

中文摘要

本篇研究為利用天然植物中的香豆精(coumarin)處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)的作用機轉。主要探討目的如下：(1)香豆精是否能抑制子宮頸癌細胞(HeLa)增生。(2)以香豆精處理子宮頸癌細胞是否會誘發細胞凋亡(apoptosis)的現象。(3)以香豆精處理子宮頸癌細胞是否會造成細胞週期停止(cell cycle arrest)的現象。(4)以香豆精處理子宮頸癌細胞對於活性氧化物(reactive oxygen species)、粒線體膜電位改變(mitochondrial membrane potential)、鈣離子(Ca^{2+})產生的影響。(5)以香豆精處理子宮頸癌細胞造成細胞凋亡和細胞週期停止的機制。以 MTT assay 和流式細胞計數儀來偵測細胞的存活率，發現隨著藥物濃度的上升和加藥時間的延長，確實會抑制細胞存活率。以倒立式位相差顯微鏡來觀察細胞型態上的改變，結果發現有細胞型態不完整、細胞膜皺縮、與空泡化的現象。以流式細胞計數儀來偵測細胞週期，發現在 G0/G1 期的細胞比例上升，故香豆精會造成細胞週期的 G0/G1 期的停止，並有細胞凋亡(apoptosis)的現象產生。以流式細胞計數儀來偵測活性氧化物(reactive oxygen species)，發現 ROS 有增加的趨勢，故推測香豆精會誘發細胞產生 ROS。以流式細胞計數儀來偵測粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)，發現粒線體膜電位下降，故推測香豆精會誘發細胞膜孔道的打開，而導致粒線體膜電位下降。以流式細胞計數儀來偵測鈣離子(Ca^{2+})濃度，發現鈣離子(Ca^{2+})濃度升高，故推測香豆精會經由粒線體釋出 Ca^{2+} 進入內膜，造成鈣離子(Ca^{2+})濃度升高。以彗星試驗偵測細胞的 DNA 損傷(damage)，發現在高濃度香豆精處理後，造成細胞拖尾的比例最為明顯，表示有 DNA 損傷的現象。而以 DNA 電泳膠片觀察香豆精對於人類子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞的 DNA 情形，發現 DNA 斷裂呈階梯狀片段，表示有細胞凋亡的現象。而後以西方墨點法(Western blotting)來偵測蛋白表現量的改變，發現 caspase-3、Cdk 4、p53、p21、Bax、Cytochrome c 與 iNOS 蛋白表現量增加，而 Cyclin D、CDK 2、CDC 25A、p15、Bcl-2、Bcl-xl、NF- κ B p50、NF- κ B p65 蛋白表現量減少。綜合以上結果發現：以香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)，在細胞內會產生 ROS，導致 DNA 損傷，進而活化 p53，之後活化 p21，而 p21 會造成 CDC 25A 下降，進而抑制 Cyclin D、Cdk2 的表現，而 p15 亦會抑制 Cyclin D，使細胞停止在 G0/G1 期。當 p21 活化後會使得粒線體內的 Bcl-2 家族蛋白減少，包括 Bcl-2 與 Bcl-xl，並刺激粒線體 Bax 增加，此時粒線體的能量發生變化，粒線體會釋出鈣離子(Ca^{2+})，並造成膜電位下降，而粒線體亦會釋出 cytochrome c，並活化下游的 caspase-3，造成 DNA fragment，並誘發細胞凋亡，最終造成細胞死亡，進而抑制細胞的存活率。

Abstract

In the last years, the strategy of selectively killing tumor cell by the induction of apoptosis has been addressed extensively. In this study, we have addressed the cytostatic and apoptosis effects of coumarin on human cervical carcinoma cell lines (HeLa). Treatment of HeLa cells with coumarin resulted in the inhibition of cell proliferation, arrest of cell cycle in G₀/G₁ phase and commitment to apoptosis. Inhibition of cell proliferation was examined by MTT assay and flow cytometry. The inhibition effect is dose-dependent manner. The effects on cell cycle phases were determined at 100 μ M of coumarin using flow cytometry. The same concentration were used to study apoptosis, detected by morphological cell changes, sub-G₁ peak detection and ladder fragmentation occurrence. Coumarin also induced the levels of Ca²⁺ concentration and decreased the levels of mitochondria membrane potential in HeLa cells. Moreover, the redox events associated with this compound and the protein levels of molecules involving cell cycle regulation and apoptosis have been investigated. The production of reactive oxygen species was slightly increased only after 30 min of treatment with 100 μ M coumarin, reaching a maximum at 36 hr. The results also demonstrated that coumarin down-regulate the expression of cell cycle progress factors cyclin D, Cdc25A and CDK2. The coumarin up-regulate the expression of cell cycle progress factors cytochrome c, p53 and p21. The active form of apoptosis key enzyme caspase-3 was increased and the apoptosis inhibitors Bcl-2 and Bcl-xl were down-regulated. The apoptosis inducer Bax were up-regulated.

Overall, the results suggest a pivotal role for oxidative stress in coumarin-induced apoptosis and, taking into account that tumor cells are deficient in antioxidants, suggest a plausible utilization of this compound as an anti-proliferative agent in cancer therapy.

致謝

光陰荏苒，歲月流逝，轉眼間兩年就過去了，在吾師莊淨媛副教授與鍾景光教授的指導下，使我在生活上與學識上，有了長足的進步，亦使我獲益良多，受益匪淺，使得本論文可以順利完成，真是不勝感激。

在這兩年期間，承蒙微生物科劉昭君副教授、陳師慶副教授、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。事實上，要感謝的人還很多，無論是在生活上以及實驗上的幫助，感謝的話語，點滴在心頭；感謝學長姐王述綺、陳怡珊、黃瓊瑢、蔡悅瑜、邱華浩、林冠勳、謝素琴、廖美惠、陳淑幸；同學立昇、育賢、邱勤、恩綺、仲宜、怡文、家豪、滇藝、柔亘、景堂、孔文、馨婷、鶯驕、怡蓓、怡均、曉雲等在實驗上與課業上的幫助與扶持；學弟妹婉文、宣榜、宜蒼、瑜婷、筑毓、依芸、嵩裕、靜怡、佳柔、子靖、炳峰、善恩、建良、彭欣、傑文等在生活上的鼓勵與協助。

這兩年中也學到很多的東西，還有人與人之間的互相幫助，說真的，困難挫折不是沒有，完全看你怎麼去面對它，找出克服問題的關鍵，勝過於自憐自艾。我覺得大家在這邊學習，都願意幫忙彼此，而且都不自私，這是我每逢遭遇問題時得以在第一時間克服的關鍵，才能順利的完成這篇研究結果。

由衷的感謝我的父母，亦由衷感謝所有幫助過我的人，使這篇研究結果得以順利完成，未來，我將面臨更大考驗，我想我會坦然面對，去克服人生的每一道難題，進而邁向成功的坦途。最後將此論文獻給所有關心我的家人、師長、同學、學弟妹，感謝大家。

黃永豐 謹致於
中國醫藥大學 醫學研究所
中華民國九十四年六月

目錄

	頁次
中文摘要	1
英文摘要	2
致謝	3
目錄	4
圖表目錄	6
縮寫表	9
第一章 前言	10
第一節 研究緣起	10
第二節 研究目的	10
第二章 文獻探討	11
第一節 天然中草藥之應用	11
第二節 香豆精(coumarin)簡介	11
第三節 細胞週期的調控	12
第四節 細胞凋亡(Apoptosis)	15
第五節 活性氧化物(Reactive oxygen species)	17
第六節 粒腺體膜電位(Mitochondrial membrane potential)、鈣離子(Ca^{2+})與 DNA 損傷(DNA damage)	19
第三章 研究設計與研究假說	21
第一節 研究設計	21
第二節 研究假說	21
第四章 研究材料與方法	22
第一節 實驗材料	22
第二節 實驗方法	24
第五章 實驗結果	29
第一節 香豆精在人類子宮頸癌細胞株對細胞增生的影響與細胞型態上的改變情形	29
第二節 香豆精在人類子宮頸癌細胞株對細胞週期(Cell cycle)的影響	33
第三節 檢測香豆精在人類子宮頸癌細胞株細胞是否產生活性氧化物(Reactive oxygen species)	35
第四節 香豆精在人類子宮頸癌細胞株細胞對膜電位(Mitochondrial membrane potential)的影響	39
第五節 香豆精對細胞內鈣離子(Ca^{2+})濃度之影響	42
第六節 利用慧星試驗(Comet assay)觀察香豆精對於人類子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞其 DNA 傷害程度	46
第七節 利用 DNA 電泳膠片觀察香豆精對於人類子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞其	

	DNA ladder 情形	47
第八節	利用西方墨點法(Western blotting)檢測香豆精對細胞週期蛋白表現量的影響	48
第九節	利用西方墨點法檢測香豆精在人類子宮頸癌細胞中對 caspase 蛋白與細胞凋亡調控蛋白的表現量之影響	51
第十節	利用西方墨點法對香豆精在人類子宮頸癌細胞中 Death Receptor 與 iNOS 蛋白表現量的變化	55
第六章	討論	58
第七章	結論與建議	63
第一節	結論	63
第二節	建議	63
	參考文獻	65
	自述	72

圖表目錄	頁次
圖一	香豆精(coumarin)與7-hydroxycoumarin的化學結構式 12
圖二	Cyclin D1 與 G1-S 期的相關性 13
圖三	調控細胞週期 G1 期的因子 14
圖四	經粒線體路徑而誘發細胞凋亡的現象 16
圖五	細胞凋亡的途徑 18
圖六	哺乳動物細胞死亡的路徑之模型 19
圖七	利用 MTT 分析法檢測香豆精在 24 和 48 小時對人類子宮頸癌細胞株 存活率(cell viability)之影響 30
圖八	利用流式細胞計數儀評估細胞的存活率(濃度差) 30
圖九	利用流式細胞計數儀評估細胞的存活率(時間差) 31
圖十	利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的型態(濃度差) 31
圖十一	利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的型態(時間差) 32
圖十二	人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μM 濃度的香豆精處理 6、12、24 小 時後之流式細胞計數儀所檢測到的情形 33
圖十三	人類子宮頸癌細胞經由給予或不給予 100 μM 濃度的香豆精分別處理 6、12、24、48、72 小時之流式細胞計數儀所檢測到的情形 34
圖十四	利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度 之香豆精於 0.5 小時所造成 ROS 的影響 35
圖十五	利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度 之香豆精在 0.5 小時所造成 ROS 的影響 36
圖十六	人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精在 0.5 小時的 ROS 之量化圖 36
圖十七	利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μM 濃度之 香豆精在 0.5、1、4、6、8、10、12 小時所造成 ROS 的影響 37
圖十八	利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μM 濃度之 香豆精在 0.5、1、4、6、10、12、16、18、20、24 小時所造成 ROS 的影響 37
圖十九	利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μM 濃度之 香豆精在 24、36、48、60、72 和 84 小時所造成 ROS 的影響 38
圖二十	人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μM 濃度之香豆精所造成的 ROS 之 量化圖 38
圖二十一	利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度 之香豆精所造成 MMP 的變動 39
圖二十二	人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精所造成 MMP 變動 的量化圖 40
圖二十三	利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μM 濃度之

	香豆精在各個不同的時間點所造成 MMP 的變動	40
圖二十四	利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μ M 濃度之香豆精在各個不同的時間點所造成 MMP 的變動	41
圖二十五	人類子宮頸癌細胞經由給予濃度 100 μ M 之香豆精所造成 MMP 變動之量化圖	41
圖二十六	人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精造成鈣離子濃度變動的情形	42
圖二十七	人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精造成鈣離子濃度變動的情形	43
圖二十八	人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精造成鈣離子濃度變動的量化圖	43
圖二十九	人類子宮頸癌細胞經由給予 50 μ M 濃度之香豆精在 1、2、4、6、8、12 小時造成鈣離子濃度變動的情形	44
圖三十	人類子宮頸癌細胞經由給予 50 μ M 濃度之香豆精在 12、18、24、36、48、60 小時造成鈣離子濃度變動的情形	44
圖三十一	人類子宮頸癌細胞經由給予 50 μ M 濃度之香豆精在 12、18、24、36、48、60 小時造成鈣離子濃度變動的情形	45
圖三十二	人類子宮頸癌細胞經由給予濃度 50 μ M 之香豆精所造成鈣離子濃度變動的量化圖	45
圖三十三	藉由慧星試驗偵測 DNA 傷害的程度	46
圖三十四	經由不同濃度的香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa cells) 24 小時後，以慧星試驗分析其對細胞 DNA 傷害的程度	46
圖三十五	利用 DNA 電泳法檢測 DNA 斷裂的情形	47
圖三十六	利用西方墨點法觀察 G0/G1 期中的 cyclin D1/2、cdk 2、cdk4、p15 的蛋白表現量變化	49
圖三十七	利用西方墨點法觀察 G0/G1 期中的 cyclin D1/2、cdk 2、cdk4、p15 的蛋白表現量變化的量化圖	49
圖三十八	利用西方墨點法觀察 G0/G1 期中的 CDC 25A、p21、p53 的蛋白表現量變化	50
圖三十九	利用西方墨點法觀察 G0/G1 期中的 CDC 25A、p21、p53 的蛋白表現量變化的量化圖	50
圖四十	利用西方墨點法觀察與 apoptosis 有關的 Bcl-xl-xs、Bcl-2、Bax 與 cytochrome c 的蛋白表現量變化	52
圖四十一	利用西方墨點法觀察與 apoptosis 有關的 Bcl-xl-xs、Bcl-2、Bax 的蛋白表現量變化的量化圖	52
圖四十二	利用西方墨點法觀察 cytochrome c 的蛋白表現量的量化圖	53
圖四十三	利用西方墨點法觀察與 caspase family 有關的 caspase-3、caspase-8、caspase-9 的蛋白表現量變化	54

圖四十四	利用西方墨點法觀察與 caspase family 有關的 caspase-3 、caspase-8 、caspase-9 的蛋白表現量變化的量化圖	54
圖四十五	利用西方墨點法觀察 Death receptor 有關的 NF- κ B p50 、NF- κ B p65 與 iNOS 的蛋白表現量變化	56
圖四十六	利用西方墨點法觀察 Death receptor 有關的 NF- κ B p50 、NF- κ B p65 的蛋白表現量變化的量化圖	56
圖四十七	利用西方墨點法觀察 iNOS 的蛋白表現量的量化圖	57
圖四十八	Coumarin 對 HeLa 細胞株誘發細胞凋亡(apoptosis)與造成細胞週期停止(cell cycle arrest)的路徑	64

縮寫表

Dimethyl sulfoxide	DMSO
2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate	H ₂ DCFDA
3, 3-dihexyloxocarbocyanine iodide	DioC6
Enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA
Fetal bovine serum	FBS
Phosphate buffered Saline	PBS
Propidium iodide	PI
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide	MTT

關鍵詞： coumarin ， Human cervical cancer cells ， cell cycle arrest ， apoptosis 。

第一章 前言

第一節 研究緣起

根據衛生署在2004年的統計，我國2000年共有6,276例子宮頸癌新病例，是常見的女性癌症，包括侵襲癌症2,720例與原位癌3,556例，為排名第一的女性癌症。依據世界衛生組織估計2000年約有47,000名新病例，2002年有239,000名婦女因子宮頸癌死亡，是全球女性常見癌症第三名。研究顯示，第一次性行為時的年齡愈輕、性伴侶數目愈多，愈容易患上子宮頸癌。而子宮頸癌發生率排名為女性癌症第一位，各個年齡層的女性都有可能發生子宮頸癌，但以25歲到45歲的婦女最為常見¹。針對一些癌症作搜尋，發現在開發中國家的診斷和治療有較高的效率，並可以降低死亡率和延長存活率。而對於一些未開發的國家的偵測更值得特別注意。而放射治療是子宮頸癌的主要治療方法，而現今針對癌症的治療，其一為抑制癌細胞間血管生成而達抑制成長之效；二則為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或是藥物，就可以針對癌細胞而加以治療，故找出有效且不傷害正常細胞的方法是刻不容緩的課題。

臨床上用化學療法治療轉移的子宮頸癌，會有一些副作用，而治療子宮頸癌藥物如Cisplatin、Mitolactol、5-Fluorouracil和Taxol，有時以一種藥物單獨使用或合併數種藥物使用，用以治療子宮頸癌，皆有一定的效果。近年來，使用天然中草藥治療癌症有不錯的療效，故有多數實驗與研究從事中草藥之研究與開發新藥合成。

第二節 研究目的

近年來利用中草藥在醫學抗癌方面頗為熱門，在1985年，科學家發現利用太平洋紫杉提煉的紅豆杉醇(paclitaxel)可作為治療肺癌和乳癌之應用²，自此之後，彷彿替中草藥研發製程開啟了一扇大門。而香豆精已知有止咳、平喘、祛痰作用，亦有抗細菌作用，故想進一步研究香豆精與人類子宮頸癌細胞株之間的關係，探討香豆精對人類子宮頸癌是否有抑制作用，及其作用的機轉。

第二章 文獻探討

第一節 天然中草藥之應用

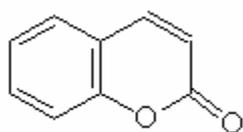
近三十年來，科學家廣泛地使用天然的萃取物或藥物應用於癌症治療，自然界中早期曾以 *podophyllum peltatum* 及 *Catharanthus roseus* 作為治療癌症的藥物。在1960至1982年間，就約有35,000種的植物利用其萃取物或提煉的藥物作為對抗老鼠的血癌細胞之研究，在1985年，科學家發現利用太平洋紫杉提煉的紅豆杉醇(paclitaxel)可作為治療肺癌和乳癌之應用，甚至對於近六十多種人類的癌細胞株具有療效²。而八角蓮(Bajiaolian)為mayapple家族中的一種，在中國有千年的歷史可以廣泛地應用於蛇毒、濕病、尖性濕疣、淋巴腺病變上和癌症的治療上³。早期治療血癌多以放射線治療或是化學療法，然而治療結果並未盡如人意，而天然多酚類化合物如黃芩(baicalein)早期證實有抗發炎作用，亦有實驗證明有抗肝癌的作用，經由細胞凋亡的路徑而導致抑制血癌細胞的增生⁴。而5-methoxypsoralen (5-MOP)中含有furocoumarin成份，可以誘發細胞凋亡的現象及抑制肝癌細胞的增生，並會造成細胞週期G2/M期的停止⁵。大蒜中含有Diallyl Sulfide和Diallyl Disulfide的成份，對於大腸癌細胞有抑制增生的作用，並會誘發細胞凋亡的現象⁶，Diallyl Sulfide亦會經由活化的JNK/c-Jun路徑而產生活性氧化物並抑制神經母細胞瘤細胞的增生⁷，從大蒜精(garlic)萃取出來的Diallyl disulfide (DADS)可以抗贅瘤的活性，亦可以抑制人類食道上皮癌的增生⁸。而Aloe-emodin會抑制血癌細胞(HL-60 cells)的增生並導致細胞週期G2/M期停止和誘發細胞凋亡的現象⁹。白藜(*Ampelosis cantoniensis*)的粗萃取物在先前文獻指出有抗菌功能，而後發現其可以誘發細胞凋亡並抑制血癌細胞的增生¹⁰。故近年來從事中草藥的研究與開發新藥是一項熱門的工作。

第二節 香豆精(coumarin)簡介

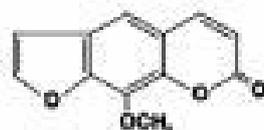
先前有文獻指出，從茵陳蒿(*Artemisia capillaries*)萃取出馬栗樹皮素(Esculetin)為一種香豆精的衍生物，它可以誘發細胞凋亡並抑制血癌細胞的生長¹¹。而6-nitro-7-hydroxycoumarin對於腎細胞癌有抑制細胞生長的效果，導致細胞凋亡和活化p38 MAP激酶¹²。從巴西梧桐(*Calophyllum braxiliense*)中粹取出一種天然產物GUT-70，為一種三環香豆精的結構，會誘發細胞凋亡並有效抑制血癌細胞的增生，並可能會減低藥物產生多重抗藥性基因的問題¹³。

而香豆精(Coumarin)和7-hydroxycoumarin可以抗腫瘤活性，誘發細胞凋亡和抑制非小細胞肺癌細胞(non-small cell lung carcinoma)的增生，並可能作為一種抗腫瘤藥物¹⁴。而甘草甜素(glycyrrhizin)亦是一種香豆精的衍生物，可以用來預

防C型肝炎病毒引起的癌症，此項仍在實驗中，目標是開發口服的抗肝癌的新藥¹⁵。香豆精和黃酮類藥物含有一種叫做Benzopyrones的成份，日常生活的飲食中如茶、水果、核仁、蔬菜、咖啡、酒類皆可以發現這種成份，香豆精是一種天然的受質，已知被用於抗腫瘤的體內實驗，近年來常研究香豆精和其衍生物的功能。此外，其相關的成份用於治療更顯得重要，最近的研究發現7-hydroxycoumarin會抑制 cyclin D1的釋出，並在其他的癌症上表現，並用於癌症治療(cancer therapy)。Esculetin會抑制血癌細胞(HL-60 leukaemia cells)生長並誘發細胞週期的停止，而黃酮類藥物並可針對多種類的癌症加以治療並嘗試對HIV病人加以處理，像是異黃酮的Genistein就能抑制細胞的增生和分化，對於乳癌、皮膚癌和前列腺癌具有療效，而香豆精和香豆精的相關成份對於癌細胞株具有療效，利用Esculetin與Genistein針對乳癌細胞株(MCF-7)和肺癌細胞株(A 549)可以抑制其細胞的增生¹⁶。而香豆精含有三種功能基，例如(3-(4'-chlorophenyl)、4-benzyl、7-methoxyl)，它們可以抑制女性雌激素的aromatase，所以可能會有效的抑制乳癌ER受器上的aromatase，進而對乳癌產生療效¹⁷。而香豆精被發現於天然植物，早期在植物醫藥期刊上發表並用於治療血管類疾病。而香豆精和其代謝物7-hydroxycoumarin發現對於肝癌細胞株(HepG2)、胃癌細胞株和大腸癌細胞株有抑制增生的效果¹⁸。從天然植物中可以萃取出香豆精的成份，如茵陳蒿、桃花、月橘、白芷、馬栗樹皮素..等等，而香豆精與其衍生物對於一些癌症的治療有不錯的效果。



coumarin



7-hydroxycoumarin

圖一 香豆精(coumarin)與7-hydroxycoumarin的化學結構式

第三節 細胞週期的調控

生物體依照DNA中密碼的指示重複進行著生長、發育及生殖等過程，而DNA遺傳來自父母。當母細胞生長、分裂成第一代子細胞，子細胞再生長、分裂為第二代子細胞，如此不斷地進行，這種週期則稱為細胞週期(cell cycle)。細胞生長經由細胞週期和部份的轉錄調節。酵母菌和哺乳動物有類似的調控機制。像是DNA複製就是利用一些蛋白去調控其他的基因，並調節細胞週期多方面的機制，而cyclin和cyclin-dependent kinases (CDKs)顯然在基本和活化轉錄的影響上扮演著重要的角色。此外，如腫瘤抑制基因亦會影響細胞週期的調控，包括轉錄的活化或是抑制(repressors)¹⁹。

細胞週期 (cell cycle) 指的是包含了 G0/G1、S、G2、M 等階段時期¹⁸。

Gap 0 (G0)：細胞處在休眠的狀態，也許是暫時休眠或是永久性休眠，需

有適當的訊息才會重新進入細胞週期。

Gap 1 (G1)：細胞維持正常代謝與繼續生長，在進入 S (synthesis) 時期之前會檢查染色體(chromosome) DNA 是否受到破壞而進行修補(repair)工作，此時期需要花十小時到十二小時。細胞亦可由此脫離細胞週期進入不生長的休止狀態(G0)。

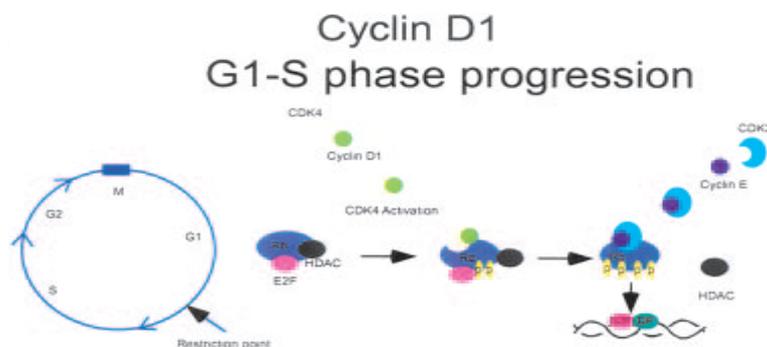
Synthesis (S)：當細胞進入 S 時期會花六到八小時進行 DNA 之複製，將原本的二十三對染色體加以複製。

Gap 2 (G2)：當細胞進入 G2 (gap2)時期需要花三至四小時，此期細胞繼續生長並且合成蛋白質，此外，細胞亦負責檢查染色體 DNA 的複製是否完整而準備進行下一步的有絲分裂(mitosis)。

M (mitosis)：細胞會由一個母細胞變成兩個子細胞，當染色體複製完成之後便會各自分配到子細胞內，讓子細胞內的染色體與母細胞完全一樣，此時期約為一小時，最後子細胞便準備再進入下一個細胞週期。

調控細胞週期的因子包括 p53，而 p53 的調節包括 DNA 錯誤配對修復 (mismatch repair)、鹼基的切除修復 (base excision repair) 或核苷酸的切除修復 (nucleotide excision repair) 三種系統²⁰。在細胞週期中，每個階段之交界處都有所謂的「檢查點」(checkpoint)，由 1980 年美國的 Leland Hartwell 所提出，主要是說細胞週期有暫時停止的現象 (cell cycle arrest)，並觀察細胞是否受到破壞，而進行修補 (repair) 或是進行 DNA 的合成 (synthesis)，最後進行細胞分裂 (mitosis)，當其無法修復時，會走向細胞凋亡 (apoptosis) 的途徑，最後導致細胞死亡²¹。

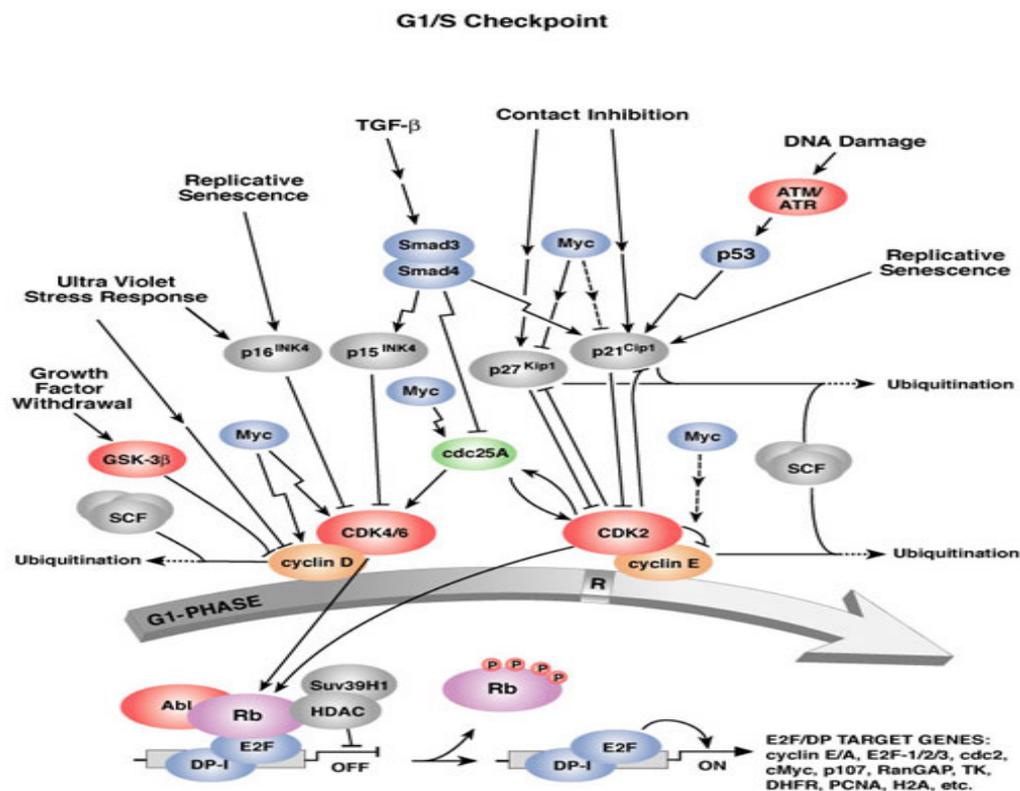
週期素 (cyclins) D 和 E 主要存在 G1 期，並在 G1-S 期時會被分解，像是幾種 cyclin-dependent kinases (CDKs)，皆與 G1 期調控有關，當靜止細胞進入細胞週期時，基因編碼 (encoding) 在 D-type 週期素上 (D1, D2, 和 D3)，並且誘發細胞分裂的訊息，而週期素亦會催化一些因子，如 CDK4 和 CDK6，進而促進 G1 期²²。



圖二 Cyclin D1 與 G1-S 期的相關性。 出自 *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* (2005).

由 Cyclin D1 去調節 holoenzymes 的次單元並使其磷酸化，而藉由 cyclin E/CDK2 而磷酸化，視網膜母細胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein; pRb) 呈現未活化

狀態而抑制細胞週期，pRb可說是G1期的看門人，亦可說它會穿越過限制點而導致DNA的合成²³。當cyclin D1過度表現時，會是導致癌症和腫瘤因子的形成和轉移的開始。故cyclin D1在G1期的調控扮演重要角色²⁴。



圖三 調控細胞週期 G1 期的因子。出自 Technology cell signal

關於真核細胞的 G1/S 期的檢查點(checkpoint)，主要是 G1 期進入 DNA 合成期(synthesis phase)時，由兩群細胞激素調控，包括(CDK4/6-cyclin D 和 CDK2-cyclin E)，及轉錄複合物包括(Rb and E2F) 扮演在此檢查點的關鍵角色。在 G1-phase，發現 Rb-HDAC 的抑制複合物會與 E2F-DP1 轉錄因子結合並抑制下游路徑的轉錄。藉由 CDK4/6 和分離的 CDK2 與 Rb-repressor complex 會使 Rb 磷酸化，容許轉錄的 S 期基因與蛋白編碼(encoding)，成為一個 G1 往 S 期的開關，並進行 DNA 複製。多數不同的刺激會影響檢查點(checkpoint)的控制，如 TGF- β ，DNA 損傷，contact inhibition，和生長因子消退。在 INK4 家族蛋白中，包括 p14、p15(INK4B)、p16(INK4A)、p18(INK4C)以及 p19(INK4D)，會抑制 Cyclin D/CDK4 與 Cyclin D/CDK6 而調控 G1 期^{25,26}。還包括 Kip/Cip families 亦與 G1 期調控有關。而 TGF- β 會抑制 Cdc25A 的轉錄，並活化細胞週期激素的磷酸化。而 KIP/CIP families，包括了 p21^(CIP1/WAF1/SDI1)、p27^(KIP1) 以及 p57^(KIP2)。在細胞週期和細胞凋亡的路徑，轉錄因子 p53 扮演一個重要的角色，他是一個多頻率的腫瘤抑制基因，當細胞缺 p53 時會導致 DNA 損傷和裂殖原(mitogenic)受到刺激而使細胞死亡。造成細胞損傷可能是由蛋白質激素 ATM (ataxia telangiectasia mutated) 和 ATR (ATM-related) 所引起的。ATM 藉由離子放射線或其他因子辨識雙股的斷裂。ATM 和 ATR 分別活化轉換調節點 CHK2 和 CHK1。CHK1 藉由細胞核的

互斥或降解抑制CDC25磷酸化並抑制CDKs磷酸化。CHK2和ATM的訊息經p53誘發p21^{Cip1/WAF1}的表現，多種前凋亡因子(Puma, Bax, Noxa)，DNA修復補和氧化壓力基因和回饋調節HDM2。p53是一種壽命較短的蛋白並藉ATM的磷酸化而活化轉錄，而泛素素(ubiquitin)接合酶HDM2結合p53使細胞核p53互斥或破壞。另一個G1的調節點功能為p53和Rb去調控高度活化的Ras，Myc和E2F訊息^{27,28,29}。故與細胞週期有關的因子包括p15、p16、p21、p27、p53、CDK2、CDK4、CDK6、cyclin D、cyclin E等等都在G1期扮演著重要的角色。

第四節 細胞凋亡 (Apoptosis)

細胞凋亡(apoptosis)是一種細胞自殺的機制，用以調控組織中的細胞數目並減少個別細胞對於動物生存的威脅。如細胞表面的專一性受器、死亡受器(death receptors)。而死亡受器會偵測到細胞外面死亡的訊息，並進入細胞內而導致細胞凋亡的機制³⁰。

細胞凋亡(apoptosis)又稱為細胞計畫性死亡，在真核細胞的生長與細胞分化中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。

在多細胞的生物體中，細胞凋亡(apoptosis)為一種調控與維持細胞數目非常重要的程序。而生物體的恆定亦需要細胞凋亡與細胞增生的之間平衡來控制。倘若細胞凋亡程序被抑制或是其中調控的基因遭受損害，則會造成細胞無法走向程式性凋亡，而導致細胞循錯誤訊息而繁衍下去，造成細胞不斷增生與細胞癌化。

細胞凋亡(apoptosis)與細胞壞死(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)，由單核球或 macrophage 吞噬處理掉。細胞凋亡是有計畫性的死亡，細胞凋亡只牽涉到本身的細胞對於其他周圍的細胞並不涉及在內，而且不發生發炎現象。而 necrosis 意即是壞死，而其死亡方式會造成細胞發炎、細胞破裂，釋出發炎因子並且涉及周圍細胞，有壞死現象的出現³¹。

而apoptosis與caspase有很重要的關係，caspase-specific inhibitors會抑制促進apoptosis的刺激因子，故得知caspase在apoptosis當中也是扮演著很重要的角色。在apoptosis啟動的時候，caspase會活化apoptosis路徑，亦是所謂的瀑布式的效應，故利用本身的酵素活性去切割下游的caspase並活化caspase。而細胞凋亡的現象，會產生DNA片段的斷裂，故從電泳圖可以看到DNA ladder的產生。而caspase有兩個種類，其中一類包括起始的caspase，有caspase-2，-8，-9，-10，另一類則為有作用(effector)的caspase，有caspase-3，-6，-7，當caspase活化時，有作用的caspase會將細胞中蛋白裂解掉，最後導致細胞的死亡³²。

經由粒線體路徑誘發的細胞凋亡，其會釋出cytochrome c，是一種電子傳遞鏈的關鍵蛋白，經由粒線體的細胞凋亡信號，會活化Apaf-1，進而活化caspase-9，而Smac/DIABLO會自粒線體釋出，並抑制IAP蛋白，使caspase-9作用而促進apoptosis³³，而Bcl-2家族蛋白會調節細胞凋亡並形成複合物而進入粒線體的膜裡

第五節 活性氧化物(Reactive oxygen species)

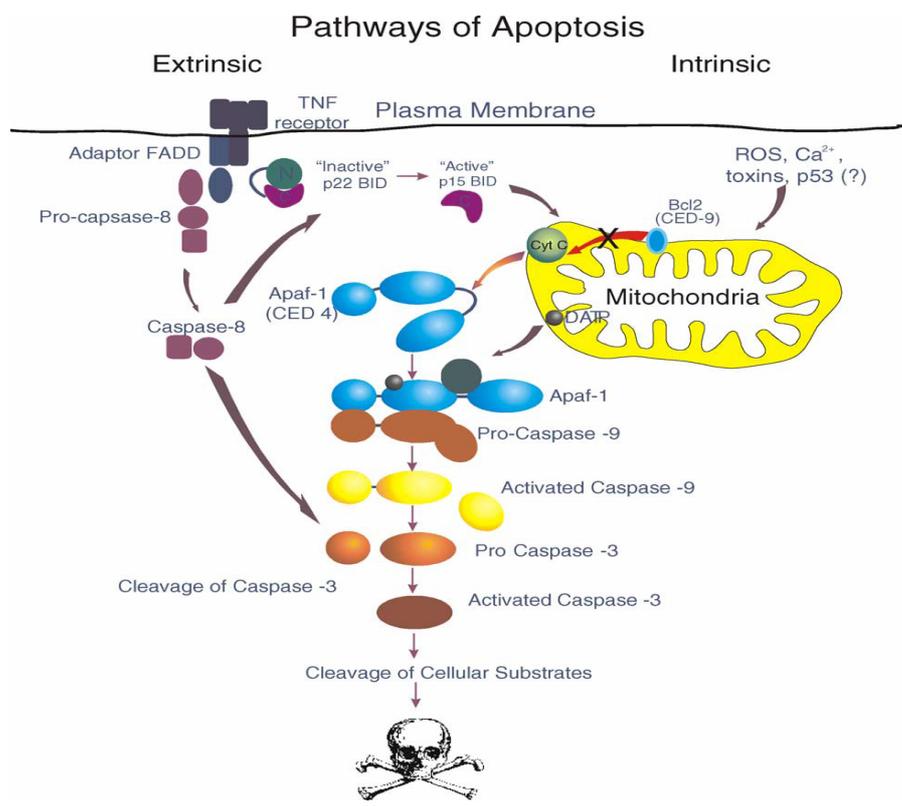
科學家在探討老化和年齡之間的關係，於是有人提出代謝所產生一種活性大的副產物稱「活性氧化物」(ROS, reactive oxygen species)，認為 ROS 會傷害細胞，造成 DNA 傷害，並可能會導致老化。ROS 如超氧根陰離子 (superoxide anion)、一氧化氮 (nitric oxide)，皆與生命的現象有關。例如 NO (nitric oxide)，會與調控血壓有關，故難以界定 ROS 是好或是不好，後來發現取決於 ROS 對於人體產生反應的好壞在於氧化壓力(oxidative stress)，而利用過氧化歧異酶 (superoxide dismutase)，和催化酶(catalase)可以對抗氧化壓力而延長生命³⁸。而無脊椎動物的基因突變常由於試圖延長生命週期和加強抵抗環境中的氧化壓力像是 ultraviolet light 或是 reactive oxygen species 而發生的。對於哺乳動物而言，調節壓力反應的了解還不夠透徹並且無已知的基因能延長生命週期。而有科學家發現老鼠的 p66^{shc} 基因能作為標的突變基因並誘發抵抗壓力並延長生命。p66^{shc} 是一種 p52^{shc}/p46^{shc} 疊接變異(splice variant)，細胞質液的訊號傳遞包括來自於活化受器至 Ras 的細胞分裂信號的傳輸，當遇到 hydrogen peroxide (H₂O₂)或是放射線 ultraviolet light 時，p66^{shc} 的 serine 磷酸化會上升。而 p66^{shc} 為信號傳輸路徑的一部分可能會調節細胞凋亡的壓力並能延長哺乳動物的生命³⁹。

而氧會接受其他分子的電子而形成氧化自由基，很多細胞內的反應包括呼吸反應，需要還原氧變成 superoxide (O⁻)或是過氧化氫，這些分子會調節生物體內分子間的反應。當他們有高度的反應時會形成 ROS 而造成氧化性傷害(oxidative damage)。究竟細胞凋亡的產生是否需要活性氧化物(ROS)呢?科學家做了三點推測：(1) 當 ROS 或是內源性抗氧化機制缺失時會誘發細胞凋亡的產生。(2) 細胞凋亡可能有時候會去抑制內源性或是外源性的抗氧化機制。(3) 細胞凋亡有時候會幫助細胞內 ROS 的增加⁴⁰。而大蒜精成份的 diallyl disulfide(DADS) 會誘發細胞凋亡，並會使癌細胞的抗氧化機制缺失掉，進而抵抗氧化壓力，故可能作為癌症治療的抗腫瘤增生的試劑⁷。

而活性氧化物(reactive oxygen species)會調節多種細胞的死亡，而高濃度的活性氧化物會導致脂質過氧化、細胞膜損傷、caspase 酵素的未活化和細胞壞死。反地，低濃度的活性氧化物會活化蛋白質激酶和磷酸酶、鈣離子儲存、活化或未活化轉錄因子和導致細胞凋亡的現象。高濃度的活性氧化物會直接損傷細胞並殺死細胞，相反地，低濃度的活性氧化物會間接的經由蛋白質激酶和磷酸酶、轉錄因子和分子中基因表現而誘發細胞凋亡。而活性氧化物在細胞中誘發的細胞凋亡的基因表現正被研究中，如 Bcl-2 過度表現藉由活性氧化物會誘發細胞凋亡而保護細胞，然而，藉由 Bcl-2 防止活性氧化物誘發細胞凋亡的機制仍是未知的，需進一步探討，而後發現 Bcl-2 down-regulation 使活性氧化物去活化 T 細胞，而且需要兩種信號模式才能活化 T 細胞的細胞凋亡現象。第一個信號是活性氧化物使 Bcl-2 down-regulation，而第二個訊號是 Bim 的表現⁴¹。

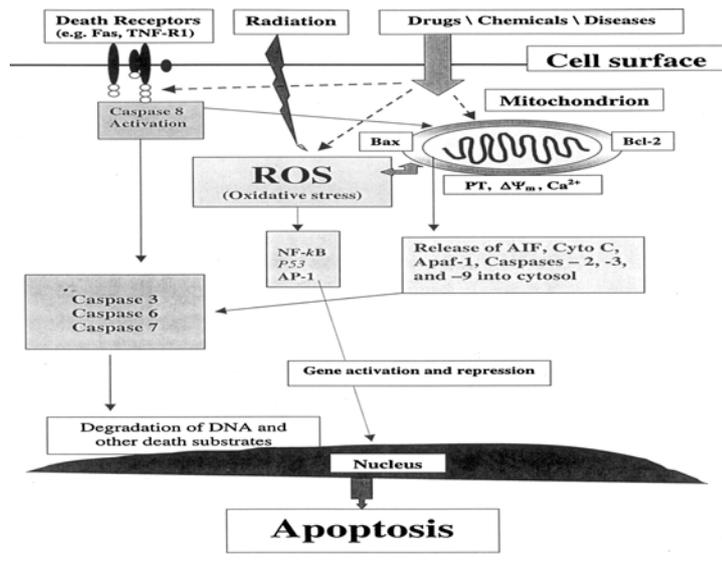
先前提到造成細胞凋亡的兩個路徑，外在路徑是經由細胞表面受器導致活化起始

者(如caspase-8)和反應者(如caspase-3)蛋白水解酵素，而內在路徑主要是指粒線體，其會釋出cytochrome *c*和活化起始者caspase，如caspase-9，隨後活化反應者(caspase-3)，而內在路徑主要是粒線體的標的直接活化，或是間接經由外在路徑caspase-8分解未活化的蛋白BID。當活化BID後，BID會轉移到粒線體並刺激cytochrome *c*的釋放。而Bcl-2為一種抗細胞凋亡的蛋白，它在粒線體上扮演防止cytochrome *c*釋放的角色⁴²。



圖五 細胞凋亡的途徑。 出自 *Brain Res. Bull.* 62, 497-504 (2004)

活性氧化物為氧的化學反應之衍生物，它包括自由基(free radicals)像是超氧離子(O₂^{·-})、氫氧自由基(·OH)、過氧化氫(H₂O₂)。它們的高化學反應會使得DNA、蛋白質、碳水化合物和脂質遭受破壞。細胞利用抗氧化防禦系統去對抗活性氧化物，經由直接或是間接去對抗氧化性傷害。當活性氧化物去克服這些防禦系統，結果產生氧化壓力(oxidative stress)。氧化壓力包括病理引起的疾病如AIDS, 杭汀頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、阿滋海默症(Alzheimer's disease)和一些退化性神經性疾病。氧化壓力主要的來源為活性氧化物，故調節活性氧化物對於調控氧化壓力扮演著重要的角色，亦可以使用技術去調控細胞凋亡有關的氧化壓力⁴³。



圖六 哺乳動物細胞死亡的路徑之模型。 出自Pathophysiology 7 (27) 153–163

細胞表面的死亡訊號經由ligand-receptor反應發出，而使死亡受器活化caspase-8或是由化學藥劑、離子放射線直接活化caspase-9，而後造成細胞死亡。而藉由凋亡因子和細胞質中的蛋白酶，經由粒線體途徑會誘發細胞凋亡，而粒線體途徑主要的檢查點是前凋亡因子(Bax)和抗凋亡因子(Bcl-2)數目的比例。粒線體機能不良包括粒線體可透性的轉變、粒線體膜電位的改變(mitochondrial membrane potential)、ROS的產生、cytochrome c的釋出、AIPF-1和caspases-2、-3、-9進入細胞質所形成的多種的複合物。隨後活化下游的caspase和細胞核內死亡受質的降解而導致細胞死亡⁴⁴。

第六節 粒腺體膜電位(Mitochondrial membrane potential)、鈣離子(Ca²⁺)與 DNA 損傷(DNA damage)

在治療高血糖症方面，以減少粒線體自由基的產生和氧化性傷害作為給予治療藥劑時的策略。而對於糖尿病的治療，給予藥劑的原理包括以抗氧化劑作為粒線體的標的或是減少膜電位移動而達到治療的效果⁴⁵。

對於多數的生理狀況而言，細胞內的Ca²⁺信號扮演著一個重要的角色，經由調節Ca²⁺依賴型酵素像是磷脂酶、蛋白酶和核酸酶，導致細胞受傷和細胞凋亡。粒線體沿著內質網的路徑對調節細胞內Ca²⁺的含量扮演著關鍵的角色。粒線體為Ca²⁺運送機制主要位置，經由粒線體而釋出Ca²⁺進入內膜。當細胞內的Ca²⁺過量時，細胞內液的Ca²⁺會占據著粒線體，此時會誘發細胞膜孔道的打開，會產生粒線體膜電位改變(Mitochondrial membrane potential)。粒線體會釋出cytochrome c，隨後活化caspases，導致細胞核的裂解(fragmentation)和細胞死亡。Bcl-2家族蛋白在調控細胞凋亡上扮演著重要的角色。這些蛋白會出現在調控細胞內Ca²⁺

上。當 Bax 出現時，就開啟了細胞凋亡訊號的路徑(apoptosis signaling pathway)⁴⁶。

而粒線體活性在調控生熱作用(thermogenesis)和調控能量上扮演著相當重要的角色。而關於粒線體的代謝作用和能量平衡與細胞呼吸作用和膜電位移動有絕對的關係⁴⁷。調控粒線體內容物的釋放被認為是粒線體膜上一種稱為 mitochondrial permeability transition pore (PT pore) 的巨大通道有關，包含了兩大部分：一個是粒線體內膜與 adenine nucleotide translocator (ANT) 相關之蛋白質；另一個為外膜蛋白質（有 porin, voltage-dependent anion channel, VDAC)⁴⁸。當粒線體基質的 ATP/ADP 通道打開時，藉由粒線體的氧化磷酸化產生 ATP。當 ATP/ADP 通道打開時，粒線體內膜兩側 氫離子梯度消失、粒線體膜電位下降、使粒線體的外膜漲破，而 caspase-inducing factors (cytochrome c 和 AIF) 釋放到細胞質液中造成細胞凋亡。故粒線體膜電位下降在細胞凋亡中為一重要指標^{49,50}。而人類老化和許多疾病發生都與粒線體異常有關，如帕金森氏症(Parkinson's disease)、阿滋海默症(Alzheimer's disease)和一些退化性神經性疾且細胞凋亡過程中扮演著重要的角色，故對於粒線體膜電位的改變確實有必要作更深入的研究。

鈣離子(Ca^{2+})對細胞存活率的調節扮演一重要角色，而鈣離子亦與誘發細胞凋亡反應有關⁵¹。而以大蒜中的成份 Diallyl disulfide 去處理血癌細胞並經由 caspase-3 依賴型路徑而誘發細胞凋亡。而 Diallyl disulfide 在血癌細胞中會產生鈣離子和 caspase-3 的活化。故偵測鈣離子(Ca^{2+})可以進一步探討細胞凋亡的機制⁵²。

造成 DNA 損傷(DNA damage)的原因包括紫外線、離子化幅射(ionizing radiation)及 DNA 複製抑制物 氫氧基尿素(hydroxyurea)等基因毒性壓力(genotoxic stress)。而當 DNA 損傷的細胞為了再繼續 DNA 複製及細胞分裂等過程，此時就需要 DNA 修補的動作來維持細胞複製時的正確性，並防範細胞癌化的情形。與毛細血管擴張性失調有關之 ATM (ataxia telangiectasia mutated) 蛋白質在 DNA 損傷反應中扮演極為重要的角色。ATR 及 ATM 與磷酸肌醇激酶家族(phospho- inositide kinase family)的結構較為相似，與 p53、BRCA1 等蛋白質的磷酸化反應有關。科學家發現當人類的 Rad17 蛋白質必須被 ATR/ATM 激酶磷酸化後，才會引發基因毒性壓力反應⁵³。故因此，藉由訊息傳遞途徑的調控，DNA 損傷與訊息傳遞路徑調控有相關性，與細胞週期停止(cell-cycle arrest)、細胞凋亡、特定基因之轉錄與 DNA 修補等基因毒性壓力反應(genotoxic stress responses)是有關的⁵⁴，故需要進一步探討造成 DNA 損傷之機制。而一氧化氮(nitric oxide)是由一氧化氮合成酶(iNOS)的正向調節反應所造成的，其會造成缺血性的壓力，亦會造成細胞凋亡，通常伴隨以下的路徑：(1)粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)的下降。(2)經由粒線體釋出 cytochrome c。(3)活化 caspase-9 和 -3 使得產生低濃度 NO 的保護機制而去抵抗神經細胞死亡。故一氧化氮(NO)與一些退化性神經疾病有關，如杭汀頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、阿滋海默症(Alzheimer's disease)，故值得我們進一步探討⁵⁵。

第三章 研究設計與研究假說

第一節 研究設計

本實驗利用流式細胞計數儀來分析香豆精對人類子宮頸癌細胞的存活率、細胞週期分布、凋亡細胞的比例情形、活性氧化物的產生、細胞內膜電位的移動與鈣離子的產生。再利用倒立式位像差顯微鏡觀察加入不同濃度的香豆精後觀察細胞型態改變的情形，再使用 DNA 電泳膠片檢測香豆精對人類子宮頸癌細胞 DNA 斷裂的情形。之後利用單細胞凝膠電泳法偵測細胞的 DNA 傷害，而後利用西方點墨法（Western blotting）檢測細胞週期的調控與調控細胞凋亡相關的分子，以及找出香豆精在人類子宮頸癌細胞株中參與細胞凋亡的訊息傳遞分子，並探討其造成細胞週期和細胞凋亡的路徑，進而研發出治癌的新藥物。

第二節 研究假說

許多含中草藥成份的傳統藥物被廣泛應用並作為重要新藥的來源⁷。而文獻指出香豆精有抗腫瘤作用，於是設立研究假說，認為香豆精應該可以抑制人類子宮頸癌細胞的生長，與細胞凋亡的產生，並可能調控細胞週期，而經由分子技術的方法，我們得以檢測其抑制細胞的生長與細胞凋亡的訊息傳遞，進而發現香豆精在人類子宮頸癌細胞上所扮演的角色及其重要性。

第四章 研究材料與方法

第一節 實驗材料

1. 細胞株

人類子宮頸癌細胞 (Human cervical cancer carcinoma cell line : HeLa cell) 取自於台灣新竹食品工業發展研究所。

2. 香豆精 (coumarin) 的製備

香豆精為天然中草藥之萃取物，現在已經有商品在市面上販售，公司名為 Sigma，其製備方法為以 0.5%DMSO 溶解，並以振盪器振盪後，儲存在 4°C 冰箱備用。

3. 藥品試劑

- (1)MEM Medium (購自 GIBCO)
- (2)Fetal Bovine serum (購自 GIBCO)
- (3)_L-glutamine (購自 GIBCO)
- (4)Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 ; 購自 Merck)
- (5)Penicillin-Streptomycin (購自 GIBCO)
- (6)Sodium bicarbonate (購自 Merck)
- (7)Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 ; 購自 Merck)
- (8)Potassium chloride (KCl; 購自 Merck)
- (9)Trypan Blue (購自 Sigma)
- (10)Dimethyl Sulfoxide (DMSO; 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 Merck)
- (15)Formaldehyde (購自 Merck)
- (16)Coumarin (購自 Sigma)
- (17)Bovine serum albumin (BSA; 購自 Merck)
- (18)Trypsin-EDTA (購自 Hyclone)
- (19)Commassie blue (購自 Sigma)
- (20)Protein assay-Dye reagent concentrate (購自 Bio-Rad)
- (21)Glycerol (購自 Scharlau)
- (22)SDS (Sodium dodecyl sulfate; 購自 Merck)
- (23)MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-terazolium bromide) (購自 Sigma)
- (24)APS (Ammonium persulfate; 購自 Merck)
- (25)TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine; 購自 Merck)

- (26)Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane ; 購自 Merck)
- (27)Glycine (購自 Merck)
- (28)Methanol (購自 Merck)
- (29)Protein maker (購自 Femantas)
- (30)Tween 20 (購自 Sigma)
- (31)脫脂奶粉 (購自安怡奶粉)
- (32)ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit ; 購自 PerKlin-Elmer™)
- (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 Merck)
- (38)4X Protein loading dye (購自 Amresco)
- (39)Agarose I (購自 Amresco)
- (40)Sodium chloride (NaCl ; 購自 Merck)
- (41)Phosphate buffer saline [PBS](由 NaCl,KCl,KH₂PO₄,Na₂HPO₄ · 2H₂O 組成 ; 購自 Merck)
- (42)Anti-foam A (購自 Sigma)
- (43)5X TBE buffer (購自 Merck)
- (44)Acrylamide (購自 Merck)
- (45)Bis-Acrylamide (N,N'-methylenebisacrylamide ; 購自 Merck)
- (46)Proteinase K (購自 Worthington)
- (47)X-ray(Hypercassette Amersham)
- (48)TE buffer (1 mM EDTA , 10 mM Tris-base ; 購自 Merck)
- (49)Phenol : Chloroform : isoamyl alcohol(購自 Amresco)
- (50)LMA(low melting agarose) (購自 Pharmacia Biotech)
- (51)NMA(normal melting agarose) (購自 Transgenomic)
- (52)一級抗體 :
- i anti-actin (購自 Upstate) 比例 : 1 : 1000
 - ii anti-p15 (購自 Upstate) 比例 : 1 : 1000
 - iii anti-cdk2 (購自 Upstate) 比例 : 1 : 1000
 - iv anti-cdk4 (購自 Upstate) 比例 : 1 : 500
 - v anti-Cyclin D1/2 (購自 Upstate) 比例 : 1 : 1000
 - vi anti-p21^{WAF1} (購自 Upstate) 比例 : 1 : 1000
 - vii anti-cytochrome c (購自 Upstate) 比例 : 1 : 500
 - viii anti-p53^{P1} (購自 Oncogene) 比例 : 1 : 1000
 - ix anti-caspase 3 (購自 Upstate) 比例 : 1 : 1000

- x anti-caspase 8 (購自 Upstate) 比例：1：1000
 - xi anti-caspase 9 (購自 Upstate) 比例：1：1000
 - xii anti-Bcl-2 (購自 Upstate) 比例：1：1000
 - xiii anti-Bax (購自 Calbiochem) 比例：1：1000
 - xiv anti-Bcl-xl-xs (購自 Calbiochem) 比例：1：1000
 - xv anti-NF- κ B (p50) (購自 Ztmed. Laboratories. Inc.) 比例：1：1000
 - xvi anti-NF- κ B (p65) (購自 Ztmed. Laboratories. Inc.) 比例：1：1000
 - xvii anti-CDC 25A (購自 Calbiochem) 比例：1：1000
 - xviii anti-iNOS (購自 BD) 比例：1：1000
- (54) 二級抗體
- (a). goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody (購自 Chemicon)
 - (b). goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody (Chemicon)
- (55) H₂DCFDA、Dioc6、Indo/AM1 (購自 Calbiochem)

4. 設備與器材

- (1)細胞培養箱 (購自 Nuair)
- (2)細胞培養盤 (購自 FALCON)
- (3)水浴鍋
- (4)倒立式位像差顯微鏡 (phase-contrast microscope, 購自 Olympus)
- (5)細胞計數器 (Haemocytometer)
- (6)離心機 (購自 Beckman)
- (7)微量天平 (購自 Mettler Toledo)
- (8)RO 純水製造機 (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 (購自 Mettler Toledo)
- (12)PVDF membrane (購自 Amersham)
- (13)SDS-PAGE 電泳槽套組 (購自 Hofer)
- (14)分光光度計 (購自 Beckman)
- (15)ELISA reader (購自 Dynatech Max Reader)
- (16)低溫冷凍超高速離心機 (購自 Hitachi ; CF15R)

第二節 實驗方法

一、細胞培養

將 HeLa 細胞培養於含有 L-glutamin、100U/mL penicillin G、100 μ g/mL

streptomycin、1 mM non-essential amino acid、pyruvate、10 %FBS(fetal bovine serum)的 MEM(Modified eagle medium)培養液中，置於 5%CO₂、37°C 恆溫培養箱。當細胞生長在培養盤 70%至 80%時，以 1xPBS(phosphate buffer saline)清洗細胞後，加入 0.5 mL 的 0.5x trypsin 於培養箱作用 2 分鐘，以 5 mL 培養液中中和 trypsin 後，離心後去除上清液，輕輕打散細胞後，計數細胞為 3x10⁶ cells/dish，作繼代培養。當細胞數過多時，可以作細胞冷凍將其冷凍在液態氮中。

二、細胞存活率測定(MTT assay)

培養細胞 5x10³ 在 96 孔洞培養盤(190 μL)於 37°C 恆溫培養箱。在每個孔洞中加入 10 μL 的香豆精，濃度為 1、5、10、20、50、100 與 200 μM，分別培養 24 與 48 小時後，加入 20 μL 的 MTT(0.5mg/mL)於培養箱中 4 小時，再加入 100 μL 的 SDS/HCL，置於 ELISA reader 偵測(波長 570 nm)。

三、細胞存活率測定(Flow cytometry analysis)

培養細胞 1x10⁵ /mL 於 12 孔洞培養盤，培養 24 小時，加入濃度 1、5、10、25、50、與 100 μM 的香豆精，分別培養 24、48 和 72 小時，以 0.5x trypsin 打下細胞，並以 1xPBS 清洗，加入 400 μL propidium iodide(40 μg/mL)，再移至 FACS 管，再以流式細胞計數儀偵測。

四、以倒立式位相差顯微鏡觀察細胞型態(Morphology)

培養細胞 1x10⁵ /mL 於 12 孔洞培養盤，培養 24 小時，加入濃度 1、5、10、25、50、與 100 μM 的香豆精，分別培養 6、12、24、48 和 72 小時，以倒立式位相差顯微鏡(phase microscope)觀察細胞型態。

五、細胞週期測定(Cell cycle analysis)

培養細胞 1x10⁵ /mL 於 12 孔洞培養盤，培養 24 小時，加入濃度 1、5、10、25、50、與 100 μM 的香豆精，分別培養 6、12、24、48 和 72 小時，以 0.5x trypsin 打下細胞，並以 1xPBS 清洗，加入 70% 酒精(in PBS)放置 -20°C 冰箱 24 小時，加入 450 μL 含有 2.5 μg/mL 的 propidium iodide (PI)，再移至 FACS 管，再以流式細胞計數儀偵測。

六、活性氧化物測定(Reactive oxygen species)

培養細胞 1x10⁵ /mL 於 12 孔洞培養盤，要做 2 個 blank 組(不加藥和試劑)，培養 24 小時，加入濃度 1、5、10、25、50、與 100 μM 的香豆精，分別培養 0.5、1、4、6、10、12、16、18、20、24、36、48、60、72 和 84 小時，以 0.5x trypsin 打下細胞，並以 1xPBS 清洗，之後以 1500 rpm 離心 5 分鐘，再以 1xPBS 清洗兩次，將細胞 pellet 放在試管中，加入 500 μL 的 200 μM H₂DCFDA 於試管中，要全程避光，培養於 37°C 培養箱中 30 分鐘，再移至 FACS 管，再以流式細胞計數儀偵測。

七、粒線體膜電位測定(Mitochondria membrane potential)

培養細胞 1×10^5 /mL於12孔洞培養盤，要做2個blank組(不加藥和試劑)，培養24小時，加入濃度1、5、10、25、50、與100 μ M的香豆精，分別培養0.5、6、12、24、36、和48小時，以0.5x trypsin打下細胞，並以1xPBS清洗，之後以1500 rpm離心5分鐘，再以1xPBS清洗兩次，將細胞pellet放在試管中，加入500 μ L的100 μ M DioC6於試管中，要全程避光，培養於37 $^{\circ}$ C培養箱中30分鐘，再移至FACS管，再以流式細胞計數儀偵測。

八、鈣離子測定(Calcium)

培養細胞 1×10^5 /mL於12孔洞培養盤，要做2個blank組(不加藥和試劑)，培養24小時，加入濃度1、5、10、25、50、與100 μ M的香豆精，分別培養0.5、6、12、24、36、和48小時，以0.5x trypsin打下細胞，並以1xPBS清洗，之後以1500 rpm離心5分鐘，再以1xPBS清洗一次，以1500 rpm離心5分鐘，之後完全避光，加入Indo1/AM 1mL(3 μ g/1mL)於試管中，而Blank組只加入1 mL的1xPBS，置於37 $^{\circ}$ C培養箱中40分鐘，每十分鐘拿出來上下搖動，再放回培養箱中，以1500 rpm離心5分鐘後，並以1xPBS清洗一次，再以1500 rpm離心5分鐘後，再以1xPBS清洗一次，再以1500 rpm離心5分鐘後，加入500 μ L的1xPBS，並移至FACS管，再以流式細胞計數儀偵測。

九、以慧星試驗測定DNA損傷(Comet assay)

培養細胞 1×10^6 /mL於6孔洞培養盤(3 mL)，培養24小時，更換新鮮培養液，加入濃度(5 μ M~80 μ M)的香豆精，一個孔洞加入1%的DMSO作為陰性控制組，一個孔洞加入3 μ M的 H_2O_2 ，將上清液吸掉，加入1xPBS後去掉，再加入0.1% trypsin 200 μ L，作用3分鐘，加1 mL培養液中和後，將細胞懸浮液吸至1.5 mL離心管。離心1000 rpm 5分鐘，去上清液後彈散沉澱物(pellet)，加入1xPBS清洗一次，最後細胞懸浮液最終體積為300 μ L，將LMA和NMA以微波爐加熱溶解，置於50 $^{\circ}$ C水浴鍋內。拿磨砂載玻片和蓋玻片，編號之後加上85 μ L(LMA+NMA)於載玻片上以蓋玻片45度角蓋下，避免氣泡，等膠凝固後拿掉蓋玻片。取10 μ L細胞懸浮液加75 μ L LMA，混合後加到第一層膠面，蓋上蓋玻片，新鮮配置lysis buffer，將蓋玻片拿掉，置於lysis buffer一個小時，準備電泳槽並加入alkalin buffer，置於冰上，清洗玻片後置於alkalin buffer 20分鐘，以25v、300mA，跑電泳30分鐘。以清水輕輕清洗後，置於0.4M Tris-HCl約10分鐘使回到中性，置於methanol中脫水5分鐘，待乾後加PI(2.5 μ g/mL)螢光染液。以螢光顯微鏡觀察，數100顆細胞打價數。(0, +1, +2, +3, +4)

十、DNA萃取(DNA fragment analysis)

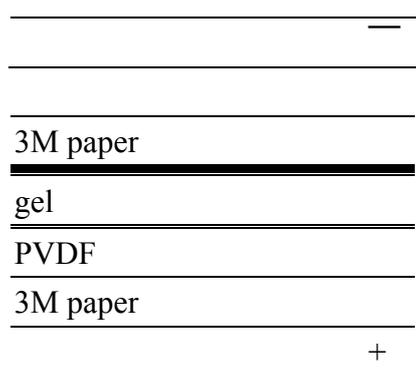
將細胞培養在10公分培養盤，細胞數為 2×10^6 ，每個培養盤中含10%培養

液 10 mL，放置隔夜。加入 100 μ M 濃度的香豆精，培養 24、36 與 48 小時。收細胞，以刮杓刮下細胞，以吸管取細胞懸浮液放入離心管，以 1xPBS 清洗一次。以 1000 rpm 離心 5 分鐘。將細胞移至離心管，以 1000 rpm 離心 5 分鐘。去除上清液，加入 700 λ DNA extraction buffer，混合均勻。加 5 λ RNAase。置於 37°C 水浴槽 1~2 小時。加 5 λ proteinase K(20mg/mL)混合後，上下輕搖，之後置於 55°C 水浴槽 1~2 小時。加 500 λ Phenol/CHCl₃，混合均勻後，並清洗 2 次(在 4°C，需澄清分兩層)。混合後，先 vortex 再以 7000 rpm、4°C 離心 7 分鐘。以 chloroform 清洗 1 次(藉以去除 phenol)。混合後，先 vortex 後離心再以 7000 rpm、4°C 離心 7 分鐘。取上層液至另一個離心管，加 2 倍體積 100%酒精。Mix gently for precipitation at -80°C，30 分鐘。以 12000rpm、4°C 離心 10 分鐘。除去 supernant 加 1c.c. 70%酒精。12000 rpm 離心，10' at 4°C。除去上層液後將沉澱物風乾。加入 TE buffer(50~100 λ)溶 DNA 沉澱物，置於 4°C。隔日，將其儲存於 -20°C。以 25V 跑電泳 20 分鐘。以 Eagle eye II 照相觀察。

十一、西方墨點法(Western blotting)

做西方墨點法前，先定量蛋白質，以 ELISA 偵測，作成檢量線，並將蛋白質定量，並加以統計分析，使其回歸係數趨近於 0.99。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。故利用 SDS PAGE 使蛋白在電泳槽中移動並被凝膠固定，使我們容易觀察蛋白表現量的變化。將細胞培養在 10 公分培養盤，細胞數為 2×10^6 ，每個培養盤中含 10%培養液 10 mL，放置隔夜。加入 100 μ M 濃度的香豆精，培養 24 與 48 小時。先以蛋白標準品作檢量線，將蛋白質定量後做西方墨點法。電泳片玻璃以酒精擦拭，組裝電泳片。(配置多片時，每片請以秤藥紙隔開)。

配製下層膠，靜置 30 分鐘，配置上層膠，靜置 30 分鐘，插上鋸齒後並作標記。桌上放置一層保鮮膜，先將蛋白定量，煮 5 分鐘後 spin down，以 protein 加 SDS sample buffer loading 至孔洞上。跑 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis SDS (PAGE)：150mA 30 分鐘或 90 mA 2 小時(1x protein running buffer)，跑完後在 gel 左上截角。PVDF(membrane)、3M paper 先剪好，membrane 先放入 methanol、在放入 running buffer。3M paper gel 放入 running，在置入滾平。Transfer 300 mA 30 分鐘。



之後 wash 和 block membrane ~blot/tween buffer, 1st: 15min, 2nd: 20min (wash 去除 SDS, 去除 Ag-Ab reaction) hybridization 1° Ab, 以 blotto/tween 稀釋(β actin 1:1000), 1 小時或置於 4°C, 隔夜。之後以 10 分鐘請洗 3 次, 每次約 50 mL 的 blotto/tween(每換一次 blotto 可以先 ranse)hybridization 加入二級抗體 1 小時(2° Ab : blotto/tween=1:5000=1 λ :5mL) 以 blotto/tween buffer 清洗 3、4、5、6、7 分鐘之後將 membrane 以 1X PBS 清洗, 並前往暗房(dark room)押片。(帶 12 項物品)

I. 保鮮膜 II. timer III. membrane in 1x PBS IV. film

V. 剪刀 VI. ECL reagent black : white = 1 : 1

VII. mix container(器皿)+chips(夾子) VIII. 3 個 box

IX. X 光片 X. pipetman +tip XI. 顯影劑+定影劑

XII. 擦手紙

ECL reagent black: white=1:1(約 1.8mL+1.8mL mix well) membrane 放入後來回翻面, 約 1 分鐘至 1 分 10 秒。鋪保鮮膜, membrane 稍乾放上去, 保鮮膜折半蓋上, 壓平吸乾。放進 cassette, 蓋上底片, 蓋好(曝光時間依螢光強度為準)。顯影 → 清水 → 定影 → 清水(1 分鐘)。回收顯影劑、定影劑(可重複使用)。membrane 用較淡的 comassive blue 染色 8 分鐘。之後 destain。

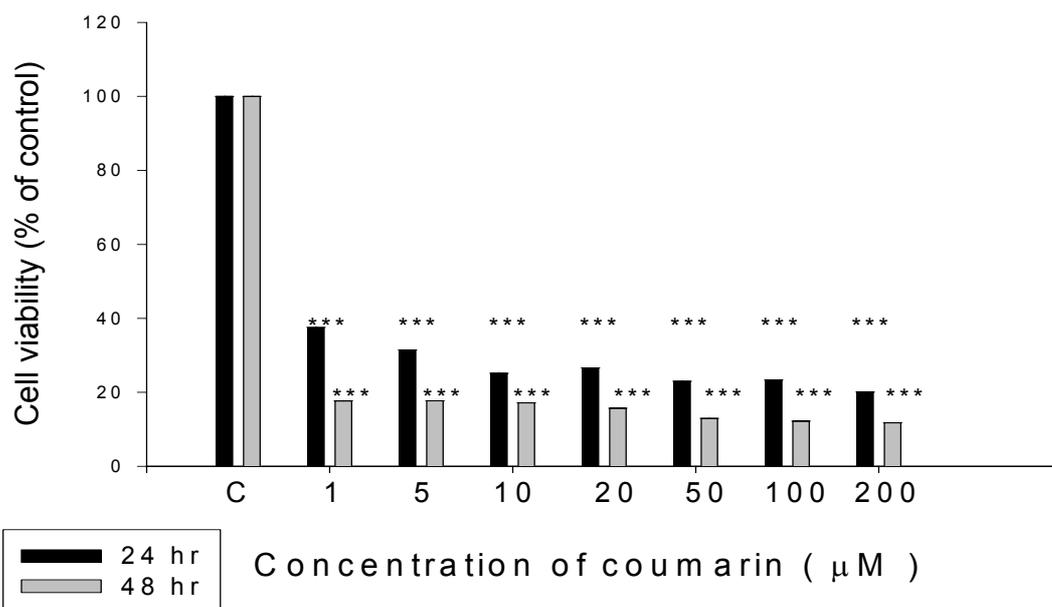
十、統計方法

利用 SPSS 套裝軟體, 採 Unpaired student's test 分析實驗組與對照組之間的差異, 當 $P < 0.05$ 表示兩組間有差異, 當 $p < 0.01$ 表示兩組間有極顯著差異, 而 $P < 0.001$ 表示兩組間有非常極顯著差異。

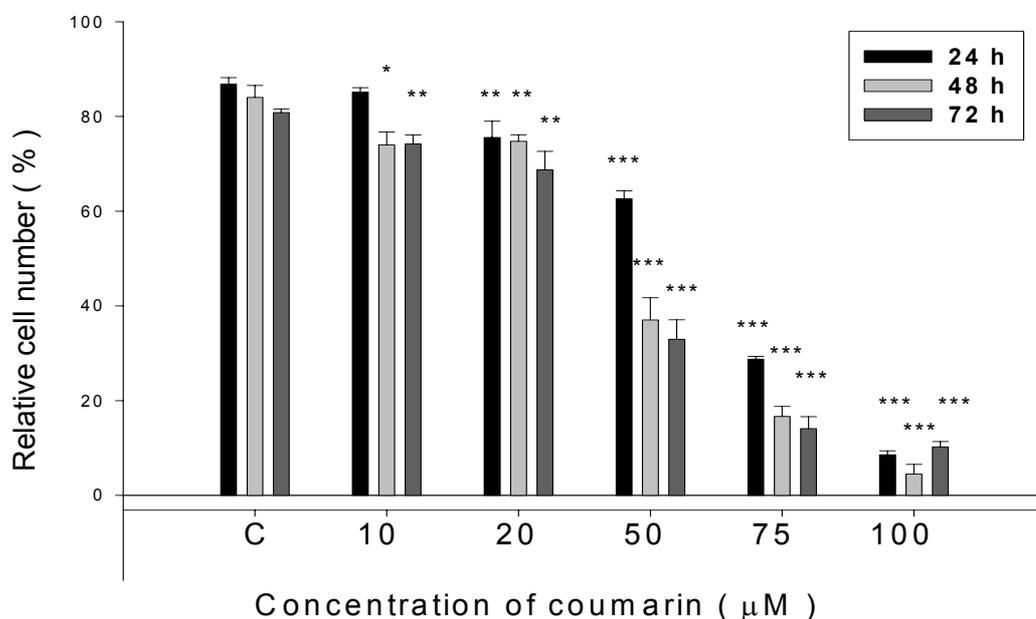
第五章 實驗結果

第一節 香豆精在人類子宮頸癌細胞株對細胞增生的影響與細胞型態上的改變情形

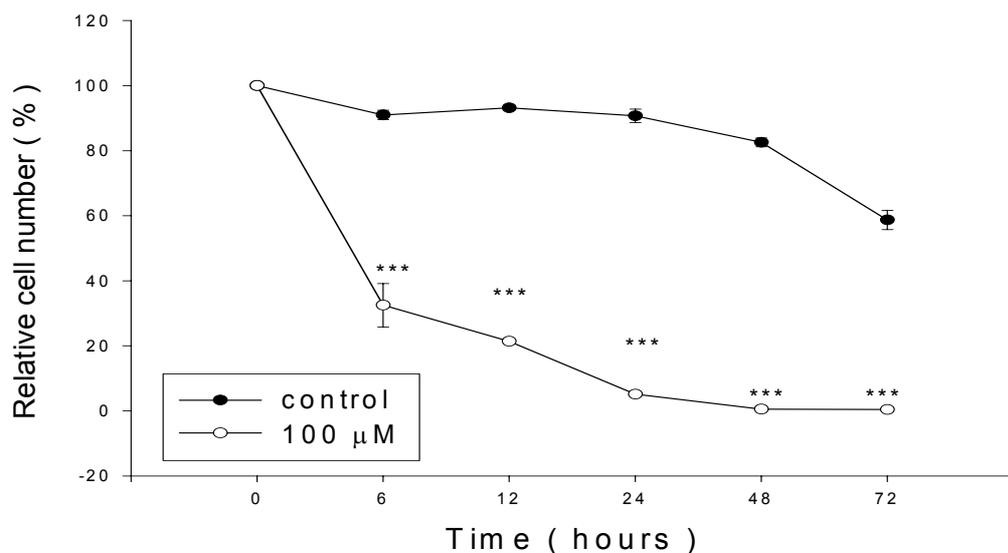
利用MTT assay評估細胞存活率，結果發現加入不同濃度的香豆精之後，細胞的存活率隨著藥物濃度的上升而下降，在圖七中可以發現子宮頸癌細胞經由藥物濃度的上升，使得細胞存活率下降，且隨著時間點的延長，亦使得細胞存活率下降。而圖八是利用流式細胞計數儀(flow cytometry)評估細胞存活率，結果發現加入不同濃度的香豆精之後，細胞的存活率隨著藥物濃度的上升而下降，而分別在24、48、72小時的時間點，亦發現細胞的存活率隨著時間點的延長而有下降的現象，在100 μM 濃度處理細胞的情形下，細胞存活率不到10 %。而圖九是利用流式細胞計數儀評估細胞的存活率，在100 μM 濃度的coumarin處理6、12、24、48、72小時後，結果發現隨著時間點的延長，香豆精有效的抑制細胞的生長。利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的型態，加入不同濃度的香豆精處理24小時後，發現細胞數目有明顯下降的情形，且有細胞型態不完整、細胞膜皺縮、與空泡化的現象（如圖十）。而圖十一固定以100 μM 濃度的香豆精處理不同的時間點後，發現隨著加入藥物時間增長，細胞數目明顯下降，由此可知香豆精對於人類子宮頸癌細胞有引起細胞計畫性死亡作用，在倒立式相位差顯微鏡，可看到凋亡小體及空泡化現象，此外亦有細胞皺縮變形、空泡化、裂解等特徵。



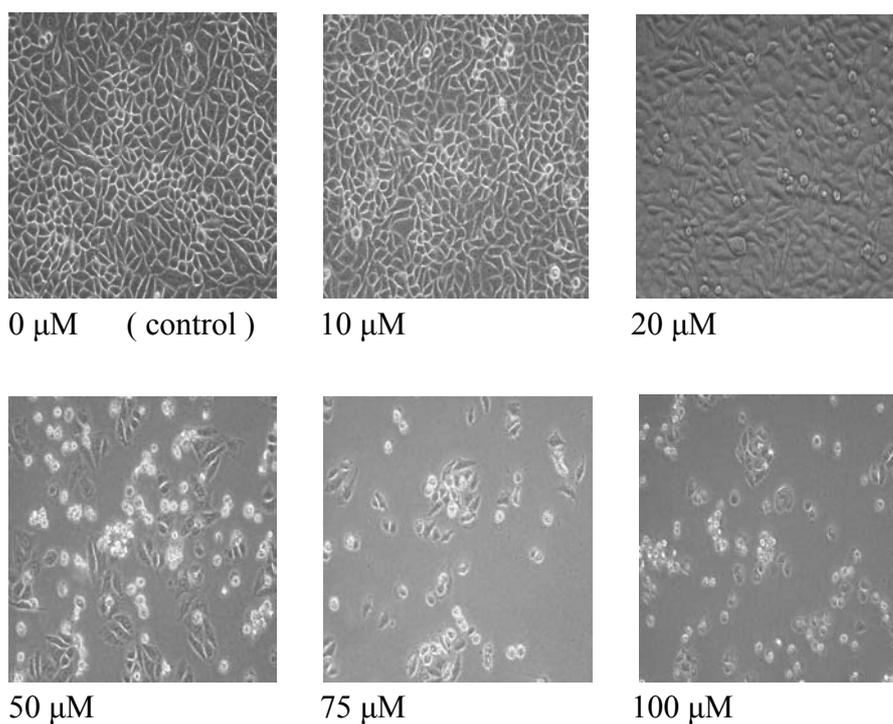
圖七 利用 MTT 分析法檢測香豆精在 24 小時和 48 小時對人類子宮頸癌細胞株存活率(cell viability)之影響。(濃度範圍為 1 µM-100 µM) 對照組則加入 0.5% DMSO。實驗結果如圖四所示,隨著 coumarin 藥物濃度的升高其 HeLa cell 之細胞存活率越來越低,數據結果以 mean±SD 值表示, n=3。
(* p< 0.05, ** p< 0.01, *** p<0.001)



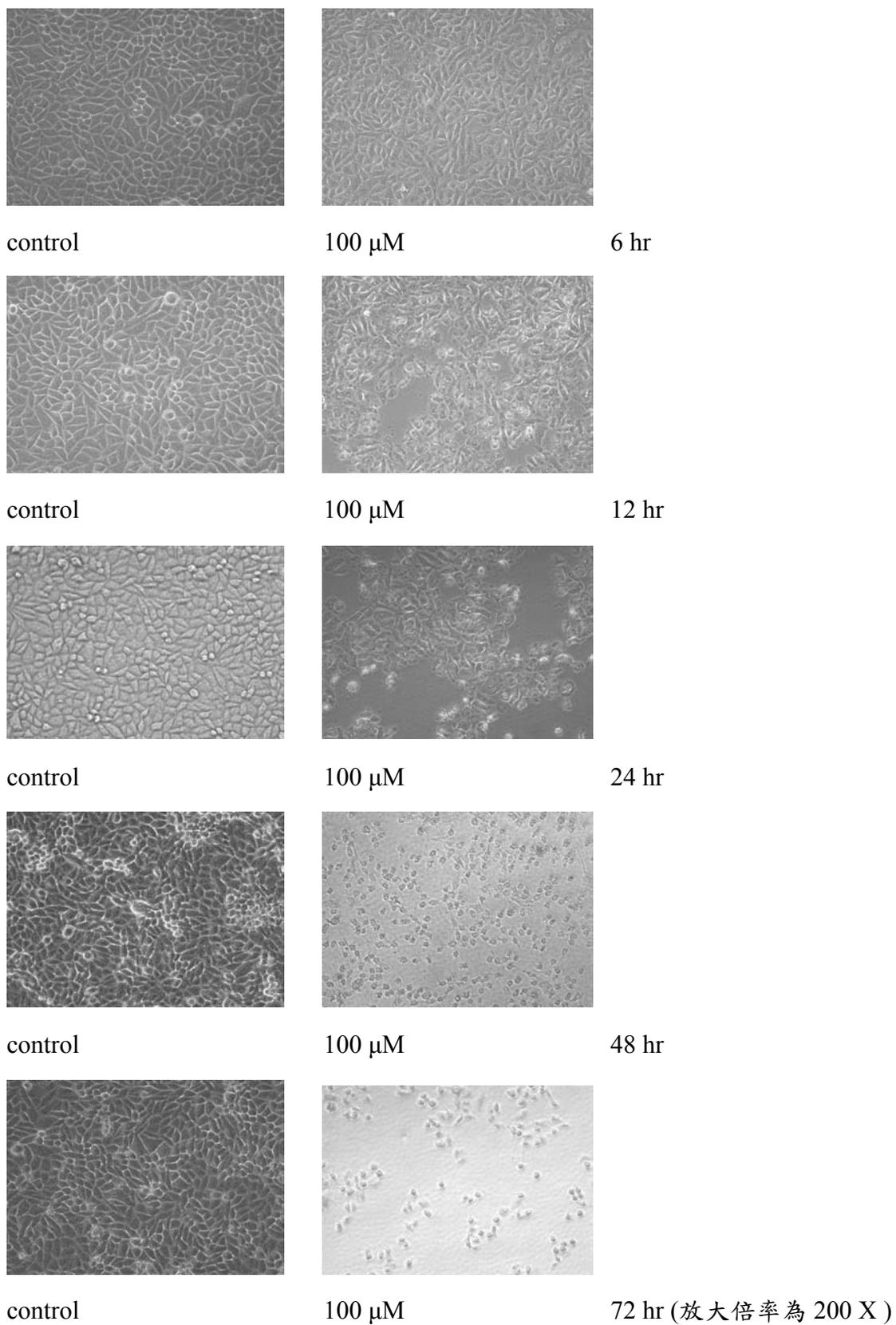
圖八 利用流式細胞計數儀評估細胞的存活率。使用不同濃度的香豆精分別處理 24、48、72 小時後,在人類子宮頸癌細胞株所檢測到的存活率情形。數據結果以 mean±SD 值表示, n=3。(* p< 0.05, ** p< 0.01, *** p<0.001)



圖九 利用流式細胞計數儀評估細胞的存活率。使用 100 μM 濃度的 coumarin 處理 6、12、24、48、72 小時後，在人類子宮頸癌細胞所檢測到的存活率情形。數據結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 值表示， $n=3$ 。（* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ）



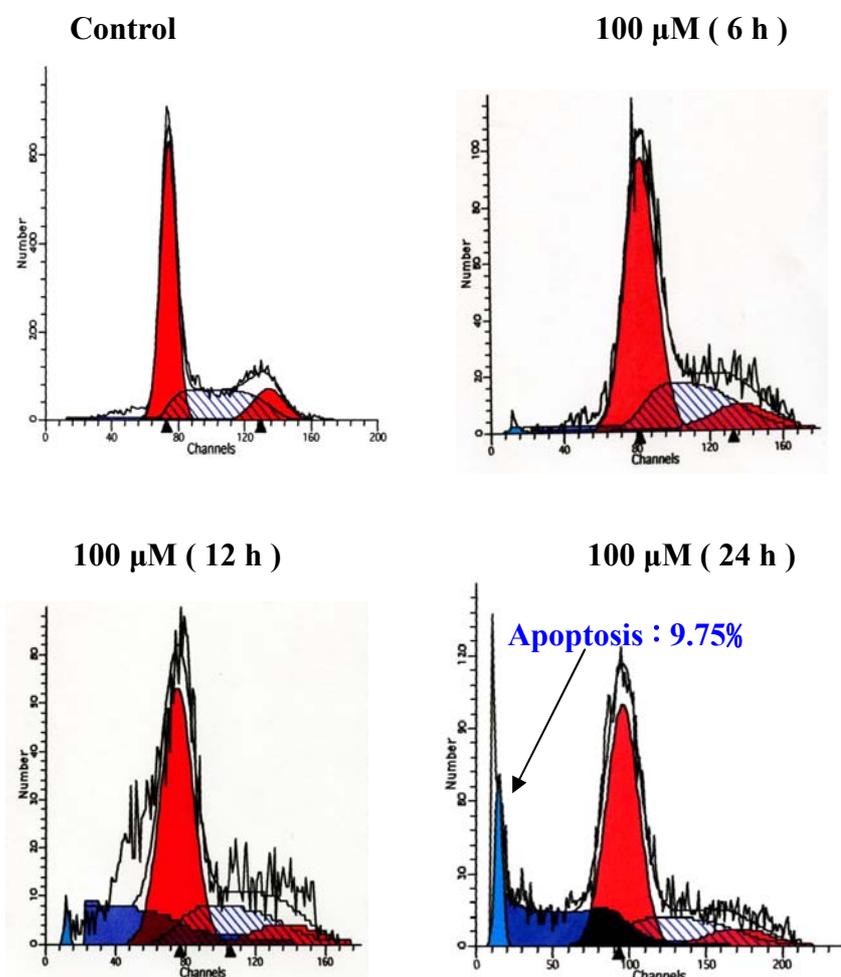
圖十 利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的型態。加入不同濃度的香豆精處理 24 小時後，發現隨著藥物濃度的上升，細胞數目有明顯下降的趨勢，且有細胞型態不完整、細胞膜皺縮與細胞空泡化的現象。放大倍率 200 X。



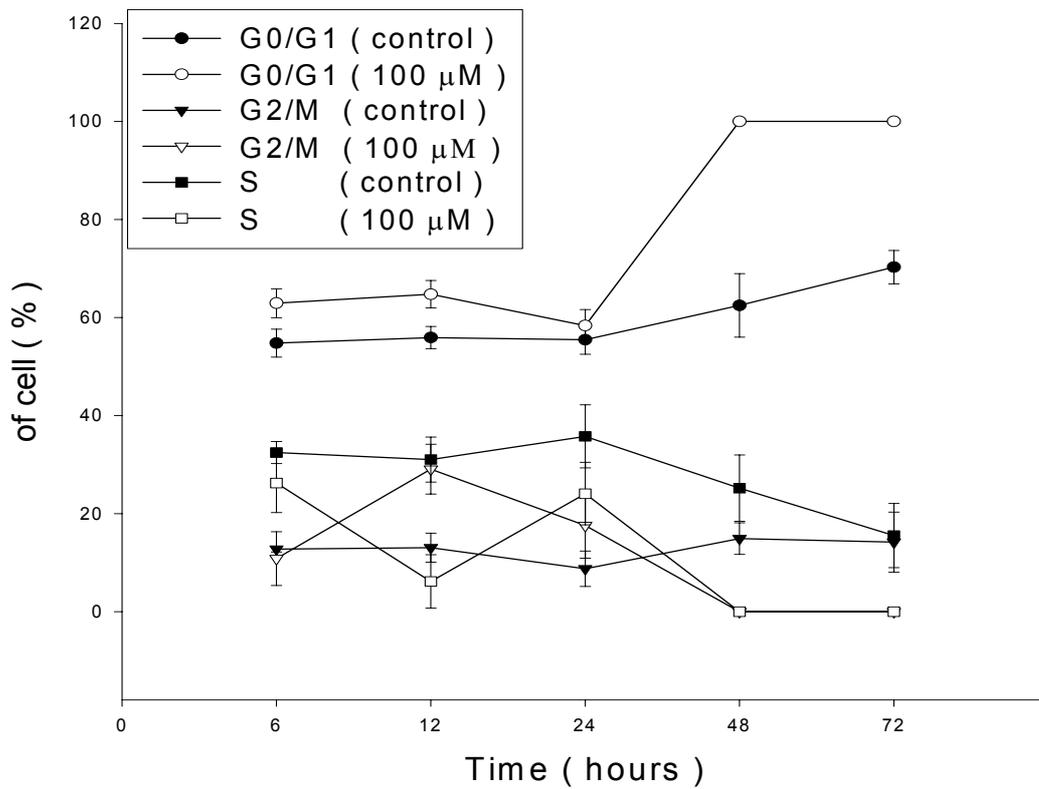
圖十一 利用倒立式相位差顯微鏡觀察細胞的型態。加入 100 μ M 濃度的香豆精處理不同的時間點後，發現隨著加入藥物時間點的上升，細胞數目有明顯下降的情況，且有細胞型態不完整、細胞膜皺縮與細胞空泡化現象。

第二節 香豆精在人類子宮頸癌細胞株對細胞週期(Cell cycle)的影響

利用流式細胞計數儀評估濃度為 $100 \mu\text{M}$ 香豆精處理 24 小時或不同時間點後，加入 PI，並觀察其細胞週期的表現。發現隨著藥物濃度的增加，G0/G1 期之細胞比例有越來越多的趨勢，在 48 小時的時候，G0/G1 期的細胞比例上升了 37.5%。由此可知，香豆精可以使人類子宮頸癌細胞引起細胞週期在 G0/G1 期的停止(G0/G1 arrest)，而且會引起細胞計畫性死亡作用，在圖中可見 sub-G1 peak。(如圖十二、十三)



圖十二 人類子宮頸癌細胞經由給予 $100 \mu\text{M}$ 濃度的香豆精處理 6、12、24 小時後之流式細胞計數儀所檢測到的情形，結果發現隨著時間點的延長，細胞週期中的 G0/G1 期細胞數有明顯的上升，而細胞凋亡的現象也明顯的增加。



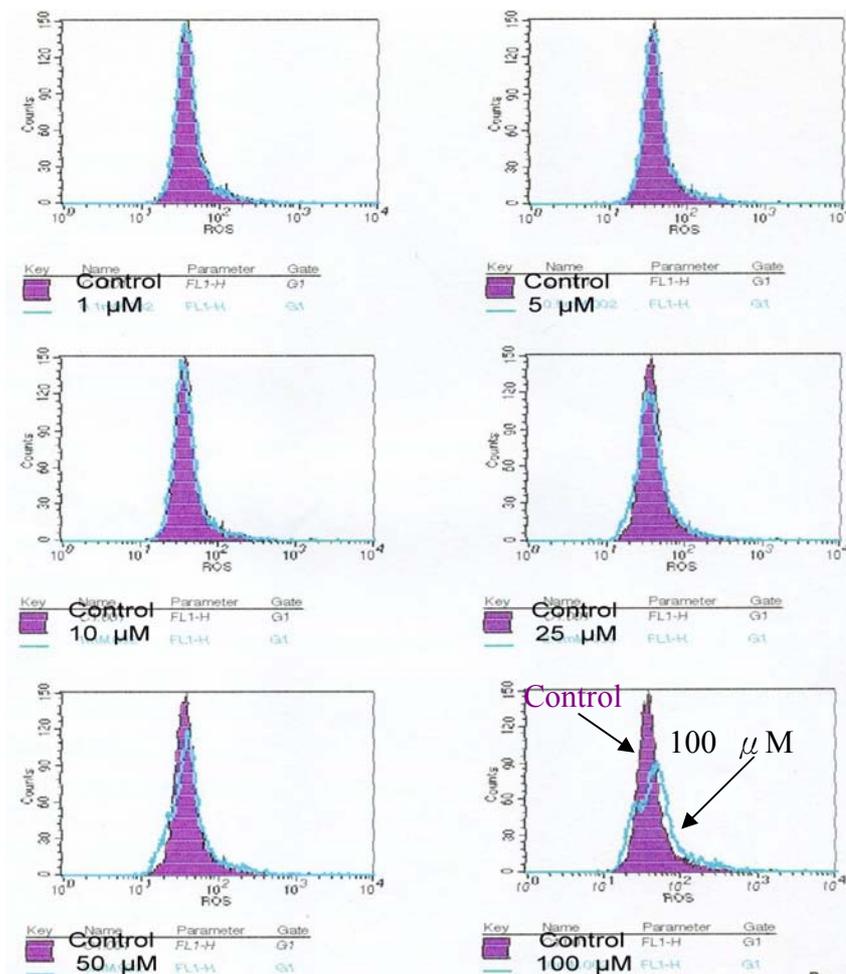
圖十三 人類子宮頸癌細胞經由給予或不給予 100 μM 濃度的香豆精分別處理 6、12、24、48、72 小時之流式細胞計數儀所檢測到的情形。隨著加藥時間點的延長，細胞週期中的 G0/G1 期細胞數有明顯的上升。數據結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 值表示， $n=3$ 。

第三節 檢測香豆精在人類子宮頸癌細胞株細胞是否產生活性氧

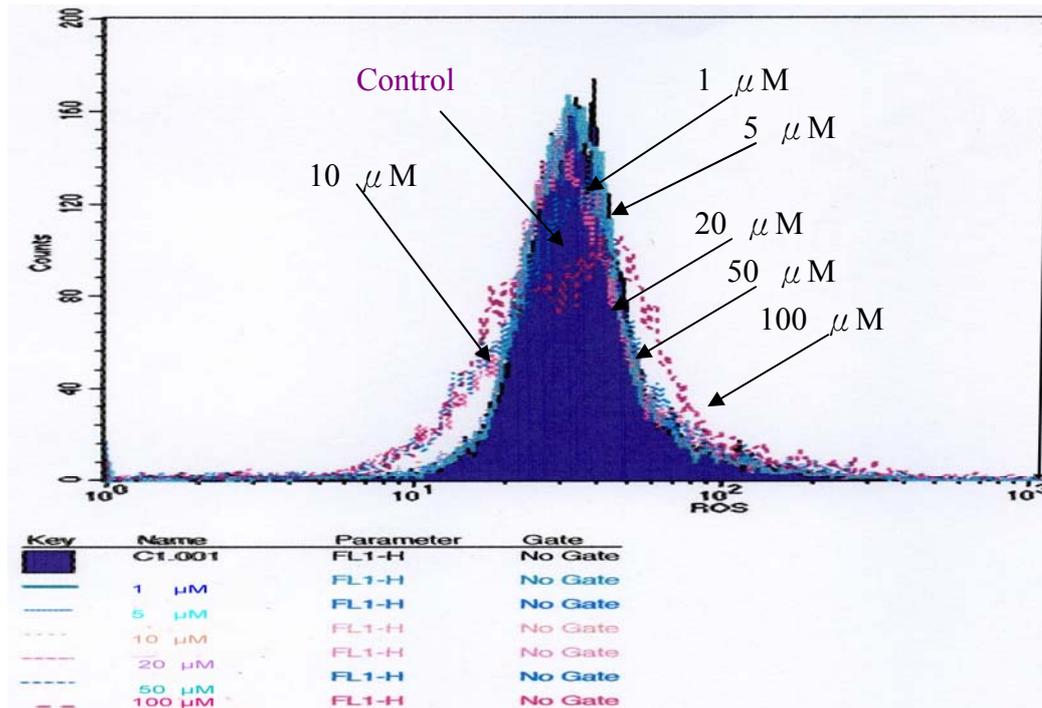
化物(Reactive oxygen species)

利用流式細胞計數儀評估不同濃度的香豆精處理 0.5 小時之後，加入 H₂DCFDA，觀察其產生活性氧化物的情形。發現隨著藥物濃度的增加，曲線有些微右移的情形，且 M1 Gated 數值也隨之增加，表示細胞有產生活性氧化物的情形，在 100 μM 為 9.3±0.7，可知 100 μM 濃度處理的細胞為明顯。(如圖十四、十五、十六)

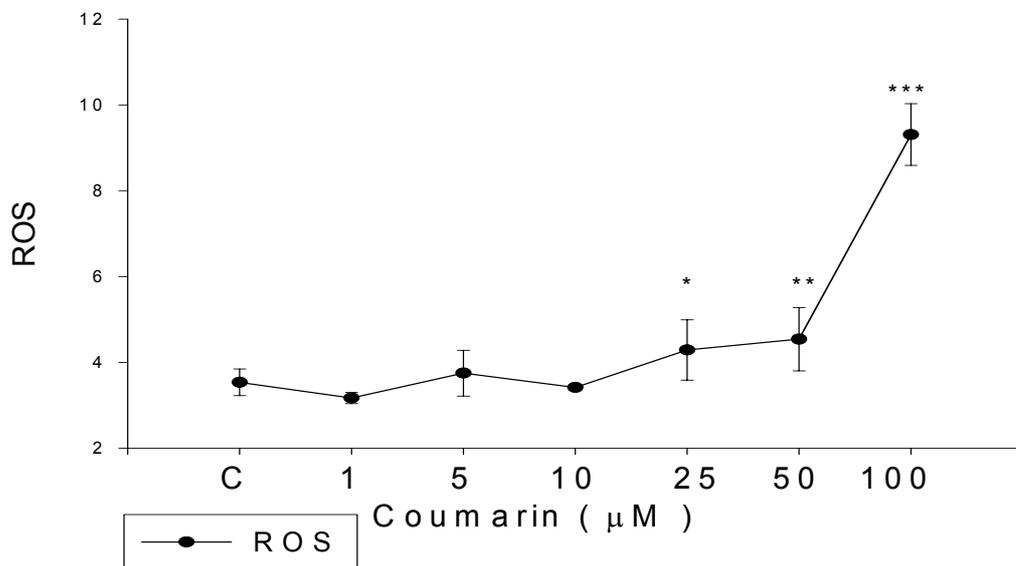
之後利用流式細胞計數儀評估 100 μM 濃度的香豆精處理不同時間 0.5、1、4、6、8、10、12、16、18、20、24、36、48、60、72 和 84 小時，再加入 H₂DCFDA，並觀察其產生活性氧化物的情形。結果發現隨著時間的延長，曲線相對地有右移的趨勢，且 M1 Gated 數值也隨之增加，表示細胞有產生活性氧化物的情形(如圖十七、十八、十九、二十)，可能因此而造成細胞的 DNA 傷害。



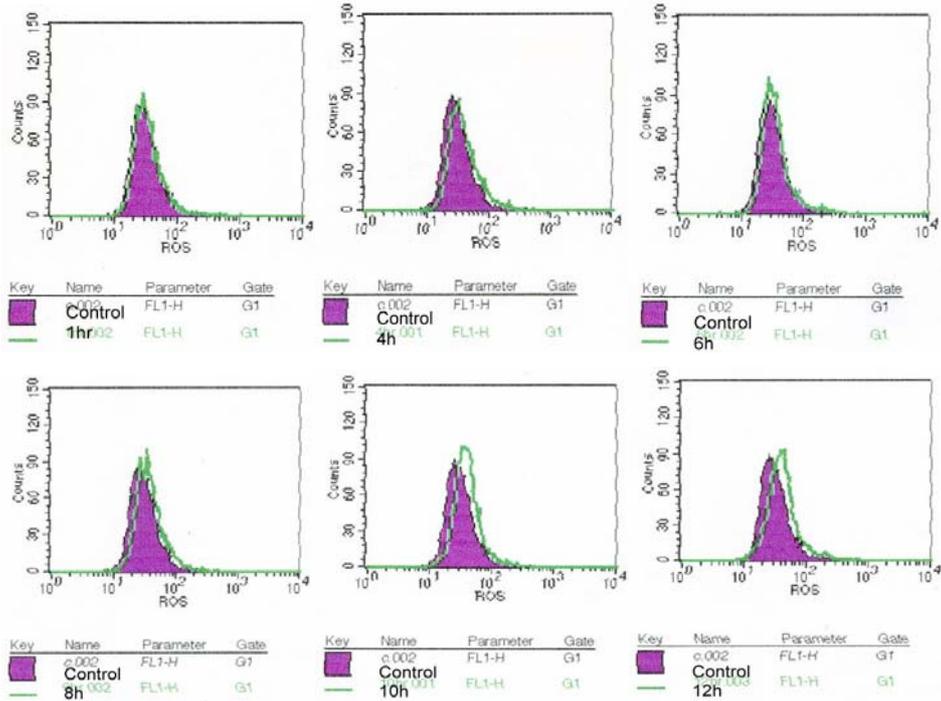
圖十四 利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精於 0.5 小時所造成 ROS 的影響。結果發現隨著濃度的增加，曲線有右移的趨勢，表示有產生 ROS 的現象。



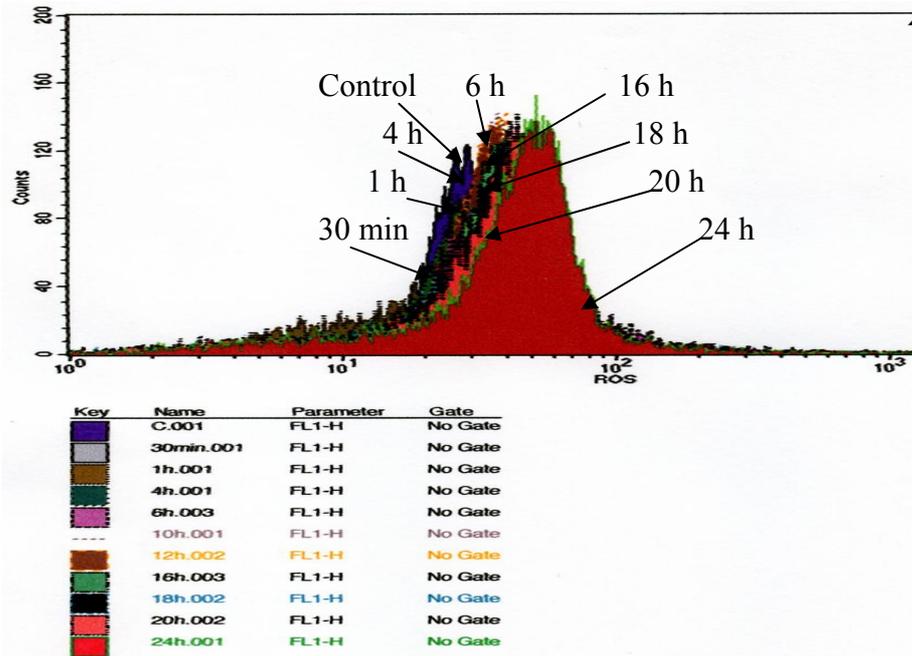
圖十五 利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精在 0.5 小時所造成 ROS 的影響。結果發現隨著濃度的增加，曲線有右移的趨勢，表示有產生 ROS 的現象。



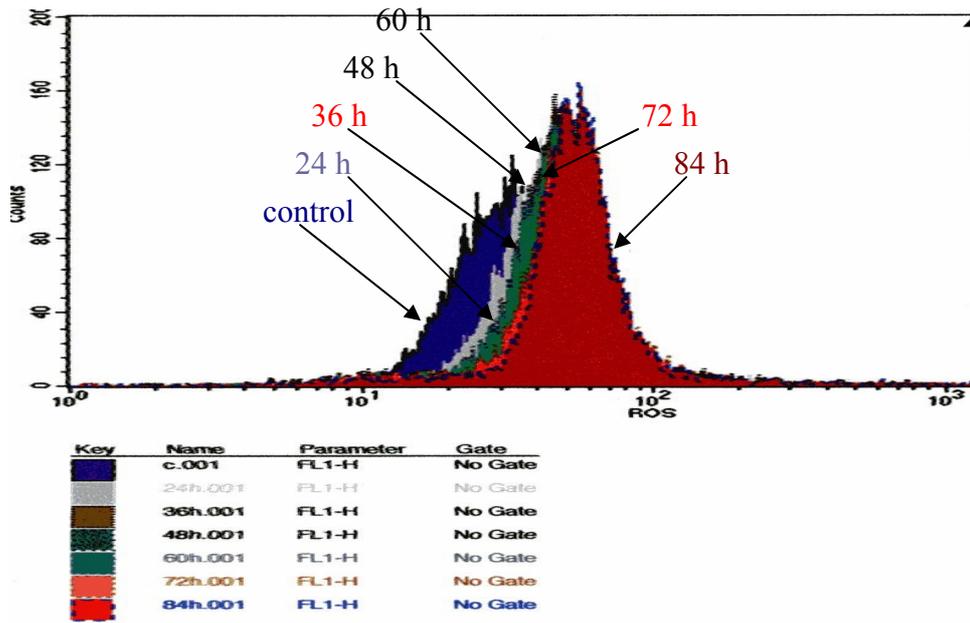
圖十六 人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精在 0.5 小時的 ROS 之量化圖。結果發現隨著濃度的增加，ROS 數值上升，表示有產生 ROS 的現象。數據結果以 mean±SD 值表示，n=3。
(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)



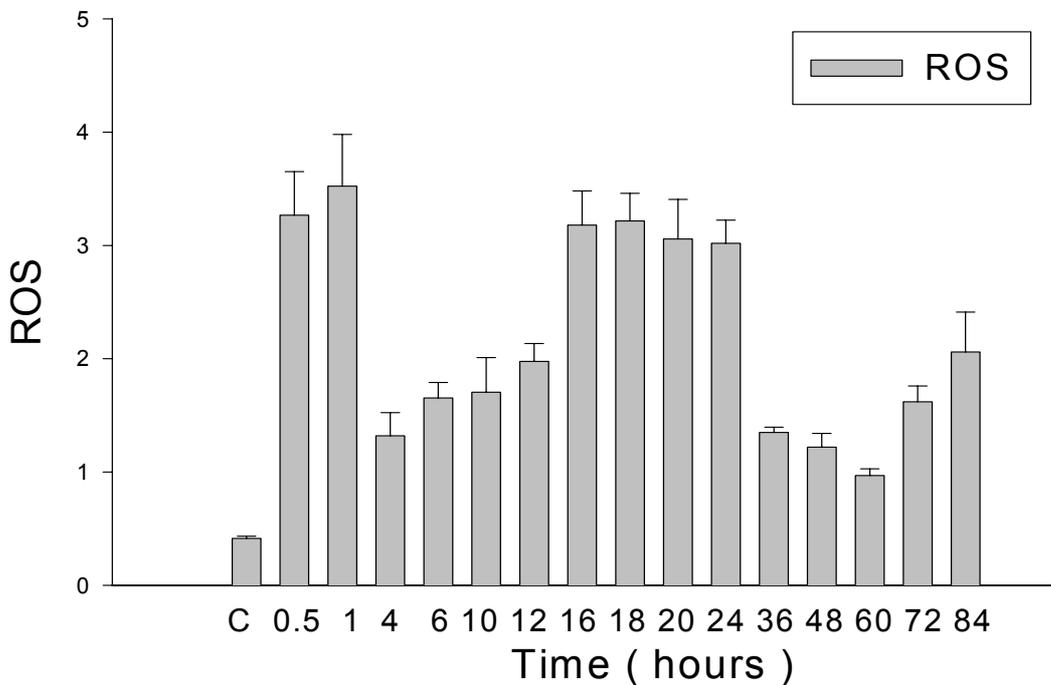
圖十七 利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μ M 濃度之香豆精在 0.5、1、4、6、8、10、12 小時所造成的 ROS 影響。結果發現隨著時間點的延長，曲線有右移的趨勢，表示有產生 ROS 的現象。



圖十八 利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μ M 濃度之香豆精在 0.5、1、4、6、10、12、16、18、20、24 小時所造成 ROS 的影響。結果發現隨著時間點的延長，曲線有右移的趨勢，表示有產生 ROS 的現象。



圖十九 利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μ M 濃度之香豆精在 24、36、48、60、72 和 84 小時所造成 ROS 的影響。結果發現隨著時間的延長，曲線有右移的趨勢，表示有產生 ROS 的現象。

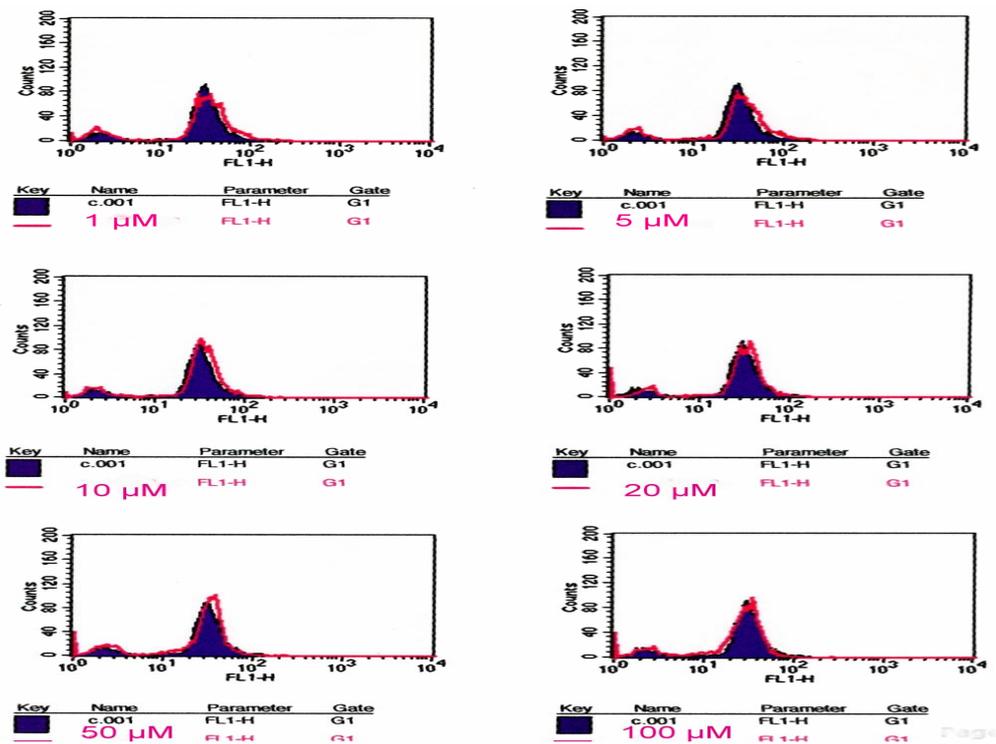


圖二十 人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μ M 濃度之香豆精所造成的 ROS 之量化圖。結果發現隨著時間的延長，ROS 數值上升，表示有產生 ROS 的現象。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。

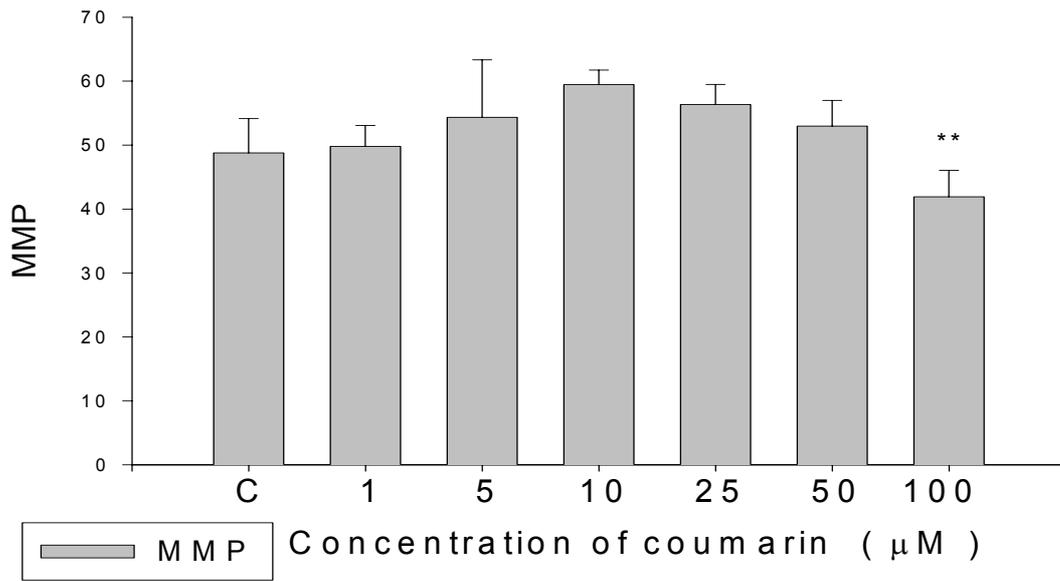
第四節 香豆精在人類子宮頸癌細胞株細胞對膜電位(Mitochondrial membrane potential)的影響

利用流式細胞計數儀評估不同濃度的香豆精處理 1 小時之後，加入 DioC6，並觀察其產生膜電位變動的情形。發現隨著藥物濃度的增加，發現曲線有些微左移的情形，且 M2 Gated 數值也隨之增加，表示細胞有產生膜電位移動的情形，推測可能經由粒線體而導致產生膜電位移動，而在 100 μM 的濃度較為明顯。(如圖二十一、二十二)

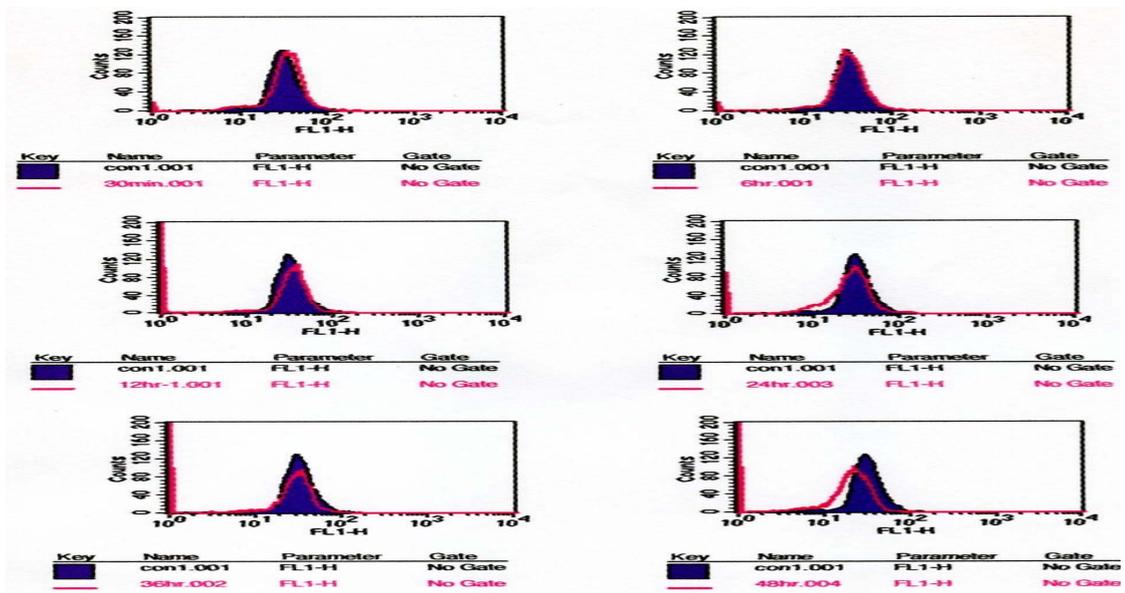
之後以 100 μM 香豆精處理細胞不同時間後，加入 DioC6 來檢測膜電位變動的情形。分別從 0.5、1、4、6、8、10、12、16、18、20、24、36、48、60、72 和 84 小時的處理時間來檢測細胞產生膜電位變動的情況。結果發現隨著時間的延長，曲線相對地有左移的趨勢，且 M2 Gated 數值也隨之增加(如圖二十三、二十四、二十五)，表示細胞有產生膜電位變動的情形，可能是經由粒線體的路徑而造成膜電位的變動。



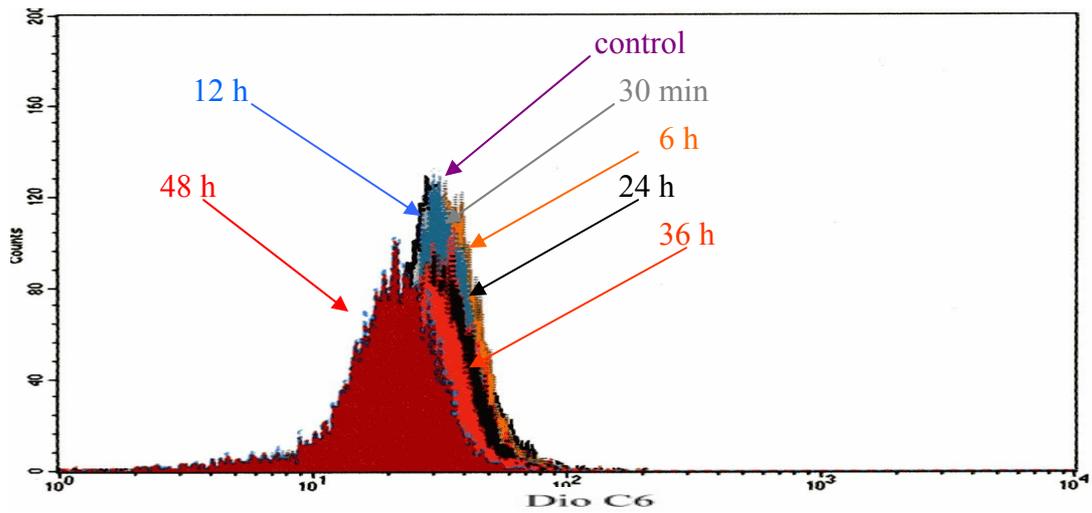
圖二十一 利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精所造成 MMP 的變動。結果發現隨著濃度的增加，曲線唯有在 100 μM 的濃度有左移的趨勢，表示有產生 MMP 的現象。



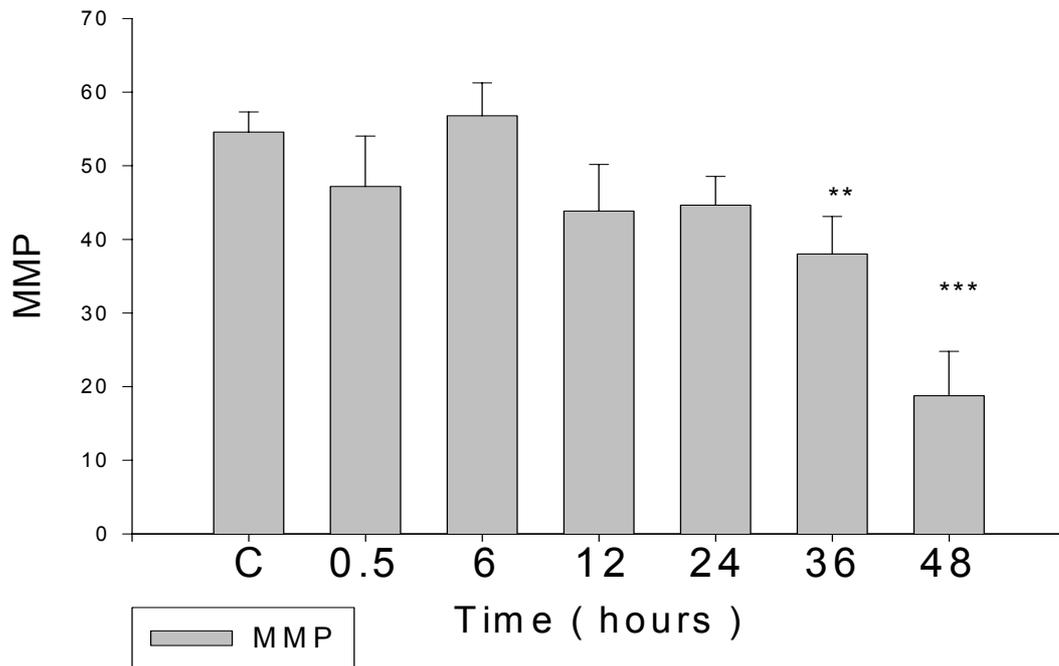
圖二十二 人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精所造成 MMP 變動的量化圖。結果發現只有在 100 μM 濃度下，會有 MMP 數值下降，表示有產生 MMP 的現象。數據結果以 mean±SD 值表示，n=3。(* p<0.05, ** p<0.01)



圖二十三 利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μM 濃度之香豆精在各個不同的時間點所造成 MMP 的變動。結果發現隨著時間點的延長，曲線有左移的趨勢，表示有產生 MMP 的現象。



圖二十四 利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予 100 μM 濃度之香豆精在各個不同的時間點所造成 MMP 的變動。結果發現隨著時間點的延長，曲線有左移的趨勢，在 48 h 左移的情況最明顯，表示有產生 MMP 的現象。

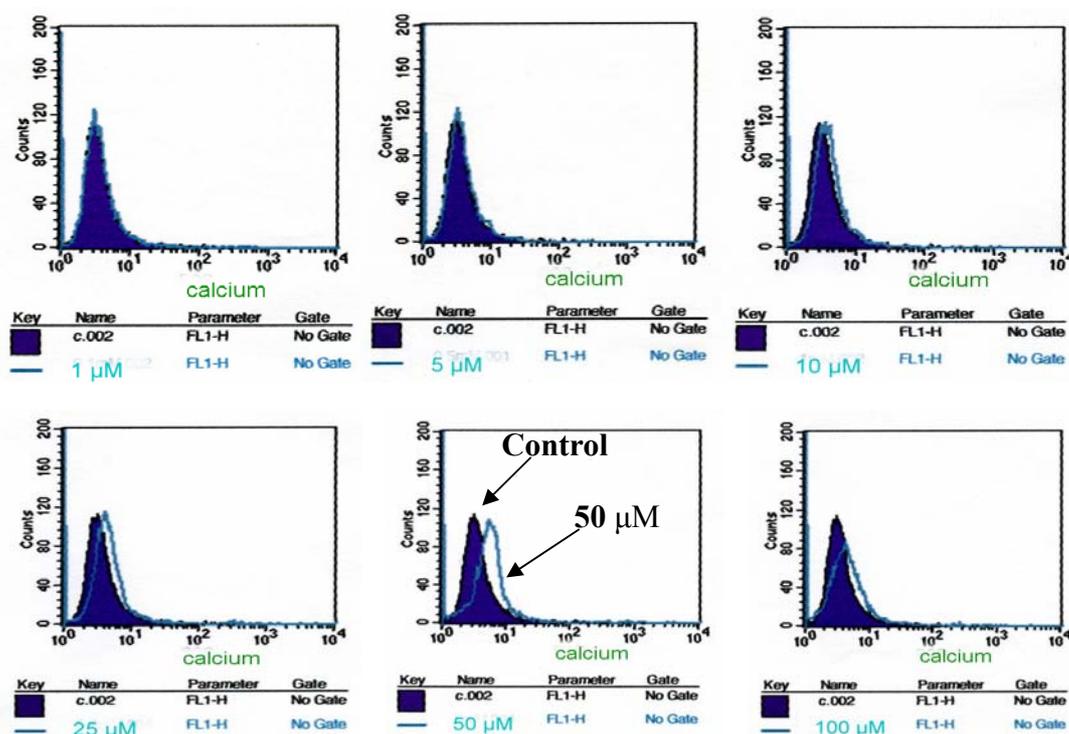


圖二十五 人類子宮頸癌細胞經由給予濃度 100 μM 之香豆精所造成 MMP 變動之量化圖。結果發現隨著時間點的延長，MMP 數值也隨之下降，在 48 小時，MMP 數值最低，表示在 48 小時產生最多的 MMP。數據結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 值表示， $n=3$ 。（* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ）

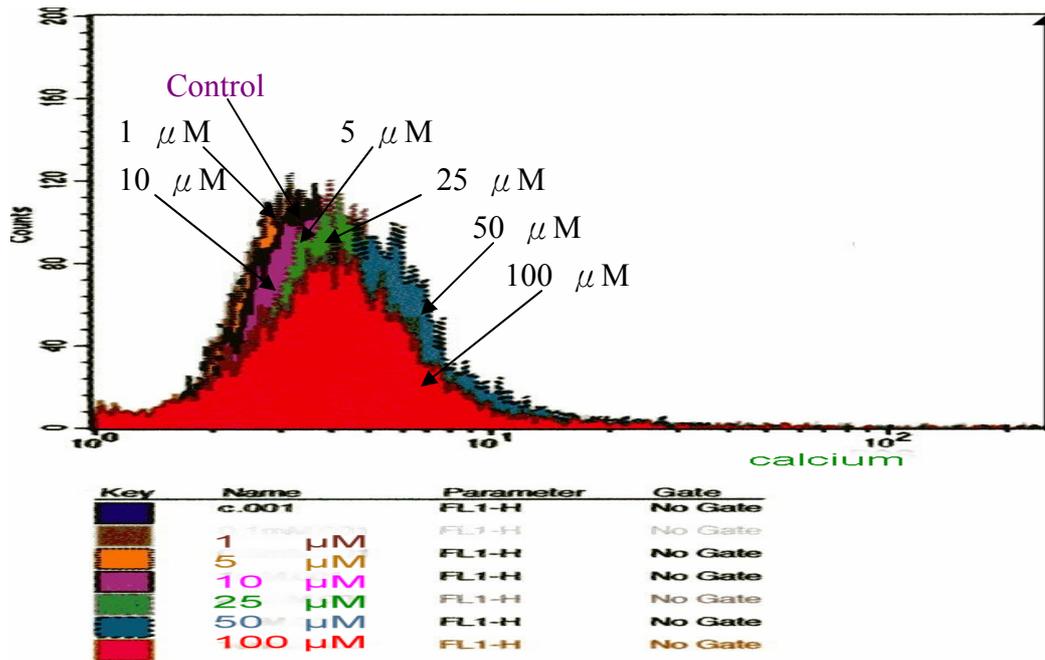
第五節 香豆精對細胞內鈣離子(Ca²⁺)濃度之影響

利用流式細胞計數儀評估不同濃度的香豆精處理 1 小時之後，加入 Indo-1AM，並觀察其產生鈣離子的情形。發現隨著藥物濃度的增加，發現曲線有些微右移的情形，且 M1 Gated 數值也隨之增加，表示細胞內鈣離子濃度增加，以 50 μM 香豆精處理鈣離子濃度增加為明顯。(如圖二十六、二十七、二十八)

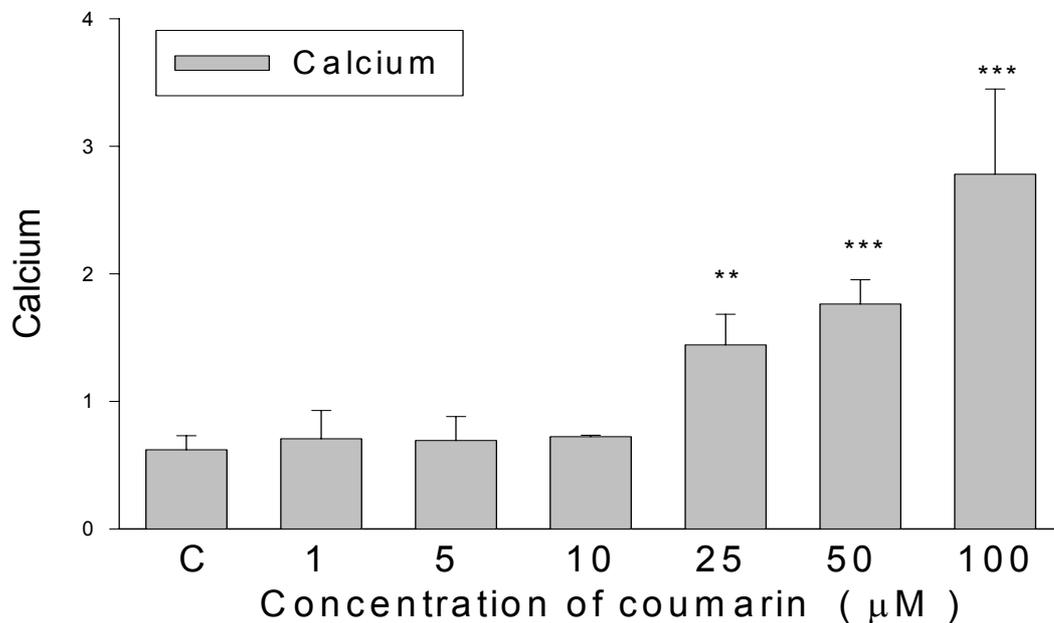
之後評估以 50 μM 的香豆精處理不同時間後的情況，同樣加入 Indo-1AM，觀察鈣離子的濃度變化。從 1、2、4、6、8、12、18、24、36、48 和 60 小時的時間點來探討細胞產生鈣離子的情形。結果發現隨著時間的延長，曲線相對地有右移的趨勢，且 M1 Gated 數值也隨之增加，表示香豆精會促使細胞內鈣離子濃度增加。(如圖二十九、三十、三十一、三十二)



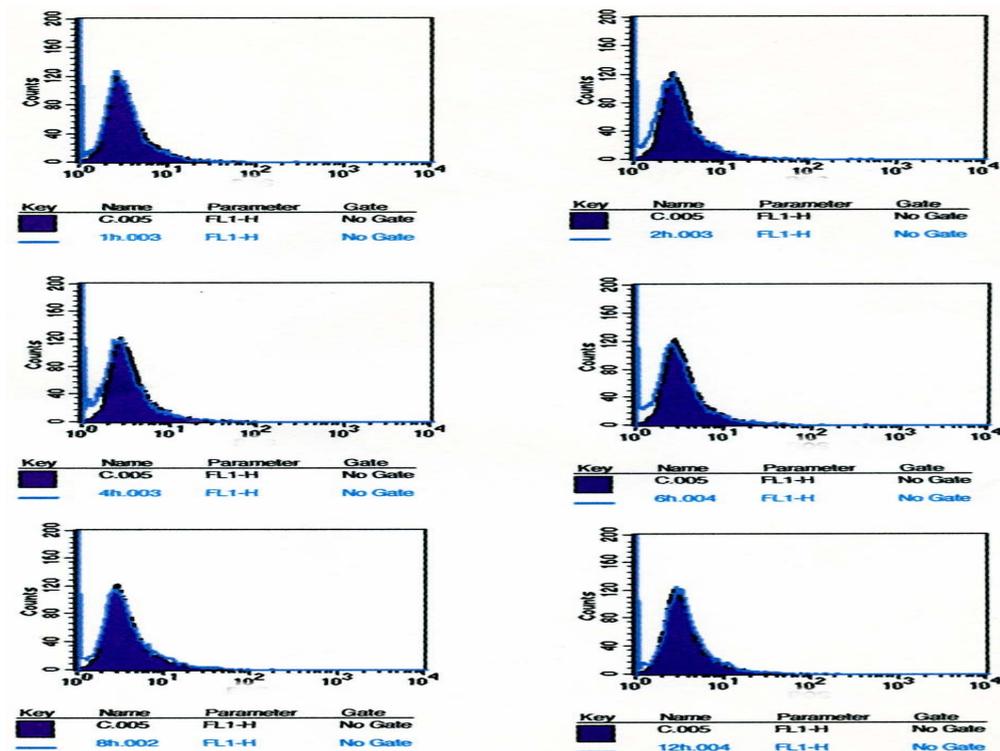
圖二十六 人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精造成鈣離子濃度變成的情形。分別給予香豆精濃度 1、5、10、25、50、100 μM 於人類子宮頸癌細胞作用 1 小時，結果發現隨著濃度的增加，曲線有右移的趨勢，表示有鈣離子濃度增加的情形，在 50 μM 處理的濃度下右移情況最為明顯。



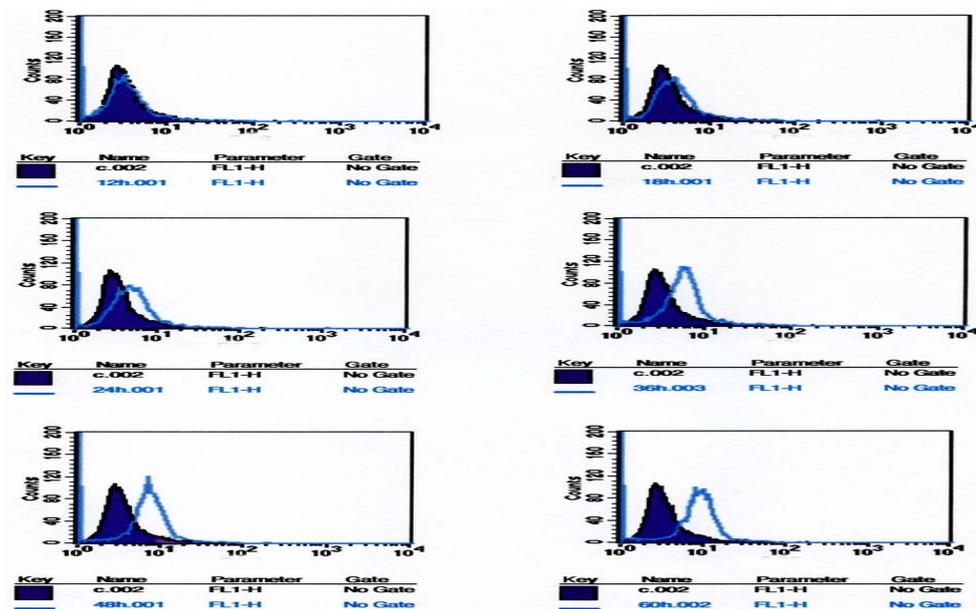
圖二十七 人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精造成鈣離子濃度增加的情形。分別給予香豆精濃度 1、5、10、25、50、100 μM 於人類子宮頸癌細胞作用 1 小時，結果發現隨著濃度的增加，曲線有右移的趨勢，表示鈣離子濃度增加，在 50 μM 處理的濃度下右移情況最為明顯。



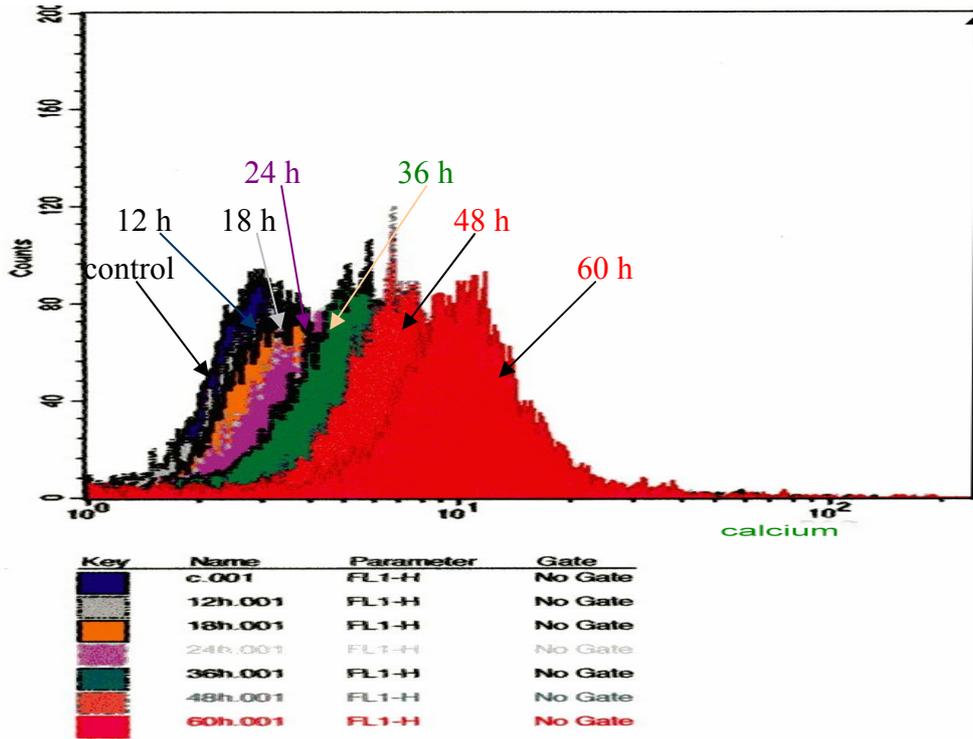
圖二十八 人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精造成鈣離子濃縮變動的量化圖。結果發現在 25、50、100 μM 濃度下，calcium 數值上升較為明顯，表示有明顯鈣離子濃度增加的現象。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)



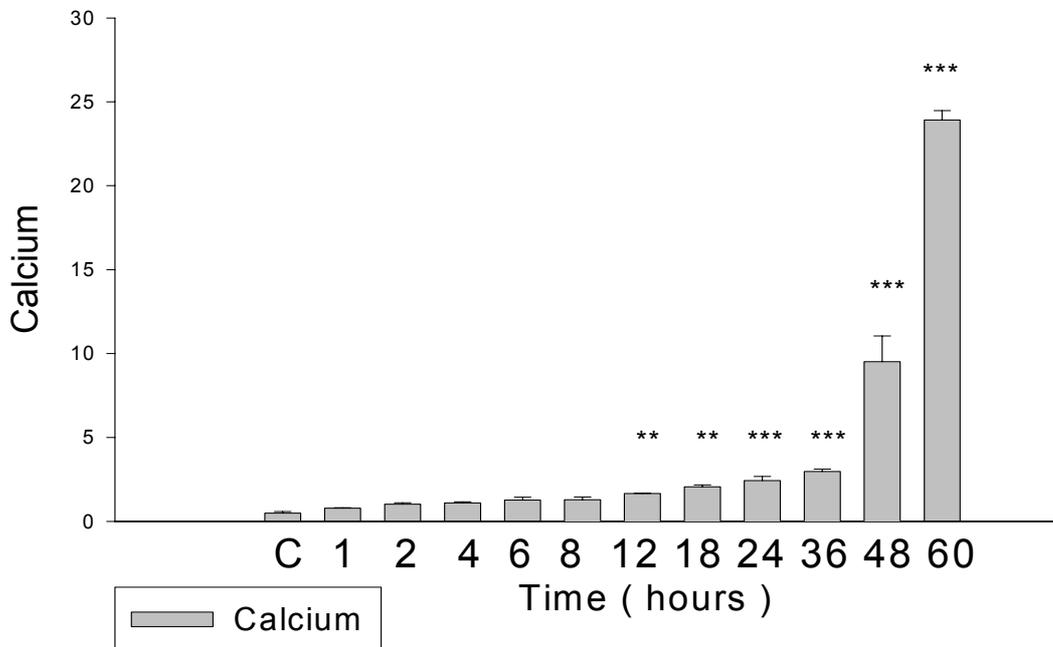
圖二十九 人類子宮頸癌細胞經由給予 50 μM 濃度之香豆精在 1、2、4、6、8、12 小時造成鈣離子濃度變動的情形。結果發現在這些時間點，曲線右移的趨勢並沒有很明顯，表示只有些微的鈣離子濃度增加。



圖三十 人類子宮頸癌細胞經由給予 50 μM 濃度之香豆精在 12、18、24、36、48、60 小時鈣離子變動的情形。結果發現隨著時間點延長，曲線有明顯右移的趨勢，表示鈣離子濃度增加。



圖三十一 人類子宮頸癌細胞經由給予 50 μ M 濃度之香豆精在 12、18、24、36、48、60 小時造成鈣離子濃度變動的情形。結果發現隨著時間點延長，曲線有明顯右移的趨勢，表示鈣離子濃度增加。

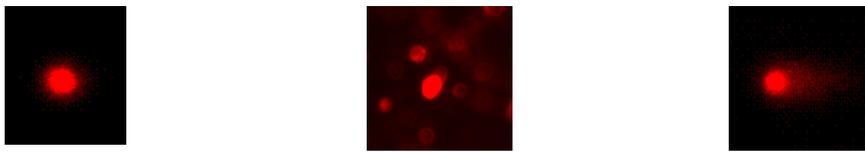


圖三十二 人類子宮頸癌細胞經由給予濃度 50 μ M 之香豆精所造成鈣離子濃度上升的量化圖。結果發現隨著時間點的延長，calcium 數值也隨之上升，表示鈣離子濃度增加。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3。
(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

第六節 利用慧星試驗(Comet assay)觀察香豆精對於人類子宮頸

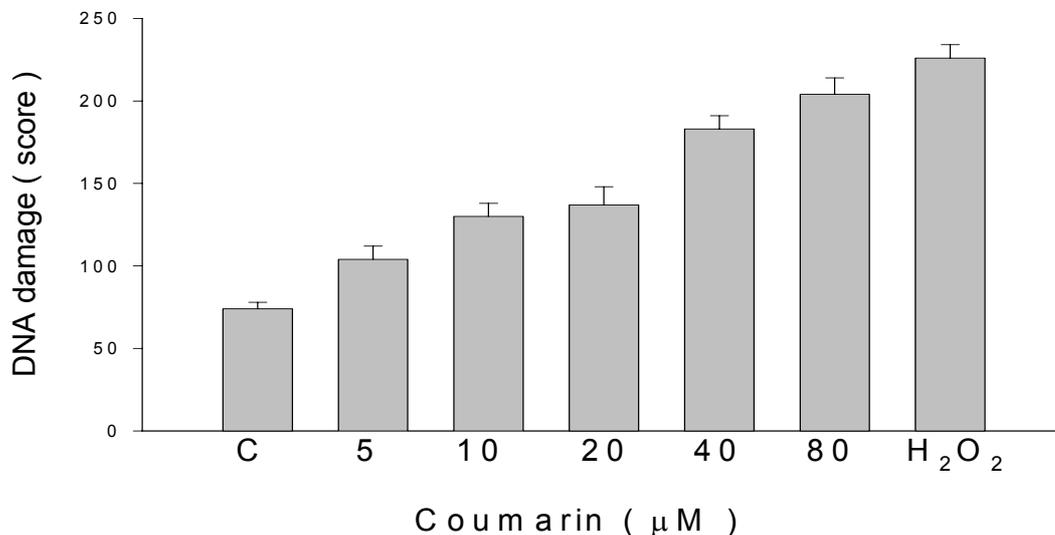
癌細胞株 HeLa 細胞其 DNA 傷害程度

利用慧星試驗法觀察濃度分別為 5、10、20、40、80 μM 香豆精對 HeLa 細胞作用 24 小時後，所造成細胞 DNA 單股斷裂的程度。在陰性對照組加入 1% DMSO，陽性對照組加入 3 μM H_2O_2 ，其餘則加入 5、10、20、40、80 μM 濃度的香豆精，以慧星試驗偵測，觀察細胞拖尾的情形，隨機選取 100 顆細胞按拖尾情況給予 0~4 價數。結果發現：當香豆精濃度愈高，其 DNA 拖尾的情況愈嚴重，亦表示其 DNA 損傷的程度也愈高。(如圖三十三、三十四)



1% DMSO (negative control) H_2O_2 (positive control) 80 μM of coumarin

圖三十三 藉由慧星試驗偵測 DNA 傷害的程度。陰性對照組加入 1% DMSO，陽性對照組加入 3 μM H_2O_2 ，並觀察 DNA 傷害的程度。

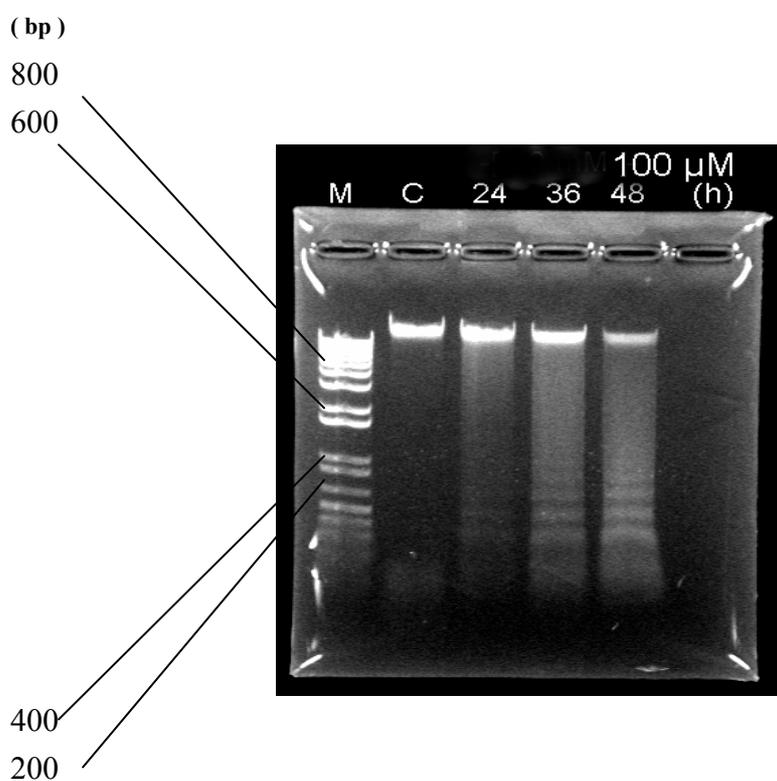


圖三十四 經由不同濃度的香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa cells) 24 小時後，以慧星試驗分析其對細胞 DNA 傷害的程度。陰性對照組加入 1% DMSO，陽性對照組加入 3 μM H_2O_2 ，作用 24 小時，並觀察 DNA 傷害的程度。

第七節 利用 DNA 電泳膠片觀察香豆精對於人類子宮頸癌細胞株

HeLa 細胞其 DNA ladder 情形

為了進一步確定香豆精在人類子宮頸癌細胞所引起的細胞凋亡情形，於是利用 DNA 電泳膠片來觀察其斷裂的 DNA fragment。使用 1% 的電泳膠片以 100 V 的電壓跑膠片，並以 ethidium bromide 來染色，在 Eagle Eye II 的 UV light 下觀察其 DNA 斷裂的情形。在圖三十三中，加入 100 μM 的香豆精處理 24、36、48 小時後，在 50-300 bp 的位置出現斷裂的 DNA 片段，可以清楚的看到有斷裂的 DNA fragment，並且形成 DNA ladder 的情形。



圖三十五 利用 DNA 電泳法檢測 DNA 斷裂的情形。加入 100 μM 的香豆精處理 24、36、48 小時後，在 50-300 bp 的位置出現斷裂的 DNA 片段，形成 ladder 的情形。

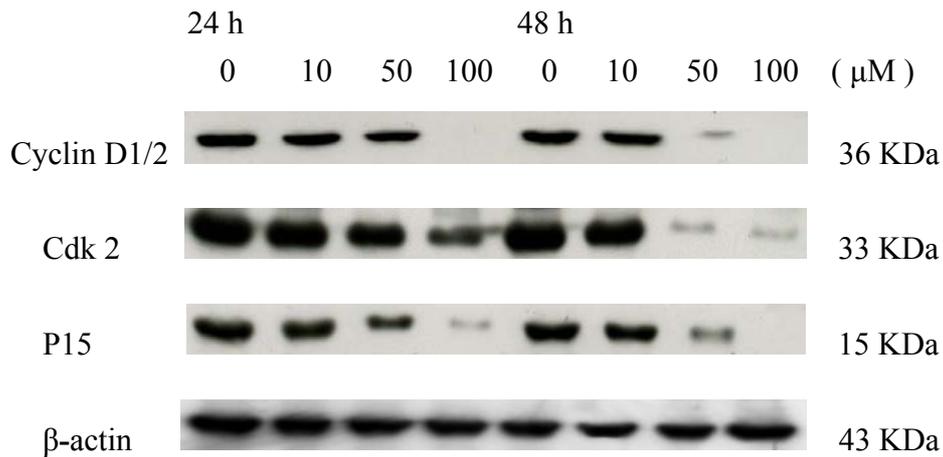
第八節 利用西方墨點法(Western blotting)檢測香豆精對細胞週期蛋

白表現量的影響

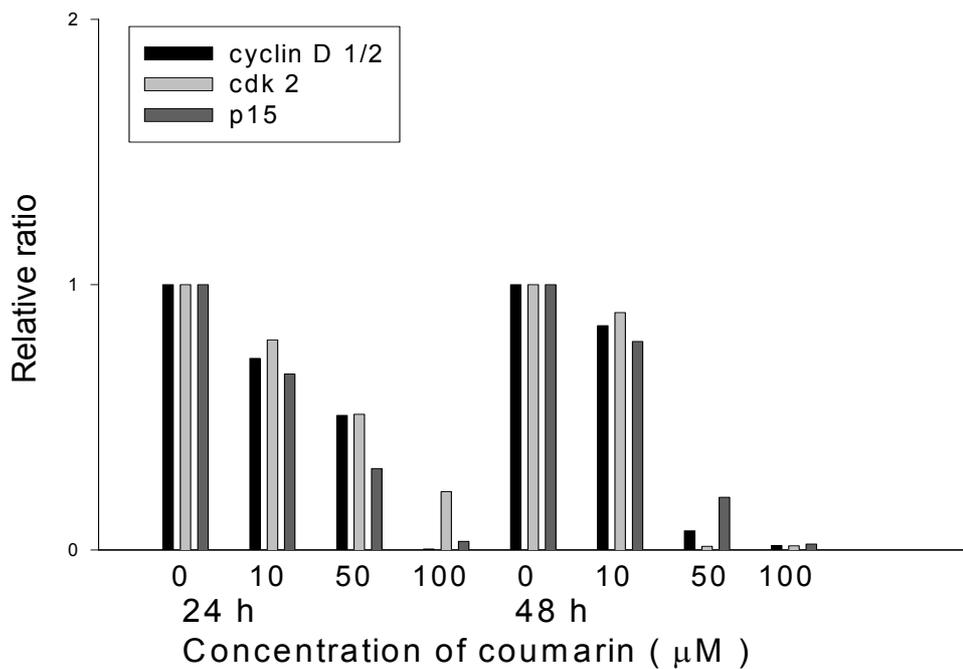
以西方墨點法分析，香豆精對人類子宮頸癌細胞內的細胞週期相關蛋白質的影響。先前的實驗結果顯示，香豆精造成參與調控細胞週期中 G0/G1 期的停止，為探究其機制故接著偵測參與調控細胞週期相關的 G0/G1 期的蛋白，包括 Cdk 2、Cdk 4、cyclin D1/2、CDC 25A、p15、p21 和 p53，觀察蛋白表現量。

利用西方墨點法觀察 G0/G1 期中的 cyclin D1/2、cdk 2、cdk4、p15 的蛋白表現量。分別以濃度 0、10、50、100 μ M 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa) 24 或 48 小時後，觀察蛋白表現量變化，以 β -actin 作為 internal control，結果發現隨著濃度上升與時間的延長，cyclin D1/2 蛋白表現量下降，cdk 2 蛋白表現量下降，cdk4 蛋白表現量上升，p15 蛋白表現量下降。(如圖三十六、三十七)

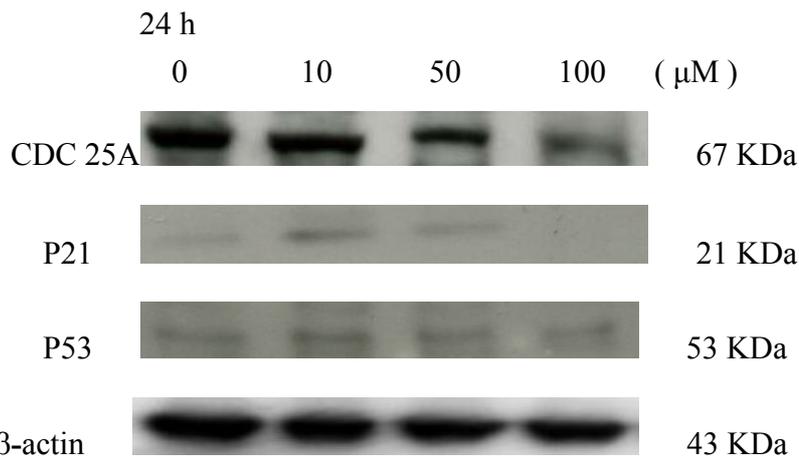
利用西方墨點法觀察 G0/G1 期中的 CDC 25A、p21、p53 的蛋白表現量。分別以濃度 0、10、50、100 μ M 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量變化，結果發現隨著濃度的上升，CDC 25A 蛋白表現量下降，p21 蛋白表現量先增加而後遞減，p53 蛋白表現量先增加而後遞減。(如圖三十八、三十九)



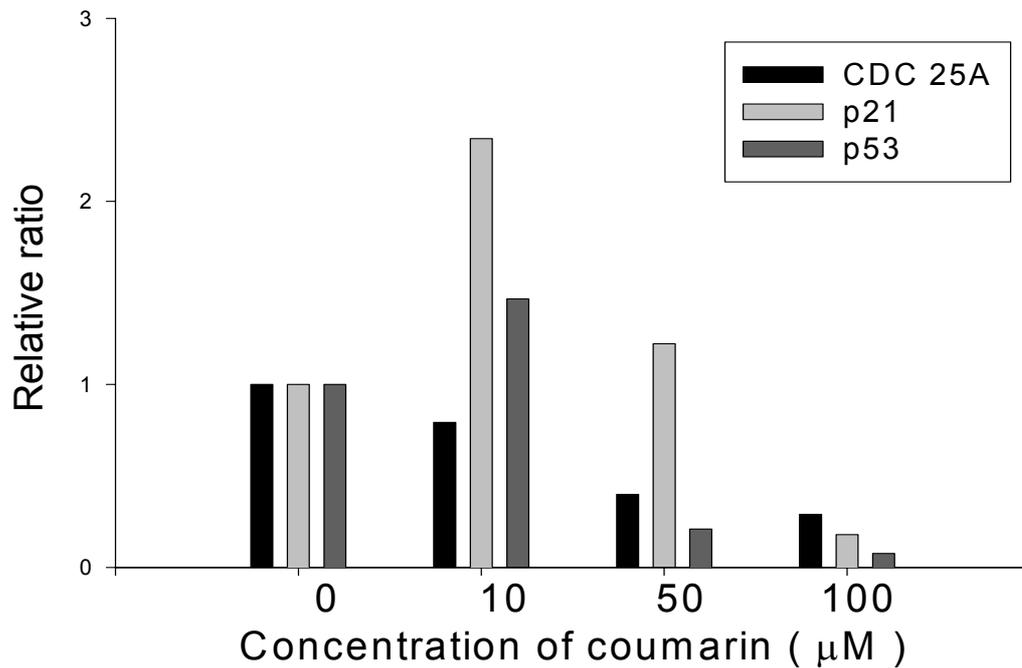
圖三十六 利用西方墨點法觀察 G0/G1 期中的 cyclin D1/2、cdk 2、cdk4、p15 的蛋白表現量變化。分別以濃度 0、10、50、100 μ M 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24、48 小時，觀察蛋白表現量，以 β -actin 當作 internal control。



圖三十七 利用西方墨點法觀察 G0/G1 期中的 cyclin D1/2、cdk 2、cdk4、p15 的蛋白表現量變化的量化圖。分別以濃度 0、10、50、100 μ M 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24、48 小時，觀察蛋白表現量，以 β -actin 當作 internal control。



圖三十八 利用西方墨點法觀察 G0/G1 期中的 CDC 25A、p21、p53 的蛋白表現量變化。分別以濃度 0、10、50、100 μ M 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量變化，以 β -actin 當作 internal control。



圖三十九 利用西方墨點法觀察 G0/G1 期中的 CDC 25A、p21、p53 的蛋白表現量變化的量化圖。分別以濃度 0、10、50、100 μ M 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量變化，以 β -actin 當作 internal control。

第九節 利用西方墨點法檢測香豆精在人類子宮頸癌細胞中對

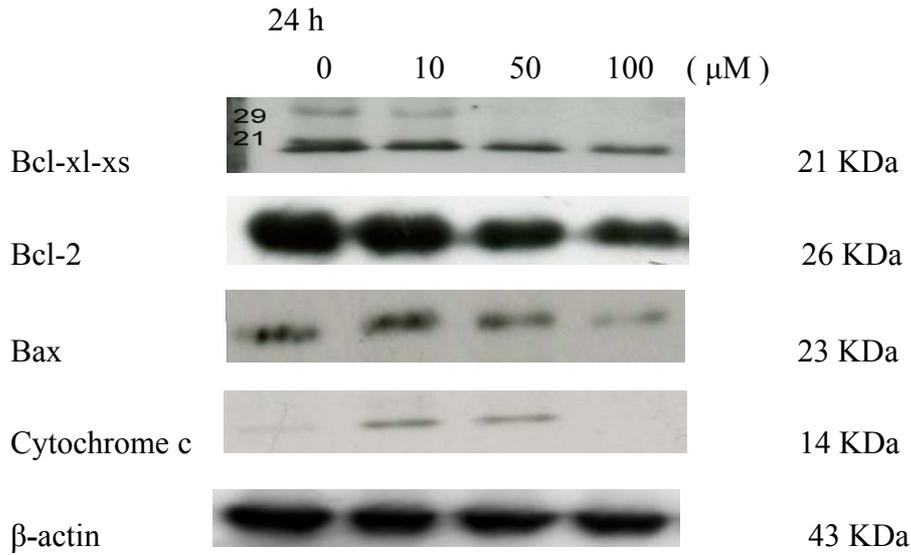
caspase 蛋白與細胞凋亡調控蛋白的表現量之影響

先前的實驗結果顯示，香豆精會導致子宮頸癌細胞凋亡，為探究其機制，故接著以西方墨點法偵測參與調控細胞凋亡相關的蛋白，包括促進細胞凋亡的 Bax，與抑制細胞凋亡之因子 Bcl-xl-xs 和 Bcl-2，以及執行細胞凋亡的 caspase family 包括 caspase-3、caspase-8、caspase-9，觀察其蛋白表現量變化，以 β -actin 作為 internal control。

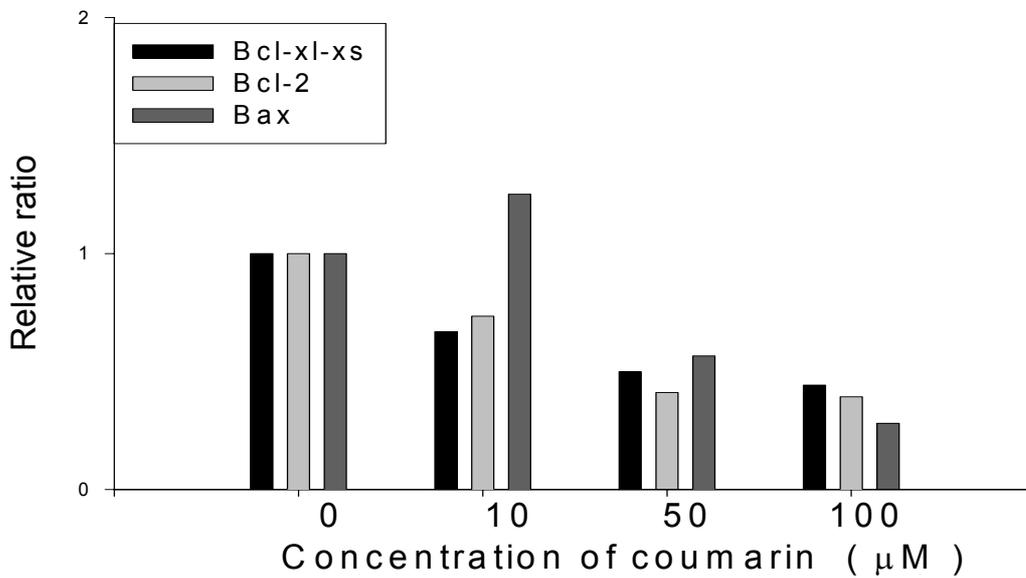
分別以濃度 0、10、50、100 μ M 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa) 24 小時，觀察蛋白表現量，結果發現隨著濃度的上升，Bcl-xl-xs 蛋白表現量下降，Bcl-2 蛋白表現量下降，Bax 蛋白表現量先增加而後遞減。(如圖四十、四十一)

而經由粒線體會釋出 cytochrome c，進而造成細胞凋亡，並活化下游路徑，故接著偵測 cytochrome c，結果發現 cytochrome c 蛋白表現量先增加而後遞減。(如圖四十、四十二)

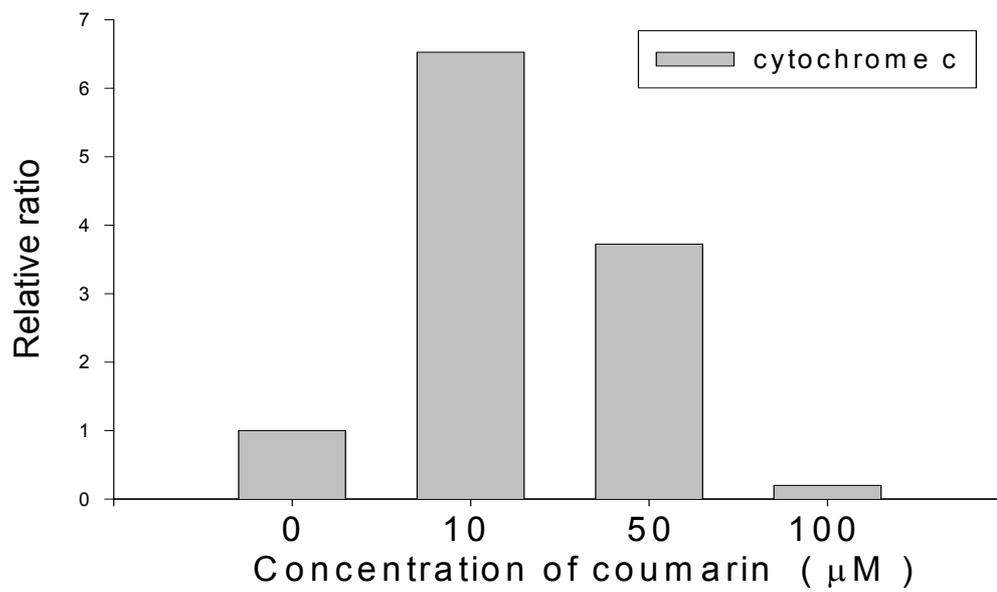
利用西方墨點法觀察與 caspase family 有關的 caspase-3、caspase-8、caspase-9 的蛋白表現量。分別以濃度 0、10、50、100 μ M 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量，結果發現隨著濃度的上升，caspase-3 蛋白表現量上升，caspase-8 蛋白表現量下降，caspase-9 蛋白表現量下降。(如圖四十三、四十四)



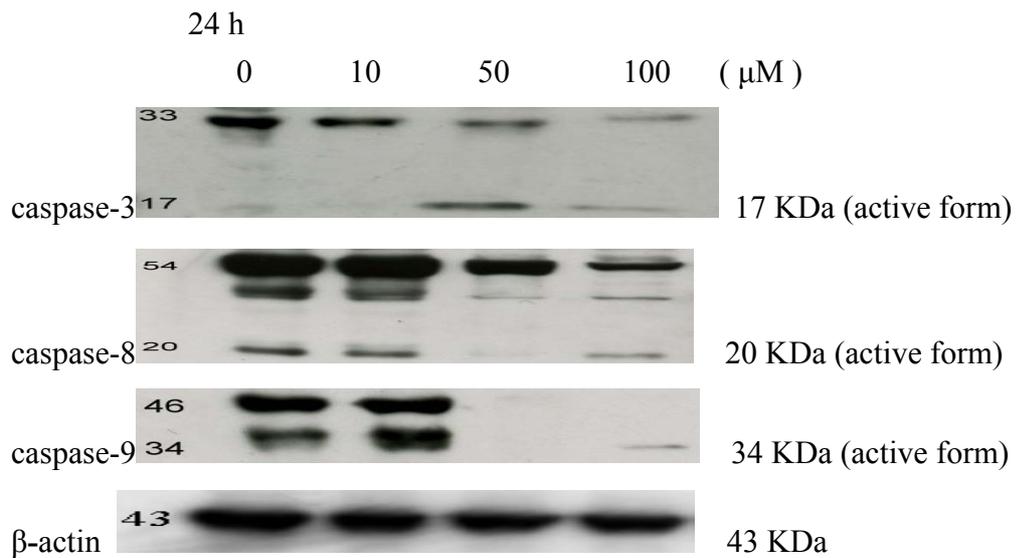
圖四十 利用西方墨點法觀察與 apoptosis 有關的 Bcl-xl-xs、Bcl-2、Bax 與 cytochrome c 的蛋白表現量變化。分別以濃度 0、10、50、100 μM 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量，以 β-actin 當作 internal control。



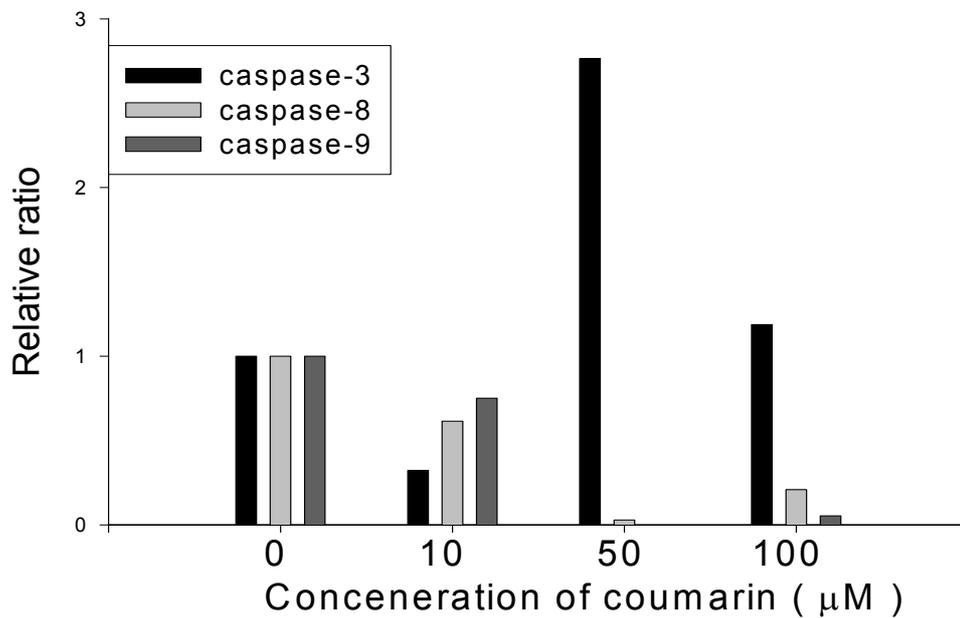
圖四十一 利用西方墨點法觀察與 apoptosis 有關的 Bcl-xl-xs、Bcl-2、Bax 的蛋白表現量變化的量化圖。分別以濃度 0、10、50、100 μM 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量，以 β-actin 當作 internal control。



圖四十二 利用西方墨點法觀察 cytochrome c 的蛋白表現量的量化圖。分別以濃度 0、10、50、100 μM 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量變化，以 $\beta\text{-actin}$ 當作 internal control。



圖四十三 利用西方墨點法觀察與 caspase family 有關的 caspase-3、caspase-8、caspase-9 的蛋白表現量變化。分別以濃度 0、10、50、100 μM 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量，以 β-actin 當作 internal control。



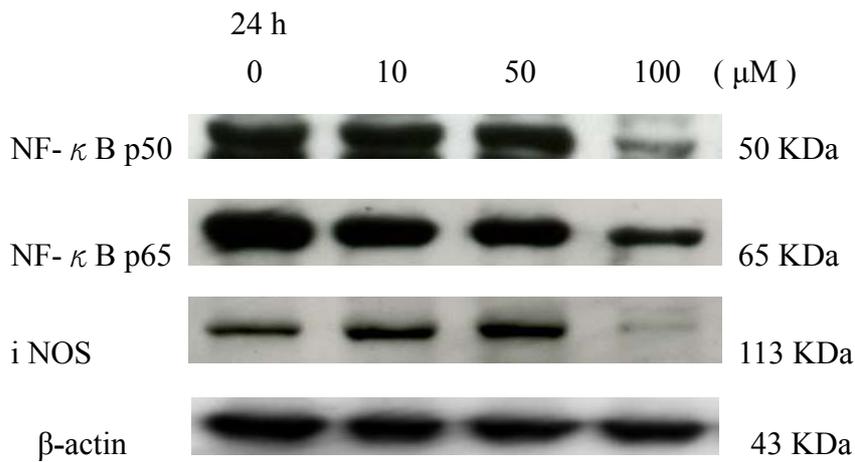
圖四十四 利用西方墨點法觀察與 caspase family 有關的 caspase-3、caspase-8、caspase-9 的蛋白表現量變化的量化圖。分別以濃度 0、10、50、100 μM 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量，以 β-actin 當作 internal control。

第十節 利用西方墨點法對香豆精在人類子宮頸癌細胞中 Death

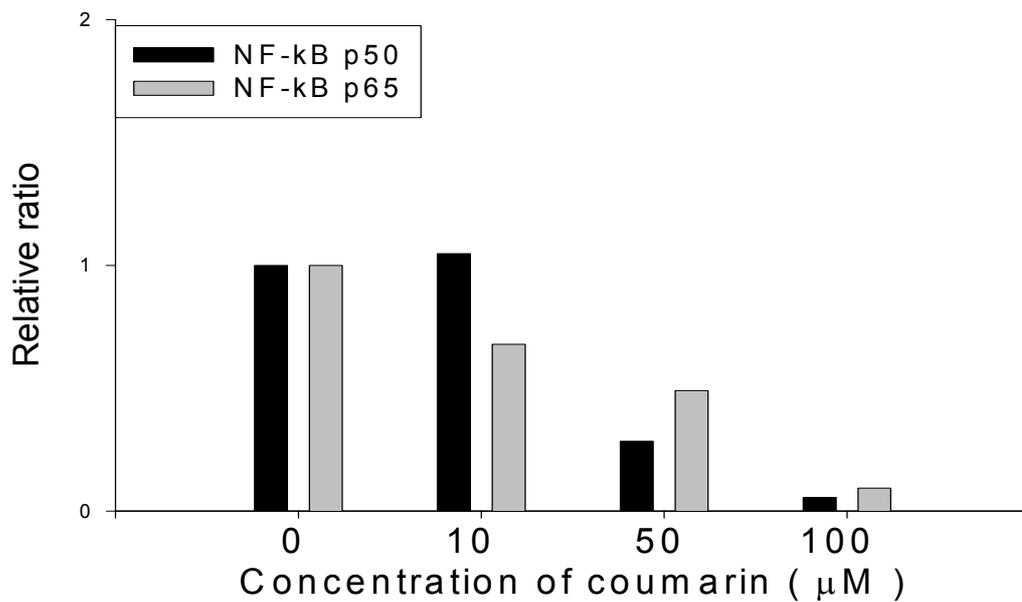
Receptor 與 iNOS 蛋白表現量的變化

以西方墨點法分析，香豆精對人類子宮頸癌細胞內的調控細胞死亡受器相關蛋白質的影響。先前的實驗結果顯示，香豆精會造成參與調控細胞凋亡的機制，亦可能會經由調控細胞死亡受器而造成細胞凋亡，故接著偵測參與調控細胞死亡受器相關的蛋白，包括 NF- κ B p50、NF- κ B p65；因為 iNOS 與造成 NO 的路徑有關，故接著偵測 iNOS，並觀察蛋白表現量變化，進一步探討調控細胞死亡受器的機制。

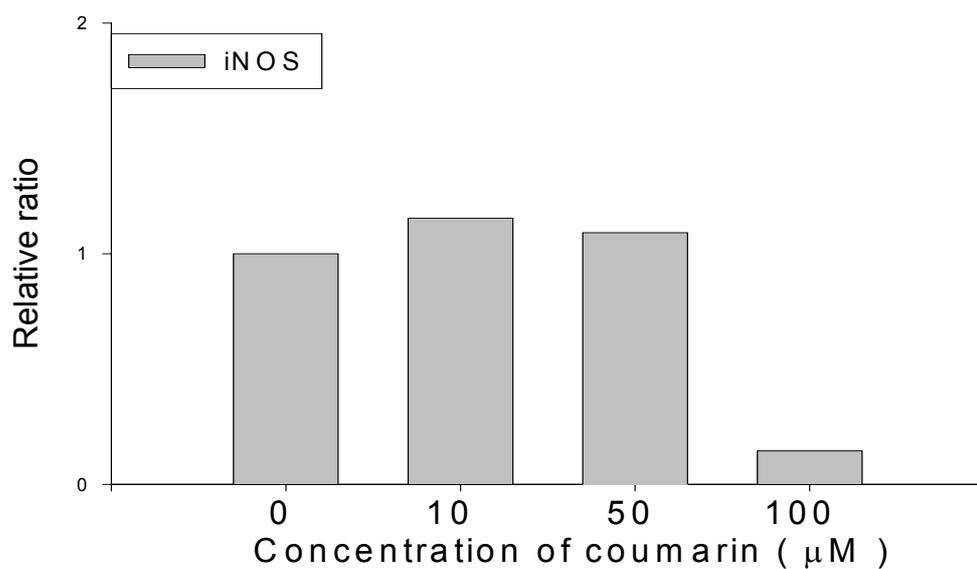
利用西方墨點法觀察 Death receptor 有關的 NF- κ B p50、NF- κ B p65 與 iNOS 的蛋白表現量。分別以濃度 0、10、50、100 μ M 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量變化，結果發現 NF- κ B p50 蛋白表現量下降，NF- κ B p65 蛋白表現量下降，iNOS 表現量先增加而後遞減。(如圖四十五、四十六、四十七)



圖四十五 利用西方墨點法觀察 Death receptor 有關的 NF-κ B p50 、NF-κ B p65 與 iNOS 的蛋白表現量變化。分別以濃度 0、10、50、100 μM 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量變化，以 β-actin 當作 internal control。



圖四十六 利用西方墨點法觀察 Death receptor 有關的 NF-κ B p50 、NF-κ B p65 的蛋白表現量變化的量化圖。分別以濃度 0、10、50、100 μM 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量變化，以 β-actin 當作 internal control。



圖四十七 利用西方墨點法觀察 iNOS 的蛋白表現量的量化圖。分別以濃度 0、10、50、100 μM 香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)於 24 小時，觀察蛋白表現量變化，以 β -actin 當作 internal control。

第六章 討論

從天然植物中萃取出香豆精的成份，如茵陳蒿、桃花、月橘、白芷、紫花味喃、馬栗樹皮素..等等，而香豆精與其衍生物對於一些癌症的治療有不錯的效果。事實上，香豆精和黃酮類藥物含有一種叫做Benzopyrones的成份，日常生活的飲食中如茶、水果、核仁、蔬菜、咖啡、酒類皆可以發現這種成份，而研究發現：香豆精和其代謝物7-hydroxycoumarin發現對於肝癌細胞株(HepG2)、胃癌細胞株和大腸癌細胞株有抑制增生的效果¹⁸。而子宮頸癌細胞(HeLa)又是極容易取得的細胞株，故以香豆精處理細胞，試圖找出香豆精和子宮頸癌細胞(HeLa)兩者之間的關係，並探討香豆精抑制子宮頸癌細胞(HeLa)增生的效果。

本篇主要探討目的如下：(1)香豆精是否能抑制子宮頸癌細胞(HeLa)增生。(2)以香豆精處理子宮頸癌細胞是否會誘發細胞凋亡(apoptosis)的現象。(3)以香豆精處理子宮頸癌細胞是否會造成細胞週期停止(cell cycle arrest)的現象。(4)以香豆精處理子宮頸癌細胞對於活性氧化物(reactive oxygen species)、粒線體膜電位改變(mitochondrial membrane potential)、鈣離子(Ca²⁺)產生的影響。(5)以香豆精處理子宮頸癌細胞造成細胞凋亡和細胞週期停止的機制。

MTT assay 與流式細胞計數儀的結果對照，MTT 是測粒線體酵素的活性，觀察酵素是否表達，但細胞或許還沒死卻仍有酵素活性，而流式細胞計數儀是偵測細胞的存活率，且較為靈敏，故兩者可以對照，皆說明了香豆精可以抑制細胞存活率。流式細胞計數儀存活率算存活率時，測定未加藥組與加藥組，利用流式細胞計數儀的分選原理，定 15 秒測 8000 顆細胞，可以觀察 15 秒鐘未加藥的有多少細胞數，加藥的有多少細胞數，故機器只要到了 8000 顆就會停，故即使在高濃度的香豆精，其細胞數再少仍可測得同樣的細胞數目，而不會造成未加藥組細胞數較多，加藥組細胞數較少的情形。而之後測活性氧化物，則設定數固定的數目，則可以觀察到未加藥組與加藥組一起算的細胞數目，才不會造成圈選面積的大小不一樣。

利用流式細胞計數儀評估不同濃度的香豆精處理 24 小時之後，觀察其細胞週期的表現。當細胞凋亡時，DNA 斷裂，在流式細胞計數儀上呈現 sub-G1 peak 特徵，在細胞週期內，DNA 含量會發生週期性變化，透過螢光探針加以測定，觀察發現隨著時間點的延長，在 24、48、72 小時的時間點，G0/G1 期之細胞比例有越來越多的趨勢，故推測香豆精可能造成細胞週期 G0/G1 期的停止。已知飲食中的酚類可以藉活化一些分子導致一連串效應(cascade)以對抗病毒，像是細胞毒殺作用、細胞凋亡和細胞週期的停止。酚類中的鞣花酸(Ellagic acid)，對人類的膀胱癌細胞株有抑制效果，並會造成 G0/G1 期的停止⁵⁶。

Fenton reaction 為氧化壓力常見的機制。 $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + ^-\text{OH}$ 而超氧離子和自由基因於具高度化學性質，會與 DNA 反應，並與 ROS 結合形成抗氧化機制，當 ROS 克服了此防禦系統後，結果便形成了氧化壓力⁴³。利用流式細胞計數儀評估不同濃度的香豆精處理 0.5 小時之後，加入 H₂DCFDA，並

觀察其產生活性氧化物的情形。 H_2DCFDA 為一非選擇性探針，會與細胞核、粒線體內膜、細胞質的 ROS 反應，當染劑主動擴散進入細胞內，醋酸鹽基的部分會被酯酶分解，而後進行氧化反應，使 cytochrome c 或 Fe^{2+} 會進入 DCF 中，形成 2', 7'-dichlorofluorescein(DCF)的螢光產物進入細胞中，故令我們偵測到螢光⁵⁷。結果發現隨著藥物濃度的增加，發現曲線有些微右移的情形，且 M1 Gated 數值也隨之增加，表示細胞有產生活性氧化物的情形，以 $100 \mu M$ 的濃度較為明顯。之後以 $100 \mu M$ 濃度的香豆精處理人類子宮頸癌細胞株於不同時間，發現曲線有右移的趨勢，表示細胞有產生活性氧化物的情形，可能因此而造成細胞的 DNA 傷害，細胞內維持平衡機制由於 ROS 的產生和抗氧化防禦機制兩者之間受到干擾而使細胞產生氧化壓力⁵⁸。利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予 $100 \mu M$ 濃度之香豆精在 0.5、1、4、6、8、10、12、16、18、20、24、36、48、60、72 和 84 小時所造成的影響。結果發現隨著時間的延長，曲線有右移的趨勢，表示有產生 ROS 的現象。依據 ROS 量化圖發現，在 0.5 和 1 小時有產生大量的 ROS，而後產生 ROS 趨勢下降，至 18~24 小時又再上升，而後呈現下降的趨勢，最後至 72 和 84 小時又再上升，因為細胞在短時間內會產生 ROS，而後有減緩的趨勢，右移的曲線會稍微回移，而後曲線則再度右移，推測是加藥後細胞抗氧化作用被破壞，反應便拉不回來了，故隨時間的延長而有 ROS 的產生。在 ROS 方面，可以加做抑制劑，進一步證實確實是香豆精處理人類子宮頸癌細胞株造成 ROS 而使細胞發生 DNA 傷害，將來要做 DMPO 抑制劑去觀察 ROS 的變化，觀察是否有抑制的現象；或針對短時間，如 20 分鐘至 200 分鐘去偵測 ROS，去觀察短時間 ROS 的變化情形，這樣的結果會更有意義。

關於經由粒線體而誘發細胞凋亡之路徑常被探討。其結果會失去粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)、 $\Delta\psi_m$ 、粒線體滲透性轉換孔洞(permeability transition pore)的打開和釋出 pro-apoptotic factors 如 cytochrome c 和經粒線體活化的 caspases/IAP 結合蛋白、low pI (Smac/DIABLO) 和 AIF 在細胞凋亡路徑。粒線體滲透性轉換孔洞是一種非特异性離子通道，需要電位調控型陰離子通道，(voltage-dependent anion channel) 亦需要腺嘌呤核苷酸轉位酶(adenine nucleotide translocase)。當粒線體內膜區域的離子大於外膜時，粒線體滲透性轉換孔洞打開，而基質會脹大，粒線體內膜區域的 apoptogenic factors 就會釋放出來⁵⁹。Dioc6 為一種陽離子親脂性的染劑，為 dihexyloxocarbocyanine iodide，通常用於偵測細胞凋亡的粒線體膜電位的改變⁶⁰。利用流式細胞計數儀評估人類子宮頸癌細胞經由給予各種不同濃度之香豆精所造成的影響。結果發現隨著曲線唯有在 $10 mM$ 的濃度有左移的趨勢，表示在高濃度有出現 MMP 的情況；而後針對 0.5、6、12、24、36、48 小時做 MMP 實驗，發現在 12 小時有曲線左移的情形，在第 48 小時最為明顯，表示隨時間延長，粒線體膜電位下降情形愈多，由於在粒線體的細胞膜上有 Ca^{2+} uniporter，讓 Ca^{2+} 流出，此時為粒線體膜電位下降，而誘發 Na^{2+} 使 Ca^{2+} 排出⁶¹。粒線體滲透性轉換孔洞為調控粒線體膜通道的地方，它在調控凋亡細胞的死亡所扮演的角色亦受到爭議。粒線體滲透性轉換孔洞(PTP)會抑制滴濃

度的免疫抑制劑cyclosporin A。當此通道開啟時，基質會釋出鈣離子進入粒線體的內膜並使得膜電位下降。當此通道開啟時，粒線體內膜的膜電位下降，而ATP合成，並開起了細胞凋亡之門。粒線體調控凋亡細胞的機制如cytochrome c釋出與粒線體滲透性轉換孔洞的打開，皆扮演著一個關鍵的角色。而當粒線體內膜的膜電位增加或不變時，細胞凋亡的情形會下降。進而維持粒線體滲透性轉換孔洞(PTP)打開而導致細胞死亡的情況⁶²。而外膜會使得粒線體基質脹大藉著蛋白如Bax或是粒線體膜電位下降而使得孔道打開⁶³。

利用流式細胞計數儀評估不同濃度的香豆精處理1小時之後，加入Indo-1AM，並觀察鈣離子濃度變動的情形。Indo-1 Am為一靈敏性螢光探針，用以偵測鈣離子濃度變動情形⁶⁴。結果發現隨著藥物濃度的增加，曲線有右移的情形，且M1 Gated數值也隨之增加，表示細胞中的鈣離子濃度增加，在50 μ M的鈣離子濃度最明顯。以50 μ M濃度的香豆精處理1、2、4、6、8、12、18、24、36、48、60小時的時間來探討細胞中鈣離子濃度變動的情形。發現在1小時曲線有右移的情形，第12小時有顯著性差異，第60小時曲線右移最明顯，表示鈣離子濃度增加。在細胞質液中游離的鈣離子藉由ATP依賴型鈣離子幫浦使外面的鈣離子回到鈣離子儲存的胞器中或是使來自細胞外面的鈣離子活化而進入漿膜中⁶²。鈣離子在真核細胞反應扮演著調控第二傳訊者的角色，經由活化CaM和其他訊號蛋白去調節能量代謝的細胞功能⁶⁵。

利用彗星試驗法觀察香豆精對HeLa細胞作用24小時後，造成的DNA損傷的影響，發現當藥物濃度增加時，DNA損傷的情形更為明顯。彗星試驗有研究報告用於偵測in vitro UVA照射皮膚細胞的嗜銻黑色素和黑色素，而嗜銻黑色素和黑色素會誘發單股DNA片段斷裂。而黑色素細胞造成的DNA損傷超過纖維母細胞⁶⁶。

為了進一步確定香豆精在人類子宮頸癌細胞所引起的細胞凋亡情形，於是利用DNA電泳膠片來觀察DNA ladder。我們以100 μ M香豆精處理人類子宮頸癌細胞株，時間為24、36、48小時，結果發現在24、36、48小時產生明顯的DNA ladder，在50-300 bp的位置出現斷裂的DNA片段，表示有產生DNA fragment，亦證明了細胞的死亡是細胞凋亡所造成，而非細胞壞死^{4,5,9,10}。

以西方墨點法分析，香豆精對人類子宮頸癌細胞內的細胞週期相關蛋白質的影響。在細胞週期方面，蛋白表現量增加的有cdk 4、p21和p53，蛋白表現量減少的有cyclin D1/2、cdk 2、p15、CDC 25A，而p53與p21的蛋白表現量在50 μ M與100 μ M的濃度有減少的情形，推測是因濃度較高而造成細胞的死亡。而cyclin D下降為細胞週期G0/G1期停止的現象^{22,24}。而p53與p21的上升表示是經由此路徑造成細胞週期G0/G1期停止的現象^{28,29}。在細胞凋亡方面，蛋白表現量增加的有Bax、cytochrome c和caspase-3，蛋白表現量減少的有Bcl-x1與Bcl-2，而caspase-8與caspase-9為先增後減，而可能造成的原因為濃度較高造成細胞的死亡。而Bcl-x1與Bcl-2減少為造成細胞凋亡的原因，因為Bcl-x1與Bcl-2為anti-apoptotic factor，故會抑制蛋白的表現量，而Bax為另一群Bcl-2家族，藉由粒線體調控細胞凋亡路徑

活化而增加，而後釋出Cytochrome c和其他蛋白，故Bax與cytochrome c蛋白表現量會增加³¹。而caspase-3增加亦是細胞凋亡的一重要指標，pro-caspase-3經由apoptosome刺激活化caspase-3，而誘發apoptotic substrate³¹。以西方墨點法分析，香豆精對人類子宮頸癌細胞內的調控細胞死亡受器相關蛋白質的影響。先前證實香豆精會造成參與調控細胞凋亡的機制，然而亦可能會經由調控細胞死亡受器而造成細胞凋亡，故偵測參與調控細胞死亡受器相關的蛋白，包括NF- κ B p50、NF- κ B p65，結果發現NF- κ B p50與NF- κ B p65的蛋白表現量皆為減少，表示可能不是由此路徑造成細胞凋亡的現象。而腦部缺血可能是由神經膠細胞的一氧化氮合成酶(iNOS)活化神經元NOS所造成神經細胞凋亡⁶⁷。而iNOS蛋白表現量增加亦表示會參與iNOS的調控，故推測經由Glial cell誘導iNOS而產生NO，導致細胞凋亡反應⁶⁷。

調控細胞週期機制有cyclin和cyclin-dependent kinase (Cdk)，它們在細胞週期中扮演著重要的角色。藉由cyclin E使Cdk2會使G1期停止活化，而藉由cyclin A會影響G1-S期的傳輸，而cyclin B會活化CDC2 G2M期的停止；故我們可以這麼說：Cdk複合物在特殊的細胞週期中會調節檢查點(checkpoints)。Cyclin D:Cdk4/6複合物為transforming growth factor β 的一個特別標的並導致細胞週期的G1期停止，故藉由誘發p15^{INK4b}，Cdk4/Cdk6的負調節、CDC25A的down-regulation、Cdk4的down-regulation，這些情況皆會導致G1期的停止⁶⁸。

發現在西方墨點法的實驗中，高濃度的香豆精會造成蛋白的表現有下降的情形，如cytochrome c、p21、p53、Bax、caspase 3...等等，造成此現象可能的原因則為濃度太高而導致細胞死亡的情形，亦有可能是每個時期的細胞的生理狀況不同所造成。

細胞凋亡的機制，主要是藉由細胞凋亡基因和蛋白的調節表現去調控凋亡的機制，包括多種的瀑布式(cascade)的反應。結果導致細胞的裂解和產生凋亡小體。而造成這種自殺機制的主要角色為caspase家族蛋白，故我們要對於caspase家族蛋白做更進一步的探討⁶⁹。而細胞凋亡現象亦包括染色質的裂解(chromatin condensation)，當活化caspases後，DNA在internucleosomal linker sites的180-200 base pairs會產生裂解的現象，可以看到有類似階梯狀的band。在細胞凋亡時，DNA fragmentation的產生有兩個過程，首先，DNA在50-300 kb會產生large fragments的裂解，隨後在一些小的oligonucleosomes產生裂解的情況⁷⁰，而以上所說的caspase的cascade的反應及DNA fragmentation的產生，都在本實驗中一一加以驗證，故香豆精確實誘發了細胞凋亡的現象。

綜合以上實驗結果，發現香豆精確實能抑制人類子宮頸癌細胞(HeLa)存活率，並造成細胞週期G0/G1期的停止(cell cycle arrest)及誘發細胞凋亡(apoptosis)的現象，此外，亦會產生活性氧化物(reactive oxygen species)，造成粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)下降，產生鈣離子(Ca²⁺)的現象，造成DNA損傷及DNA fragment，而利用西方墨點法去研究其作用機制。結果發現：蛋白的表現量增加，如Bax、caspase-3、p53、p21與cytochrome c...等，及蛋白的表現量

減少，如Bcl-2、Bcl-xl、cyclin D、CDK 2、p15、NF- κ B p50與NF- κ B p65，使我們更進一步了解其調控細胞週期和細胞凋亡的機制。

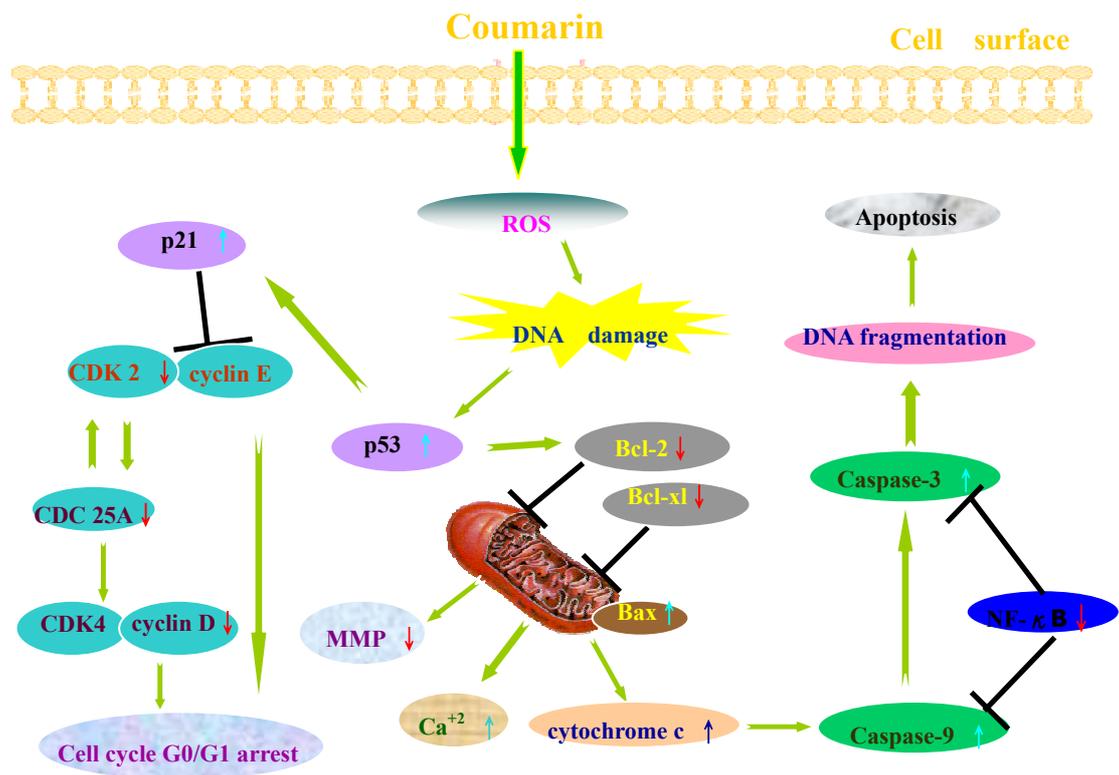
第七章 結論與建議

第一節 結論

近年來應用天然中草藥於醫學抗癌方面頗為熱門，先前有文獻指出香豆精(Coumarin)有抗細菌作用，而香豆精和 7-hydroxycoumarin 可以抗腫瘤活性，誘發細胞凋亡和抑制非小細胞肺癌細胞(non-small cell lung carcinoma)的增生，並可用作為一種抗腫瘤藥物的研究。香豆精和其代謝物 7-hydroxycoumarin 發現對於肝癌細胞株(HepG2)、胃癌細胞株和大腸癌細胞株會抑制細胞存活率的效果。而本篇的目的為探討香豆精與人類子宮頸癌細胞株之間的關係，探討香豆精對人類子宮頸癌是否有抑制作用，及其作用的機轉。本篇主要探討香豆精是否能抑制子宮頸癌細胞(HeLa)增生、以香豆精處理子宮頸癌細胞是否會誘發細胞凋亡(apoptosis)的現象、是否會造成細胞週期停止(cell cycle arrest)的現象、是否會產生活性氧化物(reactive oxygen species)、是否有粒線體膜電位改變(mitochondrial membrane potential)及是否產生鈣離子(Ca^{2+})的現象，並利用西方墨點法進一步研究其作用機制。綜合以上結果發現：以香豆精處理人類子宮頸癌細胞株(HeLa)，在細胞內會產生 ROS，導致 DNA 損傷，進而活化 p53，之後活化 p21，而 p21 會造成 CDC 25A 下降，進而抑制 Cyclin D、Cdk2 的表現，而 p15 亦會抑制 Cyclin D，使細胞停止在 G0/G1 期。當 p21 活化後會使得粒線體內的 Bcl-2 家族蛋白減少，包括 Bcl-2 與 Bcl-xl，並刺激粒線體 Bax 增加，此時粒線體的能量發生變化，粒線體會釋出鈣離子(Ca^{2+})，並造成膜電位下降，而粒線體亦會釋出 cytochrome c，並活化下游的 caspase-3，造成 DNA fragment，並誘發細胞凋亡，最終造成細胞死亡，進而抑制細胞的存活率。(如圖四十八，香豆精對於人類子宮頸癌細胞株的作用機轉之路徑)；綜合以上實驗，使我們對本篇研究有進一步的了解，未來，我們可以更加詳究探討其作用機制，並進一步做動物實驗，對於新藥開發與研究的這條路，將是無限的寬廣。

第二節 建議

關於本篇的實驗，在未來，我們還可以做 ROS 的抑制劑，如加入 DMPO，去看它抑制 ROS 的現象，去證實確實是 ROS 所造成的影響；亦可以做鈣離子的抑制劑，如加入 BAPTA，去看它抑制鈣離子的現象，去證實確實是鈣離子所造成的影響；在細胞週期方面，我們可以利用西方墨點法做一些本篇沒有使用的調控細胞週期之因子，更進一步探討其調控細胞週期的因子；而後可以做動物實驗，觀察香豆精在動物體內是否仍有抑制細胞存活的作用，及其作用的機制，相信對於抗癌藥物的研究與開發，會有更新、更進一步的體認。



圖四十八 Coumarin 對 HeLa 細胞株誘發細胞凋亡(apoptosis)與造成細胞週期停止(cell cycle arrest)的路徑

References

1. Pecorelli, S., Favalli, G., Zigliani, L. & Odicino, F. Cancer in women. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **82**, 369-379 (2003).
2. Mann, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 143-148 (2002).
3. Kao, W. F., Hung, D. Z., Tsai, W. J., Lin, K. P. & Deng, J. F. Podophyllotoxin intoxication: toxic effect of Bajiaolian in herbal therapeutics. *Hum. Exp. Toxicol.* **11**, 480-487 (1992).
4. Li, Y. C., Tyan, Y. S., Kuo, H. M., Chang, W. C. Chang., Hsia, T. C. & Chung, J. G. Baicalein induced in vitro apoptosis undergo caspases activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 37-43 (2004).
5. Lee, Y. M., Wu, T. H., Chen, S. F. & Chung, J. G. Effect of 5-methoxypsoralen (5-MOP) on cell apoptosis and cell cycle in human hepatocellular carcinoma cell line. *Toxicol. In Vitro.* **17**, 279-287 (2003).
6. Chung, J. G. H.F. Lu, C.C. Yeh, K.C. Cheng, S.S Lin, J.H. Lee. Inhibition of N-acetyltransferase activity and gene expression in human colon cancer cell lines by diallyl sulfide. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 195-202 (2004).
7. Filomeni, G., Aquilano, K., Rotilio, G. & Ciriolo, M. R. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res.* **63**, 5940-5949 (2003).
8. Lu, H. F., C.C. Sue , C.S. Yu , S.C. Chen , G.W. Chen , J.G. Chung. Diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis undergo caspase-3 activity in human bladder cancer T24 cells. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 1543-1552 (2004).
9. Chen, H. C., Hsieh, W. T., Chang, W. C. & Chung, J. G. Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 1251-1257 (2004).

10. Tan, T. W., Tsai, H. Y., Chen, Y. F. & Chung, J. G. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells by *Ampelopsis cantoniensis* crude extract. *In Vivo* **18**, 457-462 (2004).
11. Chu, C. Y., Tsai, Y. Y., Wang, C. J., Lin, W. L. & Tseng, T. H. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. *Eur. J. Pharmacol.* **416**, 25-32 (2001).
12. Finn, G., Creaven, B. & Egan, D. Modulation of mitogen-activated protein kinases by 6-nitro-7-hydroxycoumarin mediates apoptosis in renal carcinoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* **481**, 159-167 (2003).
13. Kimura, S. *et al.* Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *Int. J. Cancer* **113**, 158-165 (2005).
14. Lopez-Gonzalez, J. S. *et al.* Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* **43**, 275-283 (2004).
15. Okamoto, T., Kobayashi, T. & Yoshida, S. Chemical aspects of coumarin compounds for the prevention of hepatocellular carcinomas. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc Agents* **5**, 47-51 (2005).
16. Lacy, A. & O'Kennedy, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 3797-3811 (2004).
17. Chen, S., Cho, M., Karlsberg, K., Zhou, D. & Yuan, Y. C. Biochemical and biological characterization of a novel anti-aromatase coumarin derivative. *J. Biol. Chem.* **279**, 48071-48078 (2004).
18. Shah, M. A. & Schwartz, G. K. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **7**, 2168-2181 (2001).
19. Dynlacht, B. D. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* **389**, 149-152 (1997).

20. Viktorsson, K., De Petris, L. & Lewensohn, R. The role of p53 in treatment responses of lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 868-880 (2005).
21. Smith, M. L. & Fornace, A. J., Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutat. Res.* **340**, 109-124 (1996).
22. Dhulipala, V. C., Maddali, K. K., Welshons, W. V. & Reddy, C. S. Secalonic acid D blocks embryonic palatal mesenchymal cell-cycle by altering the activity of CDK2 and the expression of p21 and cyclin E. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* (2005).
23. Dyson, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**, 2245-2262 (1998).
24. Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T. & Pestell, R. G. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* **145**, 5439-5447 (2004).
25. Pavletich, N. P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* **287**, 821-828 (1999).
26. Roussel, M. F. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* **18**, 5311-5317 (1999).
27. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501-1512 (1999).
28. Zhou, B. B. & Elledge, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439 (2000).
29. Massague, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298-306 (2004).
30. Weil, M. *et al.* Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J. Cell Biol.* **133**, 1053-1059 (1996).
31. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776 (2000).

32. Shi, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* **9**, 459-470 (2002).
33. Srinivasula, S. M. *et al.* A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112-116 (2001).
34. Joza, N. *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-554 (2001).
35. Harris, M. H. & Thompson, C. B. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ.* **7**, 1182-1191 (2000).
36. Shi, Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 394-401 (2001).
37. Matsui, H., Hikichi, Y., Tsuji, I., Yamada, T. & Shintani, Y. LIGHT, a member of the tumor necrosis factor ligand superfamily, prevents tumor necrosis factor- α -mediated human primary hepatocyte apoptosis, but not Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 50054-50061 (2002).
38. Melov, S. *et al.* Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* **289**, 1567-1569 (2000).
39. Orsini, F. *et al.* The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *J. Biol. Chem.* **279**, 25689-25695 (2004).
40. Jacobson, M. D. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 83-86 (1996).
41. Hildeman, D. A. *et al.* Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15035-15040 (2003).
42. Takahashi, A., Masuda, A., Sun, M., Centonze, V. E. & Herman, B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial

caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m). *Brain Res. Bull.* **62**, 497-504 (2004).

43. Curtin, J. F., Donovan, M. & Cotter, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods* **265**, 49-72 (2002).

44. Immenschuh, S. & Baumgart-Vogt, E. Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 768-777 (2005).

45. Green, K., Brand, M. D. & Murphy, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S110-8 (2004).

46. Smaili, S. S. *et al.* Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36**, 183-190 (2003).

47. Zorzano, A., Bach, D., Pich, S. & Palacin, M. Role of novel mitochondrial proteins in energy balance. *Rev. Med. Univ. Navarra* **48**, 30-35 (2004).

48. Chevrollier, A., Loiseau, D. & Stepien, G. What is the specific role of ANT2 in cancer cells? *Med. Sci. (Paris)* **21**, 156-161 (2005).

49. Green, D. R. & Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312 (1998).

50. Tsujimoto, Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci. Rep.* **22**, 47-58 (2002).

51. Hajnoczky, G., Davies, E. & Madesh, M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 445-454 (2003).

52. Park, E. K., Kwon, K. B., Park, K. I., Park, B. H. & Jhee, E. C. Role of Ca(2+) in diallyl disulfide-induced apoptotic cell death of HCT-15 cells. *Exp. Mol. Med.* **34**, 250-257 (2002).

53. Kurz, E. U. & Lees-Miller, S. P. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* **3**, 889-900 (2004).

54. Bao, S. *et al.* ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* **411**, 969-974 (2001).
55. Kaneko, M., Takahashi, T., Niinuma, Y. & Nomura, Y. Manganese superoxide dismutase is induced by endoplasmic reticulum stress through IRE1-mediated nuclear factor (NF)-kappaB and AP-1 activation. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1202-1206 (2004).
56. Li, T. M. *et al.* Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Res.* **25**, 971-979 (2005).
57. Shanker, G., Aschner, J. L., Syversen, T. & Aschner, M. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **128**, 48-57 (2004).
58. Le Bras, M., Clement, M. V., Pervaiz, S. & Brenner, C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol. Histopathol.* **20**, 205-219 (2005).
59. Regula, K. M. & Kirshenbaum, L. A. Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**, 3-13 (2005).
60. Raghuvar Gopal, D. V., Narkar, A. A., Badrinath, Y., Mishra, K. P. & Joshi, D. S. Betulinic acid induces apoptosis in human chronic myelogenous leukemia (CML) cell line K-562 without altering the levels of Bcr-Abl. *Toxicol. Lett.* **155**, 343-351 (2005).
61. Saris, N. E. & Carafoli, E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* **70**, 187-194 (2005).
62. Waring, P. Redox active calcium ion channels and cell death. *Arch. Biochem. Biophys.* **434**, 33-42 (2005).
63. Gupta, S. & Knowlton, A. A. HSP60, Bax, apoptosis and the heart. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 51-58 (2005).

64. Mokashi, A. *et al.* Ryanodine receptor-mediated $[Ca^{2+}]_i$ release in glomus cells is independent of natural stimuli and does not participate in the chemosensory responses of the rat carotid body. *Brain Res.* **916**, 32-40 (2001).
65. Bigelow, D. J. & Squier, T. C. Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 121-134 (2005).
66. Agar, N. & Young, A. R. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutat. Res.* **571**, 121-132 (2005).
67. Nomura, Y. Neuronal apoptosis and protection: effects of nitric oxide and endoplasmic reticulum-related proteins. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 961-963 (2004).
68. Nagahara, H. *et al.* Transforming growth factor beta targeted inactivation of cyclin E: cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14961-14966 (1999).
69. Philchenkov, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J. Cell. Mol. Med.* **8**, 432-444 (2004).
70. Higuchi, Y. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J. Cell. Mol. Med.* **8**, 455-464 (2004).

自述

自我介紹：學生黃永豐，出生於台中，民國六十四年十二月十六日生，家住台中市，畢業於東海大學畜產系。學生外表斯文，言談間充滿著親和力，平常樂於助人，亦喜歡幫助朋友；本人平日亦喜歡運動，故身體狀況不錯，加上平日正常的飲食和生活習慣，因此身體非常健康。本人做事積極進取，凡事樂觀以對，做任何事情都很有信心，而一旦做了，就一定要做到最好，這樣一來，才能走向成功的坦途。

家庭狀況：家父從事旅館業，在南投縣信義鄉東埔溫泉開了一家名為「櫻之泉」的旅館，家母負責家管，而兩個弟弟分別在雲林和南投念書。

求學過程：學生從小對於學習新鮮的事物皆有濃厚的興趣，小學就讀於中市忠孝國小，期間表現良好，每學期皆拿到獎狀。國中畢業於中市崇倫國中，在功課方面表現不錯。五專就讀於中台醫護技術學院，就讀科系為醫事技術科，之後於民國八十五年畢業後入伍服役，退伍後考上東海大學畜產系，在校期間十分活躍，系上的迎新露營和牧場迎新，皆邀請學生參與演出，在演唱和演奏上，皆有亮麗表現，參加農院盃歌唱比賽和全校民歌比賽，皆為比賽的常勝軍。而在學業方面，亦是收穫頗多，成績皆維持在一定的水準。畢業後考上東吳大學的微生物所，而由於家母身體欠佳，需要妥善照顧，故最後仍回來台中念書，就讀於中國醫藥大學。

專長和興趣：學生的專長為醫事檢驗技術，在中台醫護技術學院讀了五年，亦學到很多醫學類的知識。平日喜歡的興趣包括寫歌、唱歌、畫畫、打籃球…等等，平日很喜歡運動，因為運動可以防止一些疾病的發生，且有益健康，此外，對於戲劇方面亦滿有興趣的，以前在校外曾參加過頑石劇團的演出。

未來展望：在畢業之後，其實是另一個全新的開始，亦有一個更大的挑戰在等著我，而我必須做好準備，去面對一個新的挑戰，在未來，吾希望能精益求精，凡事必定盡自己最大的努力，全力以赴做到最好，如此才不負家人的期望，並開拓自己的視野，進而邁向更美好的明天。