

第四章 結果

第一節、 蘆薈大黃素對人類血癌細胞株細胞增生的影響

利用流式細胞儀評估存活細胞數及 MTT 分析法，發現蘆薈大黃素對人類血癌細胞增生，伴隨著濃度及時間增加有明顯的抑制效果。發現給予蘆薈大黃素經不同時間培養之後，在 12 小時藥物對血癌細胞作用並不明顯，於 25 μ M 時其相對細胞數目仍然達 85%，24 小時後開始抑制細胞生長，隨著藥物濃度增加而抑制作用越明顯，而且當時間增加抑制作用也隨之增強。(如圖 5-7)。



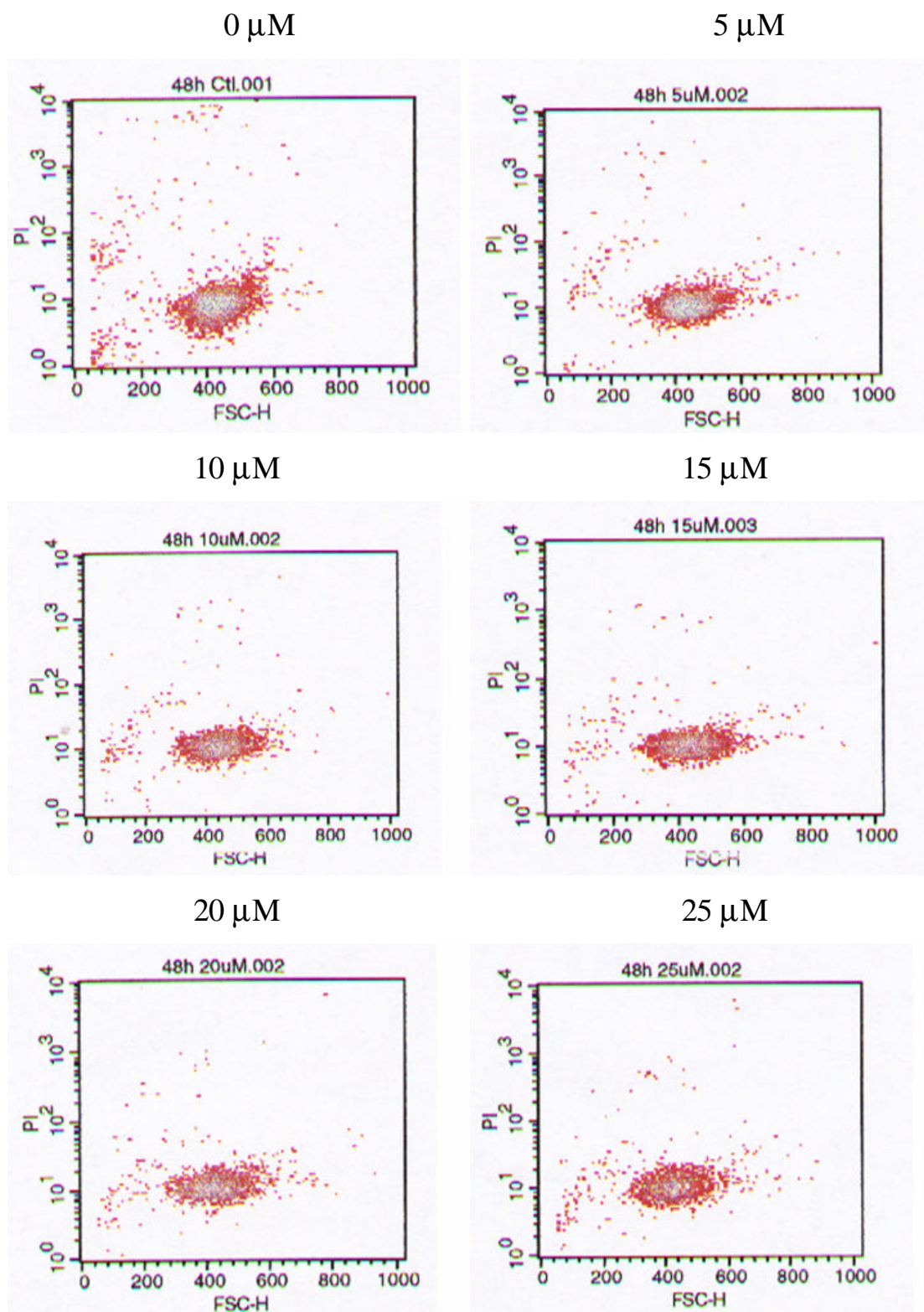


圖 5. 利用流式細胞儀評估存活細胞數不同濃度之蘆薈大黃素對血癌細胞處理 48 小時後觀察細胞增生的變化。

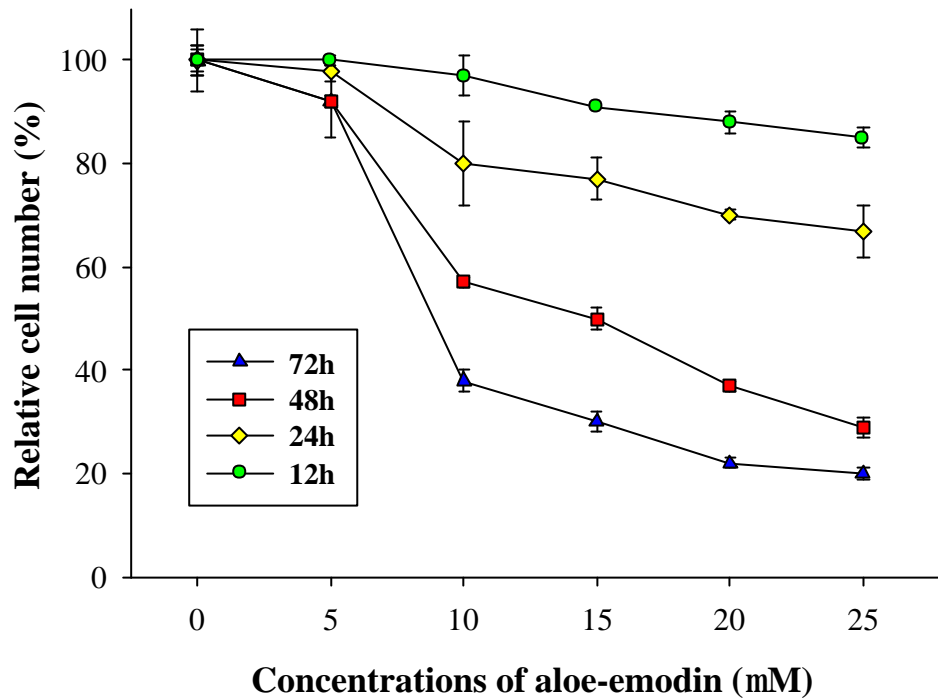


圖 6. 利用流式細胞儀評估細胞增殖率不同濃度之蘆薈大黃素對血癌細胞處理 12、24、48 及 72 小時後觀察細胞增生的變化。以對照組存活細胞數目作為 100%。數據結果以平均值±標準差 (mean±SD)表示，n=8。

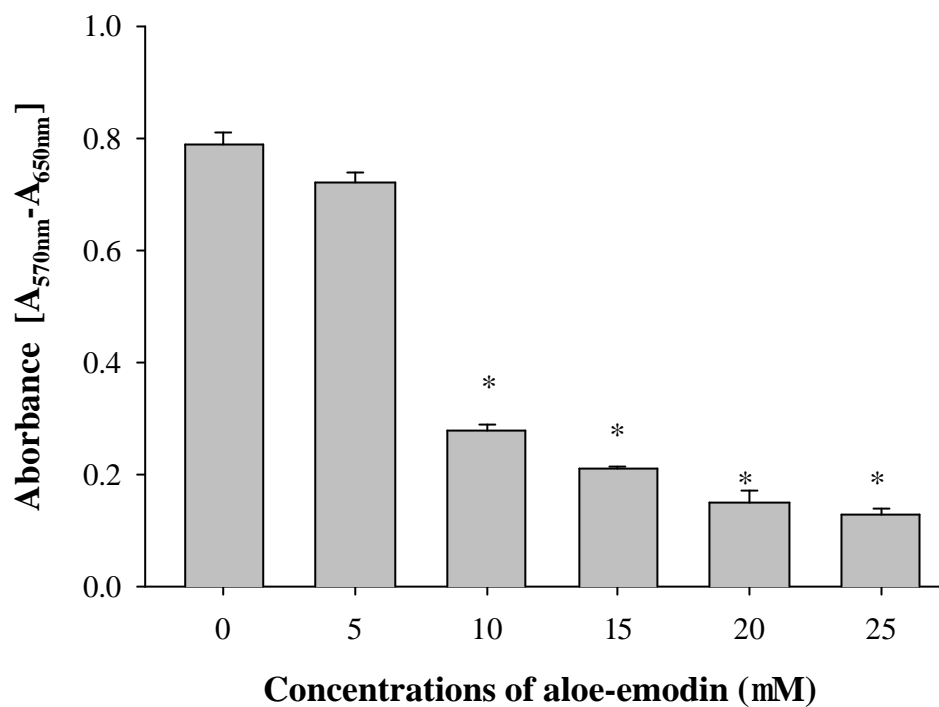


圖 7. 利用 MTT 分析法不同濃度之蘆薈大黃素對血癌細胞處理 72 小時後觀察細胞增生的變化。吸光值的高低代表細胞數目的多寡。數據結果以平均值±標準差(mean±SD)表示，n=8。*代表 P 值小於 0.05

第二節、 蘆薈大黃素對人類血癌細胞株形態的影響

利用流式細胞儀及倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態，發現蘆薈大黃素對人類血癌細胞在 48 小時有明顯改變。伴隨著濃度增加，其細胞數目明顯減少。代表細胞大小的前向散射光（FSC）並無明顯改變；代表細胞顆粒性的側向散射光（SSC）則大幅上升。（如圖 8）。倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態，細胞數目亦明顯減少也有空泡化現象，（如圖 9）。

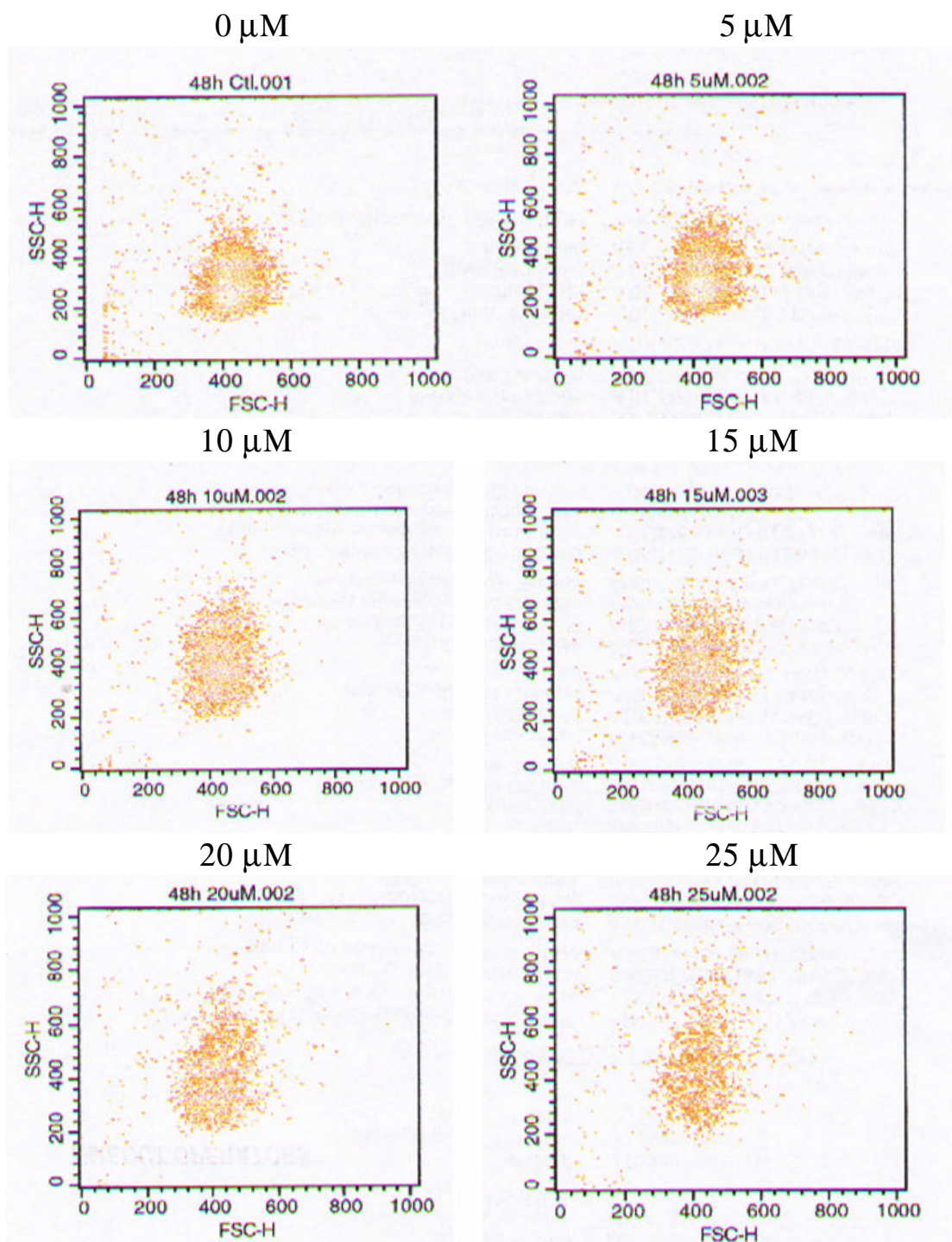


圖 8. 血癌細胞經不同濃度之蘆薈大黃素處理 48 小時，以流式細胞儀評估血癌細胞形態的改變。代表細胞大小的前向散射光 (FSC) 並無明顯改變；代表細胞顆粒性的側向散射光 (SSC) 則大幅上升。

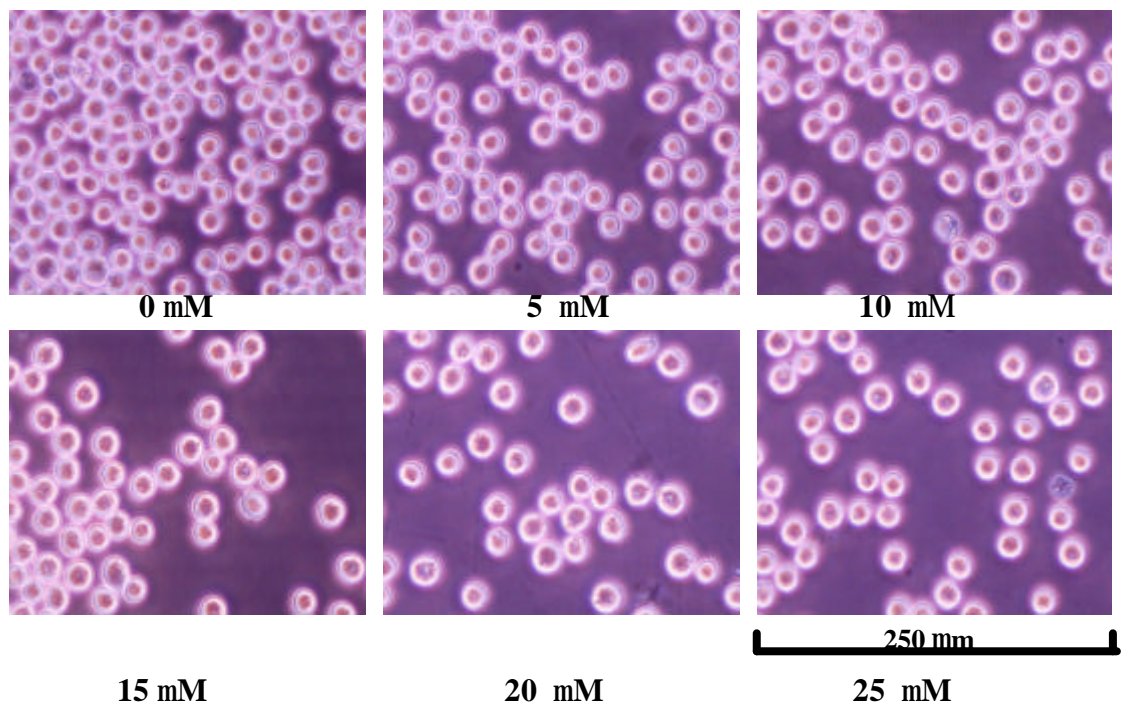


圖 9. 血癌細胞經不同濃度之蘆薈大黃素處理 48 小時，以倒立式位相差顯微鏡觀察細胞型態的改變。

第三節、 蘆薈大黃素對人類血癌細胞株細胞週期的影響

給予不同濃度 (0-25 μM) 蘆薈大黃素的血癌細胞種入 12 孔洞平盤，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培養箱進行培養，48 小時後取出細胞來檢測細胞週期改變的情形。隨著濃度增加，於 10 μM 時發生 S phase arrest，於 25 μM 時發生 G2/M phase arrest (如圖 10)。

給予 (10 μM) 或不給予蘆薈大黃素的血癌細胞種入 12 孔洞平盤，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培養箱進行培養，12、24、48 和 72 小時後，來檢測細胞週期改變的情形。隨著時間增加，48hr 小時 HL-60 cells 處於 S phase arrest；而 72 小時 HL-60 cells 處於 G2/M phase arrest。(如圖 11)。

圖 10A.

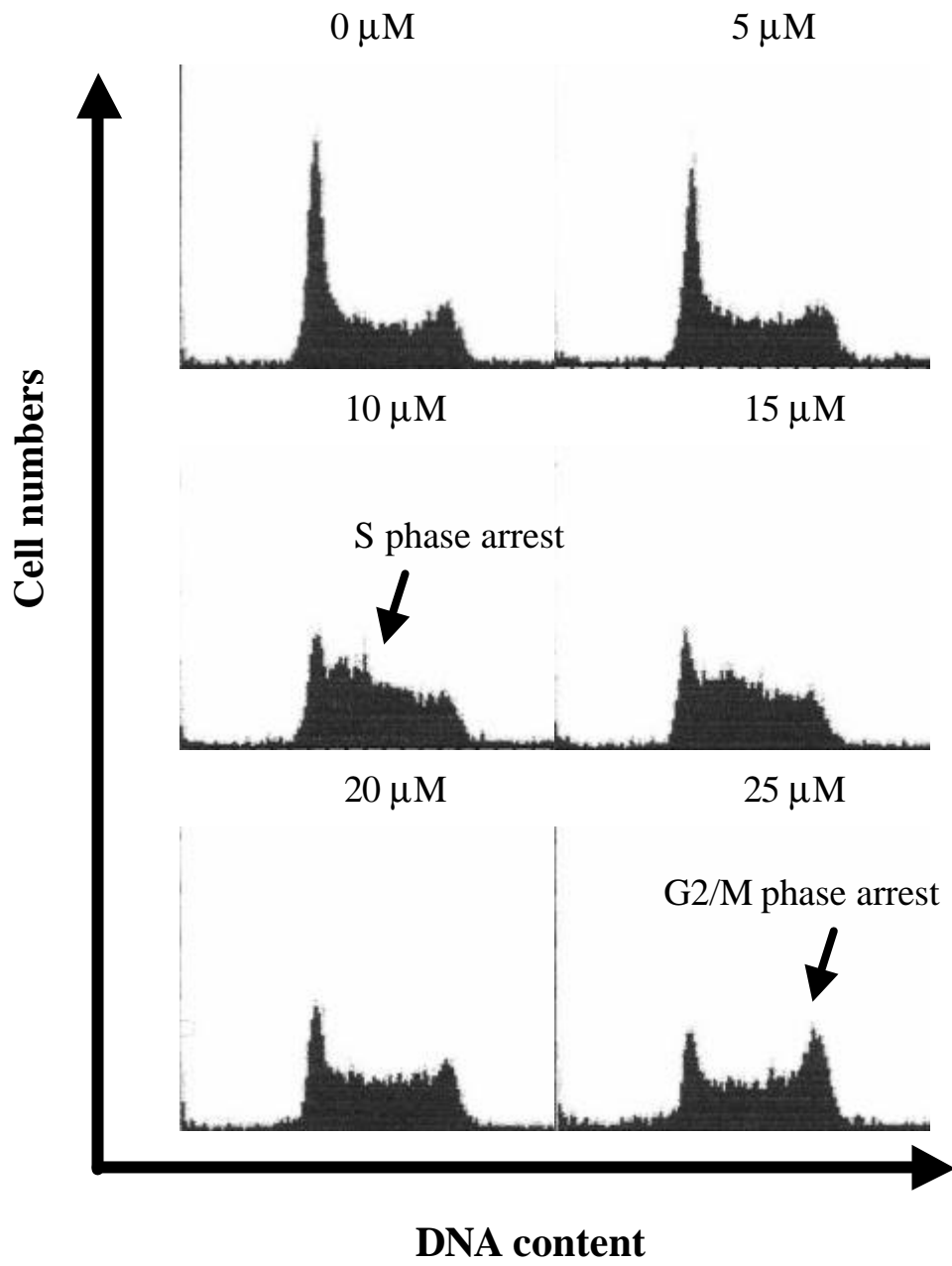


圖 10B.

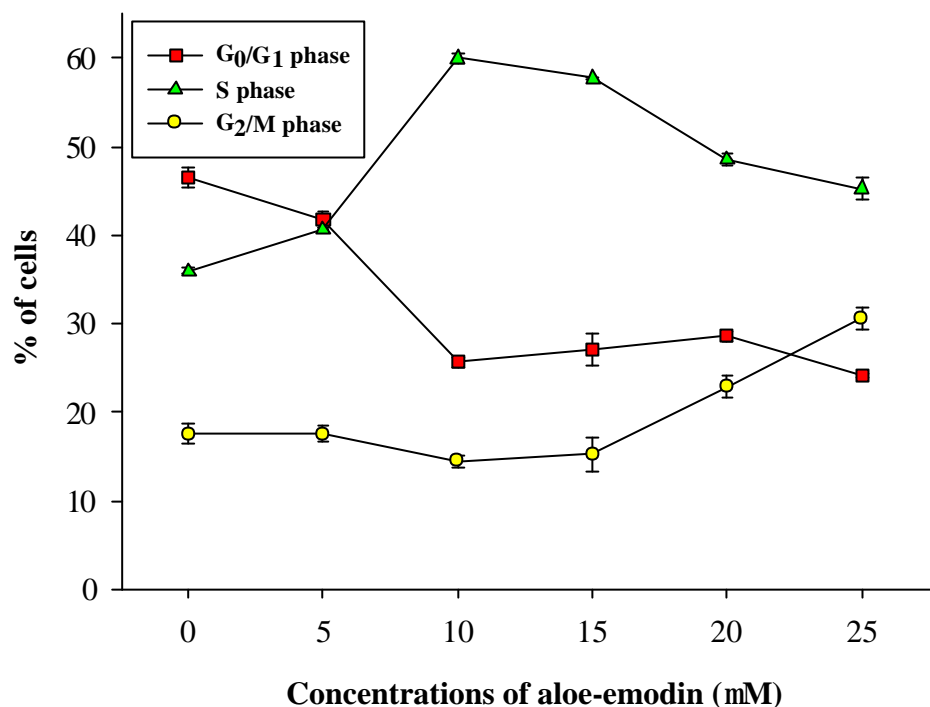


圖 10. (A)血癌細胞經不同濃度之蘆薈大黃素處理 48 小時，經酒精固定細胞，再以 PI stain solution 將細胞 DNA 染色，以流式細胞儀評估血癌細胞週期的改變。(B)血癌細胞週期的統計圖。隨著濃度增加，於 10 μ M 時發生 S phase arrest，於 25 μ M 時發生 G2/M phase arrest。數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示，n=8。

11A.

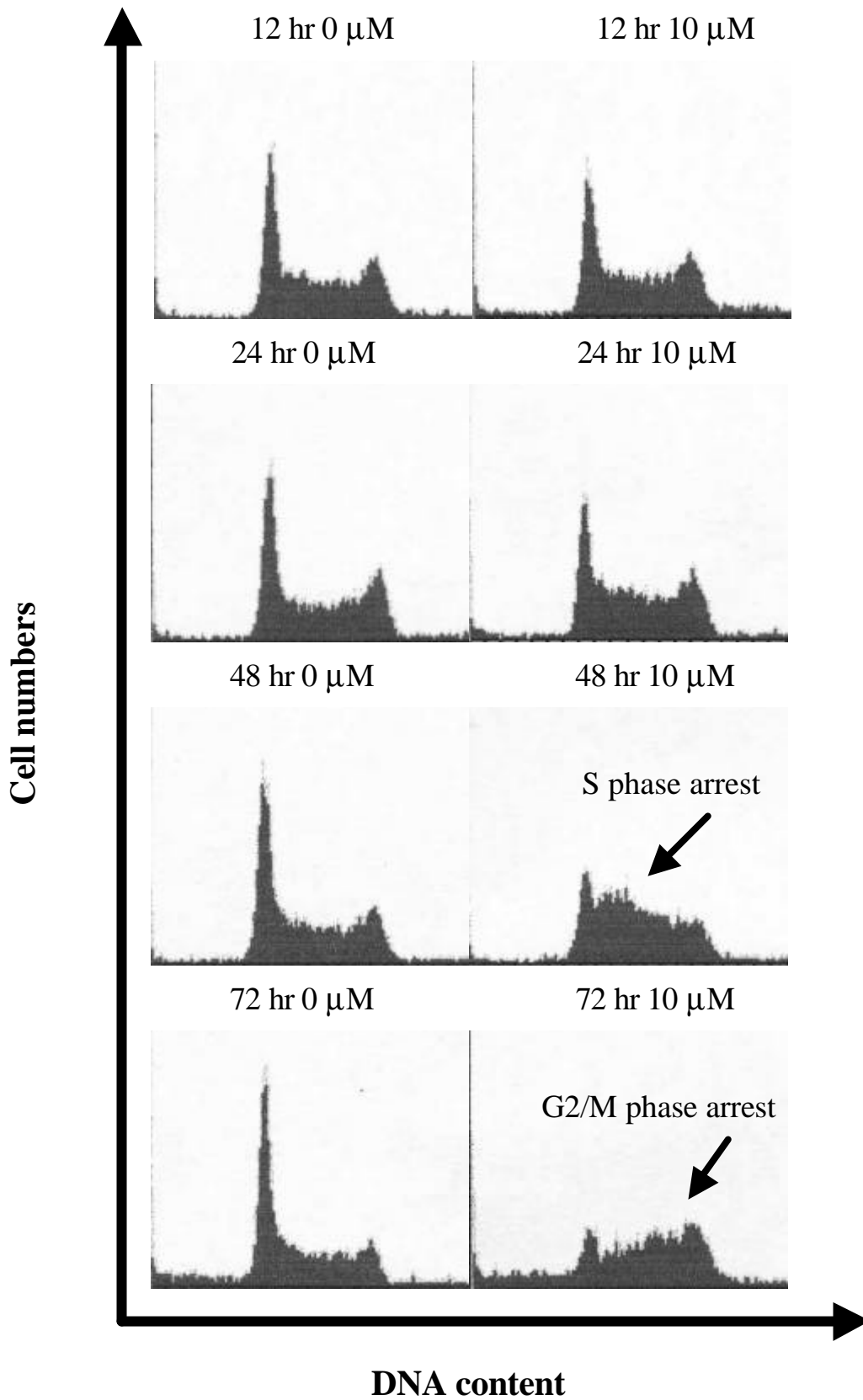


圖 11B.

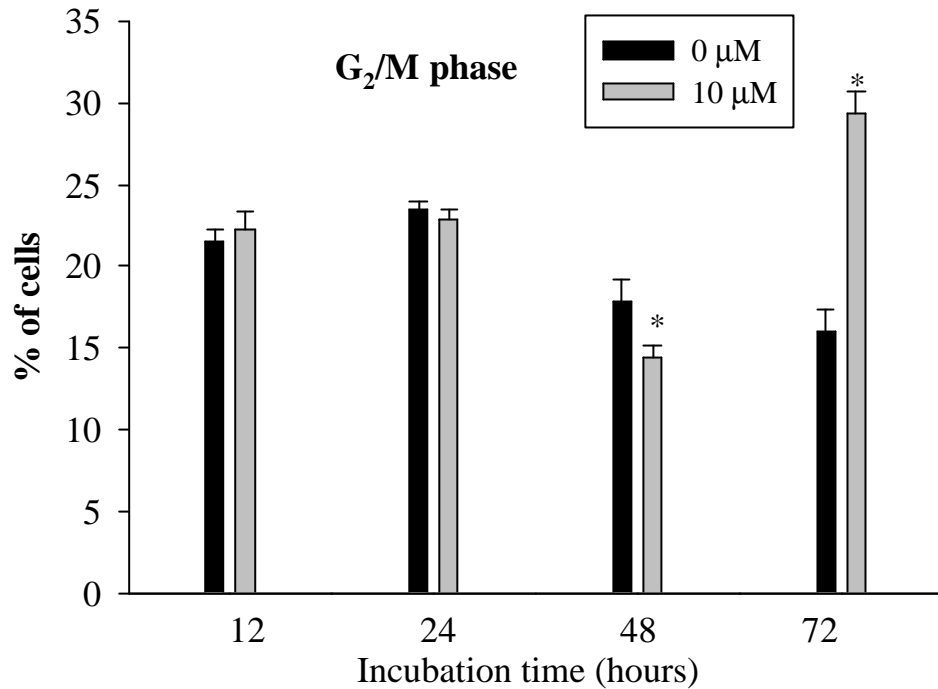


圖 11. (A)血癌細胞經給予或不給予蘆薈大黃素處理 12、24、48 及 72 小時，經酒精固定細胞，再以 PI stain solution 將細胞 DNA 染色，以流式細胞儀評估血癌細胞週期的改變。隨著時間增加，48 小時 HL-60 cells 處於 S phase arrest；而 72 小時 HL-60 cells 處於 G₂/M phase arrest。 (B)血癌細胞週期 G₂/M phase 的統計。數據結果以平均值±標準差(mean±SD)表示，n=8。*代表 P 值小於 0.05

第四節、 蘆薈大黃素對人類血癌細胞株細胞內與細胞週期 相關蛋白質的影響

以西方墨點法分析，蘆薈大黃素對人類血癌細胞株細胞內與細胞週期相關蛋白質的影響。與細胞週期中的 G2/M 期相關的 cyclins ; cyclin B1 及 Cyclin A , 經不同濃度之蘆薈大黃素處理 48 小時後，皆明顯上升。(如圖 12-13)。與細胞週期中的 G2/M 期相關的 CDKs ; CDK1 及 CDK2 , 經不同濃度之蘆薈大黃素處理 48 小時後，CDK1 明顯上升，而 CDK2 則無。(如圖 14-15)。另一方面，cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI); p27 及 p21 , 經不同濃度之蘆薈大黃素處理 48 小時後，p27 明顯上升，而 p21 則無。(如圖 16-17)。

利用流式細胞儀，分析細胞週期中的 G2/M 期相關的 cyclins ; cyclin B1 及 Cyclin A , 經蘆薈大黃素處理 48 小時後，也明顯上升。(如圖 18-19)。

圖 12A.

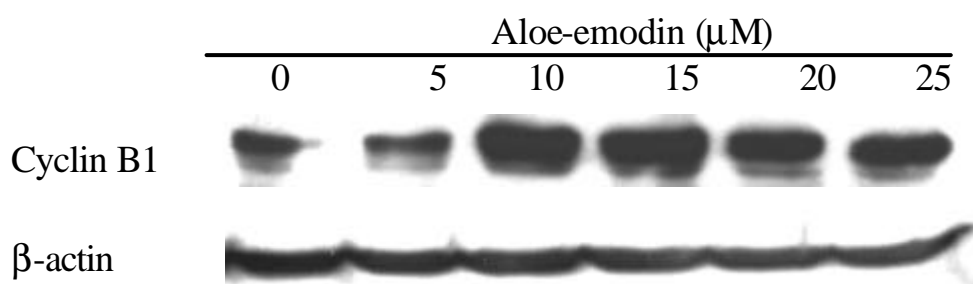


圖 12B.

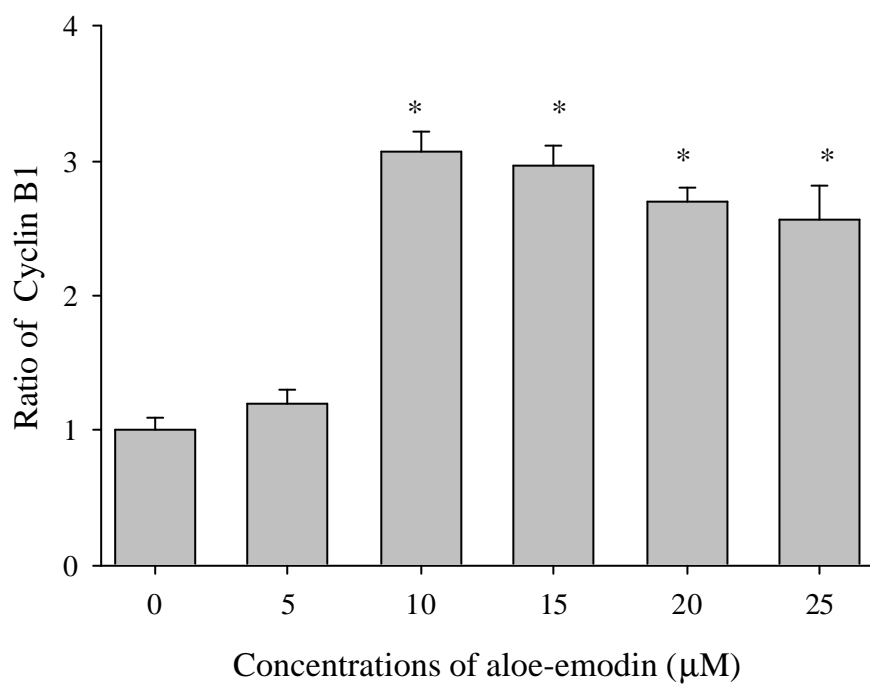


圖 12. (A)以西方墨點法分析血癌細胞經不同濃度蘆薈大黃素處理 48 小時後分析細胞中 Cyclin B1 蛋白的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B)Cyclin B1 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示，n=3。*代表 P 值小於 0.05

圖 13A.

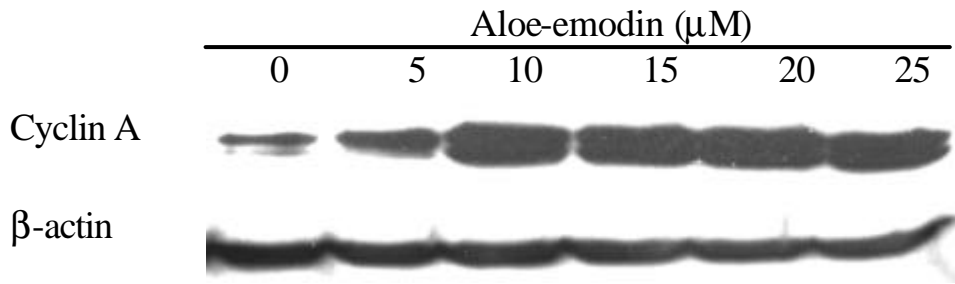


圖 13B.

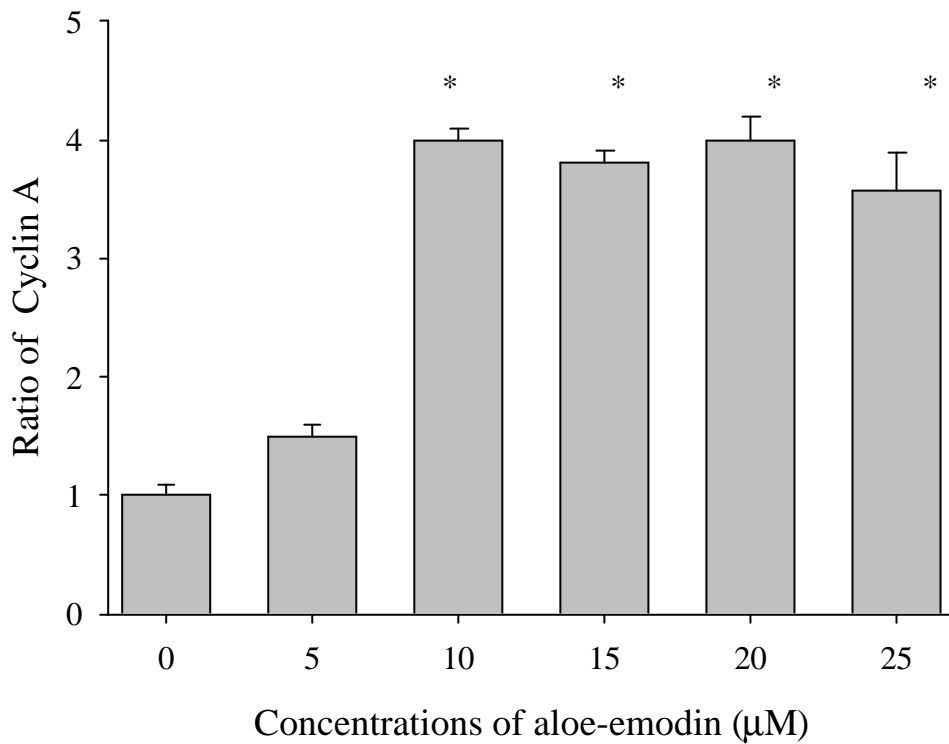


圖 13. (A)以西方墨點法分析血癌細胞經不同濃度蘆薈大黃素處理 48 小時後分析細胞中 Cyclin A 蛋白的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B)Cyclin A 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示，n=3。*代表 P 值小於 0.05

圖 14A.

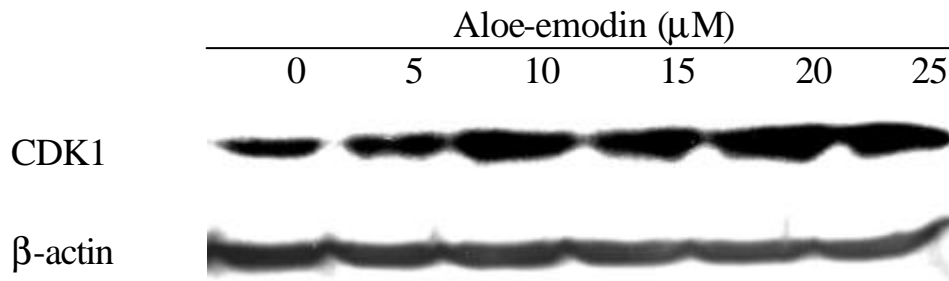


圖 14B.

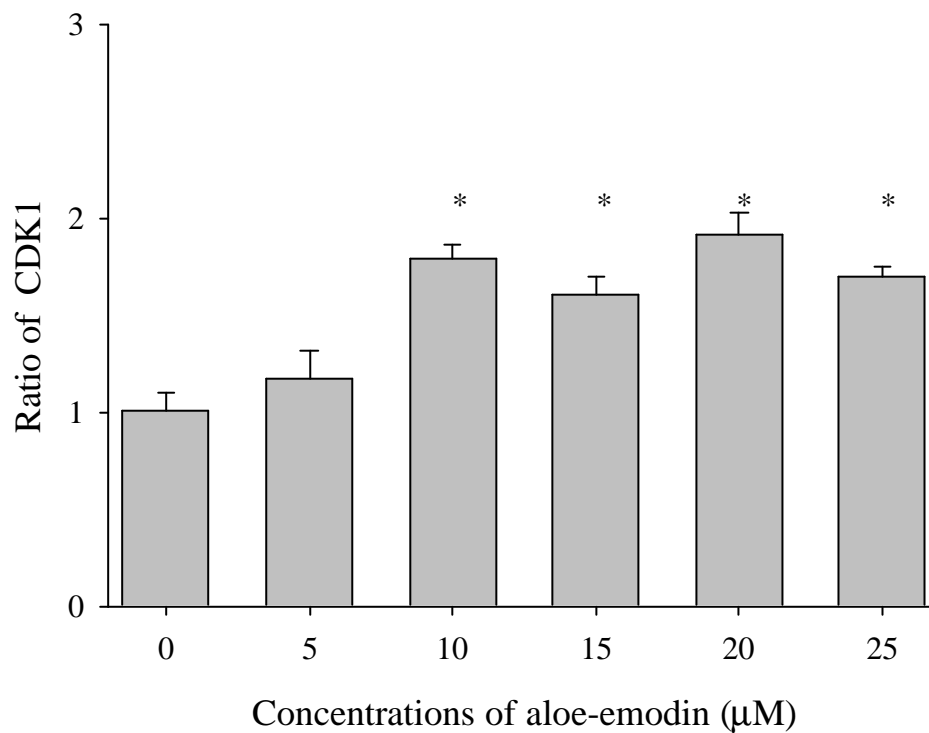


圖 14. (A)以西方墨點法分析血癌細胞經不同濃度蘆薈大黃素處理 48 小時後分析細胞中 CDK1 蛋白的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B)CDK1 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示, n=3 *代表 P 值小於 0.05

圖 15A.

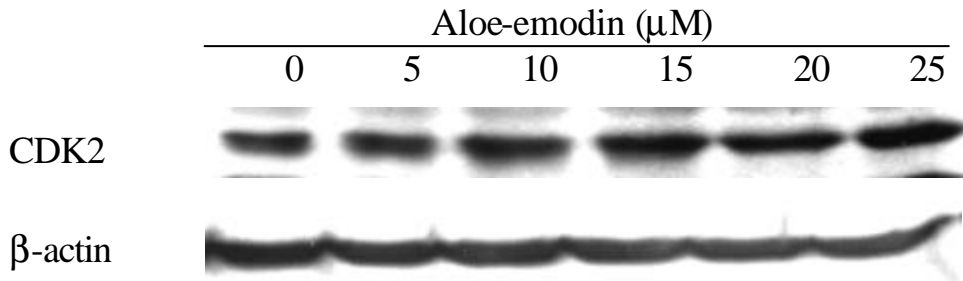


圖 15B.

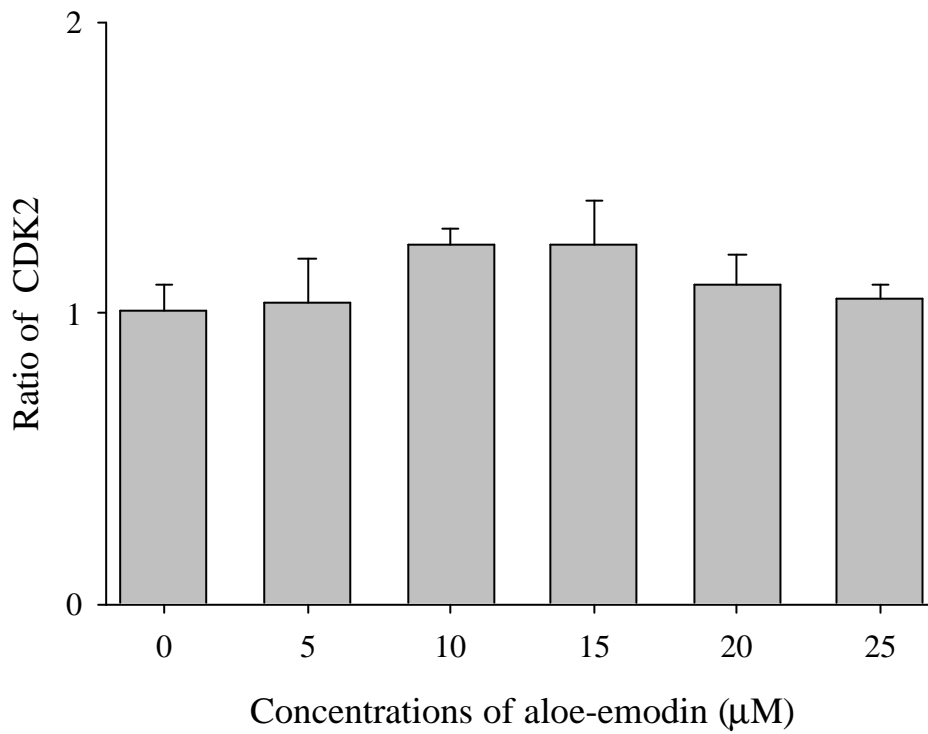


圖 15. (A)以西方墨點法分析血癌細胞經不同濃度蘆薈大黃素處理 48 小時後分析細胞中 CDK2 蛋白的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B)CDK2 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示，n=3。

圖 16A.

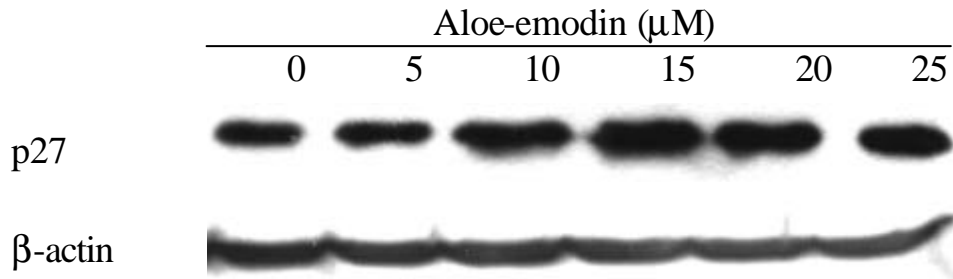


圖 16B.

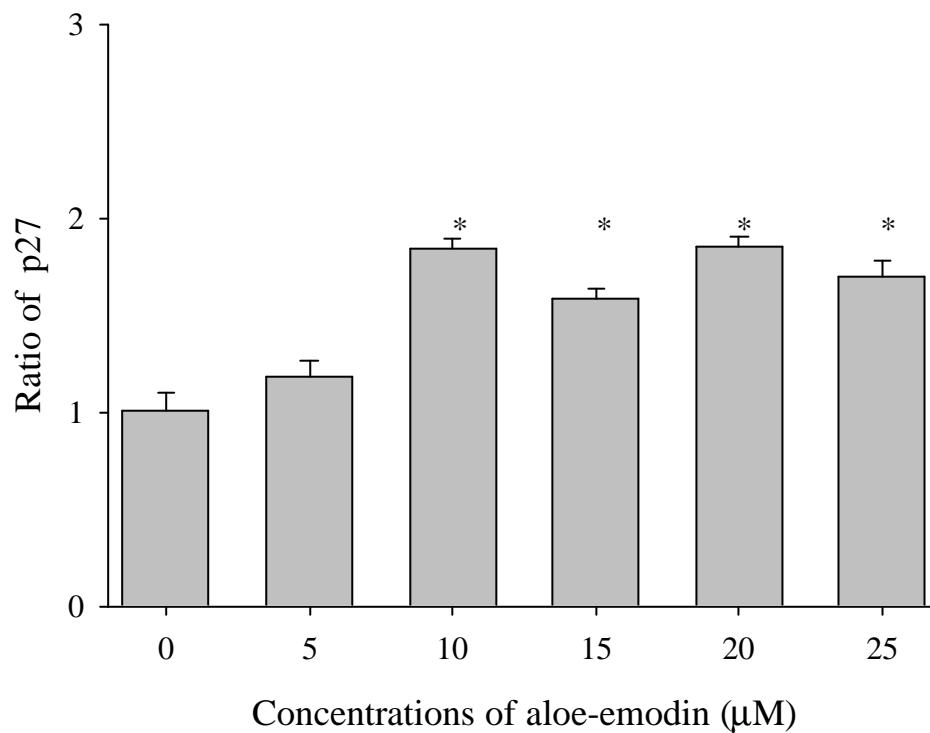


圖 16. (A)以西方墨點法分析血癌細胞經不同濃度蘆薈大黃素處理 48 小時後分析細胞中 p27 蛋白的相對表現量, β -actin 為 internal control。 (B)p27 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示, n=3。*代表 P 值小於 0.05

圖 17A.

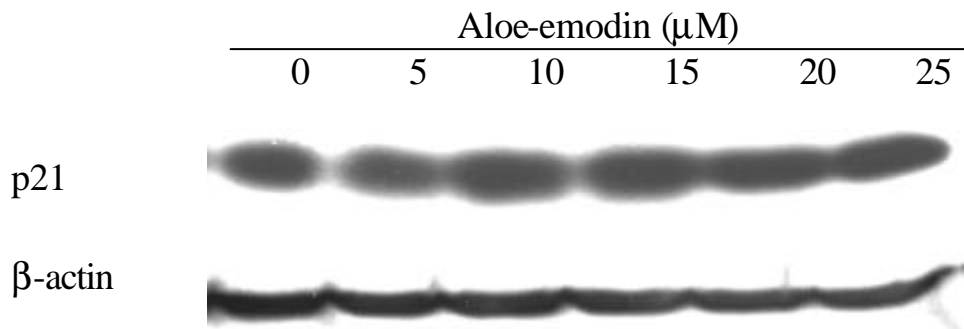


圖 17B.

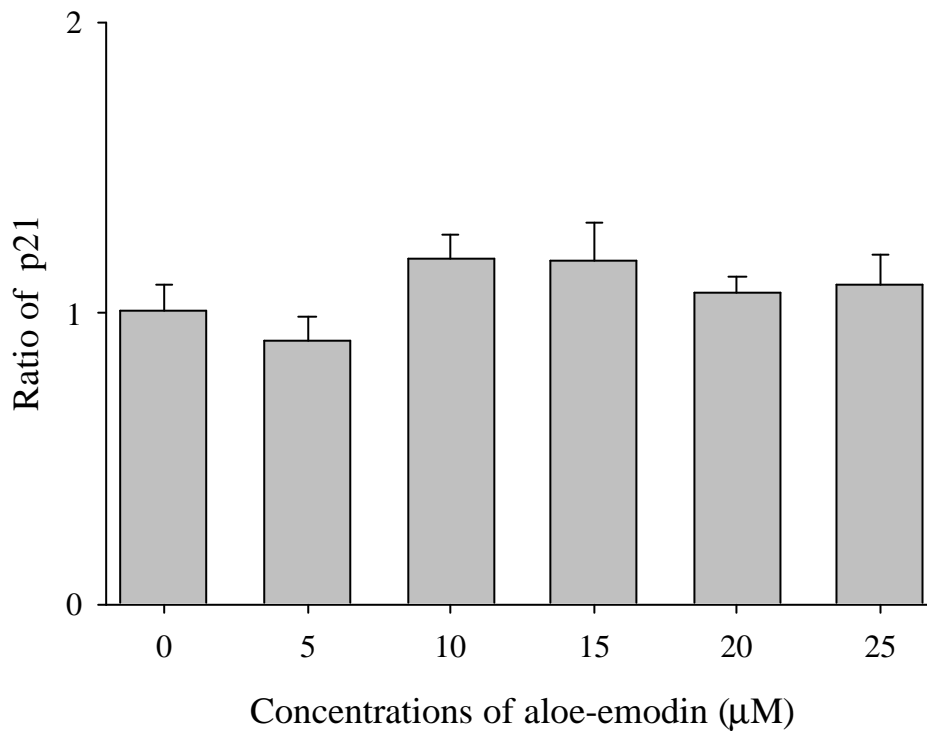


圖 17. (A)以西方墨點法分析血癌細胞經不同濃度蘆薈大黃素處理 48 小時後分析細胞中 p21 蛋白的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B)p21 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示，n=3。

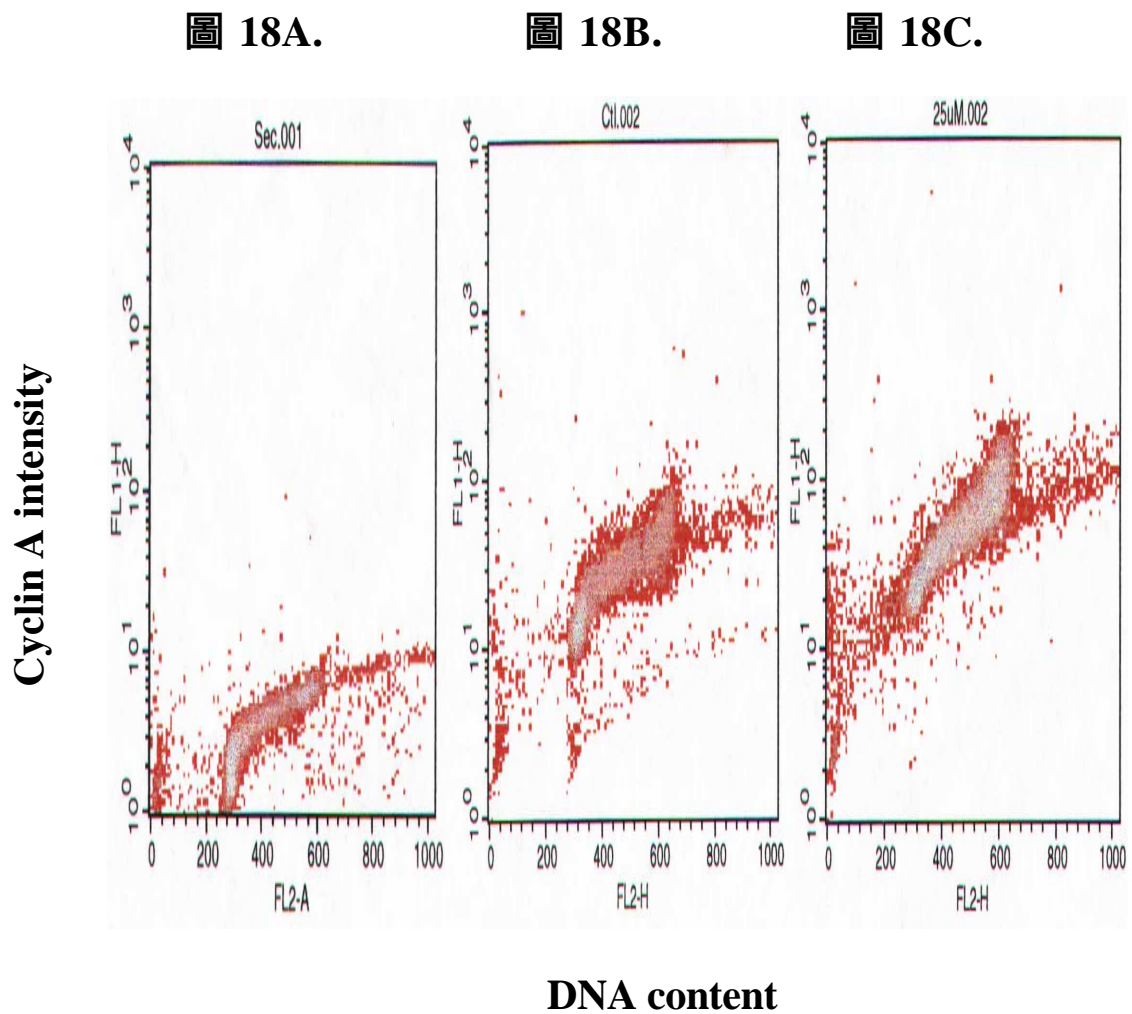


圖 18. 以流式細胞儀分析細胞週期中的 G2/M 期相關的 cyclins ;
 Cyclin A 經蘆薈大黃素處理 48 小時後明顯上升。(A)代表非
 專一性時的螢光強度 (B)未經蘆薈大黃素處理時的螢光強度
 (C)經蘆薈大黃素 (25 μ M) 處理時的螢光強度

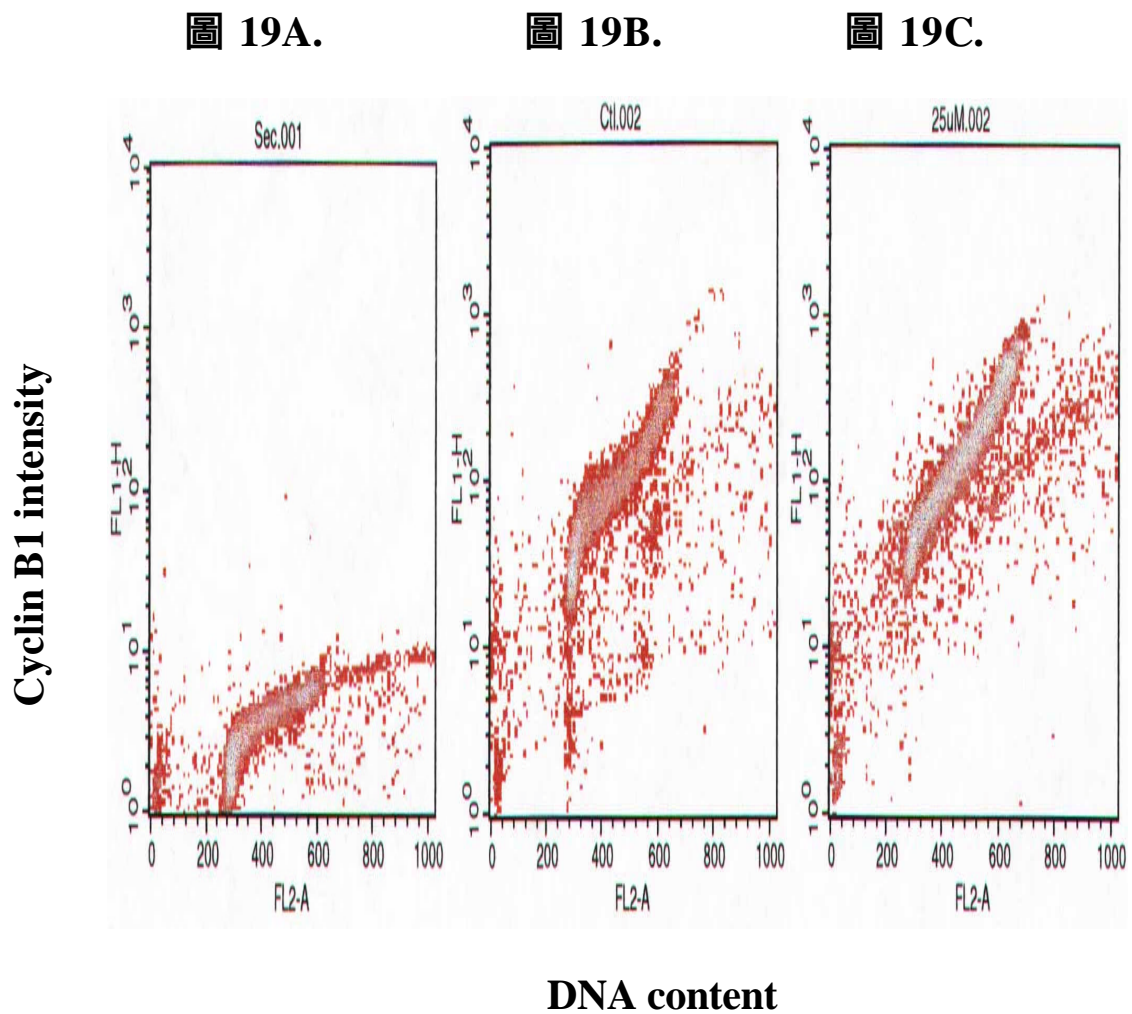


圖 19. 以流式細胞儀分析細胞週期中的 G2/M 期相關的 cyclins; cyclin B1 經蘆薈大黃素處理 48 小時後明顯上升。(A)代表非專一性時的螢光強度 (B)未經蘆薈大黃素處理時的螢光強度 (C)經蘆薈大黃素 (25 μ M) 處理時的螢光強度

第五節、 蘆薈大黃素對人類血癌細胞株產生細胞凋亡

為了進一步確認蘆薈大黃素對人類血癌細胞抑制生長是否與細胞凋亡有關，利用 DNA 電泳檢測是否有細胞核內的 DNA 裂解成 180-200 bp 梯度片段產生；同時也以 PI 溶液染色，用流式細胞儀分析細胞內 Sub-G1 的比例（即 Apoptotic nuclei）。給予（10 μ M）或不給予蘆薈大黃素的血癌細胞，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱進行培養，72 小時後進行分析。給予蘆薈大黃素（10 μ M）的血癌細胞，可以看到 DNA 裂解成梯度片段；另一方面 Sub-G1 的比例也增加，（如圖 20-21）。

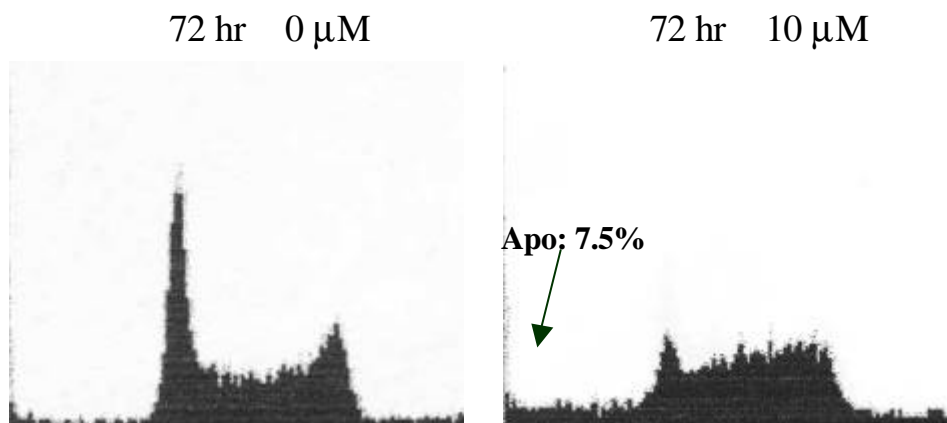


圖 20. 細胞經由酒精固定再以 PI 溶液染色後，用流式細胞儀分析細胞內 Sub-G1 的比例（即 Apoptotic nuclei）。給予（10 μ M）或不給予蘆薈大黃素的血癌細胞，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的培養箱進行培養，72 小時後進行分析。給予蘆薈大黃素（10 μ M）的血癌細胞，Sub-G1 的比例為 7.5%。數據結果以平均值 \pm 標準差 (mean \pm SD) 表示，n=8。

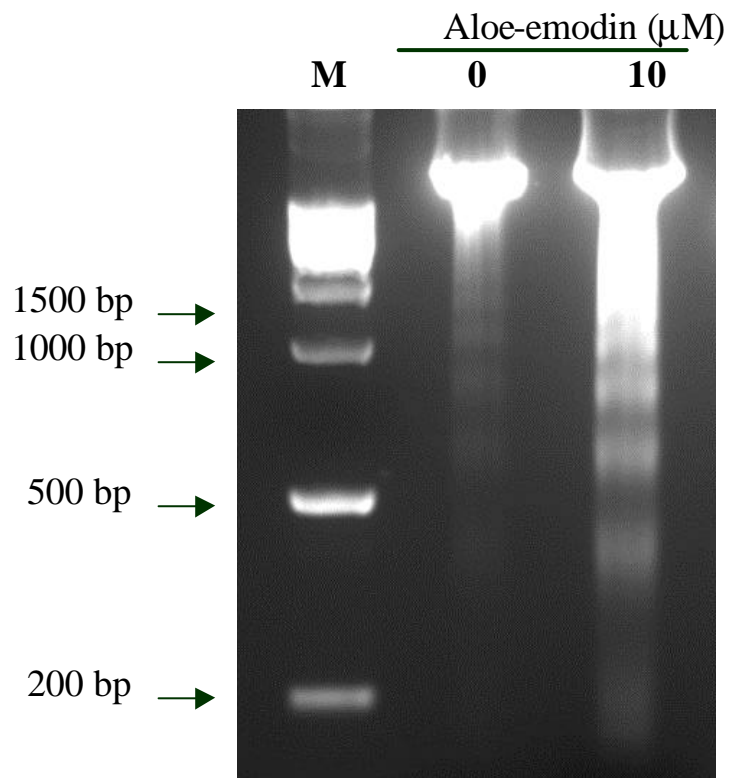


圖 21. 利用 DNA 電泳檢測是否有細胞核內的 DNA 裂解成 180-200 bp 梯度片段產生。給予 (10 μM) 或不給予蘆薈大黃素的血癌細胞，於 37 °C、5% CO_2 的培養箱進行培養，72 小時後進行分析。給予蘆薈大黃素 (10 μM) 的血癌細胞，可以看到 DNA 裂解成梯度片段。

第六節、 蘆薈大黃素影響 Caspase 3、 8 及 9 的表現

以西方墨點法檢測與細胞凋亡有關的 Caspase 3、 8 及 9，來探討蘆薈大黃素誘導細胞凋亡的訊息傳導路徑。給予或不給予蘆薈大黃素（10 μ M）的血癌細胞種入 10 cm 培養盤，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱進行培養，12、24、48 和 72 小時後進行分析 Caspase 3、8 及 9 的表現。在 12 小時，給予蘆薈大黃素（10 μ M）的血癌細胞，Caspase 8 及 9 的表現有增加的現象。但是 24、48 和 72 小時，對照組和實驗組的 Caspase 8 及 9 則無明顯差異，(如圖 22-23)。Caspase 3 的表現，從 24、48 和 72 小時開始有增加的現象，(如圖 24)。

圖 22A.

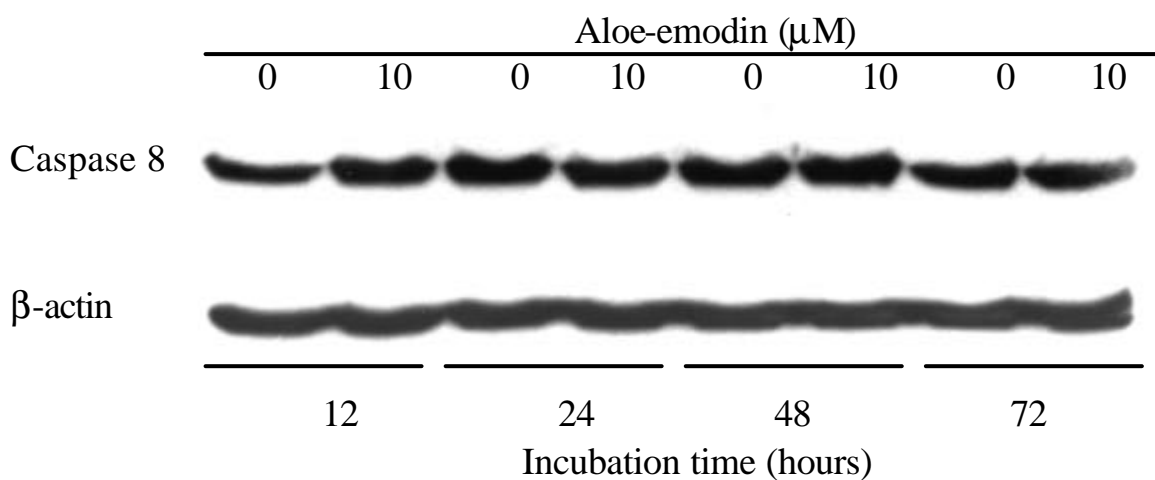


圖 22B.

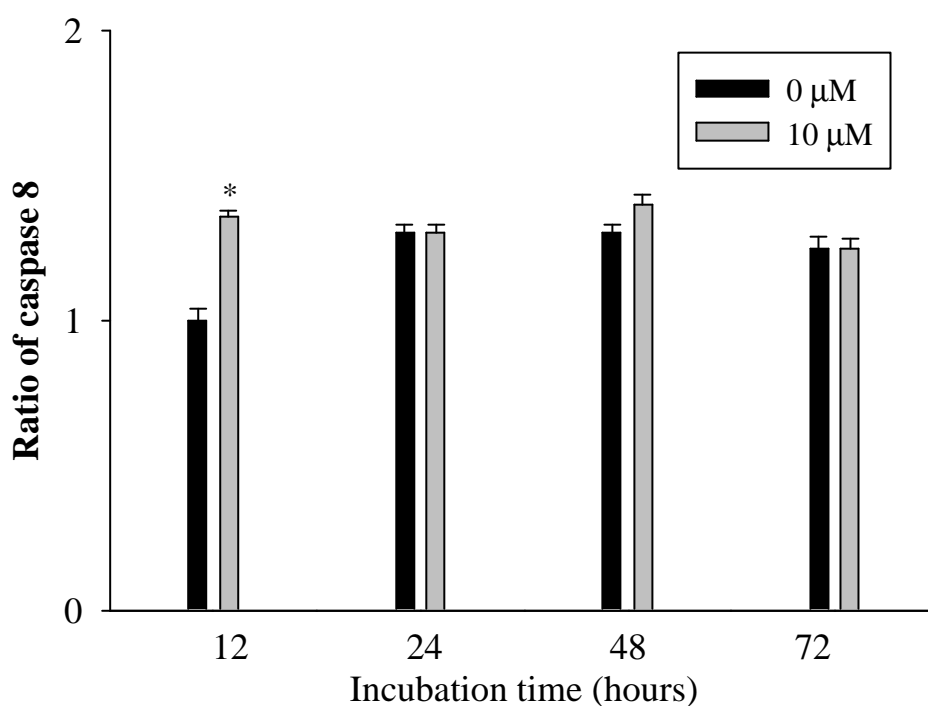


圖 22. (A)以西方墨點法分析，血癌細胞經不同時間蘆薈大黃素處理後，分析細胞中 caspase 8 蛋白的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B)caspase 8 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示，n=3。*代表 P 值小於 0.05

圖 23A.

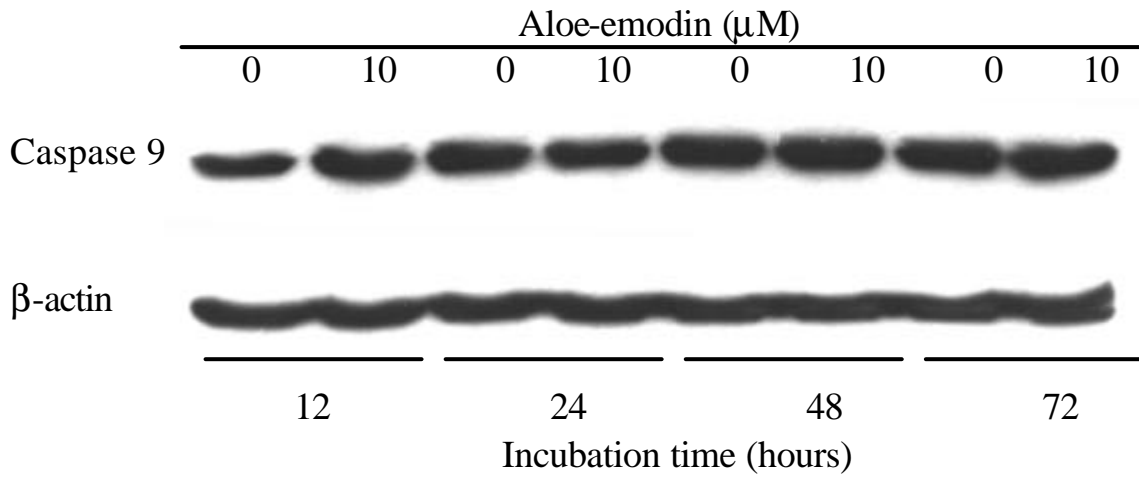


圖 23B.

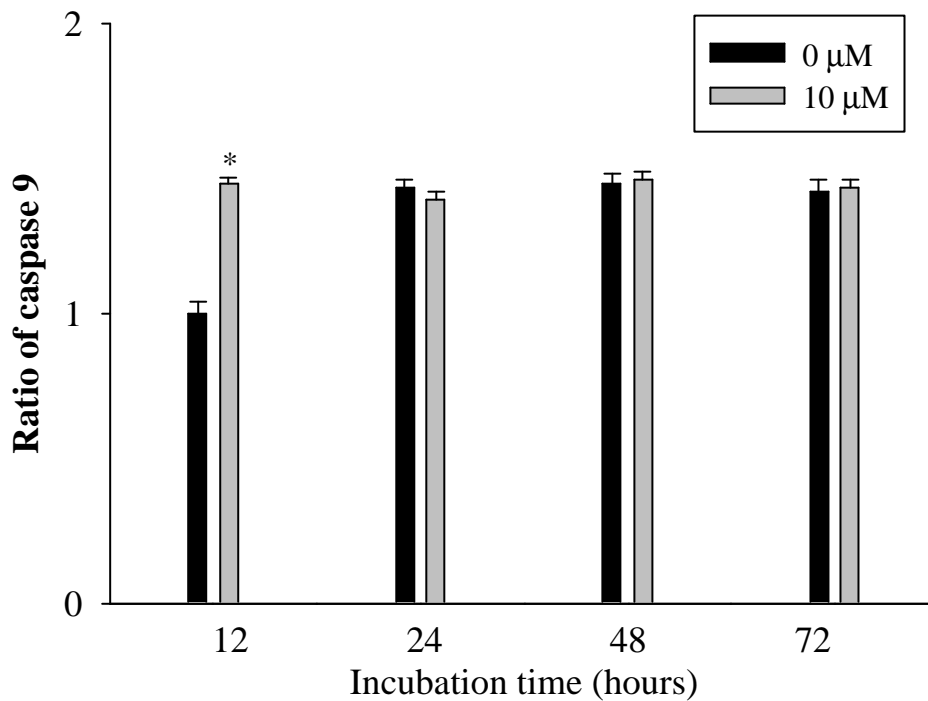


圖 23. (A)以西方墨點法分析，血癌細胞經不同時間蘆薈大黃素處理後，分析細胞中 caspase 9 蛋白的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B)caspase 9 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示，n=3。*代表 P 值小於 0.05

圖 24A.

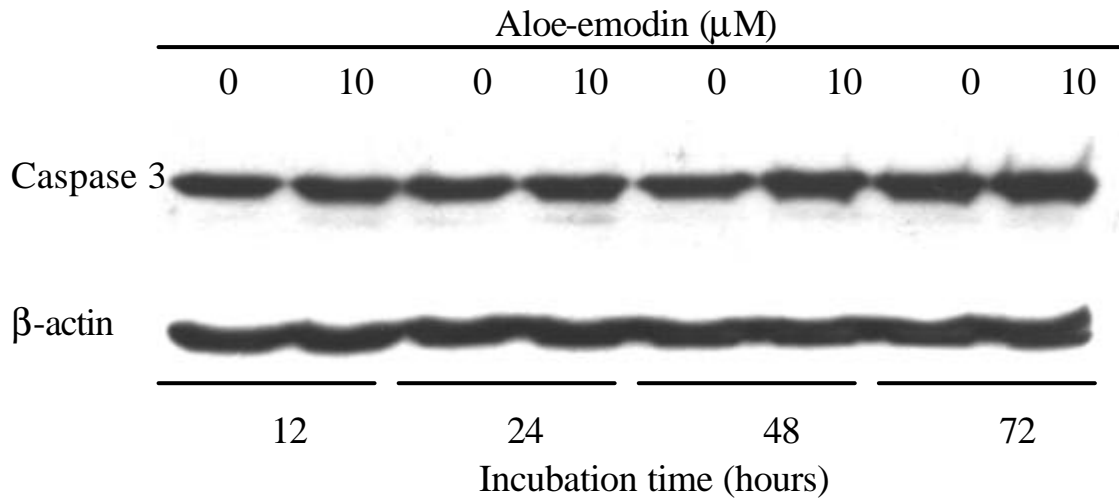


圖 24B.

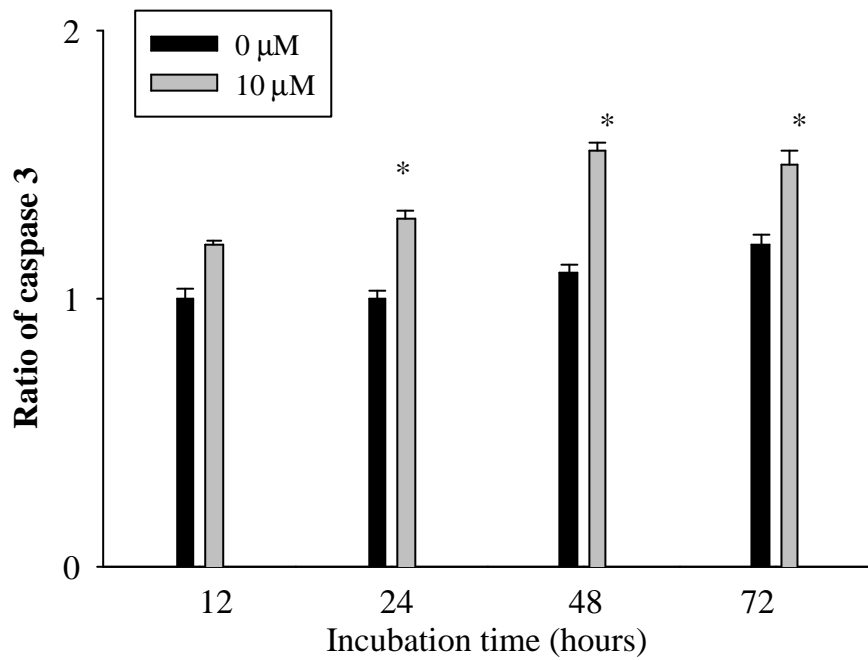


圖 24. 以(A)以西方墨點法分析，血癌細胞經不同時間蘆薈大黃素處理後，分析細胞中 caspase 3 蛋白的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B)caspase 3 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示，n=3。*代表 P 值小於 0.05