

中國醫藥大學
營養研究所
碩士學位論文

石斛對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 的
細胞
週期及細胞凋亡之影響

Effects of Shihu on cell cycle and apoptosis
in human breast cancer line (MDA-MB-231)

指 導 教 授 葉兆雲 副教授
龍鳳娣 副教授
鍾景光 教 授

研 究 生 : 郭詩晴

中華民國九十三年六月

總目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第一章 前言.....	5
第一節 中草藥的潛力.....	4
第二節 研究動機與目的.....	4
第二章 文獻探討.....	8
第一節 癌症.....	8
一、癌症簡介.....	8
二、乳癌.....	9
三、人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231).....	10
第二節 簡介石斛.....	11
一、石斛植物之化學成分.....	11
二、石斛的藥理(抗癌) - 文獻回顧.....	12
第三節 細胞週期 (cell cycle) 調控對細胞增生的影響.....	14
第四節 細胞凋亡 (Apoptosis).....	19
一、細胞凋亡的定義.....	19
二、細胞凋亡分期之特徵及細胞壞死(necrosis).....	19
三、細胞凋亡訊息傳導途徑.....	22
(一) 細胞凋亡的起始作用.....	22
(二) 細胞凋亡的執行作用.....	26
五、粒腺體的細胞凋亡的訊息傳導.....	28
(一) cytochrome c 的釋放.....	28
(二) Smac 的釋放.....	28
(三) 細胞凋亡之誘發因子的釋放.....	28
第三章 材料與方法.....	30
第一節 實驗材料.....	30
一、原料.....	30
二、藥品試劑.....	30
三、設備、器材.....	34
第二節 實驗方法.....	36
一、石斛水萃取物的製備及配製.....	36
二、冷凍細胞之活化.....	38

三、細胞冷凍保存.....	38
四、人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 之培養.....	39
五、細胞計數及細胞存活測試.....	40
六、石斛水萃取物對人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 細胞增生的影響.....	41
七、檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 細胞型態的影響 - 利用倒立式像位差顯微鏡.....	46
八、檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 細胞週期的影響.....	46
九、檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞是否產生細胞凋 亡的情形.....	48
(一) 利用流式細胞儀檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞 產生細胞凋亡的情形.....	48
(二) 利用DNA電泳法檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞 產生細胞凋亡的情形.....	49
十、反轉錄聚合酵素連鎖反應 (Reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR).....	50
(一) total RNA的抽取.....	50
(二) 定量total RNA.....	51
(三) cDNA的合成.....	51
十一、檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 細胞內與細胞週期相關蛋白質的影響 - 西方點墨法(Western blotting).....	54
(一) 細胞蛋白質抽取.....	54
(二) 蛋白質定量.....	54
(三) 變性電泳 (SDS-PAGE).....	55
(四) 西方點墨法(Western blotting).....	56
第四章 結果.....	59
第一節 中草藥水萃取物的產率.....	59
第二節 石斛水萃取物對人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 細胞存活的影響.....	60
第三節 石斛水萃取物對人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 細胞增生的影響.....	62

第四節 檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 細胞型態的影響.....	64
第五節 檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 細胞週期的影響.....	66
一、 石斛水萃取物對人類乳癌細胞之細胞週期的影響 是否呈劑量關係 - 分析24小時細胞週期分佈情形.....	66
二、 石斛水萃取物對人類乳癌細胞之細胞週期的影響 是否呈劑量關係 - 分析48小時細胞週期分佈情形.....	69
三、 檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞之細胞週期的影響 是否呈時間關係.....	72
第六節 檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞產生細胞凋 亡的情形.....	74
一、 利用流式細胞儀檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞 產生細胞凋亡的情形.....	74
二、 利用DNA電泳法來檢測石斛水萃取物對人類乳癌 細胞產生細胞凋亡的情形.....	75
第七節 反轉錄聚合酵素連鎖反應 (Reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)探討細胞週期 相關 Cyclin、Cdk及Apoptosis基因的表現.....	77
一、 Cyclin B mRNA之相對含量變化.....	77
二、 Cdk 1 mRNA之相對含量變化.....	77
三、 Wee 1 mRNA之相對含量變化.....	78
四、 Chk1 mRNA之相對含量變化.....	78
五、 p21 mRNA之相對含量變化.....	78
六、 Caspase 3 mRNA之相對含量變化.....	79
七、 Caspase 8 mRNA之相對含量變化.....	79
八、 Caspase 9 mRNA之相對含量變化.....	80
第八節 西方點墨法探討細胞週期相關蛋白質的表現.....	89
一、 細胞週期中調控G2/M期相關蛋白質相關蛋白質 的表現.....	89
二、 cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) 蛋白質的表現.....	89

三、 Bcl-2和Bax蛋白質的表現.....	90
四、 Caspase 3和Caspase 9蛋白質的表現.....	90
第五章 討論.....	102
第六章 結論.....	108
第七章 參考文獻.....	110

圖目錄

圖2.1	石斛的外觀.....	11
圖2.2	細胞週期的調節.....	14
圖2.3	細胞凋亡的階段.....	20
圖2.4	Apoptosis 與 Necrosis 的區別.....	21
圖2.5	兩種主要細胞凋亡的訊息傳導途徑.....	22
圖2.6	經由死亡受體之細胞凋亡訊息傳導途徑.....	24
圖2.7	經由粒腺體之細胞凋亡訊息傳導途徑.....	25
圖3.1	石斛水萃取物之製備流程圖.....	37
圖3.2	細胞計數盤結構.....	40
圖3.3	利用PI (Propidium Iodide) 單染細胞時細胞型態變化.....	42
圖3.4	12孔洞平盤中石斛水萃物濃度分配情形.....	44
圖3.5	轉漬夾內部組成.....	57
圖4.1	投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 於第24 及48小時之細胞存活率變化的情形.....	61
圖4.2	投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 於第24 及48小時之細胞增生的變化情形.....	63
圖4.3	投予300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水提取物以倒立式位相差顯微鏡 觀察12-48小時之人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 之 細胞型態變化的情形.....	65
圖4.4	投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 24小時 之細胞週期變化的情形.....	67
圖4.5	投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 24小時 之細胞週期變化的情形.....	68
圖4.6	投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 48小時 之細胞週期變化的情形.....	70
圖4.7	投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 48小時 之細胞週期變化的情形.....	71
圖4.8	投予300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物12-48小時之細胞週期 變化的情形.....	73
圖4.9	投予300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物24-48小時產生細胞凋 亡的情形.....	74

圖4.10	不同濃度的石斛水萃取物誘發人類乳癌細胞之DNA 斷裂作用.....	76
圖 4.11	投予300 µg/mL石斛水萃取物至人類乳癌細胞3-24 小時之Cyclin B mRNA變化的情形.....	81
圖 4.12	投予300 µg/mL石斛水萃取物至人類乳癌細胞3-24 小時之Cdk1 mRNA變化的情形.....	82
圖 4.13	投予300 µg/mL石斛水萃取物至人類乳癌細胞3-24 小時之Wee 1 mRNA變化的情形.....	83
圖 4.14	投予300 µg/mL石斛水萃取物至人類乳癌細胞3-24 小時之Chk1 mRNA變化的情形.....	84
圖 4.15	投予300 µg/mL石斛水萃取物至人類乳癌細胞3-24 小時之p21 mRNA變化的情形.....	85
圖 4.16	投予300 µg/mL石斛水萃取物至人類乳癌細胞3-24 小時之Caspase-3 mRNA變化的情形.....	86
圖 4.17	投予300 µg/mL石斛水萃取物至人類乳癌細胞3-24 小時之Caspase-8 mRNA變化的情形.....	87
圖 4.18	投予300 µg/mL石斛水萃取物至人類乳癌細胞3-24 小時之Caspase-9 mRNA變化的情形.....	88
圖4.19	投予不同濃度石斛水萃取物至人類乳癌細胞24小時 之Cyclin B1蛋白質相對表現量變化的情形.....	91
圖4.20	投予不同濃度石斛水萃取物至人類乳癌細胞24小時 之Cdk1蛋白質相對表現量變化的情形.....	92
圖4.21	投予不同濃度石斛水萃取物至人類乳癌細胞24小時 之Cdc25c蛋白質相對表現量變化的情形.....	93
圖4.22	投予不同濃度石斛水萃取物至人類乳癌細胞24小時 之Wee 1蛋白質相對表現量變化的情形.....	94
圖4.23	投予不同濃度石斛水萃取物至人類乳癌細胞24小時 之p21蛋白質相對表現量變化的情形.....	95
圖4.24	投予不同濃度石斛水萃取物至人類乳癌細胞24小時 之Bcl-2蛋白質相對表現量變化的情形.....	96
圖4.25	投予不同濃度石斛水萃取物至人類乳癌細胞24小時 之Bax蛋白質相對表現量變化的情形.....	97
圖4.26	投予不同濃度石斛水萃取物至人類乳癌細胞36小時 之Bcl-2蛋白質相對表現量變化的情形.....	98

圖4.27	投予不同濃度石斛水萃取物至人類乳癌細胞36小時 之Bax蛋白質相對表現量變化的情形.....	99
圖4.28	投予不同濃度石斛水萃取物至人類乳癌細胞36小時 之Caspase-3蛋白質相對表現量變化的情形.....	100
圖4.29	投予不同濃度石斛水萃取物至人類乳癌細胞36小時 之Caspase-9蛋白質相對表現量變化的情形.....	101
圖6.1	Hypothesized signaling pathways of Shihu-induced G ₂ /M arrest and apoptosis.....	109

表目錄

表 3.1	1 倍磷酸緩衝鹽類溶液 (1X phosphate buffer saline, PBS, pH=7.4)之組成.....	45
表 3.2	PI(propidium iodide) stain 染劑之組成.....	45
表 3.3	PCR primer 序列.....	53
表 3.4	蛋白質標準品的配製及組成.....	55
表 3.5	變性電泳之上層膠和下層膠的配製及組成.....	55
表 3.6	1.5 M Tris (pH8.0) 的組成.....	58
表 3.7	0.5 M Tris (pH6.6) 的組成.....	58
表 3.8	跑膠緩衝液 (running buffer) 的組成.....	58
表 3.9	轉漬緩衝液 (transfer buffer) 的組成.....	58
表 3.10	0.1 % PBS/Tween (PBST) 的組成.....	58
表 4.1	製備石斛之水萃取物的產率.....	59

中文摘要

石斛最早收載於神農本草經上品，主要功效為清熱生津，滋陰養胃，清肝明目等。本篇研究探討石斛水萃取物在人類乳癌細胞 (MDA-MB-231 cells) 之細胞增生、細胞週期和細胞凋亡調節的作用。稱取經冷凍乾燥之石斛水提取物 0.045 g，溶於 1.5 mL DMSO，配製成石斛水提取物之原始溶液 (stock solution)。從原始溶液 (30 mg/mL) 分別取 1.25、2.5、5、10 及 20 μ L (其最終濃度為 18.75、37.5、75、150 及 300 μ g/mL) 至人類乳癌細胞，經過不同的時段 (12、24、36、48 小時) 培養後分別進行如下的試驗。在細胞增生的試驗中，結果發現於 150 及 300 μ g/mL 的石斛水萃取物可以抑制經過 24 及 48 小時培養的人類乳癌細胞 (MDA-MB-231 cells) 之細胞增生。在流式細胞儀分析 DNA 含量的試驗中，投予 300 μ g/mL 的石斛水萃取物培養 24 小時後，結果發現細胞週期的分佈中 G_0/G_1 期為 31% (控制組為 60%)，與控制組比較降低了 29%。 G_2/M 期為 44% (控制組為 19%)，與控制組比較增加了 25%。在西方點墨法的試驗中，經不同濃度之石斛水萃物處理 24 小時後分析 cyclin B1、Cdk1、p21 蛋白質的表現量，結果在 300 μ g/mL 濃度的石斛水萃取物與控制組比較，cyclin B1、Cdk1、p21 蛋白質的表現量皆明顯上升，分別為 2.82 倍、1.42 倍和 2.53。p21 蛋白質表現量的增加可能是石斛水萃取物引起細

胞週期停滯於 G₂/M 期的其中一個主要的因子。在流式細胞儀的分析和 DNA 片段膠體電泳分析試驗中，皆確認石斛水萃取物可誘發 MDA-MB-231 cells 之細胞凋亡。在西方點墨法的試驗中，經不同濃度之石斛水萃取物處理 36 小時後分析 Bax、Caspase-3、Caspase-9 蛋白質的表現量，結果在 300 μg/mL 濃度的石斛水萃取物與控制組比較，其 Bax 蛋白質的表現量明顯上升（1.80 倍）。將 300 μg/mL 濃度的石斛水萃取物與 75 μg/mL 的石斛水萃取物進行比較，Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白質的表現量皆上升，分別為 1.11 倍和 1.80 倍。由本研究中的試驗結果證明，石斛會抑制人類乳癌細胞的細胞增生，引起細胞週期停滯於 G₂/M 期和誘發細胞凋亡。因此，石斛為具有潛力的細胞週期阻斷劑。對於石斛是否可當作抗癌藥物需要再作更深入的評估其抗癌的功效。

英文摘要

Shihu is a Chinese medicine used as a Yin tonic to nourish the stomach, to promote the production of body fluid, and to reduce fever. In this study, water extract of Shihu was analyzed for its effects on the regulation of proliferation, cell cycle progression and apoptosis in human breast cancer cell line, MDA-MB-231. Thirty milligram per milliliter of water extract of Shihu (30 mg/mL) was prepared as the stock solution. Cultured cancer cells were treated with different concentrations (0, 18.75, 37.5, 75, 150 and 300 $\mu\text{g/mL}$) of Shihu water extract for different times (12, 24, 36 and 48 hr). Treatment of MDA-MB-231 cells with water extract of Shihu (150 and 300 $\mu\text{g/mL}$) for 24 or 48 hr inhibited the proliferation of human breast cancer cells. Flow cytometric analysis for the DNA content in Shihu-treated cells indicated that following Shihu (300 $\mu\text{g/mL}$) treatment for 24 hr, the cell cycle distribution in the G_0/G_1 phase decreased; 60.02 % vs. 31.30 % concomitant with an increase in cells in the G_2/M ; 18.45 % vs. 44 % , for control vs. Shihu, respectively. Immunoblot analysis of the levels of cyclin B1, cyclin-dependent kinases (Cdk1), and p21 in the MDA-MB-231 cells treated with Shihu water extract (300 $\mu\text{g/mL}$) for 24 hr showed that expressions of cyclin B1, cyclin-dependent kinases (Cdk1), and p21 increased 2.82 fold, 1.42 fold, and 2.53 fold, respectively, comparing to the control group. The increase of the level of p21 may be one of the major factors for Shihu water extract to cause G_2/M arrest in the examined cells. Flow cytometric assays and DNA fragmentation gel electrophoresis both confirmed that Shihu water extract induced apoptosis in MDA-MB-231 cells. In cell treated with Shihu (300 $\mu\text{g/mL}$) for 36 hr, the level of Bax increased 1.80 fold, comparing to the control group. The levels of Caspase-3 and Caspase-9 in cells treated with 300 $\mu\text{g/mL}$ of

Shihu for 36 hr were increased by 1.11 fold and 1.80 fold, respectively, comparing to the cells treated with 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Shihu for 36 hr. Results in this study demonstrate that Shihu inhibited the proliferation of cancer cells, caused G2/M arrest, and induced apoptosis. Thus, Shihu is promising as an important cell cycle bloker and is important for further evaluation for its application as a cancer chemopreventive agent.

第一章 前言

民國七十一年起，癌症即成為臺灣地區十大死因之首，於癌症十大死因中，婦女罹患乳癌的人數逐年在增加，且因乳癌而致死的患者也是與日俱增。根據我國行政院衛生署的九十一年癌症登記報告，台灣地區婦女乳癌在十大癌症的發生率與死亡率分居第二位與第四位，國內女乳性癌的發生率雖然較西方國家低，但國內乳癌的發生年齡卻較西方國家為低，中國人乳癌發生年齡大約 45 歲，西方婦女乳癌發生年齡大約 50 歲(1-3)。

對於乳癌的治療具有多樣化的方式，如手術切除治療、化學藥物治療、荷爾蒙藥物治療和放射線治療等。不管是何種方式皆可能引起一些副作用的產生。像是化學療法一般都採用 3~5 種藥物如：Methotrexate、5-FU (5-Fluorouracil)、Adriamycin、Tamorifen 等。它們可經由血液循環到達全身殺死手術及放射線治療無法接觸到的癌細胞，但對正常細胞也會造成傷害並產生包括在噁心、嘔吐、食慾減低、口腔炎或腹瀉、感染、出血或貧血等副作用。另外以外科手術進行切除治療卻又無法完全清除腫瘤，所以研發新的抗癌藥物是刻不容緩的。但是研發新的抗癌藥物是一個複雜但循序漸進的過程，新藥的安全性有效性最終必須經過臨床試驗加以證實，加上需要投入大量的

時間、人力及資金 (4)，所以從天然食材或中草藥中去發掘生物有效性成分對於癌細胞生長抑制的情形，似乎是現在對於抗癌藥物研發的新趨勢。

第一節 中草藥的潛力

全球聞名的「哈佛商業評論」曾經在日前的報導中預測：生物科技、網路、中草藥現代化與行動通訊，將是未來二十年最重要的四大產業。我國中草藥的醫療保健市場（包括中藥材食補）約為 150 250 億元，雖然比食品市場的 1000 多億元和飲料市場的 400 多億元的規模小，但市場潛力依舊吸引人 (4)。民國九十年，政府即開始大力推動「中草藥發展五年計畫」，預計將投入五十億推動台灣的中草藥產業，並將中草藥的相關研究納入「農業生技國家型計畫」和「生技醫藥國家型計畫」的範疇中。因此國內有越來越多的學術研究單位相繼投入中草藥的研究 (4)。

第二節 研究動機與目的

臨床上使用的抗癌藥物其藥理作用大致分為兩種：一種為干擾癌細胞之細胞週期的調控或抑制癌細胞的分裂，使其趨於較分化的狀態。另一種為可藉由誘導細胞凋亡作用的進行，進而殺死癌細胞達到治療的目的。近年來人們的生活水準提高對食的要求已提升為質，越來越多人食用健康食品或中草藥配合食物的燉補以進行身體的調理

作用，由此可知中草藥的潛力。另外許多先進、學者指出國內對中草藥的研究應該致力於提升與管控中草藥的品質、進行中草藥的臨床療效評估、培育高經濟價值的台灣特有種中草藥等，並建議針對成本較低，但經濟效益較大的中草藥、及已經被驗證具有療效的方藥等，可以作為優先考量的研究標的。

中草藥 - 石斛之毒性很低，臨床上認為“甘平無毒”且石斛中含有許多的成分，如石斛鹼、石斛次鹼等；石斛鹼為具有抗腫瘤的成分，因此本研究室選擇石斛當作主要的研究標的，將進一步探討石斛水萃取物對人類乳癌細胞(MDA-MB-231)之影響，包括細胞增生的影響、細胞週期的調控、細胞凋亡的探討等。

第二章 文獻探討

第一節 癌症

一、 癌症簡介

動物體內細胞分裂調節失控而無限增殖的細胞稱為腫瘤細胞 (tumor cells), 其主要特徵為：1. 細胞生長與分裂失去控制：核質比例增大，分裂速度加快，結果破壞了正常組織的結構與功能；2. 具有滲透性和擴散性：良性腫瘤與惡性腫瘤細胞最主要的區別是：惡性腫瘤細胞的細胞間黏著性下降，具有滲透性和擴散性，易滲入周圍健康組織，或透過血液循環或透過淋巴途徑轉移，並在其他部位黏著和增殖；3. 細胞間相互作用改變：正常細胞之間的辨識主要透過細胞表面專一性蛋白的相互作用，癌細胞在轉移過程中除了產生水解酵素，而且異常表現某些膜受體蛋白，以便與他處細胞黏著及生長；4. 蛋白質表現譜系或蛋白質活性改變：癌細胞的蛋白質表現譜系中，往往出現自胚胎中表現的蛋白，且多數癌細胞中具有較高的端粒酶 (telomerase) 活性。5. mRNA 轉錄譜系的改變：將乳腺癌和直腸癌細胞與正常細胞中基因表現普進行比較。檢測的 30 萬個轉錄片段中 (transcripts), 相當於 4.5 萬個所表現的基因中約有 500 個轉錄片段 (相當於 75 個基因) 有明顯不同 (6)。

癌症因其衍化的組織或細胞而分類：來自上皮細胞稱為上皮細胞瘤 (cacinomas)；來自結締組織或肌肉組織稱為肉瘤 (sarcomas)；來自造血系統者稱為白血病 (leukemias)。約有 90% 的人類癌症是上皮細胞瘤，而最常見的前五種上皮細胞瘤是肺癌、胃癌、乳癌、大腸直腸癌和子宮頸癌 (7)。

根據九十一年版之衛生統計重要指標中的報告，發現在已開發國家中，癌症 (惡性腫瘤) 一直是屬於高死亡率的一項因素。世界衛生組織最新統計顯示，世界癌症新發病例每年約為 1000 萬，因癌症死亡的人數每年約為 700 萬，癌症死亡率在世界各國中都佔了第一位。

二、 乳癌 (breast cancer)

女性乳房之發育主要是靠雌激素 (estrogen) 和黃體激素 (progesterone) 的控制。雌激素由循環血液中的膽固醇轉化而來，為第 3 位置上含有 OH 基的 18 個碳類固醇激素，包括三種激素：17 β -estradiol (E₂)、estrone (E₁)、estriol (E₃)，其中以 17 β -estradiol 的作用性最強的雌激素。可由卵巢濾泡內膜 (theca interna)、顆粒細胞 (granulosa cell)、黃體 (corpus luteum)、胎盤等分泌，其生理功能為：刺激濾泡的生長、刺激子宮內膜的增生、促進第二性徵的發育、刺激乳房內管腺增生等。而黃體激素為含 21 個碳之類固醇激素，可由黃體及胎盤分泌，其生理功能為：刺激月經前子宮內膜的增生、刺

激子宮頸及陰道的週期變化、乳腺小葉及腺泡的發育等。約三分之一的乳癌病例中，發現乳癌的危險因子包括較高濃度或增加雌激素的暴露。雖然由雌激素所誘發腫瘤形成的機制尚有爭議（8），但關於雌激素產生基因毒性的效應已經被提出（9）。許多的臨床研究、流行病學和生物學的研究皆指出雌激素參與了乳癌的起始和擴展期（10-12）。也有文獻指出雌激素之荷爾蒙取代療法會增加乳癌的發生率（13）。

當正常乳房細胞轉變成原發性或早期之乳癌細胞時，其生長雖仍受雌激素影響，但卻轉變為對雌激素具高度敏感性，屬於雌激素相關(estrogen-dependent)型乳癌。再發性或後期之乳癌細胞則有失去對雌激素反應的現象，其生長轉變為不受雌激素的影響，屬於雌激素不相關(estrogen-independent)型乳癌。而本實驗選擇 estrogen-independent 型的人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 作為實驗的細胞株評估藥物的作用。

三、 人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231)

MDA-MB-231 類型為 human breast adenocarcinoma , 種 (species) 為 *Homo sapiens* (human)。其生長特性為貼附型的細胞，具有突變的 p53 和缺乏功能性的雌激素接受體 (14-15)。

第二節 石斛的簡介

石斛屬是蘭科中最大的屬之一，石斛性味甘，寒；歸胃、肺、腎經。功能滋陰除熱，補脾進食，益精壯骨。《本草綱目拾遺》謂其：清胃，除虛熱，生津，已勞損。以之代茶，開胃健脾。《本草備要》載能治發熱自汗，夢遺滑精，囊澀餘歷（16-17）。



圖 2.1 石斛的外觀

一、 石斛植物之化學成分

石斛屬植物具有其特殊之生物鹼和蘭科特有芳香類化合物，是主要活性成分來源。其主要成份可分為 21 種類別，分別為 acylated anthocyanins (AA)、alkaloid salts (AS)、bibenzyls (B)、bidihydrophenanthrene (BDP)、coumarins (C)、dendrobine-type alkaloids (DBA)、9, 10-dihydrophenanthrenes (DP)、9,10-dihydrophenanthropyrans (DPP)、9, 10-dihydrophenanthraquinones (DPQ)、dendroxine-type alkaloids (DXA)、fluorenones (F)、glycosides (G)、indolizine alkaloids (IA)、nobiline-type alkaloids (NA)、phenanthrenes (P)、phenolic esters

(PE)、 phenanthraquinones (PQ)、 steroids (S)、 spirophthalides (phthalide-pyrrolidine alkaloids) (SA)、 sesquiterpenes (ST)、 others (O) 如: oleanolic acid、 aurantiamide acetate、 dimethyl terephthalate 等(18)

二、 石斛的藥理 (抗癌作用) - 文獻回顧

1994 年，馬國祥等人在鼓槌石斛及其化學成份的抗腫瘤活性作用之研究指出 (19)，分別以鼓槌石斛的乙醇提取物及毛蘭素 (erianin)、毛蘭菲 (confusarin)、鼓槌菲 (chrysotoxene) 進行抗腫瘤活性研究，發現對小鼠肝癌以毛蘭素作用最強，其抑瘤率為 62.25 %。且從小鼠的體重、精神狀態、毛髮脫落等情形，其副作用遠低於腫瘤化療藥物 5FU。

1995 年，Lee 等人 (20) 從金釵石斛 (*D. nobile*) 中分離 2 個具有抗癌活性的并菲類 (phenanthrenes) 成分，為 4,7-dihydroxy-2methoxy-9,10-dihydrophenanthrene 及 denbinobin。

1997 年，王天山等人研究指出，鼓槌石斛中聯苳類化合物如：毛蘭、鼓槌石斛素 (chrysotoxine)、鼓槌菲 (chrysotobibenzyl) 及菲類化合物如：毛蘭菲對體外培養的腫瘤細胞株 K₅₆₂ 的生長具有不同的抑制作用，其抑制細胞增殖 50 % 的藥物濃度 (IC₅₀) 分別為 0.0065、5.34、0.32 和 46.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (21)。

1998年，馬國祥等人採用轉殖人類MDR-1(multi-drug resistance-1) 基因至對長春花鹼及阿霉素具有交叉抗藥性的鼠? 色素瘤細胞株，投與從鼓槌石斛中分離的二個氫苄類化合物毛蘭及鼓槌素的抗腫瘤多藥的抗藥性進行研究，結果證明鼓槌石斛中此兩化合物均能增加阿霉素 (adriamycin, ADM) 在多抗藥性細胞株中的累積 (22)。

2001年，張潔等人在探討銅皮石斛水提液的抗癌活性及其誘導急性白血病細胞凋亡的發生機制之研究指出 (23)，當投與銅皮石斛水提液至HL-60細胞株中，利用MTT assay檢測可以發現使細胞株之生長停滯。利用DNA電泳、流式細胞儀及西方點墨法觀察誘導HL-60的凋亡模式。利用DNA電泳檢測投予銅皮石斛水提液(6.25 mg/mL)，24-72 h的癌細胞，可以發現DNA裂解片段。利用螢光觀察顯微鏡則發現，細胞在銅皮石斛水提液之作用下發生細胞濃縮、核染色質凝聚的情形，並出現凋亡小體。利用西方點墨法檢測投予銅皮石斛水提液 (6.25 mg/mL) 的癌細胞中凋亡抑制基因Bcl2之表現，結果發現處理6-12 h後癌細胞中Bcl-2蛋白質表現量增加，而24-48 h處理後Bcl-2蛋白質表現量降低。

第三節 細胞週期 (cell cycle) 之調控對細胞增生的影響

細胞增生 (cell proliferation) 是細胞生命活動的重要特徵之一。生命過程有長有短，但最終的命運無外乎兩種：其一，細胞分裂 (cell division)，由原來的親代細胞 (mother cell) 變成兩個子代細胞 (daughter cell)；其二，細胞死亡 (cell death)，生命活動消失。細胞增生受到嚴密的調控機制所監控，不僅要遵循細胞自身的增生調控規律，同時還要遵守生物體整體調控機制的調節。一般而言，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，這整個過程稱為細胞週期，如圖 2.2 (24)。

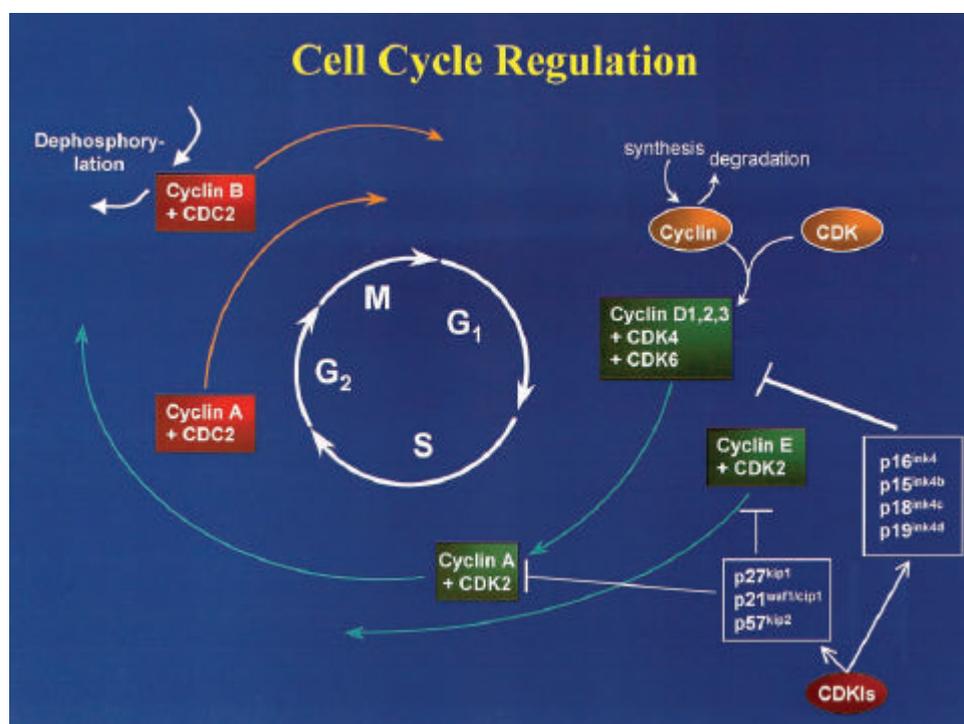


圖 2.2 細胞週期的調節 (24)

細胞週期可分為 Interphase (G_0 、 G_1 、 S and G_2 phase) 及 M phase (24-25)。

Gap 0 (G_0) : 細胞處於休眠期，可能為暫時性或永久性的停止生長。當細胞得到訊號指使，會快速返回細胞週期，分裂增殖。如結締組織中的纖維母細胞，平時並不分裂，一旦組織受到傷害，它們會返回細胞週期，分裂產生大量纖維母細胞，分佈於傷口部位，使傷口癒合。如神經細胞 (neuron) 發展到最後階段便不再生長。

Gap 1 (G_1) : 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。在 G_1 的晚期有一個特定時期，稱為限制點 (restriction point) 或檢查點 (checkpoint)。如果細胞走向分裂，則可以通過限制點進入 S 期，開始合成 DNA。

Synthesis (S) phase: DNA 合成期，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 (G_2) : DNA 複製到有絲分裂的期間，此時細胞核內 DNA 的含量由 G_1 期的 $2n$ 變成 $4n$ 。 G_2 期也存在限制點，檢查 DNA 是否完成複製，細胞是否生長至合適大小，環境因素是否有利於細胞分裂等。

Mitosis (M) phase：細胞分裂期，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。

文獻指出，當DNA受損時，週期便無法通過檢查點(checkpoints)而停滯 (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 (26)。

在真核細胞中，經由一系列特殊的Cyclin-CDK (Cyclin-CDK complex) 的活化與否來調控細胞週期進行，細胞的增生。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) 則會促使CDK的抑制者來負向調控細胞週期的進行 (27-30)。

調控細胞週期進行的蛋白稱為Cyclins，而調控Cyclins活化的則是一些Cyclin-dependent kinases (CDKs)。這些Cyclins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。Cyclins家族，主要在細胞週期中被合成。目前已知至少有8種Cyclins的存在，分別為A、B_{1,2,3}、C、D_{1,2,3}、E、F、G及H，這些Cyclins在N-端與CDKs鍵結處皆具有約150個胺基酸的相同區域，稱之為cyclin-box (30-33)，

cyclin-box媒介Cyclins與CDKs的結合。

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（34）。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（34）。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cdc 2 (CDK1) 及CDK2（35-36）。

在哺乳動物細胞中，Cyclin A在G₁期的早期即開始表現並逐漸累積，到達G₁/S交界處，其含量到達最大值並維持到G₂/M期。Cyclin B從G₁期晚期開始表現並逐漸累積，到G₂期後期達到最大值並一直維持到M期的中期，然後迅速分解。作為G₁期之Cyclin D在細胞週期中持續表現，而Cyclin E則在M期的晚期和G₁期早期開始表現並逐漸累積，到達G₁期的晚期，其含量到達最大值，然後逐漸下降，到達G₂期的晚期，其含量降至最低值（37）。

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 (35-36)。 cdc2主要存在S、 G2以及M時期，並與Cyclin A及B結合 (38)。

細胞週期中，除了上述Cyclins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 (CDKIs) (39-41)。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。在INK4家族 (命名由來為inhibit cdk4)，特別針對抑制的目標為cyclin D-dependent kinases (42-43)，INK4 proteins 功能為抑制Cyclin D/CDK4之結合及Cyclin D/CDK6之結合而達G₁時期的控制；另外INK4 proteins可抑制低磷酸化的視網膜原瘤蛋白 (hypophosphorylated retinoblastoma protein) 與轉錄因子 (transcriptional factor, E2F) 結合進而抑制S期基因的轉錄作用，最終造成G₁期的停滯 (44-46)。INK4 proteins其主要成員有p14、 p15 (INK4B) , p16 (INK4A) , p18 (INK4C) 以及 p19 (INK4D)。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 (39-41)。

第四節 細胞凋亡 (Apoptosis)

一、 細胞凋亡之定義

細胞凋亡一詞，源自於古希臘語，意指花瓣或樹葉的脫落、凋零。在1972年由病理學家John Kerr所提出 (47)。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 (48-50)，對於多細胞生物個體發育的正常進行、自穩平衡的保持及抵抗外界各種因素的干擾等方面都具有非常關鍵的作用。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 (51)。另一方面，當細胞凋亡失調時 (包括不恰當的活化或抑制) 會導致疾病，例如阿茲海默症 (Alzheimer disease) (52-56)、愛滋病、自體免疫疾病等 (57)。

二、 細胞凋亡分期之特徵及細胞壞死(necrosis)

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) (58-59)。凋亡小體最終會

為鄰近細胞所吞噬並切割。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。

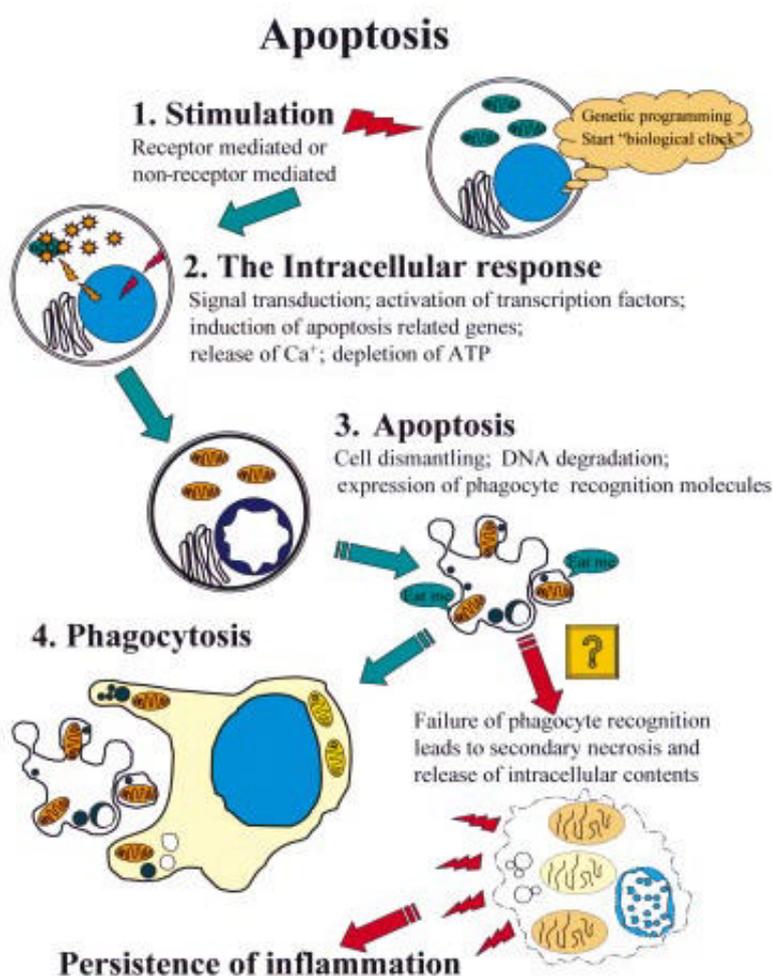


圖 2.3 細胞凋亡的階段 (59)

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（60-62）。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。

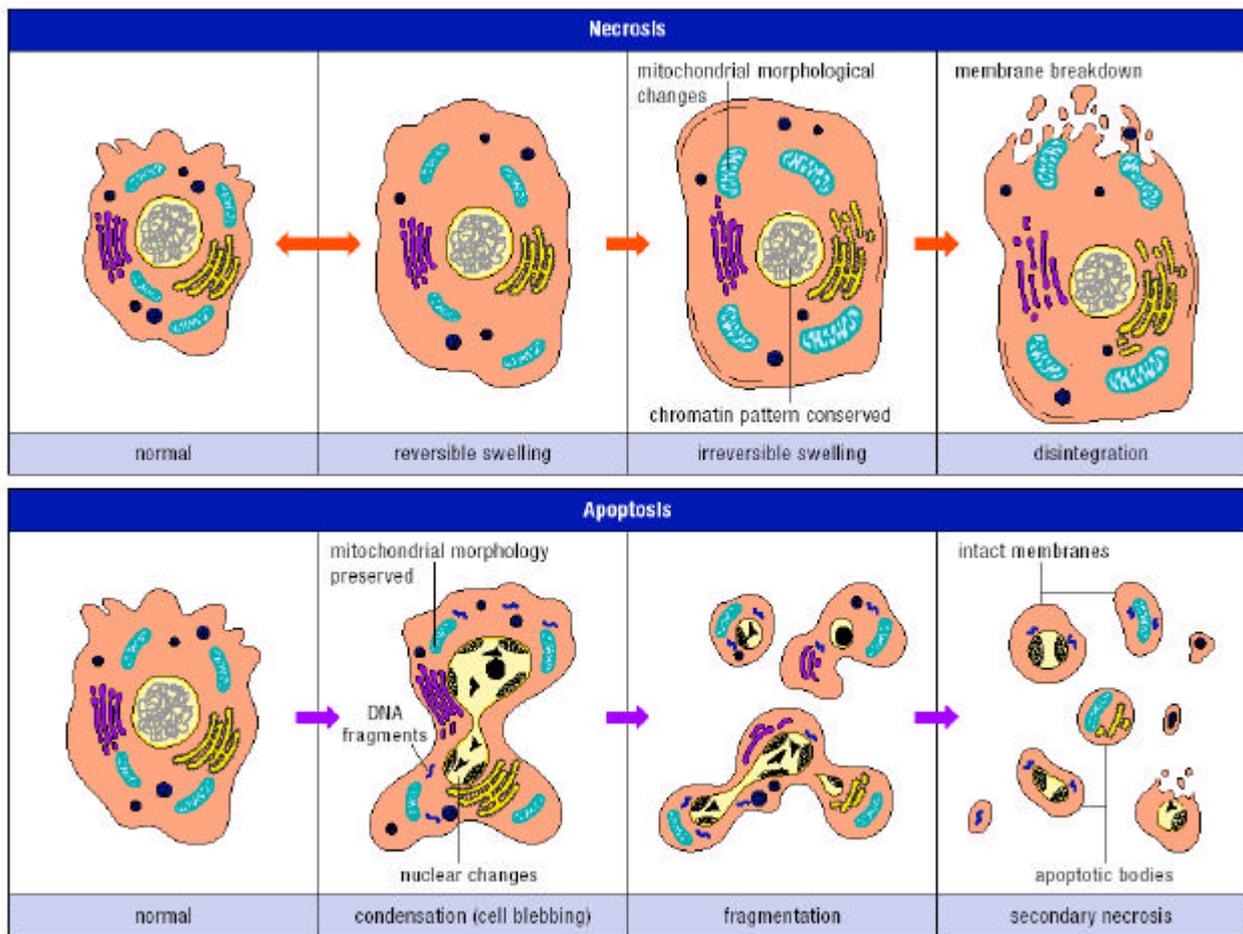


圖 2.4 Apoptosis 與 Necrosis 的區別 (63)

三、 細胞凋亡訊息傳導途徑

(一) 細胞凋亡的起始作用

細胞凋亡時之起始作用包括兩種途徑：一是細胞表面之死亡受體 (death receptor) 亦稱為外部的途徑 (extrinsic pathway), 如圖 2.5 所示 (64)。另一途徑為藉由粒腺體產生, 亦稱為內部的途徑 (intrinsic pathway) (65-66)。這兩種途徑皆造成 cysteine aspartyl-specific proteases (Caspases) 的活化, 活化的Caspases可切割細胞受質導致生化和型態學上的改變。

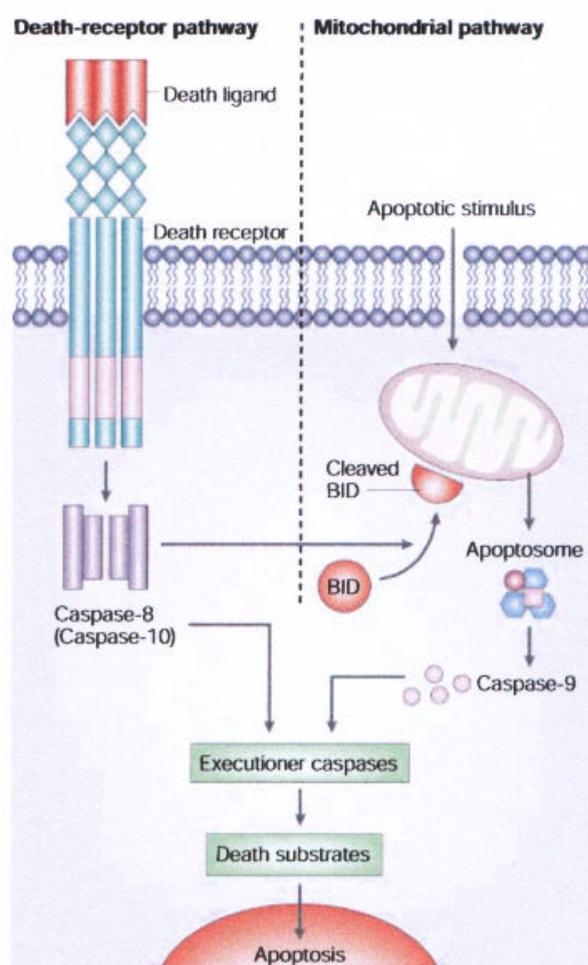


圖 2.5 兩種主要細胞凋亡的訊息傳導途徑 (64)

經由death receptors之細胞凋亡訊息傳導 - death receptors 是腫瘤壞死因子 (tumour-necrosis factor, TNF) receptor superfamily 的成員如CD95、TRAIL-R1、TRAIL-R2等，其具有death domain (65-66)可連接“細胞內連結蛋白”(intracellular adaptor protein) 如FADD (Fas-associated death domain protein, 如MORT1)。死亡受體(如CD95)會被它們的專一性鍵合物(ligands, 如CD95L)活化。當這些鍵合物與其專一性死亡受體結合形成“誘發死亡的訊息傳導複合體”(death-inducing signaling complex, DISC), 可引起Caspases family(如Caspase-8 Caspase-10)的活化, Caspase-8 Caspase-10又稱之為“initiator” casases。Caspase-8可活化Bid, 被活化的Bid會誘發細胞凋亡蛋白如Smac/Diablo從粒腺體內膜釋放至細胞質中, 去除“細胞凋亡蛋白的抑制劑”(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs), 而進一步促進procaspase-9、procaspase-3活化形成Caspase-9、Caspase-3, 如圖 2.6所示(64)。

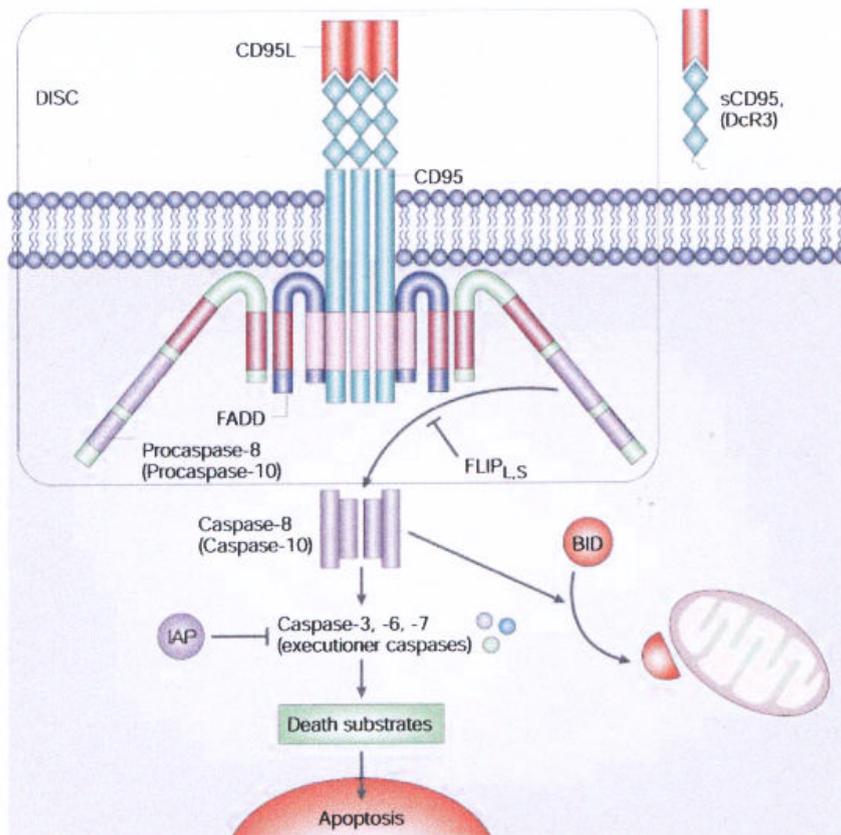


圖 2.6 經由死亡受體之細胞凋亡訊息傳導途徑 (64)

經由粒腺體之細胞凋亡訊息傳導 - 在粒腺體啟動死亡是藉由 Bcl-2 family 調節，其可分為抗細胞凋亡蛋白(antiapoptotic proteins 如 Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl_w, 等) 和促進細胞凋亡蛋白 (proapoptotic proteins 如 Bax, Bak, Bcl-X_s, Bid, Bad 等)。 proapoptotic proteins 又可細分為 Bax subfamily (Bax, Bak, Bok 等) 和 BH3-only (Bcl-2 homology 3) proteins (Bid, Bad 等) (67)。

在化療、放射線及其他刺激下可經由粒腺體的途徑來啟動細胞
凋亡。 proapoptotic proteins 是死亡訊號重要的調節者，其可活化粒
腺體造成 cytochrome c 釋放至細胞質中，cytochrome c 可與“細胞
凋亡蛋白活化因子”（apoptotic protease activating factor 1,
Apaf-1）結合形成 apoptosome。Caspase-9 與 apoptosome 結合形成
複合體並促進 Caspase-9 自活化。而活化型 Caspase-9 會活化下游
executioner caspase（如 Caspase-3）（68），如圖 2.7（64）所示。

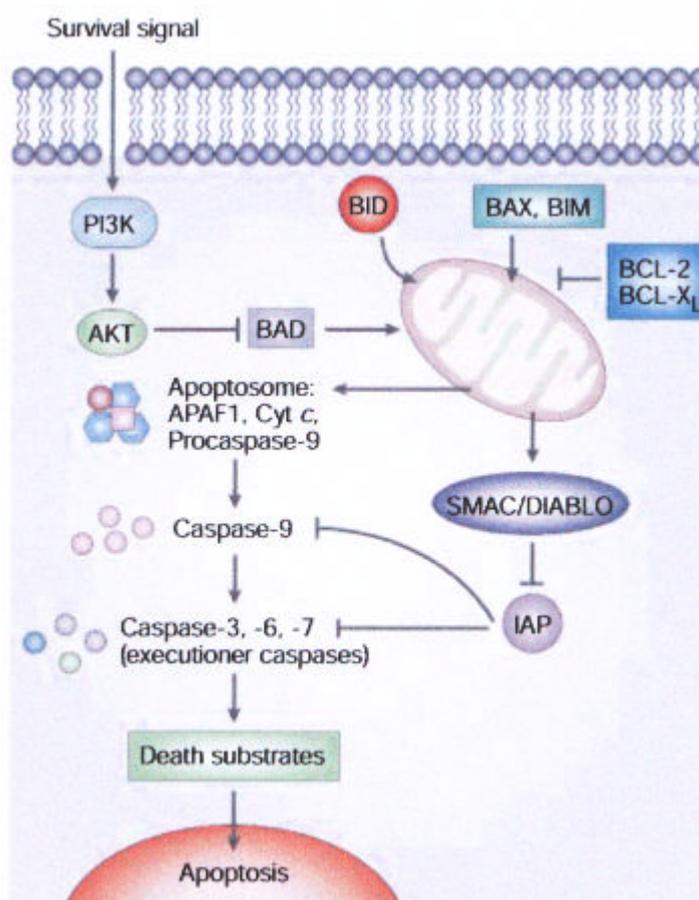


圖 2.7 經由粒腺體之細胞凋亡訊息傳導途徑（64）

(二) 細胞凋亡的執行作用

當 initiator ' caspases 被活化後，initiator ' caspases 會切割修飾和活化 ' executioner ' caspases (Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7)，然後這些 executioner ' caspases 彼此間會相互活化，接著 caspases 的活化作用即啟動 (69)。最終地，executioner ' caspases 可切割死亡受質，造成特徵生化和型態上的改變。當切割 nuclear LAMINS 時會造成染色質濃縮及細胞核裂解。當切割 ICAD (inhibitory subunit of the caspase-activated DNase 如 DFF45)，會引起核酸內切？釋放至細胞核去執行切割片段 DNA。切割細胞骨架的蛋白質如 actin、plectin、ROCK1 (Rho kinase 1) 和 gelsolin 也會造成細胞斷裂及形成凋亡小體。當出現 ' eat me signals ' (如暴露 phosphatidylserine、表面醣基的改變)，凋亡小體會被吞噬細胞所吞噬 (70)。

細胞凋亡的執行者 - caspase enzyme family

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 (71-72)：

a. The ICE subfamily of cytokine processors

此類 caspases 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 caspases 有 caspase-2、-8、-9、-10。其負責活化 apoptotic executioners，使 apoptotic executioners 執行細胞凋亡的作用。此類 caspases (如：caspase-8、caspase -10) 在 N 端具有較長的 prodomain 且於 N 端 prodomain 中具有兩個 DED (death effector domain)，可與下游的 adaptor molecule C 端的 DD domain 連結，以傳導來自 Death receptor pathway 的 death signals。而位於 prodomain 上 caspase-9 則具有 CARD (caspase-recruitment domain)，此 CARD domain 可與 Apaf-1 上 N 端的 CARD 結合 (73)，傳導來自 mitochondria pathway 的 death signals。

c. The Ced-3/CPP32 subfamily of apoptotic executioners

此類 caspases 有 caspase-3、-6、-7。其負責執行細胞凋亡，裂解其下游的蛋白如：PARP { Poly (ADP-ribose) polymerase } ...等。這類 caspases 其 N 端的 prodomain 較短。PARP 為 caspase-3 的受質。。一旦 PARP 受 caspase-3 裂解，會由 116kDa 被水解成 85 kDa，PARP 即失去修復受損的 DNA、調控細胞增殖與死亡的平衡、和維持基因體的穩定性的作用。

四、 粒腺體的細胞凋亡的訊息傳導

(一) *cytochrome c* 的釋放

cytochrome c 為粒腺體的電子傳遞鏈之組成物，於細胞凋亡期間會由粒腺體釋放，可啟動 caspases 的活化作用(74) *cytochrome c* 與 Apaf-1 結合使 Apaf-1 構型改變；而促使核糖酸 (dATP/ATP) 與 Apaf-1/*cytochrome c* complex 結合形成 apoptosome(75) Apaf-1 為細胞質的蛋白其具有 CARD (76)，當 CARD 暴露出來可吸引 procaspase-9 至 apoptosome，並幫助 procaspase-9 的自活化形成 Caspase-9。Caspase-9 可切割及活化下游 Caspases-3。

(二) *Smac/Diablo* 的釋放

Smac/Diablo 的前趨物在細胞液中合成並轉運至粒腺體，其粒腺體標的之序列會被切除，暴露出 Ala-Val-Pro-Ile 殘基 (AVPI)；此 AVPI 可與 IAPs 的 BIR (baculovirus IAP repeat) domain 結合 (77)；IAPs 可與 Caspase-3 及 Caspase-9 結合並抑制其作用，被 *Smac/Diablo* 結合的 IAPs 即被去除其抑制作用。

(三) 細胞凋亡之誘發因子的釋放

當誘發細胞凋亡時，細胞凋亡之誘發因子會從粒腺體轉運至細胞核，造成染色體濃縮及大量的 DNA 斷裂作用 (74)。

細胞凋亡的過程受到許多基因的調控，如 p53 基因，p53 基因是一種腫瘤抑制基因，其所轉錄的蛋白 p53 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（78）。但是當 DNA 受損太嚴重時，p53 則會促使細胞進入細胞凋亡。

第三章 材料與方法

第一節 實驗材料

一、 原料

由欣隆中藥行購買石斛。

二、 藥品試劑

- [1]. MEM Medium (購自 GIBCO)
- [2]. Fetal Bovine serum (購自 GIBCO)
- [3]. Penicillin-Streptomycin (購自 GIBCO)
- [4]. L-glutamine (購自 GIBCO)
- [5]. Dimethyl Sulfoxide (DMSO; 購自 Sigma)
- [6]. Trypan blue (購自 Sigma)
- [7]. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 ; 購自 Merck)
- [8]. Sodium chloride (NaCl ; 購自 Merck)
- [9]. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 ; 購自 Merck)
- [10]. Potassium chloride (KCl ; 購自 Merck)
- [11]. Aloe-emodin (購自 Sigma)
- [12]. PI (Propidium iodide; 購自 Sigma)
- [13]. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-terazolium bromide; 購自 Sigma)

- [14]. RNase A (Ribonuclease A; 購自 CLONTECH)
- [15]. Triton X-100 (購自 Sigma)
- [16]. Ethanol (購自 TEDIA)
- [17]. APS (Ammonium persulfate; 購自 Amresco).
- [18]. Acrylamide/Bis 40% solution (ACRYL/BISTM29:1;
購自 Amresco)
- [19]. Bovine serum albumin (BSA; 購自 Merck)
- [20]. Glycine (購自 Amresco)
- [21]. Methanol (購自 TEDIA)
- [22]. formaldehyde (購自 Merck)
- [23]. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit ; 購自 Amersham)
- [24]. GelCodeR commassie blue (購自 PIERCE)
- [25]. Glycerol (購自 Scharlau)
- [26]. Hydrochloric acid (購自 Merck)
- [27]. Protein assay-Dye reagent concentrate (購自 Bio-Rad)
- [28]. Protein maker (購自 Femantas)
- [29]. SDS (Sodium dodecyl sulfate; 購自 Amresco)
- [30]. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine; 購自
Amresco)
- [31]. Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane; 購自 Amresco)

- [32]. Tween 20 (購自 Amresco)
- [33]. 脫脂奶粉 (安佳)
- [34]. 顯影劑 (購自 Kodak)
- [35]. 定影劑 (購自 Kodak)
- [36]. BioMax Flim (購自 Kodak)
- [37]. 10X BlueJuice (Gel loading buffer; 購自 Invitrogen)
- [38]. Agarose I (購自 Amresco)
- [39]. 核酸純化試劑組 (G-NOME DNA KIT; 購自 Bio101 Inc)
- [40]. 蛋白質萃取試劑 (PRO-PREP protein extraction solution;
購自 iNtRON Biotechnology)
- [41]. 5X TBE buffer (購自 Amresco)
- [42]. 10X SDS-PAGE running buffer (TG-SDS buffer;
購自 Amresco)
- [43]. 4X Protein loading dye (購自 Amresco)
- [44]. TE buffer (購自 Amresco)
- [45]. 人類血癌細胞株 (HL-60:Acute Promyelocytic leukemia
cell line; 購自新竹食品工業研究院)
- [45]. 一級抗體 :
- (a). anti-Cyclin A (#05-374; 購自 Upstate)
- (b). anti-Cyclin B1 (#05-373; 購自 Upstate)

- (c). anti-cdk1/cdc2 (#06-923; 購自 Upstate)
- (d). anti-cdk2 (#05-596; 購自 Upstate)
- (e). anti-actin (MAB1501; 購自 Chemicon)
- (f). anti-p27^{Kip1} (MS-256-P0; 購自 NeoMarkers)
- (g). anti-p21^{WAF1} (MS-891-P0; 購自 NeoMarkers)
- (h). anti-caspase-8 (RB-1200-P0; 購自 NeoMarkers)
- (i). anti-caspase-9 (RB-1205-P0; 購自 NeoMarkers)
- (j). anti-caspase-3 (RB-1197-P0; 購自 NeoMarkers)

[46]. 二級抗體

- (a). goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody (AP124P; 購自 Chemicon)
- (b). goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody (購自 Chemicon)
- (c). goat anti-mouse IgG (FITC) fluorescein 5-isothiocyanate conjugated antibody (購自 Chemicon)

三、設備、器材

- [1]. 無菌操作台 (購自 Lian Shen)
- [2]. 細胞培養箱 (購自 Nuair)
- [3]. 細胞培養皿 (購自 FALCON)
- [4]. 細胞培養盤 (購自 FALCON)
- [5]. 細胞計數器 (Haemocytometer; 購自 Boeco)
- [6]. 倒立式位像差顯微鏡 (phase-contrast microscope; 購自 Olympus)
- [7]. 冷凍管 (購自 TPP)
- [8]. 離心機 (購自 Beckman)
- [9]. Dispensor (購自 TPP)
- [10]. 微量離心管 (購自 季勗)
- [11]. Pipetment (購自 Costar)
- [12]. 加熱板 (購自 Lab-Line)
- [13]. 酵素免疫分析儀 (anthos 2020; 購自 Anthos Labtec, Australia)
- [14]. 微量天平 (GR-200; 購自 A&D)
- [15]. 去離子水製造機 (購自 Minipore)
- [16]. 乾浴槽 (Model 110001; 購自 Boekel)
- [17]. 電源供應器 (購自 Amersham)

- [18]. 酸鹼值測定計 (C831; 購自 Consort)
- [19]. PVDF membrane (購自 Minipore)
- [20]. Mini-3D Shaker (購自 Boeco)
- [21]. SDS-PAGE 電泳槽套組 (購自 Bio-Rad)
- [22]. Transfer Cell Blot 套組 (購自 Bio-Rad)
- [23]. 流式細胞儀 (Flow cytometry; 購自 Becton Dickinson)
- [24]. DNA 電泳槽 (購自 Mupid-2)
- [25]. 高速離心機 (購自 Labnet)

第二節 實驗方法

一、 石斛水萃取物的製備及配製

秤取 50 g 的石斛，加入 750 mL 去離子水浸泡 4 小時 將含有 750 mL 去離子水之浸泡液的石斛一起放入自動煎藥壺（麥登保溫自動煎藥壺，型號 MD-318/628）進行 90 min 的煎煮。原藥材再加入 750 mL 去離子水進行第二次煎煮。將兩次煎煮好的藥汁混合均勻，使用一號濾紙過濾，將濾液分裝至 50 mL 離心管並放至-80 冰箱中凍結，然後進行真空冷凍乾燥（如圖 3.1）。

稱取經冷凍乾燥之石斛水提取物 0.045 g，溶於 1.5 mL DMSO，配製成石斛水提取物之原始溶液（stock solution），從 stock solution（30 mg/mL）分別取 1.25、2.5、5、10 及 20 μ L（其最終濃度為 18.75、37.5、75、150 及 300 μ g/mL）加入 12 孔洞平盤（12 well plate）中進行細胞增生及細胞週期測試。加入 10 cm dish 中進行細胞凋亡的測試（DNA fragmentation electrophoresis analysis）和反轉錄聚合酵素連鎖反應（Reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR）等分析。

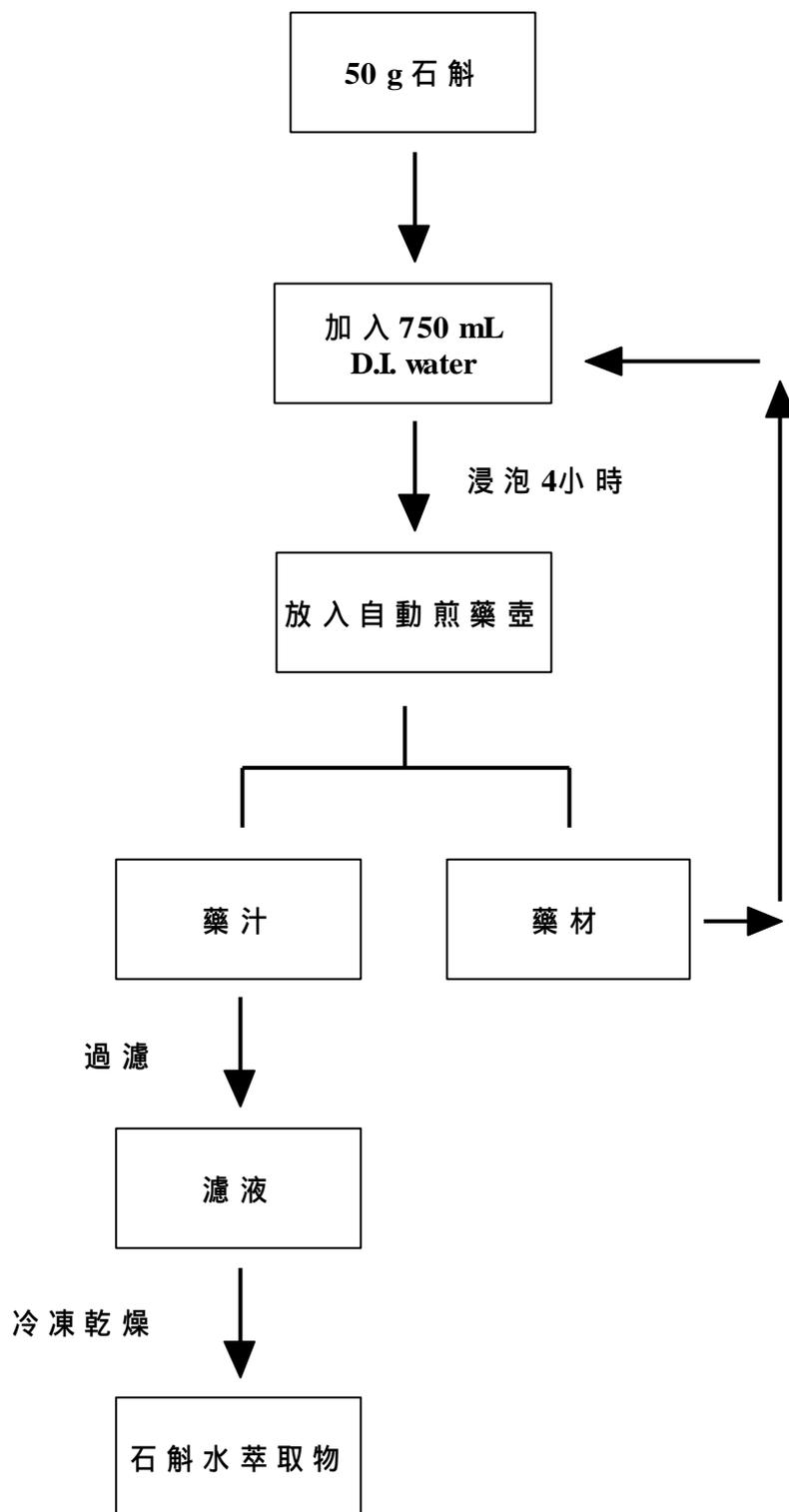


圖 3.1 石斛水萃取物之製備流程圖

二、 冷凍細胞之活化

冷凍細胞之活化原則為快速解凍，以避免冰晶重新結晶而對細胞造成傷害，導致細胞之死亡。細胞活化後，約需數日，或繼代一至二代，其細胞生長或特性表現才會恢復正常（例如產生單株抗體或是其他蛋白質）。冷凍的細胞快速解凍的方法為：將冷凍管由液氮或乾冰容器中取出，立即放入 37 °C 水槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 3 分鐘內全部融化，以 70% 酒精擦拭保存管的外部，移入無菌操作台內。取出解凍之細胞懸浮液，緩緩加入有培養基之培養容器內（稀釋比例為 1:10 1:15），混合均勻，放入 CO₂ 培養箱培養。在解凍培養後隔日更換培養基。

三、 細胞冷凍保存

注意事項：欲冷凍保存之細胞應在生長良好（log phase）且存活率高之狀態，約為 80-90% 緻密度。注意冷凍保護劑之品質。DMSO 應為試劑級等級，無菌且無色（以 0.22 micron FGLP Teflon 過濾或是直接購買無菌產品），以 5-10mL 小體積分裝，4 °C 避光保存，勿作多次解凍。冷凍保存之細胞濃度： 5×10^6 10×10^6 cells/mL。冷凍保存劑濃度為 5% DMSO。

細胞冷凍保存之操作步驟為：冷凍前一日前更換半量或全量培養基，觀察細胞生長情形。配製冷凍保存溶液（使用前配製）：將 DMSO

加入新鮮培養基中，最後濃度為 5 % ，混合均勻，置於室溫下待用。
取少量細胞懸浮液（約 0.1 mL）計數細胞濃度及凍前存活率。離心，
去除上清液，加入適量冷凍保存溶液，使細胞濃度為 1×10^6 - 5×10^6
cells/mL，混合均勻，分裝於已標示完全之冷凍保存管中，1 mL/vial。
冷凍保存方法：冷凍管置於 4 °C 10 分鐘？ -20 °C 30 分鐘？ -80 °C
16 - 18 小時？ 液氮槽長期儲存。

四、 人類乳癌細胞（MDA-MB-231）之培養

實驗進行前，無菌室和無菌操作台以紫外燈照射 36-60 分鐘，以
70 % ethanol 擦拭無菌操作台面，並開啟無菌操作颱風扇運轉 10 分鐘
後，才開始實驗操作。所有進入無菌操作台的器物均需先噴灑 70% 酒
精，有蓋容器旋開瓶蓋前均需先過火。

人類乳癌細胞（human breast cancer, MDA-MB-231）購自食品工
業發展研究所（Food Industry Research and Development Institute），培
養於 MEM（Modified Eagle Medium）中（含 10 % fetal calf serum, 2 mM
L-glutamine、100 µg/mL of streptomycin 和 100 units/mL of penicillin）
。將細胞放置於 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱中培養。定期以 Trypan blue
染色，利用血球計數盤（Hemocytometer）計數細胞數目及存活率，
並控制持續培養的數目，使其細胞密度維持在 2×10^5 - 5×10^5
cells/mL。

五、 細胞數目計數及細胞存活測試

計算細胞數目是用血球計數盤，血球計數盤一般有兩個槽 chambers，每個槽 (chamber) 中細刻 9 個 1 mm^2 大之正方形，其中 4 個角落之正方形再細刻 16 個小格，深度均為 0.1 mm 。當 chamber 上方蓋上蓋玻片後，每個大正方形之體積為 $1\text{ mm}^2 \times 0.1\text{ mm} = 1 \times 10^{-4}\text{ mL}$ 。使用時，計數每個大正方形內之細胞數目，乘以稀釋倍數，再乘以 10^4 ，即為每 mL 中之細胞數目 (如下圖 3.2 所示)。

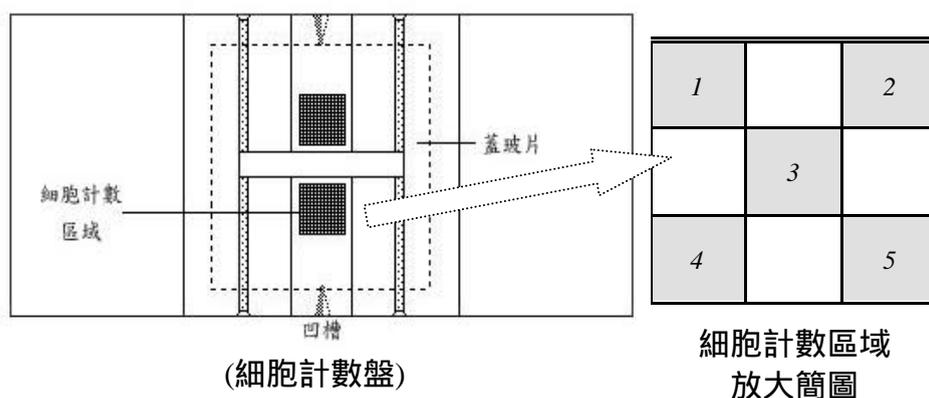


圖 3.2 細胞計數盤結構

存活測試之原理為 dye exclusion，利用染料會滲入死細胞中而呈色，而活細胞因細胞膜完整，染料無法滲入而不會呈色。一般使用藍色之 trypan blue 染料。

存活測試之步驟，首先取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 細胞懸浮液與 $50\text{ }\mu\text{L}$ trypan blue ($0.4\% \text{ w/v}$ trypan blue)等體積混合均勻於 1.5 mL 離心管中。取少許混

合液(約 15 μ L)血球計數盤之 chamber 上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於 100 倍倒立顯微鏡下觀察，活細胞不被染色，死細胞則被染成藍色。計數五個大方格之細胞總數，再除 5，乘以稀釋倍數（至少乘以 2，因與 trypan blue 等體積混合），最後乘以 10^4 ，即為每 mL 中細胞懸浮液之細胞數。若細胞位於線上，只計上線與右線之細胞（或計下線與左線之細胞）。如所含細胞密度過高，則算出的數目誤差較大（每一大格過 50 個細胞），需再加入更多的培養液稀釋。完成存活測試之步驟後，即可計算所需的細胞數，將所需的細胞數培養至 12 孔洞平盤或 10 cm dish 中利用流式細胞儀進行存活率的測試。

六、 石斛水萃取物對人類乳癌細胞株（MDA-MB-231）細胞增生的影響

細胞增生的測試中存活的細胞數是利用流式細胞儀（Flow Cytometer）計數。流式細胞儀包括液流系統、光學系統、分選系統和電子系統。待測樣本經液流系統傳送後，依序地通過流式細胞儀中雷射照射的區域，受雷射的激發產生信號，被信號接收器接受並放大，這些放大的信號經電腦分析處理，並以圖表的形式顯示出來。流式細胞儀產生並分析的信號主要有光散射信號和螢光信號。依螢光素的不同，用不同波長的光激發，發射出不同波長的螢光，可顯示不同的顏色（79）。

利用流式細胞儀評估存活細胞數和存活率其原理如下：當細胞死亡時會進行細胞壞死（Necrosis）或細胞凋亡（Apoptosis）的路徑，死亡的細胞其細胞膜會失去完整性（membrane integrity）（79）。Propidium Iodide（PI）是一種核酸染劑，以 PI 進行染色時，死亡的細胞，因其細胞膜破裂，PI 可進入細胞內和核酸結合；存活的細胞，因其細胞膜完整，PI 無法和細胞內的核酸結合。經 PI 染色完成的細胞可由流式細胞儀於 488 nm 的雷射光激發後，死亡的細胞會呈現較強的紅色螢光，而存活的細胞則呈現較弱的紅色螢光（80）。以 CellQuest 軟體分析細胞的增殖率（如下圖 3.3 所示）。

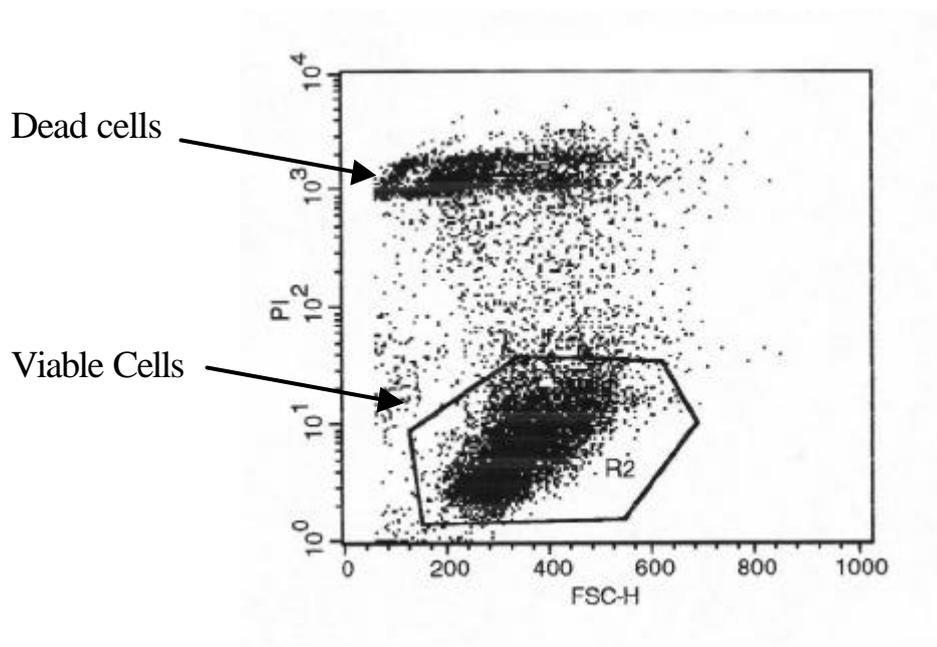


圖 3.3 利用 PI (Propidium Iodide) 單染細胞時細胞型態變化

細胞增殖率以下列公式計算：

$$\left(\frac{\text{實驗組存活細胞數目}}{\text{對照組存活細胞數目}} \right) \times 100 \%$$

實驗組：乳癌細胞加入石斛 (stock solution : 30 mg/mL DMSO)

對照組：乳癌細胞加入含有 20 μ L DMSO 之 2 mL 新鮮的培養液

進行分盤實驗的前一天，乳癌細胞需以離心去除上清液後加入新鮮的培養液，並使細胞密度在 2×10^5 - 4×10^5 cells/mL。

進行分盤時，首先需利用細胞計數盤計數細胞（至少二重複）以求出其準確的細胞密度，接著加入培養液把細胞密度稀釋至 1×10^5 cells/mL 並將 2 mL 含 2×10^5 cells 種植至 12 孔洞平盤中，然後放置於 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 的培養箱 (incubator) 進行培養。隔天加藥。試藥的配製為秤取 0.045 g 試藥溶於 1.5 mL DMSO 中，從 stock solution 分別取 1.25、2.5、5、10 及 20 μ L 加入 12 孔洞平盤中，每種濃度作四重複。其最終濃度為 18.75、37.5、75、150 及 300 μ g/mL，12 孔洞平盤中石斛水萃物濃度分配如圖 3.4。培養 24 和 48 小時後，各取一組細胞來檢測細胞生長的情形。

C	C	C	C	75	75	75	75
18.75	18.75	18.75	18.75	150	150	150	150
37.5	37.5	37.5	37.5	300	300	300	300

圖 3.4 12 孔洞平盤中石斛水萃物濃度分配情形

取 15 mL 離心管並於其上標示各個藥物濃度。利用塑膠吸管從每一個孔洞中的 medium 吸取至 15 mL 離心管，加入 2 mL PBS 緩衝液(表 3.1)至平盤中清洗，輕搖晃平盤並吸取 PBS 緩衝液至離心管，加入約 1 mL 胰蛋白酶，貼附的細胞從平盤上分離，接著加入 2 mL PBS 緩衝液至平盤並吸取 PBS 緩衝液至離心管，進行 1500 rpm, 5 min 的離心。倒掉上清液，將細胞完勻打散後，再加入 2 mL PBS 緩衝液至平盤並吸取 PBS 緩衝液至離心管，進行 1500 rpm, 5 min 的離心。於離心管中加入適量經 5 倍稀釋後的 PI 染劑 (450 - 550 μ L, 視細胞數而定)(表 3.2), 混合均勻後，即可進行流式細胞儀分析，固定計數秒數 (20 秒) 及流速 (35 μ L/min), 計數細胞增殖率。

表 3.1 1 倍磷酸緩衝鹽類溶液 (1X phosphate buffer saline, PBS, pH=7.4) 之組成

組 成	重 量(g)
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.44
KH ₂ PO ₄	0.24
加 DDW 至總體積 1000 mL	

表 3.2 PI (propidium iodide) stain 染劑之組成

組 成	最終濃度	初濃度	體積 (ml)
Propidium iodide (PI)	0.4 mg/dl	2 mg/dl	5
Triton	1 %	5 %	5
RNase A	0.1 mg/mL	2 mg/mL	1.25
1X PBS	-	-	13.75
總體積			25 mL

*RNase A 配好後需以 70 °C 加熱 20 分鐘處理後分裝。

*PI stain 染劑儲存於 4 °C 。

七、 檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 細胞型態的影響

將 2 mL 含 2×10^5 cells 種植至 12 孔洞平盤之每個孔洞中，放入 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱進行培養。隔天加入 300 µg/mL 的石斛水提取物至 12 孔洞平盤中，放入 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱進行培養。經過 12、24、36 及 48 小時培養後，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態的改變。

八、 檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 細胞週期的影響

將 2 mL 含 2×10^5 cells 種植至 12 孔洞平盤之每個孔洞中，放入 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱進行培養。隔天加入不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 µg/mL) 至 12 孔洞平盤中，放入 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱進行培養，於 24 和 48 小時後檢測細胞週期改變的情形。

將離心管標示各個藥物濃度，同時取出胰蛋白酶回溫。利用塑膠吸管從每一個孔洞中的 medium 吸取至 15 mL 離心管，加入 2 mL PBS 緩衝液至平盤中清洗，輕搖晃平盤並吸取 PBS 緩衝液至離心管，加入約 1 mL 的胰蛋白酶使貼附的細胞從平盤上分離，接著加入 2 mL PBS 緩衝液至平盤並吸取 PBS 緩衝液至離心管，進行 1500 rpm, 5 min

離心。倒掉上清液，將細胞完全均勻打散後，再加入 2 mL PBS 緩衝液至平盤並吸取 PBS 緩衝液至離心管，進行 1500 rpm, 5 min 的離心。倒掉上清液，再將細胞完全均勻打散後，以冰的 70% 酒精（4 ）進行細胞固定步驟（震盪器以”SHAKE 3”速度震盪，一滴一滴緩慢將酒精滴入），隨後將細胞固定步驟完成的樣品置於-20 冰箱隔夜存放。

隔天，將樣品從冰箱取出後離心（1500 rpm、5 分鐘）以去除酒精，之後將細胞完全打散。加入 2 mL 的 PBS 緩衝液清洗並離心。將完全均勻打散的細胞加入 500 μ L 的 PI stain 染劑(其量可視細胞數目增減)，避光反應 30 分鐘。以 1 mL pipette 在 15 mL 離心管中抽吸數次後，將細胞移至流式細胞儀專用管，置於冰上及避光。以流式細胞儀(Flow cytometry; FACS)進行分析，數據以 Modfit LT[®]軟體進行處理分析（81）。

九、 檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞是否產生細胞凋亡的情形

(一) 利用流式細胞儀檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞株產生細胞凋亡的情形

將 2 mL 含 2×10^5 cells 種植至 12 孔洞平盤之每個孔洞中，放入 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱進行培養。隔天加入不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 μg/mL) 至 12 孔洞平盤中，放入 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱進行培養，於 36 小時後檢測細胞凋亡的情形。

將細胞懸浮液從 12 孔洞平盤中分別移至 15 mL 離心管，進行 1500 rpm、5 分鐘的離心。倒掉上清液並將細胞完全均勻打散後加入 2 mL/well 的 PBS 緩衝液進行 1500 rpm、5 分鐘的離心。取出倒掉上清液並將細胞完全均勻打散，以 4 °C 冰的 70 % 酒精進行細胞固定步驟(以"SHAKE 3"速度震盪，一滴一滴緩慢將酒精滴入)，隨後將細胞固定步驟完成的樣品置於 -20 °C 冰箱隔夜存放。隔天，從冰箱中取出樣品並離心(1500 rpm、5 分鐘)以去除酒精。之後將細胞完全均勻打散加入 2 mL 的 PBS 緩衝液清洗及離心。取出細胞將之完全均勻打散，在每個試管中加入 500 μL 的 PI stain 染劑(其量可視細胞數目增減)，避光反應 30 分鐘。在檢查 FACS 專用管是否破損後，於管子外標上樣品編號備用。以 1 mL pipette 在 15 mL 離心管中抽吸數次後，將細胞移到 FACS 專用管後置於冰上並避光。最後以流式細胞儀

(Flow cytometry; FACS) 進行樣品分析，一秒細胞數不超過 300 顆細胞，每個數據收集 12000 顆細胞，數據以 Cell Quest[®]軟體進行處理分析。

(二) 利用電泳法來檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞株產生細胞凋亡的情形

將 12 mL 含 5×10^6 cells 均勻種入 10 cm 細胞培養盤，放入 37、5% CO₂ 的培養箱進行培養。隔天加入不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 至 10 cm 細胞培養盤中。放入 37、5% CO₂ 的培養箱進行培養，於 36 小時後檢測細胞凋亡的情形。

收集加藥後 36 小時的細胞並利用 DNA 抽取 KIT (G-NOME BIO101 Inc.) 將 DNA 抽取出來。首先將細胞收集放在 15 mL 離心管中並小心將 PBS 吸乾淨，接著加入 1.85 mL Cell Suspension Solution 左右搖晃使細胞完全均勻分散，加入 50 μL RNase Mix. 搖晃均勻，再加入 100 μL Cell Lysis/Denaturing Solution 搖晃均勻，放入 55 水浴鍋中 30 分鐘，取出加入 25 μL Protease Mix. 搖晃均勻，再放入 55 水浴鍋中 90 分鐘，加入 500 μL Salt-Out Mixture 小心混合均勻並將檢體分裝到 2 mL 離心管中，置於冰上 10 分鐘，接著離心 15000 rpm、10 分鐘後小心吸取上清液放入 15 mL 離心管中，加入 2 mL TE-buffer 混合均勻，接著加入 8 mL 100% ethanol，小心緩慢混合均勻。此時若

DNA 抽取成功，經輕輕搖晃會出現白色絲狀棉絮。接著 1500rpm、10 分鐘離心，小心倒掉上清液後，將 15mL 離心管倒立放置自然風乾。風乾後 15 mL 離心管底部會有透明狀沉澱物(pellet)，即為 DNA，加入 50 μ L TE buffer 促進 DNA 溶解（若不易溶解時，可以加熱促進溶解）。

將溶解的 DNA 與 10 倍 DNA loading dye 混合 loading 至 2 % agarose (1 g agarose、50 mL 0.5X TBE buffer、10 μ L Eithidium bromide)。進行電泳，最後放入 UV 燈下檢查並照相。

十、反轉錄聚合酵素連鎖反應 (Reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

(一) total RNA 的抽取

將 12 mL 含 5×10^6 cells 均勻種入 10 cm 細胞培養盤，放入 37、5 % CO₂ 的培養箱進行培養。細胞成長至 6-7 分滿時，加入不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 μ g/mL) 至 10cm 細胞培養盤中，進行培養，於不同時段收集細胞並利用 RNeasy[®] Mini kit(50) (購自 QIAGEN Inc. Cat. No. 74104) 進行 total RNA 的抽取。加入 600 μ L Buffer RLT (lysis buffer) 與 2-mercaptoethanol 的混合液於 50 mL 離心管中並震盪至澄清狀(約 30 秒)，加入 700 μ L 70 % ethanol 並用 pipette 上下均勻吸取，以 pipette 吸取液體(呈粘稠絲狀)至 spin column，進

行 13000 rpm、30 sec 離心，倒掉下層液。繼續從 50mL 離心管中吸取剩下液體進行離心。加入 700 μ L Buffer RW1(wash buffer)，進行離心。更換新的 collection tube，加入 500 μ L Buffer RPE(wash buffer)，進行離心。更換新的 collection tube 並加入 500 μ L Buffer RPE，進行 13000 rpm、約 2 min 離心(離乾為止)。更換新的 collection tube 並標示濃度，加入 30 μ L RNAase free water 於室溫靜置 10 min，進行離心收集下層液(total RNA)，將 total RNA 於-20 貯存。

(二) 定量 total RNA

以 200 μ L 的去離子水當作 blank；取 2 μ L total RNA 與 198 μ L 的去離子水混合，於 260 nm 波長下測定吸光值。如果 O.D < 0.04，則無法進行 RT-PCR。Total RNA 濃度計算方式如下：

total RNA 濃度 (ng/ μ L) = O.D₂₆₀ × 40 (ng/ μ L) × 稀釋倍數

註：1 O.D = 40 ng/ μ L (即每 μ L 內含 1 ng RNA 的 O.D 值為 0.025)

將 total RNA 定量為 1500 ng。

(三) cDNA 的合成

反轉錄的步驟：加入 DEPC-H₂O 及 total RNA (視 total RNA 的吸光值不同，兩者的量有所不同) 於微量離心管中 (輕拍離心管，tip

輕碰觸液面上下吸放使之均勻混合)。加入 2 μ L 混合物 (1 μ L dNTP, 1 μ L oligo(dT)₁₈ primer) 置於 Bio-Rad iCycler 反應 5 min。加入 7 μ L (4 μ L 5 X First strand Buffer、 2 μ L DTT、 1 μ L dd H₂O) 混合物置於 Bio-Rad iCycler 反應 42 °C、 2 min。加入 1 μ L RNAaseH 置於 Bio-Rad iCycler 反應 42 °C、 50 min 及 70 °C、 15 min , 即可得到 cDNA (需迅速置於冰上)。

聚合酵素連鎖反應的步驟：於微量離心管中加入 38.1 μ L dd H₂O 震盪數秒, 加入 2 μ L cDNA 及 9.9 μ L 混合物(10 mM dNTP 10 X PCR Buffer, 50 mM MgCl₂, reverse/forward primers and taq DNA Polymerase 分別為 1 μ L、 5 μ L、 1.5 μ L、 1 μ L/1 μ L 和 0.4 μ L), 震盪數秒, 置於 Bio-Rad iCycler 反應。放大 35 cycles cycle 包括

0.5 min, 94 °C - denaturation

0.5 min, 55 °C - annealing

1 min, 72 °C - extension

Agarose gel electrophoresis 的步驟, 將 17 μ L 放大的 cDNA 與 2 μ L 10 倍 DNA loading dye 混合並注入至 1.5% agarose(0.75 g agarose, 50 mL 0.5X TBE buffer) 進行電泳, 以 EtBr(Eithidium bromide) 染色, 最後放入 UV 燈下檢查並照相。

表 3.3 PCR primer 序列

Gene	Primers	產物大小(bp)	References
Actin	Fw : 5'-GGCGACGAGGCCCAAGA-3' Rv : 5'-CGATTTCCCGCTCGGC-3'	353	80
Cyclin B	Fw : 5'-AAGGCGAAGATCAACATGGC-3' Rv : 5'-AGTCACCAATTTCTGGAGGG-3'	720	81
Cyclin D1	Fw : 5'-GAGACCATCCCCCTGACGGC-3' Rv : 5'-TCTTCCTCCTCCTCGGCGGGC-3'	495	
CDK1	Fw : 5'-TTTTCAGAGCTTTGGGCACT-3' Rv : 5'-AAATCCAAGCCATTTTCATCC-3'	142	
p21	Fw : 5'-AGTGGACAGCGAGCAGTGA-3' Rv : 5'-TAGAAATCTGTCATGCTGGTCTG-3'	380	82
Wee-1	Fw : 5'-ACTGATAGAATCCAGTTTGC-3' Rv : 5'-ATGCAATGCCTACAAAGTGC-3'	321	
cdc25c	Fw : 5'-GCAGCCTTGAGTTGCATAGAG-3' Rv : 5'-GACAACGCTCTTGCATAGCC-3'	131	
Chk1	Fw : 5'-GCATTGTTTTGGAGCTGGTT-3' Rv : 5'-AGAACTGGCCACGCAGTC-3'	130	
caspase 3	Fw : 5'-CTAAGCCATGGTGATGAAGGG-3' Rv : 5'-CTGCAAAGGGACTGGATGAAC-3'		
caspase 9	Fw : 5'-AGCTCTTCTTCATCCAGG-3' Rv : 5'-CCCCCAGCCTCATGAAGTT-3'		
Bcl-2	Fw : 5'-CTGTTTGATTTCTCCTGGCTGT-3' Rv : 5'-TGCACCTGACGCCCTTCAC-3'	389	
Bax	Fw : 5'-ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC-3' Rv : 5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTC-3'	517/560	

十一、 檢測石斛水提取物對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231)

細胞內與細胞週期相關蛋白質的影響 - 西方點墨法

(Western Blotting)

(一) 細胞蛋白質抽取

將12 mL 含 5×10^6 cells均勻種入10 cm細胞培養盤，放入37 °C、5 % CO₂的培養箱進行培養。隔天加入300 µg/mL的石斛水萃取物 (0-300 µg/mL) 至12孔洞平盤中，放入37 °C、5 % CO₂的培養箱進行培養。經過12、24、36及48小時培養後進行蛋白質的抽取。

於不同時間將不同濃度組別的細胞懸浮液分別移到15 mL離心管中離心 (1500 rpm、5分鐘)。倒掉上清液，再將細胞完全打散後加入2 mL/wells的PBS緩衝液離心 (1500 rpm、5分鐘)。倒掉上清液，將細胞完全打散後，加入200 µL的Lysis buffer。劇烈震盪後置於冰上30分鐘處理樣品，再經離心 (4 °C、13000 rpm、10分鐘) 取出上清液即含細胞蛋白質。

(二) 蛋白質定量

使用胎牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin; BSA) 當蛋白質的標準品，利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 在 O.D 590 nm 測定各蛋白質標準品吸光值之平均值。以蛋白質標準品吸光值與濃度畫出標準品檢量線，並求出趨勢線方程式及 R² 值。

1. 蛋白質標準檢量線製作

依表 3.4 配製 protein 標準品

表 3.4 蛋白質標準品的配製及組成

組成 \ 蛋白質濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	5	10	15	20	25
DDW (μL)	800	750	700	650	600	550
0.1 mg/ml BSA (μL)	0	50	100	150	200	250
Bradford 染劑	200 μL					
總體積 1000 μL						

2. 樣品蛋白質定量：

取 5 μL 蛋白質樣品與 795 μL 的去離子水混合，加入 200 μL

Bradford 染劑，反應 5 min 後測定吸光值。將樣品吸光值 (y) 代

入趨勢線方程式，即可算出樣品之蛋白質濃度 (x)。

(三) 變性電泳 (SDS-PAGE)

依表 3.5 依序配製下層膠和上層膠

表 3.5 變性電泳之上層膠和下層膠的配製及組成

組成	下層膠 (10% Separation gel)		上層膠 (5% Stacking gel)	
	一片量	兩片量	一片量	兩片量
DDW	4.75 mL	9.5 mL	3.04 mL	6.08 mL
1.5 M Tris (pH8.8)	2.5 mL	5.0 mL	-	-
0.5 M Tris (pH6.8)	-	-	1.25 mL	2.5 mL
10% SDS	100 μL	200 μL	50 μL	100 μL
40% Acrylamide/Bis (29:1)	2.5 mL	5.0 mL	610 μL	1.22 mL
10% Ammonium persulfate (APS)	50 μL	100 μL	50 μL	100 μL
TEMED	10 μL	20 μL	6 μL	12 μL

下層膠注入鑄膠台，以 1-butanol 去除氣泡並壓平下層膠之上緣，30 min 待膠體凝固，製備上層膠並將上層膠注入並插上 comb，30 min 待膠體凝固，鑄好的膠體放入電泳槽中並放入 running buffer (表 3.8)，吸取 running buffer 將樣品槽中氣泡去除。樣品與 4 X sample buffer 混合並加熱 5 min，將樣品與 4 X sample buffer 之混合物置於冰上冷卻 30 sec 以上，開始注入 5 μ L maker 及 sample (由左至右)。以 100 V, 30 min、120 V, 30 min 及 150 V, 30 min 的條件進行電泳。

(四) 西方點墨法 (Western Blotting)

轉漬步驟：

將轉漬夾打開後黑色面朝下放，取出一片海綿墊片以轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 潤濕，置於其上面，並於海綿片上依序放上 3M 濾紙、SDS-PAGE gel、PVDF 轉漬膜、3M 濾紙，最後再放上一片海綿墊片即可夾上轉漬夾，形成類似三明治夾層的構造 (圖 3.5)。將轉漬夾放入電泳槽，於電泳槽外圍放入足夠的冰塊，使整個系統保持低溫狀態。以 100 V、300 mA、2 小時的條件下進行蛋白質轉漬步驟 (轉漬緩衝液的配製，如表 3.9)。轉漬完成後取出轉漬膜裁去多餘部分並以 3M 濾紙壓乾。接著加入 5% 脫脂奶 (溶於 0.1% PBS/Tween 中) 於室溫進行 1 小時的 blocking。之後取出轉漬膜以 0.1% PBS/Tween (表

3.10) 清洗 5 分鐘 (3 次)。於封口袋中加入 2 mL 的一級抗體 (稀釋倍數為 1:1000), 再將轉漬膜放入小盒中, 置於 4 °C 冰箱中搖盪 overnight。隔天取出轉漬膜以 0.1 % PBS/Tween 清洗 5 分鐘共 3 次。加入 2 mL (稀釋倍數為 1:5000) 的二級抗體, 於室溫下搖盪 1 小時, 最後取出轉漬膜並以 0.1 % PBS/Tween 清洗 5 分鐘 (3 次)。



圖 3.5 轉漬夾內部組成

壓片步驟：將轉漬膜浸泡於 ECL 試劑之混合液中反應 1 分鐘。將投影片裁成適當大小並對折, 以膠帶固定投影片於壓片卡匣 (Cassette) 內; 將轉漬膜放置於投影片裡側。以 Hyperfilm 底片進行壓片, 依轉漬膜上螢光亮度決定時間長短, 約 5 秒至 1 小時不等。感光完成後底片放入顯影劑進行顯影。顯影完成後底片以清水沖洗 30 秒, 接著放入定影劑中經過 30 秒的定影, 再以清水沖洗底片 30 秒。底片以 Kodak digital science 1D 分析軟體進行結果分析。

表 3.6 1.5 M Tris (pH8.0) 的組成

組成	重量 (g)
Tris	18.16
加 DDW 到總體積 100 mL	

表 3.7 0.5 M Tris (pH6.6) 的組成

組成	重量 (g)
Tris	6.0
加 DDW 到總體積 100 mL	

表 3.8 跑膠緩衝液 (running buffer) 的組成

組成	重量 (g)
Tris	6
Glycine	28.8
SDS	2
加 DDW 到總體積 2000 mL	

表 3.9 轉漬緩衝液 (transfer buffer) 的組成

組成	重量 (g)
Tris	12.1
Glycine	72
100% Methanol	750 mL
加 DDW 到總體積 5000 mL	

註：將 Tris 及 Glycine 先以 4000 mL 去離子水溶解後，再加入 750 mL 的 100% 甲醇，最後以去離子水定量至 5000 mL。

表 3.10 0.1 % PBS/Tween (PBST) 的組成

組成	重量(g)
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.44
KH ₂ PO ₄	0.24
Tween 20	1
加 DDW 到總體積 1000 mL	

第四章 結果

第一節 中草藥水萃取物之產率

秤取 50g 的石斛，進行兩次煎煮得到的藥汁，使用一號濾紙過濾，將濾液分裝並放至-80 冰箱中凍結，之後進行真空冷凍乾燥。經真空冷凍乾燥後，石斛之水萃取物所獲得的產率如下表 4.1。

表 4.1 製備石斛之水萃取物的產率

名稱	樣品重 (g)	產物重 (g)	產率 (%)
石斛	50	1.2561	2.5

第二節 檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 細胞 存活的影響

將 2 mL 的人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 約 2×10^5 cells 種植至 12 孔洞平盤中，放入 37 °C、5% CO₂ 的培養箱進行培養。當細胞貼附於平盤上時即可加入不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 μg/mL) 至每孔含有 2×10^5 cells 12 孔洞平盤中，之後放入 37 °C、5% CO₂ 培養箱。於加藥後第 24 及第 48 小時，分別取出平盤利用流式細胞儀分析石斛水萃取物對人類乳癌細胞存活的影響。將投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 μg/mL) 於第 24 及 48 小時之細胞存活率變化的情形，此運算結果整理於圖 4.1。圖 4.1 (a) 為加藥後第 24 小時存活率的變化情形，由圖中可發現石斛水萃取物對於人類乳癌細胞的存活之影響為隨著石斛濃度的增加 (150-300 μg/mL)，導致乳癌細胞死亡的作用越顯著。圖 4.1 (b) 為加藥後第 48 小時細胞存活率的變化情形，同樣地也發現了隨著濃度 (150-300 μg/mL) 及時間的增加導致細胞死亡的作用越顯著。

第三節 檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 細胞增生的影響

將 2 mL 的人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 約 2×10^5 cells 種植至 12 孔洞平盤中，放入 37 °C、5% CO₂ 的培養箱進行培養。當細胞貼附於平盤上時即可加入不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 μg/mL) 至每孔含有 2×10^5 cells 12 孔洞平盤中，之後放入 37 °C、5% CO₂ 培養箱。於加藥後第 24 及第 48 小時，分別取出平盤利用流式細胞儀分析石斛水萃取物對人類乳癌細胞增生的影響。此運算結果整理於圖 4.2。圖 4.2(a) 為加藥後第 24 小時細胞增生的變化情形，由圖中可發現石斛水萃取物對於人類乳癌細胞的增生之影響為隨著石斛濃度的增加 (150-300 μg/mL)，其抑制乳癌細胞增生的作用越顯著。圖 4.2 (b) 為加藥後第 48 小時細胞增生的變化情形，同樣地也發現了隨著濃度 (150-300 μg/mL) 及時間的增加此抑制作用越顯著。

第四節 檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 細胞 型態的影響

投予 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物以倒立式位像差顯微鏡觀察 12-48 小時人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 之細胞型態變化的情形 (如圖 4.3)。結果可發現於第 12 小時石斛水萃取物處理之細胞, 其細胞型態即開始皺縮變圓, 觀察 24 36 及 48 小時石斛水萃取物處理之細胞, 此情形更為明顯且細胞數目逐漸減少。

第五節 檢測石斛對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 細胞週期的影響

一、檢測投予石斛水萃取物對人類乳癌細胞之細胞週期的影響是否呈劑量關係 - 分析 24 小時細胞週期分佈情形

從 stock solution(30 mg/mL)的石斛水萃取物中分別取 1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{L}/\text{well}$ (其最終濃度分別為 18.75、37.5、75、150 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 加入於 12 孔洞平盤中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培養箱進行培養。經過 24 小時後利用流式細胞儀檢測乳癌細胞其細胞週期分佈情形的變化 (如圖 4.4、表 4.2、圖 4.5)。圖 4.4 為投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 於第 24 小時之乳癌細胞週期變化的情形，結果發現隨著石斛水萃取物濃度的增加，尤其是濃度為 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 發生顯著 G_2/M phase arrest 和 apoptosis。表 4.2 為投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 於第 24 小時之乳癌細胞週期分佈情形，將人類乳癌細胞其細胞週期 ($\text{G}_0\text{-}\text{G}_1$ 、S、 $\text{G}_2\text{-}\text{M}$) 所佔每一個時期以百分比表示。結果發現濃度為 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 其 $\text{G}_2\text{-}\text{M}$ 分別為 27% 及 33% (控制組為 13%)，與控制組比較分別增加了 14% 及 20%。另外 Apoptosis 分別為 8% 及 16% (控制組為 0%)。

二、 檢測投予石斛水萃取物對人類乳癌細胞之細胞週期的影響是否呈劑量關係 - 分析 48 小時細胞週期分佈情形

從 stock solution(30 mg/mL)的石斛水萃取物中分別取 1.25、 2.5、 5、 10、 20 $\mu\text{L}/\text{well}$ (其最終濃度分別為 18.75、 37.5、 75、 150 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 加入於 12 孔洞平盤中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 的培養箱進行培養。經過 48 小時後利用流式細胞儀檢測乳癌細胞其細胞週期分佈情形的變化 (如圖 4.6、 表 4.3、 圖 4.7)。圖 4.6 為投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 於第 48 小時之乳癌細胞週期變化的情形，結果發現隨著石斛水萃取物濃度的增加，尤其是濃度為 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 發生顯著 G_2/M phase arrest 和 apoptosis。表 4.3 為投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 於第 48 小時之乳癌細胞週期分佈情形，將人類乳癌細胞其細胞週期 ($\text{G}_0\text{-}\text{G}_1$ 、 S、 $\text{G}_2\text{-}\text{M}$) 所佔每一個時期以百分比表示。結果發現濃度為 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 其 $\text{G}_2\text{-}\text{M}$ 分別為 28% 及 25% (控制組為 17%)，與控制組比較分別增加了 11% 及 8%。另外 Apoptosis 分別為 9% 及 17% (控制組為 0%)。

三、檢測投予石斛水萃取物對人類乳癌細胞之細胞週期的影響是否呈時間關係

從 stock solution(30 mg/mL)的石斛水萃取物中分 20 μ L/well(最終濃度為 300 μ g/mL) 加入於 12 孔洞平盤中，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱進行培養。經過 12、24、36 和 48 小時後利用流式細胞儀檢測乳癌細胞其細胞週期分佈情形的變化 (如圖 4.8)。由圖 4.8 結果發現於第 12 小時開始發生顯著的 G₂/M phase arrest，其 G₂/M 為 44% (控制組為 25%)，與控制組比較增加了 19%。第 24 小時乳癌細胞細胞週期之 G₂/M 為 47% (控制組為 18%)，與控制組比較增加了 29%。第 36 小時細胞週期之 G₂/M 為 23% (控制組為 18%)。第 48 小時細胞週期之 G₂/M 為 26% (控制組為 21%)。另外 24、36、48 小時乳癌細胞細胞週期之 apoptosis 百分比分別為 9%、13% 及 7%。

第六節 檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞是否產生細胞凋亡的情形

一、利用流式細胞儀檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞株產生細胞凋亡的情形

投予 300 $\mu\text{g/mL}$ 的石斛水萃取物至乳癌細胞，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培養箱進行培養，經過 12-48 小時後利用流式細胞儀分析細胞內 Sub- G_1 的比例（即 Apoptotic nuclei）。結果發現在第 24、36 和 48 小時，乳癌細胞產生細胞凋亡，其百分比分別為 9%、13% 及 7%（如圖 4.9），為了進一步確認石斛水萃取物對人類乳癌細胞的生長抑制是否與細胞凋亡有關。本實驗利用 DNA 電泳檢測。

二、利用 DNA 電泳法來檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞株產生細胞凋亡的情形

DNA 電泳，其原理為當細胞進行細胞凋亡時其細胞核內的 DNA 會裂解成 180-200 bp，利用 DNA 電泳來檢測是否會有 180-200 bp 的梯度片段產生。投予不同濃度的石斛水萃取物至乳癌細胞，在 37、5% CO₂ 的培養箱進行培養，36 小時後進行分析。由圖 4.10 結果可發現濃度為 150、300 μg/mL 的石斛水萃取物，可以看到乳癌細胞之 DNA 裂解成梯度片段。

第七節 反轉錄聚合酵素連鎖反應(Reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 探討細胞週期相關 Cyclin、Cdk 及 Apoptosis 基因的表現

一、Cyclin B mRNA 之相對含量變化

將 300 µg/mL 石斛水萃取物加入於 10 cm dish 中，於 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱進行培養。經過 3、6、12 和 24 小時後，抽取細胞中的 total RNA，利用 RT-PCR 分析乳癌細胞其 Cyclin B mRNA 之相對含量變化。由圖 4.11 可觀察到投予石斛水萃取物 (300 µg/mL) 經過 12、24、36 和 48 小時後，乳癌細胞 Cyclin B mRNA 之相對含量與控制組 (將 3 小時控制組設定為 1) 比較，其值分別為 0.95、0.96、1.02 和 1.32。

二、Cdk1 mRNA 之相對含量變化

將 300 µg/mL 石斛水萃取物加入於 10 cm dish 中，於 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱進行培養。經過 3、6、12 和 24 小時後，抽取細胞中的 total RNA，利用 RT-PCR 分析乳癌細胞其 Cdk1 mRNA 之相對含量變化。由圖 4.12 可觀察到投予石斛水萃取物 (300 µg/mL) 經過 12、24、36 和 48 小時後，乳癌細胞 Cdk1 mRNA 之相對含量與控制組 (將 3 小時控制組設定為 1) 比較，其值分別為 0.86、0.75、0.45 和 0.52。

三、Wee 1 mRNA 之相對含量變化

將 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物加入於 10 cm dish 中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 的培養箱進行培養。經過 3、6、12 和 24 小時後，抽取細胞中的 total RNA，利用 RT-PCR 分析乳癌細胞其 Wee1 mRNA 之相對含量變化。由圖 4.13 可觀察到投予石斛水萃取物 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 經過 12、24、36 和 48 小時後，乳癌細胞 Wee1 mRNA 之相對含量與控制組 (將 3 小時控制組設定為 1) 比較，其值分別為 1.5、0.91、0.14 和 0.18。

四、Chk1 mRNA 之相對含量變化

將 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物加入於 10 cm dish 中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 的培養箱進行培養。經過 3、6、12 和 24 小時後，抽取細胞中的 total RNA，利用 RT-PCR 分析乳癌細胞其 Chk1 mRNA 之相對含量變化。由圖 4.14 可觀察到投予石斛水萃取物 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 經過 12、24、36 和 48 小時後，乳癌細胞 Chk1 mRNA 之相對含量與控制組 (將 3 小時控制組設定為 1) 比較，其值分別為 0.34、0.84、0.75 和 0.81。

五、p21 mRNA 之相對含量變化

將 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物加入於 10 cm dish 中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 的培養箱進行培養。經過 3、6、12 和 24 小時後，抽取細胞中的 total RNA，利用 RT-PCR 分析乳癌細胞其 p21 mRNA 之相對含量

變化。由圖 4.15 可觀察到投予石斛水萃取物 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 經過 12、24、36 和 48 小時後，乳癌細胞 p21 mRNA 之相對含量與控制組 (將 3 小時控制組設定為 1) 比較，其值分別為 1.25、1.29、0.95 和 0.78。

六、Caspase-3 mRNA 之相對含量變化

將 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物加入於 10 cm dish 中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 的培養箱進行培養。經過 3、6、12 和 24 小時後，抽取細胞中的 total RNA，利用 RT-PCR 分析乳癌細胞其 Caspase-3 mRNA 之相對含量變化。由圖 4.16 可觀察到投予石斛水萃取物 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 經過 12、24、36 和 48 小時後，乳癌細胞 Caspase-3 mRNA 之相對含量與控制組 (將 3 小時控制組設定為 1) 比較，其值分別為 1.23、1.27、1.24 和 1.30。

七、caspase-8 mRNA 之相對含量變化

將 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物加入於 10 cm dish 中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 的培養箱進行培養。經過 3、6、12 和 24 小時後，抽取細胞中的 total RNA，利用 RT-PCR 分析乳癌細胞其 Caspase-8 mRNA 之相對含量變化。由圖 4.17 可觀察到投予石斛水萃取物 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 經過 12、24、36 和 48 小時後，乳癌細胞 Caspase-8 mRNA 之相對含量與控制組 (將 3 小時控制組設定為 1) 比較，其值分別為 1.26、1.13、

0.95 和 1.58。

八、Caspase-9 mRNA 之相對含量變化

將 300 $\mu\text{g/mL}$ 石斛水萃取物加入於 10 cm dish 中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 的培養箱進行培養。經過 3、6、12 和 24 小時後，抽取細胞中的 total RNA，利用 RT-PCR 分析乳癌細胞其 Caspase-9 之相對含量變化。由圖 4.18 可觀察到投予石斛水萃取物 (300 $\mu\text{g/mL}$) 經過 12、24、36 和 48 小時後，乳癌細胞 Caspase-9 之相對含量與控制組 (將 3 小時控制組設定為 1) 比較，其值分別為 0.86、1.40、1.63 和 2.25。

第八節 西方點墨法探討探討細胞週期相關蛋白質的表現

將 0、18.75、37.5、75、150 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物加入於 10 cm 平盤中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培養箱進行培養。經過 24 和 36 小時後以西方墨點法分析，石斛水萃取物對人類乳癌細胞株細胞內與細胞週期相關蛋白質的影響。

一、細胞週期中調控 G2/M 期相關蛋白質的表現

經不同濃度之石斛水萃取物處理 24 小時後分析 cyclinB1 蛋白質的表現量與控制組比較，其蛋白質的表現量明顯上升（如圖 4.19）。Cdk1，經不同濃度之石斛水萃取物處理 24 小時後，與控制組比較其蛋白質的表現量明顯上升（如圖 4.20）。另外經不同濃度之石斛水萃取物處理 24 小時後，Cdc25c 與控制組比較其蛋白質的表現量無明顯變化（如圖 4.21）；Wee 1 在石斛水萃取物（150 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）劑量時與控制組比較其表現量顯著上升（如圖 4.22）。

二、cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) 蛋白質的表現

經不同濃度之石斛水萃取物處理 24 小時後分析 p21 蛋白質的表現，與控制組比較其表現量明顯上升（如圖 4.23）。

三、 Bcl-2 和 Bax 蛋白質的表現

經不同濃度之石斛水萃取物處理 24 小時後， antiapoptosis protein： Bcl-2 蛋白質的表現明顯降低（如圖 4.24）， 36 小時後 Bcl-2 表現量也呈現降低的情形（如圖 4.26）。 經不同濃度之石斛水萃取物處理 24、 36 小時後， proapoptotic protein： Bax 蛋白質的表現量則明顯上升（如圖 4.25、 4.27）。

四、 Caspase 3 和 Caspase 9 蛋白質的表現

經不同濃度之石斛水萃取物處理 36 小時後， 分析 caspase-3 及 caspase-9 蛋白質的表現量， 在 75-300 μ g/mL 濃度時與控制組比較， 其活化型之蛋白質表現量明顯上升（如圖 4.28、 4.29）。

第五章 討論

由於西藥（抗癌藥物）引起副作用的報告不斷，研究人員漸漸把注意力轉移到中草藥。例如：苦艾，華盛頓大學的生物工程研究員 Henry Lai 的報告顯示，此複合物可以在十六個小時內消滅了試管內所有與其接觸的人體癌細胞（85）。此外，西元 1994 年，FDA 通過的紫杉醇用於轉移性乳癌的第二線化學治療或在輔助性化學治療完後六個月內復發的乳癌患者也非常有效（86）。因此中草藥對於預防或治療癌症之潛力，成為治療癌症之保健食品或新藥開發之研究重點。而抗癌藥物誘發細胞週期的停滯和細胞凋亡的作用是很重要的測定抗癌藥物的治療效果。所以本研究選用中草藥 - 石斛，分析是否可誘發人類乳癌細胞（MDA-MB-231）之細胞週期的停滯和細胞凋亡的作用

石斛，有文獻指出石斛具有抗癌的活性，如 HL-60 細胞株、小鼠肝癌、腫瘤細胞株 K₅₆₂ 等（19-23）。但是石斛對於人類乳癌細胞（MDA-MB-231）是否能有效抑制依然沒有足夠的資料。

因此本研究中將藉由石斛來探討是否其可抑制細胞增生、是否能干擾細胞週期的運轉及誘發細胞凋亡。在 2001 年，張潔等人在探討銅皮石斛水提液的抗癌活性及其誘導急性白血病細胞凋亡的發生機

制中，使用的劑量為 0.39、1.56、3.13 和 6.25 mg/mL。使用 0.39、1.56、3.13 mg/mL 進行流式細胞儀的分析，而 6.25 mg/mL 進行 DNA fragmentation 及西方點墨分析，結果發現銅皮石斛水提液的抗癌活性及其誘導急性白血病細胞凋亡。而本研究所使用的劑量為 18.75、37.5、75、150 及 300 $\mu\text{g/mL}$ ，皆比上述所使用的劑量還低，尤其是使用 300 $\mu\text{g/mL}$ 劑量時呈現顯著的 G₂/M arrest 和細胞凋亡。不過由於所購買的中藥材沒有經過基原鑑定，只能從中藥行的老闆告知其為二級品的霍山石斛。因此本研究使用的石斛需要再經過基原鑑定。

檢測石斛水提取物對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 細胞增生的影響，圖 4.2 (a) 為加藥後第 24 小時細胞增生的變化情形，由圖中可發現石斛水萃取物對於人類乳癌細胞的增生之影響為隨著石斛濃度的增加 (150-300 $\mu\text{g/mL}$)，其抑制乳癌細胞增生的作用越顯著。圖 4.2 (b) 為加藥後第 48 小時細胞增生的變化情形，同樣地也發現了隨著濃度 (150-300 $\mu\text{g/mL}$) 及時間的增加此抑制作用越顯著。利用倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態，發現投予石斛水萃取物 (300 $\mu\text{g/ml}$) 對人類乳癌細胞在 24 小時即有明顯改變。隨著時間的增加，其細胞數目明顯減少，也有受損、破裂及空泡化現象，如圖 4.3。

檢測石斛對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 細胞週期的影響，圖 4.4-4.7 為投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g/mL}$) 於第

24、48 小時之乳癌細胞週期變化的情形，結果發現隨著石斛水萃取物濃度的增加，尤其是濃度為 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 發生顯著 G_2/M phase arrest 和 apoptosis。另外投予 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物於第 12、24、36 和 48 小時之乳癌細胞週期變化的情形，圖 4.8 結果發現於第 12 和 24 小時開始發生顯著的 G_2/M phase arrest, 第 36 和 48 小時 G_2/M 所佔細胞週期的百分比逐漸降低，但產生顯著的細胞凋亡的現象（36 小時）。

接著進行檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞是否產生細胞凋亡的情形，由細胞週期的分析可以發現投予 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物於 36 小時產生細胞凋亡的現象，所以進一步地利用 DNA 電泳檢測 36 小時細胞凋亡的情形，結果也發現顯著 DNA 裂解成梯度片段的產生。

經由流式細胞儀分析細胞週期的分佈情形，發現明顯的 G_2/M phase arrest；所以進一步利用反轉錄聚合酵素連鎖反應檢測投予 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物至人類乳癌細胞，經過 3、6、12 和 24 小時，乳癌細胞之 G_2/M 期相關 cyclin、CDK 及 apoptosis 基因的表現。Cyclin B1 mRNA 之相對含量在 12 小時是相較於控制組為低，然在 24 小時相較於控制組為高（圖 4.11）。Cdk1 mRNA 之相對含量於 6 和 24 小時相較於控制組為高（圖 4.12）。Wee 1 mRNA 之相對含量於 3 和 6 小時增加，至 12 小時顯著降低（圖 4.13）。Chk1 mRNA 之相對含量

在 3 和 6 小時是相較於控制組為低，然在 12 和 24 小時相較於控制組為高（圖 4.14）。p21 mRNA 之相對含量在 3 和 24 小時是相較於控制組為高（圖 4.15）。Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9mRNA 之相對含量在 24 小時相較於控制組為高（圖 4.16-18）。

第五章 討論

由於西藥（抗癌藥物）引起副作用的報告不斷，研究人員漸漸把注意力轉移到中草藥。例如：苦艾，華盛頓大學的生物工程研究員 Henry Lai 的報告顯示，此複合物可以在十六個小時內消滅了試管內所有與其接觸的人體癌細胞（85）。此外，西元 1994 年，FDA 通過的紫杉醇用於轉移性乳癌的第二線化學治療或在輔助性化學治療完後六個月內復發的乳癌患者也非常有效（86）。因此中草藥對於預防或治療癌症之潛力，成為治療癌症之保健食品或新藥開發之研究重點。而抗癌藥物誘發細胞週期的停滯和細胞凋亡的作用是很重要的測定抗癌藥物的治療效果。所以本研究選用中草藥 - 石斛，分析是否可誘發人類乳癌細胞（MDA-MB-231）之細胞週期的停滯和細胞凋亡的作用。

石斛，有文獻指出石斛具有抗癌的活性，如 HL-60 細胞株、小鼠肝癌、腫瘤細胞株 K₅₆₂ 等（19-23）。但是石斛對於人類乳癌細胞（MDA-MB-231）是否能有效抑制依然沒有足夠的資料。

因此本研究中將藉由石斛來探討是否其可抑制細胞增生、是否能干擾細胞週期的運轉及誘發細胞凋亡。在 2001 年，張潔等人在探討銅皮石斛水提液的抗癌活性及其誘導急性白血病細胞凋亡的發機

制中，使用的劑量為 0.39、1.56、3.13 和 6.25 mg/mL。使用 0.39、1.56、3.13 mg/mL 進行流式細胞儀的分析，而 6.25 mg/mL 進行 DNA fragmentation 及西方點墨分析，結果發現銅皮石斛水提液的抗癌活性及其誘導急性白血病細胞凋亡。而本研究所使用的劑量為 18.75、37.5、75、150 及 300 $\mu\text{g/mL}$ ，皆比上述所使用的劑量還低，尤其是使用 300 $\mu\text{g/mL}$ 劑量時呈現顯著的 G₂/M arrest 和細胞凋亡。不過由於所購買的中藥材沒有經過基原鑑定，只能從中藥行的老闆告知其為二級品的霍山石斛。因此本研究使用的石斛需要再經過基原鑑定。

檢測石斛水提取物對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 細胞增生的影響，圖 4.2 (a) 為加藥後第 24 小時細胞增生的變化情形，由圖中可發現石斛水萃取物對於人類乳癌細胞的增生之影響為隨著石斛濃度的增加 (150-300 $\mu\text{g/mL}$)，其抑制乳癌細胞增生的作用越顯著。圖 4.2 (b) 為加藥後第 48 小時細胞增生的變化情形，同樣地也發現了隨著濃度 (150-300 $\mu\text{g/mL}$) 及時間的增加此抑制作用越顯著。利用倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態，發現投予石斛水萃取物 (300 $\mu\text{g/mL}$) 對人類乳癌細胞在 24 小時即有明顯改變。隨著時間的增加，其細胞數目明顯減少，也有受損、破裂及空泡化現象，如圖 4.3。

檢測石斛對人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 細胞週期的影響，圖 4.4-4.7 為投予不同濃度的石斛水萃取物 (0-300 $\mu\text{g/mL}$) 於第

24、48 小時之乳癌細胞週期變化的情形，結果發現隨著石斛水萃取物濃度的增加，尤其是濃度為 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 發生顯著 G_2/M phase arrest 和 apoptosis。另外投予 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物於第 12、24、36 和 48 小時之乳癌細胞週期變化的情形，圖 4.8 結果發現於第 12 和 24 小時開始發生顯著的 G_2/M phase arrest, 第 36 和 48 小時 G_2/M 所佔細胞週期的百分比逐漸降低，但產生顯著的細胞凋亡的現象（36 小時）。

接著進行檢測石斛水萃取物對人類乳癌細胞是否產生細胞凋亡的情形，由細胞週期的分析可以發現投予 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物於 36 小時產生細胞凋亡的現象，所以進一步地利用 DNA 電泳檢測 36 小時細胞凋亡的情形，結果也發現顯著 DNA 裂解成梯度片段的產生。

經由流式細胞儀分析細胞週期的分佈情形，發現明顯的 G_2/M phase arrest；所以進一步利用反轉錄聚合酵素連鎖反應檢測投予 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石斛水萃取物至人類乳癌細胞，經過 3、6、12 和 24 小時，乳癌細胞之 G_2/M 期相關 cyclin、CDK 及 apoptosis 基因的表現。Cyclin B1 mRNA 之相對含量在 12 小時是相較於控制組為低，然在 24 小時相較於控制組為高（圖 4.11）。Cdk1 mRNA 之相對含量於 6 和 24 小時相較於控制組為高（圖 4.12）。Wee 1 mRNA 之相對含量於 3 和 6 小時增加，至 12 小時顯著降低（圖 4.13）。Chk1 mRNA 之相對含量

在 3 和 6 小時是相較於控制組為低，然在 12 和 24 小時相較於控制組為高（圖 4.14）。p21 mRNA 之相對含量在 3 和 24 小時是相較於控制組為高（圖 4.15）。Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 mRNA 之相對含量在 24 小時相較於控制組為高（圖 4.16-18）。

利用西方點墨法檢測投予 0、18.75、37.5、75、150 及 300 $\mu\text{g/mL}$ 石斛水萃物至人類乳癌細胞，經過 24 小時後，其細胞內與細胞週期 G_2/M phase 相關蛋白質的影響。結果發現 cyclin B1、Cdk1 蛋白質的表現量與控制組比較，其表現量是明顯上升（如圖 4.19-4.20），Cdc25c 蛋白質的表現量與控制組比較則無明顯變化（如圖 4.21）；Wee 1 在石斛水萃物（150 及 300 $\mu\text{g/mL}$ ）劑量時與控制組比較其表現量是顯著上升（如圖 4.22）。於 G_2/M phase 進行需要 Cdk1 的活性，cyclin B1 與 Cdk1 結合而正向調控 G_2/M phase 進行（87），當 Cdk1 之胺基酸序列 Thr14 和 Tyr15 受到磷酸化時，其活性受到抑制而負向調控 G_2/M phase 進行造成 G_2/M arrest（88-89）。由實驗結果發現 cyclin B1、Cdk1 蛋白質的表現量與控制組比較是明顯上升，這在其他的文獻也有報導過（90-94）；因此石斛水萃取物對於 MDA-MB-231 細胞週期停滯於 G_2/M phase 並非是藉由降低 cyclin B1 的機制。Wee 1 可使 Cdk1 之胺基酸序列 Thr14 和 Tyr15 磷酸化造成 Cdk1 的活性降低（95）；由實驗結果發現 Wee 1 蛋白質的表現量隨濃度增加而上升。因此可推測石斛

水萃取物引起細胞週期停滯於 G₂/M phase 可能是 Cdk1 的活性降低所造成。至於 Cdk1 活性則需要作更進一步的研究探討。另一方面，p21^{WAF1/CIP1} 的表現量也會隨著加入石斛萃取物而表現量增加（如圖 4.23），故推論 p21^{WAF1/CIP1} 也許是調控促使人類乳癌細胞引起細胞週期停滯於 G₂/M phase 的主要因子。有文獻報導過 p21^{WAF1/CIP1} 的表現量增加，可抑制 cyclin B1 及 CDK1 複合物的活性(96-99)，引起 G₂/M phase arrest (100)。

另外，利用西方點墨法檢測投予不同濃度的石斛水萃物至人類乳癌細胞經過 24 小時後，其細胞凋亡相關蛋白質之影響。Bcl-2、Bax，這兩種蛋白質已經被報導過其扮演測定是否細胞進行細胞凋亡的角色（101-102）。antiapoptosis protein：Bcl-2 蛋白質的表現量與控制組比較是明顯降低（如圖 4.24）。proapoptotic protein：Bax，蛋白質的表現量與控制組比較是明顯上升（如圖 4.25）。另外，曾有文獻報導過 Cdk1 的表現量增加與細胞凋亡有關(103-104)，由本研究結果 Cdk1 的表現量增加可能與石斛水萃物促進人類乳癌細胞產生細胞凋亡有關。在 Yiwei 等學者於 1999 發表：利用 genistein 會誘發人類乳癌細胞（MDA-MB-231）產生細胞凋亡，其誘發細胞凋亡的機制是 p53-independent pathway，其 p21^{WAF1/CIP1} 可能是誘發細胞凋亡的另一分子機制（105），因此本研究也認為石斛水萃物誘發細胞凋亡是經由

p21^{WAF1/CIP1} 分子機制。

另外，利用西方點墨法檢測投予不同濃度的石斛水萃物至人類乳癌細胞經過 36 小時後，其 Bcl-2、 Bax、 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白質之影響。Bcl-2 蛋白質的表現量也呈現降低的情形(如圖 4.26)，Bax 蛋白質的表現量則明顯上升(如圖 4.27)。而 Caspase-3、 Caspase-9 的蛋白質在 75-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度時，與控制組比較其活化型之蛋白質表現量明顯上升(如圖 4.28、 4.29)。於本篇研究中無法明確指出石斛水萃物誘導細胞凋亡是透過哪一種上游的路徑，這部分則需作進一步的研究證實。Galvesen 等學者於 1999 年，報導 Caspase-3 活化可以誘導 PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) 分解、染色體 DNA 裂解及最後產生細胞凋亡 (104)；另一方面 Inhibitor of nuclear factor- κB (I κB) α 會抑制抗細胞凋亡轉譯因子 Nuclear factor (NF)- κB 的作用，I κB α 也需要 Caspase-3 活化，使其與 NF κB 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 活化後的下游路徑仍然須要作更深入的研究。基於現有的實驗結果，石斛水萃取物抑制人類乳癌細胞的增生是透過引發細胞週期停滯在 G₂/M 期與活化 Bax、 Caspase-3 而使細胞凋亡。

第六章 結論

在本篇研究中，藉由探討細胞增生(proliferation) 細胞週期(cell cycle) 及細胞凋亡(apoptosis) 等機制，評估石斛水萃取物對於人類乳癌細胞株(MDA-MB-231) 抗癌的角色。由實驗數據發現，石斛水萃取對人類乳癌細胞株會抑制細胞增生、細胞週期停止在 G_2/M 期 (G_2/M phase arrest) 及誘導細胞凋亡。同時由西方點墨法分析細胞週期素(cyclin B1) 和細胞週期素激酶(Cdk1)，結果顯示石斛水萃取物會增加 cyclin B1 和 Cdk1 蛋白質的表現量。另一方面，而引發細胞週期停止在 G_2/M 期之上游因子 p21 的表現量也會隨著加入石斛水萃取物而表現量增加，故推論 p21 也許是調控促使人類乳癌細胞株發生細胞週期停止在 G_2/M 期的主要因子。流式細胞儀分析實驗與 DNA 裂解實驗皆確認石斛水萃取物會誘發人類乳癌細胞株產生凋亡現象(apoptosis)；另外西方點墨法分析 Bax、Caspase-9 及 Caspase-3 的蛋白表現量，結果這些蛋白的表現量皆增加。綜合以上之論點得之，石斛水萃取物的抗癌活性在於抑制人類乳癌細胞株細胞增殖、引發細胞週期停止在 G_2/M 期與活化 Bax、Caspase-9 和 Caspase-3 而促使凋亡發生。(圖 6.1)

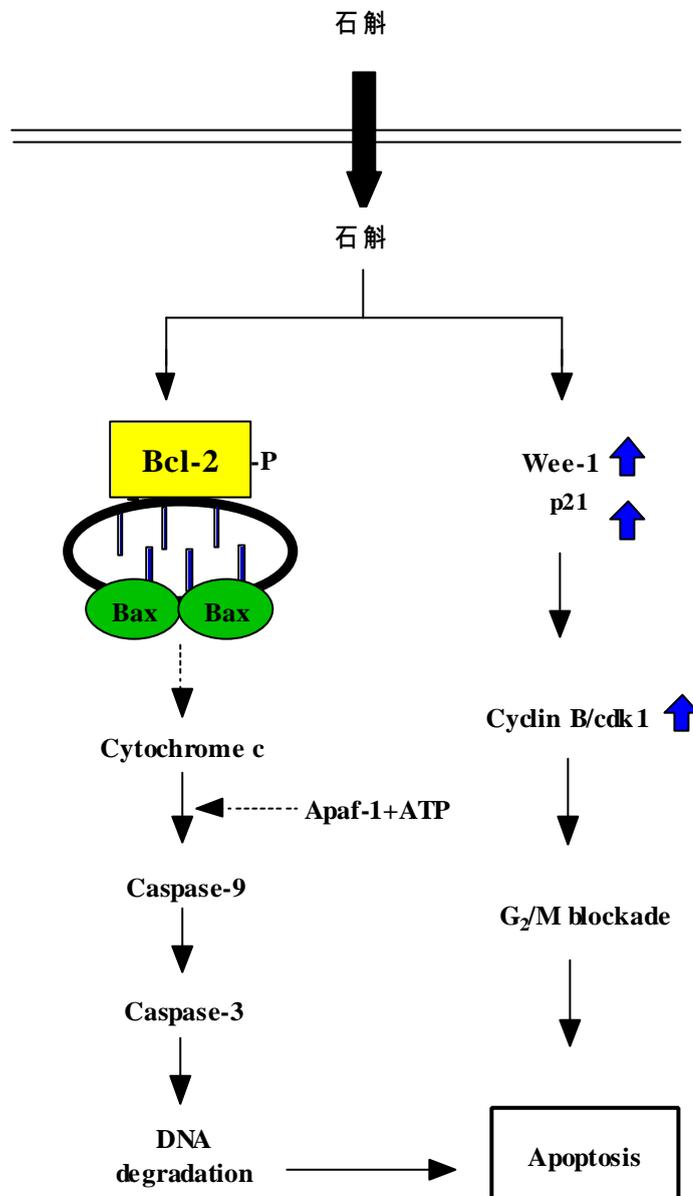


圖 6.1 Hypothesized signaling pathways of Shihu-induced G₂/M arrest and apoptosis. The dash line indicates the pathway, which has not been investigated in the present study.

第七章 參考文獻

1. Kelsey, J. L., and Bernstein, L. 1996. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annu Rev Public Health*. 17: 47-67.
2. Kelsey, J. L., and Horn-Ross, P. L. 1993. Breast cancer: magnitude of the problem and descriptive epidemiology. *Epidemiol Rev*. 15: 7-16.
3. 衛生統計重要指標九十一年版, 行政院衛生署統計室編輯 (2003)
4. 陳堂麒 (2003) 各大財團爭相投入350億美金市場 - 科學中草藥強登未來四大明星產業, P24-31. *生技時代*, 第25期.
5. 李中岳, 夏善友 (1996) 石斛的加工與利用, *中國土特產*, 第3期.
6. 瞿中和, 王喜中, 丁孝 (2001) *細胞分子生物學*, P519-521. 九州圖書文物有限公司.
7. Baynes Dominiczak (2001) *Medical Biochemistry*, P522. 藝軒圖書出版社.
8. Henderson, I. C. 1993. Risk factors for breast cancer development. *Cancer (Phila.)*. 71:2127-2140.
9. Service, R. F. 1998. New role for estrogen in cancer? *Science (Washington DC)*. 279:1631-1633.
10. MacGregor, J. I., and Jordan, V. C. 1998. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol. Rev*. 50:151-196.
11. Sommer, S., and Fuqua, S. A. 2001. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin. Cancer Biol*. 11:339-352.
12. Cummings, S. R., Duong, T., Kenyon, E., Cauley, J. A., Whitehead, M., and Krueger, K. A. 2002. Serum estradiol level and risk of breast cancer during treatment with raloxifene. *JAMA*. 287:216-220.
13. Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., La Croix, A. Z., Kooperberg, C., Kotchen, J. M., and Ockene, J. 2002. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 288:321-333.
14. Sheikh, M. S., Li X-S, Chen, J. C., Shao, Z-M, Ordonez, J.V., and Fontana, J.A. 1994. Mechanisms of regulation of *WAF1/CIP1* gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathway. *Oncogene* 9:3407-3415.
15. Niewolik, D., Vojtesek, B., and Kovarik. 1995. p53 derived from human tumor cell lines and containing distinct point mutations can be activated to bind to its consensus sequence. *Oncogene* 10:881-890.
16. 彥欣中西醫藥學術研習中心 (1988) *中藥藥理學*, P360-361. 弘祥出版社.

17. 林宗輝 (2001) 台灣蘭科植物 - 石斛、連珠石斛與台灣金線之化學成分及藥理活性研究, 中國醫藥學院 中國藥學研究所 藥學博士論文.
19. Ma, G., Xu, G., Xu, L., and Wang, X. 1994. Inhibitory effects of *Dendrobium chrysotoxum* and its constituents on the mouse HePA and ESC. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*. 25(3):188-189.
20. Lee, Y. H., Park, J. D., Baek, N. I., Kim, S. I., and Ahn, B. Z. 1995. In vitro and in vivo antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Med*. 61:178-179.
21. 王天山、陸躍鳴、馬國祥 (1997) 鼓槌石斛中化學成分對K562腫瘤細胞株生長抑制作用體外實驗, 天然產物研究與開發, 第9卷, 第2期.
22. Ma, G. X., and LeBlance, G. A. 1998. The activity of erianin and chrysotoxine from *Dendrobium chrysotoxum* to reverse multidrug resistance in B16/Nmdr-1 cells. *J. Chin. Pharm. Sci*. 7(3):142-146.
23. Zhang, J., Li, X., Lu, R.-L., and Liu, J. 2001. Apoptosis of human myeloid leukemia cell HL-60 induced by water extracts of *Dendrobium Moniliforme*. *Chinese Journal of Cancer*. 20(9):956-960.
24. Shah, M. A., and Schwartz, G. K. 2001. Cell Cycle-mediated Drug Resistance: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*. 7:2168-2181.
25. 瞿中和, 王喜中, 丁孝 (2001) 細胞分子生物學, P440-445. 九州圖書文物有限公司.
26. Smith, M. L., and Fornace, A.J. 1996. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutation Research*. 340:109-124.
27. Sherr, C. J. 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*. 79(4):551-5.
28. Draetta, G. F. 1994. Mammalian G1 cyclins. *Current Opinion in Cell Biology*. 6(6):842-6.
29. Hunter, T., and Pines, J. 1994. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age *Cell*. 79(4):573-82.
30. King, R. W., Jackson, P. K., and Kirschner, M. W. 1994. Mitosis in transition *Cell*. 79(4):563-71.
31. Brooks, R., Fantes, P., Hunt, T., and Wheatley, D. eds. 1989. *The cell cycle*. Cambridge: The Company of Biologists Ltd.
32. Hutchison, C., and Glover, D.M. 1995. *Cell cycle control*. New York: Oxford University Press.
33. Tyson, J. J., Novak, B., Odell, G. M., Chen, K., and Thron, C. D. 1996. Chemical kinetic theory: understanding cell-cycle regulation. *TIBS*. 21 89-95.
34. McGill, C. J., and Brooks, G. 1995. Cell cycle control mechanisms and their role in cardiac growth. *Cardiovasc. Res*. 30:557-69.
35. Tyson, J. J., Novak, B., Odell, G. M., Chen, K., and Thron, C. D. 1996. Chemical

- kinetic theory: understanding cell-cycle regulation. *TIBS*. 21:89-95.
36. McGill, C. J., and Brooks, G. 1995. Cell cycle control mechanisms and their role in cardiac growth. *Cardiovasc. Res.* 30:557-69. (31)
 36. Martinez, A. M., Afshar, M., Martin, F., Cavadore, J. C., Labbé, J. C., and Dorée, M. 1997. Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J.* 16:343-354.
 38. 瞿中和, 王喜中, 丁孝 (2001) 細胞分子生物學, P489-491. 九州圖書文物有限公司.
 39. Li, J. M., and Brooks, G. 1999. Cell cycle regulatory molecules (cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors) and the cardiovascular system. *Eur. Heart J.* 20:406-420.
 40. Reed, S. I., Bailly, E., Dulic, V., Hengst, L., Resnitzky, D., and Slingerland, J. 1994. G1 control in mammalian cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 18:69-73.
 41. Pines, J. 1997. Cyclin-dependent kinase inhibitors: the age of crystals. *Biochem Biophys. Acta.* 1332: M39-M42.
 42. Brooks, G., Poolman, R. A., and Li, J. M. 1998. Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: Role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovasc. Res.* 39:301-311.
 43. Sherr, C. J., and Roberts, J. M. 1995. Inhibition of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9:1149-1163.
 44. Ruas, M., and Petter, G. 1998. The p16^{INK4a/CDKN2A} tumor suppressor and its relatives. *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer.* 1378:F115-F177.
 45. Guan, K-L., Jenkins, C. W., Li, Y., Nichols, M. A., Wu, X., O'Keefe, C. L., Matera, A. G., and Xiong, Y. 1994. Growth suppression by p18, a p16^{INK4/MTS1}- and p15^{INK4B/MTS2}-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.* 8:2939-2952.
 46. Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D. J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J. 1995. Retinoblastoma protein-dependent cell cycle inhibition by the tumor suppressor p16. *Nature (Lond.).* 375:503-506.
 47. Medema, R. H., Herrera, R. E., Lam, F., and Weinberg, R. A. 1995. Growth suppression by p16^{ink4} requires functional retinoblastoma protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:6289-6293.
 48. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics *Br J Cancer.* 26: 239-57.
 49. Lockshin, R. A., and Beaulaton, J. 1974. Programmed cell death *Life Sci.* 15: 1549-65.

50. Zakeri, Z., and Lockshin, R. A. 1994. Physiological cell death during development and its relationship to aging. *Ann N Y Acad Sci.*719:212-29.
51. Ishizaki, Y. 1998. Physiological functions of programmed cell death. *Seikagaku.* 70:365-70.
52. Reed, J. C. 1999. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol.* 11: 68-75.
53. Behl, C. 2000. Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 107: 1325-44.
54. Cotman, C. W., Whitemore, E. R., Watt, J. A., Anderson, A. J., and Loo, D. T. 1994. Possible role of apoptosis in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 747: 36-49.
55. Cotman, C. W., and Anderson, A. J. 1995. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 10:19-45.
56. Perry, G., Nunomura, A., Lucassen, P., Lassmann, H., and Smith, M. A. 1998. Apoptosis and Alzheimer's disease. *Science.* 282:1268-9.
57. 瞿中和, 王喜中, 丁孝 (2001) 細胞分子生物學, P557-561. 九州圖書文物有限公司.
58. Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407:770-776.
59. Afford, S., and Randhawa, S. Demystified . .Apoptosis. *J Clin Pathol: Mol Pathol* ;53:55-63.
60. Searle, J., Kerr, J. F., and Bishop, C. J. 1982. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 17:229-59.
61. Matsuda, H., Strebel, F. R., Kaneko, T., Stephens, L. C., Danhauser, L. L., Jenkins, G. N., Toyota, N., and Bull, J. M. 1996. Apoptosis and necrosis occurring during different stages of primary and metastatic tumor growth of a rat mammary adenocarcinoma. *Anticancer Res.*16:1117-21.
62. Nicotera, P., Leist, M., and Ferrando-May, E. 1999. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp.* 66:69-73.
63. Wyllie, A. et al, *Apoptosis and Cell Proliferation* 2nd edition. p22 1998 BOEHRINGER MANNHEIM.
64. Igney, F. H. and Krammer, P. H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews.* 2: 227-288.
65. Krammer, P. H. 1999. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* 71:163-210 .
66. Schmitz, I., Kirchhoff, S. and Krammer, P. H. 2000. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32:1123-1136.

67. Huang, D. C. and Strasser, A. 2000. BH3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839–842.
68. Rodriguez, J. and Lazebnik, Y. 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & Dev.* 13:3179-3184.
69. Rathmell, J. C. and Thompson, C. B. 1999. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 17:781-828.
70. Savill, J. and Fadok, V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 407:784-788.
71. Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell.* 9:459-470.
72. Zornig, M., Hueber, A. O., Evan, G. 2001. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1551: F1-F37.
73. Schmitz, I., Kirchhoff, S. and Krammer, P. H. 2000. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32:1123-1136.重複
74. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86:147-157.
75. Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol Chem.* 274: 11549-11556.
76. Chai J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation bySmac/DIABLO. *Nature.* 406:855-862.
77. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
78. Lundberg, A. S., and Weinberg, R. A. 1999. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer.* 35:1886-94.
79. Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., and Traganos, F. 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry.* 13: 795-808.
80. Garner, D. L., and Johnson, L. A. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 57: 276-284.
81. Jaroszeski, M. J., et al. 1998. Flow cytometry protocols. Humanan Press. pp157-165.
82. Homo sapiens actin, beta (ACTB), Mrna. Gi | 5016088 | ref | NM-001101.2 | Gene Bank number NM-001101.
83. Florence, V., Gael, D., Jocelyn, C., and Jean-Pierre, B. 1999. p53-independent regulation of cyclin B1 in normal human fibroblasts during UV-induced G2-arrest. *Biology of the Cell.* 91:665-674.
84. Wong, H., and Riabowol, K. 1996. Differential CDK-inhibitor gene expression in

- aging human diploid fibroblast. *Experimental Gerontology*. 31:311-325.
85. Department of bioengineering , University of Washington , Winter 2002
 86. Ling, X. Bernacki, R. J., Brattain, M. G., Li, 2000. Induction of surviving expression by taxol (paclitaxel) is an early event which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *JBC Papers in Press*. Published on January 13.
 87. Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. 1995. *Nature*. 374:131-134.
 88. Norbury, C., Blow, J., and Nurse, P. 1991. Regulatory phosphorylation of the p34 cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J*. 10:3321-3329.
 - 89 Atherton-Fessler, S., Parker, L. L., Geahlen, R.L., and Piwnicka-Worms, H. 1993. Mechanism of p34cdc2 regulation. *Mol Cell Biol*. 13:1675-1685.
 90. Pines, J., and Hunter, T. 1989. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell*. 58:833-846.
 91. Pines, J., and Hunter, T. 1990. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*. 346:760-763.
 92. Clemens, D. L., Calisto, L. E., Sorrel, M. F., and Tuma, D. J. 2003. Ethanol metabolism results in a G2/M cell-cycle arrest in recombinant Hep G2 cells. *Hepatology*. 38:385-393.
 93. Jeong, H-W., Han, D. C., Son, K-H., Han, M. Y., Lim, J-S., Ha, J-H., Lee, C. W., Kim, H-M., Kim, H-C., and Kwon, B-M. 2003. Antitumor effect of the cinnamaldehyde derivative CB403 through the arrest of cell cycle progression in the G2/M phase *Biochemical Pharmacology*. 65:1343-1350.
 94. Santucci, M. A., Mercatali, L., Brusa, G., Pattacini, L., Barbieri, E., and Perocco, P. 2003. Cell-cycle deregulation in BALB/c 3T3 cells transformed by 1,2-dibromoethane and folpet pesticides. 2003. *Environmental and molecular mutagenesis*. 41:315-321.
 95. Wells, N.J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M.A., and Hunter, T. 1999. The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G2/M progression. *J Cell Sci*. 112:3361-3371.
 96. Niculescu AB 3rd, et al. 1998. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transition: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol*. 18: 629-43.
 97. Shao, Z-M., Alpaugh, M. L., Fontana, J. A., and Barsky, S. H. 1998. Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by p21^{WAF1/CIP1} induction, G2/M arrest, and apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 69:44-54.

98. Lian, F., Bhuiyan, M., Li, Y., Wall, N., Kraut, M., and Sarkar, F.H. 1998. *Nutr. Cancer*.
99. Matsukawa, Y., Marui, N., Sakai, T., Satomi, Y., Yoshida, M., Matsumoto, K., Nishimo, H., and Aoike, A. 1993. *Cancer Res.* 53:1328-1331.
100. Tchou, W. W., Rom, W. N., and Tchou-Wong, K. M. 1996. Novel form of p21(WAF1/CIP1/SD11) protein in phorbol ester-induced G2/M arrest. *J. Biol Chem.* 271:29556-29560.
101. Salomons, G. S., Brady, H. J. Verwijs-Janssen, M., Van, J.D., Hart, A. A., Van, H., Behren, K., and Smets, L. A. 1997. *Int. J. Cancer.* 71:959-965.
102. Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R. L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., and Hla, T. 1995. *Cancer Res.* 55:3785-3789.
103. Donaldson KL, et al. 1994. Activation of p34cdc2 coincident with taxol-induced apoptosis. *Cell Growth Diff.* 5: 1041-1050.
104. Shi L, et al. 1994. Premature p34^{cdc2} activation required for apoptosis. *Science.* 263: 1143-1145.
105. Li, Y., Upadhyay, S., Bhuiyan, M., and Sarkar, F. H. 1999. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. 1999. *Oncogene.* 18:3166-3172.
- 106 Galvesen G, et al. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci.* 96: 10964-10967.
107. Barkett M, et al. Phosphorylation of IκBα inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. 1997. *J Biol Chem.* 272: 29419-29422.
108. Reuther JY, et al. Apoptosis promotes a caspase-induced amino-terminal truncation of IκBα, that functions as a stable inhibitor of NF-κB. 1999. *J Biol Chem.* 274: 20664-20670.