

## 第六章 討論

### 第一節 結果討論

在本研究中，我們選取了包含黃酮類五大類結構、具代表性的黃酮類化合物共 24 種，及目前廣泛用於肝癌化學治療的柔紅黴素做為實驗的材料，分別或混合之後加入代表不同癌化程度的人類肝細胞株 Chang liver/AP-1 及 HepG2/AP-1 中，培養 24 小時，然後進行細胞週期分析，再以 G2-M 期所佔比例是否上升做為準則，試圖由這 24 種黃酮類中篩選出對柔紅黴素的藥效具有增效功能的藥物。很幸運地，我們初步的實驗結果發現高濃度的 apigenin 對柔紅黴素的藥效有協同作用，可使 Chang liver/AP-1 細胞的 G2-M 期所佔比例上升。

就像其他的 anthracycline 類化學治療藥物一樣，柔紅黴素即使以經動脈化學藥物栓塞 (transarterial chemoembolization, TACE) 的方式使用在肝癌治療時也不免會對週圍的正常細胞造成毒性；若以傳統的化學治療方式做靜脈注射，更會造成全身性的副作用。這些副作用，例如免疫抑制及心肌毒性，都和使用的劑量呈正比。限制劑量雖然可以減少副作用的產生，但也因而限制了柔紅黴素在癌症治療上的效果 (Von Hoff *et al.*, 1979)。因此，科學家們亟欲尋找能降低化學治療藥物副作用及加強抗癌效果的兩全其美的辦法；而將化療藥物與其他營養補充品合併使用，企圖達到增效、減毒的效果也就成為思考的方向之一。

黃酮類是一種天然的多酚化合物，它們普遍地存在於日常的飲食之中，蔬菜、水果、穀物及飲料都有它們的蹤跡。由於它們具有很強的抗氧化、抗癌效用而在近幾年受到人們的重視。根據前人的研究，apigenin 具有很強的細胞生長抑制效果，而且也具有無毒、及非致癌性等優點 (Birt *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997)。透過 p53-p21/waf1 response pathway (Mac Vean *et al.*, 2000)，apigenin 可減低化療藥物對細胞的傷害 (Kuo *et al.*, 1992; Chaumontet *et al.*, 1994)。目前已知 apigenin 可使小白鼠神經細胞 (Middleton *et al.*, 1984) 人類角質細胞 (Lepley

*et al.*, 1996) 及人類乳癌細胞 (Yin *et al.*, 2001) 等產生 G2-M arrest, 並且抑制這些癌細胞的生長。另外, 透過抑制 p34<sup>cdc2</sup> kinase 及 cyclin B1 這兩個存在於細胞週期的調控因子, apigenin 可以抑制人類大腸癌細胞的生長, 並使其產生 G2-M arrest (Wang *et al.*, 2000)。在 HL-60 血癌細胞株中, apigenin 可以促使細胞凋亡發生及快速誘發 caspase-3 的活性, 並在隨後產生 pro-caspase-9 (Wang *et al.*, 1999) 最近, 更有學者在 *in vivo* 的實驗中發現 apigenin 會抑制黑色素瘤 B16-BL6 的生長及轉移 (metastasis) (Caitagirone *et al.*, 2000)。

在本研究中, 我們發現所選的這 24 種黃酮類化合物在未合併柔紅黴素使用時 (圖 5-3), 只有五種可以使 G2-M 期所佔的比例略微上升, 而這五種中有四種 (編號 10、11、12、13) 屬於 flavones (編號 9-14)。雖然在後續的合併柔紅黴素使用的實驗中 (圖 5-4), flavones 並未使 Chang liver/AP-1 細胞的 G2-M 期所佔比例明顯上升, 但相較於其他四大類 (flavonols、flavanols、flavanones、isoflavones) 藥物, flavones 仍然引起我們的注意, 並決定挑選已證實對多種癌細胞有抑制效果的 apigenin 做進一步的研究, 果然證明 apigenin 對人類肝癌細胞也有生長抑制效果, 可使其產生 G2-M arrest。

Chang liver/AP-1 雖然較接近正常的肝細胞, 但由於其具有永生 (immortalization) 的特性, 所以也可視為已轉形 (transformation) 或是位於腫瘤週圍已有變異的肝細胞, 它可以提供我們觀察化學治療藥物對腫瘤週圍細胞影響的模式。透過實驗, 我們發現當 apigenin 單獨使用時, 低濃度 (0-25  $\mu$ M) 的 apigenin 對細胞週期的影響並不明顯; 但在濃度達 50  $\mu$ M 時, 開始有 G2-M 期比例上升的現象; 在濃度 100  $\mu$ M 時更為明顯 (表 5-4A)。當定量的柔紅黴素 (0.01  $\mu$ M) 與 apigenin 合併使用時, 低 apigenin 濃度 (0-25  $\mu$ M) 下的 G2-M arrest 現象也不明顯; 但當濃度達 50  $\mu$ M 以上, 就有明顯的 G2-M 比例上升 (表 5-4B), 這和其他學者所發表的報告相符 (Sato *et al.*, 1994; Lepley *et al.*, 1996; Yin *et al.*, 2001)。歸納他們所發表的結果, 雖然使用的細胞種類不同, 但顯現 G2-M arrest 效果的 apigenin 濃度均介於 50 至 120  $\mu$ M 之間, 和我們的實驗結果相同。有學

者曾經利用 silibinin 做研究，結果發現 silibinin 在 100  $\mu$  M 時才會與柔紅黴素產生協同作用，使人類攝護腺癌細胞發生生長抑制、G2-M arrest 及細胞凋亡 ( Tyagi *et al.*, 2002 )。Shapiro 等人曾將一種人工合成但已被證實具有抗癌效果的黃酮類—flavopiridol 加入人類非小細胞肺癌 ( non-small cell lung cancer ) 細胞株內，結果發現 flavopiridol 的有效濃度雖然只要 30  $\mu$  M，但卻必須作用長達 72 小時；同時，他也發現藥物的濃度和所需的作用時間成反比，亦即濃度愈高則作用時間可縮短 ( Shapiro *et al.*, 1999 )。在本研究中，當我們將 24 種黃酮類以 25  $\mu$  M 的濃度分別與 0.01  $\mu$  M 柔紅黴素混合後，加入 Chang liver/AP-1 細胞中再做搜尋時，卻未見 apigenin ( 編號 13 ) 使 G2-M 期的比例上升 ( 圖 5-4 )。所以我們認為 apigenin 在高濃度之下才會誘發細胞產生 G2-M arrest；並且根據前人的研究，大膽推論其他的 23 種黃酮類可能要在較高的濃度下才有可能誘發 Chang liver/AP-1 產生 G2-M arrest。

如前所述，細胞週期包含 initial growth phase (G1)、DNA replication (S)、gap phase (G2)及 mitosis (M) ( 圖 2-2 )。細胞週期的進行受到許多正向及負向因子的調控，例如 protein kinase、protein phosphatases、cyclins、cyclin-dependent kinase 及 cyclin-dependent kinase inhibitors 等 ( Elledge *et al.*, 1994 ; Goldberg *et al.*, 1996 )。由於細胞週期的調控在癌細胞的生成或腫瘤抗藥性的產生上扮演重要的角色，因此，能抑制細胞週期進行及使細胞停止生長的藥物便具備抑制癌細胞增生的效果，也可能有助於降低癌症化學治療藥物的副作用。在本研究中，我們發現 apigenin 確能使 Chang liver/AP-1 細胞產生 G2-M arrest 的現象；同時，它對於柔紅黴素在 Chang liver/AP-1 中所產生的 G2-M arrest 也有協同作用。

當細胞由 G2 期進行到 M 期必須通過 G2-M checkpoint，而 G2-M checkpoint 主要受 cdc-family protein ( tyrosine kinase 及 phosphatase ) 和 cyclin complexes 的活化與去活化調控 ( Taylor *et al.*, 2001 )。正如我們所知的，p34<sup>cdc2</sup> 去磷酸化之後再與 cyclin B1 形成複合體，便可活化 cdc25，使細胞由 G2 期進行到 M 期。不過，當 DNA 受傷時，便會透過位在上游的 Chk1/2 抑制 cdc25，阻止有絲分裂

進行 (Graves *et al.*, 2000)。另外，根據相關的研究報告，有 G2-M arrest 現象的細胞較易走向凋亡 (Moragoda *et al.*, 2001)。所以，apigenin 應可藉由調控 G2 到 M 期的進行來抑制癌細胞的生長與增殖，並促使癌細胞凋亡。

在本研究中，我們建立了一個以分析細胞週期為基礎的抗癌藥物搜尋平台，並利用此一平台對有代表性的黃酮類化合物做搜尋，企圖找出對柔紅黴素的藥效具有增效、減毒功效的藥物。結果發現 apigenin 不僅本身可以促使人類肝細胞產生 G2-M arrest；並且可以和柔紅黴素產生協同作用，使其 G2-M 期比例上升，增強其抗癌的效果。

## 第二節 其他相關性討論

根據本實驗室先前的結果顯示，在人類肝細胞中，TPA 是經由活化 ERKs 訊息傳導路徑，使得 AP-1 與 DNA 之結合能力上升，因而活化 AP-1 的活性。而 AP-1 活性持續上升的結果，即造成肝細胞進行轉形，但如加入 AP-1 抑制劑，細胞轉形就會被抑制，因此 AP-1 的活性是肝細胞轉形所必須 (賴, 2000)。目前已知 AP-1 可調控細胞週期 (圖 6-1) 及細胞凋亡的進行，同時在癌化的過程中也扮演了重要的角色 (圖 6-2) (Jochum *et al.*, 2001)，所以我們認為能阻斷 TPA 活化 AP-1，就能抑制細胞轉形。因此我們首先測試柔紅黴素對 Chang liver/AP-1 及 HepG2/AP-1 的活性抑制情形及細胞毒殺效應，結果呈現明顯的劑量關係，這除了證明柔紅黴素可以有效抑制 Chang liver/AP-1 及 HepG2/AP-1 的活性外，也再次證明 AP-1 的活性和肝細胞轉形有關。但是，我們同時也發現不論是 Chang liver/AP-1 或 HepG2/AP-1 細胞，只要是不含 TPA 的組別，低劑量的柔紅黴素反而會使 AP-1 的活性上升 (圖 5-1A, C)。這可能是因為組成 AP-1 的 Jun family 和 Fos family 在細胞受到環境中壓力的刺激而活化 (Gupta *et al.*, 1996)。究其原因，少量的柔紅黴素便可能是壓力的來源。

接著，我們將不同濃度的柔紅黴素分別加入 Chang liver/AP-1 及 HepG2/AP-1

細胞中，再做細胞週期分析，結果發現只要 0.01  $\mu\text{M}$  的濃度即可使這兩種細胞產生明顯的 G2-M arrest (圖 5-2)。這個實驗的主要目的在於驗證柔紅黴素是否真能有效產生 G2-M arrest，做為決定後續實驗使用柔紅黴素濃度的依據。但是，我們同時也發現，在 1  $\mu\text{M}$  的濃度下，細胞中 G2-M 期所佔的比例反而減少，由於柔紅黴素為一暗紅色液體，在高濃度下有可能干擾流式細胞儀對 propidium iodide (呈橙色) 染色的判讀；而且，根據流式細胞儀所得的資料分析，在此濃度下有大量的細胞死亡，會干擾儀器對細胞所處時期的判定，所以結果不足採信。

歸納前人對黃酮類所做的相關研究 (Shapiro *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 2000 ; McVean *et al.*, 2002 ; Tyagi *et al.*, 2002 ) 及自己的實驗結果，我們認為大部分的黃酮類化合物對細胞的作用相當溫和，需要在較高的濃度下才可對細胞有所作用，或許這就是我們在做 24 種黃酮類大量搜尋的實驗中，G2-M 期的變化普遍不明顯的主要原因。

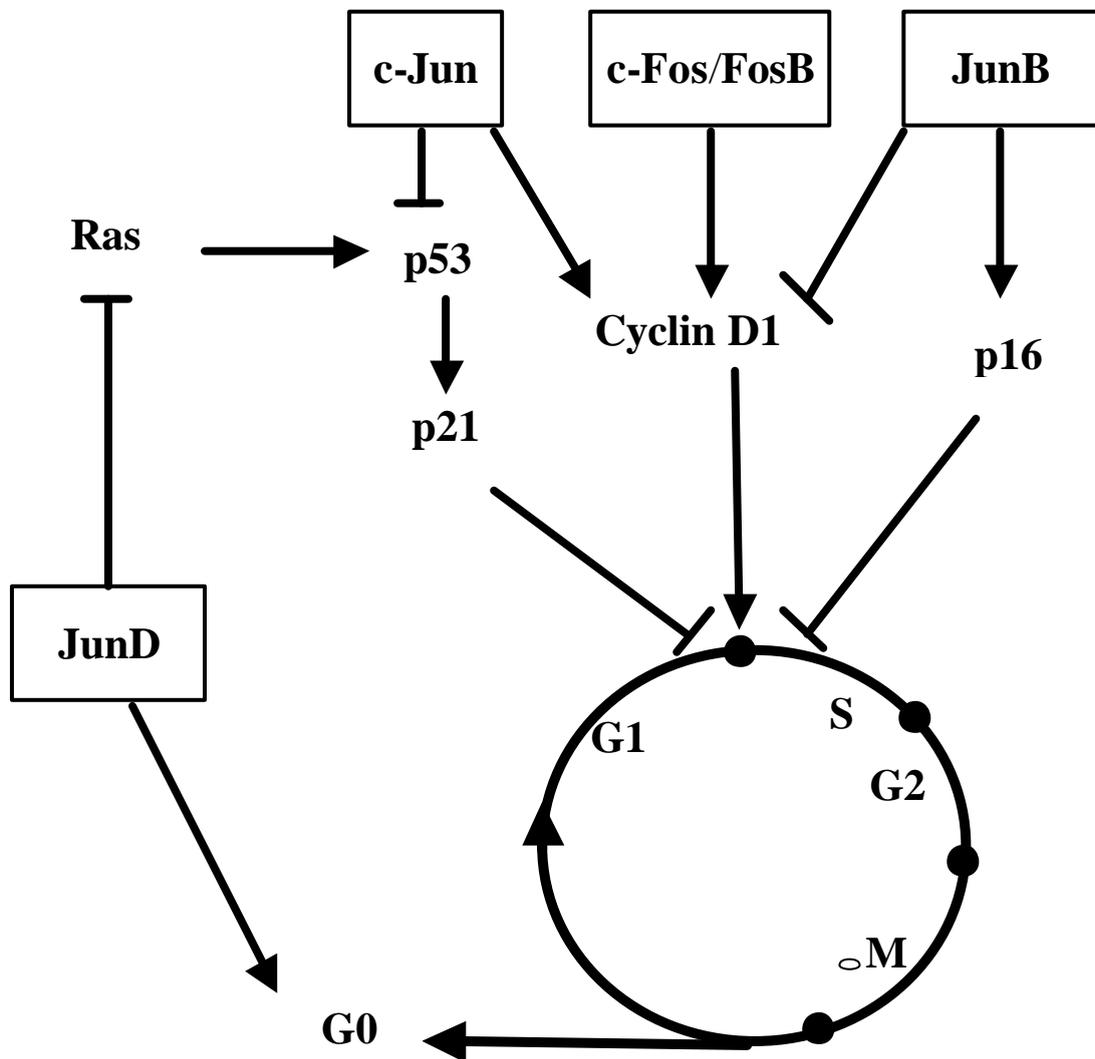


圖 6-1、AP-1 調控細胞週期的分子機制 ( Jochum *et al.*, 2001 )。

AP-1 藉由調控細胞週期中的關鍵因子 ( key components ) 來調控細胞週期, 例如: c-Jun 透過抑制 p53 以抑制 p21 的生成, 及促進 cyclin D1, 使細胞由 G1 期進入 S 期; c-Fos 及 FosB 則是直接促進 cyclin D1 表現, 以使細胞由 G1 期進入 S 期。JunB 透過抑制 cyclin D1, 及促進 p16, 阻止細胞由 G1 期進入 S 期; JunD 則是透過抑制 Ras/p53 pathway 來阻止細胞由 G1 期進入 S 期, 另外, 它也促使細胞進入 G0 期。

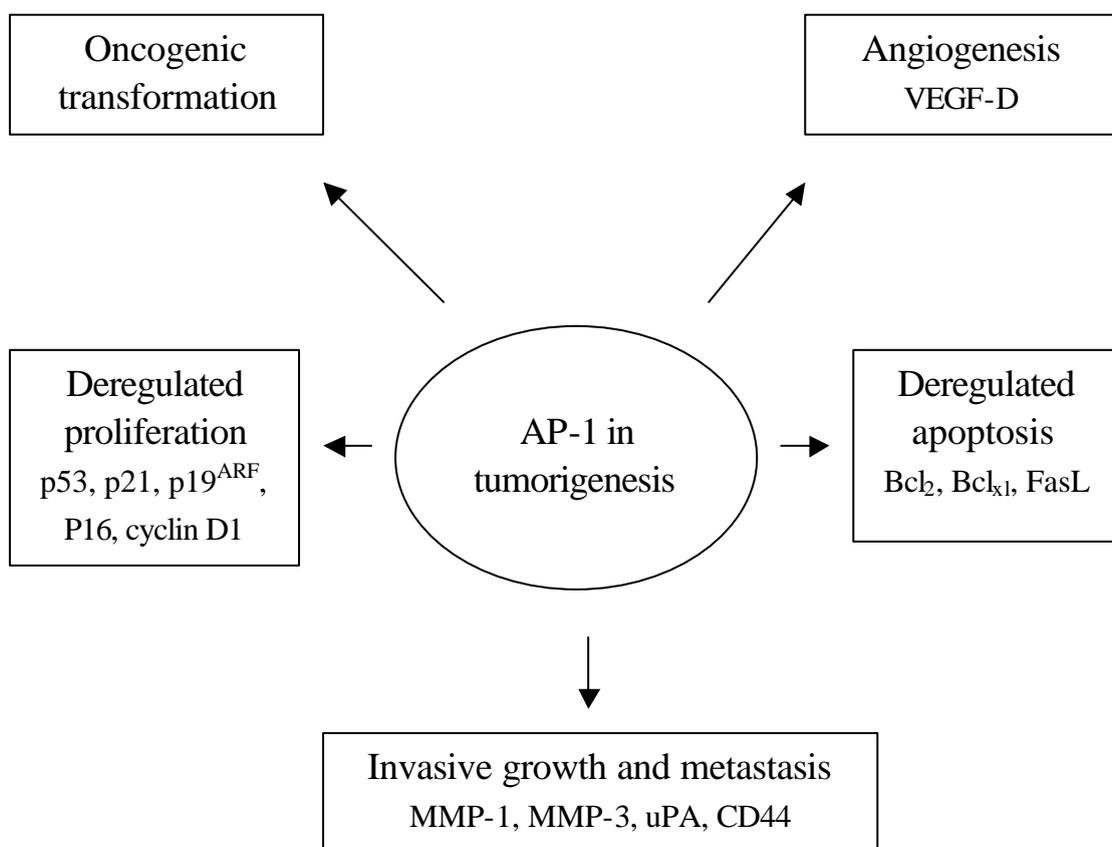


圖 6-2、AP-1 在腫瘤形成的過程中所扮演的角色 ( Jochum *et al.*, 2001 )。

在腫瘤形成的過程中，AP-1 藉由調控一些重要的分子標的，參與細胞癌化、增殖、凋亡、侵襲與轉移、及新血管生成等多個步驟。

