

第一章 緒言

近幾年來，癌症的發生高居國人十大死因的第一位。世界衛生組織更將癌症列為二十一世紀的三大殺手之一。最近的統計更顯示，在台灣約每9分20秒就發現一個新的癌症個案，其中肺癌 (lung cancer) 在男性人口十大癌症發生率佔第二名，為女性人口死亡率的第一名，顯示到目前為止，臨床上並無藥物可有效的控制及治療肺癌的發生。臨床上肺癌分為兩大類，即小細胞癌 (Small Cell Lung Cancers, SCLCs)與非小細胞癌 (Non-Small Cell Lung Cancers, NSCLCs)，多數的患者屬於非小細胞癌，肺非小細胞癌又可分為肺腺癌 (adenocarcinoma lung cancer)、肺鱗狀細胞癌 (squamous cell lung cancer)和肺大細胞癌 (large cell lung cancer)，其中肺腺癌為肺癌患者中最常見，無吸煙者所罹患肺癌常為此類，而肺鱗狀細胞癌則常見於吸煙患者當中。

所謂的癌細胞，是因為體內細胞多次基因複製上的錯誤與突變而轉型成的，於分子層次上是跳脫一般我們正常細胞受到的死亡與生長的調控機制，癌細胞不易衰老、死亡且具有快速增殖的能力。在過去的研究發現，許多刺激生長的接受體和訊息分子，如 erb-B、HER-2 和 Ki-ras、c-myc，以及抗細胞凋亡的分子，像是 Bcl-X_L，於癌細胞中均有大量表現或過度活化的現象，這些分子我們稱之為致癌因子

(oncogenes)。另一方面，一些細胞週期中重要的調控分子，如 p53、p16 和 pRb，它們可能在基因庫上的序列整段被移除，或是在 DNA 序列促進端 (promotor) 上被嚴重的甲基化，也有可能是產生了突變，導致這些分子無法執行正常的功能，因而使細胞週期漫無章法的進行著，促使癌細胞不斷的分裂增殖，所以，我們常稱這些分子為腫瘤抑制因子 (tumor suppressor genes)。當然，癌細胞的形成不是只有單純的幾個分子失去調控而已，許多已知和未知的分子都有可能參與其中，也由於癌細胞本身的複雜性，更增添了我們在癌症治療中的困難度。

正常細胞生長的趨勢是細胞週期 (cell cycle) 受到精確的調控，以維持個體及器官組織的大小，若一個體在細胞增殖、死亡間維持的動態的平衡關係失控，就可能發展為腫瘤。當然，細胞週期的調控是透過許多複雜的機轉，自 1990 年來，多人投入與 Cdk (cyclin dependent kinase) 相關的研究。Cdk 在整個細胞週期的進行扮演極重要的角色，不同的 Cdk 需要與不同的 cyclin 結合，而於特定階段影響細胞週期的進行^(1,2)。在某些腫瘤，如乳癌，食道癌，胃癌中發現 cyclin-D 會過度表現 (overexpression)⁽³⁾。另外，在乳癌中也可以見到 cyclin-E 的異常表現⁽⁴⁾。

目前已知道 Cdk/cyclin 的活性會被 CKI (cyclin dependent kinase

inhibitor)所抑制，CKIs 依其結構功能可以分為兩大類：（一）INK family，包括 p15^{INK4b}、p16^{INK4a}、p18^{INK4c}、p19^{INK4d}，其主要是競爭性地抑制 Cdk-4、Cdk-6 和 cyclin-D 的結合⁽²⁾；（二）Kip/Cip family，包括 p21^{Cip/WAF1/sdi1}、p27^{Kip1}、p57^{Kip2}，會與 Cdk/cyclin complex 結合，使之失去活性⁽⁵⁾，而 p27 除了可以抑制多數 Cdk/cyclin complex 外，也能阻止 CAK (CDK activating kinase)對於 Cdk/cyclin 的磷酸化作用⁽⁶⁾。另外，當放射線等因素造成的 DNA 受損，會誘導 p53 的大量表現，並促使 p21 增加，抑制細胞週期的進行，使受損的細胞有機會進行 DNA 修復，或是進一步誘導細胞凋亡 (apoptosis)⁽⁷⁾。

先前的研究認為化學治療的作用是在於造成腫瘤細胞的壞死，但近年來的文獻報導指出許多抗癌劑是造成細胞生理的混亂，進而引起細胞的計劃性死亡 (programmed cell death)⁽⁸⁾，所謂計劃性死亡幾乎存在所有組織細胞，當細胞老化、受損、失去功能時，多數細胞會經由自殺行為來清除這些無用的細胞⁽⁹⁾，這樣的死亡方式有別於一般的壞死，稱為細胞凋亡 (apoptosis)。正因為細胞凋亡不會像壞死一樣引起發炎反應 (inflammation)，且凋亡的細胞很快會被鄰近細胞吞噬分解，所以以往一直未被注意，目前經由對線蟲類 (caenorhabditis elegans) 的研究，已分離出許多調控細胞凋亡的基因⁽¹⁰⁾，也認同 apoptosis 需透過許多內在及外來的訊號分子調控⁽¹¹⁾。在哺乳動物中

最早被分離出的是 bcl-2 基因，當 bcl-2 gene 過度表現會抑制 apoptosis 的進行，某些癌症就是依賴 bcl-2 及相關基因，來防止細胞死亡。而前列腺癌、大腸癌的癒後也和 bcl-2 的表現有關⁽¹¹⁾。另外，p53 gene 也被廣泛研究，當 DNA 受損時，p53 大量表現，使細胞停留在 G1 期，以進行修補或是誘導細胞死亡。在某些癌症，可以偵測到 p53 gene 的缺陷⁽¹²⁾。而 PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) 作用和 p53 類似⁽¹³⁾，具有修補缺損 DNA 的功能與細胞週期之進行有關⁽¹⁴⁾。

以往抗癌劑只是手術及放射線療法的輔助，直到 1980 年代，新的抗癌劑。投藥方式還有合併療法的進步，對某些癌症，如小兒急性淋巴性白血病，成人急性非淋巴性白血病，睪丸癌等已可達治癒效果。因此，癌化學療法已和手術、放射線治療合並成為治療腫瘤的重要方法⁽¹⁵⁾。抗癌劑的主要作用之一是干擾細胞週期的進行，影響 DNA，RNA 及蛋白質的合成，以達到抑制腫瘤細胞的增殖⁽¹⁵⁾。許多中藥也可以抑制腫瘤生長或誘導腫瘤凋亡，但其中是否含具抗癌的化學成分，或促進細胞的凋亡達到殺死腫瘤細胞的效應，是值得探討的。

傳統中藥使用以複方為主，加上中藥成分複雜，所以在研究上受到許多限制，但隨著藥理學的發展，許多中藥的有效成分已被確定，且進一步分離出來，對於研究的進行頗有助益。以人參為例，其屬於五加科植物，始載於神農本草經，列為上品，歷代本草皆有收載。其

種類繁多⁽¹⁶⁾，主治方面多強調其大補元氣，治療內傷及一切血證⁽¹⁷⁾。而早在 1858 年 Grarrique 就已經自美國人參分離出粗皂甙⁽¹⁸⁾，但直到一九五十年代中期，對人參的化學成分分析才有顯著進展，尤其在六十年代以後，陸續有研究發現人參皂甙 (ginsenoside) 是人參生理活性的主要成分⁽¹⁶⁾。

本實驗擬探討人參皂甙 Rh2 對於肺腺癌細胞株 A549 生長的影響，一方面探討其對細胞週期的影響，及對細胞週期相關分子之作用；另外一方面亦探討 Rh2 是否會造成肺腺癌細胞的凋亡，及其凋亡路徑為何。

第二章 總論

第一節 人參

〔別名〕人銜《本經》、鬼蓋《本經》、神草《別錄》、

土精《別錄》、地精《廣雅》、海腴、皴面還丹《廣雅》。

吉林參、朝鮮參（舊名高麗參，又名別直參）、石柱參、

紅參、白參、邊條參、參鬚尖。

〔來源〕為五加科植物人參 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根。

產於吉林、遼寧者稱吉林參；產於朝鮮者稱朝鮮參；石柱參、

紅參、白參、邊條參都屬吉林參。

本品有主根和支根（多為2支）及根莖（蘆頭）之分，狀如

人形。種子入土后，芽苞孕育期為10個月左右，和孕婦育

嬰期相同，故名。始載于《神農本草經》，列為上品。

〔形態〕多年生草本，高達65cm。主根肥大，圓柱形或紡錘形，黃

白色。莖直立，單生。葉為掌狀復葉，3-6片輪生莖頂；小

葉3-5；小葉片橢圓形，邊緣有細鋸齒。傘形花序頂生，有

花10-50朵不等。漿果狀核果，熟時鮮紅色，扁腎形。種子

2枚，腎形，乳白色。

〔產地〕主產于吉林、遼寧、黑龍江省。最早生長在北緯38度到48

度之間的溫帶氣候區的大山林中，差不多是位於韓國漢城和

中國東北的佳木斯之間的地區。他長在海拔 200 至 1100 米高，夏天攝氏 20 至 25°C，冬天 1 至 4°C 的環境中⁽¹⁹⁾。

[采收]園參 9-10 月間采挖生長 6 年以上的人參，用鎬細心的刨起，防止斷根和傷根，去掉泥土，再行加工。新鮮品稱“園參水子”。新鮮的移山參稱“移山參水子”。野山參 5-9 月間采挖。用骨針撥松泥土，將根及須根細心拔出，防止折斷，去淨泥土、莖葉。新鮮品稱“野山參水子”。一至六年參齡人參根見圖 2-1。

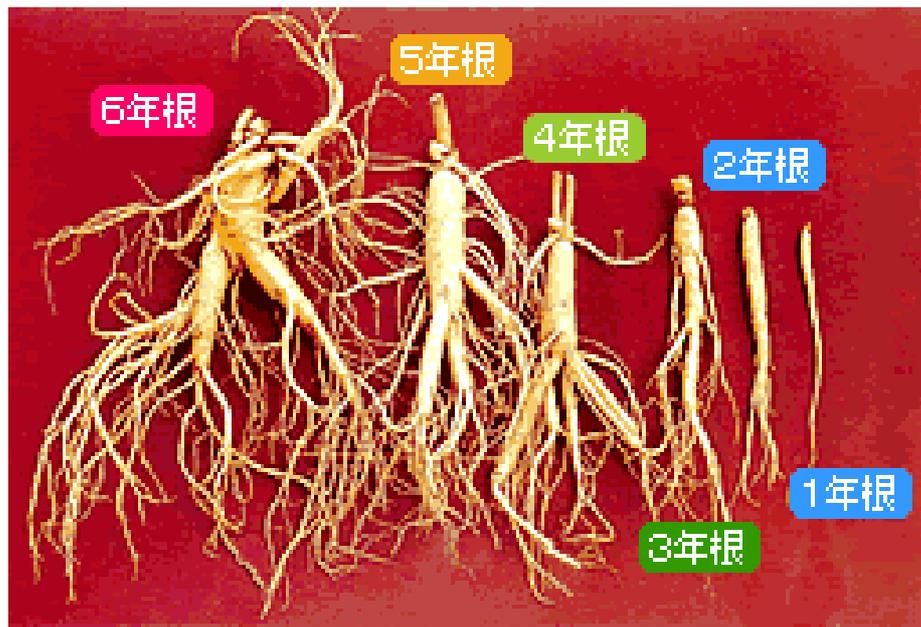


圖 2-1 一至六年參齡的人參根⁽¹⁹⁾。一般人參由種到收約需六年以上的時間

〔藥材〕黃潤緊實，似人形者良。

〔炮制〕糖參類：除去蘆頭，切段即可。紅參類：除去蘆頭，切段。

或以濕布包裹，潤軟后切片，晾干。

〔性味〕味甘微寒《神農本草經》

味甘，微寒、微溫《新修本草》

生甘苦微涼熟甘溫《本草備要解析》

〔歸經〕入脾、肺經。

〔主治〕《神農本草經》主補五臟，安精神，定魂魄，止驚悸，除邪

氣，明目開心益智，久服輕身延年。

《新修本草》主補五臟，安精神，定魂魄，止驚悸，除邪氣，

明目，開心，益智。療腸胃中冷，心腹鼓痛，胸脅逆滿，

霍亂吐逆，調中，止消渴，通血脈，破堅積，令人不忘。

久服輕身延年。

《本草綱目》補五臟，安精神，定魂魄，止驚悸，除邪氣，

明目開心益智。久服輕身延年（《本經》）。

療腸胃中冷，心腹鼓痛，胸脅逆滿，霍亂吐逆，調中，止

消渴，通血脈，破堅積，令人不忘（《別錄》）。

主五勞七傷，虛損痰弱，止嘔噦，補五臟六腑，保中守神。

消胸中痰，治肺痿及癰疾，冷氣逆上，傷寒不下食，凡虛

而多夢紛紜者加之 (甄權)。

止煩躁，變酸水 (李珣)。消食開胃，調中治氣，殺金石藥毒 (大明)。

治肺胃陽氣不足，肺氣虛促，短氣少氣，補中緩中，瀉心、肺、脾、胃中火邪，止渴生津液 (元素)。

治男婦一切虛証，發熱自汗，眩暈頭痛，反胃吐食，瘧，滑瀉久痢，小便頻數淋瀝，勞倦內傷，中風中暑，痿痺，吐血、嗽血、下血，血淋、血崩，胎前、產後諸病 (時珍)。

〔配伍〕茯苓為使，畏五靈脂，惡皂莢、黑豆、紫石英、人溲、鹹鹵，反藜蘆。

〔用法與用量〕內服：3-9 g。

〔宜忌〕實証、熱証忌服。

〔成分〕人參根所含的成分列於表 2-1。根含人參皂甙 (Panaxosides)，依其甙元分 2 類，人參三醇 (Panaxatriol)，人參二醇 (Panaxadiol)。關於人參中含有的皂甙成分，早年曾有許多不同的報告，提出的成分各給予不同的名稱，但化學研究不詳，所說 Panaquilon、Panaxin、Ginsenin 是另一種人參皂甙——人參二醇—2—葡萄糖，Panacon、 α -Panaxink 是人參原皂甙元——人參二醇—3—葡萄糖。人參皂甙中原存的形式是

原人參二醇 (Protopanaxadiol)和原人參三醇 (Protopanaxatriol)，由于分離甙元時稀酸的作用，分子側鏈部分的羥基和烯鍵環合而成人參二醇和人參三醇。

根含揮發油約 0.05%，主成分乃人參倍半烯 (Panacene $C_{15}H_{24}$)，是人參特異香氣來源。又含人參醇 (Panaxynol $C_{17}H_{26}O$)，是一種極不穩定的液體，在空氣中容易樹脂化。參皮中也含此人參醇。此外，人參根部尚含人參酸 (系軟脂酸、硬脂酸、油酸和亞油酸的混合物)，植物甾醇，膽鹼 (0.1-0.2%，是人參中降低血壓的成分)，各種氨基酸，葡萄糖、果糖、麥芽糖、蔗糖、幾種人參三糖 (Panose A, B, C, D)、果膠等糖類，維生素 (B1)、(B2)、煙酸、泛酸等。

地上部分含廿九烷 (Nonacosane)、1—廿八醇 (1—Octacosanol)和 β —谷甾醇；又含皂甙，水解則生人參二醇、人參三醇和齊墩果酸。

莖葉和根的皂甙成分基本相同。因此莖葉似有利用的價值。莖葉還含黃酮類山柰酚 (Kaempferol)、三葉豆 (Trifolin)、人參黃酮 (Panasenoid)和木犀草素—7—葡萄糖 (Luteolin—7—glucoside)。

表 2-1 人參根所含的成分⁽¹⁹⁾

特殊活化物質	
人參二醇類皂甙	Ra1, Ra2, Ra3, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Rg3, (Rh2, Rs1, Rs2 僅存於紅參中)
人參三醇類皂甙	Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh1, Rho
油烷酸	Ro
苯酚	麥芽酚 (僅存於紅參中)
非特殊活化物質	
維他命	維他命 B12, 葉酸, 煙尿酸, 泛酸, 生物素, 煙洗胺
礦物質	銅, 鈣, 鎂, 鉀, 鈉, 磷, 鐵, 鋁
微量元素	鎳, 錳, 鉻, 鉀, 硒, 鉬, 鈷, 鈳, 鋇
氨基酸	各種氨基酸
香精油	200 種成分
油脂	中性油脂
糖	葡萄糖, 果糖, 蔗糖, 麥芽酚, 三糖類

〔毒性〕人參毒性很小，狗、貓皆可耐受很高劑量，小鼠皮下注射半數致死量為 16.5 mg/kg。人在內服 3% 人參酞劑 100 ml 後，僅感到輕度不安和興奮；內服 200 ml，可出現中毒現象：全身玫瑰疹、瘙癢、眩暈、頭痛、體溫升高及出血。曾有一內服人參根酞劑 500 ml 而導致死亡的報導。

〔藥理作用〕⁽²⁰⁾

1. 興奮神經系統：能縮短神經反射的潛伏期，加快神經衝動的傳導，增加條件反射的強度。
2. 興奮垂體：興奮腎上腺皮質功能。

3. 增強性機能：具促性腺激素樣作用。
4. 強心：使心臟收縮力加強。
5. 降血糖：能降低血糖，並與胰導素有協同作用。
6. 改善消化功能和代謝功能，增進食慾，促進蛋白質合成。
7. 抗過敏：與抗組織胺作用有關。
8. 抗利尿：使醛固酮分泌增加，從而促使鈉滯留而抗利尿。

〔臨床應用〕

1. 大補元氣，提高病人的抗病能力
2. 用於脾胃虛弱
3. 用於治療貧血
4. 用於肺腎不足的虛喘，常見於病程較久的慢性支氣管炎、肺氣腫、支氣管哮喘、慢性肺部感染及心肺功能不全
5. 治療糖尿病
6. 治療神經衰弱
7. 治療性機能衰弱
8. 扶正祛邪

第二節 人參皂甙 Rh2

一、 人參皂甙

把人參皂甙有系統的從高麗參中分離出來，是由兩位日本科學家 Shibata 和 Tanaka 博士在 1950 年代後期完成的，由此提取的人參皂甙統稱為 Ginsenosides，此舉為人參皂甙奠定了里程碑^(21,22)。此後大量的研究證明，人參皂甙是參類植物中重要的活性成分，為千百年來人參治療多種疾患的功效提供了科學化的依據。

單體人參皂甙的命名，是根據其在薄層色層分離譜的 Rf 質而定，比如 Ra、Rb1、Rb2、Rc、Rd、Re、Rf 等。人參皂甙的結構是由糖類再加上無糖甙骨架，無糖甙骨架有三種：(1) Dammarane (2) Ocotillol (3) Oleanane。其中 Dammarane 屬四環三萜結構，其又可再分為二醇組 (Protopanaxadiol) 和三醇組 (Protopanaxatriol) 兩個亞型。

各國科學家進行大量的研究，以探究人參皂甙的有效成分及其機理，某些人參皂甙的生物活性已被確認，包括對心肌細胞及神經細胞的離子通道活性之改變⁽²³⁻²⁵⁾，對蛋白質、脂質合成之活化^(26,27)，對 DNA、RNA 的合成調整^(28,29) 均有影響。以表 2-2 列出各種人參皂甙的作用。

表 2-2 人參皂甙的作用⁽²³⁻³⁰⁾

Ginseng Saponin	Oleanolic acid	Ginsenoside Ro	抗炎作用，解毒作用，抗酵素作用，Thrombin 細胞活性化作用。
	Panaxadiol	Ginsenoside Ra1-3	
		Ginsenoside Rb1	抑制中樞神經作用、催眠作用、鎮痛作用、精神安定作用、消熱作用、促進血清蛋白質合作用，抑制中性脂肪分解，促進膽固醇再合成作用，蛋白質分解酵素活性化作用，促進 DNA 合成作用，促進荷爾蒙分泌作用。
		Ginsenoside Rb2	抑制中樞神經作用、促進 DNA，RNA 合成作用，使分解蛋白質酵素活性化作用，促進刺激副腎皮質荷爾蒙分泌作用，抗糖尿作用。
		Ginsenoside Rb3	
Ginsenoside Rc	抑制中樞神經作用，抑制 RNA 合成作用，促進血清蛋白質合作用，使分解蛋白質酵素活性化作用，促進刺激副腎皮質荷爾蒙分泌作用。		

表 2-2：續

Ginseng Saponin		Ginsenoside Rd	促進副腎皮質荷爾蒙分泌作用。
		Ginsenoside Re	抑制中樞神經作用，促進 DNA、RNA 合成作用，促進血清蛋白質合成作用，蛋白質分解酵素活性化作用，促進刺激副腎皮質荷爾蒙分泌作用。
	Panaxatriol	Ginsenoside Rf	與腦神經興奮有關連的鎮痛作用。
		Ginsenoside Rg1	中樞神經興奮作用，抗疲勞作用，恢復疲勞作用，改善記憶，學習機能，促進 DNA、RNA 合成作用，蛋白質分解酵素活性化作用。
		Ginsenoside Rg2	抑制血小板凝集作用，蛋白質分解酵素活性化作用。
	Red ginseng Saponins	Panaxadiol	Ginsenoside Rh2
20(s) Ginsenoside Rg3			抑制癌細胞轉移作用。
Panaxatriol		20(R)Ginsenoside Rh1	
		Ginsenoside Rh4	

對二醇型與三醇型的人參皂甙作一比較，以 Rb1 (二醇)、Rg1 (三醇) 為例，二醇型有安神鎮定作用而三醇型卻是提神興奮功效，兩者的許多功效是相反的⁽³⁰⁾。

二、 人參皂甙 Rh2

Rh 類的人參皂甙在 1980 年代中期被分離出來^(31,32)，它們存在紅參中，Rh2 為二醇型人參皂甙，其結構式畫於下方(圖 2-2)。所以 Rh2 的來源為人參的根，人參根炮製成紅參，紅參裡面含有許多人參皂甙，而 Rh2 是屬於二醇類人參皂甙。

Rh2 的來源簡圖：

人參→紅參→人參皂甙→二醇類人參皂甙→Rh2

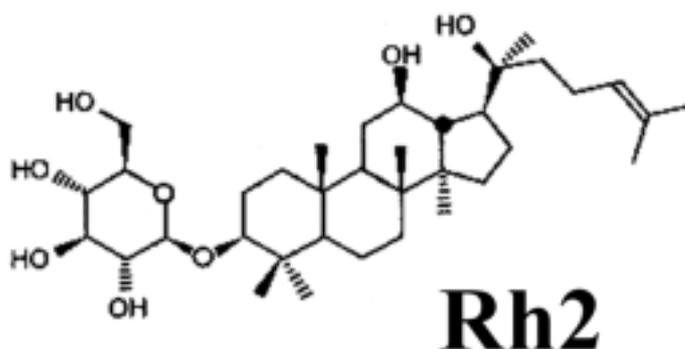


圖 2-2 Rh2 的結構式⁽³³⁾。Rh2 為二醇類人參皂甙，其四個碳環上的醇基「OH」個數為二。

Rh2 的相關實驗做的最多的是日本人和韓國人，這可能與該國家有種植人參有關，人參其栽種需特別的環境，而且 Rh2 在紅參中的含量極少，取得不易。

Rh2 抑制癌細胞生長的動物實驗中，日本的一個研究團隊研究做的很詳盡，他們在 nude mice 身上種植人類卵巢癌細胞，再口服 Rh2，證實 Rh2 可以抑制癌細胞的生長，並且在 1990，1993，1998 發表他們的研究成果⁽³⁴⁻³⁶⁾。

細胞實驗中有一個南韓的漢城大學與釜山大學合作的研究團隊，他們以 SK-HEP-1 這株肝癌細胞為研究對象，證實 Rh2 可以使癌細胞的細胞週期停滯 (cell cycle arrest)，並且造成癌細胞的凋亡 (apoptosis)^(37,38)。日本亦有做相關的實驗，他們取的是 murine 的 B16 melanoma 這株細胞，也證實了 Rh2 可使癌細胞的細胞週期停滯在 G1 期⁽³⁹⁾。

由於台灣 Rh2 的相關實驗做的很少，在國際上無相關論文發表，所以本實驗取人類肺腺癌細胞株 A549 來進行實驗，看是否會抑制癌細胞的生長以及探討其分子作用機轉。

第三節 細胞週期的調控

一、細胞週期 (cell cycle) ⁽⁴⁰⁾：

一個細胞分裂增殖成兩個細胞，中間受到許多分子調控複製程序的進行，這期間我們稱之為細胞週期，整個週期可被分為兩大時期—interphase (包含 G1、S、G2 phase)及 M phase，而在這過程當中，則會有三個 checkpoints 來決定細胞週期是否能進入至下一時期：

Go phase：又稱 senescence 或 quiescence，為細胞靜止期，經由某些分子的刺激，可進行分化或進入 G1 期。

G1 phase：G 意指為 Gap，處於 M 期及 S 期的中間時期，細胞會複製本身胞器與蛋白質，增大自體體積，準備進入 S 期，此期間可長達數小時至數天之久。由 G1 要進入 S 期為第一個 Chechpoint。

S phase：S 意指 Synthesis，此期細胞進行的是 DNA 的複製工作，需 10 至 12 小時的時間。

G2 phase：為 S 期與 mitosis 的中間時期，為進入 M 期做準備。而由 S 進入 M 期為第二個 checkpoint。

M phase：M 意指 Mitosis，為細胞週期最短的一期，進行細胞核與胞質的分裂，又可細分為數個時期，如下：

Prophase：核內複製完的染色體進行濃縮，胞質中 mitotic spindle

進行組裝，兩個 centrosome 分別移向兩側。

Prometaphase：centrosome 移至 indle pole 處，核膜破裂，染色體藉由 kinetochores 附著到 spindle microtubules 上，並開始移動。

Metaphase：染色體排列於 spindle pole 中間的赤道板上，準備進行分裂。此時為第三個 checkpoint。

Anaphase：複製完的染色體進行分裂成兩子染色體，此時 kinetochore microtubules 開始縮短，Spindle pole 往外側移動。

Telophase：分裂完的子染色體移至 spindle pole 處，染色體開始 decondense，新的核膜及細胞質中 contractile ring 開始形成

Cytokinesis：核膜形成完全，細胞質分裂為二，細胞準備重新回到 interphase。

二、細胞週期調控分子:

1. Cyclins and Cdks

調控細胞週期的進行主要為 Cyclins 與 Cdks (cyclin-dependent kinases)兩大家族，單獨的 Cdks 並無磷酸化其下游分子的能力，必須當 Cdks 與 Cyclins 結合形成複合體時，Cdks 才會具有蛋白質激酶的活性，即可磷酸化下游分子;在細胞週期的四個時期中，都有特定促使每一時期進行的 Cyclin-Cdk complexes，G1 期有 Cyclin-D-Cdk-4/6

complexes 以及 Cyclin-E-Cdk-2 complexes，S 期有 Cyclin-A-Cdk-2 complexes，G2/M 期有 Cyclin-B-Cdk-1 complexes⁽⁴¹⁻⁴³⁾ (表 2-3)。

表 2-3 哺乳類動物之 Cyclins 與 Cdks

Cell-cycle stages	Cyclins	Cdks
Early/Mid G1 phase	Cyclin-D ₁ , -D ₂ , -D ₃	Cdk-4, Cdk-6
Late G1 phase	Cyclin-E	Cdk-2
S phase	Cyclin-A	Cdk-2
M phase	Cyclin-B	Cdk-1

然而，就算 Cdks 與 Cyclins 結合在一起並不能代表一定就有活性，當 Cdks 某些位置上被加上磷酸根時，有可能會使其失活性，例如在 Tyr15 的位置被 Wee 1 kinase 磷酸化時就會使 Cdks 失活性，相反的，在相同位置 Cdc25 phosphatase 解磷酸化時，會使得 Cdks 又恢復活性；另外，在 Thr14 如被 Myt 1 加上磷酸根，同樣會使 Cdks 失活性，而在 Thr 161 位置由 CAK (cyclin H/Cdk7 complex) 加上磷酸根的話，可使得 Cdks 為活性型態，因此我們可以了解列，當 Cdks 上的 Thr 14 和 Tyr 15 有一者或兩者均被加上磷酸根時，Cdks 活性是被抑制的，而 Thr 161 單獨被磷酸化，Cdks 才具活性⁽⁴⁴⁾。

另一方面，Cyclins 的表現量是隨著細胞週期而有所變化的，在 G2 期表現的 cyclin-B 如果在進入 mitosis 的晚期時，若沒有被 anaphase-promoting complex (APC) ubiquitylation 分解，則會使 mitosis 停止於 anaphase，而在 G1/S transition 時的 cyclin-E 如果大量表現，

因為要進入列 S 期需要 Cdk2 與 cyclin-A 的結合，但大量的 cyclin-E 把 Cdk2 都抓住了，因此便無法進入到 S 期⁽⁴⁵⁾。

2. Cdk inhibitors and p53

Cdk inhibitors 顧名思義就是抑制 Cdk 活性的分子，CdkIs 主要可分為兩大家族-- CIP/KIP 家族與 INK4 (Inhibitors of Cdk4) 家族，CIP/KIP 家族成員有 p21^{CIP1/WAF1/sdi1}、P27^{KIP1} 及 p57^{KIP2}；INK 家族則有 p16^{INK4a}、p15^{INK4b}、p18^{INK4C} 和 P19^{INK4d} (46)。

一般而言，CIP/KIP 家族中的 p57^{KIP2} 主要是跟細胞的分化比較相關，而 p21^{CIP1/WAF1/sdi1} 與 p27^{KIP1} 對於所有的 cyclin-Cdk complexes 均有抑制作用⁽⁴⁷⁾。它們會形成 cyclin-Cdk-CdkI 型式的三元體，藉由遮蔽掉 Cdks 的 catalytic site，使不能與下游分子反應；進而抑制了細胞週期的進行⁽⁴⁸⁾。

另一方面，INK 家族則對於 G1 期的 Cdk4 與 Cdk6 具有選擇性的抑制作用，它們的結構上含有 ankyrin repeat domains⁽⁴⁹⁾ 會與 cyclin-D 競爭 Cdk4 跟 Cdk6 的結合區域，使 cyclin-D 無法與 Cdk4 跟 Cdk6 形成有活性的 Complex，而使的細胞週期停滯於 G1 早至中期⁽⁵⁰⁾。

p53 本身為一轉錄因子 (transcription factor) 平時與 MDM2 protein 結合在一起為不活化型，當細胞 DNA 受到傷害、缺氧 (hypoxia) 或是致癌因子 (oncogene) 活化的形況下，就會誘使 p53 的活化，p53 參與了包括細胞 DNA 的修復、細胞週期的停止與細胞凋亡 (apoptosis) 等

的生物反應，比如說 CdkIs 中的 p21^{CIP1/WAF1/sdi1} 為 p53 主要下游調控分子；p53 的活化會使得 p21^{CIP1/WAF1/sdi1} 於細胞內的表現量上升，導致細胞週期的停滯，此外，有關細胞 DNA 修復的 GADD45 和 p53R2 以及細胞凋亡相關的 Bax、NOXA、PUMA 和 p53AIP1 都會受到 p53 的調控⁽⁵¹⁾。

3. pRb and E2F families

pRb (retinoblastoma protein, also called pocket protein) 家族有 pRb1/P110、pRb2/p130 與 p107 三個，E2F (early gene 2 factor) 家族則有 E2F-1 到 E2F-6⁽⁵²⁾，E2F 本身為 transcription factor，平時在與 Rb protein 結合的時候是沒有活性的，但當 Rb protein 被上游的 cyclin/Cdk complexes 磷酸化時，就會與 E2F 脫離，使 E2F 具活性。一般來說，Rb protein 本身有 16 個位置可能會被加上磷酸根，而 cyclin/Cdk complexes 主要會去磷酸化 Rb Protein C-terminus 的位置，比如說 cyclin-D/Cdk4 complex 會去磷酸化 Rb Protein 在 Ser 780、Ser 795 與 Thr 826 的位置⁽⁵³⁾。

就目前所知，pRb1 是跟 E2F-1, -2, -3 結合在一起，pRb2/p130 和 p107 是與 E2F-4, -5 結合在一起，而 E2F-6 則和 pRb 較無相關，它主要與 Polycomb group proteins (PcG) 結合在一起。一般認為，E2F-4, -5 與 pRb2/p130 以及 E2F-6 與 PcG 的結合是在 G0 與 early G1 期時，扮演 transcription repressors 的角色，E2F-1, -2, -3 則作用於 late G1 跟 S

期，為 transcription activators。近年來的研究發現，受到 E2F 家族調控的分子相當的多，除了調控細胞週期進入 S 期的分子，如 cyclin-E、Cyclin-A、c-Myb 和 Cdk2 外；尚有與 DNA 合成相關的，如 ORC protein，MCMs (mini chromosome maintenance proteins)、Cdc6、ribonucleotide reductase、thymidine synthase 與 DNA polymerase α 以及與 DNA 修復相關的分子，如 msh2 和 mihl (mismatch repair gene)，Fanconi anemia 和 rpa3 (excision repair) 與 rad51、recQ1 和 rad54 (double-strand break recombination repair)；另外對於 mitosis 與 DNA-damage checkpoint、apoptosis 相關的分子，如 cyclin-B、cdc2、Mad2、chk 1、caspase-3 和 APAF-1，都會受到 E2Fs 家族的調控⁽⁵⁴⁾。因此，就最近的研究文獻報導，顯示 pRb 與 E2Fs 家族的分子，對於細胞的影響不僅調控細胞週期，並且可能參與細胞分化與死亡的調控。細胞週期及其相關調控分子示圖於圖 2-3。

CELL CYCLE

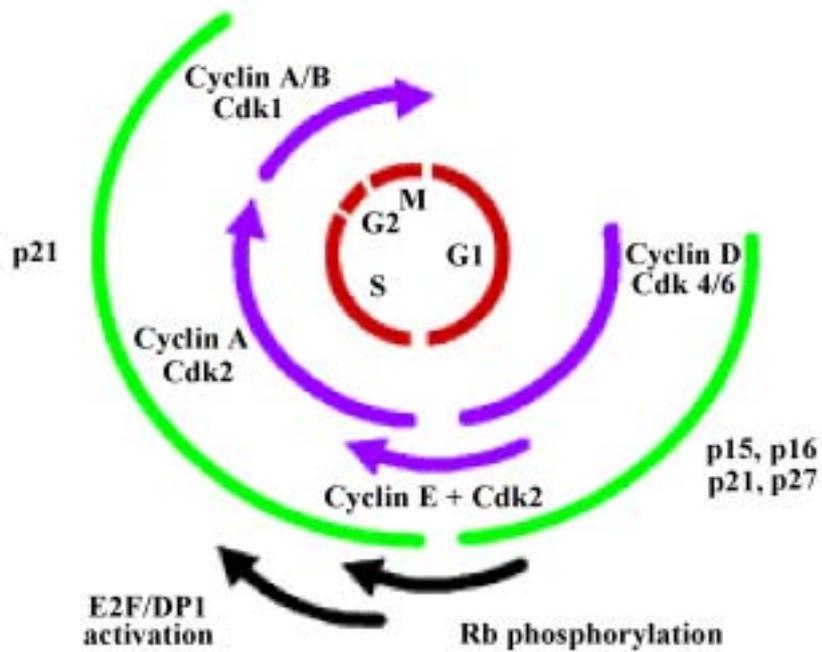


圖 2-3 細胞週期及其相關調控分子⁽⁵⁵⁾。細胞分為 G1, S, G2 及 M 四期，不同時期有不同的 cyclin 及 Cdk 來調控，亦有 Cdk inhibitors 及 pRb and E2F families 來調控細胞週期的進行。

第四節 細胞凋亡的機轉

細胞凋亡乃是細胞經由訊息傳遞所造成的一種程序性死亡，其死亡過程隨著一連串的生化及型態變化。其細胞死亡的形式與 necrosis 不同 (圖 2-4)，cell morphology 上的特徵有細胞皺縮 (shrinkage)、圓起來 (round up)、細胞核凝縮且斷裂 (condensed and fragmented nuclei)、細胞膜產生泡狀結構 (blebbing) 並且產生凋亡小體 (apoptotic bodies)⁽⁵⁶⁾。其可以經由 DNA 的萃取和電泳分析以及 TUNEL 的分析，來看 DNA fragmentation。

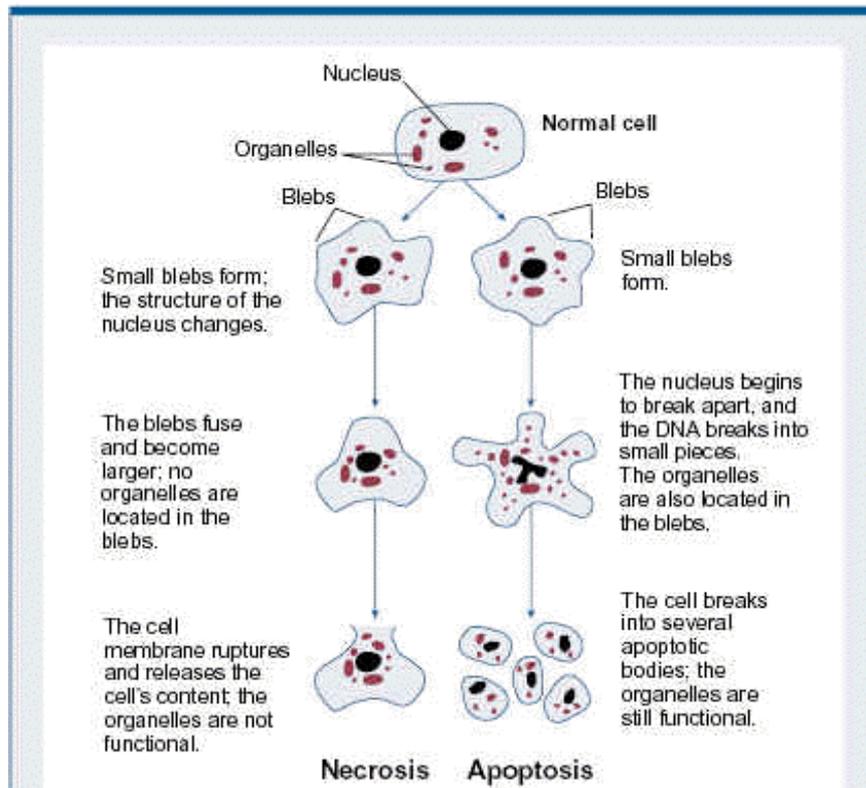


圖 2-4 cell necrosis 與 cell apoptosis 之比較⁽⁵⁷⁾。cell apoptosis 在 morphology 上的特徵有細胞皺縮 (shrinkage)、圓起來 (round up)、細胞核凝縮且斷裂 (condensed and fragmented nuclei)、細胞膜產生泡狀結構 (blebbing) 並且產生凋亡小體 (apoptotic bodies)。cell necrosis 則無這些特徵，cell necrosis 會造成細胞膜的破裂釋放出細胞質中的物質。

有許多凋亡途徑 (apoptosis pathway)，目前了解較多的途徑有三個，分別為粒線體路徑 (mitochondria pathway)、死亡受體路徑 (death receptor)、及內質網路徑 (endoplasmic reticulum pathway)。以下介紹

最常見的粒線體路徑及死亡受體路徑。

(一)粒線體路徑 (mitochondria pathway)：

粒線體中的 Bcl-2 家族蛋白質在細胞凋亡的控制過程中扮演相當重要的角色，這一群蛋白質可分為促進細胞凋亡的分子 (pro-apoptotic molecules)及抑制細胞凋亡的分子 (antiapoptotic molecules)兩大類。促進細胞凋亡的蛋白包括有 Bax、Bad、Bid、Bcl-Xs、Bak、Bok、Diva、Bik、Bim、Hrk、Nip3、Nix 等；抑制細胞凋亡的蛋白包括有 Bcl-2、Bcl-X_L、Bcl-w、Mcl-1、Nrl3、Al/Bfl-1 等⁽⁵⁸⁾。研究指出這些 Bcl-2 家族蛋白質的結構相似，都具有 BH (Bcl-2 Homology) domains：BH1、BH2、BH3 和 BH4，而促進細胞凋亡的分子及抑制細胞凋亡的分子彼此以 heterodimers 或 homodimers 的形式結合，調控細胞凋亡⁽⁵⁹⁾。Bcl-2 的家族成員大部分在 C 端都含有疏水性區域 (hydrophobic domain)，使得它們可以存在粒線體外膜上。一般認為抑制細胞凋亡的分子平時都存在粒線體膜上、內質網膜上或是核膜上；而促進細胞凋亡的分子平時都存在細胞質中，但若接受到死亡訊息則會轉位 (translocation)到膜上，尤其是粒線體膜上⁽⁶⁰⁾。而具有促進細胞凋亡特性之 Bcl-2 家族蛋白之所以會造成細胞的死亡是因為它們會在粒線體膜形成孔洞 (pore)，造成粒線體膜上通透性的改變 (mitochondrial permeability transitions or MPT)，進而導致 cytochrome c

或 apoptosis induced factors (AIP)外流至細胞質中⁽⁶¹⁾。粒線體膜上通透性的改變同時也會造成粒線體膜電位 (mitochondrial transmembrane potential)之下降及 mitochondrial uncoupling 之現象，最後導致大量過氧化物 (reactive oxygen species or ROS)聚積，進而造成細胞之傷害⁽⁶²⁾。文獻報告指出當 cytochrome c 釋放到細胞質時，與細胞質中的 dATP、Apoptosis activating factor-1 (Apaf-1)結合後會活化 caspase-9，進而引發細胞的凋亡⁽⁶³⁾。而抗細胞凋亡的 Bcl-2 家族蛋白，則是直接和 Apaf-1 結合，抑制 Apaf-1 的活性；或經由穩定粒線體膜電位以及其體積之恆定性，以防止 cytochrome c、apoptogenic cofactor 之外流，進而保護細胞使其免於步上凋亡之途⁽⁶⁴⁾。

促進細胞凋亡的分子一旦被活化後，會經由一群蛋白水解酶，稱為蛋白酶 (protease)來執行凋亡之動作。Caspase 是具有專一性的 cysteine Proteases，專門切割 aspartic acid residues⁽⁶⁵⁾。Caspase 蛋白系列均具有相似的氨基酸序列、結構和專一性，都是經非活化態的 proenzyme (約 30-50 kD)之裂解所致。這些 proenzyme 包含三個主要的部位 (domain)：NH2 terminal、large subunit、small subunit。Proenzyme 活化時必須先經由其他 caspases 進行一連串蛋白分解，裂解這些 domain，移除 prodomain 和 linker region，使得大、小 subunit 結合形成複合體，成為活化態的酵素 (caspase)⁽⁶⁶⁾。Caspase 依其功能

可分為 initiator caspase 和 effector caspase ；initiator caspase 受到來自細胞內或細胞外死亡訊息的刺激活化後，再進一步活化 effector caspase⁽⁶⁷⁾。在粒線體路徑為 cytochrome c 與 Apaf-1 結合，使 caspase-9 活化⁽⁶⁸⁾，進而活化下游的 caspase-3, -6, -7。這樣的結果會造成核膜蛋白 (lamin)的分解、PARP 【poly(ADP-ribose)polymerase】的裂解和 DNA fragmentation，最後導致細胞的凋亡。細胞的凋亡路徑圖示於圖 2-5。

(二) 死亡受體路徑 (death receptor pathway)

細胞膜上死亡受體路徑則是經由活化細胞膜上 Fas、TNFR 或 TRAIL receptor 等死亡受體，吸引 FADD (Fas activating domain)與之結合，接著再與 procaspase-8 結合形成 DISC (death-inducing signaling complex)，將 caspase-8 活化後再直接活化 caspase-3，或者 caspase-8 的活化促使 Bcl-2 家族成員 Bid 的裂解，tBid 位移至粒線體，促使粒線體釋放出 cytochrome c 接著活化 caspase-9 和 caspase-3⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾。

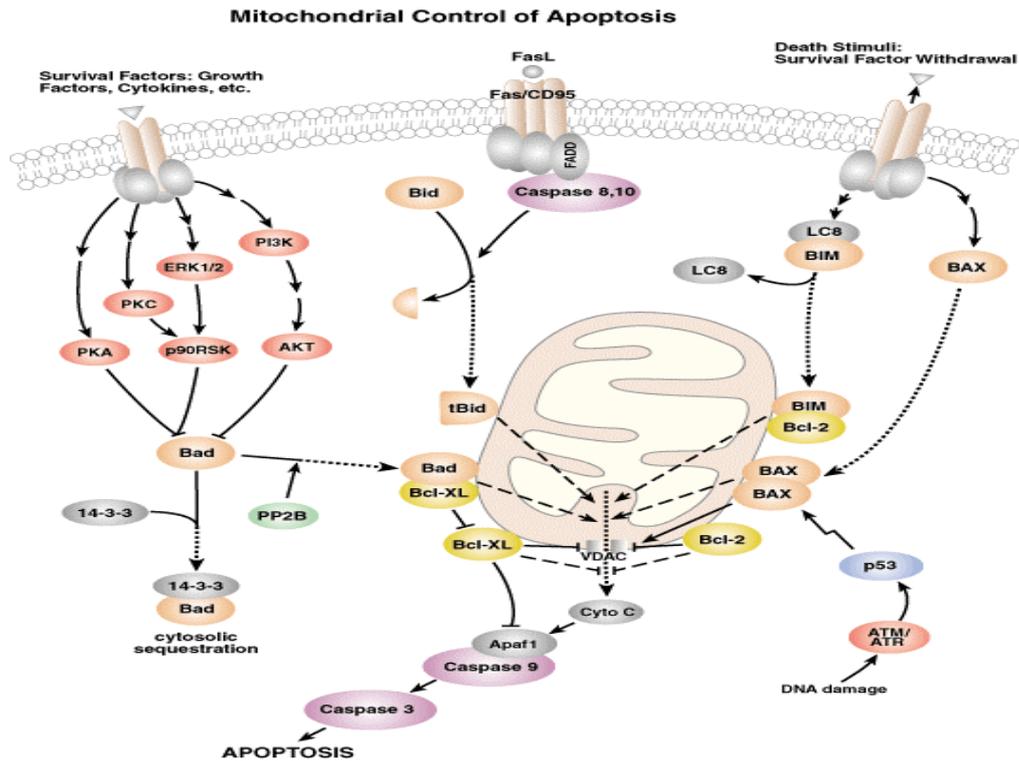


圖 2-5 細胞凋亡的粒線體路徑及細胞膜死亡受體路徑⁽⁷²⁾。粒線體中的 Bcl-2 家族蛋白質在細胞凋亡的控制過程中扮演相當重要的角色，這一群蛋白質可分為促進細胞凋亡的分子 (pro-apoptotic molecules) 及抑制細胞凋亡的分子 (antiapoptotic molecules) 兩大類。當粒線體釋放出 cytochrome C 會與 Apaf-1、Procaspase-9 形成一複合體 apoptosome，在 dATP 存在下活化 procaspase-9，接著活化下游的 procaspase (procaspase-3, -6, -7)。細胞膜上死亡受體路徑則是經由活化細胞膜上 Fas、TNFR 或 TRAIL receptor 等死亡受體來達成。

細胞膜上有許多 Death ligand receptors，它們有一些相同的 domain，細胞外 (extracellular) 有不同數目的 cystein-rich domain，細胞內則有些有 internal death domain。目前較熟知的 Death ligand receptors 有 TNFR1、TNFR2、FAS、DcR3、DR4、DR5、TRID、TRUNDD，其中 TNFR1、FAS、DR4、DR5 有 internal death domain 會誘發凋亡反應，其餘的 receptors 則不會⁽⁷⁰⁾。

TRAIL 的 receptors 有 TRAIL-R1 (DR4)、TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2)、TRID (DcR1)、及 TRUNDD (DcR2)，其中 TRAIL-R1 (DR4)、TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2) 有 death domain，其誘發的 death pathway 與 FAS 相似，都是與 receptor 結合後吸引 FADD (Fas activating domain) 與之結合，接著再與 procaspase-8 結合形成 DISC (death-inducing signaling complex)，將 caspase-8 活化後再直接活化 caspase-3，或者 caspase-8 的活化促使 Bcl-2 家族成員 Bid 的裂解，tBid 位移至粒線體，促使粒線體釋放出 cytochrome c 接著活化 caspase-9 和 caspase-3 (圖 2-6)。

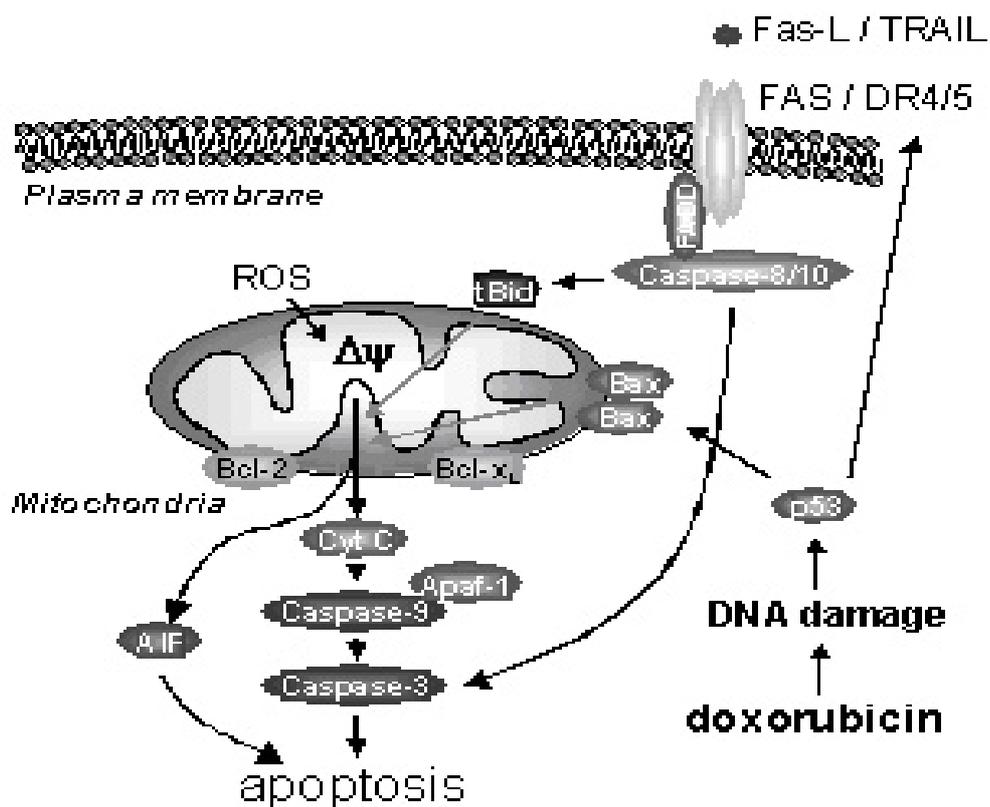


圖 2-6 細胞膜上死亡受體路徑⁽⁷³⁾。經由活化細胞膜上 Fas、TNFR 或 TRAIL-R 等死亡受體，吸引 FADD 與之結合，接著再與 procaspase-8 結合形成 DISC (death-inducing signaling complex)，將 caspase-8 活化後再直接活化 caspase-3，或者 caspase-8 的活化促使 Bcl-2 家族成員 Bid 的裂解，tBid 位移至粒線體，促使粒線體釋放出 cytochrome c 接著活化 caspase-9 和 caspase-3。

第三章 材料與方法

第一節 實驗材料

一、細胞株來源：

本實驗所使用之細胞株 A549、CH27、H460 為人類肺癌細胞株 (human lung cancer cell lines)，由美國組織細胞庫 (ATCC)購得。A549 為肺腺癌細胞株 (lung adenocarcinoma cell line)；CH27 為肺鱗狀細胞癌細胞株 (squamous lung cancer cell line)；而 H460 則為大細胞肺癌細胞株 (small cell lung cancer cell line)。

二、實驗試劑：

1. Rh2:

由台灣生福生技公司提供，粉劑溶於 DMSO 及 100% alcohol 中，比例為 1:5。

2. 台灣榮民製藥：

Penicillin, Streptomycin

3. ABI (American Biorganics INC):

Tris

4. Amersham:

ECL detection kits

5. BD PharMingen:

Anti-cyclin A monoclonal antibody , Anti-cyclin E monoclonal antibody

6. BD Transduction Laboratory:

Anti-Cdk1 monoclonal antibody, Anti-Cdk2 monoclonal antibody,
Anti-Cdk4 monoclonal antibody, Anti-cyclin B monoclonal antibody,
Anti-cyclin D1 monoclonal antibody, Anti-cyclin D3 monoclonal
antibody, Anti-pRb1 monoclonal antibody, Anti-pRb2/p130
monoclonal antibody

7. Bio-Rad :

Acrylamide, Ammonium Persulfate (APS), Glycine,
Kaleidoscope

Prestained Standards, N,N'-methylene-bis-acrylamide (Bis),

N,N,N',N',-Tetra-methylethylenediamine (TEMED)

8. Falcon:

Cell culture dish (10 cm diameter), Cell culture plate (12 well)

9. Gibco:

RPMI 1640 Medium

10. Hyclone:

Fetal Bovine Serum (FBS)

11. NEN:

L-glutamine , Non Essential Amino Acid Solution (NEAA),

Polyvinylidene fluoride (PVDF) Transfer Membrane, Trypsin

12. Merck:

2-Mercaptoethanol (2-ME), EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$),

Dimethylsulfoxide (DMSO), Methanol, Sodium dodecyl sulfate

(SDS), Sodium chloride (NaCl), Xylene cyanol

13. Pharmacia:

Protein A sepharose

14. Santa Cruz Biotechnology, Inc:

Anti-CDK6 polyclonal antibody, Anti-cyclin D2 monoclonal
antibody,

Anti-p15 polyclonal antibody, Anti-p16 polyclonal antibody,

Anti-p27 polyclonal Antibody

15. Sigma:

Berrberine hemisulfate, Dithiothreitol (DTT), Leupeptin,

Methylene blue ($C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$), Propidium Iodide (PI),

Sodium Pyruvate

16. Upstate Biotechnology

Anti-Akt phospho-specific monoclonal antibody, Anti-p21
monoclonal antibody, Anti-p53 monoclonal antibody

17. Bio Vision

Caspase activity assay kits

第二節 實驗方法與步驟

一、細胞培養:

1.細胞培養液的配製

將 RPMI 1640 粉末先溶於約 9.5 L Mili-Q 去離子水中，加入 20 g 的 NaHCO_3 ，再用 HCl 調整 pH 至 7.0~7.2 後以 Mili-Q 去離子水補足體積至 10 L，然後以 0.22 μM 的過濾器過濾滅菌，最後儲存於 4 冰箱備用。

2.完全培養液

每 500 ml RPMI 1640 細胞培養液添加 100 IU 青黴素 (Penicillin)、100 μg 鏈黴素 (Streptomycin)、2 mM 麩胺酸 (L-glutamine)、100 μM 非必須胺基酸 (non-essential amino acid)，1mM 焦葡萄糖酸鈉 (sodium pyruvate)，最後加入 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)即得。

3.細胞株的培養

H460、A549 和 CH27 三種肺癌細胞株，均以 RPMI 1640 完全培養液培養於 37 °C、5% CO₂ 的培養箱中；繼代培養 (subculture) 時，先用 PBS (Phosphate-Buffered Saline) 清洗 1 至 2 次，再以 TEG (0.05 mM trypsin、2.5 mM EDTA 和 2.8 mM glucose) 處理數 mins，使細胞與培養皿底解離，最後分種於新的細胞培養皿中，每一培養皿注入約 7 ml 的細胞培養液，細胞培養液每兩天更換一次。

二、細胞數目的測定:

將培養於細胞培養皿的細胞經 TEG 處理過後，以 3~5 ml 的培養液將細胞打下來，使用血球計數器 (hemocytometer) 計算所有的細胞數目，接著以每 ml 有 1×10^5 個細胞分種於 12 孔細胞培養盤中，每孔加入 1 ml 細胞與培養液的混和液，均勻搖散細胞後，將細胞培養於 37 °C、5% CO₂ 的培養箱中，經 24 hrs 後給予各濃度藥物 (3 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml) 處理，再經 8、16、24、48、72 hrs 後，以血球計數器計算各孔盤內的細胞數，每一藥物濃度處理為三重覆。

三、流式細胞分析儀測定:⁽⁷⁴⁾

將細胞以每 10 ml 有 1×10^6 個細胞種於 10 cm 的培養皿中，在藥物劑別處理 16、24、48 hrs 後，先以 PBS 清洗細胞，再將細胞

用 TEG 處理，用 1 ml PBS 細胞打下來，置於 1.5 ml 的 eppendorf tube 中，再以 900 rpm 室溫下離心 5 mins，倒掉上清液，置於震盪器輕輕震盪，將 1 ml 的 70% EtOH/PBS 一滴一滴滴入 eppendorf tube 中，使細胞完全均勻分散於 70% EtOH/PBS 中，即可置於 4 °C 冰箱保存。

待要分析前，將 sample 以 900 rpm 在 4 °C 下離心 5 mins，倒掉上清液，於避光條件下，每一個 sample 重新分佈於 1 ml PI solution 中，置於 37 °C 中作用 30 mins，最後置於冰上，利用 flowcytometer (FACScan) 儀器分析，所得之結果以 ModFIT LT 2.0 軟體分析，加以量化之。

四、蛋白質定性與定量的分析：

1. 蛋白質的萃取 (Protein Extraction)

將細胞用冰的 PBS 洗二次後用刮棒刮下，於 4°C 下 5000 rpm 離心 5 mins，倒掉上清液並用棉棒將多餘的水吸乾，加入適量的 RIPA buffer [50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% Na Deoxycholate, 5 mM EDTA (pH 8.0), 1 mM EGTA (pH 8.0), *1 mM DTT, *5 µg/ml Leupeptin, *0.2 mM PMSF, *5 µg/ml Aprotinin, *1 mM Na Vanadate, *1 mM NaF (*add before use)]，將細胞 pellet 均勻打散置於冰上作用 20 mins，接著以超高速離心 55000 rpm、4°C、30 mins，收集上清液，以 Bradford 的方法測量

蛋白質溶液，在波長 595 nm 下的吸光值，換算成蛋白質濃度 (g/l)
[以一系列已知濃度的 BSA 做成之 standard curve 換算蛋白質濃
度。以每個 eppendorf tube 50 g 的蛋白質分裝並用 RIPA buffer 調整
成相同體積，接著再加入調整完體積的蛋白質溶液 1/3 量的 4 X
protein loading dye (8% SDS，0.04% Serva blue R-250，40%
glycerol，200 mM Tris pH 6.8，10% 2-mercaptoethanol)，以 95°C
乾浴加熱變性 10 mins 後，即可置於-80°C 中保存。

2. 聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE Assay)

將蛋白質依分子量分離利用 SDS-PAGE，首先配製 1.5 mm 厚
的 discontinuous acrylamide gel，gel 分上下兩層，下層 separating gel
其 acrylamide 的百分比視分析蛋白質分子量而定，上層的 stacking
gel 則含 4% acrylamide。配製完成的膠體放置於電泳槽內，加入
電泳緩衝液 (running buffer: 25 mM Tris，192 mM glycine，0.1%
SDS)。接著將萃取出來的蛋白質與 4 X protein loading dye 混合液再
以 95°C 乾浴加熱變性 10 mins，冰浴冷卻後離心。將各 sample 及
標示標準分子量的 Multimaker 依序注入膠體的孔槽中，通以電壓
80 Volts，待樣品通過 stacking gel 後電壓調整為 100 Volts，當 serva
blue R-250 的 dye 跑到膠片底部或視其需要，即可將電源關閉。

3. 西方轉漬法 (western blot) ⁽⁵⁰⁾

將 PVDF membrane 浸於 methanol 數秒後以 Mill-Q 水浸濕，接著裁好的濾紙與 membrane 先浸泡在 transfer buffer (50 mM tris，40 mM glycine，0.375% SDS，pH 9.0—9.4; 20% methanol) 中。裁下電泳膠中所要轉漬的區域後，亦浸泡於 transfer buffer 中。轉印石墨板之正極板以 transfer buffer 潤濕後，依序重疊平鋪 4 張濾紙、membrane、gel、4 張濾紙，最後蓋上以 transfer buffer 潤濕的負極石磨板，設定電流 (電流=濾紙面積 X 9/7 X 疊數)，通電流經 1 hr 又 10 mins 後將 membrane 取出，浸泡於 5% non-fat milk/TBST 中，於室溫下搖晃至少 30 mins。以 TBST buffer (24.22 g Tris，87.75 g NaCl，10 ml Tween 20，加水調到 1 L) 清洗 membrane 10 mins 三次，加入一級抗體，並置於 4°C 下作用一天。

隔日先以 TBST buffer 清洗 membrane 10 mins 三次，加入二級抗體，使其在室溫下搖晃作用 1 hr 之後，再用 TBST buffer 清洗 10 mins 三次，接著在暗房中將 membrane 與 ECL (enhanced chemi-luminescence) 反應後，裝於透明塑膠袋內並置於壓片夾中，以 X-ray film 感光顯影，再以自動沖片機沖片。

五、蛋白質激酶活性分析 (Kinase Activity Assay) ⁽⁷⁵⁾

將細胞用冰的 PBS 洗二次後用刮棒刮下，於 4°C 下 5000 rpm

離心 5 mins，倒掉上清液並用棉棒將多餘的水吸乾，加入適量的 lysis buffer (RIPA butter : Tris buffer=1 : 1，*200 μ M PMSF，*20 μ l/ml Leupeptin，*1 mM NaF，*1 mM Sodium Vanadate) (*add before used)，依照上述萃取蛋白質的步驟，取定量蛋白質 (250-350 μ g)以 Tris buffer 調整體積到 250 或 300 μ l。蛋白質溶液加入 4 μ l 的 antibody 以及 30 μ l protein A sepharose 後，在 4°C 冰箱內旋轉作用一天。

次日混合液以 7000 rpm，4°C 離心 10 mins，吸掉上清液後，再加入 400 μ l buffer I 【20 mM Tris (pH 7.4)，0.5 M NaCl】清洗 3 次，接著 buffer II [20 mM Tris (pH 7.4)，0.5 M DTT，20 μ g/ml Leupeptin，20 μ M PMSF，1 mM Sodium Vanadate，1 mM NaF) 清洗 1 次，每次清洗於 4°C 下以 7000 rpm 離心 5 mins，完成後吸掉上清液。

接著每管 sample 加入 15 μ l reaction mixture [50 mM Tris (pH 7.4)，10 mM $MgCl_2$ ，0.5 mM DTT，5 μ M ATP，1 μ g/ μ l Histone H1、RB protein、MBP or c-Jun，2 μ Ci γ -32 p ATP] 在 37°C 作用 20 mins 之後，加入 4 X protein loading dye 在 95°C 下加熱變性 15 mins，將 sample 離心後，注入 12.5% SDS-PAGE gel 進行蛋白質電泳，待 Serva blue R-250 的 dye 跑到膠片底部，即可將電源關閉。依

照西方轉漬法的步驟，將蛋白質轉印到 PVDF membrane 後，將 membrane 裝於透明塑膠袋內並置於片夾中，在暗房中以 X-ray film 直接感光顯影，再以自動沖片機沖片。

六、細胞內分子之螢光染色 (Intracellular fluorescence staining)

1. 懸浮或漂起的細胞：

收集細胞培養液以 3600 rpm 離心 5 mins，沉降之細胞以含有 2 mM EDTA 的 PBS (Phosphate buffer saline) 溶液清洗後再離心，然後細胞以 75% ethanol 置於 -20°C 固定 1 hr，再以 PBS 清洗離心，倒掉上清液，加入 0.1% Triton X-100 in PBS 在室溫下處理 30 mins 後重複清洗離心的步驟。加入 1 µg/ml DAPI 置黑暗中染色 1 hr，最後經 2 次以上的清洗去除多餘的染劑後加入少許 PBS 使細胞懸浮其中，將懸浮液倒在培養盤中於螢光顯微鏡下觀察、拍照。

2. 貼附在培養皿的細胞：

附著在培養盤之細胞以 PBS 清洗後，用 75% ethanol 在 -20°C 下固定 1 hr，再以 0.1% Triton X-100 in PBS 處理 30 mins 使細胞膜產生孔隙得以讓染劑進入。30 mins 後以 PBS 清洗後加入 DAPI 染劑在黑暗中染色 1 hr，以 PBS 清洗多餘染劑之後置螢光顯微鏡下觀察、照相。

七、DNA 的萃取和電泳分析

收集細胞以 3600 rpm 室溫下離心 10 mins，沈降下來的細胞以 PBS 清洗後再離心。倒掉上清液加入 800 μ l 細胞溶解液 (extraction buffer : Tris 50 mM , EDTA 10 mM , Triton X-100 0.3%) 置冰上作用 20-30 mins，加入 20 μ l RNase 於 55°C 水浴作用 30 mins 後再加入 20 μ l proteinase K 置 55°C 水浴 10 mins，快速離心後取上清液以等體積的 phenol 萃取 1 次，chloroform 萃取 2 次，依次將細胞溶出液與有機溶劑充分混合均勻，離心 5 mins 後，收集水層並加入 10% 體積 NaOAc，再加入 2.5 倍體積冰冷的 100% ethanol 置 -20°C 沈降一夜。沈降完畢後以 12,000 rpm 離心 20 mins，倒掉上清液，以棉籤將管壁拭乾，加入 TE buffer (10 mM Tris, pH 7.0, 1 mM EDTA) 混合均勻後，置 65°C 水浴 1 hr 使之完全溶解。取 5 μ l 稀釋 100 倍，在波長 260 nm 下測定吸光值，計算核酸濃度 (μ g/ml)。取樣品 10 μ g DNA 加 2 μ l 的 10 x DNA loading dye 並置 65°C 水浴 1 hr，配製 2% agarose gel (2 g agarose in 100ml 0.5 X TBE)，最後將樣品 DNA 注入電泳膠孔槽，以 0.5 X TBE buffer 【0.5 X TBE buffer containing: Tris 5.4 g, boric acid 2.75 g , 2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)】為電泳緩衝液，電壓 25 Volts 跑 16-18 hrs。

八、凋亡細胞之偵測-TUNEL 分析

染色體斷裂為細胞凋亡的普遍現象，造成許多 DNA 端 3'OH 的暴露。DNA 端 3'OH 可被量化，以偵測細胞凋亡，而不需溶解細胞。

1. 細胞用 paraformaldehyde 固定在 PBS 中，接著用乙醇固定。
2. 細胞清洗後在 37°C 緩衝液與 TdT enzyme (terminal deoxynucleotidyl transferase) 與 Br-dUTP (bromodeoxyuridine triphosphate) 反應 60 mins。在這過程中，bromodeoxyuridine 結合進入 3'DNA 端。
3. 在 bromodeoxyuridine 處理後，標示的細胞徹底的沖洗後與 bromodeoxyuridin 的抗體 FITC (fluorescein isothiocyanate) 培養 30 mins。FITC 標示的 anti-bromodeoxyuridine 抗體指出 3'自由端的數目。細胞的 RNA 被消化與所有的 DNA 被含 RNase A plus propidium iodide 染色。以 propidium iodide 對細胞染色用來檢測細胞 DNA 的總量。
4. 著色的細胞用 flow cytometry 分析
flowcytometer 用 argon laser 發出 488 nm 的光以分析 FITC 與 propidium iodide 信號。FITC 在 520 nm 波長顯示螢光，propidium iodide 在 623 nm 波長顯示螢光，然而，FITC 與 propidium iodide

staining 只能觀察單一樣品。

九、caspase activity assay (caspase 活性分析)

caspase 的活性以原廠的提供步驟進行。簡述之，即細胞溶液 (100 μg 總蛋白) 加入反應混合物 (最後容量 50 μl) 內含螢光氨基酸物質為 caspase 的分解基質 (即 caspase-1 (YVAD-AFC), caspase-3 (DEVD-AFC), caspase-8 (IETD-AFC) 與 caspase-9 (LEHD-AFC) 的反應基質 (substrates)。此反應在 37°C 中作用 2 hrs。螢光用 fluorescence microplate reader (excitation wavelength, 400 nm; emission wavelength, 505 nm) 偵測。

十、統計分析 (statical analysis)

所有資料於此報告中以三個獨立的實驗後以 mean \pm SD 評估。統計誤差以 Student's *t*-test, 其 p 值設在 *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ 。

第四章 結果

第一節 Rh2 對肺腺癌細胞的抑制增殖作用

三種人類肺癌細胞株 A549 (肺腺癌細胞)、CH27 (鱗狀細胞癌)、H460 (大細胞癌)以每孔 1×10^5 的細胞密度植入 12 孔的培養盤中，分別以 0、3 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 的 Rh2 處理 72 hrs。每二天重新更新含有藥劑的培養液，分別於給藥的 8、16、24、48、72 hrs 後，以 Trypan blue dye 染色，利用血清計數器計算出確實的細胞數目，而得一細胞生長的曲線圖 (圖 4-1)。由圖 4-1 得知對三株肺癌細胞株均有顯著且相近的生長抑制作用，隨著劑量的增加及作用時間的加長，Rh2 對肺癌細胞的抑制增殖作用愈強，呈現劑量-時間依存效應 (dose-and time-dependent response)。細胞在處理 10 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度下經過 16 hrs 即有明顯的生長抑制現象。30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2 經 24 hrs 的培養發現細胞的增殖現象幾乎完全的被抑制，48 hrs 之後的培養發現細胞的數目明顯減少，有漂浮死亡的細胞出現，到了 72 hrs 肺癌細胞幾乎全數死亡。

於顯微鏡下觀察三種人類肺癌細胞株 A549 (肺腺癌細胞)、CH27 (鱗狀細胞癌)、H460 (大細胞癌)處理 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2 後之形態變化，發現給藥 8, 16, 24 hrs 可看出處理組的生長受到抑制，48 hrs 後細胞的數目明顯少於未處理藥物之對照組 (圖 4-2)，除了細胞的數目減少之

外細胞的形態 (morphology)也有所不同，細胞變的較皺縮，甚至有細胞無法貼附在培養皿上而飄浮起來。

由上面的結果得知 Rh2 對肺腺癌細胞有抑制增殖作用，這樣的作用是否會對正常的細胞也會造成影響，於是本實驗取大鼠的肝臟星狀細胞 (rat hepatic stellate cells)、內皮細胞 (rat endothelial cells)及人類肺纖維細胞 (WI-38 human lung fibroblast)當作正常細胞，分別未處理及處理 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2，培養 0-6 days，Trypan blue dye 染色後以血清計數器計算細胞數目。結果發現 Rh2 會抑制肺腺癌細胞株的增殖，且長時間處理會造成細胞死亡，但對這三株正常細胞的生長會抑制，但並不會造成正常細胞的死亡 (圖 4-3)。

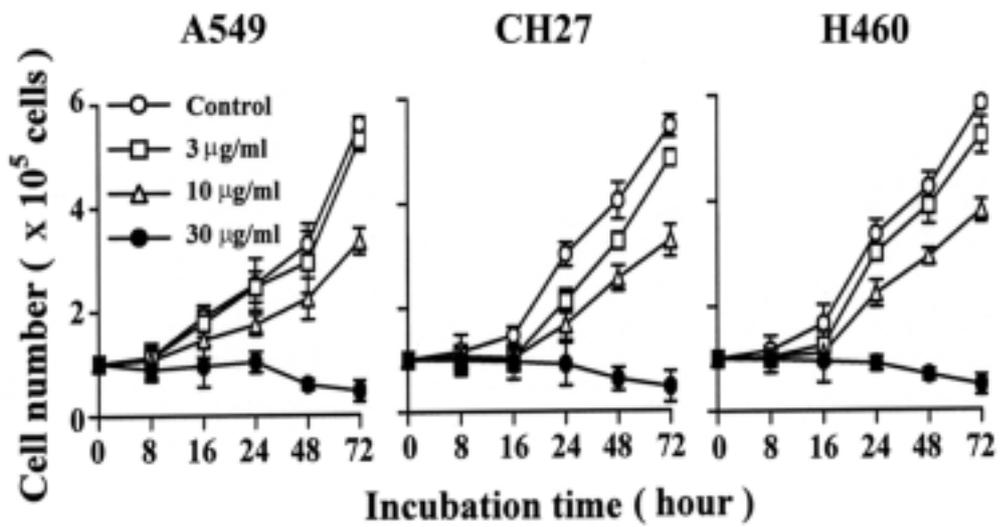


圖 4-1 Rh2 抑制肺腺癌細胞的增殖

三種肺癌細胞 (A549, CH27, H460) 分別處理不同濃度的 Rh2 (0, 3, 10, 30 μg/ml), 0, 8, 16, 24, 48 及 72 hrs 後以 Trypan blue dye 染色, 用血清計數器直接計數癌細胞的數目。隨著劑量的增加及作用時間的加長, Rh2 對肺癌細胞的抑制增殖作用愈強, 呈現劑量-時間依存效應 (dose-and time-dependent response)。

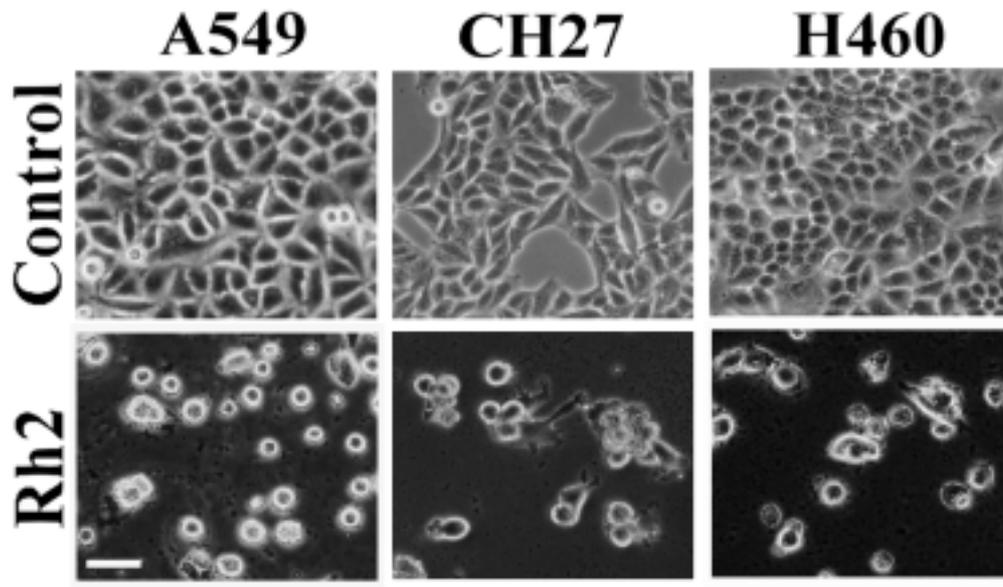


圖 4-2 Rh2 造成癌細胞形態上的改變

三種肺癌細胞 (A549, CH27, H460) 分別未處理及給予 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2, 48 hrs 後在顯微鏡下觀察細胞的形態 (morphology), 下排三個圖為 Rh2 處理組, 細胞的數目減少且細胞的外形也有改變--細胞較皺縮。此圖為顯微鏡放大倍率 100 倍; scale bar, 20 μm 。

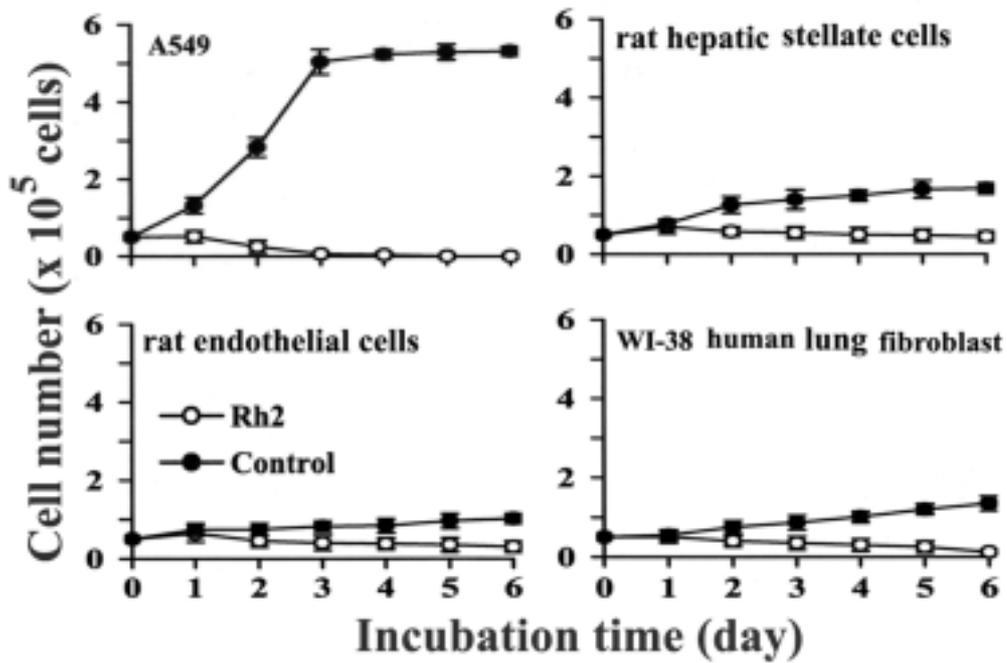


圖 4-3 正常細胞對 Rh2 較具抗性

取大鼠的肝臟星狀細胞 (rat hepatic stellate cells)、內皮細胞 (rat endothelial cells)及人類肺纖維細胞 (WI-38 human lung fibroblast)當作正常細胞，分別未處理及處理 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2，培養 0-6 days，Trypan blue dye 染色後以血清計數器計算細胞數目。結果發現同樣濃度之 Rh2 會顯著抑制肺腺癌細胞的增殖，但對正常細胞存活之影響不大。

第二節 Rh2 使肺腺癌細胞週期停滯在 G1 期

過去的研究明確的指出，細胞的增生與分裂是遵循著一套規律的法則稱之為細胞週期，整個週期可分為 G1, S, G2 及 M 期，由上述實驗結果得知 Rh2 會抑制肺腺癌細胞的增殖，此現象有可能是透過阻止細胞週期的進行，因此利用流式細胞分析儀 (flow cytometry) 分析 Rh2 是否會影響肺癌細胞週期的進行。

細胞分別未處理及處理 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2，經過 16, 24 及 48 hrs 後，由 Flow cytometry 的圖形來看細胞週期的分布情形。16 hrs 的 Rh2 處理組 G1 期的細胞數目占 75.6%，比未處理組的 58.4% 來的高，而 24 hrs 及 48 hrs 處理組的 S 期及 G2/M 期所佔的比例皆比未處理組低 (圖 4-4)，此結果顯示 Rh2 處理後細胞無法進入 S 期而使細胞週期停滯在 G1 期。

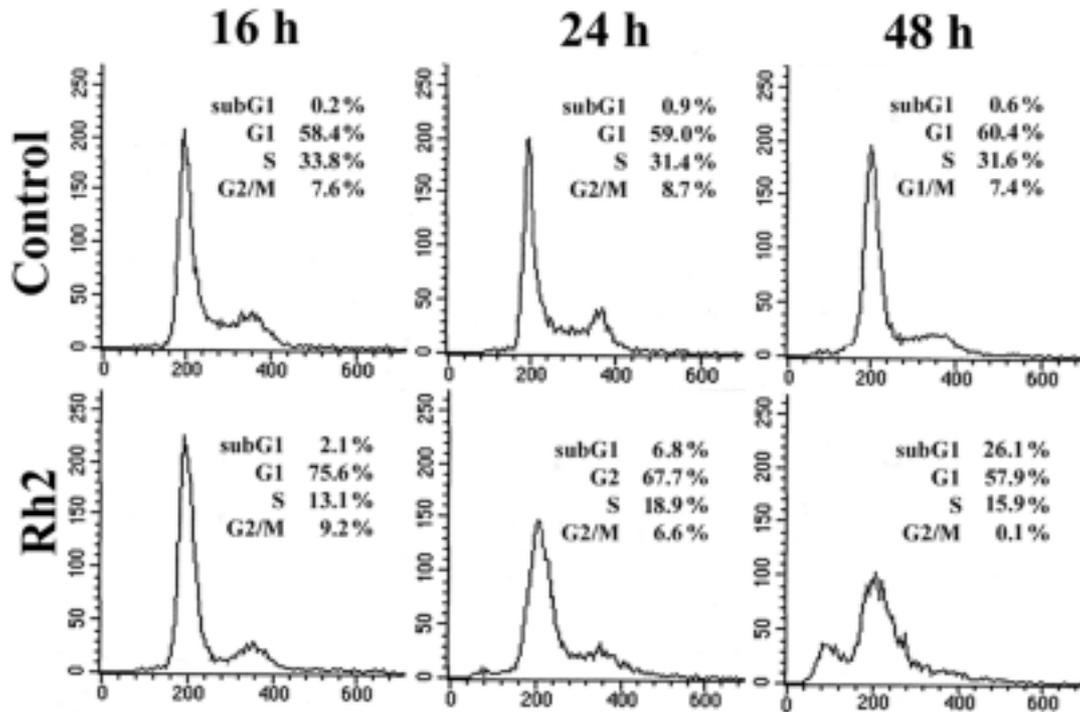


圖 4-4 Rh2 使細胞週期停滯在 G1 期

細胞分別未處理及處理 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2，經過 16, 24, 及 48 hrs 後，細胞以 propidium iodide 染色，用流式細胞分析儀 (flow cytometry) 來分析細胞週期分布情形。由 Flow cytometry 的 hisrogram 圖形來看 16 hrs 的 Rh2 處理組 G1 期的細胞數目占 75.6%，比未處理組的 58.4% 來的高，所以 Rh2 使細胞週期停滯在 G1 期。

第三節 Rh2 調控細胞週期相關分子

一般而言細胞週期的進行與否，是靠著許多分子的參與，彼此間訊息的傳遞環環相扣且錯綜複雜，有時因為一個分子表現量的差異，可能就產生截然不同的結果，Rh2 使肺腺癌細胞週期停滯在 G1 期，有可能是因為 Rh2 調控了與 G1 期相關分子的表現，所以本實驗利用西方墨點法偵測 G1 期相關分子的表現。

Cyclin 與 Cdk 是細胞週期進行的重要調控因子，參與 G1 早中期的調控分子是 Cyclin-D1, -D2, -D3 與 Cdk-4, -6，參與 G1 晚期的調控分子是 Cyclin-E 與 Cdk-2，肺腺癌細胞經 Rh2 處理與未處理，分別作用 8, 16, 24 及 48 hrs，作用 16 hrs 之後發現 Cyclin-D1, -E 及 Cdk-6 表現量有下降的情形 (圖 4-5)，其結果導致細胞週期停滯在 G1 期。

另一方面，本實驗亦探討抑制細胞週期進行的 CdkI 分子表現，以西方墨點法偵測 CdkI (p15, p16, p21, p27) 分子表現，p53 是一轉錄因子，參與了包括細胞 DNA 的修復、細胞週期的停止與細胞凋亡等的生理反應，CdkI 中的 p21 為 p53 主要下游調控分子，p53 的活化會使 p21 於細胞內的表現量上升導致細胞週期的停滯。

pRb 家族有 pRb1/p110，pRb2/p130，p107，Rb protein 被上游的 Cyclin /Cdk 磷酸化時就會與 E2F 脫離，使 E2F 具活性。但是 pRb1/p110 與 pRb2/p130，會與不同的 E2F 結合而扮演不同的角色，pRb1/p110

為 transcription activator，pRb2/p130 為 transcription repressors。

本實驗 Western blot 觀察 Rh2 對調控細胞週期之 CdkI (p15, p16, p21, p27)，p53 及 pRb (pRb1, pRb2)分子的作用情形。處理及未處理 Rh2，分別作用 8, 16, 24 及 48 hrs。結果發現 CdkI (p15, p16 及 p27) 表現量沒有變化，p21，p53 表現量有下降的情形，pRb2 表現量有上升的情形 (圖 4-6)。

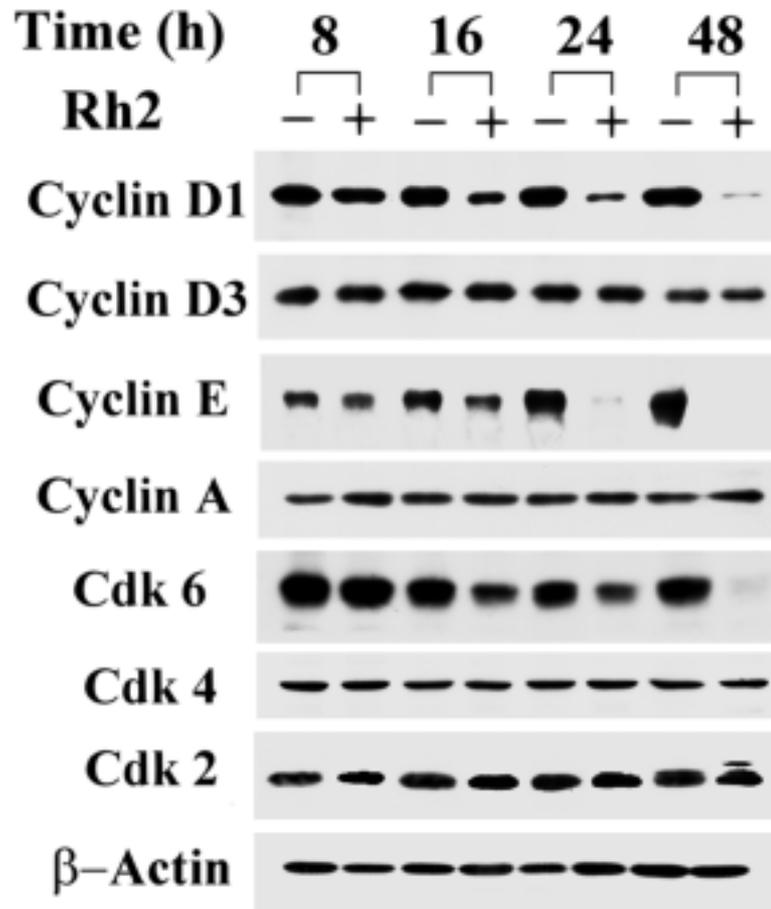


圖 4-5 Rh2 調控細胞週期之 Cyclin 及 Cdk 分子

以 Western blot 分析 Rh2 調控細胞週期之 Cyclin, Cdk 這兩類分子的作用情形。處理及未處理 Rh2，分別作用 8, 16, 24 及 48 hrs。結果發現作用 16 hrs 之後 Cyclin-D1, -E, 及 Cdk-6 表現量有下降的情形。其中 β -Actin 為 internal control。

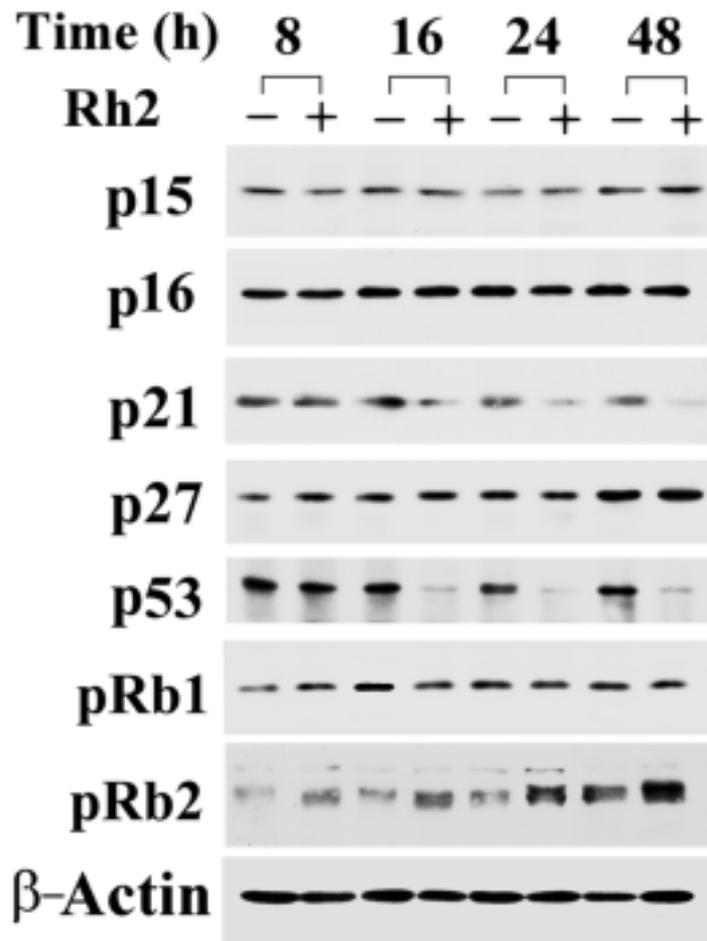


圖 4-6 Rh2 調控細胞週期之 CdkI，p53 及 pRb 分子

以 Western blot 分析 Rh2 對調控細胞週期之 CdkI (p15, p16, p21 及 p27)，p53 及 pRb (pRb1, pRb2) 分子。處理及未處理 Rh2，分別作用 8, 16, 24 及 48 hrs。結果發現 CdkI (p15, p16 及 p27) 沒有變化，p21、p53 表現量有下降的情形，pRb2 表現量有上升的情形。

第四節 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡

肺腺癌 A549 細胞以 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2 處理 48 hrs 後，用位相差顯微鏡觀察顯示細胞質及核濃縮，細胞圓起飄浮於培養盤中 (圖 4-1 右上圖)，顯示細胞死亡。我們進一步檢視細胞死亡是否經由凋亡路徑，我們以 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) assay 將 DNA 端 3'OH 端接上螢光，在螢光顯微鏡下觀察，與對照組 (control) 比較，處理組螢光明顯增加，顯示 Rh2 造成肺腺癌細胞 DNA fragmentation 而造成凋亡 (圖 4-7 右下圖)。DNA 電泳分析再確認 Rh2 處理之細胞是死於細胞凋亡之作用，肺腺癌 A549 細胞以 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2 處理 72 hrs 後，萃取 DNA 跑電泳 (Lane 2)，與對照組 (Lane 1) 相比較，肺腺癌細胞的 DNA 有斷裂 (fragmentation) 的情形，其斷裂的長度大約為 180-200 bp 的倍率 (圖 4-8)。所以這兩個實驗都說明了 Rh2 會造成肺腺癌細胞的 DNA 裂解而使細胞凋亡。

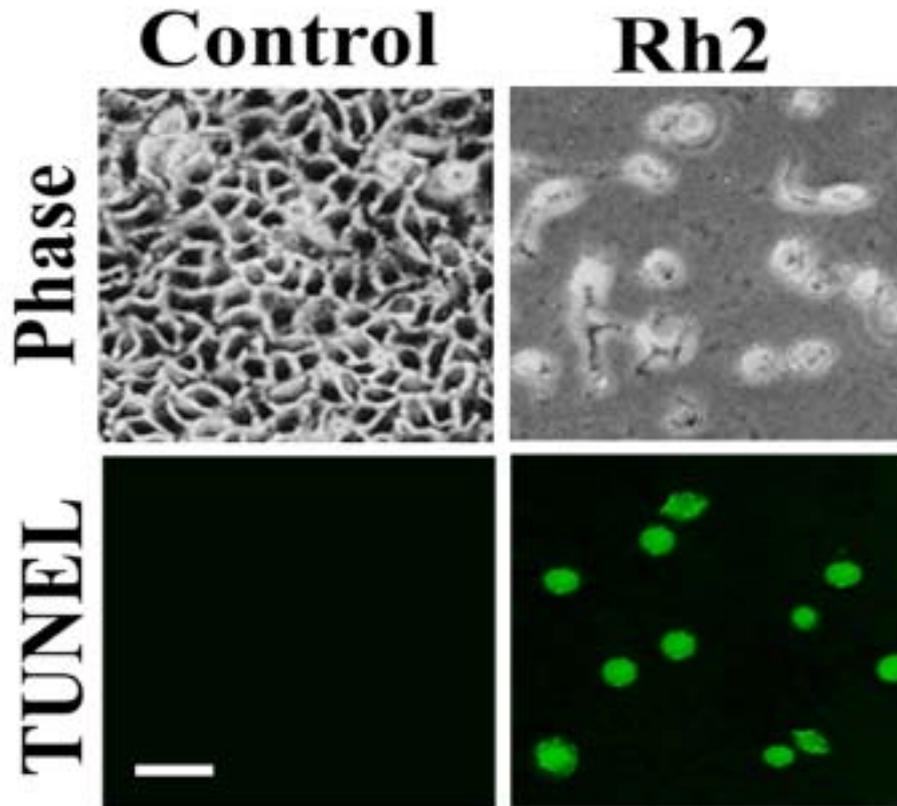


圖 4-7 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡-TUNEL Assay

肺腺癌 A549 細胞以 $30\mu\text{g/ml}$ Rh2 處理 48 hrs 後，用 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) assay 將 DNA 端 3'OH 端接上螢光，在螢光顯微鏡下觀察，與 control 組相比較螢光明顯增加，顯示 Rh2 造成肺腺癌細胞 DNA 斷裂。

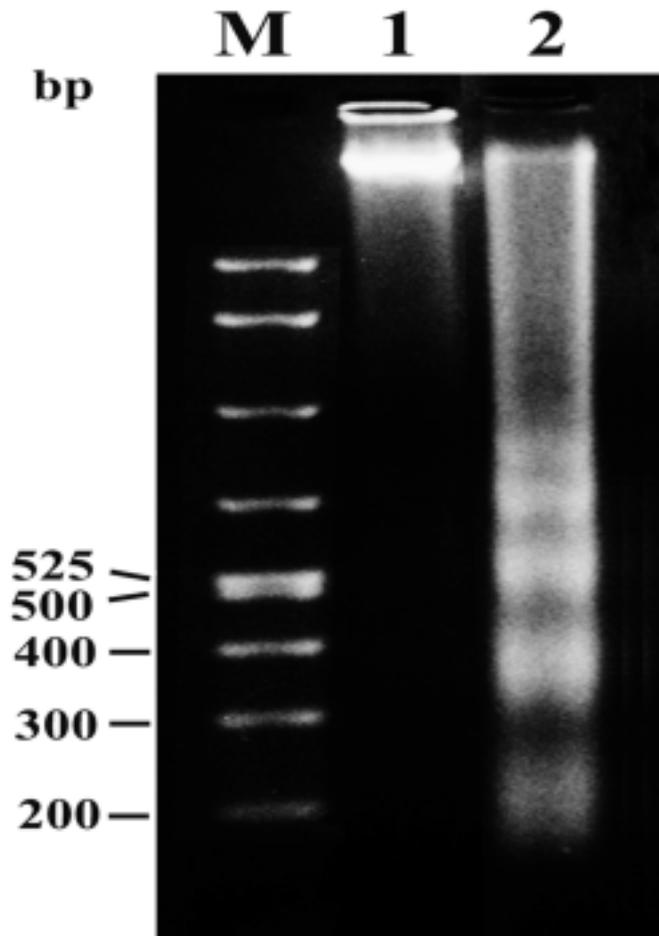


圖 4-8 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡-DNA fragmentation analysis

Lane 2: 肺腺癌 A549 細胞以 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2 處理 72 hrs 後，萃取 DNA 跑電泳 (2% agarose gel)，與對照組 (Lane 1) 相比較，肺腺癌細胞的 DNA 斷裂 (fragmentation) 成 180-200 bp 的倍率。Lane M 為 DNA size marker。

第五節 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡之分子機轉

細胞進行凋亡有許多路徑，其中較有名以及研究較透徹的為粒腺體路徑及細胞膜上死亡受體路徑。粒腺體中的 Bcl-2 家族蛋白質在細胞凋亡的控制過程中扮演相當重要的角色，這一群蛋白質可分為促進細胞凋亡的分子 (pro-apoptotic molecules) 及抑制細胞凋亡的分子 (antiapoptotic molecules) 兩大類。

實驗由 TUNEL assay 及 DNA fragmentation analysis 的電泳表現知道 Rh2 會造成肺腺癌細胞的凋亡，為了進一步了解所造成的凋亡路徑為何，首先實驗分析 Rh2 是否會對 Bcl-2 家族造成影響，肺腺癌細胞分別未處理及處理 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2，經過 24, 36, 48 及 72 hrs 後，以 Western blot 來分析 Bcl-2 家族中相關分子 (Bcl-2, Bcl-X_L, Bax 及 Bak) 的表現。其中 Bcl-2, Bcl-X_L 是抑制凋亡分子；Bax 及 Bak 是促進凋亡分子。結果 Bcl-2 家族中相關分子未處理及處理 Rh2 其表現量皆無變化，顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞的凋亡路徑為 Bcl-2 independent (圖 4-9)。我們亦藉由肺腺癌細胞載入 adenoviral 及 adeno-Bcl-2 viral vector 使 Bcl-2 過度表現來看結果，發現 Bcl-2 的過度表現並不會影響 Rh2 所造成的癌細胞死亡情形，因此證實 Bcl-2 家族並沒有參與 Rh2 誘發的凋亡路徑 (圖 4-10)。

本實驗進一步觀察 Rh2 是否會對細胞膜上死亡受體路徑造成影

響，肺腺癌細胞分別未處理及處理 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2，經過 24, 36, 48 及 72 hrs 後，以 Western blot 來分析細胞膜凋亡路徑相關分子[FasL / Fas，DR4 (TRAIL-R1)，DR5 (TRAIL-R2)，TNF-RI 及 TNF-RII]的表現。結果 DR4 (TRAIL-R1)的表現量增加，顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞的凋亡路徑與細胞膜上之 DR4 路徑有關 (圖 4-11)。同樣為了證實這個論點，實驗加入抑制 DR4 表現的抑制劑 (DR4:Fc)來探討 Rh2 所造成的凋亡情形，當加入 30, 100 及 300 ng/ml 的 DR4:Fc，Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的情形會減弱，且抑制劑的劑量增加，抑制的效果越強 (dose-dependent)，P 值分別為 0.0024，0.0008 及 0.0002，具統計學上極顯著的差異，更一步證實了 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡路徑與 DR4 有關 (圖 4-12)。

Rh2 會誘導肺腺癌細胞凋亡，無論是走粒腺體路徑或細胞膜上死亡受體路徑都會活化割蛋白酶 (caspase)，所以進一步探討 Rh2 活化了哪些 caspase 進而促使細胞凋亡。30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2 作用肺腺癌細胞 24, 36, 48 及 72 hrs 後，以 caspase activity assay kit 測 caspase 的活性，結果 caspase-3, -8 及 -2 活性有上升，caspase-6 及 -9 活性沒有多大改變 (圖 4-13)。因此進一步加入 caspase 抑制劑觀察是否會抑制 Rh2 的作用，將肺腺癌細胞細胞先加入某一種 caspase 抑制劑 (100 μM)，2 hrs 後再加入 Rh2，72 hrs 後觀察 Rh2 造成的凋亡情形。結果發現加入

caspase-2, -3, -8 抑制劑者，會減弱 Rh2 所造成的凋亡，其抑制的程度分別為 30%, 48%及 65%，所以又進一步證實 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡與 caspase-2, -3 及-8 有關 (圖 4-14)。實驗又假設 Rh2 是先活化了 caspase-8，再活化其他的 caspase，因此將肺腺癌細胞加入 Rh2 合併 100 μ M caspase-8 的抑制劑 (z-IETD-fmk)後，以 caspase activity assay kit 觀察 caspase-2, -3, -8 的活性表現。其結果與單純加入 Rh2 者相比較，caspase-2, -3, -8 三者的活性皆下降。因此，Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的路徑可能是先誘發 caspase-8 活化，再誘發 caspase-2, -3 的活化，所以抑制了 caspase-8 的活化會影響 caspase-2 及-3 的活化 (圖 4-15)。

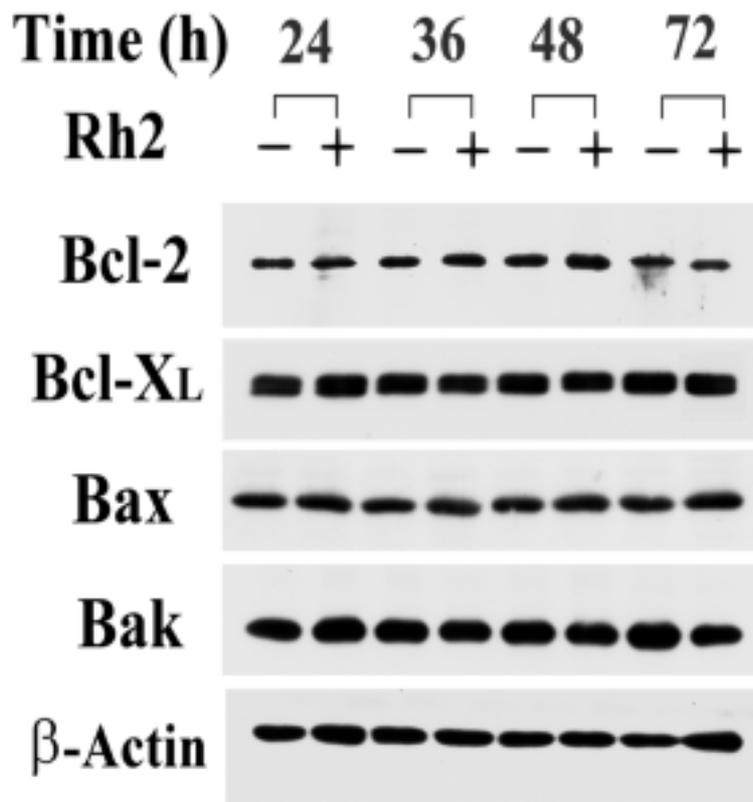


圖 4-9 Bcl-2 家族之分子未參與 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡之路徑

肺腺癌細胞分別未處理及處理 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2，經過 24, 36, 48 及 72 hrs 後，以 Western blot 來分析 Bcl-2 家族中相關分子 (Bcl-2, Bcl-X_L, Bax 及 Bak) 的表現。其中 Bcl-2, Bcl-X_L 是抑制凋亡分子；Bax 及 Bak 是促進凋亡分子。結果 Bcl-2 家族中相關分子未處理及處理 Rh2 其表現量皆無變化，顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的過程中不需要 Bcl-2 家族分子的參與。

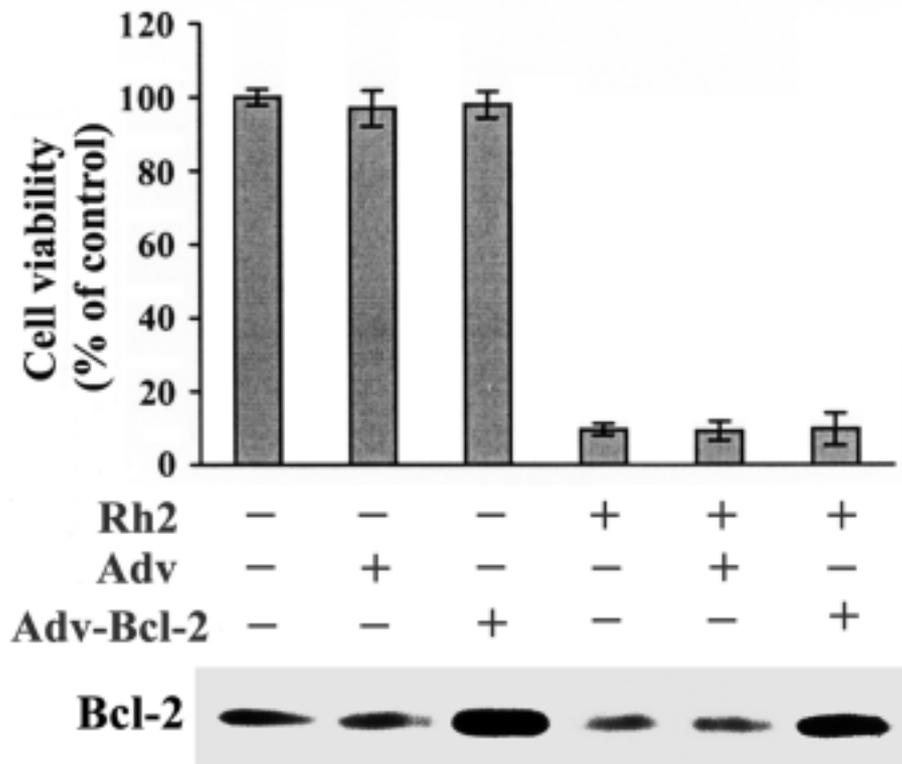


圖 4-10 Bcl-2 家族之分子未參與 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡之路徑

肺腺癌細胞載入 adenoviral 及 adeno-Bcl-2 viral vector 16 hrs 後加入 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2, 72 hrs 後觀察細胞的存活情形。外加 Bcl-2 會使 Bcl-2 過度表現 (見下方 Western blot 圖), 但 Bcl-2 的過度表現並不會影響 Rh2 所造成的凋亡現象。

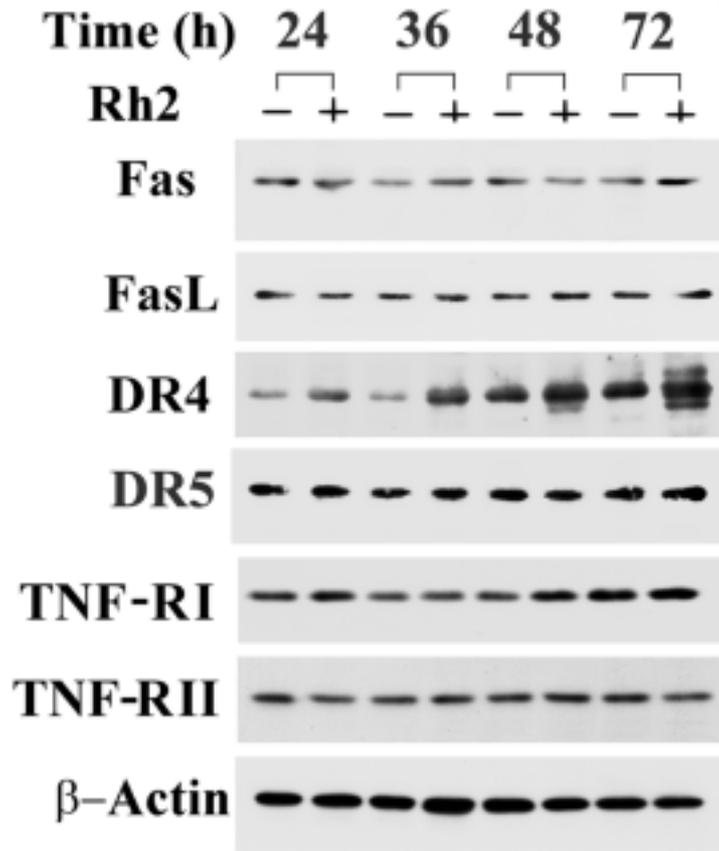


圖 4-11 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡路徑與 DR4 有關

肺腺癌細胞分別未處理及處理 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2，經過 24, 36, 48 及 72 hrs 後，以 Western blot 來分析細胞膜凋亡路徑相關分子 (Fas, FasL, DR4, DR5, TNF-RI 及 TNF-RII) 的表現。結果 DR4 的表現量增加，顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞的凋亡路徑與細胞膜上之 DR4 有關。

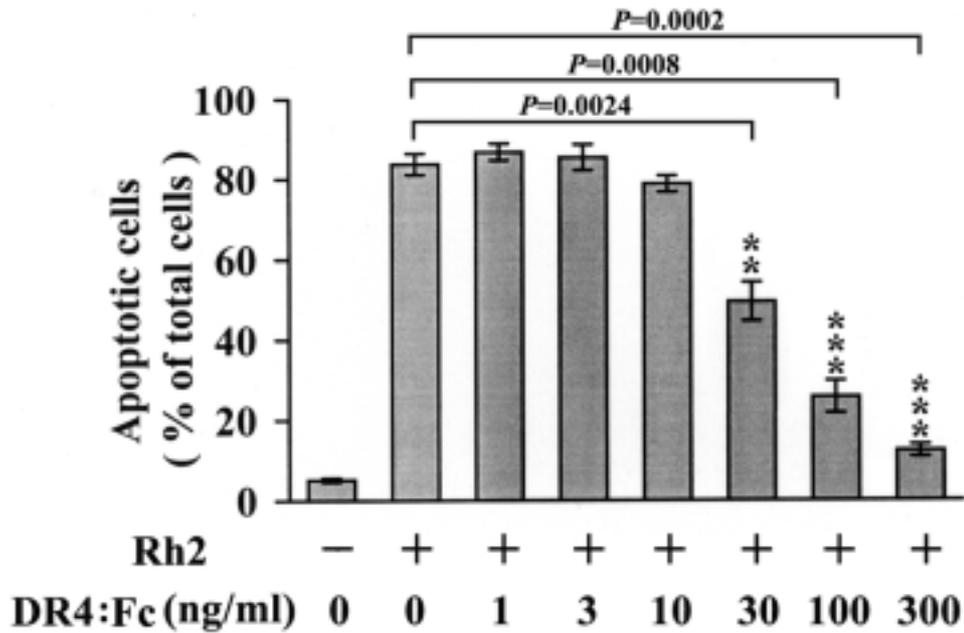


圖 4-12 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡路徑與 DR4 有關

DR4:Fc 為抑制 DR4 表現的抑制劑，當我們加入 30, 100 及 300 ng/ml 的 DR4:Fc，Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的情形會減弱，且抑制劑的劑量越重抑制的效果越強 (dose-dependent)，P 值分別為 0.0024，0.0008 及 0.0002，有極顯著的差異。所以 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡路徑與 DR4 有關。註：Apoptotic cell 是以 TUNEL assay 方式評估。

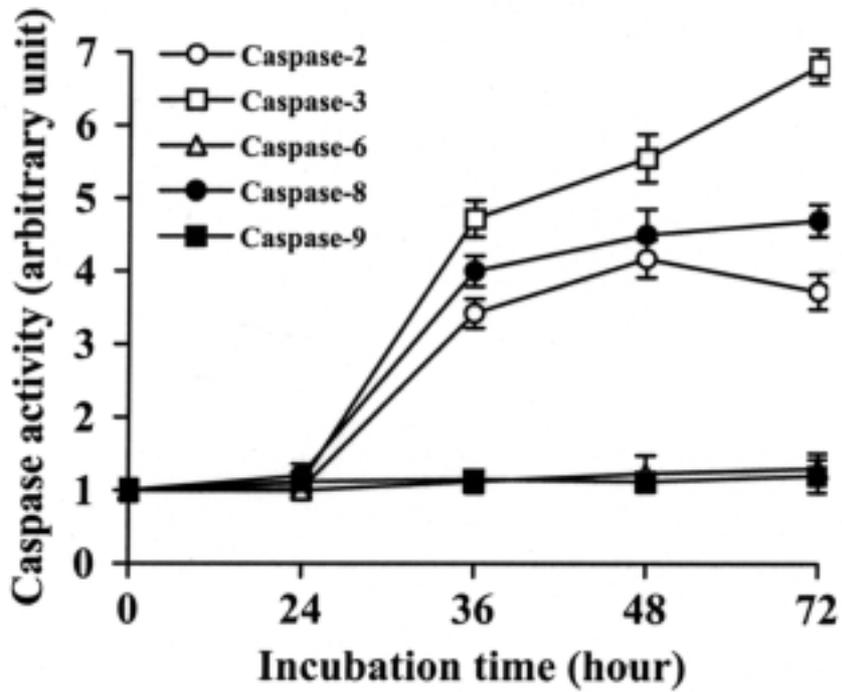


圖 4-13 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡造成創蛋白酶 (caspase)活化

30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2 作用肺腺癌細胞 24, 36, 48 及 72 hrs 後，以 caspase activity assay kit 測 caspase 的活性，結果 caspase-3, -8, -2 活性有上升，caspase-6, -9 活性沒有多大改變。

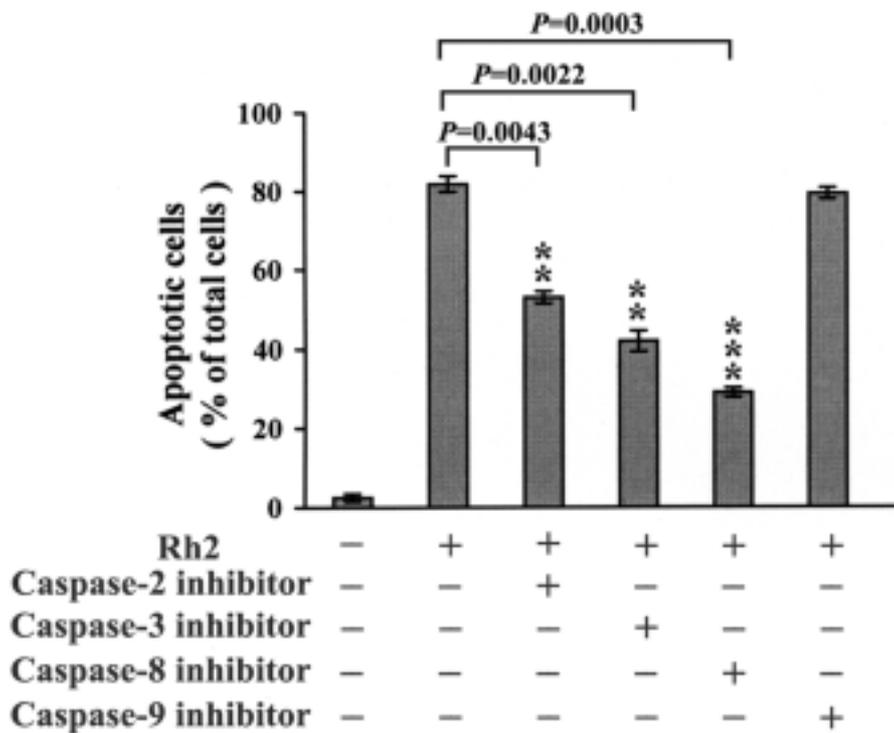


圖 4-14 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡造成創蛋白酶 (caspase)活化

肺腺癌細胞先加入某一種 caspase 抑制劑 (100 μ M)，2 hrs 後再加入 Rh2，72 hrs 後再分析 Rh2 造成的凋亡情形。結果發現加入 caspase-2, -3, -8 抑制劑者，會抑制 Rh2 所造成的凋亡，其抑制的程度分別為 30%，48%及 65%，所以又進一步證實 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡與 caspase-2, -3 及-8 有關。caspase-2 的抑制劑為 z-VDVAD-fmk；caspase-3 的抑制劑為 z-DEVD-fmk；caspase-8 的抑制劑為 z-IETD-fmk；caspase-9 的抑制劑為 z-LEHD-fmk。

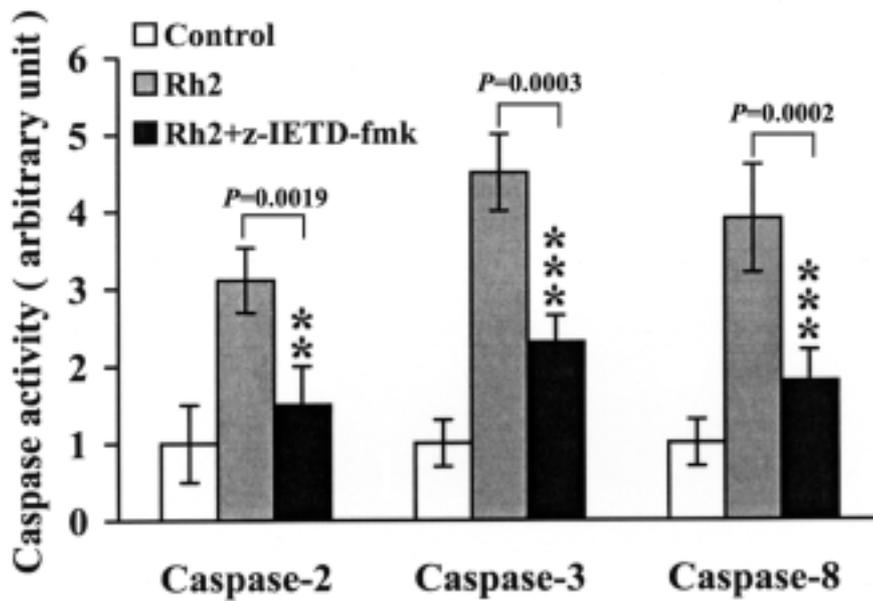


圖 4-15 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡是經由 caspase-8 的活化

肺腺癌細胞加入 Rh2 合併 100 μ M caspase-8 的抑制劑 (z-IETD-fmk) 後，以 caspase activity assay kit 看 caspase-2, -3, -8 的活性表現，與單純加入 Rh2 者相比較，caspase-2, -3, -8 三者的活性皆下降。因此，Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的路徑可能是先誘發 caspase-8 活化，再誘發 caspase-2, -3 的活化，所以抑制了 caspase-8 的活性會影響 caspase-2 及-3 的活性。

第五章 討論

一、 Rh2 造成肺腺癌細胞生長週期停滯及凋亡

Rh2 有抗癌的作用它不僅造成肺腺癌細胞生長週期停滯，也促使肺腺癌細胞凋亡，在 Rh2 作用於肺腺癌細胞的生長曲線圖中 (圖 4-1)，可以看出在我們處理的不同濃度下 Rh2 皆會抑制肺腺癌細胞的生長，其折線圖皆在未處理的折線之下。細胞在處理 10 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 的 Rh2，經過 16 小時有明顯的生長抑制現象。30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2 經 24 小時的培養發現細胞的增殖現象幾乎完全的被抑制，48 小時之後的培養發現細胞的數目下降，細胞死亡的現象發生，到了 72 小時幾乎全數死亡。所以 Rh2 對肺腺癌細胞的作用一開始 (16、24 小時) 可能是造成癌細胞生長週期停滯，之後 (48、72 小時) 會造成癌細胞 apoptosis。

進行 apoptosis 的細胞其形態 (morphology) 會改變，細胞會圓起來、皺縮，死亡的細胞會飄浮於培養皿中，我們在圖 4-2 及圖 4-7 的右上圖都可看到細胞的數目減少，也看到了細胞的這些形態上的改變，所以 Rh2 不僅造成肺腺癌細胞生長週期停滯 (細胞數目不增加)，也促使肺腺癌細胞凋亡。

以 Flow cytometry assay 分析細胞週期分布情形，Rh2 作用後的癌細胞以 Flow cytometry assay 來分析並作出 histogram，16 小時的

Rh2 處理組 G1 期的細胞數目占 75.6%，比未處理組的 58.4% 來的高，而 24 小時及 48 小時處理組的 S 期及 G2/M 期所佔的比例皆比未處理組低 (圖 4-4)，似乎是細胞無法進入 S 期而使細胞週期停滯在 G1 期。除了看到 G1 期的分布較多之外，我們亦在 48 小時明顯的看到 sub-G1 peak，這顯示細胞進行 apoptosis⁽⁷⁶⁾。所以綜合以上這些表現說明了 Rh2 不僅造成肺腺癌細胞 cell cycle arrest，也促使肺腺癌細胞 apoptosis。

二、 Rh2 對調控細胞週期相關分子作用，使細胞週期停滯於 G1 期

調控細胞週期的相關分子非常的多，可大致上分為以下這幾類：

1. Cyclins and Cdks

調控細胞週期的進行主要為 Cyclins 與 Cdks (cyclin-dependent kinases) 兩大家族，單獨的 Cdks 並無磷酸化其下游分子的能力，必須當 Cdks 與 Cyclins 結合形成複合體時，Cdks 才會具有蛋白質激酶的活性，即可磷酸化下游分子；在細胞週期的四個時期中，都有特定促使每一時期進行的 Cyclin-Cdk complexes，G1 期有 Cyclin D-Cdk4/6 complexes 以及 Cyclin E-Cdk2 complexes，S 期有 Cyclin A-Cdk2 complexes，G2 期有 Cyclin B-Cdk1 complexes⁽⁴¹⁻⁴³⁾。

2. Cdk inhibitors and p53

Cdk inhibitors 顧名思義就是抑制 Cdk 活性的分子，CdkIs 主要可分為兩大家族- CIP/KIP 家族與 INK4 家族，CIP/KIP 家族成員有

p21^{CIP1/WAF1/sdi1}、P27^{KIP1}及 p57^{KIP2}；INK 家族則有 p16^{INK4a}、p15^{INK4b}、p18^{INK4C}和 P19^{INK4d}。大致上來說 CIP/KIP 家族會與 Cdk/cyclin 結合使其失去活性；INK4 家族會競爭性的抑制 Cdk-4, -6/cyclin-D。

p53 本身為一轉錄因子 (transcription factor) 平時與 MDM2 protein 結合在一起為不活化型，當細胞 DNA 受到傷害、缺氧 (hypoxia) 或是致癌因子 (oncogene) 活化的形況下，就會誘使 p53 的活化，p53 參與了包括細胞 DNA 的修復、細胞週期的停止與細胞凋亡 (apoptosis) 等的生物反應，比如說 CdkIs 中的 p21^{CIP1/WAF1/sdi1} 為 p53 主要下游調控分子；p53 的活化會使得 p21^{CIP1/WAF1/sdi1} 於細胞內的表現量上升，導致細胞週期的停滯，此外，有關細胞 DNA 修復的 GADD45 和 p53R2 以及細胞凋亡相關的 Bax、NOXA、PUMA 和 p53AIP1 都會受到 p53 的調控⁽⁵¹⁾。

3. pRb and E2F families

pRb (retinoblastoma protein, also called pocket protein) 家族有 PRb pRb1/P110、pRb2/p130 與 p107 三個，E2F (early gene 2 factor) 家族則有 E2F-1 到 E2F-6⁽⁵²⁾，E2F 本身為 transcription factor，平時在與 Rb protein 結合的時候是沒有活性的，但當 Rb protein 被上游的 cyclin/Cdk complexes 磷酸化時，就會與 E2F 脫離，使 E2F 具活性。一般認為，E2F-4, -5 與 pRb2/p130 以及 E2F-6 與 PcG 的結合是在 Go 與 early G1 期時，扮演 transcription repressors 的角色，E2F-1, -2, -3 則作用於 late

G1 與 S 期，為 transcription activators。

Rh2 作用於肺腺癌細胞發現 Cyclin-D1, -E, 及 Cdk-6 表現量有下降的情形 (圖 4-5)，細胞週期 G1 早中期的調控分子是 Cyclin-D1, -D2, -D3 與 Cdk-4, -6，參與晚期的調控分子是 Cyclin-E 與 Cdk-2，Rh2 所造成的 Cyclin-D1, -E, 及 Cdk-6 表現量有下降，是會導致細胞週期停滯在 G1 期，與理論相符。另外值得一提的是由於肺腺癌細胞無 Cyclin-D2 的存在，所以西方墨點法無此分子的表現。

p53 的活化會使得 p21^{CIP1/WAF1/sdi1} 於細胞內的表現量上升，導致細胞週期的停滯，DNA 修復，以及細胞凋亡。但是 Rh2 在 Cdk inhibitors and p53 分子的作用方面，我們見到 p21 與 p53 有下降的情形，這與細胞週期的停滯，以及細胞凋亡結果不符。這說明了細胞與細胞間的訊息傳遞以及細胞內的分子調控機制其實並非是單一的調控，而是複雜的多因素性的 (multiple factor)，不能僅看到一些分子表現就斷定其結果，在生物的世界裏是複雜又多變化的，尚有許多因子是我們所未知的。我們在這裡看到了 p21 與 p53 的下降，但它們的下降並沒有造成細胞週期的影響。

E2F-4, -5 與 pRb2/p130 以及 E2F-6 與 PcG 的結合是在 G0 與 early G1 期時，扮演 transcription repressors 的角色，所以 pRb2 的上升會使細胞週期停滯在 G1 期。

總結 Rh2 對細胞週期的作用，Rh2 使 Cyclin-D1, -E 及 Cdk-6 表現量下降，以及 pRb2 含量的上升，促使細胞週期停滯在 G1 期。

其他學者對於 Rh2 所做的實驗也看到了細胞週期停滯在 G0 或 G1 早期，但在調控細胞週期相關分子方面的研究有些許不同，有的是發現 p27 表現量上升⁽³⁷⁾，有的是發現 p21 表現量上升⁽⁷⁷⁾，也有發現 Rh2 會造成 Cdk-2 下降者⁽³⁹⁾。這樣的差異性有可能是因為癌細胞的種類不同所致，有的是以肝癌細胞株 (SK-HEP-1 cell) 來做實驗^(37,38)，有的則是用 B16 melanoma cell line⁽³⁹⁾，細胞株的種類不同或許調控的分子也會有些許差異。

三、 Rh2 造成肺腺癌細胞的凋亡

細胞凋亡會有形態上的變化也會有 DNA fragmentation 的現象，本實驗從 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) 分析及萃取 DNA 跑電泳，都可發現 Rh2 會造成肺癌細胞的凋亡。在其他許多學者所做的 Rh2 抗癌研究方面，也發現 Rh2 會造成癌細胞凋亡這樣的結果⁽⁷⁸⁻⁸⁵⁾。

Rh2 會造成癌細胞 DNA fragmentation 進而造成細胞凋亡。至於 DNA fragmentation 會斷裂成 180-200 bp 倍率的固定長度的原因，可能是細胞凋亡的過程中基因體是以 domain cleavage 的方式切成 200-300 kb 的斷片，第二期則是 Wyllie 所發現的 DNA laddering，其

具有酵素活性是 fragmentation nuclease 故造成 180-200 bp 倍率的規則斷片。

四、 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡之途徑 (apoptosis pathway)

細胞進行凋亡有許多路徑，其中較有名以及研究較透徹的為粒腺體路徑及細胞膜上死亡受體路徑。在處理 Rh2 後 Bcl-2 家族中相關分子其表現量在 western blot 的圖中皆無變化。若大量表現 Bcl-2 也無法影響 Rh2 造成的凋亡結果，顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞的凋亡路徑與 Bcl-2 家族分子相關性不大 (圖 4-9)。許多其他學者的研究亦看到同樣的結果⁽³⁸⁾，表示 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡之途徑非經由粒腺體及 Bcl-2 家族調控的凋亡路徑。

本實驗發現 Rh2 在誘發肺腺癌細胞凋亡的過程中 DR4 (TRAIL-R1)的表現量增加，顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞的凋亡路徑或許與細胞膜上之 DR4 有關 (圖 4-11)。細胞膜上死亡受體路徑則是經由活化細胞膜上 Fas、TNFR 或 TRAIL-R 等死亡受體，吸引 FADD 與之結合，接著再與 procaspase-8 結合形成 DISC (death-inducing signaling complex)，將 caspase-8 活化後再直接活化 caspase-3，或者 caspase-8 的活化促使 Bcl-2 家族成員 Bid 的裂解，tBid 位移至粒線體，促使粒線體釋放出 cytochrome c 接著活化 caspase-9 和 caspase-3。在臨床上有許多疾病的發生就是經由這條路徑，例如，呼吸性融合病毒

(RSV)是常見的小兒呼吸道感染原，人體清除受 RSV 感染的呼吸道細胞使之凋亡，透過的路徑是經由 TRAIL/DR4, 5 來達成⁽⁸⁶⁾。另外第一型的糖尿病其胰島素的分泌不足可能與 Beta-cell destruction 有關，而 Beta-cell 的死亡路徑可能與 TRAIL death pathway 有關⁽⁸⁷⁾。連慢性胰臟炎也與這條路徑有關⁽⁸⁸⁾。所以在人體中這是一條重要的凋亡路徑也與許多疾病息息相關。

本實驗 Rh2 會造成肺腺癌細胞的凋亡，其依循的是細胞膜上的死亡受體路徑，之後會活化一系列的蛋白酶，由圖 4-13 可看出 caspase-3, -8 及-2 活性有上升，加入三者的抑制劑亦會抑制其活性(圖 4-14)，實驗更進一步將肺腺癌細胞加入 Rh2 合併 caspase-8 的抑制劑 (z-IETD-fmk)後，觀察 caspase-2, -3, -8 的活性表現，其結果與單純加入 Rh2 者相比較，caspase-2, -3, -8 三者的活性皆下降。因此，Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的路徑可能是先誘發 caspase-8，再誘發 caspase-2, -3 的活性上升，所以抑制了 caspase-8 的活性會影響 caspase-2 及-3 的活性(圖 4-15)。這樣的結果與細胞膜上的死亡受體路徑，活化細胞膜上 TRAIL-R 死亡受體，吸引 FADD 與之結合，接著再與 procaspase-8 結合形成 DISC，將 caspase-8 活化後再活化 caspase-3 結果相符。

總結本實驗 Rh2 所造成的凋亡現象：Rh2 所誘發的凋亡路徑並非

粒腺體凋亡路徑而是細胞膜上的死亡受體路徑，Rh2 會使 DR4 (TRAIL-R1)的表現量增加，先誘發 caspase-8，再誘發 caspase-2, -3 的活性上升，使得分解 DNA 的酵素活化，因而裂解 DNA 成片斷，結果便造成肺癌細胞的凋亡。

第六章 結論

Rh2 會造成肺腺癌細胞 cell cycle arrest 及 apoptosis。Rh2 可使細胞週期調控分子 Cyclin-D1, -E 及 Cdk-6 表現量下降，以及 pRb2 含量的上升，促使細胞週期停滯在 G1 期。Rh2 另一方面亦會造成肺腺癌細胞的凋亡現象，其所誘發的凋亡路徑並非粒腺體凋亡路徑而是細胞膜上的死亡受體路徑，Rh2 會使 TRAIL-R1 (DR4) 的表現量增加，先誘發 caspase-8，再誘導 caspase-2, -3 的活性上升，這會使 DNA fragmentation，結果造成肺癌細胞的凋亡 (圖 6-1)。

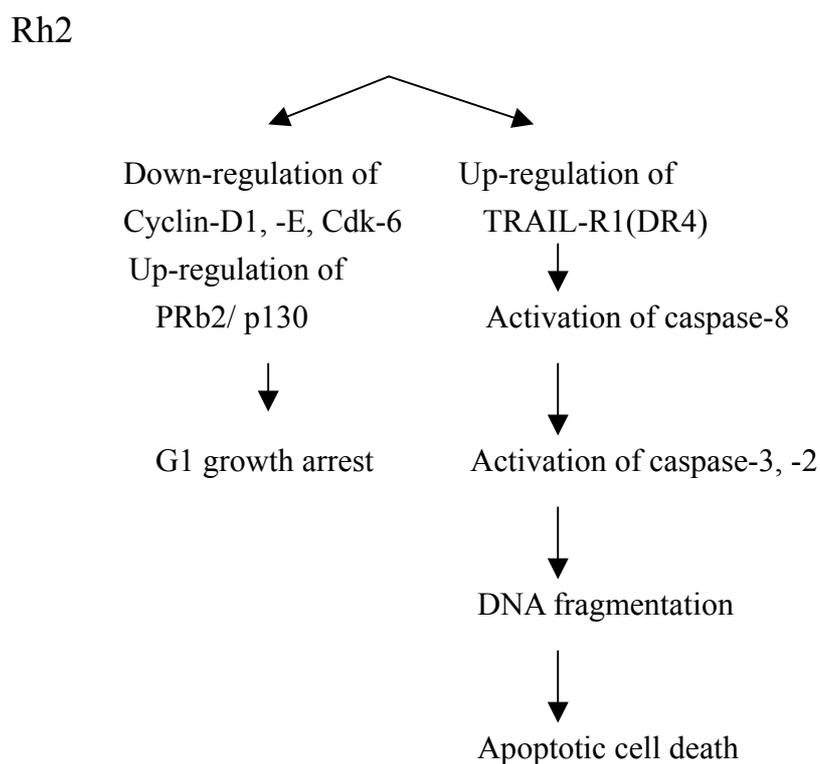


圖 6-1 Rh2 抑制肺腺癌細胞生長及造成凋亡之路徑圖。

參考文獻

1. Hunter, T., and Pines, J. Cyclins and Cancer : Cyclin D and CDK Inhibitors come of ages. *Cell*. 79:573-582, 1994.
2. Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. *Nature*. 374:131-134, 1995.
3. Lebowitz, D. E., Muise-Helmericks, R., Sepp-Lorenzino, L., Serve, S., Timaul, M., Bol, R., Borgen, P., and Resen, N. A truncated cyclinD1 gene encodes a stable mRNA in a human breast cancer cell lines. *Oncogene*. 9(7):1925-1929, 1994.
4. Keyomarsi, K., O'Leary, N., Molnar, G., Lees, E., Fingert, H. J., and Pardee, A. B. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Research*. 54:380-385, 1994.
5. Kwon, T. K., Nordin, A. A. Overexpression of cyclin E and cyclin Dependent kinase inhibitor (p27): Effect on cell cycle regulation in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 38:534-538, 1997.
6. Kato, J., Matsuoka, M., Polyka, K., Massague, J., and Sherr, C. J. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by inhibitor (p27) of Cyclin-dependent kinase cdk4 activation. *Cell*. 79:487-496, 1994.

7. 梁金銅，張金堅，細胞凋亡的特徵. 致癌角色及研究方法，當代醫學. 第 23 卷 第 11 期 pp.885-890, 1996.
8. Carson, D. A., and Ribeiro, J. M. Apoptosis and disease. *Lancet*. 341:1251-1254, 1993.
9. Raff, M. C. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 356:397-399, 1992.
10. Steller, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 267:1445-1449, 1995.
11. Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267:1456-1462, 1995.
12. Anelli, A., Anelli, T. F., Youngson, B., Rosen, P. P., and Borgen, P. I. Mutations of the p53 in male breast cancer. *Cancer*. 75(9):2233-2238, 1995.
13. Nossari, C. Possible involvement of poly (ADP-Ribosyl) polymerase In triggering stress-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*. 212:367-373, 1994.
14. Greenberg, A. H., and Litechfield, D. W. P34 and apoptosis. *Science*. 259:106-107, 1995.
15. 郭俊逸，癌症的現代觀 (基礎與臨床的新進展)，合記圖書出版社.

pp.151-152, 1990.

16. 林景彬，常用中藥藥理與應用，中國醫藥學院出版. p.400, 1985.
17. 張賢哲，本草備要解析中國醫藥學院出版. pp.6-9, 1990.
18. 人參的研究及栽培，淑馨出版社. p169, 1989.
19. 恩斯特.D. 人參-永保青春和活力.小薰書房.P15-16,39, 1999.
20. 中藥臨床應用.啟業書局. P262-264, 1988.
21. Mindell, E., and Bible, H. Fireside Publishers New York. ed. Vol. 1991.
22. Minyi, C. Anticancer Medicinal Herbs. Human Science and Technology Press Beijing. ed. Vol. 1992.
23. Enomoto, Y., Ito, K., Kawagoe, Y., Morio, Y., and Yamasaki, Y. Positive inotropic action of saponins on isolated atrial and papillary muscles from the guinea-pig. British Journal of Pharmacology. 88:259-267, 1986.
24. Jiang, Y., Zhong, G. G., Chen, L., and Ma, X. Y. Influences of ginsenosides Rb1, Rb2, and Rb3 on electric and contractile activities of normal and damaged cultured myocardiocytes. Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao. 13:403-406, 1992.
25. Kim, N. D., Kang, S Y., Kim, M.J., Park, J. H., and Schini, K. V. The

- ginsenoside Rg3 evokes endothelium-independent relaxation on rat aortic rings: role of K⁺ channels. *European Journal of Pharmacology*. 367:51-57, 1999.
26. Danesi, R., Figg, W. D., Reed, E., and Myers, C. E. Paclitaxel (taxol) inhibits protein isoprenylation and induces apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Molecular Pharmacology*. 47:1106-1111, 1995.
27. Kang, S.Y., Lee, K.Y., and Lee, S. K. Ginsenoside-Rg1 regulates the induction of tyrosine aminotransferase gene transcription in rat hepatocyte cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 205:1696-1701, 1994.
28. Salim, K. N., McEwen, B. S., and Chao, H. M. Ginsenoside Rb1 regulates ChAT, NGF and trkA mRNA expression in the rat brain. *Brain Research Molecular Brain Research*. 47:177-182, 1997.
29. Yokozawa, T., Yasui, T., and Oura, H. Molecular biological analysis of the effects of ginsenoside-Rb2 on albumin mRNA in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of Pharmacy Pharmacology*. 48:763-767, 1996.
30. Shibata, S. Chemistry and cancer preventing activities of Ginseng Saponin and some related Triterpenoid compounds. *The Korean*

- Medical Journal. 16 (suppl): S28-37, 1993.
31. Kanazawa, H., Nagata, Y., Matsushima, Y., Tomoda, M., and Takai, N.
Simultaneous determination of ginsenosides and saikosaponins by
high- performance liquid chromatography. Journal of
Chromatography. 507:327-332, 1990.
32. Samukawa, K., Yamashita, H., Matsuda, H., and Kubo, M.
Simultaneous analysis of ginsenosides of various ginseng radix by
HPLC. Yakugaku Zasshi. 115:241-249, 1995.
33. http://www.btgin.com/htm/work_3.asp
34. Kikuchi, Y., Sasa, H., Kita, T., Hirata, J., Tode, T., and Nagata, I.
Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitro by
ginsenoside Rh2 and adjuvant effects to cisplatin in vivo.
Anti-cancer drugs. 2:63-67, 1990.
35. Tode, T., Kikuchi, Y., Kita, T., Imaizumi, E., and Nagata, I. Inhibitory
effects by oral administration of ginsenoside Rh2 on the growth of
human ovarian cancer cells in nude mice. Journal of Cancer
Research and Clinical Oncology. 120:24-26, 1993.
36. Nakata, H., Kikuchi, H., Tode, T., Hirata, J., Kita, T., Ishii, K., Kudoh,
K., Nagata, I., and Shinomiya, N. Inhibitory effects of ginsenoside
Rh2 on tumor growth on nude mice bearing human ovarian cancer

- cell. Japanese Journal of Cancer Research. 89:733-740, 1998.
37. Lee, K. Y., Park, J. A., Chung, E., Lee, Y. H., Kim, S. I., and Lee, S. K. Ginsenoside-Rh2 blocks the cell cycle of SK-HEP-1 cells at the G1/S boundary by selectively inducing the protein expression of p27^{kip1}. Cancer Letters. 110:193-200, 1996.
38. Park, J.A., Lee, K. Y., Oh, Y. J., Kim, K. W., and Lee, S. K. Activation of caspase-3 protease Via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-induced apoptosis. Cancer Letter. 121:73-81, 1997.
39. Ota, T., Maeda, M., Odashima, S., and Tatsuka, M. G1 phase-specific suppression of the Cdk2 Activity by Ginsenoside Rh2 in cultured murine cells. Life Science. 160(2):39-44, 1997.
40. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Boberts, K., and Walter, P. Molecular biology of the cell, New York. 878-80, 983-1022, 1027-1036, 2002.
41. Sherr, C. J. Cancer cell cycles. Science . 274:1672-1677, 1996.
42. Ho, A., and Dowdy, S. F. Regulation of G1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor gene. Current Opinion in Genetics and Development. 12:47-52, 2002.

43. Sherr, C. J. The pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Research*. 60:3689-3695, 2000.
44. Ohi, R., and Gould, K. L. Regulating the onset of mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*. 11:267-273, 1999.
45. Fang, F., Orend, G., Watanabe, N., Hunter, T., and Ruoslahti, E. Dependence of cyclin E-Cdk2 kinase activity on cell anchorage. *Science*. 271:499-502, 1996.
46. Sherr, C. J., and Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development*. 13:1501-1512, 1999.
47. Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. P21 is a universal inhibitor of cyclin kinase. *Nature*. 366:701-704, 1993.
48. Russo, A. A., Jeffrey, P.D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P. Crystal structure of the p27^{kip1} cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*. 382:325-331, 1995.
49. Luh, F. Y., Archer, S. J., Domaille, P. J., Smith, B. O., Brotherton, D. H., Raine, A. R. C., Xu, X., Brizuela, L., Brenner, S. L., and Laue, E.

- D. Structure of the cyclin-dependent kinase inhibitor p19^{ink4d}. *Nature*. 389:999-1003, 1997.
50. McConnell, B. B., Gregory, F. J., Stott, F. J., Hara, E., and Peters, G. Induced expression of p16^{INK4a} inhibits both Cdk4- and Cdk2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-Cdk-inhibitor complexes. *Molecular and Cellular Biology*. 19:1981-1989, 1999.
51. Ryan, K. M., Phillips, A. C., and Vousden, K. H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology*. 13:332-337, 2001.
52. Dyson, N. The regulation of E2F by pRb-family proteins. *Genes and Development*. 12:2245-2262, 1998.
53. Adams, P. D. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1471:123-133, 2001.
54. Stevaux, O., and Dyson, N. J. A revised picture of the E2F transcriptional network and Rb function. *Current Opinion in Cell Biology*. 14:684-691, 2002.
55. <http://pingu.salk.edu/~forsburg/cclecture.html>

56. Kerr, J. E., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26:239-257, 1972.
57. <http://www.niaaa.nih.gov/publications/arh25-3/175-184.ht>
58. Reed, J. C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. 17:3225-3236, 1998.
59. Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J. C. Bax directly induces release of cytochrome c isolated mitochondria. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:4997-5002, 1998.
60. Kroemer, G., and Reed, J. C. Mitochondrial control of cell death. *Nature medicine*. 6:513-519, 2000.
61. Kroemer, G., Petit, P. X., Zamzami, N., Vayssiere, J. L., and Mignotte, B. The biochemistry of programmed cell death. *Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 9:1277-1287, 1995.
62. Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Letters*.

- 378:150-152, 1996.
63. Li, H., Zhu, H., Ju, C. J., and Yuan, J. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94:491-501, 1998.
64. Cosulich, S. C., Savory, P. J., and Clarke, P. R. Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c. *Current Biology*. 9:147-150, 1999.
65. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wang, W. W., and Yuan, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 87:171, 1996.
66. Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences*. 22:299-306, 1997.
67. Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elias, A., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S. A., Lowe, S. W., Penninger, J. M., and Mak, T. W. Differential requirement for caspase-9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*. 94:339-352, 1998.
68. Li, P., Nijhawan, D., Budiardjo, I., Srinivasula, S. M, Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. Cytochrome C and dATP-dependent

- formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91:479-489, 1997.
69. Sun, X. M., Marion, M. F., Zhuang, J., Beni, B. W., Douglas, R. G., and Gerald, M. C. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:5053-5060, 1999.
70. Ozoren, N., and El-Deiry, W. S. Cell surface death receptor signaling in normal and cancer cells. *Seminars in Cancer Biology*. 13:135-147, 2003.
71. Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A. D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Current Biology*. 7:1003-1006, 1997.
72. <http://www.digilander.libero.it/.../apoptosismitmap.html>
73. <http://www.toxicology.leidenuniv.nl/index.php3?c=5>
74. Li, X. K., Motwani, M., Tong, W., Bornmann, W., and Schwartz, G. K. Huanglian, a Chinese herbal extract, Inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting cdc2 kinase activity in human cancer cells. *Molecular Pharmacology*. 58:1287-1293, 2000.

75. Keenan, S. M., Bellone, C., and baldassare, J. J. Cyclin-dependent kinase 2 nucleocytoplasmic translocation is regulated by extracellular regulated kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(25): 22404-22409, 2001.
76. Hsieh, T. C., and Wu, J. M. Apoptosis and restriction of G1/S cell cycle by Fenretide in Burkitt's lymphoma Mutu 1 cell line accessed with bcl-6 down- regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 276:1295-1301, 2000.
77. Oh, M., Choi, Y. H., Choi, S., Chung, H., Kim, K., Kim, S. I., Kim, D. K., and Kim, N. D. Anti-proliferating effects of ginsenoside Rh2 on MCF-7 human breast cancer cells. *International Journal of Oncology*. 14:869-875, 1999.
78. Popovich, D. G., and Kitts, D. D. Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and induce apoptosis in the human leukemia (THP-1) cell line. *Archive of Biochemistry and Biophysics*. 406:1-8, 2002.
79. Kim, Y. S., Jin, S. H., Lee, Y. H., Park, J. D., and Kim, S. I. Differential expression of protein kinase C subtypes during Ginsenoside Rh2-induced apoptosis in SK-N-BE(2) and C6Bu-1

- cells. *Archive of Pharmacal Research*. 23:518-524, 2000.
80. Park, J. A., Lee, K. L., Oh, Y. J., Kim, K. W., and Lee, S. K. Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of Ginsenoside Rh2-induced apoptosis. *Cancer Letters*. 121:73-81, 1997.
81. Kim, Y. S., Jin, S. H., Lee, Y. H., Kim, S. I., and Park, J. D. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis independently of Bcl-2, Bcl-XL, or Bax in C6Bu-1 cells. *Archive of Pharmacal Research*. 22:448-453, 1999.
82. Kim, H. E., Oh, J. H., Lee, S. K., and Oh, Y. J. Ginsenoside Rh2 induces apoptotic cell death in rat C6 glioma via a reactive oxygen-and caspase-dependent but Bcl-X_L-independent pathway. *Life Science*. 65:33-40, 1999.
83. Jin, Y. H., Yoo, K. J., Lee, Y. H., and Lee, S. K. Caspase 3- mediated cleavage of p21^{WAF/CIP1} associated with the cyclin A dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:30256-30263, 2000.
84. Fei, X. F., Wang, B. X., Tashiro, S., Li, T. J., Ma, J. S., and Ikejima, T. Apoptosis effects of Ginsenoside Rh2 on human malignant

- melanoma A375-S2 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 23:315-322, 2002.
85. Ham, Y. M., Chun, K. H., Choi, J. S., Kim, D. H., and Lee, S. K. SEK1-dependent JNK1 activation prolongs cell survival during G-Rh2-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 304:358-364, 2003.
86. Kotelkin, A., Prikhod'ko, E. A., Cohen, J. I., Collins, P. L., and Bukreyev, A. Respiratory Syncytial Virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Journal of Virology*. 9156-9172, 2003.
87. Ou, D., Metzger, D. L., Wang, X., Hung, J., Pozzilli, P., and Tingle, A. J. TNF-related apoptosis-inducing ligand death pathway-mediated human beta-cell destruction. *Diabetologia*. 45:1678-1688, 2002.
88. Hasel, C., Durr, S., Rau, B., Strater, J., Schmid, R. M., Walczak, H., Bachem, M. G., and Moller, P. In chronic pancreatitis, Widespread emergence of Trail receptors in Epithelia coincides with neoexpression of TRAIL by pancreatic stellate cells of early fibrotic areas. *Laboratory Investigation*. 83(6):825-836, 2003.

附錄

Abbreviation:

Adv, adenovirus; Cdk, cycline-dependent kinase;

DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; Rb, Retinoblastoma;

Rh2, Ginsenoside Rh2;

TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand;

TUNEL, terminal transferase-mediated dUTP-fluorescensin nick
end-labeling;

VDVAD-AFC, Val-Asp-Val-Ala-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl
coumarin;

DEVD-AFC, Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin;

VEID-AFC, Val-Glu-Ile-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin;

IETD-AFC, Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin;

LEHD-AFC, Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin;

z-VDVAD-fmk, z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone;

z-DEVD-fmk, z-Asp-Glu-Val-Asp-fluoromethyl ketone;

z-IETD-fmk, z-Ile-Glu-Thr-Asp-fluoromethyl ketone;

z-LEHD -fmk, z-Leu-Glu-His-Asp-fluoromethyl ketone;

Molecular mechanisms of Ginsenoside Rh2 mediated G1
growth arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells

Shu-Mei Yang

Major Professor: Jung-Chou Chen

Institute of Chinese Medical Science, China Medical University

Ginsenoside Rh2 (Rh2), a purified ginseng saponin, has been shown to have antiproliferative effects in certain cancer cell types. However, the molecular mechanisms of Rh2 on cell growth and death have not been fully clarified. In this study, the anti-proliferative effect of Rh2 in human lung adenocarcinoma A549 cells was investigated. Treatment of A549 cells with 30 $\mu\text{g/ml}$ Rh2 resulted in a G1-phase arrest, following progressed to apoptosis. This Rh2-mediated G1 arrest was accompanied by the down-regulation of the protein levels and kinase activities of cyclin-D1, cyclin-E, and Cdk6, and the up-regulation of pRb2/p130. In addition, Rh2-induced apoptosis was confirmed by TUNEL assay and DNA fragmentation analysis. Administration of Rh2 caused an increase in the expression levels of TRAIL-R1 (DR4) death receptor but did not alter the levels of other death receptors and Bcl-2 family molecules. Furthermore, the Rh2-induced apoptosis was significantly inhibited by DR4:Fc fusion protein, which inhibits TRAIL-DR4-mediated apoptosis.

In addition, the caspase-2, -3 and -8 were drastically activated upon Rh2 treatment. The inhibitors of caspase-2, -3, and caspase-8 markedly prevented the cell death induced by Rh2. The inhibitor of caspase-8 significantly inhibited the activation of caspase-2, -3 and -8. These observations indicate that multiple G1-related cell cycle regulatory proteins were regulated by Rh2 and contributed to Rh2-induced G1 growth arrest. The increase in the expression level of DR4-death receptor may play a critical role in the initiation of Rh2-triggered apoptosis, and the activation of caspase-8/caspase-3 cascade acts as the executioner of the Rh2-induced death process.

Key words: Caspase, Cyclin, Ginsenoside Rh2, pRb2/p130, TRAIL-R1

謝辭

回憶起二年前，由於中國虎尾診所的成立，我由台中本部調任北港媽祖醫院，在每天往返台中、雲林二地的日子裡，心中有股失落感，於是才有報考研究所的動機。上榜後卻猶豫不知該念與否，這時陳延年主任主動關心並鼓勵就讀，於是才決定讀讀看。剛入學時必須決定指導教授，這讓我困擾不已，好在陳主任介紹了陳榮洲老師及徐士蘭博士指導研究。陳榮洲老師學識極為豐富，指導過無數碩博士學生，感謝陳老師不嫌棄，願意擔任指導教授，並常主動關心且認真指導。本實驗之所以能順利的進行，須感謝台中榮總徐士蘭博士及實驗室所有助理人員的協助，分子生物學是我之前未曾接觸過的學科，在徐博士的指導下，以及所上侯庭鏞老師和江素瑛老師的分生課程及實驗的學習中，才一窺了分生世界的奧妙。這短短的二年僅能稍懂一點皮毛而已，非常謝謝徐博士能接受我這門外漢並且熱心指導。

除此之外，我要感謝我的丈夫，謝謝他的支持，也謝謝他在我壓力大的時候當我的出氣筒。感謝我的公公、婆婆幫我帶幼小的兒子、女兒，讓我在事業及學業忙碌之中無後顧之憂。