

## 第二章 緒論

### 第一節 血癌

人體內所有血球細胞都來自骨髓中的多能造血幹細胞 ( Pluripotential stem cells ) , 如圖 1 所示 , 大略可分為骨髓性幹細胞 ( Myeloid stem cells ) 與淋巴性幹細胞 ( Lymphoid stem cells )<sup>14</sup>。骨髓性幹細胞再分化為骨髓系幹細胞 ( CFU-GEMM ) , CFU-GEMM 再演化成 BFU-E、CFU-MEG、CFU-GM、CFU-EQ、CFU-BASO 五大分支。BFU-E 含有血紅素 , 最後會發育成熟變成紅血球 ( Erythrocyte, red blood cell )。CFU-MEG 與凝血功能相關 , 最後會發育成熟形成血小板 ( Platelets )。CFU-GM 可再分為 CFU-G 與 CFU-M 兩大類 ; CFU-G 會發育成熟而形成 Metamyelocyte、Band、Polymorphonuclear neutrophils 等不同成熟度之顆粒球 ( Granulocyte ) ; CFU-M 會發育成熟而形成單核球 ( Monocyte ) 和巨噬細胞 ( Macrophage ) 兩種不同成熟度之單核球。CFU-EQ 最後會發育成熟變成嗜酸性球 ( Eosinophil )。CFU-BASO 最後會發育成熟變成嗜鹼性球 ( Basophil ) 與更成熟的肥大細胞 ( Mast cell )。

而淋巴性幹細胞可分為 Pre-B 和 Pre-T 兩分支 ; Pre-B 細胞最後會發育成熟生成 B cell 與 Plasma cell , Pre-T 細胞最後會發育成熟生成 T cell。當細胞達到末端分化時 , 成熟的血球細胞才會自骨髓跑

到周邊組織各司其職。依分類的不同會產生不同的抗體；像是嗜中性球( Neutrophil )、單核球和嗜酸性球會吞蝕、殺死甚至分解外來入侵的物質，其中嗜中性球和單核球主要針對細菌作用，而嗜酸性球則主要針對寄生蟲作用；嗜鹼性球因為含有 Histamine 和 Serotonin，所以有抗過敏功能；而 B 淋巴細胞和 T 淋巴細胞則具有細胞免疫的功能<sup>15</sup>。

所有的血球細胞都有一定的生命期限，像是大腦記憶區的淋巴細胞可以活好幾年，紅血球細胞可以活 120 天，而嗜中性球只有幾天的壽命；當生命週期到了終點骨髓就會自動再生新的細胞替換之<sup>16-17</sup>。

一旦這種替換模式受到外界刺激而不再正常運作時就可能導致癌症的生成( ex : Leukemia Lymphoma、 ... )。造成白血病的成因包括了游離輻射( 例如：X-光 )，及一些治療癌症的藥物【例如：烷化劑( alkylating agents )】，還有大量運用在工業上的化學物質( 如：苯 )等等。以上均屬於外來的侵犯物質。而近年來，科學家在癌症的內生成因的研究中也有重大突破，其發現人體內有某些基因稱為原癌基因( protooncogene )以及抑癌基因( tumor suppressor genes )，而當二者無法取得平衡時即往往造成器官組織細胞的不正常增生及複製，於是便成為癌症發展的起點。另外在某些特定基因

位置上發生突變或是染色體發生異位時也常造成某些癌症的發生。

例如：急性前骨髓性白血病(屬 AML-M3)發現在染色體 15 及 17 位置上發生轉位所造成的<sup>18</sup>。

白血病(Leukemia)是骨髓內的白血球在生長過程中，幼稚型白血球無法正常分化而導致造血組織異常增生、浸潤身體各大組織、最後器官功能失調；成熟白血球劇減而易受感染、紅血球減少而貧血、血小板量不足而造成嚴重出血。故白血病是造血系統的惡性癌症，俗稱血癌。

根據臨床上 Landis 等學者對癌症罹患率所作的統計中發現，1998 年美國罹患癌症的人口中大約就有 28600 人是因白血病而起，其中近 21600 名患者因白血病而死<sup>19</sup>。依白血球成熟度可將白血病分為急性(Acute)和慢性(Chronic)；急性白血病常好發於幼童，血液中大多為較不成熟的白血球，依型態可分為急性骨髓性白血病(Acute myelogenous leukemia, AML)和急性淋巴性白血病(Acute lymphocytic leukemia, ALL)；慢性白血病中則大多為較成熟的白血球其病史會拖得較長，大多好發於 40 歲以上的成年人，且男性罹患率約為女性的兩倍<sup>20-23</sup>。

其中急性骨髓性白血病又稱為急性非淋巴性白血病(Acute nonlymphocytic leukemia, ANLL)，在成人急性白血病中大約佔了

80~90 % ; 平均每年都會增加 9200 個 AML 的病患。根據 French-American-British ( FAB )型態分類,急性白血病可依其細胞成熟度分成 M<sub>0</sub> ( Undifferentiation AML )、M<sub>1</sub> ( Acute myeloblastic leukemia )、M<sub>2</sub> ( Differentiation AML )、M<sub>3</sub> ( Acute promyelocyte leukemia, APL )、M<sub>4</sub> ( Acute myelomonocytic leukemia )、M<sub>5</sub> ( Acute monocytic leukemia ) M<sub>6</sub> ( Acute erythrocytic leukemia )和 M<sub>7</sub> ( Acute megakaryocytic leukemia )等八種亞型 ; 依亞型的不同會使用不同療法。

一般針對白血病的治療包括有傳統的化學治療(chemotherapy)、骨髓幹細胞移植(stem cell transplantation ; SCT)、放射線治療(radiation therapy, ex : -ray), 及 Interferon 治療...等等。其中仍是以化療為主,傳統的化療藥物包括 cyclophosphamide、cytarabine、etoposide....等,其屬於全身性的治療,可經由口服或是直接靜脈或肌肉注入藥物使之進入全身血液循環中,藉此循環全身並殺死身體各部位的癌細胞。有時也會直接由脊髓注入藥物(稱為脊髓液的化療)。上述過程均為第一階段療法,其目的在於盡可能殺死白血病細胞並達到緩解(complete remission)的目的。接下來再進入第二段療法(又稱為鞏固療法 ; consolidation therapy),即持續殺死任何殘存的白血病細胞使之不易復發。但是,化療的缺點即在於需使用

極高劑量的藥物，其對於人體正常細胞以及生長極快的毛囊細胞、表皮細胞均具有同等的傷害能力，致使病人需忍受掉髮、噁心、嘔吐...等副作用，最後導致病人順從性不佳而終告治療失敗。

近年來，也漸漸發展出新型療法，例如放射線治療，其運用高能量的  $\gamma$ -ray 去殺死癌細胞並使得腫瘤縮小，但是於白血病的治療上只適用於殺死位在腦膜壁或是睪丸內的白血病細胞，或在供應緊急治療來使用。另外一勞永逸的辦法即取得適當的骨髓捐贈而進行骨髓移植的治療，這卻也是機率最小的治癒辦法。也正由於目前臨床上使用的療法均有某些限制以致無法徹底毀滅癌症的機制，於是發展另一最佳治療療程已是刻不容緩的事情。

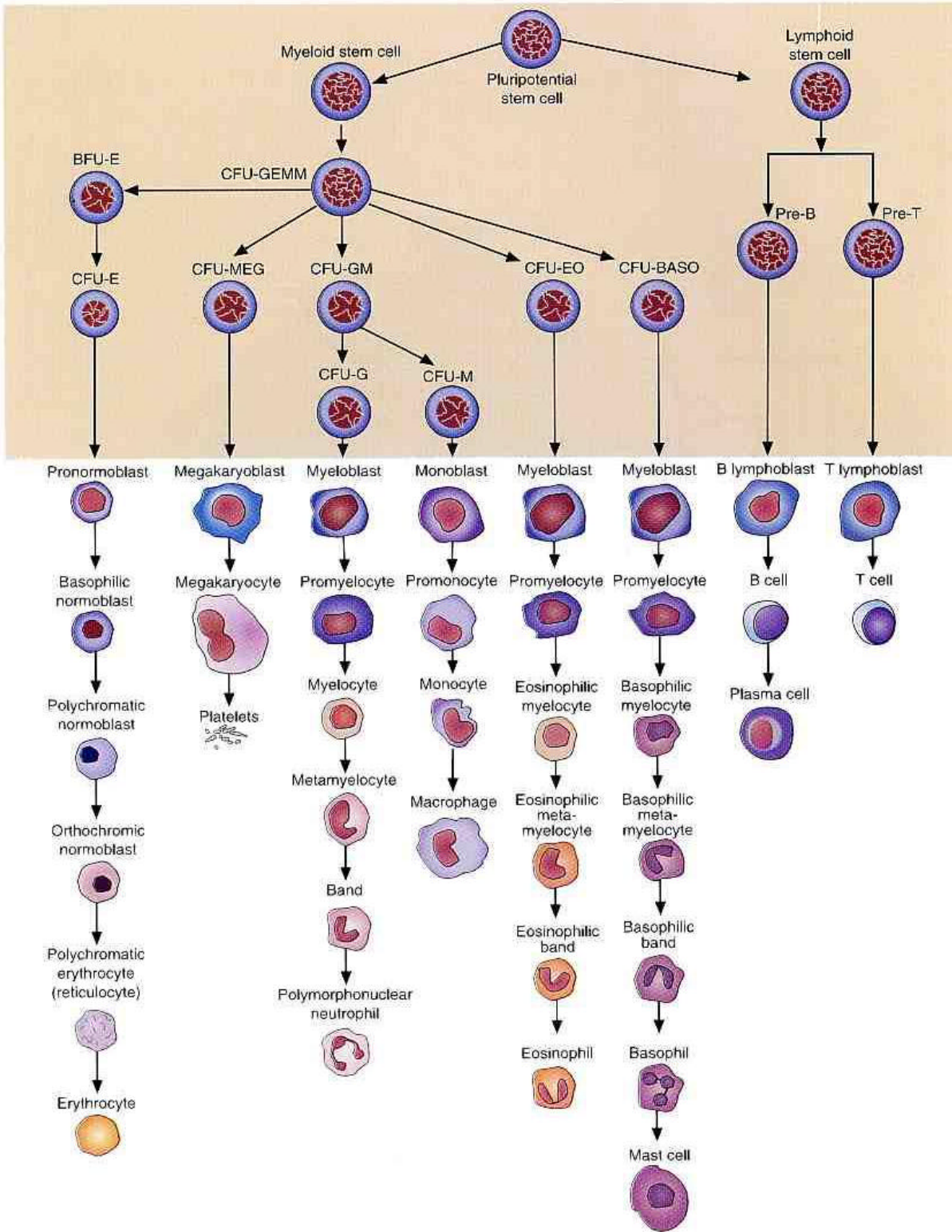


圖 1：血球細胞分化圖

Carr, Jacqueline H.; Bernadette, F. Rodak. Clinical hematology atlas. Philadelphia : Saunders, 1999.

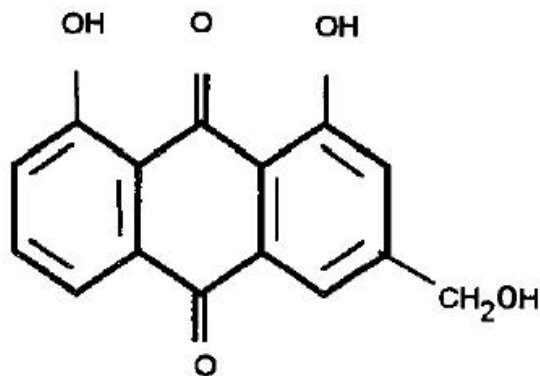
## 第二節 蘆薈大黃素 ( Aloe-emodin )

蘆薈大黃素 (1,8-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-anthraquinone) , 屬於??類 ( anthraquinone ) 的化合物。天然界中 , 它主要存在蘆薈的葉子 ( *Aloe vera* ) 及大黃的根莖 ( *Rheum palmatum* )<sup>24-26</sup>。早期文獻指出蘆薈大黃素具有瀉下、抗黴菌、抗菌、抗病毒、保肝等作用<sup>27-31</sup>。

最近的研究發現 , 蘆薈大黃素能降低人類腦癌細胞的存活率但對於正常細胞則無較強的細胞毒性 , 而且在細胞培養和動物模式中都有相同效果<sup>11</sup>。另一方面對蘆薈大黃素對於人類肺癌細胞 ( CH27 ) 和人類肝癌細胞 ( HepG2 及 Hep3B ) 除了抑制增生也可以誘導細胞凋亡<sup>12-13</sup>。

由於蘆薈大黃素對於癌細胞有專一性的抑制效果以及誘導細胞凋亡的特性 , 具有潛力開發成為新一代抗癌藥物。

圖 2 : 蘆薈大黃素  
的結構式



### 第三節 細胞週期 ( Cell cycle ) 調控對細胞增生之影響

由幹細胞(stem cell)分化到完整的細胞,真核細胞(eukaryotic cell)不是處於有絲分裂就是停止在休眠狀態。大致而言,我們可將複雜的細胞增殖現象分為三個時期:細胞生長期、DNA 複製期、細胞分裂期,這個過程稱為細胞週期。

細胞週期可分為 Interphase(G0, G1, S phase, G2)及 M phase<sup>32</sup>。

Gap 0 (G0): 細胞處於休眠期,可能為暫時性或永久性的停止生長,若細胞以發展到最後階段便不再生長。(如神經細胞; neuron)

Gap 1 (G1): 此期之細胞開始生長,細胞大小增加,同時產生 RNA 及合成蛋白質,目的是為 DNA 複製做好準備

Synthesis (S) phase: 為了使分裂後的二個子細胞相似,必須複製使含量增加一倍。

Gap 2 (G2): DNA 複製到有絲分裂的期間,細胞會持續生長並產生新的蛋白質。

Mitosis (M) phase: 這個階段的細胞停止生長及蛋白質合成,所有細胞的能量集中在複雜而有規律性的細胞分裂以期得到兩個相似之子細胞。



而其中 G1 及 G2 期各含有檢查哨，以每次進入 S 期或 M 期檢查是否一切準備就緒，才可以接著進行 DNA 的合成或是細胞分裂作用。在文獻中指出，當 DNA 受損時，週期便無法通過檢查哨而停下 (Cell cycle arrest)，此時細胞內會進行 DNA 的修復，一旦修補完成時才進入下一期，若是發現有無法彌補的錯誤時，細胞則選擇走向凋亡 (apoptosis)，以避免錯誤遺傳至下一代<sup>33</sup>。

在真核細胞中，藉由連續的訊息，經過活化，與隨後一系列特殊的 Cyclin-CDK(Cyclin-CDK complex)的活化與否來調控細胞週期進行，讓細胞增生。對於多樣的抑制增生 (antiproliferative)訊號，包含有 DNA 損傷 (DNA damage)、分化 (differentiation)、接觸性抑制 (contact inhibition)、和衰老 (senescence)也會促使 CDK 的抑制者來負向調控細胞週期的進行<sup>34-37</sup>。

調控細胞週期進行的蛋白稱為 Cyclin，而調控 Cyclin 活化的則是一些 Cyclin-dependent kinase(CDK)。這些 Cyclin 與 CDKs 會形成複合物，而此複合物的活化與分解則調節著週期的進行。

Cyclin-CDK 複合物的活化是經由多層次的調控，包含：

- (1) Cyclin 蛋白的表現(induction)並與 CDK 結合<sup>38</sup>
- (2)CDK 被 CAK(Cyclin-activation kinase)磷酸化<sup>39</sup>
- (3)合成可抑制 CDK 的蛋白(CDK-inhibitory proteins)的調控<sup>40</sup>

Cyclins 家族，主要在細胞週其中被合成。目前已知至少有 8 種 Cyclins 的存在，分別為 A、B<sub>1,2,3</sub>、C、D<sub>1,2,3</sub>、E、F、G 及 H，他們在 N-端與 CDKs 鍵結的地方都具有約 150 個胺基酸的不同區域，稱之為 cyclin-box<sup>41-44</sup>。

Cyclins C、D 以及 E，主要存在於 G1 時期，並在 G1-S 的過渡期間被分解<sup>43</sup>。而 Cyclins A 與 B 被稱為 mitotic cyclins，穩定的存在於 interphase，但在 mitosis 時會迅速分解<sup>42</sup>。而 Cyclin H 則會和 CDK 7 形成一具有酵素活性的複合物，進而活化 cdc2(CDK1) 及 CDK2<sup>45-46</sup>。

Cyclin-dependent kinases (CDKs) 是一群蛋白激酶家族，會和特殊的 Cyclin 結合而活化。目前已知共有 7 種 CDKs 被發現，分別是 cdc 2(CDK1)、CDK2、3、4、5、6、7。細胞在 G0/G1 時期，CDK4、5 及 6 會和 Cyclin D 家族結合；而 CDK2 也會與 Cyclin D 家族結合，但主要還是在 G1 及 G1-S 過渡期與 Cyclin A 及 E 結合。如上述所提及，CDK7 會與 Cyclin H 結合，並磷酸化 cdc2、CDK2 或 RNA polymerase 的 C 端次單元體<sup>45-46</sup>。cdc2 主要存在 S、G2 以及 M 時期，並與 Cyclin A 及 B 結合<sup>47</sup>。

細胞週期中，除了上述 Cyclin 與 Cyclin-dependent kinases 的正向調控因子外，另有一家族擔任著負向調控的角色，稱之為 Cyclin-dependent kinases inhibitors(CDKI)<sup>48-50</sup>。在哺乳類細胞中，CDKI 主要可分為兩大族群，一為 INK4 家族，另一為 KIP/CIP 家族<sup>(9)</sup>。在 INK4 家族中，主要成員有 p14 p15(INK4B), p16(INK4A), p18(INK4C)以及 p19(INK4D)，其功能為抑制 Cyclin D/CDK4 與 Cyclin D/CDK6 而達 G1 時期的控制。另一個族群為 KIP/CIP 家族，包括了 p21(CIP1/WAF1/SDI1), p27(KIP1)以及 p57(KIP2)。KIP/CIP 家族所影響的層級較 INK4 家族為廣，其所調控的蛋白包括 Cyclin E/CDK2, Cyclin D/cdc2, Cyclin D/ CDK6, Cyclin A/CDK2 及 Cyclin B/cdc2 等<sup>48-50</sup>。

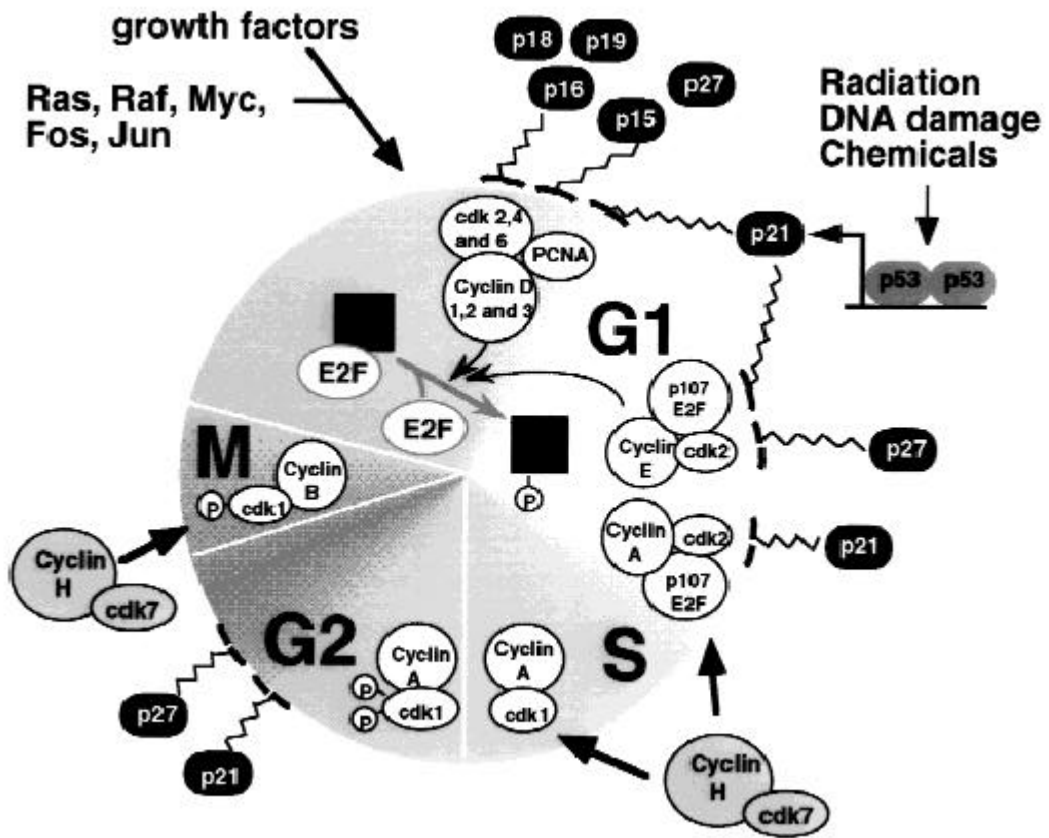


圖3：細胞週期調控

Adrian M. Senderowicz, Edward A. Sausville Preclinical and Clinical Development of Cyclin-Dependent Kinase Modulators  
*Journal of the National Cancer Institute*, 2000; 92: 376-387

## 第四節 細胞凋亡 ( Apoptosis )

### 1、細胞凋亡之定義

細胞凋亡(apoptosis)一詞最早是在 1972 年由病理學家 John Kerr 所提出<sup>51</sup>，原本字面的意思是指樹葉凋落或掉落。細胞凋亡又被稱為生理上的細胞死亡(physiological cell death)或是計畫性的細胞死亡(programmed cell death)，在生理上扮演著相當重要的角色<sup>52-54</sup>。例如在胚胎發育或是精子的形成過程中都會發生細胞凋亡。除此之外，當正常的細胞受到傷害而發生基因突變時，也會自動引發細胞凋亡的機制使突變的細胞死亡，避免突變的遺傳<sup>55</sup>。而在病理學上，也有一些疾病與細胞凋亡有關，例如阿茲海默症<sup>56-59</sup>。

### 2、細胞凋亡時之分期

細胞凋亡主要是發生在單一細胞中。它可分為兩個時期，早期(early stage)以及晚期(later stage)。細胞凋亡早期時，會出現染色質濃縮(compaction of nuclear chromatin)、細胞質濃縮(condensation of cytoplasm)以及細胞皺縮等特徵；到了晚期，細胞核會開始發生裂解，然後形成凋亡小體(apoptotic bodies)。在細胞凋亡過程中，並不會發生胞器或是胞膜破裂，因此不會引起發炎反應或危害到周圍組織。

### 3、細胞凋亡與細胞壞死(necrosis)之分別

細胞壞死會同時發生在一群細胞，也可分為早期與晚期兩個時期。在細胞壞死早期，細胞內之胞器會脹大，細胞膜也會破裂；到了晚期細胞膜也發生破裂<sup>60-62</sup>。由於細胞發生破裂，因此會釋放出一些發炎物質而引起局部發炎反應，傷害到鄰近的細胞或組織。

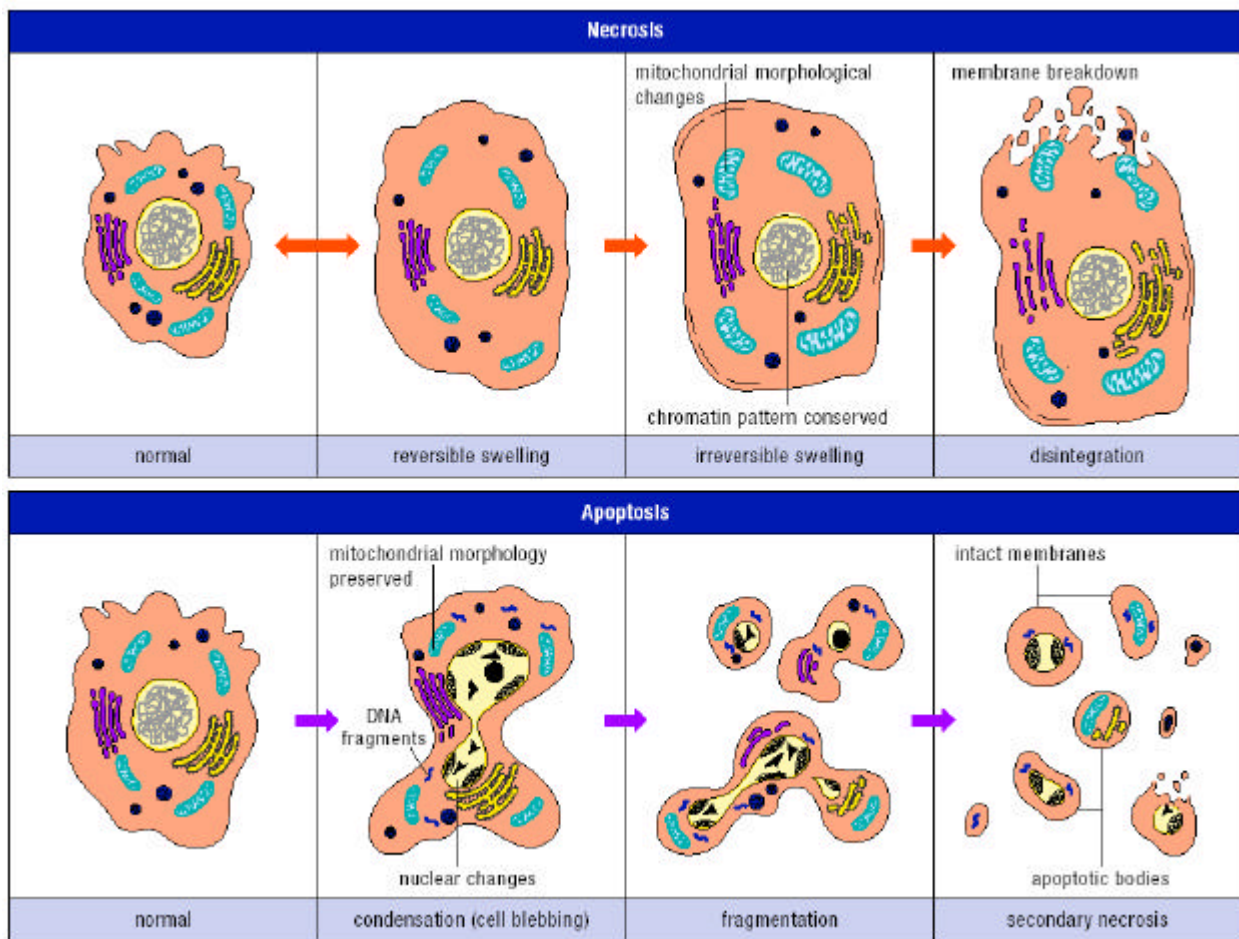


圖4：Apoptosis 與 Necrosis 的區別

Andrew Wyllie et al, Apoptosis and Cell Proliferation 2<sup>nd</sup> edition pp.2  
1998 BOEHRINGER MANNHEIM

## 4、細胞凋亡時的生化變化與特徵

### A、DNA 降解

當細胞凋亡進入晚期時，細胞內的核酸內切酶會被活化而將 DNA 隨之分解，產生 180~200 bp 或其倍數的 DNA 片段。此時藉由 1.8% 的 agarose gel 進行電泳時，會出現特殊的梯形電泳帶。此為細胞凋亡時之明顯特徵<sup>63</sup>。

### B、細胞鈣離子濃度改變

細胞凋亡早期時可偵測到細胞內鈣離子濃度之上升<sup>64-65</sup>。若是在培養基中移除鈣離子或抑制鈣離子濃度上升時，細胞凋亡也會受到抑制。

### C、Caspase enzyme family

當細胞發生凋亡時，細胞內有一系列的蛋白水解酵素(Cysteine dependent aspartate specific protease)會被活化，這些 Caspase 活化之後，會裂解其他細胞內的酵素，造成細胞形態之改變<sup>66-67</sup>。Caspase 家族有許多成員，目前研究至少已經發現 14 種的 Caspase 存在。根據他們的同源性，可大致分為三類<sup>68-69</sup>：

#### a、The ICE subfamily of cytokine processors

此類 Caspase 有 Caspase 1、4、5、11、12、13、14，此類 Caspase 的功能與發炎反應有較大的關係。

### **b、 The ICH-1/Nedd-2 subfamily of apoptotic initiators**

此類 Caspase 有 Caspase 2、8、9、10，而此類 Caspase 的功能，則負責活化 apoptotic executioners 使其能執行 apoptosis。此類 Caspase 在結構上，N 端具有較長的 prodomain，如：Caspase 8 及 Caspase 10，其 N 端 prodomain 具有兩個 death effector domain(DED)，來與下游的 adaptor molecule C 端的 DD domain 連結，以傳導來自 Death receptor pathway 的 death signals。而在 Caspase 9 上，則具有 CARD(Caspase recruitment domain)位於 prodomain 上，此 CARD domain 可與 Apaf-1 上 N 端的 CARD 結合，傳導來自 mitochondria pathway 的 death signals。

### **c、 The Ced-3/ CPP32 subfamily of apoptotic executioners**

此類 Caspase 有 Caspase 3、6、7，而此類 Caspase 的功能則負責執行細胞凋亡，裂解其下游的 protein 如：Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)、DNA-PK(DNA-dependent protein kinase)... 等 protein 改變細胞原本作用。這類 Caspase 在其結構上，N 端的 prodomain 較短，能分解細胞內的蛋白質如：Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)，此蛋白質為 Caspase 3 的受質。而 PARP 其原本作用為修復受損的 DNA、調控細胞增殖與死亡的平衡、和維持基因體的穩定性。但當 PARP 受 Caspase 3 裂解，會由



116kDa 被水解成 85kDa，進而失去原本的效用。又如：Caspase 3 裂解 ICAD/DFP45 導致其鍵結的 CAD 能脫離 ICAD 的束縛，進而 CAD 可轉移到細胞核內分解 DNA，將 DNA 切成大約 180-200 bp 長度的片斷。

然而，上述三大類的 Caspase 均具有一些共同的特徵<sup>70</sup>：

1. 原本為單一無活性的 precursor proenzyme，活化後被切割形成大、小次單位，而形成四聚體模式，如：Caspase 8 其活化態為 (P20/P10)<sub>2</sub>，其切割蛋白質的作用位置則是 Asp 之 C 端的肽鍵。
2. 具有自身催化或相互激活的能力。
3. 具有相似的催化部位 (catalytic site)，包括含有 active site cysteine 殘基的 QACXG sequence。

## 5、細胞凋亡時的分子機轉

### A、造成細胞凋亡的因素

能造成細胞凋亡的原因有許多種，其中包括放射線、高溫、具有毒性的抗癌藥物、自由基的傷害以及特殊抗體，例如能與 APO-1/FAS 抗原結合之抗體等等<sup>71-72</sup>。

### B、細胞凋亡的基因調節

細胞凋亡的過程受到許多基因的調控，分別敘述如下：

### a、 p53 基因

p53 基因是一種腫瘤抑制基因，其所轉錄的蛋白 p53 則是一種能夠抑制腫瘤的蛋白。當細胞的 DNA 在 G1/S 時期發生損傷時，p53 會促使其下游基因的表現，如 WAF1。而 WAF1 的蛋白質產物 p21 會使細胞週期停留在 G1/S 期，直至 DNA 修復後才進入正常的週期<sup>73</sup>。但是當 DNA 受損太嚴重時，p53 則會促使細胞進入細胞凋亡。

### b、 Bcl 家族

Bcl 家族包括 Bcl-2、 Bax、 Bcl-xL、 Bad 等，是一個與細胞凋亡有關的基因家族<sup>74</sup>。Bcl-2 與 Bcl-xL 可以阻止細胞凋亡，造成腫瘤的發生<sup>75-76</sup>。而 Bad、 Bak、 Bax 和 Bcl-Xs 則可以引發細胞凋亡<sup>77-78</sup>。在正常情況下這兩類蛋白質之間維持一定的比率以調節細胞狀態<sup>79</sup>，當 Bcl2 的表現量高於 Bax 時，便會阻礙細胞凋亡的發生；相反的，若是 Bax 表現量大於 Bcl2 時，細胞便進入凋亡狀態。

### c、 c-myc

c-myc 是一種原致癌因子(proto-oncogene)，屬於 myc 家族中的一員<sup>80-82</sup>。它是一種轉錄因子，可與 Max 結合形成 heterodimer，來調節下游基因的表現。直到目前為止，c-myc 與細胞凋亡之

間的關係還不是很清楚。

#### **d 、 APO-1/FAS**

FAS 基因所轉錄的蛋白是一種跨膜蛋白，在許多正常細胞或腫瘤細胞表面都可以發現到它的存在<sup>83-85</sup>。當 APO-1/FAS 與一些細胞激素或是抗體結合時，便會引發細胞的 apoptosis。