

總目錄

頁次

| | |
|----------|------|
| 總目錄 | i |
| 圖目錄 | vi |
| 表目錄 | x |
| 致謝 | xi |
| 中文摘要 | xii |
| 英文摘要 | xiii |
| 第一章 前言 | 1 |
| 第二章 緒論 | 3 |
| 第一節 乳癌 | 3 |
| 壹 乳癌形成原因 | 4 |
| 貳 乳癌病理分類 | 4 |
| 參 乳癌的治療 | 5 |
| 一、手術治療 | 5 |
| 二、放射線治療 | 6 |
| 三、化學藥物治療 | 7 |
| 四、荷爾蒙治療 | 9 |

| | |
|--|----|
| 五、免疫療法----- | 10 |
| 第二節 細胞增殖與調控----- | 14 |
| 壹、細胞週期 (Cell Cycle)----- | 14 |
| 貳、影響細胞週期之蛋白和激? ----- | 16 |
| 一、Cyclins週期蛋白家族----- | 16 |
| 二、Cyclin-dependent kinases (CDKs) 週期蛋白依賴激? 家 族----- | 18 |
| 三、Cyclin-dependent kinase inhibitors(CDKI)週期蛋白依賴 抑制激? ----- | 19 |
| 四、細胞週期檢查點 (Cell cycle check points)----- | 20 |
| 五、細胞週期與各週期蛋白和激? 之間的關連性----- | 22 |
| 第三節 細胞凋亡(Apoptosis)----- | 24 |
| 壹、細胞凋亡時之分期----- | 24 |
| 貳、細胞凋亡時的生化變化與特徵----- | 24 |
| 一、DNA 降解----- | 24 |
| 二、細胞鈣離子濃度改變----- | 25 |
| 三、Caspases 蛋白水解? ----- | 25 |
| 參、細胞凋亡時之相關因素----- | 28 |

| | |
|---|----|
| 一、造成細胞凋亡的分子因素----- | 28 |
| 二、細胞凋亡的基因調節----- | 28 |
| 肆 乳癌與細胞週期與細胞凋亡的關係----- | 28 |
| 第四節 苦蕒(<i>Physalis angulata</i>)----- | 30 |
| 第三章 材料與方法----- | 34 |
| 第一節 實驗材料----- | 34 |
| 壹、藥品試劑----- | 34 |
| 貳、設備 器材----- | 37 |
| 第二節 實驗方法----- | 39 |
| 壹、藥物之萃取----- | 39 |
| 貳、冷凍細胞活化----- | 39 |
| 參、細胞冷凍保存----- | 40 |
| 肆、人類乳癌細胞培養----- | 40 |
| 伍、細胞數目計數及存活測試----- | 41 |
| 陸、檢測苦蕒萃取物對人類乳癌細胞株細胞增生的影響----- | 43 |
| 柒、利用倒立式位像差顯微鏡檢測檢測苦蕒萃取物對人類乳癌 癌細胞株細胞型態的影響----- | 45 |
| 捌、利用流式細胞儀檢測苦蕒萃取物對人類乳癌細胞株細胞週 | |

| | |
|---|----|
| 期的影響----- | 45 |
| 玖、 檢測苦蕒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----- | 47 |
| 拾、 利用流式細胞儀檢測是否會產生細胞凋亡的情形----- | 52 |
| 拾壹、 RNA 萃取----- | 53 |
| 拾貳、 Two-Step RT-PCR----- | 55 |
| 拾參、 DNA 跑膠----- | 57 |
| 拾肆、 數據分析----- | 59 |
| 第四章 結果----- | 60 |
| 第一節、 苦蕒萃取物對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株形態的影響 ----- | 60 |
| 第二節、 苦蕒萃取物對 MDA-MB 231 乳癌細胞株細胞增生的影響 ----- | 65 |
| 第三節、 苦蕒萃取物及抽取出對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株細 胞週期的影響----- | 67 |
| 第四節、 苦蕒萃取物對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株細胞內與細 胞週期相關蛋白質的影響----- | 78 |
| 第五節、 苦蕒萃取物對人類MDA-MB 231乳癌細胞株細胞內與細胞 週期相關mRNA的影響----- | 89 |

頁次

| | |
|---------------|----|
| 第五章 討論----- | 92 |
| 第六章 結論----- | 97 |
| 第七章 參考文獻----- | 99 |

圖目錄

| | 頁次 |
|--|----|
| 圖一、苦植植物----- | 31 |
| 圖二、Physalin L 之結構式----- | 31 |
| 圖三、MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理 12 小時，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態的改變。----- | 61 |
| 圖四、MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理 24 小時，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態的改變。----- | 62 |
| 圖五、MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理 48 小時，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態的改變。----- | 63 |
| 圖六、MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理 72 小時，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態的改變。----- | 64 |
| 圖七、利用流式細胞儀評估細胞增殖率不同濃度之苦蕓萃取物對 MDA-MB 231 乳癌細胞株處理 12、24、48 及 72 小時後觀察細胞增生的變化。----- | 66 |
| 圖八、MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理 12 小時，以流式細胞儀評估 MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的改變。----- | 69 |
| 圖九、MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的統計圖。MDA-MB 231 乳癌細 | |

胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理12小時，隨著濃度增加，
於300 $\mu\text{g/ml}$ 時發生G2/M phase arrest。-----70

圖十.MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理 24 小
時，以流式細胞儀評估 MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的改
變 -----71

圖十一.MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的統計圖。MDA-MB 231 乳癌
細胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理 24 小時，隨著濃度增
加，於300 $\mu\text{g/ml}$ 時發生G2/M phase arrest -----72

圖十二.MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理 48
小時，以流式細胞儀評估 MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的改
變 -----73

圖十三.MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的統計圖。MDA-MB 231 乳癌
細胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理 48 小時，隨著濃度增
加，於300 $\mu\text{g/ml}$ 時發生G2/M phase arrest -----74

圖十四.MDA-MB 231乳癌細胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理72小
時，以流式細胞儀評估MDA-MB 231乳癌細胞株週期的改變。
-----75

圖十五.MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的統計圖。MDA-MB 231 乳癌

| | |
|--|----|
| 細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物處理 72 小時，隨著濃度增加，於 300 $\mu\text{g/ml}$ 時發生 G2/M phase arrest ----- | 78 |
| 圖十六. MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物 Ethyl Acetate 層處理 72 小時，以流式細胞儀評估 MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的改變。----- | 77 |
| 圖十七. 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕨萃取物 24 小時後分析細胞中 Cyclin A 蛋白的相對表現量。----- | 81 |
| 圖十八. 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕨萃取物 24 小時後分析細胞中 Cyclin B1 蛋白的相對表現量。----- | 82 |
| 圖十九. 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕨萃取物 24 小時後分析細胞中 Cdk1 蛋白的相對表現量。----- | 85 |
| 圖二十. 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕨萃取物 24 小時後分析細胞中 P21 ^{Waf1/Cip1} 蛋白的相對表現量。----- | 84 |

圖二十一. 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 P27^{Kip1} 蛋白的相對表現量。-----85

圖二十二. 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Chk2 蛋白的相對表現量。-----86

圖二十三. 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Cdc25c 蛋白的相對表現量 β-actin 為 internal control -----87

圖二十四. 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Wee1 蛋白的相對表現量 β-actin 為 internal control -----88

圖二十五. 以 RT-PCR 分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Cyclin A mRNA 的相對表現量。-----90

圖二十六. 以 RT-PCR 分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Cyclin B1 mRNA 的相對表現量。β-actin 為 internal control -----91

表目錄

頁次

| | |
|----------------------|----|
| 表一、苦職於民俗醫療之利用情形----- | 32 |
|----------------------|----|

致 謝

由衷感謝吾師謝文聰博士及鍾景光教授在學業研究上的悉心指導，使本論文撰寫得以順利完成。文稿始成之初，承蒙各論文口試委員，撥冗審閱，大力斧正，提供諸多寶貴意見，使論文內容得以更臻完善，在此致上衷心的謝意。

回顧兩年研究期間，承蒙藥裡學科陳主任玉芳老師、蔡輝彥老師、林文川老師、張惠玲老師、吳介信老師、譚思濉老師、柯毅文先生、在研究和生活上的指導與關心。此外，感謝學長姐、潘俊旭、詹明哲、方焄蓮、陳宣嘉、陳厚志、陳怡叡、張恆源；同學宜珊、孟芹、詩晴、致芬、明鋒、思穎；助理睿麒、湘筠等在課業和實驗上的協助和砥礪；及學弟妹柔?、宏柏、仕杰、靜雯 等在生活上的鼓勵和幫助。

由衷感謝親愛的父母與哥哥於生活和精神上的支持和鼓勵，最後謹將此論文獻給所有關心、鼓勵和協助我的師長、同學和家人。

黃寬裕 謹致於

中國醫藥大學 醫學研究所

中華民國九十三年六月

中文摘要

苦蕒在台灣及世界其它國家常為草藥被使用，它曾用於治療糖尿病、肝癌、氣喘、及傷寒。再我們先期實驗中 *Physalis angulata* 發現抑制人類乳癌細胞增生及誘導細胞凋亡，再這研發中我們更進一步能發現 *Physalis angulata* 能降低 Cyclin A 濃度及 Cdc2 活性，減低 Cdc25c 而增加細胞週期蛋白抑制劑 p21^{waf1/cip1} 及 p27^{Kip1}，並能增加 Chk2 及 Wee1 的濃度。

從實驗結果看出 P.A 能經由三路徑產生細胞週期提止於 G2/M 期為(1)抑制 Cyclin A Cyclin B 的濃度(2)增加細胞週期蛋白抑制劑 p21^{waf1/cip1} 及 p27^{Kip1} 濃度(3)可能增加 Chk2 導致 Cdc25c 磷酸化，而使 Cdc2 減低，增加 Wee1 而使細胞分化週期停滯。

綜合實驗結果顯示，P.A 活化 Chk2 而抑制 Cdc25c，也可能活化細胞週期蛋白依賴抑制劑 p21^{waf1/cip1} 及 p27^{Kip1} 而導致乳癌細胞分裂停止於 G2/M。

英文摘要

Physalis angulata (PA) is employed in herbal medicine in Taiwan and some countries in the world. It was used to treat diabetes, hepatitis, asthma and malaria. In our preliminary study, we found that PA could inhibit the progression of proliferation and induce apoptosis in human breast cancer cells. In this study, we found that PA treatment decrease cyclin A level, decrease Cdc2 activity, increase Cdc2 phosphorylation, decrease Cdc25c and enhance the expression of the cell cycle inhibitor, p21^{waf1/cip1} and P27^{Kip} level. Furthermore, it increased both the levels of Chk2 and Wee1 kinase.

From these results, we conclude that PA arrests MDA-MB 231 cells at G2/M phase through (i) by inhibiting cyclin A level, cyclin B in high concentration of PA, and Cdc2 (ii) by increasing p21^{waf1/cip1} and P27^{Kip} levels, (iii) by increasing Chk2 causing a increasing Cdc25c phosphorylation/inactivation inducing a decrease in Cdc2 levels and an increase in Wee1 levels.

Taken together, these results suggest that the effect of *Physalis angulata* on the levels of phosphorylated/inactivated Cdc25C are mediated by Chk2 activation, at least in part, via p21^{waf1/cip1} and P27^{Kip} cyclin- dependent kinase inhibitors pathway to arrest cells at G2/M phase in breast cancer carcinoma .

第一章 前言

二十世紀之後，癌症成為人類危害健康之頭號殺手，西方國家女性乳癌的發生率，是所有癌症中的第一位⁽¹⁾。國內女性乳癌在十大癌症的發生率與死亡率分居第二位與第五位，發生率方面，但若扣除子宮原位癌，則乳癌發生率卻躍居女性十大癌症的首位。乳癌傳統以的外科手術切除、化學療法、放射療法或是賀爾蒙療法。目前最常被使用的藥物為 Tamoxifen⁽²⁾，副作用包含臉潮紅、陰道分泌物的增加、月經週期不規律及造成停經的現象。其它化學藥物可能造成血球細胞損傷時，則容易出現感染、出血、貧血、頭髮脫落、食慾差、噁心、嘔吐、腹瀉或口炎等症狀。目前治療皆面臨相當程度之瓶頸副作用。因此研發有效的治療藥物實為刻不容緩之要務。

本先期研究發現，苦蕒能有效抑制乳癌細胞株增殖及具促進細胞凋亡作用。雖苦蕒以往有文獻報導能抑制血癌⁽³⁾、子宮頸癌和肝癌⁽⁴⁾的發生，對於乳癌細胞尚無報導。為證實苦蕒對於抑制人類乳癌細胞，我們研究方向大致分為三階段，第一階段為以苦蕒對乳癌細胞株型態學變化為主的觀察乳癌細胞的生長及細胞毒性、DNA 破壞、染色體損害細胞形態的影響；第二階段為以流式細胞儀各項測試及分析，探討苦蕒對乳癌細胞株之細胞週期及細胞凋亡影響；第三階段為以西方點墨法及反轉錄聚合？鏈鎖反應，觀察苦蕒對乳癌細胞型態與

內部週期蛋白(cyclin)、週期蛋白依賴激酶(CDK)、週期蛋白依賴抑制劑(CDKI)及細胞週期檢查點(Check point)之各項相關因子於癌細胞週期分子生物學的變化。

所以本研想藉上述各階段的研究，更進一步探討苦蕒對乳癌癌細胞抑制的作用，希望能藉瞭解其對生長及分化的情況，以利開發抑癌新藥。

第二章 緒論

本先期研究發現台灣民間常見植物苦蕒 *Physalis angulata* 對 MDA-MB-231 及 MCF-7 乳癌細胞株具抑制細胞增殖作用，具有明顯影響細胞週期造成癌細胞株死亡及產生細胞凋亡作用並具劑量效價依存性。所以就這些範圍進一步論述，並更欲進一步進行分子細胞學研究，探討其其抗癌作用原理。

第一節 乳癌

西方國家女性乳癌的發生率，是所有癌症中的第一位，所以乳癌防制一直是西方國家的重要課題⁽⁵⁾。反觀國內女性乳癌的發生率，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，西方延後 5 年至 50 歲（行政院衛生署, 1999, 2001）⁽⁶⁾。根據行政院衛生署最新發佈的國人十大死因統計，民國 92 年癌症（惡性腫瘤）仍穩居寶座（行政院衛生署, 2003），高居不下；而乳癌在女性癌症（肺癌、肝癌、大腸直腸癌、乳癌、子宮頸癌）死因中，則高居第四；更驚心的是，乳癌自民國八十八年更躍居婦癌（乳癌、子宮頸癌、卵巢癌）死因的第一位，且有向上攀升、日漸年輕化的趨勢。另一方面，根據民國九十二年癌症登記資料，女性乳癌在十大癌症的發生率與死亡率分居第二位與第

五位，發生率方面，相較第一位的子宮頸癌，其發生率雖略低，但若扣除子宮原位癌，則乳癌發生率卻躍居女性十大癌症的首位（行政院衛生署, 2004）。更重要的是，中國女性在個體隱私較為保守，因此會延誤診斷時機，降低了早期發現，早期治療的功能。因此女性乳癌在國內公共衛生的防制上，就顯得格外重要。探討乳癌的形成原因，對乳癌防制在衛生政策上，可以提供必要的方針，另一方面，期望能降低乳癌的發生率。

壹、乳癌形成原因

癌症的形成，是環境因子及細胞生長過程所導致的基因變異，經長期累積下來的結果，乳癌也不例外⁽⁷⁾。目前對於乳癌發生的認識，可以將乳癌的複雜致病原因歸納為環境性因子（如社經地位、飲食習慣、乳房受放射線的輻射、口服避孕藥、地理分佈等）及個體性因子（如荷爾蒙失調、乳腺疾病、乳癌家族病史等），其中以乳癌家族病史為重要的危險因子⁽⁸⁾，顯示乳癌的發生與遺傳有十分密切的關係。

貳、乳癌病理分類

乳癌大致分為乳腺管道上皮 (mammary ductal epithelium) 或乳腺小葉 (mammary lobular) 的惡性腫瘤，然而其組織形態分佈又以來自乳腺管道的上皮癌為主，佔所有乳癌病例的百分之九十以上⁽⁹⁾。

原發性乳癌的病理分類或臨床分期對其治療方式及預後追蹤相當重要，乳癌的病理分類最常用世界衛生組織 (World Health Organization) 於1981 年所提乳房腫瘤分類標準，由表一可知，乳癌分為非侵襲性 (non-invasive)、侵襲性 (invasive) 上皮癌及來自乳頭的Paget 疾病。

參、乳癌的治療

將乳癌的治療，手術切除是主要的方法，然後再接受放射治療、化學藥物治療、賀爾蒙治療或免疫治療等。⁽¹⁰⁾

一、手術治療

將癌細胞開刀拿掉，手術切除是主要的方法，並且會切除大部份腋下淋巴結以便確定是否有轉移。手術的方式會因不同的狀況有不同的處理方法。若腫瘤小，則可做腫瘤切除或者利用近代新發展的乳房保留術，即部份乳房切除，然後再接受放射治療的方法，不但可保存乳房的外觀，並且治療效果與預後接近於完全乳房切除。外科切除術雖可遏止癌細胞擴散，但不是每名乳癌患者也適合採用，手術前醫生會衡量腫瘤的大小、位置、性質和擴散程度，再評估病人的整體健康情況和個人意願，才決定手術的性質及治療方法。手術用於最早期的乳癌，會較為有成效。這些不適包括：

1. 緊繃感：接受乳房切除手術後，會有手術部位附近皮膚的緊繃感、患側手臂及肩膀的僵硬感，整體不適的感受。
2. 神經性的感覺不適：在手術過程中，會造成不同程度的表淺感覺神經傷害。可能會感受到胸壁、肩膀及手臂的麻痺和刺痛、觸電、麻木、針刺、沈重、燒灼等神經性的感覺不適及感覺異常。
3. 腫脹：手術中腋下淋巴結的移除將造成淋巴循環變差，有時因此會導致患側上肢的腫脹。
4. 活動之限制：由於手術切除乳房組織及肌肉，術後，可能感受整體活動的影響。如果感受到手術部位的胸壁緊崩感，患側上肢無力，以及暫時性的日常生活功能障礙，這些都要藉復健運動來恢復，加以自我訓練。

二、放射線治療

放射線是一種電磁波，放射線治療可縮小腫瘤或在手術後摧毀可能殘餘的癌細胞。副作用較不明顯，出現時間多為治療二週後。

1. 疲倦感：治療的過程中，最常見的副作用為疲倦感，尤其在治療最後的數週最為明顯。

2. 局部皮膚反應：照射部位的皮膚於治療中也會有發紅、乾燥、敏感及發癢的現象。在治療後期皮膚甚至會變得潮濕，且容易脫屑的情形，嚴重時甚至造成局部的皮膚受損。
3. 骨髓抑制：放射治療所引起的白血球下降使抵抗力變差。

三、化學藥物治療

化學治療是使用一種或多種藥物，阻止癌細胞生長和繁殖能力。癌症的化學治療能以口服方式來進行的藥品非常少，這是因為口服給藥途徑牽涉到複雜的腸胃吸收、藥物本身的物化性質，或是藥品在病人個體之藥動學表現差異，所以不容易得到穩定一致的效果，因此，絕大部分的化學治療藥物皆以靜脈注射為主要的投與方式。

但新近開發了一種口服化學藥品 - Capecitabine (Xeloda)⁽¹¹⁾，是一種具選擇性的腫瘤活化型的藥品。Capecitabine 為 5 - FU 的前驅藥，對乳癌、大腸直腸癌、胃癌等具有活性。口服後在胃腸道以原型吸收，在肝臟先代謝成 5 - dFCR 後，再度於肝臟與腫瘤組織內被第二個？代謝成 5 - dFUR，最後才轉化為 5 - FU，而最後這一轉化步驟的決定？主要存在於腫瘤組織內，因此，由於這種對活化底地點的選擇性，使全身其他正常組織產生的有效藥品濃度低，而腫瘤細胞濃度高，造成直接殺死腫瘤，減輕全身其他系統的毒性。

根據美國及加拿大多所醫學中心的研究結果顯示，在接受多次化學治療及荷爾蒙治療失敗後的乳癌病人，甚至包括曾經接受太平洋紫杉醇 - Taxol 治療，而疾病仍然惡化的病人，如果給予 Capecitabine 2510 mg/m²/day，分兩次服用，口服 14 天，休息 7 天，依據第二期及第三期毒性來調整劑量，結果有百分之二十的病人可得到完全的反應或部分反應；百分之四十的人病情穩定，平均反應期的中數值可長達兩百四十天，整體的中位存活期為三百八十天，如果病情持續惡化的病人，存活期中數不長，但對於治療結果有反應或病情穩定的病人的存活則可延長，由此可知，即使病情穩定的病人也應能得到存活的好處

Capecitabine 最常見的副作用為「手足症候群」，第一級為無痛性的紅斑與紅腫，不會干擾日常活動；第二級為疼痛性紅斑與腫脹，會引起稍許不適，影響日常活動；第三級為潮濕性脫皮、潰瘍、起泡，嚴重疼痛，重度不適，無法從事日常活動。在建議劑量治療下，出現副作用三、四級的病人約佔百分之二十，有百分之七的病人因副作用而停藥，百分之十的人需要住院處理副作用，但是並沒有與治療相關的死亡報告。這些現象和持續注射 5 - FU 相同，出現二級副作用以上時需調整劑量。此外，Capecitabine 並沒有引起明顯的掉頭髮等副作用，其他如第三或四級的白血球減少，腹瀉、口炎、噁心、嘔吐等發生率約在百分之十左右。

一般而言，化學藥物也會使生長較快的正常細胞受到損害，這些細胞包括了：血球細胞、頭髮的毛細胞、及消化道內膜的細胞。血球細胞的功能為對抗感染、幫助血液凝固、與攜帶氧氣到身體的各個部位，因此當化學藥物造成血球細胞損傷時，則容易出現感染、出血及貧血的症狀，當頭髮的毛細胞受到損傷時，容易出現頭髮脫落。當消化道內膜細胞受到損傷時，則容易產生食慾差、噁心、嘔吐、腹瀉或口炎等症狀。

以目前的化學治療方式，極少會產生長期的副作用，像是影響心臟的功能，或影響卵巢的功能，其中若卵巢無法製造荷爾蒙時，則會產生類似停經後的症狀如臉潮紅及陰道乾燥，某些藥物可能會使女性月經週期變的不規律，甚至可能會造成永久性的不孕。

四、荷爾蒙治療

乳癌和荷爾蒙的變化有密切的關係，而它的治療方向就是減少體內女性荷爾蒙的量或阻斷其作用。目前荷爾蒙療法對乳癌約有三分之一的病患受惠。如果切除的腫瘤細胞中雌激素受體 (ER) 或孕激素受體會 (PgR) 含量高，荷爾蒙治療就有效，可以用相應的荷爾蒙去對抗癌細胞。反之，如果腫瘤細胞中荷爾蒙受體含量低的話，荷爾蒙的治療效果就較差。

目前最常被使用的荷爾蒙藥物為 Tamoxifen⁽¹²⁾，其作用是阻斷動

情素被癌細胞所運用的功能，副作用包含臉潮紅、陰道分泌物的增加、月經週期不規律及造成停經的現象，Tamoxifen 所產生的嚴重副作用是非常少見的，但仍有少數的報告會造成下肢的靜脈血栓及子宮內膜癌。停經前及停經後 ER (+) 的轉移性乳癌病人，選擇荷爾蒙治療時，大多會考慮先使用 Tamoxifen，除非 Tamoxifen 無效，才會考慮較後線的藥物，如：megestrol acetate⁽¹³⁾、aromatase inhibitors⁽¹³⁾。

五、免疫療法

一個腫瘤細胞不論其為誘發者或由其他動物移植者，細胞表現結構對宿主而言都是異物。對有健全免疫力之宿主而言，一定會產生反應而試圖消滅異常細胞。這種腫瘤細胞在同品種動物 (inbred) 實驗中，被發現具有特異性之腫瘤相關抗原 (tumor associated antigens, TAA)⁽¹⁴⁾。這種高度特異化的抗原，打入適當之宿主時可以誘導產生積極的特異性免疫反應，隨致癌源之異同而有不同之特性，此便是腫瘤主動免疫的基本原理。即使發生在同品種的老鼠身上而且腫瘤病理相同，但是化學或物理致癌源引起之 TAA 的性質殊異、無通性。而以病毒等生物性致癌源產生不同病理的肉瘤，卻擁有相同之 TAA；這提供科學家研發通性防癌疫苗的可能性。

但人類自然長出的癌症 TAA 到現在都沒有被確實的分離出；而且這些自然發生的人類癌症細胞抗原性都相當的弱，不易引發免疫反應；而這些具有共通性的腫瘤抗原不僅表現在腫瘤細胞上，也同樣出現在幹細胞上；我們深知幹細胞對身體十分重要，因此利用這些抗原來預防癌症便顯得十分危險。根據免疫理論，疫苗若要有效，必須在腫瘤發生前引入；只有在極少的情況下才能以免疫方法治療「已長成的腫瘤」。

目前主動免疫應用在癌症上，最好的例子應該是 B 細胞淋巴癌。導致 B 細胞淋巴癌的元兇是 EB 病毒。1958 年由英國醫生 D. Burkitt 發現這種特殊之淋巴瘤，1964 年 Epstein 在這些淋巴瘤組織中發現這種類似？疹病毒的正 20 面體病毒，故稱 EB 病毒 (EBV)。它是一種 DNA 病毒，只有在 B 淋巴球上才會生長；當它感染 B 淋巴球後會造成 B 淋巴球不死化 (immortalization)，引發鼻咽癌及下顎腫瘤。

治療的方法是利用單株抗體來製造以腫瘤專一性抗原為目標的抗體，此法端賴腫瘤細胞表面抗原的確認。單株抗體係由健康 B 細胞在自然狀態或者人工體系產生的單一種類的抗體，目前皆由人工生產，始能掌握其均一抗體都有已知的特性，來與特定的抗原作用。目前 EBV 疫苗的使用僅對接受免疫抑制治療的移植接受者較為有效；

由於腫瘤基因的不穩定性使腫瘤易出現變異種，往往使得中期的腫瘤不再與抗體結合，造成疫苗免疫失效。

利用人類化的單株抗體治療乳癌藥物是 Trastuzumab (Herceptin)⁽¹⁵⁾。配合傳統的化學治療來治療乳癌，已獲得初步的成功。一個命名為 Her/2 的基因，與其所製造出的蛋白質能夠在腫瘤細胞膜表面形成一個細胞內外相溝通的管道，當癌細胞接受到某些生長因子的刺激時，可經由此處將訊息傳達入細胞內，以促成腫瘤細胞生長及複製，因而也大幅提昇腫瘤細胞的侵襲性及惡性度。科學家已經能夠用精確的檢驗方式查出這種名為 Her/2 的基因或蛋白接受體，是否過度地在癌細胞內表現，因此可以使用針對此蛋白的免疫抗體療法，來對抗 Her/2 細胞表面蛋白接受體與生長激素的結合，設法阻斷一系列的細胞內的變化，達到抑制腫瘤的生長的目的。此 Her/2 蛋白不僅限存在於乳癌細胞，其他如肺癌、大腸癌、胃癌等諸多癌症細胞皆可發現它的蹤跡。以乳癌為例，約百分之三十的病人，存在此 Her/2 的基因或蛋白接受體，在檢驗時呈現陽性，因此預期可以藉由此種治療得到好處，但是陰性的病人則不適用此種治療。

已知幾個大型的臨床實驗，針對標準治療藥品產生抗藥性的轉移性乳癌病人，單獨使用 Herceptin 便有百分之十六的反應率，中位存

活期可達約十三個月。大規模的第三階段藥品臨床研究也證實，接受化學治療加上 Herceptin，比另一組只接受化學治療的乳癌病人，出現更高的臨床反應率（48%：32%），疾病緩解的時間從 4.6 個月延長到 7.6 個月。唯一令人擔心的是心臟毒性在 Herceptin 與化療合併組比單獨化療組要高，原因不明。使用 Rituximab 單株抗體與 CD20 結合造成淋巴細胞凋亡 (apoptosis)，以治療非霍奇金氏 B 細胞淋巴瘤。以樹突細胞 (dendritic cell) 疫苗治療目前亦被普遍採用，樹突細胞分布於全身，可自末梢血管血液中用白血球分離機分出；樹突細胞是極有效的抗原呈現者，在體外可用來接合腫瘤溶解產物或純化的腫瘤抗原，再帶入癌症病患體內以活化免疫反應而達到治療的效果，在臨床上已發表的有應用在淋巴瘤、黑色素瘤、大腸直腸癌、腦神經腫瘤等等。

未來的展望是以提高腫瘤的免疫原性 (immunogenicity) 給予癌症治療的希望。熱休克蛋白是一種具有細胞內陪伴蛋白 (chaperon) 作用的抗原性胜？，當它被分離時必同時帶出與其結合之胜？；所以利用腫瘤細胞中的熱休克蛋白作為疫苗的成分，即使我們不了解腫瘤排斥抗原的特性，也可以製造疫苗。免疫療法是採免疫抗體療法 (Herceptin) 與紫杉醇合併使用，已經有報告顯示此種治療有不錯的療效。治療副作用積極的癌症的治療的過程中，除了會殺滅掉癌細胞

外，正常健康的細胞與組織同時也會受到傷害，因而產生了副作用。但這些副作用種類及嚴重度會因人而異，甚至會隨著療程而有所不同。

第二節 細胞增殖與調控

人體各種細胞皆由幹細胞 (stem cell) 分化到完整的真核細胞，這些真核細胞 (eukaryotic cell) 不是處於有絲分裂就是停止在休眠狀態。當細胞接受了生長因子的刺激後，便會推動整個細胞週期的進行。

壹、細胞週期 (Cell Cycle)

在正常細胞的生長過程中，DNA 的套數會由 $2N$ 變為 $4N$ ，然後細胞由一分為二。在這整個過程中，大致可區分為四個時期，分別為：G₀/G₁ 期 (Gap 1 phase)、S 期 (DNA synthesis phase)、G₂ 期 (Gap 2 phase)、M 期 (Mitotic phase) 等，細胞經由 G₀/G₁ 時期進入 S 期，然後開始進行 DNA 的複製，接著進入 G₂ 時期，最後進入可使細胞分裂成子細胞 (daughter cell) 的 M 時期，才算是結束一整個細胞週期的進行⁽¹⁶⁾。大致而言，我們可將複雜的細胞增殖現象分為 Inter phase (G₀, G₁, S phase, G₂) 及 M phase⁽¹⁷⁾。這個過程稱為細胞週期。

Gap 0 (G₀)：細胞處於休眠期，可能為暫時性或永久性的停止

生長，若細胞以發展到最後階段便不再生長。（如神經細胞；neuron）當細胞處在屬於停滯期的 G0 期時，細胞內包括 mRNA 的生成，蛋白質的製造等，都會減到最小的產量。

Gap 1 (G1)：當細胞接受了生長因子的刺激後，便會推動整個細胞週期的進行⁽¹⁸⁾。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。

Synthesis (S) phase：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 (G2)：DNA 複製到有絲分裂的期間，細胞會持續生長並產生新的蛋白質。

Mitosis (M) phase：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。

而其中G1及G2期各含有檢查點 (check point)，以每次進入S期或M期檢查是否一切準備就緒，才可以接著進行DNA的合成或是細胞分裂作用。在文獻中指出，當DNA受損時，週期便無法通過檢查哨而停下 (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⁽¹⁹⁾。

貳、影響細胞週期之蛋白和激酶？

在真核細胞中，為了維持整個細胞週期的正常運轉，細胞內會利用許多不同的蛋白，形成許多不同的複合體，來掌控細胞週期的正常運行。細胞週期的進行可被許多的蛋白激酶複合體 (Protein kinase complex) 所調控，而這類的蛋白複合體是由細胞週期素 (Cyclin) 和細胞週期激酶 (Cyclin-dependent kinase, CDK) 所組成；當二者結合在一起時，會在特殊位置產生磷酸化，藉由連續的訊息，經過活化，與隨後一系列特殊的Cyclin-CDK (Cyclin-CDK complex) 的活化與否來調控細胞週期進行，讓細胞增生，然後達到活化的目的⁽²⁰⁾。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) 也會促使CDK的抑制者來負向調控細胞週期的進行⁽²¹⁾。CDK在細胞週期的進行中，會常態性的表現，而Cyclin則會受到Cyclin gene 的活化，或是Ubiquitin 的水解作用所調控⁽²²⁾。

Cyclin-CDK複合物的活化是經由多層次的調控，包含：

- (1) Cyclin 蛋白的表現 (induction) 並與 CDK 結合⁽²³⁾
- (2) CDK 被 CAK (Cyclin-activation kinase) 磷酸化⁽²⁴⁾
- (3) 合成可抑制 CDK 的蛋白 (CDK-inhibitory proteins) 的調控⁽²⁵⁾。

一、Cyclins 週期蛋白家族

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，他們在 N-端與 CDKs 鍵結的地方都具有約 150 個胺基酸的相同區域，稱之為 cyclin-box⁽²⁶⁾。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⁽²⁷⁾。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⁽²⁸⁾。而 Cyclin H 則會和 CDK 7 形成一具有活性的複合物，進而活化 cdc 2 (CDK1) 及 CDK2⁽²⁹⁾。

(一) **Cyclin A**；Cyclin A 在細胞週期的 G₂/S 期出現⁽³⁰⁾。它目前較為了解的功能，是促進 DNA 複製或中心體複製⁽³¹⁾，所以它與 cyclin B 一起被稱為 mitotic cyclin。然而現今對 cyclin A 的研究仍稍嫌不足，所以在功能方面，仍需更多研究加以闡述。

(二) **Cyclin B** 細胞週期進行至 G₂/M，B 型態的 cyclin 會作用在此間期，它與 cdc2 複合成 maturation-promoting factor (MPF)，啟始了染色體凝集、核膜破裂與紡垂絲形成的機制，進而引導染色體在子細胞作均等的分裂。

(三) **Cyclin D** 分為 D1、D2 及 D3 三種基因序列相似的蛋白，他們經由生長因子 (mitogen) 的作用，在短時間內濃度突然增高，進行細胞週期的啟動。所以有研究指出，他們是細胞內與細胞外生長環

境溝通的橋樑⁽³²⁾。一般而言，cyclin D1 是促使細胞由G₀期進入G₁期的因子⁽³³⁾，D2 與D3 則具有組織專一性 (tissue specificity)，較常在T 細胞型態的白血球出現，其他組織例如乳癌組織則較少或沒有表現⁽³⁴⁾。他們分別會與cdk4 或cdk6 形成複合物，促進細胞經由G₀期進入G₁期，進行細胞生長。

(四) Cyclin E 則與cdk2 作用，會磷酸化RB1 蛋白，促使E2F 蛋白釋放，執行由G₁期轉入S 期作DNA 複製的功能⁽³⁵⁾。cyclin E 會因本身調節機制或經由E2F、TGF-β 的誘導而在G₁/S 增高濃度⁽³⁶⁾，之後作用在細胞週期其他基因上，以促使細胞週期持續進行⁽³⁷⁾，現有研究發現，cyclin E 也作用於中心體的複製功能⁽³⁸⁾。

二、Cyclin-dependent kinases (CDKs) 週期蛋白依賴激酶 家族

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⁽³⁹⁻⁴⁰⁾。cdc2 主要存在 S、G₂ 以及 M 時期，並與 Cyclin A 及 B 結合⁽⁴¹⁾。

三、Cyclin-dependent kinase inhibitors(CDKI)週期蛋白依賴抑制激?

Cyclin-dependent kinases (CDKs) 是一群蛋白激酶。在細胞週期中，除了上述 Cyclin 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 kinase inhibitors (CDKI) ⁽⁴²⁾。根據目前研究得知，CDKIs 分為兩類，它們各有不同功能。

第一類為 Kip/Cip family，包含三種分子結構相似的蛋白，即 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⁽⁴³⁻⁴⁴⁾，作用可抑制大部份 cyclin-cdk 的複合物，阻斷這些複合物去磷酸化其下游分子。

第二類為 INK4 的蛋白分子，主要成員有 p14^(INK4B)，p16^(INK4A)，p18^(INK4C) 以及 p19^(INK4D) ⁽⁴⁵⁾，其功能為抑制 Cyclin D/CDK4 與 Cyclin D/CDK6 而達 G1 時期的控制。相對於 Kip/Cip family 分子的作用機制，這類分子只抑制 cyclin D-Cdk 的作用。CKIs 表現的調節機制與 cyclin 很相似，它們也會經由外部的訊息傳達或內部分子的作用而調節。例如 p21^(CIP1/WAF1/SDI1) 會因細胞遺傳物質受損傷，經由 p53 基因誘導，被重新釋放在細胞中，作為停止細胞週

期以修復受損傷的基因組⁽⁴⁶⁾。p27^(KIP1) 基因會因細胞生長接觸而誘導，停止細胞週期，間接抑制細胞再持續生長⁽⁴⁷⁾。

四、細胞週期檢查點 (Cell cycle check points)

當細胞遭受到一些外在壓力時，會活化某些機制來抑制細胞週期的進行，以便於細胞進行修補的工作，這些機制稱為細胞週期關卡 (Cell cycle checkpoints)⁽⁴⁸⁾，當細胞無法進行適當的修補時，便會走向凋亡之路徑。在整個細胞週期中存在著三個重要的Checkpoints，分別為G1-S Checkpoint、G2 Checkpoint 和Mitotic spindle checkpoint，分述如下：

(一)、 G1-S Checkpoint

這一個時期的停滯，主要由CDK inhibitors (CDKIs) 來負責，CDKIs 主要的功能在於抑制G1 時期的Cyclin-CDK 活性，來達到週期停滯的目的。目前知道CDKI 可分為兩個族群：INK4 inhibitors 和 Cip/Kip inhibitors⁽²⁰⁾。INK4 家族，如：p16INK4A、p15INK4B，會特異性的抑制CDK4、CDK6 的活化，來引發不經由p53 路徑的G1 時期停滯。Cip/Kip 家族，如：p21^{Waf1/Cip1}、p27^{Kip1}，對於所有細胞週期的CDK 都有抑制性，會受到p53 腫瘤抑制蛋白 (tumor suppressor protein) 的調控⁽²⁰⁾。而不管是INK4 家族或是Cip/Kip 家族，最後都是經由抑制CDK 對Rb 的磷酸化，來造成G1時期的停滯⁽⁴⁹⁾。

(二)、 G2 Checkpoint

DNA 受到傷害時，細胞內會啟動ATM (ataxia telangiectasia mutated) /ATR (ATM and Rad3-related) 路徑，來造成G2 時期的停滯⁽⁵⁰⁾。ATM/ATR 分別會使Chk2 (checkpoint kinase 2) /Chk1 (checkpoint kinase 1) 磷酸化轉為活化態；而活化態的Chk2/Chk1，則會磷酸化CDC25C 上的14-3-3 結合位：serine 216⁽⁵¹⁾。當CDC25C上14-3-3 結合位被磷酸化時，便會吸引14-3-3 與CDC25C 結合，而使CDC25C 滯留在細胞質中，然後CDC2 的活化被抑制，造成G2 時期的停滯。另外，ATM/ATR 也會造成p53 路徑的活化：p53 會造成14-3-3s和p21 的表現量上升，14-3-3 會使CDC2 停留在細胞質中，而使G2 時期的進行中斷⁽⁵²⁾；而p21 則是藉由抑制Cyclin B/CDC2 複合體的活性來阻止G2 時期運行。另有文獻指出，p21 也會阻斷CDC25C 與PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 之間的交互作用，來達到造成G2 時期停滯的目的⁽⁵³⁾。

(三)、 Mitotic spindle checkpoint

這個關卡主要是在掌控微小管在分裂時期的動作。當染色體以錯誤的方式排列在赤道板上，此時微小管的動作會中斷，無法與染色體上的動粒 (kinetochore) 結合，這個機制便會啟動，使細胞分裂中斷。這個關卡的作用蛋白包含了：BUB1、BUB3、BUBR1 和MAD2，其

中BUBR1 和MAD2 會直接與APC 結合，並抑制APC 的作用，使得細胞無法進入anaphase；而BUB1 和BUB3 則是在微小管動作中斷後，造成分裂期停滯 (mitotic arrest) 的主因⁽⁵⁴⁾。

五、細胞週期與各週期蛋白和激酶之間的關連性

在G1時期主要由Cyclin D-CDK4、Cyclin D-CDK6、Cyclin E-CDK2、Cyclin A-CDK2 這幾個複合體所調控。在G1 時期初期，Cyclin D-CDK4 、Cyclin D-CDK6 這兩個複合體會先對Rb (retinoblastoma protein) 蛋白產生部份的磷酸化，然後使得Cyclin E-CDK2 被製造出來，進而使Rb 產生完全的磷酸化。此時，被未磷酸化態Rb 所抓住的轉錄因子E2F 便會完全釋放出來，啟始DNA 開始製造出進入S 時期所需的蛋白⁽⁴⁹⁾。

而在G2/M 時期，則是由Cyclin B-CDC2 (CDK1) 來調控。CDC2 與Cyclin B 結合後，形成一稱為M-phase promoting factor (MPF) 的複合體，受到CAK (CDK-activating kinase) 在Thr-161 的位置磷酸化後，會形成有活性的複合體⁽⁵⁵⁾，此時Wee-1 和Myt-1這兩個激酶會在CDC2 的Thr-14 和Tyr-15 的抑制位置上，產生磷酸化使其失去活性。

沒有活性的Cyclin B-CDC2 複合體會在G2 時期開始累積，在將進入M 時期時，去磷酸酶CDC25C 會將CDC2 上，抑制位的磷酸化

去除，使其轉為活化態，此時Cyclin B/CDC2 複合體會將一些相關蛋白磷酸化，如Lamin 的磷酸化造成核膜崩解、Histone H1 的磷酸化造成DNA 結構鬆開、Kinesin 的磷酸化造成微小管運動等，而使細胞開始進入M時期⁽⁵⁶⁾。

當細胞在M 時期末期時，Cyclin B 會被anaphase-promoting complex (APC) 所引發的蛋白水解作用所水解，同時CDC2 也轉為不活化的形態，此時細胞便離開M 時期⁽²²⁾。

另外RB1 蛋白則是整個細胞週期的主宰，它控制細胞分裂與分化⁽⁵⁷⁾。當細胞處在細胞週期G0/G1、不生長的細胞或分化完成的細胞，RB1 蛋白是呈現無功能狀態。RB1 未被磷酸化前，細胞轉錄因子E2F 蛋白會與RB1 結合在一起，經由cyclin- cdk 作用，RB1 才會被磷酸化 (phosphorylation)，被磷酸化的RB1 蛋白會釋放細胞轉錄因子E2F，作用在其他基因的轉錄，進行細胞生長。研究顯示*RB1* 基因也對細胞週期進行抑制作用，限制DNA 在S 期的複製作用，進一步抑制細胞生長。近來亦有研究指出，RB1 蛋白對染色體分離 (chromosome segregation) 和chromatin⁽⁵⁸⁾ remodeling 佔有重要的角色，所以RB1 維持基因體穩定扮演很重要的角色，藉由 hsHec1p，Rb1 蛋白維持染色體分離的完整性，因此RB1蛋白功能若受抑制，則可能引起G1/S 或G2/M 機制異常⁽⁵⁹⁾。

第三節 細胞凋亡 (Apoptosis)

細胞凋亡 (apoptosis) 一詞最早是在 1972 年由病理學家 John Kerr 所提出⁽⁶⁰⁾，原本字面的意思是指樹葉凋落或掉落。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⁽⁶⁰⁾。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⁽⁶¹⁾。而在病理學上，也有一些疾病與細胞凋亡有關，例如阿茲海默症⁽⁶²⁻⁶³⁾。

壹、細胞凋亡時之分期

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)。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。

貳、細胞凋亡時的生化變化與特徵

一、DNA 降解

當細胞凋亡進入晚期時，細胞內的核酸內切酶會被活化而將 DNA 隨之分解，產生 180~200 bp 或其倍數的 DNA 片段。此時藉由 1.8% 的 agarose gel 進行電泳時，會出現特殊的梯形電泳帶。此為細胞凋亡時之明顯特徵⁽⁶⁴⁾。

二、細胞鈣離子濃度改變

細胞凋亡早期時可偵測到細胞內鈣離子濃度之上升⁽⁶⁵⁻⁶⁶⁾。若是在培養基中移除鈣離子或抑制鈣離子濃度上升時，細胞凋亡也會受到抑制。

三、Caspases 蛋白水解?

當細胞發生凋亡時，細胞內有一系列的蛋白水解酶 (Cysteine dependent aspartate specific protease) 會被活化，這些 Caspases 活化之後，會裂解其他細胞內的蛋白質，造成細胞形態之改變⁽⁶⁷⁾。Caspases 家族有許多成員，目前研究至少已經發現 14 種的 Caspases 存在。根據他們的同源性，可大致分為三類⁽⁶⁸⁾：

(一)、The ICE subfamily of cytokine processors

此類 Caspases 有 Caspase-1、-4、-5、-11、-12、-13、-14，此類 Caspases 的功能與發炎反應有較大的關係。

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

此類 Caspases 有 Caspase-2、-8、-9、-10，而此類 Caspases 的功

能，則負責活化 apoptotic executioners 使其能執行 apoptosis。此類 Caspase 在結構上，N 端具有較長的 prodomain，如：Caspase-8 Caspase -10，其 N 端 prodomain 具有兩個 death effector domain (DED)，來與下游的 adaptor molecule C 端的 DD domain 連結，以傳導來自 Death receptor pathway 的 death signals。而在 Caspase-9 上，則具有 CARD (Caspase recruitment domain) 位於 prodomain 上，此 CARD domain 可與 Apaf-1 上 N 端的 CARD 結合，傳導來自 mitochondria pathway 的 death signals。

(三)、The Ced-3/ CPP32 subfamily of apoptotic executioners

此類 Caspases 有 Caspase-3、-6、-7，而此類 Caspases 的功能則負責執行細胞凋亡，裂解其下游的 protein 如：Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)、DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) ... 等 protein 改變細胞原本作用。這類 Caspases 在其結構上，N 端的 prodomain 較短，能分解細胞內的蛋白質如：Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)，此蛋白質為 Caspase-3 的受質。而 PARP 其原本作用為修復受損的 DNA、調控細胞增殖與死亡的平衡、和維持基因體的穩定性。但當 PARP 受 Caspase-3 裂解，會由 116 kDa 被水解成 85kDa，進而失去原本的效用。又如：Caspase-3 裂解 ICAD/DFF45 導致其鍵結的 CAD 能脫離 ICAD 的束縛，進而 CAD 可轉移到細胞核

內分解 DNA，將 DNA 切成大約 180-200 bp 長度的片斷。

然而，上述三大類的 Caspases 均具有一些共同的特徵⁽⁶⁹⁾：(一)原本為單一無活性的 precursor proenzyme，活化後被切割形成大、小次單位，而形成四聚體模式，如：Caspase-8 其活化態為 (P20/P10)₂，其切割蛋白質的作用位置則是 Asp 之 C 端的肽鍵。(二)具有自身催化或相互激活的能力。(三)具有相似的催化部位 (catalytic site)，包括含有 active site cysteine 殘基的 QACXG sequence。

參、細胞凋亡時之相關因素

一、造成細胞凋亡的分子因素

能造成細胞凋亡的原因有許多種，其中包括放射線、高溫、具有毒性的抗癌藥物、自由基的傷害以及特殊抗體，例如能與 APO-1/FAS 抗原結合之抗體等等⁽⁷⁰⁾。

二、細胞凋亡的基因調節

細胞凋亡的過程受到許多基因的調控，分別敘述如下：

(一)、p53 基因

p53 基因是一種腫瘤抑制基因，其所轉錄的蛋白 p53 則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⁽⁷¹⁾。

但是當 DNA 受損太嚴重時，p53 則會促使細胞進入細胞凋亡。

(二)、Bcl 家族

Bcl 家族包括 Bcl-2、Bax、Bcl-xL、Bad 等，是一個與細胞凋亡有關的基因家族⁽⁷²⁾。Bcl-2 與 Bcl-xL 可以阻止細胞凋亡，造成腫瘤的發生⁽⁷³⁾。而 Bad、Bak、Bax 和 Bcl-Xs 則可以引發細胞凋亡⁽⁷⁴⁾。在正常情況下這兩類蛋白質之間維持一定的比率以調節細胞狀態⁽⁷⁵⁾，當 Bcl-2 的表現量高於 Bax 時，便會阻礙細胞凋亡的發生；相反的，若是 Bax 表現量大於 Bcl-2 時，細胞便進入凋亡狀態。

(三)、c-myc

c-myc 是一種原致癌因子 (proto-oncogene)，屬於 myc 家族中的一員⁽⁷⁶⁾。它是一種轉錄因子，可與 Max 結合形成 heterodimer，來調節下游基因的表現。直到目前為止，c-myc 與細胞凋亡之間的關係還不是很清楚。

(四)、APO-1/FAS

FAS 基因所轉錄的蛋白是一種跨膜蛋白，在許多正常細胞或腫瘤細胞表面都可以發現到它的存在⁽⁷⁷⁾。當 APO-1/FAS 與一些細胞激素或是抗體結合時，便會引發細胞的 apoptosis。

肆、乳癌與細胞週期與細胞凋亡的關係

在癌症研究中，這些細胞週期因子異常時常被發現⁽⁷⁸⁾，乳癌研

究也具有相似的發現⁽⁷⁹⁾。在cyclins 方面，其蛋白質都有過度表現情形，在RB1、 p21 與p27 方面，其蛋白質表現都較正常細胞為少或沒表現⁽⁸⁰⁾。根據上面說明，細胞週期因子在各間期都有個別的功能，所以當致癌基因或抑癌基因無法在各細胞間期適當調控，則導致細胞不斷增生，終致癌症產生⁽⁸¹⁾。

與乳癌有關的因子中，最常被研究提及的，就是cyclin D1 基因異常⁽⁸²⁾。在具有生長意義的致癌基因方面，由表2 可知，利用組織免疫染色法 (immunohistochemistry, IHC), cyclin D1 蛋白表現異常的比例分布在5-80%之間。研究個案數、抗體種類、呈色方法與判定方式，都是影響異常比例高低的原因。Cyclin E 表現異常比例與D-型態的分佈相似，它們同是細胞週期影響生長的重要因子⁽⁸³⁾。另一方面，在抑癌基因方面，p21 與p27 減少表現是常常發現的現象，雖然p27 基因偶爾會有相反的結果，其可能原因是p27 基因會與cyclin D1 基因有負迴饋機制 (feedback regulatory loops)，其意義指出，在某些細胞中某些促進生長的因子(例如cyclin D1)和抑制生長的因子(例如p27)間的表現量，會達到平衡，進而在細胞生長與抑制的功能也趨於平衡的情形。所以在乳癌組織中，常常觀察到cyclin D1 與p27，兩者蛋白質同時會有增多的情形。p27 有20-90% 個案沒有表現，或只有微量表現。P21 基因也有30-60% 蛋白質表現異常，然而這些比例的差異，

也是與研究個案數、抗體種類、呈色方法與判定方式有關係。

第四節 苦蕒 (*Physalis angulata*)

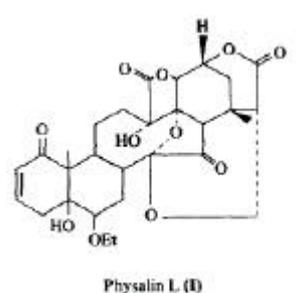
目前乳癌治療方式都有不少盲點及副作用的產生。近年來也漸漸發展出新型療法，能有效的減低副作用，但仍可殺死癌細胞並使得腫瘤縮小。也正由於目前臨床上使用的療法均有某些限制以致無法徹底毀滅癌症的機制。所以開發新的抗乳癌藥物也成了極重要的事情。從自然界中尋找是可行的辦法。美國藥化製藥工業如此發達的今日，大部份的藥仍然是從自然界中所發現，或是人工模仿自然界的產物。許多天然西藥都是植物的有效成分，治療卵巢癌和乳癌的太平洋紫杉醇 (Taxol)⁽⁸⁴⁾，天然植物藥對西醫的貢獻確實可稱之為人類的醫藥寶庫。本先期研究發現台灣民間常見植物苦蕒對乳癌細胞株具抑制細胞增殖作用，具有明顯影響細胞週期造成癌細胞株死亡及產生細胞凋亡作用並具劑量效價依存性。

苦蕒為茄科酸漿屬植物苦蕒 *Physalis angulata* L. [*Physalis pubescens acut. non* L.]⁽⁸⁵⁾，別名：炮仔燈、燈籠草、天泡子、天泡草、黃姑娘、小酸漿、樸樸草、打額泡。以根或全草入藥。苦蕒味苦，性寒。全草具清熱解毒，消腫利尿及祛風、止痛、鎮咳、行血、調經及解毒之效。主治：咽喉腫痛，腮腺炎，急慢性氣管炎，肺膿瘍，痢疾，

睪丸炎，小便不利；外用治膿泡瘡。苦蕒本身幾乎無毒性，民間常用以為清涼退火的涼茶。



圖一、苦蕒植物



圖二、Physalin L 之結構式

苦蕒莖葉含酸漿苦味素 (physalin) D、E、F、G、H、I、J、K、L，酸漿紅素 (physalien, $C_{72}H_{116}O_4$)⁽⁸⁶⁾。種子含脂肪油約 21%，油中含亞油酸 (約 75%) 及油酸 (約 12%)。「苦蕒」顧名思義，一定是很苦的青草，語云：「良藥苦口」，苦蕒的確是「涼性」的草藥，全草有清熱、利尿、鎮咳、行血、調經、解毒之功效，在台灣山區與民間草藥上，常被利用為青草茶，把苦蕒拔起洗淨曬乾後用溫火加紅糖煮 1-2 小時，在炎熱之夏天是很好之健康飲料。

苦蕒與酸漿為同屬不同種的植物，本草綱目中記載如何分辨苦蕒與酸漿，李時珍的注釋便認為「酸漿苦蕒，一種兩物也，但大者為酸漿，小者為苦蕒，以此為別」，根據現今植物學之分類，依“楊氏園藝植物大名典”之記載，茄科酸漿屬 (Physalis) 原產於暖帶及溫帶地區約有 100 種以上，大部分原產於美洲大陸，其中酸漿類有五種被園藝

利用外，尚有一種便是我們常可在鄉間甚至南美的熱帶雨林中發現的苦蕒。最近幾年，苦蕒在世界各國的藥用研究，苦蕒成分抗腫瘤活性，發現對五種人類腫瘤細胞株如肝癌、鼻咽癌、子宮頸癌、大腸癌及肺癌均有細胞毒性的反應⁽⁸⁷⁻⁸⁸⁾。

在美國農部的民俗植物資料庫內，酸漿屬共有 11 種具有醫藥用途，其中苦蕒之療效算是最廣泛的。根據統計，世界共有 15 國家與地區使用苦蕒（表一），而其對人體免疫功能的加強已被證實⁽⁸⁹⁾，但有許多民俗療法的藥用效果在臨床上並未獲得證實。苦蕒的萃出物對引發嗜眠性腦炎之布魯氏錐蟲具殺錐蟲效果⁽⁹⁰⁾。苦蕒抗菌效果也有效，苦蕒的萃出物對愛滋病人常感染之肺結核菌有顯著的抗病性⁽⁹¹⁾。

表一、苦蕒於民俗醫療之利用情形

| 國家 (或地區) | 民俗療效 |
|----------|---|
| 中 美 洲 | 防流產、淋病、瘧疾 |
| 哥倫比亞 | 抗炎、氣喘、消炎劑、麻醉劑、皮膚病 |
| 秘 魯 | 抗炎、氣喘、糖尿病、消炎、耳痛、肝炎、利肝、瘧疾、風濕、寄生蟲 |
| 巴 西 | 清潔、皮膚炎、利尿、小便困難、耳痛、退燒、風濕、鎮靜藥、皮膚病變、利膽、利腎、利肝、黃疸病 |
| 中 國 | 利尿劑、祛痰劑、退燒、助產 |
| 日 本 | 解毒、感冒、利尿、退燒、消腫、喉嚨痛 |
| 泰 國 | 癩、直腸 |
| 台 灣 | 退熱、利尿、肝炎、肝病、腫瘤 |
| 非 洲 | 殺菌、喉嚨痛 |
| 迦 納 | 退燒、胃痛、昏厥 |
| 海 地 | 利尿、退燒、水腫 |
| 千 里 達 | 防腐、退燒、消化不良、腎炎、直腸炎 |
| 蘇 利 南 | 利尿、淋病、黃疸、瘧疾、腎炎 |
| 上 伏 塔 | 止痛、痢疾、噁心、昏睡病 |
| 其他地區 | 助產、防流產、抗炎、治氣喘、糖尿病、痢疾、止血、眼炎、睪丸腫瘤、昏睡病 |

本先期研究發現苦蕒具有明顯影響細胞週期造成癌細胞株死亡及產生細胞凋亡作用。所以就這些範圍進一步進行分子細胞學研究，探討其其抗癌作用原理。

第三章 材料與方法

第一節 實驗材料

壹、藥品試劑

- [1]. DULBECCO'S MEM (1X) (購自 BIOCHROM AG)
- [2]. Fetal Bovine serum (購自 GIBCO)
- [3]. Penicillin-Streptomycin (購自 BIOCHROM AG)
- [4]. L-glutamine (購自 GIBCO)
- [5]. Dimethyl Sulfoxide (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]. PI (Propidium iodide; 購自 Sigma)
- [12]. RNase A (Ribonuclease A; 購自 CLONTECH)
- [13]. Triton X-100 (購自 Sigma)
- [14]. Ethanol (購自 TEDIA)
- [15]. APS (Ammonium persulfate; 購自 Amresco).

- [16]. Acrylamide/Bis 40% solution (ACRYL/BIS™29:1; 購自 Amresco)
- [17]. Bovine serum albumin (BSA; 購自 Merck)
- [18]. Glycine (購自 Amresco)
- [19]. Methanol (購自 TEDIA)
- [20]. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit ; 購自 Amersham)
- [21]. GelCodeR commassie blue (購自 PIERCE)
- [22]. Glycerol (購自 Scharlau)
- [23]. Hydrochloric acid (購自 Merck)
- [24]. Protein assay-Dye reagent concentrate (購自 Bio-Rad)
- [25]. Protein maker (購自 Femantas)
- [26]. SDS (Sodium dodecyl sulfate; 購自 Amresco)
- [27]. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine; 購自 Amresco)
- [28]. Tris (Tris (hydroxymethyl) -aminomethane; 購自 Amresco)
- [29]. Tween 20 (購自 Amresco)
- [30]. 脫脂奶粉 (克寧)
- [31]. 顯影劑 (購自 Kodak)
- [32]. 定影劑 (購自 Kodak)
- [33]. Super RX (購自 FUJIFILM)

- [34]. 10X BlueJuice (Gel loading buffer; 購自 Invitrogen)
- [35]. Agarose I (購自 Amresco)
- [36]. 核酸純化試劑組 (G-NOME DNA KIT; 購自 Bio101 Inc)
- [37]. 蛋白質萃取試劑 (PRO-PREP protein extraction solution;
購自 iNtRON Biotechnology)
- [38]. 5X TBE buffer (購自 Amresco)
- [39]. 10X SDS-PAGE running buffer (TG-SDS buffer; 購自
Amresco)
- [40]. TE buffer (購自 Amresco)
- [41]. 人類乳癌細胞株 (MAD-MB-231: human breast
adenocarcinoma; 購自新竹食品工業研究院)
- [42]. 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-actin (MAB1501; 購自 Chemicon)
 - (e). anti-p27^{Kip1} (MS-256-P0; 購自 NeoMarkers)
 - (f). anti-p21^{WAF1} (MS-891-P0; 購自 NeoMarkers)
 - (g). anti-cdc25c (cat[#]05-507;購自 Upstate)

(h). anti-wee1 (cat[#]06-972;購自 Upstate)

(i). anti-chk2 (cat[#]05-649;購自 Upstate)

[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)

貳、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 (購自季昶)

- [11]. Pipetment (購自 Costar)
- [12]. 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 323K (購自 Hermle); Avente 30TM (購自 Beckman)
- [26]. Eyela coolace
- [27]. Eyela N-11 rotary vacuum evaporator

第二節 實驗方法

壹、藥物之萃取

將十公斤乾苦蕒植物放於甲醇水浴桶中室溫浸漬三天/一次，將甲醇萃出液倒出，苦蕒再於甲醇水浴桶中室溫浸漬一次，再將甲醇萃出液倒出，苦蕒最後再於甲醇水浴桶中 70℃ 浸漬一次，再將甲醇萃出液倒出，合併甲醇萃出液於 Eyela rotary vacuum evaporator 於 50℃ 進行減壓濃縮，並經冷凍乾燥後，得 950 公克粗抽出物於 -30℃ 冷凍備用。

貳、冷凍細胞活化

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）。

步驟：將新鮮培養基置於 37℃ 水槽中回溫，回溫後噴以 70% 酒精並擦拭之，移入無菌操作台內。自液氮或乾冰容器中取出冷凍管，檢查蓋子是否旋緊，由於熱脹冷縮過程，此時蓋子易鬆掉。取出冷凍管，立即放入 37℃ 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。

參、 細胞冷凍保存

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 5~10 ml 小體積分裝, 4 避光保存, 勿作多次解凍。冷凍保存之細胞濃度: $5\sim 10 \times 10^6$ cells/ml。冷凍保護劑濃度為 10% DMSO。

步驟: 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 $1\sim 5 \times 10^6$ 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 10 分鐘 ? -20 30 分鐘 ? -80 16 18 小時 (或隔夜), 最後以液氮槽長期儲存。

肆、 人類乳癌細胞培養

無菌操作台使用前先讓其抽氣運轉 10 分鐘, 再以 70 % 酒精擦拭

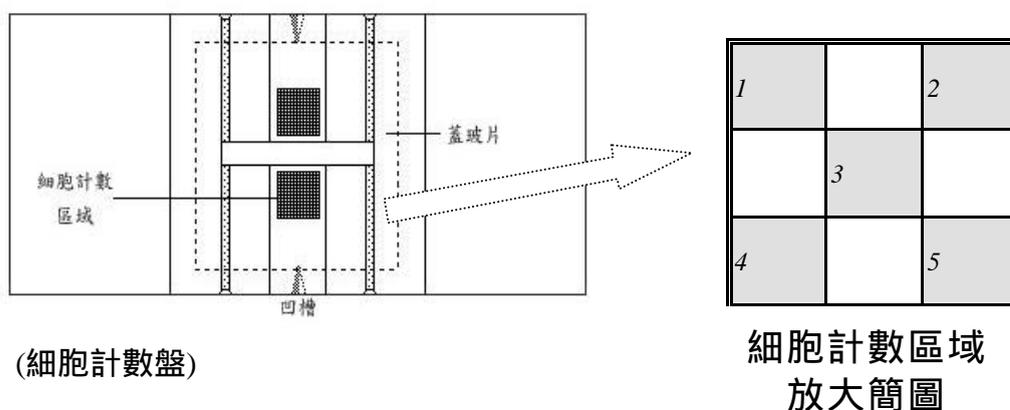
台面。所有進入無菌操作台的器物均需先噴灑 70 %酒精，有蓋容器旋開瓶蓋前均需先過火。培養基若使用量小，則盡量置於室溫下回溫，以避免 pH 值變化。

MDA-MB-231 培養在 10% FBS-DMEM 培養基中(含 10% fetal bovine serum、100 units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin、2 mM L-glutamine)，置於 37^oC、5%CO₂的 T75 方形培養盒於培養箱中培養。每二天更換 DMEM 培養基，當細胞約長九分滿則進行分盤，首先將舊培養基吸乾淨，再以 7 ml 1xPBS 緩衝液(pH=7.4)洗清一次，再加入 trypsin-EDTA 1 ml 約 2 分鐘，再加入 1 ml 10% FBS-DMEM 中斷 trypsin 作用，以抽吸方式將細胞沖散，再將培養瓶中細胞吸換到離心試管中再加入 10% FBS-DMEM 達 10 ml，取部分利用血球計數盤 (Hemocytometer) 計數細胞數目，其他以 1500 rpm 離心五分鐘，進行分盤培養。

伍、 細胞數目計數及存活測試

首先將舊培養基吸乾淨，再以 7 ml 1xPBS 緩衝液(pH=7.4)洗清一次，再加入 trypsin-EDTA 1 ml 約 2 分鐘，再加入 1 ml 10% FBS-DMEM 中斷 trypsin 分離細胞作用，以抽吸方式將細胞沖散，再將培養瓶中細胞吸換到離心試管中再加入 10% FBS-DMEM 達 10 ml，計算細胞數目是用血球計數盤，血球計數盤一般有二 chambers，

每個 chamber 中細刻 9 個 1 mm^2 大正方形，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 $1\text{ mm}^2 \times 0.1\text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4}\text{ ml}$ 。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。（如下圖所示）



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。

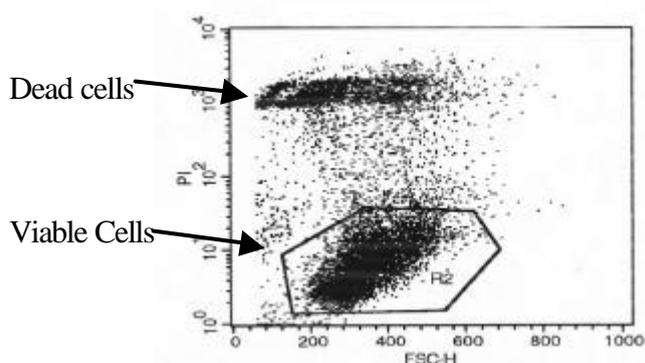
步驟：取 $50\ \mu\text{l}$ 細胞懸浮液與 $50\ \mu\text{l}$ trypan blue ($0.4\% \text{ w/v}$ trypan blue) 等體積混合均勻於 1.5 ml 小離心管中。取少許混合液(約 $15\ \mu\text{l}$) 自血球計數盤 chamber 上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於 100 倍倒立顯微鏡下觀察，活細胞不染色，死細胞則為藍色。計數四個大方格之細胞總數，再除 4，乘以稀釋倍數（至少乘以 2，因與 trypan blue 等體積混合），最後乘以 10^4 ，即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞數。若細胞位於線上，只計上線與右線之細胞（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。

陸、 檢測苦蕈萃取物對人類乳癌細胞株細胞增生的影響

一、 利用流式細胞儀計數存活的細胞數

利用流式細胞儀評估存活細胞數和存活率其原理如下：無論細胞是進行細胞壞死（Necrosis）或細胞凋亡（Apoptosis）的路徑，只要細胞死亡，其細胞膜就會失去完整性（membrane integrity）⁶⁶。Propidium iodide（PI）是一個核酸染劑，進行 PI 染色時，若細胞死亡，細胞膜破裂，PI 會進入細胞內和核酸結合。若細胞存活，細胞膜完整，PI 則無法和細胞內的核酸結合。PI 染色完成的細胞經由流式細胞儀 488 nm 的雷射光激發後，若死亡的細胞會有較高的紅色螢光，而存活的細胞則有較弱的紅色螢光⁶⁷。再用 Cell Quest 軟體分析細胞增殖率。（如下圖所示）



細胞增殖率以下列公式計算：

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

實驗組：乳癌細胞加入待測的苦蕓萃取物

對照組：乳癌細胞加入待測苦蕓萃取物相同體積的溶媒 (DMSO)

於實驗進行的前一天，乳癌細胞需以離心去除上清液後加入新鮮的培養基，並使細胞密度在 $2-4 \times 10^5$ cells/ml。在給予藥物時，首先利用細胞計數盤，求出其準確的細胞密度，至少二重複，接著加入培養基把細胞密度稀釋至 5×10^4 cells/ml。接著取六個 50 ml 無菌離心管，每個加入 35 ml 含乳癌細胞的培養基，接著依序加 35 μ l 的 DMSO 和 150、300、450 及 600 μ g/ml 素混合均勻。取八個 12 孔洞平盤，兩個 12 孔洞平盤為一組，總共四組進行不同時間點的實驗。每種濃度作四重複。每個孔洞加入 2 ml 含乳癌細胞的培養基，其最終濃度為 Q 150、300、450 及 600 μ g/ml 的苦蕓萃取物，其濃度分配如下：

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| C | 150 | 300 | 450 |
| C | 150 | 300 | 450 |
| C | 150 | 300 | 450 |

| | | | |
|-----|--|--|--|
| 600 | | | |
| 600 | | | |
| 600 | | | |

把種好的乳癌細胞的 12 孔洞平盤，擺進 37 °C、5% CO₂ 的培養箱 (incubator) 進行培養，在培養 12、24、48 和 72 小時後各取一組細胞來檢測細胞生長的情形。

利用流式細胞儀檢測細胞生長情形的方法如下，每個孔洞取 500 μ l 的培養基，至 5 ml 的流式細胞儀專用管，接著加入 5 μ l 的 PI Stock Solution (400 μ g/ml)，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 $\mu\text{l}/\text{min}$ ），計數細胞增殖率。

柒、 利用倒立式位像差顯微鏡檢測苦蕒萃取物對人類乳癌細胞株細胞型態的影響

給予不同濃度苦蕒萃取物（0-600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）的乳癌細胞種入 12 孔洞平盤，擺進 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培養箱進行培養，在培養 48 小時後，於倒立式位像差顯微鏡下照相分析。

捌、 利用流式細胞儀檢測苦蕒萃取物對人類乳癌細胞株細胞週期的影響

給予不同濃度苦蕒萃取物（0-600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）的乳癌細胞種入 12 孔洞平盤，擺進 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培養箱進行培養，在培養 48 小時後，每個孔洞取 500 μl 的培養基，至 5 ml 的流式細胞儀專用管，混合均勻後，即可進行流式細胞儀分析。給予不同濃度苦蕒萃取物（0-600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）的乳癌細胞種入 12 孔洞平盤，擺進 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培養箱進行培養，12、24、48 和 72 小時後各取一組細胞來檢測細胞週期改變的情形。

將不同組別，經 trypsin-EDTA 處理過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，以 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 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 1 次後將細胞完全打散。最後在每個試管中加入 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。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 離心管中抽吸次後，將細胞移到 FACS 專用管後避光置於冰上。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 Modfit LT[®]軟體進行處理分析⁽⁹²⁾。

1X Phosphate buffer saline (PBS) : (pH=7.4)

| 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 到總體積 1000 ml | |

PI stain 染劑配製：(4 保存)

| 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。

玖、 檢測苦蕨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、 西方墨點法 (Western Blotting)

(一)、 細胞蛋白質抽取

給予不同濃度苦蕨萃取物的乳癌細胞種入 10 cm 細胞培養盤，擺進 37 °C、5% CO₂ 的培養箱進行培養，於不同時間從培養箱中取出後，將將不同組別，經 trypsin-EDTA 處理過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、10,000 rpm、10 分鐘) 取出上清液即含細胞蛋白質。

(二)、 蛋白質定量

蛋白質標準品檢量線製作：以胎牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin; BSA) 為蛋白質標準品，依下面表格製作蛋白質標準品樣品：

| 濃度 (ug/ml). | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
|--------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 組成 | | | | | | |
| 0.1 mg/ml BSA (μl) | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| DDW (μl) | 800 | 750 | 700 | 650 | 600 | 550 |
| Bradford 染劑 | 200 μl | | | | | |
| 總體積 1000 μl | | | | | | |

將配製好的蛋白質標準品樣品以每個樣品放在 3 個 wells 的方式依序放入 96 孔細胞培養盤中，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，並求出趨勢線方程式及 R^2 值。 $(R^2$ 值必須有 ≥ 0.99 以上的準確度，否則需重新製作檢量線)

(三)、樣品蛋白質定量：

取 10 μl 的蛋白質樣品與 790 μl 的二次水混合，再加入 200 μl 的 Bradford 染劑，混勻 5 分鐘後以每個樣品放在 3 個 wells 的方式依序放入 96 孔細胞培養盤中，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之蛋白質濃度，最後再乘上稀釋倍數，則可求得實際蛋白質樣品濃度。

(四)、變性電泳 (SDS-PAGE)

依照下面表格依序配製下層膠和上層膠：

| 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 μ l | 200 μ l | 50 μ l | 100 μ l |
| 40% Acrylamide/Bis (29:1) | 2.5 ml | 5.0 ml | 610 μ l | 1.22 ml |
| 10% Ammonium persulfate (APS) | 50 μ l | 100 μ l | 50 μ l | 100 μ l |
| TEMED | 10 μ l | 20 μ l | 6 μ l | 12 μ l |

下層膠注入鑄膠台後，緩緩加滿二次水去除氣泡並壓平下層膠之上緣，等約 30 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 30 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。鑄好的膠體先以 75 v、30 mA 為條件預跑 3 分鐘。將樣品與樣品緩衝液 (Sample buffer) 混合後總體積為 20 μ l (蛋白質濃度約為 2 μ g/ μ l)，經加熱 5 分鐘後立刻冰上冷卻 30 秒以上。取 5 μ 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。跑膠以 75v 跑 3-4 小時。

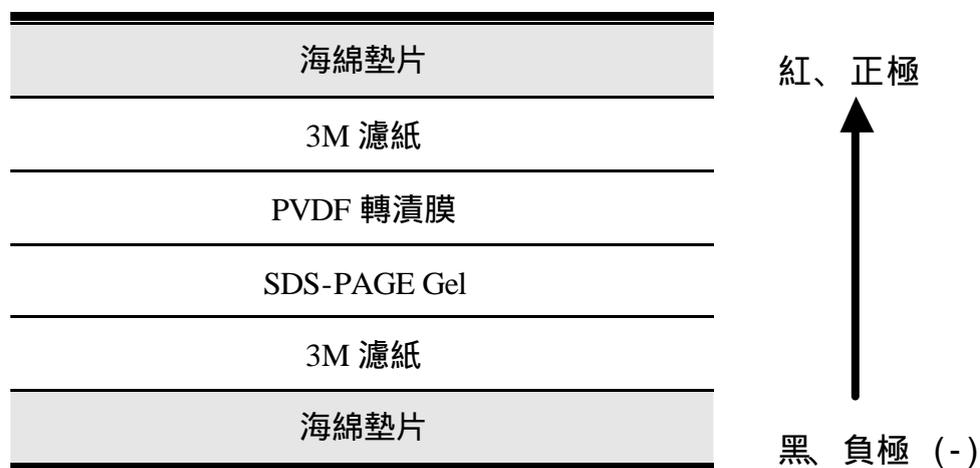
1x Running buffer : 6X Sample buffer :

| 組成 | 重量 (g) | 組成 | 最終濃度 | 初濃度 | 體積(ml) |
|--------------|--------|------------------|---------|-------|--------|
| Tris | 30 | Tris-HCl、pH6.8 | 62.5 mM | 0.5 M | 5 |
| Glycine | 144 | SDS | 2 % | 10 % | 8 |
| SDS | 10 | Glycerol | 60 % | 100 % | 24 |
| 加 DDW 到 10 L | | Bromophenol blue | 0.6% | - | 0.24 g |
| 加 DDW 到總體積 | | | | | 40 ml |

(五)、西方墨點法 (Western Blotting)

轉漬步驟：

將轉漬夾打開後黑色面朝下放，取出一片海綿墊片浸泡轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 後放於其上面，並依序在海綿片上放上 3M 濾紙、SDS-PAGE gel、PVDF 轉漬膜 (先用 100 % 甲醇濕潤 15 秒、再放於轉漬緩衝液中浸泡 1 分鐘以上)、3M 濾紙，最後再放上一片海綿墊片後夾上轉漬夾 (夾層中間夾切勿有氣泡)，形成類似三明治夾層的構造。



將轉漬夾放入電泳槽中後放入冰盒並加滿轉漬緩衝液。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、1 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 3M 濾紙壓乾並在正面（與膠體接觸面）右上角截角做記號。緊接將轉漬膜以 5 % 脫脂奶（溶於 0.1 % PBS/Tween 中）進行 blocking 步驟，以室溫 1 小時為條件進行。取出轉漬膜後於小盒中以 0.1 % PBS/Tween 清洗 5 分鐘共 6 次。取封口袋放入 2 ml 的一級抗體（溶於 0.1 % PBS/Tween 中），再將轉漬膜以鑷子放入，並將封口袋中的汽泡趕去後用封口機封住，以 4℃ 隔夜進行。隔天取出轉漬膜後置於小盒中以 0.1 % PBS/Tween 清洗 5 分鐘共 6 次。取封口袋加入 2 ml 的二級抗體溶於 1 % PBS/Tween 中），用鑷子將轉漬膜放入其中，再將封口袋中的汽泡趕去後用封口機封住，於室溫下搖盪進行 1 小時，最後取出轉漬膜後以 0.1 % PBS/Tween 於小盒中清洗 5 分鐘共 6 次。

壓片步驟：（暗室中進行）

將轉漬膜浸泡於 ECL 試劑之混合液（每瓶各取 500 μ l 等比例混合）中 1 分鐘反應。以保鮮膜平整包覆好轉漬膜並正面朝上放置於壓片卡匣（Cassette）內，再用膠帶固定保鮮膜。以 Super RX 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 1 小時不等。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，底片經晾乾後以 Kodak digital science 1D 分析軟體進行結果分析。

轉漬緩衝液配製如下：

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

* 配製試劑先加二次水到 4000 ml，待完全溶解後再加入 750 ml 的 100% 甲醇，最後加二次水到達 5000 ml 即可。

拾、 利用流式細胞儀檢測是否會產生細胞凋亡的情形

給予不同濃度苦蕓萃取物 Ethyl acetate 的乳癌細胞種入 12 孔洞平盤，擺進 37 °C、5% CO₂ 的培養箱進行培養，24 小時後檢測細胞凋亡的情形。

將不同組別，經 trypsin-EDTA 處理過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，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，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 1 次後將細胞完全打散。最後在每個試管中加入 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。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 專用管後避光置於冰上。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 10000 顆細胞，數據以 Cell Quest[®]軟體進行處理分析。

拾壹、RNA 萃取

一、萃取試劑：TRIZOL[®]

二、步驟：

(一) 樣品均質：細胞：一盤 10 cm^2 培養皿的貼附性細胞加入 1 ml TRIZOL，並以抽吸方式使細胞破裂。如為懸浮性細胞則先離心後，以 5×10^6 細胞數加入 1 ml TRIZOL 為比例。

(二) 分層：均質後的樣品換到 2 ml 的 eppendorf 中，於室溫下靜置 5 分鐘。以 1 ml TRIZOL 加入 0.2 ml 的 Chloroform 為比例加入 Chloroform，充分震盪 15 秒後，室溫靜置 15 分鐘。以 12,000 $\times g$ 、4 離心 15 分鐘。(4 條件對分層很重要!!)

(三) RNA 沉澱：取上清液到新的 1.5 ml eppendorf 中，並以 1 ml

TRIZOL 加入 0.5 ml 的 Isopropanol 為比例加入 Isopropanol, 混勻後, 室溫靜置 10 分鐘。以 12,000 xg、4 離心 10 分鐘。(離心後管壁有白色或膠狀 pellets 即是 RNA)

(四) RNA 清洗：小心去除上清液後, 並以 1 ml TRIZOL 加入 1 ml 的 75% Ethanol 為比例加入 75% Ethanol, 充分混勻。以 12,000 xg、4 離心 5 分鐘。

(五) RNA 溶解：小心去除上清液後, 將 eppendorf 打開倒置於擦手紙上 5 分鐘, 待自然風乾。加入 10~30 μ l 的 DEPC 水溶解 RNA。

(六) RNA 濃度測定：RNA 以 DEPC 水稀釋適當倍數後 (ex: 4 μ l RNA 加 796 μ l DEPC 稀釋 200 倍), 以分光光度計於 260 nm、280 nm 測定吸光值。(260 nm 測核酸、280 nm 測蛋白質)。260 nm 之吸光值乘上稀釋倍數後, 再乘上 40 μ g/ml, 即可得到 RNA 濃度 (μ g/ml)。

注意事項：

- 1、均質機鑽頭使用前要高壓滅菌, 並於均質每個組織前都要先以 DEPC \rightarrow Chloroform \rightarrow DEPC 順序清洗, 且均質中如果 DEPC 或 Chloroform 有混濁就要換新。使用後的 Chloroform 廢液要回收
- 2、均質液加 Chloroform 後離心會分成三層：上層 (Aqueous phase) 含 RNA、DNA 在中層 (Interphase)、下層 (Organic phase) 含蛋白質。

- 3、 75%酒精必須以 99.5%純酒精和 DEPC 水進行配製。
- 4、 RNA 勿完全風乾，會使 RNA pellet 溶解度下降。

拾貳、 Two-Step RT-PCR

一、 **RNA 定量**：取 2 μ l 抽出的 RNA 樣品加入 998 μ l 的 DEPC 混勻後 (稀釋 500 倍)，測定 A260 (核酸) 和 A280 (蛋白質) 的吸光值。→RNA 樣品稀釋倍數可依需要調整。將測出的 A260 吸光值乘上 40 μ g/ml 後，再乘上稀釋倍數 (n) 可得樣品的 total RNA 含量。→ $A_{260} \times 40 \times n = \mu\text{g/ml}$ 的 total RNA，依照算出之 total RNA 濃度，以 DEPC 將 RNA 稀釋到 500 μ g/ml 備用。

* 一般 RNA 樣品的 $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ 比值在 1.8~2.0 之間為佳。

二、 **Reverse transcription (Step 1)**：*此步驟目的是將定量後的 RNA 經由逆轉錄酵素作用轉變成 cDNA。

在 200 μ l 的 microtube 中依順序加入下面組成，混勻：

| 組成 | 初濃度 (stock) | 體積 (μ l) |
|--------------------|----------------------|---------------|
| DEPC-treated water | - | 8 -? |
| dNTP | 10 mM | 1 |
| Oligo dT primer | 2.5 μ g/ μ l | 1 |
| RNA 樣品 | - | ? |
| 總體積 10 μ l | | |

- (一)、 一般 RNA 加入含量以 1~1.5 μg 為佳。如果 RNA 濃度為 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 則加入 2~3 μl 。
- (二)、 一般小體積的試劑應先離心後再取用。
- (三)、 混合試劑時一般會多乘上安全係數，例如需 2 個樣品量則取 2.5~3 個的體積，以免取用量不足。

放入機器，以 65 跑 5 分鐘後，立刻置於冰上 1 分鐘以上。隨後 microtube 中依順序加入下面組，混勻：

| 組 成 | 初濃度(stock) | 體 積 (μl) |
|---------------------|------------|-----------------------|
| RT buffer | 10x | 2 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 4 |
| DTT | 0.1 M | 2 |
| RNase Inhibitor | - | 1 |
| 總體積 9 μl | | |

放入機器，以 42 跑 2 分鐘。加入 1 μl 的 Superscript RT (50 U/ μl)，混勻。放入機器，以 42 跑 50 分鐘，再以 70 跑 15 分鐘後，置於冰上。加入 1 μl 的 RNase H (2 U/ μl)，混勻。放入機器，以 37 跑 20 分鐘。將跑好的 cDNA 樣品貯存在 -80 或直接進行 PCR 步驟。

三、 Polymerase Chain Reaction (Step 2)：此步驟目的是利用耐熱性的 DNA 聚合酵素和適當的引子 (primer) 將特定的 cDNA 量化。

在 200 μl 的 microtube 中依順序加入下面組成，混勻：

| 組 成 | 初濃度 | 體 積 (μl) |
|-----|-----|-----------------------|
| | | |

| | (stock) | |
|-------------------|---------|------|
| PCR buffer | 10x | 2.5 |
| MgCl ₂ | 50 mM | 0.75 |
| dNTP | 10 mM | 0.5 |
| sense primer | 10 μM | 0.5 |
| anti-sense primer | 10 μM | 0.5 |
| Taq | 5 U/μl | 0.2 |
| cDNA | - | 1 |
| MQ water | - | 19.1 |
| 總體積 25 μl | | |

*一般先將穩定的試劑先拿出退冰添加，Taq 最後拿出退冰。

*Taq 為溫泉區細菌的耐熱性 DNA polymerase。

放入機器，依照需要設定溫度 (Annealing temp.) 和時間進行量化。

四、確認結果：取 10 μl 的 cDNA 產物和 2 μl 的 DNA dye 混合後，跑 1% Agarose Gel。 (須記得 loading Standard DNA Maker，以確認跑出的 bands 是否為預期的結果)

拾參、DNA 跑膠

一、配製 Agarose Gel：

| 體積、濃度 組成 | 50 ml (Small Tank) | | | 150 ml (Large Tank) | | |
|-------------|--------------------|-------|-----|---------------------|-------|-----|
| | 1 % | 1.5 % | 2 % | 1 % | 1.5 % | 2 % |
| Agarose (g) | 0.5 | 0.75 | 1 | 1.5 | 2.25 | 3 |
| 1x TAE (ml) | 50 | | | 150 | | |

將 Agarose 和 1x TAE 放入血清瓶中，以微波加熱到液體澄清為止。加熱方式以每次 30 秒慢慢加熱為宜。將滾燙的液態狀膠倒入 50ml

離心管，並以手觸摸外壁方式，待膠體溫度降到 50 左右再加入 EtBr (量為 1 μ l/10 ml Gel)，混勻。將液態狀膠緩慢倒入造膠台中，並以 tip 將膠上的氣泡趕掉。待膠硬化，加入 300~350 ml 的 1x TAE 當作 Running buffer; Loading 6~10 μ l 的 DNA Maker; Loading sample (DNA 與 6x Loading buffer 以 5:1 比例混勻)。以 100V、50 分鐘為條件跑膠

二、50x TAE 配製：

| 組成 | 初濃度 | 重量、體積 |
|------------------------|-------|---------|
| Tris base | - | 242 g |
| Glacial acetic acid | 100% | 57.1 ml |
| EDTA (pH 8.0) | 0.5 M | 100 ml |
| 加 MQ water 到體積 1000 ml | | |

三、6x Loading buffer (for DNA & RNA) 配製：

| 組成 | 初濃度 | 重量、體積 |
|------------------------|-------|---------|
| Bromophenol blue | - | 0.125 g |
| Xylene cyanol FF | - | 0.125 g |
| Glycerol | 100 % | 15 ml |
| 加 DEPC water 到體積 50 ml | | |

* 4 儲存。

四、DNA maker 配製：取 10 μ l 的 6x Loading buffer 加 45 μ l 的 MQ water，最後再加入 5 μ l 購回的 DNA maker 原液，或依說明書配製。

五、Ethidium Bromide (EtBr) 配製：將 EtBr 用 MiniQ water 稀釋配成濃度 0.5mg/ml，避光儲存。

拾肆、數據分析

數據結果以平均值±標準差 (mean±SD) 表示，各組與對照組間之數據分析以 paired-*t* test 進行統計比較。當 $p < 0.05$ 表示在統計學上具有差異。

第四章 結果

第一節、 苦蕒萃取物對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株形態的影響

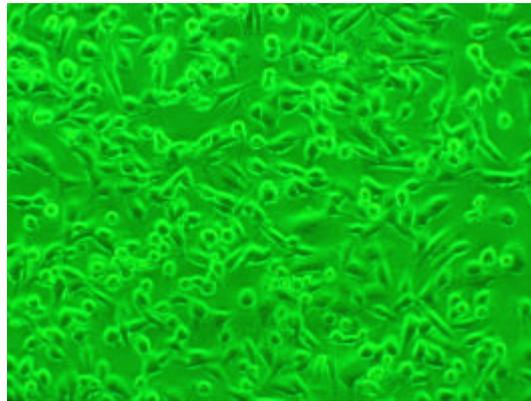
倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態，發現苦蕒萃取物對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株在 12 小時培養之後，在 150 $\mu\text{g/ml}$ 已經有明顯的產生抑制增殖作用，部分產生細胞無法貼壁現象，300 $\mu\text{g/ml}$ 有明顯的產生細胞無法貼壁現象並制細胞生長，隨著藥物濃度增加而抑制作用越明顯。450 $\mu\text{g/ml}$ 除了已經有明顯的產生抑制增殖作用其細胞數目明顯減少，伴隨著有細胞凋亡體產生，細胞數目亦明顯減少也有空泡化現象 (如圖三)。

在 24 小時培養之後，在 150 $\mu\text{g/ml}$ 已經有更明顯的產生抑制增殖作用，部分產生細胞無法貼壁現象，300 $\mu\text{g/ml}$ 有明顯制細胞生長及產生細胞無法貼壁現象，隨著藥物濃度增加而抑制作用越明顯。450 $\mu\text{g/ml}$ 除了已經有明顯的產生抑制增殖作用其細胞數目明顯減少，伴隨著有細胞凋亡體產生，也有空泡化現象 (如圖四)。

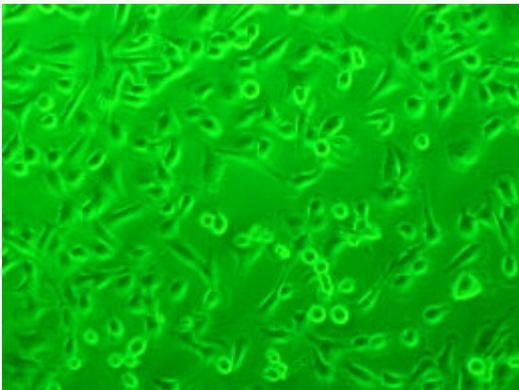
當時間增加抑制作用也隨之增強，經 48,72 小時培養之後，在 150 $\mu\text{g/ml}$ 已經有更明顯的產生抑制增殖作用；300 $\mu\text{g/ml}$ 有明顯的產生細胞無法貼壁現象並制細胞生長，少有空泡化現象；而且 450 $\mu\text{g/ml}$ 除了已經有明顯的產生抑制增殖作用其細胞數目明顯減少，有細胞凋亡體產生，細胞數目亦明顯減少更多空泡化現象 (如圖五、六)。

12h

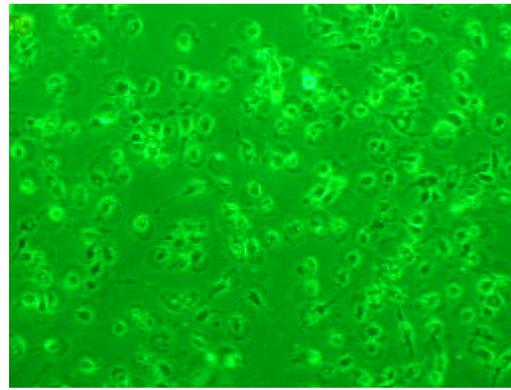
Control



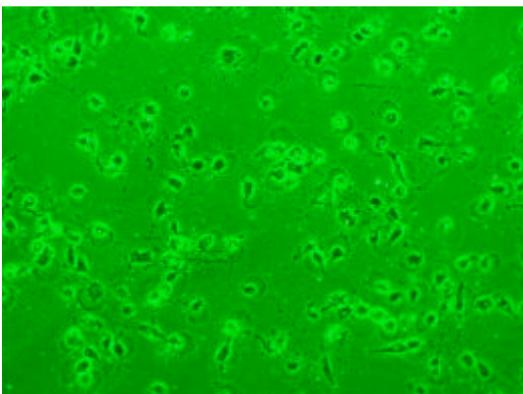
P.A 150 $\mu\text{g/ml}$



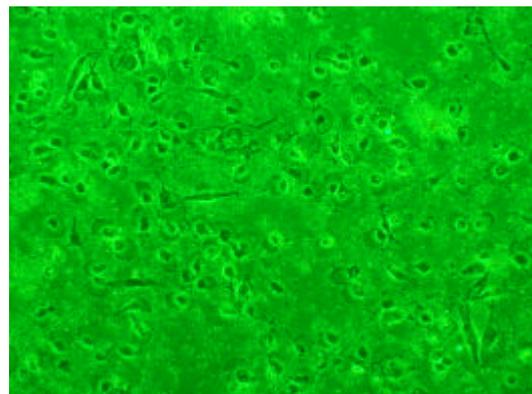
P.A 300 $\mu\text{g/ml}$



P.A 450 $\mu\text{g/ml}$

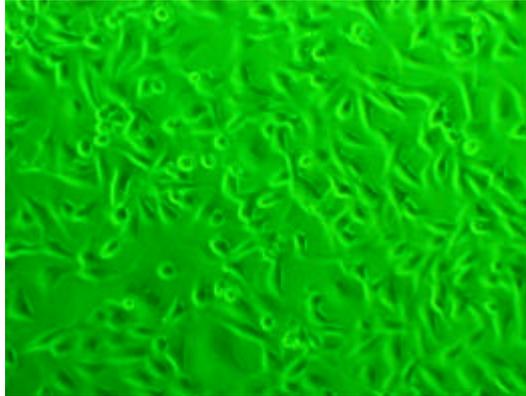


P.A 600 $\mu\text{g/ml}$

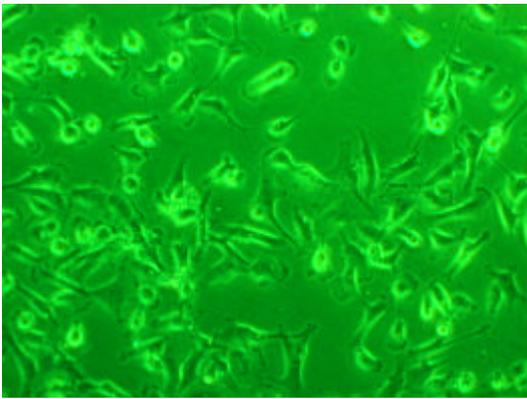


圖三 . MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物處理 12 小時，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態的改變。

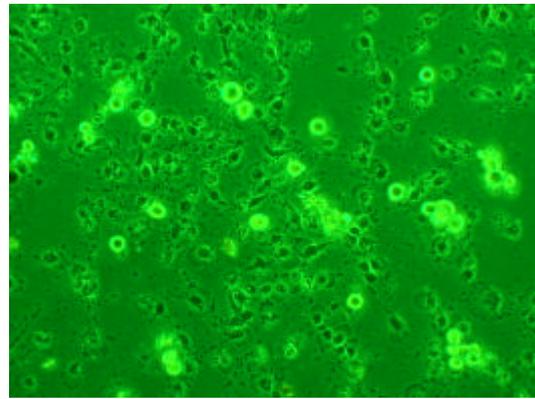
24h
Control



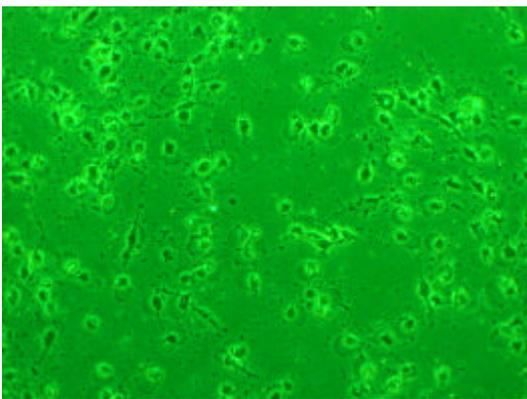
P.A 150 $\mu\text{g/ml}$



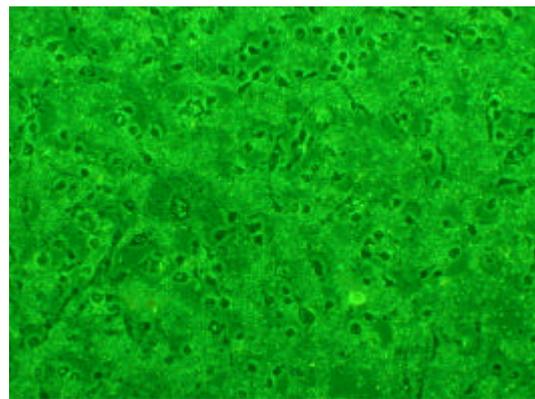
P.A 300 $\mu\text{g/ml}$



P.A 450 $\mu\text{g/ml}$

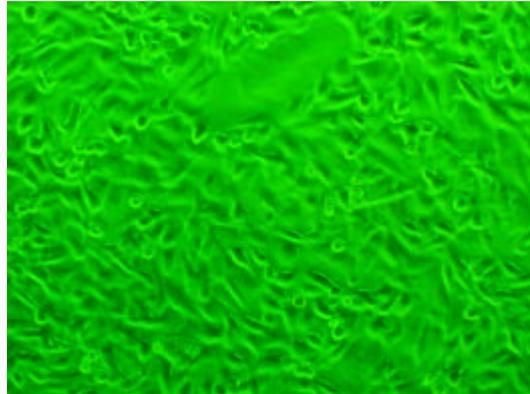


P.A 600 $\mu\text{g/ml}$

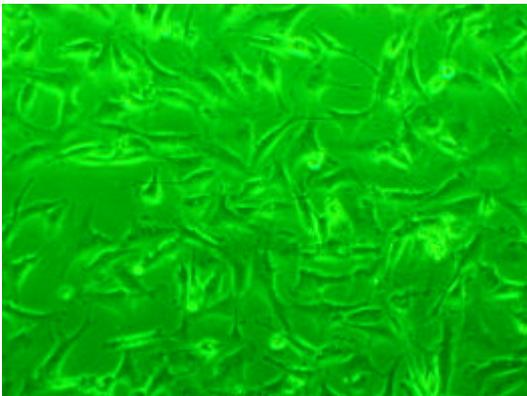


圖四 . MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕓萃取物處理 24 小時，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態的改變。

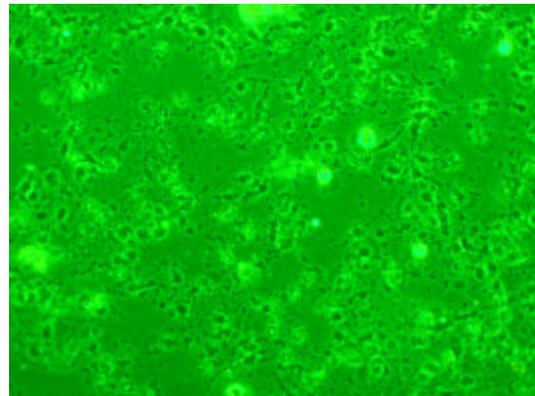
48h
Control



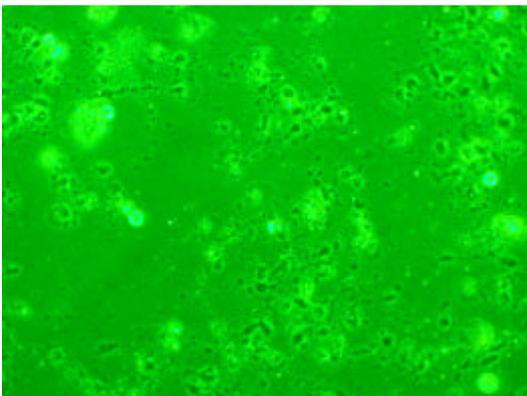
P.A 150 $\mu\text{g/ml}$



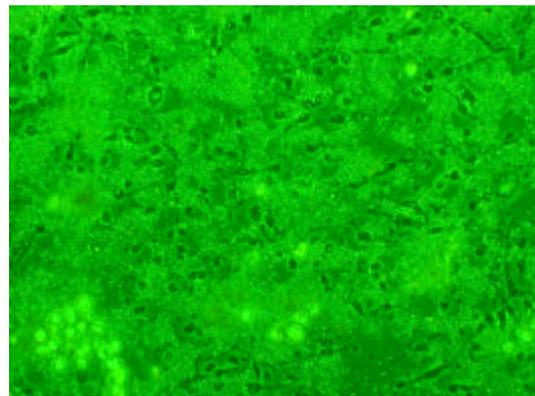
P.A 300 $\mu\text{g/ml}$



P.A 450 $\mu\text{g/ml}$



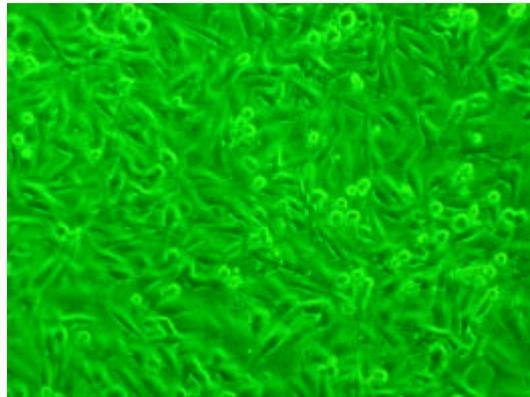
P.A 600 $\mu\text{g/ml}$



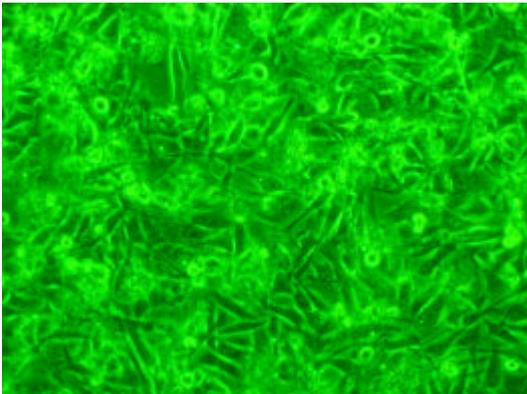
圖五. MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物處理 48 小時，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態的改變。

72h

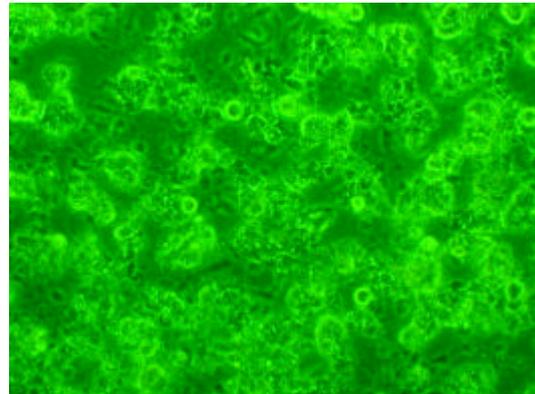
Control



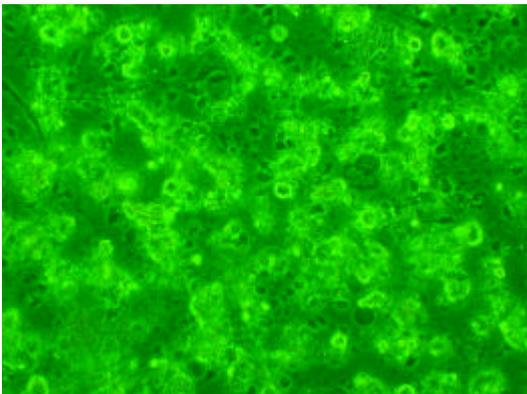
P.A 150 $\mu\text{g/ml}$



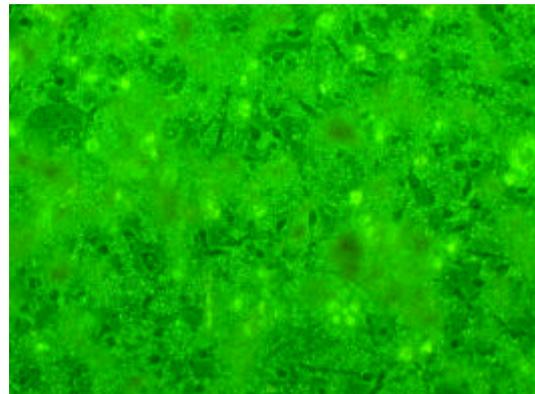
P.A 300 $\mu\text{g/ml}$



P.A 450 $\mu\text{g/ml}$



P.A 600 $\mu\text{g/ml}$



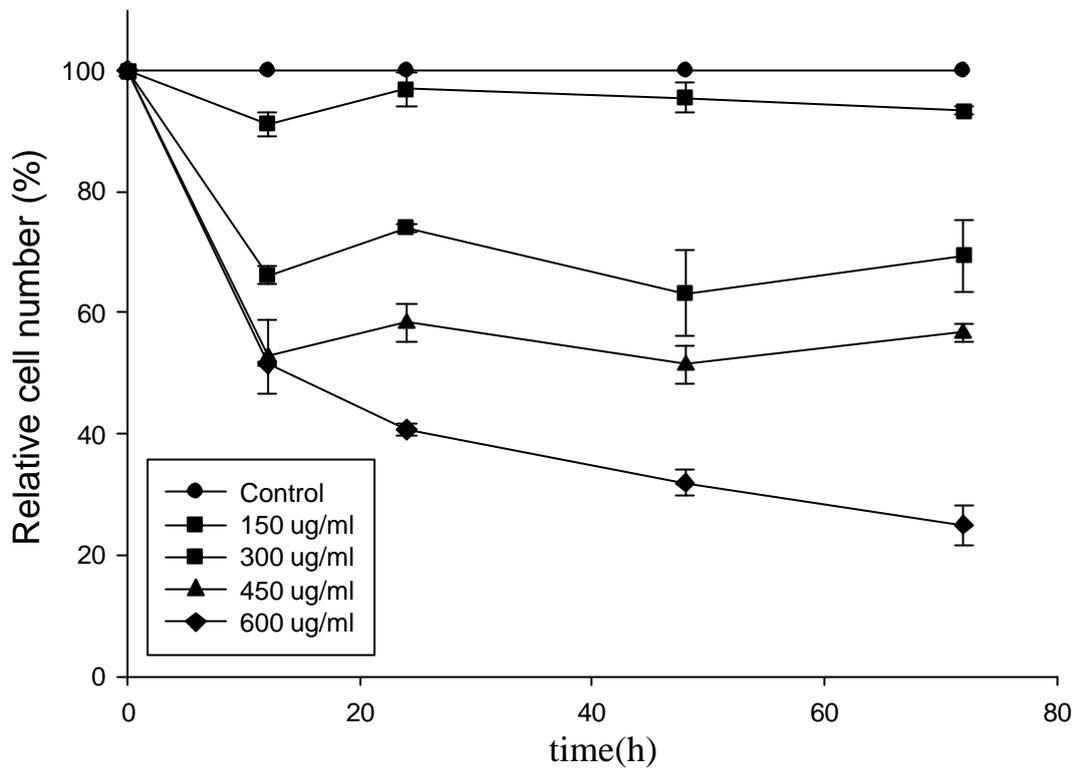
圖六 . MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物處理 72 小時，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態的改變。

第二節、苦蕒萃取物對 MDA-MB 231 乳癌細胞株細胞增生的影響

以流式細胞儀評估存活細胞數，發現苦蕒萃取物對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株增生，伴隨著濃度及時間增加有明顯的抑制效果。

發現給予苦蕒萃取物經不同時間培養之後，苦蕒萃取物 150 $\mu\text{g/ml}$ 在 12 小時就有產生抑制作用，細胞數目約僅 85% (圖七)；苦蕒萃取物 300 $\mu\text{g/ml}$ 有更明顯制細胞生長，在 12 小時就有產生抑制作用，細胞數目約僅 73%，在 48 小時就有產生抑制作用，細胞數目約僅 62% 隨著藥物濃度增加而抑制作用越明顯 (圖七)；苦蕒萃取物 450 $\mu\text{g/ml}$ 有更明顯制細胞生長，在 12 小時就有產生抑制作用，細胞數目約僅 53%；苦蕒萃取物 600 $\mu\text{g/ml}$ 有更明顯制細胞生長，在 12 小時就有產生抑制作用，細胞數目約僅 53%，在 72 小時就有產生抑制作用，細胞數目約僅 23% (圖七)。

綜合流式細胞儀評估存活細胞數實驗結果，發現苦蕒萃取物對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株增生，伴隨著濃度及時間增加有明顯的抑制效果。



圖七. 利用流式細胞儀評估細胞增殖率不同濃度之苦蕨萃取物對 MDA-MB 231 乳癌細胞株處理 12、24、48 及 72 小時後觀察細胞增生的變化。以對照組存活細胞數目作為 100%。數據結果以平均值±標準差 (mean±SD) 表示, n=8。

第三節、苦蕒萃取物及抽取出對人類 MDA-MB231 乳癌細胞株細胞週期的影響

MDA-MB 231 乳癌細胞株 3×10^5 /well，種入 12 孔洞平盤，於 37、5% CO_2 的培養箱，經同步化孵育培養後，給予不同濃度 (0-600 $\mu\text{g/ml}$) 苦蕒萃取物，經 12 小時分別取出細胞來檢測細胞週期改變的情形。苦蕒萃取物於 150 $\mu\text{g/ml}$ 時就發生 G2/M phase arrest 及 S phase arrest; 於 300 $\mu\text{g/ml}$ 時明顯發生 G2/M phase arrest，其比例增加為三倍(45%)之多，隨著濃度增加而越明顯。隨著時間增加，G2/M phase arrest 有稍微的下降(圖八)。經統計後發現於 300 $\mu\text{g/ml}$ 時明顯減低 G0/G1 phase，隨著濃度增加而減低越明顯，但對 G2/M phase 明顯增加，隨著濃度增加而越明顯(圖九)。所以可確定苦蕒萃取物對 MDA-MB 231 乳癌細胞株抑制作用為產生 G2/M phase arrest，使細胞週期停滯。

經 24 小時分別取出細胞來檢測細胞週期改變的情形。苦蕒萃取物於 150 $\mu\text{g/ml}$ 時就發生 S phase 減低；於 300 $\mu\text{g/ml}$ 時明顯發生 G2/M phase 比例增加為 41%，隨著濃度增加而越明顯 (圖十)。經統計後發現於 300 $\mu\text{g/ml}$ 時明顯減低 G0/G1 phase，隨著濃度增加而減低越明顯，但對 G2/M phase 明顯增加，隨著濃度增加而越明顯(圖十一)。

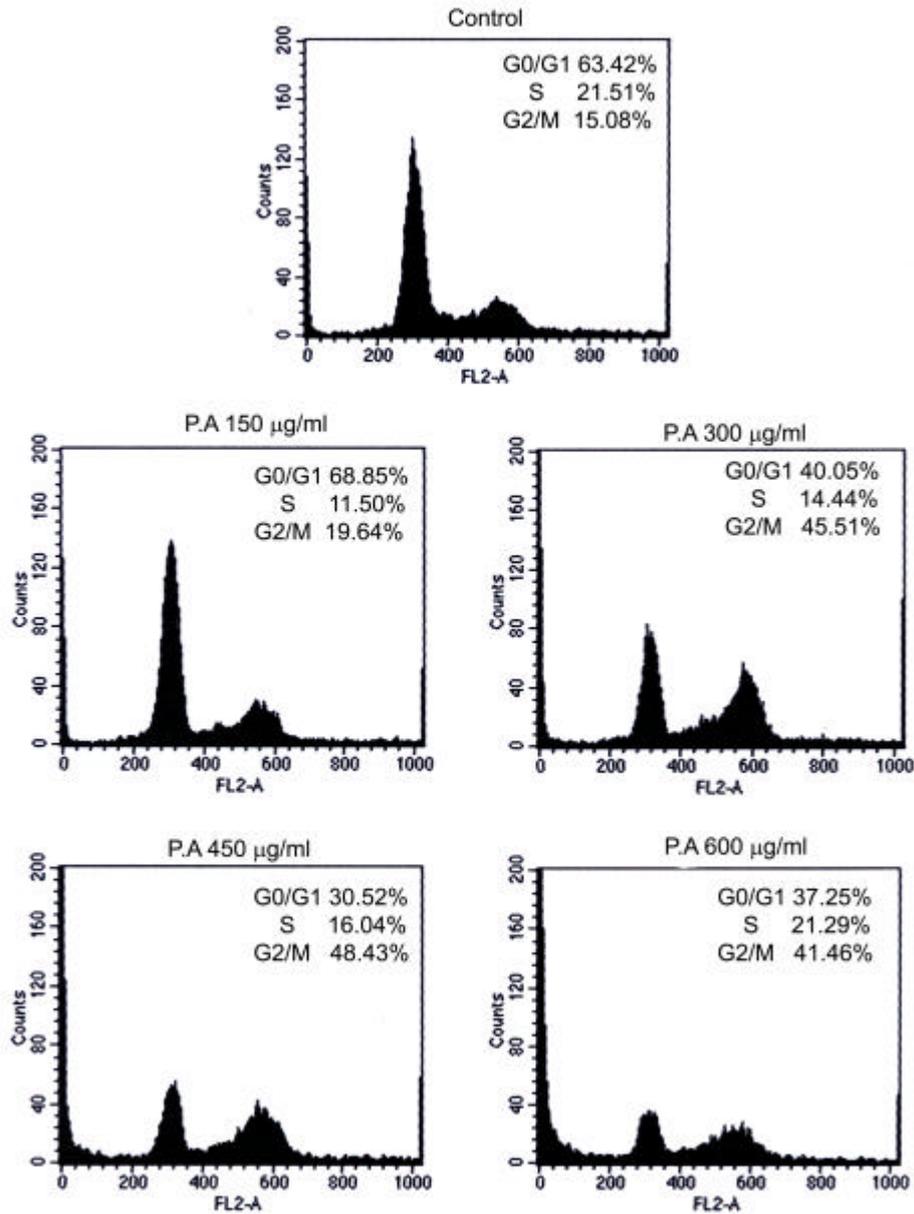
進一步發現 48 及 72 小時培養後，苦蕒萃取物於 150 $\mu\text{g/ml}$ 時對

MDA-MB231 乳癌細胞株就發生 S phase 減低；於 300 $\mu\text{g/ml}$ 時明顯發生 G2/M phase 比例增加，隨著濃度增加而越明顯 (圖十二、圖十四)。經統計後發現於 300 $\mu\text{g/ml}$ 時明顯減低 G0/G1 phase，隨著濃度增加而減低越明顯，但對 G2/M phase 明顯增加，隨著濃度增加而越明顯 (圖十三、圖十五)。

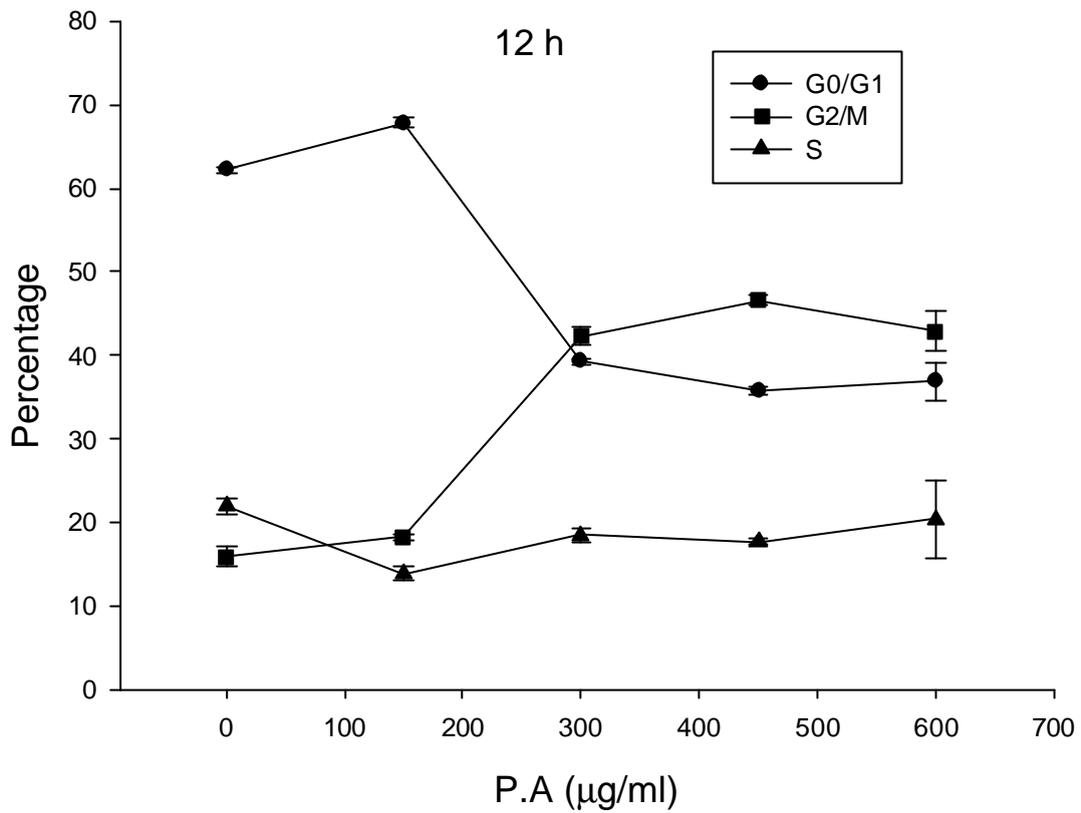
經進一步實驗發現，給予苦蕒萃取物 Ethyl Acetate 層不同濃度 (0-450 $\mu\text{g/ml}$) 對於 MDA-MB 231 乳癌細胞株，經 24 小時取出檢測細胞週期的改變，發現在 300 $\mu\text{g/ml}$ 時開始產生細胞凋亡約 20%，450 $\mu\text{g/ml}$ 時達到 40% (圖十六)。

綜合以上結果可確定苦蕒萃取物對 MDA-MB 231 乳癌細胞株抑制作用為產生 G2/M phase arrest，使細胞週期停滯及產生細胞凋亡。

12h cell cycle

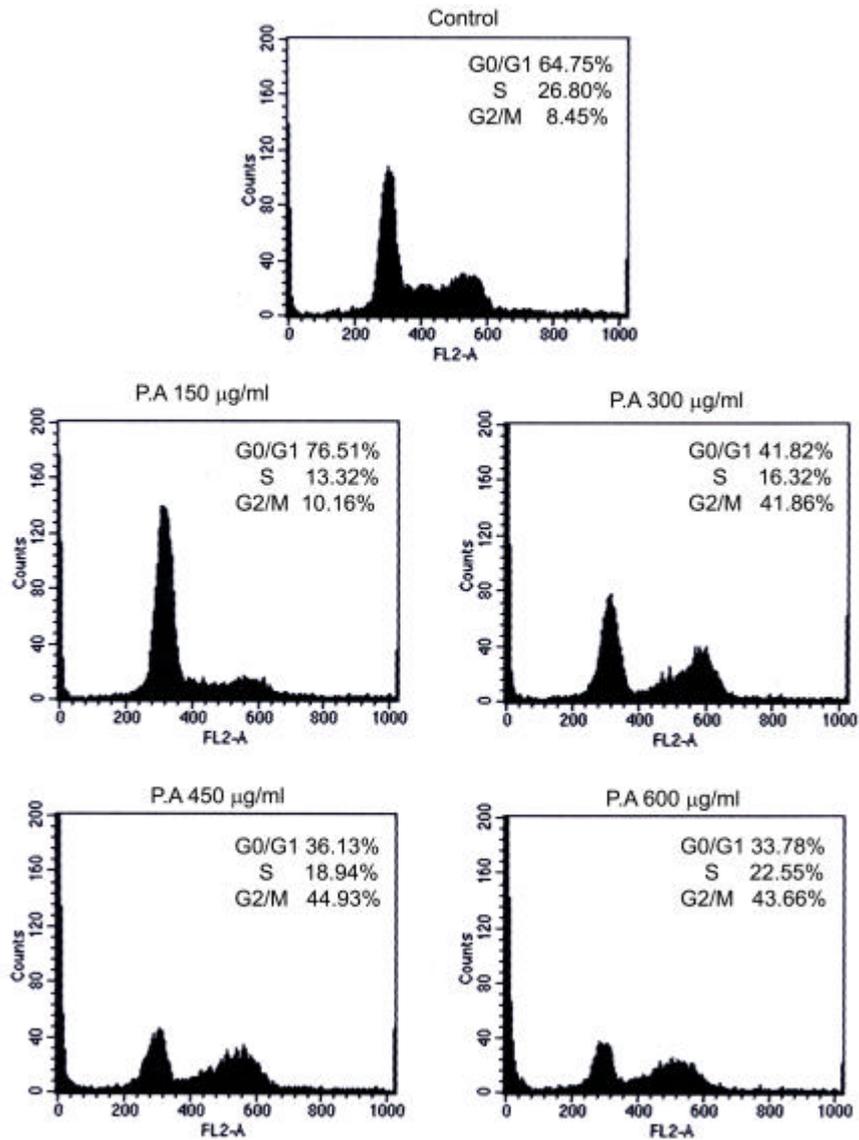


圖八 . MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕚萃取物處理 12 小時，經酒精固定細胞，再以 PI stain solution 將細胞 DNA 染色，以流式細胞儀評估 MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的改變。

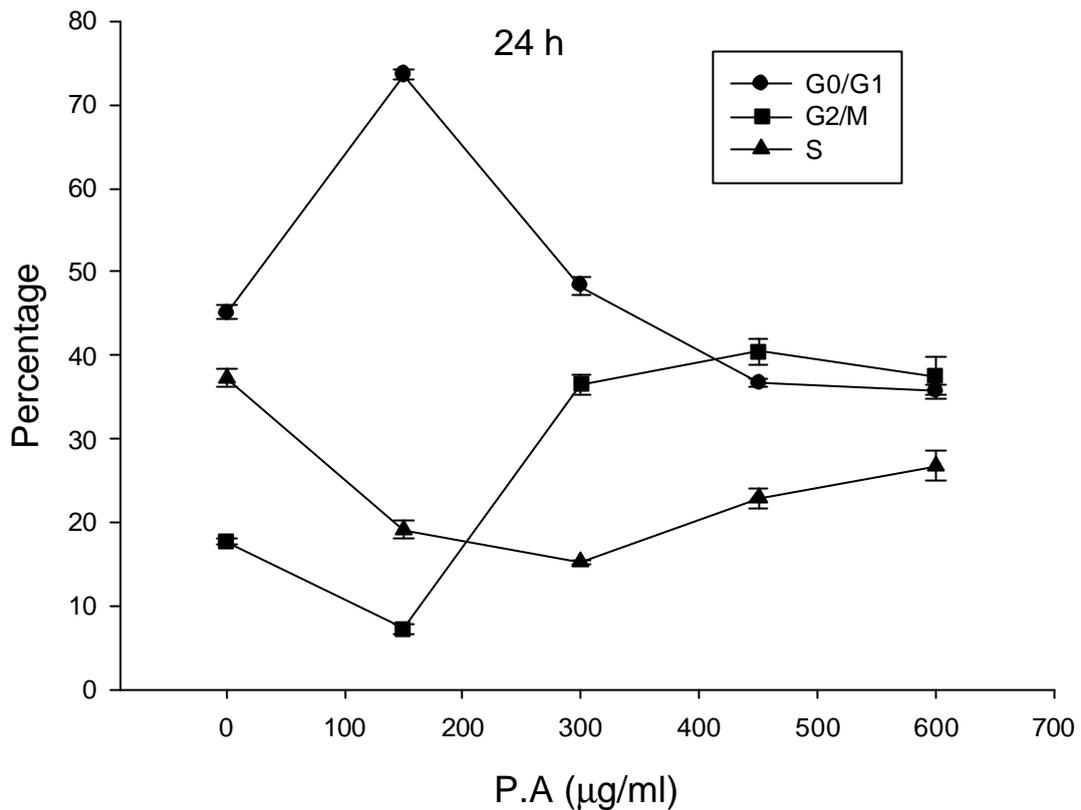


圖九. MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的統計圖。MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物處理 12 小時，隨著濃度增加，於 300 µg/ml 時發生 G2/M phase arrest。數據結果以平均值±標準差 (mean±SD) 表示，n=8。

24h cell cycle

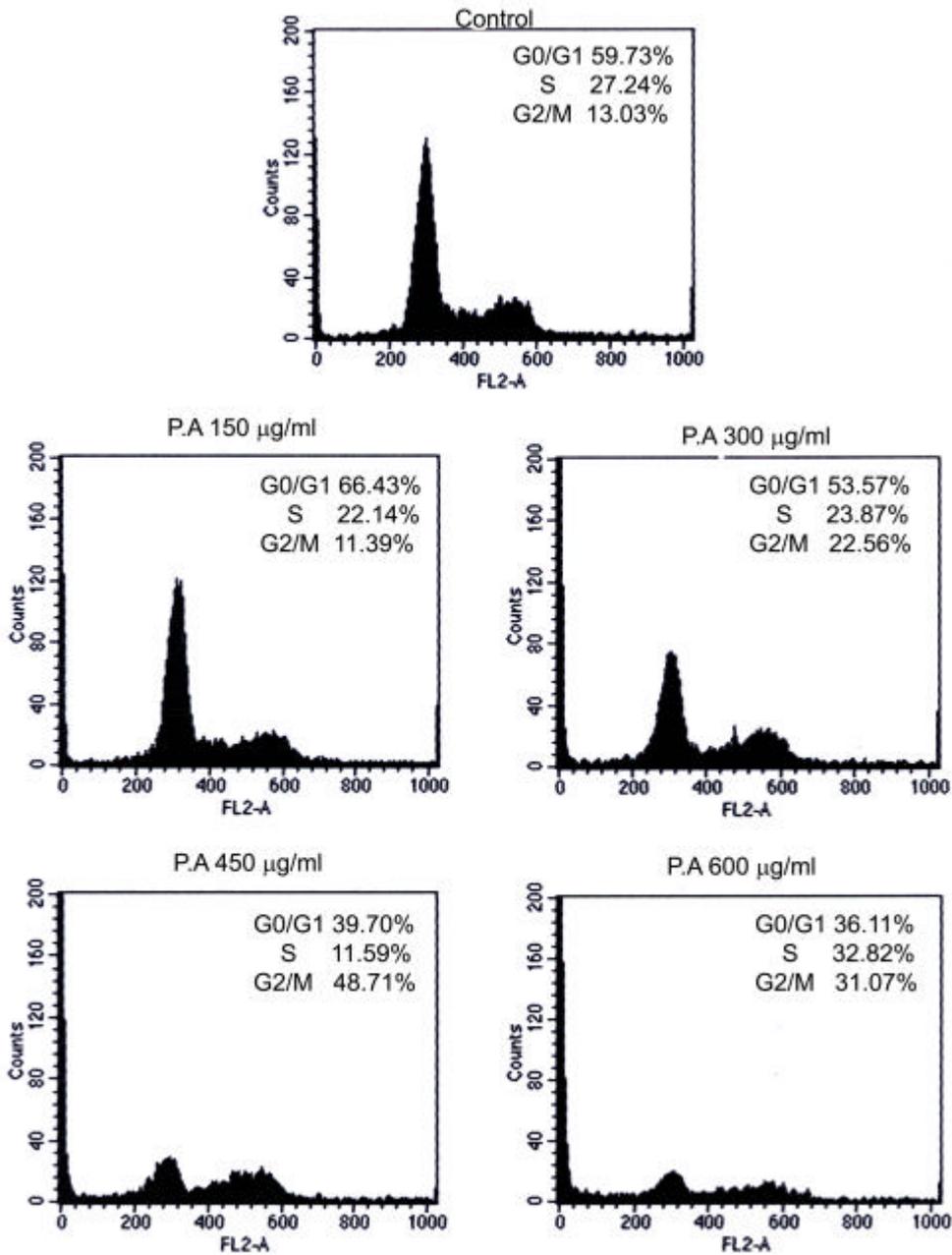


圖十. MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物處理 24 小時，經酒精固定細胞，再以 PI stain solution 將細胞 DNA 染色，以流式細胞儀評估 MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的改變。

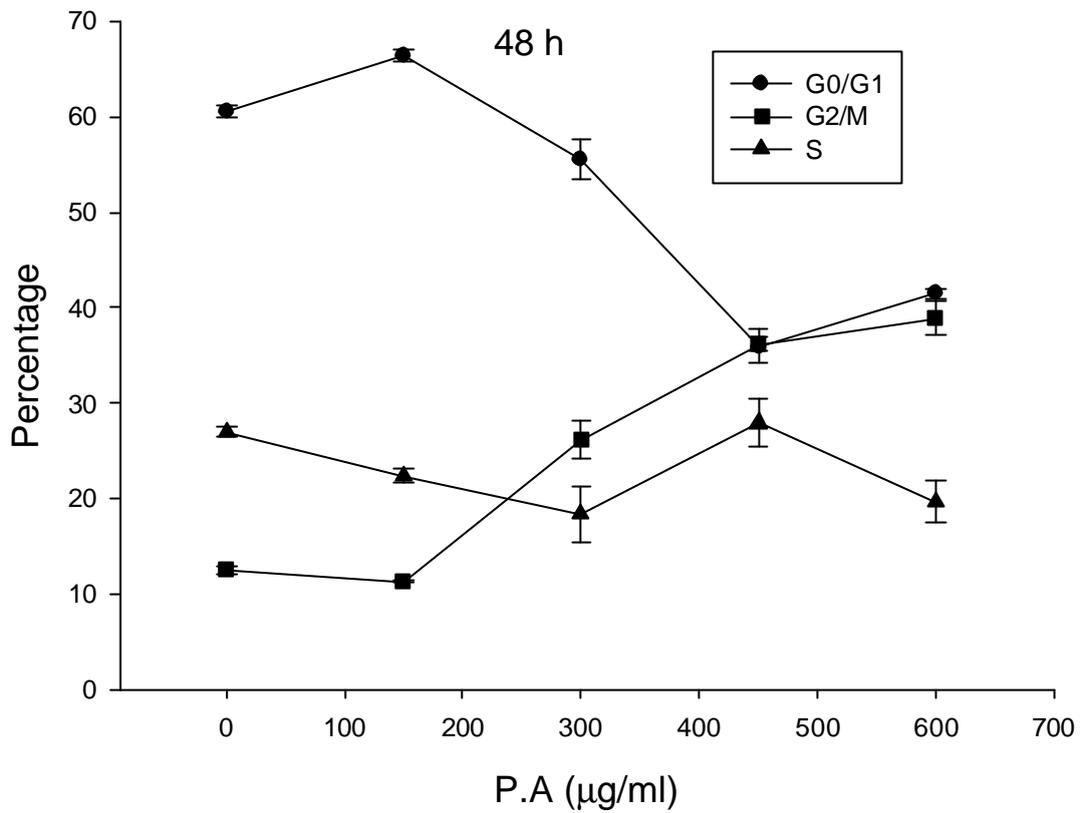


圖十一. MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的統計圖。MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物處理 24 小時，隨著濃度增加，於 300 µg/ml 時發生 G2/M phase arrest。數據結果以平均值±標準差 (mean±SD) 表示，n=8。

48h cell cycle

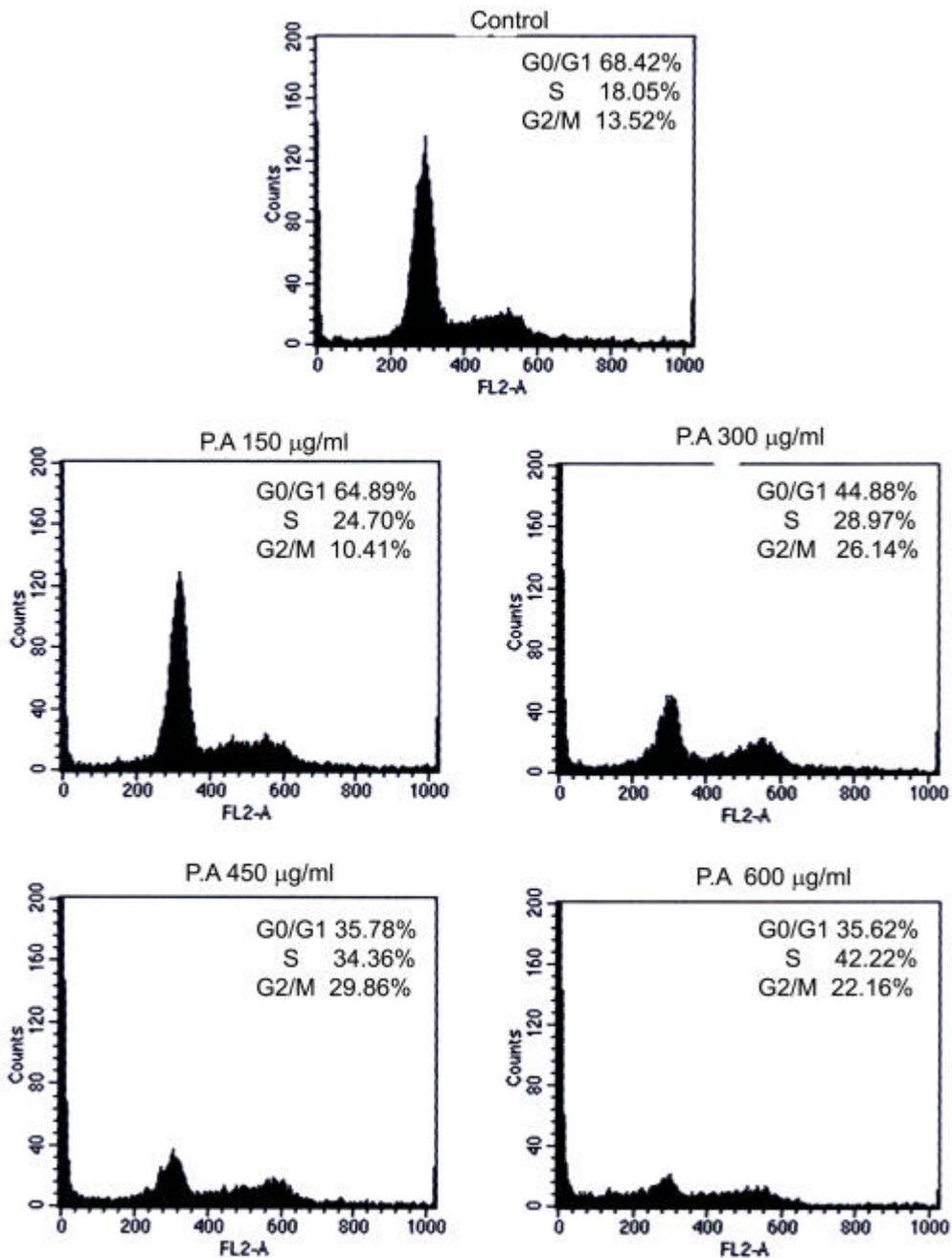


圖十二 . MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物處理 48 小時，經酒精固定細胞，再以 PI stain solution 將細胞 DNA 染色，以流式細胞儀評估 MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的改變。

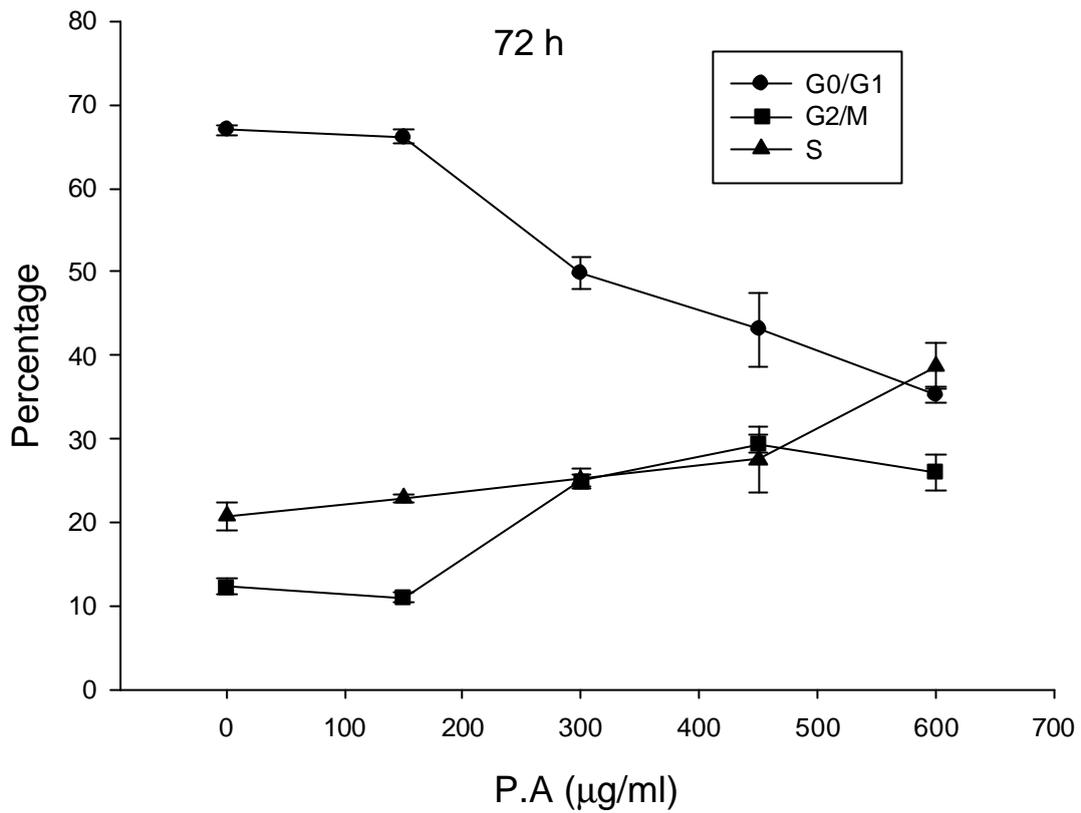


圖十三. MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的統計圖。MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕈萃取物處理 48 小時，隨著濃度增加，於 300 µg/ml 時發生 G2/M phase arrest。數據結果以平均值±標準差 (mean±SD) 表示，n=8。

72h cell cycle

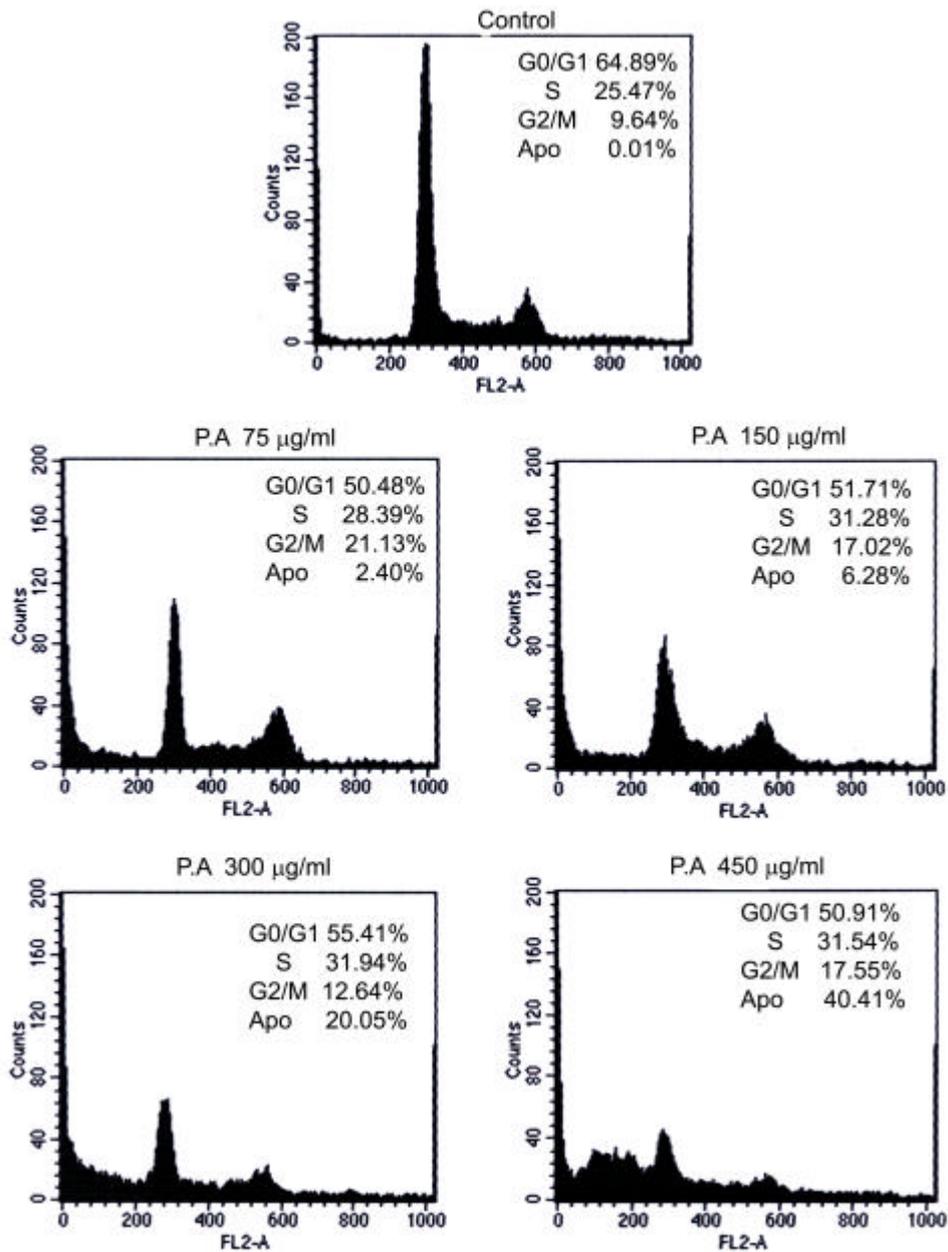


圖十四 . MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物處理 72 小時，經酒精固定細胞，再以 PI stain solution 將細胞 DNA 染色，以流式細胞儀評估 MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的改變。



圖十五. MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的統計圖。MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物處理 72 小時，隨著濃度增加，於 300 $\mu\text{g/ml}$ 時發生 G2/M phase arrest。數據結果以平均值 \pm 標準差 (mean \pm SD) 表示，n=8。

Ethyl Acetate 24h cell cycle



圖十六. MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度之苦蕨萃取物 Ethyl Acetate 層處理 72 小時，經酒精固定細胞，再以 PI stain solution 將細胞 DNA 染色，以流式細胞儀評估 MDA-MB 231 乳癌細胞株週期的改變。

第四節、苦蕒萃取物對乳癌細胞株之細胞週期相關蛋白質的影響

以流式細胞儀發現苦蕒萃取物對 MDA-MB 231 乳癌細胞株抑制作用為產生 G2/M phase arrest，使細胞週期停滯及產生細胞凋亡。給予不同濃度苦蕒萃取物的 MDA-MB 231 乳癌細胞株，於 10cm 細胞培養盤，擺進 37 °C、5% CO₂ 的培養箱進行培養，於 24 小時培養後，再加入 trypsin-EDTA 1 ml 約 2 分鐘，再加入 1 ml 10% FBS-DMEM 中斷 trypsin 作用，以抽吸方式將細胞沖散，再將培養瓶中細胞吸換到離心試管中，再離心 (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 μ l 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、10,000 rpm、10 分鐘) 取出上清液即含細胞蛋白質。再經西方點墨法於 β -actin 比對下測定，分析乳癌細胞株細胞內與細胞週期相關蛋白質的影響，進而探討其分子作用機轉。

一、測定與細胞週期中的 G2/M 期相關的 cyclins (cyclin B1 ; Cyclin A)

經西方點墨法於 β -actin 比對下測定 cyclin B1 及 Cyclin A。結果發現苦蕒萃取物 150 μ g/ml 就可以有異差的減低 Cyclin A 濃度達 40%，隨藥物劑量升高抑制作用也加強 (圖十七)。而苦蕒萃取物 600 μ g/ml 才可以有異差的減低 Cyclin B1 濃度 (圖十八)。所以根據實驗

結果顯示苦蕒萃取物，可以有異差的減低與細胞週期中的 G2/M 期相關的 cyclin A 及 Cyclin B1。

二、測定與細胞週期中的 G2/M 期相關的 CDKs (cdc2; chk1)；

以西方點墨法於 β -actin 比對下測定 cdc2。結果發現苦蕒萃取物 150 μ g/ml 就可以影響 cdc2 濃度。而 450 μ g/ml 才可以有異差的減低 cdc2 濃度 (圖十九)。所以根據實驗結果顯示苦蕒萃取物，可能有異差的減低與細胞週期中的 G2/M 期相關的 Cdc2, 但影響小 (圖二十)。

三、測定與細胞週期中的 G2/M 期相關的 CDKIs (p21^{Waf1/Cip1} 及 p27^{Kip1})

經西方點墨法於 β -actin 比對下測定週期蛋白依賴抑制激? p21^{Waf1/Cip1} 及 p27^{Kip1} 濃度。結果發現苦蕒萃取物 150 μ g/ml 處理 24 小時後，就可以有異差的增加 p21^{Waf1/Cip1} 濃度，隨藥物劑量升高增加濃度作用也加強 (圖二十)。而苦蕒萃取物 150 μ g/ml 處理 24 小時後，就可以有異差的增加 p27^{Kip1} 濃度，隨藥物劑量升高增加濃度作用也加強 (圖二十一)，但 600 μ g/ml 處理 24 小時後，就可以有異差的增加 p27^{Kip1} 濃度作用反而減低(圖二十一)。所以根據實驗結果顯示苦蕒萃取物，可以有異差的增加與細胞週期中的 G2/M 期相關的週期蛋白依賴抑制激? p21^{Waf1/Cip1} 及 p27^{Kip1} 濃度。

四、測定與細胞週期中的 G2/M 期相關檢查點的相關因子；Chk2、Cdc25c、Wee1

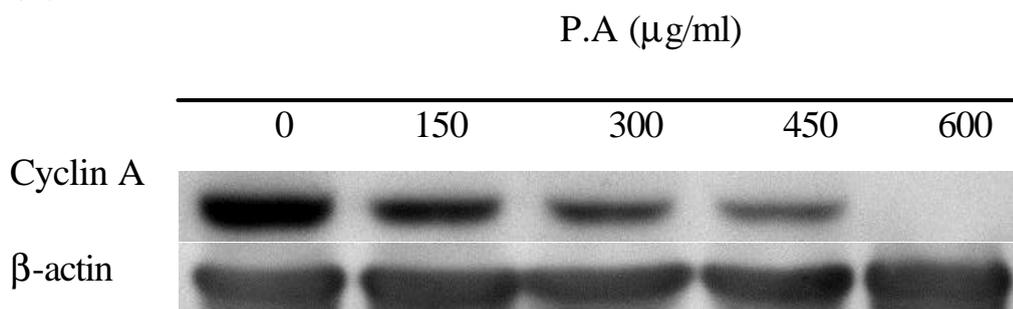
經西方點墨法於 β -actin 比對下測定 G2/M 期相關檢查點的相關因子 Chk2 濃度。結果發現苦蕒萃取物 150 μ g/ml 處理 24 小時後，就可以有異差的增加 Chk2 濃度，隨藥物劑量升高增加濃度作用也加強 (圖二十二)。

經西方點墨法於 β -actin 比對下測定 G2/M 期相關檢查點的相關因子 cdc25c。結果發現苦蕒萃取物 150 μ g/ml 就可以有異差的減低 cdc25c 濃度達，隨藥物劑量升高抑制作用也加強 (圖二十三)

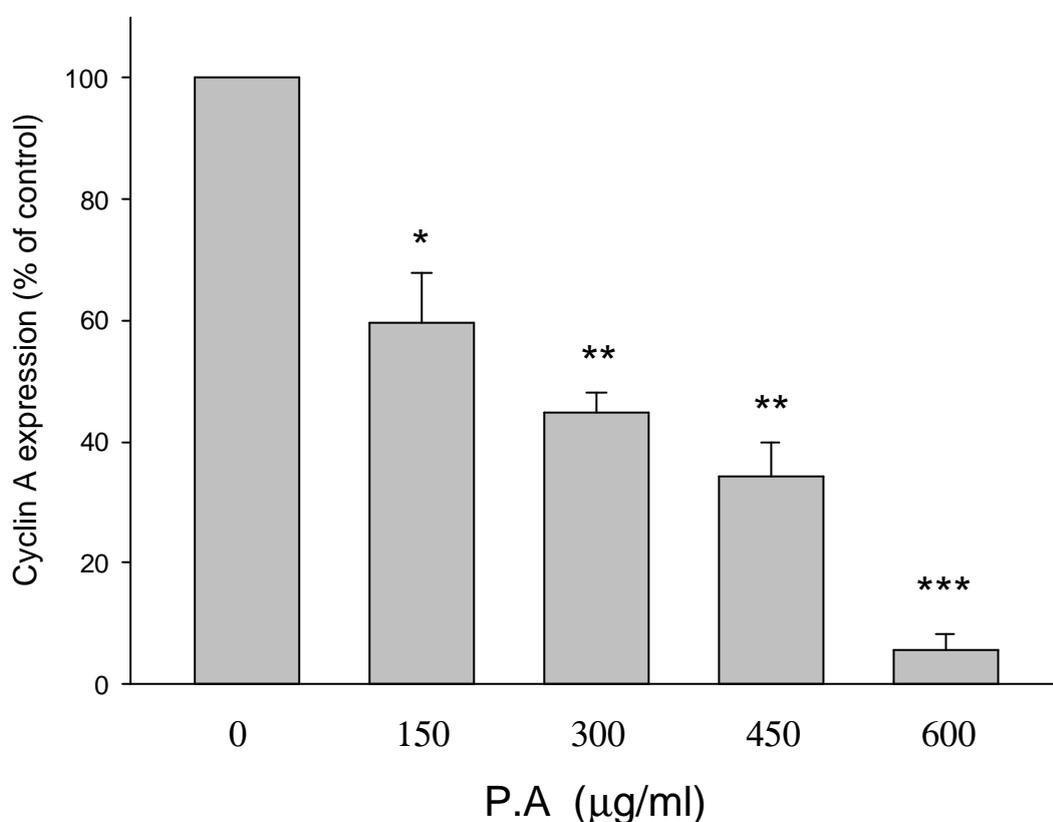
經西方點墨法於 β -actin 比對下測定 G2/M 期相關檢查點的相關因子 Wee1 濃度。結果發現苦蕒萃取物 150 μ g/ml 處理 24 小時後，就可以有異差的增加 Wee1 濃度，隨藥物劑量升高增加濃度作用也加強 (圖二十四)。

所以根據實驗結果顯示苦蕒萃取物處理 24 小時後，可以有異差的影響細胞週期中的 G2/M 期相關檢查點的相關因子；Chk2、Cdc25c、Wee1 濃度。

(A)

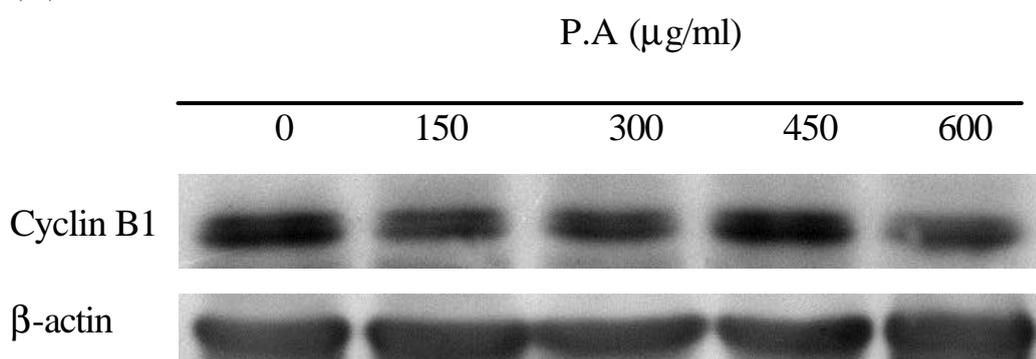


(B)

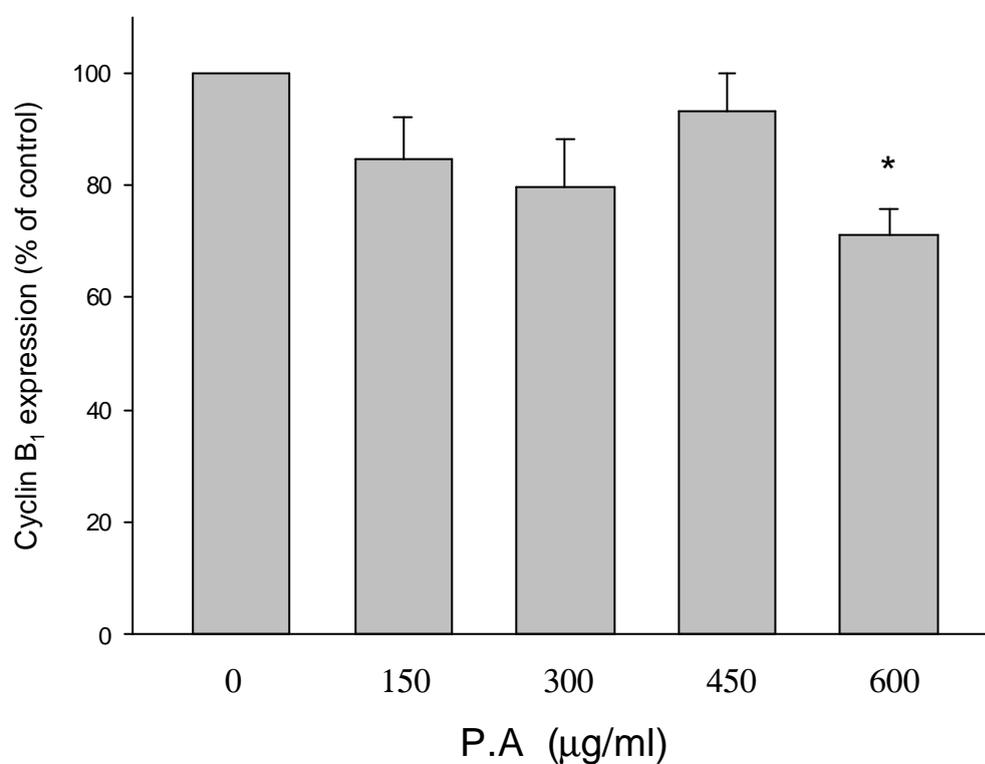


圖十七. (A) 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Cyclin A 蛋白的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B) Cyclin A 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差 (mean \pm SD) 表示, n=3。*代表 P 值小於 0.05、**代表 P 值小於 0.01、***代表 P 值小於 0.001。

(A)

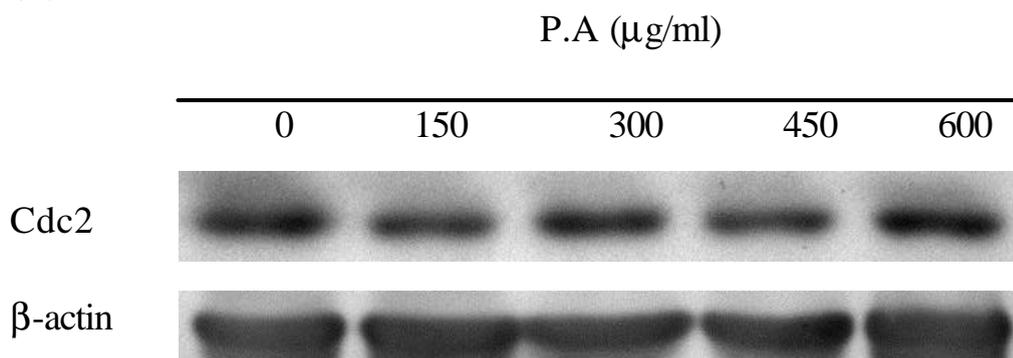


(B)

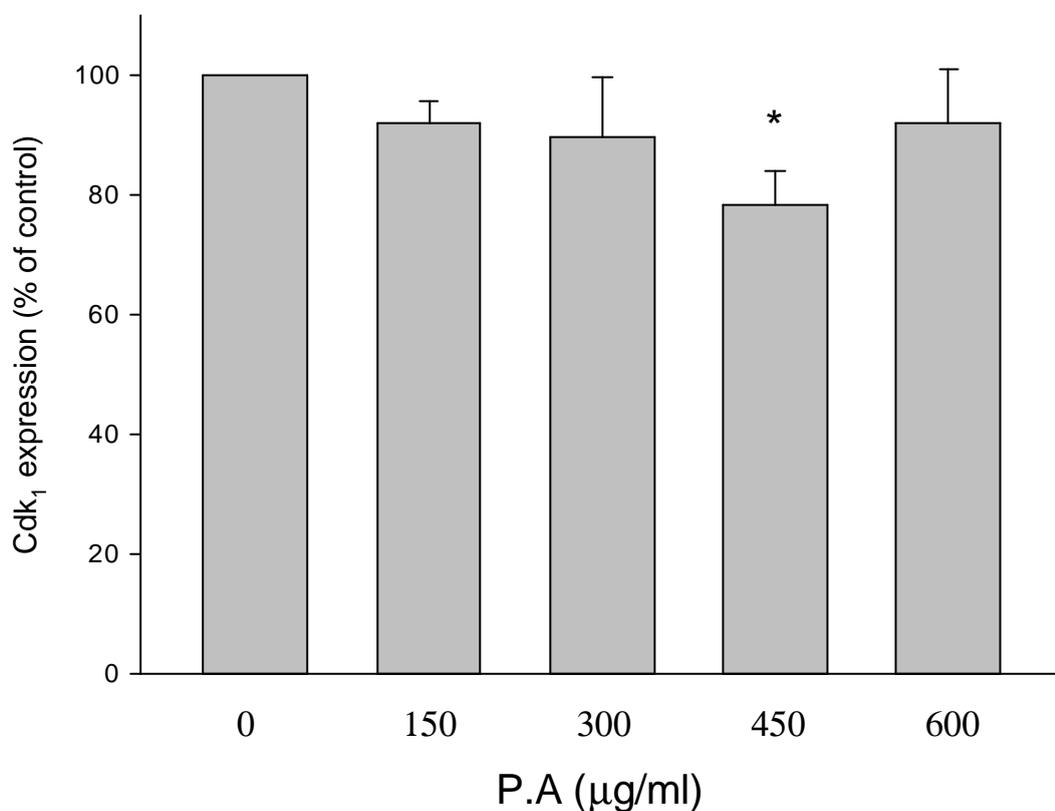


圖十八. (A) 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Cyclin B1 蛋白的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B) Cyclin B1 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差 (mean \pm SD) 表示, n=3。*代表 P 值小於 0.05。

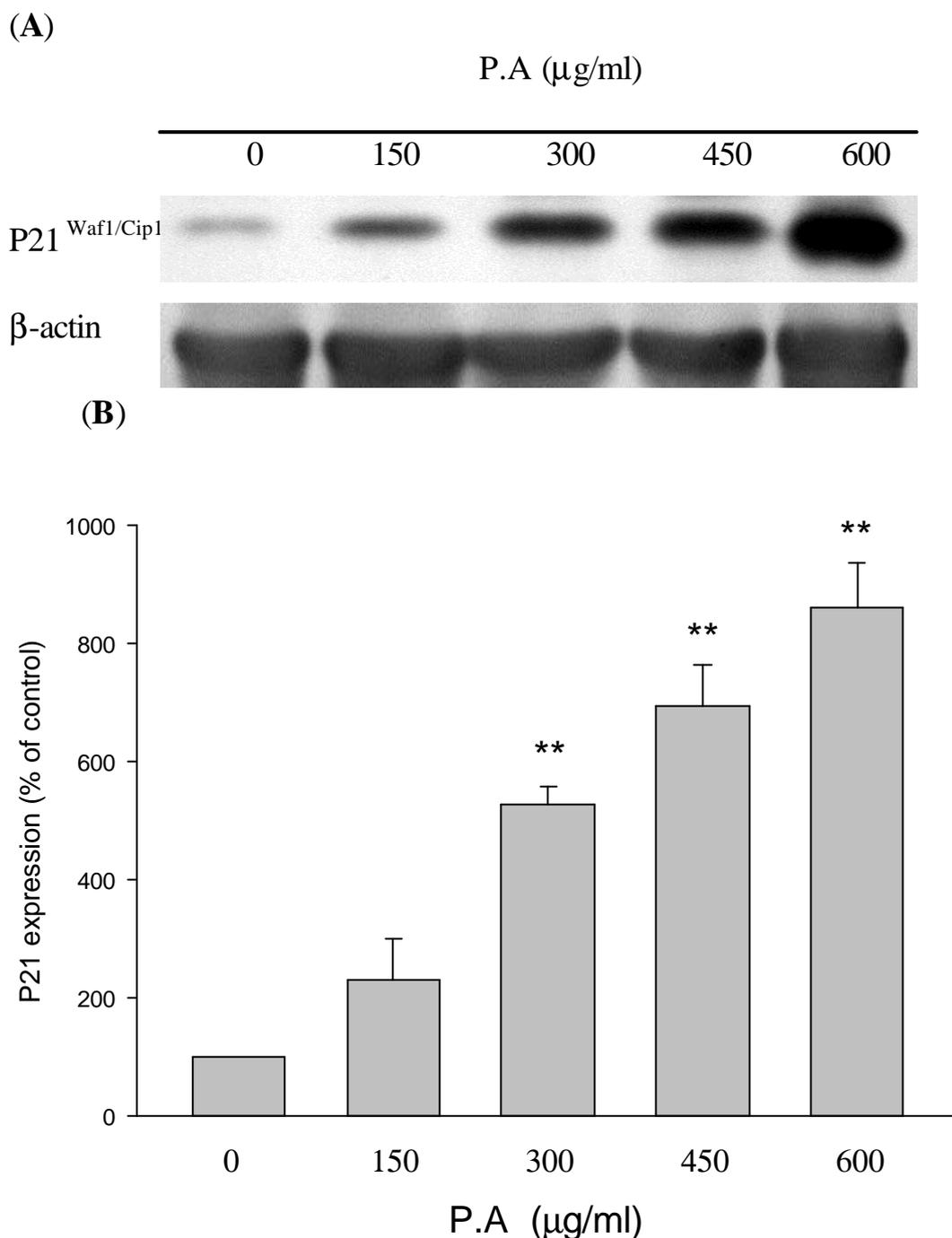
(A)



(B)

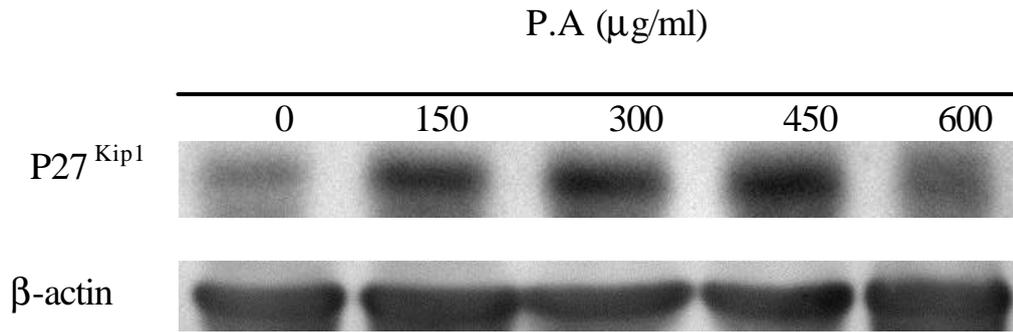


圖十九. (A) 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Cdk1 蛋白的相對表現量。β-actin 為 internal control。 (B) Cdk2 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值±標準差 (mean±SD) 表示, n=3。 *代表 P 值小於 0.05。

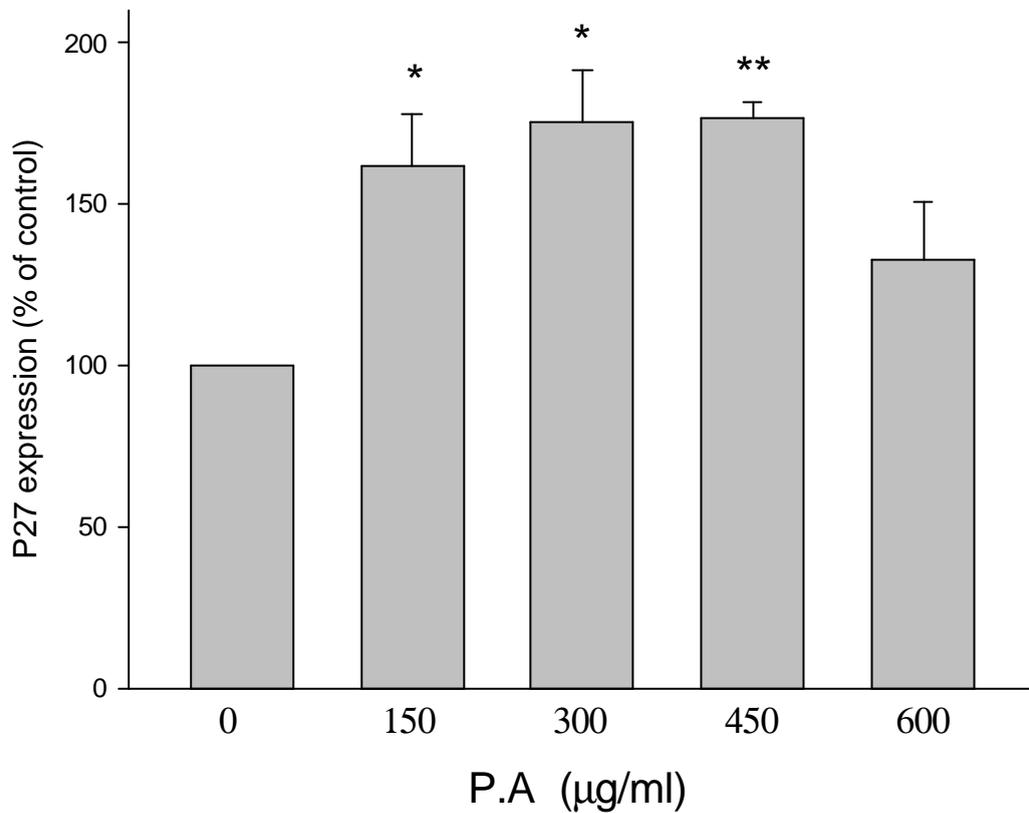


圖二十. (A) 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 P21^{Waf1/Cip1} 蛋白的相對表現量。β-actin 為 internal control。 (B) P21^{Waf1/Cip1} 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值±標準差 (mean±SD) 表示, n=3。*代表 P 值小於 0.05、**代表 P 值小於 0.01、***代表 P 值小於 0.001。

(A)

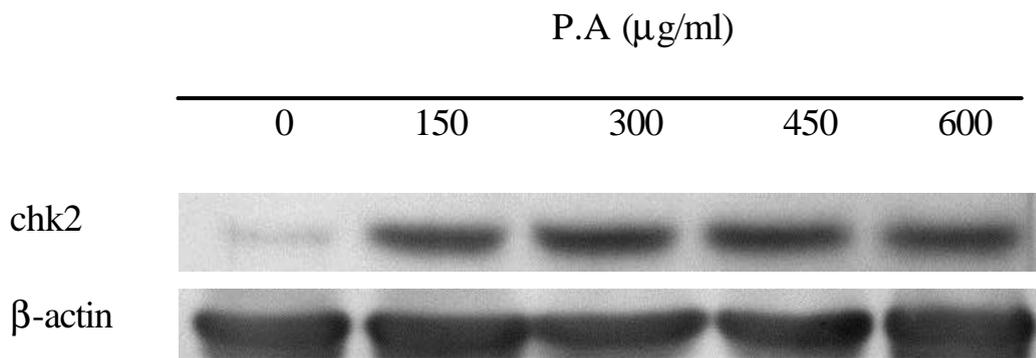


(B)

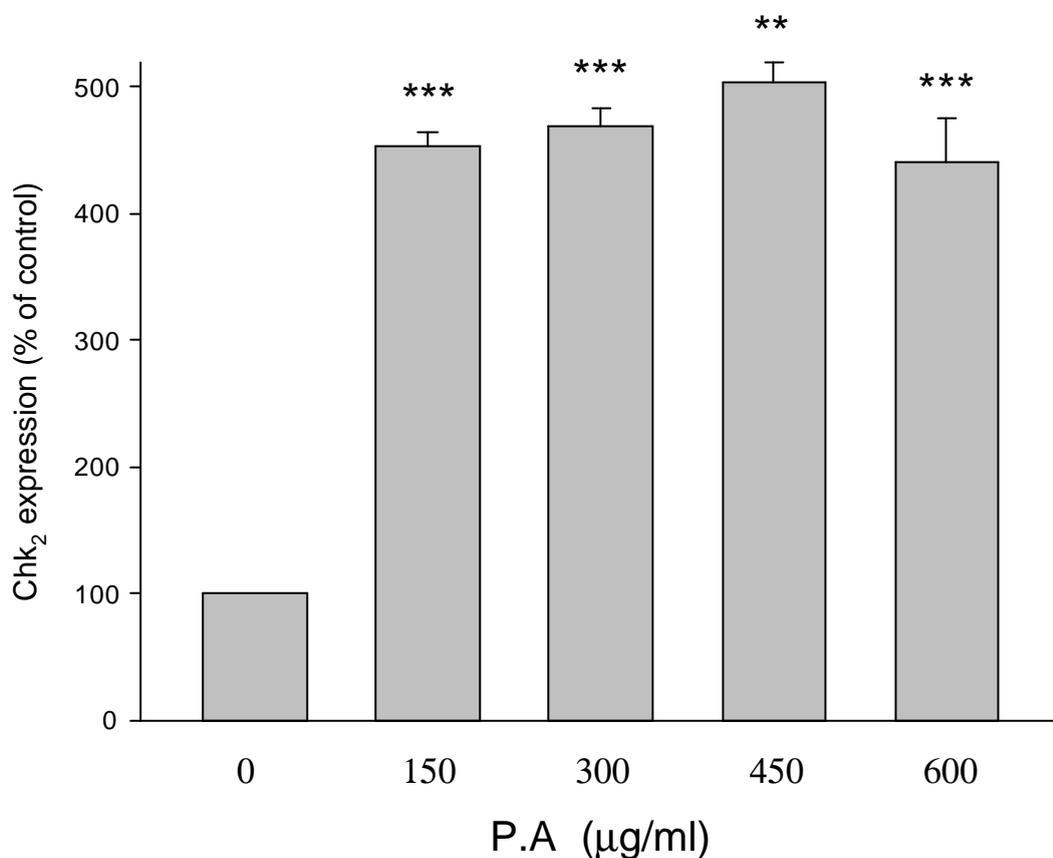


圖二十一. (A) 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 P27^{Kip1} 蛋白的相對表現量。β-actin 為 internal control。 (B) P27^{Kip1} 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值±標準差 (mean±SD) 表示，n=3。*代表 P 值小於 0.05、**代表 P 值小於 0.01。

(A)

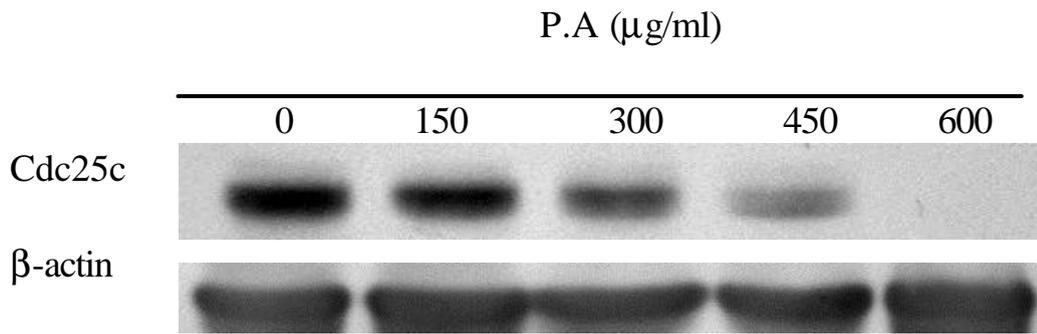


(B)

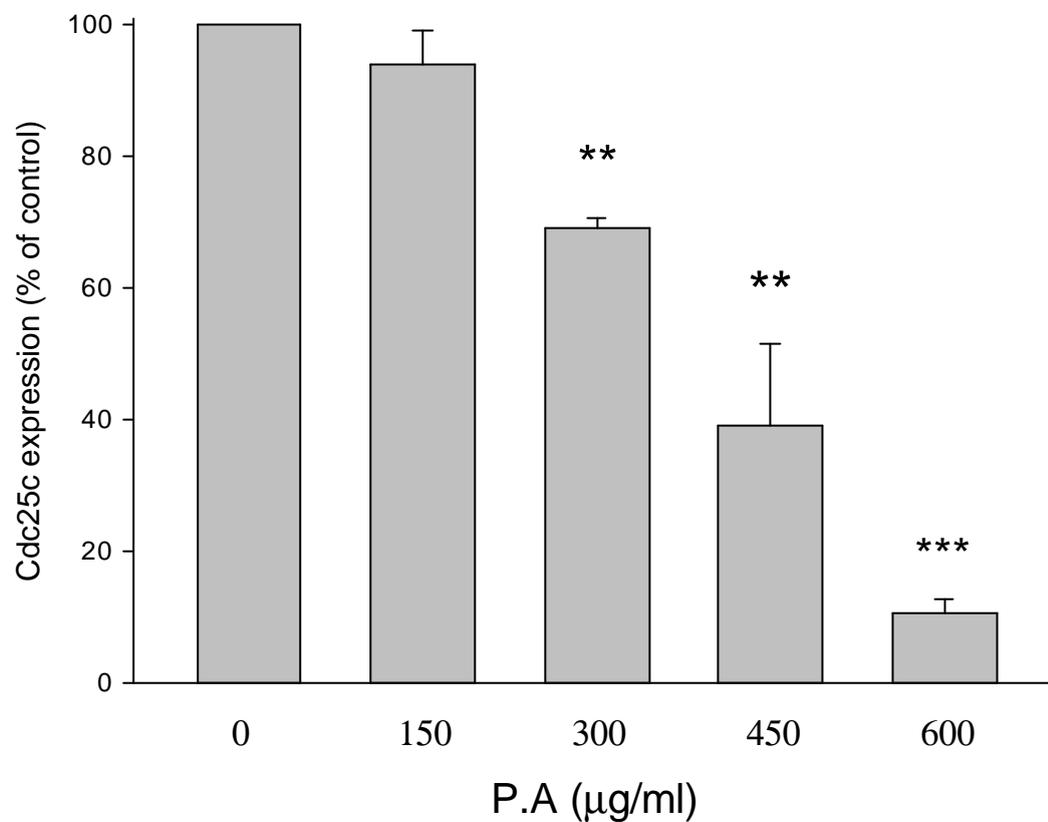


圖二十二. (A) 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Chk2 蛋白的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B) Chk2 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值 \pm 標準差 (mean \pm SD) 表示, n=3。 **代表 P 值小於 0.01、***代表 P 值小於 0.001。

(A)

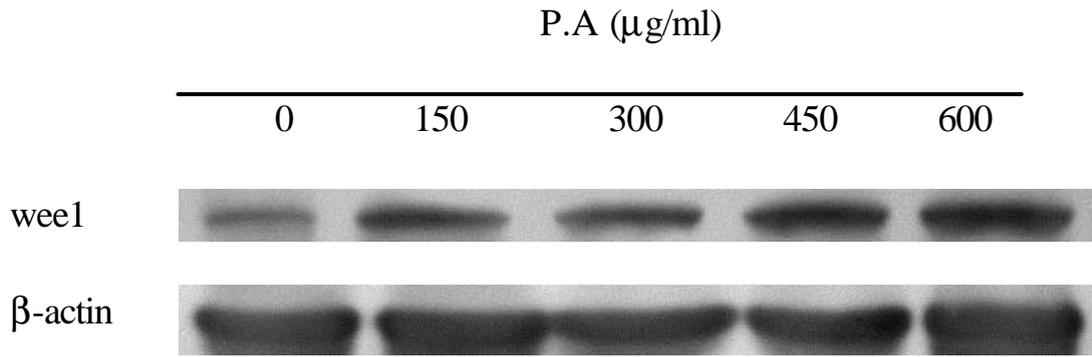


(B)

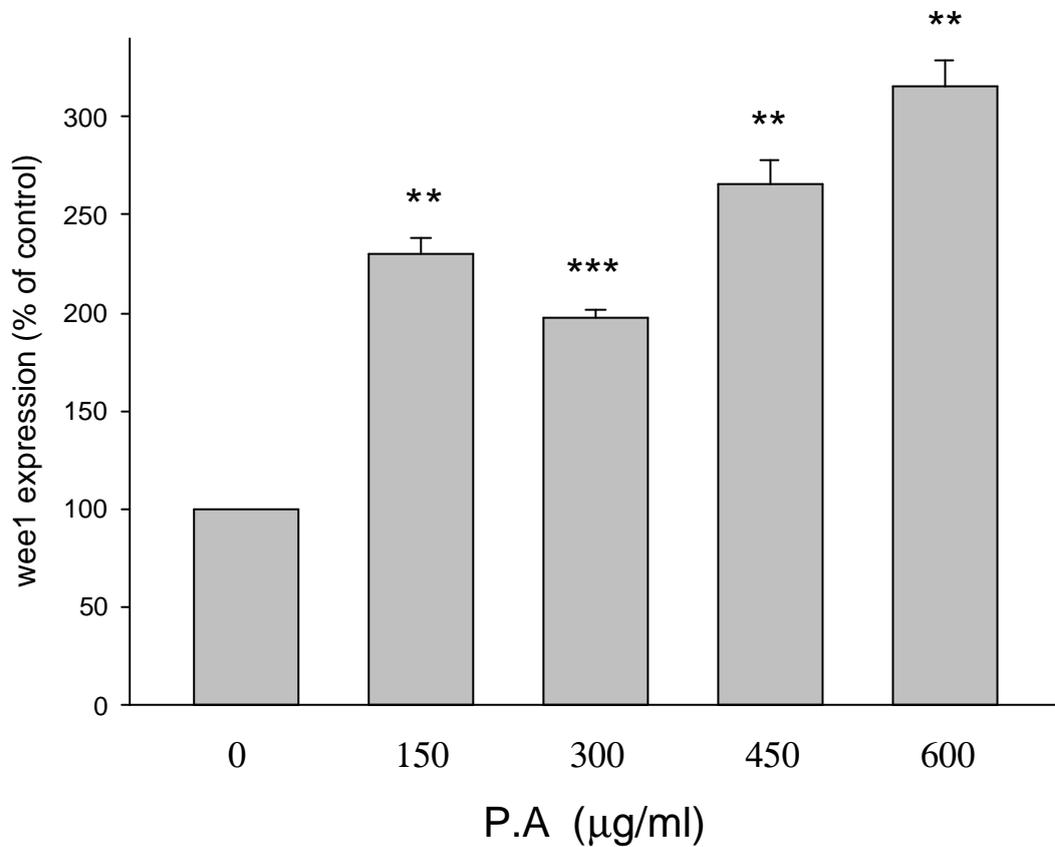


圖二十三. (A) 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Cdc25c 蛋白的相對表現量。β-actin 為 internal control。 (B) Cdc25c 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值±標準差 (mean±SD) 表示，n=3。*代表 P 值小於 0.05、**代表 P 值小於 0.01、***代表 P 值小於 0.001。

(A)



(B)

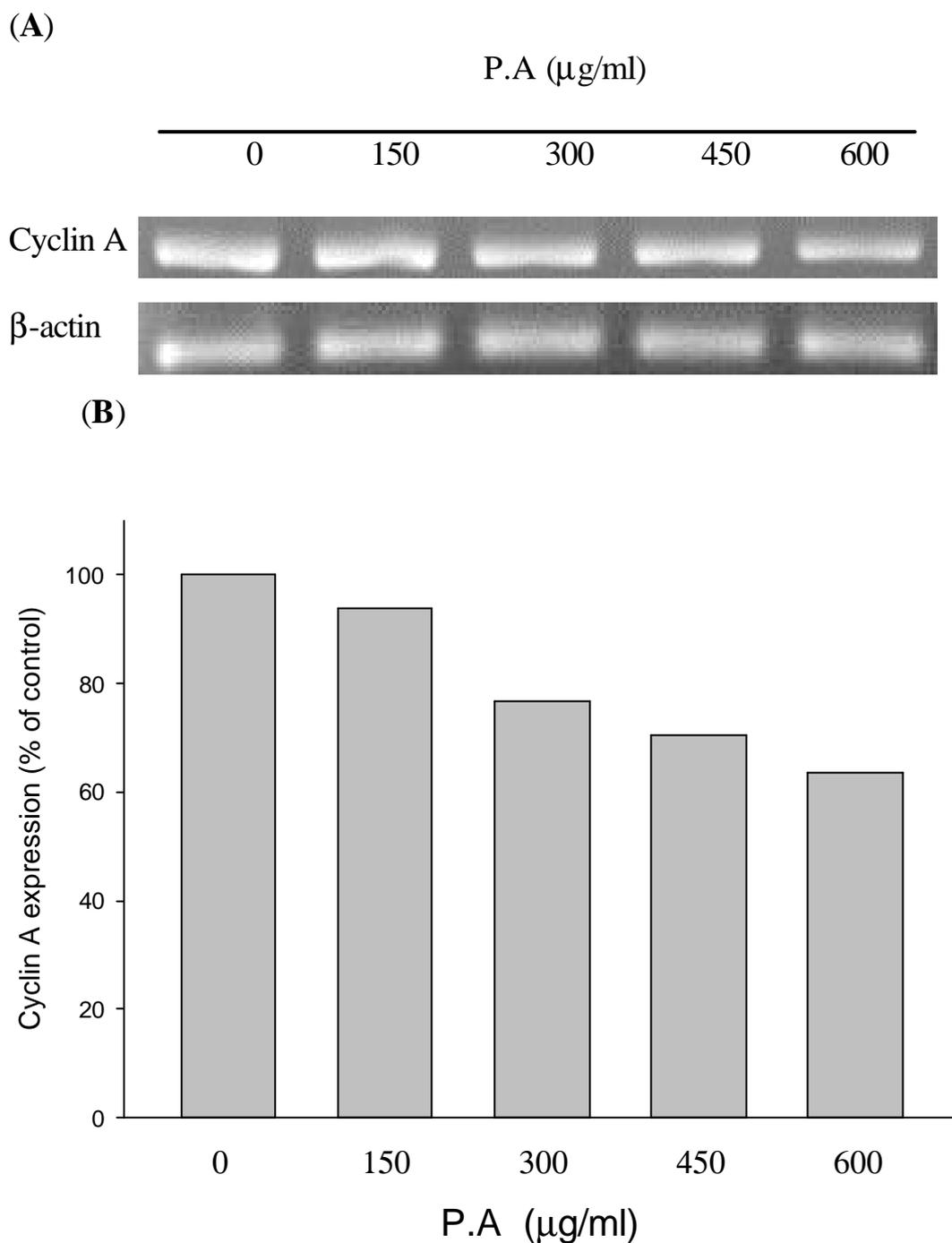


圖二十四. (A) 以西方墨點法分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Wee1 蛋白的相對表現量。β-actin 為 internal control。 (B) Wee1 蛋白相對表現量的統計圖。數據結果以平均值±標準差 (mean±SD) 表示, n=3。*代表 P 值小於 0.05、**代表 P 值小於 0.01、***代表 P 值小於 0.001。

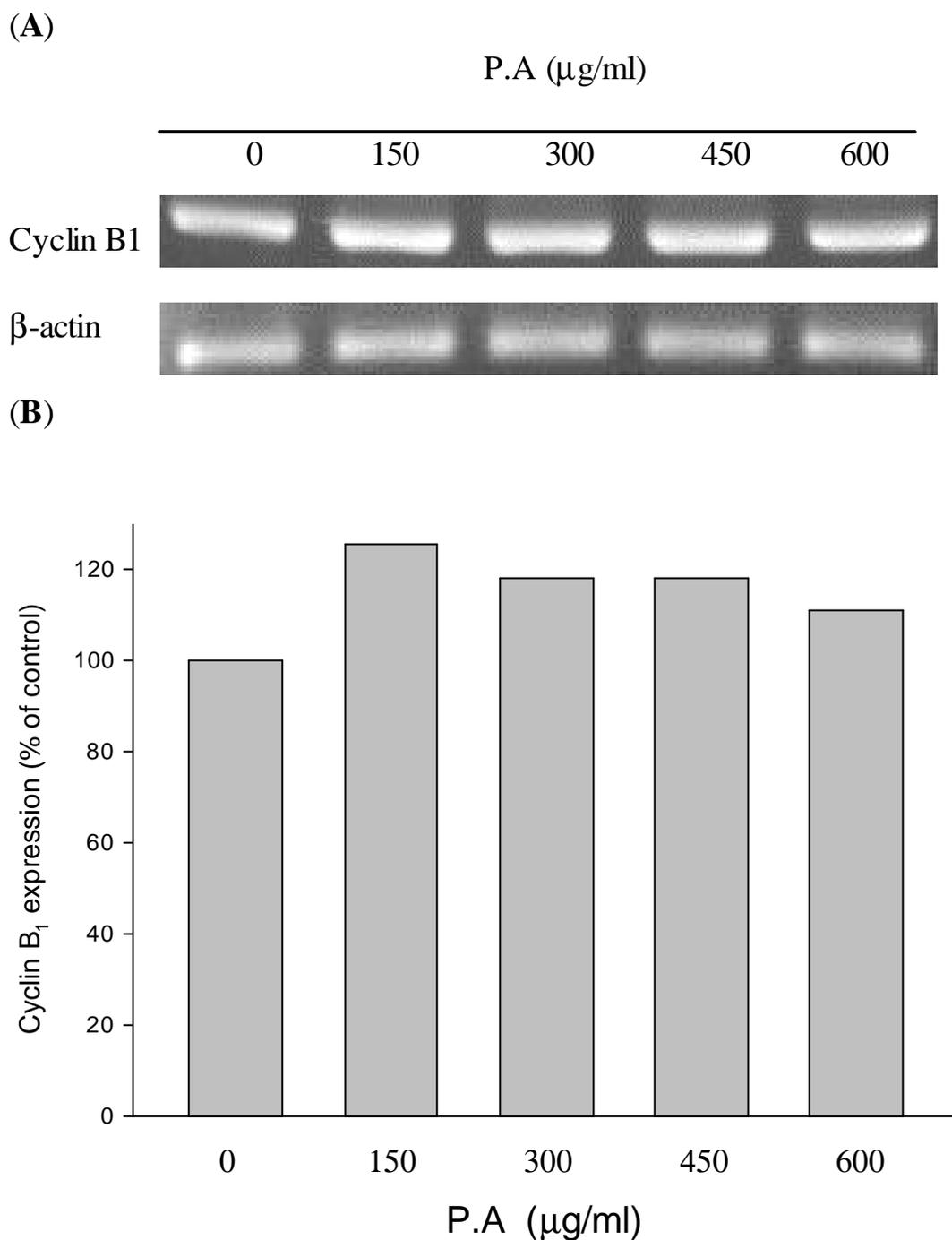
第五節、以 RT-PCR 分析：檢測苦蕒萃取物對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株細胞內與細胞週期相關 mRNA 的影響

以流式細胞儀發現苦蕒萃取物對 MDA-MB 231 乳癌細胞株抑制作用為產生 G2/M phase arrest，使細胞週期停滯及產生細胞凋亡。經西方點墨法於 β -actin 比對下測定 cyclin B1 及 Cyclin A。結果發現苦蕒萃取物，隨藥物劑量升高可以有異差的減低 Cyclin A (圖二十五)。而苦蕒萃取物 600 μ g/ml 才可以有異差的影響 Cyclin B1 濃度 (圖二十六)。

所以為進一步探討苦蕒萃取物對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株細胞內與細胞週期相關 mRNA，以 RT-PCR 分析，苦蕒萃取物對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株細胞內與細胞週期相關 mRNA 的影響。結果發現苦蕒萃取物 150 μ g/ml 就可以有異差的減低 Cyclin A mRNA 濃度，隨藥物劑量升高抑制作用也加強 (圖二十五)。而 Cyclin B1 mRNA 則沒有明顯的差異 (如圖二十六)。



圖二十五. (A) 以 RT-PCR 分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Cyclin A mRNA 的相對表現量。β-actin 為 internal control。 (B) Cyclin A mRNA 相對表現量的統計圖。



圖二十六. (A) 以 RT-PCR 分析 MDA-MB 231 乳癌細胞株經不同濃度處理苦蕒萃取物 24 小時後分析細胞中 Cyclin B1 mRNA 的相對表現量。 β -actin 為 internal control。 (B) Cyclin B1 mRNA 相對表現量的統計圖。

第五章 討論

本研究在型態學方面，發現苦蕒對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株抑制作用也隨之增強。經 12, 24, 48, 72 小時培養後，苦蕒萃取物 150 $\mu\text{g/ml}$ 已經有更明顯的產生抑制增殖作用；300 $\mu\text{g/ml}$ 有明顯的產生細胞無法貼壁現象並制細胞生長，少有空泡化現象；而且 450 $\mu\text{g/ml}$ 除了已經有明顯的產生抑制增殖作用其細胞數目明顯減少，有細胞凋亡體產生，細胞數目亦明顯減少更多空泡化現象 (如圖三-六)。所以此現象與先前文獻苦蕒成分抗腫瘤活性，發現對五種人類腫瘤細胞株如肝癌、鼻咽癌、子宮頸癌、大腸癌及肺癌均有細胞毒性的反應⁽⁸⁷⁻⁸⁸⁾

以流式細胞儀評估存活細胞數，發現苦蕒萃取物對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株增生，伴隨著濃度及時間增加有明顯的抑制效果。發現給予苦蕒萃取物經不同時間培養之後，苦蕒萃取物 150 $\mu\text{g/ml}$ 在 12 小時就有產生抑制作用，細胞數目約隨著藥物濃度增加而抑制作用越明顯(七)。苦蕒萃取物對人類 MDA-MB 231 乳癌細胞株增生，伴隨著濃度及時間增加有明顯的抑制效果。

給予不同濃度 (0-600 $\mu\text{g/ml}$) 苦蕒萃取物，經 12, 24, 48, 72 小時分別取出細胞來檢測細胞週期改變的情形。苦蕒萃取物於 150 $\mu\text{g/ml}$ 時就發生 G2/M phase arrest；於 300 $\mu\text{g/ml}$ 時明顯發生 G2/M phase arrest，其比例增加，隨著濃度增加而越明顯。隨著時間增加，G2/M

phase arrest 有稍微的下降(圖八)。經統計後發現於 300 $\mu\text{g/ml}$ 時明顯減低 G0/G1 phase, 隨著濃度增加而減低越明顯, 但對 G2/M phase 明顯增加, 隨著濃度增加而越明顯(圖九-十五)。所以可確定苦蕒萃取物對 MDA-MB 231 乳癌細胞株抑制作用為產生 G2/M phase arrest, 使細胞週期停滯及產生細胞凋亡。

再經西方點墨法測定乳癌細胞株細胞內與細胞週期相關蛋白質的影響, 進而探討其分子作用機轉。發現苦蕒萃取物對與細胞週期中的 G2/M 期相關的 cyclins (cyclin B1 ; Cyclin A)具抑制作用。

測定與細胞週期中的 G2/M 期相關的 CDKs (cdc2); 以西方點墨法於 β -actin 比對下測定 cdc2。結果發現苦蕒萃取物 150 $\mu\text{g/ml}$ 就可以影響 cdc2 濃度。而 450 $\mu\text{g/ml}$ 才可以有異差的減低 cdc2 濃度 (圖十九)。所以根據實驗結果顯示苦蕒萃取物, 可能有異差的減低與細胞週期中的 G2/M 期相關的 Cdc2, 但影響小 (圖十九)。

測定與細胞週期中的 G2/M 期相關的 CDKIs (p21^{Waf1/Cip1} 及 p27^{Kip1}), 結果發現苦蕒萃取物 150 $\mu\text{g/ml}$ 處理 24 小時後, 就可以有異差的增加 p21^{Waf1/Cip1} 濃度, 隨藥物劑量升高增加濃度作用也加強 (圖二十)。而苦蕒萃取物 150 $\mu\text{g/ml}$ 處理 24 小時後, 就可以有異差的增加 p27^{Kip1} 濃度, 隨藥物劑量升高增加濃度作用也加強 (圖二十一), 但 600 $\mu\text{g/ml}$ 處理 24 小時後, 就可以有異差的增加 p27^{Kip1} 濃度作用反

而減低(圖二十一)。所以根據實驗結果顯示苦蕒萃取物，可以有異差的增加與細胞週期中的 G2/M 期相關的週期蛋白依賴抑制激? p21^{Waf1/Cip1} 及 p27^{Kip1} 濃度。

測定與細胞週期中的 G2/M 期相關檢查點的相關因子，結果發現苦蕒萃取物 150 $\mu\text{g/ml}$ 處理 24 小時後，就可以有異差的增加 Chk2 濃度，隨藥物劑量升高增加濃度作用也加強 (圖二十二); 苦蕒萃取物 150 $\mu\text{g/ml}$ 就可以有異差的減低 cdc25c 濃度達，隨藥物劑量升高抑制作用也加強 (圖二十三); 苦蕒萃取物 150 $\mu\text{g/ml}$ 處理 24 小時後，就可以有異差的增加 Wee1 濃度，隨藥物劑量升高增加濃度作用也加強 (圖二十四)。

我們發現苦蕒增降低了 cdc2 的活性，增強 cdc2 的磷酸化，並且增加 p21^{waf1/cip1}、p27^{Kip1} 的表現，使細胞週期受到抑制。此外，苦蕒增加 Cdc25c 磷酸化而失去活性，但 Wee1 活性增強。從以上的結果，我們的結論苦蕒會導致乳癌細胞 (MDA-MB-231) G2/M 滯留：(1) Cdc25c 量降低，Wee1 量增加，導致 Cdc2 無法去磷酸化而失去活性。(2) p21^{waf1/cip1}、p27^{Kip1} 的表現增加，抑制 Cdc2 活性。這些結果顯示苦蕒可能會使 Cdc25c 磷酸化是經由 Chk2 活化。

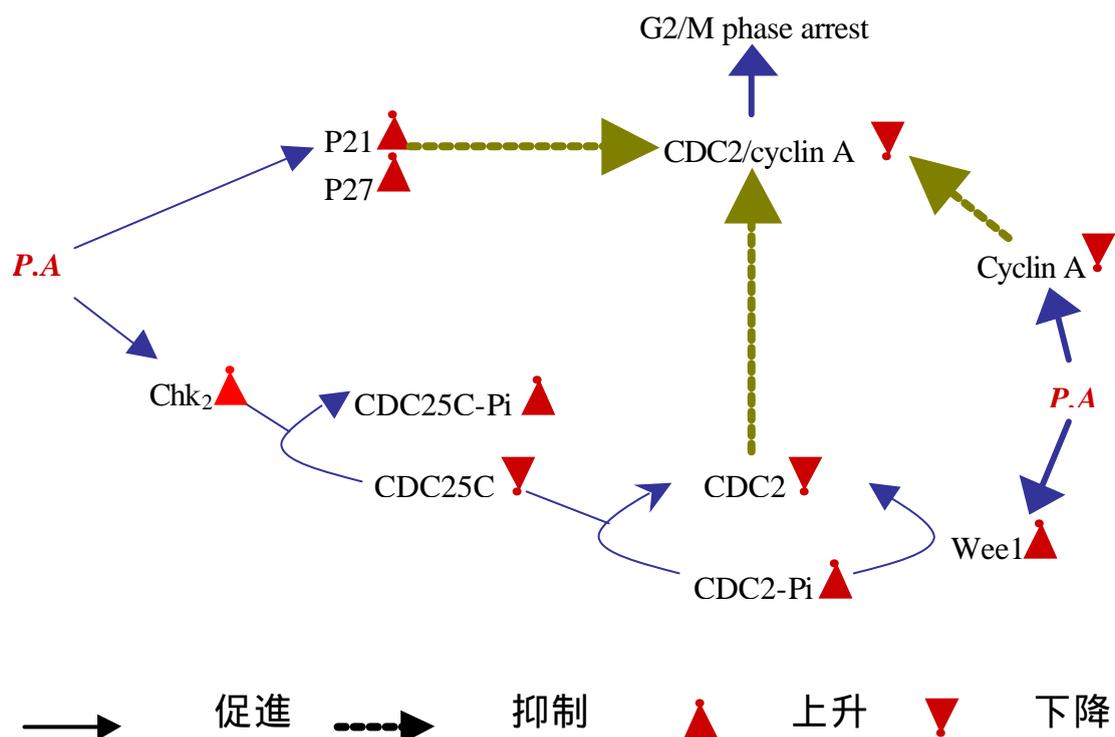
近年發現 p21^{waf1/cip1} 蛋白將不會抑制 G1 進行，而是 G2/M⁽⁹³⁾。除外 p21^{waf1/cip1} 會活化 Cdc2 的 Tyr-15 去磷酸化，而這各化合物缺乏? 的活化，因此 p21^{waf1/cip1} 扮演著抑制 Cdc2 的角色和 G2 滯留⁽⁹⁴⁾。而 MDA-MB-231 是 P53 所突變而成的，因此 P53 沒有表現功能⁽⁹⁵⁾，因此我們再這次實驗中將不予探討。

雖然最近的研究發現，苦蕒對於血癌和肝癌能抑制增生⁽³⁻⁴⁾，但是能否有干擾細胞週期的運轉沒有詳細探討。於本研究中證明苦蕒對於人類乳癌細胞，隨著濃度及時間增加，細胞週期停止G2/M期。如圖6-13。顯然地不同的癌細胞，苦蕒會有不同的作用，至少於本研究苦蕒對於人類乳癌細胞，可以使其細胞週期停止在G2/M期來抑制細胞增生。理由為在細胞週期中的G2/M期會大量表現的cyclin B1、cyclin A及Cdc2，經苦蕒處理24小時後，伴隨著濃度明顯下降（圖十七、二十、十九），這些實驗結果與細胞週期停止在G2/M期的文獻有一定地吻合，首先p21^{waf1/cip1}會與cyclin A/Cdk2複合體專一性結合並且抑制複合體的活性，而導致G2滯留⁽⁹⁶⁾。

另一方面，p21、p27（CDKI；cyclin-dependent kinase inhibitor）的表現量也會隨著加入苦蕒而表現量增加，故推論 p21^{waf1/cip1}、p27^{Kip1}也許是調控促使人類乳癌細胞發生細胞週期停止在G2/M期的主要因子。因為研究發現 p21^{waf1/cip1}及 p27^{Kip1}可以抑制 cyclin A、cyclin B1及 Cdc2 複合物的活性⁽⁹⁷⁾。如圖二十、二十一。。在正常細胞週期的運轉，CDK2 要與 cyclin A 結合成複合物並去磷酸化才会有作用。具活性的 CDK2 與 cyclin A 複合物，可以使細胞週期的 G2 期進入 M 期⁽⁹⁸⁾。基於實驗結果，推測蘆薈大黃素對於人類乳癌細胞的抑制增生是透過多重不同的機制。

而導致G2/M滯留的控制因子就是細胞週期的檢查點（check point）也是由許多的蛋白所調控⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾。所以苦蕒促使乳癌細胞（MDA-MB-231）DNA受損，導致chk2磷酸化的增加，使得Cdc25c也被磷酸化，因此cdc25c的量因被磷酸化而下降，而當cdc25c降低就無法將cdc2的T-14、Y-15去磷酸化，所以G2/M無法進行產生滯留⁽¹⁰²⁻¹⁰³⁾。而此論點剛好符合苦蕒於MDA-MB-231在24小時Chk2在150μg/ml有

明顯的增加（圖二十二），Cdc25c在300 $\mu\text{g/ml}$ 也有增加（圖二十三）。檢查點除了Cdc25c會影響cdc2之外，還有一各因子就是Wee1，Wee1也是促使Cdc2上的T-14、Y-15去磷酸化，所以G2/M無法進行產生滯留⁽¹⁰⁴⁾。而此論點跟我們做出來的實驗吻合，Wee1在150 $\mu\text{g/ml}$ 就有明顯的增加（圖二十二）。



細胞死亡可以區分為細胞凋亡與細胞壞死，兩者差別與致癌物所誘發的癌症和癌化息息相關⁽⁹⁹⁾。利用 PI 溶液染色，用流式細胞儀分析細胞內 Sub-G1 的比例（即 Apoptotic nuclei）給予苦蕒抽取的 Ethyl Acetate(300 $\mu\text{g/ml}$)的乳癌細胞，可以看到 Sub-G1 的比例也增加(圖十四)。有文獻指出粒腺體中的 cytochrome C 釋出可以使 caspase 活化誘導細胞凋亡⁽¹⁰⁰⁾。於本篇研究中，苦蕒抽取的 Ethyl Acetate 層是透過哪一個路徑誘導細胞凋亡，仍然須要作更深入的研究。總結來說，基於現有的實驗結果，苦蕒抑制人類乳癌細胞株細胞增殖是透過引發細胞週期停止在 G2/M 期而苦蕒的 Ethyl Acetate 層會促使細胞凋亡。

第六章 結論

二十世紀之後，癌症成為人類危害健康之頭號殺手，而人類乳癌又為許多癌症中不容易治療的疾病。針對乳癌的治療一般為傳統的化學治療，但是化療的缺點即在於需使用高劑量的藥物，其對於人體正常細胞以及生長極快的毛囊細胞、表皮細胞均具有同等的傷害能力，致使病人需忍受掉髮、噁心、嘔吐...等副作用，最後導致病人順從性不佳而終告治療失敗。

最近的研究發現，苦蕒能降低人類乳癌細胞的存活率但對於正常細胞則無較強的細胞毒性。由於苦蕒對於癌細胞有專一性的抑制效果以及苦蕒的 Ethyl Acetate 層會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)及細胞凋亡(apoptosis)等機制，評估苦蕒(*Physalis angulata*)對於人類乳癌細胞株(MDA-MB-231)抗癌的角色。由實驗數據發現，苦蕒對人類乳癌細胞株會抑制細胞增生、細胞週期停止在 G2/M 期(G2 / M phase arrest)及苦蕒抽取的 Ethyl Acetate 層會誘導細胞凋亡。同時由西方點墨法(immunoblotting)分析細胞週期素(cyclin A、cyclin B1)，結果顯示苦蕒對 cyclin B1 影響不大，而 cyclin A 明顯降低。分析細胞週期素激酶(CDK1)，CDK1 再高濃度下(600 μ g/ml)有明顯下

降。另一方面，而引發細胞週期停止在 G2/M 期之上游因子 p21、p27 的表現量也會隨著加入苦蕒而表現量增加，故推論 p21、p27 也許是調控促使人類乳癌細胞株發生細胞週期停止在 G2/M 期的主要因子。另一各 G2/M 期檢查點也會影響 G2/M 的滯留，所以苦蕒促使乳癌細胞(MDA-MB-231)DNA 受損，導致 chk2 磷酸化的增加，使得 Cdc25c 也被磷酸化，因此 cdc25c 的量因被磷酸化而下降，而當 cdc25c 降低就無法將 cdc2 的 T-14、Y-15 去磷酸化，所以 G2/M 無法進行產生滯留。

流式細胞儀分析實驗指出，苦蕒會誘發人類乳癌細胞株產生凋亡現象(apoptosis)。綜合以上之論點得之，苦蕒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 G2/M 期及苦蕒抽取的 Ethyl Acetate 層促使凋亡發生。

第七章 參考文獻

1. Boyle P, Leon ME, Maisonneuve P, Autier P. Cancer control in women. Update 2003. *Int J Gynaecol Obstet.* 2003; 83: 179-202.
2. Kaklamani V, O'Regan RM. New targeted therapies in breast cancer. *Semin Oncol.* 2004; 31: 20-5
3. Chiang HC, Jaw SM, Chen PM, Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro. *Anticancer Res.* 1992; 12:1155-62.
4. Chiang HC, Jaw SM, Chen CF, Kan WS, Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. *Anticancer Res.* 1992; 12: 837-43.
5. Kelsey JL, Horn-Ross PL. Breast cancer: magnitude of the problem and descriptive epidemiology. *Epidemiologic Reviews.* 1993; 15: 7-16.
6. Kelsey JL, Bernstein L. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annual Review of Public Health.* 1996; 17: 47-67.
7. Hanahan D and Weinberg RA : The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100: 57-70.
8. Kelsey JL and Bernstein L : Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annu. Rev.* 1996; 17: 47-67.
9. Kelsey JL and Horn-Ross PL : Breast cancer: magnitude of the problem and descriptive epidemiology. *Epidemiol. Rev.* 1993; 15: 7-16.
10. McCready T. Management of patients with breast cancer. *Nurs Stand.* 2003; 17: 45-53.
11. Friedrich M, Diesing D, Villena-Heinsen C, Felberbaum R, Kolberg HC, Diedrich K. Taxanes in the first-line chemotherapy of metastatic breast cancer: review. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2004; 25: 66-70.

12. A.M. Brzozowski, A.C.W. Pike, Z. Dauter et al., Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997;389 : 753–758.
13. Buzdar AU. Hormonal therapy in early and advanced breast cancer. *Breast J*. 2004; 10: 19-21.
14. Hakomori S. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol*. 2001; 491: 369-402.
15. Ross JS, Gray GS. Targeted therapy for cancer: the HER-2/neu and Herceptin story. *Clin Leadersh Manag Rev*. 2003; 17: 333-40.
16. Baserga R. Wiebel F. The cell cycle of mammalian cells. *International Review of Experimental Pathology*. 1969; 7: 1-30.
17. 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.
18. Hanna DE. Rethinaswamy A. Glover CV. Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270: 25905-14.
19. Smith ML, and Fornace AJ Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutation Research*. 1996; 340: 109-24.
20. Sherr CJ. Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*. 1999; 13: 1501-12,
21. Hunter T, and Pines J. Cyclin D and CDK inhibitors come of age *Cell*. *Cyclins and cancer II*. 1994; 79: 573-82.

22. Koepp DM. Harper JW. Elledge SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*. 1999; 97: 431-4.
23. Reed SI, Bailly E, Dulic V, Hengst L, Resnitzky D, and Slingerland J. G1 control in mammalian cells. *Journal of Cell Science - Supplement*. 1994; 18: 69-73.
24. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995; 374:131-4.
25. Sherr CJ, and Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development*. 1995;9:1149-63.
26. Brooks, R., Fantes, P., Hunt, T., and Wheatley, D. eds. *The cell cycle*. Cambridge: *The Company of Biologists Ltd*, 1989
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. Hutchison, C., Glover, D.M. *Cell cycle control*. New York: Oxford University Press., 1995
29. Martinez, A.M., Afshar, M., Martin, F., Cavadore, J.C., Labbé, J.C., and Dorée, M. Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J*. 1997; 16: 343-354.
30. Vecchione A. Ishii H. Baldassarre G. Bassi P. Trapasso F. Alder H. Pagano F. Gomella LG. Croce CM. Baffa R. FEZ1/LZTS1 is down-regulated in high-grade bladder cancer, and its restoration suppresses tumorigenicity in transitional cell carcinoma cells. *American Journal of Pathology*. 2002; 160: 1345-52,.
31. Meraldi P. Lukas J. Fry AM. Bartek J. Nigg EA. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and

- Cdk2-cyclin A. *Nature Cell Biology*. 1999. 1: 88-93.
32. Sutherland C. Campbell DG. Cohen P. Identification of insulin-stimulated protein kinase-1 as the rabbit equivalent of rskmo-2. Identification of two threonines phosphorylated during activation by mitogen-activated protein kinase. *European Journal of Biochemistry*. 1993; 212: 581-8.
 33. Baldin V. Lukas J. Marcote MJ. Pagano M. Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & Development*. 1993; 7: 812-21.
 34. Courjal F. Louason G. Speiser P. Katsaros D. Zeillinger R. Theillet C. Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. *International Journal of Cancer*. 1996; 69: 247-53.
 35. Koff A. Cross F. Fisher A. Schumacher J. Leguellec K. Philippe M. Roberts JM. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell*. 1991; 66: 1217-28,.
 36. Ohtani K. DeGregori J. Nevins JR. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92: 12146-50.
 37. Wimmel A. Lucibello FC. Sewing A. Adolph S. Muller R. Inducible acceleration of G1 progression through tetracycline-regulated expression of human cyclin E. *Oncogene*. 1994; 9: 995-7.
 38. Hinchcliffe EH. Li C. Thompson EA. Maller JL. Sluder G. Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science*. 1999; 283: 851-4.
 39. Martinez, A.M., Afshar, M., Martin, F., Cavadore, J.C., Labbé, J.C.,

- and Dorée, M. Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J.* 1997; 16: 343-354.
40. 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.
41. 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.
42. Reed, S.I., Bailly, E., Dulic, V., Hengst, L., Resnitzky, D., and Slingerland, J. G1 control in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 1994; 18: 69-73.
43. Pines, J. Cyclin-dependent kinase inhibitors: the age of crystals. *Biochem. Biophys. Acta.* 1997; 1332: 39-42.
44. Brooks, G., Poolman, R.A., and Li, J.M. Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: Role of cyclin- dependents kinase inhibitors. *Cardiovasc. Res.* 1998; 39: 301-311.
45. Driscoll JS, et al. Structure-antitumor activity relationships among quinone derivatives. *Cancer Chemother Rep.* 1974; 2: 1-362.
46. Agami R. Bernards R. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell.* 2000; 102: 55-66.
47. Polyak K. Lee MH. Erdjument-Bromage H. Koff A. Roberts JM. Tempst P. Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular

- antimitogenic signals. *Cell*. 1994; 78: 59-66.
48. Paulovich AG. Margulies RU. Garvik BM. Hartwell LH. RAD9, RAD17, and RAD24 are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Genetics*. 1997; 145: 45-62.
49. Stewart ZA. Pietsenpol JA. p53 Signaling and cell cycle checkpoints. *Chemical Research in Toxicology*. 2001; 14: 243-63.
50. Abraham A. Macnicol MF. Growth arrest lines and recurrent patellar dislocation: a new sign. *Knee*. 2001; 8: 163-5.
51. Sanchez A. Alvarez AM. Benito M. Fabregat I. Cycloheximide prevents apoptosis, reactive oxygen species production, and glutathione depletion induced by transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology*. 1997; 26: 935-43.
52. Hermeking H. Lengauer C. Polyak K. He TC. Zhang L. Thiagalingam S. Kinzler KW. Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell*. 1997; 1: 3-11.
53. Kawabe T. Suganuma M. Ando T. Kimura M. Hori H. Okamoto T. Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene*. 2002 ; 21: 1717-26.
54. Musacchio A. Hardwick KG. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002; 3: 731-41,.
55. Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochemical Journal*. 1995; 308: 697-711.
56. Draetta G. Eckstein J. Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997; 1332: 53-63.

57. Bartek J. Bartkova J. Lukas J. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Experimental Cell Research*.1997; 237:1-6.
58. Brooks, G., Poolman, R.A., and Li, J.M. Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: Role of cyclin- dependents kinase inhibitors. *Cardiovasc. Res*.1998; 39: 301-311.
59. Zheng A. Mantymaa P. Saily M. Savolainen E. Vahakangas K. Koistinen P. p53 pathway in apoptosis induced by all-trans-retinoic acid in acute myeloblastic leukaemia cells. *Acta Haematologica*. 2000; 103: 135-43.
60. Lockshin, R. A. and Beaulaton, J. Programmed cell death. *Life Sci*. 1974; 15: 1549-65.
61. Reed, J. C. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol*. 1999; 11: 68-75.
62. Cotman, C. W., Whittemore, E. R., Watt, J. A., Anderson, A. J., and Loo, D. T. Possible role of apoptosis in Alzheimer's disease, *Ann N Y Acad Sci*. 1994; 747: 36-49.
63. Behl, C. Apoptosis and Alzheimer's disease, *J Neural Transm*. 2000; 107: 1325-44.
64. Gross, N., Balmas, K., Beretta Brognara, C., and Tschopp, J. Expression of Fas (APO-1/CD95) and Fas ligand (FasL) in human neuroblastoma, *Med Pediatr Oncol*. 2001; 36: 111-4.
65. Ishizaki, Y. Physiological functions of programmed cell death *Seikagaku*. 1998; 70: 365-70.
66. Reed, J. C. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol*. 1999; 11: 68-75.

67. Miller, D. K. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis, *Semin Immunol.* 1997; 9: 35-49.
68. Zornig, M., Hueber, A.O., Evan, G., Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochemica et Biophysica Acta* 2001; 1551: F1-F37.
69. Leonhard, M., Gruber, P., Chott, P.A., Mutations in apoptosis genes : a pathogenetic factor for human disease. *Mutation Research.* 2001; 488: 211-231.
70. Esser, P., Heimann, K., Abts, H., Fontana, A., and Weller, M. CD95 (Fas/APO-1) antibody-mediated apoptosis of human retinal pigment epithelial cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 213: 1026-34.
71. Lundberg, A. S. and Weinberg, R. A. Control of the cell cycle and apoptosis, *Eur J Cancer.* 1999; 35: 1886-94.
72. 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.
73. Ibrado, 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.
74. Reed, J. C. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance, *Curr Opin Oncol.* 1995; 7: 541-6.
75. Reed, J. C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family, *Nature.* 1997; 387: 773-6.
76. Alt, F. W., DePinho, R., Zimmerman, K., Legouy, E., Hatton, K., Ferrier, P., Tesfaye, A., Yancopoulos, G., and Nisen, P. The human

- myc gene family, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986; 51: 931-41.
77. Robertson, M. J., Manley, T. J., Pichert, G., Cameron, C., Cochran, K. J., Levine, H., and Ritz, J. Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells, *Leuk Lymphoma.* 1995; 17: 51-61.
78. Dictor M. Ehinger M. Mertens F. Akervall J. Wennerberg J. Abnormal cell cycle regulation in malignancy. *American Journal of Clinical Pathology.* 1999 ; 112: 40-52.
79. Keyomarsi K. Pardee AB. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993; 90: 1112-6.
80. Catzavelos C. Bhattacharya N. Ung YC. Wilson JA. Roncari L. Sandhu C. Shaw P. Yeger H. Morava-Protzner I. Kapusta L. Franssen E. Pritchard KI. Slingerland JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Medicine.* 1997; 3: 227-30.
81. Donnellan R. Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *Molecular Pathology.* 1998; 51:1-7.
82. van Diest PJ. Michalides RJ. Jannink L. van der Valk P. Peterse HL. de Jong JS. Meijer CJ. Baak JP. Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. Correlations and prognostic value. *American Journal of Pathology.* 1997; 150: 705-11.
83. Courjal F. Louason G. Speiser P. Katsaros D. Zeillinger R. Theillet C. Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian

- cancers: evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. *International Journal of Cancer*. 1996; 69: 247-53. Aug 22.
84. Nabholz JM, Vannetzel JM, Llory JF, Bouffette P. Advances in the use of taxanes in the adjuvant therapy of breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2003; 4:187-92.
 85. Kan WS. *Physalis angulata* L. Pharmaceutical botany. *National research institute of Chinese medicine*, 1981;6th ed pp 495.
 86. Trypanocidal constituents in plants 4. Withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27: 193-7.
 87. Chiang HC, Jaw SM, Chen CF, Kan WS. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. *Anticancer Res*. 1992; 12: 837-43.
 88. Wu SJ, Ng LT, Chen CH, Lin DL, Wang SS, Lin CC. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. *Life Sci*. 2004; 74: 2061-73.
 89. Lin YS, Chiang HC, Kan WS, Hone E, Shih SJ, Won MH. Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L extract. *Am J Chin Med*. 1992; 20: 233-43.
 90. Freiburghaus F, Kaminsky R, Nkunya MH, Brun R. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. *J Ethnopharmacol*. 1996; 55: 1-11.
 91. Pietro RC, Kashima S, Sato DN, Januario AH, Franca SC In vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. *Phytomedicine*. 2000; 7: 335-8.

92. Jaroszeski MJ. Flow cytometry protocols. *Humanan Press* . 1998; pp157-165.
93. Barboule N, Lafon C, Chadebech P, Vidal S, Valette A. Involvement of p21 in the PKC-induced regulation of G2/M cell cycle transition. *FEBS Lett.* 1999; 444: 32–7.
94. Laurence Maggiorella, Eric Deutsch, Valérie Frascogna, Nicole Chavaudra, Laurence Jeanson, Fabien Milliat, François Eschwege, and Jean Bourhis. Enhancement of Radiation Response by Roscovitine in Human Breast Carcinoma in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* 2003; 63: 2513-2517
95. Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W., Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* 1992; 11: 961-971.
96. Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W., Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* 1992 ;11: 961-971.
97. Niculescu AB 3rd. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transition: pRb is acritical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol.* 1998; 18: 629-43.
98. Panaro NJ. Flavone acetic acid induces a G2/M cell cycle arrest in mammary carcinoma cells. *Br J Cancer.* 1999; 80: 1905-1911.
99. Yano H. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Res.* 1994; 54: 448-454.

100. Solange D. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* .2000; 10: 369-377.
101. Gross A. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* .1999; 13: 1899-1911.
102. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ: Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*. 1998; 282: 1893-1897.
103. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*. 1997; 277: 1497–1501.
104. Suda M, Yamada S, Toda T, Miyakawa T, Hirata D. Regulation of Wee1 kinase in response to protein synthesis inhibition. *FEBS Lett* . 2000; 486: 305–9.