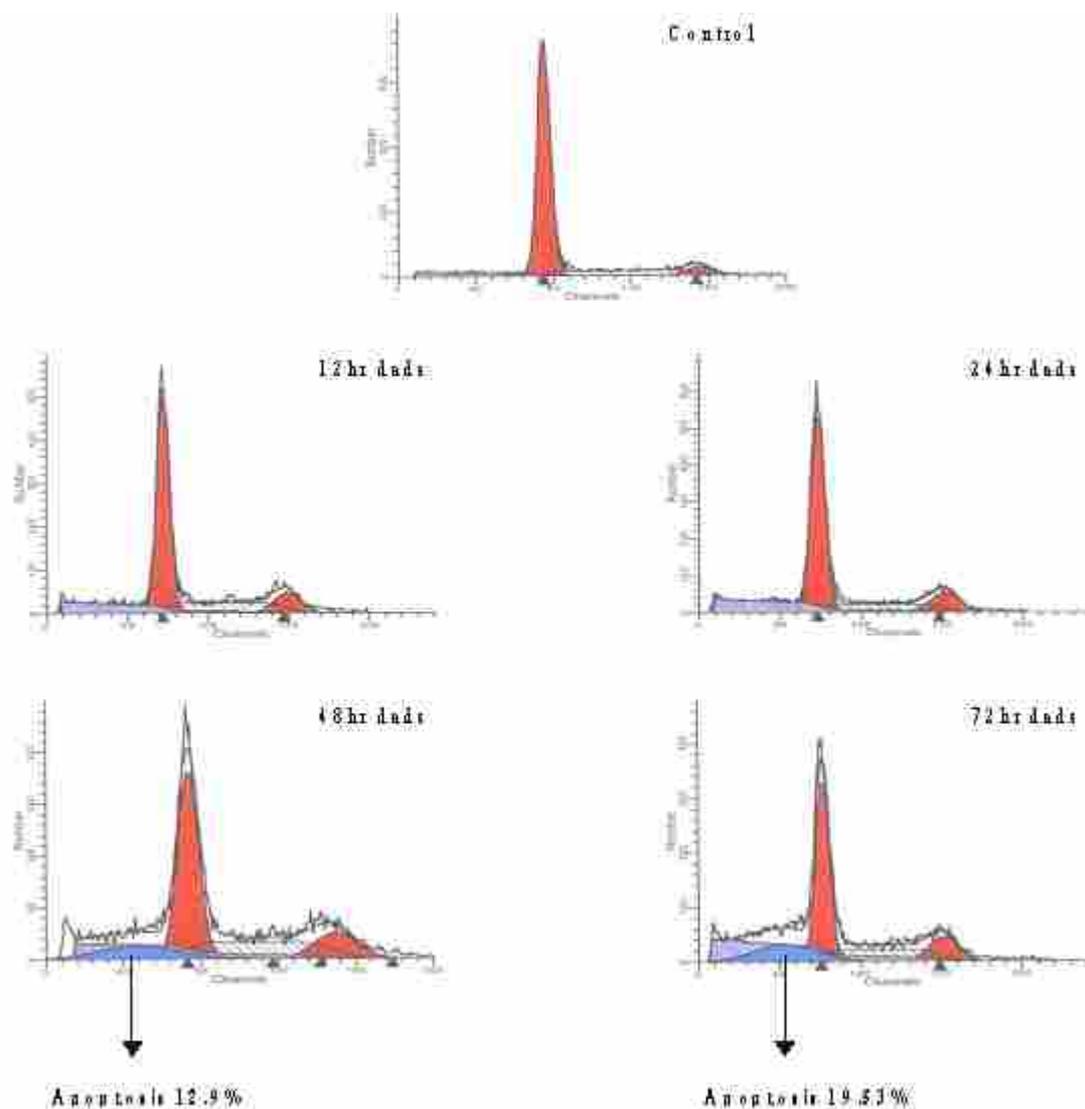
* 圖八



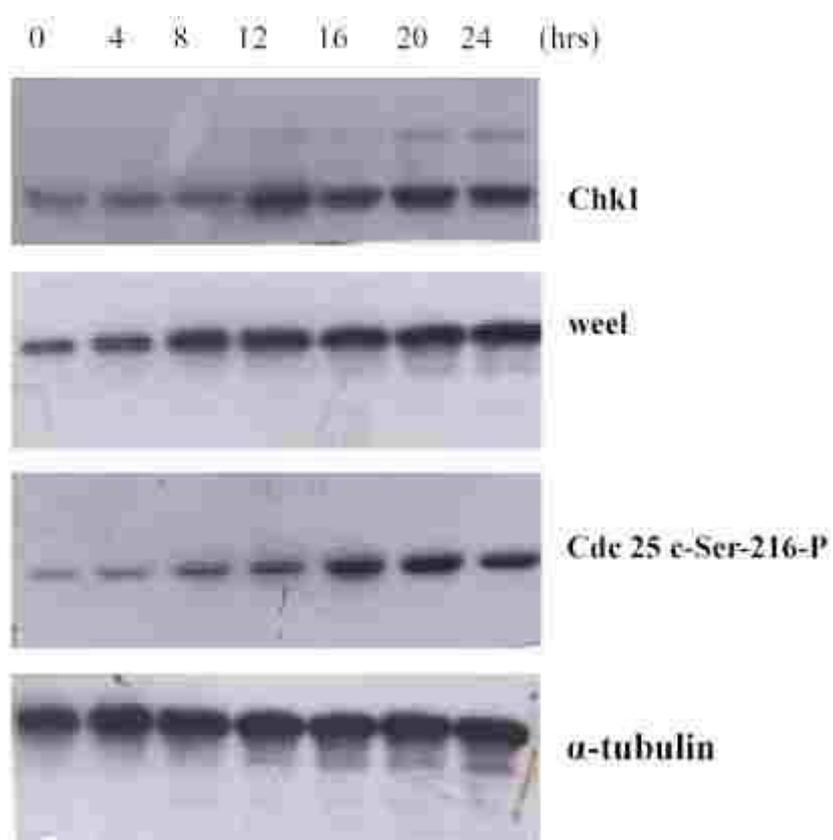
有關 DADS 導致 G2 / M arrest 也經由流氏細胞計數儀(Flow cytometry), 利用 propidium iodide (PI)染色細胞而分析結果發現導致 G2 / M arrest , 且有劑量依存 Dose-dependent 的影響(圖九), 同時經 PCR 和 Western blotting 的檢測也發現經由改變相關的 Cycline 和 Cyclin-dependent kinase 的量有關(圖十)。DADS 對 Cyclin E 和 CDK1 表現有明顯抑制, 導致其量相對的減少, 此由 Western blotting 可證實, 再利用 PCR 反應顯示 DADS 影響 Cyclin E 的基因表現, 因而導致其蛋白質量的改變, 但是對於 Cyclin A、CDK2 則沒有統計上的差異。

綜合以上結果, 可把「DADS 引發人類大腸癌細胞 Apoptosis 及 G2 / M arrest」利用下面流程圖表示(圖十一)。

* 圖九



* 圖十



* 圖十一

