

## 中文摘要

中草藥的研究在近年來成為非常熱門的研究主題。葫蘆科植物絞股藍 (*Gynostemma pentaphyllum* MAKINO) 是一種在亞洲治療肝炎以及心臟血管性疾病常使用的中草藥，絞股藍皂苷 (Gypenosides) 為由葫蘆科植物絞股藍經由 *n*-butanol 層中所萃取出來的主要藥效成分。然而絞股藍皂苷引起的細胞週期抑制與誘導計畫性死亡的機制到現在仍然不是非常的清楚。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，評估絞股藍皂苷對於人類肺癌細胞株 (A549) 抗癌的作用機轉。由實驗數據發現，絞股藍皂苷對人類肺癌細胞株會抑制細胞增生、細胞週期停止在 G0/G1 期及誘導細胞凋亡。藉由反轉錄聚合酶反應 (Reverse-Transcriptase Polymerase chain reaction; RT-PCR) 與西方點墨法 (Western Blotting) 分析細胞週期素，發現 p21、p27 皆有上升的趨勢。因而引發細胞週期停止在 G0/G1 期之上游因子 p21、p27 的表現量也會隨著加入絞股藍皂苷劑量增加而表現量增加，故推論 p21、p27 也許是調控促使人類肺癌細胞株發生細胞週期停止在 G0/G1 期的主要因子。流式細胞計數儀分析與 DNA 裂解實驗指出，絞股藍皂苷會誘發人類肺癌細胞株產生凋亡現象 (apoptosis)。藉由 RT-PCR 與 Western Blotting 的方法可以發現，Bax 有些許的上升，Bcl-2 與 p53

的量並沒有變化，而 caspase-3 與 caspase-9 的量也是明顯上升，NF- $\kappa$ B 也有些許上升的趨勢。因此我們認為，絞股藍皂苷可以藉由 NF- $\kappa$ B 的路徑，導致 Bax 的上升，而促使 caspase-9 活化，再使下游的 caspase-3 活化而導致計畫性死亡，而這樣的死亡路徑是不經由 p53 這條路徑的。

## Abstract

Recently, Herbal medicines are increasingly becoming a popular project. *Gynostemma pentaphyllum* MAKINO is noted for its functions of treating hepatitis and cardiovascular diseases in Asia. Gypenosides are the major components that are extracted from *Gynostemma pentaphyllum* MAKINO. However, the molecular mechanism underlying the gypenosides-induced cell cycle arrest and apoptotic process is unclear. In this study, we have evaluated the chemopreventive role of gypenosides in human lung cancer (A549) cells *in vitro* by studying the regulation of proliferation, cell cycle and apoptosis. Gypenosides inhibited cell proliferation, induced G0/G1 arrest and apoptosis in A549 cells. Investigation on the levels of CDKIs (p21 and p27) by Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Western Blotting showed that p21 and p27 were increased with the increasing doses of gypenosides in A549 cells. The levels of p21 and p27 increased after A549 cells were cotreated with various concentrations of gypenosides. The increase of the levels of p21 and p27 may be the major factor for gypenosides to cause G0/G1 arrest in the examined cells. Flow cytometric assay and gel electrophoresis of DNA fragmentation also confirmed that gypenosides induced apoptosis in A549 cells. Our data demonstrated that gypenosides-induced apoptotic cell death was accompanied by up-regulation of Bax, NF- $\kappa$ B, caspase-3 and caspase-9, while it had no effect on the levels of Bcl-2 and p53. Taken together, gypenosides therefore appears to exert its anticarcinogenic properties by inhibiting proliferation, inducing G0/G1 phase arrest and apoptosis underwent

activation of NF- $\kappa$ B, Bax and caspase-3 in human lung A549 cancer cell line.

## 致謝

時光荏苒，一下子兩年的時間過去了，由衷的感謝吾師鍾景光教授與吳禮宇副教授在生活上與學識上的教導，使本論文得以順利完成。文稿撰寫之初，承蒙各口試委員的撥冗審閱與大力斧正，提供諸多的寶貴意見，使論文內容更加完善，在此謹至上我最由衷的感謝。

回顧兩年期間，承蒙微生物科劉昭君副教授、方世華副教授、陳師慶副教授、項千芸副教授、寄生蟲科郭秀滿副教授、醫學系所系辦麗如姐在生活與研究的指導與關心。此外感謝學長姐楊家欣、陳俊仁、徐美華、林孟葳、王孟珠、林珮如、馬嘉贛、李佳陽、邱華浩、陳宣嘉；同學瓊瑤、豐仁、志宏、信賢、述綺、詩晴、孟芹；助理碧玲等在實驗上與課業上的協助與砥礪；學弟妹寶文、欣如、宣榜、孔文、宜蒼等在生活上的鼓勵與幫助。

由衷的感謝我親愛的父母與弟妹，在這兩年來於精神與生活上的鼓勵和支持，讓我得以順利完成這兩年來的學業，最後將此論文獻給所有關心我的家人、師長、同學與學弟妹。

陳宜珊 謹致於

中國醫藥大學 醫學研究所

中華民國九十三年六月

# 總目錄

	頁次
中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
總目錄.....	6
圖表目錄.....	9
符號與縮寫.....	13
第一章 前言	
第一節 研究緣起.....	14
第二節 研究目的.....	15
第二章 文獻探討	
第一節 絞股藍與絞股藍皂苷.....	16
第二節 細胞週期的調控.....	21
第三節 細胞凋亡.....	26
第四節 多重抗藥性基因.....	37
第三章 研究設計與假說	
第一節 研究設計.....	38
第二節 研究假說.....	38
第四章 材料與方法	

第一節	實驗材料.....	39
第二節	實驗方法.....	44
第三節	分析方法.....	60
<b>第五章 研究結果</b>		
第一節	絞股藍皂苷對人類肺癌細胞株細胞增生的影響.....	62
第二節	絞股藍皂苷對人類肺癌細胞在細胞週期的影響.....	66
第三節	絞股藍皂苷對人類肺癌細胞株在計畫性死亡上的改變情形.....	71
第四節	絞股藍皂苷對人類肺癌細胞在 DNA 電泳膠片的表現情形.....	75
第五節	使用 RT-PCR 技術對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞中細胞週期素的 mRNA 表現量的改變.....	77
第六節	使用 RT-PCR 技術對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞中 Bcl-2 family 與 caspase 的 mRNA 表現量的改變.....	80
第七節	使用 RT-PCR 技術對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞中 MRP 的 mRNA 表現量的改變.....	83
第八節	使用西方點墨法對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞中細胞週期素蛋白表現量的改變.....	85
第九節	使用西方點墨法對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞中	

casapase 蛋白表現量的改變.....	88
第十節 使用西方點墨法對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞中粒線 體蛋白表現量的改變.....	90
第十一節 使用西方點墨法對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞中 Death Receptor 蛋白表現量的改變.....	92
第六章 討論.....	94
第七章 結論與建議	
第一節 結論.....	101
第二節 建議.....	103
參考文獻.....	104

## 圖表目錄

圖一 細胞週期.....	25
圖二 Apoptosis 與 necrosis 的不同.....	28
圖三 經由 Fas 活化計畫性死亡的路徑.....	30
圖四 經由 TNF 活化計畫性死亡的路徑.....	31
圖五 經由 DR4/DR5 活化計畫性死亡的路徑.....	32
圖六 粒線體在計畫性死亡中扮演的角色.....	33
表一 Bcl-2 family 與其在計畫性死亡中的角色.....	36
圖七 進行流式細胞計數儀分析出來的細胞週期標準圖.....	47
表二 PCR 技術所使用到的 primer.....	53
表三 PCR 技術所使用到的 primer.....	54
圖八 聚丙烯醯胺/亞甲基雙丙烯醯胺的結構式.....	57
圖九 利用流式細胞計數儀使用不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時 後在人類肺癌細胞株的細胞存活情形.....	63
圖十 利用流式細胞計數儀評估細胞的增生率.....	64
圖十一 利用流式細胞計數儀評估細胞的增生率.....	65
圖十二 人類肺癌細胞經過給予不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時 之流式細胞計數儀所檢測到的情形.....	67
圖十三 人類肺癌細胞經過加入不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時	

	之流式細胞計數儀所檢測到的情形.....	68
圖十四	人類肺癌細胞經過給予或不給予 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的絞股藍皂苷處理 6、12、24、48 小時之流式細胞計數儀所檢測到的情形.....	69
圖十五	人類肺癌細胞經由給予或不給予 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的絞股藍皂苷處理 6、12、24、48 小時後以流式細胞計數儀所檢測到的情形.....	70
圖十六	人類肺癌細胞經過給予或不給予 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的絞股藍皂苷處理 6、12、24、48 小時之流式細胞計數儀所檢測到的情形.....	72
圖十七	利用流式細胞計數儀加入或不加入 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的絞股藍皂苷培養 6、12、24、48 小時之後分析計畫性死亡的細胞分布情形.....	73
圖十八	利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的型態.....	74
圖十九	利用 DNA 電泳法檢測 DNA 斷裂的情形.....	76
圖二十 A.	以 RT-PCR 分析人類肺癌細胞經加入不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時後細胞中 CDK2、CDK4、p53 的相對表現量.....	78
圖二十 B.	以 RT-PCR 分析人類肺癌細胞經加入不同濃度的絞股藍皂	



圖二十七	利用西方點墨法觀察絞股藍皂苷對人類肺癌細胞中 death receptor 中的 Fas、NF- $\kappa$ B (p50)、NF- $\kappa$ B (p65) 蛋白質相對表現量.....	93
圖二十八	結論總圖.....	101

## 符號與縮寫

BSA : Bovine serum albumin

CDK : Cyclin-dependent kinase

CDKI : Cyclin- dependent kinase inhibitor

DMSO : Dimethyl sulfoxide

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

FBS : Fetal bovine serum

PBS : Phosphate buffered Saline

PARP : Poly(ADP-ribose) polymerase

PI : Propidium iodide

# 第一章 前言

## 第一節 研究緣起

據統計，在世界上約有 35 個先進國家其肺癌死亡率居所有癌症死亡率的<sup>1</sup>第一位。世界衛生組織報告，近 20 年來，人類的癌病死亡率增加 19%，其中以肺癌增加最多，在男性增加 76% 而女性增加 135%。肺癌致病因子眾多，吸菸和二手菸與日俱增，其中所含之多環芳香碳氫類（polycyclic aromatic hydrocarbons）及尼古丁衍生物之亞硝胺，油煙、煙塵、高揮發有機化合物、空氣中彌漫的重金屬化合物、石棉等因子，導致肺癌罹患和死亡率逐年攀升<sup>1</sup>。台灣每年約有五千名病患因肺癌而死亡，於 1999 年越居癌症死亡率之冠<sup>2</sup>，其嚴重性不可小覷。現今對於癌症療法研究有兩大方向：一為抑制癌細胞間血管生成而達抑制成長之效；二從細胞自身的細胞計畫性凋亡（Apoptosis）著手，找出使癌細胞自殺卻不影響其他正常細胞的方法，故找出有效且不傷害正常細胞的方法是刻不容緩的課題。

## 第二節 研究目的

近年來中草藥在醫學抗癌方面掀起一股熱潮，其中絞股藍為民間傳統的草藥，其製品有皂苷、茶葉等。其味甘、無毒，因具與人參皂苷結構相同，故有"第二人參"之美譽<sup>3</sup>。在其抗腫瘤方面，有報導指出絞股藍皂苷在低劑量時可以減小腫瘤的體積，延長壽命<sup>4</sup>，但在高劑量時，抑制腫瘤的能力反而減弱<sup>5</sup>。在一另方面，也有研究發現絞股藍皂苷可以使大腸癌細胞DNA合成降低，核分裂數減少，細胞變性壞死<sup>6</sup>。但是絞股藍皂苷誘發人類肺癌細胞（A549）凋亡的機轉並沒有任何文獻有報導，於是本論文旨在找出絞股藍皂苷對人類肺癌細胞（A549 cell line）的抑制機轉，以尋出預期效果，進而開發有效的量產。

## 第二章 文獻探討

### 第一節 絞股藍與絞股藍皂苷

#### 1. 絞股藍的簡介

絞股藍為葫蘆科絞股藍屬植物 *Gynostemma pentaphyllum* MAKINO。

異名為七葉膽、小苦草、公羅鍋底、遍地生根、五月五、五葉參、金絲五爪龍等，在日本稱之為《甘蔓茶》<sup>7-8</sup>。其為多年生攀援草本植物，生長分布廣，大陸陝西南部及長江流域以南各省區，均有其生長蹤跡，以雲南種類最多。韓國、日本、越南、印尼等地區亦有蹤跡。台灣在 600~2000 公尺的山谷陰濕處均能生長。其味甘、無毒，因具與人參皂苷結構相同，故有"第二人參"之美譽<sup>3</sup>。絞股藍始載於明代救荒本草，本草綱目中記載，絞股藍具有冰血降火、生津止渴功效，具涼血之效、降火，然授乳期體寒之婦女不宜飲用<sup>3,9</sup>。

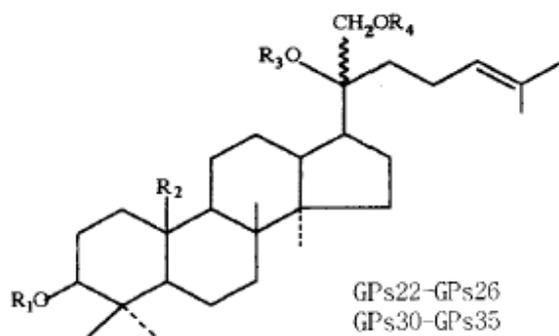
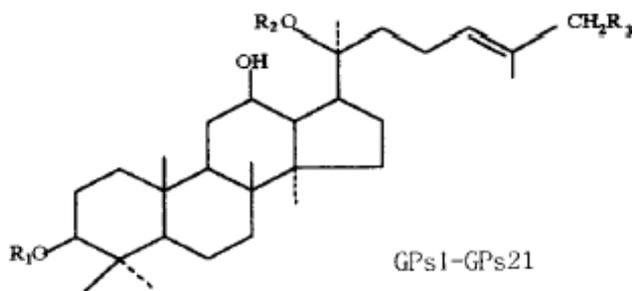
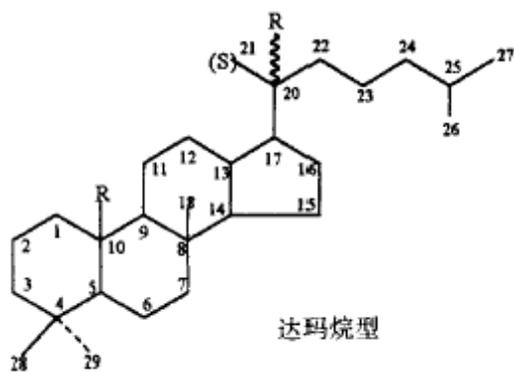
#### 2. 化學成分

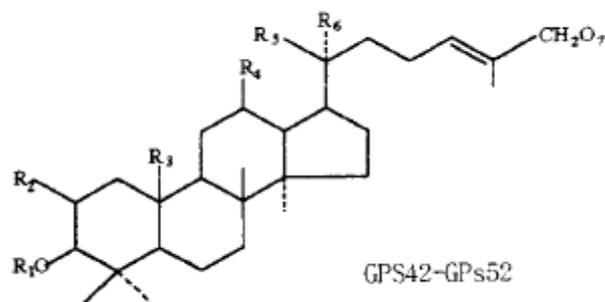
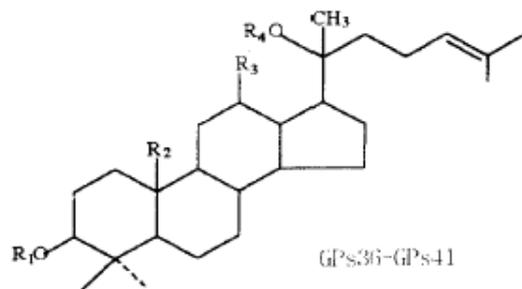
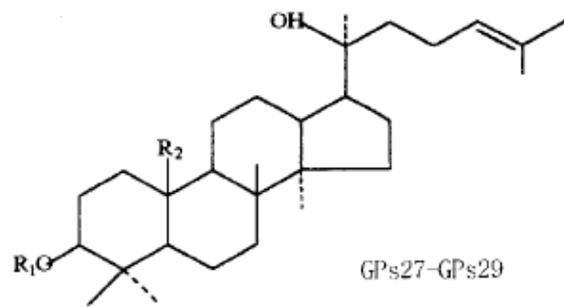
近二十年來，已分離鑑定出80多種皂苷<sup>10-11</sup>，發現其中主要藥效成分為絞股藍皂苷（Gypenosides；Gps）。其中絞股藍皂苷III、IV、VIII、XII分別與人參Rb1、Rb3、Rd、F2、Rg3在化學結構上完全相同，其餘為人參皂苷的異構體，另外絞股藍皂苷還含有醣類、黃酮、各種胺基酸和微量元素<sup>12,13</sup>。

已分析出來的GPs有五類，其中瑪烷型為基本結構式：

GPs1-GPs21; GPs22-GPs26 ; GPs30-GPs35; GPs27-GPs29;

GPs36-GPs41; GPs42-GPs52。結構式如下<sup>14</sup>：





### 3. 藥理作用

#### (1) 抗腫瘤作用

在抗腫瘤實驗中，對S<sub>180</sub>小鼠每天餵食絞股藍皂苷 50 mg/kg連續用七天，12 天內可使腫瘤減小 40% ，以 20-40 mg/kg隔日皮下注射，能延長患有腹水瘤小鼠的壽命<sup>4</sup>。王等學者在 1988 年研究表明，絞

股藍皂苷對小鼠S<sub>180</sub>移植性腫瘤的生長有明顯的抑制效果，每日灌服 30 mg/kg、300 mg/kg及 120 mg/kg的絞股藍皂苷腹腔注射連續 10 天，其腫瘤抑制率均大於 30%。其中以 30 mg/kg灌服作用最強，抑制率約達 87.1%，增加劑量反而抑制能力減弱<sup>7</sup>。

金和薛學者在 1992 年發現一定劑量範圍（1-20 μg/mL）的絞股藍提取液作用一定的時間（24、48、72 小時）後，發現可以使大腸癌細胞DNA合成降低，核分裂數減少，細胞變性壞死。其作用機制之一可能為抑制腫瘤細胞生長增殖和直接的細胞毒性作用<sup>6</sup>。對未使用化療或化療結束一個月後的患者測定其T淋巴細胞的轉化率（LTT）與脂酶染色陽性率（ANAE），發現絞股藍皂苷具有增強T細胞免疫功能的作用，用於防範惡性腫瘤有良好的效果<sup>4</sup>。

## （2）升高白血球的作用

魏和劉等學者在 1993 年使用絞股藍皂苷 150-300 mg/kg灌胃小鼠連續八天，能使環磷酸胺或<sup>60</sup>Co照射所導致的低白血球症小鼠的白血球數明顯升高，而對正常的小鼠卻無明顯的影響<sup>15</sup>。

## （3）抗心肌缺血缺氧作用

欣和劉等學者在 1993 年利用通過大鼠急性心肌梗塞模型，即離體培養大鼠心肌細胞缺糖缺氧損害模型，在早期腹腔注射絞股藍皂苷，結果發現能明顯縮小心肌梗塞範圍，抑制心肌梗塞後血清磷酸肌

酸肌酶 (CPK) 及乳酸脫氫酶 (LDH) 的升高。早期預防性靜脈注射絞股藍皂苷，能明顯減輕缺血心肌組織結構的損傷程度。體外實驗還證明，絞股藍皂苷對培養大鼠、乳鼠心肌細胞缺糖缺氧損傷具有直接保護的作用<sup>16</sup>。

#### (4) 降低血脂、抑制肥胖

孟和朱等學者在 1989 年利用給高脂大鼠每天灌服絞股藍皂苷 200 mg/kg 連續 10 天後，取血液測定，顯示絞股藍皂苷能顯著降低血清總膽固醇 (TC)、低密度脂蛋白 (LDL) 含量，提高高密度脂蛋白 (HDL) 含量，使 HDL/LDL 的比值增大<sup>17</sup>。木村善行也證明絞股藍皂苷對餵食高糖高脂的大鼠所致的高血脂症有效。給藥組大鼠血清總膽固醇 (TC)、中性脂肪 (TG)、磷脂質 (PL) 與過氧化脂質 (LPD) 顯著降低，這樣的結果表示高血脂症可被絞股藍皂苷所抑制<sup>18</sup>。

#### (5) 抗氧化作用

雷等將絞股藍皂苷提取物依 400 mg/kg 灌胃，能使正常小鼠血漿中 cAMP 含量降低，cGMP 含量升高，cAMP/cGMP 的比值降低<sup>19</sup>。

#### (6) 保肝作用

高糖、高脂導致的大鼠高脂血時常伴隨著肝損傷，使其中的 GPT 上升。使用絞股藍皂苷 100 mg/kg 連續七天後能抑制血清中的 GPT 上升以及肝過氧化脂質的增加。使用絞股藍皂苷 50 mg/kg 能明顯抑制四

氧化碳所致的大白鼠急性肝損傷<sup>20</sup>。

## 第二節 細胞週期的調控

2001 年的諾貝爾生理醫學獎頒發給三位研究細胞週期(cell cycle)的生物學家：英國的保羅·諾爾斯(Paul Nurse)與蒂莫西·漢德(Timothy Hunt) 以及美國的利蘭·哈特韋爾(Leland Hartwell)，以表揚他們發現細胞週期的調控因子之重大貢獻，解開生命之謎。早在 1665 年虎克(Robert Hooke)便從自製顯微鏡下觀察到生物體的細胞，1838 年由馬薩斯·薩爾登(Matthias Schleiden)與陶德·薩旺(Theodor Schwann)提出細胞理論(cell theory)，認為生物體是由一或多個細胞所組成，所有細胞都是由一個細胞所分裂衍生而來，因此細胞分裂是一個維持細胞永遠不死的唯一途徑，會有新細胞生成以代替死去細胞<sup>21</sup>。

所謂細胞週期 (cell cycle) 指的是包含了G0/G1、S、G2、M等階段時期<sup>22</sup>。

Gap 0 (G0)：細胞處於休眠的狀態，可能是暫時休眠或者是永久性休眠，需要有適當的訊息才會重新投入細胞週期。

Gap 1(G1)：細胞維持正常代謝並且繼續生長，在進入 S (synthesis) 時期之前會檢查染色體(chromosome) DNA 是否受到

破壞以進行修補(repair)的工作，此時期需要花十到十二小時。細胞也可能由此脫離細胞週期進入不生長的休止狀態(G0)。

Synthesis (S)：當細胞進入 S 時期會花六到八小時進行 DNA 的合成，將原本的二十三對染色體複製另一份，其目的在複製。

Gap 2 (G2)：當細胞進入 G2 (gap2)時期需要花三到四小時，除了繼續生長並且合成蛋白質之外，細胞也會負責檢查染色體 DNA 的複製是否完整以準備進行有絲分裂(mitosis)。

M (mitosis)：細胞會由一個母細胞變成兩個子細胞，已複製完整的染色體會各自分配到子細胞內，使得子細胞內的染色體與母細胞完全一樣，此時期只有一小時，之後子細胞再開始進入下一個細胞週期。

在細胞週期中，每個階段或是時期交界都有所謂的『檢查點』(checkpoint)，其意義類似於工廠製造過程中的品管控制。G1 階段所監測的為細胞個體的大小，在細胞成長過程中，細胞核遺傳物質若有受外界高能輻射線或化學物質的影響而突變，則啟動修復系統。S 階段則是在進行 DNA 複製，而 G2 階段主要在檢查所有染色體 DNA 是

否都被複製且限於一次，若一切都正常才能進入最後細胞分裂M期。若是當DNA受損時，細胞週期便無法通過檢查哨而造成停滯，這就是所謂的cell cycle arrest。此時DNA會進行修復（DNA repair），若是遇到無法彌補的錯誤時，細胞則會走向計畫性凋亡（apoptosis）<sup>23</sup>。而細胞週期中最重要的調控因子就是Cyclins與CDKs（cyclin dependent kinases），其可以正向調控細胞週期<sup>24</sup>。Cyclins家族主要是在細胞週期中被合成，其成員已知有8種，分別為：Cyclin A、B<sub>1,2,3</sub>、C、D<sub>1,2,3</sub>、E、F、G、H<sup>25-28</sup>。

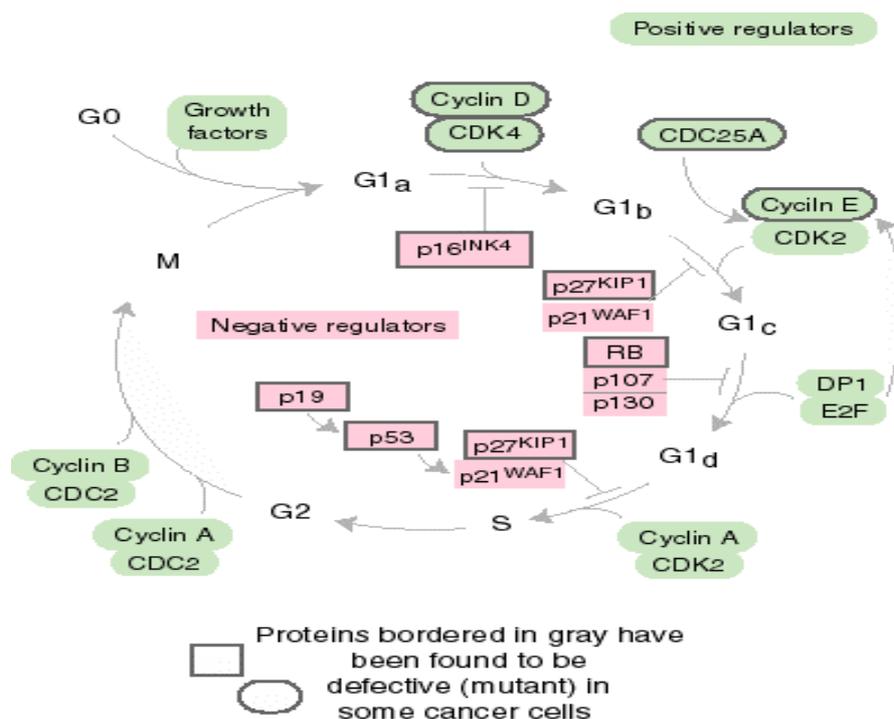
Cyclins A and B主要存在於S-G2 phase，為mitosis cyclins，在mitosis時會迅速的被分解<sup>28</sup>。Cyclins C、D and E主要存在G1 phase，並在G1-S phase時會被分解<sup>27</sup>。而Cyclin H與CDK7會形成一個具有酵素活性的複合物，可以活化CDK1（cdc2）與CDK2。

CDKs（cyclin dependent kinases）是一群蛋白激酶，其成員目前已知有7種，分別為：CDK1（cdc2）、CDK2、3、4、5、6、7，其會與特定的Cyclin結合而活化他們。CDK1（cdc2）主要存在S、G2以及M時期，並與Cyclins A及B結合<sup>29</sup>。細胞在G0/G1 phase，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Cyclins A及E結合。而CDK7會與Cyclin H結合，並磷酸化CDK1與CDK2<sup>30,31</sup>。

細胞週期中還有另一群重要的調控因子，就是CDKI (cyclin dependent kinase inhibitors) <sup>32-34</sup>。基本上分成兩個族群，一為INK4 family，另一為KIP/CIP family <sup>35</sup>。在INK4 family中，主要成員有p14、p15(INK4B)、p16(INK4A)、p18(INK4C)以及p19(INK4D)，其功能為抑制Cyclin D/CDK4 與Cyclin D/CDK6 而達G1 時期的控制。另一個族群為KIP/CIP family，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/CDK1、Cyclin D/ CDK6、Cyclin A/CDK2 及Cyclin B/CDK1 等 <sup>32-34</sup>。

癌症與細胞週期的變化息息相關，細胞不受控制的增殖是癌症的主要特徵。導致此現象的發生是由於負責調節細胞週期或者參與細胞週期檢查點調控的蛋白質的基因受到改變，使得這些蛋白質產物失去原有的功能而造成細胞週期不斷地進行。有幾種腫瘤抑制蛋白質 (tumor suppressor gene)的作用之處是位於細胞週期的檢查點上，隨時掌握細胞週期是否該採煞車，例如 p53 轉錄因子(transcription factor)的基因突變之情形在很多癌症中可以被發現，p53 蛋白質的含量在DNA 受損時會增加，受到活化的 p53 會使 p21 開始生產，p21 結合至 Cyclin 與 CDK 的複合體使細胞週期被停止在 G1 晚期以修補錯誤的 DNA 序列，所以 p53 的功能喪失將會使得細胞該停止時卻停不下

來，因此不斷地增生。視網膜母細胞瘤(retinoblastoma, RB)是在視網膜(retina)生成的一種癌症，在正常情況下，未受到Cyclin D與CDK4以及Cyclin E與CDK2的複合物高度磷酸化的RB會與轉錄因子E2F結合並停止在G1晚期，當pRB受到高度磷酸化時，E2F會離開RB而啟動基因轉錄的進行，而此基因所轉譯的蛋白質會推動細胞週期走向S時期，所以當RB基因突變時，細胞週期便無法正常停止在G1晚期，在細胞尚未檢查DNA序列正確與否之前就直接走入S時期，結果會使得細胞無法停止地增生<sup>36-37</sup>。



圖一 細胞週期

Adrian M. Senderowicz, Edward A. Sausville Preclinical and Clinical Development of Cyclin-Dependent Kinase Modulators  
*Journal of the National Cancer Institute*, 2000; 92: 376-387.

### 第三節 細胞凋亡 (Apoptosis)

#### 1. 細胞凋亡的意義

早在 1972 年, Kerr與Wyllie等學者將Apoptosis的命名取自於希臘文, 希臘文中的”apo”代表離去、消失的意思, 而”ptosis”在希臘文中代表凋落、落下的意思。原本字面的意思是指樹葉凋落或掉落<sup>38</sup>。而在拉丁文中”apopto-”在拉丁文中是”枯萎·凋零”的意思, 用來表示細胞進行apoptosis 時的外觀, 並指”死亡”之意。

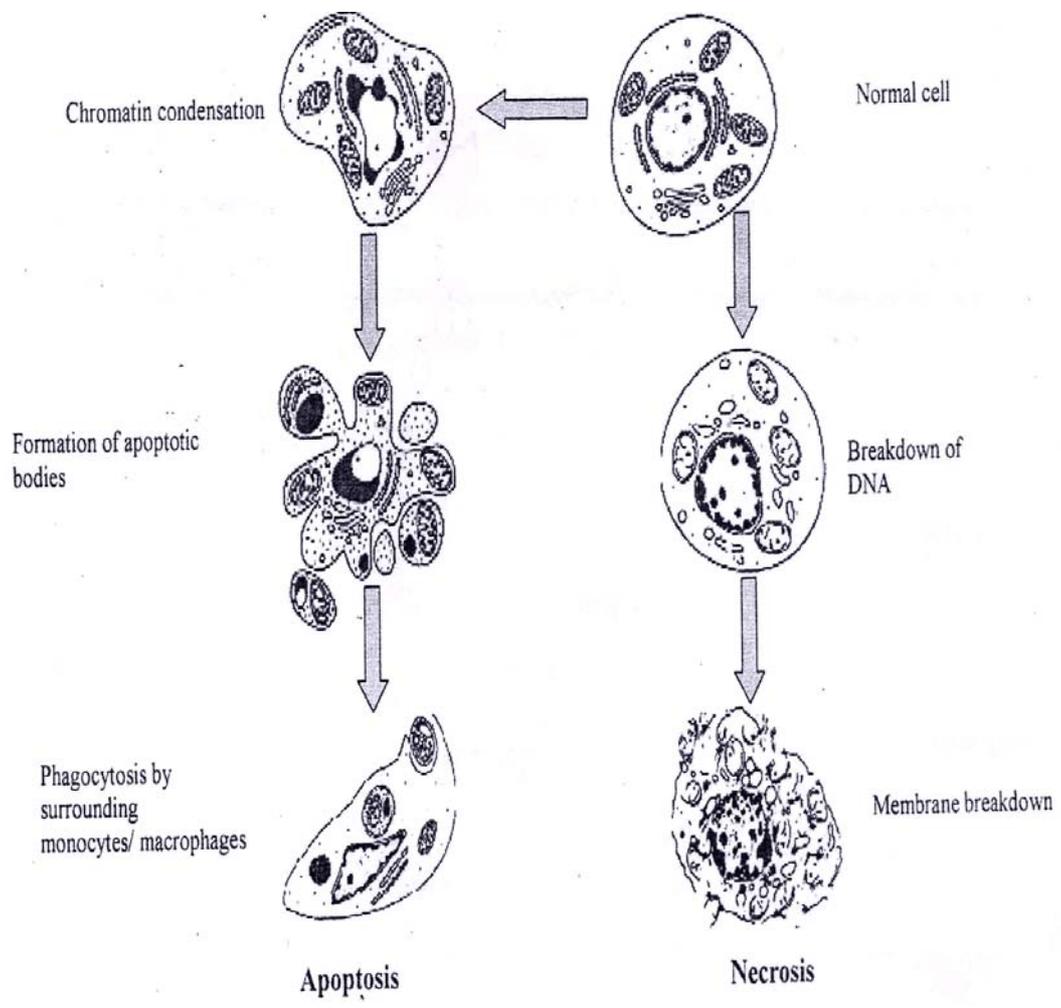
Apoptosis或為計畫性死亡, 在真核細胞的發展、生長與分化當中以排除大量與不需要的細胞的方式, 為一種細胞自我毀滅的過程<sup>39</sup>。所以apoptosis為一種發生在正常的物理狀態之下死亡的過程而不是細胞有損傷或是遭受攻擊的時候<sup>39</sup>。在多細胞有機生物體中, apoptosis是一種控制與維持細胞數非常重要的程序。而生物體的恆定也依靠著apoptosis與細胞增生的之間平衡來控制。如果apoptosis程序被抑制或是其中調控的基因有損害, 則會造成細胞無法走向計畫性死亡, 而導致細胞循著錯誤的訊息繁衍下去, 造成細胞增生, 癌化的表現。

Apoptosis與necrosis的不同在於apoptosis的死亡是經由分裂成DNA片段、細胞膜皺縮、染色質變濃染而後形成凋亡小體 (apoptotic

bodies)，由monocyte或macrophage吞噬處理掉<sup>39-42</sup>，如圖二。這樣的死亡不會波及其他周圍的細胞，且不會發生發炎現象。而necrosis的死亡方式會造成細胞發炎破裂，釋出發炎因子而造成周圍細胞一併被波及，出現壞死現象。許多的因子都會促使apoptosis的產生，例如：外加的stress (ionizing and ultraviolet radiation, heat shock) 與經由一些receptor像是：tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等的receptor因子所造成。這些促使apoptosis的刺激因子會被caspase-specific inhibitors所抑制，由此可知caspase在apoptosis當中也是扮演著很重要的角色。當apoptosis啟動時，caspase會經由瀑布式活化apoptosis路徑，利用本身的酵素活性去切割下游的caspase而使之活化。Caspase還可以去活化DNAase，於是DNAase就可以去切割DNA，使在apoptosis當中造成DNA fragmentation<sup>43</sup>。

## 2. 形態學上的表現

接受到細胞進行apoptosis的指令之後，細胞核內的染色質開始濃染且細胞變圓，接著DNA fragment開始形成，產生 180-200 bp或其倍數的DNA片段，因此藉由電泳膠片法來觀察的時候，可以看見像樓梯狀的電泳帶<sup>44</sup>。其他的形態包括cytoplasm開始皺縮，然後lamins與actin filaments被切割而使細胞形成凋亡小體，最後經由monocyte與macrophage進行吞噬作用將細胞碎片處理掉<sup>39</sup>。



圖二 Apoptosis與necrosis的不同<sup>39</sup>。

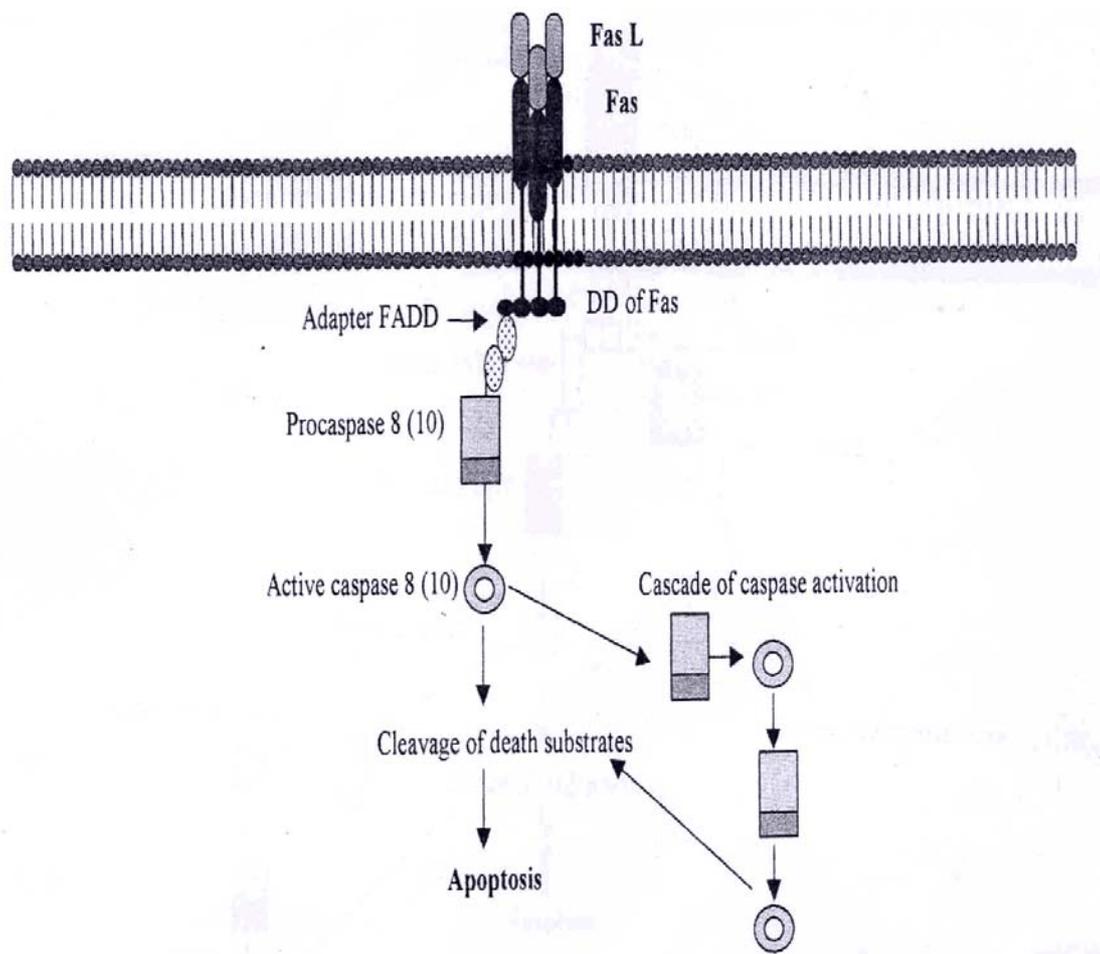
### 3. 內在與外在的apoptosis pathway<sup>39</sup>

#### (1) 外在路徑

外在路徑由death receptor與細胞膜上的surface receptor結合釋放計畫性死亡訊號後所開啟。Apoptosis開啟之後會去活化caspase cascade，而這樣經由caspase路徑所啟動apoptosis是非常迅速的<sup>39</sup>。最代表性的例子就是CD95 (Fas)、TNFR1、TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)。

(A) 由 CD95/Fas 所傳遞的路徑

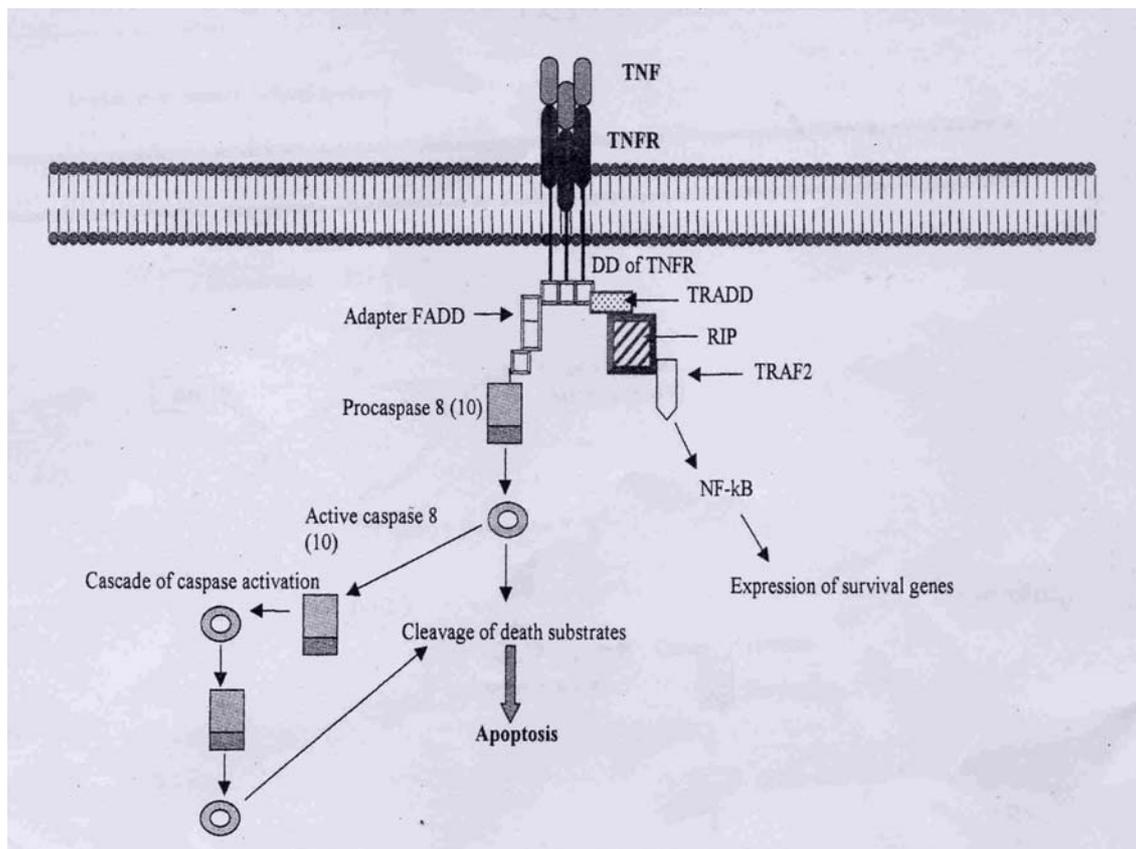
Fas屬於tumor necrosis factor receptor superfamily當中的一員。當Fas與Fas ligand結合後會導致death domains (DD) 的聚集，接著會吸引細胞內的Fas-associated death domain (FADD) 過來與DD結合，結合之後會活化caspase-8<sup>45</sup>，經由一連串切割的過程再去活化下游的caspase，例如caspase-3與caspase-7等。



圖三 經由Fas活化apoptosis的路徑<sup>39</sup>。

(B) 由 Tumor Necrosis Factor Receptor-1 (TNFR1) 所傳遞的路徑

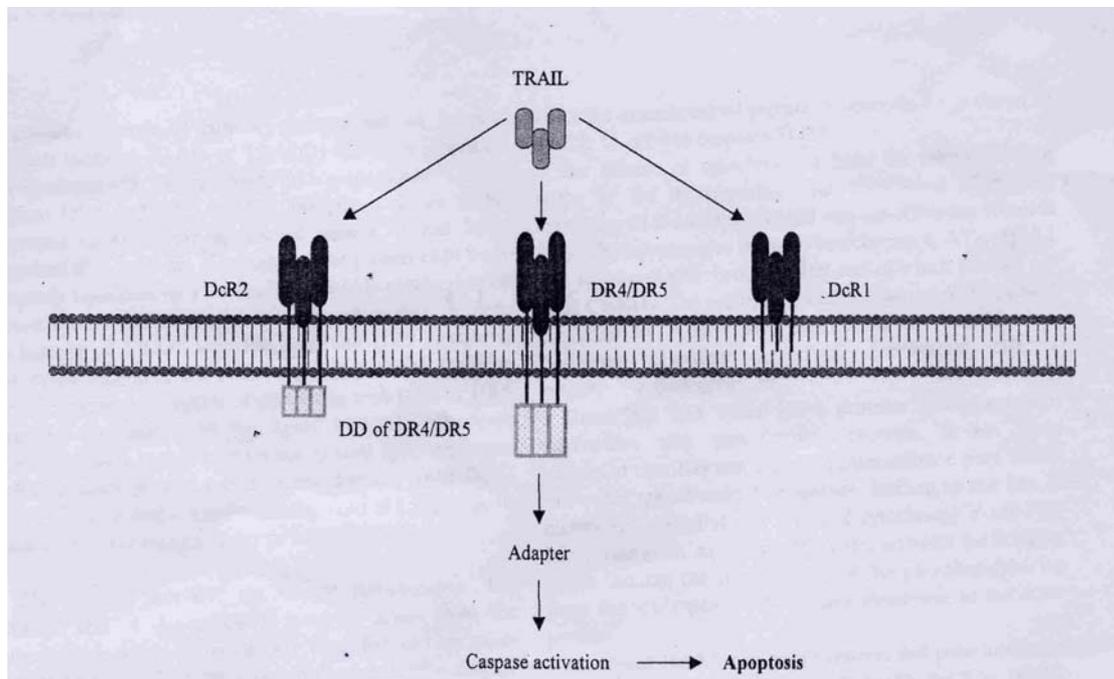
TNF 是由遭受到感染所反映出來的 T cell 與活化的 macrophage 所製造出來的，其 ligand 則為 TNFR1。在一些細胞當中，TNF 可以藉由啟動免疫反應而活化 NF- $\kappa$ B。當 TNF 結合上 TNFR1 時，會吸引 TRADD (TNFR-associated death domain) 的靠近，這樣的機制會啟動更多蛋白的靠近。而其中吸引來的蛋白：RIP (receptor interacting protein) 與 TRAF2 (TNF-associated factor 2) 可以活化 NF- $\kappa$ B 的路徑，促使細胞生存或死亡，另一方面也活化 caspase-8，導向 apoptosis。



圖四 經由TNF活化apoptosis的路徑<sup>39</sup>。

(C) 由 TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) 所傳遞的路徑

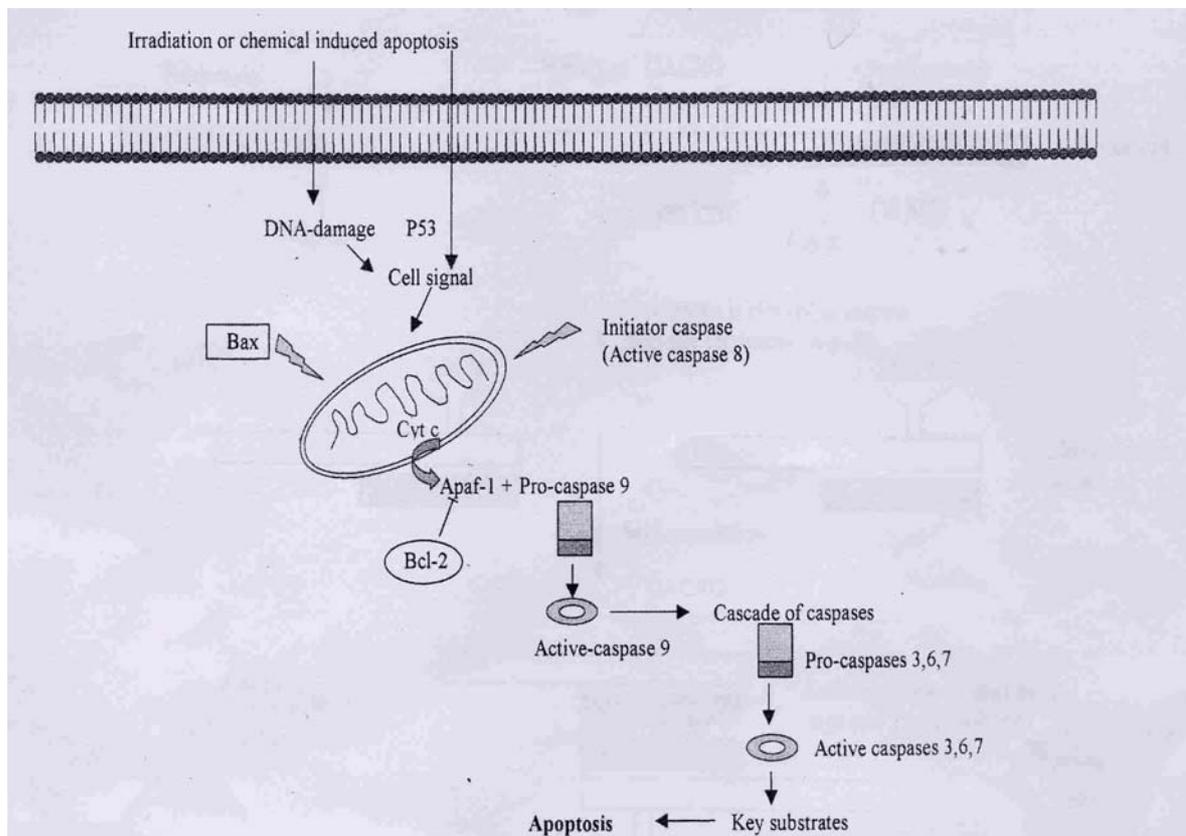
其實 TRAIL 所造成的 apoptosis 路徑與 Fas L 很相似，TRAIL 的 receptor 是 DR4 或 DR5，當 TRAIL 與 DR4 或 DR5 結合之後，則會啟動 apoptosis 的機制。唯一跟 Fas L 機制不太一樣的是 Fas L 的表現需要 T cell 與 NK cell 的活化，而 TRAIL 的活化可以由許多組織刺激來表現。在細胞表面上仍有兩種 receptor 來與 DR4 或 DR5 競爭與 TRAIL 所結合的位置，這兩種 receptor 就是 DcR1 與 DcR2。於是當 TRAIL 與 DcR1 或 DcR2 結合上，則不會啟動 apoptosis；而 TRAIL 與 DR4 或 DR5 結合上之後則會啟動 apoptosis。



圖五 經由DR4/DR5 活化apoptosis的路徑<sup>39</sup>。

## (2) 內在路徑

內在路徑最代表性的是由粒線體所誘發的<sup>46</sup>。第一個被發現的就是Bcl-2，Bcl-2位於粒線體膜的外層，調控細胞的存活。第二個被發現的是cytochrome c<sup>46</sup>。當細胞受到傷害，有個訊號將引起計畫性死亡的時候，就促使cytochrome c由粒線體的intermembrane space釋放到細胞質中，刺激形成apoptosome與活化caspase的複合物<sup>47</sup>，apoptosome包括了cytochrome c、ATP、Apaf-1與caspase-9原生酶。經由切割pro-caspase 9使之變成活化態之後，即可活化下游的caspase而啟動apoptosis。



圖六 粒線體在apoptosis中扮演的角色<sup>39</sup>。

## (A) Caspase

Caspase的全名為Cystein aspartase，為一種有著Cystein活化態殘基的蛋白酶。Caspase可以在目標蛋白N端的aspartate殘基與C端的small hydrophobic residue間做切割的動作而導致變成活化態<sup>48-49</sup>。Caspase的原生酶包括了三個部分，他們可以經由切割而活化：amino-terminal prodomain、a large subunit (17-20 kD) 與a small subunit (10-12 kD)。在caspase-3 與caspase-7 中，他們的prodomain通常都比較短，而在caspases-1、-2、-4、-8、-9、-10 中，他們的prodomain通常都比較長。

這些caspase皆有幾個共通點<sup>50</sup>：

1. 可藉由切割形成大小不同的次單位而活化，其切割位置為 Asp 的 C 端肽鍵上。
2. 具有本身催化或互相激活的能力
3. 具有相似的催化部位，包括 active site cystein residue 的 QACXG 序列。

目前已發現的caspase至少有 14 種，根據他們的同源性，約可以分成三大類<sup>49, 51</sup>：

### (a) The ICE subfamily of cytokine processors：

此類的 capsase 有 casapses-1、-4、-5、-11、-12、-13、-17，大部

分都跟發炎反應有關

(b) The Ced-3/ CPP subfamily of apoptotic executioners

此類的 caspase 有 caspases-3、-6、-7。其功能為負責執行細胞凋亡，裂解下游的蛋白，例如：poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)。PARP 原本的作用為修復已受損的 DNA，但如果當 PARP 受到 caspase 3 的活化裂解，則會由 116 kD 裂解成 85 kD，失去原本的功能，而使得朝 apoptosis 的方向進行。

(c) The ICH-1/Nedd-2 subfamily of apoptotic initiators

此類的 caspase 包括了 caspases-2、-8、-9、-10。這類 caspase 的功能在於活化 apoptotic executioners，使其能執行 apoptosis。

(B) Bcl-2 family

Bcl-2 family 包括了 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-Xs、Bax、Bad、Bag、Bak、Bid。其各有促進以及抵抗 apoptosis 的功能<sup>52-56</sup>。當過度表現 Bax 基因會打亂 Bcl-2 或 Bcl-XL 抑制 apoptosis 的作用而啟動計畫性死亡<sup>57</sup>。Bcl-2、Bcl-XL、Bax 與 Bad 可以扮演著 channel protein 的角色在粒線體膜上穿梭<sup>57-59</sup>。

Bax 與 Bak 可以控制粒線體膜的通透性而調控 apoptosis 機制。因此

Bax與Bak則可以運輸像是cytochrome c與apoptosis inducing factor，而啟動下游的caspase活化與apoptosis。也有報導指出這些pro-apoptotic與anti-apoptotic protein的比例可以控制apoptosis是否要進行<sup>57, 60-61</sup>。

Bcl-2 family各成員功能列在下表<sup>39</sup>。

Table I. Partial list of Bcl-2 family members and their impact on apoptosis.

Bcl-2 Family Member	Inhibits apoptosis	Promotes apoptosis
Bcl-2	x	
Bcl-XL	x	
Bcl-Xs		x
Bax		x
Bad		x
Bag	x	
Bak		x
Bid	x	

#### 第四節 多重抗藥性基因 (Multiple Drug Resistance ; MDR)

在 1970 年，Bieder等學者發現在p388 白血病細胞株及中國地鼠肺細胞在對放線菌素D產生抗藥性的同時，對化學結構與作用機制完全不同的抗腫瘤藥物如絲裂霉素C (Mitomycin) 、柔紅霉素 (Daunorubicin) 等也產生抗藥性，這種現象稱為MDR(Multiple Drug Resistance) <sup>62</sup>。

典型的抗藥性產生就是過度表現P-glycoprotein這個蛋白<sup>63-66</sup>。P-glycoprotein為一種可以與膜結合且須能量的幫浦蛋白，可以將藥物彈出細胞而造成抗藥性<sup>67-68</sup>。這個大型的P-glycoprotein位於細胞膜上且有著可以藉由濃度梯度而抵抗一系列斥水性藥物的作用<sup>63-66,69</sup>。但是造成抗藥性的機制不單單只有這一種，近來發現在一些不具有p-gp MDR的細胞株，例如H69AR small-cell lung carcinoma (SCLC) cell 會過度表現MRP (Multidrug-resistance associated protein) <sup>70</sup>。而MRP為 180-195 kD的抗藥性蛋白。文獻指出，MRP屬於ABC (ATP-binding cassette) superfamily中的傳輸蛋白<sup>70-71</sup>，其作用有點類似p-gp一樣，是一種可以將藥物彈出的幫浦蛋白。但MRP出現的位置似乎與p-gp不是非常類似。有些學者認為MRP主要位在內質網上的膜，而不是細胞膜<sup>72-73</sup>。

## 第三章 研究設計與假說

### 第一節 研究設計

本實驗利用流式細胞計數儀來分析絞股藍皂苷對人類肺癌細胞的存活率、細胞週期分布與計畫性死亡細胞的比例情形。再利用倒立式位像差顯微鏡觀察加入不同濃度的絞股藍皂苷後觀察細胞型態改變的情形，而後使用 DNA 電泳膠片檢測絞股藍皂苷對人類肺癌細胞 DNA 斷裂的情形。更細微的部分利用分子生物技術：Reverse-Transcriptase Polymerase chain reacton (RT-PCR) 與西方點墨法 (Western blotting) 檢測細胞週期素與計畫性死亡相關的分子，找出絞股藍皂苷在人類肺癌細胞株中如何引起抑制效果與計畫性死亡的訊息傳遞，進而開發治癌新藥。

### 第二節 研究假說

許多文獻指出絞股藍皂苷有抗腫瘤作用<sup>4</sup>與抗氧化作用<sup>19</sup>，於是本實驗認為絞股藍皂苷應該可以引起人類肺癌細胞的細胞抑制與計畫性死亡的產生，經由分子技術的方法，我們得以檢測其細胞抑制與計畫性死亡的訊息傳遞，進而發現絞股藍皂苷在人類肺癌細胞的應用。

## 第四章 材料與方法

### 第一節 實驗材料

#### 1. 細胞株

人類肺癌細胞 (Human lung cancer carcinoma cell line : A549) 取自於台灣新竹食品工業發展研究所。

#### 2. 絞股藍皂苷 (Gypenosides) 的製備

取自於中國醫藥大學中國醫學研究所陳榮洲博士之製備<sup>9</sup>。絞股藍購自於中草藥店，經陳榮洲博士鑑定之後，取莖葉 600 公克，用 2 公升的水熬煮 1 個小時連續 2 次，將熬汁過濾後以 n-butanol 抽取，所得的抽取物以 rotary vacuum evaporator (Eyela NH-1, Rikakikai Co., LTD, Tokyo, Japan) 在 40 °C、減壓下濃縮，再以冷凍乾燥機器 (Dura-Top MP, microprocessor control bulk tray dryer, FTS system) 在 -50 °C 冷凍乾燥，至於冰箱冷藏備用。

#### 3. 藥品試劑

【1】F-12K Medium (購自 GIBCO)

【2】Fetal Bovine serum (購自 GIBCO)

【3】L-glutamine (購自 GIBCO)

【4】Penicillin-Streptomycin (購自 GIBCO)

- 【5】 Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ; 購自 Merck)
- 【6】 Sodium chloride ( $\text{NaCl}$  ; 購自 Merck)
- 【7】 Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 購自 Merck)
- 【8】 Potassium chloride ( $\text{KCl}$  ; 購自 Merck)
- 【9】 Dimethyl Sulfoxide (DMSO ; 購自 Sigma)
- 【10】 Trypan Blue (購自 Sigma)
- 【11】 Propidium iodide (PI ; 購自 Sigma)
- 【12】 Triton X-100 (購自 Sigma)
- 【13】 RNase A (Ribonuclease A ; 購自 Sigma)
- 【14】 Ethanol (購自 TEDIA)
- 【15】 Formaldehyde (購自 Merck)
- 【16】 RNA kit (購自 Qiagen)
- 【17】 Bovine serum albumin (BSA ; 購自 Merck)
- 【18】 Acrylamide/Bis 40% solution (ACRYL/BIS<sup>TM</sup>29:1; 購自 Amresco)
- 【19】 GelCode<sup>®</sup> commassie blue (購自 PIERCE)
- 【20】 Protein assay-Dye reagent concentrate (購自 Bio-Rad)
- 【21】 Glycerol (購自 Scharlau)
- 【22】 SDS (Sodium dodecyl sulfate ; 購自 Amresco)
- 【23】 Hydrochloric acid (購自 Merck)

- 【24】 APS (Ammonium persulfate ; 購自 Amresco)
- 【25】 TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine ; 購自 Amresco)
- 【26】 Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane ; 購自 Amresco)
- 【27】 Glycine (購自 Amresco)
- 【28】 Methanol (購自 TEDIA)
- 【29】 Protein maker (購自 Femantas)
- 【30】 Tween 20 (購自 Amresco)
- 【31】 脫脂奶粉 (購自雀巢奶粉)
- 【32】 ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit ; 購自 Amersham)
- 【33】 顯影劑 (購自 Kodak)
- 【34】 定影劑 (購自 Kodak)
- 【35】 BioMax Flim (購自 Kodak)
- 【36】 蛋白質萃取試劑 (PRO-PREP protein extraction solution ; 購自 iNtRON Biotechnology)
- 【37】 10X SDS-PAGE running buffer (TG-SDS buffer ; 購自 Amresco)
- 【38】 4X Protein loading dye (購自 Amresco)
- 【39】 核酸純化試劑組 (G-NOME DNA KIT ; 購自 Bio101 Inc)
- 【40】 Agarose I (購自 Amresco)

【41】 10X BlueJuice (Gel loading buffer ; 購自 Invitrogen)

【42】 5X TBE buffer (購自 Amresco)

【43】 一級抗體 :

(a) anti-actin (MAB1501; 購自 Chemicon) 比例 : 1 : 500

(b) anti-cdk1/cdc2 (#06-923 ; 購自 Upstate) 比例 : 1 : 500

(c) anti-cdk2 (#05-596 ; 購自 Upstate) 比例 : 1 : 150

(d) anti-cdk4 (購自 Upstate) 比例 : 1 : 500

(e) anti-Cyclin A (#05-374 ; 購自 Upstate) 比例 : 1 : 500

(f) anti-Cyclin B1 (#05-373 ; 購自 Upstate) 比例 : 1 : 500

(g) anti-Cyclin D1/2 (購自 Upstate) 比例 : 1 : 500

(h) anti-Cyclin E (購自 Upstate) 比例 : 1 : 500

(i) anti-p21<sup>WAF1</sup> (MS-891-P0 ; 購自 NeoMarkers) 比例 : 1 : 500

(j) anti-p27<sup>Kip1</sup> (MS-256-P0 ; 購自 NeoMarkers) 比例 : 1 : 500

(k) anti-p53<sup>P1</sup> (MS-256-P0 ; 購自 NeoMarkers) 比例 : 1 : 500

(l) anti-caspase 3 (RB-1197-P0 ; 購自 NeoMarkers) 比例 : 1 :  
500

(m) anti-caspase 8 (RB-1200-P0 ; 購自 NeoMarkers) 比例 : 1 :  
1000

(n) anti-caspase 9 (RB-1205-P0 ; 購自 NeoMarkers) 比例 : 1 :  
500

(o) anti-Bcl-2 (N-19-sc-492 ; 購自 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

比例：1：1000

(p) anti-Bax (N-19-sc-492; 購自 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

比例：1：1000

(q) anti-Fas (購自 upstate) 比例：1：250

(r) anti-NF- $\kappa$ B (p50) (購自 Ztmed. Laboratories. Inc.) 比例：

1：250

(s) anti-NF- $\kappa$ B (p65) (購自 Ztmed. Laboratories. Inc.) 比例：

1：500

#### 【44】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)

#### 4. 設備與器材

【1】細胞培養箱 (購自 Nuaire)

【2】細胞培養盤 (購自 FALCON)

【3】無菌操作台 (購自 Lian Shen)

【4】倒立式位像差顯微鏡 (phase-contrast microscope; 購自

Olympus)

- 【5】細胞計數器 (Haemocytometer; 購自 Boeco)
- 【6】離心機 (購自 Beckman)
- 【7】微量天平 (GR-200; 購自 A&D)
- 【8】去離子水製造機 (購自 Millipore)
- 【9】流式細胞儀 (Flow cytometry; 購自 Becton Dickinson)
- 【10】DNA 電泳槽 (購自 Mupid-2)
- 【11】酸鹼值測定計 (C831; 購自 Consort)
- 【12】PVDF membrane (購自 Millipore)
- 【13】SDS-PAGE 電泳槽套組 (購自 Bio-Rad)
- 【14】Mini-3D Shaker (購自 Boeco)
- 【15】Transfer Cell Blot 套組 (購自 Bio-Rad)
- 【16】Polymerase chain reaction 加熱器

## 第二節 實驗方法

### 1. 活化冷凍細胞

首先將新鮮的細胞培養基放入 37 °C 水浴鍋中，等待培養基回溫至 37 °C，接著取回溫好的培養基 10 mL 至滅菌的 15 mL 離心管中，再從液態氮中取出冷凍管，迅速的將冷凍管移至 37 °C 水浴鍋中，使冷凍管裡的細胞液急速解凍，盡量使其在 1-2 分鐘內融化，融化之後

將冷凍管裡的細胞液取至以含有回溫好的新鮮培養基中。使其混和均勻後，以 1500 rpm 的速度離心 5 分鐘，後去除上清液，再加入新鮮的培養基 10 mL，接著移入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養，隔日及馬上更換新鮮的培養基，等其長至 log phase 再拿來當做實驗的樣品。

## 2. 人類肺癌細胞 (A549 cell) 的培養

首先將新鮮的培養基回溫至 37 °C，使用 70% 的酒精擦拭檯面。所有放入無菌操作檯的物品都要以 70% 的酒精擦拭，並帶無菌手套進行以下的實驗。

人類肺癌細胞 (A549 cells) 培養在 F-12K 培養基中，其中含有 10% fetal bovine serum、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin 與 2 mM L-glutamine，至於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養。定期更換新鮮的培養基，當其長到七八分滿時即繼代下來做實驗。

## 3. 利用流式細胞計數儀檢測絞股藍皂苷對人類肺癌細胞增生的影響

流式細胞計數儀評估細胞存活率原理如下：當細胞死亡的時候，其細胞膜會呈現不完整狀態<sup>74</sup>，因此利用加入 Propidium Iodine (PI) 染劑，此染劑是可以染細胞核內的核酸，於是細胞膜不完整的細胞就會被 PI 染上，而細胞膜完整的細胞則不會被 PI 染上，再藉由流式細胞計數儀可以在 488 nm 的位置激發出螢光，而死亡的細胞會有較高的

紅色螢光，存活的細胞則有較弱的紅色螢光<sup>75</sup>。再用Cell Quest軟體分析細胞增殖率。

將細胞繼代下來之後，等待到隔天將其更換新鮮的培養基，利用12 well的培養盤以 $2 \times 10^5$  cells/2 mL的密度培養實驗需要的時數，以DMSO為溶媒，最後加入絞股藍皂苷的最終濃度是1%。等待培養時間到之後，利用trypsin使細胞游離培養瓶的表面，以PBS清洗兩次，將細胞徹底打散，加入350  $\mu$ L的400  $\mu$ g/mL PI solution，接著以固定計數秒數（20秒）及流速（35  $\mu$ L/min）的速度進行流式細胞計數儀檢測。每個實驗組皆以三重複增加實驗的準確度。

#### 4. 利用流式細胞計數儀檢測絞股藍皂苷對人類肺癌細胞週期的影響

細胞使用12 well的培養盤，給予不同濃度的絞股藍皂苷（c、100、150、200、300、400  $\mu$ g/mL），以 $2 \times 10^5$  cells/2 mL的密度培養實驗需要的時數，以DMSO為溶媒，最後加入絞股藍皂苷的最終濃度是1%。等培養時間到之後，利用trypsin使細胞游離培養瓶的表面，以PBS清洗兩次之後，以4  $^{\circ}$ C、70%的酒精固定細胞形態，-20  $^{\circ}$ C冰箱隔夜存放。隔天，將細胞懸浮液以1500 rpm、5分鐘離心去除酒精上清液，再以PBS清洗兩次之後，將細胞徹底打散，加入350  $\mu$ L的PI stain染劑，避光30分鐘之後轉移到FACS專用小管，進行流式細

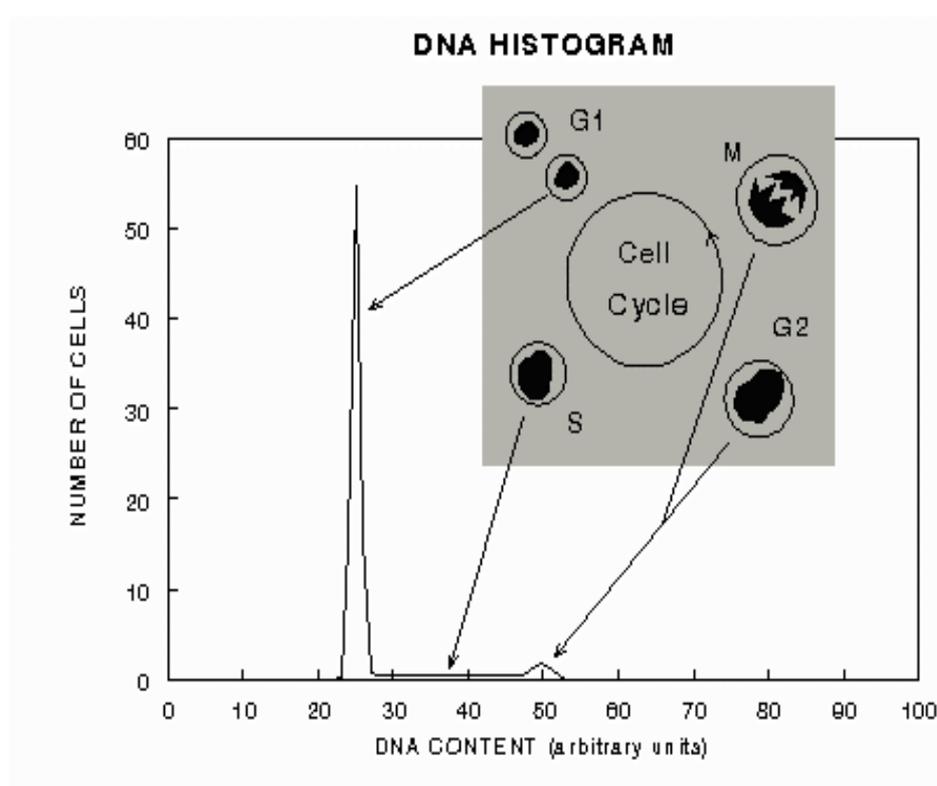
胞計數儀檢測，以一秒細胞數不超過 300 顆細胞，每個數據收集 10000 顆細胞，數據以 Modfit LT<sup>®</sup> 軟體進行處理分析<sup>76</sup>。每個實驗組皆以三重複增加實驗的準確度。

PI stain 染劑的配製：

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

PS：RNase A 須以 70 °C、加熱 20 min 處理過後才可使用。

由流式細胞計數儀分析出來標準 cell cycle 的圖<sup>74</sup>：



圖七 進行流式細胞計數儀分析出來的細胞週期標準圖<sup>74</sup>。

## 5. 利用倒立式相位差顯微鏡檢測絞股藍皂苷對人類肺癌細胞型態的影響

細胞使用 6 well 的培養盤，給予不同濃度的絞股藍皂苷 (c、100、150、200、300、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，以  $2 \times 10^5$  cells/3 mL 的密度培養 24 小時，在倒立式相位差顯微鏡下以 400 X 來觀察細胞型態。每個實驗組皆以三重複增加實驗的準確度並取解析度最好的呈現。

## 6. 檢測絞股藍皂苷是否會對人類肺癌細胞造成計畫性死亡

### A. 利用流式細胞計數儀檢測絞股藍皂苷對人類肺癌細胞 *sub G1 phase* 的分布情形

細胞使用 12 well 的培養盤，給予或不給予 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  絞股藍皂苷，以  $2 \times 10^5$  cells/2 mL 的密度培養實驗所需要的時數，以 DMSO 為溶媒，最後加入藥物的最終濃度是 1%。等待培養時間到之後，利用 trypsin 使細胞游離培養瓶的表面，以 PBS 清洗兩次之後，利用 4  $^{\circ}\text{C}$ 、70% 的酒精固定細胞形態，-20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱隔夜存放。隔天，將細胞懸浮液以 1500 rpm、5 分鐘離心去除酒精上清液，再以 PBS 清洗兩次之後，將細胞徹底打散，加入 350  $\mu\text{L}$  的 PI stain 染劑，避光 30 min 之後轉移到 FACS 專用小管，上流式細胞儀以一秒細胞數不超過 300 顆細胞，每個數據收集 10000 顆細胞。數據以 Modfit LT<sup>®</sup> 軟體進行處理分析，每個實驗組皆以三重複增加實驗的準確度。

## *B. 利用 DNA 電泳膠片檢測絞股藍皂苷乾對人類肺癌細胞 DNA 斷裂的情形*

細胞使用 6 well 的培養盤，給予不同濃度的絞股藍皂苷 (c、100、150、200、300、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，以  $1 \times 10^7$  cells 的細胞數培養實驗所需要的時數後，利用 DNA 抽取 KIT (G-NOME BIO101 Inc.) 將 DNA 抽取出來。

DNA 抽取步驟：

將細胞收取下來之後，放入 15 mL 離心管中，加入 PBS 使其細胞懸浮液為 200  $\mu\text{L}$ ，再加入 20  $\mu\text{L}$  的 QIGEN Protease 使其混和均勻，接著加入 200  $\mu\text{L}$  的 Buffer AL，利用 pipetman 來回混和均勻，再使用 vortex 機器使其 vortex 徹底之後，加熱 56  $^{\circ}\text{C}$ 、10 分鐘（此溫度與時間必須非常準確，且離心管須蓋蓋子，才不會使水蒸氣跑進去或蒸發），從水浴鍋取出的離心管以 1500 rpm、5 秒的速率將細胞液 spin down，加入 200  $\mu\text{L}$  無水的 ethanol 並使用 pipetman 來回混和均勻徹底，此時若細胞很多則會呈現黏稠的現象，接下來持續使用 1500 rpm、5 秒的速率將細胞液 spin down，避免細胞在管壁上殘留。將混和細胞液轉移至 DNA 專用的 column (QIAamp spin column) 中，以 13000 rpm、30 秒的速率離心，將 column 中的液體全都離下來，此時更換新的 2 mL microtube，再加入 500  $\mu\text{L}$  的 Buffer AW1，以 1500 rpm、

30 秒的速率將細胞離心下來，再更換新的 2 mL microtube，加入 500  $\mu$ L 的 Buffer AW2，以 13000 rpm，3 分鐘、1 分鐘、1 分鐘的速率離到乾為止。最後加入 50  $\mu$ L 的 Buffer AE，放在室溫下等待 10 分鐘，使膜完全被浸濕後以 13000 rpm、1 分鐘的速率將含有 DNA 的 Buffer AE 離心下來，儲存於-20  $^{\circ}$ C 冰箱中。

將處理好的 DNA 加入 6X DNA loading dye 混合，loading 入含有 0.5X 的 TBE buffer、2% 的 agarose gel 中，以 50V 的電壓跑膠並以 Eithidium Bromide 染色，最後在 UV light 下照相。

## 7. 利用 RT-PCR 技術檢測絞股藍苷乾對人類肺癌細胞中 mRNA

### 改變量的影響

細胞使用 6 well 的培養盤，給予不同濃度的絞股藍皂苷 (c、100、150、200、300、400  $\mu$ g/mL)，以  $1 \times 10^7$  cells 的細胞數培養實驗所需要的時數後，利用 RNA 抽取 KIT (G-NOME BIO101 Inc.) 將 RNA 抽取出來。

#### A. RNA 抽取步驟：(此實驗的器材須完全無菌)

將細胞收取下來之後，放入 15 mL 離心管中，加入 600  $\mu$ L 的 RLT Buffer ( $\beta$ -Mercaptoethanol : RLT = 1 : 100 ;  $\beta$ -Me 有穩定 RNA 的作用)，使用 vortex 機器使其細胞液變澄清，再加入 600  $\mu$ L、70% 的 ethanol 並使用 pipetman 來回混和均勻徹底，此時若細胞很多則會

呈現黏稠的現象。接下來將混和細胞液轉移至 RNA 專用的 column 中，以 13000 rpm、30 秒的速率離心，將 column 中的液體全都離下來，此時更換新的 2 mL microtube，再加入 700  $\mu$ L 的 Buffer RW1，以 1500 rpm、30 秒的速率將細胞離心下來，再更換新的 2 mL microtube，加入 500  $\mu$ L 的 RPE Buffer，以 13000 rpm、30 秒的速率離心並重複兩次。最後以 1500 rpm、3 分鐘、1 分鐘、1 分鐘的速率離到乾為止。最後加入 35  $\mu$ L 的 RNAase free buffer，放在室溫下等待 10 分鐘，使膜完全被浸濕後以 13000 rpm、1 分鐘的速率將含有 RNA 的 RNAase free buffer 離心下來，儲存於-20  $^{\circ}$ C 冰箱中。

### ***B. RNA 的定量：***

取 198  $\mu$ L 的滅菌二次水加上 2  $\mu$ L 的 RNA 溶液在 260 nm 的波長下測其吸光值，之後乘上 40 (1 OD= 40  $\mu$ g/ $\mu$ L)  $\times$ 100 (稀釋 100 倍) = 4000。其值就是 RNA 的濃度。

本實驗室做 PCR 最低的 RNA 量是 1500 ng。

### ***C. RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reactoin )***

將以定量好的 RNA 加入適量的滅菌二次水與 1  $\mu$ L 的 oligo-dT 跟 1  $\mu$ L 的 10 mM dNTP 以 65  $^{\circ}$ C、5 分鐘的條件加熱，再加入 4  $\mu$ L 的 5X first-strand buffer、2  $\mu$ L 的 0.1 M 的 DTT 與 1  $\mu$ L 的滅菌二次水混

和均勻後，加熱 42 °C、2 分鐘。最後再加入 1 μL 的反轉錄酶加熱 42 °C、50 分鐘；70 °C、15 分鐘。成品即為 cDNA。

#### ***D. PCR (Polymerase Chain Reactoin)***

依下列表格來製作：

成分	體積 (μL)
滅菌去離子水	38.1
10X PCR Buffer	5
MgCl <sub>2</sub> (10 mM)	1.5
dNTP Mix (10 mM)	1
Primer 1 (10 μM)	1
Primer 2 (10 μM)	1
cDNA	2
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.4

將其成品混和均勻後，以加熱

↓ 95 °C、5 分鐘

↓ 95 °C、1 分鐘

↓ 55 °C、1 分鐘

↓ 72 °C、1 分鐘

repeat 35 cycles

↓ 72 °C、10 分鐘

↓ 4 °C (保存於 4 °C 中)

Table 2. The PCR primers were used in this study.

Primers	Sequence 5'-3'	Size (bp)	References
Act-b1	5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'	21	77
Act-b2	5'-CAAACATGATCTGGGTCCTTCTC-3'	25	
Cyclin B1	5'-AAGGCGAAGATCAACATGGGC-3'	20	78
	5'-AGTCACCAATTTCTGGAGGG-3'	20	
Cyclin D1	5'-GAGACCATCCCCCTGACGGC-3'	18	
	5'-TCTTCTCTCTCTCGGCGGGC-3'	19	
Cyclin E	5'-GTTGCACCAGTTTGCGTATGTG-3'	22	
	5'-GGCCCTCCACAGCTTCAAGC-3'	20	
CDK2	5'-GCTTTCTGCCATTCTCATCG-3'	20	
	5'-GTCCCAGAGTCCGAAAGAT-3'	20	
p16	5'-AGCATGGAGCCTTCGGCTGACT-3'	22	79
	5'-CTGTAGGACCTTCGGTGACTGAT-3'	23	
p21	5'-AGTGGACAGCGAGCAGCTGA-3'	20	79
	5'-TAGAAATCTGTCATGCTGGTCTG-3'	23	
p27	5'-AAACGTGCGAGTGTCTAACGGGA-3'	23	79
	5'-CGCTTCCTTATTCTGCGCATTG-3'	23	
p53	5'-CAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTAC-3'	26	80
	5'-CTATGTCGAAAAGTGTCTCTGTCATC-3'	26	
E2F	5'-ACCAGGGTTTCCAGAGATGC-3'	189	
	5'-CACCACACAGACTCCTTCCC-3'	189	
Fas	5'-CAGAACTTGGAAGGCCTGCATC-3'	680	81
	5'-TCTGTTCTGCTGTGTCTTGGAC-3'	680	
Bcl-2	5'-CGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG-3'	389	81
	5'-ACTTGTGGCTCAGATAGGCACCCAG-3'	389	
Bax	5'-CATGAAGACAGGGGCCCTT-3'	517	81
	5'-CATCTTCTTCCAGATGGT-3'	560	
Bid	5'-GGTCTTACAGCAGGCAGTATCC-3'	162	
	5'-TCAGAATCTCTGTGCCATGTG-3'	162	
Bad	5'-AACATTTGGTAGTGAGCACGG-3'	241	
	5'-TTGTCTCCTTTGGAGGGAGG-3'	241	
NF- $\kappa$ B	5'-GATGAATATGTGTGTATCCG-3'	658	82
	5'-TTTGTTGTGCTTGAGAACC-3'	658	

Table 3. The PCR primers were used in this study.

Primers	Sequence 5'-3'	Size (bp)	References
MRP-1	5'-ATCATCCTCCACCCTGGGTT-3'	270	83
	5'-CACTCATGGTTCAGCTTGTC-3'	270	
MRP-2	5'-ATCCTCAGCTGCTGAAGTTG-3'	439	84
	5'-CTGATCTTGGATGCCAGAAC-3'	439	
MRP-3	5'-TCAAAGAGGAGATCGCAGAG-3'	439	83
	5'-AGCATGAGGATGGTGGGGGCCAG-3'	439	

## 8. 利用西方點墨法 (Western blotting) 技術檢測絞股藍皂苷對人類肺癌細胞中蛋白質改變量的影響

### A. 蛋白質的抽取

細胞使用 6 well 的培養盤，給予不同濃度的絞股藍皂苷 (c、100、150、200、300、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，以  $1 \times 10^7$  cells 的細胞數培養實驗所需要的時數後，將細胞收取下來並以 PBS 清洗 2 次，將上清液徹底吸除，打散細胞，一邊 vortex 一邊加入 200  $\mu\text{L}$  的 RIPA lysis buffer [ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediamine-tetra-acetic acid (EDTA), 1 mM ethylene glycol - bis (aminoethylether) - tetra-acetic acid (EGTA), 0.5 mM dithiothreitol, 1% NP-40, 0.3% deoxycholate, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  soybean trypsin inhibitor, 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) ]。之後用 pipetman 將細胞徹底混和均勻，轉移至 1.5 mL 的微離心小管，以 13000 rpm、20 分鐘的

速率離心，取其上清液，則蛋白質就在上清液裡。

## B. 蛋白質的定量

### a. 檢量線的製作

以胎牛血清白蛋白(Bovine serum albumin; BSA)為蛋白質標準品，依照下列表格製作蛋白質標準品樣品：

組成 \ 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	1	5	10	25	50
0.1 mg/mL BSA ( $\mu\text{L}$ )	0	10	50	100	250	500
DDW ( $\mu\text{L}$ )	800	790	750	700	550	300
Bradford 染劑	200 $\mu\text{L}$					
總體積 1000 $\mu\text{L}$						

將配製好的蛋白質標準品樣品以三重複的方式依序放入 96 well 培養盤中，利用酵素免疫分析儀(ELISA reader)在 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，其蛋白質標準品的濃度為 1.5625  $\mu\text{g}$ -50  $\mu\text{g}$ ，並求出趨勢線方程式及  $R^2$  值。

### b. 樣品蛋白質定量：

取 10  $\mu\text{L}$  的蛋白質樣品與 790  $\mu\text{L}$  的二次水混合，再加入 200  $\mu\text{L}$  的 Bradford 染劑，混勻後以三重複的方式依序放入 96 well 培養盤中，利用酵素免疫分析儀在 590 nm 測定其吸光值平均值。將樣品吸光值平均值代入趨勢線方程式，則可算出稀釋後樣品的蛋白質濃度，最後

再乘上稀釋倍數，則可求得實際蛋白質之樣品濃度。

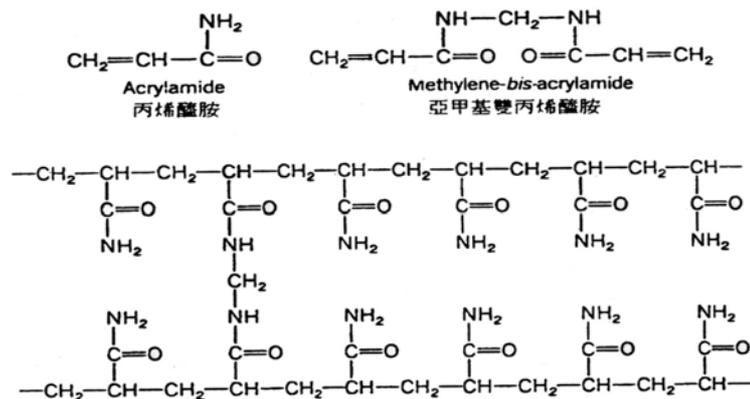
### c. *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)* 變性電

泳：

#### (1) 原理：

電泳法是利用外加電場，對溶液中的帶電分子造成影響而使這些分子移動。在聚丙烯醯胺凝膠電泳 (PAGE ; Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 中，被分析的蛋白質在水溶液電場移動且在凝膠團塊中被固定。而凝膠有兩大功能包括穩定電泳系統不受對流作用之影響與形成小孔。

電泳時電流會產生熱量，熱量消散的速度以邊界最快而在中央散失最慢，於是形成了溫度梯度 (gradient) 在溶液中引起對流作用，但是凝膠中則不會有此現象。形成的小孔可以使大分子的泳動受阻礙<sup>85</sup>，而小分子受到的影響則比較小。丙烯醯胺 (acrylamide) 與亞甲基雙丙烯醯胺 (methylene- bis-acrylamide) 是聚丙烯醯胺凝膠的成分。丙烯醯胺與少量的亞甲基雙丙烯醯胺於緩衝溶液中，在自由基催化劑的存在下會引發聚合反應<sup>85</sup>。形成長鏈的聚丙烯醯胺，有些丙烯醯胺的位置被亞甲基雙丙烯醯胺取代，而形成交聯。而沒有交聯的聚丙烯醯胺鏈具有高度的黏滯性。



圖八 聚丙烯醯胺/亞甲基雙丙烯醯胺的結構式<sup>85</sup>。

(2) 變性電泳 (SDS-PAGE) 的配製：

組成	下層膠 (10% Separation gel)	上層膠 (5% Stacking gel)
	四片量	四片量
DDW	9.6mL	6.29 mL
40% Acrylamide/Bis (29:1)	5.0 mL	1.02 mL
1.5 M Tris (pH8.8)	5.0 mL	—
1 M Tris (pH6.8)	—	1 mL
10% SDS	0.2 mL	80 $\mu\text{L}$
10% Ammonium persulfate (APS)	0.2 mL	80 $\mu\text{L}$
TEMED	20 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$

下層膠注入膠台後，緩緩用二次水去除氣泡並壓平下層膠的上緣，等約 45 分鐘待膠體凝固。隨後，將上層膠注入後小心地插入樣品槽梳子(comb)到未凝固的膠體中，避免氣泡出現於樣品槽(wells)下緣。等待約 45 分鐘上層膠凝固後拔出樣品槽梳子，並以二次水小心沖洗樣品槽內避免雜質殘留。將鑄好的膠體放入電泳槽中，加入 Running buffer。用塑膠滴管以抽吸方式去除膠體下緣殘留的氣泡。做

好的膠體先以 110 V、400 mA 為條件預跑 30 分鐘。將樣品與樣品緩衝液(Sample buffer)混合後總體積為 16  $\mu$ L (蛋白質濃度約為 35  $\mu$ g/ $\mu$ L)，經 95  $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後即可使用。取 5  $\mu$ L 分子量標準品(maker)和配製好的樣品由左至右分別 loading 到樣品槽中。跑膠先以 50 V 跑 30 分鐘，再以 80 V 跑 60 分鐘。

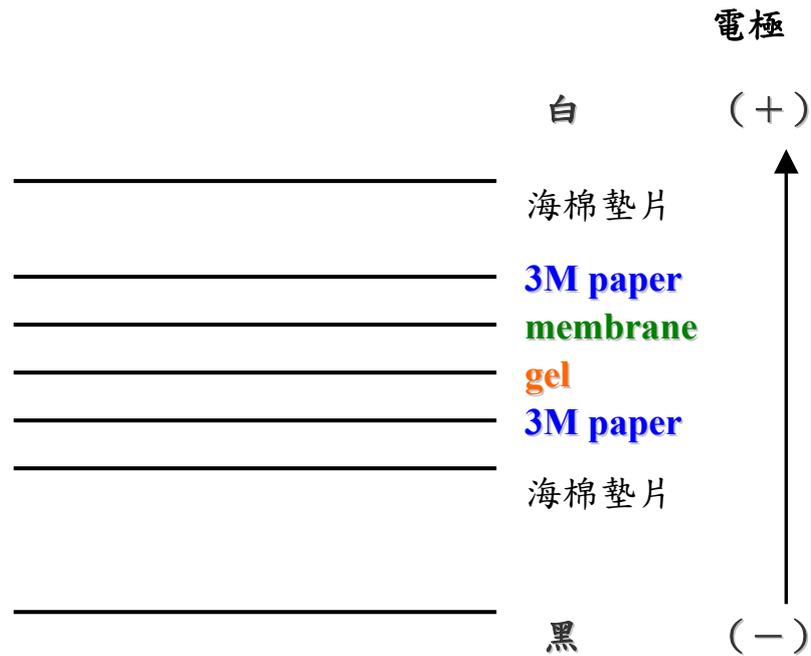
**d. 西方點墨法 (Western Blotting) :**

樣品的配置與上下層膠的配製詳見於上兩頁。

轉漬 (Transfer) :

先配好 transfer buffer。PVDF 轉漬膜先用 100% 甲醇浸潤 15 秒、再放於轉漬緩衝液中浸泡 1 分鐘以上，而海綿墊片、3M 濾紙與 PVDF 轉漬膜浸泡於 transfer buffer 至少 30 分鐘。將轉漬夾打開後黑色面朝自己方向放，取出已浸泡轉漬緩衝液的海綿墊片放於其上面，並依序在海綿片上放上 3M 濾紙、SDS-PAGE gel 以及 PVDF 轉漬膜(夾層中間夾切勿有氣泡)、3M 濾紙，最後再放上一片海棉墊片後夾上轉漬夾，形成三明治夾層的構造。

如下圖：



接著將轉漬夾放入電泳槽中後放入冰盒中並一併放入旋轉磁石並加滿轉漬緩衝液。在電泳槽外圍放入足夠的冰塊，使整個系統保持低溫狀態。以固定安培（400 mA）、最高伏特、1.5 小時為條件，進行蛋白質轉漬步驟。轉漬完成後取出轉漬膜裁去多餘部分，以 0.05% Tween 20 in 1X PBS 清洗 10 分鐘後，將轉漬膜以 5% 胎牛血清(溶於 0.05% Tween 20 in 1X PBS 中)進行 blocking 的動作，以室溫 shaking 30 分鐘。取出轉漬膜後於小盒中以 0.05% Tween 20 in 1X PBS 清洗 5 分鐘共 3 次。放入 5 mL 的一級抗體(溶於 5% 胎牛血清 in 0.05% Tween 20 in 1X PBS 中) (比例視參考廠商建議)，以 4 °C overnight 進行。隔天取出轉漬膜後置於小盒中以 0.05% Tween 20 in 1X PBS 清洗 5 分鐘共 3 次。加入 10 mL 的二級抗體溶於 5% 胎牛血清 in 0.05% Tween 20 in 1X PBS 中，於室溫下搖盪進行 1 小時，最後取出轉漬膜

後以 0.05% Tween 20 in 1X PBS 於小盒中清洗 5 分鐘共 3 次。

轉漬緩衝液配製如下：

組成	重量 (g)
Tris	6.6
Glycine	28.8
100% Methanol	400 mL
加 DDW 到總體積 2000 mL	

壓片步驟：(暗房中進行)

將轉漬膜浸泡於 ECL 試劑之混合液(每瓶各取 3 mL 等比例混合)中 30 秒反應。壓片卡匣(Cassette)內先以投影片剪成兩半，再用膠帶黏合成卡片形式，轉漬膜正面朝上、marker 放左邊置於壓片卡匣(Cassette)內。以 Hyperfilm 軟片進行壓片，感光時間依轉漬膜上螢光亮度決定時間長短，約 5 秒至 30 秒不等。感光完成後放入顯影劑進行顯影步驟(時間依實際觀察決定)，再以清水沖洗 30 秒後放入定影劑中，過 30 秒後再以清水沖洗 30 秒，底片吊起來晾乾。

### 第三節 分析方法

#### 1. 數據分析

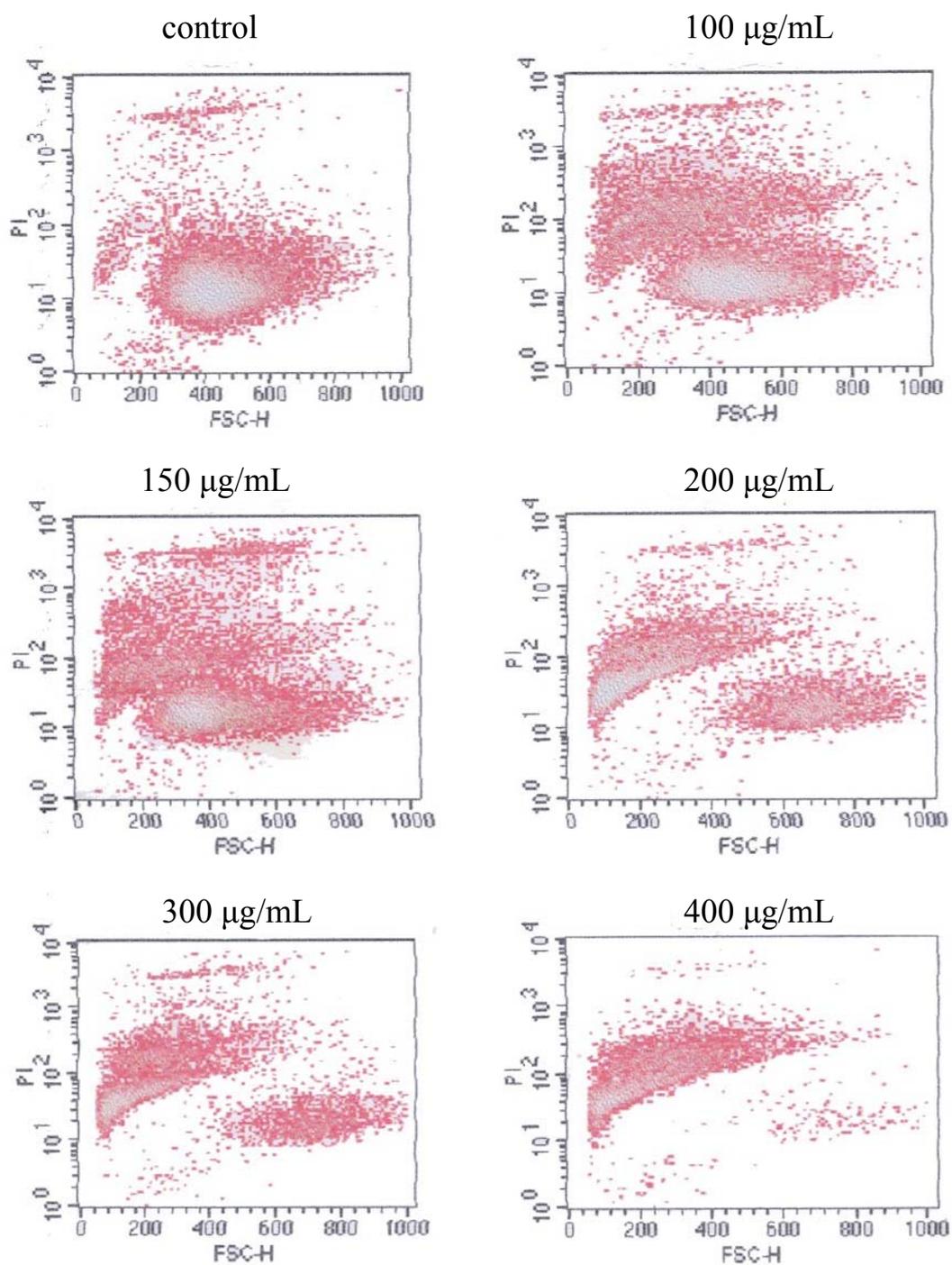
數據結果以平均值±標準差(mean±SD)表示，實驗組與對照組間之數據以 student-t test 進行統計比較。當  $p < 0.05$  表示在統計學上具有

差異，以（\*）代表，當  $p < 0.01$  以（\*\*）代表，當  $p < 0.001$  以（\*\*\*）代表。

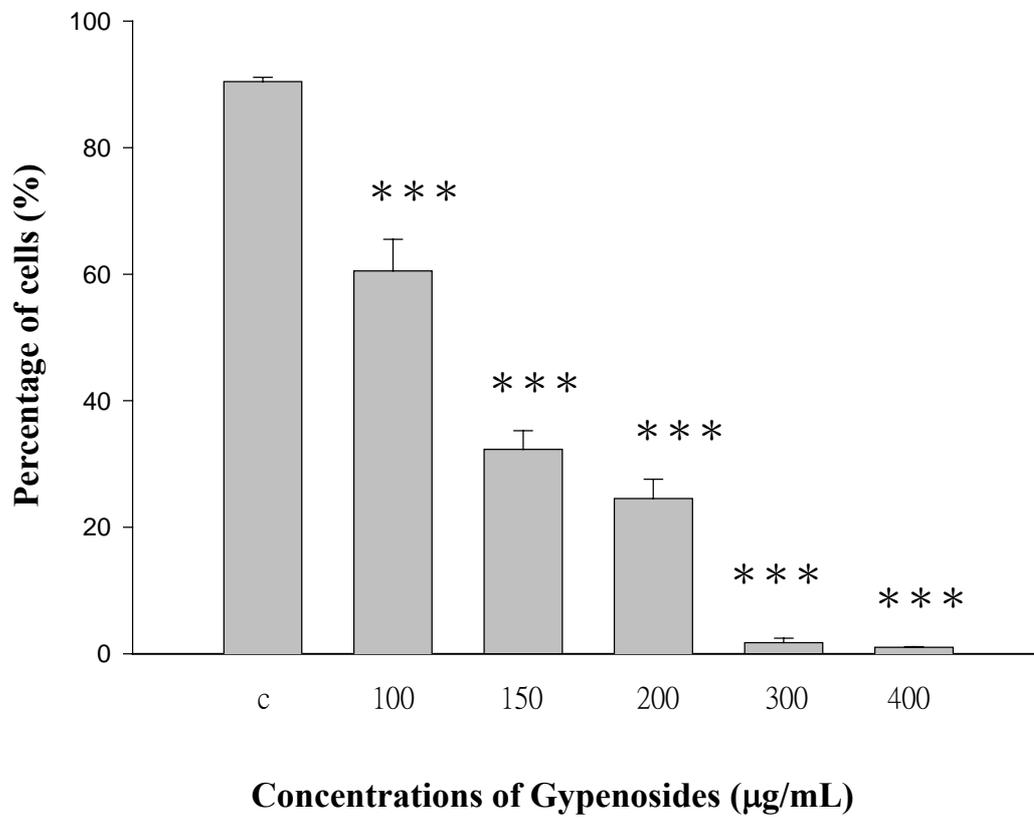
## 第五章 研究結果

### 第一節 絞股藍皂苷對人類肺癌細胞株細胞增生的影響

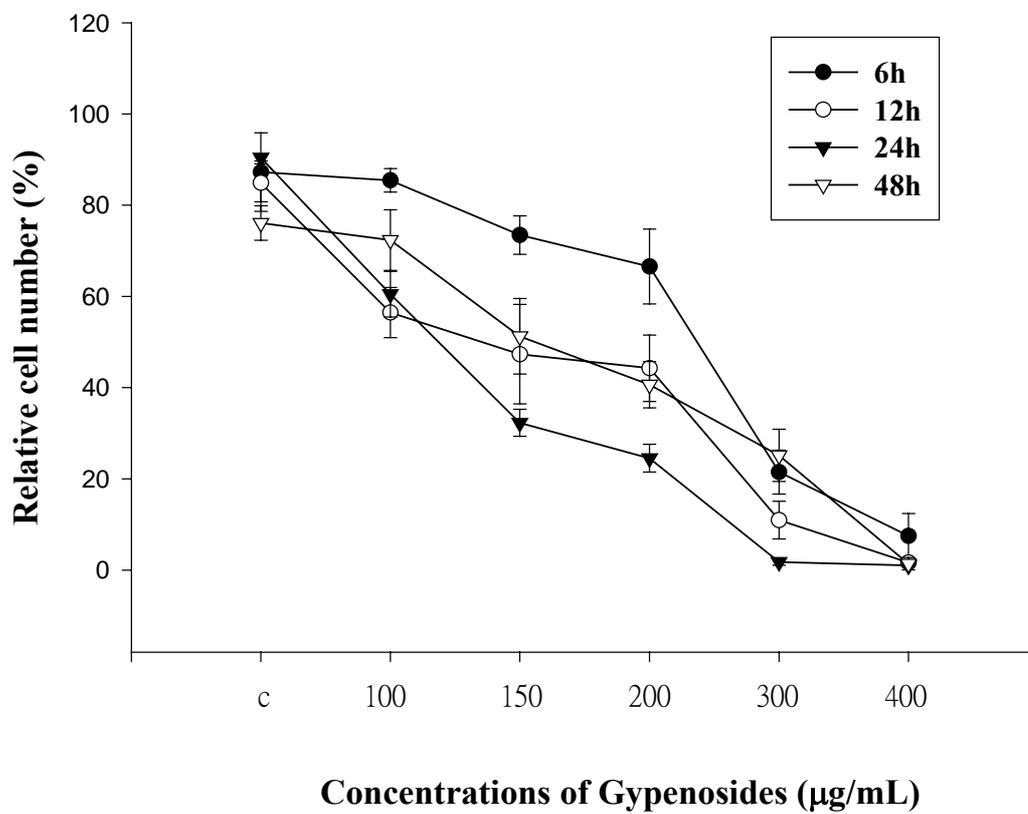
利用流式細胞計數儀(flow cytometry)評估細胞存活率，結果發現加入不同濃度的絞股藍皂苷之後，細胞的存活率隨著藥物濃度的上升而下降，在圖九中可以發現細胞原先從非常密集且集中的狀態，經由藥物濃度的上升，使得細胞群越來越分散且細胞碎裂情形越來越嚴重的現象。圖十中可觀察到在 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度的時候就可以看出存活下降的情形，且到達有 50% 的細胞抑制，而在 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的時候，細胞存活率近幾乎等於 0。而在圖十一中，可以發現絞股藍皂苷對人類肺癌細胞的抑制是有時間上依據的(dose dependent)。



圖九 利用流式細胞計數儀使用不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時後在人類肺癌細胞株的細胞存活情形。



圖十 利用流式細胞計數儀評估細胞的增生率。使用不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時後，在人類肺癌細胞所檢測到的存活率情形。數據結果以 mean±SD 值表示，n=3。當  $p < 0.001$  以 (\*\*\*) 代表。

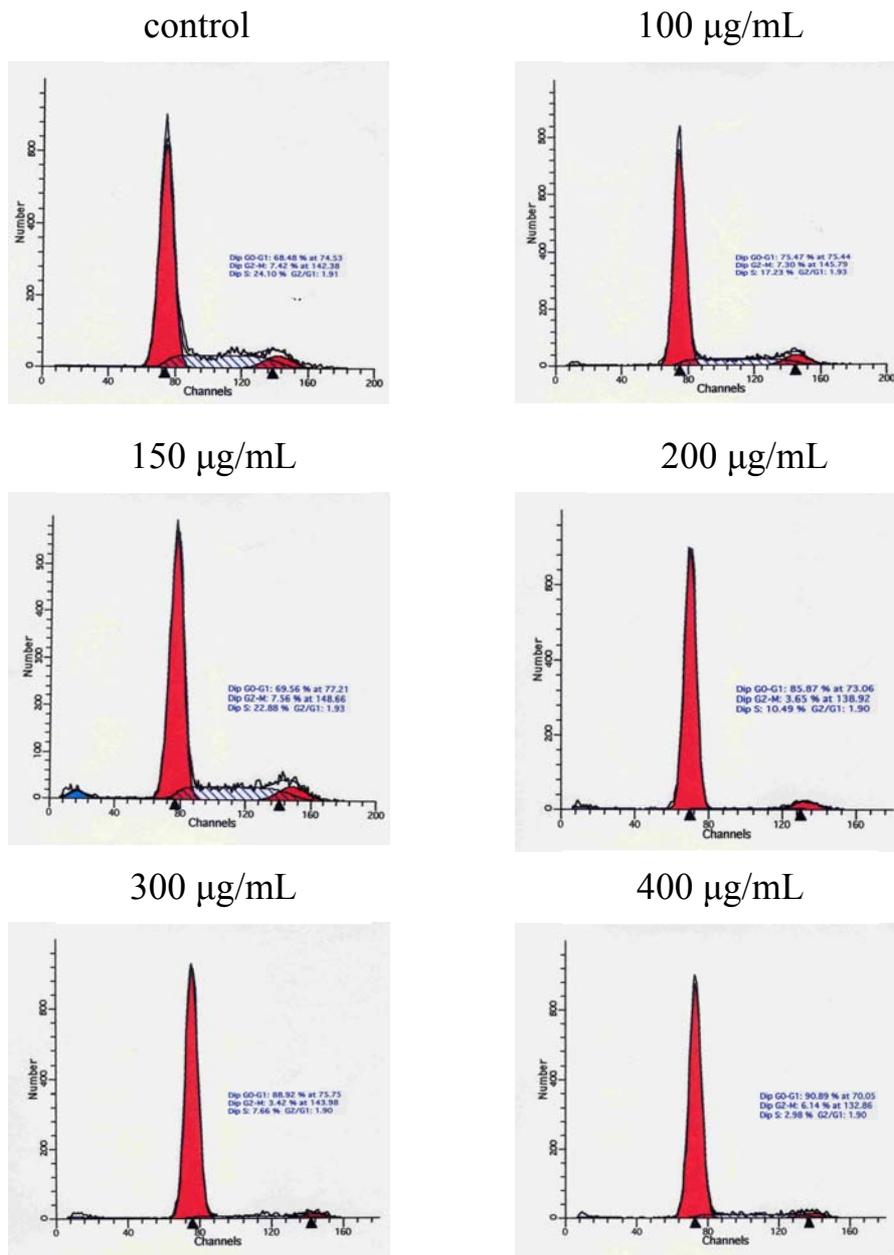


圖十一 利用流式細胞計數儀評估細胞的增生率。使用不同濃度的絞股藍皂苷處理 6、12、24、48 小時後，在人類肺癌細胞所檢測到的存活率情形。數據結果以 mean±SD 值表示，n=3。

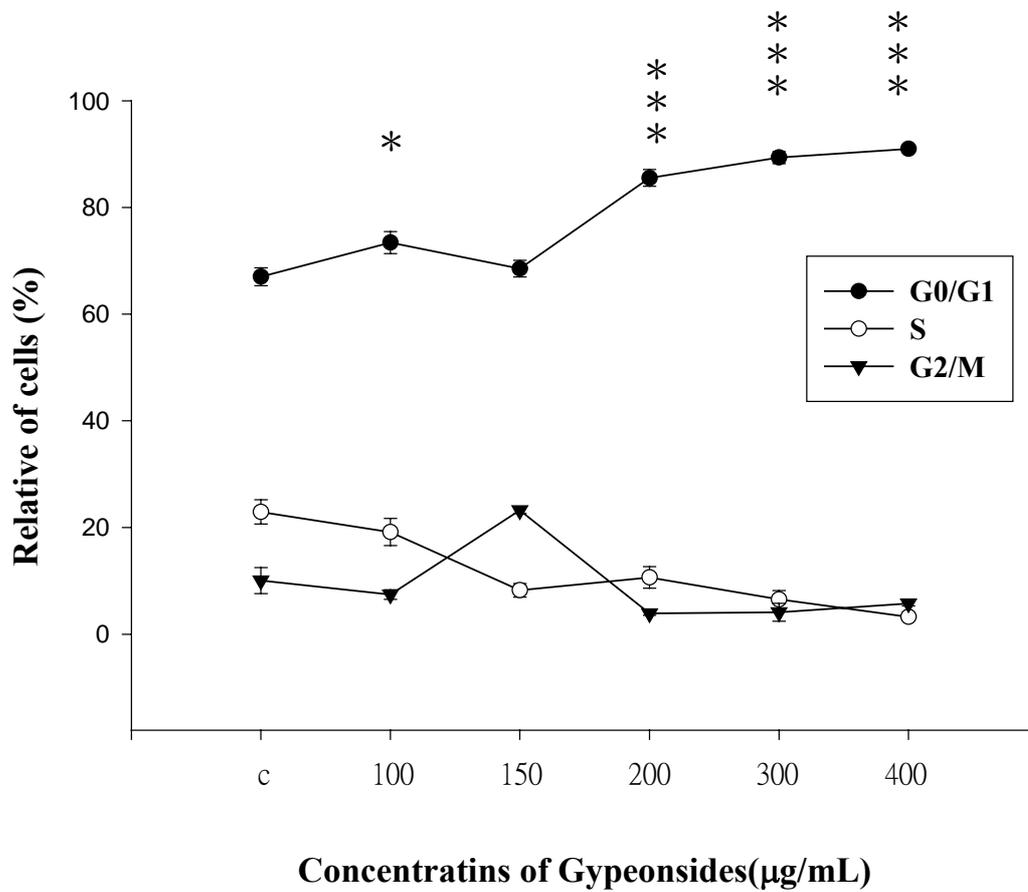
## 第二節 絞股藍皂苷對人類肺癌細胞在細胞週期的影響

利用流式細胞計數儀評估不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時之後，加入 PI，觀察其細胞週期的表現。發現隨著藥物濃度的增加，G0/G1 phase 的細胞數有越來越多的趨勢，到 400  $\mu\text{g/mL}$  的時候，G0/G1 phase 的細胞數上升了 23%。由此可知，絞股藍皂苷可以使人類肺癌細胞引起細胞週期在 G0/G1 phase 的停留，造成 G0/G1 arrest。

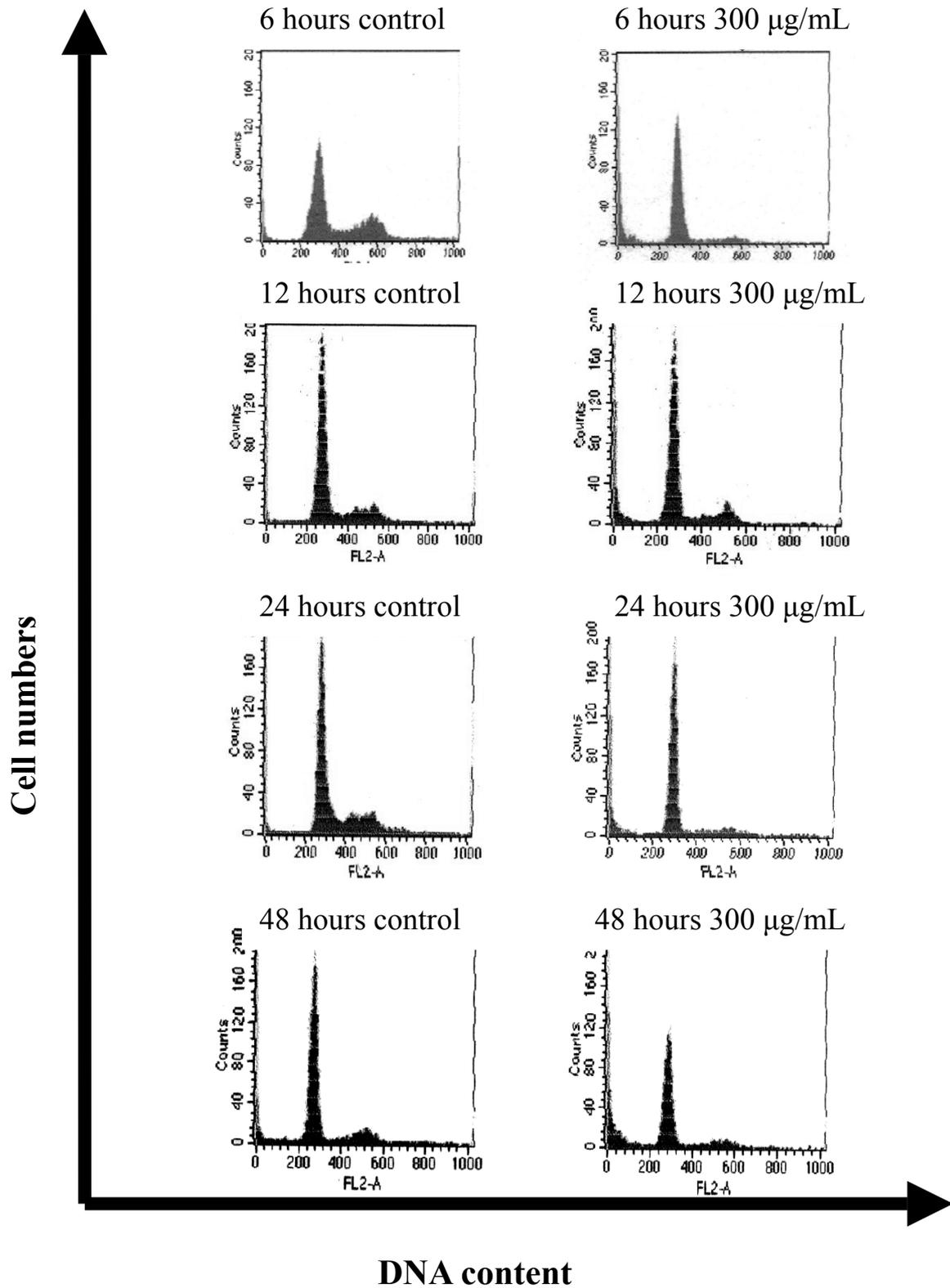
(如圖十二、十三、十四、十五)



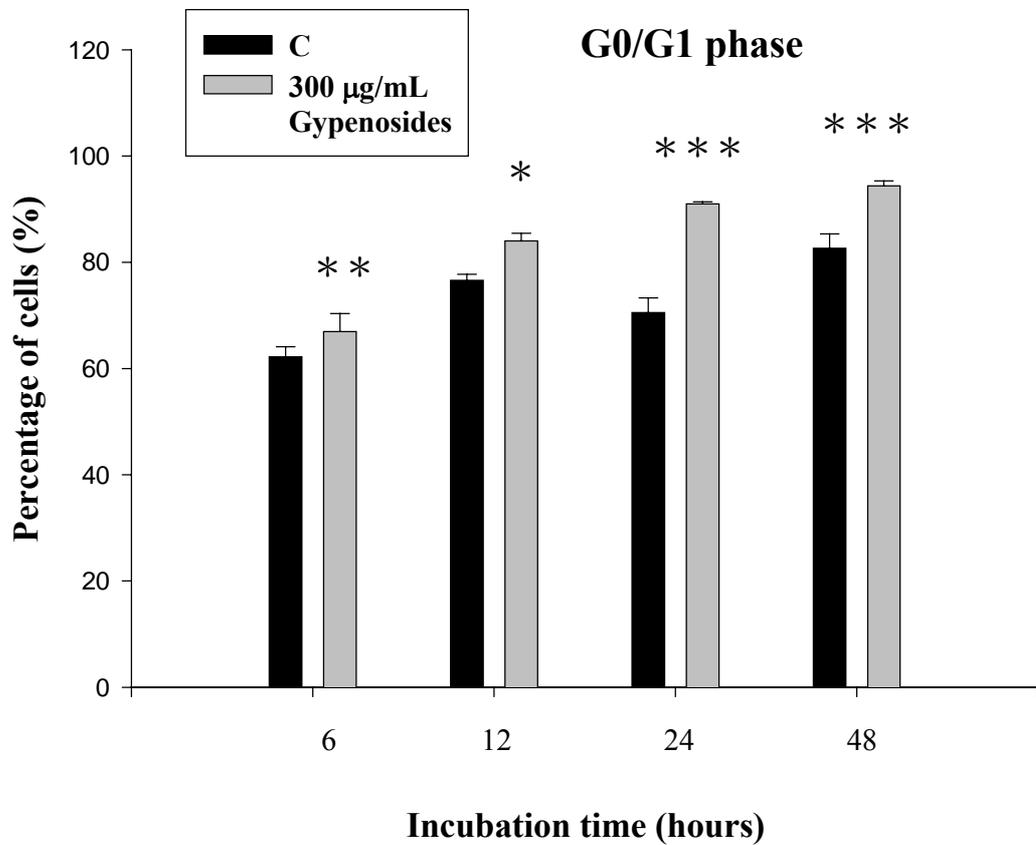
圖十二 人類肺癌細胞經過給予不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時之流式細胞計數儀所檢測到的情形。隨著藥物濃度的上升，細胞週期中的 G0/G1 phase 細胞數有明顯的上升。



圖十三 人類肺癌細胞經過加入不同濃度的絞股藍皂苷處理24小時之流式細胞計數儀所檢測到的情形。隨著藥物濃度的上升，細胞週期中的 G0/G1 phase 細胞數有明顯的上升。數據結果以 mean±SD 值表示，n=3。當  $p < 0.05$  以 (\*) 代表，當  $p < 0.001$  以 (\*\*\*) 代表。



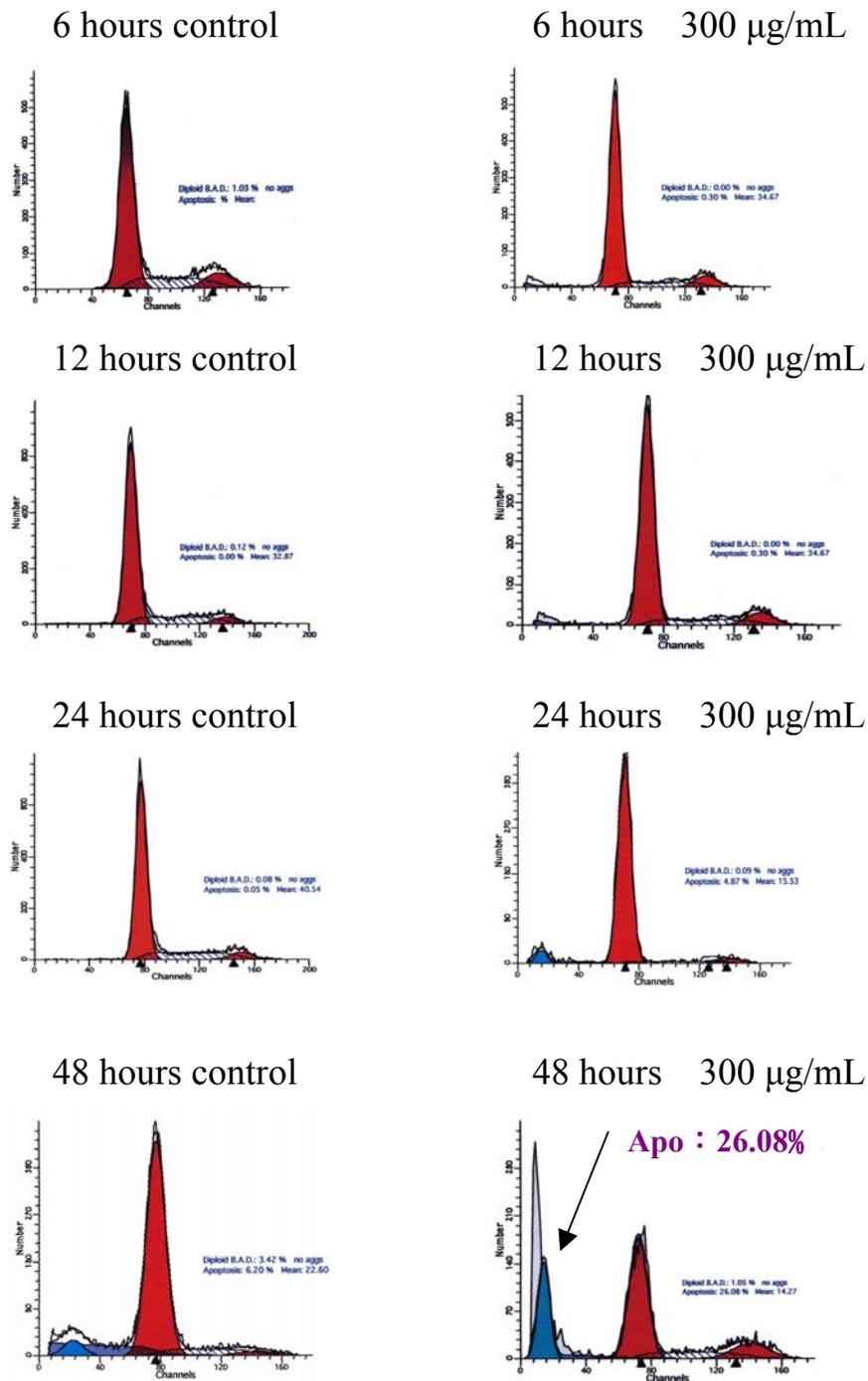
圖十四 人類肺癌細胞經由給予或不給予 300 µg/mL 絞股藍皂苷處理 6、12、24、48 小時之流式細胞計數儀所檢測到的情形。



圖十五 人類肺癌細胞經由給予或不給予 300 µg/mL 的絞股藍皂苷處理 6、12、24、48 小時以流式細胞計數儀所檢測到的情形。隨著時間的上升，G0/G1 phase 的細胞數也隨著上升。數據結果以 mean±SD 值表示，n=3。當  $p < 0.05$  表示在統計學上具有差異，以 (\*) 代表，當  $p < 0.01$  以 (\*\*) 代表，當  $p < 0.001$  以 (\*\*\*) 代表。

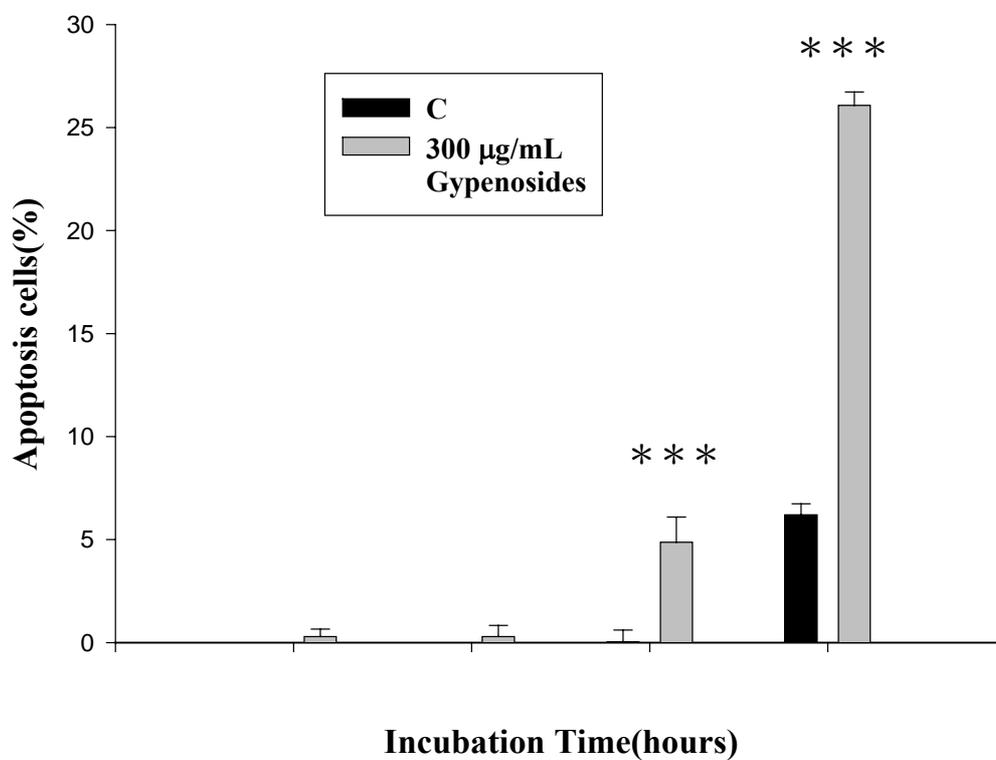
### 第三節 絞股藍皂苷對人類肺癌細胞株在 Apoptosis 與細胞型態上的改變情形

經由加入或不加入 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的絞股藍皂苷，培養 6、12、24、48 小時之後，利用流式細胞計數儀觀察其細胞週期在 sub G1 的細胞數分布情形。發現隨著時間點的上升，sub G1 的細胞數有明顯的上升（如圖十六、十七）。利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的型態，加入不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時後，發現細胞數目有明顯下降的情形，且有細胞膜皺縮、細胞型態不完整、與空泡化的現象（如圖十八），由此可知絞股藍皂苷對於人類肺癌細胞有引起細胞計畫性死亡作用。

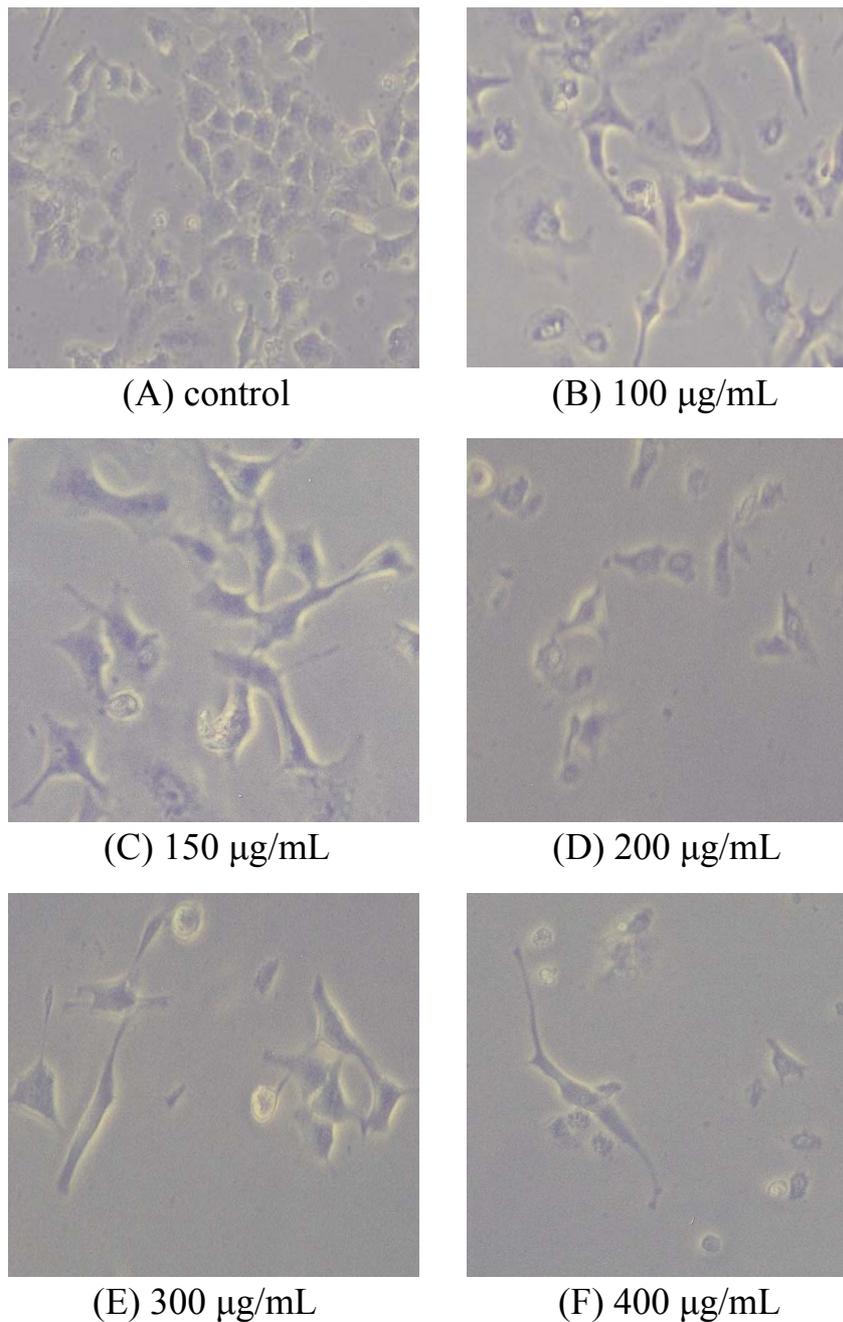


圖十六 人類肺癌細胞經過給予或不給予 300 µg/mL 絞股藍皂苷處理

6、12、24、48 小時之流式細胞計數儀所檢測到的情形。



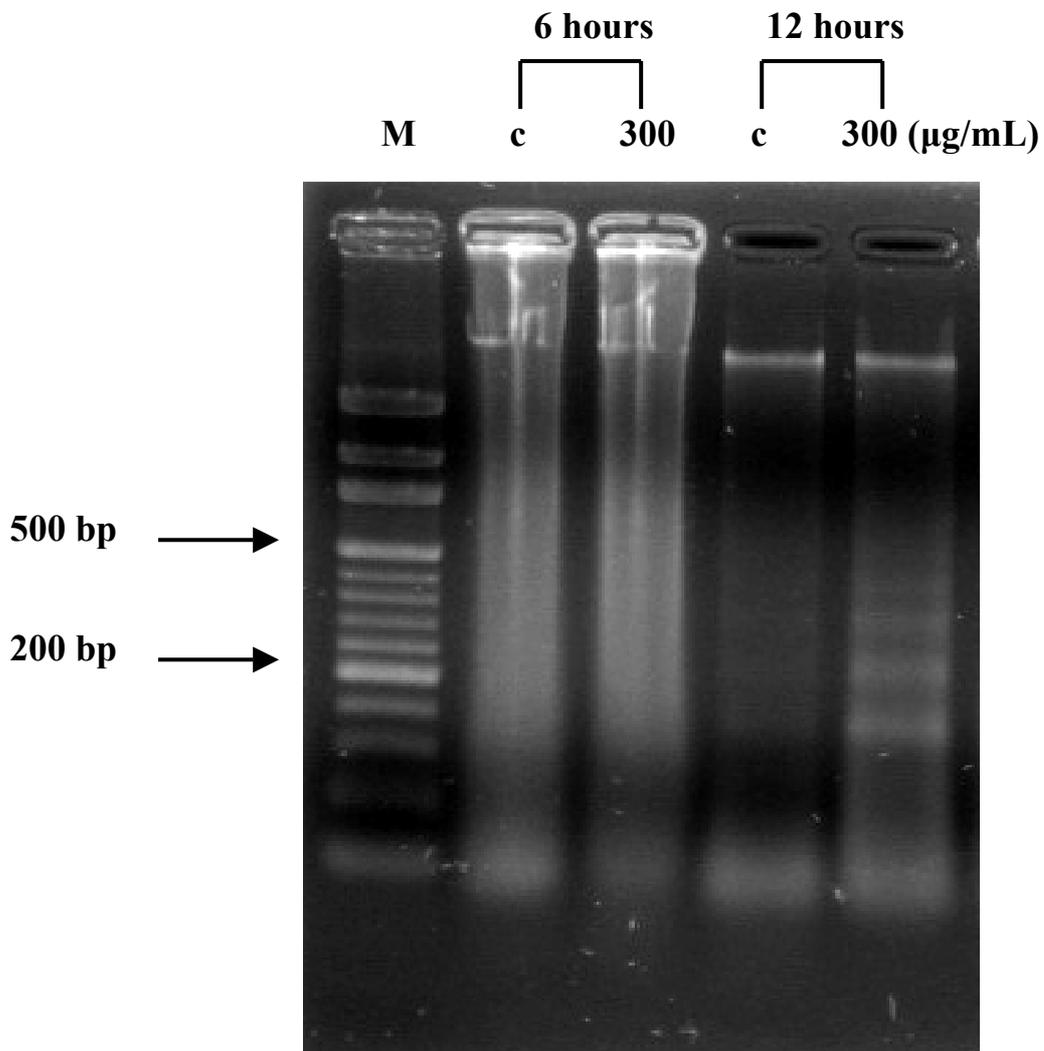
圖十七 利用流式細胞計數儀加入或不加入 300 µg/mL 的絞股藍皂苷培養 6、12、24、48 小時之後分析 apoptosis 的細胞分布情形。數據結果以 mean±SD 值表示，n=3。當  $p < 0.001$  以 (\*\*\*) 代表。



圖十八 利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的型態。加入不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時後，發現隨著藥物濃度的上升，細胞數目有明顯下降的情形，且有細胞膜皺縮、細胞型態不完整、與空泡化的現象。

#### 第四節 絞股藍皂苷對人類肺癌細胞在 DNA 電泳膠片的表現情形

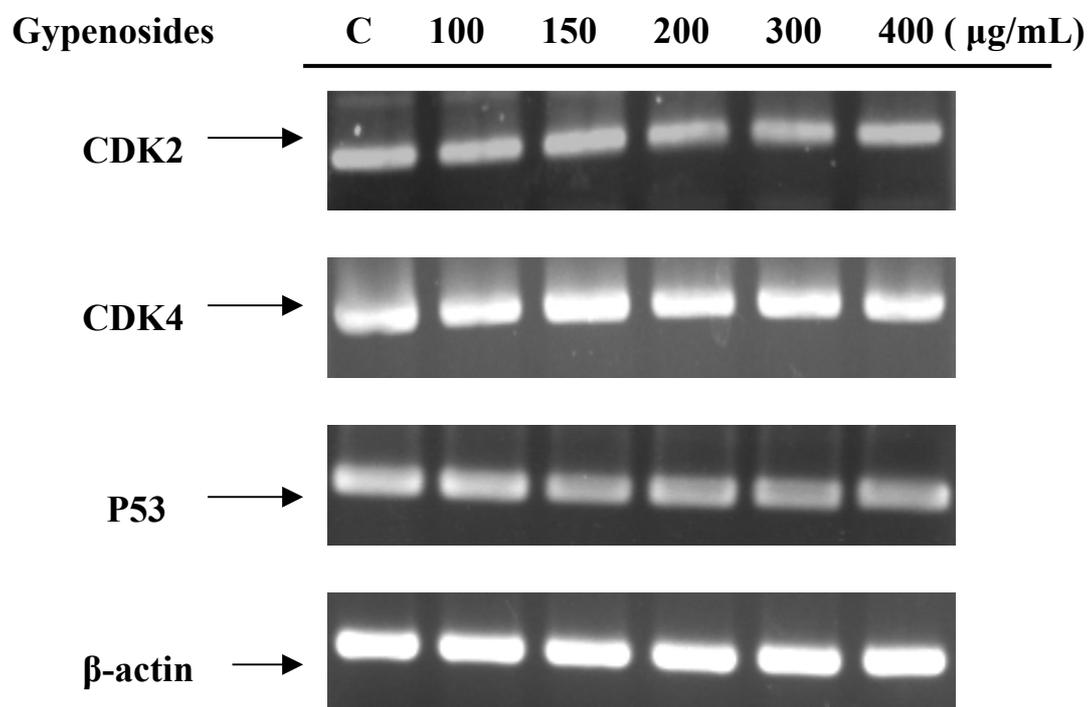
為了更進一步的了解及確定絞股藍皂苷在人類肺癌細胞所引起的計畫性死亡情形，於是利用 DNA 電泳膠片來觀察其斷裂的 DNA fragment。使用 2% 的電泳膠片以 50 V 的電壓跑膠片，並以 ethidium bromide 來染色，在 UV light 下觀察其 DNA 斷裂的情形。在圖十九中，發現在藥物處理後 6 小時並沒有看見有 DNA 片段的情形，而在藥物處理 12 小時後，發現有明顯的 DNA 片段表現。由此我們更可以確定絞股藍皂苷可以在人類肺癌細胞(A549 cell)引起計畫性死亡。



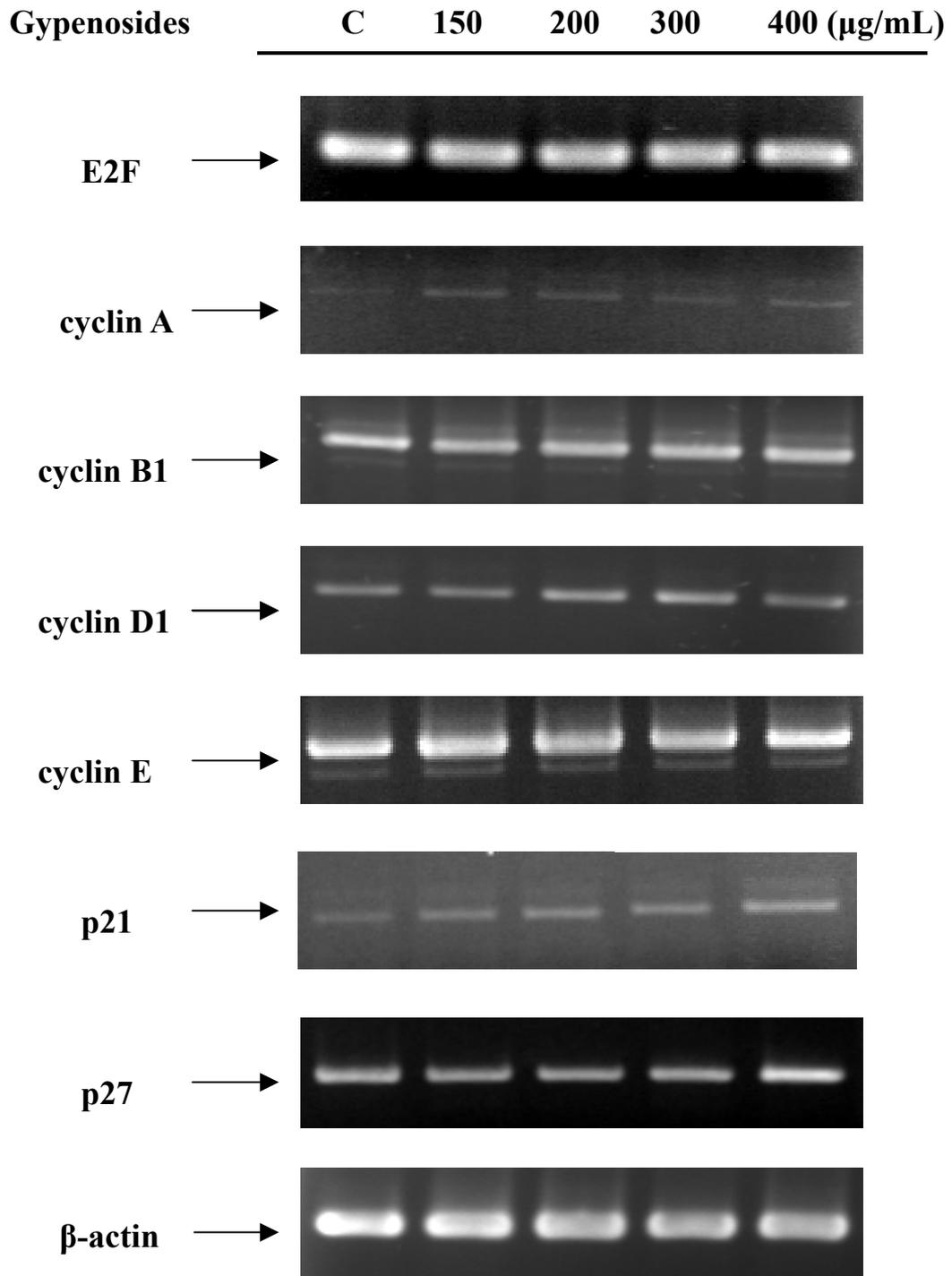
圖十九 利用 DNA 電泳法檢測 DNA 斷裂的情形。加入 300 µg/mL 的  
 絞股藍皂苷處理後，在 180-200 bp 的位置出現斷裂的 DNA  
 片斷，形成 ladder 的情形。

## 第五節 使用 RT-PCR 技術對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞中細胞週期的 mRNA 表現量的改變

利用 RT-PCR(Reverse-Transcriptase Polymerase chain reaction)技術觀察對人類肺癌細胞中細胞週期的 mRNA 的改變量，使用絞股藍皂苷處理 24 小時後，發現在細胞週期中的 Cyclins、CDK、E2F 與 p53 部分，例如：CDK2、CDK4、Cyclin A、Cyclin B1、Cyclin D1、Cyclin E、E2F、p53（圖二十 A）幾乎沒有什麼改變，而在 CDKI 的部份，例如 p21、p27（圖二十 B）則有些許的改變。p21 有明顯的上升，而 p27 有些許的上升。 $\beta$ -actin 為 internal control。



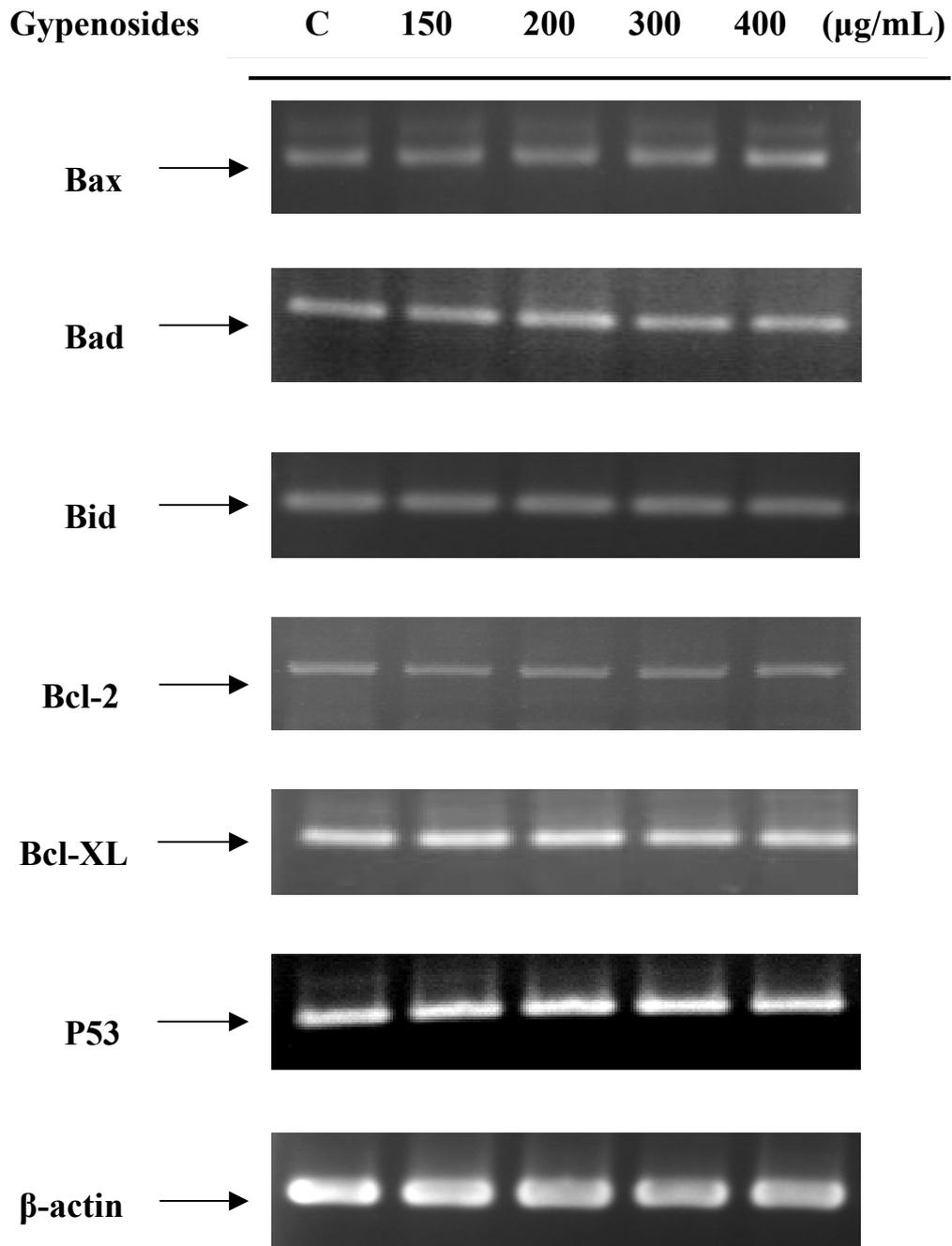
圖二十 A. 以 RT-PCR 分析人類肺癌細胞經加入不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時後細胞中 CDK2、CDK4、p53 的相對表現量。β-actin 為 internal control。



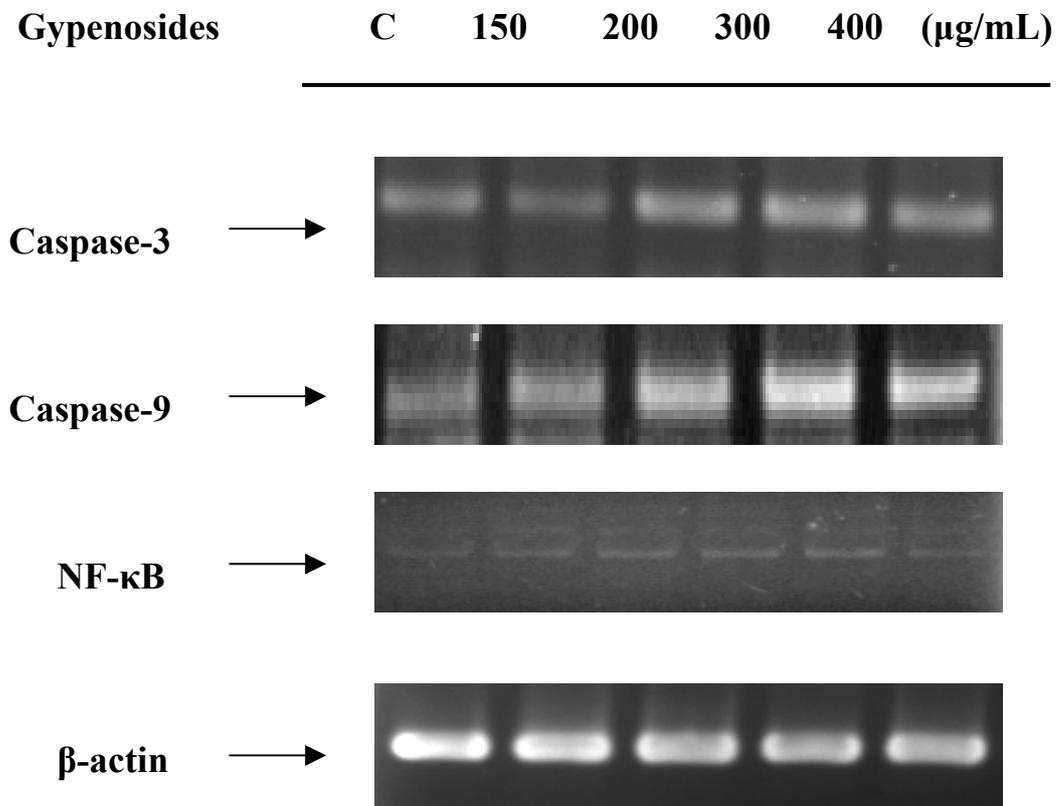
圖二十 B. 以 RT-PCR 分析人類肺癌細胞經加入不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時後細胞中 E2F、cyclin A、cyclin B1、cyclin D1、cyclin E、p21、p27 的相對表現量。 $\beta$ -actin 為 internal control。

## 第六節 使用 RT-PCR 技術對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞 Bcl-2 family 與 caspase 的 mRNA 表現量的改變

利用 RT-PCR 技術觀察對人類肺癌細胞中 Bcl-2 family 與 caspase 的 mRNA 的改變量，使用絞股藍皂苷處理 24 小時後，發現在 Bcl-2 family(圖二十一 A)中的 Bax 有些許的上升，而 Bcl-2、Bad、Bcl-XL、Bid 卻沒什麼太大的改變，p53 的量一樣的也沒有變化。在 caspase(圖二十一 B)的部分，發現 caspases -1、-2、-7、-8 無法被偵測到（無法被偵測到故無附數據），而 caspase-3 與 caspase-9 的量有明顯上升的趨勢。NF- $\kappa$ B 也有些許上升的趨勢。 $\beta$ -actin 為 internal control。



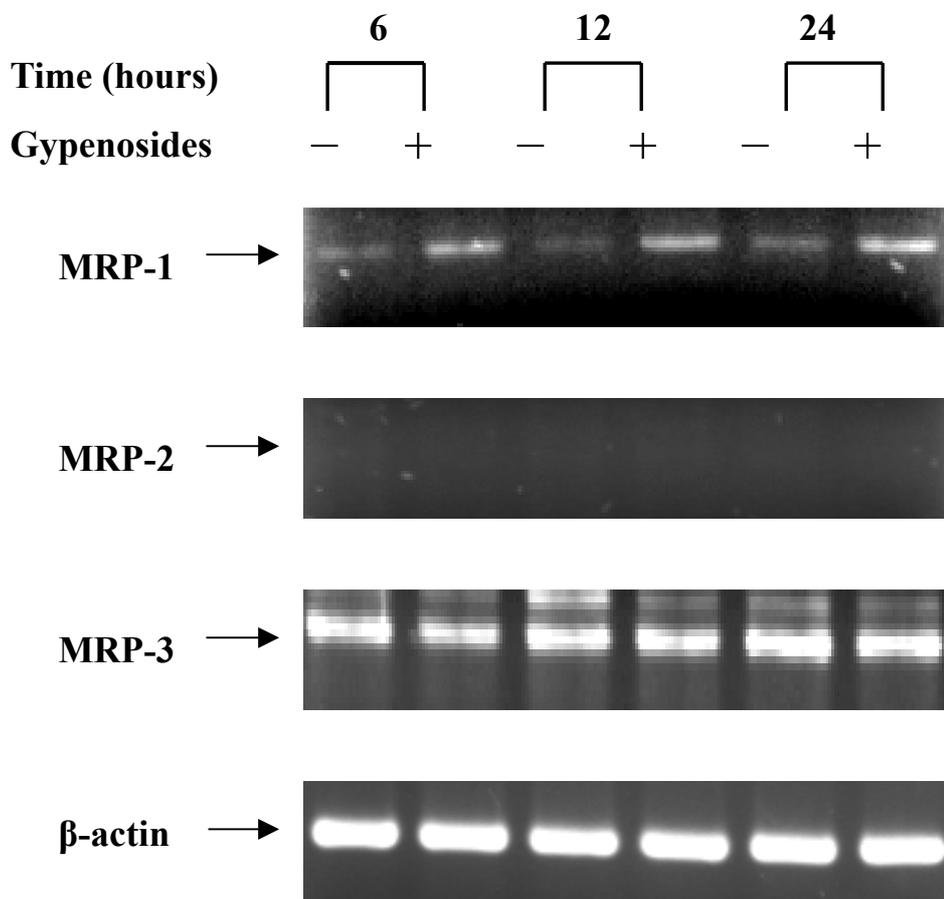
圖二十一 A. 以 RT-PCR 分析人類肺癌細胞經加入不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時後細胞中 Bax、Bad、Bid、Bcl-2、Bcl-XL、p53 的相對表現量。β-actin 為 internal control。



圖二十一 B. 以 RT-PCR 分析人類肺癌細胞經加入不同濃度的絞股藍皂苷處理 24 小時後細胞 caspase-3、caspase-9、NF-κB 的相對表現量。β-actin 為 internal control。

## 第七節 使用 RT-PCR 技術對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞中 MRP(Multiple drug resistant protein)的 mRNA 表現量的改變

利用 RT-PCR 技術觀察對人類肺癌細胞中 MRP(Multiple drug resistant protein)的 mRNA 的改變量，使用加入有無 300  $\mu\text{g/mL}$  的絞股藍皂苷處理 6、12、24 小時後，發現 MRP-1 的 mRNA 量有明顯的隨著時間而上升，而在 MRP-2 與 MRP-3 的部分，MRP-2 無法被偵測到，而 MRP-3 的量並沒有改變。 $\beta$ -actin 為 internal control。(如圖二十二)

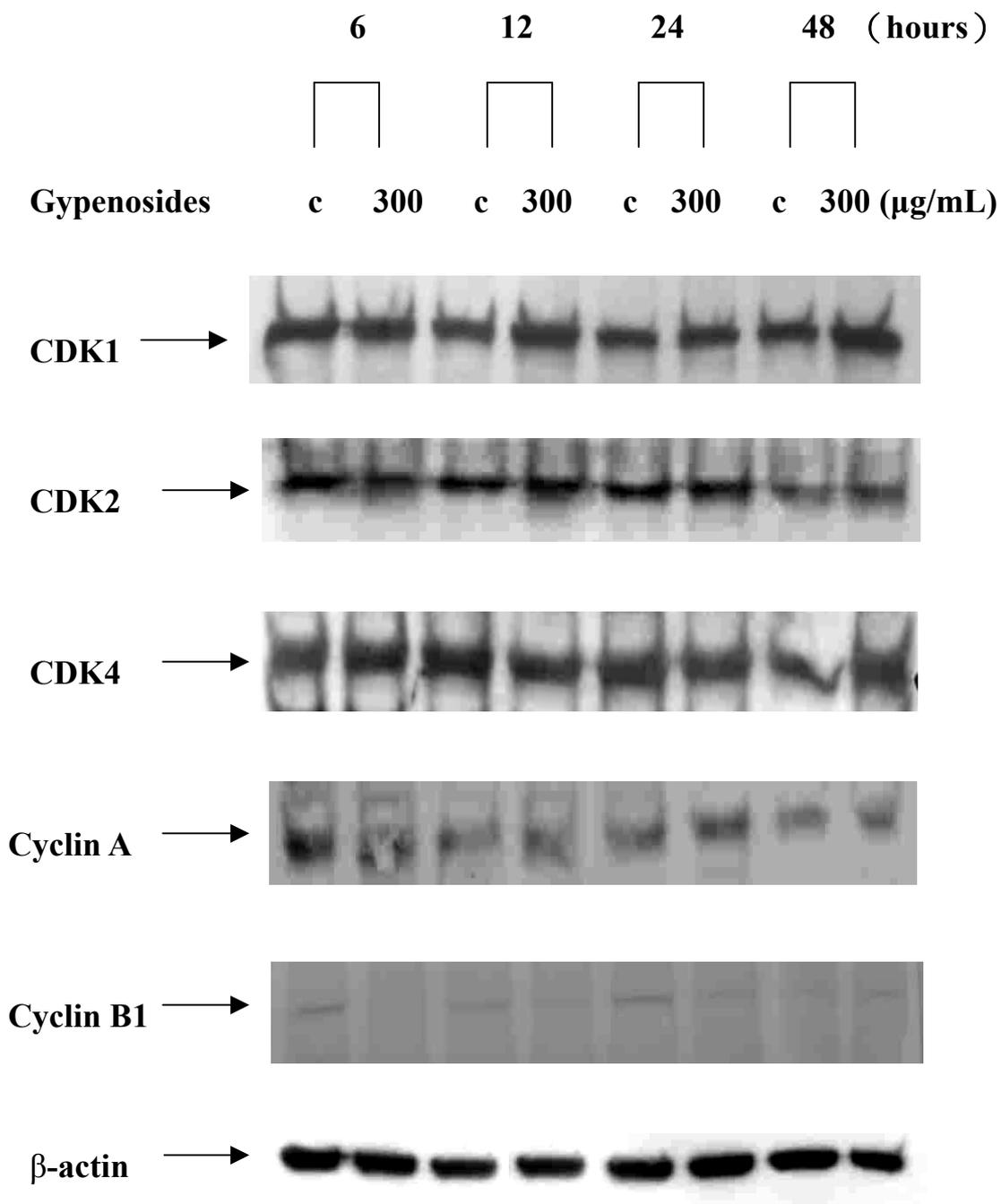


圖二十二 以 RT-PCR 分析人類肺癌細胞經加入有無 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的絞股藍皂苷處理 6、12、24 小時後細胞中 MRP-1、MRP-2、MRP-3 的相對表現量。 $\beta$ -actin 為 internal control。

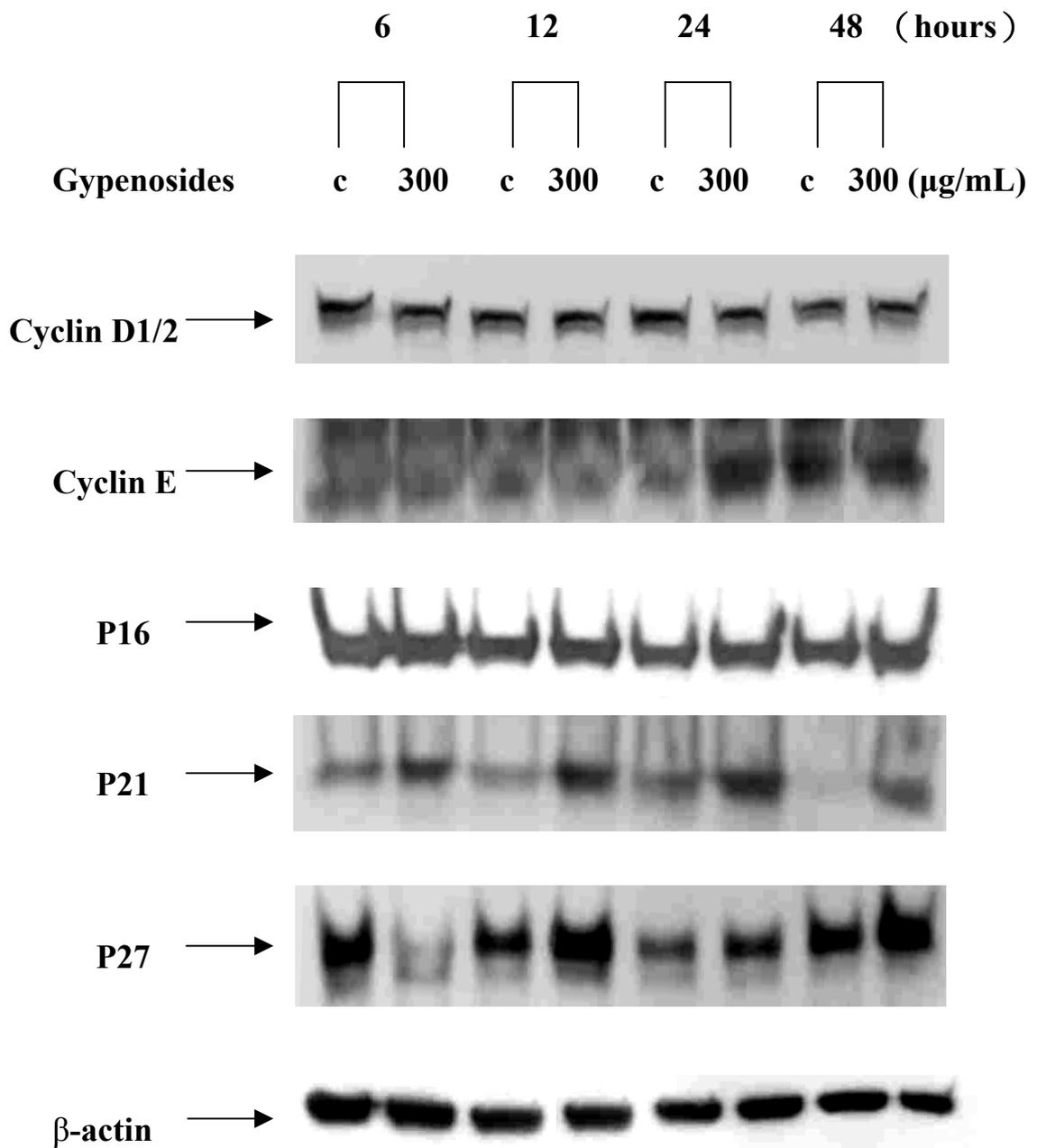
## 第八節 使用西方點墨法對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞 中細胞週期蛋白表現量的改變

以西方墨點法分析，絞股藍皂苷對人類肺癌細胞內的細胞週期相關蛋白質的影響。與細胞週期中的 G0/G1 phase 相關的蛋白有 CDKs：CDK2 與 CDK4；Cyclins：cyclin A、cyclin B1、cyclin D1/2、cyclin E；CDKIs：p16、p21、p27。以  $\beta$ -actin 當作 internal control。經加入或不加入 300  $\mu$ g/mL 的絞股藍皂苷處理 6、12、24、48 小時後的結果如下：

發現在 CDKs 的部分：CDK2 有隨著時間的上升而上升的趨勢，而 CDK1 與 CDK4 則沒什麼太大的改變。在 cyclins 的部分：cyclin A、cyclin D1/2 並沒有改變，cyclin B1 在 24 小時的時間點開始表現，而 cyclin E 的部分在 24 小時上升，在 48 小時卻又沒有改變。在 CDKIs 的部分，p16 沒什麼太大的改變，p21 則是在 6 小時即上升在 24 小時達高峰，而 p27 則是在 12 小時的時間點開始上升。以  $\beta$ -actin 當作 internal control。(如圖二十三、二十四)



圖二十三 利用西方點墨法觀察 G0/G1 phase 中的 CDK1、CDK2、CDK4、cyclin A、cyclin B1 的蛋白表現量。以  $\beta$ -actin 當作 internal control。

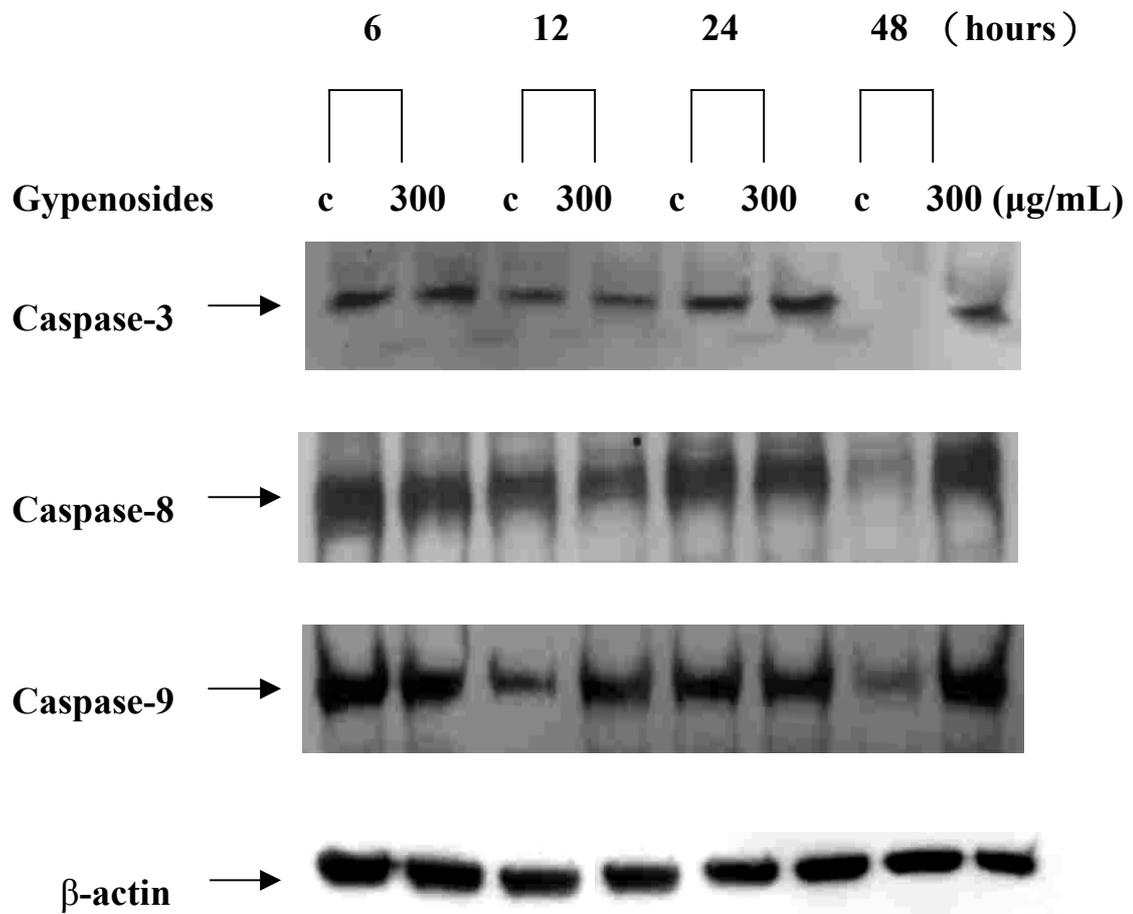


圖二十四 利用西方點墨法觀察 G0/G1 phase 中的 cyclin D1/2、cyclin E、p16、p21、p27 的蛋白表現量。以  $\beta$ -actin 當作 internal control。

## 第九節 使用西方點墨法對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞 casapse 蛋白表現量的改變

以西方墨點法分析絞股藍皂苷對人類肺癌細胞內的 caspase 蛋白質的影響。與計畫性死亡相關的 caspase 有 caspase-3、caspase-8、caspase-9。以  $\beta$ -actin 當作 internal control。經加入或不加入 300  $\mu\text{g/mL}$  的絞股藍皂苷處理 6、12、24、48 小時後的結果如下：

發現 caspase-3、caspase-8、caspase-9 皆有上升的跡象。尤其是 caspase-9 上升的最明顯。(如圖二十五)

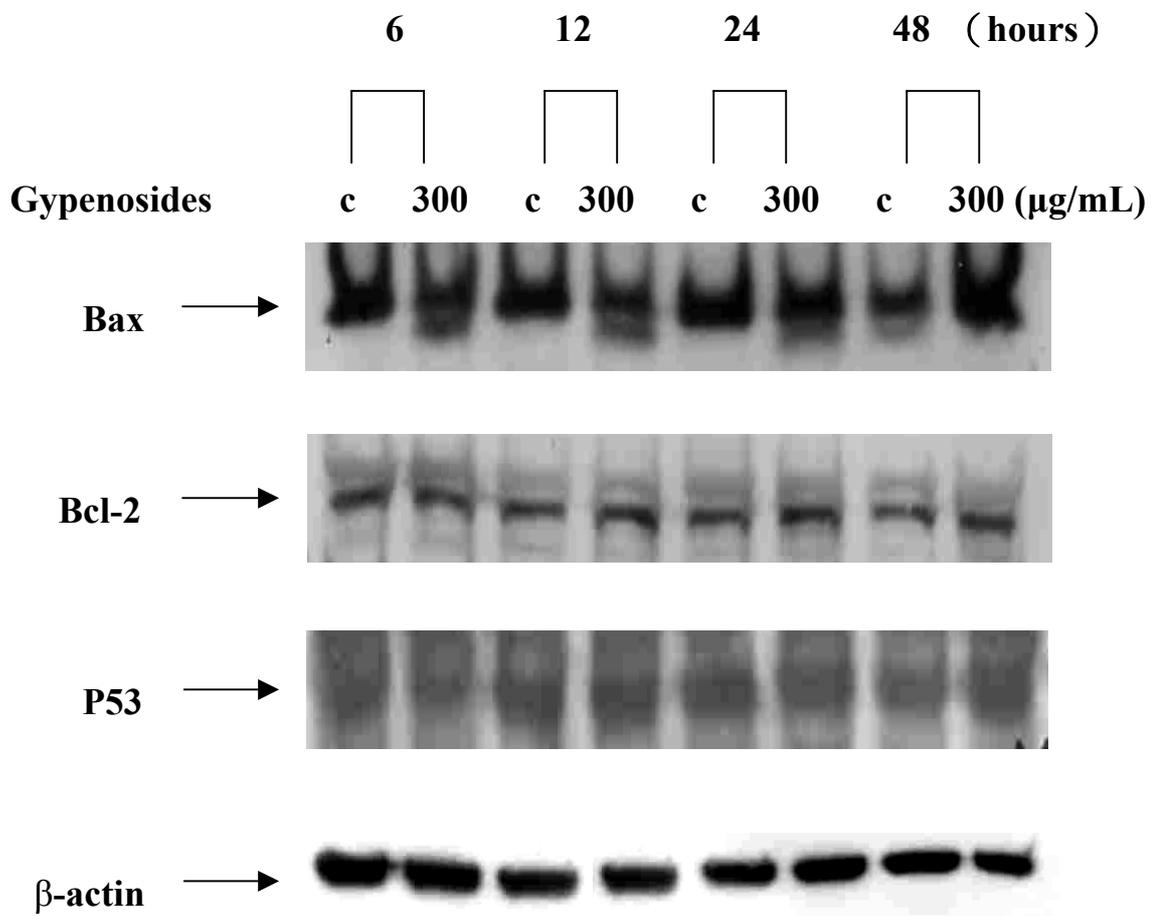


圖二十五 利用西方點墨法觀察有關於計畫性死亡路徑中的 caspase-3、caspase-8、caspase-9 的蛋白表現量。以 β-actin 當作 internal control。

## 第十節 使用西方點墨法對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞粒線體蛋白表現量的改變

以西方墨點法分析，絞股藍皂苷對人類肺癌細胞內的粒線體蛋白質的影響。與計畫性死亡相關的粒線體蛋白有 Bax 與 Bcl-2。以  $\beta$ -actin 當作 internal control。經加入或不加入 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的絞股藍皂苷處理 6、12、24、48 小時後的結果如下：

發現 Bax 蛋白在 24 小時的時間點開始上升，Bcl-2 蛋白卻沒有太大的改變。而在 p53 蛋白方面，也沒有改變。(如圖二十六)



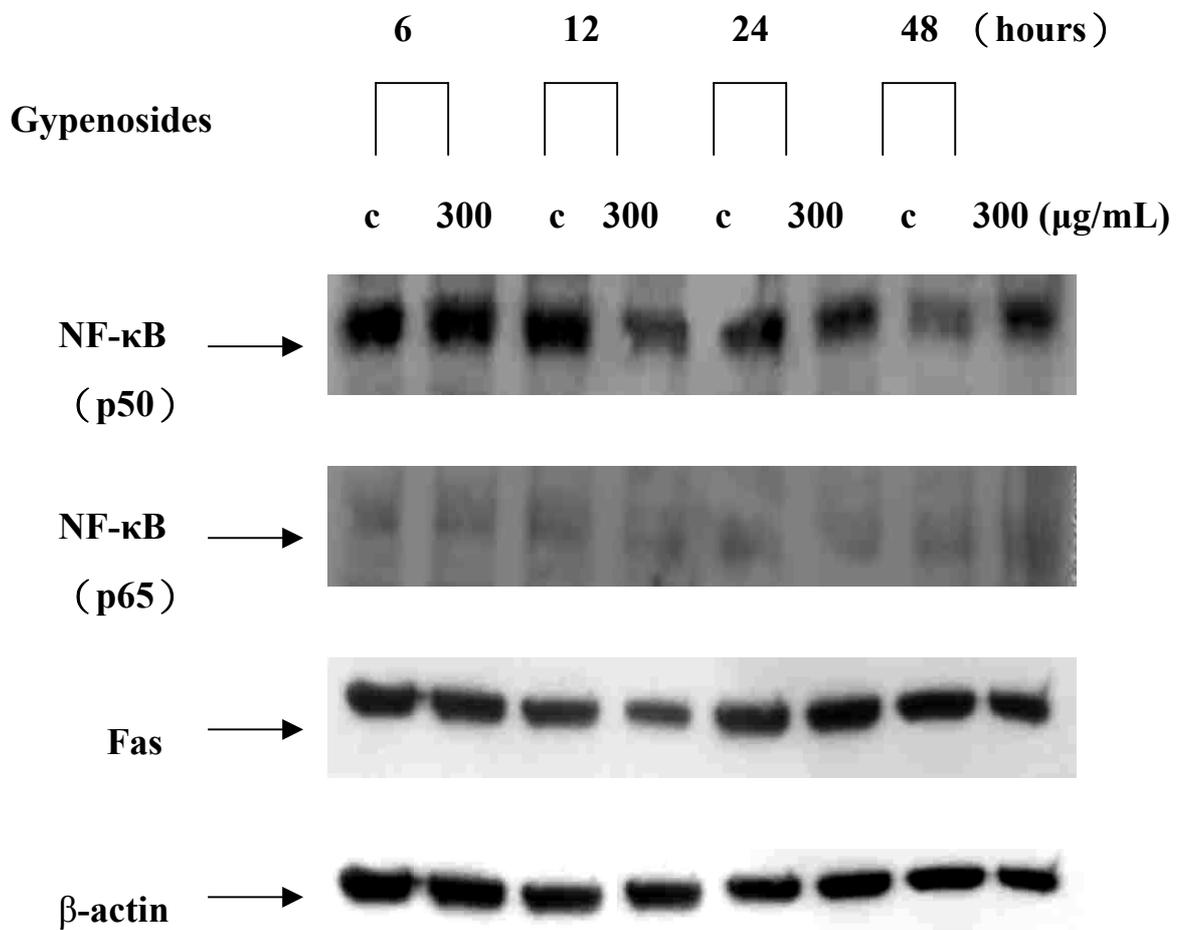
圖二十六 利用西方點墨法觀察有關於粒線體內的 Bax、Bcl-2 蛋白表現量與 p53 的蛋白表現量。以  $\beta$ -actin 當作 internal control。

## 第十一節 使用西方點墨法對絞股藍皂苷在人類肺癌細胞

### Death Receptor 蛋白表現量的改變

以西方墨點法分析，絞股藍皂苷對人類肺癌細胞內的 death receptor 蛋白質的影響。與計畫性死亡相關的 death receptor 蛋白有 NF- $\kappa$ B (p50)、NF- $\kappa$ B (p65)、Fas。以  $\beta$ -actin 當作 internal control。經加入或不加入 300  $\mu$ g/mL 的絞股藍皂苷處理 6、12、24、48 小時後的結果如下：

發現 Fas 與 NF- $\kappa$ B (p65) 並沒有改變，而 NF- $\kappa$ B (p50) 在 48 小時的時間點開始加強表現而上升。(如圖二十七)



圖二十七 利用西方點墨法觀察絞股藍皂苷對人類肺癌細胞內的 death receptor 中的 NF-κB (p50)、NF-κB (p65)、Fas 蛋白質影響。以 β-actin 當作 internal control。

## 第六章 討論

二十一世紀危害人類的頭號殺手：癌症。台灣每年約有五千名病患因肺癌而死亡，於 1999 年越居癌症死亡率之冠，其嚴重性不可小覷。其治療方法仍以外科切除及放射線療法為主，預後的情況則是不大理想<sup>86</sup>。於是對於找出新穎且有效率的治療方法，是現今無須等待的重要課題。

現代藥理學研究證明，絞股藍皂苷具有抗癌症的作用<sup>24</sup>。直到現在仍沒有任何的研究報導有關於絞股藍皂苷對於A549 肺癌細胞的研究。因此本篇論文就在探討絞股藍皂苷對於人類肺癌細胞（A549）的抑制機轉。

藉由流式細胞計數儀檢測絞股藍皂苷對於人類肺癌細胞的增生影響，發現絞股藍皂苷可以在 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的濃度造成有 50% 細胞的致死率，而在 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的濃度，細胞的存活率幾乎等於零。於是本實驗認為絞股藍皂苷可以對人類肺癌細胞造成細胞抑制的效果。

在流式細胞計數儀檢測絞股藍皂苷對於人類肺癌細胞的細胞週期影響，發現絞股藍皂苷可以引起細胞週期的G0/G1 phase arrest，且到了藥物濃度 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的時候，G0/G1 phase的細胞數上升了 23%。值得注意的是，在使用絞股藍皂苷處理 12 及 24 小時後的細胞週期情形，發現在 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的部分，G2/M phase的細胞數有

上升的趨勢。而在處理 48 小時的細胞週期則沒有見到如此的現象，於是本實驗認為當細胞週期在運轉的時候，在各個分期皆會有不同比例的細胞數，就人類肺癌細胞A549 來說，此細胞則是一個G0/G1 phase細胞數比較多的細胞株，它的G0/G1 phase細胞數可以到達 70% ，而G2/M phase的細胞數約有 20% 左右，S phase的細胞數約有 10% 左右。而當加入的藥物濃度不夠高且時間不夠久時，細胞週期還沒有受到完全的抑制，於是細胞週期仍會處在進行式下繼續行走，於是S-G2/M phase的細胞這時會加強表現，而使得細胞週期往G0/G1 phase推擠而堆積，在藥物濃度高的地方，造成G0/G1 phase arrest。這樣的現象可由 1988 年在Bontenbal M.等學者在Eur J Cancer Clin Oncol發表的Oestradiol enhances doxorubicin uptake and cytotoxicity in human breast cancer cells (MCF-7)文章中得到佐證<sup>87</sup>。文章中指出，Oestradiol這個藥物所導致細胞週期抑制的過程或許是經由藥物處理時間以及濃度所造成的結果。文章中還指出，當藥物處理濃度與時間在比較低的時候，會造成S-G2/M phase細胞數的堆積，當藥物處理濃度與時間上升的時候，卻造成G0/G1 phase arrest。於是我們認為絞股藍皂苷對人類肺癌細胞的作用也許也是依據著這樣的行為模式在進行。

藉由RT-PCR技術的方法，我們觀察到了CDK2、CDK4、cyclin A、cyclin B1、cyclin D1、cyclin E、E2F在mRNA的層級上皆沒有太大的

改變，而p21、p27 皆有上升的趨勢，尤其是p21 最明顯。在利用西方點墨法技術(Western Blotting)觀察細胞週期的細胞素蛋白表現量，發現CDK4、cyclin A、cyclin D1/2、p16 皆並沒有改變，CDK2 有隨著加藥時間上升而上升，cyclin B1 在第 24 小時候開始表現，p21 則是在第 6 小時即開始上升，p27 從第 12 小時才開始上升。因此本研究認為絞股藍皂苷是藉由上調控p21 與p27 這兩個CDK-inhibitors而導致人類肺癌細胞在G0/G1 phase arrest。因為研究發現，p21 與p27 可以抑制cyclins與CDKs的活性<sup>88</sup>。而在 2004 年 Musgrove EA 等學者發現，p27 可以降低cyclin D1 的表現且其中的cyclin E-CDK2 activity 是上升的<sup>89</sup>，可對本實驗CDK2 有隨著加藥時間上升而上升取得一個合理的解釋。而cyclin B1 的些許上升，可由之前arrest在S-G2/M phase 得到合理的解釋。值得注意的是，cyclin E在第 24 小時表現量上升，卻又在 48 小時趨於平緩，對於這樣的結果，仍有待接下來的實驗求證，本研究無從而知。

利用計畫性死亡(Apoptosis)在治療癌症上是近年來非常熱門的話題。已有文獻指出，絞股藍皂苷可以對肝癌細胞(Hep3B cell、Huh7 cell、HA22T cell)引起細胞進行計畫性死亡<sup>24</sup>，且可以對human cervix epidermoid carcinoma cells (Ca Ski)產生DNA adduct的現象<sup>90</sup>，但利用絞股藍皂苷對於人類肺癌細胞的計畫性死亡研究領域仍然不是非常

詳盡，於是本研究另一個重點就在探討利用絞股藍皂苷對於人類肺癌細胞的計畫性死亡。利用倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態，發現絞股藍皂苷可以引起細胞型態上的變化，例如隨著藥物濃度的上升，細胞數目有明顯下降的情形，且有細胞膜皺縮、細胞型態不完整、與空泡化的現象，由此可知絞股藍皂苷對於人類肺癌細胞有引起細胞計畫性死亡作用。

為了更進一步的了解及確定絞股藍皂苷在人類肺癌細胞所引起的計畫性死亡情形，於是本實驗利用DNA電泳膠片來觀察其斷裂的DNA fragment。發現在藥物處理後6小時並沒有看見有DNA片段的情形，而在藥物處理12小時後，發現有明顯的DNA片段表現。由此我們更可以確定絞股藍皂苷可以在人類肺癌細胞(A549 cell)引起計畫性死亡。許多文獻指出，參與計畫性死亡其中最重要的一個機制是活化caspase的路徑，這樣的路徑可以促使細胞訊號從一些細胞表面的death receptor或是由粒線體來釋放apoptosis inducing factor<sup>91</sup>。而與caspase有關聯的Bcl-2 family蛋白也已被證實在計畫性死亡中佔有非常重要的角色<sup>24</sup>。Bcl-2 家族包括anti-apoptotic molecules (Bcl-2、Bcl-xL、Bag-1、Bcl-W、Mcl-1) 與pro-apoptotic molecules (Bax、Bad、Bak、Bcl-Xs)，在這兩者之間的平衡可以調控apoptosis是否發生<sup>57</sup>。Bcl-2 及Bcl-XL大量表現可以抑制粒線體中的cytochrome C釋

出，進而促使caspase無法活化及細胞凋亡消失<sup>92</sup>。也有其他的學者認為促細胞凋亡蛋白質與抗細胞凋亡蛋白質的比例，對於細胞是否走向細胞凋亡有一定的影響<sup>93-94</sup>。Galvesen等學者在1999年，也曾報導caspase 3活化可以誘導Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)分解、染色體DNA裂解及最後產生細胞凋亡<sup>95</sup>；另一方面Inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B(I- $\kappa$ B)會抑制抗細胞凋亡轉譯因子Nuclear factor (NF)- $\kappa$ B的作用，I- $\kappa$ B也需要caspase-3活化，使其與NF- $\kappa$ B結合的區域露出，抑制抗細胞凋亡的作用<sup>96-97</sup>。也有文獻指出，在一些有DNA damage的神經元細胞中，其NF- $\kappa$ B可以去上調控p53而導致apoptosis的情形<sup>98</sup>。因此藉由RT-PCR技術的方法，我們觀察到了Bcl-2 family中的Bax有些許的上升，而Bcl-2、Bad、Bcl-XL、Bid卻沒什麼太大的改變，p53的量一樣的也沒有變化。在caspase的部分，發現caspases-1、-2、-7、-8無法被偵測到，而caspase-3與caspase-9的量有明顯上升的趨勢。NF- $\kappa$ B也有些許上升的趨勢。而在使用西方點墨法技術(Western Blotting)可以觀察到發現發現Bax蛋白在24小時的時間點開始上升，Bcl-2蛋白卻沒有太大的改變。而在p53蛋白方面，也沒有改變。在caspase的部分，caspase-3、caspase-8、caspase-9皆有上升的跡象，尤其是caspase-9上升的最明顯。而在death receptor的部分，發現Fas與NF- $\kappa$ B (p65)並沒有改變，而NF- $\kappa$ B (p50)在48小時的時間點開始

加強表現而上升。因此我們認為，絞股藍皂苷可以藉由NF- $\kappa$ B的路徑，導致Bax的上升，而促使caspase-9活化，再使下游的caspase-3活化而導致計畫性死亡，而這樣的凋亡路徑是不經由p53這條路徑的。

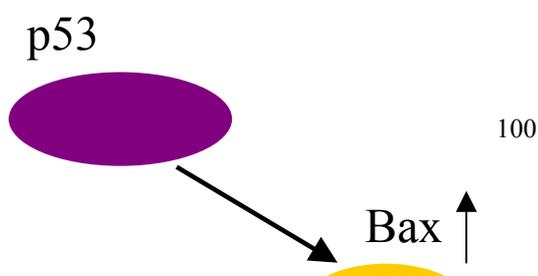
近年來使用化學療法在治療癌症方面已產生了不容忽視的抗藥性，抗藥性的問題使得化學療法越來越難以治療癌症。許多學者專家已鑑定出不同種的癌細胞會對不同種的藥物產生抗藥性，甚至還有cross-resistance的情形<sup>99</sup>。這樣的機制早在1970年，Bieder等學者發現在p388白血病細胞株及中國地鼠肺細胞在對放線菌素D產生抗藥性的同時，對化學結構與作用機制完全不同的抗腫瘤藥物如絲裂霉素C (Mitomycin)、柔紅霉素 (Daunorubicin) 等也產生抗藥性，這種現象稱為MDR (Multiple Drug Resistance)<sup>67</sup>。之後的研究發現，MDR細胞膜上過表現一種特殊的跨膜轉移蛋白P-glycoprotein (P-gp)<sup>67</sup>。P-gp是一種ATP依賴性藥物排出幫浦，能將抗癌藥物排出細胞外，減少藥物在細胞內的積蓄<sup>100</sup>。二十世紀90年代初期發現另外兩種與MDR有關的跨膜蛋白：multidrug related protein (MRP) 與lung resistance protein (LRP)<sup>101</sup>。由於在我們的一組48小時存活率的數據顯示藥物濃度在100-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的時候出現細胞存活率上升的情形 (與control比較)，而藥物濃度在300-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的時候細胞存活率又開始下降。因此我們想來觀察人類肺癌細胞對絞股藍皂苷是否會產生抗

藥性的情形。

利用RT-PCR技術方法，我們發現，使用加入有無300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的絞股藍皂苷處理6、12、24小時後，發現MRP-1的mRNA量有明顯的隨著時間而上升，而在MRP-2與MRP-3的部分，MRP-2無法被偵測到，而MRP-3的量並沒有改變。

有報導指出絞股藍皂苷在低劑量時可以減小腫瘤的體積，延長壽命<sup>4</sup>，但在高劑量時，抑制腫瘤的能力反而減弱<sup>5</sup>，這樣的文獻或許可以為以上的發現做個合理的解釋。這樣的結果是否就確認人類肺癌細胞會對絞股藍皂苷產生抗藥性我們不得而知。不過令人注意的是，是否MRP的上升就代表有抗藥性呢？有抗藥性是否就代表細胞的存活率會上升呢？之前在藥物處理48小時後的存活率，在100-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的時候出現細胞存活率上升，而藥物濃度在300-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的時候細胞存活率又開始下降，這樣是否代表絞股藍皂苷還是有細胞毒性的，對於抗藥性的部分只是依據濃度上的差別呢？這樣的疑問我們還須再做更進一步的研究才能夠釐清。

## 結論總圖



]

## 第七章 結論與建議

### 第一節 結論

自科技蓬勃發展以來，文明所帶來的浩劫--癌症，似乎儼然成為全球人類最受矚目也最令人頭痛的病症。在台灣，癌症更是國民十大死因之首，其深切的嚴重性更是不能小覷。而現今癌症的治療方法不脫外科手術切除腫瘤、放射線照射療法與化學療法；然而這些療法也間接侵入正常細胞，病人出現折磨痛苦的副作用或癒後不佳的功能喪失，導致患者配合度降低等盲點。因此研究界開始試著找出替代且更有療效的方法來突破瓶頸。

最近的研究發現，絞股藍皂苷能降低人類肝癌細胞的存活率，提升免疫力、抗心肌缺血缺氧作用、降低血脂、抑制肥胖、抗氧化作用與保肝作用。由於絞股藍皂苷對於癌細胞有專一性的抑制效果以及誘導細胞凋亡的特性，具有潛力開發成為新一代抗癌藥物。

在本篇研究中，藉由探討細胞增生 (proliferation)、細胞週期 (cell cycle)、細胞凋亡 (apoptosis) 與抗藥性機制 (multiple drug resistance)，評估絞股藍皂苷 (gypenosides) 對於人類肺癌細胞株 (A549) 抗癌的角色。由實驗數據發現，絞股藍皂苷對人類肺癌細胞株會抑制細胞增生、使細胞週期停止在 G0/G1 期 (G0/G1 phase arrest) 及誘導細胞凋亡。同時由反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 與西方點墨法 (immunoblotting) 分析細胞週期素，結果顯示藉由 PCR 技術的方法，我們觀察到了 CDK2、CDK4、cyclin A、cyclin B1、cyclin D1、cyclin

E、E2F 在 mRNA 的層級上皆沒有太大的改變，而 p21、p27 皆有上升的趨勢，尤其是 p21 最明顯。在利用西方點墨法技術(Western Blotting)觀察細胞週期的細胞素蛋白表現量，發現 CDK4、cyclin A、cyclin D1/2、p16 皆並沒有改變，CDK2、 cyclin B1、p21、p27 皆有上升。因此本研究認為絞股藍皂苷是藉由上調控 p21 與 p27 這兩個 CDK-inhibitors 而導致人類肺癌細胞在 G0/G1 phase 造成停留的主要因子。流式細胞計數儀分析實驗與 DNA 裂解實驗指出，絞股藍皂苷會誘發人類肺癌細胞株產生凋亡現象(apoptosis)；我們觀察到了 Bcl-2 family 中的 Bax 有些許的上升，而 Bcl-2、Bad、Bcl-XL、Bid 卻沒什麼太大的改變，p53 的量一樣的也沒有變化。在 caspase 的部分，發現 caspase-3 與 caspase-9 的量有明顯上升的趨勢。NF- $\kappa$ B 也有些許上升的趨勢。而在使用西方點墨法技術(Western Blotting)可以觀察到發現發現 Bax 蛋白上升，p53 與 Bcl-2 蛋白卻沒有太大的改變。在 caspase 的部分，caspase-3、caspase-8、caspase-9 皆有上升的跡象，尤其是 caspase-9 上升的最明顯。而在 death receptor 的部分，發現 Fas 與 NF- $\kappa$ B (p65) 並沒有改變，而 NF- $\kappa$ B (p50) 在藥物處理 48 小時後開始上升。因此我們認為，絞股藍皂苷可以藉由 NF- $\kappa$ B 的路徑，導致 Bax 的上升，促使 caspase-9 活化，再使下游的 caspase-3 活化而導致計畫性凋亡，。

## 第二節 建議

本實驗仍有許多地方需要更進一步探討，例如實驗數更深一層的訊號傳遞及相關基因和蛋白量的表現等，未來的研究著重於更加了解絞股藍皂苷所引起的訊息傳遞與生物性的特點，我們期待有更多關於絞股藍皂苷的資料，使其有機會應用於治療癌症上，降低人類罹患癌症的死亡率。

## 參考文獻

1. World Health Organization – WHO

2. Department of Health, Executive Yuan, R.O.C.
3. 代正福：南方人參—絞股藍。農藥世界 1993；58-60.
4. 于戰洋、洋輝：絞股藍研究近況。醫學通報 1988；23（1）：13.
5. 王玉琴、張秋菊、徐世明：絞股藍皂苷的抗腫瘤作用。中西醫結合雜誌 1988；8（5）：286.
6. 金梅、薛洋驥：絞股藍提取液對人直腸腺癌細胞系的影響。現代應用醫學 1992；9（2）：49.
7. 齊剛、張荊：絞股藍研究新發展。中草藥 1995；26（7）：377-380.
8. 陳建國：絞股藍與其混淆品烏薺莓的本草考譯。中草藥 1990；29（2）：79-83.
9. 陳榮洲：絞股藍皂苷複方對四氯化碳和半乳糖氨誘發大白鼠急性肝中毒之治療效果。中醫藥雜誌 1999；10（4）：231-247.
10. 丁樹利、朱兆儀、李勇：絞股藍及其同屬植物的生藥學研究。中國醫藥學雜誌 1994；29（2）：79-83.
11. 陰進、郭力弓：中藥現代研究與臨床運用。學苑出版社，北京 1995：524-534.
12. 李俊峰等：絞股藍藥理作用研究發展。河北中醫藥學報 1999；14（2）：37.
13. 連玉樹：絞股藍藥理與作用。福建中醫藥 1989；20（4）：55.
14. 姜彬慧、楊方春、趙余慶：絞股藍抗腫瘤作用研究現狀。中藥材 2003；26（9）：683-685.
15. 魏云、劉禮意、吉藍：絞股藍皂苷升高白血球作用探討。中草藥 1993；24（7）：100-102.
16. 辛冬生、劉俊田等：絞股藍總皂苷對實驗性心肌缺血缺氧損傷的保護作用。中國藥學雜誌 1990；25（7）：398.
17. 孟慶玉、朱悍國等：絞股藍總皂苷對各種脂蛋白的影響。中草藥 1989；20（4）：28.
18. Yoshiyuki K, Hiromicchi O, Shigeru A, Tsunemaysu T. Effect of Crude saponins of *Gynostemma pentaphyllum* on lipid metabolism. Shoyakugaku Zasshi. 1983; 37(3): 272-275.
19. 雷肖環、楊品純：絞股藍對小鼠血漿環核苷酸含量的影響。廣西

- 中醫藥 1900 ; 13 ( 4 ) : 45.
20. 徐聲林：絞股藍總皂苷與齊墩果酸保肝作用比較。現代應用藥學 1989 ; 6 ( 3 ) : 5.
  21. 牛頓雜誌2001年219期。
  22. Manish A. Shah and Gary K. Schwartz Cell cycle-mediated Drug Resistance : An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 2168-2181.
  23. Smith ML, and Fornace AJ Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutation Research*. 1996; 340 ( 2-3 ) :109-24.
  24. Chau-Jong Wang , Yu-Jin Hsieh , Chia-Yih Chu : Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by escultin. *Cancer Letter*. 2002; 183: 163-168.
  25. Brooks, R., Fantes, P., Hunt, T., and wheatley, D.eds. The cell cycle. Cambridge: The Company of Biologists ltd, 1989
  26. Hutchison, C., and Glover, D.M. Cell cycle control. New York: Oxford University Press., 1995
  27. Tyson, J.J., Novak, B., Odell, G.M., Chen, K., and Thron, C.D. Chemical kinetic theory: understanding cell-cycle regulation. *TIBS*. 1996; 21 :89-95.
  28. McGill, C.J., and Brooks, G. Cell cycle control mechanisms and their role in cardiac growth. *Cardiovasc. Res*. 1995; 30:557-69.
  29. Li, J.M., and Brooks, G. Cell cycle regulatory molecules (cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors) and the cardiovascular system. *Eur. Heart J*. 1999; 20: 406-420.
  30. Martinez, A.M., Affshar, M., Martin, F., Cavadore, J.C., Labbe, J.C., and Doree, M. Daul phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J*. 1997;16:343-354.
  31. Andersen, G., Busso, D., Poterszman, A., Hwang, J.R., Wurtz, J.M.,

- Ripp, R., Thierry, J.C., Egly J.M., and Moras, D. The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features. *EMBO.J.* 1997; 16: 958-967.
32. Reed, S.I., Bailly, E., Dulic, V., Hengst, L., Resnitzky, D., and Slingerland, J. G1 control in mammalian cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 1994; 18:69-73
33. Pines, J. Cyclin-dependent kinase inhibitors: the age of crystals. *Biochem. Biophys. Acta.* 1997; 1332: M39-M42.
34. Brooks, G., Poolman, R.A., and Li, J.M., Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: Role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovasc. Res.* 1998; 39: 301-311.
35. Driscoll JS, et al. Structure-antitumor activity relationships among quinone derivatives. *Cancer Chemother Rep* 1974; 2(4): 1-362.
36. P. L. Puri, T.K. Maclachlan, M. Levrero, A. Giordano, The intrinsic cell cycle: from yeast to mammals, in: G.S. Stein, R. baserga, A. Giordano, D.T. Denhardt (Eds.), *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*, Wiley, 1999, pp. 15-79.
37. E.S. Knudsen, J.Y.J. Wang, Dual mechanism for the inhibition of E2F binding to Rb by cyclin-dependent kinase-mediated Rb phosphorylation, *Mole. Cell. Biol.* 1997; 17: 5571-5783.
38. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* 1972; 23: 239-257.
39. Hanane Derradji and Sarah Baatout. Apoptosis: A Mechanism of Cell Suicide. *In Vivo.*2003; 17: 185-192.
40. Searle, J., Kerr J.F., and Bishop, C.J. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance, *Pathol Annu.* 1982; 17: 229-59.
41. Matsuda, H., Strebel, F. R., kaneko, T., Stephens, L. C., Danhauser, L.L., Jenkins, G. N., Toyota, N., and bull, J. M. Apoptosis and necrosis occurring during different stages of primary and metastatic

- tumor growth of a rat mammary adenocarcinoma, *Anticancer Res.* 1996; 16:1117-21.
42. Nicotera, P., Leist, M., and Ferrando-May, E. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death, *Biochem Soc Symp.* 1999; 66: 69-73.
  43. Plas DR and Thompson CBC: Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 3: 75-8.
  44. Zhang, J. H., and Xu, M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res.* 2000; 10: 205-11.
  45. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kiachkel FC, O'rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, BrezJD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, and Dixit VM: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/ CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-827.
  46. Parone PA, James D and Kroemer G: Mitochondria-regulating the inevitable. *Biochimie* 1994; 76: 665-676.
  47. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmertson R and Wang X: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86: 147-157.
  48. Vaux D and Korsmeyer SJ: Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245-254.
  49. Shi Y: Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002; 9: 3459-70.
  50. Leonhard, M., Gruber, P., Chott, P.A., Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutation Research* 2001; 488: 211-231.
  51. Zornig, M., Hueber, A.O., Evan, G., Apoptosis regulators and their role on tumorigenesis. *Biochemica et Biophysica Acta* 2001; 1551: F1-F37.
  52. McDonnell, T. J., Beham A., Sarkiss, M., Andersen M.M., and Lo, P. Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation, *Experientia.*

- 1996; 52: 1008-17.
53. Ibrabo, A. M., Huang, Y., Fang G., Liu, L., and Bhalla, K. Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells, *Cancer Res.* 1996; 56: 4743-8.
  54. Han, Z., Chatterjee, D., Early, J., Pantazis, P., Hendrickson, E., A., and Wyche, J. H. Isolation and characterization of an apoptosis-resistant variant of human leukemia HL-60 cells that has switched expression from Bcl-2 to Bcl-xL, *Cancer Res.* 1996; 56: 1621-8.
  55. Reed, J. C. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer chemoresistance, *Curr Opin Oncol.* 1995; 7: 541-6.
  56. Reed, J. C. Bcl-2 family proteins: regulators of chemoresistance in cancer, *Toxicol Lett.* 1995; 82-83: 155-8.
  57. A. Gross, J.M. McDonnell, Stanley J. Korsmeyer, Bcl-2 family members and mitochondria in apoptosis, *Genes Dev.* 1999; 13: 1899-1911.
  58. R. Eskes, S. Desagher, B. Antonsson, J. C. Martinou, Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondria membrane, *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20: 929-935.
  59. D.E. Wood, E.W. Newcomb, Cleavage of Bax enhances its cell death function, *Exp, Cell. Res.* 2000; 256: 375-382.
  60. M.G. Vander Heiden, C.B. Thompson, Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondria homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 1999; 1: E209-E216.
  61. L. Zhang, Yu, B.H. Park, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, Role of Bax in the apoptotic response to anticancer agents, *Science* 2000; 290: 989-992.
  62. Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance' radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res.* 1970; 30: 1174-1184.

63. DanΦ, K. *Biochim. Biophys. Acta.* 1973; 323: 466-483.
64. Chen, C., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M. and Roninson, I. B. *Cell* 1986; 47: 381-389.
65. Endicott, J. A. and Ling, V. *Annu. Rev. Biochem.* 1989; 58: 137-171.
66. Gottesman, M.M. and Pastan I. *Annu. Rev. Biochem.* 1993; 62: 385-427.
67. Wu Da-long, Huang Feng, Lu Huan-Zhang. Drug-resistant proteins in Breast cancer: Recent progress in Multidrug Resistance. *Chinese Journal of Cancer.* 2003; 22(4): 441-444.
68. G. J. R. Zaman, M. J. Hlans, M. R. Van Leusden, M. De Haas,. Etl. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pypm. *Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 8822-8826.
69. Lankelma, J., Spoelstra, E. C., Dekker, H. and Broxterman, H. J. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990; 1055: 217-222.
70. Cole, S. P. C., bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. V., and Deeley R. G. *Science* 1992; 258: 1650-1654.
71. Higgins, C. F. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1992; 8: 67-113.
72. Krishnamachary, H. and Center, M. S. *Cancer Res.* 1993; 53: 3658-3661.
73. Barrand, M. A., Heppell-Parton, A. C., Wright, K. A., Rabbits, P.H. and Twentyman, P. G. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994; 86: 110-117.
74. Sarzynkiewicz, Z., Bruno, S., del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., and traganos, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13: 795-808.
75. Garner, D. L. and Johnson, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Repord.* 1995; 57: 276-284.
76. Jaroszeski MJ, et al. Flow cytometry protocols. Humanan Press 1998; pp157-165.
77. Homo sapiens actin, beta(ACTB), Mrna. Gi | 5016088 | ref|

- NM-001101.2 | . Gene Bank number NM-001101
78. Florence V., Gael D., Jocelyn C., Brigitte D., and Jean-Pierre B.: p53-independent regulation of cyclin B1 in normal human fibroblasts during UV-induced G2-arrest, *Biology of the Cell*. 1999; 91: 665-674.
  79. Howard Wong and Karl Riabowal: Differential CDK-inhibitor gene Expression in aging human diploid fibroblast, *Experimental Gerontology*. 1996; 31: 311-325.
  80. Shinya Kato, Takami A., Kazuhisa S., Akio K. and Mitsuru A.: Evaluation of biological responses to polymeric biomaterials by RT-PCR analysis IV: study of c-myc, c-fos and p53 mRNA expression, *Biomaterials* 2000; 21: 521-527.
  81. Arpad Totth, Anna Sebestyén, Gabor Barna, Katalin Nagy, Antita Gondor, Jozsef Bocsi et al. TGF  $\beta$  1 induces caspase-dependent but death-receptor independent Apoptosis in lymphoid cells. *Anticancer Research* 2001; 21: 1207-1212.
  82. Homo sapiens, NF- $\kappa$ B. Gene Bank Accession: G65806
  83. Mayer R, Kartenbeck J, Buchler M, Jedlitschky G, Leier I and Keppler D: Expression of MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J Cell Biol*. 1995; 131: 137-150.
  84. Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJR, Bakker CTM, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P and Oude Elferink RPJ: Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance associated protein gene. *Science* 1996; 27: 1126-1128.
  85. 李建武等合編。生物化學實驗原理和方法。藝軒圖書出版社 1999; P114~146.
  86. Diahn-Warng Perng, Chung-Hua Chen, Yu-Chin Lee, Reury-Perng Perng. Cutaneous Metastasis of Lung Cancer: An Ominous Prognostic Sign. *Chin Med J (Taipei)* 1996; 57: 343-7.
  87. Bontenbal M, Sonneveld P, Foekens JA, Klijn JG. Oestradiol

- enhances doxorubicin uptake and cytotoxicity in human breast cancer cells (MCF-7). *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1988 ; 24(9): 1409-14.
88. Musgrove EA, Davison EA, Ormandy CJ. Role of the CDK Inhibitor p27 (Kip1) in Mammary Development and Carcinogenesis: Insights from Knockout Mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004 ;9(1): 55-66.
89. Musgrove EA, Davison EA, Ormandy CJ. Role of the CDK Inhibitor p27 (Kip1) in Mammary Development and Carcinogenesis: Insights from Knockout Mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004; 9(1): 55-66.
90. Chiu TH, Chen JC, Chung JG. N-acetyltransferase is involved in gypenosides-induced N-acetylation of 2-aminofluorene and DNA adduct formation in human cervix epidermoid carcinoma cells (Ca Ski). *In Vivo*. 2003; 17(3): 281-8.
91. N. Toshiyuki, Z. Hong, M. Nobuhiro, L. En, X. Jin., A. Y. Bruce, Y. Junying, Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ , *Nature* 2000; 403: 98-103.
92. Solange D, et al. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 369-377.
93. Van der Heiden, et al. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis. *Nat Cell Biol* 1999; 1: E209-E216.
94. Zhang L, et al. Role of Bax in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 2002; 90: 989-992.
95. Galcesen G, et al. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 10964-10967.
96. Barkett M, et al. Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. *J Biol Chem* 1997; 272: 29419-29422.
97. Reuther JY, et al. Apoptosis promotes a caspase-induced amino-terminal truncation of I $\kappa$ B $\alpha$ , that functions as a stable inhibitor of NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 1999; 274: 20664-20670
98. Aleyasin H, Cregan SP, Iyirhiaro G, O'Hare MJ, Callaghan SM, Slack

- RS, Park DS. Nuclear factor-(kappa)B modulates the p53 response in neurons exposed to DNA damage. *J Neurosci*. 2004 ;24(12):2963-73.
99. Yong J. Lee , Sandra S. Galpforo, Christine M. Berns, William P. Tong, Hyeong Reh C. Kim and Peter M. Corryl. Glucose deprivations-induced cytotoxicity in drug resistant human human breast carcinoma MCF-7/ADR cells: role of c-myc and bcl-2 in apoptotic cell death. *Journal of Cell Science* 1997; 110: 681-686.
100. Pastan I, Gottesman M. Multiple-drug resistance in human cancer. *N Engl J Med*, 1987; 316: 1688-1693.
101. Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 467-473.

## 自述

吾人出生於台北，民國六十九年十二月三十一日生，家上有父母與兩個弟妹，畢業於中國醫藥大學醫學研究所。在這兩年來的研究生生活中，很感激許多人對我的協助與鼓勵，使我踏上這研究的路途，並不感到孤獨，學習做研究的精神也徹底的潛移默化我的心靈，實驗磨練我的耐心，訓練我的獨立思考能力，更讓我培養不屈不撓、再挫再勇的意志力，所以剛開始前輩們總是說：做實驗沒什麼技巧，不過耐心罷了。設計實驗的過程也訓練我的思考能力與精益求精的精神。而這兩年下來，對我在學識上與穩定性情上，有非常大的幫助。所謂一日為師終身為父，在這之間，我的指導教授與共同指導教授，啟發了我許多的思想，讓我發現了另一片不同美麗的天空，而我也贏得了許多珍貴的友情，學長姐與同學們的激勵與協助，讓我在求學的路途上走的更順遂，更意外的獲得一段真摯的情感，而最後仍要感謝我的父母與弟妹，他們是我生命的原動力，讓我疲憊時有個溫暖的避風港，也是孕育我人格的溫床。我只能說，這兩年來，我活得很精采。

陳宜珊謹誌