

## 第五章 討 論

劉恕通鑑外紀云：民有疾病，未知藥石，炎帝始嘗草木之滋味，曾一日而遇十二毒，神而化之，遂作方書。由此可知，我們祖先發現藥物、使用藥物治病，在醫療經驗之中累積了一定基礎，近代依據前人的經驗，我們再進一步的來探討其對於細胞層次上的生命活動，其間離不開細胞增殖、分化、死亡，三項基本生命活動。

細胞的增殖分化維持著個體生存及其生命活動，而生物體所處環境的各種因素，如溫度、酸鹼度(pH 質)、陽光、空氣、養分等都影響生物機體，機體的激素、細胞因子等，都通過細胞週期調節系統直接或間接地作用於細胞的增殖、分化。細胞週期控制系統是指一系列相互作用的蛋白質，以生物化學方法，週期性地操縱誘導和協調細胞內涵物的複雜和細胞分裂的基本過程。因此，使用外界因素刺激來調控細胞週期的進行，為研究細胞增殖、分化及死亡的方法之一。

Baicalein 是在中國傳統中藥黃芩 *Scutellaria baicalensis* GEORGI 中，最主要的一種黃酮類 (flavonoid) 化合物。傳統的藥理研究其具清熱解毒的作用，然而在最近的研究中發現其有抗癌的作用<sup>(31,118)</sup>，在報導中黃酮類化合物 (flavonoids) 可經由抑制細胞核內的酵素，拓撲 □

(topoisomerase )，及改變 DNA 的立體結構狀態<sup>(119,120)</sup>。對於人類肝癌細胞株有導致細胞死亡之現象，但其誘導肝癌細胞進行凋亡並不是因其調控拓撲□ 使其蛋白質量不足所引起，而是經由其他未知的機轉所造成<sup>(38)</sup>。

此外，在腫瘤生長過程中若無法獲得充足養分，生長就會受到抑制，腫瘤塊無法持續長大。因此，腫瘤細胞必須誘導新血管生成提供腫瘤細胞生長所需的養分。過去的研究可知，baicalein 對於心臟血管病變如抗凝血、降血脂、降血壓和利尿等，均有一定之功效，但有關細胞分子層次的探討甚少。本實驗設計是以老鼠心臟內皮細胞為模式，研究 baicalein 對內皮細胞的生長、移位及血管生成等作用之影響。

#### 一、 Baicalein 抑制內皮細胞的生長

利用氘標幟胸腺嘧啶加入法與計算細胞數目，確認 baicalein 誘導的細胞生長抑制是經由抑制 DNA 的合成，導致細胞生長停滯於 G1 及 G2/M 期。先前研究證實 baicalein 可以抑制動脈平滑肌細胞 (aortic smooth muscle cells)<sup>(39)</sup>、人類肝癌細胞株 (human hepatocellular carcinoma cell lines in vitro)<sup>(31,121)</sup>與培養的老鼠肝星狀細胞 (cultured rat hepatic stellate cells)<sup>(122)</sup>的細胞增生作用，然而 baicalein 也可抑制內皮細胞蛋白質的合成。Baicalein 導致的細胞生長抑制，並不會造成細胞

的死亡。因為在細胞進行凋亡 ( apoptosis ) 的早期，染色體會聚集成半月狀沿著核膜周圍分佈，細胞質濃縮、細胞核開始皺縮凝集 ( condensation )，輪廓已有不規則凸起。到了末期有凋亡小體 ( apoptotic bodies ) 的產生<sup>(123)</sup>。若細胞進行壞死 ( necrosis ) 時，染色質亦緊縮在核膜周圍，但不明顯較難區分<sup>(124)</sup>；到了末期染色質消失，細胞質膨脹，細胞膜與胞器外膜雖已不完整，但整個細胞輪廓仍在。由直接鏡檢及 DAPI 螢光染核之結果，觀察到 baicalein 處理之細胞，發現並沒有細胞凋亡或壞死現象之特徵。

在本實驗中我們亦發現，添加血清會影響到 baicalein 的作用功效。血清中含有許多成分，如生長因子 ( growth factor )、血紅素等。若在無血清的培養液中加入 baicalein 會出現棕褐色沈澱，若以此培養液培養處理內皮細胞，則細胞生長之情況與其不加 baicalein 之控制組差不多。反之血清濃度在 2% 時 baicalein 抑制內皮細胞生長之能力較在 15% 血清存在時差。根據 Yoshino 之研究發現 baicalein 可與培養液中之鐵分子結合形成棕褐色複合物<sup>(125)</sup>，降低 baicalein 之生物可利用性，當有鐵螯合物 ( iron chelator ) 存在時，也可減弱對細胞的傷害<sup>(126,127)</sup>。因此，推論在本實驗中無血清時 baicalein 與培養液中之鐵作用而產生棕褐色物質，此種與鐵分子結合之 baicalein，無法有效的抑制內皮細胞的生長。在 2% 血清存在之時，部分 baicalein 仍會與鐵分子作用，而減少

baicalein 的生物可利用性。但在 15% 血清存在下，因血清中之殘存血紅素與鐵結合，減少鐵與 baicalein 結合之機會，使 baicalein 之生物可利用性增加，因此可有效的抑制細胞之生長。

## 二、 Baicalein 對細胞週期的影響

內皮細胞生長在含 baicalein 的培養液中生長受抑制，顯示參與細胞生長的分子受到 baicalein 的作用產生了變化。但由本論文回復生長實驗之結果可知 baicalein 造成之生長抑制作用，此種改變是可以回復的，在細胞處理 baicalein 後再換回不含藥劑之培養液中一段時間後，細胞又可恢復生長。基於此點，我們推論在 baicalein 誘發內皮細胞生長抑制的過程中，在調控細胞生長週期的調節分子中，有些分子可能受到 baicalein 之影響。因此，針對細胞生長週期的調控分子進行分析，探討這些分子在 baicalein 誘發的生長抑制過程中所扮演的角色。

由細胞分析儀 (flow cytometer) 分析得知，經 baicalein 處理之內皮細胞其 G1 與 G2/M 期的比例顯著增加，S 期比例相對的減少。顯示 baicalein 處理後細胞會停滯於 G1 與 G2/M 期，此結果表示在 baicalein 調控內皮細胞的細胞週期分子中，G1 與 G2/M 期中的細胞週期調節因子被調控。前人研究發現造成細胞生長停滯的調控方式至少有三種，以 TGF $\beta$  為例，第一種方式是抑制 Cdk 激酶的表現<sup>(128)</sup>。第二種方式

是抑制 cyclin/Cdk 複合體的形成與磷酸化程度<sup>(129)</sup>。而第三種為誘導一類 Cdk 激酶抑制蛋白的表現<sup>(42)</sup>。此外，除了 TGF $\beta$  外也會經由 p53 蛋白誘發 p21<sup>CIP1</sup> 的表現，進而抑制 cyclin/Cdk 複合體激酶<sup>(130)</sup>。

### 1. Baicalein 對 CDKs 的影響

Cdks 是調控細胞週期進行的主要分子；Cdks 活性除需與適當的 cyclins 結合外尚須正確的磷酸化。Cdc2 ( Cdk1 ) 是最早被發現的 Cdks，參與 G2/M 之進行，如 Cdc2 ( Cdk1 ) 需和 cyclin A 或 cyclin B 結合，並經 Cdk activating kinase ( CAK ) 將 Threonine 161 位置磷酸化後，方能參與 G2/M 期的進行<sup>(131)</sup>。

Cdk2 主要出現在 G1 期晚期至 S 期初期，在 G1 期 Cdk2 先與 cyclin E 結合，並調控細胞進入 S 期的速度，至 G1 晚期及 S 初期時則與 cyclin A 結合；Cdk4 分子於 G1 期初期與 cyclin D 結合，細胞由 G1 初期過渡到 G1 晚期，Cdk4 與 cyclin D 的複合物及激酶活性會持續累積 ( accumulation )，直到細胞進入 S 期後活性降低<sup>(132)</sup>。

由本論文中之 Western Blot 試驗結果得知，Cdk1、Cdk2 的分子在 baicalein 誘發之內皮細胞生長抑制過程中此二分子皆有減少之趨勢，而 Cdk3、Cdk4 處理組的蛋白質之表現在 baicalein 及對照組之間並無明顯之差異。Cdk1 為 G2/M 期重要的調節蛋白，如果降低會

導致與 cyclin B/Cdk1 與 cyclin A/Cdk1 之激□活性降低，使細胞停滯在 G1/S 之轉換期或 G2/M 期。

此外在 baicalein 處理之細胞分析其 Cdk1 與 Cdk2 蛋白質的激□活性，在放射線磷酸的檢測下發現的確有活性下降之現象。此結果顯示除了蛋白質量的降低外其激□活性也隨之下降。

## 2. Baicalein 對 cyclins 的影響

細胞週期調節蛋白 (cyclins) 是調節蛋白質激□ (Cdks) 的重要分子，細胞週期的不同時期各有不同的 cyclins 與 Cdks 結合成複合物，以維持細胞週期的運行<sup>(133)</sup>。cyclins 依據其在細胞週期中參與順序可分為 G1 cyclins 包括 cyclin D 及 cyclin E，主要作用在 DNA 合成之前；cyclin A 主要作用在 DNA 合成期；而 cyclin A 及 cyclin B (mitotic cyclins)，主要作用在 DNA 合成之後<sup>(134,135)</sup>。Cyclin A 需與 Cdk2 和 Cdc2 結合，才能完成 DNA 合成之過程進而進入 G2 期<sup>(133)</sup>。而 cyclin D 為 G1 期所必須的 cyclin，當細胞受生長因子 (extracellular growth factor) 刺激時可持續的生成，此時 cyclin D 在細胞中穩定的堆積 (accumulation)<sup>(136)</sup>。cyclins 在細胞中的表現量影響其功能，除了 cyclin D 的生成受到細胞外訊息 (extracellular signals) 調控外，其餘如 cyclin A、cyclin B、cyclin E 在細胞週期進行之過程中，多呈

現週期性的消長<sup>(137,138)</sup>。

本實驗中老鼠心臟內皮細胞經 baicalein 處理後，細胞內 cyclin D2 與 cyclin A 之表現量明顯減少，cyclin D1、cyclin B 與 cyclin E 有增加之趨勢，cyclin D3 則無明顯變化。cyclin D 主要功能是調控細胞通過 G1 期的 R 點 (restriction point)，決定細胞是否進入 S 期的一個重要調控點<sup>(139,140,141)</sup>。由本論文之試驗結果，我們得知處理 baicalein 後，cyclin D2 的減少，可促使內皮細胞停滯在 G1 期。又 S 期時期 cyclin E 必須降低，才能使細胞順利的進入 S 期<sup>(142)</sup>，但是在 baicalein 處理後 cyclin E 分子卻增加，這可能也會促使細胞停滯在 G1 期<sup>(143)</sup>。而 cyclin A 蛋白之表現量降低，也可促使細胞停滯在 G1 期。因此 baicalein 在內皮細胞中調控 cyclin D2、cyclin E 及 cyclin A 之表現，可能是促使內皮細胞停滯在 G1 期的主要因子。而 cyclin B 的增加會促使細胞進入 G2 期，但在 M 期的晚期若 cyclin B 仍不分解，則細胞無法脫離 M 期<sup>(144)</sup>。因此 baicalein 處理造成內皮細胞中 cyclin B 分子之變化，可能是促使其停置在 G2/M 期之主要因子之一。

### 3. Baicalein 對 p53、pRb 及 CKIs 的影響

蛋白質激酶抑制分子 (Cdk inhibitors ; CKIs) 分為兩大類：一為 CIP/KIP family 包括 p21、p27 即 p57 三個分子；另一則為 INK family

包括 p15、 p16、 p18 及 p19 四分子。這些蛋白質激酶抑制分子直接與 cyclin-Cdk complex 結合後，產生抑制的效果<sup>(145)</sup>。

已知 p27<sup>KIP1</sup> 的表現隨著細胞週期的進行而波動，在 G0/G1 期的表現最多，當細胞由靜止狀態進入生長週期時 p27<sup>KIP1</sup> 隨之減少。本實驗中，baicalein 處理後之內皮細胞其 p27<sup>KIP1</sup> 的表現量沒有明顯的變化。p21<sup>CIP1</sup> 在細胞中具有多重的功能，低濃度存在時的 p21<sup>CIP1</sup> 對 cyclin/Cdk 而言為促進組合之分子 (assembly promotor)，cyclins 與 Cdk 藉由 p21<sup>CIP1</sup> 之結合而順利形成複合物<sup>(146)</sup>，在細胞中 P21<sup>CIP1</sup> 與 cyclin Cdk 及 proliferating cell nuclear antigen( PCNA )形成 quaternary complex，當細胞中的 CIP1 大量增加時，則對 cyclin-Cdk 的活性產生抑制<sup>(147,148)</sup>。p21<sup>CIP1</sup> 為受 p53 調控的下游分子，當 p53 誘發大量 p21<sup>CIP1</sup> 的表現時，會造成 G1 arrest<sup>(130,149)</sup>。另外一種研究認為 p53-independent pathways 是在細胞受 mitogens 刺激時的調控方式，p21<sup>CIP1</sup> 在細胞進入生長週期之前快速的被誘發，目的是調整細胞狀態，避免細胞過早進入生長週期<sup>(150,151,152)</sup>。Extracellular matrix 與內皮細胞 integrin  $\alpha_3$  結合可直接調控細胞週期，且抑制 p53 和 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 的表現<sup>(153)</sup>。本論文實驗之結果發現，p53 及 p21<sup>CIP1</sup> 在 baicalein 處理後之內皮細胞中有增加的趨勢，因此認為 baicalein 亦可藉由 p53 大量表現誘導 p21<sup>CIP1</sup> 的表現，造成 G1 期的停滯。



細胞週期激酶抑制分子 p15 與 p16，主要是作用在 Cdk4。我們發現內皮細胞處理 baicalein 後細胞中之 p15 有些微增加的趨勢，但 p16 卻沒有變化<sup>(154,155,156)</sup>。p15 對於 G1 期 Cdk4 的 R point 有抑制的作用，也可能導致細胞停滯在 G1 期<sup>(157)</sup>。但是如果 Cdk/cyclin 結含量少且活性也顯著降低，則 CKIs 對於細胞週期調控的影響，相對來說就不是那麼的重要了<sup>(158)</sup>。

Retinoblastoma 是發生於兒童視網膜的惡性腫瘤，發生的原因是位於第 13 對染色體上之腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) 的缺失所致，此被選殖出之缺失基因被稱為 Rb 基因。未受磷酸化的 Rb 會與轉錄因子 (transcription factor) E2F 結合，當 Rb 過度磷酸化後，將 E2F 釋出，活化 S 期所需之基因。磷酸化 Rb 主要是經由 cyclin D/Cdk4 complex，cyclin D/Cdk4 在 G1 期活化後，將 Rb 磷酸化並且不斷的累積，一直到細胞完成 mitosis 為止<sup>(159,160)</sup>。

由本實驗可知，內皮細胞經處理 baicalein 後，Rb1 的蛋白質表現並無明顯之變化。Rb2 的蛋白質表現呈現兩個條帶，上方分子量較大者為磷酸化的 Rb(ppRb)，下方分子量較小者為未磷酸化狀態的 Rb(pRb)。在處理 baicalein 後，Rb2 的表現無論是磷酸化或未磷酸化狀態都明顯增加，此結果證明 baicalein 處理的確可促使細胞停滯在 G2/M 期，因此我們可偵測到較多磷酸化之 Rb。

### 三、 Baicalein 對內皮細胞移位能力及新血管生成的影響

#### 1. Baicalein 對內皮細胞移位能力的影響

內皮細胞在血液與組織間具有選擇性的屏障，藉由探討附著分子來找尋調控細胞移位能力對於腫瘤的轉移<sup>(161)</sup>、血管新生<sup>(162)</sup>及胚胎發育等研究而言均為重要的探討方向<sup>(163)</sup>。一般而言，細胞移位顯示 integrin adhesion receptor 與 extracellular matrix(ECM) ligands 的結合<sup>(164)</sup>產生了變化。而細胞移位也與 fibronectin、collagen 等 ECM 蛋白之密度有關<sup>(165)</sup>。前人研究發現如 transforming growth factor (TGF- )、endothelial cell growth factor(ECGF)、vascular endothelial growth factor(VEGF)及 basic fibroblast growth factor-1 and -2(bFGF-1 and bFGF-2)等<sup>(166,117)</sup>等生長因子，可調控內皮細胞生長並影響移位能力與血管生成<sup>(167,168)</sup>，我們以在離體( in vitro )模式探討，baicalein 對內皮細胞增生與創傷修補的影響，結果發現在處理 baicalein 的內皮細胞其移位能力的確會受到明顯的抑制，至於是否經由抑制附著分子之表現或是因細胞生長緩慢而造成移位能力降低，尚待進一步之研究。

#### 2. Baicalein 對血管生成的影響

新血管的生成，是血管內皮細胞受到生長因子的刺激活化後，內皮細胞會侵入細胞外基質(matrix)中，形成微血管芽(sprout)<sup>(169)</sup>。再進行遷移 (initiation)、增殖 (proliferation)、侵入 (invasion)、接合 (maturation)、分化 (differentiation)，使微血管芽的內側有管腔的出現，重新組成具有管腔的構造，形成新的微血管網。然而腫瘤的生長必須不斷的誘發新微血管網的形成，以維持其生長<sup>(170)</sup>，因此血管新生對腫瘤細胞的生長與轉移有決定性的影響<sup>(171)</sup>。目前臨床正朝向混合使用抑制腫瘤血管生成藥物及抗癌藥物，期能研發出較有效之治癌方法。因此抑制血管新生藥物之開發為癌症藥物研發之重要方向之一<sup>(172)</sup>。中藥薑黃成分中之 curcumin 就被報導可以作為未來抑制血管新生之藥物<sup>(173)</sup>。本論文實驗中，我們使用由 Engelbreth-Holm-Swarm(EHS) mouse sarcoma 萃取出的 Matrigel<sup>®</sup> Basement membrane Matrix 作為細胞外基質，其內含有 laminin、collagen、heparan sulfate proteoglycans、entactin、nidogen<sup>(174)</sup>等與細胞外 extracellular matrix(ECM)相近物質來評估血管新生。在細胞離體血管生成試驗中，控制組之內皮細胞會由分散而逐漸聚集；但預處理 baicalein 之內皮細胞其絲狀偽足大量形成；但後處理 baicalein 之內皮細胞因生長受抑制使血管生成的速度變慢。處理 baicalein 的確可以抑制內皮細胞在 Matrigel 分化成血管狀的情形；反之若內皮

細胞在之前處理 baicalein 造成細胞生長抑制期間可能改變了細胞中之某些分子，當培養到 ECM 上時即移位進行細胞分化與血管生成，使得血管生成之速度反比不處理 baicalein 之控制組更快，至於為何預先處理 baicalein 一段時間後，反而有利於新血管之生成，其作用機轉有待進一步之研究。

#### 四、 Baicalein 對內皮細胞內肌動蛋白 ( actin ) 的影響

Baicalein 除了調節細胞週期外，對於細胞骨架 ( cytoskeleton ) 也造成很大的影響，先前的研究指出細胞骨架可以調控 neutrophils 和 lymphocytes integrin adhesion receptors 的易變性 ( mobility ) 與親合性 ( affinity )<sup>(175,176,177)</sup>。因此，actin filament 和 actin-binding protein 一般認為會局部的和 integrin 附著，來決定細胞的吸附能力和調控細胞形狀與移位運動，並提供訊息蛋白 ( signaling protein ) 調控訊息傳遞途徑的組織網絡，因此 integrin 之變化可改變細胞的行為<sup>(178,179)</sup>。Kiyoko 發現以 Saponin 刺激老鼠 spleen 的 sinus endothelial cells 會在細胞膜內層形成 straight bundles 並形成網狀環繞在細胞內，其會影響血液細胞的 migration 外，也調控細胞的附著與分離<sup>(180)</sup>。此外，integrin 下游分子 focal adhesion kinase ( FAK ) 的 tyrosine phosphorylation 為早期的反應過程<sup>(181,182)</sup>。Human osteoblast-like cells, Saos2 細胞以生長荷爾蒙刺激，

可使 FAK( p125<sup>FAK</sup> )蛋白被磷酸化,並且伴隨產生 actin stress fiber<sup>(183)</sup>。

在本論文結果顯示,內皮細胞處理 baicalein 後在細胞周圍出現了大量的 stress fiber,長時間持續處理 baicalein 細胞出現平行且稀疏的 stress fiber,可能與處理 baicalein 內皮細胞長時間後變得大而平貼狀有關。

然而是否與 FAK 分子相關,其作用機轉有待進一步之研究。

## 五、 Baicalein 處理可改變內皮細胞之附著能力

在血管新生的過程中,內皮細胞吸附能力扮演了主要的功能<sup>(184)</sup>。

在細胞質中附著分子可與細胞骨架分子( cytoskeleton molecules )連合,並且與二級訊息( second messenger )途徑的組成分子有直接的訊息傳遞<sup>(185,186,187)</sup>。這顯示外在因子的結合( extracellular ligand binding ),可以調節細胞質內的訊息傳遞過程<sup>(188)</sup>。正常組織之細胞除了血球與淋巴球細胞外都有 anchorage dependence 與 contact inhibition 之作用,因此初代培養之內皮細胞其生長及存活也有 anchorage-dependent 之特性,因此若沒有 integrin 造成的附著時,就會進行凋亡<sup>(189,190)</sup>。細胞表面的附著分子,一般可被分類為四個不同家族: integrins<sup>(191,192)</sup>、selectins<sup>(193)</sup>、cadherins<sup>(194)</sup>和 immunoglobulin(Ig) superfamily<sup>(195)</sup>。細胞與細胞外間質之附著作用是經 integrins 與細胞間質( extracellular matrix )結合而產生。而細胞與細胞之附著作用是經由 cadherins、Ig-superfamily、selectins

之結合，進而影響內皮細胞接合及管腔之形成<sup>(196)</sup>。

在研究 baicalein 對內皮細胞附著能力之影響時，發現在同時處理 baicalein 時，內皮細胞之附著能力的確有下降的趨勢，經長時間作用附著於培養盤之細胞數目並無統計上的意義。先前報導指出 baicalein 可抑制由 IL-1 和 TNF- $\alpha$  所誘導的 endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) 和 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1 immunoglobulin-like molecule) 的表現<sup>(197,198)</sup>，使內皮細胞與淋巴球細胞間之附著能力下降。

反觀在預先處理 baicalein 之內皮細胞，其附著能力與控制組差距頗大，顯示預處理 baicalein 可以增加內皮細胞的附著能力。Cheng 等研究發現多種內皮細胞可分泌 fibronectin、vitronectin、laminin、collagen type I 和 III、von Willebrand factor、fibrinogen 和 denatured collagen<sup>(199)</sup> 等可與 integrin 結合的 ECM 蛋白。先前的研究中，sequence arg-gly-aspartic acid (RGD)，一個 integrin adhesion receptor 的 peptide，可干擾細胞與 fibronectin 和 collagen 的附著<sup>(200,201)</sup>。在本論文之實驗中預先處理 baicalein 之內皮細胞，其附著於 ECM 之能力的確有改變。此現象是否與新血管生成之效應有關，實有待進一步探討。