

第五章 討論

二十世紀之後，癌症成為人類危害健康之頭號殺手，而人類白血病又為許多癌症中不容易治療的疾病。於是如何防止癌症的發生被大為重視。已有許多天然化合物被報導可以抑制癌症的發生⁹¹。最近的研究發現，蘆薈大黃素能有效抑制癌症的發生，例如腦癌、肺癌和肝癌¹¹⁻¹³。但是蘆薈大黃素對於人類血癌細胞（HL-60）是否能有效抑制依然沒有足夠資料。因此於本研究論文中將針對蘆薈大黃素對於人類血癌細胞的抑制增生進行研究：(1) 是否能抑制細胞增生(2) 是否能誘發細胞凋亡(3) 是否能干擾細胞週期的運轉。

利用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，也有受損、破裂及空泡化現象，如圖 9。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。如圖 5-7。

另一方面給予蘆薈大黃素的血癌細胞，隨著濃度及時間增加，細胞週期先停止在S期再停止在G2/M期。如圖10及圖11。這種特別的情形也有前例可尋，Olivia Aranha等學者於2000年發表Ciprofloxacin影響膀胱癌細胞株(HTB9)的細胞週期，是先停止在S期再停止在G2/M期，還有於2003年Ethan A. Kohn等學者發現

Gö6976對於乳癌細胞株(MCF-10A及MDA-MB-231)其細胞週期的影響，亦是先停止在S期再停止在G2/M期⁹²⁻⁹³。其推測Gö6976的作用機轉為抑制Check kinase 1及Check kinase 2來影響細胞週期⁹³。本篇論文中蘆薈大黃素的作用機轉是否與Check kinase 1及Check kinase 2的活性有關，需要作更進一步的研究。

雖然最近的研究發現，蘆薈大黃素對於肺癌和肝癌能抑制增生並誘發細胞凋亡¹²⁻¹³，但是能否有干擾細胞週期的運轉沒有詳細探討。於本研究中證明蘆薈大黃素對於人類血癌細胞，可以使其細胞週期停止在G2/M期並產生細胞凋亡，如圖10 圖11及圖20 圖21。顯然地不同的癌細胞，蘆薈大黃素會有不同的作用，至少於本研究中蘆薈大黃素對於人類血癌細胞，可以使其細胞週期停止在G2/M期來抑制細胞增生。理由為在細胞週期中的G2/M期會大量表現的cyclin B1、cyclin A及CDK1，經蘆薈大黃素處理48小時後，伴隨著濃度明顯上升，這些實驗結果與細胞週期停止在G2/M期的文獻有一定地吻合，Benzylamide Sulindac Analogues (CP461)對於慢性淋巴白血病細胞株(WSU-CLL)誘導細胞週期停止在G2/M期與cyclin B1上升有關；PS-341對於人類非小細胞肺癌細胞株(H460、H358 及H322)引起的G2/M phase arrest是由於cyclin B1及cyclin A上升和CDK1的活性增加；UCN-01造成細胞週期停止在G2/M期是透過上

游Wee1Hu Kinase的去活化及Cdc25C Phosphatase的活化等方式增加CDK1的活性⁹⁴⁻⁹⁶。

另一方面，p27 (CDKI ; cyclin-dependent kinase inhibitor) 的表現量也會隨著加入蘆薈大黃素而表現量增加，而 p21 並沒有改變，故推論 p27 也許是調控促使人類血癌細胞發生細胞週期停止在G2/M 期的主要因子。因為研究發現 p27 及 p21 可以抑制 cyclin B1 及 CDK1 複合物的活性⁹⁷。如圖 12-14、圖 16-17 及圖 18-19。CDK1 的表現量增加，可能與蘆薈大黃素促使人類血癌細胞產生細胞凋亡有關。因為 CDK1 的表現量增加與細胞凋亡有關^{91,98}。在正常細胞週期的運轉，CDK1 要與 cyclin B1 結合成複合物並去磷酸化才會有作用。具活性的 CDK1 與 cyclin B1 複合物，可以使細胞週期的G2 期進入 M 期⁹⁹。基於實驗結果，推測蘆薈大黃素對於人類血癌細胞的抑制增生是透過多重不同的機制。細胞週期的檢查點(check point) 也是由許多的蛋白所調控¹⁰⁰⁻¹⁰²。所以蘆薈大黃素可能透過 CDK1 及 caspase 3 的表現量增加，促使產生細胞凋亡。

細胞死亡可以區分為細胞凋亡與細胞壞死，兩者差別與致癌物所誘發的癌症和癌化息息相關¹⁰⁰。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。

有文獻指出粒腺體中的 cytochrome C 釋出可以使 caspase 活化誘導細胞凋亡¹⁰¹。於本篇研究中，無法明確指出蘆薈大黃素是透過哪一個路徑誘導細胞凋亡，許多研究報導抗細胞凋亡蛋白質家族中的 Bcl-2 及 Bcl-x1 大量表現可以抑制粒腺體中的 cytochrome C 釋出，進而使 caspase 無法活化及細胞凋亡消失¹⁰¹⁻¹⁰³。也有其他研究學者認為促細胞凋亡蛋白質與抗細胞凋亡蛋白質的比例，對於細胞是否走向細胞凋亡有一定的影響¹⁰⁴⁻¹⁰⁵。Galvesen 等學者於 1999 年，報導 caspase 3 活化可以誘導 Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 分解、染色體 DNA 裂解及最後產生細胞凋亡¹⁰⁶；另一方面 Inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B) α 會抑制抗細胞凋亡轉譯因子 Nuclear factor (NF)- κ B 的作用，I κ B α 也需要 caspase 3 活化，使其與 NF κ B 結合的區域露出，抑制抗細胞凋亡的作用¹⁰⁷⁻¹⁰⁸。在本篇研究中，caspase 3 活化後的下路徑仍然須要作更深入的研究。

總結來說，基於現有的實驗結果，蘆薈大黃素抑制人類前骨髓白血病細胞株細胞增殖是透過引發細胞週期停止在 G2/M 期與活化 caspase-3 而促使細胞凋亡。